

OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE RACEMICZNYCH I OPTYCZNIE CZYNNYCH LAKTONÓW Z PIERŚCIENIEM AROMATYCZNYM W POZYCJI β

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF RACEMIC AND OPTICALLY ACTIVE LACTONES WITH AROMATIC RING ON β -POSITION

Witold Gładkowski

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: witold.gladkowski@upwr.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. β -Arylo- δ -jodo- γ -laktony i β -arylo- γ -jodo- δ -laktony
 - 1.1. Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnych jodolaktonów
 - 1.2. Aktywność biologiczna racemicznych i optycznie czynnych β -arylo- δ -jodo- γ -laktonów
2. Optycznie czynne β -arylo- δ -bromo- γ -laktony i β -arylo- γ -bromo- δ -laktony
 - 2.1 Synteza
 - 2.2 Aktywność biologiczna
3. *trans* β -Arylo- δ -hydroksy- γ -laktony
 - 3.1 Synteza i aktywność biologiczna
 - 3.2 Otrzymywanie optycznie czynnych *trans* β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów
 - 3.3 Otrzymywanie optycznie czynnych *cis* β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów w wyniku mikrobiologicznej dehalogenacji
4. β -Arylo- γ -alkilo- γ -laktony – produkty dehalogenacji jodolaktonów
 - 4.1 Synteza racemicznych β -arylo- γ -alkilo- γ -laktonów i ich aktywność biologiczna
 - 4.2 Mikrobiologiczna hydroliza β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Witold Gładkowski, prof. uczelni, w 2006 roku rozpoczął pracę w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Stopień naukowy doktora uzyskał w 2006 r., broniąc rozprawy pt. „Mikrobiologiczna funkcjonalizacja bicyklicznych laktonów z układem alkilopodstawionego cykloheksanu”, której promotorem był prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk. Stopień doktora habilitowanego nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia uzyskał w roku 2016. Jego zainteresowania naukowe obejmują izolowanie, identyfikację i modyfikacje struktury fosfolipidów, syntezę pochodnych fitosteroli, otrzymywanie optycznie czynnych laktonów o ukierunkowanej aktywności biologicznej, biotransformacje związków organicznych oraz ustalanie struktury związków chemicznych metodami

spektroskopowymi (NMR, IR, HRMS).



<https://orcid.org/0000-0002-3271-779X>

ABSTRACT

Natural and synthetic lactones containing an aromatic ring exhibit a number of biological properties, e.g. antiproliferative, antifeedant or antimicrobial activity. This review deals with the synthesis and biological properties of lactones containing an aromatic substituent in the β -position of the lactone ring. The described group of compounds includes halolactones, hydroxylactones, unsaturated lactones and products of reductive dehalogenation of iodolactones. In addition to chemical transformations, biotechnological methods for obtaining optically active lactones have also been described, including the use of lipases in the chemoenzymatic pathway leading to the production of halolactones, kinetic separation of hydroxylactones in the process of enzymatic transesterification, microbial hydrolytic dehalogenation of iodolactones and enantioselective hydrolysis of the lactone ring. The biological activity of the obtained β -aryllactones was also briefly characterized.

Keywords: lactones, chemoenzymatic synthesis, absolute configuration, antiproliferative activity, antifeedant activity

Słowa kluczowe: laktony, synteza chemoenzymatyczna, konfiguracja absolutna, aktywność antyproliferacyjna, aktywność antyfidantna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcOH	– kwas octowy
CAL-B	– lipaza B z <i>Candida antarctica</i>
CLBL-1	– chłoniak B-komórkowy
CLB70	– przewlekła białaczka B-komórkowa
Bcl-2	– białko regulujące apoptozę
Bcl-xL	– białko transmembranowe w mitochondriach hamujące apoptozę
Bid	– białko proapoptyczne
m-CPBA	– kwas <i>meta</i> chloronadbenzoesowy
D17	– kostniakomięsak psa
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DIPE	– eter diizopropylowy
E2	– eliminacja zachodząca według mechanizmu dwucząsteczkowego
EtCOOH	– kwas propionowy
Et ₂ O	– eter dietylowy
GL-1	– ostra białaczka B-komórkowa
HI	– jodowodór
HeLa	– rak szyjki macicy
L	– większy podstawnik przy centrum chiralności
M	– średni podstawnik przy centrum chiralności
MCF7	– gruczolakorak piersi
MeOH	– metanol
NBS	– N-bromoimid kwasu bursztynowego
NHDF	– prawidłowe komórki ludzkich fibroblastów
S _N 2	– substytucja nukleofilowa zachodząca według mechanizmu dwucząsteczkowego
THF	– tetrahydrofuran
U2-OS	– kostniakomięsak człowieka

WPROWADZENIE

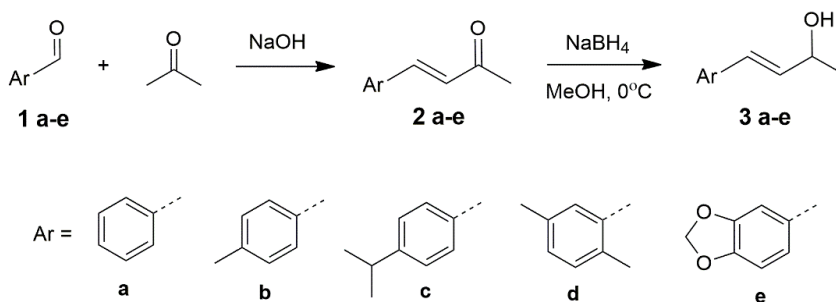
Laktony stanowią jedną z najliczniejszych grup związków spotykanych w przyrodzie. Są wtórnymi metabolitami roślin [1], owadów [2], mikroorganizmów [3,4]. Naturalne i syntetyczne laktony są często nośnikami przyjemnych zapachów [5,6], a większość z nich charakteryzuje się właściwościami biologicznymi, np. aktywnością antyfidantną [7,8], przeciwdrobnoustrojową [9,10] czy cytostatyczną [11]. Pełnią często rolę feromonów u zwierząt [12,13] i mikroorganizmów [14].

Interesujące właściwości biologiczne stwierdzono dla laktonów zawierających pierścień aromatyczny. Wykazują one m.in. działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne [15], przeciwbakteryjne [16], przeciwgrzybicze [17], przeciwwirusowe [18]. Szeroko opisana jest ich aktywność cytostatyczna względem komórek nowotworowych [19–21]. W tej grupie laktonów na uwagę zasługują γ i δ -laktony z podstawnikami aromatycznymi w pozycji β . Serię takich związków, wywodzących się z naturalnych aldehydów aromatycznych, otrzymano także w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Oprócz form racemicznych, opracowano również chemoenzymatyczne i biotechnologiczne metody uzyskania ich poszczególnych enancjomerów.

1. β -ARYLO- δ -JODO- γ -LAKTONY I β -ARYLO- γ -JODO- δ -LAKTONY

1.1. CHEMOENZYMATYCZNA SYNTEZA OPTYCZNIE CZYNNYCH JODOLAKTONÓW

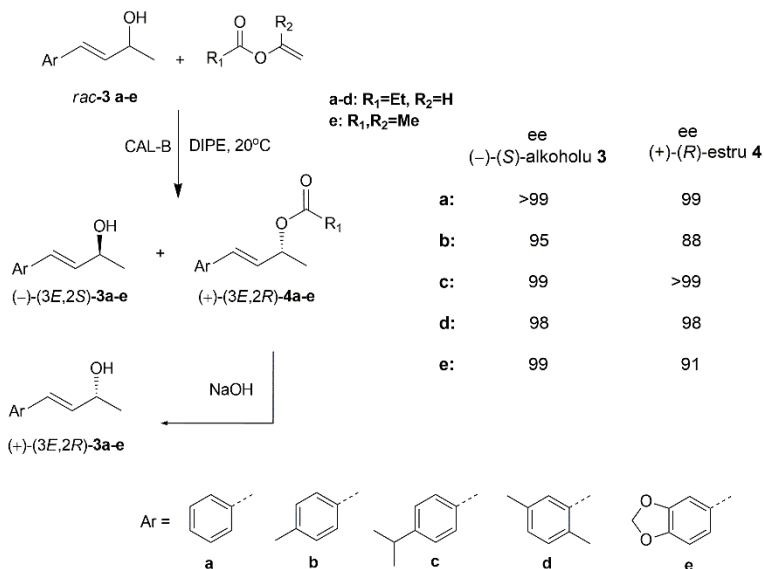
Związkami wyjściowymi w syntezie serii laktonów z podstawnikiem aromatycznym w pozycji β były naturalne, aromatyczne aldehydy: aldehyd benzoesowy, *p*-metylobenzoesowy, kuminowy, 2,5-dimetylobenzoesowy i piperonal (**1a-e**), które w pierwszym etapie poddano kondensacji krzyżowej Claisena-Schmidta z acetonem w środowisku zasadowym, otrzymując odpowiednie α,β -nienasycone ketony **2a-e**. Uzyskane ketony zredukowano następnie przy użyciu borowodoru sodu do odpowiednich alkoholi allilowych z układem 4-arylobut-3-en-2-olu (**3a-e**) (Rys. 1) [22,23].



