

**Załącznik 3 do wniosku
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego**

Autoreferat

**Przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych określonych
w art. 16 ust. 2 ustawy (w języku polskim)**

Dr Ewa Rudzińska-Szostak
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska

Wrocław 2019

Ewa Rudzińska-Szostak, dr
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wroclawska

Autoreferat

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- a. Magister chemii, **2000**, Uniwersytet Opolski, Wydział Matematyczno-Fizyczno-Chemiczny
- b. Doktor nauk chemicznych, **2004**, Politechnika Wroclawska, Wydział Chemiczny, Rozprawa doktorska zatytułowana: Oznaczanie czystości optycznej aminofosfonianów (promotor Prof. Paweł Kafarski)

2. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- a. **2004 – 2006** asystent naukowo-dydaktyczny, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska
- b. **2006 – 2008** asystent naukowo-badawczy, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska
- c. **2008 – 2012** adiunkt naukowy, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska
18.09.2011 - 03.03.2012 urlop macierzyński
- d. **od 2012** adiunkt naukowo-dydaktyczny, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska
13.08.2013- 10.02.2014 urlop macierzyński

3. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

- a. Tytuł osiągnięcia naukowego: [Oddziaływania stereospecyficzne z udziałem związków fosforoorganicznych](#)
- b. Wykaz publikacji (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

H1. Berlicki, Ł.; Rudzińska, E.; Młynarz, P.; Kafarski, P.* Organophosphorus supramolecular chemistry. Part 1. Receptors for organophosphorus compounds. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 2285 – 2306; [IF = **3,232**; cyt. = **12**]

H2. Młynarz, P.; Rudzińska, E.; Berlicki, Ł.; Kafarski, P.* Organophosphorus supramolecular chemistry. Part 2. Organophosphorus receptors. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 1593 – 1609; [IF = **3,961**; cyt. = **12**]

H3. Rudzińska, E.; Poliwoda, A.; Berlicki, Ł.; Mucha, A.; Dzygiel, P.; Wieczorek, P.P.; Kafarski, P.* Enantiodifferentiation of *N*-benzyloxycarbonylaminophosphonic and phosphinic acids and their esters using cyclodextrins by means of capillary electrophoresis. *J. Chromat. A* **2007**, *1138*, 284 – 290; [IF = **3,641**; cyt. = **10**]

H4. Rudzińska, E.*; Berlicki, Ł.; Mucha, A.; Kafarski, P. Chiral discrimination of ethyl and phenyl *N*-benzyloxycarbonylaminophosphonates by cyclodextrins. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18*, 1579 – 1584; [IF = **2,634**; cyt. = **6**]

- H5. Rudzińska, E.*;** Berlicki, Ł.; Mucha, A.; Kafarski, P. Analysis of pD dependent complexation of *N*-benzyloxycarbonylaminophosphonic acids by α -cyclodextrin. Enantiodifferentiation of phosphonic acid pK_a values. *Chirality* **2007**, *19*, 764 – 768; [IF = **2,436**; cyt. = 5]
- H6. Rudzińska, E.*;** Berlicki, Ł.; Kafarski, P.; Lämmerhofer, M.; Mucha, A. Cinchona alkaloids as privileged chiral solvating agents for enantiodiscrimination of *N*-protected aminoalkanephosphonates – a comparative NMR study. *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 2709 – 2714; [IF = **2,625**; cyt. = 13]
- H7. Rudzińska, E.*;** Dziędziola, G.; Berlicki, Ł.; Kafarski, P. Enantiodifferentiation of α -hydroxyalkanephosphonic acids in ³¹P NMR with application of α -cyclodextrin as chiral discriminating agent. *Chirality* **2010**, *22*, 63 – 68; [IF = **2,893**; cyt. = 14]
- H8. Górecki, Ł.;** Berlicki, Ł.; Mucha, A.; Kafarski, P.; Ślepokura, K.; **Rudzińska-Szostak, E.*** Phosphorylation as a method of tuning the enantiodiscrimination potency of quinine – an NMR study. *Chirality* **2012**, *24*, 318 – 328; [IF = **1,718**; cyt. = 8]
- H9. Górecki, Ł.;** Berlicki, Ł.; Mucha, A.; Kafarski, P.; Ślepokura, K.; **Rudzińska-Szostak, E.*** Zwitterionic phosphorylated quinines as chiral solvating agents for NMR spectroscopy. *Chirality* **2015**, *27*, 752 – 760; [IF = **2,025**; cyt. = 2]

Sumaryczny Impact Factor prac składających się na osiągnięcie: 25,164 przy liczbie 82 cytowań

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

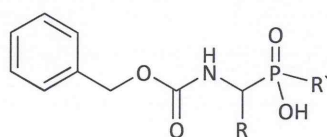
Chiralność jest właściwością materii przejawiającą się na poziomie molekularnym poprzez asymetryczność aminokwasów, cukrów, większości witamin, a co za tym idzie również białek i kwasów nukleinowych. Organizmy żywe same w sobie stanowią rozbudowane, chiralne środowisko reakcji. Począwszy od podstawowych procesów metabolicznych takich jak reakcje enzymatyczne, a skończywszy na skomplikowanych przemianach jak synteza białek czy replikacja DNA, oddziaływania stereospecyficzne pomiędzy substancjami biorącymi udział w tych przemianach odgrywają bardzo istotną rolę. Wynika to z faktu, że izomery konfiguracyjne są specyficznie rozpoznawane w organizmie ludzkim, a tym samym mogą wywoływać odmienne efekty biologiczne. Nie jest zatem zaskakujące, że tylko jeden z enancjomerów wielu leków, pestycydów, dodatków smakowych i innych substancji wykazuje pożądane właściwości. Postęp technologiczny sprawił, iż osiągalne stało się otrzymanie związków czystych optycznie w znaczących ilościach, co zapoczątkowało marginalizację leków racemicznych. Obecnie kładzie się duży nacisk na projektowanie, otrzymywanie i wprowadzanie na rynek leków w postaci czystych enancjomerów. Rozwój chemii organicznej, a zwłaszcza katalizy asymetrycznej oraz biotechnologii pozwala na otrzymywanie tych związków z coraz większą wydajnością i z prawie 100% nadmiarem enancjomerycznym. W następstwie tego niezbędna okazała się dostępność szybkich i precyzyjnych metod analitycznych pozwalających monitorować czystość

enancjomeryczną otrzymywanych preparatów. Metody bezpośrednie tj. takie, które nie wymagają przekształcenia badanej substancji w diastereoizomery za pomocą reakcji chemicznych przed analizą, to przede wszystkim techniki chromatograficzne (wysokosprawna chromatografia cieczowa, chromatografia gazowa), elektroforeza kapilarna (CE) oraz spektroskopia NMR. W tym wypadku kluczowy jest dobór chiralnego dyskryminatora, który stereospecyficznie rozpoznaje enancjomery poprzez tworzenie niekowalencyjnych kompleksów z różnymi stałymi kompleksowania i/lub o innej geometrii. Celem niniejszej pracy było poszukiwanie metod badania składu enancjomerycznego i analiza podstaw molekularnych procesów enancjodyskryminacji z udziałem związków fosforoorganicznych. Organiczne związki fosforu stanowią szeroką grupę pochodnych o zróżnicowanej strukturze oraz charakterystyce fizykochemicznej i biologicznej. Znalazły one zastosowanie w medycynie [1-3], rolnictwie [4] i przemyśle [5]. Znane są wśród nich środki trujące o działaniu paralityczno-drgawkowym [6], leki przeciw osteoporozie [7], jaskrze [8], leki antynowotworowe [9], przeciwwirusowe [10], insektycydy, herbicydy czy też regulatory wzrostu roślin [11]. Związki fosforoorganiczne zajmują istotne miejsce w chemii supramolekularnej. Receptory fosforoorganiczne, cząsteczki zawierające w strukturze anionową resztę kwasu fosforowego, fosfonowego, fosfinowego czy też obojętnego fosfitotlenku, która może oddziaływać elektrostatycznie i/lub brać udział w tworzeniu sieci wiązań wodorowych, zdolne są do tworzenia kompleksów z szeregiem związków organicznych takich jak: aminoalkohole, katecholoaminy, aminy, węglowodany, aminokwasy, peptydy, białka [H1]. Inną grupę układów supramolekularnych stanowią receptory zdolne do selektywnego rozpoznawania i wiązania cząsteczek fosfonianów, fosfinianów bądź też fosforanów. Są to między innymi receptory poliaminowe, amidowe, polipirole, cyklodekstryny czy metaloreceptory [H2].

