

KATEDRA BIOLOGII I BIOCHEMII MEDYCZNEJ
ZAKŁAD BIOCHEMII MEDYCZNEJ
85-092 Bydgoszcz, ul. Karłowicza 24
tel. (52) 585-37-37; fax (52) 585-37-42
e-mail: kizbiolog@cm.umk.pl

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT

Renata Kołodziejska

BYDGOSZCZ 2018

1. IMIĘ I NAZWISKO:

Renata Kołodziejska

2. WYKAZ POSIADANYCH DYPLOMÓW, STOPNI NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

- doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej – Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu); Bydgoszcz kwiecień 2003 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „ACYLOWANIE NUKLEOZYDÓW I ACYKLONUKLEOZYDÓW PIRYMIDYNOWYCH – WYKORZYSTANIE KATALITYCZNYCH WŁAŚCIWOŚCI LIPAZ”

Praca realizowana w ramach studiów doktoranckich (1.12.1998-16.04.2003) w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej Akademii Medycznej w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu).

Promotor: Prof. dr hab. Marcin Dramiński

- magister chemii, specjalność chemia polimerów, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu; 25 czerwiec 1998

Tytuł pracy magisterskiej: „ZINTEGROWANY UKŁAD WIELOMEMBRANOWY DO UTYLIZACJI ODPADÓW POGALWANICZNYCH”

Praca realizowana w Katedrze Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Promotor: Prof. dr hab. Romuald Wódzki

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH:

01.04.2018 - nadal (po zmianie jednostek organizacyjnych na Wydziale Lekarskim):

- adiunkt w Katedrze Biologii i Biochemii Medycznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

01.04.2014 - 01.04.2018 (po zmianie jednostek organizacyjnych na Wydziale Lekarskim):

- adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

01.10.2012 - 01.04.2014

- adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

1.07.2003 - 30.09.2012:

- asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

4. WYKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U 2016 POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. 2016 POZ. 1311):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

**ENANCJOSELEKTYWNA ENZYMATYCZNA REAKCJA DESYMETRYZACJI
ZWIĄZKÓW PROCHIRALNYCH POCHODNYCH ZASAD PIRYMIDYNOWYCH**

b) osiągnięcia zostały udokumentowane cyklem 6 prac tematycznych opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku IF równym 15.38.

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

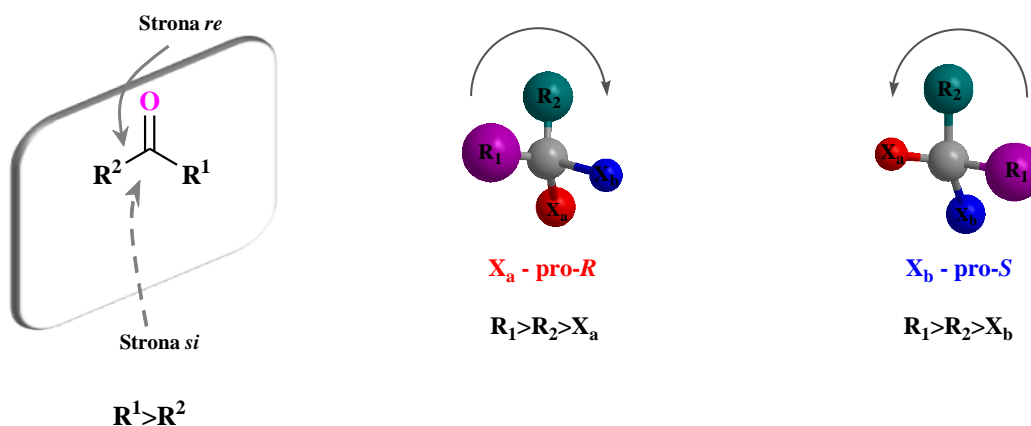
LP.	Autorzy	Tytuł	Czasopismo, Rok, Vol. Strony, DOI	MNiSW; IF
1.	R. Kołodziejska, A. Karczmarzka-Wódzka, A. Wolan, M. Dramiński.	<i>Candida antarctica</i> lipase B catalyzed enantioselective acylation of pyrimidine acyclonucleoside.	Biocatalysis and Biotransformation, 2012, Vol. 30(4), s. 426–430, DOI: 10.3109/10242422.2012.715637	20 pkt.; 0.895
2.	R. Kołodziejska, M. Górecki, J. Frelek, M. Dramiński.	Enantioselective enzymatic desymmetrization of the prochiral pyrimidine acyclonucleoside.	Tetrahedron Asymmetry, 2012, Vol. 23, s. 683–689, DOI: 10.1016/j.tetasy.2012.05.003	30 pkt.; 2.115
3.	R. Kołodziejska, M. Kwit, R. Studzińska, M. Jelecki.	Enantio- and diastereoselective acylation of prochiral hydroxyl group of pyrimidine acyclonucleosides.	J. Mol. Catal. B: Enzym., 2016, Vol. 133, s. 98–106, DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.07.013	25 pkt.; 2.269
4.	R. Kołodziejska, R. Studzińska, H. Pawluk.	Lipase-catalyzed enantioselective transesterification of prochiral 1-((1,3-dihydroxypropan-2-yloxy)methyl)-5,6,7,8-tetrahydroquinazoline-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-dione in ionic liquids.	Chirality, 2018, Vol. 30, s. 206–214, DOI: 10.1002/chir.22787	20 pkt.; 1.833
5.	R. Kołodziejska, R. Studzińska.	Reverse stereoselectivity in the lipase-catalysed hydrolysis of diacetylated pyrimidine acyclonucleosides.	ChemCatChem, 2016, Vol. 8, s. 3644–3649, DOI: 10.1002/cctc.201600931	35 pkt.; 4.803
6.	R. Kołodziejska, R. Studzińska, H. Pawluk, A. Karczmarzka-Wódzka, A. Woźniak.	Enantioselective bioreduction of prochiral pyrimidine base derivatives by Boni Protect fungicide containing live cells of <i>Aureobasidium pullulans</i> .	Catalysts, 2018, Vol. 8(7), s. 290; DOI: 10.3390/catal8070290	30 pkt.; 3.465
SUMARYCZNY IF				15.38

- określenie indywidualnego wkładu autorskiego w powstanie wyżej wymienionych prac znajduje się w Załączniku nr 3
- oświadczenie współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim znajdują się w Załączniku nr 4
- kopie powyższych prac znajdują się w Załączniku nr 5

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WPROWADZENIE

Naturalne związki chemiczne występujące w organizmach żywych są homochiralne, tzn. posiadają określoną konfigurację, o ile zawierają centrum stereogeniczne. Ich odbicia lustrzane mają identyczne właściwości chemiczne oraz fizyczne, ale odmienną skręcalność światła spolaryzowanego. Oddziaływanie pary izomerów optycznych z podłożem chiralnym nie jest takie same i dlatego chiralne związki mogą znacznie różnić się swoją aktywnością. Jeden z enancjomerów może być biologicznie czynny, podczas gdy drugi jest nieaktywny lub wykazuje inny rodzaj pożądanej lub niepożądanego aktywności farmakologicznej. Znanym przykładem toksycznego działania jednego z enancjomerów, było stosowanie w latach 60. racemicznego Thalidomidu (Conterganu), leku podawanego kobietom ciężarnym. Stereoizomer *R* posiada działanie uspokajające, natomiast enancjomer o konfiguracji *S* ma działanie teratogenne, wywoływał deformacje płodu. Z tego względu synteza enancjomerycznie czystych związków chiralnych jest jednym z ważniejszych wyzwań chemii organicznej. Jedną z metod umożliwiających otrzymanie chiralnych związków o wysokiej czystości optycznej jest enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja (EED). Wiąże się ona z generowaniem asymetrii poprzez przekształcenie cząsteczki achiralnej w związek czynny optycznie w obecności katalizatora enzymatycznego. Białka katalityczne umożliwiają zróżnicowanie prochiralnych stron (*si/re*) w achiralnych związkach z atomem węgla o hybrydyzacji sp^2 oraz dwóch enancjotopowych, identycznych pod względem chemicznym, podstawników z atomem węgla o hybrydyzacji sp^3 (pro-*S*/pro-*R*) – Schemat 1.



Schemat 1. Prochiralny atom węgla o hybrydyzacji sp^2 i sp^3 .

Do badań przedstawionych w niniejszym osiągnięciu naukowym wybrałam serię prac dotyczących asymetrycznej syntezy z zastosowaniem katalitycznych właściwości lipaz należących do grupy hydrolaz oraz pracę z zakresu asymetrycznej mikrobiologicznej bioredukcji.

Hydrolazy (3.1.1.3 - 3.9.1.1.) stanowią ważną klasę enzymów intensywnie eksplorowaną w syntezie organicznej, głównie ze względu na szeroką specyficzność substratową - enzymatyczne reakcje z udziałem hydrolaz można prowadzić dla szerokiej gamy substratów zróżnicowanych strukturalnie, jak również szerokie spektrum działania - pracują nie tylko w układach wodnych, ale także w rozpuszczalnikach organicznych. Nie bez znaczenia jest również aspekt ekologiczny - reakcje enzymatyczne mają statut przyjaznych dla środowiska, spełniają wszystkie wymagania zielonej chemii. Dodatkowo rosnące zainteresowanie procesami biokatalitycznymi wynika z faktu, iż w porównaniu do standardowych syntez organicznych, reakcje z udziałem enzymów przebiegają w łagodnych warunkach pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej i/lub niewiele wyższej. Spośród hydrolaz najlepiej poznaną i najczęściej wykorzystywaną grupą enzymów w asymetrycznej syntezie są lipazy. Swoją popularność lipazy zawdzięczają licznym zaletom, do których należą między innymi wysoka selektywność, stabilność w warunkach niefizjologicznych oraz dostępność i relatywnie niska cena. W obecności lipaz przeprowadza się reakcje acylowania lub hydrolizy zarówno mieszanin racemicznych jak również związków prochiralnych lub *mezo* syntonów. Reakcje desymetryzacji katalizowane lipazami doskonale wpasowują się w asymetryczną syntezę organiczną umożliwiając otrzymanie szeregu chiralnych, farmakologicznie ważnych reagentów z wysoką chemo-, regio- i stereo-selektywnością.

