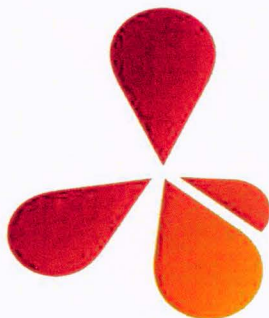




INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK



**Badania nad zastosowaniem nowych właściwości  
katalitycznych wybranych hydrolaz**

mgr Monika Wilk

Monotematyczny cykl publikacji z komentarzem przedstawiony Radzie  
Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w celu  
uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

**Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski**

Warszawa 2021

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

**Org.-B.431/21**



80000000343523

<https://rcin.org.pl>

A-21-6

K-S-172

K-C-124





B. Ona  
431/21

**Wykonane badania były realizowane w ramach projektu:**



*„Chemoenzymatyczne kaskady reakcji multikomponentowych.”*

OPUS 12 NCN (2016/23/B/ST5/03307)





Dziękuję mojemu Promotorowi,  
Panu Prof. dr. hab. inż. Ryszardowi Ostaszewskiemu  
za wybór interesującej tematyki badawczej i wszechstronną pomoc  
podczas realizacji niniejszej pracy.  
Serdecznie dziękuję za ogromną życzliwość, wsparcie oraz cenne  
wskazówki otrzymane w trakcie kilkuletniej współpracy.





Dziękuję również członkom Zespołu XX za wspaniałą atmosferę.  
Szczególne podziękowania składam Annie Brodzkiej oraz  
Dominikowi Koszelewskiemu za kilka lat współpracy, wartościowe dyskusję  
i przekazaną wiedzę.

Dziękuję Damianowi Trzepizurowi za bezinteresowne wsparcie oraz  
przyjaźń.



Dziękuję mojej Rodzinie i Przyjaciołom  
za możliwość rozwoju oraz wsparcie.

Dziękuję Andreasowi  
za miłość i wiarę w moje możliwości.





**Pamięci mojego  
Taty**





SPIS PUBLIKACJI  
WCHODZĄCY W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Monika Wilk, Anna Brodzka, Dominik Koszelewski, Arleta Madej, Daniel Paprocki, Anna Żądło-Dobrowolska, Ryszard Ostaszewski, „The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction”, *Bioorg. Chem.* **2019**, *93*, 102817.
2. Monika Wilk, Damian Trzepizur, Dominik Koszelewski, Anna Brodzka, Ryszard Ostaszewski, „Synthesis of (*E*)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid *via* promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/Knoevenagel reaction”, *Bioorg. Chem.* **2019**, *93*, 102816.
3. Monika Wilk, Ryszard Ostaszewski, „Efficient Assay for the Detection of Hydrogen Peroxide by Estimating Enzyme Promiscuous Activity in the Perhydrolysis Reaction”, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 1464–1469.
4. Monika Wilk, Anna Brodzka, Dominik Koszelewski, Jan Samsonowicz-Górski, Ryszard Ostaszewski, „Model Studies on the Enzyme-Regulated Diastereodivergent Cascade Passerini Reaction”, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, DOI: 10.1002/ejoc.202100760.

## SPIS PUBLIKACJI NIEWCHODZĄCY W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Anna Żądło-Dobrowolska, Dominik Koszelewski, Daniel Paprocki, Arleta Madej, Monika Wilk, Ryszard Ostaszewski, „Enzyme-Promoted Asymmetric Tandem Passerini Reaction”, *ChemCatChem* **2017**, 9, 3047-3053.
2. Dominik Koszelewski, Damian Trzepizur, Ewelina Zaorska, Arleta Madej, Anna Brodzka, Daniel Paprocki, Filip Borys, Monika Wilk, Ryszard Ostaszewski, „Facile Conversion of  $\alpha$ -Acyloxy Amides into 3-Hydroxy-lactams”, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 25, 3280-3290.
3. Daniel Paprocki, Monika Wilk, Arleta Madej, Peter Walde, Ryszard Ostaszewski, „Catalyst-free synthesis of  $\alpha$ -acyloxy-carboxamides in aqueous media”, *Environ. Chem. Lett.* **2019**, 17, 1011-1016.

## SPIS WYSTĄPIEŃ KONFERENCYJNYCH

1. **BioTrans 2017**, Budapeszt (Węgry), 9-13.07.2017, plakat: „The Studies on Providing  $\alpha$ -Acyloxy Carboximides from Esters *via* Chemoenzymatic Cascade.”
2. **XI OSCO**, Warszawa (Polska), 8-11.04.2018, plakat: „The Enzyme Driven Enantioselective Passerini Reaction.”
3. **4th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetics Industry**, Trzebnica (Polska), 25-27.06.2018, plakat: „Acetals as a novel substrates for enzymatic tandem esterification / Knoevenagel reaction.”
4. **9th International Congress on Biocatalysis**, Hamburg (Niemcy), 26-30.08.2018, plakat: „Probing enzyme active sites in promiscuous Ugi reaction by isocyanides.”

5. **BioTrans 2019**, Groningen (Holandia), 7-11.07.2019, plakat: „Synthesis of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated compounds *via* promiscuous enzymatic cascade esterification/ Knoevenagel reaction.”
6. **BioTrans 2021**, on-line Graz (Austria), 19-22.07.2021, plakat: „Parallel assay for estimating the enzyme promiscuity and hydrogen peroxide in the enzyme-mediated perhydrolysis of *p*-nitrophenyl esters.”





## Spis treści

1.	Streszczenie w języku polskim .....	19
2.	Abstract in english.....	21
3.	Cel pracy.....	23
4.	Wstęp literaturowy- wprowadzenie.....	25
4.1.	Hydrolazy w syntezie organicznej.....	25
4.1.1.	Lipazy- charakterystyka i mechanizm reakcji natywnej .....	25
4.1.2.	Metody oznaczania aktywności hydrolaz.....	27
4.1.3.	Reakcje katalizowane przez lipazy .....	29
4.2.	Promiskuityzm enzymów.....	31
4.2.1.	Promiskuityzm środowiskowy .....	32
4.2.2.	Promiskuityzm substratowy .....	32
4.2.3.	Promiskuityzm katalityczny .....	34
4.3.	Reakcje kaskadowe.....	36
4.4.	Enzymatyczne reakcje multikomponentowe.....	37
4.4.1.	Reakcja Ugiego i jej enzymatyczny wariant .....	38
4.4.2.	Reakcja Passeriniego .....	40
4.5.	Podsumowanie rozdziału .....	43
5.	Badania własne -przewodnik po publikacjach .....	45
5.1.	Tworzenie wiązania węgiel-węgiel w kaskadowej reakcja Knoevenagla.....	45
5.2.	Enzymatyczna multikomponentowa reakcja Ugiego.....	52
5.3.	Stereodywergentna kaskadowa reakcja Passeriniego .....	57
5.4.	Próbniki fluorescencyjne do oznaczania promiskuitycznej aktywności hydrolaz.....	63
6.	Podsumowanie badań własnych.....	67
7.	Publikacje oryginalne oraz oświadczenia od współautorów .....	69



## 1. Streszczenie w języku polskim

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było przeprowadzenie badań nad zastosowaniem nowych aktywności katalitycznych wybranych hydrolaz w syntezie organicznej. Zdolność enzymów do katalizowania reakcji innych niż natywne określane jest mianem promiskuityzmu. Fenomen ten stanowi podstawę prowadzonych badań, a w szczególności jego wykorzystania w syntezie związków o wysokiej wartości dodanej. Skupiono się na zbadaniu nowych właściwości katalitycznych hydrolaz w reakcjach przebiegających jednoetapowo oraz w kaskadzie.

Podczas realizacji pracy doktorskiej opracowano: (1) wysoce *E*-selektywną metodę syntezy  $\alpha,\beta$ -nienasyconych estrów kwasu cyjanooctowego bazującej na kaskadowej reakcji Knoevenagla, (2) jednoetapową enzymatyczną metodę syntezy peptydomimetyków w wyniku reakcji Ugięgo, (3) zbadano wpływ struktury substratu na przebieg tej reakcji oraz (4) zaproponowano dogodną i ogólną metodologię stereo –rozbieżnej kaskady umożliwiającej syntezę diastereoizomerycznych  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów z bardzo wysoką enancjoselektywnością. Synteza związków enancjomerycznie czystych metodami klasycznymi jest na ogół bardzo złożona, dlatego istotnym zagadnieniem zrealizowanych badań było określenie wpływu hydrolaz na stereochemiczny przebieg prowadzonych reakcji. Dodatkowo po raz pierwszy opracowano metodę określania promiskuitycznej aktywności enzymów w reakcji perhydrolizy. Badania te zakończyły się opracowaniem efektywnej procedury, która w szybki i bezpieczny sposób umożliwia syntezę nadkwasów.



## 2. Abstract in english

This study aimed to expand the application of new catalytic properties of selected hydrolases in organic synthesis. The application of enzymes plays a key role in the synthesis of the high-value-added compounds from simple substrates due to their high selectivity and promiscuous properties. Enzyme promiscuity is defined as the capability of an enzyme to mediate reactions, which are divergent from their natural role. To achieve the goal, the promiscuous hydrolases were used in the single and cascade reactions.

In particular, the: (1) highly (*E*)-selective method for the synthesis of  $\alpha,\beta$ -unsaturated cyanoacetic acid esters *via* cascade Knoevenagel reaction was designed, (2) the one-pot chemoenzymatic Ugi reaction was expanded, and (3) the influence of substrates in the Ugi reaction was investigated. Furthermore, (4) the stereodivergent cascade Passerini reaction enabling the formation of diastereoisomeric  $\alpha$ -acyloxycarboxamides with an excellent enantiomeric excess were presented.

The stereoselective synthesis by classical methods is generally very challenging, therefore an important issue of the presented studies was to check the influence of hydrolases on the stereochemical course of the reaction. In addition, for the first time, an efficient assay for the determination of enzyme promiscuity in the perhydrolysis reaction was developed. These studies have concluded with the development of an effective, fast and safe method for peracid formation.



### 3. Cel pracy

W Zespole XX Instytutu Chemii Organicznej PAN kierowanym przez prof. Ryszarda Ostaszewskiego od kilkunastu lat rozwijane są badania nad wykorzystaniem enzymów w syntezie organicznej oraz biochemii. Szczególnie ważnym aspektem prowadzonych badań jest zastosowanie enzymów do syntezy związków o wysokiej wartości dodanej, w tym enancjomerycznie czystych peptydomimetyków. Z punktu widzenia badań podstawowych kluczowe jest poznanie odpowiedzi na pytanie czy i w jaki sposób enzymy naturalnie eksponują oraz modyfikują swoją aktywność pod wpływem warunków, w jakich się znajdują. Podstawę klasyfikacja enzymów stanowi fakt, iż dany enzym katalizuje tylko jeden typ reakcji chemicznej. W przypadku hydrolaz jest to reakcja hydrolizy wiązań chemicznych przy udziale wody. Pomimo, iż enzymy są wysoce specyficzne to znane są przypadki ich aktywności w katalizie dodatkowych transformacji chemicznych, np. hydrolaz w katalizie reakcji tworzenia wiązania węgiel-węgiel czy węgiel-heteroatom. Zdolność enzymów do katalizowania nienaturalnych dla nich reakcji określana jest mianem promiskuityzmu. Fenomen ten jest interesujący nie tylko pod względem mechanizmu działania enzymów, ale przede wszystkim z uwagi na znaczenie praktyczne. **Dlatego celem moich badań było poszukiwanie i wykorzystanie nowych właściwości katalitycznych wybranych hydrolaz w syntezie organicznej.** Skupiłam się na zbadaniu zmiany aktywności katalitycznej hydrolaz spowodowanych zmianą struktury substratów i warunków prowadzenia reakcji jednoetapowych oraz kaskadowych. Za cele szczegółowe postawiłam sobie zdefiniowanie aktywności promiskuitycznej wykazywanej przez te enzymy w różnych typach przemian, tj.:

- a) reakcji tworzenia wiązania C-C w kaskadowej reakcji Knoevenagla,
- b) multikomponentowej reakcji Ugięgo prowadzącej do otrzymania peptydomimetyków,
- c) stereodywergentnej kaskadowej reakcji Passeriniego.

Ponadto, istotnym wyzwaniem było **określenie wpływu biokatalizatorów na stereochemiczny przebieg** prowadzonych reakcji. Dodatkowo postanowiłam **opracować szybki test szacujący ilościowy udział promiskuitycznej aktywności hydrolaz w reakcji perhydrolizy.**

Fenomen promiskuityzmu enzymów jest podstawą reakcji opisanych w niniejszej rozprawie, a w szczególności jako efektywna metoda syntezy wybranych związków o wysokiej wartości dodanej. Realizacja postawionych celów może umożliwić zastąpienie



zmudnych procedur wykorzystujących katalizatory chemiczne przez wydajne enzymy. Pozwala także ominąć problemy, które są częste w przypadku stosowania metod klasycznej syntezy takich jak niska stereoselektywność reakcji, wysoki udział produktów ubocznych czy bezpieczeństwo prowadzenia reakcji. Co więcej badania nad promiskuityzmem hydrolaz mogą pozwolić zrozumieć zdolności adaptacyjne organizmów żywych, co jest bezpośrednio związane z ewolucją życia na ziemi.

## 4. Wstęp literaturowy- wprowadzenie

Komórki organizmów są najbardziej wydajnymi „fabrykami chemicznymi”. W ich wnętrzu przebiega tysiące różnych reakcji katalizowanych przez enzymy. Zadziwiająca skuteczność z jaką żywe organizmy budują złożone struktury z prostych materiałów wyjściowych od wieków stanowi inspirację dla chemików. Wyjątkowe znaczenie spośród syntetycznych strategii wykorzystywanych przez naturę ma współdziałanie enzymów, które uczestnicząc w szlakach metabolicznych katalizują ogromną ilość reakcji chemicznych. Badania inspirowane metabolizmem komórkowym dostarczają nie tylko ciekawych spostrzeżeń, ale również mogą wzbogacić metody stosowane w syntezie organicznej. Pośród nich szczególne znaczenie ma wykorzystanie enzymów w katalizie chemicznej, które doskonale wpisują się w wymagania „zielonej chemii”. Ponadto, z punktu widzenia badań podstawowych kluczowe jest poznanie odpowiedzi na pytanie czy i w jaki sposób enzymy naturalnie eksponują oraz modyfikują swoją aktywność pod wpływem warunków w jakich się znajdują.

### 4.1. Hydrolazy w syntezie organicznej

#### 4.1.1. Lipazy- charakterystyka i mechanizm reakcji natywnej

Enzymy to naturalne katalizatory, które przyspieszają przebieg reakcji chemicznych. W zależności od reakcji jaką katalizują zostały one podzielone na sześć głównych klas: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy oraz ligazy. Na przykład lipazy (EC 3.1.1.3) należące do klasy hydrolaz, pod wpływem wody katalizują reakcję hydrolizy wiązania estrowego w estrach wyższych kwasów karboksylowych.<sup>1</sup> Lipazy występują w tkankach roślinnych, zwierzęcych i drobnoustrojach, gdzie ich fizjologiczną rolą jest udział w metabolizmie lipidów.<sup>2</sup> W biokatalizie spory obszar zajmują reakcje hydrolizy lub tworzenia wiązań estrowych, dlatego lipazy są jednymi z najczęściej stosowanych enzymów w syntezie organicznej. Lipazy charakteryzują się szeroką specyficznością substratową, co zwiększa atrakcyjność ich stosowania. Ponadto lipazy nie wymagają obecności kofaktorów, są łatwo dostępne oraz wysoce stabilne

---

<sup>1</sup> a.) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633.; b.) B. D. Ribeiro, A. M. de Castro, M. A. Z. Coelho, D. M. G. Freire, *Enzyme Research* **2011**, doi:10.4061/2011/615803.

<sup>2</sup> a.) P. Woolley, S. B. Petersen, *Lipases: their structure, biochemistry and application* **1994**, UK: Cambridge University Press.; b.) K. E. Jaeger, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 315–51.

w wielu rozpuszczalnikach organicznych.<sup>3</sup> Dodatkowo istotną zaletą wykorzystania lipaz w syntezie jest ich wysoka chemo-, regio- oraz stereoselektywność. Jest to spowodowane trójwymiarową strukturą enzymu, która wpływa na specyficzność oddziaływania substratu w centrum aktywnym. Miejsce to tworzy sekwencja aminokwasów, których łańcuchy boczne spełniają podwójną funkcję: selekcionują związki efektywnie uczestniczące w reakcji oraz wpływają na odpowiednie przestrzenne ułożenie substratu. Dzięki temu enzym wykazuje właściwość różnicowania analogicznych grup funkcyjnych w różnych miejscach tej samej cząsteczki.

Centrum aktywne lipaz tworzy tak zwana triada katalityczna, którą budują trzy główne aminokwasy: seryna (Ser) lub cysteina (Cys), histydyna (His) oraz kwas asparaginowy (Asp). Należy jednak zauważyć, iż enzym jest zbudowany z szeregu różnych aminokwasów, których grupy funkcyjne również mogą oddziaływać z substratem. Na przykład w strukturze białkowej lipazy z *Rhizopus oryzae* w pobliżu centrum aktywnego zlokalizowane są kwas asparaginowy (Asp), treonina (Thr) czy walina (Val), które tworzą tak zwaną lukę oksyanionową, stabilizującą oddziaływanie substratu z triadą katalityczną enzymu.<sup>4</sup> Miejsce aktywne zajmuje niewielką objętość całego enzymu i zlokalizowane jest w kieszeni lub szczelinie enzymu do którego prowadzi kanał, którego wielkość zależy od typu enzymu.

Mechanizm reakcji katalizowanych przez lipazy obejmuje deprotonowanie seryny zachodzącą pod wpływem sekwencyjnej polaryzacji wiązań wywołanej obecnością grupy karboksylowej kwasu asparaginowego, który oddziałuje z pierścieniem imidazolowym histydyny. Jeżeli w pobliżu centrum aktywnego znajdzie się odpowiedni substrat to następuje atak pary elektronowej atomu tlenu reszty serynowej na karbonylowy atom węgla substratu. Wówczas poprzez tetraedryczny stan przejściowy (TS) następuje wytworzenie produktu pośredniego, jakim jest acylowany enzym. W tym etapie następuje również wydzielenie cząsteczki alkoholu. Warto zauważyć, iż utworzony produkt pośredni jest dodatkowo stabilizowany przez łańcuchy boczne aminokwasów znajdujących się w luce oksyanionowej enzymu. W kolejnym etapie dochodzi do związania kolejnego substratu, którym w przypadku reakcji hydrolizy jest cząsteczka wody, w wyniku czego powstaje tetraedryczny stan przejściowy – kompleks enzym – produkt [EP], który ulegając

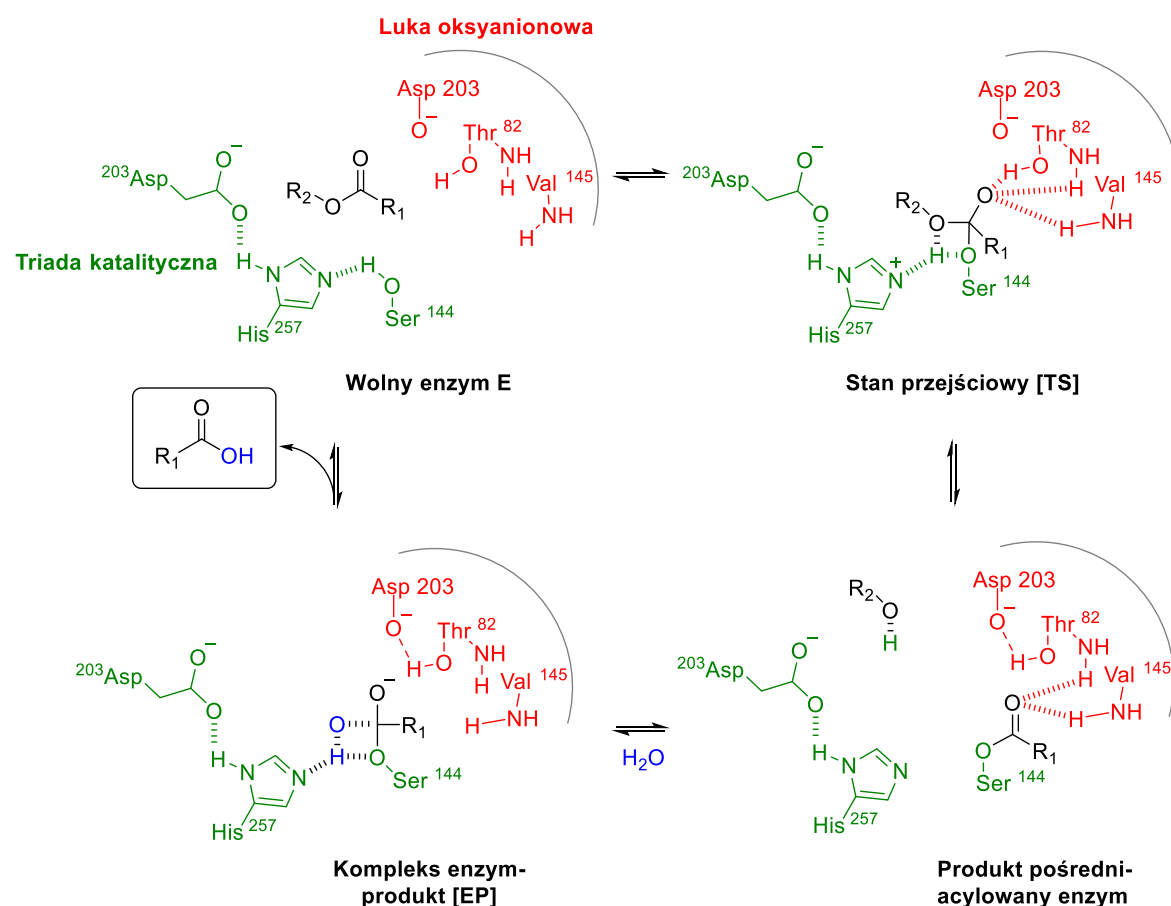
---

<sup>3</sup> a.) F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed, *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 235–51.; b.) A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721–54.

<sup>4</sup> R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1608.

rozpadowi uwalnia cząsteczkę kwasu karboksylowego oraz zregenerowany enzym (Schemat 1).

Ściśle określona struktura przestrzenna centrum aktywnego lipaz sprawia, iż mogą one katalizować reakcje w sposób stereoselektywny, nawet w przypadku zastosowania substratów, których centra stereogeniczne oddalone są od centrum reakcji szeregiem wiązań, co w przypadku klasycznej katalizy jest niezwykle trudne.

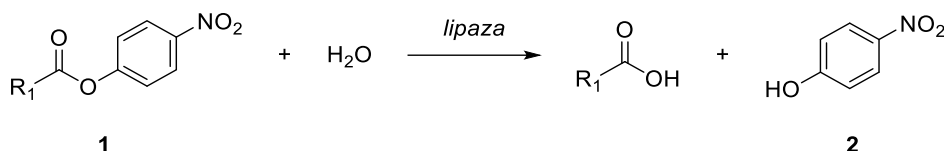


**Schemat 1.** Etapy reakcji hydrolizy katalizowanej przez lipazę na przykładzie lipazy z *Rhizopus oryzae*.

#### 4.1.2. Metody oznaczania aktywności hydrolaz

Czynniki zewnętrzne takie jak na przykład podwyższona temperatura, pH, czynniki redukujące oraz utleniające mogą wpływać na strukturę przestrzenną enzymu, prowadząc do zmiany ich aktywności katalitycznej. Dlatego szybkie, powtarzalne i czułe metody wykrywania i oznaczania aktywności enzymów hydrolitycznych są niezwykle cenne. Szczególnie użyteczne są metody spektrofotometryczne, ponieważ charakteryzują się

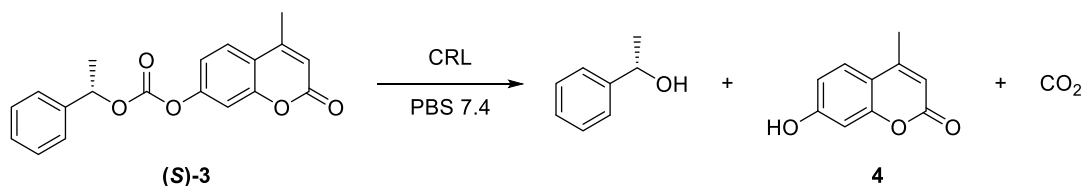
wysoką czułością oraz umożliwiają pomiar zarówno jakościowy jak i ilościowy. Ponadto metody te są proste w wykonaniu oraz tanie, co również wpływa na atrakcyjność ich wykorzystania w analizie. Często do oznaczania aktywności hydrolaz wykorzystuje się estry *p*-nitrofenolu i alifatycznych kwasów karboksylowych o wzorze **1** (Schemat 2).



**Schemat 2.** Spektrofotometryczny próbnik aktywności katalitycznej enzymów.

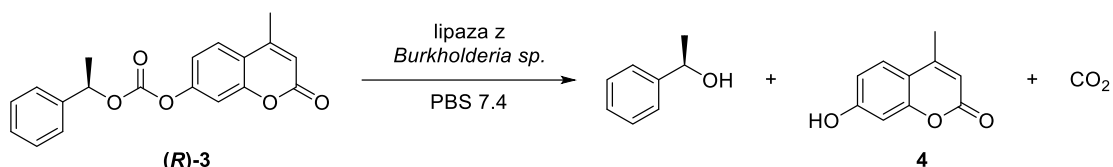
Reakcja hydrolizy estru *p*-nitrofenolu (**1**) w obecności lipazy przebiega zgodnie z mechanizmem przedstawionym na Schemacie 1. W wyniku reakcji następuje wytworzenie odpowiedniego kwasu karboksylowego oraz cząsteczki *p*-nitrofenolu (**2**), który w warunkach reakcji występuje w postaci anionu, a jego stężenie można oznaczyć przy pomocy spektrofotometrii *UV-Vis*.

Ponadto w pracach Zespołu XX udowodniono, iż odpowiednie zaprojektowanie próbника umożliwi określenie enancjopreferencji badanego enzymu. Chiralne węglany fluorogenne okazały się szczególnie przydatne do przewidywania stereoselektywności reakcji chemicznych. W tym celu zsyntetyzowano dwa oddzielne enancjomery substratu **3** oraz przeprowadzono pomiary szybkości jego hydrolizy. W wyniku reakcji przebiegającej w obecności enzymów hydrolitycznych następuje wydzielenie fluorescencyjnej pochodnej kumaryny (**4**), której stężenie oznaczano przy pomocy pomiaru intensywności fluorescencji. Udowodniono, iż między innymi lipaza z *Candida rugosa* (CRL) faworyzuje hydrolizę enancjomeru (**S**)-**3** (Schemat 3A), podczas gdy lipaza z *Burkholderia sp.* wykazuje preferencję w kierunku enancjomeru (**R**)-**3** (Schemat 3B).<sup>5</sup>



**Schemat 3A.** Fluorogeny próbnik (**S**)-**3** stereopreferencji enzymów.

<sup>5</sup> A. Żądło, D. Koszelewski, F. Borys, R. Ostaszewski, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 677 – 682.

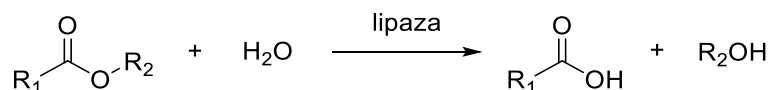


**Schemat 3B.** Fluorogeny próbnik **(R)-3** stereopreferencji enzymów.

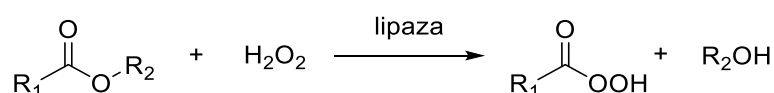
### 4.1.3. Reakcje katalizowane przez lipazy

Podstawę klasyfikacji enzymów stanowi założenie, że dany enzym katalizuje tylko jeden typ reakcji, co wynika z funkcji jaką pełni w komórce. Podstawową grupą na którą ukierunkowana jest aktywność hydrolaz jest wiązanie estrowe (RCOOR'). Natomiast z uwagi na charakter wiązań reakcje hydrolizy układu RCOOR' katalizowane przez lipazy mogą przebiegać jako:

- **hydroliza:** przebiega w obecności wody, gdy substratem jest ester lub węglan;

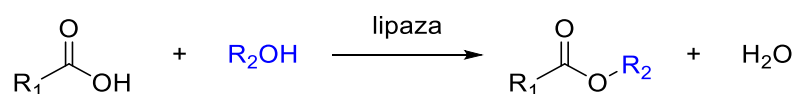


- **perhydroliza:** przebiega w obecności nadtlenu wodoru, gdy substratem jest ester; reakcja ta ma ogromne znaczenie w przemyśle oraz medycynie, jako metoda wytwarzania nadkwasów;

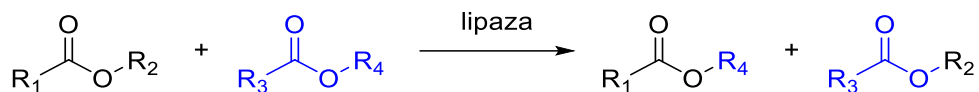


Ponadto lipazy mogą katalizować również reakcje odwrotne, które ze względu na typ tworzonego wiązania można podzielić na:

- **estryfikację:** przebiega pomiędzy kwasem karboksylowym lub bezwodnikiem i alkoholem;

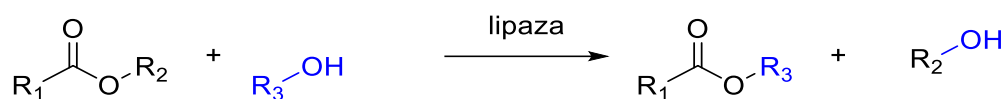


- **transestryfikację:** przebiega pomiędzy substratami zawierającymi grupy estrowe (ester lub węglan);

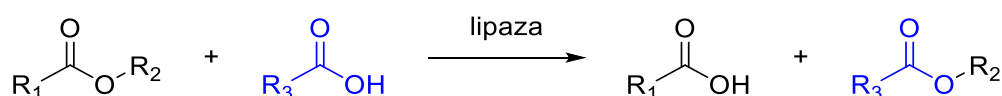


Wśród reakcji transestryfikacji można wyróżnić również:

- **alkoholizę:** która przebiega pomiędzy estrem lub węglanem oraz alkoholem;



- **acydolizę:** przebiega pomiędzy estrem lub węglanem oraz kwasem karboksylowym lub bezwodnikiem;



Chociaż enzymy charakteryzuje wysoka specyficzność to znane są przykłady zastosowania lipaz w katalizie związków otrzymanych przez człowieka. Ponadto nie wszystkie aminokwasy znajdujące się w miejscu aktywnym muszą uczestniczyć w transformacji chemicznej, co wpływa i modyfikuje zdolność katalityczną hydrolaz. Lipazy są aktywne również w reakcji hydrolizy amidów, mimo iż jest to natywna reakcja dla proteaz.<sup>6</sup> Lipazy znalazły zastosowanie w szeregu innych, „nienaturalnych” reakcji, takich jak na przykład tworzenie wiązania węgiel-węgiel czy węgiel-heteroatom. Ta wszechstronność sprawia, że lipazy są enzymami o wysokim potencjale zastosowań w przemyśle spożywczym, detergentowym, farmaceutycznym, skórzanym, tekstylnym, kosmetycznym i papierniczym.<sup>7</sup>

<sup>6</sup> a.) A. Liljelblad, P. Kallio, M. Vainio, J. Niemi, L. T. Kanerva, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *21*, 886-895; b.) E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotrans.* **1997**, *16*, 181-204; c.) C. López-Otín, J. S. Bond, *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283*, 30433-30437; d.) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6032-6040.

<sup>7</sup> A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, *Applied biochemistry and biotechnology* **2004**, *118*, 155-170.

## 4.2. Promiskuityzm enzymów

Mimo, że enzymy cechuje wysoka specyficzność substratowa i katalityczna to wiele z nich katalizuje inne, dodatkowe reakcje. Podobną właściwość zaobserwowano również u niektórych przeciwciał czy białek strukturalnych.<sup>8</sup> Co ciekawe katalizator rutenowy typu Grubbsa również wykazuje taką wielozadaniową aktywność: katalizuje reakcję transwinylowania kwasów karboksylowych bez utraty swojej pierwotnej aktywności w reakcji metatezy.<sup>9</sup> Cecha ta została zdefiniowana jako promiskuityzm, czyli zdolność do katalizowania nietypowych transformacji, które różnią się od naturalnych dla danego katalizatora.<sup>10</sup>

Rozbieżność enzymatyczna prawdopodobnie odegrała kluczową rolę w przystosowywaniu organizmów do zmieniających się warunków zewnętrznych. Próba powiązania ewolucji białek z promiskuityzmem enzymów została poczyniona w 1976 roku przez Jensena, który wysnuł hipotezę, iż stosunkowo niewiele podstawowych enzymów działało na wiele substratów, zapewniając szerszy zakres zdolności katalitycznych. Ponadto dywergencja wyspecjalizowanych enzymów, poprzez duplikację, mutację i selekcję, doprowadziła do obecnej różnorodności enzymów.<sup>11</sup>

Promiskuityczne właściwości enzymów mogą wyrażać się na kilka sposobów poprzez zmianę:

- a) aktywności w odmiennych warunkach reakcji (promiskuityzm środowiskowy),
- b) zakresu tolerancji substratów (promiskuityzm substratowy),
- c) zdolności katalitycznych (promiskuityzm katalityczny).

Klasyfikacja ta często nie jest prosta, ponieważ różne rodzaje promiskuityzmu enzymów można łączyć. Zmiana substratu reakcji może wpłynąć na zupełnie nowe właściwości katalityczne, a poprzez optymalizację warunków prowadzenia procesów modyfikowana jest także aktywność środowiskowa. Poszczególne aktywności enzymów mogą współistnieć ujawniając zupełnie nowe możliwości syntetyczne. Dlatego poszukiwanie nieznanymi właściwościami enzymów daje szansę poszerzenia kanonu reakcji katalizowanych przez lipazy.

---

<sup>8</sup> a.) K. S. Dalal, Y. A. Tayade, Y. B. Wagh, D. R. Trivedi, D. S. Dalal, B. L. Chaudhari, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 14868-14879; b.) S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1986**, *234*, 1570-1573.

<sup>9</sup> A. Brodzka, D. Koszelewski, R. Ostaszewski, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 15305-15313.

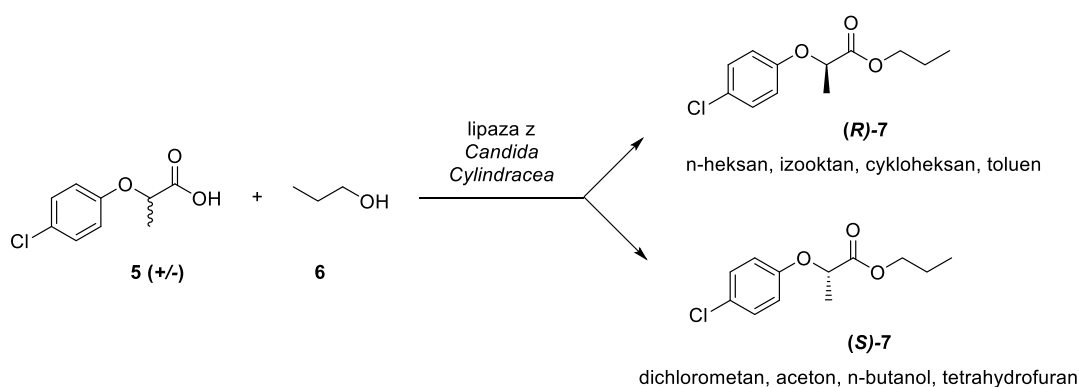
<sup>10</sup> K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238.

<sup>11</sup> R. A. Jensen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409-25.



### 4.2.1. Promiskuityzm środowiskowy

Promiskuityzm środowiskowy (warunkowy) przejawia się w zachowaniu lub zwiększeniu aktywności enzymów *ex vivo* w warunkach reakcji, takich jak na przykład środowisko bezwodne, podwyższona temperatura czy ciśnienie. Historia wykorzystania promiskuitycznej aktywności enzymów w warunkach odbiegających od natywnych została zauważona już w 1913 roku przez Bourquelota i Bridela, którzy zastosowali hydrolazy do efektywnej syntezy glikozydów w bezwodnym alkoholu.<sup>12</sup> Kolejno pojawiło się wiele prac udowadniających wysoką aktywność enzymów w warunkach bezwodnych.<sup>13</sup> Ponadto wykazano, iż zmiana środowiska prowadzenia reakcji może wpłynąć na zmianę stereopreferencji stosowanego biokatalizatora. Reakcja estryfikacji racemicznego kwasu 2-(4-chlorofenylopropionowego) (**5**) z *n*-butanolem (**6**) prowadzi do otrzymania dwóch enancjomerycznych produktów (**R**)-**7** lub (**S**)-**7**, w zależności od zastosowanego medium reakcyjnego. (Schemat 4).



**Schemat 4.** Kierunkowa selektywność enzymu poprzez zmianę medium reakcyjnego jako przykład promiskuitycznej aktywności enzymu.

Reakcja w m.in. *n*-heksanie, izooktanie czy toluenie prowadzi do otrzymania produktu o konfiguracji (**R**)-, podczas gdy dichlorometan czy aceton umożliwia otrzymanie enancjomeru (**S**)-2-(4-chlorofenyl)-propionianu propylu.<sup>14</sup>

### 4.2.2. Promiskuityzm substratowy

<sup>12</sup> M. Kapoor, M. N. Gupta, *Process Biochemistry* **2012**, *47*, 555-569.

<sup>13</sup> M. N. Gupta MN, *Methods in non-aqueous enzymology*, Springer Science & Business Media, **2000**, Basel: Birkhauser Verlag.

<sup>14</sup> S. H. Wu, F. Y. Chu, K. T. Wang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1991**, *1*, 339-342.

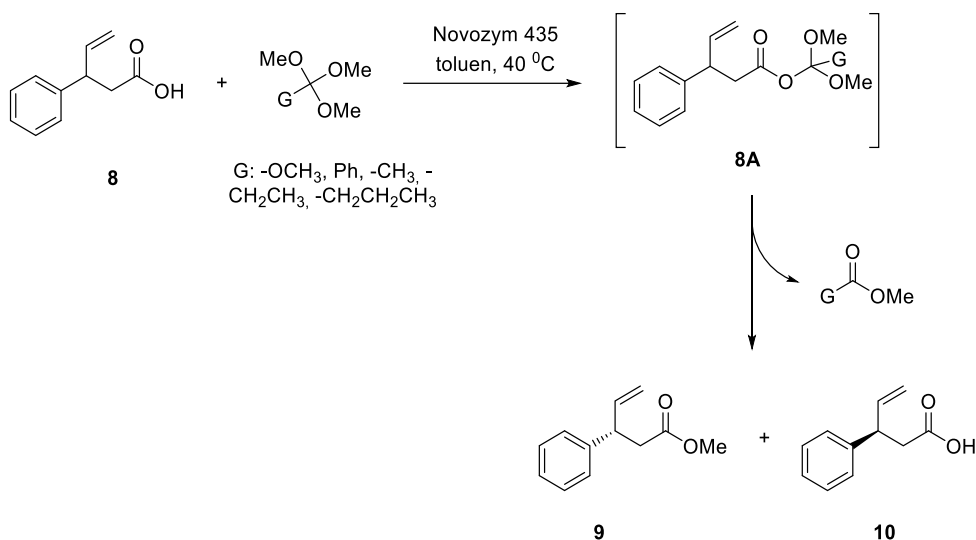
Promiskuityzm substratowy enzymów wyraża się poprzez zachowanie lub zwiększenie ich aktywności w katalizie tego samego typu transformacji dla różnych substratów, najczęściej zawierających analogiczne grupy funkcyjne. Choć specyficzność substratowa hydrolaz jest dobrze rozpoznana<sup>15</sup> to lipazy akceptują szeroki zakres substratów w reakcji hydrolizy estrów kwasów karboksylowych alkoholi alifatycznych. Ponadto reakjom katalizowanym przez lipazy mogą podlegać również acykliczne, bicykliczne czy aromatyczne estry. Dlatego enzymy te znalazły zastosowanie przy rozdziale kinetycznym racemicznych kwasów i alkoholi. Enzymatyczny rozdział kinetyczny mieszany racemicznej (EKR) to proces, w którym enzym z różnymi szybkościami katalizuje przekształcenie enancjomerów (*R*) lub (*S*) substratu w odpowiedni produkt. Najbardziej popularnymi substratami w reakcjach enzymatycznego rozdziału kinetycznego są alkohole drugorzędowe. Jest to spowodowane faktem, iż lipazy wykazują wysoką selektywność w reakcjach alkoholi II-rzędowych w porównaniu do innych oraz z uwagi na ogromne znaczenie alkoholi II-rzędowych w syntezie organicznej. W badaniach zrealizowanych w Zespole XX udowodniono, iż lipazy wykazują nowy rodzaj promiskuityzmu w reakcjach estryfikacji kwasów karboksylowych.<sup>16</sup> Powszechnie wiadomo, że długość łańcucha alkoholu używanego do estryfikacji wpływa na wydajność oraz enancjoselektywność bezpośredniej estryfikacji kwasu karboksylowego.<sup>17</sup> Ponadto, istotnym wymaganie jest to by reakcja estryfikacji przebiegała w sposób nieodwracalny. Dlatego zastosowanie odpowiedniego donora grupy alkoksylowej między innymi ortoestrów trialkilowych oraz acetalu umożliwiło efektywne otrzymanie tylko jednego enancjomeru odpowiedniego estru, pozostawiając enancjomerycznie czysty kwas 3-fenyl-4-pentenowy (**10**) (Schemat 5).

---

<sup>15</sup> a.) R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 763–81; b.) R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *62*, 197–212.

<sup>16</sup> A. Brodzka, D. Koszelewski, M. Zysk, R. Ostaszewski, *Catalysis Communications* **2018**, *106*, 82-86.

<sup>17</sup> U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, **1999**, Wiley-VCH, Weinheim.



**Schemat 5.** Rozdział kinetyczny chiralnego kwasu jako przykład promiskuityzmu substratowego lipaz.

Badania nad mechanizmem enzymatycznej estryfikacji wyjaśniły rolę donora grupy alkoksylowej w prezentowanej reakcji. Reakcja ortoestru z kwasem karboksylowym **8** katalizowana przez Novozym 435 przebiega z wytworzeniem produktu pośredniego **8A**, który jest wysoce niestabilny i ulega natychmiastowemu przekształceniu do odpowiedniego estru **9**. Prezentowana metoda jest unikalnym przykładem promiskuityzmu hydrolaz wykazywanego w reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych.

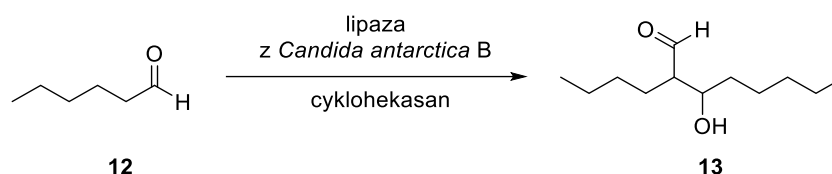
### 4.2.3. Promiskuityzm katalityczny

Promiskuityzm katalityczny odnosi się do zdolności lipaz do katalizowania różnych typów reakcji chemicznych, bez utraty swojej natywnej funkcji. Te transformacje chemiczne mogą różnić się pod względem zaangażowanych reszt łańcuchów bocznych aminokwasów zlokalizowanych w centrum aktywnym (lub jego pobliżu), co może wpłynąć na przebieg danej reakcji chemicznej. Promiskuityzm enzymów ujawnia się poprzez różny sposób tworzenia lub rozszczepiania wiązań chemicznych.<sup>18</sup> Jednym z wyzwań w obecnym projektowaniu i modyfikowaniu aktywności biokatalizatorów jest zmiana niskiej aktywności katalitycznej wykazywanej przez dany enzym w jego główną funkcję lub wykorzystanie części istniejącej funkcji i przekierowaniu ścieżki reakcji w kierunku tworzenia nowych produktów. Hydrolazy są enzymami które są najczęściej wykorzystywane w badaniach nad promiskuityzmem enzymów.<sup>19</sup>

<sup>18</sup> R. J. Kazlauskas, *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, 195–201.

<sup>19</sup> B. P. Dwivedee, S. Soni, M. Sharma, J. Bhaumik, J. K. Laha, U. C. Banerjee, *ChemistrySelect* **2018**, 3, 2441-2466.

Tworzenie wiązania węgiel-węgiel jest jedną z ważniejszych reakcji w chemii organicznej, a w szczególności w syntezie złożonych cząsteczek. Chociaż w literaturze znane są przykłady zastosowań aldolaz w katalizie reakcji tworzenia wiązania C-C, to lipazy również mogą być wykorzystane w reakcjach tego typu. Berglund w 2003 roku wykazał promiskuityczną aktywność lipazy z *Candida antarctica* B w reakcji aldolowej<sup>20</sup> prowadzącą do otrzymania związku **13** (Schemat 6).



**Schemat 6.** Zastosowanie enzymów hydrolitycznych w reakcji tworzenia wiązania węgiel-węgiel.

Ponadto podobną aktywność lipaz zaobserwowano w innych reakcjach na przykład addycji Michaela<sup>21</sup>, Markownikowa<sup>22</sup> czy reakcji Knoevenagla.

