

dr inż. Paweł Borowiecki
Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3, 00–664 Warszawa

***Nowe chemoenzymatyczne strategie w asymetrycznej syntezie
wybranych farmaceutyków z zastosowaniem
rekombinowanych oksydoreduktaz i hydrolaz jako
biokatalizatorów***

Autoreferat

(załącznik nr 3)

SPIS TREŚCI

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	3
4. Omówienie osiągnięć naukowych	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4.2. Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	4
4.3. Opis badań, będących podstawą osiągnięcia naukowego	7
4.3.1. Streszczenie	7
4.3.2. Wprowadzenie i cele badawcze	8
4.3.3. Wyniki badań własnych i ich dyskusja	13
4.3.3.1. Przedmowa autora	13
4.3.3.2. Chemoenzymatyczna synteza tenofowiru (P1)	13
4.3.3.3. Nowe chemoenzymatyczne strategie w asymetrycznej syntezie substancji czynnych leków opartych na pochodnych ksantyny (P4–P5 oraz P7–P9)	19
4.3.3.4. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconych substancji czynnych leków β -adrenolitycznych (P3)	31
4.3.3.5. Projektowanie oraz chemoenzymatyczna synteza nowego eterowego analogu (<i>R</i>)-izo-moramidu o potencjalnie wysokiej aktywności anelgetycznej jako prototypowego leku przeciwbólowego (P2)	38
4.3.3.6. Opracowanie nowej metody bezchromatograficznego, enzymatycznego rozdziału kinetycznego racemicznych alkoholi z wykorzystaniem lipaz, α -angelica laktonu oraz odczynnika Girarda typu P (P6)	46
4.3.4. Podsumowanie	55
4.4. Obecne i przyszłe kierunki badań	56
4.5. Plany badawcze na najbliższe lata	57
4.6. Bibliografia	58
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	62
5.1. Współpraca z zagranicznymi ośrodkami naukowymi (Załącznik 6c)	63
5.2. Współpraca z krajowymi ośrodkami naukowymi	63
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	64
6.1. Działalność dydaktyczna	64
6.1.1. Przedmioty wykładowe	64
6.1.2. Ćwiczenia laboratoryjne	64
6.1.3. Ćwiczenia projektowe	65
6.1.4. Promotor prac dyplomowych na stopień inżyniera	65
6.1.5. Promotor prac dyplomowych na stopień magistra	66
6.1.6. Promotor pomocniczy doktoratów	67
6.1.7. Autorstwo skryptów, podręczników i innych materiałów dydaktycznych	68
6.2. Działalność popularyzatorska	68
6.3. Funkcje organizacyjne na Uczelni	69
7. Inne informacje, dotyczące kariery zawodowej	70
7.1. Nagrody i wyróżnienia (Załącznik 7a)	70
7.2. Wyróżnione artykuły naukowe (Załącznik 7b)	70
7.3. Odbite kursy i szkolenia (Załącznik 7d)	71

1. Imię i nazwisko.**Paweł Borowiecki**

Nr ORCID: 0000-0001-5355-7281

Nr Scopus: 55354040300

Nr Web of Science: IQS-3288-2023

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Stopień naukowy /zawodowy	Data nadania	Podmiot nadający stopień	Tytuł pracy	Informacje dodatkowe
Doktor (w obszarze nauk ścisłych, dziedzinie – Nauki Chemiczne, dyscyplinie – Biotechnologia)	25.01.2016 r.	Rada Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej	"Zastosowanie katalizy enzymatycznej do otrzymywania optycznie czynnych alkoholi drugorzędowych jako prekursorów w syntezie związków heterocyklicznych o potencjalnych właściwościach biologicznych"	Praca wyróżniona
Magister inżynier (kierunku: "Biotechnologia" w specjalności: "Biotechnologia Chemiczna – Leki i Kosmetyki")	28.01.2010 r.	Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny	"Otrzymywanie optycznie czynnych cieczy jonowych" (Nr dyplomu 17770/196849)	Praca wyróżniona

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

Okres zatrudnienia	Stanowisko i miejsce zatrudnienia
01.11.2016 r. – obecnie	Zatrudnienie na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego , Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej.
19.04.2010–31.05.2016 r.	Zatrudnienie na stanowisku samodzielnego chemika w ramach projektu "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym" (POIG.01.03.01-00-158/09), Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej.

4. Omówienie osiągnięć naukowych, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt.:

"Nowe chemoenzymatyczne strategie w asymetrycznej syntezie wybranych farmaceutyków z zastosowaniem rekombinowanych oksydoreduktaz i hydrolaz jako biokatalizatorów"

4.2. Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Na cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowiących osiągnięcie naukowe składa się **9 prac** opublikowanych w latach 2016–2023 w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR), w których jestem współautorem. We wszystkich **9 pracach** byłem autorem korespondencyjnym, **7 pracach** byłem autorem pierwszym, przy czym jedna z prac była pracą jednoautorską.

Wybrane i zestawione poniżej prace były **cytowane 65-krotnie** (w tym zanotowały **36 cytowań bez autocytowań**; dane pochodzą z dnia **13.02.2025 r.** wg bazy bibliometrycznej Web of Science–WoS). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor wg roku publikacji) jednotematycznego cyklu prac wynosi **47,7** i został obliczony na podstawie wartości zgodnej z rokiem opublikowania danej pracy. Natomiast sumaryczna liczba punktów z listy czasopism MEiN z dnia 05.01.2024 r. wynosi **1 070 (Tabela 1)**.

Opis mojego merytorycznego i szacowanego procentowego wkładu pracy w publikacje będące częścią cyklu, zawarty jest w **Załączniku 4** do wniosku, oraz w oświadczeniu habilitanta (**Załącznik 6a**). Dodatkowo oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład pracy każdego z nich w publikacjach [**P1–P9**] stanowią treść **Załącznika 6a** do wniosku.

- [P1] "Chemoenzymatic Synthesis of Tenofovir", Beata Zdun, Tamara Reiter, Wolfgang Kroutil, **Paweł Borowiecki**,* *The Journal of Organic Chemistry* **2023**, 88, 11045–11055. doi: 10.1021/acs.joc.3c01005.
- [P2] "Chemoenzymatic Synthesis of Optically Active Ethereal Analog of iso-Moramide—A Novel Potentially Powerful Analgesic", **Paweł Borowiecki**,* *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23, 11803–11832. doi: 10.3390/ijms231911803.
- [P3] "Development of a Novel Chemoenzymatic Route to Enantiomerically Enriched β -Adrenolytic Agents. A case Study Toward Propranolol, Alprenolol, Pindolol, Carazolol, Moprolol, and Metoprolol", **Paweł Borowiecki**,* Beata Zdun, Natalia Popow, Magdalena Wiklińska, Tamara Reiter, Wolfgang Kroutil, *RSC Advances* **2022**, 12, 22150–22160. doi: 10.1039/d2ra04302e.
- [P4] "Chemoenzymatic Deracemization of Lisofylline Catalyzed by a (Laccase/Tempo)-Alcohol Dehydrogenase System", **Paweł Borowiecki**,* Aleksandra Rudzka, Tamara Reiter, Wolfgang Kroutil, *Catalysis Science & Technology* **2022**, 12, 4312–4324. doi: 10.1039/d2cy00145d.
- [P5] "Biocatalytic Hydrogen-Transfer to Access Enantiomerically Pure Proxyphylline, Xanthinol, and Diprophylline", **Paweł Borowiecki**,* Aleksandra Rudzka, Tamara Reiter, Wolfgang Kroutil, *Bioorganic Chemistry* **2022**, 127, 105967–105978. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.105967.
- [P6] "From Waste to Value—Direct Utilization of α -Angelica Lactone as a Nonconventional Irreversible Acylating Agent in a Chromatography-Free Lipase-Catalyzed KR Approach toward sec-Alcohols", Marcin Poterała, **Paweł Borowiecki**,* *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2021**, 9, 10276–10290. doi: 10.1021/acssuschemeng.1c02845.
- [P7] "Chemoenzymatic Enantioselective and Stereo-Convergent Syntheses of Lisofylline Enantiomers via Lipase-catalyzed Kinetic Resolution and Optical Inversion Approach", **Paweł Borowiecki**,* Beata Zdun, Maciej Dranka, *Molecular Catalysis* **2021**, 111451. doi: 10.1016/j.mcat.2021.111451.
- [P8] "Chemoenzymatic synthesis of Enantiomerically Enriched Diprophylline and Xanthinol Nicotinate", **Paweł Borowiecki**,* Mateusz Młynek, Maciej Dranka, *Bioorganic Chemistry* **2021**, 106, 104448. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104448.
- [P9] "Chemoenzymatic Synthesis of Proxyphylline Enantiomers", **Paweł Borowiecki**,* Daniel Paprocki, Agnieszka Dudzik, Jan Pleniewicz, *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, 81, 380–395. doi: 10.1021/acs.joc.5b01840.

* – autor korespondencyjny

Tabela 1. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiący osiągnięcie naukowe pt. "Nowe chemoenzymatyczne strategie w asymetrycznej syntezie wybranych farmaceutyków z zastosowaniem rekombinowanych oksydoreduktaz i hydrolaz jako biokatalizatorów" – podsumowanie.

Ozn.	Czasopismo/ Rok opublikowania	IF*	MEiN**	Liczba cytowań***	Uwagi
P1	J. Org. Chem./2023	3,6	140	1 (1)	- Autor korespondencyjny - Udział w pracy: 65%
P2	Int. J. of Mol. Sci./2022	5,6	140	2 (1)	- Autor korespondencyjny - Pierwszy autor - Praca jednoautorska - Udział w pracy: 100%
P3	RSC Adv./2022	3,9	100	3 (1)	- Autor korespondencyjny - Pierwszy autor - Udział w pracy: 60%
P4	Catal. Sci. Technol./2022	5,0	140	9 (6)	- Autor korespondencyjny - Pierwszy autor - Udział w pracy: 60%
P5	Bioorg. Chemistry./2022	5,1	100	3 (1)	- Autor korespondencyjny - Pierwszy autor - Udział w pracy: 70%
P6	ACS Sustain. Chem. Eng./2021	9,2	140	5 (3)	- Autor korespondencyjny - Udział w pracy: 50%
P7	Mol. Catal./2021	5,1	70	11 (7)	- Autor korespondencyjny - Pierwszy autor - Udział w pracy: 65%
P8	Bioorg. Chemistry./2021	5,3	100	7 (2)	- Autor korespondencyjny - Pierwszy autor - Udział w pracy: 90%
P9	J. Org. Chem./2016	4,8	140	24 (14)	- Autor korespondencyjny - Pierwszy autor - Udział w pracy: 85%
Suma		47,7	1 070	–	–
Średnio na pracę		5,3	119	–	–

* Współczynnik oddziaływania podany wg roku publikacji lub z 2023 r. w przypadku braku nowszego.

** Liczba punktów z listy czasopism Ministerstwa Edukacji i Nauki (05.01.2024 r.).

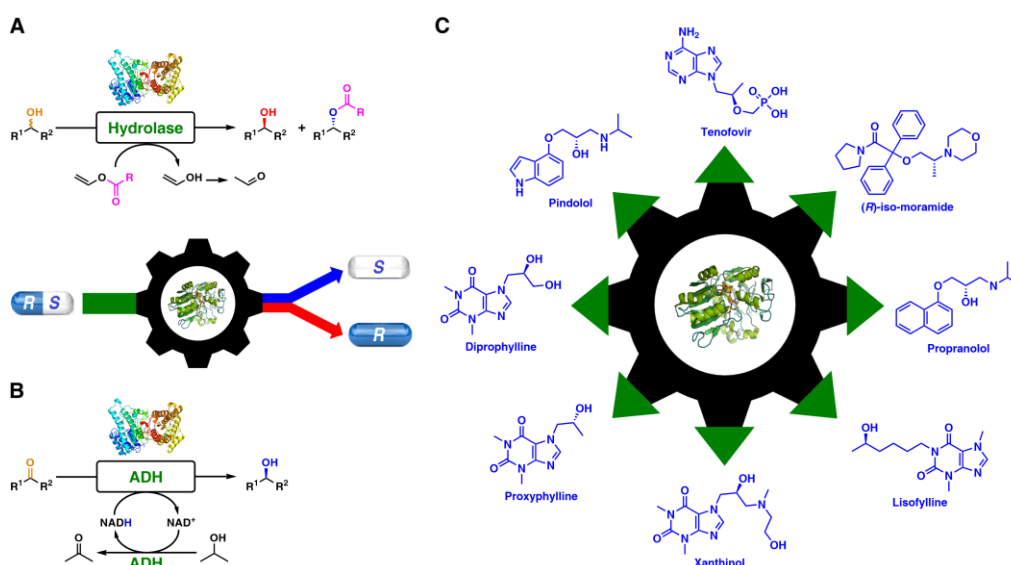
*** Liczbę cytowań podano w oparciu o dane przedstawione w bazie Web of Science (01.02.2025 r.). W nawiasie podano liczbę cytowań bez autocytowań.

4.3. Opis badań, będących podstawą osiągnięcia naukowego.

4.3.1. Streszczenie.

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę niniejszego wniosku habilitacyjnego polega na opracowaniu szeregu nowych, chemoenzymatycznych metod syntezy enancjomerycznie czystych substancji czynnych leków (API) oraz prototypowych związków farmakologicznie aktywnych zawierających drugorzędowe ugrupowania hydroksylowe, z wykorzystaniem enzymów jako biokatalizatorów kluczowych asymetrycznych transformacji (**Rysunek 1**).

Chiralne prekursory enancjomerycznie wzbogaconych API otrzymano na drodze kinetycznego rozdziału odpowiednich mieszanin racemicznych przy użyciu hydrolaz (głównie lipaz) katalizujących enancjoselektywną estryfikację alkoholi i/lub hydrolizę bądź alkoholizę ich estrów. Alternatywnie zastosowano dehydrogenazy alkoholowe katalizujące asymetryczną redukcję prochiralnych ketonów. Reakcje te prowadziły do powstania optycznie czynnych alkoholi, które albo same stanowiły substancje czynne leków, albo jako ich chiralne prekursory poddawano je dalszemu procedurom funkcjonalizacji, ukierunkowanym na uzyskanie farmakologicznie aktywnych związków.



Rysunek 1. Przykłady ilustrujące zakres tematyki badawczej w ramach przedstawionego osiągnięcia: (A) rozdział kinetyczny racemicznych alkoholi z wykorzystaniem hydrolaz; (B) desymetryzacja prochiralnych ketonów z zastosowaniem dehydrogenaz alkoholowych (ADH); (C) spektrum substancji czynnych leków oraz prototypowych substancji farmakologicznie aktywnych otrzymanych przy użyciu chemoenzymatycznych strategii syntezy zilustrowanych w panelach A–B.

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie optymalnych warunków chemoenzymatycznych transformacji, umożliwiających uzyskanie optycznie czynnych API o możliwie najwyższej wydajności całkowitej oraz, co najważniejsze, wysokiej czystości enancjomerycznej. Realizacja tego zadania wymagała: (i) identyfikacji lub zaprojektowania *de novo* odpowiedniego racemicznego i/lub prochiralnego prekursora API, który mógłby zostać zastosowany w biotransformacjach z użyciem wspomnianych enzymów, (ii) doboru biokatalizatora o pożądanej aktywności katalitycznej i stereoselektywności, (iii) analizy wpływu kluczowych parametrów bioprocessu na jego przebieg, (iv) powiększenia skali, a także (iv) optymalizacji warunków pozostałych etapów syntezy, tak aby uniknąć racemizacji optycznie czynnych produktów.

Jednym z głównych założeń było również wyjście poza dotychczasowe, rutynowe badania nad zastosowaniem tytułowych enzymów w syntezie asymetrycznej. W związku z tym wyniki eksperymentalne w zakresie syntezy zostały uzupełnione obliczeniami komputerowymi z wykorzystaniem dokowania molekularnego, które umożliwiły identyfikację fundamentalnych zależności pomiędzy strukturą badanych enzymów, nowymi, dotąd nietestowanymi w reakcjach enzymatycznych substratami a stereochemicznymi wynikami biotransformacji z ich udziałem. Szczegółowa analiza oddziaływań niekowalencyjnych w kompleksach białko-ligand pozwoliła na zracjonalizowanie przebiegu szeregu procesów enzymatycznych i może stanowić solidną podstawę do dalszych badań nad udoskonalaniem właściwości katalitycznych biokatalizatorów.

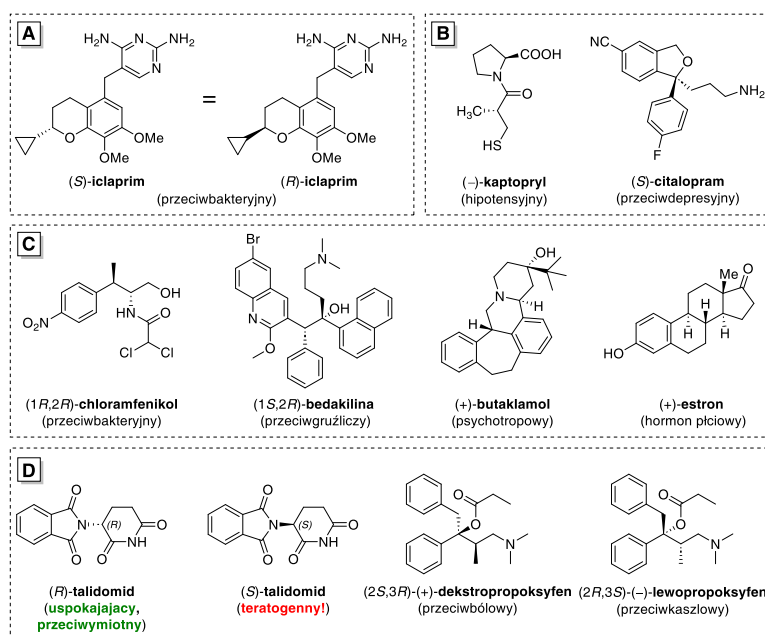
Zwieńczeniem moich badań było opracowanie prototypowego opioidowego analgetyku zaprojektowanego na bazie struktury dekstromoramide oraz dokowania molekularnego z zastosowaniem struktur krystalicznych receptorów opioidowych, a także nowego odczynnika o charakterze nieodwracalnego donora acylu, który umożliwia prowadzenie enzymatycznych rozdziałów kinetycznych racemicznych alkoholi bez konieczności stosowania chromatografii żelowej na etapie oczyszczania produktów.

4.3.2. Wprowadzenie i cele badawcze.

Opracowywanie innowacyjnych, ekonomicznie opłacalnych i zrównoważonych metodologii syntetycznych dedykowanych produkcji aktywnych substancji farmaceutycznych (API) stanowi nie tylko jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej chemii organicznej i przemysłu farmaceutycznego, ale przede wszystkim kluczowy aspekt związany z jakością leków i bezpieczeństwem ich stosowania. Obecnie ponad połowa małącząsteczkowych substancji czynnych leków dopuszczonych do obrotu posiada strukturę chiralną,^[1] co sprawia, że ich otrzymywanie w postaci optycznie czystej lub przynajmniej wysoce wzbogaconej w jeden z izomerów optycznych ma ogromne znaczenie dla efektywności terapii ukierunkowanych na konkretny cel molekularny, minimalizując jednocześnie ryzyko wystąpienia skutków ubocznych. Korzyści ze stosowania optycznie czystych API w farmakoterapii obejmują przede wszystkim szybszy początek działania, zwiększoną siłę i selektywność efektu terapeutycznego oraz zmniejszoną skłonność do interakcji z innymi lekami. Dzięki temu możliwe jest stosowanie niższych dawek leku, co przekłada się na większe bezpieczeństwo i lepszą tolerancję terapii.

Restrykcje dotyczące konieczności syntezy enancjomerycznie czystych API wynikają głównie z faktu, że cząsteczki chemiczne o chiralnej budowie wykazują selektywne oddziaływania z większością chiralnych biomakromolekuł, takich jak białka komórkowe (np. enzymy poszczególnych szlaków metabolicznych, receptory jądrowe, receptory związane z białkami G, kanały jonowe), transportery neuroprzekaźników, białka wiążące (np. albuminy), kwasy nukleinowe (np. DNA i RNA), hormony, lipidy błon biologicznych i inne. Stopień selektywności tych oddziaływań, a tym samym powinowactwo chiralnego leku do określonego celu molekularnego, wynika bezpośrednio z różnic w energii tworzenia kompleksów lek-receptor i/lub ich stałych dysocjacji. W skrajnych przypadkach mogą również występować alternatywne miejsca wiążące, zlokalizowane na tym samym lub innych receptorach. Te różnice skutkują odmiennymi właściwościami farmakokinetycznymi i farmakodynamicznymi chiralnej substancji leczniczej.

Zgodnie z przedstawionymi na **Rysunku 2** czterema możliwymi typami relacji między budową stereochemiczną chiralnych leków a ich właściwościami farmakologicznymi, podawanie optycznie czystych farmaceutyków jest szczególnie uzasadnione w sytuacjach, gdy pożądaną aktywność biologiczną wykazuje wyłącznie jeden z enancjomerów danej substancji czynnej, podczas gdy drugi stanowi niepotrzebny lub wręcz szkodliwy dla organizmu balast.



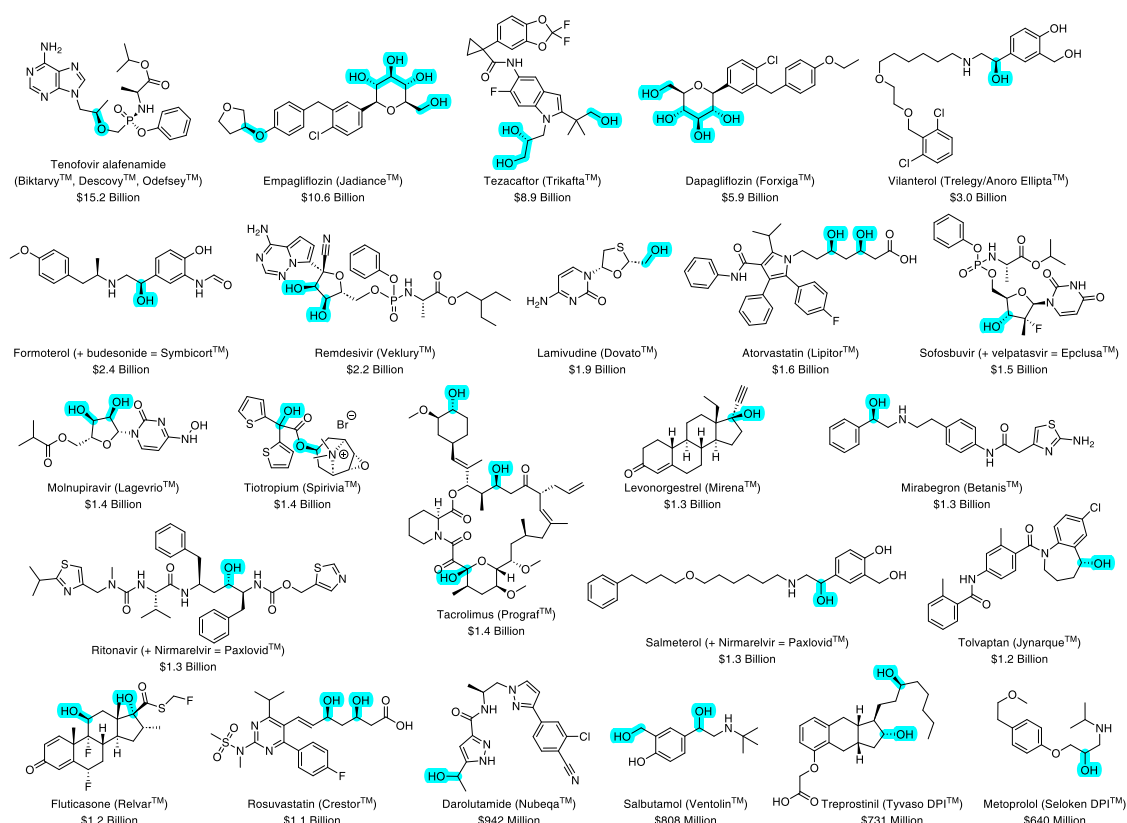
Rysunek 2. Przykładowe typy zależności między strukturą (budową stereochemiczną) a aktywnością farmakologiczną na przykładzie chiralnych API. **(A)** Izomery optyczne wykazujące takie samo działanie biologiczne; **(B)** izomery optyczne o takim samym działaniu biologicznym, ale różniące się poziomem aktywności; **(C)** izomery optyczne, w których aktywność biologiczną wykazuje wyłącznie jeden stereoizomer; **(D)** izomery optyczne wykazujące różne działania biologiczne.

Wyrazistym przykładem skrajnie różnego działania enancjomerów w organizmie człowieka jest talidomid – lek przeciwymiotny o działaniu uspokajającym, który w latach 60. XX wieku był powszechnie przepisywany kobietom w pierwszym trymestrze ciąży w celu łagodzenia porannych nudności. Niestety, jego stosowanie doprowadziło do wystąpienia zespołu wad wrodzonych, znanego jako "embriopatia talidomidowa", obejmującego ciężkie malformacje kończyn u noworodków (fokomelię). Wykazano, że w mieszaninie

racemicznej, oprócz (*R*)-enancjomeru o pożądanym działaniu terapeutycznym, obecny jest silnie teratogeny (*S*)-enancjomer.

Od 1992 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (*ang.* The U.S. Food and Drug Administration, FDA),^[2] a od 1993 roku także Komitet ds. Leków Gotowych przy Europejskiej Agencji ds. Oceny Produktów Leczniczych (*ang.* The European Medicines Agency, EMA),^[3] ustanowiły prawny wymóg pełnej charakterystyki działania izomerów optycznych chiralnej substancji czynnej leku przed jego rejestracją i dopuszczeniem do obrotu. Charakterystyka ta obejmuje także szczegółowy opis metod wytwarzania API, zastosowanych metod analitycznych potwierdzających jego strukturę i jednorodność, a także wyniki badań farmakokinetycznych, farmakodynamicznych i toksykologicznych przeprowadzonych na zwierzętach i ludziach. Taki postęp prawny wpłynął na zmianę tendencji na rynku farmaceutycznym – z każdym rokiem maleje liczba leków wprowadzanych na rynek w postaci racematów. Przed 1985 rokiem większość leków dopuszczonych do obrotu stanowiły racematy, a jedynie od trzech do pięciu leków rocznie wprowadzano jako enancjomery.^[4] Dla odmiany w latach 2002–2022 spośród 506 zatwierdzonych nowych małączesteczkowych API aż 326 (64%) miało strukturę chiralną, z czego aż 291 (89%) jest dostępnych w handlu w postaci enancjomerów.^[5]

Moją bezpośrednią motywacją do zaangażowania się w rozwój stereokontrolowanych metod syntezy chiralnych alkoholi jest ich ogromny i nieustannie rosnący potencjał aplikacyjny w przemysłowej produkcji farmaceutyków. Warto zauważyć, że w 2023 roku spośród 100 najlepiej sprzedających się małączesteczkowych API aż 24 pochodne zawierały co najmniej jedno chiralne ugrupowanie hydroksylowe, a ich łączna sprzedaż wyniosła około 70 miliardów USD (**Rysunek 3**).^[6] Co więcej, spośród tych 24 API jedynie 3 – salmeterol, salbutamol i metoprolol – są sprzedawane w postaci racemicznej, podczas gdy pozostałe substancje czynne dostępne są w formie izomerów optycznych.



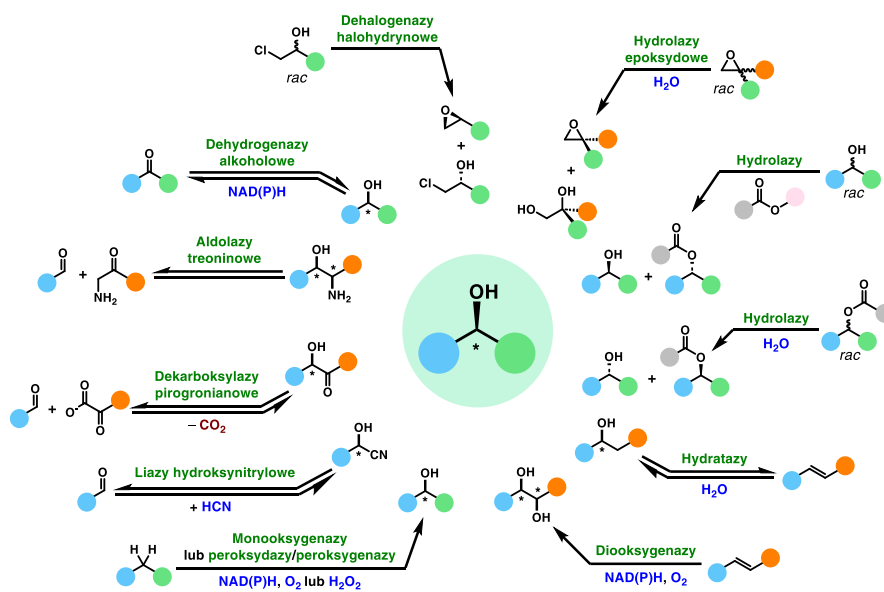
Rysunek 3. Przykłady najlepiej sprzedających się w 2023 roku małączesteczkowych chiralnych API, zawierających co najmniej jedno ugrupowanie hydroksylowe (zaznaczone turkusowym tłem). Rysunek opracowano na podstawie raportu "Top 200 Small Molecule Drugs by Sales in 2023".^[6]

Wzmocniona potrzeba otrzymywania optycznie czystych API wymaga od chemików wszechstronnej wiedzy, specjalistycznych umiejętności laboratoryjnych oraz coraz częściej stosowania interdyscyplinarnych podejść do planowania ścieżek syntezy. W tym kontekście zastosowanie enzymów w asymetrycznej syntezie oferuje znaczące korzyści. Enzymy bowiem umożliwiają katalizowanie przekształceń szerokiej gamy substratów, zarówno fizjologicznych, jak i ksenobiotycznych, w łagodnych warunkach reakcyjnych (neutralne pH, środowisko wodne, umiarkowane temperatury, ciśnienie atmosferyczne) z nieznierównaną sobie szybkością oraz chemo-, regio- i stereoselektywnością.^[7] Warto podkreślić, że enzymy, będące produktami ewolucji istniejącymi na Ziemi od miliardów lat, są wyspecjalizowane nie tylko w katalizowaniu niezwykle szybkich i precyzyjnych reakcji

biochemicznych, które umożliwiają syntezę złożonych związków chemicznych z prostych prekursorów, ale także w kontrolowaniu skomplikowanych szlaków metabolicznych w organizmach żywych. Dzięki tym właściwościom biokatalizatory znacznie przewyższają swoim potencjałem katalitycznym nawet najbardziej zaawansowane katalizatory chemiczne, zarówno organiczne, jak i metaloorganiczne, w tym kompleksy metali przejściowych (np. Pt, Pd, Rh, Ru, Co itp.).^[8] Co więcej, enzymy są biodegradowalne i nie generują toksycznych ani trudnych do utylizacji odpadów, co wyróżnia je na tle wielu chemicznych katalizatorów nieprzyjaznych dla środowiska. Dodatkowo, enzymy można w prosty sposób wytwarzać w hodowlach mikroorganizmów, co sprawia, że są one produktami pochodzącymi z odnawialnych źródeł, idealnie wpisującymi się w ideę zrównoważonego rozwoju. Dzięki temu biokataliza stanowi jeden z kluczowych filarów tzw. "zielonej chemii".^[9]

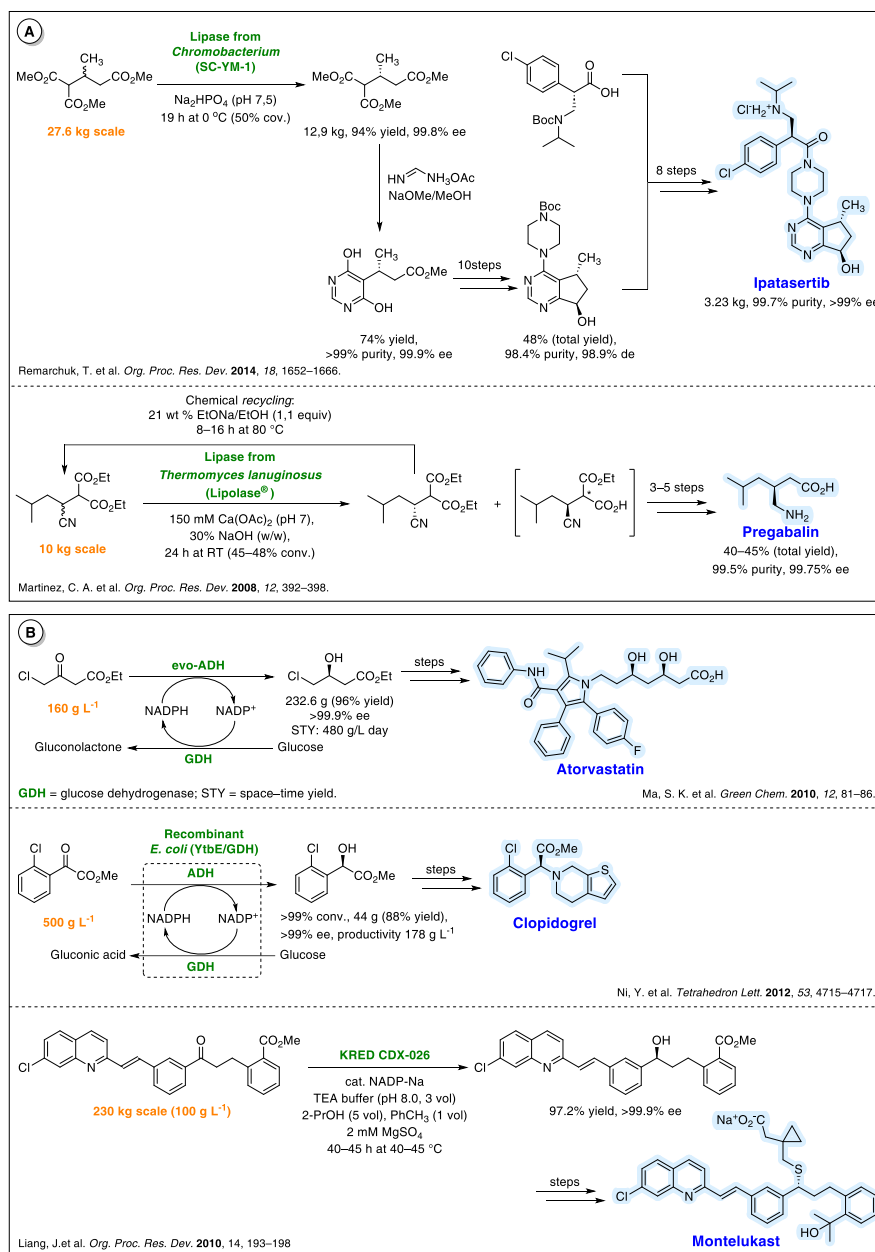
Biotransformacje z wykorzystaniem enzymów i/lub komórek mikroorganizmów zawierających pożądane enzymy jako biokatalizatory odgrywają kluczową rolę w stereokontrolowanej syntezie optycznie czynnych substancji czynnych farmakologicznie.^[10] Implementacja enzymów w procesach otrzymywania API w wielu przypadkach upraszcza daną technologię, skracając ścieżkę syntezy oraz eliminując konieczność stosowania strategii ochrony grup funkcyjnych.^[11] W efekcie zmniejsza się zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych oraz ogranicza ryzyko generowania szkodliwych odpadów. Co więcej, chemoenzymatyczne strategie syntezy nie wymagają bezwodnych ani beztlenowych warunków reakcji, ani drogiej i wysoko wyspecjalizowanej aparatury chemicznej, a powiększenie skali produkcji zarówno biokatalizatorów, jak i bioprocessów, które katalizują, nie stwarza większych trudności, co w połączeniu z wymienionymi wcześniej zaletami znacząco zwiększa efektywność kosztową technologii danego API. W rezultacie biokataliza stała się obecnie praktycznym narzędziem biotechnologicznym, które umożliwia realizację wielu ambitnych wyzwań syntetycznych, dotychczas nieosiągalnych przy użyciu klasycznych metod chemicznych, szczególnie w zakresie wytwarzania chiralnych API i innych związków o wysokiej wartości dodanej.

W ramach zaprezentowanego cyklu prac, stanowiącego moje główne osiągnięcie naukowe, skoncentrowałem się na opracowaniu chemoenzymatycznych metod syntezy enancjomerycznie czystych alkoholi, pełniących rolę API lub ich kluczowych prekursorów. Zgodnie z danymi literaturowymi repertuar biokatalitycznych metod syntezy optycznie czystych alkoholi jest niezwykle wszechstronny i obejmuje zastosowanie różnorodnych biokatalizatorów (**Rysunek 4**).



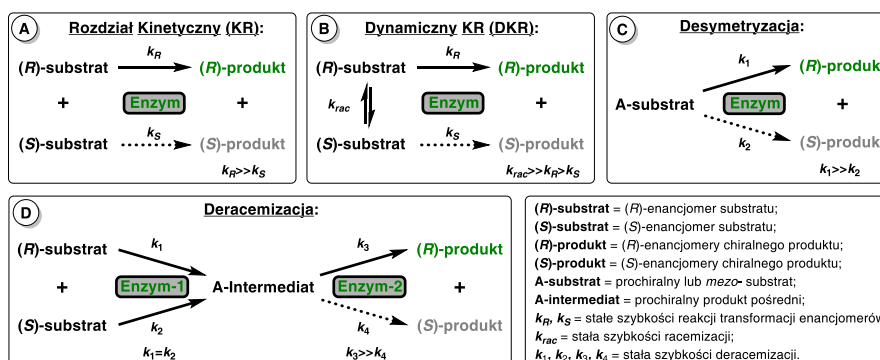
Rysunek 4. Biokatalityczne metody syntezy enancjomerycznie wzbogaconych alkoholi. Opracowano na podstawie artykułu.^[11a]

Ze względu na wysoką efektywność enzymów w katalizowaniu przemian szerokiego spektrum ksenobiotycznych substratów oraz ich relatywnie wysoką stabilność w warunkach procesowych, niskie koszty wytwarzania biokatalizatorów w warunkach laboratoryjnych lub zakupu odpowiednich gotowych preparatów enzymatycznych, a także ich szeroką dostępność handlową, najczęściej stosowanymi enzymami w syntezie organicznej są hydrolazy – przede wszystkim lipazy (E.C. 3.1.1.3), esterazy (E.C. 3.1.x.x) i proteazy (E.C. 3.4.x.x) – oraz oksydoreduktazy, w tym szczególnie dehydrogenazy alkoholowe (E.C. 1.1.1.x) i/lub ketoreduktazy (E.C. 1.1.1.x). Odzwierciedleniem tego trendu w przemyśle farmaceutycznym stanowią zaprezentowane na **Rysunku 5** przykładowe chemoenzymatyczne syntezy enancjomerycznie czystych API z wykorzystaniem (**A**) lipaz oraz (**B**) dehydrogenaz alkoholowych (ADH) i/lub ketoreduktaz (KRED), opracowane w skali wielolaboratoryjnej oraz półtechnicznej. Szczególnym przypadkiem jest synteza atorwastatyny, w której dzięki zastosowaniu biokatalizatorów skrócono proces produkcyjny o 6 etapów w porównaniu z tradycyjną ścieżką syntezy chemicznej.^[12]



Rysunek 5. Przykłady przemysłowych syntez enancjomerycznie czystych API z użyciem lipaz (A) oraz dehydrogenaz alkoholowych (B).

Z kolei wśród biokatalitycznych strategii powszechnie wykorzystywanych w stereokontrolowanej syntezie izomerów optycznych wyróżnia się: (A) rozdział kinetyczny (*ang.* kinetic resolution, KR), (B) dynamiczny rozdział kinetyczny (*ang.* dynamic kinetic resolution, DKR), (C) desymetryzację prochiralnych substratów i/lub mezo-związków oraz (D) deracemizację realizowaną w układach kaskadowych (Rysunek 6).



Rysunek 6. Strategie otrzymywania optycznie czynnych związków z zastosowaniem enzymów jako stereoselektywnych biokatalizatorów.

W moich badaniach wykorzystywałem głównie lipazy, których podstawowym zastosowaniem w ramach wymienionych strategii jest katalizowanie rozdziału mieszanin racemicznych (alkoholi, estrów oraz amin) w warunkach kontroli kinetycznej i/lub dynamicznej (**A–B**), a także desymetryzacja achiralnych związków występujących w formie *mezo* (**C**). Alternatywnie syntezę enancjomerycznych API prowadziłem z wykorzystaniem dehydrogenaz alkoholowych, których potencjał katalityczny wykorzystuje się powszechnie w ramach strategii desymetryzacji prochiralnych związków karbonylowych (**C**) i/lub deracemizacji racemicznych alkoholi oraz amin (**D**).

Pomimo że literatura chemiczna dotycząca użycia wspomnianych biokatalizatorów w syntezie asymetrycznej nieracemicznych alkoholi jest niezwykle bogata, a spektrum nowych zastosowań tych enzymów w tworzeniu chiralnych struktur staje się coraz bardziej ograniczone, niewątpliwym elementem oryginalności moich badań prowadzonych w latach 2016–2023 jest wykorzystanie innowacyjnych prekursorów API, które poddane opracowanym przeze mnie relatywnie wydajnym, selektywnym i skalowalnym biotransformacjom, znalazły zastosowanie w syntezie enancjomerycznie czystych substancji czynnych leków. Ponadto, choć do tej pory opracowano wiele efektywnych tandemowych procesów prowadzących do deracemizacji racemicznych alkoholi, obejmujących konkurencyjne reakcje redoks (utleniania-redukcji), zakres stosowności tych metod ograniczony jest zwykle do bardzo aktywnych alkoholi benzylowych. Tym większym wyzwaniem okazało się otrzymanie optycznie czystej lizofiliny z zastosowaniem strategii deracemizacyjnej opisanej w dalszej części autoreferatu.

Celem podjętych badań było:

- 1) Zaprojektowanie i przeprowadzenie chemoenzymatycznych syntez optycznie czystych substancji czynnych leków zawierających grupę hydroksylową (*vide* tenofowiru, proksyfiliny, dirpofiliny, nikotynianu ksantynolu, propranololu, alprenololu, pindololu, karazololu, moprolołu oraz metoprolołu) z zastosowaniem dwóch niezależnych strategii biokatalitycznych:
 - a) rozdziału kinetycznego odpowiednich mieszanin racemicznych przy użyciu lipaz katalizujących enancjoselektywną estryfikację alkoholi lub alkoholizę ich estrów;
 - b) desymetryzacji prochiralnych ketonów z zastosowaniem dehydrogenaz alkoholowych katalizujących stereoselektywną redukcję grupy karbonylowej.
- 2) Zaprojektowanie i przeprowadzenie chemoenzymatycznych syntez optycznie czystych prototypowych substancji farmakologicznych [*vide* (*R*)-lizofiliny oraz (*R*)-*izo*-moramidu] z zastosowaniem dwóch niezależnych strategii biokatalitycznych:
 - a) rozdziału kinetycznego racemicznych pochodnych alkoholi/estrów katalizowanych przez lipazy;
 - b) deracemizacji racemicznej lizofiliny z zastosowaniem tandemowego biokatalitycznego układu redoks opartego na sekwencyjnym, niestereoselektywnym utlenianiu grupy hydroksylowej katalizowanym przez lakazę/TEMPO oraz stereoselektywnej bioredukcji grupy karbonylowej katalizowanej przez stereokomplementarne dehydrogenazy alkoholowe.
- 3) Wykorzystanie dokowania molekularnego w analizie oddziaływań białko-ligand do:
 - a) racjonalizacji wyników prac eksperymentalnych z użyciem biokatalizatorów, w tym wyznaczanie ich stereopreferencji działania względem biotransformowanych substratów;
 - b) projektowania nowego analogu dekstromoramidu o potencjalnej aktywności przeciwbólowej.
- 4) Zaprojektowanie oraz zastosowanie nowego odczynnika chemicznego w charakterze nieodwracalnego donora acylu, umożliwiającego prowadzenie enzymatycznych rozdziałów kinetycznych racemicznych alkoholi bez konieczności stosowania chromatografii żelowej na etapie oczyszczania produktów.

4.3.3. Wyniki badań własnych i ich dyskusja.

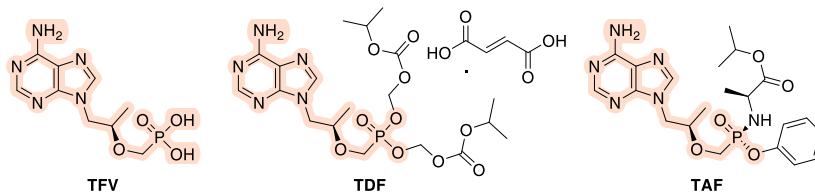
4.3.3.1. Przedmowa autora.