Bioredukcje prochiralnych związków karbonylowych prowadzone są głównie z wykorzystaniem potencjału katalitycznego NADH/NADPH zależnych dehydrogenaz (1.1.1.x.). Dehydrogenazy należą do oksydoreduktaz, katalizują reakcję utleniania alkoholi do odpowiednich aldehydów lub ketonów. Białko to występuje bardzo powszechnie w komórkach bakterii, grzybów, zwierząt i roślin. U grzybów i u ludzi w miejscu aktywnym tego enzymu znajduje się atom cynku, u bakterii żelazo, podczas gdy u owadów enzym ten nie zawiera żadnego metalu. Dehydrogenazy w reakcji redukcji mają zdolność przenoszenia jonu wodorkowego (pro-*S* lub pro-*R*) z kofaktora na jedną z prochiralnych stron wiązania karbonylowego (strona *re* lub *si*) dając czyste enancjomerycznie lub diastereomerycznie produkty. Ze względu jednak na aspekt ekonomiczny (wysoki koszt kofaktorów) reakcje katalizowane izolowanymi dehydrogenazami nie cieszą się zbyt dużym zainteresowaniem przemysłu farmakologicznego. Natomiast biokataliza w obecności żywych organizmów w postaci kultur tkankowych lub całych komórek mikroorganizmów jest bardzo obiecującą i efektywną metodą, ponieważ dehydrogenaza, kofaktor i układ regeneracyjny zlokalizowany jest w komórce. W asymetrycznej bioredukcji ketonów, obok popularnych drożdży piekarskich, wykorzystuje się najczęściej całe komórki pochodzenia bakteryjnego, grzybiczego oraz tkanki roślin. Rośliny, które stosuje się, jako bioreagenty to głównie jabłko (*Malus pumila*), marchew (*Daucus carota*), ogórek (*Cucumis sativus*), cebula (*Allium cepa*), ziemniaki (*Solanum tuberosum*), rzodkiewka (*Raphanus sativus*), pomidor (*Lycopersicon esculentum*) i słodkie ziemniaki (*Ipomoea batatas*). Spośród drożdży na uwagę zasługują *Rhodotorula rubra*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces montanus*, *Rhodotorula glutinis*, *Zygosaccharomyces bailii*, a spośród bakterii *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* oraz *Corynebacterium*. Zastosowanie bioreagentów dostarcza całą gamę chiralnych alkoholi, które z powodzeniem mogą zostać wykorzystane, jako intermedyaty w syntezie ważnych biologicznie i farmakologicznie związków. Nie bez znaczenia jest fakt, że reakcje bioredukcji prowadzone są, podobnie jak reakcje katalizowane hydrolazami, w umiarkowanych warunkach, w roztworach wodnych bez stosowania drogich i często toksycznych reagentów. Z tego powodu są przyjazne dla środowiska, co zwiększa zakres ich zastosowań.

CEL

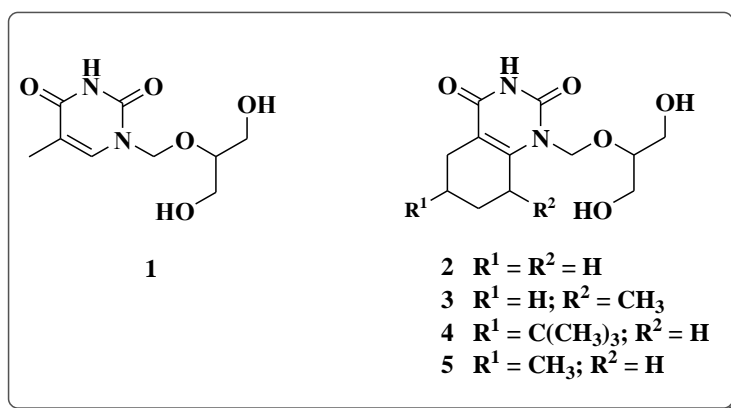
Głównym celem przedstawionych przeze mnie prac było uzyskanie czystych optycznie chiralnych acyklonukloezydów pirymidynowych w enzymatycznej reakcji desymetryzacji katalizowanej lipazami i dehydrogenazami. Desymetryzacji poddano achiralne diole lub odpowiednie diestry, w reakcji acylowania i deacylowania oraz prochiralne związki

karbonylowe w reakcji redukcji. Zbadano również wpływ użytego katalizatora enzymatycznego, rozpuszczalnika, temperatury, czynnika acylującego oraz budowy prochiralnego reagenta na selektywność procesu enzymatycznej desymetryzacji substratów o hybrydyzacji sp^3 . Dodatkowo określono wpływ środowiska reakcji, temperatury oraz struktury chemicznej reagentów na enancjoselektywność bioredukcji związków karbonylowych.

Wykorzystane przeze mnie metody generowania asymetrii z użyciem katalizatorów enzymatycznych mogą mieć zastosowanie w syntezie ważnych chiralnych związków o aktywności biologicznej, jeśli wymagana jest wysoka czystość enancjo- lub diastereomeryczna.

DESYMTRYZACJA PROCHIRALNYCH ACYKLONUKLEOZYDÓW PIRYMIDYNOWYCH – WYKORZYSTANIE POTENCJAŁU KATALITYCZNEGO LIPAZ

Obiekty badań eksperymentalnych, prochiralne propano-1,3-diole, są pochodnymi zasad pirymidynowych, strukturalnymi analogami gancyklowiru, leku przeciwwirusowego, zawierające identyczny synton – fragment imitujący jednostkę cukrową naturalnych nukleozydów (Schemat 2). Czyste optycznie pochodne propano-1,3-dioli należą do ciekawej grupy związków ze względów farmakologicznych, są prekursorami w syntezie aktywnych biologicznie reagentów, na przykład leków przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, immunosupresantów oraz naturalnych, aminokwasów lub hormonów. Związek **2**, poddany reakcji desymetryzacji, należy również do związków aktywnych biologicznie, jest znany, jako mikromolowy inhibitor fosforylasy urydynowej z *E. coli* a jego strukturalne analogi hamują wzrost komórek nowotworowych *in vitro*.



Schemat 2. Prochiralne propano-1,3-diole (**1-5**).

Za pomocą konwencjonalnych metod chemicznych otrzymanie związków o określonej konfiguracji z prochiralnych reagentów o hybrydyzacji sp^3 wymaga wieloetapowych syntez, z często kłopotliwymi procesami oczyszczania produktów pośrednich. Zastosowanie enzymów umożliwi wprowadzenie lub hydrolizę reszt acylowych w sposób selektywny, bez stosowania grup blokujących, dzięki temu uzyskuje się chiralne reagenty w jednoetapowej syntezie. Z tego wynika, że aby zróżnicować dwie identyczne grupy wodorotlenowe w syntonie nieodzowne jest zastosowanie katalizy enzymatycznej.

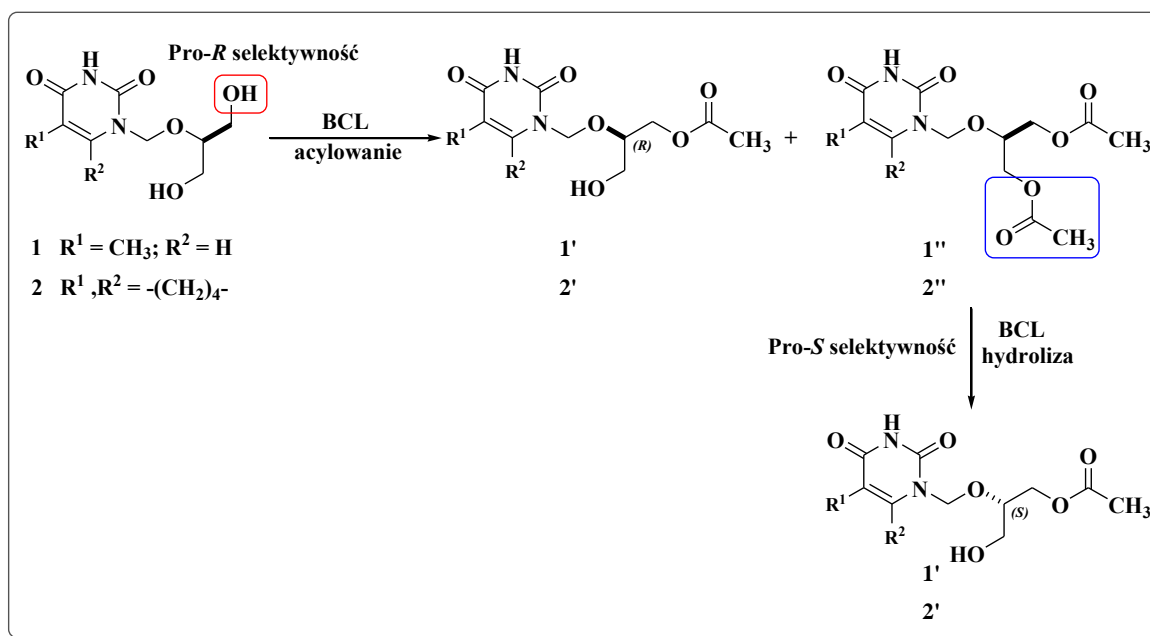
LIPAZA

Katalizatory białkowe ze względu na swoją stereogeniczną strukturę mają możliwość przeprowadzenia reakcji stereoselektywnie i dlatego wybór właściwego katalizatora enzymatycznego jest podstawą powodzenia całego eksperymentu. W celu przeprowadzenia skutecznej desymetryzacji prochiralnych 1,3-dioli przetestowałam kilka handlowo dostępnych lipaz: lipazę B z *Candida antarctica* (CALB), lipazę Amano PS z *Burkholderia cepacia* (BCL), lipazę z *Pseudomonas cepacia* (PCL), lipazę z *Candida rugosa* (OF) [**praca numer 1, 2, 3**]. Modelowymi związkami poddanymi reakcji transestryfikacji były diole: 1-[[1,3-dihydroksypropano-2-yl)oksy]metylo]-5-metylopirymidyno-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**1**) i 1-[[1,3-dihydroksypropan-2-yl)oksy]metylo]-5,6,7,8-tetrahydrochinolino-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**2**).

Jako czynnik acylujący zastosowano octan winylu, powszechnie stosowany donor acylu, należący do mało reaktywnych estrów. W czasie transestryfikacji uwolniony alkohol winylowy przekształcał się w etanal, korzystnie przesuwając równowagę reakcji. **Spośród przetestowanych lipaz najlepszą enancjoselektywność uzyskano dla bakteryjnej lipazy Amano Ps z *Burkholderia cepacia*. W obecności BCL zarówno wydajność monoacetylowej pochodnej jak również czystość enancjomeryczna była najwyższa.** Reakcja przebiegała z dużą szybkością i wysoką stereoselektywnością, już po pierwszych 10 minutach otrzymano monoester (**1'**) z 22% wydajnością i 82% nadmiarem enancjomerycznym. W trakcie prowadzenia eksperymentu, od 20 minuty do 24 godziny wydajność optyczna monopochodnej (**1'**) wahała się w granicach od 85 do 91% ee [**praca numer 2**]. W przypadku związku **2**, po pół godzinie skład mieszaniny poreakcyjnej był następujący: 17,8% dipochodnej (**2''**) i 35,4% monopochodnej (**2'**) z 94% czystością optyczną. Selektowne wprowadzenie reszty acylowej na jedną z prochiralnych grup hydroksylowych umożliwia uzyskanie monopochodnej (**2'**) z czystością enancjomeryczną od 83% do 99% ee [**praca numer 3**].