Reakcja Knoevenagla przebiega pomiędzy związkiem karbonylowym i aktywnym związkiem metylenowym np. estrem kwasu malonowego w obecności zasady lub kwasu Lewisa. Z uwagi na znaczenie syntetyczne opracowano wiele różnych systemów katalitycznych umożliwiających efektywne otrzymywanie  $\alpha,\beta$ -nienasyconych produktów reakcji Knoevenagla. Między innymi wykorzystanie promiskuitycznych właściwości hydrolaz umożliwia otrzymanie odpowiednich produktów z dobrą wydajnością oraz wysoką proporcją izomerów *E/Z*. Jednym z takich przykładów jest reakcja pomiędzy aldehydem octowym oraz acetylooctanem w *tert*-butanolu prowadząc do otrzymania  $\beta$ -ketoestrów z wydajnością do 33% oraz stosunkiem izomerów (*E/Z*) 4.3:1.<sup>23</sup> Co więcej zauważono, że wydajność reakcji można zwiększyć stosując system tandemowy. Układ ten wykorzystuje octan winylu (**14**) jako prekursor niskowrzącego aldehydu octowego. W pierwszym etapie octan winylu ulega enzymatycznej reakcji hydrolizy, w wyniku której powstaje aldehyd octowy biorący udział w reakcji. W wyniku reakcji hydrolizy i następczej

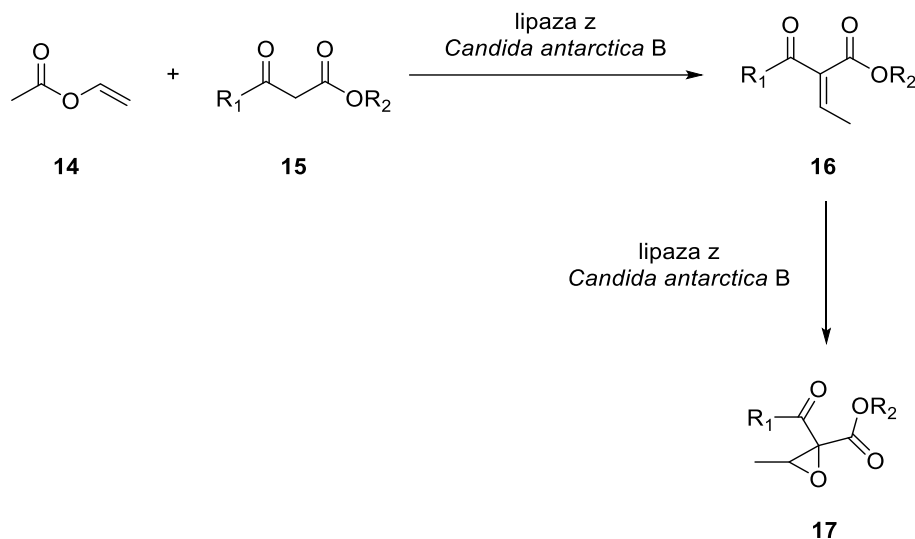
<sup>20</sup> C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875.

<sup>21</sup> a.) O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725; b.) J. M. Xu, F. Zhang, Q. Wu, Q. Y. Zhang, X. F. Lin, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2007**, *49*, 50-54; c.) E. M. Rustoy, Y. Sato, H. Nonami, R. Erra-Balsells, A. Baldessari, *Polymer* **2007**, *48*, 1517-1525.

<sup>22</sup> W.-B. Wu, N. Wang, J.-M. Xu, Q. Wu, X.-F. Lin, *Chem. Commun.* **2005**, 2348-2350.

<sup>23</sup> D. Koszelewski, R. Ostaszewski, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 10156-10164.

kondensacji Knoevenagla otrzymano  $\beta$ -ketoester **16** z wydajnością do 72%.<sup>24</sup> Ponadto otrzymany produkt reakcji Knoevenagla został poddany enzymatycznej funkcjonalizacji prowadzącej do odpowiedniego epoksydu oznaczonego symbolem **17** (Schemat 17).



**Schemat 7.** Promiskuityzm katalityczny lipazy z *Candida antarctica* B wykorzystany w tandemowej reakcji hydrolizy / Knoevenagla / epoksydowania.

Istotnym jest fakt, że trzy reakcje przebiegały w jednym naczyniu oraz katalizowane były przez ten sam enzym. Otrzymane wyniki prezentują połączenie kilku promiskuitycznych aktywności enzymu działającego w systemie tandemowym.

### 4.3. Reakcje kaskadowe

Wyjątkowe znaczenie spośród syntetycznych strategii wykorzystywanych przez naturę ma zastosowanie enzymów działających sekwencyjnie. Powstały na drodze jednej reakcji produkt stanowi substrat do kolejnej. Wspólne, kaskadowe działanie enzymów pozwala organizmom żywym budować bardzo złożone struktury. Biokatalizatory połączone w bardzo wyrafinowane sieci metaboliczne są zdolne do budowy złożonych struktur z prostych materiałów wyjściowych. Stanowi to inspirację dla chemików, którzy przenieśli znakomitą skuteczność syntetyczną wykazywaną przez enzymy do laboratorium. Tradycyjna metoda syntezy związków organicznych polega na stopniowym tworzeniu poszczególnych wiązań, w kierunku budowy docelowej cząsteczki. Jednakże, bardziej

<sup>24</sup> D. Koszelewski, D. Paprocki, A. Madej, F. Borys, A. Brodzka, R. Ostaszewski, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 4572–4579.

wydajna byłaby możliwość przeprowadzenia kilku transformacji bez konieczności izolacji produktów pośrednich. Taką możliwość dają reakcje przebiegające kaskadowo.

Faber w swojej pracy przeglądowej<sup>25</sup> używa terminu kaskada wymiennie z reakcjami typu domino. Procesy te są zdefiniowane jako reakcje, w których substrat ulega transformacjom w dwóch lub więcej reakcjach następujących w sposób nierozdzielny jedna po drugiej. Sugeruje, iż powstały produkt pośredni jest wysoce reaktywny i od razu ulega kolejnej przemianie. W konsekwencji procesy te są silnie od siebie zależne i raczej trudne do poprowadzenia w sposób rozbieżny. Dla kontrastu reakcje przebiegające kolejno po sobie, gdzie każdy z etapów może być poprowadzony osobno definiowane są jako reakcje tandemowe.

Chociaż w literaturze bardzo często spotykamy się z wymiennym stosowaniem tych terminów to procesy te zawsze są opisywane jako kilka reakcji następujących w określonej kolejności. Bardzo ważną cechą jest fakt, iż wszystkie reagenty dodawane są jednocześnie, a związek docelowy otrzymujemy bez izolacji produktów pośrednich. Reakcje kaskadowe inicjowane przez hydrolazy mogą przebiegać w układach chemoenzymatycznych, multienzymatycznych lub też spontanicznych.

#### **4.4. Enzymatyczne reakcje multikomponentowe**

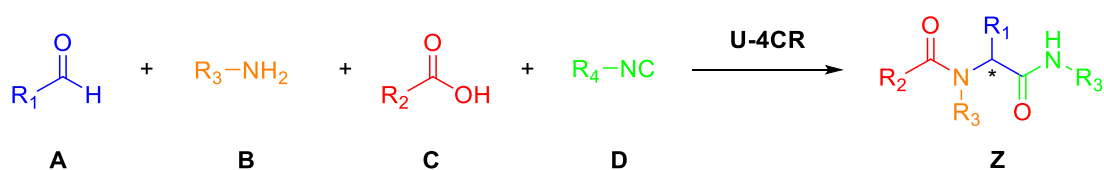
Peptydy są cząsteczkami zbudowanymi z aminokwasów połączonych wiązaniem peptydowym. Wchodzą w skład organizmów i mogą spełniać w nim rolę neurotransmiterów, hormonów czy też inhibitorów aktywności enzymów. Poza tym, pełnią funkcję regulacyjną szeregu funkcji życiowych oraz uczestniczą w metabolizmie komórki. Obecnie dużą uwagę poświęca się opracowaniu syntezy peptydomimetyków, czyli struktur naśladujących naturalne peptydy, szczególnie pod względem ich zastosowania terapeutycznego. Stosowane metody powinny umożliwić otrzymanie produktów o ściśle zdefiniowanej konfiguracji absolutnej, ponieważ aktywność wielu związków jest powiązana z ich budową przestrzenną. Wśród znanych metod szczególne znaczenie syntetyczne mają reakcje multikomponentowe (MCR), a w szczególności trójkomponentowa reakcja Passeriniego (P-3CR) oraz czterekomponentowa reakcja Ugiiego (U-4CR).

---

<sup>25</sup> S. F. Mayer, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 332-339.

### 4.4.1. Reakcja Ugiego i jej enzymatyczny wariant

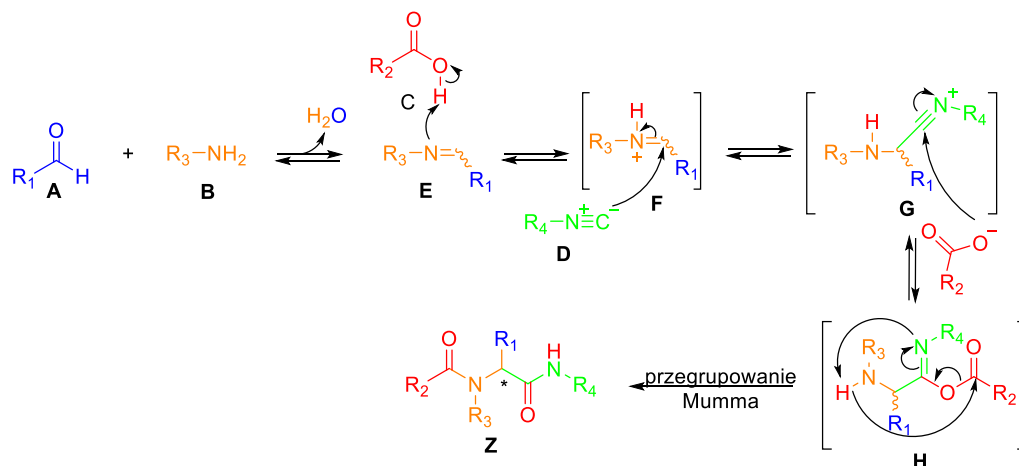
Multikomponentowa reakcja Ugiego jest jedną z reakcji opartych na chemii izocyjanków, która została opisana w 1958 roku przez Ivara Ugiego. W swojej klasycznej wersji przebiega pomiędzy związkiem karbonylowym **A** (aldehydem lub ketonem), kwasem karboksylowym **C**, aminą **B** oraz izocyjankiem **D**, prowadząc do produktu o strukturze peptydu z dwoma ugrupowaniami amidowymi **Z** (Schemat 8).



Schemat 8. Reakcja Ugiego (U-4CR).

Reakcje Ugiego prowadzone są najczęściej w rozpuszczalnikach protycznych, takich jak na przykład metanol czy etanol. Zaletą reakcji Ugiego jest jej doskonała wydajność atomowa, bowiem wszystkie atomy zawarte w substratach biorących udział w reakcji są wbudowane w utworzony produkt.

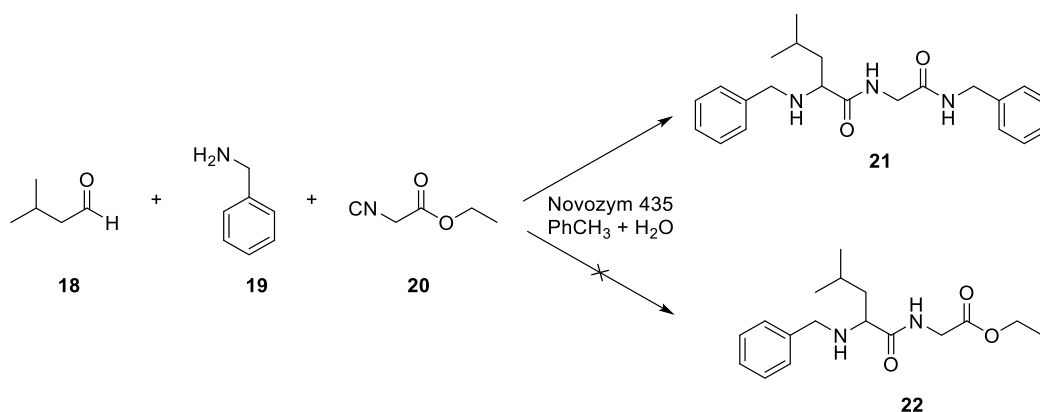
Postulowany mechanizm reakcji obejmuje wytworzenie iminy jako wynik reakcji pomiędzy aldehydem **A** oraz aminą **B**. Reakcja przebiega z wydzieleniem cząsteczki wody. Następnie dochodzi do aktywowania wytworzonej iminy **E** poprzez protonowanie atomu azotu i zwiększenie elektrofilowości podwójnego wiązania węgiel-azot. Podobną aktywację można uzyskać przez dodatek kwasów Lewisa na przykład TiCl<sub>4</sub> czy BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>. Kolejno następuje nukleofilowy atak izocyjanku **D** na elektrofilowy węgiel aktywowanej iminy **F** w efekcie czego dochodzi do wytworzenia produktu pośredniego **G**.



Schemat 9. Mechanizm reakcji Ugiego (U-4CR).

W ostatnim etapie następuje nieodwracalne przegrupowanie Mumma z przeniesieniem grupy acylowej z atomu tlenu na atom azotu, prowadzące do wytworzenia produktu reakcji Ugiego **Z**. Mechanizm sugeruje odpowiednią kolejność dodawania reagentów do mieszaniny, co pomaga uniknąć tworzenia produktów ubocznych reakcji. Jednym z procesów, które mogą zachodzić w mieszaninie reakcyjnej jest trójkomponentowa reakcja Passeriniego, przebiegająca pomiędzy aldehydem lub ketonem, kwasem karboksylowym oraz izocyjankiem. Warto zauważyć, iż w wyniku reakcji Ugiego dochodzi do powstania nowego centrum stereogenicznego na atomie węgla, który pochodzi od grupy karbonylowej aldehydu (lub ketonu). Jeśli jednak w mieszaninie nie znajdzie się żaden czynnik stereoróżnicujący, produkt **Z** powstaje jako równomolowa mieszanina enancjomerów *R* oraz *S*, co jest bezpośrednim następstwem drugiego etapu postulowanego mechanizmu. Atak nukleofilowy izocyjanku **D** na aktywnowaną iminę **F** może przebiegać zarówno od strony *Si* oraz *Re* prowadząc do dwóch produktów reakcji.

Chociaż w klasycznej wersji reakcji Ugiego udział biorą cztery komponenty, to znane są jej warianty trójkomponentowe, w których zastosowano kwasy Lewisa lub Brønsteda jako katalizatory.<sup>26</sup> Ponadto, nasza grupa zaprezentowała pierwszy przykład wykorzystania hydrolaz w trójkomponentowej reakcji Ugiego.<sup>27</sup> Reakcja przebiega pomiędzy benzylaminą (**19**), aldehydem izowalerianowym (**18**) oraz izocyjanooctanem etylu (**20**) i umożliwia otrzymanie odpowiedniego dipeptydu **21** z wydajnością 75% (Schemat 10). Reakcje poprowadzono w toluenie z 0.5% (*v/v*) dodatkiem wody. Eksperyment prowadzony bez enzymu dowiódł, iż jest on niezbędny i najważniejszy w reakcji. Co ciekawe, w mieszaninie reakcyjnej nie obserwowano tworzenia produktu **22**.



**Schemat 10.** Katalizowana enzymatycznie trójkomponentowa reakcja Ugiego (U-3CR).

<sup>26</sup> a.) S. C. Pan, B. List, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3622–3625; b.) B. Saha, B. Frett, Y. Wang, H.-Y. Li, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2340–2343; c.) A. Kumar, D. Saxena, M. K. Gupta, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 4610–4612; d.) S. C. Pan, B. List, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3678–3681.

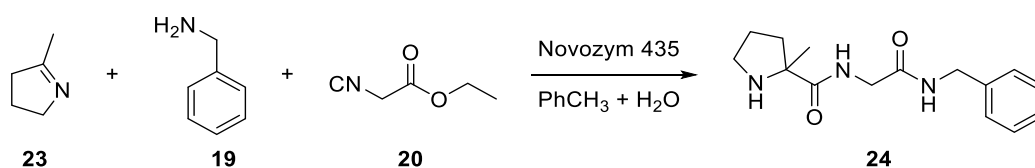
<sup>27</sup> S. Kłossowski, B. Wiraszka, S. Berłożcki, R. Ostaszewski, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 566–569.



Zaproponowano mechanizm, w którym etapem decydującym jest wytworzenie acylowanego enzymu przez grupę alkoksylową obecną w izocyjanku zgodnie z klasycznym mechanizmem reakcji katalizowanych przez lipazy (Schemat 2). Następnie imina powstała w wyniku reakcji aldehydu z aminą, zostaje zaktywowana przez reszty łańcuchów bocznych aminokwasów znajdujących się w centrum aktywnym lipazy. Kolejne etapy przebiegają analogicznie do mechanizmu klasycznej reakcji Ugiego (Schemat 9). Etap odtworzenia enzymu zachodzi na skutek reakcji amidolizy, w wyniku której uwolniony zostaje dipeptyd.

Ponieważ jednym z etapów mechanizmu reakcji Ugiego jest wytworzenie iminy, w kolejnych badaniach nad zastosowaniem enzymów w reakcjach multikomponentowych zastosowano 2-metylo-pirolinę (**23**). W obecności Novozymu 435 w warunkach uprzednio zoptymalizowanych otrzymano produkt **24** z wydajnością 44% (Schemat 11).<sup>28</sup>

W tym przypadku również zbadano prawdopodobny mechanizm procesu, w którym etapem decydującym jest tworzenie acylowanego enzymu.



**Schemat 11.** Katalizowana enzymatycznie trójkomponentowa reakcja Ugiego (U-3CR) w wariacie z iminą.

Warto zauważyć, iż reakcja zachodzi w centrum aktywnym enzymu, który ma ograniczoną objętość. Kwestią otwartą pozostaje pytanie czy i w jaki sposób objętość centrum aktywnego enzymu wpływa na przebieg enzymatycznej reakcji Ugiego.

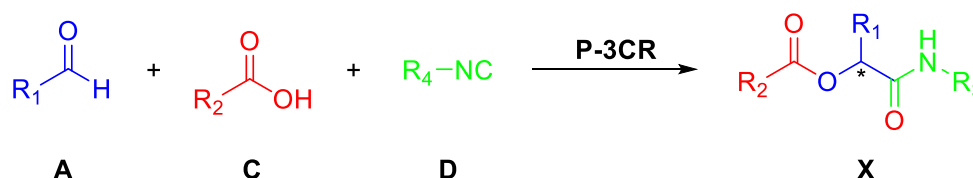
#### 4.4.2. Reakcja Passerinięgo

Kolejnym przykładem reakcji multikomponentowej opartej na chemii izocyjanków jest opisana już w 1921 roku reakcja Passerinięgo<sup>29</sup>. Reakcja ta przebiega pomiędzy kwasem karboksylowym **C**, związkiem karbonylowym (aldehydem lub ketonem) **A** oraz izocyjankiem **D** (Schemat 12). Przebiega najlepiej w rozpuszczalnikach aprotycznych, takich jak dichlorometan, ale znane są przykłady prowadzenia reakcji bez

<sup>28</sup> A. Żądło-Dobrowolska, S. Kłossowski, D. Koszelewski, D. Paprocki, R. Ostaszewski, *Chem. Eur.J.* **2016**, *22*, 16684–16689.

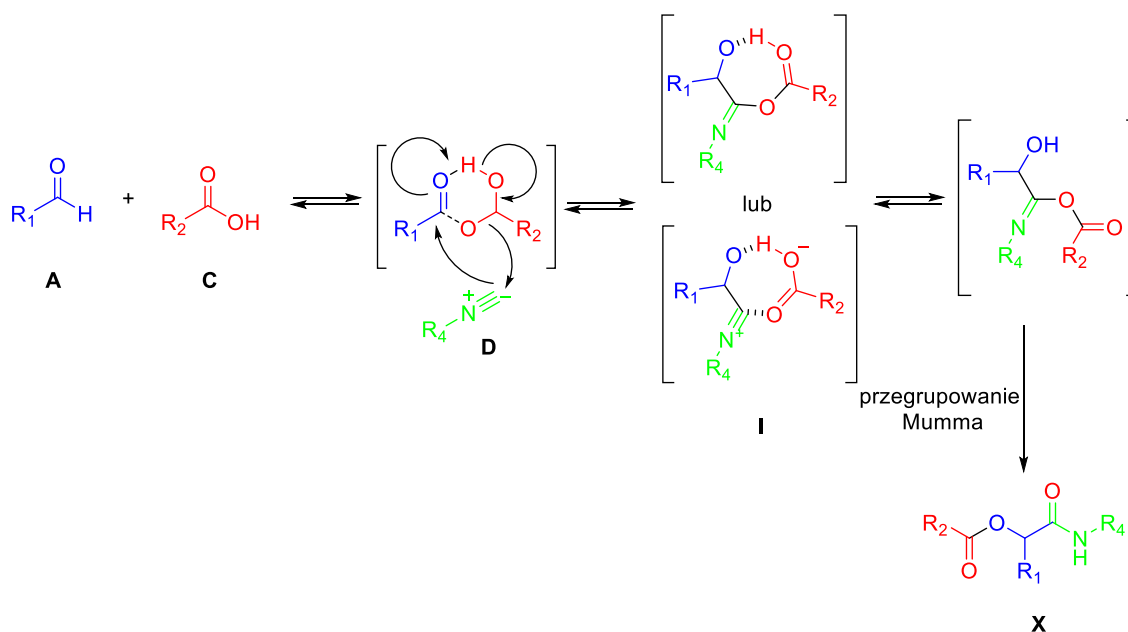
<sup>29</sup> M. Passerini, *Gazz. Chim. Ital.* **1924**, *54*, 126–129.

rozpuszczalnika.<sup>30</sup> Produktem reakcji jest odpowiedni  $\alpha$ -acyloksamid. Zaletą tej reakcji jest tak jak w przypadku reakcji Ugiego wysoka ekonomia atomowa oraz niski udział produktów ubocznych. Reakcja jest interesująca nie tylko ze względu na potencjalne znaczenie biologiczne otrzymanych produktów, ale również z punktu widzenia chemii kombinatoryjnej.



Schemat 12. Reakcja Passeriniego (P-3CR).

Reakcję Passeriniego przeprowadza się w jednym naczyniu, a kolejność dodawania substratów warunkowana jest mechanizmem reakcji<sup>31</sup> (Schemat 13). W pierwszym etapie następuje wytworzenie adduktu I, jako wynik reakcji pomiędzy kwasem karboksylowym oraz aldehydem (lub ketonem).



Schemat 13. Mechanizm reakcji Passeriniego (P-3CR).

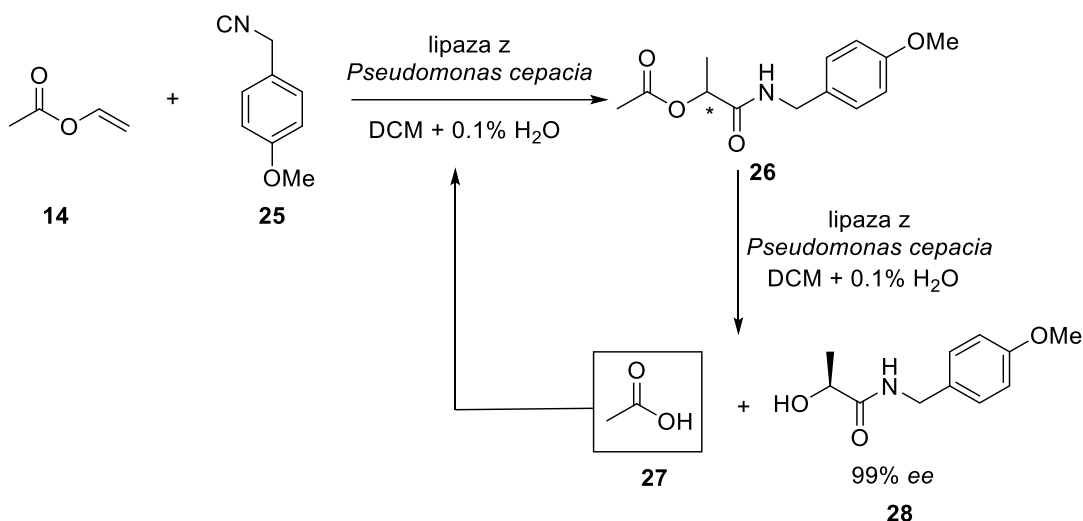
<sup>30</sup> D. Koszelewski, W. Szymanski, J. Krysiak, R. Ostaszewski, *Synthetic Communications* **2008**, 38, 1120–1127.

<sup>31</sup> a.) I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, 1, 8-21; b.) L. Banfi, R. Riva, *Org. React.* **2005**, 65, 1–140.

Kolejno do atomu węgla grupy karbonylowej wytworzonego adduktu **I** następuje addycja nukleofilowego atomu węgla pochodząca od izocyjanku **D** oraz przyłączenie anionu kwasu karboksylowego **C**. Ostatnim etapem jest transfer grupy acylowej, czyli przegrupowanie Mumma, który prowadzi do wytworzenia produktu końcowego. Jest to etap nieodwracalny, co stanowi siłę napędową całego procesu.

Warto zauważyć, iż w reakcji Passeriniego następuje wytworzenie centrum stereogenicznego. Jednak otrzymanie enancjomerycznie czystych  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów jest bardzo wymagające. Liczba znanych przykładów stereoselektywnych wariantów reakcji Passeriniego jest dość ograniczona. Większość metod wykorzystuje chiralne, nieracemiczne substraty, co prowadzi do otrzymania mieszaniny diastereoizomerów, które następnie poddawane są rozdzielaniu.<sup>32</sup> Z uwagi na znaczące powiązanie czystości optycznej z aktywnością biologiczną otrzymanych peptydomimetyków, niezbędne jest opracowanie asymetrycznej wersji reakcji Passeriniego.

Poza opisaną klasyczną wersją trójkomponentowej reakcji Passeriniego w literaturze znane są warianty przebiegu tej reakcji z wykorzystaniem katalitycznych ilości kwasów Brønsteda lub Lewisa. Ponadto ciekawym wariantem reakcji Passeriniego jest opracowana w naszym zespole kaskada łącząca reakcję multikomponentową z rozdziałem kinetycznym (Schemat 14).<sup>33</sup>



**Schemat 14.** Enzymatyczna kaskadowa reakcja Passeriniego.

<sup>32</sup> D. J. Ramon, M. Yus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1602-1634.

<sup>33</sup> A. Żądło-Dobrowolska, D. Koszelewski, D. Paprocki, A. Madej, M. Wilk, R. Ostaszewski, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3047-3053.

Jednym z substratów jest octan winylu (**14**), który w warunkach reakcji ulega hydrolizie z uwolnieniem aldehydu octowego oraz kwasu octowego (**27**). Jeżeli w mieszaninie reakcyjnej obecny jest izocyjanek (**25**), następuje spontaniczna chemiczna reakcja Passeriniego, w której powstaje  $\alpha$ -acyloksyamid oznaczony symbolem **26**. Wytworzony produkt ulega dalszej enzymatycznej reakcji hydrolizy do enancjomerycznie wzbogaconych  $\alpha$ -hydroksyamidów **28** oraz kwasu octowego (**27**), który ponownie może uczestniczyć w chemicznej reakcji Passeriniego. Co istotne wszystkie reakcje prowadzone są w jednym naczyniu i katalizowane są przez ten sam enzym. Zoptymalizowanie warunków prowadzenia reakcji umożliwiło otrzymanie odpowiednich  $\alpha$ -hydroksyamidów z 99% nadmiarem enancjomerycznym.

Jednakże biorąc pod uwagę zalety pochodnych  $\alpha$ -acyloksy karboksamidów, w szczególności zawierających dwa centra stereogeniczne, to powstaje pytanie czy możliwe jest opracowanie efektywnej metody selektywnej syntezy diastereoizomerycznych produktów. Warto zaznaczyć, iż klasyczne chemiczne podejście prowadzi do równomolowej mieszaniny stereoizomerów. W związku z tym powstaje pytanie, czy możliwe jest zaprojektowanie systemu, który przy użyciu tych samych substratów umożliwi utworzenie pojedynczego stereoizomeru produktu reakcji Passeriniego. Jeszcze bardziej istotne byłoby osiągnięcie opracowanie metodologii umożliwiającej regulację selektywności otrzymanych produktów w zależności od potrzeb syntetycznych.

#### **4.5. Podsumowanie rozdziału**

Obszar badań nad wykorzystaniem hydrolaz w syntezie organicznej jest szeroko rozwijany szczególnie pod względem syntezy związków o wysokiej wartości dodanej. Pomimo dostępnych technik wykorzystywanych w nowoczesnej syntezie organicznej, wciąż poszukiwane są nowe właściwości katalityczne hydrolaz umożliwiające ich zastosowanie w alternatywnych reakcjach chemicznych. Szczególnym wyzwaniem jest synteza związków enancjomerycznie czystych. Metody chemiczne umożliwiają otrzymanie produktów w postaci mieszaniny stereoizomerów, co jest niepożądane z punktu widzenia produktywności. Poznanie i wykorzystanie nowych właściwości hydrolaz może umożliwić opracowanie szeregu nowych i użytecznych metod syntezy związków organicznych, a w szczególności w postaci enancjomerycznie czystej.



## 5. Badania własne -przewodnik po publikacjach

### 5.1. Tworzenie wiązania węgiel-węgiel w kaskadowej reakcji Knoevenagla

Reakcja Knoevenagla jest jedną z najczęściej wykorzystywanych reakcji tworzenia wiązań C-C w przemyśle chemicznym oraz farmaceutycznym. W klasycznej wersji reakcja przebiega pomiędzy związkiem karbonylowym, najczęściej aldehydem oraz aktywnym estrem kwasu malonowego w obecności zasady organicznej lub kwasu Lewisa.<sup>34</sup> Pomimo poglądu związanego wysoką efektywnością i prostotą przebiegu reakcji Knoevenagla, metoda ta charakteryzuje się pewnymi wadami. Głównym problemem jest odwracalność każdego etapu reakcji, co wpływa na niską wydajność oraz tworzenie produktów ubocznych. Co więcej, otrzymane w reakcji produkty stanowią równomolową mieszaninę izomerów *E/Z*. Znane są publikacje dotyczące wykorzystania enzymów jako katalizatorów reakcji Knoevenagla. Przykłady te ograniczają się do zastosowania aldehydów aromatycznych oraz wysoce reaktywnych estrów kwasu malonowego, podczas gdy kwasy karboksylowe wydają się być bardziej atrakcyjnymi substratami w reakcji Knoevenagla. Znany jest przykład wykorzystania kwasu cyjanooctowego w kondensacji Knoevenagla, jednak procedura ta wymaga zastosowania wysokich temperatur oraz prowadzi do następczej dekarboksylacji otrzymanego produktu. Dlatego wychodząc naprzeciw oczekiwaniom oraz poszerzając zakres potencjału wykorzystania kondensacji Knoevenagla jako efektywnej metody syntezy, postanowiłam opracować metodę syntezy  $\alpha,\beta$ -nienasyconych związków wykorzystując kwas cyjanooctowy.

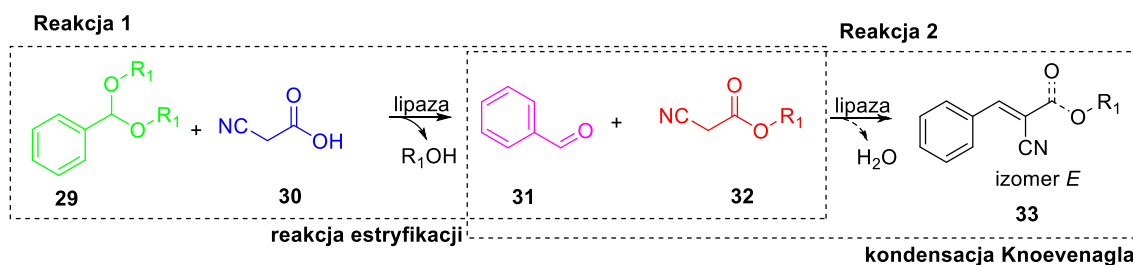
Cel ten może zostać zrealizowany poprzez połączenie reakcji estryfikacji oraz kondensacji Knoevenagla. Pracę rozpoczęłam od przeprowadzenia reakcji pomiędzy aldehydem benzoesowym oraz kwasem cyjanooctowym w warunkach opisywanych przez Lai i współpracowników.<sup>35</sup> Jednakże nie zaobserwowałam tworzenia oczekiwanego produktu, co jest spowodowane odwracalnością reakcji bezpośredniej estryfikacji katalizowanej przez enzym. Ponadto w obecności krótkołańcuchowych alkoholi enzym ulega dezaktywacji.

Dobrym sposobem ominięcia istniejących ograniczeń jest zmiana donora grupy alkoksylowej w reakcji estryfikacji. W badaniach prowadzonych w Zespole XX

<sup>34</sup> a.) E. Knoevenagel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2345–2346; b.) E. Knoevenagel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, 31, 2596–2619.

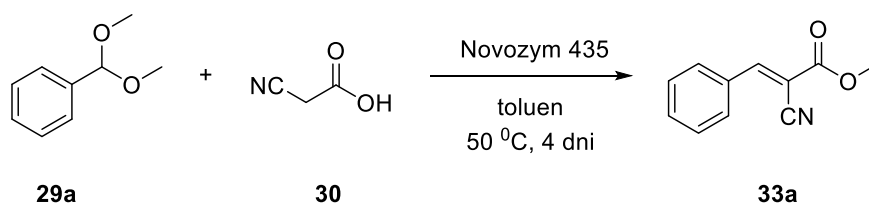
<sup>35</sup> Y. F. Lai, H. Zheng, S. J. Chai, P. F. Zhang, X. Z. Chen, *GreenChem.* **2010**, 12, 1917–1918.

udowodniono, iż acetale (**29**) mogą być zastosowane jako donory grupy alkoksylowej w reakcjach enzymatycznej estryfikacji. Dodatkowym atutem wykorzystania acetali w moich badaniach jest fakt, iż są one jednocześnie prekursorami aldehydów (**31**), które są niestabilne i wymagają przygotowania przed użyciem w reakcji. Powstające w trakcie enzymatycznej estryfikacji (Reakcja 1, Schemat 15) komponenty **31** oraz **32**, mogą ulec następcej enzymatycznej reakcji Knoevenagla (Reakcja 2, Schemat 15). Na tym etapie postulowałam, iż odpowiednie  $\alpha,\beta$ -nienasycone estry kwasu cyjanooctowego oznaczone na Schemacie 14 symbolem **33** mogą być otrzymane w wyniku enzymatycznej reakcji estryfikacji oraz następcej kondensacji Knoevenagla. Pozostawało pytanie, czy obie reakcje mogą być katalizowane przez ten sam enzym.



**Schemat 15.** Enzymatyczna kaskadowa reakcja Knoevenagla z wykorzystaniem acetali jako donora grupy alkoksylowej.

Badania wstępne rozpoczęłam od przeprowadzenia reakcji pomiędzy acetalem dimetylowym aldehydu benzoowego (**29a**) oraz kwasem cyjanooctowym (**30**) w obecności Novozymu 435 w toluenie w 50 °C przez 4 dni. (Schemat 16) W wyniku tej reakcji otrzymałam produkt **33a** z wydajnością 43% (L.p. 1, Tabela 1) oraz doskonałą regioselektywnością, tylko jako jeden izomer *E*, podczas gdy metody klasyczne prowadzą do otrzymania mieszaniny izomerów *E/Z*. W celu potwierdzenia wpływu enzymu na przebieg reakcji kaskadowej, wykonałam reakcję bez jego dodatku (L.p. 2, Tabela 1) oraz z dezaktywowanym enzymem (L.p. 3, Tabela 1). Otrzymane wyniki potwierdziły, że enzym jest niezbędny w efektywnej syntezie pochodnych estrów kwasu cyjanooctowego.



**Schemat 16.** Enzymatyczna synteza pochodnej kwasu cyjanooctowego **33a**.

Kolejno sprawdziłam ponad 30 enzymów dostępnych w laboratorium, spośród których 14 efektywnie katalizowało obie reakcje: estryfikacji kwasu cyjanooctowego za pomocą acetalu oraz następczą reakcją kondensacji Knoevenagla pomiędzy *in situ* wytworzonymi reagentami.

**Tabela 1.** Badania przesiewowe enzymów<sup>a</sup>.

L.p.	Enzym	Wydajność <sup>b</sup> (%)
1.	Novozym 435	43
2.	-	0
3.	Dezaktywowana lipaza z <i>C. cylindracea</i> <sup>c</sup>	0
4.	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	50

<sup>a</sup>Warunki reakcji: 0.5 mmol kwasu cyjanooctowego (2), 1.5 mmol acetalu dimetylowego z aldehydu benzoowego (1a), 2 mL toluenu, 30 mg enzym, 4 dni, 50 °C. <sup>b</sup>Wydajność reakcji produktu izolowanego. <sup>c</sup>Dezaktywacja poprzez ogrzewanie enzymu w 110 °C przez 16h.

Reakcja z lipazą z *Candida cylindracea* umożliwiła otrzymanie produktu z najwyższą wydajnością 50% (L.p. 4, Tabela 1), dlatego enzym ten został użyty w dalszych badaniach. Wynik ten sugeruje, że każda z reakcji enzymatycznych musi przebiegać z wydajnością powyżej 80%. Jako produkt otrzymałam tylko jeden z dwóch możliwych izomerów, dowodzi, że reakcja przebiega w obecności czynnika różnicującego, jakim jest enzym. Jest to dodatkowym atutem zaproponowanej metody. Ponadto, przeprowadzone reakcje są doskonałym przykładem wykorzystania multipromiskuitycznej aktywności hydrolaz w procesie kaskadowym, które umożliwiają efektywną i wysoce selektywną syntezę związków nienasyconych.

W dalszym etapie zbadalam wpływ stosunków molowych reagentów na przebieg reakcji. Okazało się, że trzykrotny nadmiar acetalu w odniesieniu do kwasu umożliwia otrzymanie produktu reakcji Knoevenagla z najwyższą wydajnością. Zwiększenie zawartości acetalu powoduje zmniejszenie wydajności reakcji kaskadowej.

Środowisko prowadzenia reakcji ma istotny wpływ na jej przebieg, dlatego zbadalam również wpływ rozpuszczalnika na wydajność produktu reakcji kaskadowej. Medium reakcji może być opisane przez wpływ ilościowej polarności rozpuszczalników określanej jako logarytm współczynnika podziału ( $\log P$ ). Ogólnie, im wyższa wartość współczynnika  $\log P$ , tym niższa polarność rozpuszczalnika. Wykonane eksperymenty wykazały, iż polarność rozpuszczalnika ma istotny wpływ na przebieg badanej reakcji



kaskadowej. Najlepszym rozpuszczalnikiem w reakcji otrzymywania nienasyconych estrów kwasu cyjanooctowego są toluen oraz heksan, dla których wartości współczynnika podziału  $\log P$  są wysokie (L.p.1-2, Tabela 2). Co ciekawe reakcja w cykloheksanie, który opisywany jest przez najwyższy  $\log P$  przebiega z niewielką wydajnością (L.p. 3, Tabela 2), co może wynikać z niekorzystnych oddziaływań pomiędzy hydrofilowym rozpuszczalnikiem oraz resztami grup aminokwasów w centrum aktywnym enzymu. Reakcje w rozpuszczalnikach o wysokiej polarności nie przebiegają (L.p. 4-5, Tabela 2).

**Tabela 2.** Wpływ rozpuszczalnika na przebieg reakcji kaskadowej.

L.p.	Rozpuszczalnik	$\log P$	Wydajność <b>33a</b> <sup>a</sup> (%)
1.	toluen	2.30	55
2.	heksan	2.76	53
3.	cykloheksan	3.44	4
4.	<i>N,N</i> -dimetyloformamid	-1.01	0
5.	DMSO	-1.40	0

<sup>a</sup>Określona na podstawie analizy GC. Warunki reakcji: kwas cyjanooctowy (**2**), 0.125 mmol kwas cyjanooctowy (**2**), 0.375 mmol acetal dimetylowy aldehydu beznoesowego, 0.5 mL toluen, 15 mg lipaza z *Candida cylindracea* (4.01 U/mg), 4 dni, 50 °C.

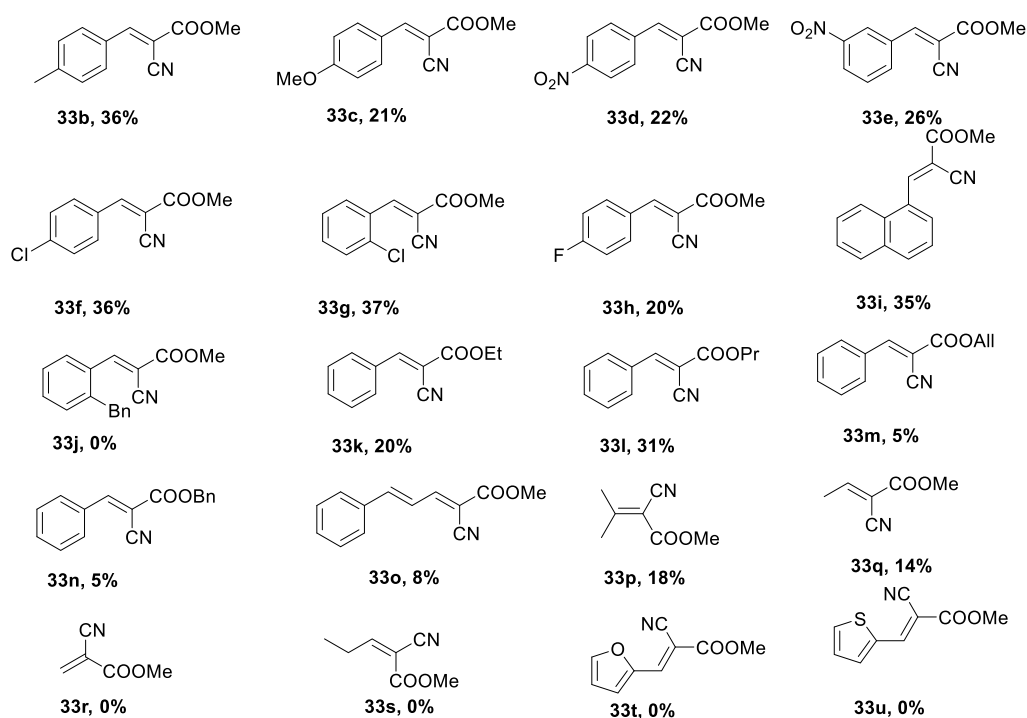
Następnie sprawdziłam również wpływ temperatury oraz dodatku wody na przebieg reakcji. Kiedy reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej, nie obserwowałam tworzenia produktu reakcji kaskadowej. Zauważyłam, iż wraz ze wzrostem temperatury następuje wzrost ilości powstającego produktu **33a**. Po przekroczeniu temperatury 50 °C wydajność otrzymanego produktu maleje, co może wynikać z termicznej denaturacji enzymu. Sprawdziłam również wpływ dodatku wody na przebieg reakcji kaskadowej. Reakcje prowadziłam w toluenie w temperaturze 50 °C wykorzystując modelowe reagenty (**29a** i **30**) oraz lipazę z *Candida cylindracea*. Reakcja z 0.5% dodatkiem wody spowodowała drastyczny spadek wydajności produktu **33a** w porównaniu do reakcji bez jej dodatku, co prawdopodobnie wynika z nadmiernej hydrolizy acetalu. Dlatego w dalszych badaniach reakcję prowadziłam bez dodatku wody.

Z uwagi na znaczenie środowiskowe, sprawdziłam również możliwość ponownego użycia opracowanego systemu katalitycznego. Wykorzystując modelową reakcję oraz zoptymalizowane warunki jej prowadzenia, tj. reakcję pomiędzy dimetylowym acetalem

aldehydu benzoowego (**29a**) oraz kwasem cyjanooctowym (**30**) w toluenie w 50 °C w obecności lipazy z *Candida cylindracea*.

Okazało się, że enzym może być odzyskany poprzez filtrację oraz zastosowany ponownie w kolejnym cyklu reakcyjnym aż do 5 razy, bez znaczącej utraty swojej aktywności, tj. 55% i 47% wydajności, odpowiednio w pierwszym oraz piątym cyklu.

Sprawdziłam również zakres stosowalności opracowanej metody, przeprowadzając szereg reakcji dla różnych acetalu. Sprawdziłam wpływ podstawników pierścienia aromatycznego w acetalu dimetylowym aldehydu benzoowego oraz wpływ grupy alkoksylowej acetalu aldehydu benzoowego. Reakcje przeprowadziłam w uprzednio zoptymalizowanych warunkach w obecności lipazy z *Candida cylindracea*. Enzym wykazuje wysoką selektywność substratową w zaprojektowanej kaskadzie (Schemat 17).



