

PRACA
DYPLOMOWA

**INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

**Biokatalityczne metody syntezy
wybranych alkoholi
drugorzędowych**

Biocatalytic synthesis of secondary alcohols

mgr inż. Anna Żądło

Praca doktorska wykonana w

Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

w latach 2011-2015

Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

Promotor pomocniczy: Dr Dominik Koszelewski

Warszawa 2015

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.372/16



90000000191657

A-21-6
K-f-136
K-c-130
K-c-119



B. Org. 372/16

Dziękuję prof. Ryszardowi Ostaszewskiemu za życzliwość, opiekę, wskazówkę podczas wykonywania i redagowania niniejszej pracy.

I would like to express my great thanks to Professor Wolfgang Kroutil for giving me the opportunity to do the part of my research in his group and for his kind cooperation and valuable advice during my stay in Graz.

Dziękuję dr Dominikowi Koszelewskiemu za opiekę oraz cenne rady.

Bardzo serdecznie dziękuję całemu zespołowi XX za wspaniałą atmosferę w pracy.

Bardzo gorąco dziękuję również moim Rodzicom za wsparcie i trud włożony w moje wychowanie.

Narzeczonemu Mateuszowi za cierpliwość i wiarę we mnie.

Dziękuję.

Wykonane badania były realizowane w ramach projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” nr POIG.01.03.01-00-158/09-01.

Projekt realizowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013.



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Część badań zawartych w niniejszej pracy została wykonana w ramach projektu COST Action CM1303 Systems Biocatalysis.

Biokatalityczne metody syntezy wybranych alkoholi drugorzędowych

Anna Żądło

Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad opracowaniem efektywnych metod otrzymywania alkoholi drugorzędowych o wysokiej czystości enancjomerycznej. 1,3-Diole oraz β -hydroksyketony są szczególnie ważnymi blokami budulcowymi do syntezy wielu związków biologicznie czynnych, dlatego też wybrano pochodne kwasu 5-arylo-3,5-dihydroksypentanowego oraz 5-arylo-5-hydroksy-3-oksopentanowego jako związki docelowe. W wyniku wykonanych badań opracowano nową, chemoenzymatyczną metodę syntezy, która umożliwiała otrzymanie wszystkich stereoizomerów badanych związków o wysokiej czystości enancjomerycznej. Osiągnięcie celu wymagało przeprowadzenia badań przesiewowych na dużej liczbie enzymów i całych komórek mikroorganizmów. Ponieważ metody chromatograficzne oznaczania nadmiarów enancjomerycznych, konwersji do określania enancjoselektywności reakcji są czasochłonne i kosztowne, rozszerzono zakres pracy o opracowanie szybkiej i taniej metody szacowania tego parametru. Do tego celu zastosowano technikę spektroskopii optycznej, która umożliwia śledzenie postępu reakcji w czasie rzeczywistym, ale wymaga użycia odpowiednich substratów chromogennych lub fluorogennych. Znane do tej pory związki fluorogenne nie pozwalały na przeprowadzenie oznaczeń aktywności enzymów wobec drugorzędowych alkoholi, dlatego też zaprojektowano i zsyntetyzowano nową klasę próbników. Oceniono je pod kątem zastosowania jako substratów do badań przesiewowych nad aktywnością enzymów hydrolitycznych oraz chemoselektywnością i stereoselektywnością reakcji. Uzyskane wyniki stały się przedmiotem publikacji naukowej w *ChemBioChem*, polskiego zgłoszenia patentowego oraz były prezentowane na licznych międzynarodowych i krajowych konferencjach w postaci komunikatów ustnych i posterów. Część wyników została wykonana w zespole Prof. Wolfganga Kroutila na Uniwersytecie w Graz w ramach programu COST CM1303.

Biocatalytic synthesis of secondary alcohols

Anna Żądło

Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

In this work, studies toward effective synthesis of selected enantiomerically pure secondary alcohols are presented. 1,3-Diols and β -hydroxyketones are especially important building blocks for synthesizing many biologically active compounds. As target chemicals, derivatives of 5-aryl-3,5-dihydroxypentanoic acid and 5-aryl-5-hydroxy-3-oxopenatnoic acid were selected. New chemoenzymatic approach, which allows to obtain all stereoisomers of examined compounds with high enantiomeric excesses, was developed. Screening a large amount of enzymes and whole cell microorganisms was an effort required to achieve the objectives of the research. Chromatographic methods, for determining enantioselectivity are time-consuming and expensive. Therefore, the scope of the work was extended to develop a rapid and inexpensive method for estimating those parameters. Optical spectroscopy technique was used to monitor the progress of the reaction in real time but it requires the use of appropriate chromogenic or fluorogenic substrates. Already known, available compounds did not allow for screening the activity of enzymes toward secondary alcohols. Therefore, a new class of fluorogenic probes was designed and synthesized. These probes were evaluated for use as substrates for screening the activity of hydrolytic enzymes and chemoselectivity and stereoselectivity of the reactions. Obtained results were published in *ChemBioChem*, polish patent application, and were presented on numerous international and national conferences as oral communications, as well as posters. Part of research was performed on University of Graz in Prof. Wolfgang Kroutil team, within the COST CM1303 action.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej ukazały się w następujących publikacjach:

1. A. Zadło, D. Koszelewski, F. Borys, R. Ostaszewski, Mixed Carbonates as Useful Substrates for a Fluorogenic Assay for Lipases and Esterases, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 677-682.

Związki otrzymane podczas badań zostały zastrzeżone w następującym patencie:

1. R. Ostaszewski, A. Żądło, M. Zysk, A. Brodzka, S. Kłossowski, Nowe pochodne kumaryny, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie w sposobie wykrywania i/lub oznaczania aktywności katalitycznej i stereoselektywności reakcji hydrolaz, Polskie zgłoszenie patentowe P 407948, 2014.

Opublikowane prace, które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej:

1. M. Ufnal, A. Zadło, R. Ostaszewski, TMAO, a small molecule of great expectations, *Nutrition* **2015**, doi:10.1016/j.nut.2015.05.006

2.C. Wisniewska, D. Koszelewski, M. Zysk, S. Kłossowski, A. Zadło, A. Brodzka, R. Ostaszewski, Enzymatic Synergism in the Synthesis of β -Keto Esters, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *24*, 5432-5437.

3. D. Koszelewski, M. Zysk, A. Brodzka, A. Żądło, D. Paprocki, R. Ostaszewski, Evaluation of the new protocol to enzymatic dynamic kinetic resolution of 3-hydroxy-3-(aryl)propanoic acids, *Org. Biomol. Chem.* **2015** (*In Press*)

4. M. Zysk, A. Zadło, A. Brodzka, C. Wisniewska, R. Ostaszewski, The unexpected kinetic effect of enzyme mixture: The case of enzymatic esterification, *J. Mol. Catal. B* **2014**, *102*, 225-229.

5. A. Zadło, R. Ostaszewski, Studies toward chemoenzymatic synthesis of nonracemic α -bromophenylacetic acid, *Copernican Letters* **2012**, *3*, 171-177.

Zgłoszenia patentowe zawierające wyniki nieujęte w rozprawie doktorskiej:

1. Ostaszewski, R., Ćwiklak, M., Wóltańska, A., Kłossowski, S., Żądło, A., Sposób wytwarzania estrów kwasów karboksylowych z wykorzystaniem mieszaniny enzymów oraz węglanów alkilowych oraz kompozycja znajdująca w nim zastosowanie., Polskie zgłoszenie patentowe 2011: P 394722.

2. R. Ostaszewski, M. Ćwiklak, A. Wóltańska, S. Kłossowski, A. Żądło. Sposób biokatalitycznego wytwarzania chiralnych, nieracemicznych kwasów i estrów kwasów karboksylowych z zastosowaniem ortoestrów kwasów aromatycznych i związek do stosowania w tym sposobie. Polskie zgłoszenie patentowe 2011: P 394723.

SPIS SKRÓTÓW

ADH – dehydrogenaza alkoholowa

ALAT – aminotransferaza alaninowa

ASPAT – aminotransferaza asparaginowa

API – aktywne składniki farmaceutyków

ATP – adenozyntrójfosforan

BLAP – proszek acetonowy z wątroby dzika

BSA – albumina z surowicy bydłowej

Bu – grupa butylowa

CoA – koenzym A

dDKR – podwójny dynamiczny rozdział kinetyczny

DIPEA - diizopropylloetyloamina

DKR – dynamiczny rozdział kinetyczny

DMAP – 4-(*N,N*-dimetyloamino)-pirydyna

dr – proporcja diastereoizomerów

Et – grupa etylowa

FRET – rezonansowy transfer energii Förster'a

GDH – dehydrogenaza glukozy

GLAP – proszek acetonowy z wątroby gęsi

HMG-CoA – reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HTS – badania przesiewowe wysokiej przepustowości

LDH – dehydrogenaza mleczanowa

KR – rozdział kinetyczny

KRED – ketoreduktaza

Me – grupa metylowa

NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

Novozym – immobilizowana lipaza z *Candida antarctica*

Ph – grupa fenyłowa

PLE – esteraza z wątroby świńskiej

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

Wyd. - wydajność

Spis treści

I CZĘŚĆ LITERATUROWA	1
1. Wstęp	1
2. Oznaczanie aktywności enzymów	2
3. Wyznaczanie enancjoselektywności reakcji	5
3.1. Wyznaczanie enancjoselektywności na podstawie parametrów kinetycznych	5
3.2. Wyznaczanie enancjoselektywności na podstawie szybkości początkowych reakcji....	8
4. Fluorescencja	9
4.1. Zastosowanie zjawiska fluorescencji do badania kinetyki reakcji chemicznych i biochemicznych.....	11
4.2. Próbniki chromogenne i fluorogenne	16
4.2.1. Oznaczanie aktywności lipaz i esteraz	17
4.2.2. Oznaczanie aktywności proteaz.....	23
4.2.3. Oznaczanie aktywności oksydoreduktaz	26
4.2.4. Oznaczanie aktywności aminotransferaz.....	30
5. Znaczenie chiralnych drugorzędowych alkoholi	32
5.1. Biokatalityczne metody otrzymywania enancjomerycznie czystych drugorzędowych alkoholi.....	34
5.1.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny	35
5.1.2. Dynamiczny rozdział kinetyczny	38
5.1.3. Redukcja enzymatyczna	41
6. Podsumowanie części literaturowej	49
II BADANIA WŁASNE	51
7. Cel badań.....	51
8. Chemoenzymatyczna synteza wybranych drugorzędowych alkoholi	51
8.1. Synteza chemiczna pochodnych kwasu 5-fenylo-5-hydroksy-3-oksopenatanowego ...	52
8.2. Synteza enzymatyczna pochodnych kwasu 5-fenylo-5-hydroksy-3-oksopenatanowego	54
9. Mieszane węglany jako nowa grupa próbników fluorogennych do oznaczania aktywności i stereoselektywności hydrolaz	60
9.1. Próbniki fluorogenne do oznaczania aktywności i stereoselektywności lipaz i esteraz	62
9.2. Próbniki fluorogenne do oznaczania stereoselektywności enzymów hydrolitycznych	72
9.3. Próbniki do wykrywania aktywności lipaz, esteraz i proteaz	81
9.4. Próbniki do oznaczania aktywności, stereoselektywności oraz chemoselektywności proteaz	82

9.5. Próbniki do wykrywania aktywności transaminaz i oksydoreduktaz	87
10. Rozdział kinetyczny pochodnych kwasu 5-fenylo-5-hydroksy-3-oksopenatanowego	89
11. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-5-hydroksy-3-oksopenatanowego za pomocą drożdży piekarskich.	90
12. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-3-oksopenatanowego za pomocą komórek mikroorganizmów.	95
13. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-3,5-dioksopenatanowego za pomocą komórek mikroorganizmów.	98
14. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-3,5-dioksopenatanowego oraz estru etylowego kwasu 5-fenylo-3-oksopentanowego za pomocą dehydrogenaz.	99
15. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-3,5-dioksopenatanowego oraz estru etylowego kwasu 5-fenylo-3-oksopentanowego w skali preparatywnej.	100
16. Podsumowanie i wnioski	102
III Część eksperymentalna.....	105
17. Uwagi ogólne.....	105
17.1. Synteza i analiza związków chemicznych	105
18. Cytowana literatura.....	130

I CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Wstęp

Otrzymywanie enancjomerycznie czystych związków chemicznych ma istotne znaczenie w wielu gałęziach przemysłu chemicznego, spożywczego oraz kosmetycznego, a szczególnie ważne jest w przemyśle farmaceutycznym. Czystość enancjomeryczna substancji często decyduje o możliwości zastosowania danego związku jako leku. Dlatego też trwają intensywne badania nad opracowaniem efektywnych i tanich metod otrzymywania związków o wysokiej czystości enancjomerycznej. Jedną z takich metod jest biokataliza, której zastosowanie umożliwi otrzymanie wielu związków z wysokimi wydajnościami i wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi, trudnymi do otrzymania drogą klasycznej syntezy organicznej. Biokataliza jest metodą syntezy wolną od produktów zanieczyszczonych metalami ciężkimi, których obecność dyskwalifikuje zastosowanie ich jako leki. Procesy te są wykonywane zgodnie z zasadami zielonej chemii, nie obciążają środowiska naturalnego i mogą być wykonywane w wodzie, jak również w rozpuszczalnikach organicznych. Zastosowanie w przemyśle związane jest nieodłącznie z poszukiwaniem enzymów, które muszą wykazywać wysoką regio-, chemo- i stereoselektywność. Katalizatory takie, izolowane są ze źródeł naturalnych, a następnie bardzo często ich właściwości katalityczne są modyfikowane metodami inżynierii genetycznej. Tym samym możliwe jest dopasowanie enzymu do reakcji. Ponieważ metody biologiczne prowadzą do uzyskania bardzo dużych bibliotek genetycznie modyfikowanych enzymów, istotnym problemem staje się znalezienie najefektywniejszych mutantów posiadających odpowiednią specyficzność substratową. Znane metody są złożone oraz wymagają specjalistycznego wyposażenia. Dużym problemem jest również określenie stereoselektywności poszczególnych enzymów, szczególnie w badaniach przesiewowych. Wymagane jest połączenie syntezy chemicznej z enzymologią i biochemią, aby opracować dogodną metodologię oznaczeń stereoselektywności. Wciąż nie znaleziono efektywnej metody, która pozwalałaby na monitorowanie reakcji otrzymywania drugorzędowych alkoholi w czasie rzeczywistym, bez wydzielania i oczyszczania związków. Zastosowanie spektroskopii optycznej, do tej pory, umożliwiała śledzenie postępu procesu

tylko dla pochodnych kwasów karboksylowych. Chiralne drugorzędowe alkohole są ważnymi blokami budulcowymi do syntezy wielu związków biologicznie czynnych, a grupa hydroksylowa może być w prosty sposób przekształcona w inne grupy funkcyjne. Dlatego poszukiwanie nowych dróg syntezy enancjomerycznie czystych związków tej klasy jest pożądane, szczególnie przez przemysł farmaceutyczny i kosmetyczny.

2. Oznaczanie aktywności enzymów

Większość znanych enzymów jest wielocząsteczkowymi katalizatorami białkowymi, wytwarzanymi jedynie przez organizmy żywe (bakterie, drożdże, grzyby, komórki roślinne i zwierzęce). Wpływają one na szybkość i kierunek reakcji chemicznych zachodzących wewnątrz tych organizmów. Enzymy ze względu na typ katalizowanej reakcji można podzielić na 6 klas: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy i ligazy. Najczęściej w syntezie organicznej znajdują zastosowanie hydrolazy. Mechanizmy reakcji tych enzymów różnią się od mechanizmów odpowiednich reakcji chemicznych. W reakcji z udziałem hydrolazy następuje ścisła orientacja przestrzenna reagujących cząsteczek, dzięki czemu ograniczona jest przypadkowość w sposobie ich oddziaływania. Ponadto, substraty są aktywowane w wyniku tworzenia się kompleksu enzym-substrat poprzez zmianę rozmieszczenia par elektronów. Enzym przybiera wtedy odpowiednią konformację, ułatwiającą zbliżenie substratu do grup funkcyjnych centrum aktywnego, co prowadzi do odkształcania i rozerwania określonych wiązań. Struktura białkowa decyduje o specyficzności oddziaływania z substratem, dzięki czemu enzym może kierować przemianą tylko jednego regioizomeru, stereoizomeru czy też enancjomeru substratu. Enzymy o mniejszej specyficzności akceptują szersze spektrum substratów, tak jak, np. lipazy katalizują hydrolizę wiązań estrowych estrów kwasów karboksylowych o zróżnicowanej budowie. Ponadto specyficzność działania enzymu przejawia się zdolnością wybierania i katalizowania tylko kilku z wielu możliwych termodynamicznie reakcji. Wiązanie substratów następuje w centrum aktywnym hydrolazy. Jest ono zgrupowaniem reszt aminokwasowych o odpowiednim ułożeniu przestrzennym, które mogą być znacznie od siebie oddalone w sekwencji aminokwasów ze względu na pofałdowanie łańcucha białkowego. W centrum aktywnym lipaz wyróżnia się triadę katalityczną, złożoną z trzech aminokwasów: seryna - kwas asparaginowy - histydyna. Czynniki zewnętrzne oddziałujące na budowę przestrzenną enzymu mają wpływ na jego funkcje i mogą prowadzić do utraty właściwości katalitycznych, np. czynniki redukujące, czynniki

utleniające, zmiany pH, temperatura. Aktywność preparatów zawierających enzymy można zwiększyć przez oczyszczanie, zmianę warunków działania, immobilizację lub metodami inżynierii genetycznej.¹

Ze względu na miejsce działania enzymy można podzielić na komórkowe i pozakomórkowe. Enzymy komórkowe działają wewnątrz komórek i są związane z różnymi organellami komórkowymi (cytoplazma, błona komórkowa, lizosomy, mitochondria, ER) i pojawiają się w dużych ilościach po uszkodzeniu narządów. Enzymy pozakomórkowe są produkowane przez komórki, a następnie wydzielane do środowiska pozakomórkowego, gdzie pełnią dane funkcje. Enzymy sekrecyjne, takie jak czynniki krzepnięcia krwi oraz fibrynolizy, lipaza lipoproteinowa, esterazy cholinowe obniżają swoją aktywność w przypadku uszkodzenia komórek (np. hepatocytów), ponieważ ich ilość zależy od syntezy w rybosomach. Natomiast enzymy esekrecyjne, takie jak enzymy soku trzustkowego, żółci, fosfataza sterczowa przedostają się do krwiobiegu w przypadku utrudnionego odpływu wydzielin ustrojowych. Zmiana aktywności enzymów ma ogromny wpływ na funkcjonowanie komórki. Dlatego też, oznaczanie aktywności enzymów w diagnostyce medycznej pozwala na diagnozowanie wielu stanów chorobowych. Umożliwia to zastosowanie odpowiedniej terapii oraz monitorowanie postępu leczenia. Aby aktywność enzymu mogła być oznaczana we krwi, moczu lub innych płynach ustrojowych musi być opracowana czuła, powtarzalna i selektywna metoda analityczna. Ponadto powinna występować znaczna różnica poziomów aktywności w stanie patologicznym i w stanie normalnym, aby enzym mógł być markerem stanów chorobowych. Takie oznaczenie powinno dawać informacje o aktywności enzymu w próbce, aktywności w relacji do innych enzymów oraz umożliwiać monitorowanie jej zmian.

Enzymy, jako katalizatory reakcji chemicznych i biochemicznych znalazły szerokie zastosowanie w procesach technologicznych i biotechnologicznych, głównie w syntezie związków o wysokiej wartości dodanej, takich jak aktywne składniki farmaceutyków (API; Active Pharmaceutical Ingredients).² Wynika to z faktu stosowania enancjomerycznie czystych API zgodnie z wymaganiami farmakopei europejskiej. Wydzielenie enancjomerów z mieszaniny racemicznej jest szczególnie ważne, ponieważ każdy z enancjomerów posiada zupełnie odmienne właściwości farmakologiczne oraz profil działań niepożądanych.³

¹ Ćwiczenia z biochemii pod redakcją L. Kłyszejko-Stefanowicz, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, 471-575.

² V. Farina, J. T. Reeves, C. H. Senanayake, J. J. Song, *Chem. Rev.* 2006, 106, 2734–2793.

³ B. Testa, W. F. Trager, *Chirality* 1990, 2, 129-133.

Obecnie, każdy z enancjomerów musi być przebadany *in vivo* w celu określenia wpływu konfiguracji przestrzennej na właściwości farmakologiczne. Zdarza się, że jeden z enancjomerów wykazuje działanie lecznicze, natomiast drugi działanie toksyczne. Przykładem takiego związku, stosowanego jako mieszanina racemiczna, może być ketamina, będąca dożylnym środkiem anestetycznym, której niepożądane działanie przejawiające się w występowaniu halucynacji, przypisywane jest toksycznemu działaniu *R*-enancjomeru.⁴ Z tego względu coraz częściej zastępuje się mieszaniny racemiczne substancji czynnych jednym z enancjomerów, a czystość enancjomeryczna jest szczególnie ważnym parametrem przy projektowaniu nowych substancji czynnych.

Czyste enancjomerycznie związki można otrzymać na drodze organicznej syntezy asymetrycznej, jednak wciąż poszukuje się nowych, efektywniejszych i przyjaznych dla środowiska metod ich syntezy. Jedną z tych metod, spełniającą powyższe wymagania, jest biokataliza, a przykładem może być enzymatyczny rozdział kinetyczny.⁵ Zastosowanie enzymów w syntezie organicznej wymaga opracowania prostych i wiarygodnych procedur oznaczania ich aktywności katalitycznej oraz określania stereoselektywności katalizowanych reakcji, gdy substraty są związkami racemicznymi. Ze względu na specyficzność substratową enzymy nie zawsze spełniają wymagania dla określonych zastosowań przemysłowych, dlatego cały czas poszukuje się nowych biokatalizatorów lub prowadzi się modyfikacje znanych, np. poprzez ich mutacje. Wiąże się to z koniecznością zbadania ogromnych ilości próbek (ilość mutantów tylko jednego enzymu, może sięgać nawet miliona). Szybkie i wiarygodne określenie aktywności dużych bibliotek enzymów możliwe jest przy zastosowaniu badań przesiewowych wysokiej przepustowości (HTS; High-throughput Screening). Badania te oparte są na technikach chromatograficznych, spektroskopii IR, spektroskopii mass, elektroforezie kapilarnej, metodach chiralooptycznych, badaniach pH, czy najpowszechniej stosowanych metodach spektrofotometrycznych i fluorymetrycznych. Najczęściej stosowane jest oznaczenie oparte na śledzeniu zmian absorbancji pochodzącej od powstającego lub zużywanego kofaktora reakcji enzymatycznej NADH lub NADPH. W takim przypadku redukcja NAD⁺ do NADH lub NADP⁺ do NADPH może być monitorowana przy długości fali 340 nm, gdyż forma utleniona nie absorbuje światła przy tej długości fali. Pomiar szybkości reakcji zachodzi w ustalonych i ściśle kontrolowanych warunkach: temperatury, pH, stężenia substratów, aktywności innych obecnych w roztworze enzymów.

⁴ R. Kohrs, M. E. Durieux, *Anesthesia & Analgesia* **1998**, 87, 1186-1193.

⁵ K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, Second Edition, **2008**, Wiley.

3. Wyznaczanie enancjoselektywności reakcji

Zależność konwersji reakcji (c), nadmiaru enancjomerycznego substratu (ee_s) i nadmiaru enancjomerycznego produktu (ee_p) można powiązać zależnością matematyczną, która charakteryzuje selektywność reakcji enzymatycznej i jest wyrażona wzorem Chen'a:⁶

$$\text{Enancjoselektywność } (E) \text{ liczona dla produktu: } E = \frac{\ln [1-c(1+ee_p)]}{\ln [1-c(1-ee_p)]}$$

$$\text{Enancjoselektywność } (E) \text{ liczona dla substratu: } E = \frac{\ln [1-c(1-ee_s)]}{\ln [1-c(1+ee_s)]}$$

$$\text{Enancjoselektywność } (E) \text{ liczona dla substratu i produktu: } E = \frac{\ln \frac{ee_p(1-ee_s)}{ee_p+ee_s}}{\ln \frac{ee_p(1+ee_s)}{ee_p+ee_s}}$$

gdzie: $ee = \frac{R-S}{R+S}$ gdy $R > S$ lub

$$ee = \frac{S-R}{R+S} \text{ gdy } S > R.$$

Równanie Chen'a

Jeżeli parametr E wynosi 15-20, wtedy rozdział jest zadawalający, gdy wynosi $E > 100$ to reakcja może mieć zastosowanie przemysłowe.

Niestety, aby wyznaczyć wartość enancjoselektywności należy przeprowadzić analizę składu enancjomerycznego powstałej mieszaniny za pomocą metod chromatograficznych. Jest to technika czasochłonna i kosztowna, dlatego też opracowano szybkie i tanie metody wyznaczania aktywności enzymów i przybliżonej enancjoselektywności reakcji z zastosowaniem technik spektroskopowych. Szczególnym zainteresowaniem cieszy się technika fluorymetryczna, ze względu na wysoką czułość, selektywność oraz możliwość zastosowania w badaniach biologicznych.

3.1. Wyznaczanie enancjoselektywności na podstawie parametrów kinetycznych

Badanie kinetyki reakcji polega na badaniu szybkości reakcji w zależności od różnych czynników, takich jak: stężenie substratów, temperatura, wpływ katalizatorów, pH środowiska itp. Poprzez pomiary ustala się charakter reakcji i w sposób matematyczny ujmuje zależności pomiędzy szybkością reakcji a czasem jej trwania. Szybkość reakcji jest proporcjonalna do stężenia substratów, a jej miarą jest przyrost stężenia produktu lub ubytek substratu w jednostce czasu. Ponieważ szybkość maleje na skutek wyczerpywania się reagujących substancji czas, w którym mierzone są przyrosty stężenia powinny być jak

⁶ C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.

najmniejsze. Dlatego też mierzy się początkowe szybkości reakcji. Równanie kinetyczne reakcji I rzędu wyraża się wzorem:

$$v = \frac{d[S]}{dt} = k[S], \text{ gdzie}$$

[S] - stężenie substratu,

t - czas,

k - stała szybkości reakcji.

Stosuje się je, gdy w reakcji bierze udział tylko jedna substancja lub gdy stężenie drugiej substancji można uznać za stałe (np. stężenie wody). Jeżeli za a przyjmie się stężenie początkowe substratu, za x stężenie po czasie t to równanie można przedstawić w postaci:

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x)$$

Po scałkowaniu równania można wyliczyć szybkość reakcji:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}, \text{ gdzie}$$

a - stężenie początkowe substratu,

x - stężenie substratu po czasie t .

Równanie kinetyczne drugiego rzędu stosuje się, gdy zmienia się stężenie dwóch substratów i można je przedstawić wzorem:

$$v = -\frac{d[S_A]}{dt} = -\frac{d[S_B]}{dt} = k[S_A] \cdot [S_B], \text{ co daje po scałkowaniu:}$$

$$k = \frac{1}{t(a-b)} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$$

Jeżeli $a = b$, to równanie ma postać:

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x)^2, \text{ a po scałkowaniu:}$$

$$k = \frac{1}{t} \cdot \frac{x}{a(a-x)}$$

W reakcjach zerowego rzędu szybkość nie zależy od stężenia substratu, a równanie wyraża się wzorem:

$$\frac{dx}{dt} = k$$

Po scałkowaniu: $k = \frac{x}{t}$

W przypadku reakcji enzymatycznej równanie przybiera postać:

$$\frac{dx}{dt} = k[E]$$

gdzie:

[E] – stężenie enzymu.

W tym przypadku podwojenie stężenia enzymu spowoduje podwojenie szybkości reakcji.

Większość reakcji hydrolizy enzymatycznej można opisać za pomocą równania Michaelisa-

Menten:

$(V_{max} - v_0)(K_m + [S]) = V_{max} \cdot K_m$, gdzie:

V_{max} – szybkość maksymalna reakcji enzymatycznej,

v_0 – szybkość początkowa reakcji,

K_m – stała Michaelisa,

[S] – stężenie substratu.

Graficznie równanie to przedstawia się w postaci hiperboli. Zależność tą tłumaczy się powstawaniem kompleksu enzym-substrat. Przy małym stężeniu substratu niektóre cząsteczki enzymu nie są połączone z substratem. Wtedy reakcja jest I rzędu i jej szybkość jest uzależniona od stężenia związku reagującego. Zwiększenie stężenia powoduje wysycenie enzymu substratem i osiągnięcie maksymalnej szybkości reakcji. W tym zakresie reakcja jest reakcją zerowego rzędu i szybkość reakcji nie zależy od stężenia substratu, zależy natomiast od stężenia enzymu. Stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji równa jest połowie szybkości maksymalnej nazywana jest stałą Michaelisa (K_m). Określa ona powinowactwo enzymu do substratu. Małe wartości K_m wskazują na duże powinowactwo.

Przekształcenie wzoru Michaelisa-Mentendo równania Lineweavera-Burka:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

pozwała na sporządzenie wykresu w postaci linii prostej ($y=ax+b$), gdzie współczynnik nachylenia prostej $a = K_m/V_{max}$, natomiast współczynnik $b=1/V_{max}$.

Parametry K_m i V_{max} nie są wystarczające do porównania między sobą różnych enzymów, dlatego wyznacza się wartości k_{cat} i k_{cat}/K_m . Stała katalityczna k_{cat} określa liczbę cząsteczek substratu, które enzym może przekształcić w produkt w jednostce czasu i wylicza się ją ze wzoru:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{n_E}, \text{ gdzie}$$

k_{cat} – stała katalityczna,

V_{max} – szybkość maksymalna reakcji enzymatycznej

n_E – liczba moli enzymu (iloczyn stężenia białka w roztworze i masy molowej enzymu).

Natomiast stała specyficzności, czyli stosunek k_{cat}/K_m określa specyficzność katalityczną enzymu.

Wyznaczenie parametrów kinetycznych dla czystych enancjomerycznie związków pozwala na wyznaczenie enancjoselektywności reakcji. Przeprowadzenie szeregu reakcji dla obydwu enancjomerów w oddzielnych pomiarach pozwala na wyznaczenie stosunku k_{cat}/K_m szybciej reagującego enancjomeru do k_{cat}/K_m wolniej reagującego enancjomeru:

$$E = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)^R}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)^S} \text{ jeśli } k_{(R)} > k_{(S)}.$$

3.2. Wyznaczanie enancjoselektywności na podstawie szybkości początkowych reakcji

Ponieważ wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji jest procesem czasochłonnym grupa Kazlauskas'a zaproponowała uproszczoną metodę określania enancjoselektywności hydrolaz (Quick E).⁷ Wyznaczano szybkości początkowe reakcji dla każdego z enancjomerów estru kwasu karboksylowego w oddzielnym pomiarze, a następnie wyliczono ich iloraz. Takie podejście powodowało błędy wynikające z nie uwzględnienia współzawodnictwa do miejsca aktywnego enzymu, dlatego do każdej próbki dodawano związek referencyjny, będący estrem innego kwasu i różniący się długością fali absorbowanego promieniowania. Wzrost absorbancji śledzono przy dwóch długościach fali: związku właściwego oraz związku referencyjnego. Przybliżone wartości enancjoselektywności obliczano ze wzoru:

$$\text{Quick } E = \frac{\frac{V_S}{V_{ref}}}{\frac{V_R}{V_{ref}}}$$

V_S – szybkość reakcji (S)-enancjomeru, gdy $V_S > V_R$,

V_R – szybkość reakcji (R)-enancjomeru,

V_{ref} – szybkość reakcji związku referencyjnego.

Zarejestrowano dobrą korelację między wartościami E obliczonymi na podstawie konwersji i nadmiarów enancjomerycznych, a wartościami Quick E .

Z niewielkim błędem można również wyznaczyć wartość E poprzez porównanie szybkości relatywnych reakcji:⁸

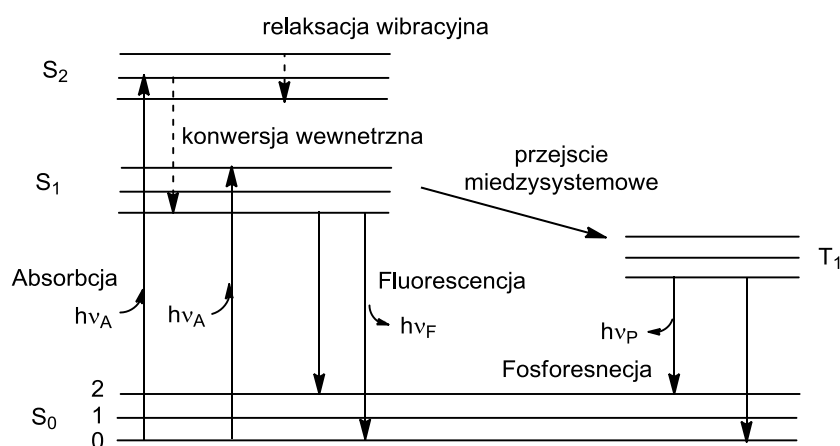
$$E = \frac{V_{rel}(S)}{V_{rel}(R)}$$

⁷ L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4560-4561.

⁸ G. Klein, J.-L. Reymond, *Helvetica Chimica Acta* **1999**, 82, 400-407.

4. Fluorescencja

Cząsteczka związku organicznego pochłaniając energię przechodzi z podstawowego stanu elektronowego S_0 na wzbudzony stan elektronowy S_1 , Rysunek 1. W wyniku zderzeń z innymi cząsteczkami traci ona nadmiar swojej energii oscylacyjnej i przechodzi na coraz niższe stany oscylacyjne, aż osiągnie najniższy wzbudzony stan elektronowy. Następnie energia wzbudzenia cząsteczki może zostać wyemitowana w postaci promieniowania z jednoczesnym powrotem cząsteczki do stanu podstawowego, albo w sposób bezpromienisty. Jeżeli emisja jest następstwem absorpcji światła mamy do czynienia z fotoluminescencją. Zależnie od rodzaju stanu wzbudzonego, z którego następuje emisja kwantu energii można ją podzielić na fluorescencję i fosforescencję. Fluorescencja to zjawisko, w którym następuje przejście cząsteczki z poziomu zerowego wzbudzonego stanu singletowego S_1 na dowolny poziom oscylacyjno-rotacyjny stanu podstawowego S_0 . Zależność natężenia wyemitowanego promieniowania elektromagnetycznego od częstotliwości przedstawiana jest w postaci widma fluorescencji. Widmo fluorescencji, w porównaniu z widmem absorpcji jest przesunięte w kierunku dłuższych fal, a energia promieniowania emitowanego jest niższa niż energia zaabsorbowana.⁹



Rysunek 1. Diagram Jabłońskiego.

Badania fluorymetryczne wykorzystują proporcjonalność intensywności fluorescencji do stężenia związku emitującego, zgodnie ze wzorem:

$$I_f = k \cdot I_0 \cdot c \cdot s$$

gdzie:

I_f – intensywność fluorescencji

k – stała proporcjonalności

⁹ Chemia analityczna: ćwiczenia laboratoryjne, praca zbiorowa pod redakcją I. Głuch i M. Balcerzak, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2007, 138-149.

I_0 – natężenie promieniowania wzbudzającego

c – stężenie

s – grubość warstwy absorbującej.

Zależność ta jest prawdziwa tylko w zakresie niskich stężeń, gdyż dla stężeń wysokich obserwuje się zjawisko autowygaszania. Obniżenie wartości intensywności fluorescencji może być również spowodowane wzrostem temperatury oraz wpływem innych substancji, powodujących przekazanie energii przez cząsteczkę wzbudzoną w sposób bezpromienisty.

Substancjami pochodzenia naturalnego wykazującymi zjawisko fluorescencji są m.in.: aminokwasy (tryptofan, tyrozyna, fenyloamina), zasady nukleinowe w DNA i RNA (adenina, guanina, cytozyna, tymina, uracyl), barwniki roślinne (chlorofile, karotenoidy, bakteriochlorofile), witaminy (ryboflawina, biotyna, tiamina, witamina A oraz część witamin z grupy B). Ponadto możliwa jest modyfikacja struktury wielu związków oraz warunków pomiaru tak, aby przeprowadzić je w związki fluoryzujące.¹⁰ Wysoka czułość i selektywność metod fluorymetrycznych predestynuje je do zastosowania w diagnostyce klinicznej, szczególnie gdy dostępna jest niewielka ilość próbki. We krwi oraz płynach ustrojowych rutynowo wykonuje się oznaczenia aminokwasów, kwasu foliowego, ryboflawiny, tiaminy. Coraz częściej monitoruje się także aktywność enzymów, ponieważ są markerami wielu chorób. W nowoczesnych laboratoriach stosuje się mikroskopy fluorescencyjne do obrazowania nowotworów, chorób neurologicznych i immunologicznych. Metoda ta jest również przydatna do badania biodystrybucji i farmakokinetyki leków zawierających w swojej strukturze fluorofor. Spektroskopia fluorescencyjna jest również techniką wykorzystywaną do badania białek, ich struktury czy wzajemnych oddziaływań. Dzięki obecności aromatycznych aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym oraz połączonych z nim grup prostetycznych, białka wykazują własności fluorescencyjne przypadające na zakres bliskiego ultrafioletu.^{11,12,13}

¹⁰ Progress in Molecular Biology and Translational Science, edited by M. C. Morris, Elsevier **2013**, 113, 1-27

¹¹ S. Paszyc, Podstawy fotochemii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **1992**

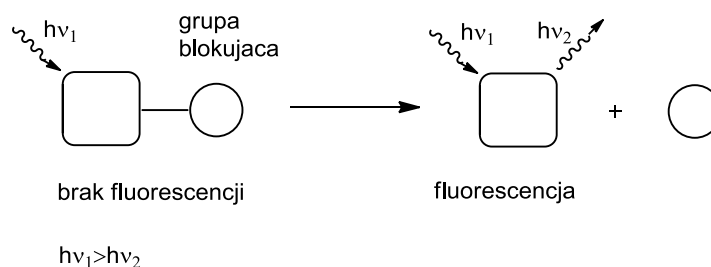
¹² J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer **2006**

¹³ P. Suppan, Chemia i światło, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **1997**

4.1. Zastosowanie zjawiska fluorescencji do badania kinetyki reakcji chemicznych i biochemicznych

Spektrofluorymetria jest szczególnie ważną metodą w badaniach biochemicznych, służącą do oznaczania bardzo małych stężeń związków organicznych. Związkami fluorescencyjnymi, w niniejszej pracy, nazwano związki, które w danych warunkach pomiarów wykazują zjawisko fluorescencji. Jeżeli substrat do reakcji jest związkiem niefluorescencyjnym, a w wyniku przekształceń chemicznych, biochemicznych lub zmiany warunków środowiska zostaje przekształcony w związek fluorescencyjny to nazywany jest związkiem fluorogennym. Poprzez śledzenie wzrostu intensywności fluorescencji w czasie można badać kinetykę reakcji. Możliwe jest również podejście odwrotne, tzn. śledzenie spadku intensywności fluorescencji w wyniku przekształcenia związku fluorescencyjnego w niefluorescencyjny.

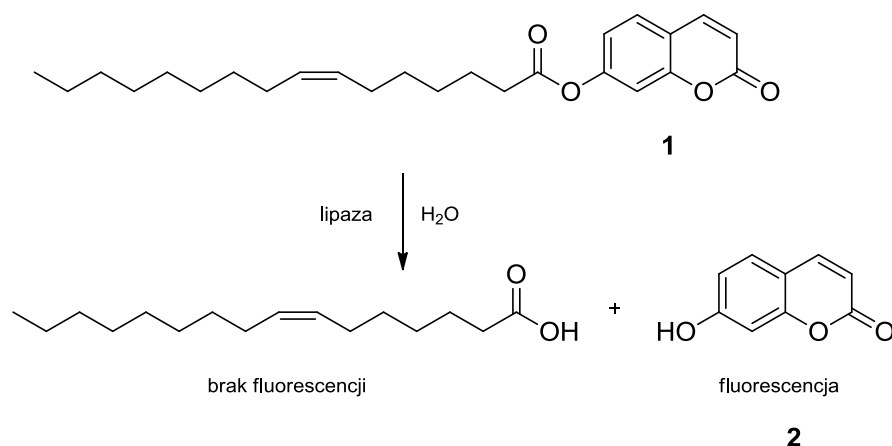
Najprostszą metodą modyfikacji fluorescencji jest przyłączenie do fluoroforu ugrupowania wygaszającego fluorescencję. Następnie w wyniku reakcji enzymatycznej, fotolizy lub innego rozłączenia wiązania kowalencyjnego fluorescencja zostaje przywrócona przez usunięcie grupy blokującej, Schemat 1.



Schemat 1

Klasycznym przykładem usunięcia grupy wygaszającej fluorescencję jest hydroliza estru 7-hydroksykumaryny **1**, przedstawiona na Schemacie 2. Reszta kwasowa pełni funkcję grupy blokującej, przez co związek **1** nie wykazuje fluorescencji. Hydroliza wiązania estrowego powoduje uwolnienie 7-hydroksykumaryny (**2**). Forma anionowa 7-hydroksykumaryny emituje silną niebieską fluorescencję. Rejestrowanie zmian fluorescencji w czasie dla różnych stężeń substratu pozwala na badanie kinetyki reakcji enzymatycznej.¹⁴

¹⁴ T. de Laborde de Monpezat, B. de Jesob, J.-L. Butourc, L. Chavafita, M. Sancholled, *Lipids* **1990**, 25, 661-664.



Schemat 2

Kolejnym sposobem modyfikowania fluorescencji substratów jest wykorzystanie mechanizmu FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Aby związek mógł działać zgodnie z tą koncepcją, powinien w swojej strukturze posiadać dwa chromofory o różnych widmach absorpcji i emisji promieniowania, znajdujące się w odległości od 1 do 10 nm. Mechanizm ten polega na przenoszeniu energii pomiędzy dwoma chromoforami: donorem i akceptorem. Wzbudzając donor wiązką promieniowania o długości fali odpowiadającej maksimum jego absorpcji następuje wewnątrzcząsteczkowe przekazanie energii do akceptora. Wywołuje to emisję fali o długości światła odpowiadającej maksimum emisji akceptora, co zostało zobrazowane na Schemacie 3. Jeżeli chromofory znajdują się w większej odległości, przekazanie bezpromieniste energii nie zachodzi i obserwuje się emisję fali odpowiadającej maksimum emisji donora.¹⁵ Pierwotnie metodologia ta została opisana dla wykrywania aktywności proteazy HIV,¹⁶ a kolejnych latach do badania interakcji pomiędzy białkami,^{17,18} które znakuje się różnymi markerami fluorescencyjnymi, badania interakcji w żywych komórkach za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego,¹⁹ a także do monitorowania w czasie rzeczywistym oporności na leki w przewlekłej białaczce szpikowej.²⁰

¹⁵ E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1387 – 1395.

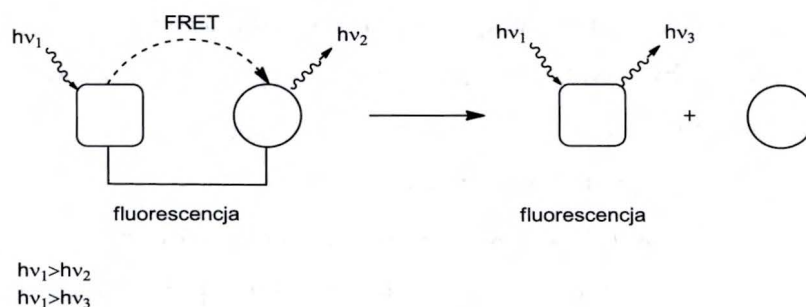
¹⁶ E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, Erickson J., *Science* **1990**, *247*, 954–958.

¹⁷ A. K. Kenworthy, *Methods* **2001**, *24*, 289-296.

¹⁸ K. Truong, M. Ikura, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 573-578.

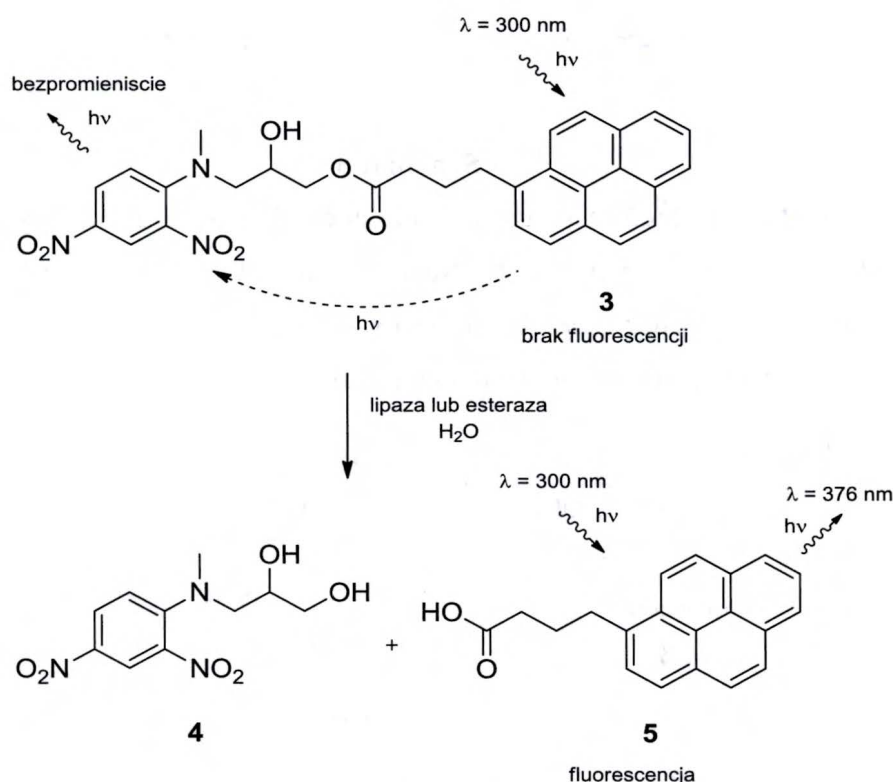
¹⁹ R.B. Sekar, A. Periasamy, *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 629-633.

²⁰ A. Tunceroglu, M. Matsuda, R. B. Birge, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 3065-3073.



Schemat 3

Przykład próbnika fluorogennego **3** działającego w oparciu o mechanizm FRET przedstawiono na Schemacie 4.²¹ Autorzy zsyntetyzowali ester 3-[*N*-metylo-*N*-(2,4-dinitrofenylo)amino]propan-1,2-diolu i kwasu pirenobutanowego, który nie wykazywał fluorescencji.



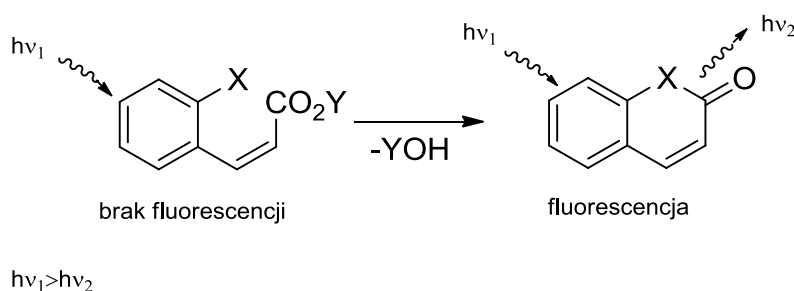
Schemat 4

Naświetlanie związku wiązką promieniowania o długości fali 300 nm, odpowiadającą maksimum absorpcji kwasu pirenobutanowego (donora), prowadziło do zaabsorbowania kwantu energii. Następnie energia ta ulegała wewnątrzcząsteczkowemu przeniesieniu na drugi chromofor (akceptor), który w sposób bezpromienisty emitował nadmiar energii. Ugrupowanie dinitrofenyloaminowe, które nie posiada zdolności emisji promieniowania,

²¹ Y. Yang, P. Babiak, J.-L.Reymond, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1746–1754.

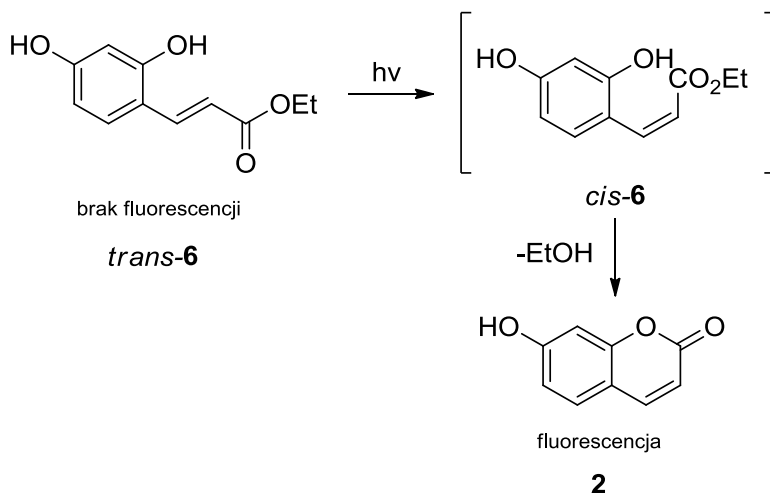
działało jako wygaszacz fluorescencji. Jeżeli związek **3** poddano reakcji enzymatycznej hydrolizy, uwalniany był kwas pirenobutanowy (**5**), który emitował promieniowanie o długości fali 376 nm. Wraz z postępem reakcji obserwowano wzrost intensywności fluorescencji za pomocą spektrofluorymetru.

Trzecią metodą modulowania fluorescencji związków organicznych jest chemiczna modyfikacja rdzenia związku. Poprzez odpowiednie przekształcenia chemiczne bądź biochemiczne ze związku niefluorescencyjnego można otrzymać związek fluorescencyjny, Schemat 5.



Schemat 5

Przykładem takiej strategii jest zastosowanie pochodnej kwasu *trans*-cynomonowego (*trans*-**6**), przedstawione na Schemacie 6. Naświetlanie takiego związku światłem UV powoduje izomeryzację z formy *trans*-**6** do formy *cis*-**6**. Forma *cis* ulega spontanicznej laktonizacji, co w rezultacie prowadzi do powstania fluorescencyjnej kumaryny **2**.^{22,23}

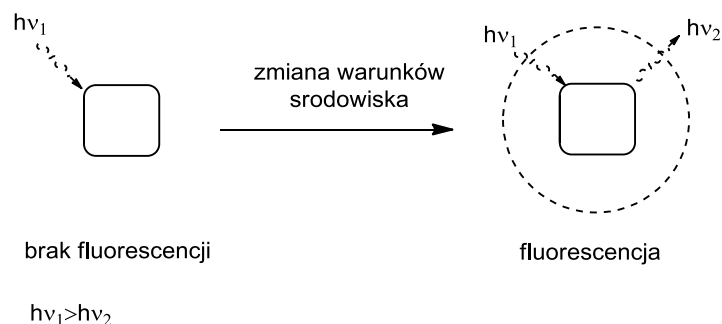


Schemat 6

²² N. Gagey, P. Neveu, C. Benbrahim, B. Goetz, I. Aujard, J.-B. Baudin, L. Jullien, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9986-9998.

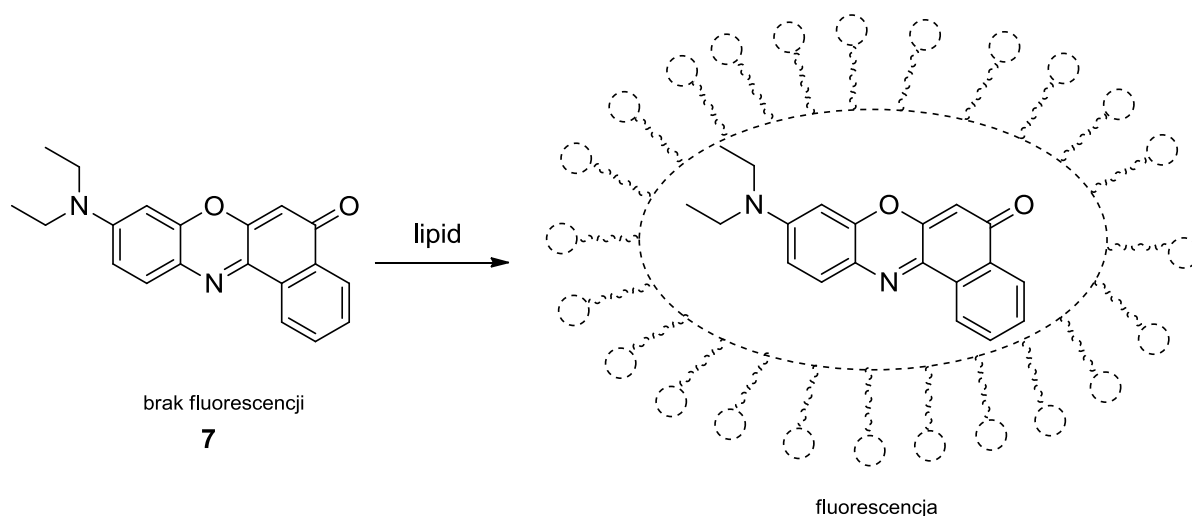
²³ S. Y. Cho, Y. K. Song, J. G. Kim, S. Y. Oh, C. M. Chung, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4769-4772.

Również zmiana warunków środowiska, np. polarności środowiska czy warunków pH może powodować powstanie zjawiska fluorescencji, Schemat 7.



