

**ENANCJOSELEKTYWNA ENZYMATYCZNA
DESOMETRYZACJA KATALIZOWANA LIPAZAMI
CZĘŚĆ I. ZWIĄZKI PROCHIRALNE**

ENANTIOSELECTIVE ENZYMATIC
DESYMMETRIZATION CATALYZED IN THE PRESENCE
OF LIPASE. PART I. PROCHIRAL COMPOUNDS

**Renata Kołodziejska^{*}, Aleksandra Karczmarzka-
-Wódzka^{*}, Agnieszka Tafelska-Kaczmarek^{**}, Renata Stu-
dzińska^{*}, Marcin Dramiński^{*}**

^{} Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK Toruń
ul. Dębowa 3, 85-626 Bydgoszcz*

*^{**} Katedra Chemii Organicznej, UMK Toruń
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*

*Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK Toruń
ul. Dębowa 3, 85-626 Bydgoszcz*

Abstract

Wprowadzenie

1. Desymetryzacja w reakcji enzymatycznej aspekt termodynamiczny i kinetyczny
2. Zastosowanie lipaz w syntezie asymetrycznej
 - 2.1. Budowa centrum aktywnego a stereoselektywność
 - 2.2. Kierunek reakcji enzymatycznej
 - 2.3. Przykłady enzymatycznej reakcji desymetryzacji związków prochiralnych w obecności lipazy jako katalizatora

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr Renata Kołodziejcka, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad regio- i stereoselektywnymi właściwościami biokatalizatorów oraz modyfikacją analogów nukleozydów pirymidynowych.



Mgr Aleksandra Karczmarska-Wódzka, ukończyła chemię na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Chemii Organicznej. Obecnie pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się enancjoselektywną redukcją analogów nukleozydowych.



Dr Agnieszka Tafelska-Kaczmarek, pracownik Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują badania nad asymetryczną syntezą fluoropochodnych związków biologicznie czynnych.



Dr Renata Studzińska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad syntezą zmodyfikowanych analogów nukleozydów pirymidynowych.



Prof. dr hab. Marcin Dramiński, kieruje pracą w Zakładzie Chemii Ogólnej *Collegium Medicum*. Interesuje się chemia i stereochemią syntez związanych z analogami nukleozydów pirymidynowych i dydaktyką przedkliniczną dla studentów medycyny i kierunków pokrewnych.

ABSTRACT

In the enzymatic asymmetric synthesis, the enzyme allows the desymmetrization of achiral compounds resulting in chiral compounds of high optical purity. Therefore, this type of biotransformation is known as enantioselective enzymatic desymmetrization (EED) [1–11]. This method is related to the generation of an asymmetry (loss of symmetry elements) in prochiral molecules (most often an sp^3 or sp^2 hybridized carbon atom), in *meso* synthones, and centrosymmetric compounds. An achiral center of the tetrahedral system is defined as a prochiral one if it becomes chiral as a result of one of the two substituents replacement which, when separated from the particles, are indistinguishable (Scheme 1, 2) [1–4, 9, 12].

Asymmetric synthesis is enantioselective when one of the enantiotopic groups or faces of an optically inactive compound is biotransformed faster than the other (Scheme 3–5) [1, 10, 11, 13–15].

Lipases are enzymes of highest importance in stereoselective organic synthesis, mainly due to their exceptionally broad substrate tolerance, stability, activity in unphysiological systems, and relatively low price [9, 14]. The mechanism of enzymatic hydrolysis catalysed by hydrolases is similar to that observed in the chemical hydrolysis with the use of base. The selectivity of enzymatic catalysis depends on the substrate orientation in the enzyme active site (Scheme 6, 7) [25–29].

Lipases were successfully used for the desymmetrization of different prochiral diesters, alcohols and amines. Most lipases preferentially convert the same prochiral groups in the above mentioned types of reaction. This allows the preparation of the both enantiomers of the product in high chemical and optical yield (Scheme 9–13) [9, 13, 32–56].

Keywords: prochiral compounds, desymmetrization, transesterification, hydrolysis, lipase

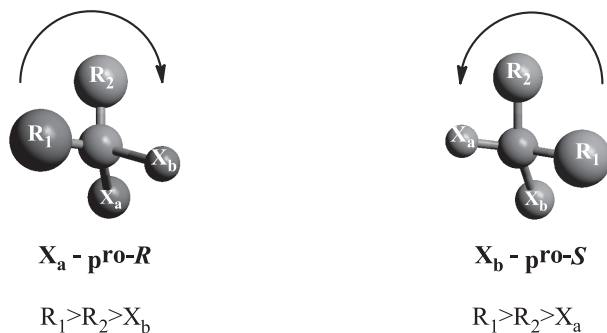
Słowa kluczowe: związki prochiralne, desymetryzacja, transestryfikacja, hydroliza, lipazy

WPROWADZENIE

Synteza asymetryczna jest reakcją, w której cząsteczka achiralna jest przekształcona w cząsteczkę chiralną w taki sposób, że produkty stereoizomeryczne tworzą się w nierównych ilościach [1–4]. Przykładem syntezy asymetrycznej jest enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja (EED).

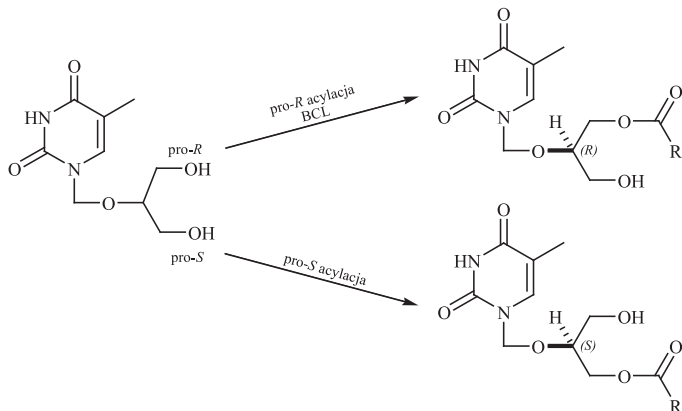
W EED stereogeniczna struktura białka katalitycznego generuje asymetrię w związkach achiralnych prowadząc do uzyskania związków chiralnych o wysokiej czystości optycznej [6]. EED stanowi jedną z ciekawszych metod syntezy stereoselektywnej, ponieważ pozwala na bezpośrednie osiągnięcie wysokich nadmiarów enancjomerycznych, z maksymalną 100% wydajnością [5–11]. Generowanie asymetrii wiąże się z utratą elementów symetrii w cząsteczkach prochiralnych (najczęściej atom węgla o hybrydyzacji sp^3 lub sp^2), w mezo-syntonach i związkach centrosymetrycznych.

Z uwagi na temat niniejszego opracowania szczegółowo zostanie omówiona synteza EED z prochiralnym tetraedrycznym atomem węgla. Centrum achiralne w układzie tetraedrycznym określa się jako prochiralne, jeśli w wyniku zastąpienia jednego z dwóch podstawników, które w oderwaniu od cząsteczki są nierozróżnialne, staje się chiralne. Innymi słowy w cząsteczce prochiralnej typu $R_1R_2CX_2$ dwa identyczne pod względem chemicznym podstawniki X pod wpływem czynnika chiralnego na przykład białka katalitycznego stają się rozróżnialne tzn. enancjotopowe. Selektywna modyfikacja jednego z nich prowadzi do związku o określonej konfiguracji. Oznaczając jeden z podstawników X jako X_a a drugi jako X_b oraz nadając jednemu z nich priorytet możemy określić który z nich jest pro-*R* a który pro-*S*. W tym celu orientujemy cząsteczkę w taki sposób aby mniej ważny podstawnik na przykład X_a był skierowany w stronę przeciwną do obserwatora i względem tej grupy dla pozostałych podstawników określamy pierwszeństwo według reguł Cahn-Ingolda-Preloga (CIP). Jeśli poruszamy się zgodnie z ruchem wskazówek zegara od najważniejszego podstawnika do najmniej ważnego to prochiralny podstawnik X_a określa się jako pro-*R*, jeśli w przeciwnym kierunku – pro-*S*. Na schemacie podstawnik X_a jest pro-*R* (pierwszeństwo maleje zgodnie z kierunkiem wskazówek zegara – cząsteczka ma konfigurację *R*) a X_b jest pro-*S* (pierwszeństwo maleje niezgodnie z kierunkiem wskazówek zegara – cząsteczka ma konfigurację *S*) (Schemat 1) [1–4, 9].