**Schemat 17.** Zakres stosowalności opracowanej metody syntezy pochodnych kwasu cyjanooctowego.

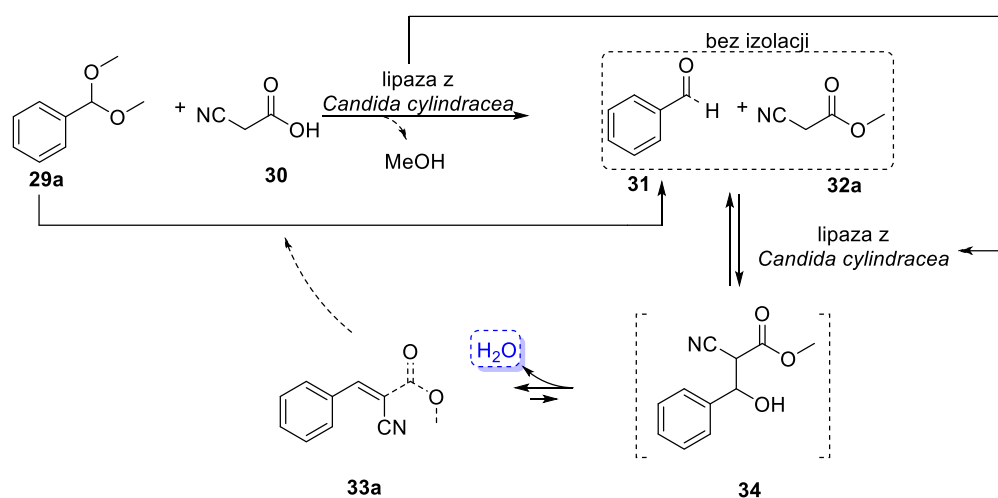
Pomimo, iż reakcja przebiega równie efektywnie dla podstawników należących do grup elektronoakceptorowych, takich jak na przykład grupa  $-CH_3$  (**33b**) czy dla podstawników należących do grup elektronodonorowych jak na przykład  $-Cl$  (**33f**), to nie przebiega dla acetalu alifatycznych (**33r-s**) oraz heterocyklicznych (**33s-u**). Ponadto, efektywność katalityczna enzymu maleje ze wzrostem długości łańcucha grupy alkoksylowej acetalu aldehydu benzoowego. Jednakże, zgodnie ze strategią

wykorzystywaną przez naturę nie każdy substrat jest odpowiedni dla każdego enzymu. Dlatego optymalizacja warunków reakcji dla indywidualnego substratu pozwoli rozszerzyć różnorodność stosowanych substratów w enzymatycznej kaskadowej reakcji Knoevenagla. Niewątpliwie najbardziej istotnym spostrzeżeniem jest fakt, iż zaprojektowana kaskada przebiega z doskonałą selektywnością prowadząc do otrzymania tylko jednego izomeru *E*-produktu, co jest trudne w przypadku metod klasycznych. Doskonała selektywność powstających produktów sugeruje, iż etap limitujący selektywność przebiega w centrum aktywnym enzymu, ujawniając dodatkowy atut zaproponowanej kaskady w porównaniu z reakcjami jednoetapowymi.

Niezwykle istotnym elementem prowadzonych badań było przeprowadzenie jednoetapowej reakcji pomiędzy aldehydem benzoesowym oraz estrem metylowym kwasu cyjanooctowego w obecności lipazy z *Candida cylindracea* w warunkach uprzednio zoptymalizowanych. Okazało się, iż procedura umożliwiła otrzymanie produktu reakcji Knoevenagla **33a** z wydajnością 40%, podczas gdy wykorzystanie podejścia kaskadowego prowadzi do otrzymania produktu z wyższą wydajnością (55%). Otrzymany wynik stanowił inspirację do przeprowadzenia badań mechanistycznych wyjaśniających przebieg zaprojektowanej kaskady. Przeprowadziłam serię eksperymentów w czasie dla reakcji modelowej. Stężenia poszczególnych reagentów analizowałam przy pomocy chromatografii gazowej (GC).

Enzymatyczna estryfikacja kwasu cyjanooctowego przebiega w ciągu pierwszych 48 godzin. Po tym czasie otrzymany ester metylowy kwasu cyjanooctowego (**32a**) ulega reakcji z *in situ* wytworzonym aldehydem benzoesowym (**31**) prowadząc do wytworzenia produktu kondensacji Knoevenagla. Warto zaznaczyć iż stężenie aldehydu benzoesowego (**31**) pozostawało stałe, podczas gdy ester metylowy kwasu cyjanooctowego (**32a**) ulegał ciągłej konsumpcji w enzymatycznej reakcji Knoevenagla. Przeprowadzone badania sugerują, że zaproponowana kaskada jest wspomagana przez dodatkowy etap umożliwiający produkcję aldehydu benzoesowego (**31**). Zgodnie z klasycznym mechanizmem kondensacji Knoevenagla jednym z etapów jest  $\alpha,\beta$ -eliminacja wytworzonego aldolu oznaczonego na Schemacie 17 symbolem **34**, podczas którego następuje wydzielenie cząsteczki wody. Woda ta jest sukcesywnie zużywana w spontanicznej reakcji hydrolizy acetalu **29a**, którego użyłam w nadmiarze. Wynikiem tego procesu jest dostarczanie dodatkowych ilości aldehydu biorącego udział w reakcji kondensacji Knoevenagla. Ponadto, stałe zużywanie wody, wytworzonej w ostatnim etapie reakcji Knoevenagla przesuwa równowagę całego procesu w kierunku tworzenia produktu,

wpływając na efektywność kaskady w porównaniu do reakcji jednoetapowej. W badaniach udowodniłam, iż zewnętrzny dodatek wody do układu ma negatywny wpływ na przebieg procesu, zatem woda obecna w centrum aktywnym enzymu jest wystarczająca do efektywnej reakcji. Bez dodatku wody acetal spełnia rolę donora grupy alkoksylowej w enzymatycznej reakcji estryfikacji kwasu cyjanooctowego prowadząc do wytworzenia odpowiedniego estru oraz uwalniając aldehyd. Produkt **34** powstaje w następstwie enzymatycznej reakcji pomiędzy aldehydem oraz estrem. Ostatnim etapem jest przebiegająca z wydzieleniem cząsteczki wody  $\alpha,\beta$ -eliminacja prowadząca do otrzymania ostatecznego produktu reakcji Knoevenagla (**33a**) (Schemat 18).



**Schemat 18.** Enzymatyczna kaskada prowadząca do (E)- $\alpha,\beta$ -nienasyconych estrów kwasów karboksylowych.

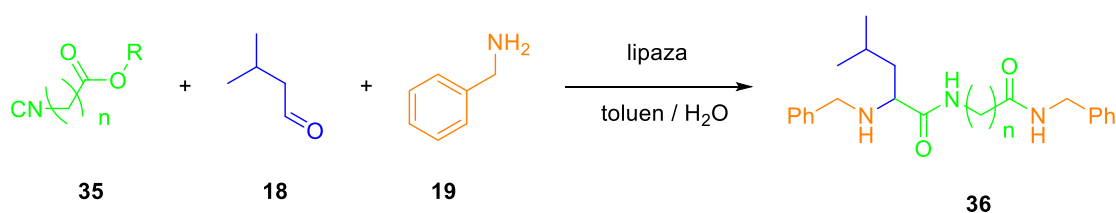
Wydzielona w tym etapie woda poddana jest ciągłej reakcji z nadmiarem acetalu obecnego w mieszaninie reakcyjnej co dodatkowo przesuwa równowagę reakcji w kierunku tworzenia produktu. Warto zauważyć, iż acetale znane są ze swoich właściwości odwadniających. Dlatego zastosowanie trzykrotnego nadmiaru acetalu jest niezbędne w efektywnej syntezie. Zastosowana metodologia jest doskonałym przykładem promiskuitycznych właściwości enzymów, które katalizują różne następujące po sobie reakcje w jednym naczyniu. Ponadto, opracowana metodologia wykorzystuje promiskityzm środowiskowy oraz substratowy co wpływa na wysoką produktywność oraz brak produktów ubocznych.

Przeprowadzone reakcje są doskonałym przykładem wykorzystania multi-promiskuitycznej aktywności hydrolaz w procesie kaskadowym, które umożliwiają efektywną i wysoce selektywną syntezę związków nienasyconych.

## 5.2. Enzymatyczna multikomponentowa reakcja Ugiego

W badaniach prowadzonych w Zespole XX udowodniono, że enzymy mogą być wykorzystane jako efektywne katalizatory w reakcjach multikomponentowych, co stanowi doskonałą metodę syntezy peptydomimetyków. Kontynuując pracę nad zastosowaniem nowych właściwości lipaz w syntezie peptydomimetyków, postanowiłam sprawdzić struktury substratu na efektywność reakcji Ugiego.

Reakcja Ugiego jest reakcją, która w klasycznej wersji przebiega pomiędzy kwasem karboksylowym, aldehydem, aminą oraz izocyjanekiem i prowadzi do struktur **Z** oznaczonych na Schemacie 9. Trudno w niej osiągnąć chemoselektywność, ponieważ nie wymaga obecności katalizatora. W swoich badaniach skupiłam się na przebiegu opracowanej w Zespole XX, enzymatycznej wersji reakcji Ugiego przedstawionej na Schemacie 10. Struktury związków otrzymane tą drogą są różne od produktów klasycznej reakcji 4- komponentowej. Ponadto, uzyskanie podobnych struktur na drodze klasycznych metod syntezy jest bardzo wymagające. Jako substraty zastosowałam benzylaminę (**19**), aldehyd izowalerianowy (**18**) oraz różne izocyjanoestry (**35**) (Schemat 19).



**Schemat 19.** Badana enzymatyczna multikomponentowa reakcja Ugiego.

Ponieważ reakcja przebiega w centrum aktywnym enzymu, które charakteryzuje ograniczona objętość, zbadalam wpływ długości łańcucha alifatycznego i grupy alkoksylowej izocyjanoestrów (**35**) oraz na przebieg reakcji. Przeprowadziłam szereg eksperymentów w warunkach optymalnych opracowanych w poprzednich badaniach Zespołu XX. Zbadałam wpływ struktury izocyjanoestrów na reakcje katalizowane przez lipazę z *Candida cylindracea*, lipazę z *Pseudomonas cepacia* oraz Novozym 435, ponieważ enzymy te okazały się być najbardziej efektywnymi katalizatorami w modelowej enzymatycznej reakcji Ugiego.

W badaniach sprawdziłam jak rozbudowany izocyjanoester zmieści się w centrum aktywnym. Otrzymane wyniki wykazały kluczowy wpływ długości łańcucha alifatycznego

izocyjanków na selektywność badanych enzymów. Spośród zbadanych enzymów najwyższą aktywność zaobserwowałam dla Novozymu 435 (Tabela 3).

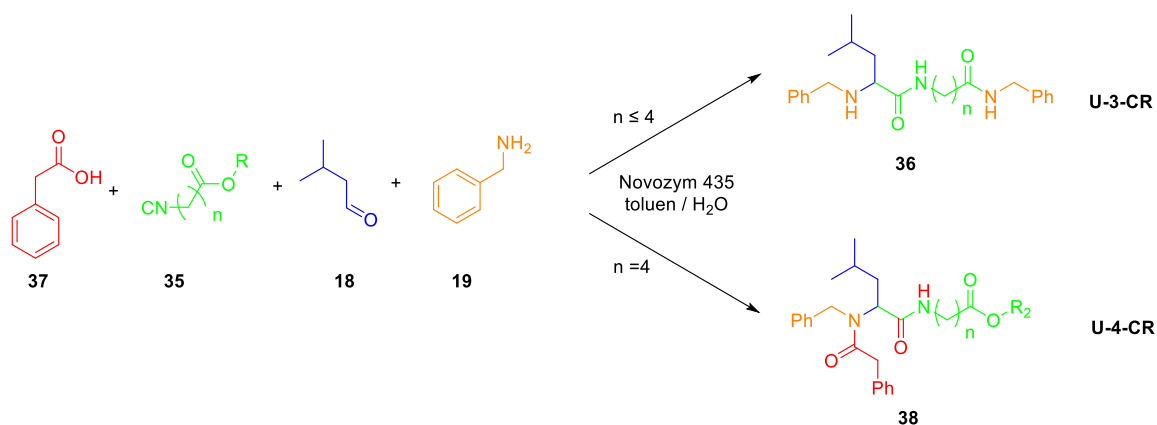
**Tabela 3.** Wpływ struktury izocyjanków na przebieg reakcji katalizowanej przez Novozym 435.<sup>a</sup>

L.p.	n	R	Wydajność 36 [%]
1.	1	Et	75
2.	2	Et	57
3.	3	Et	44
4.	4	Et	<1
5.	2	Me	26
6.	2	<i>n</i> -Bu	38

<sup>a</sup> Warunki reakcji: 1.0 mmol benzylamina (**19**), 0.5 mmol aldehyd izowalerianowy (**18**), 0.5 mmol izocyjanoester (**35**) 20 mL toluen, 0.1 mL woda, 20% wag. Novozym 435, 3 dni, 25 °C.

Efektywność chemoenzymatycznej reakcji typu Ugiego maleje ze wzrostem długości łańcucha alifatycznego izocyjanoestru, aż do 5-węglowych łańcuchów (Lp.4, Tabela 3), dla których reakcja nie przebiega. Ponadto, zmieniając grupę alkoksyłową R, wykazałam zróżnicowany wpływ na efektywność reakcji, który był charakterystyczny dla danego enzymu. Podobny rezultat zaobserwowałam również dla lipazy z *Candida cylindracea* oraz lipazy z *Pseudomonas cepacia*. Otrzymane wyniki wykazały kluczowy wpływ struktury izocyjanków na selektywność badanych enzymów, które dzięki promiskuitycznej aktywności osiągają różnicowanie substratów. Wykazane różnicowanie jest trudne do osiągnięcia w przypadku metod chemicznych.

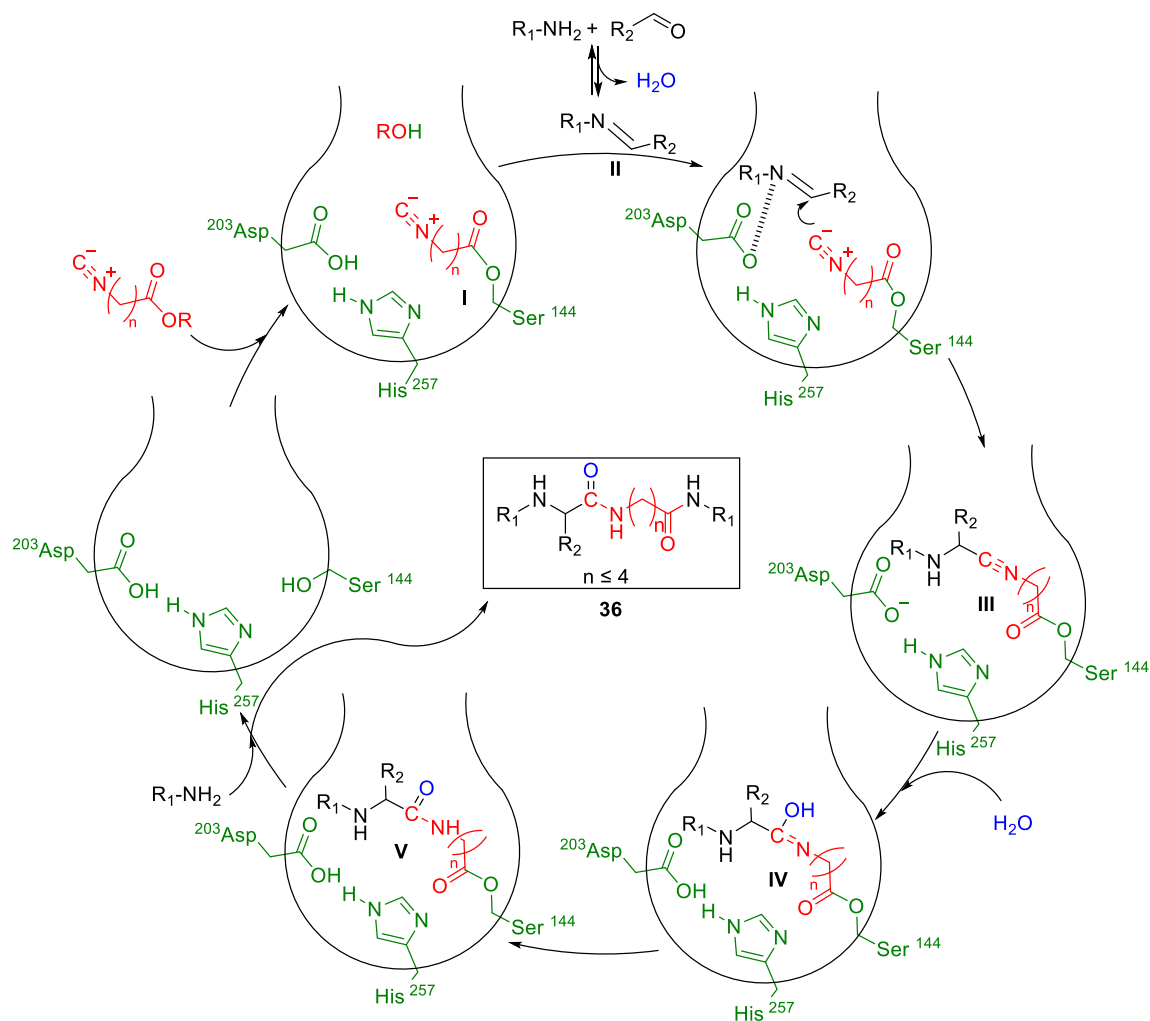
Dodatkowo nieoczekiwane rezultaty osiągnęłam prowadząc klasyczną, 4-komponentową reakcję Ugiego (U-4CR) w obecności Novozymu 435. Jako substraty zastosowałam benzylaminę (**19**), aldehyd izowalerianowy (**18**), kwas fenylooctowy (**37**) oraz krótko- lub długołańcuchowy izocyjanoester (**35**) (Schemat 20).



**Schemat 20.** Enzymatyczne sterowanie przebiegiem reakcji Ugiego.

Okazało się, iż enzym wpływa również na przebieg reakcji, w której nie uczestniczy. Stosując krótkołańcuchowe izocyjanki, otrzymałam wyłącznie produkty enzymatycznej reakcji Ugiego oznaczone na Schemacie 18 symbolem **36**. W reakcji w obecności Novozymu 435 dla izocyjanków do 4-łańcuchów węglowych nie obserwowałam tworzenia produktu klasycznej reakcji Ugiego (**38**), ponieważ reakcja enzymatyczna jest faworyzowana nad reakcją klasyczną. Natomiast dla długołańcuchowego izocyjanku, reakcja przebiega w kierunku tworzenia wyłącznie produktu reakcji klasycznej o symbolu **38**. Otrzymane wyniki sugerują iż enzym kieruje przebiegiem reakcji Ugiego w zależności od zastosowanego izocyjanku, co jest nowym i zaskakującym fenomenem, trudnym do osiągnięcia w przypadku metod chemicznych.

Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniej zaproponowanym mechanizmem, w którym reakcja przebiega bezpośrednio w miejscu aktywnym enzymu (Schemat 21).



**Schemat 21.** Mechanizm reakcji Ugiego w centrum aktywnym enzymu o ograniczonej objętości.

Pierwszy etap jest analogiczny do reakcji hydrolizy estrów katalizowanej przez lipazę: seryna znajdująca się w triadzie katalitycznej jest acylowana grupą estrową izocyjanoestru (I). Następnie, aktywowany jest pośredni związek iminowy (II), powstały jako wynik reakcji pomiędzy aminą oraz aldehydem. Możliwe, że kwasowa reszta Asp w miejscu aktywnym enzymu jest odpowiedzialna za aktywację iminy analogicznie jak w klasycznym mechanizmie reakcji Ugi przedstawionym na Schemacie 9. Kolejne etapy są również zgodne z opisanym wcześniej mechanizmem klasycznej reakcji Ugiego. Aktywowany elektrofilowy związek iminowy ulega addycji izocyjanoestru prowadzącej do adduktu nitrylowego (III). Co istotne, dodatek wody prowadzi do wytworzenia związku pośredniego IV, który po kolejnej izomeryzacji prowadzi do adduktu V. Warto zauważyć, iż trzeciorzędowa struktura enzymów w rozpuszczalniku organicznym silnie zależy od zawartości wody, co bezpośrednio może wpłynąć na poprawę wydajności reakcji. W ostatnim etapie reakcji enzymatycznej następuje odtworzenie enzymu poprzez

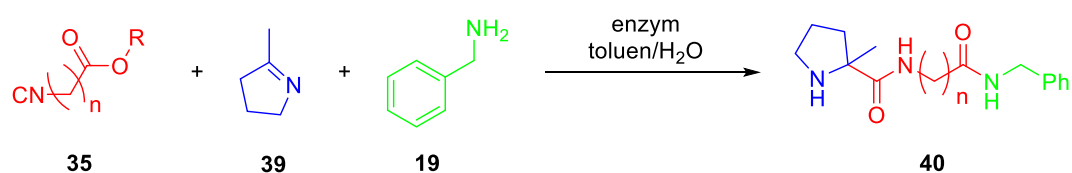


nukleofilowy atak kolejnej cząsteczki aminy, która zastosowana była w nadmiarze. W efekcie jako produkt powstaje dipeptyd **36**.

Centrum aktywne enzymu znajduje się w szczelinie enzymu, do której prowadzi specjalny kanał, więc ma określoną objętość. Zgodnie z zaproponowanym mechanizmem enzymatycznej reakcji Ugiego, każdy z etapów przebiega w centrum aktywnym. Dlatego wzrost długości łańcucha powoduje, iż prawdopodobnie długołańcuchowe izocyjanki nie mieszczą się w centrum aktywnym, bądź też blokują jego dostęp dla reszty reagentów. Ponadto, w przypadku niektórych substratów następuje zmiana struktury białka w miejscu aktywnym, co może skutkować spowolnieniem szybkości reakcji.

W badanych warunkach reakcji otrzymałam produkty w postaci mieszaniny racemicznej. Brak stereoselektywności można wyjaśnić stosunkowo wysoką reaktywnością ugrupowania izocyjankowego. Etap addycji izocyjanku do zaaktywowanej iminy przebiega szybko i w sposób nieodwracalny, co może wyjaśniać brak stereoselektywności w przeprowadzonych reakcjach.

Kluczowym etapem przebiegu multikomponentowej reakcji Ugiego jest reakcja zachodząca pomiędzy aminą oraz aldehydem prowadząca do wytworzenia iminy. Dlatego w kolejnej części badań sprawdziłam wpływ długości izocyjanków na przebieg reakcji Ugiego w wariacie wykorzystującym iminę. Reakcję modelową pomiędzy 2-metylo-1-piroliną (**39**), benzylaminą (**19**) oraz różnymi izocyjankami (**35**) przeprowadziłam w warunkach uprzednio zoptymalizowanych: toluen z 0.1% dodatkiem wody, 20% wagowych enzymu, temperatura pokojowa (Schemat 22).



**Schemat 22.** Zastosowanie iminy **39** w enzymatycznej reakcji Ugiego.

Sprawdziłam wpływ struktury izocyjanków na efektywność reakcji katalizowanej przez Novozym 435, lipazę z *Candida cylindracea* oraz lipazę z *Pseudomonas cepacia*. Otrzymane wyniki potwierdziły poprzednią obserwację, iż wraz ze wzrostem długości łańcucha izocyjanku, spada wydajność reakcji. Co więcej metoda z wykorzystaniem iminy charakteryzuje się jeszcze węższym zakresem tolerancji badanych enzymów. Niższą aktywność enzymów wobec stosowanych izocyjanków w wariacie reakcji

z iminą w porównaniu do reakcji Ugiego, w której następuje *in situ* wytworzenie iminy, można wyjaśnić budową centrum aktywnego enzymu, które nie mieści rozbudowanych sterycznie substratów.

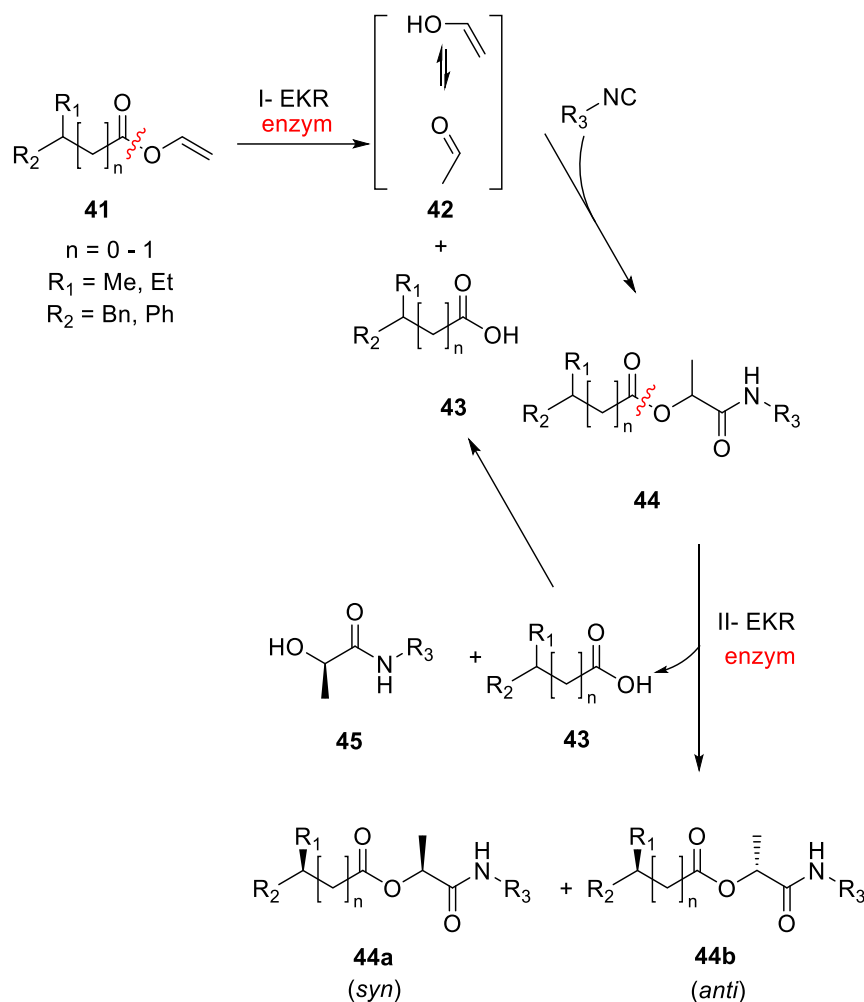
W przeprowadzonych badaniach udowodniłam, że struktura izocyjanków ma kluczowy wpływ na aktywność katalityczną badanych lipaz w enzymatycznej reakcji Ugiego. Rozważyłam dwa warianty prowadzenia reakcji: z wytworzeniem iminy *in situ* oraz z jej bezpośrednim dodatkiem do mieszaniny reakcyjnej. W obu przypadkach reakcji Ugiego zastosowane enzymy wykazują preferencję w kierunku krótkołańcuchowych izocyjanków (1-4-węglowe). Co więcej, przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż reakcja enzymatyczna przebiega znacznie szybciej niż chemiczna reakcja Ugiego, co w pełni współgra z zaproponowanym mechanizmem. Ten fenomen daje możliwość sterowania oraz przełączania przebiegiem reakcji Ugiego w zależności od produktu jaki chcemy uzyskać co jest niemożliwe w przypadku klasycznej syntezy.

### 5.3. Stereodywergentna kaskadowa reakcja Passeriniego

Rozwój syntezy chiralnych  $\alpha$ -acyloksy karboksamidów zawierających jedno lub więcej centrum stereogeniczne nadal stanowi wyzwanie w syntezie złożonych molekuł. Ponadto ścisły związek między aktywnością biologiczną a stereoisomerią substancji sprawia, że ma to kluczowe znaczenie w przemyśle farmaceutycznym. Biorąc pod uwagę znaczenie pochodnych kwasu mlekowego postanowiłam zbadać zdolność katalityczną wybranych lipaz w syntezie pochodnych kwasu mlekowego, wykorzystując multikomponentową reakcję Passeriniego.

Klasyczne podejście chemiczne prowadzi do nierozdzielnej mieszaniny stereoisomerów. Dlatego powstało pytanie, czy enzym może regulować udział poszczególnych stereoisomerów  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów powstających reakcji Passeriniego. Szczególnie enzymatyczna reakcja kaskadowa wydaje się być atrakcyjną metodą syntezy asymetrycznej, ponieważ może umożliwić osiągnięcie stereorozbieżności produktów. W swoich badaniach zaproponowałam nową ogólną strategię podwójnego procesu biokatalitycznego przebiegającego w systemie kaskadowym. Zaproponowana kaskada obejmuje trzy reakcje: katalizowany enzymatycznie rozdział kinetyczny (EKR) estru winylowego, następczą chemiczną reakcją Passeriniego oraz enzymatyczną hydrolizę (EKR) wytworzonych diastereoizomerycznych  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów. Tak zaprojektowana kaskada stanowi potężne narzędzie szybkiej syntezy złożonych cząsteczek

z doskonałą enancjo- oraz diastereokontrolą osiągniętą dzięki promiskuitycznym właściwościom enzymów. Warto zauważyć, że metody klasyczne są wymagają oddzielnej kontroli stereochemii na każdym etapie. Co więcej klasyczna metoda wymaga trzech oddzielnych procesów z maksymalnie 25% wydajnością.

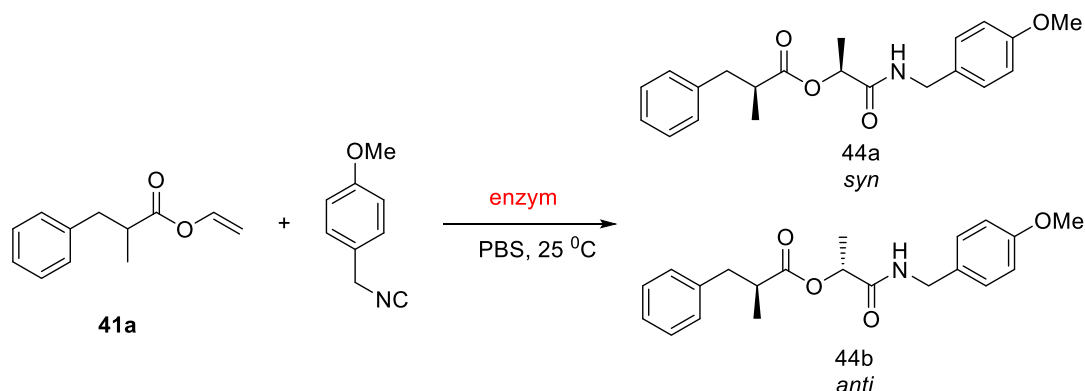


**Schemat 23.** Chemoenzymatyczna stereodywergentna synteza pochodnych kwasu mlekowego.

W zaproponowanej kaskadzie (Schemat 23) ester winylowy **41** stosowany jest jako jednoczesny prekursor niskowrzącego aldehydu octowego (**42**) i kwasu karboksylowego (**43**), które są substratami w reakcji Passerini. Kaskada składa się z trzech następujących po sobie reakcji. W pierwszym etapie enzym katalizuje rozdział kinetyczny racemicznego estru winylowego **41** prowadząc do enancjomerycznie wzbogaconego kwasu karboksylowego (**43**) oraz aldehydu octowego (**42**). Następnie, powstałe związki ulegają chemicznej kondensacji Passerini z izocyjankiem obecnym

w mieszaninie reakcyjnej. Ponieważ w reakcji Passeriniego powstaje nowe centrum stereogeniczne a jako substrat zastosowano chiralny kwas, w drugim etapie zaprojektowanej kaskady powstaje diastereoizomeryczna mieszanina  $\alpha$ -acyloksykarboksyamidu **44**: (*RR*), (*SS*), (*SR*) i (*RS*). Na podstawie postawionej hipotezy, selektywna enzymatyczna hydroliza otrzymanych diastereoizomerów ma istotny wpływ na ich czystość optyczną otrzymanego  $\alpha$ -acyloksykarboksyamidu. W zależności od zastosowanego enzymu hydroliza  $\alpha$ -acyloksykarboksyamidu **44** przebiegała z różną selektywnością, wpływającą na skład stereoizomerów **44a** oraz **44b**. Przeprowadzone badania są doskonałym dowodem na enzymatyczną kontrolę diastereo-selektywnego przebiegu reakcji Passerini, którą można zoptymalizować dla każdego stereoizomerycznego produktu, co jest przywilejem zaprojektowanej kaskady nad podejściem klasycznym.

W celu uniknięcia głównego ograniczenia, jakim jest zaprojektowanie reakcji kaskadowej z kompatybilnymi warunkami dla wszystkich etapów, przeprowadziłam reakcje pomiędzy różnymi estrami winylowymi i izocyjankiem *p*-metoksybenzylowy w jednym naczyniu reakcyjnym. Jako reagenty modelowe zastosowałam 2-metylohydrocynamonian winylu (**41a**) i izocyjanek *p*-metoksybenzylowym w buforze fosforanowym o pH 7.4. (Schemat 24).



**Schemat 24.** Enzymatyczna kaskada prowadząca do diastereoizomerycznych produktów reakcji Passeriniego.

Badania rozpoczęłam od reakcji bez dodatku enzymu, w której nie zaobserwowałam tworzenia się produktu reakcji Passeriniego ani produktu jego późniejszej hydrolizy (L.p. 1, Tabela 4). Następnie zbadalam aktywność katalityczną kilku lipaz w proponowanej kaskadzie, między innymi lipazy *Candida cylindracea* (CCL), lipazy *Pseudomonas fluorescens* (PFL) i lipazy trzustki wieprzowej (PPL).

**Tabela 4.** Kierowana enzymatycznie kaskadowa reakcja Passeriniego.<sup>a</sup>

L.p.	Enzym	Konwersja <b>44</b> [%] <sup>b</sup>	Stereoizomer <b>44</b> [%] <sup>c</sup>				<i>ee</i> [%]	<i>ee</i> [%]
			<i>RR</i>	<i>SS</i>	<i>SR</i>	<i>RS</i>	<b>44a</b>	<b>44b</b>
1	-	0	<i>nd</i>				0	0
2 <sup>d</sup>	-	43	25	25	25	25	0	0
3	CCL	58	7	35	23	35	67	21
4	PFL	78	27	36	3	34	14	84
5	PPL	20	9	26	53	12	49	63
6 <sup>e</sup>	PPL	30	18	16	48	17	6	48
7 <sup>f</sup>	PPL	57	25	3	39	33	77	8
8 <sup>g</sup>	PPL	36	14	32	0	54	40	99
9 <sup>h</sup>	PPL	28	14	27	3	56	31	90
10 <sup>i</sup>	PPL	40	3	50	46	2	89	92

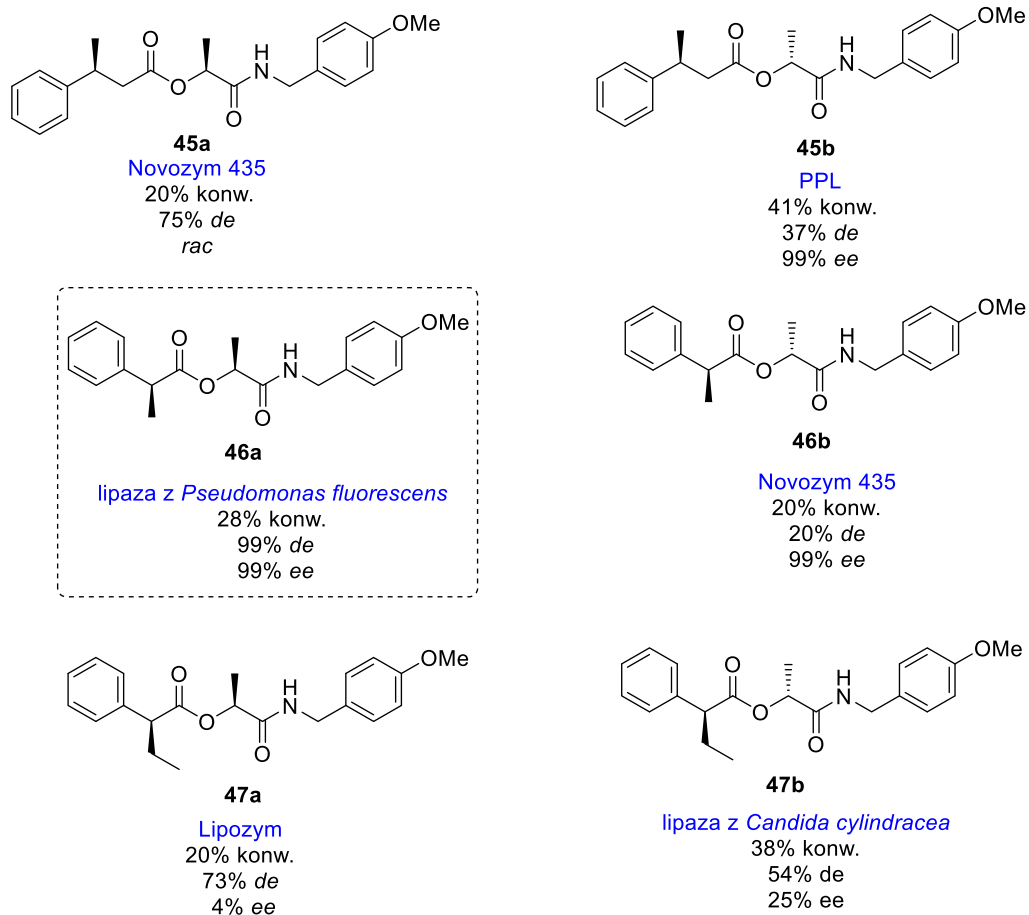
<sup>a)</sup> Warunki reakcji: 100 mg enzymu w buforze PBS (10 mL, pH 7.4, 0.1 M), ester winylowy **41a** (0.5 mmol), izocyjanek *p*-metoksybenzylowy (0.5 mmol), 2 dni, 25 °C. <sup>b)</sup> Konwersja produktu reakcji Passeriniego obliczona jako  $(n_{44}+n_{45})/n_{41a} \times 100\%$ . <sup>c)</sup> Procentowa zawartość poszczególnych stereoizomerów reakcji Passeriniego określona przy pomocy HPLC. <sup>d)</sup> Reakcja z racemicznym kwasem 2-metylohydrocynamonowym (0.5 mmol) i aldehydem octowym (0.5 mmol). <sup>e)</sup> Czas reakcji 3 dni. <sup>f)</sup> Czas reakcji 6 dni. <sup>g)</sup> Reakcja z 2-krotnym nadmiarem estru winylowego **44a**. <sup>h)</sup> Reakcja z 3-krotnym nadmiarem estru winylowego **44a**. <sup>i)</sup> Reakcja prowadzona w dichlorometanie z 0.1% zawartością wody.

Chemiczna reakcja Passeriniego zachodząca pomiędzy kwasem 2-metylohydrocynamonowym, aldehydem octowym i izocyjanianem *p*-metoksybenzylu prowadzi do mieszaniny stereoizomerów produktu **44** z wydajnością 43% (L.p. 2, Tabela 4). W obecności enzymu racemiczny ester winylowy **41a** ulega rozdziałowi kinetycznemu z różną efektywnością. Etap kondensacji Passeriniego prowadzi do otrzymania pożądanego produktu **44** z różną zawartością procentową  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów **44a** i **44b**. Na podstawie postawionej hipotezy jednoczesny rozdział kinetyczny enancjomerycznie wzbogaconego  $\alpha$ -acyloksykarboksamidu **44** ma istotny wpływ na czystość pozostałych związków. W zależności od użytego enzymu, proponowana kaskada daje dostęp do wszystkich stereoizomerów diastereoizomerycznego produktu Passeriniego, co jest bardzo trudne przy zastosowaniu metod klasycznych. Warto zauważyć, że PPL (L.p. 5, Tabela 1) umożliwia otrzymanie  $\alpha$ -acyloksykarboksamidu **44** zawierającego więcej niż 50% (*SR*)-

stereoizomeru w mieszaninie produktów. Nieoczekiwanie wydłużenie czasu reakcji spowodowało zmniejszenie udziału stereoizomerów (*SS*) i (*SR*) oraz zwiększenie zawartości produktów komplementarnych (*RR*) i (*RS*). Ponadto w oparciu o strukturę chemiczną pożądanego produktu zbadalam wpływ stosunku molowego reagentów na przebieg reakcji. Zastosowanie dwóch ekwiwalentów estru winylowego **41** umożliwia otrzymanie stereoizomeru (*RS*)- z doskonałą enancjoselektywnością (99% *ee*) (L.p. 8, Tabela 4). Warto zauważyć, że przedstawiona kaskada składa się z trzech reakcji przebiegających z znakomitą wydajnością każdego etapu.

Modelową reakcję przeprowadzono w buforze fosforanowym (pH 7.4), ale testowałam także inne rozpuszczalniki. Reakcja przebiegająca w dichlorometanie z 0,1% zawartością wody skutkowała powstaniem czystych diastereoizomerycznych produktów reakcji Passeriniego z 40% wydajnością dla niezoptymalizowanych warunków reakcji (L.p. 10, Tabela 4). Warto wspomnieć, że dwa enancjomerycznie czyste diastereoizomery można łatwo rozdzielić metodą chromatografii kolumnowej, otrzymując (*SS*)- i (*SR*)-acyloksykarboksyamidy z zadowalającą wydajnością i doskonałym nadmiarem enancjomerycznym (89 i 92% *ee*). Dla porównania, syntezy chemiczne są trudne i prowadzą do nierozdzielnej mieszaniny stereoizomerów z maksymalną wydajnością 25%.

Ze względu na dużą złożoność proponowanej metodyki zbadalam aktywność różnych enzymów w reakcji kaskadowej z różnymi estrami winylowymi i izocyjankiem *p*-metoksybenzylowym. Otrzymane wyniki wykazały, że wydajność reakcji silnie zależy od typu enzymu, który reguluje powstawanie odpowiednich diastereo- i enancjo-wzbogaconych  $\alpha$ -acyloksykarboksyamidów **45-47** (Rysunek 1).



**Nieoptymalizowane warunki reakcji:** enzym (100 mg) w buforze PBS (10 mL, pH 7.4, 0.1 M), ester winylowy (0.5 mmol), izocyjanek *p*-metoksybenzylowy (0.5 mmol), 2 dni, 25 °C. Produkty reakcji wyizolowano i poddano analizie HPLC.

**Rysunek 1.** Dostęp do stereoizomerycznych produktów reakcji Passeriniego.

Co ciekawe, reakcja estru winylowego kwasu 2-fenylpropionowego katalizowanego przez lipazę z *Pseudomonas fluorescens* prowadzi do otrzymania odpowiedniego  $\alpha$ -acyloksykarboksyamidu **46a** z doskonałą diastereo- i enancjoselektywnością, co jest niesamowicie wymagające w przypadku stosowania metod klasycznych. Ponadto uzyskane wyniki są zgodne z zasadami procesu biokatalitycznego, które wymagają odpowiednich warunków dla każdej przemiany. Rozbieżność proponowanej metodologii opiera się na promiskuitycznej aktywności enzymów, dlatego można ją w razie potrzeby zoptymalizować dla każdego stereoizomeru.

W prowadzonych badaniach udowodniłam zastosowanie wydajnej, stereoróżnicującej metody syntezy enancjomerycznie czystych  $\alpha$ -acyloksykarboksyamidów. Dostęp do poszczególnych produktów stereoizomerycznych uzyskałam przez połączenie enzymatycznego rozdziału kinetycznego racemicznych estrów

winylowych z reakcją Passeriniego oraz następczym enzymatycznym rozdziałem kinetycznym utworzonych  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów. Odpowiedni dobór enzymu pozwala na wytworzenie pojedynczego stereoizomeru  $\alpha$ -acyloksykarboksamidu z wysoką wydajnością i doskonałą stereoselektywnością w jednoetapowej procedurze, podczas gdy metody klasyczne wymagają skomplikowanej, wieloetapowej syntezy. Przebieg procesu jest w pełni regulowany przez enzym i może być optymalizowany dla każdego produktu stereoizomerycznego, co jest przywilejem zaprojektowanej reakcji kaskadowej.

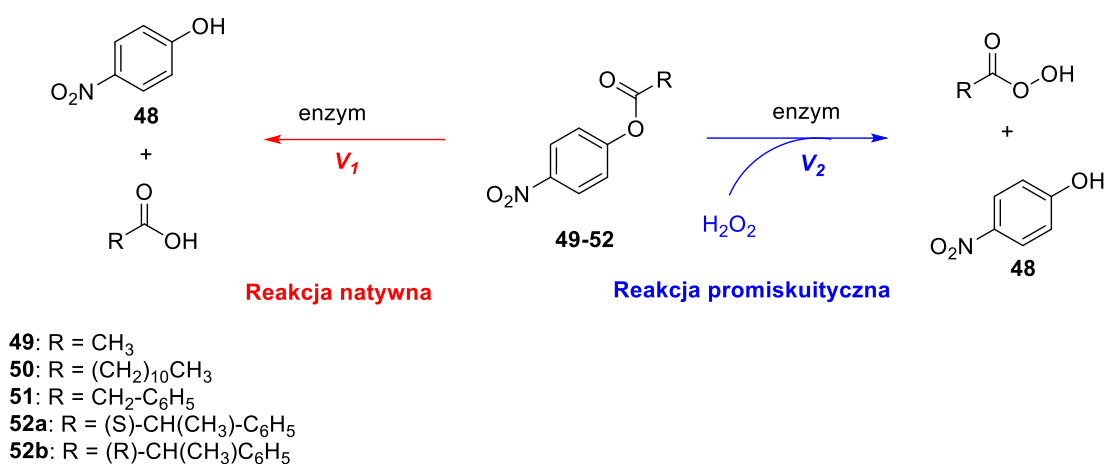
#### **5.4. Próbniki fluorescencyjne do oznaczania promiskuitycznej aktywności hydrolaz**

Nadkwasы stanowią ważną grupę reagentów wykorzystywanych w chemii organicznej oraz różnych gałęziach przemysłu. Z uwagi na ich wysoką reaktywność oraz silne właściwości utleniające poszukiwane są bezpieczne metody syntezy tej grupy związków. Synteza nadkwasów metodami klasycznymi wymaga zastosowania niebezpiecznych odczynników, dlatego wykorzystanie enzymów stanowi bardziej wydajną i użyteczną metodę szczególnie z punktu widzenia tzw. „zielonej chemii”. Ogólnie w obecności nadtlenu wodoru enzym wykorzystany jest do produkcji nadkwasów w reakcji perhydrolizy kwasów karboksylowych lub ich estrów. Ta transformacja chemiczna oparta jest na promiskuitycznej aktywności enzymu.