Rysunek 1. Synteza racemicznych alkoholi allilowych **3a-e**

Figure 1. Synthesis of racemic allyl alcohols **3a-e**

Celem uzyskania jako końcowych produktów optycznie czynnych laktonów, w kolejnym etapie syntezy dokonano kinetycznego rozdziału enancjomerów otrzymanych alkoholi **3a-e** w procesie transestryfikacji. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej w środowisku eteru diizopropylowego (DIPE), z zastosowaniem propionianu winylu lub octanu izopropenyłu jako donorów grupy acylowej. Spośród testowanych w tym procesie lipaz najbardziej efektywnym biokatalizatorem okazała się lipaza CAL-B, w przypadku której już po 1-2 h reakcji uzyskano enancjomerycznie wzbogacone (*S*)-alkohole **3a-e** i (*R*)-estry **4a-e** z bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (88-99%) i blisko 50%-owymi wydajnościami izolowanymi. Produkty reakcji enzymatycznych rozdzielono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, a wydzielone estry zhydrolizowano w środowisku zasadowym uzyskując (*R*)-alkohole **3a-e**. (Rys.2) [22,24,25].

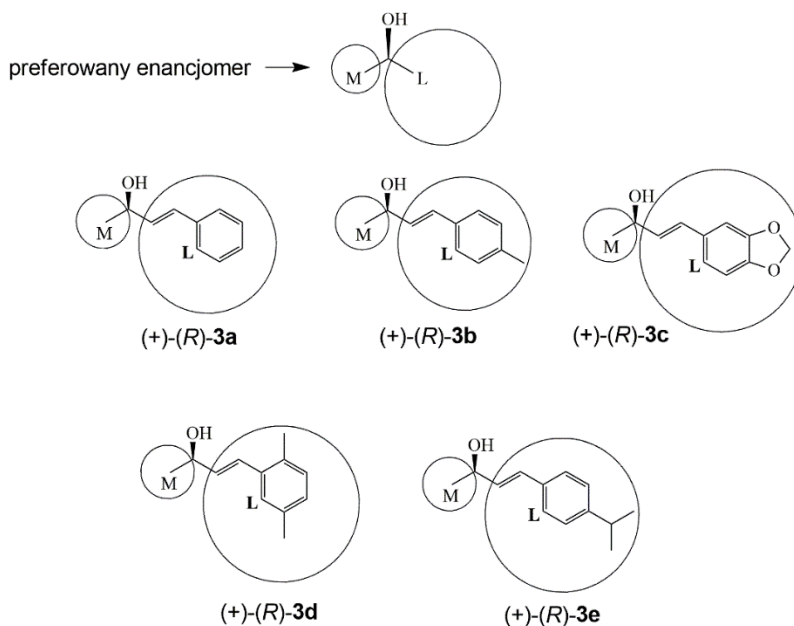


Rysunek 2. Kinetyczny rozdziel racemicznych alkoholi allilowych **3a-e** w procesie enzymatycznej transestryfikacji

Figure 3. Kinetic resolution of racemic allyl alcohols **3a-e** by enzymatic transesterification

Konfiguracje absolutne uzyskanych alkoholi ustalono w oparciu o znaną, empiryczną regułę Kazlauskasa, która pozwala przewidzieć, który z enancjomerów alkoholu reaguje szybciej w reakcjach transestryfikacji katalizowanych przez lipazy. Zgodnie z tą regułą, mającą zastosowanie w przypadku, gdy podstawniki wokół centrum asymetrii różnią się wyraźnie wielkością i przy założeniu kolejności

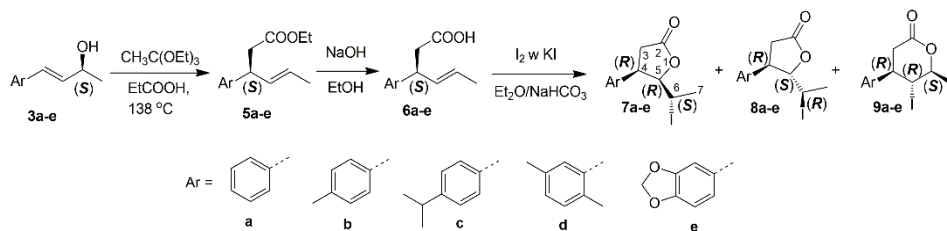
podstawników ustalonej wg reguł pierwszeństwa w porządku: grupa OH > większy podstawnik (L) > średni podstawnik (M), większość lipaz katalizuje preferencyjnie reakcje transestryfikacji (*R*)-alkoholi (Rys. 3). W efekcie przypisano konfiguracje *R* szybciej reagującym enancjomeroom alkoholi **3a-e** i ich estrów **4a-e** oraz przeciwne konfiguracje nieprzereagowanym enancjomeroom alkoholi **3a-e**. W przypadku znanych związków **3a**, **3b** i **3e** ustalenia te potwierdzono porównując dodatnie znaki skręcalności właściwej otrzymanych izomerów z danymi literaturowymi. Regułę zastosowano również dla nieopisanych wcześniej w literaturze alkoholi **3c** i **3d**, biorąc pod uwagę ich dużą analogię strukturalną do alkoholi **3a,b,e** (Rys. 3), dodatni znak skręcalności właściwej wszystkich enancjomerów uzyskanych po hydrolizie optycznie czynnych estrów **4a-e** oraz fakt, iż estry te otrzymano w reakcjach z udziałem tego samego enzymu w praktycznie tych samych warunkach reakcji [22].



Rysunek 3. Enancjomery (*E*)-4-arylobut-3-en-2-oli preferowane w reakcjach transestryfikacji katalizowanych przez lipazę CAL-B zgodnie z regułą Kazlauskasa

Figure 3. Enantiomers of (*E*)-4-arylbut-3-en-2-ols preferred in CAL-B-catalyzed transesterification according to the Kazlauskas' rule

Kolejnym kluczowym ze stereochemicznego punktu widzenia etapem syntezy było przegrupowanie Claisena w ortoocctanowej modyfikacji Johnsona, w wyniku którego z enancjomerów alkoholi **3a-e** otrzymano estry **5a-e**. Stereochemia tej reakcji skutkuje przeniesieniem chiralności z atomu C-2 alkoholu allilowego na atom C-3 w pozycji benzylowej tworzącego się estru z pełną retencją konfiguracji. Produktami przegrupowania enancjomerów *S* alkoholi **3a-e** były zatem estry **5a-e** o konfiguracji *S*, a z alkoholi o konfiguracji *R* otrzymano estry o konfiguracji *R*. Otrzymane (*S*)-estry **5a-e** zhydrolizowano w środowisku zasadowym otrzymując kwasy **6a-e** o identycznych konfiguracjach i nadmiarach enancjomerycznych w stosunku do substratów. Kwasy te w końcowym etapie poddano reakcji jodolaktonizacji za pomocą jodu w jodku potasu, w układzie dwufazowym: eter dietylowy-nasycony roztwór NaHCO₃ (Rys.4). Identyczną ścieżkę syntetyczną zastosowano w przypadku (*R*)-alkoholi **3a-e** [24,25].