Schemat 1. Związek prochiralny
Scheme 1. Prochiral compound

Acyklonukleozyd pirymidynowy zawierający dwa identyczne podstawniki enancjotopowe jest przykładem cząsteczki z tetraedrycznym centrum prochiralności. Selektywna enzymatyczna modyfikacja prochiralnego acyklonukleozydu w reakcji transestryfikacji jak również hydrolizy jego diacylowej pochodnej prowadzi do związku o określonej konfiguracji absolutnej. W reakcji transestryfikacji jeśli reakcji acylowania ulegnie grupa pro-R to otrzymuje się monoester o konfiguracji absolutnej R, natomiast jeżeli reszta acylowa zostanie wprowadzona na grupę pro-S – enancjomer o konfiguracji przeciwnej. Enzym lipaza z *Bulkholderia cepacia* (BCL) umożliwia enancjotopowe rozróżnienie prochiralnych grup wodorotlenowych w acyklonukleozydzie pirymidynowym i w wyniku reakcji w przewodzie otrzymuje się enancjomer R poprzez selektywne acylowanie grupy pro-R (Schemat 2).



Schemat 2. EED prochiralnego acyklonukleozydu pirymidynowego katalizowana BCL
Scheme 2. EED of prochiral pyrimidine acyclonucleoside catalyzed by BCL

Lipaza BCL w reakcji hydrolizy diacylowych pochodnych acyklonukleozydu pirymidynowego selektywnie hydrolizuje tą samą grupę prochiralną. Deacylowanie estrowej grupy pro-R w tym przypadku prowadzi do monoestru o konfiguracji S [12].

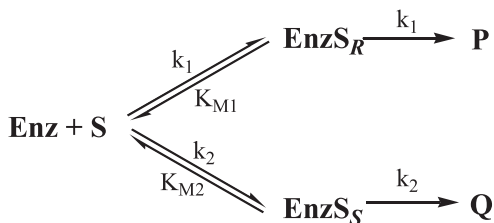
1. DESYMETRYZACJA W REAKCJI ENZYMATYCZNEJ ASPEKT TERMODYNAMICZNY I KINETYCZNY

Istotą enzymatycznej desymetryzacji jest uzyskanie chiralnych związków o wysokiej czystości optycznej. Synteza asymetryczna jest enancjoselektywna jeśli w cząsteczce nieczynnej optycznie jedna z enancjotopowych (diastereotopowych) grup lub stron ulega szybciej biotransformacji. Aby uzyskać wysoką enancjoselektywność w reakcji enzymatycznej, w trakcie reakcji muszą zostać utworzone dwa odmiennie diastereoizomorficzne stany przejściowe. Selektyność reakcji jest zdefiniowana różnicą energii swobodnej ($\Delta\Delta G^\ddagger$) tychże stanów.

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln E \quad (1)$$

Im wyższa wartość $\Delta\Delta G^\ddagger$ tym enancjoselektywność reakcji enzymatycznej jest wyższa. Dzięki logarytmicznej zależności pomiędzy E (ang. *enantiomeric ratio*) a $\Delta\Delta G^\ddagger$ niewielka zmiana $\Delta\Delta G^\ddagger$ powoduje drastyczną zmianę wartości E . Na przykład gdy $\Delta\Delta G^\ddagger$ wzrasta o około 1 kcal/mol nadmiar enancjomeryczny produktu wzrasta od 80% do 95% [1, 13, 14].

W reakcji enzymatycznej wartość E wyznacza się jako stosunek szybkości reakcji tworzenia dwóch enancjomerycznych produktów (Schemat 3).



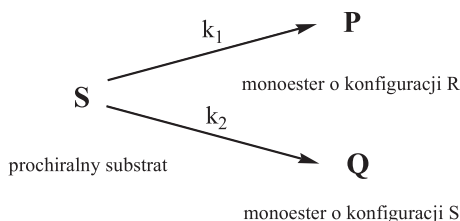
Schemat 3. Reakcji desymetryzacji związków pochiralnych
Scheme 3. Desymmetrization of prochiral compounds

Produkty P i Q powstają w wyniku nieodwracalnej reakcji z diastereoizomerycznych kompleksów Michaelisa (Enz-S_R i Enz-S_S) utworzonych poprzez niekowalencyjne wiązanie substratu w miejscu aktywnym enzymu. Szybkość powstawania produktów P i Q dla nieskończenie niskich stężeń definiuje się jako stosunek specyficznych stałych szybkości reakcji.

$$E = \frac{P}{Q} = \frac{V_1}{V_2} = \frac{(k/K_M)_1}{(k/K_M)_2} \quad (2)$$

W reakcji enzymatycznej miarą selektywności procesu jest wartość E . Wartość ta nie zależy od stężenia tylko od stosunku dwóch stałych (k/K_M). W enzymatycznym rozdziale kinetycznym nie wystarczy podać wartości nadmiarów enancjomerycznych (ee_s i ee_p), ponieważ są funkcją stężenia. Natomiast w przypadku

reakcji enzymatycznej desymetryzacji praktycznie w celu oceny enancjoselektywności reakcji wystarczy podać wartość nadmiaru enancjomerycznego ee_p , ponieważ w odróżnieniu od reakcji KRr wartość ta nie ulega zmianie podczas procesu. Na Schemacie 4 prochiralny substrat S na przykład diester jest selektywnie przekształcany w enzymatycznej reakcji w jeden z produktów P lub Q [15].



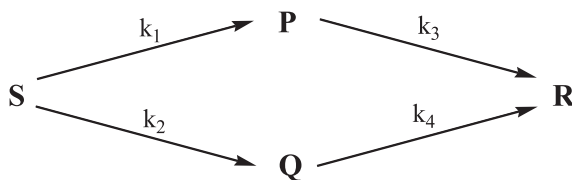
Schemat 4. Jednoetapowa reakcja enzymatyczna

Scheme 4. The one step enzymatic reaction

Reakcja przebiega praktycznie nieodwracalnie i kończy się na etapie powstania monoestru. Wartość E w reakcji desymetryzacji jest definiowana jako stosunek pseudo pierwszorzędowych stałych szybkości reakcji tworzenia enancjomerycznych produktów (k_1/k_2) i można ją wyznaczyć z równania równoważnego, w którym E jest funkcją łatwo mierzalnej eksperymentalnie wartości ee_p .

$$E = \frac{1 + e_p}{1 - e_p} \quad (3)$$

Wartość ee_p nie może być miarą enancjoselektywności EED gdy produkt nie jest stabilny i ulega dalszej przemianie, tzw. wartość ee_p jest funkcją stężenia. W praktyce jest wiele takich reakcji desymetryzacji, które nie zatrzymują się na etapie monoestrów i bieżą dalej w kierunku tworzenia diolu (produkt R), ponieważ uzyskany monoester staje się substratem dla hydrolaz (Schemat 5) [10, 11]. Etap drugi prowadzący do achiralnego produktu końcowego jest zwykle wolniejszy nie można jednak go zlekceważyć, gdyż ma decydujący wpływ na wydajność i enancjoselektywność reakcji.



Schemat 5. Dwu etapowa reakcja enzymatyczna

Scheme 5. Two step enzymatic reaction

Na wydajność chemiczną produktów (P + Q) ma wpływ stosunek stałych szybkości reakcji pierwszego i drugiego etapu ($(k_1 + k_2)/(k_3 + k_4)$). W celu uzyskania

wysokiej wydajności pierwszy etap powinien przebiegać szybciej niż etap drugi ($(k_1 + k_2) \gg (k_3 + k_4)$). Podobnie czystość optyczna otrzymanych chiralnych produktów zależy również od czterech stałych szybkości reakcji. Reakcja przebiega enancjoselektywnie jeśli w pierwszym etapie $k_1 \gg k_2$, a w etapie drugim $k_4 \gg k_3$. Innymi słowy gdy na przykład substrat ulega szybciej przekształceniu w produkt P (enancjomer szybko powstający) niż w produkt Q (enancjomer wolno powstający) to enzym w trakcie trwania procesu może wykazywać niezmienną enancjoselektywność jeżeli diol powstaje preferencyjnie z enancjomeru (Q), który w pierwszym etapie reakcji powstawał wolniej. Takie połączenie enancjoselektywnej desymetryzacji prochiralnego substratu, oraz następującego rozdziału kinetycznego mieszaniny enancjomerów, pozwala na zachowanie wysokiej czystości optycznej, z wydajnością powyżej 50% [10, 11].