W toku badań opracowałam prosty test szacujący ilościowy udział promiskuitycznych właściwości hydrolaz bezpośrednio w reakcji perhydrolizy estrów *p*-nitrofenolu. Próbkę przygotowałam w wodnym buforze fosforanowym o pH 7.0 w 37 °C (warunki optymalne dla większości hydrolaz). Jako substrat modelowy zastosowałam octan *p*-nitrofenolu. Ogólnie ester jest hydrolizowany przez lipazę zgodnie z klasycznym mechanizmem do odpowiedniego kwasu karboksylowego oraz alkoholu. Ilość uwolnionego *p*-nitrofenolu można zmierzyć w czasie za pomocą spektroskopii *UV-Vis*. Przeprowadziłam dwa oddzielne eksperymenty w czasie: reakcję enzymatycznej hydrolizy estru *p*-nitrofenolu (**49-52**) oraz reakcję w tych samych warunkach z dodatkiem nadtlenu wodoru (Schemat 25). Nadtlenek wodoru może reagować jako nukleofil zgodnie z mechanizmem reakcji katalizowanej przez hydrolazy w reakcji perhydrolizy. Warto dodać, iż reakcję poprowadziłam w rozpuszczalniku wodnym, w którym stężenie wody pozostaje niezmiennione. Nadtlenek wodoru jest silniejszym nukleofilem, dlatego zaobserwowałam konkurencję między reakcją natywną oraz promiskuityczną, w której



uczestniczy ten sam enzym. W wyniku reakcji promiskuitycznej powstaje nadkwas oraz cząsteczka *p*-nitrofenolu (**48**) (Schemat 24).

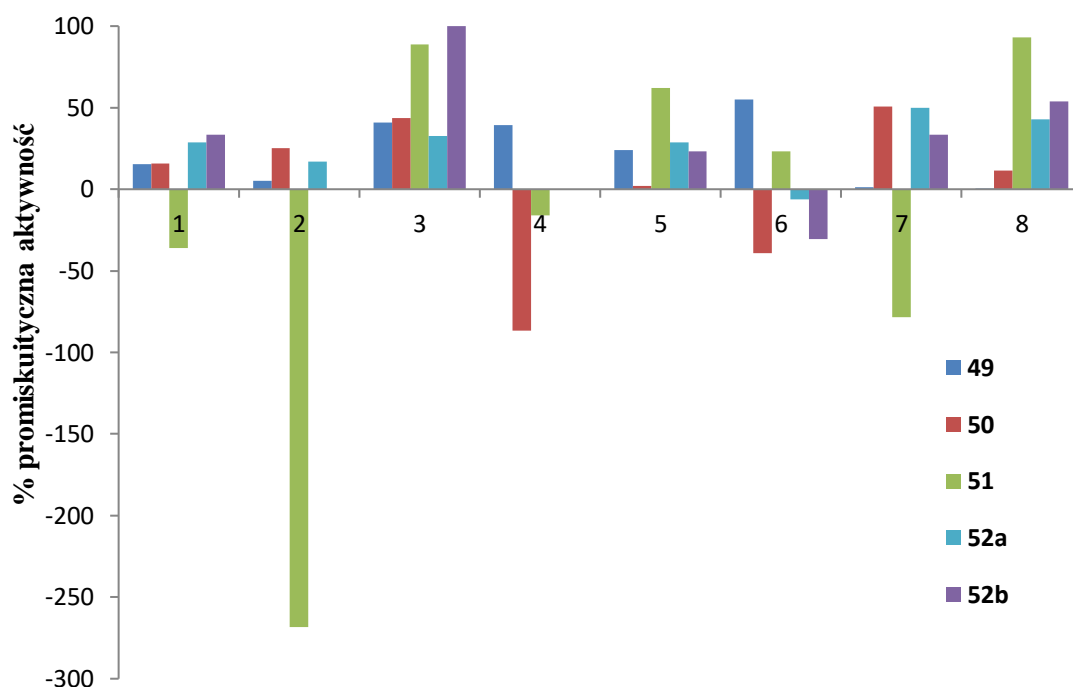


**Schemat 25.** Enzymatyczna reakcja hydrolizy i perhydrolizy estrów **49-52**.

Porównałam szybkość reakcji hydrolizy do szybkości reakcji po dodaniu nadtlenu wodoru. Na szybkość enzymatycznej reakcji perhydrolizy składa się szybkość reakcji natywnej ( $V_1$ ) i szybkość reakcji promiskuitycznej ( $V_2$ ). Porównanie dwóch wartości szybkości reakcji dostarcza informacji na temat wpływu nadtlenu wodoru na aktywność perhydrolityczną badanego enzymu. Jeśli wartość ( $V_2$ ) jest wyższa niż ( $V_1$ ), możemy zaobserwować promocję promiskuitycznej reakcji perhydrolizy. W przypadku niższego ( $V_2$ ) niż ( $V_1$ ) mamy do czynienia z hamowaniem aktywności enzymatycznej przez cząsteczki nadtlenu wodoru. Niezmieniona szybkość reakcji perhydrolizy ( $V_2$ ) w odniesieniu do reakcji natywnej ( $V_1$ ) sugeruje, że dany enzym nie bierze udziału w perhydrolizie estrów *p*-nitrofenolu.

Początkowo wyznaczyłam szybkości spontanicznej reakcji hydrolizy oraz perhydrolizy ( $V_{noE}$ ). Otrzymane wyniki wykazały niewielki wpływ spontanicznych reakcji hydrolizy i perhydrolizy na całkowity efekt kinetyczny reakcji. W dalszych eksperymentach, spośród czterdziestu testowanych enzymów, wybrałam kilka, które wykazywały aktywność wobec reakcji perhydrolizy. Zmierzyłam i porównałam kinetyczne szybkości hydrolizy ( $V_1$ ) i perhydrolizy ( $V_2$ ) octanu *p*-nitrofenolu (**49**), dodekanianu *p*-nitrofenolu (**50**) oraz fenylloctanu *p*-nitrofenolu (**51**). Wykorzystałam również chiralne estry (*S*)- (**52a**) oraz (*R*)-2-fenylpropionianu *p*-nitrofenolu (**52b**) do oznaczenia stereopreferencji enzymów w promiskuitycznej reakcji perhydrolizy. Poprzez porównanie szybkości reakcji hydrolizy oraz perhydrolizy dla każdego enancjomeru

w oddzielnych eksperymentach oszacowałam enancjoselektywności wybranych hydrolaz. Otrzymane wyniki wskazują na preferencję promiskuitycznej aktywności badanych enzymów w odniesieniu do perhydrolizy odpowiednich estrów *p*-nitrofenolu, ale dla każdego estru można zauważyć różny wkład promiskuitycznej aktywności enzymów (Wykres 1). Postanowiłam więc znormalizować wpływ właściwości pojedynczego enzymu w reakcji perhydrolizy w odniesieniu do wszystkich reakcji przebiegających w mieszaninie reakcyjnej, tj. reakcji spontanicznych oraz enzymatycznej hydrolizy. W tym celu obliczyłam procentowy udział właściwości promiskuitycznych w danej transformacji chemicznej z równania:  $\% \text{promiskuityzmu enzymów} = (V_2 - V_1) / V_2 \cdot 100\%$ .



**Wykres 1.** Wkład promiskuityzmu enzymów w reakcji estrów **49-52**. Enzym: 1- Novozym 435, 2- lipaza z *Candida cylindracea*, 3- lipaza z *Candida rugosa*, 4- lipaza z *Pseudomonas cepacia*, 5- lipaza z *Pseudomonas fluorescens*, 6- PPL, 7- lipaza z *Rhizopus niveus*, 8- Acylaza I.

Na wykresie przedstawiłam porównanie wkładu promiskuitycznych aktywności enzymów w reakcji perhydrolizy estrów *p*-nitrofenolu. W reakcji perhydrolizy octanu *p*-nitrofenolu (**49**) dla wszystkich zbadanych hydrolaz zaobserwowałam promowanie przebiegu reakcji promiskuitycznej w porównaniu do reakcji natywnej hydrolizy, co można tłumaczyć niewielkimi rozmiarami molekuly. Najwyższą aktywność perhydrolityczną w badanych warunkach reakcji wykazuje lipaza z *Candida rugosa* w reakcji z (*R*)-2-fenylopropionianem *p*-nitrofenolu (**52b**) oraz acylaza I w reakcji perhydrolizy

fenylooctanu *p*-nitrofenolu (**51**). W reakcji fenylooctanu *p*-nitrofenolu (**51**) z dodatkiem nadtlenku wodoru zaobserwowałam silną inhibicję aktywności natywnej lipazy z *Candida cylindracea*. Zgodnie z przewidywaniem reakcje z dwoma enancjomerycznie czystymi estrami kwasu 2-fenylpropionowego **52a** i **52b** wykazały enancjopreferencję badanych hydrolaz. Lipaza z *Candida cylindracea* wykazuje wyższą preferencję w kierunku perhydrolizy enancjomeru *S*-**52a**, podczas gdy lipaza z *Candida rugosa* w kierunku enancjomeru *R*-**52b**.

W dalszych badaniach sprawdziłam również wpływ stężenia nadtlenku wodoru na aktywność Novozymu 435. Zwiększanie stężenia dodawanego nadtlenku wodoru powodowało zwiększenie szybkości enzymatycznej perhydrolizy octanu *p*-nitrofenolu aż do 0.18 mM. Po przekroczeniu tej wartości zaobserwowałam spadek szybkości reakcji perhydrolizy oraz wzrost szybkości reakcji spontanicznej. Sprawdziłam również wpływ wysokich stężeń nadtlenku wodoru (3 – 232 mM) na przebieg reakcji. Przy wysokich stężeniach nadtlenku wodoru obserwowałam promowanie reakcji spontanicznej. Opracowany próbnik aktywności promiskuitycznej enzymów można wykorzystać jako doskonałą metodę detekcji nadtlenku wodoru. Zastosowanie enzymu umożliwia wykrycie nadtlenku wodoru w zakresie stężeń  $1-7.8 \times 10^{-3}$  ppm, natomiast wyższe stężenia mogą zostać oszacowane poprzez wydzielanie *p*-nitrofenolu w reakcji spontanicznej perhydrolizy estrów *p*-nitrofenolu.

Opracowana metodologia jest pierwszym przykładem szybkiego i wszechstronnego próbniaka ilościowej promiskuitycznej aktywności hydrolaz, który można wykorzystać w detekcji nadtlenku wodoru. Ponadto zaproponowana metodologia stanowi doskonały sposób bezpiecznej syntezy nadkwasów w warunkach wodnych.

## 6. Podsumowanie badań własnych

Fenomen promiskuityzmu enzymów jest podstawą badań niniejszej rozprawy doktorskiej. Najważniejsze osiągnięcia wynikające z wykonanych badań są następujące:

- a) opracowanie *E*-selektywnej metody syntezy  $\alpha,\beta$ -nienasyconych estrów kwasu cyjanooctowego w enzymatycznej reakcji kaskadowej, zmniejszającej do zera ilość produktów ubocznych,
- b) stwierdzenie, że enzymy wykazują selektywność substratową w multikomponentowej reakcji Ugięgo: aktywność promiskuityczna dotyczy tylko izocyjanoestrów posiadających do trzech atomów węgla pomiędzy grupami -COOR i -NC, ponieważ najprawdopodobniej tylko one mieszczą się w centrum aktywnym badanych hydrolaz,
- c) zaproponowanie nowej metody syntezy amidów posiadających dwa centra stereogeniczne w kaskadzie reakcji, w której jeden enzym katalizuje dwie stereoselektywne reakcje następujące po sobie,
- d) synteza enancjomerycznie wzbogaconych  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów w chemoenzymatycznej kaskadzie EKR, reakcji Passeriniego i kolejnej reakcji EKR,
- e) opracowanie metody pozwalającej oszacować ilościowy udział promiskuitycznej aktywności hydrolaz w reakcji perhydrolizy,
- f) opracowanie bezpiecznej metody syntezy nadkwasów katalizowanej przez hydrolazy w środowisku wodnym,
- g) opracowanie wszechstronnej metody detekcji nadtlenu wodoru wykorzystującej promiskuityczne właściwości hydrolaz.

W toku prowadzonych badań udowodniłam, iż lipazy posiadają nieznanne dotychczas właściwości katalityczne w reakcjach przebiegających jednoetapowo oraz w kaskadzie. W szczególności przeprowadzone badania umożliwiły selektywną syntezę związków o wysokiej wartości dodanej takich jak nadkwas oraz enancjomerycznie czyste diastereoizomery  $\alpha$ -acyloksykarboksamidów. Wykorzystanie promiskuitycznych właściwości hydrolaz umożliwiło opracowanie szeregu procesów przebiegających z wysoką produktywnością, którą trudno otrzymać w przypadku stosowania metod klasycznej syntezy chemicznej, m.in.:

- wysoka *E*-selektywność determinowana przez hydrolazy w kaskadowej reakcji Knoevenagla, podczas gdy metody chemiczne prowadzą do mieszaniny izomerów *E/Z*,

- słaba inhibicja substratem i produktem reakcji enzymatycznej,
- tolerancja dla szerokiego zakresu rozpuszczalników,
- brak zanieczyszczeń od katalizatora (ważne z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego oraz medycyny),

- brak produktów ubocznych, co znacznie upraszcza opracowanie metody oczyszczania związków, szczególnie istotne w przypadku reakcji multikomponentowych.

Ponadto, zdefiniowałam nowe właściwości wybranych hydrolaz wykazywanych w badanych reakcjach.

<b>Badana reakcja</b>	<b>Promiskuityzm katalityczny</b>	<b>Promiskuityzm substratowy</b>	<b>Promiskuityzm środowiskowy</b>	<b>Efekt współlistnienia promiskuitycznych właściwości</b>
<i>Kaskada estryfikacja /kondensacja Knoevenagla</i>	+	+	+	Wysoka <i>E</i> -selektywność otrzymanych produktów
<i>Enzymatyczna reakcja Ugiego</i>	+	+		Sterowanie przebiegiem reakcji pomiędzy reakcją U-3CR oraz U-4CR
<i>Kaskada EKR /reakcja Passeriniiego /EKR</i>	+	+	+	Dostęp do wszystkich stereoizomerów $\alpha$ -acyloksykarboksamidów z doskonałym nadmiarem enancjomerycznym
<i>Enzymatyczna perhydroliza</i>	+	+		Łagodna i wydajna metoda syntezy nadkwasów w środowisku wodnym

Klasyfikacja nie jest jednoznaczna, ponieważ jak wykazałam, hydrolazy łączą co najmniej dwa typu promiskuityzmu. Jeden enzym może stereoselektywnie katalizować reakcję dwóch różnych substratów. Zauważyłam również, że zmiana substratu czy warunków prowadzenia reakcji wpływa na nowe właściwości badanych enzymów. Poszczególne aktywności enzymów mogą współlistnieć ujawniając zupełnie nowe możliwości syntetyczne hydrolaz. Badania nad wykorzystaniem nieznanymi właściwościami katalitycznymi wybranych hydrolaz w syntezie organicznej zostały zakończone sukcesem, a realizacja postawionych celów umożliwiła poszerzenie zakresu reakcji, w których można stosować hydrolazy.

## **7. Publikacje oryginalne oraz oświadczenia od współautorów**





## Synthesis of (*E*)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid via promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/Knoevenagel reaction



Monika Wilk, Damian Trzepizur, Dominik Koszelewski, Anna Brodzka, Ryszard Ostaszewski\*

*Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland*

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Acetal  
Cascade reaction  
Esterification  
Knoevenagel condensation  
Lipase  
Multi-promiscuity

### ABSTRACT

A new enzymatic protocol based on lipase-catalyzed cascade toward (*E*)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters is presented. The proposed methodology consists of elementary organic processes starting from acetals and cyanoacetic acid leading to the formation of desired products in a cascade sequence. The combination of enzyme promiscuous abilities gives a new opportunity to synthesize complex molecules in the one-pot procedure. Results of studies on the influence of an enzyme type, solvent, and temperature on the cascade reaction course are reported. The presented methodology provides meaningful qualities such as significantly simplified process, excellent *E*-selectivity of obtained products and recycling of a biocatalyst.

\* Corresponding author.

E-mail address: [ryszard.ostaszewski@icho.edu.pl](mailto:ryszard.ostaszewski@icho.edu.pl) (R. Ostaszewski).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.041>

Received 18 January 2019; Received in revised form 18 February 2019; Accepted 19 February 2019

Available online 22 February 2019

0045-2068/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.





















## Supporting Information

### **Synthesis of (*E*)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid *via* promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/Knoevenagel reaction**

Monika Wilk, Damian Trzepizur, Dominik Koszelewski, Anna Brodzka and Ryszard Ostaszewski<sup>[a]\*</sup>

Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland

DOSTĘP OGRANICZONY









































































ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Bioorganic Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioorg](http://www.elsevier.com/locate/bioorg)

## The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reactions



Monika Wilk, Anna Brodzka, Dominik Koszelewski, Arleta Madej, Daniel Paprocki,  
Anna Źądło-Dobrowolska, Ryszard Ostaszewski\*

*Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland*

## ARTICLE INFO

*Keywords:*

Enzymatic catalysis  
Ugi reactions  
Isocyanoesters

## ABSTRACT

The impact of isocyanoesters structure on enzymatic three-component Ugi reactions course has been determined. The significant promiscuous ability of enzyme in Ugi-type reaction switching between four (U-4CR) and three (U-3CR) components reactions depending on the size of used isocyanoester. The application of short-chain cyanoesters up to isocyanopropionate leading to product of three component reaction exclusively while longer isocyanobutyrate gives only the product of four component reaction. The limitation of studied enzymatic Ugi reaction is a substrate selectivity of lipases.

\* Corresponding author.

*E-mail address:* [ryszard.ostaszewski@icho.edu.pl](mailto:ryszard.ostaszewski@icho.edu.pl) (R. Ostaszewski).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.042>

Received 18 January 2019; Received in revised form 18 February 2019; Accepted 19 February 2019

Available online 26 February 2019

0045-2068/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

















Supporting Information

**The influence of the isocyanoesters structure on the  
course of enzymatic Ugi reaction**

Monika Wilk, Anna Brodzka, Dominik Koszelewski, Arleta Madej, Daniel  
Paprocki, Anna Żądło-Dobrowolska, Ryszard Ostaszewski<sup>[a]\*</sup>

*Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland  
ryszard.ostaszewski@icho.edu.pl*

DOSTĘP OGRANICZONY























































# EurJOC

European Journal of Organic Chemistry

 **Chemistry  
Europe**

European Chemical  
Societies Publishing

## Accepted Article

**Title:** Model Studies on the Enzyme-Regulated Stereodivergent Cascade Passerini Reaction

**Authors:** Monika Wilk, Anna Brodzka, Dominik Koszelewski, Jan Samsonowicz-Górski, and Ryszard Ostaszewski

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

**To be cited as:** *Eur. J. Org. Chem.* 10.1002/ejoc.202100760

**Link to VoR:** <https://doi.org/10.1002/ejoc.202100760>

WILEY-VCH

## COMMUNICATION

# Model Studies on the Enzyme-Regulated Stereodivergent Cascade Passerini Reaction

Monika Wilk, Anna Brodzka, Dominik Koszelewski, Jan Samsonowicz-Górski, and Ryszard Ostaszewski\*<sup>[a]</sup>

[a] Monika Wilk, Dr. Anna Brodzka, Dr. Dominik Koszelewski, Jan Samsonowicz-Górski, Prof. Ryszard Ostaszewski  
Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences  
Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland  
www.icho.edu.pl  
E-mail: r.ostaszewski@icho.edu.pl

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

WILEY-VCH

Accepted Manuscript

COMMUNICATION

---

Accepted Manuscript



COMMUNICATION

---

Accepted Manuscript

WILEY-VCH

Accepted Manuscript

## Table of contents

1. **Materials and methods.**
2. **Synthesis and characterization of racemic vinyl esters 9-12.**
3. **Chemical synthesis and characterization of  $\alpha$ -acyloxy-carboxamides 15–18.**
4. **General screening procedures.**
5. **Chemical correlation and absolute configuration assignment of product 15.**

**Figure S1.** Resolution of racemic 2-methylhydrocinnamic acid.

**Figure S2.** Resolution of (*S*)-2-methyl-3-phenylpropionic acid isolated after the enzymatic kinetic resolution catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase.

**Figure S3.** Resolution of racemic diastereoisomer 15a.

**Figure S4.** Resolution of racemic diastereoisomer 15b.

**Figure S5.** Resolution of racemic diastereoisomer 15 obtained from enantiomerically pure 2-(*S*)-methyl-3-phenylpropionic acid.
6. **Chemical correlation and absolute configuration assignment of product 19.**

**Figure 6.** Resolution of racemic compound 19.

**Figure 7.** Resolution of compound 19 obtained from (*S*)-lactic acid.
7. **Scheme S1: detailed scheme of the chemoenzymatic diastereo- and enantiodivergent cascade reaction.**
8. **Table S1-S4 of enzymatic screening for product 15–18.**
9. **Table S5 of solvent screening for product 15.**
10. **Analytical data of racemic vinyl esters 9-12.**

**Figure S8.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 9.

**Figure S9.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 10.

**Figure S10.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 11.

**Figure S11.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 12.
11. **Analytical data of  $\alpha$ -acyloxy-carboxamides 15-18.**

**Figure S12.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 15.

**Figure S13.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 15a.

**Figure S14.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 15b.

**Figure S15.** HR-MS spectra of compound 15.

**Figure S16 –S25.** HPLC data of product 15 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by various enzymes.

**Figure S26.** HPLC data of product 15 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL isolated after 2 days.

**Figure S27.** HPLC data of product 15 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL isolated after 3 days.



**Figure S28.** HPLC data of product 15 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL isolated after 6 days.

**Figure S29.** HPLC data of product 15 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL with 2 equiv. of vinyl ester 9 isolated after 2 days.

**Figure S30.** HPLC data of product 15 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL with 3 equiv. of vinyl ester 9 isolated after 2 days.

**Figure S31.** HPLC data of product 15 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL in DCM + 0.1 % H<sub>2</sub>O isolated after 2 days.

**Figure S32.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 16.

**Figure S33.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 16a.

**Figure S34.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 16b.

**Figure S35.** HR-MS spectra of compound 16.

**Figure S36.** HPLC data of racemic compound 16.

**Figure S37.** HPLC data of product 16 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by Novozym 435.

**Figure S38.** HPLC data of product 16 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL.

**Figure S39.** HPLC data of product 16 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase.

**Figure S40.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 17.

**Figure S41.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 17a.

**Figure S42.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 17b.

**Figure S43.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 17.

**Figure S44.** HPLC data of racemic product 17.

**Figure S45.** HPLC data of product 17 after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase.

**Figure S46.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 18.

**Figure S47.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (112 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 18a.

**Figure S48.** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 18b.

**Figure S49.** HR-MS data of compound 18.

## 12. Analytical data of compound 19.

**Figure S50.** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 19.

**Figure S51.** HPLC data of product 19 after the enzymatic cascade reaction of ester 9 catalyzed by *Candida lipolytica* lipase.

**Figure S52.** HPLC data of product 19 after the enzymatic cascade reaction of ester 10 catalyzed by Lipozym.

## 13. Analytical data of compound 20.

**Figure S53.** <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 20.

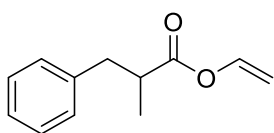
## 1. Materials and methods.

Unless otherwise noted, all reactions were carried out under a normal atmosphere. All reagents were purchased from commercial suppliers (Sigma Aldrich) and used without further purification. *p*-methoxyisocyanide was prepared following known procedures.<sup>1</sup> Experiment was monitored by TLC on silica gel Kieselgel 60 F254 aluminum sheets using UV light and potassium permanganate staining solutions followed by heating. Purification of reaction products was carried out by column chromatography using Merck silica gel 60/230–400 mesh and hexane and ethyl acetate at analytical grade. Diastereoisomeric products were separated by flash chromatography conducted on CombiFlash® Rf 200 using 4 g silica column and analytical grade hexane: ethyl acetate as eluents. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded on Varian 200, Varian 500, Bruker 400, and 500 MHz in CDCl<sub>3</sub> solution with TMS as an internal standard (0 ppm) and are reported in parts per million. All 2D NMR spectra were recorded at 298K on Bruker 500 MHz with a residual solvent signal as an internal standard. Peaks are reported as (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet or unresolved, br = broad signal, coupling constant(s) in Hz, integration). The HPLC analyses were performed on Chiralcel OD-H chiral column (Ø4.6 mm x 250 mm, from Daicel Chemical Ind., Ltd) equipped with a pre-column (Ø4mm×10 mm, 5µm) or Chiralcel OJ-H chiral column (Ø4.6 mm x 250 mm, from Daicel Chemical Ind., Ltd) equipped with a pre-column (Ø4mm×10 mm, 5µm) using an LC-6A Varian ProStar apparatus with UV Varian ProStar 330 detector and Chromatopac C-R6A analyzer. Optical rotations were measured in 10 cm cell of 1 mL capacity using Jasco DIP-360 polarimeter operating at 589 nm. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Synapt G2:SHD apparatus with a QqTOF analyzer. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Synapt G2:SHD apparatus with a QqTOF analyzer. Lipase from *Candida cylindracea* was purchased from Fluka. Immobilized lipase from *Candida antarctica* B (Novozym 435) from Novo Nordisk. The rest of the used enzymes were purchased at Sigma Aldrich.

## 2. Synthesis and characterization of racemic vinyl esters 9-12.

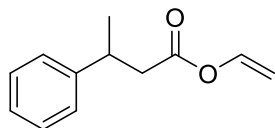
To a solution of the corresponding carboxylic acid (3.0 mmol) and vinyl ester (6.0 mmol) in anhydrous toluene (50 mL) under argon atmosphere was added Grubbs second-generation catalyst (5 mol %). The reaction mixture was heated in an oil bath at 80°C for 16 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and filtered over a Celite pad. The excess solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography.<sup>2</sup>

### (rac)- Vinyl 2-methylhydrocinnamate (9)



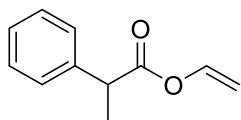
The corresponding compound was prepared following the general procedure using a racemic mixture of 2- methylhydrocinnamic acid and vinyl propanoate. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 8/2) afforded the product as a colorless oil (546 mg, 96 % yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.31-7.16 (m, 5H), 4.86 (dd, J = 14.0, 1.6 Hz, 1H), 4.56 (dd, J = 6.3, 1.6 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 13.3, 6.5 Hz, 1H), 2.85 – 2.75 (m, 1H), 2.71 (m, 1H), 1.20 (d, J = 6.9 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.1, 141.3, 138.9, 129.0, 128.4, 126.5, 97.7, 41.2, 39.4, 16.4. HR-MS (EI<sup>+</sup>): m/z calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup> 190.0994, found 190.0992.

### (rac)- Vinyl 3-phenylbutyrate (10)



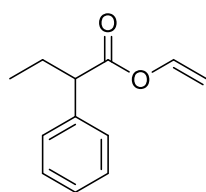
The corresponding compound was prepared following general procedure using racemic mixture of 3- phenylbutyric acid and vinyl propanoate. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 8/2) afforded the product as a colourless oil (500 mg, 88 % yield).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33 – 7.19 (m, 6H), 4.85 (dd,  $J = 14.0, 1.6$  Hz, 1H), 4.55 (dd,  $J = 6.3, 1.6$  Hz, 1H), 3.37 – 3.26 (m, 1H), 2.67 (qd,  $J = 15.5, 7.5$  Hz, 2H), 1.34 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.4, 145.3, 141.1, 128.6, 126.7, 97.7, 42.5, 36.2, 21.7. **HR-MS** ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$  [ $\text{M}$ ] $^+$  190.0994, found 190.0993.

**(rac)- Vinyl 2-phenylpropionate (11)**



The corresponding compound was prepared following general procedure using racemic mixture of 2-phenylpropionic acid and vinyl acetate. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 8/2) afforded the product as a light yellow oil (380 mg, 72 % yield).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.37 – 7.23 (m, 6H), 4.86 (ddd,  $J = 14.0, 1.6, 0.5$  Hz, 1H), 4.56 (dd,  $J = 6.3, 1.6$  Hz, 1H), 3.79 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 1.55 (dd,  $J = 7.2, 0.6$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.6, 141.4, 139.7, 128.7, 127.4, 97.9, 45.3, 18.4. **HR-MS** ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$  [ $\text{M}$ ] $^+$  176.0837, found 176.0839.

**(rac)- Vinyl 2-phenylbutyrate (12)**

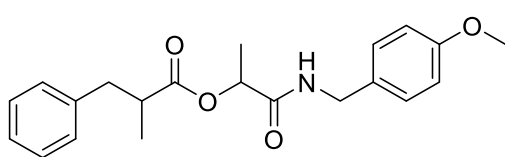


The corresponding compound was prepared following general procedure using racemic mixture of 2- phenylbutyric acid and vinyl propanoate. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 8/2) afforded the product as a colourless oil (400 mg, 70 % yield).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36 – 7.22 (m, 6H), 4.86 (dd,  $J = 14.0, 1.6$  Hz, 1H), 4.55 (dd,  $J = 6.3, 1.6$  Hz, 1H), 3.52 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 2.20 – 2.07 (m, 1H), 1.90 – 1.78 (m, 1H), 0.92 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.1, 141.4, 138.3, 128.7, 128.0, 127.4, 97.9, 53.2, 26.6, 12.1. **HR-MS** ( $\text{EI}^+$ ):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$  [ $\text{M}$ ] $^+$  190.0994, found 190.0995.

### 3. Chemical synthesis and characterization of $\alpha$ - acyloxycarboxamides 15 – 18

To a mixture of the corresponding carboxylic acid (1.0 mmol) and acetaldehyde (1.0 mmol) in dichloromethane (1 mL) *p*-methoxybenzylisocyanide (1.0 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature. After this time the crude mixture was washed with  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 10$  mL), and the resulting organic layers were dried with  $\text{MgSO}_4$ . Then the rest of the solvent was evaporated under reduced pressure and the product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/AcOEt).

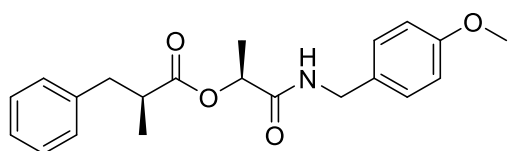
**(rac)- 1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-methyl-3-phenylpropionate (15)**



The corresponding compound was prepared following general procedure using racemic mixture of 2-methyl 3-phenylpropionic acid. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 7/3) afforded the product as a colourless oil (170 mg, 48 % yield).  $^1\text{H NMR}$  analysis of the crude mixture showed a *dr*. 1:1.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.26 – 7.08 (m, 15H), 6.86 (d,  $J = 8.5$  Hz, 4H), 5.99 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.17 (dq,  $J = 8.6, 6.8$  Hz, 2H), 4.37 – 4.27 (m,

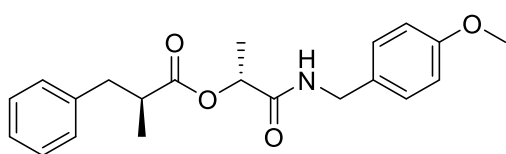
3H), 4.11 (dd,  $J = 14.7, 5.4$  Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 2.98 – 2.69 (m, 6H), 1.42 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.35 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.20 (dd,  $J = 12.5, 6.7$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.7, 170.1, 159.0, 138.9, 130.0, 129.0 – 128.7 (m), 128.5, 126.6, 114.1, 70.6, 70.4, 55.3, 42.5, 41.6, 41.4, 41.2, 40.1, 39.7, 17.7, 17.3, 17.1. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$   $[\text{Na}]^+$  378.1681, found 378.1663; **HPLC**: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C  $\lambda = 220$  nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_{R1} = 39.9$ ,  $t_{R2} = 44.9$ ,  $t_{R3} = 79.5$ ,  $t_{R4} = 100.5$ .

***syn*- 1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-methyl-3-phenylpropionate (15a)**



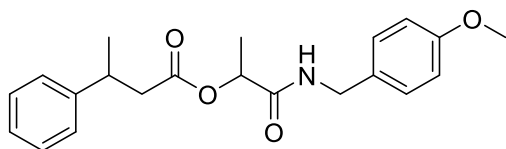
The diastereomeric mixture of compound **15** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate), afforded product *-syn-* **15a** as a colourless oil.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.23 – 7.08 (m, 7H), 6.86 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 5.73 (s, 1H), 5.18 (q,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.34 (dd,  $J = 14.7, 6.4$  Hz, 1H), 4.11 (dd,  $J = 14.7, 5.4$  Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.91 (dd,  $J = 13.1, 8.6$  Hz, 1H), 2.81 (dt,  $J = 8.1, 6.8$  Hz, 1H), 2.73 (dd,  $J = 13.1, 6.2$  Hz, 1H), 1.43 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.22 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.7, 170.0, 159.0, 139.0, 130.0, 128.8, 128.5, 126.6, 114.0, 70.4, 55.3, 42.5, 41.7, 40.1, 17.8, 17.3. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$   $[\text{Na}]^+$  378.1681, found 378.1660; **HPLC**: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C  $\lambda = 220$  nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_R$  (*R,R*) = 38.0,  $t_R$  (*S,S*) = 79.8.

***anti*- 1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-methyl-3-phenylpropionate (15b)**



The diastereomeric mixture of compound **15** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate = X/X), afforded product *-syn-* **15b** as a colourless oil.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.27 – 7.10 (m, 15H), 6.86 (d,  $J = 8.5$  Hz, 4H), 5.99 (s, 2H), 5.16 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 4.30 (d,  $J = 5.8$  Hz, 4H), 3.80 (s, 6H), 2.94 (dd,  $J = 13.4, 8.1$  Hz, 2H), 2.87 – 2.79 (m, 2H), 2.74 (dd,  $J = 13.4, 6.7$  Hz, 2H), 1.35 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.19 (d,  $J = 6.9$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.5, 170.2, 159.1, 138.9, 129.9, 128.8, 128.5, 126.5, 114.1, 70.5, 55.3, 42.6, 41.2, 39.7, 17.7, 17.1. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$   $[\text{Na}]^+$  378.1681, found 378.1663; **HPLC**: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 1.0 mL/min., 20 °C  $\lambda = 220$  nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_R$  (*R,S*) = 43.3,  $t_R$  (*S, R*) = 103.5.

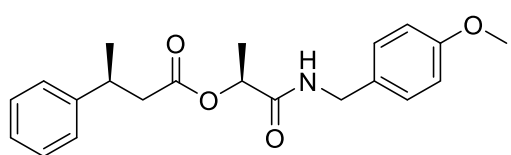
**(rac)- 1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 3-methyl-3-phenylpropionate (16)**



The corresponding compound was prepared following general procedure using racemic mixture of 3-phenylbutyric acid. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 7/3) afforded the product as a colourless oil (83 mg, 23 % yield).  $^1\text{H NMR}$  analysis of the crude mixture showed a d.r. 1:1.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.27 – 7.09 (m, 16H), 6.86 (d,  $J = 8.7$  Hz, 4H), 5.85 (d,  $J = 35.1$  Hz, 2H), 5.15 (qd,  $J = 6.8, 2.3$  Hz, 2H), 4.31 (dd,  $J = 14.7, 6.3$  Hz, 1H), 4.24 (dt,  $J = 13.1, 6.6$  Hz, 2H), 4.15 (dd,  $J = 14.6, 5.5$  Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.26 (dt,  $J = 22.6, 7.7$  Hz, 2H), 2.74 – 2.62 (m, 4H), 1.40 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.35 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.29 (dd,  $J = 9.4, 7.0$  Hz, 7H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.7, 170.1, 159.1, 130.0, 128.8, 126.7, 114.1, 70.5, 55.3, 43.0, 42.7 – 42.4, 37.0, 36.5, 22.4, 22.2, 17.8. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$   $[\text{Na}]^+$

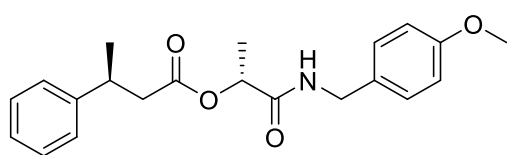
378.1681, found 378.1671; **HPLC**: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C  $\lambda$ = 220 nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_{R1}$  = 40.5,  $t_{R2}$  = 49.7,  $t_{R3}$  = 82.2,  $t_{R4}$  = 113.4.

***syn*- 1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 3-methyl-3-phenylpropionate (16a)**



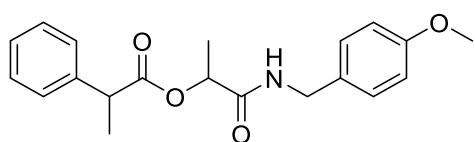
The diastereomeric mixture of compound **15** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate), afforded product *-syn-* **16a** as a colourless oil. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.25 – 7.11 (m, 9H), 6.87 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 5.78 (s, 1H), 5.16 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 4.32 (dd,  $J$  = 14.7, 6.2 Hz, 1H), 4.15 (dd,  $J$  = 14.7, 5.6 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.24 (dd,  $J$  = 15.1, 7.3 Hz, 1H), 2.73 – 2.59 (m, 2H), 1.40 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 1.30 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.9, 170.0, 159.0, 145.0, 130.0, 128.8, 126.7, 114.0, 70.5, 55.3, 43.0, 42.5, 37.0, 30.9, 22.2, 17.8. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> [Na]<sup>+</sup> 378.1681, found 378.1680.

***anti*- 1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 3-methyl-3-phenylpropionate (16b)**



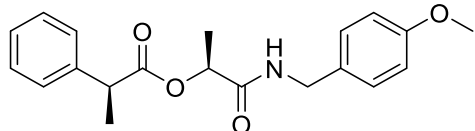
The diastereomeric mixture of compound **15** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate = X/X), afforded product *-anti-* **16b** as a colourless oil. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.20 – 7.02 (m, 8H), 6.83 – 6.76 (m, 2H), 5.81 (s, 1H), 5.08 (dt,  $J$  = 9.6, 5.5 Hz, 1H), 4.27 – 4.05 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.18 (dt,  $J$  = 11.7, 7.2 Hz, 1H), 2.67 – 2.54 (m, 2H), 1.28 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 1.21 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  170.62 (s), 170.1, 159.0, 145.1, 130.0, 128.7, 126.7, 114.0, 70.6, 55.3, 42.5, 36.5, 22.4, 17.8. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> [Na]<sup>+</sup> 378.1681, found 378.1671.

**(*rac*)-1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-methyl phenylpropionate (17)**



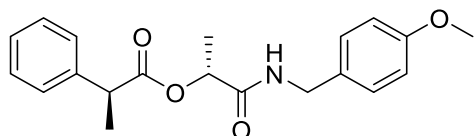
The corresponding compound was prepared following general procedure using racemic mixture of 2-phenylpropionic acid. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 7/3) afforded the product as a colourless oil (167 mg, 49 % yield). **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.34 – 7.05 (m, 29H), 6.95 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 4H), 6.84 (dd,  $J$  = 14.5, 8.7 Hz, 9H), 5.96 (s, 2H), 5.55 (s, 2H), 5.28 (q,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 5.21 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 4.26 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 4H), 4.12 (ddd,  $J$  = 14.3, 6.6, 2.3 Hz, 3H), 4.01 (dd,  $J$  = 14.5, 5.6 Hz, 2H), 3.80 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 12H), 3.79 – 3.66 (m, 6H), 1.54 – 1.44 (m, 19H), 1.39 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 6H). **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.8, 172.5, 170.1, 159.0, 140.1, 139.5, 129.8, 128.9, 127.4, 114.0, 70.7, 70.3, 55.3, 45.7, 45.4, 42.6, 42.4, 17.7. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub> [Na]<sup>+</sup> 364.1525, found 364.1531; **HPLC**: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 1.0 mL/min., 20 °C  $\lambda$ = 254 nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_{R1}$  = 21.2,  $t_{R2}$  = 26.9,  $t_{R3}$  = 30.0,  $t_{R4}$  = 39.4.

**(*syn*)-1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-methyl phenylpropionate (17a)**



The diastereomeric mixture of compound **17** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate), afforded product *-syn-* **17a** as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.36 – 7.02 (m, 7H), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.55 (s, 1H), 5.27 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 4.07 (dd, J = 29.2, 5.8 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.79 – 3.68 (m, 2H), 1.47 (dd, J = 14.6, 7.0 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.8, 172.5, 170.1, 159.0, 140.1, 139.5, 129.8, 128.9, 127.4, 114.0, 70.7, 70.3, 55.3, 45.7, 42.6, 42.4, 17.7. HR-MS (ESI): m/z calcd for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub> [Na]<sup>+</sup> 364.1524, found 364.1528.

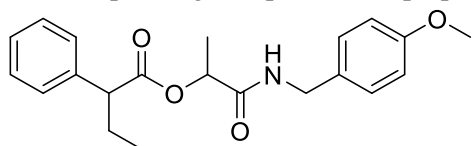
**(anti)-1-[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-methyl phenylpropionate (17b)**



The diastereomeric mixture of compound **17** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate), afforded product *-anti-* **17a** as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.24 (d, J = 4.5 Hz, 5H), 7.09 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.03 (s, 1H), 5.21 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 4.25 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.79 – 3.73 (m, 2H), 1.52 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.39 (d, J = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.8, 170.1, 159.1, 139.5, 129.8, 129.0, 128.8, 127.4, 127.3, 114.1, 70.68, 55.3, 45.7, 42.6, 17.8, 17.6. HR-MS (ESI): m/z calcd for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub> [Na]<sup>+</sup> 364.1525, found 364.1530.

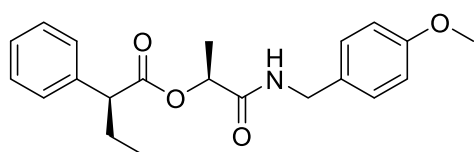
**(rac)-1-[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-ethyl phenylpropionate (18)**

The corresponding compound was prepared following general procedure using racemic mixture of 2-phenylbutyric acid. Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 7/3) afforded the product as a colourless oil (150 mg, 42 % yield).



Purification by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 7/3) afforded the product as a colourless oil (150 mg, 42 % yield). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.32 – 7.16 (m, 10H), 7.08 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.83 (dd, J = 14.4, 8.7 Hz, 4H), 5.98 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 5.31 – 5.19 (m, 2H), 4.25 (dd, J = 5.7, 2.2 Hz, 2H), 4.14 (dd, J = 14.6, 6.1 Hz, 1H), 4.00 (dd, J = 14.6, 5.6 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.47 (dt, J = 18.0, 7.7 Hz, 2H), 2.11 (ddd, J = 13.8, 7.0, 2.4 Hz, 2H), 1.91 – 1.73 (m, 2H), 1.46 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.40 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.88 (dd, J = 15.8, 7.5 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.2, 127.1, 170.1, 159.0, 138.6, 138.5, 130.0, 129.0, 128.8, 128.6, 128.0, 127.7, 127.5, 113.9, 70.2, 55.3, 53.1, 52.7, 436.0, 42.4, 26.5, 25.5, 17.9, 12.0, 11.9. HR-MS (ESI): m/z calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> [Na]<sup>+</sup> 378.1681, found 378.1683; HPLC: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C λ = 220 nm, retention time of racemic compound (in min): t<sub>R1</sub> = 40.5, t<sub>R2</sub> = 49.7, t<sub>R3</sub> = 82.2, t<sub>R4</sub> = 113.4.

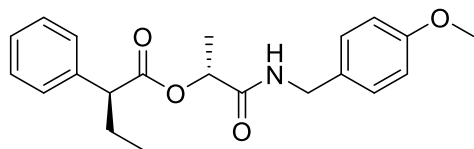
**(syn)-1-[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-ethyl phenylpropionate (18a)**



The diastereomeric mixture of compound **18** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate), afforded product *-syn-* **18a** as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.28 – 6.99 (m, 10H), 6.88 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.78 – 6.71 (m, 2H), 5.49 (s, 1H), 5.22 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 4.07 (dd, J = 14.6, 6.1 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 14.5, 5.7 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.38 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 2.11 – 2.00 (m, 2H), 1.73 (dt, J = 13.9, 7.3 Hz, 2H), 1.39 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.80 (t, J = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR

(126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.1, 170.1, 159.0, 138.6, 129.8, 128.8, 128.0, 127.6, 127.5, 127.4, 114.0, 70.1, 55.3, 53.2, 42.4, 25.5, 17.9, 11.9. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> [Na]<sup>+</sup> 378.1681, found 378.1682.

**(anti)-1[(4-methoxybenzyl)amino]-1-oxopropan-2-yl 2-ethyl phenylpropionate (18b)**



The diastereomeric mixture of compound **18** separated by flash chromatography (hexane/ethyl acetate), afforded product *-anti-* **18b** as a colourless oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.26 – 7.11 (m, 6H), 7.02 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 6.79 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 5.90 (s, 1H), 5.16 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 4.23 – 4.13 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.43 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 2.08 – 1.98 (m, 1H), 1.83 – 1.72 (m, 1H), 1.33 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H), 0.82 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.2, 170.1, 159.1, 138.1, 129.8, 129.1, 128.7, 128.0, 127.7, 127.5, 114.1, 70.5, 55.3, 53.6, 42.6, 25.9, 17.6, 12.1. **HR-MS** (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> [Na]<sup>+</sup> 378.1681, found 378.1683.

#### 4. General screening procedure

**Enzyme screening in phosphate buffer:** a corresponding vinyl ester (respectively: 0.5 equiv. = 0.25 mmol, 1.0 equiv. = 0.5 mmol, 2 equiv. = 1.0 mmol or 3 equiv. = 1.5 mmol) was added to the suspension of an enzyme (100 mg) in 10 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), followed by addition of *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol). The mixture was stirred for 2, 3, or 6 days at room temperature. The crude mixture was extracted with ethyl acetate, the organic layer was separated and dried with MgSO<sub>4</sub>. Then the solvent was evaporated in vacuo. The product was purified by column chromatography (silica gel, hexane: ethyl acetate) and analyzed by HPLC.

