

**Wybrane zagadnienia  
z metod poszukiwania  
i otrzymywania  
środków leczniczych**



# **Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych**

**pod redakcją Katarzyny Kieć-Kononowicz**

**WYDAWNICTWO UNIwersYTETU Jagiellońskiego**

© Copyright by Katarzyna Kieć-Kononowicz  
& Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Wydanie II poprawione, Kraków 2006  
All rights reserved

RECENZENT

*Prof. dr hab. Marian Woźniak*

PROJEKT OKŁADKI

*Andrzej Harasz*

OPRACOWANIE REDAKCYJNE

*Władysława Bulsza*

SKŁAD KOMPUTEROWY, GRAFIKA I ŁAMANIE

*Tadeusz Kononowicz*

Niniejszy utwór ani żaden jego fragment nie może być reprodukowany, przetwarzany i rozpowszechniany w jakikolwiek sposób za pomocą urządzeń elektronicznych, mechanicznych, kopiujących, nagrywających i innych oraz nie może być przechowywany w żadnym systemie informatycznym bez uprzedniej pisemnej zgody Wydawcy.

Książka dofinansowana ze środków Collegium Medicum UJ

ISBN 978-83-233-2103-3

WYDAWNICTWO  
UNIWERSYTETU  
JAGIELLOŃSKIEGO  
[www.wuj.pl](http://www.wuj.pl)

Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Redakcja: ul. Michałowskiego 9/2, 31-126 Kraków  
tel. 12-631-18-81, 12-631-18-82, fax 12-631-18-83  
Dystrybucja: tel. 12-631-01-97, tel./fax 12-631-01-98  
tel. kom. 506-006-674, e-mail: [sprzedaz@wuj.pl](mailto:sprzedaz@wuj.pl)  
Konto: PEKAO SA, nr 80 1240 4722 1111 0000 4856 3325

# SPIS TREŚCI

<b>PRZEDMOWA</b> .....	11
<b>A. METODY POSZUKIWANIA LEKÓW</b> .....	13
I. Projektowanie związków biologicznie czynnych – <i>E. Pękala</i> .....	15
I.1. Poszukiwanie substancji wiodącej i optymalizacja jej struktury....	15
I.2. Teoria analogii strukturalnej.....	18
I.3. Modelowanie zależności między chemiczną budową cząsteczek a ich aktywnością biologiczną.....	19
I.4. Analiza konformacyjna.....	20
II. Chemia kombinatoryczna – <i>E. Pękala</i> .....	22
II.1. Synteza równoległa.....	22
II.2. Metoda <i>split-and-mix</i> .....	24
II.3. Biblioteki leków.....	24
<b>B. METODY OGÓLNE</b> .....	27
I. Jednostkowe operacje fizyczne – <i>A. Drabczyńska</i> .....	29
I.1. Ogrzewanie.....	30
I.2. Chłodzenie.....	31
I.3. Mieszanie.....	33
I.4. Oddzielanie ciał stałych od cieczy.....	34
I.4.1. Filtracja.....	34
I.4.2. Wirowanie.....	37
I.5. Destylacja.....	38
I.6. Krystalizacja.....	40
II. Jednostkowe procesy chemiczne – <i>B. Sancewicz, J. Handzlik, E. Szymańska</i> .....	42
II.1. Acylacja.....	43
II.1.1. Wiadomości ogólne.....	43
II.1.2. C-acylowanie.....	44
II.1.3. N-acylowanie.....	45
II.1.4. Acylowanie związków heterocyklicznych.....	45
II.1.5. Szczególne przypadki acylacji.....	46

II.1.6.	Przykłady z przemysłu farmaceutycznego.....	46
II.2.	Estryfikacja.....	48
II.2.1.	Wiadomości ogólne.....	48
II.2.2.	Estryfikacja bezpośrednia – przykład O-acylowania.....	49
II.2.3.	Estryfikacja alkoholi bezwodnikami, chlorkami kwasowymi lub ketenem.....	50
II.2.4.	Transestryfikacja (wymiana estrowa przebiegająca jako alkoholiza lub acydoliza).....	50
II.2.5.	Inne przemysłowe metody syntezy estrów.....	51
II.2.6.	Przykłady z przemysłu farmaceutycznego.....	52
II.3.	Nitrowanie.....	53
II.3.1.	Wiadomości ogólne.....	53
II.3.2.	Nitrowanie związków aromatycznych.....	53
II.3.3.	Nitrowanie fenoli i amin aromatycznych.....	55
II.3.4.	Nitrowanie alkanów.....	56
II.3.5.	Nitrowanie alkoholi wielowodorotlenowych (O-nitrowanie).....	57
II.3.6.	Przykłady z przemysłu farmaceutycznego.....	57
II.4.	Sulfonowanie i siarczanowanie.....	58
II.4.1.	Wiadomości ogólne.....	58
II.4.2.	Sulfonowanie związków aromatycznych.....	59
II.4.3.	Sulfonowanie amin.....	63
II.4.4.	Siarczanowanie.....	63
II.4.5.	Przykłady sulfonowania w przemyśle farmaceutycznym.....	64
II.5.	Hydroliza.....	65
II.5.1.	Wiadomości ogólne.....	65
II.5.2.	Hydroliza poszczególnych grup związków organicznych.....	66
II.5.3.	Przykłady zastosowania hydrolizy w przemyśle farmaceutycznym.....	68
II.6.	Redukcja.....	68
II.6.1.	Wiadomości ogólne.....	68
II.6.2.	Redukcja z udziałem wodoru atomowego.....	69
II.6.3.	Redukcja przebiegająca z udziałem jonu wodorkowego.....	70
II.6.4.	Redukcja przebiegająca z udziałem protonu.....	71
II.6.5.	Wodoroliza.....	71
II.6.6.	Redukcja elektrolityczna.....	71
II.6.7.	Inne metody redukcji.....	71
II.6.8.	Przykłady przemysłowego zastosowania redukcji.....	72
II.7.	Alkilowanie.....	73
II.7.1.	Wiadomości ogólne.....	73
II.7.2.	C-alkilowanie (reakcja Friedela-Craftsa).....	74
II.7.3.	Alkilowanie redukcyjne.....	75
II.7.4.	Przykłady z przemysłu farmaceutycznego.....	76
II.8.	Chlorowcowanie.....	77
II.8.1.	Wiadomości ogólne.....	77
II.8.2.	Chlorowcowanie poszczególnych grup związków organicznych..	79
II.8.3.	Zastosowanie chlorowcowania w przemyśle farmaceutycznym....	80
II.9.	Utlenianie.....	81
II.9.1.	Wiadomości ogólne.....	81
II.9.2.	Przykłady zastosowania procesu utleniania w przemyśle farmaceutycznym.....	85

III.	Kondensacje proste i cyklizujące – <i>A. Drabczyńska</i> .....	87
III.1.	Kondensacje proste.....	87
III.1.1.	Kondensacje połączone z odwodornieniem.....	87
III.1.2.	Kondensacje połączone z odwodnieniem.....	87
III.1.2.1.	Otrzymywanie eterów i alkenów z alkoholi.....	87
III.1.2.2.	Reakcje kondensacji aldehydów i ketonów ze związkami zawierającymi grupy aminowe.....	88
III.1.2.3.	Kondensacja Knoevenagela.....	89
III.1.2.4.	Kondensacja Mannicha – reakcja aminometylowania.....	89
III.1.3.	Kondensacja połączona z wydzieleniem cząsteczki alkoholu.....	90
III.1.3.1.	Kondensacja Claisena.....	90
III.1.4.	Kondensacja połączona z wydzieleniem cząsteczki kwasu.....	91
III.1.4.1.	Reakcja Perkina.....	91
III.1.5.	Inne kondensacje.....	92
III.1.5.1.	Kondensacja aldolowa (dimeryzacja aldolowa).....	93
III.1.5.2.	Kondensacja acyloinowa (dimeryzacja acyloinowa).....	93
III.2.	Kondensacje cyklizujące.....	94
III.2.1.	Otrzymywanie prostych układów.....	95
III.2.1.1.	Układ imidazolu.....	95
III.2.1.2.	Układ imidazoliny.....	95
III.2.1.3.	Układ pirydyny (dihydropirydyny).....	96
III.2.1.4.	Układ pirymidyny.....	97
III.2.2.	Układy wielopierścieniowe.....	98
III.2.2.1.	Synteza Skraupa układu chinoliny.....	98
III.2.2.2.	Synteza układu izochinoliny – metoda Bischlera-Napieralskiego.....	99
III.2.2.3.	Synteza układu 4-chinolonu.....	101
III.2.2.4.	Synteza układu pirymido[5,4-d]pirymidyny.....	104
IV.	Izomeria optyczna – <i>M. Więcek</i> .....	107
IV.1.	Definicje.....	107
IV.2.	Różnice farmakokinetyczne.....	110
IV.3.	Różnice farmakodynamiczne.....	112
IV.4.	Otrzymywanie związków optycznie czynnych.....	114
IV.4.1.	Wydzielanie z surowców naturalnych.....	114
IV.4.2.	Rozdział racematu.....	115
IV.4.2.1.	Krystalizacja racematu.....	115
IV.4.2.2.	Rozdział racematu poprzez diastereoizomery.....	116
IV.4.2.3.	Rozdział kinetyczny.....	120
IV.4.2.4.	Kataliza enzymatyczna.....	121
IV.5.	Metody adsorpcyjne – metody chromatograficzne.....	124
IV.5.1.	Chiralne fazy stacjonarne.....	124
IV.5.1.1.	Fazy typu Pirkle'a.....	124
IV.5.1.2.	Fazy typu „ligand exchange” – wymiany ligandu.....	128
IV.5.1.3.	Fazy cyklodekstrynowe.....	129
IV.5.1.4.	Fazy polisacharydowe.....	129
IV.5.1.5.	Fazy modyfikowane eterami koronowymi.....	130
IV.5.1.6.	Fazy białkowe.....	130
IV.5.2.	Chiralne odczynniki różnicujące w fazie ruchomej.....	130
IV.5.3.	Chromatografia cienkowarstwowa.....	130

IV.5.4.	Elektroforeza kapilarna.....	131
IV.6.	Synteza z wykorzystaniem chiralnego syntonu.....	131
IV.7.	Synteza asymetryczna.....	132
IV.7.1.	Synteza asymetryczna z użyciem chiralnego pomocnika.....	133
IV.7.2.	Synteza asymetryczna z użyciem chiralnego katalizatora.....	133
V.	Polimorfizm – <i>H. Marona</i> .....	137
VI.	Procesy biotransformacyjne – <i>E. Szymańska</i> .....	139
VI.1.	Wstęp.....	139
VI.2.	Reakcje hydrolizy.....	144
VI.3.	Reakcje oksyredukcyjne.....	150
VI.3.1.	Reakcje redukcji.....	150
VI.3.2.	Reakcje utleniania.....	154
VI.4.	Inne reakcje.....	158
VI.4.1.	Estry kwasu fosforowego.....	158
VI.4.2.	Formowanie wiązania C–C.....	159
VI.4.3.	Reakcje eliminacji – addycji.....	162
VII.	Drożdże piekarskie jako reagent w syntezie organicznej – <i>E. Szymańska</i> .....	165
VII.1.	Wstęp.....	165
VII.2.	Reakcje redukcji.....	165
VII.2.1.	Redukcja związków zawierających jedną grupę karbonylową.....	165
VII.2.2.	Redukcja $\beta$ -ketoestrów.....	167
VII.2.3.	Redukcja $\alpha$ -podstawionych $\beta$ -ketoestrów.....	168
VII.2.4.	Redukcja 1,3-diketonów.....	169
VII.2.5.	Redukcja 1,2-diketonów i 1,4-diketonów.....	170
VII.2.6.	Redukcja związków z wiązaniem podwójnym.....	171
VII.3.	Formowanie wiązania C–C.....	172
VII.3.1.	Kondensacja acyloinowa.....	172
VII.4.	Hydroliza estrów.....	176
VIII.	Technologia genowa w badaniach i produkcji farmaceutycznej – <i>K. Kieć-Kononowicz, E. Pękala</i> .....	179
VIII.1.	Wprowadzenie.....	179
VIII.2.	Podstawowe metody technologii genowej.....	179
VIII.2.1.	Podstawowe narzędzia klonowania DNA.....	179
VIII.2.1.1.	Enzymy restrykcyjne (restryktazy, endonukleazy restrykcyjne)...	180
VIII.2.1.2.	Wektory.....	182
VIII.2.1.2.1.	Wektory plazmidowe.....	182
VIII.2.1.2.2.	Wektory fagowe, bakteriofagi, wirusy bakteryjne.....	184
VIII.2.1.2.3.	Kosmidy.....	184
VIII.2.1.2.4.	Inne wektory.....	184
VIII.2.1.3.	Łączenie cząsteczek DNA.....	186
VIII.2.2.	Klonowanie cDNA.....	187
VIII.2.2.1.	Metody identyfikacji genów.....	189
VIII.2.3.	Klonowanie z użyciem PCR.....	193
VIII.2.4.	Ekspresja rekombinowanych białek.....	195
VIII.2.4.1.	Transkrypcja, translacja i modyfikacje białek.....	195
VIII.2.4.2.	Ekspresja białek w <i>E. coli</i> .....	196
VIII.2.4.3.	Ekspresja białek w drożdżach.....	196



VIII.2.4.4.	Ekspresja skomplikowanych białek w komórkach ssaków.....	198
VIII.2.4.5.	Ekspresja transgenów w zwierzętach transgenicznych – „żywe bioreaktory”.....	199
VIII.2.4.6.	Ekspresja białek rekombinowanych w komórkach owadów.....	201
VIII.2.4.7.	Transgeniczne rośliny.....	202
VIII.3.	Projektowanie białek.....	203
VIII.3.1.	Białka wariantowe.....	204
VIII.3.2.	Białka chimeryczne.....	205
VIII.4.	Technologia genowa w odkryciach leków niepeptydowych i peptydowych.....	206
VIII.4.1.	Receptory błonowe jako cele w poszukiwaniu leków.....	206
VIII.4.2.	Biblioteki epitopowe.....	207
VIII.5.	Zwierzęta transgeniczne jako modele chorób.....	207
VIII.6.	Terapia genowa.....	211
VIII.7.	Produkty otrzymane z rekombinowanego DNA znajdujące się na rynku i w produkcji.....	212
VIII.8.	Podstawowe pojęcia stosowane w technologii genowej.....	214
<b>C.</b>	<b>PRZYKŁADY OTRZYMYWANIA LEKÓW I GRUP LEKÓW</b>	221
I.	Technologia kwasu acetylosalicylowego – <i>H. Marona</i> .....	223
I.1.	Wybrane zagadnienia.....	223
I.2.	Technologia kwasu salicylowego.....	224
I.3.	Kwas acetylosalicylowy – przegląd i ocena techniczna metod otrzymywania kwasu acetylosalicylowego, odpowiadającego wymogom farmakopealnym.....	228
I.3.1.	Zanieczyszczenia kwasu acetylosalicylowego – przyczyny obniżonej temperatury topnienia.....	228
I.3.2.	Wpływ zawartości kwasu salicylowego na temperaturę topnienia kwasu acetylosalicylowego.....	229
I.3.3.	Przegląd i ocena technicznych metod krystalizacji kwasu acetylosalicylowego – problem polimorfizmu.....	231
II.	Przemysłowe metody syntezy ksantyn – <i>A. Drabczyńska</i> .....	233
II.1.	Synteza diprofiliny.....	233
II.1.1.	Metoda chloropropandiolowa.....	233
II.1.2.	Metoda glicydolowa (glicydowa).....	239
II.1.3.	Metoda epichlorhydrinowa.....	240
II.1.4.	Metoda polska (Wojciechowski i wsp.).....	240
II.2.	Synteza nikotynianu ksantynolu (Sadamin).....	243
II.2.1.	Metoda syntezy nikotynianu ksantynolu według patentu firmy Wülfing.....	243
II.2.2.	Metoda aminolizy 7-β,γ-epoksypropyloteofiliny.....	248
II.2.3.	Metoda syntezy z zastosowaniem 2-aminoetanolu i alkiłowania metodą Eschweilera-Clarke’a.....	248
II.2.4.	Metoda polska – z 1,3-dimetylomocznika i kwasu cyjanooctowego.....	250
III.	Antybiotyki naturalne – <i>E. Pękala</i> .....	252
III.1.	Produkcja antybiotyków naturalnych.....	252
III.1.1.	Selekcja szczepów produkcyjnych.....	252
III.1.2.	Przygotowanie inokulum posiewowego.....	253

III.1.3.	Metody wyodrębniania (izolacji) antybiotyków z brzeźki pofermentacyjnej.....	255
III.2.	Biosynteza naturalnych penicylin.....	256
III.3.	Biosynteza naturalnych tetracyklin.....	258
IV.	Antybiotyki półsyntetyczne – <i>H. Marona</i> .....	260
IV.1.	Antybiotyki $\beta$ -laktamowe.....	260
IV.1.1.	Penicyliny półsyntetyczne.....	262
IV.1.1.1.	Metody otrzymywania kwasu 6-aminopenicylanowego.....	262
IV.1.1.1.1.	Metody biologiczne.....	262
IV.1.1.1.2.	Metody chemiczne.....	263
IV.1.2.	Inne penicyliny półsyntetyczne i metody ich syntezy.....	265
IV.1.2.1.	Przegląd najważniejszych penicylin półsyntetycznych.....	265
IV.1.2.2.	Przykłady syntezy niektórych półsyntetycznych penicylin.....	272
IV.1.3.	Konwersja penicylin do cefalosporyn.....	276
IV.2.	Tetracykliny i antybiotyki tetracyklinopodobne.....	276
IV.2.1.	Półsyntetyczne tetracykliny.....	276
V.	Insulina – <i>E. Pękala</i> .....	280
V.1.	Otrzymywanie insuliny.....	283
V.1.1.	Klasyczna metoda izolacji z trzustek zwierzęcych według Bantinga i Besta.....	283
V.1.2.	Metoda biosyntezy z wykorzystaniem inżynierii genetycznej.....	285
V.1.3.	Semisynteza z insuliny wieprzowej.....	285
V.1.4.	Metoda pełnej syntezy chemicznej.....	285
VI.	Metody otrzymywania steroidów – <i>M. Więcek</i> .....	292
VI.1.	Otrzymywanie steroidów na drodze chemicznej.....	293
VI.2.	Otrzymywanie związków steroidowych ze źródeł naturalnych i na drodze biotransformacji.....	299
VI.2.1.	Reakcje utleniania.....	301
VI.2.2.	Odszczepienie i degradacja łańcucha bocznego.....	302
VI.2.3.	Reakcje redukcji.....	303
	<b>SKOROWIDZ RZECZOWY</b> .....	305

## PRZEDMOWA

Niniejszy podręcznik jest opracowaniem zagadnień omawianych w ramach zajęć z „Technologii środków leczniczych”, prowadzonych ze studentami IV roku Wydziału Farmacji CM UJ. Zamierzeniem Autorów nie jest wyczerpujące przedstawienie całej problematyki tematu, lecz jedynie zwrócenie uwagi Czytelników na różnorodność zagadnień związanych z otrzymywaniem środków leczniczych i produktów pośrednich w ich syntezie, prowadzonej metodami chemicznymi lub biochemicznymi.

Książka obejmuje 3 zasadnicze części. Część A poświęcona jest metodom poszukiwania leków, B – ogólnym sposobom ich otrzymywania, część C – zawiera opis przykładów otrzymywania konkretnych środków leczniczych lub ich grup.

Na wstępie należałoby wyjaśnić termin „środki lecznicze”. Rozumiane są tu one jako substancje chemiczne o **strukturze odpowiadającej lekom**, lecz jeszcze nie będące lekami z tego powodu, że nie nadano im **odpowiedniej postaci leku**.

W części A zarysowano jedynie podstawowe tendencje związane z poszukiwaniem struktur biologicznie aktywnych. Problematyka jest bardzo szeroka, dlatego wybrano te tematy, które pozwalają zorientować się w ogólnych kierunkach poszukiwań nowych leków poprzez racjonalne projektowanie i modelowanie struktur o przewidywanej aktywności oraz na drodze bardziej przypadkowego przeszukiwania ogromnych zbiorów połączeń, jakie umożliwia chemia kombinatoryczna.

Część B omawia ogólne kwestie związane z otrzymywaniem środków leczniczych, związków będących substratami w ich syntezie lub produktami pośrednimi, z zastosowaniem metod chemicznych i biosyntezy. Kolejno przedstawiono jednostkowe operacje fizyczne i chemiczne procesy jednostkowe, prowadzące do otrzymania określonych związków chemicznych. W rozdziałach tych zasygnalizowano trudności związane z syntezą związków chemicznych prowadzoną na dużą skalę – problemy wynikające z konieczności stosowania właściwej aparatury i odpowiedniego prowadzenia procesu technologicznego. Omówienie poszczególnych chemicznych procesów jednostkowych zakończono podaniem kilku przykładów syntez leków wraz z ich zastosowaniem.

Rozdział poświęcony kondensacjom prostym i cyklizującym jest omówieniem niezwykle ważnych przykładów reakcji, prowadzących do otrzymania substratów lub podstawowych układów chemicznych niezbędnych w syntezie środków leczniczych.

Problem izomerii optycznej, zarówno w chemii leków jak i związków biologicznie czynnych, ma ogromne znaczenie. Stąd odrębny rozdział poświęcono metodom otrzymywania związków chiralnych.

Metody biosyntezy omówiono, uwzględniając procesy biotransformacji i przemian zachodzących pod wpływem całych mikroorganizmów, posługując się przykładem drożdży piekarskich. W opracowaniu tego tematu położono szczególny nacisk na specyficzność przemian prowadzonych pod wpływem wyosobnionych enzymów oraz enzymów całych mikroorganizmów.

Bardzo dynamicznie rozwijającą się w ostatnim okresie technologię genową (inżynierię genetyczną) i jej znaczenie w badaniach i produkcji farmaceutycznej omówiono nieco szerzej, ze względu na aktualność tego tematu oraz powszechnie przewidywany, a nawet obserwowany już, wzrost znaczenia tej technologii w farmacji.

Trzecia część podręcznika podaje przykłady zastosowania omówionych poprzednio metod w rozwiązywaniu problemów występujących w produkcji konkretnych leków (technologia kwasu acetylosalicylowego, insulina) lub grup leków (przemysłowe metody syntezy ksantyn, antybiotyki naturalne i syntetyczne, sposoby otrzymywania steroidów).

Aby ułatwić korzystanie z podręcznika, pragniemy zwrócić uwagę na to, że każda z trzech jego zasadniczych części (A, B, C) posiada własną numerację rozdziałów i podrozdziałów, a każdy rozdział zaopatrzony został we własny wykaz literatury przedmiotu, odrębnie numerowany w tekście (z wyjątkiem części A, w której dla obu rozdziałów literatura podana jest łącznie).

Prezentowana książka jest unikalnym opracowaniem traktującym o problemach związanych z poszukiwaniem i syntezą środków leczniczych, uwzględniającym zarówno dawną – obecnie już trudno dostępną – jak i najnowszą literaturę przedmiotu. Autorzy mają świadomość tego, że przedstawienie problematyki jest niepełne, a dobór tematów zapewne dyskusyjny. Stąd prośba do Czytelników o krytyczne uwagi, które pozwoliłyby w przyszłości uniknąć popełnionych błędów i udoskonalić tę formę pomocy dydaktycznej.

Mamy nadzieję, że podręcznik ten, adresowany zasadniczo do studentów farmacji, znajdzie czytelników także wśród osób studiujących inne, spokrewnione z nią kierunki.

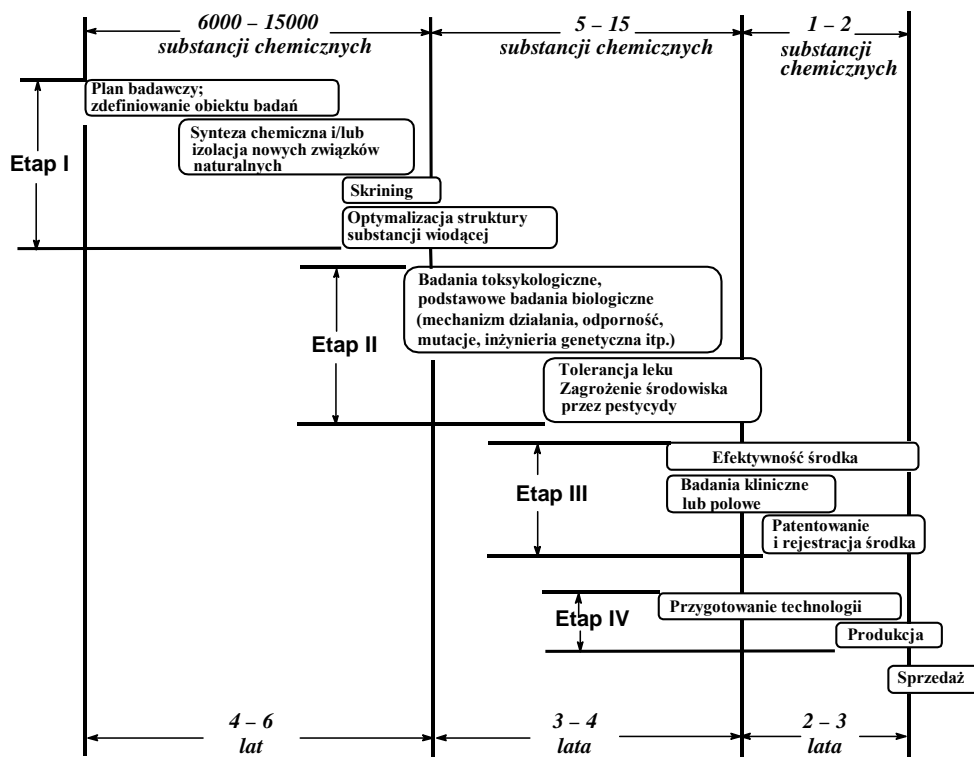
# **CZĘŚĆ A. METODY POSZUKIWANIA LEKÓW**



# I. PROJEKTOWANIE ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH

Poszukiwanie nowych leków i nowych pestycydów jest jednym z najintensywniej rozwijających się obszarów działalności człowieka. Statystyka wykazuje, że wprowadzenie na rynek nowego leku lub pestycydu wymaga uruchomienia programu badawczego, w którym ponad 10 000 substancji chemicznych poddanych zostanie odpowiednim testom biologicznym. Koszt takiego programu wynosi średnio około 150 milionów dolarów. Olbrzymia część nakładów finansowych na te badania koncentruje się jednak w zaledwie kilku krajach – USA, Niemcy, Szwajcaria, Wielka Brytania, Japonia i Francja. W konsekwencji kraje te są największymi producentami i eksporterami leków i pestycydów, a inwestycje na badania zwracają się z nawiązką.

W programie badań można wyróżnić cztery etapy:



Rys. 1. Etapy programu poszukiwań nowego leku lub pestycydu  
[wg P. Kafarski, B. Lejczak: *Chemia bioorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1994]

## I.1. Poszukiwanie substancji wiodącej i optymalizacja jej struktury

Substancja wiodąca to związek chemiczny, otrzymany na drodze syntezy lub też wyizolowany ze źródeł naturalnych, który wykazuje pożądane, użyteczne właściwości biologiczne. Substancję taką znajduje się przez mniej lub bardziej przypadkowe badanie właściwości nowych związków chemicznych, czyli tzw. skrining; bądź też poprzez racjonalne projektowanie substancji o z góry założonych właściwościach biologicznych.

**Skrining** jest procesem, w którym substancje chemiczne, syntetyczne czy też wyizolowane ze źródeł naturalnych poddaje się standardowym badaniom biologicznym. Szanse na sukces w postaci odkrycia nowego środka, zależą tu zarówno od różnorodności strukturalnej badanych połączeń chemicznych, jak i od jakości i prostoty testów biologicznych.

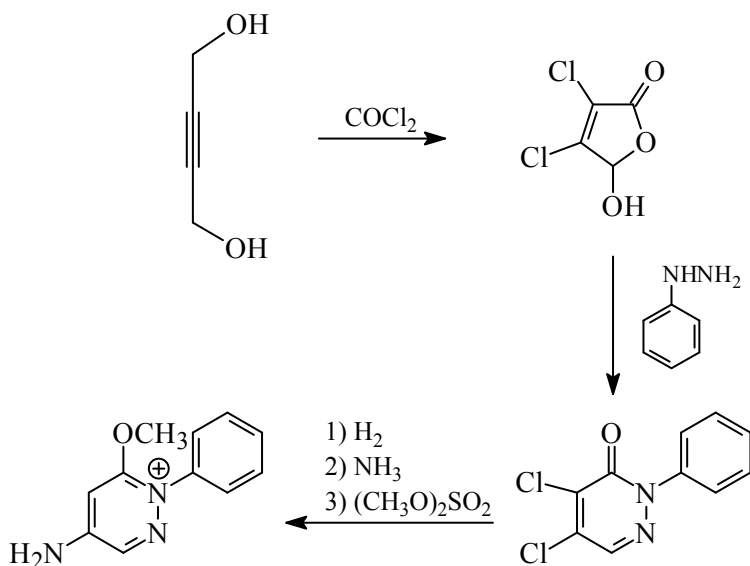
**Racjonalne** poszukiwanie środków biologicznie czynnych polega na takim projektowaniu budowy związku, aby oddziaływał on z odpowiednio wybranym ligandem czy receptorem biologicznym. Wymaga to jak najpełniejszej wiedzy o układzie biologicznym, dla którego projektuje się efektor.

Procesem ściśle powiązanim z poszukiwaniem substancji wiodącej jest optymalizacja jej struktury, tj. poszukiwanie takiego jej analogu strukturalnego, który wykazywałby korzystniejsze właściwości niż substancja wzorcowa (wiodąca). Jest to więc proces polegający na wykorzystaniu wiedzy o tym, jakim zmianom strukturalnym substancji wiodącej odpowiadają korzystne zmiany właściwości biologicznych. Metody optymalizacji bardzo często polegają na matematycznym modelowaniu zależności między strukturą chemiczną substancji a ich aktywnością biologiczną. Celem tych badań jest otrzymanie nowych, lepszych leków lub pestycydów z wykorzystaniem poprzedniej generacji tychże jako substancji wiodących.

Oba typy badań, poszukiwanie substancji wiodących i modyfikacje ich struktury, stanowią wraz ze skriningiem pierwszy etap programu. Badania te mogą być prowadzone równolegle, a wnioski z nich wynikające wpływają na oba kierunki poszukiwań.

### Metoda syntezy w poszukiwaniu substancji wiodących

2-butyno-1,4-diol w reakcji z fosgenem daje użyteczny substrat do syntez wielu połączeń heterocyklicznych. Wykorzystano to w laboratorium firmy BASF, otrzymując nowe serie połączeń liczące po 10–20 związków. Po poddaniu ich skriningowi okazało się, iż jeden z otrzymanych związków wykazuje znaczną aktywność hipertensyjną.



Rys. 2. Przykład syntezy substratu dla wielu nowych połączeń heterocyklicznych



### Związki naturalne jako substancje wiodące

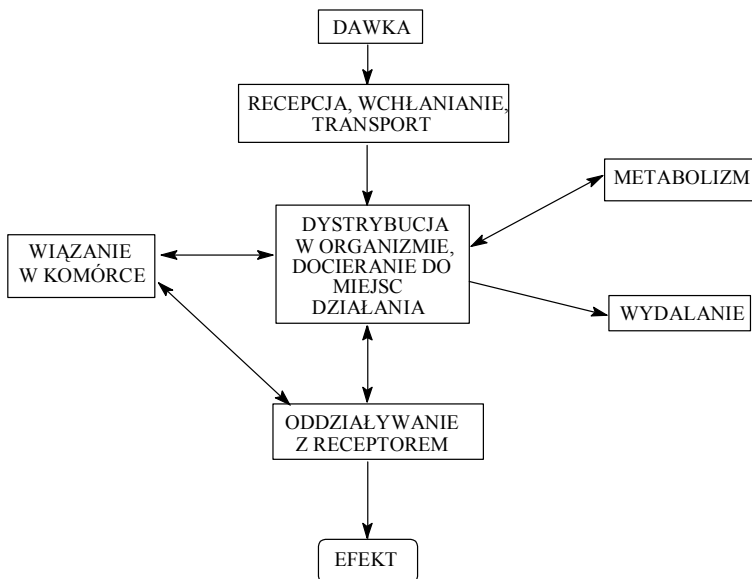
Drugim, obok nowych syntez chemicznych, źródłem substancji wiodących są produkty izolowane ze źródeł naturalnych. W tabeli 1 zebrano reprezentatywne przykłady substancji naturalnych o znaczeniu praktycznym.

Tabela 1

Przykłady leczniczych i pestycydowych substancji naturalnych [wg 1]

Pochodzenie substancji	Związek naturalny	Aktywność
Rośliny	chinina rezerpina kodeina digitalis pyretroidy azadirachtyny	przeciwmalaryczna hipotensyjna przeciwkaszlowa leczy niewydolność serca insektycydowa antyfidanty
Mikroorganizmy	penicylina streptomycyna adriamycyna bialaphos	przeciwbakteryjna przeciwbakteryjna przeciwrakowa herbicydowa
Zwierzęta stałocieplne	steroidy insulina	przeciwzapalne antykonceptyjne leczenie cukrzycy
Organizmy morskie	prostaglandyny (z koralowców)	przeciwzawałowe

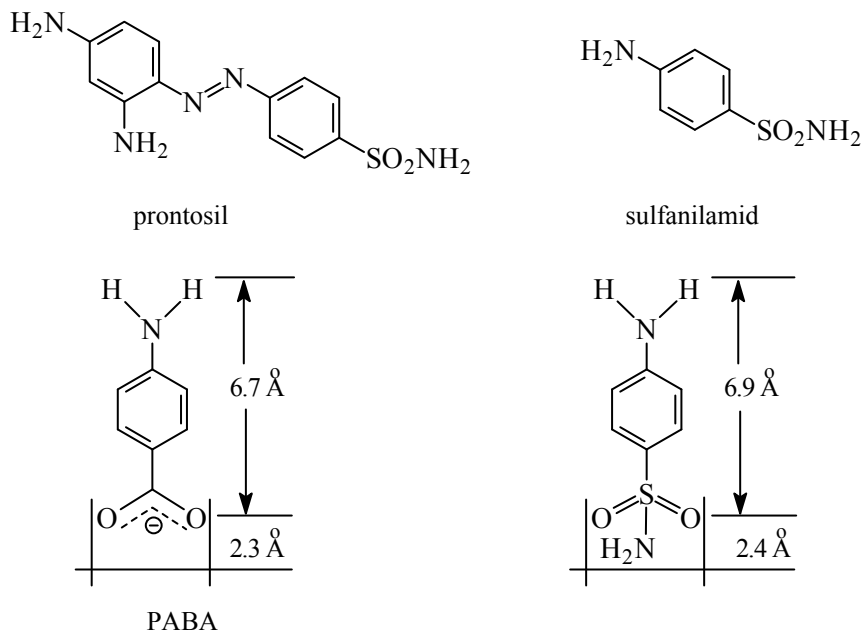
**Racjonalne projektowanie struktur wiodących.** Możliwość dobrego projektowania struktur o założonej aktywności pojawia się dopiero wtedy, gdy działanie biologiczne rozpatruje się na poziomie molekularnym, czyli na poziomie oddziaływania cząsteczek z receptorami białkowymi, a zwłaszcza z enzymami.

Rys. 3. Czynniki wpływające na efektywność działania substancji wiodącej [wg P. Kafarski, B. Lejczak: *op. cit.*]

Znalezienie substancji skutecznie oddziałującej z wybranym receptorem komórkowym nie daje jeszcze gwarancji na to, że ta substancja będzie miała dobre, pożądane właściwości biologiczne. Mimo że oddziaływanie z receptorami stanowi bezpośrednią przyczynę efektu biologicznego, to na efekt ten wpływa jeszcze wiele innych czynników wymienionych na rys. 3. Do dyskwalifikacji nowej substancji wiodącej wystarczy bowiem niekorzystne działanie któregośkolwiek z przedstawionych czynników.

## 1.2. Teoria analogii strukturalnej

Przed 1900 rokiem znano tylko 3 zdefiniowane substancje chemiczne używane w leczeniu: rtęć (do leczenia syfilisu), chininę (środek przeciw malarii) oraz ipekakuanę (przeciw bieguncie). Współczesna terapia narodziła się z pracami niemieckiego biologa Paula Ehrlicha, który, poszukując mineralnego leku, zainicjował szeroko pojęty skrining. Badaniom poddał głównie barwniki, wychodząc z założenia, że jeśli używa się ich do selektywnego barwienia bakterii, to muszą one w jakiś sposób oddziaływać. Szóśćset szóstym z testowanych związków była odkryta w 1909 roku pochodna arsenu nazwana salwarsanem, stosowana potem przez wiele lat do leczenia syfilisu. O odkryciu naukowym decyduje często przypadek, świadczy o tym historia sulfonamidów. Lecząc ciężkie zakażenie paciorkowcem u swojej córki, niemiecki lekarz Gerhard Domagk zdecydował się zastosować barwnik o nazwie prontosisil. Pozytywny skutek tej terapii spowodował intensywne badania i rok później stwierdzono, że nie prontosisil jest substancją działającą, a jego produkt hydroлізу w organizmie ludzkim – sulfanilamid.

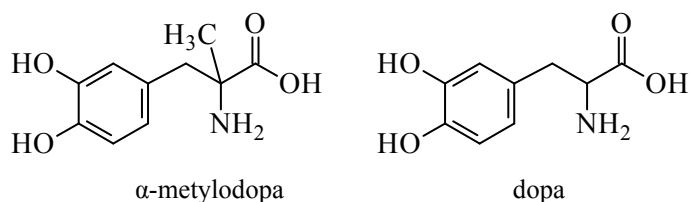
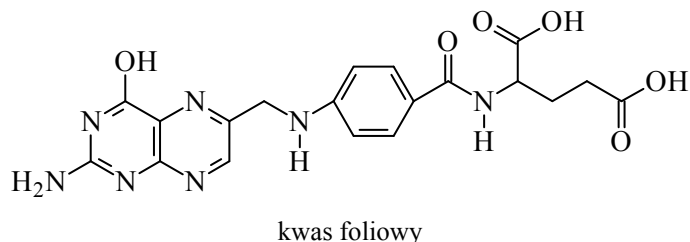
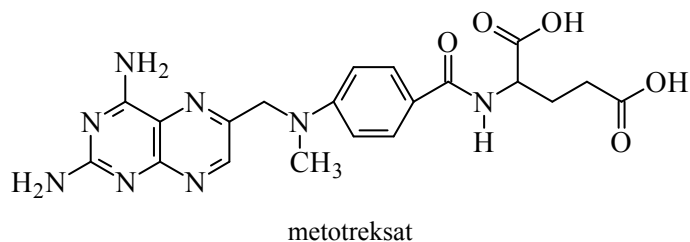


Rys. 4. Przykład analogii strukturalnej w grupie sulfonamidów

Związek ten konkuruje z kwasem PABA w procesie biosyntezy kwasu foliowego. Sulfanilamid jest pierwszym przykładem niezwykle skutecznego antagonisty metabolicznego, który

konkuruje z naturalnym substratem i zajmuje jego miejsce w centrum wiążącym enzym. Ten sulfanilamid jest pierwszym przykładem analogu strukturalnego, gdyż jego działanie antybakteryjne jest spowodowane podobieństwem do kwasu p-aminobenzoowego.

Rozmiar grupy sulfonamidowej jest nieomal ten sam, co rozmiar grupy karboksylowej. Także rozkład gęstości elektronowej w obu związkach jest bardzo zbliżony. Podobieństwo strukturalne, w tym podobny rozkład ładunku, nosi nazwę analogii izopolarnej lub izoelektronowej.



Rys. 5. Przykłady analogii strukturalnej w innych grupach związków

Przy projektowaniu analogów strukturalnych substancjami wiodącymi są substraty reakcji enzymatycznych, hormony lub neuroprzekaźniki. Zasadą jest dokonywanie w obrębie tych cząsteczek niewielkich zmian, które powodują, że analog jest w tym podobny do substratu, iż możliwe jest jego oddziaływanie z wybranym receptorem. Przykładami leków, które zostały zaprojektowane według tej metody, są metotreksat i  $\alpha$ -metylodopa.

### I.3. Modelowanie zależności między chemiczną budową cząsteczek a ich aktywnością biologiczną

Optymalną drogą, pozwalającą na przewidywanie aktywności biologicznej określonego związku byłoby oczywiście opracowanie teorii oddziaływania związku z receptorem na poziomie molekularnym. Nie jest to jednak w pełni możliwe i dlatego jedną z podstawo-

wych metod stanowią próby korelowania i modelowania zależności między strukturą związku a jego aktywnością. Istnienie takiej korelacji zauważył już 90 lat temu Emil Fischer, porównując enzym i jego substrat do zamka i klucza. Jednak próby ilościowego analizowania tych zależności liczą zaledwie 25 lat i rozpoczęły je prace C. Hanscha, T. Fujity, S.M. Free i J.W. Wilsona. Opracowane przez nich i ich następców metody znane są pod nazwą QSAR (*quantitative structure – activity relationship*). Metody QSAR polegają na znalezieniu odpowiednich parametrów opisujących właściwości fizykochemiczne cząsteczki i określeniu, za ich pomocą, przewidywanej aktywności biologicznej cząsteczki. Hansch i Fujita postawili hipotezę, że w działaniu biologicznym można wyróżnić dwa procesy. Pierwszy to wędrówka związku od miejsca podania do miejsca działania. Drugi to reakcje chemiczne w miejscu działania. Punktem wyjścia do konstrukcji takiej zależności były przyjęte przez Hanscha i Fujitę podstawowe założenia:

- właściwości cząsteczki odpowiedzialne za aktywność biologiczną są reprezentowane przez mierzalne parametry fizykochemiczne,
- aktywność biologiczna jest właściwością mierzalną,
- mechanizm działania wszystkich związków należących do tej samej klasy jest taki sam,
- relacja pomiędzy reprezentowanymi przez właściwości fizykochemiczne parametrami strukturalnymi a mierzoną aktywnością biologiczną może być opisana prostym modelem matematycznym.

Naukowcy wykorzystali informacje i hipotezy dotyczące wpływu niektórych parametrów fizykochemicznych na aktywność biologiczną niektórych klas związków. Głównie wykorzystali fakt, że aktywność leków narkotycznych rośnie ze wzrostem ich charakteru lipofilowego, osiąga maksimum, a następnie maleje. Założyli, że jedynie związki o optymalnych właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych są zdolne do przekroczenia jednej lub wielu błon biologicznych i osiągnięcia receptora w odpowiednim stężeniu.

#### **I.4. Analiza konformacyjna**

Niezwykle ważnym czynnikiem w oddziaływaniu związku z receptorem jest trójwymiarowy kształt cząsteczki. Dokładna znajomość kształtu cząsteczki, a w przypadku cząsteczek konformacyjne labilnych informacja o prawdopodobieństwie występowania poszczególnych konformerów, jest bodajże najważniejszym czynnikiem pozwalającym na wyjaśnienie sposobu oddziaływania związku z receptorem. Taką możliwość stwarzają techniki komputerowego projektowania struktur i grafika molekularna, czyli techniki wykorzystujące grafikę komputerową, statystykę, mechanikę molekularną i mechanikę kwantową. Zastosowanie technik komputerowych do optymalizowania struktur wiodących pozwala na:

- dokładne przedstawienie struktury chemicznej związku zależne tylko od poziomu wiedzy, a nie od sposobu jej przedstawienia, np. na płaskim rysunku, czy w postaci modelu fizycznego,
- łatwe obliczanie parametrów geometrycznych cząsteczek,
- nakładanie na siebie dwu i więcej struktur cząsteczek w celu znalezienia różnic i podobieństw struktur,
- łatwe przechowywanie danych.

Analiza konformacyjna jest jednym z etapów, który pozwala na zrozumienie jak przestrzenna budowa cząsteczki wpływa na jej aktywność biologiczną. W celu określenia konformacji cząsteczek stosowane są w zasadzie trzy metody: rentgenografia w fazie krystal-

licznej, badania techniką magnetycznego rezonansu jądrowego w roztworze i obliczenia energii wszystkich konformerów cząsteczki metodami kwantowo-mechanicznymi lub metodami mechaniki molekularnej. Konformacja cząsteczki w kryształach jest jedną z możliwych niskoenergetycznych (niekoniecznie o najniższej energii konformacji), przy której powstawaniu mają udział również i efekty wynikające z upakowania cząsteczek w kryształach. Uprzywilejowana konformacja cząsteczkowa w roztworze wodnym lub chloroformowym, znajdowana za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, wcale nie musi być tą, która jest wiązana w centrum wiążącym receptora. Im większy jest udział w mieszaninie konformeru preferowanego przez receptor, tym silniejszy jest efekt biologiczny. Za pomocą analizy konformacyjnej znaleziono dwa neuroleptyki, np. benperidol i lek, będący inhibitorem enzymu konwertującego angiotensynę – cilazapril.

## II. CHEMIA KOMBINATORYCZNA

W dziedzinie poszukiwania leków ostatnimi laty pojawiła się nowa metoda *combinatorial synthesis* – synteza kombinatoryczna.

**Synteza kombinatoryczna** polega na równoczesnym prowadzeniu syntezy wielkiej liczby związków w ilościach submikro dla poddania ich badaniu, czy znajdują się wśród nich związki wykazujące działanie na określone receptory komórkowe. Badania wykazujące istnienie działania na dany receptor (działanie antagonistyczne, bądź agonistyczne) prowadzone są metodami immunofluorescencyjnymi lub metodami radioimmunologicznymi z użyciem ligandów znakowanych trytem [ $H^3$ ], jodem [ $J^{125}$ ] bądź fosforem [ $P^{32}$ ], co pozwala na użycie w eksperymencie bardzo małych ilości substancji (max rzędu pikomoli) dla stwierdzenia istnienia działania danego rodzaju. Z niektórych doniesień wynika, że użycie metod immunoluminescencyjnych z zastosowaniem lucyferazy pozwala na uzyskanie wyników przy zastosowaniu femtomoli badanej substancji.

W chemii kombinatorycznej zarówno proces syntezy, jak i badanie aktywności farmakologicznej są wysoce zautomatyzowane i sterowane przy zastosowaniu maszyn cyfrowych, czyli komputerów. Takie postępowanie pozwala na wstępne przebadanie tysięcy i dziesiątków tysięcy związków, zatem liczby dotychczas niewyobrażalnej, zasługuje więc na określenie go jako narzędzia, które może zrewolucjonizować badania nad lekami. Sposób tworzenia kombinatorycznych kolekcji (bibliotek) związków poddawanych później testom jest dość prosty. Wykorzystujemy standardowe reakcje chemiczne, dzięki którym ze zbioru elementów wyjściowych powstają możliwie większe struktury.

Poszukiwacze leków mają do dyspozycji dwie podstawowe techniki kombinatoryczne.

### II.1. Synteza równoległa

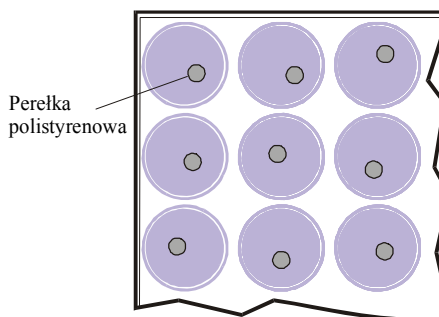
Po raz pierwszy zastosował ją w połowie lat osiemdziesiątych H. Mario Geysen, związany obecnie z firmą farmaceutyczną Glaxo Wellcome.

Produkty uzyskiwane techniką syntezy równoległej powstają w oddzielnych naczyniach reakcyjnych. Aby ułatwić sobie zadanie, chemicy stosują często tzw. płytkę mikromiareczkową, czyli plastikowy arkusz z wgłębieniami o pojemności kilku mililitrów uszeregowanymi w 8 rzędów i 12 kolumn. Tutaj zachodzą reakcje chemiczne. Tablicowe uporządkowanie odczynników jest ułatwieniem w przygotowaniu mieszanin reakcyjnych oraz identyfikacji pobieranych produktów.

Aby otrzymać np. serię amidów przez łączenie 8 niektórych amin z 12 kwasami karboksylowymi, należy wkropić pierwszą aminę do studzienek w pierwszym rzędzie, drugą do drugiego itd., a następnie dodać kwasy karboksylowe, każdy z nich do jednej z dwunastu kolumn. Z 20 elementów można zatem w ten sposób otrzymać bibliotekę 96 różnych związków chemicznych. Syntezę kombinatoryczną chemicy zaczynają często od przyłączenia pierwszego zestawu elementów do chemicznie obojętnych mikroskopijnych perełek polistyrenowych. Nieprzereagowany materiał jest odmywany po każdej reakcji, pozostają jedynie zakotwiczone produkty. Korzyści płynące z łatwego oczyszczenia przeważają nad komplikacjami związanymi z koniecznością osadzenia związków w podłożu i późniejszego ich uwalniania.

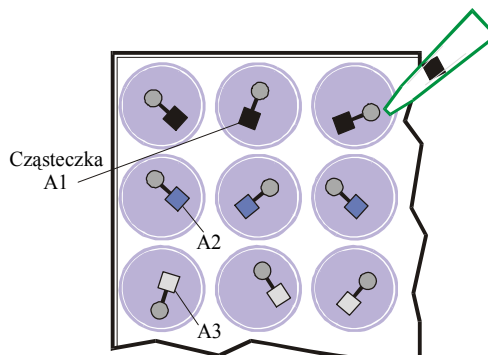
### I etap

Włębienie płytki mikromiareczkowej wypełnia się zawiesiną obojętnych chemicznie perełek polistyrenowych (kółka). Typowa płytka zawiera 8 rzędów i 12 kolumn, czyli 96 mikrostudzienek; jej fragment przedstawiono obok.



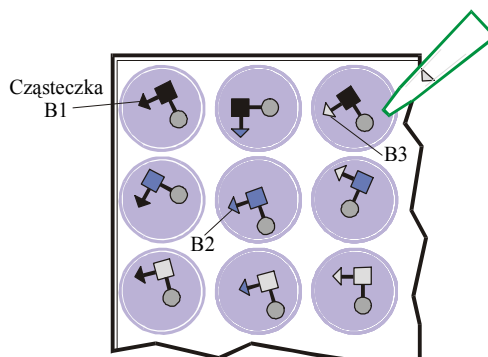
### II etap

Do zawiesiny polistyrenowych perełek dodaje się pierwszy zestaw cząsteczek (kwadraty) – klasa A, tak aby A1 znalazły się w pierwszym rzędzie, A2 w drugim itd. Następnie przefiltrowuje się zawartość wszystkich studzienek w celu oddzielenia nieprzereagowanych odczynników.



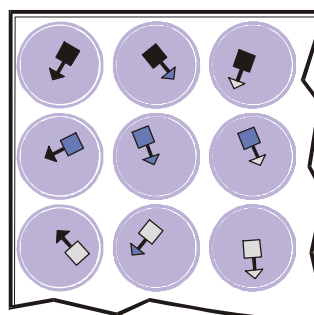
### III etap

Dodaje się drugi zestaw cząsteczek – klasa B (trójkąty). B1 wkrapla się do pierwszej kolumny, B2 do drugiej itd. Następnie prowadzi się filtrowanie w celu oddzielenia nieprzereagowanych odczynników.



### IV etap

Po skompletowaniu 96-elementowej biblioteki odłącza się końcowe produkty od polistyrenowego podłoża. Następnie poddaje się je próbom na aktywność biologiczną.



Rutynowe operacje w syntezie równoległej, takie jak wkraplanie odczynników do odpowiednich studzienek, w wielu laboratoriach wykonuje się wyspecjalizowanym robotem. Dzięki temu proces staje się dokładniejszy i mniej pracochłonny. Pierwszy robot syntetyzujący 40 nowych związków jednocześnie powstał w firmie Parker-Davis, 1000 nowych substancji dziennie produkuje robot w firmie Ontogen.

Czas potrzebny do zakończenia syntezy równoległej zależy od liczby produkowanych związków i jej podwojenie wydłuża czas niemal dwukrotnie. Te praktyczne względy ograniczają wielkość tworzonych bibliotek najwyżej do kilkudziesięciu tysięcy związków chemicznych.

## II.2. Metoda *split-and-mix*

Metoda *split-and-mix* (dziel i mieszaj) zaproponowana została w końcu lat osiemdziesiątych przez A. Furka (Advanced Chem-Tech, Louisville, Kentucky).

Techniką tą w jednym naczyniu otrzymujemy mieszaninę wielu produktów. Dzięki temu potrzeba mniej naczyń reakcyjnych, a liczba produktów rośnie nawet do kilku milionów. Ceną za to są jednak trudności z identyfikacją i testowaniem biologicznej aktywności poszczególnych związków w złożonych mieszaninach. W metodyce „podział i mieszanie” w pierwszym cyklu perełki dzieli się na 3 lub więcej różnych części i każdą część poddaje się w odrębnym naczyniu reakcji z określonymi półproduktami  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ . Po zakończeniu cyklu perełki są łączone razem, zostają dobrze wymieszane i ponownie podzielone na 3 lub więcej różnych części, z których każdą poddaje się ponownie reakcji z półproduktem  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ . Otrzymuje się zbiór perełek, do których dołączone jest 9 różnych związków. Ponownie cyklu daje 17 różnych związków, następnie 81 itp. Zakłada się, że na pojedynczej perełce powinno być 100–200 pikomoli ściśle określonego związku, oczyszczonego, jednak o nieznanym strukturze.

Aby wyłonić najcenniejsze z nich, należy badać średnią aktywność kolejnych mieszanin. Później, stosując różne techniki, dedukuje się, który z „kombinatorycznych” produktów obecnych w najbardziej aktywnej mieszaninie ma pożądane właściwości biologiczne. Podczas syntez opartych na dzieleniu i mieszaniu trudno zidentyfikować konkretną aktywną substancję, która kryje się w złożonej miksturze. Do identyfikacji substancji aktywnej stosuje się czułe metody analityczne, bądź można posłużyć się metodą oznaczenia perełek chemicznymi „etykietkami” – swego rodzaju kod kreskowy, z którego można odczytać historię dodawania kolejnych odczynników. Odczytanie etykiety jest jednoznaczne z identyfikacją zakotwiczonej substancji. Mimo wszystko kłopoty z identyfikacją związków są poważne, dlatego większość firm poprzestaje dziś raczej na syntezie równoległej.

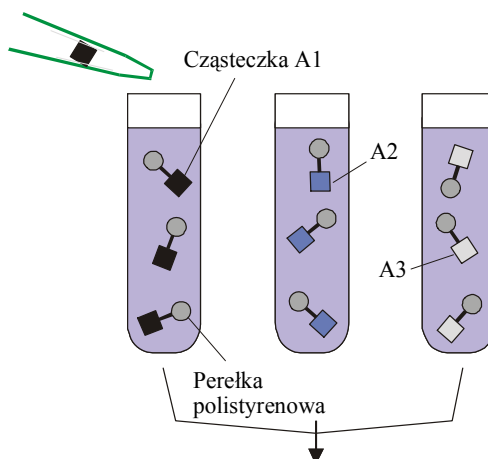
## II.3. Biblioteki leków

Obie metody syntezy kombinatorycznej debiutowały jako sposób tworzenia peptydów. Częsteczki te, choć bardzo istotne dla organizmu, nie są zbyt przydatne jako leki, ponieważ rozkładają się w jelitach, trudno się wchłaniają w żołądku i szybko znikają z krwiobiegu. Różnorodność zastosowania benzodiazepin sprawiła, że leki te były pierwszą grupą związków, w której poszukiwano nowych leków metodami chemii kombinatorycznej. W 1992 roku Ellman i Bunin z University of California w Berkeley przedstawili sposób syntezy benzodiazepin na podłożu stałym. Otwarto w ten sposób drogę do tworzenia bibliotek zawierających tysiące potencjalnie użytecznych pochodnych.

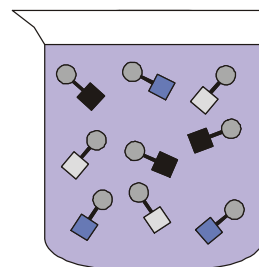


**I etap**

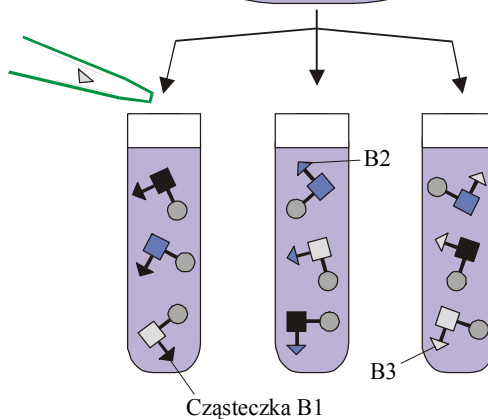
Do probówek, wypełnionych zawiesiną obojętnych chemicznie kulek polistyrenowych (kółka), dodaje się pierwszy zestaw cząsteczek klasy A (kwadraty), tak aby w pierwszej znalazł się związek A1, w drugiej A2 itd.

**II etap**

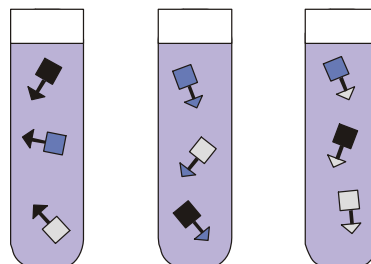
W jednym naczyniu miesza się zawartość wszystkich probówek.

**III etap**

Mieszaninę dzieli się na trzy równe części. Następnie dodaje się drugi zestaw cząsteczek klasy B (trójkąty), wkrapla się B1 do pierwszej probówki, B2 do drugiej itd.

**IV etap**

Odfiltrowuje się nieprzereagowane odczynniki, oddziela gotowe związki od perełek polistyrenowych. Często bada się zawartość każdej z probówek w celu określenia średniej aktywności biologicznej mieszanin.



Rys. 2. Etapy syntezy „dziel i mieszaj” [wg M.J. Plunkett, J.A. Ellman: *op. cit.*]

Najtrudniejszym zadaniem podczas projektowania syntez kombinatorycznych jest wybranie warunków eksperymentalnych, gwarantujących minimalizację reakcji ubocznych, a tym samym niski poziom zanieczyszczeń. Optymalizacja wszystkich parametrów pozwoliła metodą równoległej syntezy wytworzyć 11 200 związków w ciągu zaledwie dwóch miesięcy. Okazało się, że biblioteka ta zawiera kilka potencjalnych leków:

- jedna z pochodnych benzodiazepiny została zidentyfikowana jako inhibitor enzymu zaangażowanego w powstawanie raka okrężnicy i w osteoporozę,
- druga pochodna benzodiazepiny – hamuje oddziaływanie jednoniciowego DNA z przeciwciałami, które mogą być przyczyną układowego tocznia rumieniowatego.

Szukając środka przeciw bólom migrenowym, chemicy firmy Eli Lilly posłużyli się syntezą równoległą. Dysponowali substancją wyjściową, która chętnie łączyła się z docelową strukturą biochemiczną (receptorami). Obawiano się jednak niepożądanych efektów ubocznych, wykazywała ona bowiem także silne powinowactwo do innych, pokrewnych receptorów. Po zsyntetyzowaniu około 500 pochodnych tej substancji wyselekcjonowano obiecujący lek, poddawany obecnie testom klinicznym.

### Literatura

1. P. Kafarski, B. Lejczak: *Chemia bioorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994, rozdz. *Projektowanie związków biologicznie czynnych*.
2. K. Samuła, A. Cieniecka: *Wstęp do projektowania leków*, PZWL, Warszawa 1979.
3. A.B. Bunin, M.J. Plunkett, J.A. Ellman: *The combinatorial synthesis and chemical and biological evaluation of a 1,4-benzodiazepine library*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91, 4708–4712.
4. M.J. Plunkett, J.A. Ellman: *Chemia kombinatoryczna*, tłum. R. Kołos, Świat Nauki, 1997, 6, 27–31.
5. K.D. Janda: *Tagged versus untagged libraries: Methods for the generation and screening of combinatorial chemical libraries*, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91, 10779–10785.

## **CZEŚĆ B. METODY OGÓLNE**



## I. JEDNOSTKOWE OPERACJE FIZYCZNE

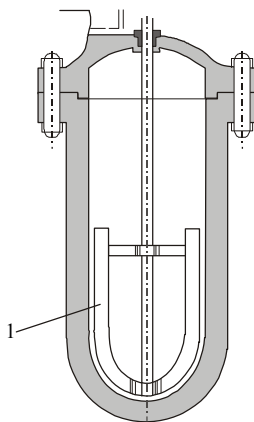
Środki lecznicze produkowane są na drodze syntezy chemicznej, przez wyodrębnienie z surowców roślinnych i zwierzęcych oraz metodami biotechnologii. Produkcję leku opracowuje się najpierw na skalę laboratoryjną, celem dobrania metody dającej najlepszą wydajność przy użyciu najtańszych surowców, ustalenia optymalnych parametrów temperatury, ciśnienia, stężenia substratów itd. Reakcje wykonuje się w typowej szklanej aparaturze laboratoryjnej. Następnie przeprowadza się badania w aparaturze ćwierć lub półtechnicznej, a w końcu w aparaturze technicznej. Przejście z małej skali produkcji na dużą, z zachowaniem tych samych warunków reakcji, nie jest proste. Powiększenie  $n$  razy produkcji wymaga w przybliżeniu zwiększenia  $n^3$  razy pojemności reaktorów, wzrasta również ilość wywiązującego się ciepła i powstają problemy z jego odprowadzeniem. W świetle walki o zachowanie czystości środowiska duże znaczenie ma utylizacja produktów ubocznych.

Czynności przemysłowe można podzielić na:

- jednostkowe procesy chemiczne (str. 42),
- jednostkowe operacje fizyczne.

Produkcja leków wymaga specjalnej aparatury przemysłowej, która składa się z:

- a) reaktorów, w których prowadzi się jednostkowe procesy chemiczne (np. sulfonowanie, nitrowanie, chlorowcowanie itd.),
- b) maszyn i urządzeń, w których prowadzi się proste i bardziej złożone operacje fizyczne (np. destylację, krystalizację itd.).



Rys. 1. Reaktor z mieszadłem kotwicznym: 1 – mieszadło  
[wg J. Tulecki: *Aparaty i maszyny przemysłu farmaceutycznego*, PZWL, 1967]

Reaktory są to kotły zbudowane z żeliwa lub stali, z pokrywą, systemem grzejnym lub chłodzącym i mieszadłem.

Zespół reaktorów, maszyn i urządzeń potrzebnych do wyprodukowania jakiegoś preparatu nazywamy instalacją przemysłową (aparaturą).

Aparatura przemysłowa zbudowana jest z materiałów odpowiadających specjalnym wymaganiom natury chemicznej (odporność na działanie związków chemicznych, obojętność) i fizycznej (odporność na działanie temperatury, ciśnienia, dobre lub złe przewodnic-

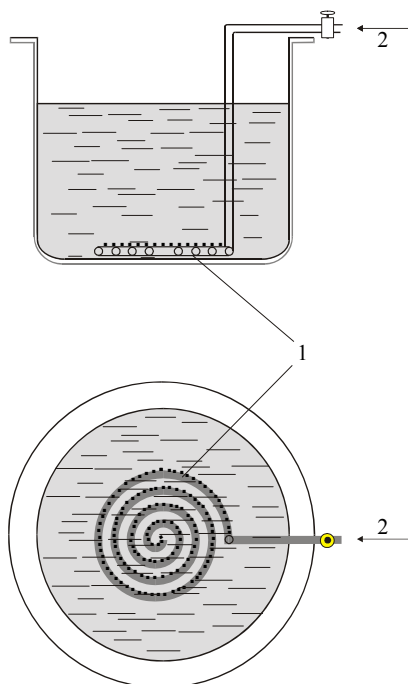
two ciepła, trwałość mechaniczna). Szczególne znaczenie ma odporność na korozję. Najczęściej stosowanym materiałem jest żeliwo (stop żelaza z węglem – 2,5–4,5%), często z dodatkiem niklu, chromu, molibdenu oraz wolframu. W ochronie przed korozją reaktory żeliwne pokrywa się emaliami (najczęściej ze szkła boroołowiawego). Do budowy aparatury używa się również stali (stop żelaza z mniejszą ilością węgla – do 1,7%), które zawierają również domieszkę metali uszlachetniających (nikiel, chrom, wanad, wolfram, molibden). Najczęściej stosowane są stale chromoniklowe (18% chromu, 8% niklu, 0,1% węgla) bardzo odporne na korozję i działanie mechaniczne. Z innych metali stosowane są: miedź, aluminium, cyna, cynk, srebro oraz tantal (bardzo odporny, ale drogi metal). Z materiałów niemetalicznych stosowana jest porcelana, kamionka, szkło, drewno, tworzywa sztuczne (np. polichlorek winylu, teflon).

Do ważniejszych procesów fizycznych zaliczamy: rozdrabnianie, transport, ogrzewanie i chłodzenie, mieszanie, oddzielanie ciał stałych od cieczy, destylację, krystalizację, sublimację, ekstrakcję, adsorpcję, absorpcję, suszenie.

Niżej krótko omawiamy kilka najważniejszych procesów fizycznych i przedstawiamy schematy aparatury, w których są wykonywane.

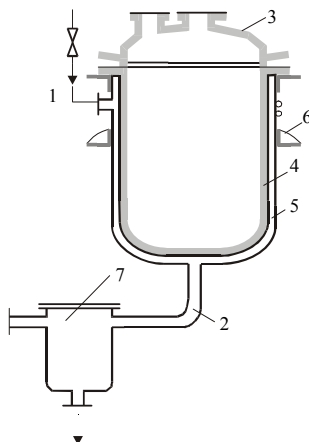
### I.1. Ogrzewanie

Większość reakcji chemicznych wymaga podwyższonej temperatury. Ogrzewanie w przemyśle prowadzi się różnymi sposobami: gazami spalinowymi, parą wodną nasyconą lub przegrzaną, wysokowrzącymi cieczami, elektrycznie. Ogrzewanie nasyconą parą wodną może być prowadzone bezprzeponowo np. za pomocą bełkotki.

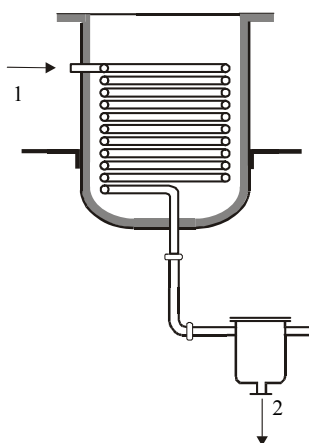


Rys. 2. Ogrzewanie bezprzeponowe: 1 – bełkotka, 2 – doprowadzenie pary  
[wg L. Kuczyński: *Technologia środków leczniczych*, PZWL, 1963]

Do ogrzewania przeponowego służą płaszcze parowe, węzownice, podgrzewacze wielorurkowe.



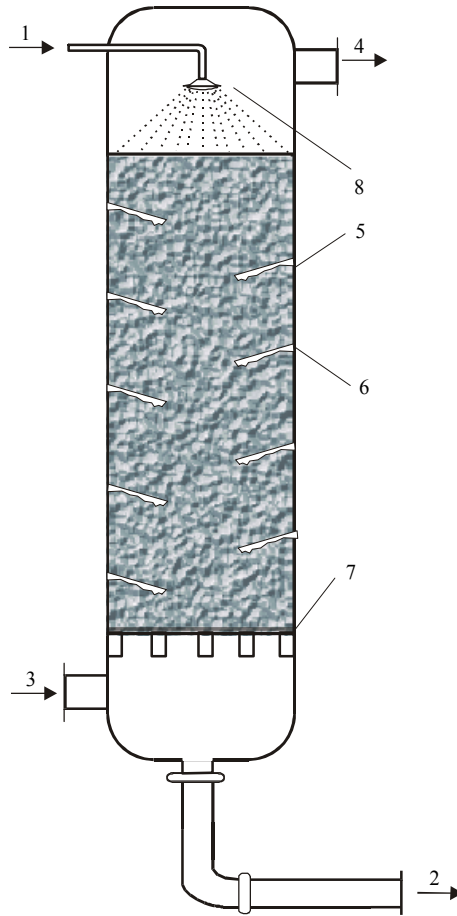
Rys. 3. Reaktor z płaszczem parowym: 1 – doprowadzenie pary, 2 – odprowadzenie kondensatu, 3 – pokrywa, 4 – korpus aparatu, 5 – płaszcz parowy, 6 – wspornik, 7 – garnek kondensacyjny [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]



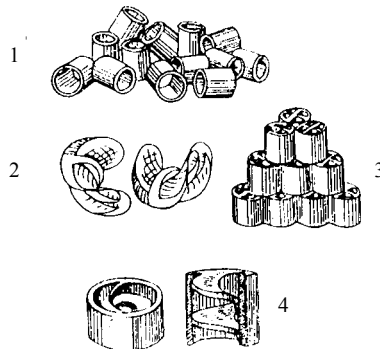
Rys. 4. Reaktor z węzownicą: 1 – doprowadzenie pary grzejnej, 2 – odprowadzenie kondensatu [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

## I.2. Chłodzenie

Chłodzenie w przemyśle farmaceutycznym jest równie ważne jak ogrzewanie. Reakcje egzotermiczne wymagają odprowadzenia ciepła. Szereg procesów chemicznych wymaga niskich temperatur (np. diazowanie, sulfonowanie). Jako środek chłodzący stosuje się wodę, zimne powietrze, solankę chłodniczą, mieszaniny oziębiające (np. lód + sól kuchenna). Podobnie jak przy ogrzewaniu rozróżniamy chłodzenie bezprzeponowe i przeponowe. Do bezprzeponowego chłodzenia gazów służą **skrubery**. Są to wieże metalowe lub ceramiczne zraszane od góry wodą chłodzącą. Gaz wprowadzany jest u dołu skrubera. Skrubery mają wypełnienie, zwiększające powierzchnię styku gazu i wody. Jako wypełnienie stosuje się tzw. pierścienie Raschiga i siodełka Berla.



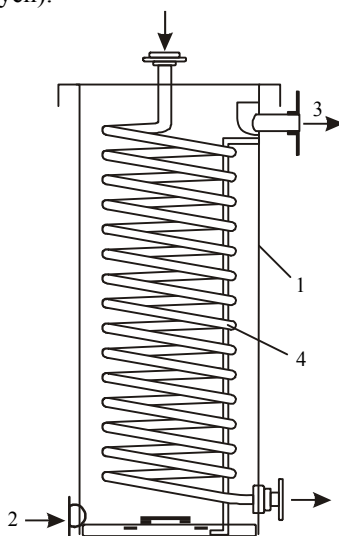
Rys. 5. Skruber: 1 – doprowadzenie wody, 2 – odprowadzenie wody, 3 – doprowadzenie par, 4 – odprowadzenie gazów, 5 – wypełnienie skrubera, 6 – półki, 7 – ruszt, 8 – sito [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]



Rys. 6. Wypełnienie skrubera: 1,3,4 – pierścienie Raschiga, 2 – siodełka Berla [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]



Chłodzenie przeponowe przeprowadza się za pomocą wymienników ciepłych i chłodziw (węzownicowych lub rurkowych).

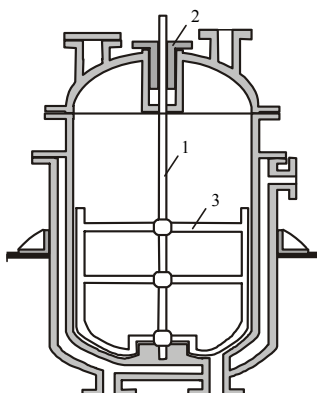


Rys. 7. Chłodnica węzownicowa: 1 – płaszcz cylindryczny, 2 – dopływ wody chłodzącej, 3 – odpływ wody chłodzącej, 4 – wężownica [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

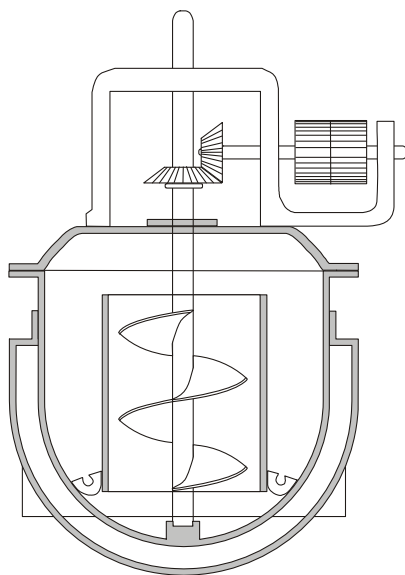
### I.3. Mieszanie

Mieszanie ma znaczny wpływ na przebieg procesów fizycznych i chemicznych. Mieszanie może mieć na celu: rozwinięcie powierzchni dwóch faz reagujących ze sobą, polepszenie wymiany ciepłej, przyspieszenie procesu rozpuszczania się ciał stałych w cieczy, otrzymanie jednolitej mieszaniny różnych składników. Mieszanie ciał stałych w stanie sypkim odbywa się w mieszalnikach.

Do mieszania cieczy oraz cieczy z osadem służą mieszadła, które zamontowane są w reaktorach i mogą mieć różny kształt. Wyróżniamy np. mieszadła łopatkowe, propellerowe, ślimakowe, kotwiczne i ramowe.



Rys. 8. Reaktor z mieszadłem ramowym: 1 – wał mieszadła, 2 – uszczelnienie, 3 – mieszadło [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]



Rys. 9. Reaktor z mieszadłem ślimakowym [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

#### I.4. Oddzielanie ciał stałych od cieczy

Do oddzielania ciał stałych od cieczy służą następujące metody:

- odstawanie (dekantacja), które polega na swobodnym opadaniu cząstek ciała stałego w cieczy pod wpływem siły ciężkości. Odstawanie prowadzi się w zbiornikach zwanych odstożnikami, zaopatrzonych w odpustowe kurki boczne, przez które zlewa się ciecz z nad osadu;
- filtracja;
- wirowanie.

##### I.4.1. Filtracja

Osad od cieczy oddziela się najczęściej drogą filtracji. Polega ona na przepływie zawiesiny przez warstwę materiału filtracyjnego, którym może być: płótno filtracyjne, warstwa materiału ziarnistego, np. żwiru lub piasku, materiał porowaty jak porcelana, szkło, nitroceluloza. Niekiedy stosuje się tzw. pomoce filtracyjne, które przyspieszają sączenie, jak: węgiel aktywny, ziemię krzemkową, kaolin itp.

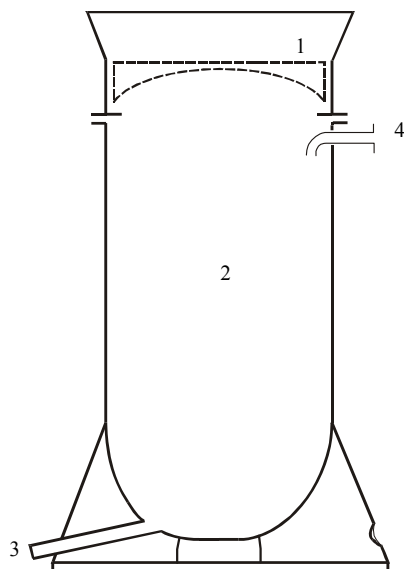
Do filtracji służą:

- a) nucze (cedzidła, filtry),
- b) prasy filtracyjne,
- c) filtry bębnowe obrotowe.

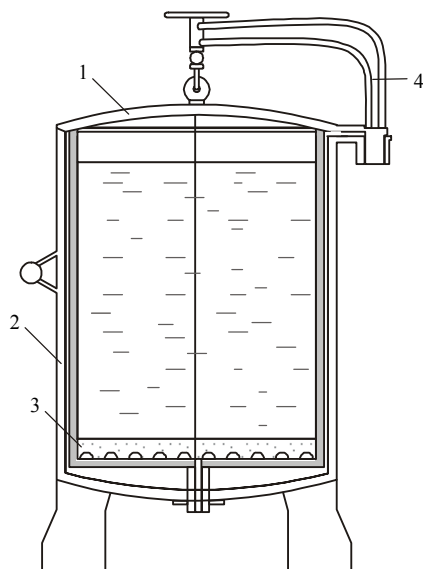
Ad a. Nucze

Nucze stosuje się przy filtracji zawiesin ze znaczną ilością fazy stałej. Są cedzidła otwarte, które pracują pod ciśnieniem hydrostatycznym lub przy podciśnieniu i cedzidła

zamknięte (ciśnieniowe), do których zawiesina doprowadzana jest pod ciśnieniem sprężonego powietrza.



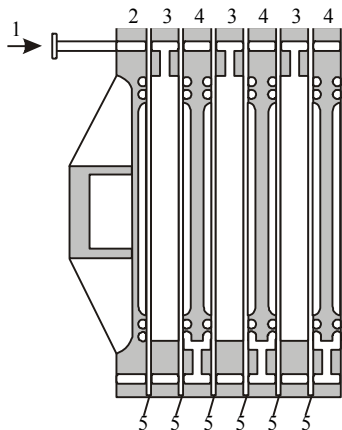
Rys. 10. Cedzidło (nucza) otwarte: 1 – przegroda, 2 – zbiornik, 3 – przewód odprowadzający przesącz, 4 – przewód łączący nuczę z pompą próżniową [wg J. Tułecki: *op. cit.*]



Rys. 11. Cedzidło zamknięte: 1 – pokrywa, 2 – obudowa, 3 – przegroda, 4 – dźwignia do zdejmowania przegrody [wg J. Tułecki: *op. cit.*]

## Ad b. Prasy filtracyjne

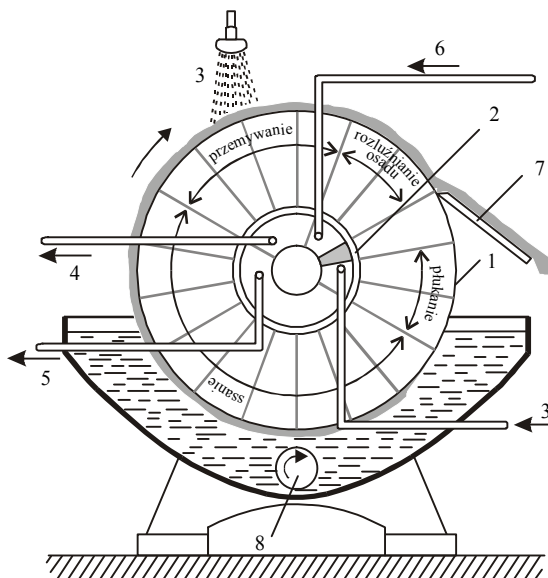
Służą do oddzielania osadów koloidalnych, ściśliwych, trudno sączących się. Prasy filtracyjne (komorowe lub ramowe) zbudowane są z ram lub płyt obciążonych płótnem filtracyjnym. Odznaczają się znaczną powierzchnią sączenia i pracują pod ciśnieniem do 20 atm.



Rys. 12. Prasa ramowa: 1 – dopływ zawiesiny, 2 – płyta czołowa, 3 – ramy, 4 – płyty, 5 – płótno [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

## Ad c. Filtry obrotowe

Filtry bębnowe obrotowe służą do filtrowania w sposób ciągły dużych ilości cieczy z osadem. Składają się z bębna sitowego, pokrytego materiałem filtracyjnym. Bęben jest zanurzony w cieczy filtrowanej i podzielony na szereg komór.



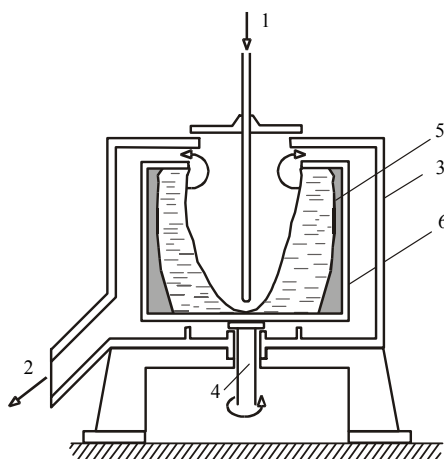
Rys. 13. Filtr obrotowy: 1 – bęben, 2 – głowica, 3 – dopływ wody myjącej, 4 – odpływ wody z przemycia, 5 – odpływ filtratu, 6 – dopływ sprężonego powietrza, 7 – skrobak, 8 – mieszadło [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

### I.4.2. Wirowanie

Wirowanie jest najszybszym sposobem oddzielania osadu od cieczy. Prowadzi się je w wirówkach. Mieszanka cieczy i osadu zostaje wprowadzona w ruch obrotowy. Częstki ciała stałego odrzucane są siłą odśrodkową ku obwodowi. Wirówki dzielimy ze względu na sposób oddzielania na:

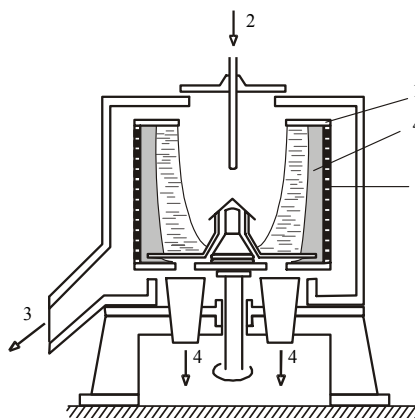
- a) przelewowe (sedymentacyjne),
- b) filtracyjne.

W wirówkach przelewowych bęben ma pełne ściany boczne – osad układa się na ścianach bębna, oddzielona ciecz przelewa się górą do przestrzeni między bębniem a obudową.



Rys. 14. Wirówka przelewowa: 1 – dopływ zawiesiny, 2 – odpływ filtratu, 3 – obudowa, 4 – wał obrotowy, 5 – osad, 6 – bęben obrotowy [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

W wirówkach filtracyjnych boczne ściany bębna są perforowane i pokryte materiałem filtracyjnym. W czasie wirowania ciecz przesącza się przez materiał i odpływa do przestrzeni między bębniem a obudową.

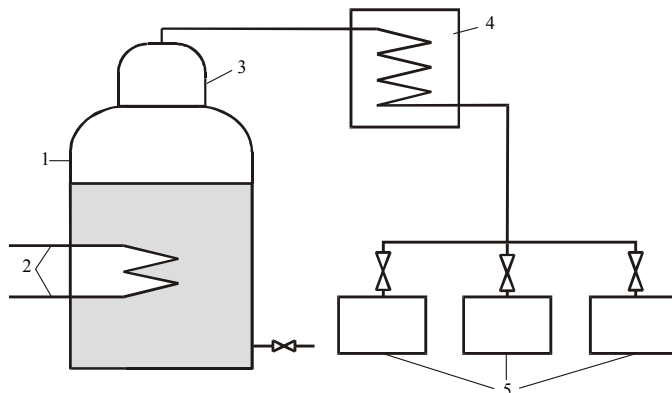


Rys. 15. Wirówka filtracyjna: 1 – bęben, 2 – dopływ zawiesiny, 3 – odpływ filtratu, 4 – osad, 5 – ściana boczna bębna wyściełana płótnem filtracyjnym [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

## I.5. Destylacja

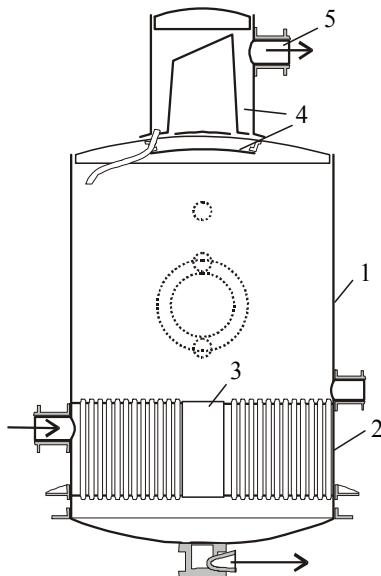
Destylacja jest czynnością polegającą na przeprowadzeniu cieczy przez ogrzewanie w temperaturze wrzenia w stan pary nasyconej, odprowadzenie tej pary i skroplenie jej przez ochłodzenie w chłodnicy. Destylację w przemyśle farmaceutycznym stosuje się najczęściej do oczyszczania rozpuszczalników i zagęszczania roztworów.

Aparatura do destylacji prostej składa się z kotła, chłodnicy i odbieralnika.



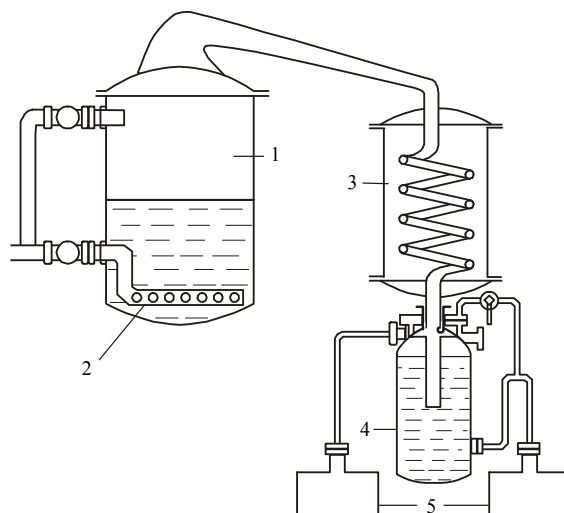
Rys. 16. Schemat destylacji prostej: 1 – kocioł, 2 – grzejnik, 3 – helm, 4 – chłodnica, 5 – odbieralnik  
[wg J. Tułeczki: *op. cit.*]

Do zagęszczania roztworów służą wyparki. Są to cylindry z systemem rurek pionowych lub poziomych ogrzewane parą.



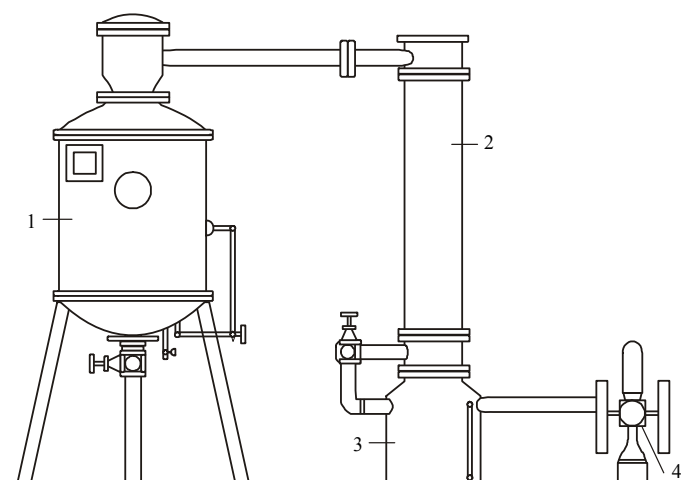
Rys. 17. Wyparka: 1 – cylinder, 2 – komora ogrzewająca parową, 3 – rura cyrkulacyjna, 4 – blachy zaporowe, 5 – przewód parowy [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

Do destylacji cieczy i ciał stałych nierozpuszczalnych w wodzie, lotnych z parą wodną stosuje się destylację z parą wodną. Dodatkowymi urządzeniami w tej destylacji jest kocioł do wytworzenia pary wodnej i tzw. flaszka florentyńska (rodzaj rozdzielacza przemysłowego), w której następuje rozwarstwienie cieczy.



Rys. 18. Destylacja z parą wodną: 1 – kocioł, 2 – doprowadzenie pary wodnej przez belkotkę, 3 – chłodnica, 4 – flaszka florentyńska, 5 – odbieralniki [wg J. Tułeki: *op. cit.*]

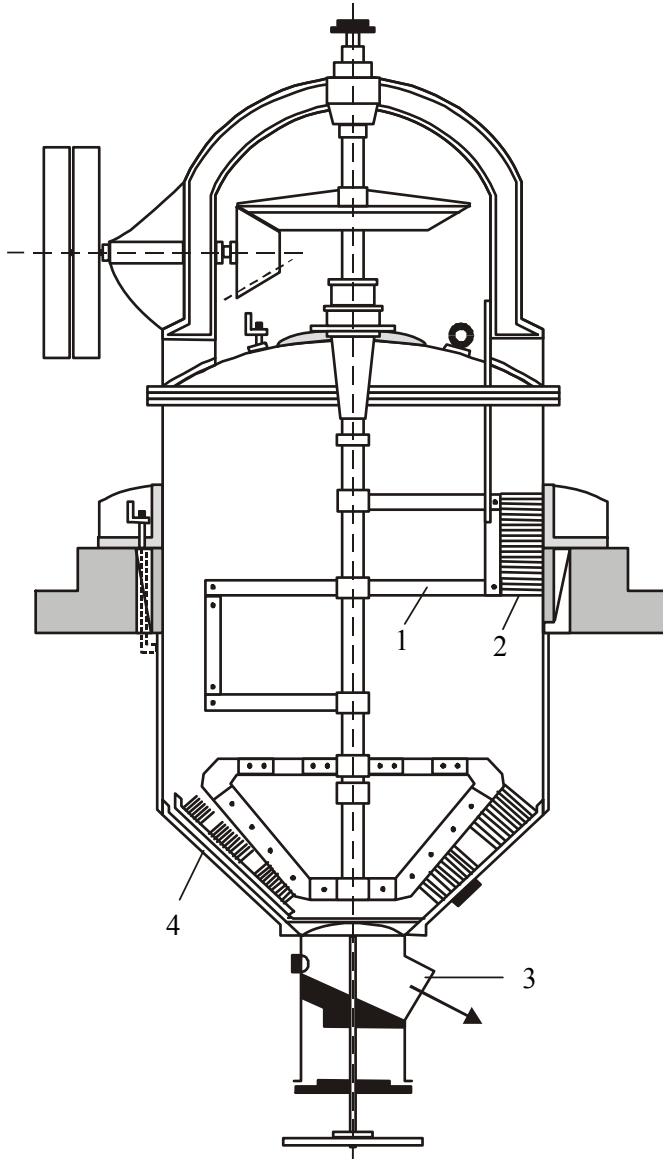
Również destylacja pod zmniejszonym ciśnieniem, w której wykorzystuje się zasadę obniżenia temperatury wrzenia cieczy przy obniżonym ciśnieniu, ma zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, zwłaszcza przy produkcji związków termolabilnych, np. witamin, hormonów, enzymów. Instalacje próżniowe są kosztowne, wymagają szczelnej aparatury i pomp próżniowych.



Rys. 19. Destylacja próżniowa: 1 – kocioł destylacyjny, 2 – skraplacz, 3 – odbieralnik, 4 – pompa próżniowa [wg J. Tułeki: *op. cit.*]

## I.6. Krystalizacja

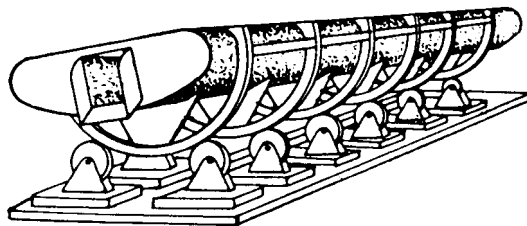
Krystalizacja jest jednostkową operacją fizyczną, która służy do oczyszczania ciał stałych. W reaktorze sporządza się na gorąco roztwór nasycony substancji oczyszczanej, sączy od zanieczyszczeń przez filtr i oziębia w krystalizatorach. Roztwór nasycony staje się przesycony, zaczynają wypadać kryształy. Krystalizatory przemysłowe mogą mieć kształt kotła zamkniętego zaopatrzonego w płaszcz chłodzący i mieszadło.



Rys. 20. Krystalizator zamknięty: 1 – mieszadło, 2 – szczotki, 3 – usuwanie kryształów, 4 – płaszcz chłodzący  
[wg J. Tułeki: *op. cit.*]



Mogą być otwarte i mieć kształt kołyski lub korytka.



Rys. 21. Krystalizator kołyskowy [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

### Literatura

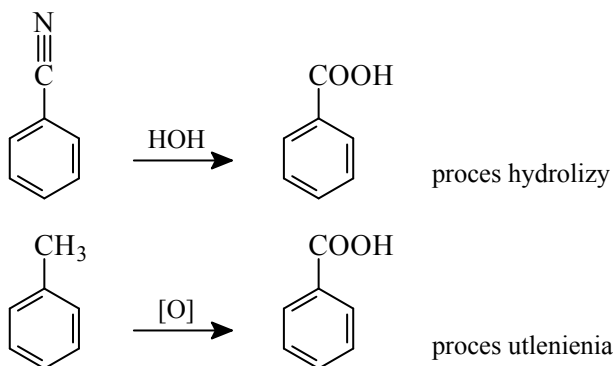
1. H.H. Emous: *Lehrbuch der technischen Chemie*, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Lipsk 1974.
2. J. Molenda: *Chemia techniczna*, WNT, Warszawa 1975.
3. L. Kuczyński: *Technologia środków leczniczych*, PZWL, Warszawa 1963.
4. J. Tulecki: *Aparaty i maszyny przemysłu farmaceutycznego*, PZWL, Warszawa 1967.

## II. JEDNOSTKOWE PROCESY CHEMICZNE

**Procesy jednostkowe:** stanowią propozycję klasyfikacji procesów technologicznych, przeprowadzanych w przemyśle organicznym, charakteryzujących się podobnym chemizmem; określają sposób prowadzenia w skali przemysłowej reakcji chemicznej określonego typu, co związane jest z powstawaniem pewnej klasy związków organicznych, np. związki nitrowe, chlorowcopochodne itd.

Proces jednostkowy obejmuje całokształt metod chemicznych, które w sposób ujednolicony stosuje się w różnych gałęziach przemysłu organicznego w celu zmiany struktury cząsteczek lub wprowadzenia określonych grup funkcyjnych.

Nazwa danego procesu jednostkowego pochodzi od nazwy typu reakcji, którą on obejmuje, a określony proces związany jest z wytworzeniem pewnej grupy związków organicznych. Proces jednostkowy nie jest ograniczony ani wyborem surowca, ani mechanizmem reakcji czy też parametrami fizykochemicznymi. Określony związek można otrzymać w różnych warunkach i różnych szczegółowych reakcjach, należących do danego procesu jednostkowego, wychodząc z różnych substratów, np.:



### Podział procesów jednostkowych:

I grupa – procesy polegające na wprowadzeniu do cząsteczek związków organicznych nowych grup funkcyjnych w wyniku przyłączenia lub podstawienia (nitrowanie, sulfonowanie, alkilowanie, acylowanie, chlorowcowanie, utlenianie, uwodornienie).

II grupa – procesy polegające na chemicznym przekształceniu już istniejących grup funkcyjnych na inne (redukcja, estryfikacja, diazowanie).

III grupa – procesy polegające na zasadniczej przemianie budowy chemicznej substratów:

- izomeryzacja – proces polegający na zmianie struktury cząsteczki (wzajemne rozmieszczenie atomów) przy zachowaniu masy cząsteczkowej;
- piroliza, hydroliza, alkoholiza – procesy, w których wyniku z dużych cząsteczek otrzymuje się mniejsze;

- sprzężanie, kondensacja, polimeryzacja – procesy, w których ze związków małowcząsteczkowych otrzymuje się związki średnio- lub wielkocząsteczkowe.

Wyodrębnienie w technologii organicznej procesów jednostkowych pozwala na klasyfikację metod otrzymywania poszczególnych klas związków organicznych.

## II.1. Acylacja

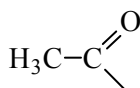
### II.1.1. Wiadomości ogólne

**Acylacja** polega na wprowadzeniu do cząsteczki związku organicznego grupy acylowej – reszty kwasowej powstałej przez odjęcie OH od tlenowego kwasu organicznego lub nieorganicznego. Grupa acylowa zastępuje w związku organicznym atom H, który może być połączony z atomem C, N, O.

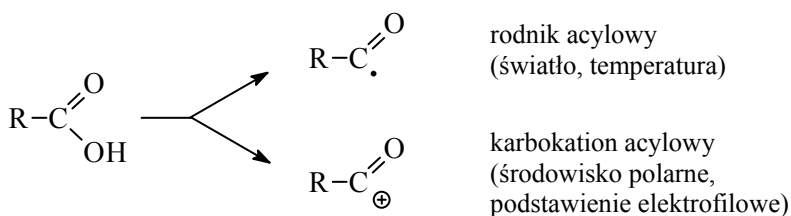
Grupę acylową wprowadza się w celu otrzymania określonego produktu lub na okres przejściowy (głównie acetylowanie), aby zabezpieczyć pewne grupy funkcyjne ( $\text{NH}_2$ , OH) wrażliwe na działanie niektórych reagentów, jak np. mieszanina nitrująca, środki utleniające. W tym drugim przypadku, po zakończeniu właściwej reakcji, przeprowadza się deacetylację poprzez hydrolizę w wodnym roztworze kwasów lub zasad.

Ze względu na pochodzenie grupy acylowej, można wyróżnić acylację przy użyciu kwasu nieorganicznego (np. sulfonowanie, nitrowanie) lub przy użyciu kwasu organicznego (wprowadzenie podstawnika RCO, ArCO). Sulfonowanie i nitrowanie zostanie omówione osobno.

Największe znaczenie przemysłowe ma acetylowanie, czyli wprowadzenie ugrupowania:



W zależności od warunków prowadzenia reakcji, acylowanie może mieć przebieg rodnikowy lub jonowy.



Acylację prowadzi się przy użyciu następujących środków:

- chlorków kwasowych – reakcja zachodzi ilościowo w temperaturze pokojowej, ma burzliwy przebieg na skutek wydzielania się gazowego HCl (aby zapobiec niekorzystnym procesom chlorowania cząsteczek, stosuje się trzeciorzędową aminę jako czynnik wiążący HCl),
- bezwodników kwasowych – reakcja wymaga podwyższonej temperatury i dłuższego czasu,
- kwasów organicznych – stosuje się, gdy acylowanie zachodzi łatwo, lecz reakcja wymaga wielogodzinnego ogrzewania,

- estrów,
- ketenu – energicznego środka acylującego.

Przy użyciu chlorków kwasowych, bezwodników i ketenu nie wydziela się woda, która zmniejsza szybkość i wydajność reakcji. Reakcję acylowania prowadzi się w temperaturze 50–90°C pod ciśnieniem atmosferycznym, często w środowisku rozpuszczalnika organicznego.

W skali technicznej acylację przeprowadza się w reaktorach zaopatrzonych w chłodnicę zwrotną, mieszadło i płaszcz. Reakcja jest egzotermiczna i należy stosować chłodzenie reaktora. Ze względu na agresywność czynników acylujących, aparatura musi być wykonana ze stali kwasoodpornej lub porcelany.

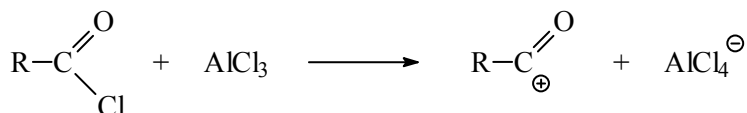
Uwzględniając rodzaj związków poddawanych acylacji, można wyróżnić następujące jej typy:

- C-acylowanie – acylowanie związków aromatycznych w pierścieniu benzenowym, produktami są ketony,
- N-acylowanie – dotyczy związków zawierających grupy NH<sub>2</sub> (aminy alifatyczne i aromatyczne, amidy), produktami są amidy lub imidy,
- acylowanie układów heterocyklicznych,
- O-acylowanie – acylacji poddaje się związki zawierające grupy OH (alkohole lub fenole), produktami są estry (omówione przy estryfikacji).

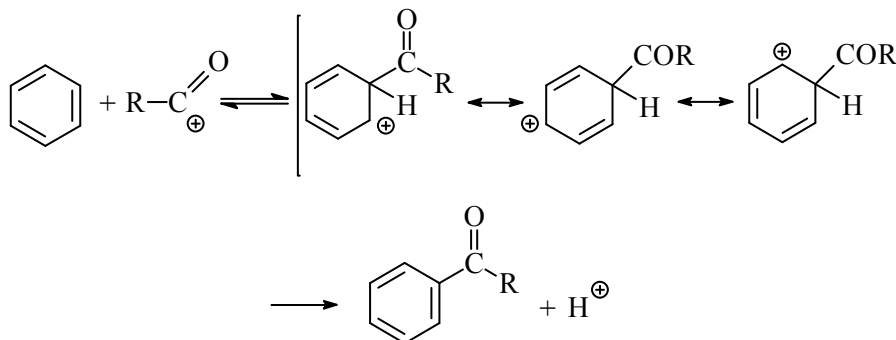
### II.1.2. C-acylowanie

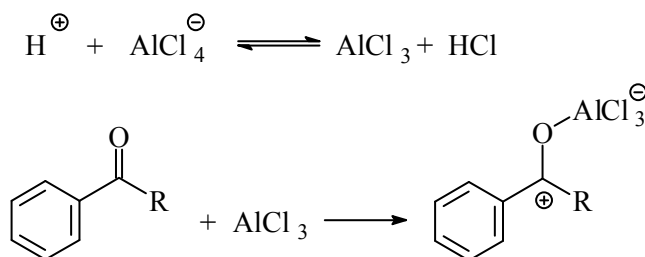
Węglowodory aromatyczne trudno ulegają acylacji. Reakcję taką można prowadzić tylko chlorkami lub bezwodnikami kwasowymi w obecności katalizatora – kwasu Lewisa (związki wykazujące lukę elektronową, np. AlCl<sub>3</sub>). Jest to reakcja typu Friedela-Craftsa. Wymaga całkowicie bezwodnego środowiska.

W I etapie reakcji, w wyniku działania katalizatora na czynnik acylujący, powstają jony acyliowe:



Następnie jony acyliowe, jako czynniki elektrofilowe, atakują pierścień benzenowy:

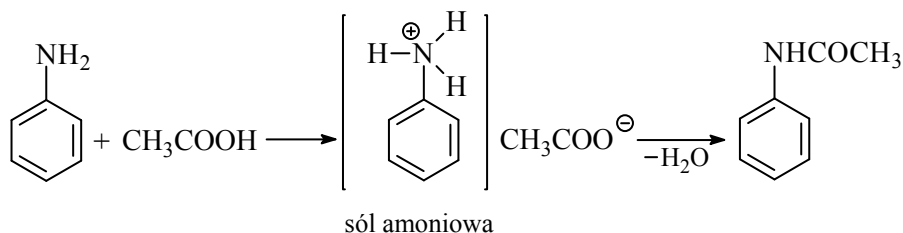




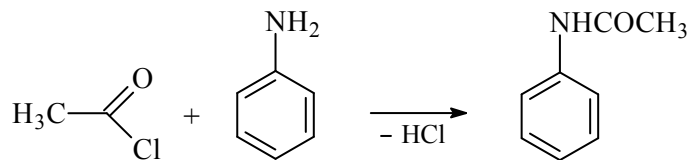
$\text{AlCl}_3$  reaguje z utworzonym ketonem, tworząc trwałe kompleksy, a jego powstanie oznacza unieczynnienie katalizatora, dlatego w reakcjach Friedela-Craftsa należy stosować stechiometryczne ilości chlorku glinu.

### II.1.3. N-acylowanie

Acyłację amin można prowadzić za pomocą kwasu organicznego. W pierwszej fazie następuje zobojętnienie, w wyniku czego tworzy się sól amoniowa. W drugiej fazie następuje rozkład soli amoniowej z utworzeniem acylowej pochodnej aminy, czyli amidu:



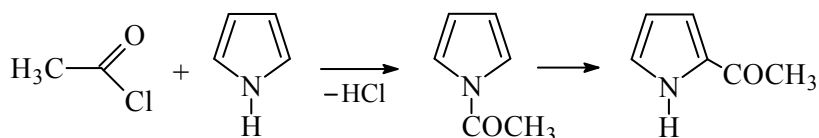
W przypadku użycia chlorku kwasowego reakcja przebiega jednoetapowo – od razu powstaje amid.



Reakcja acylacji amidów ma podobny przebieg.

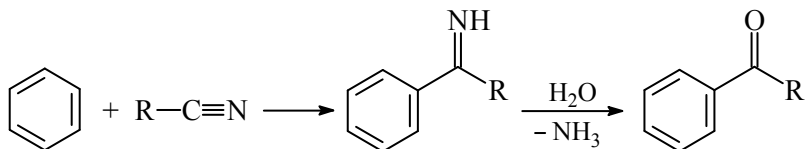
### II.1.4. Acylowanie związków heterocyklicznych

Układy heterocykliczne acyluje się raczej chlorkami kwasowymi. Stosuje się wysokie temperatury i pirydynę, jako środek wiążący chlorowódor.

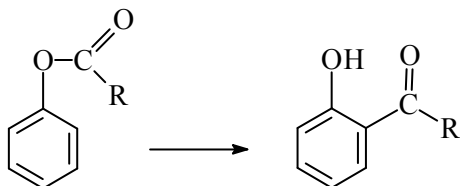


### II.1.5. Szczególne przypadki acylacji

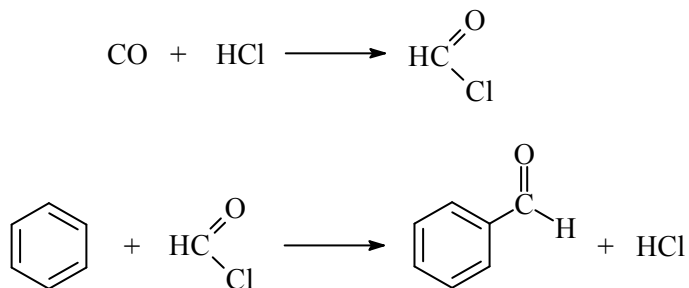
a) reakcja Gattermanna, w której środkami acylującymi są nityryle:



b) przegrupowanie Friesa, gdzie z O-acylofenoli otrzymuje się o- lub p-hydroksyketony:

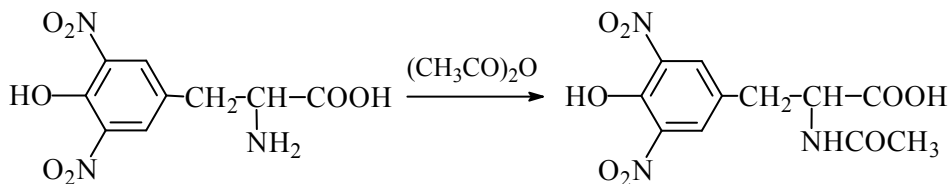


c) reakcja Gattermanna-Kocha – formylowanie związków aromatycznych za pomocą tlenku węgla



### II.1.6. Przykłady z przemysłu farmaceutycznego

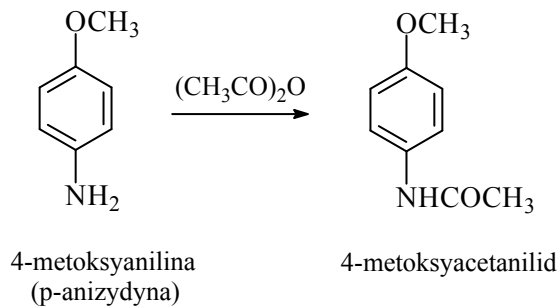
1. Produkcja tyroksyny – N-acetylowanie 3,5-dinitrotyrozyny bezwodnikiem octowym w drugim etapie syntezy:



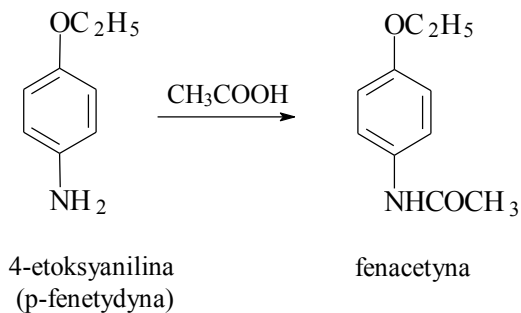
3,5-dinitrotyrozyna

N-acetylo-3,5-dinitrotyrozyna

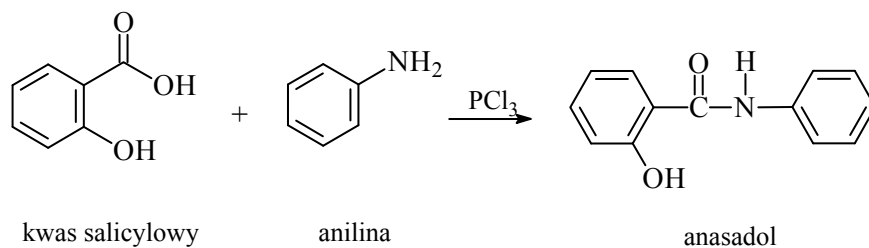
2. Otrzymywanie plazmochiny (leku przeciwmalarycznego) – pierwszy etap syntezy polega na N-acetylowaniu p-anizydyny w celu zabezpieczenia grupy  $\text{NH}_2$  przy nitrowaniu:



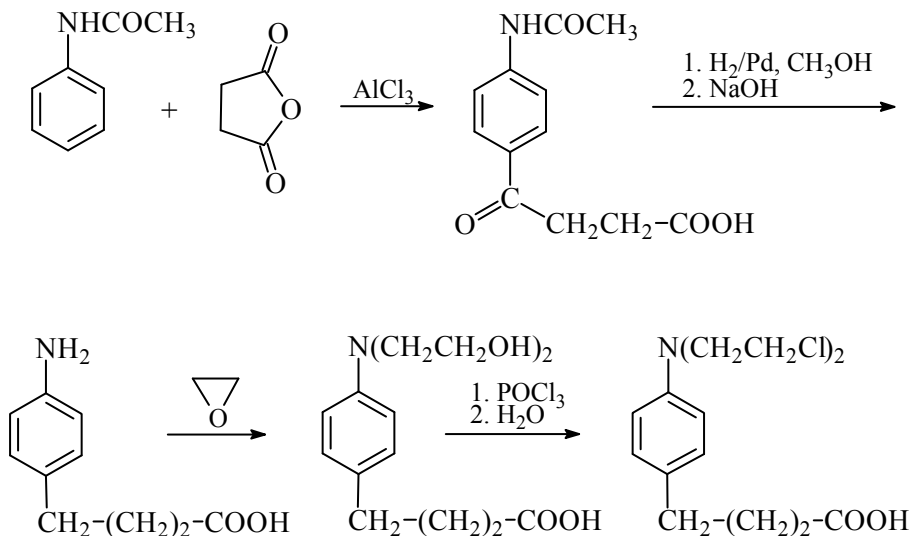
3. Otrzymywanie fenacetyny z p-fenetydyny – czynnikiem acylującym jest bezwodny kwas octowy w roztworze benzenowym:



4. Otrzymywanie anasadolu przez acylowanie aniliny kwasem salicylowym:



5. Otrzymywanie chlorambucylu. Acetanilid ulega reakcji z bezwodnikiem kwasu bursztynowego metodą Friedela-Craftsa:



## II.2. Estryfikacja

### II.2.1. Wiadomości ogólne

**Estryfikacja** to proces jednostkowy, obejmujący całokształt przemysłowych metod syntezy estrów. Estry są rozpowszechnione w przyrodzie jako:

- woski (estry wyższych kwasów tłuszczowych i wyższych alkoholi monowodorotlenowych),
- tłuszcze (estry gliceryny i wyższych kwasów tłuszczowych),
- fosfolipidy (lecytyny, kefaliny).

Wyróżnia się estry będące pochodnymi alkoholi lub fenoli i kwasów organicznych aromatycznych lub alifatycznych oraz estry będące pochodnymi alkoholi i tlenowych kwasów nieorganicznych (siarczany, azotany, fosforany organiczne – stosowane jako pestycydy). W przypadku alkoholi pierwszorzędowych estryfikacja zachodzi najłatwiej, trudniej dla drugorzędowych, a najtrudniej, i z małą wydajnością, dla alkoholi trzeciorzędowych.

Synteza estrów ma bardzo duże znaczenie przemysłowe. Reakcje estryfikacji wykorzystuje się do produkcji związków wielkocząsteczkowych – poliestrów, które służą jako polimery włóknotwórcze i materiały powłokotwórcze (np. octanoftalan celulozy do powlekania tabletek). Na dużą skalę produkuje się tylko ftalan dioktylowy, octan celulozy i tereftalan dimetylu. Inne estry otrzymuje się w zależności od potrzeb.

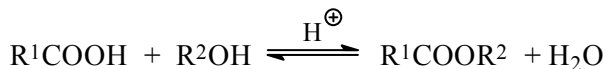
Estry mają zróżnicowaną postać fizyczną: od bardzo lotnych cieczy (mrówczan etylu) do substancji stałych (woski i tłuszcze).

Większość estrów rozpuszcza się bardzo słabo w wodzie, natomiast dobrze w rozpuszczalnikach organicznych. Estry niższych kwasów karboksylowych mają przyjemny zapach i stosuje się je przy produkcji olejków zapachowych.



## II.2.2. Estryfikacja bezpośrednia – przykład O-acylowania

Podstawowa metoda estryfikacji polega na reakcji alkoholi z kwasami:



Reakcja ta jest odwracalna i przebiega do ustalenia stanu równowagi, który charakteryzuje stała K:

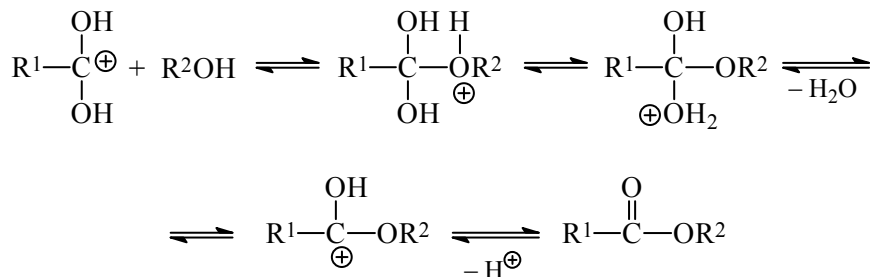
$$K = \frac{[R^1COOR^2] [H_2O]}{[R^1COOH] [R^2OH]}$$

Czas ustalenia się równowagi zależy od temperatury, stężenia substratów i dodatku katalizatora. Szybkość reakcji można zwiększyć poprzez wzrost temperatury i dodatek katalizatora. Aby uzyskać jak największą wydajność produktu, parametry procesu dobiera się tak, aby równowaga była przesunięta jak najbardziej w prawo. W tym celu można stosować nadmiar substratów (alkoholu lub kwasu) lub usuwać ze środowiska produkt reakcji (ester lub wodę). W zależności od właściwości fizycznych substratów i powstałego estru stosuje się różne metody:

- gdy estry są bardzo lotne i mają temperaturę wrzenia niższą od substratów (octan i mrówczan metylu, octan etylu), z mieszaniny reakcyjnej oddestylowuje się ester;
- w przypadku, gdy jeden z substratów jest lotny (najczęściej alkohol) z mieszaniny oddestylowuje się jego azeotrop z wodą, po czym reagent po oddzieleniu od wody zawraca się do procesu;
- gdy jeden z substratów i ester są lotne, oddestylowuje się układy trójskładnikowe azeotrop: woda – alkohol – ester lub woda – kwas – ester;
- gdy substraty i ester są nielotne, z mieszaniny reakcyjnej oddestylowuje się wodę w miarę jej powstawania – proces przeprowadza się pod zmniejszonym ciśnieniem lub przepuszcza się przez mieszaninę reakcyjną gaz obojętny;
- niektóre procesy estryfikacji przeprowadza się w obecności pomocniczych rozpuszczalników (benzen, toluen), dających z wodą azeotropy o niskich temperaturach wrzenia.

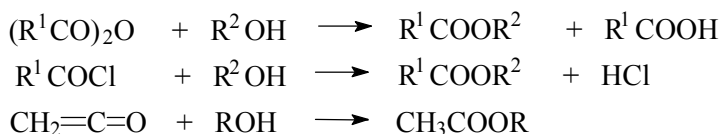
Estryfikację alkoholi kwasami prowadzi się w obecności katalizatorów kwasowych. Działanie ich polega na protonowaniu karbonylowego atomu tlenu grupy C=O, dzięki czemu rośnie podatność związanego z nim atomu węgla na atak nukleofilowy.

Reakcja alkoholu z karbokationem, po której następuje odszczipienie wody, prowadzi do powstania estru:



Najczęściej stosowanymi w estryfikacji katalizatorami są kwasy mineralne ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HBr}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Kwas siarkowy nie tylko dostarcza jonów  $\text{H}^+$ , ale dodany w ilości większej niż 3% wiąże wodę, co zwiększa wydajność reakcji. Jeśli kwas siarkowy wywołuje reakcje uboczne, można go zastąpić aromatycznymi kwasami sulfonowymi, kationitami lub suchym chlorowodorem. Aby usunąć wodę, stosuje się też odwadniające sole nieorganiczne, np. bezwodny  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ .

### II.2.3. Estryfikacja alkoholi bezwodnikami, chlorkami kwasowymi lub ketenem



Reakcje te są nieodwracalne, przebiegają z dobrą wydajnością w stosunkowo niskich temperaturach.

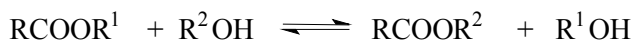
Za pomocą bezwodników estryfikuje się fenole i III-rzędowe alkohole (trudno estryfikują się samym kwasem). Reakcję przyspieszają katalityczne ilości mocnego kwasu (siarkowego (VI)) lub bezwodnego chlorku cynku. Najważniejszym przykładem prowadzenia estryfikacji za pomocą bezwodnika kwasowego jest produkcja octanu celulozy.

Acylowanie alkoholi za pomocą chlorku kwasowego prowadzi się na małą skalę – wadą takiego procesu jest wydzielanie się  $\text{HCl}$ . Chlorki kwasów aromatycznych reagują wolniej niż kwasów alifatycznych, najwolniej reagują chlorki kwasów sulfonowych.

Podczas estryfikacji alkoholi ketenem nie powstają produkty uboczne. Keten reaguje z niższymi alkoholami w temperaturze pokojowej, produktami są octany użytych alkoholi.

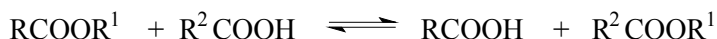
### II.2.4. Transestryfikacja (wymiana estrowa przebiegająca jako alkoholiza lub acydoliza)

Alkoholiza to reakcja estru z alkoholem, podczas której – na skutek działania alkoholu – w estrze następuje wymiana grupy alkoksylowej na inną grupę alkoksylową:



Jest to reakcja odwracalna, przebiegająca do końca, gdy jeden z produktów jest usunięty z mieszaniny reakcyjnej. Przyspieszają ją katalizatory o charakterze zasadowym (alkoholany metali alkalicznych). Wymagane jest całkowicie bezwodne środowisko reakcji. Niewielką ilość metalicznego sodu rozpuszcza się w alkoholu i tak przygotowany roztwór ogrzewa się z estrem. W ten sposób na skalę przemysłową otrzymuje się tereftalan di- $\beta$ -hydroksyetylenowy z tereftalanu dimetylowego w reakcji z glikolem etylenowym, alkohol poliwinylowy z polioctanu winylu, gliceryny i mieszaniny wyższych kwasów tłuszczowych z tłuszczów poddawanych alkoholizie. Estry te są potem przerabiane w procesie redukcji na wyższe alkohole tłuszczowe.

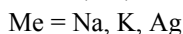
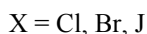
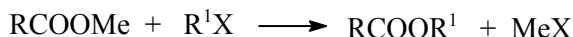
Acydoliza to reakcja estru z kwasem, podczas której w estrze następuje wymiana reszt kwasowych:



Reakcja jest odwracalna, lecz można ją przeprowadzić do końca, gdy kwas powstały w reakcji jest lotny i daje się usunąć z mieszaniny reakcyjnej, np. przez destylację. Szybkość reakcji wzrasta dzięki ogrzewaniu i obecności katalizatora ( $\text{BF}_3$ , sole Hg – katalizatory kwaśne działają słabo, a zasadowe nie działają w ogóle). Acydoliza ma mniejsze znaczenie przemysłowe. Stosuje się ją w przemyśle spożywczym do poprawy jakości olejów.