Schemat 7

Jednym z przykładów jest pochodna fenoksazyny **7** (Czerwień Nilu), która absorbuje promieniowanie o długości fali 591 nm, a emituje promieniowanie o długości 657 nm, a jej wodny roztwór wykazuje bardzo niską fluorescencję, Schemat 8.²⁴ Natomiast w środowisku niepolarnym, np. w ksylie nie maksimum absorpcji przesuwają się w kierunku fal krótszych ($\lambda_{\text{max}}/\lambda_{\text{em}} = 523 \text{ nm}/565 \text{ nm}$), czemu towarzyszy zwiększenie wydajności kwantowej fluorescencji. Zjawisko to umożliwia oznaczanie hydrofobowych obszarów w żywych komórkach, np. kropelek lipidowych.²⁵

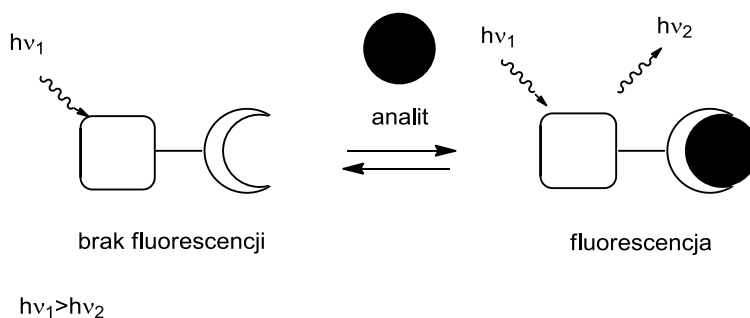


Schemat 8

Również modyfikacja struktury elektronowej związku chemicznego może prowadzić do powstania zjawiska fluorescencji, Schemat 9.

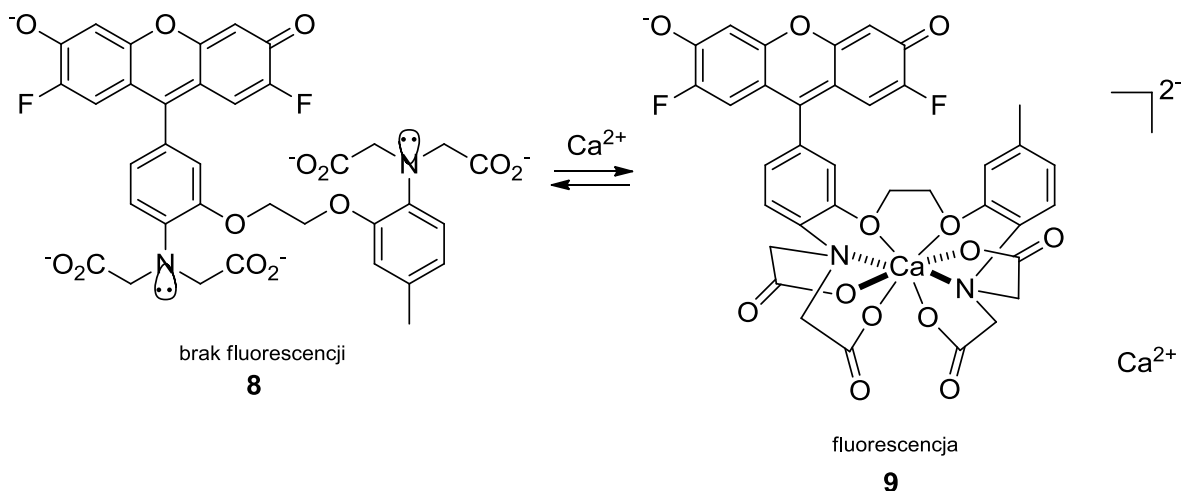
²⁴ P. Greenspan, S. Fowler, *J. Lipid Res.* **1985**, 26, 781-789.

²⁵ P. Greenspan, E. P. Mayer, S. D. Fowler, *J. Cell Biol.* **1985**, 100, 965-973.



Schemat 9

Przykładem takich próbników są wskaźniki jonów Ca^{2+} , np. związek **8** przedstawiony na Schemacie 10. Wolne pary elektronowe reszt anilin kwasu 1,2-bis(*o*-aminofenoksy)etano-*N,N,N',N'*-tetraoctowego wygaszają fluorescencję z powodu występowania fotoindukowanego transporu elektronów. Natomiast powstanie kompleksu chelatowego z jonami Ca^{2+} angażuje te pary elektronowe do kompleksowania jonów wapnia, przez co zmniejsza się wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie energii i tym samym zwiększa się intensywność fluorescencji związku **9**.²⁶



Schemat 10

4.2. Próbniki chromogenie i fluorogenne

Metody oznaczania aktywności enzymatycznej oparte na oznaczeniach optycznych zapewniają wysoki standard, a do wykonania odpowiednich oznaczeń stosuje się próbniki chromogenie lub fluorogenne. Związki te można zastosować wtedy, gdy substrat lub produkt uzyskiwany w wyniku reakcji katalizowanej przez enzym są substancjami barwnymi lub fluorescencyjnymi. Nie jest to jednak możliwe w przypadku, gdy oba związki nie różnią się

²⁶ A. Minta, J. P.Kao, R. Y.Tsien, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8171-8178.

właściami spektroskopowymi.²⁷ Ponadto, zsyntetyzowane związki, aby były dobrymi próbnikami do oznaczeń enzymatycznych powinny charakteryzować się wysoką stabilnością, brakiem podatności na autohydrolizę, brakiem tendencji do reakcji z niekatalitycznymi białkami, takimi jak albumina surowicy bydłowej (BSA; bovine serum albumin) oraz powinny być dobrymi substratami dla enzymów. Przy ocenie przydatności próbników do oznaczeń enzymatycznych należy uwzględnić wszystkie powyższe parametry.

4.2.1. Oznaczanie aktywności lipaz i esteraz

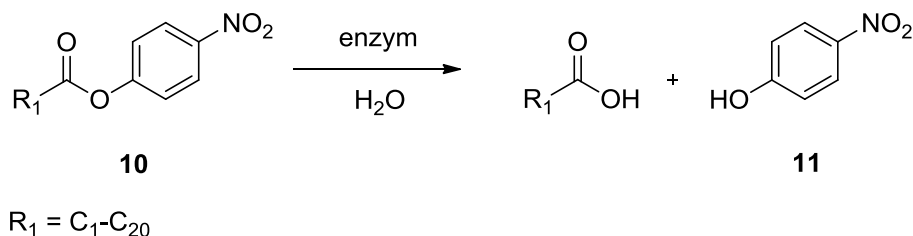
Lipazy (EC 3.1) są enzymami należącymi do klasy hydrolaz. Katalizują reakcję hydrolizy estrów kwasów tłuszczowych. Odpowiadają za hydrolizę triacylogliceroli będących źródłem energii organizmów żywych. Produktami reakcji są kwasy tłuszczowe, diacyloglicerole i monoacyloglicerole.²⁸ Szczególnie ważne znaczenie w organizmach ludzi i zwierząt mają lipazy: wątrobowa, trzustkowa, jelitowa, językowa, żołądkowa oraz lipoproteinowa. Określenie aktywności lipazy we krwi przydatne jest w diagnostyce medycznej, w rozpoznaniu i oceny efektywności leczenia ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki, mukowiscydozy, celiakii i choroby Crohna. Przy ostrym zapaleniu trzustki poziom enzymu we krwi jest wysoki i przekracza 5-10 krotnie prawidłowe wartości. Niski poziom często towarzyszy cukrzycy, podwyższonemu poziomowi cholesterolu i nadciśnieniu tętniczemu. W warunkach laboratoryjnych, aktywność lipazy trzustkowej oznacza się na podstawie ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych w czasie działania enzymu w optymalnych warunkach. Lipazy pochodzenia mikrobiologicznego, syntetyzowane przez szczepy drożdży, pleśni i bakterii (np. *Candida antarctica*, *Candida rugosa*) wykorzystywane są na szeroką skalę w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Dlatego tak ważne jest opracowanie wiarygodnych i szybkich metod do jakościowego oraz ilościowego oznaczania nawet bardzo małych ilości enzymu. Ponadto, istotne jest określenie stereoselektywności reakcji katalizowanych przez te enzymy.

Powszechnie do oznaczania aktywności lipaz i esteraz stosuje się estry *p*-nitrofenolu i kwasów karboksylowych o wzorze **10**, posiadające grupy R¹ będące łańcuchami alifatycznymi C₁-C₂₀. Krótkołańcuchowe estry, takie jak octan czy maślan, są rozpuszczalne w wodzie i zwykle wykorzystywane do oznaczania aktywności esteraz, natomiast estry długołańcuchowe, jak laurynian, palmitynian czy oleinian, nie są rozpuszczalne w środowisku wodnym oraz wymagają stosowania dodatku środków powierzchniowo czynnych

²⁷ J. P. Goddard, J. L. Reymond, *Trends in Biotechnol.* **2004**,22, 363-370.

²⁸ R. Gupta, P. Rathi, N. Gupta, S. Bradoo, *Biotechnol. App. Biochem.* **2003**, 37, 63-71.

i są wykorzystywane do oznaczania aktywności lipaz. Reakcje takie przebiegają zgodnie z mechanizmem przedstawionym na Schemacie 11, powodując uwalnianie (*p*-nitrofenolu) **11**. Stężenie formy anionowej oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm i pH obojętnym.



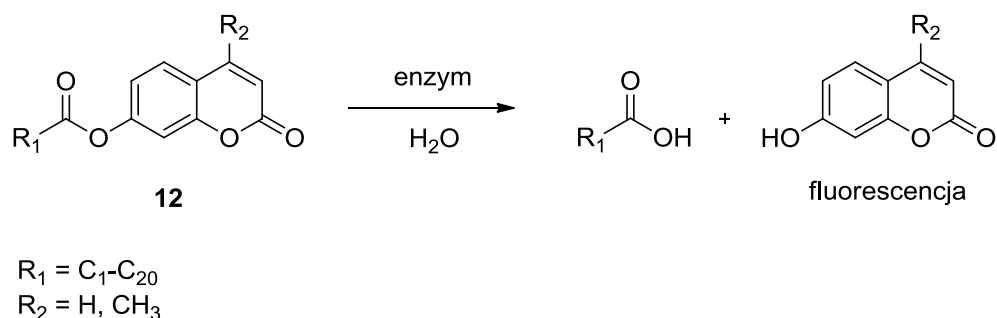
Schemat11

Metoda ta pomimo wielu zalet, takich jak łatwość oznaczania i niski koszt substratów, posiada jednak również szereg wad.²⁹ Jednymi z ważniejszych jest jej ograniczenie tylko do oznaczania aktywności kwasów karboksylowych, podatność na autohydrolizę, tendencja do reakcji z niekatalitycznymi białkami oraz niska stabilność w czasie.

Aktywność enzymów hydrolitycznych może być oznaczana z dużą czułością i dokładnością za pomocą metod fluorymetrycznych z zastosowaniem substratów fluorogennych, które nie posiadają właściwości fluorescencyjnych, a dopiero uwolniony w wyniku hydrolizy enzymatycznej związek wykazuje silną fluorescencję, Schemat 12. Szeroko stosowane do tego celu są estry kumaryny o wzorze **12** posiadające jako grupę R_2 wodór lub metyl oraz grupę R_1 będącą łańcuchem alifatycznym $\text{C}_1\text{-C}_{20}$. Najczęściej stosowane są octan i maślan 7-hydroksy-4-metylokumaryny do oznaczania aktywności esteraz oraz palmitynian i laurynian do oznaczania aktywności lipaz.³⁰ Metody te jednak nie pozwalają na wyznaczenie stereoselektywności reakcji, a także dotyczą tylko pochodnych kwasów karboksylowych. Tylko postać zjonizowana 7-hydroksy-4-metylokumaryny odpowiedzialna jest za emisję promieniowania, dlatego też pomiary wykonuje się zazwyczaj w środowisku obojętnego pH lub lekko zasadowego.

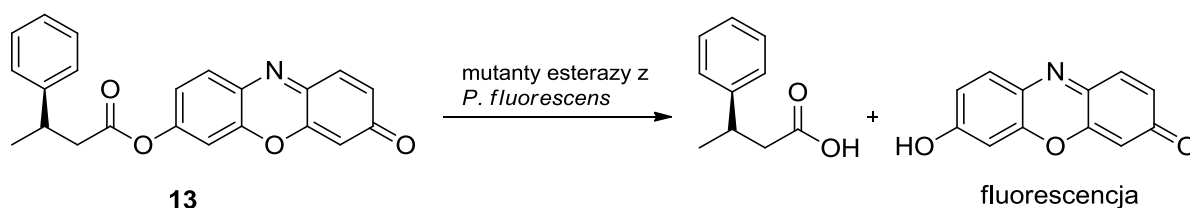
²⁹ C. Huggins, J. Lapidés, *J. Biol. Chem.* **1947**, *170*, 467-482.

³⁰ T. De Laborde de Monpezat, B. De Jeso, J.L. Butour, L. Chavant, M. Sancholle, *Lipids* **1990**, *25*, 661-664.



Schemat 12

W kolejnych latach opracowano metody bezpośredniego określania enancjoselektywności reakcji. W tym celu jako próbniki fluorogenne zastosowano enancjomerycznie czyste estry kwasu (*R*)- i (*S*)-fenylobutanowego i rezorufiny (**13**), co przedstawia Schemat 13. Początkowe szybkości reakcji hydrolizy katalizowanej przez różne mutanty esterazy z *Pseudomonas fluorescens* wyznaczano na podstawie pomiarów intensywności fluorescencji w czasie. Pomiarzy prowadzono dla każdego z enancjomerów oddzielnie, a następnie porównano ich szybkości reakcji. Na tej podstawie wyznaczono pozorne enancjoselektywności, które następnie porównano z wartościami rzeczywistymi, wyznaczonymi dla mieszanin racemicznych na podstawie analiz GC i HPLC na kolumnach chiralnych. Zaobserwowano dobrą korelację pomiędzy wartościami pozornymi i rzeczywistymi.³¹



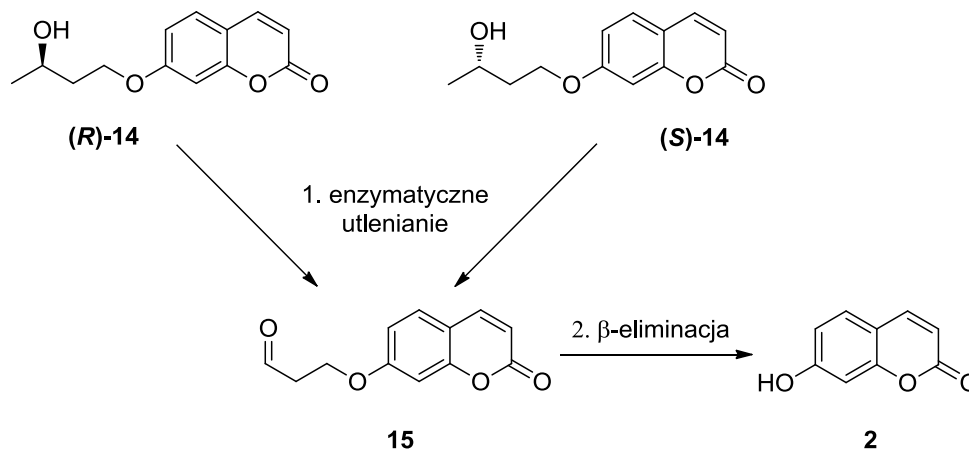
Schemat 13

Niestety, oznaczenia te ograniczone są do wybranych grup substratów, w których funkcję grupy alkoksylowej pełni cząsteczka chromoforu lub fluoroforu. Oznaczenie aktywności dla nieracemicznych estrów alkoholi drugorzędowych, tioli czy amidów nieracemicznych amin nie jest bezpośrednio możliwe, jak też oznaczenie stereoselektywności tych reakcji. Dlatego też, opracowanie nowych metod, pozwalających na badanie kinetyki reakcji tych związków jest niezwykle pożądane.

Szereg metod oznaczania aktywności enzymatycznych bazuje na koncepcji Klein'a i Reymond'a. Zaproponowali oni pośrednie metody oznaczania aktywności dehydrogenazy alkoholowej z zastosowaniem procedury składającej się z sekwencji dwóch następujących po

³¹ E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.* **1999**, 380, 1029-1033.

sobie reakcji przedstawionych na Schemacie 14.³² W pierwszym etapie w wyniku działania alkoholowej dehydrogenazy z wątroby końskiej alkohol **14** był utleniany do odpowiedniego ketonu **15**, który pod działaniem albuminy z surowicy bydłowej ulegał procesowi β -eliminacji, prowadząc do uwolnienia fluorescencyjnej 7-hydroksykumaryny (**2**). W kolejnych latach metoda ta została zaadaptowana do badań przesiewowych nad lipazami i esterazami,³³ aldolazami,³⁴ amidazami,³⁵ fosfatazami,³⁶ hydrolazami epoksydowymi,³⁷ monooksygenazami Bayera-Villigera.³⁸



Schemat 14

Opracowanie próbników fluorogennych opartych na sekwencji trzech reakcji pozwoliło na badanie aktywności lipaz i esteraz, co przedstawia Schemat 15.

³² G. Klein, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1113-1116G.

³³ E. Nyfeler, J. Grognum, D. Wahler, J.L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 2919-2926.

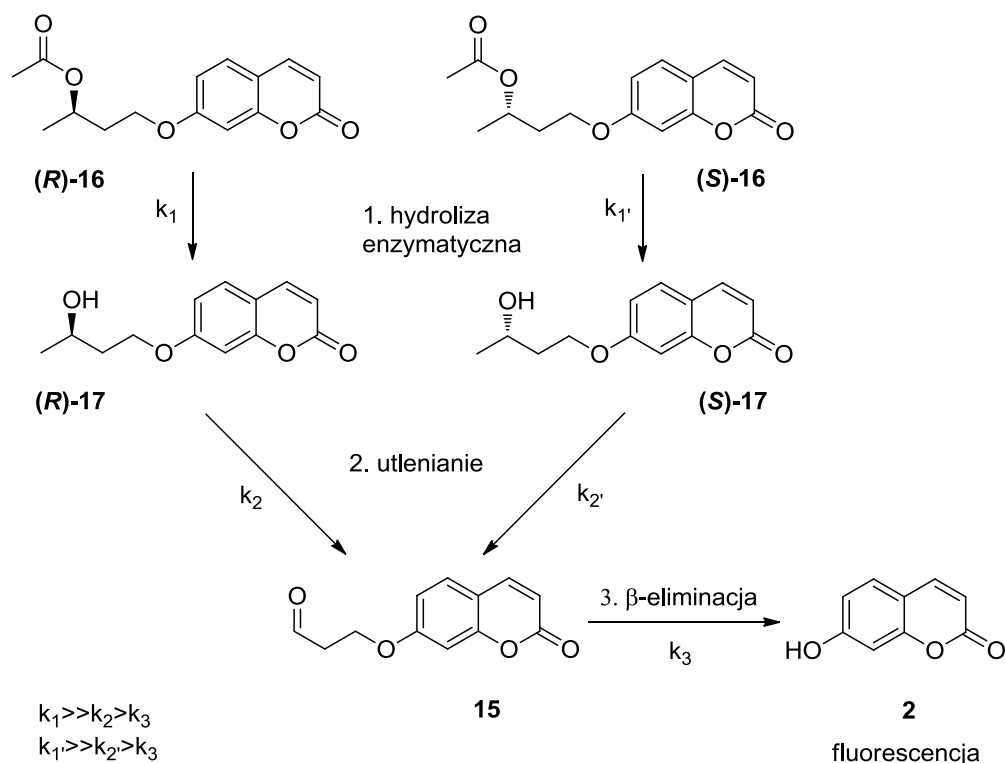
³⁴ R. P. Carlón, N. Jourdain, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 4154-4162.

³⁵ E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 255-260.

³⁶ E. M. González-García, J. Grognum, D. Wahler, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 2458-2467.

³⁷ P. D. Jones, N. M. Wolf, C. Morisseau, P. Wheatstone, B. Hock, B. D. Hammock, *Anal. Biochem.* **2005**, 343, 66-75.

³⁸ R. Sicard, L. S. Chen, A. J. Marsaioli, J.-L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1041-1050.



Schemat 15

Z fluorogennych substratów (R)-16 i (S)-16 w wyniku hydrolizy enzymatycznej uwalniany był kwas karboksylowy i drugorzędowy alkohol (R)-17 i (S)-17 połączony wiązaniem eterowym z 7-hydroksykumaryną. Następnie w wyniku następczej reakcji utleniania i β -eliminacji uwolniona została 7-hydroksykumaryna (2) o silnej fluorescencji. Hydroliza enzymatyczna była etapem limitującym szybkość reakcji, a dwa kolejne etapy zachodziły z dużo większą szybkością. Śledzenie wzrostu intensywności fluorescencji w czasie przy danej długości fali emisji, pozwalało na określenie stężenia uwalnianej 7-hydroksykumaryny (2), a tym samym na obliczenie szybkości katalizowanej przez enzymy reakcji. Zastosowanie dwóch oddzielnych pomiarów umożliwiło na wyznaczenie szybkości reakcji dla każdego z enancjomerów, a tym samym oznaczenie stereoselektywności procesu i określenie, który z enancjomerów substratu reaguje szybciej w obecności danego enzymu. Zastosowanie techniki fluorymetrycznej gwarantowało osiągnięcie wysokiego standardu oznaczeń.³⁹

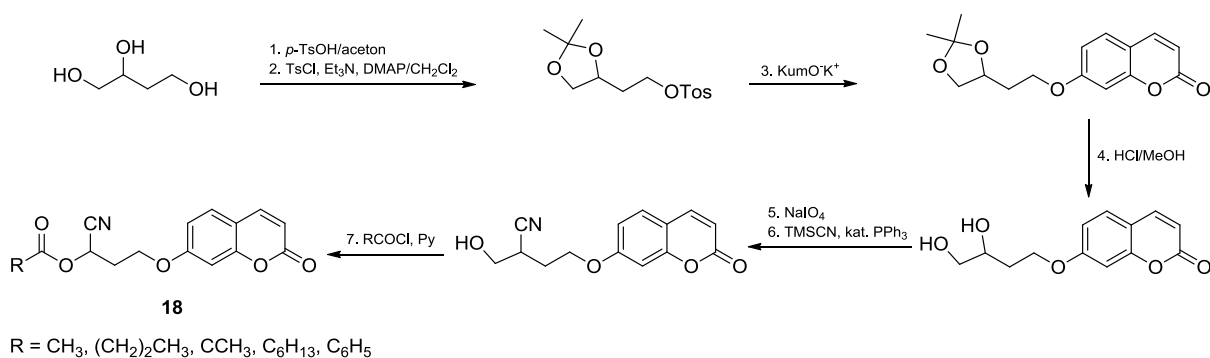
W kolejnych latach w oparciu o identyczną koncepcję oznaczania zsyntetyzowano estry cyjanohydrin **18**⁴⁰ oraz acyloksymetylowe etery 7-hydroksykumaryny **19**,⁴¹ charakteryzujące się wysoką stabilnością w warunkach fizjologicznych i niską podatnością na

³⁹ G. Klein, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 400-407.

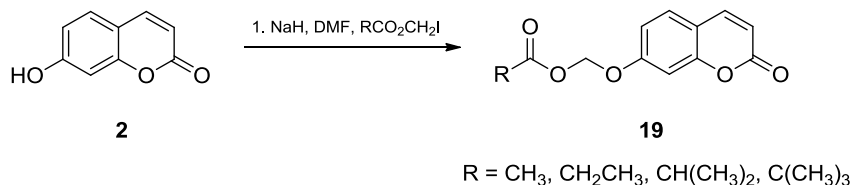
⁴⁰ E. Leroy, N. Bensef, J.-L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 859-865.

⁴¹ E. Leroy, N. Bensef, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 2105-2108.

niespecyficzną degradację, Schemat 16 i 17. W obydwu przypadkach zarejestrowano wysokie relatywne szybkości reakcji enzymatycznych wobec wysokiego stężenia białek niekatalitycznych. Przebadano szereg dostępnych komercyjnie enzymów w obecności albuminy z surowicy bydlęcej, której zadaniem było naśladowanie warunków oczyszczania enzymów, w których badana próbka zawiera oprócz poszukiwanego enzymu również inne białka. W obydwu przypadkach, jako produkty uboczne powstawały aldehydy lub ketony, które są często inhibitorami badanych hydrolaz. Ponadto, metoda otrzymywania związku **18** jest bardzo złożona i bazuje na 7-etapowej syntezie.^{42,43}



Schemat 16



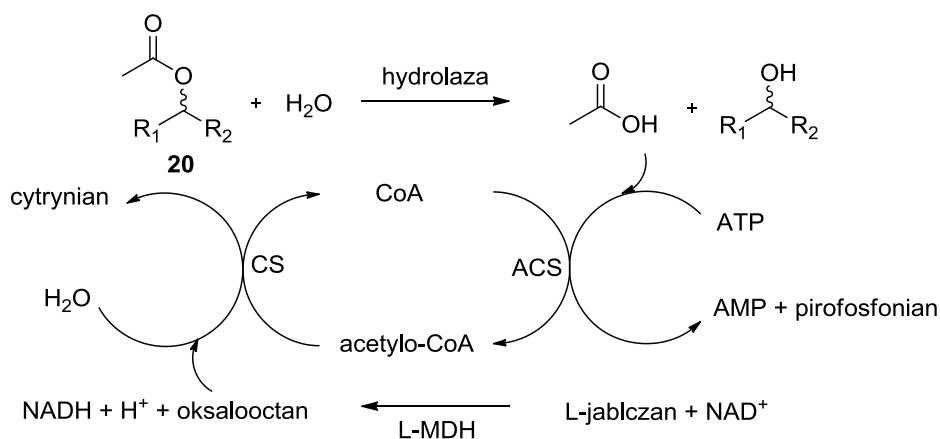
Schemat 17

W 1999 roku opracowano pośrednią metodę pozwalającą na oznaczenie aktywności lipaz względem octanów alkoholi drugorzędowych, co przedstawiono na Schemacie 18. Hydroliza octanu chiralnego drugorzędowego alkoholu **20** katalizowana przez lipazy bądź esterazy prowadzi do uwolnienia kwasu octowego, który umożliwia wyznaczenie szybkości początkowych reakcji. Kwas octowy jest przekształcany w obecności ATP i koenzymu A (CoA) przez syntetazę acetylo-CoA do acetylo-CoA. Następnie acetylo-CoA i oksaloocetan zostają przekształcone do cytrynianu przez syntetazę cytrynianową. Oksaloocetan jest wytwarzany w wyniku katalizowanej przez dehydrogenazę L-jabłczanu reakcji utleniania jabłczanu ze stechiometryczną konsumpcją NAD⁺. Obserwowanie wzrostu stężenia NADH

⁴² J. L. Cage, B. P. Branchaud, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 831-837.

⁴³ E. Nyfeler, D. Wahler, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2919-2926.

przy $\lambda=340$ nm za pomocą metod spektrofotometrycznych umożliwia wyznaczenie szybkości początkowych reakcji dzięki kilkietapowej reakcji kaskadowej. Ponadto esej umożliwia szybki, wiarygodny pomiar aktywności i enancjoselektywności przez zastosowanie odpowiednich (*R*)- i (*S*)-enancjomerów chiralnych alkoholi w dwóch oddzielnych pomiarach. Niestety stosowanie tak skomplikowanego systemu enzymów i kofaktorów sprawia, że metoda ta jest droga.⁴⁴



Schemat 18

Opracowano również próbniki do oznaczania syntetycznej aktywności hydrolaz w rozpuszczalnikach organicznych.⁴⁵ Opisane metody można zastosować do jakościowego oraz ilościowego oznaczania nawet bardzo małych ilości enzymów, gdy produkty reakcji katalizowanej przez nie posiadają silną fluorescencję w środowisku reakcji, natomiast substraty nie wykazują fluorescencji.

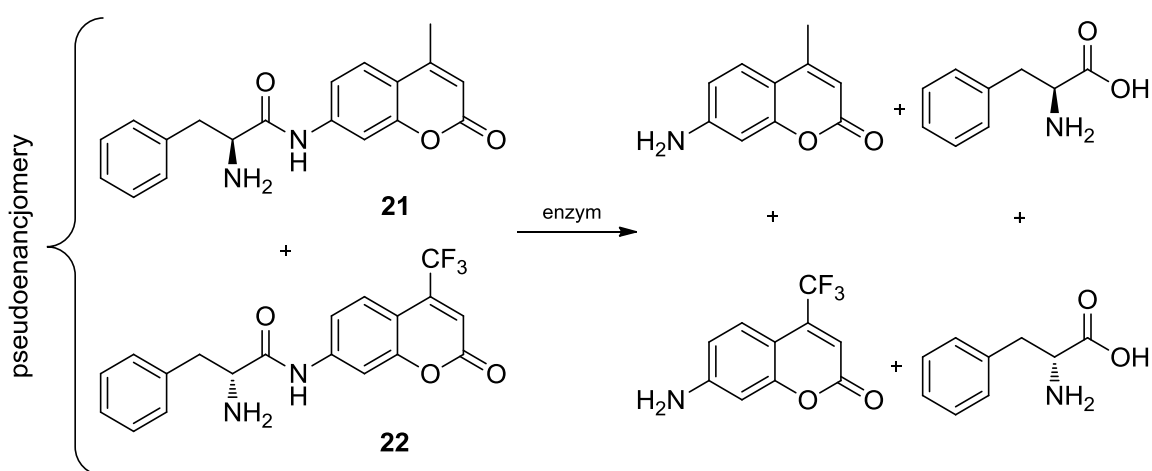
4.2.2. Oznaczanie aktywności proteaz

Enzymy proteolityczne (E.C. 3.4.) są podklasą enzymów z klasy hydrolaz. Odpowiadają za procesy proteolizy, czyli hydrolizy wiązań peptydowych pomiędzy aminokwasami. Miejsce hydrolizy jest określone przez występowanie specyficznej sekwencji aminokwasów i może odbywać się od N-końca (aminopeptydazy), C-końca (karboksypeptydazy) lub w środku (endopeptydazy), tylko w określonych warunkach środowiska. Proteazy, ze względu na środowisko pH w jakim działają, można podzielić na kwaśne, obojętne oraz zasadowe. A ze względu na mechanizm działania na serynowe, treoninowe, cysteinowe, asparaginowe, glutaminianowe oraz metaloproteazy. Enzymy te regulują wiele procesów fizjologicznych w organizmach żywych poprzez kontrolę aktywacji,

⁴⁴ M. Baumann, R. Stürmer, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4201–4204.

⁴⁵ M. Konarzycka-Bessler, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1418-1420.

syntezy oraz degradacji białek. Inhibitory proteaz są wykorzystywane w leczeniu wielu chorób, np. inhibicja proteaz odpowiedzialnych za replikację wirusa HIV, stosowana jest w leczeniu AIDS; inhibicja ludzkiej trombiny, odpowiedzialnej za procesy krzepnięcia krwi jest jedną z metod leczenia choroby wieńcowej, czy blokowanie proteazy ACE, która odpowiada za wzrost ciśnienia krwi, pozwala na leczenie nadciśnienia tętniczego. Określanie aktywności proteaz jest jednym z intensywniej badanych obszarów chemii medycznej. Monitorowanie w czasie rzeczywistym aktywności proteaz, nie tylko pozwala na diagnozowanie wielu chorób, ale również umożliwia kontrolę efektywności działania inhibitorów proteaz o potencjalnych właściwościach leczniczych.⁴⁶ Proteazy cysteinowe (katepsyna D) i proteazy serynowe (kalikreiny) są biomarkerami w diagnozowaniu chorób nowotworowych.⁴⁷ W ostatnich latach, opracowano szeroką gamę próbników fluorogennych do zastosowań biomedycznych. Kilkaście z nich zostało przebadanych na modelach *in vitro* i *in vivo*. Pierwsze metody HTS do oznaczania aktywności proteolitycznych zazwyczaj wykorzystywały do tego celu aminokwasy lub peptydy sprzężone z odpowiednim fluoroforem.⁴⁸ Grupa Scheper'a opracowała metodę, dzięki której można było, oprócz aktywności, również przewidywać enancjopreferencję proteaz i esteraz, Schemat 19.



Schemat 19

Do tego celu zsyntetyzowano pochodne L- i D-fenylalanino-7-amido-4-metylokumarynę (**21**) oraz L- i D-fenylalanino-7-amido-4-trifluorometylokumarynę (**22**), a następnie monitorowano postęp reakcji dla wybranych par pseudoenancjomerów. Pseudoenancjomerami nazywamy pary związków o przeciwnej konfiguracji, które zwykle

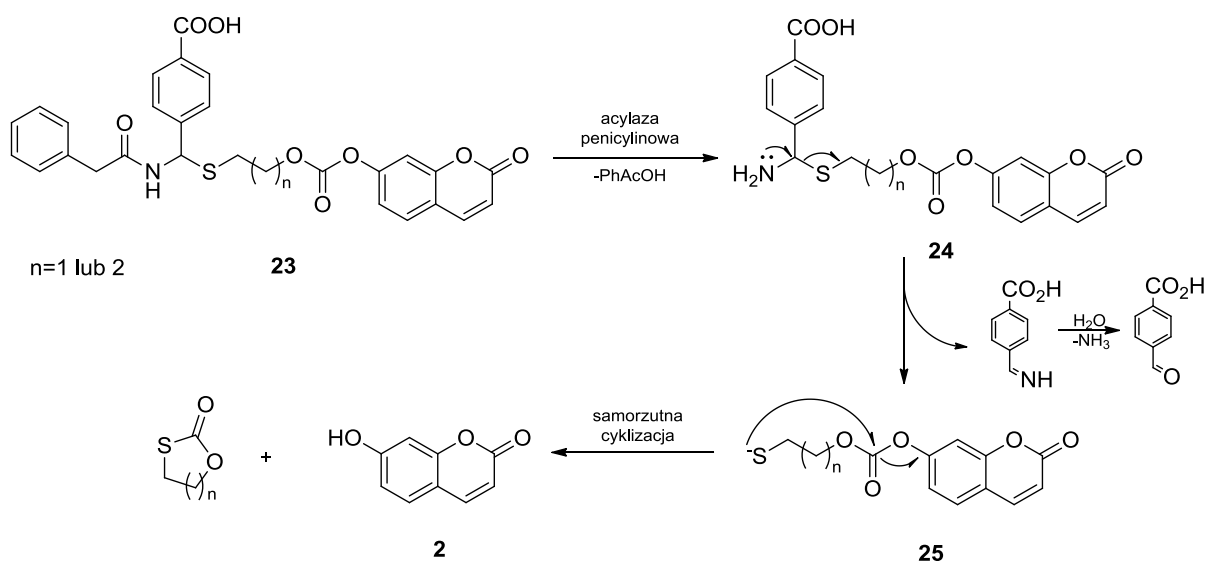
⁴⁶ B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785-799.

⁴⁷ M. F. Ullah, M. Aatif, *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 193-200.

⁴⁸ M. V. Toth, G. R. Marschall, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 544-550.

różnią się jednym z podstawników przy centrum stereogenicznym. Mieszanina takich związków powinna chemicznie zachowywać się jak mieszanina racemiczna. Dzięki różnicy w strukturze związku te wykazują odmienne właściwości fizyczne i można w łatwy sposób monitorować przebieg reakcji z ich udziałem. Pochodne 7-amino-4-metylokumaryny oraz 7-amino-4-trifluorometylokumaryny różniły się widmami fluorescencji, dzięki czemu możliwe było rejestrowanie widm trójwymiarowych, w układzie intensywność fluorescencji-długość fali wzbudzenia-długość fali emisji.^{49,50}

Jednak ze względu na dużą zawadę steryczną powodowaną przez ugrupowanie fluoroforu i utrudnione podejście substratu do miejsca aktywnego enzymu, w kolejnych latach opracowano nową koncepcję, w której substrat był połączony z fluoroforem za pomocą łącznika. Hydroliza wiązania amidowego, katalizowana przez proteazę zapoczątkowywała kaskadę reakcji, podczas których łącznik ulegał samorzutnemu rozłączeniu, powodując uwolnienie fluorescencyjnego produktu. Zadaniem łącznika było odsunięcie centrum reakcyjnego od rozbudowanego przestrzennie fluoroforu i zwiększenie dostępności substratu do miejsca aktywnego enzymu. Przykład takiego próbnika o wzorze **23** przedstawiono na Schemacie 20.



Schemat 20

Jako enzym modelowy wykorzystano acylazę penicylinową, która katalizowała hydrolizę wiązania amidowego. Reakcja enzymatyczna zapoczątkowywała reakcję domino, polegającą na fragmentacji hemitioaminalu **24** i następującej po niej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji

⁴⁹ T. Knüttel, T. Hartmann, H. Meyer, T. Scheper, *Enzym. Microb. Technol.* **2001**, 29, 150–159.

⁵⁰ T. Knüttel, H. Meyer, T. Scheper, *Enzym. Microb. Technol.* **2005**, 37, 673–686.

tiolakilowęglanu **25** prowadząc do uwolnienia fluorescencyjnej 7-hydroksykumaryny (**2**). Całkowita konwersja została osiągnięta po 10 minutach.⁵¹

Powstało wiele prac opartych na koncepcji odwracalnego połączenia peptydowego substratu z fluoroforem zawierającym reaktywne ugrupowanie aminowe, hydroksylowe lub tiolowe, za pomocą „autodestruktywnych” łączników.⁵² Badanie aktywności proteaz jest szczególnie ważne nie tylko ze względu na szerokie zastosowanie w diagnostyce medycznej, ale również ze względu na bardzo istotną rolę proteaz w syntezie peptydów⁵³ i enzymatycznym rozdziale kinetycznym.⁵⁴

4.2.3. Oznaczanie aktywności oksydoreduktaz

Oksydoreduktazy są enzymami katalizującymi reakcje utleniania i redukcji. Ze względu na mechanizm działania można je podzielić na: oksydazy, oksigenazy, dehydrogenazy, hydroperoksydazy, hydroksylazy. Pośród enzymów oksydoredukcyjnych szczególne miejsce zajmują monooksygenazy będące enzymami błonowymi. Katalizują one włączenie jednego atomu tlenu do substratu, natomiast drugi atom tlenu wiązany jest w cząsteczkę wody z udziałem NAD(P)H. Największa ich ilość występuje w wątrobie. Katalizują one reakcje z udziałem substratów endogennych i egzogennych. Substratami endogennymi dla monooksygenaz są przede wszystkim kwasy tłuszczowe i steroidy, a więc biorą one udział w syntezie kwasów żółciowych i hormonów steroidowych. Substratami egzogennymi są ksenobiotyki. Mechanizm działania polega na wprowadzaniu jednego atomu tlenu do substratu w obecności NADPH i tlenu. W zależności od rodzaju substratu oraz pozycji, w której dołączony zostaje atom tlenu monooksygenazy mogą katalizować reakcje: hydroksylacji, epoksydacji, dealkilacji przy N, O i S, desulfuracji, deaminacji, dehalogenacji i denitryfikacji. Mikrosomalny układ monooksygenaz stanowi kompleks enzymatyczny, który składa się z reduktazy NADPH-cytochrom P-450 i cytochromu P-450. Aktywność katalityczna monooksygenaz najczęściej oznaczana jest z zastosowaniem metod spektrofotometrycznych oraz fluorymetrycznych.^{55,56} Metoda opublikowana w 2003 przez

⁵¹ Y. Meyer, J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1517-1520.

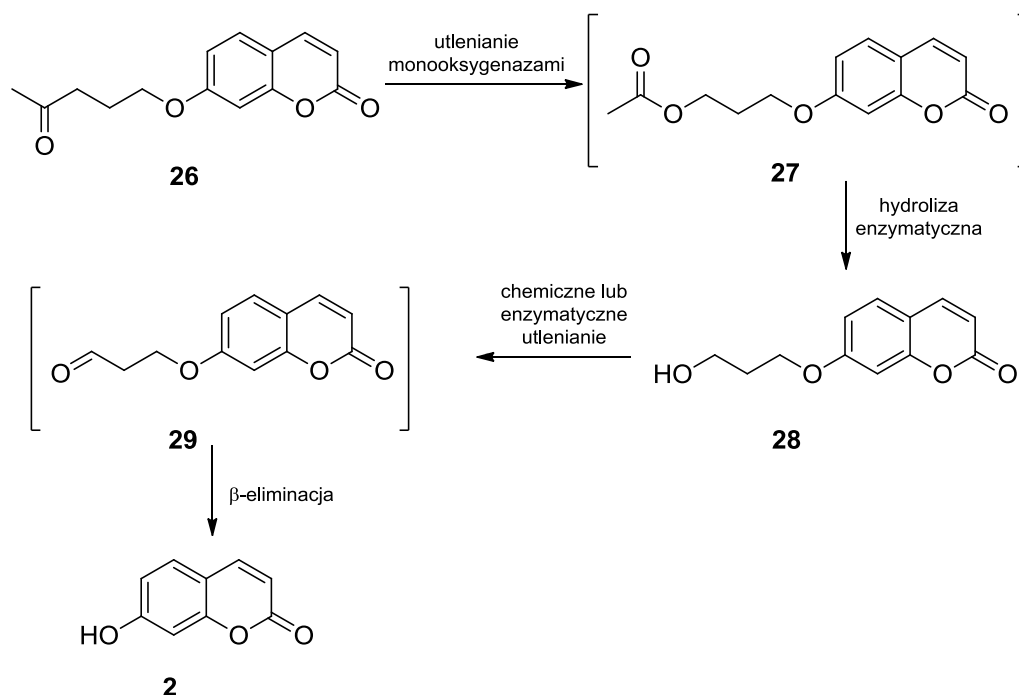
⁵² Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1777-1780.

⁵³ K. Morihara, *Trends in Biotechnology* **1987**, *5*, 164-170.

⁵⁴ S.-T. Chen, S.-Y. Chen, S.-C. Hsiao, K.-T. Wang, *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 773-778.

⁵⁵ S. Saß, M. Kadow, K. Geitner, M. L. Thompson, L. Talmann, D. Böttcher, M. Schmidt, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7575-7580.

grupę Furstossa⁵⁷ bazowała na zastosowaniu kaskady enzymatycznej wychodząc z 4-oksopentylowego eteru 7-hydroksykumaryny (**26**) jako substratu fluorogennego, co ilustruje Schemat 21. W wyniku działania monooksygenaz produkowanych przez komórki mikroorganizmów, związek ten przekształcany był w octan **27**, a ten z kolei w wyniku hydrolizy enzymatycznej bądź reakcji spontanicznej do 3-hydroksypropylowego eteru 7-hydroksykumaryny (**28**). W kolejnym etapie w reakcji katalizowanej chemicznie lub enzymatycznie (dehydrogenaza z wątroby końskiej) alkohol **28** utleniano do aldehydu **29**, który ulegał spontanicznej β -eliminacji uwalniając fluorescencyjną 7-hydroksykumarynę (**2**).



Schemat 21

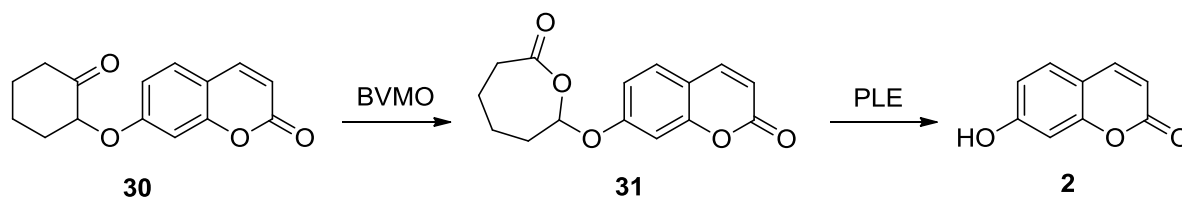
Dwa lata później grupa Reymonda⁵⁸ zaproponowała zastosowanie 2-kumaryloksyketonów **30** jako substratów fluorogennych do wykrywania aktywności monooksygenaz Baeyer-Villiger'a w hodowlach mikrobiologicznych w formie HTS, co można zobaczyć na Schemacie 22. 2-Kumaryloksyketony **30** były przekształcane przez mikroorganizmy w pochodne acyloksyalkilowe 7-hydroksykumaryny **31**, a następnie

⁵⁶ A. B. Watts, J. Beecher, C. S. Whitcher, J. A. Littlechild, *Biocatal. Biotrans.* **2002**, *20*, 209-215.

⁵⁷ M. C. Gutiérrez, A. Slegers, H. D. Simpson, V. Alphand, R. Furstoss, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3500-3506.

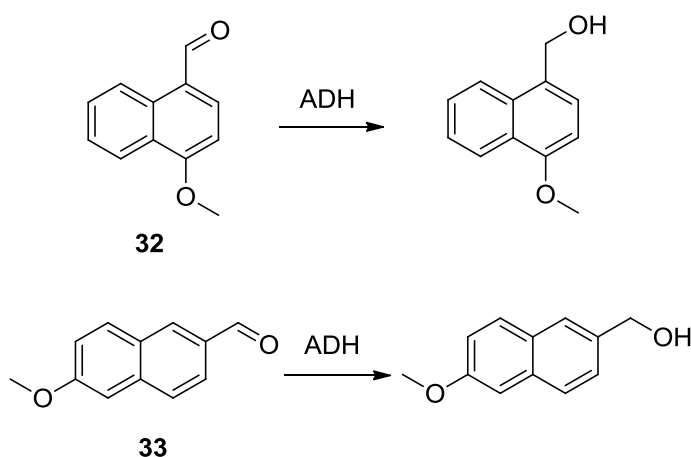
⁵⁸ R. Sicard, L. S. Chen, A. J. Marsaioli, J.-L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1041-1050.

w wyniku hydrolizy enzymatycznej za pomocą esterazy z wątroby świńskiej uwalniana była fluorescencyjna 7-hydroksykumaryna (**2**).



Schemat 22

Drugą ważną grupą są dehydrogenazy, których rolą w organizmach żywych jest odszczepianie atomu wodoru, który następnie jest wiązany z NAD^+ i wykorzystany do hydrogenacji albo utleniany w kaskadzie oksydacyjnej mitochondrium. Przykładem jest dehydrogenaza alkoholowa (ADH, EC.1.1.1.1.), katalizująca odwracalny proces przekształcania alkoholi pierwszorzędowych w aldehydy. Już w 1989 opublikowano zastosowanie 4-metoksy-1-naftaldehydu (**32**) oraz 6-metoksy-2-naftaldehydu (**33**) jako wskaźników do wykrywania aktywności ludzkiej dehydrogenazy alkoholowej, Schemat 23.⁵⁹ Dehydrogenazy współdziałają z cząsteczkami koenzymu NAD^+ oraz NADH . W reakcji utleniania alkoholu do aldehydu, NAD^+ redukowany jest do NADH .



Schemat 23

Szczególne znaczenie w organizmach żywych ma również dehydrogenaza mleczanowa (LDH) katalizująca odwracalną reakcję redukcji pirogronianu do mleczanu. Szybkość reakcji, podczas której NADH utlenia się do NAD^+ , można śledzić mierząc zanik pasma absorpcji przy 340 nm metodą Wróblewskiego.⁶⁰

⁵⁹ J. Wierzchowski, W. P. Dafeldecker, B. Holmquist, B. L. Vallee, *Anal. Biochem.* **1989**, *178*, 57-62.

⁶⁰ F. Wróblewski, J. S. Ladue, *Exp. Biol. Med.* **1955**, *90*, 210-213.

Dehydrogenazy, jako pierwsze enzymy łańcucha oddechowego, znalazły również zastosowanie w oczyszczaniu ścieków metodą osadu czynnego. Oznaczanie aktywności dehydrogenaz służy jako wskaźnik aktywności mikroorganizmów i jest szczególnie istotne w procesie oczyszczania ścieków charakteryzujących się dużą zawartością związków toksycznych, inhibitorów reakcji biochemicznych. Metoda spektrofotometryczna z użyciem chlorku trójfenylotetrazoliowym służy do oceny aktywności biochemicznej mikroorganizmów, kontroli prawidłowości przebiegu oczyszczania oraz określenia stopnia adaptacji osadu czynnego do ścieków przemysłowych. Pomiar aktywności dehydrogenaz polega na pośrednim pomiarze stężenia trójfenyloformazonu, o zabarwieniu czerwonym, który zostaje wytworzony w wyniku przeniesienia wodoru na bezbarwny chlorek trójfenylotetrazoliowy. Wodór jest dostarczany przez dehydrogenazy, które katalizują proces odwodornienia glukozy dodanej do próbki.^{61,62} Inną wiarygodną metodą wyznaczania aktywności dehydrogenaz jest wspomniana już wcześniej metoda opracowana przez Reymonda (Schemat 14).⁶³

Wiele wskaźników fluorescencyjnych bazuje na zależności strukturalnej typu ang. „push-pull”, w której grupy elektronoakceptorowe są połączone z grupami elektronodonorowymi rozbudowanym systemem sprzężonych wiązań π . Fluorofory typu „push-pull” wykazują dobre parametry nieliniowo-optyczne dzięki efektywnemu wewnątrzcząsteczkowemu przeniesieniu ładunku. Związki tego typu są szczególnie przydatne do projektowania próbników redoks, gdzie redukcja elektroakceptorowej grupy karbonylowej do elektronodonorowej grupy hydroksylowej powoduje zmianę struktury elektronowej związku, co w następstwie może powodować zmiany długości fali emisji.⁶⁴ Wykorzystując to zjawisko, opracowano nowe wskaźniki redoks posiadające odpowiednie profile emisji, które mogą być wykorzystane jako substraty dla enzymów oksydoredukcyjnych.⁶⁵ Szczególnie nadają się do selektywnego wykrywania aktywności enzymu 3α -hydroksysteroidowej dehydrogenazy (3α -HSD), która bierze udział w ważnych funkcjach fizjologicznych człowieka. Związek **34** przedstawiony na Schemacie 24 posiadał

⁶¹ P.H. Jones, D. Prasad, *Journal (Water Pollution Control Federation)*, **1969**, *41*, R441-R449.

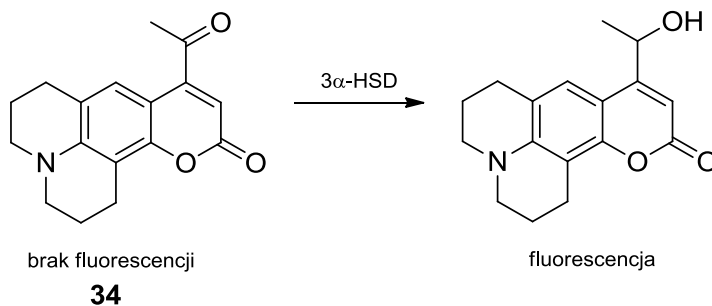
⁶² A.E. Ghaly, N.S. Mahmoud, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2006**, *2*, 186-194.

⁶³ G. Klein, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1113-1116.

⁶⁴ W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 971-988.

⁶⁵ D. J. Yee, V. Balsanek, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2282-2283.

bardzo dobre właściwości optyczne i selektywność względem enzymu. A w kolejnych latach próbnik ten został zaadaptowany do badań *in vitro*.⁶⁶



Schemat 24

4.2.4. Oznaczanie aktywności aminotransferaz

Aminotransferazy są enzymami uczestniczącymi w metabolizmie aminokwasów u zwierząt i katalizują reakcję przenoszenia grup aminowych z α -aminokwasów na α -ketokwasy. Należy do nich aminotransferaza alaninowa (ALAT) oraz aminotransferaza asparaginianowa (ASPAT). Działają one według mechanizmu podwójnego przeniesienia (reakcje ping-pong). Aminotransferaza alaninowa wiąże L-alaninę, z której to zostaje usunięta grupa aminowa i przeniesiona na koenzym fosforan pirydoksalu, prowadząc do powstania fosforanu pirydoksaminy i uwolnienia donora grupy aminowej w postaci pirogronianu. Następnie, w drugim etapie, grupa aminowa zostaje przeniesiona na związany przez enzym aminoakceptor (α -ketoglutaran) dając L-glutaminian. Powstający w reakcji pirogronian można ilościowo oznaczać, mierząc spadek absorbancji przy 340 nm. Odpowiada on zmniejszającemu się stężeniu NADH w następczej reakcji z dehydrogenazą mleczanową.⁶⁷

W analogiczny sposób działa aminotransferaza asparaginianowa katalizując przeniesienie grupy aminowej z asparaginianu na α -ketoglutaran, co prowadzi do powstania szczawiooctanu i L-glutaminianu. ALAT występuje głównie w wątrobie, dlatego też jest wskaźnikiem bardziej swoistym. ASPAT oprócz wątroby występuje również w sercu, mięśniach i nerkach. Oznaczenie aktywności aminotransferaz jest metodą wykrywania zaburzeń funkcjonowania wątroby, takich jak marskość, stłuszczenie, wirusowe zapalenie wątroby, uszkodzenie polekowe, uszkodzenie toksyczne, guzy pierwotne, zapalenie dróg

⁶⁶ D. J. Yee, V. Balsanek, D. R. Bauman, T. M. Penning, D. Sames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13304-13309.

⁶⁷ H.U.Bergmeyer, M. Horder, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1980**, *18*, 521-534.