**Screening Procedure in Organic Solvents:** a vinyl ester (0.5 mmol) was added to the suspension of a PPL (100 mg) in 10 mL of organic solvent, followed by the addition of *p*-methoxybenzylisocyanide (0.5 mmol). The mixture was stirred for 4 days at room temperature. The enzyme was then filtered off on the funnel filled with Celite and MgSO<sub>4</sub>. Then the solvent was evaporated in a vacuum. The product was purified by column chromatography (silica gel, hexane: ethyl acetate) and analyzed by HPLC.

**Screening Procedure according to previously assigned condition<sup>3</sup>:** a vinyl ester (2 equiv., 1.0 mmol) was added to the suspension of PPL (100 mg) in 10 mL of dichloromethane and water (0.1 % v/v). The reaction was stirred for 2 days at room temperature. After this time, the enzyme and water were filtered off with a funnel with Celite and MgSO<sub>4</sub>. Then the solvent was evaporated in a vacuum. The product was purified by column chromatography (silica gel, hexane: ethyl acetate) and analyzed by HPLC.

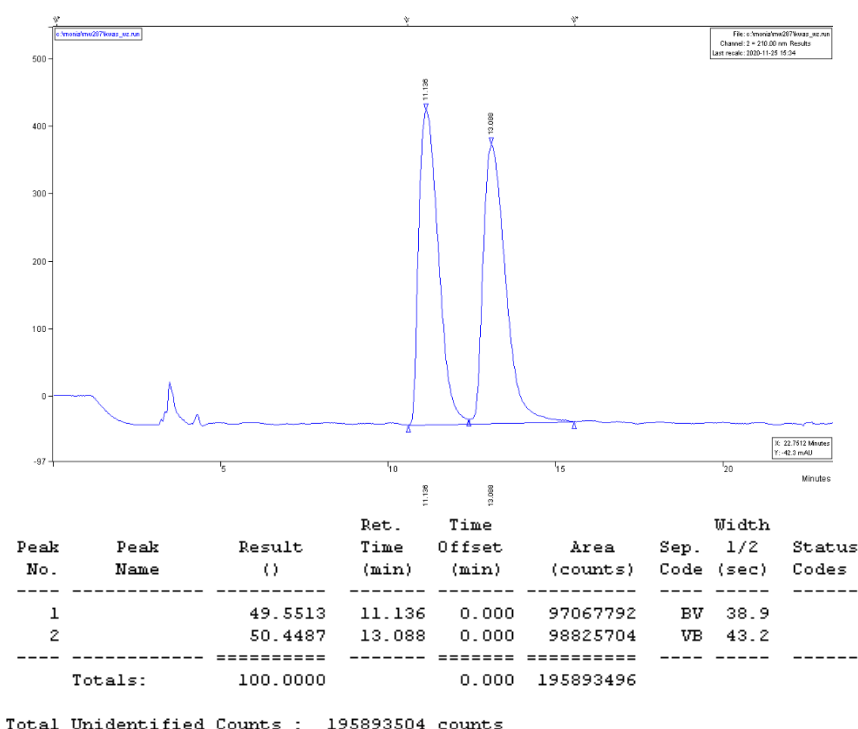
#### 5. Chemical correlation and absolute configuration assignment of product 15.

**Determination of absolute configuration of compound 15:** the direct determination of the configuration of **15** was not possible using HPLC methods. Thus, we performed the enzymatic kinetic resolution of ethyl 2-methylhydrocinnamate **20**. The retention time of 2-methylhydrocinnamic acid was correlated with the literature data.<sup>4</sup> **HPLC:** Chiralcel OJ-H; hexane/isopropanol (97:3), 1.0 mL/min., 25 °C  $\lambda$  = 210 nm, retention time of racemic acid (in min):  $t_R R$  = 11.1,  $t_R S$  = 13.1. The configuration was assigned according to the literature data. The obtained enantiomerically pure (*S*)-2-

methylhydrocinnamic acid was applied to the chemical Passerini reaction. On the other side, the enantiomerically pure (*S*)-lactic acid was correlated with the corresponding  $\alpha$ -hydroxy carboxamide **19**. The configuration of corresponding stereoisomeric products was confirmed with COSY and NOESY NMR experiments.

**General procedure for the synthesis of racemic ethyl 2-methyl- 3-phenylpropionate (20):** the mixture of racemic 2-methylhydrocinnamic acid (1 eq., 3.0 mmol) in 10 mL of ethanol, 0.5 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added dropwise. The reaction was reflux for 16 h. After that time the solvent was evaporated and a crude mixture was washed dissolved in dichloromethane and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>. (2x10 mL). The organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated and the product was purified by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 8/2) affording light yellow liquid with 85 % yield (490 mg, 2.55 mmol). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.41 – 7.09 (m, 5H), 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.03 (dt, J = 10.8, 5.4 Hz, 1H), 2.70 (ddd, J = 13.0, 12.5, 7.3 Hz, 2H), 1.31 – 1.08 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  176.3, 139.7, 77.9, 77.3, 76.7, 60.5, 41.7, 40.0, 17.0, 14.4. (Known compound)<sup>5</sup>

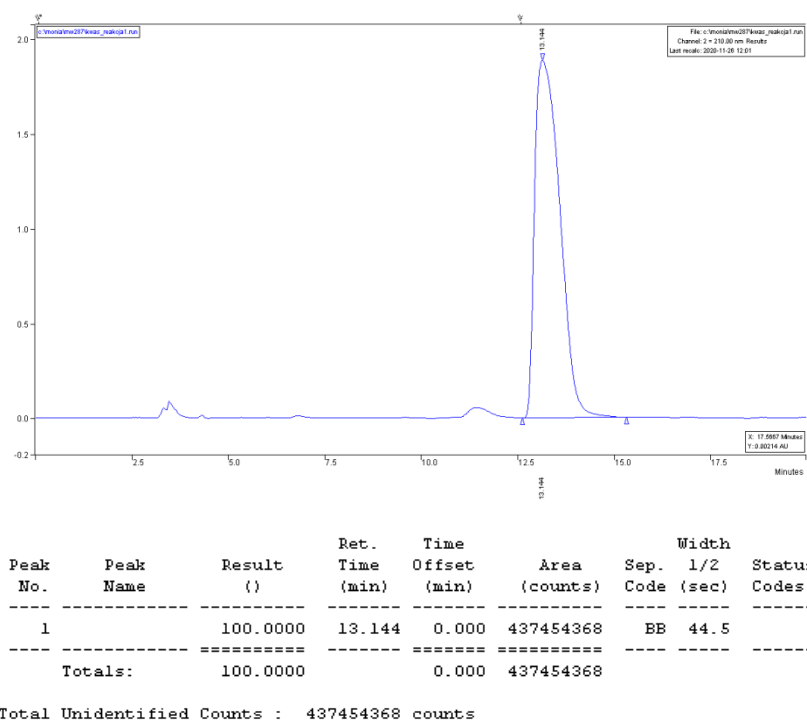
**Enzymatic kinetic resolution of compound 20:** An ester (1 equiv., 1.33 mmol) was added to the suspension of *Pseudomonas fluorescens* lipase (50 mg) in 20 mL of the phosphate buffer pH 7.5. The reaction was stirred at room temperature for 20 h. The enzyme was then filtered off and washed with ethyl acetate (2x10 mL). Then the resulting aqueous layer was acidified with HCl and washed with ethyl acetate (2x10 mL). The organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and the product was analyzed with HPLC (hexane/*i*-propanol, 97/3). The <sup>1</sup>H NMR data were in accordance with racemate. **HPLC:** Chiralcel OJ-H; hexane/isopropanol (97:30), 1.0 mL/min., 25 °C  $\lambda$  = 210 nm, retention time compound (in min):  $t_R$  *S* = 13.1;  $[\alpha]_D$  = -42.5 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).



**Figure S1:** Resolution of racemic 2-methylhydrocinnamic acid.

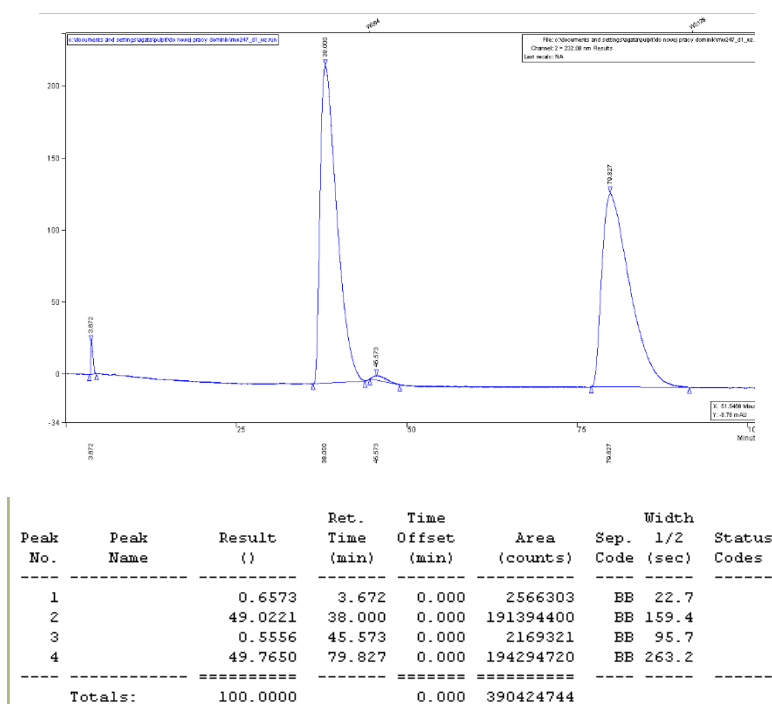
**Analytical Method:** 1.5 mL samples dissolved in 2-propanol were analyzed by HPLC, using a Varian ProStar instrument coupled to a UV-Vis detector. Chiralcel OJ-H; hexane/isopropanol (97:3), flow, 1.0 mL/min, 25 °C  $\lambda$  = 210 nm, retention time of racemic acid (in min):  $t_R$  *R* = 11.1,  $t_R$  *S* = 13.1.



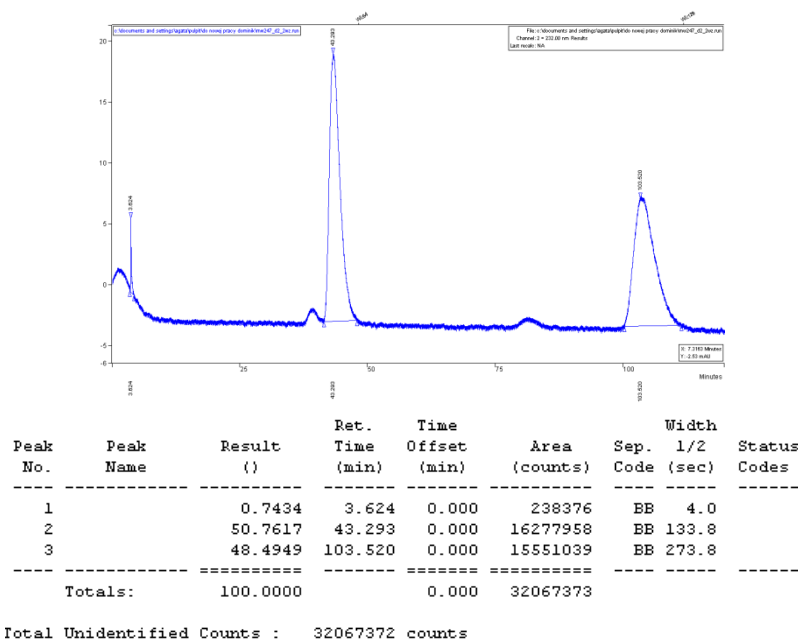


**Figure S2:** Resolution of (*S*)-2-methyl-3-phenylpropionic acid isolated after the enzymatic kinetic resolution catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase.

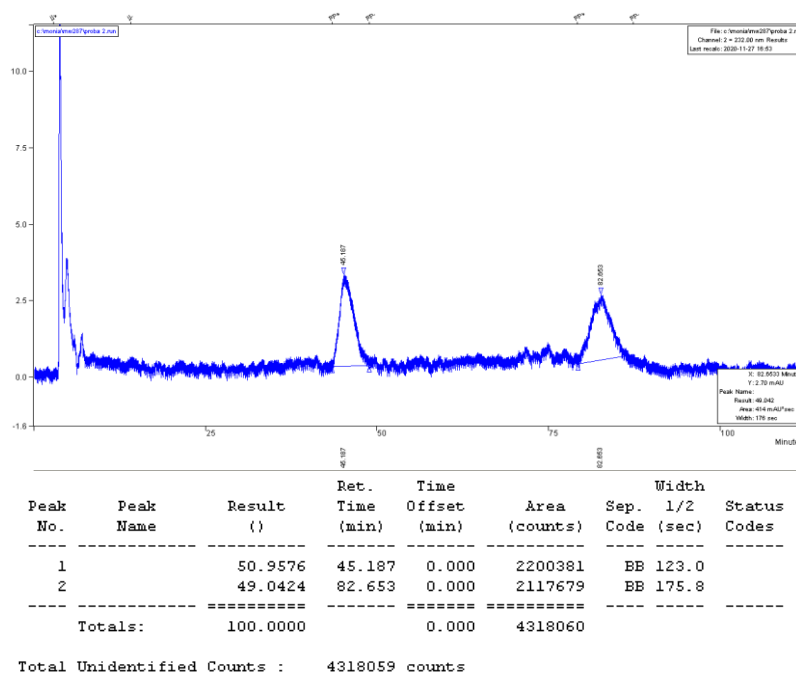
**The Passerini reaction with the (*S*)-2-methyl-3-phenylpropionic acid:** to a mixture of (*S*)-2-methyl-3-phenylpropionic acid (1 equiv., 0.06 mmol) and acetaldehyde (1 equiv., 0.06 mmol) in 0.5 mL of DCM, *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.06) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature. The formation of  $\alpha$ -acyloxycarboxamide was monitored by TLC chromatography (hexane/ethyl acetate = 7/3). Then the crude mixture was analysed with HPLC (HPLC: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C  $\lambda$  = 220 nm, retention time of racemic compound **15** (in min):  $t_{R1}$  = 45.1;  $t_{R2}$  = 82.7.



**Figure S3** Resolution of racemic diastereoisomer **15a**.



**Figure S4** Resolution of racemic diastereoisomer **15b**.

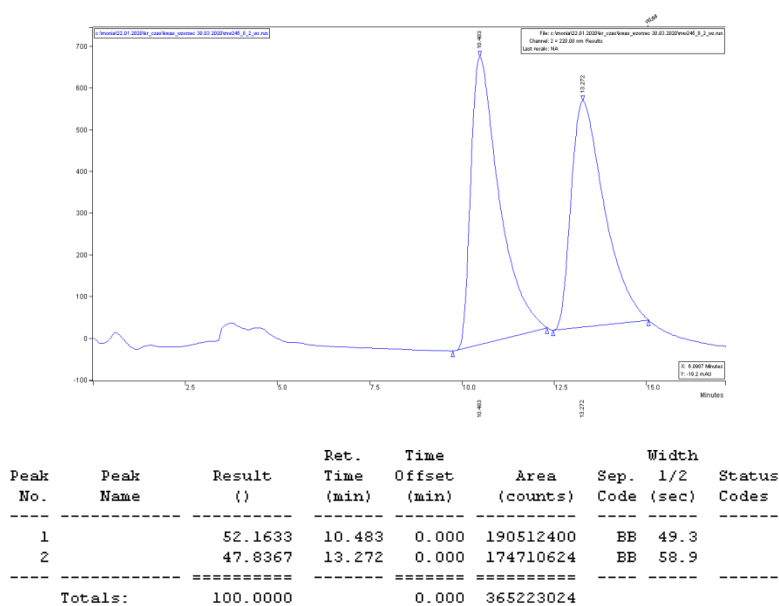


**Figure S5** Resolution of racemic diastereoisomer **15** obtained from enantiomerically pure 2-(*S*)-methyl-3-phenylpropionic acid.

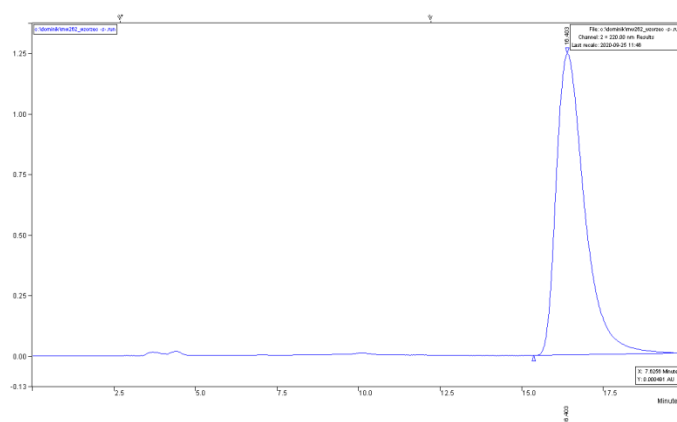
**Analytical Method:** 1.5 mL samples dissolved in 2-propanol were analyzed by HPLC, using a Varian ProStar instrument coupled to a UV-Vis detector. Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C  $\lambda = 220$  nm, retention time of racemic compound **15** (in min):  $t_{R1} = 38.0$ ,  $t_{R2} = 43.3$ ,  $t_{R3} = 79.8$ ,  $t_{R4} = 103.5$ .

## 6. Chemical correlation and absolute configuration assignment of product **19**.

**General procedure for synthesis of enantiopure 2(*S*)-hydroxy-*N*-(4-methoxybenzyl)propanamide (19):** to the mixture of *S*-lactic acid (1 equiv., 1.11 mmol) and *p*-methoxybenzylamine (1.30 equiv., 1.44 mmol) in an anhydrous dichloromethane (20 mL), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (1.30 equiv., 1.44 mmol) and *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide (EDC) (1.30 equiv., 1.44 mmol) were added. The mixture was stirred overnight at room temperature. Then reaction was filtered with funnel, washed with 1 M HCl (10 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) and dried with MgSO<sub>4</sub>. The solvent was evaporated and product was purified by column chromatography affording white solid with 67 % yield (160 mg, 0.76 mmol). m.p. 75 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.18 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 3H), 4.36 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 4.24 (q, J = 6.8 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.12 (s, 1H), 3.06 (s, 1H), 1.43 (d, J = 6.8 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.3, 159.1, 130.0, 129.1, 114.3, 68.4, 55.3, 42.7, 21.3. The <sup>1</sup>H NMR data were in accordance with racemate. **HR-MS** (EI+): [M +] m/z calcd for C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>: 209.1052, found: 209.1056; **HPLC**: Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (80:20), 1.0 mL/min., 20 °C λ = 220 nm, retention time of racemic compound (in min): t<sub>R</sub> S = 16.4; [α]<sub>D</sub> = -47.5 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).



**Figure S6** Resolution of racemic compound 19.



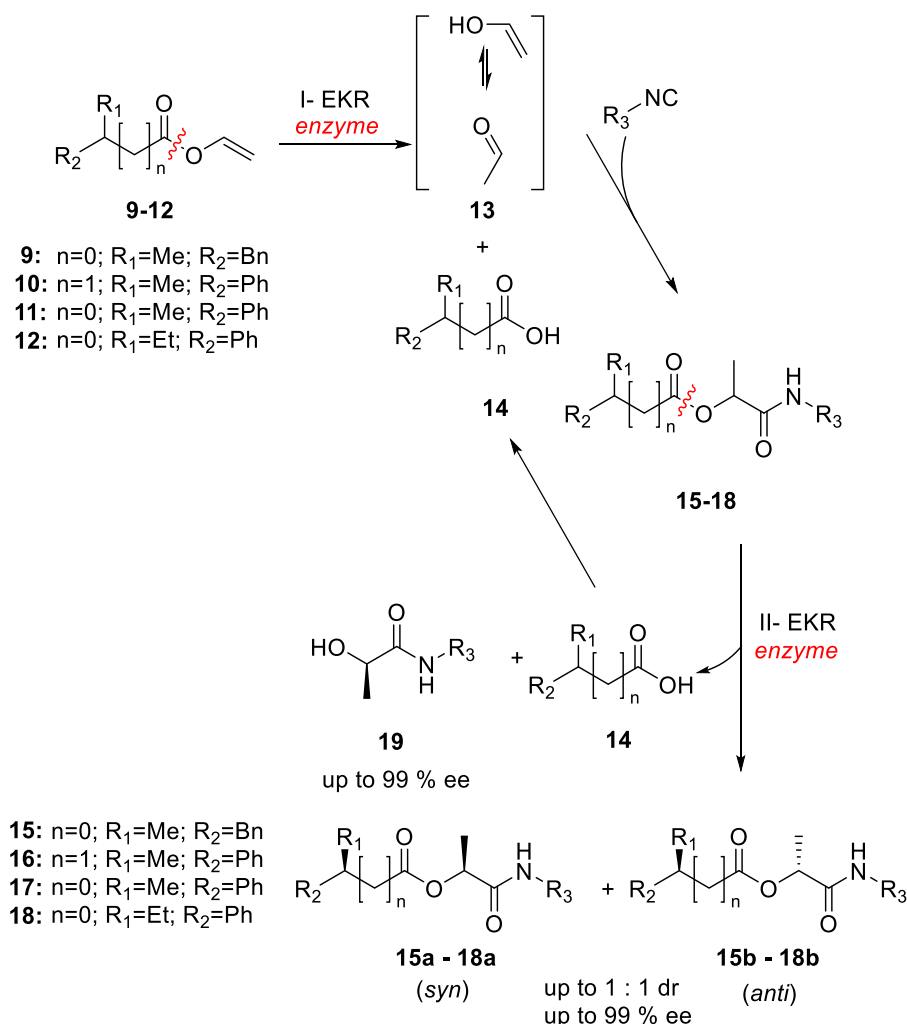
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		100.0000	16.403	0.000	386234176	BB	53.9	
Totals:		100.0000		0.000	386234176			

Total Unidentified Counts : 386234176 counts

**Figure S7** Resolution of compound **19** obtained from (*S*)-lactic acid.

**Analytical Method:** 1.5 mL samples dissolved in 2-propanol were analyzed by HPLC, using a Varian ProStar instrument coupled to a *UV-Vis* detector. Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (80:20), 1.0 mL/min., 20 °C  $\lambda$ = 220 nm, retention time of racemic compound **19** (in min):  $t_R$  = 10.5;  $t_R$  = 13.3.

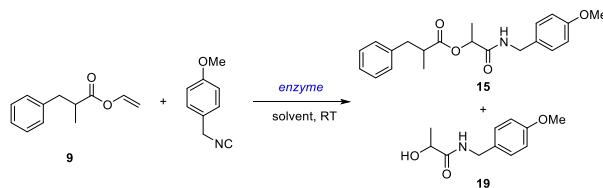
**7. Scheme S1: detailed scheme of the chemoenzymatic diastereo- and enantiodivergent cascade reaction.**



**Scheme S1.** Chemoenzymatic diastereo- and enantiodivergent preparation of lactate derivatives via cascade I- EKR / Passerini / II- EKR reaction.

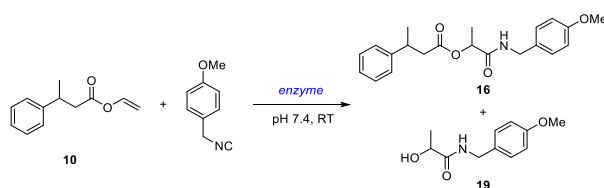
## 8. Table of enzymatic screening for product 15–18.

Table S1. The evaluation of reaction conditions for the compound 15.



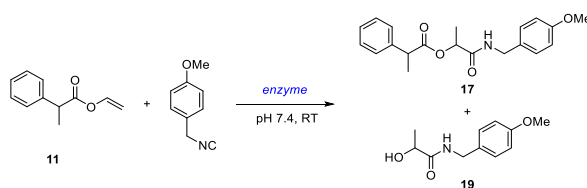
Enzyme	Conv. [%] <sup>b</sup>	15 Stereoisomer [%] <sup>c</sup>				19 Yield [%] <sup>d</sup>	19 ee [%]	
		RR	SS	SR	RS			
1 <sup>a</sup>	none	0		nd		0	nd	
2 <sup>a</sup>	BSA	0		nd		0	nd	
3 <sup>a</sup>	CCL	58	7	35	23	35	85	8
4 <sup>a</sup>	PFL	78	27	36	3	34	76	14
5 <sup>a</sup>	N435	46	20	28	27	25	70	86
6 <sup>a</sup>	MML	63	26	31	19	24	69	33
7 <sup>a</sup>	PCL	34	20	32	7	41	89	9
8 <sup>a</sup>	CLL	30	18	35	30	17	45	>99
9 <sup>a</sup>	WGL	0		nd		0	0	nd
10 <sup>a</sup>	RAL	52	24	27	23	26	53	40
11 <sup>a</sup>	CRL	43	24	25	25	26	63	14
12 <sup>a</sup>	LIP	44	16	34	17	33	60	8
13 <sup>a</sup>	MJL	53	25	33	12	30	80	15
14 <sup>a</sup>	RNL	40	24	25	26	25	75	rac
15 <sup>a</sup>	PPL	20	9	26	53	12	70	20
16 <sup>e</sup>	PPL	30	18	16	48	17	74	25
17 <sup>f</sup>	PPL	57	25	3	39	33	85	6
18 <sup>g</sup>	PPL	36	14	32	0	54	87	38
19 <sup>h</sup>	PPL	26	14	27	3	56	82	35
20 <sup>i</sup>	PPL	18	26	25	24	25	75	rac
21 <sup>gj</sup>	PPL	40	3	50	46	2	52	92

<sup>a</sup> Reaction conditions: to the mixture of enzyme (100 mg) in phosphate buffer (10 mL, pH 7.4, 0.1 M) vinyl ester **9** (1 equiv., 0.5 mmol) and *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 2 days. After this time the products **15** and **19** were isolated by column chromatography and analyzed by HPLC. <sup>b</sup> refers to the Passerini product **15** calculated as:  $\frac{n_{15} + n_{19}}{n_{19}} \cdot 100\%$ . <sup>c</sup> The percentage contribution of particular stereoisomers of the Passerini product **15** determined by HPLC. <sup>d</sup> The isolated yields of product **19** calculated as:  $\frac{n_{19}}{n_{19} + n_{15}} \cdot 100\%$ . <sup>e</sup> Reaction stirred for 3 days. <sup>f</sup> Reaction stirred for 6 days. <sup>g</sup> Reaction conditions: **9** (2 equiv., 1.0 mmol), *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol), 100 mg of PPL stirred for 2 days at room temperature. <sup>h</sup> Reaction conditions: **9** (3 equiv., 1.5 mmol), *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol), 100 mg of PPL stirred for 2 days at room temperature. <sup>i</sup> Reaction conditions: **9** (0.5 equiv., 0.25 mmol), *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol), 100 mg of PPL stirred for 2 days at room temperature. <sup>j</sup> Reaction conducted in dichloromethane with 0.1 % water content (v/v) according to Żądło-Dobrowolska et al.

**Table S2. The evaluation of reaction conditions for the compound 16.**


	Enzyme	Conv. [%] <sup>b</sup>	16 Stereoisomer [%] <sup>c</sup>				19 Yield [%] <sup>d</sup>	19 ee [%]
			16a		16b			
1 <sup>a</sup>	none	0	nd				nd	nd
2 <sup>a</sup>	BSA	0	nd				nd	nd
3 <sup>a</sup>	<i>C. cylindracea</i> L.	62	21	21	28	30	65	45
4 <sup>a</sup>	<i>AK Ps fluorescens</i> L.	27	17	12	16	54	84	20
5 <sup>a</sup>	Novozym 435	20	38	37	12	13	75	32
6 <sup>a</sup>	<i>Mucor meihei</i> L.	62	20	25	37	18	63	30
7 <sup>a</sup>	<i>PS cepacia</i> L.	45	20	30	24	26	40	<i>rac</i>
8 <sup>a</sup>	<i>C. lyopolitica</i> L.	34	20	33	33	14	30	76
9 <sup>a</sup>	Wheat germ L.	0	nd				0	nd
10 <sup>a</sup>	<i>Rhizopus arrhizus</i> L.	50	27	23	26	24	48	20
11 <sup>a</sup>	<i>C. rugosa</i> L.	44	16	17	33	34	60	5
12 <sup>a</sup>	Lipozyme	19	23	25	25	27	47	99
13 <sup>a</sup>	<i>Mucor javanicus</i> L.	20	<i>rac</i>				15	<i>rac</i>
14 <sup>a</sup>	<i>Rhizopus niveus</i> L.	0	nd				nd	0
15 <sup>a</sup>	PPL	41	35	28	0	37	77	16

<sup>a</sup> Reaction conditions: to the mixture of enzyme (100 mg) in phosphate buffer (10 mL, pH 7.4, 0.1 M) vinyl ester **10** (1 equiv., 0.5 mmol) and *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 2 days. After this time the products **16** and **19** were isolated by column chromatography and analyzed by HPLC. <sup>b</sup> refers to the Passerini product **16** calculated as:  $\frac{n_{16} + n_{19}}{n_{10}} \cdot 100\%$ . <sup>c</sup> The percentage contribution of particular stereoisomers of the Passerini product **16** determined by HPLC. <sup>d</sup> The isolated yields of product **19** calculated as:  $\frac{n_{19}}{n_{19} + n_{16}} \cdot 100\%$ .

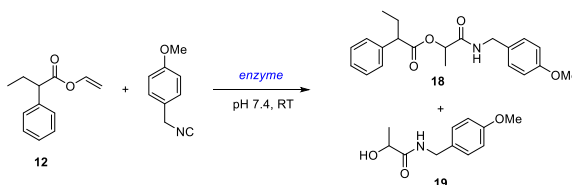
**Table S3. The evaluation of reaction conditions for the racemic compound 17.**


	Enzyme	Conv. [%] <sup>b</sup>	17 Stereoisomer [%] <sup>c</sup>				19 Yield [%] <sup>d</sup>	19 ee [%]
			17a		17b			
1 <sup>a</sup>	none	nd	nd				nd	nd
2 <sup>a</sup>	BSA	nd	nd				nd	nd
3 <sup>a</sup>	<i>C. cylindracea</i> L.	50	nd				99	<i>rac</i>
4 <sup>a</sup>	<i>AK Ps fluorescens</i> L.	28	0	> 99	0	0	71	70
5 <sup>a</sup>	Novozym 435	20	7	33	0	60	47	99
6 <sup>a</sup>	<i>Mucor meihei</i> L.	15	<i>rac</i>				5	25
7 <sup>a</sup>	<i>PS cepacia</i> L.	37	6	44	46	4	76	6
8 <sup>a</sup>	<i>C. lyopolitica</i> L.	1	nd				50	72

9 <sup>a</sup>	Wheat germ L.	5		nd		1	nd	
10 <sup>a</sup>	<i>Rhizopus arrhizus</i> L.	50	9	36	25	30	25	64
11 <sup>a</sup>	<i>C. rugosa</i> L.	20		nd			20	<i>rac</i>
12 <sup>a</sup>	Lipozyme	40		<i>rac</i>			50	80
13 <sup>a</sup>	<i>Mucor javanicus</i> L.	15		nd			80	8
14 <sup>a</sup>	<i>Rhizopus niveus</i> L.	4		nd			50	88
15 <sup>a</sup>	PPL	35	15	25	23	27	30	5

<sup>a</sup> Reaction conditions: to the mixture of enzyme (100 mg) in phosphate buffer (10 mL, pH 7.4, 0.1 M) vinyl ester **11** (1 equiv., 0.5 mmol) and *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 2 days. After this time the products **17** and **19** were isolated by column chromatography and analyzed by HPLC. <sup>b</sup> refers to the Passerini product **17** calculated as:  $\frac{n_{17} + n_{19}}{n_{11}} \cdot 100\%$ . <sup>c</sup> The percentage contribution of particular stereoisomers of the Passerini product **17** determined by HPLC. <sup>d</sup> The isolated yields of product **19** calculated as:  $\frac{n_{19}}{n_{17} + n_{19}} \cdot 100\%$ .

**Table S4. The evaluation of reaction conditions for the racemic compound 18.**

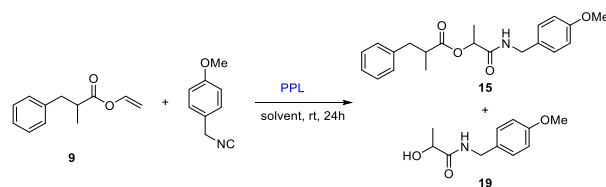


	Enzyme	Conv. [%] <sup>b</sup>	18 Stereoisomer [%] <sup>c</sup>			19 Yield [%] <sup>d</sup>	19 ee [%]	
			18a	18b				
1 <sup>a</sup>	none	nd	nd	nd	nd	nd		
2 <sup>a</sup>	BSA	nd	nd	nd	nd	nd		
3 <sup>a</sup>	<i>C. cylindracea</i> L.	38	20	26	30	24	50	<i>rac</i>
4 <sup>a</sup>	AK <i>Ps. fluorescens</i> L.	15		nd			78	10
5 <sup>a</sup>	Novozym 435	20	15	19	35	31	56	20
6 <sup>a</sup>	<i>Mucor meihei</i> L.	5		<i>rac</i>			nd	nd
7 <sup>a</sup>	<i>PS cepacia</i> L.	nd		nd			nd	nd
8 <sup>a</sup>	<i>C. lyphoptica</i> L.	nd		nd			nd	nd
9 <sup>a</sup>	Wheat germ L.	nd		nd			nd	nd
10 <sup>a</sup>	<i>Rhizopus arrhizus</i> L.	nd		nd			nd	nd
11 <sup>a</sup>	<i>C. rugosa</i> L.	15		<i>rac</i>			79	18
12 <sup>a</sup>	Lipozyme	20	35	38	13	14	80	<i>rac</i>
13 <sup>a</sup>	<i>Mucor javanicus</i> L.	10		nd			60	15
14 <sup>a</sup>	<i>Rhizopus niveus</i> L.	nd		nd			nd	nd
15 <sup>a</sup>	PPL	nd		nd			nd	nd

<sup>a</sup> Reaction conditions: to the mixture of enzyme (100 mg) in phosphate buffer (10 mL, pH 7.4, 0.1 M) vinyl ester **12** (1 equiv., 0.5 mmol) and *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 2 days. After this time the products **18** and **19** were isolated by column chromatography and analyzed by HPLC. <sup>b</sup> refers to the Passerini product **18** calculated as:  $\frac{n_{19} + n_{18}}{n_{12}} \cdot 100\%$ . <sup>c</sup> The percentage contribution of particular stereoisomers of the Passerini product **12** determined by HPLC. <sup>d</sup> The isolated yields of product **19** calculated as:  $\frac{n_{19}}{n_{19} + n_{18}} \cdot 100\%$ .

## 9. Table of solvent screening for product 15.

**Table S5. The influence of the solvent on the enzyme-promoted cascade reaction.**



	Enzyme	Conv. [%] <sup>b</sup>	<b>15</b> Stereoisomer [%] <sup>c</sup>				<b>19</b> Yield [%] <sup>d</sup>	<b>19</b> ee [%]
			<i>RR</i>	<i>SS</i>	<i>SR</i>	<i>RS</i>		
1	none	44	24	26	25	25	7	13
2	PBS	20	9	26	12	53	70	20
3	toluene	35	26	14	25	35	24	14
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10	10	38	12	40	45	85
5 <sup>a</sup>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	18	2	46	1	51	52	95
6	hexane	10	34	14	34	18	15	25
7	TBME	5	<i>rac</i>				nd	nd
8	acetonitrile	0	nd				nd	nd
9	1,4-dioksan	0	nd				nd	nd

Reaction conditions: to the mixture of the enzyme (100 mg) in 10 mL of solvent, vinyl ester **10** (1 equiv., 0.5 mmol) and *p*-methoxybenzylisocyanide (1 equiv., 0.5 mmol) were added. The mixture was stirred at room temperature for 2 days. After this time the products **15** and **19** were isolated by column chromatography and analyzed by HPLC. <sup>a</sup> with 0.1 % water content (v/v), stirred for 96h; <sup>b</sup> refers to the Passerini product **15** calculated as:  $\frac{n_{15} + n_{19}}{n_9} \cdot 100$  %. <sup>c</sup> The percentage contribution of particular stereoisomers of the Passerini product **15** determined by HPLC. <sup>d</sup> The isolated yields of product **19** calculated as:  $\frac{n_{19}}{n_{19} + n_{15}} \cdot 100$  %.



## 10. Analytical data of racemic vinyl esters 9 - 12:

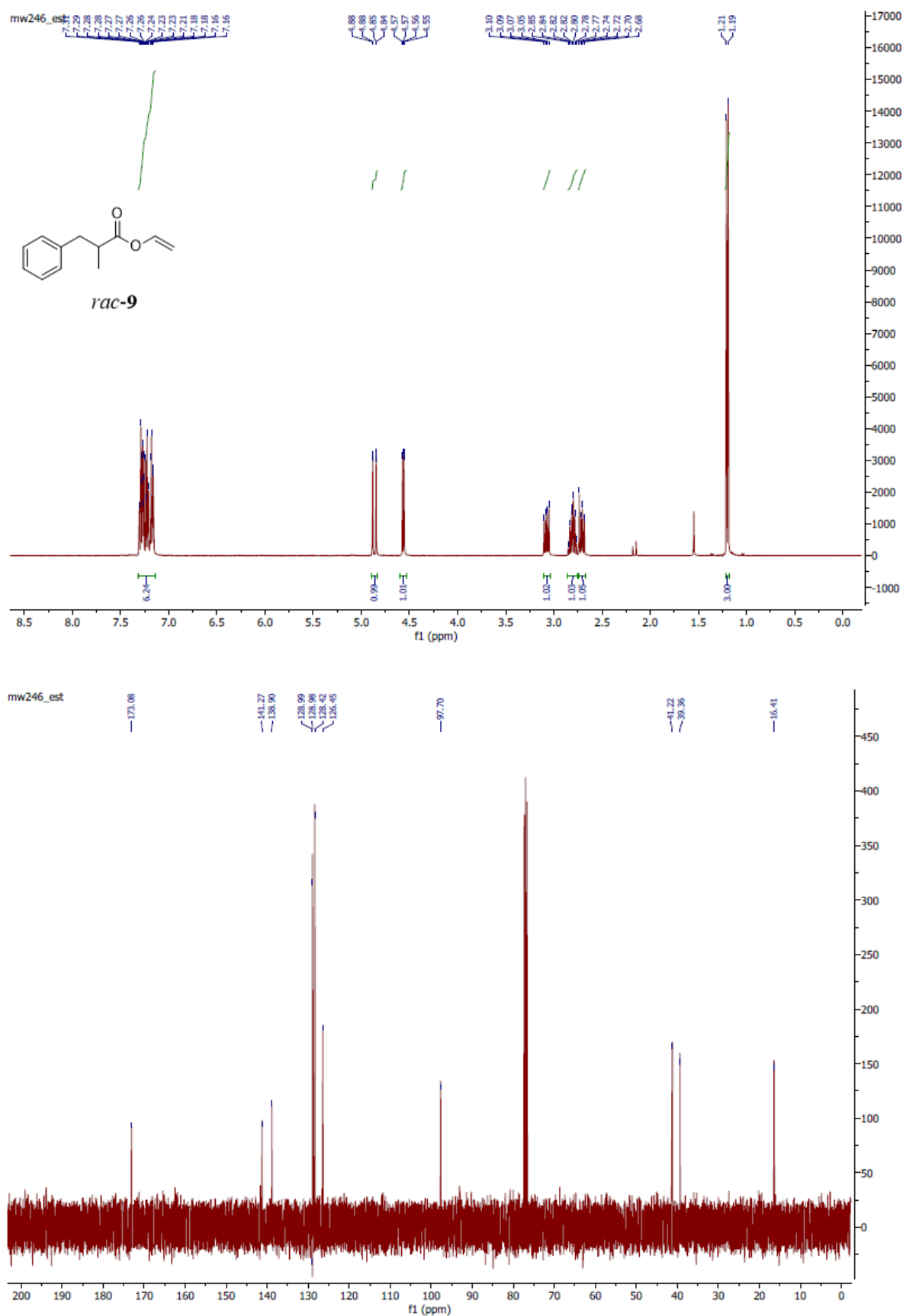
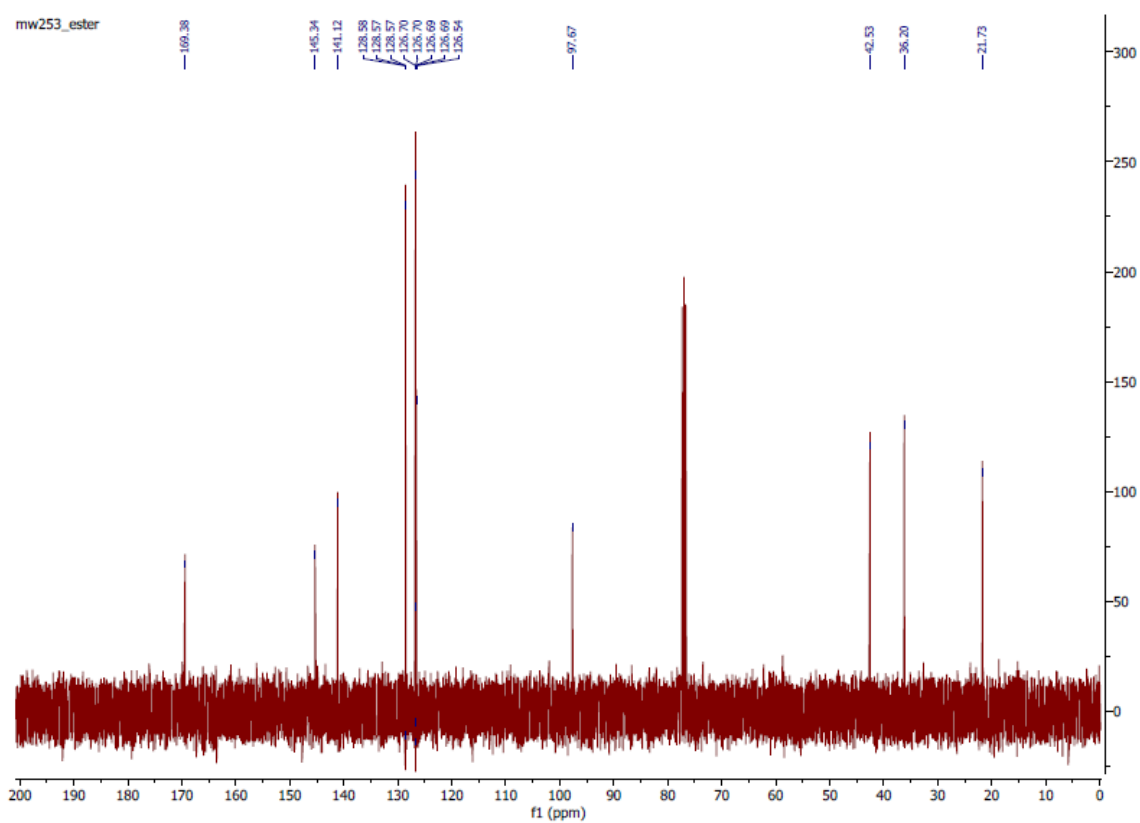
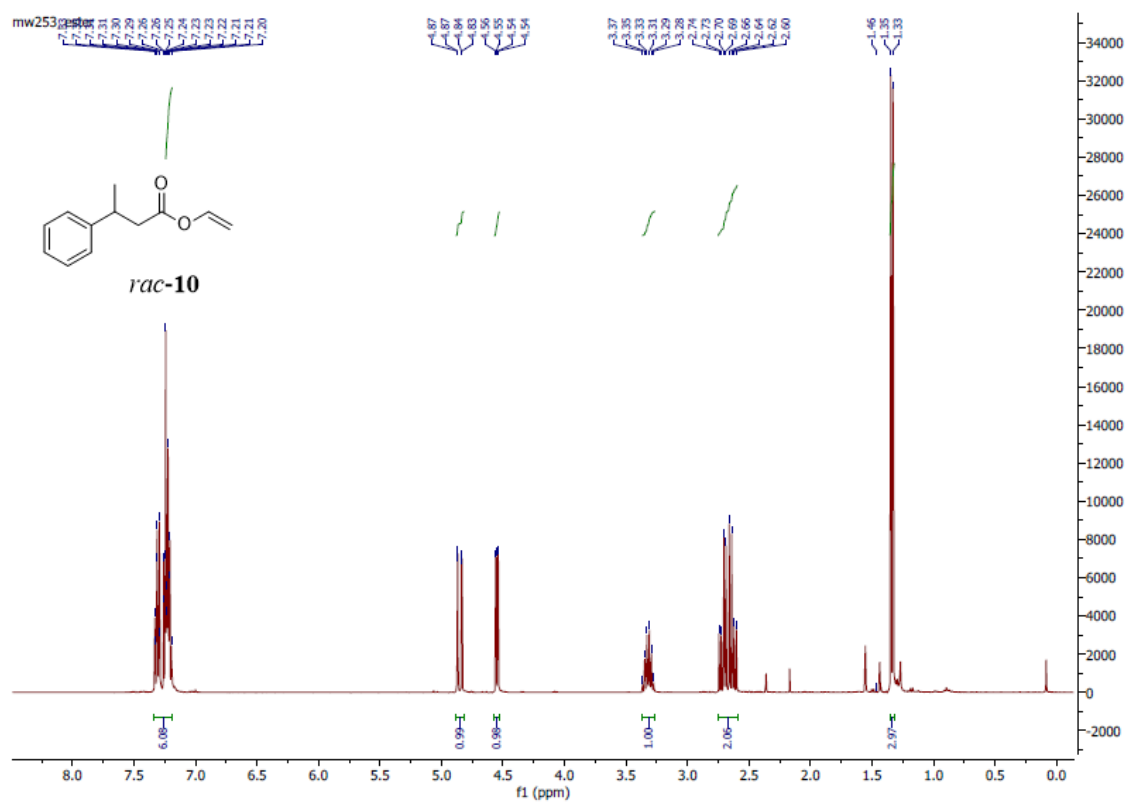


Figure S8. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound **9**.