Wszystkie publikacje składające się na moje osiągnięcie naukowe są ściśle powiązane tematycznie, a ich wspólnym mianownikiem jest zastosowanie biokatalizy w asymetrycznej syntezie nieracemicznych substancji czynnych leków i/lub prototypowych związków farmakologicznie aktywnych. Część z artykułów (**P1**, **P2**, **P3** oraz **P6**), stawia jednak odrębne cele badawcze i rozwiązuje indywidualne problemy syntetyczne, dzięki czemu dana publikacja spośród wyżej wymienionych stanowi zamkniętą i samodzielną całość. Z tego względu zdecydowałem się omówić większość przedstawionych prac oddzielnie, przedstawiając nie tylko szczegółowe uzasadnienie ich powstania, ale także podkreślając najważniejsze walory poznawcze, które przyczyniają się do rozwoju dyscypliny naukowej – *Nauki Chemiczne*.

Numeracja związków zastosowana w niniejszym przewodniku jest zgodna z tą używaną w publikacjach wchodzących w skład rozprawy. Dla ułatwienia interpretacji wyników badań przedstawionych w autoreferacie, do liczbowo-literowego oznaczenia związków dodano symbol danej publikacji (np. **P1–P9**), do której się one odnoszą. Przykładowo, 6-chloro-9H-puryna oznaczona symbolem **1** w publikacji **P1** została w autoreferacie oznaczona jako **1_P1**.

4.3.3.2. Chemoenzymatyczna synteza tenofowiru (**P1**).

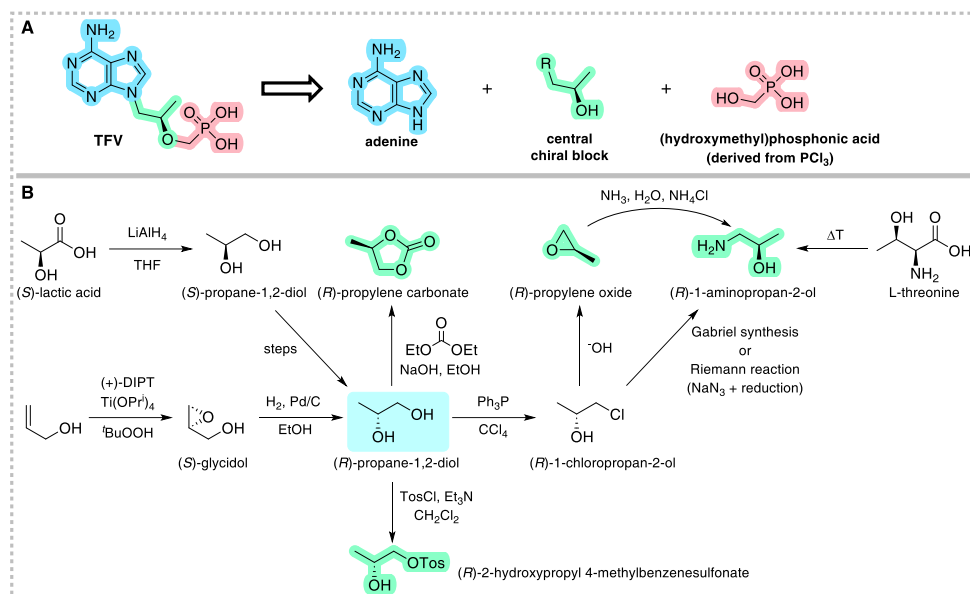
Głównym celem badań opisanych w **publikacji P1** było opracowanie wysoce selektywnej i wydajnej chemoenzymatycznej metody syntezy tenofowiru [**TFV**, (R)-9-(2-fosfonometoksypropylo)adeniny], przeciwwirusowego leku powszechnie stosowanego w leczeniu zakażeń ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) oraz wirusem HBV (*hepatitis B*).^[13] Tenofowir oraz jego lipofilowe proleki, takie jak fumaran dizoproksylu tenofowiru (**TDF**) i alafenamid tenofowiru (**TAF**) (**Rysunek 7**), należą do najskuteczniejszych substancji czynnych leków o działaniu przeciwretrowirusowym. Charakteryzują się one relatywnie długim czasem działania, niskim ryzykiem rozwoju tolerancji lekowej oraz udoskonalonym profilem bezpieczeństwa,^[14] co ugruntowało ich pozycję w terapii AIDS oraz ostrego i przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B (WZW B).^[15] Aktywność anti-HIV tenofowiru wynika z jego zdolności do konkurencyjnego hamowania odwrotnej transkryptazy HIV w stosunku do trójfosforanu deoksyadenozyny (dATP). Kluczowym elementem tej aktywności jest konfiguracja absolutna centrum stereogenicznego substancji czynnej tego leku. (R)-Enancjomer tenofowiru wykazuje około 100-krotnie wyższą aktywność biologiczną jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusowej w porównaniu z jego (S)-enancjomerem.^[16] Z tego powodu tenofowir jest na całym świecie produkowany i dystrybuowany wyłącznie w postaci (R)-enancjomeru.^[17]



Rysunek 7. Struktury chemiczne tenofowiru (**TFV**), fumaranu dizoproksylu tenofowiru (**TDF**) i alafenamidu tenofowiru (**TAF**).

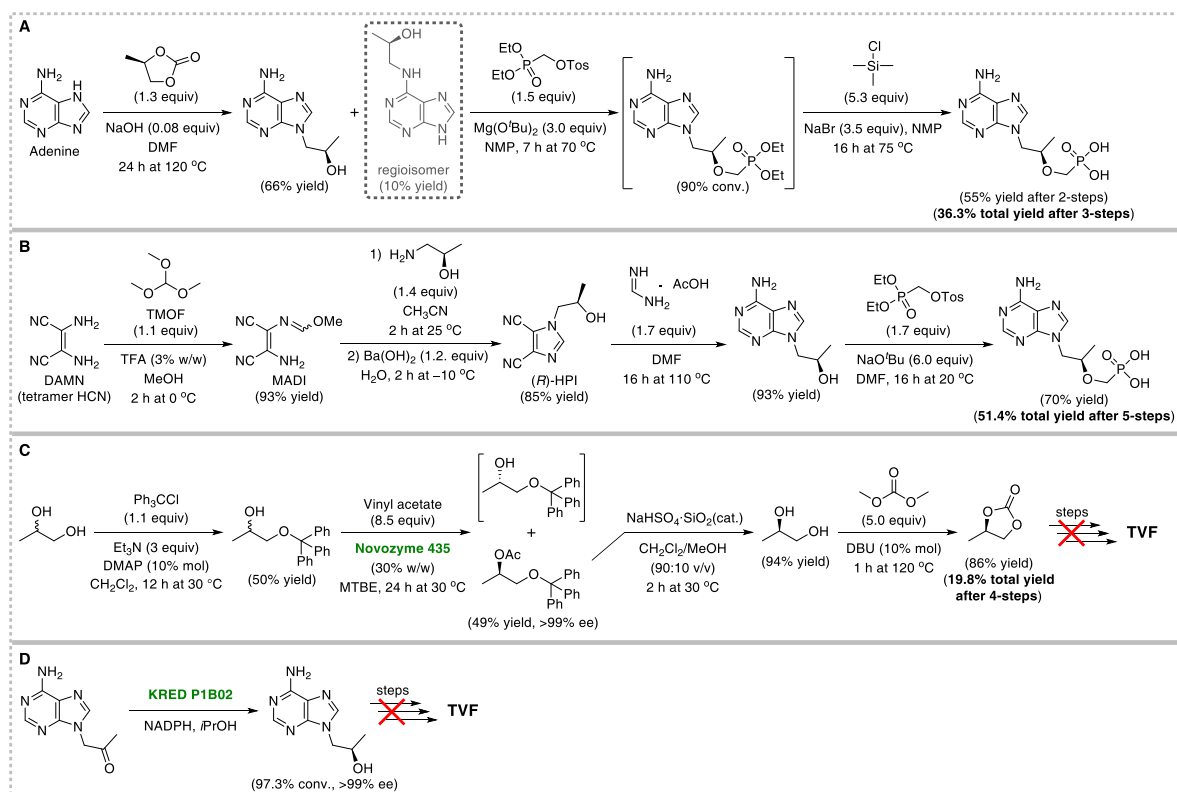
Według najnowszego raportu WHO^[18] szacuje się, że pod koniec 2022 roku na świecie żyło 39,0 mln osób zakażonych wirusem HIV, a w tym samym roku odnotowano 1,3 mln nowych zakażeń. Z kolei, zgodnie z danymi WHO z 2019 roku, na świecie żyło ok. 296 mln ludzi z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B (WZW B), a liczba nowych zakażeń wynosiła ok. 1,5 mln rocznie. Co ciekawe, w samym 2023 roku sprzedaż trzech preparatów leczniczych o handlowych nazwach BiktarvyTM, DescovyTM oraz OdefseyTM, zawierających alafenamid tenofowiru, osiągnęła wartość 15,2 miliarda USD.^[19] Z tego powodu rozwój nowych metod produkcyjnych tenofowiru pozostaje nadal opłacalny. Większość procesów wytwarzania **TFV** wykorzystuje adeninę, kwas (hydroksymetylo)fosfonowy oraz różne chiralne bloki budulcowe, które pochodzą albo z puli związków naturalnych, takich jak L-(+)-kwas mlekowy i/lub L-treonina, albo są w pełni syntetyczne, jak w przypadku (S)-glicydolu (**Rysunek 8**).

Z kolei synteza optycznie czystego (S)-glicydolu w dużej mierze opiera się na asymetrycznej epoksydacji odpowiedniego alkoholu allilowego metodą Sharplessa, wykorzystując wodoronadtlenek *tert*-butylu (*t*-BuOOH) w obecności (R,R)-winianu diizopropylowego [(+)-DIPT] oraz tetraizopropanolanu tytanu Ti(OPrⁱ)₄. Ze względu na trudności w uzyskiwaniu odpowiednich (R)-enancjomerów zarówno centralnego bloku budulcowego, tj. (R)-propano-1,2-diolu, jak i produktów jego funkcjonalizacji (np. tosyłanu, węglanu propylenu oraz tlenku propylenu), koszty ich zakupu znacząco przewyższają ceny detaliczne (S)-enancjomerów.



Rysunek 8. (A) Retrosynteza tenofowiru (TFV) z uwzględnieniem trzech głównych fragmentów (jednostek budulcowych): (i) grupy nukleotydowej wywodzącej się z adeniny, (ii) centralnego chiralnego rdzenia pochodzącego z (R) -propano-1,2-diolu lub jego pochodnych, oraz (iii) kwasu fosfonowego, otrzymywanego w wyniku hydrolizy trichloru fosforu (PCl_3). (B) Struktury chiralnych bloków budulcowych niezbędnych do syntezy TFV wraz z uproszczonymi warunkami ich syntezy.

Spośród wyżej wymienionych chiralnych bloków budulcowych, w większości przykładów literaturowych dotyczących syntezy tenofowiru najczęściej wykorzystywanym reagentem jest węglan (R) -propyleny (**Rysunek 9A**).^[20] Niestety, zastosowanie tego prekursora wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Nie tylko wymaga on użycia żmudnej i wieloetapowej asymetrycznej metodologii syntezy, ale także podczas N -alkilowania adeniny reakcja z jego udziałem charakteryzuje się wydajnością niższą o co najmniej 10% od spodziewanej, co wynika z powstawania niepożądanego regioizomeru. Aby uniknąć problemów związanych z selektywnością reaktywności obu tych związków, często konieczne jest zastosowanie strategii ochrony grupy aminowej przy węglu C-6 adeniny. Taki zabieg wydłuża ścieżkę syntezy tenofowiru o co najmniej dwa dodatkowe etapy.

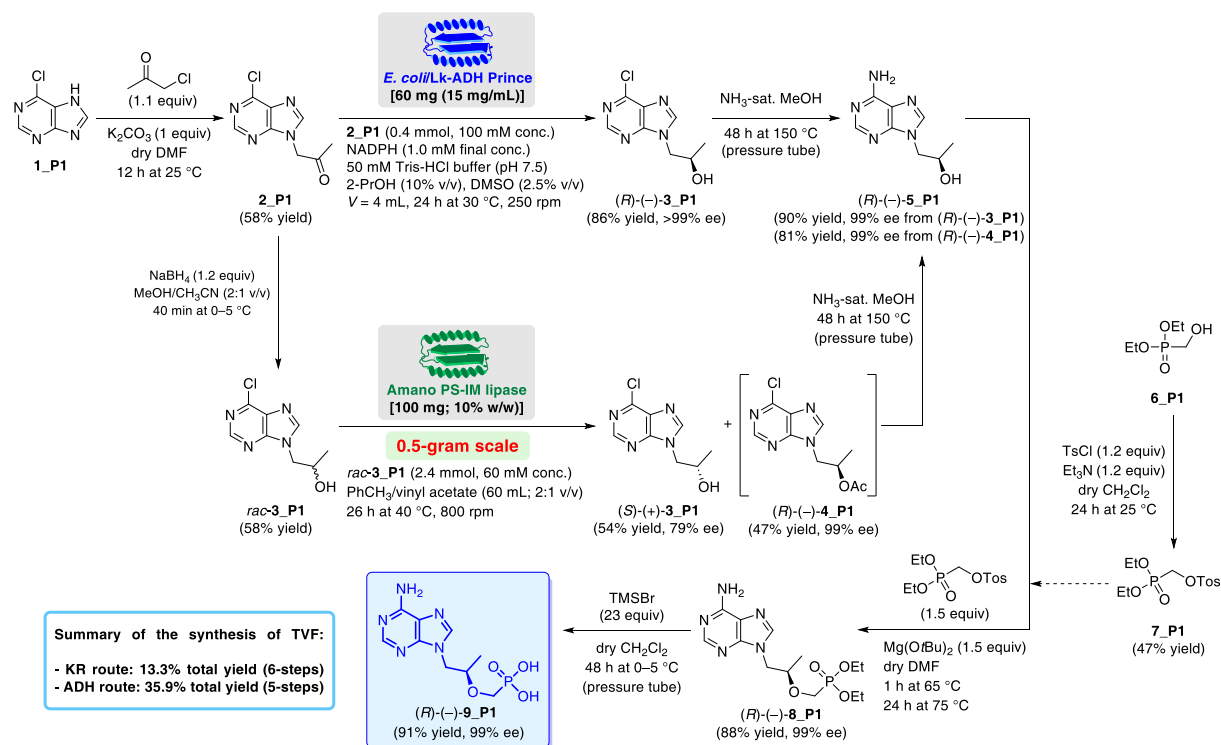


Rysunek 9. Przykładowe metody syntezy tenofowiru i/lub jego chiralnych prekursorów: chemiczne (A–B) oraz chemoenzymatyczne (C–D).

W 2020 roku, w celu obniżenia kosztów produkcji **TFV**, opracowano alternatywną strategię syntetyczną, w której kluczowym półproduktem jest 5-amino-4-cyanoimidazol (**HPI**), otrzymywany z (*R*)-1-aminopropan-2-olu jako chiralnego bloku budulcowego wywodzącego się z L-treoniny (**Rysunek 9B**).^[21] Metoda ta rozpoczyna się od zastosowania 2,3-diaminomaleonitrylu (**DAMN**) jako zamiennika cyjanowodoru, który jest wysoce toksyczny i wymaga dobrze wentylowanego wyciągu wyposażonego w detektor HCN. Choć ścieżka syntezy oparta na **HPI** pozwala uniknąć powstawania zidentyfikowanego wcześniej niepożądanego regioizomeru oraz charakteryzuje się wyższą łączną wydajnością syntezy tenofowiru (51.4%) niż metoda z użyciem (*R*)-węglanu propylenu (36.3%), to niestety jest dłuższa o dwa etapy, dość skomplikowana i wymaga zastosowania niestandardowych odczynników.

Pomimo licznych chemoenzymatycznych metod syntezy leków przeciwwirusowych i ich syntetycznych półproduktów,^[22] brakowało kreatywnych rozwiązań dotyczących syntezy tenofowiru. W okresie, gdy prowadziłem badania nad syntezą **TFV**, opisane były jedynie dwa podejścia chemoenzymatyczne i dotyczyły jedynie syntezy prekursorów. Pierwsze podejście wykorzystywało lipazę B z *Candida antarctica* (**CAL-B**; Novozyme 435), katalizującą rozdział kinetyczny (**KR**) racemicznego 1-(trityloksy)propan-2-olu^[23] (**Rysunek 9C**), natomiast drugie opierało się na zastosowaniu komercyjnej, (*R*)-selektywnej ketoreduktazy (**Codexis KRED P1B02**), katalizującej stereoselektywną bioredukcję prochiralnego 1-(6-amino-9*H*-puryno-9-yl)propan-2-onu^[24] (**Rysunek 9D**). Niestety, obie te metody miały istotne ograniczenia. W przypadku podejścia z wykorzystaniem **CAL-B**, potencjalna ścieżka syntezy tenofowiru była wydłużona o co najmniej cztery etapy w porównaniu z rutynową metodą opartą na handlowo dostępnych chiralnych blokach budulcowych. Natomiast drugie podejście nie tylko nie przedstawiało dokładnych warunków reakcji, ale również wymagało użycia komercyjnych biokatalizatorów o nieznanym składzie enzymatycznym. Sytuacja taka jest wyjątkowo niekorzystna, gdyż prowadzi do zależności od konkretnego producenta oraz ogranicza możliwość dalszej optymalizacji procesu i jego potencjalnej komercjalizacji w przyszłości.

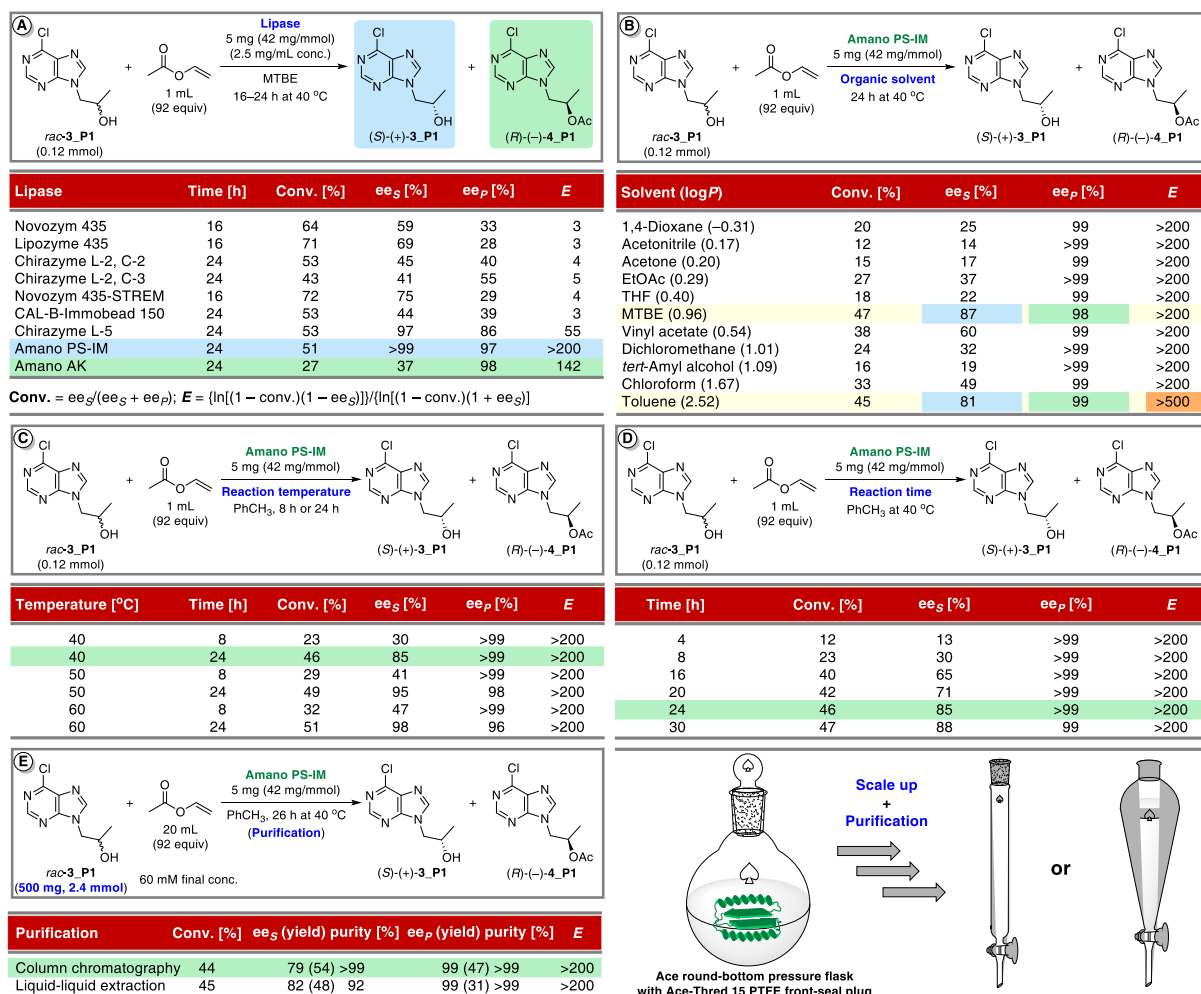
Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej wymienione ograniczenia asymetrycznych metod syntezy tenofowiru opisanych w literaturze, postanowiłem opracować nową ścieżkę syntezy, która wykorzystywałaby łatwo dostępne i tanie surowce chemiczne oraz komercyjne i/lub proste w przygotowaniu w warunkach laboratoryjnych preparaty enzymatyczne stosowane w roli biokatalizatorów (**Schemat 1**). Plan zakładał wykorzystanie dwóch rodzajów enzymów (lipaz oraz dehydrogenaz alkoholowych) na decydującym etapie biotransformacji odpowiedniego prekursora, aby wprowadzić odpowiednią chiralność pożądaną z punktu widzenia dalszych stereochemicznych przekształceń. Przełomową innowacją zaprojektowanej metodologii syntezy było zastosowanie fragmentu nukleotydowego nie bezpośrednio pochodzącego z problematycznej adeniny, lecz z jej pochodnej – odpowiedniej 6-chloro-9*H*-puryny (**1_P1**). Taki wybór miał na celu uproszczenie procesu otrzymywania tenofowiru oraz eliminację trudności związanych z tradycyjnym podejściem opartym na adeninie.



Schemat 1. Chemoenzymatyczna synteza tenofowiru [(*R*)-(-)-9_P1] z zastosowaniem lipaz i/lub dehydrogenaz alkoholowych.

Kluczowe etapy biokatalityczne zostały zaprojektowane w oparciu o rozdział kinetyczny racemicznego 1-(6-chloro-9H-purin-9-yl)propan-2-olu (*rac*-3_P1), katalizowany przez handlowo dostępne preparaty lipaz z wykorzystaniem octanu winylu jako donora grupy acetylowej w środowisku rozpuszczalników organicznych (Schemat 2). Alternatywnie, proces obejmował stereoselektywną bioredukcję odpowiedniego prochiralnego 1-(6-chloro-9H-purin-9-yl)propan-2-onu (2_P1) z zastosowaniem komórek *E. coli* nadprodukujących rekombinowane dehydrogenazy alkoholowe, prowadzoną w wodnych roztworach buforowych.

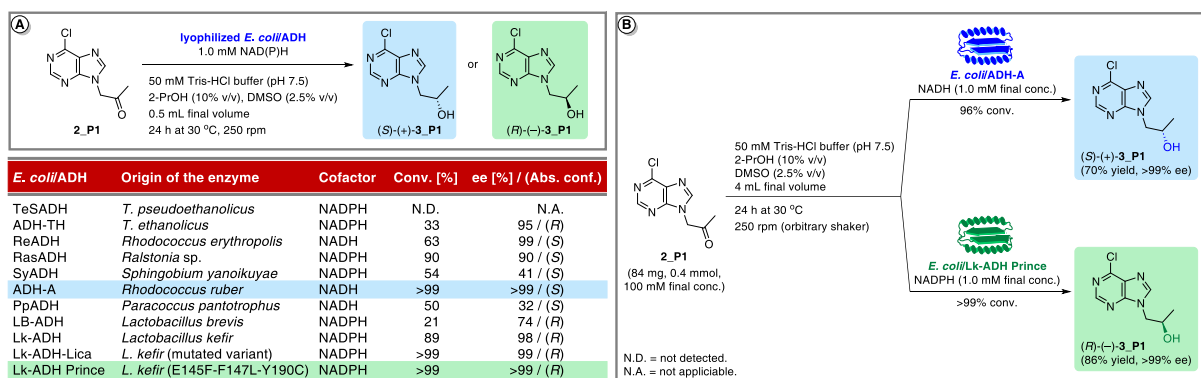
Jeśli chodzi o pierwszy proces, to standardowa procedura optymalizacji jego warunków obejmowała dobór odpowiedniego preparatu lipazy (A), wybór rozpuszczalnika organicznego (B), określenie wpływu temperatury (C) oraz czasu reakcji (D) na wynik stereochemiczny, a także walidację skalowalności procesu enzymatycznego (E) (Schemat 2). W skali preparatywnej dodatkowo przeanalizowano możliwość izolacji oraz oczyszczania produktów rozdziału kinetycznego bez konieczności stosowania chromatografii kolumnowej. Skrupulatne badania nad optymalizacją enzymatycznego KR racemicznego alkoholu *rac*-3_P1 (0,06 mmol/mL) wykazały, że najlepsze wyniki pod względem konwersji oraz nadmiaru enancjomerycznego pożądanego (*R*)-octanu [(*R*)-(-)-4_P1] uzyskiwano, gdy biokatalizatorem była handlowa lipaza z *Burkholderia cepacia* (BCL) immobilizowana na ziemi okrzemkowej (Amano PS-IM) i zawieszona w mieszaninie toluenu i octanu winylu (2:1, v/v). Preparatu lipazy używano w ilości 42 mg/mmol substratu, co odpowiadało zawieszeniu 5 mg immobilizowanego enzymu w 2 mL medium reakcyjnego. Optymalna temperatura enancjoselektywnej transestryfikacji *rac*-3_P1 wynosiła 40 °C, a proces kończono po 24 godzinach, co gwarantowało otrzymanie enancjomerycznie czystego (*R*)-octanu (>99% ee) z 46% konwersją. Warto dodać, że w ramach badań zsyntetyzowano i przeprowadzono analogiczną optymalizację rozdziału kinetycznego dla racemicznej pochodnej zawierającej jod w pozycji C-6 zamiast chloru. Uzyskane wyniki były jednak porównywalne lub nieco gorsze, co było bezpośrednią przyczyną pominięcia szczegółowego opisu tych badań w niniejszym autoreferacie.



Schemat 2. Optymalizacja rozdziału kinetycznego racemicznego 1-(6-chloro-9H-purin-9-yl)propan-2-olu (*rac*-3_P1) katalizowanego lipazami z użyciem octanu winylu jako donora acylu w rozpuszczalnikach organicznych.

Celem ostatniego etapu badań nad enzymatycznym KR *rac*-**3_P1** było proporcjonalne (liniowe) przeskalowanie procesu, prowadzonego w zoptymalizowanych warunkach, do skali 0,5 grama użytego racemicznego alkoholu. Umożliwiło to uzyskanie praktycznie takich samych wyników pod względem konwersji (ok. 44–45%), ale wymagało wydłużenia czasu reakcji do 26 godzin. Po odsączeniu enzymu pod zmniejszonym ciśnieniem oraz poddaniu surowej mieszaniny oczyszczaniu za pomocą chromatografii kolumnowej z żelom krzemionkowym otrzymano optycznie czynne produkty: (*S*)-(-)-**3_P1** z 54% wydajnością i 79% ee oraz (*R*)-(-)-**4_P1** z 47% wydajnością i 99% ee. Wykorzystując fakt, że nieprzereagowany (*S*)-enancjomer alkoholu (*S*)-(+)-**3_P1** charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością w toluenie, lecz bardzo dobrą w wodzie, w przeciwieństwie do powstającego w reakcji octanu (*R*)-(-)-**4_P1**, podjąłem próby wyizolowania obu produktów KR wyłącznie przy użyciu ekstrakcji ciecz-ciecz w układzie toluen-woda. Niestety jak się okazało metoda bez użycia chromatografii była nieco mniej skuteczna, co szczególnie odbiło się na wydajności oraz czystości alkoholu (*S*)-(+)-**3_P1**.

W przypadku rozdziału kinetycznego maksymalna teoretyczna wydajność otrzymania pożądanego enancjomeru wynosi jedynie 50% i dodatkowo wymaga zastosowania żmudnej procedury oczyszczania za pomocą chromatografii kolumnowej, toteż zbadano alternatywną metodę stereoselektywnego bio-transwodowania prochiralnego ketonu **2_P1** (Schemat 3). Wstępne badania przesiewowe biokatalizatorów przeprowadzono z wykorzystaniem liofilizowanych komórek *Escherichia coli* zawierających rekombinowane dehydrogenazy alkoholowe (*E. coli*/ADHs) pochodzące z różnych mikroorganizmów. Testowane biokatalizatory obejmowały enzymy z *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* ATCC 33223 (*E. coli*/TeSADH), *Thermoanaerobacter ethanolicus* (*E. coli*/ADH-TH), *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297 (*E. coli*/ReADH), *Ralstonia* sp. DSM 6428 (*E. coli*/RasADH), *Sphingobium yanoikuyae* DSM 6900 (*E. coli*/SyADH), *Rhodococcus ruber* DSM 44541 (*E. coli*/ADH-A), *Paracoccus pantotrophus* DSM 11072 (*E. coli*/PpADH), *Lactobacillus brevis* (*E. coli*/LB-ADH), *Lactobacillus kefir* (*E. coli*/LkADH) oraz odpowiednie mutanty wyprowadzone z *L. kefir* (*E. coli*/Lk-ADH-Lica oraz *E. coli*/Lk-ADH Prince). Bioredukcję prochiralnego ketonu **2_P1** prowadzono w standardowych warunkach, stosując 10 mM substratu i 10 mg biokatalizatora (*E. coli*/ADHs) zawieszonego w 50 mM buforze Tris-HCl (pH 7,5) w obecności 1,0 mM kofaktora (NADH lub NADPH), wytrząsając mieszaninę reakcyjną przez 24 godziny w temperaturze 30 °C. Aby zapewnić pełną rozpuszczalność **2_P1** w medium reakcyjnym oraz umożliwić regenerację *in situ* zredukowanej formy kofaktorów NAD(P)H, do reakcji dodawano odpowiednio dimetylosulfotlenek (DMSO, 2,5% v/v) i propan-2-ol (2-PrOH, 10% v/v). Spośród przetestowanych biokatalizatorów, komórki *E. coli* zawierające warianty ADH pochodzące z *Lactobacillus kefir* (*E. coli*/Lk-ADH-Lica i *E. coli*/Lk-ADH Prince) umożliwiły ilościowe uzyskanie pożądanego enancjomeru (*R*)-(-)-**3_P1** z doskonałą czystością optyczną (>99% ee) wyznaczoną przy użyciu HPLC wyposażonego w kolumnę z chiralną fazą stacjonarną. Natomiast zastosowanie *E. coli*/ADH-A pozwoliło otrzymać enancjomerycznie czysty (*S*)-(+)-**3_P1** (>99% ee) przy konwersji wynoszącej >99%. Co ciekawe, badania przesiewowe przeprowadzone dla analogu ketonu z podstawnikiem 6-jodo wykazały, że dostępne dehydrogenazy alkoholowe katalizowały reakcję bioredukcji tego związku znacznie mniej efektywnie niż w przypadku opisanego substratu z atomem chloru **2_P1**.



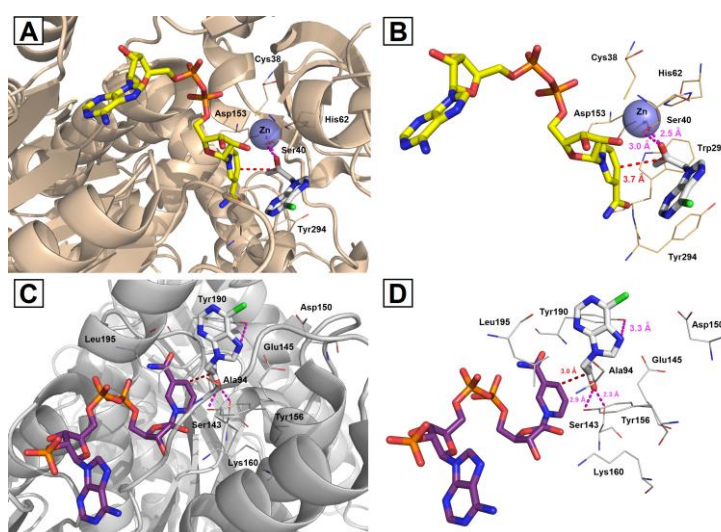
Schemat 3. Stereoselektywna bioredukcja 1-(6-chloro-9*H*-puryn-9-yl)propan-2-onu (**2_P1**), katalizowana z użyciem liofilizowanych komórek *E. coli* zawierających rekombinowane dehydrogenazy alkoholowe (*E. coli*/ADHs).

Ostatnim etapem badań biokatalitycznych z wykorzystaniem *E. coli*/ADH było powiększenie skali procesu przy jednoczesnym zwiększeniu stężenia użytego substratu, co miało na celu poprawę produktywności reakcji, a w efekcie uzyskanie preparatywnych ilości chiralnego prekursora. Biotransformacje przeprowadzono z użyciem 0,4 mmol ketonu **2_P1** w 4 ml mieszaniny reakcyjnej, co odpowiadało 10-krotnie wyższemu stężeniu substratu (100 mM) niż w skali analitycznej (10 mM). Stosując *E. coli*/ADH-A, asymetryczna bioredukcja **2_P1** pozwoliła uzyskać (*S*)-(+)-**3_P1** z 70% wydajnością oraz >99% ee. Natomiast zastosowanie *E. coli*/Lk-ADH Prince jako biokatalizatora umożliwiło wyizolowanie pożądanego (*R*)-(-)-**3_P1** z wydajnością 86% oraz >99%

ee. Warto dodać, że aby uzyskać oba enancjomeryczne alkohole z wyższymi wydajnościami, konieczne było zmodyfikowanie procedury izolacji produktów z surowej mieszaniny poreakcyjnej. W celu zminimalizowania strat masy w skutek doskonałej rozpuszczalności alkoholu w wodzie zrezygnowano z ekstrakcji fazy wodnej przy użyciu rozpuszczalników organicznych. Zamiast tego postanowiono usunąć wodę bezpośrednio poprzez jej azeotropowe odparowanie z toluenem, co nie tylko zwiększyło wydajność procesu, ale również umożliwiło opracowanie bardziej zrównoważonego protokołu izolacji nieracemicznych alkoholi, ograniczającego zużycie szkodliwych rozpuszczalników organicznych.

Chemiczna funkcjonalizacja kluczowego prekursora (*R*)-(-)-**3_P1** została zrealizowana w sekwencji następujących po sobie reakcji: (i) aminolizy (*R*)-(-)-**3_P1** prowadzonej w nasyconym roztworze metanolem amoniaku, (ii) *O*-alkilowania powstałego (2*R*)-1-(6-amino-9*H*-puryn-9-yl)propan-2-olu [(*R*)-(-)-**5_P1**] przy użyciu (dietoksyfosforylo)metylo-4-metylobenzenosulfonianu (**7_P1**) w obecności di-*tert*-butoksydu magnezu [Mg(O*t*Bu)₂] jako zasady w dimetyloformamidzie (DMF), oraz (iii) usunięcia grup alkilowych z estru fosforanowego za pomocą bromotrimetylosilanu (TMSBr) w lodowatym bezwodnym chlorku metylenu (CH₂Cl₂). Proces ten zakończył się pomyślnym otrzymaniem enancjomerycznie wzbogaconego tenofowiru (99% ee) z całkowitą wydajnością wynoszącą 35,9% po pięciu etapach syntezy. Warto podkreślić, że alternatywna ścieżka syntezy oparta na metodologii enzymatycznego rozdzielu kinetycznego nie tylko wymagała dodatkowego etapu chemicznej redukcji ketonu **2_P1** z użyciem borowodoru sodu, ale również prowadziła do uzyskania tenofowiru z istotnie niższą całkowitą wydajnością (13,3%). Co ciekawe, etap hydrolizy octanu (*R*)-(-)-**4_P1** otrzymywanego w wyniku KR racemicznego alkoholu *rac*-**3_P1** zrealizowany został w tych samych warunkach co amonioliza chlorku (*R*)-(-)-**3_P1**, dzięki czemu ścieżka ta i tak została skrócona o jeden etap. Jak się okazało jedną z kluczowych modyfikacji wspólnego dla obu dróg syntezy etapu *O*-alkilowania (*R*)-(-)-**5_P1** było zastosowanie Mg(O*t*Bu)₂ zamiast NaO*t*Bu. Zamiana przeciwnonu w wyżej wymienionej zasadzie umożliwiła uzyskanie odpowiedniego fosfonianu (*R*)-(-)-**8_P1** z wydajnością o 18% wyższą w porównaniu do danych literaturowych.

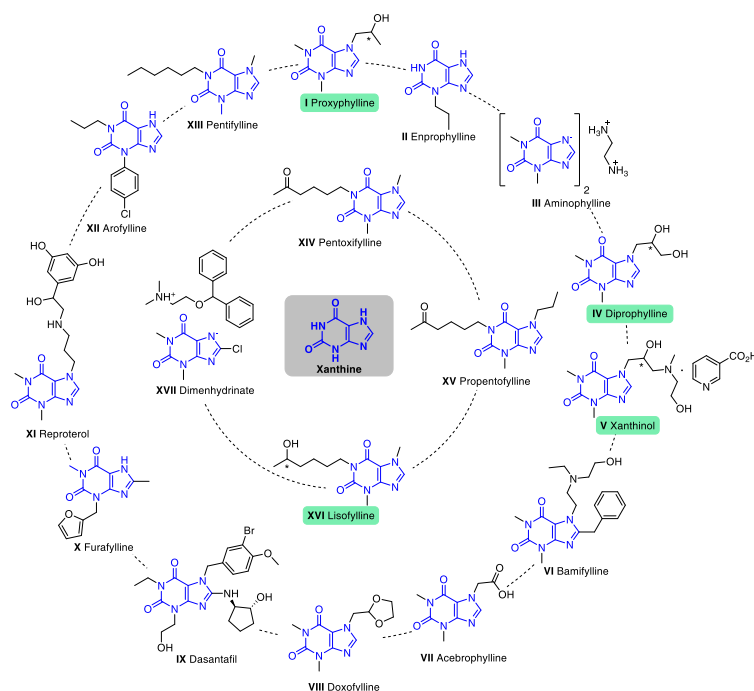
Warto zaznaczyć, że w niniejszej publikacji przedstawiono również wyniki badań obliczeniowych z wykorzystaniem dokowania molekularnego (**Rysunek 10**), które miały na celu potwierdzenie komplementarnej stereoselektywności wykazywanej przez zastosowane dehydrogenazy alkoholowe, w tym ADH z *Rhodococcus ruber* (ADH-A) oraz ADH z *Lactobacillus kefir* (Lk-ADH), względem prochiralnego ketonu **2_P1**. Komputerowe modelowanie oddziaływań białko-ligand pozwoliło na identyfikację kluczowych interakcji oraz zależności strukturalnych, obejmujących zarówno samą kieszeń miejsca wiążącego substraty, jak i położenie specyficznych dla danego enzymu kofaktorów względem związanej cząsteczki ketonu. Analizy te pozwoliły racjonalizować warunki umożliwiające stereopreferencyjny i wysoce selektywny atak anionu wodorotlenkowego: (i) od strony lica *Re* w przypadku NADH zakotwiczonego w strukturze ADH-A oraz (ii) od strony lica *Si* w przypadku NADPH zakotwiczonego w strukturze Lk-ADH. Badania te mogą znacząco przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów reakcji enzymatycznych na poziomie molekularnym, z uwzględnieniem stereokomplementarnych dehydrogenaz alkoholowych jako biokatalizatorów oraz ksenobiotycznych ketonów jako substratów. W efekcie powinny umożliwić w przyszłości projektowanie nowych wariantów enzymów o udoskonalonych właściwościach katalitycznych, w tym lepszej stereoselektywności działania oraz szerszego spektrum substratowego.



Rysunek 10. Trójwymiarowe struktury hipotetycznych kompleksów 1-(6-chloro-9*H*-puryno-9-yl)propan-2-onu (**2_P1**) ze stereokomplementarnymi dehydrogenazami alkoholowymi, ADH-A (kod PDB: 2XAA; panel **A–B**) oraz Lk-ADH (kod PDB: 4RF2; panel **C–D**), uwzględniająca kluczowe oddziaływania między substratem a resztami aminokwasowymi oraz kofaktorami zlokalizowanymi w centrum aktywnym każdego z enzymów. Szkielet węglowy cząsteczki substratu zaznaczono kolorem szarym, a kofaktora fioletowym. Kluczowe wiązania wodorowe zostały zaznaczone różowymi przerywanymi liniami.

4.3.3.3. Nowe chemoenzymatyczne strategie w asymetrycznej syntezie substancji czynnych leków opartych na pochodnych ksantyny (P4–P5 oraz P7–P9).

Układ pierścieniowy ksantyny jest wszechobecnym motywem strukturalnym wielu naturalnych produktów oraz ich metabolitów, wykazujących głównie aktywność stymulującą ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Do najbardziej znanych przedstawicieli tej grupy związków należą purynowe alkaloidy roślinne, takie jak kofeina, teobromina i teofilina. Większość naturalnie występujących ksantyn (2,6-diketo-1*H*-puryn) wykazuje szerokie spektrum korzystnych aktywności biologicznych, które mają kluczowe znaczenie dla organizmu człowieka. Dzięki temu ksantyny stanowią niezwykle istotną klasę stosunkowo tanich, łatwo dostępnych oraz zrównoważonych syntonów heterocyklicznych, powszechnie wykorzystywanych w produkcji leków. Z kolei główne działania farmakologiczne farmaceutyków opartych na pochodnych ksantyny obejmują: (i) inhibowanie aktywności katalitycznej tkankowych fosfodiesteraz (PDE), (ii) antagonistyczne działanie na receptory adenozynowe (A1, A2A, A2B i A3), (iii) hamowanie uwalniania wewnątrzkomórkowych jonów wapnia oraz (iv) aktywację deacetylaz histonowych (HDAC).^[25] W tym kontekście różne syntetyczne pochodne 1,3-dialkiloksantyny są cenione w farmakologii za swoje działanie rozszerzające oskrzela i naczynia krwionośne, odgrywając tym samym istotną rolę w leczeniu chorób układu oddechowego [np. przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), astmy oskrzelowej, etc.] oraz dysfunkcji układu sercowo-naczyniowego (np. chorób naczyń obwodowych i mózgowych, choroby wieńcowej, etc.). Kilka farmaceutycznie istotnych związków zawierających motyw ksantynowy przedstawiono na **Rysunku 11**. Spośród siedemnastu zaprezentowanych poniżej API, pięć zawiera chiralny atom węgla, co sprawia, że ich aktywność farmakologiczna zależy od właściwej konfiguracji absolutnej tego centrum stereogenicznego. Zatem zgodnie z najnowszymi wytycznymi FDA oraz EMA,^[26] ich synteza powinna być prowadzona z uwzględnieniem odpowiedniej stereochemii.

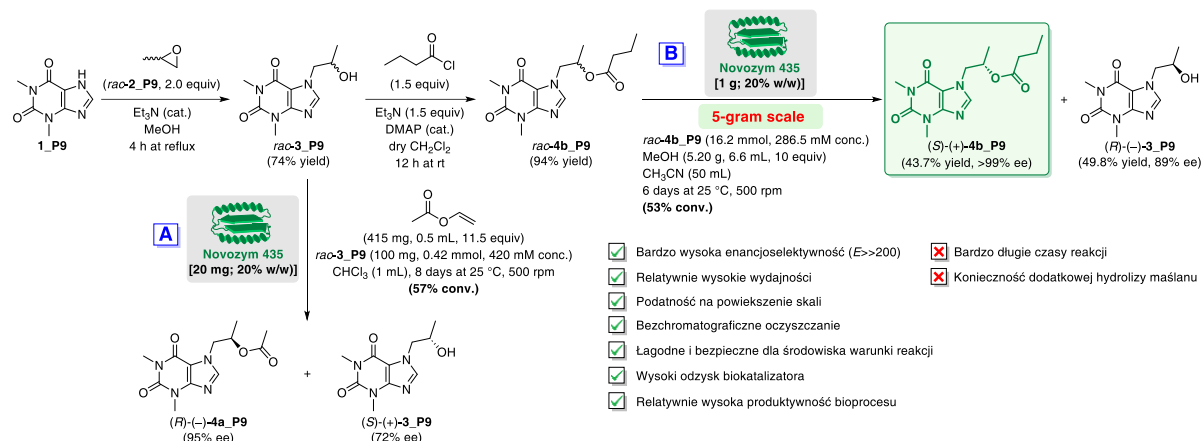


Rysunek 11. Przykłady substancji czynnych leków (API) opartych na strukturze ksantyny. Zielonym tłem wyróżniono nazwy substancji czynnych leków, które zostały przeze mnie otrzymane w postaci enancjomerycznie czystej z zastosowaniem chemoenzymatycznych metod syntezy i stanowią istotny element opisywanego przeze mnie osiągnięcia habilitacyjnego.