Acylowanie prochiralnego substratu może przebiegać dwustopniowo z etapem różnicowania grup prochiralnych i rozdziału kinetycznego otrzymanej mieszaniny

enancjomerów. Z monitorowania procesu w czasie wynika, że reakcja nie zatrzymuje się na etapie monoacetylowania, obie reakcje monoacetylowanie i diacetylowanie zachodzą równolegle. Dlatego w 10 minucie reakcji obserwuje się 2% udział dipochodnej **1''** a po 30 minucie 17,8% udział dipochodnej **2''** [*praca numer 2, 3*]. Na pierwszym etapie lipaza BCL preferuje grupę wodorotlenową pro-*R*, a następnie w etapie drugim szybciej reaguje z enancjomerem o konfiguracji *S*. Tak długo jak enancjomer o konfiguracji *S* jest preferencyjnie acetylowany wydajność optyczna i chemiczna monoacetylowej pochodnej jest wysoka. Jest to zgodne z badaniami Shi, dla reakcji acylochlora przebiegającej dwuetapowo, niezmienna enancjoselektywność (nadmiar enancjomeryczny produktu praktycznie nie zależy od stężenia) ma miejsce, gdy substrat przekształca się szybciej w enancjomer o określonej konfiguracji w etapie pierwszym, a achiralny produkt powstaje preferencyjnie z enancjomeru o konfiguracji przeciwnej, czyli z tego izomeru, który tworzy się wolniej w etapie pierwszym. W przypadku transestryfikacji związku **2**, w 150 minucie i 270 minucie prowadzenia reakcji, obliczona wartość *E* na podstawie nadmiaru enancjomerycznego produktu ($E = 1 + ee_p / 1 - ee_p$) wynosiła 199, co świadczy o wysokiej selektywności obu etapów: desymetryzacji i rozdzieleniu kinetycznego mieszaniny enancjomerów [*praca numer 3*]. Generalnie, niezależnie od zastosowanego prochiralnego substratu (**1/2**), końcowym chiralnym produktem, powstającym w przewadze, był enancjomer o konfiguracji *R* (Schemat 3) [*praca numer 2, 3*]. Natomiast w reakcji hydrolizy pochodnej diacetylowej otrzymuje się (*S*)-monoester (Schemat 3).



Schemat 3. Enzymatyczna reakcja desymetryzacji dioli (**1**, **2**) i odpowiednich diestrów (**1''**, **2''**) w obecności BCL.

BCL selektywnie deacyluje grupę prochiralną pro-*R* dając monoacetylową pochodną **1'** o konfiguracji przeciwnej z około 70% wydajnością i 82% ee [*praca numer 2*]. W reakcji hydrolizy diestru **2''** otrzymuje się (*S*)-monoester z 46,5% wydajnością i 97% czystością optyczną [*praca numer 3*].

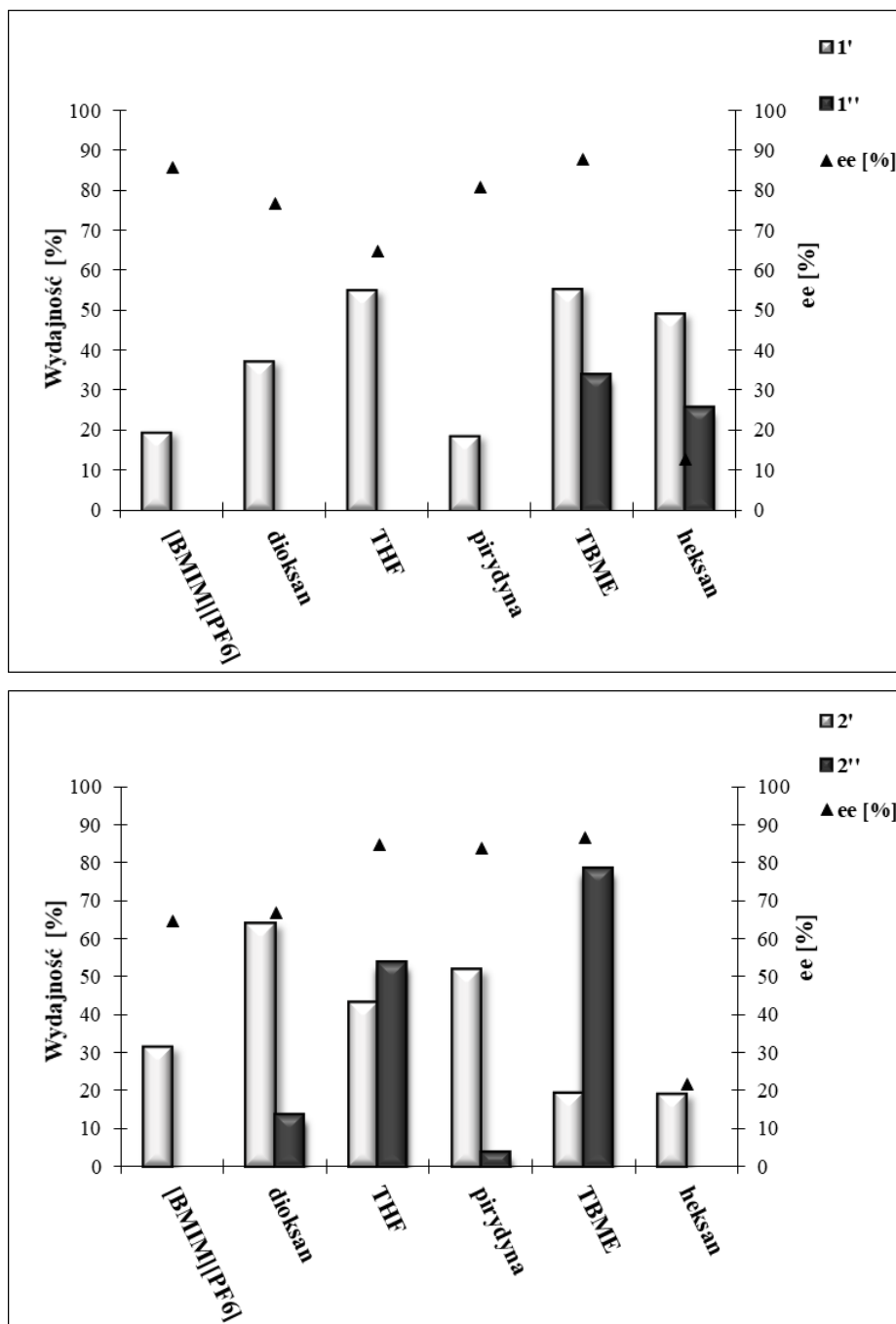
Uzyskane wyniki pozwalają sformułować wniosek, że lipaza Amano Ps z *Burkholderia cepacia* ma określoną stereopreferencję w stosunku do jednej z prochiralnych grup w acyklonukleozydach pirymidynowych. Acetylowanie i deacetylowanie tej samej grupy prochiralnej pozwala uzyskać oba izomery optyczne *R* i *S* z wysoką czystością enancjomeryczną.

MEDIUM REAKCJI

W celu optymalizacji procesu transestryfikacji dokonano wyboru rozpuszczalnika zastosowanego, jako medium reakcji. Podstawowym kryterium doboru rozpuszczalnika są jego właściwości hydrofilowo-hydrofobowe, które wpływają na aktywność, stabilność i selektywność enzymu. Wraz ze wzrostem polarności medium reakcji enzymatycznej zmniejsza się ilość wody niezbędnej do aktywacji enzymu, ponieważ cząsteczki wchodzą w interakcję z polarnym rozpuszczalnikiem. W konsekwencji niekorzystne zmiany konformacyjne katalizatora powodują spadek aktywności i selektywnych właściwości enzymu, a usunięcie warstwy monomolekularnej wody z białka enzymatycznego w rozpuszczalniku polarnym w większości przypadków jest przyczyną dezaktywacji enzymu. Enzym jest bardziej selektywny w hydrofobowym rozpuszczalniku organicznym, ale jego stabilność jest mniejsza niż w odpowiednim rozpuszczalniku polarnym. Zgodnie z przesłankami literaturowymi ze wzrostem hydrofobowości środowiska reakcji enzymatycznej wzrastają enancjoselektywne i diastereoselektywne właściwości biokatalizatora, ponieważ w hydrofobowym środowisku enzym posiada bardziej sztywną, mniej labilną konformację. Rzadko jednak reakcje katalizowane lipazami przeprowadza się w całkowicie hydrofobowym środowisku. Najczęściej, aby doszło do zmiany położenia pokrywy zasłaniającej centrum aktywne, a tym samym udostępnienia miejsca aktywnego dla hydrofobowego substratu, lipazy potrzebują aktywacji międzyfazowej (niezbędna ilość wody w układzie reakcyjnym waha się od 0,02 do 10% wody w stosunku do masy makrocząsteczki). Istnieją jednak takie lipazy, które tej aktywacji nie potrzebują na przykład lipaza z *Fusarium solani*, z *Pseudomonas aeruginosa* i lipaza B z *Candida antarctica*. Lipazy te nie posiadają hydrofobowej pokrywy zasłaniającej miejsce aktywne, a do ich aktywności enzymatycznej wystarczy monomolekularna warstwa wody w centrum katalitycznym.