2. ZASTOSOWANIE LIPAZ W SYNTEZIE ASYMETRYCZNEJ

Hydrolazy (3.1.1.3–3.9.1.1.) stanowią ważną klasę enzymów intensywnie wykorzystywaną w syntezie organicznej. Szczególnie istotna jest ich dostępność, brak kofaktorów, które należy poddawać recyklingowi oraz szeroka specyficzność substratowa. Dodatkowo hydrolazy mogą być wykorzystywane w reakcjach nie mających nic wspólnego z ich naturalną funkcją jaką pełnią w układach fizjologicznych na przykład w reakcji Dielsa-Aldera, Baeyer-Villiger oraz addycji Michaela [9, 14].

Mechanizm reakcji enzymatycznej, w której biorą udział hydrolazy, jest bardzo podobny. Nukleofilowa grupa z centrum aktywnego atakuje elektrofilowy atom najczęściej węgla w grupie karbonylowej substratu i tworzy się związek przejściowy acyl–enzym, który w następnym etapie ulega deacylacji w wyniku ataku jednej z cząsteczek nukleofilowych wody, alkoholu lub estru. Ostatecznie powstaje produkt reakcji i zregenerowany katalizator. Aminokwasem o charakterze nukleofilowym inicjującym biotransformację może być grupa hydroksylowa seryny (np.: esteraza izolowana z wątroby świni, endopeptydaza subtilizyna oraz większość lipaz), grupa karboksylowa kwasu asparginowego (np.: pepsyna) lub tiolowa cysteiny (np.: papaina) [14–18].

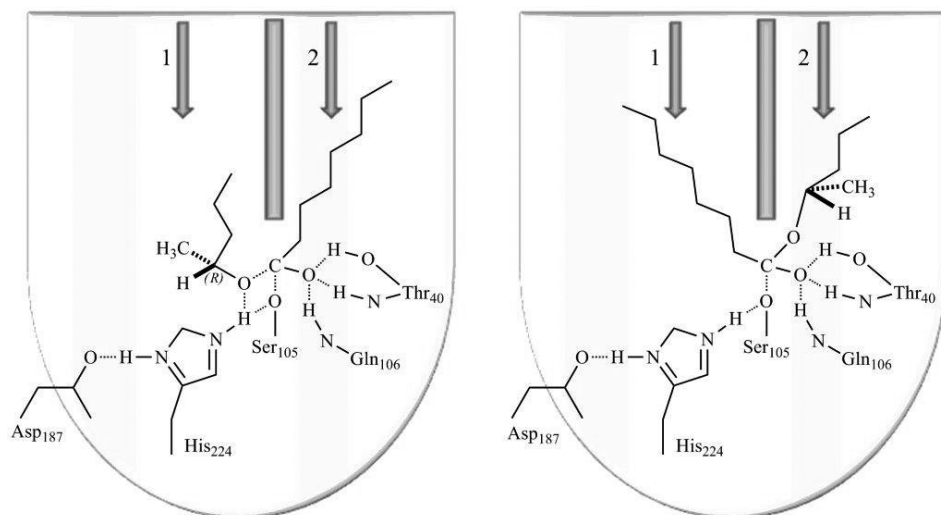
Spośród hydrolaz w enancjoselektywnej syntezie organicznej wykorzystuje się katalityczne właściwości lipaz (3.1.X.X), esteraz (3.1.X.X.), proteaz (3.4.X.X.). Esterazy jak również proteazy najczęściej używane są w reakcjach hydrolizy estrów karboksylowych. Liczba esteraz, które skutecznie przeprowadzają enzymatyczną reakcję hydrolizy, jest ograniczona, ponieważ substrat z reguły musi być zbliżony strukturalnie do naturalnego reagenta. Wszechstronną esterazą wykazującą dużą tolerancję substratową oraz wysoką selektywność jest esteraza izolowana z wątroby świni (PLE; 3.1.1.1.). W przypadku proteaz najczęściej używa się α -chymotrypsynę (3.4.21.1), subtylizynę (3.4.21.62), trypsynę (3.4.21.4), pepsynę (3.4.23.1), papainę (3.4.22.2) [14].

Zdecydowanie jednak lipazy należą do enzymów o największym znaczeniu w stereoselektywnej syntezie organicznej głównie z uwagi na wyjątkową szeroką specyficzność substratową, stabilność i aktywność w układach нефизjologicznych oraz stosunkowo niską cenę. Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej lipazy (E.C. 3.1.1.3) zdefiniowano jako hydrolazy estrów glicerolowych. Katalizują one reakcje przeniesienia grup acylowych z odpowiednich donorów na akceptory, umożliwiając przeprowadzenie reakcji estryfikacji, transestryfikacji, syntezy amidów i peptydów oraz hydrolizy estrów, amidów i peptydów. Lipazy są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Występują w nasionach i organach wegetatywnych wielu roślin, w niektórych mikroorganizmach oraz w organizmach ludzi i zwierząt (trzustka, wątroba, ściana żołądka i jelit). Lipazy znalazły zastosowanie w przemysłach: farmaceutycznym, mleczarskim, środków czyszczących, kosmetycznym, oleochemicznym.

W przeciwieństwie do esteraz centrum aktywne lipaz zorientowane na substrat jest ukryte pod hydrofobowymi α -helisowymi warstwami (fałdami). Obecność α -helisowej pętli pokrywającej miejsce aktywne tłumaczy potrzebę reorientacji biokatalizatora na granicy faz. Umieszczenie lipazy w pobliżu hydrofobowego substratu prowadzi do odsłonięcia dużej powierzchni miejsca aktywnego enzymu dzięki zdolności odchyłania się pokrywy w kierunku hydrofilowego zgłębienia – lipaza staje się aktywna [19–22]. Aby doszło do zmiany położenia pokrywy zasłaniającej centrum aktywne a tym samym udostępnienie miejsca aktywnego dla hydrofobowego substratu wiele lipaz potrzebuje aktywacji międzyfazowej. Istnieją takie lipazy, które nie potrzebują aktywacji lipolitycznej np.: lipaza z *Fusarium solani*, z *Pseudomonas aeruginosa* i z lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B) [22–24].