W niniejszym cyklu prac, opublikowanych w artykułach naukowych **P4–P5** oraz **P7–P9** w latach 2016–2022, przedstawiam skuteczne zastosowanie chemoenzymatycznych metod syntezy wybranych enancjomerycznie czystych pochodnych 1,3-dialkiloksantyny, znajdujących zastosowanie jako składniki aktywne leków, takich jak proksyfilina (**I**), diprofilina (**IV**), nikotynian ksantynolu (**V**) oraz lizofilina (**XVI**). Warto podkreślić, że w okresie poprzedzającym opublikowanie wyników moich badań preparatywna synteza wspomnianych wyżej substancji czynnych leków w postaci optycznie czystej z wykorzystaniem biokatalizatorów nie była opisana w literaturze naukowej. Innowacyjnym aspektem tych badań było jednak nie tylko opracowanie nowych ścieżek syntezy ww. API, ale także określenie potencjału biokatalitycznego komercyjnie dostępnych hydrolaz oraz rekombinowanych dehydrogenaz alkoholowych (ADH) otrzymywanych w warunkach laboratoryjnych we współpracy z grupą naukową Prof. Wolfganga Kroutil’a z Uniwersytetu Karola i Franciszka w Grazu (Austria).

Potencjał ten zbadano w kontekście nowego, dotychczas nieprzebadanego spektrum substratowego, obejmującego odpowiednie racemiczne alkohole II-rzędowe, ich estry i/lub prochiralne ketony zawierające podstawnik 1,3-dialkiloksantynowy.

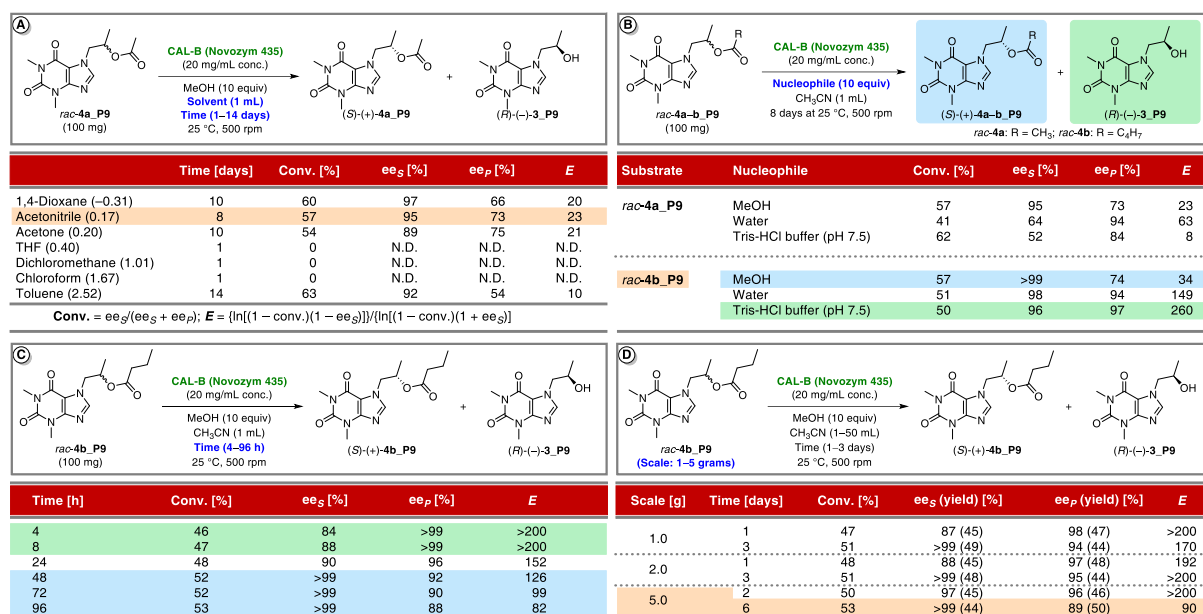
Głównym celem pierwszej części badań było opracowanie wydajnej i wysoce selektywnej chemoenzymatycznej metody otrzymywania czystych enancjomerów proksyfiliny – farmakologicznie aktywnego składnika leków stosowanych w terapii schorzeń górnych dolnych oddechowych (m.in. astmy oskrzelowej, rozedmy płuc, POChP, etc.) oraz chorób układu sercowo-naczyniowego (m.in. nadciśnienia tętniczego). Metoda ta opierała się na enzymatycznie katalizowanym rozdziale kinetycznym odpowiednich mieszanin racemicznych (**Schemat 4**).



Schemat 4. Chemoenzymatyczna synteza optycznie czystego maślanu proksyfiliny [(S)-(+)-4b_P9] z zastosowaniem lipaz.

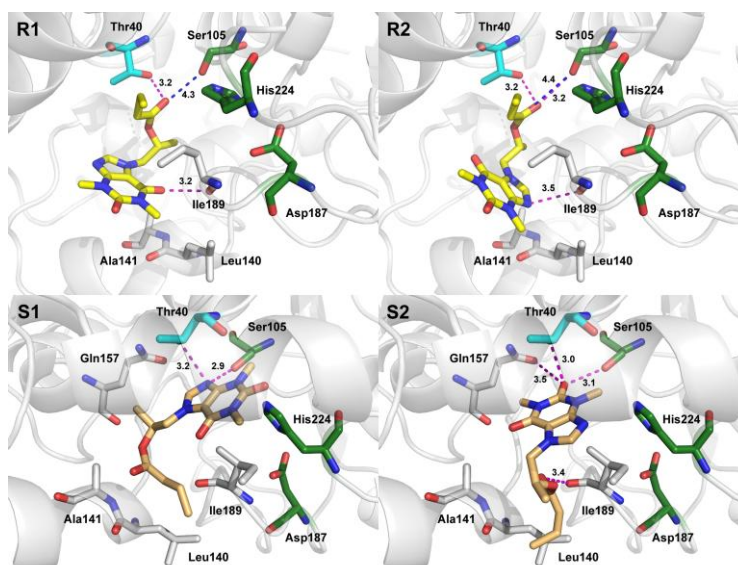
Zastosowano dwa podejścia syntetyczne z użyciem lipaz jako biokatalizatorów asymetrycznych przekształceń: (i) kinetycznie kontrolowaną enancjoselektywną transestryfikację racemicznej proksyfiliny (**rac-3_P9**) z wykorzystaniem octanu winylu jako donora grupy acetylowej w czystym rozpuszczalniku organicznym (**Schemat 5A**) oraz (ii) kinetycznie kontrolowaną enancjoselektywną hydrolizę i/lub metanolizę odpowiednich racemicznych pochodnych estrowych – octanu **rac-4a_P9** lub maślanu **rac-4b_P9** proksyfiliny – w dwuskładnikowych układach homofazowych: acetonitryl-woda, acetonitryl-bufor Tris-HCl (pH 7,5) oraz acetonitryl-metanol (**Schemat 5B**). Przedmiotem szczegółowych badań w ramach tego zadania była optymalizacja warunków prowadzenia procesu enzymatycznego (**Schemat 5A–D**), która obejmowała głównie: (i) selekcję odpowiednio aktywnych i enancjoselektywnych lipaz, (ii) dobór optymalnego rozpuszczalnika organicznego, w tym analizę wpływu środowiska reakcji na kinetykę i wydajność procesu oraz możliwość izolacji produktów reakcji w czystej postaci bez konieczności stosowania chromatografii kolumnowej, a także (iii) skalowanie prowadzonych chemoenzymatycznych procesów do ilości 5 gramów użytego racemicznego substratu, co pozwoliło na bezpośrednie określenie ekonomicznej efektywności opracowanej metody syntezy. Dodatkowo przeprowadzono testy stabilności operacyjnej wybranego preparatu enzymatycznego w warunkach procesowych, mające na celu ocenę możliwości jego wielokrotnego zastosowania w procesie okresowym. Z punktu widzenia wydajności prowadzonych biotransformacji, minimalizacji czasu ich trwania oraz uzyskiwania bardzo wysokich wartości nadmiarów enancjomerycznych (% ee) produktów enzymatycznego rozdziału kinetycznego, najlepsze rezultaty osiągnięto poprzez zastosowanie enancjoselektywnej metanolizy racemicznego maślanu proksyfiliny (**rac-4b_P9**), katalizowanej handlowo dostępnym immobilizowanym preparatem lipazy B z *Candida antarctica* (Novozym 435), zawieszonym w mieszaninie alkoholu z acetonitrylem jako współrozpuszczalnikiem (**Schemat 5A–B**). Dalsze szczegółowe badania kinetyki tego procesu pozwoliły na określenie optymalnego momentu zakończenia reakcji tak, aby izolowane produkty KR uzyskać w postaci homochiralnej (>99% ee). Dla optycznie czystej proksyfiliny (**(R)-(-)-3_P9**) optymalny czas reakcji wynosił od 4 do 8 godzin (46–47% konwersji), natomiast dla jej (**S**)-maślanu (**(S)-(+)-4b_P9**) od 48 do 96 godzin (52–53% konwersji) (**Schemat 5B**).

W optymalnych warunkach enzymatycznego KR bioprodukt został poddany skalowaniu w celu oceny efektywności rozdziału enancjomerów w reakcjach prowadzonych z użyciem odpowiednio 1, 2 oraz 5 gramów racemicznego maślanu **rac-4b_P9** (**Schemat 5D**). Dla największej ilości testowanego substratu uzyskano z powodzeniem enancjomerycznie czysty maślan proksyfiliny (**(S)-(+)-4b_P9**) (>99% ee) z wydajnością wynoszącą 44%. Niestety przy tej konwersji przeciwny enancjomer (**(R)-(-)-3_P9**) charakteryzował się dużo niższym nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 89%. Należy w tym miejscu wyraźnie podkreślić, że w skali preparatywnej skutecznie wykorzystano różnicę w rozpuszczalności proksyfiliny (**(R)-(-)-3_P9**) oraz jej maślanu (**(S)-(+)-4b_P9**) w acetonitrylu. Dzięki temu możliwe było wydzielenie obu związków z mieszaniny poreakcyjnej bez konieczności stosowania chromatografii kolumnowej.



Schemat 5. Przykładowe kluczowe etapy optymalizacji rozdzielu kinetycznego racemicznych estrów proksyfiliny (*rac-4a-b_P9*) katalizowanego lipazą B z *Candida antarctica* z użyciem dwuskładnikowych układów homofazowych jako mediów reakcyjnych.

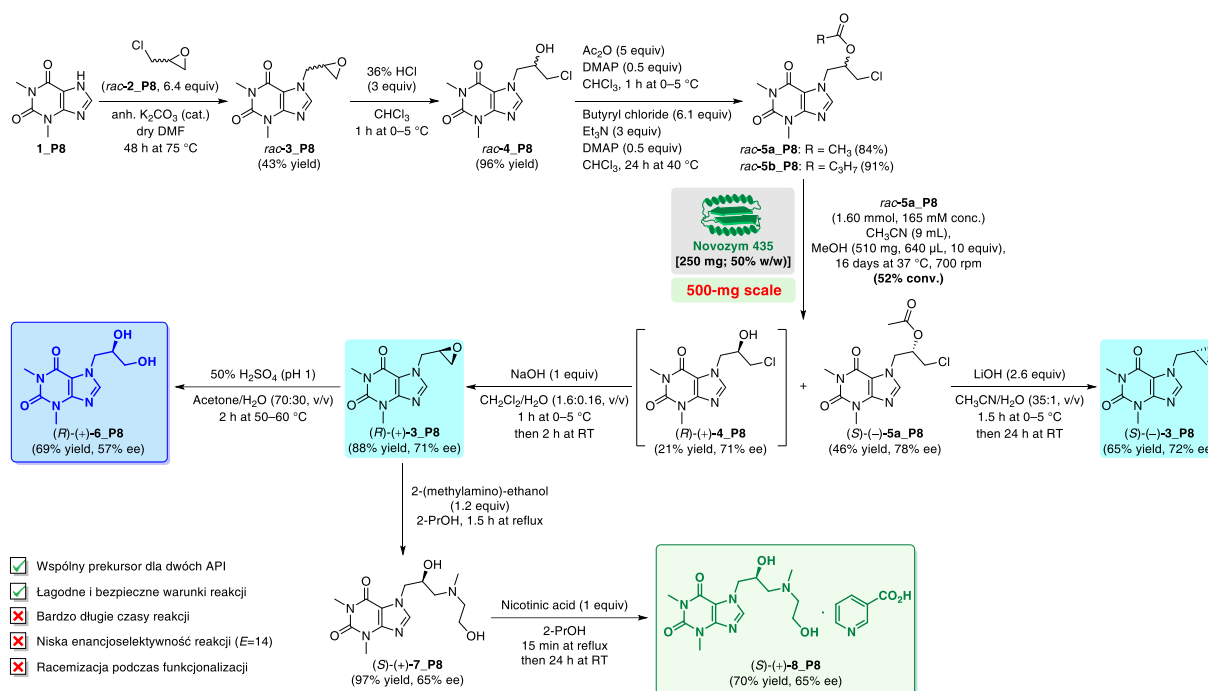
Ponadto, z perspektywy badań podstawowych, których celem było zgłębienie stereochemii katalizowanych enzymatycznie reakcji, a co za tym idzie także ich mechanizmów na poziomie molekularnym, za znaczący sukces badawczy należy uznać przeprowadzenie teoretycznej racjonalizacji (*R*)-stereoselektywności użytych lipaz wobec enancjomerów rozdzielanego maślanu proksyfiliny (*rac-4b_P9*). Zadanie to zostało zrealizowane przy użyciu oprogramowania komputerowego do modelowania molekularnego oddziaływań typu białko-ligand. Kluczowe oddziaływania pomiędzy pojedynczymi enancjomerami rozdzielanego enzymatycznie racemicznego maślanu proksyfiliny (*rac-4b_P9*) a centrum aktywnym lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B), które wpływają na (*R*)-selektywność stereochemicznego przebiegu katalizowanej metanolizy, przedstawiono na **Rysunku 12**. Z analizy hipotetycznych kompleksów białko-ligand wynika, że tylko w przypadku (*R*)-enancjomeru grupa estrowa znajduje się w bliższej odległości od nukleofilowej seryny, należącej do tzw. "triady katalitycznej" CAL-B (Asp187-His224-Ser105), niż w przypadku jego enancjomerycznego odbicia lustrzanego. Dzięki temu możliwe jest powstanie "katalitycznie produktywnych konformacji", co skutkuje preferencyjnie szybszą biotransformacją tego izomeru optycznego.



Rysunek 12. Trójwymiarowe struktury hipotetycznych kompleksów lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B, kod PDB: 1TCA) z (*R*)-enancjomerem (pane R1–R2) oraz (*S*)-enancjomerem (pane S1–S2) racemicznego maślanu 1-(1,3-dimetylo-2,6-diokso-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)propan-2-ylu (*rac-4b_P9*) przedstawiają kluczowe oddziaływania między substratem, a resztami aminokwasowymi centrum aktywnego CAL-B. Reszty aminokwasowe tzw. "triady katalitycznej" CAL-B (Asp187-His224-Ser105) wyróżniono za pomocą zielonych pałeczek. Szkielet węglowy (*R*)-enancjomeru substratu zaznaczono kolorem żółtym, a (*S*)-enancjomeru – kolorem złotym. Kluczowe wiązania wodorowe oznaczono różowymi przerywanymi liniami.

W opublikowanej pracy wykazałem, że zastosowanie darmowego programu AutoDock Vina, bazującego na standardowym algorytmie genetycznym Lamarckian'a, może z powodzeniem służyć do badań nad mechanizmem katalitycznym lipaz oraz stanowić uniwersalne narzędzie do przewidywania stereochemicznego przebiegu reakcji katalizowanych przez te enzymy. Wykazałem tym samym, że narzędzie to może stanowić potencjalnie pomocne rozwiązanie w sytuacjach, gdy brakuje danych literaturowych dotyczących optycznego czynnego związku i/lub gdy inne metody badawcze okazują się niewystarczające w kontekście ustalenia konfiguracji absolutnej produktów reakcji katalizowanych przez enzymy. Warto podkreślić, że w momencie publikacji niniejszej pracy (w 2016 r.) liczba dostępnych pozycji literaturowych raportujących wykorzystanie technik *in silico*, w tym szczególnie dokonywania molekularnego, do racjonalizacji stereochemicznego przebiegu reakcji enzymatycznych była bardzo ograniczona. Fakt ten dodatkowo podkreślił istotne walory badawcze rezultatów przedstawionych w **publikacji P9**.

Strategia chemoenzymatycznej syntezy proksyfiliny okazała się skuteczna, toteż w kolejnych badaniach postanowiłem rozszerzyć zakres stosowalności opracowanej przeze mnie metody na kolejne pochodne ksantyny, które mogłyby znaleźć zastosowanie w produkcji broncho- i wazodylatorów. W **publikacji P8** przedstawiłem nową asymetryczną metodę syntezy optycznie czynnej diprofiliny (**IV**) oraz nikotynianu ksantynolu (**V**) z zastosowaniem immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (Novozym 435) jako enancjoselektywnego biokatalizatora rozdziału kinetycznego racemicznego octanu 1-chloro-3-(1,3-dimetylo-2,6-diokso-1,2,3,6-tetrahydro-7*H*-puryn-7-yl)propan-2-ylu (*rac*-**5a_P8**) (**Schemat 6**). Co istotne, zaproponowany przeze mnie "związek węzłowy" (wyróżniony turkusowym tłem), mimo że stanowi kluczowy prekursor obu wymienionych API, nigdy wcześniej nie został otrzymany z zastosowaniem metod enzymatycznych ani wykorzystany bezpośrednio w syntezie enancjomerycznej diprofiliny.



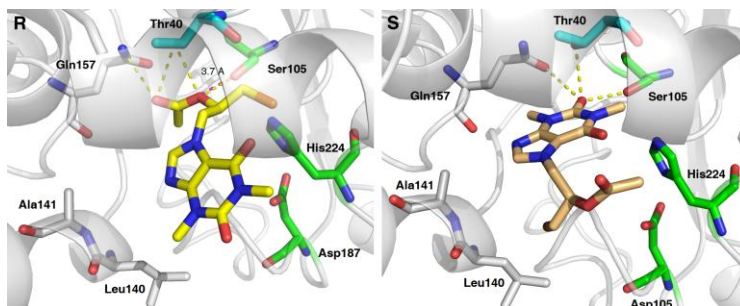
Schemat 6. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconej (*R*)-diprofiliny [(*R*)-(+)-**6_P8**] oraz nikotynianu (*S*)-ksantynolu [(*S*)-(+)-**8_P8**] z zastosowaniem lipaz jako biokatalizatorów.

Co więcej, opublikowane w literaturze naukowej metody syntezy obu tych leków były obciążone licznymi wadami, w tym m.in. koniecznością zastosowania kosztownych, komercyjnie dostępnych chiralnych bloków budulcowych, takich jak (R)- lub (S)-3-chloro-1,2-propanodiol w przypadku enancjomerycznej diprofiliny^[27] oraz (S)-(+)-epichlorohydryny w przypadku (R)-(-)-nikotynianu ksantynolu.^[28] Alternatywny protokół otrzymywania (R)-(-)-nikotynianu ksantynolu,^[29] polegający na żmudnej i mało wydajnej krystalizacji preferencyjnej odpowiednich diastereoizomerycznych soli ksantynolu utworzonych z wykorzystaniem kwasu (1S)-(+)-10-kamforsulfonowego, wymagał dodatkowej wymiany kwaśnych anionów na kolumnie wypełnionej odpowiednią żywicą Amberlite CG-400. Taka procedura była złożona i mało atrakcyjna z punktu widzenia zastosowań przemysłowych.

Uwzględniając powyższe fakty, znalazłem, że otrzymanie kluczowego prekursora z wykorzystaniem metod biotechnologicznych, a następnie jego chemiczna funkcjonalizacja w kierunku obu tytułowych leków, całkowicie spełni przesłanki nowości oraz znacząco uprości proces ich syntezy. W ramach tych badań zastosowałem dwa alternatywne podejścia syntetyczne. Pierwsze polegało na sprawdzeniu możliwości wykorzystania enzymatycznej

transestryfikacji racemicznej chlorohydryny *rac*-4_P8 z użyciem octanu winylu jako donora grupy acetylowej. Drugie podejście opierało się na enzymatycznej hydrolizie lub metanolizie odpowiednich estrów racemicznej chlorohydryny – octanu *rac*-5a_P8 oraz maślanu *rac*-5b_P8. Oba typy reakcji prowadzono w warunkach kontroli kinetycznej, wykorzystując lipazy o różnej aktywności katalitycznej (500–30 000 U/g) zawieszone w rozpuszczalnikach organicznych oraz ich mieszaninach z wodą lub metanolem. Najlepsze wyniki uzyskano w przypadku enzymatycznej metanolizy racemicznego octanu chlorohydryny *rac*-5a_P8. Jednak mimo to, uzyskane nadmiary enancjomeryczne izolowanych produktów KR należy ocenić jako przeciętne, osiągające wartości w przedziale 71–78% ee. Niestety sam bioprocess nie tylko charakteryzował się niską enancjoselektywnością ($E=14$), ale także trwał bardzo długo (16 dni), aby osiągnąć odpowiednio wysoki stopień przereagowania substratu w produkt (52% konwersji). Dodatkowo napotkane problemy podczas następczej funkcjonalizacji kluczowego prekursora (*R*)-(+)-4_P8, związane z racemizacją produktów izolowanych na poszczególnych etapach syntezy, prowadziły do znacznego spadku czystości optycznej syntetyzowanych API. W efekcie otrzymano (*R*)-diprofilinę [(*R*)-(+)-6_P8] z 57% ee oraz nikotynian (*S*)-ksantynolu [(*S*)-(+)-8_P8] z 65% ee.

Niska enancjoselektywność zastosowanego biokatalizatora została dodatkowo potwierdzona badaniami komputerowymi z zakresu modelowania molekularnego oddziaływań w kompleksach białko-ligand. Wyniki dokowania obu enancjomerów rozdzielanej pochodnej 1,3-dimetyloksantynowej w centrum aktywnym CAL-B wykazały niewielką różnicę w energiach tworzenia się kompleksów pomiędzy poszczególnymi izomerami optycznymi a badanym enzymem (**Rysunek 13**). Co więcej, liczba aktywnych katalitycznie konformacji, umożliwiających odpowiednie ułożenie reaktywnych grup funkcyjnych cząsteczek substratu *rac*-5a_P8 w dostatecznie bliskim otoczeniu aminokwasów triady katalitycznej, nie wykazywała wyraźnej przewagi na korzyść szybciej transformowanego stereoisomeru. Niejednoznaczność wyników dokowania w tym zakresie dobitnie wskazuje, że wybrany enzym nie stanowił idealnego biokatalizatora dla procesu rozdziału enancjomerów racemicznego octanu *rac*-5a_P8.

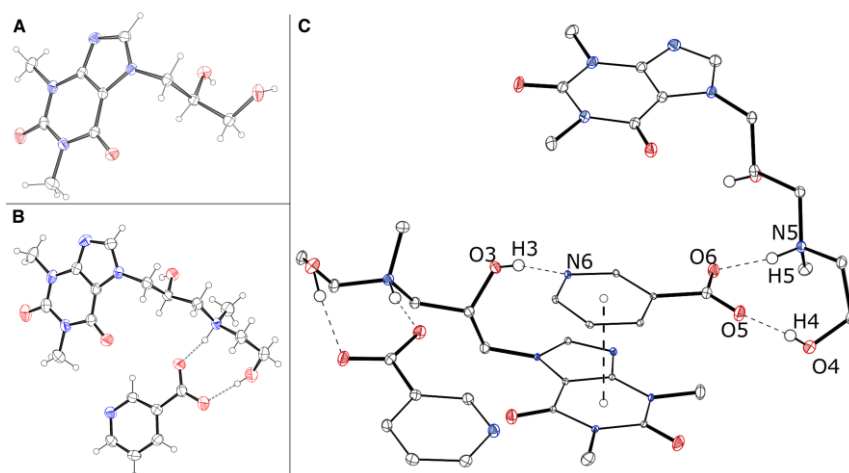


Rysunek 13. Budowa hipotetycznych kompleksów lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B, kod PDB: 1TCA) z (*R*)-enancjomerem (lewy panel) oraz (*S*)-enancjomerem (prawy panel) racemicznego octanu 1-chloro-3-(1,3-dimetylo-2,6-dioksa-1,2,3,6-tetrahydro-7H-puryn-7-yl)propan-2-ylu (*rac*-5a_P8). Szkielet węglowy (*R*)-enancjomeru substratu zaznaczono kolorem żółtym, a (*S*)-enancjomer – kolorem złotym. Kluczowe wiązania wodorowe przedstawiono jako żółte przerywane linie.

W publikacji P8 przedstawiono również próby opracowania alternatywnych metod analitycznych do określania czystości enancjomerycznej nieracemicznego (*S*)-ksantynolu [(*S*)-(+)-7_P8]. W tym celu zastosowano metody wykorzystujące spektroskopię ^1H NMR z użyciem chiralnych odczynników solwatujących (CSAs), takich jak (*S*)-(+)-1-(9-antryl)-2,2,2-trifluoroetanol oraz (*S*)-(-)-1,1'-bi(2-naftol) [(*S*)-BINOL]. Rezultaty obu eksperymentów skorelowano z wynikami ilościowych pomiarów przeprowadzonych za pomocą HPLC, wyposażonego w kolumnę z odpowiednią chiralną fazą stacjonarną. Wykazano, że zarówno zastosowanie optycznie czystej pochodnej antracenu, jak i atropoizomerycznego (*S*)-BINOL-u nie pozwala na rzetelne wyznaczenie nadmiaru enancjomerycznego tytułowego API. Bezpośrednim powodem niepowodzeń w tym zakresie były niewystarczająco dobrze rozdzielone sygnały rezonansowe odpowiednich protonów ksantynolu na zarejestrowanych widmach ^1H NMR, co skutkowało zawyżeniem wartości obliczanych nadmiarów enancjomerycznych w porównaniu z wartościami uzyskanymi na podstawie analizy przeprowadzonej za pomocą chiralnego HPLC.

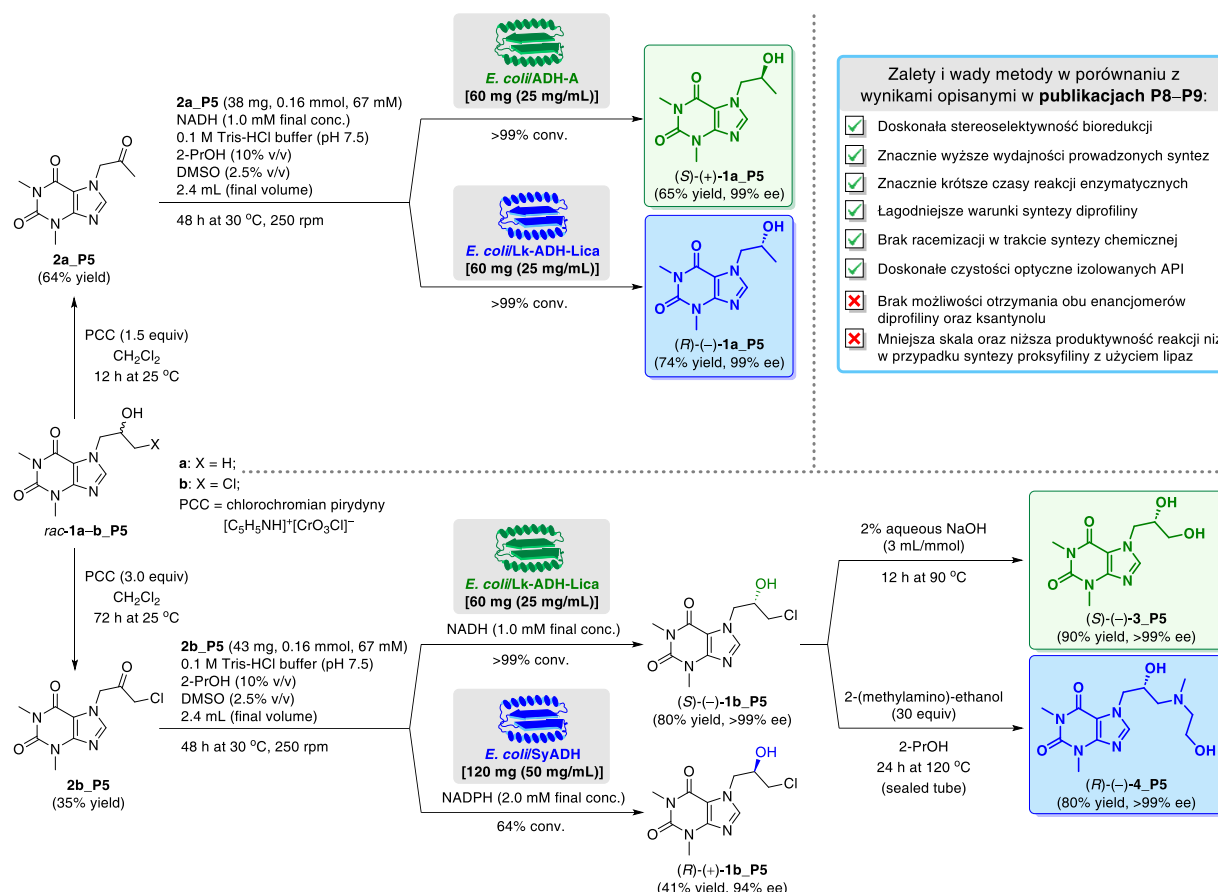
Walory badawczo-poznawcze niniejszej pracy zostały dodatkowo wzmocnione wynikami badań rentgenostrukturalnych monokryształów obu zsyntetyzowanych API (**Rysunek 14A–C**), w tym szczególnie niepublikowaną dotąd pierwszą strukturą krystaliczną optycznie czynnego nikotynianu ksantynolu (**Rysunek 14B–C**). Badania strukturalne przeprowadzone metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) przez dr. hab. inż., prof. uczelni Macieja Drankę z Katedry Chemii Nieorganicznej (WCh PW) ujawniły interesujące właściwości krystaliczne (*S*)-(+)-7_P8. Zaobserwowano bowiem istnienie bardzo silnych wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami kwasu nikotynowego a łańcuchem bocznym ksantynolu. W opisywanym kontekście jednostka asymetryczna składa się z anionu nikotynianowego oraz kationu ksantynolowego, które tworzą kwas...aminoalkoholowy pierścień heteroaromatyczny typu $R_2^2(9)$ za

pośrednictwem dwóch synergistycznych wiązań wodorowych: N–H $\cdots$ O oraz O–H $\cdots$ O. Zaobserwowane wiązania wodorowe należą do specyficznej klasy podwójnie jonowych wiązań wodorowych, które występują pomiędzy kationami i anionami. Obecność ładunku jonowego znacznie zwiększa siłę takich wiązań, która w tego typu przypadkach może wynosić od 5 do 35 kcal/mol, co odpowiada około jednej trzeciej siły wiązań kowalencyjnych. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym siłę tych wiązań, oprócz dominującego przyciągania elektrostatycznego, jest rezonans pierścienia heterocyklicznego, co zostało potwierdzone w literaturze.^[30] Dominujący charakter kowalencyjny tych wiązań wodorowych wynika głównie z klasycznego przyciągania dipol-dipol, ponieważ rezonans redystrybuje gęstość elektronową i zwiększa momenty dipolowe w poszczególnych monomerach. Warto podkreślić, że tworzenie trwałych par jonowych stabilizuje powstawanie drugiego pseudoasymetrycznego centrum stereogenicznego przy atomie azotu w podstawniku 2-(metyloamino)-etanolowym, co jest skutkiem zahamowania efektu tzw. "inwersji parasolowej" na atomie azotu. Ponadto sąsiednie jednostki elektroujemne, połączone parą wiązań wodorowych N5–H5 $\cdots$ O6 oraz O4–H4 $\cdots$ O5, są dodatkowo stabilizowane przez oddziaływania typu π - π , wspierane przez słabe wiązanie wodorowe O3–H3 $\cdots$ N6 między atomem azotu kwasu nikotynowego a grupą hydroksylową ksantynolu (**Rysunek 14C**). W efekcie, wzdłuż osi Y, tworzy się niekowalencyjny łańcuch słabo związanych par jonowych. Obserwowana geometria wyraźnie wskazuje na zdolność fragmentów teofiliny do oddziaływania z pierścieniami heteroaromatycznymi (w tym przypadku pirydyną) poprzez oddziaływania typu π -stacking, które są dodatkowo wspierane przez geometrycznie dopasowaną grupę hydroksylową z alifatycznego łańcucha bocznego. Tego rodzaju sprzężone interakcje mogą mieć istotne znaczenie w modelowaniu centrów aktywnych enzymów oraz w rozpoznawaniu biomolekularnym, co znajduje zastosowanie m.in. w projektowaniu nowych leków.



Rysunek 14. ORTEP-y (R)-diprofiliny [(R)-(+)-**6_P8**] (**A**) oraz nikotynianu [(S)-(+)-**8_P8**] (**B–C**). Struktury krystaliczne odpowiednio (R)-(+)-**6_P8** (CCDC-1815550) oraz (S)-(+)-**8_P8** (CCDC-2016376) zdeponowano w Cambridge Crystallographic Data Centre. Elipsoidy przedstawiono z 50% poziomem prawdopodobieństwa (C czarny, H szary, N niebieski, O czerwony), a atomy wodoru pominięto dla przejrzystości. Rycina **C** przedstawia asymetryczną jednostkę optycznie czynnego (S)-(+)-**8_P8**, ukazującą tworzenie pary jonowej stabilizowanej bardzo silnymi wiązaniami wodorowymi pomiędzy anionem nikotynianowym, IV-rzędowym atomem azotu oraz grupą hydroksylową fragmentu 2-(metyloamino)-etanolowego. Dodatkowo, obecny jest π -stacking pomiędzy teofiliną (1,3-dimetyloksantyną) a pierścieniem pirydyny.

Niezrażony początkowymi niepowodzeniami w otrzymaniu ksantynowych pochodnych API w postaci enancjomerycznie czystej oraz ograniczeniami wydajności, które nie przekraczały górnego limitu 50% ze względu na charakter procesów opartych na rozdziale kinetycznym, skierowałem swoje dalsze wysiłki syntetyczne na desymetryzację odpowiednich prochiralnych pochodnych. Wyniki badań dotyczących opracowania udoskonalonej chemoenzymatycznej metody syntezy obu enancjomerów proksyfiliny, (R)-ksantynolu oraz (S)-diprofiliny przedstawiłem w **publikacji P5** (**Schemat 7**). W początkowej fazie badań przeprowadziłem szczegółowe testy aktywności katalitycznej oraz stereoselektywności rekombinowanych dehydrogenaz alkoholowych jako biokatalizatorów transwodorowania odpowiednich prochiralnych ketonów **2a–b_P5**. Do tego celu wykorzystałem tę samą bibliotekę liofilizowanych komórek *Escherichia coli* zawierających rekombinowane dehydrogenazy alkoholowe (*E. coli*/ADHs), co w przypadku syntezy tenofowiru (zob. **publikacja P5**). Oprócz *E. coli*/ADHs przetestowałem również potencjał biokatalityczny całych komórek dzikich szczepów mikroorganizmów z rodzajów *Komagataella phaffii*/*Pichia pastoris*, *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp. oraz *Actinomyces* sp., ale wyniki bioredukcji **2a–b_P5** z ich udziałem nie przyniosły pożądanych efektów. Dla najskuteczniej działających stereokomplementarnych biokatalizatorów biotransformacje zostały następnie skutecznie powiększone do skali 0,16 mmol zastosowanych prochiralnych substratów **2a–b_P5**, co w przypadku bioredukcji α -chloroketonu **2b_P5** pozwoliło na uzyskanie optycznie czystej (S)-chlorohydryny (S)-(-)-**1b_P5** w ilości niezbędnej do sfunkcjonalizowania jej w kierunku optycznie czystej (S)-diprofiliny [(S)-(-)-**3_P5**] oraz (R)-ksantynolu [(R)-(-)-**4_P5**].



Schemat 7. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerów proksyfiliny [(S)-(+)-1a_P5 oraz (R)-(-)-1a_P5], (S)-diprofiliny [(S)-(-)-3_P5] oraz (R)-ksantynolu [(R)-(-)-4_P5] z zastosowaniem dehydrogenaz alkoholowych jako biokatalizatorów.

Górna ścieżka opracowanej przeze mnie syntezy pozwoliła na uzyskanie obu enancjomerów proksyfiliny [(S)-(+)-1a_P5 oraz (R)-(-)-1a_P5] w formie praktycznie czystej optycznie (99% ee), z konwersją przekraczającą 99% oraz wydajnościami w zakresie od 65% do 74%, w zależności od zastosowanego biokatalizatora. Kluczowymi preparatami enzymatycznymi w tym przypadku okazały się (S)-selektywna dehydrogenaza alkoholowa z *Rhodococcus ruber* (*E. coli*/ADH-A) oraz (R)-selektywny wariant ADH wyprowadzony z pałeczek kwasu mlekowego *Lactobacillus kefir* (*E. coli*/Lk-ADH Lica).

Z kolei optycznie czystą (S)-diprofilinę [(S)-(-)-3_P5] oraz (R)-ksantynol [(R)-(-)-4_P5] otrzymano ze wspólnego chiralnego prekursora (S)-(-)-1b_P5, uzyskanego w formie homochiralnej (>99% ee) z 80% wydajnością w wyniku bioredukcji α -chloroketonu 2b_P5 katalizowanej przez *E. coli*/Lk-ADH Lica. Warto podkreślić, że (S)-diprofilina [(S)-(-)-3_P5] została zsyntetyzowana z wydajnością wynoszącą 90% w reakcji podstawienia atomu chloru anionem hydroksylowym w środowisku zasadowym. Zastosowanie 2% wodnego roztworu NaOH umożliwiło wyizolowanie pożądanego API bez utraty czystości optycznej, co stanowi znaczną przewagę nad wcześniej opisaną procedurą hydrolizy odpowiedniej chlorohydryny prowadzoną w środowisku kwaśnym. Dla przypomnienia, procedura z zastosowaniem 50% roztworu H₂SO₄ była obciążona znaczną erozją nadmiaru enancjomerycznego, która osiągała $\Delta\%$ ee = 14. Syntezę optycznie czystego (R)-ksantynolu [(R)-(-)-4_P5] przeprowadzono poddając aminolizie chlorohydrynę (S)-(-)-1b_P5 z wykorzystaniem 2-(metyloamino)-etanolu w propan-2-olu w szklanym reaktorze ciśnieniowym. W wyniku tej reakcji otrzymano (R)-enancjomer tytułowego API z 97% wydajnością oraz nadmiarem enancjomerycznym >99%. Co interesujące, zastosowanie znacznie większego ekwiwalentu molowego 2-(metyloamino)-etanolu okazało się skuteczniejsze w porównaniu z wariantem reakcji opisanym w publikacji P8, w trakcie której dochodziło do racemizacji produktu ($\Delta\%$ ee = 6).

Podsumowując, zmodyfikowana metoda syntezy wspomnianych API zapewniła znaczącą poprawę nie tylko w zakresie wydajności syntezy tytułowych substancji czynnych leków, ale także w czystości optycznej, z jaką uzyskiwano enancjomerycznie wzbogacone produkty. Warto podkreślić, że wszystkie chiralne API uzyskane w ramach tej metody charakteryzowały się wydajnościami przekraczającymi 65% oraz nadmiarami enancjomerycznymi w zakresie 99–99,9% ee. Takie rezultaty stanowią niewątpliwą sukces, wyróżniający się na tle dostępnych danych literaturowych.

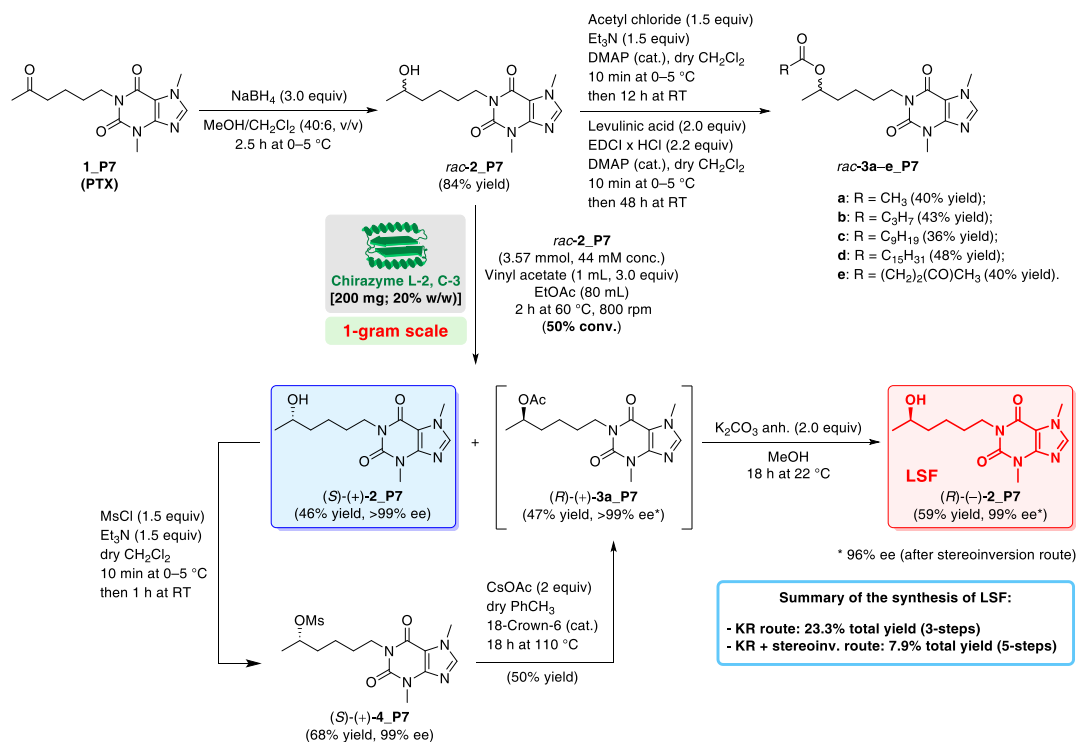
Kontynuację badań nad opracowaniem chemoenzymatycznych syntez chiralnych leków pochodnych ksantyny stanowiły wyniki opublikowane w publikacjach P4 oraz P7. Dotyczyły one otrzymywania

enancjomerycznie czystej lizofiliny (LSF) – prototypowego leku o bardzo silnych właściwościach przeciwzapalnych i immunomodulujących,^[31] o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu różnych zaburzeń autoimmunologicznych, takich jak eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia,^[32] choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. *graft-versus-host disease*, GVHD),^[33] choroby zapalne jelit (np. choroba Leśniowskiego-Crohna),^[34] cukrzyca insulinozależna (typu 1),^[35] astma oskrzelowa,^[36] a także w łagodzeniu skutków ubocznych chemioterapii nowotworów, takich jak infekcje neutropeniczne.^[37] Na poziomie molekularnym lizofilina wykazuje bardzo szerokie spektrum aktywności biologicznej, działając jako selektywny inhibitor fosfodiesteraz (głównie PDE4B i PDE7) oraz hamując produkcję kilku kluczowych cytokin prozapalnych, takich jak interleukiny (np. IL-1, IL-12, IL-18), interferon gamma (IFN- γ) oraz czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α). Istotne jest, że za pożądaną aktywność farmakologiczną lizofiliny w organizmie człowieka odpowiada wyłącznie jej (*R*)-enancjomer, który wykazuje kilkaset razy silniejsze działanie jako inhibitor cytokin prozapalnych w porównaniu do związku macierzystego, tj. pentoksifyliny (PTX), od którego się wywodzi.^[38]

Bezpośrednią motywacją do podjęcia badań nad opracowaniem syntezy (*R*)-lizofiliny w postaci enancjomerycznie czystej była ograniczona liczba skutecznych metod jej otrzymywania, opisanych w literaturze. W ciągu ostatnich dwóch dekad opracowano kilka chemicznych metod syntezy enancjomerycznie wzbogaconej (*R*)-lizofiliny, opartych na zastosowaniu: (i) komercyjnie dostępnych chiralnych bloków budulcowych [(*S*)-mleczan etylu,^[39] 5-(*R*)-acetoksy-1-chlorohexan^[40]]; (ii) chiralnych pomocników [(–)-pinanodiol^[41]]; oraz (iii) chiralnych metaloorganicznych katalizatorów (kompleks irydu [Ir-(*R*)-SpiroPAP],^[42] katalizator Jacobsena^[43]). Wśród metod biokatalitycznych można wymienić (*R*)-stereoselektywną bioredukcję pentoksifyliny katalizowaną przez komórki *Saccharomyces cerevisiae*^[44] lub *Lactobacillus kefir* DSM 205878,^[45] a także przez (*R*)-specyficzną dehydrogenazę alkoholową z *Lactobacillus kefir* (LK-ADH).^[46] Ponadto ciekawą alternatywą jest metoda oparta na chemo- i stereoselektywnej hydroksylacji 1-*N*-heksylteobrominy katalizowanej przez natywne (dzikie) oraz genetycznie modyfikowane warianty ludzkiego cytochromu P450.^[47]

Niestety, większość opisanych w literaturze metod chemicznych wymagała wieloetapowych procesów, co sprawiało, że były one czasochłonne i dość skomplikowane. Z kolei reakcje z zastosowaniem biokatalizatorów, mimo że były jednoetapowe, prowadzono je głównie w skali analitycznej lub, co trudno zrozumieć, bez przedstawienia metod wydzielania i oczyszczania produktu, a w konsekwencji także bez określenia wydajności reakcji. Brak tych danych sugeruje, że analizie podlegały wyłącznie surowe mieszaniny reakcyjne, co znacząco ograniczało możliwość adaptacji takich procedur w kontekście potencjalnych zastosowań przemysłowych.