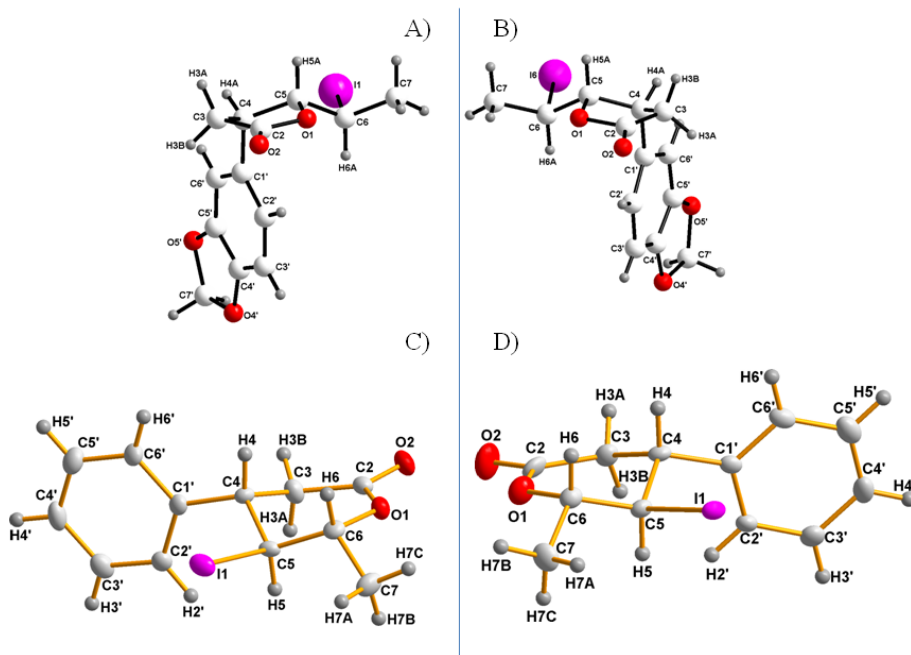


Rysunek 4. Trzyetapowa synteza jodolaktonów **7-9a-e** z (*S*)-alkoholi **3a-e**

Figure 4. Three-step synthesis of iodolactones **7-9a-e** from (*S*)-alcohols **3a-e**

W mieszaninach produktów jodolaktonizacji zdecydowanie dominowały produkty 5-*exo*-cyklizacji, najwyższą zawartością (40-56%) charakteryzowały się *cis*-δ-jodo-γ-laktony **7a-e**, ich izomery *trans* (**8a-e**) identyfikowano w ilościach 23-35%. Reakcja jest kontrolowana kinetycznie, a etapem determinującym szybkość całego procesu jest atak anionu karboksylanowego na kompleks jod-wiązanie podwójne. Preferencja tworzenia izomeru *cis* wynika z dążenia do minimalizacji sił odpychania elektrostatycznego w stanie przejściowym reakcji między pierścieniem aromatycznym a szybko tworzoną w pierwszym etapie jonem jodoniowym. Powstałe w wyniku 6-*endo*-cyklizacji *trans,cis*-γ-jodo-δ-laktony **9a-e** stanowiły 15-24% mieszaniny produktów. Wszystkie jodolaktony otrzymano z bardzo dużymi

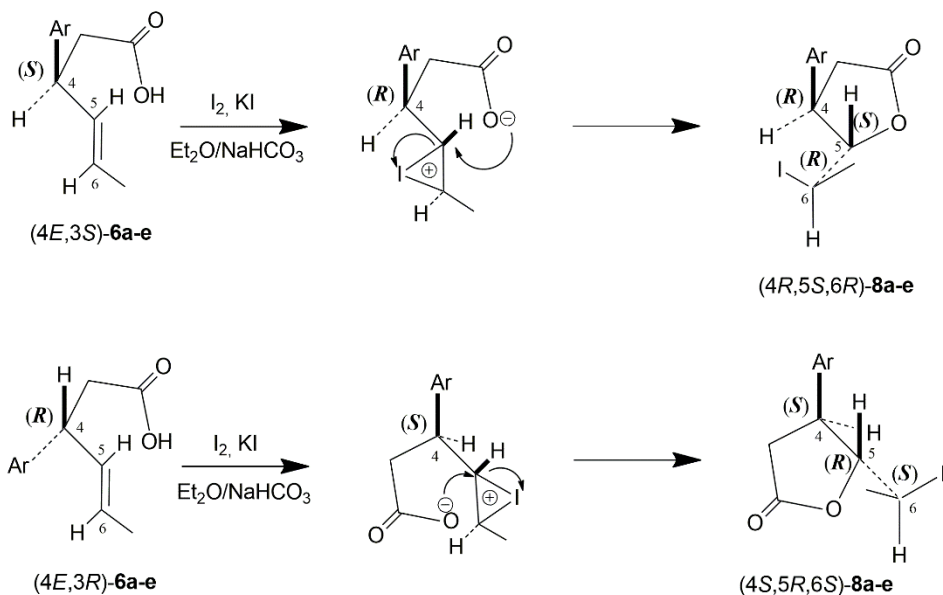
nadmiarami enancjomerycznymi (93-99%), a konfiguracje absolutne ich centrów chiralności potwierdziły analizy rentgenograficzne. Wyniki tej analizy wykazały, że *cis*- δ -jodo- γ -laktony **7a-e** oraz wyizolowane *trans,cis*- γ -jodo- δ -laktony **9a,b** otrzymane z *S*-enancjomerów kwasów posiadały konfiguracje *4R,5R,6S*, natomiast ich enancjomery uzyskano jako produkty laktonizacji kwasów o konfiguracji *R*. Przykładowe struktury krystaliczne enancjomerycznych par otrzymanych jodolaktonów przedstawiono na rysunku 5 [24,25].



Rysunek 5. Wybrane struktury krystaliczne enancjomerycznych par jodolaktonów: *cis*- δ -jodo- γ -lakton (*4R,5R,6S*)-**7e** (A) i jego enancjomer (*4S,5S,6R*)-**7e** (B) oraz *trans,cis*- γ -jodo- δ -lakton (*4S,5S,6R*)-**9a** (C) oraz jego enancjomer (*4R,5R,6S*)-**9a** (D)

Figure 5. Selected crystal structures of enantiomeric pairs of iodolactones: *cis*- δ -iodo- γ -lactone (*4R,5R,6S*)-**7e** (A) and its enantiomer (*4S,5S,6R*)-**7e** (B) and *trans,cis*- γ -iodo- δ -lactone (*4S,5S,6R*)-**9a** (C) and its enantiomer (*4R,5R,6S*)-**9a** (D)

Z uwagi, iż nie udało się uzyskać monokryształów *trans*- δ -jodo- γ -laktonów **8a-e**, konfiguracje ich centrów stereogenicznych ustalono w oparciu o mechanizm jodolaktonizacji (Rys.6).



Rysunek 6. Mechanizm powstawania stereozomerów *trans* δ-jodo-γ-laktonów w reakcji jodolaktonizacji enancjomerycznych kwasów **6a-e** pokazujący konfigurację centrów stereogenicznych powstałych produktów

Figure 6. The mechanism of formation of *trans* δ-iodo-γ-lactones in the iodolactonization of enantiomeric acids **6a-e** showing the configuration of stereogenic centers of the resulting products

Stosując wyżej opisaną ścieżkę syntetyczną z racemicznych alkoholi allilowych **3a-e** otrzymano także racemiczne *cis* δ-jodo-γ-laktony **7a,b,c,e**, *trans* δ-jodo-γ-laktony **8a,b,c,e** oraz γ-jodo-δ-laktony **9a,b** [23].