Wykorzystanie właściwości kompleksujących związków fosforu pozwoliło na opracowanie szybkich, powtarzalnych i skutecznych metod do oznaczania składu enancjomerycznego *N*-benzyloksykarbonylowych (Cbz) pochodnych kwasów α -aminoalkilofosfinowych, monoestrów etylowych oraz fenyloowych kwasów α -*N*-Cbz-aminoalkilofosfonowych, a także wybranych kwasów α -hydroksyalkilofosfonowych, o potencjalnej aktywności biologicznej [H3-H7]. Ta część osiągnięcia habilitacyjnego stanowi twórcze rozwinięcie tematyki doktoratu, która dotyczyła zastosowania elektroforezy kapilarnej (CE) [12-15] oraz spektroskopii ^{31}P NMR [16,17] z użyciem cyklodekstryn jako dyskryminatorów chiralności do analizy enancjomerów kwasów α -aminoalkilofosfonowych [12-16], ich pochodnych Cbz [15,17] oraz kwasów α -aminoalkilofosfinowych [13,16]. Spektroskopia ^{31}P MNR została również zastosowana do analizy chiralnej kwasów α -*N*-Cbz-aminoalkilofosfinowych [17]. Natomiast zupełnie nowym elementem było zaprojektowanie i otrzymanie nowych fosforoorganicznych dyskryminatorów chiralności [H8,H9]. Wprowadzenie reszty fosforanowej do cząsteczki chininy, która jest znanym chiralnym odczynnikiem solwującym wykorzystywanym w różnych technikach analitycznych (HPLC, CE, NMR) [18-22], miało na celu poszerzenie zdolności tego

alkaloidu do kompleksowania stereoselektywnego. Potencjał otrzymanych estrów fosforanowych zbadano za pomocą spektroskopii NMR dla modelowej grupy związków takich jak: aminokwasy, aminy, alkohole, kwasy karboksylowe i ich *N*-pochodne.

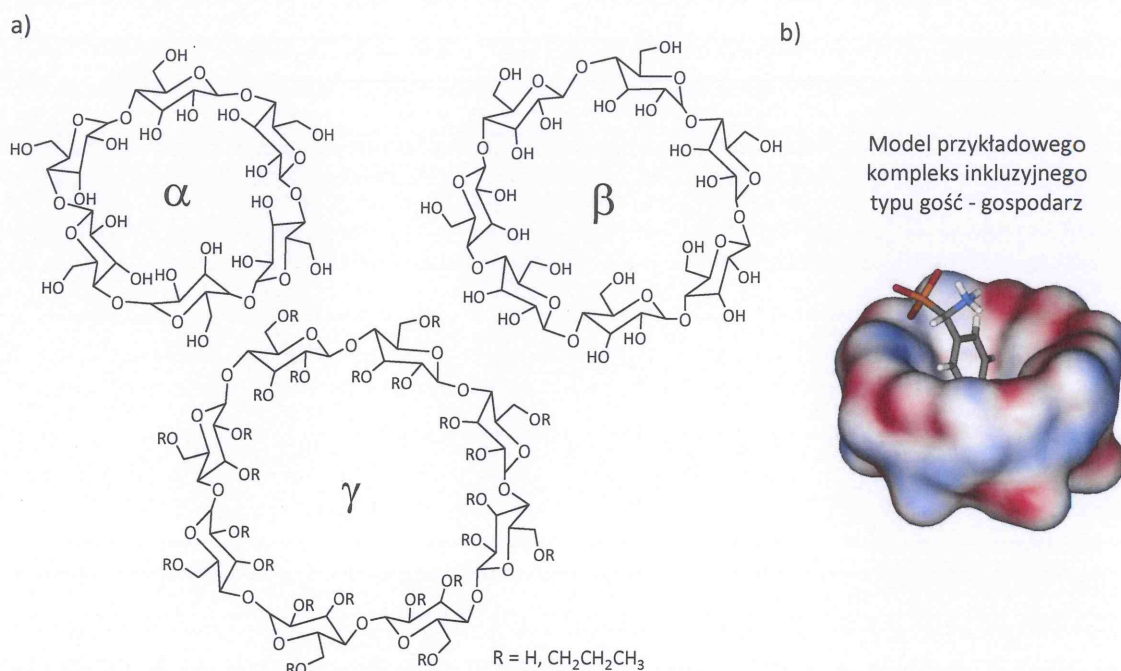
Pierwszą grupą związków, której poświęciłam znaczną część swoich badań są α -*N*-Cbz-aminoalkilofosfoniany. Związki te stanowią podstawowe substraty do syntezy fosfonowych, fosfinowych oraz fosfonoamidowych mimetyków peptydów [23-28]. Ugrupowania zawierające atom fosforu wprowadzone do cząsteczki pseudopeptydu naśladują substrat w wysokoenergetycznym stanie przejściowym reakcji hydrolizy wiązania amidowego. Dodatkowo fragment fosforoorganiczny wykazuje zdolności do koordynowania jonów metalu, np. cynku, znajdujących się w centrach aktywnych metaloenzymów. Takie związki stanowią zatem grupę potencjalnych inhibitorów białek katalitycznych, o szczególnej aktywności względem przedstawicieli rodziny metaloproteaz [29-31].



- | | |
|--|--|
| 1. R' = OH, R = a - f | R = CH ₃ (a), CH ₃ CH ₂ (b), (CH ₃) ₂ CH (c), (CH ₃) ₂ CHCH ₂ (d), |
| 2. R' = H, R = a, c - g | C ₆ H ₅ (e), C ₆ H ₅ CH ₂ (f), C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ (g). |
| 3. R' = OCH ₂ CH ₃ , R = a,d,e | |
| 4. R' = OC ₆ H ₅ , R = a - f | |

Rysunek 1. Struktury badanych α -*N*-Cbz-aminoalkilofosfonianów i fosfinianów.

Zastosowanie elektroforezy kapilarnej z użyciem cyklodekstryn jako selektorów chiralnych okazało się efektywną techniką analityczną do oznaczania składu enancjomerycznego szeregu różnie podstawionych kwasów α -*N*-Cbz-aminoalkilofosfinowych (**2a,c-g**), a także monoestrów etylowych (**3a,d,e**) i fenylowych (**4a-f**, rys. 1), ich fosfonowych analogów [H3]. Jako chiralne selektory użyto α -, β - oraz hydroksypropylo- γ -cyklodekstrynę (α -CD, β -CD, HP- γ -CD) (rys. 2a). W celu optymalizacji warunków metody zbadano wpływ pH buforu, a także stężenia selektora chiralnego na efektywność rozdzielania enancjomerów. Do standardowej analizy wybrano pH buforu 6.5 dla kwasów fosfinowych (**2**) oraz 6.0 dla monoestrów (**3, 4**), natomiast stężenie cyklodekstryn: α -CD – 40 mM, β -CD – 5 mM oraz HP- γ -CD – 40 mM dla kwasów aminofosfinowych (**2**) a 30 mM dla monoestrów (**3, 4**). Cząsteczki cyklodekstryn mają kształt ściętego stożka i tworzą supramolekularne kompleksy inkluzyjne typu gość-gospodarz poprzez inkorporację hydrofobowego fragmentu cząsteczki gościa w hydrofobowej wnęce gospodarza (rys. 2b). Kompleksy są stabilizowane przez oddziaływania wodorowe gościa z grupami hydroksylowymi znajdującymi się na zewnętrznych pierścieniach cyklodekstryny. Użyte do badań cyklodekstryny różnią się wielkością wnęki hydrofobowej, w związku z tym rodzaj użytego selektora znacząco wpływał na zdolność kompleksowania poszczególnych substancji.



Rysunek 2. Struktury α -, β - i hydroksypropylo- γ -cyklodekstryny (stopień substytucji 0,6) (a). Przykład kompleksu inkluzyjnego typu gość – gospodarz z udziałem α -cyklodekstryny (b).

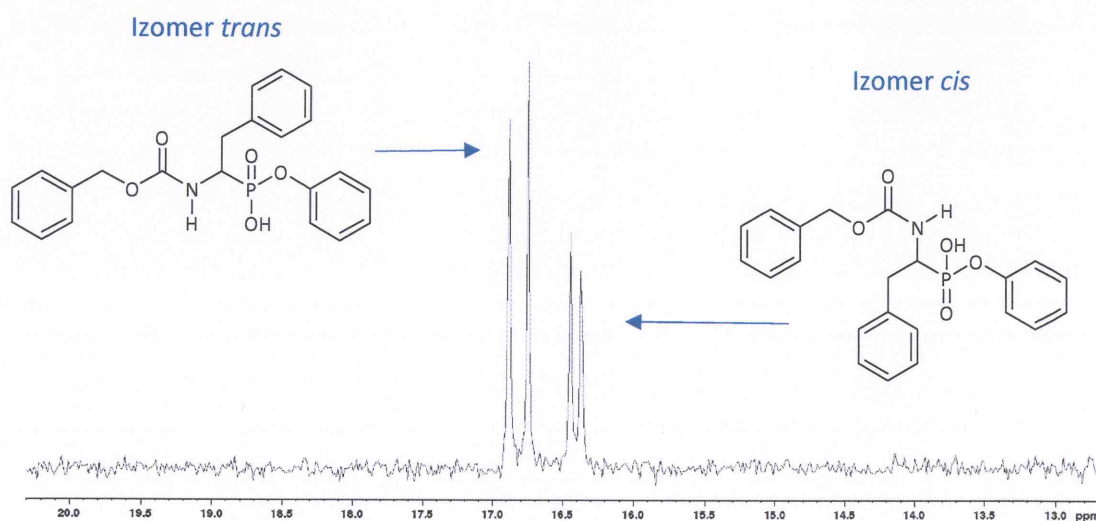
W przypadku kwasów aminofosfinowych największą enancjoselektywnością wykazały się α - i β -cyklodekstryna (efektywność rozdziału α w granicach 1,020 – 1,046 dla α -CD, wyj. **2f**: $\alpha = 1$ oraz 1,008 – 1,032 dla β -CD, wyj. **2g**: $\alpha = 1$; całkowity rozdziel pików na elektroferogramie obserwowano dla α powyżej 1,022). HP- γ -CD praktycznie nie wykazała stereoselektywnego oddziaływania (wyj. **2c**: $\alpha = 1,010$). W przypadku monoestrów fosfonowych enancjoróżnicowanie obserwowano w obecności wszystkich cyklodekstryn, natomiast najmniejsze współczynniki rozdziel uzyskano dla β -CD (α w granicach 1,012 – 1,032, wyj. **3a, 4e,f**: $\alpha = 1$). Rozpatrując wpływ struktury analizowanych związków na jakość rozdziel, α -CD najefektywniej różnicowała monoestry etylowe (**3**: α w granicach 1,023 – 1,030), zaś HP- γ -CD fenylowe (**4**: α w granicach 1,018 – 1,044, wyj. **4f**: $\alpha = 1,005$). Podsumowując, opracowana metoda pozwoliła zarówno na jakościowe i ilościowe oznaczenie składu enancjomerycznego dwunastu z piętnastu badanach związków: czterech kwasów α -N-Cbz-aminoalkilofosfinowych (**2a,c-e**), trzech monoestrów etylowych (**3**) oraz pięciu monoestrów fenylowych kwasów α -N-Cbz-aminoalkilofosfonowych (**4a-e**).