W enzymatycznej desymetryzacji zastosowano szereg rozpuszczalników organicznych o różnej hydrofobowości. **Reakcje przeprowadzono w całkowicie niepolarnym środowisku, bez dodatku wody. BCL, podobnie jak lipazy z *Fusarium solani*, z *Pseudomonas aeruginosa* i lipaza B z *Candida antarctica* nie potrzebuje aktywacji lipolitycznej. Najlepsze wyniki uzyskano dla reakcji prowadzonej w eterze *tert*-butyloowo-metylowym (TBME – $\log P = 1,12$). Otrzymano monoester **1'** z 88% nadmiarem enancjomerycznym i ponad 50% wydajnością. Czystość optyczna monoestru **2'** w TBME wynosiła 87% ee. Wysoką wydajność optyczną, ale niską chemiczną zaobserwowano w praktycznie niemieszającej się z wodą cieczy jonowej heksafluorofosforanie 1-butylo-3-metyloimidazoliowym ([BMIM][PF₆]). W typowych hydrofobowych rozpuszczalnikach organicznych takich jak cykloheksan, heksan ($\log P > 3$), stwierdzono natomiast wysoką aktywność katalityczną BCL z jednoczesnym spadkiem enancjomerycznej selektywności [*praca numer 2, 3*]. Na wykresie 1 przedstawiono wydajność i nadmiar enancjomeryczny produktów transestryfikacji związków **1** i **2** w wybranych rozpuszczalnikach organicznych.**

Nie jest to do końca zgodne z modelem Laane, który dotyczy ilościowej zależności fizykochemicznych właściwości indywidualnych rozpuszczalników, a aktywnością biokatalizatorów. Generalnie rozpuszczalniki charakteryzujące się wartościami $\log P < 2$ są niekorzystne dla biokatalizy, ponieważ silnie oddziałują na płaszczyznę hydratacyjną. **Lipaza Amano Ps z *Burkholderia cepacia* nie tylko jest stabilna w rozpuszczalnikach z wartością $\log P < 2$, ale pomimo braku wody w układzie reakcyjnym nie traci aktywnych właściwości. Niezbędna ilość monomolekularnej warstwy wody białka katalitycznego, która jest potrzebna do aktywacji, nie ulega dezintegracji. Dodatkowo niezgodnie z danymi literaturowymi, wraz ze wzrostem hydrofobowości rozpuszczalników nie stwierdzono poprawy enancjoselektywnych właściwości BCL.**

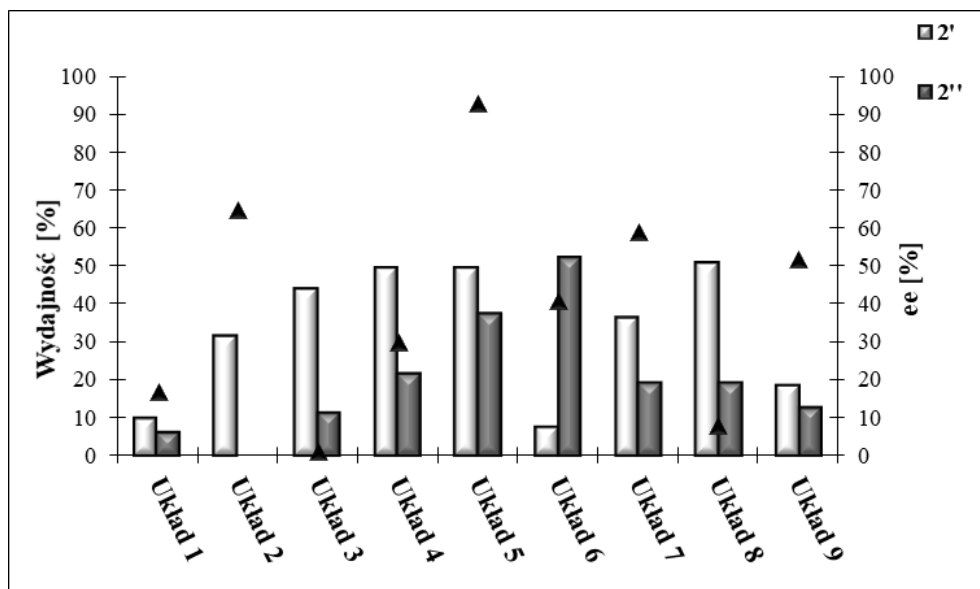


Wykres 1. Wydajność chemiczna i optyczna reakcji acetylowania związków 1 i 2.

Ciecze jonowe szczegółowo przetestowano w enzymatycznej reakcji acylowania związku 2 [*praca numer 4*]. Zastosowano szereg ciekłych w temperaturze pokojowej cieczy jonowych (tetrafluoroboran 1-butylo-3-metyloimidazoliowy ([BMIM][BF₄]), [BMIM][PF₆]), tetrafluoroboran 1-etylo-3-metyloimidazoliowy ([EMIM][BF₄]), tetrafluoroboran 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy ([HMIM][BF₄]), L-(+)-mleczan 1-etylo-3-metyloimidazoliowy ([EMIM][CH₃CH(OH)COO]), L-(+)-mleczan tris-(2-hydroksyetylo)metyloamoniowy ([HEMA][CH₃CH(OH)COO])) otrzymując monopochodną z umiarkowaną

enancjoselektywnością. Ciecz jonowa [BMIM][PF₆] była najlepszym medium reakcji dla enzymatycznej transestryfikacji związku **2**, otrzymano monoacetylową pochodną z 65% ee. Podobnie w reakcji acetylowania związku **1** katalizowanej CALB ciecz jonowa [BMIM][PF₆] była najlepszym z zastosowanych rozpuszczalników. W [BMIM][PF₆] CALB była 2,7 - 4 razy bardziej selektywna niż w konwencjonalnym rozpuszczalniku organicznym [*praca numer 1*]. [BMIM][PF₆] posiada niewątpliwie zalety, jest tak samo polarna jak etanol (identyczna wartość E^N_T) i jako jedyna z zastosowanych cieczy jonowych słabo miesza się z wodą tylko w 0,13%. Anion towarzyszący tej cieczy jonowej ma słaby charakter nukleofilowy, a jak wiadomo jon towarzyszący silniej koordynuje się w miejscu aktywnym enzymu, wraz ze wzrostem charakteru nukleofilowego, powodując w ten sposób niekorzystne zmiany konformacyjne katalizatora, które mają wpływ na aktywność i stabilność enzymu.

W celu poprawy enancjoselektywnych właściwości BCL przeprowadzono reakcję transestryfikacji w TBME, najlepszym z rozpuszczalników organicznych dla reakcji desymetryzacji prochiralnych dioli, zmieszany z cieczami jonowymi w stosunku 1:1 v/v oraz 4:1 v/v. **Najwyższy nadmiar enancjomeryczny (93% ee), wyższy niż w samym TBME, uzyskano w układzie dwufazowym [BMIM][PF₆]:TBME (1:1 v/v).** Nieoczekiwanie dodatek [BMIM][PF₆] jako współrozpuszczalnika do TBME (mieszanina [BMIM][PF₆]:TBME (1:4 v/v)) prowadził do drastycznego pogorszenia selektywności. Wyniki w wybranych cieczach jonowych i układach dwufazowych przedstawiono na wykresie 2 [*praca numer 4*].



Wykres 2. Reakcja acetylowania związku **2** w różnych warunkach:

Układ 1: [BMIM][BF₄]; Układ 2: [BMIM][PF₆]; Układ 3: [EMIM][CH₃CH(OH)COO]; Układ 4: [BMIM][BF₄]:TBME 1:1 v/v; Układ 5: [BMIM][PF₆]:TBME 1:1 v/v; Układ 6: [EMIM][CH₃CH(OH)COO]:TBME 1:1 v/v; Układ 7: [BMIM][BF₄]:TBME 1:4 v/v; Układ 8: [BMIM][PF₆]:TBME 1:4 v/v; Układ 9: [EMIM][CH₃CH(OH)COO]:TBME 1:4 v/v

W reakcji hydrolizy pochodnych diacylowych stosowano układ dwufazowy rozpuszczalnik organiczny:woda lub bufor fosforanowy (pH=7,0). Najlepszą mieszaniną rozpuszczalników, ze względu na czystość enancjomeryczną monoestrów, był układ TBME:woda 80:20 v/v w przypadku związków **1** i **2** [*praca numer 2, 3*]. W reakcji deacylowania racemicznych diestrów, wysoką wydajność optyczną uzyskano w TBME:woda 80:20 v/v i THF:bufor fosforanowy 20:80 v/v dla związku **3** oraz TBME:woda 80:20 v/v i CH₃CN:bufor fosforanowy 20:80 v/v dla związku **4** [*praca numer 5*].

Uzyskane wyniki dowodzą, że reakcje desymetryzacji katalizowane lipazą Amano Ps z *Burkholderia cepacia* można prowadzić w całkowicie niewodnym środowisku oraz że, lipaza jest aktywna zarówno w rozpuszczalnikach hydrofobowych jak i polarnych.

Na właściwości selektywne lipazy istotny wpływ ma środowisko reakcji. BCL wykazują wyjątkową enancjoselektywność w TBME oraz w układzie dwufazowym TBME:[BMIM][PF₆] (1:1 v/v) w reakcji transestryfikacji oraz w mieszaninie TBME:woda (80:20 v/v) w reakcji hydrolizy.

TEMPERATURA

Obok środowiska reakcji, temperatura ma wpływ na selektywność i wydajność reakcji enzymatycznej. W optymalizacji procesów, katalizowanych enzymatycznie, istotne jest także dobranie temperatury, aby zarówno wydajność, jak i selektywność, były możliwie najwyższe. W celu określenia temperatury optymalnej można wyznaczyć tzw. temperaturę racemizacji, czyli taką, dla której nie ma różnicy w energii swobodnej pomiędzy dwoma diastereoizomerycznymi produktami przejściowymi. Jeśli temperatura, w której prowadzi się reakcję enzymatyczną jest niższa od temperatury racemizacji to głównym czynnikiem determinującym czystość optyczną produktu jest zmiana entalpii. W takiej sytuacji czystość optyczna produktu maleje wraz ze wzrostem temperatury. Z drugiej strony, jeśli temperatura jest wyższa od temperatury racemizacji, to głównie czynnik entropowy ma wpływ na selektywność reakcji, dlatego też wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się czystość optyczna produktów. Dla większości lipaz obniżenie temperatury wpływa na poprawę enancjoselektywnych właściwości. **W przypadku BCL czystość optyczna produktów wzrastała wraz z podwyższeniem temperatury, najlepszą enancjoselektywność uzyskano w temperaturze 50 °C.** Na przykład, w enzymatycznej reakcji acylowania związku **2** w układzie dwufazowym [BMIM][PF₆]:TBME 1:1 v/v otrzymano odpowiednio w temperaturze 30 °C, 40 °C i 50 °C monoester o czystości enancjomerycznej 82%, 87% i 93% ee [*praca numer 4*].