1.2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA RACEMICZNYCH I OPTYCZNIE CZYNNYCH β-ARYLO-δ-JODO-γ-LAKTONÓW

Otrzymane z racemicznych alkoholi allilowych **3a-e** racemiczne *cis* δ-jodo-γ-laktony z podstawnikiem fenylovym (**7a**), *p*-metylofenylovym (**7b**) i *p*-izopropylfenylovym (**7c**) wykazywały działanie bakteriobójcze przeciwko *Proteus mirabilis*, laktony **7b** i **7c** były dodatkowo aktywne przeciwko *Bacillus cereus*. Spośród testowanych laktonów najwyższą cytotoksyczność wobec linii komórek nowotworowych HeLa i MCF7 oraz normalnej linii komórkowej NHDF wykazywał lakton **7c**, który również w największym stopniu zaburzał równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną w komórkach linii NHDF. W przeciwieństwie do laktonu **7c**, laktony **7a** i **7b** nie wywoływały hemolizy erytrocytów po 48 h inku-

bacji. Odmienne aktywność laktonów z grupami alkilowymi była konsekwencją ich różnego wpływu na właściwości fizykochemiczne błony komórkowej skorelowanego z budową podstawnika aromatycznego. Obecność dużej objętościowo grupy izopropylowej w pierścieniu benzenowym powodowała głębszą penetrację lipidu dwuwarstwy przez lakton **7c** i bardziej znaczące zmiany w organizacji błony takie jak wzrost upakowania w obszarze hydrofilowym oraz nieznaczny wzrost płynności łańcuchów węglowodorowych [26]. W innych badaniach lakton **7c** wykazał wysoką aktywność antyproliferacyjną względem linii Jurkat (linia białaczki T komórkowej człowieka) [23].

Interesujące zależności wykazano w badaniach aktywności antyproliferacyjnej enancjomerycznych jodolaktonów. Badania przeprowadzono na czterech wybranych liniach komórek nowotworowych: Jurkat (białaczka T komórkowa człowieka), D17 (kostniakomięsak psa), GL-1 (ostra białaczka B-komórkowa) i CLBL-1 (chłoniak B-komórkowy). W 42 spośród 48 przeprowadzonych testów badane związki wykazały znaczącą aktywność antyproliferacyjną. Największy stopień zahamowania proliferacji w stosunku do wszystkich badanych linii komórkowych odnotowano dla obu enancjomerów laktonu **8d** oraz izomeru *trans*-(4*S*,5*R*,6*S*)-**8e**. Izomery *trans* były bardziej aktywne od izomerów *cis*, zależność ta była wyraźnie widoczna dla związków z pierścieniem 2,5-dimetylofenylowym oraz 1,3-benzodioxolowym. Oba enancjomery *trans*-laktonu wywodzącego się z 2,5-dimetylobenzaldehydu (**8d**) wykazały porównywalnie wysoką aktywność, natomiast wśród pozostałych izomerów *trans* aktywniejsze były enancjomery o konfiguracji 4*S*,5*R*,6*S*. W przypadku izomerów *cis* obserwowane relacje między aktywnościami enancjomerów były zmienne w zależności od rodzaju podstawnika aromatycznego i testowanej linii komórkowej [24].

W kolejnych badaniach wybrane aktywne jodolaktony poddano kolejnym testom celem poznania mechanizmu działania tych związków. Cztery stereoizomery δ -iodo- γ -laktonu z podstawnikiem *p*-izopropylfenylowym wykazały wyższą aktywność względem komórek nowotworów układu limfatycznego w porównaniu z nowotworami sutka. Również w tym przypadku stereoizomery o konfiguracji 4*S*

posiadały większą aktywność, a najbardziej aktywny okazał się izomer *cis*-(4*S*,5*S*,6*R*)-**7c**. Badane związki indukowały apoptozę komórek poprzez szlak zależny od mitochondriów i aktywację kaspaz [27]. Z kolei oba enancjomery *trans*-5-(1-jodoetylo)-4-(2',5'-dimetylofenylo)dihydrofuran-2-onu (**8d**) powodowały apoptozę komórek nowotworowych poprzez obniżenie poziomu ekspresji białek anty-apoptotycznych: Bcl-2 i Bcl-xL. W zastosowanych w badaniu psich liniach testowane związki angażowały także receptorową ścieżkę apoptozy poprzez powodowanie fragmentacji białka Bid, co dodatkowo wzmacniało proapoptyczne działanie tych związków [28].

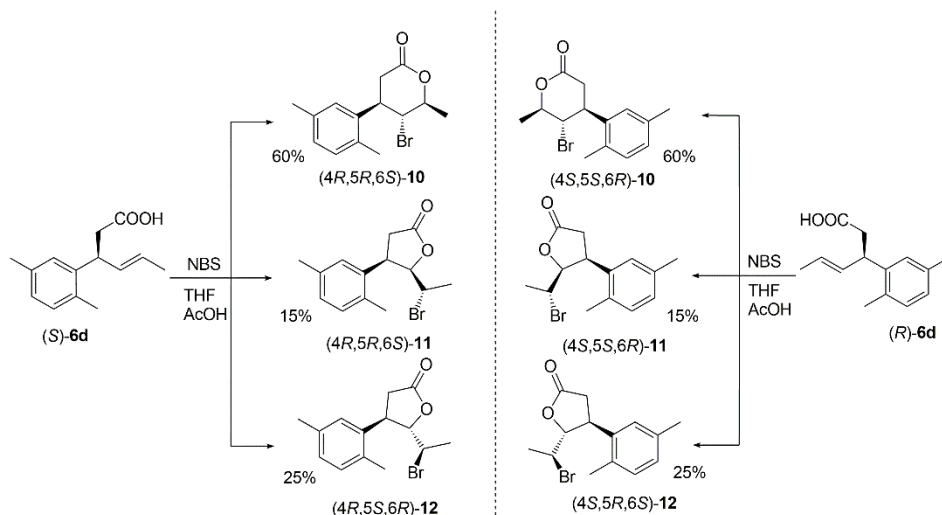
2. OPTYCZNIE CZYNNIE β -ARYLO- δ -BROMO- γ -LAKTONY I β -ARYLO- γ -BROMO- δ -LAKTONY

2.1 SYNTEZA

Z uwagi na wysoką aktywność jodolaktonów otrzymanych z 2,5-dimetylobenzaldehydu, w kolejnych badaniach przedmiotem zainteresowania stały się ich analogi z atomem bromu [29]. Reakcje bromolaktonizacji enancjomerycznych kwasów **6d** wykonano z stosując jako reagent *N*-bromoimid kwasu bursztynowego (NBS) w tetrahydrofuranie (THF) w środowisku kwaśnym. W przeciwieństwie do reakcji jodolaktonizacji, w mieszaninie poreakcyjnej dominowały (ok.60%) produkty 6-*endo* cyklizacji czyli *trans,cis*- γ -bromo- δ -laktony **10** (Rys. 7).

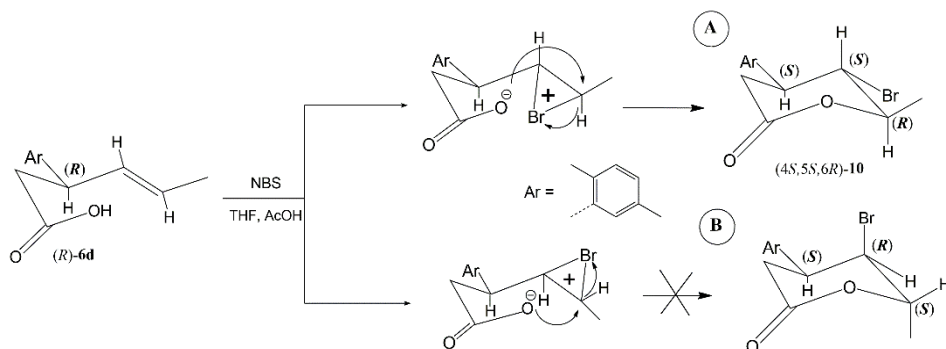
Odmierna w porównaniu z opisaną wcześniej jodolaktonizacją regioselektywność bromolaktonizacji manifestująca się przewagą δ -laktonów w mieszaninach poreakcyjnych wynika z faktu, iż jej najwolniejszym etapem, determinującym szybkość reakcji jest w tym przypadku addycja bromu do wiązania podwójnego. W drugim etapie reakcji odpychanie steryczne i elektronowe między podstawnikiem arylowym przy C-3 i jonem karboksylanowym utrudnia atak nukleofila na C-4, sprzyjając w ten sposób szybszemu tworzeniu pierścienia sześciocząłowego. Podczas otwarcia jonu bromoniowego (Rys. 8) tworzy się tylko jeden stereoizomer γ -bromo- δ -laktonu **10** (A). Brak drugiego teoretycznie możliwego stereoizomeru (B) wyjaśnia analiza jego struktury konformacyjnej. Wy-

nika z niej, że w tym stereoizomerze brom i podstawnik metylowy musiałyby zająć energetycznie niekorzystne pozycje pseudoaksjalne.