żółciowych, cholestaza.⁶⁸ Aktywność aminotransferaz w surowicy krwi może być oznaczana za pomocą metod kolorymetrycznych i spektrofotometrycznych. Zmiany poziomu aminotransferaz mogą wynikać nie tylko z uszkodzeń wątroby, ale również z interferencji ze strony leków. Zwiększenie aktywności na drodze mechanizmu fizjologicznego następuje pod wpływem działania leków przeciwbólowych (kodeina, morfina) i cholinergicznym. Natomiast leki o działaniu toksycznym zwiększają aktywność enzymów według mechanizmu farmakologicznego, uszkadzając tkankę mięśniową (barbiturany, karbromal), hepatocyty (doustne leki antykoncepcyjne, aspiryna), przez uszkodzenia cholestatyczne (estrogeny).⁶⁹ Szybki postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej i technice tasowania genów pozwolił na otrzymanie bibliotek genetycznie zmodyfikowanych transaminaz, o pożądanych charakterystykach, a ich badania metodami HTS pozwalają na szybką analizę specyficzności substratowej i enancjoselektywności.⁷⁰ Jest to szczególnie istotne przy ich zastosowaniu w organicznej syntezie chemicznej. Enzymy te są bardzo przydatne w syntezie nienaturalnych aminokwasów oraz enancjomerycznie czystych amin,⁷¹ które to z kolei są ważnymi blokami budulcowymi do syntezy peptydomimetyków, leków czy kosmetyków. Enancjomerycznie czyste związki można otrzymać na drodze trzech podejść: syntezy asymetrycznej z pro-chiralnych ketonów,⁷² rozdziału kinetycznego,⁷³ deracemizacji racemicznych związków.⁷⁴ Do tej pory opracowano niewiele metod oznaczania aktywności transaminaz, ze względu na wymianę grupy aminowej pomiędzy związkami o podobnych masach molowych i braku efektywnych metod rozróżniania ich między sobą bez wpływu na aktywność enzymów. Większość z nich opiera się na technice spektrofotometrii UV-Vis,^{75,76} a zaledwie jedna na technice konduktometrycznej.⁷⁷

Opracowana w 2004 roku metoda opierała się na monitorowaniu zmian absorbancji, zachodzącej w wyniku powstawania kompleksów α -aminokwasów z jonami miedzi. Podczas reakcji transaminowania, donor grupy aminowej, jak amina lub α -aminokwas i akceptor

⁶⁸ A. Karmen, F. Wróblewski, J. S. LaDue, *J. Clin. Invest.* **1955**, *34*, 126–133.

⁶⁹ F. Wróblewski, J. S. Ladue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1956**, *91*, 569-571.

⁷⁰ S. Mathew, G. Shin, M. Shon, H. Yun, *Biotech. Bioproc. Eng.* **2013**, *18*, 1-7.

⁷¹ S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001.

⁷² D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761 – 2766.

⁷³ D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2009**, *60*, 191-194.

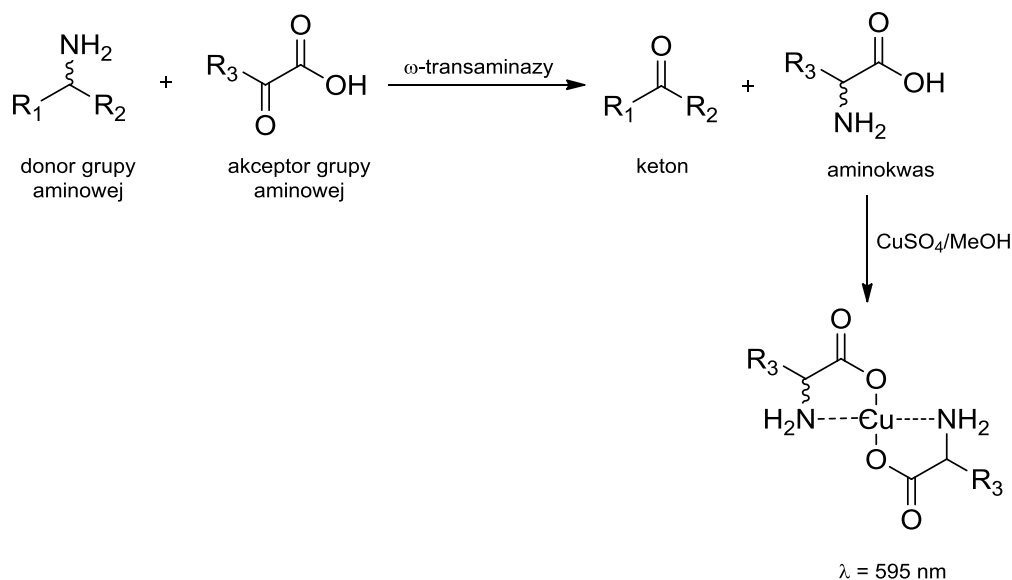
⁷⁴ D. Koszelewski, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *14*, 2289-2292.

⁷⁵ M. D. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore, N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 395-398.

⁷⁶ J. Hopwood, M. D. Truppo, N. J. Turner, R. C. Lloyd, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 773-775.

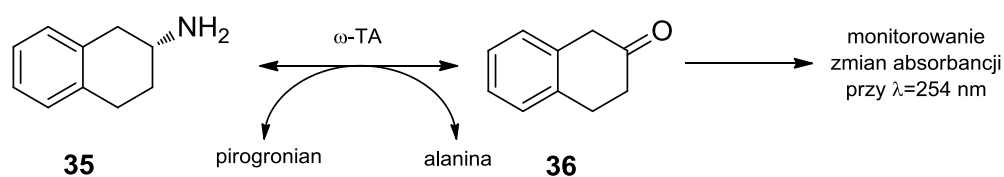
⁷⁷ S. Schatzle, M. Hohne, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2082-2086.

grupy aminowej (α -ketokwas) są przekształcane odpowiednio do ketonu lub β -ketokwasu oraz α -aminokwasu. Jeżeli do roztworu dodany zostanie $\text{CuSO}_4/\text{MeOH}$ powstający α -aminokwas tworzy kompleks z jonem miedzi o zabarwieniu niebieskim, co można śledzić za pomocą spektrofotometru przy długości fali 595 nm, Schemat 25. Pozostałe substraty aminy, β -aminokwasy, α -ketokwasy oraz produkt ketony nie tworzą barwnych kompleksów z jonami miedzi.⁷⁸



Schemat 25

Innym opublikowanym sposobem oznaczania aktywności transaminaz jest śledzenie zmian absorbancji w wyniku przekształcania (*S*)-2-aminotetraliny (**35**) do tetragonu (**36**) o niebieskim zabarwieniu, Schemat 26.⁷⁹



Schemat 26

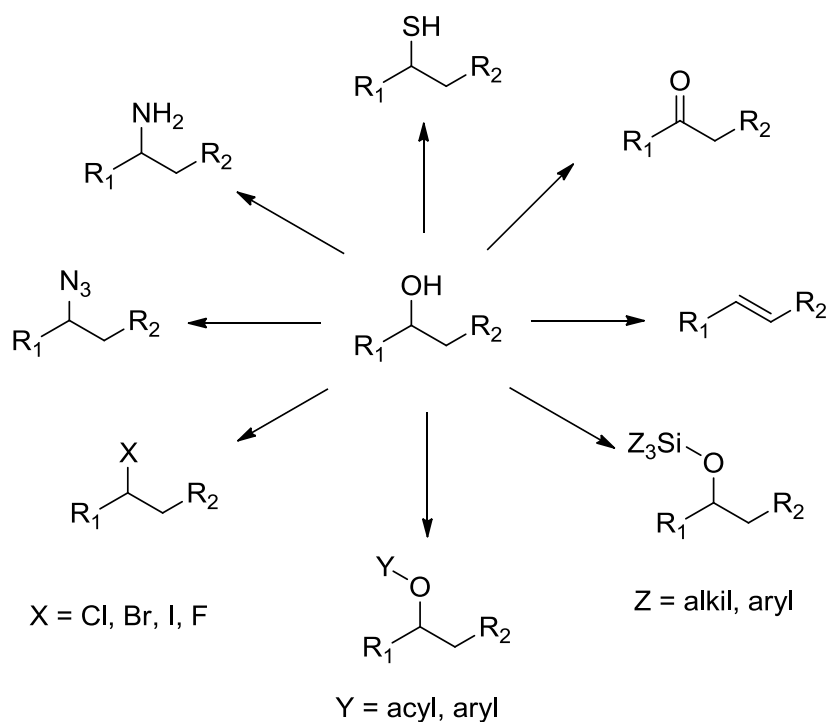
5. Znaczenie chiralnych drugorzędowych alkoholi

Synteza złożonych związków organicznych zawierających kilka centrów stereogenicznych wymaga dostarczenia enancjomerycznie czystych substratów. W przypadku

⁷⁸ B.-Y. Hwang, B.-G. Kim, *Enzym. Microb. Technol.* **2004**, *34*, 429–436.

⁷⁹ A. R. Martin, R. DiSanto, I. Plotnikov, S. Kamat, D. Shonnar, S. Pannuri, *Biochem. Eng. J.* **2007**, *37*, 246-255.

API szczególnie istotna jest konfiguracja na centrach stereogenicznych, gdyż wszystkie stereoisomery substancji aktywnej mogą mieć zupełnie inne właściwości farmakologiczne. Różnice we właściwościach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych poszczególnych enancjomerów przyczyniają się do potrzeby charakteryzowania leków dopuszczonych do obrotu pod kątem ich składu enancjomerycznego.⁸⁰ Związki enancjomerycznie czyste można pozyskać ze źródeł naturalnych, ale często niezbędne jest zastosowanie enancjomerów, które niewystępują w naturze, a których otrzymanie możliwe jest jedynie na drodze stereoselektywnej syntezy organicznej. Szczególnie istotnymi blokami budulcowymi są chiralne drugorzędowe alkohole, gdyż grupa hydroksylowa może być w prosty sposób przekształcona w inne grupy funkcyjne, grupy opuszczające, utleniona czy zredukowana, Schemat 27.⁸¹



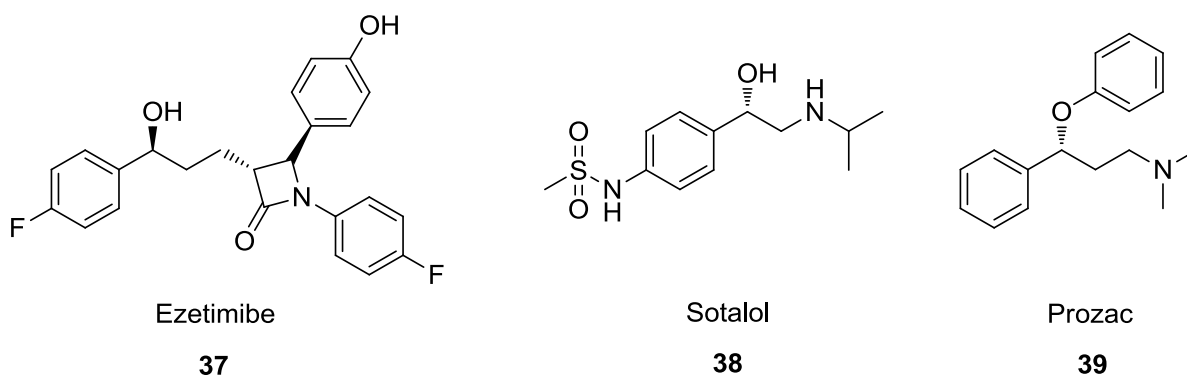
Schemat 27^[98]

Przykładem drugorzędowych alkoholi stosowanych w postaci enancjomerycznie czystych API są Ezetimibe (**37**) i Sotalol (**38**) oraz otrzymywany z alkoholu Prozac (**39**) (Schemat 28). W syntezie totalnej tych związków, jako jeden z etapów, powszechnie stosuje się katalizowany hydrolazami rozdział kinetyczny.⁸²

⁸⁰ B. Grodner, D. Sitkiewicz, *Psychiatria Polska* **2013**, 3, 511–518.

⁸¹ D. J. Trader, E. E. Carlson, *Mol. BioSyst.* **2012**, 8, 2484-2493.

⁸² G. V. More, K. C. Badgujar, B. M. Bhanage, *RSC Adv.* **2015**, 5, 4592-4598.



Schemat 28

5.1. Biokatalityczne metody otrzymywania enancjomerycznie czystych drugorzędowych alkoholi

Enancjomerycznie czyste drugorzędowe alkohole są ważnymi blokami budulcowymi do syntezy wielu związków biologicznie czynnych. Dlatego poszukiwanie nowej drogi syntezy jest szczególnie istotne. Od momentu odkrycia lowastatyny **42** w latach 70,⁸³ badania nad otrzymaniem jej nowych analogów o potencjalnych właściwościach inhibujących reduktazę HMG-CoA cieszą się szczególnym zainteresowaniem. Uważa się, że reszta laktonowa lowastatyny jest kluczowym fragmentem struktury odpowiedzialnym za jej aktywność biologiczną, Schemat 29. Odpowiednie enancjomerycznie czyste laktony są syntonami niezbędnymi do otrzymania szerokiej gamy analogów lowastatyny. Dlatego też podjęto wiele badań nad otrzymaniem podstawionych pochodnych tetrahydro-4-hydrokso-2H-pyran-2-onu (**41**).⁸⁴ Odpowiednią strukturę laktonu **41** można uzyskać poprzez wewnątrzcząsteczkową cyklizację 3,5-dihydrokso estrów **40**.^{85,86} Aby otrzymać dihydroksoestry o odpowiedniej konfiguracji prowadzi się enzymatyczny rozdział kinetyczny⁸⁷ lub dynamiczny rozdział kinetyczny⁸⁸ 5-hydrokso-3-oksoestrów lub enzymatyczną redukcję⁸⁹ 3,5-dioksoestrów, a następnie diastereoselektywną redukcję chemiczną.

⁸³ G. Beck, K. Kessler, E. Baader, W. Bartmann, A. Bergmann, E. Granzer, H. Jendrilla, B. v. Kerekjarto, R. Krause, E. Paulus, W. Schubert, G. Wess *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 52-60.

⁸⁴ C. Bonini, P. Pucci, L. Viggiani, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4050-4052.

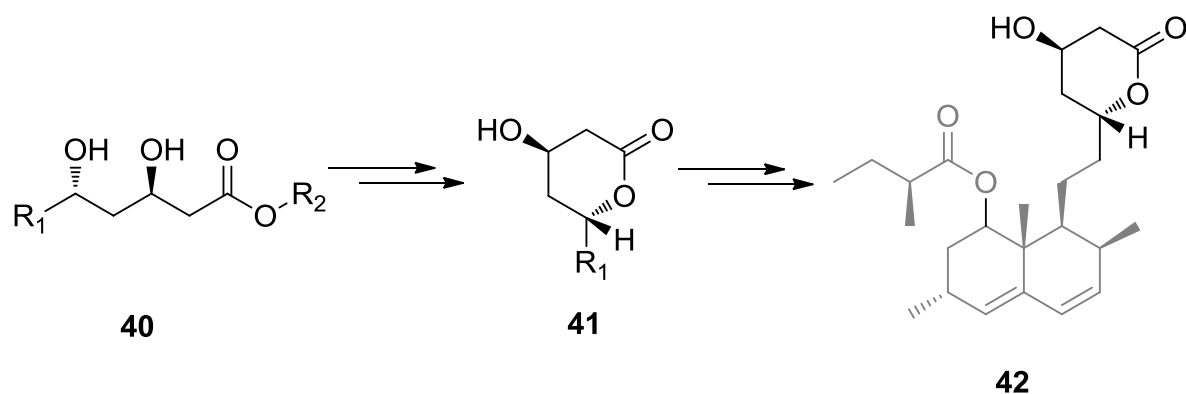
⁸⁵ C. Bonini, P. Pucci, R. Racioppi, L. Viggiani, *Tetrahedron Asymm.* **1992**, *3*, 29-32.

⁸⁶ B. Henkel, A. Kunat, H. Schick, *Tetrahedron: Asymm.* **1993**, *4*, 153-156.

⁸⁷ C. Xu, C. Yuan, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2169-2186.

⁸⁸ S. Lüdeke, M. Richter, M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 253-259.

⁸⁹ M. Wolberg, W. Hummel, M. Müller, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4562-4571.

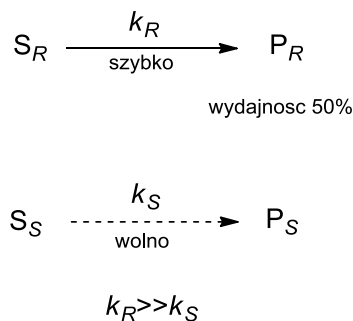


Schemat 29

W kolejnych rozdziałach opisano najczęściej stosowane metody otrzymywania enancjomerycznie czystych alkoholi drugorzędowych z zastosowaniem biokatalizatorów, takich jak rozdział kinetyczny, dynamiczny rozdział kinetyczny, enzymatyczna redukcja, enzymatyczna reakcja aldolowa. Szczególny nacisk położono na chemoenzymatyczne metody, prowadzące do otrzymania 5-podstawionych-3,5-dihydroksyestrów kwasu pentanowego, będących syntonami do syntezy analogów lowastatyny.

5.1.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny

Najczęściej stosowaną metodą otrzymywania związków enancjomerycznie czystych jest rozdział kinetyczny mieszanin racemicznych. Enzymatyczny rozdział kinetyczny możliwy jest dzięki różnej szybkości przekształcania każdego z enancjomerów substratu w produkt przez enzym. Różnice w szybkościach reakcji są wynikiem różnego dopasowania przestrzennego enancjomerów substratu do centrum aktywnego enzymu. Aby rozdział kinetyczny był efektywny, enzym musi przekształcać jeden z enancjomerów substratu z dużo większą szybkością niż drugi, co ilustruje Schemat 30.⁹⁰

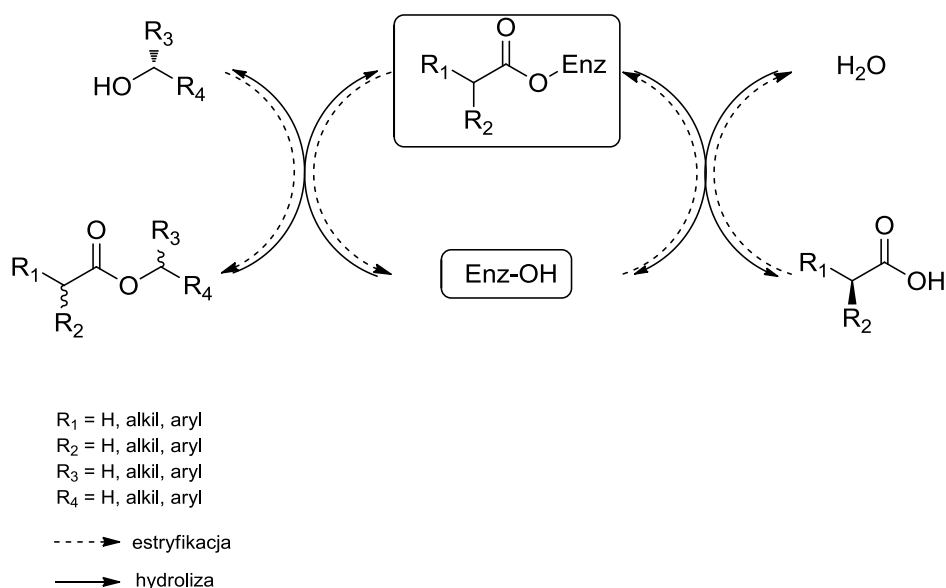


Schemat 30

⁹⁰ O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 407-413.

Produkt o wysokiej czystości enancjomerycznej może być otrzymany, gdy konwersja nie przekroczy 50%, a enzym przekształca z większą szybkością enancjomer lepiej dopasowany do centrum aktywnego. Powyżej 50% konwersji, stężenie szybciej reagującego enancjomeru jest bardzo niewielkie, dlatego też enzym przekształca coraz więcej drugiego z enancjomerów i tym samym spada czystość enancjomeryczna produktu. Analogicznie odbywa się to dla nieprzereagowanego substratu, dla którego wysoką czystość enancjomeryczną można uzyskać przy konwersji powyżej 50%. Dlatego też istotna jest optymalizacja warunków prowadzenia reakcji (czasu temperatury, rozpuszczalnika, środowiska pH, zawartości wody, użytego enzymu).

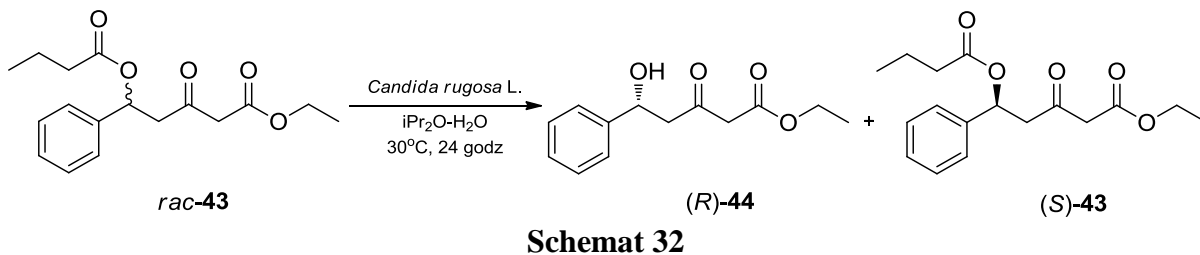
Do procesu hydrolizy estrów kwasów karboksylowych najczęściej wykorzystuje się hydrolazy. Enzymy te posiadają szeroką specyficzność substratową, ponadto nie wymagają stosowania dodatkowych małowczątkowych związków, czyli tzw. kofaktorów. Reakcje takie są prowadzone w wodzie, mieszaninie wody z rozpuszczalnikami organicznymi lub w rozpuszczalnikach organicznych. Hydroliza estrów kwasów karboksylowych katalizowana przez enzymy jest procesem kilkietapowym, co pokazuje Schemat 31.⁹¹ Zgodnie z powszechnie przyjętym mechanizmem, w pierwszym etapie tworzy się produkt pośredni w postaci acylovanego enzymu oraz alkohol, następnie produkt pośredni reaguje z wodą dając produkt w postaci kwasu karboksylowego z jednoczesnym odtworzeniem wolnego enzymu. Jeżeli substrat jest związkiem racemicznym, możliwa jest reakcja tylko z jednym z enancjomerów.



Schemat 31

⁹¹ L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4524.

Przykład rozdziału kinetycznego estru alkoholu drugorzędowego przedstawiono na Schemacie 32. W wyniku enzymatycznej hydrolizy związku *rac*-**43** otrzymano ester etylowy kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-okso-pentanowego ((*R*)-**44**) (wydajność 47%, *E*>200) oraz nieprzereagowany substrat (*S*)-**43**.⁹²



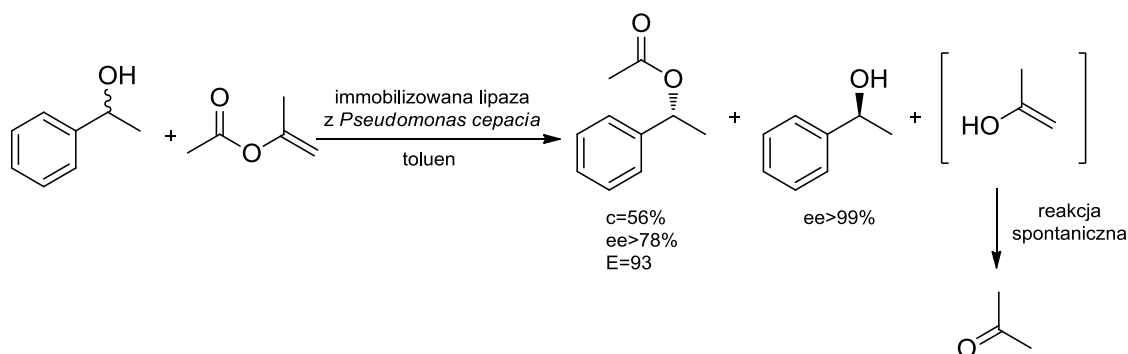
Lipazy ze względu na swoją funkcję fizjologiczną w organizmach żywych, polegającą na hydrolizie wiązań estrowych w tłuszczach, nadają się do katalizowania reakcji nie tylko w wodzie. Możliwe jest zastosowanie tych enzymów również w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych z niewielkim dodatkiem wody, niezbędnym do zachowania struktury przestrzennej i właściwości katalitycznych. Polarne rozpuszczalniki stosuje się jedynie do poprawy rozpuszczalności, gdyż dezaktywują one enzymy przez denaturację białka. Wyeliminowanie wody z układu reakcyjnego umożliwia przeprowadzenie reakcji odwrotnej, czyli estryfikacji bądź transestryfikacji. Podczas estryfikacji kwasów karboksylowych w pierwszym etapie tworzy się produkt pośredni w postaci acylowanego enzymu i wody, następnie produkt pośredni reaguje z alkoholem dając produkt w postaci estru kwasu karboksylowego z jednoczesnym odtworzeniem wolnego enzymu. Jeżeli któryś z substratów jest związkiem racemicznym, możliwa jest reakcja tylko z jednym z enancjomerów.

Reakcje enzymatyczne są procesami odwracalnymi, co niekorzystnie wpływa na przesunięcie równowagi reakcji i uzyskiwanie produktów z mniejszymi nadmiarami enancjomerycznymi. Jeżeli zamiast kwasu karboksylowego zastosowany zostanie odpowiedni ester enolu, bezwodnika lub oksymu to proces ten będzie nieodwracalny, a równowaga reakcji zostanie przesunięta na korzyść produktu. Powstający w reakcji transestryfikacji enol alkoholu ulega następnej tautomeryzacji do acetaldehydu lub acetonu, w zależności czy zastosowano ester winylu czy propenylu, Schemat 33.⁹³ Możliwe jest

⁹² C. Xu, C. Yuan, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2169–2186.

⁹³ A. Ghanem, V. Schurig, *Monatshefte für Chemie* **2003**, *134*, 1151–1157.

również zastosowanie innych donorów grup alkoksylowych niż alkohole, np. węglanów, ortowęglanów, ortoestrów czy acetai.⁹⁴



Schemat 33

Inna metoda syntezy polega na zastosowaniu chiralnych racemicznych kwasów karboksylowych, które w reakcji z racemicznymi alkoholami dają racemiczne mieszaniny diastereoizomerycznych estrów, które można za pomocą chromatografii lub diastereoselektywnej krystalizacji rozdzielić na poszczególne diastereoizomery. Maksymalna wydajność procesu rozdzielania kinetycznego wynosi 50%, ale istnieje kilka sposobów zwiększenia wydajności. Możliwe jest to poprzez zastosowanie związków mezo,⁹⁵ stereoinwersja nieprzereagowanego substratu⁹⁶ lub zastosowanie reagentów racemizujących w wariacie dynamicznego rozdzielania kinetycznego. Diole o różnej strukturze, np. mezo-diole, C2-symetryczne diole, racemiczne diole posiadające pierwszo- i drugorzędową grupę hydroksylową^{97,98} powszechnie stosuje się jako substraty w katalizowanej lipazami desymetryzacji z użyciem octanu winylu w rozpuszczalnikach organicznych w celu otrzymania chiralnych bloków budulcowych o wysokiej czystości stereoizomerycznej.

5.1.2. Dynamiczny rozdział kinetyczny

Aby nie stracić połowy racemicznego substratu coraz częściej stosuje się praktykę połączenia *in-situ* enzymatycznego rozdzielania kinetycznego z etapem racemizacji. Dzięki takiemu zabiegowi możliwe jest otrzymanie enancjomerycznie czystego produktu z maksymalną wydajnością 100%. Aby dynamiczny rozdział kinetyczny przebiegał z dużą wydajnością proces musi być nieodwracalny, stosunek szybkości reakcji jednego

⁹⁴ A. Brodzka, D. Koszelewski, M. Cwiklak, R. Ostaszewski, *Tetrahedron: Asymm.* **2013**, *24*, 427–433.

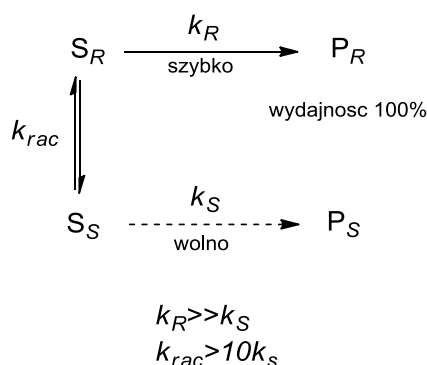
⁹⁵ E. Schoffers, A. Golebiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769.

⁹⁶ H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1-16.

⁹⁷ F. Theil, *Methods Biotechnol.* **2001**, *15*, 277-289.

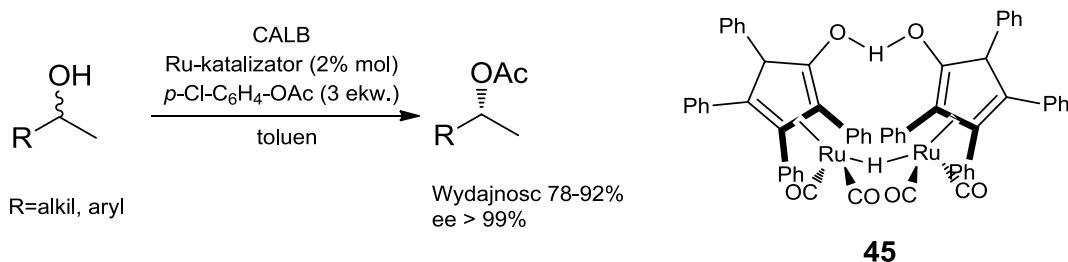
⁹⁸ A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Chirality* **2005**, *17*, 1-15.

enancjomeru do drugiego powinien być większy od 20, szybkość racemizacji powinna być 10 krotnie większa niż szybkość reakcji szybciej reagującego enancjomeru, produkt nie może ulegać racemizacji, a reakcja spontaniczna nie powinna mieć miejsca, Schemat 34.⁹⁹



Schemat 34

Racemizację substratu można osiągnąć kilkoma sposobami: poprzez racemizację termiczną, racemizację katalizowaną zasadami, kwasami lub enzymami, racemizację w wyniku reakcji redoks oraz w wyniku generowania rodników. Pierwsze badania nad DKR-em alkoholi zostały opisane w 1996.¹⁰⁰ Reakcja polegała na jednoczesnym racemizowaniu drugorzędowego alkoholu przez katalizator metaliczny i enzymatycznym acylowaniu. Pomimo tego, że reakcja zachodziła z umiarkowanymi wydajnościami (76% konwersja 80% ee oraz 60% konwersja i 98% ee) praca ta pokazała, że kombinacja kompleksów metali przejściowych z enzymami jest możliwa. W kolejnych latach grupa Bäckvall'a opracowała efektywny system DKR oparty na octanie *p*-chlorofenyłu jako donorze grupy acylowej oraz katalizatorze rutenowym o wzorze **45** do racemizacji arylowych i alkiowych alkoholi drugorzędowych, Schemat 35.



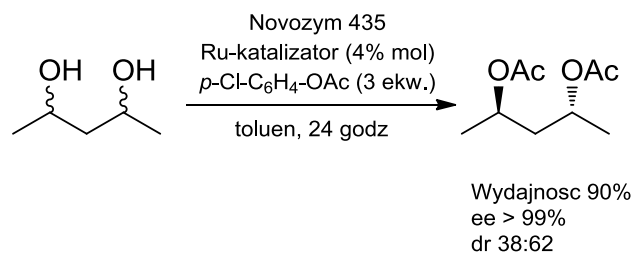
Schemat 35

Park i współpracownicy zaproponowali nowy, zmodyfikowany katalizator rutenowy, dzięki czemu możliwa była racemizacja drugorzędowych alkoholi nawet w temperaturze

⁹⁹ U. T. Strauss, U. Felfler, K. Faber, *Tetrahedron Asymm.* **1999**, *10*, 107-117.

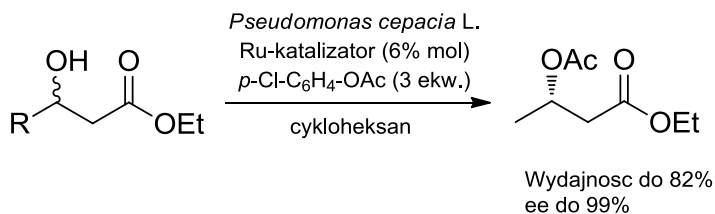
¹⁰⁰ P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *42*, 7623.

pokojujowej.¹⁰¹ Ponadto odkryli, że dodatek węglanu sodu lub sit molekularnych w znacznym stopniu zwiększa wydajność reakcji oraz nadmiar enancjomeryczny uzyskiwanego produktu. Opracowany katalizator rutenowy znalazł również zastosowanie do podwójnego DKR-u (dDKR) drugorzędowych symetrycznych dioli, Schemat 36. Produkty otrzymywano z wysokimi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi, niezależnie czy były to 1,2-diole, 1,3-diole czy 1,4-diole.¹⁰² Jednak w przypadku 1,3-dioli i 1,4-dioli diastereoselektywności były stosunkowo niskie.¹⁰³



Schemat 36

Ponadto procedura DKR może być zastosowana do sfunkcjonalizowanych alkoholi, takich jak α - i β -hydroksyestry. Bäckvall zastosował do tego celu immobilizowany enzym z *Pseudomonas cepacia*, octan *p*-chlorofenylowy jako donor grupy acylowej w cykloheksanie otrzymując produkty ze średnimi i dobrymi wydajnościami, patrz Schemat 37.^{104,105} Zastosowanie katalizatora rutenowego nie wymaga zastosowania zasad, co jest istotne, ze względu na możliwą racemizację powstającego octanu w warunkach zasadowych.



Schemat 37

Koncepcja ta została zastosowana również do γ - i δ -hydroksyestrów kwasów karboksylowych, które mogą być z łatwością przekształcone do laktonów, które to z kolei są strukturą wiodącą wielu związków naturalnych, np. feromonów.¹⁰⁶ W opracowanych

¹⁰¹ J. H. Choi, Y. H. Kim, S. H. Nam, S. T. Shin, M. J. Kim, J. Park *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2373.

¹⁰² B. A. Persson, F. F. Huerta, J. E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5237.

¹⁰³ R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.

¹⁰⁴ F. F. Huerta, Y. R. S. Laxmi, J. E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1037.

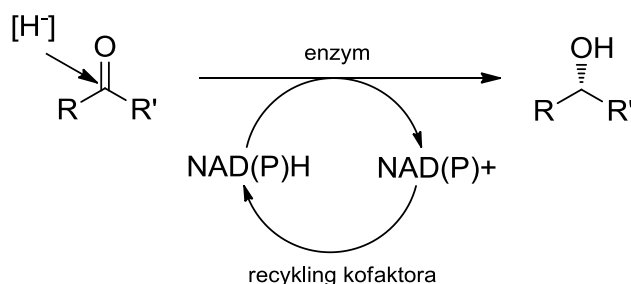
¹⁰⁵ F. F. Huerta, Y. R. S. Laxmi, J. E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1209

¹⁰⁶ Y. Wu, L. Esser, J. K. De Brabander, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4308.

warunkach reakcji poddano również azydoalkohole, hydroksynitryle i halogenoalkohole.^{107,108,109}

5.1.3. Redukcja enzymatyczna

Pojedyńcze enancjomery alkoholi drugorzędowych można otrzymać na drodze enzymatycznej reakcji redoks. W tym celu jako biokatalizatory stosuje się oksydoreduktazy, takie jak: dehydrogenazy, oksigenazy i oksydazy. Spośród nich dehydrogenazy są szeroko stosowane do redukcji karbonylowej grupy aldehydów i ketonów oraz redukcji wiązań podwójnych. Mechanizm działania dehydrogenaz wymaga udziału kofaktorów w postaci dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) lub jego fosforanu (NADPH). Kofaktory te są nośnikami anionu wodorkowego, który atakuje węgiel grupy karbonylowej ketonu związanego z centrum aktywnym enzymu, prowadząc do powstania nowego centrum stereogenicznego, co zostało pokazane na Schemacie 38.



Schemat 38

Mechanizm został opisany przez Preloga w 1964¹¹⁰ i od jego nazwiska pochodzi nazwa reguły określającej stereoselektywność dehydrogenaz. Reguła ta mówi, że przeniesienie anionu wodorkowego na atom węgla grupy karbonylowej następuje od strony *re* z wytworzeniem alkoholu o konfiguracji (*S*), a atak od strony *si* prowadzi do alkoholu o konfiguracji (*R*). Większość dostępnych handlowo dehydrogenaz działa zgodnie z regułą Preloga, takich jak: alkoholowa dehydrogenaza z wątroby końskiej, alkoholowa dehydrogenaza z drożdży, alkoholowa dehydrogenaza z *Thermoanaerobium brockii*. Zdarzają się jednak odstępstwa od tej reguły (*Lactobacillus kefir*).¹¹¹ Przeciwny proces utlenienia alkoholi prowadzi do destrukcji centrum stereogenicznego i może być

¹⁰⁷ O. Pamies, J. E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1418.

¹⁰⁸ O. Pamies, J. E. Bäckvall, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 947.

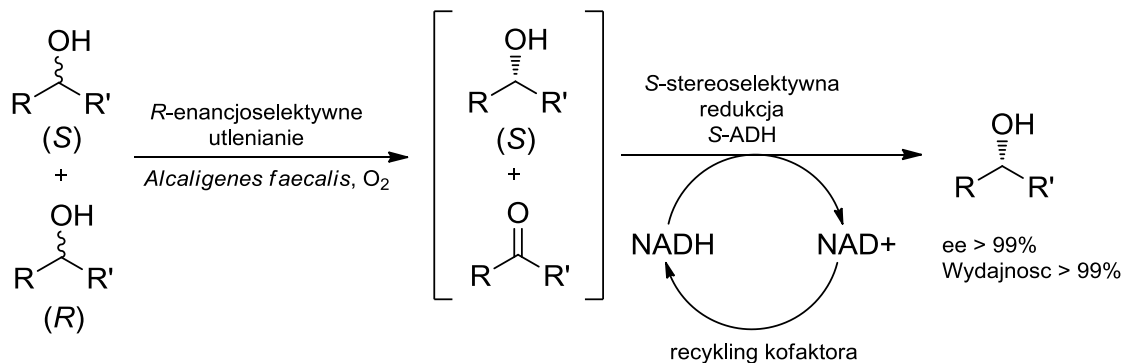
¹⁰⁹ O. Pamies, J. E. Bäckvall *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9006.

¹¹⁰ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119.

¹¹¹ D. H. R. Barton, F. Kalley, N. Ozbalik, E. Young, G. Balavoine, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7144.

wykorzystywany

w reakcji kaskadowej do otrzymywania związków o wysokiej czystości enancjomerycznej z teoretyczną wydajnością 100%, co zostało zilustrowane na Schemacie 39.¹¹² Enancjomer (*R*)-alkoholu jest utleniany do ketonu, a następnie selektywnie redukowany do (*S*)-alkoholu.



Schemat 39

Zastosowanie izolowanych enzymów wymaga zastosowania kofaktorów w ilości molowej lub opracowania wydajnego systemu regeneracji, gdyż ceny kofaktorów są bardzo wysokie. Zastosowanie takiego systemu katalitycznego wiąże się z poniesieniem wysokich kosztów w przypadku produkcji na skalę przemysłową. Rozwiązaniem problemu może być zastosowanie całych komórek mikroorganizmów, które będą w wyniku procesów metabolicznych regenerować kofaktory. W tym przypadku można zastosować tanie źródła węgla w postaci glukozy lub sacharozy. Najpowszechniej stosowanymi mikroorganizmami są drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*, które wykazują szerokie spektrum substratowe, możliwość działania w rozpuszczalnikach organicznych z niewielkim dodatkiem wody oraz dużą dostępnością handlową w bardzo niskiej cenie. Zastosowanie całych komórek mikroorganizmów oprócz szeregu zalet ma również kilka niedogodności, jak niskie konwersje spowodowane toksycznością wielu związków organicznych, co wiąże się ze stosowaniem niskich stężeń substratów. Drożdże są mało produktywne, dlatego stosuje się dużą ilość biomasy, co prowadzi do niskiego odzysku produktu, zwłaszcza jeśli produkt znajduje się wewnątrz komórek i jego ekstrakcja do medium jest problematyczna. Tylko część substratów pomocniczych jest wykorzystywana do regeneracji kofaktorów (0.5-2%), a reszta jest poddawana metabolizmowi, co prowadzi do powstania wielu polarnych produktów ubocznych, które utrudniają oczyszczanie właściwego produktu. Powtarzalność wyników w dużej mierze zależy od użytej kultury mikroorganizmów, które charakteryzują się dużą specyficnością, dlatego bardzo ważne jest używanie tej samej kultury co opisana w

¹¹² C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 741-745.

literaturze. Zwiększenie selektywności można uzyskać poprzez stosowanie grup zabezpieczających, które można będzie następnie usunąć, immobilizację, stosowanie komórek w różnym wieku, stosowanie różnych warunków fermentacji, selektywną inhibicję enzymów o określonej stereopreferencji, badania przesiewowe nad różnymi szczepami mikroorganizmów oraz dodatek rozpuszczalników organicznych.¹¹³ Drożdże piekarskie tolerują ketony podstawione szeroką gamą grup funkcyjnych, takich jak: heterocykliczna, fluoro-, chloro-, bromo-, perfluoroalkilo-, cyjano, azydo-, nitro-, hydroksy-, tiolo-, silylo-.¹¹⁴

Tabela 1. Wpływ wielkości podstawnika na uzyskiwane nadmiary enancjomeryczne produktu.

R ₁	R ₂	Konfiguracja produktu	ee [%]
Me	Et	<i>S</i>	67
CF ₃	CH ₂ -Br	<i>S</i>	>80
Me	<i>n</i> -Bu	<i>S</i>	82
Me	Ph	<i>S</i>	89
Me	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	<i>S</i>	>95

Długołańcuchowe ketony oraz ketony podstawione zatłoczonymi sterycznie grupami fenyłowymi nie są akceptowane jako substraty. Jeżeli jeden podstawnik jest długołańcuchową grupą alkilową, aby był dobrym substratem dla drożdży, drugi podstawnik musi być grupą metylową. Najwyższe nadmiary enancjomeryczne są otrzymywane, gdy podstawniki znacznie różnią się wielkością, Tabela 1.¹¹⁵

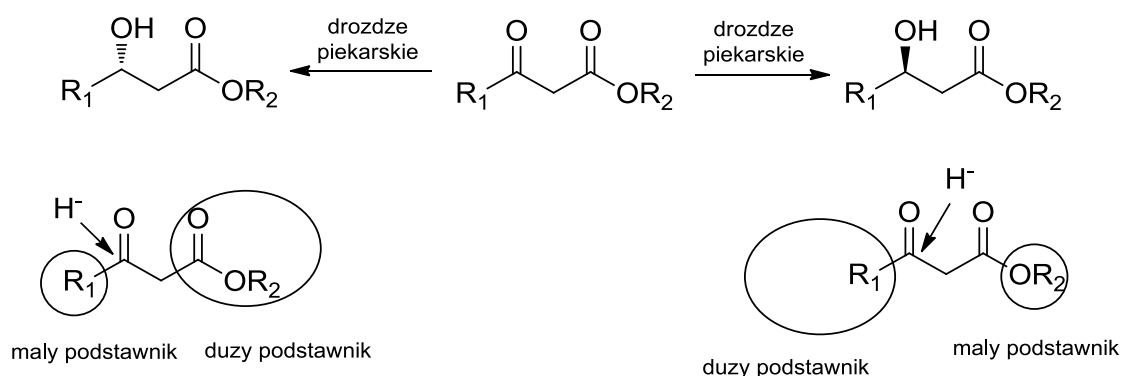
Acykliczne β-ketoestry są redukowane do β-hydroksyestrów, które to z kolei są ważnymi blokami budulcowymi do syntezy β-laktamów, feromonów owadów oraz karotenoidów. Jest to oczywiste, że enancjoselektywność i stereopreferencja anionu wodorkowego na atak nukleofilowy od strony *re*- bądź *si*- β-ketoestrów zależy od relatywnej wielkości podstawnika alkoksylogowego oraz podstawnika w pozycji ω, Schemat 40. Można sterować konfiguracją uzyskiwanego produktu poprzez modyfikację substratu. Podstawienie

¹¹³ O. Rotthaus, D. Krüger, M. Demuth, K. Schaffner, *Tetrahedron* **1997**, 53, 935-938.

¹¹⁴ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry 5th Edition* **2004**, Springer

¹¹⁵ R. Macleod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi, H. S. Mosher, *Biochemistry* **1964**, 3, 838.

krótko- lub długołańcuchowymi- grupami w pozycji R₁ oraz R₂ powoduje zmianę relatywnych wielkości podstawników, Tabela 2.



Schemat 40

Tabela 2. Wpływ wielkości podstawników na stereopreferencję enzymu.

R ₁	R ₂	Konfiguracja produktu	ee [%]	Lit.
CH ₂ -Cl	Me	<i>S</i>	64	128
CH ₂ -Cl	Et	<i>S</i>	54	116
CH ₂ -Cl	<i>n</i> -Pr	<i>S</i>	27	117
CH ₂ -Cl	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	<i>R</i>	97	135
CCl ₃	Et	<i>S</i>	85	134
CH ₂ -Br	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	<i>R</i>	100	134
Ph	Et	<i>S</i>	88	118

Powodem różnego zachowania się szczepów drożdży piekarskich jest obecność kilku dehydrogenaz, często o przeciwnych preferencjach stereochemicznych, co może prowadzić do obniżenia czystości enancjomerycznej produktu. W konsekwencji ukierunkowanie redukcji w stronę jednego z enancjomerów może się odbywać na drodze odpowiedniego doboru substratu lub inhibicji dehydrogenaz o określonej enancjopreferencji. Inhibicja (*R*)-selektywnego enzymu, prowadząca do zwiększenia ilości powstającego (*S*)-β-hydroksyestru, odbywa się poprzez dodatek alkoholu allilowego¹¹⁹ oraz ketonu metyloowo-winylowego,¹²⁰ a także poprzez immobilizację enzymu na żelu poliuretanowym.¹²¹ Jak można się spodziewać inhibitory (*R*)-selektywnego enzymu prowadzą do zwiększenia

¹¹⁶ P. Deshong, M.-T. Lin, J. J. Perez, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2091.

¹¹⁷ C. Fuganti, P. Grasselli, P. F. Seneci, P. Casati, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5275.

¹¹⁸ A. Varga, V. Zaharia, M. Nógrádi, L. Poppe, *Tetrahedron Asymm.* **2013**, 24, 1389-1394

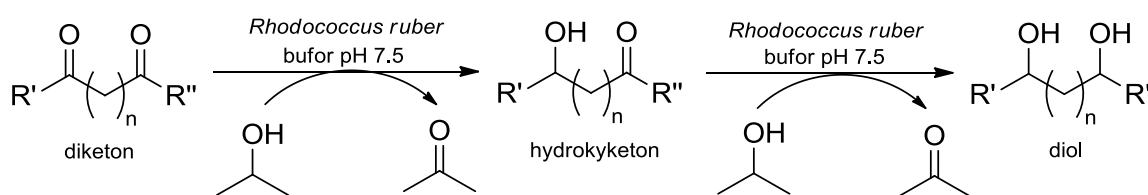
¹¹⁹ K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Chem. Lett.* **1987**, 679.

¹²⁰ K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 875.

¹²¹ K. Nakamura, M. Higaki, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 4213

czystości optycznej (*S*)- β -hydroksyestru, natomiast dodatek różnych halogenooctanów¹²² oraz bromku allilu¹²³ prowadzi do selektywnej inhibicji (*S*)-selektywnego enzymu. Również dodatek kwasów tłuszczowych¹²⁴ oraz związków siarki¹²⁵ powoduje zwiększenie czystości enancjomerycznej powstającego (*R*)- β -hydroksyestru.

Szerokie spektrum ketonów i diketonów (Schemat 41) może być regio- i stereoselektywnie redukowane z zastosowaniem dehydrogenaz prowadząc do chiralnych drugorzędowych alkoholi za pomocą liofilizowanych komórek z mikroorganizmu *Rhodococcus ruber*, zawierających dehydrogenazę ADH-‘A’. 2-propanol został zastosowany jako donór wodoru, a także jako korozpuszczalnik poprawiający rozpuszczalność substratów.¹²⁶



R' = Me, Et
 R'' = Me, Et, *n*-Bu
 n = 0-2

Schemat 41

Inną metodą prowadzącą do otrzymywania dioli jest synteza chemoenzymatyczna, Schemat 42 oraz Tabela 3.

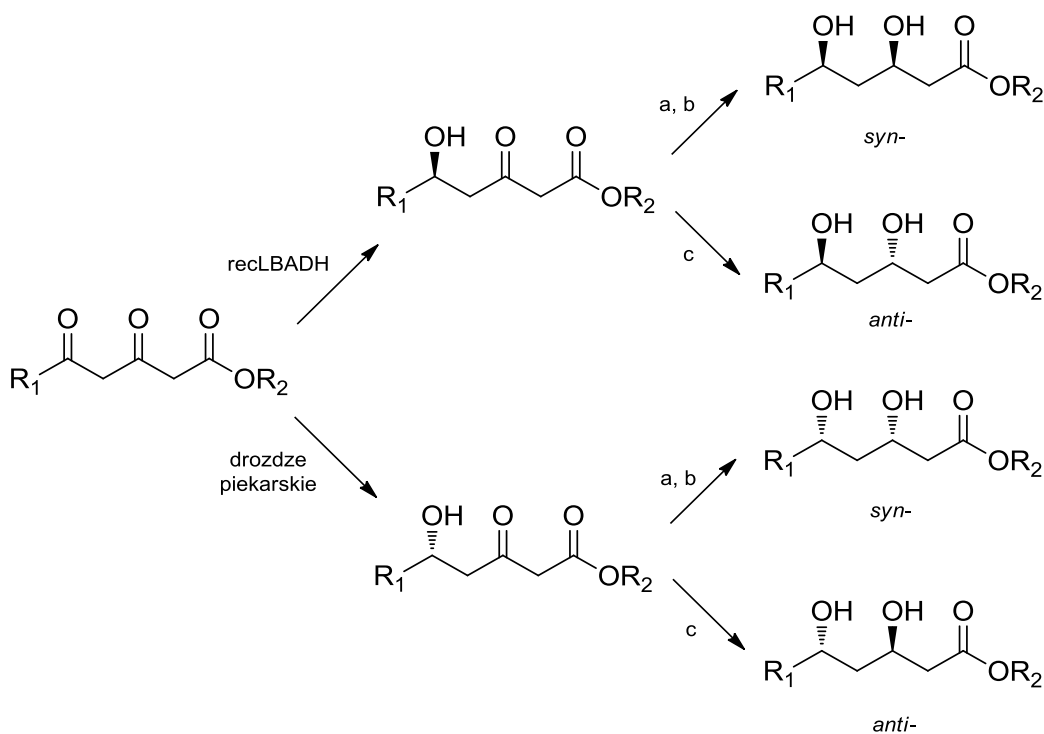
¹²² K. Nakamura, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 267.

¹²³ K. Ushio, J. Hada, Y. Tanaka, K. Ebra, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, 15, 222.

¹²⁴ K. Ushio, K. Ebara, T. Yamashita, *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, 13, 834.

¹²⁵ R. Hayakawa, K. Nozawa, K. Kimura, M. Shimizu, *Tetrahedron* **1999**, 55, 7519.

¹²⁶ K. Edegger, W. Stampfer, B. Seisser, K. Faber, S. F. Mayer, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1904-1909.



- a) 1. B(OMe)Et₂, THF/MeOH (80:20 v/v), -70°C, 20min. 2. NaBH₄, -70°C, 3 godz.
 b) H₂O₂, THF/woda (70:30 v/v, pH 9), 0°C->temp. pok., 30min.
 c) Me₄N[B(OAc)₃H], MeCN/AcOH (50:50, v/v), -25°C, 5 godz.

Schemat 42

Tabela 3. Chemoenzymatyczna redukcja β,δ-diketoestrów za pomocą recLBADH.