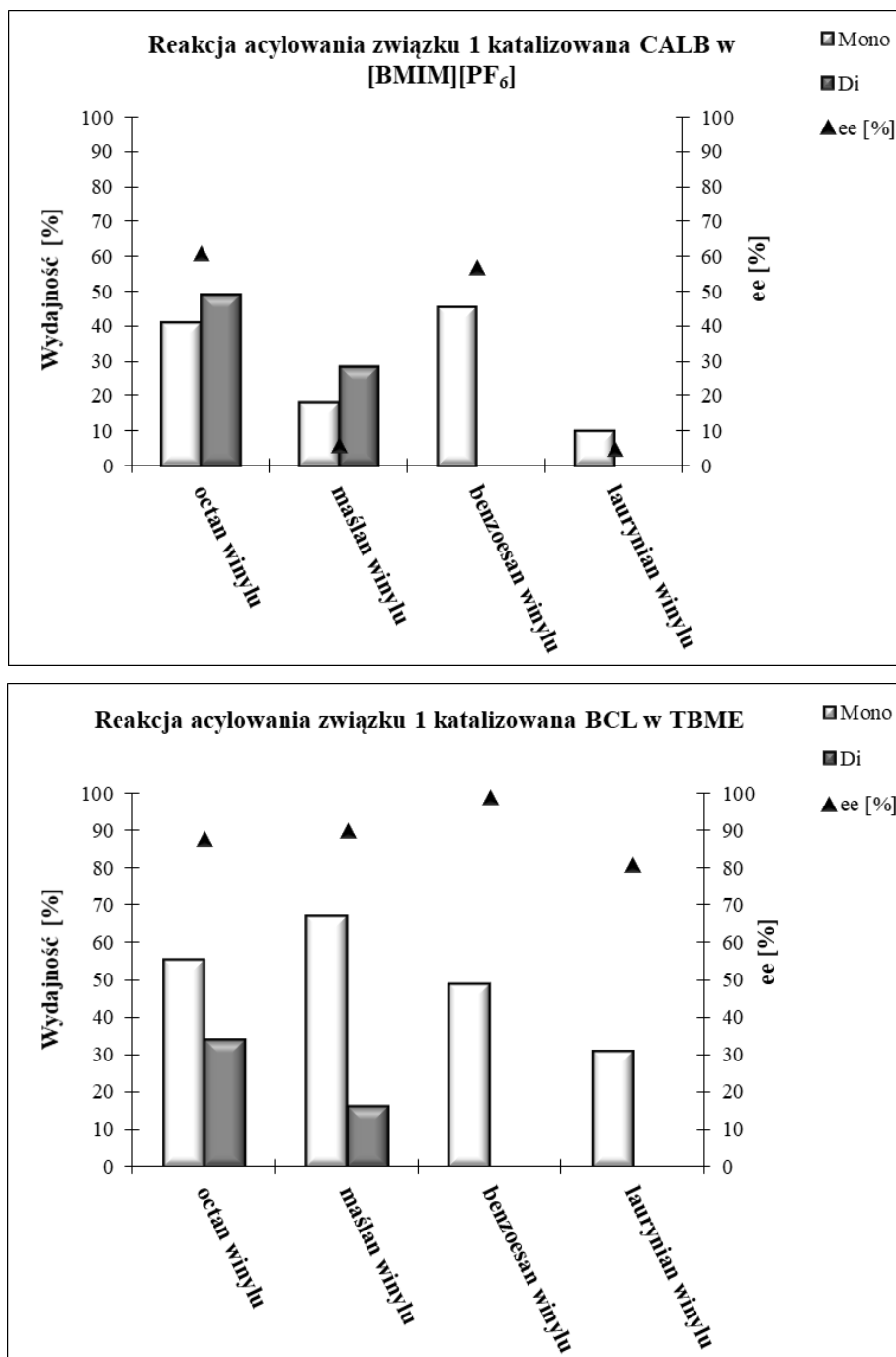
Na podstawie uzyskanych wyników temperaturę 50 °C uznano za optymalną. W celu otrzymania wysokich wydajności chemicznych i optycznych wszystkie reakcje desymetryzacji katalizowane BCL prowadzono w tej temperaturze.

DONOR ACYLU

Rodzaj użytego czynnika acylującego ma również wpływ na selektywność prowadzonej reakcji enzymatycznej. Lipazy w układzie fizjologicznym hydrolizują wiązania estrowe z długołańcuchowymi resztami acylu. Biorąc pod uwagę rolę, jaką pełnią w żywych organizmach spodziewano się wyraźnego wzrostu selektywnych właściwości lipazy wraz z wydłużeniem reszty alkilowej donora acylu. Podczas transestryfikacji prochiralnych reagentów **1** i **2** z użyciem BCL, jako katalizatora, niezależnie od użytego rozpuszczalnika, nie stwierdzono takiej zależności. W reakcji z laurynianem winylu selektywność enzymatycznego acylowania była najniższa [*praca numer 2*]. **Najlepsze wyniki uzyskano stosując benzoesan winylu, jako czynnik acylujący w reakcji ze związkiem 1 w TBME (99% ee), oraz maślan winylu w reakcji ze związkiem 2 w [BMIM][PF₆] (99% ee) [*praca numer 2, 4*]. W reakcji acylowania w [BMIM][PF₆] związku 1 w obecności CALB spośród testowanych czynników acylujących najlepszą enancjoselektywność uzyskano z octanem winylu i benzoesanem winylu.** Niespodziewanie reakcja transestryfikacji maślanem i laurynianem winylu w [BMIM][PF₆] przebiegała nie selektywnie, otrzymano praktycznie mieszaninę racemiczną [*praca numer 1*].

Generalnie jednak estry winylowe były dobrze tolerowane przez BCL i CALB, nie zauważono stopniowej dezaktywacji enzymów, która mogła być wynikiem reakcji powstałego acetaldehydu z aminową grupą lizyny białka katalitycznego jak w przypadku innych lipaz.

Wpływ czynnika acylującego na selektywność monoacylowania związku **1** przedstawiono na wykresie 3.



Wykres 3. Wpływ czynnika acylującego na selektywność reakcji transestryfikacji związku **1**.

Podobnie hydroliza odpowiednich diacylowych pochodnych związku **1** była mało selektywna podczas deacylowania estru dilaurylowego. BCL wykazuje niedużą preferencję w stosunku do enancjotopowych długołańcuchowych grup alkilowych. Wydajność optyczna wynosiła jedynie 48% ee. Zdecydowanie lepsze wyniki uzyskano w trakcie desymetryzacji prochiralnego dioctanu i dimaślanu. W wyniku hydrolizy dioctanu otrzymano z 78% wydajnością (*S*)-monoocetan o czystości optycznej 82% ee. Natomiast hydroliza dimaślanu dostarcza (*S*)-monoester ze 100% wydajnością i wysoką 98% czystością enancjomeryczną.

Co ciekawe, w przypadku hydrolizy dimasłowej pochodnej reakcja zatrzymała się na pierwszym etapie, nie otrzymano produktu całkowicie zhydrolizowanego [*praca numer 2*].

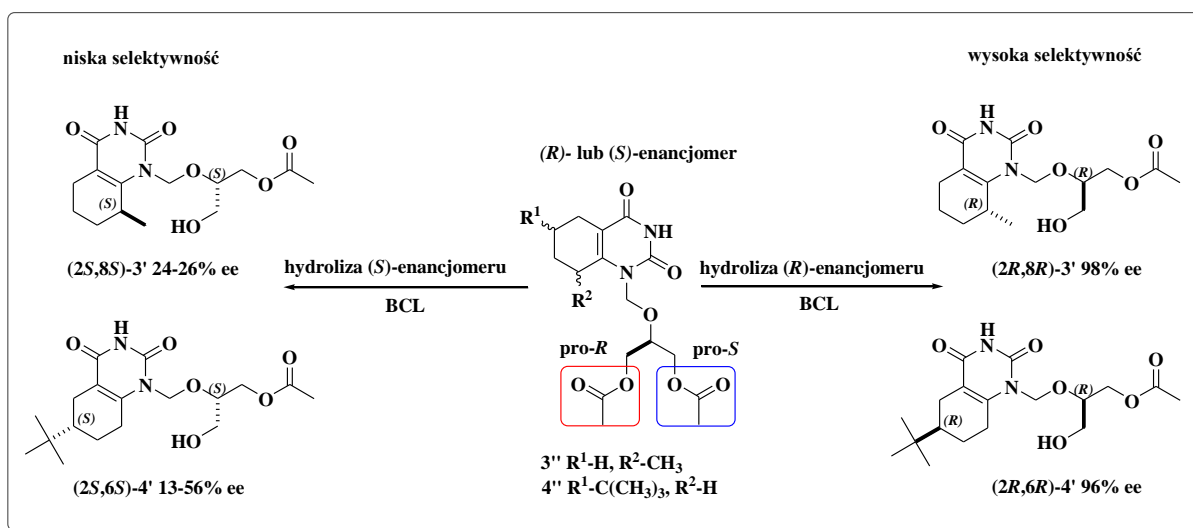
Konkludując, wykazano istotny wpływ donora acylu na selektywność enzymatycznej reakcji desymetryzacji. Wbrew przewidywaniom najmniej efektywnym donorem acylu w reakcji transestryfikacji był laurynian winylu. Podobnie hydroliza dilaurylowych pochodnych była mało selektywna.

PROCHIRALNY REAGENT

Szczególnie interesującymi reagentami w enzymatycznej reakcji acylowania były pochodne 1-[[[(1,3-dihydroksypropan-2-yl)oksy]metylo]-5,6,7,8-tetrahydrochinazolino-2,4(1*H*,3*H*)-dionu zawierające obok centrum prochiralnego, centrum chiralne w pierścieniu tetrahydrochinazoliny. Jak wiadomo, struktura chemiczna substratu jest obok wymienionych parametrów jednym z ważniejszych aspektów determinujących selektywność biotransformacji. **Najlepszym substratem w enzymatycznej reakcji transestryfikacji racemicznych dioli był związek posiadający w pierścieniu tetrahydrochinazoliny dodatkowy podstawnik metylowy w pozycji C-6 (5).** W wyniku reakcji acylowania katalizowanej BCL otrzymano czysty diastereoizomerycznie octan 3-hydroksy-2-[(6-metylo-2,4-dioksa-3,4,5,6,7,8-heksahydrochinazolin-1(2*H*)-yl)metoksy]propylu (99% de) o konfiguracji (2'*R*,6*S*/6*R*). Substrat z dodatkowym podstawnikiem metylowym w pozycji C-8 (3) ulegał enzymatycznej modyfikacji z 89% nadmiarem diastereomerycznym. Najniższą selektywność uzyskano natomiast dla reagenta z podstawnikiem *tert*-butylowym w pozycji C-6 (4) - 85% ee w THF. Obecność dużego objętościowo podstawnika w pierścieniu tetrahydrochinazoliny powodowała pogorszenie selektywności procesu. Jednak w każdym przypadku na etapie różnicowania prochiralnych grup wodorotlenowych, BCL selektywnie acylowała grupę pro-*R*, umożliwiając otrzymanie w przewadze izomeru z konfiguracją *R* atomu węgla w syntonie. Natomiast etap diacylowania dla reagentów posiadających centrum chiralne przebiegał z niewielką lub umiarkowaną selektywnością. Zdecydowanie etap drugi był bardziej selektywny w reakcji z reagentem 3. Na tym etapie preferowany był (2'*S*,8*S*)-diastereoizomer, dlatego otrzymano w przewadze diacetylową pochodną o konfiguracji *S* [*praca numer 3*].