2.1. BUDOWA CENTRUM AKTYWNEGO A STEREOSELEKTYWNOŚĆ

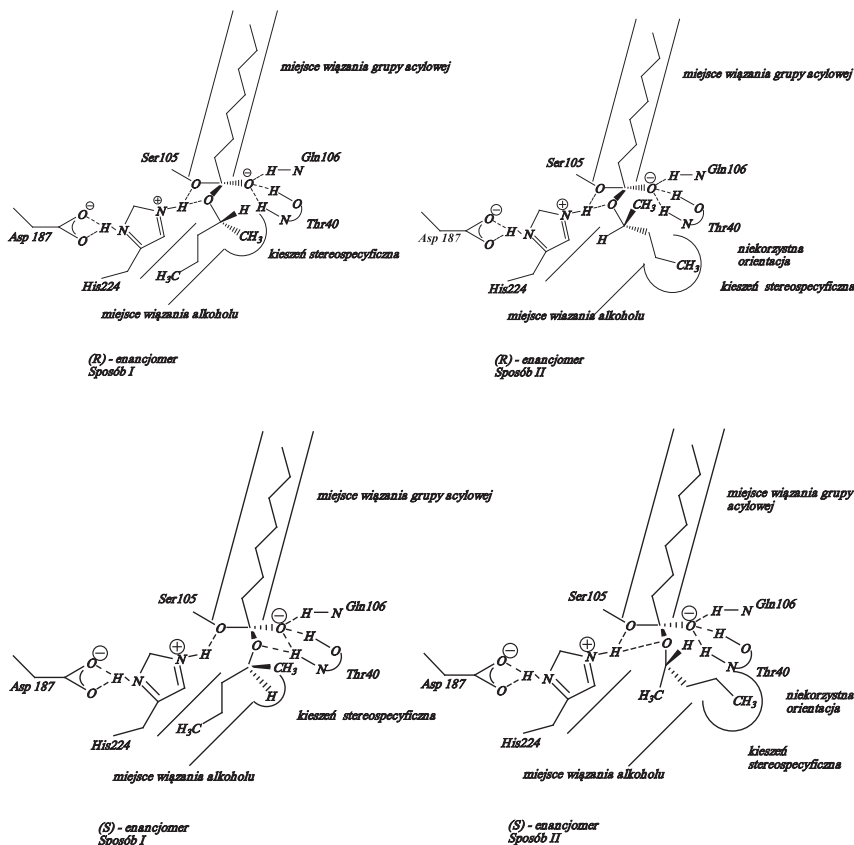
Specyficzna budowa centrum aktywnego lipaz umożliwia przeprowadzenie katalizy zarówno w środowisku wodnym jak również w rozpuszczalnikach organicznych, co powoduje poszerzenie zakresu przydatności tych enzymów w syntezie organicznej w porównaniu z esterazami. Dodatkowo spośród licznie dostępnych komercyjnie lipaz można wybrać odpowiedni enzym do odpowiedniego substratu, biorąc pod uwagę aspekt steryczny. Tylko właściwa orientacja substratu w miejscu aktywnym enzymu prowadzi do selektywnej katalizy. Na przykład miejsce aktywne w lipazie CAL-B składa się z dwóch kieszeni rozdzielonych przez hydrofobowe reszty aminokwasów część acylową i alkoholową. W skutecznej katalizie enzymatycznej część acylowa tetraedrycznego kompleksu przejściowego musi znajdować się w kieszeni 2 (kieszeń acylowa), a część alkoholowa powinna się znajdować w kieszeni 1 (kieszeń alkoholowa) (Schemat 6).



Schemat 6. Centrum aktywne CAL-B

Scheme 6. The active site of CAL-B

Umieszczenie w centrum aktywnym reszty alkoholowej tetraedrycznego kompleksu przejściowego nie jest również przypadkowe, istnieją dwa sposoby umieszczenia chiralnej części alkoholowej prowadzące do skutecznej selektywnej katalizy. W sposobie pierwszym objętościowo duże grupy (reszta acylowa grupy alkoholowej tetraedrycznego kompleksu przejściowego) ułożone są poza centrum katalitycznym, średnie natomiast (część chiralna grupy alkoholowej tetraedrycznego kompleksu przejściowego) zajmują miejsce wewnątrz centrum aktywnego w specyficznym miejscu zwanym kieszenią stereospecyficzną. Taka orientacja jest korzystna ze względów sterycznych. Drugi sposób rozmieszczenia części alkoholowej kompleksu przejściowego nie jest tak korzystny energetycznie, gdy średniej wielkości grupy umieszczone są na zewnątrz miejsca aktywnego enzymu, a duże podstawniki wewnątrz (w kieszeni stereospecyficzej) (Schemat 7) [25–29].



Schemat 7. Dwa sposoby umieszczenia chiralnej części alkoholowej
Scheme 7. Two modes of the chiral alcohol moiety orientation

2.2. KIERUNEK REAKCJI ENZYMATYCZNEJ

Enzymy hydrolityczne, w tym lipazy, w warunkach fizjologicznych katalizują przede wszystkim reakcje w środowisku wodnym, cząsteczki wody są substratem w reakcjach hydrolizy. Białka enzymatyczne są jednak w stanie prowadzić reakcje odwrotne. Kierunek reakcji zdeterminowany jest zastosowanym środowiskiem, przy czym nadmiar wody sprzyja hydrolizie, natomiast wyeliminowanie wody z układu reakcyjnego przesuwa równowagę reakcji w kierunku estryfikacji.

W enzymatycznej reakcji hydrolizy katalizowanej lipazami, w celu przesunięcia równowagi w kierunku produktu stosuje się nadmiar rozpuszczalnika, który jednocześnie jest czynnikiem nukleofilowym, natomiast w reakcjach acylowania używa się aktywne estry. Do najczęściej stosowanych czynników acylujących należą estry: octan winylu (VA), octan izoprenylu (IPA) oraz estry 1-etoksywinylowe. Octan winylu pomimo, iż jest często stosowany w katalizie enzymatycznej może mieć

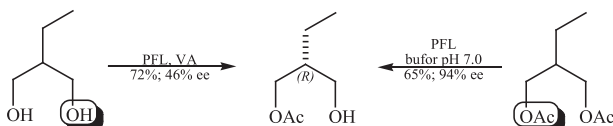
niekorzystny wpływ na aktywność katalityczną enzymów, ponieważ powstały acetaldehyd jako produkt uboczny może powodować stopniową dezaktywację enzymu w wyniku tworzenia iminy z grupą aminową łańcucha bocznego lizyny. W enzymatycznej reakcji acylowania obok standardowych estrów winylowych stosuje się octan izoprenylu oraz estry 1-etoksywinylowe, estry te są równie aktywnymi czynnikami acylującymi jednak powstałe odpowiednio aceton oraz octan etylu jako produkty uboczne nie wpływają niekorzystnie na właściwości katalityczne enzymu. Enzymy mogą wykazywać zróżnicowaną tolerancję w zależności od reszty acylowej estru. Jedną z lipaz, która praktycznie niezależnie od zastosowanego czynnika acylującego, wykazuje wysoką enancjoselektywność jest lipaza CAL-B.

Obok estrów w reakcji enzymatycznej katalizowanej lipazami stosuje się również bezwodniki acykliczne, cykliczne oraz mieszane karboksylowo-węglanowe [13, 30].

2.3. PRZYKŁADY ENZYMATYCZNEJ REAKCJI DESYMETRYZACJI ZWIĄZKÓW PROCHIRALNYCH W OBECNOŚCI LIPAZY JAKO KATALIZATORA

Najczęściej w reakcji desymetryzacji lipazy selektywnie przekształcają prochiralne diestry oraz alkohole. W reakcji transestryfikacji alkoholi lub hydrolizy odpowiednich pochodnych acylowych otrzymuje się chiralne hemiestry poprzez różnicowanie jednakowych, pod względem chemicznym, grup. Większość lipaz preferencyjnie przekształca zarówno w reakcji hydrolizy jak i acylowania te same grupy prochiralne dzięki temu można uzyskać oba enancjomery z wysoką wydajnością zarówno chemiczną jak i optyczną [9, 13].

Przykładem reakcji, w której enzym wykazuje odmienną enancjopreferencję jest reakcja desymetryzacji 2-etylopropano-1,3-diolu i jego diestru. Lipaza *Pseudomonas fluorescens* (PFL) w reakcji transestryfikacji selektywnie acyluje grupę wodorotlenową pro-*S*, natomiast w reakcji deacylowania hydrolizuje prochiralną grupę estrową pro-*R*, z tego powodu zarówno w reakcji hydrolizy jak i transestryfikacji otrzymuje się monoester o tej samej konfiguracji – enancjomer *R* (Schemat 8) [31].