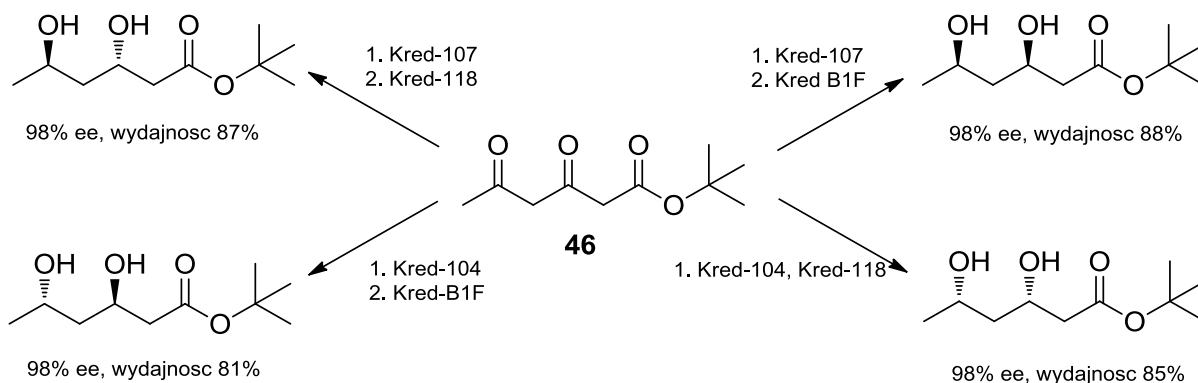
R ₁	R ₂	Konfiguracja produktu	Wydajność [%]	ee [%]	dr ^[a] (syn:anti)
CH ₂ Cl	<i>t</i> -Bu	<i>S</i>	72	>99.5	
CH ₂ Cl	<i>t</i> -Bu	<i>R</i> ^[b]	50	94	
CH ₃	<i>t</i> -Bu	<i>R</i>	77	99.4	
CH ₂ CH ₃	<i>t</i> -Bu	<i>R</i>	61	98.1	
CH ₂ Cl	<i>t</i> -Bu	<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	62	>99.5	205:1 (28:1)
CH ₂ Cl	<i>t</i> -Bu	<i>syn</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	52	98 (90)	187:1 (45:1)
CH ₂ Cl	<i>t</i> -Bu	<i>anti</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	70	>99.5	1:211 (1:14)
CH ₂ Cl	<i>t</i> -Bu	<i>anti</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	68	99.3 (94)	1:316 (1:18)

[a] stosunek diastereoizomerów podano dla przekrystalizowanych produktów, a dla surowych produktów wartości podano w nawiasie; [b] reakcja katalizowana drożdżami piekarskimi

W pierwszym etapie z β,δ-diketoestrów w wyniku enzymatycznej regio- i enancjoselektywnej redukcji katalizowanej alkoholową dehydrogenazą z *Lactobacillus brevis* (recLBADH) otrzymywano czyste enancjomerycznie δ-hydrokso-β-ketoestry. Zastosowanie drożdży piekarskich umożliwiło otrzymanie δ-hydrokso-β-ketoestrów o przeciwnej konfiguracji. Następnie za pomocą reagentów chemicznych związki te stereoselektywnie zredukowano do β,δ-dihydroksoestrów. Połączenie redukcji katalizowanej enzymatycznie z

redukcją chemiczną umożliwiało otrzymanie wszystkich diastereoizomerów z wysokimi czystościami stereoizomerycznymi.¹²⁷

W 2012 roku opublikowano metodę pozwalającą na uzyskanie β,δ -dihydroksyestrów w jednoetapowej reakcji kaskadowej z zastosowaniem ketoreduktaz (KRED). Badania przeprowadzono na estrze *tert*-butylowym kwasu β,δ -diketoheksanowego **46** jako związku modelowym, Schemat 43. Wyizolowano wszystkie diastereoizomery z bardzo wysokimi wydajnościami, nadmiarami enancjomerycznymi oraz nadmiarami diastereomerycznymi.¹²⁸



Schemat 43

5.1.4. Reakcja aldolowa i dekarboksylatywna reakcja aldolowa

Reakcja aldolowa jest jedną z ważniejszych reakcji tworzenia wiązań C-C szeroko stosowaną w chemii organicznej do syntezy hydroksyketonów. Otrzymanie produktów z wysokimi wydajnościami wymaga jednak stosowania ostrych warunków reakcji, silnych zasad, katalizatorów metalicznych¹²⁹ czy organokatalizatorów.¹³⁰ Katalizatory te charakteryzują się wysoką efektywnością i zapewniają wysokie enancjoselektywności powstających produktów, ale nie spełniają wymagań zielonej chemii. Naturalnymi katalizatorami reakcji aldolowej są aldolazy, które uczestniczą w biosyntezie ketokwasów, węglowodanów i aminokwasów w organizmach żywych. Ze względu na odwracalność reakcji aldolazy posiadają zdolność do katalizowania reakcji kondensacji aldolowej, jak również reakcji retro-aldolowej.¹³¹ Enzymy, w szczególnych przypadkach, mogą katalizować reakcje „niekonwencjonalne”. Zjawisko to określa się mianem promiskuityzmu (wielospecyficzności). W 2009 roku został opisany przez grupę Yu pierwszy przypadek

¹²⁷ M. Wolberg, W. Hummel, M. Müller, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4562-4571.

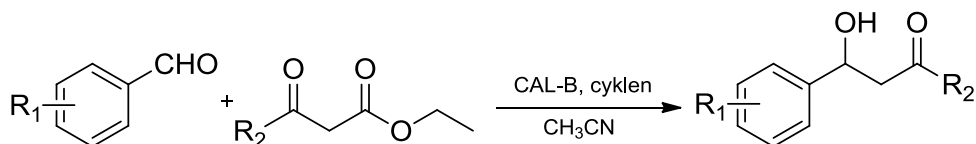
¹²⁸ A. Bariotaki, D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1792-1795.

¹²⁹ J. H. Langenheimer, *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 1223-1280.

¹³⁰ N. Utsumi, M. Imai, F. Tanaka, S. S. V. Ramasastry, C. F. Barbas, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3445-3448.

¹³¹ E. E. Farmer, C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7713-7716.

dekarboksylatywnej reakcji aldolowej katalizowanej przez lipazy o aktywności promiskuitywnej,¹³² Schemat 44.¹³³ Autorzy przedstawili wyniki badań nad reakcją pomiędzy pochodnymi benzaldehydu i różnymi β-ketoestrami prowadzącą do odpowiednich β-hydroksyketonów wraz z propozycją mechanizmu reakcji. Reakcja katalizowana immobilizowaną lipazą z *Candida antarctica* prowadziła do otrzymania produktów z wysokimi wydajnościami, ale wymagała stosowania enzymu aż w ilości 67% wagowych, Tabela 4.



Schemat 44

Tabela 4. Wpływ podstawników na wydajność dekarboksylatywnej reakcji aldolowej.

R ₁	R ₂	Wydajność [%]
<i>p</i> -NO ₂	Me	96
<i>o</i> -NO ₂	Me	81
<i>m</i> -NO ₂	Me	87
<i>p</i> -NO ₂	Et	95
<i>p</i> -NO ₂	Pr	94
<i>p</i> -NO ₂	Ph	87

Dwa lata później grupa Bornscheuer'a opublikowała badania podważające teorię Yu.¹³⁴ Udowodnił on, że reakcja przebiega w suchym rozpuszczalniku tylko w ilościach śladowych, a dopiero dodatek wody powoduje powstanie produktu. Wynika stąd, że enzym katalizuje reakcję hydrolizy acetylooctanu etylu do kwasu acetylooctowego, do czego potrzebuje udziału wody. Co więcej reakcja nie zachodziła dla estrów *tert*-butylowych, gdyż nie są one hydrolizowane przez lipazę z *Candida antarctica*. Dopiero kwas acetylooctowy wchodzi w reakcję z pochodnymi benzaldehydu bez udziału enzymu, co również zostało udowodnione. Grupa badawcza Yu nie pozostała bez odpowiedzi, w 2014 opublikowała kolejne wyniki potwierdzające swoją koncepcję, Schemat 45.¹³⁵ Aby udowodnić udział enzymu w całym procesie, acetylooctan etylu (**47**) mieszano z Novozymem przez 24

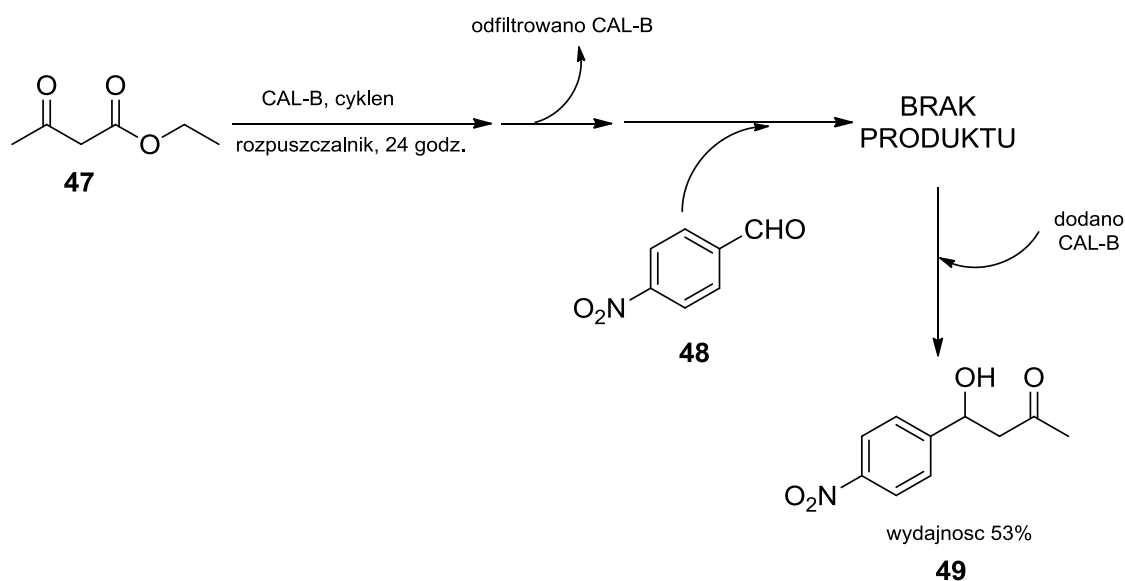
¹³² K. Hult, P. Berglund, *Trends in Biotechnology* **2007**, 25, 231-238.

¹³³ X.-W. Fenf, C. Li, N. Wang, K. Li, W.-W. Zhang, Z. Wang, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2009**, 11, 1933-1936.

¹³⁴ A. S. Evitt, U. Bornscheuer, *Green Chem.* **2011**, 13, 1141-1142.

¹³⁵ W.-W. Zhang, N. Wang, X.-W. Feng, Y. Zhang, X.-Q. Yu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 173, 535-543.

godziny, następnie enzym usunięto przez filtrację i dodano *p*-nitrobenzaldehyd (**48**). Nie zaobserwowano powstawania produktu, natomiast jeżeli powtórnie dodano Novozym w wyniku reakcji aldolowej powstawał odpowiedni hydroksyketon **49**.



Schemat 45

Badania nad dekarboksylatywną reakcją aldolową przeprowadzili również Kapoor i współpracownicy potwierdzając promiskuitywną aktywność lipaz i proteaz.¹³⁶ Żadna z opisanych reakcji nie była stereoselektywna, co jest powszechne dla reakcji promiskuitywnych. Niestety mechanizm reakcji wciąż nie jest jasny, a przeprowadzone do tej pory doświadczenia nie pozostają ze sobą w zgodzie. Na podstawie dotychczasowej wiedzy nie można jednoznacznie stwierdzić czy enzym katalizuje dekarboksylatywną reakcję aldolową, czy bierze udział tylko w hydrolizie estru acetlooctanu etylu.

6. Podsumowanie części literaturowej

W części literaturowej pokazano znaczenie drugorzędowych alkoholi w syntezie organicznej oraz możliwości otrzymywania enancjomerycznie czystych alkoholi w wyniku transformacji chemoenzymatycznych. Opracowanie nowych metod otrzymywania enancjomerycznie czystych alkoholi drugorzędowych jest szczególnie istotne, ponieważ są one ważnymi blokami budulcowymi do syntezy wielu związków biologicznie czynnych, co uzasadnia wybór tej grupy związków jako związków docelowych. Pokazano wpływ wielkości podstawników na wydajności i nadmiary enancjomeryczne uzyskiwanych produktów. W większości przytoczonych przykładów, związki podstawione

¹³⁶ M. Kapoor, A. B. Majumder, J. Mukherjee, M. N. Gupta, *Biocatal. Biotransform.* **2012**, *30*, 399-408.

długołańcuchowymi lub zatłoczonymi sterycznie podstawnikami nie były akceptowane przez enzymy. Potwierdza to konieczność opracowania efektywnych i prostych metod pozwalających na wyselekcjonowanie enzymów aktywnych wobec pochodnych drugorzędowych alkoholi o złożonej budowie oraz pozwalających na śledzenie stereoselektywności tych reakcji. Ponieważ techniki chromatograficzne są drogie i czasochłonne zdecydowano się na zastosowanie techniki fluorymetrycznej. Pozwala ona na monitorowanie przebiegu reakcji w czasie rzeczywistym z wysoką czułością, ale wymaga opracowania odpowiednich substratów fluorogennych. W kolejnych rozdziałach przedstawiono szereg znanych próbników chromogennych i fluorogennych. Następnie pokazano, że są one dogodnym narzędziem do badań przesiewowych nad aktywnością i stereoselektywnością ogromnych bibliotek enzymów. Jednocześnie przedstawiono główne ograniczenia stosowania związków fluorogennych, polegające na szybkiej spontanicznej hydrolizie w warunkach pomiarowych, tendencji do reakcji z niekatalitycznymi białkami. Przedstawiono przykłady wyznaczania stereoselektywności reakcji przez porównanie szybkości reakcji każdego z enancjomerów substratu prowadzonych w dwóch oddzielnych kuwetach pomiarowych. Metoda ta nie uwzględniała konkurencji do miejsca aktywnego enzymu. Ponadto opracowane metody nie pozwalały na badania przesiewowe pochodnych drugorzędowych alkoholi.

II BADANIA WŁASNE

7. Cel badań

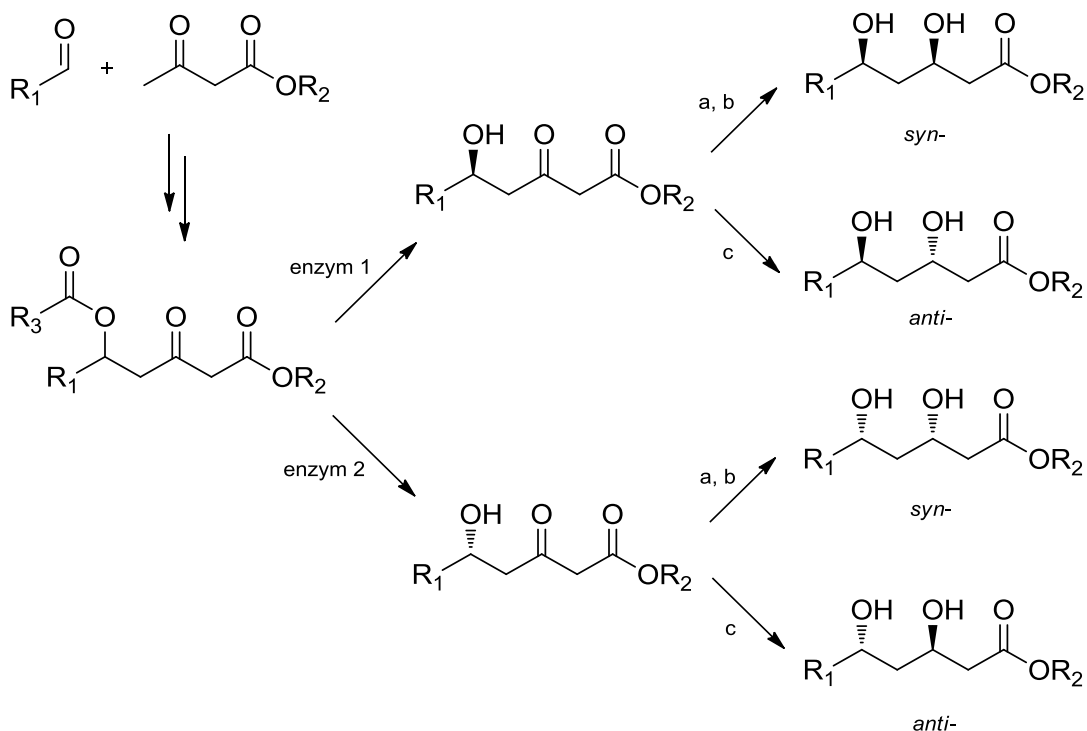
Celem niniejszej pracy było wykonanie badań nad opracowaniem biokatalitycznej metody otrzymywania wybranych enancjomerycznie czystych alkoholi drugorzędowych. Opracowanie prostych i efektywnych dróg syntezy tej klasy związków, będących blokami budulcowymi do syntezy wielu związków biologicznie czynnych, wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej chemii organicznej. Jako cel szczegółowy postawiłam sobie opracowanie metody dającej dostęp do wszystkich stereoizomerów 5-podstawionego-3,5-dihydroksyestru kwasu pentanowego o wysokiej czystości enancjomerycznej. Aby osiągnąć ten cel niezbędne było opracowanie metod analitycznych pozwalających na oznaczenie enancjoselektywności badanych reakcji. Ponieważ techniki chromatograficzne są czasochłonne i kosztowne, należałoby przeprowadzić badania nad opracowaniem tańszych i szybszych metod pomiaru w czasie rzeczywistym. Najprostszą metodą wykonania takich oznaczeń jest zastosowanie techniki spektroskopii optycznej. Niestety znane do tej pory próbki chromogenne i fluorogenne nie pozwalają na oznaczanie aktywności i stereoselektywności enzymów względem pochodnych alkoholi drugorzędowych oraz charakteryzują się dużą podatnością na reakcje z niespecyficznymi białkami. Postanowiłam poszerzyć zakres badań o etap syntezy nowej klasy próbników fluorogennych do fluorescencyjnego i spektrofotometrycznego wykrywania aktywności katalitycznej oraz oznaczania stereoselektywności reakcji z udziałem pochodnych drugorzędowych alkoholi. Następnie należało dokonać oceny próbników pod kątem przydatności do zastosowań w badaniach przesiewowych.

8. Chemoenzymatyczna synteza wybranych drugorzędowych alkoholi

Opracowanie prostych i efektywnych metod syntezy 5-podstawionych-3,5-dihydroksyestrów kwasu pentanowego, będących syntonami do syntezy analogów lowastatyny, wciąż stanowi wyzwanie dla współczesnej chemii organicznej. W tej części pracy, badania będę prowadziła w taki sposób, aby opracowana metodologia dawała dostęp do wszystkich stereoizomerów badanych związków o wysokiej czystości enancjomerycznej.

Sformułowałam strategię badań opartą na trzyetapowej reakcji, co zostało przedstawione na Schemacie 46. W pierwszym etapie przeprowadzę enzymatyczną bądź chemiczną syntezę estru kwasu 5-podstawionego-5-hydroksy-3-oksopentanowego. Następnie związek ten poddam reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego, a dzięki dobraniu

odpowiednich enzymów możliwe powinno być otrzymanie obydwu enancjomerów produktu. Czyste enancjomerycznie estry kwasu 5-podstawionego-5-hydroksy-3-oksopentanowego będzie można znanymi w literaturze metodami diastereoselektywnie zredukować.

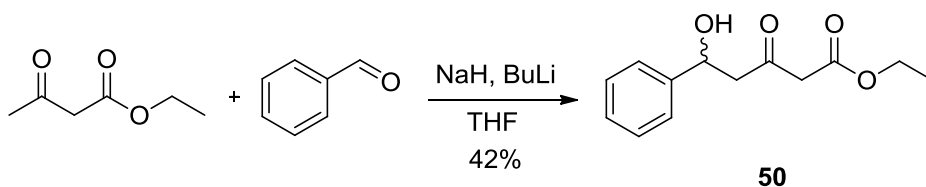


- a) 1. B(OMe)Et₂, THF/MeOH (80:20 v/v), -70°C, 20min. 2. NaBH₄, -70°C, 3 godz.
 b) H₂O₂, THF/woda (70:30 v/v, pH 9), 0°C→temp. pok., 30min.
 c) Me₄N[B(OAc)₃H], MeCN/AcOH (50:50, v/v), -25°C, 5 godz.

Schemat 46

8.1. Synteza chemiczna pochodnych kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego

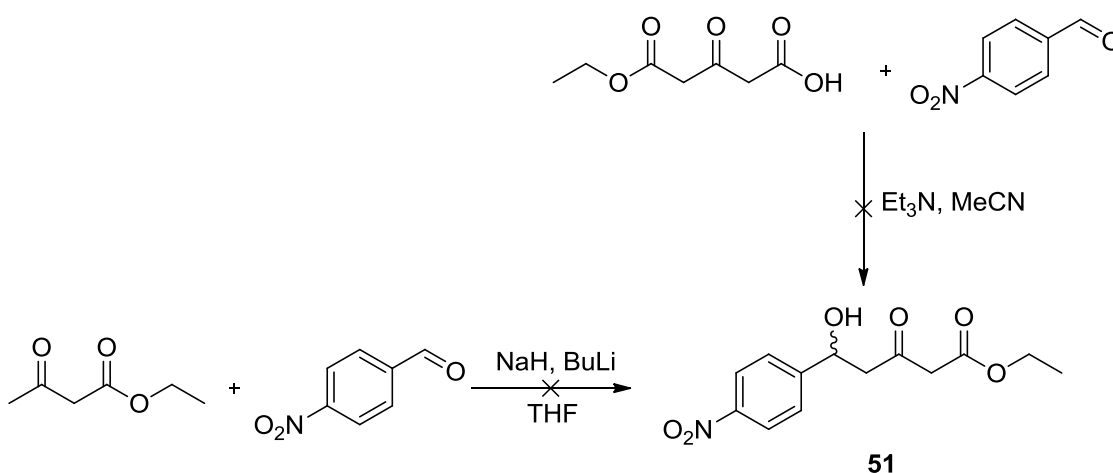
Jako pierwszy związek modelowy wybrałam ester etylowy kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego (**50**), Schemat 47. Zgodnie z procedurą literaturową związek ten otrzymałam z wydajnością 42% na drodze kondensacji acetylooctanu etylu z benzaldehydem.



Schemat 47

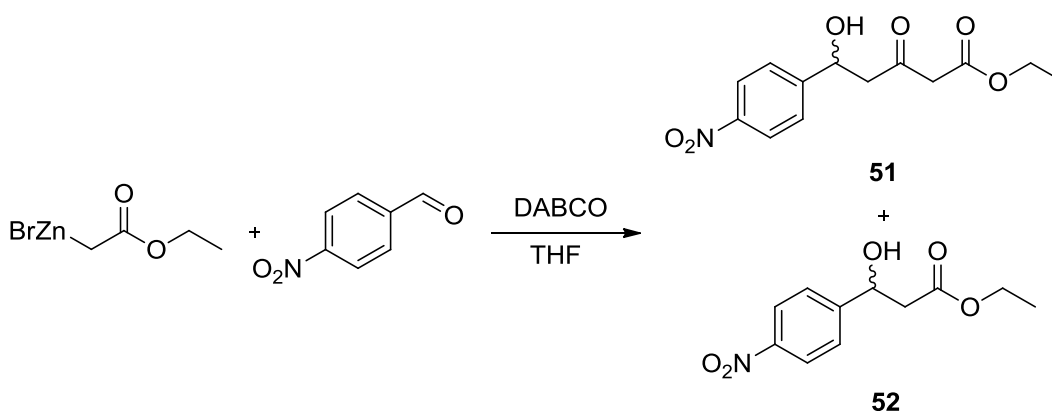
Jako drugi związek modelowy wybrałam ester etylowy kwasu 5-(4-nitrofenylo)-5-hydroksy-3-oksopentanowego (**51**). Przeprowadziłam reakcję kondensacji acetylooctanu etylu

z 4-nitrobenzaldehydem według tej samej procedury co dla związku **50**, Schemat 48. W wyniku reakcji otrzymałam mieszaninę wielu produktów, z której nie możliwe było wyizolowanie oczekiwanego związku. Następnie przeprowadziłam reakcję pomiędzy 3-oksogluratanem monoetylowym oraz 4-nitrobenzaldehydem, ale również w tym przypadku powstawała mieszanina, z której nie udało się wydzielić produktu w czystej postaci.



Schemat 48

Ponieważ znanych jest kilka metod syntezy tego związku przeprowadziłam reakcję podwójnego Reformatsky'iego, zgodnie z procedurą literaturową,¹³⁷ Schemat 49. W wyniku przebiegu procesu zaobserwowałam powstawanie dwóch produktów. Oczyszczenie za pomocą chromatografii kolumnowej i analiza NMR wykazały, że produktami są związki **51** i **52**, otrzymane z wydajnościami odpowiednio 35% i 47%.

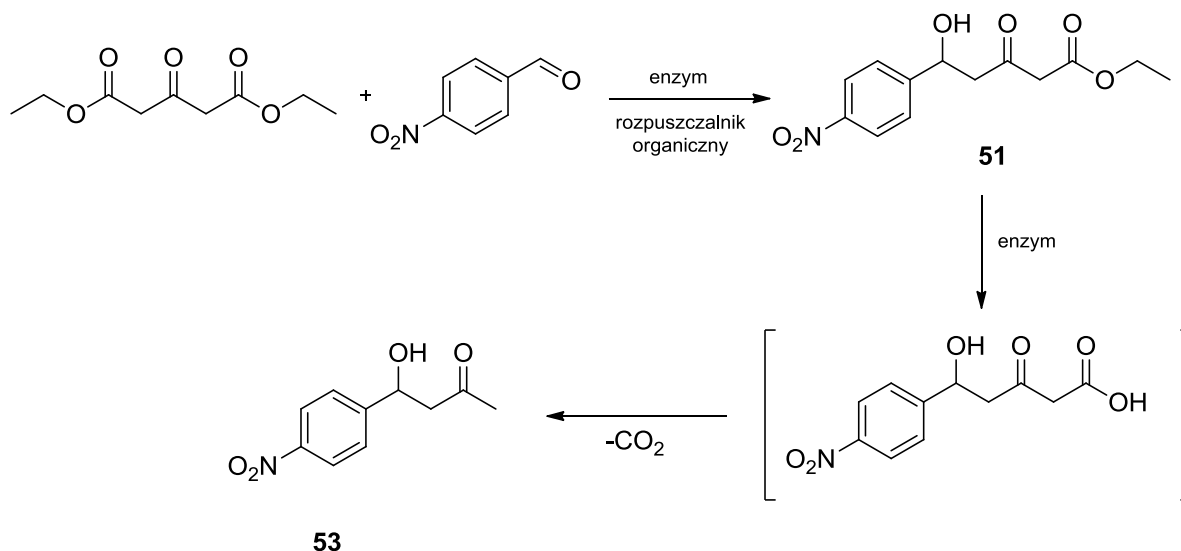


¹³⁷ M. Mineno, Y. Sawai, K. Kanno, N. Sawada, H. Mizufune, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5843–5850.

Schemat 49

8.2. Synteza enzymatyczna pochodnych kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopenatanowego

W wyniku badań literaturowych zauważyłam, że lipazy mogą katalizować reakcję aldolową oraz dekarboksylatywną reakcję aldolową. Dobór odpowiednich biokatalizatorów powinien umożliwić otrzymanie nieracemicznych pochodnych kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopenatanowego, Schemat 50. Aby sprawdzić, które enzymy katalizują reakcję pomiędzy 3-oksoglutaranem dietylu i 4-nitrobenzaldehydem przebadalam 17 dostępnych handlowo lipaz, 2 esterazy, 1 acylazę i 7 proszków acetonowych. Uprościłam badania przesiewowe stosując po 3 enzymy w każdej mieszaninie reakcyjnej. Tylko w jednym przypadku obserwowałam powstawanie oczekiwanego produktu: immobilizowanej lipazy z *Candida antarctica* (Novozym), proszku acetonowego z wątroby gęsi (GLAP), proszku acetonowego z wątroby dzika (BLAP). Wyniki zestawiałam w Tabeli 5. Następnie enzymy te zastosowałam pojedynczo do reakcji, ale zaobserwowałam tworzenie się śladowych ilości produktu tylko w przypadku Novozymu. Dopiero reakcje przeprowadzone na dwóch enzymach potwierdziły, że za powstawanie związku **51** odpowiedzialna jest para Novozym-GLAP.



Schemat 50

W trakcie reakcji enzymatycznej zaobserwować można było powstawanie dwóch produktów: produktu kondensacji aldolowej **51** oraz produktu następczej reakcji hydrolizy i dekarboksylacji **53**. Związek **51** wyizolowałam z wydajnością 32%, a **53** z wydajnością 23%. Obydwa produkty były nieracemiczne, a ich nadmiary enancjomeryczne wynosiły 15%.

Tabela 5. Reakcja aldolowa prowadząca do związków **51** i **53** katalizowana enzymatycznie.

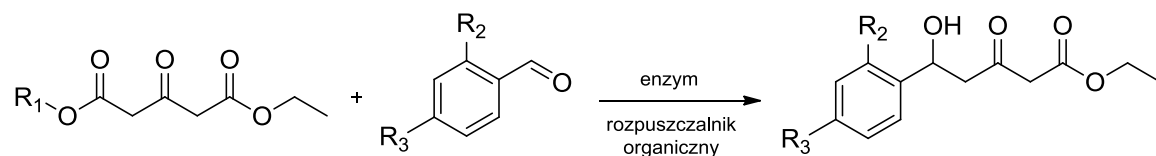
Lp.	Enzym ^[a]	Wydajność 51 [%]	<i>ee</i> [%] ^[b]	Wydajność 53 [%]	<i>ee</i> [%] ^[c]
1	Brak	-	-	-	-
2	Novozym	<1	-	-	-
3	GLAP	-	-	-	-
4	BLAP	-	-	-	-
5	Novozym, GLAP	32	15	23	15
6	Novozym, BLAP	-	-	-	-
7	GLAP, BLAP	-	-	-	-
8	Novozym, GLAP, BLAP	32	15	23	15

[a] GLAP – proszek acetonowy z wątroby gęsi, BLAP – proszek acetonowy z wątroby dzika, Novozym – immobilizowana lipaza z *Candida antarctica*;

[b] wyznaczono na podstawie rozdzielania mieszaniny enancjomerów za pomocą HPLC z zastosowaniem kolumny Chiralcel OB-H (Daicel, Japonia);

[c] obliczono na podstawie porównania wyznaczonej skręcalności właściwej z wartością literaturową.

Aby potwierdzić efekt współdziałania enzymów, w kolejnym kroku przeprowadziłam badania dla większej liczby substratów, Schemat 51.



R₁=H, CH₃

R₂=H, NO₂

R₃=H, NO₂

50: R₂=H, R₃=H

51: R₂=H, R₃=NO₂

54: R₂=NO₂, R₃=NO₂

Schemat 51

Tabela 6. Enzymatyczna reakcja aldolowa.

Lp.	R ₁	R ₂	R ₃	Enzym ^[a]	Wydajność [%]	ee [%]
1	H	H	NO ₂	Brak	-	-
2	H	H	NO ₂	Novozym	-	-
3	H	H	NO ₂	GLAP	-	-
4	H	H	NO ₂	Novozym, GLAP	4	-
5	CH ₃ CH ₂	H	H	Brak	-	-
6	CH ₃ CH ₂	H	H	Novozym	9	<i>rac</i> ^[b]
7	CH ₃ CH ₂	H	H	GLAP	-	-
8	CH ₃ CH ₂	H	H	Novozym, GLAP	9	<i>rac</i> ^[b]
9	CH ₃ CH ₂	NO ₂	NO ₂	Brak	-	-
10	CH ₃ CH ₂	NO ₂	NO ₂	Novozym	8	<i>rac</i> ^[c]
11	CH ₃ CH ₂	NO ₂	NO ₂	GLAP	-	-
12	CH ₃ CH ₂	NO ₂	NO ₂	Novozym, GLAP	41	<i>rac</i> ^[c]

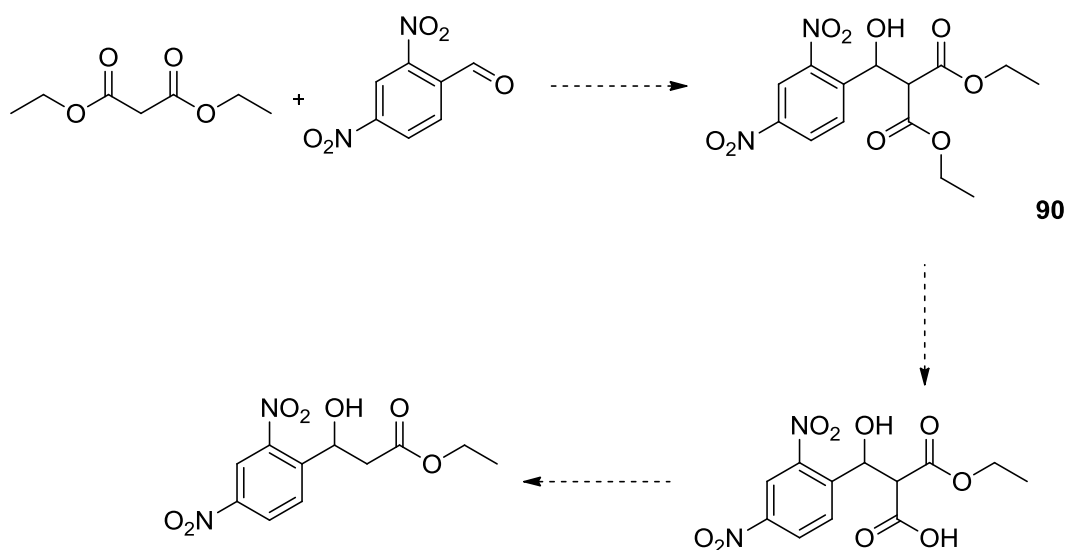
[a] GLAP – proszek acetonowy z wątroby gęsi, [b] – rozdział HPLC z zastosowaniem kolumny Chiralcel OB-H, [c] – wyznaczono na podstawie skręcalności optycznej

W przypadku reakcji benzaldehydu z 3-oksoglutaranem dietylu (poz. 5-8, Tabela 6) zaobserwowałam powstawanie takiej samej ilości produktu dla mieszaniny enzymów Novozym i GLAP, jak dla samego Novozymu. Dodatek proszku acetonowego z wątroby gęsi nie wpływał na wydajność tej reakcji. Natomiast kondensacja 2,4-dinitrobenzaldehydu z 3-oksoglutaranem dietylu potwierdziła wpływ dodatku proszku acetonowego na zwiększenie wydajności reakcji (Tabela 6, poz. 9-12). Zobserwowałam 5-krotne zwiększenie efektywności reakcji, w porównaniu do reakcji katalizowanej samym Novozymem. Także obecność elektronodonorowych grup nitrowych w pierścieniu aromatycznym benzaldehydu wpływa na zwiększenie szybkości kondensacji.

Nasuwa się pytanie, w jaki sposób dodatek proszku acetonowego z wątroby gęsi wpływa na zwiększenie szybkości reakcji. Jeżeli reakcja przebiegałaby zgodnie z mechanizmem zaproponowanym przez Bornscheuera, 3-oksoglutaran dietylu ulegałby katalizowanej Novozymem hydrolizie do estru monoetylowego, a następnie spontanicznej kondensacji. Aby potwierdzić tą koncepcję jako substrat do reakcji zastosowałam 3-oksoglutaran monoetylowy (Tabela 6, poz. 1-4). Reakcja z 3-oksoglutaranem monoetylowym powinna zachodzić spontanicznie i z większą szybkością. Natomiast badania pokazały, że tylko w jednym przypadku tworzył się produkt z niewielką wydajnością.

Nasuwa to wniosek, że być może mechanizm reakcji jest zupełnie inny od do tej pory zaproponowanych.

Sprawiłam, czy analogiczna reakcja może zachodzić najpierw przez tworzenie się produktu pośredniego **55**, a następnie jego hydrolizę i dekarboksylację, Schemat 52. W tym celu zsyntetyzowałam związek **55** i poddałam go działaniu enzymów, w takich samych warunkach reakcji jak dla związku **54**. W żadnym eksperymencie nie pojawił się produkt, co wskazuje na to, że związek ten jest trwały w acetonitrylu i nie jest hydrolizowany do odpowiedniego estru kwasu 5-arylo-3-oksopropanowego. Również dodatek wody do reakcji nie prowadził do powstania produktu hydrolizy. Badany wariant kondensacji aldolowej katalizowanej enzymatycznie zdecydowanie nie przebiega przez ten produkt pośredni.



Schemat 52

Właściwości rozpuszczalników, takie jak hydrofobowość, mieszalność z wodą, zdolność do tworzenia wiązań wodorowych wpływają znacząco na stabilność konformacyjną oraz aktywność katalityczną enzymów. Enzymy, w hydrofobowych rozpuszczalnikach mogą zachowywać swoją strukturę przestrzenną dzięki obecności wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Ze względu na hydrofilową naturę białek, jakakolwiek ilość wody, która może być obecna w naczyniu reakcyjnym będzie wiązać się z powierzchnią białek.^{138,139} Podejrzałam, że przyczyną zwiększenia efektywności reakcji może być pewna ilość wody strukturalnej jaką mogą zawierać proszki acetonowe. Pomimo zastosowania bezwodnych rozpuszczalników może być ona wprowadzona do reakcji z enzymami. Woda jest niezbędna

¹³⁸ C. Mattos, D. Ringe, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 761-764.

¹³⁹ T. Kortemme, A. V. Morozov, D. Baker, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1239-1259.

do zainicjowania procesu hydrolizy, a jej dodatek powinien zwiększać aktywność enzymów, a tym samym efektywność reakcji. Dlatego też przebadalam wpływ zawartości wody na wydajność otrzymywanego produktu, Tabela 7.

Tabela 7. Wpływ wody na wydajność reakcji pomiędzy benzaldehydem i 3-oksoglutaranem dietylu katalizowana parą enzymów Novozym-GLAP.

Lp.	Zawartość wody [%]	Wydajność [%]
1	0	9
2	0.1	16
3	1	4
4	100	-

Reakcja prowadzona bez dodatku wody dawała produkt **50** z niską wydajnością 9% (Tabela 7, poz. 1). Dodatek 0.1% objętościowego wody powodował podwojenie wydajności otrzymywanego produktu (Tabela 7, poz. 2), jednak dalsze zwiększanie jej ilości obniżało efektywność reakcji (Tabela 7, poz. 3). W buforze fosforanowym (pH 7.4) reakcja nie zachodziła wcale (Tabela 7, poz. 4). Wynika stąd, że kondensacja aldolowa do produktu **50** zachodzi tylko w rozpuszczalniku organicznym, a niewielki dodatek wody wpływa pozytywnie na efektywność reakcji. Zatem, zwiększenie wydajności produktu mogło być spowodowane niewielką ilością wody strukturalnej, która może być obecna w proszkach acetonowych. Zwiększenie aktywności enzymów poprzez niewielki dodatek wody do reakcji w rozpuszczalnikach organicznych jest znanym w literaturze zjawiskiem.¹⁴⁰

W kolejnym etapie badań zbadalam wpływ różnych rozpuszczalników na wydajność otrzymywanego produktu. Wyniki zestawiam w Tabeli 8.

Spośród przebadanych rozpuszczalników reakcja zachodziła z największą wydajnością w acetonitrylu (Tabela 8, poz. 1). W eterze dietylowym (Tabela 8, poz. 2) oraz eterze *tert*-butylowo metylowym (Tabela 8, poz. 5) uzyskałam śladowe ilości produktu. W pozostałych przypadkach nie obserwowałam powstawania oczekiwanego związku.

¹⁴⁰ A. Zaks, A. M. Klivanov, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8017-8021.

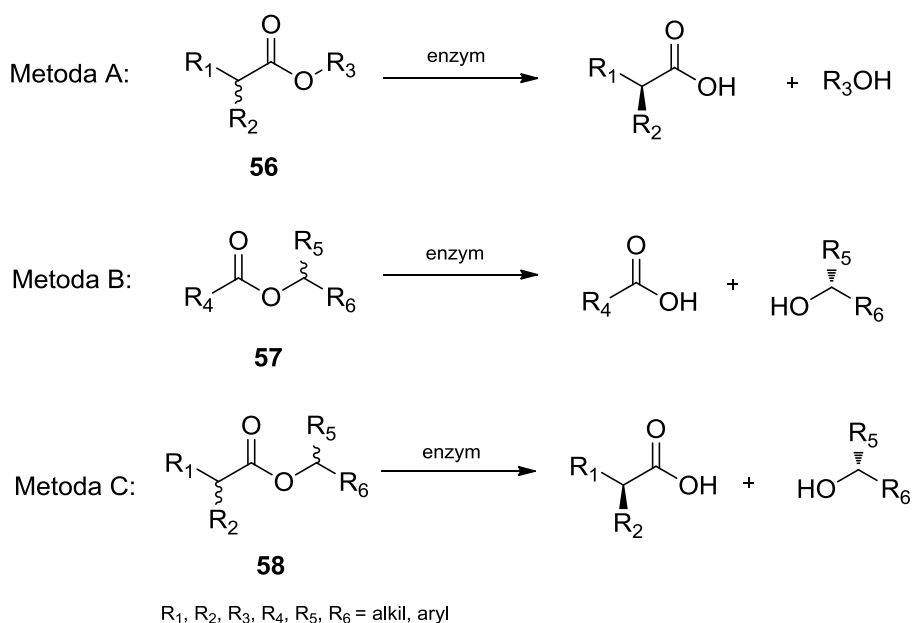
Tabela 8. Optymalizacja warunków enzymatycznej reakcji aldolowej przez dobór rozpuszczalnika.

Lp.	Rozpuszczalnik	Wydajność [%]
1	Acetonitryl	9
2	Eter dietylowy	4
3	Eter diizopropylowy	-
4	Dioksan	-
5	Eter <i>tert</i> -butyloowo metylowy	3
6	heksan	-
7	Cykloheksan	-
8	Octan etylu	-
9	Izooktan	-
10	Toluen	-
11	Tetrahydrofuran	-

W wyniku reakcji aldolowej katalizowanej enzymatycznie otrzymałam pożądane związki **50** i **51** w postaci racematów lub z niewielkimi nadmiarami enancjomerycznymi. Do określenia wartości nadmiarów enancjomerycznych opracowałam metody analityczne z zastosowaniem HPLC na fazach chiralnych. Dla każdego z wymienionych związków należało sprawdzić kilka kolumn chromatograficznych, a następnie zoptymalizować warunki rozdzału. Ponieważ wyniki reakcji aldolowej nie były satysfakcjonujące postanowiłam otrzymać pochodne kwasu 5-podstawionego-5-hydroksy-3-oksopentanowego oraz 5-podstawionego-3,5-dihydroksypentanowego w wyniku enzymatycznego rozdzału kinetycznego, a następnie diastereoselektywnej redukcji. Opracowanie biokatalitycznej metody wymagało przeprowadzenia badań przesiewowych na dużej liczbie enzymów oraz mikroorganizmów, dlatego też wskazane było opracowanie szybkiej metody wyselekcjonowania enzymów najbardziej aktywnych i stereoselektywnych względem alkoholi drugorzędowych. Metody chromatograficzne są czasochłonne i kosztowne. Natomiast zastosowanie technik spektroskopii optycznej pozwoliłoby na efektywne monitorowanie postępu reakcji w czasie rzeczywistym i oszacowanie stereoselektywności reakcji. Niestety, znane do tej pory próbniki chromogenne i fluorogenne nie są odpowiednie do badań nad drugorzędowymi alkoholami. W kolejnych rozdziałach przedstawiłam koncepcję nowej klasy próbników fluorogennych, których syntezę wykonałam wraz z oceną ich przydatności w badaniach przesiewowych.

9. Mieszane węglany jako nowa grupa próbników fluorogennych do oznaczania aktywności i stereoselektywności hydrolaz

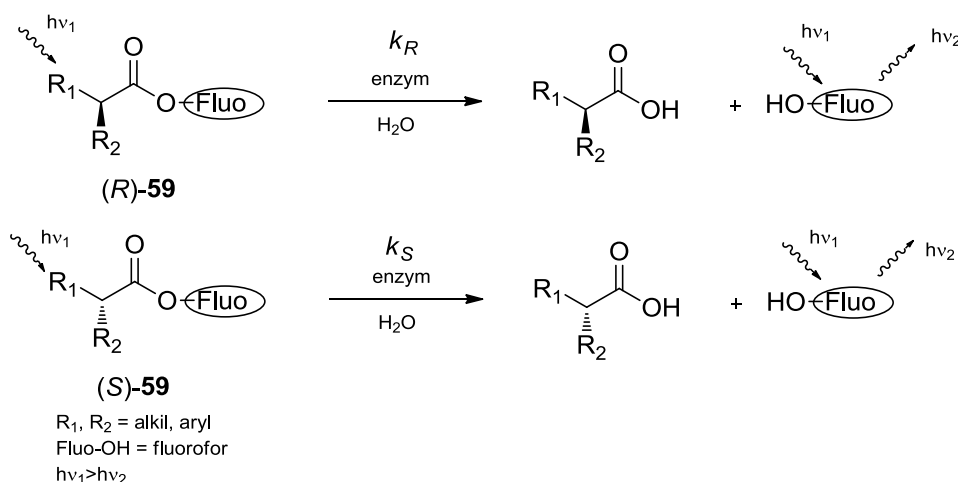
Szybki postęp w dziedzinie inżynierii genetycznej pozwala na otrzymanie ogromnych bibliotek genetycznie zmodyfikowanych enzymów o pożądanym charakterystykach. Zastosowanie hydrolaz w syntezie organicznej wymaga przeprowadzenia wielu badań przesiewowych w celu wyselekcjonowania najbardziej aktywnych i stereoselektywnych biokatalizatorów. Konieczność zbadania dużej liczby enzymów wymagała opracowania czułej, szybkiej i wiarygodnej metody oznaczania ich aktywności i stereoselektywności. Ponieważ zarówno reszta kwasowa, jak i część alkoksylowa może posiadać centrum stereogeniczne możliwe jest przeprowadzenie reakcji hydrolizy stosując jako substraty: ester racemicznego kwasu karboksylowego i achiralnego alkoholu **56**; ester achiralnego kwasu karboksylowego i racemicznego drugorzędowego alkoholu **57**; ester racemicznego kwasu karboksylowego i racemicznego alkoholu drugorzędowego **58**, co pokazałam na Schemacie 53.



Schemat 53

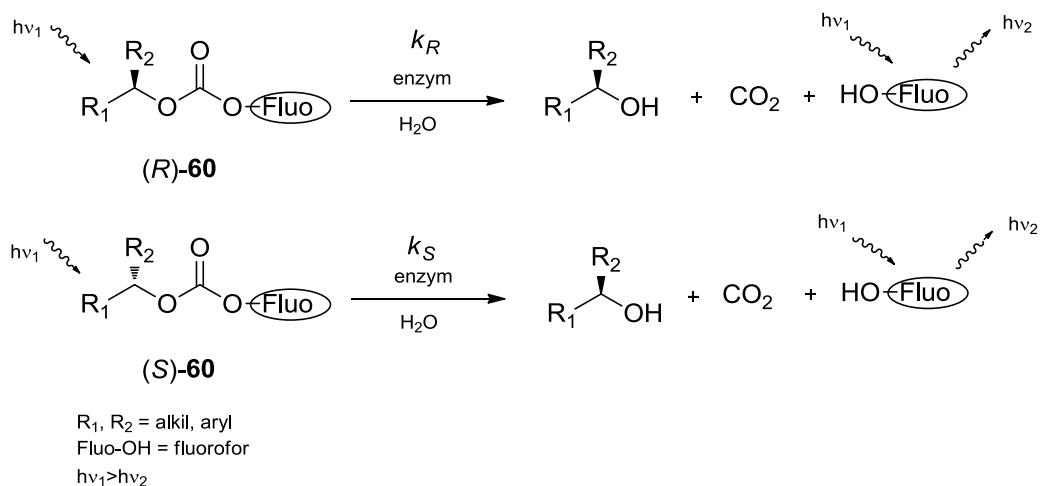
Za pomocą zsyntetyzowanych do tej pory próbników fluorogennych możliwe było wyznaczenie szybkości reakcji tylko za pomocą Metody A (Schemat 53), natomiast nie było możliwe oznaczenie aktywności dla pochodnych chiralnych alkoholi drugorzędowych (Metoda B i C), ponieważ funkcję grupy alkoksylowej pełni cząsteczka chromoforu lub fluoroforu.

Próbniki do oznaczania stereoselektywności reakcji ograniczone były do estrów chiralnych kwasów karboksylowych i achiralnych fluorescencyjnych alkoholi. Śledząc wzrost intensywności fluorescencji odpowiadający stężeniu uwalnianego fluoroforu możliwe było wyznaczenie szybkości reakcji hydrolizy. Stosując enancjomerycznie czyste substraty (*R*)-59 i (*S*)-59, poprzez porównanie szybkości reakcji dla każdego enancjomeru w oddzielnym pomiarze możliwe było oszacowanie enancjoselektywności enzymów, Schemat 54. Wyjątkiem są próbki przedstawione na Schemacie 15, opracowane przez grupę Reymonda. Wykazywały one dużo mniejszą podatność na reakcje niespecyficzne. Jednak zaproponowane substraty w wyniku reakcji z hydrolazami dawały produkty uboczne takie jak aldehydy lub ketony, które są często inhibitorami badanych hydrolaz. Metody otrzymywania takich próbników często były skomplikowane i wieloetapowe. Ponadto, ich zastosowanie umożliwiało śledzenie aktywności enzymów tylko dla pochodnych kwasów karboksylowych i pochodnych 1,3-dioli.



Schemat 54

Zaproponowana przeze mnie koncepcja polegała na zamianie wiązania estrowego na izosteryczne wiązanie węglanowe, co umożliwiłoby badania nad pochodnymi chiralnych alkoholi i śledzenie postępu reakcji w czasie rzeczywistym za pomocą spektrofluorymetru, co ilustruje Schemat 55. Jako fluorofor wybrałam pochodne kumaryny, gdyż są to związki pochodzenia naturalnego, nietoksyczne i charakteryzujące się wysoką wydajnością kwantową fluorescencji.

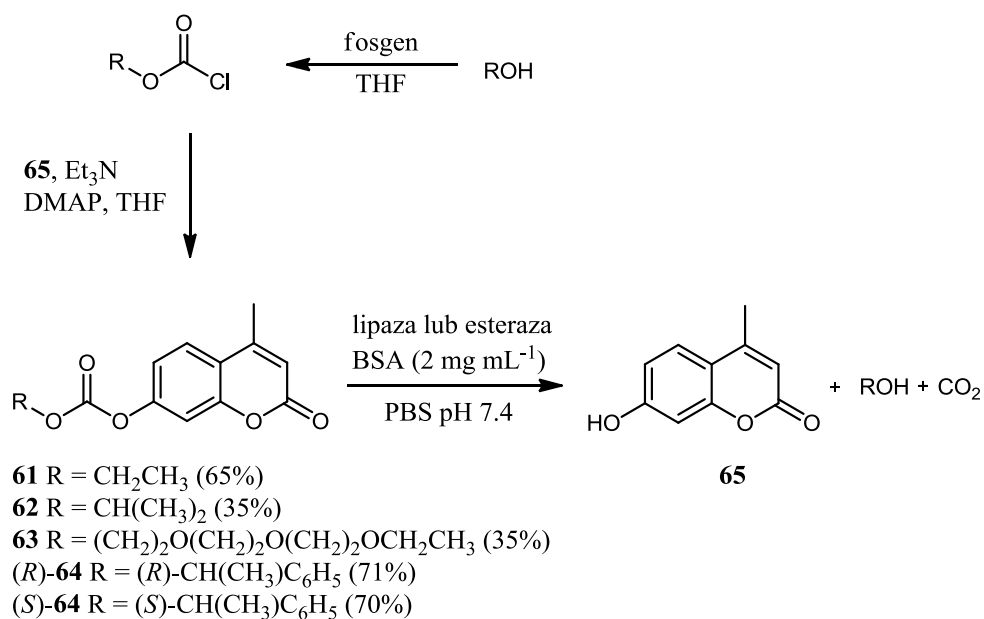


Schemat 55

Zgodnie z tą koncepcją, synteza enancjomerycznie czystych węglanów o wzorze (R)-60 i (S)-60, zawierających w swojej strukturze fluorofor, z enancjomerycznie czystych substratów, może pozwolić na otrzymanie uniwersalnych próbników fluorogennych do badań przesiewowych nad enzymami hydrolitycznymi. Pomiar szybkości reakcji dla każdego z enancjomerów oddzielnie może pozwolić na wyznaczenie szybkości reakcji katalizowanej przez enzym, a następnie na wyznaczenie wartości Quick *E*.

9.1. Próbniki fluorogenne do oznaczania aktywności i stereoselektywności lipaz i esteraz

W toku badań opracowałam prostą, dwuetapową metodę syntezy próbników fluorogennych opartych na strukturze mieszanych węglanów. Związki te otrzymałam poddając reakcji odpowiednie alkohole z fosgenem, co prowadziło do powstania chlorowęglanów, które w drugim etapie reakcji z 7-hydroksy-4-metylokumaryną dawały pożądane mieszane węglany z dobrymi wydajnościami (35-71%). W wyniku działania enzymów hydrolitycznych istnieje prawdopodobieństwo rozłączenia wiązania C-O od strony alkoholu lub od strony 7-hydroksy-4-metylokumaryny prowadzące do powstania wodorowęglanów. Związki takie są wysoce niestabilne w środowisku wodnym i spontanicznie ulegają hydrolizie do odpowiedniego alkoholu, 7-hydroksy-4-metylokumaryny i dwutlenku węgla, Schemat 56. Nie udało przeprowadzić syntezy, w której otrzymano by w pierwszym etapie chloromrówczan 7-hydroksy-4-metylokumaryny, ponieważ 7-hydroksy-4-metylokumaryna nie reagowała z fosgenem.



Schemat 56

Zsyntetyzowane związki przebadalam pod kątem przydatności do zastosowań w badaniach przesiewowych nad aktywnością hydrolityczną lipaz i esteraz. Mieszane węglany 7-hydroksy-4-metylokumaryny i alkoholi nie wykazywały fluorescencji. Dopiero w procesie hydrolizy, katalizowanym przez enzymy uwolniona została 7-hydroksy-4-metylokumaryna o silnej, niebieskiej fluorescencji. Obserwowanie wzrostu intensywności fluorescencji w czasie za pomocą spektrofluorymetru pozwoliło na bezpośrednie wyznaczenie szybkości poszczególnych reakcji. Śledzenie enancjopreferencji enzymów możliwe było przez syntezę pochodnych z enancjomerycznie czystych substratów, a następnie porównanie szybkości reakcji prowadzonych osobno dla każdego z enancjomerów.

W wielu przypadkach wysoka reaktywność substratów jest powiązana z chemiczną niestabilnością oraz tendencją do niespecyficznego reakcji z niekatalitycznymi białkami. Z tego powodu zsyntetyzowane substraty **61-64** przebadalam pod kątem niespecyficznego reakcji w obecności niekatalitycznego białka BSA. BSA działało jako nieselektywne białko, aby naśladować warunki badań przesiewowych w ekstraktach komórkowych, gdzie oprócz enzymów znajduje się również dużo innych białek. Do badań wybrałam bufor fosforanowy o pH 7.4, gdyż pH obojętne jest optymalnym środowiskiem dla większości lipaz i esteraz. Ponadto w tym pH obserwuje się silny sygnał emisji promieniowania pochodzący od anionowej formy 7-hydroksy-4-metylokumaryny. Otrzymane wyniki zestawiałam w Tabeli 9.

Tabela 9. Wyznaczone szybkości hydrolizy substratów **61-64** w PBS w obecności i braku obecności BSA.