Rysunek 7. Bromolaktonizacja enancjomerycznych kwasów **6d**

Figure 7. Bromolactonization of enantiomeric acids **6d**

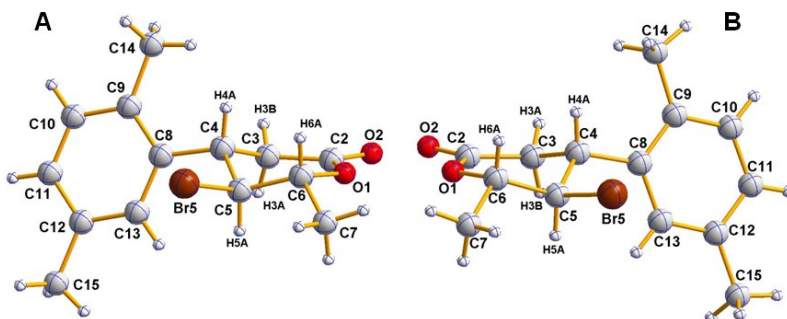


Rysunek 8. Mechanizm bromolaktonizacji wyjaśniający tworzenie tylko jednego stereoizomeru δ -laktonu na przykładzie reakcji kwasu (*R*)-**6d** z NBS

Figure 8. The mechanism of bromolactonization explaining the formation of only one stereoisomer of δ -lactone on the example of the reaction of (*R*)-**6d** acid with NBS

Przewidywane na podstawie mechanizmu bromolaktonizacji konfiguracje centrów chiralności enancjomerycznych γ -bromo- δ -laktonów **10** potwierdzono badaniami krystalograficznymi (Rys.9), natomiast dla δ -bromo- γ -laktonów **11** i **12**

zostały one przypisane na podstawie mechanizmu bromolaktonizacji, analogicznie jak w opisanym wcześniej procesie jodolaktonizacji [29].



Rysunek 9. Struktury krystaliczne *trans,cis*- γ -bromo- δ -laktonu (4*S*,5*S*,6*R*)-**10** oraz jego enancjomeru 4*R*,5*R*,6*S*

Figure 9. Crystal structures of *trans,cis*- γ -bromo- δ -lactone (4*S*,5*S*,6*R*)-**10** and its enantiomer 4*R*,5*R*,6*S*

2.2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

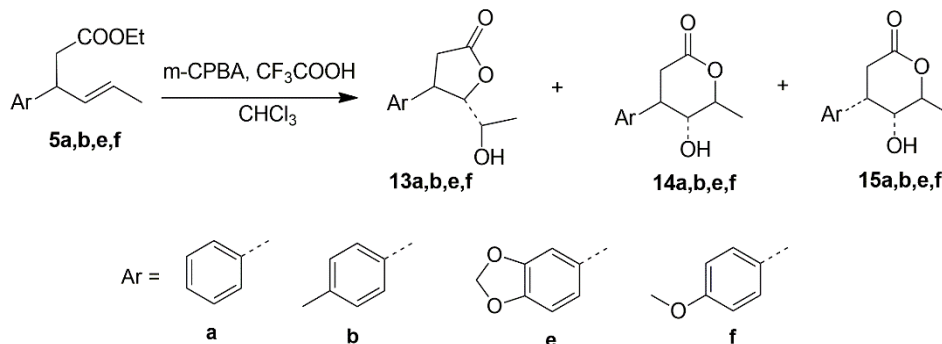
Testy *in vitro* wykazały znaczącą aktywność antyproliferacyjną uzyskanych związków względem linii D17, CLBL-1, CLB70, GL-1 oraz Jurkat, przy czym najbardziej aktywne były enancjomery *trans* δ -bromo- γ -laktonu **12**. Wyższą aktywność obserwowano każdorazowo w przypadku enancjomerów o konfiguracji *S* na atomie C-4. W badaniach interakcji uzyskanych enancjomerów z błonami biologicznymi nie stwierdzono efektu cytotoksycznego tych związków względem erytrocytów. Testy przeprowadzone metodami fluorymetrycznymi wykazały, iż związki te oddziałują z błoną erytrocytów lokując się w jej części hydrofilowej, natomiast nie wykazują praktycznie żadnego wpływu na obszar hydrofobowy [29].

3. TRANS β -ARYLO- δ -HYDROKSY- γ -LAKTONY

3.1. SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Otrzymane wcześniej z odpowiednich aldehydów aromatycznych w toku syntezy racemicznych jodo- i bromolaktonów racemiczne γ,δ -nienasycone estry z pierścieniem fenylovym (**5a**), *p*-metylofenylovym (**5b**) oraz 1,3-benzodioxolo-

wym (**5e**) oraz ester zawierający podstawnik *p*-metoksyfenylowy (**5f**) poddano laktonizacji z zastosowaniem kwasu *m*-chloronadbenzoesowego (*m*-CPBA) oraz katalitycznej ilości kwasu trifluoroctowego (Rys.10) [30].



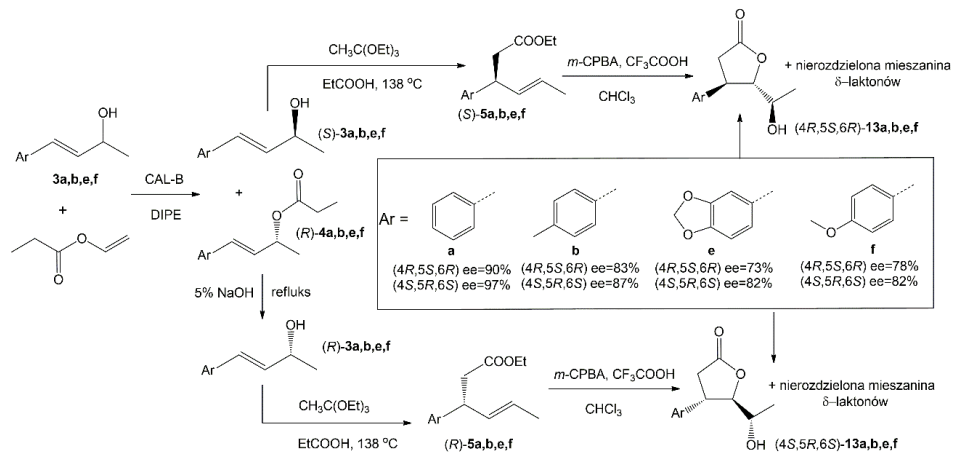
Rysunek 10. Synteza hydroksylaktonów z estrów **5a, b, e, f**
 Figure 10. Synthesis of hydroxylactones from esters **5a, b, e, f**

W trakcie reakcji następowała epoksydacja podwójnego wiązania, a powstały produkt pośredni był natychmiast przekształcany do mieszaniny hydroksylaktonów. W każdym przypadku w postaci czystej otrzymano jedynie izomery *trans* β-arylo-δ-hydroksy-γ-laktonów (**13a, b, e, f**), które poddano testom na aktywność antyfidantną i antyproliferacyjną. Dobrą aktywność deterentną wobec owadzych szkodników magazynowych (wołka zbożowego, skórka zbożowego, trojszyka ulca) wykazały hydroksylaktony z podstawnikami fenylowym i *p*-metylofenylowym (**13a** i **13b**). Z kolei ich analogi z pierścieniem dioksolowym (**13e**) lub grupą metoksyową w pierścieniu aromatycznym (**13f**) wykazywały zauważalną aktywność antyproliferacyjną wobec linii komórkowej kostniakomięsaka człowieka (U2-OS)[30].