Wykorzystując cyklodekstryny jako dyskryminatory chiralności, zaproponowano spektroskopię ^{31}P NMR jako alternatywną technikę do analizy enancjomerów monoestrów kwasów α -N-Cbz-aminoalkilofosfonowych (**3, 4**) [H4]. Szeroki zakres przesunięć chemicznych rezonansów jąder ^{31}P (-300 – 250 ppm) na widmie NMR, wysoka czułość pomiaru (tylko ok. 15 % niższa od ^1H NMR), wynikająca ze 100%-wej naturalnej zawartości jąder izotopu fosforu ^{31}P w przyrodzie, a także nieskomplikowana analiza widm, będąca konsekwencją tego, że w warunkach szybkiej wymiany w skali czasowej NMR

na widmie obserwuje się jedynie sygnały rezonansowe pochodzące od kompleksów poszczególnych enancjomerów z selektorem chiralnym sprawia, że technika ta jest bardzo dobrym narzędziem do enancjodyskryminacji związków fosforoorganicznych. Jako chiralne czynniki dyskryminujące zastosowano α -, β -, γ - oraz hydroksypropylo- γ -cyklodekstrynę. Zoptymalizowano warunki analizy takie jak pD roztworu i stężenie selektora chiralnego. Do rutynowych pomiarów użyto dziesięciokrotny nadmiar molowy cyklodekstryny (100 mM dla α -, γ -, HP- γ -CD oraz 10 mM dla β -CD) w stosunku do badanego monoestru oraz pD = 12. Opracowana metoda dała możliwość ilościowego oznaczania wszystkich badanych monoestrów fenylowych (**4**: $\Delta\delta$ w granicach 0,119 – 0,352 ppm, całkowite różnicowanie sygnałów na widmie ^{31}P NMR uzyskiwano dla $\Delta\delta \geq 0,1$ ppm) i monoestru etylowego kwasu α -*N*-Cbz-amino(fenyl)metylofosfonowego (**3e**: $\Delta\delta = 0,229$ ppm), natomiast pozwoliła na jakościowe szacowanie czystości enancjomerycznej pozostałych estrów etylowych, analogów alaniny (**3a**: $\Delta\delta = 0,043$ ppm) oraz leucyny (**3d**: $\Delta\delta = 0,059$ ppm). Rozpatrując potencjał poszczególnych cyklodekstryn do enancjoróżnicowania badanych monoestrów, najłabsze efekty enancjodyskryminacji uzyskano z użyciem γ -CD ($\Delta\delta$ dla **1a,c,e,f** oraz **2d,e** w granicach 0,022 – 0,081 ppm, wyj. **1f**: $\Delta\delta = 0,221$ ppm), która została po raz pierwszy zastosowana do analizy stereoizomerów aminofosfonianów. W przypadku tego selektora nie zauważono również żadnych preferencji względem struktury kompleksowanych związków. Najwyższe wartości enancjoselektywności uzyskano natomiast w przypadku zastosowania β -CD oraz HP- γ -CD do analizy estrów fenylowych (**4**: $\Delta\delta$ w granicach 0,104 – 0,352 ppm). Pomimo, że różnice przesunięć chemicznych ^{31}P NMR poszczególnych enancjomerów w obecności α -CD były mniejsze niż dla β -CD oraz HP- γ -CD, selektor ten wykazał największe zdolności stereoselektywnego kompleksowania monoestrów etylowych (**3**: $\Delta\delta$ w granicach 0,043 – 0,223 ppm).

Spektroskopia NMR, w szczególności eksperymenty dwuwymiarowe, dają możliwość badania podstaw molekularnych procesu kompleksowania, a także sposobu oddziaływania poszczególnych indywiduów. Na podstawie wykresu Joba oraz analizy widm 2D ROESY wykazano, że fosfonowy analog monoestru fenylowego *N*-Cbz pochodnej fenylglicyny (**4e**), który posiada w strukturze cząsteczki trzy pierścienie aromatyczne, które mogą równocześnie lub z osobna oddziaływać z cząsteczkami α -CD, tworzył z nią w roztworze kompleksy supramolekularne o różnej stechiometrii. Dodatkowo okazało się, że fragmenty aromatyczne gościa mogą penetrować wnękę cyklodekstryny z dwóch stron, co znacznie zwiększyło liczbę możliwych kombinacji. Natomiast w przypadku oddziaływania tego estru z γ -CD, która posiada szerszą hydrofobową wnękę, zdolną do inkluzji dwóch pierścieni aromatycznych, w roztworze obecne były kompleksy jedynie o stechiometrii 1:1. Ciekawy przypadek enancjodyskryminacji zauważono dla estru fenylowego **4f**. *N*-Cbz pochodne aminofosfonianów, ze względu na zahamowaną rotację wokół wiązania amidowego, występują w postaci dwóch izomerów *cis* i *trans*, co uwidacznia

się na widmach NMR [17,32,33]. Zwykle udział izomeru *cis* związku jest niewielki (poniżej 10%) i nie jest brany pod uwagę przy oznaczaniu składu enacjomerycznego danego związku. Natomiast dla omawianego monoestru procentowa zawartość tego izomeru wynosiła 24% i wzrastała w obecności γ -CD (38%) i HP- γ -CD (43%, rys. 3).



Rysunek 3. Fragment widma ^{31}P NMR monoestru **4f** w obecności HP- γ -CD (10mM : 100mM).

Stabilizacja izomeru *cis*, a także wysoka enancjoselektywność γ -cyklodekstryny w stosunku do tej formy estru, wyraźnie sugerowało tworzenie się kompleksów supramolekularnych, w których nastąpiła jednoczesna inkluzja dwóch pierścieni aromatycznych do wnętrza cyklodekstryny. Ze zrozumiałych względów zjawiska tego nie obserwowano dla α -CD.

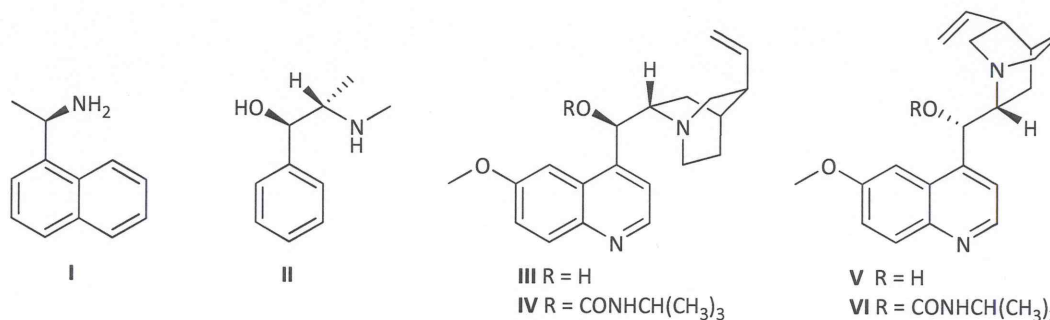
W przeciwieństwie do opisanych aminofosfinianów i monoestrów fosfonowych, *N*-Cbz pochodne kwasów aminofosfonowych posiadają dwuzasadową grupę kwasową, która może być różnie sprotonowana w zależności od pH roztworu. pK_a pierwszej grupy hydroksylowej wynosi około 1,5, natomiast drugiej około 7. Kwasy *N*-Cbz-aminoalkilofosfonowe tworzą supramolekularne diastereoizomeryczne kompleksy z α -cyklodekstryną, a enancjoselektywność obserwowana na widmach ^{31}P NMR silnie zależy od pD roztworu [17]. Analiza tych zależności (pD 5 – 10) dla czterech wybranych kwasów fosfonowych, pochodnych alaniny (**1a**), waliny (**1c**), leucyny (**1d**) oraz fenyloglicyny (**1e**) wykazała wyższe efekty enancjodyskryminacji w zasadowych warunkach dla kwasów posiadających alifatyczny łańcuch boczny, natomiast w kwaśnych dla fosfonowej pochodnej fenyloglicyny. Przy czym we wszystkich przypadkach najlepsze wyniki uzyskano w pD odpowiadającym deprotonacji drugiej grupy hydroksylowej [H5]. Szczegółowe badania wykazały, że oddziaływanie z cząsteczką α -cyklodekstryny zwiększało kwasowość tej grupy (pK_{a2}), co było konsekwencją reorganizacji oddziaływań wodorowych w kompleksie. Co więcej oddziaływanie z cyklodekstryną różnicowało pK_a grup fosfonowych poszczególnych enancjomerów (tab. 1).