W reakcji deacylowania odpowiednich diestrów (3'' i 4'') stereopreferencja BCL była całkowicie zależna od konfiguracji atomu węgla w pierścieniu tetrahydrochinazoliny. Hydroliza racemicznej mieszaniny diacylowych pochodnych przebiegała, niezależnie od medium reakcji, z umiarkowaną selektywnością. **Czystość optyczna monopochodnych acetylowych otrzymanych w wyniku deacylowania *rac*-estrów 3'' i 4'' była efektem dwóch**

równoległych, konkurencyjnych reakcji hydrolizy obu enancjomerów, a tylko jeden z nich był selektywnie hydrolizowany. W reakcji hydrolizy diacetylowych pochodnych związku 3 jak i 4, BCL nie preferowała tej samej grupy prochiralnej jak w przypadku diestru związku 2. Deacylowanie racemicznych diestrów 3'' i 4'' umożliwiło uzyskanie w nadmiarze enancjomeru o konfiguracji 2'R, podczas gdy niepodstawiony analog był selektywnie hydrolizowany do (2'S)-izomeru. **BCL hydrolizowała prochiralne grupy acylowe diestru 3'' i 4'' enancjoselektywnie tylko wtedy, gdy wyjściowy substrat miał konfigurację R.** W przypadku (S)-izomeru lipaza nie wykazywała jednoznacznej preferencji w stosunku do określonej prochiralnej grupy estrowej. Deacylowanie (R)-enancjomeru prowadziło do otrzymania (2'R,6/8R)-monoestrów z wysoką czystością optyczną, 96% i 98% de, odpowiednio dla związku 3'' i 4''. Hydroliza diestru o konfiguracji S umożliwiała uzyskanie (2'S,6/8S)-monoestrów z czystością diastereomeryczną dla związku 3'' wynoszącą 24-26% de i dla związku 4'' 13-56% de (Schemat 4) [praca numer 5].



Schemat 4. Enzymatyczna reakcja deacylowania prochiralnych diestrów z dodatkowym centrum asymetrycznym w pierścieniu tetrahydrochinazolinu.

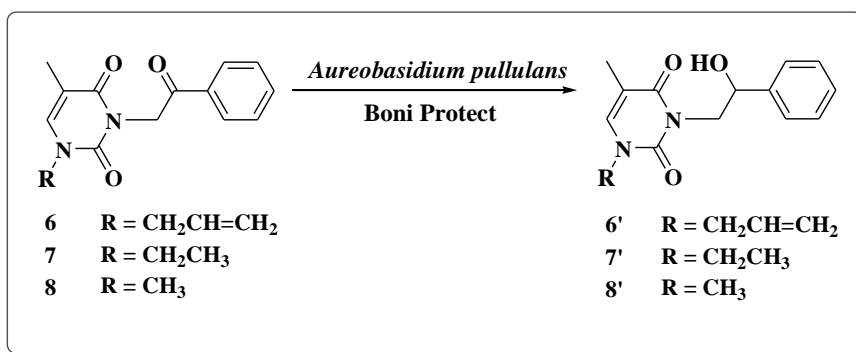
Podsumowując, dzięki przeprowadzonym badaniom uzyskano chiralne acyklonukeozydy pirymidynowe o konfiguracji S i R w syntonie z wysoką czystością enancjo- i diastereomeryczną. Selektywność i wydajność enzymatycznej biotransformacji jest zależna od wielu parametrów, które dla każdego prochiralnego substratu należy oddzielnie optymalizować. Szczególnie istotny jest wybór katalizatora enzymatycznego, który w warunkach dalece różnych od fizjologicznych, dla substratów niepodobnych strukturalnie do naturalnych reagentów, umożliwia przeprowadzenie stereoselektywnej biotransformacji.

Wykorzystana przez mnie metoda enzymatycznej desymetryzacji katalizowanej BCL umożliwia generowanie asymetrii w prochiralnych reagentach w prostej, mało kosztownej, ekologicznej oraz jednoetapowej syntezie. Można stwierdzić, że enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja jest konkurencyjną metodą w stosunku do konwencjonalnych syntez organicznych.

DESYMTRYZACJA PROCHIRALNYCH ACYKLONUKLEOZYDÓW PIRYMIDYNOWYCH – WYKORZYSTANIE POTENCJAŁU KATALITYCZNEGO MIKROORGANIZMU *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

Mikrobiologiczna bioredukcja prochiralnych związków karbonylowych jest tańszą alternatywą reakcji, w których wykorzystuje się izolowane enzymy. Obok niewątpliwych zalet, jakie posiadają metody mikrobiologiczne, które zostały wymienione wcześniej, jedną z istotnych wad jest obecność w mikroorganizmie zestawu oksydoreduktaz o zróżnicowanej stereopreferencji. Może to skutkować znacznym obniżeniem enancjoselektywności i wydajności procesu i dlatego tak ważna jest optymalizacja biotransformacji, na którą składa się pH, temperatura oraz dobór właściwego medium reakcji.

Przeprowadziłam mikrobiologiczną biotransformację 3-*N*-fenacylowych 1-*N*-podstawionych pochodnych tyminy w reakcji redukcji katalizowanej *Aureobasidium pullulans* w postaci preparatu przeciwgrzybiczego Boni Protect (Schemat 5) [*praca numer 6*]. Boni Protect wykorzystuje się w sadownictwie szczególnie w zwalczaniu pleśni białej, ponieważ zawarty w tym preparacie mikroorganizm ma działanie antagonistyczne wobec fitopatogennych grzybów. Fenacylowe pochodne zasad pirymidynowych (**6-8**), posiadające dwa duże objętościowo podstawniki wokół prochiralnego atomu węgla, należą do tak zwanych bulky-bulky ketonów. Niektóre z 3-*N*-podstawionych pochodnych zasad pirymidynowych są biologicznie czynne, na przykład 3-podstawione arabinofuranozylouracyle oraz 4-tio analogi 3-*N*-podstawionych urydyn posiadają aktywność hipnotyczną.



Schemat 5. Bioredukcja ketonów **6-8** katalizowana *Aureobasidium pullulans*.

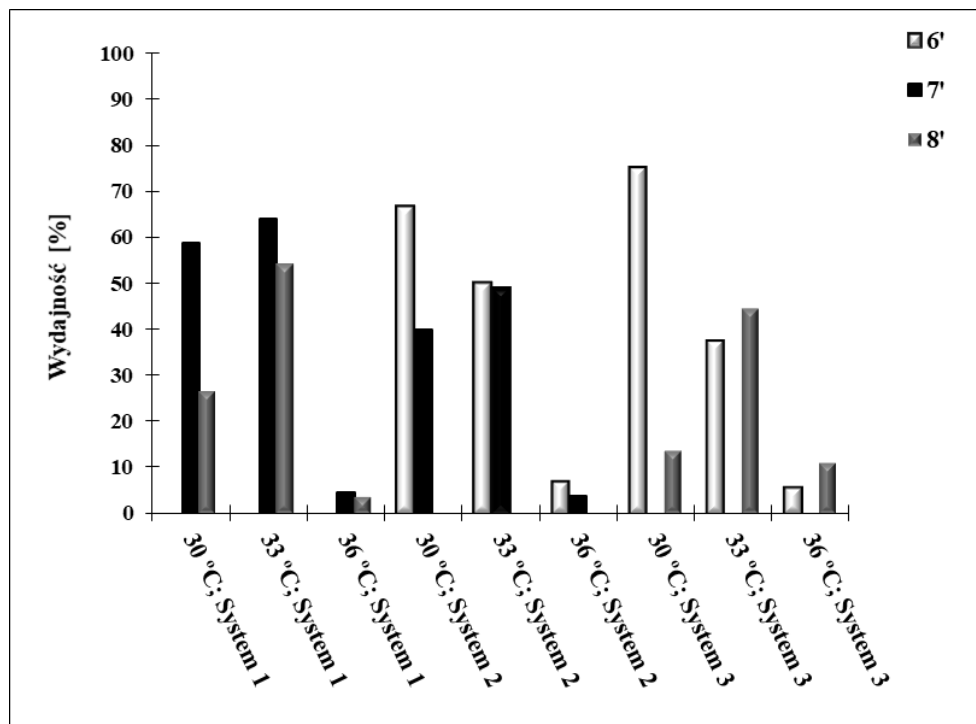
MEDIUM REAKCJI

Reakcję biotransformacji katalizowanej *A. pullulans* przeprowadzono w środowisku wodnym - buforu fosforanowego o pH=7,0 lub 6,5 oraz w układzie dwufazowym bufor fosforanowy (pH=7,0):rozpuszczalnik organiczny. Dla ketonu **6** najlepszą wydajność (75,1%) uzyskano w buforze fosforanowym o pH=7,0, z zastosowaniem sacharozy, jako źródła atomu węgla. W układach dwufazowych zaobserwowano znaczne obniżenie wydajności reakcji, maksymalną wydajność (11,6%) otrzymano w roztworze buforu fosforanowego (pH=7,0) z 2% dodatkiem cieczy jonowej [BMIM][BF₄]. Związek **7** i **8**, podobnie jak związek **6**, został zredukowany selektywnie z najlepszą wydajnością w roztworze buforu fosforanowego o pH=7,0, ale w obecności glukozy. Niezależnie od zastosowanego medium reakcji, mikrobiologiczna bioredukcja katalizowana *A. pullulans* przebiegała całkowicie selektywnie. Prochiralne ketony były redukowane z 94-99% nadmiarem enancjomerycznym.

TEMPERATURA

Temperatura miała szczególny wpływ na wydajność biotransformacji. Dla związku 6 najbardziej optymalną okazała się temperatura 30 °C. Podwyższenie temperatury niespodziewanie wpływało na obniżenie wydajności. Zupełnie inaczej wyglądała zależność wydajności bioredukcji związków **7** i **8** ze wzrostem temperatury. **Wyższą wydajność związku 7' uzyskano w temperaturze 33 °C (64,1%).** W porównaniu jednak do redukcji przeprowadzonej w tych samych warunkach w temperaturze 30 °C, wzrost wydajności był nieznaczny. **Zdecydowany wzrost wydajności zaobserwowano w reakcji redukcji związku 8 po podwyższeniu temperatury o 3 °C. W roztworze buforu fosforanowego o pH=7,0 z glukożą wydajność reakcji wzrosła 2-krotnie i aż 3-krotnie w tych samych warunkach z sacharozą dodaną, jako źródło atomu węgla.** Ostatecznie otrzymano związek

8' z 54,1% wydajnością. Podwyższenie temperatury do 36 °C, niezależnie od struktury substratu, powodowało obniżenie wydajności. Wyniki w trzech różnym środowiskach i temperaturach zostały przedstawione na wykresie 4.