**Figure S9.**  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **10**.



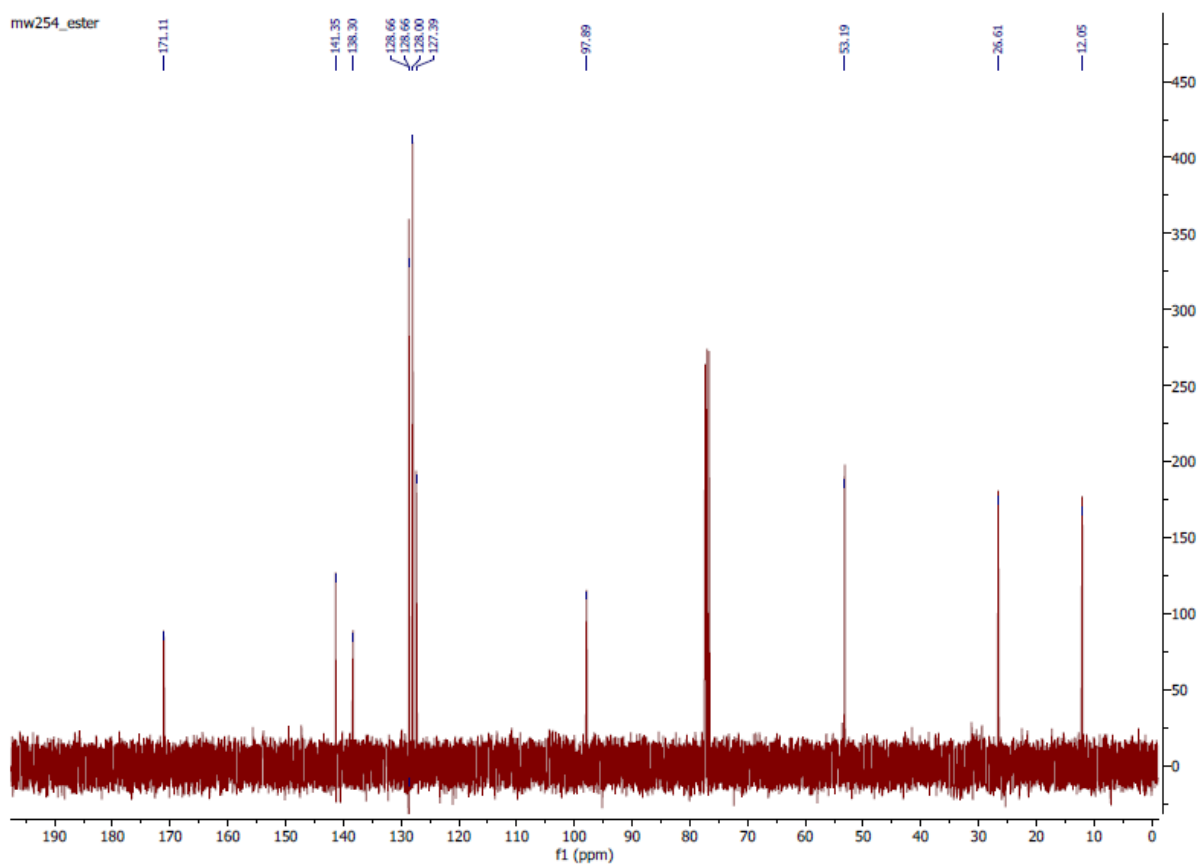
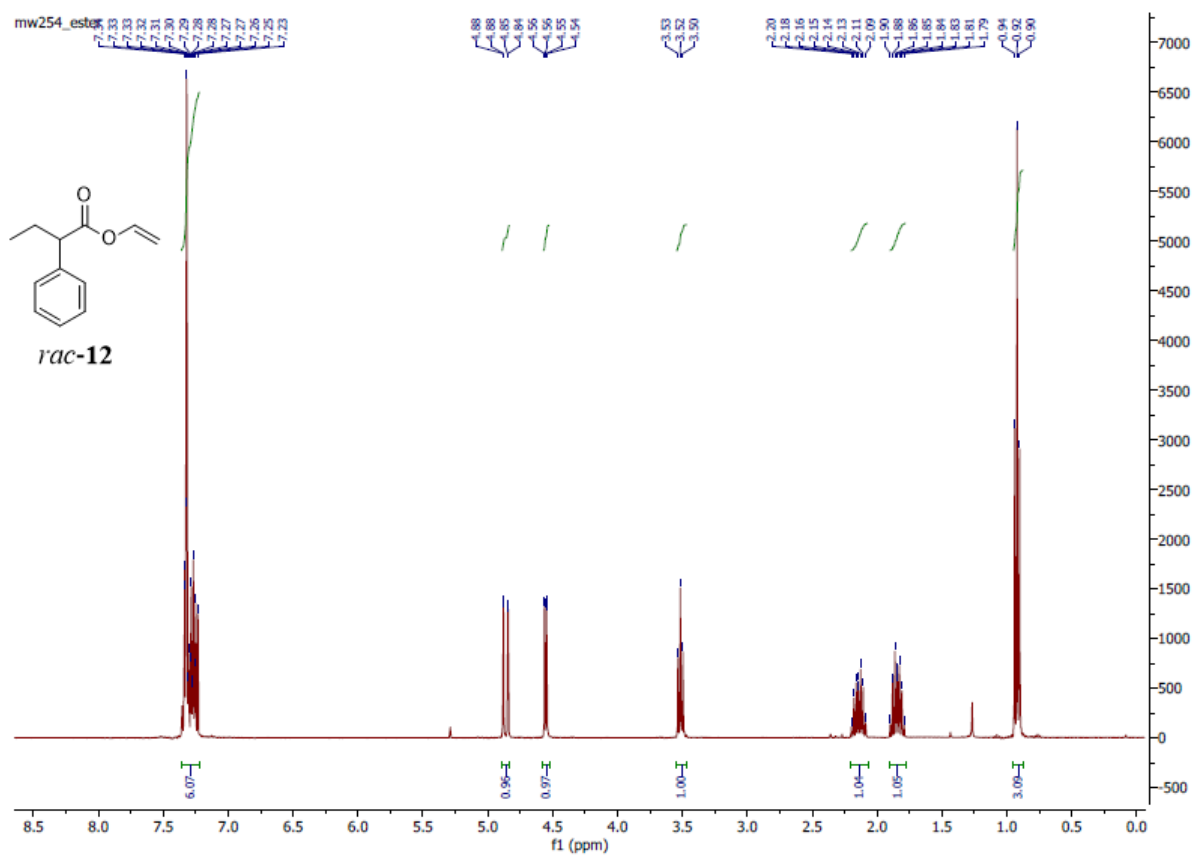


Figure S11.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **12**.

## 11. Analytical data of $\alpha$ -acyloxycarboxamides 15 - 18:

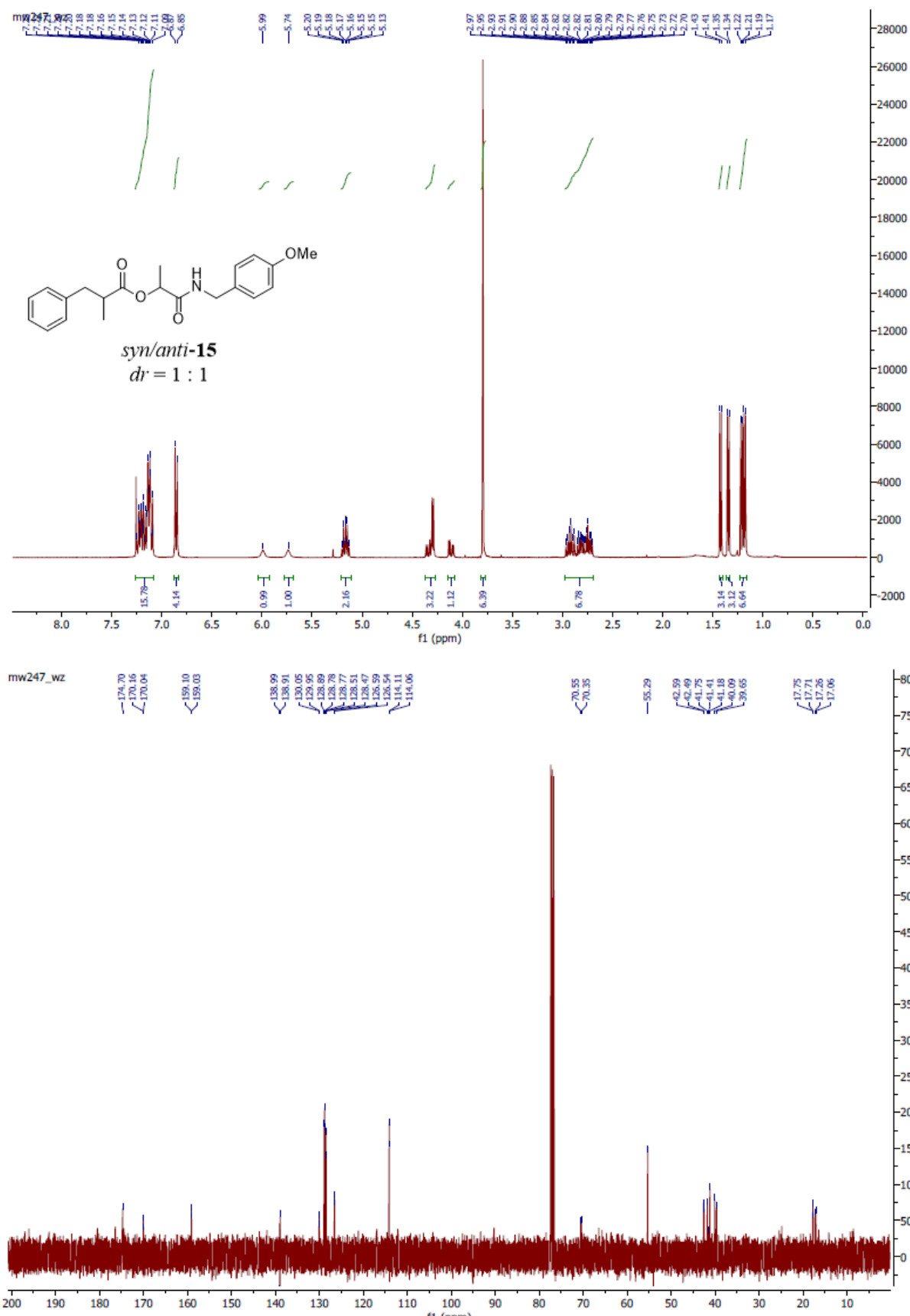


Figure S12. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 15.

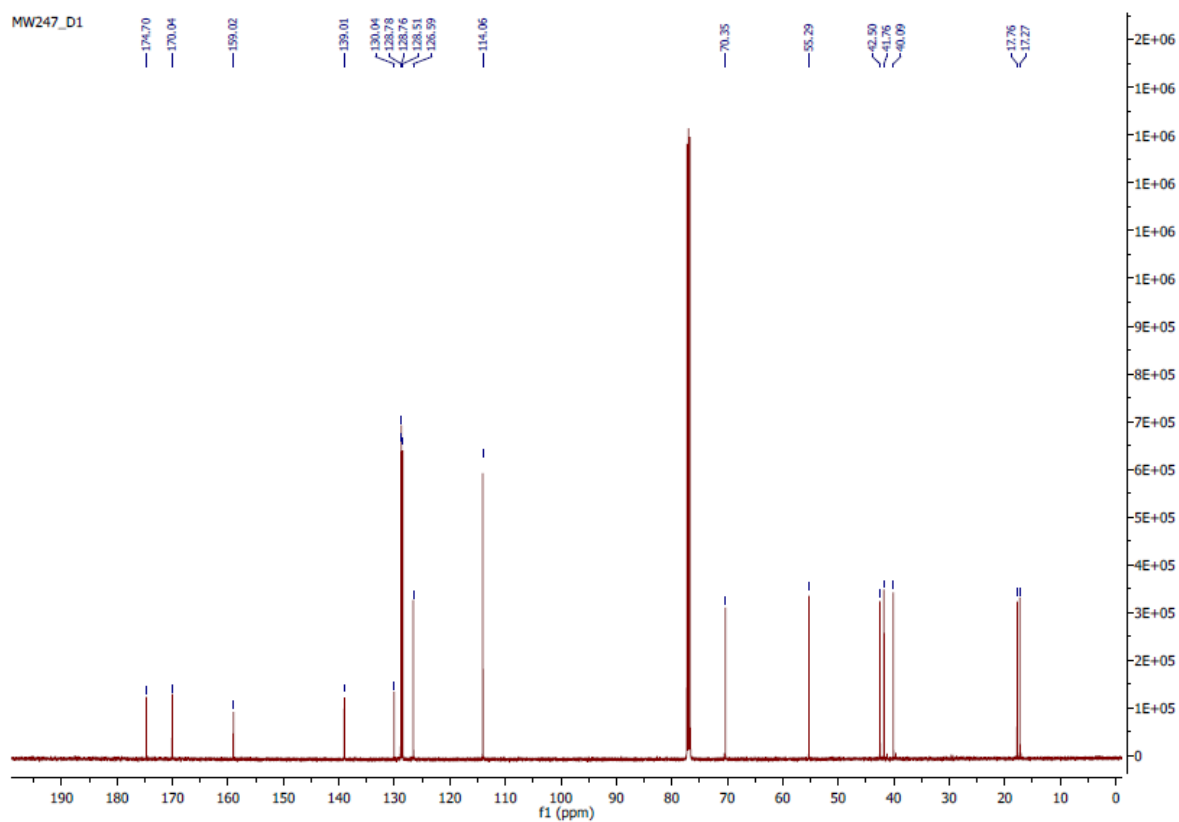
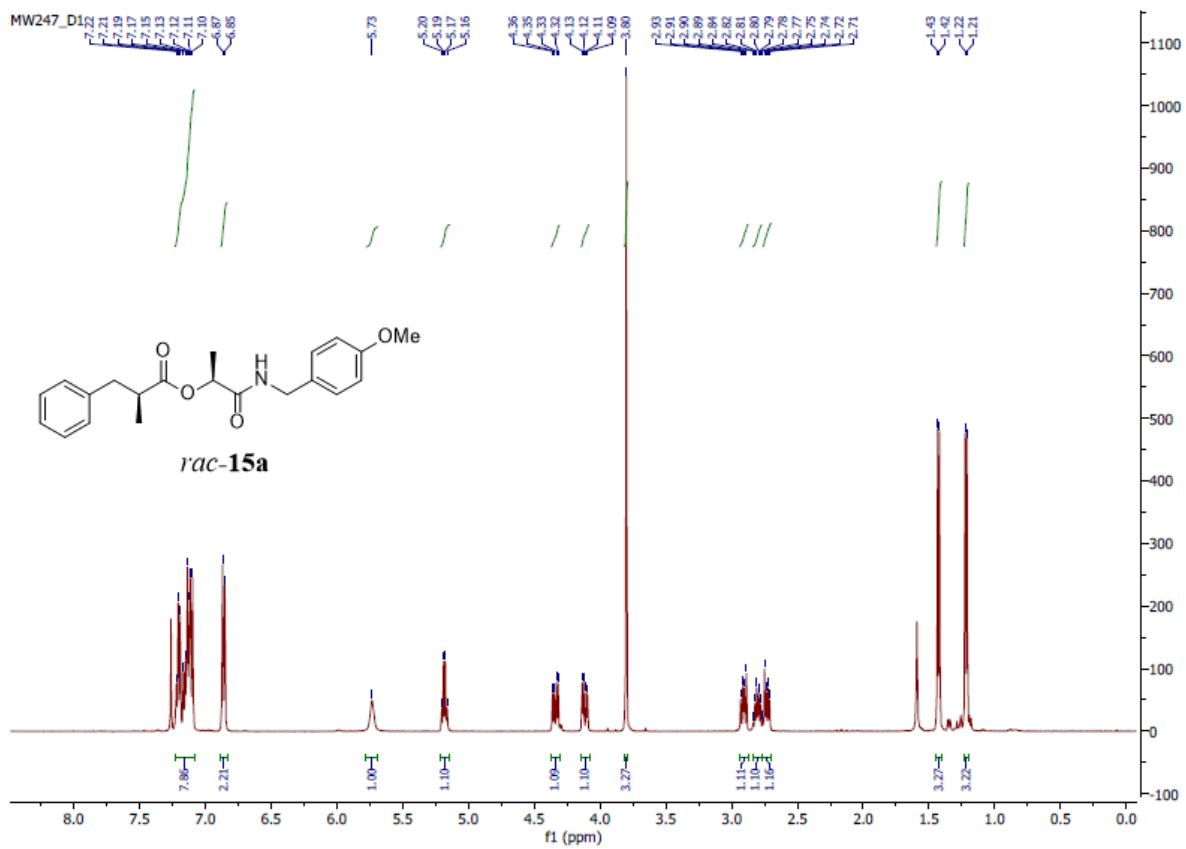
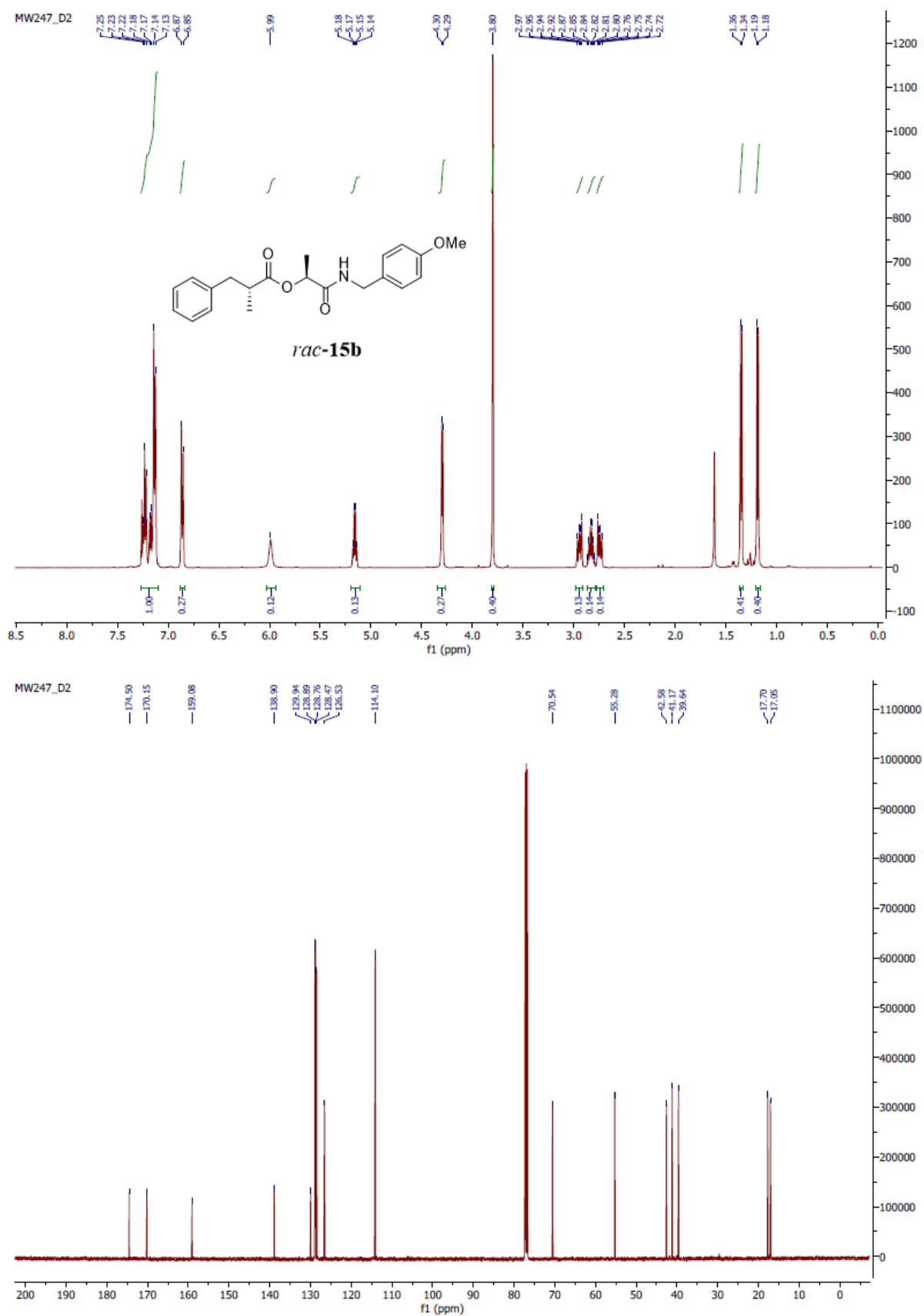
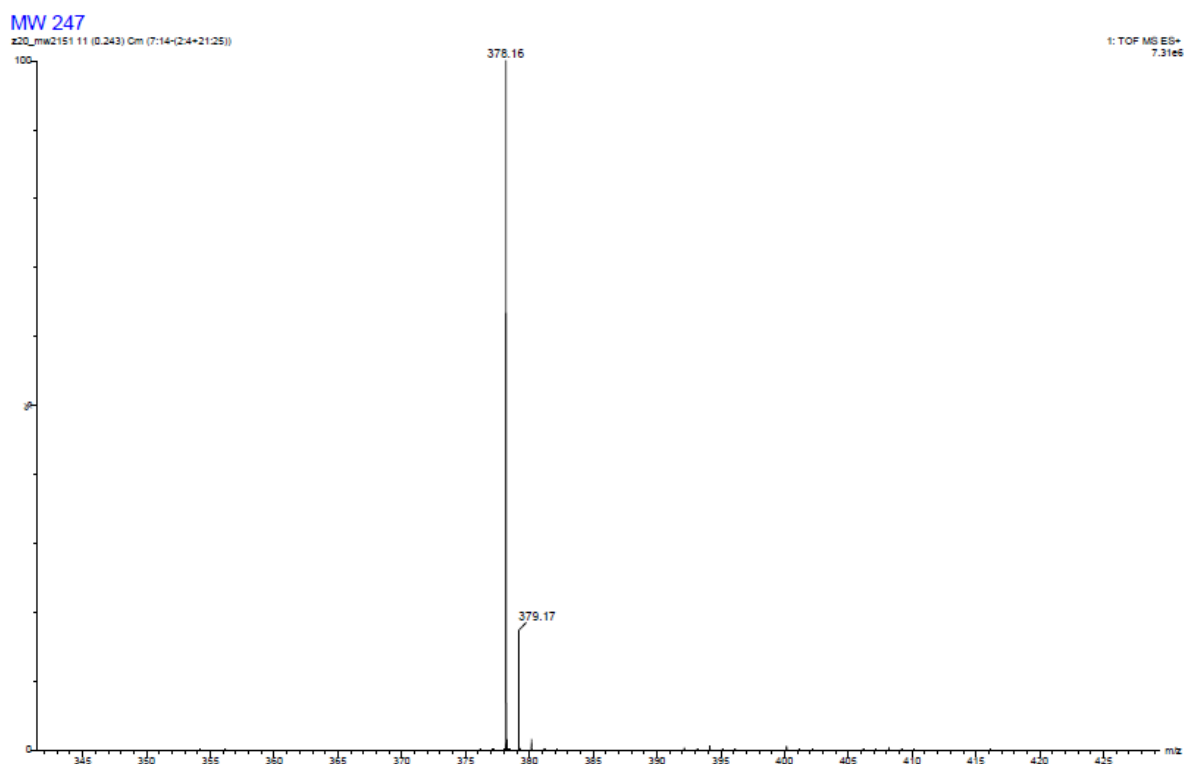


Figure S13:  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **15a**.



**Figure S14** <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound **15b**.



#### Single Mass Analysis

Tolerance = 3.0 mDa / DBE: min = -0.5, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

232 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

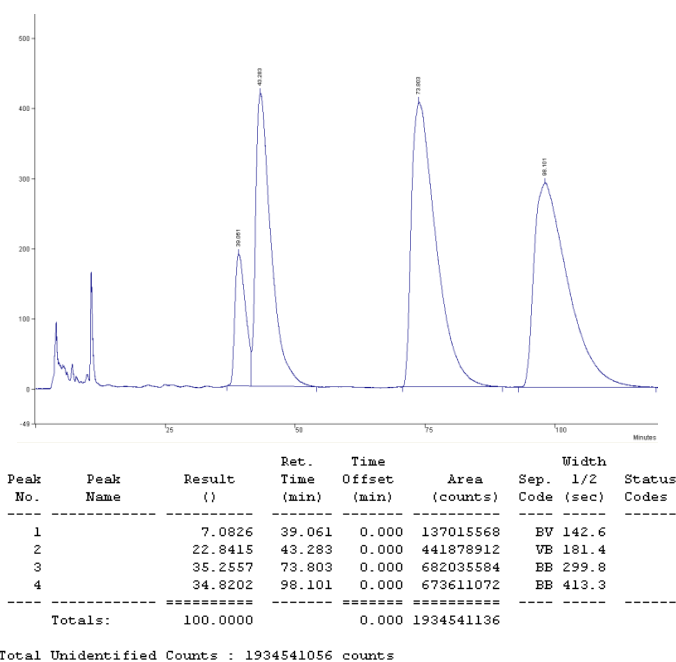
Elements Used:

C: 0-60      H: 0-120      N: 0-4      O: 0-4      Na: 0-1

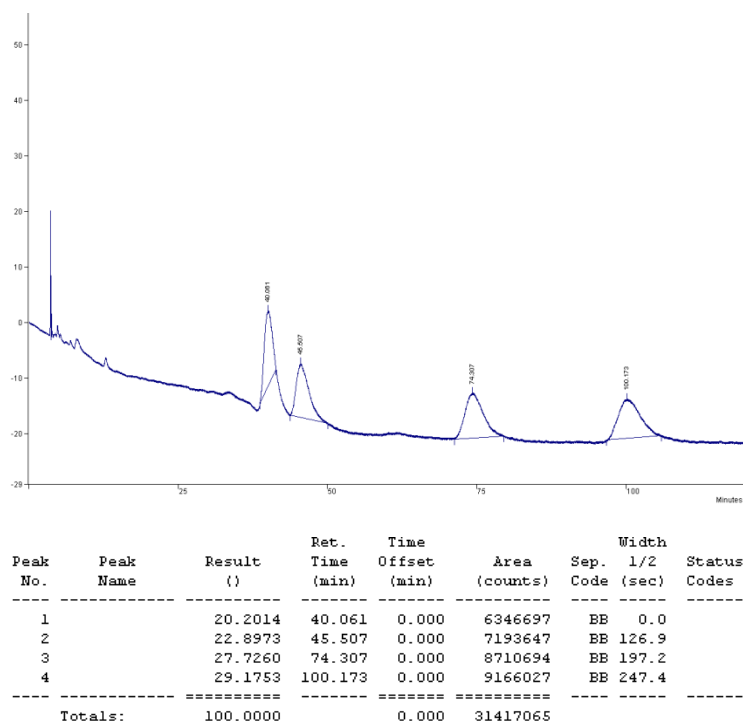
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O	Na
378.1663	378.1681	-1.8	-4.8	9.5	C21 H25 N O4 Na	775.4	n/a	n/a	21	25	1	4	1

**Figure S15** HR-MS spectra of compound **15**.

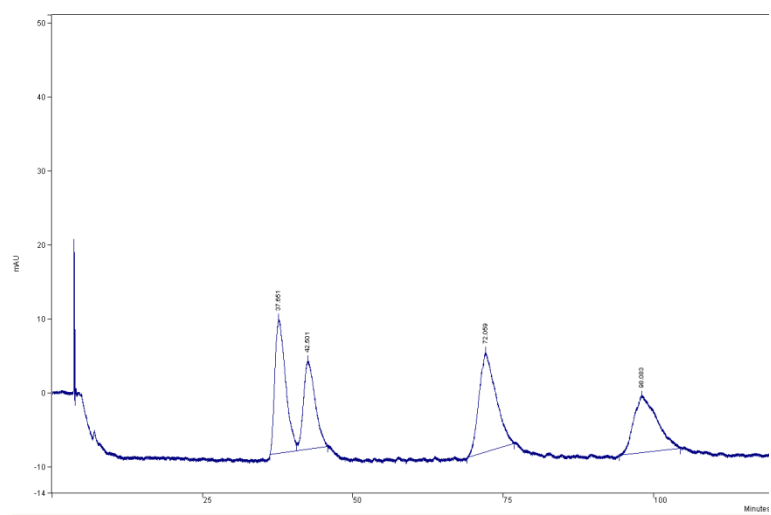




**Figure S16.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Candida cylindracea* lipase.



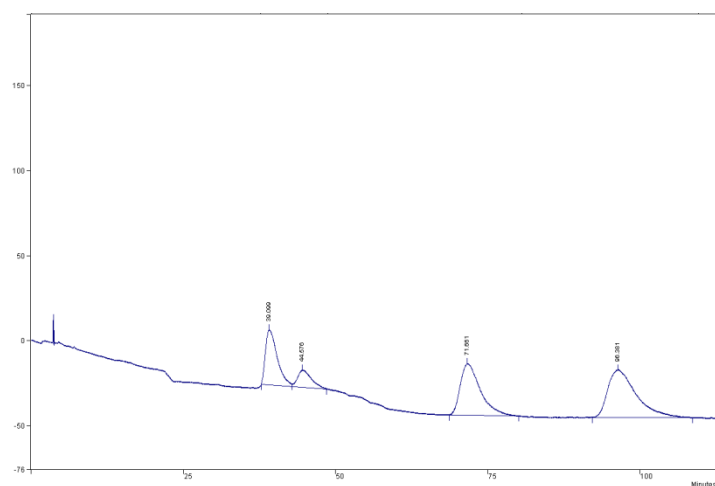
**Figure S17.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by Novozym 435.



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Width Sep. Code (sec)	Status Codes
1		26.2385	37.651	0.000	11454396	BV 117.3	
2		18.8097	42.501	0.000	8211366	VB 131.0	
3		30.7761	72.059	0.000	13435290	BB 199.8	
4		24.1757	98.083	0.000	10553874	BB 278.7	
Totals:		100.0000		0.000	43654926		

Total Unidentified Counts : 43654928 counts

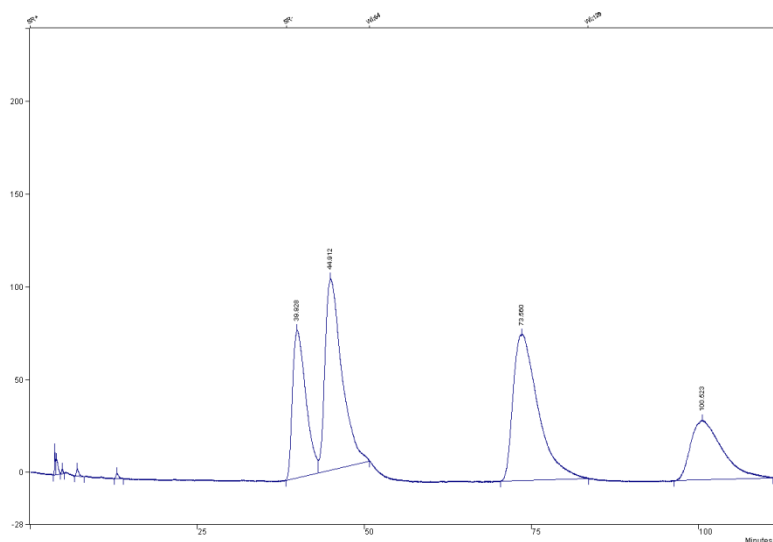
**Figure S18.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Mucor meihei* lipase.



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Width Sep. Code (sec)	Status Codes
1		19.9516	39.099	0.000	22388250	BV 121.3	
2		7.1619	44.576	0.000	8036598	VB 121.0	
3		31.5504	71.661	0.000	35403672	BB 204.0	
4		41.3360	96.381	0.000	46384372	BB 285.9	
Totals:		99.9999		0.000	112212892		

Total Unidentified Counts : 112212896 counts

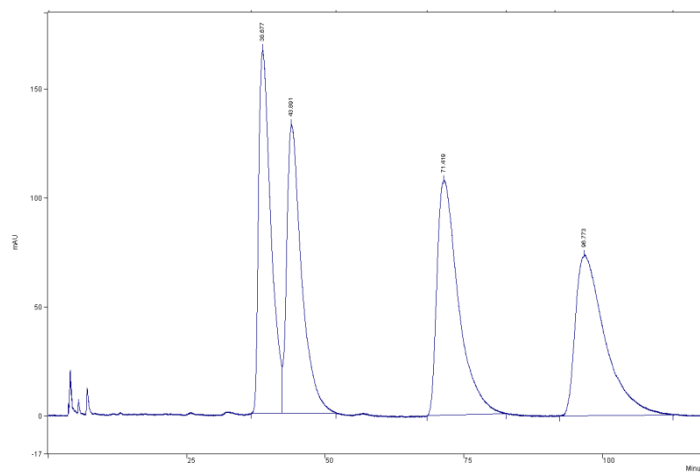
**Figure S19.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase.



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		18.2915	39.928	0.000	56403872	BV	133.8	
2		30.0849	44.912	0.000	92770008	VB	164.6	
3		34.1474	73.560	0.000	105297288	BB	233.8	
4		17.4762	100.523	0.000	53889592	BB	306.4	
Totals:		100.0000		0.000	308360760			

Total Unidentified Counts : 308360768 counts

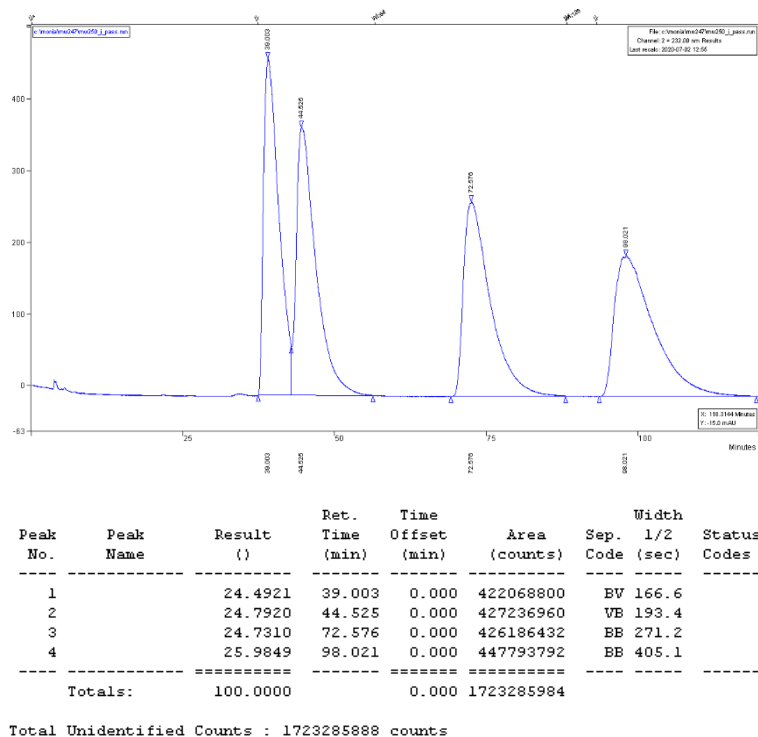
**Figure S20.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Candida lypholitica* lipase.



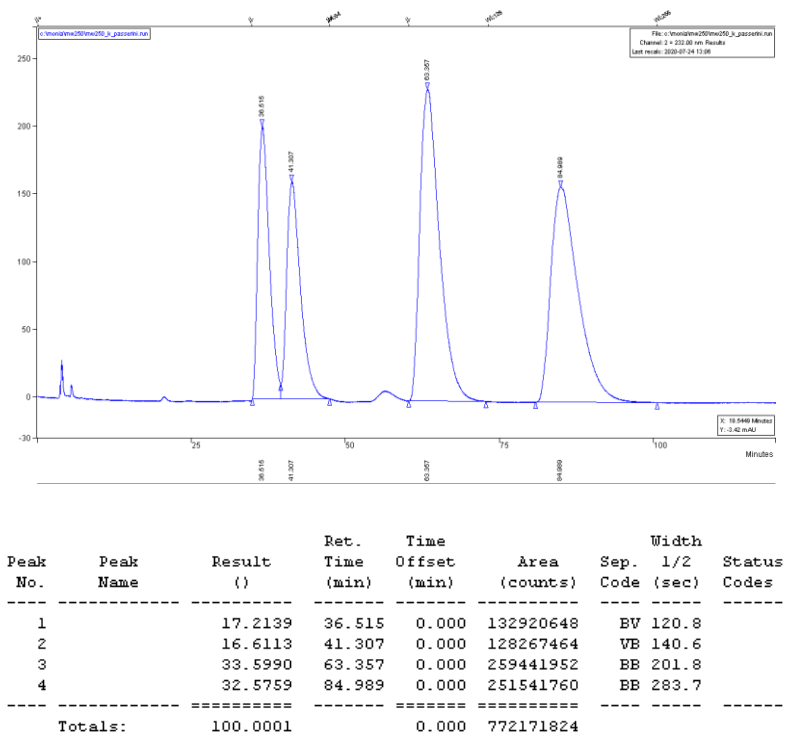
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		24.0419	38.677	0.000	130983128	BV	140.3	
2		23.1936	43.891	0.000	126361328	VB	161.0	
3		27.1233	71.419	0.000	147770816	BB	235.8	
4		25.6413	96.773	0.000	139696640	BB	324.2	
Totals:		100.0001		0.000	544811912			

Total Unidentified Counts : 544811904 counts

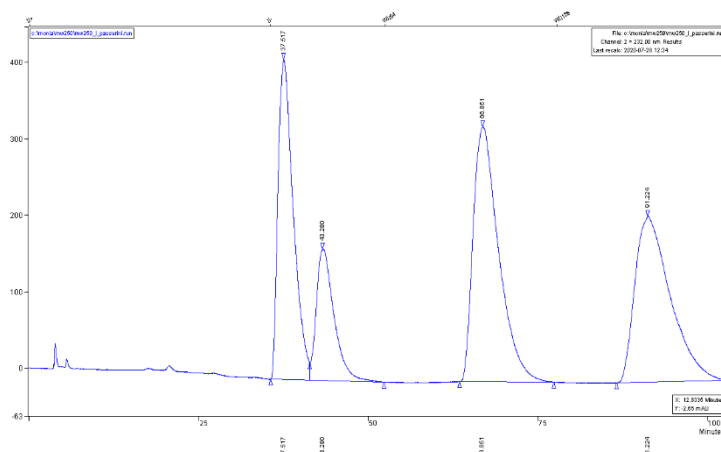
**Figure S21.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Rhizopus arrhizus* lipase.



**Figure S22.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Candida rugosa* lipase.



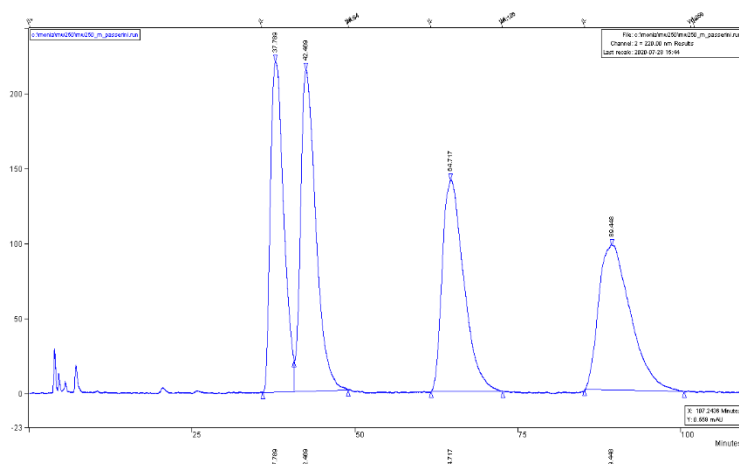
**Figure S23.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by Lipozym.



Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Width Sep. Code	l/2 (sec)	Status Codes
1		25.0109	37.517	0.000	336422016	BV	145.6	
2		11.8730	43.280	0.000	159703936	VB	159.2	
3		33.1952	66.851	0.000	446509152	BB	239.0	
4		29.9209	91.224	0.000	402467296	BB	335.4	
Totals:		100.0000		0.000	1345102400			

Total Unidentified Counts : 1345102464 counts

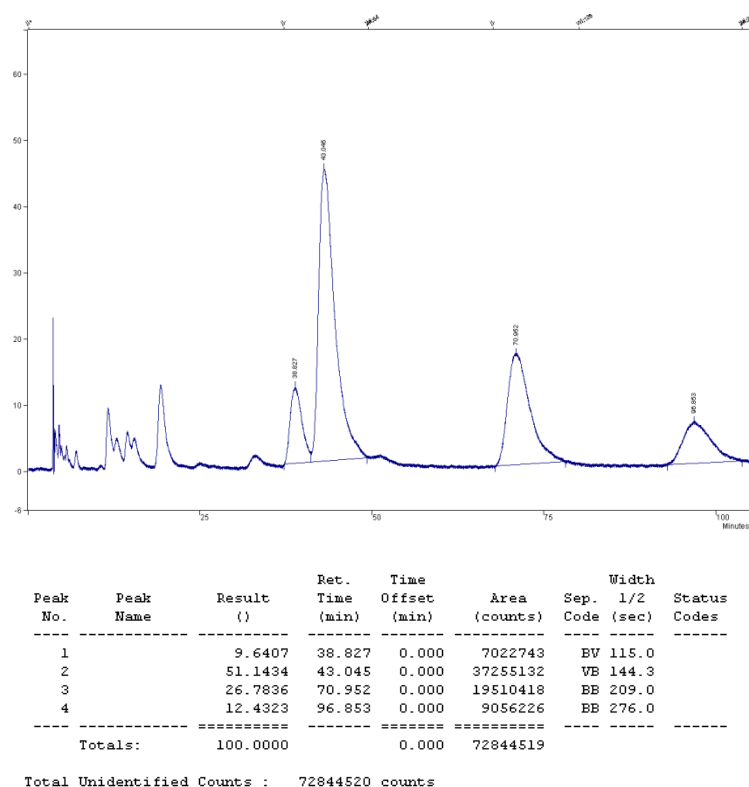
**Figure S24.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Mucor javanicus* lipase.



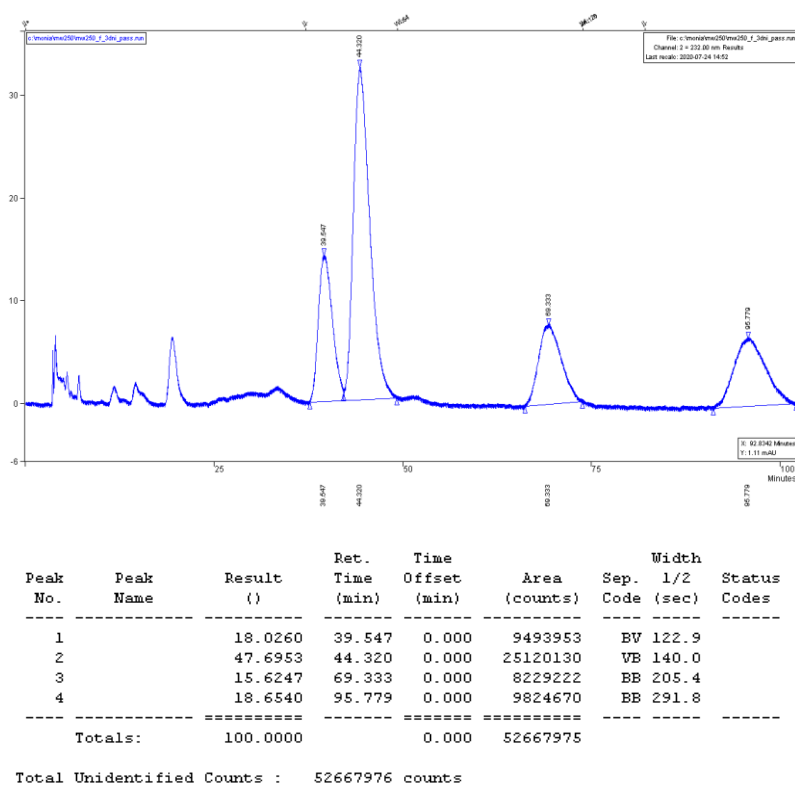
Peak No.	Peak Name	Result ( )	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Width Sep. Code	l/2 (sec)	Status Codes
1		23.8801	37.789	0.000	160686384	BV	133.9	
2		26.4606	42.469	0.000	178050288	VB	147.5	
3		24.6296	64.717	0.000	165729392	BB	213.0	
4		25.0297	89.448	0.000	168421744	BB	319.2	
Totals:		100.0000		0.000	672887808			

Total Unidentified Counts : 672887808 counts

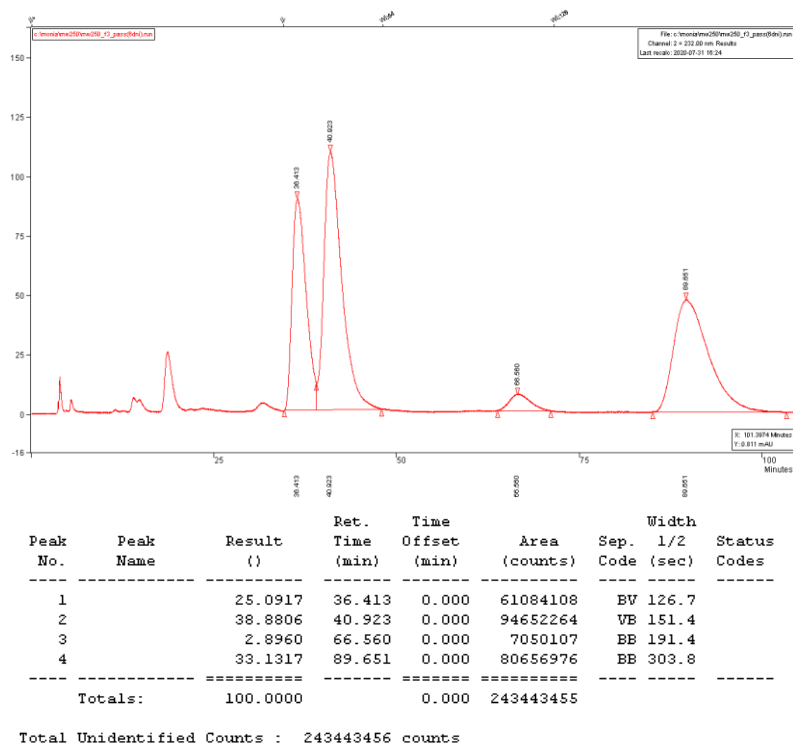
**Figure S25.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Rhizopus niveus* lipase.