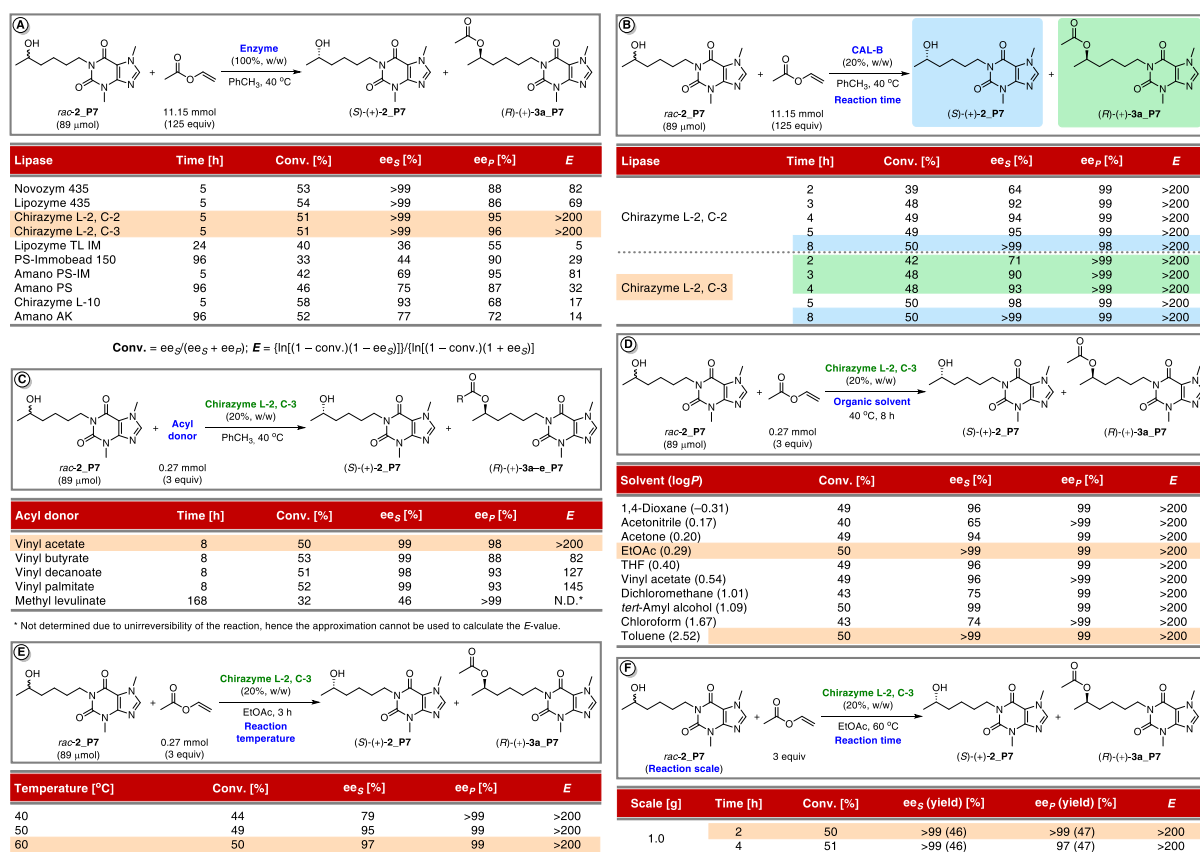
W pierwszym podejściu, opisanym w **publikacji P7**, opracowałem chemoenzymatyczną, stereozbieżną syntezę optycznie czystej (*R*)-lizofiliny na drodze katalizowanego lipazami rozdziału kinetycznego jej mieszaniny racemicznej oraz optycznej inwersji odpadowego (*S*)-enancjomeru (**Schemat 8**).



Schemat 8. Chemoenzymatyczna, stereozbieżna synteza lizofiliny [(*R*)-(-)-2_P7] z zastosowaniem immobilizowanej lipazy CAL-B (Chirazyme L-2, C-3) oraz strategii inwersji konfiguracji absolutnej w przeciwnym enancjomerze (*S*)-(+)-2_P7.

Badania obejmowały kompleksową optymalizację warunków dwóch wariantów reakcji enzymatycznych z udziałem komercyjnie dostępnych preparatów hydrolaz: (i) enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznej lizofiliny (*rac-2_P7*) z zastosowaniem aktywowanych estrów winylowych jako donorów acylu oraz (ii) enancjoselektywnej metanolizy racemicznego octanu lizofiliny (*rac-2_P7*). Metanoliza nie przyniosła satysfakcjonujących wyników w zakresie stopnia przereagowania substratu jak również czystości optycznej produktów KR, toteż całą uwagę w niniejszym autoreferacie skupiono wyłącznie na transestryfikacji (**Schemat 9**).

W pierwszej kolejności dokonano selekcji odpowiedniego biokatalizatora. Kluczowym aspektem tej części badań był wybór enzymu, który zapewniłby najlepszy kompromis między aktywnością katalityczną a enancjoselektywnością. W tym celu przetestowano ok. 20 różnych komercyjnie dostępnych preparatów hydrolaz, wśród których dominowały natywne i immobilizowane lipazy pochodzenia bakteryjnego [np. *Burkholderia cepacia* (PS-Immobead 150, Amano PS, Amano PS-IM, Amano PS-C II), *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Alcaligenes* sp. (Chirazyme L-10), etc.] oraz grzybowego [np. *Candida antarctica* B (Novozym 435, Lipozyme 435, Chirazyme L-2, C-2, Chirazyme L-2, C-3), *Candida antarctica* A (Chirazyme L-5), *Thermomyces lanuginosus* (TL-Immobead 150, Lipozyme TL IM), *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Mucor javanicus* (Amano Lipase M), *Rhizopus oryzae* (Amano Lipase F-AP15), *Candida rugosa* (Lipase AY Amano 30, Chirazyme L-3), *Geotrichum candidum* (Chirazyme L-8), etc.]. Spośród przetestowanych enzymów wyłącznie dwa preparaty zawierające immobilizowaną lipazę CAL-B (Chirazyme L-2, C-2 oraz Chirazyme L-2, C-3) wykazywały pożądane właściwości katalityczne względem pochodnej ksantynowej, katalizując rozdział jej enancjomerów bardzo szybko (w ciągu 5 godzin) i, co ważniejsze, w sposób wysoce enancjoselektywny ($E > 200$).



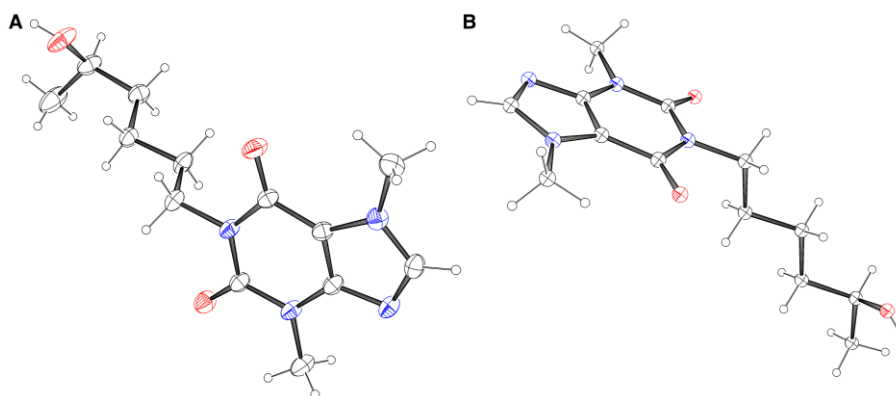
Schemat 9. Wybrane wyniki kluczowych etapów optymalizacji enzymatycznego rozdzielu kinetycznego racemicznej lizofiliny (*rac-2_P7*).

W dalszych etapach prac eksperymentalnych zbadano wpływ ilości użytego biokatalizatora, rodzaju donora acylu, rozpuszczalnika organicznego, a także czasu i temperatury reakcji na wynik stereochemiczny enzymatycznych rozdzielów kinetycznych *rac-2_P7*. Wyżej wymieniony proces został zoptymalizowany zarówno pod kątem konwersji, wydajności, jak i czystości enancjomerycznej izolowanych produktów KR. Najbardziej wydajny biokatalityczny układ reakcyjny składał się z preparatu lipazy Chirazyme L-2, C-3 zawieszonego w octanie etylu, z dodatkiem trzech molowych równoważników octanu winylu, prowadzony w temperaturze 60 °C. W optymalnych warunkach sprawdzono także możliwość powiększenia skali bioprocessu. Dla najlepszej próby przeprowadzonej w skali preparatywnej, z użyciem 1 grama racemicznego substratu *rac-2_P7*, oba produkty rozdzielu kinetycznego uzyskano w postaci homochiralnej (>99% ee) oraz z wydajnościami

wynoszącymi odpowiednio 46% [dla (S)-(+)-2_P7] i 47% [dla (R)-(+)-3a_P7]. Warto dodać, że proces enzymatycznego rozdziału racemicznej lizofiliny (*rac*-2_P7) wymagał jedynie 2 godzin, aby osiągnąć pożądane 50% konwersji.

W kolejnych części badań wysiłki syntetyczne skoncentrowano na opracowaniu chemicznej metody stereoinwersji nieprzereagowanego (S)-enancjomeru lizofiliny [(S)-(+)-2_P7], w celu uzyskania pożądanej farmakologicznie aktywnej formy lizofiliny [(R)-(-)-2_P7]. W pierwszym etapie zbędny enancjomer (S)-(+)-2_P7 przereagowano z chlorkiem mesylu wobec trietyloaminy (N₃Et) jako zasady, a otrzymany optycznie czynny (S)-mesylan lizofiliny [(S)-(+)-4_P7] poddano substytucji nukleofilowej z zastosowaniem octanu cezu (CsOAc) w obecności katalitycznej ilości eteru koronowego (18-korona-6) we wrzącym toluenie. W wyniku tej dwuetapowej transformacji otrzymano (R)-octan lizofiliny [(R)-(+)-3a_P7] z łączną wydajnością 34% oraz nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 96%. Jak się okazało strategia inwersji konfiguracji absolutnej (S)-enancjomeru skutkowałą niestety erozją w nadmiarze enancjomerycznym i z tego względu wymagała dalszej optymalizacji, aby po hydrolizie (R)-octanu można było otrzymać w pełni czystą optycznie lizofilinę [(R)-(-)-2_P7]. Pomimo niepowodzenia tej części badań, pierwotną ścieżkę syntezy, niewymagającą dodatkowej stereoinwersji na atomie asymetrycznym, należy uznać za względnie udaną na tle danych literaturowych. Łączna wydajność otrzymywania LSF z PTX wyniosła 23,3% po 3 etapach, co stanowi wynik lepszy w porównaniu z najlepszą dotąd metodą opublikowaną przez Drosos i wsp.,^[19] która umożliwiła syntezę LSF z łączną wydajnością 21,8% po 4 etapach.

Dzięki uzyskaniu obu enancjomerów lizofiliny w ilościach preparatywnych oraz opracowaniu metody wytwarzania ich monokryształów za pomocą techniki dyfuzyjnej, przy współpracy z dr hab. inż. Maciejem Dranką, prof. uczelni, przeprowadzono analizę rentgenostrukturalną i po raz pierwszy rozwiązano struktury krystaliczne tego związku (**Rysunek 15**). Wyniki analizy XRD nie tylko jednoznacznie potwierdziły stereopreferencję zastosowanych lipaz wobec rozdzielanego racematu *rac*-2_P7, lecz także mogą stanowić doskonały punkt wyjścia do dalszych badań nad strukturami polimorficznymi tytułowego API.

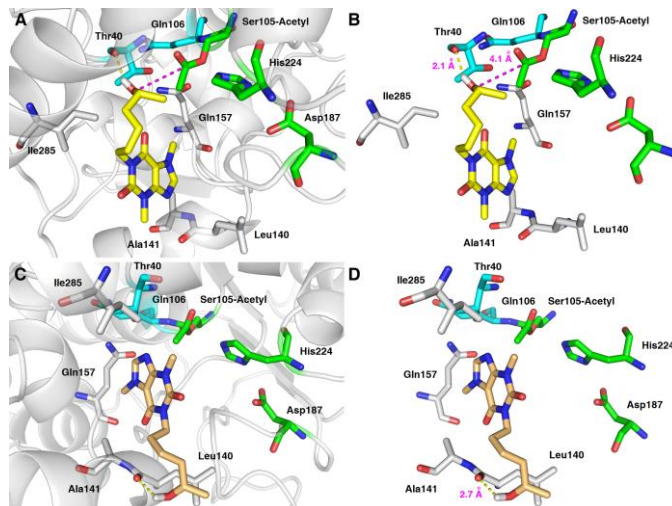


Rysunek 15. ORTEP-y (R)-lizofiliny [(R)-(-)-2_P7] (A) oraz (S)-lizofiliny [(S)-(+)-2_P7] (B). Struktury krystaliczne odpowiednio (R)-(-)-2_P7 (CCDC-2023424) oraz (S)-(+)-2_P7 (CCDC-2023425) zdeponowano w Cambridge Crystallographic Data Centre. Elipsoidy przedstawiono z 50% poziomem prawdopodobieństwa (C czarny, H szary, N niebieski, O czerwony), a atomy wodoru pominięto dla przejrzystości.

Co więcej, wyniki eksperymentalne uzyskane w toku badań enzymatycznych zostały dodatkowo zracjonalizowane przy użyciu dokowania molekularnego, które obejmowało szczegółową analizę charakteru oddziaływań oraz mechanizmu tworzenia kompleksów białko-ligand (w tym przypadku lipaza CAL-B i poszczególne enancjomery lizofiliny), uwzględniając różnorodność przyjętych konformacji poszczególnych izomerów optycznych chiralnego leku (**Rysunek 16**). Badania *in silico*, obejmujące obliczenie wartości energii tworzenia się kompleksów CAL-B-lizofilina oraz określenie położenia nieracemicznych cząsteczek substratu w centrum aktywnym enzymu, umożliwiły identyfikację kluczowych oddziaływań niekowalencyjnych pomiędzy atomami grup funkcyjnych pochodnej ksantynowej a resztami aminokwasowymi w obrębie miejsca wiążącego. Dokowanie pozwoliło również wskazać zawady steryczne oraz niekorzystne oddziaływania odpychające, które zmniejszają powinowactwo w parze białko-ligand i/lub determinują odpowiednie ułożenie cząsteczek substratu względem aminokwasów tzw. "triady katalitycznej", kluczowej dla przebiegu danej reakcji katalitycznej. Analiza dokowania molekularnego wykazała, że w najniższej energetycznych kompleksach białko-ligand odpowiednio bliska odległość między acetylowaną Ser105 w centrum aktywnym a nukleofilową grupą hydroksylową lizofiliny była osiągalna wyłącznie dla (R)-enancjomeru. Oksyanion tego enancjomeru był dodatkowo stabilizowany bardzo silnym wiązaniem wodorowym krótkiego zasięgu (2,1 Å), utworzonym z atomem wodoru grupy hydroksylowej reszty treoniny – Thr40. W przeciwieństwie do tego, brak wiązań wodorowych stabilizujących oksyanion oraz nadmiernie duża odległość między katalitycznie aktywną acetylowaną seryną a grupą hydroksylową lizofiliny w nieproduktywnym kompleksie CAL-B z (S)-enancjomerem

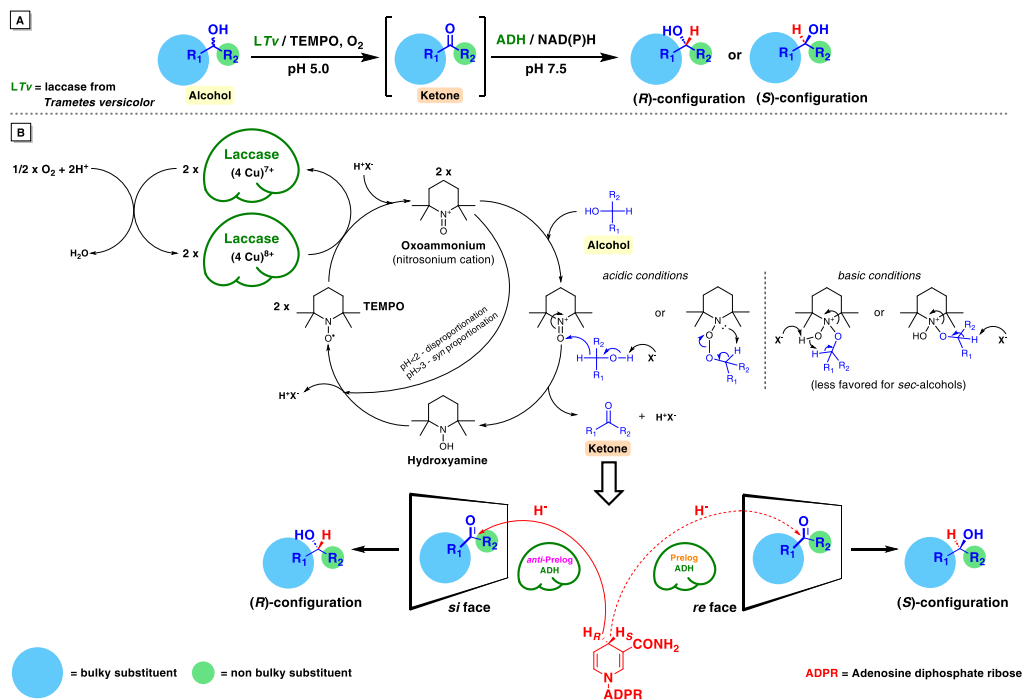
uniemożliwiają utworzenie tetraedrycznego intermediatu i efektywną katalizę, co dodatkowo może tłumaczyć doskonałą enancjoselektywność procesu KR.

Podsumowując, powyższe ustalenia mogą stanowić cenne źródło wiedzy przy określaniu kluczowych miejsc punktowych mutacji podczas projektowania nowych wariantów rekombinowanych lipaz o udoskonalonych właściwościach katalitycznych lub nawet odwrotnej stereopreferencji działania wobec stereoisomerów pochodnych metyloksantyn.



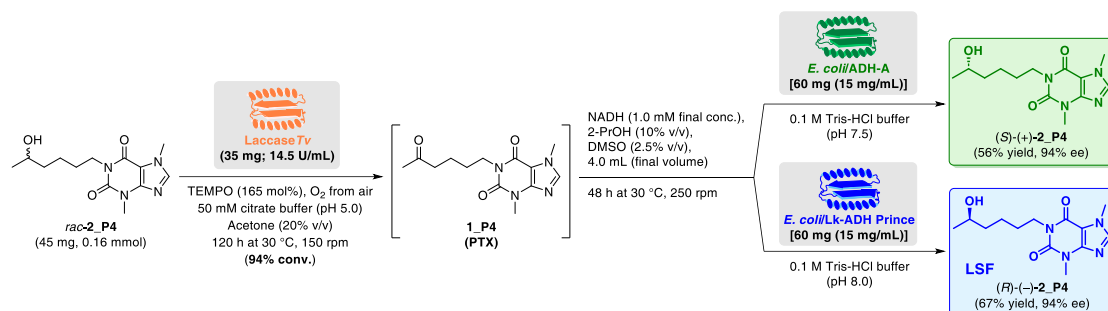
Rysunek 16. Budowa hipotetycznych kompleksów lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B, kod PDB: 1TCA) zawierającej zmodyfikowaną (acetylowaną) Ser105 z (R)-enancjomerem (panele **A–B**) oraz (S)-enancjomerem (panele **C–D**) racemicznej lizofiliny (*rac*-**2_P7**). Szkielet węglowy (R)-enancjomeru substratu zaznaczono kolorem żółtym, natomiast (S)-enancjomeru – kolorem zielonym. Aminokwasy triady katalitycznej CAL-B (Ser105-acetyl-His224-Asp187) wyróżniono kolorem zielonym. Kluczowe wiązania wodorowe przedstawiono jako żółte przerywane linie, natomiast odległość między atomem tlenu grupy hydroksylowej lizofiliny a atomem węgla grupy karbonylowej acetylowanej seryny (Ser105-acetyl) oznaczono różowymi przerywanymi liniami.

W kolejnym podejściu, opisanym w **publikacji P4**, przedstawiłem nową chemoenzymatyczną syntezę obu enancjomerów lizofiliny z zastosowaniem enzymatycznego procesu kaskadowego, bazującego na tandemowym układzie biokatalitycznym lakaza/TEMPO-dehydrogenaza alkoholowa (**Rysunek 17**).



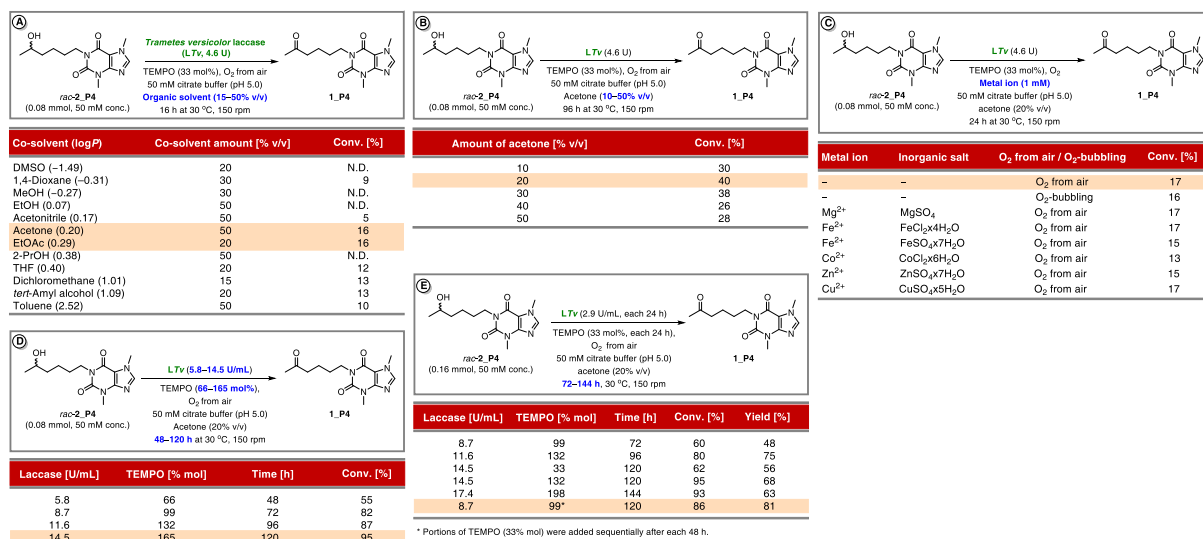
Rysunek 17. (A) Schematyczne przedstawienie liniowej deracemizacji alkoholi drugorzędowych z wykorzystaniem układu LTv/TEMPO-ADH. (B) Proponowany mechanizm niestereoselektywnego utleniania alkoholi drugorzędowych katalizowany przez układ lakazy/TEMPO z użyciem tlenu cząsteczkowego (O_2) jako terminalnego utleniacza połączony ze stereoselektywną bioredukcją prochiralnego ketonu katalizowaną przez dehydrogenazy alkoholowe (ADH).

W ramach tych badań opracowałem sekwencyjną chemoenzymatyczną deracemizację racemicznej lizofiliny (*rac*-2_**P4**), obejmującą dwa konkurencyjne procesy oksydoredukcyjne: (i) niestereoselektywne utlenianie *rac*-2_**P4** do pentoksyfiliny (PTX) z użyciem lakazy grzybowej izolowanej z wrośniaka różnobarwnego [*lac. Trametes versicolor* (LTv)] w obecności stabilnego wolnego rodnika 2,2,6,6-tetrametylo-1-oksopiperidyny (TEMPO) jako mediatora reakcji redoks oraz (ii) stereoselektywną bioredukcję PTX przy użyciu liofilizowanych komórek *E. coli* zawierających odpowiednie rekombinowane dehydrogenazy alkoholowe (ADH): (*S*)-selektywną ADH z *Rhodococcus ruber* (*E. coli*/ADH-A) lub (*R*)-selektywny wariant z *Lactobacillus kefir* (*E. coli*/LK-ADH Prince) (Schemat 10). Opracowana metodologia syntezy umożliwiła uzyskanie obu enancjomerów lizofiliny z wydajnościami izolowanymi w zakresie 56–67% oraz wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi, sięgającymi 94%.



Schemat 10. Chemoenzymatyczna, stereokomplementarna synteza obu enancjomerów lizofiliny [(*R*)-(-)-2_**P4**] oraz (*S*)-(+)-2_**P4**] z zastosowaniem biokatalitycznej kaskady katalizowanej przez lakazę z *T. versicolor*/TEMPO/O₂-dehydrogenazę alkoholową.

Z punktu widzenia powodzenia procesu deracemizacji racemicznej lizofiliny (*rac*-2_**P4**) kluczowym etapem badań okazała się optymalizacja nieselektywnego utleniania grupy hydroksylowej obecnej w *rac*-2_**P4** z zastosowaniem układu lakaza/TEMPO/O₂. W ramach tego zadania zweryfikowano wpływ rodzaju i ilości rozpuszczalnika organicznego dodawanego do medium reakcyjnego (50 mM roztwór buforowy cytrynianowy pH 5,0), dodatku dwuwartościowych kationów metali, ilości użytego enzymu i mediatora reakcji redoks (TEMPO), a także czasu trwania procesu na konwersję substratu w skali analitycznej. Dzięki przeprowadzonym badaniom uzyskano znaczną poprawę konwersji reakcji, która początkowo wynosiła 16%, a po pełnej optymalizacji wzrosła aż do 95%. Dla najlepszych warunków bioutlenianie zostało poddane skalowaniu do 0.16 mmoli substratu w celu wyznaczenia wydajności procesu. Wybrane wyniki tej części pracy przedstawia Schemat 11.



Schemat 11. Wybrane wyniki kluczowych etapów optymalizacji enzymatycznego bioutleniania racemicznej lizofiliny (*rac*-2_**P4**) z zastosowaniem układu lakaza/TEMPO/O₂.

Po skutecznym dobraniu optymalnych warunków dla reakcji bioutleniania oraz bioredukcji kolejnym bardzo istotnym aspektem niniejszych badań było zintegrowanie obu wspomnianych procesów w jeden funkcjonalny układ biokatalityczny realizowany w ramach sekwencyjnej procedury "one-pot", tj. przeprowadzanej w jednym naczyniu reakcyjnym, bez konieczności izolowania produktu pośredniego. Zmiana pH mieszaniny reakcyjnej w trakcie procesu deracemizacji z wartości 5, optymalnej dla działania lakazy, na zakres pH 7,5–8, przy którym katalitycznie aktywne były jedynie dehydrogenazy alkoholowe, okazała się niezbędna do osiągnięcia

założonej reaktywności. Takie podejście pozwoliło uniknąć wzajemnej dezaktywacji biokatalizatorów oraz przeciwdziałania konkurencyjnych reakcji.

Z uwagi na fakt, że bioutlenianie lizofiliny z wykorzystaniem układu lakaza/TEMPO/O₂ nie prowadziło do ilościowego otrzymywania ketonu, nadmiary enancjomeryczne nieracemicznych produktów enzymatycznej kaskady osiągnęły maksymalnie 94%, mimo że bioredukcja przejściowego ketonu przebiegała z idealną stereoselektywnością. Niedoskonałości opracowanej metody bioutleniania *rac*-2_P4 rekompensuje fakt, że dzięki zastosowaniu chemoenzymatycznych warunków reakcji proces ten nie generuje szkodliwych odpadów, w przeciwieństwie do klasycznych metod syntezy, które wykorzystują nadstechiometryczne ilości toksycznych utleniaczy opartych na metalach przejściowych, takich jak: (i) chrom [np. H₂CrO₄, odczynnik Jonesa (CrO₃/wodny H₂SO₄), Na₂Cr₂O₇, chlorochromian pirydyniowy (odczynnik Corey-Suggsa, PCC), dichromian pirydyniowy (PDC)], (ii) mangan (np. KMnO₄, MnO₂) lub (iii) srebro (np. AgNO₃), a także (iv) związki jodu o wysokiej wartościowości, takie jak kwas 2-jodoksybenzoesowy (IBX) i perjodynan Dessa-Martina (DMP), czy wreszcie (v) chlorek oksalilu z DMSO (utlenianie Swerna). Proekologiczne walory tej metody wynikają głównie z faktu, że tlen cząsteczkowy, stosowany jako terminalny utleniacz, generuje jedynie wodę i/lub nadtlenek wodoru jako produkty odpadowe, a sam enzym użyty w reakcji jest całkowicie nietoksyczny i w pełni biodegradowalny. Warto również podkreślić, że opublikowana metoda stanowiła pierwszy przykład zastosowania układu lakaza/TEMPO/O₂ do utleniania nieaktywowanego alkoholu. Dotychczasowe doniesienia literaturowe opisywały reakcje przeprowadzane głównie na prostych substratach, takich jak łatwo utleniające się alkohole benzytowe.

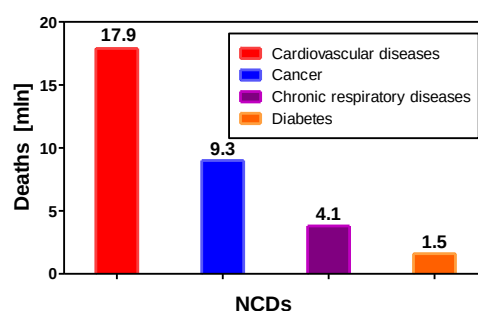
Biorąc pod uwagę powyższe fakty, opracowaną metodę syntezy enancjomerów lizofiliny z zastosowaniem układu katalitycznego LTv/TEMPO/O₂-ADH można uznać za relatywnie wydajną i przyjazną dla środowiska. Niemniej jednak, dalsze prace laboratoryjne ukierunkowane na ilościowe otrzymywanie przejściowego ketonu są niezbędne, aby poprawić wyniki w zakresie czystości optycznej tytułowego API.

4.3.3.4. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconych substancji czynnych leków β -adrenolitycznych (P3).

Choroby układu sercowo-naczyniowego (ang. cardiovascular diseases, CVDs) stanowią najpoważniejszy problem zdrowotny na świecie, ponieważ zajmują pierwsze miejsce wśród chorób niezakaźnych odpowiedzialnych za śmiertelność w populacji ludzkiej, wyprzedzając nowotwory, przewlekłe choroby układu oddechowego oraz cukrzycę (**Rysunek 18**).

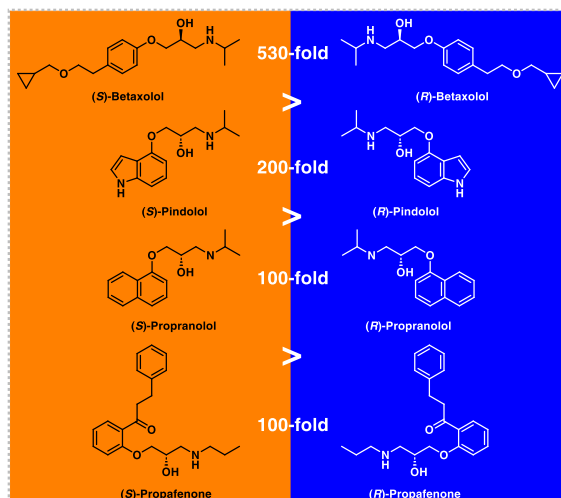
Według raportu 'World Health Statistics 2024' Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO),^[48] w 2023 roku z powodu chorób kardiologicznych zmarło niemal 18 milionów ludzi. Między innymi z tego powodu leki kardiologiczne, do których zaliczają się m.in. leki przeciwzakrzepowe, leki przeciwmiażdżycowe, diuretyki (leki moczopędne), wazodylatory (leki rozszerzające naczynia krwionośne), blokery kanałów wapniowych, inhibitory konwertazy angiotensyny oraz leki β -adrenolityczne, nie tylko stanowią jedną z najliczniejszych grup leków stosowanych w farmakologii, ale również zajmują znaczną część globalnego rynku farmaceutycznego.

Z kolei wśród leków kardiologicznych jedną z kluczowych, o ile nie najważniejszą, pozycję zajmują leki będące antagonistami receptorów β -adrenergicznych, powszechnie znane jako β -blokerzy. Ta wysoce skuteczna grupa farmaceutyków, której mechanizm działania polega na kompetycyjnym blokowaniu receptorów β -adrenergicznych dla endogennych amin katecholowych (np. adrenaliny, noradrenaliny), zapobiegając odpowiedzi chronotropowej, inotropowej oraz zwężeniu naczyń krwionośnych,^[49] jest głównie stosowana w leczeniu nadciśnienia tętniczego, choroby wieńcowej (choroby niedokrwienna serca), dławicy piersiowej (łac. *angina pectoris*), powikłań związanych z zawałem mięśnia sercowego, arytmii serca oraz kardiomiopatii.^[50] Co więcej, ze względu na wysoce stereoselektywne interakcje β -blokerów z β -adrenoreceptorami, kluczowe znaczenie dla uzyskania pożądanej aktywności farmakologicznej stanowi podawanie pacjentom odpowiednich enancjomerycznych form substancji czynnych tych leków o możliwie najwyższej czystości optycznej. Ogólnie rzecz biorąc, większość pozytywnych efektów leczniczych związanych ze stosowaniem β -blokerów wynika z dostarczania do organizmu (S)-enancjomerów, podczas gdy (R)- β -blokerzy wykazują znacznie mniejszą aktywność i mogą powodować potencjalnie poważne działania niepożądane (**Rysunek 19**).^[51] Wyjątkiem jest nebiwolol, którego (R)-enancjomer odpowiada za działanie blokujące receptory β 1-adrenergiczne, podczas gdy (S)-enancjomer przyczynia się do rozszerzenia naczyń krwionośnych poprzez uwalnianie tlenu azotu.^[52] Co ciekawe, liczne prace poświęcone działaniu (R)- β -blokerów wskazują, że leki te w niektórych przypadkach wykazują stosunkowo silną aktywność w blokowaniu receptorów β 2-adrenergicznych



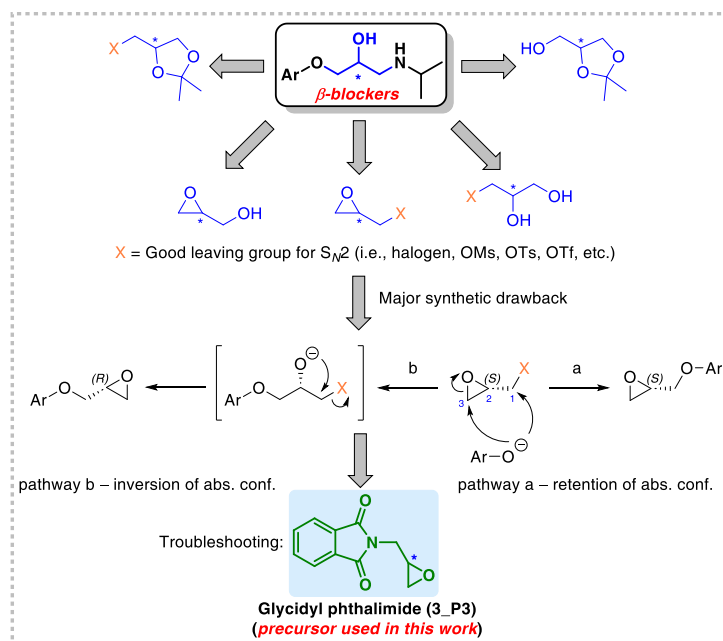
Rysunek 18. Liczba zgonów spowodowanych chorobami niezakaźnymi (ang. non-communicable diseases, NCDs) według raportu WHO z 2024 roku.^[48]

zlokalizowanych w wyrostkach rzęskowych, co prowadzi do obniżenia ciśnienia wewnątrzgałkowego u pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta (JPOK) i nadciśnieniem ocznym.^[53]



Rysunek 19. Przykłady różnic w aktywności farmakologicznej wybranych enancjomerów β -blokerów w kontekście ich stosowania w leczeniu chorób układu krążenia.

Moja bezpośrednia motywacja do podjęcia badań nad chemoenzymatyczną syntezą β -blokerów wynikała nie tylko z wyżej wymienionych zalet stosowania tych leków w postaci (S)-enancjomerów, ale również z braku uniwersalnej i praktycznej metody ich otrzymywania. Niewątpliwie do najważniejszych chiralnych bloków budulcowych stosowanych powszechnie w syntezie nieracemicznych β -blokerów zalicza się enancjomeryczną epihalohydrynę, 3-halogeno-1,2-propanodiol, glicydol, oraz solketal wraz z jego pochodnymi (**Rysunek 20**).^[54]



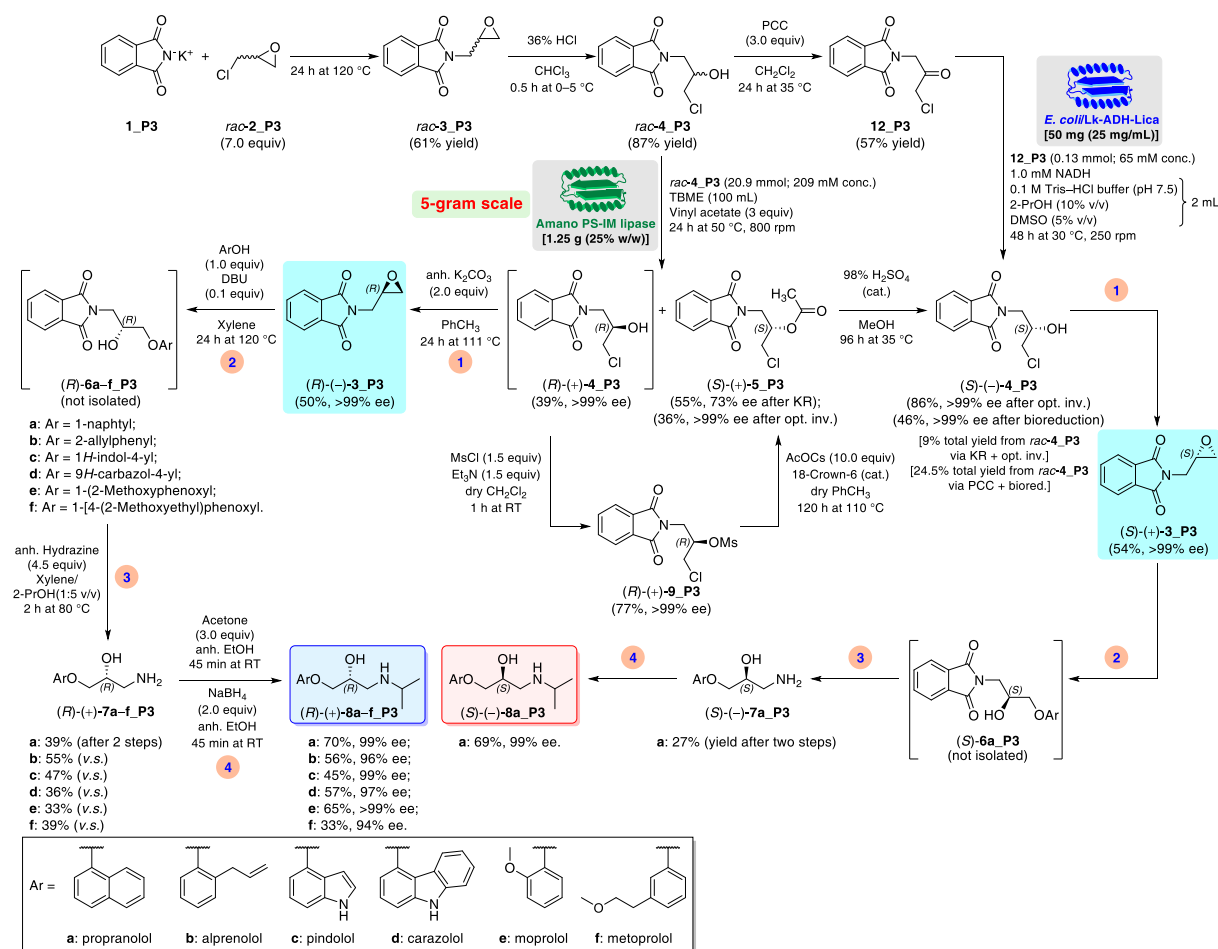
Rysunek 20. Retrosyntetyczne opcje otrzymywania nieracemicznych β -blokerów z ugrupowaniem izopropylaminowym, oparte na zastosowaniu klasycznych chiralnych bloków budulcowych (np. epihalohydryny, 3-halogeno-1,2-propanodiolu, glicydolu, solketalu, etc.) albo zastosowanego przeze mnie N-glicydyloftalimidu (**3_P3**) jako uniwersalnego chiralnego prekursora.

Z oczywistych względów atom chlorowca w wyżej wymienionych związkach może być zastępowany innymi grupami dobrze odchodzącymi w reakcji substytucji nukleofilowej dwucząsteczkowej (S_N2), takimi jak grupy mesylowa (Ms), tosylowa (Ts) czy triflatowa (Tf). Jednakże główną wadą stosowania tych odczynników jest niska chemoselektywność reakcji z reagentami nukleofilowymi, co w przypadku syntezy leków β -adrenolitycznych obejmuje odpowiednie aromatyczne fenolany. Najbardziej jaskrawym przykładem wadliwego użycia ww. pochodnych w syntezie (S)- β -blokerów jest reakcja (S)-epichlorohydryny z dowolnym anionem aryloksylowym, podczas której mogą zachodzić dwa konkurencyjne procesy. Z jednej strony dochodzi

do bezpośredniego podstawienia atomu chloru przy węglu C-1 w (*S*)-epichlorohydrynie z retencją konfiguracji absolutnej, co prowadzi do powstania odpowiedniego (*S*)-oksiranu (**Rysunek 20**, "ścieżka a"). Z drugiej zaś strony może dojść do otwarcia pierścienia epoksydowego epichlorohydryny w wyniku ataku anionu fenolanowego na mniej zatłoczony sterycznie elektrofilowy atom węgla C-3, co skutkuje powstaniem przejściowej (*S*)- α -chlorohydryny, która w warunkach zasadowych szybko ulega wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z inwersją konfiguracji i utworzeniem (*R*)-oksiranu (**Rysunek 20**, "ścieżka b"). Konsekwencją niskiej chemoselektywności opisaną reakcją jest utrata pożądanej czystości enancjomerycznej syntetyzowanych epoksydów, co uniemożliwia uzyskanie konkretnych enancjomerów β -blokerów.

Warto wspomnieć, że wśród biokatalitycznych metod syntezy optycznie czynnych β -blokerów dominującym podejściem jest klasyczny rozdział kinetyczny (KR) odpowiednich racemicznych 1-aryloksy-3-halogeno-2-propanoli i/lub ich estrów katalizowany przez lipazy. Dzięki zastosowaniu tej strategii z powodzeniem uzyskano kilkanaście substancji czynnych, m.in. takich leków jak acebutolol, alprenolol, atenolol, bufuralol, bunitrolol, karteolol, karwedilol, kloranolol, esmolol, labetalol, metoprolol, moprolol, nifenalol, pindolol, praktolol, propranolol oraz satolol (patrz referencje wymienione w **publikacji P3**). Niestety, wszystkie te opracowania nie miały pożądanej ogólności, ponieważ wymagały indywidualnego podejścia do każdej racemicznej pochodnej, co wiązało się każdorazowo z ponowną optymalizacją warunków procesu KR. Co więcej, mimo że rdzeń strukturalny β -blokerów jest w dużej mierze zachowany (konserwatywny) i różnice sprowadzają się głównie do budowy podstawnika (hetero)aromatycznego, to w większości przypadków konieczne jest zastosowanie różnych lipaz, aby selektywnie rozdzielić daną parę enancjomerów, co w konsekwencji dodatkowo wydłuża czas opracowania optymalnych warunków syntezy.

To skłoniło mnie do zaprojektowania nowej ścieżki syntezy nieracemicznych β -blokerów, wykorzystującej komercyjnie dostępne, niedrogie substraty oraz proste do przygotowania, w pełni biodegradowalne biokatalizatory (**Schemat 12**).