Związek	brak obecności BSA (nM·s ⁻¹) ^[a]	BSA (nM·s ⁻¹) ^[b]	dezaktywowany ekstrakt komórkowy (nM·s ⁻¹) ^[c]
60	0.4	3.0	0.5
61	0.1	2.5	0.3
62	0.9	2.1	1.1
(<i>R</i>)- 64	2.2	3.9	2.4
(<i>S</i>)- 64	2.2	3.9	2.4

[a] 100 μM substratu w PBS pH 7.4, 30 °C. [b] 100 μM substratu w PBS pH 7.4, 30 °C, 2 mg mL⁻¹ BSA, wartości odpowiadają V_{noE} . [c] 100 μM substratu w PBS pH 7.4, 30 °C, 2 mg mL⁻¹ dezaktywowanego ekstraktu komórkowego. Ekstrakt komórkowy (YEX401) został dezaktywowany przez autoklawowanie.

Mieszane węglany **61-64** charakteryzowały się dużą stabilnością w warunkach pomiarowych. Szybkość autohydrolizy mieściła się w przedziale od 0.1 do 2.2 nM·s⁻¹, a szybkość hydrolizy w obecności białek niespecyficznych V_{noE} od 2.1 do 3.9 nM·s⁻¹. Wyznaczone szybkości były porównywalne do szybkości reakcji oznaczonych przez Reymonda dla alkoksymetylowych eterów 7-hydroksykumaryny (V_{noE} od 0.1 do 6.3 nM·s⁻¹) oraz niższe niż większość z przebadanych estrów kwasów karboksylowych (V_{noE} od 0.8 do 35 nM·s⁻¹).¹⁴¹ Najniższą wartość zarejestrowałam dla pochodnej polietylenoglikolowej **63**, natomiast najwyższą dla enancjomerów (*R*)- i (*S*)- pochodnych 2-fenyletanolu (*R*)-**64** i (*S*)-**64**. Aby warunki pomiarów jeszcze lepiej naśladowały warunki oznaczeń w próbkach biologicznych, wyznaczyłam szybkości reakcji w obecności dezaktywowanego ekstraktu komórkowego. We wszystkich przypadkach szybkości hydrolizy w obecności ekstraktu z komórek drożdży były zbliżone do szybkości reakcji autohydrolizy i niższe niż w przypadku reakcji z BSA. Badanie to potwierdziło niską podatność zsyntetyzowanych mieszanych węglanów **61-64** na reakcje niespecyficzne.

W kolejnym etapie badań wyznaczyłam rozpuszczalność zsyntetyzowanych związków **61-64** w buforze fosforanowym. Związek **63** został zaprojektowany tak, aby zmaksymalizować jego rozpuszczalność w wodzie oraz zwiększyć dostępność dla enzymów. Wartości rozpuszczalności zestawiono w Tabeli 10. Rozpuszczalności związków **61**, **62** i **64** były niskie, ale wystarczające, aby związek nie wytrącał się w czasie oznaczeń aktywności

¹⁴¹ E. Leroy, N. Bensel, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2105-2108.

enzymów oraz pozwalały na uniknięcie dodatku związków powierzchniowo czynnych. Związek **63** charakteryzował się relatywnie wysoką rozpuszczalnością.

Tabela 10. Rozpuszczalność węglanów **61-64** w PBS.

Związek	Rozpuszczalność [g L ⁻¹]
61	0.1
62	0.1
63	8.8
(<i>R</i>)- 64	0.4
(<i>S</i>)- 64	0.4

Następnie związki **61-64** zastosowałam jako substraty fluorogenne do badań przesiewowych nad aktywnością hydrolityczną lipaz i esteraz. Przebrałam szereg dostępnych handlowo enzymów w reakcjach z dodatkiem BSA (2 mg·mL⁻¹).

Tabela 11. Wyznaczone szybkości reakcji hydrolizy enzymatycznej substratów **61-64** w obecności BSA.

Lp.	Enzym (lipaza lub esteraza)	V_{enz} [nM s ⁻¹][a]				
		61	62	63	(<i>R</i>)- 64	(<i>S</i>)- 64
1	Lipoproteinowa lipaza z <i>Burkholderia sp.</i>	148	34	61	314	20
2	Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	145	129	24	8	27
3	Lipaza z wątroby wieprzowej	7	6	3	88	67
4	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	75	15	25	21	12
5	Esteraza z wątroby końskiej	44	9	35	25	18
6	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	15	10	1	13	20
7	Lipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	2	3	14	11
8	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	8	2	4	8	1
9	Esteraza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	2	0	6	6

[a] $V_{enz}=V_0-V_{noE}$

Warunki: 100 μM substratu w PBS pH 7.4, 30 °C, 50 μg mL⁻¹ enzymu.

Wyniki zestawione w Tabeli 11 przedstawiają wartości wyznaczonych początkowych szybkości reakcji enzymatycznych (V_{enz}), będące różnicą początkowych szybkości reakcji katalizowanej przez enzym w obecności BSA (V_0) i reakcji niespecyficzej z BSA bez dodatku enzymu (V_{noE}). Szybkości reakcji obliczałam na podstawie prostoliniowego odcinka krzywej zależności intensywności fluorescencji w czasie.

Aby związek był uniwersalnym próbnikiem do badań przesiewowych powinien być akceptowany jako substrat przez jak największą liczbę enzymów. Mieszane węglany **61**, **62** i **64** były substratami akceptowanymi przez wszystkie enzymy. Z czego **61** i **64** były najbardziej reaktywne. Związek **63**, pomimo większej rozpuszczalności w środowisku wodnym, nie był hydrolizowany przez wszystkie z badanych biokatalizatorów (Tabela 11, poz. 9). Jest to zgodne danymi literaturowymi, że substrat do reakcji enzymatycznych powinien wykazywać odpowiedni stopień lipofilowości.^{142,143} Ponadto oceniłam możliwość zastosowania substratów (*R*)-**64** i (*S*)-**64** jako próbników do przewidywania stereoselektywności reakcji enzymatycznych. To podejście wymagało zsyntetyzowania czystych enancjomerycznie substratów, a następnie przeprowadzenia oddzielnych pomiarów szybkości reakcji hydrolizy dla obydwu enancjomerów. Zaobserwowałam, że lipaza z *Candida rugosa* (Tabela 11, poz. 2) oraz *Candida cylindracea* (Tabela 11, poz. 6) wykazywały preferencję w stosunku do pochodnej (*S*)-alkoholu. Natomiast lipaza z *Burkholderia sp.* (Tabela 11, poz. 1), *Candida antarctica* (Tabela 11, poz. 4) i *Pseudomonas cepacia* (Tabela 11, poz. 8) faworyzowały hydrolizę (*R*)-enancjomeru. Zastosowane esterazy (Tabela 11, poz. 5 i poz. 9) hydrolizowały substrat (*R*)-**64** z podobnymi szybkościami jak (*S*)-**64**.

W tabeli 12 przedstawiłam relatywne szybkości reakcji, obliczone ze wzoru: $V_{rel}=(V_{enz}/V_{noE})-1$. Wartości te są bardzo istotne przy ocenie jakości sygnału, czyli sygnału pochodzącego od katalizowanej reakcji w stosunku do sygnału tła. Należy tutaj wspomnieć, że dostępne handlowo enzymy najczęściej są surowymi ekstraktami komórkowymi, zawierającymi jedynie niewielkie ilości biokatalizatora. Dane umieszczone w Tabeli 12 potwierdziły, że związki **61** i **64** są najbardziej efektywnymi próbnikami spośród przebadanych. Ponadto iloraz relatywnych szybkości reakcji związków (*R*)-**64** i (*S*)-**64** posłużył w kolejnym etapie badań do wyznaczenia przybliżonej enancjoselektywności (Quick *E*).

¹⁴² M. T. Reetz, M. H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1758-1761.

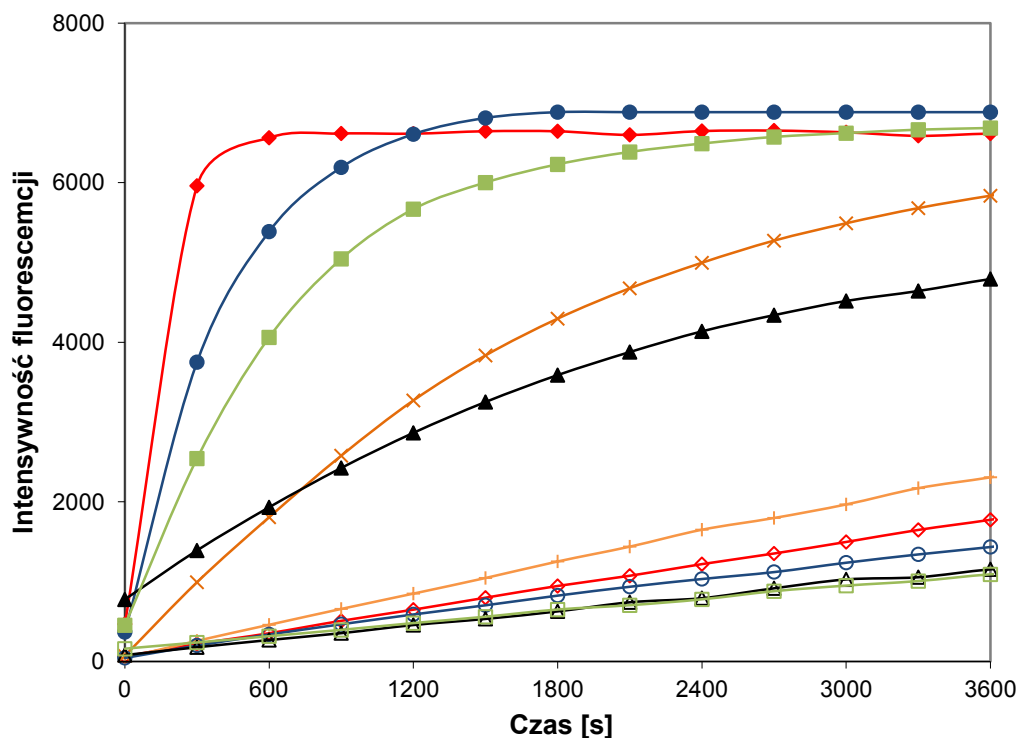
¹⁴³ D. F. V. Lewis, M. N. Jacobs, M. Dickens, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 530-537.

Tabela 12. Obliczone relatywne szybkości reakcji hydrolizy enzymatycznej substratów **61-64** w obecności BSA.

Lp.	Enzym (lipaza lub esteraza)	V_{rel} [nM s ⁻¹]				
		61	62	63	(<i>R</i>)- 64	(<i>S</i>)- 64
1	Lipoproteinowa lipaza z <i>Burkholderia sp.</i>	49 ^[a]	13	30	82	4
2	Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	48	51	12	2	5
3	Lipaza z wątroby wieprzowej	2	2	2	23	13
4	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	25	6	12	6	2
5	Esteraza z wątroby końskiej	15	4	17	6	4
6	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	5	4	0.4	3	4
7	Lipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1	1	4	2
8	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	3	1	2	2	0.2
9	Esteraza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1	0	1	1

[a] Relatywne szybkości reakcji obliczono na podstawie danych zawartych w Tabelach 1 i 3, ze wzoru $V_{rel} = (V_{enz}/V_{noE})-1$, przykład obliczeń dla substratu **61** i lipoproteinowej lipazy z *Burkholderia sp.*: $V_{rel} = (148 \text{ nM s}^{-1}/3.0 \text{ nM s}^{-1})-1 = 49$.

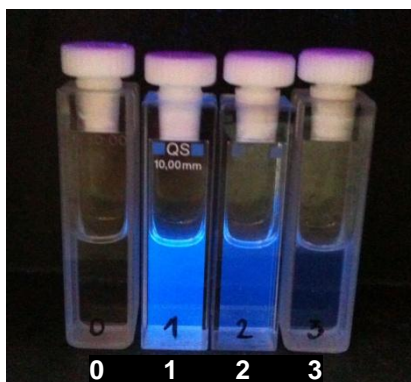
Zmiany intensywności fluorescencji podczas reakcji enzymatycznej śledziłam za pomocą spektrofluorymetru w ciągu godziny dla każdego z enzymów. Był to czas wystarczający do zakończenia reakcji dla większości biokatalizatorów. W przypadku bardziej aktywnych enzymów całkowita hydroliza substratu była obserwowana już po 10 minutach. Pomiar spektrofotometryczny wymagały zastosowania roztworów enzymów o stężeniu 200 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$, podczas gdy pomiary spektrofluorymetryczne były możliwe przy zastosowaniu 10-krotnego rozcieńczenia. Jak można wywnioskować z zależności zmian intensywności fluorescencji w czasie (Rysunek 2) mieszane węglany **61-64** są nie tylko wysoce selektywnymi próbnikami do pomiarów aktywności hydrolitycznych, ale również wysoce stabilnymi w warunkach pomiaru. Związek **61** i (*R*)-**64** były całkowicie hydrolizowane do fluorescencyjnej 7-hydroksy-4-metylokumaryny w ciągu zaledwie 5 minut przez lipazę lipoproteinową z *Burkholderia sp.* Związek **63** był hydrolizowany w ciągu pół godziny, natomiast najmniej reaktywny w tym przypadku związek **62** po ponad godzinie. 7-hydroksy-4-metylokumaryna była 16 razy szybciej uwalniana z substratu (*R*)-**64** niż z (*S*)-**64**.



Rysunek 2. Zależność intensywności fluorescencji w czasie dla związków **61-64** ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm; $\lambda_{\text{em}}=445$ nm). Pomiary prowadzono w temperaturze 30°C w buforze fosforanowym (pH 7.4) w obecności BSA (2 mg·mL⁻¹), 100 μM substratu, z dodatkiem lub bez dodatku lipoproteinowej lipazy z *Burkholderia sp.* (●) 100 μM substratu **61**, 50 μg mL⁻¹ enzymu, 2 mg mL⁻¹ BSA; (○) 100 μM substratu **61**, 2 mg mL⁻¹ BSA; (▲) 100 μM substratu **62**, 50 μg mL⁻¹ enzymu, 2 mg mL⁻¹ BSA; (△) 100 μM substratu **62**, 2 mg mL⁻¹ BSA; (■) 100 μM substratu **63**, 50 μg mL⁻¹ enzymu, 2 mg mL⁻¹ BSA; (□) 100 μM substratu **63**, 2 mg mL⁻¹ BSA; (×) 100 μM substratu (S)-**64**, 50 μg mL⁻¹ enzymu, 2 mg mL⁻¹ BSA; (+) 100 μM substratu (S)-**64**, 2 mg mL⁻¹ BSA; (◆) 100 μM substratu (R)-**64**, 50 μg mL⁻¹ enzymu, 2 mg mL⁻¹ BSA; (◇) 100 μM substratu (R)-**64**, 2 mg mL⁻¹ BSA.

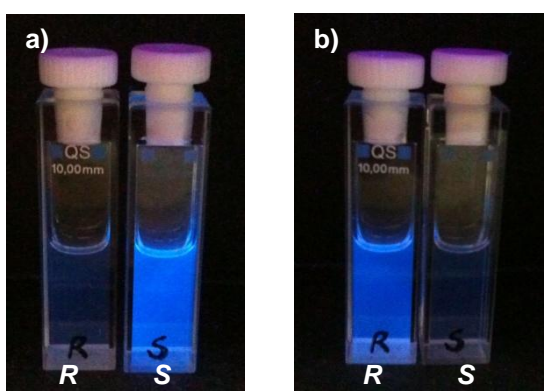
Próbniki te można zastosować do oceny aktywności enzymów hydrolitycznych prowadząc obserwację pod lampą UV (366 nm), co sprawia że metoda ta jest łatwa do zastosowania w każdym laboratorium, bez potrzeby stosowania spektrofluorymetru. Zdjęcia kuwet, przedstawione na Rysunku 3, zrobiłam 5 minut po zainicjowaniu reakcji. W każdej kuwecie znajdował się roztwór BSA (o stężeniu 2 mg mL⁻¹) w buforze fosforanowym o pH 7.4 oraz próbnik fluorogenny. Odpowiednio od lewej w kuwecie „0” znajdował się związek **61** (ślepa próba), w kuwecie „1” również związek **61**, w „2” związek **62**, a w „3” próbnik **63**. Do próbek 1-3 dodałam lipazy z *Candida rugosa* i obserwowałam pojawianie się silnej fluorescencji o zabarwieniu niebieskim. Związek **61** najszybciej uwalniał 7-hydroksy-4-

metylokumarynę, dlatego intensywność emitowanego światła po 5 minutach była w jego przypadku największa. Związek **62** był wolniej hydrolizowany przez enzym, a związek **63** bardzo wolno. W przypadku próbki „0” zaobserwować można było autohydrolizę.



Rysunek 3. Zastosowanie próbników **61-63** do oceny aktywności enzymów hydrolitycznych pod lampą UV „gołym okiem”.

Podobną ocenę stereoselektywności przeprowadziłam dla enancjomerów (*R*)-**64** i (*S*)-**64**. Rysunek 4 przedstawia różnicę w emitowanym promieniowaniu jaką można obserwować dla stereoselektywnych enzymów. Lipaza z *Candida rugosa* preferuje substrat o konfiguracji *S*, dlatego próbka zawierająca próbnik (*S*)-**64** zaczyna świecić szybciej i z większą intensywnością (Rysunek 4a). Natomiast lipoproteinowa lipaza z *Burkholderia cepacia* preferuje substrat o konfiguracji *R* (Rysunek 4b). Obserwacje prowadzone z zastosowaniem lampy UV pozostają w zgodzie z pomiarami przeprowadzonymi za pomocą spektrofluorymetru.



Rysunek 4. Zastosowanie próbników (*R*)-**64** i (*S*)-**64** do oceny enancjoselektywności enzymów hydrolitycznych pod lampą UV „gołym okiem”.

Aby ocenić przydatność zsyntetyzowanych próbników fluorogennych do badań przesiewowych przeprowadziłam reakcje w powiększonej skali. Zmieszałam równomolowe

ilości związków (*R*)-**64** i (*S*)-**64** i poddałam reakcji hydrolizy enzymatycznej w obecności BSA. Aby możliwe było wyznaczenie enancjoselektywności reakcji należało określić konwersje oraz skład enancjomeryczny uzyskanych produktów lub nieprzereagowanych substratów. Enancjomery 2-fenyletanolu nie dzieliły się na żadnej z dostępnych kolumn chromatograficznych (OD-H, OJ-H, AD-H). Z danych literaturowych wynika, że rozdział 2-fenyletanolu można prowadzić na chiralnych kolumnach GC, niestety wymaga to przeprowadzenia derywatywacji, a czasy retencji są bardzo zbliżone. Dlatego opracowałam metodę rozdziału enancjomerów mieszanego węgla 2-fenyletanolu i 7-hydroksy-4-metylokumaryny za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, który w mieszaninie poreakcyjnej będzie stanowił nieprzereagowany substrat. Do tego celu najbardziej efektywna okazała się kolumna Chiralpak AD-H (Daicel), na której czasy retencji enancjomerów różniły się o 4 minuty, a całkowity czas analizy trwał 25 minut. Wykorzystanie pochodnych fluoroforów jest powszechnie znaną metodą derywatywacji, w celu osiągnięcia skutecznego rozdziału związków na kolumnach chromatograficznych.¹⁴⁴ Na podstawie uzyskanych konwersji i nadmiarów enancjomerycznych nieprzereagowanego substratu ze wzoru:

$$E = \frac{\ln [1-c(1-ees)]}{\ln [1-c(1+ees)]}$$

obliczyłam wartości enancjoselektywności reakcji (*E*), a następnie porównałam z wartościami obliczonymi dla pomiarów fluorymetrycznych (Quick *E*). Wartości Quick *E* stanowiły stosunek szybkości relatywnej szybciej reagującego enancjomeru (*V_{rel}fast*) do szybkości relatywnej wolniej reagującego enancjomeru (*V_{rel}slow*). Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 13.

Enancjoselektywność jest bardzo istotnym parametrem służącym do porównania efektywności działania różnych enzymów. Niestety oczyszczenie produktów reakcji, a następnie wykonanie analizy chromatograficznej są czynnościami bardzo czasochłonnymi. Dlatego też wyznaczenie wartości Quick *E* jest alternatywnie stosowaną metodą i pozwala na oszacowanie enancjoselektywności enzymów w bardzo krótkim czasie, na podstawie pomiarów szybkości początkowych reakcji. Porównanie parametru enancjoselektywności obliczonego z analiz chromatograficznych oraz z pomiarów fluorymetrycznych zostało przedstawione w Tabeli 13. Wartości *E* są niższe, gdyż w przypadku powiększonej skali obydwie enancjomery substratu znajdowały się w jednej mieszaninie reakcyjnej i konkurowały pomiędzy sobą o dostęp do miejsca aktywnego enzymu. Konkurencja nie miała miejsca w metodzie fluorymetrycznej, ponieważ pomiary były prowadzone dla każdego z enancjomerów oddzielnie. Wyniki otrzymane z powiększonej skali i z mikroskali

¹⁴⁴ M. D. Mertens, M. Gütschow, *Chirality* **2013**, 25, 957-964.

dobrze ze sobą korelują, dlatego zsyntetyzowane próbki są odpowiednie do oszacowywania enancjopreferencji enzymów.

Tabela 13. Porównanie enancjoselektywności reakcji wyznaczonych z powiększonej skali i z mikroskali.

Lp.	Enzym	Liczba dni	Konwersja [%]	ee_s [%]	E	Quick E
1	Lipoproteinowa lipaza z <i>Burkholderia sp.</i>	1	74	96	7	21
2	Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	5	54	18	2	3
3	Lipaza z wątroby wieprzowej	1	55	52	4	2
4	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	1	81	56	2	3
5	Esteraza z wątroby końskiej	5	80	70	3	2
6	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	7	72	4	1	1
7	Lipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	55	34	2	2
8	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	5	57	60	5	10
9	Esteraza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	30	rac	1	1

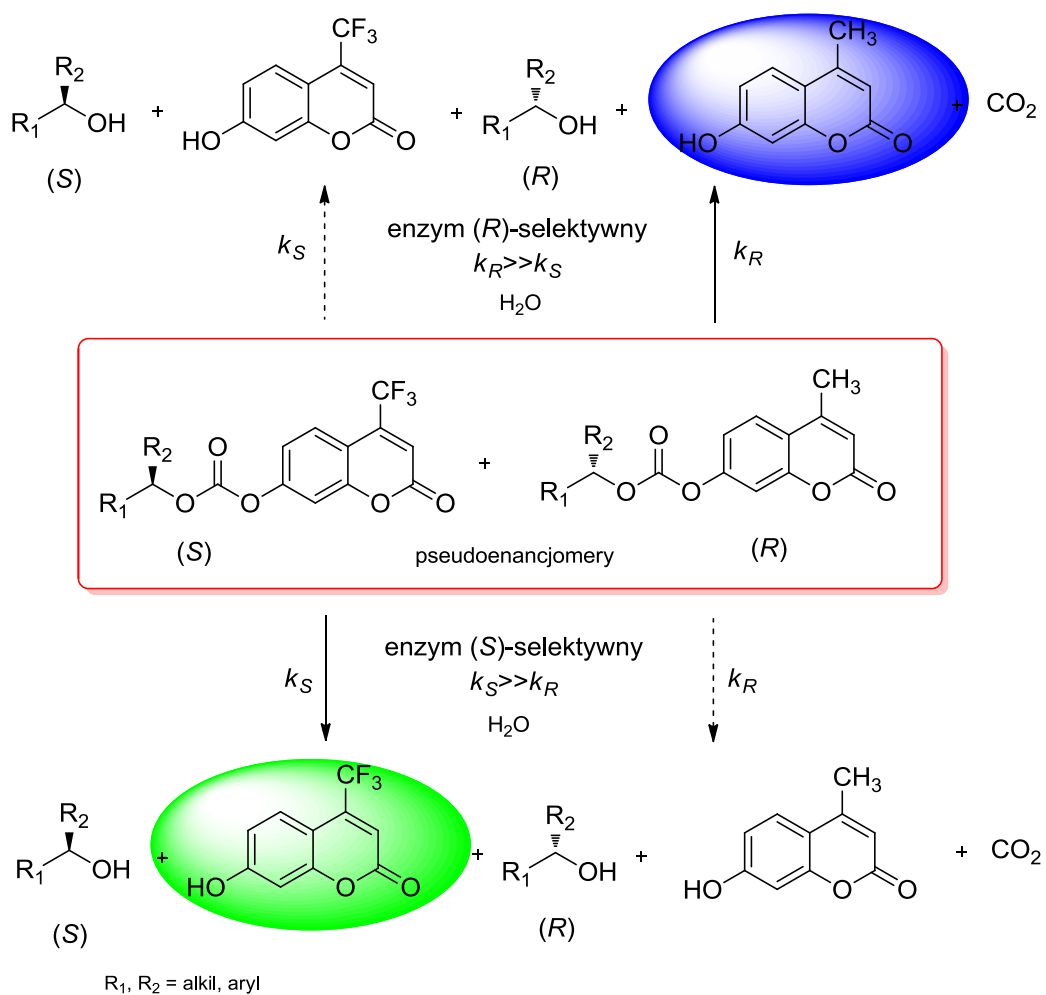
Warunki: 2 mg mL⁻¹rac-62, 1 mg mL⁻¹ enzymu w PBS pH 7.4/acetonitryl (80/20, obj./obj.), 2 mg mL⁻¹ BSA. Próbkę analizowano za pomocą HPLC z użyciem kolumn z wypełnieniem chiralnym.

Substraty dodawałam do reakcji w postaci 5 mM roztworów w acetonitrylu. Można je było przechowywać w obniżonej temperaturze przez kilka tygodni bez zauważalnego rozkładu. Jest to duża zaleta w porównaniu do niestabilnych estrów 7-hydroksy-4-metylokumaryny. Wykazałam, że związki te są dobrymi substratami dla enzymów hydrolitycznych, niepodatnymi na niespecyficzną hydrolizę, stabilnymi w czasie. Dzięki szeregowi zalet mieszane węglany alkoholi i 7-hydroksy-4-metylokumaryny są odpowiednie do zastosowań HTS oraz rutynowych badań aktywności i stereoselektywności enzymów hydrolitycznych. Mieszane węglany stanowią nową, uniwersalną klasę próbników fluorogennych do badania aktywności hydrolitycznych enzymów oraz ich enancjopreferencji. Ponadto ich droga syntezy jest prosta i pozwala na otrzymanie dużego spektrum substratowego. Oznaczenia takie można prowadzić w roztworach wodnych dla różnych preparatów biologicznych zawierających hydrolazy, w procesie oczyszczania enzymów, w procesie ich immobilizacji, hodowlach inokulum, fermentacji w skali laboratoryjnej i przemysłowej. Wyniki przedstawione w tym podrozdziale zostały opublikowane w czasopiśmie *ChemBioChem*.

9.2. Próbniki fluorogenne do oznaczania stereoselektywności enzymów hydrolitycznych

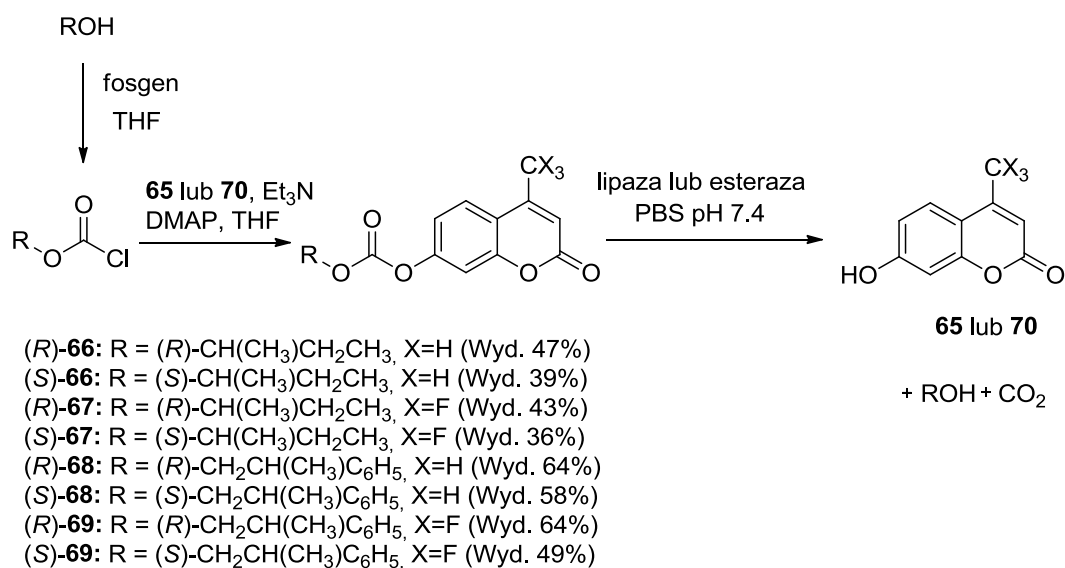
Opracowana fluorometryczna metoda szacowania stereoselektywności reakcji dla związków (*R*)-**64** i (*S*)-**64** nie uwzględniała ich współzawodnictwa do miejsca aktywnego enzymu. Aby uwzględnić wpływ reakcji konkurencyjnych powszechnie stosuje się dodatek związku referencyjnego (Rozdział 3.2.2.). Jednak stosowane do tej pory związki referencyjne różnią się budową przestrzenną od substratów w tak znacznym stopniu, że ich dodatek nie naśladuje warunków mieszanej racemicznej. Aby zmniejszyć tę niedogodność zmieniłam ideę dalszych badań poprzez zastosowanie mieszanej pseudoenancjimerów substratów. Zgodnie z tą koncepcją^{49,50} zastosowanie pary związków pseudoenancjimerów pozwoli na wyznaczenie ich szybkości reakcji w jednym eksperymencie, jeżeli związki będą różnić się właściwościami spektroskopowymi. Aby próbki różniły się długością fali emisji, przy której intensywność fluorescencji osiąga wartość maksymalną, postanowiłam do syntezy zastosować pochodne 7-hydroksykumaryny, które w pozycji 4 będą posiadały podstawnik metylowy bądź trifluorometylowy. Zamiana trzech atomów wodoru na trzy atomy fluoru nie powoduje znacznej zmiany wielkości cząsteczki 7-hydroksykumaryny, wpływa natomiast na przesunięcie długości fali emisji, przy której sygnał intensywności fluorescencji jest najwyższy. Zastosowanie mieszanych węglanów, które w trakcie trawienia będą uwalniały odpowiednio 7-hydroksy-4-metylokumarynę ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=445$ nm) i 7-hydroksy-4-trifluorometylokumarynę ($\lambda_{\text{ex}}=385$ nm, $\lambda_{\text{em}}=500$ nm) może pozwolić na monitorowanie postępu reakcji w czasie rzeczywistym za pomocą spektroskopii w trzech wymiarach: intensywność fluorescencji - długość fali emisji - czas, Schemat 57. Nieduża różnica w wydajnościach kwantowych 7-hydroksy-4-metylokumaryny $\Phi_{\text{F}}=0.63$ i 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny $\Phi_{\text{F}}=0.34$ może umożliwić wyznaczenie enancjoselektywności dla pseudoenancjimerów w jednym eksperymencie.¹⁴⁵

¹⁴⁵ W. C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3107-3110.



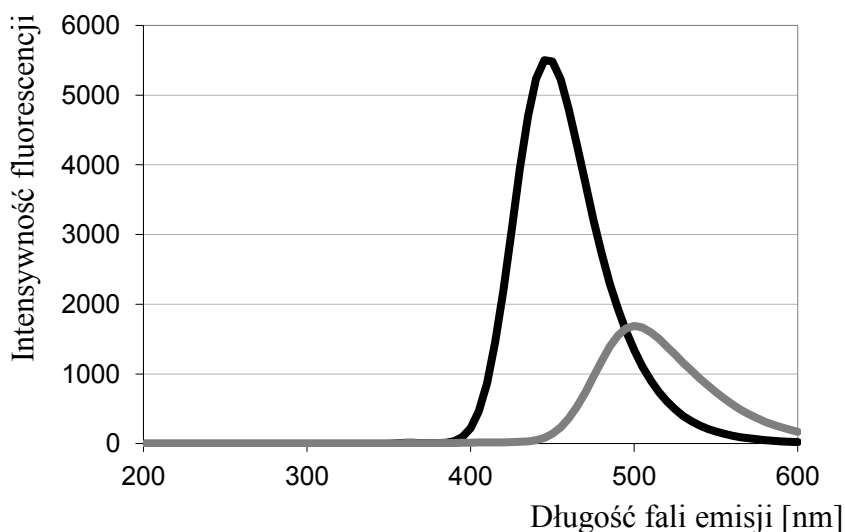
Schemat 57

Zgodnie z wcześniej opracowaną procedurą zsyntetyzowałam mieszane węglany alkoholi drugorzędowych i 7-hydroksy-4-metylokumaryny oraz 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny **66-69** z wydajnościami 36-64%, Schemat 58. Związki **66-69** nie wykazują fluorescencji, dopiero uwalniane w czasie reakcji enzymatycznej pochodne kumaryny emitują promieniowanie, którego intensywność można rejestrować za pomocą spektrofluorymetru.



Schemat 58

Uwalniane w czasie reakcji enzymatycznej pochodne kumaryny różnią się widmami fluorescencji, co zostało przedstawione na Schemacie 59. Sygnały częściowo nakładają się na siebie, dlatego nie było możliwe rejestrowanie zmian intensywności fluorescencji przy długości fali odpowiadającej maksimum intensywności fluorescencji. Dobrałam warunki pomiaru tak, aby możliwe było obserwowanie postępu hydrolizy obydwu pseudoenancjomerów w jednym eksperymencie, przy dwóch długościach fali. Długość fali wzbudzenia została ustawiona na 360 nm, natomiast wzrost intensywności fluorescencji w czasie obserwowałam przy długości fali emisji 430 nm dla 7-hydroksy-4-metylokumaryny i 550 nm dla 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny.



Schemat 59. Widmo fluorescencji 7-hydroksy-4-metylokumaryny (czarny) i 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny (szary); $\lambda_{ex}=360$ nm.

Najpierw przeprowadziłam pomiary wzrostu intensywności fluorescencji w czasie reakcji hydrolizy dla każdego związku oddzielnie **66-67**. Wyznaczone szybkości reakcji przedstawiłam w Tabeli 14.

Tabela 14. Szybkości początkowe reakcji hydrolizy enzymatycznej [nM s^{-1}] wyznaczone dla substratów **66-67**.

Lp.	Lipaza lub Esteraza	V_0 [nM s^{-1}] ^[a]			
		(R)- 66	(S)- 66	(R)- 67	(S)- 67
1	-	0.3	0.3	0.5	0.5
2	Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	92	126	97	121
3	Esteraza z wątroby wieprzowej	154	142	49	49
4	Lipaza z trzustki wieprzowej	36	20	35	24
5	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	10	12	13	10
6	Esteraza z wątroby końskiej	13	11	10	8
7	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	95	139	99	131
8	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	2	3	1	1
9	Esteraza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	3	6	10
10	Lipoproteinowa lipaza z <i>Burkholderia sp.</i>	10	7	64	67
11	Lipoproteinowa lipaza z <i>Pseudomonas sp.</i>	3	7	3	11

^[a] Warunki: 50 μM każdego substratu w PBS (pH 7.4, 100 mM), 30 °C, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzymu; zmiany intensywności fluorescencji rejestrowano dla (R)-**66** i (S)-**66** przy długości fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, i długości fali emisji $\lambda_{\text{em}}=430$ nm; dla (R)-**67** i (S)-**67** $\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=550$ nm.

Oznaczone szybkości początkowe reakcji próbników o tej samej konfiguracji, np. (R)-**66** i (R)-**67** były do siebie bardzo zbliżone. Wyjątkiem były trzy reakcje: katalizowana esterazą z wątroby wieprzowej (Tabela 14, poz. 3), lipoproteinową lipazą z *Burkholderia sp.* (Tabela 14, poz. 10) oraz esterazą z *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 14, poz. 9). Wynika stąd, że enzymy te są specyficzne, co potwierdzają dane literaturowe. Każda zmiana w strukturze substratu, nawet w pozycji bardzo odległej od centrum stereogenicznego może powodować inne dopasowanie do centrum aktywnego enzymu, a tym samym wpływać na szybkość przekształcania substratu. Szybkości reakcji autohydrolizy dla wszystkich próbników były niskie, co potwierdza, że są one stabilne w warunkach pomiaru. Następnie wyznaczyłam szybkości reakcji hydrolizy dla mieszanin pseudoracemicznych (Tabela 15), co powinno lepiej odzwierciedlać warunki rozdziału kinetycznego. W tym celu mieszałam pary pseudoenancjomerów: (R)-**66** z (S)-**67** oraz (S)-**66** z (R)-**67** w stosunku molowym 1:1.

Tabela 15. Szybkości reakcji hydrolizy enzymatycznej [nM s^{-1}] wyznaczone dla mieszaniny substratów **66-67**.

Lp.	Lipaza lub Esteraza	V_0 [nM s^{-1}] ^[a]			
		mieszanina		mieszanina	
		pseudoenancjomerów		pseudoenancjomerów	
		(R)-66 i (S)-67		(S)-66 i (R)-67	
		(R)-66	(S)-67	(R)-66	(S)-67
1	-	0.3	0.5	0.5	0.3
2	Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	62	125	78	137
3	Esteraza z wątroby wieprzowej	49	53	64	50
4	Lipaza z trzustki wieprzowej	31	11	18	11
5	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	9	9	8	6
6	Esteraza z wątroby końskiej	8	7	15	10
7	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	40	125	50	103
8	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	3	1	2	3
9	Esteraza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	26	12	4
10	Lipoproteinowa lipaza z <i>Burkholderia sp.</i>	12	87	104	9
11	Lipoproteinowa lipaza z <i>Pseudomonas sp.</i>	0.6	0.7	0.5	0.3

^[a] Warunki: 50 μM każdego substratu w PBS (pH 7.4, 100 mM), 30 °C, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzymu. Zmiany intensywności fluorescencji rejestrowano przy dwóch długościach fali jednocześnie $\lambda_{\text{em}}=430$ nm i $\lambda_{\text{em}}=550$ nm.

W większości eksperymentów, początkowe szybkości reakcji zarejestrowane dla każdego z pseudoenancjomerów w mieszaninie były niższe niż w przypadku pomiarów dla pojedynczych enancjomerów. Jest to zgodne z przewidywaniami, gdyż w mieszaninie następuje współzawodnictwo do miejsca aktywnego enzymu. 2-Butanol, ze względu na niewielkie różnice w wielkości podstawników jest trudnym substratem do rozdziału kinetycznego. Do tej pory pojawiło się zaledwie kilka prac opisujących biokatalityczne metody otrzymywania enancjomerycznie czystych stereoizomerów 2-butanolu.¹⁴⁶ Analizując wyniki w Tabeli 15 zauważyłam, że w dwóch przypadkach (Tabela 15, poz. 9 i 10)

¹⁴⁶ Z. Prokop, Y. Sato, J. Brezovsky, T. Mozga, R. Chaloupkova, T. Koudelakova, P. Jerabek, V. Stepankova, R. Natsume, J. G. E. Leeuwen, D. B. Janssen, J. Florian, Y. Nagata, T. Senda, J. Damborsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6111-6115.

wyznaczenie enancjopreferencji nie było możliwe. Wyniki dla obydwu par pseudoenancjomerów były ze sobą sprzeczne. Wynika to z chemoselektywności tych enzymów i większej szybkości hydrolizowania pochodnej 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny. Dla obydwu par pseudoenancjomerów: (*R*)-**66** i (*S*)-**67**; (*R*)-**67** i (*S*)-**66** zawsze szybciej hydrolizowana była pochodna 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny, dlatego jeden z pomiarów sugerował preferencję w kierunku enancjomeru (*S*)-**67**, a drugi (*R*)-**67**.

Przeprowadzone pomiary zmiany intensywności fluorescencji przy dwóch długościach fali emisji dla par pseudoenancjomerów nie dawały jednoznacznej odpowiedzi na temat enancjopreferencji enzymów. Dlatego też, postanowiłam wyznaczyć wartości Quick *E*, wykorzystując obecność drugiego z pseudoenancjomerów jako związku referencyjnego. Dzięki temu uwzględnione będzie zjawisko konkurencji do miejsca aktywnego enzymu, natomiast zjawisko chemoselektywności powinno być pomijalne. Bazując na używanych wynikach (Tabela 15) oraz badaniach literaturowych (Rozdział 3.2.2.) wyznaczyłam wartości Quick *E* ze wzoru $E = V_{\text{fast}}/V_{\text{ref}}/V_{\text{slow}}/V_{\text{ref}}$, gdzie wartość V_{ref} zastąpiłam wartością szybkości początkowej hydrolizy pseudoenancjomeru o przeciwnej konfiguracji (np. dla lipazy z *Candida rugosa* $E = ((S)\text{-66}/(R)\text{-67})/((R)\text{-66}/(S)\text{-67}) = (137/78)/(62/125) = 3.5$).

Aby sprawdzić słuszność zaproponowanej metody postanowiłam porównać wyniki z pomiarów fluorymetrycznych dla mieszaniny psudoracemicznej z wynikami rozdziału kinetycznego dla mieszaniny racemicznej, co zostało przedstawione w Tabel 16. Związki (*R*)-**66** i (*S*)-**66** mieszałam w ilości równomolowej, uzyskując racemat, a następnie przeprowadziłam reakcje w powiększonej skali dla każdego z enzymów. Następnie mieszaniny reakcyjne analizowałam za pomocą techniki HPLC, w celu wyznaczenia konwersji i nadmiarów enancjomerycznych. Analizę chromatograficzną wykonałam dla nieprzereagowanych substratów. Aby na podstawie konwersji (*c*) i nadmiarów enancjomerycznych substratu (ee_s) wyznaczyć enancjoselektywność (*E*) reakcję przerywałam, gdy konwersja przekroczyła wartość 50%. Wartość *E* obliczyłam na podstawie równania Chen'a (Rozdział 3.2.).

Tabela 16. Enzymatyczny rozdział kinetyczny w skali preparatywnej dla związku *rac-66*.

Lp. Lipaza lub esteraza ^[a]	Czas (godz.)	<i>c</i> (%)	<i>ee</i> (%) ^[b]	<i>E</i>	Quick <i>E</i> ^[c]
1 Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	4	80	37	1.6 (<i>S</i>)	3.5 (<i>S</i>)
2 Esteraza z wątroby wieprzowej	2	69	6	1.1 (<i>R</i>)	1.2 (<i>R</i>)
3 Lipaza z trzustki wieprzowej	72	55	44	3.2 (<i>R</i>)	4.6 (<i>R</i>)
4 Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	6	94	62	1.6 (<i>R</i>)	1.3 (<i>R</i>)
5 Esteraza z wątroby końskiej	4	59	3	1.1 (<i>R</i>)	1.7 (<i>R</i>)
6 Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	72	84	99	5.8 (<i>S</i>)	6.4 (<i>S</i>)
7 Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	4	52	4	1.1 (<i>R</i>)	2.0 (<i>R</i>)
8 Esteraza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	96	57	5	1.1 (<i>S</i>)	2.2 (<i>S</i>)
9 Lipoproteinowa lipaza z <i>Burkholderia sp.</i>	4	97	47	1.3 (<i>R</i>)	1.6 (<i>R</i>)
10 Lipoproteinowa lipaza z <i>Pseudomonas sp.</i>	2	76	18	1.3 (<i>R</i>)	1.4 (<i>R</i>)

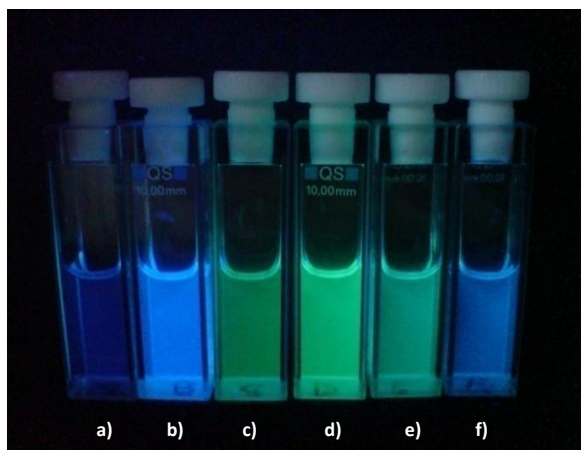
^[a]Warunki: 2 mg mL⁻¹ *rac-66*, 1 mg mL⁻¹ enzymu w buforze fosforanowym (pH 7.4, 100 mM), 20% (v/v) acetonitryl. ^[b]Próbki analizowano z wykorzystaniem chiralnych kolumn HPLC (Chiralpak AD-H column).

^[c]Wartości Quick *E* wyliczono z równania Kazlauskas'a, gdzie szybkości hydrolizy związków referencyjnych zastąpiono szybkością reakcji drugiego z pseudoenancjomerów: Quick $E = (V_{\text{fast}}/V_{\text{ref}})/(V_{\text{slow}}/V_{\text{ref}})$ gdzie V_{fast} to szybkość hydrolizy szybciej reagującego enancjomeru, a V_{slow} to szybkość hydrolizy wolniej reagującego enancjomeru, V_{ref} to szybkość hydrolizy pseudoenancjomeru o przeciwnej konfiguracji.

Oznaczone wartości Quick *E* i *E* dobrze ze sobą korelowały. Z pośród przebadanych enzymów, lipaza z *Candida cylindracea* (Tabela 16, poz. 6) charakteryzowała się najwyższą enancjoselektywnością, wynoszącą 99% *ee*. Na podstawie porównania enancjoselektywności wyznaczonych z pomiarów fluorymetrycznych i analizy chromatograficznej można stwierdzić, że uzyskane próbki w postaci par pseudoenancjomerów mogą być stosowane do wykrywania, oznaczania aktywności enzymatycznej oraz szacowania stereoselektywności reakcji katalizowanych przez hydrolazy, takie jak: lipazy i esterazy. Pomiar prowadzone dla każdego z enancjomerów substratu w obecności związków referencyjnych uwzględniają zjawisko konkurencji do miejsca aktywnego enzymu. Co więcej, zastosowanie pseudoenancjomeru o przeciwnej konfiguracji jako związku referencyjnego, w bardzo dobrym stopniu odzwierciedla warunki pomiarów w mieszaninie racemicznej.

Ponieważ obydwie pochodne kumaryny emitują światło o różnym zabarwieniu możliwe jest obserwowanie postępu reakcji pod lampą UV (366 nm). 7-Hydroksymetylokumaryna emituje światło o kolorze niebieskim, natomiast 7-hydroksy-4-

trifluorometylokumaryna o kolorze zielonym. Już na podstawie porównania intensywności i koloru zabarwienia można szacować enancjopreferencję enzymów. Na Rysunku 5 przedstawiłam zdjęcie kuwet, które zrobiłam 5 minut po zainicjowaniu reakcji poprzez dodanie lipazy z *Candida cylindracea*.



Rysunek 5. Oznaczanie enancjopreferencji enzymów w reakcjach hydrolizy próbników **66-67** obserwowanych pod lampą UV (366 nm). W kuwetach pomiarowych zawierających bufor fosforanowy o pH 7.4 umieszczono związki fluorogenne odpowiednio (od lewej): a) 50 μM (R)-**66**; b) 50 μM (S)-**66**; c) 50 μM (R)-**67**; d) 50 μM (S)-**67**; e) 50 μM (R)-**66** oraz 50 μM (S)-**67**; f) 50 μM (S)-**66** oraz 50 μM (R)-**67**. Do każdej kuwety dodano po 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ lipazy z *Candida cylindracea* i przez 5 minut obserwowano zmianę zabarwienia roztworów pod lampą UV.

W próbce pierwszej (od lewej) został umieszczony próbnik (R)-**66**, w drugiej (S)-**66**. Ponieważ (S)-**66** szybciej emitował światło i o większej intensywności można wnioskować, że enzym preferuje substrat o konfiguracji (S). Potwierdza to kolejna para eksperymentów dla związków (R)-**67** i (S)-**67**. Zmieszanie pary pseudoenancjomerów (R)-**66** i (S)-**67**, z których (R)-**66** uwalnia 7-hydroksymetylokumarynę o kolorze niebieskim, a (S)-**67** 7-hydroksy-4-trifluorometylokumarynę o kolorze zielonym i zaobserwowanie zabarwienia mieszaniny reakcyjnej na zielono świadczy o tym iż szybciej zhydrolizował związek (S)-**67**. Zmieszanie pary pseudoenancjomerów (S)-**66** i (R)-**67** i niebieski kolor mieszaniny świadczy o szybszej hydrolizie substratu o konfiguracji (S). Obserwacje te są zgodne z wynikami otrzymanymi w poprzednich eksperymentach.

Aby sprawdzić zakres stosowalności tej metody zsyntetyzowałam związki o strukturze **68-69** (Schemat 58), a następnie przeprowadziłam oznaczenia szybkości reakcji dla odpowiednich par pseudoenancjomerów, Tabela 17.

Tabela 17. Wyznaczone szybkości początkowe reakcji hydrolizy fluorogennych substratów **68-69** katalizowanej przez lipazy i esterazy.

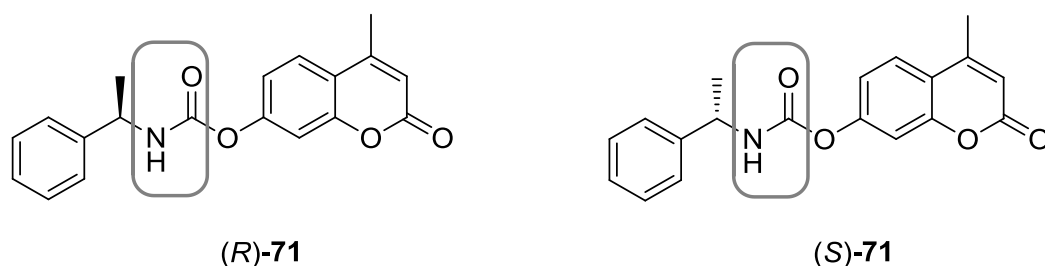
Lp.	Lipaza lub Esteraza	V_0 [nM s ⁻¹] dla pseudoenancjomerów (<i>R</i>)- 68 + (<i>S</i>)- 69		V_0 [nM s ⁻¹] dla pseudoenancjomerów (<i>S</i>)- 68 + (<i>R</i>)- 69		Quick <i>E</i>
		(<i>R</i>)- 68	(<i>S</i>)- 69	(<i>R</i>)- 69	(<i>S</i>)- 68	
1	-	0.7	0.3	0.3	0.7	
2	Lipaza z <i>Candida rugosa</i> Esteraza z wątroby wieprzowej	53	74	95	69	1.0
3	Lipaza z trzustki wieprzowej	4	3	1	2	1.5 (<i>S</i>)
4	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	10	17	14	14	1.7 (<i>S</i>)
5	Esteraza z wątroby końskiej	59	77	76	42	1.4 (<i>S</i>)
6	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	15	9	5	8	1.0
7	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	64	99	97	60	1.0
8	Esteraza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	5	4	4	2.0 (<i>R</i>)
9	Lipoproteinowa lipaza z <i>Burkholderia sp.</i>	5	83	39	28	11.9 (<i>S</i>)
10	Lipoproteinowa lipaza z <i>Pseudomonas sp.</i>	5	65	37	22	7.7 (<i>S</i>)
11		87	38	55	47	2.7 (<i>R</i>)

Warunki pomiaru: 50 μM każdego z substratów w buforze fosforanowym (pH 7.4, 100 mM), temp. pok., 50 μg mL⁻¹ enzymu.

Jak wynika z wyznaczonych szybkości reakcji, również w tym przypadku enzymy doskonale rozróżniają pochodną 7-hydroksy-4-metylokumaryny od 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny. W kilku przypadkach różnice pomiędzy szybkościami reakcji obydwu pochodnych były na tyle różne, że obserwowanie koloru zabarwienia pod lampą UV nie dałoby jednoznacznej odpowiedzi czy enzym jest (*R*) czy (*S*)-selektywny (Tabela 17, poz. 5, poz. 6, poz. 7, poz. 9, poz. 10). Dlatego też, bardzo pomocne do oszacowania enancjopreferencji jest wyznaczenie wartości Quick *E*. Na podstawie tych wartości stwierdziłam, że dwa enzymy wykazywały najwyższą enancjoselektywność: esteraza z *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 17, poz. 9) oraz lipoproteinowa lipaza z *Burkholderia sp.* (Tabela 17, poz. 10).

9.3. Próbniki do wykrywania aktywności lipaz, esteraz i proteaz

Zachęcona pozytywnymi wynikami otrzymanymi dla próbników fluorogennych do badania aktywności lipaz i esteraz postanowiłam sprawdzić czy mieszane węglany można wykorzystać także jako uniwersalne substraty do badań przesiewowych nad oznaczaniem aktywności i stereoselektywności lipaz, esteraz i proteaz. Jeżeli substraty do reakcji enzymatycznych będą posiadać w swojej strukturze wiązanie karbaminianowe, które jest wiązaniem izosterycznym do wiązania amidowego, powinny być akceptowane zarówno przez lipazy, esterazy oraz przez proteazy. W tym celu zsyntetyzowałam enancjomerycznie czyste związki (*R*)-71 i (*S*)-71 z wydajnościami 66%. Wzory strukturalne pokazałam na Schemacie 60. Związki te nie wykazywały fluorescencji, dopiero 7-hydroksy-4-metylokumaryna uwalniana w trakcie hydrolizy emitowała silne niebieskie promieniowanie.



Schemat 60. Związki fluorogene zawierające w swojej strukturze wiązanie karbaminianowe, izosteryczne do wiązania amidowego.