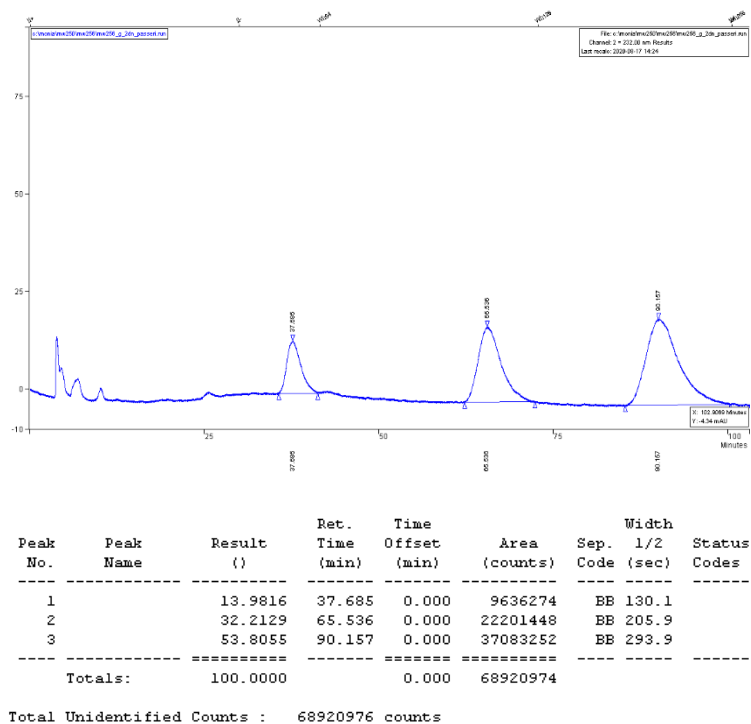
**Figure S26.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL isolated after 2 days.



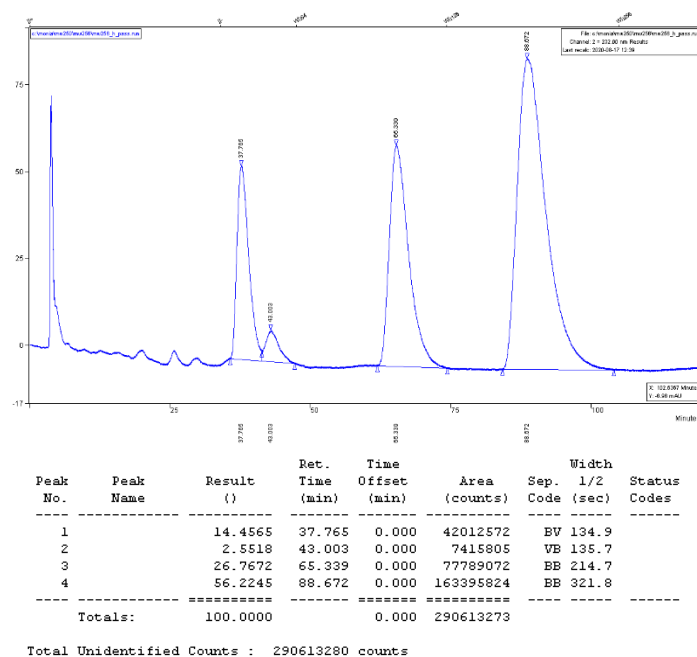
**Figure S27.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL isolated after 3 days.



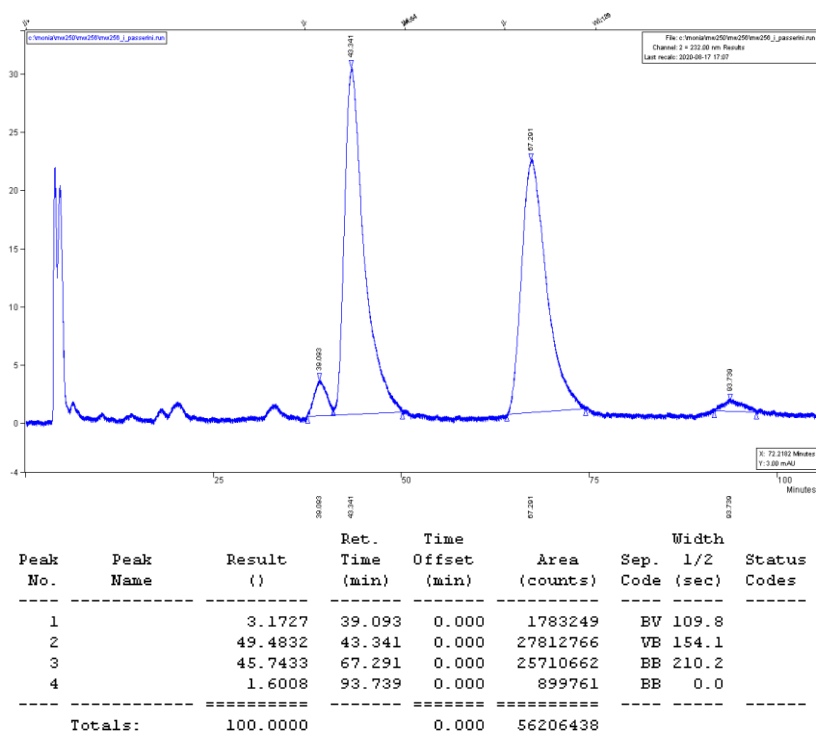
**Figure S28.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL isolated after 6 days.



**Figure S29.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL with 2 equiv. of vinyl ester **9** isolated after 2 days.



**Figure S30.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL with 3 equiv. of vinyl ester **9** isolated after 2 days.



**Figure S31.** HPLC data of product **15** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL in DCM + 0.1 % H<sub>2</sub>O isolated after 2 days.

**Analytical Method:** 1.5 mL samples dissolved in 2-propanol were analyzed by HPLC, using a Varian ProStar instrument coupled to a UV-Vis detector. Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C  $\lambda = 220$  nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_{R1} = 38.0$ ,  $t_{R2} = 43.3$ ,  $t_{R3} = 79.8$ ,  $t_{R4} = 103.5$ .



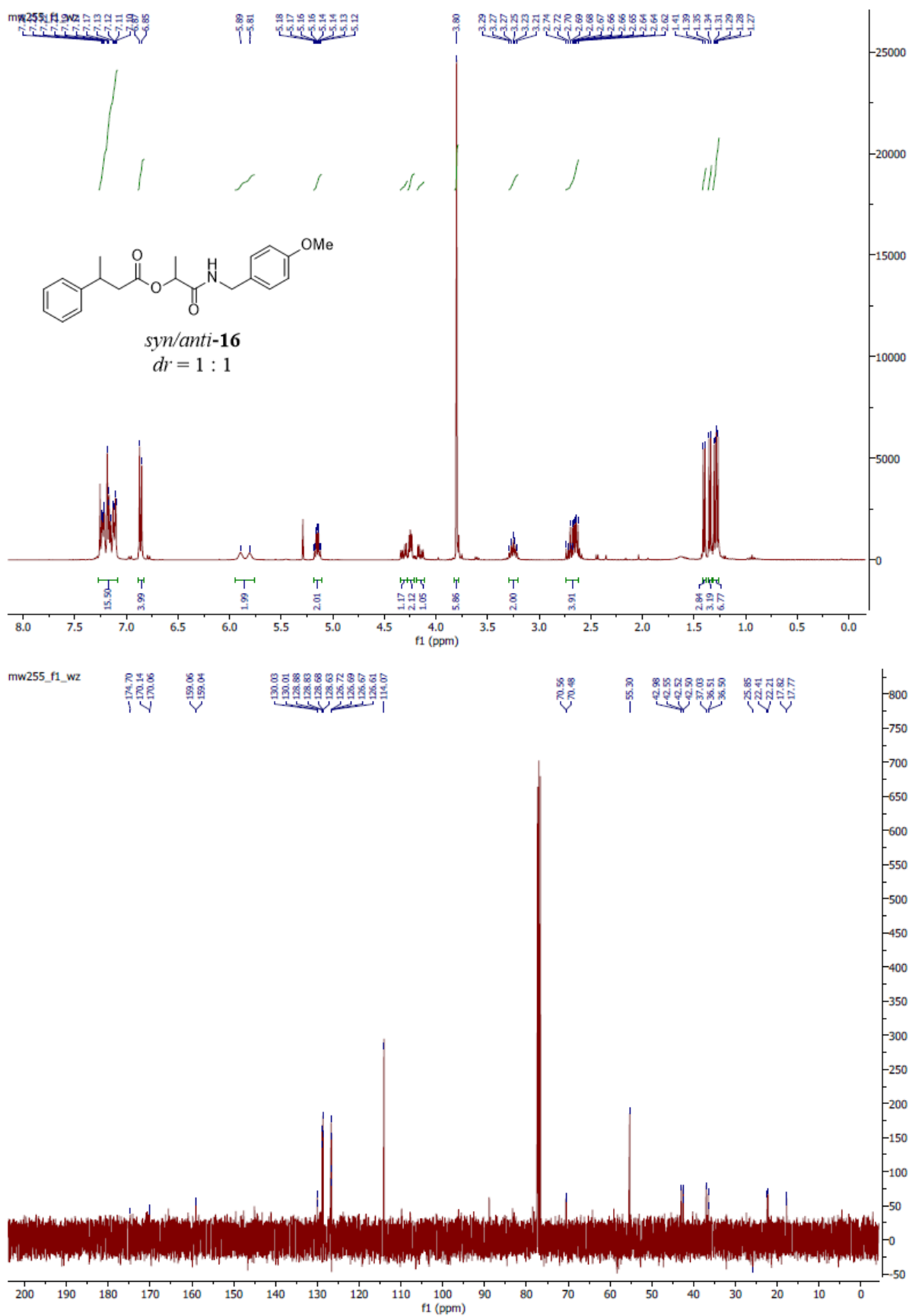


Figure S32: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 16.

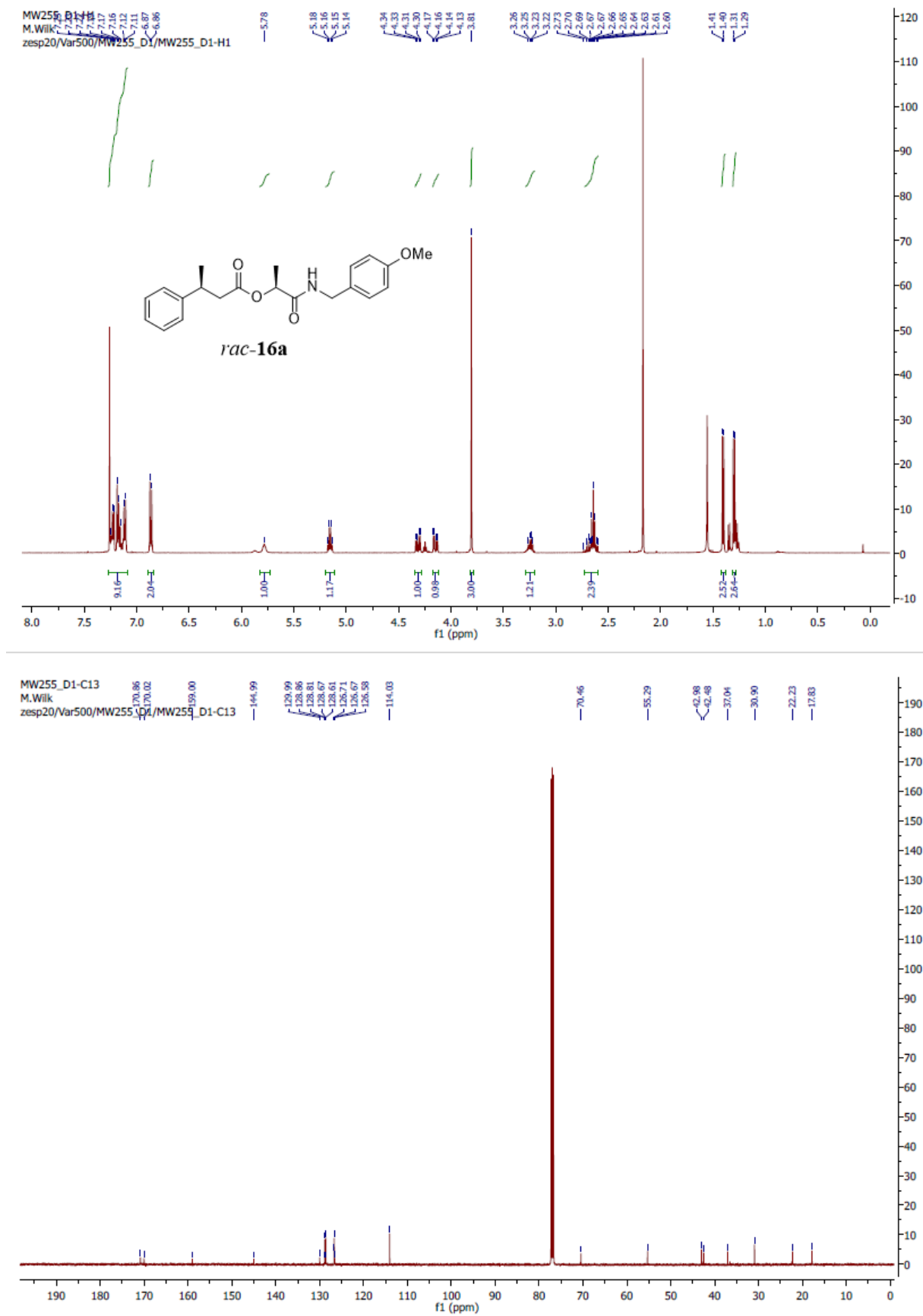


Figure S33:  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **16a**.

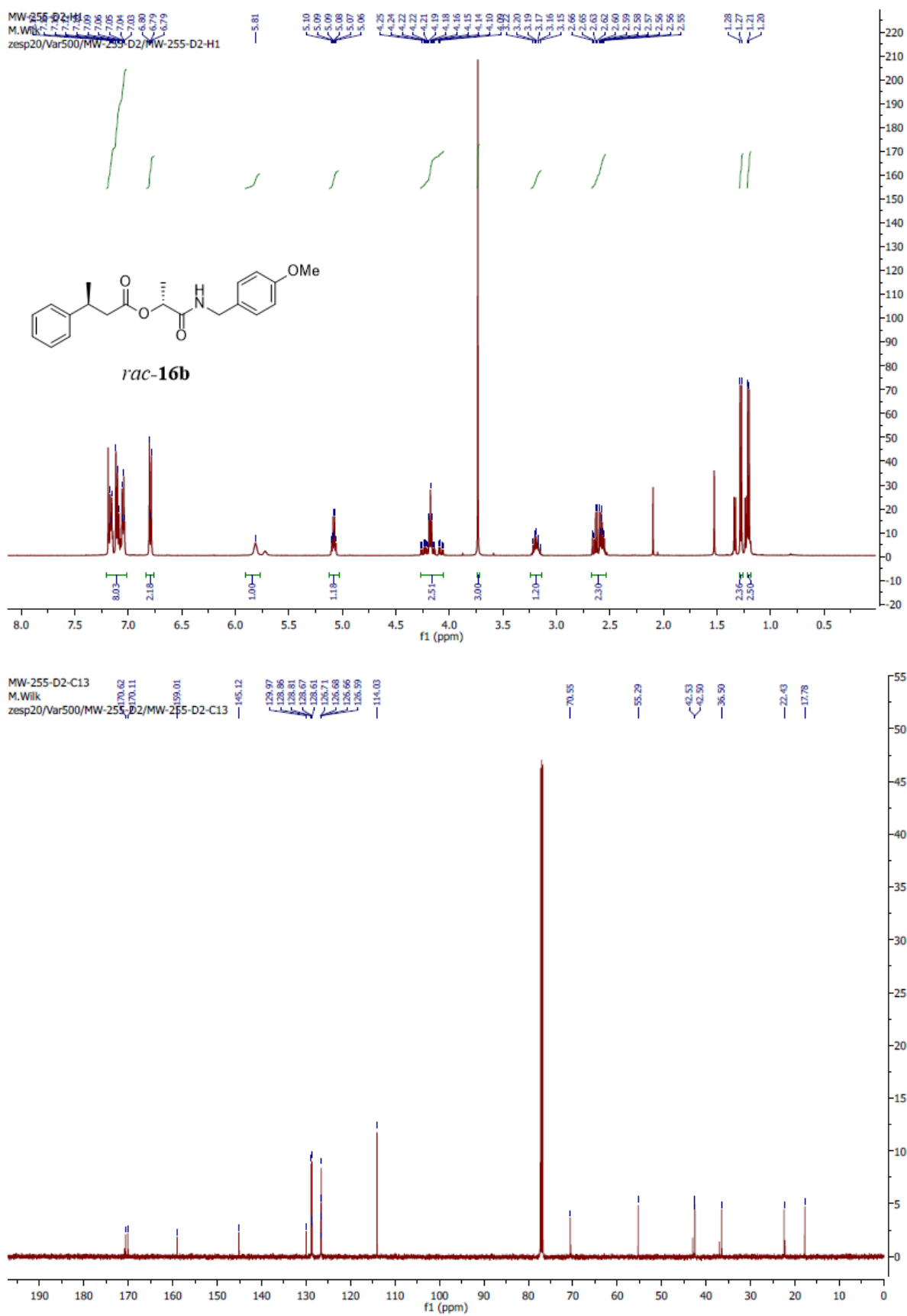
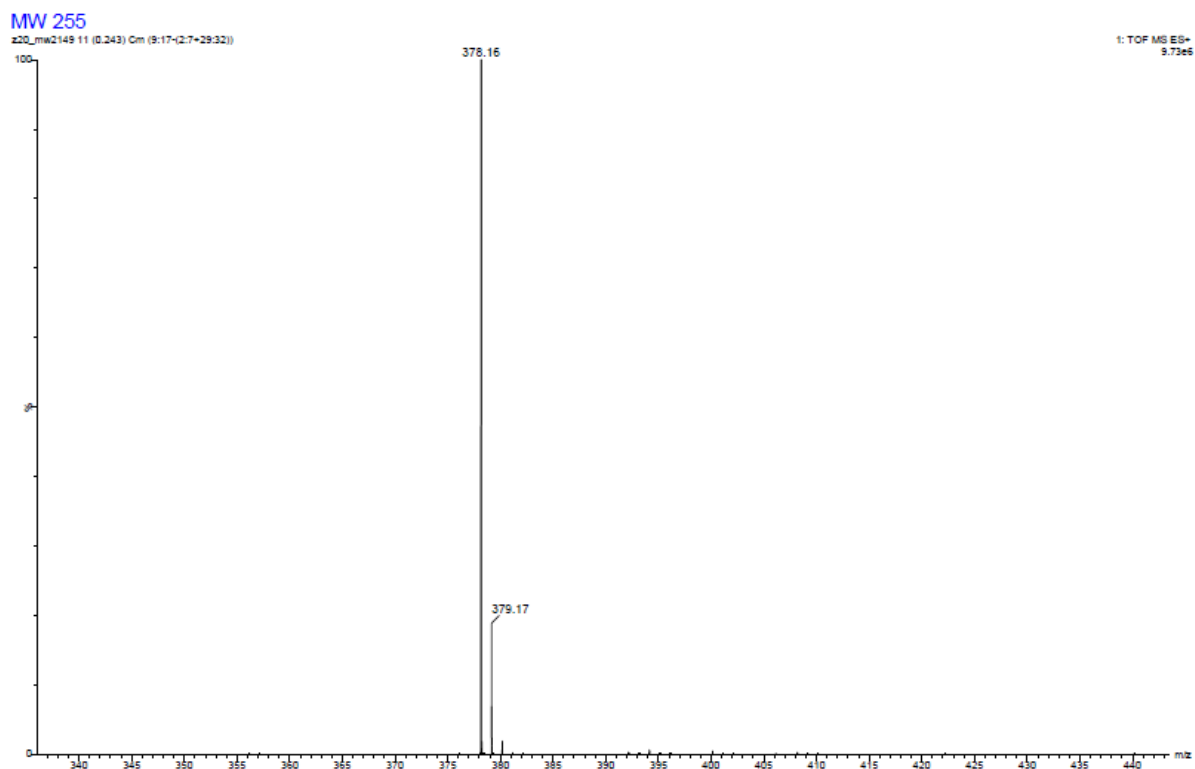


Figure S34:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **16b**.



**Single Mass Analysis**

Tolerance = 3.0 mDa / DBE: min = -0.5, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

232 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60      H: 0-120      N: 0-4      O: 0-4      Na: 0-1

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O	Na
378.1671	378.1681	-1.0	-2.6	9.5	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>04</sub> Na	712.2	n/a	n/a	21	25	1	4	1

Figure S35 HR-MS spectra of compound 16.

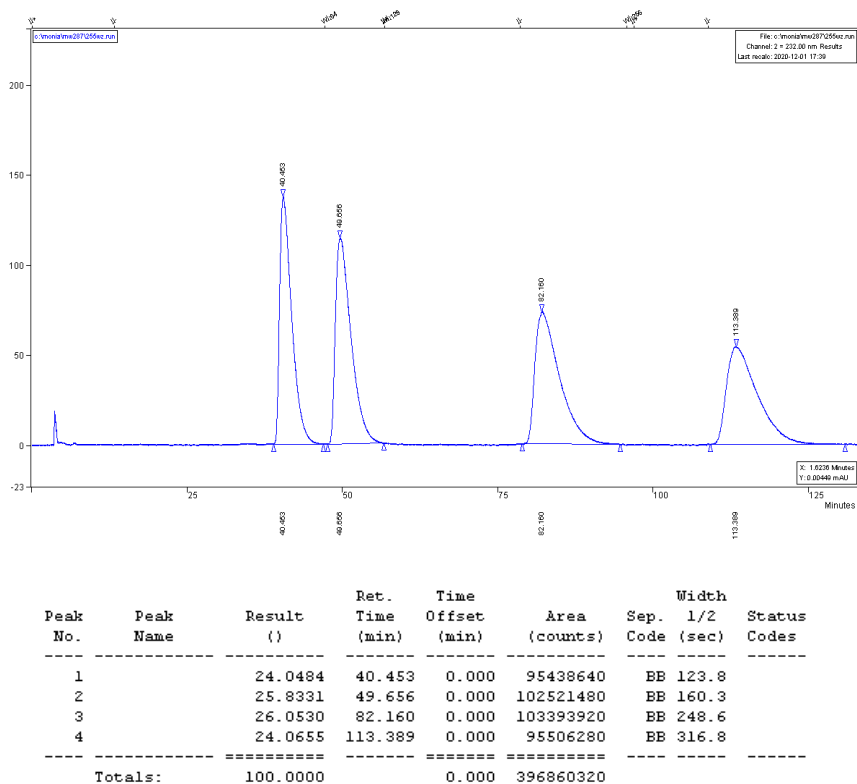


Figure S36. HPLC data of racemic compound **16**.

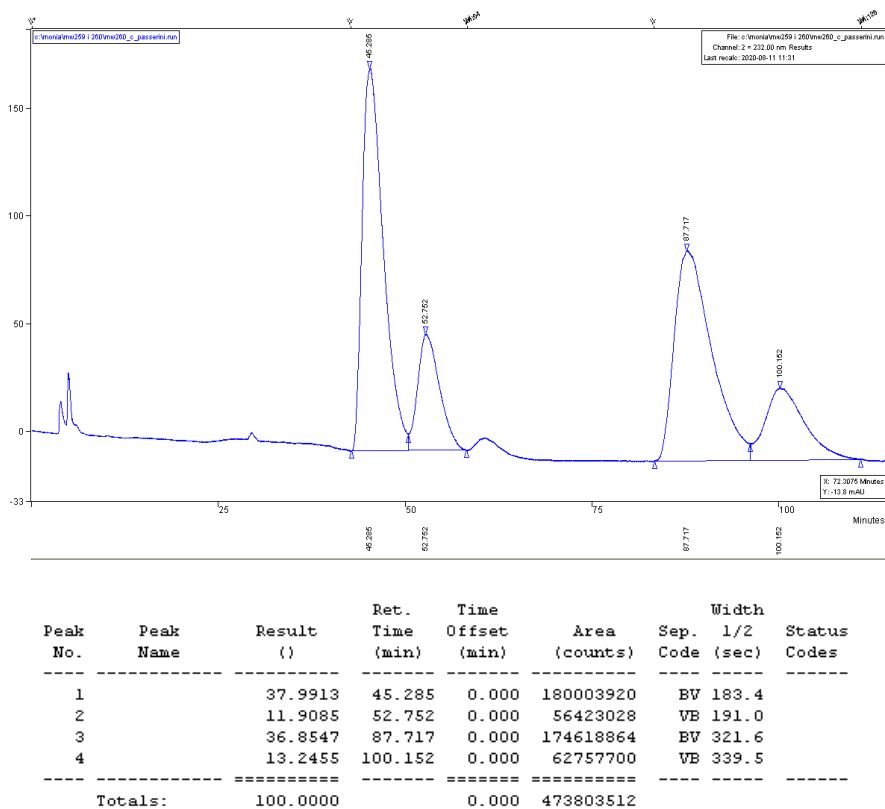
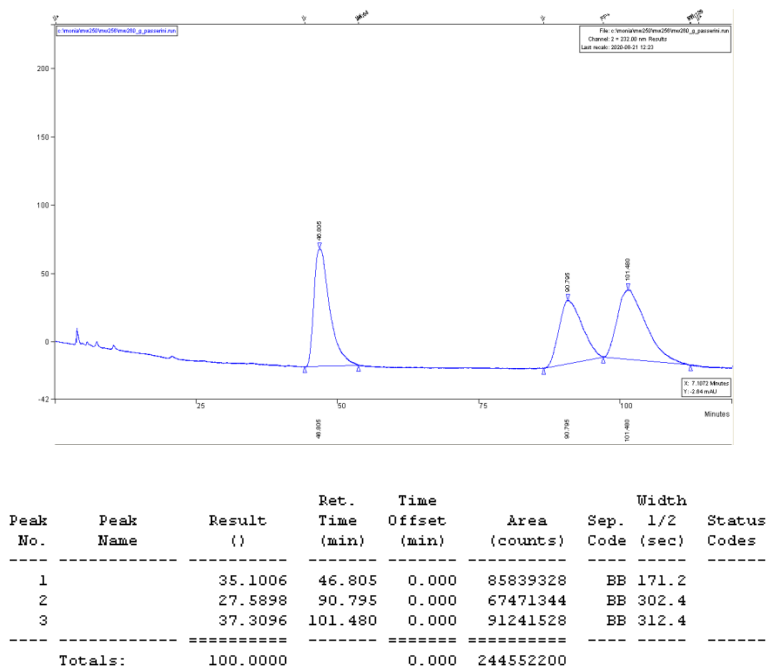
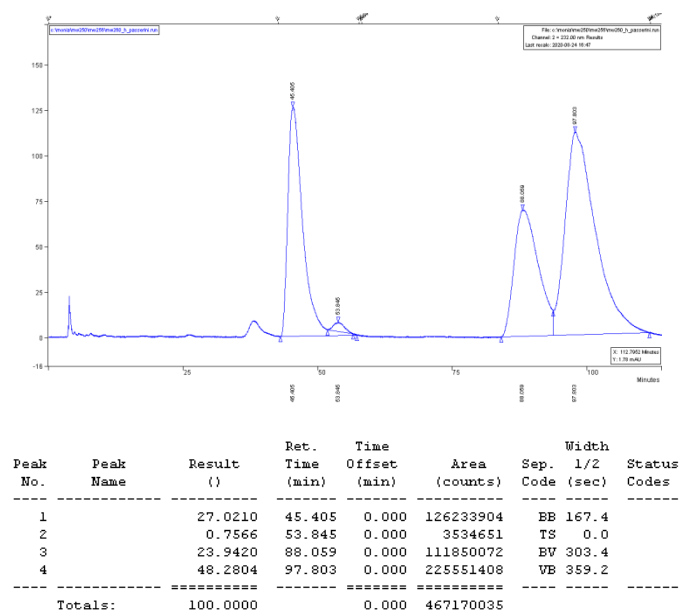


Figure S37. HPLC data of product **16** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by Novozym 435.

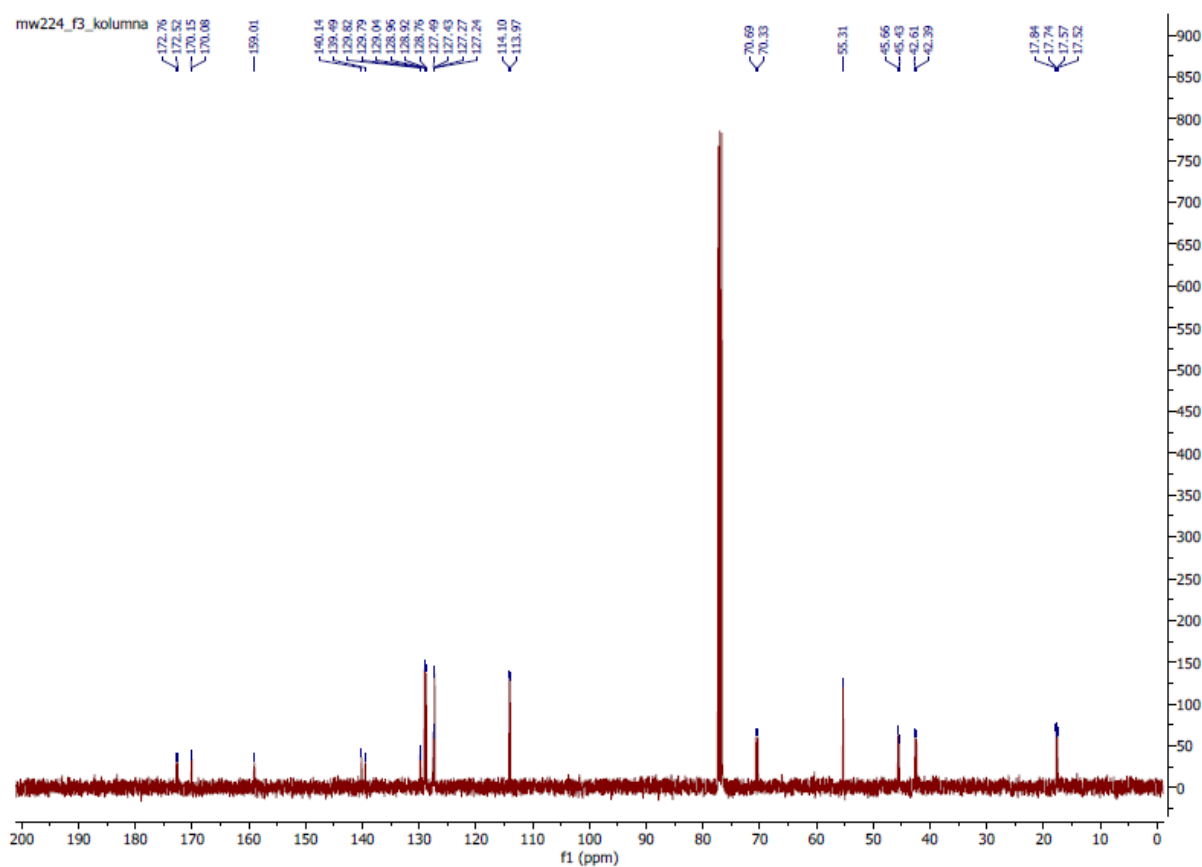
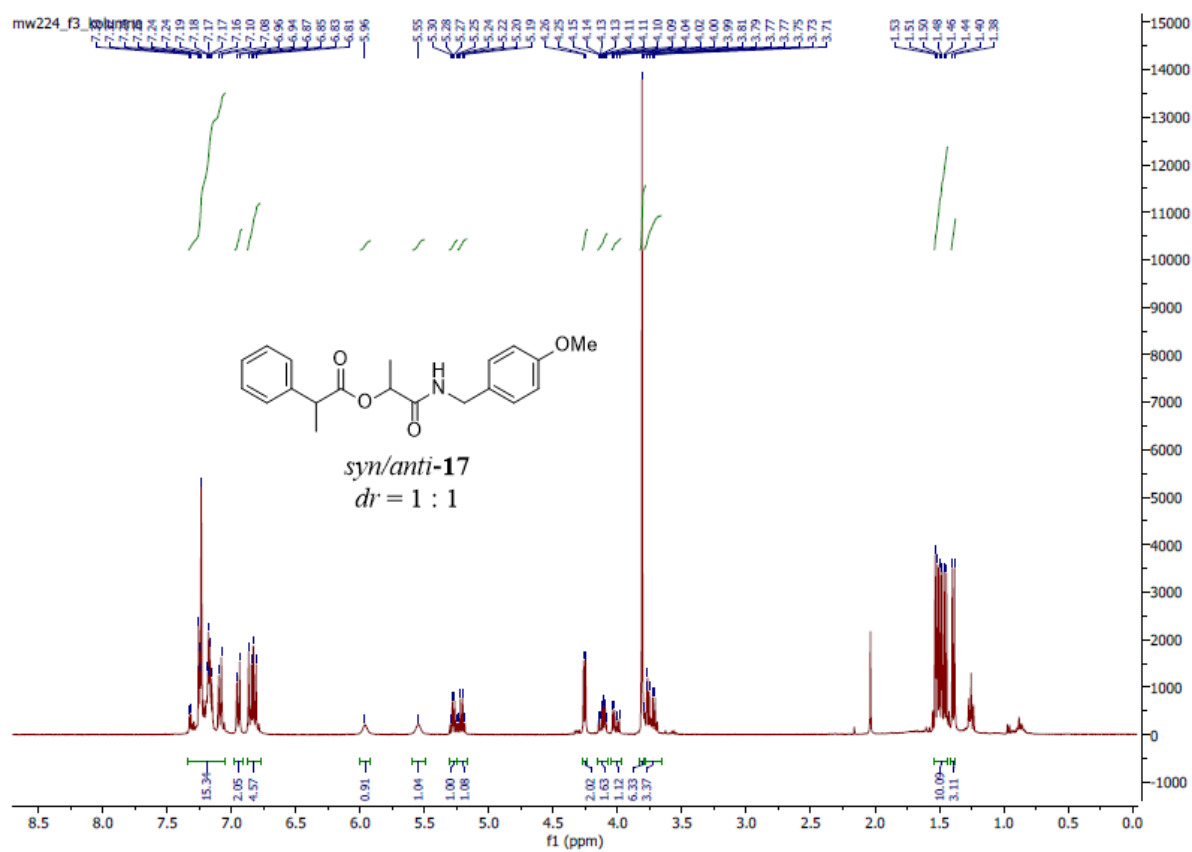


**Figure S38.** HPLC data of product **16** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by PPL.



**Figure S39.** HPLC data of product **16** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase.

**Analytical Method:** 1.5 mL samples dissolved in 2-propanol were analyzed by HPLC, using a Varian ProStar instrument coupled to a UV-Vis detector. Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 0.5 mL/min., 20 °C  $\lambda=220$  nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_{R1} = 45.3$ ,  $t_{R2} = 52.8$ ,  $t_{R3} = 87.7$ ,  $t_{R4} = 100.2$ .



**Figure S40.**  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **17**.

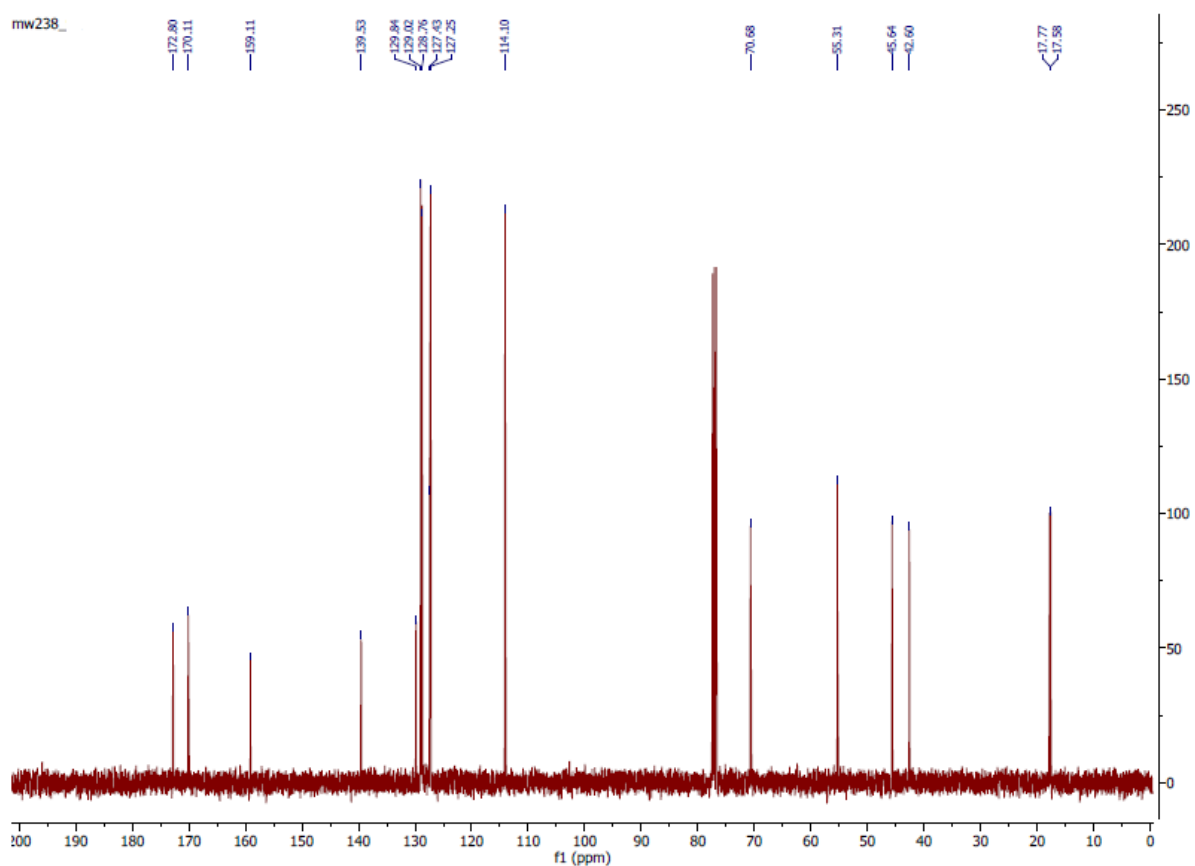
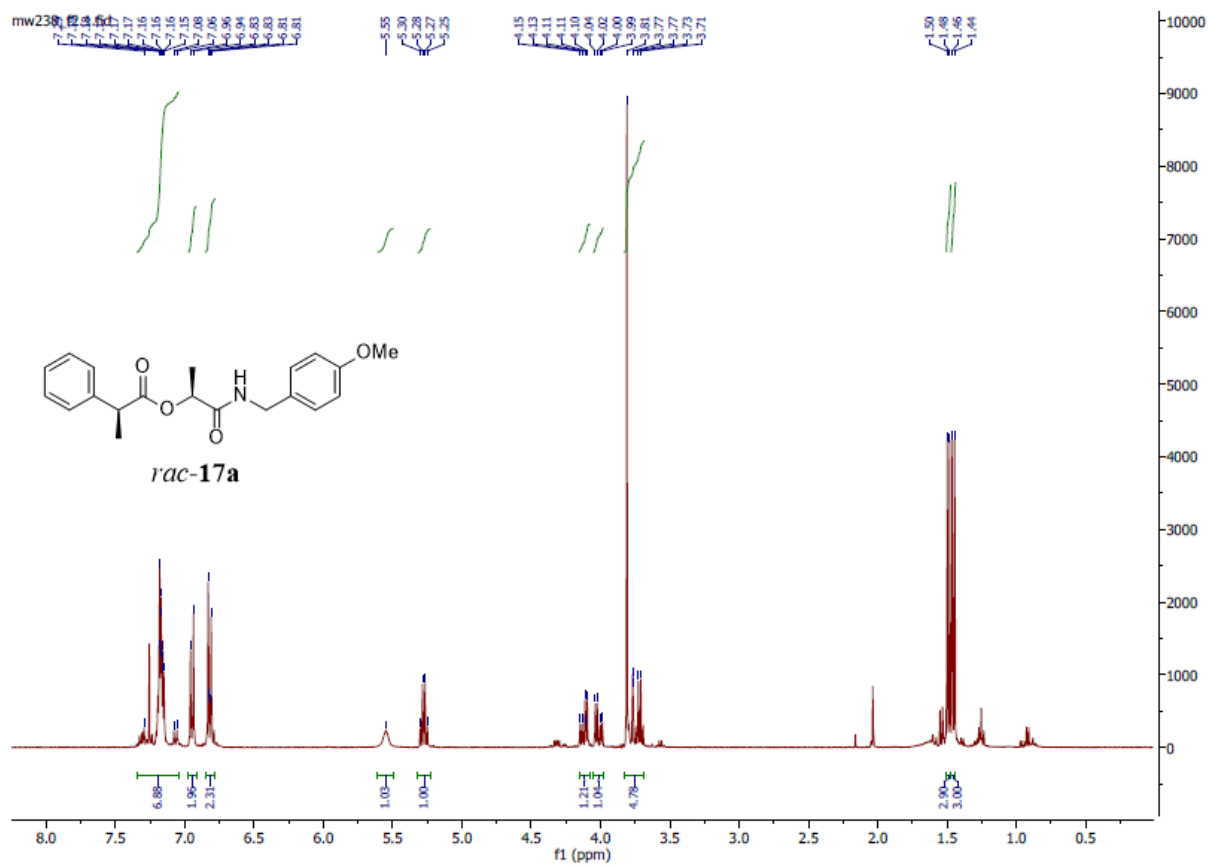


Figure S41. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 17a.