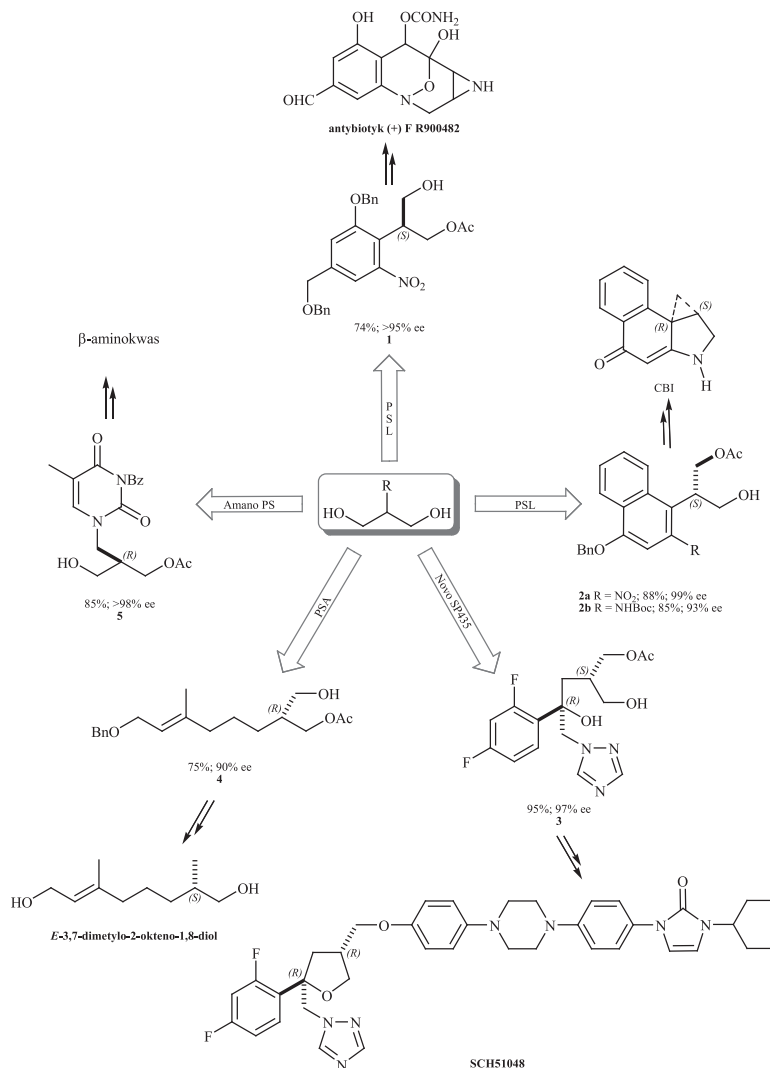


Schemat 8. EED 2-etylopropano-1,3-diol i jego diacetylowej pochodnej

Scheme 8. EED of 2-ethylpropane-1,3-diol and its di-*O*-acetate

Czyste optycznie pochodne propano-1,3-diolu są ciekawą grupą związków, ponieważ w większości przypadków stanowią prekursorów w syntezie związków biologicznie czynnych. Na przykład pochodne propano-1,3-diolu syntetyzowane enzymatycznie **1**, **2a** i **2b** posłużyły jako substraty wyjściowe do syntezy leków przeciwnowotworowych. Czystość optyczną zapewnił etap desymetryzacji katalizowanej

lipazą *Pseudomonas* sp. (PSL). Lipaza selektywnie acyluje prochiralną grupę pro-*R*, uzyskano *S*-monoestry z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (Schemat 9a, zw. **1**, **2a** i **2b**) [32, 33]. 2-podstawiony propano-1,3-diol jest również kluczowym związkiem przejściowym w syntezie SCH51048 leku o działaniu przeciwrzybi-czym. Lipazy Novo SP435 i Amano CE w reakcji desymetryzacji odpowiednio diolu i diestru umożliwiają otrzymanie czystego optycznie *S*-monoestru, który został bezpośrednio użyty w syntezie SCH51048. Lipaza Novo SP435 selektywnie acylowała grupę –OH pro-*S*, podczas gdy lipaza Amano CE selektywnie deacylowała estrową grupę pro-*R* (Schemat 9a, zw. **3**) [34].



Schemat 9a. EED prochiralnych 1,3-diolu

Scheme 9a. EED of prochiral 1,3-diols

Desymetryzacja innych pochodnych propano-1,3-dioli katalizowana lipazą *Pseudomonas cepacia* (PSA), lipazą Amano PS oraz lipazą ze świńskiej trzustki (*porcine pancreatic*) (PPL) prowadzi do uzyskania *R*-hemiestrów (Schemat 9a i b zw. **4**, **5** i **6**), poprzez selektywne acylowanie jednej z prochiralnych grup wodorotlenowych [35–38]. Otrzymany związek **4** jest produktem przejściowym w syntezie głównego komponentu wyizolowanego z narządów zapachowych samca motyla *Danaus Chrysippus*, związek **5** prekursorem nowych β -aminokwasów. Natomiast chiralne pochodne allenodioli (chiralność aksjalna) (związek **6**) mogą zostać użyte jako reaktywne bloki budulcowe w syntezie naturalnych reagentów (Schemat 9a i b, zw. **4**, **5** i **6**). Na przykład maślan (*R*)-2-hydroksymetylo-4-(3,4-metyloendioksyfenylo)-2,3-butadien-1-ylu otrzymany na drodze enzymatycznej desymetryzacji w obecności PPL posłużył jako prekursor w syntezie norlignanu (hyperiones A i B).

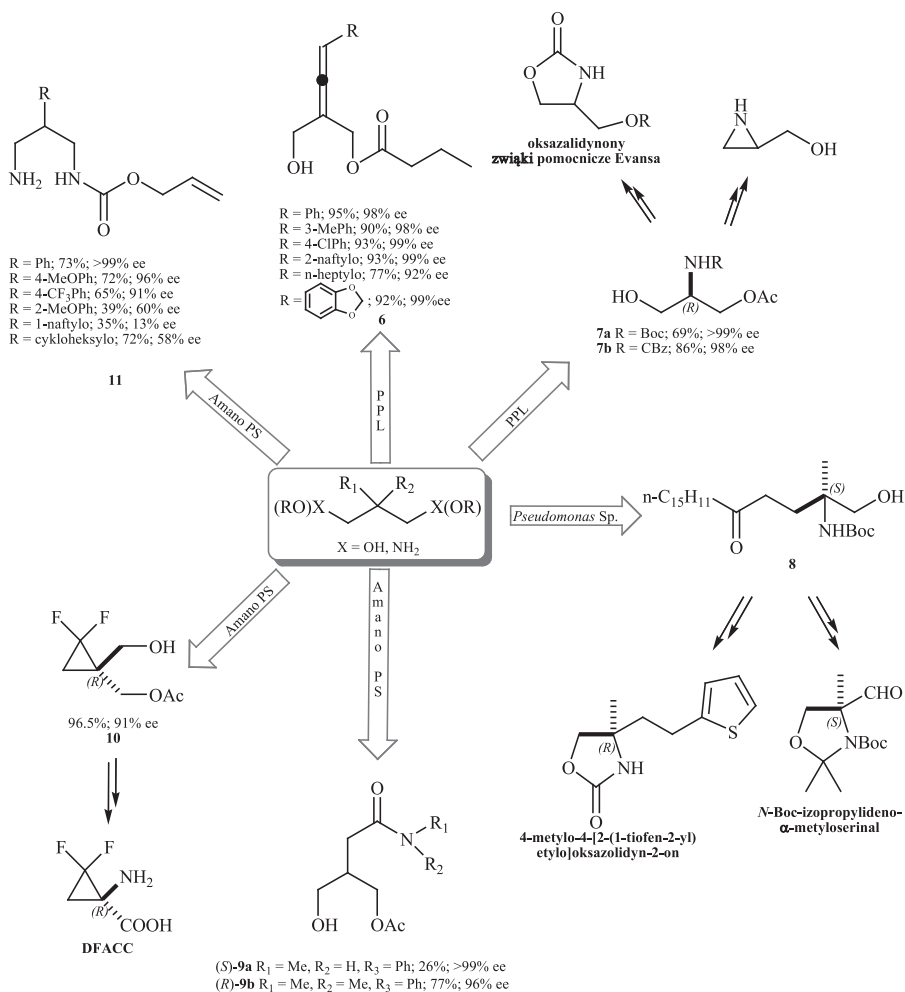
Czyste optyczne pochodne *N*-zabezpieczonych serinoli (Schemat 9b zw. **7a**, **7b** i **8**) otrzymane w enzymatycznej desymetryzacji w obecności lipazy PPL i lipazy z *Pseudomonas* sp. użyto do syntezy chiralnego związku pomocniczego Evans'a, materiałów budulcowych w syntezie pochodnych aminokwasów na przykład 2-hydroksymetyloazyrydyny lub *N*-Boc-*N,O*-izopropylideno- α -metyloserinalu oraz intermediatu w syntezie nowych immunosupresantów 4-metylo-4-[(2-(tiofen-2-yl)etylo)okazolidyn-2-onu. W każdym przypadku w etapie desymetryzacji otrzymano monoestry o konfiguracji *R* [39–41].