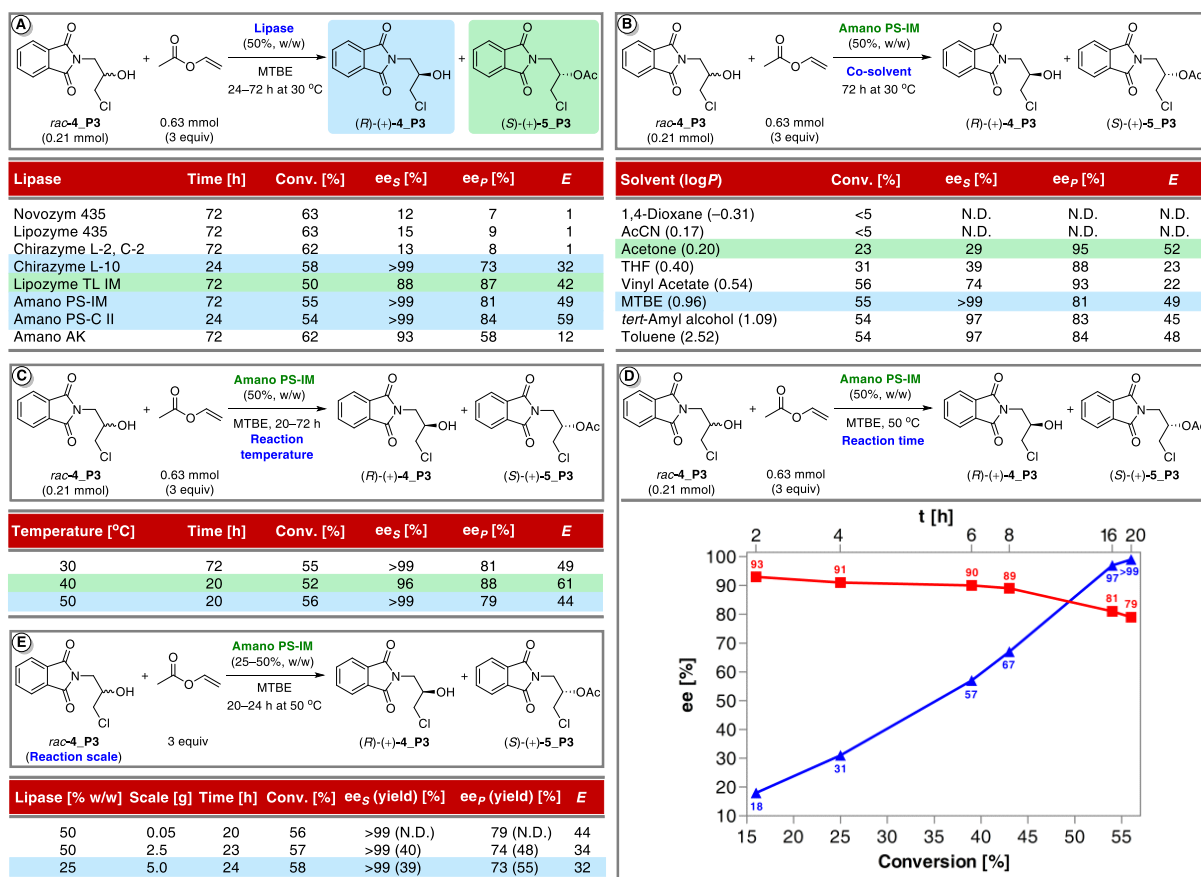


Schemat 12. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconych β -blokerów **8a-f_P3** z zastosowaniem czystych optycznie enancjomerów *N*-glicydyloftalimidu (**3_P3**) jako kluczowego prekursora.

Planowana ścieżka miała składać się z minimalnej liczby etapów, umożliwiać łatwe skalowanie reakcji i mieć szerokie zastosowanie w syntezie tych farmaceutyków. Aby to osiągnąć, moim głównym celem było zastosowanie chiralnego związku, którego uzyskanie w postaci enancjomerycznie czystej byłoby możliwe na

wczesnym etapie syntezy, co zapewniłoby dostęp do wspólnego prekursora dla tytułowych API. Wybór padł na 2-[(2S)-oksiran-2-ylometylo]-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dion, o zwyczajowej nazwie (S)-(+)-ftalimidek glicydylo [(S)-(+)-**3_P3**]. Choć już w latach 80. XX wieku rozważano zastosowanie tego związku jako potencjalnie wartościowego prekursora leków nasercowych z rdzeniem aryloksypropanoloaminowym (inaczej 2-propanoamino-1-aryloetanolowym), nigdy nie został on użyty do syntezy β -blokerów, ani w formie racemicznej, ani enancjomerycznej. Co ciekawe, chiralny epoksyd (S)-(+)-**3_P3** pełni również kluczową rolę w syntezie leku przeciwzakrzepowego – rywaroksabanu.^[55] W publikacji **P3** jako pierwszy zaprezentowałem badania nad chemoenzymatyczną syntezą nieracemicznego *N*-glicydyloftalimidu (**3_P3**), a następnie sprawdziłem, czy możliwa jest jego funkcjonalizacja w kierunku enancjomerycznych (S)- oraz (R)- β -blokerów bez utraty czystości optycznej. Zaprezentowana na Schemacie 12 chemoenzymatyczna ścieżka syntezy składa się z dwóch niezależnych dróg – jednej z zastosowaniem lipaz oraz drugiej, z wykorzystaniem dehydrogenaz alkoholowych jako kluczowych biokatalizatorów.

W pierwszej części badań, największym wyzwaniem było opracowanie katalizowanego lipazami rozdziału kinetycznego racemicznego 2-(3-chloro-2-hydroksypropylo)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu (*rac*-**4_P3**) (Schemat 13). Standardowa procedura optymalizacji warunków enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznej chlorohydryny *rac*-**4_P3** z zastosowaniem octanu winylu jako donora grupy acetylowej obejmowała dobór odpowiedniej lipazy (A), rozpuszczalnika organicznego (B), ustalenie wpływu temperatury (C) oraz czasu reakcji (D) na wynik stereochemiczny, a także walidację skalowalności procesu enzymatycznego (E).



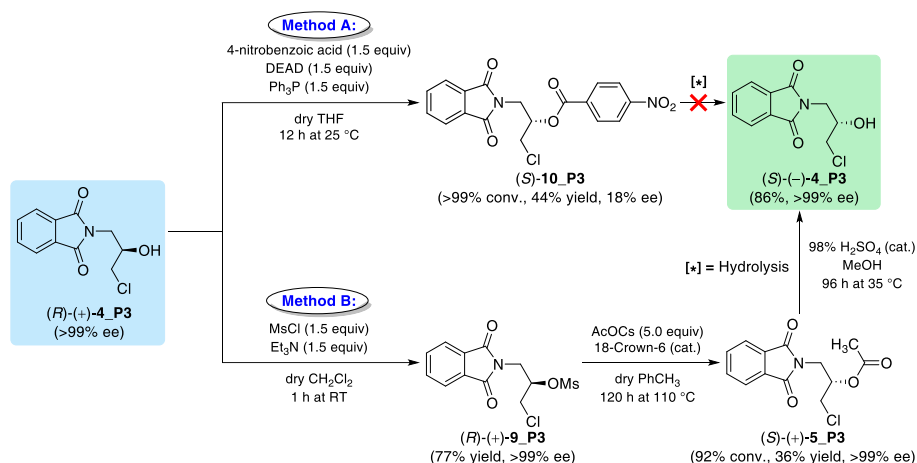
Schemat 13. Optymalizacja enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznego 2-(3-chloro-2-hydroksypropylo)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dionu (*rac*-**4_P3**) katalizowanej przez lipazy w warunkach kontroli kinetycznej z użyciem octanu winylu obejmowała następujące etapy: wybór lipazy (A), selekcję rozpuszczalnika organicznego (B), badanie wpływu temperatury (C) i czasu reakcji (D) oraz powiększenie skali bioprocessu (E).

Spośród grupy biokatalizatorów wykazujących najwyższą aktywność katalityczną wobec *rac*-**4_P3**, do których należały m.in. immobilizowane lipazy z *Candida antarctica* typu B (Novozym 435, Lipozyme 435, Chirazyme L-2, C-2), *Alcaligenes* sp. (Chirazyme L-10), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), *Burkholderia cepacia* (Amano PS-IM, Amano PS-C II) oraz *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), do dalszych badań wybrano preparat Amano PS-IM. Warto zaznaczyć, że w przypadku użycia tego enzymu otrzymywano wolniej reagujący enancjomer chlorohydryny (R)-(+)-**4_P3** z 55% konwersją oraz >99% ee. Biokatalizator ten chociaż wykazywał znacznie mniejszą aktywność katalityczną niż Chirazyme L-10 oraz Amano PS-C II, to w przeciwieństwie do nich był relatywnie tani, i co najważniejsze, dostępny w handlu bez żadnych ograniczeń. Niestety wszystkie przetestowane enzymy wykazywały przeciętną enancjoselektywność (*E*=12–59)

w reakcji transestryfikacji *rac*-4_P3, co praktycznie przekreślało możliwość otrzymania optycznie czystego (S)-enancjomeru chlorohydryny (S)-(-)-4_P3, niezbędnego z punktu widzenia dalszej syntezy (S)-β-blokerów. Z kolei próby enzymatycznej hydrolizy i/lub alkoholizy odpowiedniego racemicznego octanu *rac*-5a_P3 zakończyły się niepowodzeniem, ponieważ w najlepszym przypadku pożądaną chlorohydrynę (S)-(-)-4_P3 udało się wyizolować jedynie z 80% ee. Dalsze badania nad zastosowaniem rozpuszczalników organicznych o różnej polarności (log*P* od -0.31 do 2.52) zastosowanych w przypadku transestryfikacji *rac*-4_P3 nie przyniosły przełomowych rezultatów, a najlepszym medium reakcyjnym okazał się modelowy układ octanu winylu (3 equiv) w eterze *tert*-butylowo-metylowym (MTBE). Szczegółowa analiza wpływu pozostałych kluczowych parametrów procesu KR wykazała, że skrócenie czasu reakcji z 72 godzin do zaledwie 20 godzin było możliwe po podniesieniu temperatury do 50 °C. Co istotne, mimo zastosowania wyższej temperatury, nie zaobserwowano spadku enancjoselektywności enzymów ani erozji w nadmiarze enancjomerycznym wolniej reagującego izomeru optycznego (R)-(+)-4_P3. W optymalnych warunkach enzymatycznego acetylowania *rac*-4_P3 przeprowadzono udane próby powiększenia skali procesu z 50 mg (0,5 g/L) do odpowiednio 2,5 g (25 g/L) oraz 5 g (50 g/L) substratu. Niezależnie od skali, enancjomerycznie czystą chlorohydrynę (R)-(+)-4_P3 (>99% ee) otrzymywano z wydajnościami na poziomie 39–40%. Walidacja skalowalności procesu KR potwierdziła, że reakcję można z powodzeniem powiększyć 100-krotnie w warunkach laboratoryjnych. Co więcej, wykazano, że reakcja przebiega równie skutecznie przy dwukrotnie mniejszej ilości lipazy (25% w/w) bez negatywnego wpływu na szybkość i wynik stereochemiczny procesu KR, co dodatkowo podkreśla duży potencjał syntetyczny i użyteczność opracowanego protokołu enzymatycznego.

Dysponując enancjomerycznie czystą chlorohydryną (R)-(+)-4_P3 (>99% ee), kolejnym celem moich badań było opracowanie wysoce wydajnych i selektywnych metod transformacji, umożliwiających syntezę (R)-β-blokerów z wysoką łączną wydajnością oraz zachowaniem czystości enancjomerycznej. W tym kontekście przeprowadziłem szereg reakcji, korzystając z klasycznych metod preparatyki organicznej (Schemat 12). W pierwszym etapie syntezy przeprowadziłem wewnątrzcząsteczkową cyklizację (R)-(+)-4_P3 w warunkach zasadowych (K₂CO₃), w wyniku której otrzymałem enancjomerycznie czysty epoksyd (R)-(-)-3_P3 (>99% ee) z wydajnością 50%. Następnie dokonałem regioselektywnego otwarcia pierścienia oksiranu przy użyciu sześciu różnych fenoli (ArOH) w obecności katalitycznej ilości 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU) jako zasady. Surowe produkty tej reakcji (R)-6a-f_P3 przekształciłem bezpośrednio w (R)-aryloksyaminoalkohole (R)-(+)-7a-f_P3. Usunięcie grupy ftalimidowej przeprowadziłem zgodnie z klasyczną procedurą Ing-Manskego^[56] z zastosowaniem bezwodnej hydrazyny w mieszaninie ksylenu oraz izopropanolu (1:5 v/v). Warto dodać, że (R)-(+)-7a-f_P3 otrzymano z wydajnościami w zakresie od 33% do 55% po dwóch etapach syntezy, bez konieczności wydzielania produktów pośrednich, co dodatkowo uprościło niezbędne manipulacje. Ostatnie dwa etapy syntezy również przeprowadziłem w procedurze "one-pot" z zastosowaniem zmodyfikowanego protokołu aminowania redukcyjnego opisanego w literaturze.^[57] W tym przypadku aminoalkohole (R)-(+)-7a-f_P3 poddałem kondensacji z acetonem, a powstałą iminę zredukowałem *in situ* za pomocą borowodoru sodu (NaBH₄) w bezwodnym etanolu. Obie reakcje przebiegały bardzo szybko (1,5 godz.) w temperaturze pokojowej, a wydzielone i oczyszczone za pomocą chromatografii żelowej enancjomerycznie wzbogacone (R)-β-blokery (R)-(+)-8a-f_P3 otrzymywano z wydajnościami w zakresie 33–70%. Warto dodać, że opracowana przeze mnie czteroetapowa synteza, liczona od momentu funkcjonalizacji (R)-chlorohydryny (R)-(+)-4_P3, pozwalała na uzyskanie (R)-enancjomerów propranololu [(R)-(+)-8a_P3], pindololu [(R)-(+)-8c_P3] oraz moprolołu [(R)-(+)-8e_P3] z doskonałymi nadmiarami enancjomerycznymi w zakresie 99–99,9%. Niestety, podczas syntezy pozostałych (R)-β-blokerów zachodziła częściowa racemizacja, co skutkowało uzyskaniem (R)-alprenololu [(R)-(+)-8b_P3] z 96% ee, (R)-karazololu [(R)-(+)-8d_P3] z 97% ee oraz (R)-metoprololu [(R)-(+)-8f_P3] z 94% ee.

Strategia enzymatycznego KR zastosowana wobec *rac*-4_P3 pozwalała na uzyskanie jedynie enancjomerycznie czystej (R)-chlorohydryny (R)-(+)-4_P3, toteż kolejnym zadaniem było opracowanie metody wykorzystania tego enancjomeru w syntezie (S)-β-blokerów. W tym celu postanowiłem zbadać możliwość przeprowadzenia selektywnej inwersji konfiguracji absolutnej asymetrycznego atomu węgla w (R)-(+)-4_P3 za pomocą klasycznych metod syntezy. Porównałem skuteczność dwóch powszechnie stosowanych strategii inwersji konfiguracji absolutnej chiralnych alkoholi realizowanych w ramach: (i) tzw. reakcji Mitsunobu z zastosowaniem kwasu 4-nitrobenzoesowego, trifenylofosfiny (PPh₃) i azodikarboksylanu dietylu (DEAD) (Schemat 14, Metoda A) oraz (ii) reakcji podstawienia nukleofilowego odpowiedniego (R)-mesylanu (R)-(+)-9_P3 z użyciem octanu ceczu (AcOCs) w obecności katalitycznej ilości eteru koronowego (18-Crown-6) (Schemat 14, Metoda B). Obie te metody wymagały przeprowadzenia dodatkowej hydrolizy odpowiednich (S)-estrów: benzoesanu (S)-10_P3 w przypadku reakcji Mitsunobu oraz octanu (S)-(-)-5_P3 w przypadku acetolizy mesylanu.

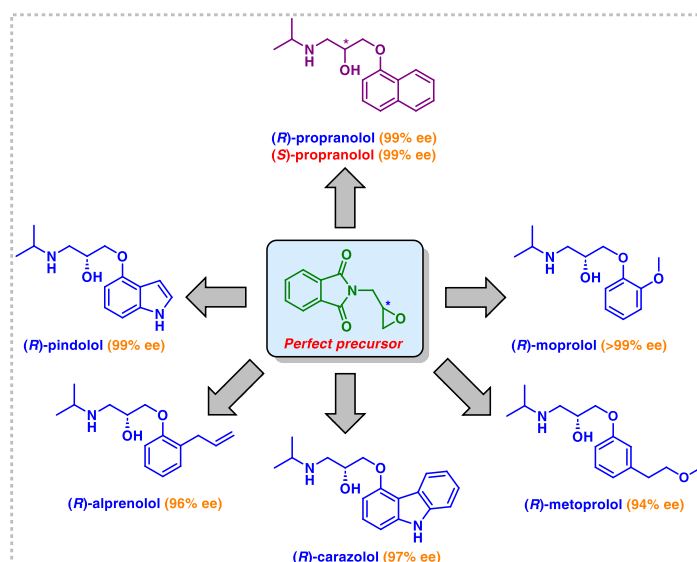


Schemat 14. Inwersja konfiguracji absolutnej enancjomerycznie czystej chlorohydryny (R)-(+)-4_P3 z zastosowaniem reakcji Mitsunobu (A) i/lub acetolizy mesylanu (R)-(+)-9_P3 (B).

Spśród przetestowanych metod skuteczniejsza okazała się ta oparta na acetolizie mesylanu, która zapewniała całkowitą inwersję konfiguracji absolutnej chiralnego alkoholu, umożliwiając przekształcenie (R)-enancjomeru w pożądany (S)-enancjomer odpowiedniej chlorohydryny. Aby to osiągnąć, wszystkie reakcje tej ścieżki syntezy, w tym otrzymywanie mesylanu, jego następne podstawienie anionem octanowym oraz hydroliza powstałego estru, musiały przebiegać bez utraty czystości enancjomerycznej. Niestety, etapem limitującym okazała się acetoliza mesylanu, która zachodziła co prawda bez racemizacji, ale produkt wydzielano zaledwie z 36% wydajnością, co wpłynęło na łączną wydajność procesu stereoinwersji, wynoszącą 24% po trzech etapach. Pomimo tego, przykładowa synteza (S)-propranololu [(S)-(-)-8a_P3] z wykorzystaniem (S)-(-)-4_P3 oraz procedur opracowanych dla (R)-β-blokerów potwierdziła możliwość otrzymania tego leku bez strat w czystości optycznej.

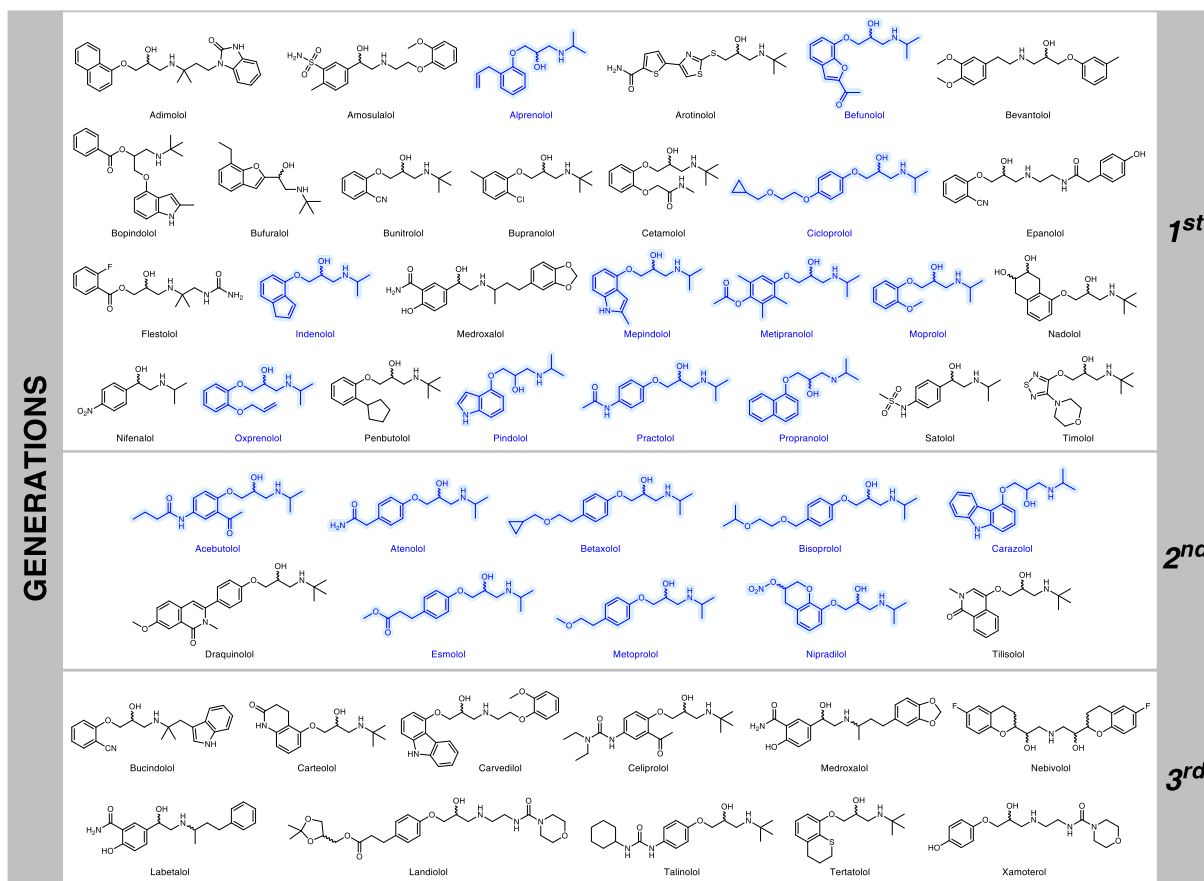
Niemniej jednak, z powodu niskiej wydajności stereoinwersji postanowiłem zmodyfikować strategię syntezy. W tym celu zweryfikowałem możliwość otrzymania kluczowego prekursora (S)-(+)-3_P3 w dwuetapowej sekwencji reakcji, składających się z: (i) stereoselektywnego biotranswodowania α-chloroketonu 12_P3 z użyciem biokatalizatorów w postaci liofilizowanych komórek *Escherichia coli*, nadprodukujących odpowiednie rekombinowane dehydrogenazy alkoholowe (*E. coli*/ADH), oraz (ii) cyklizacji powstałej chlorohydryny (S)-(-)-4_P3. Eksperymenty przesiewowe w kierunku selekcji odpowiedniego preparatu enzymatycznego, polegające na biokatalitycznym przeniesieniu wodoru z cząsteczek zredukowanej formy kofaktora – dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH) – na prochiralną grupę karbonylową α-chloroketonu 12_P3 w obecności *E. coli*/ADH, wykazały, że substrat był prawdopodobnie zbyt zabudowany sterycznie dla większości testowanych biokatalizatorów, aby mógł zostać przekształcony w chiralny, nieracemiczny produkt (S)-(-)-4_P3 z odpowiednio wysokimi konwersjami oraz nadmiarami enancjomerycznymi. Ku mojemu zadowoleniu, jeden z piętnastu przebadanych preparatów enzymatycznych, przygotowany na bazie mutanta dehydrogenazy alkoholowej z *Lactobacillus kefir* (*E. coli*/Lk-ADH-Lica), okazał się bardzo wydajnym oraz selektywnym biokatalizatorem, gdyż bioredukcja α-chloroketonu 12_P3 z jego udziałem prowadziła do powstania optycznie czystej chlorohydryny (S)-(-)-4_P3 (>99% ee) w sposób ilościowy (>99% konwersji). Niestety, podczas powiększania skali bioredukcji napotkałem szereg trudności związanych z wydzielaniem i oczyszczaniem produktu, co przełożyło się na przeciętną wydajność procesu (46%) pomimo doskonałej konwersji (>99%). Niemniej jednak, metoda oparta na stereoselektywnej bioredukcji jest potencjalnie bardziej atrakcyjna pod względem zastosowań przemysłowych niż strategia wykorzystująca KR oraz inwersję konfiguracji, gdyż pozwala skrócić ścieżkę syntezy kluczowego prekursora z czterech etapów do dwóch, co umożliwiło poprawę całkowitej wydajności otrzymywania (S)-(-)-4_P3 z 9,3% do 24,5%.

Badania zaprezentowane w publikacji P3 jednoznacznie pokazują, jak duże znaczenie dla łącznej wydajności oraz czystości enancjomerycznej otrzymywanych chiralnych substancji czynnych leków ma odpowiednio zaprojektowana i przeprowadzona procedura ich syntezy. W tym kontekście moim najważniejszym osiągnięciem było wytypowanie odpowiedniego chiralnego związku, który nie tylko stanowił wspólny prekursor dla wszystkich otrzymanych przeze mnie nieracemicznych β-blokerów, ale także który pozwolił wprowadzić na wczesnym etapie syntezy zdefiniowaną asymetrię w jego cząsteczce przy użyciu katalizy enzymatycznej. Co więcej, bardzo istotnym walorem tych badań było przeprowadzenie aż czterech jej etapów w procedurze "one-pot/two-step" (tj. w jednym naczyniu bez wydzielania produktów pośrednich), co pozwoliło radykalnie skrócić i uprościć sposób otrzymywania optycznie czynnych β-blokerów. Warto także dodać, że sześć przykładowych β-blokerów otrzymałem z bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi w zakresie 94–99,9% (Rysunek 21), co wskazuje na duży potencjał wdrożeniowy opracowanej przeze mnie metody syntezy.



Rysunek 21. Enancjomerycznie wzbogacone β -blokerzy **8a-f**, **P3** z podanymi w nawiasach nadmiarami enancjomerycznymi, uzyskanymi w przebiegu chemoenzymatycznej syntezy z zastosowaniem enancjomerów *N*-glicydyloftalimidu (**3_P3**) jako prekursora.

Co więcej, analiza budowy wszystkich trzech generacji β -blokerów (**Rysunek 22**) pozwala z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że spośród 49 struktur tych leków aż 19, zawierających układ α -hydroksy-*N*-izopropylaminowy, można otrzymać za pomocą opracowanej przeze mnie metody syntezy.



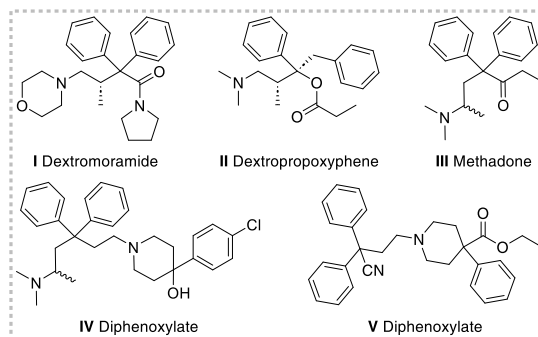
Rysunek 22. Przykłady trzech generacji β -blokerów stosowanych w terapii chorób sercowo-naczyniowych. Kolorem niebieskim wyróżniono struktury leków β -adrenolitycznych, które potencjalnie można otrzymać z użyciem opracowanej przeze mnie chemoenzymatycznej metodologii syntezy.

Co istotne, aż 80% struktur β -blokerów II generacji może być potencjalnie syntetyzowanych z wykorzystaniem tej metodologii. Dzięki mojemu opracowaniu może nastąpić przełom w produkcji leków nasercowych otrzymywanych w formie enancjomerycznie czystych związków. Główną przesłanką tej hipotezy

jest fakt, iż na tle procedur opisanych w literaturze zarówno naukowej, jak i patentowej zaprojektowana przeze mnie ścieżka syntezy w znacznym stopniu ułatwia otrzymywanie optycznie czystych β -blokerów, bez konieczności stosowania zróżnicowanych strukturalnie prekursorów. To z kolei zapewnia potencjalnie większą powtarzalność i elastyczność procesu technologicznego oraz eliminuje konieczność żmudnej optymalizacji i dostosowywania warunków syntezy do produkcji wyłącznie jednego API. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, wyniki opublikowane w **publikacji P3** mogą stanowić wartościowe źródło wiedzy dla pracowników badawczo-rozwojowych oraz technologów pracujących w przemyśle farmaceutycznym zarówno w Polsce jak i w całej Unii Europejskiej, co być może pozwoli zminimalizować ryzyko związane z niedoborami produktów leczniczych na rynkach unijnych, wynikającymi bezpośrednio z zakłóceń w tzw. "łańcuchach dostaw" surowców farmaceutycznych importowanych z krajów azjatyckich, w tym głównie Chin.

4.3.3.5. Projektowanie oraz chemoenzymatyczna synteza nowego eterowego analogu (R)-izo-moramidu o potencjalnie wysokiej aktywności anelgetycznej jako prototypowego leku przeciwbólowego (P2).

Leczenie bólu przewlekłego, a przede wszystkim ostrego (np. pourazowego, pooperacyjnego, pozawałowego, nowotworowego oraz terminalnego), jest kluczową domeną silnych leków przeciwbólowych z grupy opioidów (tzw. "leków III szczebla drabiny WHO").^[58] Do najsukuteczniejszych analgetyków należą agoniści receptorów opioidowych typu μ , wśród których na szczególną uwagę – obok morfiny, fentanylu, hydromorfonu, oksymorfonu, petydyny (meperydyny), metadonu, buprenorfiny, tapentadolu, leworfanolu czy oksykodonu – zasługuje również dekstromoramid **I**.^[59] Dekstromoramid, zsyntetyzowany po raz pierwszy przez belgijskiego chemika Paula Janssena w 1956 roku,^[60] jest strukturalnie podobny do dekstropropoksyfenu **II**, metadonu **III**, loperamidu **IV** oraz difenoksylatu **V** (**Rysunek 23**). Dzięki swojej lipofilowej budowie związek ten skutecznie przenika przez barierę krew-mózg, co skutkuje zwiększoną siłą działania przeciwbólowego i sedacyjnego (około 5-krotnie), szybszym początkiem działania (20–30 minut) oraz krótszym czasem działania (2–3 godziny) w porównaniu z morfiną.^[61] Badania farmakokinetyczne i farmakodynamiczne przeprowadzone jeszcze w latach 60. XX wieku na pojedynczych enancjomerach tego leku wykazały, że jego forma prawoskrętna (*dextro*-), w tym przypadku (*S*)-enancjomer, jest dwukrotnie aktywniejsza analgetycznie od formy lewoskrętnej (*levo*-). Oprócz tego, zarówno testy kliniczne jak i ambulatoryjne dowiodły, że dekstromoramid wykazuje znacznie wolniejszy rozwój tolerancji lekowej w porównaniu z większością innych krótko działających opioidów^[62] oraz może być z powodzeniem stosowany zamiast metadonu w terapii substytucyjnej uzależnienia od heroiny.^[63]



Rysunek 23. Strukturalne podobieństwo między dekstromoramidem (**I**) a innymi opioidowymi lekami przeciwbólowymi (**II**, **III**) oraz lekami przeciwbiegunkowymi (**IV**, **V**).

Niestety wiele z obecnie stosowanych opioidów, w tym również dekstromoramid, oprócz wykazywania doskonałych właściwości przeciwbólowych, wywołuje również szereg niepożądanych efektów ubocznych, takich jak zawroty głowy, zaburzenia nastroju (naprzemienna apatia i euforia), nudności i wymioty, senność spowodowana nadmierną sedacją, splątanie, zaburzenia funkcji poznawczych, zaburzenia motoryki układu pokarmowego (spowolniona perystaltyka jelit), bradykardię oraz silne uzależnienie psychiczne i fizyczne.^[64] Co więcej, ponieważ leki te mogą powodować silną depresję oddechową, a nawet całkowite zwiócenie mięśni w całym ciele, ich stosowanie jest bardzo niebezpieczne, a dawkowanie wymaga ścisłej kontroli klinicznej.^[65]

Warto dodać, że w ostatnim półwieczu dokonano wielu przełomowych odkryć w neurobiologii, które przyczyniły się do wyjaśnienia nie tylko podstaw biochemicznych mechanizmów analgezji i opracowania nowych sposobów leczenia bólu, ale także lepszego zrozumienia procesów warunkujących zjawisko uzależnienia na poziomie molekularnym.^[66] Oprócz eksperymentalnego udokumentowania istnienia czterech typów receptorów opioidowych [μ (*mu*-OR), δ (*delta*-OR), κ (*kappa*-OR), σ (*sigma*-OR)],^[67] identyfikacji endogennych związków opioidowych (oligopeptydów,^[68] czy endogennej morfiny i kodeiny^[69]), a także odkrycia wielu nowych, wysoce selektywnych syntetycznych analgetyków,^[70] poznano również mechanizmy regulacji procesu zapalnego, przewodzenia bodźca nocyceptywnego do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) oraz sposoby jego modulacji.^[71] Fundamentalnym osiągnięciem w tej dziedzinie, które umożliwiło przyspieszenie prac nad

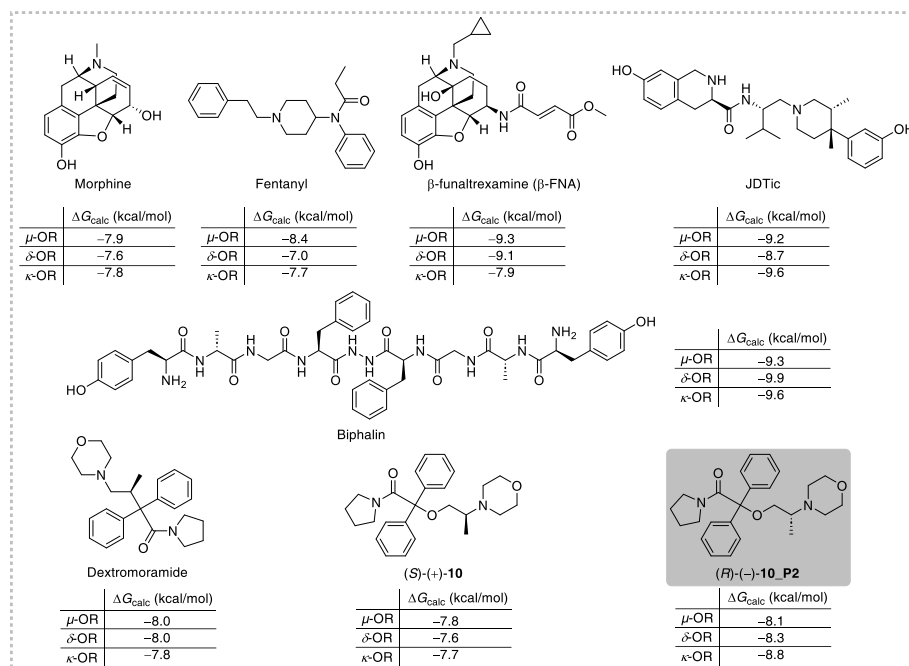
projektowaniem nowych, bardziej skutecznych i bezpieczniejszych w stosowaniu środków przeciwbólowych, było niewątpliwie wyznaczenie w 2012 r. struktur krystalicznych trzech najważniejszych receptorów opioidowych (μ ,^[72] δ ,^[73] κ ^[74]) oraz ustalenie miejsc wiążących typowe ligandy.

Poszukiwanie nowych modulatorów receptorów opioidowych stanowi duże wyzwanie dla naukowców, ale także niesie nadzieję na poprawę jakości życia osób cierpiących na ostry i/lub przewlekły ból, co w konsekwencji może znacznie polepszyć ich funkcjonowanie w społeczeństwie. Rewolucyjne wyniki badań rentgenostrukturalnych dotyczących budowy receptorów opioidowych (OR) stanowiły bezpośredni impuls do podjęcia przeze mnie prac nad zaprojektowaniem oraz syntezą nowego analogu dekstromoramidu – 2-[(2R)-2-(morfolino-4-yl)propoksy]-2,2-difenylo-1-(pirolidyn-1-yl)etan-1-onu {zwanego dalej (R)-izo-moramidem [(R)-(-)-10_P2]} – o silnym powinowactwie i wyróżniającej się selektywności działania wobec receptorów opioidowych typu κ , a tym samym potencjalnie wysokiej aktywności przeciwbólowej, pozbawionej efektów ubocznych, związanych m.in. z działaniem euforyzującym oraz ryzykiem rozwoju tolerancji, uzależnienia oraz depresji oddechowej.^[75] Badania opisane w **publikacji P2** miały charakter wielowątkowy, a ich główne filary obejmowały dokowanie molekularne, opracowanie nowej chemoenzymatycznej metodologii syntezy tytułowego analogu oraz przedstawienie teoretycznego mechanizmu kluczowego etapu jego otrzymywania.

Trudności w uzyskaniu selektywnie działających modulatorów (zarówno agonistów jak i antagonistów) receptorów opioidowych wynikają głównie z ich bliskości filogenetycznej, a co za tym idzie, strukturalnego podobieństwa tych białek. Spośród 14 reszt aminokwasowych znajdujących się w miejscach wiążących, położonych wokół górnej części centralnego kanału uformowanego przez siedem transbłonowych α -helis, aż 9 jest dobrze zachowanych ewolucyjnie i obecnych we wszystkich trzech kluczowych receptorach. Ponadto, w przypadku receptorów typu μ i δ , podobieństwo sekwencji aminokwasowej w miejscu wiążącym modulatory jest jeszcze większe, ponieważ na 14 reszt aż 11 jest identycznych. Bez nowoczesnych narzędzi badawczych, w tym zaawansowanych programów komputerowych dedykowanych badaniom oddziaływań lek-receptor opartych na odpowiednich algorytmach, realizacja takiego zdania byłaby niemożliwa.

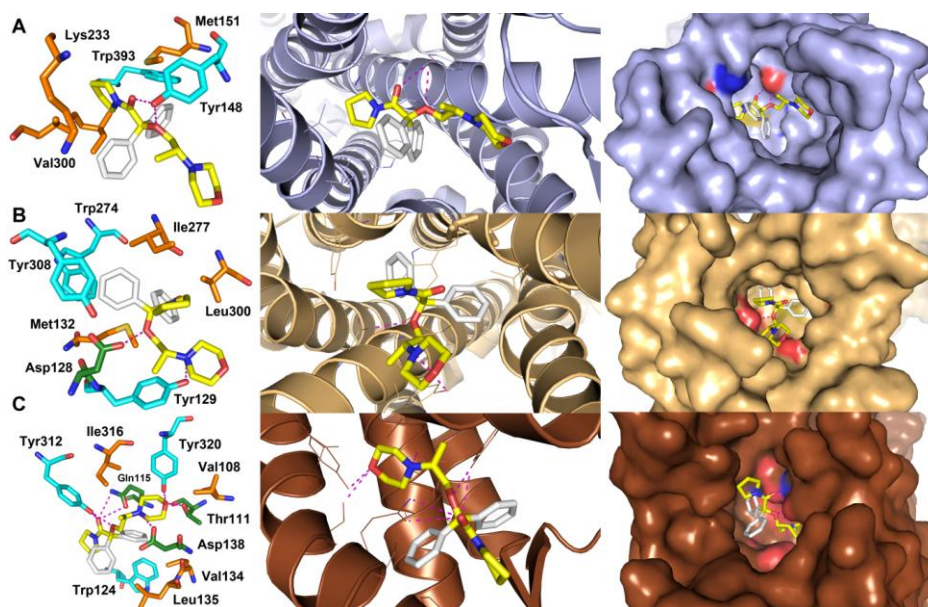
Dlatego też, w pierwszym etapie moich badań przeprowadziłem odpowiednie obliczenia komputerowe polegające na dokowaniu molekularnym z zastosowaniem programu AutoDock Vina zaprojektowanej przeze mnie serii małowymiarowych ligandów organicznych w trzech różnych typach receptorów opioidowych – μ -OR (PDB ID: 4DKL), δ -OR (PDB ID: 4EJ4) oraz κ -OR (PDB ID: 4DJH). Wybór techniki komputerowego modelowania oddziaływań białko-ligand był podyktowany faktem, że tego rodzaju analiza pozwala z bardzo dużą dokładnością odwzorować sposób, w jaki dany związek wiąże się z cząsteczką docelową, w tym przypadku białkami receptorowymi. W efekcie umożliwia to stosunkowo szybką i prostą predykcję potencjalnej aktywności biologicznej badanych związków, a w dalszych etapach badań również przeprowadzenie retrospektywnej analizy relacji struktura-aktywność. W moim przypadku zastosowanie dokowania molekularnego umożliwiło weryfikację i wstępną selekcję zaprojektowanych przeze mnie związków pod względem ich cech strukturalnych oraz sposobu wiązania z danym receptorem. Lepsze zrozumienie zjawisk zachodzących na poziomie molekularnym umożliwiło identyfikację kluczowych oddziaływań w hipotetycznych kompleksach ligand-receptor. Dzięki temu mogłem przewidzieć, a następnie ponownie zweryfikować kolejne modyfikacje strukturalne ligandów pod kątem ich steryczności oraz właściwości elektronowych, które musiały zostać spełnione, aby ligand mógł wiązać się z danym receptorem w sposób optymalny.

W wyniku przeprowadzonych obliczeń wyselekcjonowałem strukturę wiodącą dla związku, który wykazywał potencjalnie najwyższą aktywność farmakologiczną oraz selektywność względem pożądanego celu molekularnego, jakim był receptor κ . Dodatkowo, ponieważ związek ten był chiralny, przeprowadziłem osobne obliczenia dla obu jego enancjomerów (S)-(-)-10_P2 oraz (R)-(-)-10_P2, co uwidoczniło spodziewane różnice. Wyniki dokowania molekularnego, uwzględniające wartości bezwzględne swobodnych energii wiązań [ΔG_{calc} (kcal/mol)] dla tworzących się kompleksów odpowiednich receptorów opioidowych oraz najlepszego liganda, porównano z wynikami uzyskanymi dla kompleksów związków wzorcowych, takich jak: morfina, fentanyl, β -funaltreksamina (β -FNA), JDtic, bifalina, czy dekstromoramid (**Rysunek 24**). Co ciekawe, spośród struktur referencyjnych tylko bifalina oraz JDtic wykazywały znacznie większe powinowactwo do κ -OR ($\Delta G_{\text{calc}} = -9.6$ kcal/mol), ale ich selektywność wobec tego receptora była niekorzystna w odróżnieniu od zaprojektowanego analogu (R)-(-)-10_P2 ($\Delta G_{\text{calc}} = -8.8$ kcal/mol). Warto dodać, że ΔG_{calc} w kompleksach (R)-(-)-10_P2 z μ -OR była korzystniejsza niż dla morfiny czy macierzystego dekstromoramidu.



Rysunek 24. Wartości bezwzględnych swobodnych energii wiązania [ΔG_{calc} (kcal/mol)] uzyskane za pomocą dokowania molekularnego przeprowadzonego dla obu enancjomerów eterowego analogu izo-moramidu (S)-(+)-10_P2 i (R)-(-)-10_P2 oraz wzorcowych opioidów (tj. morfiny, fentanylu, dekstromoramidu itp.) skompleksowanych odpowiednio z μ -OR, δ -OR i κ -OR.

Dzięki wizualizacji wyników dokowania za pomocą programu komputerowego *PyMol* przeprowadzono analizę sposobu wiązania liganda przez wszystkie trzy typy OR oraz określono oddziaływania międzycząsteczkowe odpowiedzialne za stabilizację powstawania odpowiednich kompleksów tego analogu (Rysunek 25).



Rysunek 25. Hipotetyczna budowa trzech kompleksów o najniższych energiach wiązania dla analogu (R)-(-)-10_P2 (kolor żółty) z receptorami opioidowymi typu: (A) μ (PDB ID: 4DKL) (B) δ (PDB ID: 4EJ4) oraz (C) κ (PDB ID: 4DJH). α -Helisy budujące kanały receptorów zaznaczone są w postaci fioletowych (A), złotych (B) oraz brązowych (C) szarf (środkowa kolumna) albo sfer (prawa kolumna). Kluczowe reszty aminokwasowe dla oddziaływań polarnych zaznaczone są kolorem zielonym; dla oddziaływań hydrofobowych sił van der Waalsa (vdW): typu CH-CH kolorem pomarańczowym, a typu π - π chmur elektronowych pierścieni aromatycznych kolorem cyjanowym. Wiązania wodorowe zostały przedstawione za pomocą różowych linii przerywanych. Dla zwiększenia czytelności pominięto atomy wodoru.

Inspekcja produktywnych konformacji (R)-(-)-10_P2 w receptorze μ -OR wykazała, że ligand tworzy bliskie oddziaływania polarne między grupą karbonylową i/lub atomem tlenu eterowego a grupą hydroksylową pierścienia fenolowego obecnego w Tyr148 (Rysunek 25A). W tym przypadku, podstawnik difenyłowy odpowiadał za oddziaływania hydrofobowe z resztami Trp393, Val300 oraz Lys233.

Z kolei w przypadku kompleksu (R)-(-)-**10_P2** z receptorem δ -OR, kluczowe wiązanie wodorowe występowało między tlenem eterowym a grupą karboksylową Asp128, a także atomem azotu znajdującym się w pierścieniu morfoliny a resztą Tyr129 (**Rysunek 25B**). Dodatkowo analiza komputerowa wykazała, że pierścienie benzenowe (R)-(-)-**10_P2** wykazywały silny π -stacking z benzimidazolem reszty Trp274.