Tabela 1. Wartości pK_{a2} wyznaczone dla związków **1a,c-e** w formie wolnej i skompleksowanej z α -CD (10/100 mM).

numer związku	pK_{a2}	pK_{a2}	
	(forma nieskompleksowana)	(w obecności α -CD)	
1a	7,19	7,31	7,07
1c	7,82	7,14	6,94
1d	7,66	7,07	6,79
1e	6,77	6,69	6,59

W konsekwencji w tych warunkach występowała największa różnica w populacji formy sprotonowanej i niesprotonowanej, co wpływało na lokalną zmianę otoczenia chemicznego atomów fosforu. W wyniku tego obserwowano maksimum różnicowania sygnałów pochodzących od kompleksów supramolekularnych aminofosfonian/ α -CD na widmie ^{31}P NMR. Efekt ten był szczególnie wyraźny dla związków posiadających hydrofobowy łańcuch boczny wystarczająco duży do skutecznego oddziaływania z cyklodekstryną (**1c-e**).

Ostatnim etapem badań dotyczących enancjodyskryminacji aminofosfonianów było użycie chiralnych amin (rys. 4) do różnicowania przesunięć chemicznych enancjomerów wybranych kwasów α -*N*-Cbz-aminoalkilofosfonowych (**1a,c-f**) oraz ich fosfinowych analogów (**2a,c-g**) na widmach ^{31}P NMR [H6].

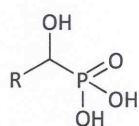
**Rysunek 4.** Struktury badanych amin: 1-(1-naftylo)etyloamina (**I**), efedryna (**II**), chinina (**III**), chinidyna (**V**), 9-*O*-*tert*-butylokarbamoilochinina (**IV**), 9-*O*-*tert*-butylokarbamoilochinidyna (**VI**).

1-(1-Naftylo)etyloamina (**I**) oraz efedryna (**II**) były wcześniej opisane w literaturze jako chiralne czynniki solwujące w spektroskopii ^{31}P NMR dla pojedynczych przypadków kwasów α -*N*-Cbz-aminoalkilofosfonowych, pochodnych waliny i leucyny [34], natomiast 9-*O*-*tert*-butylokarbamoilowe analogi alkaloidów chinolinowych (**IV**, **VI**) były użyte jako efektywne fazy stacjonarne do chromatograficznego rozdziału stereoisomerów *N*-Cbz pochodnych aminofosfonianów [35,36]. Dla porównania użyto też нефункционализованą chininę i chinidynę. Enancjodyskryminacja aminofosfonianów z udziałem amin polega na tworzeniu diastereoizomerycznych soli poprzez tworzenie pary jonowej pomiędzy resztą kwasową fosfonianu a grupą aminową selektora. Utworzone kompleksy supramolekularne są dodatkowo stabilizowane oddziaływaniami niekonwalencyjnymi, takimi jak wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe, π -elektronowe czy van der Waalsa. Aminy

zastosowane przeze mnie różnią się między sobą przede wszystkim złożonością budowy. Najprostsza, 1-(1-naftylo)etyloamina, oprócz pierwszorzędowej grupy aminowej posiada duży fragment hydrofobowy, natomiast efedryna, jest aminą drugorzędową i zawiera w strukturze dodatkowe centrum asymetrii oraz grupę hydroksylową, która może być zaangażowana w tworzenie wiązań wodorowych. Chinina i chinidyna – aminy trzeciorzędowe, różniące się konfiguracją absolutną atomów węgla C8 i C9, są najbardziej rozbudowane strukturalnie. Częsteczki te posiadają cztery asymetryczne atomy węgla, przestrzenny fragment chinuklidynowy oraz bogaty w elektrony układ chinolinowy z podstawnikiem metoksylovym. Złożona struktura cząsteczek tych alkaloidów oferuje szereg możliwych oddziaływań, a modyfikacja grupą *tert*-butylokarbamoilową dodatkowo poszerza ten potencjał. Zgodnie z oczekiwaniami najmniej efektywna okazała się 1-(1-naftylo)etyloamina (enancjoróżnicowanie uzyskano jedynie dla związków: **1d** – $\Delta\delta = 0,02$ ppm oraz **2c,d,f** gdzie $\Delta\delta$ wynosi odpowiednio 0,275 ppm, 0,022 ppm oraz 0,024 ppm). Pozostałe aminy wykazały się bardzo dobrą selektywnością w stosunku do większości badanych kwasów, zarówno fosfinowych, jak i fosfonowych ($\Delta\delta$ w granicach 0,125 – 1,008 ppm). Niemniej jednak, największą enancjoselektywność otrzymano w obecności niederywatyzowanych alkaloidów chinolinowych (**III**, **V**), zwłaszcza chinidyny ($\Delta\delta$ w granicach 0,179 – 1,125 ppm dla chininy oraz 0,348 – 1,008 ppm dla chinidyny). Jedynie fosfonowy analog fenyloglicyny (**1e**) nie tworzył stereoizomerycznych kompleksów supramolekularnych z tymi dyskryminatorami. Efektywność użytych amin porównano również z α - i HP- γ -cyklodekstryną, które opisano wcześniej jako efektywne dyskryminatory chiralności w ^{31}P NMR [17]. W tym zestawieniu α -cyklodekstryna wykazała największy potencjał do różnicowania przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od kompleksów z fosfonowymi analogami waliny ($\Delta\delta = 0,283$ ppm dla α -CD; 0,269 ppm dla pochodnej chinidyny **VI**), leucyny ($\Delta\delta = 0,331$ ppm dla α -CD; 0,196 ppm dla chinidyny **V**) oraz fenyloglicyny ($\Delta\delta = 0,287$ ppm dla α -CD; 0,066 ppm dla chininy **III**). Pozostałe wartości enancjoselektywności ($\Delta\delta$) były dużo mniejsze w porównaniu do alkaloidów chinolinowych.

Kolejną grupą związków fosforoorganicznych, dla których opracowałam metodę oznaczania składu enancjomerycznego z użyciem spektroskopii ^{31}P NMR, są kwasy α -hydroksyalkilofosfonowe [H7]. Jako analogi naturalnych kwasów hydroksykarboksylowych wykazują one aktywność inhibitorową w stosunku do enzymów biorących udział w ich metabolizmie takich jak: transferaza farnezylowa [37], syntaza 3-fosforanu 5-enolopirogronianoszikimianu [38], kinaza tyrozynowa [39] oraz proteaza wirusa HIV [40]. Leki bazujące na hydroksyfosfonianach stosowane są w leczeniu takich chorób jak białaczka, dna moczanowa, malaria, infekcje cytomegalowirusowe, osteoporoza, hiperkalcemia, nowotwory złośliwe czy AIDS [41]. Związki te są wykorzystywane także jako substraty do konstruowania bardziej rozbudowanych analogów o potencjalnej aktywności biologicznej.

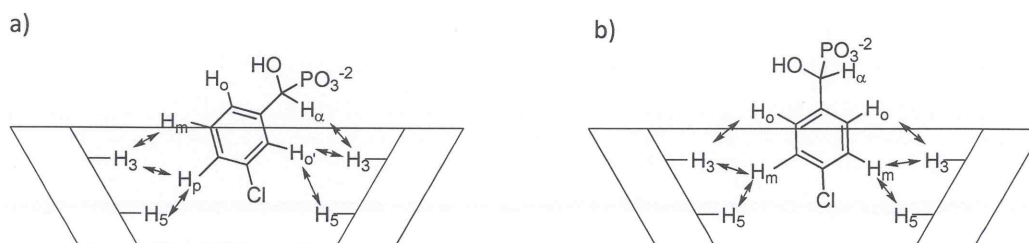
Do enancjodyskryminacji tych związków najszersze zastosowanie znalazła dotychczas spektroskopia ^{31}P NMR w obecności alkaloidów chinolinowych jako dyskryminatorów chiralności [42]. W ramach badań prowadzonych przeze mnie przetestowałam użyteczność α -cyklodekstryny do tego celu. Struktury analizowanych kwasów hydroksyfosfonowych zostały tak dobrane, aby można było zbadać wpływ rozgałęzienia łańcucha bocznego w przypadku analogów alifatycznych oraz sposobu podstawienia pierścienia fenylowego na efekt enancjodyskryminacji (rys. 5).



R = CH_2CH_3 (**5a**), $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ (**5b**), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ (**5c**),
 $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ (**5d**), C_6H_5 (**5e**), *o*-Cl-C₆H₄ (**5f**),
m-Cl-C₆H₄ (**5g**), *p*-Cl-C₆H₄ (**5h**), 2,3-di-Cl-C₆H₃ (**5i**),
 2,4-di-Cl-C₆H₃ (**5j**), 3,4-di-Cl-C₆H₃ (**5k**),
 2,6-di-Cl-C₆H₃ (**5l**), 3,5-di-Cl-C₆H₃ (**5m**).