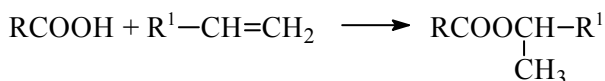
### II.2.5. Inne przemysłowe metody syntezy estrów

a) Z soli kwasów karboksylowych i halogenków alkilowych uzyskuje się estry kwasów, które trudno ulegają bezpośredniej estryfikacji:



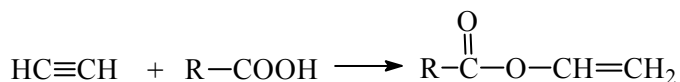
Najlepiej reagują sole srebrne i jodki alkilowe. Modyfikacją tej metody jest stosowanie siarczanów alkilowych zamiast chlorowcopochodnych alkilowych. Reakcję prowadzi się w benzenie, chloroformie lub toluenie, albo działa się na sole bezpośrednio nadmiarem jodku alkilowego. Metodą tą otrzymuje się octan benzylu (z chlorku benzylu i octanu sodu), octan amylu, benzoetan benzylu i estry wyższych kwasów tłuszczowych i wyższych alkoholi. Katalizatorami są aminy: pirydyna, cholina.

b) Z kwasów karboksylowych i alkenów, używając jako katalizatora kwasu siarkowego:



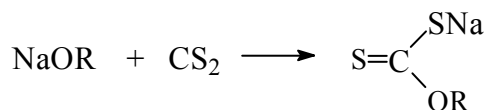
Reakcja jest odwracalna i egzotermiczna. Łatwiej przebiega z wyższymi alkenami niż z etylenem. Przyłączenie może zachodzić w temperaturze pokojowej lub podwyższonej. Korzystny wpływ ma wzrost ciśnienia. Metoda ta stosowana jest do otrzymywania estrów alkilosiarkowych.

c) Z acetyleny i kwasów karboksylowych:



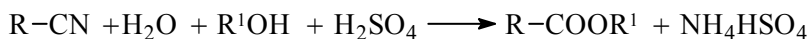
Reakcja ta była podstawową metodą otrzymywania octanu winylu (przyłączenie kwasu octowego do acetyleny) i propionianu winylu (przyłączenie kwasu propionowego do acetyleny).

d) Przyłączenie disiarczku węgla do alkoholów – w wyniku powstaje ksantogenu, np. sodu:

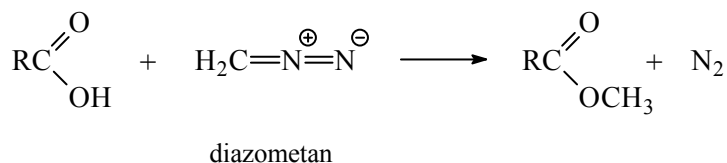


Reakcję tę stosuje się przy otrzymywaniu ksantogenu celulozy, który jest półproduktem do otrzymywania jedwabiu wiskozowego.

e) Z nityli przy działaniu alkoholi i kwasu siarkowego:

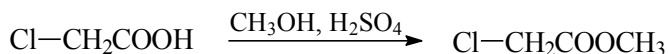


f) Z diazometanu, który z kwasami daje estry metylowe:

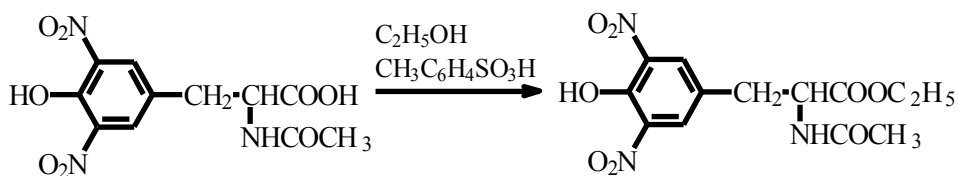


## II.2.6. Przykłady z przemysłu farmaceutycznego

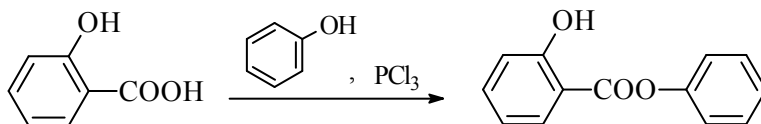
1. Produkcja pirydoksyny (składnik witaminy B<sub>6</sub>) – estryfikacja kwasu chlorooctowego metanolem w pierwszym etapie syntezy:



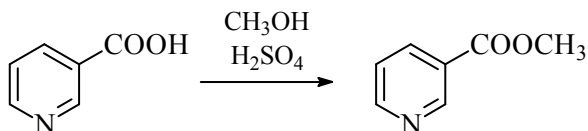
2. Produkcja tyroksyny – estryfikacja N-acetylo-3,5-dinitrotyrozyny etanolem w roztworze kwasu p-toluenosulfonowego:



3. Otrzymywanie salolu z kwasu salicylowego i fenolu:



4. Produkcja niacyny – estryfikacja kwasu nikotynowego metanolem w pierwszym etapie syntezy:



## II.3. Nitrowanie

### II.3.1. Wiadomości ogólne

**Nitrowanie** polega na wprowadzeniu do cząsteczki jednej lub kilku grup nitrowych  $-\text{NO}_2$ . Właściwe związki nitrowe to te, w których grupa nitrowa jest połączona bezpośrednio z atomem węgla ( $-\text{C}-\text{NO}_2$ ). Grupa nitrowa może łączyć się z atomem węgla poprzez atom tlenu ( $-\text{C}-\text{O}-\text{NO}_2$ ) – są to estry kwasu azotowego i alkoholi, w przemyśle zwane również nitrozwiązkami (np. nitrogliceryna). Grupę nitrową wprowadza się do cząsteczki w miejsce atomu wodoru lub – rzadziej – innej grupy funkcyjnej, np.  $\text{SO}_3\text{H}$ .

Do środków nitrujących należą:

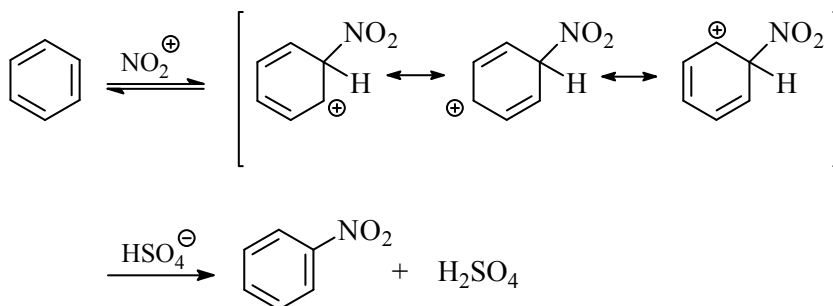
- mieszanina nitrująca, w skład której wchodzi: stężony kwas azotowy (V), stężony kwas siarkowy (VI) lub oleum i woda,
- rozcieńczony kwas azotowy,
- pochodne kwasu azotowego (V) lub azotowego (III), np. azotan (V) srebra, azotan (III) potasu.

### II.3.2. Nitrowanie związków aromatycznych

Do nitrowania węglowodorów aromatycznych używa się mieszaniny nitrującej, w której obecność kwasu siarkowego (VI) jest konieczna do wytworzenia jonów nitroilowych (nitroniowych)  $\text{NO}_2^+$  – właściwego czynnika nitrującego:



Reakcja przebiega zgodnie z mechanizmem substytucji elektrofilowej  $\text{S}_{\text{E}}$ :



Wprowadzenie grupy nitrowej do pierścienia dezaktywuje go i utrudnia wprowadzenie innych podstawników (podstawnik elektroakceptorowy).

Łatwość nitrowania maleje w następujących szeregach:

fenol > toluen > benzen > chlorobenzen > nitrobenzen,  
naftalen > benzen > antracen.

Sam stężony kwas azotowy (V) jest mało przydatny w procesie nitrowania związków aromatycznych, gdyż – w obecności nawet małej ilości wody – dysocjuje, z wytworzeniem jonów azotanowych (V), które są w tym przypadku niepożądane, ponieważ mają właściwości utleniające i mogą powodować reakcje uboczne oraz korozję aparatury. Dysocjacja z wytworzeniem jonów azotanowych ustaje w obecności kwasu siarkowego (VI) o stężeniu ok. 65%. Większe stężenie kwasu siarkowego powoduje zwiększenie stopnia jonizacji  $\text{HNO}_3$  w kierunku tworzenia jonów  $\text{NO}_2^+$ . W 94% roztworze  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kwas azotowy (V) jest prawie całkowicie zdysocjowany na jony nitroilowe (nitroniowe).

Kwas siarkowy (VI) w procesie nitrowania spełnia jeszcze inne ważne funkcje:

- pozwala na skuteczne nitrowanie w reakcjach, w których woda wydziela się jako produkt uboczny, ponieważ w mieszaninie nitrującej, zawierającej kwas siarkowy tworzą się jony nitroilowe  $\text{NO}_2^+$ , nawet przy dużym stężeniu wody,
- pochłania wydzielające się ciepło,
- zapobiega ubocznym reakcjom utleniania,
- polepsza kinetykę procesu, ponieważ mieszanina zawierająca kwas azotowy (V) i siarkowy (VI) lepiej rozpuszcza szereg związków aromatycznych niż sam kwas azotowy.

Nitrowanie związków aromatycznych przeprowadza się w fazie ciekłej. Reakcja przebiega szybko w stosunkowo niskich temperaturach. W zależności od rodzaju związku nitrowanego i od ilości wprowadzanych grup nitrowych, temperatura procesu mieści się w granicach 40–100°C. Reakcja jest praktycznie nieodwracalna – kwas azotowy może być zużyty prawie całkowicie pod warunkiem, że stężenie kwasu siarkowego w mieszaninie ponitracyjnej nie spadnie poniżej pewnej minimalnej wartości.

Reakcję nitrowania związków aromatycznych charakteryzują dwie wielkości:

- współczynnik odwodnienia WO – wyraża najmniejszy dopuszczalny stosunek ilościowy kwasu siarkowego do ilości wody:

$$\text{WO} = \frac{[\text{H}_2\text{SO}_4]}{[\text{H}_2\text{O}]_r + [\text{H}_2\text{O}]_w}$$

$[\text{H}_2\text{O}]_w$  – % wag. wody wprowadzanej z kwasami,

$[\text{H}_2\text{O}]_r$  – % wag. wody powstającej w reakcji nitrowania,

$[\text{H}_2\text{SO}_4]$  – zawartość kwasu siarkowego wprowadzanego do reakcji w % wag.

WO dla każdej reakcji nitrowania ustala się doświadczalnie. Przy syntezie mononitropochodnych ma on wartość 2–3,5; dla wielonitropochodnych – wyższą.

- współczynnik aktywności nitrowania WAN – wyraża graniczne najmniejsze dopuszczalne stężenie kwasu siarkowego w mieszaninie ponitracyjnej:

$$\text{WAN} = \frac{[\text{H}_2\text{SO}_4]}{[\text{HNO}_3]}$$

$[\text{H}_2\text{SO}_4]$ ,  $[\text{HNO}_3]$  – zawartość kwasów w mieszaninie nitrującej w % wag.

Szybkość reakcji nitrowania zależy od stężenia kwasu siarkowego (VI) w mieszaninie nitrującej. Mniejsze znaczenie ma stężenie kwasu azotowego (V). Wartości WAN niewiele zmieniają się podczas procesu, mimo wyczerpania  $\text{HNO}_3$ . Mono- i wielonitropochodne mają zróżnicowane wartości WAN, co pozwala na selektywne prowadzenie procesu.

Mieszaninę nitrującą przyrządza się z kwasu azotowego (V) o stężeniu 60% oraz stężonego kwasu siarkowego (VI) (lub oleum). Przy otrzymywaniu mononitropochodnej do mieszaniny nitrującej dodaje się wodę. Skład mieszaniny nitrującej jest uzależniony od rodzaju związku poddawanego nitrowaniu i od liczby grup nitrowych, które mają być do niego wprowadzone. Wielonitrowanie związków aromatycznych przeprowadza się w nieco wyższych temperaturach i za pomocą bardziej stężonych mieszanin nitrujących niż mononitrowanie.

Nitrowanie związków aromatycznych prowadzi się w warunkach możliwie najłagodniejszych (jeśli chodzi o temperaturę i skład mieszaniny nitrującej). Wynika to ze skłonności wielu nitrozwiązków do rozkładu wybuchowego oraz możliwości utlenienia substancji nitrowanej za pomocą kwasu azotowego (V) w zbyt wysokiej temperaturze. Stosuje się niewielki nadmiar kwasu azotowego w stosunku do jego ilości stechiometrycznej (2–20%). Nitrowanie związków aromatycznych prowadzi się w sposób okresowy (nitrator), półciągły (bateria reaktorów) lub ciągły.

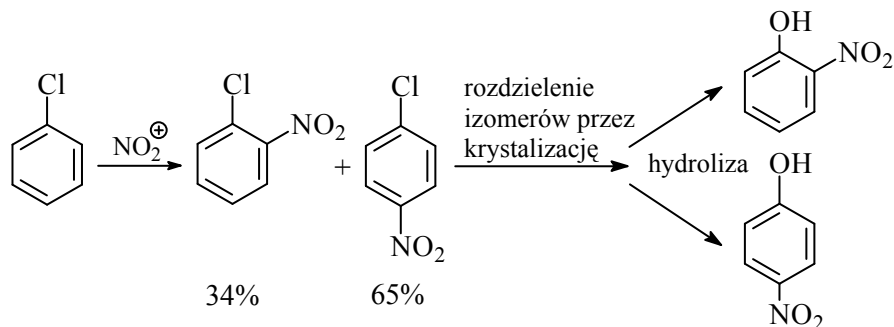
Podstawowe aparaty w procesie nitrowania to nitratory. Nitrator jest zamkniętym reaktorem cylindrycznym zaopatrzonym w mieszaninę, chłodnice wewnętrzne i płaszcz zewnętrzny. Chłodzenie jest konieczne ze względu na egzotermiczność procesu – brak odprowadzenia ciepła może doprowadzić do wybuchowego rozkładu produktów nitrowania. Medium chłodzącym jest woda lub solanka. Ze względu na agresywność substratów biorących udział w procesie, nitratory wykonuje się z odpornej stali chromoniklowej.

W przypadku otrzymywania związków zawierających wiele grup nitrowych w cząsteczce, najczęściej prowadzi się proces stopniowany z zastosowaniem kaskady reaktorów, do których wprowadza się przeciwnieprądowo mieszaninę nitrującą i związek poddawany nitrowaniu.

W procesie nitrowania obok nitrozwiązku otrzymuje się, jako produkty uboczne, kwas ponitracyjny, zawierający cały wprowadzony kwas siarkowy (VI), wodę wprowadzoną z kwasami, pozostałości kwasu azotowego (V) i tlenki azotu. Kwasy ponitracyjne neutralizuje się przez denitrację (odparowanie kwasu azotowego i tlenków azotu) i zateżenie.

### II.3.3. Nitrowanie fenoli i amin aromatycznych

Fenol ulega bardzo łatwo nitrowaniu nawet rozcieńczonym kwasem azotowym, ale powstające izomery p- i o-nitrofenolu jest trudno rozdzielić. Nitrofenole w skali przemysłowej otrzymuje się z chlorobenzenu przez hydrolizę:



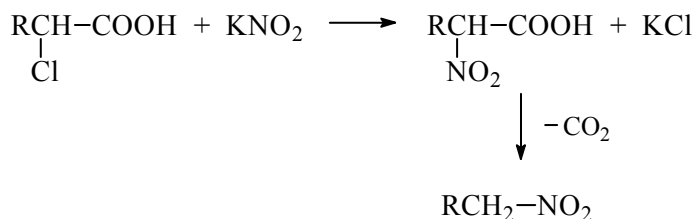
Izomer *orto* nitrofenolu przerabiany jest na gwajakol i 8-hydroksychinolinę, natomiast izomer *para* stanowi półprodukt do produkcji fenacetyny i paracetamolu. Analogicznie z chlorobenzenu otrzymuje się dinitro- i 2,4,6-trinitrofenol (kwas pikrynowy), który jest materiałem wybuchowym o silnie korodujących właściwościach.

Nitrowanie amin aromatycznych jest możliwe po zabezpieczeniu grupy aminowej przez acetylowanie.

### II.3.4. Nitrowanie alkanów

W laboratorium alifatyczne związki nitrowe otrzymuje się przez działanie  $\text{AgNO}_2$  lub  $\text{KNO}_2$  na chlorowcoalkany (najczęściej jodki alkilowe). Powstają wtedy dwie izomeryczne substancje: nitroalkany i estry kwasu azotowego (III). Przyjmuje się, że reakcja azotanu (III) z jodkiem alkilowym prowadzi częściowo do produktu bezpośredniego podstawienia (ester kwasu azotowego (III)), a częściowo reakcja zachodzi przez początkowo powstały produkt addycji, dając związek nitrowy.

Drugą metodą laboratoryjną jest działanie azotanu (III) potasu na alifatyczne 2-chlorowcokwasy:



Jako surowce w przemyśle wykorzystywane są metan i jego homologi  $\text{C}_2\text{-C}_4$  oraz węglowodory, które mają postać cieczy. Proces nitrowania alkanów, w zależności od masy cząsteczkowej, prowadzi się w fazie gazowej ( $\text{C}_1\text{-C}_4$ ) lub ciekłej ( $\text{C}_5$  lub więcej). Jako czynnika nitrującego używa się kwasu azotowego (V) w postaci cieczy lub par albo ditlenku azotu.

Nitrowanie w fazie gazowej przeprowadza się pod nieznacznie zwiększonym ciśnieniem. Stosuje się 5–10-krotny nadmiar węglowodoru oraz krótkotrwałe kontaktowanie się reagentów ( $t < 0,2\text{ s}$ ), co zapobiega rozkładowi nitrozwiązków nietrwałych w wysokiej temperaturze. Reakcja zachodzi według mechanizmu rodnikowego. Łańcuchową reakcję zapoczątkowuje rozkład kwasu azotowego (V) na rodniki:



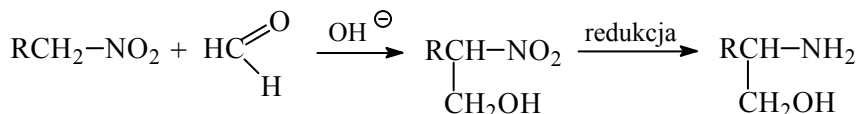
Podczas nitrowania alkanów w fazie gazowej, oprócz nitropochodnych wyjściowych węglowodorów, w wyniku reakcji ubocznych powstają również nitropochodne o krótszych łańcuchach.

Nitrowanie w fazie ciekłej węglowodorów  $\text{C}_{11}\text{-C}_{16}$  przeprowadza się pod normalnym ciśnieniem w temperaturze nieco niższej niż temperatura wrzenia surowca. Czynnikiem nitrującym są pary kwasu azotowego (V). Węglowodory  $\text{C}_5\text{-C}_{10}$  nitruje się inaczej, gdyż mają zbyt niskie temperatury wrzenia. Niekorzystna jest również reakcja w fazie gazowej, ponieważ zachodzi piroliza.

Nitroalkany są cieczami trującymi. Wykorzystuje się je jako rozpuszczalniki farb, lakierów i związków wielkocząsteczkowych. Pierwszo- i drugorzędowe nitroalkany ulegają



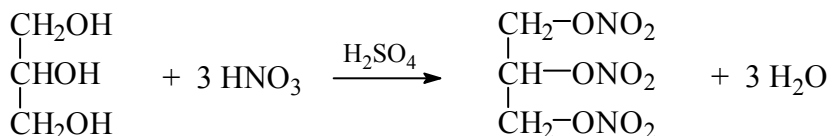
kondensacji z aldehydami w środowisku rozcieńczonego ługu, dając nitroalkohole, po których redukcji otrzymuje się aminoalkohole:



### II.3.5. Nitrowanie alkoholi wielowodorotlenowych (O-nitrowanie)

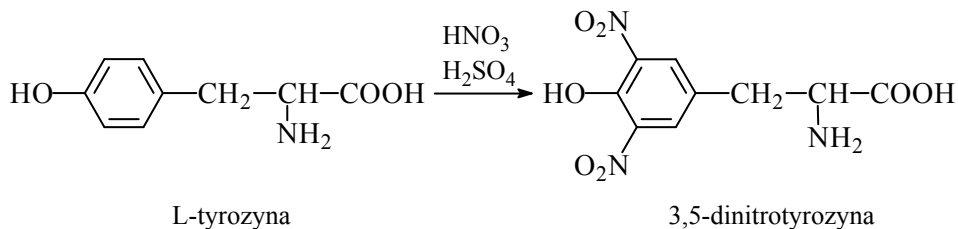
Alkohole wielowodorotlenowe i polialkohole ulegają nitrowaniu z wytworzeniem azotanów tych alkoholi. Produkty te wykorzystuje się jako leki i materiały wybuchowe.

Nitrogliceryna powstaje w reakcji gliceryny z mieszaniną nitrującą (45 HNO<sub>3</sub> + 55 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) w temperaturze 10–20°C. Należy intensywnie mieszać i chłodzić środowisko reakcji – jest to jeden z najbardziej niebezpiecznych procesów organicznych:

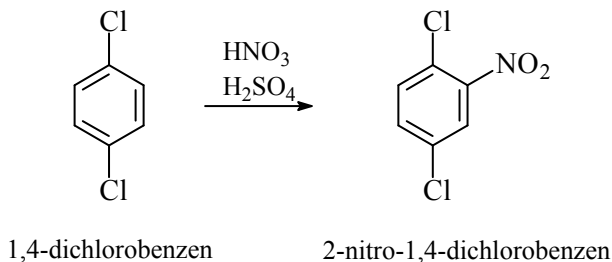


### II.3.6. Przykłady z przemysłu farmaceutycznego

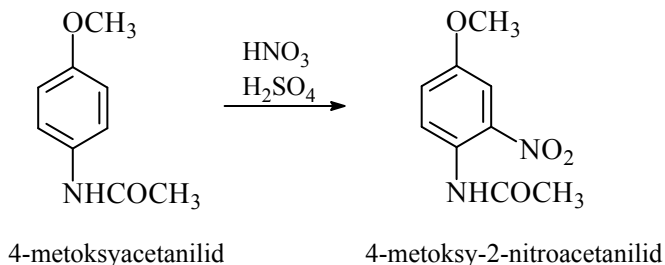
1. Pierwszy etap produkcji tyroksyny z L-tyrozyny:



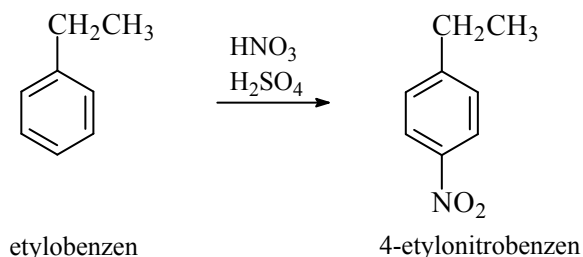
2. Pierwszy etap syntezy klio chinolu (według Turskiego i Lepacha) – nitrowanie p-dichlorobenzenu:



3. Otrzymywanie plazmochiny – drugi etap polega na nitrowaniu acetylowej pochodnej p-anizydy:



4. Pierwszy etap jednej z metod produkcji chloramfenikolu:



## II.4. Sulfonowanie i siarczanowanie

### II.4.1. Wiadomości ogólne

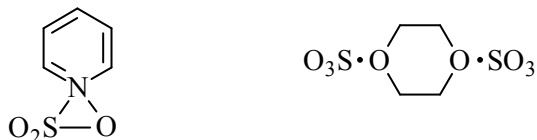
**Sulfonowanie** polega na wprowadzeniu do cząsteczki związku organicznego w miejsce atomu wodoru grupy sulfonowej ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ). Z C-sulfonowaniem mamy do czynienia, gdy grupa sulfonowa łączy się w cząsteczce bezpośrednio z atomem węgla. Poddaje się mu związki aromatyczne (benzen i jego homologi), związki o pierścieniach skondensowanych (naftalen, antrachinon) i ich pochodne, wyższe n-alkany. Produktami są kwasy alkilo- lub arylo-sulfonowe. Do procesu C-sulfonowania zalicza się również chlorosulfonowanie, które polega na wprowadzeniu do cząsteczki organicznej grupy chlorosulfonowej  $-\text{SO}_2\text{Cl}$ .

Jeżeli grupa  $-\text{SO}_3\text{H}$  połączona jest z atomem węgla poprzez tlen, to mówimy o O-sulfonowaniu, czyli siarczanowaniu. Siarczanowaniu poddaje się metanol i etanol, wyższe alkohole tłuszczowe I- i II-rzędowe, alkeny  $\text{C}_{10}\text{--}\text{C}_{18}$ , oleje i tłuszcze zawierające wiązania podwójne w reszcie kwasowej glicerydów. W wyniku tego procesu otrzymano pierwsze związki powierzchniowo czynne.

Grupa sulfonowa wprowadzona do związku organicznego nadaje mu właściwości kwasowe – związek taki może tworzyć z alkaliimi sole. Grupa  $-\text{SO}_3\text{H}$  jest silnie polarna i wykazuje dużą moc kwasową ( $\text{pK}_a < 1$ ). Sulfonowanie związków przeprowadza się w celu przeprowadzenia związków nierozpuszczalnych w wodzie w związki rozpuszczalne – nadaje się im w ten sposób właściwości hydrofilowe i zwiększa powinowactwo do wody. Pochodne sulfonowe są wykorzystywane do produkcji związków powierzchniowo czynnych (środki piorące, zwilżające, emulgatory), barwników i garbników. Reakcje sulfonowania służą również do wytwarzania syntetycznych materiałów jonowymiennych o charakterze kationitów (zmiękczanie i demineralizacja wody).

Środki sulfonujące:

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  o stężeniu 65–100% ( $\text{SO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ),
- oleum o stężeniu 18–20% i 60–65% ( $\text{SO}_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ ),
- tlenek siarki ( $\text{SO}_3$ ),
- kwas chlorosulfonowy (VI)  $\text{ClSO}_3\text{H}$  ( $\text{SO}_3 \cdot \text{HCl}$ ),
- kompleksy  $\text{SO}_3$  z substancjami organicznymi ( $\text{SO}_3 \cdot$  pirydyna,  $\text{SO}_3 \cdot$  dioksan):



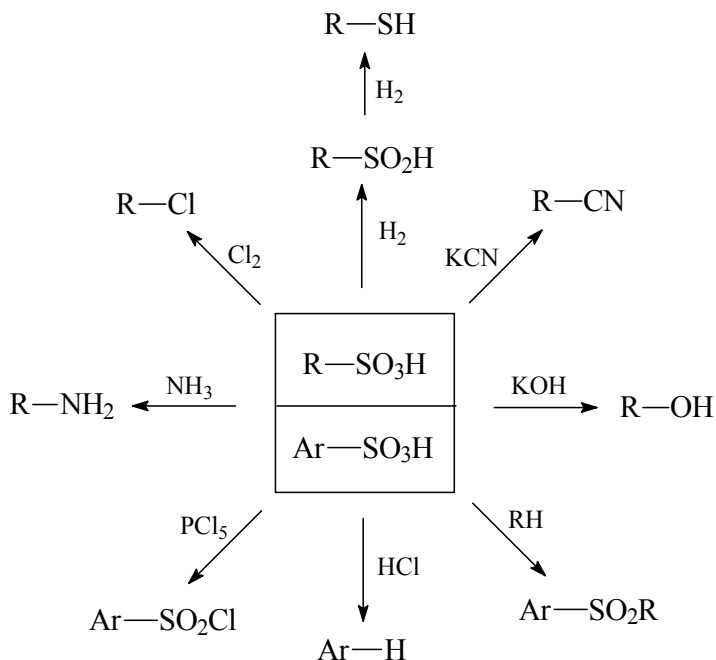
$\text{SO}_3$  jest podstawowym składnikiem wszystkich środków sulfonujących. Stężenie  $\text{SO}_3$  w środkach sulfonujących decyduje o ich mocy. Łagodny środek to  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o stęż. 65–90%; średni to  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o stęż. 90%; a najmocniejsze środki sulfonujące to oleum i  $\text{SO}_3$ .

Sulfonowanie związków aromatycznych oraz siarczanowanie wyższych alkoholi, alkenów, olejów i tłuszczów prowadzi się, działając na substraty stężonym kwasem siarkowym (VI), oleum lub tlenkiem siarki.

Wyższe n-alkany sulfonuje się, stosując ditlenek siarki w mieszaninie z chlorem lub tlenem.

#### II.4.2. Sulfonowanie związków aromatycznych

Związki aromatyczne stanowią najważniejszą grupę poddawaną sulfonowaniu w procesach przemysłowych, przy czym tylko część kwasów arylosulfonowych stanowi produkt finalny, gdyż grupa  $\text{SO}_3\text{H}$  daje się łatwo wymienić na inne podstawniki:



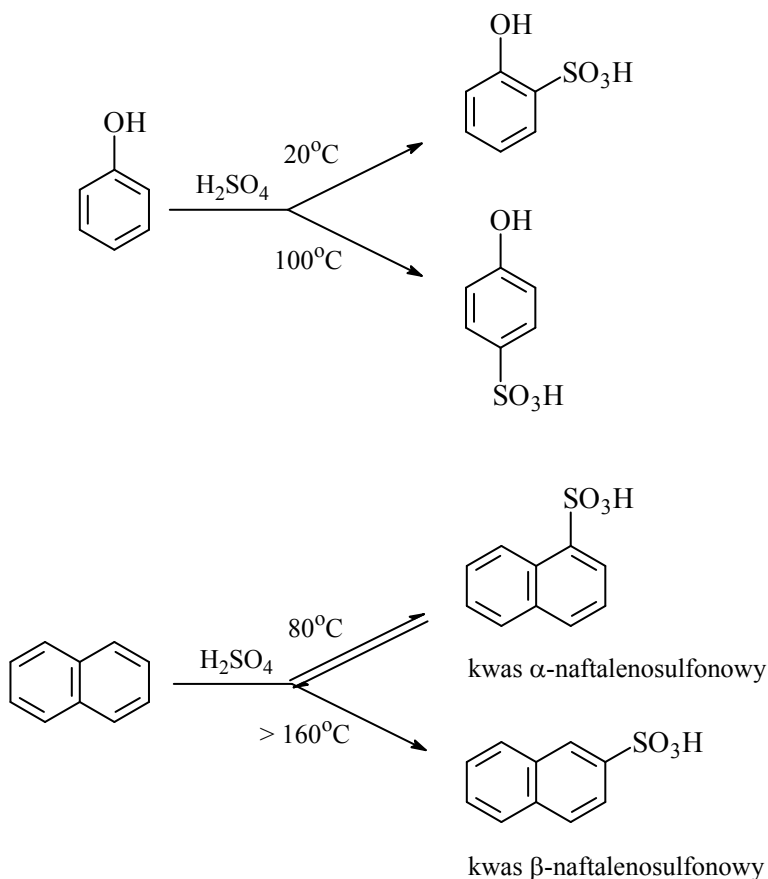
Schemat 1. Zastosowanie związków sulfonowych w procesach przemysłowych

Możliwość sulfonowania związków aromatycznych zależy od ich budowy chemicznej. Najłatwiej sulfonuje się pochodne aromatyczne zawierające podstawniki I rodzaju ( $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ , grupa alkilowa, alkoksylowa; przy czym odpowiednie pochodne naftalenu sulfonuje się łatwiej niż benzenu). Podstawniki te kierują grupę sulfonową w położenie 2- i 4-. Trudniej sulfonuje się węglowodory aromatyczne nie zawierające podstawników, przy czym w grupie tej najłatwiej sulfonuje się antracen, trudniej naftalen, a najtrudniej benzen. Najtrudniej sulfonowaniu ulegają związki aromatyczne zawierające podstawniki II rodzaju ( $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ). Podstawniki te kierują grupę sulfonową w położenie 3-. Aromatyczne związki posiadające dwie lub trzy takie grupy sulfonuje się bardzo trudno albo wcale.

Przebieg reakcji sulfonowania zależy od:

- rodzaju stosowanego środka sulfonującego,
- jego stężenia,
- stosunku ilościowego względem związku sulfonowanego.

Wzrost temperatury powoduje zwiększenie szybkości reakcji, ale przekroczenie granicy dozwolonej prowadzi do reakcji ubocznych. Przestrzeganie granic temperatury jest ważne również dlatego, że w zależności od niej grupa  $-\text{SO}_3\text{H}$  może zajmować różne położenie w pierścieniu aromatycznym. Wzrost temperatury powoduje powstanie izomeru o większej trwałości (izomer *para*). Podczas sulfonowania istnieje możliwość przekształcenia się izomerów. Sulfonując ten sam związek w różnych temperaturach, można otrzymać kwasy sulfonowe o różnym usytuowaniu grupy  $-\text{SO}_3\text{H}$ :



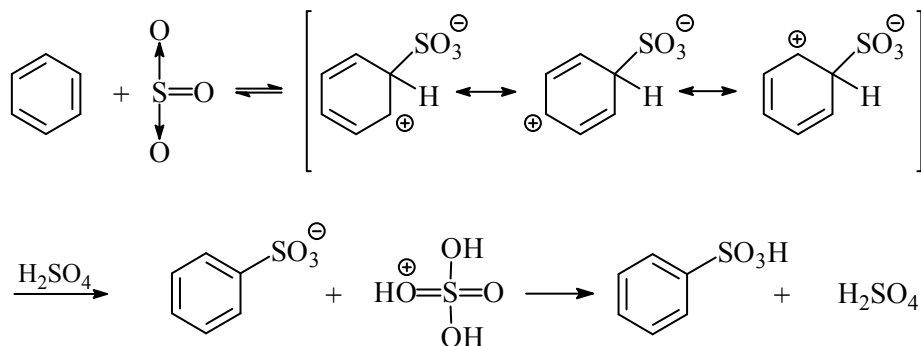
Większość reakcji sulfonowania związków aromatycznych nie wymaga użycia katalizatorów (wyjątkiem jest antrachinon). Katalizatorami sulfonowania są związki rtęci:  $\text{HgSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , rtęć metaliczna.

Środowisko reakcji to zwykle właściwy środek sulfonujący (kwas siarkowy (VI), oleum) lub rozpuszczalniki obojętne (chlorowcowęglowodory). Dodanie rozpuszczalnika ułatwia mieszanie i zapewnia równomierny przebieg reakcji. Obecność tego typu rozpuszczalników łagodzi działanie  $\text{SO}_3$ .

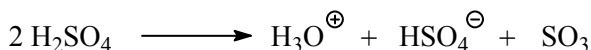
Proces sulfonowania przeprowadza się w sulfonatorach (metoda periodyczna) lub w półkowych wieżach sulfonujących metodą ciągłą. Temperatura procesu:  $0\text{--}180^\circ\text{C}$ . Proces prowadzi się pod normalnym lub nieco zwiększonym ciśnieniem. W wyższych temperaturach sulfonuje się kwasem siarkowym (VI), w niższych –  $\text{SO}_3$  i oleum. Aparatura do procesu sulfonowania wymaga materiału odpornego na korozję oraz agresywne działanie środowiska reakcji.

a) Sulfonowanie kwasem siarkowym (VI)

Sulfonowanie kwasem siarkowym (VI) ma charakter substytucji elektrofilowej:



przy czym czynnikiem aktywnym jest  $\text{SO}_3$ , powstający w reakcji:



Podczas sulfonowania prowadzonego za pomocą kwasu siarkowego (VI) w środowisku reakcyjnym powstaje woda i, w miarę przebiegu reakcji, kwas siarkowy ulega rozcieńczeniu. W wyniku tego zmniejsza się szybkość reakcji do całkowitego jej zaniku przy pewnym granicznym stężeniu  $\text{SO}_3 - \pi$ . Wartość  $\pi$  jest wielkością charakterystyczną dla każdej sulfonowanej substancji. Aby stężenie kwasu siarkowego w trakcie reakcji było cały czas wyższe od granicznego, stosuje się nadmiar kwasu siarkowego o odpowiednio wysokim stężeniu.

Obecność wody w mieszaninie sulfonującej może powodować desulfonację, która rozpoczyna się w momencie, gdy stężenie  $\text{SO}_3$  jest mniejsze od  $\pi$ . Gdy wartość  $\pi$  dla danego procesu przewyższa stężenie  $\text{SO}_3$  w 98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , to jako środek sulfonujący może być użyte tylko oleum lub tritlenek siarki.

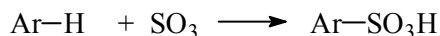
Aby uniknąć dużego nadmiaru środka sulfonującego, zapobiega się rozcieńczeniu środowiska reakcji przez:

- destylację azeotropową ze związkiem poddawanym sulfonowaniu (gdy jest on lotny z parą wodną) – środek sulfonowany oddestylowuje się wyłącznie z wodą reakcyjną i po jej oddzieleniu czynnik ten zawraca się do środowiska reakcji, dzięki czemu stężenie kwasu siarkowego pozostaje bez zmian;
- dodanie do środowiska reakcyjnego rozpuszczalnika organicznego tworzącego z wodą azeotrop.

Wyodrębnienie kwasów sulfonowych z mieszaniny reakcyjnej:

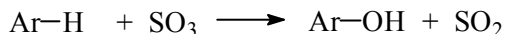
- Rozcieńczenie wodą – w ten sposób wyodrębnia się produkty reakcji sulfonowania trudno rozpuszczalne w rozcieńczonym kwasie siarkowym (VI). Wykorzystuje się tu tę właściwość, że niektóre kwasy sulfonowe są trudno rozpuszczalne w 50–80% kwasie siarkowym. Kwas rozcieńcza się wodą, odsącza wytrącony produkt, a pozostały kwas siarkowy zateża w wyparkach. Tak wyodrębnia się kwas p-toluenosulfonowy, pochodne chlorosulfonowe związków aromatycznych.
- Wysalanie – dobrze rozpuszczalne kwasy sulfonowe wydziela się z mieszaniny reakcyjnej jako sole. Rozcieńczone wodą środowisko reakcyjne nasycza się solą (np. NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Powstają sole sodowe kwasów sulfonowych, które, jako mniej rozpuszczalne od wolnych kwasów, wydzielają się w postaci osadu. Metodą tą wydziela się sulfonowe pochodne nitrobenzenu, naftalenu i antrachinonu.
- Zobojeźnianie wapnem – jeżeli sole sodowe kwasów sulfonowych są dobrze rozpuszczalne w wodzie, wówczas stosuje się mleko wapienne, celem przeprowadzenia nadmiaru kwasu siarkowego w trudno rozpuszczalny siarczan wapnia. W metodzie tej wykorzystuje się lepszą rozpuszczalność soli wapniowych kwasów sulfonowych w porównaniu z siarczanem wapnia. Po oddzieleniu CaSO<sub>4</sub> przesącz zadaje się sodą lub Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, celem przeprowadzenia soli wapniowych kwasów sulfonowych w sole sodowe. Tak wyodrębnia się sól sodową kwasu benzenosulfonowego.

#### b) Sulfonowanie tritlenkiem siarki

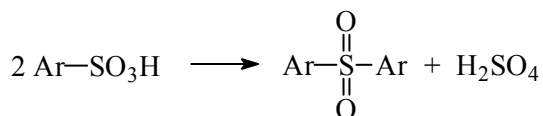


W reakcji nie wydziela się woda. Reakcja jest nieodwracalna. Tritlenek siarki umożliwia całkowite wykorzystanie substancji sulfonującej. SO<sub>3</sub> w środowisku reakcji nie ulega rozcieńczeniu wodą. Stosując tritlenek siarki, unika się otrzymania odpadowego kwasu siarkowego, którego duże ilości powstają przy stosowaniu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i oleum jako środków sulfonujących.

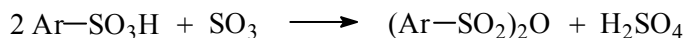
Tritlenek siarki jako bardzo mocny reagent, oprócz pożądanej reakcji sulfonowania, może wywołać też niekorzystne zmiany. W podwyższonej temperaturze może utleniać substancję organiczną, czego wynikiem może być wprowadzenie do sulfonowanego związku grupy –OH:



lub nawet całkowite spalenie substancji organicznej. Inne niepożądane reakcje prowadzą do powstania kwasów wielosulfonowych, sulfonów:



a także bezwodników kwasów sulfonowych:



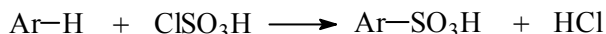
Reakcjom niepożądanym sprzyja duże stężenie środka sulfonującego i wysoka temperatura.

Tritlenek siarki może być stosowany w sposób bezpośredni tylko do sulfonowania związków trudno sulfonujących się, np. zawierających podstawniki elektronoakceptorowe. W celu złagodzenia jego mocy sulfonującej stosuje się roztwory tritlenku siarki w skroplonym  $\text{SO}_2$  lub rozpuszczalniku organicznym i roztwory adduktów  $\text{SO}_3$  z dioksanem i pirydyną (temp. reakcji 0–40°C). Tritlenek siarki używa się w postaci stałej, ciekłej i gazowej.

#### c) Sulfonowanie kwasem chlorosulfonowym (VI)

Zastosowanie kwasu chlorosulfonowego jako czynnika sulfonującego stwarza możliwość otrzymania dwóch rodzajów produktów: aromatycznych sulfochlorków ( $\text{ArSO}_2\text{Cl}$ ) lub kwasów arylosulfonowych ( $\text{ArSO}_3\text{H}$ ). Zależy to od warunków reakcji i ilości użytego do reakcji kwasu chlorosulfonowego.

W reakcji równomolowych ilości kwasu i substancji sulfonowanej lub przy małym nadmiarze kwasu powstają aromatyczne kwasy sulfonowe:



Przemiana przebiega do końca i nie wymaga dużego nadmiaru czynnika sulfonującego. Sulfonowanie kwasem chlorosulfonowym, ze względu na koszt, przeprowadza się tylko wówczas, gdy nadmiar kwasu siarkowego lub oleum powoduje niekorzystne reakcje (np. wielosulfonowanie, utlenianie, hydratacja). Aparatura musi być odporna na działanie  $\text{HCl}$ .

Przy zastosowaniu nadmiaru kwasu chlorosulfonowego produktem reakcji są sulfochlorki:

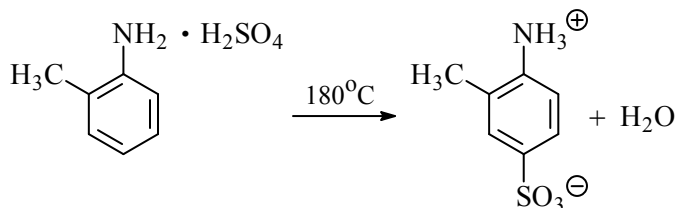


Sulfochlorki stanowią ważny półprodukt do otrzymywania aromatycznych sulfonamidów, estrów, anilidów, kwasów tiolowych i sulfinowych.

Podczas chlorosulfonowania związków aromatycznych konieczny jest 5–10-krotny nadmiar kwasu chlorosulfonowego (reakcję prowadzi się w reagentie sulfonującym lub chlorowanych rozpuszczalnikach organicznych).

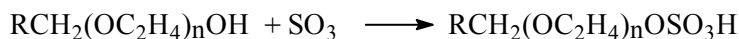
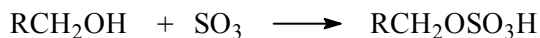
#### II.4.3. Sulfonowanie amin

Sulfonowanie amin prowadzi się przez spiekanie. Siarczan aminy ogrzewa się w temperaturze 180°C przez kilka godzin:

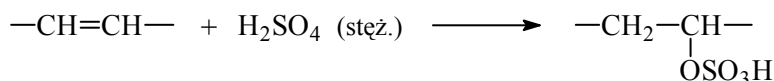


#### II.4.4. Siarczanowanie

Największe znaczenie ma siarczanowanie alkoholi, tłuszczów i ich pochodnych polioksyetylenowych. Środkami siarczanującymi są kwas siarkowy 98–100% lub gazowy  $\text{SO}_3$ :

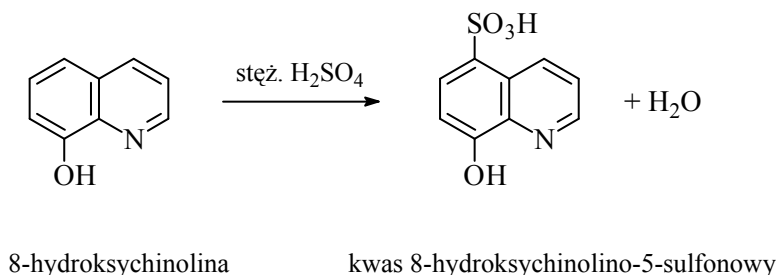


Produkty siarczanowania poddaje się neutralizacji, uzyskując sole sodowe siarczanów alkilowych. Drugorzędowe siarczany alkilowe są słabszymi środkami powierzchniowo czynnymi niż pierwszorzędowe. W podobny sposób przerabia się na środki powierzchniowo czynne tłuszcze i oleje. Następuje tu addycja kwasu siarkowego do wiązań podwójnych w kwasowych resztach glicerydów:

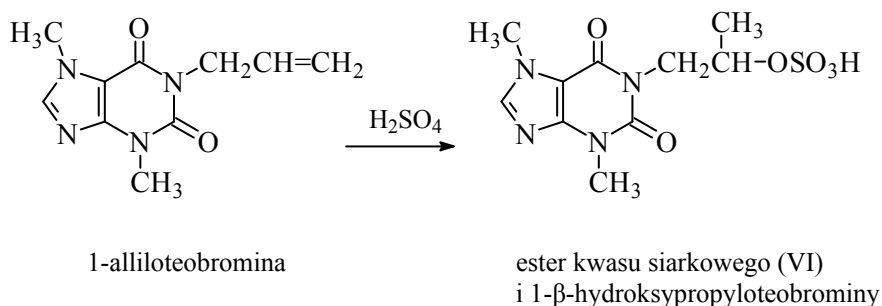


#### II.4.5. Przykłady sulfonowania w przemyśle farmaceutycznym

1. Otrzymywanie Yatrenu – sulfonowanie 8-hydroksychinoliny w pierwszym etapie syntezy:

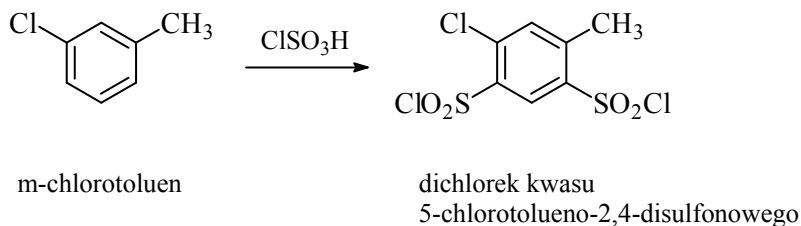


2. Produkcja Cordabrominu – działanie kwasu siarkowego (VI) na alliloteobrominę w drugim etapie syntezy:

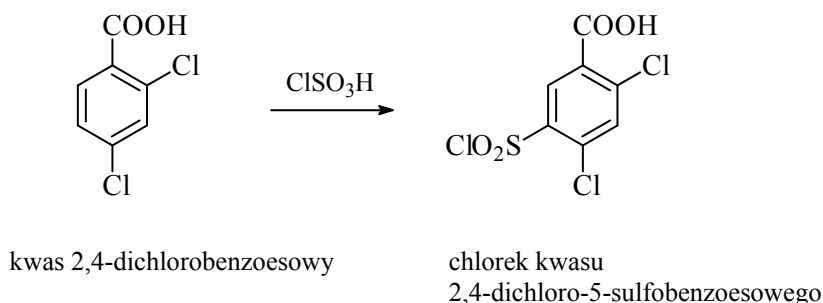




3. Otrzymywanie disulfamidu – pierwszym etapem jest chlorosulfonowanie m-chlorotoluenu:



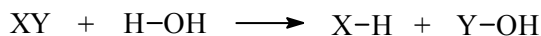
4. Otrzymywanie furosemidu – drugi etap stanowi chlorosulfonowanie kwasu 2,4-dichlorobenzoesowego:



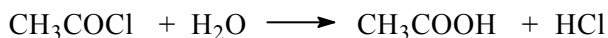
## II.5. Hydroliza

### II.5.1. Wiadomości ogólne

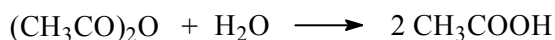
**Hydroliza** (rozpad pod wpływem wody) jest procesem jednostkowym, w którym cząsteczka związku organicznego pod wpływem wody ulega rozkładowi na dwa prostsze fragmenty, przy czym atom wodoru z wody łączy się z jednym fragmentem, a grupa hydroksylowa (z wody) z drugim, dając dwa różne produkty.



Hydrolizie ulegają różne grupy związków organicznych z różną łatwością. Niektóre reagują gwałtownie od razu po zetknięciu się z wodą:



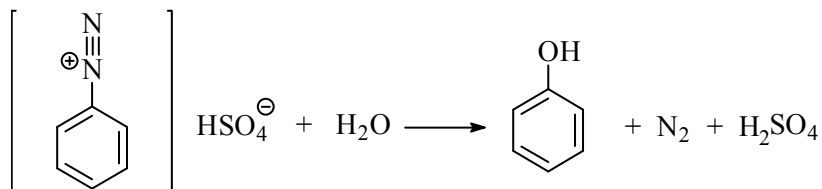
inne – dopiero po ogrzaniu:



Tego typu reakcje nie mają znaczenia i są raczej niepożądane, gdyż substraty są droższe niż powstałe produkty. Woda w stosunkowo nielicznych przypadkach powoduje szybką

i całkowitą hydrolizę związku organicznego, nawet jeśli reakcję prowadzi się w podwyższonej temperaturze i przez dłuższy czas. Dlatego zwykle stosuje się wodne lub etanolowo-wodne roztwory zasad, kwasów lub enzymów z grupy hydrolaz, które rozszczepiają wiązania estrowe, glikozydowe i peptydowe.

Przykładem reakcji, która zachodzi dość łatwo w obecności samej wody i ma praktyczne znaczenie, jest przekształcenie soli diazoniowych w fenole (reakcja zagotowania):



Aby hydroliza zachodziła szybko i całkowicie, stosuje się katalizatory. Oprócz wymienionych już kwasów, zasad i enzymów można stosować też sole, tlenki metali lub metale. W praktyce przemysłowej hydrolizę prowadzi się w obecności mniej lub bardziej stężonych kwasów mineralnych, zasad, soli. Hydrolizę w obecności kwasu stosuje się do przerobu różnych surowców pochodzenia roślinnego i zwierzęcego: tłuszczów (produktem są mieszaniny wyższych kwasów tłuszczowych i gliceryny), węglowodanów (produktem są cukry proste, np. glukoza, fruktoza), furfural z otrębów owsianych.

Do hydrolizy estrów stosuje się również roztwory enzymów, białek (produktami są aminokwasy, np. z glutenu otrzymuje się kwas glutaminowy – składnik środków leczniczych, a jego sól jest środkiem polepszającym smak potraw). Hydroliza w obecności alkaliów: rozcieńczone roztwory NaOH i Ca(OH)<sub>2</sub> przydatne są do hydrolizy tłuszczów (produkcja mydeł i gliceryny) oraz chlorków alkilowych i acylowych (produkcja fenolu z chlorobenzenu). Stężone roztwory NaOH (50–95%) wykorzystuje się do przerobu aromatycznych związków sulfonowych w celu zastąpienia grupy SO<sub>3</sub>H grupami OH. Jest to metoda stapiania alkalicznego, która była najstarszą metodą produkcji fenolu. Obecnie stosuje się ją przy produkcji naftoli i hydroksyantrachinonów.

Stosunkowo nieliczne procesy hydrolizy zachodzą w normalnej temperaturze i pod normalnym ciśnieniem, np. hydroliza drewna metodą Bergiusa. Najczęściej hydrolizę prowadzi się w temperaturze 80–160°C pod nieznacznie wyższym ciśnieniem. Przerób chlorobenzenu na fenol i wymiana grupy sulfonowej na grupę OH wymaga już temperatury 300°C.

Hydroliza ma bardzo duże znaczenie w biochemii. Jest to jeden z najczęstszych procesów metabolicznych, jakim podlegają leki w organizmie. Procesy hydrolizy są również bardzo niepożądane, ponieważ zmniejszają trwałość wielu leków. Aby zapobiec rozkładowi leku na drodze hydrolizy, stosuje się optymalne pH roztworu (buforowanie zmniejsza ilość wody w roztworze), wodę zastępuje się innym rozpuszczalnikiem (etanol, glikol propylenowy, glicerol). Substancje gwałtownie hydrolizujące przechowuje się w opakowaniach hermetycznych w stanie suchym, w niskiej temperaturze i rozpuszcza się dopiero bezpośrednio przed użyciem.

### II.5.2. Hydroliza poszczególnych grup związków organicznych

a) Hydroliza alkilo- i arylochlorowcopochodnych prowadząca do otrzymania alkoholi, aldehydów, ketonów, kwasów i fenoli. Przebieg jej zależy od ugrupowania, z jakim jest związany chlorowec. Chlorki alkilowe ulegają łatwo hydrolizie (najłatwiej jodki). Pochodne zawierające atom chlorowca przy węglu nienasyconym hydrolizują trudniej, a produktami takiej reakcji są aldehydy i ketony.

Hydroliza chlorowcopochodnych to reakcja substytucji nukleofilowej. Wpływ na hydrolizę ma rzędowość atomu węgla, przy którym znajduje się chlorowiec. Najłatwiej hydrolizują pochodne zawierające atom chlorowca przy trzeciorzędowym atomie węgla ( $S_N1$ ), najtrudniej – pochodne zawierające atom chlorowca przy pierwszorzędowym atomie węgla ( $S_N2$ ). Pochodne zawierające atom chlorowca przy drugorzędowym atomie węgla mogą reagować według mieszanego mechanizmu  $S_N1 + S_N2$ .

Bardzo łatwo hydrolizują pochodne, w których atom chlorowca jest połączony z atomem węgla związanym z układem aromatycznym (pochodne benzytowe), gdyż tworzenie karbokationów jest ułatwione. Połączenia tego typu reagują łatwiej niż trzeciorzędowe połączenia alifatyczne.

Połączenia typu  $Ar-X$  reagują trudno, gdyż wiązanie chlorowiec–węgiel może być wiązaniem podwójnym w strukturach kanonicznych hybrydy rezonansowej. Łatwość hydrolizy rośnie gdy w położeniu p- lub o- w stosunku do chlorowca znajdują się grupy elektronoakceptorowe. Produktami są fenole.

Trzeciorzędowe chlorki alkilowe hydrolizują już po krótkim ogrzewaniu w wodzie. Hydrolizę połączeń pierwszo- i drugorzędowych przeprowadza się w wodnych roztworach KOH lub NaOH. Katalizatorami są  $ZnSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnCl_2$ . Produktami hydrolizy chlorowcopochodnych są alkohole.

Hydroliza dichlorowcopochodnych z atomami chlorowca przy wicynalnych atomach węgla prowadzi do otrzymania glikoli. Gdy dwa atomy chlorowca są przy tym samym atomie węgla, powstają aldehydy lub ketony. Hydroliza zachodzi bardzo łatwo już przy ogrzewaniu z wodą. Hydroliza pochodnych trichlorowcowych prowadzi do otrzymania kwasów organicznych.

b) Przykładem hydrolizy estrów może być hydroliza tłuszczów. W środowisku alkalicznym powstaje alkohol i sól kwasu, z którego powstał ester, a w środowisku kwaśnym powstaje kwas i alkohol.

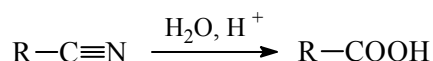
c) Halogenki kwasowe i bezwodniki hydrolizują z utworzeniem kwasu karboksylowego.

d) Amidy alifatyczne i aromatyczne hydrolizują podczas ogrzewania z rozcieńczonymi kwasami lub alkali. W środowisku kwaśnym produktami są kwas organiczny i sól amonowa, a w środowisku alkalicznym powstaje sól kwasu i  $NH_3$ . Podstawione amidy kwasowe ( $Ar-NHCO-R^1$ ,  $R-NHCO-R^2$ ) są odporne na działanie rozcieńczonych roztworów kwasów i zasad. Hydrolizują one do aminy i kwasu przy zastosowaniu bardziej stężonych roztworów kwasów mineralnych (20% HCl, 50%  $H_2SO_4$ ).

e) Sole kwasów organicznych, czyli sole słabego kwasu i mocnej zasady, w wyniku hydrolizy dają kwas organiczny i zasadę.

f) Sole zasad organicznych w wyniku hydrolizy dają zasadę organiczną (np. aminę) i kwas.

g) Hydroliza nityli jest jedną z ważniejszych metod otrzymywania kwasów organicznych:



h) Hydroliza eterów. Etery są związkami bardzo trwałymi i trudno ulegają hydrolizie. Pod działaniem kwasów chlorowcowodorowych hydrolizują do chlorowcoalkanów i alko-

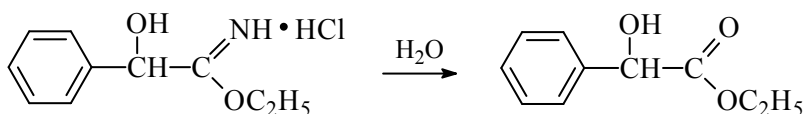
holi lub fenoli, etery aryloalkilowe dają analogicznie chlorowcoalkany i fenole. Zdolność hydrolityczna kwasów chlorowcowodorowych maleje w szeregu:  $HJ > HBr > HCl$ .

Acetale (etery uwodnionej formy aldehydów) są odporne na działanie zasad jako czynników hydrolizujących, ale bardzo łatwo hydrolizują pod wpływem kwasu, dając alkohole i aldehydy. Na przykład glikozydy będące acetalami rozpadają się do cukrów prostych.

Epoksydwiazki pod wpływem wody hydrolizują do glikoli. Ich reaktywność jest bardzo duża, z powodu naprężeń charakterystycznych dla trójczłonowych pierścieni oksiránów.

### II.5.3. Przykłady zastosowania hydrolizy w przemyśle farmaceutycznym

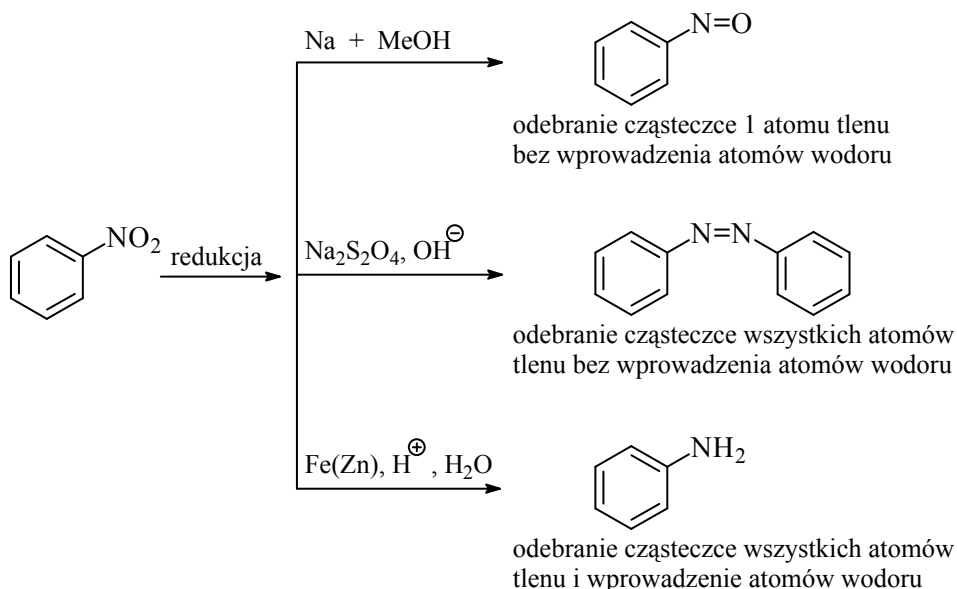
Otrzymywanie estru etylowego kwasu migdałowego przez hydrolizę chlorowodoru iminoeteru kwasu migdałowego:



## II.6. Redukcja

### II.6.1. Wiadomości ogólne

**Redukcja** jest procesem przebiegającym z pobraniem elektronów przez atom, w wyniku czego następuje zmniejszenie stopnia utlenienia pierwiastka. Redukcja zachodzi pod wpływem reduktora, tj. substancji, która sama się utlenia, oddając elektrony, które są pobierane przez substancję redukowaną:



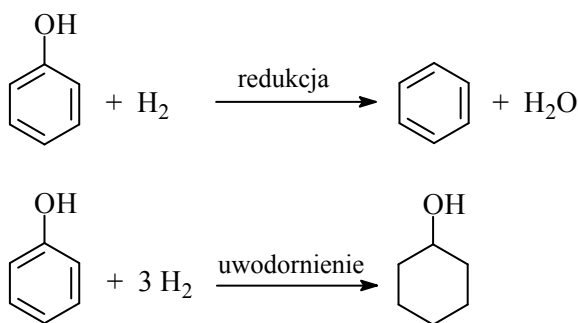
Schemat 2. Redukcja

Podczas redukcji związku organicznego następuje zmniejszenie krotności wiązań albo oderwanie od cząsteczki jednego lub kilku atomów tlenu (lub innych heteroatomów: S, N, Cl), czemu towarzyszyć może (ale nie musi) wprowadzenie do cząsteczki atomów wodoru.

Redukcję prowadzi się z zastosowaniem różnych związków chemicznych o właściwościach redukujących (w tym – bardzo często – wodoru) lub elektrolitycznie.

**Uwodornienie** prowadzi się wyłącznie przy zastosowaniu wodoru. Polega ono na przyłączaniu cząsteczki wodoru do cząsteczki związku organicznego zawierającego wiązania nienasycone. Proces zachodzi w obecności katalizatora i wymaga działania gazowego wodoru. Reakcje uwodornienia są odwracalne, mają charakter egzotermiczny i przebiegają ze zmniejszeniem objętości molekularnej (podwyższone ciśnienie i niska temperatura).

Reakcje uwodornienia mają charakter przyłączenia (brak produktów ubocznych), natomiast redukcji towarzyszy eliminacja heteroatomu z cząsteczki. Podczas uwodornienia następuje wzbogacenie cząsteczki w atomy wodoru; podczas redukcji cząsteczka może się wzbogacić w atomy wodoru, ale nie musi.



W przemyśle organicznym redukcji poddaje się:

- związki aromatyczne zawierające azot (nitrozwiązki);
- wyższe kwasy tłuszczowe i ich estry, w celu otrzymania alkoholi tłuszczowych  $\text{C}_{10}\text{--}\text{C}_{18}$ ;
- tlenek węgla, w celu otrzymania syntetycznych paliw silnikowych i syntezy metanu,
- związki zawierające heteroatomy, obecne w benzynie i olejach, w celu usunięcia S, N, O.

Uwzględniając charakter aktywnego odczynnika, metody redukcji można podzielić na:

- redukcję przebiegającą z udziałem wodoru atomowego ( $\text{S}_R$ ), np. redukcja katalityczna na metalach;
- redukcję, w której odczynnikiem jest jon wodorkowy ( $\text{H}^-$ ): redukcja z udziałem tetrahydroglinianu litu ( $\text{LiAlH}_4$ ), tetrahydroboranu sodu ( $\text{NaBH}_4$ ) –  $\text{S}_N$ ;
- redukcję, w której wodór występuje jako proton  $\text{H}^+$  –  $\text{S}_E$ .

## II.6.2. Redukcja z udziałem wodoru atomowego

Stosuje się tu katalizatory metaliczne (metale mające luki elektronowe na powłokach: Ni, Pd, Pt, Cu, Co, Fe) oraz tlenkowe (tlenki Zn, Cr, Mn, Mg, Cu, W). Pod względem aktywności dzielą się one na dwie grupy:

- mocne katalizatory (Ni, Co, Fe) – mogą powodować całkowite uwodornienie, np. aldehydu poprzez alkohol do węglowodoru nasyconego;
- łagodne katalizatory (Pd, Pt, Cu, kat. tlenkowe) – mają wysoką aktywność, ale doprowadzają reakcję uwodornienia do określonego stadium: np. aldehyd do alkoholu, nie pozwalając reakcji dojść do stadium węglowodoru (np. w obecności ZnO wodór nie atakuje wiązań nienasyconych w łańcuchu węglowym, redukuje zaś grupę  $\text{C}=\text{O}$ ).

Reakcja redukcji katalitycznej prowadzona jest gazowym wodorem wobec wyżej wymienionych katalizatorów w fazie gazowej lub w różnych rozpuszczalnikach (alkohole, woda, kwas octowy, estry, dioksan, rozcieńczony HCl).

Rozpadająca się na atomy cząsteczka wodoru, którą można uzyskać z termicznego rozkładu węglowodorów,  $\text{CH}_3\text{OH}$  i pary wodnej, przez elektrolizę wody ulega chemisorpcji na powierzchni katalizatora, gdzie reaguje z zaadsorbowaną cząsteczką zredukowanego związku. Przy tym mechanizmie bardzo ważne jest, by powierzchnia katalizatora była odpowiednio duża, dlatego stosuje się je w postaci dyspersji koloidalnej, metale osadza się na nośniku o dużej powierzchni (żel krzemionkowy,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , sita molekularne) lub stosuje się katalizator szkieletowy typu Raneya otrzymywany ze stopów Ni, Cu, Co lub Fe – z Al i Si, przez wytrawienie kwasami lub alkalicznie. Powstają struktury porowate o dobrze rozwiniętej powierzchni.

Należy stosować odpowiednio niskie temperatury i nadciśnienie. Zbyt wysoka temperatura powoduje reakcję odwrotną – odwodornienie.

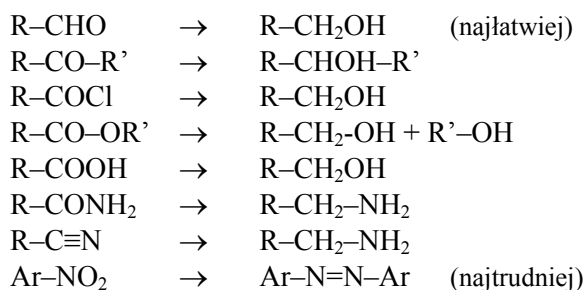
Redukcję katalityczną (uwodornienie katalityczne) prowadzi się metodą okresową w autoklawach ( $120^\circ\text{C}$ , 100 atm dla redukcji glukozy do sorbitolu przy produkcji witaminy C) i metodą ciągłą w reaktorach przemysłowych, gdzie kolumny są wyłożone katalizatorem.

Często stosowaną metodą jest redukcja wodorem *in statu nascendi*. Źródłem wodoru atomowego powstającego bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej są metale, które mają zdolność wypierania wodoru z wody (metale alkaliczne) lub kwasów (Sn, Zn, Fe). Reakcje można też prowadzić za pomocą Zn w środowisku alkalicznym (NaOH) (powstanie hydrazozwiązków). Najczęściej stosuje się drobno zmielone opiłki Fe w HCl (redukcja nitrobenzenu).

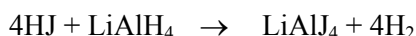
Estry i amidy redukuje się za pomocą Fe, ale w obecności  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , gdyż HCl może powodować ich hydrolizę.

### II.6.3. Redukcja przebiegająca z udziałem jonu wodorkowego

Wykorzystuje się tu kompleksowe wodorki metali ( $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{NaBH}_4$ ), które bardzo łatwo przenoszą jon wodorkowy do węgla grupy  $\text{C}=\text{O}$ .  $\text{LiAlH}_4$  może być stosowany do redukcji różnych grup funkcyjnych:

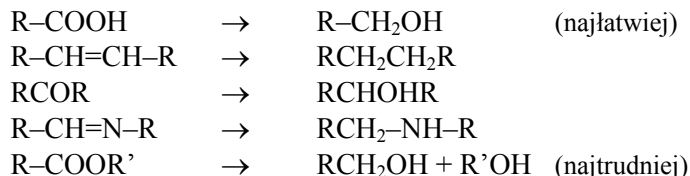


$\text{LiAlH}_4$  rozkłada się w obecności aktywnego atomu wodoru według równania:



Użyty rozpuszczalnik powinien mieć charakter obojętny, dlatego używa się eteru, tetrahydrofuranu, dioksanu, które muszą być odwodnione. Substrat musi być rozpuszczalny w użytym do reakcji rozpuszczalniku.

$\text{NaBH}_4$  reaguje podobnie, a jego zaletą jest to, że redukcję można prowadzić w alkoholach lub w wodzie. Może być stosowany do redukcji następujących połączeń:



Redukcja kompleksowymi wodorokami metali w łagodnych warunkach przebiega zazwyczaj z wysoką wydajnością i pozwala na redukcję selektywną (redukcję jednej z grup funkcyjnych, występujących w substracie, w zależności od użytego wodoroku kompleksowego).

#### II.6.4. Redukcja przebiegająca z udziałem protonu

Przykładem jest redukcja z użyciem metali alkalicznych rozpuszczonych w ciekłym amoniaku (metoda Bircha) lub w rtęci (amalgamaty Na, Al, Zn), które dodawane są bezpośrednio do roztworów redukowanych związków w rozpuszczalnikach będących donorami protonów (alkohole, woda, kwasy organiczne).

#### II.6.5. Wodoroliza

Wodoroliza polega na rozerwaniu wiązania pomiędzy węglem a innym pierwiastkiem (Cl, N). Stosuje się ją do usunięcia pierwiastka lub grupy funkcyjnej ze związku organicznego (hydrogenoliza).



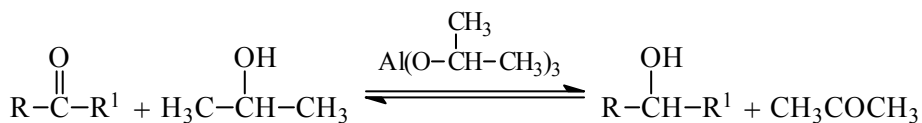
#### II.6.6. Redukcja elektrolityczna

Przeprowadza się ją pod normalnym ciśnieniem w temperaturze 30–35°C. Pod wpływem prądu elektrycznego woda w środowisku zasadowym ulega elektrolizie. Na katodzie wydziela się wodór, a na anodzie tlen, który łączy się z anodą, dając nadtlenek (katoda: Pb z amalgamatem rtęci, anoda: Pb).

Redukcję tę stosuje się do związków nitrowych, amidów alifatycznych i aromatycznych, związków nienasyconych. W tych warunkach na katodzie powstaje wodór, który redukuje związek organiczny, a na anodzie powstaje nadtlenek Pb. Redukcję tę przeprowadza się w specjalnych warunkach elektrolitycznych. Aby wzrosła wydajność elektrolizy, można dodać siarczan (VI) sodu.

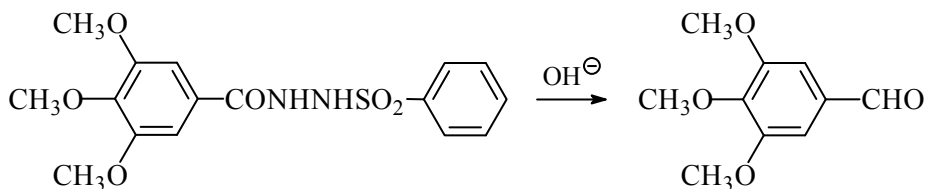
#### II.6.7. Inne metody redukcji

a) Redukcja Meerweina-Ponndorfa-Verleya jest stosowana do otrzymywania alkoholi drugorzędowych z ketonów. Środkiem redukującym jest najczęściej alkohol izopropylowy, w obecności izopropanolanu glinu. Reakcja jest odwracalna, a jej przebieg w kierunku przeciwnym to utlenianie Oppenauera.



Można stosować również inne alkohole: alkohol *sec*-butylowy w obecności *sec*-butanolanu glinu lub cykloheksanol w obecności cykloheksanolanu glinu. Redukcja ta jest wykorzystywana w syntezie chloramfenikolu.

b) Redukcja McFadyena-Stevensa: acylosulfonylohydrazyny ulegają rozszczepieniu pod wpływem zasad i można z nich otrzymać aldehydy aromatyczne lub alifatyczne, nie mające wodoru w pozycji  $\alpha$ . W ten sposób można otrzymać na przykład aldehyd 3,4,5-trimetoksybenzoowy, będący surowcem do syntezy trimetoprimu:

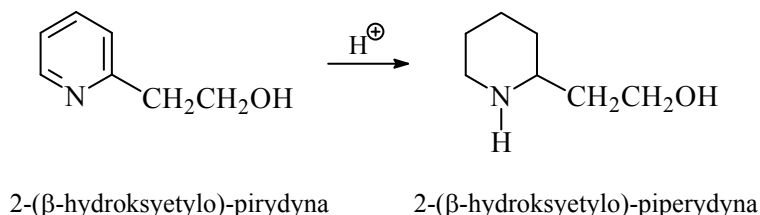


Inne środki redukujące:

- tetraksodisiarczan (III) sodu (hydrosulfit) – znajduje zastosowanie w syntezie benzyloaminy;
- siarczan (IV) i wodorosiarczany (IV): wodorosiarczan (IV) sodu – znajduje zastosowanie przy redukcji chlorku benzenodiazoniowego do fenylohydrazyny, natomiast redukcja siarczanami (IV) to, między innymi, otrzymywanie 4-aminoantypiryny i 4-nitroantypiryny;
- siarczki: najczęściej stosuje się siarczek sodu, wodorosiarczek sodu, siarczek amonu, dwu- lub wielosiarczki sodowe i siarkowodór, głównie przy otrzymywaniu nitroamin z dinitrowiązków oraz aminofenoli z nitrofenoli; ubocznym produktem redukcji siarczkami jest tiosiarczan (VI) sodu.

## II.6.8. Przykłady przemysłowego zastosowania redukcji

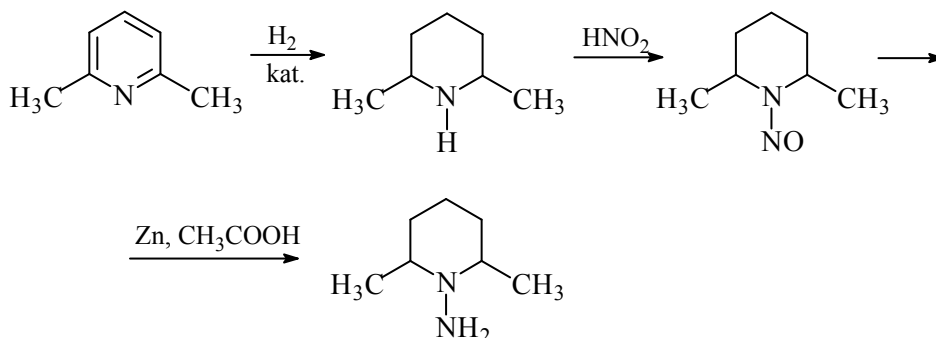
1. Otrzymywanie 2-( $\beta$ -hydroksyetylo)-piperydyny:



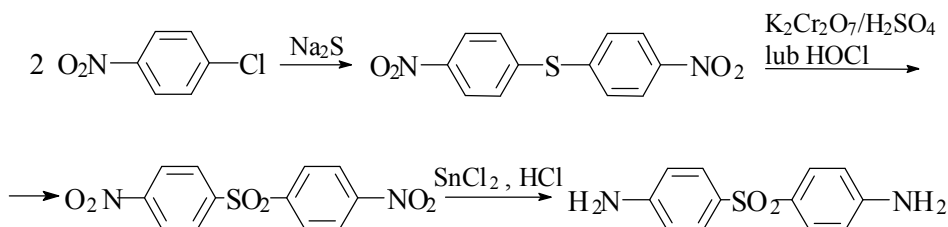
2. Otrzymywanie 1-amino-2,6-dimetylopiperydyny:

- a) katalityczne uwodornienie 2,6-dimetylopirydyny,
- b) redukcja pochodnej nitrozowej cynkiem:





3. Synteza dapsonu – w końcowym etapie 4,4'-dinitrofenylosulfon redukuje się do 4,4'-sulfonyldianiliny chlorkiem cyny (II) w kwasie solnym:



## II.7. Alkilowanie

### II.7.1. Wiadomości ogólne

Alkilowanie polega na wprowadzeniu grupy alkilowej do cząsteczki związku organicznego za pomocą przyłączenia lub podstawienia. Do alkilowania zalicza się również wprowadzenie do cząsteczki ugrupowania alkiloarylowego, np. benzylowego.

W procesie alkilowania grupa alkilowa może się połączyć z:

- atomem C w łańcuchu alifatycznym lub pierścieniu aromatycznym (C-alkilowanie),
- atomem N (N-alkilowanie),
- atomem O (O-alkilowanie),
- atomem S (S-alkilowanie).

Alkilowaniu poddaje się także metale Mg, Pb, Al, Li, otrzymując jako produkt związki metaloorganiczne, które mają bardzo duże zastosowanie w syntezie organicznej.

Grupę alkilową wprowadza się na miejsce wodoru w związku alifatycznym, aromatycznym, w grupie hydroksylowej, fenolowej, aminowej, tiolowej.

Do środków alkilujących należą:

a) alkeny (olefiny): etylen, propylen, n-buteny, izobuten w mieszaninie lub oddzielnie; prostolańcuchowe olefiny  $\text{C}_{10}$ – $\text{C}_{14}$  w mieszaninie;

b) niższe alkohole: metanol, etanol – stosuje się w obecności katalizatora (często jest nim kwas mineralny) do alkilowania amin, węglowodorów lub innych związków z aktywnym wodorem (np. fenol);

c) halogenki alkilowe: chlorki, bromki i jodki metylu, etylu, chlorek butylu, chlorek amylu; halogenki alkilo-arylowe: chlorek benzylu; monochlorowcopochodne prostołańcuchowych alkanów C<sub>10</sub>–C<sub>14</sub> (halogenki alkilowe mają niskie temperatury wrzenia, reakcje często przeprowadza się w autoklawach, w obecności zasad jako czynników wiążących wydzielający się kwas chlorowcowodorowy, najkorzystniejsze są tu jodki alkilowe, gdyż mają stosunkowo wysokie temperatury wrzenia i nie trzeba stosować autoklawów), stosuje się do alkilowania fenoli, amin, heteroatomów itp.;

d) tlenki alkilenowe (oksidy): tlenek propylenu i etylenu – mają one zdolność do przyłączania się do substancji zawierającej ruchliwe atomy wodoru, w wyniku czego otrzymuje się związki hydroksyalkilowe (tlenek etylenu stosuje się do wprowadzenia grupy β-hydroksy-etylenowej w alkilowaniu amin i amoniaku, tlenek propylenu stosuje się do otrzymania alkoholu 2-metylo-β-dimetyloaminoetylowego);

e) siarczany alkilowe, kwasy alkilosiarkowe – służą do alkilowania amin i fenoli (głównie używa się siarczanu dimetylu i dietylu), stosuje się je przeważnie do N- i O-alkilowania (w procesach tych należy zobojętnić wydzielający się kwas, dlatego stosuje się sole sodowe fenoli – środowisko zasadowe);

f) estry kwasów arylosulfonowych – służą do alkilowania amin i fenoli, wykorzystuje się je do alkilowania amin trudno alkilujących się;

g) czwartorzędowe sole amoniowe – są łagodnie działającymi środkami alkilującymi, nie powodują reakcji ubocznych (chlorek trimetylofenyloamoniowy stosuje się do produkcji kodeiny z morfiny, reakcję prowadzi się w środowisku alkalicznym);

h) diazometan – jest czynnikiem metylującym fenole, enole, kwasy, aldehydy, ketony, chlorki kwasowe (w reakcji powstają metyloetery lub estry metylowe oraz gazowe produkty uboczne – azot, w reakcji z halogenkami kwasowymi powstają diazoketony, które przekształcają się do 2-chlorowcoketonów);

i) epichlorhydrina glicerolowa – stosuje się ją do uzyskania leków β-adrenolitycznych przez alkilowanie fenolu i reakcję powstających epitlenków z izopropylaminą;

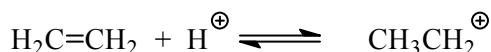
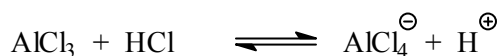
j) aldehydy lub ketony w obecności czynników uwodorniających (alkilowanie redukcyjne; reakcje Wallacha, Eschweilera-Clarke'a, Leucarta).

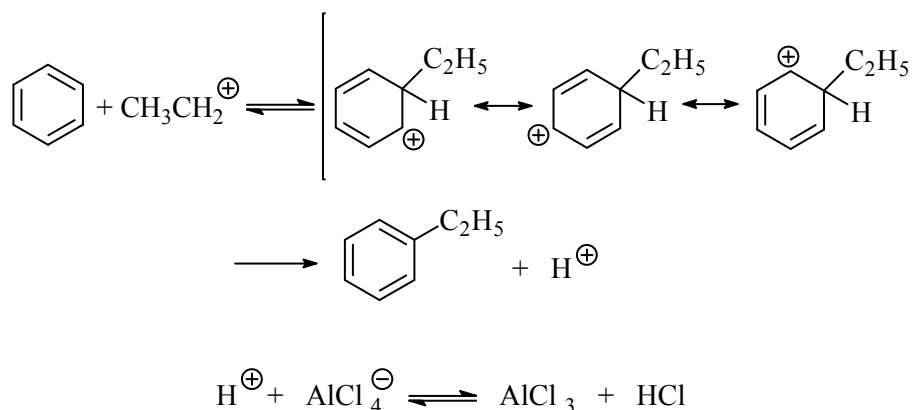
### II.7.2. C-alkilowanie (reakcja Friedela-Craftsa)

C-alkilowanie jest procesem katalitycznym. Jako katalizatory wykorzystuje się substancje będące donorami protonów:

- kwasy mineralne (alkilowanie alkenami); i /lub
- kwasy Lewisa: AlCl<sub>3</sub>, AlF<sub>3</sub>, BF<sub>3</sub>.

Reakcja alkilowania w obecności katalizatorów kwasowych ma przebieg jonowy z pośrednim utworzeniem karbokationu (składającego się z protonu i czynnika alkilującego), który atakuje cząsteczkę alkilowaną:





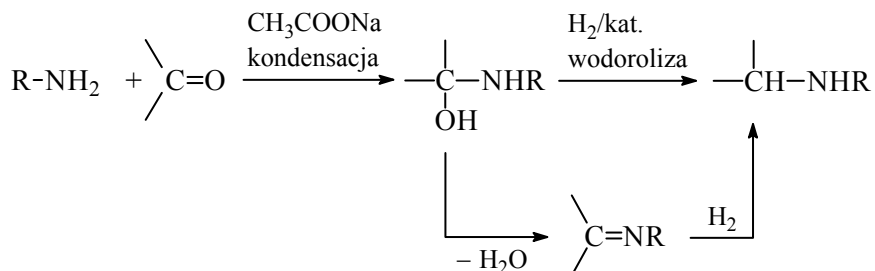
Proces prowadzony w fazie ciekłej przebiega w temperaturze 0–100°C i pod niewielkim nadciśnieniem, aby utrzymać w mieszaninie reakcyjnej lotne składniki. Reakcję katalizują kwasy Lewisa.

W procesie prowadzonym w fazie gazowej katalizatorem jest stały kwas fosforowy, otrzymany przez wysycanie ziemi krzemkowej roztworem  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , z którego usuwa się wodę przez wysuszenie. Przyłączenie protonu do czynnika alkilującego Występuje wówczas na powierzchni kontaktu. Alkilowanie w fazie gazowej przeprowadza się pod zwiększonym ciśnieniem i w temperaturze 250–300°C. Alkilowanie w tej fazie jest korzystniejsze, ponieważ kwasy mineralne, katalizatory i produkty uboczne nie działają korodująco na aparaturę.

Przy alkilowaniu związków aromatycznych otrzymuje się nie tylko pochodne monoalkilowe, ale i pochodne wieloalkilowe o wzorze  $\text{C}_6\text{H}_{6-n}\text{R}_n$ ,  $n = 2-6$ . Grupy alkilowe mają charakter podstawników elektronodonorowych i zwiększają reaktywność pierścienia aromatycznego w reakcjach  $\text{S}_{\text{E}}$ ; w wyniku powstają produkty wielopodstawione. Aby temu zapobiec, środek alkilujący stosuje się w niedomiarze w stosunku do ilości stechiometrycznej.

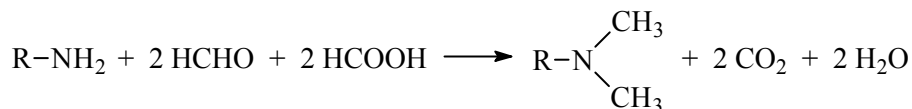
### II.7.3. Alkilowanie redukcyjne

Alkilowanie redukcyjne to działanie aldehydami lub ketonami na amoniak lub aminy w obecności wodoru i katalizatora (Ni-Raney, Pt).

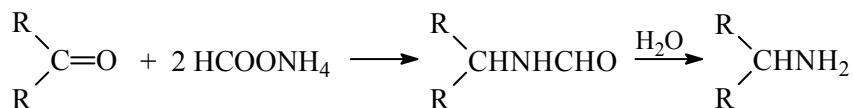


Dla amoniaku i amin pierwszorzędowych możliwe są obydwie drogi reakcji, natomiast dla amin drugorzędowych tylko jedna. Jako środki redukujące można stosować Zn, HCl,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{HCOOH}$  (reakcja Wallacha). Gdy poddaje się alkilowaniu aminy pierwszorzędowe

lub drugorzędowe za pomocą aldehydu i kwasu mrówkowego; reakcja nosi nazwę Eschweilera-Clarke'a.

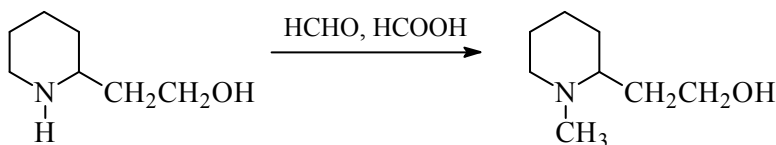


W reakcji Wallacha zamiast HCOOH można stosować mrówczan amonu, mrówczany amin, formamid lub jego pochodne. Wówczas zamiast wolnych amin można otrzymać ich pochodne N-formylowe. Metoda ta nosi nazwę reakcji Leucarta.



#### II.7.4. Przykłady z przemysłu farmaceutycznego

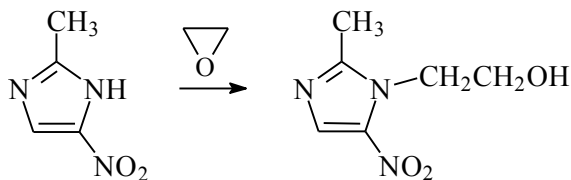
- Otrzymywanie N-metylo-2-β-hydroksyetylopiperydyny przez metylowanie β-hydroksyetylopiperydyny:



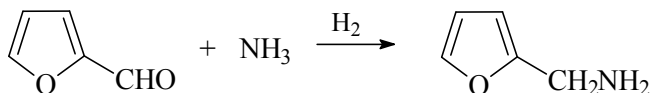
2-(β-hydroksyetylo)-piperydyna

N-metylo-2-(β-hydroksyetylo)-piperydyna

- Otrzymywanie metronidazolu przez alkilowanie 2-metylo-5-nitroimidazolu tlenkiem etylenu:



- Otrzymywanie furfuryloaminy przez redukcyjne alkilowanie amoniaku furfurałem:



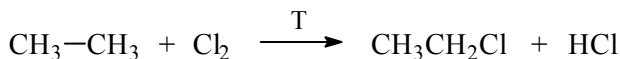
## II. 8. Chlorowcowanie

### II.8.1. Wiadomości ogólne

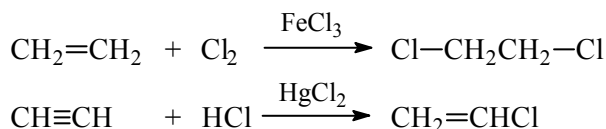
**Chlorowanie** polega na wprowadzeniu do cząsteczki atomu Cl, w wyniku czego otrzymuje się chloropochodną organiczną, zawierającą wiązanie C–Cl. Jest to proces bardzo rozpowszechniony w przemyśle i najważniejszy z procesów halogenowania (chlorowanie, bromowanie, jodowanie). Odczynniki chlorujące są tanie, a chloropochodne organiczne mają korzystne właściwości.

Chlorowanie związków organicznych następuje w wyniku reakcji:

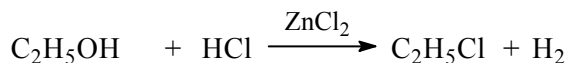
a) podstawienia atomu wodoru atomem chloru:



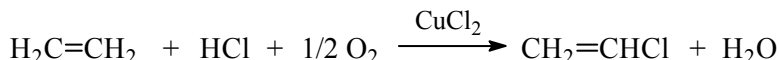
b) addycji, tj. przyłączenia Cl<sub>2</sub>, HCl, HOCl do wiązania nienasyconego:



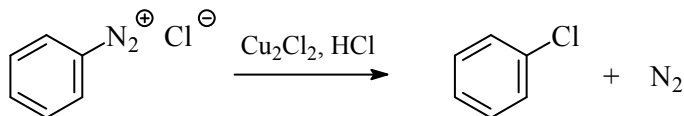
c) wymiany, tj. zastąpienie innej grupy funkcyjnej (najczęściej –OH) chlorem:



d) oksychlorowania, tj. jednoczesnego działania HCl i O<sub>2</sub>:



e) pochodne aromatyczne można uzyskać w reakcji Sandmeyera przez przegrupowanie związków diazoniowych w obecności soli miedzi zawierających nadmiar jonów chlorokowych:



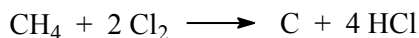
W metodzie tej uzyskuje się związki, których nie można otrzymać w innych procesach chlorowania, np. m-chlorotoluen z m-toluidyny, 2,6-dichlorotoluen z 2-amino-6-chlorotoluenu.

Środki chlorujące:

- gazowy chlor – w procesach chlorowania w przemyśle wykorzystuje się głównie gazowy chlor ze względu na jego dużą aktywność, stosunkowo niską cenę, dostępność, trwałość i łatwość magazynowania,

- HCl i jego mieszanina z tlenem – stosuje się do monochlorowania związków nienasyconych, jak i do wymiany grupy OH na Cl w alkoholach,
- kwas chlorowy (I) i jego sole NaOCl, Ca(OH)OCl – stosuje się do otrzymywania chlorohydrin (np. etylenowej, propylenowej),
- inne czynniki: chlorek tionylu (SOCl<sub>2</sub>), chlorek sulfurylu (SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), chlorki fosforu (PCl<sub>3</sub>, PCl<sub>5</sub>, POCl<sub>3</sub>), fosgen (COCl<sub>2</sub>) – stosuje się do specjalnych syntez, prowadzonych w mniejszej skali (np. chlorek tionylu i chlorki fosforu – do uzyskiwania chlorów kwasów karboksylowych).

W przemyśle chlorowanie przeprowadza się w różnych warunkach. Substancje gazowe chloruje się w fazie gazowej, ciekłe w ciekłej, a stałe po stopieniu lub rozpuszczeniu w odpowiednim rozpuszczalniku, odpornym na działanie czynników chlorujących. Ilość chloru doprowadzonego do reakcji musi być ściśle odmierzona, zwłaszcza gdy proces prowadzony jest w wysokiej temperaturze. Reakcje chlorowania mają charakter silnie egzotermiczny i wobec nadmiaru chloru, po przekroczeniu dozwolonej temperatury, może nastąpić rozkład węglowodoru do węgla i HCl:



Większość procesów chlorowania przeprowadza się pod ciśnieniem atmosferycznym lub nieznacznie podwyższonym (do 1 MPa), co uzasadnione jest utrzymaniem w środowisku reakcji łatwo lotnych reagentów.

W procesach przemysłowych stosuje się zwykle nadmiar surowca w stosunku do chloru i szybki przepływ mieszaniny reakcyjnej przez przestrzeń reakcyjną. W jednym przejściu przereagowuje tylko część surowca, który oddziela się od części nieprzereagowanej. Część ta, po uzupełnieniu świeżym surowcem, zawracana jest do reakcji. Niekiedy rozcieńcza się chlor obojętnym gazem lub surowiec – wysoko chlorowanymi węglowodorami.

W przemyśle przeprowadza się również chlorowanie wyczerpujące (węglowódor poddaje się działaniu nadmiaru chloru). Następuje tu podstawienie chlorem wszystkich atomów wodoru w węglowodorze, a produktem jest związek perchlorowany. W wysokiej temperaturze następuje rozerwanie wiązań C–C w węglowodorze i powstaje chloropochodna o mniejszej ilości atomów C niż związek wyjściowy. Proces taki to chloroliza. Metodą tą wytwarza się m.in. tetrachlorek węgla.

W procesach chlorowania uciążliwym czynnikiem jest HCl. Występuje on jako środek chlorujący albo wydzielający się w postaci produktu ubocznego w reakcjach substytucji. Działa on korodująco na aparaturę, dlatego używa się stali węglowej, szkła kwarcowego, grafitu, teflonu, żywic poliestrowych. Charakterystyczną cechą procesu chlorowania jest ścisła zależność rodzaju otrzymanych produktów od warunków reakcji. Jeśli stosuje się te same reagenty, a odmienne warunki reakcji, można otrzymać różne produkty. Na przykład chlorowanie benzenu metodą fotochemiczną przebiega jako reakcja przyłączenia chloru do pierścienia z wytworzeniem heksachlorocykloheksanu. Natomiast chlorowanie benzenu metodą katalityczną wobec FeCl<sub>3</sub> przebiega jako reakcja podstawienia, z wytworzeniem chlorobenzenu lub wielochloropochodnych benzenu. Chlorowanie toluenu w obecności katalizatorów daje chloropochodne podstawione w pierścieniu. Atomy wodoru w łańcuchu bocznym nie ulegają podstawieniu chlorem w tych warunkach. Natomiast w wyniku wolnorodnikowego chlorowania toluenu, chlor najpierw podstawia się do bocznego łańcucha alifatycznego i – w zależności od stosunku molowego reagentów – tworzy się chlorek benzylu, chlorek benzylidenu lub chlorek benzylidynu. Następnie, o ile chlor jest jeszcze obecny w środowisku reakcji, przyłącza się niemal równocześnie do wszystkich wiązań

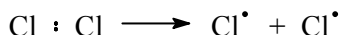
nienasyconych pierścienia aromatycznego, przekształcając go w pierścień cykloheksanowy. Wolnorodnikowe chlorowanie propylenu prowadzone metodą termiczną (450–500°C) umożliwia otrzymanie chlorku allilu, podczas gdy w temperaturze 50°C chlor przyłącza się do nienasyconego wiązania propylenu, tworząc 1,2-dichloropropan.

Należy więc przestrzegać reguł dotyczących syntezy chloropochodnych, aby odpowiednio kierować procesami i otrzymać pożądany związek z możliwie największą wydajnością.

### II.8.2. Chlorowcowanie poszczególnych grup związków organicznych

W zależności od warunków, chlorowanie przebiega według mechanizmu wolnorodnikowego lub jonowego i może być inicjowane termicznie, fotochemicznie lub katalitycznie.

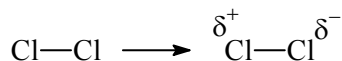
Chlorowanie wolnorodnikowe: pod wpływem światła (bliski nadfiolet), wysokiej temperatury (300–500°C w fazie gazowej) lub nadtlenków organicznych następuje homolityczne rozszczepienie wiązania atomowego w cząsteczce chloru. Powstają pojedyncze atomy chloru, co zapoczątkowuje reakcję łańcuchową:



Każdy atom zatrzymuje 1 niesparowany elektron i powstają wolne rodniki. Reakcje wolnych rodników opierają się na ich dążeniu do uzupełnienia oktetu elektronowego, dlatego potrzebny jest im 1 elektron. Według tego mechanizmu przebiega chlorowanie termiczne, gdzie rozszczepienie cząsteczki chloru na atomy inicjuje wysoka temperatura (300–500°C). Proces przebiega w fazie gazowej i poddaje się mu alkan (mono- i wielochloropochodne), propylen (chlorek allilu, chloroliza alkanów).

Chlorowanie fotochemiczne, gdzie proces inicjowany jest przez promieniowanie ultrafioletowe. Energia tego promieniowania rozszczepia cząsteczkę  $\text{Cl}_2$ , dlatego proces przebiega w znacznie niższej temperaturze (20–100°C). Metodą tą chloruje się pierścienie aromatyczne przez addycję chloru do wiązań nienasyconych.

Chlorowanie katalityczne przebiega bez udziału światła w umiarkowanie podwyższonej temperaturze (20–100°C) w obecności katalizatorów chlorkowych:  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ , które dodaje się bezpośrednio do mieszaniny reakcyjnej lub osadza na nośniku o dużej powierzchni (pumeks, krzemionka, węgiel aktywny). Katalizatory powodują polaryzację cząsteczek chloru:



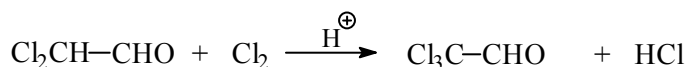
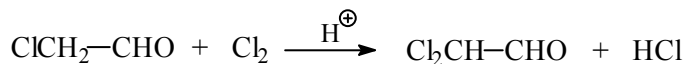
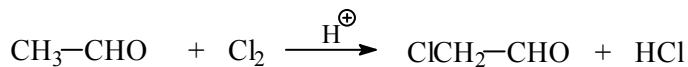
Katalizatory polaryzują również wiązania nienasycone, co ułatwia reakcje chlorowania.

Chlorowanie alkanów przebiega jonowo, wolnorodnikowo lub w obecności nadtlenków organicznych. Produktami są mono- lub polichloroalkany. Katalizatorami są nadtlarki organiczne, np. nadtlenek benzoilu.

Halogenki alkilowe otrzymuje się w wyniku wymiany grupy  $-\text{OH}$  na  $-\text{Cl}$  w alkoholach. Można to przeprowadzić, działając na alkohole  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$ ,  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{HCl}$  (w przypadku alkoholi drugo- i trzeciorzędowych). Katalizatorem reakcji jest zwykle  $\text{ZnCl}_2$ .

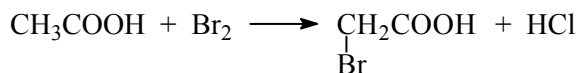
Alkeny w reakcjach chlorowania są bardziej aktywne niż odpowiednie alkan, ponieważ elektrony wiązania  $\text{C}=\text{C}$  są bardziej reaktywne. Chlorowanie zachodzi według mechanizmu jonowego lub (rzadko) wolnorodnikowo. Czynnikiem chlorującym są  $\text{Cl}_2$  lub  $\text{HCl}$ . W przypadku użycia chloru otrzymuje się produkty, będące co najmniej dichloropochodnymi. Jeśli w cząsteczce jest tylko jedno wiązanie podwójne, po użyciu  $\text{HCl}$  otrzymuje się monochloropochodną. Przyłączanie  $\text{HCl}$  do alkenów zachodzi zwykle zgodnie z regułą Markownikowa.

W aldehydach i ketonach podstawieniu atomem chloru ulegają atomy wodoru w pozycji  $\alpha$ . Reakcję katalizują kwasy i zasady:



chloral

Chlorowcowanie kwasów: chlorowiec łatwo reaguje z kwasami karboksylowymi w obecności niewielkich ilości fosforu, tworząc kwasy  $\alpha$ -chlorowcokarboksylowe. Reakcja ta przebiega najłatwiej z bromem:



kwasy  $\alpha$ -bromooctowy

Chlorki acylowe można otrzymać, ogrzewając kwasy karboksylowe lub ich sole ze środkami chlorującymi. Najdogodniej jest stosować  $\text{SOCl}_2$ , ponieważ powstające produkty nieorganiczne są w postaci gazowej.

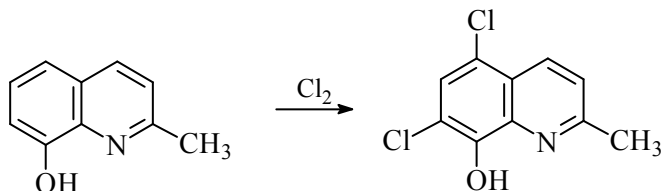
Reakcja haloformowa: ulegają jej aldehydy octowe, metyloketony, alkohole o budowie  $\text{R-CH(OH)-CH}_3$  podczas wyczerpującego chlorowcowania w środowisku silnie alkalicznym. Reakcja ta ma znaczenie analityczne, a w przemyśle wykorzystywana jest do syntezy chloroformu i aromatycznych kwasów karboksylowych, jeżeli odpowiednie metyloketony są łatwiej dostępne niż same kwasy.



Bromowanie i jodowanie są procesami analogicznymi i przebiegają w podobny sposób i w podobnych warunkach.

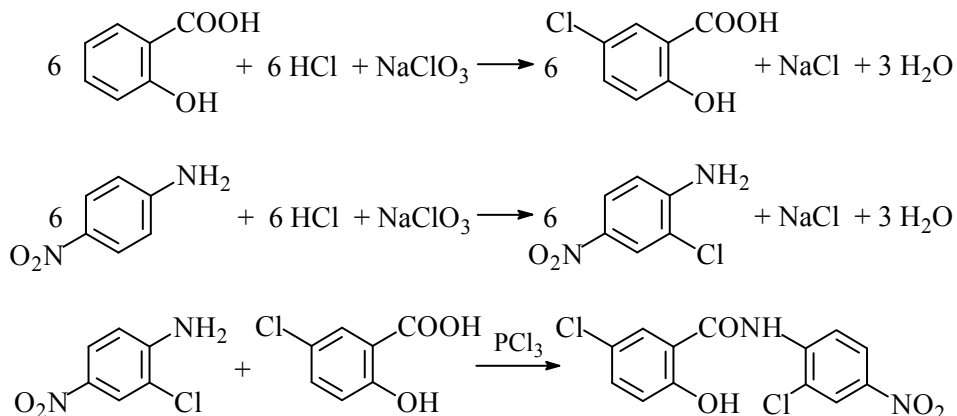
### II.8.3. Zastosowanie chlorowcowania w przemyśle farmaceutycznym

1. Otrzymywanie chlorchinaldolu:

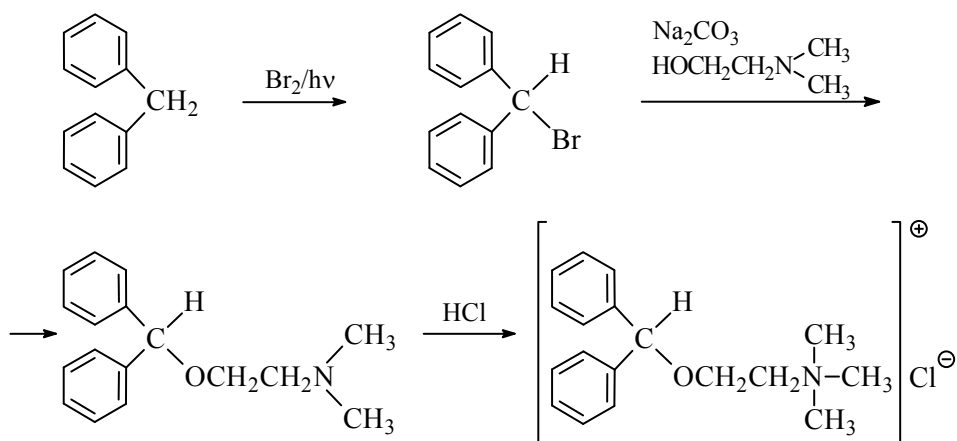




2. Otrzymywanie niklozamidu z kwasu salicylowego:



3. Otrzymywanie chlorowodoru difenhydraminy – w pierwszym etapie syntezy brom zostaje wprowadzony do cząsteczki difenylometanu:



## II.9. Utlenianie

### II.9.1. Wiadomości ogólne

**Utlenianie** polega na reakcji związku chemicznego z tlenem lub innym czynnikiem utleniającym, w wyniku której następuje zwiększenie stopnia utlenienia pierwiastka. Procesy te dzielą się na dwie podstawowe grupy:

- utlenianie zupełne (proces wysokotemperaturowy, temp. > 1000°C),
- utlenianie niezupełne (temp. < 500°C).

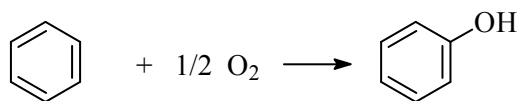
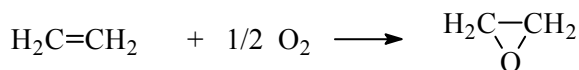
Utlenianie zupełne (spalanie) związku organicznego prowadzi do całkowitego rozpadu utlenianych cząsteczek z wytworzeniem produktu wyczerpującego utleniania, tj. CO<sub>2</sub>

i H<sub>2</sub>O. Jeśli w cząsteczce utlenianego związku występuje S, N, Cl, to tworzy się dodatkowo SO<sub>2</sub>, tlenki azotu i HCl. Przykładem tego procesu jest całkowite spalanie węgla, aby uzyskać energię.

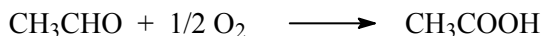
Utlenianie niepełne polega na reakcji związku organicznego z czynnikiem utleniającym i doprowadza do wzrostu stopnia utlenienia atomów zawartych w tym związku. Produktami są substancje utlenione w stopniu mieszczącym się pomiędzy stanem utlenienia wyjściowego a stanem utlenienia wyczerpującego.

Procesom tym towarzyszy:

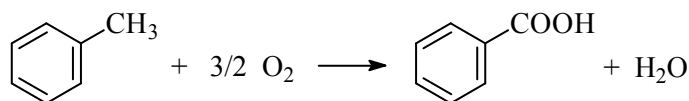
- wprowadzenie tlenu do cząsteczki niezawierającej atomu tlenu:



- zwiększenie ilości atomów tlenu w cząsteczce:

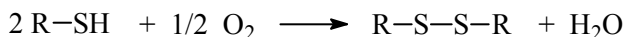


- wprowadzenie do cząsteczki atomu tlenu, przy jednoczesnym eliminowaniu atomu wodoru:



Podobnie jak spalanie, reakcja utleniania niepełnego ma także charakter egzotermiczny, choć w mniejszym stopniu. Wskutek tego równowaga ich przesunięta jest w stronę produktów i procesy utleniania łatwo przebiegają do końca. W większości przypadków stosuje się środki ograniczające zasięg reakcji i zapobiegające utracie pożądanego produktu w wyniku zbyt daleko posuniętego utlenienia.

Szczególnym przypadkiem procesów utleniania jest utlenianie odwodorniające polegające na odszczepieniu atomu (atomów) wodoru od cząsteczki związku organicznego bez wprowadzenia atomu tlenu, przy czym zachodzi to w obecności czynnika utleniającego, np. otrzymywanie disulfidów z tioli:



Utlenianie odwodorniające różni się od zwykłego procesu odwodornienia stosowaniem czynnika utleniającego (w niedomiarze), który utlenia wodór wydzielający się podczas reakcji odwodornienia.

Produktem ubocznym pierwszego procesu jest woda, a drugiego wodór. Tworzenie się wody jest egzotermiczne i przewyższa endotermiczność procesu odwodornienia.



znajdował się poza przedziałem wybuchowości (poniżej jego dolnej granicy, gdy ilość substancji utlenionej jest niewielka lub powyżej, gdy w mieszaninie znajduje się duży nadmiar substancji utlenianej).

Katalizatorami procesu są metale, ich tlenki i sole. Stosuje się tu pierwiastki łatwo zmieniające wartościowość: Cu, Ag, V, Mo, Mn oraz metale VIII grupy układu okresowego. W środowisku reakcji zawarty jest tlen, np. z powietrza, metale te łatwo ulegają utlenieniu tlenem i niemal natychmiastowej redukcji pod wpływem utlenienia związku organicznego. Spełniają one rolę pośrednika przenoszenia tlenu i w ten sposób selektywnie przyspieszają określone stadia procesów utleniania.

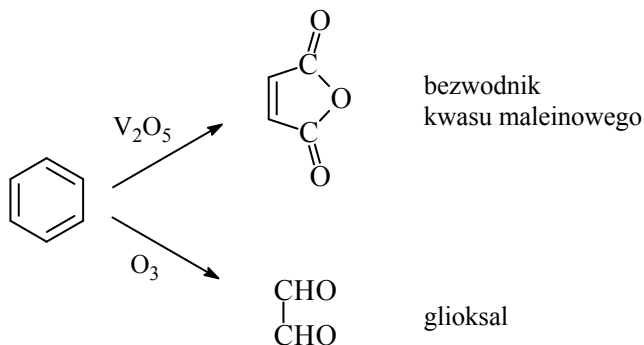
Procesy utleniania przebiegają w fazie ciekłej lub gazowej. W fazie gazowej przepuszcza się pary substancji utlenianej razem z powietrzem przez złożone kontaktu. Temperatura procesu wynosi 200–450°C, stosuje się też nieznacznie podwyższone ciśnienie. Utlenianie w fazie ciekłej polega na przepuszczeniu powietrza przez warstwę utlenianej cieczy w temperaturze 50–150°C. Stosuje się podwyższone ciśnienie.

W procesach zachodzących w warunkach wodnych, stosuje się sole wyżej wymienionych metali rozpuszczalne w wodzie. W procesach zachodzących w roztworach rozpuszczalników organicznych stosuje się sole rozpuszczalne w tym środowisku.

Procesy utleniania związków organicznych przebiegają najczęściej według mechanizmu wolnorodnikowego, a sole metali ciężkich, łatwo zmieniających wartościowość, katalizują ten proces. Reagują one przejściowo z utlenionym związkiem organicznym, a następnie regenerują się w reakcji z tlenem lub nadtlenkami.

Oprócz wspomnianych wyżej katalizatorów, procesy utleniania można przeprowadzać również przy udziale mikroorganizmów (np. produkcja kwasu octowego metodą fermentacyjną).

Należy zwrócić uwagę, że produkt utleniania i mechanizm reakcji mogą być często różne, w zależności od doboru utleniacza i warunków reakcji:

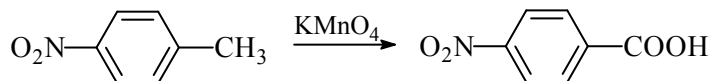


W przemyśle utlenieniu poddaje się:

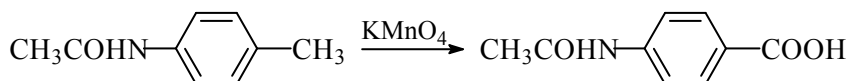
- alkanany  $C_1$ – $C_4$ , otrzymując tlenowe pochodne,
- wyższe alkanany, otrzymując mieszaninę wyższych kwasów tłuszczowych i wosków,
- alkohole do aldehydów, ketonów, kwasów karboksylowych,
- aldehydy do kwasów karboksylowych lub ich bezwodników,
- olefiny do ich tlenków lub aldehydów,
- węglowodory aromatyczne do alifatycznych i aromatycznych bezwodników kwasowych lub aromatycznych kwasów karboksylowych.

## II.9.2. Przykłady zastosowania procesu utleniania w przemyśle farmaceutycznym

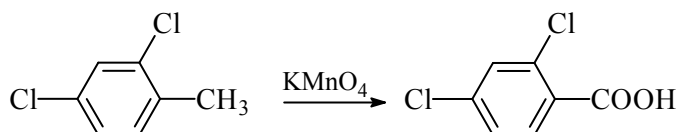
1. Otrzymywanie anestetyny z toluenu – drugi etap stanowi utlenianie 4-nitrotoluenu do kwasu 4-nitrobenzoowego:



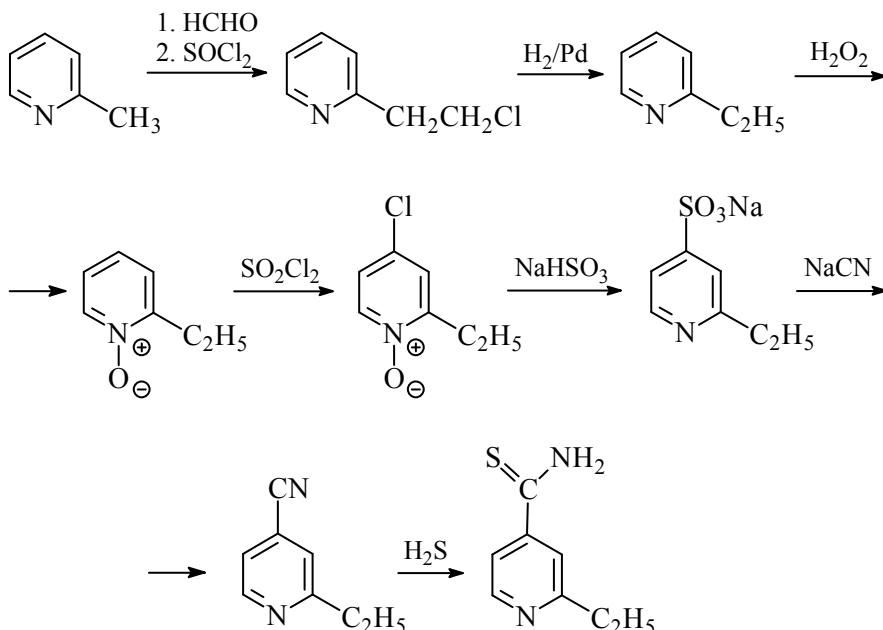
2. Otrzymywanie anestetyny z p-toluidyny – drugi etap polega na utlenianiu 4-N-acetylotoluenu do kwasu 4-acetyloaminobenzoowego:



3. Pierwszy etap syntezy furosemidu z 2,4-dichlorotoluenu:



4. Jeden z etapów syntezy etionamidu:



### Literatura

1. L. Kuczyński: *Technologia środków leczniczych*, PZWL, Warszawa 1973.
2. T. Tkaczyński, D. Tkaczyńska: *Synteza i technologia chemiczna leków*, PZWL, Warszawa 1984.
3. H. Marona (red.): *Syntezy środków leczniczych (dla studentów farmacji)*, wyd. V, poprawione i uzupełnione, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2002.
4. J.T. Wróbel (red.): *Preparatyka i elementy syntezy organicznej*, PWN, Warszawa 1983.
5. P.H. Groggins (red.): *Procesy jednostkowe w syntezie organicznej*, WNT, Warszawa 1961.
6. R. Bogoczek, E. Kociołek-Balawejder: *Technologia chemiczna, organiczne surowce i półprodukty*, AE, Wrocław 1992.
7. J. Tułeczki: *Technologia środków leczniczych*, PZWL, Warszawa 1978.
8. E. Bortel, H. Koneczny: *Zarys technologii chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.
9. *Deutsches Arzneibuch (DAB 9)*, ed. K. Hartke, E. Mutschler, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; Govi-Verlag GmbH, Frankfurt 1986.

### III. KONDENSACJE PROSTE I CYKLIZUJĄCE

**Kondensacja** jest procesem polegającym na łączeniu się dwóch lub większej ilości cząsteczek organicznych z wytworzeniem nowej substancji, o cząsteczce większej niż cząsteczki substancji wyjściowych. Kondensacja jest reakcją, w której z dwóch substratów tworzy się produkt reakcji i wydziela się przy tym cząsteczka prostego związku, np.  $H_2O$ ,  $HCl$ ,  $NH_3$ ,  $H_2$ , fluorowce, alkohol, tiol,  $H_2S$  itd.

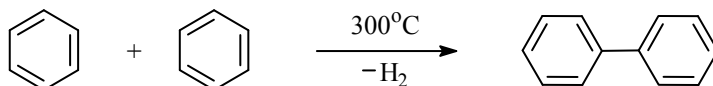
Reakcja ta prowadzi do powstania wiązania pomiędzy uprzednio nie związanymi atomami (kondensacja prosta), lub tworzy się pierścień heterocykliczny (kondensacja cyklizująca). Tylko nieliczne procesy kondensacji przebiegają bez udziału dodatkowych reagentów, w celu ich przeprowadzenia wystarczy zetknięcie się dwóch substratów w określonych warunkach. Zwykle reakcje kondensacji przeprowadza się przy udziale kwasów, zasad, soli (w szerokim tego słowa znaczeniu, np. kwas Lewisa, zasady organiczne) lub katalizatorów np.  $CN^-$ , katalizatorów kontaktowych, np. Pd, które powodują wzrost szybkości reakcji. Warunki temperatury też są różne dla różnych rodzajów kondensacji, np. kondensacja aldolowa zachodzi w temperaturze poniżej  $20^\circ C$ , a reakcja otrzymywania bifenyłu w wysokiej temperaturze ok.  $300^\circ C$ .

W definicji kondensacji mieszczą się także inne procesy, jak: acylowanie, estryfikacja, alkilowanie, chlorowcowanie itd., które zostały już omówione oddzielnie (str. 43–48, 48–53, 73–76, 77–81).

#### III.1. Kondensacje proste

##### III.1.1. Kondensacje połączone z odwodornieniem

Otrzymywanie bifenyłu:

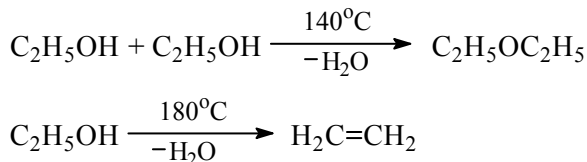


Reakcja ta wymaga wysokiej temperatury (zachodzi w fazie gazowej) i katalizatora kontaktowego, np. Pd, Cu na pumeksie, ZnS, stop cynkowo-żelazowy. Bifenyl stosowany jest jako środek grzybobójczy podczas transportu owoców cytrusowych.

##### III.1.2. Kondensacje połączone z odwodnieniem

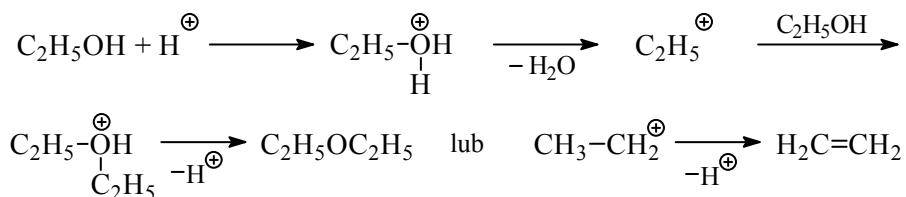
###### III.1.2.1. Otrzymywanie eterów i alkenów z alkoholi

Przebieg reakcji zależy od temperatury – w temp.  $130\text{--}140^\circ C$  powstaje eter, a w temp. powyżej  $180^\circ C$  – alken:



Jest to przykład kondensacji zachodzącej pod wpływem kwasów ( $H_2SO_4$ ).

Mechanizm:



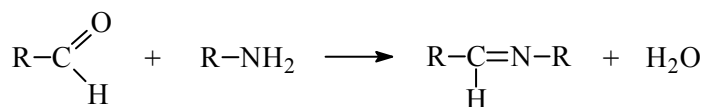
Tą metodą otrzymuje się eter dietylowy.

### III.1.2.2. Reakcje kondensacji aldehydów i ketonów ze związkami zawierającymi grupy aminowe

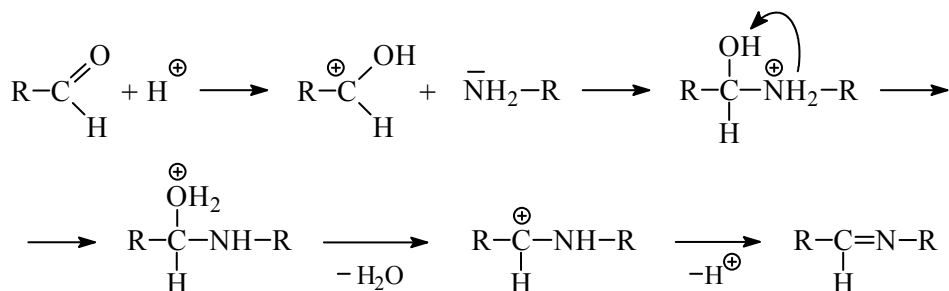
Przykładami reakcji kondensacji tego typu są:

- tworzenie zasad Schiffa z aminami,
- tworzenie oksymów z hydroksyloaminą,
- tworzenie fenylohydrazonów z fenylohydrazyną,
- tworzenie semikarbazonów z semikarbazidem,
- tworzenie tiosemikarbazonów z tiosemikarbazidem.

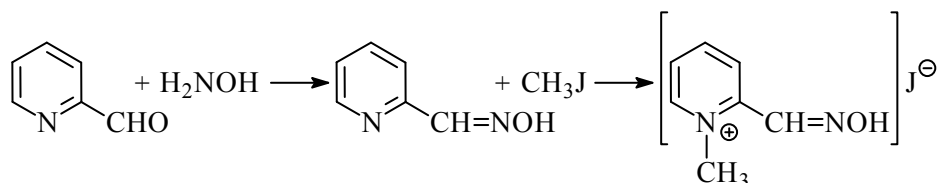
Kondensacja katalizowana przez kwasy przebiega zgodnie z następującym wzorem:



Mechanizm:



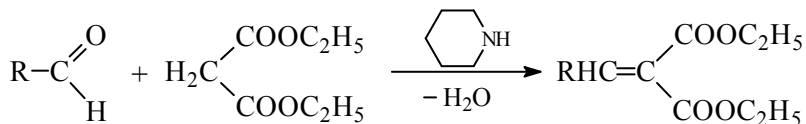
Przykład zastosowania w syntezie leków – tworzenie oksymów aldehydów pirydynowych, np. synteza pralidoksymu:



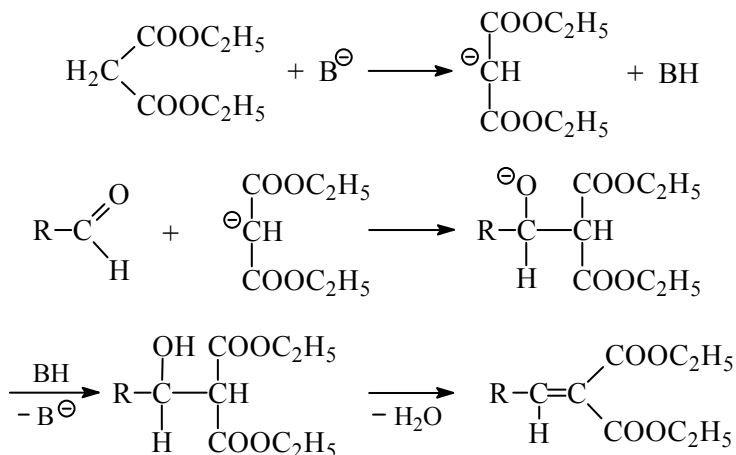


### III.1.2.3. Kondensacja Knoevenagela

Kondensacja aldehydów ze związkami posiadającymi aktywną grupę metylenową zachodzi z wydzieleniem cząsteczki wody w obecności organicznych zasad, np. piperydyny. W wyniku reakcji powstają  $\alpha$ ,  $\beta$ -nienasycone kwasy lub estry. Jest to przykład kondensacji katalizowanej przez zasady.