Warto odnotować, że kluczowym oddziaływaniem stabilizującym kompleks (R)-(-)-**10_P2** z receptorem κ (**Rysunek 25C**) jest, oprócz efektów sterycznych oraz interakcji hydrofobowych typu π - π pomiędzy szkieletem difenyłowym a resztą Trp124, także rozbudowana sieć wiązań wodorowych uformowana pomiędzy: (i) tlenem grupy karbonylowej a grupą hydroksylową łańcucha bocznego Tyr312 i/lub grupą amidową Gln115, (ii) eterowym atomem tlenu a grupą amidową reszty Gln115, (iii) azotem pierścienia morfoliny a grupą karboksylową Asp138 czy wreszcie (iv) tlenem pierścienia morfoliny a atomami wodoru grup hydroksylowych obecnych w Tyr320 oraz Thr111. Odległości ww. wiązań wodorowych mieściły się w zakresie 1,9–2,2 Å, co dodatkowo świadczyło o możliwości zachodzenia silnych oddziaływań stabilizujących kompleksy. Co więcej, ilość hipotetycznie utworzonych wiązań wodorowych pomiędzy (R)-(-)-**10_P2** a κ -OR była 3-krotnie większa niż w przypadku kompleksów z pozostałymi dwoma receptorami. Na szczególną uwagę zasługuje również fakt, iż inkorporacja eterowego atomu tlenu w zaprojektowanej cząsteczce liganda skutkuje utworzeniem w tym fragmencie cząsteczki dodatkowego oddziaływania z każdym z trzech receptorów, co w rezultacie pozwala zwiększyć wzajemne powinowactwo pomiędzy (R)-(-)-**10_P2** a badanymi białkami.

Kluczowym etapem dalszych prac syntetycznych była optymalizacja enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznego 1-(morfolin-4-yl)propan-2-olu (*rac*-**3_P2**) prowadzonej w warunkach kontroli kinetycznej, z użyciem lipaz jako biokatalizatorów oraz estrów winylowych jako donorów grupy acylowej. Co ciekawe, chociaż alkohol morfolinowy *rac*-**3_P2** jest wykorzystywany w przemysłowej metodzie syntezy dekstromoramidu oraz stanowi cenny prekursor wielu innych biologicznie aktywnych związków (patrz przykłady wymienione w **publikacji P2**), w literaturze branżowej nie odnotowano opisu dotyczącego sposobu jego otrzymywania w postaci enancjomerycznie czystej. Dlatego uznałem, że zastosowanie biokatalizy na wczesnym etapie syntezy stanowić będzie doskonałą alternatywę dla dotychczas stosowanej metody rozdziału enancjomerów dekstromoramidu za pomocą kwasu winowego, która wiązała się z koniecznością prowadzenia żmudnych, czasochłonnych i kosztownych krystalizacji diastereoizomerycznych winianów.

Badania optymalizacyjne dotyczące enzymatycznego rozdziału kinetycznego *rac*-**3_P2** obejmowały wybór odpowiedniej lipazy, rozpuszczalnika organicznego oraz donora grupy acylowej dla reakcji transestryfikacji, jak również powiększenie skali bioprocessu (**Schemat 15**).

(A)					
Lipase	Time [h]	Conv. [%]	ee _S [%]	ee _P [%]	E
Amano PS	144	41	62	89	32
Amano PS-IM	120	55	>99	81	49
Amano PS-Immobead 150	120	32	46	>99	314
Novozym 435	120	67	>99	49	14
Chirazyme L-2, C-2	24	58	>99	72	31
Chirazyme L-2, C-3	24	53	95	84	42
Amano AK	72	48	85	92	65
Chirazyme L-5	72	28	17	44	3

(B)					
Solvent (logP)	Time [h]	Conv. [%]	ee _S [%]	ee _P [%]	E
1,4-Dioxane (-0.31)	96	56	76	60	9
AcCN (0.17)	96	57	93	70	19
Acetone (0.20)	96	53	87	77	21
THF (0.40)	72	54	97	83	45
Diethyl ether (0.76)	72	57	98	74	30
MTBE (0.96)	72	57	99	75	35
tert-Amyl alcohol (1.09)	96	55	97	79	35
n-Hexane (3.00)	72	55	95	78	29

(C)					
Acyl donor	Time [h]	Conv. [%]	ee _S [%]	ee _P [%]	E
Vinyl acetate	16	55	>99	81	49
Vinyl butanoate	16	54	>99	84	59
Vinyl decanoate	16	55	>99	80	46

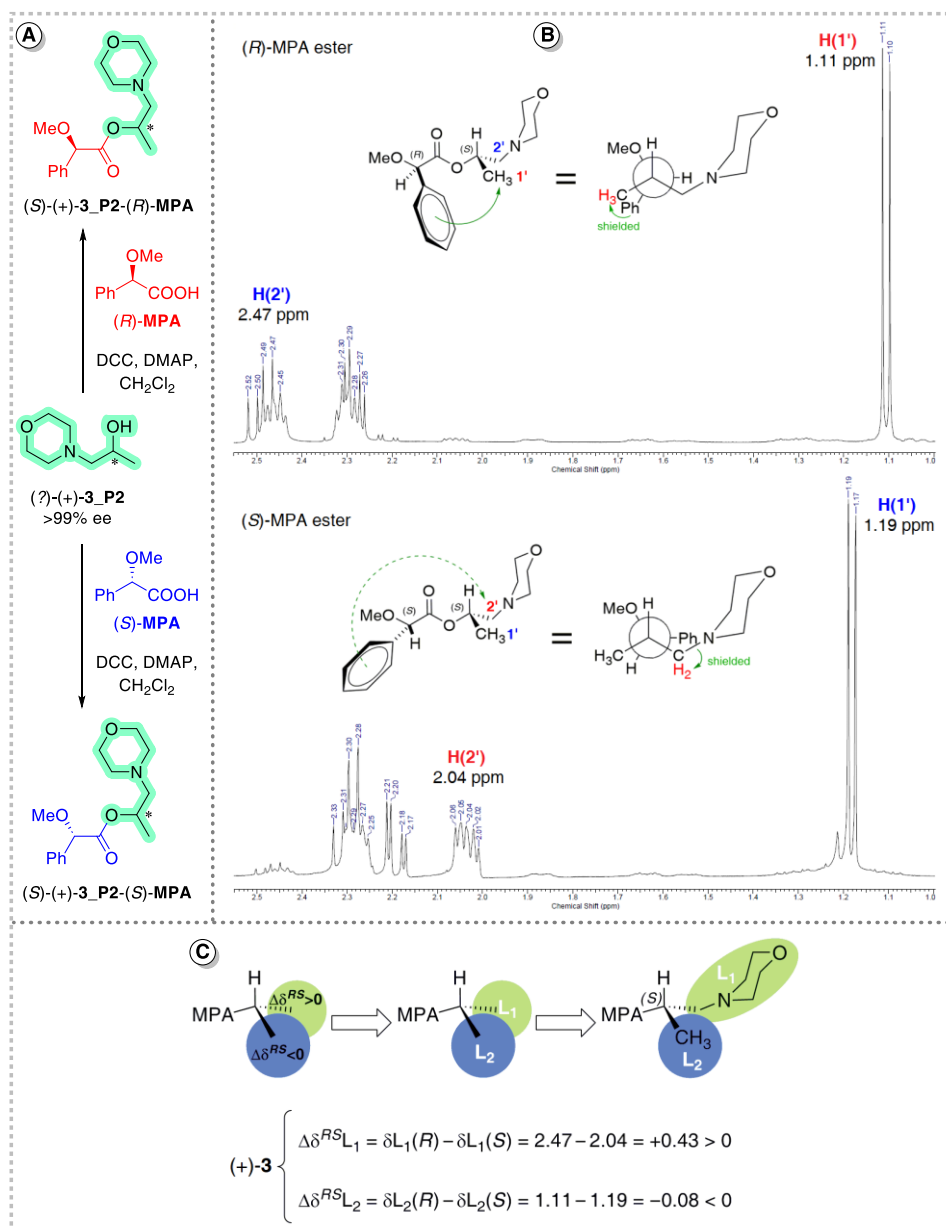
(D)					
Lipase	Scale [g]	Time [h]	Conv. [%]	ee _S (yield) [%]	ee _P (yield) [%] E
Chir. L-2, C-2	1.0	16	57	>99 (34)	75 (40) 49
PS-Imm. 150	1.0	144	33	49 (62)	99 (28) 59
Chir. L-2, C-2	10.0	27	56	>99 (36)	79 (38) 46

Schemat 15. Optymalizacja enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznego 1-(morfolin-4-yl)propan-2-olu (*rac*-**3_P2**) katalizowanej przez lipazy w warunkach kontroli kinetycznej. Badanie wpływu użytego enzymu (**A**), rozpuszczalnika organicznego (**B**), estru winylowego pełniącego rolę donora acylu (**C**) oraz skali bioprocessu (**D**) na wynik rozdziału kinetycznego, z uwzględnieniem konwersji (% conv.), nadmiarów enancjomerycznych wolniej reagującego (S)-alkoholu (ee_S) oraz tworzących się (R)-estrów (ee_P), enancjoselektywności (E) i wydajności (% yield) izolowanych chromatograficznie produktów KR.

W jej przebiegu ustalono, że najefektywniejszymi biokatalizatorami są handlowo dostępne immobilizowane preparaty lipazy z *Burkholderia cepacia* (Amano PS-Immobead 150) oraz lipazy typu B z *Candida antarctica* (Chirazyme L-2, C-2) zawieszone w mieszaninie octanu winylu (2 equiv) oraz eteru *tert*-butyloowo-metylowego (MTBE). Warto zauważyć, że w reakcjach katalizowanych przez Amano PS-Immobead 150 możliwe było otrzymanie enancjomerycznie czystego octanu (R)-(-)-**4a_P2** (>99% ee), natomiast

przy zastosowaniu Chirazyne L-2, C-2 uzyskano optycznie czysty, wolniej reagujący enancjomer (S)-(+)-**3_P2** (>99% ee). Dużym sukcesem tej części badań było opracowanie rozdziału kinetycznego racemicznego prekursora *rac*-**3_P2** w skali 10 g (100 g/L) użytego substratu. Umożliwiło to nie tylko przeprowadzenie kolejnych etapów syntezy tytułowego analogu (R)-(-)-**10_P2**, ale także pozwala z optymizmem patrzeć na ewentualne próby skutecznej adaptacji tej procedury do zastosowań przemysłowych.

Następnym zadaniem było określenie stereopreferencji użytych lipaz z zastosowaniem procedury podwójnej derywatyzacji optycznie czynnego alkoholu (+)-**3_P2** (99% ee) według zmodyfikowanej metody Moshera (Schemat 16).^[76]

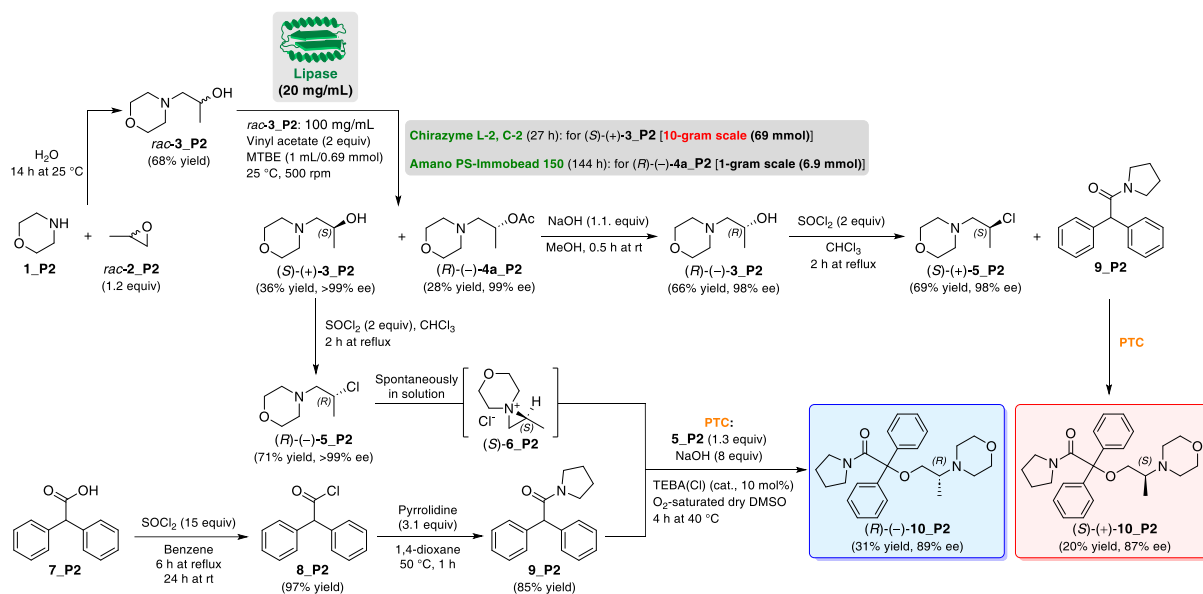


Schemat 16. Ustalenie konfiguracji absolutnej (+)-1-(morfolin-4-yl)propan-2-olu [(+)-**3_P2**] za pomocą metodologii Moshera z wykorzystaniem obu enancjomerów kwasu α -fenylo- α -metoksyoctowego (MPA). Etapy procedury Moshera obejmowały: derywatyzację alkoholu z użyciem (R)- oraz (S)-MPA (A), analizę widm ¹H-NMR zarejestrowanych dla obu diastereoizomerycznych estrów (+)-**3_P2**-(R)-MPA i (+)-**3_P2**-(S)-MPA (B), a także obliczanie różnicy wartości odpowiednich przesunięć chemicznych ($\Delta\delta^{RS}$) sygnałów jąder komplementarnych atomów obecnych w obu pochodnych (C).

Warto dodać, że procedura ta stanowi doskonałą alternatywę dla wyznaczania konfiguracji absolutnej nowych nieracemicznych związków, której nie można potwierdzić ani za pomocą polarymetrii ze względu na brak danych literaturowych, ani bezpośrednio przy użyciu wysokorozdzielczej techniki rentgenowskiej (XRD) ze względu na ciekłą postać badanego związku. Zadanie to zrealizowałem, stosując oba enancjomery kwasu α -fenylo- α -metoksyoctowego (MPA, tzw. "odczynnik Moshera") jako chiralnego reagenta derywatyzującego alkohole, w warunkach estryfikacji Steglicha z użyciem dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako reagenta

sprzęgającego oraz katalitycznej ilości 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyny (DMAP) w roztworze bezwodnego dichlorometanu (CH_2Cl_2) (**Schemat 16A**). Dla otrzymanych w ten sposób diastereizomerycznych pochodnych zarejestrowałem widma protonowe NMR (**Schemat 16B**), a następnie, na podstawie dokładnej analizy różnicy wartości przesunięć chemicznych ($\Delta\delta^{\text{RS}}$) sygnałów jąder komplementarnych atomów (**Schemat 16C**), określiłem z dużym prawdopodobieństwem, że centrum stereogeniczne w cząsteczce badanego alkoholu (+)-**3_P2** posiada (*S*)-konfigurację absolutną. Dzięki temu potwierdziłem, że wszystkie używane w rozdziałach kinetycznych lipazy szybciej katalizowały przemiany (*R*)-1-(morfolin-4-yl)propan-2-olu [(*R*)-(-)-**3_P2**] do odpowiednich optycznie czynnych estrów (*R*)-(-)-**4a-c_P2**, tym samym pozostawiając w mieszaninie poreakcyjnej nie przereagowany (*S*)-enancjomer alkoholu (*S*)-(+)-**3_P2**.

W dalszej części syntezy eterowego analogu *izo*-moramidu (*R*)-(-)-**10_P2** przeprowadziłem szereg reakcji, wykorzystując klasyczne metody preparatyki organicznej (**Schemat 17**). Najpierw przekształciłem kwas difenylooctowy (**7_P2**) w odpowiedni chlorek kwasowy **8_P2** za pomocą chlorku tionylu (SOCl_2) w benzenie, a następnie przereagowałem go z pirolidyną w 1,4-dioksanie, co doprowadziło do otrzymania *N*-difenylaoacetylo-1-pirolidyny (**9_P2**) z sumaryczną wydajnością wynoszącą 82% po dwóch etapach syntezy. Z kolei optycznie czynny alkohol (*S*)-(+)-**3_P2**, otrzymany w wyniku enzymatycznego rozdziału *rac*-**3_P2**, przekształciłem za pomocą SOCl_2 w chloroformie w enancjomerycznie czystą 4-[(2*R*)-(-)-2-chloropropyl]morfolinę [(*R*)-(-)-**5_P2**, >99% ee] izolowaną z 71% wydajnością. Co ciekawe, pomimo że w reakcji chlorowania alkoholu nie stosowałem akceptora dla powstającego *in situ* chlorowodoru (np. trietyloaminy lub pirydyny), wszystko wskazuje na to, że proces ten przebiegał zgodnie z mechanizmem dwucząsteczkowej substytucji nukleofilowej ($\text{S}_{\text{N}}2$) z inwersją konfiguracji na asymetrycznym atomie węgla. Prawdopodobnie rolę skutecznego akceptora HCl w tej reakcji pełnił zasadowy pierścień morfoliny obecny w substracie, co uchroniło przed niepożądaną racemizacją mogącą potencjalnie wystąpić w wyniku równoległej reakcji $\text{S}_{\text{N}}1$, przebiegającej przez stadium płaskiego karbokationu. Zastosowanie alternatywnego chlorowania alkoholu (*S*)-(+)-**3_P2**, prowadzonego w warunkach tzw. reakcji Appela z użyciem tetrachlorometanu (CCl_4) i trifenylofosfiny (Ph_3P), okazało się mniej wydajne. Chociaż w ten sposób produkt (*R*)-(-)-**5_P2** otrzymano bez racemizacji, to wydajność wyniosła jedynie 57%. Niemniej jednak, produkt reakcji Appela pozwolił dodatkowo potwierdzić wynik stereochemiczny reakcji (*S*)-(+)-**3_P2** z SOCl_2 .



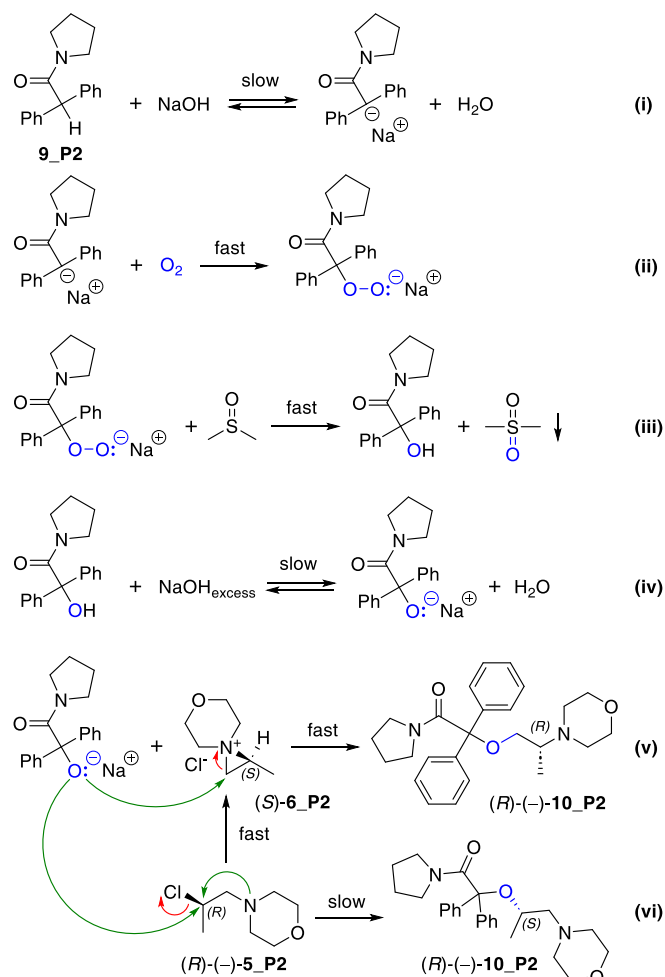
Schemat 17. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconego (*R*)-izo-moramidu [(*R*)-(-)-**10_P2**] oraz jego przeciwnego enancjomeru (*S*)-(+)-**10_P2**.

Ostatnim wyzwaniem stojącym na drodze do syntezy tytułowego produktu było połączenie obu otrzymanych półproduktów w taki sposób, aby pomiędzy fragmentem *N*-difenylaoacetylo-1-pirolidynowym a fragmentem alkilopropylomorfolinowym znajdował się mostek eterowy. W tym celu opracowałem nową reakcję oksydacyjnego alkilowania amidu pirolidynowego kwasu difenylooctowego **9_P2** w pozycji podwójnie benzyłowej z zastosowaniem morfolinowej pochodnej soli azyrydyniowej (*S*)-**6_P2** powstającej spontanicznie w roztworze z chlorku (*R*)-(-)-**5_P2**. Reakcja ta zachodzi pod wpływem działania super-zasady tworzącej się w warunkach katalizy przeniesienia fazowego (PTC) w mieszaninie wodorotlenku sodu (NaOH) rozpuszczonego w nasyconym tlenem bezwodnym dimetylosulfotlenku (O_2 -DMSO) w obecności chlorku *N*-benzyl-*N,N,N*-trietyloamoniowego [TEBA(Cl)] jako katalizatora PTC. Proces prowadzono w relatywnie łagodnych warunkach temperaturowych 40 °C przez 4 godziny, co umożliwiło uzyskanie (*R*)-(-)-**10_P2** z wydajnością 31% i nadmiarem

enancjomerycznym wynoszącym 89%. Po zastosowaniu tych samych warunków reakcji wobec (S)-(-)-5_P2 (98% ee) otrzymano przeciwny enancjomer (S)-(+)-10_P2 z wydajnością 20% i 87% ee.

W publikacji P2 zaproponowałem i przedyskutowałem hipotetyczny mechanizm tej reakcji, biegnącej najprawdopodobniej według zmodyfikowanej "reakcji Russella"^[77] (Schemat 18). Przebieg tego procesu obejmuje następującą po sobie sekwencję zdarzeń: (i) deprotonowanie amidu 9_P2 za pomocą super-zasady (NaOH/DMSO); (ii) utlenienie powstałego karboanionu tlenem cząsteczkowym (O₂), co prowadzi do utworzenia odpowiedniego nadtlenku; (iii) redukcja nadtlenku do odpowiedniego alkoholu przez DMSO z jednoczesną precypitacją słabo rozpuszczalnego dimetylosulfonu (DMSO₂), co dodatkowo przesuną równowagę reakcji w kierunku tworzenia produktów; (iv) deprotonowanie karbinolu za pomocą nadmiarowego NaOH; (v) regioselektywne otwarcie trójcłonowego pierścienia powstałej *in situ* soli azyrydyniowej przez alkoksylan, co ostatecznie prowadzi do powstania produktu (R)-(-)-10_P2.

Niewątpliwą wadą tej procedury jest jej niska wydajność (20–31%), wynikająca z dość problematycznej "podwójnej reaktywności" zastosowanego odczynnika alkilującego (R)-(-)-5_P2, który ulega wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do wysoce reaktywnej soli azyrydyniowej (S)-6_P2, odpowiedzialnej za szereg reakcji ubocznych. Ponadto reakcja eteryfikacji z udziałem tworzącego się alkoholu może przebiegać nie tylko poprzez regioselektywne otwarcie pierścienia soli azyrydyniowej (S)-6_P2, ale również przez (vi) bezpośrednie podstawienie nukleofilowe chlorku (R)-(-)-5_P2, co obserwuje się w przypadku konwencjonalnej syntezy dekstromoramidu. Oba te równocześnie zachodzące procesy prowadzą do powstania złożonej mieszaniny izomerycznych produktów o odwrotnej konfiguracji absolutnej na odpowiednich asymetrycznych atomach węgla, co znacznie utrudnia izolację i oczyszczanie pożądanego produktu (R)-(-)-10_P2.

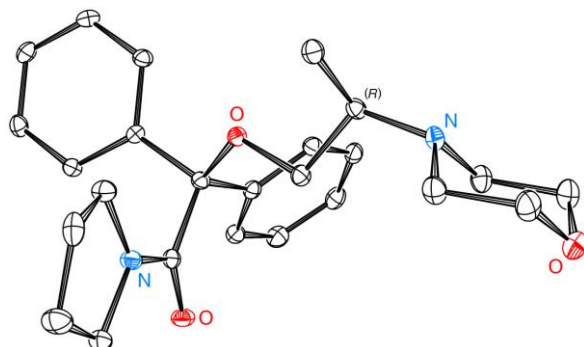


Schemat 18. Mechanizm tworzenia się (R)-izo-moramidu [(R)-(-)-10_P2] z chlorku morfolinowego (R)-(-)-5_P2 oraz amidu (R)-(-)-5_P2 katalizowany przez układ NaOH/O₂-DMSO/TEBA(Cl).

W celu uwiarygodnienia zaproponowanego mechanizmu oraz potwierdzenia budowy cząsteczkowej tytułowego produktu (R)-(-)-10_P2 przeprowadzono dodatkowe badania rentgenostrukturalne otrzymanego monokryształu. Wyznaczenie struktury krystalicznej (R)-izo-moramidu przy użyciu dyfraktometru rentgenowskiego (XRD) może stanowić początek dalszych badań nad polimorfizmem tej substancji,

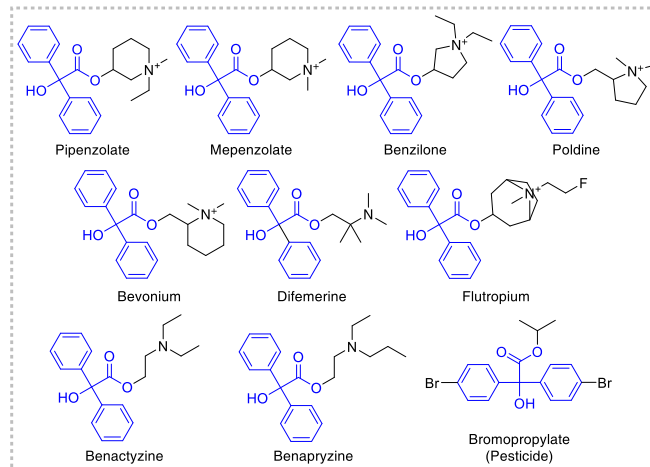
co w kontekście produkcji substancji czynnych leków (API) często decyduje o pożądanym profilu działania farmakologicznego danego preparatu leczniczego (**Rysunek 26**).

Badania strukturalne z wykorzystaniem dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) przeprowadzone zostały przez dr hab. inż., prof. uczelni Macieja Drankę z Katedra Chemii Nieorganicznej (Wydziału Chemicznego, Politechniki Warszawskiej).



Rysunek 26. ORTEP związku 2-[(2*R*)-2-(morfolino-4-ylo)propoksy]-2,2-difenyl-1-(pirolidyno-1-ylo)etan-1-onu [(*R*)-(-)-**10_P2**]. Struktura krystaliczna (*R*)-(-)-**10_P2**, oznaczona numerem CCDC-2202212, została zdeponowana w Cambridge Crystallographic Data Centre. Elipsoidy przedstawiono z 50% poziomem prawdopodobieństwa, a atomy wodoru pominięto dla przejrzystości.

Przedstawiony postulat mechanistyczny syntezy (*R*)-izo-moramidu wskazuje również na możliwość rozszerzenia zakresu stosowalności tej metody względem innych związków zawierających w swojej strukturze rdzeń difenylaoacetylowy, które do tej pory otrzymywano z zastosowaniem bimetalicznych kompleksów Pd(II) (Pd₂hpp₄)^[78] lub systemów katalitycznych bazujących na mieszaninie Cs₂CO₃/P(OEt)₃/O₂.^[79] Odkrycie przeze mnie tej reakcji może mieć ogromne znaczenie z punktu widzenia syntezy wielu cennych pochodnych, w tym substancji aktywnych leków przeciwcholinoergicznych (np. bewonium, defemeryna, flutropium, benaktyna, benapryzyna) i/lub środków agrochemicznych (np. bromopropylat), bez konieczności stosowania toksycznych, palnych oraz trudnych w użytkowaniu katalizatorów i/lub reagentów (**Rysunek 27**).



Rysunek 27. Przykłady substancji leczniczych lub agrochemicznych zawierających rdzeń α-hydroksydifenylaoacetylowy.

Podsumowując, uzyskane wyniki moich badań opublikowane w **publikacji P2** mogą w przyszłości doprowadzić do opracowania nowych analogów dekstromoramidu o znacznie silniejszym działaniu przeciwbólowym i lepszym profilu bezpieczeństwa. Dodatkowo, opracowanie nowej procedury utleniania *N*-difenylaoacetylo-1-pirolidyny oraz następczej jej eteryfikacji *in situ* przy użyciu odpowiednich halogenków jako prekursorów elektrofilowych soli azyrydyniowych, bez konieczności izolowania produktów pośrednich, może przyczynić się do rozwoju skuteczniejszych metod syntezy pochodnych benzhydrolu o złożonych, zatłoczonych sterycznie strukturach, podobnych do tych występujących w lekach antymuskarynowych i/lub antycholinoergicznych zawierających rdzeń α-hydroksydifenylaoacetylowy.

4.3.3.6. Opracowanie nowej metody bezchromatograficznego, enzymatycznego rozdziału kinetycznego racemicznych alkoholi z wykorzystaniem lipaz, α -angelica laktonu oraz odczynnika Girarda typu P (P6).

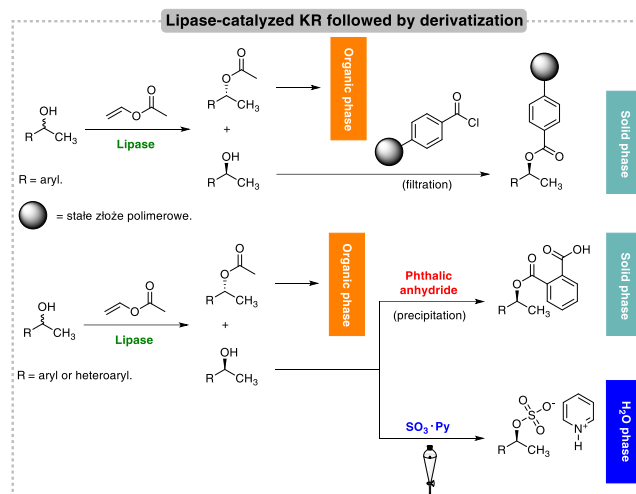
Jak już wcześniej wspomniano, enancjomerycznie czyste alkohole stanowią istotną klasę chiralnych bloków budulcowych, używanych powszechnie w produkcji związków chemicznych o wysokiej wartości dodanej, w tym m.in. farmaceutyków, środków ochrony roślin, związków zapachowych, aromatów, dodatków do żywności oraz składników kosmetyków. Dzięki wykazywaniu przez enzymy doskonałej chemo-, regio- i enancjoselektywności działania katalitycznego względem szerokiego spektrum ksenobiotycznych substratów, bioproceny oparte o rozdziały kinetyczne (KR) mieszanin racemicznych alkoholi i/lub ich odpowiednich estrów realizowane z zastosowaniem hydrolaz (gł. lipaz i/lub proteaz serynowych) jako katalizatorów, stanowią jedną z najpowszechniej stosowanych metod syntezy enancjomerycznie czystych związków z ugrupowaniem hydroksylowym.

Niestety, zastosowanie strategii enzymatycznego rozdziału kinetycznego w przemyśle chemicznym jest ograniczone z kilku powodów, z których najistotniejszym jest relatywnie niska wydajność tych procesów, wynikająca głównie z faktu, że dany enancjomer z pary można otrzymać maksymalnie z 50% wydajnością. Istotną wadą rozdziałów kinetycznych są również wysokie koszty związane z izolacją i oczyszczaniem produktów reakcji, co jest spowodowane trudnościami napotykanymi podczas destylacji oraz krystalizacji równomolowych mieszanin związków o bardzo zbliżonych właściwościach fizyko-chemicznych, w tym przede wszystkim wykazujących duże podobieństwo w zakresie temperatur wrzenia, temperatur topnienia i rozpuszczalności. Do dość skomplikowanych przypadków należy zaliczyć mieszaniny składające się z alkoholi oraz odpowiednich ich estrów niższych kwasów karboksylowych (np. octanów, propionianów i maślanów), które stanowią przeważnie produkty rozdziałów kinetycznych katalizowanych przez lipazy. W przypadku, gdy nie można zastosować standardowych metod rozdzielania mieszanin związków organicznych, takich jak wspomniane wcześniej destylacja czy krystalizacja, konieczne staje się użycie preparatywnych metod chromatograficznych, które pozwalają na rozdzielenie składników mieszanin głównie ze względu na ich różnice w polarności i tym samym wykazywanym odmiennym powinowactwie do dwóch niemieszających się faz – fazy stacjonarnej i fazy ruchomej. Niestety wykorzystanie preparatywnych metod chromatograficznych w skali większej niż laboratoryjna wiąże się z dużymi kosztami oraz pracochłonnością. I tak, chromatografia kolumnowa nie tylko znacząco obniża opłacalność ekonomiczną danej technologii, ale również pogarsza kluczowe parametry dotyczące tzw. bezpieczeństwa środowiskowego, ponieważ towarzyszy jej znacznie większe niż w przypadku krystalizacji czy destylacji zużycie lotnych, łatwopalnych i/lub toksycznych rozpuszczalników organicznych. Co równie ważne, oczyszczanie związków chemicznych za pomocą chromatografii kolumnowej opiera się na użyciu potencjalnie rakotwórczego żelu krzemionkowego, który po dłuższej ekspozycji na niego może powodować również włóknienie płuc, a gdy jest dodatkowo nasączony substancjami chemicznymi, może stanowić niebezpieczny odpad wymagający specjalnych procedur utylizacji.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione ograniczenia, zastosowanie odpowiednich modyfikacji klasycznych procedur KR, które pozwoliłyby uniknąć preparatywnej chromatografii, jest istotne z punktu widzenia potencjalnego wdrażania danej metody syntezy do zastosowań przemysłowych. W tym celu przeważnie stosuje się derywatyzację jednego z produktów KR obecnych w surowej mieszaninie reakcyjnej lub specjalnie dobranych, niekonwencjonalnych odczynników acylujących, które jeszcze na etapie biotransformacji umożliwiają uzyskanie enancjomerycznych estrów o znacznie odmiennych właściwościach fizykochemicznych niż nieprzereagowany alkohol. W efekcie zastosowania ww. strategii możliwe jest wydzielenie interesujących nas produktów KR za pomocą jednego z trzech procesów jednostkowych: filtracji, precypitacji (wytrącania) i filtracji oraz ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz. Potencjalnie użyteczną alternatywą może być również zastosowanie selektywnej ekstrakcji alkoholi bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej zawierającej oba niezmodyfikowane produkty KR za pomocą rozpuszczalników głęboko eutektycznych (ang. *deep eutectic solvents*, DES).^[80] Jednakże separacja pary związków alkohol-ester za pomocą DES-ów zazwyczaj wymaga przeprowadzenia kilku cykli ekstrakcyjnych, aby osiągnąć wysoką czystość izolowanych estrów, podczas gdy wydajność odzyskiwania nieprzereagowanych alkoholi z tych rozpuszczalników jest umiarkowana (ok. 68%), co znacząco obniża opłacalność ich stosowania.

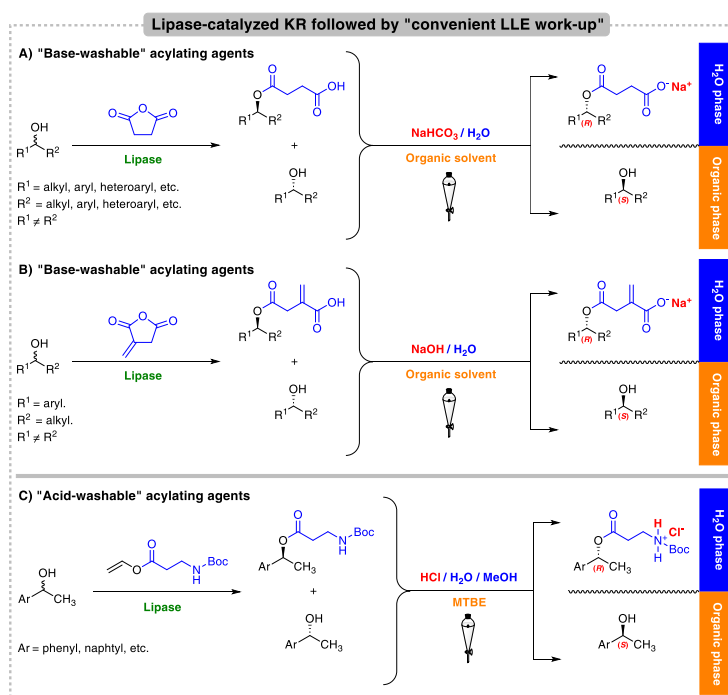
Wczesne doniesienia literaturowe dotyczące modyfikowanych procedur KR oparte były o wtórną derywatyzację nieprzereagowanych alkoholi. W tym celu stosowano takie odczynniki jak np.: chlorek benzoilu immobilizowany na polimerowej matrycy,^[81] bezwodnik ftalowy,^[82] czy chociażby kompleks trójtlenku siarki z pirydyną ($\text{SO}_3\cdot\text{Py}$)^[83] (Schemat 19). Niestety, metody te obarczone były licznymi wadami, do których najpoważniejszą zaliczyć należy możliwość zachodzenia niepożądanego racemizacji optycznej czynnych produktów KR. Oprócz spadku czystości enancjomerycznej rozdzielanych związków, niewątpliwym mankamentem ograniczającym użyteczność jednej z ww. metod jest relatywnie wysoka toksyczność sulfonianu pirydyny, który w podwyższonych temperaturach może dodatkowo wydzielać drażniące gazy. Z kolei w przypadku chlorku benzoilu należy zauważyć, że zakres tej metody jest ograniczony do substratów, które nie posiadają dodatkowych nukleofilowych grup funkcyjnych, w tym np. grup tiolowych czy aminowych

zdolnych do tworzenia odpowiednio wiązań tioestrowych czy amidowych z enancjomerami rozdzielanych substratów.



Schemat 19. Przykłady strategii rozdziałów kinetycznych racemicznych alkoholi katalizowanych lipazami, bez użycia chromatografii, sprzężonych z modyfikacją nieprzereagowanego enancjomeru z użyciem reagentów derywatyzujących umożliwiających ich filtrację (A), precypitację i filtrację z roztworu macierzystego (B) i/lub rozpuszczenie i wymycie do fazy wodnej (C).

W związku z powyższym, w ciągu ostatnich dwóch dekad wysiłki wielu chemików-syntetyków były intensywnie skupione na poszukiwaniach nowych donorów acylu, które umożliwiałyby prowadzenie wydajnych i enancjoselektywnych enzymatycznych rozdziałów kinetycznych racemicznych alkoholi oraz skuteczne wydzielanie ich produktów bez potrzeby wtórnej derywatyzacji. Należy zaznaczyć, że sposoby wydzielania za pomocą ekstrakcji najczęściej różnią się w zależności od charakteru kwasowo-zasadowego i/lub polarności nadawanej danemu alkoholowi przez fragment acylowy zastosowanego donora. W tym pierwszym przypadku, transestryfikacja np. przy użyciu bezwodnika kwasu bursztynowego umożliwia rozdzielenie pary alkohol-ester poprzez przemycanie fazy organicznej wodnym roztworem zasady, co pozwala przekształcić powstający w reakcji hemibursztynian w rozpuszczalną w wodzie sól^[84] (**Schemat 20A**). Dzięki temu nieprzereagowany alkohol pozostaje w fazie organicznej, a ester migruje do fazy wodnej, z której po następnym zakwaszeniu może być z powrotem odzyskany w postaci obojętnego hemibursztynianu poprzez ekstrakcję odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym.

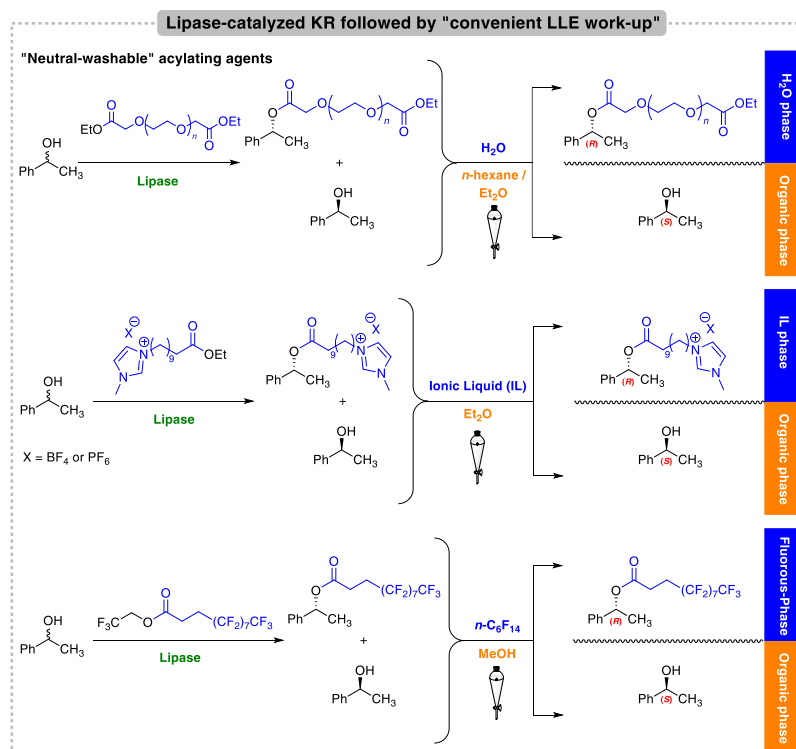


Schemat 20. Przykłady strategii bezchromatograficznych rozdziałów kinetycznych racemicznych alkoholi katalizowanych lipazami z zastosowaniem selektywnych procesów ekstrakcyjnych realizowanych w warunkach zasadowych (A–B) oraz kwasowych (C).

Alternatywą dla bezwodnika bursztynowego może być bezwodnik kwasu itakonowego^[85] (**Schemat 20B**). Niestety, zarówno bezwodnik bursztynowy, jak i bezwodnik kwasu itakonowego mają dość specyficzną budowę, co sprawia, że związki te są niekompatybilne z większością enzymów, których centra aktywne są stosunkowo małe lub do których dostęp jest ograniczony przez wąskie tunele wewnątrzbiałkowe. Ponadto, w obecności obu tych bezwodników może dochodzić do chemicznej modyfikacji grup aminowych reszt lizyny, co w większości przypadków prowadzi do pogorszenia właściwości katalitycznych białek enzymatycznych. Powstające w reakcji hemibursztynian i/lub hemiitakonian mogą również zakwaszać środowisko reakcji, prowadząc do protonowania grup aminowych łańcuchów bocznych zasadowych aminokwasów danego białka i tym samym niekorzystnych zmian w zakresie jego jonizacji, co ma bezpośrednie przełożenie na zmianę konformacji danego enzymu i tym samym spadek jego aktywności katalitycznej. Ze względu na wymienione wyżej wady tych odczynników, rozdziały kinetyczne z ich udziałem są zazwyczaj bardzo czasochłonne (96 godz.) i mało wydajne, bowiem rzadko kiedy konwersja reakcji przekracza 35%. Dodatkowo, enzymatyczny KR z użyciem bezwodników jest nieodpowiedni dla związków podatnych na rozkład i/lub racemizację w zasadowym pH, które występuje podczas ekstrakcji.

Innym skutecznym sposobem wykorzystania różnic we właściwościach kwasowo-zasadowych produktów KR jest zastosowanie estru winylowego *N*-Boc-glicyny jako donora acylu (**Schemat 20C**), dzięki czemu, po przemyciu surowej fazy organicznej wodnym roztworem kwasu solnego,^[86] powstający w reakcji ester przekształca się w rozpuszczalny w wodzie chlorowodorek odpowiedniej czwartorzędowej aminy. Odzysk estru następuje po neutralizacji pH fazy wodnej i przeprowadzeniu kolejnego cyklu ekstrakcyjnego. Wadą stosowania tego typu odczynników jest jednak ograniczenie substratów do takich alkoholi, które w warunkach kwaśnych nie rozpuszczają się w wodzie oraz są stabilne chemicznie i nie ulegają racemizacji. Co więcej, w reakcji z użyciem tego odczynnika ubocznie powstaje alkohol winylowy, który spontanicznie tautomerizuje do termodynamicznie stabilniejszego acetaldehydu – substancji toksycznej, wysoce lotnej i łatwopalnej.

Wśród donorów acylu, które wykorzystują znaczną różnicę w polarności między alkoholem a estrem, i tym samym ich odmienne powinowactwo względem niemieszających się faz ciekłych, można wyróżnić diestry etylowe odpowiednich 1,ω-karboksylanów glikolu polietylenowego (PEG₆₀₀-dikarboksylany etylu),^[87] imidazolowe ciecze jonowe (ILs)^[88] oraz perfluorowane estry^[89] (**Schemat 21**).