Rysunek 5. Struktury analizowanych kwasów α -hydroksyfosfonowych

Do analizy użyto dziesięciokrotny nadmiar molowy cyklodekstryny w stosunku do analizowanego kwasu (100:10 mM). Badania zależności enancjodyskryminacji od pD roztworu (2 – 11) wykazały zróżnicowanie względem struktury hydroksyfosfonianów. Największe zróżnicowanie efektu enancjodyskryminacji obserwowano dla pD zbliżonego do pK_a mniej kwasowej grupy OH – w zależności od struktury związku α -CD kompleksowała efektywnie hydroksyfosfoniany z pojedynczo (PO_3H^-) lub podwójnie zjonizowaną (PO_3^{2-}) grupą fosfonową. Maksimum efektywności enancjodyskryminacji uzyskano w pD 2 dla kwasów **5b**, **5c**, **5f**, **5g**, **5j**, **5l**, **5m** ($\Delta\delta$ w granicach 0,025 – 0,313 ppm), w pD 10 dla związków **5e**, **5h**, **5i**, **5k** ($\Delta\delta$ w granicach 0,037 – 0,261 ppm), natomiast w pD 7 dla hydroksyfosfonowego analogu leucyny (**5d**) ($\Delta\delta = 0.262$ ppm). Eksperymenty ROESY wykonane w pD 2 i 10 dla kwasów **5g** i **5h**, różniących się położeniem podstawnika w pierścieniu fenylowym, a także wykazujących różne efekty enancjodyskryminacji w zależności od pD środowiska, nie wykazały znaczących różnic. Natomiast funkcjonalizacja pierścienia aromatycznego miała istotny wpływ na geometrię kompleksów supramolekularnych (rys. 6).

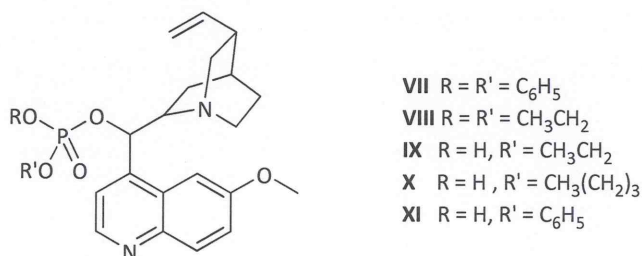


Rysunek 6. Proponowane struktury kompleksów związków **5g** (a) i **5h** (b) z α -CD.

W zoptymalizowanych warunkach metoda ta pozwoliła na oznaczenie czystości enancjomerycznej dwunastu z trzynastu badanych kwasów (w tym siedmiu związków - **5d-h,j,m**, jakościowo). Brak

różnicowania sygnałów na widmie ^{31}P NMR obserwowano jedynie w przypadku pochodnej **5a**, która prawdopodobnie posiada zbyt mały fragment hydrofobowy aby móc utworzyć stabilny kompleks supramolekularny z α -CD. O ile rozgałęzienie łańcucha bocznego miało korzystny wpływ na wynik różnicowania, to nie znaleziono oczywistych powiązań pomiędzy sposobem podstawienia pierścienia aromatycznego a efektem enancjodyskryminacji.

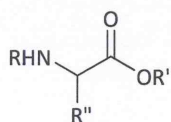
W badaniach dotyczących enancjodyskryminacji aminofosfonianów za pomocą ^{31}P NMR wykazano potencjał alkaloidów chinolinowych do stereoselektywnego tworzenia kompleksów supramolekularnych z pochodnymi kwasów aminoalkilofosfonowych [H6]. Jednakże chinina i jej pochodne były również opisywane w literaturze jako chiralne czynniki solwujące wykorzystywane do analizy enancjomerów innych grup związków organicznych, w szczególności zawierających w strukturze grupy hydroksylowe (hydroksyestry [43], alkohole [43,44], hydroksyfosfoniany [45], hemiacetale i acetale [46]), a także *N*-pochodne aminokwasów [47,48]. W osiągnięciu habilitacyjnym zaproponowano połączenie łatwo dostępnego i jednocześnie unikalnego szkieletu chininy z funkcją fosforanową (rys. 7), w celu otrzymania uniwersalnego chiralnego odczynnika solwującego do zastosowania w spektroskopii NMR [H8, H9].



Rysunek 7. Struktury fosforylowanych pochodnych chinin, jako potencjalnych dyskryminatorów chiralności w spektroskopii NMR.

Funkcjonalność zaprojektowanych dyskryminatorów przebadano dla szeregu związków, takich jak: aminokwasy, kwasy karboksylowe, 1-benzyletyloamina i 1-fenyletanol (rys. 8). W większości przypadków testowano również pochodne 3,5-dinitrobenzylowe tych związków, ponieważ obecność ubogiego w elektrony pierścienia aromatycznego fragmentu 3,5-dinitrobenzylowego pozytywnie wpływało na oddziaływanie z bogatym w elektrony fragmentem chinolinowym cząsteczki chininy. Ponadto sygnały rezonansowe jąder protonów tej grupy znajdowały się poza zakresem charakterystycznym dla selektora, a tym samym stanowiły dobre narzędzie diagnostyczne. Modyfikacja chininy polegała na podstawieniu grupy hydroksylowej resztą estru difenylowego (VII) oraz dietylowego (VIII) kwasu fosforowego [H8]. Do badań użyto też chlorowodorek (VIII×HCl). Wprowadzenie do cząsteczki fragmentu bogatego w atomy tlenu oferowało dodatkowe możliwości oddziaływać z analizowanymi związkami. Potencjał tych cząsteczek jako dyskryminatorów chiralności

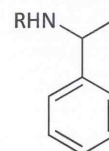
testowano za pomocą spektroskopii ^1H NMR (zoptymalizowane stężenie selektora i analizowanego związku – 50 mM, temperatura pomiaru 283K).



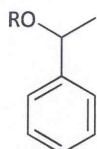
6. R = DNB, R' = OH, R'' = a - c R'' = CH₃ (a), (CH₃)₂CHCH₂ (b), C₆H₅ (c).

7. R = DNB, R' = CH₃, R'' = a - c

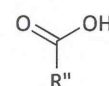
8. R = Cbz, R' = OH, R'' = a,b



9. R = DNB (a), H (b)



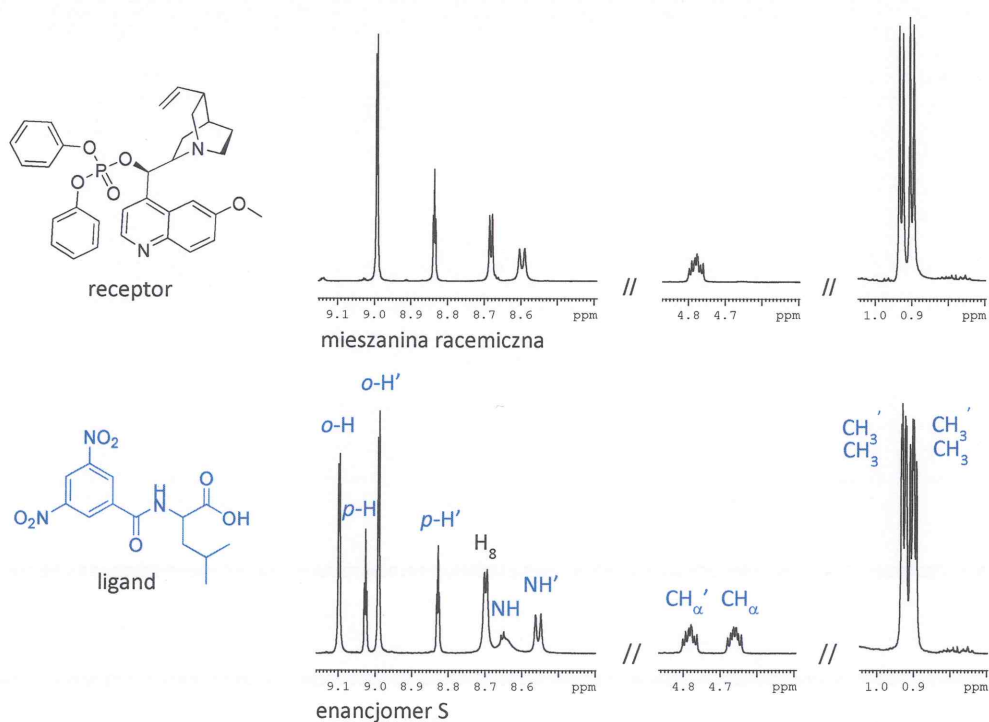
10. R = DNB (a), H (b)



11. R'' = CH₃CH₂CH₃CH (a), C₆H₅CH₂CH (b)

Rysunek 8. Struktury potencjalnych ligandów 6-11 dla fosforylowanych chinin.

Otrzymane wyniki pokazały, że wszystkie fosforylowane chininy (**VII**, **VIII**, **VIII**×HCl) oddziaływały enancjoselektywnie z większością badanych związków, a enancjoselektywności były niejednokrotnie wyższe w porównaniu do użycia nefunkcjonalizowanej chininy (**III**). Na widmach obserwowano różnicowanie sygnałów różnych grup protonów w zależności od struktury związku – protony grupy blokującej, amidowe, H_α, a także protony grup łańcucha bocznego (rys. 9).



Rysunek 9. Fragmenty widma ^1H NMR mieszaniny racemicznej oraz enancjomeru S związku **6b** w obecności fosforylowanej chininy **VII**.