Struktura użytego substratu ma istotny wpływ na stereochemiczną preferencję katalizatora enzymatycznego. Na przykład lipaza Amano PS wykazywała odmienną enancjopreferencję w stosunku do prochiralnych grup –OH 2-karbamoilometylo-1,3-propanodioli (Schemat 9b, zw. **9a** i **9b**). W przypadku *N*-monoalkilokarbamoilowych (**9a**) grup możliwość utworzenia wiązania wodorowego powodowało stabilizację produktu przejściowego w centrum aktywnym i lipaza selektywnie acylowała grupę pro-*S*. Obecność dodatkowego podstawnika alkilowego w grupie amidowej (**9b**) wymusza inną orientację substratu, dlatego w reakcji z takim reagentem otrzymano enancjomery *R* w wyniku transestryfikacji grupy pro-*R* [42].

Czyste optycznie fluorowane analogi kwasów 1-aminocyklopropano-1-karboksylowych (ACC) otrzymano w chemoenzymatycznej syntezie. Kwas ACC jest ważnym związkiem o właściwościach biologicznie czynnych będącym intermedialem w biosyntezie etylenu hormonu roślinnego stymulującego dojrzewanie owoców, związkiem przejściowym bakteryjnych fitotoksyn oraz używany w biosyntezie kwasów azetydino-2-karboksylowych. Etapem umożliwiającym uzyskanie dwóch enancjomerycznie czystych monoestrów (Schemat 9b zw. **10**) była enzymatyczna reakcja desymetryzacji prochiralnego diolu i jego dioctanowej pochodnej w obecności lipazy Amano PS [43].

Obok prochiralnych dioli lipazy mogą również biotransformować prochiralne diaminy, na przykład lipaza z *Pseudomonas cepacia* (PCL) enancjoselektywnie przekształca 2-podstawione propano-1,3-diaminy. Enzymatyczna alkoksykarbonylacja umożliwia syntezę aktywnie czynnych związków azotu o konfiguracji *R*. Najlepsze

wyniki uzyskano stosując jako substrat 2-fenylpropano-1,3-diaminę oraz jej *ortho*- i *para*-podstawione analogi (Schemat 9b, zw. 11) [44].

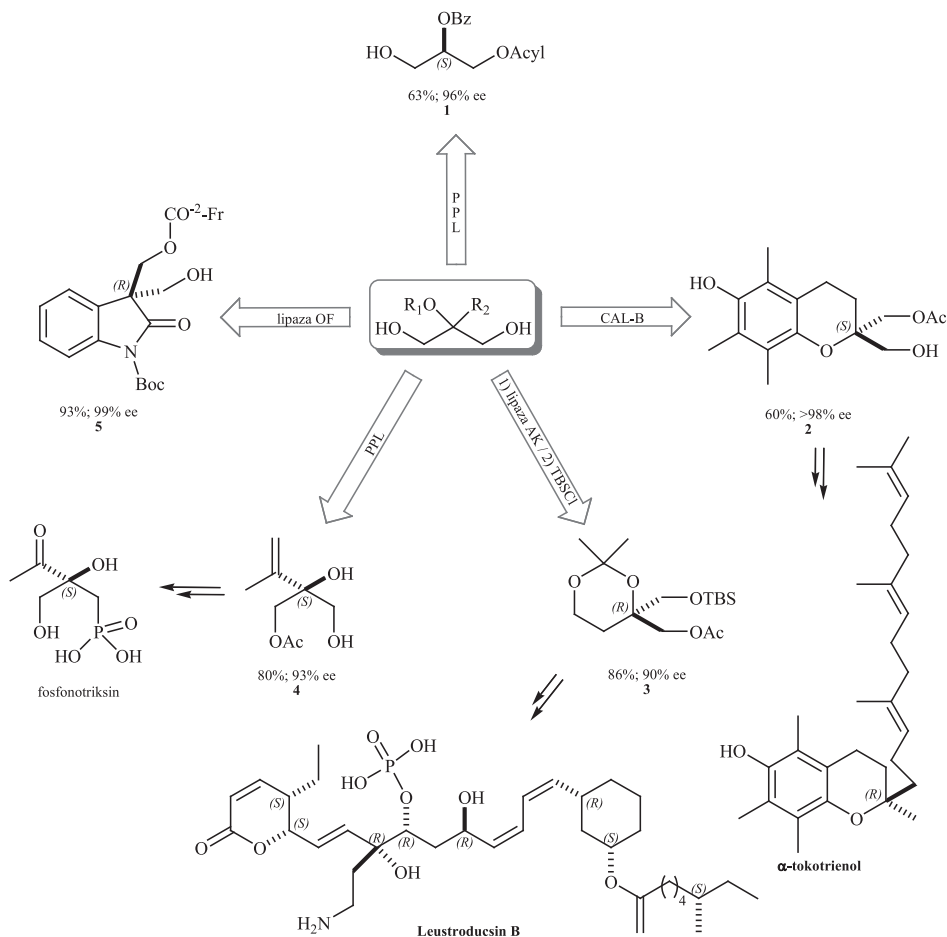


Schemat 9b. EED prochiralnych 1,3-dioli, 1,3-diamin

Scheme 9b. EED of prochiral 1,3-diols, 1,3-diamines

Następną grupą związków selektywnie biotransformowanych za pomocą lipaz są podstawione w pozycji C-2 pochodne gliceryny. 2-O-acyloglicerole w enzymatycznej reakcji transestryfikacji są dość kłopotliwą grupą substratów, ponieważ w trakcie prowadzenia reakcji grupy acylowe mogą ulegać migracji, przyczyniając się do pogorszenia enancjoselektywności. Wprowadzenie dużych objętościowo podstawników w pozycji 2 zmniejsza labilność substratów. Na przykład zastosowanie 2-benzyloksy-1,3-propanodiolu jako substratu w enzymatycznej reakcji desymetryzacji prowadzi do otrzymania czystego optycznie monoestru (Schemat 10, zw. 1)

[45]. Podobnie zastosowanie 2,2-dipodstawionych propano-1,3-diolei w enzymatycznej syntezie asymetrycznej umożliwia otrzymanie produktów z wysoką wydajnością chemiczną i optyczną. Z 2,2-dipodstawionych analogów propanodiolei otrzymuje się monoestry z czwartorzędowymi centrami stereogenicznymi. Na przykład stereoselektywna reakcja acylowania chiralnej pochodnej chromanu w obecności lipazy CAL-B daje *S*-monoester z wysoką wydajnością optyczną (Schemat 10, zw. 2). Z uzyskanego monoestru w wieloetapowej syntezie można otrzymać za pomocą dwóch różnych ścieżek dwa enancjomery α -tokotrienolu, składnika witaminy E [46].



Schemat 10. EED prochiralnych pochodnych glicerolu

Scheme 10. EED of prochiral glycerol derivatives

Innym naturalnym związkiem otrzymanym z 2,2-dipodstawionej pochodnej gliceryny jest „Leustroducsin B” wyizolowany z *Streptomyces platensis* SANK 60191, który podobnie jak α -tokotrienol, otrzymuje się w wieloetapowej chemoenzyma-

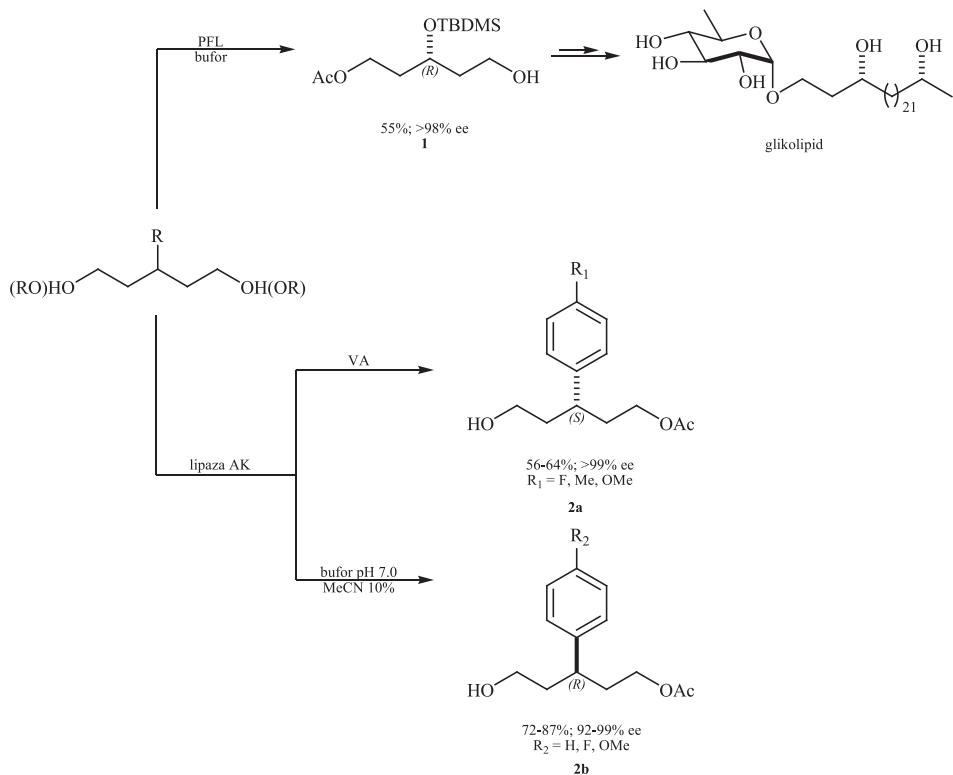
tycznej syntezie. Na czystość optyczną produktu końcowego ma wpływ etap enzymatycznej desymetryzacji, w którym w obecności lipazy AK uzyskano z wysokim nadmiarem enancjomerycznym chiralny monester o konfiguracji *S* (Schemat 10, zw. 3) [47].