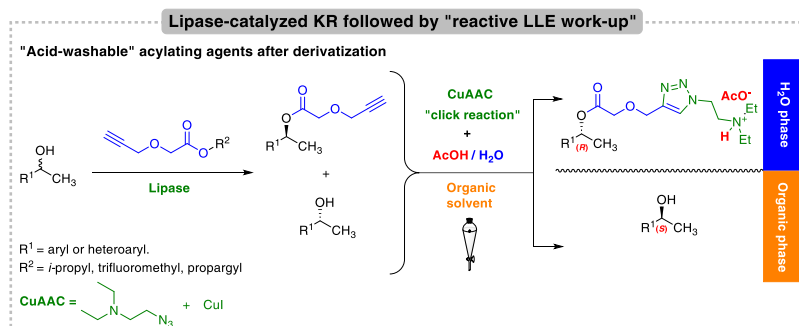


Schemat 21. Przykłady bezchromatograficznych, enzymatycznych rozdziałów kinetycznych racemicznych alkoholi, sprzężonych z selektywnym procesem ekstrakcyjnym prowadzonym w warunkach obojętnych bez użycia kwasu oraz zasady.

Niestety, metody te są ograniczone przez długie czasy reakcji (nawet do 120 godz.), niskie wydajności i znikome nadmiary enancjomeryczny produktów rozdziału, a także wysokie koszty syntezy donorów grup acylowych oraz ich potencjalnie niekorzystny wpływ na środowisko i zdrowie organizmów żywych, tak jak ma to miejsce w przypadku fluorowanych pochodnych. Ponadto, bezpośrednie monitorowanie postępu reakcji,

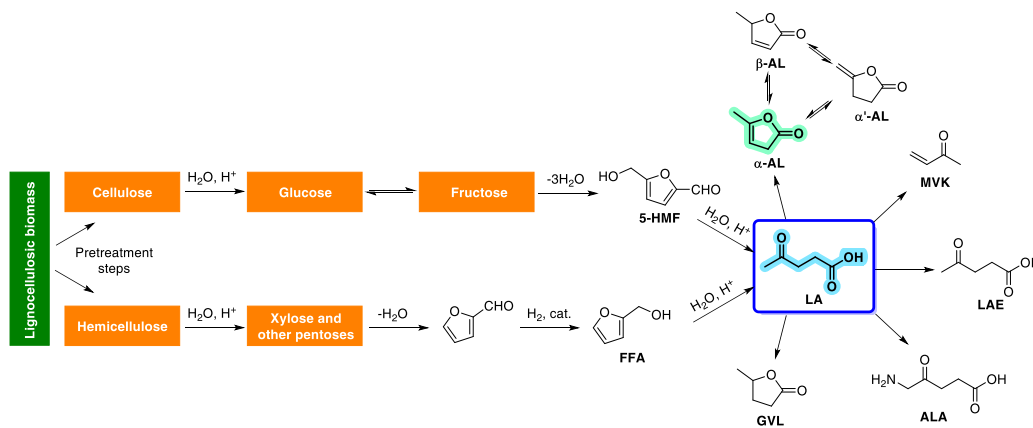
np. za pomocą chromatografii gazowej, jest mocno ograniczone ze względu na nietłoty charakter estrów PEG o wysokiej masie cząsteczkowej oraz silnie polarnych estrów IL. W obu tych przypadkach wymagane są również specyficzne biokatalizatory akceptujące estry PEG lub IL, co znacznie ogranicza spektrum substratowe ulegające takim biotransformacjom.

W 2018 r. ciekawą modyfikację enzymatycznego KR opracował międzynarodowy zespół badaczy pod przewodnictwem Prof. Monica I. Toşa,^[90] który to w charakterze donora acylu wykorzystał trzy różne estry 2-(prop-2-yn-1-yloksy)acetylowe (**Schemat 22**). Produktami KR były nieprzereagowane (*S*)-alkohole oraz (*R*)-estry sfunkcjonalizowane grupą propargilową, która z odpowiednimi azydkami ulegała cykloaddycji *in situ* do 1,4-podstawionych 1,2,3-triazoli, katalizowanej solami miedzi(I) (CuAAC). Następca derywatyzacja alkinowych estrów realizowana na drodze tzw. chemii typu "click" pozwoliła otrzymać zjonizowane i w związku z tym w pełni rozpuszczalne w wodzie związki. Co więcej, enzymatyczna etanoliza pochodnych estrowych umożliwia odzysk przeciwnych (*R*)-enancjomerów rozdzielanych kinetycznie alkoholi. Warty podkreślenia jest fakt, że spośród wszystkich znanych literaturowo bezchromatograficznych procesów KR racemicznych alkoholi, metoda bazująca na 2-(prop-2-yn-1-yloksy)octanie 2,2,2-trifluoroetylu odznaczała się najlepszą enancjoselektywnością ($E >> 500$) oraz relatywnie krótkim czasem trwania samej reakcji biotransformacji (10 godz.). Z drugiej strony, metoda oparta na estrach acetylenowych nie jest pozbawiona wad, wśród których najpoważniejszymi są bardzo skomplikowany i wieloetapowy proces izolacji produktów KR zajmujący łącznie aż 12 godzin, a także konieczność zastosowania toksycznych soli miedzi(I) podczas prowadzenia reakcji cykloaddycji oraz organicznych azydków, które są klasyfikowane jako wysoce wybuchowe odczynniki.



Schemat 22. Przykład bezchromatograficznego, enzymatycznego rozdzielania kinetycznego racemicznych alkoholi, sprzężony z wtórną derywatyzacją powstającego w reakcji estru oraz selektywną ekstrakcją prowadzoną w warunkach kwasowych.

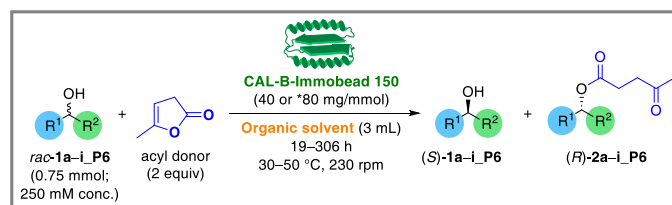
W świetle powyższych ustaleń postanowiłem zaprojektować nowy donor grupy acylowej, dedykowany bezchromatograficznym procesom enzymatycznego rozdzielania kinetycznego racemicznych alkoholi, który byłby pozbawiony większości wad związanych z wcześniejszymi generacjami tego typu reagentów. W ramach badań opisanych w **publikacji P6** wybór padł na tanią i nietoksyczną cykliczną pochodną kwasu lewulinowego – 5-metylo-2(3*H*)-furanon, związku powszechnie znanego pod nazwą zwyczajową α -angelica lakton (α -AL). Warto dodać, że kwas lewulinowy oraz jego pochodne, w tym również α -AL, mogą być otrzymywane z odpadowego i w pełni odnawialnego surowca naturalnego jakim jest biomasa lignocelulozowa i przy tej okazji wymienione zostały na liście "10 Najcenniejszych Chemikaliów Pochodzących z Biomasy" sporządzonej przez Departament Energii Stanów Zjednoczonych.^[91] Co więcej, ich przydatność syntetyczna stanowi obecnie jeden z głównych nurtów badawczych w obszarze tzw. "zielonej chemii" (**Schemat 23**).

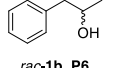
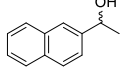
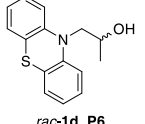
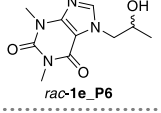
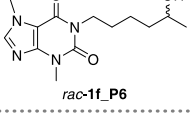
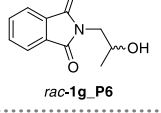
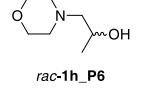
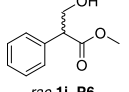


Schemat 23. Metody otrzymywania wysoko wartościowych chemikaliów pochodnych kwasu lewulinowego (LA), w tym α -angelica laktonu (α -AL), z biomasy lignocelulozowej.

Badania nad zastosowaniem α -AL rozpocząłem od prób przeprowadzenia enancjoselektywnej transestryfikacji wybranej serii racemicznych alkoholi *rac-1a-i_P6* w obecności lipazy typu B z *Candida antarctica*, rekombinowanej w komórkach grzyba strzępkowego *Aspergillus oryzae* i unieruchomionej na nośniku Immobead 150, o aktywności katalitycznej ≥ 1800 U/g. Wybrane wyniki przeprowadzonych eksperymentów, zamieszczone w **Tabeli 1**, przedstawiają najlepsze rezultaty enzymatycznego KR dla poszczególnych racemicznych substratów.

Tabela 1. Badanie zakresu stosowalności enzymatycznego rozdziału kinetycznego racemicznych alkoholi *rac-1a-i_P6* z użyciem α -angelica laktonu (α -AL) w roli nieodwracalnego donora acylu w rozpuszczalnikach organicznych.



Substrate	Solvent	Temp. [°C]	Time [h]	Conv. [%]	ee _S [%] / (config.) / Yield [%]	ee _P [%] / (config.) / Yield [%]	E
 <i>rac-1a_P6</i>	MTBE	30	30	48	91 / (S) / 17	>99 / (R) / 44	>500
 <i>rac-1b_P6</i>	MTBE	30	72	49	94 / (S) / 38	99 / (R) / 53	>500
 <i>rac-1c_P6</i>	MTBE	30	48	46	84 / (S) / 35	>99 / (R) / 39	>500
 <i>rac-1d_P6</i>	MTBE	40	109	44	79 / (S) / 33	>99 / (R) / 32	>200
	MTBE	50*	100	50	>99 / (S) / 30	>99 / (R) / 38	>>500
 <i>rac-1e_P6</i>	CH ₂ Cl ₂	40	306	33	47 / (S) / 52	94 / (R) / 26	51
	CH ₂ Cl ₂	50*	19	41	61 / (S) / 56	89 / (R) / 38	32
 <i>rac-1f_P6</i>	PhCH ₃	40*	168	54	95 / (S) / 20	80 / (R) / 21	170
	PhCH ₃	50*	96	51	>99 / (S) / 24	94 / (R) / 25	170
 <i>rac-1g_P6</i>	MTBE	30	24	38	60 / (S) / 23	>99 / (R) / 29	>200
 <i>rac-1h_P6</i>	MTBE	30	24	46	98 / (S) / 21	84 / (R) / 44	>200
 <i>rac-1i_P6</i>	MTBE	30	19	46	35 / (R) / 38	30 / (S) / 39	3

Wśród przetestowanych racemicznych alkoholi, oprócz modelowych substratów, takich jak 1-fenyletanol (*rac-1a_P6*), 1-fenylpropanol (*rac-1b_P6*) czy 1- α -naftyloetanol (*rac-1c_P6*), znalazły się również racemiczne alkohole, które wykorzystywałem w równoległych badaniach do syntez chiralnych API, w tym m.in. 1-(10H-fenotiazyn-10-yl)propan-2-ol (*rac-1d_P6* do syntezy prometazyny oraz etopropazyny), 7-(2-hydroksypropylo)-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryn-2,6-dion (*rac-1e_P6* do syntezy proksyfiliny), 1-(5-hydroksyheksylo)-3,7-dimetylo-3,7-dihydro-1H-puryn-2,6-dion (*rac-1f_P6* do syntezy lizofiliny), 2-(2-hydroksypropylo)-1H-izoindol-1,3(2H)-dion (*rac-1g_P6* do syntezy β -blokerów) oraz 1-(morfolin-4-yl)propan-2-ol (*rac-1h_P6* do syntezy dekstromoramidu oraz jego eterowej pochodnej). Oprócz ośmiu ww. alkoholi II-rzędowych, zakres stosowności enzymatycznego KR sprawdziłem również wobec pojedynczego alkoholu I-rzędowego, a mianowicie 3-hydroksy-2-fenylpropionianu metylu (*rac-1i_P6*).

Optymalizacja warunków reakcji, obejmująca dobór odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego, ilości użytego biokatalizatora, temperatury procesu oraz czasu reakcji, po którym przerywano KR, wykazała, że najlepsze wyniki rozdziału kinetycznego – zarówno pod względem szybkości procesu (30–72 godz.), konwersji substratu (46–49%), jak i enancjoselektywności działania ($E > 500$) komercyjnego preparatu lipazy – uzyskano dla prostych alkoholi aromatyczno-alifatycznych *rac-1a-c_P6*, zawierających grupę metylową po jednej stronie centrum stereogenicznego oraz odpowiednio podstawniki fenylowy, benzyłowy lub α -naftyłowy po drugiej stronie. Doskonale nadmiary enancjomeryczne ($>99\%$ ee) uzyskano również dla obu enancjomerycznych form alkoholu zawierającego pierścień fenotiazyny *rac-1d_P6*. Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że ta pochodna wymagała zastosowania dwukrotnie większej ilości enzymu (80 mg/mmol użytego substratu), znacznie wyższej temperatury (50 °C) oraz dłuższego czasu reakcji (100 godz.), aby osiągnąć odpowiednio wysoki poziom przereagowania substratu w produkt (*R*)-**2d_P6**. Nieco gorsze rezultaty pod względem enancjoselektywności (od $E=170$ do $E > 200$) uzyskano dla reakcji z pochodnymi zawierającymi w swojej strukturze podstawnik *N*-butylo-3,7-dimetyloksantynowy *rac-1f_P6*, ftalimidowy *rac-1g_P6* oraz morfolinowy *rac-1h_P6*. Z kolei racemiczna proksyfilina *rac-1d_P6*, zawierająca podstawnik 1,3-dimetyloksantynowy, nie dość, że biotransformowana była z przeciętną enancjoselektywnością ($E=50$) oraz niższą konwersją (ca. 40%) pomimo użycia wyższych temperatur oraz dłuższych czasów reakcji, to jeszcze wymagała zastosowania mało ekologicznego rozpuszczalnika jakim był chlorek metylenu. Spośród wszystkich przetestowanych substratów bez wątpienia najbardziej wymagającą okazała się pochodna zawierająca pierwszorzędową grupę hydroksylową *rac-1i_P6*, dla której produkty KR były izolowane z niskimi nadmiarami enancjomerycznymi, wynoszącymi niespełna 40%.

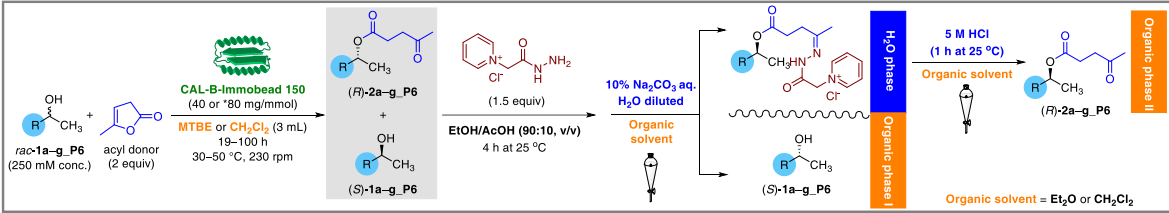
Po pozytywnym zweryfikowaniu, że α -angelica lakton (α -AL) może być stosowany jako uniwersalny donor grupy acylowej w biokatalitycznym KR racemicznych alkoholi II-rzędowych, kolejnym istotnym krokiem było zbadanie, czy mieszaniny zawierające równomolowe ilości modelowego 1-fenyletanolu (*rac-1a_P6*) oraz jego estru lewulinowego *rac-2b_P6* można rozdzielić w prosty sposób za pomocą ekstrakcji. Pierwsze eksperymenty polegały na zastosowaniu wodorosiarczyny sodu (NaHSO_3) i/lub siarczyny sodu (Na_2SO_3) w celu wymycia lewulinianu 1-fenyletylu (*rac-2b_P6*) z mieszaniny poreakcyjnej do fazy wodnej w postaci adduktu wodorosiarczynowego. Oba wspomniane siarczyny stosowano zarówno oddzielnie, jak i w różnych kombinacjach, z uwzględnieniem różnych nadmiarów molowych w stosunku do usuwanego lewulinianu *rac-2b_P6*. Zmiennymi parametrami były również czas przemycania, temperatura, skład fazy organicznej, a także rodzaj zasady (50% NaOH lub nasycony Na_2CO_3) użytej do utworzenia rozpuszczalnych w wodzie α -hydroksysulfonianów. Niestety, wszystkie przeprowadzone próby zakończyły się niepowodzeniem, co mogło wynikać z niekorzystnej równowagi tworzenia się adduktów i/lub ich deprotonowania zasadą. Z perspektywy czasu wydaje się wysoce prawdopodobne, że w celu zwiększenia wydajności nukleofilowej 1,2-addycji jonu wodorosiarczynowego do terminalnej grupy karbonyłowej obecnej w odpowiednich estrach lewulinowych, metoda ta wymagałaby zastosowania ciągłego wymywania powstającego adduktu wodorosiarczynowego w specjalnie zaprojektowanym reaktorze wyposażonym w selektywną (półprzepuszczalną) membranę.

Alternatywna strategia izolacji modelowego lewulinianu z równomolowej mieszaniny alkohol-ester zakładała użycie odczynników Girarda typu T i P. Związki te zostały po raz pierwszy zsyntetyzowane w 1936 r. przez dwóch chemików – André Girarda oraz George’a Sandulesco.^[93] W latach 1940–1960 zastosowanie tych hydrazydów umożliwiło izolację wielu cennych produktów naturalnych, w tym głównie steroidów i alkaloidów, a także wykorzystywane były w syntezie rozpuszczalnych w wodzie farmaceutyków.^[94] Warto nadmienić, że odczynnik Girarda typu T odegrał również kluczową rolę w izolacji oraz badaniach struktury chemicznej i biologicznego działania hormonów kory nadnerczy (gł. kortyzonu),^[95] za co szwajcarski biochemik pochodzenia polsko-żydowskiego – Tadeusz Reichstein – otrzymał w 1950 roku Nagrodę Nobla. Wstępne eksperymenty mające na celu porównanie efektywności działania obu wspomnianych odczynników w syntezie hydrazonów, zakładające ustalenie odpowiedniej ich stechiometrii oraz ilości dodatku kwasu octowego (AcOH), a także rodzaju rozpuszczalnika organicznego (Et_2O vs. EtOAc) użytego do ekstrakcji, wykazały, że optymalne warunki pozwalające na ilościowe wydzielenie obu produktów KR wymagały zastosowania 1.5-krotnego ekwiwalentu moleowego odczynnika Girarda typu P rozpuszczonego w mieszaninie

EtOH/AcOH (90:10, v/v). Reakcję derywatyzacji lewulinianu należało prowadzić odpowiednio przez 3 godziny w 50 °C albo przez 4 godziny w temperaturze 25 °C, a ekstrakcję wykonywać eterem dietylowym. Odzysk lewulinianu z fazy wodnej wymagał przeprowadzenia dodatkowej kwaśnej hydrolizy odpowiedniego hydrazonu z zastosowaniem 5 M HCl w 25 °C przez 1 godzinę.

Po ustaleniu optymalnych warunków procesu izolacji pary związków alkohol–lewulinian przy użyciu odczynnika Girarda typu P zbadano zakres stosowalności opracowanej metody wobec produktów enancjoselektywnej transestryfikacji siedmiu różnych racemicznych alkoholi *rac*-**1a–g_P6**, przeprowadzonej z użyciem α -AL w obecności CAL-B w warunkach kontroli kinetycznej. Reprezentatywne wyniki tych badań zestawiono w **Tabeli 2**.

Tabela 2. Badanie zakresu stosowalności bezchromatograficznego rozdziału kinetycznego racemicznych alkoholi *rac*-**1a–g_P6** z użyciem α -angelica laktonu (α -AL) zakończone izolacją produktów KR z zastosowaniem odczynnika Girarda typu P.

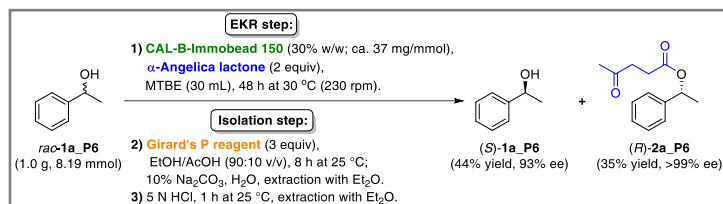


R	KR mixture (ee [%])		Organic phase I [%]		Organic phase II [%]	
	(S)-Alcohol	(R)-Levulinate	Recov. / GC-yield / ee	GC-yield	GC-yield	Recov. / GC-yield / ee
	1a_P6 (88)	2a_P6 (>99)	94 / >99 / 82	0	0	66 / >99 / >99
	1b_P6 (94)	2b_P6 (99)	91 / 93 / 91	7	2	77 / 98 / 95
	1c_P6 (84)	2c_P6 (>99)	94 / 98 / 80	2	0	90 / >99 / >99
	1d_P6 (>99)	2d_P6 (>99)	91 / >99 / 98	0	0	93 / >99 / >99
	1e_P6 (61)	2e_P6 (90)	97 / 87 / 59	13	7	92 / 93 / 90
	1f_P6 (>99)	2f_P6 (94)	88 / 96 / 98	4	1	72 / 99 / 94
	1g_P6 (60)	2g_P6 (>99)	92 / 98 / 60	2	6	53 / 94 / >99

W toku eksperymentów zdecydowano się na użycie niższych temperatur derywatyzacji lewulinianów, ponieważ w 50 °C następowała znaczna racemizacja izolowanego modelowego alkoholu (S)-**1a_P6** ($\Delta\%$ ee = 27). Optycznie czynne produkty KR zostały wyizolowane z wysoką efektywnością pod względem wydajności odzysku (53–97%), czystości chemicznej (87–99%) oraz nadmiaru enancjomerycznego (59–99%). We wszystkich eksperymentach, z wyjątkiem próby dotyczącej pary (S)-**1b_P6**–(R)-**2b_P6**, optycznie czynne (R)-lewuliniany zostały wydzielone bez strat w zakresie czystości optycznej. Niestety, w przypadku wszystkich wyizolowanych optycznie czynnych alkoholi (S)-**1a–g_P6** stwierdzono niewielką erozję nadmiarów enancjomerycznych ($\Delta\%$ ee = 1–4) w porównaniu do wartości wyjściowych oznaczonych bezpośrednio po KR. Wykazano tym samym, że opracowana metoda enzymatycznego rozdziału kinetycznego z użyciem α -AL, połączona z izolacją produktów przy zastosowaniu odczynnika Girarda typu P, jest dość prosta, wydajna i uniwersalna w odniesieniu do stosunkowo szerokiego spektrum racemicznych (hetero)aromatyczno-alifatycznych alkoholi II-rzędowych, a ponadto nie powoduje znaczącej racemizacji enancjomerycznie wzbogaconych produktów.

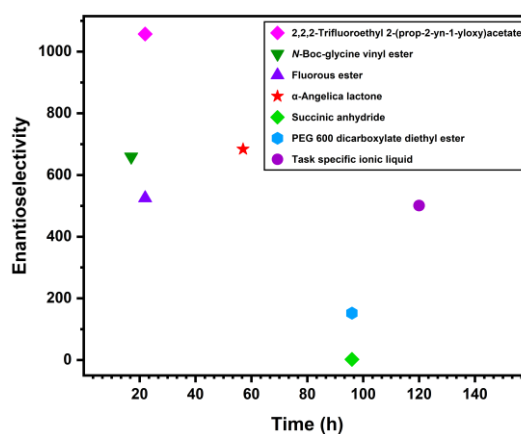
Ostatnim celem badań opisanych w **publikacji P6** było sprawdzenie użyteczności opracowanej metody w skali 1-gramowej rozdzielanego enzymatycznie racemicznego 1-fenyletanolu (*rac*-**1a_P6**) (**Schemat 26**). Zaprojektowany przeze mnie proces prowadzony w powiększonej skali wymagał kilku kosmetycznych modyfikacji, w tym wydłużenia czasu KR z 30 godzin do 48 godzin, zwiększenia nadmiaru molowego odczynnika Girarda typu P z 1,5 ekwiwalentów do 3 ekwiwalentów oraz wydłużenia czasu derywatyzacji lewulinianu do

odpowiedniego hydrazonu z 4 godzin do 8 godzin. Efektem końcowym było wydzielenie całkowicie czystych chemicznie enancjomerycznie wzbogaconych produktów KR – (S)-1-fenyletanolu [(S)-**1a_P6**] z wydajnością 44% i 93% ee oraz (R)-lewulinianu 1-fenyletylu [(R)-**2a_P6**] z wydajnością 35% i >99% ee.



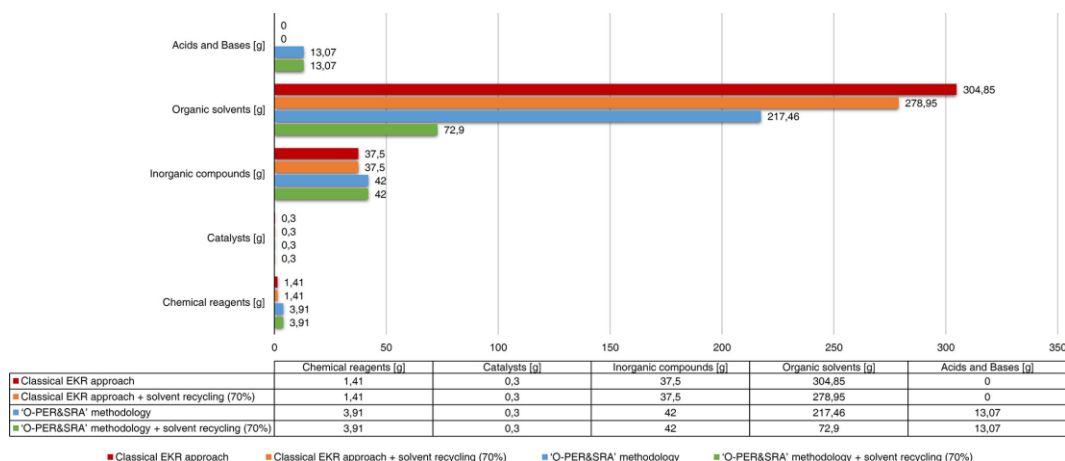
Schemat 26. Bezechromatograficzny rozdział kinetyczny racemicznego 1-fenyletanolu (*rac*-**1a_P6**) przeprowadzony w skali 1-gramowej, katalizowany lipazą B z *Candida antarctica* z użyciem α -angelica laktonu i odczynnika Girarda typu P.

Warto dodać, że na przykładzie rozdziału kinetycznego racemicznego 1-fenyletanolu (*rac*-**1a_P6**), w porównaniu z dotychczas opublikowanymi donorami grupy acylowej, użyty α -angelica lakton (★) wyróżnia się jako jeden z najbardziej obiecujących reagentów zarówno pod względem łącznego czasu niezbędnego na realizację procesu KR i wydzielenie jego produktów, jak i enancjoselektywności zastosowanej lipazy (**Rysunek 28**).



Rysunek 28. Podsumowanie wyników bezechromatograficznych rozdziałów kinetycznych (KR) racemicznego 1-fenyletanolu (*rac*-**1a_P6**) katalizowanego lipazami z użyciem niekonwencjonalnych donorów grupy acylowej. Oś odciętych przedstawia łączny czas potrzebny na przeprowadzenie procesu KR racemicznego substratu oraz izolację jego produktów metodą derywatyzacji i ekstrakcji ciecz-ciecz. Oś rzędnych reprezentuje enancjoselektywność (*E*) reakcji enzymatycznego KR *rac*-**1a_P6**.

Aby przedstawić walory proekologiczne opracowanej metody w porównaniu do klasycznej metody KR z zastosowaniem octanu winylu oraz chromatografii kolumnowej na etapie oczyszczania produktów, przeprowadzono odpowiednie bilanse masowe, uwzględniające przede wszystkim zużycie rozpuszczalników organicznych, katalizatorów, związków nieorganicznych (w tym soli, kwasów i zasad) oraz innych chemikaliów organicznych (**Schemat 27**). Bez wątpienia opracowana przeze mnie metoda góruje nad metodą klasyczną pod względem zużycia znacznie mniejszych ilości szkodliwych dla środowiska rozpuszczalników organicznych.



Schemat 27. Zestawienie czynników środowiskowych dla opracowanej metodyki "O-PER&SRA" (ang. "One-pot Enzymatic Resolution and Separation of Racemic sec-Alcohols") oraz konwencjonalnej metody KR z użyciem octanu winylu i chromatografii kolumnowej.

4.3.4. Podsumowanie.

W cyklu publikacji, które stanowią podstawę niniejszego osiągnięcia habilitacyjnego, przedstawiłem zastosowanie metod biokatalitycznych z udziałem lipaz i dehydrogenaz alkoholowych jako biokatalizatorów kluczowych transformacji asymetrycznych, przydatnych w stereokontrolowanej syntezie enancjomerycznie czystych substancji czynnych leków zawierających drugorzędowe ugrupowania hydroksylowe i/lub prototypowych związków farmakologicznych.

Większość zoptymalizowanych bioprocessów, w których zastosowano biokatalizatory o odpowiedniej aktywności katalitycznej i stereoselektywności, pozwoliła na otrzymanie chiralnych produktów z wysoką wydajnością oraz doskonałymi nadmiarami enancjomerycznymi, w relatywnie łagodnych warunkach reakcyjnych. Wszystkie przeprowadzone syntezy zostały zoptymalizowane zarówno pod względem wydajności, jak i czystości enancjomerycznej uzyskiwanych optycznie czynnych produktów. Nowe chiralne, nieracemiczne pochodne scharakteryzowano za pomocą metod spektralnych, chromatograficznych oraz chiralooptycznych, określając ich czystość enancjomeryczną i przypisując odpowiednie konfiguracje absolutne.

Najważniejsze osiągnięcia poznawcze wynikające z omawianych w przewodniku publikacji to:

1. **Opracowanie nowych biokatalitycznych metodologii syntezy substancji czynnych leków** – zidentyfikowanie i rozwój efektywnych, stereoselektywnych przekształceń asymetrycznych z udziałem lipaz i/lub dehydrogenaz alkoholowych, prowadzących do otrzymania następujących enancjomerycznie czystych API:
 - a) tenofowiru;
 - b) proksyfiliny;
 - c) dirpofiliny;
 - d) nikotynianu ksantynolu;
 - e) propranololu;
 - f) alprenololu;
 - g) pindololu;
 - h) karazololu;
 - i) moprolołu;
 - j) metoprolołu.
2. **Poszerzenie zakresu wiedzy podstawowej z chemii medycznej** – zaproponowanie praktycznych strategii syntezy chiralnych substancji czynnych oraz prototypowych związków farmakologicznych, które mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad nowymi lekami. Wśród prototypowych związków należy wyróżnić:
 - a) (*R*)-lizofilinę – istniejący kandydat na lek o działaniu przeciwzapalnym oraz immunomodulującym;
 - b) (*R*)-izo-moramid – nowozaprojektowany oraz zsyntetyzowany przeze mnie nieracemiczny analog znanego leku opioidowego (dekstromoramidu).
3. **Poszerzenie podstawowej wiedzy dotyczącej stosowalności biokatalizatorów** – udowodnienie skuteczności i wszechstronności lipaz i dehydrogenaz alkoholowych w biotransformacjach nowych substratów, co przyczynia się do lepszego zrozumienia ich mechanizmów działania i potencjału aplikacyjnego. Do nowo przebadanych związków, dotąd w większości przypadków nie testowanych w reakcjach z użyciem biokatalizatorów należy zaliczyć pochodne:
 - a) 6-halogeno-9*H*-puryny [np., 1-(6-chloro-9*H*-puryn-9-yl)propan-2-ol, 1-(6-chloro-9*H*-puryn-9-yl)propan-2-on, 1-(6-jodo-9*H*-puryn-9-yl)propan-2-ol, 1-(6-jodo-9*H*-puryn-9-yl)propan-2-on];
 - b) ksantyny [np. 7-(2-hydroksypropylo)-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion, 1,3-dimetylo-7-(2-oksopropylo)-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion, 7-(3-chloro-2-hydroksypropylo)-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion, 7-(3-chloro-2-oksopropylo)-1,3-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion, 1-(5-hydroksyheksylo)-3,7-dimetylo-3,7-dihydro-1*H*-puryno-2,6-dion];
 - c) ftalimidu [np. 2-(3-chloro-2-hydroksypropylo)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dion, 2-(3-chloro-2-oksopropylo)-1*H*-izoindolo-1,3(2*H*)-dion];
 - d) morfoliny [np. 1-(morfolin-4-yl)propan-2-ol].

4. **Charakterystyka nowatorskich związków chiralnych** – synteza i analiza nieracemicznych pochodnych zawierających drugorzędowe ugrupowania hydroksylowe, wraz z dokładnym określeniem ich czystości enancjomerycznej oraz przypisaniem konfiguracji absolutnej za pomocą metod chromatograficznych, chiralnoptycznych, spektralnych i/lub rentgenostrukturalnych.
5. **Optymalizacja procesów biotransformacji** – rozwój skalowalnych bioprocessów, które łączą wysoką wydajność chemiczną z doskonałą stereoselektywnością, umożliwiając ich potencjalne zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.
6. **Zastosowanie metod komputerowych w obliczeniach teoretycznych z zakresu badania właściwości katalitycznych enzymów** – wykorzystanie zaawansowanych technik, takich jak dokowanie molekularne, do analizy wpływu strukturalnych cech chiralnych substratów i biokatalizatorów na ich wzajemne oddziaływanie w kompleksach białko-ligand. Wyniki tych obliczeń pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmów stereochemicznej selektywności reakcji enzymatycznych oraz identyfikację czynników odpowiedzialnych za korzystne i niekorzystne interakcje wpływające na wydajność i stereoselektywność opracowywanych przeze mnie procesów biokatalitycznych.
7. **Rozwój nowych procedur w ramach istniejących biokatalitycznych strategii:**
 - a) opracowanie oryginalnej dwuenzymatycznej procedury deracemizacji nieaktywnej pochodnej racemicznego alkoholu II-rzędowego na przykładzie lizofiliny, zrealizowanej poprzez sekwencyjną kaskadę konkurencyjnych reakcji redoks katalizowanych z wykorzystaniem układu lakaza/TEMPO/ADH w procedurze typu "one-pot" – w jednym naczyniu;
 - b) opracowanie bezchromatograficznego rozdzielania kinetycznego racemicznych alkoholi katalizowanego przez lipazy z zastosowaniem α -angelica laktonu jako nowego nieodwracalnego donora acylu, upraszczającego proces wydzielania oraz oczyszczania produktów KR.
8. **Opracowanie postulatu mechanistycznego nowej reakcji chemicznej** – na przykładzie syntezy optycznie czynnego eterowego analogu dekstromoramidu, zachodzącej w wyniku utleniania trzeciorzędowego karboanionu *N*-difenyloacetylo-1-pirolidyny oraz następczego regioselektywnego otwarcia pierścienia odpowiedniej soli azyrydyniowej, będącej pochodną morfoliny, w roztworze natlenowanego dimetylosulfotlenku (DMSO) w warunkach katalizy przeniesienia międzyfazowego (PTC). Koncepcja przedstawiona w tej reakcji może stanowić podstawę do opracowania metod syntezy leków antymuskarynowych opartych na rdzeniu α -hydroksydifenyloacetylowym.

Podsumowując, opracowanie oraz wdrożenie nowych, praktycznych metodologii syntezy optycznie czynnych związków o wysokiej wartości dodanej w skali laboratoryjnej pozwala z optymizmem planować dalsze syntezy enancjomerycznie wzbogaconych API otrzymywanych w oparciu o nieracemiczne alkohole. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, przedstawione przeze mnie osiągnięcie badawcze odpowiada na aktualne potrzeby współczesnej nauki w obszarze chemii medycznej, łącząc charakter poznawczy z potencjalnym zastosowaniem praktycznym.

4.4. Obecne i przyszłe kierunki badań.

Moje plany naukowe na najbliższe lata obejmują szeroko zakrojone prace nad rozwojem chemoenzymatycznych oraz fotobiokatalitycznych metod syntezy optycznie czynnych związków o znaczeniu biologicznym, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych o udokumentowanej aktywności farmakologicznej i biocydowej. W tym kontekście planuję kontynuować pogłębione badania nad opracowywaniem alternatywnych metod syntezy enancjomerycznie czystych API oraz ich chiralnych prekursorów.

W ramach doskonalenia nowych strategii syntezy optycznie czynnych związków o wysokiej wartości dodanej zamierzam skupić swoją aktywność badawczą na projektowaniu oraz zastosowaniu multienzymatycznych procesów kaskadowych, wykorzystujących potencjał biokatalityczny hydrolaz (m.in. lipaz, esteraz, proteaz), oksydoreduktaz (m.in. dehydrogenaz alkoholowych, ketoreduktaz, ene-reduktaz, dehydrogenaz aminowych), transferaz (m.in. transaminaz, acylotransferaz) oraz oksydaz (m.in. lakaz, oksydaz aldehydowych) i in.

Obecnie od ponad roku realizuję projekt naukowy NCN OPUS 24, koncentrujący się na połączeniu dwóch strategii katalitycznych – fotokatalizy oraz biokatalizy. Jak dotąd moim największym osiągnięciem badawczym w ramach tego projektu było opracowanie nowej foto-biokatalitycznej metody deracemizacji alkoholi II-rzędowych z wykorzystaniem światła widzialnego oraz rekombinowanych dehydrogenaz alkoholowych, opublikowanej w *ACS Catal.* **2024**, 3, 1808–1823 (doi: 10.1021/acscatal.3c05100).

Drugim przełomowym odkryciem dokonany w trakcie badań realizowanych w ramach projektu OPUS 24 było opracowanie biokatalitycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego (DKR) racemicznych alkoholi drugorzędowych w środowisku wodnym, opublikowanego w *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, *64*, e202420133 (doi: 10.1002/anie.202420133).

4.5. Plany badawcze na najbliższe lata.

1. Rozszerzenie badań nad opracowywaniem foto-biokatalitycznych metod syntezy optycznie czynnych alkoholi oraz amin w sekwencyjnej procedurze typu "one-pot". W ramach tych badań planuję przeprowadzić:
 - a) fotoindukowane utlenianie terminalnych alkenów i/lub octanów enoli do związków karbonylowych oraz następnie biokatalityczne transwodorowanie i/lub aminowanie redukcyjne przejściowych, prochiralnych ketonów z wykorzystaniem odpowiednich rekombinowanych dehydrogenaz alkoholowych (ADHs) i/lub aminotransferaz (TAs) jako biokatalizatorów w wodnych roztworach buforowych;
 - b) indukowane światłem dekarboksylatywne utlenianie kwasów karboksylowych sprzężone ze stereoselektywną bioredukcją katalizowaną przez ADHs lub asymetrycznym biotransaminowaniem katalizowanym przez TAs;
 - c) multienzymatyczne reakcje kaskadowe realizowane z wykorzystaniem lakaz, lipaz oraz transaminaz, a także światła czerwonego, bez dodatku fotokatalizatorów;
 - d) projektowanie, synteza oraz badanie właściwości fotokatalitycznych nowych, w pełni rozpuszczalnych w wodzie, niemetalicznych fotokatalizatorów otrzymywanych na bazie rdzenia 9-fluorenonu oraz ich zastosowanie w reakcjach kaskadowych z udziałem enzymów;
 - e) próby intensyfikacji fotokatalitycznych reakcji redoks z wykorzystaniem pilotażowego reaktora przepływowego do prowadzenia procesów w systemach przepływu ciągłego.
2. Badania właściwości biokatalitycznych wariantów acylotransferazy pochodzącej z *Mycobacterium smegmatis* (MsAcT) w reakcjach nienatywnych prowadzonych w wodnych roztworach buforowych bez dodatku rozpuszczalnika organicznego.

W tym kontekście przeprowadzone zostaną próby odkrycia nowej aktywności katalitycznej wariantów MsAcT w reakcjach multikomponentowych (np. Kabachnik–Fieldsa, Passeriniego, Biginello, Hantzscha, Mannicha, Ugiego itp.), reakcjach domino (np. Thia-Michael–Henry), a także w klasycznych kondensacjach (np. Michaela, Aza-Michaela, Morita–Baylis–Hillmana, Knoevenagela, Knoevenagel–Phospha–Michaela, aldolowej, nitro-aldolowej Henriego itp.).
3. Projektowanie multienzymatycznych reakcji kaskadowych w syntezie enancjomerycznie czystych amido- oraz aminoalkoholi, z wykorzystaniem układów biokatalitycznych złożonych z:
 - a) dehydrogenaz alkoholowych (ADHs), ene-reduktaz (EREDs) oraz hydratyz nitrylowych (NHaz);
 - b) dehydrogenaz alkoholowych oraz nitroreduktaz.
4. Projektowanie, synteza oraz zastosowanie nowych donorów acylu dedykowanych enancjoselektywnej transestryfikacji katalizowanej lipazami w warunkach kontroli kinetycznej, w celu uproszczenia metod wydzielania oraz oczyszczania nieracemicznych produktów procesów typu KR.

4.6. Bibliografia.

- [1] Senkuttuvan, N.; Komarasamy, B.; Krishnamoorthy, R.; Sarkar, S.; Dhanasekaran, S.; Anaikutti, P. *RSC Adv.* **2024**, *14*, 33429–33448.
- [2] "US FDA. FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs": https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-new-stereoisomeric-drugs?utm_source=chatgpt.com
- [3] "EMA's Policy Statement for the Investigation of Chiral Active Substances": https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/investigation-chiral-active-substances_en.pdf?utm_source=chatgpt.com
- [4] Murakami, H. *From Racemates to Single Enantiomers – Chiral Synthetic Drugs over the last 20 Years*. (rozdział w książce: Sakai, K., Hirayama, N., Tamura, R. (Eds) *Novel Optical Resolution Technologies. Topics in Current Chemistry*) **2006**, 269, 273–299. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [5] "New Drugs at FDA: CDER's New Molecular Entities and New Therapeutic Biological Products, U. S. Food and Drug Administration (FDA), 2023", dostępna online: <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-processdrugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-bi>.
- [6] N. A. McGrath, M. Brichacek, J. T. Njardarson, *J. Chem. Ed.* **2010**, *87*, 1348–1349 i załącznika w postaci plakatu pt. "Top 200 SMALL Molecule Drugs by Sales in 2023", a poster compiled and produced by Ryn E. Williams and Hayden M. Leatherwood from the Njardarson Group (The University of Arizona), <https://sites.arizona.edu/njardarson-lab/top200-posters/>.
- [7] a) Bell, E. L.; Finnigan, W.; France, S. P.; Green, A. P.; Hayes, M. A.; Hepworth, L. J.; Lovelock, S. L.; Niikura, H.; Osuna, S.; Romero, E.; Ryan, K. S.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. *Nature Rev.* **2021**, *1*; b) Faber, K. (Ed.) *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 7th ed.; Springer: New York, NY, USA, 2018.
- [8] a) Buller, R.; Lutz, S.; Kazlauskas, R. J.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Bornscheuer, U. T. *Science* **2023**, *382*, eadh8615; b) Winkler, C. K.; Schrittwieser, J. H.; Kroutil, W. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 55–71.
- [9] Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.
- [10] a) Kinner, A.; Nerke, P.; Siedentop, R.; Steinmetz, T.; Classen, T.; Rosenthal, K.; Nett, M.; Pietruszka, J.; Lutz, S. *Biomedicines* **2022**, *10*; b) Fryszkowska, A.; Devine, P. N. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 151–160; c) de Maria, P.; de Gonzalo, G.; Alcántara, A. *Catalysts* **2019**, *9*, 802; d) Devine, P. N.; Howard, R. M.; Kumar, R.; Thompson, M. P.; Truppo, M. D.; Turner, N. J. *Nature Rev. Chem.* **2018**, *2*, 409–421; e) Patel, R. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1252–1274.
- [11] a) Simic, S.; Zukic, E.; Schmermund, L.; Faber, K.; Winkler, C. K.; Kroutil, W. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 1052–1126; b) Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88–119.
- [12] a) Hoyos, P.; Pace, V.; Alcántara, A. R. *Catalysts* **2019**, *9*, 260; b) Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A. *Green Chem.* **2010**, *12*, 81–86.
- [13] Amblard, F.; Patel, D.; Michailidis, E.; Coats, S. J.; Kasthuri, M.; Biteau, N.; Tber, Z.; Ehteshami, M.; Schinazi, R. F. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *240*, 114554.
- [14] Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 332–338.
- [15] Ray, A. S.; Fordyce, M. W.; Hitchcock, M. J. *Antiviral. Res.* **2016**, *125*, 63–70.
- [16] Balzarini, J.; Holy, A.; Jindrich, J.; Naesens, L.; Snoeck, R.; Schols, D.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 332–338.
- [17] Antiretroviral Therapy Cohort, C. *Lancet* **2008**, *372*, 293–299.
- [18] World health statistics 2024: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO (<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376869/9789240094703-eng.pdf?sequence=1>).
- [19] N. A. McGrath, M. Brichacek, J. T. Njardarson, *J. Chem. Ed.* **2010**, *87*, 1348–1349 and the appendix: Top 200 SMALL Molecule Drugs by Sales in 2023, a poster compiled and produced by Ryn E. Williams and Hayden M. Leatherwood from the Njardarson Group (The University of Arizona), <https://bpb-us-e2.wpmucdn.com/sites.arizona.edu/dist/9/130/files/2024/05/2023Top200SmallMoleculePosterV5.pdf>
- [20] a) Arimilli, M. N.; Cundy, K. C.; Dougherty, J. P.; Kim, C. U.; Oliyai, R.; Stella, V. J. Antiviral Phosphonomethoxy Nucleotide Analogs Having Increased Oral Bioavailability, U.S. Patent US5977089A, 1999; b) Brown Ripin, D. H.; Teager, D. S.; Fortunak, J.; Basha, S. M.; Bivins, N.; Boddy, C. N.; Byrn, S.; Catlin, K. K.; Houghton, S. R.; Jagadeesh, S. T.; Kumar, K. A.; Melton, J.; Muneer, S.; Rao, L. N.; Rao, R. V.; Ray, P. C.; Reddy, N. G.; Reddy, R. M.; Shekar, K. C.; Silverton, T.; Smith, D. T.; Stringham, R. W.; Subbaraju, G. V.; Talley, F.; Williams, A. *Org. Proc. Res. Dev.* **2010**, *14*, 1194–1201.
- [21] Derstine, B. P.; Tomlin, J. W.; Peck, C. L.; Dietz, J.-P.; Herrera, B. T.; Cardoso, F. S. P.; Paymode, D. J.; Yue, A. C.; Arduengo, A. J.; Opatz, T.; Snead, D. R.; Stringham, R. W.; McQuade, D. T.; Gupton, B. F. *Org. Proc. Res. Dev.* **2020**, *24*, 1420–1427.