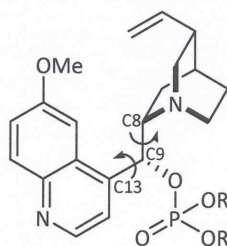
Analizując wpływ struktury ligandów na efektywność kompleksowania, najlepsze efekty enancjodyskryminacji z fosforylowymi pochodnymi (**VII**, **VIII**) wśród wszystkich zbadanych związków obserwowano dla DNB-aminokwasów (**6**). Otrzymane wartości $\Delta\delta$ były w granicach 0,119 – 0,232 ppm dla protonów amidowych (dla niefunkcjonalizowanej chininy $\Delta\delta = 0,081 - 0,124$ ppm) oraz 0,087 – 0,198 ppm dla protonów *para* grupy DNB (dla chininy $\Delta\delta = 0,031 - 0,012$ ppm). Związki te mogą tworzyć trzy typy oddziaływań z receptorem, które wpływają korzystnie na efektywność enancjodyskryminacji: wiązanie jonowe pomiędzy grupą karboksylową a aminą III-rzędową, wiązanie wodorowe pomiędzy protonem amidowym a grupą hydroksylową chininy lub atomem tlenu grupy fosforanowej oraz oddziaływania π -elektronowe pomiędzy ubogim w elektrony układem DNB a bogatym w elektrony pierścieniem chinolinowym. Nieco mniejsze efekty uzyskano dla estrów metylowych DNB-aminokwasów (**7**: $\Delta\delta$ w granicach 0,112 – 0,053 ppm dla protonów amidowych oraz 0,003 – 0,053 ppm dla protonów *para* grupy DNB, chinina nie wykazywała enancjoselektywności – $\Delta\delta \leq 0,007$ ppm) oraz *N*-Cbz pochodnych alaniny (**8a**) i leucyny (**8b**) (**8a**, **8b**: odpowiednio $\Delta\delta = 0,044$ ppm oraz 0,044 ppm dla protonu α). W pierwszym przypadku było to wynikiem utraty możliwości tworzenia oddziaływania jonowego, natomiast w drugim, spowodowane było osłabieniem interakcji π -elektronowych wynikających z zamiany pierścienia dinitrofenylowego *N*-3,5-dinitrobenzoilu na fenylowy grupy *N*-benzyloksykarbonylowej. Pozostałe związki (**9-11**) wykazywały najmniejsze efekty enancjoróżnicowania ($\Delta\delta \leq 0,010$ ppm). Było to prawdopodobnie wynikiem ograniczonej liczby oddziaływań CSA-ligand. Natomiast w porównaniu do selektorów **VII**, **VIII** chinina wykazała lepsze powinowactwo w stosunku do kwasów karboksylowych **11** ($\Delta\delta$ około 0,032 ppm dla protonów łańcucha bocznego). Podsumowując, fosforylacja chininy zwiększała jej skuteczność działania jako chiralnego czynnika solwatującego, przede wszystkim w odniesieniu do aminokwasów i ich pochodnych. Zgodnie z oczekiwaniami, dla chlorowodoru **VIII**×HCl zaobserwowano spadek skuteczności enancjoróżnicowania w porównaniu z nieprotonowanymi pochodnymi. Było to wynikiem utraty możliwości tworzenia pary jonowej pomiędzy aminą III-rzędową, a kwasem karboksylowym.

Wykorzystując obecność atomu fosforu w badanych dyskryminatorach możliwe było obserwowanie enancjodyskryminacji z wykorzystaniem widm ^{31}P NMR. Efekt ten uwidaczniał się jedynie w niskich temperaturach (180K). Wtedy spełnione były warunki wolnej wymiany w skali czasowej NMR, a na widmach otrzymano rezonanse jąder ^{31}P NMR receptorów w formie wolnej i w formach skompleksowanych z ligandem. Biorąc pod uwagę aplikacyjność metody w kontekście standardowej analizy składu enancjomerycznego, wykazała ona zbyt wiele ograniczeń, takich jak: niska temperatura pomiaru (200 K), małe stężenia, skomplikowana analiza widm, na których dodatkowo uwidaczniały się efekty konformacyjne.

Druga grupa fosforylowanych receptorów to etylo-, *n*-butylo- oraz fenyłowodorofosforany chininy (IX-XI) [H9]. Obecność w strukturze czwartorzędowego kationu amoniowego oraz anionu fosforanowego oferuje nowe możliwości specyficznych oddziaływań z ligandami. Analiza widm ^1H NMR wykazała, że fosforylowana chinina posiadająca podstawnik fenyłowy (XI) charakteryzowała się największą enancjoselektywnością. Podobnie jak w przypadku receptorów VII i VIII, najlepsze efekty uzyskano w przypadku pochodnych 3,5-dinitrobenzoylowych (6, 7, 9a: $\Delta\delta$ w granicach 0,036 – 0,489 ppm dla protonów amidowych). Jednakże, o ile triestry fosforanowe (VII, VIII) preferowały kompleksowanie kwasów karboksylowych (6), to diester (XI) wykazał się szczególną efektywnością w enancjodyskryminacji estrów (7: $\Delta\delta$ w granicach 0,115 – 0,489 ppm) oraz DNB pochodnej amidu 1-benzyloetyloaminy (9a: $\Delta\delta = 0,036$ ppm). Wysoka selektywność nowych receptorów wynikała raczej z udziału reszty fosforanowej w kompleksowaniu z ligandami niż obecności kationu amoniowego. Taki wniosek sugeruje brak oddziaływań badanych związków z chlorowodorkiem VIII×HCl, który posiada sprotonowaną grupę aminową reszty chinuklidynowej. Wyniki badań dotyczące enancjodyskryminacji z udziałem diestrów fosforanowych (IX-XI) zachęciły mnie do poszerzenia grupy potencjalnych ligandów o cykliczne aminy i aminokwasy. Jako związki modelowe wybrano 2-metylopiperydynę, 3-metylopiperydynę, 2-etylopiperydynę oraz 2-metylopiperazynę. W spektroskopii ^1H NMR użyte receptory wykazały umiarkowaną selektywność ($\Delta\delta \leq 0,018$ ppm dla protonów grupy metylowej). Znaczące efekty enancjodyskryminacji obserwowano jedynie w przypadku 3-metylopiperydyny dla wszystkich trzech receptorów ($\Delta\delta$ w granicach 0,011 – 0,036 ppm). Testowane pochodne chininy występują w roztworze w postaci jonów obojnaczych. Mogą więc tworzyć kompleksy z aminokwasami, poprzez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy chinuklidynowym kationem amoniowym chininy a grupą karboksylową aminokwasu oraz pomiędzy anionem fosforanowym receptora i grupą amoniową liganda. Ponieważ badania ^1H NMR wykazały znaczne nakładanie się sygnałów na widmach, do analizy chiralnej zastosowano spektroskopię ^{13}C NMR. Metodologia opracowana z użyciem fenyłowodorofosforanu chininy (XI) pozwoliła na jakościowe i ilościowe oznaczanie enancjomerów tryptofanu, fenyloalaniny, metioniny, treoniny oraz chlorowodorku histydyny ($\Delta\delta$ w granicach 0,046 – 0,146 ppm dla izotopu ^{31}C grupy karboksylowej).

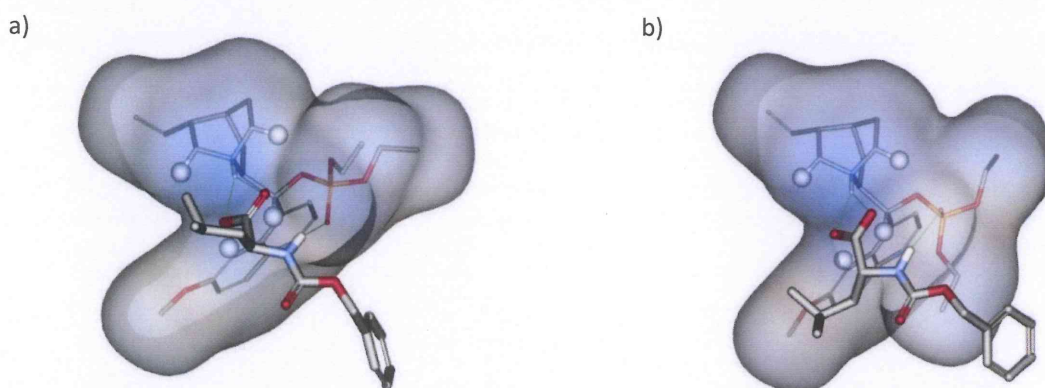
Konformacja chiralnego odczynnika solwatującego ma ogromne znaczenie dla jego właściwości enancjodyskryminacyjnych. Szczegółową analizę konformacyjną fosforylowanych chinin w postaci wolnej, protonowanej i skompleksowanej z wybranymi ligandami przeprowadzono z wykorzystaniem technik NMR, modelowania molekularnego i rentgenografii strukturalnej. Na konformację chininy i jej pochodnych największy wpływ ma ułożenie atomów węgla C8, C9 i C13 względem siebie (rys. 10). Rotacja wokół wiązań C8-C9 i C9-C13 wpływa na przestrzenne umiejscowienie dwóch usztywnionych fragmentów cząsteczek, czyli zasady chinuklidynowej i chinolinowej [47,49]. Alkaloidy chinolinowe

mogą przyjmować cztery różne konformacje, dwie otwarte (otwarta 3, otwarta 4) i dwie zamknięte (zamknięta 1, zamknięta 2).