Mechanizm:

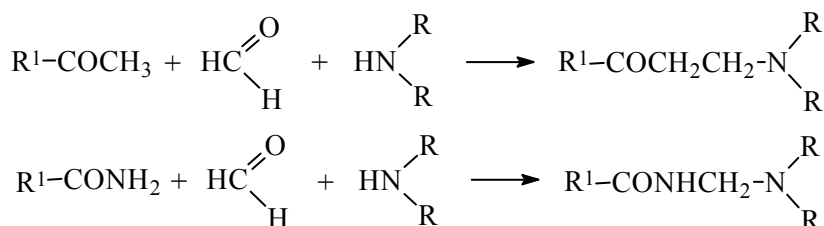


Reakcja ta ma zastosowanie w syntezie pochodnych 4-chinolonów (str. 101–103).

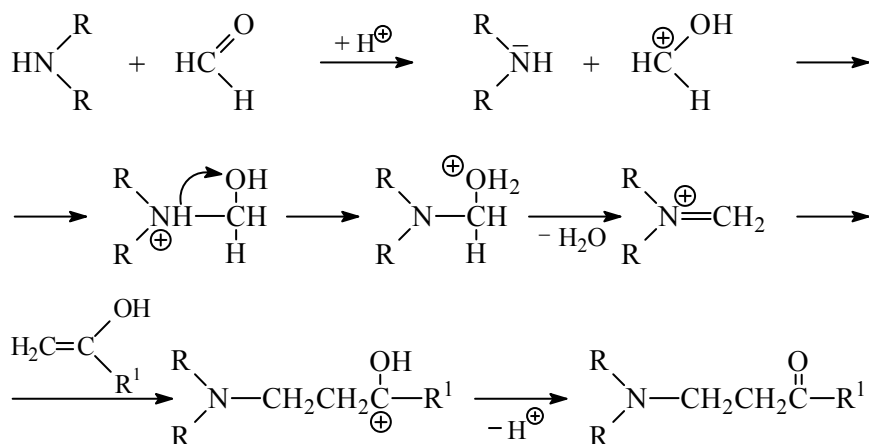
### III.1.2.4. Kondensacja Mannicha – reakcja aminometylowania

Jest to reakcja aldehydu (najczęściej mrówkowego) z aminą pierwszo- lub drugorzędową (najczęściej) i związkiem zawierającym wiązanie CH lub NH o charakterze kwasowym, np. keton, aldehyd, ester, acetylen, amidy, imidy, związki heterocykliczne, np. pirol, indol, imidazol, benzimidazol. Reakcja przebiega w środowisku kwaśnym. Tworzą się N-zasady Mannicha, gdy kwasowy wodór znajduje się przy azocie oraz C-zasady Mannicha, gdy kwasowy wodór jest przy węglu.

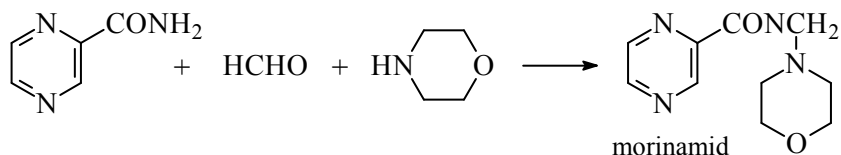
Najczęściej reakcja ta jest stosowana do otrzymywania  $\beta$ -aminoketonów i podstawionych amidów.



Mechanizm:



Reakcja Mannicha ma zastosowanie do syntezy np. morinamidu:

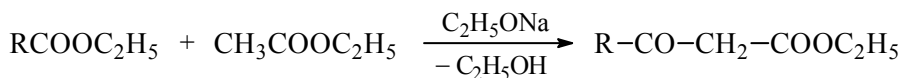


i półsyntetycznych tetracyklin (tetraweryna str. 276).

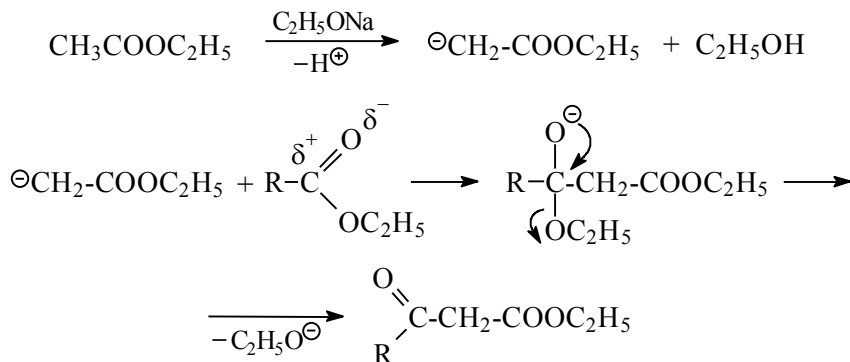
### III.1.3. Kondensacja połączona z wydzieleniem cząsteczki alkoholu

#### III.1.3.1. Kondensacja Claisena

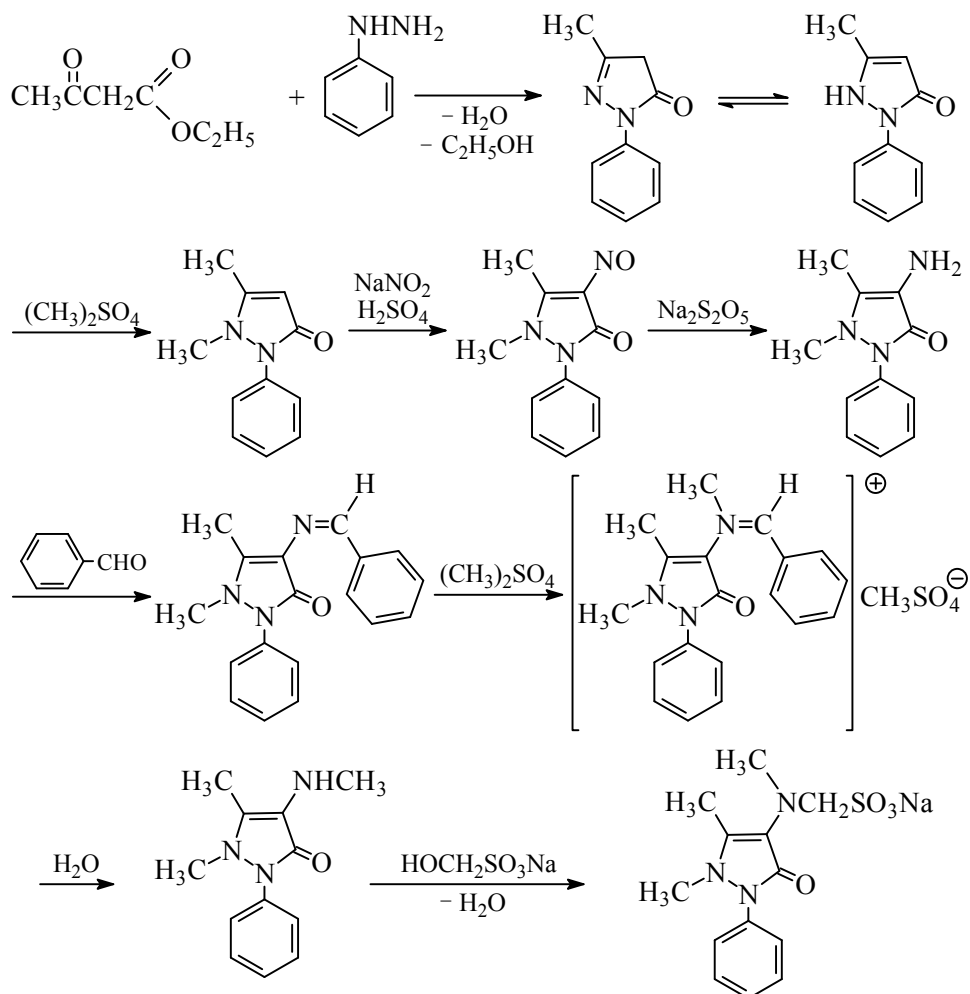
Jest przykładem reakcji zachodzącej pod wpływem soli (etanolanu sodu). Z estrów i ketonów tworzą się β-ketoestry lub β-diketony.



Mechanizm:



Zastosowanie: m.in. do syntezy estru etylowego kwasu acetylooctowego, który jest produktem wyjściowym w otrzymywaniu pochodnych 5-pirazolonu (metamizolu), nifedypiny, metylotioracylu.

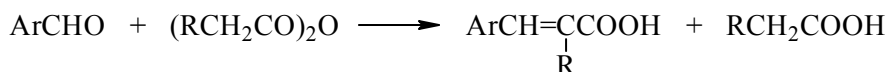


W syntezie Claisena otrzymuje się również ester kwasu oksalilooctowego ( $\rightarrow$  synteza dipirydamolu, str. 104) i ester kwasu oksalilofenylooctowego ( $\rightarrow$  synteza fenobarbitalu, str. 97).

### III.1.4. Kondensacja połączona z wydzieleniem cząsteczki kwasu

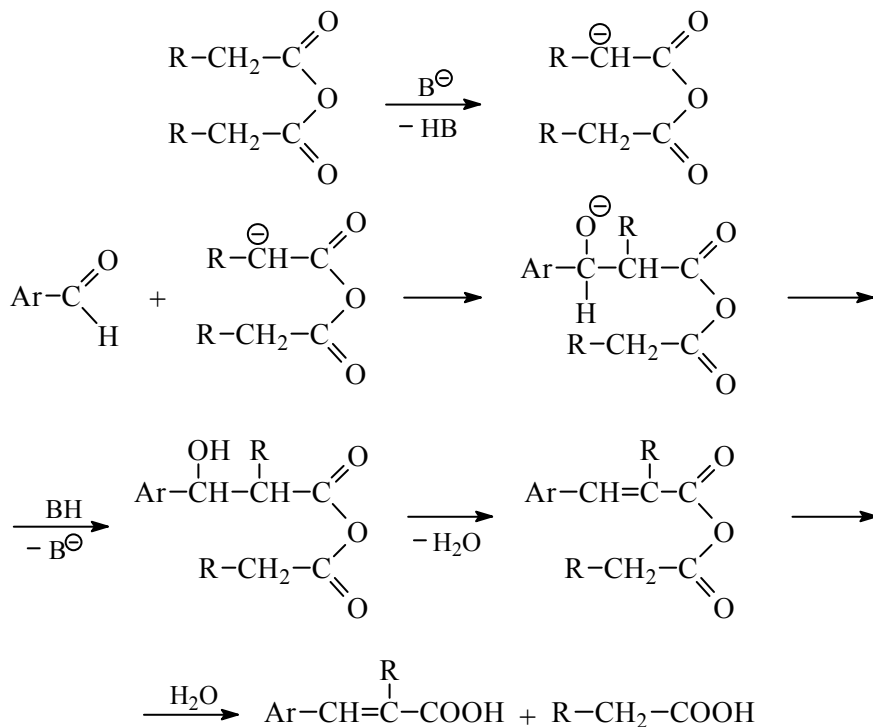
#### III.1.4.1. Reakcja Perkina

Jest to reakcja aromatycznych aldehydów z bezwodnikami kwasów zawierających 2 atomy wodoru przy węglu  $\alpha$ , prowadząca do otrzymania  $\alpha$ ,  $\beta$ -dipodstawionych kwasów akrylowych.

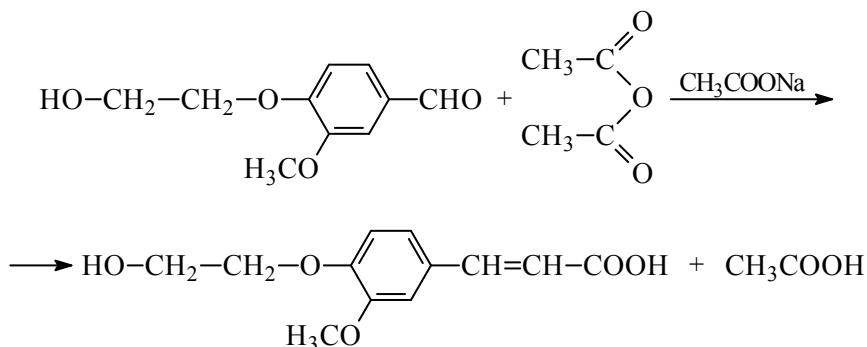


Reakcja przebiega pod wpływem soli sodowej lub potasowej kwasu odpowiadającego bezwodnikowi,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  lub zasady organicznej, np. trietyloaminy, z wydzielaniem cząsteczki kwasu.

Mechanizm:



Reakcja służy do syntezy kwasu cynamonowego i odpowiednich pochodnych. Zastosowanie: do otrzymywania środka żółciotwórczego – kwasu cinametowego.

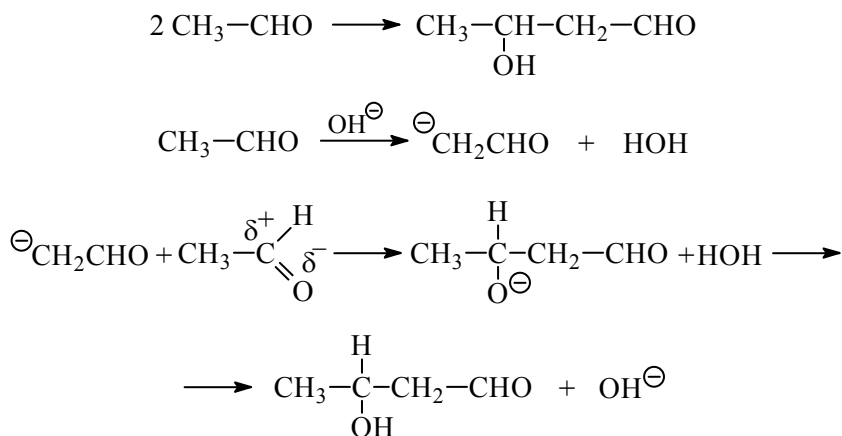


### III.1.5. Inne kondensacje

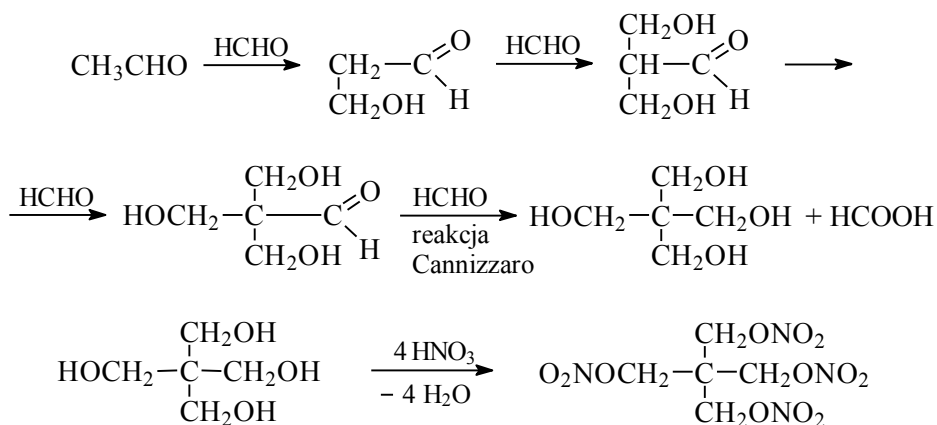
Są to kondensacje, które nie spełniają wszystkich warunków definicji, tzn. nie wydzielają się cząsteczka związku prostego, ale następuje powiększenie cząsteczki, np. podwojenie – **dimeryzacja**. Reakcje te zachodzą również pod wpływem kwasów, zasad lub katalizatorów.

### III.1.5.1. Kondensacja aldolowa (dimeryzacja aldolowa)

Jest to reakcja aldehydów posiadających co najmniej jeden atom wodoru przy węglu  $\alpha$ . Reakcja ta prowadzi do otrzymywania hydroksyaldehydów, czyli aldoli, i zachodzi pod wpływem zasad i kwasów.

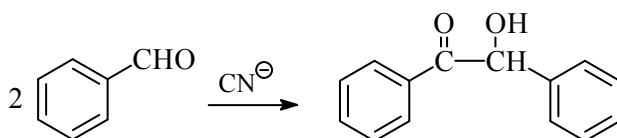


Zastosowanie – w syntezie tetraazotanu pentaerytrylu:

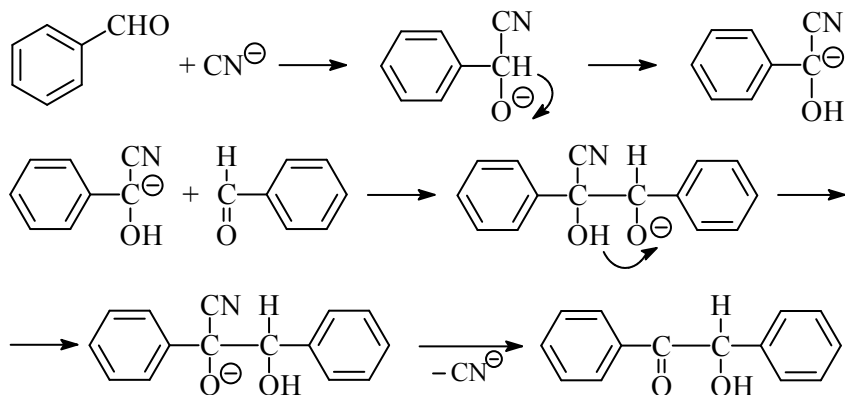


### III.1.5.2. Kondensacja acyloinowa (dimeryzacja acyloinowa)

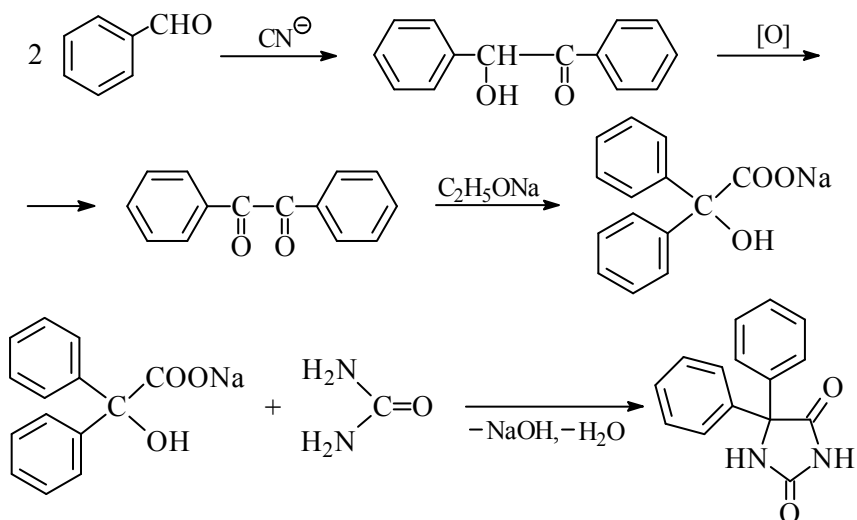
Jest to reakcja np. aldehydów aromatycznych prowadząca do otrzymywania hydroksyketonów aromatycznych. Reakcję tę katalizują jony  $\text{CN}^-$ :



Mechanizm:



Zastosowanie w syntezie fenytoiny:



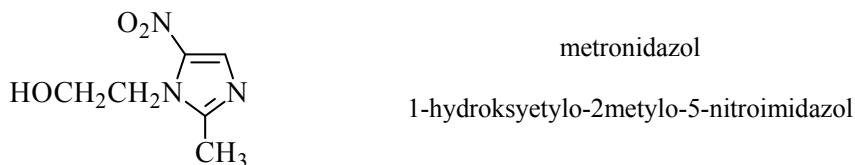
### III.2. Kondensacje cyklizujące

Są to procesy, które prowadzą do powstania układów heterocyklicznych. Można tą drogą otrzymywać proste układy jednopierścieniowe ze związków łańcuchowych z odpowiednimi grupami funkcyjnymi oraz układy o pierścieniach skondensowanych. W tym drugim przypadku jednym z produktów wyjściowych jest pierścień aromatyczny lub heterocykliczny z jakimś podstawnikiem, np. grupą  $\text{NH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{Cl}$ . Dobudowywanie drugiego lub większej ilości pierścieni do istniejącego układu nazywa się **anelowaniem**. W trakcie tej reakcji wydzielają się również cząsteczki prostego związku, np.  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$ . Odbywa się ona najczęściej przy udziale takich substancji, jak: chlorki fosforu ( $\text{PCl}_5$ ,  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{POCl}_3$ ), bezwodnik octowy, PPA (kwas polifosforowy),  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  itd.

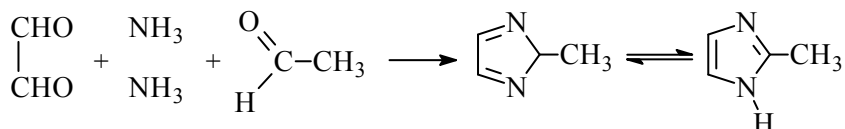
## Kondensacje cyklizujące w przykładach syntezy leków

### III.2.1. Otrzymywanie prostych układów

#### III.2.1.1. Układ imidazolu

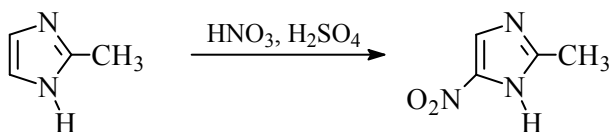


a) otrzymywanie 2-metyloimidazolu:

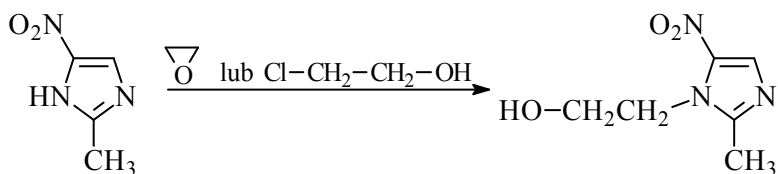


Reakcję prowadzi się 25% wodą amoniakalną z aldehydem octowym i kwasem azotowym (następuje utlenienie aldehydu octowego do glioksalu).

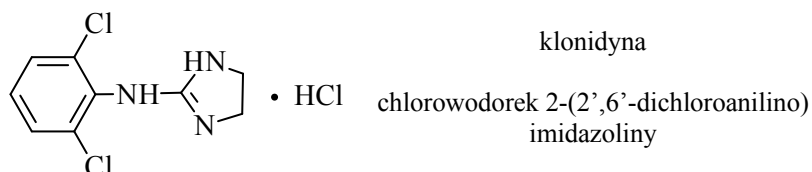
b) nitrowanie mieszaniną nitrującą:



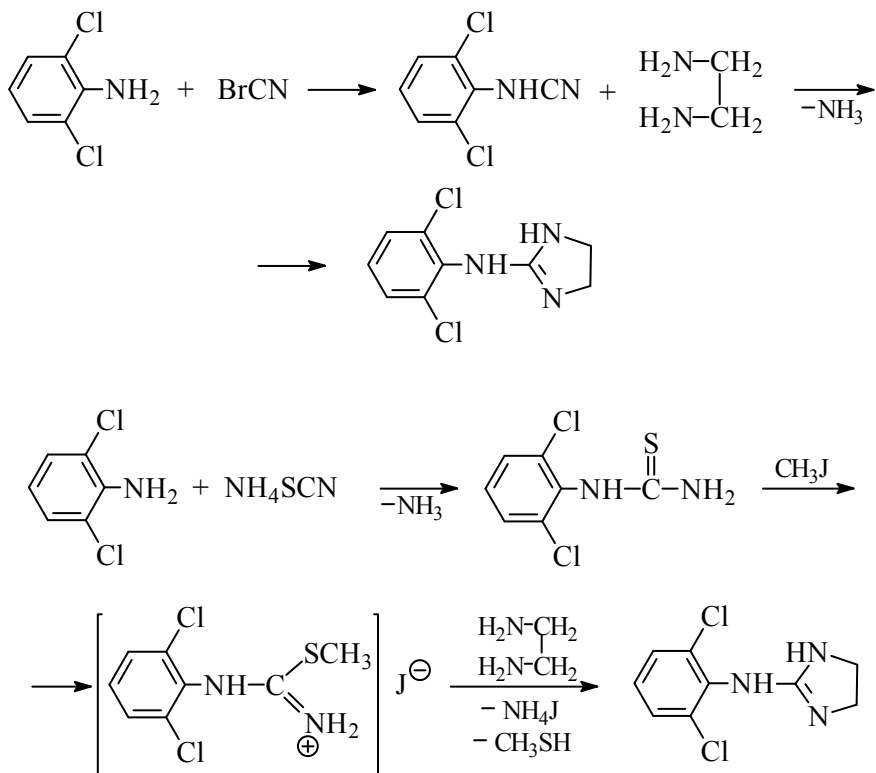
c) wprowadzenie ugrupowania hydroksyetylowego za pomocą etylenochlorhydriny lub tlenku etylenu:



#### III.2.1.2. Układ imidazolinny

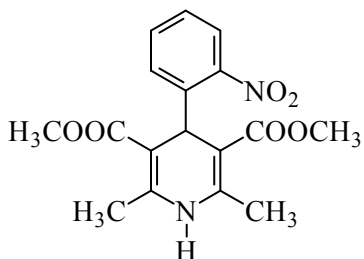


Związek ten otrzymuje się na drodze kondensacji etylenodiaminy z pochodną 2,6-dichloroaniliny (np. dichlorofenylocyanamidem) lub pochodną S-metyloizotiomocznika:



Reakcję kondensacji przeprowadza się z etylenodiaminą w środowisku alkoholowym.

### III.2.1.3. Układ pirydyny (dihydropirydyny)

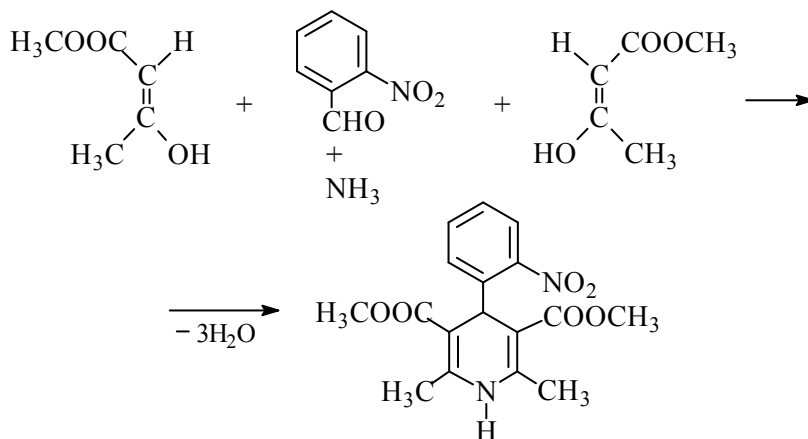


nifedipina

ester dimetylowy kwasu 2,6-dimetylo-4-(2'-nitrofenylo)-1,4-dihydropirydyno-3,5-dikarboksylowego

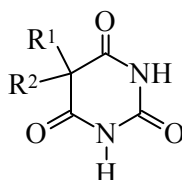
Przeprowadza się kondensację estru metyloвого kwasu acetylooctowego (otrzymanego w kondensacji Claisena str. 90) z aldehydem o-nitrobenzoesowym i amoniakiem w środowisku alkoholowym:





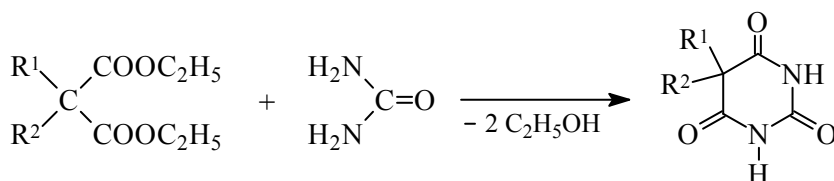
### III.2.1.4. Układ pirymidyny

#### Pochodne kwasu barbiturowego

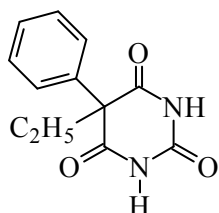


#### a) metoda malonowa

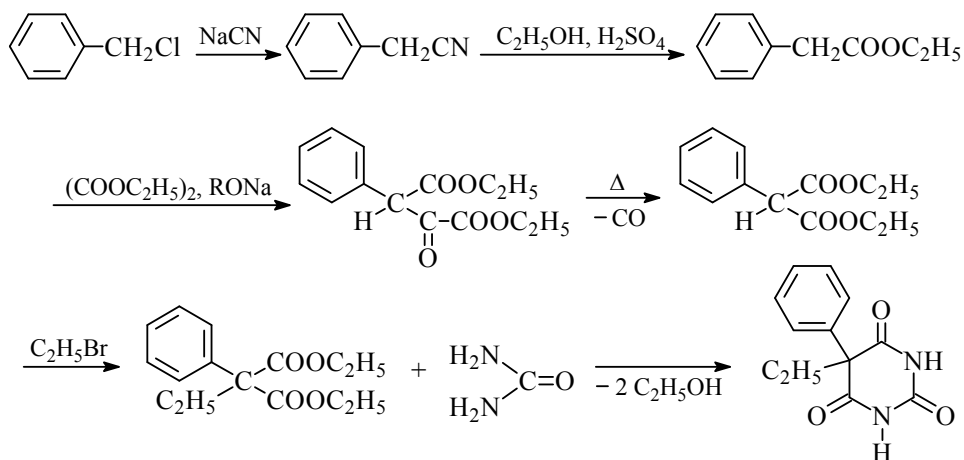
Metoda polega na cyklizacji odpowiednich pochodnych estru dietylowego kwasu malonowego z mocznikiem lub jego pochodnymi. Są różne warianty tej metody, ale najczęściej otrzymuje się pochodne estru kwasu malonowego, które poddaje się cyklizacji z mocznikiem. Reakcję cyklokondensacji prowadzi się w roztworze alkoholowym wobec alkoholanu sodu w środowisku ściśle bezwodnym, oddestylowuje się rozpuszczalnik, pochodną kwasu barbiturowego otrzymuje się w postaci soli sodowej, z której wydziela się po zakwaszeniu kwas barbiturowy.



Tą metodą otrzymywany jest np. fenobarbital:

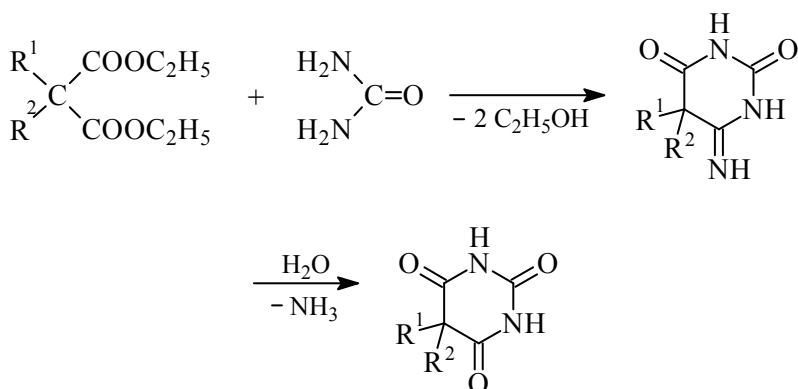


fenobarbital  
kwas 5-etylo-5-fenylbarbiturowy



### b) metoda cyjanooctowa

Metoda ta polega na cyklocondensacji pochodnych estru etylowego kwasu cyjanooctowego z mocznikiem lub jego pochodnymi (np. dicyjandiamidem):



Reakcję prowadzi się w roztworze etanolanu sodu, powstaje sól sodowa kwasu iminobarbiturowego, po oddestylowaniu rozpuszczalnika przeprowadza się kwaśną hydrolizę pochodnej iminowej.

Częściej stosowana jest metoda malonowa.

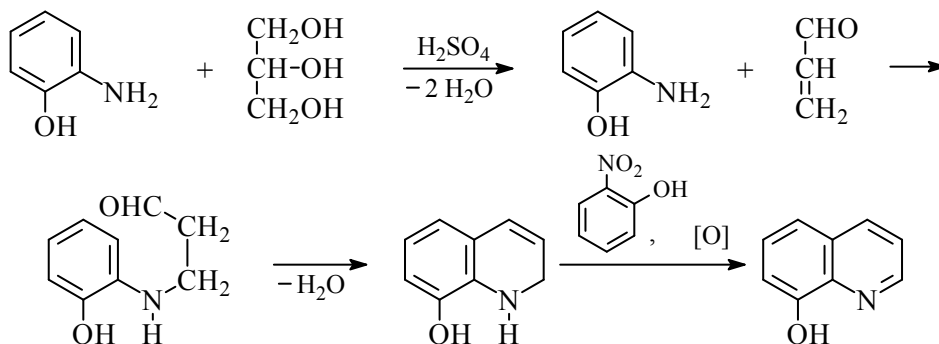
### III.2.2. Układy wielopierścieniowe

Układy wielopierścieniowe tworzy się w ten sposób, że do układu karbocyklicznego lub heterocyklicznego dobudowuje się następne pierścienie.

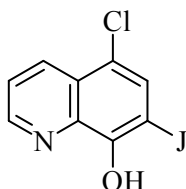
#### III.2.2.1. Synteza Skraupa układu chinoliny

Reakcja polega na kondensacji aniliny (lub jej pochodnej) i glicerolu w obecności stężonego kwasu siarkowego (powstaje akroleina na skutek odwodnienia glicerolu) i czynnika utleniającego (najczęściej nitrobenzenu lub jego pochodnych).

Synteza 8-hydroksychinoliny:



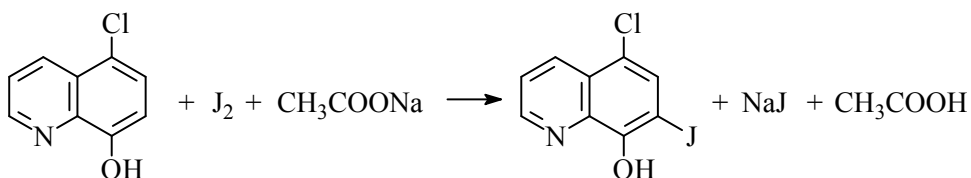
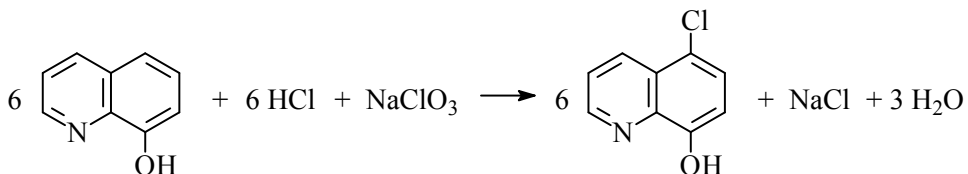
Układ 8-hydroksychinoliny występuje w wielu lekach, np. w klio chinolu:



klio chinol

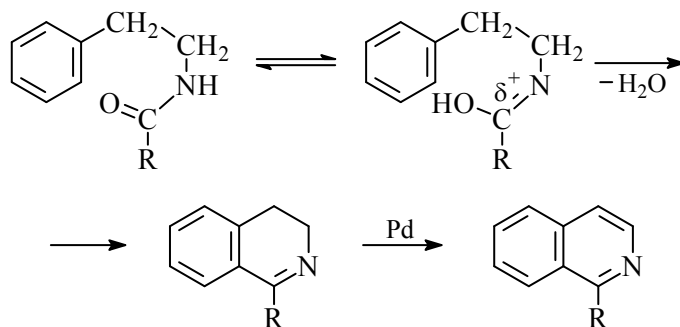
5-chloro-7-jodo-8-hydroksychinolina

8-hydroksychinolinę poddaje się chlorowaniu metodą oksydacyjną przy użyciu 25% kwasu solnego i chloranu (V) sodu, co prowadzi do otrzymania 5-chloro-8-hydroksychinoliny, a następnie przez jodowanie jodem w obecności octanu sodu powstaje klio chinol.

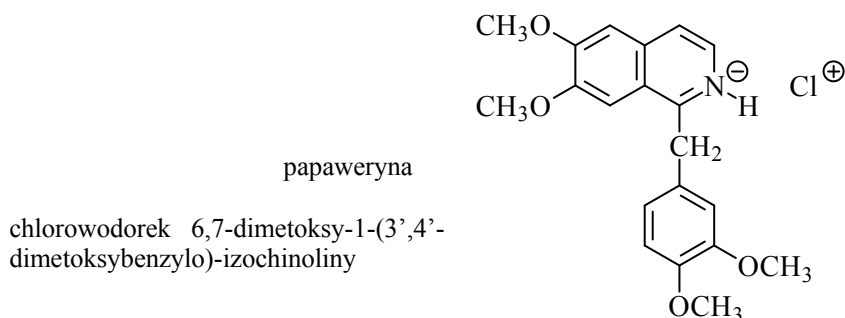


### III.2.2.2. Synteza układu izochinoliny – metoda Bischlera-Napieralskiego

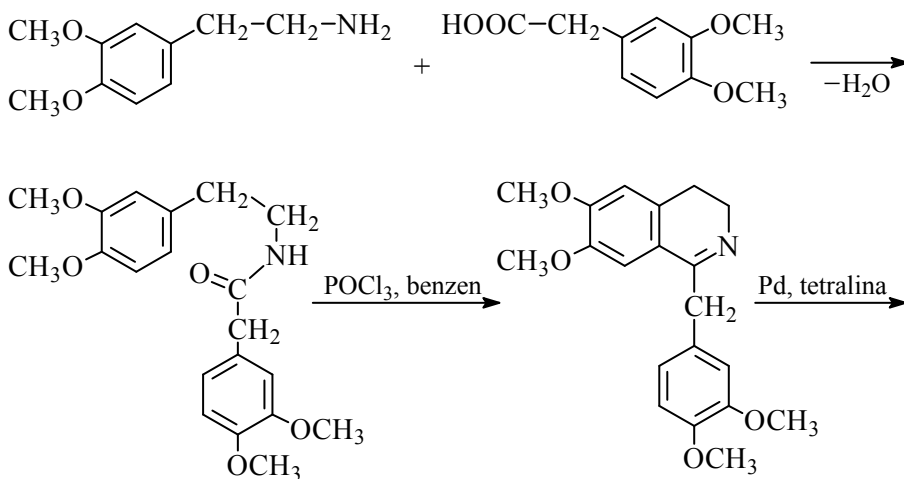
W tej metodzie substratami są N-acylo pochodne  $\beta$ -fenetyloamin. Reakcja polega na wewnątrzcząsteczkowym elektrofilowym ataku atomu węgla reszty acylowej na pierścień aromatyczny i eliminacji cząsteczki wody. Produktem jest pochodna 3,4-dihydroizochinoliny, z której przez odwodornienie otrzymuje się układ izochinoliny.

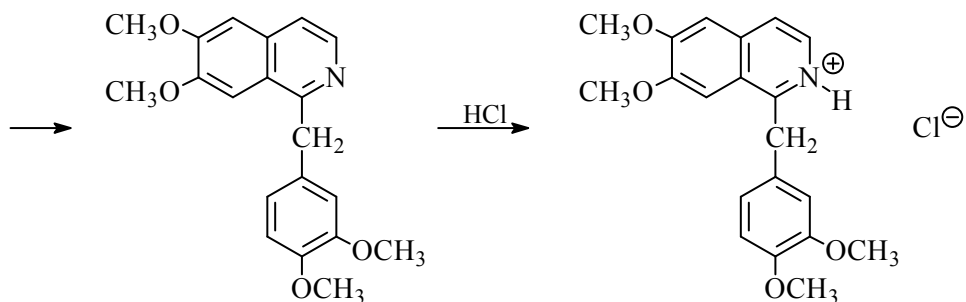


Tą metodą otrzymuje się chlorowodorek papaweryny:



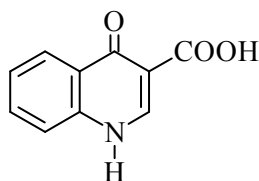
Produktem wyjściowym stosowanym w tej cyklizacji jest homoweratryloamid kwasu homoweratrowego. Otrzymuje się go przez kondensację homoweratryloaminy z kwasem homoweratrowym w dekalinie lub tetralinie i benzenie (azeotropowe oddestylowanie wody).



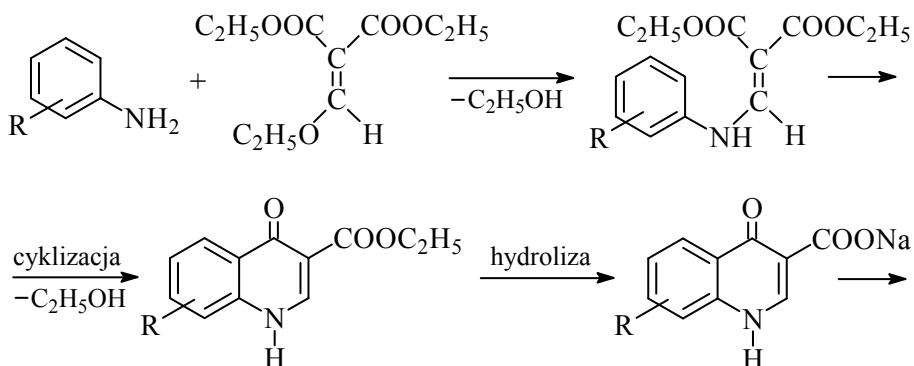


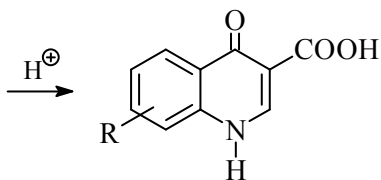
Homoweratryloamid kwasu homoweratrowego poddaje się cyklokondensacji w benzenie w obecności  $\text{POCl}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$  lub PPA. Po oddestylowaniu benzeniu i środka cyklizującego pozostałość rozpuszcza się w wodzie, alkalizuje  $\text{K}_2\text{CO}_3$  i ekstrahuje benzenem. Po oddestylowaniu benzeniu dihydropapawerynę rozpuszcza się w tetralinie i odwodorowuje Pd. Po odsączeniu katalizatora przesącz oziębia się i wydziela się papawerynę. Wolną zasadę przeprowadza się w chlorowoderek przez rozpuszczenie w alkoholu i wytrącenie stężonym kwasem solnym.

### III.2.2.3. Synteza układu 4-chinolonu



Ogólna metoda otrzymywania kwasów 4-okso-1,4-dihydrochinolino-3-karboxylowych polega na cyklokondensacji pochodnych aniliny z etoksymetylenomalonianem dietylu. W wyniku reakcji powstaje anilinometylenomalonian dietylu. Ten, poddany cyklokondensacji, daje ester etylowy kwasu 4-okso-1,4-dihydrochinolino-3-karboxylowego, który hydrolizuje się (hydroliza alkaliczna) i zakwasza celem wytrącenia kwasu.

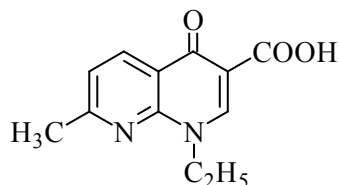




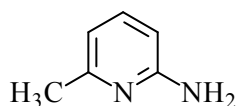
Przykładem zastosowania tej metody w chemii leków jest synteza pierwszego leku z grupy chinolonów – kwasu nalidiksowego (pochodnej 8-aza-4-chinolonu).

kwas nalidiksowy

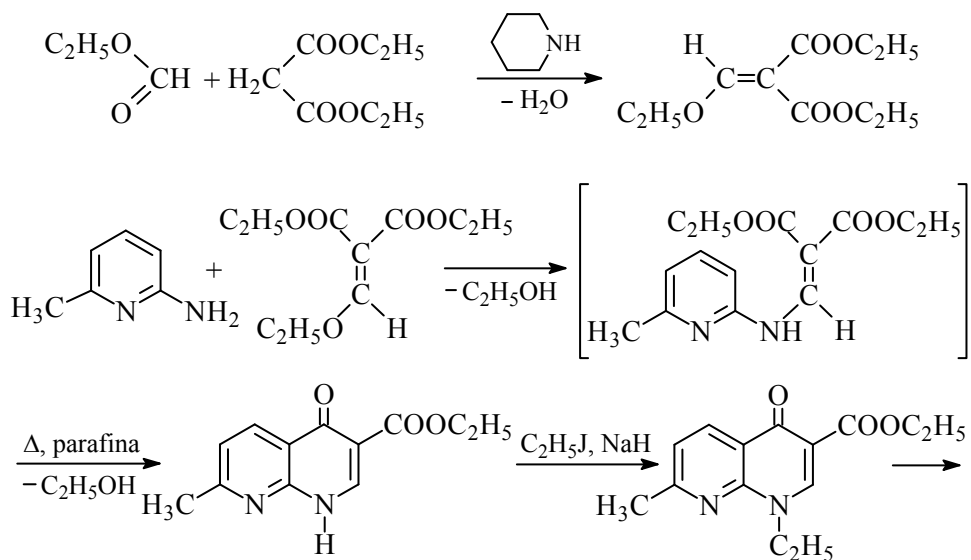
kwas 1-etylo-1,4-dihydro-7-metylo-4-okso-1,8-naftyrydino-3-karboksylowy

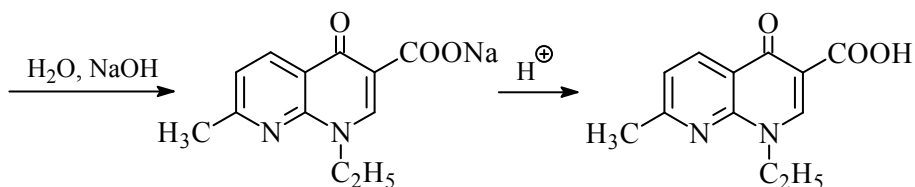


Produktami wyjściowymi są: 2-amino-6-metylopirydyna, otrzymywana w reakcji Czichibabina z  $\alpha$ -pikoliną i  $NaNH_2$

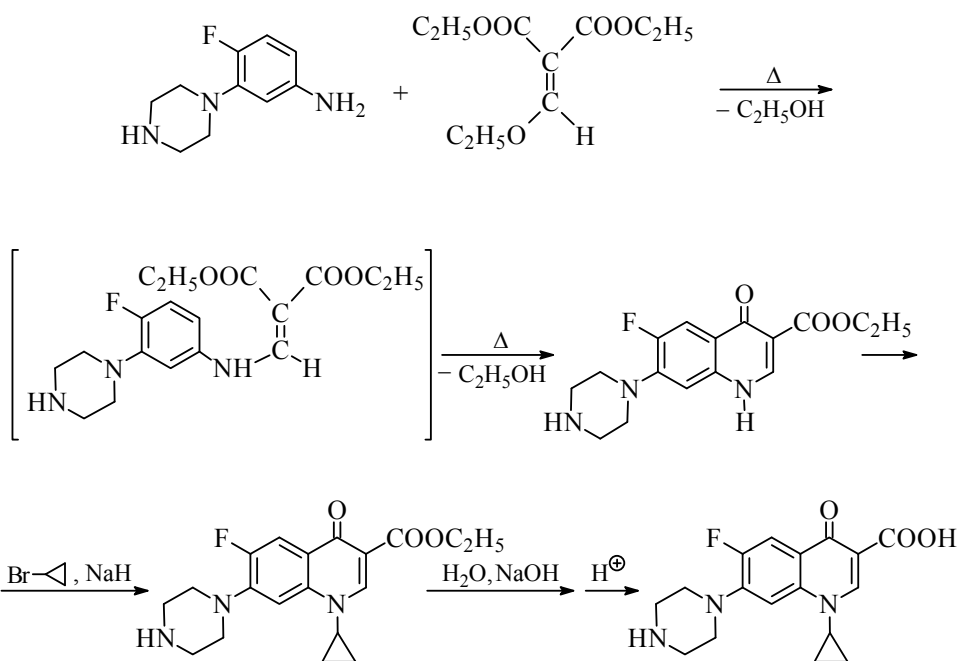
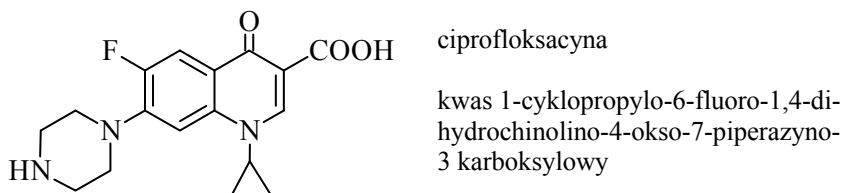


oraz ester dietylowy kwasu etoksymetylenomalonowego, który otrzymuje się z mrowczanu etylu i estru etylowego kwasu malonowego w reakcji Knoevenagela (str. 89).





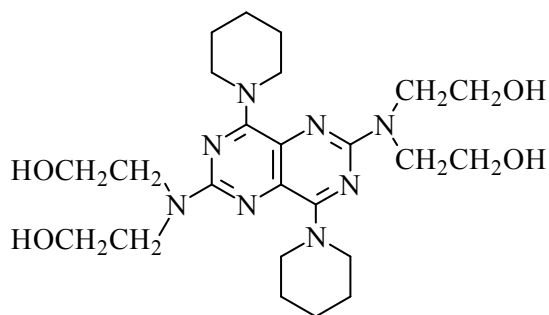
Analogicznie otrzymuje się ciprofloksacynę.



Cyklizację prowadzi się w obecności różnych środków cykliczujących, takich jak dibenzyllobenzen, kwas PPA,  $\text{POCl}_3$ , bezwodnik octowy. Najbardziej ekonomiczna jest jednostopniowa metoda tworzenia feniloaminometylenomalonianu dietylu i jego cyklizacja w środowisku obojętnego, wysokowrzącego rozpuszczalnika (parafina, olej parafinowy) w temperaturze ok.  $250^\circ\text{C}$ .

### III.2.2.4. Synteza układu pirymido[5,4-d]pirymidyny

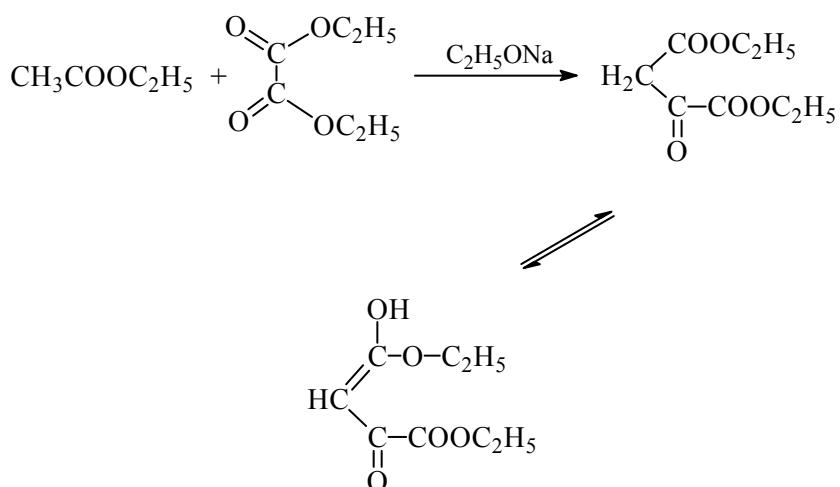
Jest to przykład dwuetapowej kondensacji cyklizującej. Najpierw tworzy się jeden układ heterocykliczny pirymidyny z podstawnikami i do niego dobudowuje się drugi pierścień. Przykładem zastosowania tej reakcji w przemyśle farmaceutycznym jest synteza dipirydamolu.



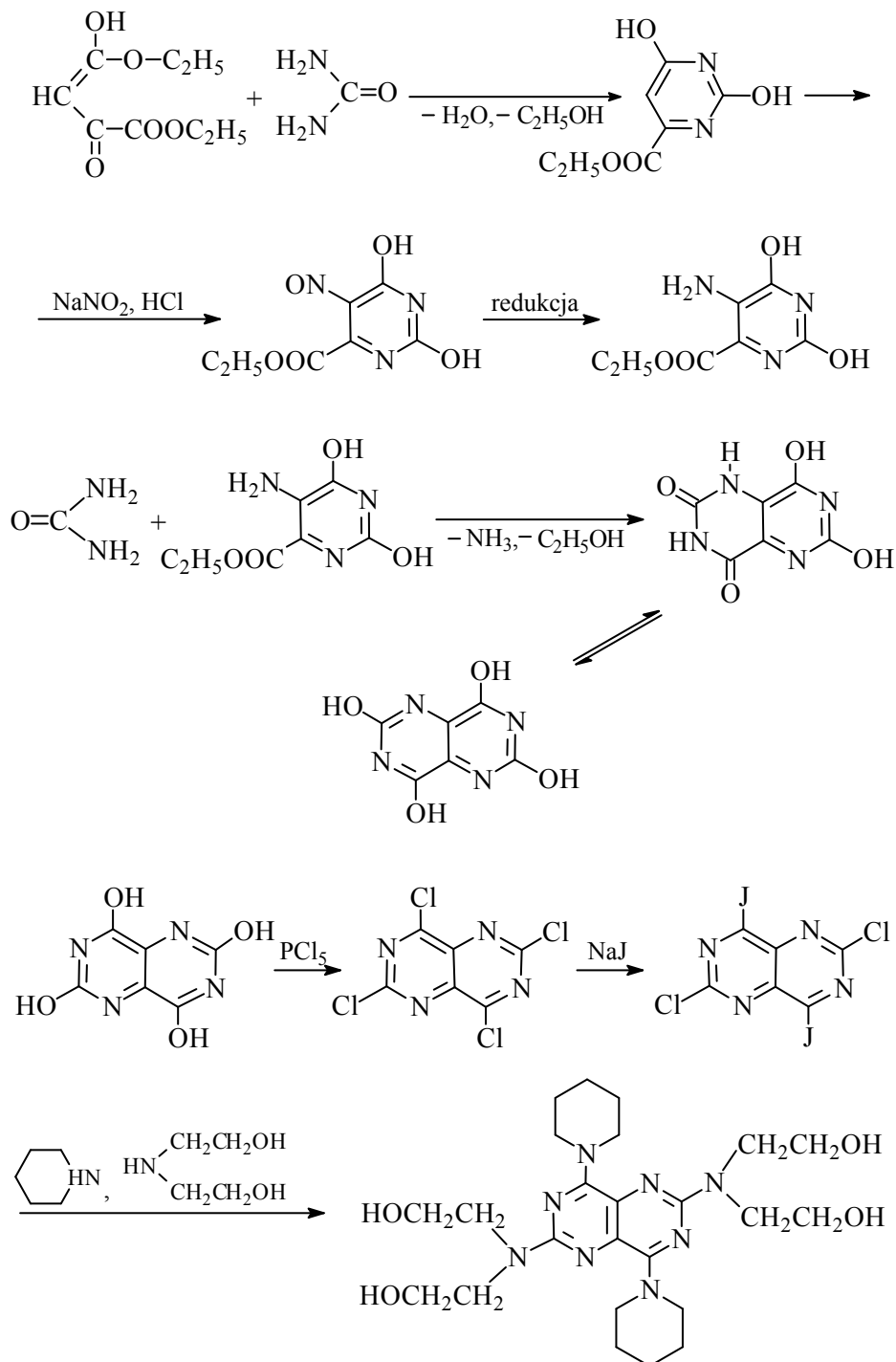
dipirydamol

2,6-bis-(β-hydroksyetyloamino)-  
4,8-(dipiperidyno-1)pirymido[5,4-d]pirymidyna

W kondensacji Claisena (str. 90) z estrów etylowych kwasów: octowego i szczawiowego otrzymuje się ester dietylowy kwasu oksalilooctowego, który cyklizuje z mocznikiem do estru etylowego kwasu 2,4-dihydroksypirymido-6-karboksylowego. Ten związek poddaje się nitrozowaniu, redukcji i powtórnej cyklizacji z mocznikiem. Tetrahydroksypochodna pirymido[5,4-d]pirymidyny ulega chlorowaniu za pomocą  $\text{PCl}_5$  w benzenie do tetrachloropochodnej, a następnie ogrzewana z  $\text{NaJ}$  w acetonie przechodzi w 2,6-dichloro-dijodopirymido[5,4-d]pirymidynę, którą poddaje się aminolizie z piperydyną i dietanoloaminą.







Przykładem dwuetapowej kondensacji cyklizującej jest również synteza układu ksantyny, np. teofiliny (str. 233).

### Literatura

1. B. Bobrański: *Preparatyka organicznych środków leczniczych*, PZWL, Warszawa 1971.
2. B. Bochwic: *Preparatyka organiczna*, PWN, Warszawa 1969.
3. R.C. Denney: *Named organic reactions*, Butherworths, London 1969.
4. H.O. House: *Nowoczesne reakcje syntezy organicznej*, PWN, Warszawa 1979.
5. H. Koga, A. Itok, S. Murayama, S. Suzue, T. Irikura: *Structure-activity relationships of antibacterial 6,7 and 7,8-disubstituted 1-alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids*, *J. Med. Chem.*, 1980, 23, 1358.
6. P. Mastalerz: *Podręcznik chemii organicznej*, Wydawnictwo Chemiczne, Wrocław 1996.
7. P. Tomasiak: *Mechanizmy reakcji organicznych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa – Łódź 1998.
8. T. Tkaczyński, D. Tkaczyńska: *Synteza i technologia chemiczna leków*, PZWL, Warszawa 1984.
9. A.I. Vogel: *Preparatyka organiczna*, WNT, Warszawa 1984.
10. J.T. Wróbel (red.): *Preparatyka i elementy syntezy organicznej*, PWN, Warszawa 1983.
11. A. Zejc, M. Gorczyca: *Chemia leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.

## IV. IZOMERIA OPTYCZNA

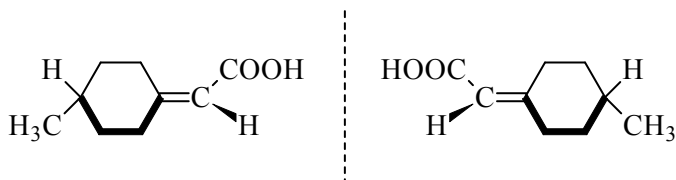
### IV.1. Definicje

Izomeria przestrzenna (stereoizomeria) jest zjawiskiem polegającym na występowaniu związków o jednakowym składzie chemicznym, lecz różniących się przestrzennym ułożeniem atomów względem siebie.

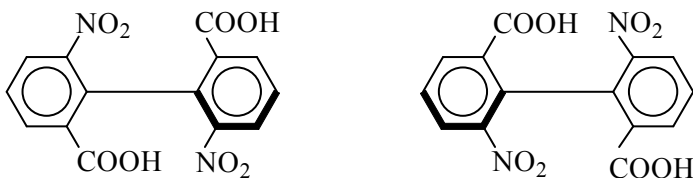
Izomerię przestrzenną dzielimy na:

- izomerię geometryczną,
- izomerię optyczną.

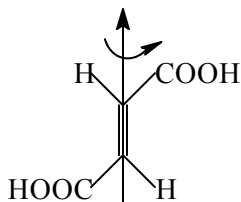
Dowolne dwa stereoizomery są albo enancjomerami – gdy są nienakładalnymi na siebie wzajemnymi odbiciami lustrzanymi, albo diastereoizomerami – nie będąc wzajemnymi odbiciami lustrzanymi. Ze względu na obecność elementów symetrii cząsteczki dzielimy na chiralne i achiralne. Cząsteczki chiralne są albo pozbawione wszelkich elementów symetrii (zawierają centrum asymetrii) – tzw. chiralność centrowa, albo zawierają zwykłą  $n$ -krotną oś symetrii – chiralność osiowa. Natomiast cząsteczki achiralne zawierają  $n$ -krotną przemienną oś symetrii (tzn. złożenie zwykłej osi obrotu i odbicia w płaszczyźnie do niej prostopadłej). Chiralność jest warunkiem koniecznym i wystarczającym istnienia enancjomerii, ale nie jest warunkiem wystarczającym (choć koniecznym) wystąpienia czynności optycznej, czyli zdolności związku do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. Istnieją zatem cząsteczki, które są achiralne, chociaż posiadają centrum chiralności (struktury *mezo*) oraz istnieją cząsteczki chiralne, chociaż nie mają centrum chiralności, np. kwas 4-metylocykloheksylenoocowy, kwas 6,6'-dinitrobifenowy.



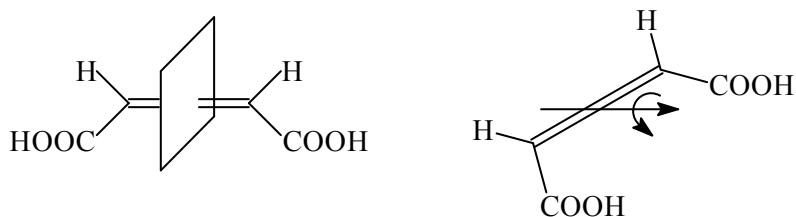
Enancjomery kwasu 4-metylocykloheksylenoocowego



Enancjomery kwasu 6,6'-dinitrobifenowego



Przykład cząsteczki posiadającej dwukrotną przemienną oś symetrii  $S_2$



Przykład cząsteczki posiadającej płaszczyznę symetrii równoważną ze zwykłą dwukrotną osią symetrii (kwas maleinowy)

Cząsteczki enancjomerów mają takie same właściwości fizyczne i chemiczne w środowisku achiralnym, natomiast w środowisku chiralnym ich właściwości różnicują się. Enancjomery różnią się kierunkiem (nie wielkością) kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. Wynika stąd, że mieszanina równomolowych ilości obu enancjomerów danego związku – tzw. mieszanina racemiczna jest optycznie nieczynna. Prawo- lub lewoskrętność związku wyznacza się doświadczalnie i oznacza odpowiednio znakiem (+) i (–), natomiast konfigurację absolutną (R, S) cząsteczek zawierających centrum chiralności oznacza się według zasad zaproponowanych przez Cahn, Ingolda i Preloga na podstawie ułożenia i liczby atomowej czterech podstawników przy asymetrycznym atomie.

Większość procesów biochemicznych przebiega w sposób wybiórczy i dlatego produkty naturalnych przemian biochemicznych są stereowybiórcze, tzn. występują tylko w jednej formie optycznej lewo- lub prawoskrętnej. Miarą stopnia stereowybiórczości danego związku jest stosunek eudysmiczny – czyli stosunek aktywności cząsteczki o silniejszym działaniu biologicznym (eutomeru) do aktywności cząsteczki o słabszym działaniu lub pozbawionej tego działania (distomeru). Im stosunek ten jest większy, tym silniejsza jest aktywność biologiczna jednego z izomerów optycznych.

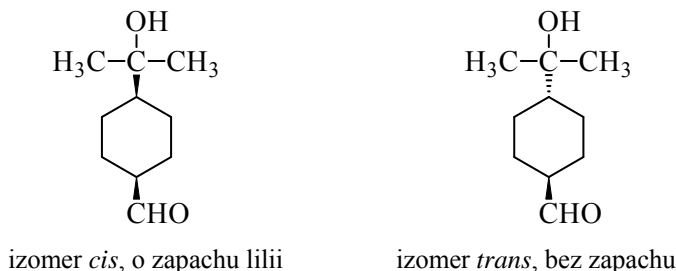
Miarą czystości optycznej związku jest nadmiar enancjomeryczny (ozn. ee), który wyraża względny nadmiar jednego z enancjomerów w mieszaninie; np. jeśli enancjomer R występuje w przewodzie, wartość ee wyliczamy według wzoru:

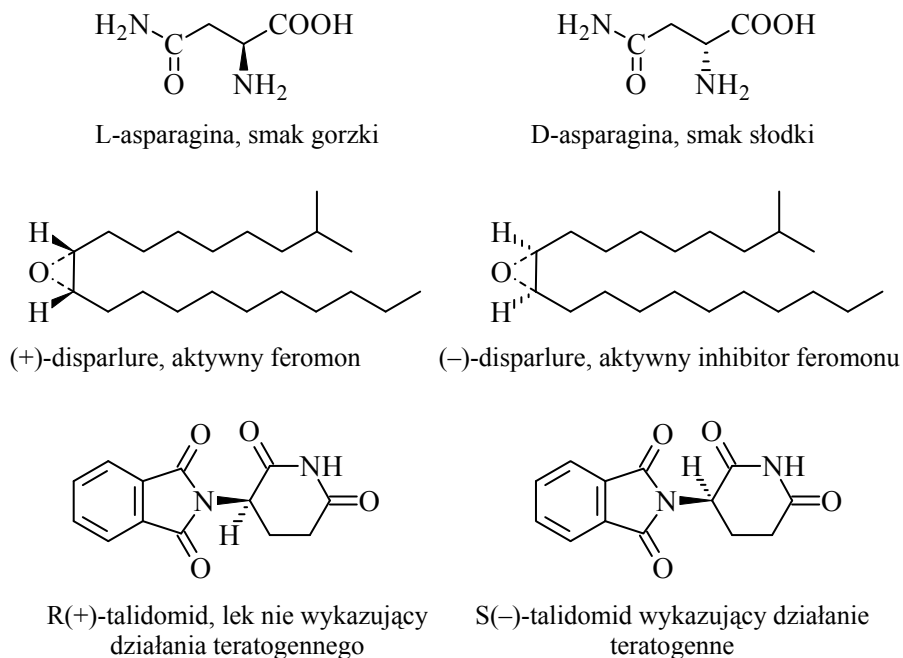
$$\% ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100\%$$

R, S – enancjomery

Znaczenie stereoizomerów w przyrodzie żywej jest ogromne, bowiem mechanizm działania większości związków biologicznie aktywnych (także leków) polega na ich wiązaniu się ze swoistymi receptorami, które mają określoną budowę przestrzenną i mogą oddziaływać tylko ze związkami o budowie odpowiadającej ich wewnętrznemu ukształtowaniu.

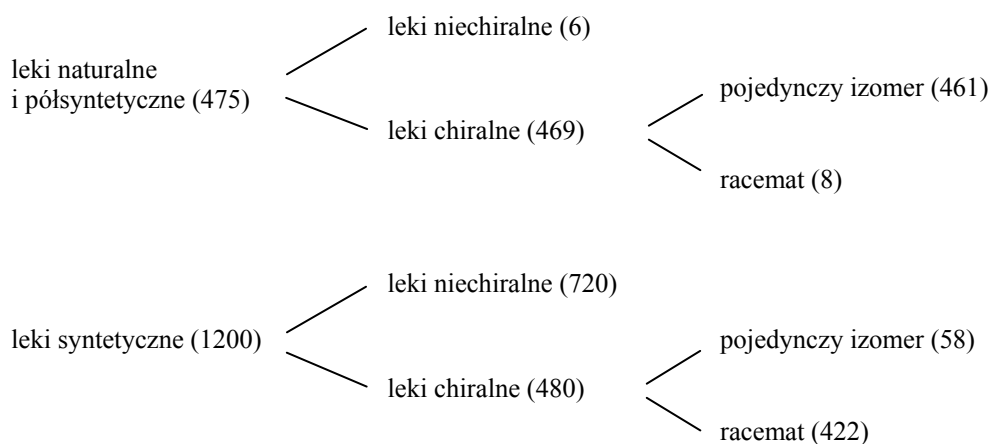
Przykłady związków o różnych właściwościach w środowisku chiralnym, jakim jest żywy organizm:





Rys. 1. Przykłady zróżnicowanych właściwości związków izomerycznych

Przeprowadzona w latach osiemdziesiątych analiza 1675 leków wykazała, że większość leków pochodzenia naturalnego jest izomerami optycznie czystymi, natomiast wśród leków pochodzenia syntetycznego tylko 58 (spośród 480 zawierających centrum asymetrii optycznej) stosowanych jest jako czyste izomery optyczne, natomiast pozostałe 422 są stosowane jako racematy.



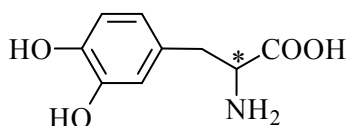
Rys. 2. Chiralność leków i ich występowanie w postaci pojedynczych izomerów lub racematu

Istnieją również ściśle zależności pomiędzy strukturą przestrzenną leków a ich działaniem farmakologicznym. Różnice w działaniu poszczególnych enancjomerów „leków chiralnych” mogą być natury farmakologicznej, które wyrażają się w efektach terapeutycznych, farmakokinetycznych i toksykologicznych, lub farmakodynamicznej – wyrażające się mechanizmem działania leku i jego wpływem na organizm. Różnicowanie to może występować praktycznie na każdym etapie losu leku w organizmie, czyli podczas wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania. Ponadto, na podstawie dokładnej analizy stosowanych leków stwierdzono, że można się spodziewać także każdego wariantu działania enancjomerów, tj. od związków wykazujących podobne właściwości i jednakowy efekt działania po związki, w których jeden izomer wykazuje działanie terapeutyczne, a drugi działanie toksyczne.

## IV.2. Różnice farmakokinetyczne

### Wchłanianie

Podczas wchłaniania stereowybiórczość może wystąpić jedynie w przypadku leków aktywnie transportowanych przez błonę śluzową jelit, gdyż enancjomery nie różnią się rozpuszczalnością ani w środowisku wodnym, ani w lipidach.



lewodopa

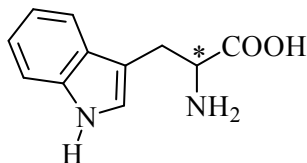
Przykładem związku charakteryzującego się aktywnym, szybkim transportem jest lewodopa, natomiast jego izomer D jest powoli absorbowany na drodze dyfuzji biernej.

### Dystrybucja

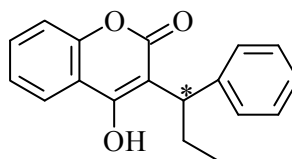
Stereowybiórczość na etapie dystrybucji występuje zarówno w przypadku leków o charakterze kwaśnym, jak i zasadowym, i wynika z różnego stopnia wiązania się poszczególnych enancjomerów leku ze składnikami osocza. Leki o charakterze kwaśnym wiążą się z albuminami surowicy krwi, natomiast leki zasadowe wiążą się głównie z  $\alpha_1$ -kwaśną glikoproteina.

Przykładami leków wiążących się stereoselektywnie z albuminami są:

L-tryptofan – jego powinowactwo do albuminy jest około 100 razy większe niż izomeru D, R(+)-fenpropromon – wiąże się w mniejszym stopniu niż izomer S.



tryptofan



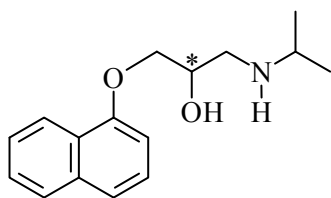
fenpropromon

Leki zasadowe wykazują znacznie mniejszą stereoselektywność na etapie dystrybucji, co wynika z faktu, że stężenie  $\alpha_1$ -kwaśnej glikoproteiny we krwi jest około 30 razy mniejsze niż albuminy surowicy.

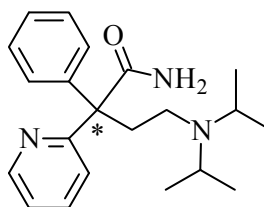
Przykładami są:

propranolol – jego izomer S(-) jest w większym stopniu wiązany z glikoproteiną niż izomer R(+),

dizopyramid – izomer S(+) jest w znacznie większym stopniu wiązany niż jego enancjomer R(-).



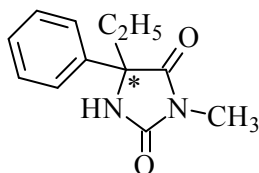
propranolol



dizopyramid

### Metabolizm (biotransformacja)

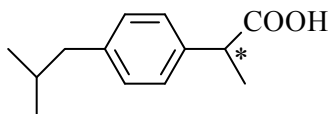
Różnice w metabolizmie poszczególnych enancjomerów mogą dotyczyć szybkości lub kierunku reakcji. Lek, zarówno chiralny jak i achiralny, może być metabolizowany do związków nieaktywnych, aktywnych biologicznie częściowo lub całkowicie odpowiedzialnych za efekt terapeutyczny lub do związków toksycznych. Przykładem leku, którego metabolizm poszczególnych enancjomerów przebiega odmiennymi szlakami jest mefenytoina:



mefenytoina

Izomer R ulega N-demetylowaniu (metabolit wykazuje większą toksyczość), natomiast izomer S ulega hydroksylacji do 5-(4'-hydroksyfenylo)-pochodnej.

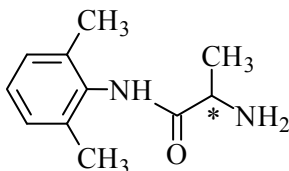
Stereowybiórczość biotransformacji leków obejmuje także inwersję chiralną. Metabolizm taki wykazuje np. ibuprofen. Eutomerem tego leku jest forma S(+) (wykazuje lepszą biodostępność); distomer R(-) jest w różnym stopniu przemieniany w organizmie w formę S(+).



ibuprofen

### Wydalanie

Stereowybórczość wydalania przez nerki obserwowano głównie w przypadku leków aktywnie wydalanych lub zwrotnie resorbowanych. Przykładem jest tokainid, którego izomer R(-) jest wydalany szybciej niż izomer S(+).

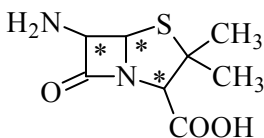


tokainid

### IV.3. Różnice farmakodynamiczne

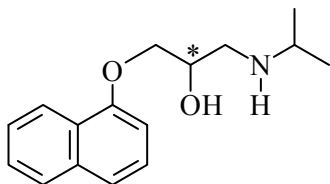
Ze względu na jakościowe działanie, leki będące związkami optycznie czynnymi można podzielić na:

- a) leki, których enancjomery wykazują podobne właściwości i jednakowy efekt biologiczny, np. antybiotyki  $\beta$ -laktamowe

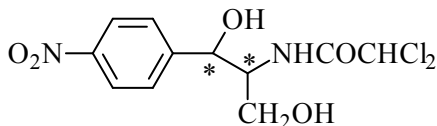


kwas 6-AP

- b) leki, których tylko jeden izomer wykazuje aktywność farmakologiczną, np. S-propranolol ( $\beta$ -bloker), izomer R nie posiada takiej aktywności; spośród czterech izomerów chloramfenikolu tylko izomer (1R, 2R) jest aktywny biologicznie



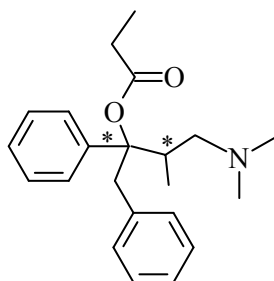
propranolol



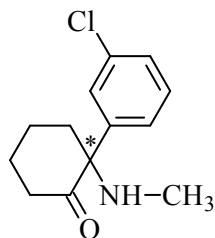
chloramfenikol

- c) leki, w których każdy z izomerów wykazuje inne działanie, np. D-propoksyfen wykazuje działanie przeciwbólowe, natomiast L-propoksyfen działa przeciwkaszlowo; S(+)-ketamina wykazuje działanie znieczulające, natomiast jej izomer R(-) pobudza OUN



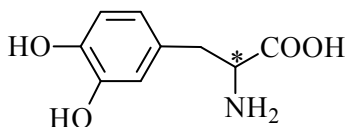


propoksyfen

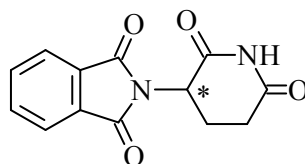


ketamina

- d) leki, w których jeden z izomerów wykazuje działanie terapeutyczne, a drugi działanie toksyczne; np. L-lewodopa wykazuje działanie przeciwparkinsonowe, natomiast izomer D powoduje granulocytopenię; talidomid – początkowo stosowany w leczeniu racemat jako lek nasenny; izomer R wykazuje działanie przeciwnowotworowe i nie działa teratogennie, natomiast izomer S wykazuje działanie teratogenne

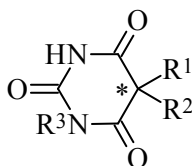


lewodopa



talidomid

- e) leki, których enancjomery wykazują działanie przeciwstawne, np. (-)-izomery barbituranów działają depresyjnie na OUN, natomiast (+)-izomery wykazują działanie pobudzające



Przedstawione fakty wyraźnie wskazują na konieczność przeprowadzania szczególnych badań leków – związków optycznie czynnych, aktualnie dostępnych na rynku farmaceutycznym, jak również preparatów mających w przyszłości zostać środkami leczniczymi. Badania te powinny obejmować:

- 1) ocenę chemiczną potwierdzającą tożsamość, jakość, czystość oraz siłę działania substancji czynnej i formy leku,
- 2) metodykę oceny substancji czynnej, formy leku i jego stabilności,
- 3) ocenę farmakologiczną (aktywność każdego enancjomeru pod kątem działania głównego, jego siły i specyficzności) oraz toksykologiczną (porównanie z racematem),
- 4) granice zanieczyszczeń (należy określić zawartość każdego z enancjomerów oraz domieszek i zanieczyszczeń),

- 5) badania kliniczne i biofarmaceutyczne, które obejmują ocenę poszczególnych stereoizomerów, badania farmakokinetyczne w pierwszej fazie badań dla poszczególnych enancjomerów oraz określenie ewentualnej interkonwersji.

#### IV.4. Otrzymywanie związków optycznie czynnych

Metody otrzymywania substancji chiralnych można podzielić na następujące grupy:

- 1) wydzielanie z surowców naturalnych,
- 2) rozdział racematu,
- 3) synteza z zastosowaniem chiralnego syntonu jako wyjściowego bloku budulcowego,
- 4) synteza asymetryczna.

##### IV.4.1. Wydzielanie z surowców naturalnych

Najstarszym źródłem leków chiralnych są ekstrakty roślinne i hodowle mikroorganizmów. Tabele 1 i 2 przedstawiają przykłady leków wydzielanych z surowców naturalnych.

Tabela 1

Leki ze źródeł naturalnych – pochodzenia roślinnego [wg 1]

Nazwa	Działanie	Źródło
efedryna	sympatykomimetyczne	<i>Ephedra sinica</i>
digitoksygenina	na układ krążenia	<i>Digitalis purpurea</i>
proscylarydyna	na układ krążenia	<i>Scilla maritima</i>
atropina	parasympatykolityczne	<i>Atropa belladonna</i>
D-tubokuraryna	zwiotczające mięśnie szkieletowe	rodz. <i>Chondrodendron</i>
winkrystyna	przeciwnowotworowe	<i>Catharanthus roseus</i>
taksol	przeciwnowotworowe	<i>Taxus brevifolia</i>
morfina	przeciwbólowe	<i>Papaver somniferum</i>
artemizyna	przeciwmalaryczne	<i>Artemisia annua</i>

Tabela 2

Leki ze źródeł naturalnych – pochodzenia drobnoustrojowego, otrzymywane przez fermentację [wg 1]

Nazwa	Działanie	Źródło (mikroorganizm)
penicyliny	przeciwbakteryjne	rodz. <i>Penicillum</i>
cefalosporyny	przeciwbakteryjne	rodz. <i>Cephalosporium</i>
tetracyliny	przeciwbakteryjne	rodz. <i>Streptomyces</i>
antybiotyki aminoglikozydowe	przeciwbakteryjne	rodz. <i>Streptomyces</i>
nystatyna	przeciwgrzybicze	<i>Streptomyces noursei</i>
adriamycyna	przeciwnowotworowe	<i>Streptomyces peuceticus</i>

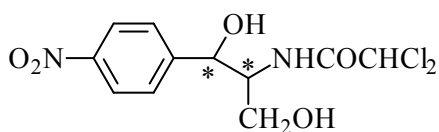
#### IV.4.2. Rozdział racematu

Jedną z najważniejszych przemysłowych metod otrzymywania czystych enancjomerów jest rozdział racematu. Metody te można podzielić na kilka typów:

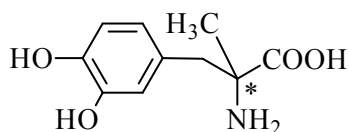
- 1) krystalizacja racematu,
- 2) rozdział utworzonych diastereoizomerów,
- 3) rozdział kinetyczny,
- 4) metody adsorpcyjne (metody chromatograficzne),
- 5) elektroforeza kapilarna.

##### IV.4.2.1. Krystalizacja racematu

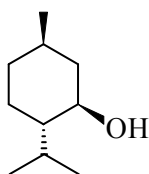
Racemat w stanie stałym może występować jako racemiczny konglomerat lub racemiczny związek. Racemiczny konglomerat jest mieszaniną obu enancjomerów, natomiast racemiczne związki stanowią homogeniczną fazę stałą, w której oba enancjomery występują w elementarnej komórce krystalicznej. Wynikają stąd różne możliwości ich rozdziału. Racemiczny konglomerat można rozdzielić poprzez krystalizację w sposób nawet mechaniczny – jeśli kryształy przynajmniej jednego izomeru są dostatecznie duże. W ten właśnie sposób zostało osiągnięte pierwsze rozszczepienie racematu przez L. Pasteura, który za pomocą pęsetki rozdzielił racemiczny winian sodowo-amonowy. Jednak metoda ta nie ma praktycznego znaczenia. Bardziej efektywny sposób rozszczepienia racemicznego konglomeru polega na preferencyjnej krystalizacji jednego z enancjomerów w wyniku zaszczeplenia jego kryształami przesyconego roztworu. W ten właśnie sposób otrzymuje się na skalę przemysłową m. in. następujące związki:



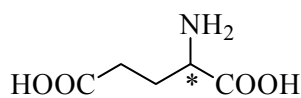
chloramfenikol



metylodopa



(-) mentol



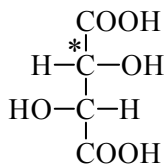
kwask glutaminowy

Rys. 3. Przykłady leków otrzymywanych przez krystalizację racemicznego konglomeru

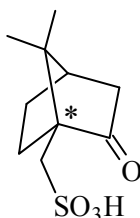
Bezpośrednia krystalizacja racemicznego konglomeru jest szczególnie korzystna, gdy towarzyszy jej transformacja asymetryczna, tzn. jeśli wraz z wydzielaniem się kryształów jednego z enancjomerów w roztworze zachodzi racemizacja. Umożliwia to uzyskanie krystalizującego izomeru z wydajnością większą niż 100% jego początkowej zawartości.

## IV.4.2.2. Rozdział racematu poprzez diastereoizomery

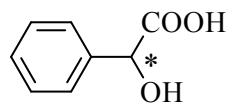
Związki racemiczne, w odróżnieniu od racemicznych konglomeratów, nie mogą być rozdzielone na czyste enancjomery za pomocą spontanicznej krystalizacji, co stało się podstawą ich definicji. Natomiast związki te można często rozdzielić przez krystalizację diastereoizomerów otrzymanych w reakcji racematu z enancjomerycznie czystymi związkami. Jest to najważniejsza metoda otrzymywania związków homochiralnych na skalę przemysłową. Metodą tą otrzymuje się około 65% syntetycznych leków chiralnych. Otrzymane mieszaniny diastereoizomerów mogą składać się z soli lub związków kowalencyjnych (estry, zasady Schiffa, glikozydy). Rozdział diastereoizomerycznych soli stosuje się przede wszystkim do kwasów karboksylowych i amin. Jako chiralny kwas używany jest najczęściej naturalny kwas (+)-winowy o konfiguracji (2R, 3R) i jego pochodne, kwas kamforowy, kwas migdałowy. Jako chiralne zasady wykorzystywane są głównie alkaloidy:



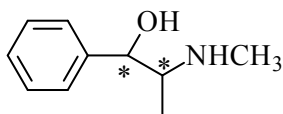
kwas L(+)-winowy



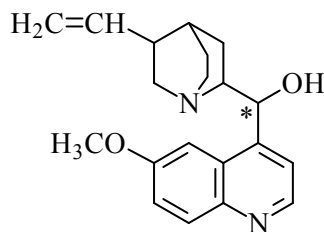
kwas kamforo-10-sulfonowy



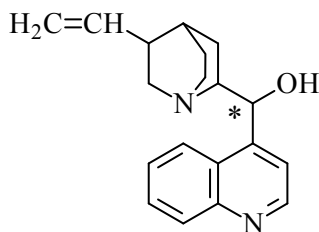
kwas migdałowy



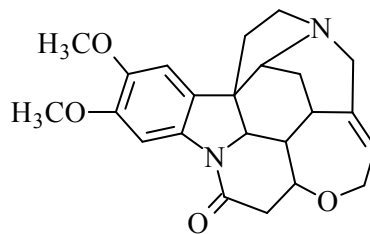
efedryna



chinina



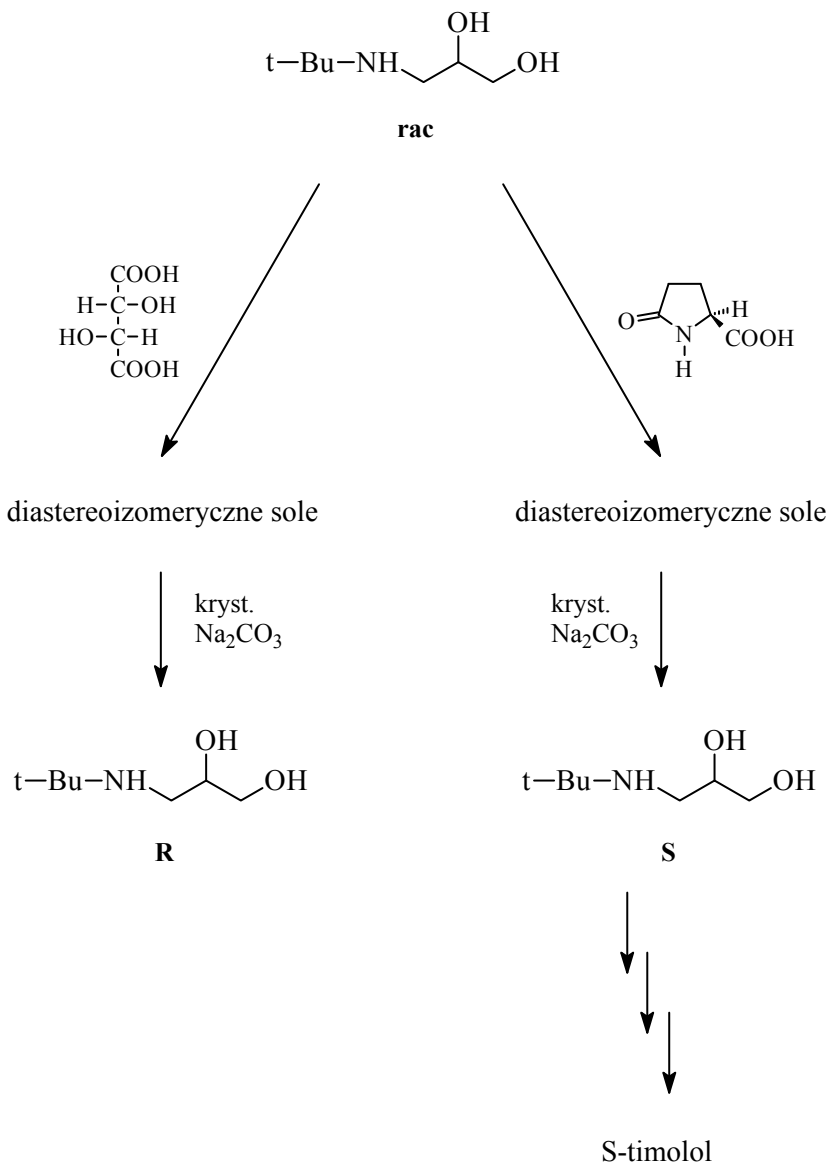
cynchonidyna



brucyna

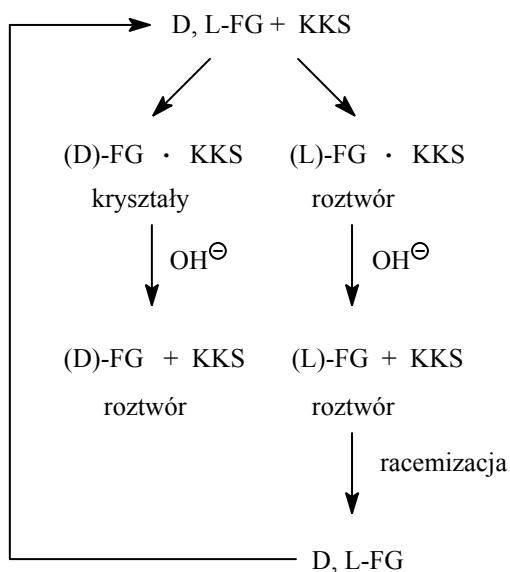
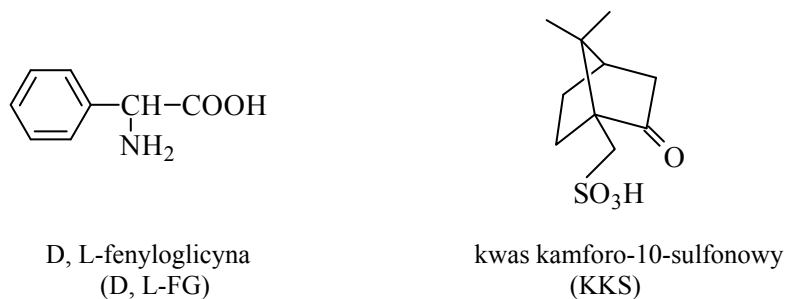
Przykładem rozszczepienia racemicznej aminy może być wydzielenie (R)- i (S)-3-(N-t-butyloamino)-propano-1,2-diolu – półproduktu do syntezy  $\beta$ -blokerów.

Utworzenie diastereoizomerycznej soli z kwasem (2R, 3R)-winowym prowadzi do wydzielenia enancjomeru R, natomiast użycie kwasu (S)-pirolidono-5-karboksylowego pozwala na otrzymanie enancjomeru S – półproduktu w syntezie timololu.



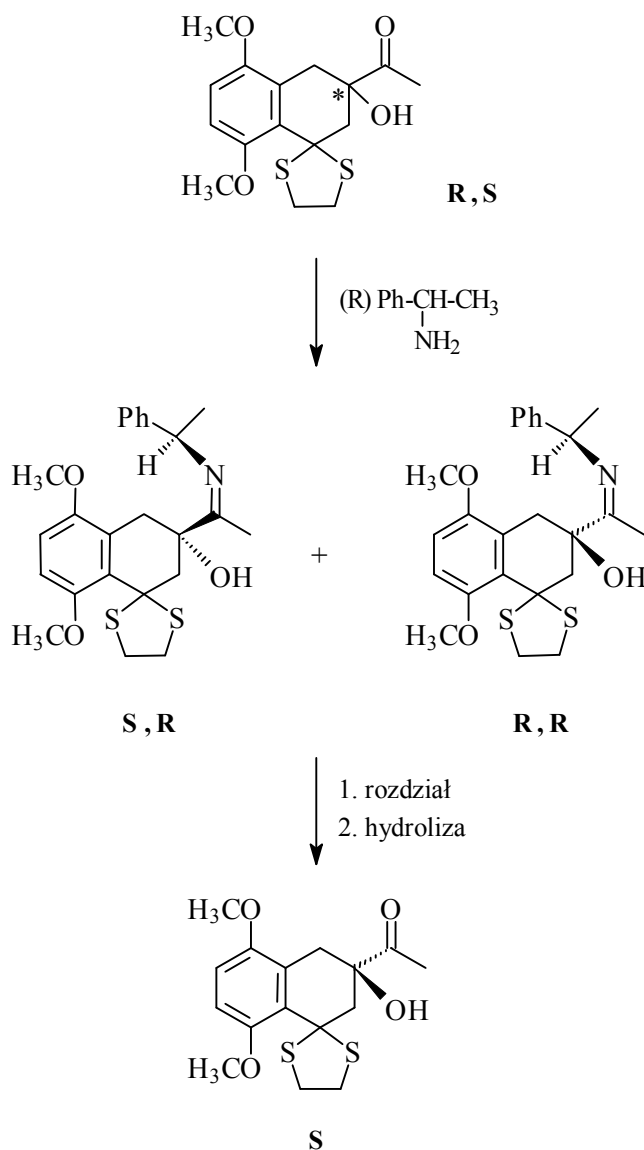
Rys. 4. Rozdział poprzez jonowe diastereoizomery

Podobnie jak w przypadku krystalizacji racemicznego konglomeru, wydajność rozdziału związków racemicznych można zwiększyć przez transformację asymetryczną. Przykładem tego jest m. in. otrzymywanie D(-)-fenyloglicyny – półproduktu w syntezie penicylin i cefalosporyn. Aminokwas ten jest otrzymywany przez rozdział diastereoizomerycznych soli z kwasem 10-kamforosulfonowym połączony z racemizacją izomeru L-fenyloglicyny.



Rys. 5. Przykład wykorzystania transformacji asymetrycznej

W przypadku związków nie mających grupy kwasowej lub zasadowej możliwy jest ich rozdział na enancjomery poprzez kowalencyjne diastereoizomery. Przykładem jest przedstawiona poniżej synteza optycznie czystego ketonu, stanowiącego półprodukt w syntezie aglikonów antybiotyków antracyklinowych, który otrzymuje się w wyniku rozdziału zasad Schiffa uzyskanych w reakcji racemicznego ketonu z (R)- bądź (S)-1-fenyletyloaminą.

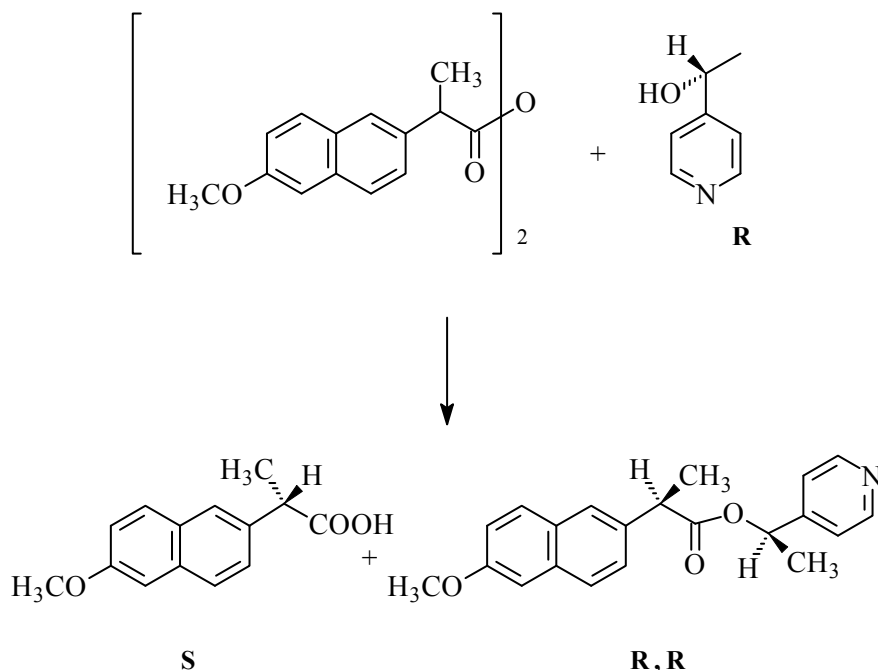


Rys. 6. Rozdział poprzez kowalencyjne diastereoizomery

Omówiona wcześniej klasyczna metoda rozszczepienia racematu nie może być zastosowana w przypadku związków nie posiadających grup funkcyjnych odpowiednich do utworzenia diastereoizomerów jonowych, bądź kowalencyjnych. W takim przypadku rozszczepienia racematu można dokonać przez utworzenie kompleksu inkluzyjnego z chiralnym czynnikiem kompleksującym. Metoda ta nie ma jednak praktycznego znaczenia.

## IV.4.2.3. Rozdział kinetyczny

Możliwość rozdziału kinetycznego racematu wynika z różnicy szybkości reagowania enancjomerów (składników mieszaniny racemicznej) z chiralnym reagentem wobec chiralnego katalizatora lub pod wpływem chiralnego czynnika fizycznego, np. kołowo spolaryzowanego światła. Reakcje te będą przez diastereoizomeryczne stany przejściowe i zachodzą z różnymi szybkościami. Jeśli reakcję przerwie się przed jej zakończeniem, wówczas otrzymuje się nierówne ilości produktów. Metodę tę ilustruje próba rozszczepienia na enancjomery naproksenu w reakcji bezwodnika racemicznego naproksenu z (R)-1-(4-pirydylo)-etanolom. W wyniku reakcji otrzymuje się (S)-naproksen i ester o konfiguracji (R, R). Jednak ze względu na osiągnięte tą drogą niskie wartości ee metoda ta w tym przypadku nie znalazła praktycznego zastosowania.

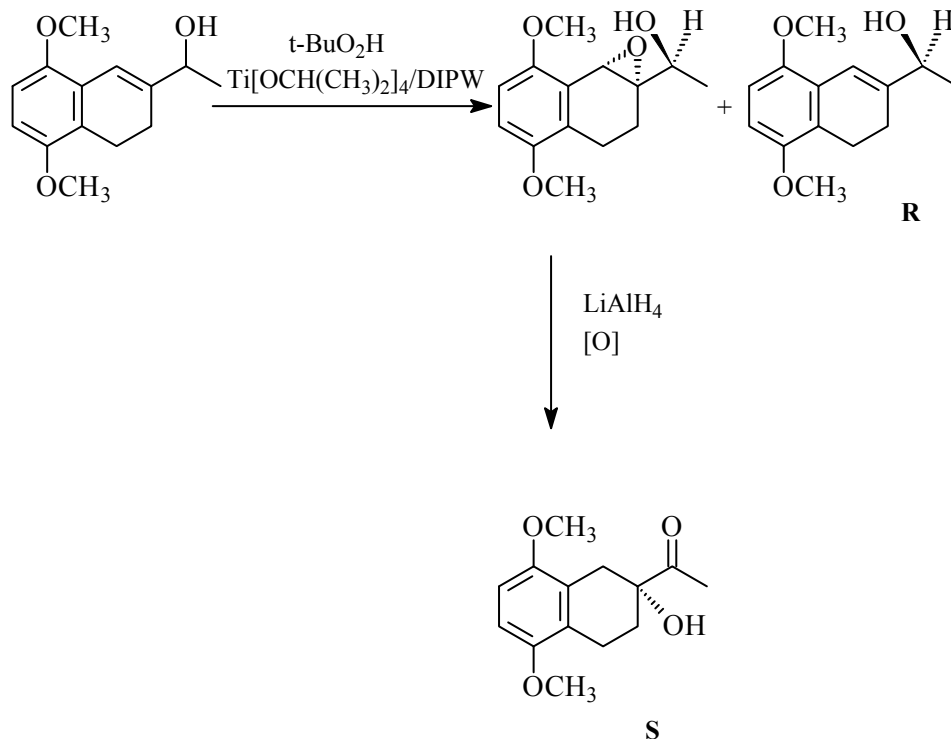


Rys. 7. Rozdział kinetyczny naproksenu

Znacznie większe znaczenie i szersze zastosowanie, zarówno w syntezie laboratoryjnej jak i przemysłowej, ma kinetyczny rozdział racematu, w którym diastereoizomery powstają dzięki użyciu chiralnego katalizatora.

Jednym z takich katalizatorów charakteryzującym się wysoką enancjoselektywnością jest wprowadzony przez Sharplessa układ: wodoronadtlenek t-butyłu (t-BuO<sub>2</sub>H), tetraizopropoksytan – Ti[OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>4</sub> i winian diizopropylu – DIPW. Odczynnik ten reaguje enancjoselektywnie z jednym z enancjomerów racemicznego alkoholu allilowego, dając chiralny epoksyd, który dalej może być łatwo przekształcany (np. w odpowiedni hydroksyketon, z indukowanym centrum chiralności). Innym produktem reakcji jest nieprzereagowany, drugi enancjomer wyjściowego alkoholu allilowego.





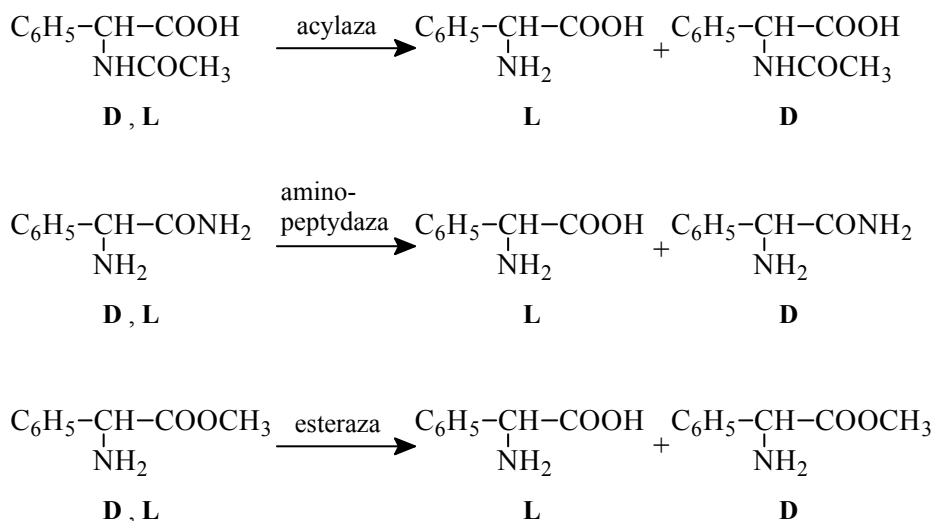
Rys. 8. Rozdział kinetyczny z zastosowaniem katalizatora Sharplessa

W podobnych warunkach rozdziałowi kinetycznemu ulegają  $\beta$ -hydroksyaminy III-rzędowe w wyniku utlenienia do N-tlenków. Inne stosowane katalizatory chemiczne to katalizatory rodowe czy rutenowe z chiralnymi ligandami, katalizujące głównie reakcję uwodornienia podwójnego wiązania węgiel-węgiel.

#### IV.4.2.4. Kataliza enzymatyczna

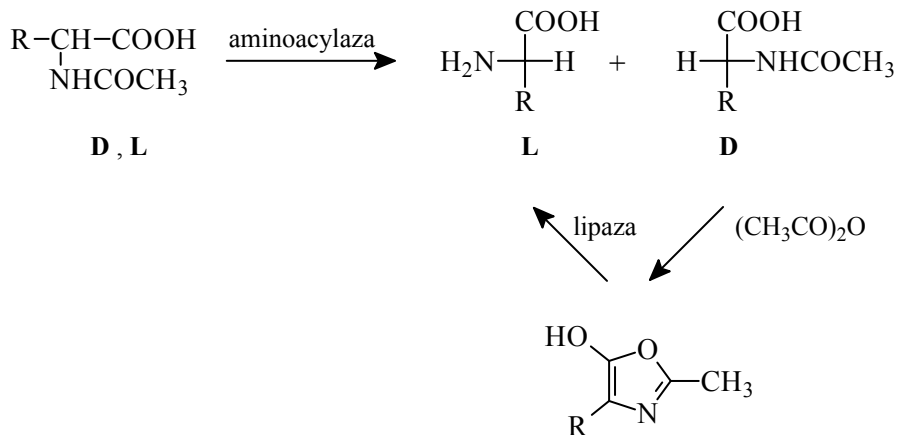
Kataliza enzymatyczna stosowana jest zarówno do separacji enancjomerów przez rozdział kinetyczny (hydrolazy, acylazy, esterazy), jak i do otrzymywania czystych enancjomerów z substratów prochiralnych (reduktazy, liazy).

Metoda rozszczepienia gotowego racemicznego leku poprzez katalizę enzymatyczną ma niewielkie znaczenie. Znacznie szersze zastosowanie ma rozdział kinetyczny w otrzymywaniu enancjomerycznie czystych substancji wykorzystywanych następnie jako chiralne substraty w syntezie. Dotyczy to substancji, których racematy są łatwe do otrzymania na drodze syntezy, a które w enancjomerycznie czystej postaci albo nie są dostępne ze źródeł naturalnych, albo występują w nich w ograniczonych ilościach. Do związków tych należą, między innymi,  $\alpha$ -aminokwasy,  $\alpha$ -hydroksykwasy i trójwęglowe syntony. Można je rozdzielić za pomocą hydrolaz lub transferaz, np.:



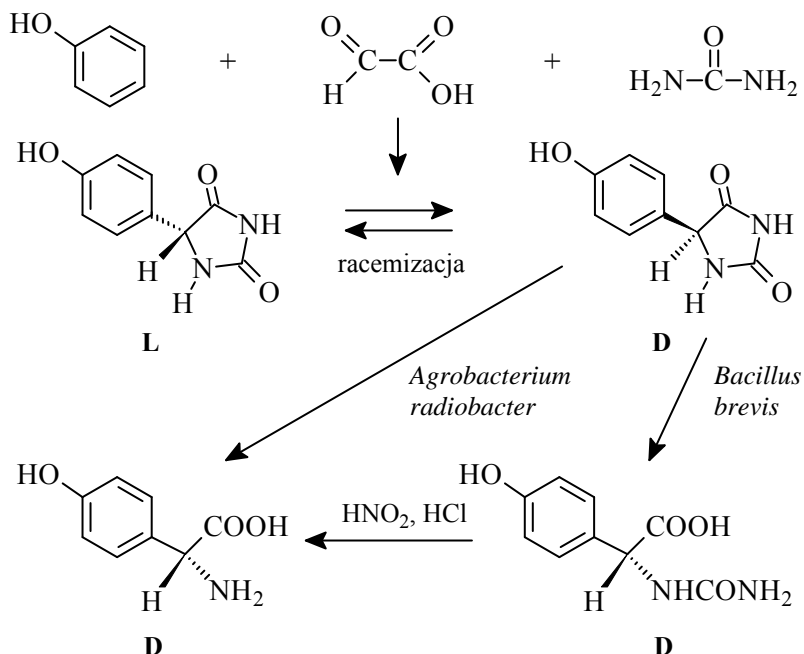
Rys. 9. Rozdział kinetyczny z zastosowaniem biokatalizatorów

Jedną z metod syntezy czystych  $\alpha$ -aminokwasów, wykorzystywaną na skalę przemysłową, jest metoda polegająca na enzymatycznym rozdziale kinetycznym. Racemat N-acetylo-aminokwasu ulega enancjoselektywnej reakcji w obecności aminoacylazy, dając L-aminokwas i (D)-N-acetyloaminokwas. Oba produkty znajdują się w nie mieszających się fazach wodnej i organicznej – stąd łatwość ich rozdzielenia. Ponadto, dalsze przekształcenie metodą chemiczną acetylowej pochodnej w pochodną oksazolową i kolejna reakcja katalizowana enzymatycznie (lipaza) pozwalają na uzyskanie dobrej ilości L-aminokwasu.



Rys. 10. Otrzymywanie L-aminokwasów

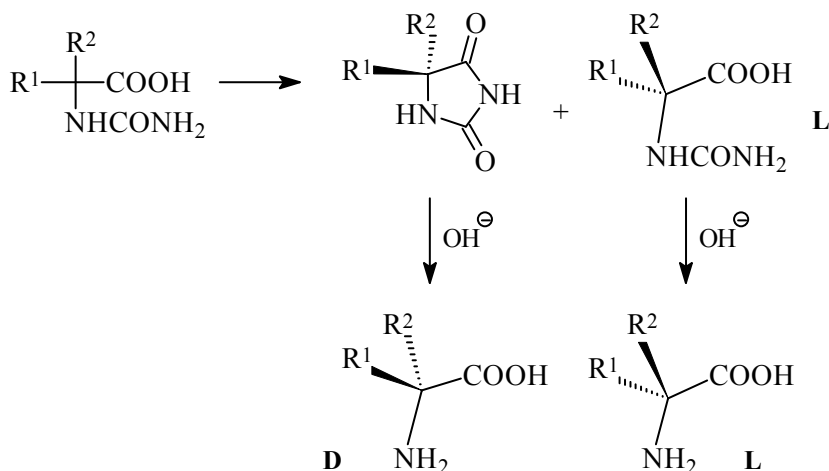
Dogodną metodą syntezy D-aminokwasów jest synteza biegnąca przez racemiczne hydantoiny, poddane następnie enancjoselektywnej hydrolizie enzymatycznej (metoda hydantoinowa).



Rys. 11. Otrzymywanie D-aminokwasów – metoda hydantoinowa; w miarę zużywania enancjomeru D zachodzi racemizacja, która pozwala w pełni przekształcić izomer L w izomer D

Metoda ta jest wykorzystywana na skalę przemysłową do syntezy D-(4-hydroksy-fenilo)-glicyny – półproduktu w syntezie amoksycyliny.

Ostatnio duże znaczenie mają także  $\alpha$ -alkilo- $\alpha$ -aminokwasy jako potencjalne inhibitory enzymów, hormonów i leków. Są one otrzymywane na skalę przemysłową, w enancjome-rycznie czystej postaci, w reakcji enancjoselektywnej enzymatycznej cyklizacji N-karba-moilopochodnych aminokwasów, z utworzeniem odpowiednich hydantoin, które mogą być łatwo oddzielone od nieprzereagowanych L-aminokwasów.



Rys. 12. Otrzymywanie  $\alpha$ -alkilo- $\alpha$ -aminokwasów

## IV.5. Metody adsorpcyjne – metody chromatograficzne

Chromatografia, znana od dawna metoda rozdzielania mieszanin, w ostatnich latach znalazła także zastosowanie do rozdzielania i analizy mieszanin racemicznych. Dotychczas największe zastosowanie w tych badaniach znalazły: wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) i chromatografię gazową – wykorzystywane jako metody analityczne i preparatywne, oraz elektroforeza kapilarna i chromatografia cienkowarstwowa – mające zastosowanie głównie do jakościowego opisu mieszanin racemicznych. Mechanizm rozdzielania izomerów optycznych metodami chromatograficznymi polega na ich enancjoróżnicowaniu poprzez tworzenie diastereoizomerycznych połączeń lub kompleksów z chiralnym odczynnikiem kompleksującym, tzw. chiralnym selektorem.

Wyróżnia się dwa sposoby enancjoróżnicowania:

- pośredni – polega na przeprowadzeniu izomerów optycznych w diastereoizomery, które następnie rozdzielają się metodami chromatograficznymi w warunkach achiralnych;
- bezpośredni – polega na tworzeniu labilnych kompleksów diastereoizomerycznych bezpośrednio podczas przeprowadzania analizy chromatograficznej. Takie tworzenie labilnych kompleksów osiąga się przez zastosowanie kolumn z chiralnym selektorem przyłączonym do fazy stacjonarnej (wówczas diastereoizomeryczne kompleksy tworzą się w fazie stacjonarnej), albo przez zastosowanie achiralnej fazy stacjonarnej i dodanie chiralnego selektora do fazy ruchomej (w tym przypadku diastereoizomeryczne kompleksy tworzą się w fazie ruchomej i/lub stacjonarnej).

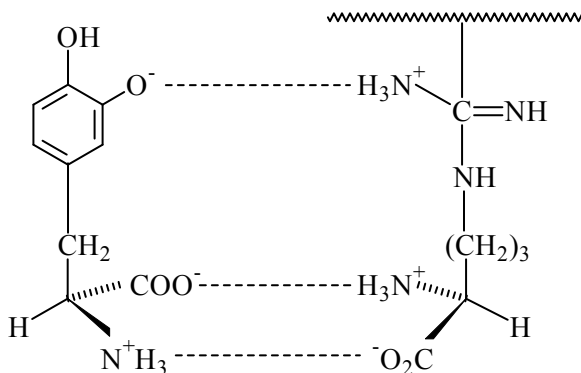
### IV.5.1. Chiralne fazy stacjonarne

Ze względu na mechanizm stereoróżnicującego działania oraz rodzaj zastosowanego selektora, chiralne fazy stacjonarne dzieli się na:

- 1) fazy tworzące kompleksowe połączenia poprzez oddziaływania przyciągające (wiązania wodorowe, oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ , dipol-dipol itp.) lub na zasadzie wymiany ligandów. Do tego typu faz należą:
  - fazy typu Pirkle'a,
  - fazy typu „ligand exchange”;
- 2) fazy posiadające wiele centrów asymetrii i/lub wnęk, w których za mechanizm różnicowania odpowiedzialne są głównie zjawiska inkluzyjne. Fazy tego typu to:
  - fazy cyklodekstrynowe,
  - fazy polisacharydowe,
  - fazy modyfikowane chiralnymi eterami koronowymi,
  - fazy na bazie helikalnych polimerów;
- 3) fazy tworzące kompleksy poprzez oddziaływania polarne i hydrofobowe – należą do nich
  - fazy białkowe.

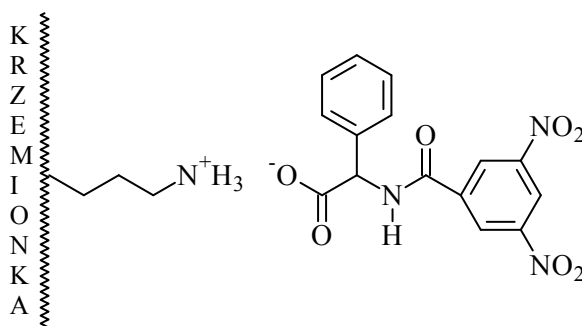
#### IV.5.1.1. Fazy typu Pirkle'a

W celu uzyskania zróżnicowania diastereoizomerycznych kompleksów wymagane jest trypunktowe oddziaływanie między próbką i selektorem – dwa oddziaływania przyciągające i jedno przyciągające lub odpychające (jedno z oddziaływań musi być różne dla obu izomerów). Ilustruje to rozdział na enancjomery DOPY przez zastosowanie jako chiralnego selektora L-argininy.

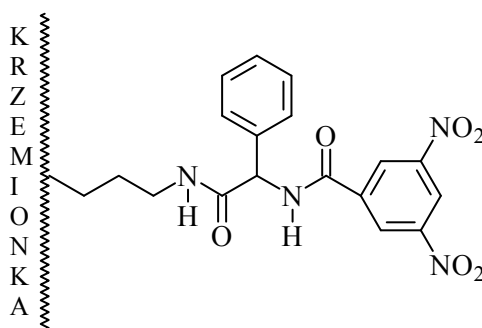


Fazy tego typu można podzielić na dwie grupy:

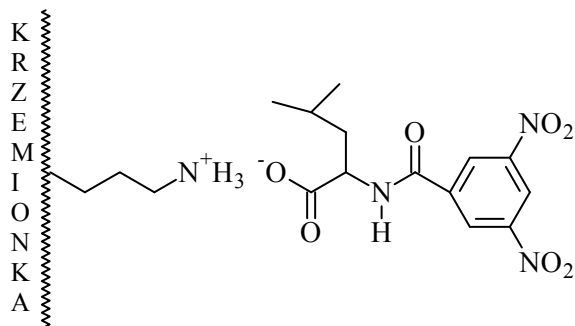
a) fazy  $\pi$ -kwasowe, w których chiralny selektor zawiera w pobliżu centrum asymetrii ugrupowanie będące akceptorem elektronów  $\pi$ , np. grupę 3,5-dinitrofenylową. Najczęściej stosowane fazy zawierają 3,5-dinitrobenzoilofenyloglicynę i 3,5-dinitrobenzoiloleucynę, związane jonowo lub kowalencyjnie z krzemionką modyfikowaną grupami aminopropylowymi. Substancje rozdzielane na takich kolumnach powinny zawierać w pobliżu centrum asymetrii grupy, będące donorami elektronów  $\pi$ , np. -OR, -NR<sub>2</sub>, -SR.



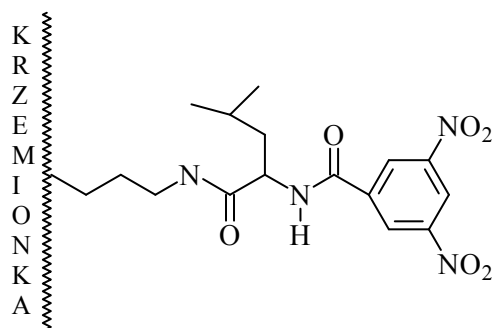
jonowo związana 3,5-dinitrobenzoilofenyloglicyna



kowalencyjnie związana 3,5-dinitrobenzoilofenyloglicyna



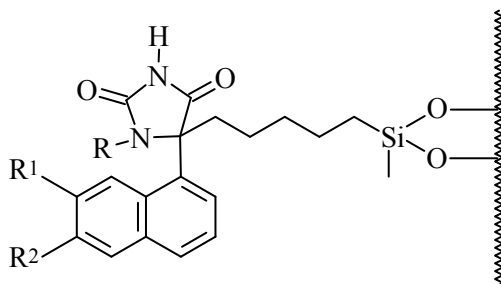
jonowo związana 3,5-dinitrobenzoiloleucyna

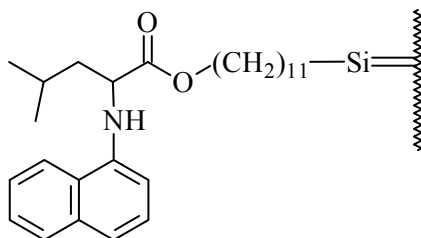


kowalencyjnie związana 3,5-dinitrobenzoiloleucyna

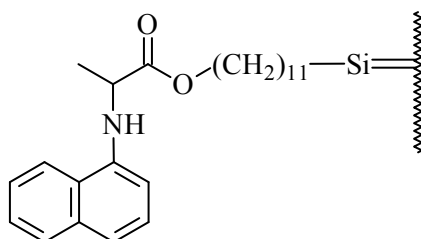
Rys. 13. Przykłady  $\pi$ -kwasowych faz Pirkle'a

b) fazy  $\pi$ -zasadowe – jako chiralne  $\pi$ -zasadowe selektory są najczęściej stosowane 5-naftylohydantoiny, aryloaminoalkany, N-aryloaminoestry, aryloamidy, aryloaminokwasy, tlenki fosfin. Substancje rozdzielone na tych fazach powinny zawierać w pobliżu centrum chiralnego grupy będące akceptorami elektronów  $\pi$ , dlatego związki rozdzielane na fazach  $\pi$ -zasadowych najczęściej przeprowadza się w pochodne 3,5-dinitrofenylowe.

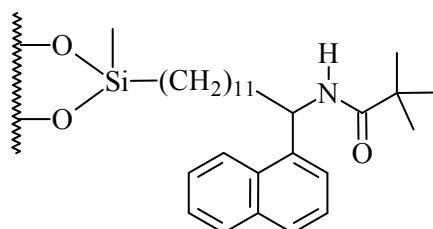
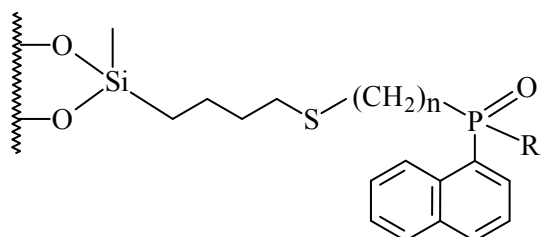
faza  $\pi$ -zasadowa z chiralnym selektorem 5-naftylohydantoinowym



N-(1-naftylo)leucyna

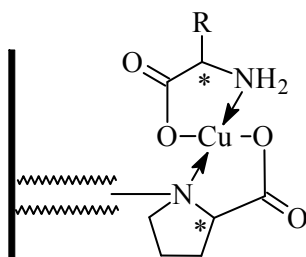
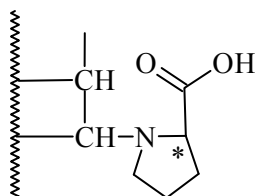
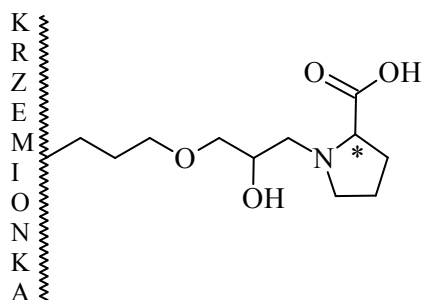


N-(1-naftylo)alanina

faza  $\pi$ -zasadowa z chiralnym selektorem naftyloamidowymfaza  $\pi$ -zasadowa z chiralnym selektorem fosforowymRys. 14. Przykłady  $\pi$ -zasadowych faz Pirkle'a

#### IV.5.1.2. Fazy typu „ligand exchange” – wymiany ligandu

W fazach tego typu selektorami są osadzone na odpowiednich nośnikach chiralne ligandy, którymi najczęściej są aminokwasy (prolina, walina), zawierające atom metalu (zwykle miedzi). Mechanizm enancjoróżnicowania polega na tworzeniu się chelatowych połączeń kompleksowych pomiędzy enancjomerami rozdzielanej mieszaniny a selektorem, różniące się trwałością.



kolumna ustabilizowana wodnym roztworem  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$

Rys. 15. Przykład fazy stacjonarnej typu „ligand exchange”

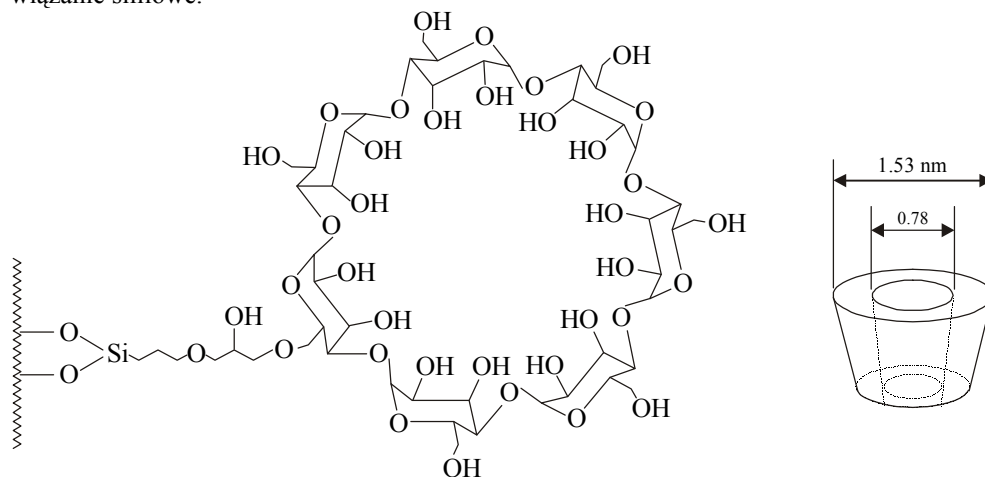
Substancje rozdzielone na fazach tego typu powinny zawierać dwie grupy polarne o odpowiednim rozmieszczeniu przestrzennym, które kompleksują jon metalu oraz dodatkowy czynnik (np. steryczny), pozwalający na dokonanie enancjoróżnicowania. Warunki te spełniają np. aminokwasy,  $\beta$ -aminoalkohole.