- [22] Slagman, S.; Fessner, W. D. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 1968–2009.
- [23] Suveges, N. S.; Rodriguez, A. A.; Diederichs, C. C.; de Souza, S. P.; Leão, R. A. C.; Miranda, L. S. M.; Horta, B. A. C.; Pedraza, S. F.; de Carvalho, O. V.; Pais, K. C.; Terra, J. H. C.; de Souza, R. O. M. A. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2018, 2931–2938.
- [24] Rivera, N. R.; Moore, J.; Schenk, D. J.; Wang, H.; Hesk, D.; Mergelsberg, I. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 1090–1092.
- [25] B.B. Fredholm (Ed.) *Methylxanthines, Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 200* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
- [26] a) FDA's policy statement on the development of new stereoisomeric drugs (Stereomeric Drug Policy). Fed. Regist. 1992, 57: FR22249; b) Committee for Proprietary Medical Products. Working Parties on Quality, Safety and Efficacy of Medicinal Products. Note for guidance: Investigation of chiral active substances (III/3501/91). Brussels: CPMP, 1993.
- [27] Brandel, C.; Amharar, Y.; Rollinger, J. M.; Griesser, U. J.; Cartigny, Y.; Petit, S.; Coquerel, G. *Mol. Pharm.* **2013**, 10, 3850–3861.
- [28] Schjelderup, L.; Aasen, A.J.; Myhren, F.; Pettersson, T.; Kivekäs, R. *Acta Chem. Scand.* **1986**, 40b, 505–507.
- [29] Grace, D.; Hamner, H.; Aasen, A.J.; Daves, J.G.D.; Svensson, S.C.T.; Wigilius, B. *Acta Chem. Scand.* **1985**, 39b, 607–609.
- [30] Beck, J. F.; Mo, Y. *J Comput. Chem.* **2007**, 28, 455–466.
- [31] a) Jankowska, A.; Swierczek, A.; Chlon-Rzepa, G.; Pawlowski, M.; Wyska, E. *Curr. Med. Chem.* **2017**, 24, 673–700; b) Swierczek, A.; Wyska, E.; Bas, S.; Woyciechowska, M.; Mlynarski, J. *Arch. Pharmacol.* **2017**, 390, 1047–1059.
- [32] Bright, J. J.; Du, C.; Coon, M.; Sriram, S.; Klaus, S. J. *J. Immunol.* **1998**, 161, 7015–7022.
- [33] Coon, M. E.; Diegel, M.; Leshinsky, N.; Klaus, S. J. *J. Immunol.* **1999**, 163, 6567–6574.
- [34] Peterson, T. C.; Peterson, M. R.; Raoul, J. M. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, 662, 47–54.
- [35] a) Striffler, J. S.; Nadler, J. L. *Metabolism* **2004**, 53, 290–296; b) Chen, M.; Yang, Z.; Wu, R.; Nadler, J. L. *Endocrinology* **2002**, 143, 2341–2348; c) Yang, Z. D.; Chen, M.; Wu, R.; McDuffie, M.; Nadler, J. L. *Diabetologia* **2002**, 45, 1307–1314.
- [36] Wojcik-Pszczola, K.; Hincza, K.; Wnuk, D.; Kadziolka, D.; Koczurkiewicz, P.; Sanak, M.; Madeja, Z.; Pekala, E.; Michalik, M. *Acta Biochim. Pol.* **2016**, 63, 437–442.
- [37] de Vries, P.; Singer, J. W. *Exp. Hematol.* **2000**, 28, 916–923.
- [38] Bleich, D.; Chen, S.; Bursten, S. L.; Nadler, J. L. *Endocrinology* **1996**, 137, 4871–4877.
- [39] J.P. Klein, A.M. Kumar, A.J. Leigh, J. Michnick, G.E. Underiner, *Asymmetric synthesis of chiral secondary alcohols*, Patent WO9531450A1, 1995.
- [40] Cui, P.; Macdonald, T. L.; Chen, M.; Nadler, J. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3401–3405.
- [41] J. Bianco, D. Porubek, J. Singer, P. Woodson, *R-enantiomerically pure hydroxylated xanthine compounds to treat baldness*, Patent US5567704A, 1996.
- [42] a) L. Wang, J. Xie, X. Yang, Q. Zhou, *Kinetic resolution of racemic hydroxy ester via asymmetric catalytic hydrogenation and application thereof*, Patent US2017334831A1, 2017; b) Yang, X. H.; Wang, K.; Zhu, S. F.; Xie, J. H.; Zhou, Q. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 17426–17429.
- [43] Drosos, N.; Morandi, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8814–8818.
- [44] Pękala E.; Wójcik, T. *Acta Pol. Pharm.* **2007**, 64, 109–113.
- [45] Pękala E.; Godawska-Matysik, A.; Żelaszczyk, D. *Biotechnol. J.* **2007**, 2, 492–496.
- [46] Pękala E.; Żelaszczyk, D. *Sci. Pharm.* **2009**, 77, 9–17.
- [47] a) Larsen, A. T.; May, E. M.; Auclair, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 7853–7858; b) Schiavini, P.; Cheong, K. J.; Moitessier, N. Auclair, K. *ChemBioChem* **2017**, 18, 248–252.
- [48] World health statistics 2024: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO (<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376869/9789240094703-eng.pdf?sequence=1>).
- [49] J. R. Richards, (Ed.), *Beta-blockers: Physiological, pharmacological and therapeutic implications*, Nova Science Publishers, Inc., **2018**.
- [50] Y. Shahin, (Ed.), *Recent Developments in Beta-Blockers Research*, Nova Science Publishers, Inc., **2015**.
- [51] Stoschitzky, K.; Lindner, W.; Klein, W. *Trends Pharmacol. Sci.* **1994**, 15, 102.
- [52] Ignarro, L. J. *Cardiovasc. Ther.* **2008**, 26, 115–134.
- [53] a) Sidjanin, D. J.; McCarty, C. A.; Patchett, R.; Smith, E.; Wilke, R. A. *Per. Med.* **2008**, 5, 377–385; b) Brooks, A. M.; Gillies, W. E. *Drugs Aging* **1992**, 2, 208–221.
- [54] a) Singh, G. S.; Mollet, K.; D'Hooghe, M.; De Kimpe, N. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 1441–1498; b) Hanson, R. M. *Chem. Rev.* **2002**, 91, 437–475.
- [55] Fattah, T. A.; Saeed, A. *Tetrahedron: Asymm.* **2017**, 28, 485–504.
- [56] Ing, H. R.; Manske, R. H. F. *J. Chem. Soc.* **1926**, 129, 2348–2351.
- [57] Cardillo, G.; Orena, M.; Sandri, S.; Tomasini, C. *Tetrahedron* **1987**, 43, 2505–2512.

- [58] Ventafridda, V.; Saita, L.; Ripamonti, C.; Deconno, F. *Int. J. Tissue React.* **1985**, *7*, 93–96.
- [59] a) Nagase, H. (Ed.) *Chemistry of Opioids; Part of Topics in Current Chemistry*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **2011**; b) Holtsman, M. *Essentials of Pain Medicine and Regional Anesthesia (Second Edition): Opioid Receptors*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, **2005**; pp. 87–93.
- [60] a) Janssen, P. A. J.; Janseen, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *78*, 3862–3862; b) Janssen, P. A. J.; Jageneau, A. H. *J. Pharm. Pharmacol.* **1957**, *9*, 381–400.
- [61] a) Demoen, P. J. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 79–82; b) Pagani, I.; Barzaghi, N.; Crema, F.; Perucca, E.; Ego, D.; Rovei, V. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1989**, *3*, 27–35.
- [62] Jones, T. E.; Morris, R. G.; Saccoia, N. C.; Thorne, D. *Palliat. Med.* **1996**, *10*, 313–317.
- [63] a) de Vos, J. W.; Ufkes, J. G.; van den Brink, W.; van Brussel, G. H.; de Wolff, F. A. *Addict. Behav.* **1999**, *24*, 707–713; b) Ufkes, J. G.; de Vos, J. W.; van Brussel, G. H. *Pharm. World Sci.* **1998**, *20*, 83–87.
- [64] a) Benyamin, R.; Trescot, A. M.; Datta, S.; Buenaventura, R.; Adlaka, R.; Sehgal, N.; Glaser, S. E.; Vallejo, R. *Pain Physician.* **2008**, *11*, S105–S120; b) Duthie, D. J.; Nimmo, W. S. *Br J Anaesth.* **1987**, *59*, 61–77.
- [65] Algera, M. H.; Kamp, J.; van der Schrier, R.; van Velzen, M.; Niesters, M.; Aarts, L.; Dahan, A.; Olofsen, E. *Br. J. Anaesth.* **2019**, *122*, e168–e179.
- [66] Raehal, K. M.; Schmid, C. L.; Groer, C. E.; Bohn, L. M. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1001–1019.
- [67] Pert, C. B.; Pasternak, G.; Snyder, S. H. *Science* **1973**, *182*, 1359–1361.
- [68] a) Hughes, J. *Brain Res.* **1975**, *88*, 295–308; b) Hughes, J.; Smith, T. W.; Kosterlitz, H. W.; Fothergill, L. A.; Morgan, B. A.; Morris, H. R. *Nature* **1975**, *258*, 577–580; c) Pasternak, G. W.; Goodman, R.; Snyder, S. H. *Life Sci.* **1975**, *16*, 1765–1769.
- [69] a) Donnerer, J.; Cardinale, G.; Coffey, J.; Lisek, C. A.; Jardine, I.; Spector, S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1987**, *242*, 583–587; b) Goldstein, A.; Barrett, R. W.; James, I. F.; Lowney, L. I.; Weitz, C. J.; Knipmeyer, L. L.; Rapoport, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1985**, *82*, 5203–5207.
- [70] a) Gutstein, H. B.; Akil, H. *Opioid Analgesics w: Hardman, J. G.; Limbard, L. E. eds. Goodman & Gillman's the Pharmacologic Basis of Therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill, **2001**; b) Le Naour, M.; Lunzer, M. M.; Powers, M. D.; Kalyuzhny, A. E.; Benneyworth, M. A.; Thomas, M. J.; Portoghese, P. S. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6383–6392; c) Mollica, A.; Carotenuto, A.; Novellino, E.; Limatola, A.; Costante, R.; Pinnen, F.; Stefanucci, A.; Pieretti, S.; Borsodi, A.; Samavati, R.; Zador, F.; Benyhe, S.; Davis, P.; Porreca, F.; Hruby, V. *J. ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1032–1036; d) Mollica, A.; Costante, R.; Stefanucci, A.; Pinnen, F.; Lucente, G.; Fidanza, S.; Pieretti, S. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 233–239; e) Pasternak, G. W.; Pan, Y. X. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 1257–317; f) Ananthan, S.; Saini, S. K.; Dersch, C. M.; Xu, H.; McGlinchey, N.; Giuvelis, D.; Bilsky, E. J.; Rothman, R. B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8350–8363.
- [71] Hutchinson, M. R.; Shavit, Y.; Grace, P. M.; Rice, K. C.; Maier, S. F.; Watkins, L. R. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 772–810.
- [72] Manglik, A.; Kruse, A. C.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Mathiesen, J. M.; Sunahara, R. K.; Pardo, L.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Granier, S. *Nature* **2012**, *485*, 321–326.
- [73] Granier, S.; Manglik, A.; Kruse, A. C.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. *Nature* **2012**, *485*, 400–404.
- [74] Wu, H.; Wacker, D.; Mileni, M.; Katritch, V.; Han, G. W.; Vardy, E.; Liu, W.; Thompson, A. A.; Huang, X. P.; Carroll, F. I.; Mascarella, S. W.; Westkaemper, R. B.; Mosier, P. D.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. *Nature* **2012**, *485*, 327–332.
- [75] Seymour-Shove, R.; Wilson, C. W. *Br. Med. J.* **1967**, *1*, 88–90.
- [76] (a) Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512–519; (b) Seco, J. M.; Quinoa, E.; Riguera, R. *Tetrahedron: Asymm.* **2001**, *12*, 2915–2925.
- [77] a) Russell, G. A.; Janzen, E. G.; Becker, H.-D.; Smentowski, F. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *84*, 2652–2653; b) Russell, G. A. *Pure Appl. Chem.* **1967**, *15*, 185–206.
- [78] Chuang, G. J.; Wang, W.; Lee, E.; Ritter, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1760–1762.
- [79] Liang, Y. F.; Jiao, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 548–552.
- [80] Maugeri, Z.; Leitner, W.; Domínguez de María, P. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6968–6971.
- [81] Cordova, A.; Tremblay, M. R.; Clapham, B.; Janda, K. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5645–5648.
- [82] Pfaltz, A.; Maywald, M. *Synthesis* **2009**, *2009*, 3654–3660.
- [83] Yamano, T.; Kikumoto, F.; Yamamoto, S.; Miwa, K.; Kawada, M.; Ito, T.; Ikemoto, T.; Tomimatsu, K.; Mizuno, Y. *Chemistry Lett.* **2000**, *29*, 448–449.
- [84] a) Melais, N.; Boukachabia, M.; Aribi-Zouiouche, L.; Riant, O. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2015**, *38*, 1579–88; b) Paravidino, M.; Hanefeld, U. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2651–2657; c) Hanefeld, U. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2405–2415.
- [85] Braia, N.; Merabet-Khelassi, M.; Toffano, M.; Guillot, R.; Aribi-Zouiouche, L. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20*, 2693–2703.
- [86] Brossat, M.; Moody, T. S.; de Nanteuil, F.; Taylor, S. J. C.; Vaughan, F. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 706–709.

- [87] Monteiro, C. M.; Lourenço, N. M. T.; Ferreira, F. C.; Afonso, C. A. M. *ChemPlusChem* **2014**, *80*, 42–46.
- [88] a) Teixeira, R.; Lourenço, N. M. T. *Tetrahedron: Asymm.* **2014**, *25*, 944–948; b) Rocha, A.; Teixeira, R.; Lourenço, N. M.; Afonso, C. A. *ChemSusChem* **2017**, *10*, 296–302; c) Lourenço, N. M.; Afonso, C. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 8178–81.
- [89] a) Hungerhoff, B.; Sonnenschein, H.; Theil, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2492–2494; b) Swaleh, S. M.; Hungerhoff, B.; Sonnenschein, H.; Theil, F. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4085–4089.
- [90] Moişă, M. E.; Poppe, L.; Gal, C. A.; Bencze, L. C.; Irimie, F. D.; Paizs, C.; Peter, F.; Toşa, M. I. *Reac. Chem. Eng.* **2018**, *3*, 790–798.
- [91] Bozell, J. J.; Petersen, G. R. *Green Chem.* **2010**, *12*, 539–554.
- [92] a) Nicotra, F.; Riva, S.; Secundo, F.; Zucchelli, L. *Synthetic Commun.* **1990**, *20*, 679–685; b) Szelwicka, A.; Kolanowska, A.; Latos, P.; Jurczyk, S.; Boncel, S.; Chrobok, A. *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 3255–3264.
- [93] Girard, A.; Sandulesco, G. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *19*, 1095–1107.
- [94] a) Henbest, H. B. *Nature* **1946**, *158*, 950–950; b) Gaddis, A. M.; Ellis, R. E. X.; Currie, G. T. *Nature* **1961**, *191*, 1391–1392; c) Wheeler, O. H. *Chem. Rev.* **2002**, *62*, 205–221.
- [95] a) Reichstein, T. *Helv. Chim. Acta* **1936**, *19*, 1107; b) Reichstein, T.; Shoppee, C. W. *Vitamins Hormones* **1943**, *1*, 345–413.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W trakcie swojej kariery naukowej odbyłem dwa krótkoterminowe staże naukowe: zagraniczny (S1) oraz krajowy (S2).

Pierwszy ze staży (S1) został zrealizowany w 2009 roku (trwał 4 miesiące) w Laboratoire de Chimie Bioorganique et Bioinorganique (LCBB) na Uniwersytecie Paris-Sud 11 we Francji, w ramach projektu pt. „*Synthesis and evaluation of new inhibitors of the glycolytic enzyme – D-2-phosphoglycerate enolase*”, którego kierownikiem był prof. Michel Therisod. Moim bezpośrednim opiekunem naukowym w laboratorium LCBB był mgr inż. Gabin Mabiála – ówczesny doktorant prof. M. Therisoda. Podczas pobytu we Francji moim zadaniem było opracowanie wieloetapowej metody syntezy oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów enolazy D-2-fosfoglicerynianowej, które miały stanowić prototypowe związki lecznicze stosowane przeciwko świdrowcowi gambijskiemu (*Trypanosoma brucei gambiense*) oraz świdrowcowi rodezyjskiemu (*Trypanosoma brucei rhodesiense*), wywołującemu śpiączkę afrykańską (trypanosomozę afrykańską). Dzięki pobytowi w grupie badawczej prof. Therisod poznałem wiele nowych technik badawczych, w szczególności metody syntezy i identyfikacji małych cząsteczkowych związków fosfoorganicznych, a także sposoby określania ich aktywności inhibitorowej wobec izolowanych enzymów w biochemicznych testach przesiewowych *in vitro*. Staż ten pozwolił mi udoskonalić warsztat badawczy oraz poznać organizację pracy w laboratorium zrzeszającym międzynarodowy zespół badawczy.

Z kolei w ramach stażu naukowego S2, odbytego w Laboratorium Badań Strukturalnych i Biochemicznych (LBSBio) Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego (CNBCh UW), ściśle współpracowałem z dr. inż. Janem Kutnerem z zespołu prof. dr. hab. Krzysztofa Woźniaka. Wspólnie z dr. Kutnerem realizowaliśmy projekt badawczy pt. „*Otrzymywanie oraz biotechnologiczne zastosowanie nowych oksydoreduktaz bakteryjnych*”. Staż miał charakter kilku krótkoterminowych wizytacji w laboratoriach LBSBio, które odbywały się spontanicznie w latach 2018–2019. Dzięki tym pobytom zdobyłem doświadczenie w podstawowych technikach hodowli komórek mikroorganizmów, produkcji i oczyszczania rekombinowanych białek, a także w zrobotyzowanych metodach hodowli monokryształów kompleksów enzymów z małocząsteczkowymi ligandami i/lub kofaktorami. Moim głównym zadaniem w ramach prowadzonych wspólnie badań było zastosowanie nowych rekombinowanych reduktaz glioksalanu/hydroksypirogronianu w reakcjach biotransformacji, wykorzystujących pochodne kwasu fenylopirogronowego jako substraty. Warto dodać, że współpraca zaowocowała złożeniem przez dr. Kutnera wspólnego wniosku projektowego do Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Opus oraz publikacją P20, która dotyczyła jeszcze innej tematyki badawczej.

Podsumowując, interdyscyplinarny charakter prowadzonych przeze mnie badań wymagał nawiązania współpracy krajowej jak i zagranicznej z różnymi ośrodkami badawczymi. Od początku prowadzonej przeze mnie działalności naukowej (tj. od kwietnia 2010 r.) realizuję badania w oparciu o współpracę prowadzone z naukowcami z innych jednostek w kraju i z zagranicy, a wymiana doświadczeń oraz potencjału badawczego była i jest podstawą efektywnej realizacji szeregu projektów oraz inicjatyw badawczych.

Warto podkreślić, że doświadczenie zdobyte podczas aktywności naukowej w różnych jednostkach badawczych znacząco przyczyniło się do mojego rozwoju jako naukowca. Miało to również bezpośrednie przełożenie na objęcie przeze mnie stanowiska kierownika "Laboratorium Biokatalizy i Biotransformacji" (tzw. "LBB WUT") w Katedrze Biotechnologii

Środków Leczniczych i Kosmetyków na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, które sprawuję od 2020 roku do dziś.

5.1. Współpraca z zagranicznymi ośrodkami naukowymi (Załącznik 6c).

Z1. Prof. Wolfgang Kroutil (Institute of Chemistry, Organic and Bioorganic Chemistry, Karl-Franzens-Universität Graz, Austria) – współpraca w zakresie biotechnologicznego zastosowania rekombinowanych enzymów, gł. dehydrogenaz alkoholowych (2019–do teraz). Wspólne publikacje: **P1, P3, P4, P5, P10, P13, P14, P15, P18** oraz **P23**.

5.2. Współpraca z krajowymi ośrodkami naukowymi.

Z2. Prof. dr hab. Maciej Szaleniec (Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN, Kraków) – współpraca w zakresie biokatalitycznego otrzymywania chiralnych alkoholi z wykorzystaniem rekombinowanej dehydrogenazy (S)-1-fenyl-etanolowej w stereoselektywnej redukcji ketonów oraz ketoestrów (2012–do teraz). Wspólne publikacje: **P23** oraz **P26**.

Z3. Prof. dr hab. Monika Staniszevska [Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii Politechniki Warszawskiej (CEZAMAT)] – współpraca w zakresie badania aktywności przeciwgrzybiczej nowych związków o potencjalnej aktywności inhibitorowej wobec kalcyneuryny (2017–do teraz). Wspólne publikacje: **P24** oraz **P28**. Wspólne patenty: **Pat1**.

Z4. Dr inż. Jan Kutner z zespołu prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka [Laboratorium Badań Strukturalnych i Biochemicznych (LBSBio) Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego (CNBCh UW)] – współpraca w zakresie otrzymywania i biotechnologicznego zastosowania oksydoreduktaz bakteryjnych z nowych podrodzin reduktaz glioksalanu/hydroksypirogronianu (2018–2022). Wspólne publikacje: **P20**.

Z5. Dr inż. Joanna Bojarska (Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Wydział Chemiczny; Politechnika Łódzka) – współpraca w dziedzinie krystalografii związków małowcząsteczkowych i biomakrocząsteczek (2021–obecnie). Wspólne publikacje: **P11, P19**, oraz **P22**.

Z6. Dr hab. Mirosława Barbara Koronkiewicz (Zakład Biotechnologii Leków i Bioinformatyki, Narodowy Instytut Leków w Warszawie) – współpraca w zakresie cytometrii przepływowej oraz mikroskopii w badaniach nowych związków cytotoksycznych z grupy inhibitorów kinaz białkowych CK-2 oraz PIM-1 (2018–obecnie). Wspólne publikacje: **P16, P21, P24** oraz **P28**.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Działalność dydaktyczna.

Działalność dydaktyczną rozpocząłem jeszcze na etapie realizacji swojej pracy doktorskiej (tj. od kwietnia 2019 r. do lutego 2016 r.), w trakcie której pełniłem rolę opiekuna naukowego prac dyplomowych na stopień inżyniera (6 szt.) oraz magistra (1 szt.).

Od momentu zatrudnienia na stanowisku adiunkta badawczo-dydaktycznego (listopad 2016 r.) moja działalność dydaktyczna skupiona jest głównie na pięciu obszarach kształcenia studentów i/lub przyszłej kadry akademickiej: wykładach (**W1–W4**), ćwiczeniach laboratoryjnych (**L1–L4**), ćwiczeniach projektowych (**PR1**), promotorstwie prac dyplomowych na stopień inżyniera (**DI1–DI15**) oraz magistra (**DM1–DM13**), a także pełnieniu funkcji promotora pomocniczego w przewodach doktorskich (**SD1–SD3**).

6.1.1. Przedmioty wykładowe.

W1. "*Technologia i Biotechnologia Surowców Naturalnych*" (kod przedmiotu: 1020-BIBTC-MSP-1007) dla studentów studiów stacjonarnych II-stopnia semestru 1 – kierunku: "*Biotechnologia*", specjalności: "*Biotechnologia Chemiczna – Leki i Kosmetyki*" realizowane na Wydziale Chemicznym, PW (od 2016 r. do dzisiaj). Wymiar godzinowy: 15 godzin. Rola: koordynator/współprowadzący.

W2. "*Rola Mikroorganizmów i Enzymów w Biogospodarce*" (kod przedmiotu: 1110-BG000-ISP-3309) dla studentów studiów stacjonarnych – kierunku: *Biogospodarka* realizowane równolegle na pięciu Wydziałach: (i) Wydziale Chemicznym, PW; (ii) Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, PW – Wydział Instalacji Budowlanych, Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska, PW; (iii) Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej, PW; (iv) Wydziale Inżynierii Materiałowej, PW oraz (v) Wydziale Zarządzania i Organizacji Produkcji, Politechniki Łódzkiej (PŁ) (od 2019 r. do 2023 r. – nabór na kierunek studiów został zawieszony). Wymiar godzinowy: 10 godzin z 30 godzin. Rola: współprowadzący.

W3. "*Podstawy Technologii Leków i Biocydów*" (kod przedmiotu: 1020-BIOBZ-ISP-7002) dla studentów studiów stacjonarnych I-stopnia semestru 7 – kierunku: "*Biotechnologia*", realizowane na Wydziale Chemicznym, PW (od 2023 r. do dzisiaj). Wymiar godzinowy: 15 godzin z 30 godzin. Rola: koordynator/współprowadzący.

W4. "*Leki – Od Pomysłu do Apteki*" (kod przedmiotu: 1020-TCCHM-MSP-1003) dla studentów studiów stacjonarnych II-stopnia semestru 1 – kierunku: "*Technologia Chemiczna*", specjalności: "*Chemia Medyczna*"; realizowane na Wydziale Chemicznym, PW (od 2024 r. do dzisiaj). Wymiar godzinowy: 30 godzin. Rola: koordynator/współprowadzący.

6.1.2. Ćwiczenia laboratoryjne.

L1. "*Laboratorium Specjalistyczne*" (kod przedmiotu: 1020-BIBTC-MSP-1001) dla studentów studiów stacjonarnych II-stopnia semestru 1 – kierunku: *Biotechnologia*, specjalności:

Biotechnologia Chemiczna - Leki i Kosmetyki realizowane na Wydziale Chemicznym, PW (od 2016 r. do 2022 r. – czasowo zwolniony z uwagi na obniżone pensum dydaktyczne z tytułu pełnienia funkcji kierownika projektu NCN SONATA 15).

L2. "*Rola Mikroorganizmów i Enzymów w Biogospodarce – Laboratorium*" (kod przedmiotu: 1110-BG000-ISP-3309) dla studentów studiów stacjonarnych – kierunku: *Biogospodarka* realizowane równolegle na pięciu Wydziałach (patrz wyżej) (od 2019 r. do 2023 r. – nabór na kierunek studiów został zawieszony).

L3. "*Chemia organiczna II - laboratorium*" (kod przedmiotu: CH.BIOB005) dla studentów studiów stacjonarnych I-stopnia semestru 6 – kierunku: *Biotechnologia* realizowane na Wydziale Chemicznym, PW (od 2016 r. do do 2021 r. – czasowo zwolniony z uwagi na obniżone pensum dydaktyczne z tytułu pełnienia funkcji kierownika projektu NCN SONATA 15).

L4. "*Laboratorium podstaw syntezy i technologii związków biologicznie czynnych*" (kod przedmiotu: 1020-TCLAB-ISP-6002) dla studentów studiów stacjonarnych I-stopnia semestru 6 – kierunku: *Technologia Chemiczna* realizowane na Wydziale Chemicznym, PW (od 2024 r. do dzisiaj).

6.1.3. Ćwiczenia projektowe.

PR1. "*Projektowanie Procesów Biotechnologicznych*" (kod przedmiotu: 1020-BI000-ISP-6005) dla studentów trzeciego roku studiów stacjonarnych kierunku: *Biotechnologia* (od 2016 r. do 2021 r. – czasowo zwolniony z uwagi na obniżone pensum dydaktyczne z tytułu pełnienia funkcji kierownika projektu NCN SONATA 15).

6.1.4. Promotor prac dyplomowych na stopień inżyniera.

DI1. "*Charakterystyka pochodnych 1,3-dimetyloksantyn pod kątem aktywności przeciw *Candida spp.**" – Magdalena Lis (2016/2017; numer dyplomu: 80441).

DI2. "*Construction of the translational fusions of the potential ParB partners in vectors used for in vivo testing of protein-protein interactions in BACTH system*" – Olga Sokolnicka (2017/2018; numer dyplomu: 80446).

DI3. "*Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnej diprofiliny i ksantynolu*" – Mateusz Młynek (2018/2019; numer dyplomu: 87583).

DI4. "*Chemoenzymatyczna synteza alkoholi homopropargilowych*" – Marta Wiśniewska (2018/2019; numer dyplomu: 88476).

DI5. "*Indukowane światłem alkilowanie bogatych w elektrony związków heteroaromatycznych diazoestrami*" – Jakub Durka (2018/2019; numer dyplomu: 94133).

DI6. "*Otrzymywanie modyfikowanych super-kwasów oraz próby ich zastosowania jako katalizatorów racemizacji w enzymatycznym dynamicznym rozdziale kinetycznym alkoholi*"

homopropargilowych" – Klaudia Stachnik (obecnie Dobrzyńska) (2018/2019; numer dyplomu: 94167).

DI7. "Opracowanie nowej syntezy optycznie czynnego inhibitora kinazy kazeinowej CK-2-(S)-2-(2-hydroksyprop-1-ylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolu" – Patrycja Puk (2019/2020; numer dyplomu: 100949).

DI8. "Badania nad oddziaływaniem kinazy białkowej CK2 z halogenowanymi pochodnymi związków heterocyklicznych" – Magda Wojtczak (2019/2020; numer dyplomu: 105783).

DI9. "Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnych alkoholi allenowych z zastosowaniem rekombinowanych oksydoreduktaz" – Natalia Antos (2021/2022; numer dyplomu: 111676).

DI10. "Optymalizacja technologii otrzymywania prekursorów leków przeciwcukrzycowych" – Karolina Kinga Kasperek (2022/2023; numer dyplomu: 94167).

DI11. "Modyfikacje powierzchni elektrod ITO z wykorzystaniem aptameru DNA do zastosowań bio i chemoczuJNIKOWYCH" – Monika Pawlonka (2023/2024; numer dyplomu: 102C-ISP-BI/310315/1216549).

DI12. "Optymalizacja początkowych etapów technologii otrzymywania substancji aktywnej o działaniu przeciwbólowym" – Miłosz Szymajda (2024/2025; numer dyplomu: 102E-ISP-TC/310143/1216357).

DI13. "Fotochemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie czystych alkoholi z zastosowaniem światła widzialnego oraz dehydrogenaz alkoholowych" – Julia Skrzypek (2024/2025; numer dyplomu: 102D-ISP-TC/318253/1248243).

DI14. "Fotochemoenzymatyczna synteza optycznie czynnych amin z zastosowaniem światła widzialnego oraz rekombinowanych ω -transaminaz" – Patryk Świstak (2024/2025; numer dyplomu: 102D-ISP-TC/318314/1269256).

DI15. "Synteza allenów i ich reakcje z oksadiazolinami indukowane światłem" – Aleksander Mitroo (2024/2025; numer dyplomu: 102D-ISP-TC/127776).

6.1.5. Promotor prac dyplomowych na stopień magistra.

DM1. "Synteza optycznie czynnego prekursora β -blokerów" – Natalia Popow (2017/2018; numer dyplomu: 90877).

DM2. "Charakterystyka białek PA0124 i PA0125 w *Pseudomonas aeruginosa*" – Agata Gruszczyńska (2017/2018; numer dyplomu: 87040).

DM3. "Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznej (R)-lizofiliny" – Beata Zdun (2018/2019; numer dyplomu: 99195).

DM4. "Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnych γ -arylo- γ -butyrolaktonów z użyciem komórek mikroorganizmów oraz rekombinowanych dehydrogenaz alkoholowych" – Natalia Telatycka (2018/2019; numer dyplomu: 107776).

DM5. *"Enzymatyczny rozdział kinetyczny racemicznego naproksenu"* – Piotr Marcin Cieśla (2019/2020; numer dyplomu: 102887).

DM6. *"Chemoenzymatyczna synteza 2-[(2S)-3-chloro-2-hydroksypropylo]-1H-izoindolo-1,3(2H)-dionu jako potencjalnie użytecznego prekursora w syntezie enancjomerycznych β -blokerów"* – Magdalena Wiklińska (2019/2020; numer dyplomu: 102794).

DM7. *"Niestandardowa reakcja cyklopropanów donorowo-akceptorowych z akceptorami Michaela"* – Jakub Durka (2019/2020; numer dyplomu: 103761).

DM8. *"Enzymatyczna deracemizacja alkoholi II-rzędowych z zastosowaniem katalitycznego układu tandemowego (lakaza/TEMPO)-ketoreduktaza"* – Aleksandra Rudzka (2020/2021; numer dyplomu: 109655).

DM9. *"Synteza potencjalnych inhibitorów kinazy kazeinowej CK2 oraz badania ich aktywności przeciwnowotworowej na komórkach białaczki limfoblastycznej oraz raka piersi"* – Kristina Fateyeva (2020/2021; numer dyplomu: 111065).

DM10. *"Halogenowe pochodne związków heterocyklicznych. Synteza oraz badanie ich oddziaływania z modelowym białkiem"* – Agnieszka Pizoń (2021/2022; numer dyplomu: 116274).

DM11. *"Synteza optycznie czynnych alkoholi z użyciem fotochemicznych oraz biokatalitycznych reakcji redoks"* – Natalia Antos (2022/2023; numer dyplomu: 119976).

DM12. *"Projektowanie in silico inhibitorów opartych na peptydach ukierunkowanych na interakcje białko-białko kompleksu HadAB z Mycobacterium tuberculosis"* – Syifa Najla Agdhiani (2023/2024; numer dyplomu: praca utajona).

DM13. *"Opracowanie chemoenzymatycznej syntezy optycznie czynnych alkoholi 1,2,3,4-tetrahydrochinolinowych z zastosowaniem rozdziałów kinetycznych katalizowanych lipazami"* – Izabela Kopińska (2023/2024; numer dyplomu: 102D-MSP-BI/291617/1237316).

6.1.6. Promotor pomocniczy doktoratów.

SD1. Doktorat realizowany w Szkole Doktorskiej Nr 1 w Dyscyplinie Nauki Chemiczne.

Imię i nazwisko doktoranta: mgr inż. **Beata Zdun** (Numer albumu: KD-230).

Imię i nazwisko promotora: dr hab. Monika Staniszevska.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *"Opracowanie nowych chemoenzymatycznych metod syntezy substancji czynnych leków z zastosowaniem hydrolaz oraz oksydoreduktaz jako biokatalizatorów"*.

Przewidywany rok obrony: **2025**

Pani mgr inż. Beata Zdun jest jednym z kilku wykonawców projektu naukowego NCN SONATA 15 pt. *"Nowe chemoenzymatyczne strategie w asymetrycznej syntezie wybranych farmaceutyków z zastosowaniem rekombinowanych oksydoreduktaz i hydrolaz jako biokatalizatorów"* (grant **G2** z wykazu osiągnięć – Załącznik Nr 4).

SD2. Doktorat realizowany w Szkole Doktorskiej Nr 1 w Dyscyplinie Nauki Chemiczne.

Imię i nazwisko doktoranta: mgr inż. **Aleksandra Rudzka** (Numer albumu: KD-458).

Imię i nazwisko promotora: dr hab. Monika Staniszevska.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *"Zastosowanie enzymatycznych reakcji redoks w biokatalitycznej syntezie chiralnych bloków budulcowych o wysokiej wartości dodanej"*.

Przewidywany rok obrony: **2026**

Pani mgr inż. Aleksandra Rudzka była jednym z wykonawców **G2** (patrz wyżej) oraz jest obecnie jednym z trzech wykonawców projektu naukowego YOUNG PW pt. *"Biotechnologiczne Zastosowanie Nowego Wariantu Rekombinowanej Dehydrogenazy Alkoholowej z Lactobacillus kefir w Asymetrycznej Syntezy Optycznie Czynnych Związków o Wysokiej Wartości Dodanej"* (grant **G5** z wykazu osiągnięć – Załącznik Nr 4) oraz projektu naukowego NCN Opus 24 pt. *"Moc Hybrydy – Opracowanie Nowatorskich Multienzymatycznych Reakcji Kaskadowych oraz Fotobiokatalitycznych Systemów Redoks do Asymetrycznej Syntezy Optycznie Czynnych Związków o Wysokiej Wartości Dodanej ("EnzCasc-Photo4BioCat")"* (grant **G1** z wykazu osiągnięć – Załącznik Nr 4).

SD3. Doktorat realizowany w Szkole Doktorskiej Nr 1 w Dyscyplinie Nauki Chemiczne.

Imię i nazwisko doktoranta: mgr inż. **Natalia Antos** (Numer albumu: KD-879).

Imię i nazwisko promotora: dr hab. inż., prof. uczelni Krzysztof Durka.

Tytuł rozprawy doktorskiej: *"Rozwój fotobiokatalitycznych systemów redoks w asymetrycznej syntezie optycznie czynnych związków o wysokiej wartości dodanej"*.

Przewidywany rok obrony: **2028**

Pani mgr inż. Natalia Antos jest jednym z wykonawców grantów **G1** oraz **G5** (patrz wyżej).

6.1.7. Autorstwo skryptów, podręczników i innych materiałów dydaktycznych.

M1. Jestem autorem opracowania dydaktycznego pt. *„Podstawy katalizy enzymatycznej z udziałem lipaz”*, służącego jako dodatkowe źródło wiedzy przydatne w prowadzeniu zajęć laboratoryjnych z przedmiotu: *„Laboratorium Specjalistyczne”* (kod przedmiotu: 1020-BIBTC-MSP-1001). Niniejszy materiał dydaktyczny stanowić będzie podstawę do przygotowania nowego skryptu dydaktycznego wydawanego przez Oficynę PW.

6.2. Działalność popularyzatorska.

W latach 2017–2021 współprowadziłem warsztaty szkoleniowe i popularno-naukowe (**WN1–WN4**) promujące chemię organiczną oraz biotechnologię wśród uczniów szkół ponadpodstawowych.

WN1. Prowadzący warsztaty popularno-naukowe pt.: *"Od pomysłu do apteki – czyli jak projektuje się współczesne leki"* w ramach programu *"Ścieżki Kopernika"* realizowanego przy Projekcie *"SmartUp Academy"* (POWR.03.01.00-00-C087/16) – projekt skierowany do uczniów szkół ponadpodstawowych realizowany we współpracy z Fundacją Adamed w latach 2017–2018.

WN2. Prowadzący warsztaty popularno-naukowe pt.: *"Projektowanie współczesnych leków oraz biotechnologiczne strategie ich otrzymywania"* w ramach Projektu *"Warsztaty naukowe*

SmartUp Academy" (POWR.03.01.00-00-T009/18) – projekt skierowany do uczniów szkół ponadpodstawowych z całej Polski realizowany we współpracy z Fundacją Adamed w latach 2019–2021.

WN3. Opiekun naukowy wolontariuszy naukowych uczęszczających w ramach tzw. "*Chemicznych Staży Badawczych dla Uczniów*" spośród wybitnych uczniów warszawskich szkół średnich (m. in. V Liceum Ogólnokształcące im. Księcia Józefa Poniatowskiego oraz XIV LO im. Stanisława Staszica w Warszawie) – projekt wspierany z inicjatywy Dziekana Wydziału Chemicznego, PW oraz koordynowany przez Stowarzyszenie Studentów i Absolwentów Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej "*Klatrat*" (dwie edycje w latach 2020–2021). Z jednym z uczniów, biorącym udział w niniejszym stażu (tj. Maciejem Kraszewskim), opublikowaliśmy razem dwuautorską pracę naukową w czasopiśmie *ARKIVOC* **2019**, (vi), 288–305. doi: 10.24820/ark.5550190.p011.059 (publikacja **P26**).

WN4. Jestem również twórcą oraz administratorem stron internetowych mojego zespołu badawczego: "Laboratory of Biocatalysis and Biotransformation – The Borowiecki Research Group" (<https://lbb-wut-borowiecki.ch.pw.edu.pl/>) oraz Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków (<https://kbslik.ch.pw.edu.pl/>), które promują badania naukowe dla szerszej społeczności.

6.3. Funkcje organizacyjne na Uczelni.

F1. Członek Rady Naukowej Dyscypliny (RND) Nauki Chemiczne na Wydziale Chemicznym, PW (od 2020 r. do teraz).

F2. Członek Rady Wydziału na Wydziale Chemicznym, PW (od 2024 r. do teraz).

F3. Członek Komisji nr 1 ds. "Śródkresowej Oceny Doktoratów Szkoły Doktorskiej Nr 1 na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej" (lata 2021–2024).

F4. Członek Zespołu ds. "Współpracy z przemysłem" (lata 2021–2024).

F5. Członek Zespołu ds. "Zakupu aparatu 400 MHz NMR" (2025).

F6. Członek Zespołu ds. "Polityki Naukowej Wydziału Chemicznego" (2025).

F7. Przedstawiciel Rady Wydziału w Radzie Naukowej Oficyny Wydawniczej PW (2025).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Nagrody i wyróżnienia (Załącznik 7a).

N1. Stypendysta projektu systemowego organizowanego przez Samorząd Województwa Mazowieckiego: "*Rozwój nauki – rozwojem regionu – stypendia i wsparcie towarzyszące dla mazowieckich doktorantów*" realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2007–2013 (Priorytet VIII Regionalne kadry gospodarki, Działania 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji).

N2. Wyróżniony nominacją do "*Nagrody i Medalu im. Stanisława Binieckiego*" w uznaniu za niezwykle wartościowy dorobek naukowy w dziedzinie chemii leków. Nominacja wręczona podczas "*X Multidyscyplinarnej Konferencji Nauki o Leku*" organizowanej przez Instytut Farmaceutyczny w Warszawie (Korytnica k/Szydłowa w dniach 15–19 maja 2016 r.).

N3. Laureat "*Nagrody Prezesa Rady Ministrów za Rozprawę Doktorską za Rok 2016*".

N4. Laureat "*Nagrody Indywidualnej Stopnia I*" JM Rektora PW za wyróżniające osiągnięcia naukowe w latach 2020–2021, mające istotny wpływ na obecny stan wiedzy i dalszy rozwój kierunków badań w dziedzinie biokatalizy.

N5. Laureat I-szej edycji konkursu "*Najlepsi z najlepszych PW*" finansowanych ze środków "Inicjatywa doskonałości–uczelnia badawcza" (IDUB PW).

N6. Laureat "*Nagrody Indywidualnej Stopnia I*" JM Rektora PW za wyróżniające osiągnięcia naukowe w latach 2022–2023, mające istotny wpływ na obecny stan wiedzy i dalszy rozwój kierunków badań w dziedzinie biokatalizy.

N7. Laureat "*Nagrody Zespołowej Stopnia I*" JM Rektora PW za wyróżniające osiągnięcia naukowe w latach 2022–2023.

7.2. Wyróżnione artykuły naukowe (Załącznik 7b).

O1. Projekt okładki tylnej ("Back Cover") artykułu *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2021**, 9, 10276–10290. doi: 10.1021/acssuschemeng.1c02845.

Źródło: <https://pubs.acs.org/toc/ascecg/9/30>.

O2. Projekt okładki przedniej ("Front Cover") artykułu *ChemBioChem* **2024**, 25, e202400394. doi: 10.1002/cbic.202400394.

Źródło: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.202482001>.

O3. Projekt okładki przedniej wewnętrznej ("Inside Front Cover") artykułu *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, 64, e202420133. doi: 10.1002/anie.202420133ACS.

Źródło: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.202424922>.

7.3. Odbyte kursy i szkolenia (Załącznik 7d).

S1. Szkolenie z zakresu: "*Pozyskiwania środków na innowacyjne badania naukowe, komercjalizację oraz marketing innowacji*" (Certyfikat nr 342/20140427).

S2. Szkolenie z zakresu: "*Skutecznej komunikacji z biznesem*" (Certyfikat nr 342/20140517).

S3. Szkolenie z zakresu: "*Zasad, regulacji prawnych dotyczące własności intelektualnej oraz ochrony patentowej*" (Certyfikat nr 342/20140707).



.....
(podpis wnioskodawcy)