Rysunek 10. Możliwości rotacji wpływające na zmianę konformacji cząsteczki alkaloidu.

W formie otwartej chinuklidynowy atom azotu jest oddalony/odchylony od pierścienia chinolinowego, podczas gdy w formie zamkniętej jest on skierowany w stronę pierścienia chinoliny. Szczegółowa analiza widm (^1H NMR, ^{31}P NMR, 1D ROE, 2D ROESY) wykazała, że difenylowe i dietylowe analogi fosforylowanej chininy (związki **VII**, **VIII**) przyjmowały w roztworze dwie konformacje zamknięte (1 i 2), przy czym konformacja zamknięta 2 była dominująca. Stosunek molowy „zamrożonych” konformacji wyznaczony w warunkach wolnej wymiany w skali czasowej NMR ($T = 200\text{ K}$) wynosił 68:32 dla estru fenylowego, natomiast 73:27 dla analogu etylowego. W przypadku obu pochodnych **VII** i **VIII** na widmach 1D i 2D ROESY nie zaobserwowano żadnych oddziaływań pomiędzy protonami grup estrowych (odpowiednio etylowych i fenylowych) a protonami chinolinowymi czy chinuklidynowymi szkieletu chininy. Wynika stąd, że fragment fosforoorganiczny znajdował się na zewnątrz rdzenia alkaloidu. Natomiast pochodne chininy zawierające w cząsteczce sprotonowaną grupę aminową **VIII**·HCl, oraz **IX-XI** wykazywały jednorodność konformacyjną charakterystyczną dla układu otwartego 3. Z doniesień literaturowych wynika, że konformacja ta jest preferowana przez chininę, a dodatkowo uważana jest za odpowiedzialną za jej właściwości enancjodyskryminacyjne [50,51]. W tym wypadku ułożenie chinuklidynowego atomu jest optymalne dla efektywnego oddziaływania z ligandami. Postanowiono zatem przyjrzeć się bliżej procesowi kompleksowania z udziałem pochodnej **VIII**, która preferowała konformację zamkniętą 3 i 4. Na przykładzie analizy kompleksowania Cbz-leucyny (**8b**) okazało się, że pod wpływem oddziaływania z ligandem analizowana pochodna chininy przyjmowała pożądaną konformację otwartą 3. Na podstawie dodatkowych eksperymentów NMR i modelowania molekularnego zaproponowano struktury kompleksów supramolekularnych poszczególnych enancjomerów tego związku z badanym dyskryminatorem (rys. 11). Wykazano, że najważniejszymi siłami stabilizującymi powstające kompleksy są: wiązanie jonowe między grupą amoniową selektora a anionem karboksylowym liganda, oraz wiązanie wodorowe między atomem tlenu grupy fosforanowej **VIII** i NH związku **8b**. Porównując wiązanie obu enancjomerów, największa różnica dotyczyła otoczenia chemicznego protonu H_α ligandów.



Rysunek 11. Modele kompleksów supramolekularnych VIII-(S)-8b (a) i VIII-(R)-8b (b). Kolory na powierzchni molekularnej receptora odpowiadają faktycznym wadunkom. Zielonymi ciągłymi liniami oznaczono wiązania wodorowe. Protony wykazujące duże zmiany przesunięć chemicznych podczas procesu kompleksowania oznaczono jako białe sfery.

Badania nad strukturą fosforylowanych chinin uzupełniono rentgenografią strukturalną. Struktury w ciele stałym częściowo odpowiadały konformacjom w roztworze. Największe różnice otrzymano dla estrów difenylowego (VII) i dietylowego (VIII), dla których w roztworze wykazano obecność dwóch konformacji zamkniętych. Przestrzenne ułożenie pochodnej VII w sieci krystalicznej było częściowo zgodne z danymi NMR, ponieważ w kryształce konformacja zamknięta 2 była jednorodna. Natomiast analiza rentgenowska estru VIII wykazała, że w kryształce nie obserwowano form zamkniętych, a związek ten przyjmował konformację otwartą 3. Konformacja otwarta 3 związku VIII×HCl oraz pochodnej *n*-butylowej (X) w monokryształach była zgodna z konformacją w roztworze oznaczoną za pomocą technik NMR.

Podsumowanie wyników i ich potencjalne zastosowania

1. Opracowano skuteczną metodologię do oznaczania składu enancjomerycznego szeregu kwasów α -*N*-benzyloksykarbonyloaminoalkilofosfinowych oraz monoestrów etylowych i fenylowych kwasów Cbz-aminoalkilofosfonowych z użyciem różnych cyklodekstryn jako chiralnych dyskryminatorów za pomocą dwóch alternatywnych technik: elektroforezy kapilarnej oraz spektroskopii ^{31}P NMR.
2. Zbadano wpływ pD roztworu na enancjodyskryminację aminofosfonianów. Udowodniono, że oddziaływanie z cyklodekstryną może różnicować pK_a grup fosfonowych poszczególnych enancjomerów, co dodatkowo zwiększa efekt enancjodyskryminacji obserwowany na widmie ^{31}P NMR dla $\text{pD} \approx \text{pK}_a$.
3. Wykazano możliwość użycia chininy, chinidyny i ich karbamoilowych pochodnych do enancjoróżnicowania kwasów α -*N*-benzyloksykarbonyloaminoalkilofosfonowych i ich *H*-fosfinowych analogów. Przeprowadzono również studia porównawcze dyskryminatorów

chiralności, które były wcześniej stosowane do analizy enancjomerów *N*-Cbz aminofosfonianów.

4. Udało się opracować prostą, szybką i powtarzalną metodę oznaczania składu enancjomerycznego szeregu różnie podstawionych kwasów hydroksyfosfonowych za pomocą ^{31}P NMR z użyciem cyklodekstryn.
5. Zaprojektowano i otrzymano nowe dyskryminatory chiralności do zastosowań w spektroskopii ^1H NMR, ale także ^{31}P i ^{13}C NMR. Były to *O*-fosforylowane pochodne chininy. Wykazano ich potencjał do enancjodyskryminacji różnych grup związków organicznych, w szczególności aminokwasów i ich pochodnych. Przeprowadzono szczegółową analizę konformacyjną fosforylowanych chinin w postaci wolnej, protonowanej i skompleksowanej z wybranymi ligandami z wykorzystaniem technik NMR, modelowania molekularnego i rentgenografii strukturalnej.

We wszystkich przypadkach wyżej wymienionych badań analizowano sposób oddziaływania liganda z chiralnym dyskryminatorem (cyklodekstryną lub chininą).

6. W pracy przeglądowej, składającej się z dwóch części, wykazano potencjał związków fosforoorganicznych do tworzenia kompleksów supramolekularnych. W pracach tych dokonano szczegółowego przeglądu literaturowego zarówno fosforoorganicznych ligandów jak i receptorów.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych oraz dalszych planów badawczych

Tematyka badawcza stanowiąca podstawę dorobku habilitacyjnego jest kontynuacją badań rozpoczętych podczas realizacji pracy magisterskiej, a potem kontynuowanych podczas doktoratu i stanowi zamknięty etap. Kilka lat temu zmieniłam swoje zainteresowania naukowe, które w najbliższych latach zamierzam rozwijać w nowym kierunku. Dotyczy on badania konformacji usztywnionych foldamerów peptydowych zawierających w strukturze resztę kwasu *cis*-2-aminocyklopentanokarboksylowego w kombinacji z naturalnymi α aminokwasami. Jest to tematyka realizowana we współpracy z dr hab. Łukaszem Berlickim, prof. Politechniki Wrocławskiej. Tego typu foldamery zdolne są do przyjmowania zdefiniowanych struktur trzeciorzędowych, między innymi takich jak różnego typu helisy czy zgięcia. W ramach przeprowadzonych badań udowodniliśmy nietypowe właściwości peptydów o schemacie sekwencji $\alpha\alpha\beta$, w której każda sąsiadująca reszta aminokwasowa ma przeciwną konfigurację [52]. Po pierwsze, peptydy te tworzą wcześniej nieopisany typ helisy — 16/17/15/18/14/17-helisę. Po drugie, zmiana długości sekwencji lub przesuwanie schematu sekwencji powoduje zmianę kierunku skrętu helisy, co jest efektem do tej pory nieobserwowanym dla peptydów zawierających α -aminokwasy. Inny wątek badań dotyczył układu

helisa-pętla-helisa, gdzie fragmenty helikalne skonstruowane w oparciu o sekwencję $\alpha\alpha\beta\beta$ tworzącej wysoce stabilne 9/12/9/10-helisy były połączone mostkami oligoglicynowymi [53]. Wykazaliśmy, że odpowiednie zaprojektowanie układu oddziałujących par lizyna-kwas glutaminowy umożliwia wzajemny kontakt obu helis, co może powodować znaczące zwiększenie stabilności konformacyjnej układu. Te zainteresowania skutkowały również napisaniem pracy przeglądowej, w której zostały opisane różnorodne sposoby modulowania preferencji konformacyjnych (skrętu helisy) chiralnych i achiralnych foldamerów peptydowych [54].