Następnie zbadałam szybkość autohydrolizy obydwu enancjomerów w buforze o pH 7.4. Okazało się, że próbki te ulegają bardzo szybkiej spontanicznej hydrolizie w środowisku obojętnym ($6 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$). Szybkość hydrolizy w środowisku lekko zasadowym (bufor fosforanowy o pH 8.0) była jeszcze większa ($12 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$), dlatego postanowiłam zmienić środowisko reakcji na lekko kwaśne (bufor fosforanowy o pH 6.0). Przy pH 6.0 następowało częściowe wygaszenie fluorescencji emitowanej przez uwalnianą w trakcie reakcji

7-hydroksy-4-metylokumarynę, ponieważ tylko niewielka ilość 7-hydroksy-4-metylokumaryny pozostawała w postaci zjonizowanej. W efekcie wartości sygnału pochodzącego od 7-hydroksykumaryny ulegały zmniejszeniu i tym samym czułość metody, jednakże tylko w tym środowisku związki były dosyć stabilne. Przeprowadziłam oznaczenie aktywności dla szeregu dostępnych handlowo proteaz, lipaz i esteraz. Wyniki zestawiałam w Tabeli 18.

Tabela 18. Wyznaczone szybkości początkowych reakcji hydrolizy próbników (*R*)-71 i (*S*)-71 w buforze fosforanowym o pH 6.0.

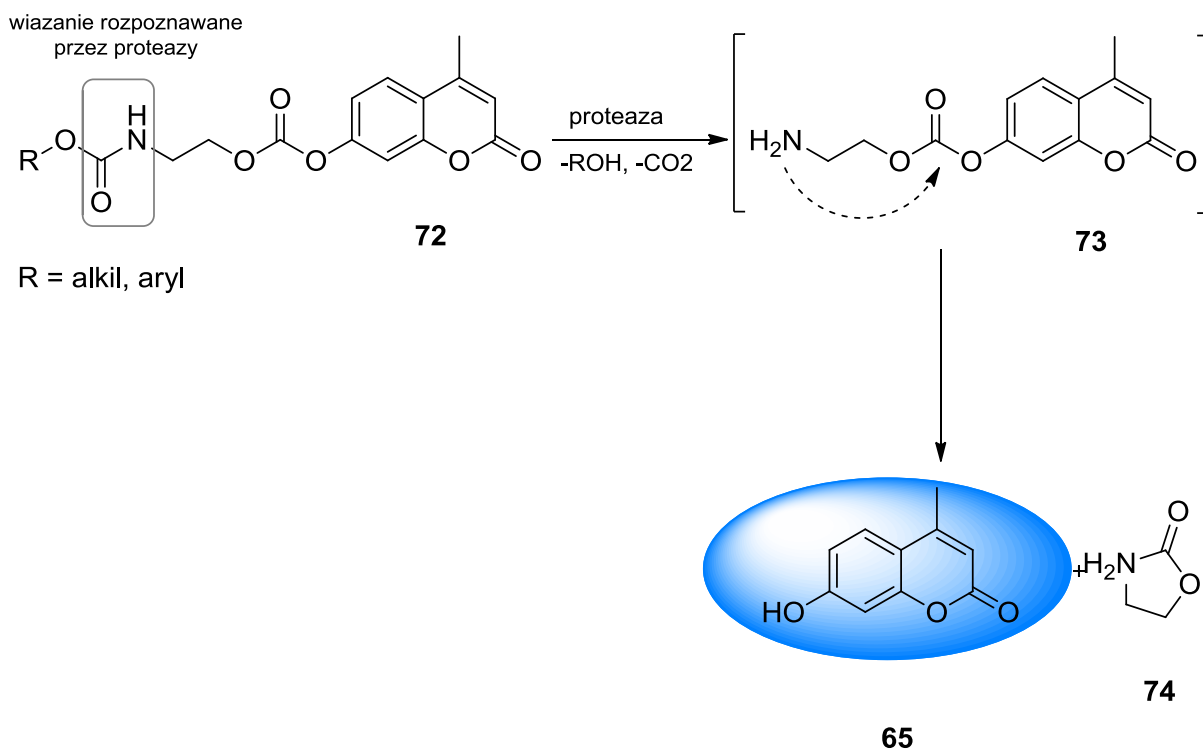
Enzym	V_0 [nM s ⁻¹]	
	(<i>R</i>)-71	(<i>S</i>)-71
Autohydroliza	2.0	2.0
Proteaza:		
Papaina	2.0	2.0
Proteaza z <i>Aspergillus saitoi</i>	2.0	2.0
Proteaza z <i>Bacillus licheniformis</i>	2.0	2.0
Proteaza z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2.0	2.0
Proteaza z <i>Aspergillus sp.</i>	2.3	2.5
Chymotrypsyna	2.7	2.8
Proteaza z trzustki wołowej Typ I	2.7	2.5
Proteaza z <i>Streptomyces griseus</i>	2.7	2.3
Proteaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	2.7	2.3
Lipaza:		
Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	2.3	2.5
Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	3.1	2.8
Esteraza:		
Esteraza z wątroby wieprzowej	2.7	2.5
Esteraza z wątroby końskiej	2.3	2.5

Niestety w większości przypadków enzymy nie były aktywne, albo wykazywały znikomą aktywność. Wynika stąd, że pochodne 1-feniloetyloaminy nie są odpowiednie do badań przesiewowych, gdyż ulegają szybkiej spontanicznej hydrolizie, ponadto nie są akceptowane przez enzymy hydrolityczne jako substraty. Utrudnione podejście substratu do miejsca aktywnego enzymu może wynikać z zawady sterycznej powodowanej przez dwa duże podstawniki: 1-feniloetyloaminę i ugrupowanie fluoroforu.

9.4. Próbniki do oznaczania aktywności, stereoselektywności oraz chemoselektywności proteaz

Bazując na danych literaturowych (Rozdział 3.4.2) i własnym doświadczeniu, sformułowałam koncepcję nowych próbników, gdzie substrat byłby połączony z fluoroforem za pomocą łącznika. Odsuniecie miejsca reakcyjnego od rozbudowanego przestrzennie

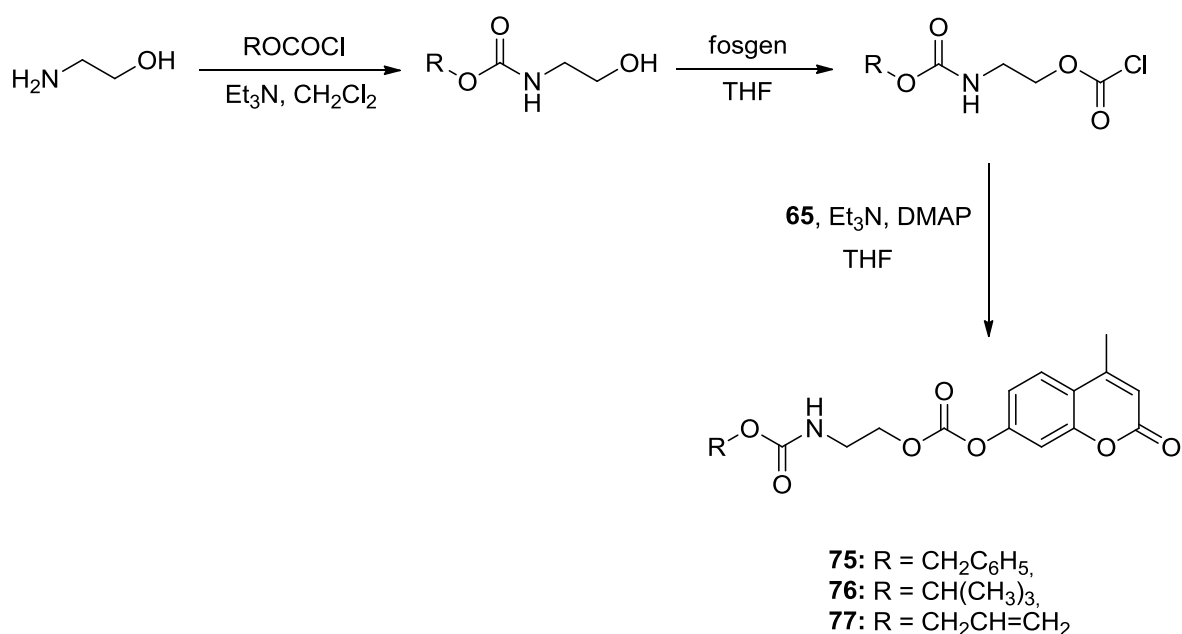
fluoroforu powinno zwiększyć dostępność substratu do centrum aktywnego enzymu oraz zmniejszyć podatność na autohydrolizę. Łącznikiem, który ulegałby samorzutnemu rozłączeniu, a jednocześnie pozwalał na przyłączenie fluoroforu może być aminoetanol. Zabezpieczenie grupy aminowej z jednej strony i przyłączenie fluoroforu z drugiej prowadziłoby do otrzymania próbników o strukturze **72**, przedstawionych na Schemacie 61. Chemoselektywna hydroliza wiązania karbaminianowego, katalizowana przez proteazę, według zaproponowanej koncepcji powinna zapoczątkować kaskadę reakcji. W pierwszym etapie powstawałby nietrwały produkt przejściowy **73**, który następnie w wyniku samorzutnej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji prowadziły do powstania okazolidyn-2-onu **74** wraz z odszczepieniem fluorescencyjnej 7-hydroksy-4-metylokumaryny **65**. Wzrost intensywności fluorescencji proporcjonalny do stężenia powstających produktów pozwoliłby na monitorowanie postępu reakcji.



Schemat 61

Związki takie mogą znaleźć zastosowanie do badań przesiewowych nad chemoselektywnym enzymatycznym odbezpieczaniem związków organicznych w łagodnych warunkach. Szereg reakcji następczych przedstawiłam na Schemacie 61. Bazując na wcześniej opracowanej procedurze syntezy próbników fluorogennych zaprojektowałam, a następnie wykonałam syntezę próbników do badania chemoselektywności proteaz. Metoda ta, w przeciwieństwie do metod zaproponowanych przez grupę Reymonda, oparta jest

nanieskomplikowanym trzyetapowym procesie zilustrowanym na Schemacie 62. Najpierw należy zabezpieczyć grupę aminową, stosowanymi powszechnie w syntezie organicznej grupami zabezpieczającymi, takimi jak chloromrówczan benzylu, chloromrówczan allilu, diwęglan di-tert-butyłowy. A następnie w reakcji z fosgenem otrzymuje się chloromrówczan, który z 7-hydroksy-4-metylokumaryną daje odpowiednie próbki o wzorach strukturalnych: **75**, **76** i **77**.



Schemat 62

W strukturze zsyntetyzowanych związków występują dwa wiązania, które mogą być rozłączane w wyniku hydrolizy enzymatycznej. Porównanie szybkości hydrolizy substratów **75**, **76** i **77** z szybkością hydrolizy związku referencyjnego **61**, który posiada tylko wiązanie węglanowe, pozwala na wyciągnięcie wniosków na temat chemoselektywności badanych enzymów. Jeżeli enzymy będą chemoselektywne względem wiązania karbaminianowego, szybkość hydrolizy związku referencyjnego pozostanie bardzo wolna. Wyniki w postaci wyznaczonych początkowych szybkości reakcji enzymatycznych dla szeregu dostępnych proteaz przedstawiłam w Tabeli 19.

Z wyznaczonych wartości szybkości autohydrolizy wynika, że wszystkie związki są bardzo stabilne w warunkach pomiaru, a szczególnie stabilny jest próbnik **77** ($V_0 = 0.01 \text{ nM s}^{-1}$). We wszystkich przypadkach hydroliza wiązania węglanowego była wolniejsza niż wiązania karbaminianowego, ponieważ związek referencyjny **61** reagował najwolniej.

Tabela 19. Wyznaczone początkowe szybkości reakcji hydrolizy próbników **61**, **75**, **76** i **77** katalizowanej przez proteazy.

Lp. Enzym	V_0 [nM s ⁻¹]			
	61	75	76	77
1 autohydroliza	0,1	0,3	0,8	0,01
2 α -chymotrypsyna	10	54	49	71
3 Proteaza z <i>Rhizopus sp.</i>	0,1	4,9	4,7	3,5
4 Proteaza z <i>Streptomyces griseus</i>	2,1	8,7	3	5,4
5 Proteaza z trzustki wołowej	6,6	56	32	53
6 Proteaza z <i>Aspergillus satoii</i>	0,9	4,5	3	3,5
7 Trypsyna wieprzowa	13	29	26	55
8 Trypsyna wołowa	6	15	15	22
9 Papaina	0,3	2,5	0,5	1,4
10 Proteaza z <i>Bacillus licheniformis</i>	4,2	13	9,4	5,9
11 Proteaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	1,4	2,4	1,8	1,9
12 Proteaza z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,6	2	0,8	1,1
13 BSA	1	2,9	1,6	1,1
14 Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	151	99	10	70

Warunki pomiaru: 100 μ M substratu w PBS pH 7.4, temp. pok., 25 μ g mL⁻¹ enzymu.

Ponadto, przeprowadziłam reakcję z niekatalitycznym białkiem (BSA), aby sprawdzić czy reakcja nie zachodzi poza centrum aktywnym enzymu. Jak wynika z porównania szybkości reakcji związku **61** i próbników **75-77** obecność niekatalitycznego białka wpływa bardzo nieznacznie na szybkość hydrolizy. Ponieważ wiązanie karbaminianowe jest wiązaniem izosterycznym zarówno do wiązania estrowego jak i amidowego może być hydrolizowane również przez lipazy. Aby potwierdzić tą hipotezę przeprowadziłam reakcję z zastosowaniem lipazy z *Candida rugosa*, co jednoznacznie potwierdziło, że lipazy hydrolizują obydwa wiązania. Natomiast, wiązanie węglanowe było hydrolizowane z większą szybkością. Wyniki te nie dają jednak jednoznacznej odpowiedzi, który z enzymów jest najbardziej chemoselektywny. Jeżeli za sygnał tła uznamy szybkość hydrolizy związku **61** to wyznaczenie relatywnych szybkości reakcji pozwoli mi na porównanie pomiędzy sobą różnych enzymów, Tabela 20.

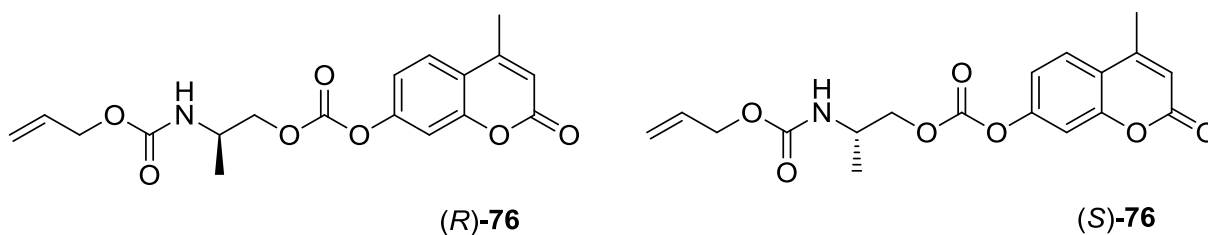
Tabela 20. Obliczone szybkości relatywne reakcji hydrolizy próbników **75-77** katalizowanej przez proteazy.

Lp.	Enzym	$V_{rel} [nM s^{-1}]^{[a]}$		
		75	76	77
1	α -chymotrypsyna	3	3	5
2	Proteaza z <i>Rhizopus sp.</i>	47	45	33
3	Proteaza z <i>Streptomyces griseus</i>	2	<1	<1
4	Proteaza z trzustki wołowej	7	3	6
5	Proteaza z <i>Aspergillus satoi</i>	3	1	2
6	Trypsyna wieprzowa	<1	<1	2
7	Trypsyna wołowa	<1	<1	2
8	Papaina	6	<1	3
9	Proteaza z <i>Bacillus licheniformis</i>	1	<1	<1
10	Proteaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	<1	<1	<1
11	Proteaza z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	<1	<1
12	BSA	<1	<1	<1

[a] $V_{rel}=(V_0/V_{61})-1$

Z wyliczonych szybkości relatywnych wynika, że proteaza z *Rhizopus sp.* była najbardziej chemoselektywnym enzymem. Katalizowała ona rozłączenie wiązania karbaminianowego kilkadziesiąt razy szybciej niż wiązania węglanowego. α -chymotrypsyna oraz proteaza z trzustki wołowej wykazywały umiarkowaną chemoselektywność.

Następnie zsyntetyzowałam enancjomerycznie czyste związki o strukturach (*R*)-**78** i (*S*)-**78**, przedstawionych na Schemacie 63, posiadające centrum stereogeniczne na atomie węgla sąsiadującym z wiązaniem karbaminianowym. Hydroliza enzymatyczna dwóch enancjomerów w osobnych pomiarach i porównanie ich szybkości reakcji pozwoliłoby na kontrolowanie nie tylko chemoselektywności, ale również enancjoselektywności reakcji.



Schemat 63

Ponieważ szybkość autohydrolizy była niska (0.9 nM s⁻¹) zsyntetyzowane próbniiki były odpowiednie do badań przesiewowych nad aktywnością i stereoselektywnością proteaz. Przeprowadziłam pomiary fluorymetryczne dla 3 wyselekcjonowanych poprzednio enzymów. Wyznaczone szybkości reakcji oraz relatywne szybkości reakcji zestawiałam w Tabeli 21.

Tabela 21. Wyznaczone początkowe szybkości, relatywne szybkości reakcji hydrolizy(*R*)-**78** i (*S*)-**78** oraz wartości Quick E dla reakcji katalizowanej przez proteazy.

Lp.	Enzym	V_0 [nM s ⁻¹]		V_{rel} [nM s ⁻¹]		Quick $E^{[b]}$
		(<i>R</i>)- 78	(<i>S</i>)- 78	(<i>R</i>)- 78	(<i>S</i>)- 78	
1	autohydroliza	0,9	0,9	-	-	-
2	α -chymotrypsyna	64	62	4	4	1.0
3	Proteaza z <i>Rhizopus sp.</i>	1,8	2,2	16	20	1.3
4	Proteaza z trzustki wołowej	38	43	4	5	1.2

[b] Quick $E = V_{fast}/V_{slow}$ gdzie V_{fast} to szybkość hydrolizy szybciej reagującego enancjomeru, a V_{slow} to szybkość hydrolizy wolniej reagującego enancjomeru

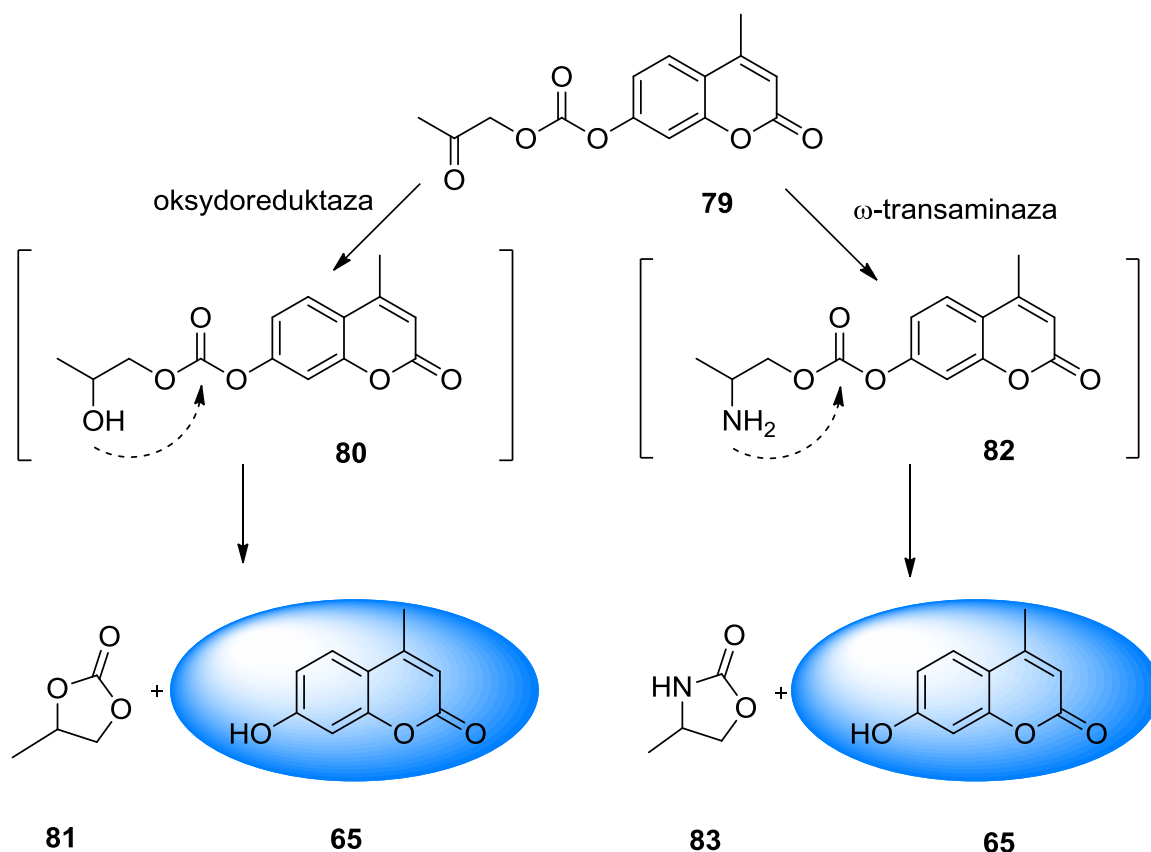
Za pomocą zaproponowanej metody można monitorować enancjoselektywność reakcji. Zbadane enzymy nie wykazywały stereopreferencji w stosunku do żadnego z enancjomerów. Proteaza z *Rhizopus sp.* również w tym przypadku wykazywała największą chemoselektywność (Tabela 21, poz. 3).

Zsyntetyzowane próbniiki fluorogenne były odpowiednie do badań przesiewowych nad aktywnością, chemoselektywnością oraz stereoselektywnością proteaz. Wykazywały bardzo niską podatność na autohydrolizę oraz bardzo małą tendencję do reakcji z niekatalitycznymi białkami. Dzięki oddaleniu zatłoczonego sterycznie fluoroforu od centrum reakcyjnego, związki te są bardzo dobrymi substratami dla enzymów proteolitycznych. Dzięki obecności wiązania karbaminianowego i węglanowego w cząsteczce substratu, możliwe było badanie chemoselektywności reakcji.

9.5. Próbniki do wykrywania aktywności transaminaz i oksydoreduktaz

W kolejnym etapie badań postanowiłam sprawdzić czy mieszane węglany można wykorzystać do badań przesiewowych nad aktywnością oksydoreduktaz i transaminaz. Zgodnie przedstawioną koncepcją synteza pochodnej hydroksyacetonu i 7-hydroksymetylokumaryny o wzorze **79** w zależności od zastosowanego enzymu powinna

pozwolić na oznaczanie szybkości reakcji, Schemat 64. W przypadku oksydoreduktaz związek **79** powinien być redukowany do alkoholu **80**. Następnie w wyniku spontanicznej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji powinien powstawać cykliczny węglan **81** wraz z odszczepieniem fluorescencyjnej 7-hydroksy-4-metylokumaryny **65**, której powstawanie można by monitorować za pomocą spektrofлуorymetru. Natomiast w przypadku transaminaz, powinno następować przeniesienie grupy aminowej na wiązanie węglanowe, a powstała amina **82** powinna samorzutnie cyklizować z uwolnieniem 7-hydroksy-4-metylokumaryny.



Schemat 64

Niestety zastosowanie opracowanej poprzednio procedury nie prowadziło do powstania oczekiwanego produktu. Modyfikacja procedury dała w efekcie mieszaninę dwóch związków z niskimi wydajnościami, których rozdzielenie za pomocą chromatografii kolumnowej nie było możliwe. Na podstawie analizy NMR stwierdziłam, że jednym ze związków jest pożądaną próbnik **79**, a drugim zanieczyszczenie w postaci hydroksyacetonu. Sprawdziłam czy dalsze zmagania z rozdzieleniem otrzymanych związków są celowe, dlatego przeprowadziłam oznaczenie spektrofлуorymetryczne szybkości autohydrolizy dla mieszaniny produktów. Otrzymany próbnik fluorogeny z dużą szybkością ulegał spontanicznej reakcji hydrolizy (19 nM s^{-1}) bez udziału enzymu, dlatego dalsze badania w tym kierunku nie były kontynuowane.

10. Rozdział kinetyczny pochodnych kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego

W celu uzyskania czystych enancjomerycznie związków przeprowadziłam enzymatyczny rozdział kinetyczny estru etylowego kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego. Najpierw zbadalam reakcję enzymatycznego rozdziału kinetycznego w rozpuszczalnikach organicznych (toluen), z zastosowaniem octanu winylu, octanu propenylu oraz octanu *p*-chlorofenylu jako donorów grupy acylowej. Dla szeregu dostępnych handlowo enzymów w żadnym przypadku nie zaobserwowałam powstawania oczekiwanego produktu. Również zmiana rozpuszczalnika z toluenu na eter *tert*-butylo- metylowy nie skutkowała osiągnięciem sukcesu.

Dlatego też zastosowałam kolejne podejście polegające na enzymatycznym rozdziale kinetycznym w wodzie. W tym celu najpierw zsyntetyzowałam estr kwasu octowego **84** ze związku **50**, a następnie poddałam go reakcji enzymatycznej hydrolizy, Schemat 65. Reakcję prowadziłam w buforze fosforanowym o pH 7.4 dla kilku dostępnych handlowo lipaz i jednej esterazy, Tabela 22.

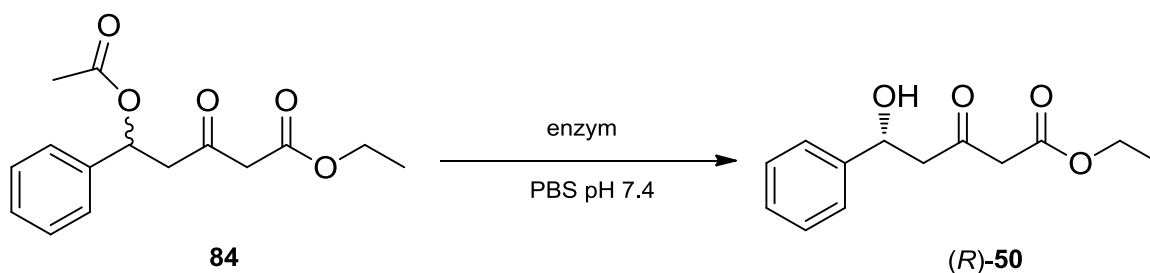


Tabela 22. Enzymatyczny rozdział kinetyczny prowadzący do związku **50**.

Lp.	Enzym	Wydajność [%]	<i>ee</i>
1	Lipaza z <i>Candida rugosa</i>	28	>99 (<i>R</i>)
2	Esteraza z wątroby wieprzowej	<1	nb
3	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	<1	nb
4	Lipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<1	nb
5	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	12	90 (<i>R</i>)

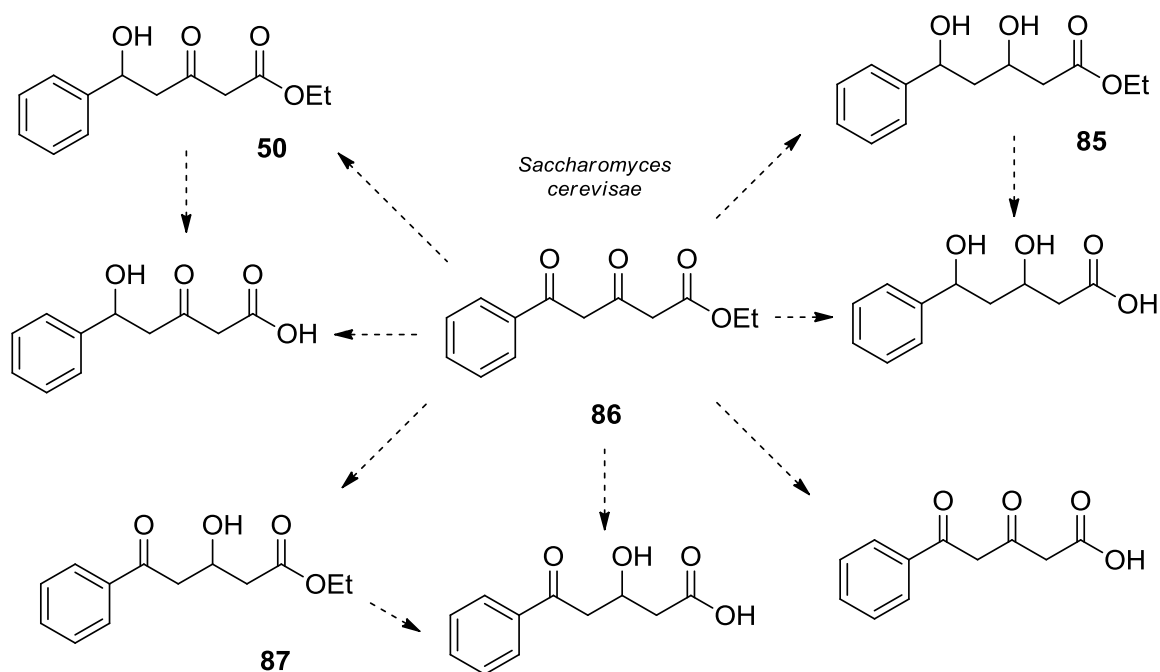
nb – nie badano

W dwóch przypadkach: lipazy z *Candida rugosa* oraz lipazy z *Candida cylindracea* otrzymałam produkt **50** z bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi oraz umiarkowanymi wydajnościami (12-28%). Na podstawie porównania skręcalności

optycznych ze skręcalnościami literaturowymi,¹⁴⁷ stwierdziłam, że w obydwu przypadkach powstaje produkt o konfiguracji *R*. Związek (*R*)-**50** można znanymi literaturowo metodami¹³⁷ zredukować diastereoselektywnie do diolu (*3S,5R*)-**85** lub (*3R,5R*)-**85**. Jako cel postawiłam sobie otrzymanie wszystkich dostępnych stereoizomerów badanych związków, a opracowana metoda rozdziału kinetycznego, nie dawała dostępu do produktu o konfiguracji *S*. Dlatego też postanowiłam otrzymać enancjomerycznie czyste związki na drodze redukcji enzymatycznej.

11. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego za pomocą drożdży piekarskich.

Najtańszą, najprostszą i najczęściej stosowaną metodą enzymatycznej redukcji grupy ketonowej do grupy hydroksylowej jest zastosowanie drożdży piekarskich. Drożdże ze szczepu *Saccharomyces cerevisiae* charakteryzują się szerokim spektrum substratowym, brakiem konieczności stosowania kofaktorów i są łatwo dostępne. W tym przypadku można zastosować tanie źródło węgla w postaci glukozy. Redukcja estru etylowego kwasu 5-fenyl-3,5-dioksopentanowego **86** powinna prowadzić do uzyskania odpowiednich produktów redukcji: **50**, **87** i **85**.

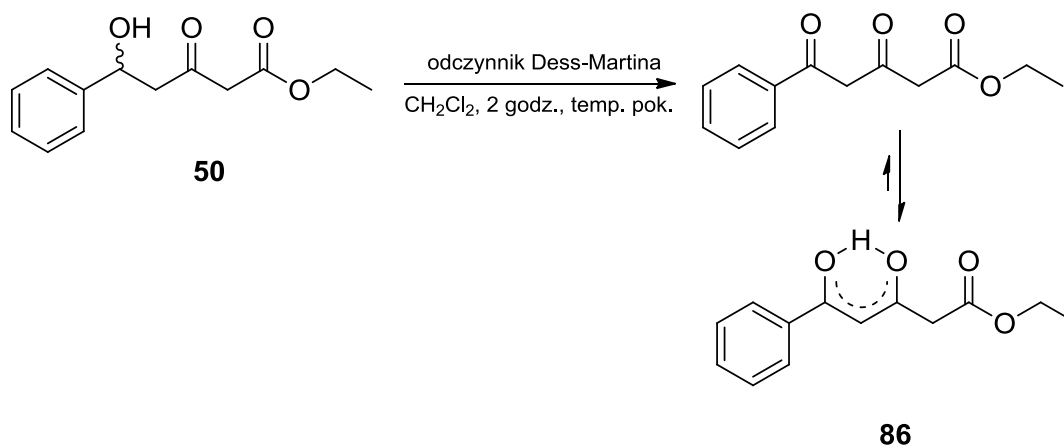


Schemat 66. Możliwe produkty redukcji i hydrolizy związku **86** katalizowanej przez drożdże ze szczepu *Saccharomyces cerevisiae*.

¹⁴⁷ C. Xu, C. Yuan, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2169-2186.

Ponieważ całe komórki drożdży oprócz dehydrogenaz zawierają również enzymy hydrolityczne możliwe jest również uzyskanie odpowiednich produktów hydrolizy, co zostało przedstawione na Schemacie 66.

Najpierw zsyntetyzowałam diketon **86** w reakcji utleniania związku **50** za pomocą odczynnika Dess-Martina, Schemat 67. Produkt **86** uzyskałam z wysoką wydajnością 70% w postaci jasnożółtego oleju. Na podstawie danych literaturowych¹⁴⁸ i analizy NMR stwierdziłam, że związek ten występuje w formie keto-enolowej (92:8).



Schemat 67

Następnie przeprowadziłam redukcję związku **86** za pomocą drożdży. Niestety, przeprowadzenie reakcji na tym substracie prowadziło do uzyskania dużej liczby produktów ubocznych, z których udało się wyizolować pożądany alkohol **50** (4%) i diol **85** (1%).

Aby zminimalizować ilość możliwych przekształceń i tym samym produktów ubocznych postanowiłam zastosować racemiczny ester etylowy kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego *rac*-**50**. Redukcja tego związku powinna w efekcie prowadzić do uzyskania stereoizomerów estru etylowego kwasu 5-fenyl-3,5-dihydroksypentanowego **85**, Schemat 68. Jeżeli reakcja będzie przebiegać w sposób stereoselektywny, możliwe będzie również wydzielenie enancjomerycznie czystego nieprzereagowanego substratu. Przebrałam reakcję enzymatycznej redukcji związku modelowego *rac*-**85** w wariantach niefermentacyjnym i fermentacyjnym, Tabela 23.

¹⁴⁸ T. Rahn, N. T. H. Nguyen, T. H. T. Dang, Z. Ahmed, K. Methling, M. Lalk, C. Fischer, A. Spannenberg, P. Langer, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1957-1961

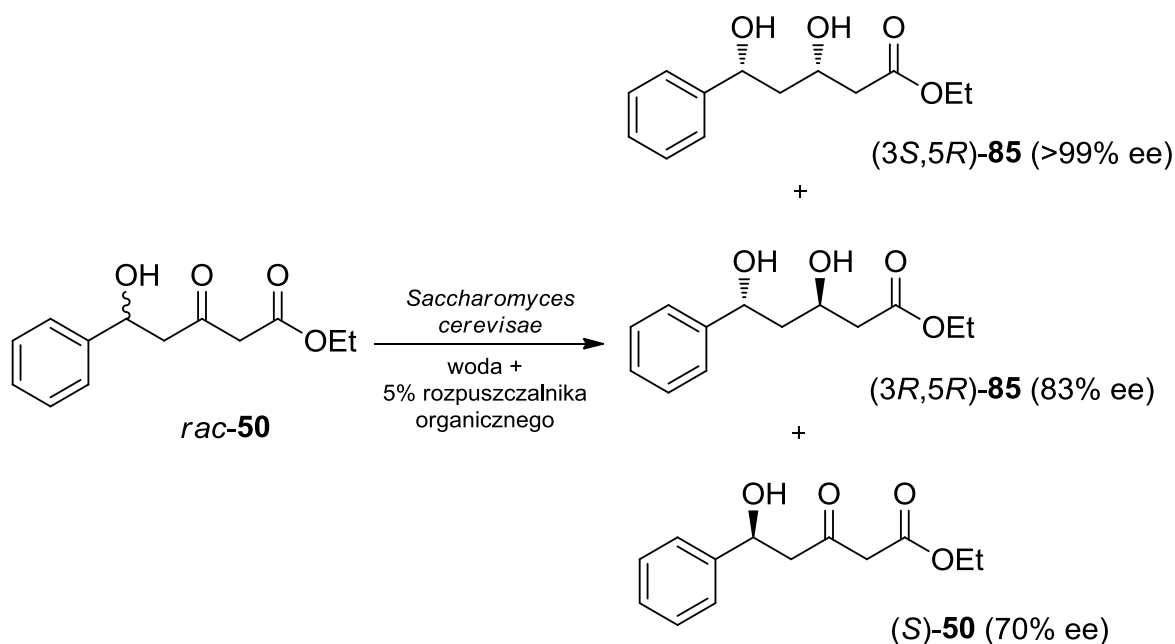


Tabela 23. Enzymatyczna redukcja związku *rac-50* za pomocą drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Lp.	System	Dodatek	Produkt 85		Substrat 50			
			Wydajność [%]	<i>dr</i> (<i>syn:anti</i>)	<i>ee_{syn}</i>	<i>ee_{anti}</i>	Odzyskany substrat [%]	<i>ee</i>
1	A	Brak	38	77:23	88	>99	23	50
2	B	Brak	66	74:26	83	>99	15	70
3	B	5% acetonitryl	35	73:27	86	99	35	50
4	B	5% toluen	<4	nb	nb	nb	63	3
5	B	5% heksan	45	78:22	83	91	45	32
6	B	5% etanol	61	69:31	80	99	17	72
7	B	5% izopropanol	52	78:22	75	99	17	64
8	B	5% THF	8	88:12	76	39	68	6
9	B	5% eter dietylowy	40	76:24	78	98	19	58
10	B	5% eter <i>t</i> -butyloowo metylowy	4	81:19	90	82	70	2
11	B	5% aceton	54	75:25	80	96	23	54

nb- niebadano

A – system niefermentacyjny; B – system fermentacyjny

Zarówno produkt reakcji, jak również nieprzereagowany substrat oczyszczałam i analizowałam. Zastosowanie systemu fermentacji glukozy wpływało korzystnie na

zwiększenie wydajności reakcji redukcji katalizowanej przez drożdże, nieznacznie wpływając na stosunek diastereoizomeryczny produktu oraz jego czystość enancjomeryczną. Zwiększenie efektywności reakcji prowadziło do mniejszego odzysku substratu, ale o większej czystości enancjomerycznej, dlatego też kolejne eksperymenty prowadziłam w systemie fermentacyjnym. W czasie procesu fermentacyjnego, oprócz oczekiwanego produktu, powstawały również produkty uboczne, będące wynikiem metabolizmu komórek. Ze względu na niską produktywność drożdży stosowałam duży nadmiar biomasy (10 g drożdży/200 mg substratu), co wiązało się z utrudnionym procesem ekstrakcji badanych związków do fazy organicznej. W konsekwencji, tworzenie się produktów ubocznych i problemy z ekstrakcją, prowadziły to do braku możliwości wyekstrahowania całkowitej ilości nieprzereagowanego substratu i powstających produktów (całkowity odzysk 61-81%).

W następnym etapie badań sprawdziłam wpływ dodatku różnych rozpuszczalników organicznych na efektywność reakcji. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi możliwe jest prowadzenie reakcji w rozpuszczalnikach organicznych z niewielkim dodatkiem wody. Zastosowanie takiego systemu ułatwiłoby wydzielenie badanych związków z mieszaniny reakcyjnej. W przypadku substratu *rac*-**50**, zaledwie 5% objętościowych jakiegokolwiek rozpuszczalnika organicznego miało inhibujący wpływ na aktywność drożdży, Tabela 23. Obecność toluenu (Tabela 23, poz. 4) lub eteru *tert*-butyloowo metylowego (Tabela 23, poz. 10) w mieszaninie reakcyjnej powodowało prawie całkowite zahamowanie procesu redukcji. Dodatek etanolu (Tabela 23, poz. 6) i izopropanolu (Tabela 23, poz. 7) miał niewielki wpływ na uzyskane wyniki, ale 20% zawartość tych rozpuszczalników całkowicie hamowała aktywność drożdży. Zastosowanie rozpuszczalników organicznych nie było korzystne w przypadku redukcji związku *rac*-**50**.

Najwyższy nadmiar enancjomeryczny odzyskanego substratu wynosił 72% (Tabela 23, poz. 6). Na podstawie porównania znaku skręcalności właściwej z danymi literaturowymi stwierdziłam, że odzyskuję substrat wzbogacony o enancjomer *S*. Wynika stąd, że w przewodzie powstaje produkt **85**, który na centrum stereogenicznym w pozycji 5 posiada konfigurację *R*. Natomiast analiza widma ¹HNMR pozwoliła stwierdzić, że w wyniku redukcji powstaje więcej stereo izomerów *syn* niż *anti*. Zatem, w wyniku reakcji katalizowanej drożdżami uzyskałam mieszaninę dwóch diastereoizomerów (*3S,5R*)-**85** i (*3R,5R*)-**85** o wysokiej czystości enancjomerycznej, co zostało zbadane za pomocą HPLC z zastosowaniem kolumny ze złożem chiralnym. Rozdzielenie diastereoizomerów związku **85** było możliwe za pomocą chromatografii kolumnowej.

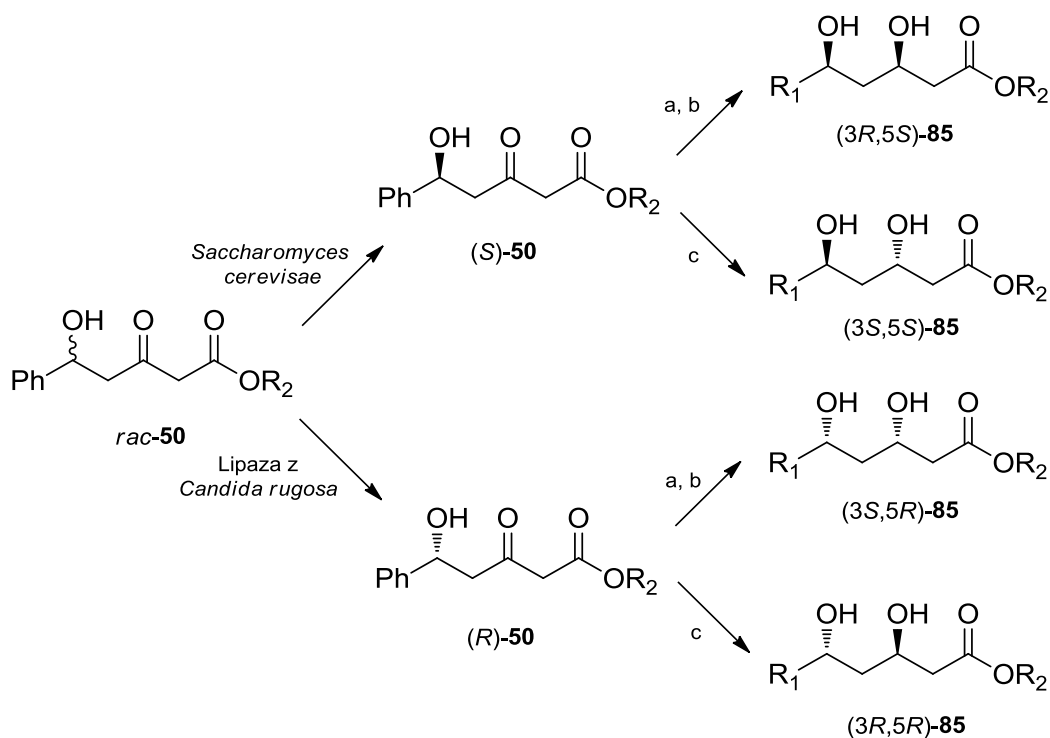
Zastosowanie całych komórek mikroorganizmów wiąże się z obecnością kilku dehydrogenaz, często o przeciwnych stereopreferencjach. Selektywna inhibicja enzymu o określonej preferencji powinna pozwolić na zwiększenie czystości enancjomerycznej uzyskiwanego produktu oraz odzyskiwanego substratu. Może się to odbywać na drodze zastosowania alkoholu allilowego, bromku allilu czy bromooctanu allilu jako dodatku do mieszaniny reakcyjnej, Tabela 24. Dodatek bromooctanu allilu działał jako inhibitor (*R*-selektywnego enzymu prowadząc do zwiększenia czystości enancjomerycznej (94%) odzyskanego substratu (Tabela 24, poz. 3). Alkohol allilowy i bromek allilu nie miały większego wpływu na czystość enancjomeryczną produktu ani substratu (Tabela 24, poz. 1-2). Odzyskany substrat (*S*)-**50** można znanymi literaturowo metodami¹³⁷ zredukować diastereoselektywnie do diolu (*3S,5S*)-**85** lub (*3R,5S*)-**85**.

Tabela 24. Wpływ dodatku inhibitorów na czystość enancjomeryczną produktu i odzyskiwanego substratu.

Lp.	Dodatek	Produkt 85				Substrat 50	
		Wydajność [%]	<i>dr</i> (<i>syn:anti</i>)	<i>ee_{syn}</i>	<i>ee_{anti}</i>	Odzyskany substrat [%]	<i>ee</i>
1	Bromek allilu ^[c]	65	56:44	94	98	6	54(<i>S</i>)
2	Alkohol allilowy ^[c]	59	60:40	79	98	4	50(<i>S</i>)
3	Bromooctan etylu ^[c]	57	60:40	98	>99	8	94 (<i>S</i>)

nb – niebadano

Podsumowując, opracowana przeze mnie metodologia dawała dostęp do wszystkich możliwych stereoizomerów badanych związków, co zostało zilustrowane na Schemacie 69. Czysty enancjomerycznie (>99% *ee*) ester etylowy kwasu (*R*)-5-fenylo-5-hydrokso-3-oksopentanowego (*R*)-**50** otrzymałam na drodze enzymatycznego rozdziału kinetycznego. Diastereoselektywna redukcja związku (*R*)-**50**, znanymi literaturowo metodami, prowadziłyby do otrzymania dioli (*3S,5R*)-**85** oraz (*3R,5R*)-**85**. Natomiast w wyniku redukcji enzymatycznej *rac*-**50** otrzymywałam czyste enancjomerycznie diole (*3S,5R*)-**85** (98% *ee*) i (*3R,5R*)-**85** (>99%), a także wydzielałam nieprzereagowany substrat (*S*)-**50** (94% *ee*) Diastereoselektywna chemiczna redukcja związku (*S*)-**50** daje dostęp do dioli (*3R,5S*)-**85** oraz (*3S,5S*)-**50**.



- a) 1. B(OMe)Et₂, THF/MeOH (80:20 v/v), -70°C, 20min. 2. NaBH₄, -70°C, 3 godz.
 b) H₂O₂, THF/woda (70:30 v/v, pH 9), 0°C→temp. pok., 30min.
 c) Me₄N[B(OAc)₃H], MeCN/AcOH (50:50, v/v), -25°C, 5 godz.

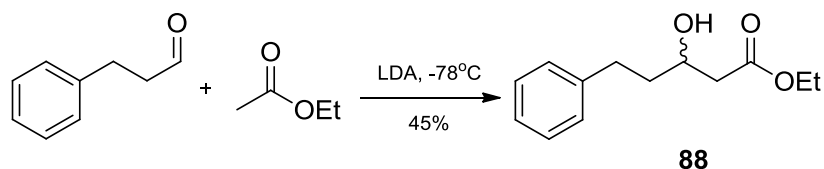
Schemat 69

12. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-3-oksopentanowego za pomocą komórek mikroorganizmów.

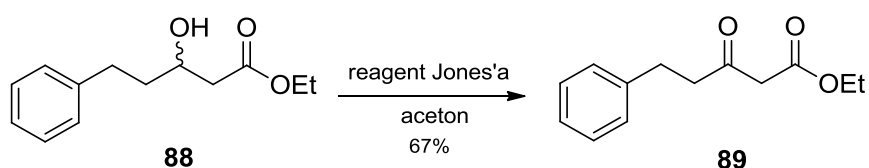
Badania na komórkach mikroorganizmów zostały wykonane przeze mnie w laboratorium Uniwersytetu Karl-Franzens w Graz w zespole naukowym prof. Wolfganga Kroutila podczas pobytu w ramach projektu COST CM1303.

Ponieważ wydajności otrzymywanych produktów w reakcji katalizowanej komórkami drożdży nie były wysokie postanowiłam opracować bardziej wydajną metodę pozwalającą na uzyskanie enancjomerycznie czystych związków. Redukcja ketoestrów powinna prowadzić do oczekiwanych produktów z teoretyczną wydajnością sięgającą do 100%. Badania przesiewowe powinny pozwolić na szybkie wyselekcjonowanie komórek zawierających dehydrogenazy o wysokiej aktywności oraz oczekiwanej enancjoselektywności. Obecność grupy fenylovej, sąsiadującej z grupą ketoestrową w strukturach *rac*-50 oraz 86 sprawia, że związki te są rozbudowane sterycznie. Może to wpływać na utrudniony dostęp do miejsca aktywnego enzymu. Dlatego też, wstępne badania przeprowadziłam, na estrze etylowym kwasu 5-fenylo-3-oksopentanowego 89, który za pomocą komórek mikroorganizmów

postanowiłam zredukować do estry etylowego kwasu 5-fenyl-3-hydrokspentanowego **88**. Związek **88**, będący β -keto estrem, otrzymałam na drodze kondensacji aldehydu propionowego i octanu etylu z wydajnością 45%, schemat 70. Następnie związek **88** utleniłam za pomocą reagenata Jones'a do keto estru **89** z wydajnością 67%, Schemat 71.

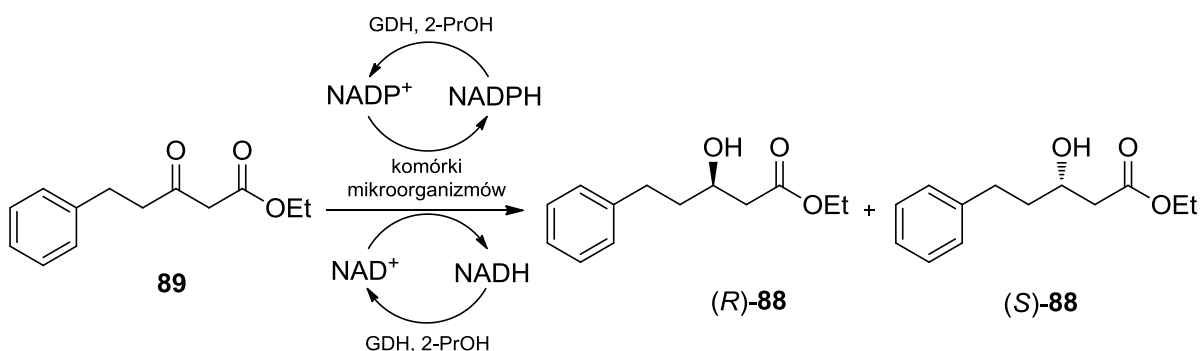


Schemat 70. Synteza estru etylowego kwasu 5-fenyl-3-hydrokspentanowego.



Schemat 71. Synteza estru etylowego kwasu 5-fenyl-3-oksypentanowego.

Redukcja enzymatyczna 3-ketoestru **89** prowadziła do powstania oczekiwanego 3-hydrokspentanoestru **88**, Schemat 72. W celu wyselekcjonowania najbardziej aktywnych mikroorganizmów przeprowadziłam badania przesiewowe na około 250 komórkach, spośród których wybrałam 33, Tabela 25. 2-propanol został zastosowany jako donor wodoru, a także jako ko-rozpuszczalnik poprawiający rozpuszczalność substratów.



Schemat 72. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenyl-3-oksypentanowego za pomocą całych komórek mikroorganizmów.

Tabela 25. Redukcja związku **89** za pomocą całych komórek mikroorganizmów.