Wykres 4. Porównanie wydajności 6'-8' w różnych warunkach.

System 1: bufor fosforanowy pH=7,0, glukoza

System 2: bufor fosforanowy pH=6,5, glukoza

System 3: bufor fosforanowy pH=7,0, sacharoza

Prochiralne fenacylowe pochodne zasad pirymidynowych, pomimo obecności w mikroorganizmie całego zestawu dehydrogenaz o różnej stereopreferencji, redukowane były z wysoką enancjoselektywnością. Dehydrogenaza zawarta w mikroorganizmie *A. pullulans* selektywnie przenosi jeden z enancjotopowych jonów wodorkowych pierścienia dihydropirydynowego koenzymu na węgiel w grupie karbonylowej ze strony *si* (lico *si*), dając izomer o konfiguracji *R*.

A. pullulans, zawarty w preparacie przeciwgrzybiczym Boni Protect, umożliwia enancjofacialne zróżnicowanie prochiranych stron niesymetrycznych bulky-bulky ketonów, należących do grupy związków karbonylowych trudnych do zredukowania metodami mikrobiologicznymi. Metoda jest prosta, ekonomiczna i nie wymaga namnażania bioreagenta. W reakcji bioredukcji katalizowanej *A. pullulans* stosowano krótki (30 minutowy) okres preinkubacji, który był wystarczający do wykorzystania potencjału katalicznego tego mikroorganizmu.

Zastosowana przeze mnie mikrobiologiczna biotransformacja charakteryzuje się wyjątkową enancjoselektywnością, która w połączeniu z aspektem ekologicznym i ekonomicznym może stanowić ciekawą alternatywę dla organokatalizy.

Podsumowując można stwierdzić, że opisany cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe dostarcza nowych informacji na temat generowania asymetrii w związkach achiralnych w reakcji enzymatycznych desymetryzacji. Metody z zastosowaniem katalizatorów enzymatycznych mają szansę na zastosowanie w biotechnologii, farmakologii oraz naukach pokrewnych.

d) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Oprócz przedstawionego powyżej cyklem 6 publikacji, wybranych, jako podstawa do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego, w skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi także 38 innych publikacji naukowych, w tym: 16 prac oryginalnych, 19 artykułów popularnonaukowych, współautorstwo 1 książki i 2 rozdziałów w podręczniku. Sumaryczny *Impact Factor* tych publikacji wynosi 23.676 (379.000 punktów wg MNiSW), w tym IF z 5.652 jako pierwszy autor prac.

TEMATYKA BADAŃ BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM MOJEGO ZAINTERESOWANIA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Jestem absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Studia ukończyłam w 1998 roku uzyskując tytuł magistra chemii w zakresie chemii polimerów. Pracę magisterską pt. „Zintegrowany układ wielomembranowy do utylizacji odpadów pogalwanicznych” wykonałam w Katedrze Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów pod kierunkiem dr hab. Romualda Wódzkiego (obecnie prof. dr hab. Romuald Wódzki) i opieką mgr Piotra Szczepańskiego (obecnie dr Piotr Szczepański). W trakcie wykonywania pracy magisterskiej zapoznałam się z podstawowymi technikami badawczymi: atomową analizą absorpcyjną oraz elektroforezą kapilarną jak również analizą i prezentacją wyników doświadczalnych.

W pracy magisterskiej przeprowadziłam badania przydatności nowego układu hybrydowego do usuwania, zateżania i separacji cynku z alkalicznych roztworów popłucznych po galwanicznym cynkowaniu z galwanizerni APATOR S.A., Toruń. W celu utylizacji odpadów pogalwanicznych zastosowałam dwie techniki membranowe: technikę membran ciekłych

i dializę Donnana w zintegrowanym układzie wielomembranowym (DN-WUH). Układ DN-WUH charakteryzował się stabilnym działaniem i wysokim strumieniem jonów cynku, jak również współczynnikiem separacji względem Zn^{2+} . W rezultacie przeprowadzonych badań wykazałam przydatność zintegrowanego układu wielomembranowego w odzyskiwaniu jonów cynku z pogalwanicznych wód popłucznych.

W grudniu 1998 roku zostałam uczestnikiem Studiów Doktoranckich w Akademii Medycznej im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu). Pracę doktorską wykonałam w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Dramińskiego. Tematyka badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej dotyczyła selektywnych modyfikacji wybranych pochodnych nukleozydów pirymidynowych metodą enzymatycznej reakcji transestryfikacji. Pracę badawczą podzieliłam na dwie części. W pierwszej z nich zweryfikowałam regioselektywne właściwości preparatu enzymatycznego przeprowadzając reakcje z użyciem nukleozydów i deoksynukleozydów pirymidynowych, jako substratów. W wyniku przeprowadzonych badań, w reakcji acetylowania katalizowanej lipazą B z *Candida antarctica* (CALB) w jednoetapowej syntezie otrzymano 5'-*O*-acetylonukleozydy i 5'-*O*-acetylo-2'-deoksynukleozydy oraz w reakcji hydrolizy 2',3'-*O*-diacetylonukleozydy i 3'-*O*-acetylo-2'-deoksynukleozydy. Udowodniono, że CALB regioselektywnie acetylowała i hydrolizowała pierwszorzędową grupę hydroksylową lub estrową pierścienia cukrowego. Stwierdzono ponadto, że obecność grupy wodorotlenowej przy 2 atomie węgla w rybozie ma istotne znaczenie w enzymatycznej reakcji transestryfikacji. Reakcje katalizowane lipazą z deoksynukleozydami będą wolniej niż w przypadku odpowiednich nukleozydów. Na przykład po 17,5 godzinie, wydajność 5'-*O*-acetylo-uracyny wynosiła 74,46%, natomiast 5'-*O*-acetylotymidyny tylko 55,31%. Ciekawym również aspektem badawczym okazał się wpływ zastosowanego rozpuszczalnika na profil reakcji enzymatycznego acetylowania nukleozydów i deoksynukleozydów. Wysoka wydajność monopochodnej zależała od konformacji egzocyklicznej grupy C(5')-OH. W pierścieniu rybozy swobodna rotacja wokół wiązania C(4')-C(5') wymusza współistnienie trzech rotamerów grupy C(5')-OH: gauche-gauche (gg – ekwatorialna-ekwatorialna), gauche-trans (gt – ekwatorialna-aksjalna) i trans-gauche (tg – aksjalna-ekwatorialna). Okazało się, że najkorzystniejsza w reakcji transestryfikacji lipazą B z *Candida antarctica* była konformacja gg. Udział tej konformacji zależał od rozpuszczalnika, w jakim przeprowadzono reakcję. Na podstawie obliczonych stałych sprzężeń $J(4'5')$ i $J(4'5'')$ udowodniłam, że procentowy udział populacji gg był wyższy w pirydynie niż w dimetylosulfotlenku (DMSO), co miało bezpośrednie przełożenie na

wydajność mnoacetylowej pochodnej. Na przykład dla urydyny rozpuszczonej w deuterowanej pirydynie udział populacji gg był większy o około 28% niż w DMSO, o czym świadczyły relatywnie małe i zbliżone stałe $J(4'5')$ i $J(4'5'')$.

W drugiej części pracy eksperymentalnej, enzymatycznej reakcji acetylowania poddano acyklonukleozydy pirymidynowe. Uzyskano z wysoką (około 50%) wydajnością pośredni produkt acetylowania – monoacetylonukleozyd. Na podstawie wykonanych analiz HPLC stwierdzono, że narastanie stężenia produktu pośredniego odbywa się w początkowym etapie reakcji w czasie od 0-5 godzin, po tym etapie sukcesywnie wzrasta stężenie produktu całkowicie zacetylowanego. Próbowano również ocenić stereoselektywne właściwości lipazy B z *Candida antarctica* za pomocą metody NMR. Uzyskane wyniki nie były jednak jednoznaczne, nie udało się w pełni potwierdzić czystości enancjomerycznej otrzymanych produktów.

W rezultacie enzymatycznej reakcji acetylowania otrzymano zmodyfikowane pochodne nukleozydów i acyklonukleozydów pirymidynowych. Lipaza B z *Candida antarctica* zapewnia wyjątkową regioselektywność w reakcji transestryfikacji nukleozydów i deoksynukleozydów, jak również umożliwia otrzymanie monoacetylopo pochodnych z wysoką wydajnością w reakcji acetylowania acyklonukleozydów [**Załącznik numer 3, II.C.a.1.; II.C.a.3.; II.C.a.4.**]. W porównaniu z reakcjami chemicznego acetylowania, reakcje enzymatyczne są relatywnie wolniejsze, co umożliwia sterowanie tymi procesami i przerywanie ich na z góry założonym etapie.

Pracę doktorską pt. „Acylowanie nukleozydów i acyklonukleozydów pirymidynowych – wykorzystanie katalitycznych właściwości lipaz” obroniłam w kwietniu 2003 roku. W lipcu 2003 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej ówczesnej Akademii Medycznej im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, a w roku 2012 na stanowisko adiunkta w tej samej jednostce.

TEMATYKA BADAŃ BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM MOJEGO ZAINTERESOWANIA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA, NIE WCHODZĄCA W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, kontynuowałam badania nad oceną stereoselektywnych właściwości lipaz w enzymatycznej desymetryzacji prochiralnych grup acyklonukleozydów pirymidynowych, które wchodzi w skład osiągnięcia naukowego opisanego w poprzednim rozdziale.

Zainteresowanie katalizą enzymatyczną jak również naturalnymi związkami bioorganicznymi umożliwiło napisanie dwóch rozdziałów w podręczniku wydanym w 2018 przez Taylor & Francis Group, LLC [*Załącznik numer 3, II.C.d.1.; II.C.d.2.*]. Tematem przewodnim książki pt. „Asymmetric synthesis of drugs and natural products” są syntezy asymetryczne chiralnych związków naturalnych. Pierwszy rozdział został poświęcony asymetrycznej biokatalizie w syntezie organicznej związków aktywnych biologicznie. Drugi dotyczył syntezy asymetrycznej naturalnych związków chiralnych osiowo, czyli izomerów konfiguracyjnych powstałych dzięki zahamowaniu rotacji wokół pojedynczego wiązania łączącego jednostki aryłowe.