#### IV.5.1.3. Fazy cyklodekstrynowe

Cyklodekstryny są naturalnymi, cyklicznymi oligomerami glukozy, zawierającymi od 6 do 12 reszt D-(+)-glukopiranozowych, połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1,4-glikozydowym. Są to chiralne cząstki w kształcie stożka ściętego, z drugorzędowymi grupami hydroksylowymi, znajdującymi się po szerszej stronie stożka, a pierwszorzędowymi po jego węższej stronie.

Aby nastąpił podział enancjomerów, chiralne cząsteczki muszą przeniknąć swoją częścią hydrofobową do wnętrza cyklodekstryny i utworzyć diastereomeryczne kompleksy inkluzyjne. Wymiary wnętrza cyklodekstryn wahają się od 4,5Å (dla 6 jednostek glukozy) do 10Å. Cyklodekstryny są łączone z krzemionką poprzez specyficzne, niehydrolizujące wiązanie sililowe.



Rys. 16. Faza cyklodekstrynowa

Substancje rozdzielane na fazach tego typu powinny posiadać następujące właściwości:

- muszą względnie ściśle „pasować” do wnętrza cyklodekstryny,
- powinny posiadać możliwość tworzenia wiązań wodorowych i oddziaływań sterycznych na zewnątrz kompleksu z cyklodekstryną,
- powinny zawierać ugrupowania cykliczne (najlepiej aromatyczne) w położeniu  $\alpha$  lub  $\beta$  względem centrum chiralnego.

#### IV.5.1.4. Fazy polisacharydowe

Najczęściej stosowanym selektorem polisacharydowym jest celuloza i jej pochodne (trioctan, tribenzoesan, tryfenylokarbaminian, tricynamonian). Dokładny mechanizm chiralnego różnicowania dla tych faz nie jest znany, ale przypuszcza się, że działają one jak dwuwymiarowe sito, a rozdział racematu spowodowany jest różnym stopniem penetracji przestrzeni wewnątrzcząsteczkowej przez poszczególne enancjomery. Przypuszcza się także, że istotną rolę w procesie enancjoróżnicowania odgrywają oddziaływania typu: wiązania wodorowe, dipolowe, oddziaływania  $\pi$ - $\pi$  elektronowe oraz tworzenie kompleksów inkluzyjnych.

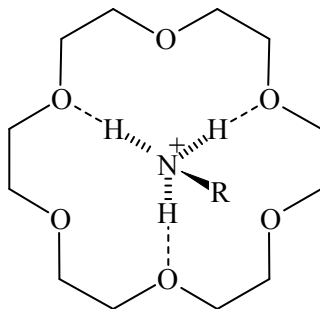
Na fazach celulozowych mogą być rozdzielane enancjomery bardzo różnych substancji i nie jest wymagana określona kombinacja grup funkcyjnych. Pewne elementy pomagają jednak w osiągnięciu dobrego rozdziału, jak np. jak najmniej podstawiona grupa fenylowa,

znajdująca się blisko centrum asymetrii, która działa na zasadzie „kotwicy” między pierścieniami piranowymi włókna celulozy.

#### IV.5.1.5. Fazy modyfikowane eterami koronowymi

Etery koronowe są syntetycznymi, makrocyclicznymi polimerami, które mogą selektywnie kompleksować odpowiednie kationy, także kationy organiczne, jak np. jon amoniowy czy protonowane aminy, głównie pierwszorzędowe.

W metodach chromatograficznych wykorzystuje się m.in. pochodne eterów: 18-korona-6, dibenzo-18-korona-6, dicykloheksylo-18-korona-6. Tworzenie kompleksu zachodzi poprzez oddziaływanie typu jon–dipol oraz wiązania wodorowe O–H...N<sup>+</sup>. Im więcej wiązań wodorowych oraz im mniejsza zawada przestrzenna podstawników w pobliżu grupy aminowej, tym trwalszy powstaje kompleks.



#### IV.5.1.6. Fazy białkowe

Jako białkowe fazy stałe w chromatografii używane są osadzone na odpowiednim nośniku białka zwierzęce, spośród których najważniejszymi są kwaśna  $\alpha_1$ -glikoproteina oraz albumina z osocza. Za enancjoróżnicowanie na fazach tego typu odpowiedzialne są prawdopodobnie oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania grup polarnych oraz efekty stereyczne. Związki rozdzielane na fazach tego typu powinny posiadać w pobliżu centrum asymetrii przynajmniej jedną grupę polarną lub jonową.

### IV.5.2. Chiralne odczynniki różnicujące w fazie ruchomej

Innym sposobem różnicowania enancjomerów w metodach chromatograficznych jest dodanie chiralnego selektora do fazy ruchomej. Rozdział enancjomerów przy zastosowaniu tej techniki opiera się na dynamicznym tworzeniu w fazie ruchomej diastereoizomerycznych kompleksów, które mogą różnić się trwałością oraz adsorpcją na fazie stacjonarnej. Rolę takich selektorów może pełnić większość chiralnych odczynników, stanowiących omówione wcześniej fazy stacjonarne, jak np. odczynniki działające na zasadzie wymiany ligandów, cyklodekstryny czy chiralne etery koronowe oraz odczynniki parujące jony.

### IV.5.3. Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografia cienkowarstwowa jest wykorzystywana głównie do jakościowego opisu mieszanin racemicznych oraz do badania ich czystości optycznej. Różnicowanie enancjomerów można osiągnąć analogicznie jak w opisanej wcześniej chromatografii kolumnowej przy zastosowaniu chiralnych faz stacjonarnych lub przez dodatek chiralnego selektora do fazy ruchomej. Do stosowanych cienkowarstwowych faz stacjonarnych należą: jonowo i kowalencyjnie związane fazy Pirkle'a, fazy cyklodekstrynowe i fazy pokryte kompleksem miedzi (II) z aminokwasami. Jako chiralne selektory dodawane do faz rucho-

mych wykorzystywane są najczęściej cyklodekstryny oraz odczynniki działające na zasadzie wymiany ligandów.

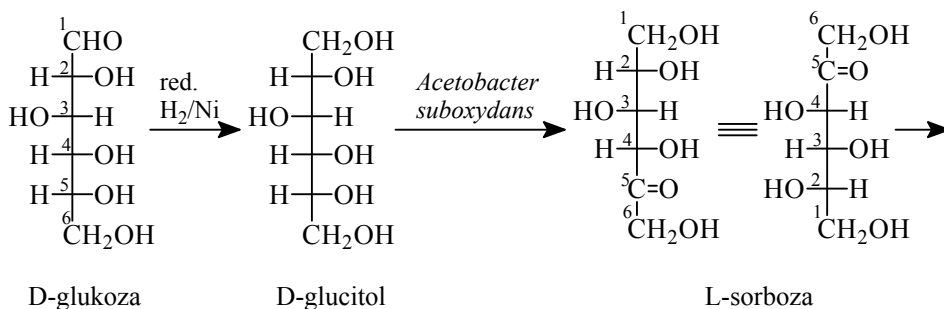
#### IV.5.4. Elektroforeza kapilarna

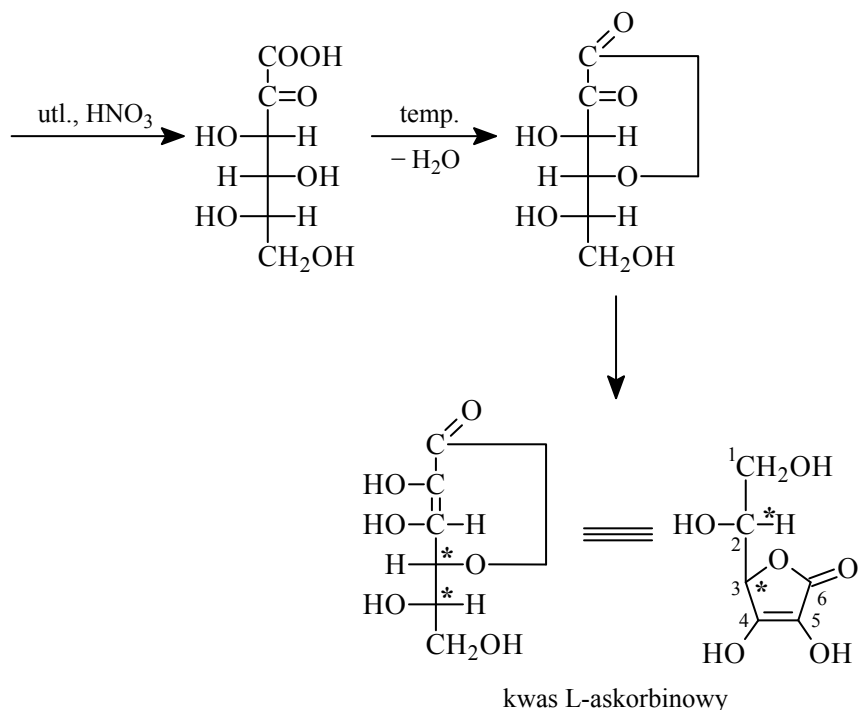
Elektroforeza jest metodą rozdzielania cząstek obdarzonych ładunkiem (jonów), opartą na różnicy ich prędkości poruszania się w stałym polu elektrycznym. W ostatnich latach metoda ta jest także wykorzystywana w badaniach związków optycznie czynnych. Dotychczas największe zastosowanie znalazła w analizie jakościowej, zwłaszcza do określania czystości enancjomerycznej. Dużym ograniczeniem klasycznej elektroforezy kapilarnej jest jej zastosowanie jedynie do rozdzielania jonów. Jednak wprowadzona w 1985 roku przez Terabego modyfikacja, polegająca na zastosowaniu naładowanych cyklodekstryń jako chiralnych selektorów odpowiedzialnych za enancjoróżnicowanie, umożliwiła analizę także cząstek elektrycznie obojętnych. Możliwość enancjoróżnicowania składników mieszaniny racemicznej wymaga zastosowania chiralnego selektora. Najczęściej stosowanymi selektorami są pochodne cyklodekstryń. Mechanizm różnicowania enancjomerów jest analogiczny jak w metodach chromatograficznych i polega na tworzeniu diastereoizomerycznych kompleksów inkluzyjnych, które wykazują różną ruchliwość w stałym polu elektrycznym, co jest podstawą ich elektroforetycznego rozdzielania. Jako chiralne selektory cyklodekstrynowe wykorzystuje się elektrycznie obojętne oraz naładowane pochodne. Najczęściej stosowane kationowe pochodne cyklodekstryń zawierają grupy aminowe lub alkiloaminowe, czwartorzędowe sole amoniowe, sole sulfoniowe oraz sole fosfoniowe. Są one wykorzystywane głównie do rozdzielania kwasów organicznych.

Przykładami anionowych pochodnych cyklodekstryń są mono-karboksymetylo- $\beta$ -cyklodekstryny oraz etery sulfoalkilowe  $\beta$ -cyklodekstryny. Selektory te są wykorzystywane przede wszystkim do rozdzielania związków o charakterze zasadowym.

#### IV.6. Synteza z wykorzystaniem chiralnego syntonu

Bardzo duże znaczenie w otrzymywaniu związków optycznie czynnych mają naturalne związki chiralne takie, jak: aminokwasy, cukry, hydroksykwasz czy terpeny. Są one wykorzystywane jako chiralne syntony (chirony) czyli składniki, które na jakimś etapie syntezy są wbudowywane z retencją lub inwersją konfiguracji w cząsteczkę półproduktu, zapewniając homochiralność związku końcowego. Stosunkowo niska cena szeregu łatwo dostępnych cukrów takich, jak: D-glukoza, D-mannitol, L-arabinoza, ich wysoka czystość enancjomeryczna oraz duża aktywność chemiczna spowodowały, że są one często wykorzystywane jako chirony. Najbardziej spektakularnym wykorzystaniem D-glukozy jest produkcja kwasu L-askorbinowego (witaminy C) metodą Reichsteina-Grüssnera.





Rys. 17. Synteza witaminy C metodą Reichsteina-Grussnera

Jest to synteza chemiczna, w której tylko jeden etap, tj. utlenianie D-glucitolu do L-sorbozy jest przeprowadzany enzymatycznie. Proces odznacza się bardzo wysokimi wydajnościami poszczególnych etapów, przy czym cały szkielet węglowy D-glukozy z nienaruszonymi centrami chiralności na C-2 i C-3 zostaje zachowany w cząsteczce kwasu L-askorbinowego.

Innymi ważnymi chironami w otrzymywaniu chiralnych leków są  $\alpha$ -aminokwasy. Zarówno naturalne aminokwasy szeregu L, jak i ich enancjomery D, są łatwo dostępne.

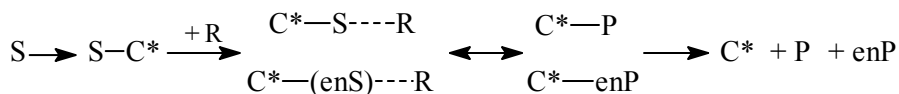
L-prolina, L-alanina oraz kwas D- i L-2-amino-4-fenylbutylowy znalazły zastosowanie w syntezie enalaprilu czy kaptoprilu – inhibitorów konwertazy angiotensynowej.

#### IV.7. Synteza asymetryczna

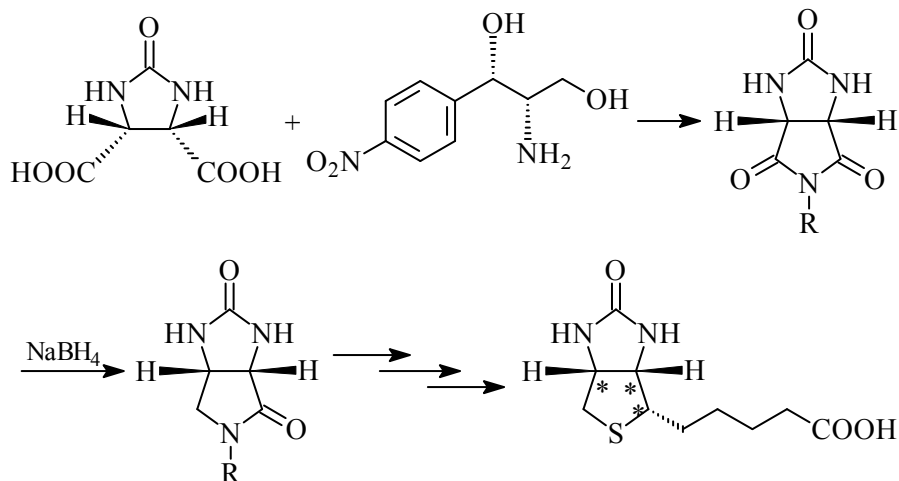
Synteza asymetryczna jest reakcją, w której achiralny substrat jest przeprowadzany w związek chiralny w procesie przekształcenia centrum (atomu) prochiralnego w chiralne. Prochiralny atom węgla jest albo w hybrydyzacji  $sp^3$  i zawiera parę identycznych ligandów, albo jest atomem o hybrydyzacji  $sp^2$  i w reakcji stereoselektywnej przekształca się w atom chiralny. W syntezie asymetrycznej nowe centrum chiralności może być indukowane przez użycie chiralnego reagenta, chiralnego środowiska, chiralnego katalizatora lub chiralnego związku pomocniczego. Spośród wymienionych metod praktyczne znaczenie znalazły tylko dwie ostatnie.

### IV.7.1. Synteza asymetryczna z użyciem chiralnego pomocnika

Synteza asymetryczna z użyciem chiralnego pomocnika polega na kowalencyjnym związaniu achiralnego substratu z chiralną cząsteczką posiłkową, poddaniu tego związku (już optycznie czynnego) reakcji przy centrum prochiralnym z reagentem R (tworzą się w nierównych ilościach diastereoizomery) i odłączeniu chiralnego pomocnika C\* w stanie niezmienionym (powstają optycznie czynne produkty P i enP).



Na skalę przemysłową metoda ta jest wykorzystywana do syntezy biotyny (witaminy H) według metody Sumitano:



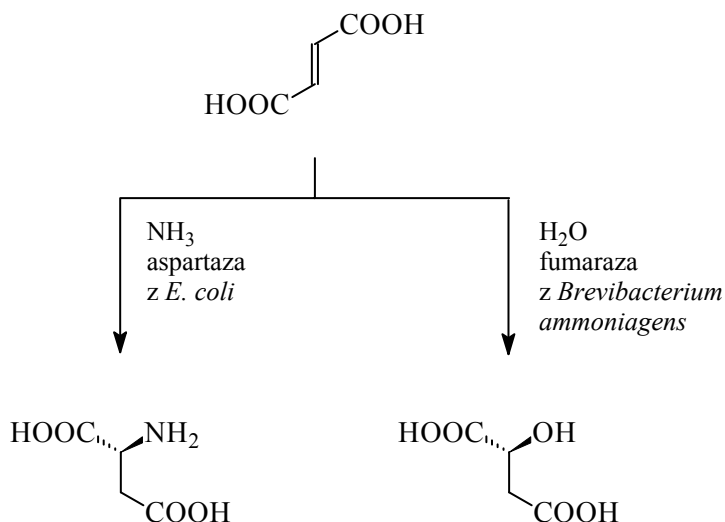
Rys. 18. Synteza witaminy H metodą Sumitano

Kwas mezo-dikarboksylowy przy użyciu optycznie czynnego aminodiolu jest przekształcany w optycznie czynny imid, który – w wyniku redukcji za pomocą NaBH<sub>4</sub> – daje laktam o konfiguracji absolutnej odpowiedniej do przekształcenia w czysty enancjomer produktu.

### IV.7.2. Synteza asymetryczna z użyciem chiralnego katalizatora

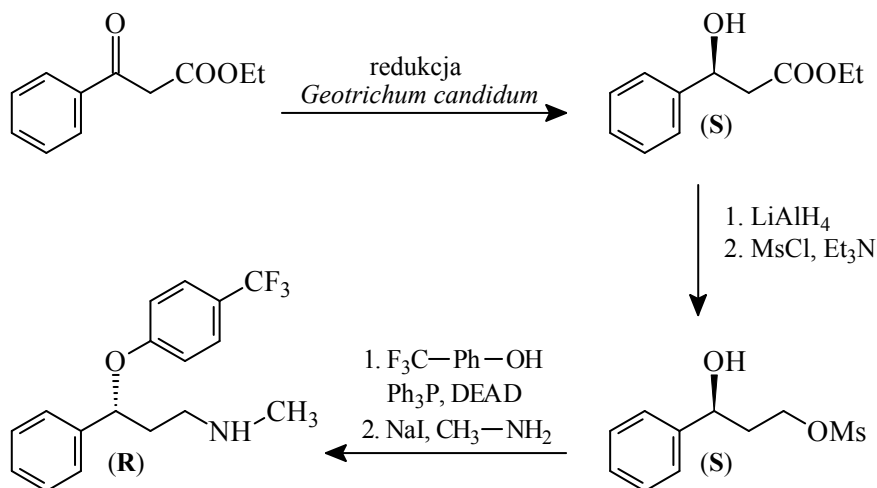
#### Biokatalizatory

Największe znaczenie w syntezie asymetrycznej mają enzymy z grupy reduktaz i liaz, które „działają” na prochiralne centra typu C=C i C=O. Typowym przykładem tego rodzaju przemian, prowadzonych za pomocą immobilizowanych enzymów i wykorzystywanych na skalę przemysłową, są reakcje kwasu fumarowego:



Rys. 19. Przykład syntezy asymetrycznej z wykorzystaniem biokatalizatora

W ostatnich latach duże znaczenie w syntezie związków chiralnych mają reakcje enancjoselektywnej redukcji ketonów, ketoestrów i innych związków karbonylowych z zastosowaniem drożdży piekarskich jako „źródła” reduktaz. Reakcje te odznaczają się bardzo wysoką stereoselektywnością, w których uzyskiwane nadmiary enancjomeryczne są często wyższe niż 97%. Przykładem tego typu syntezy jest otrzymywanie (R)-fluoksetyny (substancji czynnej leku psychotropowego – Prozac).

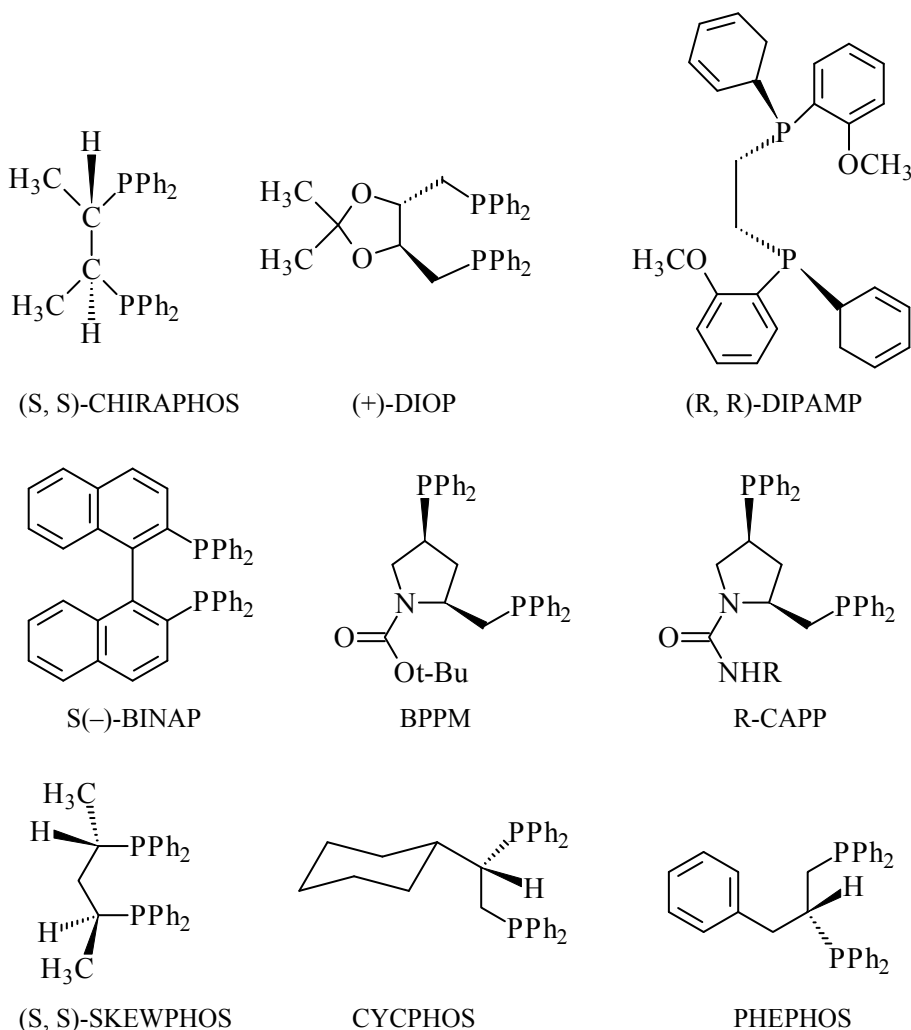


Rys. 20. Synteza fluoksetyny

Centrum asymetrii powstaje w wyniku enancjoselektywnej redukcji  $\beta$ -ketoestru (ester etylowy kwasu benzoilooctowego) za pomocą mikroorganizmu *Geotrichum candidum* z nadmiarem enancjomerycznym ee > 98% (wydajność chemiczna około 64%). Dalej, w wyniku chemicznej redukcji grupy estrowej i selektywnej estryfikacji uzyskanego diolu, otrzymuje się pochodną mesyłową (którą łatwo wymienić na grupę metyloaminową), a końcową fluoksetynę otrzymuje się w reakcji drugorzędowej grupy hydroksylowej (przy centrum chiralnym) z p-trifluorometylofenolem w warunkach odpowiadających reakcji Mitsunobu (reakcja zachodzi z inwersją konfiguracji).

### Katalizatory chemiczne

Pośród związków syntetycznych pełniących rolę chiralnych katalizatorów największe znaczenie mają: pochodne binaftyłu (np. (S)-BINAP), kompleksy metali ze sterycznie rozbudowanymi fosfinami (np. (+)-DIOP) oraz niektóre etery koronowe.



Rys. 21. Przykłady katalizatorów chemicznych wykorzystywanych w syntezie asymetrycznej

### Literatura

1. O. Achmatowicz, G. Gryniewicz: *Metody poszukiwania związków enancjomerycznie czystych*, Acta Polon. Pharm. – Drug Research, 1993, 50, 13.
2. J. Gawroński, K. Gawrońska: *Stereochemia w syntezie organicznej*, PWN, Warszawa 1988.
3. J. Bojarski: *Chromatograficzny rozdział enancjomerów*, Wiad. Chem., 1993, 47.
4. A. Zejc, M. Gorczyca: *Chemia leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
5. G. Hallas: *Stereochemia związków organicznych*, PWN, Warszawa 1968.
6. Z. Chilmonczyk, J. Cybulski: *Określanie czystości enancjomerycznej związków optycznie czynnych. Część II. Metody chromatograficzne*, Acta Polon. Pharm. – Drug Research, 1993, 50, 87.
7. B. Wiela-Hojeńska, K. Orzechowska-Juzwenko: *Kliniczne znaczenie stereowybiórczości leków*, Farmacja Polska, 1995, 51 (15), 653.
8. A. Chankvetadze: *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, Chichester 1997.



## V. POLIMORFIZM

**Polimorfizm** to wielopostaciowość związku chemicznego. Z faktu występowania jednej i tej samej substancji w kilku odmianach krystalicznych wynikają istotne różnice we właściwościach fizycznych.

Podobne różnice dają się zauważyć w przypadku odmian krystalograficznych z wbudowanymi w strukturę kryształu cząsteczkami rozpuszczalnika. Tego typu zjawisko określamy mianem pseudopolimorfizmu. Zarówno odmiany polimorficzne jak i pseudopolimorficzne różnią się najczęściej między sobą np. temperaturą topnienia, gęstością, twardością, prężnością par, współczynnikiem załamania światła, widmem rentgenowskim i w podczerwieni, a także rozpuszczalnością, ciepłem rozpuszczenia czy też szybkością rozpuszczania. Różnice te, a zwłaszcza różnice w rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania poszczególnych odmian krystalicznych danej substancji leczniczej, wydają się być najistotniejsze z uwagi na dostępność farmaceutyczną i biologiczną danego leku.

Wiele substancji leczniczych występuje co najmniej w kilku odmianach krystalicznych. W przypadku krystalizacji polimorficznej substancji leczniczej, w roztworze ustala się stan równowagi, prowadzący do powstawania tylko jednej odmiany krystalicznej, przy czym przejście jednej odmiany w drugą może przebiegać z różną szybkością. Jeśli szybkość przemiany jest stosunkowo powolna, to nietrwała termodynamicznie odmiana nosi miano metastabilnej, która na ogół jest łatwiej rozpuszczalna i wykazuje niższą temperaturę topnienia.

Z uwagi na fakt, iż szybkość rozpuszczania substancji w danych warunkach (temperatura, rodzaj rozpuszczalnika) jest zależna głównie od jej rozpuszczalności (w przypadku wchłaniania leku musi ulec rozpuszczeniu), to przejście formy nietrwałej (metastabilnej) w trwałą (stabilną) stanowi istotny problem dla wcześniej wspomnianej dostępności biologicznej, czy też farmaceutycznej.

Odmiany metastabilne, np. substancji leczniczych, mogą również ulegać transformacji do odmian stabilnych o mniejszej rozpuszczalności pod wpływem czynników mechanicznych, jak np. w procesie tabletkowania (siła zgniatania) lub suszenia. Jak już wspomniano, istnieje wiele substancji leczniczych wykazujących zjawisko poli- czy też pseudopolimorfizmu. Jednym z leków, dla którego stwierdzono istnienie wielu odmian polimorficznych jest kwas acetylosalicylowy. Dwie krańcowe odmiany, z uwagi na duże różnice rozpuszczalności (przy podaniu doustnym obserwuje się różnice w stężeniu w surowicy krwi dochodzące do 70%), wydają się być najistotniejsze dla dostępności biologicznej tego leku. Znane są również odmiany polimorficzne w grupie barbituranów, steroidów, sulfonamidów, antybiotyków (faza stała może zawierać więcej odmian krystalicznych), niesterydowych leków przeciwzapalnych, pochodnych uracylu czy też w grupie lokalnych anestetyków. Poniżej zebrano przykłady niektórych leków występujących w różnych odmianach krystalicznych. Do nich należą m.in.: fenobarbital, chlormadinon, etinyloestradiol, mestranol, kortyzon, triamcinolon acetonid, tetrakaina, sulfametoksazol, bursztynian chloramfenikolu, nowobiocyna, chlorotetracyklina, kwas acetylosalicylowy, indometacyna, 6-metylouracyl, a także trimetoprim czy też meprobamat.

### Literatura

1. S. Bynn, R. Rfeiffer, M. Ganey, C. Hoiberg and G. Poochikian: *Pharmaceutical solids a strategic approach to regulatory considerations*, Pharm. Res., 1995, 12, 945.
2. N.B. Leonidow, E.B. Romanenko: *Influence of polymorphism of methyluracyl on the activity of replication and transcription*, Pharm. Res., 1995, 12, 136.
3. N.B. Leonidow: *Metastable forms as a basis for new generation drugs*, Pharm. Res., 1995, 12, 137.
4. R. Haibala, R. Eerola, V.P. Tanninen, J. Yliruusi: *Polymorphic changes of mannitol during freeze-drying: effect of surface-active agents*, PDAJ. Pharmac. Sci. Technol., 1997, 51, 96.
5. S.B. Fitylyov, N.N. Avramenko, V.V. Gatsura, N.G. Seleznew, V.M. Zhitinyow: *Impact of betamecil on reparation in injured tissues*, Conf. Pharm. Sci. Clin. Pharmacol., Jerusalem 1996, 3, 43.
6. N.B. Leonidow, Y. Maitchouk, V. Knyazhev: *Leocaine eye drops-new generation of tropical anesthetics*, Int. Symp. Exp. Clinical Ocular. Pharmacol. Pharm., Geneva 1995, 49.
7. N.B. Leonidow, S.J. Uspenskaya, N.G. Seleznew, V.V. Gatsura: *Betamecil as stimulation of reparation processes in ophthalmopharmacology*, 2<sup>nd</sup> World Meeting on Pharmaceutical Technology, Paris 1998, 983.
8. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press, London 1986.
9. J. Brandys, A. Danek, H. Krasowska, L. Krówczyński, J. Krupińska, Z. Mach, M. Melzacka: *Zarys biofarmacji*, PZWL, Warszawa 1984.

## VI. PROCESY BIOTRANSFORMACYJNE

### VI.1. Wstęp

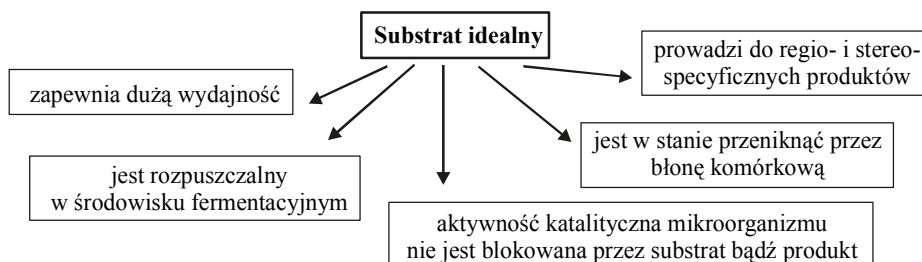
Procesy biotransformacji zachodzą z dużą wydajnością, w niewysokich temperaturach (20–40°C) i przy niskich ciśnieniach, co czyni je bardziej atrakcyjnymi od procesów chemicznych, ze względu na małe zapotrzebowanie na energię. Główną jednak ich zaletą jest to, że przebiegają w określonym miejscu substratu (regioselektywnie) i wytwarzają pojedyncze, czynne optycznie izomery produktu (są stereospecyficzne), co daje nam możliwość uzyskania chiralnych półproduktów, często wysoko funkcjonalnych, a więc bardzo cennych, w dużej przewadze enancjomerów.

Mikrobiologiczne transformacje przy użyciu mieszanych kultur mikroorganizmów były szeroko wykorzystywane przez ludzkość od dawna w rolnictwie i żywieniu – do produkcji chleba, produktów mlecznych oraz napojów alkoholowych. Naukowe podstawy biotransformacji położył Pasteur w 1862 r., utleniając etanol do kwasu octowego przy użyciu kultury *Bacterium xylinum*. Obecnie wykorzystuje się w biotransformacji czyste hodowle mikroorganizmów, komórki w stanie spoczynku, spory, wysuszone komórki lub wyizolowane z nich enzymy. Mogą być one stosowane w postaci roztworów (enzymy) bądź zawiesin, lecz częściej są wiązane (immobilizowane) ze stałymi, niereaktywnymi nośnikami, co ma na celu zwiększenie ich stabilności i umożliwienie wielokrotnego użycia.

Źródłem enzymów dla biotransformacji są komórki mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Reakcje z użyciem mikroorganizmów znajdują najszersze zastosowanie, ze względu na szeroki asortyment enzymów, zdolnych katalizować różnorodne procesy. Dużym problemem w takich transformacjach jest więc problem selektywności i ukierunkowania zdolności katalitycznej. Gdy większość aktywnych enzymów w komórkach działa w podobnych warunkach, jest często rzeczą samego substratu kierowanie reakcją tak, by powstał określony produkt. Na kierunek reakcji wpływa się przez:

- modyfikację struktury substratu,
- zmianę pH środowiska reakcji,
- stężenie substratu,
- naturę składnika odżywczego,
- dodatek nieodwracalnych inhibitorów enzymów,
- immobilizację komórek,
- warunki wzrostu komórek.

Idealny substrat powinien spełniać określone warunki (rys. 1).



Rys. 1. Warunki jakie powinien spełniać idealny substrat w procesach biotransformacyjnych

Rzadko jednak substraty wykorzystywane w praktyce spełniają wszystkie wymienione wymagania. Można wówczas wykorzystać jedną z poniższych możliwości:

**Substrat nie przenika przez błonę komórkową:**

- przeprowadzenie reakcji za pośrednictwem oczyszczonych enzymów,
- chemiczna lub fizyczna zmiana stanu komórek (zmielenie, wysuszenie, liofilizacja, dodatek detergentów, autoliza, zamrożenie),
- rozdrobnienie kryształów substratu do rozmiaru mikrona.

**Substrat zapewnia zbyt małą wydajność lub niedostateczną stereospecyficzność:**

- zmiana rasy mikroorganizmu,
- dodatek substancji pobudzającej lub inhibitora,
- zmiana stanu fizjologicznego mikroorganizmu poprzez zmianę warunków gazowych, pH, dodatek rozpuszczalników organicznych, soli, detergentów, zmianę składu środowiska, zmianę gęstości komórek,
- genetyczne udoskonalenie rasy mikroorganizmu,
- przeprowadzenie reakcji za pośrednictwem oczyszczonych enzymów.

**Substrat osłabia zdolność życia i reprodukcji komórek:**

- wzrost komórek w obecności niskich stężeń substratu,
- dodawanie do środowiska reakcji rozproszonego substratu w małych porcjach lub w sposób ciągły,
- chemiczna modyfikacja substratu przez wprowadzenie, przesunięcie lub zmianę grupy ochronnej.

**Substrat nie jest rozpuszczalny w środowisku reakcji:**

- rozpuszczenie substratu w nietoksycznym, dającym się mieszać z wodą rozpuszczalniku (aceton, etanol, glikol propylenowy, DMSO) przed dodaniem do środowiska reakcji,
- dwu- lub wielofazowe środowisko reakcji (n-alkany, cykloheksan, octan etylu, octan butylu) lub wprowadzenie stałych adsorbentów liofilowych (druga faza nie powinna wykazywać efektu inhibitora),
- dodatek czynnika emulgującego,
- rozdrobnienie kryształów substratu do rozmiaru mikrona.

W wielu poznanych i wykorzystywanych reakcjach biotransformacji z użyciem mikroorganizmów nie potrafimy ściśle określić, który konkretnie enzym (enzymy) w komórce jest odpowiedzialny za rodzaj przemiany. W chwili obecnej znamy niemal 3000 różnych enzymów, jednak tylko niewielka ich część (około 300) jest dostępna i stosowana w syntezie jako biokatalizatory.

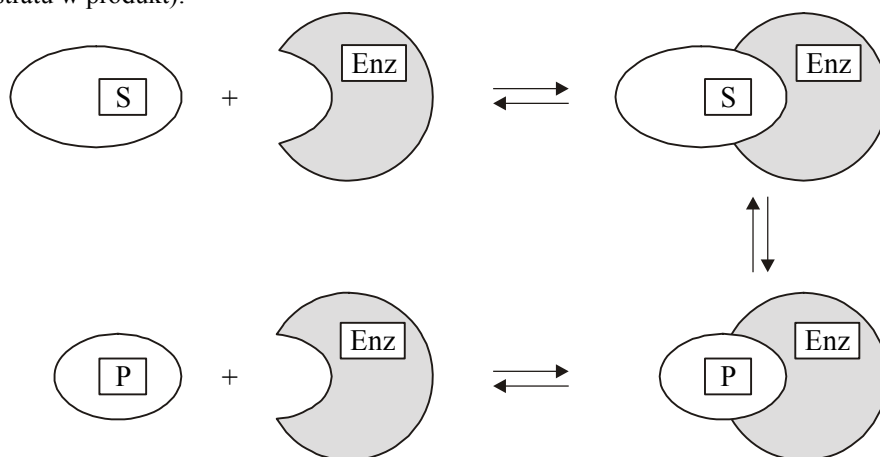
**Enzymy** są białkami zawierającymi od 60 do 1000 reszt aminokwasów w postaci jednego lub kilku łańcuchów polipeptydowych. Rozmiar enzymu pozwala na odpowiednie sfałdowanie i precyzyjne ułożenie aminokwasów w miejscu, gdzie zachodzi reakcja chemiczna, tak by osiągnąć optymalny efekt katalityczny. Wiele enzymów należy do białek złożonych, które składają się z **części białkowej** oraz związanej z nią **grupy prostetycznej** (np. polisacharydu, lipidu, porfiryny, kationu metalu). Jeżeli grupa prostetyczna związana jest w sposób odwracalny, wówczas nazywamy ją **koenzymem**, a część białkową – **apoenzymem**.

Stosując jako kryterium podziału rodzaj katalizowanej reakcji, sklasyfikowano enzymy (system IUB – *International Union of Biochemistry*) w 6 grupach (tab. 1).

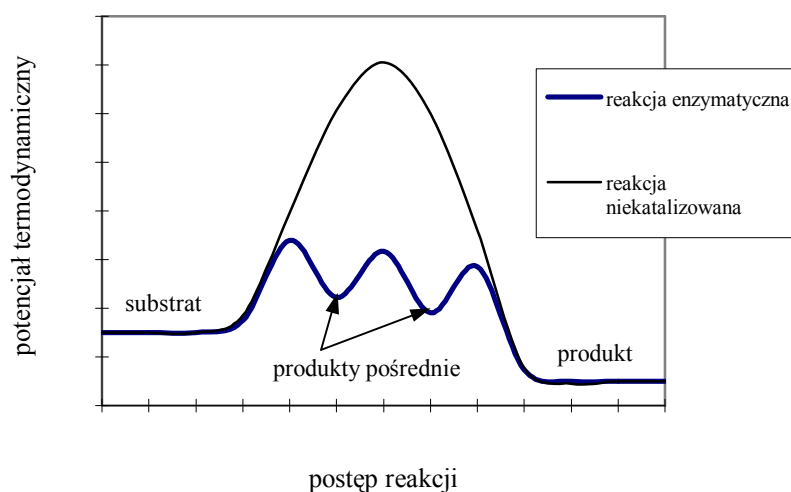
Znacząca część enzymów stosowanych jako biokatalizatory potrzebuje do swego działania tzw. koenzymów. Są to związki o stosunkowo niewielkiej masie cząsteczkowej, przyłączone (kowalencyjnie lub niekowalencyjnie) do części białkowej enzymu. Koenzymy

odpowiedzialne są za transport elektronów (reakcje oksydacyjno-redukcyjne), wodoru lub innych grup, a także transport energii. Wśród bardziej znanych koenzymów wymienić można:  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , ATP, acetylo-CoA, pochodne witamin grupy B i monofosforanu adenozy (AMP). W wielu przypadkach do pełnienia funkcji katalitycznej niezbędne są jony metali, związane z enzymem wiązaniem koordynacyjnym (Fe, Ni, Cu, Co, V, Zn, Mg, Mn).

Na proces katalizy enzymatycznej składają się procesy fizyczne (łączenie substratu z enzymem, oderwanie enzymu od gotowego produktu reakcji) i chemiczne (przemiany substratu w produkt):



Rys. 2. Uproszczony schemat procesu katalizy enzymatycznej



Rys. 3. Porównanie zmian energetycznych obserwowanych w reakcji enzymatycznej i niekatalizowanej [wg P. Kafarski, B. Lejczak: *Chemia bioorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1994]

Aby doprowadzić do zajścia reakcji, należy dostarczyć cząsteczce pewnej ilości energii, zwanej **energią aktywacji** (jest to różnica pomiędzy energią najwyższego punktu na wykresie – tzw. stanu przejściowego, a energią substratu). Katalizator (enzym) obniża energię aktywacji, prowadząc reakcję w kilku etapach, charakteryzujących się stanami przejściowymi o niższych energiach (rys. 3). Podobnie działają katalizatory chemiczne.

Efekty katalityczne osiąmane w reakcjach enzymatycznych są bardzo duże, reakcja jest przyspieszana od  $10^9$  do  $10^{15}$  razy w stosunku do odpowiedniej niekatalizowanej reakcji chemicznej. Proces katalizy zachodzi w określonym miejscu enzymu, nazywanym **centrum aktywnym** lub **niszą katalityczną** enzymu. Tworzą ją reszty aminokwasów biorących bezpośredni udział w wiązaniu cząsteczki substratu, odpowiedzialne za specyficzność działania katalizatora i jego aktywność katalityczną. Najważniejsze czynniki odpowiedzialne za strukturę centrum aktywnego to:

- odpowiedni układ grup chemicznych łańcuchów bocznych aminokwasów, zdolny do zdeformowania i polaryzacji wiązań cząsteczki substratu tak, by uczynić ją bardziej reaktywną;
- odpowiednia budowa centrum wiążącego, które unieruchamia cząsteczkę substratu w położeniu odpowiadającym ułożeniu grup reaktywnych w niszy katalitycznej;
- odpowiednia i precyzyjna orientacja przestrzenna cząsteczki substratu, która pozwala na zajście poszczególnych etapów reakcji z minimalnymi przemieszczeniami w obrębie cząsteczki;
- odpowiednie wiązanie substratu, tak aby obniżyć energię aktywacji kompleksu enzymu z substratem.

Tabela 1

## Podział enzymów wg IUB

Klasa enzymów	Podklasy enzymów	Typ reakcji katalizowanej
<b>1. Oksyreduktazy</b>	dehydrogenazy, oksydazy, reduktazy, peroksydazy, katalaza, oksigenazy, hydroksylazy	reakcje utleniania i redukcji
<b>2. Transferazy</b>	transaldolaza, transketolaza, acylo-, metylo-, glukonylo-, fosforylotransferazy, kinazy, fosfomutazy	reakcje przenoszenia grup funkcyjnych z cząsteczki donora do cząsteczki akceptora
<b>3. Hydrolazy</b>	esterazy, peptydazy, tiolazy, fosfolipazy, amidazy, dezamidazy, glikozydazy	hydroliza i formowanie wiązań w estrach, amidach, laktonach, laktamach, epoksydach, nitylach, bezwodnikach, glikozydach
<b>4. Liazy</b>	dekarboksylazy, aldolazy, ketolazy, hydratazy, dehydratazy, syntazy, liazy	reakcje addycji (lub eliminacji) małych cząsteczek ( $H_2O$ , $CO_2$ , $NH_3$ ) do wiązań podwójnych $C=C$ , $C=N$ , $C=O$
<b>5. Izomerazy</b>	racemazy, epimerazy, mutazy	izomeryzacja czyli wzajemne przekształcanie jednych izomerów w drugie (przekształcanie izomerów optycznych, geometrycznych, konstytucyjnych, tautomerów itp.)
<b>6. Ligazy</b>	syntetazy, karboksylazy	reakcje formowania (lub rozpadu) wiązań $C-O$ , $C-S$ , $C-N$ , $C-C$ sprzężone z rozzerwaniem wiązania pirofosforanowego w ATP

Najdogodniejszy sposób prowadzenia transformacji biologicznych polega na użyciu czystych, wyizolowanych enzymów. Są to jednak odczynniki bardzo kosztowne, dlatego stosuje się je jedynie wtedy, gdy celem syntezy jest uzyskanie związków niedostępnych lub bardzo trudno dostępnych na drodze syntezy chemicznej. Znacznie częściej stosuje się gotowe preparaty enzymatyczne, zawierające oprócz konkretnego enzymu (enzymów) inaktywowane proteiny, stabilizatory i sole buforowe oraz inne substancje pochodzące z hodowli. Preparaty takie są tańsze i często bardziej trwale niż czyste, wyizolowane enzymy.

Coraz szersze zastosowanie znajdują także procesy z zastosowaniem immobilizowanych enzymów i komórek mikroorganizmów. Immobilizacja polega na związaniu enzymów bądź komórek z nośnikiem (przez związanie na powierzchni nośnika lub w jego wnętrzu) lub umiejscowienie ich w określonej przestrzeni, np. w bioreaktorze. Można to osiągnąć metodami fizycznymi lub chemicznymi:

- a) wiązanie na powierzchni nośnika siłami jonowymi, wiązaniami wodorowymi (adsorpcja, adhezja) lub wiązaniami kowalencyjnymi (wiązania peptydowe, estrowe, węgiel-węgiel, węgiel-azot i in.) – drewno, celuloza, jonity, polimery syntetyczne, szkło porowate, ziemia okrzemkowa, węgiel aktywny,
- b) wiązanie w matrycy nośnika – w żelach naturalnych lub syntetycznych (agar, alginian, kolagen, poliuretan, polistyren) lub we włóknach (włókna octanu celulozy),
- c) zamykanie wewnątrz membran półprzepuszczalnych – w komórkach naturalnych (erytrocyty), pomiędzy membranami lub w węzłach półprzepuszczalnych (nylonowych, silikonowych i in.), kapsułkowanie i mikrokapsułkowanie (liposomy, kapsułki nylonowe, kolodionowe, polimocznikowe, z pochodnych celulozy),
- d) unieruchamianie bez makroskopowego nośnika mechanicznego – sieciowanie przestrzenne, kopolimeryzacja enzymów z nośnikami rozpuszczalnymi przy użyciu odczynników dwufunkcyjnych, flokulacja komórek przy udziale polielektrolitów, samoagregacja (naturalna flokulacja oraz wzrost drobnoustrojów w postaci kuleczek lub kłaczek biomasy).

Zdolność katalityczna komórek immobilizowanych jest nieco niższa w porównaniu z „nie immobilizowaną” kulturą – przyczyną jest powstanie dodatkowej bariery na granicy komórka-nośnik i utrudnienie dostępu substratu do katalizatora oraz uszkodzenie pewnej liczby komórek podczas immobilizacji. Jednak liczne zalety takiego sposobu prowadzenia biotransformacji przeważają nad wadami. Produkt reakcji, a także sam katalizator, łatwiej można wyizolować ze środowiska reakcji. Często odzyskany w ten sposób katalizator wykorzystuje się ponownie. Możliwe jest prowadzenie procesu ciągłego, ze stałym dopływem substratu i odprowadzaniem produktu reakcji. Tempo procesów z użyciem komórek unieruchomionych można znacznie zwiększyć, eliminując barierę przepuszczalności błony komórkowej poprzez traktowanie substancjami powierzchniowo czynnymi, zamrażanie i rozmrażanie, ogrzewanie do temperatury powyżej 50°C, a także częściową autolizę komórek.

Duże znaczenie uzyskały obecnie metody biosyntezy z wykorzystaniem inżynierii genetycznej, w których stosowane są szczepy drobnoustrojów lub linie komórkowe modyfikowane genetycznie oraz enzymy modyfikowane metodami inżynierii białka. Umożliwia to mikrobiologiczną biosyntezę takich związków, których otrzymywanie przy użyciu drobnoustrojów było dotychczas niemożliwe.

W obecnym rozdziale omówiono pokrótce wybrane przykłady opisanych w literaturze reakcji z zastosowaniem enzymów (lub preparatów enzymatycznych) wyizolowanych z komórek mikroorganizmów, roślin i zwierząt lub z użyciem całych komórek. Najważniejsze z nich to reakcje hydrolizy oraz reakcje redukcji. W przykładach podawano struktury

użytych w biotransformacji substratów, wydajność reakcji oraz czystość optyczną produktów.

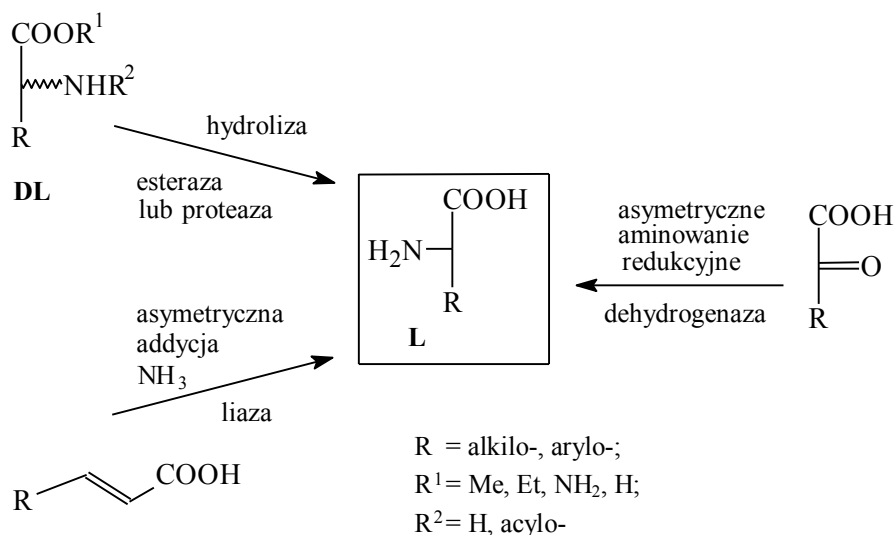
Miarą czystości optycznej związku jest nadmiar enancjomeryczny (oznaczany jako „ee”), który wyraża względny nadmiar jednego z enancjomerów w mieszaninie. Jeśli np. enancjomer R występuje w przewadze, wartość ee wyliczamy według wzoru:

$$\% ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \times 100\%$$

## VI.2. Reakcje hydrolizy

Reakcje katalizowane przez hydrolazy, w szczególności reakcje hydrolizy wiązania peptydowego, należą do najlepiej zbadanych reakcji enzymatycznych. Enzymy proteolityczne zostały wyizolowane i zidentyfikowane w XIX w. (pepsyna – Schwann, 1836; trypsyna – Kühn, 1867). Oprócz grupy proteaz (enzymów katalizujących hydrolizę wiązania peptydowego w substratach białkowych) wielkie zastosowanie w tej grupie znalazły esterazy (hydroliza estrów) oraz lipazy (hydroliza trójglicerydów stosowana w syntezie kwasów tłuszczowych).

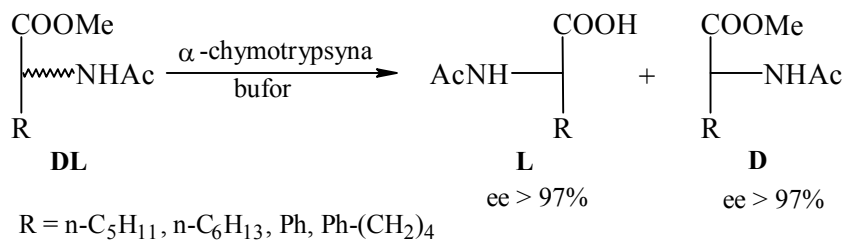
Enzymatyczna hydroliza wiązania amidowego jest ściśle związana z chemią aminokwasów i peptydów. Przy użyciu metod enzymatycznych syntetyzuje się obecnie znaczną liczbę optycznie czystych L-aminokwasów (L-feniloalanina, kwas L-aspartamowy, L-alanina, L-metionina i inne) oraz niektóre aminokwasy o konfiguracji D, mające zastosowanie w produkcji antybiotyków (D-fenyloglicyna, D-p-hydroksyfenyloglicyna).



Rys. 4. Najważniejsze sposoby uzyskiwania czystych optycznie  $\alpha$ -aminokwasów z użyciem enzymów

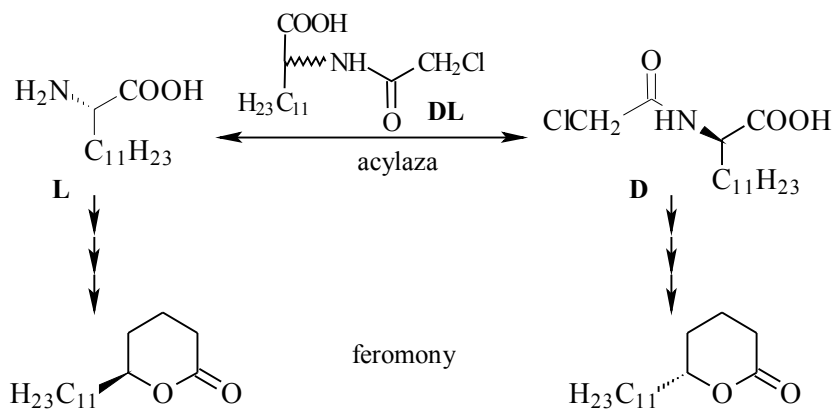
Jednym z najlepiej poznanych **enzymów proteolitycznych** jest chymotrypsyna. Enzym ten jest najbardziej specyficzny w stosunku do tych wiązań amidowych, w których grupa karboksylowa pochodzi od aminokwasu aromatycznego (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan). Chymotrypsyna katalizuje również reakcje hydrolizy amidów i estrów różnych acyloaminokwasów aromatycznych (rys. 5).



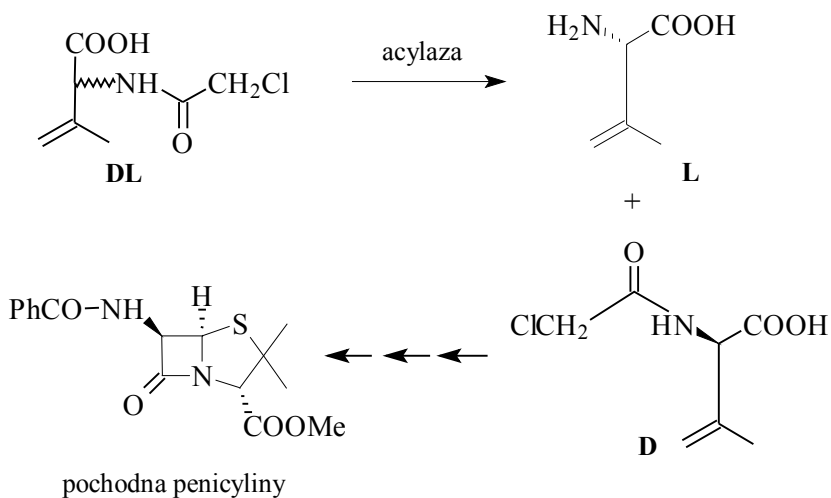


Rys. 5. Hydrolyza wiązania estrowego w N-acyloaminokwasach katalizowana przez chymotrypsynę

a)

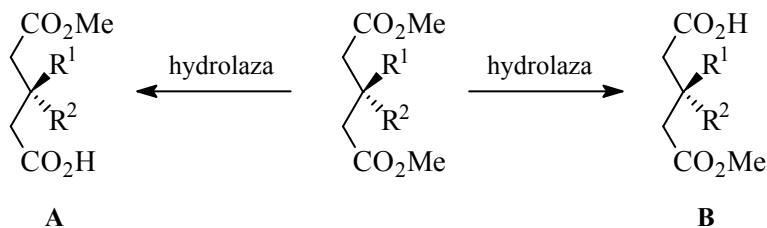


b)



Rys. 6 a, b. Wykorzystanie enzymatycznych transformacji N-acyloaminokwasów w syntezie naturalnych produktów

Za pomocą odpowiednich **esteraz** przeprowadzano rozdział izomerów w estrach kwasów dikarboxylowych (malonowego, glutarowego, bursztynowego oraz innych kwasów cyklicznych i niecyklicznych). Hydrolizie ulega w tych warunkach jedna z grup estrowych (rys. 7).



Rys. 7. Rozdział izomerów w estrach kwasów dikarboxylowych

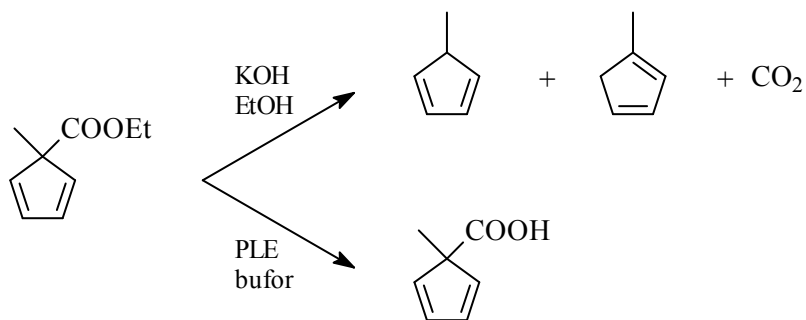
Tabela 2

Rozdział izomerów w estrach kwasów dikarboxylowych [wg 1]

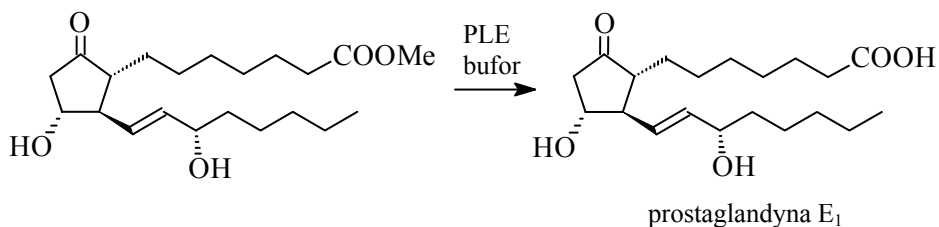
Hydrolaza	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	produkt	ee [%]
$\alpha$ -chymotrypsyna	AcNH	H	B	79
$\alpha$ -chymotrypsyna	OH	H	B	85
$\alpha$ -chymotrypsyna	Ph-CH <sub>2</sub> -O	H	B	84
$\alpha$ -chymotrypsyna	Ph-CO-O	H	B	92
$\alpha$ -chymotrypsyna	CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> O	H	B	93
PLE	CH <sub>3</sub>	H	B	90
PLE	AcNH	H	B	93
PLE	OH	H	A	12
PLE	<i>t</i> -Bu-CO-NH	H	A	93
PLE	Ph-CH <sub>2</sub> -O-CONH	H	A	93
PLE	Ph-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub>	H	A	88
PLE	OH	CH <sub>3</sub>	A	99
<i>Acinetobacter sp.</i>	OH	H	B	> 95
<i>Arthrobacter sp.</i>	OH	H	A	> 95

PLE (*pig liver esterase*) – esteraza z wątroby świni

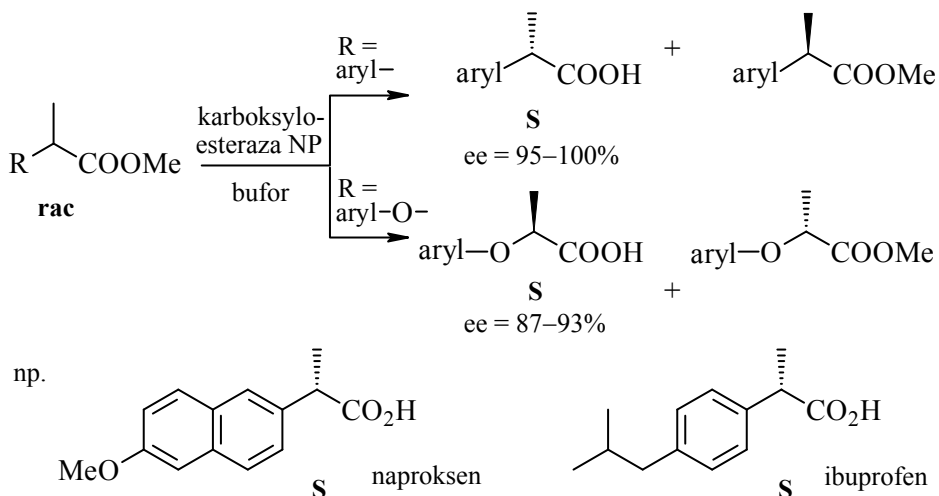
Octany pierwszo- i drugorzędowych alkoholi można selektywnie hydrolizować w łagodnych warunkach za pomocą PLE, unikając reakcji ubocznych, pojawiających się w warunkach hydrolizy środkami chemicznymi. Sposób ten wykorzystuje się, między innymi, przy końcowej deprotekcji grupy karboksylowej w cząsteczce prostaglandyny E<sub>1</sub> (rys. 8 i 9).



Rys. 8. Hydroliza octanów alkoholi środkami chemicznymi i za pomocą PLE

Rys. 9. Hydroliza grupy estrowej w cząsteczce prostaglandyny E<sub>1</sub>

Przeprowadzono także separację enancjomerów  $\alpha$ -arylo- i  $\alpha$ -aryloksypodstawionych pochodnych kwasu propionowego (naproksen, ibuprofen). Użyty enzym, wyizolowany z *Bacillus subtilis* („karboksylesteraza NP”) wykazał największą aktywność i selektywność, gdy substrat posiadał łańcuch z ugrupowaniem aromatycznym (rys. 10).

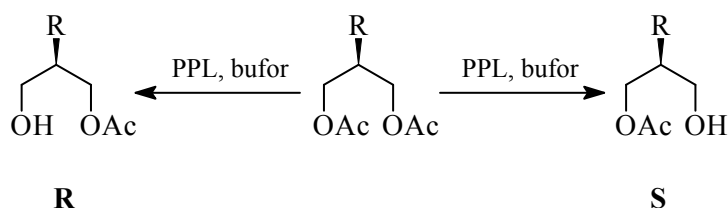
Rys. 10. Separacja enancjomerów  $\alpha$ -arylo- i  $\alpha$ -aryloksypodstawionych pochodnych kwasu propionowego za pomocą enzymu wyizolowanego z *Bacillus subtilis*

**Lipazy** mogą katalizować konwersję wielu substratów, zarówno w środowisku wodnym jak i apolarnym. Cząsteczki tych enzymów dostosowują swoje konformacje do różnych struktur substratów. Enzymy te zdolne są także do katalizowania reakcji w układach dwufazowych typu tłuszcz-woda.

Większość reakcji katalizowanych przez lipazy została przeprowadzona przy użyciu:

- PPL (*porcine pancreatic lipase*) – lipazy wyizolowanej z trzustki świni,
- lipaz uzyskanych z komórek *Candida*, np. *C. rugosa* – CRL,
- lipaz uzyskanych z komórek *Pseudomonas*, np. *Pseudomonas sp.* – PSL,
- lipaz uzyskanych z komórek *Mucor*, np. *Mucor sp.* – MSL.

Jednym z przykładów użycia lipaz jest zastosowanie PPL w asymetrycznej hydrolizie prochiralnych estrów 1,3-propanodiolu w systemie dwufazowym (eter diizopropylowy *i*-Pr<sub>2</sub>O lub toluen + woda) (rys. 11).



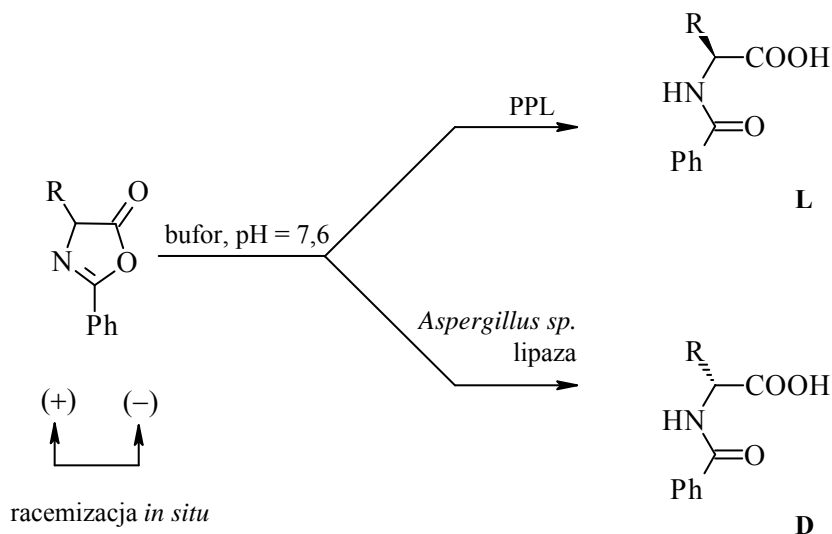
Rys. 11. Hydroliza estrów 1,3-propanodiolu w systemie dwufazowym

Tabela 3

Hydroliza estrów 1,3-propanodiolu w systemie dwufazowym [wg 1]

R <sup>1</sup>	Rozpuszczalnik organiczny	Konfiguracja produktu	ee [%]
<i>n</i> -C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	S	70
( <i>E</i> )- <i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> -CH=CH	brak	S	84
( <i>E</i> )- <i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> -CH=CH	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	S	95
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	S	72
( <i>E</i> )-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH=CH	brak	S	90
( <i>E</i> )-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH=CH	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	S	97
( <i>Z</i> )- <i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> -CH=CH	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	R	53
( <i>Z</i> )-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH=CH	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	R	15
Ph	brak	S	85–92
Ph	toluen	S	99
2-naftylo	brak	S	> 96
Ph-CH <sub>2</sub> -O	<i>i</i> -Pr <sub>2</sub> O	R	88–91

Podczas kontrolowanej hydrolizy 5-oksazolinonów, w warunkach pH = 7,6 uzyskać można aminokwasy w postaci izomerów D lub L, w zależności od użytej lipazy (rys. 12).



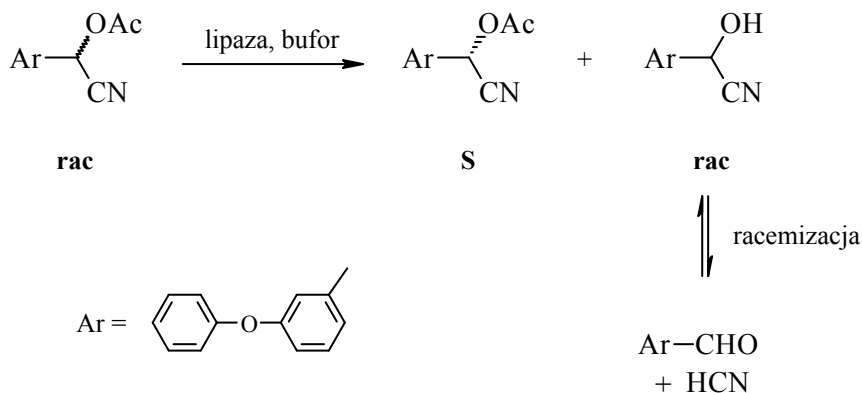
Rys. 12. Hydroliza 5-oksazolinonów przy użyciu różnych enzymów

Hydroliza 5-oksazolinonów przy użyciu różnych enzymów [wg 1]

Tabela 4

R	Lipaza	Konfiguracja produktu	ee [%]
Ph	PPL	L	76
CH <sub>3</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	PPL	L	80
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub>	PPL	L	87
Ph-CH <sub>2</sub>	PPL	L	> 99
Ph	<i>Aspergillus sp.</i>	D	80
CH <sub>3</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	<i>Aspergillus sp.</i>	D	83
Ph-CH <sub>2</sub>	<i>Aspergillus sp.</i>	D	> 99

Przykładem wpływu rodzaju enzymu na konfigurację i czystość optyczną produktu może być także reakcja uzyskiwania optycznie czystych cyjanohydrin, ważnych substratów w syntezie chiralnych  $\alpha$ -hydroksyaminokwasów,  $\alpha$ -hydroksyaldehydów i aminoalkoholi (rys. 13).



Rys. 13. Wpływ rodzaju enzymu na konfigurację i czystość optyczną produktu w reakcjach uzyskiwania optycznie czystych cyjanohydryn

Tabela 5

Wpływ rodzaju enzymu na konfigurację i czystość optyczną produktu w reakcjach uzyskiwania cyjanohydryn [wg 1]

Lipaza	Konfiguracja produktu	ee estru [%]
CRL	R	70
PSL	S	93
<i>Alcaligenes sp.</i>	S	93
<i>Chromobacterium sp.</i>	S	96
<i>Arthrobacter sp.</i>	S	> 99

W środowisku organicznym lipazy katalizują także reakcje estryfikacji, transestryfikacji, amidowania, syntezy peptydów, tworzenia cyklicznych laktonów.

### VI.3. Reakcje oksyredukcyjne

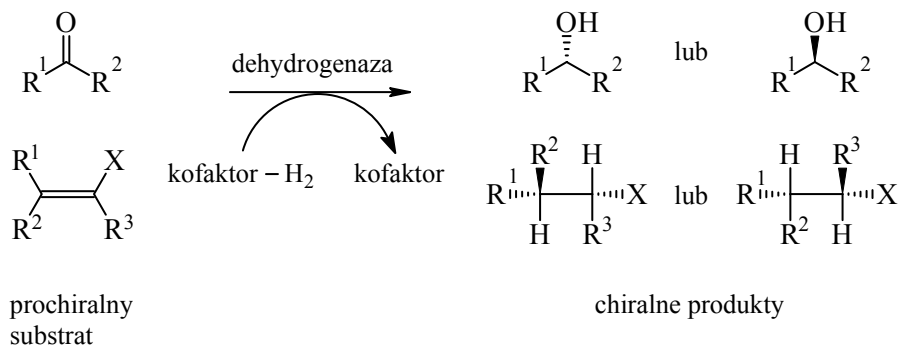
#### VI.3.1. Reakcje redukcji

Enzymy stosowane jako biokatalizatory w reakcjach oksyredukcyjnych zostały podzielone na 3 kategorie:

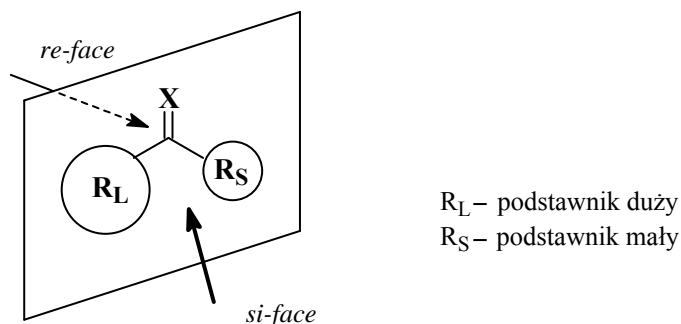
- dehydrogenazy,
- oksigenazy,
- oksydazy.

Grupa **dehydrogenaz** jest wykorzystywana w asymetrycznej redukcji związków zawierających grupę karbonylową C=O lub wiązanie podwójne C=C. Oba rodzaje reakcji prowadzą do powstania chiralnych produktów z prochiralnego substratu, przy czym dużą rolę odgrywa tu wielkość podstawnika (rys. 14). Jon wodorokowy może być dostarczony z obu stron wiązania podwójnego. Różnica w masie małej i dużej grupy reguluje kinetykę reakcji, prowadząc do selektywnej redukcji i powstania enancjomerów w różnych ilościach.

a)

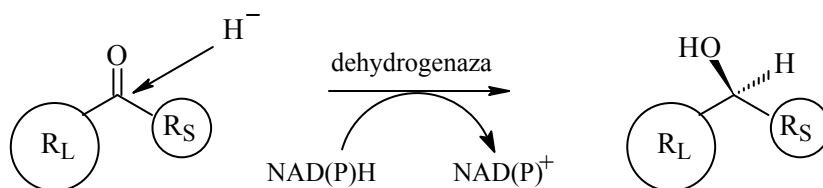


b)



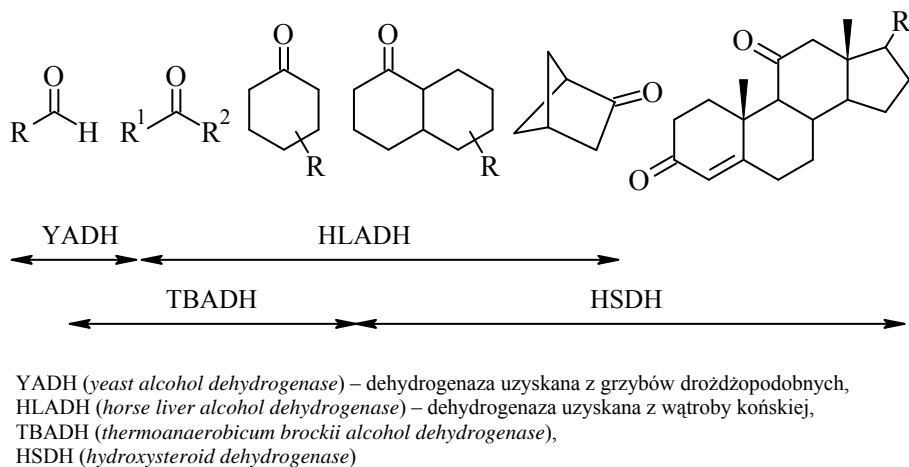
Rys. 14 a, b. Asymetryczna redukcja związków zawierających grupę karbonylową C=O lub wiązanie podwójne C=C (objaśnienia w tekście)

Stwierdzono, iż podczas redukcji grupy karbonylowej dehydrogenaza dostarcza jon wodorokowy, głównie od strony *re* prochiralnego ketonu – dzieje się tak zarówno w przypadku zastosowania wyizolowanych enzymów, jak i większości mikroorganizmów. Zwykle można więc przewidzieć, który enancjomer będzie przeważał wśród produktów danej reakcji. Regułę tę nazywamy regułą Preloga (rys. 15).



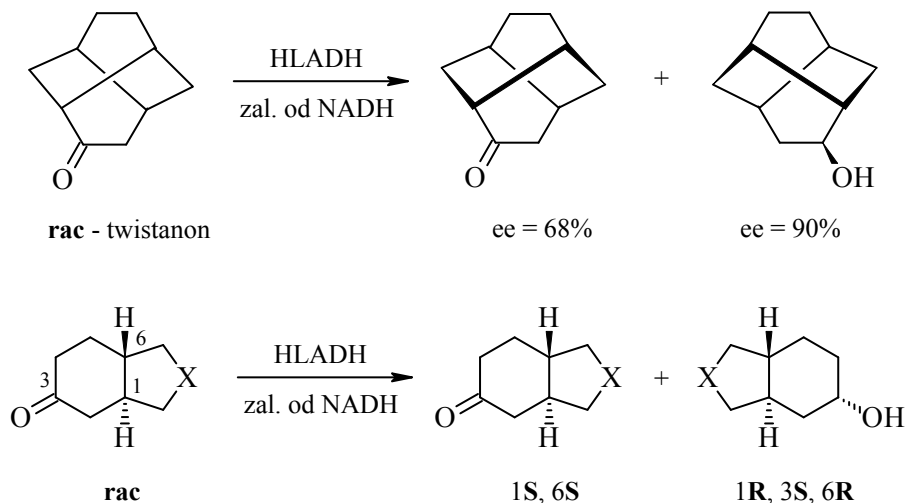
Rys. 15. Ilustracja reguły Preloga w przypadku redukcji związków z grupą karbonylową

Enzymy, których aktywność jest tu wykorzystywana, nie wykazują ścisłej specyficzności substratowej, a więc substratami katalizowanych reakcji mogą być różnorodne związki karbonylowe. Większość natomiast powszechnie używanych dehydrogenaz wykazuje pewne „preferencje”, jeżeli chodzi o wielkość substratu (rys. 16).



Rys. 16. Zastosowanie dehydrogenaz w zależności od wielkości cząsteczki substratu

YADH jest enzymem o wąskiej specyficzności substratowej. Akceptuje głównie aldehydy i metyloketony, choć przeprowadzano skutecznie redukcję także innych związków karbonylowych przy użyciu tego enzymu. HLADH posiada natomiast szerszy zasięg w odniesieniu do budowy substratu. Największe zastosowanie tego enzymu to redukcja mono-, bi- i policyklicznych ketonów racemicznych (także heterocyklicznych) (rys. 17 i 18).



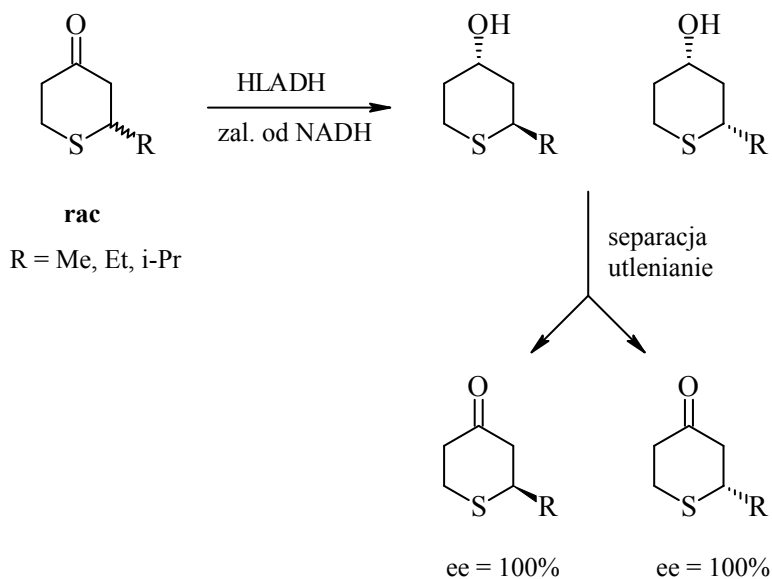
Rys. 17. Redukcja mono-, bi- i policyklicznych ketonów racemicznych za pomocą HLADH



Tabela 6

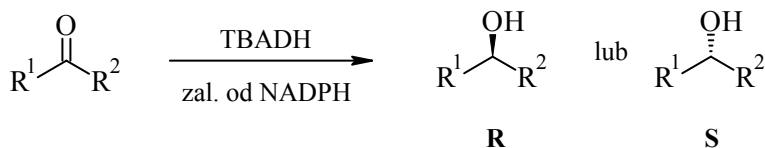
Redukcja bicyklicznych ketonów za pomocą HLADH [wg 1]

X	ee ketonu [%]	ee alkoholu [%]
O	60	> 97
S	53	> 97



Rys. 18. Zastosowanie redukcji heterocyklicznych ketonów za pomocą HLADH do rozdzielenia izomerów. Mieszaninę *cis* i *trans* (S)-alkoholi rozdziela się metodami chromatograficznymi, a następnie utlenia do optycznie czystych ketonów

Łańcuchowe metylo- i etyloketony łatwo ulegają redukcji do drugorzędowych alkoholi za pomocą YADH lub TBADH (rys. 19).



Rys. 19. Redukcja ketonów za pomocą TBADH

Substratami w reakcjach tego typu mogą być również  $\alpha$ -ketokwasy,  $\alpha,\beta$ -ketoestry,  $\alpha$ -hydroksyketony (także cykliczne).

Enzymy katalizujące reakcje oksyredukcyjne wymagają współdziałania koenzymu lub obecności w centrum aktywnym jonu metalu przejściowego. Często konieczny jest system odzyskiwania danego koenzymu lub dodatkowego zapewnienia jego obecności w środowisku, aby utrzymać zdolność katalityczną enzymu. Trudności tych można uniknąć, przeprowadzając reakcję z użyciem całych komórek mikroorganizmów, ponieważ niezbędny koenzym jest najczęściej zawarty w środowisku komórki. Do reakcji redukcji wykorzystuje się najczęściej różne gatunki *Saccharomyces* (patrz rozdział „Drożdże piekarskie jako reagent w syntezie organicznej”, str. 165).

Tabela 7

Redukcja ketonów za pomocą TBADH [wg 1]

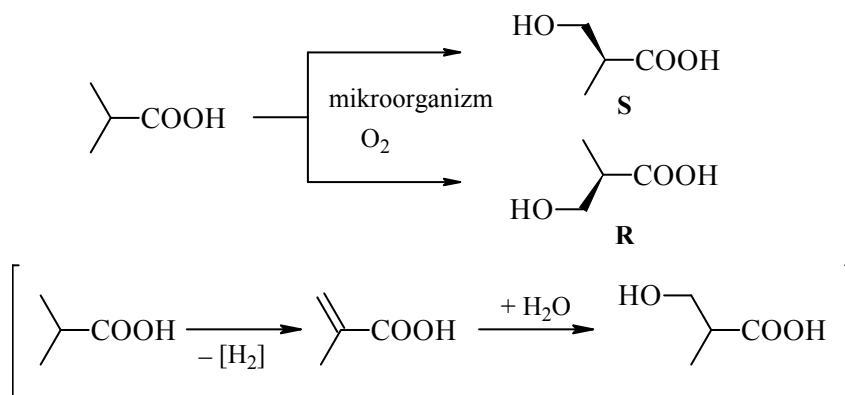
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	zgodność kierunku reakcji z regułą Preloga	konfiguracja produktu	ee [%]
CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	niezgodnie	R	48
CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	niezgodnie	R	86
CH <sub>3</sub>	cyklo-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	niezgodnie	R	44
CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	zgodnie	S	79
CF <sub>3</sub>	Ph	zgodnie	R	94
CH <sub>3</sub>	C≡CH	zgodnie	S	86
CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	zgodnie	S	95
CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Cl	zgodnie	S	98
CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -Cl	zgodnie	S	> 99
Cl-CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> Et	zgodnie	R	90
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> Me	zgodnie	S	98
CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	zgodnie	S	99
CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	zgodnie	S	98
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	zgodnie	S	97
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -Cl	zgodnie	S	> 99
<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-	brak reakcji	-
CH <sub>3</sub>	( <i>E</i> )-CH=CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	brak reakcji	-

### VI.3.2. Reakcje utleniania

**Oksygenazy** znalazły szerokie zastosowanie jako biokatalizatory w reakcjach utleniania. Uaktywniają one nieaktywne wiązania C-H i C=C, ułatwiając wprowadzenie grupy hydroksylowej lub epoksydację tych wiązań. W przeciwieństwie do reakcji redukcji, rzadko wykorzystuje się w tym typie reakcji wyizolowane enzymy, między innymi z powodu skomplikowanego systemu odzyskiwania niezbędnych koenzymów (*recycling*). Znacznie częściej używa się całych komórek mikroorganizmów, dlatego w poniżej przedstawionych przykładach częściej podawać będziemy nazwy konkretnych szczepów mikroorganizmów zamiast, jak do tej pory, nazwę enzymu.

Najwcześniej i najszerzej poznaną reakcją tego typu jest reakcja hydroksylowania steroidów. Obecna wiedza na ten temat pozwala na przykład na selektywne wprowadzanie grupy hydroksylowej do wybranego fragmentu (fragmentów) związku przy użyciu odpowiednich mikroorganizmów. W wyniku tych reakcji uzyskano wiele leków steroidowych. Niektóre z reakcji przeprowadza się w obecności rozpuszczalników organicznych, ułatwiających rozpuszczenie substratu bądź produktu. Więcej informacji na ten temat znaleźć można w rozdziale „Otrzymywanie związków steroidowych ze źródeł naturalnych i na drodze biotransformacji”, str. 299.

Substratami reakcji hydroksylowania są również związki inne niż steroidy. Przykładem zastosowania tlenu w biotransformacjach jest asymetryczna hydroksylacja kwasu izobutyrowego (rys. 20).



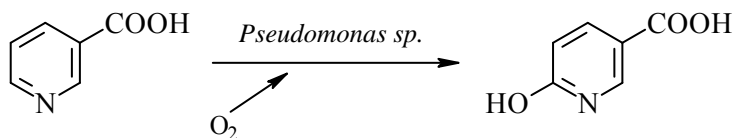
Rys. 20. Asymetryczna hydroksylacja kwasu izobutyrowego

Tabela 8

Asymetryczna hydroksylacja kwasu izobutyrowego [wg 1]

Mikroorganizm	Konfiguracja produktu	ee [%]
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21244	S	> 95
<i>Candida rugosa</i> IFO 0750	S	99
<i>Candida rugosa</i> IFO 1542	R	97

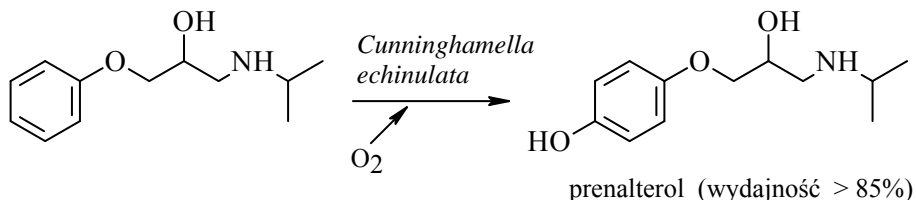
Regioselektywne wprowadzanie grupy hydroksylowej do cząsteczki kwasu nikotynowego jest stosowane przy przemysłowej produkcji kwasu 6-hydroksynikotynowego (rys. 21).



kwas 6-hydroksynikotynowy (wydajność 100%)

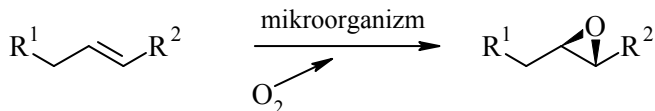
Rys. 21. Hydroksylowanie kwasu nikotynowego

Racemiczny prenatalerol, będący ważnym  $\beta$ -blokerem, otrzymano poprzez hydroksylację aromatycznego prekursora przy użyciu komórek *Cunninghamella echinulata* (rys. 22).



Rys. 22. Wprowadzanie grupy hydroksylowej podczas otrzymywania prenatalerolu

Chiralne epoksydy są ważnymi pośrednikami w syntezie chiralnych związków, ze względu na ich zdolność reagowania z różnymi nukleofilami. Między innymi są substratami przy uzyskiwaniu 3-podstawionych 1-alkiloamino-2-propanoli, związków blokujących receptory  $\beta$ -adrenergiczne. Optyczna czystość epoksydów uzyskanych z alkenów zależy od rodzaju użytego mikroorganizmu. Produkt ma zwykle konfigurację R (rys. 23).



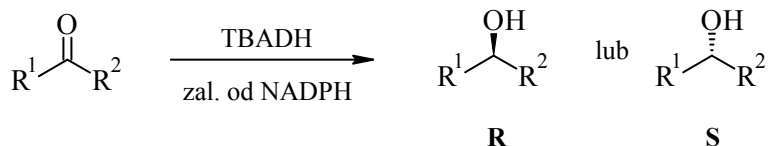
Rys. 23. Otrzymywanie epoksydów z alkenów

Tabela 9

Otrzymywanie epoksydów w zależności od użytego mikroorganizmu [wg 1]

Mikroorganizm	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Konfiguracja produktu	ee [%]
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	R	70–80
	<i>n</i> -C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	H	R	60
	H	H	R	86
	NH <sub>2</sub> CO–CH <sub>2</sub> –C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> –O	H	S	97
	CH <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> –C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> –O	H	S	98
<i>Corynebacterium equi</i>	CH <sub>3</sub>	H	R	70
	<i>n</i> -C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>	H	R	100
<i>Mycobacterium sp.</i>	H	H	R	98
	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	R, R	74
	Ph–O	H	S	80
<i>Xanthobacter Py2</i>	Cl	H	S	98
	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	R, R	78
<i>Nocardia sp.</i> IP1	Cl	H	S	98
	CH <sub>3</sub>	H	R	98

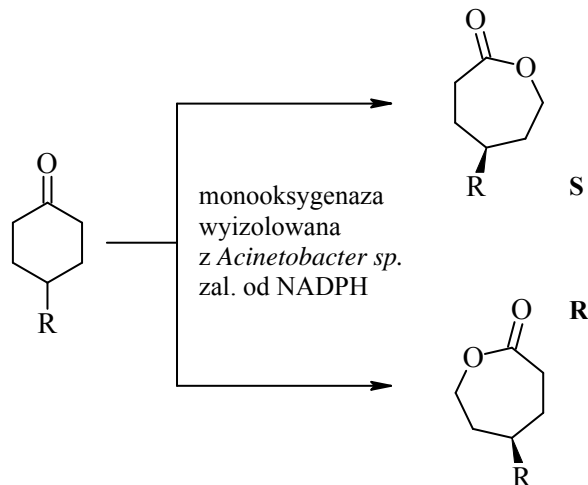
Utlenianie ketonów metodą Baeyera-Villigera (rys. 24) jest ważną reakcją pozwalającą otrzymywać estry i laktony. Enzymatyczne utlenianie tą metodą jest najczęściej katalizowane przez monoooksygenazy, zależne od flawiny. Większość tych reakcji na preparatywną skalę wykonuje się przy użyciu całych komórek mikroorganizmów.



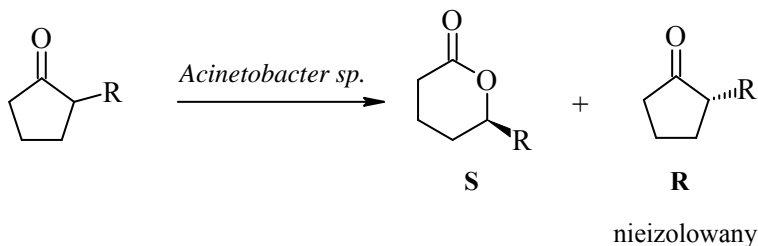
Rys. 24. Utlenianie ketonów metodą Baeyera-Villigera

Prochiralne cykliczne ketony ulegają asymetrycznemu utlenieniu za pomocą odpowiednio dobranych mikroorganizmów lub wyizolowanych z nich enzymów (rys. 25 a, b).

a)



b)



Rys. 25 a, b. Utlenianie cyklicznych ketonów

Utlenianie cyklicznych ketonów (rys. 25 a) [wg 1]

R	Konfiguracja prod.	ee [%]
CH <sub>3</sub> O	S	75
Et	S	> 98
<i>n</i> -Pr	S	> 98
<i>t</i> -Bu	S	> 98
<i>n</i> -Bu	R	52

Tabela 11

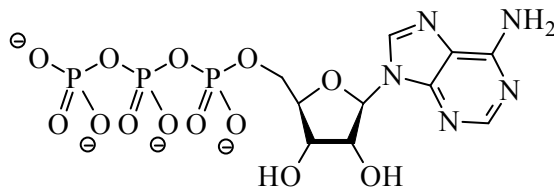
Utlenianie cyklicznych ketonów (rys. 25 b) [wg 1]

R	ee laktonu [%]
<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	97
<i>n</i> -C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	95
<i>n</i> -C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	85
<i>n</i> -C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	73

## VI.4. Inne reakcje

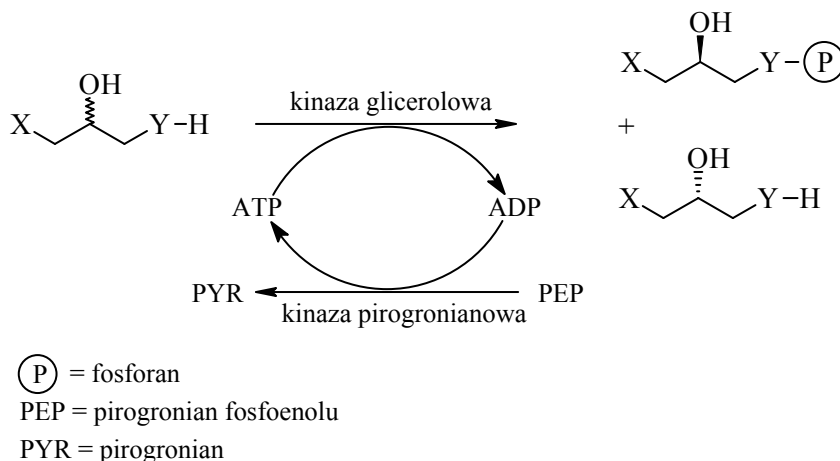
### VI.4.1. Estry kwasu fosforowego

Liczne bioaktywne związki wykazują największą aktywność w postaci estrów kwasu fosforowego. Część z nich to koenzymy, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania procesów w komórkach. Elektrofilowy atom fosforu stosunkowo łatwo ulega reakcjom podstawienia różnorodnymi nukleofilami. Reakcje te są jednymi z najważniejszych reakcji biochemicznych. Należą do nich procesy replikacji, transkrypcji, rekombinacji kwasów nukleinowych, procesy dostarczające komórkom energii, niektóre procesy regulacji metabolicznej oraz wiele reakcji ważnych w cyklu biosyntezy aminokwasów, białek, nukleotydów i węglowodanów. Enzymy, które katalizują te reakcje, można podzielić na cztery grupy: fosfatazy, fosfodiesterazy, kinazy i fosforylasy. Trzy pierwsze katalizują przenoszenie grupy fosforylowej PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. W reakcjach tych pośredniczy adenozynotrifosforan (ATP), główny przenośnik energii w żywych komórkach (ulega rozpadowi do adenozynodifosforanu ADP lub adenozynomonofosforanu AMP z wydzieleniem energii).



Rys. 26. Adenozynotrifosforan (ATP)

Enzymy te akceptują nie tylko naturalne substraty. Na przykład kinaza glicerolowa jest zdolna do transformowania różnych prochiralnych lub racemicznych pierwszorzędowych alkoholi w chiralne fosforany (rys. 27).



Rys. 27. Transformacja pierwszorzędowych alkoholi w chiralne fosforany za pomocą kinazy glicerolowej

Tabela 12

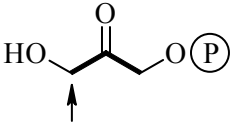
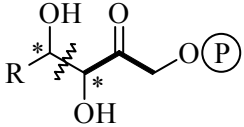
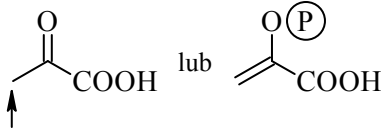
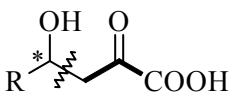
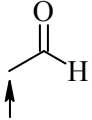
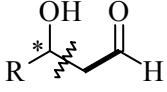
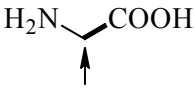
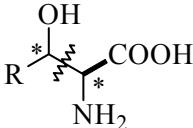
Transformacja pierwszorzędowych alkoholi w chiralne fosforany za pomocą kinazy glicerolowej [wg 1]


X	Y	ee fosforanu [%]	ee alkoholu [%]
Cl	O	> 94	88
SH	O	94	-
CH <sub>3</sub> O	O	90	-
Br	O	90	-
OH	NH	> 94	94

#### VI.4.2. Formowanie wiązania C–C

Do najważniejszych reakcji tworzenia wiązań C–C w układach biologicznych należą reakcje kondensacji aldolowej, katalizowane przez aldolazy, oraz reakcje kondensacji Claisena, katalizowane przez ligazy. Enzymy te operują na substratach o zróżnicowanej strukturze (np. węglowodany, aminokwasy, hydroksykwasy i in.), dobudowując do węgla grupy karbonyłowej fragment jedno-, dwu- lub trójwęglowy z zachowaniem wysokiej stereospecyficzności.

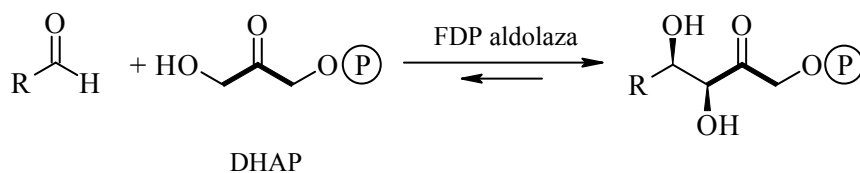
Zazwyczaj **aldolazy** używają w kondensacji tych samych donorów (czynników nukleofilowych). Ze względu na rodzaj donora aldolazy można podzielić na 4 grupy, różniące się mechanizmem działania enzymu (rys. 28).

grupa	donor	produkt
I		
II		
III		
IV		

(P) = fosforan,  = nowe wiązanie, \* = nowe centrum asymetrii

Rys. 28. Podział aldolaz ze względu na rodzaj donora

Dobrze poznanym enzymem katalizującym reakcje **kondensacji aldolowej** jest, należąca do I grupy, aldolaza fruktozo-1,6-difosforanowa (FDP), która katalizuje *in vivo* kondensację fosforanu dihydroksyacetonu (DHAP) z aldehydem D-3-fosfoglicerynowym w procesie tworzenia 1,6-difosforanu fruktozy.



Rys. 29. Kondensacja DHAP z aldehydem D-3-fosfoglicerynowym

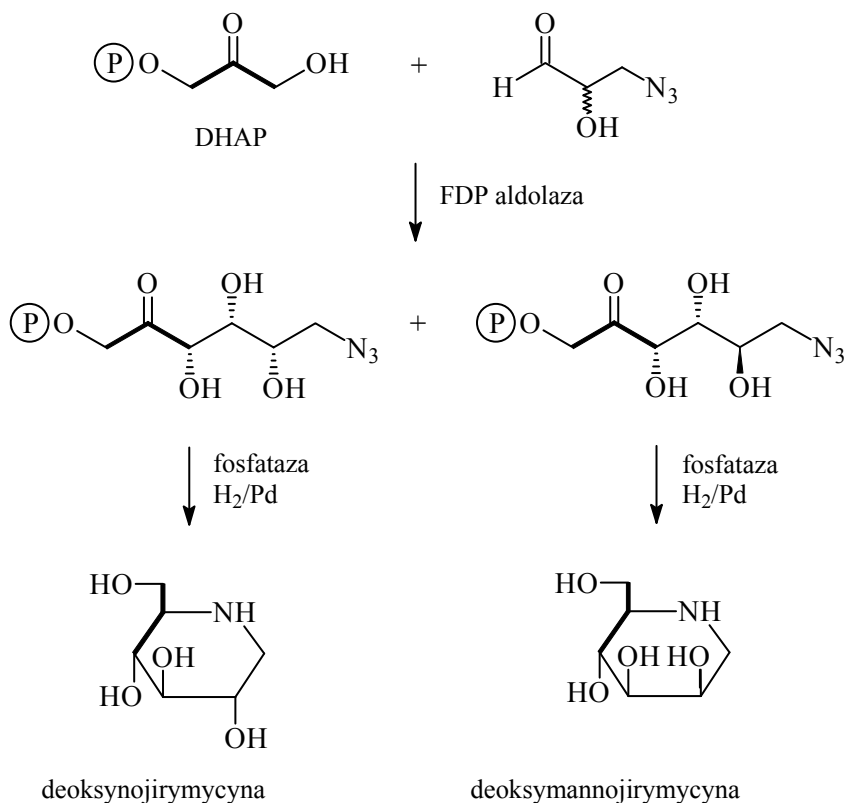


Tabela 13

Substraty naturalne i nienaturalne w reakcjach kondensacji aldolowej z wykorzystaniem FDP [wg 1]

R (w substratach naturalnych)	R (w substratach nienaturalnych)
aldehyd D-3-fosfoglicerynowy	H, Me, Et, <i>n</i> -Pr, <i>i</i> -Pr, CHO,
D- lub L-treozą	COOH, CH <sub>2</sub> F, CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> Ph,
D- lub L-erytrozą	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH, CH(OCH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> OH,
L-arabinozą	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OMe, CHO <sub>2</sub> Me,
D-rybozą	CHOHCH <sub>2</sub> OMe, CH <sub>2</sub> Ph, COPh,
D-liksozą	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CHO, CH <sub>2</sub> P(O)(OEt) <sub>2</sub> ,
D-ksylozą	2- i 3-pirydylo-, 4-cykloheksenylo-

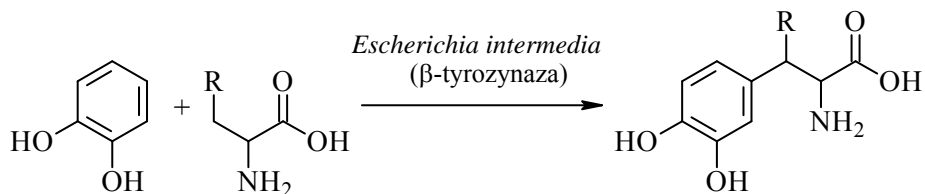
Jednym z zastosowań FDP jest chemoenzymatyczna synteza biologicznie aktywnych pochodnych cukrowych. Niektóre z nich (nojirymycyna i jej pochodne) są związkami potencjalnie aktywnymi w zwalczaniu AIDS (nie wykazują cytotoksyczności) (rys. 30).



Rys. 30. Chemoenzymatyczna synteza biologicznie aktywnych pochodnych cukrowych za pomocą FDP

Reakcje **kondensacji acyloinowej** są wywoływane z dużymi wydajnościami przez różne gatunki drożdży *Saccharomyces*. Substratami są aldehydy aromatyczne zawierające różnorodne grupy funkcyjne w pierścieniu. Reakcja ta znalazła zastosowanie w enzymatyczno-chemicznej syntezie efedryny na skalę przemysłową (rozdział „Drożdże piekarskie jako reagent w syntezie organicznej”, str. 165).

Przy użyciu komórek mikroorganizmu *Escherichia intermedia* można przeprowadzić kondensację pirokatecholu z aminokwasami, w wyniku czego powstają – z dobrymi wydajnościami – analogi L-dopy (rys. 31). W podobny sposób otrzymać można pochodne L-tryptofanu.

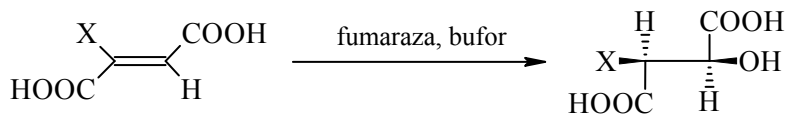


Rys. 31. Kondensacja pirokatecholu z aminokwasami za pomocą komórek *Escherichia intermedia*

#### VI.4.3. Reakcje eliminacji – addycji

Asymetryczna addycja związków małowartościowych ( $H_2O$ ,  $HCN$ ,  $NH_3$ ) do wiązań podwójnych  $C=C$  lub  $C=O$  jest katalizowana przez enzymy zwane **liazami**. Enzymy te wykazują dość wąski zakres tolerancji na różnice w budowie substratu (z wyjątkiem enzymów katalizujących syntezę chiralnych cyjanohydryn). Poniżej podano kilka przykładów (rys. 32 a, b; rys. 33):

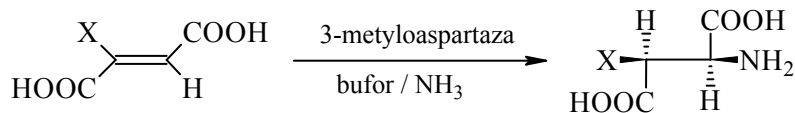
a)



ee = 100%

X = H, Cl

b)



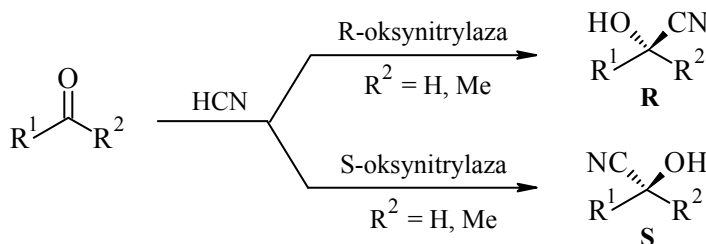
ee = 100%

Rys. 32 a, b. Asymetryczna addycja związków małowartościowych do wiązań podwójnych

Tabela 14

Asymetryczna addycja związków małowcząsteczkowych do wiązań podwójnych (rys. 32 b) [wg 1]

X	Wydajność [%]
H	90
Cl	60
CH <sub>3</sub>	61
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	60
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	54
<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	49
<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0



Rys. 33. Synteza cyjanohydrin

Tabela 15

Synteza cyjanohydrin [wg 1]

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Konfiguracja produktu	ee [%]
Ph	H	S	96–98
<i>p</i> -HO-Ph	H	S	94–99
<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	S	84
<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	CH <sub>3</sub>	S	92
CH <sub>2</sub> =CH	H	S	84
( <i>E</i> )- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -CH=CH	H	S	97
( <i>Z</i> )- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> -CH=CH	H	S	92
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	S	91
Ph	H	R	94
<i>p</i> -MeO-Ph	H	R	93
<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	R	92–96
<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub>	R	95
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	R	98
CH <sub>2</sub> =CH(CH <sub>3</sub> )	CH <sub>3</sub>	R	94
Cl-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	R	84

### Literatura

1. K. Faber: *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg 1997.
2. P. Kafarski, B. Lejczak: *Chemia bioorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.
3. A. Chmiel: *Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
4. R. Csuk, B. I. Glänzer: *Baker's Yeast Mediated Transformations in Organic Chemistry*, Chem. Rev., 1991, 91, 49–97.
5. S. Servi: *Baker's Yeast as a Reagent in Organic Synthesis*, Synthesis, 1990, 1–25.
6. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.

## VII. DROŻDŻE PIEKARSKIE JAKO REAGENT W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

### VII.1. Wstęp

Poważnym problemem przy planowaniu biotransformacji jest dobór odpowiedniego mikroorganizmu. Można kierować się tu pewnymi wskazówkami ogólnymi. Wiadomo, że redukcji mikrobiologicznych najlepiej dokonywać za pomocą drożdży, mikrobiologicznego utleniania za pomocą bakterii, a reakcji hydroksylowania za pomocą niższych grzybów.

Reakcje z użyciem mikroorganizmów wymagają wiele pracy i czasu przy separowaniu produktu ze środowiska reakcji, które zawiera masę komórkową, pożywkę, metabolity, nieprzereagowane substraty, wodę. Dużym problemem są zachodzące reakcje uboczne, często dominujące nad pożądaną. Odzyskanie produktu i nieprzereagowanego materiału może nie być proste, ilościowe; konieczne jest oczyszczenie produktu.

Drożdże piekarskie są tanie, uniwersalne, a ich wzrost nie wymaga „asysty” mikrobiologa. Światowa produkcja drożdży wynosi 600000 ton rocznie. W normalnych warunkach fermentacji, drożdże znajdują szerokie zastosowanie; większość produkowanych przez nie enzymów wykazuje aktywność w wodzie w zakresie pH od 5 do 7,5. Wykorzystanie innych mikroorganizmów wymaga już pomocy ze strony mikrobiologów i dostępu do urządzeń fermentacyjnych oraz utrzymywania sterylnych warunków wzrostu i przechowywania.

Za pośrednictwem drożdży piekarskich prowadzi się następujące reakcje:

- redukcji grupy karbonylowej  $C=O$  i wiązania podwójnego  $C=C$ ,
- budowania i przerywania wiązania  $C-C$ ,
- redukcji związków metaloorganicznych,
- redukcji związków zawierających fluorowce,
- utleniania,
- hydrolizy estrów,
- inne.

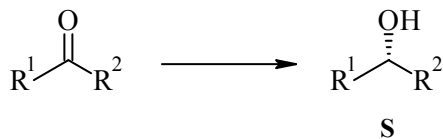
Poniżej omówiono najważniejsze z tych reakcji.

### VII.2. Reakcje redukcji

Jedną z reakcji o największym zastosowaniu, prowadzonych przy udziale drożdży jest asymetryczna redukcja związków zawierających grupę karbonylową. Redukowano ketony z różnymi podstawnikami, otrzymując głównie drugorzędowe alkohole o konfiguracji absolutnej *S*. Ketony z przeszkodą steryczną (4-oktanon, *t*-butylometyloketon, izobutyloizopropylketon) nie ulegają redukcji w tych warunkach.

#### VII.2.1. Redukcja związków zawierających jedną grupę karbonylową

Zanotowano wiele przykładów redukcji za pomocą drożdży piekarskich związków z jedną grupą karbonylową. Są wśród nich ketony mono- lub policykliczne, aromatyczne, zawierające siarkę, grupę nitrową, fluorowce, ketony heterocykliczne. Poniżej podano kilka przykładów zaczerpniętych z literatury oraz wartości wydajności i nadmiaru enancjomerycznego (ee) produktów (rys. 1–3).



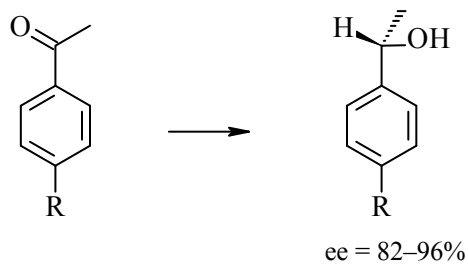
Rys. 1. Redukcja ketonów za pomocą drożdży piekarskich

Tabela 1

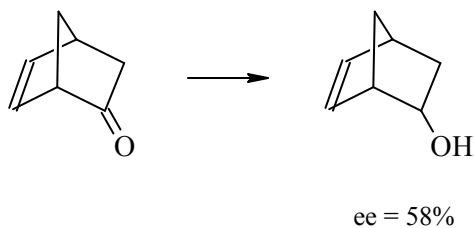
Redukcja ketonów za pomocą drożdży piekarskich [wg 1]

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	ee [%]
CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	67
CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	82
CH <sub>3</sub>	Ph	89
CH <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	> 80
CF <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -Br	> 80
CH <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -NO <sub>2</sub>	> 96
CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> -OH	91
CH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	94
CH <sub>3</sub>	<i>cyklo</i> -C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	> 95

a)

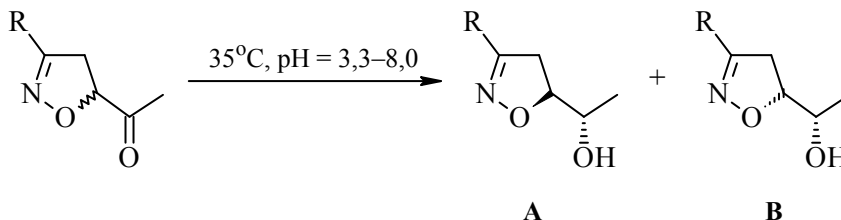
R = OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>, F, Cl, Br, J, CN, NO<sub>2</sub>

b)



Rys. 2 a, b. Redukcja ketonów za pomocą drożdży piekarskich

Redukcja  $\alpha$ -heterocyklopodstawionych ketonów za pomocą drożdży nie daje dobrych rezultatów. Ketony takie, jak 2-tienylowy, 2-furylowy nie są w ogóle redukowane. Wysoką czystość optyczną i dobrą wydajność zanotowano w nielicznych przypadkach (rys. 3).



Rys. 3. Redukcja  $\alpha$ -heterocyklopodstawionych ketonów za pomocą drożdży piekarskich

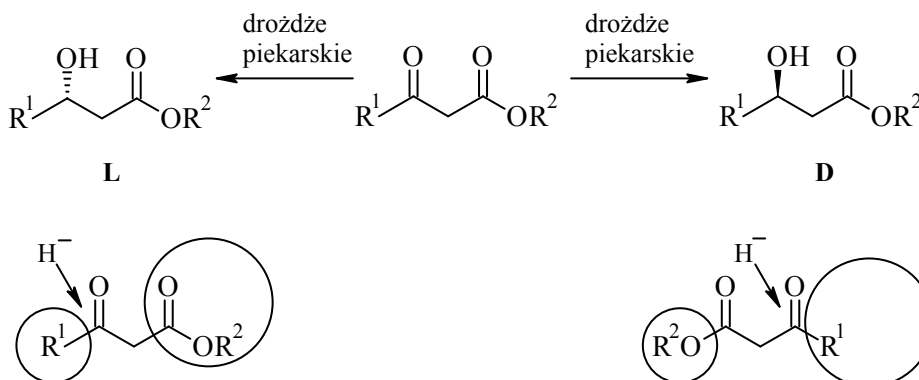
Tabela 2

Redukcja  $\alpha$ -heterocyklopodstawionych ketonów za pomocą drożdży piekarskich [wg 4]

R	ee [%]	produkt A	ee [%]	produkt B
2-furyl	98		> 98	
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	98		> 98	

### VII.2.2. Redukcja $\beta$ -ketoestrów

Niecycliczne  $\beta$ -ketoestry są chętnie redukowane przez drożdże do  $\beta$ -hydroksyestrów, będących chiralnymi substratami w syntezie dalszych związków ( $\beta$ -laktamów, feromonów owadów, karotenoidów). Redukcja  $\beta$ -ketoestrów pozwala uzyskać oba enancjomery w różnym stosunku, w zależności od tego, z której strony „podchodzi” jon wodorokowy. Używając systemu mikrobiologicznego, jakim są komórki drożdży, mamy do czynienia z co najmniej dwoma enzymami (reduktazami), które działają równocześnie z różnymi stereochemicznymi preferencjami, a każdy z nich operuje z wysoką stereoselektywnością. Można wpływać na czystość enancjomeryczną (ee) produktu różnymi drogami – na przykład poprzez modyfikacje strukturalne substratu (rys. 4).



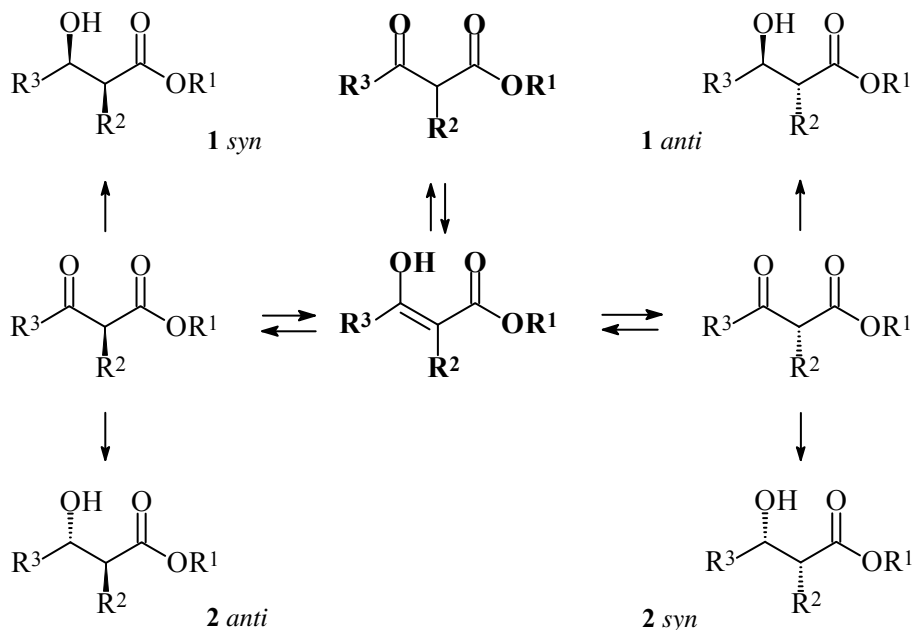
Rys. 4. Ilustracja reguły Preloga w przypadku redukcji  $\beta$ -ketoestrów drożdżami piekarskimi

Redukcja  $\beta$ -ketoestrów za pomocą drożdży piekarskich [wg 1, 4 i 5]

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Konfiguracja produktu	ee [%]
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	S	87
CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	S	> 96
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	R	96
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	<i>n</i> -C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	R	95
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	S	100
Cl-CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	S	64
Cl-CH <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	S	54
Cl-CH <sub>2</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	S	27
Br-CH <sub>2</sub>	<i>n</i> -C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	S	100

### VII.2.3. Redukcja $\alpha$ -podstawionych $\beta$ -ketoestrów

W związkach typu  $\alpha$ -podstawione  $\beta$ -ketoestry produktami redukcji są aż 4 izomery. Wynika to z występowania zjawiska tautomerii keto-enolowej. Poprzez modyfikacje struktury związku sterujemy nie tylko czystością enancjomeryczną (ee), ale także czystością diastereoizomeryczną (de) (rys. 5).



Rys. 5. Redukcja  $\alpha$ -podstawionych  $\beta$ -ketoestrów

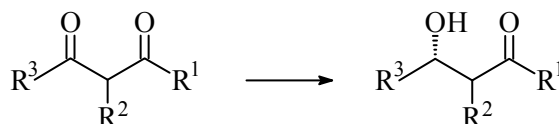


Tabela 4

Redukcja  $\alpha$ -podstawionych  $\beta$ -ketoestrów [wg 1]

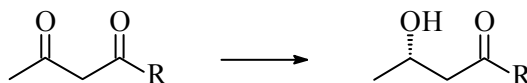
$R^1$	$R^2$	$R^3$	ee [%] produkt 2 <i>syn</i>	ee [%] produkt 2 <i>anti</i>	2 <i>syn</i> : 2 <i>anti</i>
CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -S	CH <sub>3</sub>	> 96	> 96	17 : 83
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	100	100	83 : 17
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	100	100	33 : 67
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	100	100	25 : 75
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	100	100	67 : 33

## VII.2.4. Redukcja 1,3-diketonów



Rys. 6. Redukcja 1,3-diketonów

Z wyjątkiem ketonu, w którym  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$  (a który ulega redukcji do dwóch stereoizomerów), redukcja diketonów tego typu daje produkt, w którym tylko jedna grupa karbonylowa zostaje zredukowana. Nie jest to redukcja przebiegająca przez pośredni enol; nie otrzymuje się ani dioli, ani innych izomerycznych  $\beta$ -hydroksyketonów (rys. 7 i 8). Reakcje redukcji niecyklicznych 1,3-diketonów za pomocą drożdży zachodzą wolno, z niewielką wydajnością lub/i małą wartością ee.



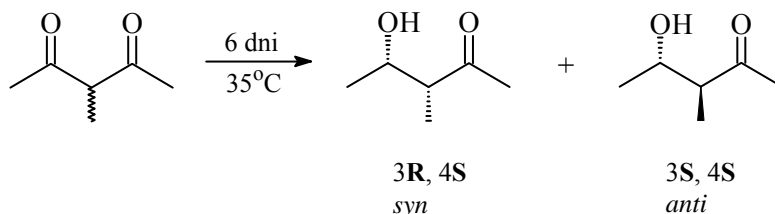
$R = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, n\text{-C}_3\text{H}_7, i\text{-C}_3\text{H}_7, n\text{-C}_4\text{H}_9, n\text{-C}_5\text{H}_{11}, \text{C}_6\text{H}_5$

wydajność 20–60%; ee = 92–99%

Rys. 7. Przykłady redukcji 1,3-diketonów

Przykłady redukcji 1,3-diketonów [wg 4]

R	Czas reakcji	Wydajność [%]	ee [%]
CH <sub>3</sub>	2 dni	18	> 99
	6 dni	90	> 99
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	2 dni	48	97
	3 dni	100	> 99
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2 dni	21	94
	6 dni	33	98

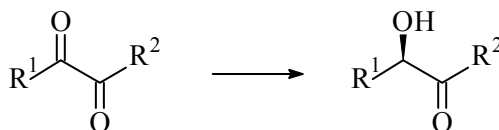


wydajność 30%; *syn* : *anti* = 4 : 1

Rys. 8. Przykłady redukcji 1,3-diketonów

### VII.2.5. Redukcja 1,2-diketonów i 1,4-diketonów

1,2-diketony są, za pomocą drożdży piekarskich, redukowane do  $\alpha$ -hydroksyketonów, lub (rzadziej) do dioli. To, która grupa zostaje podczas monoredukcji zredukowana, zależy od podstawników sąsiadujących z atomami węgla grup karbonylowych (rys. 9).