Lp.	Mikroorganizm	Oznaczenie szczepu	Konwersja 89 [%]	Wydajność 88 [%]	ee 88 [%]
1	<i>Alcaligenes sp.</i>	DSM 2625	68	36	5 (S)
2	<i>Arthrobacter sp.</i>	DSM 7325	>99	82	85 (R)
3	Izolat <i>Gordonia sp.</i> NAM-BN063A	FCC018	>99	49	77 (S)
4	Izolat <i>Gordonia sp.</i> NAM-BN063B	FCC019	>99	46	77 (S)
5	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	FCC027	94	24	96 (R)
6	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN019	FCC022	98	11	90 (R)
7	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN029	FCC023	95	14	92 (R)
8	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN042	FCC026	>99	12	88 (R)
9	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN040	FCC025	90	19	89 (R)
10	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN030	FCC024	94	28	70 (R)
11	<i>Coprinus radians</i>	CSM 888	72	29	45 (R)
12	<i>Comamonas testosteroni</i>	DSM 1455	85	32	27 (S)
13	<i>Comamonas badia</i>	DSM 17552	98	65	43 (R)
14	<i>Comamonas denitrificans</i>	DSM 17887	93	14	23 (S)
15	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	DSM 3434	95	34	61 (S)
	<i>Xanthomonas arboricola</i> pvar.				
16	<i>Celebensis</i>	DSM 50853	>99	70	48 (R)
17	<i>Xanthomonas campestris</i>	DSM 1050	>99	62	49 (R)
18	<i>Xanthomonas sp.</i>	DSM 1049	>99	55	47 (R)
19	<i>Gordonia alkanivorans</i>	DSM 44369	96	51	64 (S)
20	<i>Lactobacillus oris</i>	DSM 4864	>99	70	88 (R)
21	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	DSM 11072	60	47	92 (S)
22	<i>Pichia pastoris</i>	CBS 7435	>99	79	77 (R)
23	<i>Pseudomonas sp.</i>	DSM 6978	72	33	49 (S)
24	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	DSM 14292	98	44	66 (S)
25	Izolat ARG-AN024	FCC014	94	16	98 (R)
26	Izolat ARG-AN025	FCC015	94	21	94 (R)
27	Izolat USA-AN012	FCC021	99	10	96 (R)
28	Izolat ANTs-AN002	FCC013	91	26	67 (R)
	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> 67-BEN001				
29	(6475 m)	FCC028	96	10	90 (R)
30	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> ENG-AN033	FCC020	95	23	78 (R)
31	<i>Sphingomonas sp.</i> HXN200	FCC139	98	7	98 (R)
32	<i>Sphingomonas faenia</i>	FCC183	76	51	60 (R)
33	Bacterium (code 0091B)	FCC042	97	8	62 (R)

Na podstawie wyników zawartych w Tabeli 25, można wnioskować, że grupa karbonylowa w pozycji 3 jest podatna na redukcję. Całe komórki mikroorganizmów zawierają oprócz dehydrogenaz również hydrolazy, przez co możliwe są reakcje obydwu grup funkcyjnych obecnych w substracie. W niektórych przypadkach zaobserwowałam powstawanie ubocznych produktów hydrolizy, co było przyczyną wysokich konwersji

substratu przy niewielkich wydajnościach oczekiwanego produktu **88**. Najwyższą czystość enancjomeryczną produktu odnotowałam w przypadku zastosowania komórek *Actinomyces sp.* SRB-AN053 (96% ee, Tabela 25, poz. 5), ARG-AN024 (98% ee, Tabela 25, poz. 25), *Sphingomonas sp.* HXN200 (98% ee, Tabela 25, poz. 31), USA-AN012 (96% ee, Tabela 25, poz.27). Ich zastosowanie dawało dostęp do produktu o konfiguracji *R*. Wysoki nadmiar enancjomeryczny (85% ee) produktu (*R*)-**94** przy jednocześnie wysokiej wydajności zarejestrowałam w przypadku mikroorganizmu ze szczepu *Arthrobacter sp.* (82%, Tabela 25, poz. 2). Tylko niewielka liczba mikroorganizmów prowadziła do powstania produktu o konfiguracji *S*. Najwyższą czystość enancjomeryczną produktu (*S*)-**94** obserwowałam dla komórek *Paracoccus pantotrophus* (92% ee, Tabela 25, poz. 21), *Gordonia sp.* NAM-BN063A (77% ee, Tabela 25, poz. 3) oraz *Gordonia sp.* NAM-BN063B (77% ee, Tabela 25, poz. 4).

13. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-3,5-dioksopenatanowego za pomocą komórek mikroorganizmów.

Następnie przeprowadziłam badania przesiewowe na bardziej zatłoczonym sterycznie estrze etylowym kwasu 5-fenylo-3,5-diokso-pentenowego **86**, Tabela 26.

Tabela 26. Redukcja związku **86** za pomocą całych komórek mikroorganizmów.

Lp	Mikroorganizm	Oznaczenie szczepu	Konwersja [%]	Wydajność 50 [%]	ee [%]	Wydajność 85 [%]	syn/anti
1	<i>Arthrobacter sp.</i>	DSM 7325	89	26	87 (<i>S</i>)	-	-
2	<i>Pichia pastoris</i>	CBS 7435	>99	33	41 (<i>R</i>)	19	96:4
3	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	DSM 14292	98	6	96 (<i>R</i>)	-	-
4	<i>Pseudomonas sp.</i>	DSM 6978	93	10	81 (<i>R</i>)	-	-
5	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN040	FCC025	86	2	49 (<i>R</i>)	19	94:6

Zaledwie kilka z spośród 250 komórek mikroorganizmów, w wyniku przekształceń biokatalitycznych dawało oczekiwane produkty. Związek **86** jest nietrwały, ponadto ze względu na obecność dwóch grup karbonylowych i jednej grypy estrowej może ulegać licznym reakcjom ubocznym. Duże zatłoczenie steryczne po obydwu stronach od centrów prochiralnych sprawia, że związek ten nie jest akceptowany przez większość dehydrogenaz jako substrat. Zaledwie w przypadku 5 mikroorganizmów zaobserwowałam powstawanie

produktu redukcji **50**, a w dwóch przypadkach produktu podwójnej redukcji **85**. Ze względu na brak związku referencyjnego **87** nie było możliwe określenie wydajności powstającego produktu redukcji w pozycji 3. Mikroorganizm *Arthrobacter sp.* prowadził do uzyskania produktu **50** o konfiguracji *S*, natomiast *Pseudomonas thermotolerans* do produktu **50** o konfiguracji *R*. Dwa spośród przebadanych mikroorganizmów *Pichia pastoris* (Tabela 26, poz. 2) oraz *Actinomyces sp.*SRB-AN040 (Tabela 26, poz. 5) prowadziły do powstania diolu **85** o wysokiej proporcji diastereoizomerów *syn-85* do *anti-85* (odpowiednio 96:4 i 94:6).

14. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenyl-3,5-dioksopentanowego oraz estru etylowego kwasu 5-fenyl-3-oksopentanowego za pomocą dehydrogenaz.

W celu zminimalizowania konkurencyjnej reakcji hydrolizy przeprowadziłam badania na dwóch dehydrogenazach pochodzących z mikroorganizmów *Ralstonia sp.* oraz *Sphingobium yanoikuyae*. Wyniki redukcji związków **89** i **86** przedstawiłam w Tabeli 27 oraz Tabeli 28.

Tabela 27. Redukcja związku **89** za pomocą dehydrogenaz.

Lp.	Mikroorganizm	Oznaczenie		Wydajność	
		szczepu	<i>c</i> [%]	88 [%]	<i>ee</i> [%]
1	Ekspresja dehydrogenazy pochodzącej z <i>Ralstonia sp.</i> w <i>Escherichia coli</i>	DSM 6428	99.7	54	49 (<i>S</i>)
2	Ekspresja dehydrogenazy pochodzącej z <i>Sphingobium yanoikuyae</i> w <i>Escherichia coli</i>	DSM 6900	nb	<1	nb

Tabela 28. Redukcja związku **86** za pomocą dehydrogenaz.

Lp.	Mikroorganizm	Oznaczenie szczepu	<i>c</i> [%]	Wydajność 50 [%]	<i>ee</i> [%]	Wydajność 85 [%]	<i>dr</i> (<i>syn/anti</i>)
1	Ekspresja dehydrogenazy pochodzącej z <i>Ralstonia sp.</i> w <i>Escherichia coli</i>	DSM 6428	97	10	nb	58	92:8
2	Ekspresja dehydrogenazy pochodzącej z <i>Sphingobium yanoikuyae</i> w <i>Escherichia coli</i>	DSM 6900	nb	<1	nb	<1	nb

Tylko jeden z enzymów katalizował redukcję obydwu badanych związków. W przypadku redukcji monoketonu **89** zaobserwowałam powstawanie oczekiwanego produktu z dobrą wydajnością i umiarkowaną enancjoselektywnością. W przypadku redukcji diketonu **86** głównym produktem reakcji był diol **85**, otrzymywany z dobrą wydajnością i wysokim stosunkiem diastereoizomeru *syn* do *anti* (92:8).

15. Redukcja enzymatyczna estru etylowego kwasu 5-fenylo-3,5-dioksopenatanowego oraz estru etylowego kwasu 5-fenylo-3-oksopentanowego w skali preparatywnej.

Ponieważ każdy mikroorganizm wymaga dodatku różnych kofaktorów, w badaniach przesiewowych stosowałam równocześnie NAD^+ oraz NADP^+ oraz podwójny system regeneracji kofaktorów: dehydrogenazę glukozy i izopropanol. Aby przeprowadzić reakcje w większej skali najpierw dobrałam optymalne warunki reakcji dla wybranych mikroorganizmów, Tabela 29. W przypadku mikroorganizmu *Actinomyces sp.* SRB-AN053 (Tabela 29, poz. 6) oraz *Arthrobacter sp.* (Tabela 29, poz. 10) najlepsze wyniki uzyskałam stosując jednocześnie obydwa kofaktory oraz pojedynczy system regeneracji oparty na izopropanolu. Zmiana warunków reakcji dla izolatu *Gordonia sp.* NAM-BN063A powodowała znaczne obniżenie wydajności oraz mniejszą aktywność (*S*)-selektywnej dehydrogenazy. Aby spowolnić reakcję hydrolizy, będącą reakcją konkurencyjną do redukcji, zwiększyłam ilość izopropanolu dodawanego do reakcji (Tabela 29, poz. 2-3). 20% objętościowych izopropanolu miało nieznaczny wpływ na uzyskane wyniki. 30% objętościowych powodowało zwiększenie udziału reakcji redukcji względem reakcji hydrolizy, ale powodowało również zmniejszenie wydajności produktu **88** z 24% do 9%. W dalszym etapie badań stosowałam 10% izopropanolu.

Tabela 29. Optymalizacja warunków redukcji związku **89**.

Lp	Mikroorganizm	NAD ⁺	NADP ⁺	GDH	2-PrOH	Konwersja [%]	Wydajność [%]	ee [%]
1	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	0.5 mM	0.5 mM	20 mM	10%	94	24	96 (R)
2	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	0.5 mM	0.5 mM	20 mM	20%	92	23	98 (R)
3	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	0.5 mM	0.5 mM	20 mM	30%	24	9	nb
4	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	-	0.5 mM	20 mM	10%	99	16	97 (R)
5	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	0.5 mM	-	20 mM	10%	96	24	95 (R)
6	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	0.5 mM	0.5 mM	-	10%	95	26	>99 (R)
7	<i>Arthrobacter sp.</i>	0.5 mM	0.5 mM	20 mM	10%	>99	82	85 (R)
8	<i>Arthrobacter sp.</i>	-	0.5 mM	20 mM	10%	56	18	11 (R)
9	<i>Arthrobacter sp.</i>	0.5 mM	-	20 mM	10%	99	59	96 (R)
10	<i>Arthrobacter sp.</i>	0.5 mM	0.5 mM	-	10%	98	45	96 (R)
11	Izolat <i>Gordonia sp.</i> NAM-BN063A	0.5 mM	0.5 mM	20 mM	10%	>99	49	77 (S)
12	Izolat <i>Gordonia sp.</i> NAM-BN063A	-	0.5 mM	20 mM	10%	92	39	24 (R)
13	Izolat <i>Gordonia sp.</i> NAM-BN063A	0.5 mM	-	20 mM	10%	37	7	nb
14	Izolat <i>Gordonia sp.</i> NAM-BN063A	0.5 mM	0.5 mM	-	10%	73	22	51 (R)

nb – nie badano

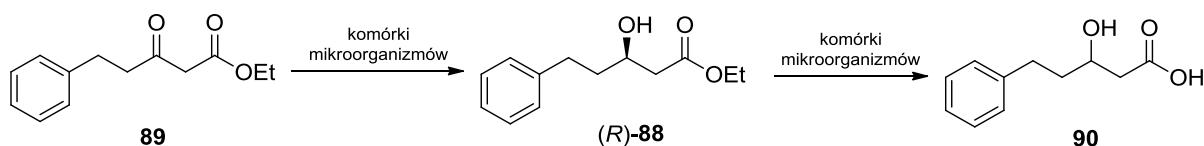
Aby pokazać użyteczność opracowanej metody przeprowadziłam reakcje redukcji związku **89** oraz **86** w skali 1 mmol, Tabela 30. Wybrałam 5 mikroorganizmów, które w badaniach przesiewowych katalizowały reakcje redukcji prowadząc do otrzymania produktów z najwyższymi wydajnościami oraz nadmiarami enancjomerycznymi. Reakcje w większej skali wymagały zastosowania 2g komórek mikroorganizmów, dlatego wyhodowałam szczepy *Actinomyces sp.*SRB-AN053 (1400m) oraz *Gordonia sp.* NAM-BN063A. Stosowane wcześniej komórki miały nawet kilka lat.

Tabela 30. Reakcja redukcji związków **89** i **86** w skali 1 mmol.

Lp.	Mikroorganizm	Produkt	Wydajność[%]	ee [%]
1	<i>Arthrobacter sp.</i>	94	47	94 (<i>R</i>)
2	Izolat <i>Actinomyces sp.</i> SRB-AN053	94	3	>99 (<i>R</i>)
3	Izolat <i>Gordonia sp.</i> NAM-BN063A	94	<1	nb
4	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	94	41	92 (<i>S</i>)
5	<i>Arthrobacter sp.</i>	85	7	86 (<i>S</i>)
6	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	85	9	85 (<i>R</i>)

nb – nie badano

Badania przeprowadzone na świeżo wyhodowanych komórkach mikroorganizmów (Tabela 30, poz. 2 i poz. 3) w powiększonej skali prowadziły do wyizolowania produktów redukcji z bardzo niskimi wydajnościami. Zaobserwowałam, że w przewodzie powstaje produkt hydrolizy. Analiza NMR wyizolowanego produktu hydrolizy wykazała, że hydroksyester **88** hydrolizuje do kwasu **90**, Schemat 73. Natomiast wyniki uzyskane dla starszych preparatów (Tabela 30, poz. 1, 4-6) prowadziły do podobnych wydajności jak w przypadku mikroskali. Prawdopodobnie w świeżo przygotowanych preparatach komórkowych przeważa ilość hydrolaz, odpowiedzialnych za katalizowanie następczej reakcji hydrolizy. W wyniku długiego przetrzymywania mikroorganizmów prawdopodobnie mniej trwałe hydrolazy mogą ulegać dezaktywacji, natomiast bardziej trwałe dehydrogenazy pozostają wciąż aktywne.



Schemat 73.

Opracowana metodologia daje dostęp do obydwu enancjomerów estru etylowego kwasu 5-fenyl-3-hydroxypentanowego **88** oraz estru etylowego kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego **50** z dobrymi wydajnościami oraz wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi.

16. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej pracy sformułowałam koncepcję nowego chemoenzymatycznego podejścia do syntezy enancjomerycznie czystych pochodnych kwasu 3,5-

dihydroksypentanowego. Związki te ze względu na złożoną budowę były trudnymi substratami dla enzymów, co znacznie utrudniało przeprowadzenie badań. W pierwszym etapie badań zsyntetyzowałam pochodną kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego stosując dwa podejścia: chemiczne oraz enzymatyczną reakcję aldolową. Następnie przeprowadziłam szereg badań, w których próbowałam przybliżyć mechanizm reakcji aldolowej katalizowanej przez promiskuitywne lipazy. Uzyskana w ten sposób pochodna kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego posłużyła jako substrat do kolejnych przekształceń biochemicznych. W wyniku enzymatycznego rozdziału kinetycznego oraz enzymatycznej redukcji katalizowanej drożdżami *Saccharomyces cerevisiae* lub całymi komórkami mikroorganizmów udało mi się otrzymać obydwa enancjomery estru etylowego kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego. Czyste enancjomeryczne związki mogą być przekształcone za pomocą opisanych literaturowo diastereoselektywnych metod w odpowiednie 3,5-dihydroksypochodne. W wyniku redukcji drożdżami otrzymałam również czyste enancjomeryczne 3,5-dihydroksyzwiązki o konfiguracji (3*R*,5*S*) oraz (3*S*,5*S*). Przeprowadzenie wielu skrupulatnie zaplanowanych badań zakończyło się sukcesem. Opracowana przeze mnie metodologia dawała dostęp do wszystkich możliwych stereoizomerów badanych związków.

Bardzo istotnym elementem badań było wyznaczenie stereoselektywności reakcji. Aby w szybki i wiarygodny sposób wyselekcjonować enzymy najbardziej aktywne i stereoselektywne względem alkoholi, zakres pracy rozszerzyłam o opracowanie metody monitorowania postępu reakcji w czasie rzeczywistym. Najbardziej odpowiednią do tego celu wydawała się technika fluorymetryczna, dlatego też zaproponowałam syntezę nowej klasy próbników fluorogennych. Otrzymałam szereg związków, będących mieszanymi węglanami pochodnych 7-hydroksy-4-metylokumaryny oraz alkoholi pierwszo- i drugorzędowych, różniących się rozpuszczalnością w wodzie. Zsyntetyzowane próbki oceniłam pod kątem zastosowań do badań przesiewowych. Stwierdziłam, że są one lepszymi substratami od obecnie stosowanych związków do wykrywania obecności, oznaczania aktywności lipaz i estraz oraz wyznaczania stereoselektywności reakcji. Do oznaczeń stosowałam enancjomerycznie czyste pochodne 7-hydroksy-4-metylokumaryny i drugorzędowych alkoholi. Wykazują one wysoką stabilność w warunkach pomiarowych i niską podatność na reakcje z niespecyficznymi białkami. Zastosowanie mieszanin pseudoenancjomerycznych umożliwiało szybkie oszacowanie enancjoselektywności reakcji. Ponadto, metoda ta pozwalała na wykonanie oznaczeń w jednym naczyniu pomiarowym przy dwóch długościach fali z uwzględnieniem konkurencji do miejsca aktywnego enzymu. Zsyntetyzowałam również

próbniiki fluorogenne odpowiednie do badań przesiewowych nad aktywnością, stereoselektywnością i chemoselektywnością proteaz. Połączenie ugrupowania fluoroforu z alkoholem za pomocą łącznika powodowało odsunięcie rozbudowanego sterycznie fluoroforu od centrum reakcyjnego. Dzięki temu została zwiększona dostępność substratu do centrum aktywnego enzymu. Próbniki te charakteryzowały się dużą stabilnością w warunkach pomiaru, a dzięki obecności dwóch grup funkcyjnych możliwe było monitorowanie chemoselektywności reakcji.

Podsumowując, opracowałam nową chemoenzymatyczną drogę syntezy drugorzędowych alkoholi na wybranych przykładach. Prowadziła ona do uzyskania wszystkich możliwych stereoizomerów badanych związków o wysokich częstościach enancjomerycznych. Zaproponowałam oraz wykonałam syntezę nowej klasy próbników fluorogennych. Następnie pokazałam przydatność zsyntetyzowanych związków jako substratów do oznaczania aktywności enzymów, szacowania enancjoselektywności oraz chemoselektywności reakcji. Przeprowadzone badania zakończyły się sukcesem. Cel badań został osiągnięty.

III Część eksperymentalna

17. Uwagi ogólne

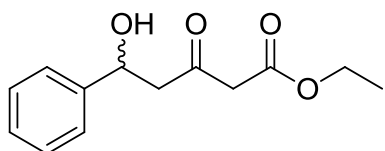
Widma NMR zarejestrowano na aparatach Varian Gemini 200 MHz oraz Varian Gemini 400 MHz stosując TMS jako wzorzec wewnętrzny. Przesunięcia sygnałów (δ) podano w ppm, a stałe sprzężenia (J) w Hz. Pomiary skręcalności właściwej wykonano na polarymetrze Jasco P-2000 stosując kuwetę pomiarową o długości 10 cm. Temperatury topnienia zmierzono za pomocą aparatu Büchi SMP-20. Analizy elementarne wykonano w pracowni Analizy elementarnej IChO PAN przy użyciu aparatów Perkin Elmer 240 Elemental Analyzer oraz Heraeus Vario EL III. Analizy HPLC przeprowadzono na chromatografii Varian ProStar zaopatrzonej w detektor UV, z wykorzystaniem kolumn chiralnych AD-H Chiralpak (Daicel, Japonia), OB-H oraz na chromatografii Shimadzu Prominence LC-20A Series połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem achiralnym C-18 Luna (Phenomenex) oraz ze złożem chiralnym OD-H Chiralcel i IA Chiralpak (Daicel, Japonia). Widma UV-Vis rejestrowano na spektrofotometrze Hitachi U-1900 w 1 cm kuwetach plastikowych. Widma fluorescencji oraz pomiary intensywności fluorescencji w czasie rejestrowano za pomocą spektrofluorymetru Shimadzu F7000 w kuwetach kwarcowych. Do analiz TLC używano płytek aluminiowych pokrytych Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck. Do chromatografii kolumnowej używano żelu krzemionkowego Kieselgel 60 (230-400 mesh) firmy Merck. Stosowane reagenty komercyjnie dostępne o czystości analitycznej zakupione były w firmach Sigma-Aldrich, TCI. Rozpuszczalniki, takie jak heksan, octan etylu, woda oczyszczano przez destylację. Komercyjnie dostępne enzymy zakupiono w firmach Fluka, Sigma-Aldrich, Novozymes.

17.1. Synteza i analiza związków chemicznych

Synteza związku 50

Do zawiesiny wodoru sodu (60%, 1.47g, 36 mmol) w suchym THF (16 mL) dodano acetylooctanu etylu (30 mmol, 3.8 mL) w atmosferze argonu i mieszano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę schłodzono do -10°C (łaznia wodna z lodem i chlorkiem sodu) i dodano butylolit (2.5M roztwór w heksanie, 36 mmol, 15 mL). Mieszano w obniżonej temperaturze przez 30 minut, po tym czasie wkroplono roztwór benzaldehydu (36 mmol, 3.82g) w 3 mL THF. Po 2 godzinach mieszania w obniżonej temperaturze mieszaninę zgaszono nasyconym roztworem chlorku amonu i ekstrahowano trzykrotnie octanem etylu.

Fazy organiczne połączone, wysuszone za pomocą siarczanu magnezu i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie gradientowym heksan:octan etylu (od 9:1 do 1:1). Otrzymano 2.68 g (11.3 mmol) estru etylowego kwasu 5-fenyl-5-hydroksy-3-oksopentanowego z wydajnością 38% w postaci żółtego oleju.



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.37-7.34 (m, 4H, Ar), 7.30-7.26 (m, 1H, Ar), 5.18 (dd, 1H, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=9.2$ Hz, CH), 4.19 (q, $J=7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 3.47 (s, 2H, COCH_2CO),

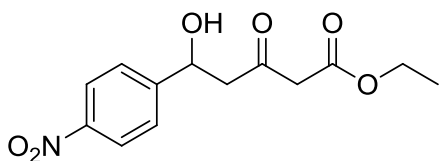
3.00 (dd, $J_1=9.2$ Hz, $J_2=17.2$ Hz, CHCH_2CO), 2.90 (dd, $J_1=3.2$ Hz, $J_2=17.2$ Hz, CHCH_2CO), 1.27 (t, 3H, OCH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz, ppm) δ 202.8, 166.8, 142.5, 128.5, 127.8, 125.6, 69.8, 61.5, 51.6, 49.9, 14.0, Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$: C 66.09; H 6.83; zbadana: C 65.99, 6.93; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem achiralnym C18 Luna (Metoda E) $t_r=19.6$ min; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym IA Chiralpak (Metoda C) $t_{r1}=26.0$ min, $t_{r2}=28.4$, analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym OB-H Chiralcel (Metoda A): $t_{r1}=47.7$ min, $t_{r2}=56.0$ min.

Synteza związków 50 i 51

Przygotowanie $\text{BrZnCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$: W atmosferze azotu, do 50 mL okrągłodennej kolbki dodano kolejno pył cynkowy (1.15g, 17.6 mmol), suchy THF (4.4 mL), TMSCl (96 mg, 0.88 mmol). Mieszaninę ogrzano do temperatury 40-50°C i wkroplono roztwór bromooctanu etylu (1.47g, 8.8 mmol) w THF (11 mL). Po wykrystalizowaniu osadu, jasno żółty supernatant zdekantowano i użyto w kolejnym etapie reakcji.

Reakcja podwójnego Reformatsky'ego: Do 50 mL okrągłodennej kolbki wprowadzono roztwór $\text{BrZnCH}_2\text{CO}_2\text{Et}/\text{THF}$ (11.7 mL, ok. 6.25 mmol), DABCO (280.4 mg) i aldehyd 4-nitrobenzoesowy (189 mg, 1.25 mmol). Mieszaninę ogrzano do temperatury 50°C i mieszano przez 3 godziny. Po tym czasie do mieszaniny dodano 25 mL octanu etylu i przemywano kolejno: 20% roztworem kwasu cytrynowego (12.5 mL), 10% roztworem NaCl (12.5 mL), 5% roztworem NaHCO_3 (12.5 mL) i wodą (12.5 mL). Fazę organiczną odparowano, a produkty oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie gradientowym heksan:octan etylu od 9:1 do 1:1 (obj./obj.) Wyizolowano dwa produkty: **51** i **52**.

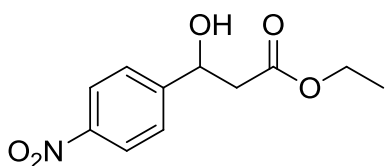
Związek 51



Ester etylowy kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-pentanowego otrzymano w postaci jasnożółtego oleju z wydajnością 31% (86.1 mg). Widmo NMR jest zgodne z widmem literaturowym.^[137]

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.21 (dd, 1H, *J*₁=2.0 Hz, *J*₂=7.2 Hz), 7.56 (dd, 1H, *J*₁=2.0 Hz, *J*₂=8.4 Hz), 5.31 (t, 1H, *J*=6.0 Hz), 4.20 (q, 2H, *J*=7.2 Hz), 3.50 (s, 2H), 2.98 (d, 2H, *J*=5.6 Hz), 1.28 (t, 3H, *J*=7.2 Hz); ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 202.4, 166.7, 149.7, 147.2, 126.4, 123.8, 68.8, 61.7, 51.2, 49.7, 14.0; Analiza element. obliczona dla C₁₃H₁₅NO₆: C 55.51, H 5.38, N 4.98; zbadana: C 55.25, H 5.28, N 4.88; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym OB-H Chiralcel (Metoda B) *t*_{r1}=48.7 min, *t*_{r1}=52.0 min.

Związek 52



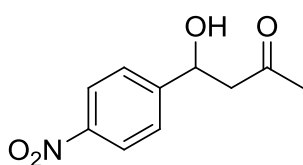
Ester etylowy kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propionowego otrzymano w postaci jasnożółtego oleju z wydajnością 47% (113.3 mg). Widmo NMR jest zgodne z widmem literaturowym.^[137]

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.21 (d, 2H, *J*=8.8 Hz), 7.56 (d, 2H, *J*=8.4 Hz), 5.23 (dd, 1H, *J*₁=4.4 Hz, *J*₂=8.4 Hz), 4.20 (q, 2H, *J*=7.2 Hz), 2.75-2.72 (m, 2H), 1.27 (t, 3H, *J*=7.2 Hz); ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 171.9, 149.7, 147.5, 126.5, 123.8, 69.4, 61.2, 42.9, 14.1

Procedura ogólna 1: enzymatyczna reakcja aldolowa

Do roztworu pochodnej benzaldehydu (1 mmol) oraz 3-oksoglutaranu dietylu (1.2 mmol, 243 mg) w 3 mL acetonitrylu dodano po 15 mg enzymu. Fiolki szczelnie zamknięto i wytrząsano w temperaturze 40°C przez 24 godziny. Po tym czasie enzym odsączono przez lejek wypełniony Celitem, rozpuszczalnik odparowano, a mieszaninę oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie gradientowym heksan:octan etylu od 9:1 do 1:1 (obj./obj.).

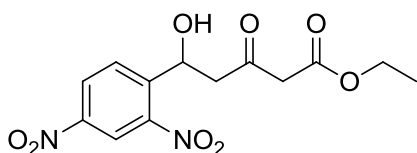
Synteza związku 53



4-hydrokso-4-(4-nitrofenylo)-butan-2-on otrzymano w postaci jasnożółtego oleju jako produkt uboczny enzymatycznej reakcji aldolowej, procedura ogólna 1. Widmo NMR jest zgodne z danymi literaturowymi. Wartość literaturowa skręcalności właściwej enancjomeru *R* $[\alpha]_D^{25} = +53.2$ ($c=0.42$, CHCl_3).¹⁴⁹

¹HNMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 8.14 (d, 2H, $J=13.6$ Hz), 7.47 (d, 2H, $J=13.6$ Hz), 5.20 (t, 1H, $J=12.0$ Hz), 3.56 (br.s., 1H), 2.78 (d, 2H, $J=14$ Hz), 2.16 (s, 3H); ¹³CNMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 208.5, 149.9, 147.3, 126.4, 123.7, 68.9, 51.5, 30.7; $[\alpha]_D^{25} = +7.9$ ($c=1.0$, CHCl_3).

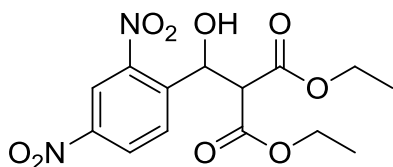
Synteza związku 54



Ester etylowy kwasu 3-hydrokso-3-(2,4-dinitrofenylo)-pentanowego otrzymano w postaci żółtego oleju w wyniku enzymatycznej reakcji aldolowej zgodnie z procedurą ogólną 1.

¹HNMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8.83 (d, 1H, $J=2.4$ Hz), 8.50 (dd, 1H, $J_1=2.0$ Hz, $J_2=8.4$ Hz), 8.19 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 5.83 (dd, 1H, $J_1=2.4$ Hz, $J_2=9.6$ Hz), 4.21 (q, 2H, $J=7.2$ Hz), 3.75 (br. s., 1H), 3.54 (s, 2H), 3.23 (dd, 1H, $J_1=2.0$ Hz, $J_2=17.6$ Hz), 2.89 (dd, 1H, $J_1=9.2$ Hz, $J_2=18.0$ Hz), 1.29 (t, 3H, $J=7.2$ Hz); ¹³CNMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 201.9, 166.6, 147.2, 147.0, 144.8, 130.3, 127.7, 120.1, 65.5, 61.8, 50.3, 49.4, 14.0; Analiza element. obliczona dla $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8$: C 47.86, H 4.33, N 8.59; zbadana: C 48.10, H 4.22, N 8.61.

Synteza związku 55



2,4-Dinitrobenzaldehyd (190 mg, 1 mmol) i malonianu dietylu (160 mg, 1 mmol) rozpuszczono w 0.5 mL benzenu. Następnie dodano piperydynę (1 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę.

Powstały osad odsączono i przekrystalizowano, otrzymując 300 mg 1-(2,4-dinitrofenylo)-2,2-

¹⁴⁹ B.V. Subba Reddy, K. Bhavani, A. Raju, J.S. Yadav, *Tetrahedron Asymm.* **2011**, 22, 881-886.

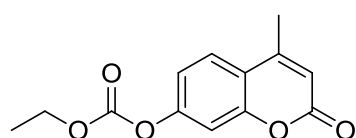
dietoksykarbonylo-etanol z wydajnością 80%. Widmo NMR i temperatura topnienia są zgodne z danymi literaturowymi.¹⁵⁰

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.88 (d, 1H, *J*=2.0 Hz), 8.47 (dd, 1H, *J*₁=2.4 Hz, *J*₂=8.8 Hz), 8.10 (d, 1H, *J*=8.8 Hz), 6.01 (d, 1H, *J*=4.0 Hz), 4.30 (br. s., 1H), 4.29-4.23 (m, 2H), 4.20-4.12 (m, 2H), 3.92 (d, 1H, *J*=3.6 Hz), 1.29 (t, 3H, *J*=6.8 Hz), 1.18 (t, 3H, *J*=7.2 Hz); ¹³CNMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 168.0, 166.9, 142.5, 131.2, 127.2, 120.2, 67.9, 62.5, 62.1, 57.0, 13.9, 13.8; *t*_f=97°C.

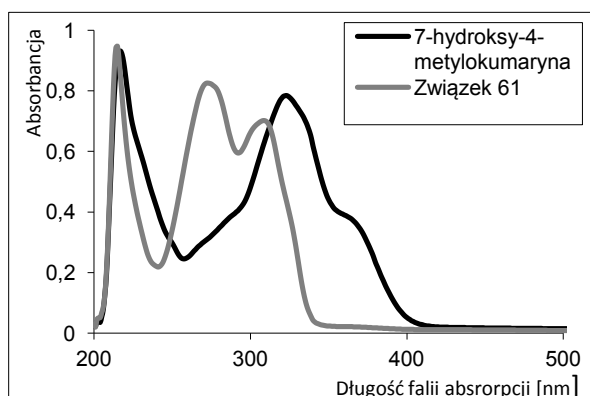
Procedura ogólna 2: synteza związków 61-62

Do schłodzonego do temperatury 0°C roztworu 7-hydroksy-4-metylokumaryny (176 mg, 1 mmol) w bezwodnym THF (5 mL) dodawano porcjami kolejno DMAP (25 mg, 0.2 mmol), Et₃N (0.42 mL, 3 mmol), chloromrówczan alkilu (2 mmol). Mieszano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Po tym czasie do mieszaniny dodano 10 mL 1 M roztworu kwasu solnego i ekstrahowano 10 mL chlorku metylenu. Oddzielno fazę organiczną, wysuszono za pomocą MgSO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano poprzez krystalizację z roztworu etanol-woda.

Związek 61



Węglan etylowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 2, używając chloromrówczanu etylu (217 mg, 2 mmol) jako jednego z reagentów. Produkt oczyszczono przez krystalizację z roztworu etanol-woda otrzymując go w postaci białych kryształów z wydajnością 65% (161.4 mg); *t*_f = 98-99 °C; ¹HNMR (CDCl₃,

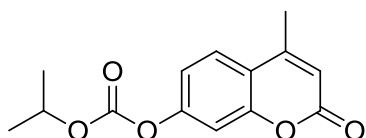


400 MHz) δ 7.60 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.21-7.14 (m, 2H), 6.26 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz), 4.35 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.42 (d, 3H, *J* = 1.2 Hz), 1.40 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz); ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 160.4, 154.1, 153.2, 152.7, 151.8, 125.4, 117.9, 117.4, 114.6, 109.9, 65.3, 18.7, 14.1; UV/Vis (λ_{max}, nm, bufor fosforanowy pH 7.4, logε): 215 (3.97), 270

¹⁵⁰ S. Kinastowski, S. Wnuk, *Synthesis* **1983**, 8, 654-9.

(3.90), 310 (3.84); Analiza elementarna obliczona dla C₁₃H₁₂O₅: C 62.90, H 4.87; zbadana: C 62.76, H 4.79. Związek **61** został zastrzeżony w polskim zgłoszeniu patentowym P 407948, 2014. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą A.

Związek 62



Węglan izopropylowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 2, używając chloromrówczanu izopropylu (254 mg, 2 mmol) jako jednego z reagentów. Produkt **62** oczyszczono przez krystalizację z

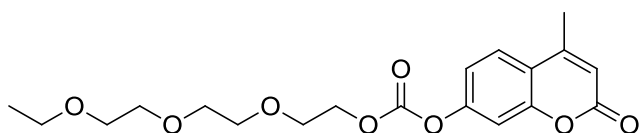
roztworu etanol-woda, otrzymując go pod postacią białych kryształów z wydajnością 35% (91.8 mg); $t_f = 94-95\text{ }^\circ\text{C}$; ¹HNMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 7.61 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.23-7.14 (m, 2H), 6.27 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz), 5.08-4.95 (m, 1H, $J = 6.2$ Hz), 2.43 (d, 3H, $J = 1.4$ Hz), 1.40 (d, 6H, $J = 6.2$ Hz); ¹³CNMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 160.4, 154.1, 153.3, 152.7, 151.8, 125.4, 117.8, 117.4, 114.5, 109.9, 73.8, 21.7, 18.7; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, log ϵ): 215 (3.99), 270 (3.86), 310 (3.84); Analiza elementarna obliczona dla C₁₄H₁₄O₅: C 64.12, H 5.38; zbadana: C 64.02, H 5.33. Związek **62** został zastrzeżony w polskim zgłoszeniu patentowym P 407948, 2014. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą A.

Procedura ogólna 3: synteza związków 63-69

Do schłodzonego do temperatury 0°C roztworu alkoholu (0.5 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) dodano fosgenu (0.25 mmol, 20% roztwór w toluenie), ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 2 godziny. Po tym czasie odparowano nadmiar fosgenu, otrzymując roztwór chloromrówczanu w THF. Mieszaninę schłodzono powtórnie do temperatury 0°C i dodano kolejno DMAP (25 mg, 0.2 mmol), 7-hydrokso-4-metylokumarynę (176 mg, 1 mmol) lub 7-hydrokso-4-trifluorometylokumarynę (230 mg, 1 mmol) i Et₃N (0.42 mL, 3 mmol). Mieszano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Po tym czasie do mieszaniny dodano 10 mL 1 M roztworu kwasu solnego i ekstrahowano 10 mL chlorku metylenu. Oddzielno fazę organiczną, wysuszono za pomocą MgSO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie chlorek metylenu : metanol (98:2). Uwaga: fosgen jest związkami wysoce toksycznym o temperaturze wrzenia 8°, jego nadmiar należy zutylizować. Fosgen podczas odarowywania skraplał się w wymrażalniku wypełnionym suchym lodem z acetonem. W celu

jego utylizacji do schłodzonego roztworu fosgenu w chlorku metylenu wkrapłano schłodzony roztwór 2-aminoetanolu (1 mL) i etanolu (6 mL) w chlorku metylenu (20 mL) w dobrze wentylowanym pomieszczeniu.

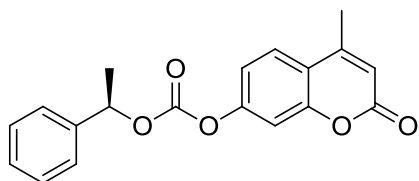
Związek 63



Węglan eteru monoetylowego glikolu trietylenowego i (2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylu) otrzymano zgodnie z

procedurą ogólną 3, używając eteru monoetylowego glikolu trietylowego (89 mg, 0.5 mmol) i 7-hydroksy-4-metylokumaryny jako substratów. Produkt wyizolowano z wydajnością 35% (133 mg) w postaci bezbarwnego oleju. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.61 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.23-7.16 (m, 2H), 6.28 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz), 4.45-4.43 (m, 2H, $J = 2.8$ Hz), 3.83-3.81 (m, 2H, $J = 2.8$ Hz), 3.73-3.66 (m, 6H), 3.62-3.60 (m, 2H), 3.52 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.44 (d, 3H, $J = 1.6$ Hz), 1.21 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 160.4, 154.0, 153.2, 152.8, 151.8, 125.5, 117.9, 117.3, 114.6, 109.9, 70.7, 70.6, 70.5, 69.7, 68.6, 68.1, 66.6, 18.7, 15.1; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, log ϵ): 215 (3.97), 270 (3.84), 310 (3.82); Analiza elementarna obliczona dla: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_8$: C 59.99, H 6.36; zbadana: C 59.75, H 6.25. Związek 63 został zastrzeżony w polskim zgłoszeniu patentowym P 407948, 2014. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą A.

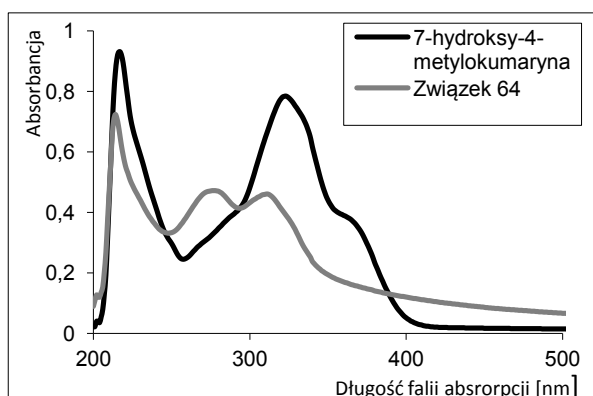
Związek (R)-64



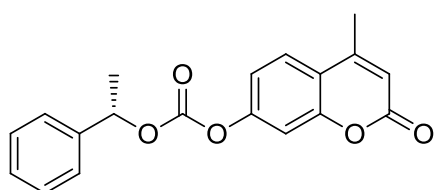
Węglan (*R*)-1-fenyletylowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (*R*)-1-fenyletanol i 7-hydroksy-4-metylokumarynę jako substraty. Produkt (*R*)-64 otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością 71% (115.8

mg); $t_f = 65-66$ °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 7.80 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.65-7.59 (m, 5H), 7.39 (td, 2H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz), 6.49 (s, 1H), 6.07 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz), 2.64 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.92 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 160.4, 154.0, 153.2, 151.9, 151.8, 140.1, 128.7, 128.5, 126.2, 125.4, 117.9, 117.4, 114.6, 109.9, 78.1, 22.1, 18.7; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, log ϵ): 215 (3.94), 270 (3.75), 310 (3.75); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_5$: C 70.36, H 4.97; zbadana: C 70.51, H 4.99; $[\alpha]_D = 124$

($c = 1.0, \text{CHCl}_3$). Związek (*R*)-**64** został zastrzeżony w polskim zgłoszeniu patentowym P 407948, 2014. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą B.



Związek (*S*)-**64**



Węglan (*S*)-1-fenyletylowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (*S*)-1-fenyletanol i 7-hydroksy-4-metylokumarynę jako substraty. Produkt (*S*)-**64** otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością

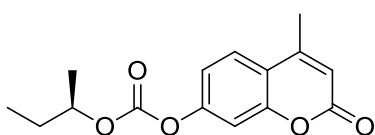
70% (113.5 mg); $t_f = 65-66\text{ }^\circ\text{C}$; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ 7.80 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.67-7.59 (m, 5H), 7.43-7.35 (m, 2H), 6.49 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz), 6.07 (q, 1H, $J = 6.6$ Hz), 2.65 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.92 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ 160.4, 154.1, 153.2, 151.8, 151.8, 140.1, 128.7, 128.5, 126.2, 125.4, 117.9, 117.4, 114.6, 109.9, 78.1, 22.1, 18.7; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, $\log \epsilon$): 215 (3.92), 270 (3.72), 310 (3.72); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_5$: C 70.36, H 4.97; zbadana: C 70.49, H 4.86; $[\alpha]_D = -122$ ($c = 1.0, \text{CHCl}_3$). Związek (*S*)-**64** został zastrzeżony w polskim zgłoszeniu patentowym P 407948, 2014. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą B.

Procedura ogólna 4: wyznaczenie enancjoselektywności reakcji z powiększonej skali

Równomolowe ilości związków (po 4 mg każdego z nich) rozpuszczono w 2 mL roztworu bufor fosforanowy o pH 7.4/acetonitryl (8:2; v/v). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 4 mg BSA i 4 mg enzymu, aby zapoczątkować proces hydrolizy. Reakcje umieszczono na wytrząsarce i wytrząsano od 1 do 7 dni w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę ekstrahowano za pomocą octanu etylu, faze organiczną oddzielono, wysuszono za pomocą MgSO_4 i odparowano. Mieszaniny analizowano za pomocą HPLC,

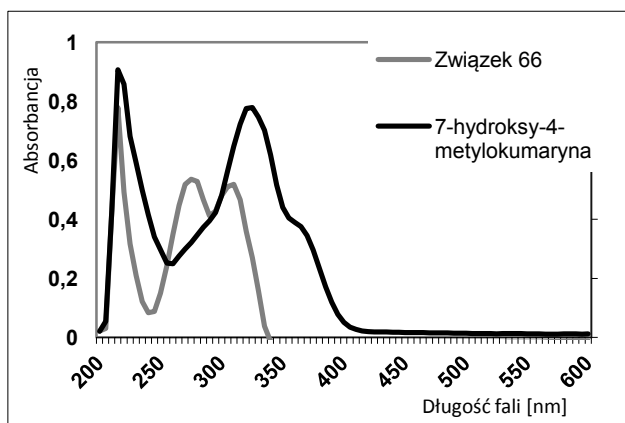
zaopatrzonego w kolumnę chiralną AD-H (Chiralcel, Daicel, Japan). Wartości E obliczono ze wzoru: $E = \ln[(1-c)(1-ee_s)] / \ln[(1-c)(1+ee_s)]$, gdzie c to konwersja, ee_s to nadmiar enancjomeryczny nieprzereagowanego substratu, ee_p to nadmiar enancjomeryczny produktu. Analizę HPLC prowadzono z zastosowaniem Metody F. Wartości Quick E obliczono ze wzoru: $E = ((S)-1/(R)-1) = ((S)-1/reference) / ((R)-1/reference)$, gdzie szybkość hydrolizy związku referencyjnego zastąpiono szybkością hydrolizy drugiego pseudoenancjomeru, np.: $E = ((S)-66/(R)-67) / ((R)-66/(S)-67)$.

Związek (R)-66



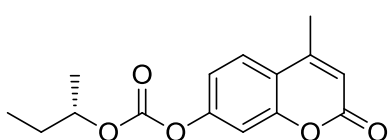
Węglan (R)-2-butylo-2-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylo-2-yl) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (R)-2-butanol i 7-hydroksy-4-metylokumarynę jako substraty.

Produkt (R)-66 otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością 47% (65.3 mg); $t_f = 50-54^\circ\text{C}$, $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.61 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.22 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz), 6.27 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz), 4.90-4.78 (m, 1H), 2.44 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.81-1.62 (m, 2H), 1.37 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz), 1.00 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, ppm) δ 160.4, 154.1, 153.4, 152.4, 151.8, 125.4, 117.8, 117.4,



114.5, 109.9, 78.4, 28.7, 19.2, 18.7, 9.5; UV/Vis (λ_{max} , nmbufor fosforanowy pH 7.4, $\log \epsilon$): 215 (4.1), 275 (3.9) 310 (3.9); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$: C 65.21, H 5.84; zbadana: C 65.30, H 5.85; $[\alpha]_D = -10.9$ ($c=1.0$, CHCl_3). Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

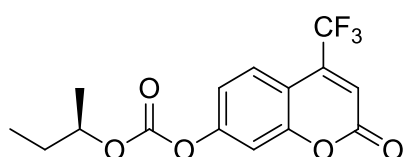
Związek (S)-66



Węglan (S)-2-butylo-2-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylo-2-yl) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (S)-2-butanol i 7-hydroksy-4-metylokumarynę jako substraty. Produkt (S)-66 otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością 39% (54.5 mg); $t_f = 50-54^\circ\text{C}$, $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.61 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz), 6.27 (q, 1H, $J = 1.1$ Hz), 4.90-4.78 (m,

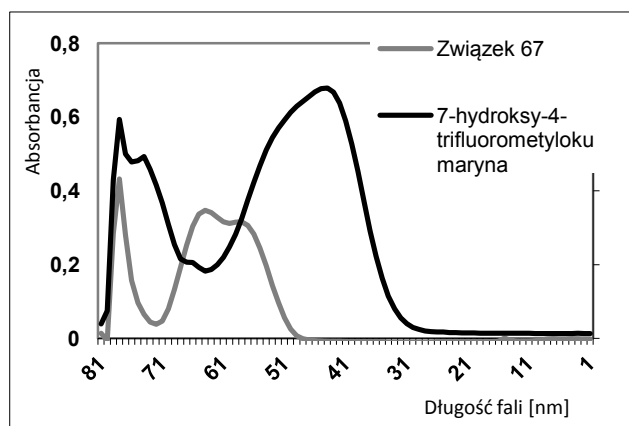
1H), 2.47-2.40 (m, 3H), 1.82-1.61 (m, 2H), 1.41-1.35 (m, 3H), 1.04-0.96 (t, 3H); ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm) δ 160.4, 154.1, 153.4, 152.4, 151.8, 125.4, 117.8, 117.4, 114.5, 109.9, 78.4, 28.7, 19.2, 18.7, 9.5; UV/Vis (λ_{max}, nm, bufor fosforanowy pH 7.4, logε): 215 (4.1), 275 (3.9) 310 (3.9); Analiza elementarna obliczona dla C₁₅H₁₆O₅: C 65.21, H 5.84; zbadana: C 65.38, H 5.87; [α]_D = +13.0 (c=1.0, CHCl₃). Pomiaru fluorometryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

Związek (R)-67



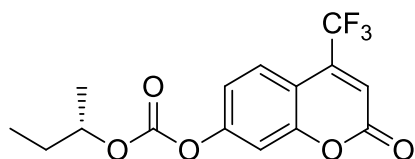
Węglan (R)-2-butylo-2-okso-4-trifluorometylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (R)-2-butanol oraz 7-hydrokso-4-

trifluorometylokumarynę jako substraty. Produkt (R)-67 otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością 43% (107.0 mg); t_f = 101-102°C, ¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm) δ 7.75 (dq, 1H, J₁ = 1.8 Hz, J₂ = 8.8 Hz), 7.34 (d, 1H, J₁ = 2.2 Hz), 7.28-7.20 (m, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.91-4.79 (m, 1H), 1.83-1.63 (m, 2H), 1.38 (d, 3H, J = 6.4 Hz), 1.01 (t, 3H, J = 7.5 Hz); ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz, ppm) δ 158.4, 155.1, 154.4, 152.1, 126.3, 122.8, 120.0,



118.3, 115.4, 111.2, 110.5, 78.8, 28.6, 19.2, 9.5; UV/Vis (λ_{max}, nm, bufor fosforanowy pH 7.4, logε): 215 (3.8), 285 (3.7), 315 (3.7); Analiza elementarna obliczona dla C₁₅H₁₃F₃O₅: C 54.55, H 3.97; zbadana: C 54.78, H 3.96; [α]_D = -9.3 (c=1.0, CHCl₃). Pomiaru fluorometryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

Związek (S)-67

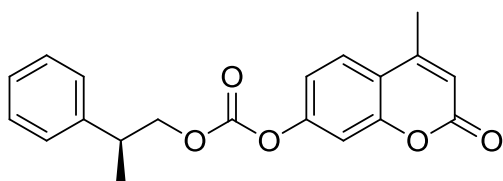


Węglan (S)-2-butylo-2-okso-4-trifluorometylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (S)-2-butanol oraz 7-hydrokso-4-

trifluorometylokumarynę jako substraty. Produkt (S)-67 otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością 36% (88.9 mg); t_f = 101-102°C, ¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.75 (dq, 1H, J₁ = 1.8 Hz, J₂ = 8.9 Hz), 7.34 (d, 1H, J = 2.2 Hz), 7.28-7.21 (m, 1H), 6.78 (d, 1H, J

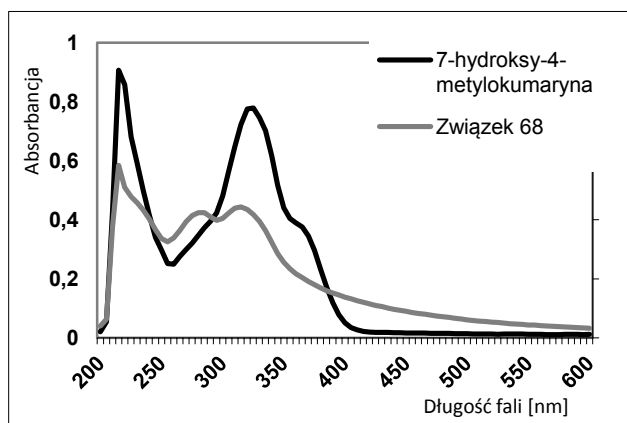
= 0.7 Hz), 4.90-4.80 (m, 1H), 1.82-1.63 (m, 2H), 1.41-1.36 (m, 3H), 1.00 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 158.4, 155.1, 154.4, 152.1, 126.3, 122.8, 120.0, 118.4, 115.3, 111.2, 110.5, 78.8, 28.7, 19.2, 9.5; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, $\log \epsilon$): 215 (3.8), 285 (3.7), 315 (3.7); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{O}_5$: C 54.55, H 3.97; zbadana: C 54.75, H 4.02; $[\alpha]_{\text{D}} = +9.8$ ($c=1.0$, CHCl_3). Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

Związek (R)-68



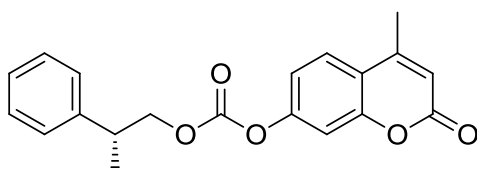
Węglan (R)-2-fenyl-1-propylowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (R)-2-fenyl-1-propanolu oraz 7-hydroksy-4-metylokumarynę jako

substraty. Produkt (R)-68 otrzymano w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 64% (108.5 mg); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.57 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.37-7.31 (m, 2H), 7.29-7.24 (m, 3H), 7.14 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.08 (dd, 2H, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz), 6.26 (q, 1H, $J = 1.2$ Hz), 4.46-4.37 (m, 1H), 4.36-4.27 (m, 1H), 3.22 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 2.41 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.39 (d, 3H, $J_1 = 7.1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, ppm) δ 160.3, 154.1, 153.2, 152.7, 151.7, 142.1, 129.0, 128.6, 128.2, 127.3, 127.0, 125.4, 117.9, 117.3, 114.6, 109.9,



73.8, 38.9, 18.6, 17.8; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, $\log \epsilon$): 215 (4.0), 285 (3.8), 315 (3.9); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$: C 71.00, H 5.36; zbadana: C 70.82, H 5.28; $[\alpha]_{\text{D}} = +4.1$ ($c=1.0$, CHCl_3). Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

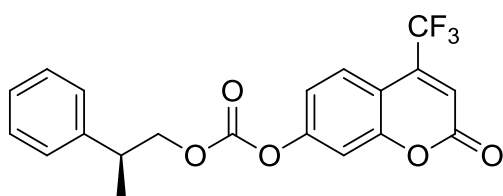
Związek (S)-68



Węglan (S)-2-fenyl-1-propylowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (S)-2-fenyl-1-

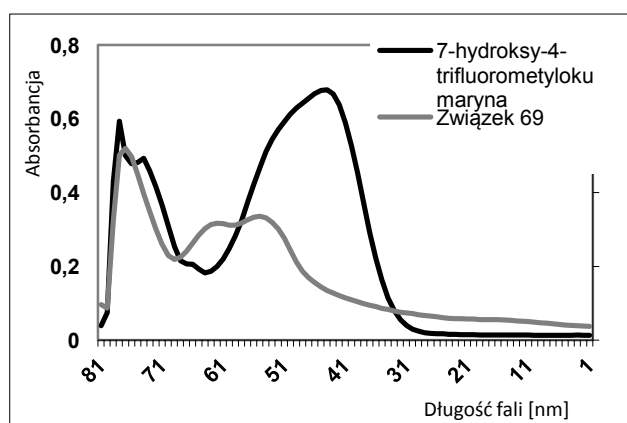
propanolu oraz 7-hydroksy-4-metylokumarynę jako substraty. Produkt (*S*)-**68** otrzymano w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 58% (98.2 mg); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.58 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.38-7.32 (m, 2H), 7.30-7.24 (m, 3H), 7.15 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 7.09 (dd, 1H, $J_1 = 2.3$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz), 6.28-6.24 (m, 1H), 4.46-4.37 (m, 1H), 4.36-4.26 (m, 1H), 3.22 (q, 1H, $J = 7.0$ Hz), 2.42 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz), 1.39 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, ppm) δ 160.4, 154.1, 153.3, 152.7, 151.7, 142.2, 128.7, 128.7, 128.7, 127.3, 127.0, 125.4, 117.9, 117.4, 114.6, 109.9, 73.8, 39.0, 18.7, 17.8; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, $\log \epsilon$): 215 (4.0), 285 (3.8), 315 (3.9); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$: C 71.00, H 5.36; zbadana: C 70.67, H 5.26; $[\alpha]_{\text{D}} = -4.0$ ($c=1.0$, CHCl_3). Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

Związek (*R*)-69



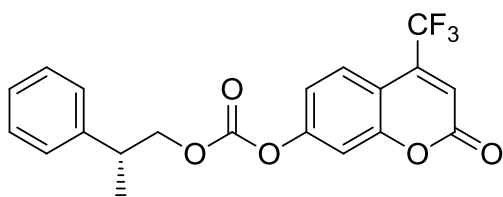
Węglan (*R*)-2-fenyl-1-propylowo-(2-okso-4-trifluorometylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (*R*)-2-fenyl-1-propanolu oraz 7-hydroksy-4-

trifluorometylokumarynę jako substraty. Produkt (*R*)-**69** otrzymano w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 64% (125.8 mg); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.65 (dq, 1H, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz), 7.31-7.25 (m, 2H), 7.23-7.19 (m, 2H), 7.19-7.16 (m, 2H), 7.08 (dd, 1H, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz), 6.70 (d, 1H, $J = 0.7$ Hz), 4.40-4.31 (m, 1H), 4.30-4.21 (m, 1H), 3.15 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 1.32 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, ppm) δ 158.4, 155.0, 154.2, 152.4, 142.0, 140.9, 128.7, 127.3, 127.1, 126.3, 120.0, 118.3, 115.5, 111.3,



110.5, 74.0, 39.0, 17.8; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, $\log \epsilon$): 220 (3.9), 295 (3.7), 330 (3.7); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{O}_5$: C 61.23, H 3.85; zbadana: C 61.36, H 3.95; $[\alpha]_{\text{D}} = +3.8$ ($c=1.0$, CHCl_3). Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

Związek (S)-69

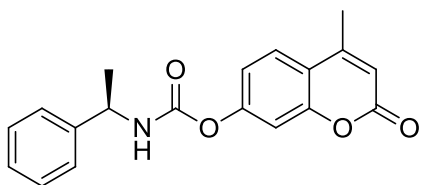


Węglan (S)-2-fenyl-1-propylowo-(2-okso-4-trifluorometylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 3, używając (S)-2-fenyl-1-propanolu oraz 7-hydroksy-4-trifluorometylokumarynę jako substraty. Produkt (S)-69 otrzymano w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 49% (96.0 mg); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.69. (m, 1H), 7.38-7.32 (m, 2H), 7.30-7.27 (m, 2H), 7.26-7.23 (m, 2H), 7.15 (dd, 1H, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz), 6.77 (d, 1H, $J = 0.5$ Hz), 4.47-4.38 (m, 1H), 4.38-4.30 (m, 1H), 3.23 (q, 1H, $J_1 = 7.1$ Hz), 1.39 (d, 3H, $J = 7.1$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz, ppm) δ 158.4, 155.0, 154.2, 152.4, 142.1, 140.9, 128.7, 127.3, 127.1, 126.4, 120.0, 118.3, 115.5, 111.4, 110.5, 74.0, 39.0, 17.8; UV/Vis (λ_{max} , nm, bufor fosforanowy pH 7.4, $\log \epsilon$): 220 (3.9), 295 (3.7), 330 (3.7); Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{O}_5$: C 61.23, H 3.85; zbadana: C 61.39, H 4.01; $[\alpha]_{\text{D}} = -3.3$ ($c=1.0$, CHCl_3). Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą C.