3.2. OTRZYMYWANIE OPTYCZNIE CZYNNYCH *TRANS*-β-ARYLO-δ-HYDROKSY-γ-LAKTONÓW

Z uwagi na opisaną wyżej aktywność biologiczną, opracowano dwie metody otrzymywania enancjomerycznie wzbogaconych *trans*-β-arylo-δ-hydroksy-γ-laktonów **13a, b, e, f**. W pierwszej metodzie chemoenzymatycznej zsyntetyzowano oba enancjomery hydroksylaktonów **13a, b, e, f** z wysokimi nadmiarami enancjome-

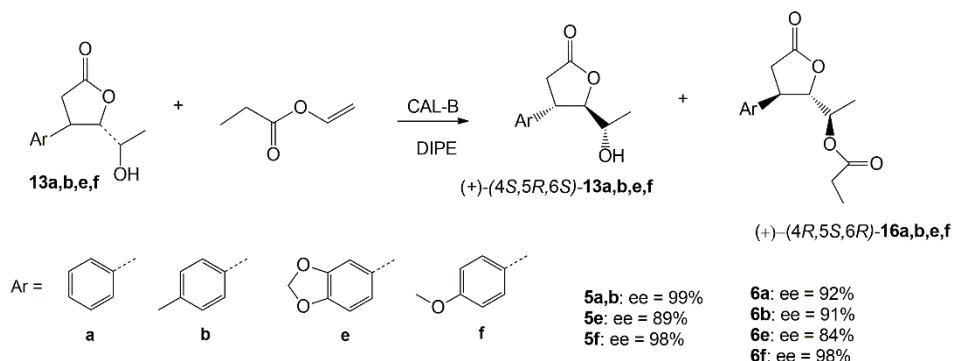
rycznymi (73-97%), wychodząc z odpowiednich enancjomerów γ,δ -nienasyconych estrów **5a,b,e,f** uzyskanych w wyniku przegrupowania Claisena z enancjomerycznych alkoholi allilowych otrzymanych przy udziale lipaz w procesie transestryfikacji (Rys.11). Konfiguracje centrów stereogenicznych zsyntetyzowanych związków wyznaczono na podstawie mechanizmu kwasowej laktonizacji estrów **5a,b,e,f** w obecności kwasu *m*-chloronadbenzoesowego [31].



Rysunek 11. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconych *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f**

Figure 11. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically enriched *trans*- β -aryl- δ -hydroxy- γ -lactones **13a,b,e,f**

Alternatywną metodą otrzymywania optycznie czynnych *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f** był katalizowany lipazą kinetyczny rozdział ich mieszanin racemicznych w procesie transestryfikacji propionianem winylu jako donorem grupy acylowej. Najbardziej efektywnym biokatalizatorem tego procesu okazała się lipaza B z *Candida antarctica*, której zastosowanie w skali preparatywnej po 6h pozwoliło na otrzymanie nieprzereagowanych (4*S*,5*R*,6*S*)-enancjomerów hydroksylaktonów **13a,b,e,f** oraz propionianów ich enancjomerów (**16a,b,e,f**) o konfiguracjach 4*R*,5*S*,6*R*. Większość z uzyskanych związków charakteryzowała się wysokimi lub bardzo wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (84-98%) (Rys.12) [31].



Rysunek 12. Kinetyczny rozdział *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f** w procesie enzymatycznej transestryfikacji

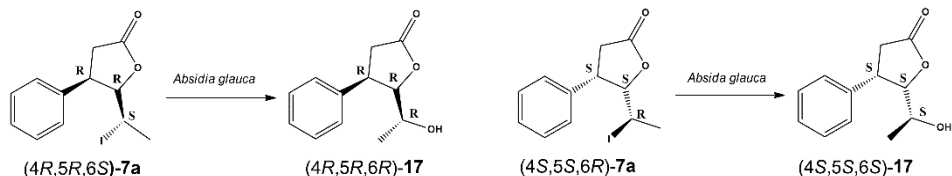
Figure 12. Kinetic resolution of *trans*- β -aryl- δ -hydroxy- γ -lactones **13a,b,e,f** by the enzymatic transesterification

Obie opracowane metody otrzymania enancjomerów *trans*- β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów **13a,b,e,f** o określonych konfiguracjach absolutnych centrów stereogenicznych, są kluczowe z punktu widzenia badań zależności: struktura przestrzenna-aktywność biologiczna.

3.3. OTRZYMYWANIE OPTYCZNIE CZYNNYCH *CIS*- β -ARYLO- δ -HYDROKSY- γ -LAKTONU W WYNIKU MIKROBIOLOGICZNEJ DEHALOGENACJI

Atrakcyjnym uzupełnieniem opisanych powyżej metod otrzymywania optycznie czynnych hydroksylaktonów z pierścieniem aromatycznym jest proces mikrobiologicznej dehalogenacji odpowiednich jodolaktonów. W ten sposób można otrzymać niedostępną opisaną wcześniej metodą laktonizacji z udziałem *m*-CPBA izomery *cis* β -arylo- δ -hydroksy- γ -laktonów. W badaniach Mazur i wsp. [32] enancjomeryczne *cis*-5-(1-jodoetylo)-4-fenylohidrofuran-2-ony (**7a**) zostały przekształcone w kulturze grzyba strzępkowego *Absidia glauca* do enancjomerycznie czystych *cis* δ -hydroksy- γ -laktonów **17** (ee=99%) w procesach hydrolitycznej dehalogenacji (Rys.13). Reakcja zachodzi zgodnie z mechanizmem substytucji nukleofilowej typu S_N2 , zakładającym atak cząsteczki wody na atom węgla związany z jodem z przeciwnej strony w stosunku do przyłączonego chlorowca, co prowadzi do odwrócenia konfiguracji na atomie C-6. W efekcie, z enancjomeru (4*R*,5*R*,6*S*)-jodolaktonu **7a** otrzymano (4*R*,5*R*,6*R*)-hydroksylakton

17, a z enancjomeru 4*S*,5*S*,6*R* jodolaktonu **7a** tworzył się enancjomer 4*S*,5*S*,6*S* hydroksylaktonu **17**.



Rysunek 13. Mikrobiologiczna dehalogenacja enancjomerycznych jodolaktonów **7a** prowadząca do otrzymania obu enancjomerów hydroksylaktonu **17**

Figure 13. Microbial dehalogenation of enantiomeric iodolactones **7a** leading to both enantiomers of hydroxylactone **17**

Racemiczny substrat był transformowany z najwyższą enancjoselektywnością w kulturze *Absidia cylindrospora*, a optymalizacja warunków biotransformacji stwarza nadzieję na możliwy całkowity rozdział kinetyczny enancjomerów jodolaktonów w reakcji hydrolytycznej dehalogenacji.

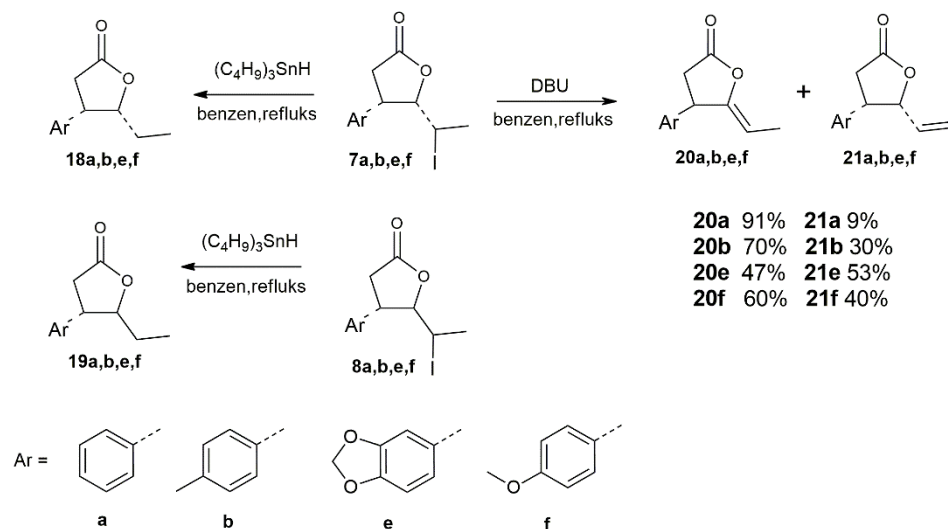
4. β -ARYLO- γ -ALKILO- γ -LAKTONY – PRODUKTY DEHALOGENACJI JODOLAKTONÓW

4.1. SYNTEZA RACEMICZNYCH β -ARYLO- γ -ALKILO- γ -LAKTONÓW I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Kolejną grupą β -arylo- γ -laktonów otrzymaną w naszym zespole badawczym były produkty dehalogenacji uzyskanych wcześniej racemicznych *cis* i *trans* δ -jodo- γ -laktonów (**7a,b,e,f** i **8a,b,e,f**) (Rys.14).