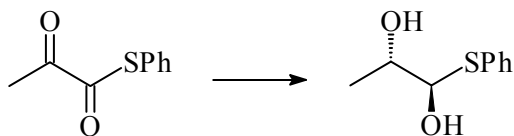
Rys. 9. Redukcja 1,2-diketonów

Przykłady redukcji 1,2-diketonów [wg 4]

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Konfiguracja produktu	Wydajność [%]	ee [%]
CH <sub>3</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	S	47	91
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	S	42	75
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	S	80	95
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	R	68	100
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	NH <sub>2</sub>	R	70	100
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	R	80	95

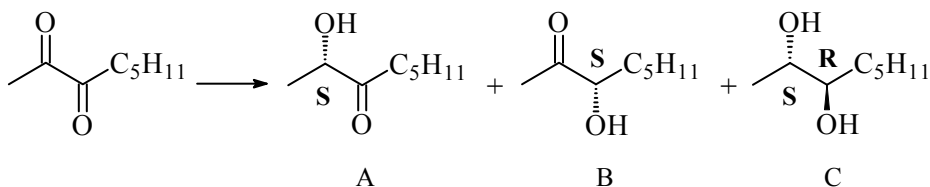
Przy redukcji obu grup karbonylowych wśród produktów przeważają diole o konfiguracji *anti* (rys.10 a, b).

a)



wydajność 66%; *anti* : *syn* = 86 : 14%

b)



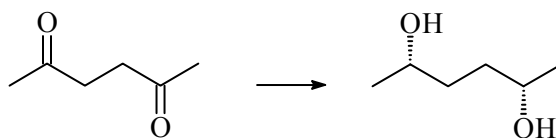
Rys. 10 a, b. Redukcja jednej lub obu grup karbonylowych w 1,2-diketonach

Tabela 7

Redukcja jednej lub obu grup karbonylowych w 1,2-diketonach (rys.10 b) [wg 4]

Produkt A		Produkt B		Produkt C	
wydajność [%]	ee [%]	wydajność [%]	ee [%]	wydajność [%]	ee [%]
71	92	22	90	7	99

1,4-diketony ulegają redukcji do dioli, przy czym obie grupy hydroksylowe najczęściej uzyskują konfigurację S (rys. 11).

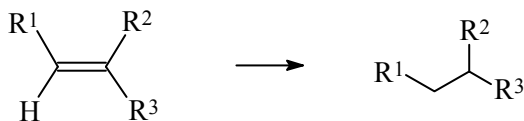


wydajność 55%; ee > 95%

Rys. 11. Redukcja 1,4-diketonów

### VII.2.6. Redukcja związków z wiązaniem podwójnym

Drożdże piekarskie były stosowane do stereospecyficznej redukcji wiązania C=C. Transformacje te przyciągają dużą uwagę, jako droga do otrzymywania chiralnych półproduktów w asymetrycznej syntezie. Najszerzej przebadaną w tym zakresie grupą związków są związki zawierające trójpodstawione wiązania podwójne (rys. 12).



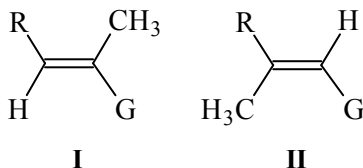
Rys. 12. Redukcja związków z wiązaniem podwójnym

Tabela 8

Redukcja związków z wiązaniem podwójnym [wg 5]

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Konfiguracja	Wydajność	ee produktu
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Br	CH <sub>2</sub> OH	S	50–60	85
CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	H	R	–	98
<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	CH <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	35	90
CHCl <sub>2</sub> (E)	Cl	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	R	60	84
CHCl <sub>2</sub> (Z)	Cl	CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	S	65	98
NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	alkil	R	30–60	80–98

Zauważono, że redukowane są głównie związki z tzw. „aktywnym” wiązaniem podwójnym. Związki takie mogą należeć do jednej z dwóch kategorii:



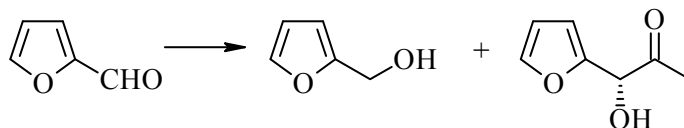
G – grupa „aktywująca”  
 G = CH<sub>2</sub>OH, CHO, CH(OR<sup>1</sup>)<sub>2</sub>

W zależności od rodzaju izomeru alkeny (E lub Z), można otrzymać produkt z konfiguracją absolutną R lub S. Zredukowane produkty, pochodzące od alkenów jednego typu (np. I) mają tę samą konfigurację, podczas gdy związki z drugiej grupy są redukowane z odwrotną stereochemią.

### VII.3. Formowanie wiązania C–C

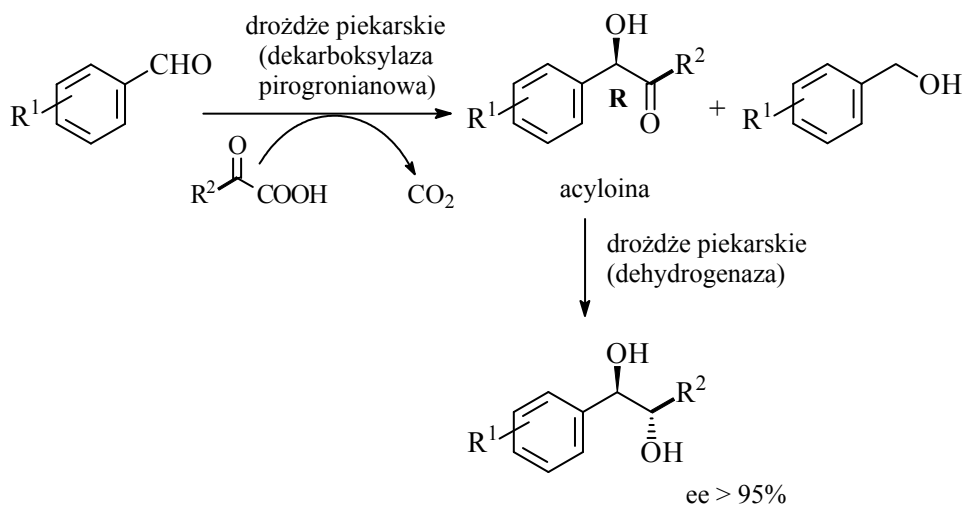
#### VII.3.1. Kondensacja acyloinowa

Produkt kondensacji acyloinowej został po raz pierwszy zaobserwowany przez Neubergera podczas drożdżowej fermentacji furfuralu, obok spodziewanego produktu reakcji – alkoholu furylowego (rys. 13).



Rys. 13. Drożdżowa fermentacja furfuralu

Przebadano wiele reakcji tego typu z wykorzystaniem jako substratu benzaldehydu i podstawionych monopochnych, uzyskując głównie diole z konfiguracją *anti*, z dużą wydajnością i czystością enancjomeryczną (rys. 14).



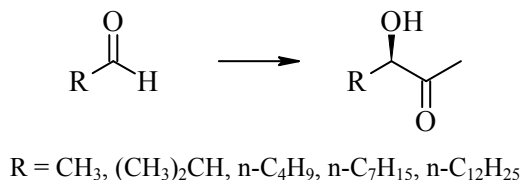
Rys. 14. Kondensacja acyloinowa przy użyciu drożdży piekarskich

Tabela 9

## Przykłady kondensacji acyloinowej [wg 5]

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Wydajność [%]	ee [%]
H	H	30	95
<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	H	22	97
<i>p</i> -CH <sub>3</sub>	H	28	97
<i>p</i> -Cl	H	27	99
<i>p</i> -F	H	26	98
<i>o</i> -CH <sub>3</sub>	H	7	97
<i>o</i> -Cl	H	32	97
<i>o</i> -F	H	31	97
<i>m</i> -F	H	30	97

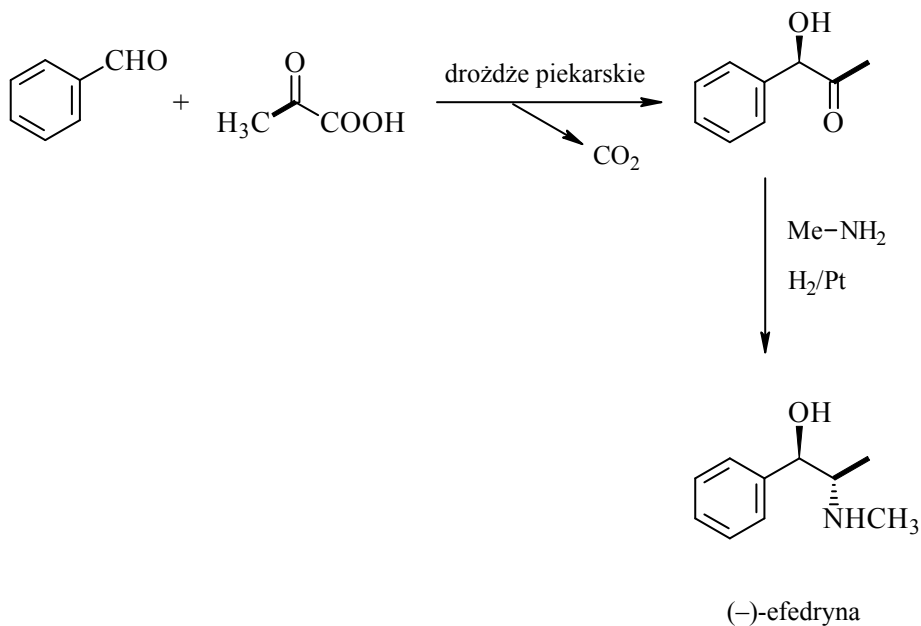
Obserwowano także kondensację acyloinową w przypadku aldehydów alifatycznych (rys. 15).



Rys. 15. Kondensacja acyloinowa w przypadku aldehydów alifatycznych

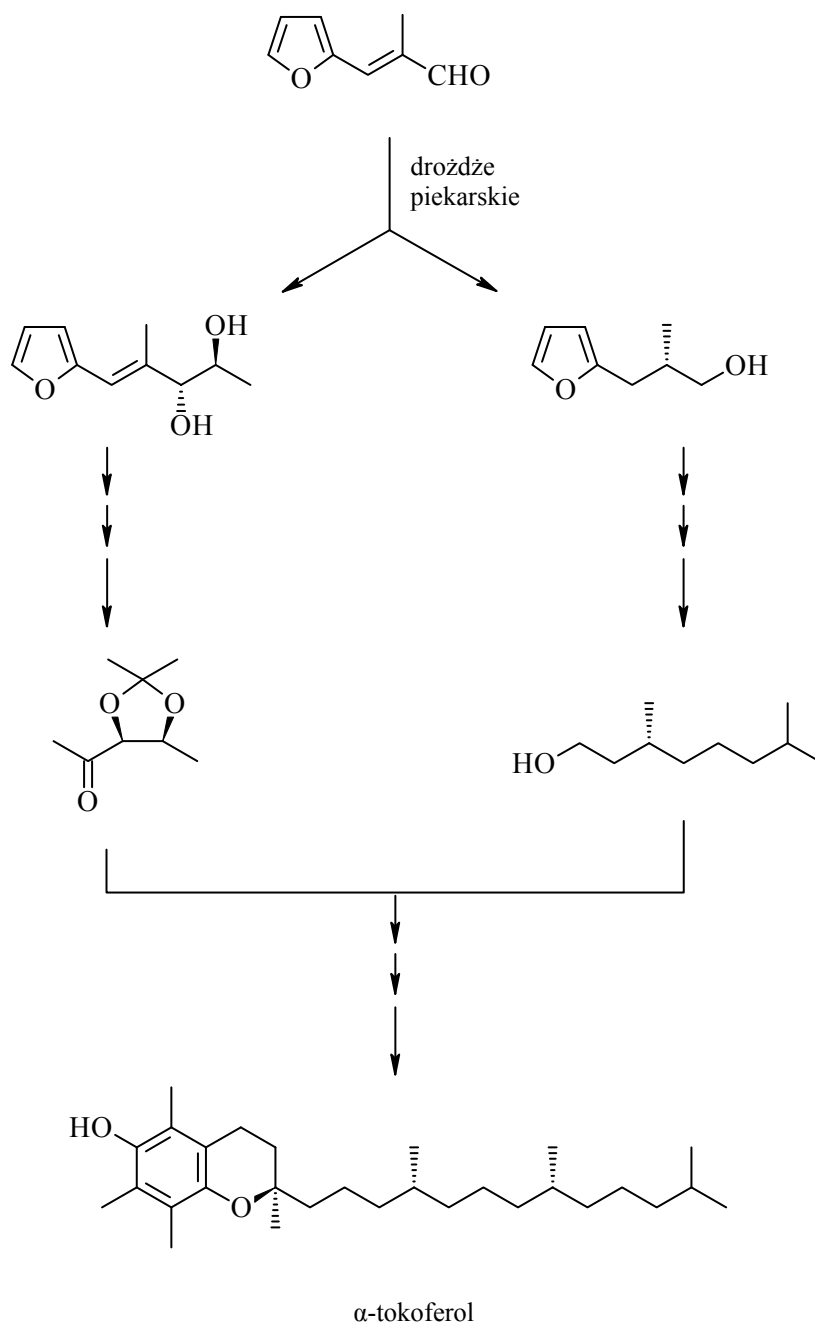
Stwierdzono, że struktura końcowego produktu reakcji zależy od pH; w kwaśnym środowisku przeważa forma ketolowa, w obojętnym lub zasadowym (optimum pH = 9,5) powstają diole z konfiguracją *anti*.

Reakcja kondensacji acyloinowej benzaldehydu za pomocą drożdży znalazła zastosowanie w przemyśle do produkcji (-)-efedryny (rys. 16).



Rys. 16. Wykorzystanie kondensacji acyloinowej przy użyciu drożdży do produkcji (-)-efedryny

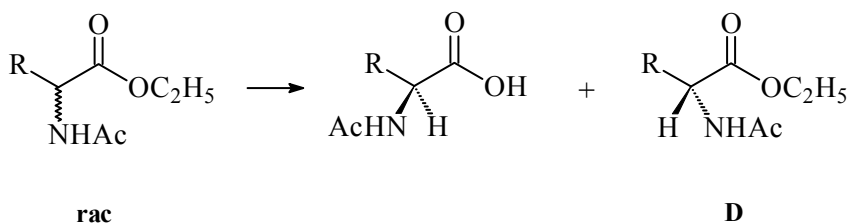
Fermentowanie za pomocą drożdży  $\alpha$ -metylo- $\beta$ -(2-furylo)-akroleiny (rys. 17) daje zredukowaną acyloinę z wydajnością 20% oraz zredukowany alkohol furylowy z wydajnością ok. 10%. Te dwa produkty można wykorzystać w syntezie  $\alpha$ -tokoferolu (witaminy E).

Rys. 17. Synteza  $\alpha$ -tokoferolu

#### VII.4. Hydroliza estrów

Drożdże piekarskie wykazują zdolności hydrolityczne dzięki zawartym w nich enzymom: esterazie, lipazie, fosfolipazie, tributyrinazie, triacyloglicerolipazie. Zdolności te wykorzystano w syntezie prostaglandyn i ich prekursorów.

Właściwości hydrolityczne drożdży znalazły także zastosowanie w syntezie aminokwasów i ich pochodnych. Hydrolizowano racemiczne estry N-acetyloaminokwasów, uzyskując kwasy oraz nieprzereagowane estry o konfiguracji D (rys. 18).



Rys.18. Hydroliza wiązania estrowego w N-acetyloaminokwasach za pomocą drożdży piekarskich

Tabela 10

Hydroliza wiązania estrowego w N-acetyloaminokwasach za pomocą drożdży piekarskich [wg 4]

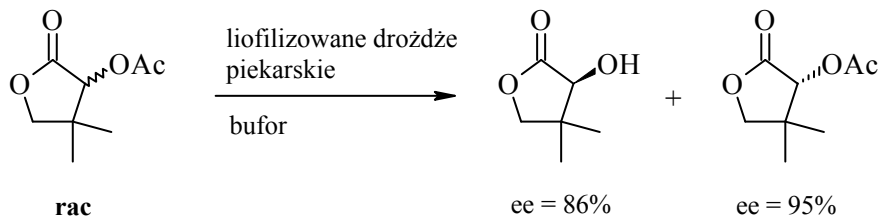
	R	Wydajność [%]	ee [%]	Warunki
1	CH <sub>3</sub>	47	100	tlenowe
2	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	48	96	tlenowe
3	<i>i</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	75	13	tlenowe
4	<i>i</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	38	80	beztlenowe
5	<i>i</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	48	92	tlenowe
6	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	38	> 97	tlenowe
7	CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	49	86	tlenowe
8	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	46	89	tlenowe
9	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NHAc	0	–	tlenowe
10	CH <sub>2</sub> OAc	37	43	tlenowe
11	CH <sub>2</sub> OAc	36	47	beztlenowe
12	CH(OAc)CH <sub>3</sub>	64	3	tlenowe

Stwierdzono, że czystość optyczna produktu była wysoka, gdy związek zawierał nierozgałęzione alkilowe lub aryloalkilowe podstawniki (przykłady 1, 2, 5, 6 w tab. 10). Wprowadzenie dodatkowych ugrupowań polarnych (przykłady 9–12) obniżyło czystość optyczną uzyskanych produktów.

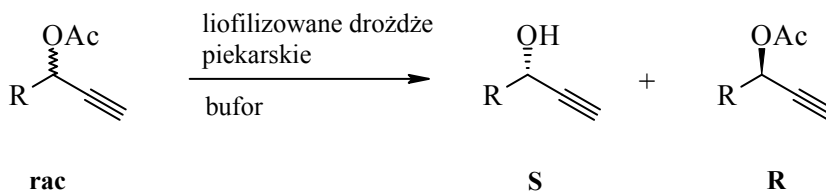


Wykorzystując liofilizowane komórki drożdży piekarskich jako źródło esterazy można przeprowadzić hydrolizę drugorzędowych octanów (m.in. octanu pantolaktonu – syntetycznego prekursora kwasu pantotenowego), zyskując chiralne alkohole (rys. 19 a, b).

a)



b)



Rys. 19 a, b. Przykłady hydrolizy estrów z wykorzystaniem liofilizowanych komórek drożdży

Tabela 11

Przykłady hydrolizy estrów z wykorzystaniem liofilizowanych komórek drożdży (rys. 19 b) [wg 1]

R	ee [%] produkt S	ee [%] produkt R
	91	72
	91	> 97
	96	59

W niniejszym rozdziale omówiono niektóre tylko przykłady przeprowadzonych dotychczas reakcji z udziałem drożdży piekarskich. W latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ukazało się wiele prac poświęconych temu tematowi; wzrasta rola biotransfor-

macji jako środka prowadzącego do uzyskania czystych optycznie półproduktów w syntezie organicznej.

### Literatura

1. K. Faber: *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg 1997.
2. P. Kafarski, B. Lejczak: *Chemia bioorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.
3. A. Chmiel: *Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
4. R. Csuk, B. I. Glänzer: *Baker's Yeast Mediated Transformations in Organic Chemistry*, Chem. Rev., 1991, 91, 49–97.
5. S. Servi: *Baker's Yeast as a Reagent in Organic Synthesis*, Synthesis, 1990, 1–25.
6. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.

## VIII. TECHNOLOGIA GENOWA W BADANIACH I PRODUKCJI FARMACEUTYCZNEJ

### VIII.1. Wprowadzenie

„Technologia genowa” jest jednym z terminów używanych do określenia zespołu metod rozwiniętych na podstawie badań nad strukturą i działaniem genów. Używa się także innych terminów, które opisują te metody, np. „technologia rekombinowanego DNA”, „inżynieria genetyczna” lub „łączenie genów”. Nazwy te sugerują, że technologia ta zajmuje się pobieraniem materiału genetycznego z jednego źródła i łączeniem go z materiałem pochodzącym z innego źródła.

Metody inżynierii genetycznej można wykorzystać do wprowadzania kodu genetycznego pożądanego białka w środowisko biologiczne, w którym białko to może być produkowane w dużych ilościach. Było to jednym z głównych powodów natychmiastowego zainteresowania się przemysłu farmaceutycznego możliwościami zastosowania metod inżynierii genetycznej do produkcji leków. Używając tych metod, producent może wytwarzać w zasadzie nieograniczone ilości biologicznie aktywnych białek i peptydów. Zostało to już przekonująco zademonstrowane w wielu przypadkach. Pierwszy lek otrzymany metodami inżynierii genetycznej wprowadzono w roku 1982. Tym lekiem była insulina, hormon peptydowy stosowany w leczeniu cukrzycy. Pod koniec roku 1994 już kilkanaście różnych peptydów i białek produkowanych metodami inżynierii genetycznej zostało dopuszczonych do lecznictwa, a następne lata przyniosły jeszcze szybszy rozwój w tej dziedzinie. W odróżnieniu od insuliny, która była produkowana metodą ekstrakcji z trzustek wieprzowych lub wołowych już od wielu lat, niektóre z przyjętych do lecznictwa wytworów inżynierii genetycznej nigdy nie były stosowane jako leki, ponieważ nie można ich było otrzymać w dostatecznie dużej ilości. Możliwość produkowania substancji, które dotychczas były niedostępne jako leki, jest jedną z realnych obietnic tej nowej technologii.

Inną zaletą technologii genowej jest to, że można za jej pomocą wprowadzać zmiany w cząsteczkach białek w ściśle określonych pozycjach ich struktury pierwszorzędowej. Te modyfikacje mogą być małymi zmianami w sekwencji aminokwasów, spowodowanymi przez wprowadzenie specyficznych mutacji w genach kodujących dane białko. Takie zmiany mogły prowadzić do otrzymania zmienionych, pożądaných właściwości fizykochemicznych (np. zmienionej rozpuszczalności) lub do zmiany okresu półtrwania aktywnego polipeptydu. Możliwe są także bardziej złożone zmiany.

Technologia genowa okazała się także nieocenionym narzędziem w badaniach farmaceutycznych. Technika ta jest obecnie szeroko stosowana w celu dostarczenia materiałów niezbędnych w poszukiwaniu leków niepeptydowych. Nowe rozumienie procesów komórkowych i fizjologicznych, które uzyskano dzięki technologii genowej, ma ogromne znaczenie w opracowywaniu nowych metod interwencji terapeutycznej.

### VIII.2. Podstawowe metody technologii genowej

#### VIII.2.1. Podstawowe narzędzia klonowania DNA

Na początku lat siedemdziesiątych opracowano wiele metod, które znalazły zastosowanie w technologii rekombinowanego DNA. Później metody te zostały ulepszone, pojawiły się nowe techniki. Zasady pracy i związane z nimi podstawowe narzędzia – enzymy, wektory DNA i komórki gospodarza – pozostały jednak te same (rys. 1).

Najważniejszym osiągnięciem lat siedemdziesiątych było odkrycie dwóch typów enzymów: enzymów restrykcyjnych i ligaz DNA. Enzymy restrykcyjne są endonukleazami, które rozpoznają i tną DNA w regionach specyficznych sekwencji (tab. 1). Enzymy te różnią się między sobą znacznie pod względem liczby i sekwencji zasad, które rozpoznają w cząsteczce DNA. Liczba ta waha się od zaledwie 4 do aż 23 zasad. W wyniku procesu cięcia powstają fragmenty DNA, które niekiedy mogą zawierać pojedynczy kompletny gen. Endonukleazy restrykcyjne są izolowane z różnych mikroorganizmów. Obecnie w handlu dostępnych jest wiele enzymów, z których każdy rozpoznaje inne, specyficzne dla siebie miejsce w cząsteczce DNA. Na przykład enzym restrykcyjny BamHI (endonukleaza I izolowana z *Bacillus amyloliquefaciens* H) przecina DNA w obrębie sekwencji GGATCC.

#### VIII.2.1.1. Enzymy restrykcyjne (restryktazy, endonukleazy restrykcyjne)

Bakterie używają tych enzymów do obrony przed infekcją przez bakteriofagi. Wyróżniamy dwie zasadnicze klasy enzymów restrykcyjnych:

- 1) klasa I – enzymy wymagające obecności kofaktorów ATP,  $Mg^{+2}$ , S-adenozylometioniny,
- 2) klasa II – enzymy wymagające obecności  $Mg^{+2}$ .

Enzymy restrykcyjne klasy I rozpoznają specyficzną sekwencję nukleotydów, jednak przecinają cząsteczkę DNA niespecyficznie w miejscach odległych od tej sekwencji (np. FokI; tab. 1).

Enzymy restrykcyjne klasy II przecinają cząsteczkę DNA w obrębie rozpoznawanej sekwencji (np. EcoRI, BamHI...; tab. 1).

Obecnie znanych jest około 200 enzymów restrykcyjnych klasy II. Wyizolowano je z bakterii i sinic. Za jednostkę aktywności enzymu restrykcyjnego przyjmuje się taką jego ilość, która jest potrzebna do strawienia 1  $\mu$ g DNA faga  $\lambda$  w czasie 1 godziny w 37°C.

#### Właściwości enzymów restrykcyjnych

Charakterystyka enzymu restrykcyjnego sprowadza się przede wszystkim do określenia rozpoznawanej przez niego sekwencji nukleotydowej DNA. Są to najczęściej odcinki DNA, charakteryzujące się występowaniem w ich obrębie dwustronnej symetrii. Na przykład sekwencja rozpoznawana przez enzym EcoRI o długości 6 par nukleotydów jest następująca:



Linia pionową zaznaczono oś symetrii, strzałkami – miejsca przecięcia przez ten enzym. Powyższy schemat pokazuje, że enzym restrykcyjny EcoRI przecina dwa łańcuchy tworzące cząsteczkę DNA w pozycjach nie leżących naprzeciw siebie. Wszystkie fragmenty uzyskane po strawieniu DNA tym enzymem będą miały czteronukleotydowe jednokierunkowe zakończenia. Są to tzw. lepkie końce (*sticky ends*), ułatwiające ewentualne późniejsze łączenie z sobą fragmentów DNA. Wiele enzymów przecina sekwencje palindromowe, to jest takie, w których sekwencja jednej nici jest taka sama jak sekwencja nici do niej komplementarnej czytanej w przeciwnym kierunku. Znane są enzymy, które przecinają dwie nici DNA w miejscach leżących dokładnie naprzeciw siebie, nie generujące lepkich końców, dając fragmenty o końcach tępych (*flush ends*, *blunt ends*). Zdarza się, że kilka różnych enzymów przecina tę samą sekwencję a także, że rozpoznając tę samą sekwencję, różne enzymy przecinają ją w różnych miejscach (np. HpaII i HaeIII; tab. 1).

Tabela 1

## Charakterystyka wybranych nukleaz restrykcyjnych [wg 2 i 8]

Enzym	Źródło	Rozpoznawana sekwencja	Produkty hydrolizy
EcoRI	<i>E. coli</i> KY 13 również <i>E. coli</i> rDNA <sup>a)</sup>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GAA}   \text{TTC} \\ \text{CTT}   \text{AAG} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNNNG} & \text{AATTCNNNNN} \\ \text{NNNNNCTTAA} & \text{GNNNNN} \ 5' \end{array}$
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>H</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GGA}   \text{TCC} \\ \text{CCT}   \text{AGG} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNNNG} & \text{GATCCNNNNN} \\ \text{NNNNNCTTAG} & \text{GNNNNN} \ 5' \end{array}$
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> również <i>E. coli</i> rDNA <sup>a)</sup>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ AAG}   \text{CTT} \\ \text{TTC}   \text{GAA} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNNNA} & \text{AGCTTNNNNN} \\ \text{NNNNNTTCGA} & \text{ANNNNN} \ 5' \end{array}$
HpaII	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ CCG}   \text{GG} \\ \text{GG}   \text{CC} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNNNC} & \text{CGGNNNNN} \\ \text{NNNNNGGC} & \text{CNNNNN} \ 5' \end{array}$
HaeIII	<i>Haemophilus aegyptus</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GG}   \text{CC} \\ \text{CC}   \text{GG} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNNNGG} & \text{CCNNNNN} \\ \text{NNNNNCC} & \text{GGNNNNN} \ 5' \end{array}$
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ AG}   \text{CT} \\ \text{TC}   \text{GA} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNNNAG} & \text{CTNNNNNN} \\ \text{NNNNNTC} & \text{GANNNNN} \ 5' \end{array}$
PstI	<i>Providencia stuarti</i> również <i>E. coli</i> rDNA <sup>a)</sup>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ CTG}   \text{CAG} \\ \text{GAC}   \text{GTC} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNNNCTGCA} & \text{GNNNNN} \\ \text{NNNNNG} & \text{ACGTCNNNNN} \ 5' \end{array}$
NotI	<i>Nocardia otidiscarianum</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GCGG}   \text{CCGC} \\ \text{CGCC}   \text{GGCG} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ NNNGC} & \text{GGCCGNNNNN} \\ \text{NNNCGCCGG} & \text{CGNNNNN} \ 5' \end{array}$
FokI	<i>Flavobacterium okeano-koides</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' \text{ GGATGNNNNNNNNN}   \text{NNNNN} \\ \text{CCTACNNNNNNNNN}   \text{NNNNN} \ 5' \\ \uparrow \end{array}$	$\begin{array}{cc} 5' \text{ GGATGNNNNNNN} & \text{NNNNNNNN} \\ \text{CCTACNNNNNNNNNN} & \text{NNN} \ 5' \end{array}$

<sup>a)</sup> enzymy otrzymane z hodowli klonów *E. coli* skonstruowanych metodami rekombinowanego DNA

Strzałkami zaznaczono miejsca hydrolizy wiązań fosfodiesterowych. Linia pionowa przechodząca przez pierwsze cztery sekwencje jest osią symetrii palindromów – sekwencji nukleotydowych rozpoznawanych przez restryktazy; N – dowolny nukleotyd. HpaII, HaeIII, AluI są przykładami enzymów „czwórkowych” – rozpoznawane przez nie sekwencje DNA o długości 4 par nukleotydów występują często i dlatego długie cząsteczki zostają pocięte na wiele krótkich odcinków. EcoRI, BamHI, HindIII i PstI należą do enzymów „szóstkowych”, NotI należy do enzymów „ósemkowych”, a rozpoznawana przez ten enzym sekwencja złożona tylko z par G/C występuje bardzo rzadko – takie enzymy tną cząsteczki DNA na niewielką liczbę fragmentów. EcoRI, BamHI, HindIII, HpaII, PstI, NotI i FokI dają w wyniku cięcia cząsteczki o lepkich końcach; HaeIII i AluI – o końcach tępych.

### Nazewnictwo

Nazwa symboliczna enzymów (np. HindIII) tworzona jest na podstawie nazwy rodzajowej (H – pierwsza litera), gatunkowej (in – dwie następne litery) i ewentualnie serotypu (d – czwarta litera) organizmu (*Haemophilus influenzae*), z którego zostały wyizolowane. Cyfra rzymska (np. III) oznacza kolejny rodzaj enzymu izolowanego z danego gatunku bakterii.

Enzymy restrykcyjne charakteryzują się dużą stabilnością, posiadają szerokie optimum pH i działają w szerokim zakresie stężeń jonów Mg.

Ligazy DNA, nie mając specyficznych wymagań sekwencji, mogą łączyć cząsteczki DNA. Te cechy enzymów restrykcyjnych i ligaz DNA umożliwiają przeprowadzenie *in vitro* przerwanie i ponowne połączenie (*splicing*) fragmentów DNA. Łączenie z sobą *in vitro* fragmentów DNA pochodzących z różnych źródeł nabiera sensu wtedy, gdy nową kombinację materiału genetycznego można powielić i uzyskać ekspresję rekombinowanych genów. Doświadczenia nad rekombinowaniem DNA polegają na podłączaniu fragmentu DNA do niewielkich cząsteczek DNA, mających zdolność do autonomicznej replikacji, spełniających rolę wektorów. Za pomocą wektorów geny zawarte w fragmencie DNA zostają wprowadzone do komórek odpowiedniego gospodarza, w których ulegają powieleniu i ewentualnie ekspresji. Najczęściej stosowanym obecnie gospodarzem dla obcego DNA są komórki bakteryjne, zwłaszcza *Escherichia coli*. Bardzo ważnym elementem układu „gospodarz – wektor” bakterii *Escherichia coli* jest ich mały (2–10 tysięcy par zasad) kolisty fragment dwuniciowego DNA zwany plazmidem.

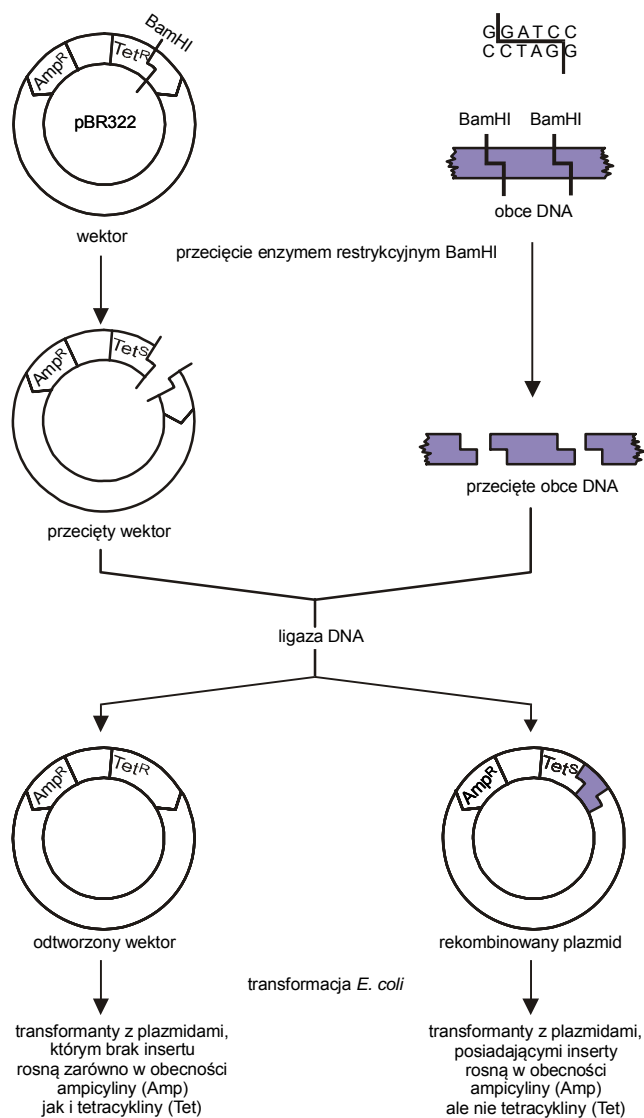
#### VIII.2.1.2. Wektory

##### **Właściwości idealnych wektorów [3]:**

- 1) Wektorem powinna być zdolna do autonomicznej replikacji niewielka cząsteczka DNA, dobrze scharakteryzowana fizycznie i genetycznie.
  - 2) Wektor powinien zawierać markery pozwalające na wyselekcjonowanie komórek, w których się znajduje.
  - 3) W cząsteczce DNA stanowiącej wektor powinna znajdować się sekwencja DNA, zwana polilinkerem, zawierająca pojedyncze miejsce rozpoznawane i cięte przez co najmniej jeden z enzymów restrykcyjnych.
  - 4) Miejsce przecięcia cząsteczki DNA wektora przez enzym restrykcyjny jest tym, w które wprowadzamy fragmenty obcego DNA. Nie powinno się ono znajdować w obrębie genu markerowego służącego do wyróżnienia i selekcji komórek zawierających wektor, ani też w takim rejonie cząsteczki, którego uszkodzenie powodowałoby zaburzenia zdolności jej replikacji.
  - 5) Pożądane jest, by wektor posiadał jeden lub kilka silnych promotorów, tak by po wstawieniu w ich sąsiedztwo fragmentu obcego DNA można było uzyskać wydajną ekspresję wprowadzonych genów.
  - 6) Pożądane jest, by wektor występował w komórce w dużej liczbie kopii lub by jego replikacja mogła zachodzić przy zahamowanej replikacji chromosomalnego DNA gospodarza.
  - 7) Wektory nie powinny zawierać genów, których rozpowszechnienie mogłoby stać się zagrożeniem dla człowieka lub innych organizmów.
  - 8) Do niektórych doświadczeń wskazane jest stosowanie wektorów wyposażonych w specjalne właściwości, uniemożliwiające przeżycie wektora i klonowanego w nim fragmentu obcego DNA poza ściśle określonym gospodarzem.
- W przypadku bakterii rolę wektorów mogą spełniać plazmidy i bakteriofagi.

##### VIII.2.1.2.1. Wektory plazmidowe

**Plazmidy** są to kowalentnie zamknięte, kolisty cząsteczki DNA występujące u wielu gatunków bakterii. Ich obecność nie jest niezbędna dla komórek gospodarza, choć w określonych warunkach może im dawać znaczną przewagę selekcyjną. Plazmidy różnią się wielkością, liczbą kopii, a także pod względem przenoszonych genów.



Plazmid pBR322 posiada geny, które nadają mu oporność na antybiotyki: ampicylinę (*Amp<sup>R</sup>*) i tetracyklinę (*Tet<sup>R</sup>*). Posiada miejsce specyficzne dla endonukleazy restrykcyjnej *Bam*HI, znajdujące się w genie oporności na tetracyklinę. Jeżeli fragment DNA jest wprowadzany w miejsce wrażliwe na działanie *Bam*HI, gen oporności jest niszczone, dając wrażliwość na tetracyklinę (*Tet<sup>S</sup>*). W celu sklonowania w to miejsce fragmentów DNA, wektor i obce DNA są rozcinane za pomocą *Bam*HI, mieszane i łączone za pomocą enzymów – ligazy DNA. Mieszanka zligowanych części DNA jest transformowana (wprowadzana) do *E. coli*. Selekcja – komórki, które otrzymały plazmid będą wzrastać w obecności ampicyliny. Transformowane kolonie, które przyswoiły rekombinowane plazmidy, są identyfikowane dzięki ich wrażliwości na tetracyklinę.

Rys. 1. Klonowanie obcego DNA przy zastosowaniu wektora pBR322 w *E. coli* [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, 2<sup>nd</sup> ed., edited by P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]

Przykładami naturalnie występujących genów plazmidowych są: geny oporności na działanie antybiotyków i promieniowanie UV oraz geny odpowiedzialne za produkcję ente-

rotoksyn i hemolizy. W zasadzie żaden z naturalnie występujących plazmidów nie jest bezpośrednio wykorzystywany jako wektor, dopiero modyfikacje strukturalne i (lub) funkcjonalne czynią je przydatnymi do klonowania obcego DNA. Wektory plazmidowe wprowadza się do komórek bakterii, wykorzystując proces transformacji. Transformacja komórek *E. coli* wymaga zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych (komórki poddaje się działaniu roztworu chlorku wapnia) – otrzymanie komórek kompetentnych. Klasycznym wektorem plazmidowym *E. coli* jest pBR322 (rys. 1), który przenosi fragmenty DNA zwykle mniejsze niż 10 kb.

#### VIII.2.1.2.2. Wektory fagowe, bakteriofagi, wirusy bakteryjne

Najczęściej stosowanymi wektorami fagowymi w *E. coli* są pochodne faga  $\lambda$ . W porównaniu z wektorami plazmidowymi, wektory fagowe mają pewne zalety. Można w nich łatwiej klonować większe fragmenty DNA (mniejsze jednak niż 15 kb), a wydajność infekcji cząsteczkami bakteriofagów jest wyższa niż wydajność transformacji. Cząsteczka DNA faga  $\lambda$  typu dzikiego nie nadaje się wprost do wykorzystania jako wektor, gdyż ma zbyt wiele miejsc restrykcyjnych, często w obrębie genów niezbędnych w cyklu życiowym faga. Konstrukcja tych wektorów polega na eliminacji określonych miejsc cięcia przez enzymy restrykcyjne EcoRI lub HindIII i pozostawieniu tylko tych, które znajdują się w tej części genomu faga  $\lambda$ , w którą można wstawić fragment obcego DNA lub którą można w ogóle zastąpić obcym DNA. Poszczególne wektory z tej serii różnią się między sobą obecnością delekcji lub duplikacji pewnych części chromosomu faga  $\lambda$ , co zapewnia im różną „pojemność”, czyli zdolność inkorporowania fragmentu DNA o różnej długości.

#### VIII.2.1.2.3. Kosmidy

Szczególnymi wektorami są tzw. kosmidy (rys. 2). Zawierają one sekwencje plazmidu bakteryjnego (*ori*, gen markerowy) połączoną z sekwencją *cos* faga  $\lambda$ . Sekwencja *cos* jest niezbędna, by DNA faga zostało „upakowane” w otoczkę białkową. Wektory te łączą w sobie zalety wektorów plazmidowych i fagowych. Klonowanie za pomocą kosmidów nie tylko umożliwia wprowadzenie do komórek bakterii bardzo dużych fragmentów obcego DNA, ale dzięki zastosowaniu otoczek białkowych faga jest bardzo wydajne. Pozwala na uzyskanie  $10^5$  klonów bakteryjnych, zawierających rekombinowane cząsteczki DNA z 1  $\mu$ g DNA użytego do doświadczenia.

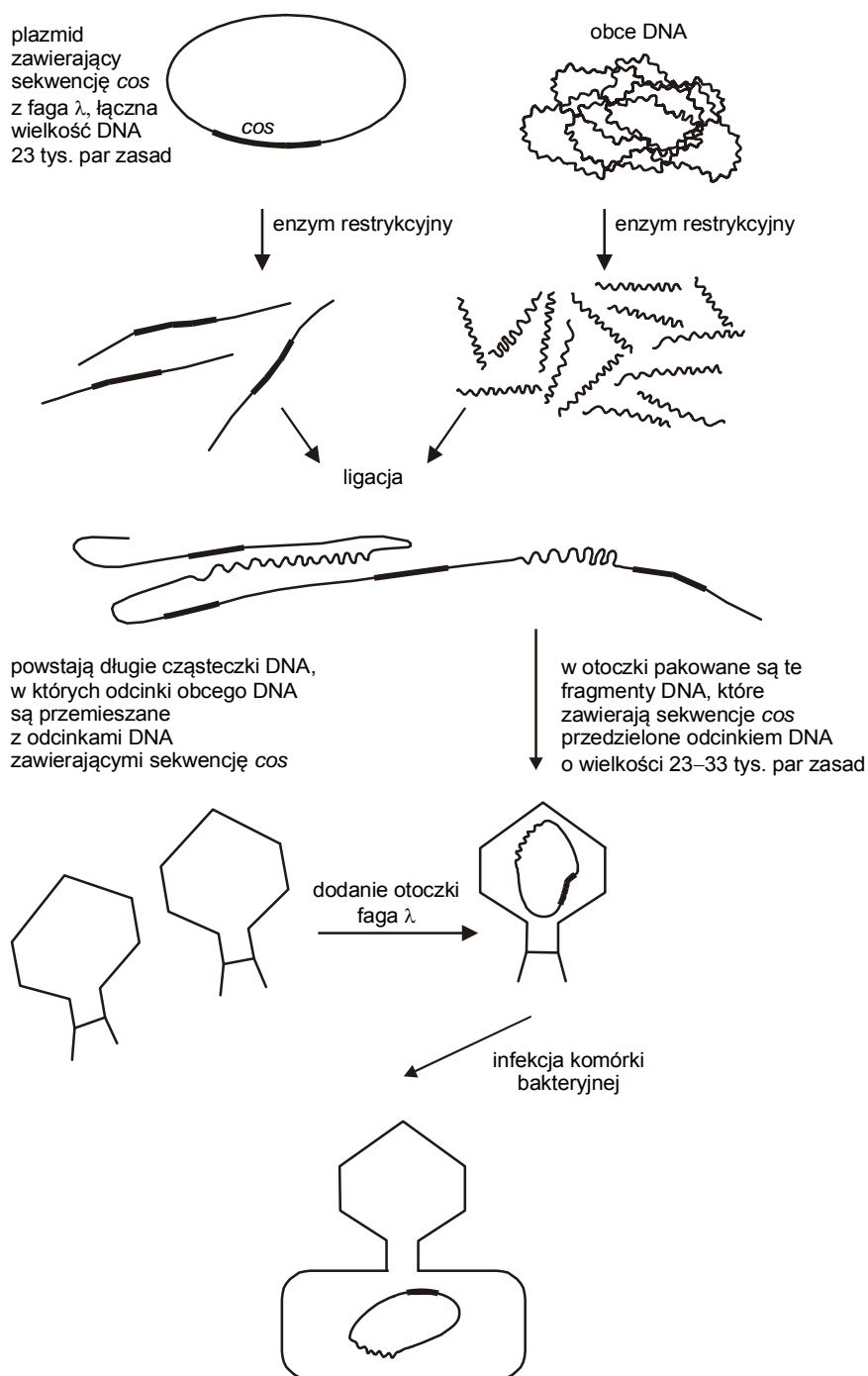
#### VIII.2.1.2.4. Inne wektory

Do klonowania fragmentów DNA używa się także komórek eukariotycznych. Stosuje się systemy klonowania w drożdżach, w komórkach roślinnych, komórkach nicieni i owadów. Do wektorów drożdżowych należą tak zwane sztuczne chromosomy drożdżowe (*yeast artificial chromosomes* – YACs). Są to cząsteczki DNA zawierające fragmenty DNA, które powodują, że YACs mogą działać w komórkach drożdży jako chromosomy. Do sztucznego chromosomu drożdżowego można wprowadzić DNA o długości około miliona par nukleotydów.

Jako wektory do wprowadzania DNA do komórek zwierzęcych służą najczęściej zmodyfikowane wirusy.

Podstawowym systemem wektorowym, używanym w przypadku roślin, jest system oparty na bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Istnieją także wektory bifunkcyjne, zdolne do przetrwania i namnażania się zarówno w komórkach bakterii, jak i eukariotycznych, np. drożdży. Przykładem takich wektorów mogą być wahadłowe wektory trypanosomowe, które mogą namnażać się zarówno w komórkach bakterii, jak i komórkach pasożytniczych pierwotniaków z rodzaju *Trypanosoma* i *Leishmania*. Przykładem wektora wahadłowego jest plazmid pTEX; skonstruowano także kosmidowe wektory wahadłowe.





Rys. 2. Przenoszenie fragmentów DNA za pośrednictwem kosmidów [wg P. Węgleński: *Genetyka molekularna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998]

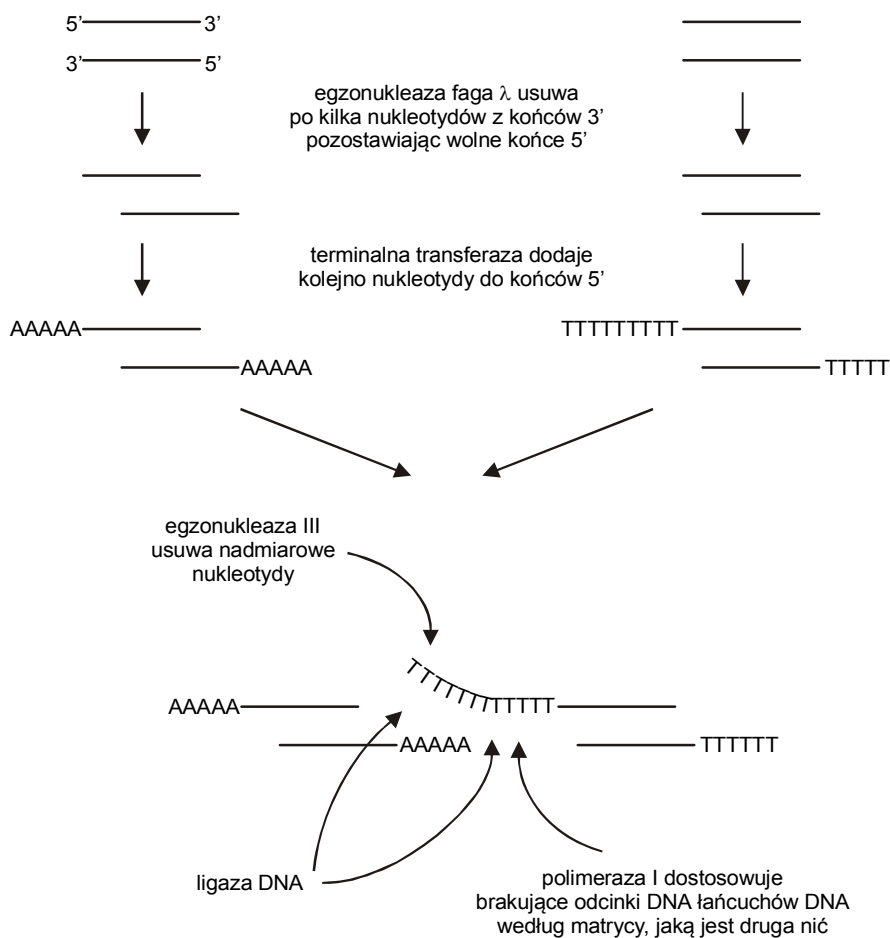
### VIII.2.1.3. Łączenie cząsteczek DNA

Łączenie (*ligacja*) fragmentu obcego DNA z DNA wektora przebiega w obecności enzymu ligazy DNA. *In vivo* enzym ten jest niezbędny w procesie replikacji DNA oraz bierze udział w naprawianiu uszkodzeń DNA. Ligaza katalizuje tworzenie wiązań fosfodiesterowych pomiędzy nukleotydami w łańcuchu DNA. Substratem dla enzymu jest dwuniciowe DNA, a także hybrydy DNA–RNA.

Enzym umożliwia łączenie pęknięć w pojedynczym łańcuchu, wchodzącym w skład dwuniciowej cząsteczki. Może też doprowadzić do połączenia ze sobą dwóch fragmentów dwuniciowego DNA o tępych końcach, z tym, że wydajność tego procesu jest niższa. Ze względu na wydajność reakcji ligowania korzystne jest, aby łączone fragmenty DNA posiadały lepkie końce. Fragmenty takie uzyskuje się w wyniku trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi, np. EcoRI lub HindIII. Najpowszechniej stosowana technika łączenia obcego DNA z DNA wektora polega na przecięciu wektora tym samym enzymem restrykcyjnym, jaki był użyty do fragmentowania obcego DNA, a następnie ligowaniu wektorowego fragmentu DNA i liniowych cząsteczek wektora. Istnieją eksperymenty, w których do klonowania fragmentów DNA nie można stosować enzymów restrykcyjnych. W takich sytuacjach wyposaża się fragmenty DNA i wektory w tzw. lepkie końce (rys. 3). Procedura ta polega na dosyntetyzowaniu do końców 5' fragmentów DNA – łańcuchów identycznych nukleotydów, np. adenylowych, a do końców 5' cząsteczek wektora – łańcuchów komplementarnych (w tym przypadku tymidylowych). Jest to tzw. „dorabianie homopolimerowych ogonów”. Ponieważ trudno jest dopasować łańcuchy o dokładnie określonej długości, przy łączeniu się fragmentów mających sztuczne lepkie końce powstają cząsteczki, będące na pewnych odcinkach jednoniciowe, np. jeżeli „ogon” poli (dA) będzie dłuższy niż „ogon” (pT). Stąd też, przed dodaniem ligazy, mieszaninę łączonych fragmentów DNA traktuje się egzonukleazą III i polimerazą I. Pierwszy enzym usuwa niesparowane, pojedyncze łańcuchy DNA, podczas gdy drugi dosyntetyzuje komplementarny łańcuch na tych odcinkach cząsteczki, w których występuje brak kilku lub kilkunastu nukleotydów. W wielu eksperymentach bardzo istotna jest możliwość wycięcia z wektora wprowadzonego doń fragmentu DNA. Sekwencja rozpoznawana przez enzym restrykcyjny jest zachowana po obu stronach wprowadzonego do wektora fragmentu obcego DNA. Fragment ten można wyciąć, stosując ten sam enzym restrykcyjny, jaki był użyty w procesie łączenia. Wycięcie odcinka DNA jest dość trudne. Jedną z metod polega na częściowej denaturacji rekombinowanej cząsteczki DNA i działaniu na nią nukleazą atakującą jednoniciowe DNA. Odcinki A–T denaturują znacznie łatwiej i można tak dopasować warunki trawienia endonukleazą, by rekombinowane cząsteczki były przecinane w obrębie sekwencji homopolimerowych, stanowiących sztuczne lepkie końce.

Drugą metodą jest wycinanie fragmentów DNA połączonych z wektorem za pomocą końcówek poli(dA) poli(dT).

Niektóre z plazmidów zostały zmodyfikowane tak, że są szczególnie przydatne do klonowania. Ważną cechą wektorów jest obecność genów kodujących dla selekcyjnego markera, takiego jak oporność na antybiotyk. Kiedy rekombinowane plazmidy zostają wprowadzone do *E. coli* (w procesie zwanym transformacją lub transfekcją, gdy wprowadzenie DNA odbywa się za pomocą bakteriofagów lub do komórek eukariotycznych), gen oporności pozwala komórkom przeżyć w obecności antybiotyku, podczas gdy komórki bez plazmidu będą eliminowane. Rekombinowany plazmid może się powiełać do momentu, gdy każda komórka zawierać będzie wiele kopii (często w granicach od 20 do 200).



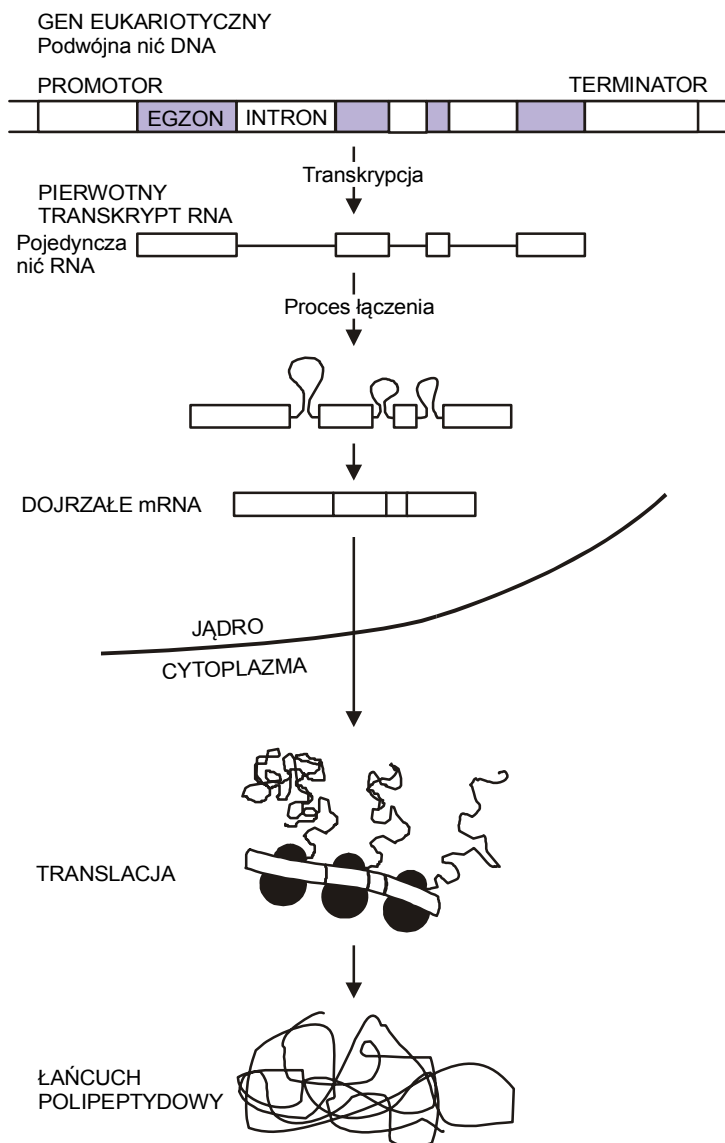
Rys. 3. Synteza sztucznych lepkich końców i łączenie wyposażonych w nie fragmentów DNA [wg P. Węgleński: *op. cit.*]

Ponieważ czas podwojenia liczby namnażanych komórek *E. coli* w warunkach optymalnych wynosi 20–30 min, możliwe jest powielenie jednej kopii rekombinowanego plazmidu do więcej niż  $10^{10}$  cząsteczek w ciągu 12 godzin. W ten sposób układ „wektor–gospodarz” pozwala produkować ogromne ilości identycznych cząsteczek plazmidów, umożliwiając w ten sposób dalsze manipulacje poszczególnymi genami.

### VIII.2.2. Klonowanie cDNA

Klonowanie i ekspresja genów ludzkich są szczególnie interesujące z farmaceutycznego punktu widzenia. Posiadają pewne charakterystyczne dla nich cechy. Polegają one na tym, że większość genów ludzkich zawiera wewnętrzne regiony, które w żadnej części nie kodują odpowiedniego białka.

Te regiony, zwane intronami (*introns*, *intervening sequences*) są czasem większe od regionów kodujących, zwanych egzonami (rys. 4).



Większość genów eukariotycznych składa się z rejonów kodujących (egzonów) przedzielonych rejonami niekodującymi (intronami). Ekspresja zaczyna się transkrypcją, która inicjowana jest od tzw. promotora i kończy na terminatorze. Otrzymany pierwotny transkrypt jest przepisywany na dojrzałe mRNA bez intronów przez specjalne enzymy łączące RNA, znajdujące się w jądrze komórkowym (*splicing*). Dojrzałe (*mature*) mRNA jest następnie przenoszone do cytoplazmy komórkowej i ulega translacji w łańcuchach polipeptydowych.

Rys. 4. Struktura i ekspresja genu eukariotycznego [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]

Geny ludzkie mogą zawierać więcej niż 200000 par zasad. Wskutek tego trudno jest wytworzyć fragment restrykcyjny zawierający kompletny gen. Innym problemem jest to, że duże fragmenty DNA są trudne do utrzymania w całości w wektorach bakteryjnych. *E. coli* nie jest zdolna do prawidłowej ekspresji genów zawierających introny, ponieważ brak jej pewnych funkcji niezbędnych dla tego procesu.

Rozwinięto jednak metodę, która pozwala na klonowanie fragmentów DNA zawierających jedynie regiony kodujące ludzkich genów. Metoda ta korzysta z faktu, że transkrypcja eukariotyczna i mechanizmy komórkowe wytwarzają dojrzałe cząsteczki mRNA, w których zostały usunięte rejony intronów. W wyniku reakcji enzymatycznej *in vitro* z użyciem enzymu wirusowego, zwanego odwrotną transkryptazą, możliwe jest wykonanie kopii DNA z mRNA. Ta kopia DNA, zwana cDNA (*copy DNA* lub *complementary DNA*), zawiera nieuszkodzony rejon kodujący, który można klonować i poddawać ekspresji w *E. coli* (rys. 5).

Aby wytworzyć cDNA kodujące pożądane białko, izoluje się mRNA z odpowiednich tkanek i organów, w których jest ono syntetyzowane. Wyizolowane mRNA jest populacją cząsteczek reprezentujących wszystkie geny, które ulegają ekspresji w tej tkance. Jednakże jedynie niewielka ilość cząsteczek cDNA wytwarzanych przez odwrotną transkrypcję odpowiada pożądanemu białku. Kompletna populacja cDNA z danej tkanki, organu lub organizmu nosi nazwę biblioteki cDNA (*cDNA library*). Klony z tej biblioteki, które zawierają pożądane cDNA (często mniej niż jeden na tysiąc), muszą być zidentyfikowane i izolowane przed analizą. To niekiedy może być bardzo trudnym zadaniem. Stosowana wówczas metoda uwzględnia rodzaj potrzebnego cDNA.

#### VIII.2.2.1. Metody identyfikacji genów

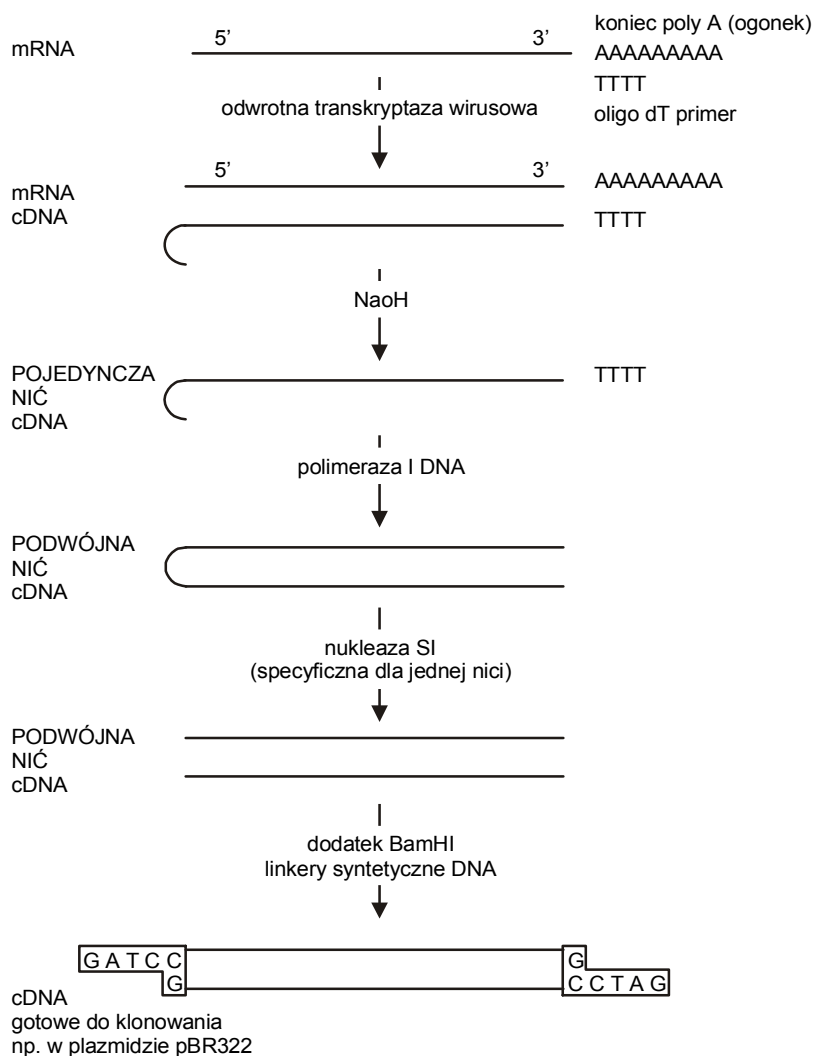
Typową metodą identyfikacji (metody niżej wymienione można stosować z pominięciem tworzenia biblioteki genów) jest technika hybrydyzacji DNA przedstawiona na rysunku (rys. 6). Ta metoda wymaga pewnej wiedzy o sekwencji cDNA, którą to wiedzę uzyskać można na podstawie znajomości, choćby tylko częściowej, sekwencji aminokwasów kodowanego białka. Sekwencja ta może być użyta do zsyntetyzowania **radioaktywnej sondy DNA** (zawierającej zwykle nukleotydy z izotopem fosforu  $^{32}\text{P}$ ), która jest w stanie związać się (hybrydyzować) z pożądanym cDNA poprzez fragment DNA komplementarny w pewnym stopniu do sondy, dając w ten sposób możliwość otrzymania sygnału z tego klonu (tab. 2). Obecnie coraz częściej stosuje się **sondy nieradioaktywne**, które – w przeciwieństwie do radioaktywnych – są trwale i bezpieczne dla zdrowia. Sonda nieradioaktywna ma przyłączone dodatkowe ugrupowanie chemiczne (np. digoksygeninę lub biotyne), pozwalające na wykrycie poprzez reakcję barwną. Uwidocznienie sondy wskazuje, do którego klonu się ona przyłączyła.

Jeżeli nie jest dostępna informacja na temat sekwencji, trzeba użyć innych metod, które zazwyczaj polegają na ekspresji białka kodowanego przez cDNA. Wówczas wektor klonowania zawiera sygnały, które pozwalają na ekspresję insertu cDNA. Chociaż nie zawsze możliwe jest wytwarzanie białek eukariotycznych, które utrzymują swą aktywność biologiczną w *E. coli*, zazwyczaj możliwe jest otrzymanie białek, które utrzymują determinanty antygenowe białka natywnego. Dlatego metoda opierająca się na skriningu przeciwciałem biblioteki ekspresji cDNA, może być użyta do identyfikacji, o ile dostępne jest specyficzne przeciwciało. Metoda ta (**poszukiwanie przeciwciałami**) jest podobna do techniki hybrydyzacji przedstawionej na rys. 6, z tym, że teraz przeciwciało jest używane w miejsce sondy DNA.

Systemy znakowania i detekcji sond [wg 22]

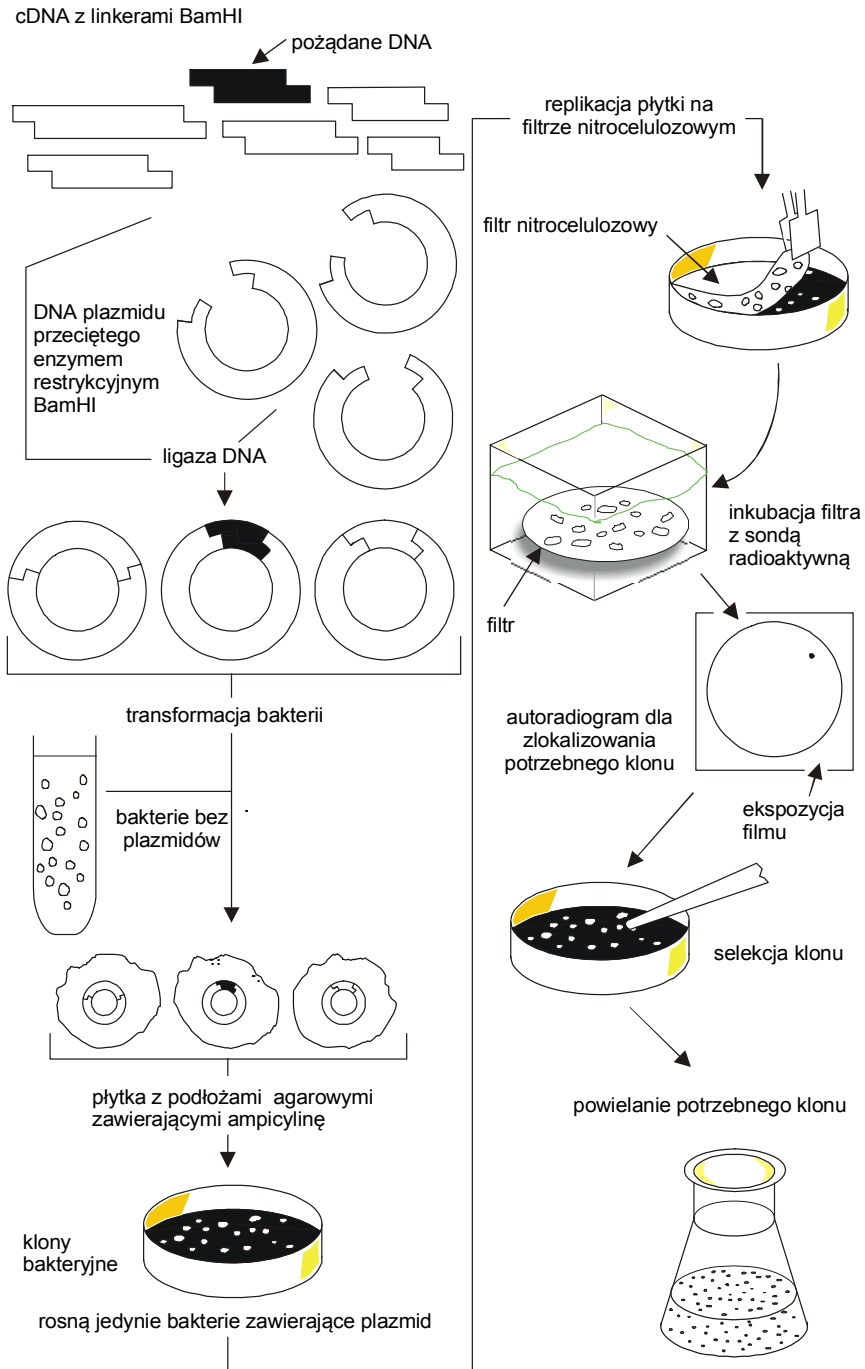
Systemy znakowania	Rodzaj markera	Detekcja
Radioizotopowe	Do sondy włączany jest nukleotyd znakowany radioaktywnym izotopem, np. $^{35}\text{S}$ , $^{33}\text{P}$ , $^{32}\text{P}$ , $^3\text{H}$ . Najczęściej jest stosowana siarka $^{35}\text{S}$ .	Autoradiografia. Stosuje się filmy wrażliwe na promieniowanie $\beta$ lub płynne emulsje fotograficzne do powlekania preparatów.
Fluorescencyjne	Do sondy włączany jest nukleotyd sprzężony z barwnikiem fluorescencyjnym – pochodną fluoresceiny, rodaminy lub kumaryny.	Za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.
Immunochemiczne Cytochemiczne	Do sondy włączany jest nukleotyd sprzężony z haptenu: biotyną, digoksygeniną lub fluoresceiną.	Za pomocą przeciwciał specyficznych dla danego haptenu. Przeciwciała sprzężone są z umożliwiającymi ich uwidocznienie cząsteczkami:  <b>alkaliczną fosfatazą</b> → przeprowadza reakcje barwne, np. z NBT ( <i>nitro blue tetrazolium</i> ) i BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolilo-fosforanem) → przeprowadza reakcję z CSPD <sup>®</sup> , której towarzyszy emisja fotonów (chemiluminescencja) → detekcja przy użyciu filmu fotograficznego,  <b>peroksydazą</b> → przeprowadza reakcje barwne, np. z diaminobenzydyną,  <b>barwnikami fluorescencyjnymi</b> (fluoresceina, rodamina) → detekcja przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego,  <b>koloidalnym złotem</b> → stosowane do mikroskopii elektronowej.  Sondy znakowane biotyną mogą też być wykrywane na podstawie reakcji biotyny z awidyną.
Enzymatyczne	Do sondy włączany jest nukleotyd sprzężony z cząsteczką enzymu, np. alkalicznej fosfatazy.	Reakcja barwna katalizowana przez enzym markerowy (np. z NBT i BCIP dla alkalicznej fosfatazy).

W niektórych przypadkach aktywność biologiczna białka może być jedyną drogą identyfikacji klonu kodującego cDNA. Wtedy trzeba używać komórek gospodarza, które zachowują tę aktywność. Oczywistym wyborem jest hodowla kultur komórkowych ssaków. Obecnie dostępnych jest wiele różnych stosowanych w tym celu układów „gospodarz – wektor”. Inne komórki gospodarza, mianowicie oocyty żaby, są – jak stwierdzono – bardzo dogodne, ponieważ mogą powodować ekspresję skomplikowanych funkcjonalnie białek, takich jak receptory błonowe ssaków lub kanały jonowe.



Fragmenty DNA, które zawierają jedynie regiony kodujące genów eukariotycznych mogą być syntetyzowane *in vitro* z eukariotycznego mRNA. Na początku chemicznie zsyntetyzowany primer oligo-dT jest poliadenylowany do 3 końców cząsteczek mRNA. Łańcuchy komplementarnego DNA (cDNA) są syntetyzowane z deoksynukleotydów za pomocą odwrotnej transkryptazy. Matrycowe mRNA usuwa się hydrolizą wodorotlenkiem sodowym; w wyniku otrzymuje się populację cząsteczek jednonicowego cDNA, które z kolei są używane jako matryce dla syntezy nowych cząsteczek DNA przy użyciu polimerazy DNA. W wyniku otrzymuje się dwuniciowe cDNA. Pętle jednociowe są usuwane za pomocą nukleazy S1. Aby skonstruować bibliotekę cDNA, syntetyczne linkery, które zawierają odpowiednie miejsce rozpoznawane przez endonukleazę restrykcyjną (np. BamHI) mogą być dodawane do końców dwuniciowych cząsteczek DNA. Otrzymany preparat jest rozcinany enzymem restrykcyjnym i klonowany do wektora DNA (np. pBR 322), jak to pokazano na rys. 1.

Rys. 5. Synteza cDNA z eukariotycznego mRNA [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]



Rys. 6. Konstruowanie biblioteki cDNA i identyfikacja specyficznych klonów za pomocą techniki hybrydyzacji DNA [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]



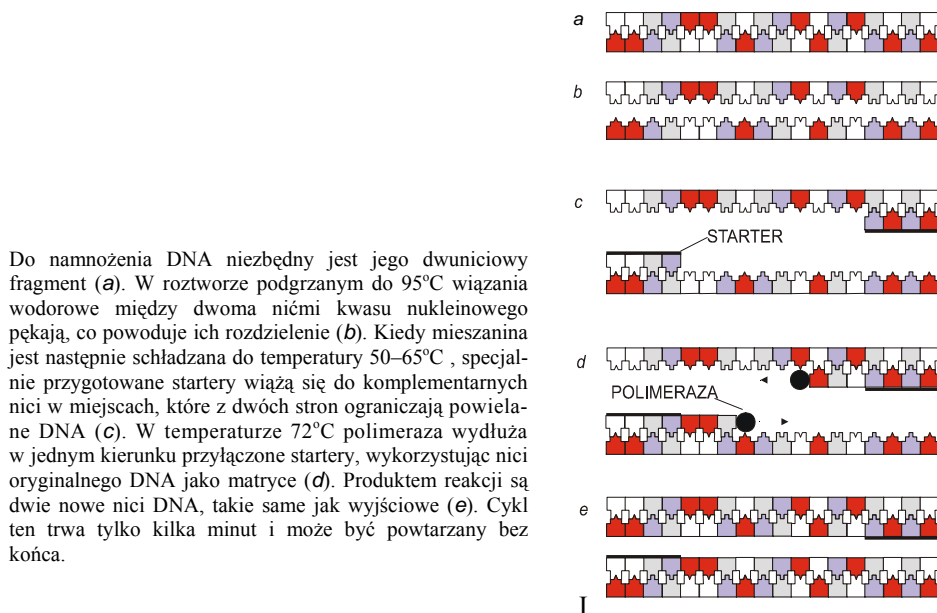
### VIII.2.3. Klonowanie z użyciem PCR

Ostatnio bardzo ważnym narzędziem klonowania stała się metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – *polymerase chain reaction*) (rys. 7).

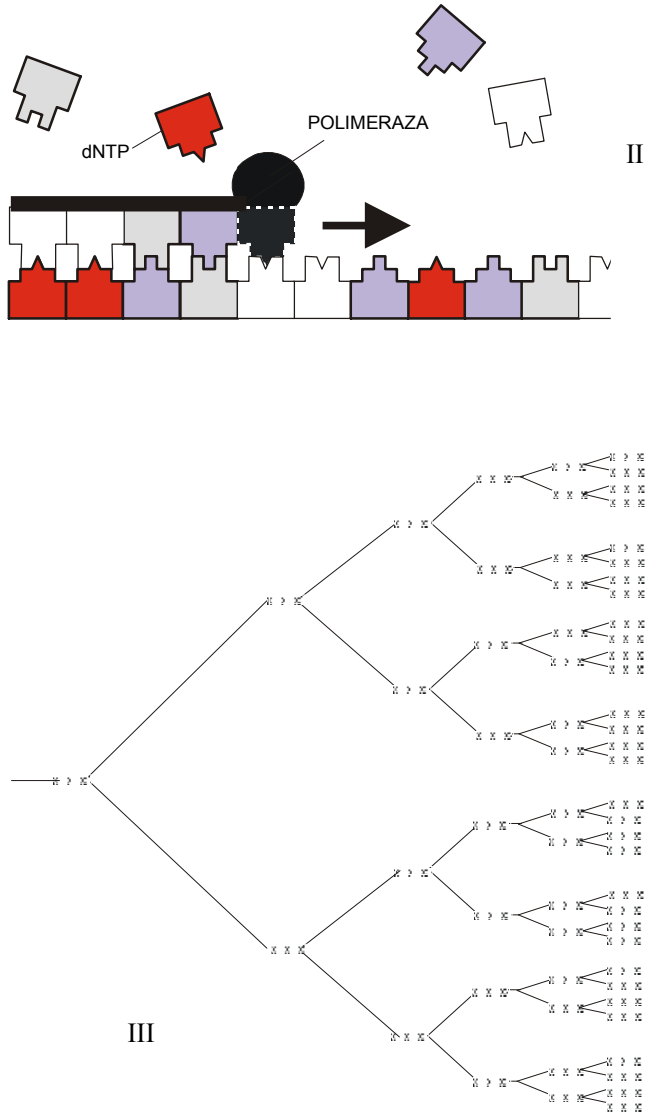
Technika PCR opiera się na powielaniu (amplifikacji) *in vitro* specyficznego DNA. Jest metodą imitującą naturalną replikację DNA. Po raz pierwszy opisana została w 1985 roku i jest obecnie podstawowym narzędziem badawczym, za którego pomocą z bardzo małej próbki DNA można uzyskać ilość kopii tego DNA wystarczającą do badań.

DNA występuje zazwyczaj w postaci dwuniciowej cząsteczki skróconej w helisę, w której poszczególne nici wzajemnie się uzupełniają (są komplementarne). PCR rozpoczyna się od umieszczenia w odpowiednim buforze fragmentu DNA (np. cDNA) razem ze starterami (krótkimi syntetycznymi odcinkami jednoniciowego DNA, specyficznie wiążącymi się na jednym z końców każdej z rozplecionych nici powielanego kwasu nukleinowego), mieszaniną czterech deoksyrybonukleotydów (dNTP, „klockami” budującymi DNA) i niewrażliwym na wysoką temperaturę enzymem – polimerazą. Ogrzewanie takiej mieszaniny powoduje rozdzielenie nici matrycowego DNA. Następnie, w kolejno zmieniających się temperaturach układają się spontanicznie pozostałe elementy, budując nowe nici, komplementarne do oryginalnych. Pod koniec każdego cyklu ilość DNA podwaja się. Zaczynając reakcję z jedną cząsteczką DNA, po 30 cyklach (zaledwie kilka godzin później) można uzyskać około miliarda kopii.

Do prawidłowego zaprojektowania promotorów, które byłyby w stanie łączyć się z celem, niezbędna jest pewna wiedza na temat matrycowego DNA. Oprócz wykorzystania danych o sekwencji białka, jak to opisano poprzednio, do projektowania promotorów mogą być użyte także inne informacje. Dane dotyczące znacznej ilości genów pozwoliły stwierdzić, że geny kodujące poszczególne funkcje rozwinęły się w rodziny genów, które wykazują znaczną homologię sekwencji. Promotory zaprojektowane w celu rozpoznania zachowanych rejonów takiej rodziny genów, mogą łatwo wyzwać amplifikację cDNA innych członków takiej rodziny genów. Jak się okazało, ta metoda jest niezwykle wydajna i pozwoliła poszerzyć znacznie wiedzę na temat rodzin genowych.



Do namnożenia DNA niezbędny jest jego dwuniciowy fragment (a). W roztworze podgrzanym do 95°C wiązania wodorowe między dwoma niemi kwasu nukleinowego pękają, co powoduje ich rozdzielenie (b). Kiedy mieszanina jest następnie schładzana do temperatury 50–65°C, specjalnie przygotowane startery wiążą się do komplementarnych nici w miejscach, które z dwóch stron ograniczają powielane DNA (c). W temperaturze 72°C polimeraza wydłuża w jednym kierunku przyłączone startery, wykorzystując nici oryginalnego DNA jako matryce (d). Produktem reakcji są dwie nowe nici DNA, takie same jak wyjściowe (e). Cykl ten trwa tylko kilka minut i może być powtarzany bez końca.



W II fragmencie rysunku: polimeraza wydłuża przyłączony starter. Wykorzystuje ona występujące w środowisku reakcyjnym wolne trójfosforany deoksynukleozydu (dNTP), które uzupełniają kolejne puste miejsca w matrycowej nici DNA. Enzym przyłącza „pasujący” dNTP do końca startera i przesuwa się na następne miejsce.

W III fragmencie rysunku: wykładniczy wzrost ilości syntetyzowanego DNA jest możliwy dzięki wykorzystaniu produktów każdego cyklu jako matrycy w cyklu następnym.

### VIII.2.4. Ekspresja rekombinowanych białek

Aby tworzenie rekombinowanych białek i peptydów mogło być zastosowane w produkcji leków, potrzebne są wydajne systemy ekspresyjne, w których wytwarzane są białka o pożądanej budowie i działaniu. Ten rozdział przedstawia wymagania stawiane ekspresji oraz dyskusję porównującą zalety i wady różnych układów ekspresyjnych „gospodarz – wektor”.

#### VIII.2.4.1. Transkrypcja, translacja i modyfikacje białek

Pierwszy etap ekspresji genów to transkrypcja do RNA (rys. 4). Transkrypcję rozpoczyna przyłączenie enzymu polimerazy RNA do specyficznej sekwencji DNA poprzedzającej region kodujący, tak zwanego promotora. Scharakteryzowano wiele promotorów i innych czynników, które wpływają na wydajność ekspresji zarówno u pro- jak i u eukariotów. Promotory są zwykle gatunkowo specyficzne, a u organizmów wyższych także specyficzne w stosunku do tkanek. U prokariotów RNA otrzymane w wyniku transkrypcji (zwane pierwotnym produktem transkrypcji) jest używane, bez większych modyfikacji, jako mRNA kierujące syntezą białek. U eukariotów mRNA jest otrzymywane z pierwotnych produktów transkrypcji w wyniku złożonego ciągu przemian enzymatycznych, które usuwają rejony intronów.

Następnym krokiem w ekspresji genów jest translacja mRNA w białko. Podstawowe mechanizmy translacyjne są identyczne u pro- i eukariotów. Tak więc kodon zaczynający translację jest uniwersalny i prowadzi do produktów translacji zawierających metioninę na N-końcu. Jednakże N-końcowa metionina jest często usuwana, już w trakcie wydłużania białka, przez połączoną z rybosomami aminopeptydazę metionylową. Białka przeznaczone do wydzielenia z komórek są syntetyzowane z tzw. peptydem sygnalizacyjnym, składającym się z 20–30 aminokwasów na ich N-końcu. Sekwencja sygnalizacyjna, ułatwiająca kontakt pomiędzy błoną i powstającym białkiem, jest często odcinana w czasie translokacji przez błonę, zanim białko zostanie w pełni zsyntetyzowane. W porównaniu z prokariotami, eukarioty mają bardzo skomplikowany sposób wydzielania białek i wiele podstawowych zmian białek zachodzi podczas procesu ich wydzielania. Dlatego eukariotyczne dojrzewanie pierwotnego produktu translacji w białko, o prawidłowej drugo- i trzeciorzędowej strukturze, może nie być możliwe u prokariotów. Aby rozwiązać ten problem, opracowano wiele wydajnych eukariotycznych systemów ekspresyjnych, jako dodatkowych w stosunku do „klasycznego” układu *E. coli*. W tabeli 3 przedstawiono potranslacyjne modyfikacje białek u pro- i eukariotów.

Tabela 3

Przykłady potranslacyjnych modyfikacji białek [wg 1, 3, 7, 19]

Modyfikacja	Występowanie
Rozrywanie wiązań peptydowych (dojrzewanie)	pro- i eukarioty
Tworzenie mostków disulfidowych	eukarioty i tylko niektóre prokarioty
Fosforylacja tyrozyny, seryny lub treoniny	
N-glikozylacja asparaginy	eukarioty
O-glikozylacja treoniny lub seryny	
Hydroksylacja proliny lub lizyny	
Mirystylacja N-końcowej glicyny	
Prenylacja cysteiny	
$\gamma$ -karboksylacja kwasu glutaminowego	wyższe eukarioty
Amidacja C-końcowej glicyny	
Sulfonowanie tyrozyny	

#### VIII.2.4.2. Ekspresja białek w *E. coli*

W roku 1977 ludzkie białko, somatostatynę, po raz pierwszy uzyskano w formie funkcjonalnej w komórkach w *E. coli*. Od tego czasu poddano ekspresji w tym organizmie ogromną ilość genów eukariotycznych. Bakteria jest niezdolna do przeprowadzenia wielu potranslacyjnych modyfikacji, które występują w komórkach ssaków, dlatego jest wygodna w produkcji białek bez modyfikacji lub z ograniczoną ich ilością. Łatwość postępowania z nią oraz zebrane dane, świadczące o jej bezpiecznym stosowaniu jako organizmu produkcyjnego, powodują, że *E. coli* uważana jest za ważnego gospodarza nawet dla białek, które nie mogą w pełni dojrzeć w tym mikroorganizmie. Wiele dopuszczonych do obrotu handlowego rekombinowanych leków jest produkowanych w *E. coli*, np. hormon wzrostu, insulina, interferon- $\alpha$  i interleukina 2. U człowieka białka te są wytwarzane jako białka wydzielane i są następnie przedmiotem ograniczonych potranslacyjnych modyfikacji, takich jak rozrywanie wiązań peptydowych i tworzenie mostków disulfidowych. W celu otrzymania w *E. coli* prawidłowo zbudowanego białka opracowano wiele pomysłowych metod. W niektórych przypadkach trzeba było przeprowadzić końcowe „dojrzewanie” białek *in vitro*. Przykład tego postępowania przedstawiono na rys. 8.

Przeprowadzono intensywne prace, mające na celu zoptymalizowanie peptydów sygnalizacyjnych stosowanych w ekspresji przeprowadzanej w *E. coli*. Dla wysoko wydajnej produkcji używane są promotory z łatwo ulegających transkrypcji genów bakteryjnych albo promotory syntetyczne. Stosowane są oba typy promotorów: konstytucyjne i regulatorowe. Regulatorowe promotory mogą być włączane i wyłączane przez zmianę środowiska hodowli (temperatury, dodawanych odczynników). Są one często używane do wytwarzania produktów rekombinowanych, które są szkodliwe dla komórek. Przykładami takich promotorów są promotor *lac* z operonu  $\beta$ -laktocydazy albo promotory  $P_L$  i  $P_R$  bakteriofaga  $\lambda$ . Zaletą tych promotorów jest to, że synteza rekombinowanych białek może być opóźniona do czasu, gdy gęstość komórki osiągnie wysoki poziom, przy którym wystarcza faza produkcji krótkich białek.

#### VIII.2.4.3. Ekspresja białek w drożdżach

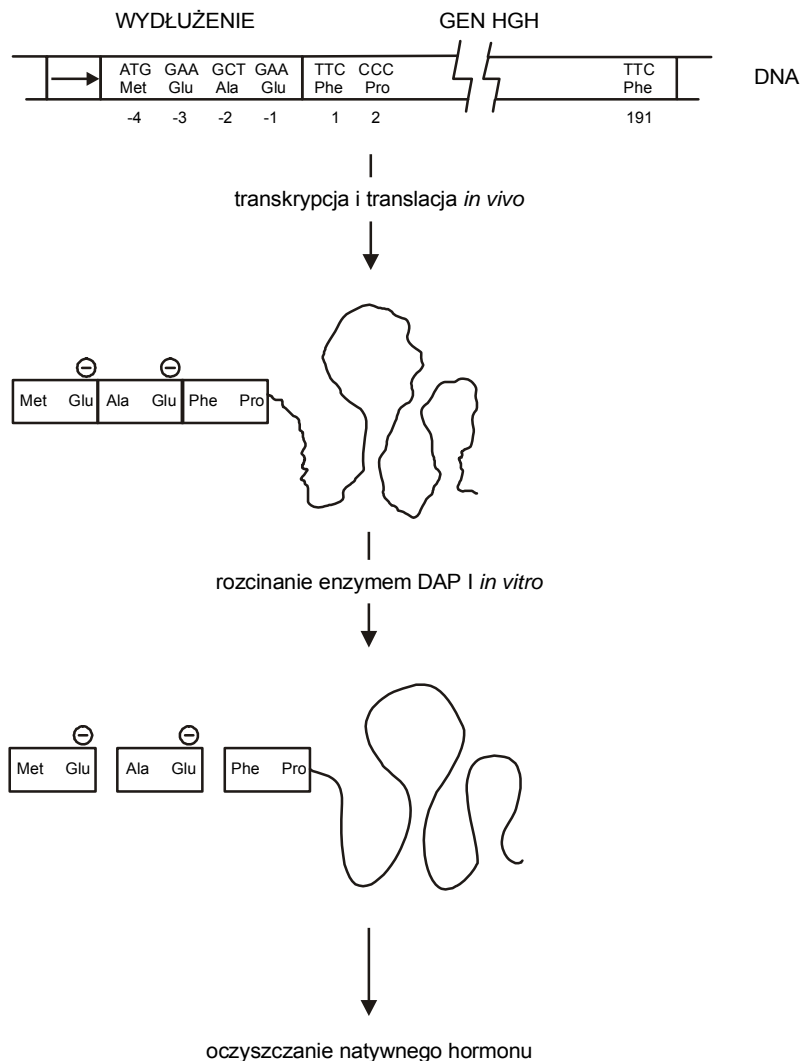
Drożdże są grzybami, które rosną głównie jako komórki pojedyncze. Jako małe eukarioty, drożdże dokonują wielu potranslacyjnych modyfikacji, które występują także u człowieka. Z tego względu są one przydatne do produkcji peptydów i białek o średnim stopniu komplikacji, podczas gdy białka o bardzo skomplikowanej budowie mogą wymagać zastosowania organizmów wyższych. Wielowiekowa tradycja stosowania drożdży w produkcji żywności jest przyczyną, dla której są bardzo cenione jako producent białek farmaceutycznych.

Termin „drożdże” jest dla wielu biologów molekularnych synonimem „drożdży piekarskich” (*Saccharomyces cerevisiae*), które były szeroko badane zarówno pod kątem genetycznym, jak i molekularnym. Prawdopodobnie w przyszłości także inne gatunki drożdży, np. *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* i *Yarrowia lipolytica*, będą używane do celów produkcyjnych. Jednak dotychczas jedynie leki produkowane przez *S. cerevisiae* zostały zaaprobowane jako leki dla ludzi (np. insulina i szczepionka przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B).

Podobnie jak *E. coli*, *S. cerevisiae* posiada naturalny plazmid (2- $\mu$ m DNA), który może być użyty jako wektor, jeśli zostanie zaopatrzone w selektywny marker.

Jako eukarioty, drożdże posiadają mechanizm wydzielania przypominający ten, który występuje w komórkach ssaków. Często korzystnie jest produkować białko rekombinowane w drożdżach w formie białka wydzielanego z dwóch powodów: po pierwsze, wydzielane białka mogą podlegać pożądanym potranslacyjnym modyfikacjom w czasie procesu wyda-

lania i są łatwiejsze do oczyszczenia. Jednakże podczas procesu wydzielania mogą także zajść niepożądane zmiany, np. nieprawidłowa N- lub O-glikozylacja. Ponieważ boczne łańcuchy glikozytowe powstające w drożdżach i u ludzi są różne, glikoproteiny produkowane w drożdżach mogą wywierać reakcje immunogenne u ludzi. Z tego powodu glikoproteiny na ogół nie są produkowane w drożdżach.

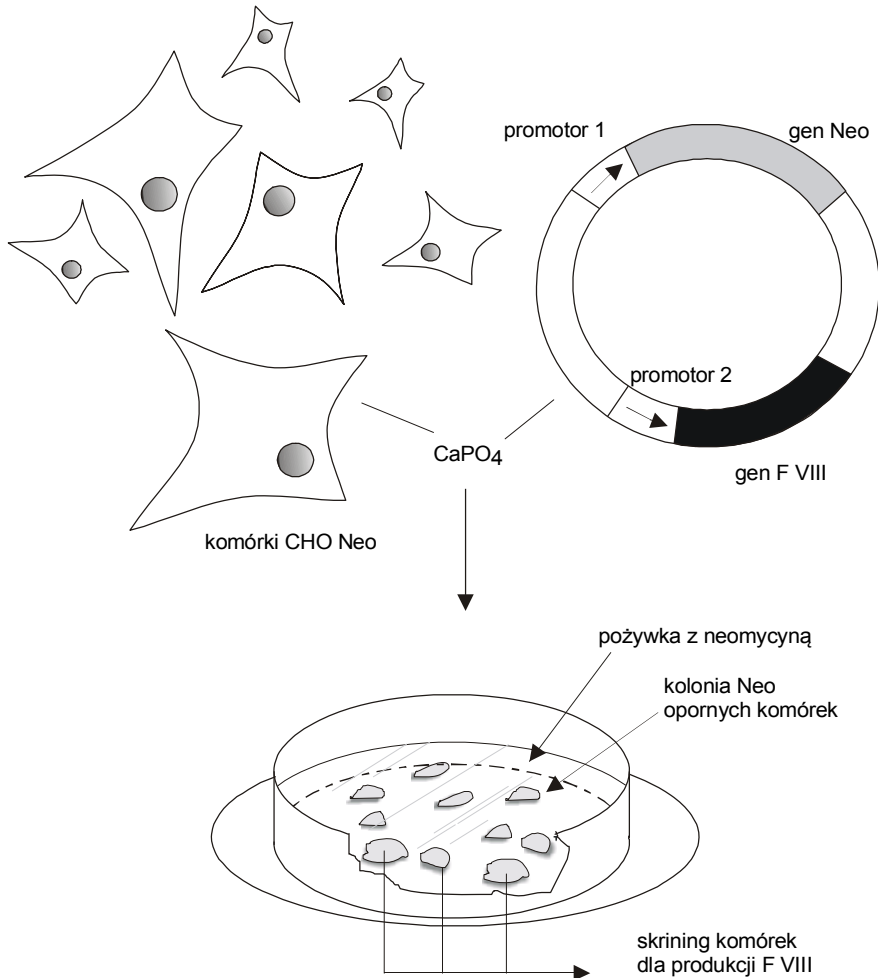


Hormon powstaje w wyniku ekspresji syntetycznego genu jako białko, zawierające cztery aminokwasy przyłączone do N-końca natywnego – zawierającego 191 aminokwasów – hormonu peptydowego. Działanie na otrzymane białko enzymem aminopeptydazą dipeptydylową I (DAP I) daje w rezultacie sekwencjonowane usunięcie dipeptydów z N-końca. DAP I jest niezdolna do rozrywania wiązań po cząsteczce proliny. W efekcie proces ulega zatrzymaniu po usunięciu czterech aminokwasów; pozwala to na otrzymanie HGH z prawidłowym N-końcem.

Rys. 8. Produkcja ludzkiego hormonu wzrostu (HGH) w *E. coli* [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]

## VIII.2.4.4. Ekspresja skomplikowanych białek w komórkach ssaków

Oczywistym gospodarzem produkcji glikoprotein i białek o innych skomplikowanych potranslacyjnych modyfikacjach są komórki ssaków. Niektóre z modyfikacji (np. sulfonowanie, amidacja i  $\gamma$ -karboksylacja) mają podstawowe znaczenie dla aktywności biologicznej białek. Na przykład aktywność niektórych czynników krzepnięcia krwi (czynniki: II, VII, IX i X) jest całkowicie uzależniona od  $\gamma$ -karboksylacji, która występuje jedynie u wyższych eukariotów.



Plazmid zawiera cDNA czynnika krzepnięcia VIII (F VIII) i gen oporności na neomycynę (Neo). Plazmid ulega transfekcji do komórek CHO w obecności fosforanu wapnia, który zwiększa przepuszczalność błon komórkowych. Jedynie komórki zawierające plazmid mogą rosnąć w obecności neomycyny. Pojedyncze klony odporne na neomycynę mogą dawać różny poziom ekspresji F VIII, zazwyczaj zależny od liczby genów F VIII. Klony o wysokiej ekspresji wyszukiwane są metodą skryningu.

Rys. 9. Transfekcja komórek CHO plazmidem ekspresji ssaków [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]

Obecnie dostępnych jest wiele różnych systemów „komórki ssaków – wektor” umożliwiających ekspresję rekombinowanych białek. Przykładami immortalizowanych linii komórek ssaków, które mogą rosnąć na pożywkach i dzięki temu pełnić funkcję komórek-gospodarzy, są: CHO (*Chinese hamster ovary* – linia komórkowa z jajnika chomika chińskiego), BHK (*baby hamster kidney* – komórki nerki noworodka chomika), COS (*African green monkey kidney* – komórki nerki zielonej małpy afrykańskiej) i HeLa (*human epitheloid carcinoma* – komórki nowotworu nabłonka macicy). Replikujące autonomicznie w komórkach wirusy ssaków mogą być używane jako wektory rekombinowanego DNA, ale możliwe jest także „utrwalenie” wprowadzonego do komórek ssaków DNA bez autonomicznie replikującego wektora, ponieważ egzogenne DNA integruje z chromosomami ssaków z małą, lecz często wystarczającą częstotliwością. Wirusy, które zostały zmodyfikowane tak, aby były szczególnie użyteczne jako wektory to: SV40 (*Simian virus*), wirus Epsteina-Barr i retrowirusy. Dwa pierwsze typy wirusów są wirusami samoreplikującymi, podczas gdy ostatni ułatwia pobieranie przez komórki i integrację do genomu DNA ze znacznie zwiększoną wydajnością, w porównaniu z układami bez udziału retrowirusów. W celu łatwego izolowania komórek, do których zostało wprowadzone rekombinowane DNA, wprowadza się do wektora selekcjonujące geny markerów, takie jak gen oporności na antybiotyk neomycynę (rys. 9). Promotory używane w celu ekspresji genów w komórkach ssaków są często silnymi promotorami wirusowymi, np. SV40 i CMV (*Cytomegalovirus*).

Modyfikacje potranslacyjne mogą nie być identyczne z tymi, które zachodzą w przypadku białek natywnych, nawet wtedy, gdy do produkcji używane są komórki ssaków. W organizmach białka są produkowane w narządach zbudowanych z wyspecjalizowanych komórek. Dostarczono licznych dowodów na to, że istnieją różnice w możliwościach zachodzenia tych procesów w komórkach różnych tkanek. Ponadto komórki z hodowli *in vitro* mogą się znacznie różnić od swych przodków, nie tylko pod względem charakterystyki wzrostu, ale także pod wieloma innymi względami. Białka ze zmienionymi potranslacyjnymi modyfikacjami mogą być przez układ immunologiczny rozpoznawane jako „nie-swoiste”. Z tego powodu mogą być nieprzydatne lub wręcz niebezpieczne. Dlatego ważna jest dokładna charakterystyka rekombinowanych białek produkowanych w komórkach ssaków.

Z ekonomicznego punktu widzenia, systemy kultur komórek ssaków są mniej atrakcyjne niż kultury mikrobiologiczne. Stosunkowo wolne tempo wzrostu, umiarkowany poziom ekspresji transgenów, złożoność pożywek i skomplikowane wyposażenie niezbędne do utrzymania hodowli są najważniejszymi przyczynami stosunkowo dużych kosztów otrzymywania produktów biologicznych za pomocą linii komórek ssaków.

#### VIII.2.4.5. Ekspresja transgenów w zwierzętach transgenicznych – „żywe bioreaktory”

Odminną drogą ekspresji genów kodujących rekombinowane białka w kulturach komórek ssaków jest użycie tzw. zwierząt transgenicznych. Zwierzęta transgeniczne mogą być otrzymywane w wyniku wstrzyknięcia obcego genu do zapłodnionych komórek jajowych z zastosowaniem mikromanipulacji *in vitro*. Wstrzyknięty obcy gen integruje do chromosomu w komórce jajowej w czasie lokacji randomizowanej. W ten sposób „zmodyfikowane” zygoty są następnie implantowane do jajowodów matki żywicielki, która, po normalnym okresie ciąży, urodzi potomka z obcym genem, wbudowanym w sposób trwały do genomu wszystkich komórek.

Przy użyciu zwierząt transgenicznych jako producentów rekombinowanych białek ważne jest, by ekspresja transgenu była regulowana. Powód jest oczywisty. Związek jest zwykle biologicznie aktywny i dlatego powinien być produkowany i przechowywany

w narządach lub tkankach, w których nie oddziałuje na zwierzę. Najkorzystniejsze systemy produkcji transgenicznej wykorzystują specjalne układy regulacyjne gruczołów mlecznych, które przyczyniają się do nagromadzenia białek w mleku zwierzęcia.

Gruczoł mleczny jest atrakcyjnym celem inżynierii genetycznej, jest czymś w rodzaju naturalnej fabryki białek, które są syntetyzowane w ogromnych ilościach i wydzielane na zewnątrz, co umożliwia ich odzyskanie bez konieczności zabijania zwierzęcia.

W tabeli 4 przedstawiono najważniejsze etapy badań, które doprowadziły do uzyskania transgenicznych zwierząt produkujących białka lecznicze.

Tabela 4

Najważniejsze osiągnięcia na drodze do uzyskania „żywych bioreaktorów” – transgenicznych zwierząt produkujących białka o działaniu leczniczym [wg 6]

Rok	Osiągnięcie
1980	uzyskanie pierwszych transgenicznych myszy
1982	fuzyjny gen wprowadzony do genomu myszy
1987	uzyskanie transgenicznych myszy wytwarzających w gruczole mlecznym obce gatunkowo białko (owczą $\beta$ -laktoglobulinę)
1987	uzyskanie transgenicznych myszy wytwarzających w gruczole mlecznym ludzkie białko o działaniu leczniczym (aktywatora plazminogenu)
1988	uzyskanie transgenicznych zwierząt gospodarskich (owiec) wytwarzających w gruczole mlecznym ludzkie białka o działaniu leczniczym ( $\alpha$ -antytrypsyny i IX czynnik krzepliwości krwi)
1994	uzyskanie transgenicznego bydła – buhaja z genem laktoferyny człowieka; wytwarzanie ludzkiej laktoferyny w gruczole mlecznym krów

Gordon i wsp. (1987 r.) byli pierwszymi naukowcami, którzy wykazali, że ludzkie białko lecznicze może być produkowane w gruczole mlecznym transgenicznego zwierzęcia. Uzyskali oni transgeniczne myszy, wytwarzające w gruczole mlecznym i wydzielające z mlekiem ludzki aktywator plazminogenu (tPA). W ciągu 10 lat, jakie upłynęły od ich publikacji, nie tylko uzyskano wiele zwierząt transgenicznych produkujących w mleku ludzkie białka, ale powstał zupełnie nowy dział przemysłu farmaceutycznego wykorzystujący zwierzęta transgeniczne jako „bioreaktory”. W samych tylko Stanach Zjednoczonych istnieje kilkanaście takich przedsiębiorstw, z budżetem ocenianym na 3 mld dolarów rocznie. Wyniki badań prowadzonych w laboratoriach tych przedsiębiorstw rzadko są publikowane, stąd pełne dane na ten temat nie są dostępne. Wiadomo jednak, że uzyskano już wiele transgenicznych zwierząt gospodarskich – producentów ludzkich białek. Jako pierwsze uzyskano w Roslyn k. Edynburga transgeniczne owce wytwarzające w mleku, pod kontrolą promotora owczej  $\beta$ -laktoglobuliny, IX czynnik krzepnięcia krwi człowieka lub ludzką  $\alpha_1$ -antytrypsynę. Początkowo stężenie ludzkich białek w mleku owiec było stosunkowo niskie (rzędu kilku ng/ml). Jednak z ostatnich doniesień z tego samego laboratorium wynika, że udało się uzyskać transgeniczne owce wytwarzające średnio 35 g, a maksymalnie aż 60 g ludzkiej  $\alpha$ -antytrypsyny w litrze mleka. Rekombinacyjne białko było w pełni aktywne biologicznie, jego glikozylacja nie różniła się od glikozylacji natywnego białka ludzkiej krwi (możliwość wytwarzania skomplikowanych białek, wymagających dla swojej aktywności potranslacyjnych modyfikacji typu glikozylacji, fosforylacji,  $\gamma$ -karboksylacji czy aktywacji przez proteolizę). W innych laboratoriach uzyskano: owce produkujące VIII czynnik krzepliwości krwi; kozy produkujące ludzki hormon wzrostu, tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) lub antytrombinę; krowy wytwarzające laktoferynę lub erytropoetynę;



świnie wytwarzające białko C lub VIII czynnik krzepliwości krwi oraz króliki wytwarzające interleukinę-2, ludzki tPA lub IGF-I (tab. 5).

Wysokie stężenie ludzkich białek w mleku niektórych z tych transgenicznych zwierząt daje nadzieję na rychle praktyczne wykorzystanie transgenyzy do produkcji ludzkich farmaceutyków.

Tabela 5

Produkcja ludzkich białek w mleku transgenicznych zwierząt gospodarskich [wg 6]

Gatunek	Białko	Ekspresja w mleku	Dane (rok)	Firma
owca	$\alpha_1$ -antytrypsyna	niska	1988	
		5 mg/l	1993	
		1,5–33g/l	1991	
	czynnik IX	0,25 mg/l	1988	
	czynnik VIII	b.d.	1993	
koza	GH	12–16 $\mu$ g/l	1994	
	antytrombina	b.d.		Genzyme Transgenics (USA)
	tPA	3 mg–3 g/l 1,5–4,5 g/l	1993 1997	
świnia	białko C	1 g/l	1994	
	czynnik VIII	2,7 mg/l	1997	
królik	interleukina-2	0,43 mg/l	1995	
	IGF-1	1g/l	1994	
	GH	50 mg/l	1995	
	$\alpha$ -glukozydaza	b.d.		Gene Pharming Europe (Holandia)
	erytropoetyna	0,5 g/l	1997	
krowa	erytropoetyna	b.d.	1994	
	laktoferyna	g/l	1996	

b.d. – brak danych

Przykładowo, postępowanie mające na celu wytworzenie transgenicznej świni zaczyna się od przygotowania fragmentu DNA, który zawiera kopię interesującego nas ludzkiego genu, z dołączoną sekwencją promotorową, pochodzącą z genu białka mleka myszy (dzięki temu u transgenicznej świni ludzki gen będzie aktywowany tylko w komórkach tkanek gruczołu mlecznego). Następnie pobiera się zarodki od świni–matki i do wyselekcjonowanych zarodków wstrzykuje się tę konstrukcję genową za pomocą cieniutkiej szklanej pipetki w okolicę przedjądra – skupiska materiału genetycznego, pochodzącego z plemnika, który zapłodnił komórkę jajową. Obce DNA zostaje zintegrowane z DNA chromosomu świni przypuszczalnie podczas procesów naprawy DNA komórki gospodarza.

#### VIII.2.4.6. Ekspresja białek rekombinowanych w komórkach owadów

Ekspresja systemów komórek owadów stała się ostatnio bardzo popularna, szczególnie w produkcji (na małą skalę) rekombinowanych białek ssaków. Podstawową cechą decydującą o atrakcyjności tego systemu jest fakt, że wysokie poziomy ekspresji aktywnych białek mogą być osiągnięte znacznie szybciej niż w komórkach ssaków.

Większość wektorów oparta jest na litycznym wirusie owadów, należącym do rodziny *Baculovirus*. Obce cDNA jest wprowadzane do genomu wirusa bez zaburzenia litycznego cyklu jego życia. W konsekwencji, produkcja białek występuje w czasie infekcji litycznej komórek owadów za pomocą rekombinowanych wirusów i zazwyczaj od momentu infekcji potrzeba niecałego tygodnia, by uzyskać maksymalną produkcję rekombinowanych białek. Fakt, że bakulowirusy nie są zaraźliwe dla kręgowców, a ich promotory nieaktywne w komórkach ssaków, powoduje, że systemy owadów są korzystniejsze od innych systemów w przypadku ekspresji onkogenów lub innych genów, które dla ssaków są szkodliwe. Tak więc *Baculovirus* został użyty do ekspresji białka HIV (gp 160), które jest obecnie w III fazie badań klinicznych jako rekombinowana szczepionka przeciwko AIDS.

Jednakże obecnie system owadów jest używany głównie wówczas, gdy potrzebne są jedynie ograniczone ilości rekombinowanych białek do ich charakterystyki, lub jeżeli rekombinowane białko jest używane raczej jako narzędzie w projektowaniu leków, a nie jako gotowy lek.

#### VIII.2.4.7. Transgeniczne rośliny

Wektorami DNA roślin dwuliściennych są duże plazmidy *Agrobacterium*, bakterii powodujących powstawanie u roślin dwuliściennych tumorowatych narośli – plazmid Ti (*tumor inducing*) lub Ri (*roots inducing*). Stosuje się dwa typy wektorów pochodnych Ti: kointegracyjne i binarne.

Wektory kointegracyjne powstają w wyniku rekombinacji pomiędzy wektorem pośrednim, namnażanym w *E. coli*, i wektorem pomocniczym, pochodzącym z *Agrobacterium*. Wektory binarne są plazmidami zdolnymi do replikacji zarówno w *E. coli*, jak i w *Agrobacterium*.

Najdogodniejszą współczesną metodą uzyskiwania roślin transgenicznych jest zakażenie wycinków liści i hodowla w środowisku stymulującym selekcję przetransformowanych pędów, wyrastających z pominięciem stadium kallusa. Postępowanie to można stosować jedynie w przypadku transfekcji wektorami pozbawionymi genów kodujących regulatory wzrostu roślin.

Opracowano także metody bezwektorowej transfekcji roślin i komórek roślinnych.

Otrzymanie genetycznie transformowanych klonów komórkowych możliwe jest w wyniku inkubacji roślinnych protoplastów z linearyzowanym plazmidowym DNA, wyposażonym w marker selekcyjny, w warunkach promujących pobranie DNA. Czynniki promocyjne można umownie podzielić na chemiczne i fizyczne. Do czynników chemicznych zalicza się glikol polietylenowy (PEG) w środowisku alkalicznym lub poli-L-ornitynę. Często stosowanym czynnikiem fizycznym powodującym transfekcję są krótkotrwałe wysokonapięciowe impulsy elektryczne (elektroporacja). Transformowane komórki można uzyskać również w wyniku fuzji liposomów z rekombinowanym DNA z protoplastami. Metoda z zastosowaniem armatek genowych (*gene gun*) polega na wstrzeliwaniu drobnych kuleczek wolframowych opłaszczonych DNA.

Zależnie od badanego gatunku rośliny, włączane DNA podlega (lub nie) różnego typu przegrupowaniu; prawie nigdy nie udaje się zintegrować z genomem roślinnym długich (kilkanaście tysięcy par zasad) fragmentów DNA.

Pierwsze rośliny transgeniczne (tytoń) otrzymano w roku 1984. Pierwsze zezwolenie na wprowadzenie rośliny transgenicznej do uprawy polowej (pomidor) wydano w Belgii w roku 1986. Rośliny transgeniczne tworzy się w celu otrzymania roślin uprawnych opornych na herbicydy, zakażenia wirusami, owadami – szkodnikami i ich gąsienicami oraz w celu otrzymania roślin przeznaczonych do bardzo wydajnej produkcji białek heterologicznych. Interesujące dla farmacji są ziemniaki z genem kodującym ludzką albuminę surowicy (HSA); ludzką albuminę wytwarzają i wydzielają do przestrzeni międzykomórkowej komórki bulw transgenicznych ziemniaków. Przeprowadzane są próby otrzymywania

ludzkich przeciwciał, które mogłyby być stosowane w terapii nowotworów, poprzez wprowadzenie ludzkiego genu do komórek rozrodczych kukurydzy, uprawy soi zawierającej ludzkie przeciwciała przeciw wirusowi *Herpes simplex 2*, wywołującemu choroby weneryczne, transgenicznego tytoniu wytwarzającego przeciwciała przeciwdziałające powstawaniu próchnicy czy produkujące w swoich liściach enzym – glukocerebrozydazę.

Mimo tych licznych przykładów uzyskania wartościowych roślin transgenicznych, wiedza genetyczna i biochemiczna o świecie roślinnym jest mniej rozwinięta niż wiedza o świecie zwierzęcym.

### VIII.3. Projektowanie białek

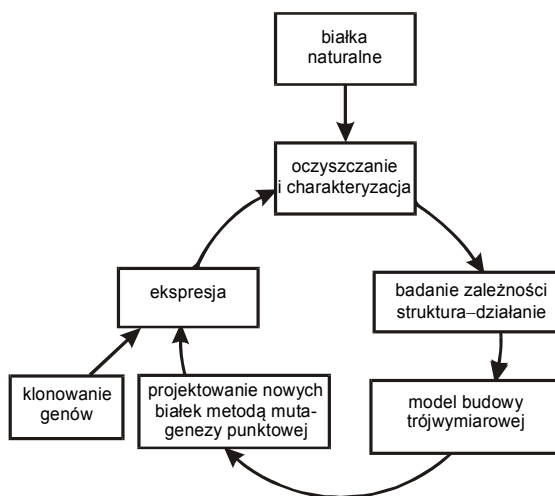
Technologia rekombinowanego DNA umożliwia nie tylko produkcję białek naturalnych, lecz także projektowanie i produkcję cząsteczek zupełnie nowych ich typów. Można wyróżnić dwie główne grupy nowych białek:

- 1) warianty białek naturalnych, w których miały miejsce zastąpienia, insercje i delekcje małej liczby aminokwasów;
- 2) białka chimeryczne z domenami pochodzącymi z różnych białek.

Osiągnięcia w tym zakresie były bardzo użyteczne w badaniach nad zależnością struktura – działanie enzymów i receptorów, np. dla określenia, która część białka jest odpowiedzialna za wiązanie substratu lub liganda. Tworzenie białek trzeciej kategorii, obejmującej białka projektowane z kawałków (*scratch*), jest zasadniczo także możliwe, ale na razie jest w stadium wstępnego zaawansowania.

W celu racjonalnego zaprojektowania nowych farmaceutyków białkowych stosuje się następujący cykl przemian, zwany „cyklem inżynierii i projektowania białek” (rys. 10).

Sama idea cyklu projektowania jest znana w przemyśle farmaceutycznym, gdzie wiedza osiągnięta w wyniku testowania chemicznych, fizycznych i biologicznych właściwości tzw. struktur wiodących jest wykorzystywana w projektowaniu nowej wersji struktury wiodącej, która jest znów badana itd., aż zostanie znaleziony satysfakcjonujący związek.

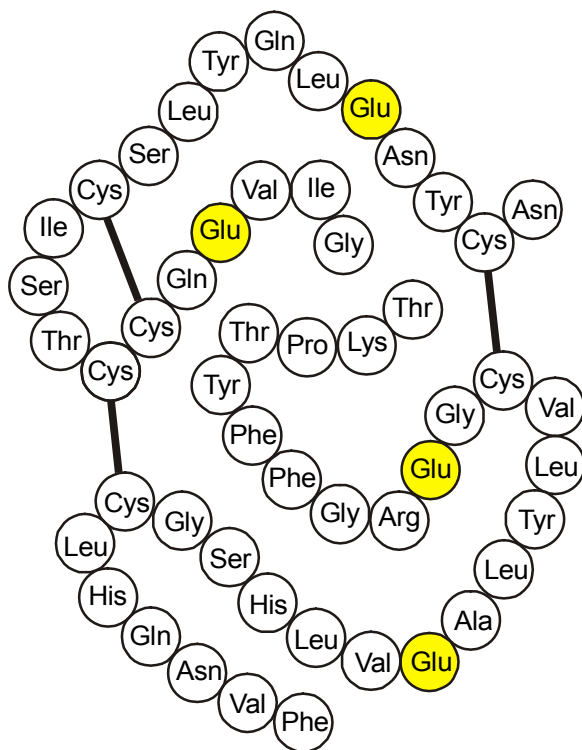


Rys. 10. Cykl projektowania i inżynierii białek [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]

### VIII.3.1. Białka wariantowe

Białka wariantowe mogą być otrzymywane metodą inżynierii genetycznej zwanej mutagenезą punktową (*site directed mutagenesis*). Stosowanie tej metody umożliwia zmianę, usunięcie lub wprowadzenie jednego lub kilku nukleotydów w rejonie kodującym. Ekspresja zmutowanego genu doprowadzi do otrzymania białka wariantowego z celowo zmienionym aminokwasem, którego funkcję bada się różnymi metodami. Inżynieria małych zmian w białkach może mieć różne cele, takie jak: zmiana rozpuszczalności, trwałości, powinowactwa do substratów lub receptorów.

Przykładem mogą być prace nad projektowaniem cząsteczek insuliny o ulepszonych właściwościach. Cząsteczka insuliny zawiera cztery reszty kwasu glutaminowego. Poprzez zmianę jednego lub większej ilości tych aminokwasów w obojętny aminokwas – glutaminę, punkt izoelektryczny zostaje przesunięty w kierunku wyższych wartości pH, dając wariant insuliny o mniejszej rozpuszczalności w fizjologicznym pH, o wartości około 7,3 (rys. 11).



Zaznaczono cztery ujemnie naładowane cząsteczki kwasu glutaminowego (Glu). Metodą celowanej mutagenезy, kodony Glu (GAA) mogą być wymienione na kodony CAA dla obojętnej cząsteczki glutaminy (Gln), prowadząc do wariantu insuliny o wyższym punkcie izoelektrycznym.

Rys. 11. Struktura cząsteczki insuliny [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]

Taki wariant insuliny może konkurować na rynku z dotychczas dostępnymi jej postaciami wolno działającymi, powstającymi w wyniku tworzenia kompleksów natywnej insu-

liny z protaminą lub jonami cynku. Podobnie, zastąpienie innego aminokwasu może prowadzić do preparatów insuliny działających błyskawicznie. Wprowadzona do lecznictwa w 1996 roku insulina lispro, w której aminokwasy 28 i 29 łańcucha  $\beta$  (Lys i Pro) zostały wymienione (Pro i Lys) działa szybciej i krócej niż krótko działająca insulina ludzka. Modyfikacja taka zmniejsza zdolność insuliny do tworzenia dimerów i zdolność powstających dimerów do tworzenia heksamerów. Ta forma insuliny ulega szybszej absorpcji, ponieważ dysocjacja heksamerów do monomerów jest etapem limitującym szybkość absorpcji.

Poważnym problemem w klinicznym zastosowaniu wariantów jest ryzyko reakcji ubocznych, spowodowanych immunogennością lub zmienionymi właściwościami funkcjonalnymi produktów degradacji. Te czynniki ryzyka są niezwykle ważne w przypadku leków typu insuliny, która podawana jest codziennie przez wiele lat i dlatego potrzebne są bardzo szeroko zakrojone badania określające działania uboczne. Obecnie parę analogów insuliny znajduje się w trzeciej fazie badań klinicznych i – jak się wydaje – są one obiecującymi nowymi lekami.

### VIII.3.2. Białka chimeryczne

Białka chimeryczne otrzymuje się przez połączenie regionu kodującego dla jednego białka (lub domeny białka) z regionem kodującym innego białka, po czym następuje ekspresja połączonych regionów kodujących. Powodzenie w otrzymywaniu funkcjonalnych białek chimerycznych wymaga zwykle dokładnej znajomości zależności struktura – aktywność obydwu wyjściowych białek, aby aktywne domeny mogły być utrzymane w nowym białku. Odwrotnie, postępy w badaniach nad białkami chimerycznymi mogą być także wykorzystywane do określenia, które regiony białek są ważne dla ich aktywności.

Postęp w badaniach nad białkami chimerycznymi może być wykorzystany np. w produkcji tzw. „humanizowanych” (*humanized*) przeciwciał monoklonalnych, które mogłyby się stać bardzo ważnymi farmaceutykami. Tak zwana technika hybrydomowa, polegająca na selekcji, immortalizacji i proliferacji komórek B, tworzących pojedyncze przeciwciała, okazała się bardzo użyteczna w produkcji szczurzych przeciwciał monoklonalnych. Jednakże, pomimo ogromnych wysiłków, trudno było opracować podobne metody produkcji dla ludzkich przeciwciał monoklonalnych. Zamiast tego, mając dostęp do genów klonowanych przeciwciał, zarówno pochodzenia ludzkiego jak i szczurzego, „humanizowane” przeciwciała mogą być otrzymywane przez ekspresję genu chimerycznego przeciwciała w odpowiednim gospodarzu. U myszy przeciwciała pożądanej specyficzności mogą być łatwo otrzymane w wyniku immunizacji antygenem, po czym następuje izolacja odpowiedniego cDNA. Przez łączenie regionu kodującego, odpowiadającego zmiennym regionom takiego przeciwciała szczurzego, ze stałym regionem z ludzkiego przeciwciała, można otrzymywać chimeryczne przeciwciała ze specyficznością przeciwciał szczurzych, które jednak są tolerowane przez ludzki układ immunologiczny.

Takie humanizowane przeciwciała mogą mieć różnorodne zastosowania – same, albo połączone z innymi biologicznie aktywnymi substancjami. Mogą być, na przykład, używane do eliminacji substancji toksycznych, takich jak endotoksyny pochodzenia bakteryjnego lub jako regulatory humoralnej odpowiedzi immunologicznej poprzez wiązanie nadmiernej ilości cytokin (interleukiny 1, *tumor necrosis factor* itd.). W terapii raka przeciwciała mogą ułatwiać selektywną destrukcję komórek nowotworowych, nie tylko poprzez normalne mechanizmy immunologiczne, ale także poprzez docelowe dostarczanie toksyn. Specyficzne przeciwciała komórek nowotworowych przyłączone do części komórkowych toksyn, takich jak toksyna dyfterytu, mogą zatem oddziaływać selektywnie i niszczyć komórki nowotworowe. Ten sposób postępowania, zwany „magiczną kulą”, nie jest ograniczony jedynie do połączeń toksyna – przeciwciała; chimery pomiędzy toksynami i ligandami

białkowymi specyficznymi receptorami pewnych typów komórek to przykład innej możliwości działania celowanego.