Kolejnym aspektem badań usztywnionych peptydów jest poszukiwanie inhibitorów oddziaływań białko-białko. Ze względu na rozbudowaną strukturę i dobrze zdefiniowaną konformację, ta klasa związków jest bardzo cennym źródłem efektywnych inhibitorów. Zsyntezowane przez mnie peptydy usztywnione hamują oddziaływanie kompleksu PD-1/PD-L1 [55]. PD-1 jest receptorem programowanej śmierci komórki (cząsteczka onkogenna) ulegającym ekspresji na aktywowanych limfocytach T. Jego związanie z ligandem PD-L1 hamuje aktywację układu odpornościowego. Blokada immunologicznych punktów kontrolnych jest jedną ze strategii przeciwnowotworowych. Scharakteryzowano również strukturę przestrzenną ich kompleksów z celem molekularnym (we współpracy z prof. Tadeuszem Holakiem, Uniwersytet Jagielloński).

Brałam także udział w projektach z zakresu chemii medycznej, gdzie wykonywałam i interpretowałam wyniki analiz NMR, MS i HPLC substancji biologicznie czynnych [56,57].

Literatura

- [1]. Hudson, H. R.; Wardle, N. J.; Bligh, S. W.; Greiner, I.; Grün, A.; Keglevich, G. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 313.
- [2]. de Clercq, E. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 727.
- [3]. Demkowicz, S.; Rachoń, J.; Daśko, M.; Kozak, W. *RCS Adv.* **2016**, *6*, 7101.
- [4]. Singh, B. K.; Walker, A. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 428.
- [5]. Marklund, A.; Andersson, B.; Haglund, P. *Chemosphere* **2003**, *53*, 1137.
- [6]. Marrs, T. C.; Maynard R. L.; Sidell, F. R. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*, John Wiley & Sons Ltd, Chinchester, 2nd ed., **2007**
- [7]. Kanis, J. A.; Burlet, N.; Cooper, C.; Delmas, P. D.; Reginster, J. Y.; Borgstrom F.; Rizzoli, R. *Osteoporosis Int.* **2008**, *19*, 399.
- [8]. Cholkar, K.; Trinh, H. M.; Pal, D.; Mitra, A. K. *Expert Opin Drug Discov.* **2015**, *10*, 293.
- [9]. Hudson, H. R.; Keglevich, G. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* **2008**, *183*, 2256.
- [10]. Boubakar, B. B.; Saux, M.-C. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *764*, 349.
- [11]. Morifusa, E. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *1*, 1.
- [12]. Dzygiel, P.; Rudzińska, E.; Wieczorek, P.; Kafarski, P. *J. Chromatogr. A* **2000**, *895*, 301.
- [13]. Rudzińska, E.; Dzygiel, P.; Wieczorek, P.; Kafarski, P. *J. Chromatogr. A* **2002**, *979*, 115.
- [14]. Rudzińska, E.; Wieczorek, P.; Kafarski, P. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2693.
- [15]. Rudzińska, E. *Rozprawa doktorska „Oznaczanie czystości optycznej aminofosfonianów”*, Wrocław 2004.
- [16]. Berlicki, Ł.; Rudzińska, E.; Kafarski, P. *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, *14*, 1535.
- [17]. Berlicki, Ł.; Rudzińska, E.; Mucha, A.; Kafarski, P. *Tetrahedron-Asymmetry* **2004**, *15*, 1597.
- [18]. Yoon, T. P.; Jacobsen, E. N. *Science* **2003**, *299*, 1691.

- [19]. Piette, V.; Lämmerhofer, M.; Lindner, W.; Crommen, J. *Chirality* **1999**, *11*, 622.
- [20]. Lämmerhofer, M.; Lindner, W. *J. Chromatogr. A* **1996**, *33*, 741.
- [21]. Lämmerhofer, M. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 814.
- [22]. Uccello Barretta, G.; Balzano, F.; Salvadori, P. *Chirality* **2005**, *17*, S243.
- [23]. Kafarski, P.; Lejczak, B.; (V.P. Kukhar, H.R. Hudson Ed), *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids—Chemistry and Biological Activity*, Wiley, Chichester, **2000**, str. 173.
- [24]. Hirschmann, R.; Yager, K.M.; Taylor, C.M.; Witherington, J.; Sprengeler, P.A.; Phillips, B.W.; Moore, W.; Smith, A.B. III *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8177.
- [25]. Małachowski, W.P.; Coward, J.K. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7616.
- [26]. Małachowski, W.P.; Coward, J.K. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7625.
- [27]. Mucha, A.; Kafarski, P.; Plenat, F.; Cristau H.-J. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 12743.
- [28]. Yiotakis, A.; Georgiadis, D.; Matziari, M.; Makaritis, A.; Dive, V. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1135.
- [29]. Kafarski, P.; Lejczak, B.; (V.P. Kukhar, H.R. Hudson Ed), *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids—Chemistry and Biological Activity*, Wiley, Chichester, **2000**, str. 407.
- [30]. Collinsova, M.; Jiřáček, J. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 629.
- [31]. Dive, V.; Lucet-Levannier, K.; Georgiadis, D.; Cotton, J.; Vassiliou, S.; Cuniasse, P.; Yiotakis, A. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 455.
- [32]. Głowacki, Z.; Hoffmann, M.; Rachoń, J. *Phosphorus Sulfur Silicon* **1995**, *104*, 21.
- [33]. Hirschmann, R.; Yager, K. M.; Taylor, C. M.; Witherington, J.; Sprengeler, P. A.; Phillips, B. W.; Moore, W.; Smith, A. B. III. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8177.
- [34]. Głowacki, Z.; Hoffmann, M.; Rachoń, J. *Phosphorus Sulfur Silicon* **1995**, *104*, 21.
- [35]. Gasparrini, F.; Misiti, D.; Villani, C. *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 35.
- [36]. Lämmerhofer, M.; Hebenstreit, D.; Gavioli, E.; Lindner, W.; Mucha, A.; Kafarski, P.; Wieczorek, P. *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, *14*, 2557.
- [37]. Pompliano, D. L.; Rands, E.; Schaber, M. D.; Mosser, S. D.; Anthony, N. J.; Gibbs, J. B. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3800.
- [38]. Sikorski, J. A.; Miller, M. J.; Braccolino, D. S.; Cleary, D. G.; Corey, S. D.; Font, J. L.; Gruys K. J.; Han, C. Y.; Lin, K. C.; Pansegrau, P. D.; Ream, J. E.; Schnur, D.; Shah, A.; Walker, M. C. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, *76*, 115.
- [39]. Burke, T. R.; Li, Z. H.; Bolen, J. B.; Marquez, V. E. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1577.
- [40]. Stowasser, B.; Budt, K. H.; Jian-Qi, L.; Peyman, A.; Ruppert, D. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6625.
- [41]. Kolodiazhnyi, O. I. *Tetrahedron-Asymmetry* **2005**, *16*, 3295.
- [42]. Głowacki, Z.; Hoffman, M.; Rachoń, J. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, *82*, 39.
- [43]. Abid, M.; Török, B. *Tetrahedron-Asymmetry* **2005**, *16*, 1547.
- [44]. Van Oeveren, A.; Menge, W.; Feringa, B. L. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6427.
- [45]. Mały, A.; Lejczak, B.; Kafarski, P. *Tetrahedron-Asymmetry* **2003**, *14*, 1019.
- [46]. Klein, J.; Hartenstein, H.; Sicker, D. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 727.
- [47]. Uccello-Barretta, G.; Vanni, L.; Balzano, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *27*, 860.
- [48]. Uccello-Barretta, G.; Vanni, L.; Berni, M.G.; Balzano, F. *Chirality* **2011**, *23*, 417.
- [49]. Bürgi, T.; Baiker, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12920.
- [50]. Uccello-Barretta, G.; Balzano, F.; Quintavalli, C.; Salvadori, P. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3596.
- [51]. Reeder, J.; Castro, P. P.; Knobler, C. B.; Martinborough, E.; Owens, L.; Diederich, F. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3151.
- [52]. Szefczyk, M.; Węglarz-Tomczak, E.; Fortuna, P.; Krzysztoń, A.; Rudzińska-Szostak, E.; Berlicki, Ł. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2087.
- [53]. Drewniak, M.; Węglarz-Tomczak, E.; Ożga, K.; Rudzińska-Szostak, E.; Macegoniuk, K.; Tomczak, J. M.; Bejger, M.; Rypniewski, W.; Berlicki, Ł. *Bioorg. Chem.* **2018**, *81*, 356.
- [54]. Rudzińska-Szostak, E.; Berlicki, Ł. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 14980.
- [55]. Magiera-Mularz, K.; Skalniak, L.; Zak, K. M.; Musielak, B.; Rudzińska-Szostak, E.; Berlicki, Ł.; Kocik, J.; Grudnik, P.; Sala, D. Zarganes-Tzitzikas, T.; Shaabani, S.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 13732 - 13735.
- [56]. Katarzyńska, J.; Mazur, A.; Rudzińska, E.; Artym, J.; Zimecki, M.; Jankowski, S.; Zabrocki, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4608.

- [57]. Macegoniuk, K.; Grela, E.; Palus, J.; Rudzińska-Szostak, E.; Grabowiecka, A.; Biernat, M.; Berlicki, Ł.
J. Med. Chem. **2016**, *59*, 8125.

16.04.2019

Ewa Rudzińska-Szostak