Pierwszą grupę stanowiły *cis* i *trans* β -arylo- γ -etylo- γ -laktony **18a,b,e,f** i **19a,b,e,f** uzyskane jako jedyne produkty redukcyjnej dehalogenacji odpowiednich substratów przy udziale tributylowodorku cyny. Reakcja *cis* δ -jodo- γ -laktonów **7a,b,e,f** z DBU dostarczyła każdorazowo dwóch produktów: β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów **20a,b,e,f** oraz β -arylo- γ -winylo- γ -laktonów **21a,b,e,f**, których proporcje w mieszaninie reakcyjnej różniły się w zależności od budowy części aromatycznej substratu. Były one wynikiem przebiegu przestrzennego eliminacji cząsteczki HI z udziałem dużej objętościowo zasady jaką jest DBU. Ten rodzaj eliminacji przebiega zgodnie z mechanizmem E2 i generalnie preferuje powstanie bardziej

trwałego termodynamicznie produktu z egzocyklicznym wiązaniem podwójnym (laktony **20a,b,e,f**). Jednocześnie jednak reakcja wymaga konformacji antyperiplanarnej atomu jodu i odszczepianego atomu wodoru, co w przypadku atomu H-5 wymusza rotację wokół wiązania C-5-C-6 i przyjęcie konformacji powodującej elektrostatyczne odpychanie atomu jodu i podstawnika aromatycznego przy C-4. Te niekorzystne oddziaływanie zwiększa się, gdy pierścień fenyłowy zawiera podstawniki przekazujące elektrony do pierścienia. W związku z tym udział w mieszaninie reakcyjnej drugiego produktu, γ -winylo- γ -laktonu (**21a,b,e,f**), którego powstanie nie wymaga wspomnianych zmian konformacyjnych, zwiększał się tym bardziej, im silniej aktywujący podstawnik znajdował się w pierścieniu aromatycznym. W przypadku reakcji jodolaktanu z pierścieniem dioksolowym (**7e**) γ -winylo- γ -lakton **21e** nieznacznie przeważał nad γ -etylideno- γ -laktonem **20e** (Rys.14). Wymagania eliminacji typu E2 skutkowały również konfiguracją *E* podwójnego wiązania w γ -etylideno- γ -laktonach **20a,b,e,f** [33,34].



Rysunek 14. Synteza nasyconych i nienasyconych β -arylo- γ -alkilo- γ -laktonów z jodolaktanów w reakcjach redukcyjnej dehalogenacji oraz eliminacji

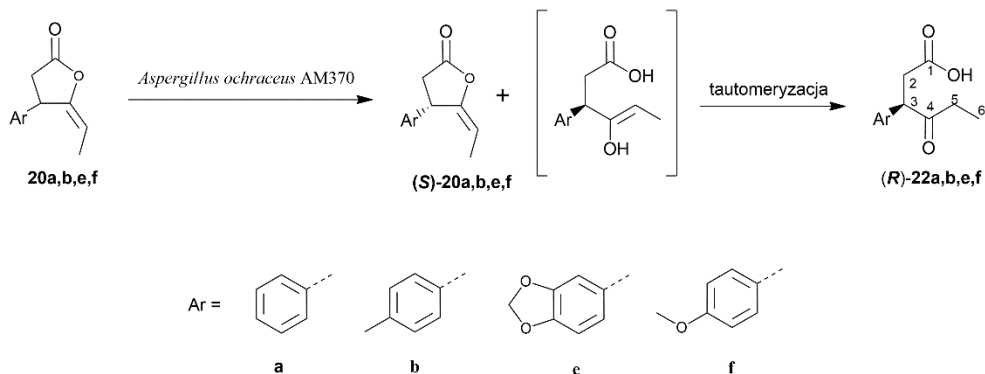
Figure 14. Synthesis of saturated and unsaturated β -aryl- γ -alkyl- γ -lactones from iodolactones by reductive dehalogenation and elimination

Nasycone β -arylo- γ -etylo- γ -laktony **18a,b,e,f** i **19a,b,e,f** uzyskane w wyniku redukcyjnej dehalogenacji jodolaktonów oraz nienasycone laktony **20a,b,e,f** oraz **21a,b,e,f**, powstałe w reakcji eliminacji testowano pod kątem aktywności antyfidantnej względem szkodników magazynów zbożowych. Produkty dehalogenacji były z reguły bardziej aktywnymi antyfidantami od wyjściowych jodolaktonów. Szczególnie aktywny okazał się *cis* γ -winylo- γ -lakton z podstawnikiem *p*-metoksyfenylowym (**21f**) oraz *trans* γ -etylo- γ -lakton z niepodstawionym pierścieniem benzenowym (**19a**) [33,34].

Związki z podstawnikiem fenylowym, *p*-metylofenylowym i benzodiolowym (**18a,b,e-21a,b,e**) badano także pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem szczepów grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium*. Kluczowym elementem strukturalnym decydującym o aktywności fungistatycznej okazał się pierścień benzodiolowy, a największą aktywnością charakteryzował się *trans* γ -etylo- γ -lakton **19e** który ograniczał wzrost szczepów *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. solani* i *F. culmorum* [34]. Grupę laktonów z podstawnikiem *p*-metoksyfenylowym (**18f-21f**) poddano testom na aktywność przeciwbakteryjną. W tej grupie jedynie *cis* γ -etylo- γ -lakton **18f** znacząco hamował wzrost Gram-dodatnich bakterii *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* [33].

4.2. MIKROBIOLOGICZNA HYDROLIZA β -ARYLO- γ -ETYLIDENO- γ -LAKTONÓW

Skrobiszewski i wsp. [35] przeprowadzili również hydrolizę β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów **20a,b,e,f** stosując jako biokatalizator szczep *Aspergillus ochraceus* AM370. Szybciej hydrolizowane były (*R*)-enancjomery substratów, pozwalając na otrzymanie enancjomerycznie wzbogaconych nieprzereagowanych (*S*)-enancjomerów laktonów. Uzyskane produkty hydrolizy, (*R*)-hydroksykwasy **22** z nietrwałym ugrupowaniem enolowym tautomeryzowały do odpowiednich (*R*)-ketokwasów (Rys.15).



Rysunek 15. Mikrobiologiczna hydroliza β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów **20a,b,e,f**
 Figure 15. Microbial hydrolysis of β -aryl- γ -ethylidene- γ -lactones **20a,b,e,f**

Enancjomeryczna czystość nieprzereagowanych laktonów była ściśle związana z rodzajem podstawnika arylowego, przy czym najwyższy nadmiar enancjomeryczny ($ee=77\%$) otrzymano dla związku posiadającego niepodstawiony pierścień benzenowy (**20a**). Wszystkie laktony, zarówno racemiczne, jak i enancjomerycznie wzbogacone, a także produkty ich hydrolizy wykazywały różną aktywność deterentną wobec pleśniakowca lśniącego, co było uzależnione od budowy związku i stadium rozwojowego owada. Szczególnie silnym antyfidantem okazał się γ -etylideno- γ -lakton z *p*-metoksy podstawionym pierścieniem fenyłowym (**20f**), zarówno w postaci racemicznej, jak i enancjomerycznie wzbogaconego izomeru *S*. W przypadku laktonu **20a** stwierdzono wpływ konfiguracji centrum stereogenicznego na aktywność, względem osobników dorosłych pleśniakowca lśniącego bardziej aktywny był lakton racemiczny niż jego (*S*)-enancjomer, wobec larw tego owada zależność była odwrotna. Można zatem przypuszczać, że w tym przypadku (*S*)-enancjomer jest bardziej aktywny wobec larw, a (*R*)-enancjomer jest lepszym antyfidantem wobec postaci dorosłych [35].