Wychodząc z 1,3-dichloroacetonu w ośmiu etapach otrzymano z 11% ogólną wydajnością *S*-fosfonotriksynę z wysokim 93% nadmiarem enancjomerycznym. Związek ten jest naturalnym produktem wyizolowanym z mikroorganizmu *Saccharotrix* sp. ST-888, wykorzystywany jako herbicyd. Czystość optyczną zapewnił etap desymetryzacji prochiralnego triolu z zastosowaniem octanu winylu jako rozpuszczalnika i czynnika acylującego. Najlepsze wyniki otrzymano w reakcji katalizowanej PPL (Schemat 10, zw. 4) [48].

Desymetryzacja oksindoli zawierających prochiralne czwartorzędowe atomy węgla umożliwia otrzymanie różnych naturalnych produktów wykorzystywanych jako chiralne bloki budulcowe w syntezie indoli. Na przykład w enzymatycznej reakcji acylowania katalizowanej lipazą OF (*Candida rugosa*) po optymalizacji otrzymano czystą optycznie *N*-Boc pochodną diolu – związek 5 (Schemat 10) [49].

Prochiralne pochodne 1,5-pentanodioli należą do prekursorów ważnych związków biologicznie czynnych oraz chiralnych związków pomocniczych. Na przykład z prochiralnego 1,3,5-pentanotriolu syntetyzowano (*R*)-3-*t*-butylodimetylosililoksy-5-acetoksy-1-fenyl, prekursor glikolipidów heterocyst- sinic. Związek ten otrzymano w reakcji hydrolizy estru diacetylowego w obecności lipazy *Pseudomonas fluorescens* (PFL) (Schemat 11, zw. 1) [50].

Serie pochodnych 3-arylopentano-1,5-dioli uzyskano w wyniku enzymatycznej reakcji desymetryzacji na drodze transestryfikacji i deacylowania. W reakcji acetylowania otrzymano *S* monoestry, natomiast w reakcji hydrolizy produkty o konfiguracji przeciwnej. Enzym (lipaza AK) zapewnił wysoką enancjoselektywność, uzyskano estry czyste enancjomerycznie, które mogą zostać użyte w syntezie nowych pochodnych kwasów karboksylowych (Schemat 11, zw. 2a i 2b) [51].

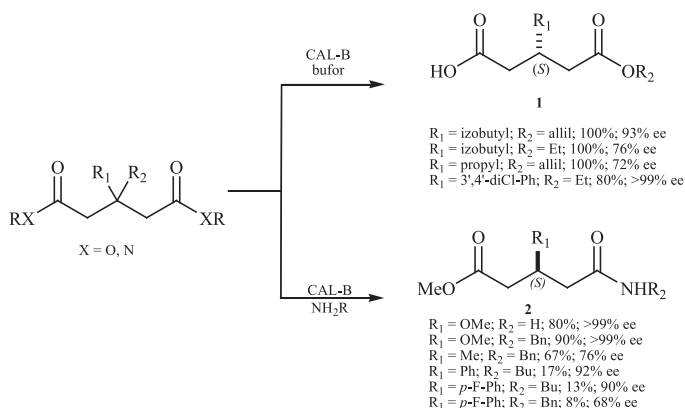


Schemat 11. EED prochiralnych 1,5-dioli
Scheme 11. EED of prochiral 1,5-diols

Lipazy obok estrów alkoholi desymetryzują również prochiralne pochodne kwasów karboksylowych. Na przykład w wyniku enzymatycznej asymetrycznej syntezy otrzymuje się chiralne 3-podstawione pochodne kwasu glutarowego, które stanowią materiał budulcowy w syntezie ważnych biologicznie czynnych związków organicznych. Enzymatyczna desymetryzacja prochiralnych estrów 3-podstawionego kwasu glutarowego z zastosowaniem większości hydrolaz umożliwia uzyskanie produktu o konfiguracji *R*. Jedną z nielicznych lipaz wykazujących enancjopreferencję w stosunku do prochiralnej grupy estrowej pro-*S* jest lipaza CAL-B, enzymatyczna deacylacja 3-arylo- i 3-alkilopochodnych kwasu glutarowego prowadzi do *S*-monoestrów. Pochodne 3',4'-dichlorofenylopodstawione kwasu glutarowego stosuje się w syntezie serii antagonistów receptora neurokininowego, natomiast 3-izobutyloglutaranów używa się jako prekursorów pregabaliny, leku przeciwpadaczkowego (Schemat 12, zw. **1**) [52, 53].

Enzymatyczna amonoliza lub aminoliza 3-podstawionych estrów kwasu glutarowego prowadzi do monoamidów – chiralnych syntonów używanych na przykład w syntezie biologicznie aktywnych aminokwasów, β -laktamów. Lipaza CAL-B katalizuje reakcje tworzenia wiązania amidowego, w wyniku różnicowania prochi-

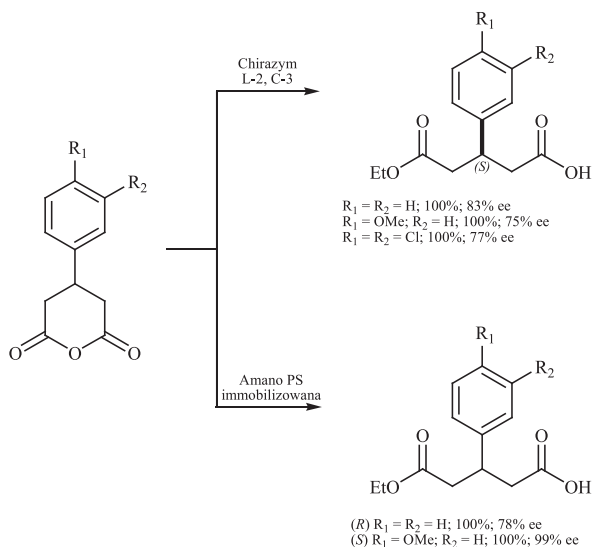
ralnych grup estrowych umożliwia otrzymanie czystych optycznie enancjomerów o konfiguracji *S*. Najlepsze rezultaty, wysoką wydajność chemiczną i optyczną, uzyskano jeśli w pozycji 3 znajdował się heteroatom, natomiast obecność podstawnika alifatycznego lub aromatycznego wydłuża czas reakcji oraz wpływa na pogorszenie wydajności i/lub enancjoselektywności. Prawdopodobnie obecność heteroatomu w pozycji C-3 umożliwia utworzenie wiązania wodorowego w miejscu aktywnym prowadząc do stabilizacji produktu przejściowego (Schemat 12, zw. 2) [54].