#### **VIII.4. Technologia genowa w odkryciach leków niepeptydowych i peptydowych**

„Celami” leków są zwykle enzymy, receptory, kanały jonowe i kompleksy aktywnego transportu. Wszystkie te cele są białkami, a jako takie mogą być izolowane przez klonowanie i ekspresję odpowiadających im genów. Fakt ten miał ogromny wpływ na odkrycie i rozwijanie leków niepeptydowych, ponieważ dostęp do czystych celów terapeutycznych pozwala na badanie interakcji lek – cel terapeutyczny, co dotychczas nie było możliwe. Podany poniżej przegląd, dotyczący wpływu technologii genowej na badania nad lekami oddziałującymi z receptorami błonowymi zawiera jedynie przykłady istniejących w tej dziedzinie możliwości. Ogólnie rzecz biorąc, każde białko o znaczącej roli w procesach fizjologicznych może się stać celem dla badań nad wynalezieniem leku o podobnym sposobie działania.

##### **VIII.4.1. Receptory błonowe jako cele w poszukiwaniu leków**

Charakterystyka farmakologiczna receptorów błonowych doprowadziła z czasem do klasyfikacji tych receptorów zbudowanej na podstawie analizy ich funkcji albo typu ich ligandów. Klonowanie i charakterystyka dużej liczby receptorów błonowych dodała wiele informacji strukturalnych do danych farmakologicznych oraz umożliwiła lokalizację receptorów w różnych narządach i tkankach. Badania te wykazały, że wiele receptorów, klasyfikowanych uprzednio jako pojedyncze jednostki, w rzeczywistości składa się z rodziny podobnych receptorów. Podtypy receptorów w obrębie pewnej rodziny posiadają strukturalne oraz funkcjonalne podobieństwa, takie jak interakcja z tymi samymi ligandami. Jednakże oddzielna ekspresja i farmakologiczna charakterystyka sklonowanych subtypów receptorów wykazała w wielu przypadkach, że powinowactwo do ligandów może być inne w przypadku różnych podtypów. To bardzo ważne odkrycie, ponieważ otwiera możliwość znalezienia selektywnych leków, które wyłącznie lub przynajmniej w przeważający sposób oddziałują z pojedynczym podtypem receptora. Ponieważ stwierdzono znaczny stopień specyficzności rozmieszczenia różnych podtypów receptorów w tkankach, lek specyficzny w stosunku do podtypu receptora będzie miał większą specyficzność i dzięki temu mniej działań ubocznych, niż leki działające na wiele podtypów receptorów.

Uwzględniając te możliwości, klasyczną metodę poszukiwania leków posługującą się skринingiem ogromnych kolekcji czystych chemicznie związków lub skomplikowanych ekstraktów biologicznych, stosuje się obecnie do oczyszczonych preparatów receptorowych. Testy stosowane w skринingu oparte są na całych komórkach dokonujących ekspresji klonowanych docelowych receptorów albo na wstępnie oczyszczonych preparatach receptorowych pochodzących z rekombinacji. Ponieważ skринing może dotyczyć tysięcy różnych substancji, warto poświęcić nawet dużo czasu na skrupulatne zaprojektowanie testu skринingowego, a w tym pomóc może znowu technologia genowa. Tak opracowane programy skринingowe przypuszczalnie przyniosą nowe postępy w poszukiwaniu leków.

Inną dziedziną, w której mogą być zastosowane programy budowane na skринingu receptorowym, jest poszukiwanie niepeptydowych analogów hormonów peptydowych. Słabą stroną hormonów peptydowych jako leków jest to, że mogą być one stosowane jedynie w postaci iniekcji, ponieważ peptydy podane doustnie ulegają rozkładowi w żołądku. Celem tych programów będzie zatem znalezienie trwałych analogów, które mogłyby być stosowane w inhalacjach lub doustnie. Jeśli znajdzie się obiecującą strukturę wiodącą, można przeprowadzić jej optymalizację w sposób analogiczny do przedstawionego na rys. 11.

### VIII.4.2. Biblioteki epitopowe

Analogicznie jak w przypadku bibliotek istniejących związków chemicznych i naturalnych ekstraktów biologicznych, jako źródło nowych aktywnych substancji farmakologicznych mogą być używane biblioteki „genetycznych” epitopów. Przykładem biblioteki genetycznych epitopów jest tzw. fagowy system prezentacji białek i peptydów (rys. 12). Fag jest wirusem bakteryjnym, który może być użyty jako wektor klonowania w komórkach bakterii (podobnie jak wirusy zwierzęce mogą być używane jako wektory klonowania w komórkach ssaków). Niektóre z białek pokrywających fagi mogą przyjmować obce sekwencje w pewnych pozycjach bez niszczenia ich normalnej funkcji. Poprzez klonowanie przypadkowych sekwencji nukleotydowych w obrębie regionu kodującego te białka, można utworzyć bibliotekę fagową, w której każda z powierzchni fagów jest odzwierciedleniem unikalnej sekwencji białek lub peptydów. Biblioteka fagowa, składająca się z ponad  $10^9$  różnych epitopów peptydowych, może być oczyszczona techniką „przez powinowactwo”, z użyciem immobilizowanych oczyszczonych receptorów (lub każdego innego celu); wybrane fagi mogą być namnożone poprzez ponowną infekcję *E. coli*. W razie potrzeby, selekcja i amplifikacja może być powtarzana wielokrotnie, aż do otrzymania czystego klonu fagowego. Sekwencję wybranego peptydu można wydedukować na podstawie sekwencji DNA zamkniętego w cząsteczce faga i sekwencja ta może być później wykorzystana do przeprowadzenia różnych przemian w ramach procesu projektowania.

Można także konstruować biblioteki genetyczne z epitopami DNA lub RNA. Amplifikacja jest wówczas uzupełniana przez oznakowanie sekwencji przypadkowych (randomowych) sekwencjami znanymi, które mogą być użyte w technice PCR. W obu przypadkach wspólną zaletą tego postępowania jest to, że ogromną ilość epitopów można analizować jako mieszaninę, ponieważ te nieliczne, które oddziałują z założonym celem, mogą być wyselekcjonowane i namnożone. W pracach z bibliotekami substancji niegenetycznych, selektywna amplifikacja nie jest możliwa i dlatego każda substancja musi być oddzielnie analizowana skringiem.

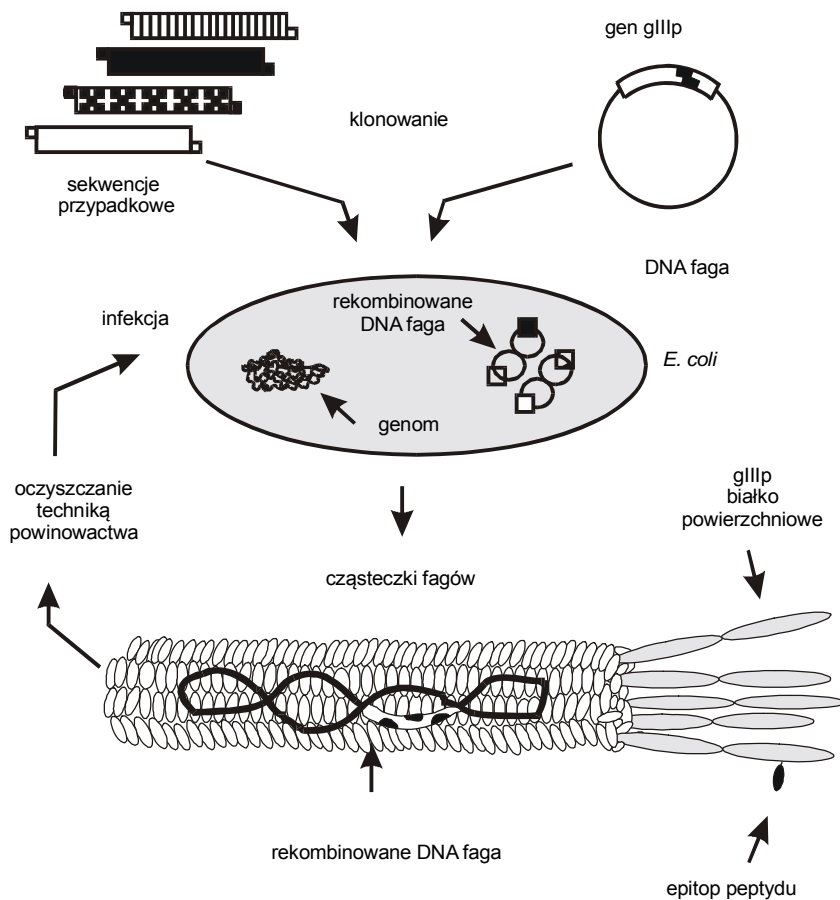
### VIII.5. Zwierzęta transgeniczne jako modele chorób

Jak wcześniej zauważono, zwierzęta transgeniczne mogą być używane do produkowania białek aktywnych farmakologicznie. Jak się jednak wydaje, zwierzęta te są znacznie ważniejsze jako modele chorób występujących u ludzi niż jako producenci białek. Przed wprowadzeniem technik transgenicznych dostępna była niewielka liczba zwierzęcych modeli chorób. Pojawiały się spontanicznie albo otrzymywane były eksperymentalnie z ogromnymi trudnościami technicznymi. Obecnie, dzięki metodom, które umożliwiają wprowadzenie lub inaktywację genów u zwierząt doświadczalnych, istnieje znacznie więcej wydajnych i bezpośrednich metod tworzenia modeli chorób. Jako modele chorób używane są zazwyczaj transgeniczne myszy, ponieważ łatwo można je namnażać i hodować.

W przypadku najprostszego modelu myszy transgenicznej ekspresja obcego genu następuje w sposób niekontrolowany, np. w większości narządów lub nawet we wszystkich narządach. Dla pewnych celów może być jednak potrzebne ograniczenie ekspresji do wybranych narządów i wtedy trzeba użyć specyficznych dla tkanki elementów regulacyjnych. Nie jest bezwzględnie konieczne, aby obcy gen został wprowadzony w specjalne położenie na chromosomie i – jak to wcześniej opisano – takie zwierzęta mogą być generowane przez wstrzyknięcie obcego genu do zapłodnionego jaja.

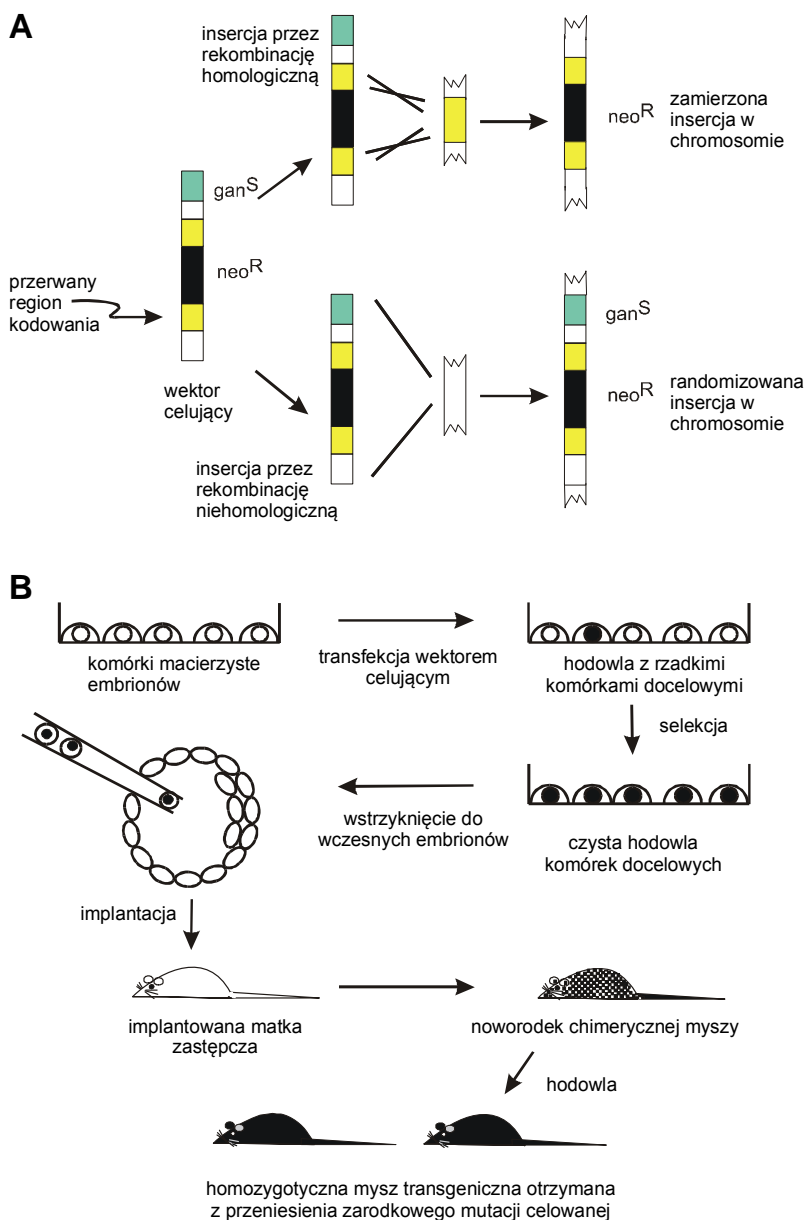
Bardziej wyrafinowanym modelem transgenicznym jest ten, w którego przypadku specyficzny gen został inaktywowany, tzw. mysz *knock-out*. Taką inaktywację wykonuje się elegancką, ale czasochłonną techniką, zwaną zastępowaniem genu celowego (specyficzne-

go) (rys. 13). Krótko mówiąc, klonowana wersja genu jest przerywana przez wprowadzenie genu kodującego selekcyjny marker, zwykle taki, który wprowadza oporność na neomycynę. Przerwany gen jest wprowadzany do rodziny komórek embrjonalnych wzrastających w hodowli *in vitro* i komórki, które pobrały DNA, są selekcjonowane poprzez wzrost w środowisku zawierającym neomycynę. W nielicznych przypadkach, gen nie integruje się w przypadkowych położeniach, ale zamienia się miejscami z jego naturalnym odpowiednikiem w wyniku homologicznej rekombinacji. Ponieważ z takimi przypadkami mamy do czynienia bardzo rzadko, opracowano metodę selekcji komórek, w których taka zamiana miejsc nastąpiła.



Klonowanie sekwencji przypadkowego DNA obramowanego rejonem kodującym białka (gIIIp) pokrywy faga prowadzi do utworzenia cząsteczek fagowych, z których każda reprezentuje na powierzchni jeden nowy epitop. Cząsteczki fagów wykazujące epitop dla specyficznego celu (np. receptora lub enzymu) mogą być izolowane poprzez technikę oczyszczania powinowactwem i zamplikowane przez ponowne infekcje *E. coli*.





**A** – Homologiczne i niehomologiczne wprowadzanie inaktywowanego genu do chromosomu. Neo<sup>R</sup> (oporność na neomycynę) i gan<sup>S</sup> (wrażliwość na ganciklowir) są selekcyjnymi markerami używanymi w celu rozróżnienia tych dwóch przypadków. **B** – Transfekcja rodziny komórek embrjonalnych wektorem celującym zawierającym inaktywowany gen, po której następuje generacja myszy chimerycznych poprzez infekcję docelowych rodzin komórkowych do wczesnych embrionów. Łatwe rozróżnienie myszy, będących potomstwem docelowych rodzin komórkowych, może być dokonane przez użycie rodzin komórkowych i wczesnych embrionów linii myszy o różnym zabarwieniu futerka.

Rys. 13. Otrzymywanie myszy *knock-out* za pomocą celowanego zastąpienia genu [wg *A Textbook of Drug Design and Development*, ed. P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors and U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers]

Inny selekcyjny gen markerowy, tym razem nadający wrażliwość na środek zewnętrzny (zwykle gen kinazy tymidynowej *Herpes simplex*, który wprowadza wrażliwość na lek ganciklowir), jest umieszczany w wektorze przylegającym do przerwanej genu. Komórki, które w wyniku procesu randomizowanej integracji przyjęły cały wektor, będą – poza genem neomycyny – zawierać gen kinazy tymidynowej, dzięki czemu są wrażliwe na ganciklowir. Jedynie te komórki, w których wystąpiła homologiczna integracja genów, będą zawierać tylko gen neomycyny i będą odporne zarówno na neomycynę, jak i na ganciklowir. Mniej więcej jedna komórka z miliona poddanych tym operacjom posiada wymaganą wymianę, ale ta mała częstość występowania wymiany jest wystarczająca, ponieważ komórki mogą być selekcyjonowane i namnażane. Embrionalne rodziny komórek są następnie wprowadzane do embrionów we wczesnym stadium rozwoju, rozwijających się później w tzw. myszy chimeryczne, u których zanikają niektóre komórki, będące nośnikami wymiany genu. Następnie trzeba wyselekcjonować myszy, które są nośnikami przerwanych genów w komórkach rozrodczych. Te myszy są używane w hodowli w ten sposób, że możliwe staje się otrzymanie potomstwa homozygotycznego (pod względem przerwanej genu). Jednakże na otrzymanie myszy *knock-out* potrzeba około roku. Oczywiście, w razie potrzeby metoda ta może być użyta także w celu zastąpienia genu mutującego spontanicznie genem dzikim.

W „prostym” typie myszy *knock-out*, określony gen jest inaktywowany we wszystkich komórkach zwierzęcia; w wielu przypadkach prowadziło to do jego śmierci. Dlatego obecnie opracowano jeszcze bardziej wyrafinowane modele, w których określone geny – w zależności od warunków – są włączane i wyłączane w uprzednio wyznaczonych narządach. Te systemy używają różnych, dokładnie scharakteryzowanych, mechanizmów regulacyjnych. W efekcie otrzymuje się mysz transgeniczną, posiadającą wiele obcych genów, o dobrze zgranym wzajemnym oddziaływaniu.

Dzisiaj dysponujemy modelami myszy transgenicznych dla wielu chorób, zarówno monogenicznych jak i poligenicznych. Przykładem tej pierwszej jest mukowiscydoza (*cystic fibrosis* CF), której przyczyną, jak wykazano, jest defekt genu kodującego duże białko błonowe – CF regulator transmembranowego przewodnictwa. Proste *knock-out* (wyrzucenie) tego genu pozwala otrzymać mysz z objawami podobnymi do tych, które stwierdza się u ludzi, a mianowicie z nagromadzeniem śluzu (*mucus*) w płucach. Opisany model był wykorzystany w różnych sposobach terapii, włącznie z somatyczną terapią genową. Ten sposób postępowania wydaje się bardzo obiecujący i przechodzi badania kliniczne. Obecnie jednak inny lek przeciw CF został wprowadzony do leczenia. Jest to rekombinowana ludzka DNaza I, enzym degradujący DNA. Terapia jest bardzo skuteczna, ponieważ DNaza, rozcinając zewnątrzkomórkowe DNA, powoduje powstawanie śluzu o zmniejszonej lepkości w płucach, poprawia w ten sposób funkcję płuc, zmniejsza natężenie i częstość kaszlu pacjentów.

Przykładami chorób poligenicznych, dla których istnieją transgeniczne modele, są rak i arterioskleroza. Arterioskleroza jest skomplikowaną chorobą, której powodem są zarówno czynniki genetyczne, jak i styl życia. W obydwu przypadkach wydaje się, że czynnikiem decydującym jest wysoka zawartość lipidów we krwi. Znanych jest wiele białek transportujących lipidy. Aby badać ich wpływ na arteriosklerozę, otrzymano myszy transgeniczne z nadmierną lub zbyt małą ekspresją tych białek. Otrzymane wyniki dobrze korelują z epidemiologicznymi wynikami przeżywalności u ludzi i potwierdzają niezbędność modeli transgenicznych. Przy użyciu tych modeli wykazano, że pewne czynniki transportujące, np. CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) przyspieszają wystąpienie arteriosklerozy, jeżeli są poddawane wzmożonej ekspresji. Inhibitory tego transportera mogą być użytecznymi lekami. Jeśli takie inhibitory są poszukiwane w wygodnym modelu badań *in vitro*, mogą

być testowane w celu określenia ich efektywności *in vivo* u transgenicznych myszy przed testowaniem ich u ludzi.

Ogromny postęp, wynikający z badań nad modelami transgenicznymi, polega na tym, że można za ich pomocą badać zarówno etiologię chorób, jak i stosować w ich przypadku interwencję terapeutyczną.

### VIII.6. Terapia genowa

U zwierząt transgenicznych opisanych powyżej, obce geny w sposób nieodróżniony ulegały insercji do wszystkich komórek, włączając komórki linii zarodkowych. Jednakże obce geny mogą być także wprowadzane w taki sposób, że procesem tym są objęte tylko specyficzne komórki ciała (komórki somatyczne), a nie komórki zarodków. Ze względów zarówno etycznych, jak i medycznych, tylko ta ostatnia możliwość, tzw. somatyczna terapia genowa, może być brana pod uwagę u ludzi. Z somatyczną terapią genową wiązane są duże nadzieje w dziedzinie skutecznego leczenia chorób genetycznych, a także wielu innych chorób. Już uzyskano pewne dobre wyniki. Obecnie badanych jest ponad sto zastosowań klinicznych somatycznych transferów genetycznych.

Aby można było stosować somatyczną terapię genową, potrzebny jest sprawny system doprowadzający geny, zwłaszcza jeśli transfer genów ma zostać wykonany *in situ*. W niektórych przypadkach komórki (np. komórki krwi) mogą być pobrane z ciała i transfekowane w czasie hodowli *in vitro*. Tutaj propagacja i selekcja transfekowanych komórek jest w zasadzie możliwa, ale w praktyce niewykonalna, ze względu na długi czas hodowli izolowanych komórek. Bardzo ważne jest w tym przypadku także to, aby transfekcji ulegała wystarczająca frakcja komórek.

Aby otrzymać efektywny system dostarczający geny, stosuje się wektory retrowirusowe o zdefektowanej replikacji. Takie wirusowe konstrukcje DNA na ogół zachowują się jak niewirusowe DNA, lecz jeżeli zostaną pobrane przez komórki ssaków zawierające geny białek powierzchniowych retrowirusów, mogą być upakowane w cząsteczki wirusów. Specjalnie w tym celu zaprojektowano tzw. linie komórek opakowujących. Rekombinowane cząsteczki wirusów, otrzymywane z tych komórek, posiadają właściwą normalnym retrowirusom zdolność infekowania innych komórek. Infekcja wirusowa komórek jest znacznie wydajniejsza niż standardowe metody transformacji DNA. Ponadto integracja DNA do chromosomów za pośrednictwem retrowirusów jest bardziej wydajna niż integracja spontaniczna. Jednakże, ze względu na bezpieczeństwo, bardzo ważne jest, żeby otrzymane komórki nie były zdolne do wytwarzania nowych cząsteczek wirusów, ponieważ mogłoby to prowadzić do rozpowszechnienia się wirusów rekombinowanych. Układy retrowirusowe są szeroko stosowane w obecnym postępowaniu terapeutycznym w przypadku chorób prowadzących do śmierci, takich jak rak. Ważne jest, aby mieć pewność, iż to postępowanie nie doprowadzi do przeniesienia się retrowirusów do innych narządów (zwłaszcza do komórek rozrodczych) lub na inne osoby.

Dla uniknięcia potencjalnych zagrożeń, jakie związane są z systemami retrowirusowymi, poszukuje się innych systemów dostarczania genów. Niektóre z nich polegają na użyciu innych typów wirusów; dlatego niosą z sobą potencjalne ryzyko podobne do wynikającego ze stosowania retrowirusów. Inne systemy wykorzystują zupełnie odmienne możliwości, takie jak „upakowywanie” DNA w liposomy, które mogą być pobrane przez komórki dzięki wydajnym mechanizmom endocytozy lub fuzję DNA do liganda receptora wchłaniania komórkowego.

Dyskutowano czy terapia genowa jest „zabiegiem”, „narzędziem” czy „lekiem”. W wyniku tej dyskusji przyjęto, że – z prawnego punktu widzenia – materiały do terapii genowej

(obejmujące geny terapeutyczne i wektory) powinny być sklasyfikowane jako „medyczne produkty biotechnologii” i traktowane jak lek.

Konstrukcje typu gen/wektor są artykułem handlowym i – jak w przypadku innych leków – przy ich produkcji przestrzegane być muszą precyzyjnie określone wymagania, odnoszące się do samego procesu technologicznego, jak i kontroli ich jakości.

Przepisy GILSP (*good industrial large scale practice*) ściśle określają warunki, jakim muszą odpowiadać elementy używane w otrzymywaniu produktów rekombinowanych.

**Organizm gospodarza** musi być niepatogenny, nie może zawierać żadnych przypadkowych czynników patogennych, musi być przedmiotem długotrwałego doświadczenia w skali przemysłowej lub posiadać zdolność optymalnego wzrostu w warunkach przemysłowych, z jednocześnie ograniczoną zdolnością przeżycia w środowisku, bez szkodliwych skutków.

**Wektor** musi być dokładnie zbadany, musi być stwierdzone, że nie powoduje on szkodliwych skutków, powinien posiadać wymiary ograniczone do jednej pożądanej funkcji, być minimalnie mobilny, nie posiadać czynników stabilizujących jego przeżycie w środowisku.

**Organizm z rekombinowanym DNA** musi być niepatogenny, być tak nieszkodliwy, jak organizm gospodarza w warunkach przemysłowych, z jednocześnie ograniczoną zdolnością przeżycia w środowisku, bez jakichkolwiek szkodliwych konsekwencji.

Chociaż terapię genową uważano początkowo za narzędzie korygujące choroby wrodzone o przyczynie monogenicznej, nie ma wątpliwości, że terapia genowa bardziej rozpowszechnionych chorób, jak: AIDS, rak lub choroby neurodegeneracyjne, będzie równie ważna. Wiele obecnie prowadzonych prac doświadczalnych w zakresie terapii genowej dotyczy raka i zmierza do wyprodukowania białka typu TNF (*tumor necrosis factor*), interferonu lub interleukiny, (które – jak się wydaje – są zdolne do przeprowadzenia selektywnej immunologicznej destrukcji komórek docelowych), a także do zablokowania produkcji czynników takich, jak insulinopodobny czynnik wzrostu I (który – jak się wydaje – ułatwia rozwój raka). Terapia genowa AIDS nie osiągnęła jeszcze etapu badań klinicznych, ale badania laboratoryjne wykazały, że w zasadzie jest to już możliwe. Przykładami chorób monogenicznych, dla których przeprowadzane są próby kliniczne terapii genowej na ludziach są *cystic fibrosis* i ciężkie schorzenia immunologiczne spowodowane niedoborem enzymu ADA (deaminazy adenozynej).

### VIII.7. Produkty otrzymane z rekombinowanego DNA znajdujące się na rynku i w produkcji

Tabela 6 przedstawia białka rekombinowane, które są sprzedawane jako leki. Niewiele spośród tych leków było produkowanych metodami nierekombinacyjnymi, a tylko jeden (insulina) był dostępny w dużych ilościach. Jak widać, reprezentują one szeroki wachlarz substancji biologicznych, poczynając od hormonów i cytokin, poprzez enzymy i regulatory krzepnięcia krwi, po szczepionki i przeciwciała.

Zgodnie z danymi, pochodzącymi z różnych źródeł, zaawansowane badania kliniczne przechodzi obecnie około 150 nowych białek, a około stu z nich to całkiem nowe substancje farmaceutyczne, nie mające żadnych prekursorów w terapii medycznej. Wiele z nich to rodziny cytokin, lecz reprezentowane są także hormony, białka przeciwkrzepliwie, przeciwciała i szczepionki. Niektóre z białek są zmodyfikowanymi wersjami białek naturalnych lub zaprojektowanymi białkami chimerycznymi.

Tabela 6

Leki będące rekombinowanymi białkami, dostępne na rynku [wg 1, 9, 13, 14, 15, 18, 20 i 21]

Substancja czynna	Preparat	Rodzaj	Wskazanie	Wprowadzenie
insulina	Insuman (Humulin)	hormon	cukrzyca	1982
insulina lispro	Humalog	hormon	cukrzyca	1996
glukagon	GlukaGen	hormon	hipoglikemia	1993
hormon wzrostu II generacja hormonu wzrostu (bez metioniny)	Genotropin  Nutropin	hormon	zaburzenia wzrostu	1985  1994
folitropina $\alpha$	Gonal-F	hormon	leczenie niepłodności	1996
folitropina $\beta$	Puregon	hormon	leczenie niepłodności	1996
interferon $\alpha$		cytokina	terapia raka	1986
interferon $\alpha_{2a}$	Roferon-A			
interferon $\alpha_{2b}$	Intron A (Bioferon)			
interferon $\alpha_{2c}$	Berofor			
interferon $\alpha_{N1}$	Wellferon			
interferon $\alpha_{con-1}$	Infergen		choroby wirusowe	1997
interferon $\beta_{1a}$	Avonex	cytokina	stwardnienie rozsiane	1996
interferon $\beta_{1b}$	Betaseron	cytokina	stwardnienie rozsiane	1993
interferon $\gamma$		cytokina	terapia raka	1990
interferon $\gamma_{1a}$	Biogamma		terapia raka	1992
interferon $\gamma_{1b}$	Imukin			
interleukina 2		cytokina	terapia raka	1989
czynnik wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF)	Neu-up (Nartograstim)	cytokina	leukopenia, terapia raka (po chemioterapii), AIDS	1994
lenograstim	Granocyte		leukopenia	
czynnik wzrostu kolonii granulocytów/makrofagów (GM-CSF)		cytokina	leukopenia, terapia raka, AIDS	1991
molgramostim	Leucomax		leukopenia	
filgrastim (G-CSF)	Neupogen	cytokina	leukopenia	
erytropoetyna		cytokina	anemia	1989
erytropoetyna $\alpha$	Eprex			
erytropoetyna $\beta$	Recormon			
aktywator plazminogenu		antytrombotyczny	tromboza	1987
tkankowy aktywator plazminogenu	Solclot (Duteplase)	antytrombotyczny	tromboza	1995
tkankowy aktywator plazminogenu	Retavase	antytrombotyczny	tromboza	1996
inhibitor trombiny	Refludan	antytrombotyczny	tromboza	1997
czynnik VIII	Recombinate	czynnik krzepnięcia	hemofilia A	1992
czynnik VIIa	NovoSeven	czynnik krzepnięcia	hemofilia A	1996
$\alpha$ -hANP	Hanp	peptyd	zawał serca	1996
$\alpha_1$ -antytrypsyna		inhibitor enzymu	niedobór $\alpha_1$ -antytrypsyny	1992
DNaza I	Pulmozyme (Dornase alfa)	enzym	mukowiscydoza	1994
glukocerebrozydaza	Cerezyme	enzym	choroba Gauchera	1994
szczepionka przeciw <i>hepatitis B</i>	H-B-Vax II	szczepionka	zapobieganie wirusowe- mu zapaleniu wątroby	1988

Ocenia się, że około 2 000 leków, opierających się na technologii genowej, białek i niebiałek, jest we wczesnej fazie badań. W dziedzinie leków niebiałkowych, nową obiecującą możliwością terapeutyczną stanowią tzw. cząsteczki antysensowe. Cząsteczki antysensowe to krótkie cząsteczki RNA lub DNA (albo zmodyfikowane ich wersje), które są komplementarne dla docelowego mRNA. Ponieważ, zgodnie z zasadą komplementarności, cząsteczki antysensowe mogą się wiązać ze swoimi celami, mogą też hamować translację białka. Cząsteczki antysensowe, aby były wydajne *in vivo*, muszą mieć zdolność wnikania do komórek i być stosunkowo trwałe. Te właściwości posiadają jedynie w pewnym stopniu. Dziś badania nad cząsteczkami antysensowymi są najbardziej zaawansowane w dziedzinie chorób wirusowych, ale cząsteczki te prawdopodobnie mogą znaleźć zastosowania także w przypadku wielu innych dziedzin chorób. Terapia antysensowa naśladuje efekt przzerwiania genów i dlatego może być konkurencyjna dla terapii genowej tam, gdzie celem jest inaktywacja genu. Jak już wspomniano, terapia genowa oferuje inne niż białkowe możliwości terapeutyczne, które – jak się przypuszcza – doprowadzą do powstania nowych leków, które prawdopodobnie w przyszłości całkowicie zastąpią białka (i inne leki). W tej chwili jest to być może tylko spekulacja. Niepodważalny jest jednak fakt, że podstawowe odkrycie dotyczące łączenia genów miało w stosunkowo krótkim czasie ogromny wpływ na efektywne poszukiwania nowych leków. Jak się wydaje, w najbliższym czasie wpływ ten nie będzie malał.

#### VIII.8. Podstawowe pojęcia stosowane w technologii genowej [wg 4, 7, 8 i 21]

<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	bakterie wykorzystywane w systemie wektorowym do wprowadzania rekombinowanych fragmentów DNA do komórek roślinnych
<b>Allel</b>	jedna z dwóch lub więcej alternatywnych form genu
<b>Antykodon</b>	sekwencja trzech zasad umożliwiająca rozpoznawanie kodonów
<b>Antykodon (na przykład) treoniny</b>	3'-UGC-5'
<b>Bakteriofagi</b>	wirusy infekujące bakterie
<b>Biblioteka cDNA</b>	zbiór genów w postaci odcinków cDNA połączonych z cząsteczkami wektora, nie zawiera intronów
<b>Biblioteka genomowa</b>	zbiór odcinków DNA odpowiadających całemu genomowi danego organizmu (komórki), połączonych z cząsteczkami wektorów DNA powiązane z białkami występującymi w chromosomach eukariotów
<b>Chromatyna</b>	odpowiadające sobie chromosomy, pochodzące z gamety męskiej i żeńskiej, w komórkach diploidalnych
<b>Chromosomy homologiczne</b>	proces wymiany odcinków DNA między dwoma homologicznymi cząsteczkami DNA bądź chromatydami homologicznych chromosomów, następujący w wyniku rekombinacji uprawnionej
<b>Crossing over</b>	
<b>Delecja</b>	wypadnięcie odcinka DNA lub chromosomu
<b>Duplikacja</b>	podwojenie sekwencji nukleotydowej w DNA, odpowiadającej jednemu genowi lub jakiegokolwiek innej, dłuższej bądź krótszej sekwencji
<b>Egzonukleazy</b>	enzymy degradujące kwasy nukleinowe od końca 5' lub 3' łańcucha

<b>Ekspresja genu</b>	wytwarzanie produktu genu, czyli polipeptydu, w wyniku transkrypcji i translacji, lub RNA – w wyniku jedynie transkrypcji
<b>Endonukleazy</b>	enzymy atakujące łańcuchy kwasów nukleinowych wewnątrz łańcucha polinukleotydowego
<b>Epitop</b>	determinanta antygenowa
<b>Eukarioty</b>	organizmy zbudowane z komórek posiadających obłonione jądro (zawierające chromosomy) oraz odrębne obłonione organelle komórkowe, jak mitochondria czy plastydy, zawierające własny organellarny DNA; należą do nich wszystkie organizmy z wyjątkiem bakterii i sinic
<b>Fenotyp</b>	zespół właściwości morfologicznych, biochemicznych i wszelkich innych właściwości komórki lub organizmu, wynikający z współdziałania czynników dziedzicznych (genotypu), jak i czynników zewnętrznych, środowiskowych
<b>Gen supresorowy</b>	inaczej supresor, czyli gen znoszący efekty mutacji w innym nieallelicznym genie
<b>Genom</b>	całkowite DNA danego organizmu zawarte w komórce
<b>Homozygota</b>	organizm powstały z połączenia gamet o jednakowym składzie genetycznym
<b>Heterozygota</b>	organizm powstały z połączenia gamet o różnym składzie genetycznym
<b>Hybrydyzacja</b>	łączenie się jednoniciowego DNA z innym fragmentem (DNA lub RNA), w wyniku utworzenia komplementarnych par zasad
<b>Hybrydyzacja kwasów nukleinowych</b>	łączenie <i>in vitro</i> pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych (np. nici DNA z nicią RNA, pojedyncze nici DNA nie tworzące uprzednio jednej cząsteczki) w cząsteczki dwuniciowe; odbywa się dzięki formowaniu wiązań wodorowych między komplementarnymi nukleotydami z obu nici
<b>Hybrydyzacja Southerna</b>	procedura obejmująca etap kapilarnego przenoszenia (wsiakania) z żelu na filtr z nitrocelulozy lub błony nylonowej
<b>Southern blotting</b>	(w który wsiąkają – jak atrament w bibułę – fragmenty DNA) fragmentów rozdzielonych elektroforetycznie odcinków DNA; inkubacja filtru, na którym jest DNA z radioaktywną sondą, umożliwia wiązanie się sondy z fragmentami zawierającymi sekwencję do niej komplementarną i uwidocznienie ich położenia
<b>Immunocytochemiczne metody</b>	metody detekcji położenia lub stężenia określonych antygenów dzięki uwidocznionej barwnie reakcji antygen – przeciwciało
<b>Indukcja genu lub operonu</b>	proces uruchamiający ekspresję pojedynczego genu lub szeregu genów wchodzących w skład operonu
<b>Izoenzymy</b>	enzymy o tej samej lub zbliżonej funkcji i nieidentycznej strukturze aminokwasowej; kodowane są przez różne allele tego samego genu
<b>Klonowanie</b>	powielanie
<b>Konstruowanie biblioteki cDNA</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) izolowanie mRNA</li> <li>2) poddanie działaniu odwrotnej transkryptazy, w wyniku otrzymuje się komplementarne do nich nici DNA (cDNA)</li> <li>3) wstawienie cDNA do DNA wektorów plazmidowych lub wirusowych – powstaje biblioteka cDNA</li> </ol>

<b>Kodon</b>	sekwencja trzech nukleotydów w DNA lub mRNA, stanowiąca informację o wstawieniu jednego aminokwasu do łańcucha polipeptydowego podczas translacji
<b>Liza komórek</b>	dezintegracja błon i protoplastu komórek, powodowana różnymi czynnikami chemicznymi lub też w wyniku działania specyficznych enzymów wirusowych
<b>Mapa restrykcyjna</b>	mapa miejsc restrykcyjnych, określenie miejsc, które są przecinane przez specyficzne enzymy restrykcyjne
<b>Mirystylacja</b>	koniec N pewnych białek jest kotranslacyjnie acylowany resztą kwasu mirystynowego; na końcu N musi być wtedy glicyna; resztą w pozycji 5 jest zazwyczaj seryna lub treonina, a reszty 6 i 7 są zasadowe; donorem reszty acylowej w reakcji katalizowanej przez transferazę N-mirystoilu jest mirystoil-CoA
<b>mRNA</b>	matrycowe, informacyjne RNA – niesie specyficzną informację o budowie białka
<b>Mutacja</b>	zmiana informacji genetycznej komórki, organizmu lub wirusa
<b>Mutagen</b>	czynnik fizyczny lub chemiczny wywołujący mutację w DNA
<b>Northern-blotting</b>	przeniesienie, z zachowaniem wzorca rozdziału, rozdzielonych elektroforetycznie cząsteczek RNA na folię, w celu ich hybrydyzacji z sondą molekularną
<b>Nukleazy</b>	enzymy hydrolizujące (depolimeryzujące) kwas nukleinowy
<b>Organizmy transgeniczne</b>	organizmy wyższe (roślin i zwierząt), które włączyły do genomów swoich komórek obce DNA; DNA wprowadza się często za pomocą wektorów wirusowych lub np. wstrzykiwania DNA bezpośrednio do komórek
<b>Operator</b>	krótki odcinek DNA, do którego przyłącza się białko regulujące transkrypcję genów znajdujących się pod kontrolą promotora sąsiadującego z operatorem; operator jest jednym z elementów składowych operonu
<b>Operon</b>	zespół ułożonych szeregowo genów bakteryjnych (tzw. genów strukturalnych), podlegających wspólnej regulacji; geny strukturalne znajdują się pod kontrolą jednego promotora, ulegają transkrypcji łącznie
<b>PCR</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – ang. <i>polymerase chain reaction</i> ) – metoda <i>in vitro</i> umożliwiająca namnażanie bardzo małych próbek DNA; w próbówce, w ciągu kilku godzin replikuje się miliony razy konkretną sekwencję DNA; wykonanie – rozdziela się dwie nici DNA, podgrzewając roztwór → replikacja → podgrzewanie → replikacja po 20 cyklach 20 <sup>20</sup> cząsteczek o identycznej sekwencji z sekwencją cząsteczki wyjściowej
<b>Plazmid</b>	mała, kolistą cząsteczka DNA, która może się replikować w komórce bakterii; ograniczenia w wykorzystaniu plazmidów jako wektorów wynikają z maksymalnej wielkości fragmentu DNA, który może być efektywnie przenoszony przez plazmid (mniejszy niż 10 kb)



<b>Plazmid Ti</b>	specjalny plazmid Ti ( <i>tumor inducing</i> ) z <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , po „rozbrojeniu” służy jako wektor do wprowadzania genów do komórek roślinnych
<b>Polimeraza DNA</b>	używana w PCR – specjalna odporna na wysoką temperaturę polimeraza DNA (pochodzi z bakterii, których naturalnym środowiskiem są gorące źródła)
<b>Prenylacja</b>	wiązanie się białek do błon poprzez kowalencyjne wiązanie farnesyli (C15) lub geranylogeranyli (C20) z cysteiną końca karboksylowego; prenylacja nadaje związkowi charakter hydrofobowy
<b>Prokarioty</b>	bakterie i sinice, których komórki nie posiadają obłonionych jąder i organelli komórkowych; przedstawiają bardziej pierwotny poziom organizacji komórki niż organizmy eukariotyczne
<b>Regulatorowy gen</b>	gen kodujący białko represorowe (lub inne białko regulacyjne) kontrolujące ekspresję genu lub zespołu genów (operonu)
<b>Rekombinacja</b>	wymiana odcinków DNA metodą <i>crossing over</i> między dwoma cząsteczkami DNA lub dwoma chromatydami chromosomu; łączenie <i>in vitro</i> cząsteczek DNA różnego pochodzenia
<b>Replikacja DNA</b>	proces syntezy nowych łańcuchów DNA na matrycy, jaką stanowią stare łańcuchy DNA
<b>Represja</b>	proces wyłączania transkrypcji genów lub operonów w zjawiskach regulacji aktywności genów
<b>Represor</b>	białko kodowane przez gen regulatorowy, wiążące się z obszarem operatorowym w DNA
<b>RFLP</b>	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragment length polymorphism</i> ), wykorzystywany jest do określania stopnia pokrewieństwa różnych członków populacji
<b>RNA wirusy</b>	retrowirusy – wektory przenoszące fragmenty rekombinowanego DNA, syntetyzują na matrycy własnego RNA, za pomocą odwrotnej transkryptazy kopie DNA
<b>Sekwencja palindromowa</b>	komplementarne łańcuchy, czytane od przeciwnych końców mają identyczną sekwencję
<b>Sonda genetyczna</b>	komplementarny próbnik genetyczny, odcinek DNA lub RNA związany ze znacznikiem, umożliwiającym jego uwidocznienie (np. izotopem radioaktywnym bądź znacznikiem wykrywanym immunochemicznie), służący do wykrywania komplementarnych fragmentów DNA lub RNA
<b>Splicing (splajsing)</b>	proces wycinania intronów z pierwotnej nici RNA i sklejenia ze sobą sekwencji kodujących (egzonów)
<b>Starter</b>	primer; <b>w naturze</b> – krótkie odcinki RNA tworzone podczas replikacji przez enzym prymazę, niezbędne do rozpoczęcia działania replikazy DNA, w dalszych etapach replikacji są usuwane i zastępowane przez DNA; <b>w inżynierii genetycznej</b> – mogą to być na przykład krótkie odcinki DNA komplementarne do nici matrycowej, stosowane do namnażania określonych fragmentów DNA metodą PCR
<b>Supresja</b>	zjawisko znoszenia efektów mutacji genowej przez inną mutację, w tym samym lub innym genie
<b>Transdukcja</b>	przenoszenie odcinków DNA z jednej komórki do drugiej za pośrednictwem wirusów

<b>Transfekcja</b>	wprowadzenie egzogenego materiału genetycznego do komórki za pomocą wirusów
<b>Transferaza polinukleotydomowa</b>	enzym dołączający do końca cząsteczki DNA dodatkowe nukleotydy bez matrycy
<b>Transformacja</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– zmiana genetycznych właściwości komórki, spowodowana pobraniem DNA wyizolowanego z innej komórki i włączeniem go do aparatu genetycznego</li> <li>– wprowadzanie egzogenego materiału genetycznego do komórki za pomocą wektorów plazmidowych</li> </ul>
<b>Transkrypcja</b>	przepisywanie, kopiowanie informacji zawartej w jednym kwasie nukleinowym – DNA na inny kwas nukleinowy – RNA
<b>Transkrypt</b>	produkt transkrypcji odcinka DNA
<b>Transkryptaza odwrotna</b>	zależna od RNA polimeraza DNA, czyli enzym syntetyzujący komplementarny łańcuch DNA na matrycy RNA
<b>Translacja</b>	tłumaczenie, przetworzenie języka kwasów nukleinowych na język aminokwasów – według informacji mRNA jest syntetyzowane białko
<b>tRNA</b>	transportujący (przenośnikowy RNA) – bierze udział w kluczowym etapie translacji, tj. odszyfrowaniu kodu mRNA
<b>Tworzenie biblioteki banku genowego</b>	<p>ma na celu wydzielenie genu np. z organizmu człowieka; etapy:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) cięcie DNA za pomocą enzymu restrykcyjnego (powstaje populacja fragmentów DNA, różniaca się długością i zawartością informacji genetycznej, mająca jednak identyczne „lepkie końce”)</li> <li>2) cięcie DNA wektorów plazmidowych tym samym enzymem</li> <li>3) mieszanie w roztworze cząsteczek DNA dwóch rodzajów (ludzkich i plazmidowych)</li> <li>4) tworzenie się między komplementarnymi odcinkami DNA wiązań wodorowych</li> <li>5) enzym ligaza DNA łączy komplementarne końce (powstaje mieszanina rekombinowanych plazmidów, z których każdy zawiera inną sekwencję ludzkiego DNA)</li> <li>6) namnażanie rekombinowanych plazmidów w komórkach <i>E. coli</i> <ol style="list-style-type: none"> <li>a) wprowadzenie za pomocą transformacji rekombinowanych plazmidów do wrażliwych na antybiotyki komórek <i>E. coli</i>, w mieszaninie transformacyjnej należy zachować niski stosunek liczby plazmidów do liczby komórek, tak aby komórki tylko bardzo rzadko pobierały więcej niż jedną cząsteczkę plazmidu, część komórek w ogóle nie pobiera plazmidu</li> <li>b) hodowla komórek bakterii na pożywkę, która zawiera antybiotyk; rosną komórki, które pobrały plazmid, zawierający gen oporności na antybiotyk</li> <li>c) wysiewanie próbki bakteryjnej na stałe podłoże wzrostowe, jeśli zawiesina jest dostatecznie rozcieńczona, komórki wzrastają w postaci pojedynczych, oddzielonych od siebie kolonii; każda kolonia powstała z pojedynczej</li> </ol> </li> </ol>

	transformowanej komórki stanowi klon identycznych genetycznie komórek; w trakcie powstawania kolonii dochodzi do sklonowania specyficznej sekwencji ludzkiego DNA; następne najważniejsze zadanie to określenie, w której spośród kolonii został sklonowany konkretny, poszukiwany fragment DNA
<b>Wektor</b>	nośnik wyciętego DNA; jako wektory wykorzystywane są DNA bakteriofagów lub specjalne, małe, koliste cząsteczki DNA zwane plazmidami
<b>Wektor fagowy</b>	umożliwia przenoszenie fragmentów DNA o wielkości do 15 kb
<b>Wektory biologiczne</b>	np. plazmidy, wektory fagowe, rozbrojone wirusy
<b>Wektory niebiologiczne</b>	np. wstrzykiwanie DNA do jądra komórkowego; komórki posiadają zdolność pobierania DNA zaadsorbowanego na powierzchni kryształów fosforanu wapniowego
<b>Western blotting</b>	przeniesienie rozdzielonych elektroforetycznie białek z żelu na folię z zachowaniem wzorca rozdziału, w celu wykrycia tych cząsteczek, które reagują ze specyficzną surowicą

## Literatura

### Opracowano na podstawie:

1. N. Din, J.G.L. Petersen, H. Dalbøge, S. Carlsen: *Gene Technology in Pharmaceutical Research and Production*, w: *A Textbook of Drug Design and Development*, edited by P. Krosggaard-Larsen, T. Liljefors, U. Madsen, Copyright © 1996 OPA (Overseas Publishers Association) Amsterdam B.V., Harwood Academic Publishers, 1996, 131–155.

oraz

2. A. Chmiel: *Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996.
3. P. Węgleński: *Genetyka molekularna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
4. Z. Porwit-Bóbr: *Mały słownik terminów stosowanych w genetyce molekularnej*, Wydawnictwo „Księgarni Akademickiej”, Kraków 1992.
5. *Inżynieria genetyczna*, w: E.P. Solomon, L.R. Berg, D.W. Martin, C.A. Villee: *Biologia*, Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1998.
6. L. Zwierzchowski: *Biotechnologiczne wykorzystanie gruczołu mlecznego – perspektywy manipulacji genetycznych białkami mleka*, *Biotechnologia*, 1998, 2(41), 33–56.
7. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer: *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
8. W. Kofta: *Podstawy inżynierii genetycznej*, Wyd. Prószyński i S-ka, Warszawa 1997.
9. M. Sanak: *Podstawy medycyny molekularnej*, *Medycyna Praktyczna*, 1998–1999, odcinki 1–10.
10. W.W. Gibbs: *Przeciwciała z roślin*, *Świat Nauki*, 1998, 1, 17.
11. W.H. Velander, H. Luboń, W.N. Drohan: *Transgeniczne zwierzęta jako fabryki leków*, tłum. L. Zwierzchowski, *Świat Nauki*, 1997, 3, 42–46.

12. J.E. Carey: *Molecular biology – a new route to drug discovery*, w: *Medicinal Chemistry: Principles and Practice*, ed. F.D. King, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 1994, 166–178.
13. *To Market, to market*, Annu. Rep. Med. Chem., 1992–1998.
14. *Genetic Engineering: Commercial Applications*, w: *Comprehensive Medicinal Chemistry*, ed. C.Hansch, 1990, t. I, 455–479.
15. J. Długoński: *Biotechnologia mikrobiologiczna*, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1997.
16. M. Buraczyńska, J. Hanzlik: *Zastosowanie technik zrekombinowanego DNA w chorobach układu krążenia. Krótki zarys metod badania zrekombinowanego DNA*, Pol. Merkuriusz Lek., 1996, 2, 139–142.
17. M. Buraczyńska, J. Hanzlik: *Zastosowanie technik zrekombinowanego DNA w chorobach układu krążenia. Zastosowanie analizy DNA w badaniach chorób układu krążenia*, Pol. Merkuriusz Lek., 1996, 2, 143–146.
18. M.C. Venuti: *The role of recombinant DNA technology in medicinal chemistry and drug discovery* w: *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*, wyd. 5, vol. 1: *Principles and practice*, ed. M.E. Wolff, wyd. John Wiley and Sons, 1995, 661–696.
19. G.R. Jacobson: *Posttranslational Control and Modification of Proteins*, w: *Biology of the Prokaryotes*, eds. J.W. Lengeler, G. Drews, H.G. Schlegel, wyd. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1999, 469–490.
20. I. Zündorf: *Gentechnisch hergestellte Arzneimittel. Von authentischen Proteinen zu Mutteinen und Chimären*, Pharmazeutische Zeitung, 1999, 22, 1763–1770.
21. U. Schulte: *Molekulare Medizin. Von der Therapie zur Verbesserung des Menschen?*, Deutsche Apotheker Zeitung, 1999, 139, 2125–2134.
22. B. Ziółkowska: *Hybrydyzacja in situ*, w: *Biomedycyna molekularna. XIV Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 1997*, red. I. Nalepa, R. Przewłocki, Instytut Farmakologii PAN, Kraków 1997, 93.
23. E. Dragon: *Reakcja łańcuchowa polimerazy*, tłum. M.Grynberg, Świat Nauki, 1998, 7, 88.

**CZĘŚĆ C. PRZYKŁADY OTRZYMYWANIA  
LEKÓW I GRUP LEKÓW**



# I. TECHNOLOGIA KWASU ACETYLOSALICYLOWEGO

## I.1. Wybrane zagadnienia

Spośród licznych pochodnych kwasu salicylowego wykazujących wielokierunkowe działanie farmakologiczne (przeciwgorączkowe, przeciwbólowe, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, przeciwbacze, antyseptyczne, żółciotwórcze), najdonioślejszym osiągnięciem było wprowadzenie do lecznictwa kwasu acetylosalicylowego (*acidum acetylsalicylicum*).

Kwas acetylosalicylowy (Aspirin, Polopiryna), mimo iż otrzymany w dość odległych czasach – po raz pierwszy przez Gerhardta (1853 r.), a później przez Krauta (1869 r.), wciąż znajduje się w ścisłej czołówce wśród sprzedawanych leków i należy do czołowych środków leczniczych w grupie niestereoidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), których liczba niustannie rośnie.

Kwas acetylosalicylowy, w zależności od dawki, działa przeciwbólowo (do 3g na dobę), przeciwzapalnie i przeciwgorączkowo (powyżej 4g na dobę). Mechanizm jego działania przeciwreumatycznego, podobnie jak wielu innych NLPZ, wiąże się z hamowaniem biosyntezy prostoglandyn poprzez hamowanie szlaku cyklooksygenazy.

Badania ostatnich lat nad farmakologią i biochemią tego kwasu, pozwoliły na wskazanie nowych możliwości jego stosowania w lecznictwie. Kwas ten ma – między innymi – działanie antyagregacyjne, co wykorzystuje się w leczeniu zakrzepicy naczyń krwionośnych. Można stosować go profilaktycznie przed zawałem mięśnia sercowego. W dawkach powyżej 6g na dobę hamuje syntezę protrombiny i wydłuża czas protrombinowy. Kwas acetylosalicylowy jest lekiem mało toksycznym (30–40g – dawka śmiertelna), jednak drażni stosunkowo silnie błonę śluzową żołądka, co wywołuje negatywne skutki, zwłaszcza u pacjentów z nadkwasotą. Również może wywołać uczulenie. Trzeba jednak stwierdzić, iż większość NLPZ, zwłaszcza z ugrupowaniem karboksylowym, drażni w różnym stopniu śluzówkę żołądka, stąd poszukiwanie nowych skutecznych połączeń w grupie NLPZ jest wciąż aktualne. Wadą kwasu acetylosalicylowego jest stosunkowo mała trwałość, co stwarza dodatkowe wymagania w odniesieniu do warunków jego przechowywania, jak i technologii postaci leków. Jego silnie drażniące działanie osłabia podawanie w postaci soli, m.in. sodowej, litowej, wapniowej, magnezowej, glinowej, z fenetydyną, mocznikiem i lizyną. Acetylosalicylan lizyny (Aspégic, Aspisol), z uwagi na rozpuszczalność w wodzie, stosowany jest pozajelitowo (dożylnie), m.in. w bólach pourazowych, pooperacyjnych, gośćcowych, w leczeniu przeciwzakrzepowym, kiedy doustne stosowanie kwasu acetylosalicylowego jest niemożliwe. Interesującym lekiem jest 4-N-acetyloaminofenolowa pochodna kwasu acetylosalicylowego (benorylat), który praktycznie nie rozkłada się w przewodzie pokarmowym (podanie doustne), natomiast pod wpływem esteraz krwi uwalnia dwa aktywne metabolity (kwas acetylosalicylowy i 4-N-acetyloaminofenol – paracetamol).

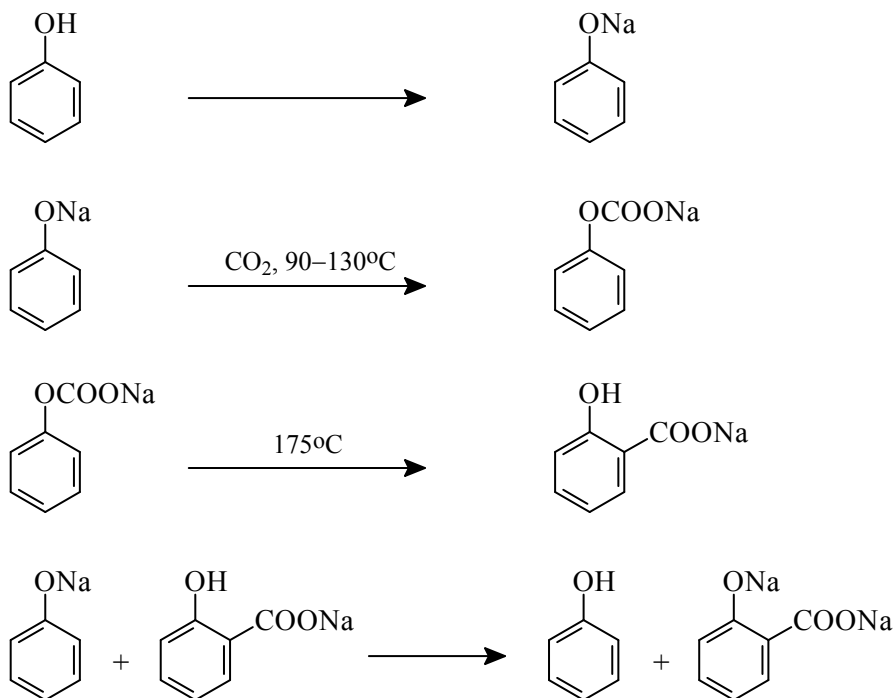
Na uwagę zasługuje również preparat, będący polimerem wodorotlenku glinowego i kwasu acetylosalicylowego, tzw. acetylosalicylan polioksyglinowy (aloksypryna, Superpyrin), który po podaniu doustnym, uwalnia kwas acetylosalicylowy w zasadowej treści jelit. Powyższe przykłady świadczą o ciągłym poszukiwaniu nowych pochodnych kwasu salicylowego (przykładem jest salsalat). Jednak dotychczas, mimo szeroko prowadzonych badań w tym kierunku i zaangażowania dużych środków finansowych, efekty są niewielkie.

W świetle powyższego wydaje się, że kwas acetylosalicylowy, dzięki swym szczególnym właściwościom, przynoszącym ulgę rzeszom chorych, będzie miał – jak dotychczas – znaczącą pozycję na rynku farmaceutycznym.

## I.2. Technologia kwasu salicylowego

Kwas salicylowy jest podstawowym substratem dla grupy środków leczniczych zwanych salicylanami, w tym kwasu acetylosalicylowego.

Kwas salicylowy otrzymuje się w reakcji substytucji elektrofilowej, jaką jest karboksylacja fenolu. Wprowadzenie grupy karboksylowej do fenoli prowadzi się metodą opracowaną przez Kolbego i Schmitta. Polega ona na wysyceniu bezwodnego fenolanu sodowego bezwodnikiem węglowym i przegrupowaniu wytworzonego węglanu fenylosodowego. Mechanizm reakcji polega na ataku ditlenku węgla, głównie na aktywną pozycję *orto* jonu fenolanowego. W przypadku odchylenia od wymaganych parametrów, przewidzianych dla tego procesu (ciśnienie, temperatura) dochodzi również do ataku w pozycji *para* bądź *orto* oraz *para* jonu fenolanowego; wówczas powstaje – odpowiednio – kwas 4-hydroksybenzoesowy i 4-hydroksyizoftalowy. Związki te, obok fenolu, stanowią istotne zanieczyszczenia w produkcji kwasu salicylowego. Stwierdzono, iż optymalną solą w procesie Kolbego-Schmitta byłby fenolan litu, z uwagi na promień jonowy kationu litu. W przypadku zastosowania tej soli, można praktycznie wyeliminować powstawanie kwasu 4-hydroksybenzoesowego.



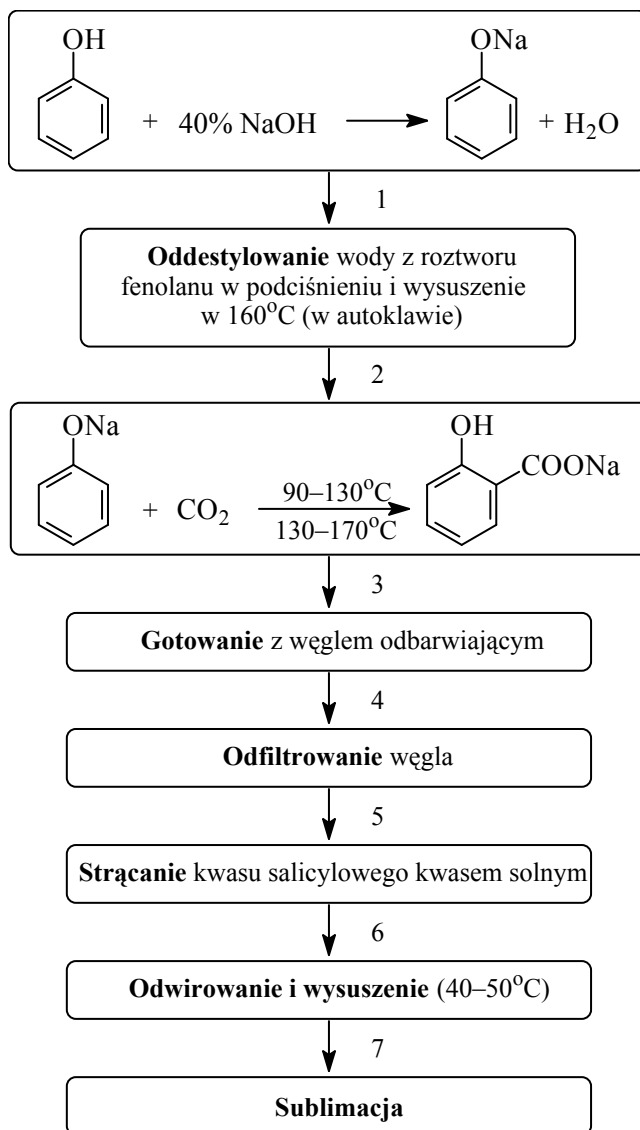
Rys. 1. Przebieg syntezy kwasu salicylowego [wg L. Kuczyński: *Technologia leków*, WNT, 1971]



Proces syntezy kwasu salicylowego można podzielić na następujące etapy:

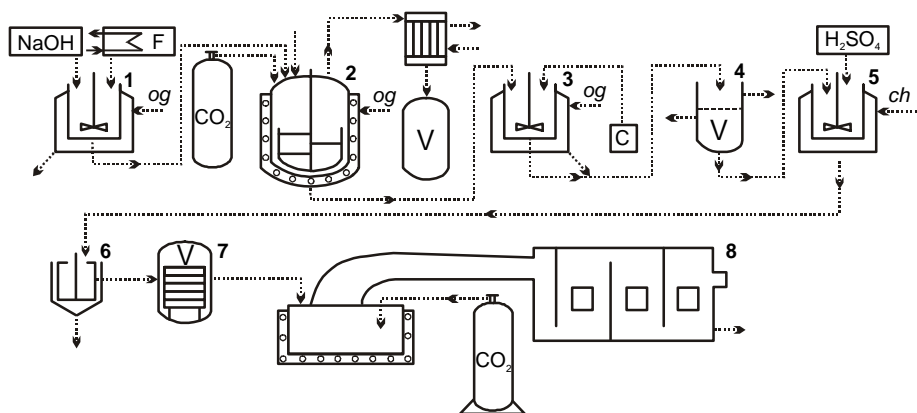
- 1) otrzymanie bezwodnego fenolanu sodowego,
- 2) wysycenie ditlenkiem węgla bezwodnego fenolanu sodowego i przegrupowanie powstałego węglanu fenylosodowego,
- 3) wydzielenie surowego kwasu salicylowego,
- 4) oczyszczenie kwasu salicylowego.

Przebieg reakcji oraz schemat produkcji kwasu salicylowego przedstawiono na rys. 1–3.



1 – roztwór fenolanu sodowego, 2 – suchy fenolan sodowy, 3 – mieszanina po karboksylowaniu, 4 – mieszanina po oczyszczeniu, 5 – oczyszczony roztwór salicylanu sodowego, 6 – oczyszczony i wytrącony kwas salicylowy, 7 – suchy kwas salicylowy do sublimacji

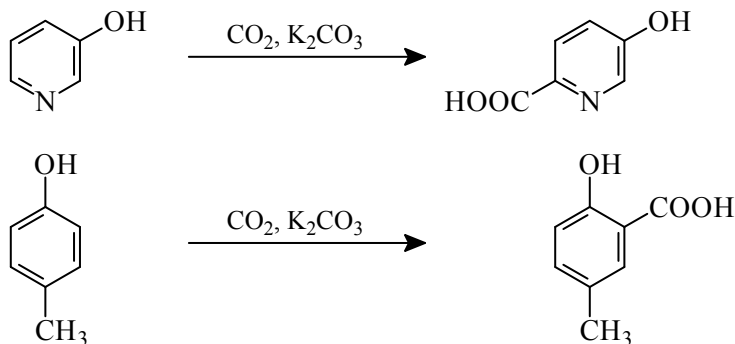
Rys. 2. Skrócony schemat produkcji kwasu salicylowego [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]



1 – mieszalnik do rozpuszczania fenolu w roztworze NaOH, 2 – autoklaw, 3 – mieszalnik do oczyszczania roztworu salicylanu sodowego, 4 – filtr próżniowy, 5 – aparat do wytrącania kwasu salicylowego, 6 – wirówka, 7 – suszarnia próżniowa, 8 – aparat do sublimacji kwasu salicylowego; ch – chłodzenie, og – ogrzewanie, C – węgiel aktywny, F – fenol

Rys. 3. Schemat produkcji kwasu salicylowego [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

Z ważniejszych związków o charakterze fenolowym, ulegających z dobrą wydajnością karboksylowaniu, należy wymienić: krezole, naftole i ich homologi, fenole wielowodorotlenowe, chlorowcofenole, aminofenole, hydroksypochodne bifenylu, hydroksypochodne pirydyny i hydroksypochodne chinoliny. Na przykład:



Bezwodny fenolan sodowy otrzymuje się przez dokładną neutralizację czystego fenolu 40% roztworem NaOH z dodatkiem siarczanu (IV) sodu, w celu przeciwdziałania utlenianiu fenolanu sodowego. Proces ten prowadzi się w kotle z mieszadłem i płaszczem grzejnym. Następnie uzyskany roztwór fenolanu sodowego wprowadza się do autoklawu ogrzewanego systemem Frederkinga. Autoklaw jest zaopatrzony w silne mieszadło, a jego konstrukcja pozwala na jednoczesne rozdrabnianie suchego fenolanu. Przez stopniowe ogrzewanie pozbawia się go wody, najpierw pod normalnym, a potem pod zmniejszonym ciśnieniem, w temp. 130°C. W końcu resztę wody usuwa się w temp. 16°C, uzyskując suchy rozdrobniony fenolan sodowy. Wreszcie zawartość autoklawu chłodzi się do temp. 90°C przez przepuszczenie zimnej wody przez węzownicę Frederkinga i wprowadza z kolei suchy CO<sub>2</sub> pod ciśnieniem, początkowo 2 atm, później – 6 atm. Zachodzi szybka absorpcja CO<sub>2</sub> z wydzielaniem ciepła. Temperaturę w autoklawie utrzymuje się początkowo na poziomie

ok. 100°C, przez chłodzenie wodą, a następnie pozwala się jej wzrosnąć do 130°C. Po całkowitym wysyceniu CO<sub>2</sub>, zawartość autoklawu ogrzewa się powoli, w ciągu 1,5 godziny – do temp. 175°C. Zachodzi wtedy przegrupowanie węglań fenylsodowego do salicylanu sodowego. Ciśnienie wzrasta w autoklawie do 8 atm. Powoli otwiera się zawór autoklawu połączony z chłodnicą, chłodzoną wodą w temp. 40°C, którym uchodzi CO<sub>2</sub> razem z fenolem powstającym w reakcji ubocznej, zachodzącej między salicylanem sodowym i nieprze-reagowanym fenolanem sodowym.

Resztę fenolu, który powstaje w ilości 8–10%, usuwa się przez włączenie pompy próżniowej. Po usunięciu fenolu wprowadza się do autoklawu gorącą wodę. Roztwór przetłacza się do emaliowanego kotła z mieszadłem oraz płaszczem grzejnym i oczyszcza przez gotowanie z węglem aktywnym, po czym – w celu pozbycia się węgla oraz zanieczyszczeń – filtruje się przez filtr kulisty do otwartego kotła emaliowanego z mieszadłem i zakwasza kwasem solnym (bez Fe<sup>3+</sup>). Wydzielony kwas salicylowy odwirowuje się w wirówce i suszy w suszarni. Po zmieleniu uzyskuje się techniczny kwas salicylowy, który oczyszcza się zwykle przez sublimację.

Sublimację prowadzi się w aparaturze (rys. 4), składającej się z dwóch zasadniczych części :

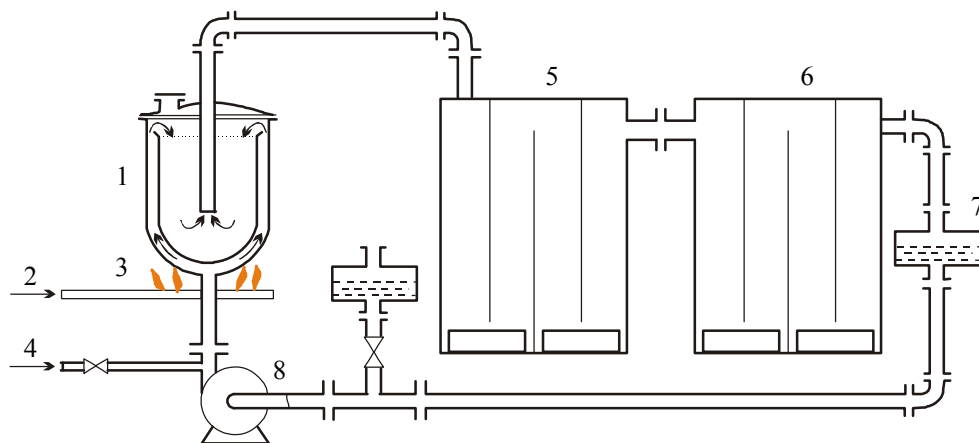
- 1) kotła sublimacyjnego,
- 2) odbieralnika oraz urządzeń pomocniczych, służących do ogrzewania kotła i do chłodzenia odbieralnika.

Aparatura połączona jest z pompą próżniową.

Kocioł sublimacyjny powinien:

- 1) mieć dużą powierzchnię parowania,
- 2) ogrzewać równomiernie za pomocą płaszcza olejowego lub parowej wężownicy Frederkinga.

Najczęściej jest to kocioł o dużej średnicy, połączony z odbieralnikiem rurą o dużym przekroju, aby nie zatykała się sublimatem. Kocioł ten jest zaopatrzony w mieszadło i może mieć dodatkowe urządzenia do wprowadzania obojętnego gazu nad powierzchnię sublimacyjną.



1 – kocioł sublimacyjny, 2 – doprowadzenie gazu, 3 – palnik gazowy, 4 – doprowadzenie CO<sub>2</sub>,  
5, 6 – komory chłodnicze, 7 – filtr, 8 – wentylator

Rys. 4. Urządzenie do sublimacji kwasu salicylowego [wg L. Kuczyński: *op. cit.*]

Strumień gazu obojętnego, bardzo często powietrze lub dwutlenek węgla, przyspiesza znacznie sublimację. Odbieralnik ma zwykle kształt dużej komory o objętości kilkakrotnie przewyższającej objętość kotła. W komorze, która może być w razie potrzeby chłodzona z zewnątrz wodą, są umieszczone przegrody dla zmiany kierunku przepływu gazów. Sublimat osadza się na ściankach komory; po skończeniu sublimacji jest zdrapowany ze ścian i usuwany przez drzwiczki, szczelnie zamykane w czasie trwania sublimacji.

Przez sublimację oczyszcza się, między innymi, kamforę, pirogalol, kwas benzoowy i salicylowy. Dobre wyniki osiąga się przy sublimacji kwasu salicylowego w urządzeniu przedstawionym na rys. 4. Kwas salicylowy ładuje się do kotła sublimacyjnego na sito w warstwie o grubości kilku centymetrów. Kocioł zaopatrzony w podwójne dno jest ogrzewany gazem. Powietrze, zasysane wentylatorem poprzez filtr, przechodzi przez podwójne dno kotła do góry, przeciska się przez warstwę kwasu salicylowego, i unosząc ze sobą sublimat, przechodzi szerokim kanałem do komór z przegrodami, na których osadza się kwas salicylowy. Powietrze przechodzi dalej przez filtr zatrzymujący porwany pył i rurą dochodzi z powrotem do wentylatora. Powietrze rozcieńcza się ditenkiem węgla, doprowadzonym osobną rurą (w celu zapobieżenia ewentualnym wybuchom pyłu kwasu salicylowego, jakie zdarzały się w niektórych fabrykach).

### **I.3. Kwas acetylosalicylowy – przegląd i ocena technicznych metod otrzymywania kwasu acetylosalicylowego, odpowiadającego wymogom farmakopealnym**

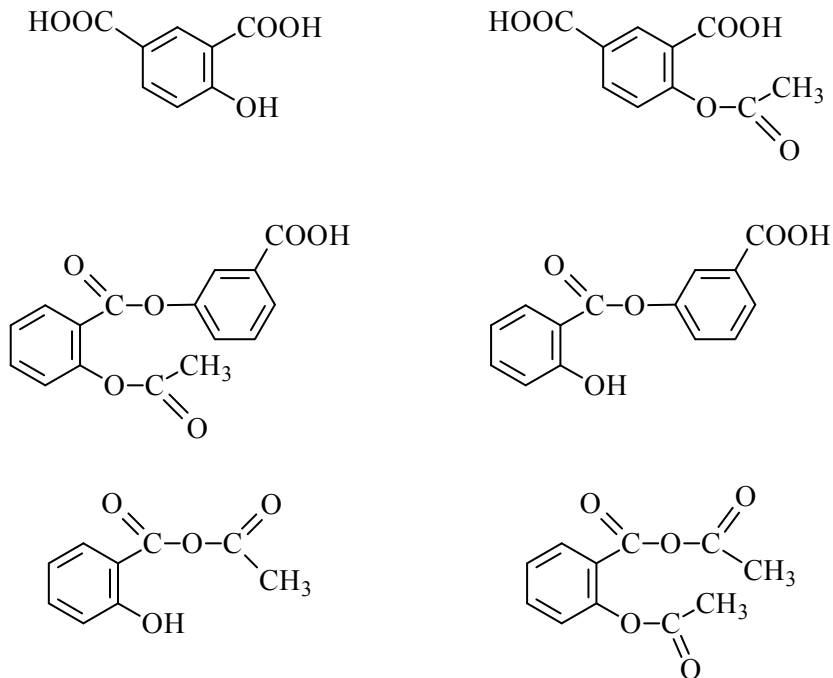
Kwas acetylosalicylowy otrzymuje się najczęściej w reakcji kwasu salicylowego z bezwodnikiem octowym. Publikacje i patenty omawiające tę reakcję zalecają prowadzenie jej w niskich temperaturach, stosowanie dużych nadmiarów bezwodnika oraz katalizatorów, takich jak kwas siarkowy, pirydyna lub kwas fosforowy. Dla ułatwienia przebiegu reakcji i późniejszej krystalizacji zaleca się rozcieńczanie środowiska kwasem octowym, bezwodnikiem octowym, benzenem, toluenem, ligroiną, a nawet naftą. Jednak bezpośrednie otrzymanie produktu farmakopealnego w odpowiedniej postaci krystalicznej, pozbawionego zanieczyszczeń, mimo stosowania najrozmaitszych technik prowadzenia procesu acetylacji, jest bardzo trudne i wymaga dodatkowej krystalizacji. Zwykle otrzymuje się zanieczyszczony kwas acetylosalicylowy, który – w zależności od parametrów wykończeniowych, tj. sposobu krystalizacji, suszenia itp. – posiada temperaturę topnienia w granicach 125–136°C.

#### **I.3.1. Zanieczyszczenia kwasu acetylosalicylowego – przyczyny obniżonej temperatury topnienia**

Dla określenia zanieczyszczeń kwasu acetylosalicylowego powstającego w procesie produkcyjnym posługuje się zwykle metodami chromatograficznymi. Badane próbki kwasu acetylosalicylowego, obok głównego zanieczyszczenia, jakim jest kwas salicylowy, mogą zawierać także produkty uboczne, takie jak wspomniane wcześniej kwasy: 4-hydroksybenzoowy, czy też 4-hydroksyizoftalowy i jego acetylową pochodną, kwas acetylosalicylosalicylowy bądź salicylosalicylowy, czy też bezwodnik salicylooctowy, bądź acetylosalicylooctowy (rys. 5).

Gdy krystalizację kwasu acetylosalicylowego prowadzono stosując odpowiednie alkohole, takie jak metanol czy etanol, stwierdzono powstawanie odpowiednich estrowych pochodnych kwasu acetylosalicylowego. Trzeba podkreślić, iż w wyniku krystalizacji najczęściej uzyskuje się jedynie poprawę wyglądu zewnętrznego, bez znacznego zwiększenia chemicznej czystości. Często zdarza się, że produkt po krystalizacji posiada więcej zanieczyszczeń i niższą temperaturę topnienia aniżeli przed krystalizacją. Wiąże się to, między

innymi, z łatwo zachodzącym w czasie ogrzewania rozkładem kwasu acetylosalicylowego i możliwością powstawania wymienionych wcześniej pochodnych.



Rys. 5. Produkty uboczne towarzyszące syntezie kwasu acetylosalicylowego [wg 3 i 4]

### I.3.2. Wpływ zawartości kwasu salicylowego na temperaturę topnienia kwasu acetylosalicylowego

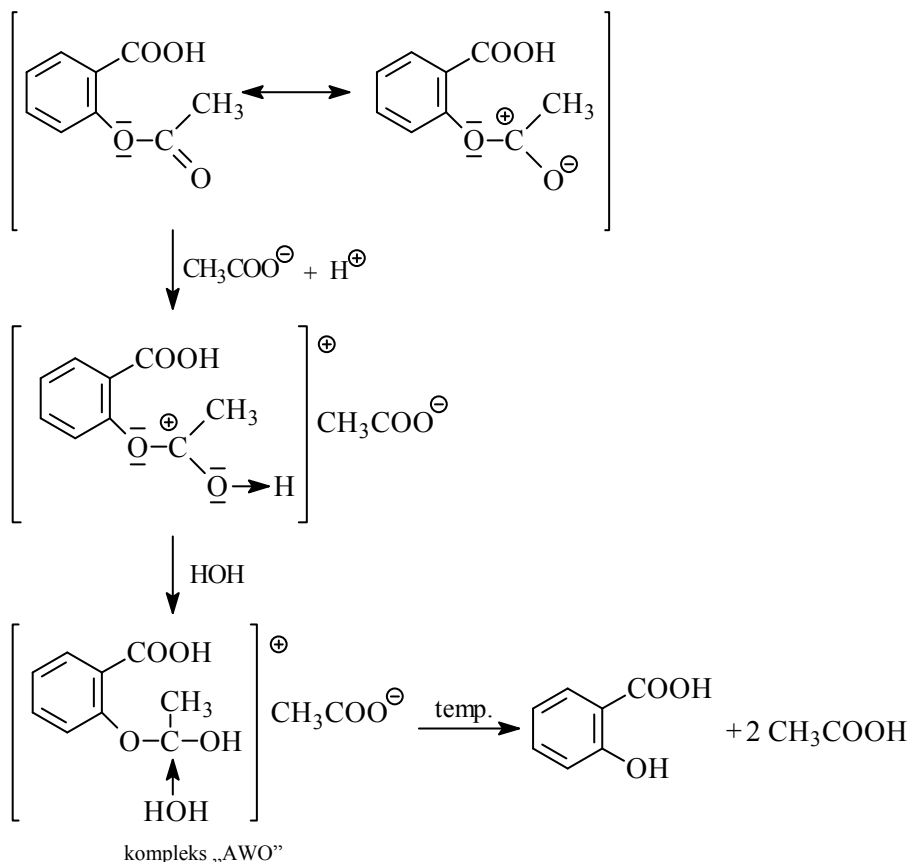
Temperatura topnienia jest wielkością fizyczną, która charakteryzuje daną substancję. Depresja temperatury topnienia związana jest z odpowiednią zawartością zanieczyszczeń w badanej próbce i często głębokość depresji jest proporcjonalna do ilości zanieczyszczeń. W przypadku kwasu acetylosalicylowego zanieczyszczony kwasem salicylowym temperatura topnienia nie jest wyznacznikiem stopnia czystości, ponieważ stwierdzono, iż początkowo każde 0,05% kwasu salicylowego w mieszaninie z kwasem acetylosalicylowym obniża temperaturę topnienia próbki o około 1°C. Przy dalszym wzroście zawartości kwasu salicylowego spadek ten stopniowo maleje i od pewnego momentu następuje powrotne podnoszenie się temperatury, tak iż próbki o zawartości około 15% i 50% posiadają podobne przedziały temperatur topnienia. Ponieważ otrzymany z reakcji produkt, po odsączeniu ługów pokryształicznych, może zawierać nie więcej niż ok. 0,05% kwasu salicylowego, można wnioskować, że – przy nieobecności innych zanieczyszczeń – zagadnienie otrzymywania kwasu acetylosalicylowego o temperaturze topnienia (135–137°C) sprowadza się przede wszystkim do usunięcia kwasu salicylowego z produktu poniżej 0,05% zawartości tego kwasu.

Można to spowodować przez przemywanie lodowatym kwasem octowym, wodnymi roztworami kwasu octowego, benzenem, ligroiną lub wodą. Woda, która w procesie produkcyjnym jest najbardziej ekonomicznym i dostępnym rozpuszczalnikiem, przez wiele lat była pomijana, bowiem sądzono, iż wywiera działanie hydrolityczne, w wyniku czego

następuje rozkład kwasu acetylosalicylowego. Stwierdzono, iż produkty przemywane wodą, podobnie jak i roztworami kwasu octowego, posiadały zbyt niskie temperatury topnienia. Mimo całkowitego usunięcia kwasu salicylowego przy przemywaniu, pojawiał się on ponownie po wysuszeniu, a nawet w tabletkach, co dyskwalifikowało produkt jako lek. Bliższe badania wykazały, iż hydrolityczne działanie wody, szkodliwe dla operacji przemywania kwasu acetylosalicylowego, następuje tylko w przypadku niedostatecznego odmycia produktu od kwasu octowego, powstającego w trakcie acetylacji kwasu salicylowego.

Gdy przemywanie wodą surowego kwasu acetylosalicylowego prowadzi się tak długo, aż pH przesącza osiągnie wartość powyżej 4, wówczas nie obserwuje się hydrolitycznego działania wody. Z teoretycznego punktu widzenia za wspomniany rozkład w czasie suszenia, a nawet w gotowych formach leku (np. tabletki) przemywanego wodą kwasu acetylosalicylowego, odpowiedzialne są jony wodorowe, pochodzące przede wszystkim od kwasu octowego, które przyłączają się do atomu tlenu spolaryzowanego wiązania C=O.

Koordynacyjne przyłączenie wody do karbokationu prowadzi do powstania połączenia określonego w literaturze kompleksem „AWO”, który – na przykład w trakcie suszenia lub dłuższego przechowywania – rozkłada się do kwasu salicylowego, dającego z kwasem acetylosalicylowym spadek temperatury topnienia (rys. 6).



Rys. 6. Hydrolityczny rozkład kwasu acetylosalicylowego [wg 4]

### I.3.3. Przegląd i ocena technicznych metod krystalizacji kwasu acetylosalicylowego – problem polimorfizmu

Jak już wspomniano, kwas acetylosalicylowy otrzymany wprost ze środowiska reakcji zwykle nie odpowiada stawianym mu wymaganiom pod względem czystości i formy krystalicznej. Spośród stosowanych w technice sposobów oczyszczenia kwasu acetylosalicylowego wymienia się krystalizację, między innymi, z mieszaniny benzenu i 20–60% bezwodnika octowego (w metodzie tej dochodzi do izomeryzacji kwasu acetylosalicylowego do bezwodnika salicylooctowego), z benzenu, tetrachlorku węgla. W firmie Alpine Chemische Werke Kufstein stosowano metanol, naftę lub kwas octowy. Stosowanie metanolu lub benzenu, a także chlorku etylenu, dioksanu z dodatkiem chloroformu zalecają również patenty niemieckie i amerykańskie. Stosowanie powyższych rozpuszczalników do krystalizacji ma sens wówczas, gdy poddaje się krystalizacji produkt o względnie wysokiej czystości. W przypadku bardziej zanieczyszczonego produktu krystalizację należy powtarzać kilkakrotnie, co podraża koszty produkcji. Należy nadmienić, iż przy próbach krystalizacji z wysokoprocentowych lub bezwodnych alkoholi zaobserwowano również, zachodzącą częściowo, estyfikację kwasu acetylosalicylowego i powstającego z rozkładu kwasu salicylowego.

Szeroko zakrojone badania doprowadziły do stwierdzenia istnienia kilku odmian polimorficznych kwasu acetylosalicylowego, co ma doniosłe znaczenie dla jego dostępności biologicznej. Wiadomo, iż najbardziej trwała (stabilna) odmiana polimorficzna ma zwykle najwyższą temperaturę topnienia i najmniejszą rozpuszczalność. Między krańcowymi odmianami polimorficznymi, stwierdzono 50% różnicę w rozpuszczalności, co wpływa m.in. na szybkość wchłaniania. Tak więc otrzymanie kwasu acetylosalicylowego w odpowiedniej odmianie polimorficznej (odmiana bezpostaciowa jest z reguły lepiej rozpuszczalna niż odmiana krystaliczna) jest pewnym dodatkowym utrudnieniem w procesie technologicznym.

Badania mikroskopowe kryształów kwasu acetylosalicylowego, otrzymywanych w różnych warunkach i z różnych rozpuszczalników przekonały, jak już wspomniano, o istnieniu kilku form krystalicznych, z których dwie zasadnicze to forma „płytkowo-brylasta” – powstająca w rozpuszczalnikach polarnych (kwas octowy, bezwodnik octowy, octan etylu, metanol itp.) i forma „słupowo-iglasta” – wydzielająca się na ogół z rozpuszczalników o małej stałej dielektrycznej (benzen, chlorek etylenu, trichloroetan itd.). Stwierdzono ponadto, że rozpuszczalniki polarne lepiej rozpuszczają i izolują zanieczyszczenia (inhibitory) krystalizacji kwasu acetylosalicylowego.

Dobre wyniki przy krystalizacji kwasu acetylosalicylowego uzyskuje się, stosując mieszaninę dwóch rozpuszczalników o różnej polarności (10–20% lodowatego kwasu octowego i 80–90% węglowodoru lub jego chlorowcopochodnej). Omawiając otrzymywanie odpowiedniej odmiany krystalicznej, nie sposób nie wspomnieć o samym procesie chłodzenia mieszaniny reakcyjnej lub roztworu krystalizowanego kwasu acetylosalicylowego. Według niektórych autorów chłodzenie powinno zaczynać się z szybkością 3–12°C na godzinę, a np. w przedziale temperatury 15–10°C odbywać się z szybkością 5°C na 3 godziny.

Podsumowując, można stwierdzić, iż pozornie prosty proces acetylacji kwasu salicylowego do kwasu acetylosalicylowego, odpowiadającego wymogom farmakopealnym kryje wiele niespodzianek.

### Literatura

1. L. Kuczyński: *Technologia leków*, WNT, Warszawa 1971.
2. T. Tkaczyński, D. Tkaczyńska: *Synteza i technologia chemiczna leków*, PZWL, Warszawa 1984.

3. Z. Brzozowski: *Krystalizacja kwasu acetylosalicylowego*, *Farmacja Polska*, 1958, 7, 97.
4. Z. Brzozowski: *Przyczyny obniżania się temperatury topnienia kwasu acetylosalicylowego i celowość jej oznaczania*, *Farmacja Polska*, 1959, 12, 314.
5. A. Szczeklik, R.J. Gryglewski, J.R. Vane: *Eicosanoids, Aspirin and Asthma*, ed. Mariel Dekker, Inc., New York – Basel – Hong Kong 1998, vol. 114.
6. A. Zejc, M. Gorczyca: *Chemia leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.



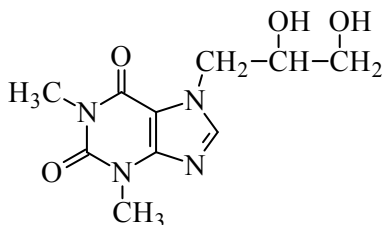
## II. PRZEMYSŁOWE METODY SYNTEZY KSANTYN

Wielokierunkowość działania naturalnych metyloksantyn (teofiliny, teobrominy i kofeiny) i ich syntetycznych pochodnych o zmodyfikowanej strukturze zapewniła tej grupie środków leczniczych ważne miejsce we współczesnej farmakoterapii.

Śśród ok. 20 leków o strukturze metyloksantyn, w Polsce produkuje się: diprofilinę, nikotynian ksantynolu (Sadamin), pentoksyfilinę (Polfilin) i aminofilinę.

Poniżej omówiono metody syntezy diprofiliny i nikotynianu ksantynolu, z uwzględnieniem otrzymywania produktów wyjściowych.

### II.1. Synteza diprofiliny



diprofilina

7-(2',3'-dihydroksypropilo)-teofilina

Diprofilina działa rozszerzająco na naczynia wieńcowe, naczynia mózgu i nerek, pobudza ośrodek rdzenia przedłużonego, obniża ciśnienie krwi, rozszerza oskrzela, działa łagodnie moczopędnie. Stosowana jest doustnie i doodbytniczo w dychawicy oskrzelowej, przewlekłych chorobach oskrzelowo-płucnych, chorobie wieńcowej, niewydolności krążenia.

#### II.1.1. Metoda chloropropandiolowa

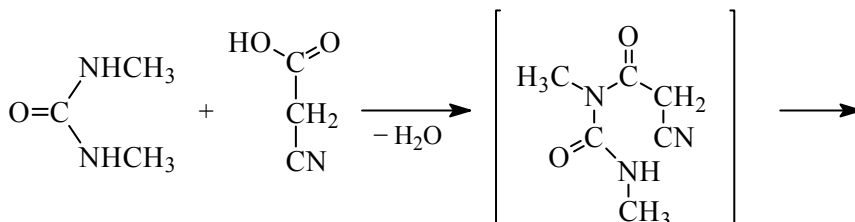
Surowce: teofilina, 1-chloro-2,3-propandiol, NaOH

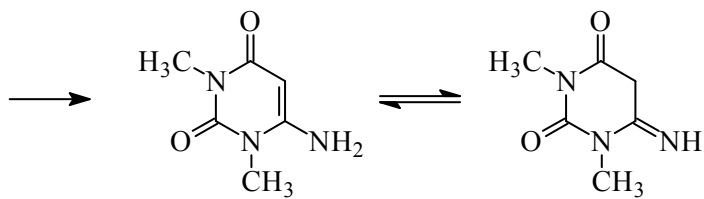
##### a) Teofilina

Teofilina występuje w liściach herbaty, ale pozyskiwanie jej z tego surowca jest nieoptyczne. Otrzymuje się ją w wyniku pełnej syntezy z prostych produktów wyjściowych: mocznika i kwasu cyjanooctowego lub metodami półsyntezy, przez modyfikację takich związków purynowych, jak np. kwas moczowy i kofeina.

- Metoda Traubego

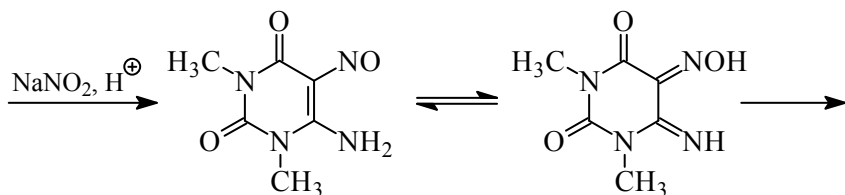
Metoda syntezy teofiliny została opracowana na początku tego stulecia przez Traubego i jest stosowana, po wprowadzeniu różnych modyfikacji, do dnia dzisiejszego:



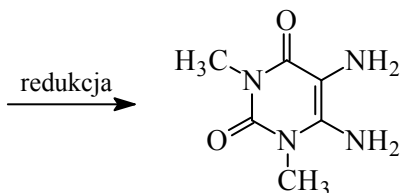


1,3-dimetylo-6-aminouracyl  
kwas 1,3-dimetylo-6-iminobarbiturowy

Kondensację prowadzi się za pomocą alkoholowego roztworu etoksyłanu sodu lub bezwodnika octowego. Następnie przeprowadza się nitrozowanie azotanem (III) sodu w roztworze kwaśnym i redukcję, np. żelazem, cynkiem w kwasie siarkowym (VI), siarczkiem sodu lub amonu w środowisku alkalicznym, hydrosulfitem lub elektrolitycznie.

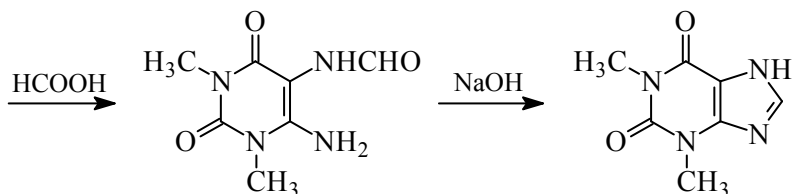


1,3-dimetylo-5-nitrozo-6-aminouracyl      kwas 1,3-dimetylo-6-iminowiolurowy



1,3-dimetylo-5,6-diaminouracyl

Po reakcji formylowania 50% kwasem mrówkowym i ogrzaniu formylowej pochodnej z ługiem następuje zamknięcie pierścienia imidazolu:

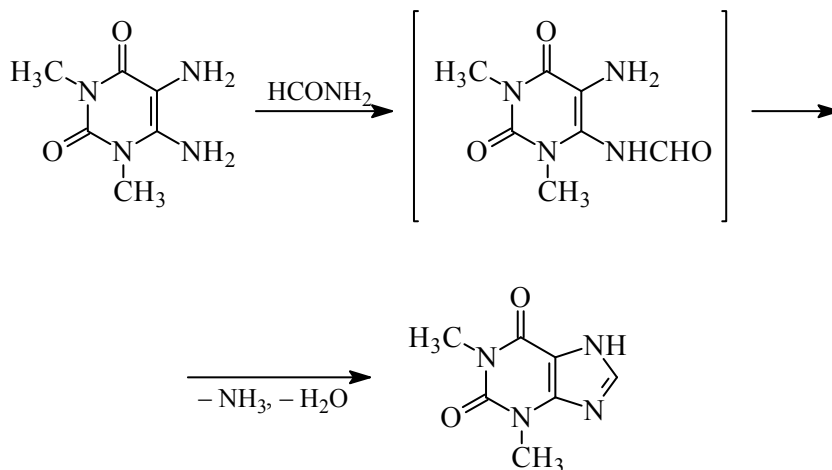


1,3-dimetylo-5-formyloamino-6-aminouracyl

teofilina

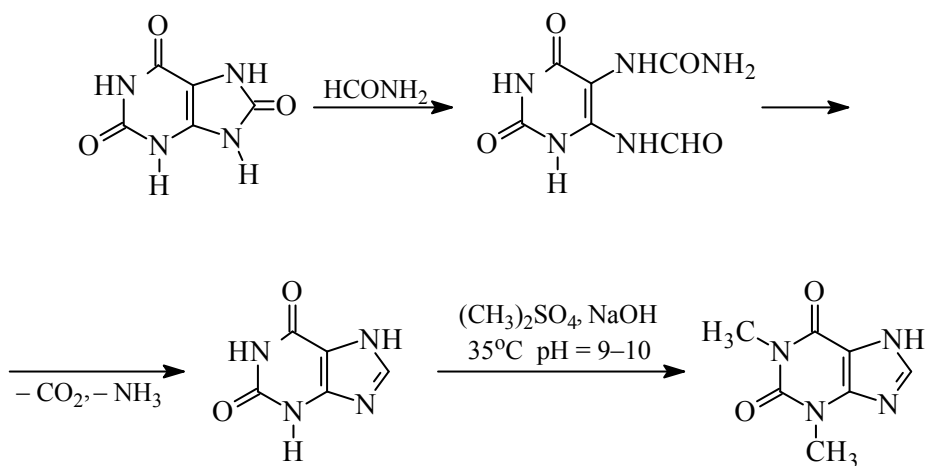
Jeżeli w syntezie stosuje się mocznik, a nie jego dimetylową pochodną, metylowanie odbywa się w trakcie syntezy: można metylować siarczanem dimetylu formylową pochodną lub 6-aminouracyl (metoda Bobrańskiego i Synowiedzkiego).

Bredereck opracował modyfikację syntezy Traubego, polegającą na zastosowaniu formamidu do jednoetapowej reakcji formylowania 1,3-dimetylo-5,6-diaminouracylu i cyklizacji do układu ksantyn.

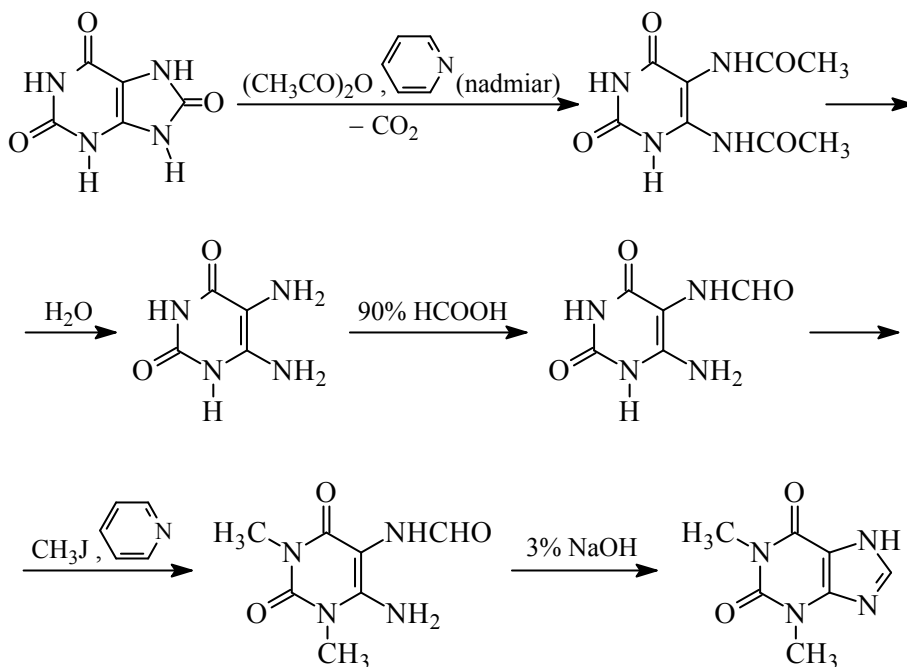


- Półsynteza teofiliny z kwasu moczowego

Kwas moczowy stanowi ostatni etap metabolizmu puryn, np. u ptaków. Ekskrementy ptaków (guano) zawierają 3–25% tego składnika, który łatwo można wyekstrahować rozcieńczonym roztworem alkaliów i wyodrębnić przez wytrącenie kwasem solnym. Ze 100 kg guana otrzymuje się 2–3 kg kwasu moczowego.

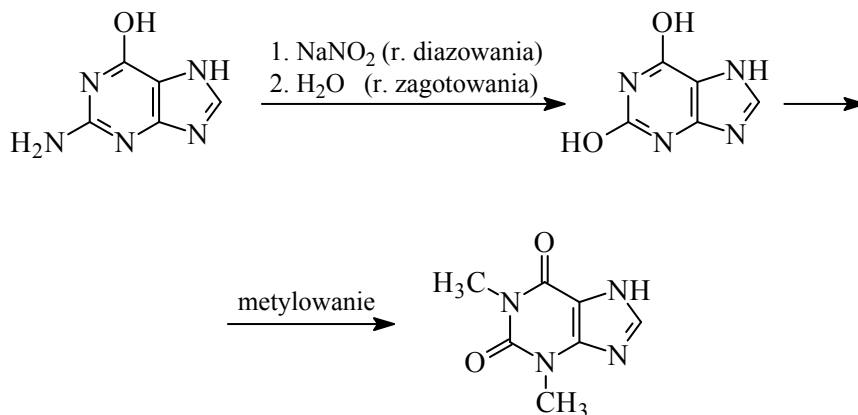


- Najbardziej ekonomiczny wariant syntezy teofiliny polega na połączeniu starej metody półsyntezy z kwasu moczowego z fragmentem pełnej syntezy według Traubego:



- Półsynteza teofiliny z guaniny

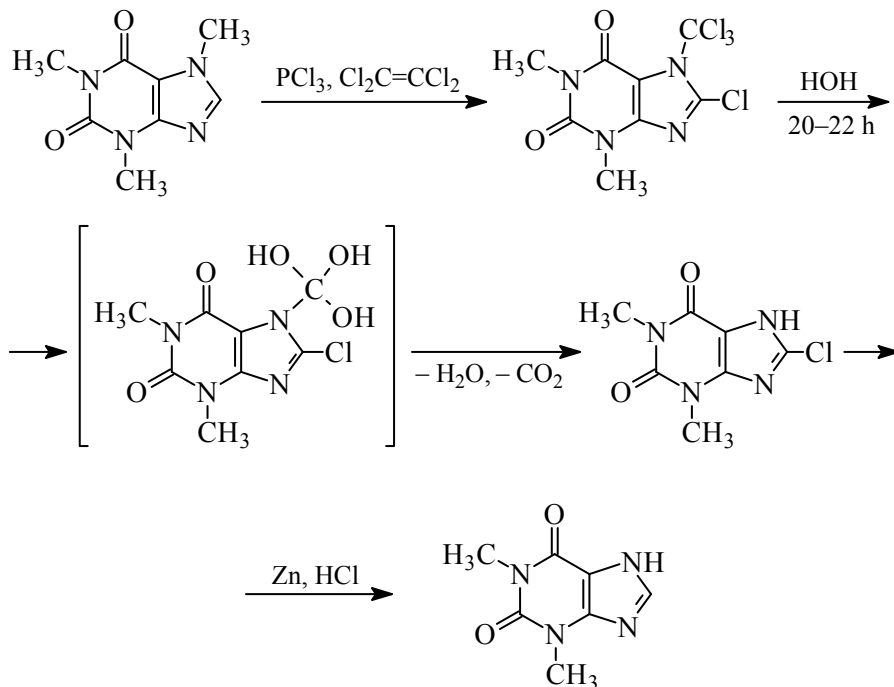
Ciekawym surowcem naturalnym mogą być kwasy nukleinowe pozyskiwane z drożdży. Przez hydrolizę kwasów nukleinowych rozcieńczonym kwasem siarkowym (VI) otrzymuje się m.in. guaninę, z której przez diazowanie i zagotowanie można otrzymać ksantynę, a z niej – przez selektywne metylowanie – teofilinę:



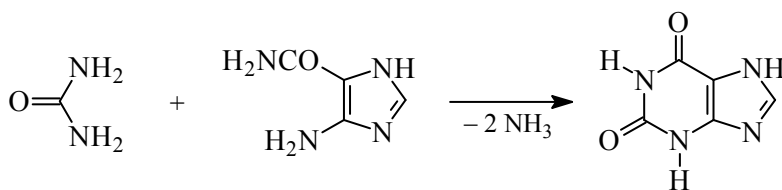
Metoda ta nie jest stosowana w technice, mimo jej atrakcyjności i prostoty.

- Półsynteza teofiliny z kofeiny

Przez chlorowanie kofeiny trichlorkiem fosforu w temp. 30–70°C w tetrachloroetylenie otrzymuje się tetrachlorokofeinę, z której – przez hydrolizę i redukcję – powstaje teofilina.



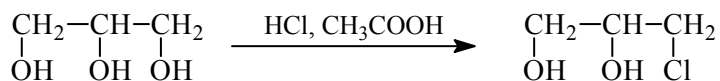
- Metody syntezy układu ksantyny z imidazolu nie mają praktycznego przemysłowego znaczenia, ale są znane, na przykład:



Drogą biosyntezy układu puryny w organizmie jest pierwotna synteza pierścienia imidazolu.

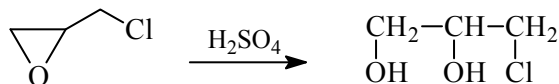
b) 1-chloro-2,3-propandiol

- Otrzymywanie z glicerolu:



90% glicerol ogrzewa się w lodowatym kwasie octowym do temp. 110°C i przepuszcza gazowy chlorowódor, następnie destyluje pod zmniejszonym ciśnieniem, zbierając frakcję o  $tw_{14mm}$  114–120°C,  $tw_{11mm}$  115–117°C.

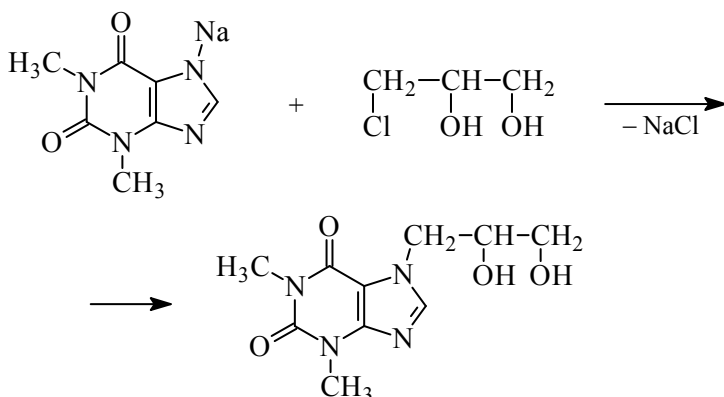
- Otrzymywanie z epichlorhydriny (1-chloro-2,3-epoksypropanu):



Przeprowadza się łagodną hydrolizę ok. 1,5% kwasem siarkowym (VI). Do reaktora wlewa się wodę destylowaną i przy włączonym mieszadle wkrapla cienkim strumieniem akumulatorowy kwas siarkowy (VI) (ok. 30%) w takiej ilości, aby powstał kwas siarkowy (VI) o stężeniu ok. 1,5%. Otrzymany kwas ogrzewa się do 50–60°C, po czym wkrapla epichlorhydrinę takimi porcjami, aby temperatura mieszaniny nie przekroczyła 50–60°C. Roztwór poreakcyjny zobojętnia się węglanem wapnia do pH = 7 w temp. 50°C, odsącza powstały siarczan (VI) wapnia. Z przesącza oddestylowuje się przedgon, a następnie frakcję właściwą ( $tw_{700mm}$  117,9°C,  $tw_{400mm}$  98°C,  $tw_{200mm}$  79,3°C,  $tw_{100mm}$  62°C,  $tw_{40mm}$  42°C).

### c) Synteza diprofiliny

Kondensację soli sodowej teofiliny z chloropropandiolem przeprowadza się w środowisku wodnym lub bezwodnym:



W pierwszym wariantcie w reaktorze umieszcza się wodorotlenek sodu, wodę destylowaną i bezwodną lub uwodnioną teofilinę, ogrzewa 15 min w temp. 60°C, dodaje chloropropandiol i ogrzewa kilka godzin do momentu, gdy ciecz staje się klarowna. Z kolei oddestylowuje się wodę, dodając pod koniec benzen celem azeotropowego usunięcia wody. Następnie dodaje się metanol (celem wytrącenia chlorku sodu), węgiel aktywny, gotuje 20 minut, filtruje przez filtr ciśnieniowy do ziębionego solanką (–7°C) krystalizatora. Po ok. 24 godz. odsącza się wytrąconą surową diprofilinę i przeprowadza krystalizację z 85% metanolu. Aby przeprowadzić reakcję kondensacji w środowisku bezwodnym, otrzymuje się najpierw sól sodową teofiliny (przez rozpuszczenie teofiliny w ługu, oddestylowanie wody, wysuszenie i rozdrobnienie). W reaktorze sporządza się roztwór chloropropandiolu w toluenie i ogrzewa do 111°C. Do tego roztworu wsypuje się małymi porcjami sproszkowaną sól teofiliny, mieszając. Kondensacja jest zakończona, gdy masa staje się homogeniczną pastą. Do mieszaniny reakcyjnej

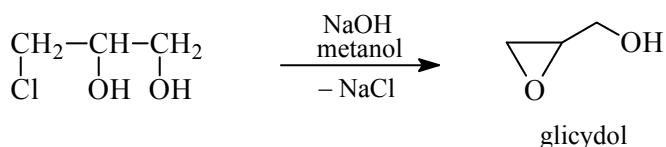
dodaje się metanolu, celem lepszego wytrącenia chlorku sodu, miesza i sączy na nuczcy. Z filtratu po oziębieniu krystalizuje diprofilina.

### II.1.2. Metoda glicydolowa (glicydowa)

Surowce: teofilina, glicydol (2,3-epoksy-1-propanol), N,N-dimetyloanilina

#### a) Glicydol

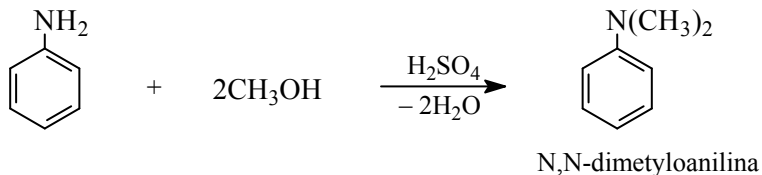
Glicydol otrzymuje się z chloropropandiolu:



Roztwór chloropropandiolu w metanolu oziębia się do 15°C, dodaje się, mieszając przez 2 godziny, stały wodorotlenek sodu w temp. 20°C, potem miesza się jeszcze przez 1 godz., odsąca wytrącony chlorek sodu, przemywa trzykrotnie metanolem i połączone filtry destyluje pod normalnym ciśnieniem w temp. 80°C (destyluje metanol), a następnie obniża się ciśnienie i w temp. 85°C przy 30 mm Hg destyluje glicydol. W aparacie destylacyjnym pozostaje nieprzereagowany chloropropandiol.

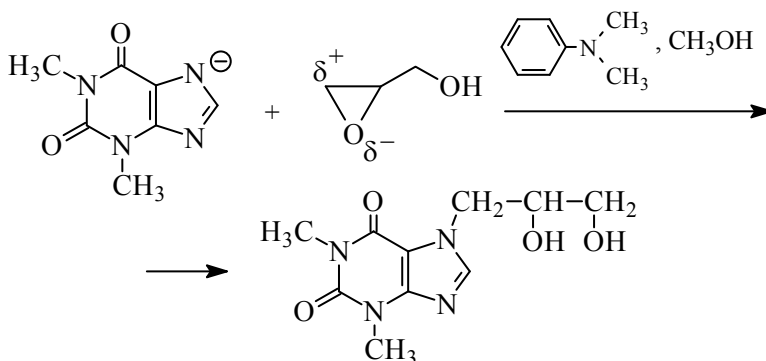
#### b) N,N-dimetyloanilina

N,N-dimetyloanilinę otrzymuje się przez ogrzewanie aniliny, metanolu i stężonego kwasu siarkowego (VI) pod ciśnieniem, z powstającego siarczanu wydziela się wolną zasadę przez zalkalizowanie:



#### c) Synteza diprofiliny

W celu otrzymania diprofiliny metodą glicydolową ogrzewa się teofilinę, glicydol, N,N-dimetyloanilinę do wrzenia w metanolu lub innym alkoholu do rozpuszczenia teofiliny (ok. 2–2,5 godz.) i od tego momentu jeszcze ok. 1 godz. do zmiany barwy roztworu na żółtą, następnie oziębia w temp. 0–7°C 6–8 godz. Wypada osad, który filtruje się i krystalizuje z 85% metanolu.

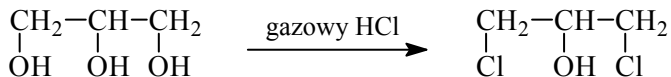


### II.1.3. Metoda epichlorhydrynowa

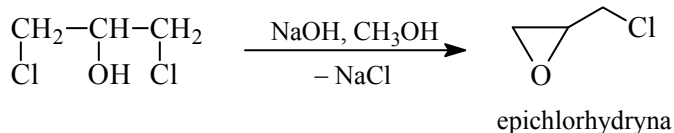
Surowce: teofilina, epichlorhydryna (1-chloro-2,3-epoksy)propan, NaOH

#### a) Epichlorhydryna

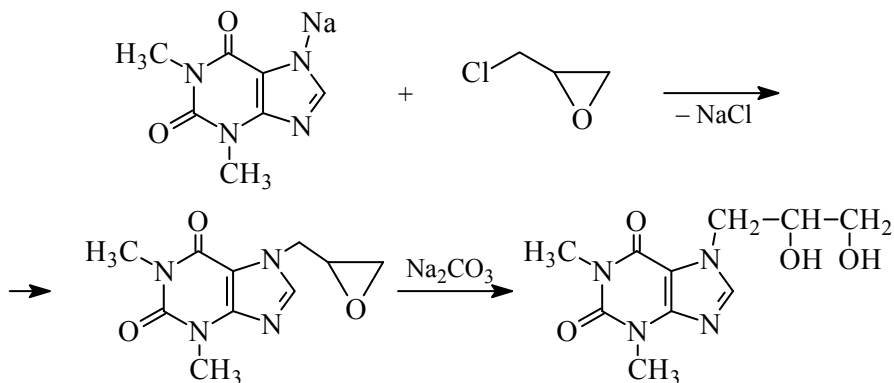
Glicerol poddaje się reakcji z gazowym chlorowodorem:



a następnie przeprowadza dehydrohalogenację 1,3-dichloro-2-propanolu stałym wodorotlenkiem sodu w sposób zbliżony do otrzymywania glicydotu (str. 239).



#### b) Synteza diprofiliny



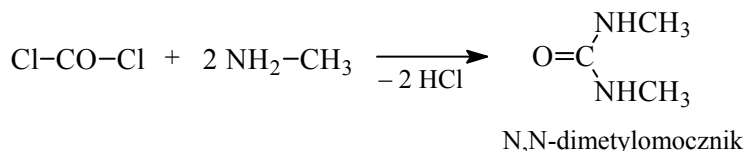
Sporządza się suchą sól sodową teofiliny (str. 238) i gotuje z nadmiarem epichlorhydryny kilka godzin, odfiltrowuje chlorek sodu, filtrat oziębia i odsącza wytrąconą 7-(2',3'-epoksypropylo)teofilinę, którą poddaje się hydrolizie przez gotowanie z wodnym roztworem węgla sodu w czasie 15–20 minut. Po oziębieniu wypada osad diprofiliny.

### II.1.4. Metoda polska (Wojciechowski i wsp.)

Metoda ta opracowana została na skalę laboratoryjną i ćwierćtechniczną w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie; oparta jest na metodzie syntezy teofiliny Traubego.

Surowce: N,N-dimetylomocznik, kwas cyanooctowy, epichlorhydryna (pkt a powyżej)

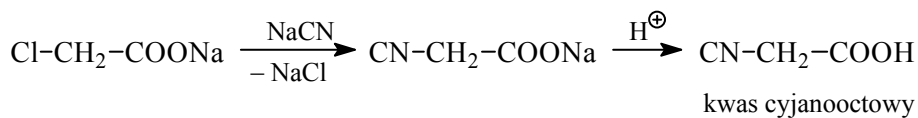
#### a) N,N-dimetylomocznik



Przeprowadza się aminolizę fosgenu metyloaminą w benzenie.



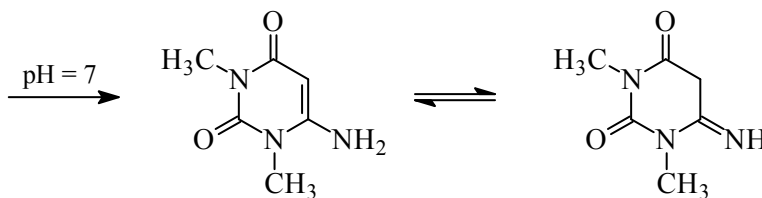
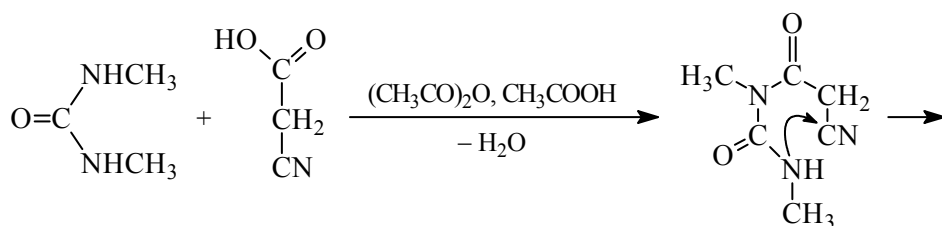
## b) Kwas cyjanooctowy



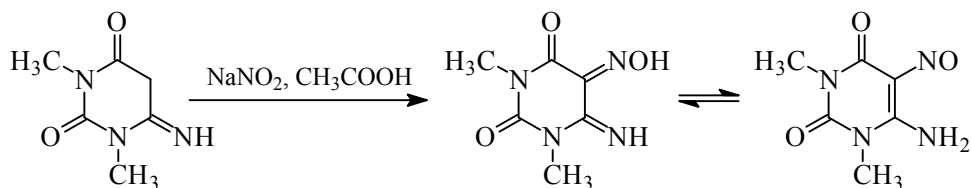
Kwas chlorooctowy rozpuszcza się w roztworze wodorotlenku sodu i wprowadza, mieszając, roztwór cyjanku sodu (reakcja egzotermiczna) tak, aby temperatura nie przekroczyła 50°C. Po zakończeniu reakcji zakwasza się 30% roztworem kwasu siarkowego (VI), odsącza wytrącony kwas cyjanooctowy.

## c) Synteza diprofiliny

- Otrzymywanie 1,3-dimetylo-5-nitrozo-6-aminouracylu (kwasu 1,3-dimetyloimino-wioliurowego)



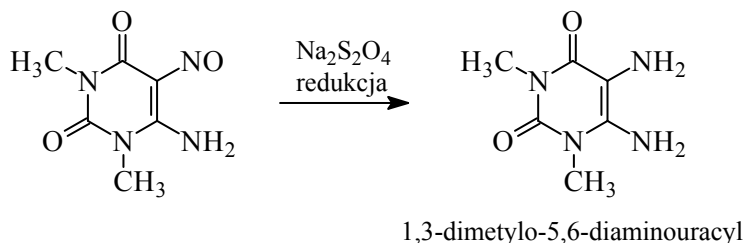
1,3-dimetylo-6-aminouracyl  
kwas 1,3-dimetylo-6-iminobarbiturowy



1,3-dimetylo-5-nitrozo-6-aminouracyl  
kwas 1,3-dimetylo-6-iminowioliurowy

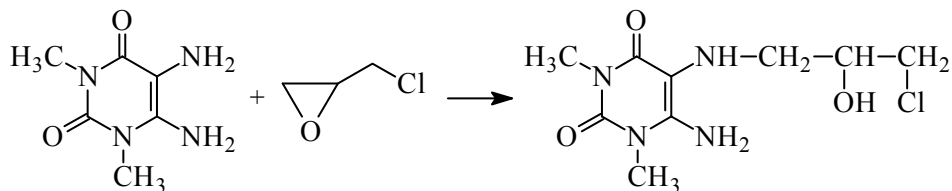
W kolbie zaopatrzonej w mieszadło umieszcza się N,N-dimetylomocznik, kwas cyjano-octowy, bezwodnik kwasu octowego, kwas octowy lodowaty i ogrzewa na łaźni wodnej w temp. 50°C do rozpuszczenia. Następnie podgrzewa się mieszaninę do 70°C, utrzymując w tej temperaturze 1 godz., oddestylowuje nadmiar kwasu octowego pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostały olej przelewa się do wody, podgrzewa do 50°C i zobojętnia węglanem sodu do pH = 7. W tych warunkach następuje cyklizacja do układu uracylu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewa się w temp. 70°C przez 1,5 godz., dodając na 15 min przed końcem ogrzewania azotan (III) sodu. Osad zmienia barwę na łososioworóżową, w tej temperaturze wkrapla się kwas octowy do pH = 3–4. Wytrąca się buraczkowy osad kwasu 1,3-dimetylo-6-iminowiolurowego z wydajnością ok. 89%.