UWAGI KOŃCOWE

Opracowane ścieżki syntezy laktonów zawierających podstawnik aromatyczny w pozycji β pozwalają na otrzymanie nie tylko racemicznych, lecz również optycznie czynnych laktonów o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Wykazują one akty-

wność antyfidantną, przeciwdrobnoustrojową, jednak największe nadzieje wiązać należy z ich aktywnością antyproliferacyjną w kontekście potencjalnego zastosowania jako składników preparatów przeciwnowotworowych. Z tego względu badania tych związków obejmują również ich interakcje z błonami komórkowymi. Szczególnego znaczenie nabiera także możliwość badania zależności aktywności biologicznej tych związków od konfiguracji ich centrów stereogenicznych. Należy więc spodziewać się dalszych badań zarówno nad otrzymaniem poszczególnych enancjomerów β -arylolaktonów metodami biotechnologicznymi (biotransformacje z udziałem oczyszczonych enzymów lub całych komórek drobnoustrojów), jak i kompleksowych badań oddziaływań: aktywny związek-docelowa komórka.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Chadwick, H. Trewin, F. Gawthrop, C. Wagstaff, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 12780.
- [2] S. Basu, R. E. Clark, Z. Fu, B. W. Lee, D. W. Crowder, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2021, **128**, 103514.
- [3] L. Küppers, W. Ebrahim, M. El-Neketi, F. C. Özkaya, A. Mándi, T. Kurtán, R. S. Orfali, W. E. G. Müller, R. Hartmann, W. Lin, W. Song, Z. Liu, P. Proksch, *Mar. Drugs*, 2017, **15**, 359.
- [4] J. Wang, C. Quan, X. Wang, P. Zhao, S. Fan, *Microb. Biotechnol.*, 2011, **4**, 479.
- [5] G. D. Dumitriu, N. López de Lerma, C. I. Zamfir, V. V. Cotea, R. A. Peinado, *LWT-Food Sci., Technol.* 2017, **86**, 643.
- [6] H. Zia, U. Von Ah, Y. H. Meng, R. Schmidt, J. Kerler, P. Fuchsmann, *Food Chem. X*, 2022, **13**, 100220.
- [7] A. Grudniewska, M. Kłobucki, K. Dancewicz, M. Szczepanik, B. Gabryś, C. Wawrzęńczyk, *PLoS One*, 2015, **10**, e0131028.
- [8] B. M. Fraga, C. E. Díaz, M. Bailén, A. González-Coloma, *Plants*, 2021, **10**, 891.
- [9] D. F. Dalla Lana, A. R. Carvalho, W. Lopes, M. H. Vainstein, L. S. P. Guimarães, M. L. Teixeira, L. F. S. de Oliveira, M. M. Machado, S. F. de Andrade, M. M. Sá, T. V. C. Russo, G. P. Silveira, A. M. Fuentesfria, *Folia Microbiol.*, 2019, **64**, 509.
- [10] M. Mazur, D. Masłowiec, *Antibiotics* 2022, **11**, 1327.
- [11] M. F. García Manzano, M. B. Joray, J. Laiolo, S. M. Palacios, M. C. Carpinella, *J. Nat. Prod.*, 2020, **83**, 1909.
- [12] M. Kamio, M. Schmidt, M. W. Germann, J. Kubanek, C. D. Derby, *J. Exp. Biol.*, 2014, **217**, 1286.
- [13] V. Būda, L. Blažytė-Čereškienė, S. Radžiūtė, V. Apšegaitė, P. Stamm, S. Schultz, D. Aleknavičius, R. Mozūraitis, *Insects*, 2020, **11**, 138.
- [14] S. Schulz, S. Hötling, *Nat. Prod. Rep.*, 2015, **32**, 1042.
- [15] W. Shen, H. Mao, Q. Huang, J. Dong, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **97**, 747.
- [16] W. Gładkowski, M. Siepka, T. Janeczko, E. Kostrzewa-Susłow, M. Mazur, B. Żarowska, W. Łaba, *Molecules*, 2019, **24**, 4151.
- [17] F. Jun-Tao, W. De-Long, W. Yong-Ling, Y. He, Z. Xing, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 4393.
- [18] C. Zhao, K. P. Rakesh, S. Mumtaz, B. Moku, A. M. Asiri, H. M. Marwani, H. M. Manukumar, H. L. Qin, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 9487.
- [19] B. H. Alizadeh, A. Foroumadi, S. Emami, M. Khoobi, F. Panah, S. K. Ardestani, A. Shafiee, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 5979.
- [20] G. Benedeković, I. Kovačević, M. Popsavin, J. Francuz, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Popsavin, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**, 3318.
- [21] Y. Ren, D. D. Lantvit, Y. Deng, R. Kanagasabai, J. C. Gallucci, T. N. Ninh, H. B. Chai, D. D. Soejarto, J. R. Fuchs, J. C. Yalowich, J. Yu, S. M. Swanson, A. D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.*, 2014, **77**, 1494.

- [22] W. Gładkowski, A. Gliszczyńska, M. Siepka, M. Czarnecka, G. Maciejewska, *Tetrahedron Asymmetry*, 2015, **26**, 702.
- [23] W. Gładkowski, A. Skrobiszewski, M. Mazur, M. Siepka, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Białońska, D. Poradowski, A. Drynda, M. Urbaniak, *Tetrahedron*, 2013, **69**, 10414.
- [24] W. Gładkowski, A. Skrobiszewski, M. Mazur, A. Gliszczyńska, M. Czarnecka, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, G. Maciejewska, A. Białońska, *Tetrahedron Asymmetry*, 2016, **27**, 227–237.
- [25] W. Gładkowski, A. Skrobiszewski, M. Mazur, M. Siepka, A. Białońska, *European J. Org. Chem.*, 2015, 605.
- [26] A. Włoch, D. Stygar, F. Bahri, B. Bażanów, P. Kuroпка, E. Chełmecka, H. Pruchnik, W. Gładkowski, *Biomolecules*, 2020, **10**, 1594.
- [27] A. Pawlak, W. Gładkowski, M. Mazur, M. Henklewska, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Rapak, *Chem. Biol. Interact.*, 2017, **261**, 18.
- [28] A. Pawlak, W. Gładkowski, J. Kutkowska, M. Mazur, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Rapak, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2018, **28**, 1171.
- [29] W. Gładkowski, A. Włoch, A. Pawlak, A. Sysak, A. Białońska, M. Mazur, P. Mituła, G. Maciejewska, B. Obmińska-Mrukowicz, H. Kleszczyńska, *Molecules*, 2018, **23**, 3035.
- [30] Skrobiszewski A., Gładkowski W., Lis M., Gliszczyńska A., Maciejewska G., T. Klejdysz, Obmińska-Mrukowicz B., Nawrot J., Wawrzeńczyk C., *Przem. Chem.*, 2014, **93**, 1637.
- [31] A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk, *Molecules*, 2016, **21**, 1552.
- [32] M. Mazur, A. Kudrynska, A. Pawlak, B. Hernandez-Suarez, B. Obmińska-Mrukowicz, W. Gładkowski, *Catalysts*, 2020, **10**, 1313.
- [33] M. Mazur, A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, M. Podkowik, J. Bania, J. Nawrot, T. Klejdysz, C. Wawrzeńczyk, *Pest Manag. Sci.*, 2016, **72**, 489.
- [34] A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, P. Walczak, A. Gliszczyńska, G. Maciejewska, T. Klejdysz, J. Nawrot, C. Wawrzeńczyk, *J. Chem. Sci.*, 2015, **127**, 687.
- [35] A. Skrobiszewski, W. Gładkowski, M. Mazur, M. Szczepanik, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk, *Molecules*, 2018, **23**, 1516.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lutego 2023 r.