Schemat 12. EED pochodnych kwasu glutarowego

Scheme 12. EED of glutaric acid derivatives

Prochiralne mono i dipodstawione bezwodniki kwasu 3-aryloglutarowego desymetryzowano w reakcji enzymatycznej alkoholizy. W każdym przypadku najwyższą aktywność katalityczną wykazywały lipazy immobilizowane. Z monopodstawionych pochodnych bezwodnika 3-aryloglutarowego otrzymano monoestry o wysokiej czystości optycznej, jeśli zastosowano immobilizowaną lipazę CAL-B oraz Amano PS, w przypadku dipodstawionej pochodnej w reakcji katalizowanej CAL-B. Lipaza CAL-B niezależnie od zastosowanego substratu charakteryzowała się pro-*S* stereoselektywnością. Podczas gdy lipaza Amano PS w zależności od struktury związku wyjściowego wykazywała zróżnicowaną enancjopreferencję, na przykład w reakcji z niepodstawionym bezwodnikiem selektywnie przekształcała prochiralną grupę pro-*R*. Ważnym czynnikiem mającym wpływ na stereochemię reakcji, niezależnie od katalizatora, była obecność podstawników w pierścieniu aromatycznym. Najwyższe nadmiary enancjomeryczne uzyskano stosując niepodstawiony bezwodnik kwasu 3-fenyloglutarowego (Schemat 13) [55, 56].



Schemat 13. EED bezwodników kwasu 3-fenyloglutarowego

Scheme 13. EED of 3-phenylglutaric anhydrides

UWAGI KOŃCOWE

Enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja jest jedną z metod stereoselektywnej syntezy asymetrycznej, która umożliwiła otrzymanie związków optycznie czynnych z achiralnych substratów. Najczęściej w reakcji desymetryzacji stosuje się enzymy, na przykład hydrolazy. Spośród hydrolaz największe zastosowanie w EED znalazły lipazy. Prochiralnymi substratami w enzymatycznej asymetryzacji katalizowanej lipazami są głównie diole lub ich pochodne diacylowe, diaminy, estry i amidy kwasów dikarboksylowych oraz bezwodniki. Selektowna modyfikacja określonej grupy prochiralnej umożliwia syntezę produktów wzbogaconych enancjomerycznie, które często używane są jako związki przejściowe w syntezie reagentów o właściwościach biologicznie czynnych.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] J. Gawroński, K. Gawrońska, *Stereochemia w syntezie organicznej*, PWN, Warszawa, 1988.
- [2] I.Z. Siemion, *Biostereochemia*, PWN, Warszawa, 1985.
- [3] F.A. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry*, Springer: New York, 2007.
- [4] Ch.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, Ch. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 7294.
- [5] V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **384**, 797.
- [6] K. Frings, M. Koch, W. Hartmeier, *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **25**, 303.
- [7] M.-J. Kim, Y. Ann, J. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2005, **26**, 515.

- [8] B.A. Persson, A.L.E. Larsson, M.L. Ray, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1645.
- [9] E. Garcia-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 313.
- [10] Y.-F. Wang, Ch.-S. Chen, G. Girdaukas, Ch. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 3695.
- [11] Ch. J. Sih, W.-R. Shieh, Ch.-S. Chen, S.-H. Wu, G. Girdaukas, 1986, *International Symposium on Bioorganic Chemistry*, 239.
- [12] R. Kołodziejska, M. Górecki, J. Frelek, M. Dramiński, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2012, **23**, 623.
- [13] V. Gotor, I. Alfonso, E. Garcia-Urdiales, *Asymmetric organic synthesis with enzymes*, Willey-VCH, Weinheim, 2008.
- [14] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer, Berlin, 1992.
- [15] Ch.-S. Chen, Y. Fujimoto, Ch. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3580.
- [16] H.-H. Otto, T. Schirmeister, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 133.
- [17] M.J. Harrison, N.A. Burton, I.H. Hillier, I.R. Gould, *Chem. Commun.*, 1996, 2769.
- [18] A. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, Wyd. 2, Freeman, New York, 1985.
- [19] J. Uppenberg, N. Öhrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, F. Spener, R.D. Schmid, D. Schoburg, *J. Mol. Biol.*, 1996, **259**, 704.
- [20] A.M. Brzozowski, U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Björkling, B. Hüge-Jensen, S. Patkar, L. Thim, *Nature*, 1991, **351**, 491.
- [21] U. Derewenda, A.M. Brzozowski, D.M. Lawson, Z.S. Derewenda, *Biochemistry*, 1992, **31**, 1532.
- [22] C. Martinez, A. Nicolas, H. Van Tilbeurgh, M. P. Egloff, C. Cudrey, R. Verger, C. Cambillau, *Biochemistry*, 1994, **15**, 29.
- [23] K.E. Jaeger, S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. Van Heuvel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, **15**, 29.
- [24] M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1258**, 272.
- [25] J. Orrenius, F. Hæffner, D. Rotticci, N. Öhrner, T. Norin, K. Hult, *Biocatal. Biotransform.*, 1998, **16**, 1.
- [26] J. Uppenberg, N. Öhrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T.A. Jones, *Biochemistry*, 1995, **34**, 16838.
- [27] J. Ottosson, J. C. Rotticci-Mulder, D. Rotticci, K. Hult, *Protein Science*, 2001, **10**, 1769.
- [28] K. Faber, G. Ottolina, S. Riva, *Biocatalysis and Biotransformation*, 1993, **8**, 91.
- [29] M. Holmquist, F. Hæffner, T. Norin, K. Hult, *Protein Science*, 1996, **5**, 83.
- [30] R. Chênevert, N. Pelchat, P. Morin, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**, 1191.
- [31] I. Izquierdo, M.T. Plaza, M. Rodríguez, J. Tamayo, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, **10**, 449.
- [32] I.M. Fellows, D.E. Kaelin, S.F. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 10781.
- [33] D.B. Kastrinsky, D.L. Boger, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2284.
- [34] B. Morgan, D.R. Dodds, A. Zaks, D.R. Andrews, R. Klesse, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7736.
- [35] K. Takabe, N. Mase, H. Hashimoto, A. Tsuchiya, T. Ohbayasi, H. Yoda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 1967.
- [36] T. Yokomatsu, K. Takada, A. Yasumoto, Y. Yuasa, S. Shibuya, *Heterocycles*, 2002, **5**.
- [37] Ch.M. Sapu, J.-E. Bäckvall, J. Deska, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 9731.
- [38] Ch.M. Sapu, J. Deska, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 1376.
- [39] C. Neri, J.M.J. Williams, *Adv. Synth. Catal.*, 2003, **345**, 835.
- [40] J.Y. Choi, R.F. Borch, *Org. Lett.*, 2007, **18**, 215.
- [41] T. Tsuji, Y. Iio, T. Takemoto, T. Nishi, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 3139.
- [42] K. Takabe, Y. Iida, H. Hiyoshi, M. Ono, Y. Hirose, Y. Fukui, H. Yoda, N. Mase, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 4825.
- [43] M. Kirihara, M. Kawasaki, T. Takuwa, H. Kakuda, T. Wakikawa, Y. Takeuchi, K.L. Kirk, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 1753.
- [44] N. Ríos-Lombardía, E. Busto, E. García-Urdiales, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 2571.

- [45] V. Bódai, L. Novák, L. Poppe, *Synlett.*, 1999, 759.
- [46] R. Chênevert, G. Courchesne, N. Pelchat, *Bioorganic & Medical Chemistry*, 2006, **14**, 5389.
- [47] K. Shimada, Y. Kauragi, T. Fukuyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4048.
- [48] R. Chênevert, M. Simard, J. Bergeron, M. Dasser, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 1889.
- [49] S. Akai, T. Tsujino, E. Akiyama, K. Tanimoto, T. Naka, Y. Kita, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2478.
- [50] A. Soriente, G. Laudisio, M. Giordano, G. Sodano, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 859.
- [51] N. Rios-Lombardia, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 811.
- [52] M.J. Homann, R. Vail, B. Morgan, V. Sabesan, C. Levy, D.R. Dodds, A. Zaks, *Adv. Synth. Catal.*, 2001, **343**, 744.
- [53] J.-H. Jung, D.-H. Yoon, P. Kang, W.K. Lee, H. Eum, H.-J. Ha, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 3635.
- [54] M. López-García, I. Alfonso, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 603.
- [55] R. Ostaszewski, D.E. Portlock, A. Fryszkowska, K. Jeziorska, *Pure Appl. Chem.*, 2003, **75**, 413.
- [56] A. Fryszkowska, M. Komar, D. Koszelewski, R. Ostaszewski, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 2475.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 czerwca 2013