- Otrzymywanie 1,3-dimetylo-5,6-diaminouracylu



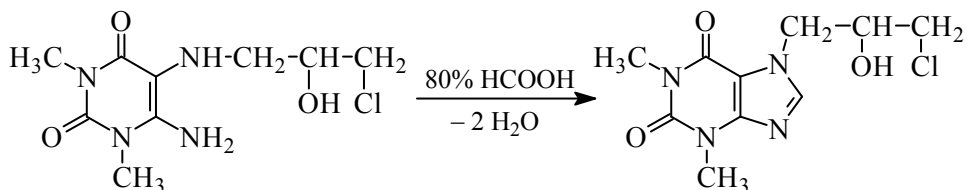
W kolbie zaopatrzonej w mieszadło, termometr i chłodnicę zwrotną umieszcza się kwas 1,3-dimetylo-6-iminowiolurowy i, mieszając, dodaje 25% wodę amoniakalną. Mieszaninę ogrzewa się do 50°C i w tej temperaturze wkrapla się roztwór hydrosulfitu (ditiionianu III sodu). Osad rozpuszcza się, a roztwór zmienia barwę na zielonożółtą i zaczyna wydzielać się osad 1,3-dimetylo-5,6-diaminouracylu, który po oziębieniu odsącza się.

- Otrzymywanie 1,3-dimetylo-5-(N-3'-chloro-2'-hydroksypropylo)-amino-6-aminouracylu



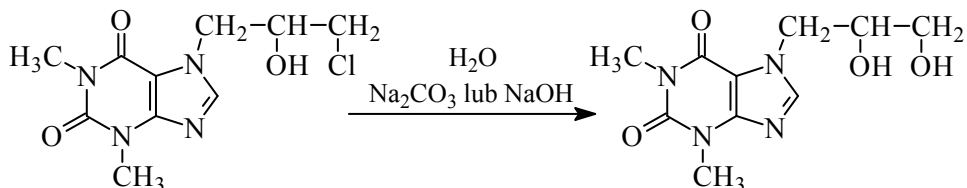
Ogrzewa się 1,3-dimetylo-5,6-diaminouracyl, epichlorohydrinę i metanol przez 5 godz., oziębia w temp. 0°C i odsącza wytrącony produkt.

- Otrzymywanie 7-(3'-chloro-2'-hydroksypropylo)-teofiliny



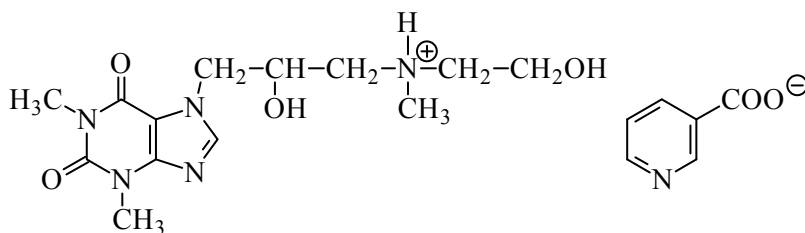
80% kwas mrówkowy, metanol i poprzedni produkt ogrzewa się przez 2–3 godziny, oddestylowuje nadmiar kwasu mrówkowego i metanol, a pozostałość oczyszcza przez krystalizację z metanolu.

- Otrzymywanie diprofiliny



Przeprowadza się hydrolizę 7- $\beta$ -hydrokso- $\gamma$ -chloropropylteofiliny ok. 4% roztworem węglańu sodu w czasie 15 min w temp. 95–96°C, otrzymując diprofilinę z wydajnością ilościową. Prowadzenie hydrolizy 0,5 n roztworem wodorotlenku sodu powoduje spadek wydajności do 50%.

## II.2. Synteza nikotynianu ksantynolu (Sadamin)



Sadamin

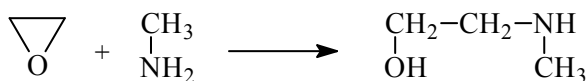
nikotynian 7-(2'hydrokso-3'-N-metylo-N- $\beta$ -hydroksoetyloaminopropyl)teofiliny

Nikotynian ksantynolu wzmagą przepływ krwi w naczyniach włosowatych, poprawia oddychanie tkankowe, zwiększa przepływ naczyniowy, bezpośrednio rozszerza sieć drobnych naczyń mózgu, serca, kończyn, poprawia metabolizm i utlenianie w tkankach, obniża podwyższony poziom fibrynogenu, cholesterolu i lipidów w osoczu. Stosowany w zaburzeniach naczyniowego krążenia obwodowego tętniczego i żylnego (choroba Bürgera, Meniera, Raynauada), przy miażdżycy naczyń, niewydolności krążenia wieńcowego, migrenie, trudno gojących się owrzodzeniach podudzi.

### II.2.1. Metoda syntezy nikotynianu ksantynolu według patentu firmy Wülfing

Surowce: teofilina (str. 233), epichlorhydryna (str. 240), N-metyloaminoetanol, kwas nikotynowy

- a) N-metyloaminoetanol

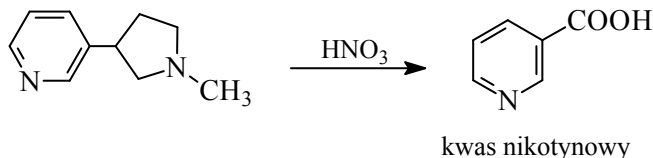


N-metyloaminoetanol

N-metyloaminoetanol otrzymuje się przemysłowo przez aminolizę tlenku etylenu metyloaminą, przy intensywnym chłodzeniu.

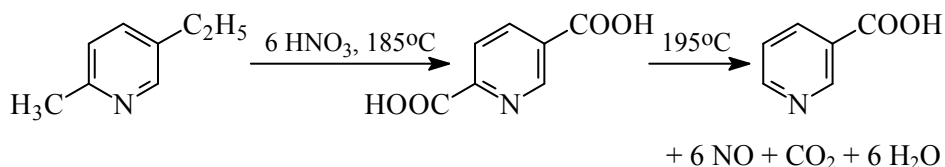
b) Kwas nikotynowy

Kwas nikotynowy został otrzymany po raz pierwszy przez Hubera w 1867 roku, w wyniku utlenienia nikotyny za pomocą stężonego kwasu azotowego (V):



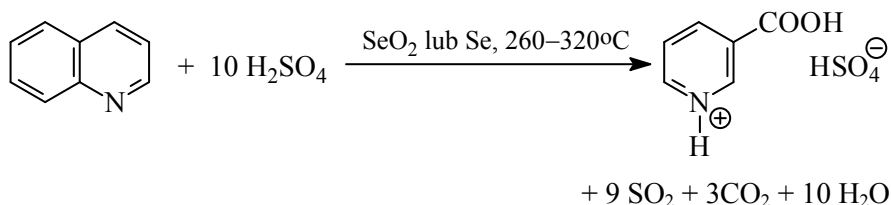
Obecnie otrzymuje się kwas nikotynowy z takich surowców, jak: chinolina lub 8-hydroksychinolina, 2-metylo-5-etylopirydyna,  $\beta$ -pikolina, pirydyna. Jako czynniki utleniające stosuje się kwas azotowy (V), kwas siarkowy (VI), chlor, nadtlenek wodoru, manganian (VII) potasu.

- Otrzymywanie kwasu nikotynowego z 2-metylo-5-etylopirydyny – działaniem stężonego kwasu azotowego (V)



2-metylo-5-etylopirydynę ogrzewa się ze stężonym kwasem azotowym (V) w temp. 185°C pod ciśnieniem; powstaje kwas pirydyno-2,5-dikarboksylowy, który w temp. 195°C poddawany jest dekarboksylacji.

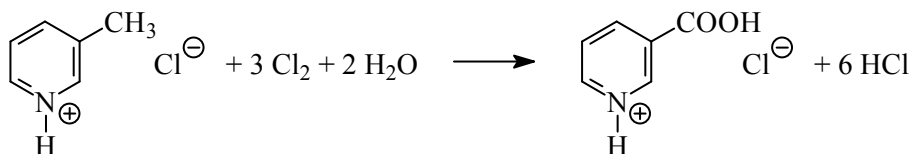
- Otrzymywanie kwasu nikotynowego z chinoliny – działaniem stężonego kwasu siarkowego (VI)



Metoda polega na utlenianiu chinoliny stężonym kwasem siarkowym (VI) wobec katalizatorów – selenu (metoda Woodwarda) lub tlenku selenu (IV) (metoda Jordana) w temp. 260–320°C. W trakcie reakcji wydzielają się duże ilości tlenku siarki (IV) i ditlenku węgla, które kieruje się do absorpcji. Ilość wody jest wskaźnikiem postępu utleniania. Wydzielanie kwasu nikotynowego odbywa się przez wytrącenie za pomocą siarczanu (VI) miedzi (II) przy pH = 3,5 trudno rozpuszczalnej soli kwasu nikotynowego, którą rozkłada się siarkowodorem, po odfiltrowaniu od siarczku miedzi, roztwór wodny kwasu nikotynowego zagęszcza się.

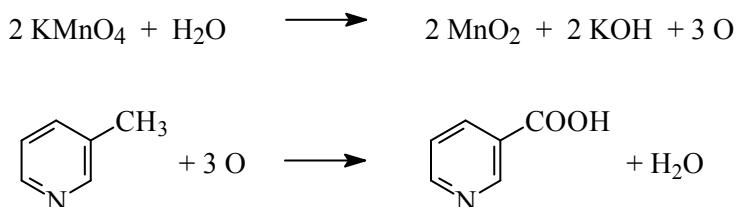
Tą metodą utlenia się również  $\beta$ -pikolinę i 2-metylo-5-etylopirydynę.

- Otrzymywanie kwasu nikotynowego z  $\beta$ -pikoliny – przez utlenienie chlorem gazowym



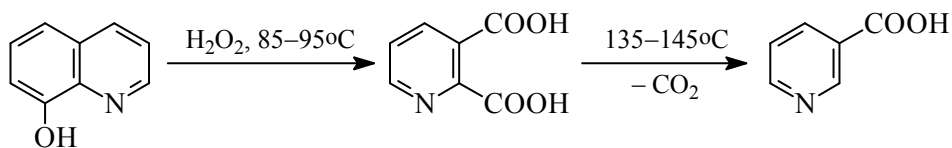
Do roztworu wodnego chlorowodoru  $\beta$ -pikoliny wprowadza się, przy naświetlaniu w temp. 100–110°C, chlor gazowy; powstaje chlorowodorek kwasu nikotynowego, który po zagęszczeniu wykrystalizowuje z roztworu.

- Otrzymywanie kwasu nikotynowego z  $\beta$ -pikoliny – przez utlenienie manganianem (VII) potasu



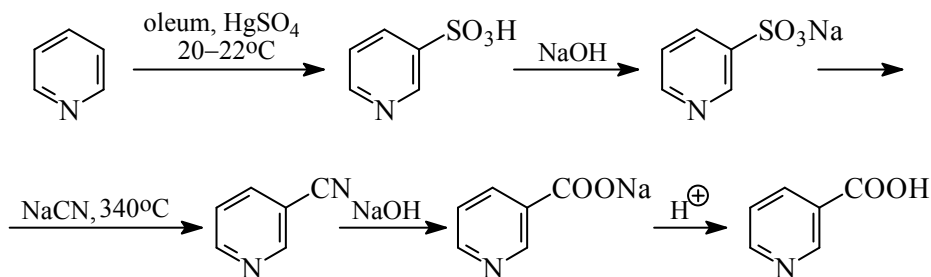
Ogrzewa się, mieszając,  $\beta$ -pikolinę i wodę, dodając porcjami w temperaturze 70–90°C sproszkowany manganian (VII) potasu, aż do odbarwienia roztworu. Odsąca się wytrącony tlenek manganu (IV), przesącz zagęszcza i zakwasza stężonym chlorowodorem do pH = 3,5; kwas nikotynowy wydziela się po oziębieniu.

- Otrzymywanie kwasu nikotynowego z 8-hydroksychinoliny przez utlenienie nadtleniem wodoru



8-hydroksychinolinę rozpuszcza się w ok. 8% roztworze wodorotlenku sodu, ogrzewa do 65–75°C i w ciągu 2 godz. utlenia wodą utlenioną o stężeniu 3,5%, po czym podwyższa się temperaturę do 80–95°C, utrzymując ją przez 1 godz. Następnie dodaje się stężonego kwasu siarkowego (VI) do słabo kwaśnej reakcji, ochładza, wypada kwas chinolinowy (2,3-pirydyno-dikarboksylowy), który odsąca się. Do reaktora wprowadza się kwas chinolinowy, lodowaty kwas octowy i ogrzewa w temp. 135–145°C do energicznego wydzielania ditlenku węgla. Po ochłodzeniu wypada osad kwasu nikotynowego.

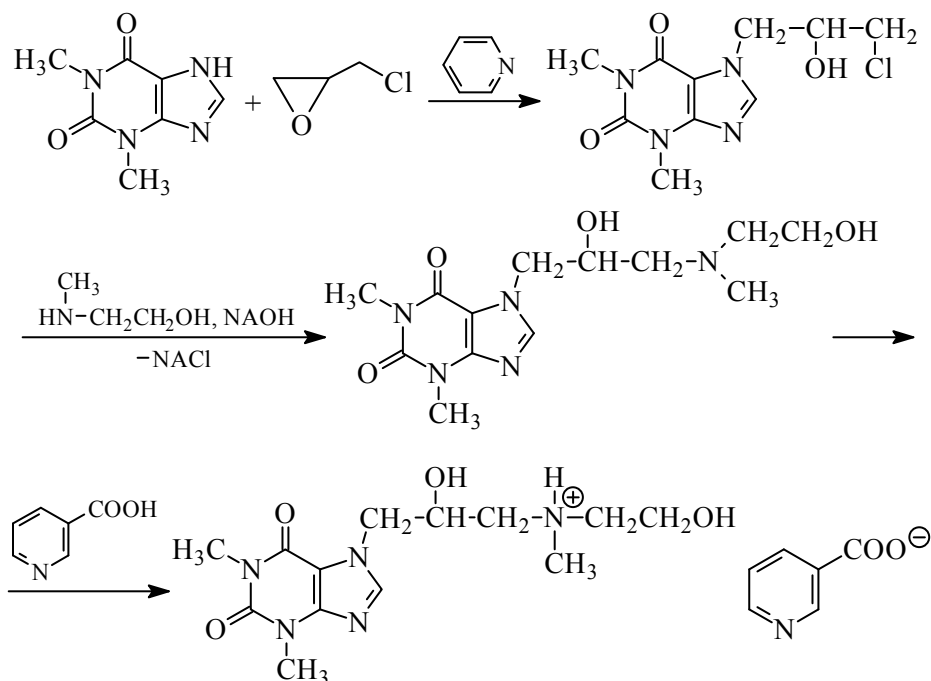
- Otrzymywanie kwasu nikotynowego z pirydyny (metoda laboratoryjna)



Pirydynę poddaje się sulfonowaniu 20–22% oleum (roztwór tlenku siarki (VI) w stężonym kwasie siarkowym (VI)) wobec siarczynu rtęci (katalizator). Po oddestylowaniu kwasu siarkowego (VI), dodaje się bezwodny etanol i pozostawia w temp. 0°C w celu wykrystalizowania kwasu 3-pirydynosulfonowego, który przeprowadza się w sól sodową przez rozpuszczenie w roztworze wodorotlenku sodu i odparowanie. Sól sodową kwasu 3-pirydynokarboksyłowego poddaje się reakcji z trzykrotnym nadmiarem cyjanku sodu w temp. 340–400°C, w czasie 40–50 min. Destyluje się 3-cyanopirydynę, którą poddaje się hydrolizie alkalicznej, ogrzewa z roztworem wodorotlenku sodu, z którego wytrąca się kwas nikotynowy przez zakwaszenie chlorowodem.

c) Synteza nikotynianu ksantynolu

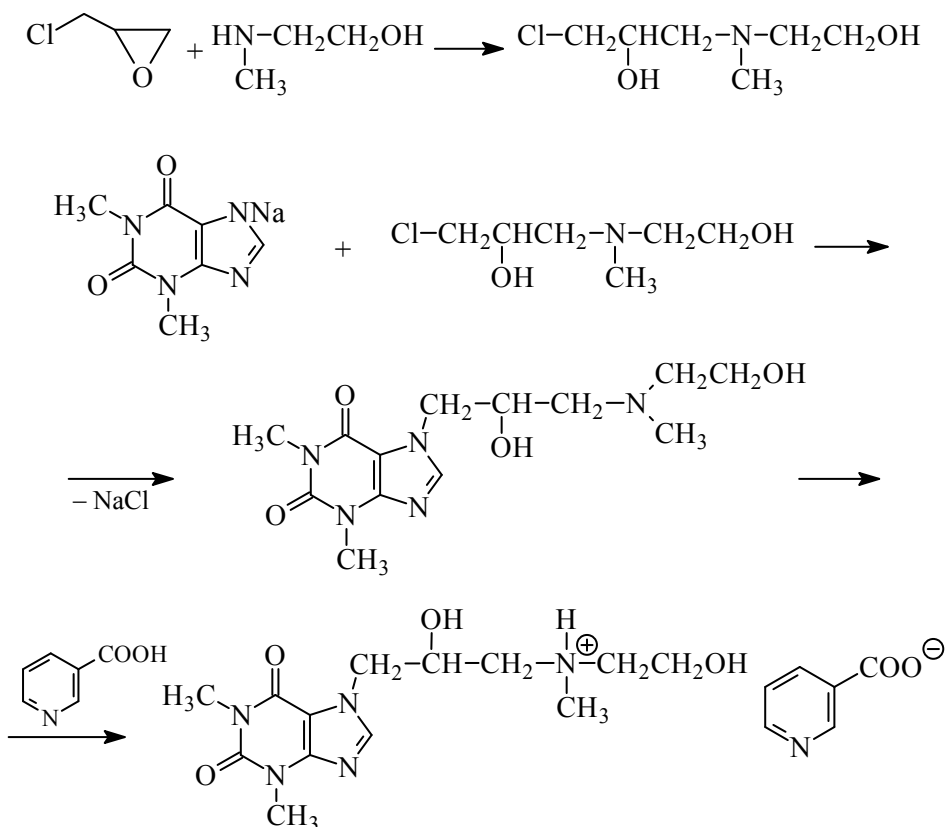
- Wariant pierwszy: z produktem pośrednim 7-β-hydroksy-γ-chloropropyloteofiliną



Reakcja polega na ogrzewaniu teofiliny z epichlorhydrną w środowisku alkoholowym (metanol, propanol) w obecności katalizatora pirydyny (substytucja elektrofilowa). Po oziębieniu wypada osad 7-β-hydroksy-γ-chloropropyloteofiliny, który odsącza się.

Aminolizę produktu pośredniego, tj. 7-β-hydroksy-γ-chloropropyloteofiliny, przeprowadza się w środowisku alkoholu (etylowego, propylowego lub izopropylowego), ogrzewając stechiometryczne ilości 7-β-hydroksy-γ-chloropropyloteofiliny i N-metyloaminoetanolu przez kilka godzin, przy stopniowym dodawaniu stechiometrycznych ilości wodorotlenku sodu rozpuszczonego w niewielkiej ilości wody. W trakcie reakcji wydziela się chlorek sodu, który odsącza się, a do klarownego roztworu dodaje kwas nikotynowy do reakcji obojętnej. Sól wytrąca się po oziębieniu.

- Wariant drugi: z produktem pośrednim N-(3'-chloro-2'-hydroksypropylo)-N-metyloaminoetanolem



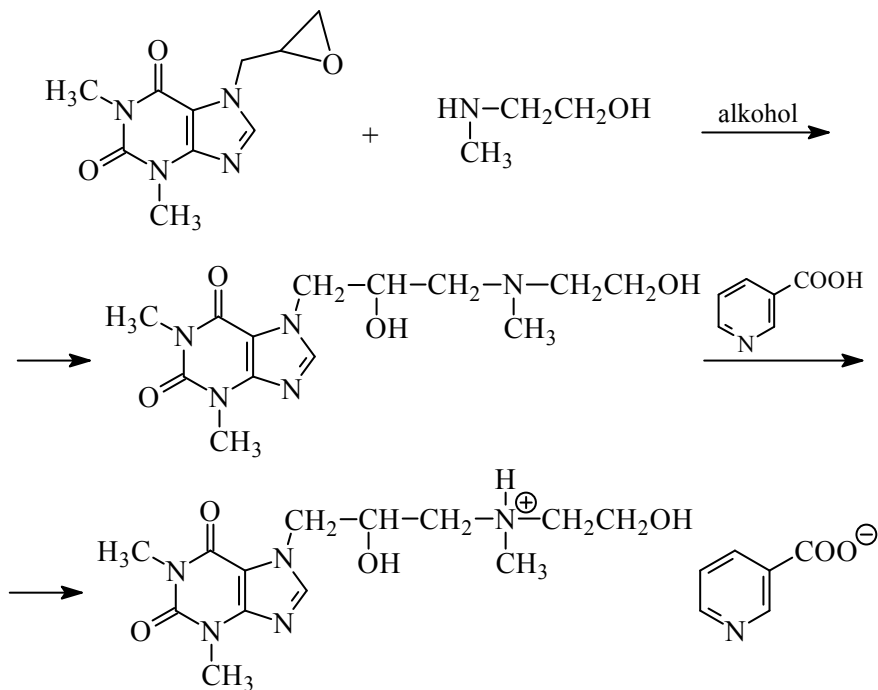
Reakcję aminolizy epichlorhydrny N-metyloaminoetanolem przeprowadza się, wkraplając do roztworu epichlorhydrny w alkoholu (etylowym, propylowym lub izopropylowym) trzykrotny nadmiar aminoalkoholu w czasie 3 godz., utrzymując temp. 15–25°C (reakcja egzotermiczna) i mieszając. Następnie zawartość reaktora miesza się jeszcze 1 godz. Produktu reakcji nie wydziela się, tylko jego roztwór alkoholowy stosuje się do dalszych przemian.

Kondensację z solą sodową teofiliny przeprowadza się w ten sposób, iż do roztworu wodorotlenku sodu w wodzie dodaje się alkoholu i po ogrzaniu do temp. 50–60°C wprowadza, mieszając, teofilinę. Wytwarza się papkowata sól teofiliny, do której wkrapla się w czasie 3 godz., mieszając i ogrzewając do wrzenia, opisany wyżej roztwór halogenopochodnej aminoalkoholu. Mieszanie utrzymuje się w temperaturze wrzenia dalsze 2 godz., a następnie odsącza się chlorek sodu. Gorący przesącz alkoholowy zadaje się kwasem nikotynowym i ogrzewa do rozpuszczenia go. Nikotynian ksantynolu wydziela się już na ciepło w postaci błyszczących blaszek, które odsącza się po oziębieniu.

Otrzymany według obydwu wariantów nikotynian ksantynolu krystalizuje się z 85% izopropanolu.

### II.2.2. Metoda aminolizy 7- $\beta$ , $\gamma$ -epoksypropyloteofiliny

Surowce: 7- $\beta$ , $\gamma$ -epoksypropyloteofilina (str. 240), N-metyloaminoetanol (str. 243), kwas nikotynowy (str. 244)



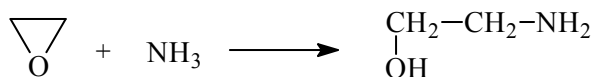
Reakcję aminolizy 7- $\beta$ , $\gamma$ -epoksypropyloteofiliny przeprowadza się nadmiarem N-metyloaminoetanolu, ogrzewając substraty w roztworze alkoholowym (etanol lub izopropanol) kilka godzin. Do gorącego roztworu dodaje się kwasu nikotynowego; po oziębieniu wypadają kryształy nikotynianu ksantynolu, który krystalizuje się z 85% izopropanolu (jak w metodzie II.2.1c).

### II.2.3. Metoda syntezy z zastosowaniem 2-aminoetanolu i alkilowania metodą Eschweilera-Clarke'a

Surowce: 7- $\beta$ -hydroksy- $\gamma$ -chloropropyloteofilina (str. 247), 2-aminoetanol (etanoloamina, kolamina), kwas nikotynowy (str. 244)



## a) 2-aminoetanol

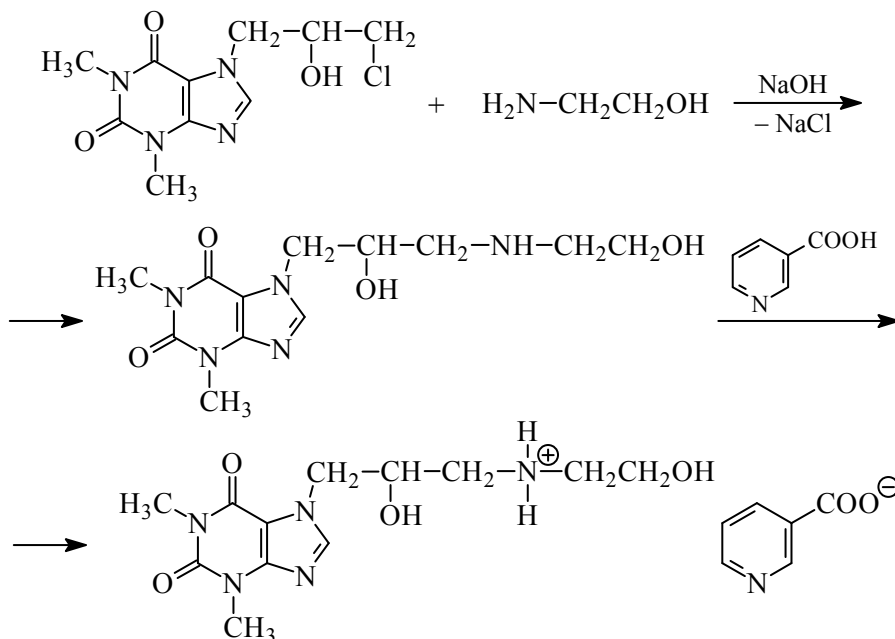


2-aminoetanol

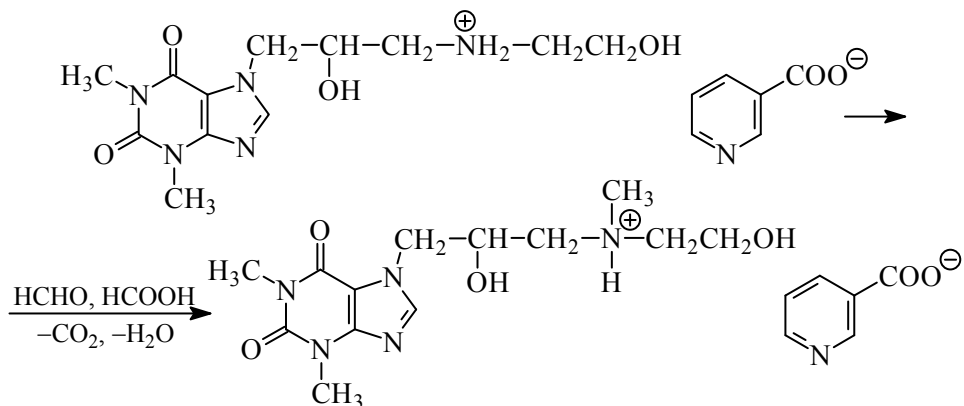
Aminoetanol otrzymuje się na skalę przemysłową przez amonolizę tlenku etylenu w szczelnej aparaturze przy intensywnym chłodzeniu.

## b) Synteza nikotynianu ksantynolu

Reakcja kondensacji:



Reakcję przeprowadza się analogicznie jak w metodzie firmy Wülfing (str. 243). Wydzieloną sól poddaje się reakcji metylowania metodą Eschweilera-Clarke'a z udziałem formaldehydu i kwasu mrówkowego:

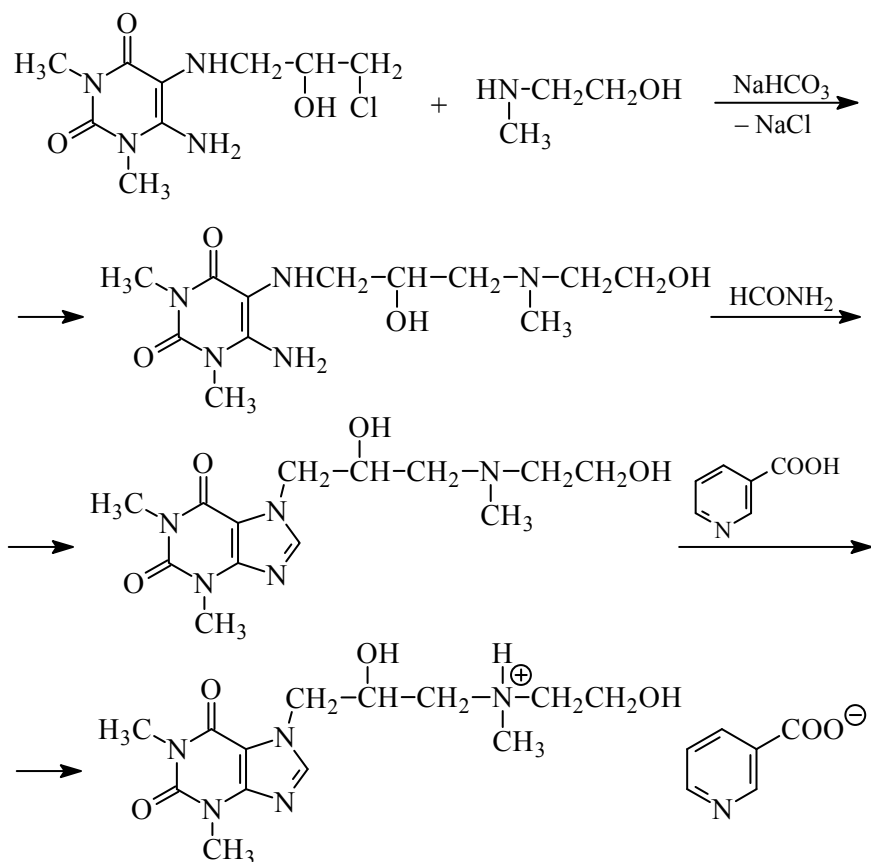


Otrzymaną wcześniej sól ogrzewa się z formaldehydem i 80% kwasem mrówkowym przez 8 godz. (do zaprzestania wydzielania się ditlenku węgla), następnie dodaje się etanolu, pozostawia do oziębienia na 12 godz., wydziela się nikotynian ksantynolu.

#### II.2.4. Metoda polska – z 1,3-dimetylomocznika i kwasu cyjanooctowego

Surowce : N,N-dimetylomocznik, kwas cyjanooctowy, epichlorohydryna (str. 240)

Przebieg tej reakcji jest analogiczny jak przy otrzymywaniu diprofiliny, do momentu otrzymania 1,3-dimetylo-5-(N-3'-chloro-2'-hydroksypropylo)-amino-6-aminouracylu (str. 242). Produkt ten poddaje się reakcji aminolizy N-metyloaminoetanolem w następujący sposób:



W kolbie z mieszadłem ogrzewa się przez 3 godz. 1,3-dimetylo-5-(3-chloro-2-hydroksypropyloamino)-6-aminouracyl z 10-krotnym nadmiarem N-metyloaminoetanolu w metanolu. Następnie oddestylowuje się rozpuszczalnik i nadmiar aminoalkoholu, a pozostały olej rozpuszcza się w wodzie i zobojętnia wodorowęglanem sodu. Wodę odparowuje się, a pozostałość rozpuszcza się w chloroformie, odsącza od soli nieorganicznych i oddestylowuje rozpuszczalnik. Pozostały olej zadaje się formamidem i ogrzewa się 10 min w temperaturze wrzenia, a następnie oddestylowuje nadmiar formamidu. Pozostałość rozpuszcza się w metanolu, dodaje po podgrzaniu do  $60^\circ\text{C}$  kwas nikotynowy. Po oziębieniu wypada osad nikotynianu ksantynolu.

### Literatura

1. W. Bestian (firma J.A. Wülfig): *Salts of theophylline bases*, Ger. P. 1102750 (1961), C.A.56, 11602, 1962.
2. W. Bestian (firma J.A. Wülfig): *Derivatives of theophylline*, USP 294598 (1962), C.A.54, 15410, 1960.
3. B. Bobrański: *Preparatyka organicznych środków leczniczych*, PZWL, Warszawa 1971.
4. H. Bredereck, A. Edenhofer: *Synthesen in der Purinreihe*, VI Mitteil.: *Synthesen mit 4- und 5-Aminouracil*, Chem. Ber., 1955, 88, 1306.
5. D. Dąbrowska, Z. Zaczyński: *2,3-dihydroxypropyldimethylxanthines*, Pat. Pol. 59071 (1970), C.A.73, 45544d, 1970.
6. G. Dysen, P. May: *May's chemistry of synthetic drugs*, Butherworths, London 1959.
7. D.B. Ishay: *7-(2,3-dihydroxypropyl)theophylline*, J. Chem. Soc., 1956, 3975.
8. D. Horbonits, R. Szebenyi, K. Harsanyi: *Theophylline derivatives I*, Acta Pharm. Hung., 1968, 38, 98.
9. D. Mastalerz: *Podręcznik chemii organicznej*, Wydawnictwo Chemiczne, Wrocław 1996.
10. W. Traube: *Über eine neue Synthese des Guanins und Xanthines*, Berichte, 1900, 33, 1371.
11. J. Wojciechowski, J. Wolff: *Z zagadnień syntezy pochodnych metylowych ksantyny*, Przemysł Chemiczny, 1954, 33, 281.
12. J. Wojciechowski, M. Krajewska, R. Palanowski, D. Dąbrowska, Z. Zaczyński: *1,3-dialkyl-7-hydroxypropyl derivatives of xanthine*, Pat. Pol. 124939 (1967), C.A.72, 66989, 1970.

### III. ANTYBIOTYKI NATURALNE

**Antybiotyk** – substancja wytwarzana przez mikroorganizmy (pleśnie, grzyby, bakterie) na drodze wtórnego metabolizmu, zdolna do selektywnego zahamowania wzrostu lub zabicia komórek drobnoustrojów patogennych.

Lata badań prowadzonych w grupie antybiotyków spowodowały weryfikację tej definicji. Obecnie antybiotyki to nie tylko związki pochodzenia naturalnego, większość z nich otrzymuje się w wyniku chemicznej i mikrobiologicznej modyfikacji cząsteczek, otrzymanych metodami biosyntezy. Dużą grupę stanowią także antybiotyki, które powstają jako wynik pełnej syntezy chemicznej.

Poszukiwania badawcze zmierzały i nadal zmierzają do wykrycia antybiotyku, który w minimalnych dawkach wykazywałby maksymalne działanie przeciwbakteryjne, przy równoczesnym minimalnym działaniu toksycznym w stosunku do makroorganizmu.

Możliwość stosowania antybiotyków w terapii tkwi w selektywności ich działania toksycznego.

Mechanizm ten polega na ingerencji w procesy:

- 1) replikacji DNA,
- 2) transkrypcji,
- 3) transportu elektronów i jonów,
- 4) biosyntezy ściany komórkowej drobnoustrojów.

Ze względu na mechanizm działania antybiotyków, został zaproponowany następujący ich podział (Gauze, 1969):

- 1) antybiotyki hamujące syntezę ściany komórkowej (np. penicyliny),
- 2) antybiotyki uszkadzające funkcje błony komórkowej (antybiotyki polienowe – np. nystatyna),
- 3) antybiotyki hamujące syntezę kwasów nukleinowych (np. aktinomycyna, mitomycyna),
- 4) antybiotyki hamujące syntezę białka (np. tetracykliny, chloramfenikol),
- 5) antybiotyki hamujące procesy bioenergetyczne (np. gramicydyna, oligomycyna).

#### III.1. Produkcja antybiotyków naturalnych

W cyklu produkcyjnym antybiotyków wyodrębnia się następujące etapy:

- 1) hodowla kultur posiewowych (przygotowanie tzw. inokulum),
- 2) przygotowanie pożywki i materiału posiewowego na skalę przemysłową,
- 3) wytwarzanie antybiotyku w skali przemysłowej – fermentacja,
- 4) wyodrębnienie antybiotyku z brzezki pofermentacyjnej,
- 5) oczyszczenie surowego antybiotyku,
- 6) wytworzenie form leku.

##### III.1.1. Selekcja szczepów produkcyjnych

W obrębie jednego gatunku bakterii może występować duże zróżnicowanie w zakresie zdolności wytwarzania antybiotyków. Po wyizolowaniu odpowiedniego szczepu produkującego dany rodzaj antybiotyku (selekcja naturalna), laboratoria mikrobiologiczne o profilu inżynierii genetycznej pracują nad uszlachetnieniem szczepu.

„Uszlachetnienie” szczepu ma na celu wyhodowanie mutantów o dużej zdolności wytwarzania danego antybiotyku. Korzystne zmiany dotyczące zdolności produkowania antybiotyków przez drobnoustroje można uzyskać, stosując następujące zabiegi:

- 1) aklimatyzację,
- 2) kultywację,
- 3) mutację.

**Aklimatyzacja** – hodowanie szczepów drobnoustrojów w różnych warunkach zewnętrznych, tzn.: w różnych warunkach temperatury, przy różnym pH, przy różnych stężeniach składników pożywek.

**Kultywacja** – polega na hodowaniu szczepów na różnych rodzajach pożywek, na przemian – (rodzaj „płodozmianu” stosowanego w rolnictwie).

**Mutowanie** – osiągnięcie korzystnych zmian w szczepie drobnoustrojów pod wpływem:

- 1) promieniowania – UV, X,
- 2) działania chemicznymi czynnikami mutagennymi (np. kolchicina, hydantoina).

Dobre wyniki w uszlachetnieniu kultur dają tzw. **szoki**, np. dodanie do kultury drobnoustroju silnego kwasu, szybkie ogrzanie do wyższej temperatury, a potem gwałtowne schłodzenie, nagła zmiana ciśnienia osmotycznego. Tego typu zmiany warunków hodowli często doprowadzają do korzystnych trwałych zmian we wtórnym metabolizmie mikroorganizmów. Wyizolowany, uszlachetniony szczep o dużej aktywności antybiotycznej jest reprodukowany drogą hodowli. Ważnym zagadnieniem jest stabilizacja i utrwalenie nabytych korzystnych cech, dlatego reprodukcja szczepu musi mieć charakter stopniowy (stopniowe powiększanie skali namnażania).

### III.1.2. Przygotowanie inokulum posiewowego

- 1) Po wyizolowaniu szczepu właściwego (na ogół hodowla na podłożach utwardzonych agarom na szalkach Petriego) przeszczepia się go na pożywkę płynną do kolb o pojemności 250 ml – 2 l z łamaczami wirów, zatkanymi korkami z waty. Kolby z zaszczerpioną pożywką umieszcza się na trzęsawkach w pokojach o regulowanej temperaturze. Hodowle grzybowe inkubuje się w temp. 27°C, natomiast bakteryjne – w temp. 35–37°C, przez okres 24–48 godzin, niekiedy nawet do 300 godzin. W kolbach prowadzi się namnażanie szczepu, czyli tzw. inokulum.
- 2) Następnie szczepi się tank fermentora laboratoryjnego (pojemność 14–16 l). Taki fermentor pozwala na prowadzenie namnażania kultury drobnoustrojów w warunkach zbliżonych do skali produkcyjnej. Ta hodowla jest również mieszana (tym razem za pomocą mieszadeł mechanicznych) oraz natleniana sterylnym powietrzem.
- 3) Po ustalonym okresie inkubacji powiększa się dalej skalę namnażania drobnoustrojów. Przetacza się więc brzeczki sterylnymi przewodami do fermentorów produkcyjnych o pojemności:
  - a) 400 litrów (mieszanie, natlenianie, namnażanie),
  - b) 20–80 tys. litrów (tu, oprócz namnażania drobnoustrojów, następuje także produkcja antybiotyku).

Bardzo duży wpływ na namnażanie drobnoustrojów i wydajność produkcji antybiotyku odgrywa prowadzenie wszystkich procesów w sterylnych warunkach oraz napowietrzanie i mieszanie hodowli.

### Sterylizacja powietrza

Prowadzi się ją różnymi sposobami:

- 1) Filtracja powietrza przez ośrodki włókniste (bawełna, wełna, wata szklana lub

węgiel aktywny). Używa się filtrów z mas papierowych, ze spieków szkła, ceramiki. Filtry papierowe i spiekowe odznaczają się wysoką sprawnością – zatrzymują cząsteczki wielkości poniżej 1 mikrona.

- 2) Wysoka temperatura. Przetrawalniki bakterii i grzybów są odporne na efekty cieplne w środowisku suchym, jednakże temperatura powyżej 200°C działa zabójczo, w krótkim czasie.
- 3) Skrubery zraszane roztworami środków dezynfekujących.

Najczęściej stosuje się filtrację poprzez kolumny wypełnione węglem aktywnym. Kolumny takie sterylizuje się poprzez przepuszczanie pary wodnej pod zmniejszonym ciśnieniem.

### Gaszenie piany

Silne napowietrzanie brzezki fermentacyjnej powoduje silne pienienie pożywki, które usuwa się przez dozowanie jałowego detergentu, np. oleju roślinnego, smalca, oktadekanolu w oleju (detergent może stanowić maksymalnie 10% objętości brzezki, najlepiej jeśli jest metabolizowany przez drobnoustroje). Stosuje się także oleje silikonowe, lecz te nie są metabolizowane i przeszkadzają przy filtracji brzezki.

### Kontrola jałowości procesów

Niezależnie od metod zabezpieczających jałowe (sterylne) prowadzenie poszczególnych procesów biosyntezy, na każdym etapie prowadzi się kontrolę jałowości inokulum, pożywek i powietrza poprzez pobieranie próbek w warunkach aseptycznych, a następnie posiewa się je na odpowiednich podłożach i sprawdza, czy po okresie inkubacji następuje rozwój drobnoustrojów innych niż produkcyjnie pożądane.

### Surowce do biosyntezy antybiotyków

Od składu oraz od wzajemnego stosunku poszczególnych składników pożywki zależy ilość i jakość wyprodukowanego antybiotyku.

1. Substancje odżywcze:
  - a) źródło węgla i energii stanowią węglowodany i substancje białkowe – najczęściej stosowanymi węglowodanami są glukoza i skrobia;
  - b) źródło azotu – surowce pochodzenia naturalnego, – hydrolizaty surowców białkowych, np. drożdży, – wodny namok kukurydzy (wyciąg namokowy kukurydzy) – WNK.
2. Sole mineralne – związki fosforanowe, sole amonowe lub azotany, które uzupełniają azot organiczny. Są one zużywane na początku biosyntezy, zanim azot organiczny drogą przemian (dezaminacja) może być przyswajany.
3. Prekursory – substancje ułatwiające, ukierunkowujące produkcję ściśle określonego antybiotyku, np.
  - a) metionina  $\text{CH}_3\text{-S-(CH}_2)_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ ,
  - b) kwas fenylloctowy przy otrzymywaniu benzylopenicyliny,
  - c)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  lub  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (jako źródło siarki) do otrzymywania cysteiny (jeden z aminokwasów tworzących kwas 6-AP).
4. Aktywatory – w postaci witamin i prowitamin: kwas askorbinowy, karoten, tiamina, niacyna, kwas foliowy, pirydoksyna.
5. Pierwiastki mineralne: Ca, F, Fe, Mg, K, Na oraz Mn, Zn, Cu.
6. Rozpuszczalniki – woda, najlepiej dejonizowana, aby nie nastąpiła kumulacja pierwiastków metalicznych, które mogłyby wpłynąć na zmianę warunków biosyntezy.
7. Mieszaniny buforowe – utrzymują właściwą dla każdego antybiotyku wartość pH.

8. Powietrze sterylne (!)
9. Antyseptyki – chroniące drobnoustroje aktywne przed zakażeniami innymi drobnoustrojami.

Zachwianie wzajemnej proporcji składników podłoża prowadzi do zaburzeń procesu biosyntezy. Na przykład:

– niedobór węglowodanów powoduje wcześniejsze zakończenie biosyntezy, autolizę grzybni; nadmiar jest nieszkodliwy, natomiast pozostaje w brzeczce i utrudnia izolację antybiotyku;

– nadmiar fosforu powoduje szybkie wyczerpanie się substratów, nagromadzenie kwasów: pirogronowego i octowego.

### **Fermentacja**

Fermentację prowadzi się w ciągu kilku dni, kontrolując jej przebieg przez pobieranie próbek. W próbkach oznacza się zużycie cukrów, azotu oraz aktywność produkowanego antybiotyku. W zależności od rodzaju produkowanego antybiotyku, proces fermentacji może mieć dwa lub trzy stadia.

Przy otrzymywaniu penicyliny wyróżnia się trzy etapy:

- 1) silny wzrost grzybni,
- 2) biosynteza antybiotyku,
- 3) autoliza grzybni.

Gdy ilość i aktywność antybiotyku osiąga swoje maksimum (potwierdzone przez wyniki badań laboratoryjnych), proces fermentacji przerywa się.

Przy produkcji tetracyklin wyróżnia się dwa stadia:

- 1) wzrost grzybu,
- 2) biosynteza antybiotyku.

Po zakończeniu biosyntezy następuje odfiltrowanie biomasy. Po przerwaniu procesu fermentacji kończy się postępowanie jałowe. Odfiltrowanie biomasy przeprowadza się na prasach filtracyjnych. Z grzybnią filtruje się również (przez dodanie kwasu szczawowego lub rozcieńczonego  $H_2SO_4$ ) sole wapniowe, stanowiące pozostałość z pożywki.

### **III.1.3. Metody wyodrębniania (izolacji) antybiotyków z brzeczki pofermentacyjnej**

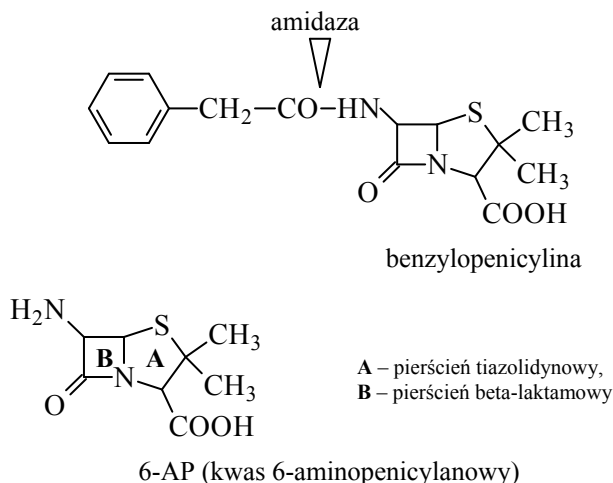
1) **Adsorbacja na węglu aktywnym, tlenku glinu, wymienniczkach jonowych.** Wymywanie antybiotyku z powierzchni sorbentów prowadzi się często metanolem lub etanolem zakwaszonym ( $pH = 3-5$ ). Kwaśny wyciąg zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość ekstrahuje się butanolem, z którego wytrąca się antybiotyk innym, odpowiednio dobranym rozpuszczalnikiem.

2) **Ekstrakcja.** Przy zastosowaniu tej metody antybiotyków z fazy wodnej przechodzi do rozpuszczalnika trudno mieszającego się z wodą w określonym  $pH$ . Po oddzieleniu grzybni w roztworze wodnym stężenie antybiotyku wynosi 0,05–1%, po zmieszaniu z 4–6-krotnie mniejszą objętością rozpuszczalnika organicznego następuje zwiększenie koncentracji antybiotyku. Najczęściej w tej metodzie jako rozpuszczalnik organiczny stosuje się butanol, octan amylu, metyloetyloketon.

3) **Strącanie.** Proces ten polega na strącaniu antybiotyku w postaci soli wapniowej. Po oddzieleniu grzybni filtrat zadawany jest roztworem  $CaCl_2$ . Stosując węglan sodu, osiąga się  $pH = 8,8-9,2$ . Przy tej wartości  $pH$  wytrąca się sól wapniowa, która zostaje odfiltrowana. Metody oczyszczania takiej soli wapniowej antybiotyku polegają na rozłożeniu jej rozcieńczonym  $H_2SO_4$  i ponownym wytrąceniu.

### III.2. Biosynteza naturalnych penicylin

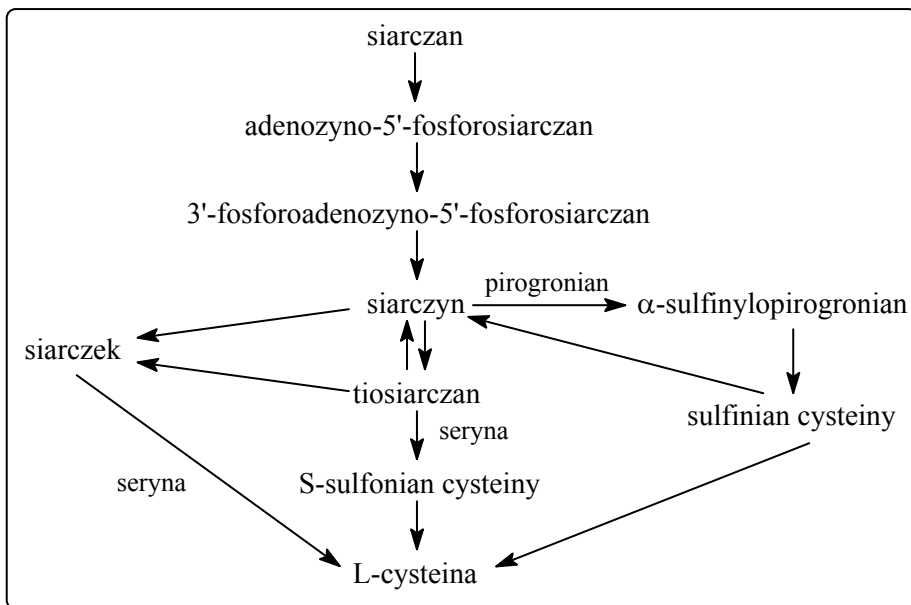
Penicyliny naturalne są wytwarzane przez *Penicillium chrysogenum*. Tylko dwie penicyliny są produkowane metodą biosyntezy: benzylopenicylina i fenoksymetylopenicylina. Pozostałe powstają w wyniku modyfikacji kwasu 6-AP (aminopenicylanowego). Kwas 6-AP otrzymuje się jako wynik enzymatycznej reakcji amidazy z benzylopenicyliną:



#### Biosynteza benzylopenicyliny

Prekursorami głównego szkieletu są L-cysteina i D-walina. Do kondensacji tych dwóch cząsteczek aminokwasów potrzebny jest udział kwasu  $\alpha$ -L-aminoadypinowego.

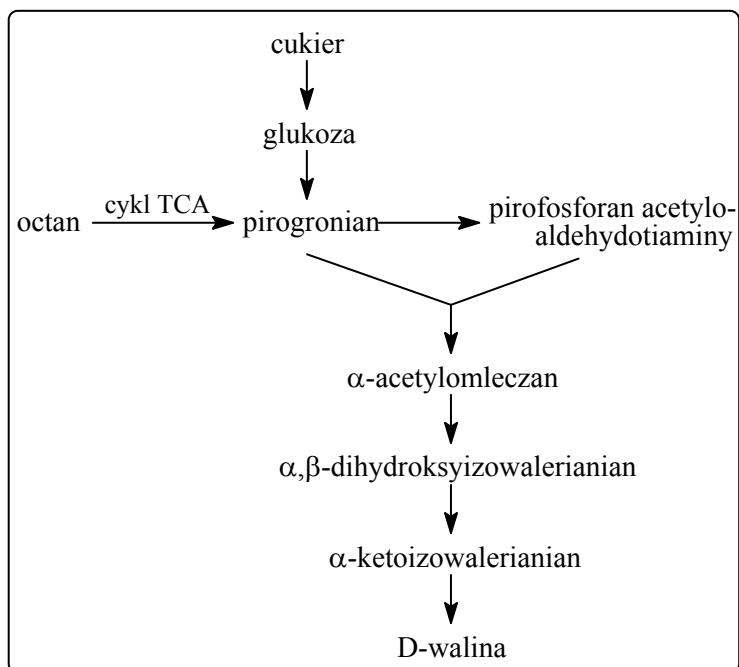
W biosyntezie L-cysteiny bierze udział siarczan sodu lub tiosiarczan (VI) sodu, które – dodane do podłoża – stanowią źródło siarki dla tego aminokwasu.



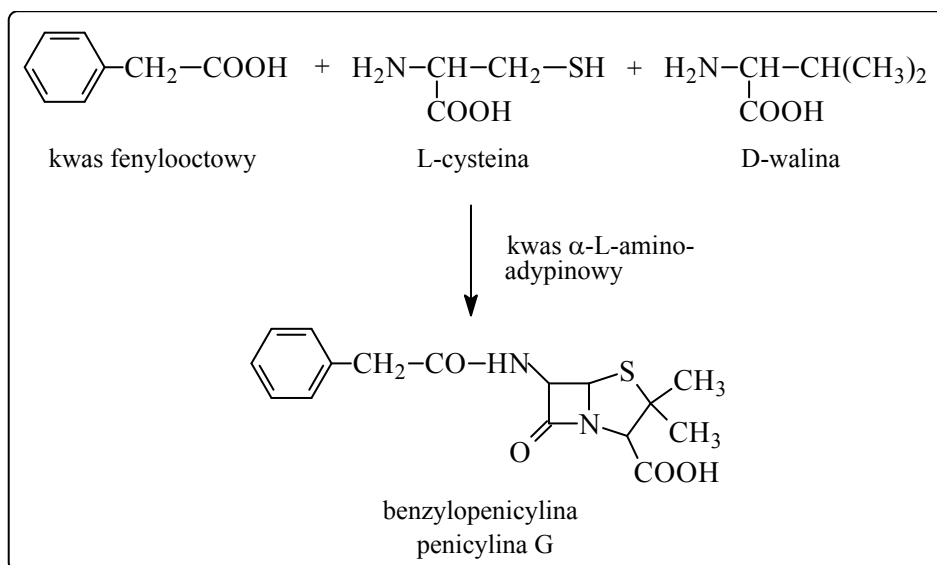
Rys.1. Biosynteza L-cysteiny



Synteza D-waliny następuje z cukrów i octanu.



Rys. 2. Biosynteza D-waliny

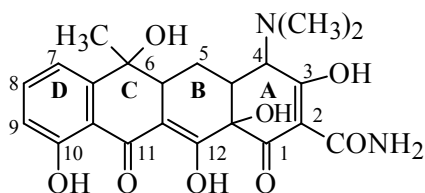


Rys. 3. Schemat biosyntezy benzylpenicyliny

### III.3. Biosynteza naturalnych tetracyklin

Tetracykliny są produkowane przez promieniowce z rzędu *Actinomycetes*, rodzaju *Streptomyces*. Podstawowy szkielet tetracyklin to układ naftacenu z kilkoma podstawnikami. Do naturalnych tetracyklin zalicza się:

- chlorotetracyklinę,
- tetracyklinę,
- oksytetracyklinę.



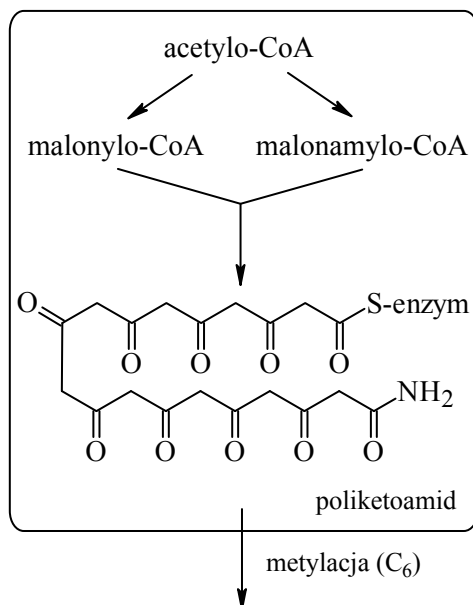
tetracyklina

jeśli chlorotetracyklina – to w pozycji 7 chlor,  
jeśli oksytetracyklina – to w pozycji 5 grupa OH

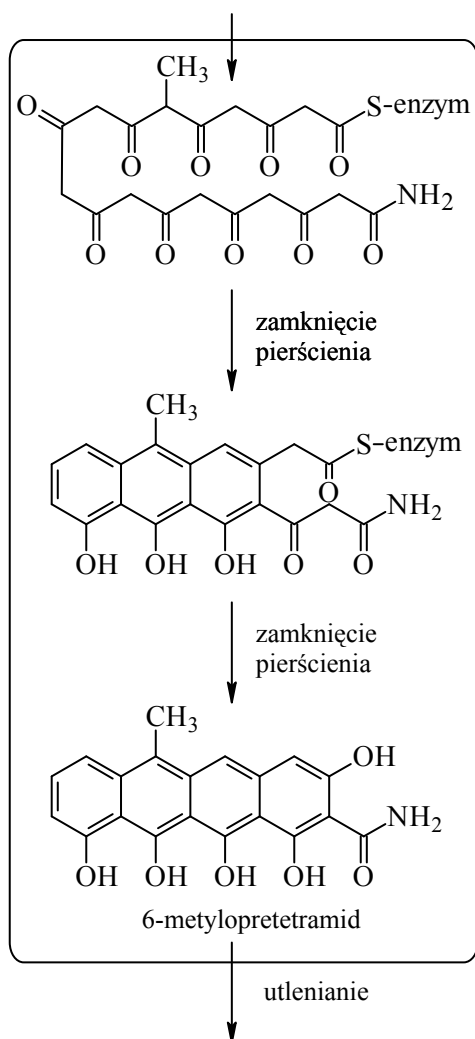
Biosyntezę naturalnych tetracyklin można ująć w trzech następujących etapach:

- etap I – budowa poliketoamidu,
- etap II – zamknięcie pierścienia i utworzenie aromatycznego pretetramidu,
- etap III – przegrupowanie do anhydrotetracykliny i końcowo do tetracykliny.

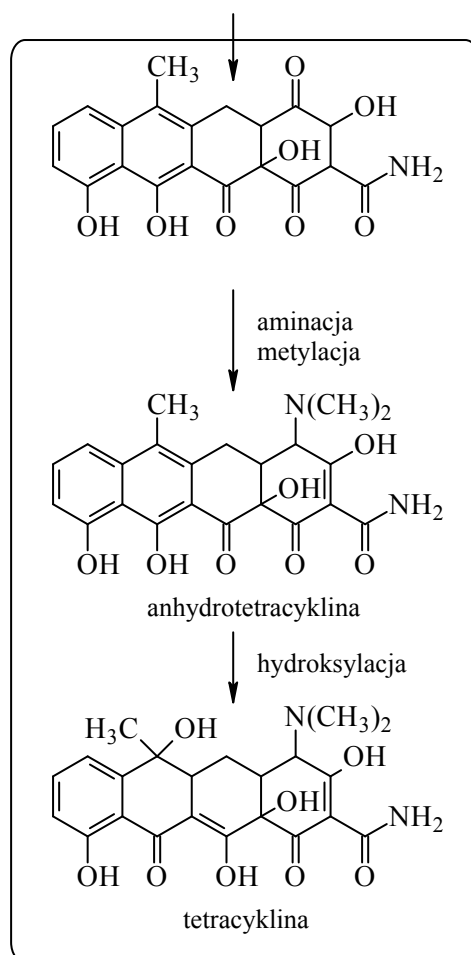
#### Etap I



## Etap II



## Etap III



Rys. 4. Etapy biosyntezy tetracykliny

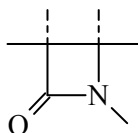
## Literatura

1. Z. Kowszyk-Gindifer, W. Sobiczewski: *Antybiotyki, współczesny stan wiedzy*, Przedsiębiorstwo Wydawnictw i Wystaw Przemysłu Chemicznego i Lekkiego „Chemil”, Warszawa 1990.
2. L. Kuczyński: *Technologia leków*, WNT, Warszawa 1971.
3. B. Birch: *Aleksander Fleming*, Czytelnik, Warszawa 1992.
4. A. Chmiel: *Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
5. J. Luba: *Technologia antybiotyków*, PZWL, Warszawa 1974.

## IV. ANTYBIOTYKI PÓLSYNTETYCZNE

### IV.1. Antybiotyki $\beta$ -laktamowe

Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe charakteryzują się obecnością w cząsteczce czterocząłkowego pierścienia laktamowego (rys. 1) i dzięki dużej aktywności przeciwbakteryjnej wobec drobnoustrojów chorobotwórczych, przy równocześnie niskiej toksyczności dla organizmu człowieka i zwierząt, należą do jednej z najcenniejszych grup leków.

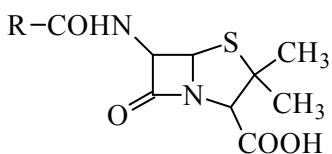


Rys. 1. Pierścień  $\beta$ -laktamowy

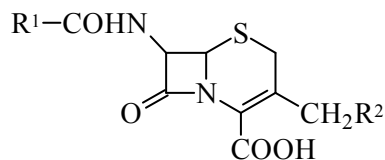
Wrażliwość drobnoustrojów na działanie antybiotyków  $\beta$ -laktamowych i aktywność tych leków są ze sobą ściśle sprzężone, co wynika z wzajemnego oddziaływania cząsteczki antybiotyku na komórkę bakteryjną i bakterii na leki. Oporność bakterii w stosunku do antybiotyków  $\beta$ -laktamowych sprowadza się głównie do zdolności wytwarzania zarówno przez bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne specyficznych enzymów  $\beta$ -laktamaz, katalizujących hydrolityczny proces rozerwania pierścienia  $\beta$ -laktamowego, prowadzący do unieczynnienia antybiotyku.

W związku z masowym stosowaniem antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, stwierdza się szybkie narastanie chorobotwórczych szczepów bakterii opornych na stosowane dotychczas leki z tej grupy. Stąd poszukiwania nowych leków o zwiększonej oporności na działanie  $\beta$ -laktamaz i rozszerzonym spektrum działania, a także dobrze wchłaniających się z przewodu pokarmowego, nadających się do stosowania doustnego.

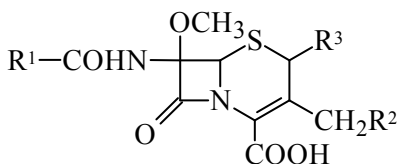
Grupa antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, na którą przez wiele lat składały się penicyliny i cefalosporyny, rozszerzyła się między innymi o karbapenemy (w tym o tienamycynę oraz pochodne kwasu oliwanowego), nokardycyny, penemy, kwas klawulanowy, monocykliczne monobaktamy (w tym formadycyny) oraz formamidopodstawne cefalosporyny, cefabacyny (rys. 2).



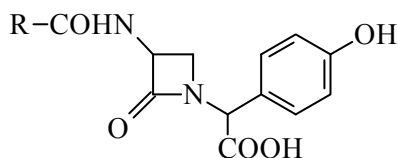
penicyliny (1940)



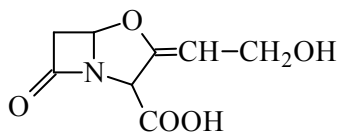
cefalosporyny (1950)



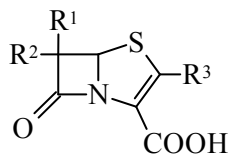
cefamycyny (1971)



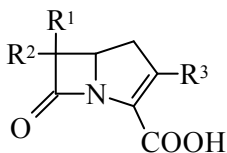
nokardycyny (1976)



kwas klawulanowy (1976)

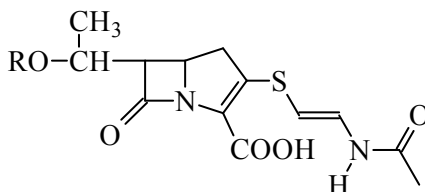


penemy (1976)

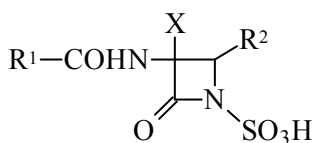


karbapenemy (1977)

( $R^1 = \text{CH}_3\text{CHOH}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ,  
 $R^3 = \text{SCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ; tienamycyna)

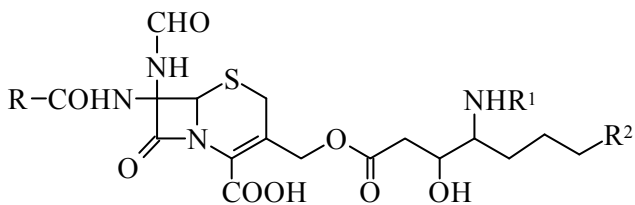


kwasy oliwanowe (1977)

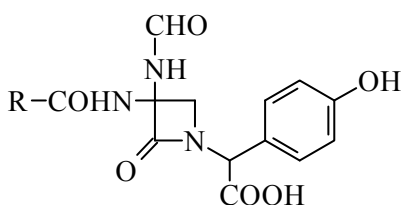


monobaktamy (1981)

( $X = \text{H}, \text{OCH}_3$ )



cefabacyny (1984)



formadicyny (1985)

Rys. 2. Typy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych

Próby uzyskania na drodze biosyntezy nowych penicylin nie przyniosły spodziewanych rezultatów w postaci wyizolowania nowych związków, bardziej aktywnych od dotychczas otrzymanych naturalnych penicylin (penicyliny benzylowej – G, fenoksymetylowej – V, alliliotymetylowej – O, czy też p-aminobenzylowej – T).

Dopiero otrzymanie na drodze biosyntezy, a następnie opanowanie procesu enzymatycznego rozszczepiania penicyliny G do kwasu 6-aminopenicylanowego (6-AP) umożliwiło syntezę nowych penicylin o szerokim zakresie działania.

#### IV.1.1. Penicyliny półsyntetyczne

W końcu lat pięćdziesiątych angielscy badacze G.N. Rolison i F.R. Batchelor otrzymali w znacznych ilościach kwas 6-AP. Opanowanie metod jego otrzymywania w skali przemysłowej przyniosło szybki rozwój badań nad penicylinami. Stosując kwas 6-AP jako substancję wyjściową, zsyntetyzowano dotychczas dziesiątki tysięcy półsyntetycznych penicylin, z których praktyczne zastosowanie znalazło jedynie około trzydziestu.

##### IV.1.1.1. Metody otrzymywania kwasu 6-aminopenicylanowego

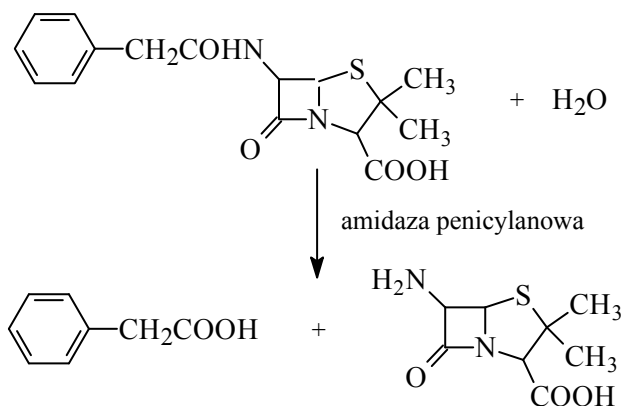
###### IV.1.1.1.1. Metody biologiczne

###### a) Metoda biosyntezy

W ten sposób Batchelor i inni (w 1959 r.) wyodrębnili kwas 6-AP z brzezki fermentacyjnej *Penicillium chrysogenum*, stosując podłoże nie posiadające prekursorów łańcucha. Metoda ta nie ma dotychczas praktycznego znaczenia i została wyparta z chwilą opanowania enzymatycznego rozszczepienia penicyliny G do kwasu 6-AP.

###### b) Metoda biochemiczna

Metoda szeroko stosowana przez wiele firm farmaceutycznych; polega na enzymatycznej hydrolizie naturalnych penicylin (najczęściej benzylopenicyliny, tzw. penicyliny G) za pomocą amidazy penicylanowej (według schematu), rozszczepiającej wyłącznie wiązanie amidowe w łańcuchu bocznym penicyliny, nie naruszając jednocześnie nietrwałego ugrupowania  $\beta$ -laktamowego:



Enzym ten (amidaza penicylanowa) jest wytwarzany przez szereg drobnoustrojów, np. *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis* var. *Niger* lub *Nocardia*. Kwas 6-AP można również uzyskać, działając amidazą wytworzoną przez szczep *Escherichia coli* ATCC 9637. Stosując bakterie *Escherichia coli* należy w pierwszym etapie otrzymać odpowiednio dużą ilość komórek bakteryjnych. Hodowlę prowadzi się w aparatach fermentacyjnych używanych do biosyntezy antybiotyków.

Obecnie do enzymatycznej hydrolizy naturalnej penicyliny G coraz częściej wykorzystuje się immobilizowane acylazy penicylinowe lub też wytwarzające ten enzym drobnoustroje. Takie immobilizowane preparaty enzymatyczne mogą być użyte nawet kilkaset razy. Większość firm farmaceutycznych produkujących kwas 6-AP stosuje oczyszczony immobilizowany enzym. Rzadziej stosowane są immobilizowane komórki (martwe), np. *Escherichia coli*, które usieciowane są aldehydem glutarowym i polietylenoiminą. Niektórzy bada-

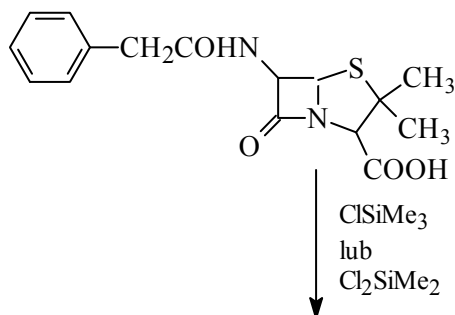
cze próbują technik inżynierii genetycznej do otrzymania komórek ze znacznie zwiększonym poziomem acylazy penicylinowej lub tzw. komórek pułapkowanych w żywicach epoksydowych. Te ostatnie nadają się do ciągłej produkcji kwasu 6-AP, i to zarówno z penicyliny G jak i penicyliny V. Okres półtrwania komórek immobilizowanych wynosi ok. 40 dni, w porównaniu z 1 dniem dla komórek wolnych. Należy wspomnieć, iż immobilizowane biokatalizatory mogą służyć nie tylko do rozkładu antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, ale również do ich syntezy, czego przykładem było otrzymanie ampicyliny z kwasu 6-AP, stosując jako biokatalizator immobilizowane komórki *Bacillus megaterium*. Podobną reakcję syntezy półsyntetycznych cefalosporyn z kwasu 7-aminocefalosporanowego (kwas 7-AC) przeprowadzono używając immobilizowanych komórek *Pseudomonas putida*. Kwas 7-AC był również półproduktem do wytwarzania cefalotyny, cefaloglicyny i cefamandolu z udziałem immobilizowanych komórek *Bacillus megaterium*. Reaktory służące do hydrolizy penicyliny do kwasu 6-AP muszą spełniać dodatkowe wymagania, w porównaniu z klasycznymi reaktorami (fermentorami), w których prowadzi się proces biosyntezy antybiotyku. W trakcie hydrolizy penicyliny dochodzi do silnego obniżenia wartości pH środowiska, co powoduje zahamowanie pracy enzymu, a także rozkład produktów reakcji. W związku z tym najkorzystniejsze jest zastosowanie serii reaktorów z kontrolą pH na wejściu do każdego z nich, z jednoczesną możliwością recykulacji płynu hydrolizowanego, co również ma zabezpieczać immobilizowany biokatalizator przed ewentualnym występowaniem zjawiska hamowania aktywności enzymu i utratą niestabilnych chemicznie produktów fermentacji (w przypadku reaktorów z immobilizowanymi komórkami produkującymi antybiotyki).

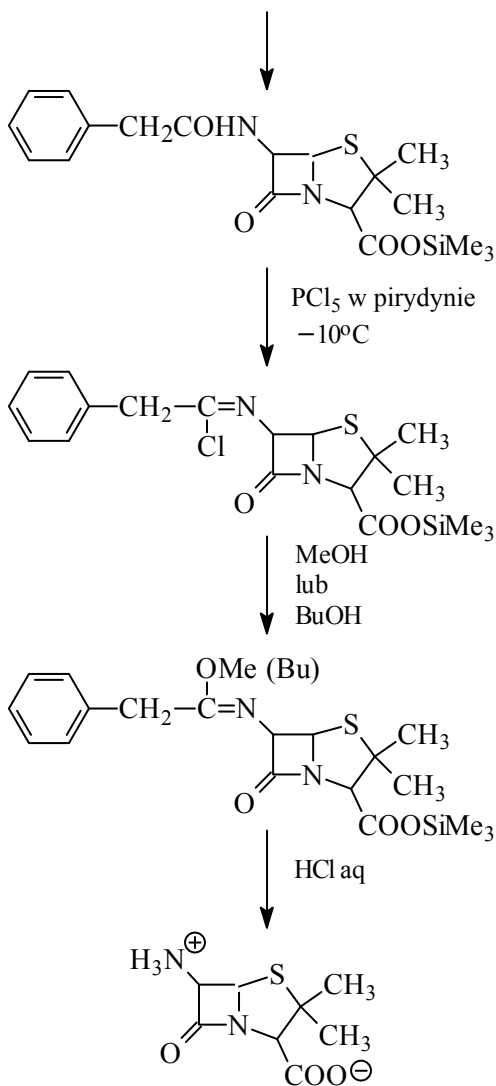
#### IV.1.1.1.2. Metody chemiczne

Istnieje kilka metod chemicznej deacylacji penicylin, zwłaszcza naturalnych. Wspólną cechą tych metod jest – w pierwszym etapie – zabezpieczenie grupy karboksylowej w naturalnych penicylinach. Bezpośrednia hydroliza wiązania amidowego jest niemożliwa, bowiem dochodzi również do rozerwania układu laktamowego. Do bardziej znanych metod należy:

a) metoda silylowania grupy karboksylowej przy udziale chlorotrimetylosilanu lub dichlorodimetylosilanu

Po zabezpieczeniu grupy karboksylowej w penicylinie naturalnej (penicylina G) poprzez powstanie odpowiedniego estru silylowego, działa się pentachlorkiem fosforu w pirydynie ( $-10^{\circ}\text{C}$ ), a następnie metanolem bądź butanolem. Reakcja przebiega poprzez stadium tworzenia się iminochlorku, a następnie iminoeteru, który po hydrolizie kwaśnej daje żądany kwas 6-AP [wg 3].

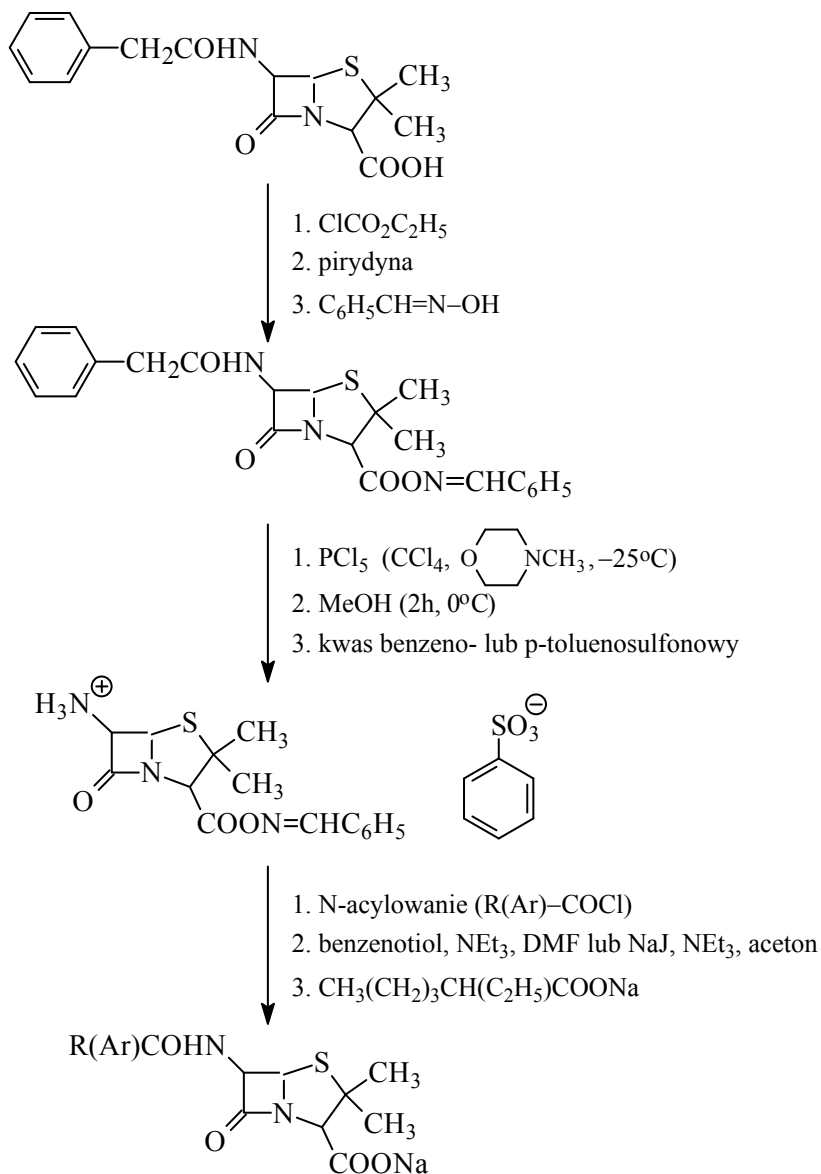




b) metoda Foskera [wg 3]

W metodzie tej grupę karboksylową w penicylinie G zabezpiecza się poprzez otrzymanie odpowiedniego oksymu O-(6-fenylacetamidopenicylanoilo)benzaldehydu bądź 2-furfuralu. Uzyskany oksym poddaje się reakcji chlorowania i metanolizy, a w końcowym etapie wydziela się oksym O-(6-aminopenicylanoilo)-benzaldehydu bądź 2-furfuralu, najczęściej w postaci soli z kwasem benzenosulfonowym. Taki związek stanowi produkt wyjściowy do N-acylowania. Wychodząc z penicyliny G i stosując tę metodę, otrzymano takie półsyntetyczne penicyliny, jak kloksacylinę, fenetycylinę i meticylinę.



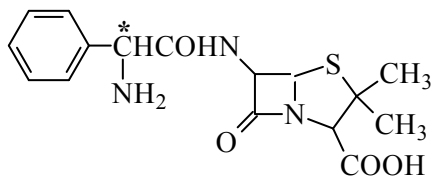


#### IV.1.2. Inne penicyliny półsyntetyczne i metody ich syntezy

##### IV.1.2.1. Przegląd najważniejszych penicylin półsyntetycznych

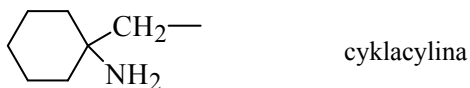
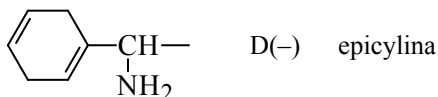
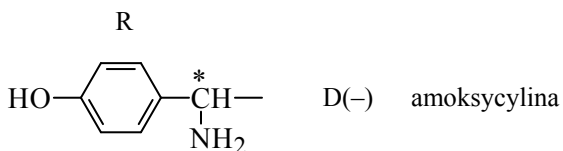
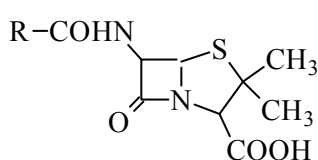
W grupie penicylin półsyntetycznych o zwiększonej oporności na działanie  $\beta$ -laktamazy gronkowcowej do najważniejszych antybiotyków należą otrzymane i wprowadzone do praktyki klinicznej w latach sześćdziesiątych: meticylina, nafcylina oraz penicyliny izoksazolowe (oksacylina, kloksacylina, dikloksacylina, flukloksacylina).

W grupie penicylin półsyntetycznych o szerokim spektrum działania największym osiągnięciem lat 60. było wprowadzenie do lecznictwa przez firmę Beecham ampicyliny o wzorze:

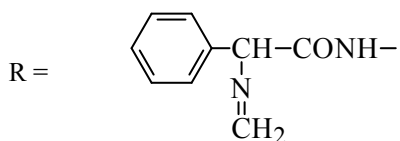
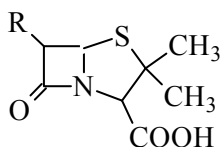


D(-)

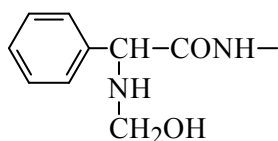
Duża skuteczność terapeutyczna ampicyliny stanowiła zachętę do syntezy jej analogów, które charakteryzowałyby się rozszerzonym zakresem działania antybiotycznego o zwiększonej aktywności. Do najważniejszych analogów ampicyliny należą stosowane w lecznictwie: amoksyacylina, epicylina, cyklacylina i azydocyлина.



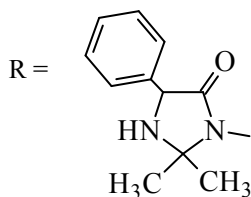
W wyniku poszukiwania pochodnych ampicyliny o lepszym indeksie terapeutycznym od wyjściowego antybiotyku wprowadzono do praktyki klinicznej dwa kolejne antybiotyki:



lub

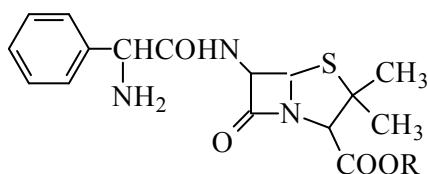


metampicylina

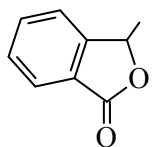
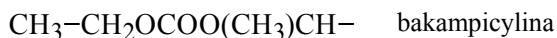
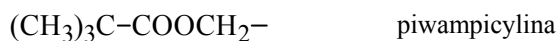


hetacylina

Metampicylina jest produktem kondensacji cząsteczki aldehydu mrówkowego z cząsteczką ampicyliny. W roztworach wodnych może występować w formie zasady Schiffa i jej hydratu. W roztworach wodnych ulega powolnej hydrolizie do wolnej ampicyliny. Hetacylina jest produktem przyłączenia cząsteczki acetonu do ampicyliny i jest nieaktywna *in vitro*, natomiast w roztworach wodnych ulega szybkiej hydrolizie do ampicyliny. Inny kierunek poszukiwania nowych leków w grupie ampicyliny i jej analogów wytyczało dążenie do znalezienia pochodnych o charakterze proleków, które byłyby lepiej i szybciej resorbowane z przewodu pokarmowego, łatwo ulegały *in vivo* rozszczepianiu do aktywnego związku, zapewniając tym samym uzyskanie wyższych poziomów czynnego antybiotyku we krwi i poszczególnych tkankach. Tego typu antybiotykami są dobrze wchłaniające się z przewodu pokarmowego i łatwo rozszczepialne *in vivo* estry ampicyliny o wzorze:



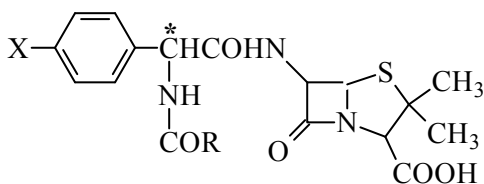
R

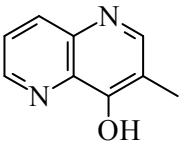
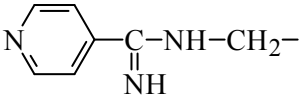
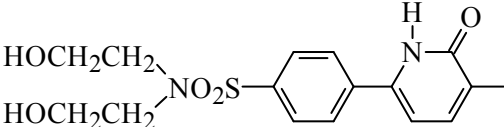
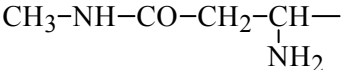
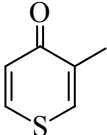
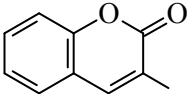
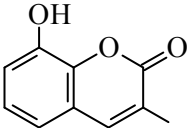


talampicylina

Dalsze prace nad syntezą nowych półsyntetycznych penicylin doprowadziły do otrzymania i wprowadzenia do lecznictwa antybiotyków, które określić można mianem N-acylo-pochodnych ampicyliny bądź amoksycykliny. Do tej grupy należą:

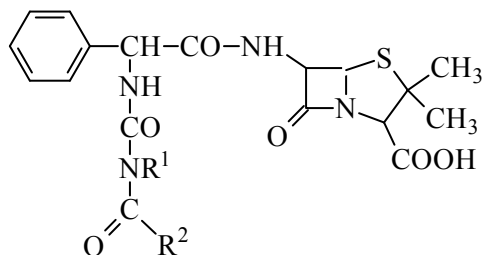
- apalcylina,
- pirbenicylina,
- pirydycylina,
- aspoksycylina,
- timoksycylina,
- TEI-1194,
- TEI-2012.



R	X	
	H	apalcylina
	H	pirbenicylina
	OH	pirydycylina
	OH	aspoksycylina
	OH	timoksycylina
	H	TEI-1194
	H	TEI-2012

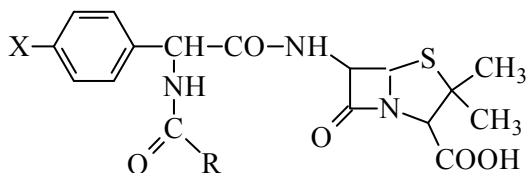
Penicyliny TEI-1194 i TEI-2012 są antybiotykami o szerokim zakresie działania, obejmującym pałeczki *P. aeruginosa*. W stosunku do tych drobnoustrojów rejestruje się 8–32 razy wyższą ich aktywność od aktywności karbenicyliny. Ich działanie na drobnoustroje *Proteus spp.* jest zbliżone do działania karbenicyliny.

Na początku lat 70. dokonano równoległe w laboratoriach firm Bayer, Beechem i Bristol odkrycia, iż N-karbamoiloacylopochodne ampicyliny ( $\alpha$ -acyloureidopenicyliny) odznaczają się zwiększoną aktywnością w stosunku do wielu ampicylinoopornych drobnoustrojów Gram-ujemnych, jak *Proteus*, *Klebsiella* i inne.



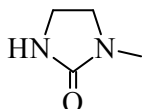
Przeprowadzono szeroko zakrojone badania nad zależnością pomiędzy typem podstawników  $R^1$  i  $R^2$  a aktywnością przeciwbakteryjną *in vitro* i efektywnością terapeutyczną *in vivo* wielu setek preparatów z tej nowej grupy pochodnych ampicyliny.

Stwierdzono, że najkorzystniejszym indeksem terapeutycznym odznaczają się te pochodne, w których podstawniki  $R^1$  i  $R^2$  łącznie z ugrupowaniem  $-N-C=O$  tworzą układ cykliczny. Z tej wąskiej grupy pochodnych ampicyliny, a także amoksycyliny, wprowadzono do praktyki klinicznej kilka preparatów:

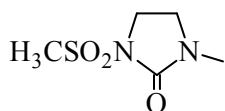


R

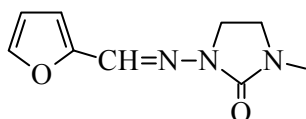
X



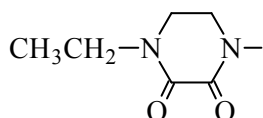
H azlocylina



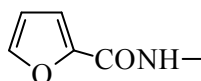
H mezlocylina



OH furazlocylina



H piperacylina

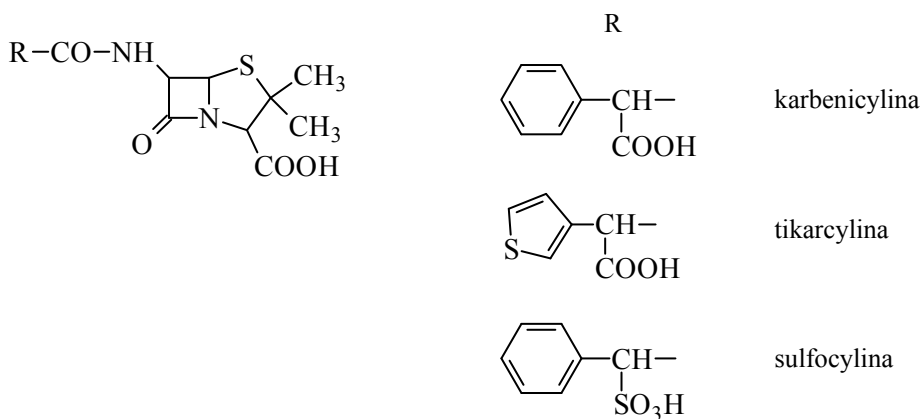


H furbenicylina

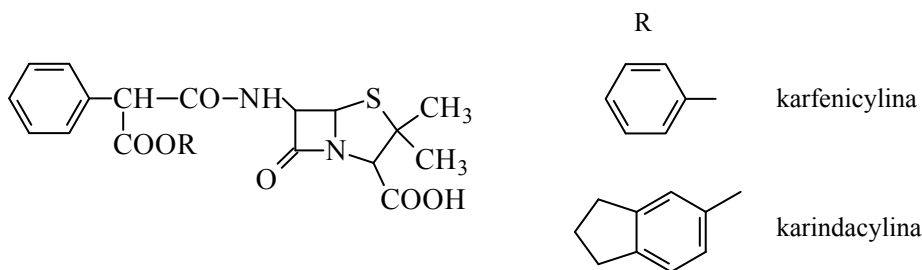
Podobnie jak w przypadku ampicyliny, poznanie cennych właściwości karbenicyliny, wprowadzonej do lecznictwa w 1967 roku, stało się bodźcem do poszukiwania jej analogów, o korzystniejszym zakresie działania przeciwbakteryjnego i lepszych właściwościach farmakologicznych, oraz pochodnych resorbujących się z przewodu pokarmowego, zapewniających uzyskanie wyższych poziomów aktywnego antybiotyku w surowicy krwi i poszczególnych narządach.

Sama karbenicylina, stanowiąca karboksylowy analog ampicyliny, jest pierwszą półsyntetyczną penicyliną wykazującą wysoką aktywność, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, wobec Gram-ujemnych pałeczek, szczególnie *P. aeruginosa* oraz indolo-dodatnich *Proteus spp.*

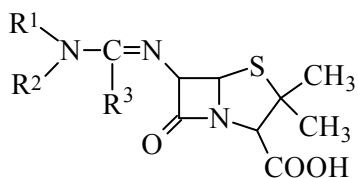
W grupie analogów karbenicyliny do praktyki klinicznej wprowadzono preparaty o wzorach:



Zakres działania karbenicyliny rozszerzają wprowadzone do lecznictwa dwie jej pochodne, zawierające w łańcuchu bocznym zestyfikowaną grupę karboksylową (ester fenylowy i ester indanylowy). Oba preparaty są, w przeciwieństwie do karbenicyliny, trwale w środowisku soku żołądkowego i odznaczają się dobrym wchłanianiem z przewodu pokarmowego:

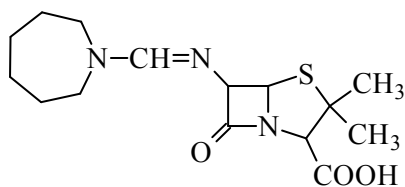


Interesującą grupę pochodnych 6-APA tworzą połączenia, które – zamiast powszechnie występującego w penicylinach półsyntetycznych ugrupowania amidowego – zawierają strukturę amidynową. Stąd penicyliny te często określa się mianem amidynopenicylin.



W wyniku badań nad zależnością pomiędzy budową chemiczną a działaniem przeciwbakteryjnym tej nowej klasy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych stwierdzono, że różnie podstawione formamidynopenicyliny, w szczególności pochodne cyklicznych imin, charakteryzują się silnym, selektywnym działaniem antybiotycznym wobec szeregu drobnoustrojów Gram-ujemnych. Z tej wąskiej już grupy amidynopenicylin, najkorzystniejszym indeksem terapeutycznym odznaczała się pochodna zawierająca w łańcuchu bocznym resztę heksametylenoiminy, znana w Polsce jako preparat HX lub mecylinam (nazwa międzynarodowa). Penicylina ta odznacza się wyjątkowo silnym, selektywnym działaniem wobec pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* (MIC dla niektórych szczepów *E. coli* wynoszą poniżej 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ).

Poszukując pochodnych amidynopenicylin o lepszej wchłanianości z przewodu pokarmowego, otrzymano labilne *in vivo* estry mecylinamu (analogiczne jak w przypadku ampicyliny), tj. ester piwaloilooksymetylowy (piwmecylinam) i ester 1-etoksykarbonyloksyetylowy (bakmecylinam).

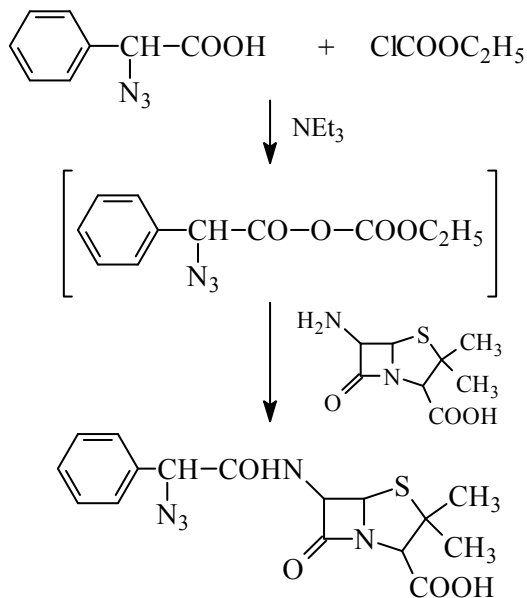


R

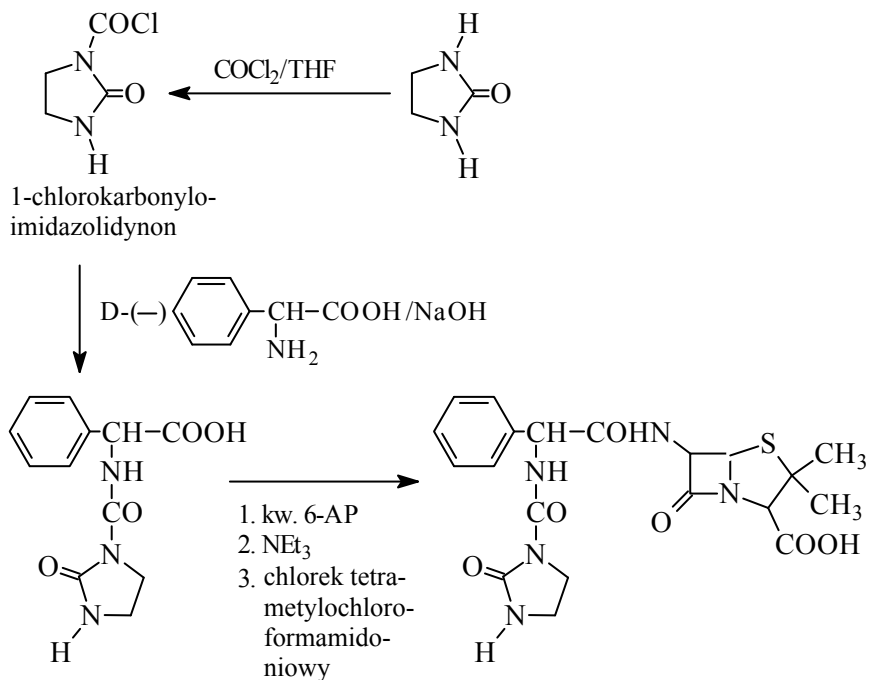
H	mecylinam (preparat HX)
$(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$	piwmecylinam
$\text{CH}_3-\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-$	bakmecylinam

Wykorzystując wyraźny efekt synergistycznej kombinacji mecylinamu z innymi  $\beta$ -laktamowymi antybiotykami, w tym szczególnie z ampicyliną, wprowadzono w latach osiemdziesiątych preparat pod nazwą Miraxid, stanowiący kombinację piwampicyliny w formie wolnej zasady z piwmecylinamem w postaci chlorowodoru (5 : 4). Preparat ten charakteryzuje się rozszerzonym i pogłębionym działaniem w stosunku do ampicyliny wobec większości pałeczek Gram-ujemnych. Interesujący również jest fakt jego aktywności na wrażliwe na penicylinę gronkowce i paciorkowce.

## IV.1.2.2. Przykłady syntezy niektórych półsyntetycznych penicylin

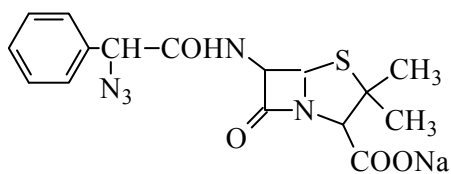


azydocylina [wg 6]

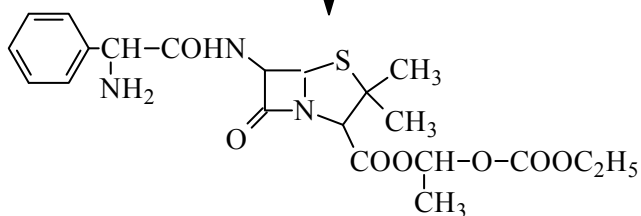
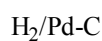
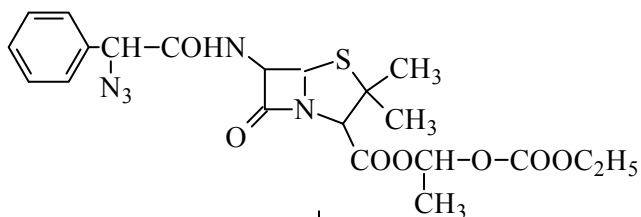
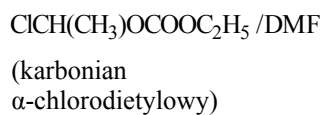


azlocylina [wg 7]

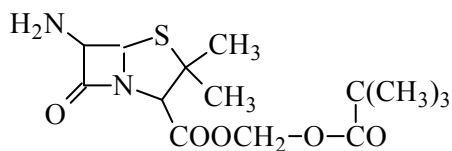
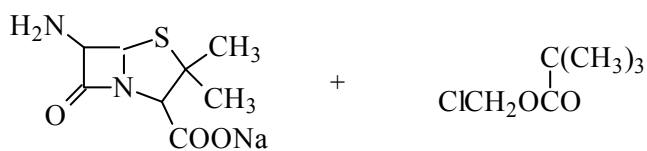


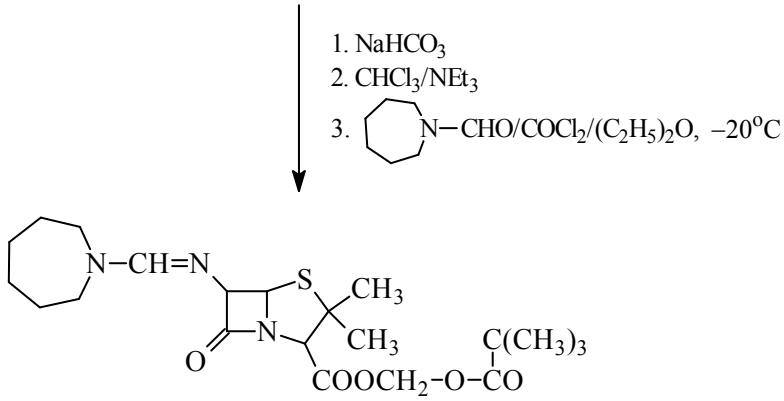


azydocylina (sól sodowa)

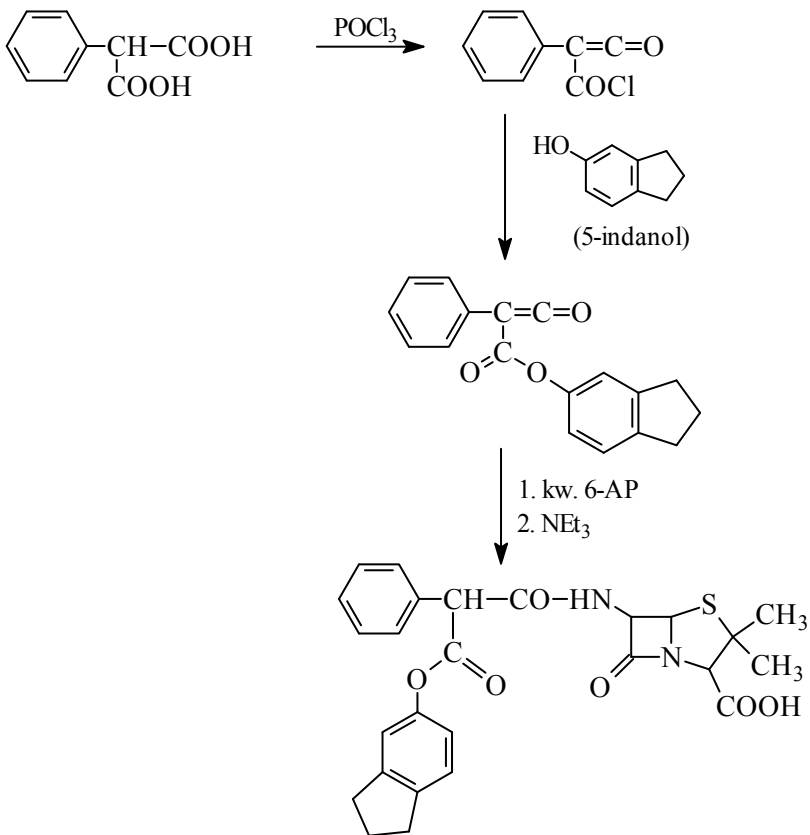


bakampicylina [wg 8]

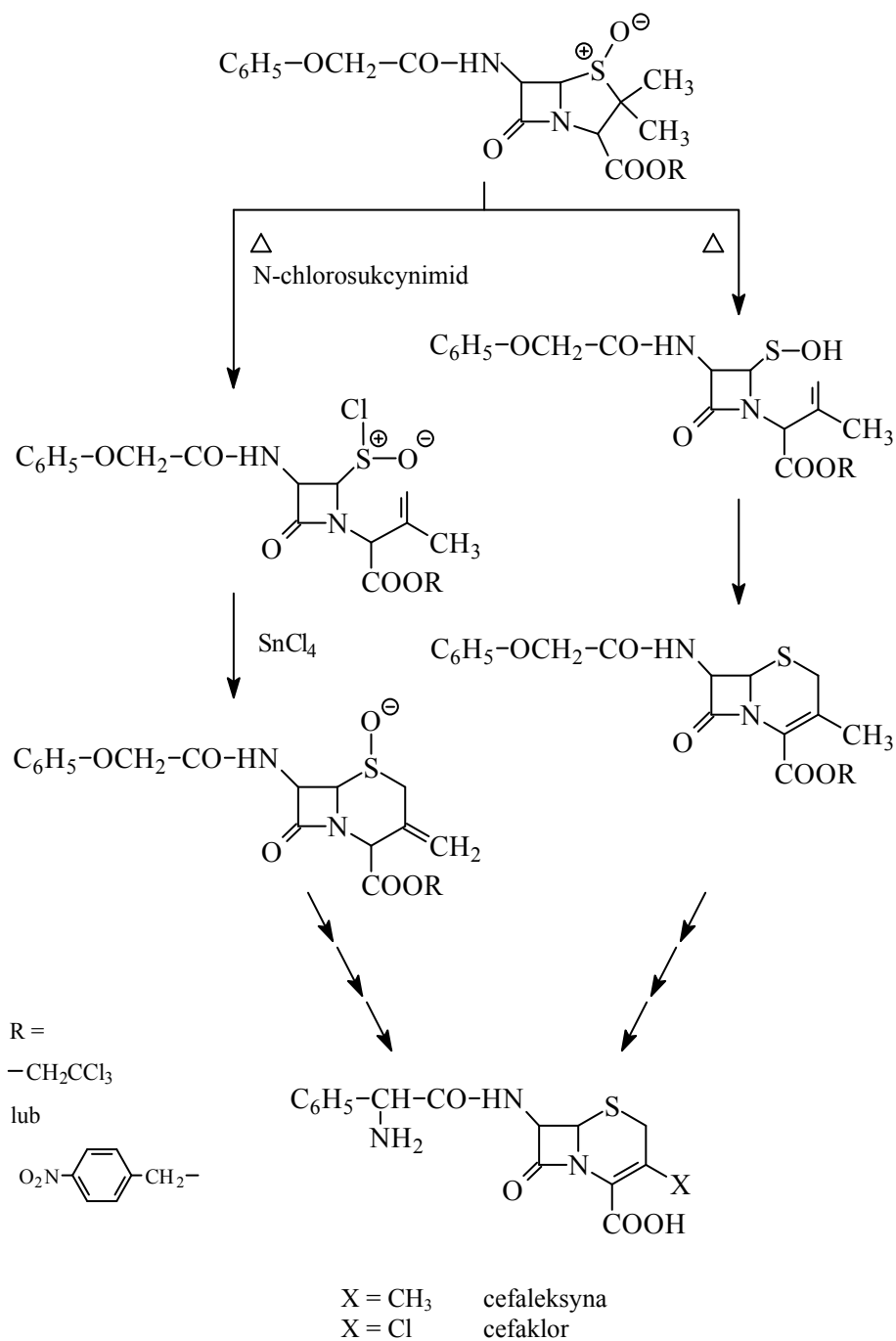




piwmeccylinam [wg 9]



karindacylina [wg 10]



Rys. 3. Schemat syntezy cefalosporyn z penicylin

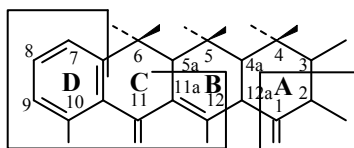
### IV.1.3. Konwersja penicylin do cefalosporyn [wg 4]

Prace prowadzone przez Morina i wsp. pozwoliły na praktyczne wykorzystanie penicylin do syntezy niektórych cefalosporyn. Poprzez przemianę układu penemu, sulfotlenkowej pochodnej penicyliny V, w warunkach podwyższonej temperatury i w środowisku kwaśnym dochodzi do powstawania układu deacetoksycefalosporyny m.in. przez odpowiedni kwas sulfenowy. Jest to atrakcyjna metoda pozyskiwania cefalosporyn, mająca jednak zastosowanie wyłącznie do ważnych ze względów klinicznych i komercyjnych cefalosporyn, takich jak cefaleksyna i cefaklor. Alternatywną metodą otrzymywania wymienionych cefalosporyn na skalę techniczną jest zastosowanie jako produktu wyjściowego trichloroetylowego estru sulfotlenkowej pochodnej penicyliny. W warunkach reakcji przy udziale N-chlorosukcynimidu dochodzi do powstania chlorosulfinylovej pochodnej penicyliny, która w obecności kwasu Lewisa ( $\text{SnCl}_4$ ) tworzy układ sulfotlenku 3-metyleno-cefamu. Redukcja ugrupowania sulfotlenkowego i ozonoliza podwójnego wiązania daje układ C(3)-hydroksycefemu. Dalsze przemiany chemiczne prowadzą do cefakloru. Uproszczony schemat omówionych przemian przedstawiono na rys. 3.

## IV.2. Tetracykliny i antybiotyki tetracyklinopodobne

Antybiotyki z grupy tetracyklin pojawiły się w lecznictwie w roku 1948. Pierwszym związkiem była chlorotetracyklina (Aureomycin). W ciągu następnych lat pojawiły się w lecznictwie następne antybiotyki z tej grupy, m.in. oksytetracyklina (Terramycin), tetracyklina (Achromycin) oraz demeklocyklina (Declomycin). Związki te były wytwarzane na drodze biosyntezy. Tetracyklinę otrzymano również na drodze katalitycznej redukcji chlortetracykliny.

Tetracykliny są grupą antybiotyków posiadających identyczną, czteropierścieniową budowę, różniącą się jedynie chemicznie odmiennymi podstawnikami. Związki te stanowią pochodne 1-, 4-, 4a-, 5-, 5a-, 6-, 11-, 12a-oktahydronaftacenu z układem podwójnych wiązań. Atom węgla w pozycji 12a oddziela dwie strefy chromoforowe A i BCD, natomiast atomy węgla 4, 4a, 5a, 6 i 12a, dzięki odpowiednim podstawnikom, są atomami asymetrycznymi.



Układ pierścieni w cząsteczce tetracyklin

Tetracykliny są związkami amfoterycznymi, a więc tworzącymi sole zarówno z kwasami, jak i z zasadami. Łatwo tworzą odwracalne kompleksy z kationami metali, anionami, niektórymi związkami naturalnymi i biopolimerami.

### IV.2.1. Półsyntetyczne tetracykliny

Z uwagi na fakt, iż tetracykliny naturalne słabo rozpuszczają się w wodzie, co w praktyce uniemożliwia stosowanie ich w postaci iniekcji, już w latach 50. rozpoczęto poszukiwanie nowych pochodnych naturalnych tetracyklin. Prace badawcze zmierzały z jednej strony do uzyskania pochodnych lepiej rozpuszczalnych w wodzie, a równocześnie lepiej tolerowanych przez organizm, z drugiej zaś do uzyskania połączeń, które odznaczałyby się szerszymi i korzystniejszymi właściwościami terapeutycznymi. Jedną z pierwszych pochodnych (rok 1956) była piroolidynometylotetracyklina (rolitetracyklina, Tetraverinum),

otrzymana w wyniku działania na tetracyklinę formaldehydem i pirolidyną na drodze reakcji Mannicha. Otrzymany jako N-zasada Mannicha związek, w porównaniu z wyjściową tetracykliną odznaczał się bardzo dobrą rozpuszczalnością w wodzie i znalazł zastosowanie w sporządzeniu form iniekcyjnych tego antybiotyku. Istnieje szereg innych analogów rolitetracykliny wprowadzonych do lecznictwa, np. penimepicyklina (Penetracylina), limecyklina (Tetralysal). W trakcie dalszych szeroko prowadzonych prac badawczych w wielu ośrodkach naukowych, otrzymano szereg związków o zmienionej budowie chemicznej, z których tylko nieliczne wykazały korzystne właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Najkorzystniejszymi właściwościami farmakologicznymi charakteryzowały się trzy półsyntetyczne tetracykliny o zmiennej strukturze cząsteczki: 6-metyleno-5-hydroksytetracyklina (metacyklina), występująca w lecznictwie pod nazwą Rondomycin,  $\alpha$ -6-dezoksy-5-hydroksytetracyklina (doksycyklina – Vibramycin) i 6-desmetylo-6-dezoksy-7-dimetyloaminotetracyklina (minocyklina – Klinomycin) (tab. 1).

Wymienione preparaty znacznie lepiej przenikają do komórek drobnoustrojów wrażliwych i opornych na działanie tetracykliny, zabijają je w znacznie mniejszych stężeniach, a więc w porównaniu w tetracyklinami naturalnymi wykazują większą aktywność właściwą wobec wielu szczepów chorobotwórczych.

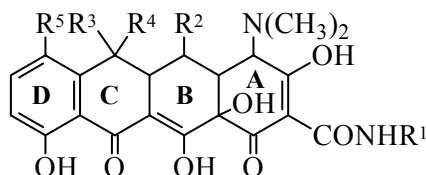



Tabela 1

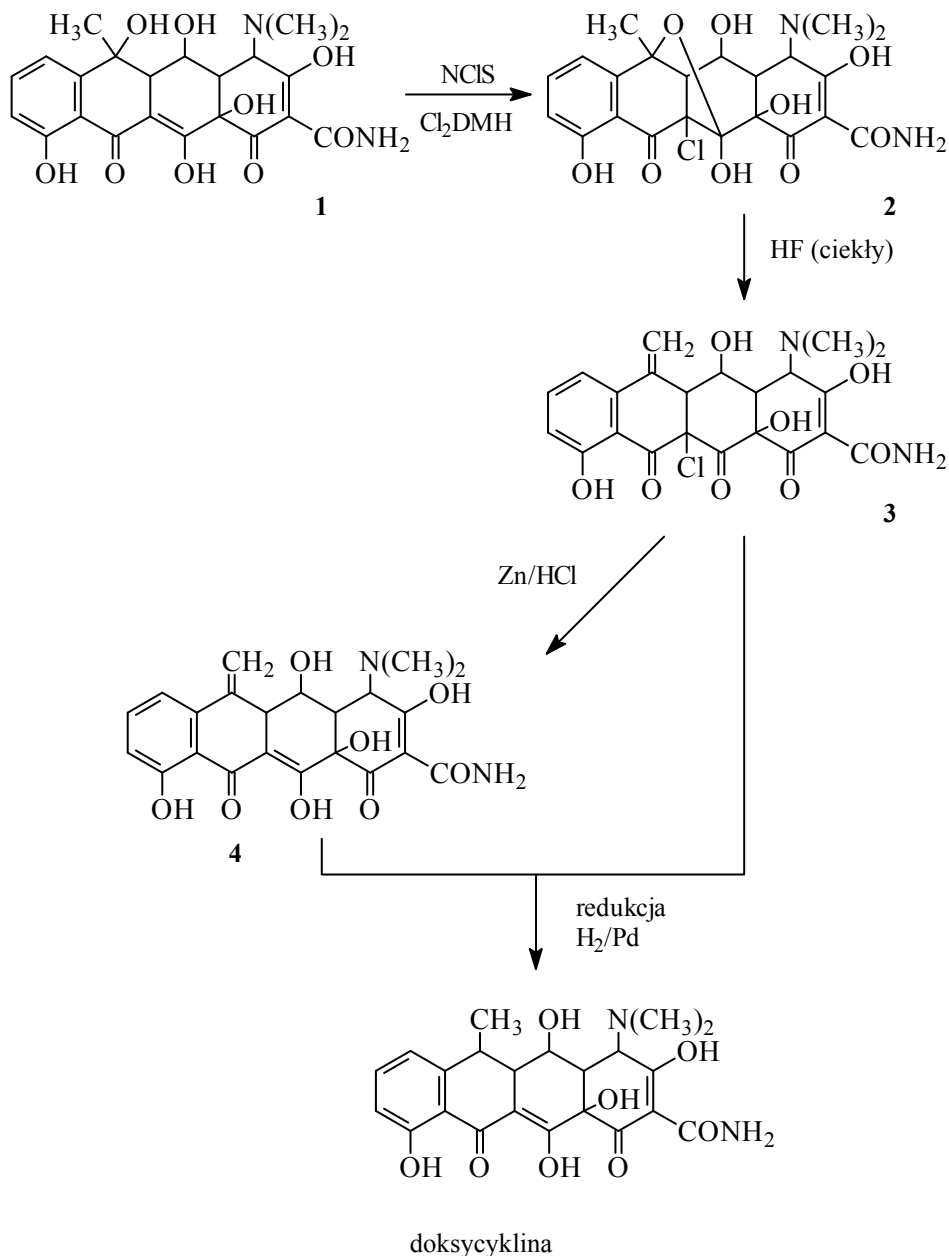
Tetracykliny i ich pochodne [wg 2]

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	Nazwa
H	H	OH	CH <sub>3</sub>	Cl	chlorotetracyklina
H	OH	OH	CH <sub>3</sub>	H	oksytetracyklina
H	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	tetracyklina
H	H	OH	H	Cl	desmetylochlorotetracyklina
CH <sub>2</sub> -N 	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	rolitetracyklina
H	OH	–	=CH <sub>2</sub>	H	metacyklina
H	OH	H	CH <sub>3</sub>	H	doksycyklina
H	H	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	minocyklina

Z omawianych pochodnych tetracyklin najbardziej interesującym związkiem, z praktycznego punktu widzenia, dzięki swym znanym właściwościom jest doksycyklina (Vibramycin).

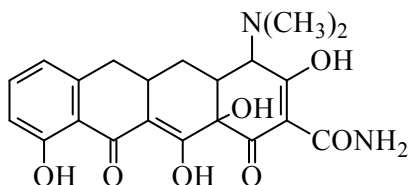
Doksycyklinę, podobnie jak i metacyklinę, otrzymuje się na drodze chemicznej poprzez odpowiednie modyfikacje chemiczne naturalnej oksytetracykliny (rys. 4). W wyniku chlorowania oksytetracykliny (zw. **1**) przy użyciu N-chlorosukcynimidu (NCIS) lub N,N-dichlorodimetylohydantoiny (Cl<sub>2</sub>DMH) otrzymuje się w pierwszym etapie syntezy związek **2**, będący 6,12-hemiketalem-11a-chloro-5-hydroksytetracykliny.

Związek **2**, poddany działaniu ciekłego fluorowodoru ulega dehydratacji, w wyniku czego powstaje 11a-chloro-6-metyleno-5-hydroksytetracyklina (zw. **3**), która poddana redukcji daje metacyklinę (zw. **4**). Katalityczna redukcja ( $H_2/Pd$ ), zarówno związku **3** jak i **4**, prowadzi do powstania doksyicykliny, którą można stosunkowo łatwo wydzielić z masy poreakcyjnej w postaci trudno rozpuszczalnych w wodzie 5-sulfosalicylanów (rys. 4).



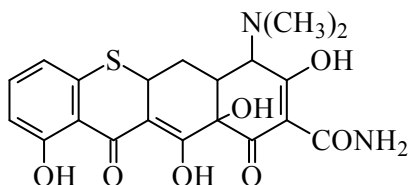
Rys. 4. Synteza doksyicykliny

Synteza chemiczna tetracyklin okazuje się zadaniem trudnym m.in. z uwagi na fakt, iż związki z grupy tetracyklin są wyjątkowo wrażliwe na działanie kwasów, zasad i czynników redukujących. Pierwszym antybiotykiem tetracyklinowym otrzymanym na drodze pełnej syntezy i charakteryzującym się pełną aktywnością biologiczną była 6-desmetylo-6-dezoksytetracyklina, o identycznej strukturze przestrzennej jak naturalne tetracykliny.



6-desmetylo-6-dezoksytetracyklina

Związkiem, który w badaniach klinicznych wykazywał dużą aktywność wobec szczepów wrażliwych jak i niewrażliwych na tetracykliny (indolo-ujemne i indolo-dodatnie szczepy *Proteus*) jest 6-tiatetracyklina. Związek ten jest przykładem możliwości korzystnych zmian właściwości biologicznych cząsteczek tetracyklin na drodze modyfikacji ich budowy chemicznej.



6-tiatetracyklina

### Literatura

1. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5<sup>th</sup> Edition, Vol. 4: *Therapeutic Agents*, Ed. M.E. Wolff; John Wiley & Sons, Inc., New York 1997.
2. Z. Kowszyk-Gindifer, W. Sobiczewski: *Antybiotyki, współczesny stan wiedzy*, Przedsiębiorstwo Wydawnictwo i Wystaw Przemysłu Chemicznego i Lekkiego „Chemil”, Warszawa 1990.
3. G.R. Fosker, K.D. Hardy, J.H.C. Nayler, (Mrs) P. Seggery, E.R. Stove: *Derivatives of 6-Aminopenicillanic Acid. Part X. A non-enzymatic conversion of Benzylpenicillin into semi-synthetic Penicillins*, J. Chem. Soc., 1971, 1917.
4. R.B. Morin, B.G. Jackson, R.A. Mueller, E.R. Lavagnino, W.B. Scanlon, S.L. Andrews: *Chemistry of Cephalosporin Antibiotics. III. Chemical Correlation of Penicillin and Cephalosporin Antibiotics*, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 1896.
5. A. Zejc, M. Gorczyca: *Chemia leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
6. USP 3293242 (Beecham); ert. 20.12.1966; G.B.-Prior. 21.7.1961.
7. USP 3933795 (Bayer), ert; 20.1.1976; D-Prior. 25.5.1970.
8. USP 3873521 (Astra) 25.3.1975.
9. GB-P 1293590 (Lovens; Anm. 11.11.1970; GB-Prior. 11.11.1969, 8.7.1970); USP 3957764 (Loevens; ert. 19.5.1976; GB-Prior. 11.11.1969, 8.7.1970).
10. USP 3557090 (Pfizer; ert. 19.1.1971. Anm. 5.1.1968); DAS 1967024 (Pfizer; Anm. 3.1.1969; USA-Prior. 5.1.1968).

## V. INSULINA

Stężenie glukozy na czczo jest u każdego zdrowego człowieka wartością względnie stałą. W populacji ludzi zdrowych zakres wartości prawidłowych glukozy waha się w granicach 3,7–5,0 mmol/l (65–90 mg/100 ml). W ciągu doby stężenie to zmienia się jednak w szerokim zakresie. Po posiłku dochodzi do przejściowego zwiększenia stężenia glukozy, czasem nawet do poziomu tzw. progu nerkowego (stężenie glukozy 9–10 mmol/l – 160–180 mg/100 ml) – u zdrowych ludzi poziom ten nigdy nie zostaje przekroczony. Gospodarka glukozą jest bardzo oszczędna. Koordynacja działania homeostatycznego glukozy odbywa się przy udziale układów: nerwowego i hormonalnego. Podstawowe znaczenie w regulacji gospodarki energetycznej spełnia układ hormonalny. Obejmuje on w zasadzie dwa przeciwstawne działające hormony – **insulinę** i **glukagon**. Oba te hormony mają źródło w wyspach trzustkowych, stanowiących tkankę wydzielania wewnętrznego (dokrewnego) tego gruczołu. Trzustka dorosłego, zdrowego człowieka zawiera ok. 1 miliona wysp Langerhansa. Około 80% komórek tych wysp stanowią **komórki  $\beta$** , wytwarzające insulinę. Około 15% wysp stanowią **komórki  $\alpha$** , wytwarzające glukagon. Są one jednocześnie komórkami receptorowymi i regulacyjnymi. Stanowią swoisty narząd, który bezustannie rejestruje stężenie związków energetycznych w płynie pozakomórkowym i dostosowuje do tego własne wytwarzanie czynników hormonalnych i ich wydzielanie do krwiobiegu.

Działanie glukozy na komórki  $\alpha$  i  $\beta$  jest przeciwstawne w skutkach.