Procedura ogólna 5: synteza związków (R)-71 i (S)-71

Do roztworu 1-fenyl-2-aminoetan-1-olu (61 mg, 0.5 mmol), DIPEA (0.26 mL, 1.5 mmol) w bezwodnym THF (2 mL) w temperaturze 0°C w atmosferze argonu dodano przez strzykawkę 20% roztwór fosgeny w toluenie (0.5 mL, 1 mmol). Reakcję mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie przez mieszaninę przepuszczano przez 15 minut argon, aby usunąć nieprzereagowany fosgen. Mieszaninę schłodzono do 0°C i powoli dodano roztwór DIPEA (0.09 mL, 0.5 mmol) i 7-hydroksy-4-metylokumaryny (106 mg, 0.6 mmol) w bezwodnym THF (2 mL). Następnie mieszano przez 12 godzin w atmosferze azotu w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do mieszaniny dodano CH_2Cl_2 (10 mL) i ekstrahowano 1M roztworem HCl (10 mL). Oddzielono fazę organiczną, wysuszono za pomocą MgSO_4 , odparowano i oczyszczano na żelu krzemionkowym w układzie chlorek metylenu:metanol (99:1, v/v).

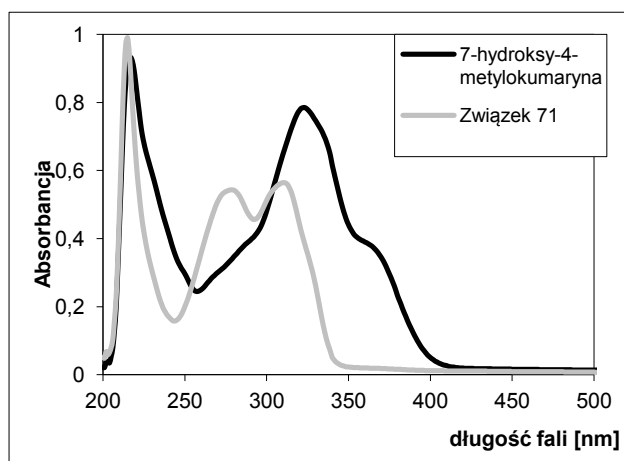
Związek (R)-71



Zastosowano procedurę ogólną 5, stosując (*S*)-1-fenyletyloaminę (61 mg, 0.5 mmol) i 7-hydrokso-4-metylokumarynę (106 mg, 0.6 mmol) jako substraty.

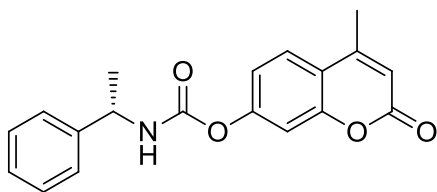
Węglan (*R*)-1-fenyletyloaminowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano w postaci półstałej z wydajnością 66% (107.1 mg).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.49-7.45 (d, 1H, $J = 18.4$ Hz), 7.32-7.28 (m, 4H), 7.25-7.20 (m, 1H), 7.05-7.03 (m, 2H), 6.15 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz), 5.43 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.84 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz), 2.32 (d, 3H, $J = 0.8$ Hz), 1.51 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz) ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ



160.6, 154.1, 153.6, 152.6, 152.0, 142.6, 128.8, 127.6, 126.0, 125.1, 117.9, 117.2, 114.1, 110.0, 51.1, 22.1, 18.6; UV/Vis (λ_{max} , nm, MeCN, $\log \epsilon$): 215 (4.20), 270 (3.95), 310 (3.94); Analiza element. obliczona dla $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{O}_5$: C 70.58, H 5.30, N 4.33; zbadana: C 70.29, H 5.29, N 4.16; $[\alpha]_{\text{D}}=81$ ($c=1.0$, CHCl_3); Pomiaru fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

Związek (S)-71



Zastosowano procedurę ogólną 5, stosując (*S*)-1-fenyletyloaminę (61 mg, 0.5 mmol) i 7-hydrokso-4-metylokumarynę (106 mg, 0.6 mmol) jako substraty.

Węglan (*S*)-1-fenyletyloaminowo-(2-okso-4-metylo-2H-chromen-7-ylowy) otrzymano w postaci półstałej z wydajnością 66% (108.0 mg).

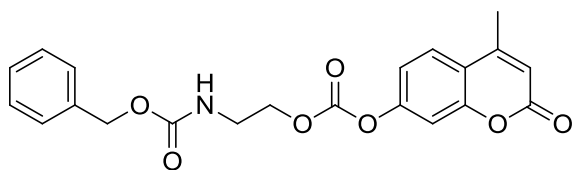
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 7.79-7.75 (d, 1H, $J = 18.4$ Hz), 7.61-7.49 (m, 5H), 7.35-7.33 (m, 2H), 6.45 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz), 5.79 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 5.17 (q, 1H, $J = 7.0$ Hz), 2.63 (d, 3H, $J = 0.8$ Hz), 1.81 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 160.6, 154.1, 153.6, 152.6, 152.0, 142.6, 128.7, 127.6, 126.0, 125.1, 117.9, 117.2, 114.1, 110.0, 51.1, 22.1, 18.6; UV/Vis (λ_{max} , nm, MeCN, $\log \epsilon$): 215 (4.23), 270 (3.96), 310 (3.94); Analiza element.

obliczona dla C₁₉H₁₃F₃O₅: C 70.58, H 5.30, N 4.33; zbadana: C 70.52, H 5.52, N 4.25; [α]_D=-78 (c=1.0, CHCl₃). Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

Procedura ogólna 6: synteza związków 75-77

Do roztworu aminoetanolu (3.3 mmol) w chlorku metylenu (8 mL) schłodzonego do temperatury 0°C wkroplono kolejno chloromrówczan (3.0 mmol) i Et₃N (4.5 mmol). Po 2 godzinach mieszania w temperaturze pokojowej rozpuszczalnik odparowano, a surowy produkt poddano oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie heksan octan etylu (1:1, obj./obj.). Następnie 0.5 mmol produktu pośredniego rozpuszczono w bezwodnym THF (10 mL), schłodzonego do temperatury 0°C, wkroplono kolejno 1.8 mL fosgeny (15% roztwór w toluenie) i 0.21 mL Et₃N. Ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 3 godziny w atmosferze argonu. Po tym czasie odparowano nadmiar fosgeny, otrzymując roztwór w THF. Mieszaninę schłodzonego do temperatury 0°C i dodano kolejno DMAP (20 % wagowych), 7-hydroksy-4-metylokumarynę (176 mg, 1 mmol) i Et₃N (0.21 mL, 1.5 mmol). Mieszano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie chlorek metylenu : metanol (98:2).

Związek 75

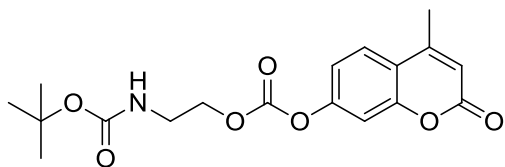


Związek **75** syntetyzowano zgodnie z procedurą ogólną 6, stosując chloromrówczan benzylu (0.42 mL, 3 mmol) jako jeden z substratów. Otrzymano produkt pod postacią

bezbarwnego oleju, wydajność pierwszego etapu wynosiła 50%, a drugiego etapu 61% (120.7 mg).

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.60 (d, 1H, J = 8.56 Hz), 7.37-7.28 (m, 5H), 7.21-7.14 (m, 2H), 6.27 (d, 1H, J =1.22 Hz), 5.30 (m, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.37-4.34 (m, 2H), 3.59 (q, J =5.22 Hz), 2.42 (d, 3H, J =1.22 Hz); ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 160.3, 154.2, 153.1, 152.7, 151.8, 136.2, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1, 125.5, 118.1, 117.3, 114.7, 109.9, 68.0, 67.0, 40.0, 18.7; Analiza element. obliczona dla C₂₁H₁₉NO₇: C 63.47, H 4.82, N 3.53; zbadana: C 63.17, H 4.37, N 3.49; Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

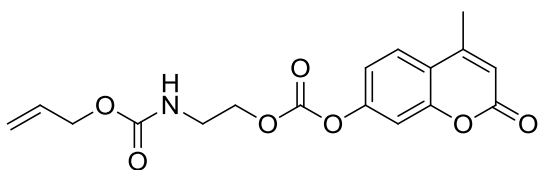
Związek 76



Związek **76** syntetyzowano zgodnie z procedurą ogólną 6, stosując diwęglan di-*tert*-butylowy (720 mg, 3.3 mmol) jako jeden z substratów. Otrzymano produkt pod postacią bezbarwnego oleju, wydajność pierwszego etapu wynosiła 98%, a drugiego etapu 48% (86.8 mg).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.26 (d, 1H, $J=8.56$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J=2.20$ Hz), 7.18 (dd, 1H, $J_1=8.68$ Hz, $J_2=2.32$ Hz), 6.28 (d, 1H, $J=1.22$ Hz), 4.79-5.03 (m, 1H), 4.34 (t, 3H, $J=5.26$ Hz), 3.51 (d, 2H, $J=5.14$ Hz), 2.44 (d, 4H, $J=1.22$), 1.47 (s, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 160.3, 154.2, 153.2, 152.7, 151.7, 125.5, 118.1, 117.3, 114.7, 109.9, 68.3, 61.3, 28.4, 18.7; Analiza element. obliczona dla $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_7$: C 59.50, H 5.83, N 3.85; zbadana: C 59.36, H 5.94, N 3.77. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

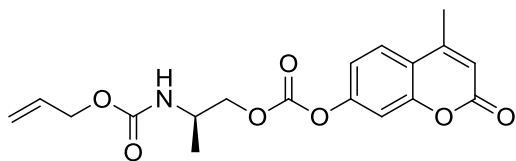
Związek 77



Związek **77** syntetyzowano zgodnie z procedurą ogólną 6, stosując chloromrówczan allilowy (0.32 mL, 3.0 mmol) jako jeden z substratów. Otrzymano produkt pod postacią bezbarwnego oleju, wydajność pierwszego etapu wynosiła 86%, a drugiego etapu 39% (67.4 mg).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.62 (d, 1H, $J=8.56$ Hz), 7.22 (d, 1H, $J=2.45$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $J_1=8.68$ Hz, $J_2=2.32$ Hz), 6.28 (d, 1H, $J=1.22$ Hz), 5.86-6.07 (m, 1H), 5.27-5.40 (m, 1H), 5.23 (dd, 1H, $J_1=10.51$ Hz, $J_2=1.22$ Hz), 5.16 (br. s., 1H), 4.60 (d, 2H, $J=5.38$ Hz), 4.37 (t, 2H, $J=5.26$ Hz), 3.58 (q, 2H, $J=5.54$ Hz), 2.44 (d, 3H, $J=1.22$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 160.3, 156.2, 154.2, 153.1, 152.7, 151.7, 132.6, 125.5, 118.1, 117.9, 117.3, 114.7, 109.9, 68.0, 65.8, 39.9, 18.7; Analiza element. obliczona dla $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_7$: C 58.79, H 4.93, N 4.03; zbadana: C 58.94, H 5.05, N 4.04. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

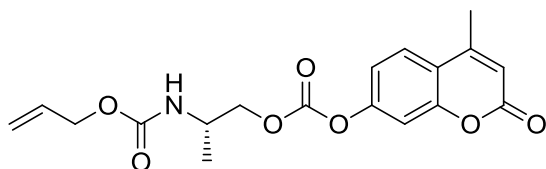
Związek (R)-78



Związek (R)-78 syntetyzowano zgodnie z procedurą ogólną 4, stosując chloromrówczan allilowy (0.32 mL, 3.0 mmol) i 2-aminopropanol (247.8 mg, 3.3 mmol) jako substraty. Otrzymano produkt pod postacią bezbarwnego oleju, wydajność pierwszego etapu wynosiła 90%, a drugiego etapu 61% (110.0 mg).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.62 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 7.22 (d, 1H, $J=2.2$ Hz), 7.18 (dd, 1H, $J_1=8.68$ Hz, $J_2=2.32$ Hz), 6.25-6.31 (m, 1H), 5.93 (ddt, 1H, $J_1=17.24$, $J_2=10.51$ Hz, $J_3=5.69$ Hz), 5.32 (dq, 1H, $J_1=17.21$ Hz, $J_2=1.52$ Hz), 5.22 (dq, 1H, $J_1=10.42$ Hz, $J_2=1.33$ Hz), 4.90 (br. s., 1H), 4.59 (d, 2H, $J=5.38$ Hz), 4.30 (dd, 1H, $J_1=10.88$ Hz, $J_2=4.28$ Hz), 4.22 (dd, 1H, $J_1=10.88$ Hz, $J_2=5.26$ Hz), 4.14 (m, 1H), 2.41-2.47 (m, 3H), 1.29 (d, 3H, $J=6.85$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 160.3, 155.5, 154.2, 153.2, 152.8, 151.8, 132.7, 125.5, 118.1, 117.9, 117.3, 114.7, 109.9, 71.5, 68.7, 65.8, 18.7, 17.4. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

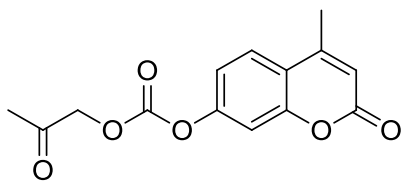
Związek (S)-78



Związek (S)-78 syntetyzowano zgodnie z procedurą ogólną 4, stosując chloromrówczan allilowy (0.32 mL, 3.0 mmol) i 2-aminopropanol (247.8 mg, 3.3 mmol) jako substraty. Otrzymano produkt pod postacią bezbarwnego oleju, wydajność pierwszego etapu wynosiła 83%, a drugiego etapu 62% (112.7 mg).

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.62 (d, 1H, $J=8.80$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J=2.20$ Hz), 7.18 (dd, 1H, $J_1=8.80$ Hz, $J_2=2.45$ Hz), 6.28 (d, 1H, $J=1.22$ Hz), 5.85-6.00 (m, 1H), 5.27-5.35 (m, 1H), 5.19-5.25 (m, 1H), 4.91 (br. s., 1H), 4.61 (d, 2H, $J=5.4$ Hz), 4.27-4.34 (m, 1H), 4.19-4.26 (m, 1H), 4.09-4.18 (m, 1H), 2.44 (d, 3H, $J=1.22$ Hz), 1.22-1.34 (d, 3H, $J=6.8$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 160.4, 155.6, 154.2, 153.2, 152.8, 151.8, 132.7, 125.5, 118.1, 117.9, 117.3, 114.7, 109.9, 71.5, 68.7, 65.8, 18.7, 17.4. Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

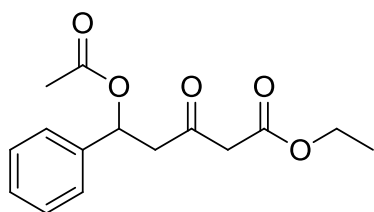
Synteza związku 79



Do schłodzonego do temperatury 0°C roztworu hydroksyacetonu (0.5 mmol, 37 mg) w THF (10 mL) dodano fosgeny (2.5 mmol, 1.8 mL, 15% roztwór w toluenie), ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 2 godziny. Po tym czasie odparowano nadmiar fosgeny, otrzymując roztwór chloromrówczanu w THF. Mieszaninę schłodzono powtórnie do temperatury 0°C i dodano kolejno DMAP (42.6 mg), 7-hydroksy-4-metylokumarynę (176 mg, 1 mmol) i pirydynę (0.24 mL, 3 mmol). Mieszano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Po tym czasie do mieszaniny dodano 10 mL 1 M roztworu kwasu solnego i ekstrahowano 10 mL chlorku metylenu. Oddzielno fazę organiczną, wysuszono za pomocą MgSO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie chlorek metylenu : metanol (95:5). Produkt **79** otrzymano w postaci białego, półstałego osadu z wydajnością 18% (24.9 mg).

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.63 (d, 2H, *J*=8.8 Hz), 7.26 (d, 1H, *J*=2.2 Hz), 7.21 (dd, 1H, *J*₁=8.7 Hz, *J*₂=2.3 Hz), 6.29 (d, 1H, *J*=1.2 Hz), 4.83 (s, 2H), 2.44 (d, 2H, *J*=1.2 Hz), 2.20 (s, 3H); ¹³CNMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 201.0, 199.9, 160.3, 154.1, 153.0, 152.4, 151.8, 125.6, 118.1, 117.2, 114.7, 109.8, 71.4, 25.9, 18.7; Pomiary fluorymetryczne wykonywano zgodnie z Metodą D.

Synteza związku 84



Do roztworu alkoholu **50** w 10 mL chlorku metylenu dodano kolejno kwasu octowy (1.2 mmol, 72mg), DCC (1.2 mmol, 248 mg), DMAP (5 mg). Reakcję prowadzono przez 12 godzin na mieszadle magnetycznym. Po tym czasie do mieszaniny dodano 1 M HCl i ekstrahowano octanem etylu. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie heksan:octan etylu (8:2, obj./obj.). Związek **84** wyizolowano w postaci jasnożółtego oleju z wydajnością 91% (252.4 mg).

¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.28-7.19 (m, 5H), 6.12 (dd, 1H, *J*₁=4.8 Hz, *J*₂=8.8 Hz), 4.10 (q, 2H, *J*=7.2 Hz), 3.50 (d, 2H, *J*=2.4 Hz), 3.15 (dd, 1H, *J*₁=8.8 Hz, *J*₂=16.8 Hz), 2.91 (dd,

^1H , $J_1=4.8$ Hz, $J_2=16.8$ Hz), 1.97 (s, 3H), 1.19 (t, 3H, $J=7.2$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 198.9, 169.7, 166.7, 139.4, 128.6, 128.5, 128.3, 126.4, 126.3, 71.3, 61.5, 49.6, 49.0, 21.0, 14.0; Analiza element. obliczona dla $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5$: C 64.74, H 6.52; zbadana: C 65.01, H 6.47.

Procedura ogólna 7: Oznaczenia fluorymetryczne

Próbники fluorogenne przechowywano w postaci 5 mM roztworów w acetonitrylu. Dane uzyskane z pomiarów fluorymetrycznych przeliczono na szybkości reakcji. Pomiarzy prowadzono w kuwetach kwarcowych przy użyciu spektrofluorymetru SHIMAZU F7000.

Metoda A: W celu wykonania oznaczeń fluorymetrycznych 40 μL roztworu substratu (100 μmol) nastrzykiwano do 1.96 mL roztworu buforu fosforanowego o pH 7.4, zawierającego 50 μg enzymu oraz 4 mg BSA. Zadaniem BSA jako nieselektywnego białka było naśladowanie warunków badań przesiewowych w surowych ekstraktach komórkowych. Badano wzrost intensywności fluorescencji w czasie proporcjonalny do stężenia uwalnianej w procesie hydrolizy 7-hydroksy-4-metylokumaryny ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=445$ nm). Dane zbierano przez 2 godziny, co było czasem wystarczającym do zakończenia reakcji dla bardziej aktywnych enzymów.

Metoda B: W celu wykonania oznaczeń fluorymetrycznych 20 μL roztworu substratu o konfiguracji *R* (50 μmol) i 20 μL roztworu substratu o konfiguracji *S* (50 μmol) nastrzykiwano do 1.96 mL roztworu buforu fosforanowego o pH 7.4, zawierającego 50 μg enzymu oraz 4 mg BSA. Zadaniem BSA jako nieselektywnego białka było naśladowanie warunków badań przesiewowych w surowych ekstraktach komórkowych. Badano wzrost intensywności fluorescencji w czasie proporcjonalny do stężenia uwalnianej w procesie hydrolizy 7-hydroksy-4-metylokumaryny ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=445$ nm). Dane zbierano przez 2 godziny, co było czasem wystarczającym do zakończenia reakcji dla bardziej aktywnych enzymów.

Metoda C: W celu wykonania oznaczeń fluorymetrycznych 20 μL roztworu substratu o konfiguracji *R* (50 μmol) i 20 μL roztworu substratu o konfiguracji *S* (50 μmol) nastrzykiwano do 1.96 mL roztworu buforu fosforanowego o pH 7.4, zawierającego 100 μg enzymu. Badano wzrost intensywności fluorescencji w czasie przy dwóch długościach fali emisji proporcjonalny do stężenia uwalnianej w procesie hydrolizy 7-hydroksy-4-

metylokumaryny ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=430$ nm) i 7-hydroksy-4-trifluorometylokumaryny ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=550$ nm). Dane zbierano przez 1 godzinę, co było czasem wystarczającym do zakończenia reakcji dla bardziej aktywnych enzymów.

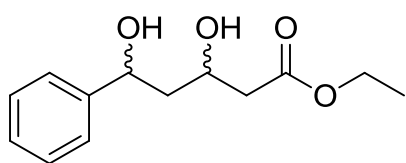
Metoda D: W celu wykonania oznaczeń fluorymetrycznych 40 μL roztworu substratu nastrzykiwano do 1.96 mL roztworu buforu fosforanowego o pH 7.4, zawierającego 50 μg enzymu. Badano wzrost intensywności fluorescencji w czasie przy proporcjonalny do stężenia uwalnianej w procesie hydrolizy 7-hydroksy-4-metylokumaryny ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=445$ nm). Dane zbierano przez 1 godzinę, co było czasem wystarczającym do zakończenia reakcji dla bardziej aktywnych enzymów.

Procedura ogólna 8: badania przesiewowe z zastosowaniem komórek mikroorganizmów

10 mg komórek mikroorganizmu zawieszono w 500 μL mieszaniny reakcyjnej, zawierającej dehydrogenazę glukozy ((1 mg mL⁻¹), 20 mM glukozy, 0.5 mM NAD⁺, 0.5 mM NADP⁺, 10 mM substratu w mieszaninie 100 mM Tris-HCl bufor o pH 7.5/izopropanol (90:10; v/v). Biotransformację prowadzono w temperaturze 30°C w termostatowanej wytrząsarce (120 obr./min) przez 20 godzin. Po tym czasie mieszaninę ekstrahowano octanem etylu, odwirowano, rozdzielono fazę organiczną i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Synteza związku 85

Do roztworu związku **50** (236 mg, 1 mmol) w etanolu (2 mL) dodano porcjami NaBH₄ (37.8 mg, 1 mmol) w temperaturze pokojowej i mieszano przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji pH mieszaniny doprowadzono do wartości 6.5 za pomocą 5% roztworu HCl. Etanol odparowano, a pozostałość ekstrahowano trzykrotnie za pomocą chlorku metylenu. Połączone fazy organiczne wysuszono za pomocą siarczanu magnezu i odparowano. Surowy produkt oczyszczano z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:octan etylu (1:1, obj./obj.), uzyskując ester etylowy kwasu 5-fenyl-3,5-dihydroksypentanowego w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 47% (0.469 mmol, 111.8 mg).

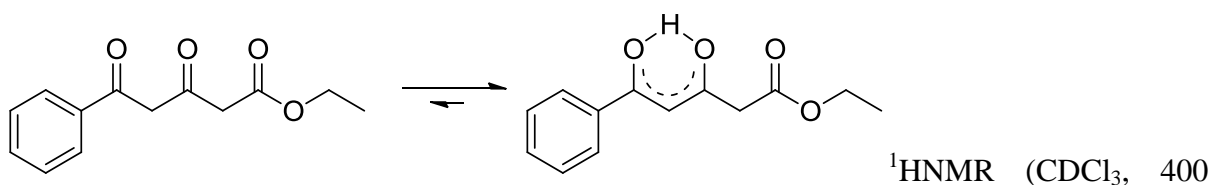


¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz, ppm, dr 90:10) δ 7.36-7.32 (m, 3H, Ar), 7.28-7.24 (m, 2H, Ar), 5-11 (dd, 0.10 H), 4.95 (dd, 0.95H, $J_1=3.3$ Hz, $J_2=9.7$ Hz), 4.35-4.28 (m, 1H), 4.16 (q, 2H, OCH₂CH₃), 3.69 (s, 2H, OH), 2.53-2.44 (m, 2H), 1.97-1.88 (m, 1H), 1.76 (dt, 1H, $J_1=2.9$ Hz, $J_2=14.4$ Hz), 1.25 (t, 3H, OCH₂CH₃); ¹³CNMR (CDCl₃, 200 MHz, ppm) δ 172.5, 144.1,

128.4, 127.5, 125.7, 74.4, 68.6, 60.8, 44.8, 41.5, 14.1; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem achiralnym Luna C18 $t_{r1}=17.3$ min, $t_{r2}=18.3$ min (Metoda E); analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym OB-H (Metoda G) $t_{(3R,5S)}=27.9$ min, $t_{(3R,5S)}=29.8$ min, $t_{(3S,5R)}=34.7$ min, $t_{(3S,5S)}=39.7$ min.

Synteza związku 86

Do roztworu związku **50** (2.36g, 10 mmol) w chlorku metylenu (150 mL) dodano odczynnik Dess-Martina (6.36g, 15 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 100 mL roztworu nasyconego NaHCO_3 i nasyconego $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1:1, obj./obj.). Fazę organiczną rozdzielono, a fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu. Połączone fazy organiczne wysuszono za pomocą siarczanu magnezu, a następnie odparowano. Produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:octan etylu 8:2 (obj./obj.), uzyskując czysty ester etylowy kwasu 5-fenyl-3,5-dioksopentanowego (1.64g, 7.01 mmol) z wydajnością 70% w postaci bezbarwnego oleju. Równowaga keton-enol przesunięta jest w stronę enolu (92:8).

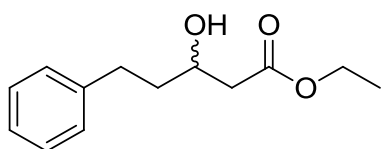


MHz, ppm, keton:enol = 8:92) δ 15.77 (s, 0.9H, OH), 7.94 (d, 0.2H), 7.88 (d, 1.96H, Ar), 7.53-7.43 (m, 3H, Ar), 6.29 (s, 1H, CH), 4.25-4.20 (m, 2H, OCH_2CH_3), 3.64 (s, 0.2H), 3.47 (s, 1.6H, CH_2), 1.33-1.23 (m, 3H, OCH_2CH_3) $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz, ppm) δ 189.2, 182.6, 167.5, 134.1, 132.6, 128.7, 127.1, 96.7, 61.5, 45.9, 14.1; Analiza element. obliczona dla $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C 66.66; H 6.02; zbadana: C 66.52; H 5.99; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym C18 Luna $t_r=20.9$ min (Metoda E).

Synteza związku 88

Reagent Jones'a przygotowano poprzez zmieszanie stężonego kwasu siarkowego (3 mL) z tlenkiem chromu (VI) (3.35 g), a następnie ostrożnie dodano wody, tak aby całkowita objętość roztworu wynosiła 25 mL. 7.3 mL reagenta Jones'a wkroplono do roztworu związku **93** (10 mmol, 2.22 g) w acetonie (40 mL), schłodzonego uprzednio do temperatury 0°C . Następnie ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 2 godziny. Dodano 4 mL metanolu, aby zgasić pozostałą ilość reagenta Jones'a. Mieszaninę ekstrahowano 40 mL eteru

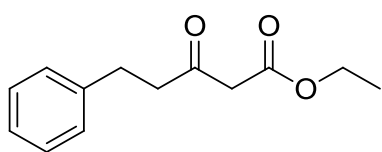
dietylowego, fazę organiczną oddzielono i przemyto trzykrotnie wodą (3x20 mL), wysuszono siarczanem magnezu i odparowano. Surowy produkt oczyszczano z zastosowaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:octan etylu (8:2, obj./obj.), uzyskując ester etylowy kwasu 5-fenylo-3-hydroksypentanowego w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 67% (6.74 mmol, 7.43 g).



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.30-7.26 (m, 2H, Ar), 7.21-7.16 (m, 3H, Ar), 4.16 (q, 2H, $J=7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 4.02 (td, 1H, $J_1=8.3$ Hz, $J_2=4.2$ Hz, CHOH), 3.06 (br. s., 1H, OH), 2.82-2.80 (m, 1H, CH_2), 2.72-2.66 (m, 1H, CH_2), 2.52-2.40 (m, 2H, CH_2), 1.91-1.78 (m, 1H, CH_2), 1.78-1.64 (m, 1H, CH_2), 1.26 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, OCH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz, ppm) δ 172.9, 141.7, 128.4, 128.4, 125.9, 67.2, 60.7, 41.3, 38.1, 31.7, 14.1; Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_3$: C 70.24, H 8.16; zbadana: C 70.11, H 8.33; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym C18 Luna (Metoda E) $t_r=21.5$ min; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym OD-H Chiralcel (Metoda D) $t_{r1}=7.1$ min, $t_{r2}=8.1$ min.

Synteza związku 89

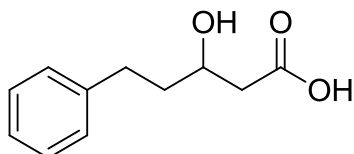
Do schłodzonego do 0°C roztworu diizopropylaminy (4.5 mL, 31.7 mmol, 1.7 ekw.) w bezwodnym THF (140 mL) wkropiono butylolit (2.7 M w heksanie, 10.4 mL, 27.9 mmol, 1.5 ekw.) w atmosferze argonu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 30 minut, utrzymując temperaturę 0°C . Następnie schłodzono do temperatury -78°C , po czym dodano roztwór aldehydu 3-fenylopropionowego (2.5 mL, 18.6 mmol, 1 ekw.) w bezwodnym THF. Po 3 godzinach mieszania w temperaturze -78°C mieszaninę zgaszono za pomocą nasyconego roztworu chlorku amonu. Mieszaninę pozostawiono do ogrzania do temperatury pokojowej, a powstałe dwie fazy rozdzielono. Fazę wodną ekstrahowano octanem etylu (3x50 mL). Połączone fazy organiczne wysuszono siarczanem magnezu i odparowano. Surowy produkt oczyszczano z pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:octan etylu (8:2, obj./obj.), otrzymując ester etylowy kwasu 5-fenylo-3-oksopentanowego w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 45% (8.37 mmol, 1.86 g).



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, ppm) δ 7.30-7.26 (m, 2H, Ar), 7.21-7.17 (m, 3H, Ar), 4.20-4.15 (m, 2H, OCH_2CH_3), 3.41 (s, 2H, COCH_2CO), 2.93-2.86 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.26 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, OCH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz, ppm) δ 201.8, 167.1, 140.5, 128.5, 128.3,

126.2, 61.4, 49.4, 44.5, 29.4, 14.1; Analiza elementarna obliczona dla C₁₃H₁₆O₃: C 70.89, H 7.32; zbadana: 70.97, H 7.43; analiza HPLC na kolumnie z wypełnieniem chiralnym C18 Lunat_r=22.8 min

Związek 90



Związek **90** otrzymano w postaci bezbarwnego oleju w wyniku reakcji katalizowanej całymi komórkami mikroorganizmów. ¹HNMR (d₆-DMSO, 400 MHz, ppm) δ 7.27-7.14 (m, 5H), 3.86-3.80 (m, 1H), 3.30 (br. s., 1H), 2.70 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.38-2.25 (m, 2H), 1.70-1.63 (m, 2H). Widmo NMR zgadza się z widmem literaturowym.¹⁵¹

Procedura nie-fermentacyjna enzymatycznej redukcji drożdżami:

Do 10 g drożdży dodano 100 mL wody destylowanej, 200 mg substratu i wytrząsano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę przesączono przez celit, odparowano i oczyszczano na kolumnie w układzie heksan:octan etylu (1:1, v/v).

Procedura fermentacyjna enzymatycznej redukcji drożdżami:

Do 10 g drożdży dodano 95 mL wody destylowanej, 4 g cukru i wytrząsano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 200 mg substratu rozpuszczonego w 5 mL rozpuszczalnika organicznego i wytrząsano przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę przesączono przez celit, odparowano i oczyszczano na kolumnie w układzie heksan:octan etylu (1:1, v/v).

Procedura enzymatycznego rozdziału kinetycznego

Do 50 mg związku **84** w 2 mL mieszaniny buforu fosforanowego o pH 7.4 z acetonitrylem (80:20, obj/obj.) dodano 10 mg enzymu. Reakcje wytrząsano przez 4 dni w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę ekstrahowano octanem etylu, wysuszono za pomocą MgSO₄, odparowano rozpuszczalnik, a produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym w układzie heksan:octan (8:2, obj./obj.).

¹⁵¹ Á. Sandoval, E. Arias-Barrau, F. Bermejo, L. Cañedo, G. Naharro, E. R. Olivera, J. M. Luengo, *App. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 97-105.

Procedura ogólna: analiza HPLC

Metoda A: Aby wyznaczyć nadmiar enancjomeryczny produktu, próbki rozpuszczono w 1.2 mL 2-propanolu, a następnie analizowano za pomocą HPLC, używając aparatury Varian ProStar połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem chiralnym OB-H Chiralcel (Daicel, Japonia) w następujących warunkach pomiarowych: eluent heksan:izopropanol (90:10, obj./obj.), temperatura 25^oC, przepływ 0.8 mL min⁻¹, λ=254 nm.

Metoda B: Aby wyznaczyć nadmiar enancjomeryczny produktu, próbki rozpuszczono w 1.2 mL 2-propanolu, a następnie analizowano za pomocą HPLC, używając aparatury Varian ProStar połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem chiralnym OB-H Chiralcel (Daicel, Japonia) w następujących warunkach pomiarowych: eluent heksan:izopropanol (80:20, obj./obj.), temperatura 25^oC, przepływ 0.8 mL min⁻¹, λ=254 nm.

Metoda C: Aby wyznaczyć nadmiar enancjomeryczny produktu **50**, próbki rozpuszczono w 1.2 mL metanolu, a następnie analizowano za pomocą HPLC, używając aparatury Shimadzu Prominence LC-20A Series połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem chiralnym IA Chiralpak (Daicel, Japonia) w następujących warunkach pomiarowych: eluent heptan:izopropanol (90:10, v/v), temperatura 30^oC, przepływ 0.5 mL min⁻¹, λ=210 nm.

Metoda D: Aby wyznaczyć nadmiar enancjomeryczny produktu **88**, próbki rozpuszczono w 1.2 mL metanolu, a następnie analizowano za pomocą HPLC, używając aparatury Shimadzu Prominence LC-20A Series połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem chiralnym OD-H Chiralcel (Daicel, Japonia) w następujących warunkach pomiarowych: eluent heptan:izopropanol (90:10, v/v), temperatura 30^oC, przepływ 1.0 mL min⁻¹, λ=210 nm.

Metoda E: W celu wyznaczenia wydajności uzyskanego produktu oraz konwersji substratu, próbki rozpuszczono w 1.2 mL metanolu, a następnie analizowano za pomocą HPLC, używając aparatury Shimadzu Prominence LC-20A Series połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem achiralnym C-18 Luna (Phenomenex) w następujących warunkach pomiarowych: eluent woda/acetonitryl, gradient od 100% wody do 100% acetonitrylu w ciągu 20 minut, następnie 100% acetonitrylu przez 5 minut, powrót do 100% wody w ciągu 5 minut, 100% wody przez 2 minuty, temperatura 30^oC, przepływ 0.5 mL min⁻¹, λ=210 nm.

Metoda F: Aby wyznaczyć nadmiar enancjomeryczny produktu, próbki rozpuszczono w 1.2 mL 2-propanolu, a następnie analizowano za pomocą HPLC, używając aparatury Varian ProStar połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem chiralnym Chiralpak AD-H (4.6 x 250 mm, Daicel, Japonia) w następujących warunkach pomiarowych: eluent heksan:izopropanol (70:30, obj./obj.), temperatura 25°C, przepływ 1.0 mL min⁻¹, $\lambda=270$ nm.

Metoda G: Aby wyznaczyć stosunek diastereoizomerów i nadmiar enancjomeryczny produktu, próbki rozpuszczono w 1.2 mL 2-propanolu, a następnie analizowano za pomocą HPLC, używając aparatury Varian ProStar połączonej z detektorem UV-Vis. Zastosowano kolumnę ze złożem chiralnym OB-H Chiralcel (Daicel, Japonia) w następujących warunkach pomiarowych: eluent heksan:izopropanol (92:8, obj./obj.), temperatura 25°C, przepływ 0.7 mL min⁻¹, $\lambda=215$ nm.

18. Cytowana literatura

1. Ćwiczenia z biochemii pod redakcją L. Kłyszajko-Stefanowicz, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **2005**, 471-575.
2. V. Farina, J. T. Reeves, C. H. Senanayake, J. J. Song, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2734–2793.
3. B. Testa, W. F. Trager, *Chirality* **1990**, *2*, 129-133.
4. R. Kohrs, M. E. Durieux, *Anesthesia & Analgesia* **1998**, *87*, 1186-1193.
5. K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Second Edition*, **2008**, Wiley.
6. C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
7. L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4560-4561.
8. G. Klein, J.-L. Reymond, *Helvetica Chimica Acta* **1999**, *82*, 400-407.
9. *Chemia analityczna: ćwiczenia laboratoryjne, praca zbiorowa pod redakcją I. Głuch i M. Balcerzak*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa **2007**, 138-149.
10. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, edited by M. C. Morris, Elsevier **2013**, *113*, 1-27
11. S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **1992**
12. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer **2006**
13. P. Suppan, *Chemia i światło*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **1997**
14. T. de Laborde de Monpezat, B. de Jesob, J.-L. Butourc, L. Chavafita, M. Sancholled, *Lipids* **1990**, *25*, 661-664.
15. E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1387 – 1395.
16. E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, Erickson J., *Science* **1990**, *247*, 954–958.
17. A. K. Kenworthy, *Methods* **2001**, *24*, 289-296.
18. K. Truong, M. Ikura, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 573-578.
19. R.B. Sekar, A. Periasamy, *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 629-633.
20. A. Tunceroglu, M. Matsuda, R. B. Birge, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 3065-3073.
21. Y. Yang, P. Babiak, J.-L. Reymond, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1746–1754.
22. N. Gagey, P. Neveu, C. Benbrahim, B. Goetz, I. Aujard, J.-B. Baudin, L. Jullien, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9986-9998.

23. S. Y. Cho, Y. K. Song, J. G. Kim, S. Y. Oh, C. M. Chung, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4769-4772.
24. P. Greenspan, S. Fowler, *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 781-789.
25. P. Greenspan, E. P. Mayer, S. D. Fowler, *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 965-973.
26. A. Minta, J. P. Kao, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8171-8178.
27. J. P. Goddard, J. L. Reymond, *Trends in Biotechnol.* **2004**, *22*, 363-370.
28. R. Gupta, P. Rathi, N. Gupta, S. Bradoo, *Biotechnol. App. Biochem.* **2003**, *37*, 63-71.
29. C. Huggins, J. Lapidus, *J. Biol. Chem.* **1947**, *170*, 467-482.
30. T. De Laborde de Monpezat, B. De Jeso, J.L. Butour, L. Chavant, M. Sancholle, *Lipids* **1990**, *25*, 661-664.
31. E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 1029-1033.
32. G. Klein, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1113-1116G.
33. E. Nyfeler, J. Grognum, D. Wahler, J.L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2919-2926.
34. R. P. Carlón, N. Jourdain, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4154-4162.
35. E. Henke, U. T. Bornscheuer, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 255-260.
36. E. M. González-García, J. Grognum, D. Wahler, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2458-2467.
37. P. D. Jones, N. M. Wolf, C. Morisseau, P. Wheatstone, B. Hock, B. D. Hammock, *Anal. Biochem.* **2005**, *343*, 66-75.
38. R. Sicard, L. S. Chen, A. J. Marsaioli, J.-L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1041-1050.
39. G. Klein, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 400-407.
40. E. Leroy, N. Benschel, J.-L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 859-865.
41. E. Leroy, N. Benschel, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2105-2108.
42. J. L. Cage, B. P. Branchaud, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 831-837.
43. E. Nyfeler, D. Wahler, J.-L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2919-2926.
44. M. Baumann, R. Stürmer, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4201-4204.
45. M. Konarzycka-Bessler, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1418-1420.
46. B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785-799.
47. M. F. Ullah, M. Aatif, *Cancer Treat. Rev.* **2009**, *35*, 193-200.
48. M. V. Toth, G. R. Marschall, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 544-550.

49. T. Knüttel , T. Hartmann , H. Meyer , T. Scheper, *Enzym. Microb. Technol.* **2001**, 29, 150–159.
50. T. Knüttel, H. Meyer, T. Scheper, *Enzym. Microb. Technol.* **2005**, 37, 673–686.
51. Y. Meyer, J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Lett.* **2008**, 10, 1517-1520.
52. Y. Meyer, J.-A. Richard, B. Delest, P. Noack, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1777–1780.
53. K. Morihara, *Trends in Biotechnology* **1987**, 5, 164–170.
54. S.-T. Chen, S.-Y. Chen, S.-C. Hsiao, K.-T. Wang, *Biotechnol. Lett.* **1991**, 13, 773-778.
55. S. Saß, M. Kadow, K. Geitner, M. L. Thompson, L. Talmann, D. Böttcher, M. Schmidt, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron* **2012**, 68, 7575–7580.
56. A. B. Watts, J. Beecher, C. S. Whitcher, J. A. Littlechild, *Biocatal. Biotrans.* **2002**, 20, 209-215.
57. M. C. Gutiérrez, A. Slegers, H. D. Simpson, V. Alphand, R. Furstoss, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3500-3506.
58. R. Sicard, L. S. Chen, A. J. Marsaioli, J.-L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1041-1050.
59. J. Wierzchowski, W. P. Däfeldecker, B. Holmquist, B. L. Vallee, *Anal. Biochem.* **1989**, 178, 57-62.
60. F. Wróblewski, J. S. Ladue, *Exp. Biol. Med.* **1955**, 90, 210-213.
61. P.H. Jones, D. Prasad, *Journal (Water Pollution Control Federation)*, **1969**, 41, R441-R449.
62. A.E. Ghaly, N.S. Mahmoud, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2006**, 2, 186-194.
63. G. Klein, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1113-1116.
64. W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 971-988.
65. D. J. Yee, V. Balsanek, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2282-2283.
66. D. J. Yee, V. Balsanek, D. R. Bauman, T. M. Penning, D. Sames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 13304-13309.
67. H.U. Bergmeyer, M. Horder, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1980**, 18, 521-534.
68. A. Karmen, F. Wróblewski, J. S. LaDue, *J. Clin. Invest.* **1955**, 34, 126–133.
69. F. Wróblewski, J. S. Ladue, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1956**, 91, 569-571.
70. S. Mathew, G. Shin, M. Shon, H. Yun, *Biotech. Bioproc. Eng.* **2013**, 18, 1-7.
71. S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, 2, 993–1001.

72. D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761 – 2766.
73. D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2009**, *60*, 191-194.
74. D. Koszelewski, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *14*, 2289-2292.
75. M. D. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore, N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 395-398.
76. J. Hopwood, M. D. Truppo, N. J. Turner, R. C. Lloyd, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 773-775.
77. S. Schatzle, M. Hohne, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2082-2086.
78. B.-Y. Hwang, B.-G. Kim, *Enzym. Microb. Technol.* **2004**, *34*, 429–436.
79. A. R. Martin, R. DiSanto, I. Plotnikov, S. Kamat, D. Shonnar, S. Pannuri, *Biochem. Eng. J.* **2007**, *37*, 246-255.
80. B. Grodner, D. Sitkiewicz, *Psychiatria Polska* **2013**, *3*, 511–518.
81. D. J. Trader, E. E. Carlson, *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 2484-2493.
82. G. V. More, K. C. Badgujar, B. M. Bhanage, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 4592-4598.
83. G. Beck, K. Kessler, E. Baader, W. Bartmann, A. Bergmann, E. Granzer, H. Jendralla, B. v. Kerekjarto, R. Krause, E. Paulus, W. Schubert, G. Wess *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 52-60.
84. C. Bonini, P. Pucci, L. Viggiani, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4050-4052.
85. C. Bonini, P. Pucci, R. Racioppi, L. Viggiani, *Tetrahedron: Asymm.* **1992**, *3*, 29-32.
86. B. Henkel, A. Kunat, H. Schick, *Tetrahedron: Asymm.* **1993**, *4*, 153-156.
87. C. Xu, C. Yuan, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2169–2186.
88. S. Lüdeke, M. Richter, M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 253–259.
89. M. Wolberg, W. Hummel, M. Müller, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4562-4571.
90. O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 407-413.
91. L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4524.
92. C. Xu, C. Yuan, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2169–2186.
93. A. Ghanem, V. Schurig, *Monatshefte für Chemie* **2003**, *134*, 1151–1157.
94. A. Brodzka, D. Koszelewski, M. Cwiklak, R. Ostaszewski, *Tetrahedron: Asymm.* **2013**, *24*, 427–433.
95. E. Schoffers, A. Golebiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769.

96. H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1-16.
97. F. Theil, *Methods Biotechnol.* **2001**, *15*, 277-289.
98. A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Chirality* **2005**, *17*, 1-15.
99. U. T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron Asymm.* **1999**, *10*, 107-117.
100. P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *42*, 7623.
101. J. H. Choi, Y. H. Kim, S. H. Nam, S. T. Shin, M. J. Kim, J. Park *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2373.
102. B. A. Persson, F. F. Huerta, J. E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5237.
103. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.
104. F. F. Huerta, Y. R. S. Laxmi, J. E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1037.
105. F. F. Huerta, Y. R. S. Laxmi, J. E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1209
106. Y. Wu, L. Esser, J. K. De Brabander, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4308.
107. O. Pamies, J. E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1418.
108. O. Pamies, J. E. Bäckvall, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 947.
109. O. Pamies, J. E. Bäckvall *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9006.
110. V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119.
111. D. H. R. Barton, F. Kalley, N. Ozbalik, E. Young, G. Balavoine, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7144.
112. C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741-745.
113. O. Rotthaus, D. Krüger, M. Demuth, K. Schaffner, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 935-938.
114. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry 5th Edition* **2004**, Springer
115. R. Macleod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi, H. S. Mosher, *Biochemistry* **1964**, *3*, 838.
116. P. Deshong, M.-T. Lin, J. J. Perez, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2091.
117. C. Fuganti, P. Grasselli, P. F. Seneci, P. Casati, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5275.
118. A. Varga, V. Zaharia, M. Nógrádi, L. Poppe, *Tetrahedron Asymm.* **2013**, *24*, 1389-1394
119. K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, s. Oka, A. Ohno, *Chem. Lett.* **1987**, 679.
120. K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 875.
121. K. Nakamura, M. Higaki, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4213
122. K. Nakamura, Y. Kawai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 267.

123. K. Ushio, J. Hada, Y. Tanaka, K. Ebra, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 222.
124. K. Ushio, K. Ebara, T. Yamashita, *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 834.
125. R. Hayakawa, K. Nozawa, K. Kimura, M. Shimizu, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7519.
126. K. Edegger, W. Stampfer, B. Seisser, K. Faber, S. F. Mayer, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1904-1909.
127. M. Wolberg, W. Hummel, M. Müller, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4562-4571.
128. A. Bariotaki, D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1792-1795.
129. J. H. Langenheim, *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 1223-1280.
130. N. Utsumi, M. Imai, F. Tanaka, S. S. V. Ramasastry, C. F. Barbas, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3445-3448.
131. E. E. Farmer, C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7713-7716.
132. K. Hult, P. Berglund, *Trends in Biotechnology* **2007**, *25*, 231-238.
133. X.-W. Fenf, C. Li, N. Wang, K. Li, W.-W. Zhang, Z. Wang, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1933-1936.
134. A. S. Evitt, U. Bornscheuer, *Green Chem.* **2011**, *13*, 1141-1142.
135. W.-W. Zhang, N. Wang, X.-W. Feng, Y. Zhang, X.-Q. Yu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *173*, 535-543.
136. M. Kapoor, A. B. Majumder, J. Mukherjee, M. N. Gupta, *Biocatal. Biotransform.* **2012**, *30*, 399-408.
137. M. Mineno, Y. Sawai, K. Kanno, N. Sawada, H. Mizufune, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5843-5850.
138. C. Mattos, D. Ringe, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 761-764.
139. T. Kortemme, A. V. Morozov, D. Baker, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1239-1259.
140. A. Zaks, A. M. Klivanov, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8017-8021.
141. E. Leroy, N. Bensel, J.-L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2105-2108.
142. M. T. Reetz, M. H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1758-1761.
143. D. F. V. Lewis, M. N. Jacobs, M. Dickins, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 530-537.
144. M. D. Mertens, M. Gütschow, *Chirality* **2013**, *25*, 957-964.
145. W. C. Sun, K. R. Gee, R. P. Haugland, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107-3110.
146. Z. Prokop, Y. Sato, J. Brezovsky, T. Mozga, R. Chaloupkova, T. Koudelakova, P. Jerabek, V. Stepankova, R. Natsume, J. G. E. Leeuwen, D. B. Janssen, J. Florian, Y. Nagata, T. Senda, J. Damborsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6111-6115.
147. C. Xu, C. Yuan, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2169-2186.

148. T. Rahn, N. T. H. Nguyen, T. H. T. Dang, Z. Ahmed, K. Methling, M. Lalk, C. Fischer, A. Spannenberg, P. Langer, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1957-1961
149. B.V. Subba Reddy, K. Bhavani, A. Raju, J.S. Yadav, *Tetrahedron Asymm.* **2011**, *22*, 881-886.
150. S. Kinastowski, S. Wnuk, *Synthesis* **1983**, *8*, 654-9.
151. Á. Sandoval, E. Arias-Barrau, F. Bermejo, L. Cañedo, G. Naharro, E. R. Olivera, J. M. Luengo, *App. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 97-105.

B. Org. 372/16



Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.372/16



90000000191657