Poza głównym tematem realizowanych przeze mnie badań, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, szczególne zainteresowanie naukowe wzbudziły we mnie asymetryczne syntezy z wykorzystaniem potencjału katalitycznego mikroorganizmów. W pracy zespołowej otrzymano czysty optycznie kwas 2-(antraceno-9-ylo)-2-metoksyoctowy (9-AMA) w czteroetapowej syntezie [*Załącznik numer 3, II.A.a.5.*]. Kwas 9-AMA jest stosowany, jako czynnik derywatyzujący w określaniu konfiguracji absolutnej chiralnych związków organicznych za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Używany jest głównie w określaniu konfiguracji absolutnej α i β -chiralnych alkoholi. Najważniejszym etapem generującym chiralność i zapewniającym wysoką czystość enancjomeryczną produktu końcowego - kwasu 9-AMA był etap desymetryzacji prochiralnego α -ketoestru. Biotransformacja z udziałem drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) prowadziła do chiralnego produktu z umiarkowanym 65% nadmiarem enancjomerycznym, oraz 70% ee z dodatkiem chlorooctanu etylu. Natomiast w wyniku mikrobiologicznej desymetryzacji katalizowanej *Aureobasidium pullulans* otrzymano czysty enancjomerycznie (*R*)-4-hydroksylo- α -(9-antrylo)octan etylu. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano dostępny handlowo preparat przeciwgrzybiczy Boni Protect, zawierający żywe komórki *A. pullulans*. Nasza metoda otrzymania 9-AMA jest tania, szybka i wydajna, i nie wymaga zakładania hodowli grzyba, gdyż zastosowany preparat jest równie skuteczny w procesie redukcji. Uzyskanie czystego optycznie 9-AMA pozwala uniknąć stosowania kosztownych i czasochłonnych metod rozdziałów mieszaniny racemicznej.

Preparat Boni Protect został szczegółowo przebadany w reakcji bioredukcji wybranych ketonów oraz α - i β -ketoestrów [*Załącznik numer 3, II.A.a.8.*]. W przypadku ketonów w biotransformacji z *A. pullulans* otrzymano drugorzędowe alkohole z umiarkowanym nadmiarem enancjomerycznym. W obecności *A. pullulans* najwyższy nadmiar enancjomeryczny wynosił 65% ee w reakcji z 2-bromo-1-(4-nitrofenylo)etanonem. W celu zniwelowania

niekompatybilności enzymatycznej zastosowano substancje dodatkowe spełniające rolę inhibitorów: chlorooctan etylu, bromek allilu, alkohol allilowy, [BMIM][PF₆], 3-oksowalerian etylu i (9-antrylo)glioksylan etylu. Generalnie wprowadzenie do układu reakcyjnego substancji dodatkowej wpłynęło na poprawę selektywnych właściwości mikroorganizmu. Redukcja 1-(benzofurano-2-ylo)-2-bromoetanonu z (9-antrylo)glioksylanem etylu prowadziła do otrzymania odpowiedniej bromohydryny ze 100 % wydajnością i 55% ee. Czysty optycznie związek 1-(benzofurano-2-ylo)etanol otrzymano w mikrobiologicznej redukcji w obecności inhibitorów: alkoholu allilowego, 3-oksowalerianu etylu (9-antrylo)glioksylan etylu. Keton 2-bromo-1-(4-nitrofenylo)etanon zredukował się całkowicie selektywnie z najwyższą wydajnością z dodatkiem cieczy jonowej [BMIM][PF₆], a związek 1-(4-bromofenylo)etanon z dodatkiem [BMIM][PF₆], chlorooctanu etylu i 3-oksowalerianu etylu. Konfiguracja absolutna uzyskanych alkoholi była uzależniona od budowy prochiralnego substratu. W przypadku ketonów z pierścieniem benzofuranowym preferowany był atak jonu wodorkowego na wiązanie karbonylowe od strony *re*. Redukcja ketonów z mniejszą zawadą przestrzenną natomiast preferencyjnie zachodziła od strony *si*.

Biotransformacja α - i β -ketoestrów katalizowana przez *A. pullulans*, przebiega z wysoką enancjoselektywnością i nie było potrzeby, jak w przypadku ketonów, stosowania substancji dodatkowych w celu poprawy selektywności procesu. Oprócz związku 2-(naftaleno-1-ylo)oksooctanu metylu, wszystkie pozostałe ketoestry w obecności *A. pullulans* redukowały się z wysokim nadmiarem enancjomerycznym od 98 do 99% ee. W większości przypadków jon wodorkowy selektywnie atakował prochiralny atom węgla od strony *re* umożliwiając otrzymanie w przewodzie hydroksyestrów o konfiguracji *S*.

Dodatkowo brałam udział w asymetrycznej syntezie organicznej z wykorzystaniem chiralnych katalizatorów chemicznych [**Załącznik numer 3, II.A.a.3.**]. W reakcji redukcji 3*N*-fenacylowych pochodnych tyminy z zastosowaniem boranu/oksazaborolidyny, wytworzonego *in situ* z metoksyboranu i (1*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-4-amino-3,7,7-trimetylobicyklo[4.1.0]heptan-3-olu oraz za pomocą (*S*)-2-metylo-CBS-oksazaborolidyny (CBS = Corey, Bakshi i Shibata) otrzymano chiralne alkohole drugorzędowe. 1-allilo-3-(2-hydroksy-2-fenyloetylo)-5-metylopirymidino-2,4(1*H*,3*H*)-dion i 3-(2-hydroksy-2-fenyloetylo)-1,5-dimetylopirymidyno-2,4(1*H*,3*H*)-dion otrzymano w reakcji redukcji w obecności boranu/oksazaborolidyny z niewielki nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 4-21% ee. W reakcji katalizowanej (*S*)-2-metylo-CBS-oksazaborolidyną otrzymuje się alkohole z 100% wydajnością i 73-85% czystością enancjomeryczną. Za pomocą chiralnej HPLC oceniono czystość optyczną produktów, dla których określona została konfiguracja absolutna metodami chiralooptycznymi.

Równolegle do prowadzonych badań eksperymentalnych wchodzących w zakres moich głównych tematów naukowych uczestniczyłam również w projekcie badawczym dr Renaty Studzińskiej, w syntezie nowych pochodnych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn, 2-alliloaminotiazoli oraz 2-allilodihydrotiazoli [Załącznik numer 3, II.A.a.2.; II.A.a.4.; II.A.a.6.; II.A.a.7.]. 2-halogenometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyno-5-ony otrzymuje się w reakcji pochodnych 3-allilo-2-tiouracyli odpowiednio z bromem lub chlorkiem jodu. Atom bromu lub grupę nitrową wprowadza się w reakcji elektrofilowego podstawienia przy 6 atomie węgla w układzie tiazolopirymidynowym. Eliminacja jodo- lub bromowodoru z halogenometylo pochodnych dostarcza szereg nowych tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn. 2-(alliloamino)tiazolo-4(5*H*)-ony syntetyzowano w reakcji *N*-allilotiocyanidu z odpowiednimi α -haloestrami w środowisku alkalicznym. Natomiast syntezę związków zawierających pierścień tiazolu przeprowadzono w wyniku kondensacji wybranych chlorooksoestrów z *N*-allilotiocyanidem w różnych warunkach. Najwyższą wydajność uzyskano przekształcając grupę karbonylową w acetal, który w następnym etapie poddano kondensacji z *N*-allilotiocyanidem w środowisku kwasowym.

Tiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-ony jak również 2-alliloaminotiazole i 2-alliloamino-4,5-dihydrotiazole przebadano pod kątem inhibicji względem dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 1 (11 β -HSD1, reduktaza kortyzonu) [Załącznik numer 3, II.A.a.9.; II.A.a.10.]. Dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa typu 1 jest NADPH-zależną oksydoreduktazą o wysokiej ekspresji w wątrobie tkance tłuszczowej i mózgu. Katalizuje ona przemianę nieaktywnego kortyzonu w aktywny fizjologicznie kortyzol oraz w mniejszym stopniu reakcję odwrotną. Razem z dehydrogenazą 11 β -hydroksysteroidową typu 2 zlokalizowana jest głównie w nerkach i okrężnicy, tworzy układ regulujący poziom kortyzolu w organizmie. Zwiększona ekspresja 11 β -HSD1 wiąże się z patogenezą zaburzeń gospodarki lipidowej, jak również insulinooporności. Hamowanie aktywności dehydrogenazy 11 β -HSD1 powoduje zmniejszenie poziomu kortyzolu, a tym samym zmniejszenie masy tkanki tłuszczowej. Sugeruje się, że związki specyficznie hamujące 11 β -HSD1 u chorych z cukrzycą typu 2 mogą obniżać stężenie glukozy we krwi, a przez to wpływać na zmniejszenie insulinooporności i otyłości centralnej. Spośród przebadanych 2-(alliloamino)tiazol-4(5*H*)-onów, związki zawierające w pozycji C-5 w pierścieniu duży objętościowo podstawnik wykazują przy stężeniu 10 $\mu\text{mol/l}$ aktywność w kierunku inhibicji 11 β -HSD1 do 71%. IC₅₀ dla najbardziej aktywnego związku: 2-(alliloamino)-1-tia-3-azaspiro[4.5]dek-2-en-4-onu wynosi 2,5 $\mu\text{mol/L}$. Dodatkowo dla trzech analizowanych związków procent inhibicji 11 β -HSD2 jest niższy niż procent inhibicji 11 β -HSD1 przy stężeniu inhibitorów 10 $\mu\text{mol/l}$. Mniejszą

aktywność względem 11 β -HSD1 wykazują tiazolo[3,2-*a*]pirymidyno-5-ony, ich aktywność hamowania 11 β -HSD1 wynosi poniżej 59,15% przy stężeniu 10 μ mol/l. Najbardziej aktywnym związkiem był 7-(cykloheksylometylo)-2-jodometylo-2,3-dihydrotiazolo[3,2-*a*]pirymidyn-5-on.

W najbliższej przyszłości planuję kontynuować badania z zakresu szeroko pojętej syntezy asymetrycznej z wykorzystaniem katalizatorów białkowych. Badania te chciałabym rozszerzyć o nowe niepatogenne mikroorganizmy oraz nowe substraty.

Planuję ponadto, włączyć się w cykl badań, dotyczących wpływu niezależnych czynników prognostycznych stanu zapalnego i antyoksydantów w etiologii chorób o podłożu autoimmunizacyjnych.

Deneta Kotwicka