Działanie insuliny można najogólniej określić jako działanie **anaboliczne**, polegające na ułatwieniu wprowadzania glukozy do komórek tkanek insulinozależnych oraz na magazynowaniu substratów i zasobów energetycznych (np. nadmiar glukozy w postaci glikogenu w wątrobie).

Działanie glukagonu jest działaniem **katabolicznym** i polega na mobilizacji oraz uwolnieniu materiału energetycznego z rezerw energetycznych (np. glikogenu).

### **Budowa chemiczna insuliny**

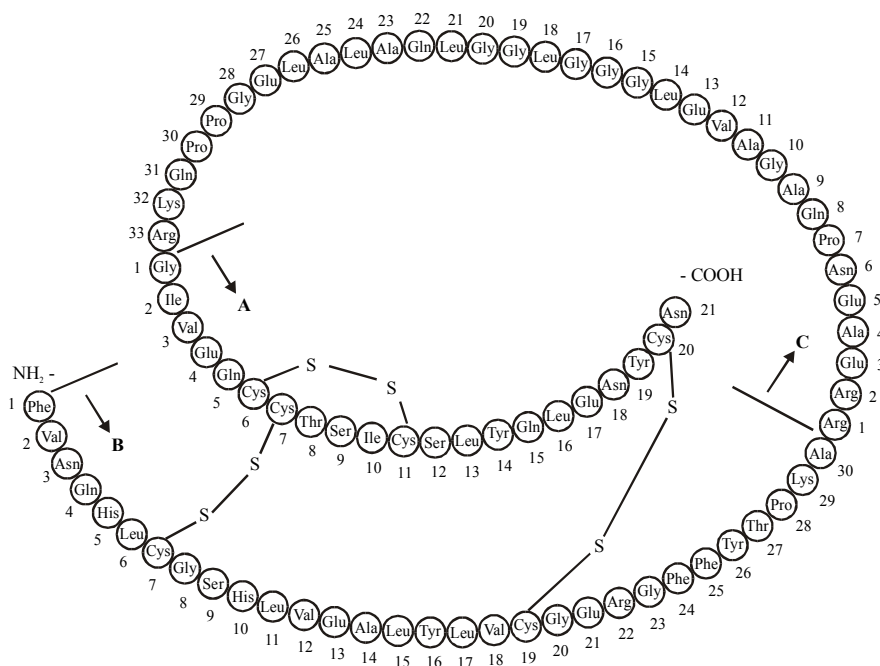
Insulina jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 6000. Cząsteczka insuliny składa się z dwóch łańcuchów: A i B. Łańcuch A zawiera 21 aminokwasów, łańcuch B – 30. Wiązania disulfidowe między łańcuchami są wytwarzane pomiędzy cząsteczkami cysteiny, zajmujących 7 i 20 pozycję w łańcuchu A oraz 7 i 19 pozycję w łańcuchu B (powstają ugrupowania cystynowe). Ponadto łańcuch A zawiera wewnątrzłańcuchowy mostek disulfidowy pomiędzy 6 i 11 cząsteczką w sekwencji aminokwasowej łańcucha A. Przez redukcję wiązań disulfidowych można otrzymać mieszaninę wolnych łańcuchów A i B, które nie wykazują już jednak żadnej aktywności biologicznej. Wskazuje to na istotne znaczenie wiązań disulfidowych w cząsteczce insuliny. Do tej pory nie wiadomo jednak, czy mostki disulfidowe są tymi ugrupowaniami, które reagują z receptorem tkankowym, czy też nadają cząsteczce hormonu taką konfigurację przestrzenną, która umożliwia rozpoznanie i związanie się z receptorem.

### **Biosynteza insuliny w komórkach $\beta$ wysp Langerhansa**

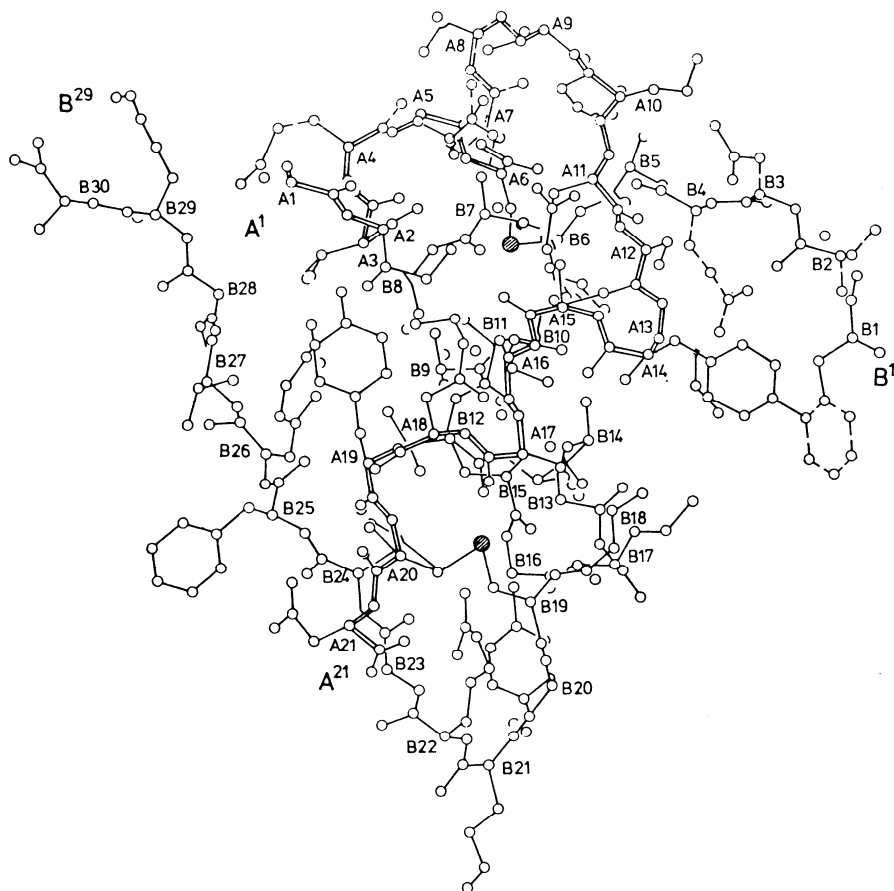
Insulina powstaje z jednołańcuchowego prekursora – proinsuliny (masa cząsteczkowa 9082) zbudowanej z 84 aminokwasów. Pojedynczy łańcuch proinsuliny rozpoczyna się N-końcówką fenyloalaniną; następująca dalej sekwencja trzydziestu kolejnych aminokwa-



sów odpowiada sekwencji łańcucha B. Sześćdziesiątym czwartym aminokwasem w łańcuchu proinsuliny jest N-końcowa glicyna łańcucha A, po której następuje normalna sekwencja tego łańcucha. Ostatnim, tj. osiemdziesiątym czwartym aminokwasem proinsuliny jest C-końcowa asparagina łańcucha A. Synteza proinsuliny odbywa się na rybosomach związanych z siateczką śródplazmatyczną. Bezpośrednim produktem transplatacji jest **pre-proinsulina**, zawierająca charakterystyczną sekwencję sygnałową w N-końcowym fragmencie łańcucha peptydowego. Sekwencja ta umożliwia związanie syntetyzowanego białka z błoną siateczki i jego transport przez błonę do wnętrza cysterny, gdzie następuje odszczepienie proinsuliny. Przez pączkowanie błon siateczki proinsulina jest transportowana do aparatu Golgiego, gdzie, w większości, ulega transformacji do aktywnego hormonu pod wpływem peptydaz. Końcowymi produktami przemiany są: insulina, tzw. peptyd łączący (C-peptyd) oraz wolne aminokwasy arginina i lizyna. Przez pączkowanie błon aparatu Golgiego powstają pęcherzyki wydzielnicze zawierające produkty transformacji proinsuliny. Zawartość pęcherzyków ulega zagęszczeniu, co nazywa się dojrzewaniem ziarnistości wydzielniczych, czyli ziarnistości  $\beta$ . Ziarnistości są uwalniane do cytoplazmy, w której pozostają wolne lub w połączeniu z podbłonowym układem mikrotubularnym komórki. Czynnikiem, który kontroluje wyrzut insuliny do krwiobiegu jest stężenie wolnego zjonizowanego Ca w obrębie cytoplazmy komórki. Kumulacja jonów Ca pod wpływem odpowiedniego sygnału powoduje skurcz elementów układu mikrotubularnego i przemieszczenie się pęcherzyków B ku powierzchni komórki. Łączą się one z błoną komórki i otwierają na zewnątrz (egzocytoza), uwalniając swoją zawartość do płynu pozakomórkowego. Proces wydzielania insuliny jest prawdopodobnie procesem ciągłym, lecz stężenie jej zmienia się znacznie w ciągu doby. Na czczo stężenie insuliny w osoczu ludzi zdrowych mieści się w granicach 20–40 mJ. m/ml.



Rys. 1. Pierwszorzędowa struktura proinsuliny świńskiej [wg H.D. Jakubke, H. Jeschkeit: *Aminokwasy, peptydy, białka*, PWN, 1982]



Rys. 2. Model struktury insuliny monomerycznej [wg H.D. Jakubke, H. Jeschkeit: *op. cit.*]

Stężenie insuliny we krwi jest wypadkową wydzielania oraz usuwania hormonów przez tkanki. Proces ten jest bardzo wydajny, skoro okres półtrwania insuliny w krwiobiegu wynosi ok. 20 minut. Przypuszcza się, że rozpad hormonu, podobnie jak i jego działanie na komórkę, rozpoczyna się związaniem przez swoisty receptor błon plazmatycznych. Związanie z receptorem powoduje wytworzenie i przekazanie do wnętrza komórki odpowiedniego sygnału wpływającego na metabolizm komórkowy. Po rozpadzie kompleksu hormon – receptor zostaje wbudowany w pęcherzyki, które łączą się lizosomami. W obrębie lizosomów odbywa się całkowity rozpad hormonu.

### Cukrzyca

Cukrzyca nie jest jednorodną jednostką chorobową. Właściwą cukrzycę definiuje się jako stan niedoboru insuliny, wynikający z pierwotnej bezwzględnej lub względnej niedoczynności komórek  $\beta$  wysp Langerhansa.

Cukrzycą wtórną nazywa się zespoły spowodowane nadmiernym wydzielaniem hormonów antagonizujących działanie insuliny lub zespoły spowodowane toksycznymi bądź zapalnymi uszkodzeniami wysp. Klinicznie rozróżnia się dwa główne typy cukrzycy właściwej.

I typ – cukrzyca insulinozależna, charakteryzująca się niedoborem insuliny lub całkowitym upośledzeniem syntezy hormonu. Postępujące uszkodzenia i zanik komórek  $\beta$  trzustki doprowadza do stanu, w którym trzustka jest niemal zupełnie pozbawiona produkcji hormonu. Stężenie insuliny we krwi jest bardzo niskie. Wśród ludzi chorych przeważają ludzie młodzi, szczupli, stwierdza się u nich kwasicę metaboliczną. Zależność od insuliny wyraża się koniecznością przyjmowania hormonu egzogenego w celu utrzymania przy życiu.

II typ – cukrzyca insulinoniezależna, charakteryzuje się względnym niedoborem insuliny. Komórki  $\beta$  nie są uszkodzone, biosynteza hormonu nie jest upośledzona lub upośledzona tylko nieznacznie. Względny niedobór oznacza, że ilość hormonu wydzielanego jest niedostateczna w stosunku do potrzeb i może tylko wynikać z upośledzonego wydzielania lub ze zwiększonego zapotrzebowania tkanek obwodowych. Wśród chorych z tą postacią cukrzycy spotykamy ludzi otyłych, w średnim wieku i starych. Całe lata mają wysoką hiperglikemię, cierpią najczęściej na zaburzenia krążeniowe (miażdżyca, stopa cukrzycowa, retinopatia).

## V.1. Otrzymywanie insuliny

Obecność w trzustce czynnika regulującego poziom cukru we krwi odkryli w 1890 roku Mehring i Minkowski. Pierwsze biologicznie czynne wyciągi zostały jednak otrzymane dopiero w 1921 roku przez Bantinga i Besta, którym udało się uzyskać wyciąg zawierający aktywną insulinę; w stanie krystalicznym otrzymał ją Abel w 1926 roku. Budowa cząsteczki insuliny została określona przez Sangera w 1955 roku po dziesięcioletnich badaniach, za które uczony otrzymał nagrodę Nobla.

Metody otrzymywania insuliny:

- a) klasyczna metoda izolacji z trzustek zwierzęcych wg Bantinga i Besta,
- b) metoda biosyntezy z wykorzystaniem inżynierii genetycznej,
- c) semisynteza z insuliny wieprzowej,
- d) metoda pełnej syntezy chemicznej.

### V.1.1. Klasyczna metoda izolacji z trzustek zwierzęcych według Bantinga i Besta

W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że insulina jest rozpuszczalna w rozcieńczonych kwasach i zasadach. W punkcie izoelektrycznym, przy  $\text{pH} = 5,3$  wydziela się z roztworu i jest rozpuszczalna w rozcieńczonym alkoholu. Można ją wydzielić z roztworów wodnych siarczanem sodowym, chlorkiem sodowym lub kwasem benzoesowym.

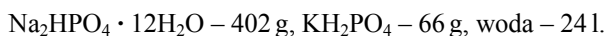
Do przeróbki technicznej, w celu otrzymania insuliny, używana jest trzustka bydlęca, zawierająca 1800–2500 jedn./kg.

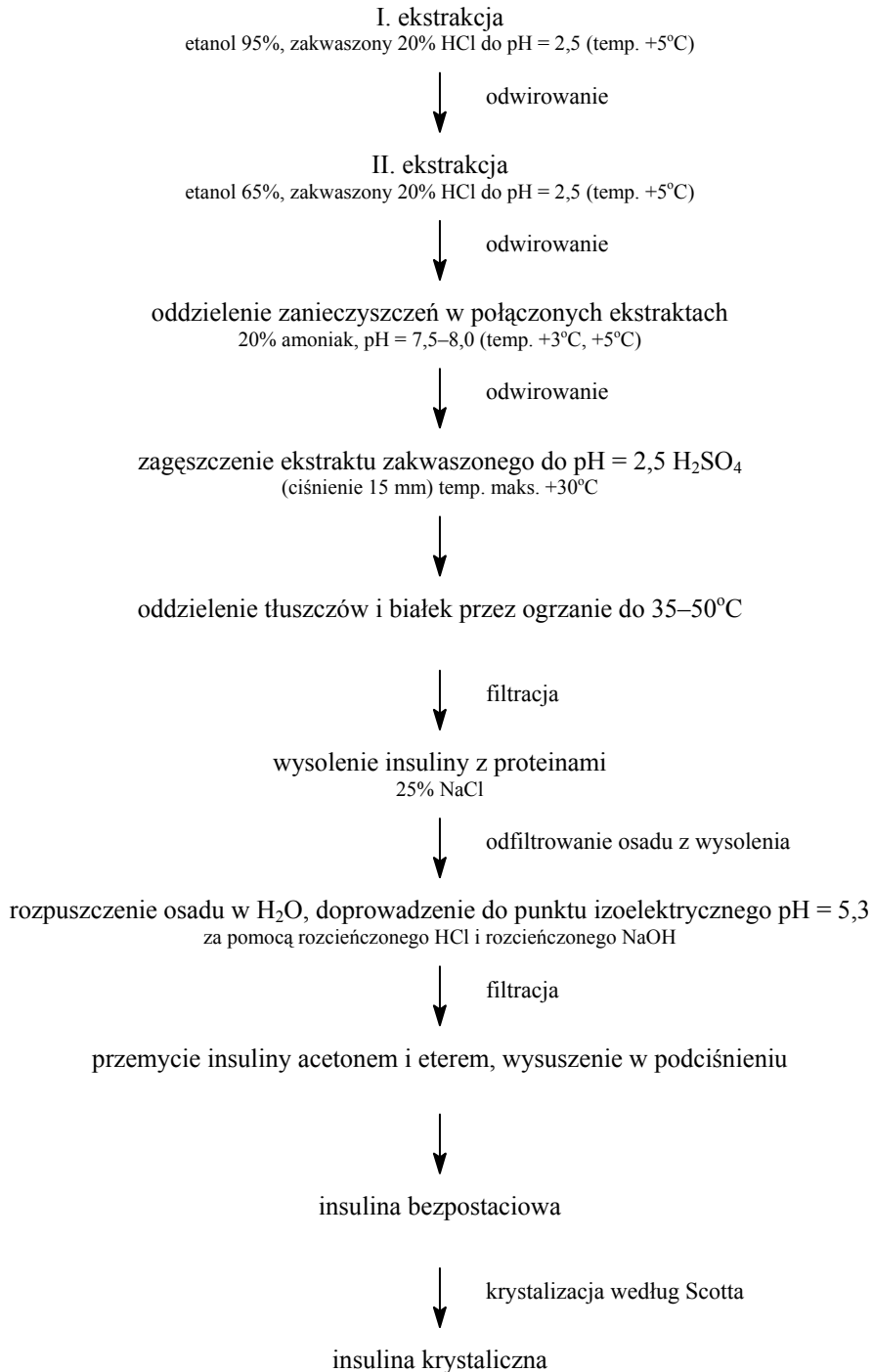
Gruczoły te wytwarzają również enzymy, np. trypsynę, które rozkładają insulinę i muszą być przed przeróbką techniczną trzustki zniszczone działaniem kwasu solnego.

Ogólna zasada otrzymywania insuliny tą metodą polega na unieczynnieniu enzymów proteolitycznych, w czasie ekstrakcji zakwaszonym alkoholem, a jej wyodrębnienie z ekstraktu polega na wysoleniu i strąceniu w jej punkcie izoelektrycznym.

Krystalizacja insuliny metodą Scotta

75 g insuliny bezpostaciowej rozpuszcza się w 3 l wody z dodatkiem 240 ml kwasu solnego, następnie dodaje się roztworu buforowego (w ilości 3 l), 600 ml acetonu i 160 ml 0,3% chlorku cynku. Przez dodanie 1n amoniaku doprowadza się roztwór do  $\text{pH} = 5,3$ . Najczęściej stosuje się bufor fosforanowy o następującym składzie:





Rys. 3. Schemat procesów w czasie izolacji insuliny z trzustek zwierzęcych  
[wg L. Kuczyński: *Technologia leków*, WNT, 1971]

Przy mieszaniu w ciągu 2–3 dni wydziela się insulina, odsącza się ją, przemywa acetonem, eterem, potem suszy. Najczystsze preparaty mają aktywność 22 jedn./mg. Wartość preparatów insulinowych oznacza się biologicznie, np. przez badanie zdolności obniżania zawartości glukozy we krwi królika przed i po iniekcji preparatu insulinowego. Na podstawie różnicy wartości glukozy we krwi określa się aktywność preparatu. Jednostką aktywności według Bantinga i Besta jest 1/3 ilości insuliny, która w przeliczeniu na 2 kg wagi królika powoduje spadek glukozy we krwi do 0,045%. Odpowiada to 1/22 mg czystej krystalicznej insuliny.

### V.1.2. Metoda biosyntezy z wykorzystaniem inżynierii genetycznej

Wykorzystując inżynierię genetyczną, insulinę można pozyskać dwoma metodami:

#### 1. Technologia rekombinacji

Metoda ta polega na przeniesieniu do plazmidu pałeczki *Escherichia coli* genów łańcucha A i B. Następnie uzyskuje się w określonych warunkach wytworzenie tych łańcuchów przez drobnoustroje. Łańcuchy A i B łączy się chemicznie – rekombinacja łańcucha A i B w cząsteczkę insuliny ludzkiej.

#### 2. Metoda inżynieryjno-genetyczna

Ta metoda jest bardziej podobna do naturalnego procesu biosyntezy insuliny, ponieważ tworzy się syntetyczny gen ludzkiej proinsuliny, wprowadza do plazmidu *Escherichia coli*, następnie wymusza się ekspresję genu (produkcja proinsuliny). W końcowym etapie proinsulina jest enzymatycznie rozkładana na insulinę i peptyd C (rys. 5).

Preparaty otrzymywane tymi metodami charakteryzują się bardzo niską antygenowością.

### V.1.3. Semisynteza z insuliny wieprzowej

Metoda półsyntetyczna, zwana też semisyntezą, polega na przetworzeniu np. insuliny wieprzowej w insulinę ludzką. Proces sprowadza się do enzymatycznego usunięcia N-końcowego aminokwasu łańcucha B – alaniny, a następnie do podstawienia w tę pozycję treoniny. Warunki reakcji są tak dobrane, aby nie wpływały na wiązania disulfidowe w cząsteczce insuliny.

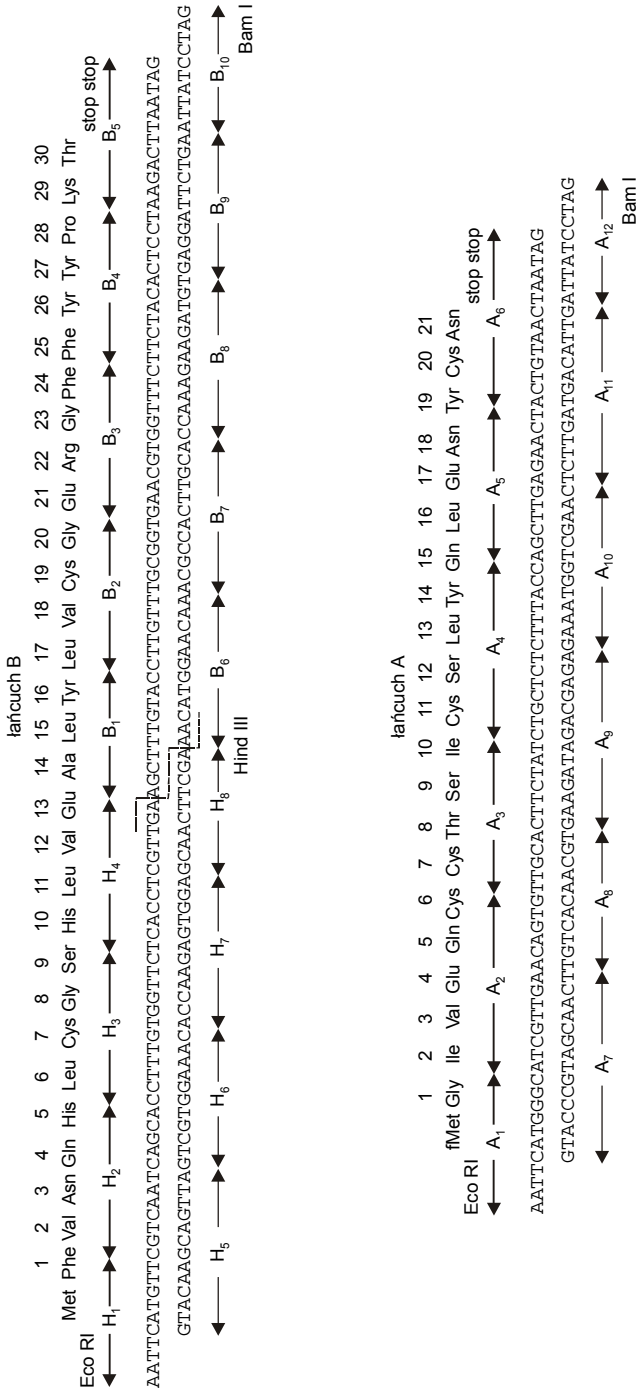
### V.1.4. Metoda pełnej syntezy chemicznej

Metoda wieloetapowej, chemicznej syntezy polega na otrzymaniu insuliny w wielu reakcjach z poszczególnych aminokwasów. Metoda trudna, obciążona dużym kosztem, miała znaczenie właściwie tylko w badaniach naukowych, ze względu na niewielką wydajność i złożoność procesu technologicznego. Jej wprowadzenie do powszechnego leczenia jest wprost niemożliwe.

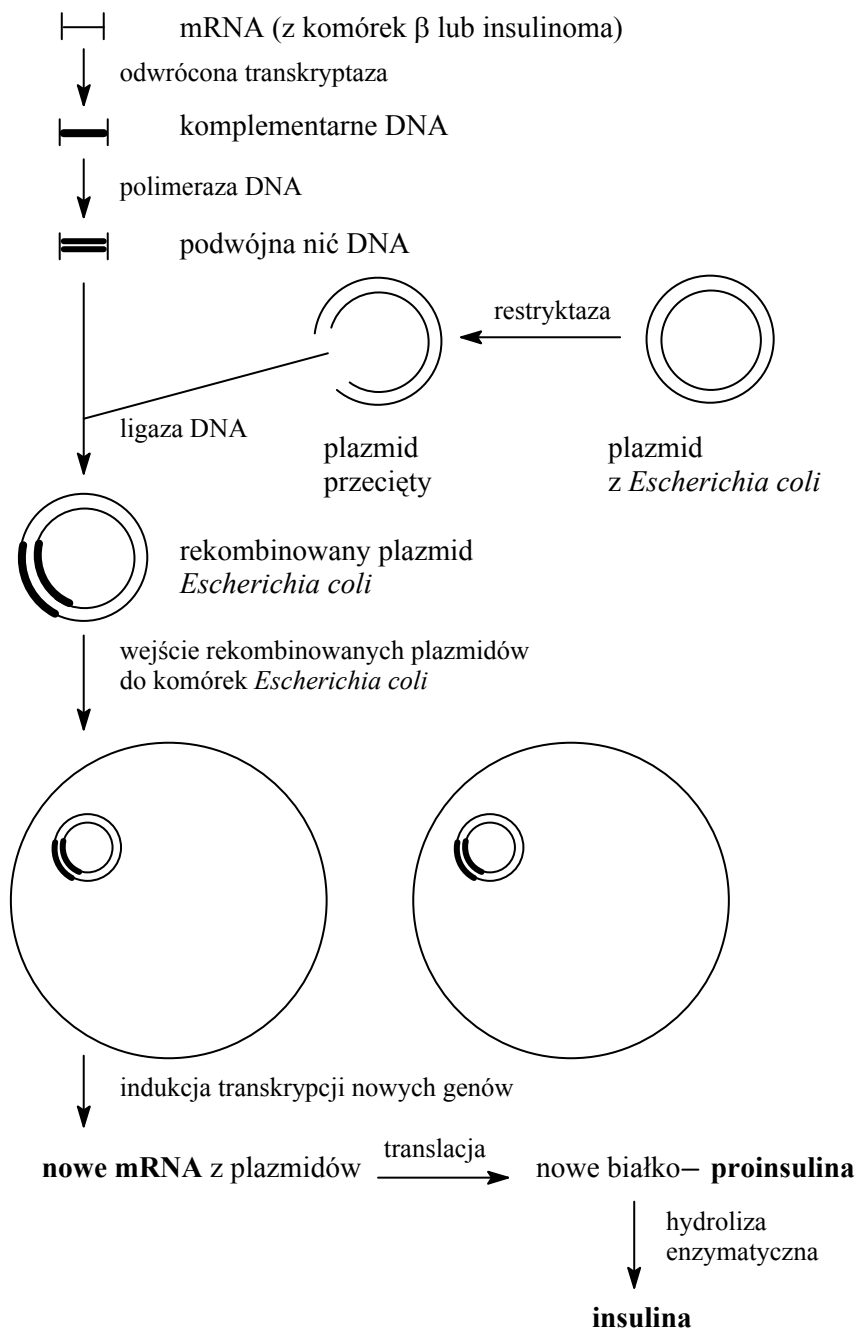
### Składniki preparatów insulinowych:

- 1) hormon,
- 2) substancje przedłużające działanie insuliny,
- 3) środki dezynfekujące oraz stabilizujące,
- 4) środki wspomagające krystalizację i bufory.

Początkowo substancjami przedłużającymi wchłanianie insuliny z tkanki podskórnej były guma arabska, lecytyna, oleje, cholesterol. W 1936 roku Hagedorn wprowadził insulinę proteinową (protamina – białko zasadowe), taki kompleks zmniejszał rozpuszczalność hormonu w obojętnym pH tkanki podskórnej, wydłużając czas wchłaniania insuliny do krwi. Protaminę uzyskuje się ze spermy ryb.



Rys. 4. Syntetyczne geny odpowiedzialne za syntezę łańcuchów A i B insuliny [wg W. Gajewski, P. Wegleński: *Inżynieria genetyczna*, PWN, 1986]

Rys. 5. Biosynteza insuliny przez *Escherichia coli*

Pierwszym stabilnym, obojętnym roztworem była insulina protaminowo-cynkowa. Cynk pełni rolę stabilizatora, ułatwia krystalizację, a powstające kryształy wydłużają czas wchłaniania insuliny nawet do 72 godz. Preparatami o przedłużonym działaniu są także:

- insuliny globinowe (globina – białko zasadowe),
- insuliny surfenowe (stosowane głównie w roztworach o odczynie kwaśnym).

### **Środki dezynfekujące i bakteriostatyczne**

Do roztworów insuliny dodaje się krezol i fenol. Do zawiesin insulin cynkowych najczęściej stosuje się metyloparaben. Substancje te zapewniają jałowość preparatom insulinowym.

### **Insulina proteinowo-cynkowa, izofanowa NPH**

W ostatnich latach ten rodzaj preparatów insulinowych przeżywa swój renesans, dlatego poświęcamy mu nieco więcej uwagi.

#### **Skład preparatu insuliny NPH**

Symbol NPH oznacza, że jest to preparat insuliny o obojętnym odczynie (N – *neutral*, pH wynosi zazwyczaj 7,3–7,4), zawierający protaminę (P – *protamine*); w symbolu upamiętniono też nazwisko twórcy (H – Hagedorn). Bezpośrednimi projektodawcami byli w 1946 roku Ch. Krayenbuhl i Th. Rosenberg. Insulina NPH wytrzymała więc czterdziestoletnią próbę czasu; obecnie przeżywa swój renesans. W wielu krajach jest jednym z najczęściej stosowanych preparatów insuliny. Wynika to z korzystnych dla realizacji celów insulinoterapii cukrzycy właściwości tak samego preparatu, jak i możliwości przygotowania *ex tempore* mieszanin z preparatami szybko działającymi.

W 1 ml *insulinum isophanicum* znajduje się 40U lub 80U insuliny oraz siarczan salminy, wodorofosforan sodu bezwodny, metakrezol, fenol, glicerol, wodorotlenek sodu lub kwas solny *q.s.* – do pH = 7,3, jałowa woda do wstrzyknięć – do 10 ml. Do krystalizacji insuliny NPH stosuje się chlorek cynku.

### **Insulina**

Preparat NPH wytwarza się z insuliny różnych gatunków zwierząt, np. z insuliny wołowej lub wieprzowej, a także z insuliny ludzkiej, otrzymanej metodą semisyntezy z insuliny wieprzowej lub drogą rekombinacji DNA przez pałeczkę okrężnicy albo drożdże piekarskie. Produkuje się ten preparat zarówno z insuliny o tradycyjnym stopniu oczyszczenia, jak i z insuliny częściowo lub wysoko oczyszczonej. Najczęściej stosuje się insulinę NPH wieprzową lub ludzką, wysoko oczyszczoną.

### **Protaminy**

Jest to grupa zasadowych polipeptydów, znajdujących w spermatocytach większości gatunków zwierząt. W produkcji insuliny NPH wykorzystuje się protaminę, uzyskiwaną z nasienia łososia (*salmo* → *salmina*).

Pod względem chemicznym jest to grupa jednołańcuchowych polipeptydów, zbudowanych wyłącznie z alifatycznych aminokwasów. Przeważnie jest to arginina, w mniejszości występują seryna, prolina, walina i glicyna. Pojedynczy łańcuch składa się zazwyczaj z 30 aminokwasów. *Salmina* nie zawiera aminokwasów aromatycznych. Z tego powodu nie pochłania ultrafioletowego światła o długości fal 260–360 nm. Pojawienie się jakiegokolwiek pochłaniania w powyższym zakresie długości fali wskazuje na obecność zanieczyszczeń. Badanie pochłaniania ultrafioletowego światła jest dobrym testem czystości salminy. Masa cząsteczkowa salminy wynosi 4250, a jej punkt izoelektryczny znajduje się powyżej 12.

Stosowany do produkcji insuliny NPH siarczan salminy musi odznaczać się pełną czystością. W połączeniu z wysoko oczyszczoną insuliną uzyskuje się preparaty odpowiadające pod względem stopnia czystości kryterium insulin monokomponentnych.



## Cynk

Na 1 heksamer insuliny, to jest uporządkowany przestrzennie kompleks 6 cząsteczek insuliny, przypadają 2 atomy cynku. Taka sama proporcja ilościowa cynku do insuliny występuje w kryształach hormonu; niezależnie od kształtu kryształów. W środowisku obojętnym obecność cynku jest konieczna do procesu krystalizacji. Jest to także jego typowa rola w technologii krystalizacji. Kształty kryształów stają się odmienne w zależności od wielu różnych cech środowiska krystalizacji, temperatury i cech materiału krystalizującego, na przykład różnic w budowie cząsteczki insuliny. Dodatkowo cynk hamuje aktywność enzymu protaminazy, który znajduje się w surowicy i w tkankach. Z tego powodu ilość cynku w preparacie wpływa na szybkość degradacji protaminy po jej wstrzyknięciu. Im więcej cynku w preparacie, tym rozkład protaminy jest wolniejszy.

## Metakrezol i fenol

Na 1 g insuliny protaminowo-cynkowej NPH przypada przeciętnie  $0,5 \times 10^{-3}$  mola fenolu lub jego pochodnych. Działając przeciwbakteryjnie, konserwują one preparat, a także ułatwiają krystalizację kompleksów insulinowo-salminowych w formie pożądaných, małych kryształów, o kształcie ostro zakończonych z obu stron prostopadłościaków. Ich długość nie przekracza 5  $\mu$ .

## Bezwodny wodorofosforan sodu

Sól tę stosuje się w celu stabilizacji obojętności odczynu oraz ewentualnego strącenia nadmiaru cynku.

## Glicerol

Substancja ta spełnia rolę środka stabilizującego. Po zmieszaniu insuliny NPH z preparatami o odczynie kwaśnym dochodzi do destabilizacji zawiesiny. Po dodaniu insuliny z grupy lente, znajdujący się w preparacie insuliny NPH bufor fosforanowy wiąże nadmiar cynku charakterystyczny dla tych insuliny. Cząstki bezpostaciowe lub kryształy tych insuliny lente ulegają rozpuszczeniu, zmieniając całkowicie farmakodynamiczne cechy preparatu. Celem sporządzenia mieszaniny insuliny NPH i preparatu szybko działającego jest uzyskanie, przez dobranie indywidualnej proporcji składników, takiego preparatu, który zapewniłby właściwe rozłożenie w czasie tempa hipoglikemizującego działania, odpowiednio do indywidualnych cech cukrzycy i stylu życia chorego. Mieszanina winna wykazać zarówno szybki efekt hipoglikemizujący preparatu szybko działającego, jak i efekt opóźniony, wywierany przez insulinę NPH. Poranny zastrzyk zapewnia działanie na cały dzień, a wieczorny – na okres nocy. Należy jednak wspomnieć, że preparat insuliny NPH oraz jego mieszaniny nie są doskonale stabilne. Pewna część wolnej insuliny z preparatu szybko działającego wiąże się z kryształami insuliny NPH lub wytrąca z cynkiem. Izofania nigdy nie jest idealna. W praktyce więc podanie wytworzonej *ex tempore* mieszaniny do tkanki podskórnej winno nastąpić bezpośrednio po zmieszaniu. Wiązanie wolnej insuliny przez preparat NPH jest zawsze o wiele słabsze aniżeli przez insuliny z grupy lente.

## Wstrzykiwanie insuliny NPH

Przy przygotowaniu mieszaniny insuliny NPH z insuliną szybko działającą wskazane jest przestrzeganie stałej kolejności nabierania do strzykawki. Preparat szybko działający dodaje się do już nabrałego preparatu NPH. Taki stały porządek zapobiega błędowi w dawkowaniu, jeśli używa się strzykawki ze stożkiem, a więc z martwą objętością. Przypadkowo, zmieniając kolejność nabierania insuliny, raz wypełnia się martwą objętość preparatem szybko działającym, a innym razem preparatem NPH. W kolejnych wstrzyknięciach zmieniają się więc przypadkowo proporcje tych preparatów o wielkość martwej objętości. Należy także zapobiegać przenoszeniu insuliny NPH do fiolki z roztworem insuliny i odwrotnie.

Jeśli konieczne jest wcześniejsze nabranie insuliny do strzykawki dla osób, które nie mogą tego samego uczynić, ale mogą później samodzielnie dokonać wstrzyknięcia, to należy z góry przewidywać pewne zmniejszenie się efektu insuliny szybko działającej. Można to uwzględnić w doborze proporcji składników mieszaniny. Przy przechowywaniu insuliny NPH w strzykawce, straty preparatu występują głównie w stożku strzykawki. Dlatego najlepiej, po nabraniu insuliny do kilkugodzinnego przechowywania, ustawić strzykawkę stożkiem do góry. Kłopoty te nie występują przy stosowaniu strzykawek bez martwej objętości, strzykawek z wtopioną igłą. Jeśli tylko jest to możliwe, należy zatem stosować takie strzykawki. Przy przechowywaniu insuliny w strzykawce przez kilka godzin, przed wykonaniem zastrzyku należy zrekonstruować zawiesinę za pomocą wstrząsania. Najczęściej rano podaje się 60–70% dobowej dawki insuliny, a wieczorem pozostałą jej część. Wstrzyknięcia dokonuje się około 1–2 godz. przed posiłkiem.

### **Przechowywanie insuliny**

Insulinę NPH, podobnie jak inne insuliny, przechowuje się w temperaturze 2–8°C bez dostępu światła. Wtedy, mimo że przy przechowywaniu doszło do osadzania się na dnie fiołki kryształów insulino-salminowo-cynkowych i utworzenia się nad osadem warstwy przezrystego płynu, energiczne wstrząsanie prowadzi do pełnej rekonstrukcji zawiesiny, którą można wstrzykiwać. Zamrożenie insuliny uszkadza strukturę kryształów, utrudnia rekonstrukcję zawiesiny. Powoduje zatem zmianę cech farmakodynamicznych preparatu. Przypadkowo zamrożoną fiołkę należy odrzucić. Dłuższe przechowywanie preparatu NPH w temperaturze powyżej 25°C wywołuje tworzenie się większych agregatów kryształów, które szczególnie mocno przyczepiają się do szkła fiołki. Inne kryształy ulegają rozpuszczeniu. Insulina tak przechowywana może nabrać barwy brązowej, wskutek utlenienia krezolu pod wpływem ciepła. Wyższa temperatura sprzyja degradacji insuliny przez jej dezamidację oraz polimeryzacji cząsteczek hormonu. Przy przestrzeganiu powyższych prawideł przechowywania insuliny, wpływ samego czynnika czasu na jej biologiczną aktywność jest względnie niewielki. Nie odgrywa on praktycznie żadnej roli w wyznaczonych czasach ważności preparatu. Na przykład insulina traci 2% swojej biologicznej aktywności dopiero po latach przechowywania w temperaturze 4°C oraz po 4 miesiącach przechowywania w temperaturze 25°C.

Preparaty insuliny ulegają dość szybkiej degradacji pod wpływem światła słonecznego. Jak już wspomniano, należy je przed światłem chronić.

W praktyce fiołka insuliny, która już jest w użyciu, może być przechowywana w zmiennej temperaturze, np. w zakresie 2°C oraz 25°C. Okres stosowania insuliny z jednej fiołki jest zazwyczaj zbyt krótki, aby mogło dojść do degradacji insuliny w tych warunkach.

### **Działania niepożądane**

Preparat insuliny NPH, ze względu na zawartość insuliny, wykazuje analogiczne niepożądane działania, jak inne preparaty insuliny. Niepożądane immunogenne działanie, a więc tworzenie przeciwciał neutralizujących lub wywołujących odczyny alergiczne miejscowe i opóźnione lub – co zdarza się bardzo rzadko – uogólnione, typu pokrzywki, zależy od stopnia oczyszczenia preparatu i gatunku insuliny. Jest wyraźnie najmniejsze w przypadku stosowania insuliny NPH wysoko oczyszczonej ludzkiej. Również powstawanie lipotropii poinsulinowej jest najmniej prawdopodobne, jeśli podaje się preparaty ludzkie, o wysokim stopniu oczyszczenia. Preparaty wieprzowe są mniej aktywne antygenowo aniżeli insuliny wołowe. Obok stopnia oczyszczenia oraz gatunku insuliny pewien wpływ na immunogenność insuliny wywiera jej fizyczna forma. Insulina podawana w postaci kryształów jest nieco bardziej aktywna antygenowo aniżeli wstrzykiwana jako roztwór.

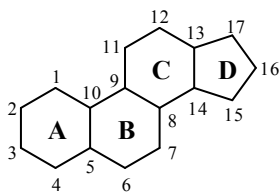
Osobnym zagadnieniem jest alergizujące działanie salminy. Dawniej sądzono, że siarczan protaminy nie jest immunogenny. Jednak wielu badaczy w latach siedemdziesiątych doniosło, że u ludzi mogą pojawić się alergiczne odczyny na salminę obecną w preparacie NPH. W 1977 roku Samuel wykazał możliwości powstania przeciwciał przeciwko protaminie. W 1983 roku Kurtz spostrzegł, że kompleks insulinowo-protaminowy ma właściwości antygenowe. Wykryto, że u chorych leczonych preparatami protamino-cynkowymi pojawiają się przeciwciała przeciwko kompleksowi insulino-protaminowemu, które krążą we krwi. Możliwość alergicznej reakcji na insulinę NPH jest wyższa u osób z pokarmową alergią na ryby.

### Literatura

1. S. Angielski, J. Rogulski (red.): *Biochemia kliniczna: podręcznik dla studentów medycyny*, wyd. III, PZWL, Warszawa 1991.
2. L. Kuczyński: *Technologia leków*, WNT, Warszawa 1971.
3. M. Fikus: *Biotechnologia*, WP, Warszawa 1987.
4. W. Gajewski, P. Węgleński: *Inżynieria genetyczna*, PWN, Warszawa 1986.
5. H.D. Jakubke, H. Jeschkeit: *Aminokwasy, peptydy, białka*, tłum. A. Rabczenko, PWN, Warszawa 1982.

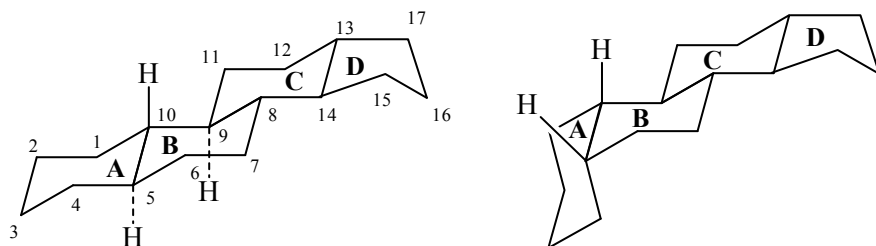
## VI. METODY OTRZYMYWANIA STEROIDÓW

Steroidy są złożonymi związkami policyklicznymi, występującymi we wszystkich organizmach roślinnych i zwierzęcych. Można je zaliczyć do prostych lipidów, ponieważ – podobnie jak kwasy tłuszczowe – nie ulegają hydrolizie. Spełniają one wiele funkcji, jednak największe znaczenie mają hormony. Do naturalnych związków o budowie steroidowej należą: cholesterol, kwasy żółciowe, hormony kory nadnerczy, witaminy D, glikozydy nasercowe i fitosterole. Według definicji, steroidy są związkami, których struktura oparta jest na układzie steranu, tj. cyklopentanoperhydrofenantrenu.



Rys. 1. Układ steranu

Związki te różnią się między sobą liczbą i rodzajem podstawionych grup, liczbą i położeniem wiązań podwójnych oraz konfiguracją przestrzenną, możliwą dzięki obecności asymetrycznych atomów węgla. Z rys. 1 widać, że każde połączenie pierścieni w układzie steranu może mieć konfigurację *cis* lub *trans*. Okazuje się jednak, że w większości naturalnych steroidów pierścienie B i C oraz C i D są połączone wiązaniem *trans* (wyjątek stanowią glikozydy nasercowe, w których pierścienie C i D mają konfigurację *cis*), natomiast pierścienie A i B są połączone albo wiązaniem *cis* albo *trans*. Wynika to stąd, że istnieją dwie serie związków steroidowych: seria 5 $\alpha$  – w której pierścienie A i B połączone są wiązaniem *trans* oraz seria 5 $\beta$  – w której pierścienie A i B łączą się wiązaniem *cis*. Przyjmuje się umownie, że przy sprzężeniu *cis* pierścieni A i B (czyli w serii 5 $\beta$ ) podstawniki przy C-5 i C-10 zaznaczamy linią ciągłą, natomiast przy sprzężeniu *trans* pierścieni A i B (w serii 5 $\alpha$ ) podstawnik przy C-5 zaznaczamy linią przerywaną, zaś przy C-10 linią ciągłą (co obrazuje, że podstawniki te znajdują się po przeciwnych stronach płaszczyzny wyznaczonej przez te pierścienie; podstawnik przy C-10 nad płaszczyzną, podstawnik przy C-5 pod płaszczyzną).



A/B *trans* B/C *trans* C/D *trans*  
(a, a) 5 $\alpha$

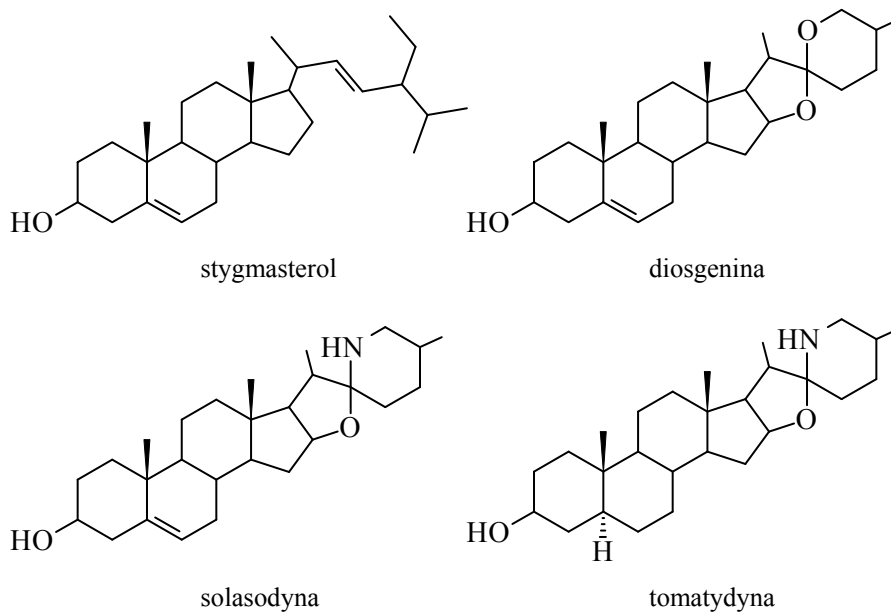
A/B *cis* B/C *trans* C/D *trans*  
(a, e) 5 $\beta$

Rys. 2. Wzory konformacyjne steranu

## VI.1. Otrzymywanie steroidów na drodze chemicznej

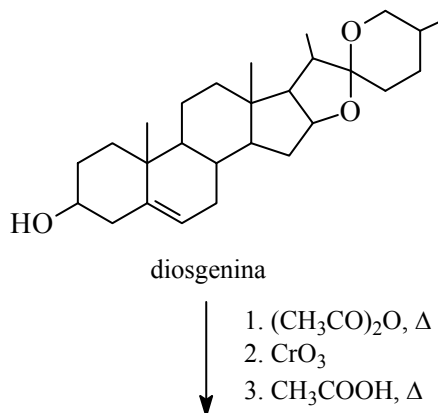
Totalne syntezы kortyzolu (z r. 1950) i kortyzonu (z r. 1951) nie mają dzisiaj żadnego znaczenia. Przemysłowe otrzymywanie glikokortykoidów polega na wieloetapowych procesach, stosujących jako substraty naturalne związki steroidowe, takie jak:

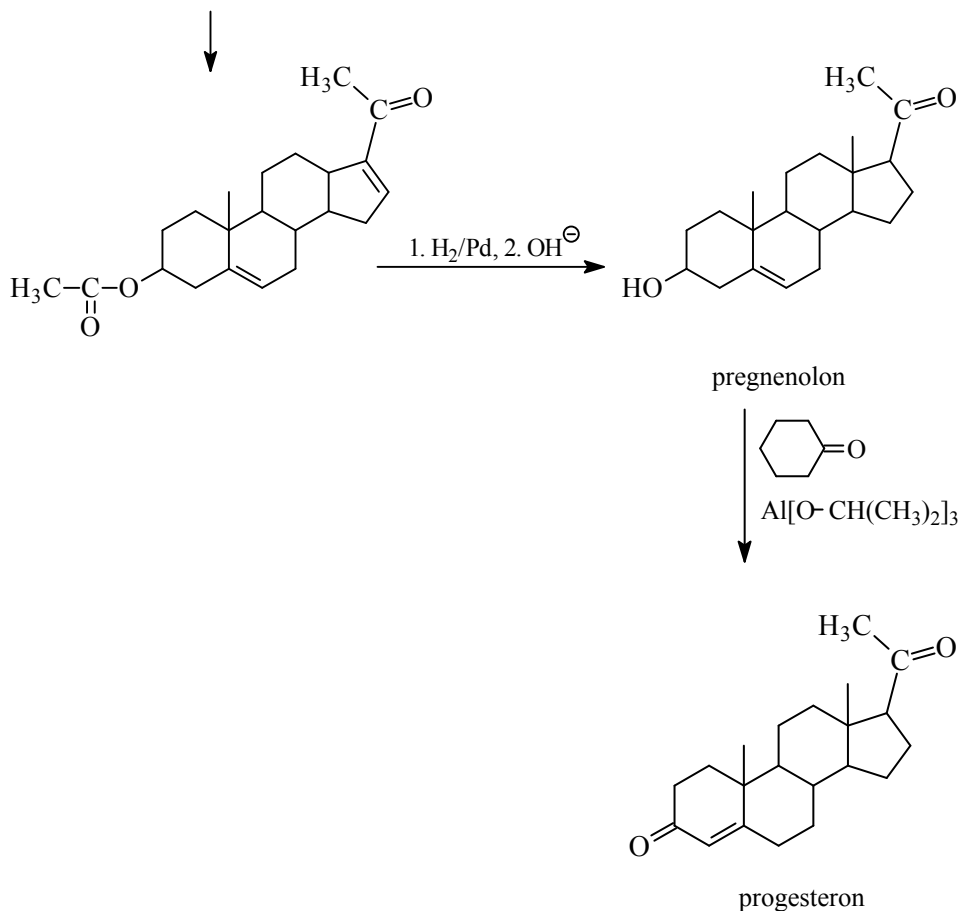
- diosgenina,
- kwasy żółciowe,
- sitosterole i stymasterol.



Rys. 3. Przykłady steroli

Największe znaczenie ma synteza z użyciem diosgeniny.

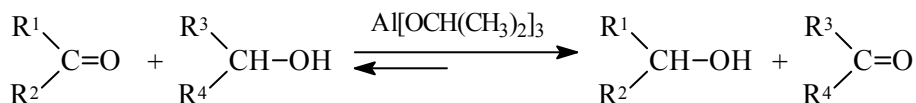




Rys. 4. Synteza progesteronu

Diosgeninę ogrzewa się z bezwodnikiem octowym z dodatkiem katalitycznej ilości kwasu Lewisa ( $\text{AlCl}_3$ ), otrzymując octan pseudosapogeniny. Otrzymany produkt, po utlenieniu kwasem chromowym (VI), ogrzewaniu w kwasie octowym, daje produkt oksydacyjnego usunięcia łańcucha bocznego (octan 16-dehydro-pregnenolonu-3). W wyniku regioselektywnego uwodornienia, a następnie alkalicznej hydrolizy otrzymuje się pregnenolon, który z kolei przekształca się w progesteron, przez utlenienie grupy OH w pozycji 3 do grupy ketonowej, połączone z równoczesną izomeryzacją podwójnego wiązania  $\Delta^5$  do  $\Delta^4$ . W technologii chemicznej etap ten przeprowadza się metodą Oppenauera.

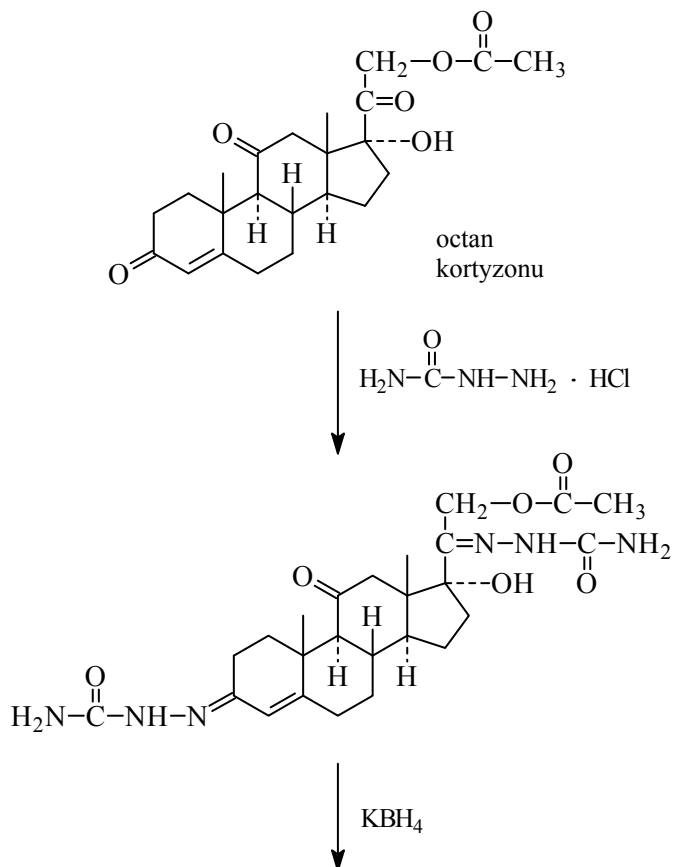
Reakcja Oppenauera polega na utlenieniu drugorzędowej grupy hydroksylowej do ketonowej za pomocą ketonów w obecności katalizatora, np. izopropanolanu glinu lub t-butanolanu glinu. Środkiem utleniającym jest zazwyczaj aceton lub cykloheksanon.

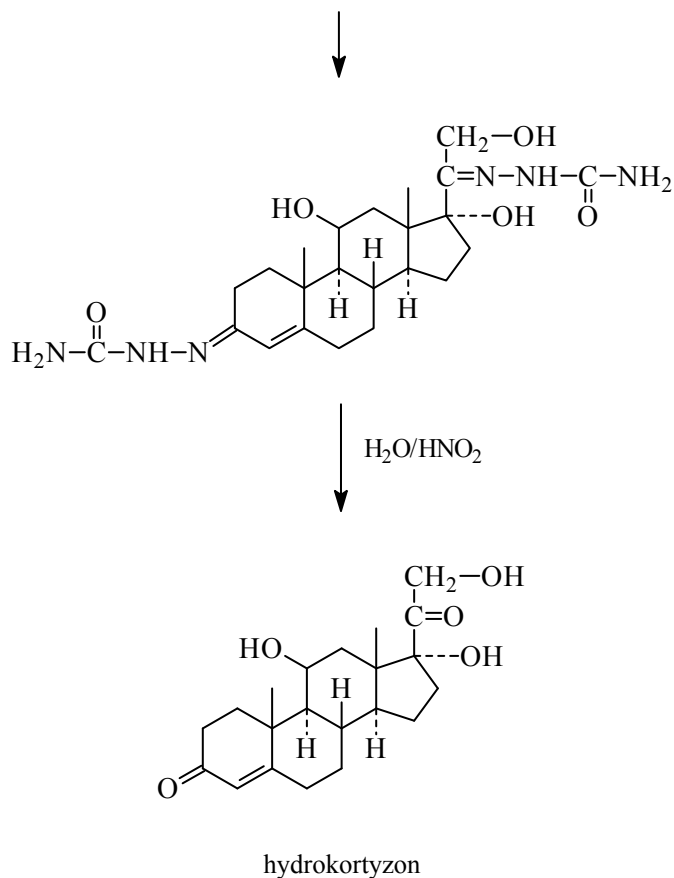


Jest to reakcja odwracalna, z dobrą wydajnością przebiega przy zastosowaniu nadmiaru odczynnika utleniającego. Wymaga absolutnie bezwodnego środowiska, proces trwa ok. 2,5 godz. Otrzymany jako produkt pośredni progesteron jest następnie selektywnie przekształcany w  $11\alpha$ -hydroksoy-progesteron za pomocą grzybów z gatunku *Rhizopus* (np. *Rhizopus nigricans* – pleśń chlebowa) i wykorzystywany do otrzymywania kortyzonu lub hydrokortyzonu (str. 300).

Synteza glikokortykoidów jest możliwa także z kwasów żółciowych oraz z fitosteroli, jednak wymaga różnorodnych przemian wieloetapowych.

Hydrokortyzon, który ma większe zastosowanie terapeutyczne niż kortyzon, jest w praktyce także otrzymywany z octanu kortyzonu. W pierwszym etapie substrat poddaje się reakcji z semikarbazydem (w celu selektywnego zabezpieczenia grup ketonowych), w wyniku czego otrzymuje się 3, 20-bis-semikarbazon, natomiast grupa 11-keto – ze względu na steryczność – nie reaguje z semikarbazydem. Z kolei, redukcja za pomocą tetrahydroboranu potasu daje specyficznie 11- $\beta$ -hydroksypochoďną, z równoczesną hydrolizą grupy 21-estrowej. W ostatnim etapie następuje odszczepienie grup semikarbazydowych i otrzymanie hydrokortyzonu z dobrą wydajnością.



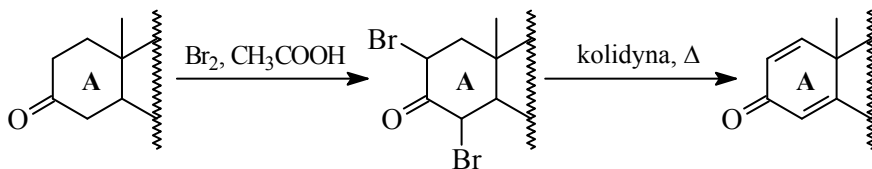


Rys. 5. Synteza hydrokortyzonu

### Glikokortykoidy półsyntetyczne

Synteza:

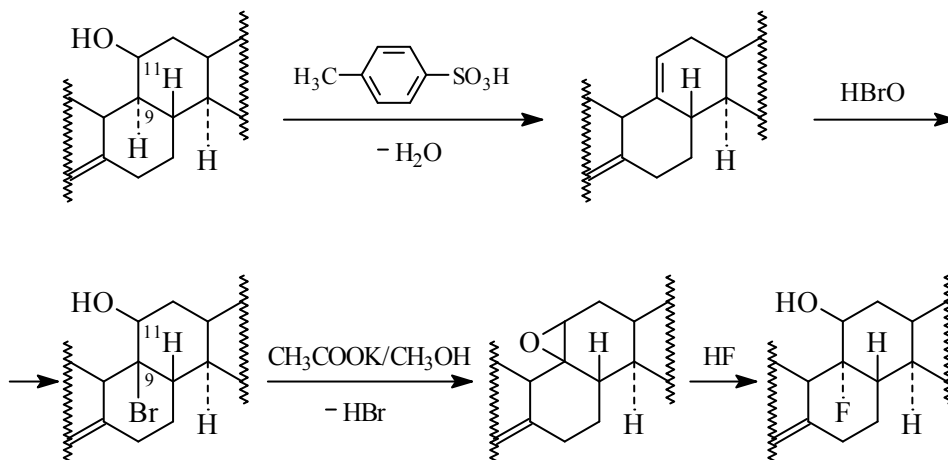
Prednizon i prednizolon (czyli 1-dehydro-pochodne) są otrzymywane (z 3-okso-pochodnych) w reakcji bromowania w środowisku lodowatego kwasu octowego. Otrzymana 2,4-dibromopochodna, w reakcji termicznej eliminacji z kolidyną (2,4,6-trimetylopirydyna), daje żądany dienon.





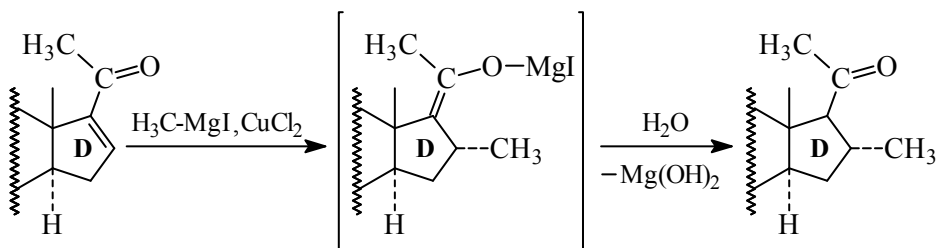
### Otrzymywanie 9-fluoropochodnych

W wyniku dehydratacji 11 $\alpha$ - lub 11 $\beta$ -hydroksysteroidów za pomocą kwasu p-tolueno-sulfonowego otrzymuje się 9,11-dehydropochodne. Następnie, addycja kwasu bromowego (I) i – z kolei – potraktowanie octanem potasu w metanolu daje 9,11- $\beta$ -epoksyd, który za pomocą fluorowodoru jest przekształcany w produkt końcowy.

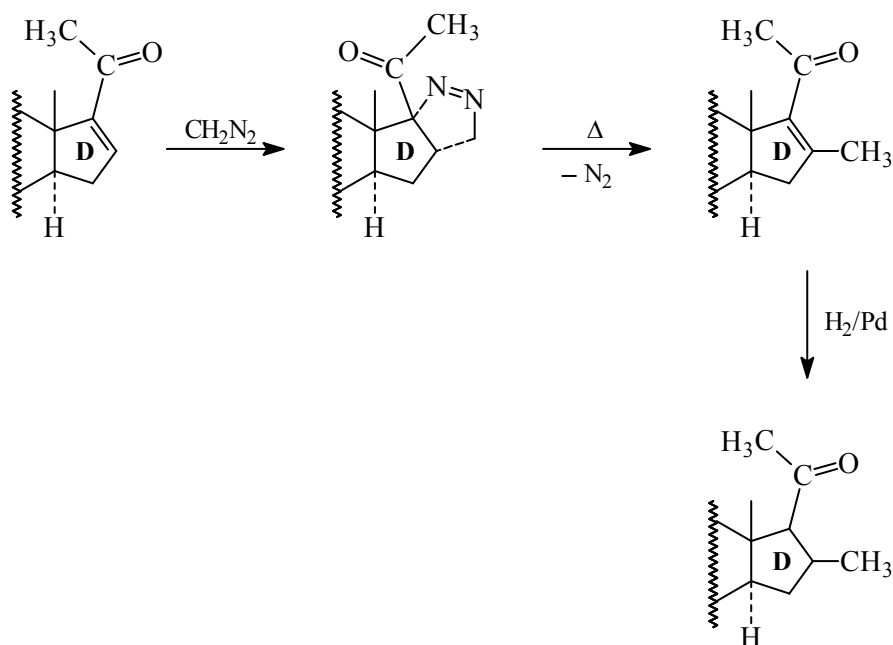


### Wprowadzenie grupy 16-CH<sub>3</sub>

Wprowadzenie grupy metylowej w pozycję 16 $\alpha$  osiąga się w reakcji addycji 1,4 jodku metylmagnezowego do winyloketonów (16-dehydro-20-oksosteroidów), katalizowanej jonami Cu (II).



Grupa metylowa może być także selektywnie wprowadzona w położenie 16 $\beta$  w reakcji winyloketonu z diazometanem. Utworzony cykliczny produkt przyłączenia (pochodna 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -pirazoliny), w wyniku pirolizy daje 16,17-dehydro-16-CH<sub>3</sub>-pochodną, która następnie jest selektywnie uwodorniona wobec palladu i węglanu wapnia do żądanej  $\beta$ -metylo-pochodnej.

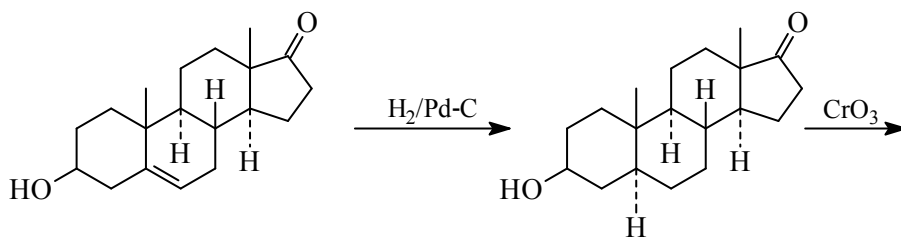


## Hormony płciowe

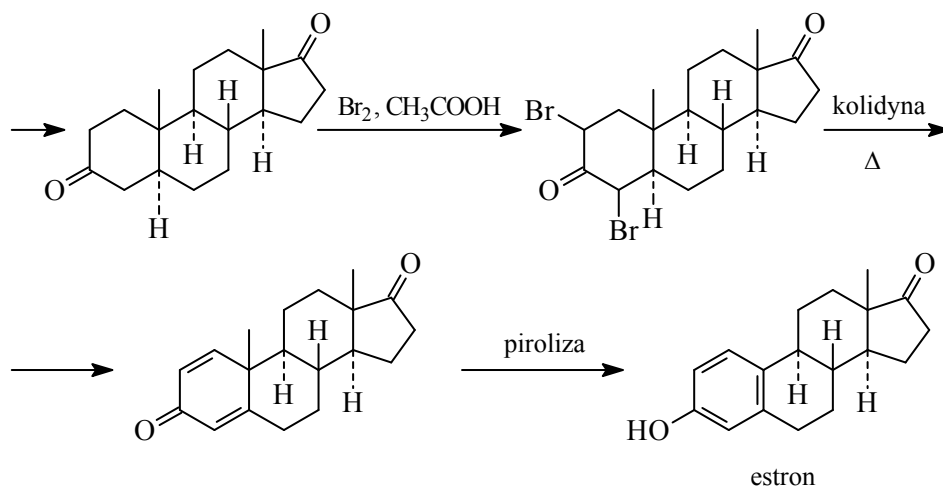
Estrogeny

### Synteza:

Z androstenolonu (otrzymywanego z fitosteroli) przez redukcję wiązania  $\Delta^{4,5}$  za pomocą  $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ , następnie utlenienie za pomocą tlenku chromu (VI) do 3-okso-pochodnej i kolejne bromowanie utworzonego ketonu bromem w kwasie octowym, powstaje 2,4-dibromo-3-keto-pochodna. Otrzymany produkt ogrzewa się z kolidyną, w wyniku czego dochodzi do utworzenia dwóch wiązań podwójnych w pierścieniu A ( $\Delta^{1,2}$  i  $\Delta^{4,5}$ ). Aromatyzację pierścienia A, z równoczesnym odszczepieniem grupy  $10\text{-CH}_3$ , przeprowadza się w temperaturze około  $600^\circ\text{C}$  w tetralinie.

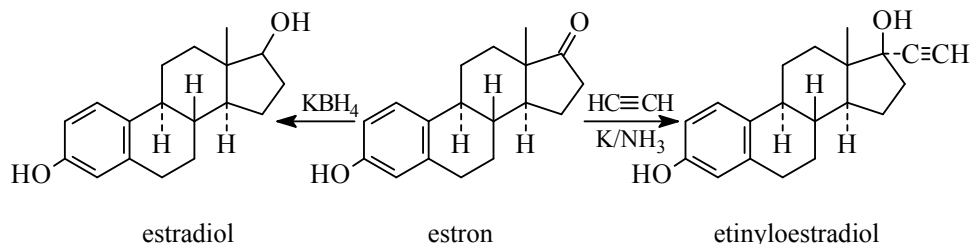


androstenolon



Rys. 6. Synteza estronu

Otrzymany estron jest półproduktem do syntezy estradiolu, przez redukcję grupy ketonowej za pomocą tetrahydroboranu potasu oraz etinyloestradiolu, działając na estron w cieplem amoniaku acetylenkiem potasu.



### Gestageny

Progesteron – hormon ciążyowy – został po raz pierwszy wydzielony z ciała żółtego przez Butenandta i Slotta w 1934 r. Obecnie jest otrzymywany wyłącznie syntetycznie. Jest on głównym półproduktem w syntezie wielu steroidów. Surowcem wyjściowym są substancje sterolowe (ergosterol, diosgenina i inne fitosterole).

## VI.2. Otrzymywanie związków steroidowych ze źródeł naturalnych i na drodze biotransformacji

### a) ze źródeł naturalnych

Pierwszą metodą otrzymywania hormonów steroidowych była ekstrakcja z odpowiednich gruczołów lub z moczu. Następnie ich produkcja była oparta na syntezie chemicznej, a obecnie na syntezie chemiczno-mikrobiologicznej. Jako surowce wyjściowe służą steroidy naturalne pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, takie jak: cholesterol, kwasy żółciowe, ergosterol, stygmasterol, diosgenina.

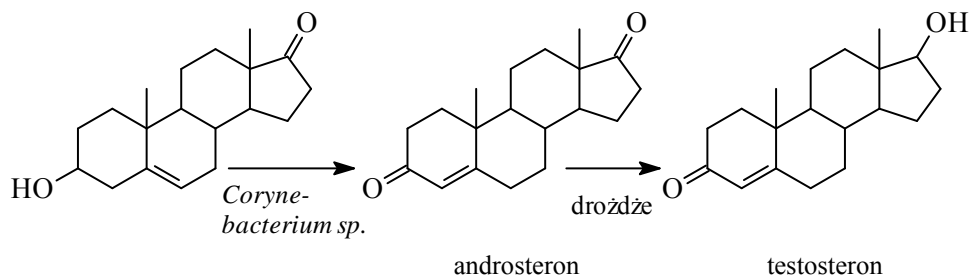
Cholesterol otrzymuje się m.in. z tłuszczu wełny owczej, który zawiera ok. 15% cholesterolu; jest on stosowany głównie do syntezy hormonów płciowych męskich. Ze 100 kg wełny można otrzymać 7 kg cholesterolu.

Hormony kory nadnerczy otrzymuje się głównie z surowców roślinnych, np. diosgeniny. Ergosterol i stygmasterol – wyodrębnia się z oleju sojowego.

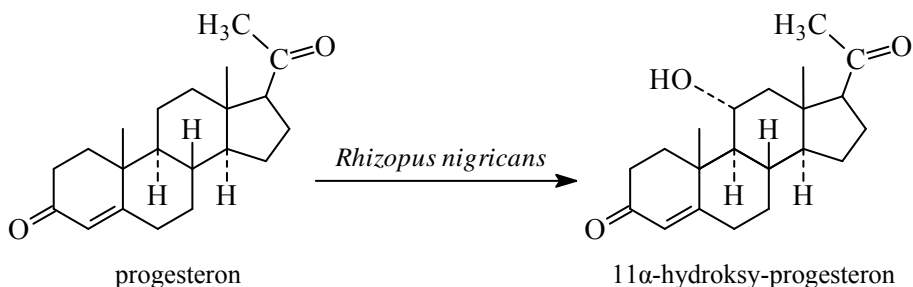
Stosowane dawniej metody ekstrakcji hormonów steroidowych z materiału zwierzęcego zostały obecnie zastąpione metodami częściowej syntezy chemiczno-mikrobiologicznej. Ograniczenie się do metod syntezy chemicznej napotyka na poważne trudności, z uwagi na skomplikowaną strukturę przestrzenną i ścisłą, stereospecyficznazależną aktywność biologiczną związków steroidowych. Uzyskanie pożądanego produktu na drodze czysto chemicznej wymaga zazwyczaj przeprowadzenia kilkunastu lub większej liczby reakcji. Liczba przejść może być jednak znacznie zredukowana przez zastosowanie konwersji mikrobiologicznej.

b) na drodze biotransformacji

Pierwszej biotransformacji związków steroidowych dokonano w 1937 roku, utleniając dehydroepiandrosteron do androsteronu za pomocą *Corynebacterium sp.*, a następnie redukując androsteron do testosteronu za pomocą komórek drożdżowych.



Drugim wielkim krokiem na drodze do otrzymywania leków steroidowych było odkrycie w 1952 roku, że za pomocą pleśni *Rhizopus nigricans* (pleśń chlebowa) można selektywnie wprowadzić grupę OH w pozycję 11 $\alpha$  do cząsteczki progesteronu:



Odtąd progesteron stał się kluczowym półproduktem w syntezie leków steroidowych.

Biotransformacja mikrobiologiczna stała się ważnym ogniwem w technologii leków steroidowych, gdyż umożliwia przeprowadzenie całego szeregu reakcji, zachodzących wybiórczo w mało reaktywnych zazwyczaj miejscach cząsteczki, przy równoczesnym zachowaniu stereospecyficzności produktu reakcji. Procesy biotransformacji steroidów obejmują zarówno przemiany zachodzące w obrębie układu pierścieniowego, jak i w łańcuchu bocznym, łącznie z jego degradacją.

Spśród licznych reakcji enzymatycznych możliwych do przeprowadzenia z użyciem substratów steroidowych praktyczne zastosowanie znalazło tylko kilka:

- 1) odszczepienie lub degradacja łańcucha bocznego, połączona z wprowadzeniem atomu tlenu do pierścienia D i jego laktonizacja,
- 2) hydroksylowanie w pozycji 11 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 9 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$  i 21,
- 3) utlenienie grupy hydroksylowej do ketonowej w pozycji 3, z równoczesną izomerizacją układu  $\Delta^5$  do  $\Delta^4$ ,
- 4) uwodornienie grupy ketonowej w pozycji 17,
- 5) odwodornienie w pozycji  $\Delta^1$  pierścienia A.

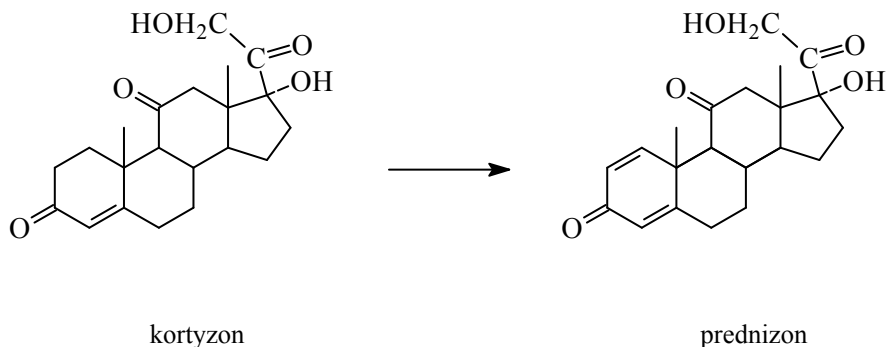
## Praktyczne wykorzystanie

### VI.2.1. Reakcje utleniania

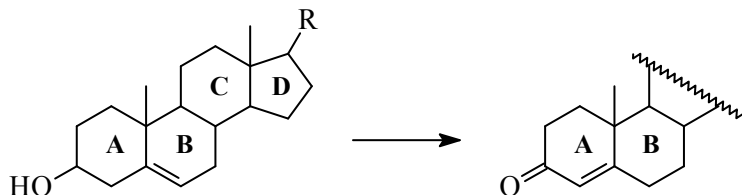
Podstawowym kierunkiem biotransformacji związków steroidowych jest ich utlenianie, które może przebiegać z udziałem różnych enzymów, głównie oksygenaz i hydrolaz. Reakcje te obejmują:

a) Hydroksylowanie, czyli wprowadzenie atomu tlenu w postaci grupy OH do cząsteczki. Reakcja ta może zachodzić praktycznie w każdej pozycji związku steroidowego, a jej regio- i stereospecyficzność zależy zarówno od użytego drobnoustroju, jak i od budowy zastosowanego związku wyjściowego (czyli od obecności w nim różnych grup funkcyjnych). Jednak przemysłowe zastosowanie znalazło jedynie hydroksylowanie w pozycjach: 11 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 9 $\alpha$ , 16 $\alpha$ , 17 $\alpha$  i 21. Spośród wymienionych reakcji bardzo duże znaczenie ma stereoselektywne wprowadzenie grupy hydroksylowej w pozycję 11 $\alpha$ , które na skalę przemysłową jest wykorzystywane w syntezie kortyzonu i jego pochodnych. W praktyce reakcję tę przeprowadza się z udziałem *Rhizopus nigricans* (str. 300). Ponadto stwierdzono, że obecność grupy OH w położeniu 17 $\alpha$  sprzyja reakcji prowadzącej do produktu 11 $\beta$ -hydroksy-steroidowego, podczas gdy brak tej grupy daje w przewodzie produkt 11 $\alpha$ -hydroksy-steroidowy.

b) Odwodornienie w pozycji 1-2 pierścienia A. Niekorzystną reakcją uboczną jest często odszczepienie łańcucha bocznego w pozycji 17, z ewentualnym otwarciem pierścienia D, oraz redukcją grupy ketonowej w pozycji 20 do grupy hydroksylowej. Odszczepieniu łańcucha bocznego zapobiega obecność w cząsteczce grupy OH w pozycji 17 $\alpha$ , dlatego możliwe jest przeprowadzenie kortyzonu w prednizon, stosując *Bacillus repens*, *Arthrobacter simplex* lub *Mycobacterium flavum*:

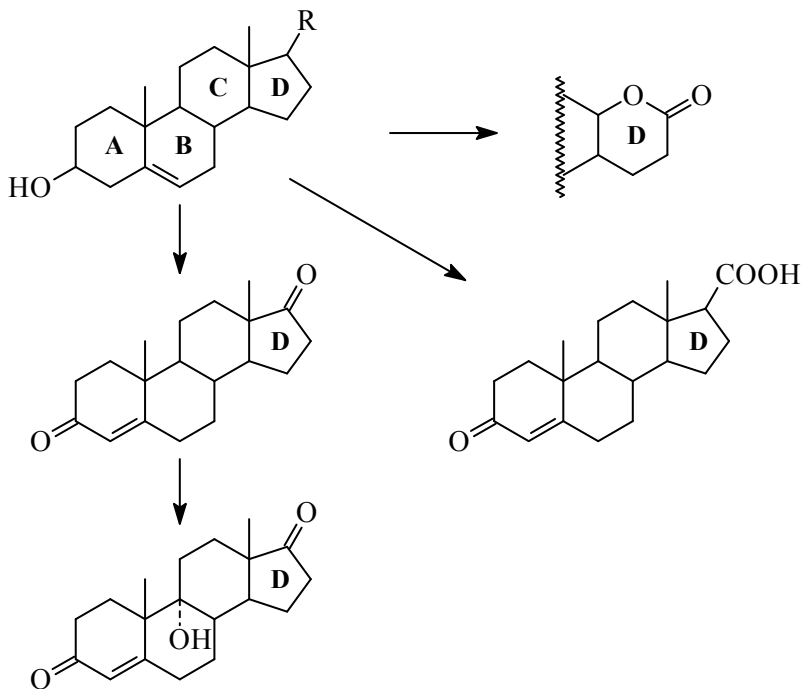


c) Utlenienie grupy hydroksylowej do ketonowej. W syntezie leków steroidowych duże znaczenie ma odwodornienie i izomeryzacja układu  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroksy do  $\Delta^4$ -3-keto. Przykładem jest ostatni etap otrzymywania progesteronu z surowców naturalnych, który na skalę przemysłową jest realizowany albo metodą chemiczną, tj. opisaną wcześniej reakcją Oppenauera, albo metodą mikrobiologiczną, używając *Aspergillus sp.* lub *Streptomyces sp.*



### VI.2.2. Odszczepienie i degradacja łańcucha bocznego

Użycie fitosteroli lub cholesterolu do produkcji leków steroidowych wiąże się z oksydacyjnym odszczepieniem lub degradacją łańcucha bocznego. Reakcje tego typu można prowadzić z udziałem wielu szczepów, np. *Nocardia*, *Streptomyces*, *Arthobacter*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*. Spośród wielu możliwych produktów tych reakcji przemysłowe znaczenie mają pochodne zawierające grupę ketonową w pozycji 17, grupę karboksylową w pozycji 20 oraz pochodne z ugrupowaniem laktonowym w pierścieniu D. Jednak bardzo często w warunkach tych reakcji, równocześnie z oksydacyjnym odszczepieniem łańcucha bocznego zachodzą także reakcje utleniania w układzie pierścieniowym, a szczególnie utlenienie grupy OH w położeniu 3, połączone z izomeryzacją układu  $\Delta^5$  do  $\Delta^4$ , wprowadzenie grupy hydroksylowej w pozycję 9 $\alpha$  czy odwodornienie pierścienia A w pozycji  $\Delta^1$ .



Rys. 7. Odszczepienie i degradacja łańcucha bocznego

### VI.2.3. Reakcje redukcji

Możliwość mikrobiologicznej redukcji związków steroidowych jest ograniczona do redukcji grupy karbonylowej do drugorzędowej grupy hydroksylowej, redukcji drugorzędowej grupy hydroksylowej do grupy metylowej lub uwodornienia wiązania podwójnego.

#### Literatura

1. L. Kuczyński: *Technologia leków*, WNT, Warszawa 1971.
2. W. Schunack, K. Mayer, M. Haake: *Arzneistoffe*; F. Vieweg & Sohn, Braunschweig–Wiesbaden 1983.
3. A. Chmiel: *Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.





# SKOROWIDZ RZECZOWY

## A

7-AC 263

*Acetobacter suboxydans* 131

acetylacja 43

*Acinetobacter* 146, 157

acydoliza 50

acylacja 43

acylaza 122

acylazy immobilizowane 262

acylotransferaza 142

acyloureidopenicyliny 268

acylowanie związków heterocyklicznych 45

C-acylowanie 44, 74

N-acylowanie 44, 45

O-acylowanie 44

ADA 212

addycja 162

adriamycyna 114

*African green monkey kidney* 199

*Agrobacterium* 202

*Agrobacterium radiobacter* 123

*Agrobacterium tumefaciens* 184, 214

aklimatyzacja szczepów bakteryjnych 253

aktywator plazminogenu 213

aktywatory 254

*Alcaligenes faecalis* 262

*Alcaligenes sp. lipase* 150

aldolaza fruktozo-1,6-difosforanowa 160

aldolazy 142, 159

alkilowanie 73

– alkenami 73

– alkoholami 73

– czwartorzędowymi solami amoniowymi 74

– diazometanem 74

– Eschweilera-Clarke'a 248, 249

– estrami kwasów arylosulfonowych 74

– halogenkami 74

– oksiranami 74

– redukcyjne 74, 75

– siarczanami alkilowymi 74

– tlenkami alkilowymi 74

alkoholiza 50

allel 214

aloksypryna 223

Alul 181

amidazy 142

amidynopenicyliny 270

aminoacylaza 122

2-aminoetanol 249

aminofilina 233

aminoglikozydowe antybiotyki 114

aminokwasy, enancjomery 122, 123, 128

– enzymatyczny rozdział kinetyczny 122

– metoda hydantoinowa 122, 123

aminometylowania reakcja 89

aminopeptydaza 122

aminopeptydaza dipeptydylowa I 197

amoksycylina 266

ampicylina 266

analiza konformacyjna 20

analogia

– izoelektronowa 19

– izopolarna 19

– strukturalna 18

anasadol 47

androstenolon 298

androsteron 300

anelowanie 94

anestezyna 85

*anti* – redukcja 168, 173

antybiotyki 252

– podział 252

– produkcja 252

– naturalne 252

– półsyntetyczne 260, 262

–  $\beta$ -laktamowe 260

antykodon 214

antykodon treoniny 214

antysensowa terapia 214

antyseptyki 255

6-AP 261, 263, 264

apalcylina 267

aparatura przemysłowa 29

apoenzym 140

armatka genowa 202

*Artemisia annua* 114

artemizyna 114

*Arthrobacter* 146

*Arthrobacter luteus* 181

*Arthrobacter simplex* 301, 302

*Arthrobacter sp. ligase* 150

L-askorbinowy kwas 131

Aspegic 223

*Aspergillus sp. lipase* 149

aspartaza 134  
 Aspisol 223  
 aspoksycylina 268  
 asymetryczna synteza 114, 132  
   – z użyciem chiralnego katalizatora 133  
   – z użyciem chiralnego pomocnika 133  
*Atropa belladonna* 114  
 atropina 114  
 autoliza grzybni 255  
 Avonex 213  
 AWO 230  
 azlocylina 269, 272  
   – synteza 272  
 azydocylina 266, 272  
   – synteza 272

## B

*baby hamster kidney* 199  
*Bacillus amyloliquefaciens* 180, 181  
*Bacillus brevis* 123  
*Bacillus megaterium* 263  
*Bacillus repens* 301  
*Bacillus subtilis* 147, 262  
*Bacterium xylinum* 139  
*Baculovirus* 202  
 Baeyer-Villiger utlenianie 157  
 bakampicylina 267, 273  
   – synteza 273  
 bakmecylinam 271  
 bakteriofagi 182, 184, 214  
 bakulowirus 202  
 BamHI 180, 181  
 Bantina i Besta metoda 283  
 BCIP 190  
 bełkotka 30  
 benorylat 223  
 Berla siodełka 32  
 Berofor 213  
 Betaseron 213  
 bezwodnik acetylosalicylooctowy 228  
 bezwodnik salicylooctowy 228, 231  
 BHK 199  
 białka 203, 204, 205  
   – chimeryczne 203, 205  
   – projektowanie 203  
   – wariantowe 203, 204  
   – rekombinowane 213  
   – wydzielane 196  
 białkowe fazy 124, 130  
 biblioteka  
   – banku genowego 218  
   – cDNA 189, 214, 215  
   – genomowa 214  
   – kombinatoryczna 22

biblioteki epitopowe 207  
 Bioferon 213  
 Biogamma 213  
 biokatalizatory 133  
 biologiczne wektory 219  
 biosynteza  
   – antybiotyków 255  
   – benzylpenicyliny 256, 257  
   – naturalnych penicylin 256  
   – naturalnych tetracyklin 258  
   – tetracyklin 258  
   – anhydrotetracyklina 259  
   – poliketoamid 258  
   – pretetramid 259  
 biotransformacje 139  
   – steroidów 299, 301  
   – hydroksylowanie 301  
   – odszczepienie i degradacja łańcucha  
     bocznego 302  
   – odwodornienie w pozycji 1-2 301  
   – reakcje redukcji 303  
   – utlenienie grupy hydroksylowej 302  
 biotylna 133  
 Bircha redukcja 71  
 Bischlera-Napierskiego synteza 99  
*blunt ends* 180  
 Bobrańskiego i Synowiedzkiego metoda 235  
 Bredercka metoda 235  
*Brevibacterium ammoniagens* 134  
 brucyna 117

## C

C-acylowanie 44, 74  
*Candida rugosa* 155  
*Candida rugosa lipase* 148  
 Cannizzaro reakcja 93  
*Catharanthus roseus* 114  
 cDNA 187  
 cDNA synteza 191  
 cedzidło 34  
   – otwarte 35  
   – zamknięte 35  
 cefabacyny 261  
 cefalosporyny 114, 260, 275  
 cefamycyny 260  
 centrum aktywne enzymu 142  
*Cephalosporium* 114  
 Cerezyme 213  
 CETP 210  
 chemia kombinatoryczna 22  
 chemiczne procesy jednostkowe 42  
*Chinese hamster ovary* 199  
 chinina 116  
 chinolina 98

- 4-chinolon 101  
 chiralne fazy stacjonarne 124  
 – białkowe 124, 130  
 – cyklodekstrynowe 124, 129, 130  
 – modyfikowane eterami koronowymi 124  
 – na bazie helikalnych polimerów 124  
 – Pirkle'a 124, 125, 127, 130  
 – polisacharydowe 124, 129  
 – typu „ligand exchange” 124, 128  
 –  $\pi$ -kwasowe 125  
 –  $\pi$ -zasadowe 126  
 chiralność  
 – centrowa 107  
 – osiowa 107  
 chiralny katalizator 132  
 – biokatalizator 133  
 – – chemiczny 133  
 chiralny selektor 124, 130, 131  
 chiralny synton 114, 131  
 chiralny związek pomocniczy 132  
 chiron 131  
 chlorambicyl 48  
 chloramfenikol 58, 112  
 chlorchinaldol 80  
 7-(3'-chloro-2'-hydroksypropylo)teofilina 242  
 chloroliza 78  
 1-chloro-2,3-propandiol  
 – synteza 237  
 – synteza z glicerolu 237  
 – synteza z 1-chloro-2,3-epoksypropanu 238  
 – synteza z epichlorhydriny 238  
 chlorotetraacyklina 258, 276  
 chlorowanie 77, 79  
 – fotochemiczne 79  
 – katalityczne 79  
 – wolnorodnikowe 79  
 chlorowcowanie 77  
 chłodnica węzownicowa 33  
 chłodzenie 31  
 – bezprzeponowe 31  
 – przeponowe 31, 33  
 CHO 199  
*cholesteryl ester transfer protein* 210  
*Chondrodendron* 114  
 choroby monogeniczne 210, 212  
 choroby poligeniczne 210, 212  
 chromatyna 214  
*Chromobacterium sp. lipase* 150  
 chromosomy homologiczne 214  
 chymotrypsyna 144  
 ciprofloksacyna 103  
 Claisena kondensacja 90  
 CMV 199  
*complementary DNA* 189  
 Cordabromin 64  
*Corynebacterium equi* 156  
*Corynebacterium sp.* 300, 302  
 COS 199  
*cos* sekwencja 184, 185  
 CRL 148, 150  
*crossing over* 214  
 CSPD 190  
*Cunninghamella echinulata* 156  
 cyjanooctowa metoda 98  
 cykl inżynierii i projektowania białek 203  
 cyklacylina 266  
 cyklodekstrynowe fazy 124, 129, 130  
 cyklodekstryny 131  
 – pochodne anionowe 131  
 – – kationowe 131  
 cynchonidyna 116  
 cynk 289  
*cystic fibrosis* 210, 212  
*Cytomegalovirus* 199  
 czynniki  
 – krzepnięcia krwi 213  
 – wzrostu kolonii granulocytów 213  
 – – kolonii granulocytów/makrofagów 213  
 L-cysteina 255  
 czystość  
 – diastereoizomeryczna 168  
 – optyczna 144
- D**  
 DAP I 197  
 dapson 73  
 de 168  
 deaminaza adenozyiny 212  
 dehydratazy 142  
 dehydrogenaza 173  
 dehydrogenazy 142, 150  
 dekantacja 34  
 dekarboksylaza pirogronianowa 173  
 dekarboksylazy 142  
 delecja 214  
 demoklocyklina 276  
 destylacja 38  
 – prosta 38  
 – próżniowa 39  
 – z parą wodną 39  
 detergenty 254  
 dezamidazy 142  
 DHAP 160  
 diastereoizomery  
 – jonowe 117  
 – kowalencyjne 117  
 difenhydramina 81  
*Digitalis purpurea* 114

- digitoksygenina 114  
 1,2-diketonów redukcja 170  
 1,4-diketonów redukcja 170  
 dikloksacylina 265  
 dimeryzacja 92  
   – aldolowa 93  
 1,3-dimetylo-6-aminouracyl 234, 241  
 N,N-dimetyloanilina 239  
 1,3-dimetylo-5,6-diaminouracyl 234, 235, 242  
 1,3-dimetylo-5-formyloamino-6-aminouracyl 234  
 N,N-dimetylomocznik 240  
 1,3-dimetylo-5-(N-3'-chloro-2'-hydroksypropylo)-amino-6-aminouracyl 242, 250  
 1,3-dimetylo-5-nitrozo-6-aminouracyl 241  
 diosgenina 293  
 dipirydamol 104  
 diprofilina 233  
   – synteza 233, 238, 239, 240, 241, 243  
   – – surowce 233  
   – – metoda chloropropandiolowa 233  
   – – – epichlorhydrinowa 240  
   – – – glicydolowa 239  
   – – – glicydowa 239  
   – – – polska 240  
   – – – Traubego 233  
   – – – Wojciechowskiego 240  
 distomer 108  
 disulfamid 65  
 dizopyramid 111  
 DNaza 210  
 doksycyklina 277  
   – synteza 278  
 Dornase alfa 213  
 drożdże 196  
   – piekarskie 134, 165  
   – – liofilizowane 177  
 duplikacja 214  
 Duteplase 213  
 D-walina 256, 257
- E**
- EcoRI 180, 181  
 ee 135, 144  
 efedryna 114, 116  
 (–)-efedryna 174  
 efektywność substancji wiodącej 17  
 egzonukleaza 186, 214  
 egzony 187  
 ekspresja 187, 188  
   – białek 199, 201, 202  
   – – w komórkach owadów 201  
   – – w transgenicznym roślinach 202  
   – – w transgenicznym zwierzętach 199  
   – genu 215  
   – rekombinowanych białek 195, 198  
 elektroporacja 202  
 enancjomery 107  
 endonukleazy 215  
 endonukleazy restrykcyjne 180  
 enzym restrykcyjny 180  
   – aktywność 180  
   – nazewnictwo 181  
   – właściwości 180, 181  
 enzymatyczna kataliza 121  
 enzymatyczne preparaty 143  
 enzymatyczny rozdział kinetyczny 122  
 enzymy 140  
   – immobilizowane 143  
   – klasy 142  
   – podklasy 142  
   – podział 142  
   – proteolityczne 144  
   – restrykcyjne 180  
   – – podział 180  
*Ephedra sinica* 114  
 epichlorhydrina 240  
 epicylina 266  
 epimerazy 142  
 epitop 208, 215  
 7-β,γ-epoksypropyloteofilina 240, 248  
 Eprex 213  
 ergosterol 300  
 erytropoetyna 213  
*Escherichia coli* 181, 262  
   – komórki immobilizowane 262  
*Escherichia intermedia* 162  
 Eschweilera-Clarke'a alkilowanie 248, 249  
   – reakcja 76  
 esteraza 122, 176  
   – z wątroby świni 146  
 esterazy 144, 146  
 estradiolu synteza 299  
 estrogenów synteza 298  
 estronu synteza 298, 299  
 estrów synteza  
   – z acetyleny i kwasów karboksylowych 51  
   – z diazaometanu i kwasów 52  
   – z disiarczku węgla i alkoholów 51  
   – z kwasów karboksylowych i alkenów 51  
   – z nitryli 52  
   – z soli kwasów karboksylowych i halogenków alkilowych 51  
 estryfikacja 48  
   – alkoholi bezwodnikami 50  
   – – chlorkami kwasowymi 50  
   – – ketenem 50  
   – bezpośrednia 49

etry koronowe chiralne 124, 130  
 etionamid 85  
 etinyloestradiolu synteza 299  
 eukariota 215  
 eutomer 108

## F

fag  $\lambda$  184  
 fagowy wektor 219  
 FDP 160  
 fenetycylina 264  
 fenobarbital 97  
 fenol 289  
 fenotyp 215  
 fenprokumon 110  
 fenytoina 94  
 fermentacja 255  
 filtr  
 – bębnowy obrotowy 34  
 – obrotowy 36  
 filtracja 34  
 filtry 254  
 flaszka florentyńska 39  
*Flavobacterium okeanokoides* 181  
 flukloksacylina 265  
 fluoksetyna 134  
 9-fluoropochodne steroidów – synteza 297  
*flush ends* 180  
 FokI 181  
 folitropina 213  
 formadicyny 261  
 fosfatazy 158  
 fosfodiesterazy 158  
 fosfolipazy 142, 176  
 fosfomutazy 142  
 fosforan dihydroksyacetonu 160  
 fosforylasy 158  
 fosforylotransferazy 142  
 Foskera metoda 264  
 Free S.M. 20  
 Friedela-Craftsa reakcja 44, 74  
 Fujita T. 20  
 fumaraza 134, 162  
 furazlocyлина 269  
 furbenicylina 269  
 furosemid 65, 85  
 ganciklowir 208, 210

## G

„gaszenie piany” 254  
 Gattermanna reakcja 46  
 Gattermanna-Kocha reakcja 46  
 gen  
 – regulatorowy 217

– supresorowy 215  
*gene gun* 202  
 genetyczna sonda 217  
 genom 215  
 Genotropin 213  
 genowa terapia 211, 214  
 genu indukcja 215  
*Geotrichum candidum* 134  
 GILSP 212  
 glicerolowa kinaza 159  
 glicydol 239  
 glikokortykoidy półsyntetyczne 296  
 glikol polietylenowy 202  
 glikozydazy 142  
 glikozydy nasercowe 292  
 GlukaGen 213  
 glukagon 280  
 glukocerebrozydaza 213  
 glukonylotransferaza 142  
 Gonal-F 213  
*good industrial large scale practice* 212  
 „gospodarz – wektor” 182, 190, 195  
 Granocyte 213  
 grupa prostetyczna 140

## H

HaeIII 181  
*Haemophilus aegyptus* 181  
*Haemophilus influenzae* 181  
*Haemophilus parainfluenzae* 181  
 Hagedorn 288  
 haloformowa reakcja 80  
 Hanp 213  
 Hansch C. 20  
*Hansenula polymorpha* 196  
 H-B-Vax II 213  
 HeLa 199  
 helikalne polimery 124  
*Herpes simplex* 203  
 hetacylina 267  
 heterozygota 215  
 HindIII 181  
 HLADH 152  
 homozygota 215  
 hormon wzrostu 197  
*horse liver alcohol dehydrogenase* 152  
 HpaII 181  
 HSA 203  
 HSDH 152  
 Humalog 213  
*human epitheloid carcinoma* 199  
 humanizowane przeciwciała 205  
 Humulin 213  
 hybrydyzacja 215

- kwasów nukleinowych 215
- Southerna 215
- hydantoina 253
- hydratazy 142
- hydrogenoliza 71
- hydrokortyzonu synteza 295
- 7- $\beta$ -hydroksy- $\gamma$ -chloropropyloteofilina 243, 247
- hydroksylazy 142
- 11- $\alpha$ -hydroksyprogesteron 300
- hydrolazy 142, 144, 301
- hydroliza 65
  - alkilochlorowcopochodnych 66
  - amidów 67
  - arylochlorowcopochodnych 66
  - bezwodników kwasowych 67
  - estrów 67, 176
  - eterów 68
  - halogenków kwasowych 67
  - nitryli 67
  - soli kwasów organicznych 67
  - soli zasad organicznych 67
- hydrosulfitu redukcja 72
- hydroxysteroid dehydrogenase* 152

## I

- ibuprofen 111
- imidazol 95
- imidazolina 95
- immobilizacja
  - enzymów 143
  - komórek 143
- immunocytochemiczne metody 215
- Imukin 213
- indukcja genu lub operonu 215
- Infergen 213
- inhibitor trombiny 213
- inokulum 252, 253
- instalacja przemysłowa 29
- insulina 204, 213, 280
  - aktywność 285
  - analiza rentgenograficzna 282
  - biosynteza w komórkach  $\beta$  wysp Langerhansa 280
  - budowa chemiczna 280
  - izolacja z trzustek zwierzęcych 284
  - izofanowa NPH 288
  - lispro 205, 213
  - otrzymywanie 285
  - – biosynteza z wykorzystaniem inżynierii genetycznej 283, 285, 287
  - – krystalizacja metodą Scotta 283
  - – metoda inżynierijno-genetyczna 285, 287
  - – metoda klasyczna 283
  - – metoda pełnej syntezy chemicznej 283, 285

- – semisynteza z insuliny wieprzowej 283, 285
- – technologia rekombinacji 285, 287
- proteinowo-cynkowa 288
- przechowywanie 290
- NPH insulina 288
- insulinowe preparaty 285
- insuliny
  - globinowe 288
  - surfenowe 288
- Insuman 213
- interferon 212, 213
- interleukiny 212, 213
- intervening sequences* 187
- Intron A 213
- introny 187
- inżynieria genetyczna 179
- izochinolina 99
- izoenzymy 215
- izolacja antybiotyków 255
  - ekstrakcja 255
  - strącanie 255
  - adsorpcja 255
- izolacja insuliny z trzustek zwierzęcych 284
- izomerazy 142
- izomeria przestrzenna 107

## J

- jednostkowe procesy
  - chemiczne 42
  - procesy fizyczne 29
- jonowe diastereoizomery 117
- Jordana metoda 244

## K

- karbapenemy 261
- karbenicylina 270
- karboksylazy 142
- karfenicylina 270
- karindacylina 270, 274
  - synteza 274
- katalaza 142
- kataliza enzymatyczna 121, 141
- katalizator chiralny 132
- katalizator Sharplessa 120
- ketamina 112, 113
- $\beta$ -ketoestrów redukcja 167
- ketolazy 142
- ketonów redukcja 165
- kinazy 142, 158
- kliochinol 57, 99
- kloksacylina 264, 265
- klonidyna 95
- klonowanie 193, 215
  - cDNA 187

- knock-out* mysz 207, 209, 210  
 Knoevenagela kondensacja 89  
 kodon 216  
 koenzymy 140  
 Kolbego-Schmitta reakcja 224  
 kolchicina 253  
 kolidyna 296  
 komórki
  - CHO 198
  - immobilizowane 263
  - kompetentne 184, 198
  - pułapkowane 263
  - ssaków stosowane do ekspresji rekombinowanych białek 199
  - – BHK 199
  - – CHO 199
  - – COS 199
  - – HeLa 199
 kompleks AWO 230  
 kondensacja 87
  - acyloinowa 93, 162
  - aldehydów ze związkami zawierającymi grupy aminowe 88
  - aldolowa 93, 160
  - Claisena 90
  - cyklizująca 87, 94
  - ketonów 88
  - Knoevenagela 89
  - połączona z odwodnieniem 87
  - połączona z wydzieleniem cząsteczki alkoholu 90
  - połączona z wydzieleniem cząsteczki kwasu 91, 92
  - kondensacja prosta 87
 konformacja cząsteczki 20  
 konstrukcja gen/wektor 212  
 konstruowanie biblioteki cDNA 215  
 konstytucyjne promotory 196  
 kontrola jałowości procesów 254  
 konwersja penicylin do cefalosporyn 276  
 kortyzon 301  
 kosmidy 184  
 kowalencyjne diastereoizomery 117  
 krystalizacja 40  
 krystalizator
  - kołyskowy 41
  - otwarty 41
  - zamknięty 40
 ksantyny 236
  - przemysłowe metody syntezy 233
 kultywacja szczepów bakteryjnych 253  
 kwas acetylosalicylosalicylowy 228  
 kwas acetylosalicylowy 220, 228
  - formy krystaliczne 231
  - hydroliza 230
  - krystalizacja 231
  - polimorfizm 231
  - produkty uboczne 229
  - rozpuszczalność 231
  - synteza 228
  - temperatura topnienia 229
  - wpływ kwasu octowego 230
  - zanieczyszczenia 228
 kwas  $\alpha$ -L-aminoadypinowy 256, 257  
 kwas 6-aminopenicylanowy 262, 264
  - biosynteza 262
  - metoda biochemiczna 262
  - metoda Foskera 264
  - metody chemiczne 263
  - otrzymywanie 256
  - sililowanie grupy karboksylowej 263
 kwas 6-AP 112, 254  
 kwas 7-aminocefalosporynowy 263
  - otrzymywanie 263
 kwas L-askorbinowy 131  
 kwas barbiturowy 97  
 kwas chinolinowy 245  
 kwas cyjanooctowy 241  
 kwas 1,3-dimetylo-6-iminobarbiturowy 234, 241  
 kwas 1,3-dimetylo-6-iminowiolurowy 234, 241  
 kwas fenylooctowy 254  
 kwas 4-hydroksybenzoesowy 228  
 kwas 4-hydroksyzioftalowy 228  
 kwas kamforo-10-sulfonowy 116  
 kwas klawulanowy 261  
 kwas migdałowy 116  
 kwas moczowy 235  
 kwas nalidiksowy 102  
 kwas nikotynowy 244
  - synteza 244, 245, 246
  - – metoda Woodwarda 244
  - – metoda Jordana 244
  - – z chinoliny 244
  - – z 8-hydroksychinoliny 245
  - – z 2-metylo-5-etylopirydyny 244
  - – z nikotyny 244
  - – z  $\beta$ -pikoliny 245
  - – zpirydyny 246
 kwas salicylosalicylowy 228  
 kwas salicylowy 224
  - produkcja 225
  - sublimacja 227
  - synteza 224
  - technologia 224
 kwas wiolurowy 234  
 kwasy oliwanowe 261

**L**

L-askorbinowy kwas 131  
 L-cysteina 255  
 lepkie końce 180, 181  
 Leucarta reakcja 76  
 Leucomax 213  
 lewodopa 110, 113  
 liazy 142, 162  
 ligacja 186  
 „ligand exchange” fazy 124, 128  
 ligazy 159  
 ligazy DNA 180, 182, 186  
 limecyklina 277  
 lipazy 122, 142, 144, 148, 176  
 liza komórek 216  
 ludzka albumina surowicy 203

**M**

„magiczna kula” 205  
 malonowa metoda 97  
 Mannicha reakcja 89, 277  
 mapa restrykcyjna 216  
 McFadyena-Stevensa redukcja 72  
 „medyczne produkty biotechnologii” 212  
 Meerweina-Ponndorfa-Verleya redukcja 71  
 mefenytolina 111  
 metacyklina 277  
 – synteza 278  
 metakrezol 289  
 metamizol 91  
 metampicylina 266  
 meticylina 264  
 metionina 254  
 metoda  
 – Bantinga i Besta 283  
 – Bobrańskiego i Synowiedzkiego 235  
 – Bredercka 235  
 – cyjanooctowa 98  
 – Foskera 264  
 – malonowa 97  
 – Oppenauera 294  
 – Reichsteina-Grussnera 131  
 – Traubego 233  
 metody immunocytochemiczne 215  
 metody poszukiwania leków 15  
 metronidazol 76  
 N-metyloaminoetanol 243  
 16-metylo pochodne steroidów  
 – 16- $\alpha$ -metylo pochodne 297  
 – 16- $\beta$ -metylo pochodne 297  
 – synteza 297  
 metylotransferaza 142  
 mezlocylin 269  
 mieszadło

– kotwiczne 29  
 – ramowe 33  
 – ślimakowe 29

mieszanie 33  
 mikroorganizmy immobilizowane 143  
 minocyklina 277  
 Miraxid 271  
 mirystylacja 216  
 Mitsonobu reakcja 135  
 modelowanie cząsteczkowe 19  
 monobaktamy 261  
 monogeniczne choroby 210, 212  
 monoklonalne przeciwciała 205  
 morfina 114  
 morinamid 90  
 mRNA 216  
 MSL 148  
*Mucor sp. lipase* 148  
 mukowiscydoza 210  
 mutacja 216  
 – szczepów bakteryjnych 253  
 mutagen 216  
 mutageneza punktowa 204  
 mutazy 142  
*Mycobacterium flavum* 301, 302  
*Mycobacterium sp.* 156  
 mysz *knock-out* 207, 209, 210  
 mysz transgeniczna 207

**N**

N-metyloaminoetanol 243  
 N,N-dimetyloaminy 239  
 N,N-dimetylomocznik 240  
 N-acylowanie 44, 45  
 Nartograstim 213  
 NBT 190  
 Neupogen 213  
 Neu-up 213  
 niacyna 53  
 niebiologiczne wektory 219  
 nieradioaktywna sonda DNA 189  
 niklozamid 81  
 nikotynian ksantynolu 233  
 – synteza 243  
 – – aminoliza 7- $\beta$ , $\gamma$ -epoksypropyloteofiliny 248  
 – – metoda polska 250  
 – – według patentu firmy Wülfig 243  
 – – z 1,3-dimetylomocznika i kwasu  
 cyjanooctowego 250  
 – – z 7- $\beta$ -hydroksy- $\gamma$ -chloropropyloteofiliny 246  
 – – z N-(3'-chloro-2'-hydroksypropylo)-N-  
 metyloaminoetanolem 247  
 – – z zastosowaniem 2-aminoetanolu  
 i alkilowania Eschweilera-Clarke'a 248



- nisza katalityczna enzymu 142  
 nitrator 55  
 nitrowanie 53
  - alkanów 56
  - alkoholi wielowodorotlenowych 57
  - amin aromatycznych 56
  - fenoli 55
  - związków aromatycznych 53
 nitrująca mieszanina 53  
*Nocardia otidiscarianum* 181  
*Nocardia sp.* 156  
 nokardycyny 260  
*northern-blotting* 216  
 NotI 181  
 NovoSeven 213  
 NPH insulina 288  
 nucza 34  
 nukleazy 216  
 Nutropin 213  
 nystatyna 114
- O**
- O-acylowanie 44  
 oddzielanie ciał stałych od cieczy 34  
 odmiana
  - metastabilna 137
  - polimorficzna 137
  - stabilna 137
 odstawanie 34  
 odwodornienie 83  
 odwrotna transkryptaza 189, 191, 218  
 ogrzewanie 30
  - bezprzeponowe 30
  - przeponowe 31
 oksacylina 265  
 oksydazy 142, 150  
 oksydehydrogenizacja 83  
 oksygenazy 142, 150, 154, 301  
 oksynitrylaza 163  
 oksyreduktazy 142  
 oksytetracyklina 258, 276  
 oocyty żaby 190  
 operator 216  
 operon 216  
 operonu indukcja 215  
 Oppenauera metoda 294  
 optymalizacja struktury wiodącej 16  
 organizmy transgeniczne 216
- P**
- palindromowe sekwencje 180, 217  
*Papaver somniferum* 114  
 papaweryna 100  
 paracetamol 223  
 pBR 322 wektor 183  
 PCR 193, 216  
 PEG 202  
 penemy 261  
*Penicillium chrysogenum* 256  
*Penicillium* 114  
 penicyliny 114, 260
  - izoksazolowe 264
  - naturalne 261
 penimepicyklina 277  
 pentoksyfilina 233  
 peptydazy 142  
 Perkina reakcja 91  
 peroksydazy 142  
*Pichia pastoris* 196  
 pierścienie Raschiga 31  
*pig liver esterase* 146  
 piperacylina 269  
 pirbenicylina 268  
 Pirkle'a fazy 124, 125, 130  
 pirogronianowa kinaza 159  
 pirolidynometylotetracyklina 276  
 pirydyna 96  
 pirymido[5,4-d]pirymidyna 104  
 pirymidyna 97  
 piwampicylina 267  
 piwmeicylinam 271, 274
  - synteza 274
 plazmid 182, 216
  - pTEX 184
  - Ri 202
  - Ti 202, 217
 plazmochina 47, 48  
 PLE 146  
 Polfilin 233  
 poligeniczne choroby 210, 212  
 polimeraza 186, 193
  - DNA 217
 polimery helikalne 124  
 polimorfizm 137  
 polinukleotydowa transferaza 218  
 polisacharydowe fazy 124, 129  
*polymerase chain reaction* 193  
 pomoce filtracyjne 34  
*porcine pancreatic lipase* 148  
 poszukiwanie leków 15  
 potranslacyjne modyfikacje białek 195
  - amidacja 195, 198
  - fosforylacja 195, 200
  - N-glikozylacja 195, 200
  - O-glikozylacja 195, 200
  - hydroksylacja 195
  - mirystylacja 195
  - $\gamma$ -karboksylacja 195, 198, 200

- prenylacja 195
- rozrywanie wiązań peptydowych 195
- sulfonowanie 195, 198
- tworzenie mostków disulfidowych 195

pożywki 254

PPL 148

pralidoksym 88

prasa

- filtracyjna 34, 36
- ramowa 36

prednizolonu synteza 296

prednizon 301

- synteza 296

pregnenolonu synteza 294

prekursory 254

Preloga reguła 151

prenalterol 156

prenylacja 217

preproinsulina 281

pretetramid 28

procesy jednostkowe – podział 42

progesteron 299

- synteza 294

proinsulina świnińska 281

projektowanie białek 203

prokariota 217

promotor 195, 196

- konstytucyjny 196
- regulatorowy 196

propoksyfen 112, 113

propranolol 111, 112

proscylarydyna 114

protaminy 285, 288, 289, 291

proteazy 144

*Providencia stuarti* 181

przeciwciała 203

- humanizowane 205
- monoklonalne 205

*Pseudomonas aeruginosa* 268, 270

*Pseudomonas oleovorans* 156

*Pseudomonas putida* 155, 263

*Pseudomonas sp. lipase* 148

pseudopolimorfizm 137

PSL 148, 150

PstI 181

pTEX 184

Pulmozyme 213

Puregon 213

## Q

QSAR 20

*quantitative structure–activity relationship* 20

## R

racematu rozdział 115

- elektroforeza kapilarna 115, 131
- krystalizacja racematu 115
- metody adsorpcyjne 115, 124
- rozdział diastereoizomerów 115, 116
- rozdział kinetyczny 115, 120, 122

racemazy 142

racemiczny konglomerat 115

racemiczny związek 115, 116

racjonalne poszukiwanie leków 16

radioaktywna sonda DNA 189

Raschiga pierścienie 32

reakcja

- aminometylowania 89
- Cannizzaro 93
- Eschweilera-Clarke'a 76
- Friedela-Craftsa 44, 48, 74
- Gattermanna 46
- Gattermanna-Kocha 46
- haloformowa 80
- Kolbego-Schmitta 224
- Knoevenagela 102
- Leucarta 76
- Mannicha 89, 277
- Mitsunobu 135
- Perkina 91
- Sandmeyera 77
- Wallacha 75

reaktor 29

- z mieszadłem kotwicznym 29
- z mieszadłem ramowym 33
- z mieszadłem ślimakowym 33
- z płaszczem parowym 31
- z węzownicą 31

Recombinat 213

Recormon 213

redukcja 68, 165

- asymetryczna 165
- Bircha 71
- elektrolityczna 71
- hydrosulfid 72
- katalityczna 70
- katalizatory 69
- kompleksowymi wodorkami metali 71
- McFadyena-Stevensa 72
- Meerweina-Ponndorfa-Verleya 71
- siarczkami 72
- tetraoksodisarczanem (III) sodu 72
- z udziałem jonu wodorkowego 70
- z udziałem protonu 71
- z udziałem wodoru atomowego 69

- redukcyjne alkilowanie 74, 75  
 reduktazy 142, 167  
 reduktor 68  
*re-face* redukcja 151  
 Refludan 213  
 regulatorowe promotory 196  
 regulatorowy gen 217  
 regulatory krzepnięcia 213  
 Reichsteina-Grussnera metoda 131  
 rekombinacja 217  
 rekombinowane białka 213  
 replikacja DNA 217  
 represja 217  
 represor 217  
 restrykcyjne enzymy 180  
 restryktazy 180  
 Retavase 213  
 retowirusowe wektory 211  
 retowirusy 199, 211, 217  
 RFLP 217  
*Rhizopus nigricans* 295, 300  
 Ri plazmid 202  
 Roferon-A 213  
 rolitetracyklina 276
- S**
- Saccharomyces* 154, 162  
*Saccharomyces cerevisiae* 196  
 Sadamin 233  
 salmina 288  
 salol 52  
 salsalat 223  
 salwarsan 18  
 Sandmeyera reakcja 77  
*Scilla maritima* 114  
 sekwencja
  - *cos* 184, 185
  - palindromowa 180, 217
 selekcja szczepów produkcyjnych 252  
 selektor chiralny 124, 130, 131  
 Sharplessa katalizator 120  
 siarczanowanie 58, 63  
*si-face* redukcja 151  
*Simian virus* 199  
 siodełka Berla 31  
*site directed mutagenesis* 204  
 Skraupa synteza 98  
 skrining 16, 18  
 skruber 31, 32, 254  
 solasodyna 293  
 Solclot 213  
 somatyczna terapia genowa 211  
 sonda genetyczna 217  
 sonda radioaktywna 189
- sondy detekcja 190
  - alkaliczną fosfatazą 190
  - autoradiografią 190
  - awidyną 190
  - barwnikami fluorescencyjnymi 190
  - koloidalnym złotem 190
  - mikroskopem fluorescencyjnym 190
  - peroksydazą 190
 sondy znakowanie 190
  - barwnikiem fluorescencyjnym 190
  - biotyną 190
  - cytochemiczne 190
  - digoksygeniną 190
  - enzymatyczne 190
  - fluoresceiną 190
  - fluorescencyjne 190
  - immunochemiczne 190
  - radioizotopowe 190*Southern blotting* 215  
 Southerna hybrydyzacja 215  
*splicing* (splajsing) 182, 217  
*split and mix* 24  
 starter 217  
 steran 292  
 stereioizomeria 107  
 steroidów biotransformacje 299, 301  
 steroidy 292  
 sterylizacja powietrza 253, 254
  - filtry 254
  - temperatura 254*sticky ends* 180  
*Streptomyces* 114  
*Streptomyces noursei* 114  
*Streptomyces peuceticus* 114  
 struktura wiodąca 15, 203, 206  
 stygmasterol 293, 299, 300  
 substancja wiodąca 15  
 sulfocyлина 270  
 sulfonator 61  
 sulfonowanie 58
  - amin 63
  - kwasem chlorosulfonowym (VI) 63
  - kwasem siarkowym (VI) 59
  - tritlenkiem siarki 62
  - związków aromatycznych 59
 sulfonujące czynniki 59  
 Superpyrin 223  
 supresja 217  
 supresorowy gen 215  
 surowce do biosyntezy antybiotyków 254  
 SV40 199  
*syn* – redukcja 168  
 syntazy 142  
 syntetazy 142

## synteza

- Bischlera-Napieralskiego 99
- „dziel i mieszaj” 24, 25
- kombinatoryczna 22
- na podłożu stałym 24
- równoległa 22
- Skraupa 98

synton chiralny 114, 131

szczepionki 213

„szok” 253

**T**

taksol 114

talampicylina 266

talidomid 113

*Taxus brevifolia* 114

TBADH 152, 154

technika hybrydyzacji DNA 189

technologia

- genowa 179
- rekombinowanego DNA 179

TEI-1194 268

TEI-2021 268

teofilina 234

- biosynteza 237
- półsynteza z guaniny 236
- – z kofeiny 237
- – z kwasu moczowego 235
- synteza 233
- – metoda Bobrańskiego i Synowiedzkiego 235
- – metoda Bredericka 235
- – metoda Traubego 233
- – z imidazolu 237
- – z kwasu moczowego 236

terapia antysensowa 214

terapia genowa 211, 214

testosteronu synteza 300

tetraazotan pentaerytrytlu 93

tetrachlorokofeina 237

tetracykliny 114, 258, 276

tepe końce 180, 181

*thermoanaerobicum brockii alcohol dehydrogenase* 152

Ti plazmid 202

tiatedracyklina 279

tikarcylina 270

timoksycylina 268

tiolazy 142

tkankowy aktywator plazminogenu 213

TNF 212

tokainid 112

 $\alpha$ -tokoferol 175

tomatodyna 293

transaldolaza 142

transdukcja 217

transestryfikacja 50

transfekcja 186, 218

transferaza 142

- polinukleotydowa 218

transformacja 218

transformacja asymetryczna 115, 117

transgeniczna mysz 207

transgeniczne zwierzęta 199, 207

transketolaza 142

transkrypcja 188, 218

- RNA 195

transkrypt 218

transkryptaza odwrotna 189, 191, 218

translacja 195, 218

Traubego metoda 233

triacyloglicerolipaza 176

tributyrynaza 176

tRNA 218

tubokuraryna 114

*tumor necrosis factor* 212

tworzenie biblioteki banku genowego 218

tyroksyna 46, 52, 57

tyrozynaza 162

**U**

„uszlachetnianie szczepów produkcyjnych”

- aklimatyzacja 253
- kultywacja 253
- mutacja 253

utleniające czynniki 83

utlenianie 81

- niezupełne 81
- odwodorniające 82
- Oppenauera 71
- zupełne 81

uwodornienie 69

**W**

Wallacha reakcja 75

WAN 54

wektor pBR322 183

wektory 182, 202, 219

- bifunkcjonalne 184
- binarne 202
- biologiczne 219
- fagowe 184, 219
- kointegracyjne 202
- kosmidowe wahadłowe 184
- kosmidy 184
- niebiologiczne 219
- plazmidowe 182
- podział 182

- retrowirusowe 211
  - transformacja 184, 186
  - wahadłowe 184
  - właściwości 182
- Wellferon 213
- western blotting* 219
- Wilson J.W. 20
- winkrystyna 114
- wirowanie 37
- wirówka
- filtracyjna 37
  - przelewowa 37
- wirus Epsteina-Barr 199
- witamina C 131
- WNK 254
- WO 54
- wodny namok kukurydzy 254
- wodoroliza 71
- Woodwarda metoda 244
- współczynnik
- aktywności nitrowania 54
  - odwodnienia 54
- wyciąg namokowy kukurydzy 254
- wymiennik ciepły 33
- wyparka 38
- X**
- Xanthobacter* 156
- Y**
- YAC 184
- YADH 152, 153
- Yarrowia lipolytica* 196
- Yatren 64
- yeast alcohol dehydrogenase* 152
- yeast artificial chromosomes* 184
- Z**
- związki optycznie czynne 114
- rozdział racematu 114, 115
  - synteza asymetryczna 114, 132
  - z zastosowaniem chiralnego syntonu 114, 131
  - z surowców naturalnych 114
- zwierzęta transgeniczne 199, 207
- Ż**
- „żywe bioreaktory” 199, 200