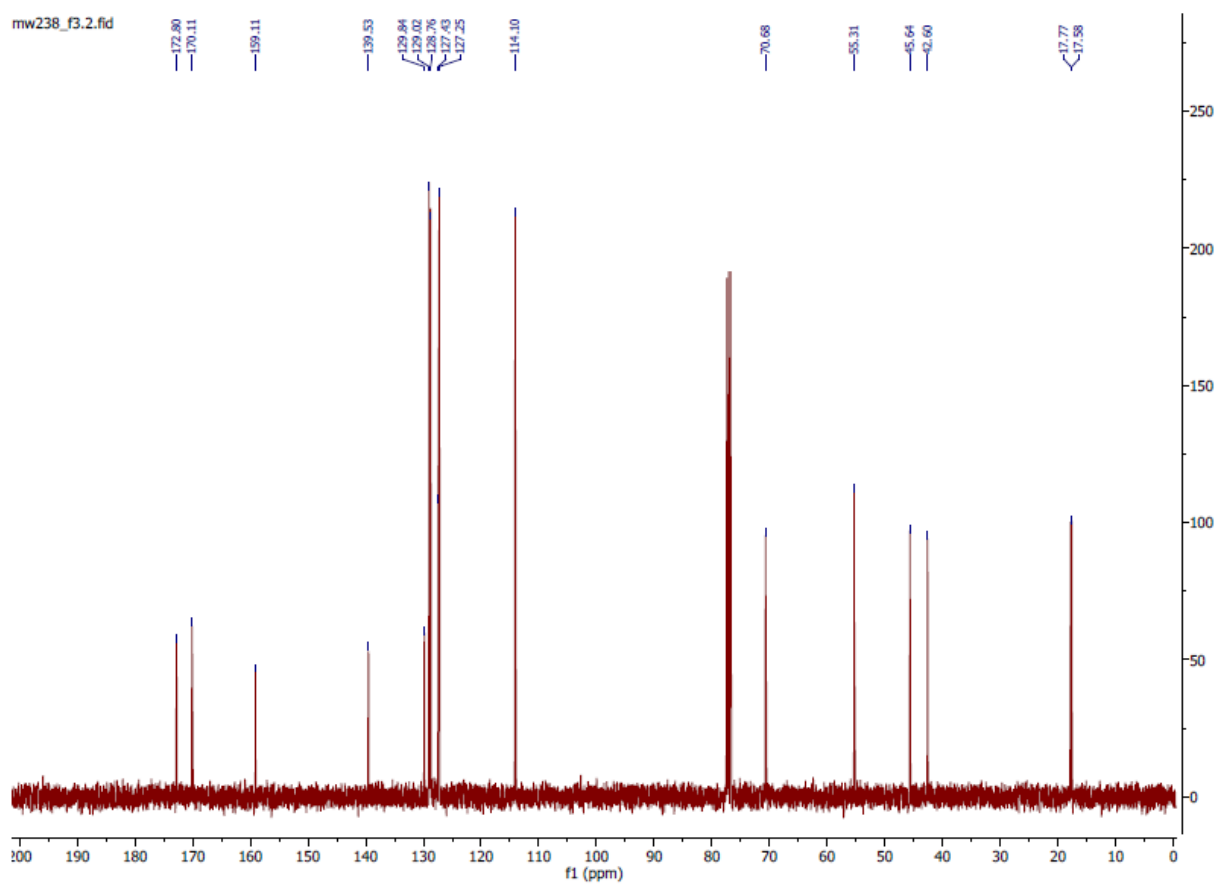
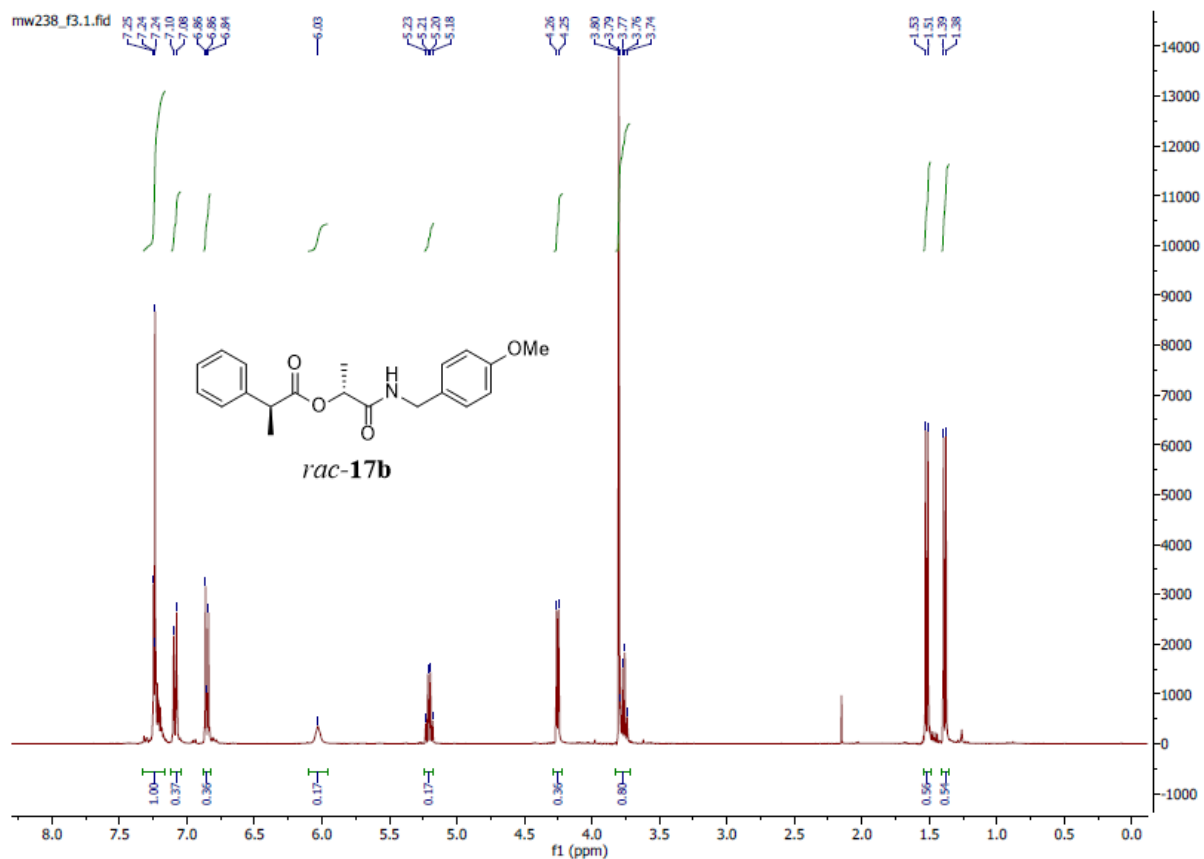
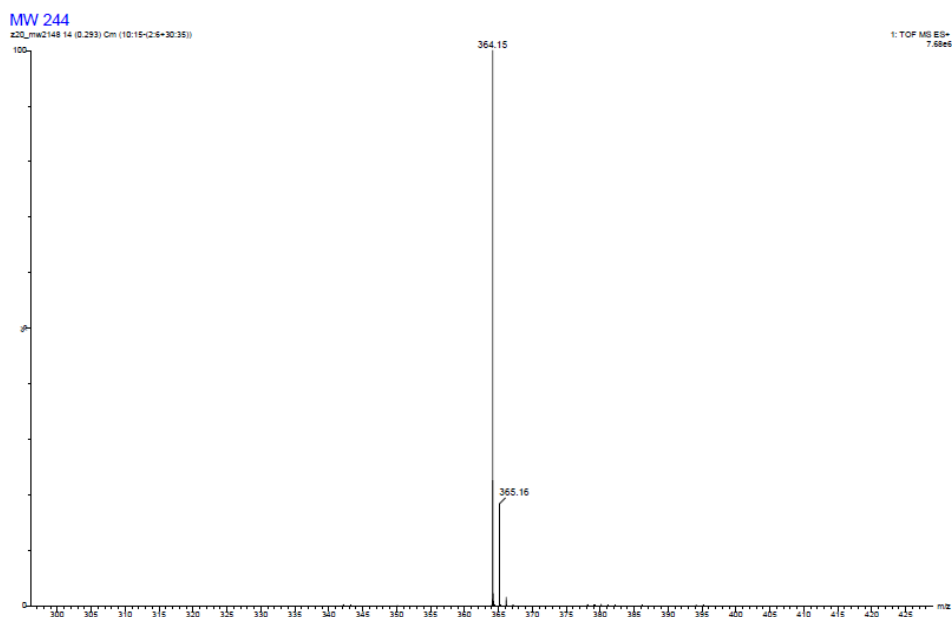


Figure S42.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **17b**.



#### Single Mass Analysis

Tolerance = 3.0 mDa / DBE: min = -0.5, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

223 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60 H: 0-120 N: 0-4 O: 0-4 Na: 0-1

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O	Na
364.1531	364.1525	0.6	1.6	9.5	C20 H23 N O4 Na	721.3	0.028	97.20	20	23	1	4	1
	364.1549	-1.8	-4.9	12.5	C22 H22 N O4	724.8	3.577	2.80	22	22	1	4	

Figure S43:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **17**.

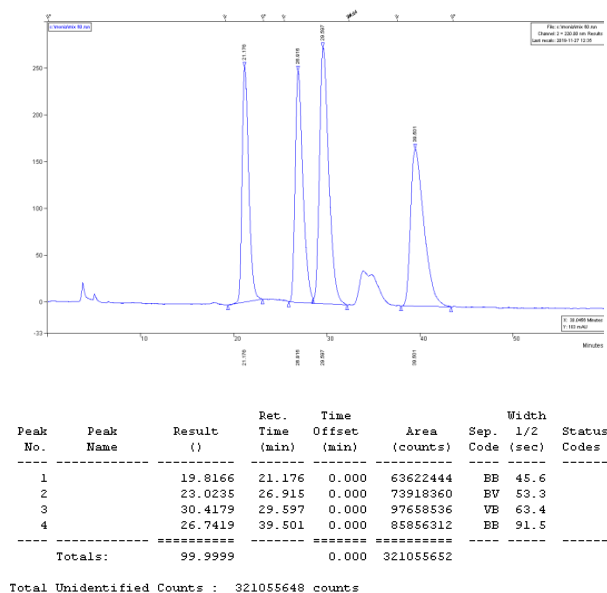
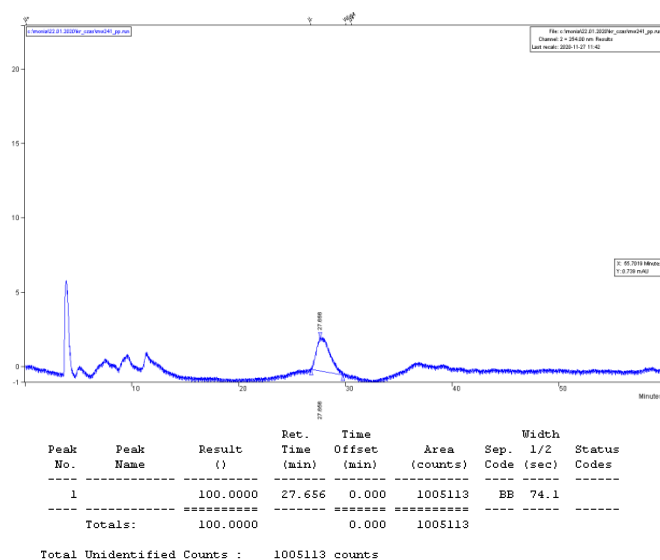


Figure S44. HPLC data of racemic product **17**.



**Figure S45.** HPLC data of product **17** after the enzymatic cascade reaction catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase.

**Analytical Method:** 1.5 mL samples dissolved in 2-propanol were analyzed by HPLC, using a Varian ProStar instrument coupled to a *UV-Vis* detector. Chiralcel OD-H; hexane/isopropanol (95:5), 1.0 mL/min., 20 °C  $\lambda = 254$  nm, retention time of racemic compound (in min):  $t_{R1} = 21.2$ ,  $t_{R2} = 26.9$ ,  $t_{R3} = 30.0$ ,  $t_{R4} = 39.5$ .

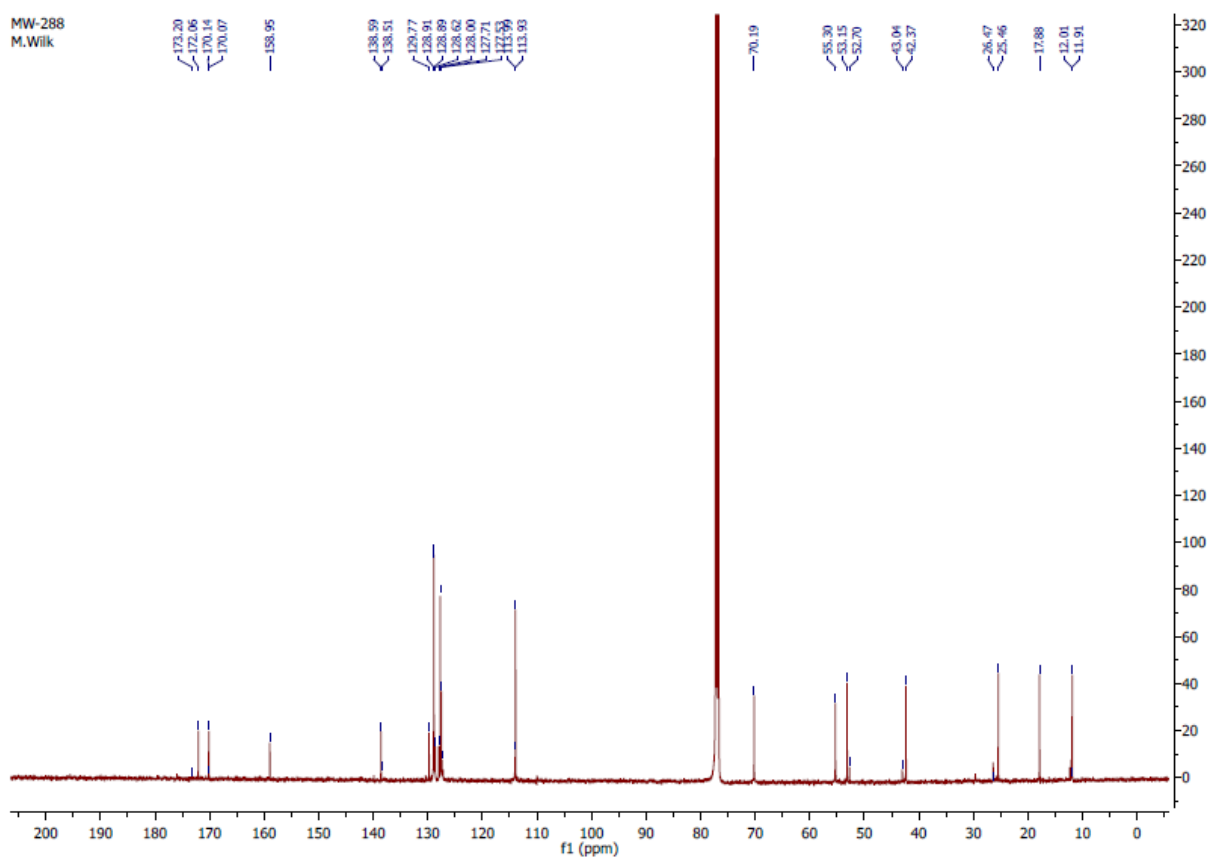
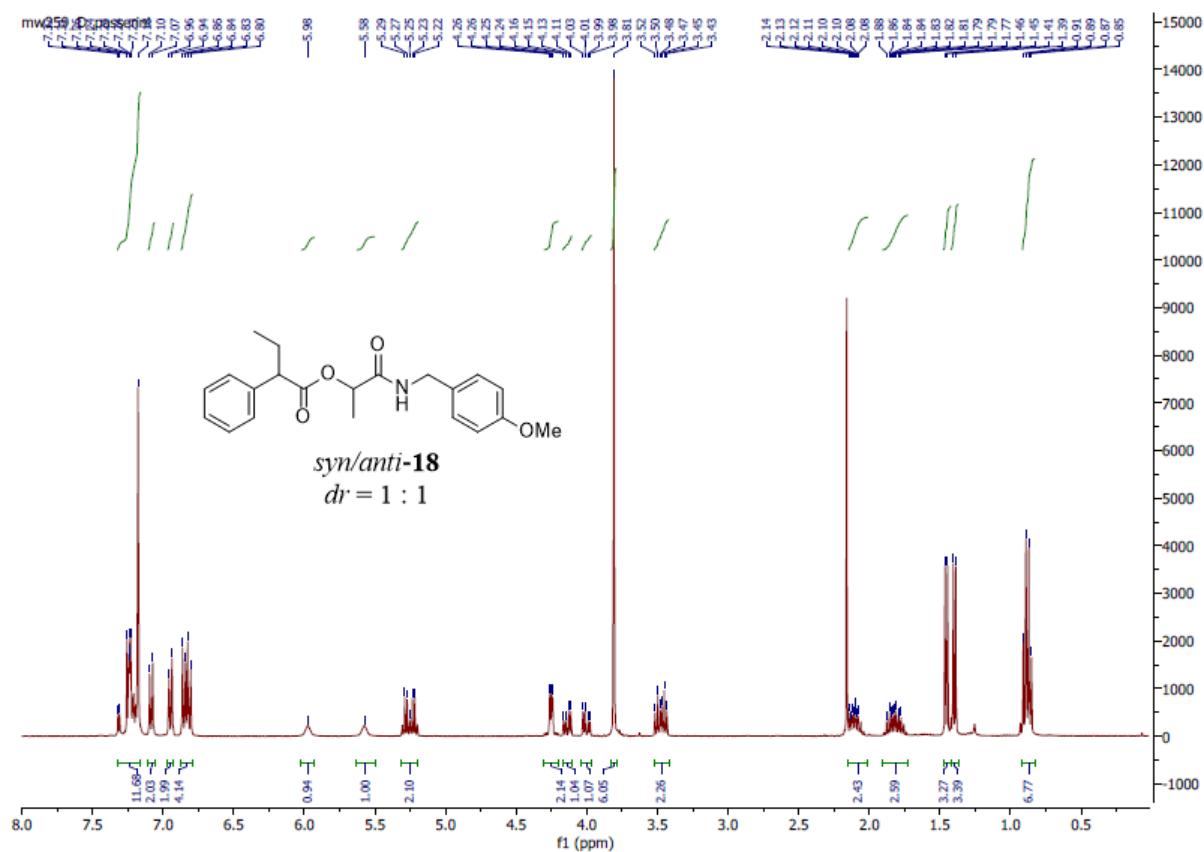


Figure S46.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **18**.

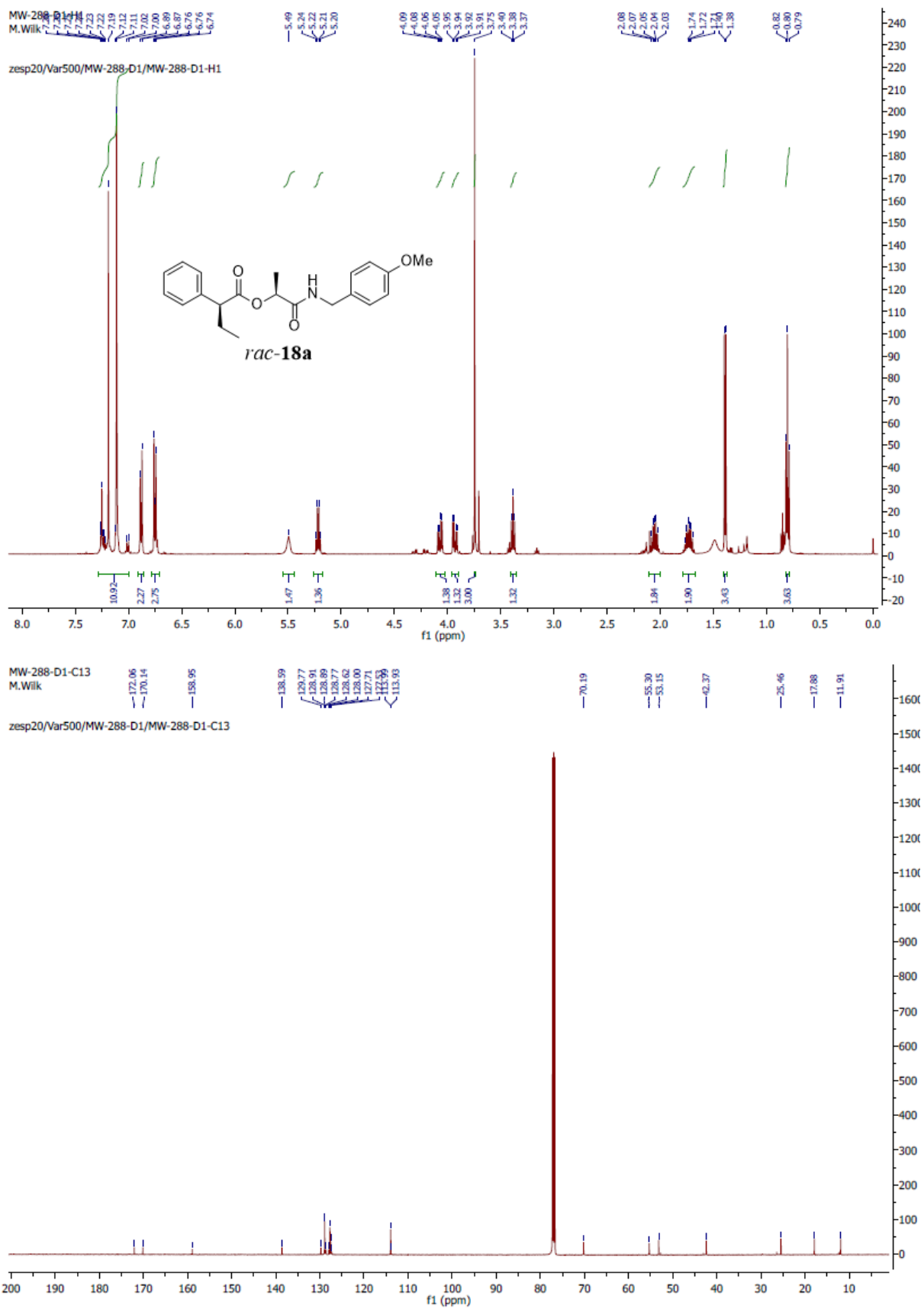


Figure S47.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **18a**.

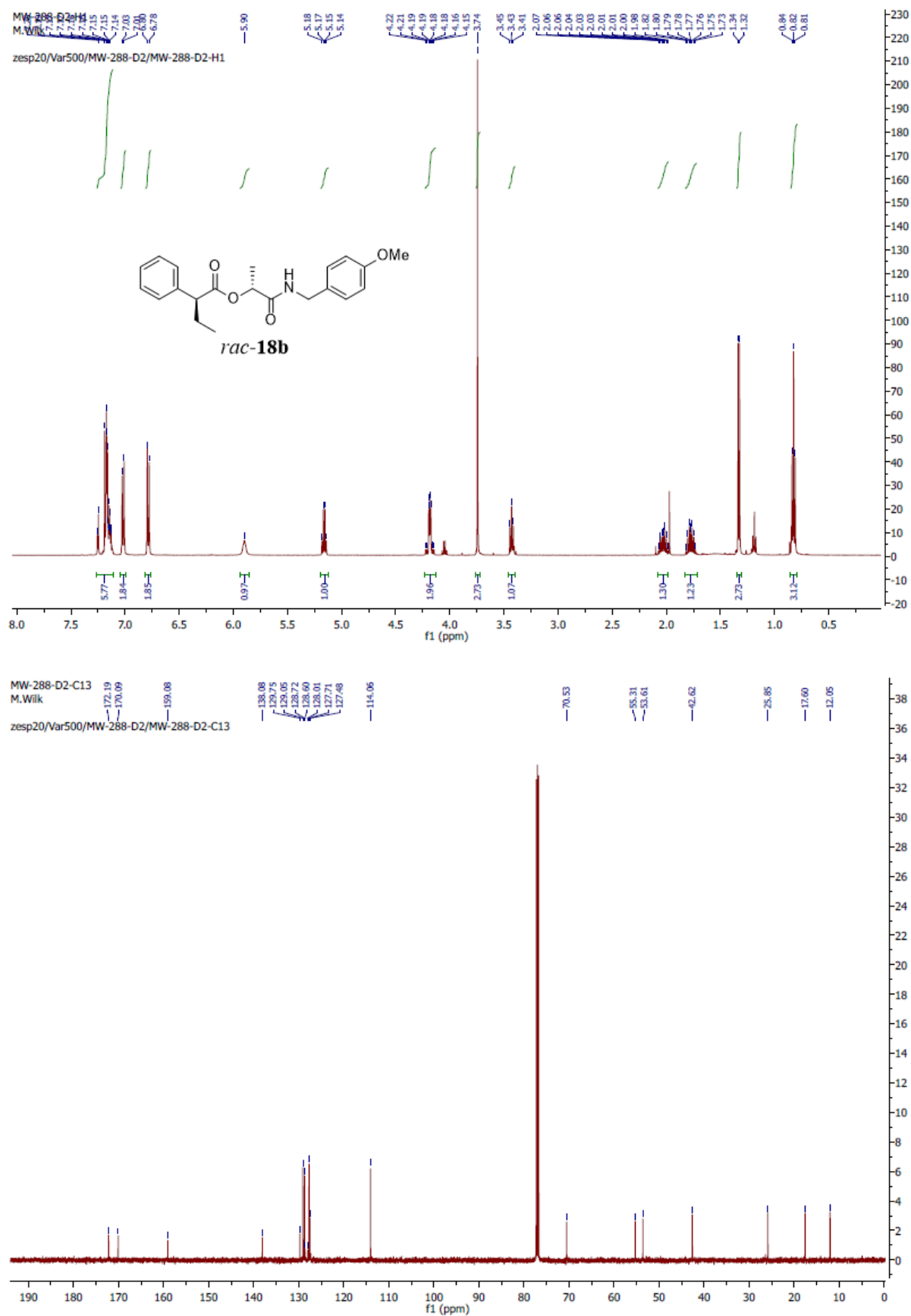
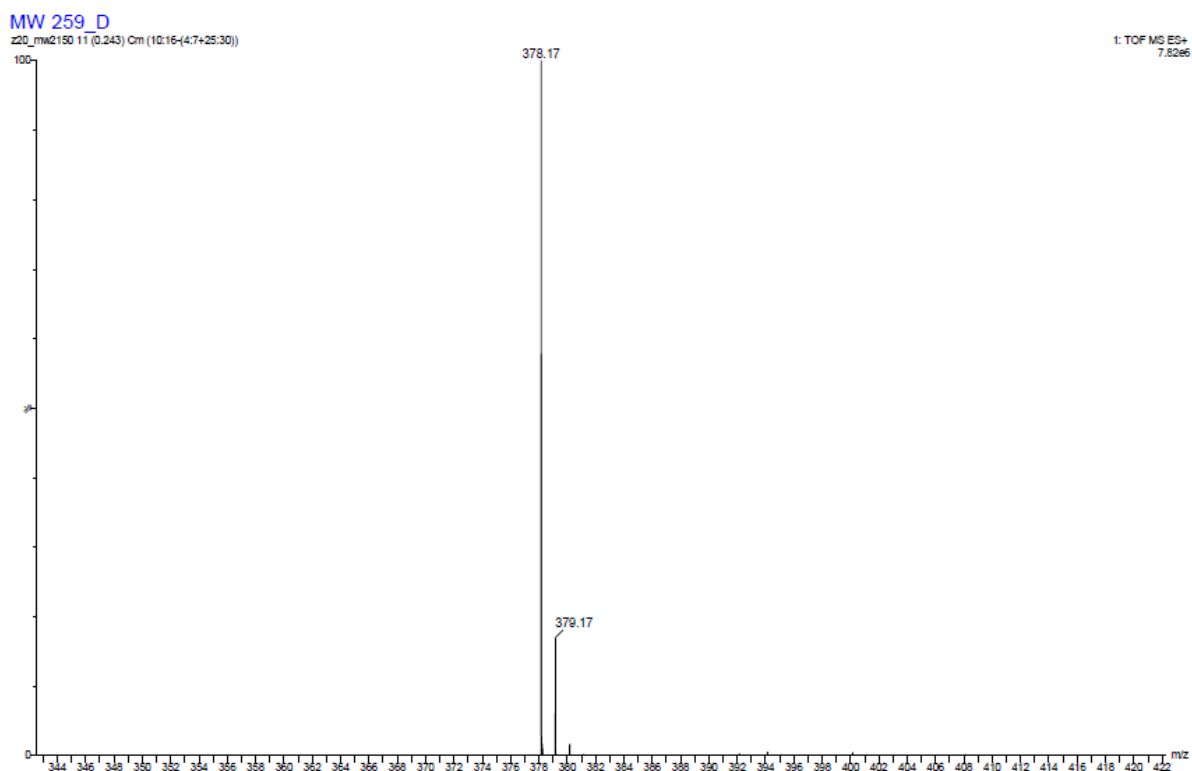


Figure S48.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spectra of compound **18b**.



### Single Mass Analysis

Tolerance = 3.0 mDa / DBE: min = -0.5, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

232 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-60    H: 0-120    N: 0-4    O: 0-4    Na: 0-1

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O	Na
378.1683	378.1681	0.2	0.5	9.5	C21 H25 N O4 Na	689.1	0.028	97.27	21	25	1	4	1
	378.1705	-2.2	-5.8	12.5	C23 H24 N O4	692.7	3.601	2.73	23	24	1	4	

Figure S49: HR-MS data of compound 18.

## 12. Analytical data of compound 19:

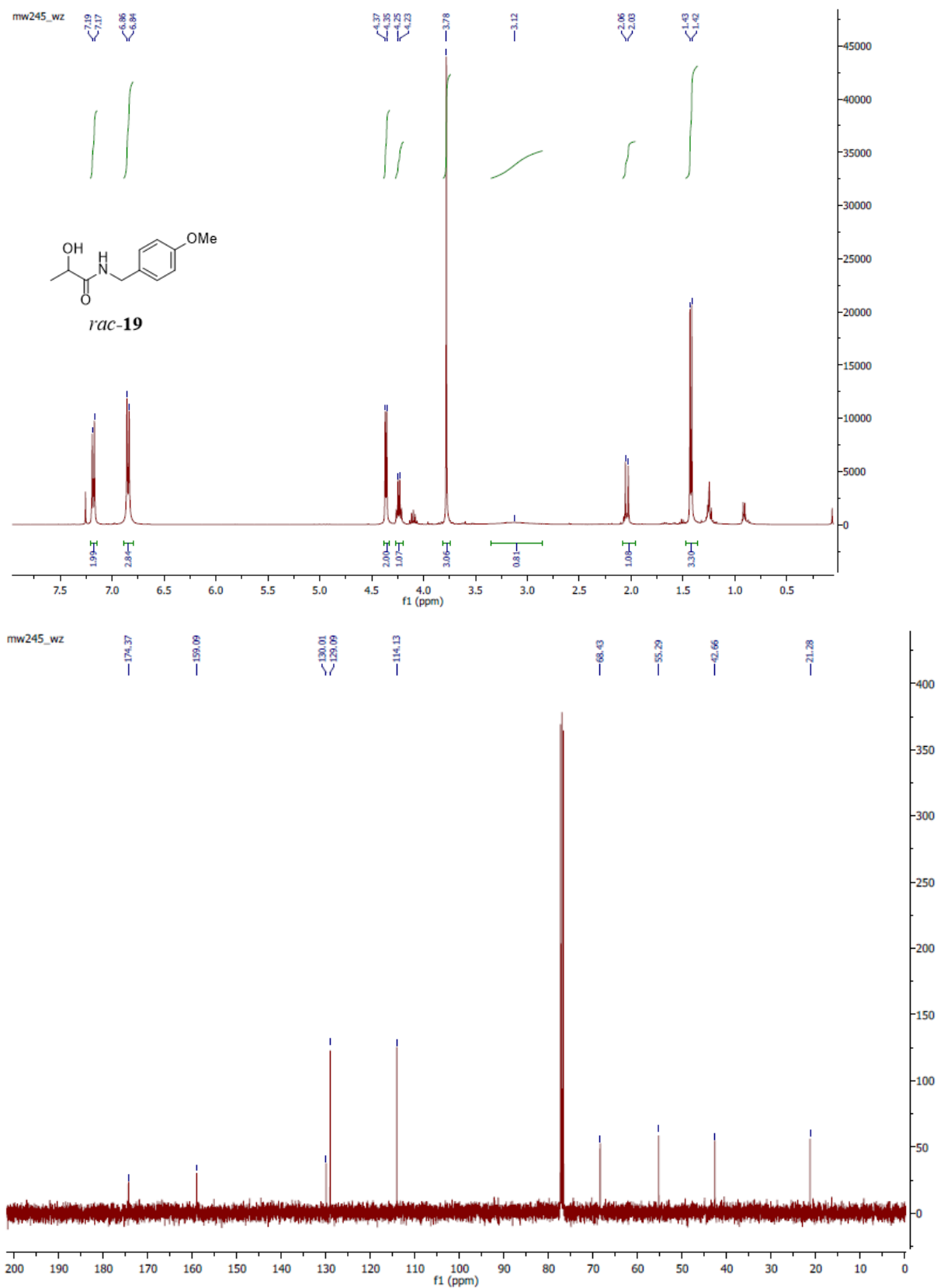
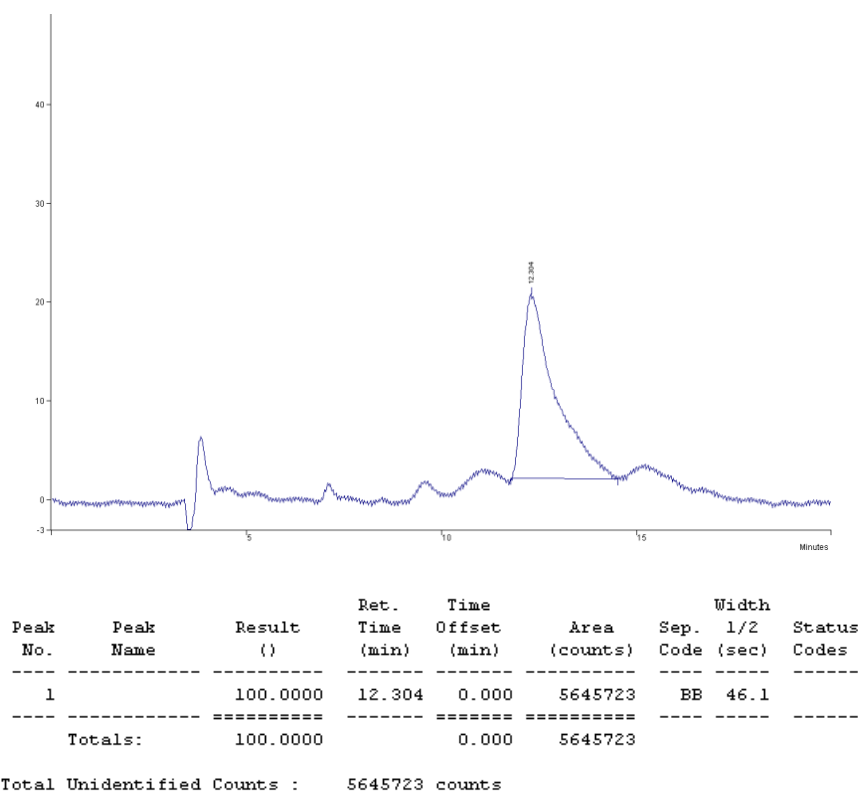
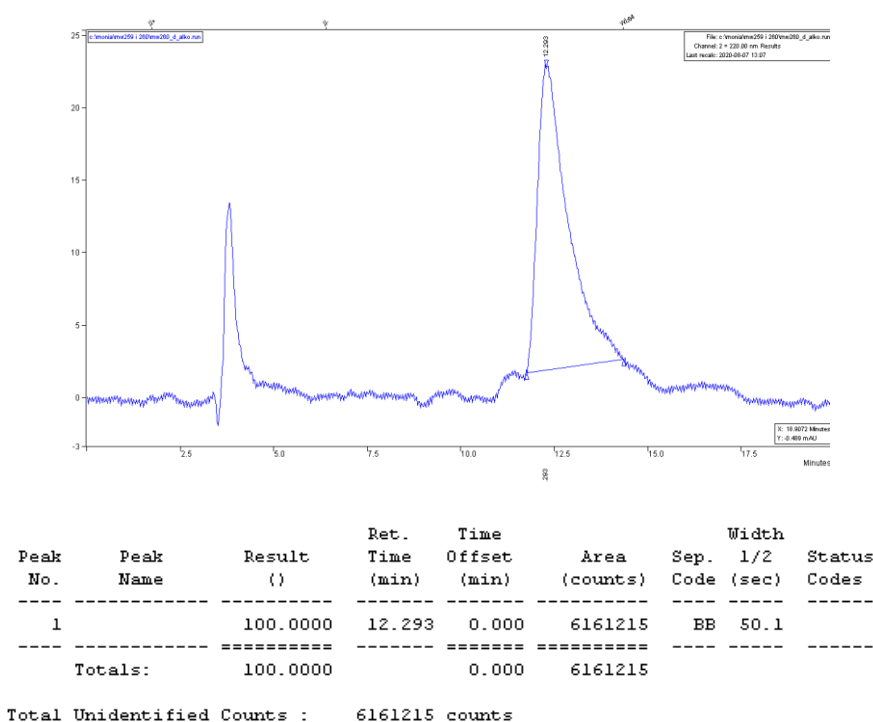


Figure S50 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 19.





**Figure S51.** HPLC data of product **19** after the enzymatic cascade reaction of ester **9** catalyzed by *Candida lipolytica* lipase.



**Figure S52.** HPLC data of product **19** after the enzymatic cascade reaction of ester **10** catalyzed by Lipozym.

### 13. Analytical data of compound 19:

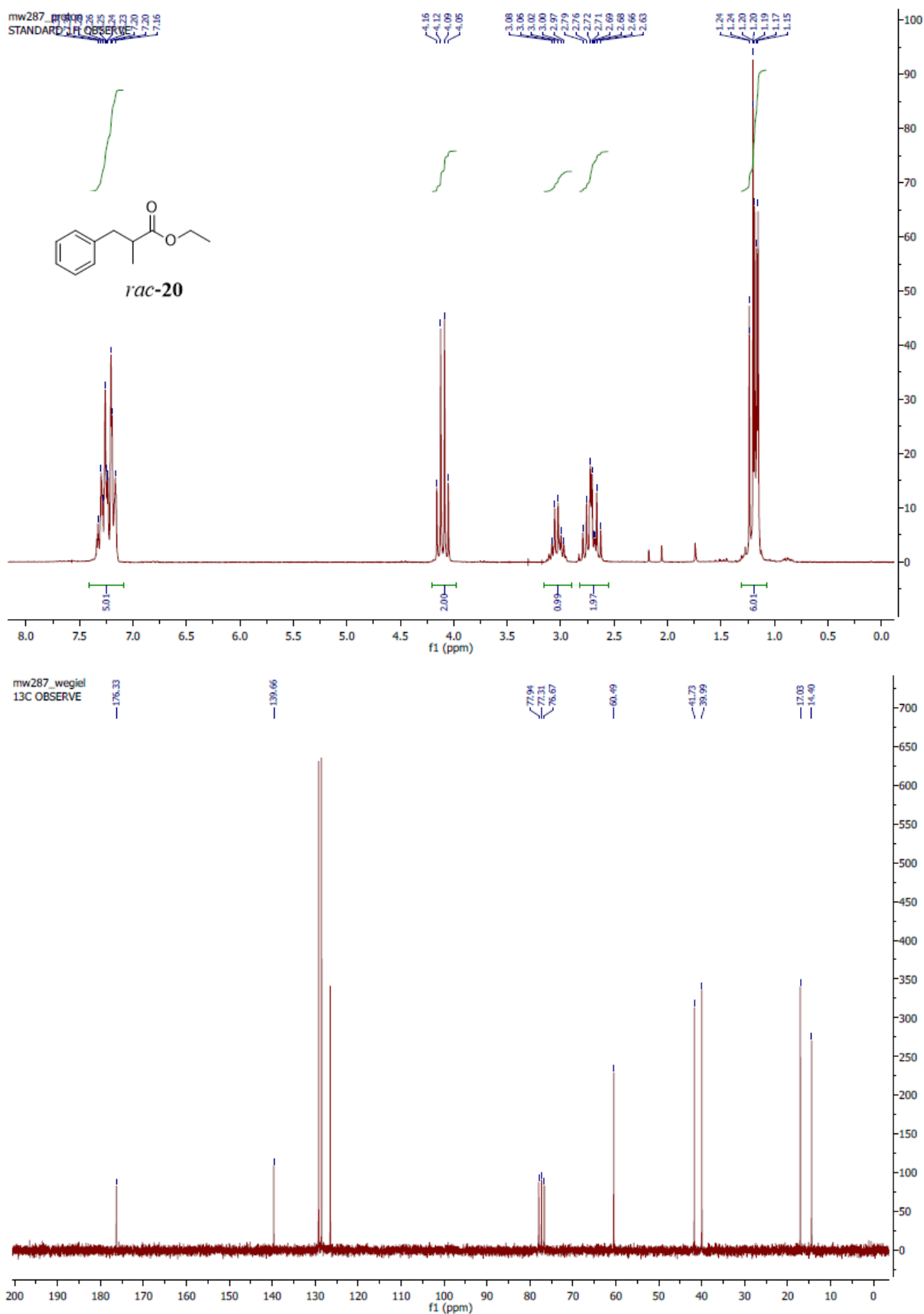


Figure S53: <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectra of compound 20.

## 14. References

1. Madej, A., Paprocki, D., Koszelewski, D., Żądło-Dobrowolska, A., Brzozowska, A., Walde, P., Ostaszewski, R. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 33344-33354.
2. Brodzka, A., Koszelewski, D., Ostaszewski, R., *J. Org. Chem.*, **2020**, *85*, 15305-15313.
3. Żądło-Dobrowolska, A.; Koszelewski, D.; Paprocki, D.; Madej, A.; Wilk, M.; Ostaszewski, R. Enzyme-Promoted Asymmetric Tandem Passerini Reaction. *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3047-3053.
4. Li, J., Shen, J., Xia, C., Wang, Y., Liu, D., Wanbin, Z. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2122-2124.
5. Wang X., Buchwald, S.L., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19080–19083.

# Efficient Assay for the Detection of Hydrogen Peroxide by Estimating Enzyme Promiscuous Activity in the Perhydrolysis Reaction

Monika Wilk<sup>[a]</sup> and Ryszard Ostaszewski\*<sup>[a]</sup>

Hydrogen peroxide is an ideal oxidant in view of its availability, atom economy, or green aspects. Furthermore, it is produced by the cell mitochondria and plays a meaningful role in controlling physiological processes, but its unregulated production leads to the destruction of organs. Due to its diverse roles, a fast and selective method for hydrogen peroxide detection is the major limitation to preventing the negative effects caused by its excess. Therefore, we aimed to develop an efficient assay for the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For this purpose, we combined the

enzymatic method for the detection of hydrogen peroxide with the estimation of the promiscuity of various enzymes. We estimated the activity of an enzyme in the reaction of *p*-nitrophenyl esters with hydrogen peroxide resulting in the formation of peracid. To our knowledge, there is no example of a simple, multi-sensor demonstrating the promiscuous activity of an enzyme and detecting hydrogen peroxide in aqueous media.











---

# ChemBioChem

Supporting Information

## **Efficient Assay for the Detection of Hydrogen Peroxide by Estimating Enzyme Promiscuous Activity in the Perhydrolysis Reaction**

Monika Wilk and Ryszard Ostaszewski\*

<b>1. General information .....</b>	<b>S3</b>
<b>2. Synthetic procedures .....</b>	<b>S3</b>
2.1. Synthesis of substrate 1.....	S3
2.2. Synthesis of substrate 2-4 .....	S3
<b>3. Enzymatic assay procedures .....</b>	<b>S3</b>
3.1. Enzyme assay for hydrolysis reaction .....	S3
3.2. Enzyme assay for perhydrolysis reaction .....	S4
<b>4. Analytical data .....</b>	<b>S5</b>
Figure S1. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C spectra of substrate 1 .....	S5
Figure S2. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C spectra of substrate 2 .....	S6
Figure S3. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C spectra of substrate 3 .....	S7
Figure S4. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C spectra of substrate 4 <i>S</i> .....	S8
Figure S5. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C spectra of substrate 4 <i>R</i> .....	S9
<b>5. Table of contents .....</b>	<b>S10</b>
Table S1. The net rates for the enzymatic hydrolysis and perhydrolysis of substrate 2. ....	S10
Table S2. The net rates for the enzymatic hydrolysis and perhydrolysis of substrate 3. ....	S10
Table S3. The net rates for enzymatic hydrolysis and perhydrolysis of substrate 4 <i>S</i> . ....	S11
Table S4. The net rates for the enzymatic hydrolysis and perhydrolysis of substrate 4 <i>R</i> . ....	S11
<b>6. Figures .....</b>	<b>S12</b>
Figure S6. The influence of hydrogen peroxide concentration on the perhydrolysis of <i>p</i> -nitrophenyl acetate .....	S12

## 1. General information

$^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with Bruker 400 MHz spectrometer in  $\text{CDCl}_3$  and TMS as a standard (0 ppm). Reactions were performed under a normal atmosphere and monitored by TLC on silica gel 60 F254 aluminium sheets using UV light as a visualizing agent. UV/Vis spectra time profiles were recorded in 1 cm quartz cuvettes at 37 °C on a U-1900 spectrophotometer (Hitachi). Acetyl chloride was purchased from Fluka, the rest of substrates were purchased from Sigma Aldrich and used without additional purification. All enzymes used, except Novozym 435 (Novo Nordisk), were purchased from Sigma. Hydrogen peroxide solution (50 wt. % in  $\text{H}_2\text{O}$ , stabilized) was purchased from Chempur Company. Buffer was prepared using the anhydrous sodium dihydrogen phosphate and di-sodium hydrogen phosphate, which were purchased from Chempur company. UV/Vis for *p*-nitrophenol recorded at phosphate buffer (pH 7.0):  $\lambda_{\text{max}} = 400\text{-}401$  nm.

## 2. Synthetic procedures

### 2.1 Synthesis of *p*-nitrophenyl acetate (1)

To the stirred mixture of 1 eq of *p*-nitrophenol in 5 mL of THF, 1.2 eq of triethylamine was added. The mixture was kept in the cooling bath (water/ice) for 15 min, followed by the dropwise addition of 1.5 eq of acyl chloride. After addition was completed, the reaction was left for c.a. 2 h at the room temperature. The reaction was monitored by TLC (hexane:ethyl acetate, 9:1). Then the solvent was evaporated under reduced pressure. Later the crude product was dissolved in DCM (80 mL) and subsequently extracted with aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 x 50 mL) and water (1 x 50 mL). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ . After filtration, DCM was evaporated and the *p*-nitrophenyl acetate was purified by the column chromatography: hexane:ethyl acetate, 9:1), to give light yellow solid with 86 % yield.

### 2.2 Synthesis of substrates 2-4.

To the stirred solution of 1 eq of *p*-nitrophenol and 1 eq of the corresponding acid (2-4) in 5 mL of ethyl acetate, dicyclohexylcarbodiimide (1.2 eq) was added. The reaction was mixed in the cooling bath for the period of 1 h and next later overnight at the room temperature. The reaction was monitored by TLC chromatography (hexane: ethyl acetate, 9:1) and after the reaction completed the precipitated was filtered off and the excess of solvent was evaporated. The product was purified by the column chromatography, using hexane:ethyl acetate (9:1) as an eluent. Corresponding esters were obtain as a solid products with 85-95 % yield.

## 3. Enzymatic assay procedures

### 3.1 Enzyme assay for hydrolysis reaction:

*p*-nitrophenyl esters (1-4) were prepared as 5 mM stock solutions in acetonitrile. Enzymes were diluted from 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  stock solutions in PBS (0.1 mM, pH 7.0). 1 mg of Novozym 435 was added directly to the reaction mixture. To the 3 mL of phosphate buffer saline, 5  $\mu\text{L}$  of enzyme solution was added. Assays were followed by addition of 40  $\mu\text{L}$  substrate solution to the buffer containing enzyme. Time profiles were recorded in 1 cm quartz cuvettes at 37 °C on a U-1900 spectrophotometer

(Hitachi). The obtained data was converted to *p*-nitrophenol concentration by using a calibration curve. The indicated reaction rates were derived from the linear portion of every curve.

### **3.2 Enzyme assay for perhydrolysis reaction:**

The procedure is the same as above, but to the stock solution of substrate, the corresponding amount of hydrogen peroxide (50 wt. % in H<sub>2</sub>O, stabilized) was added.

#### 4. Analytical data of substrates 1-4

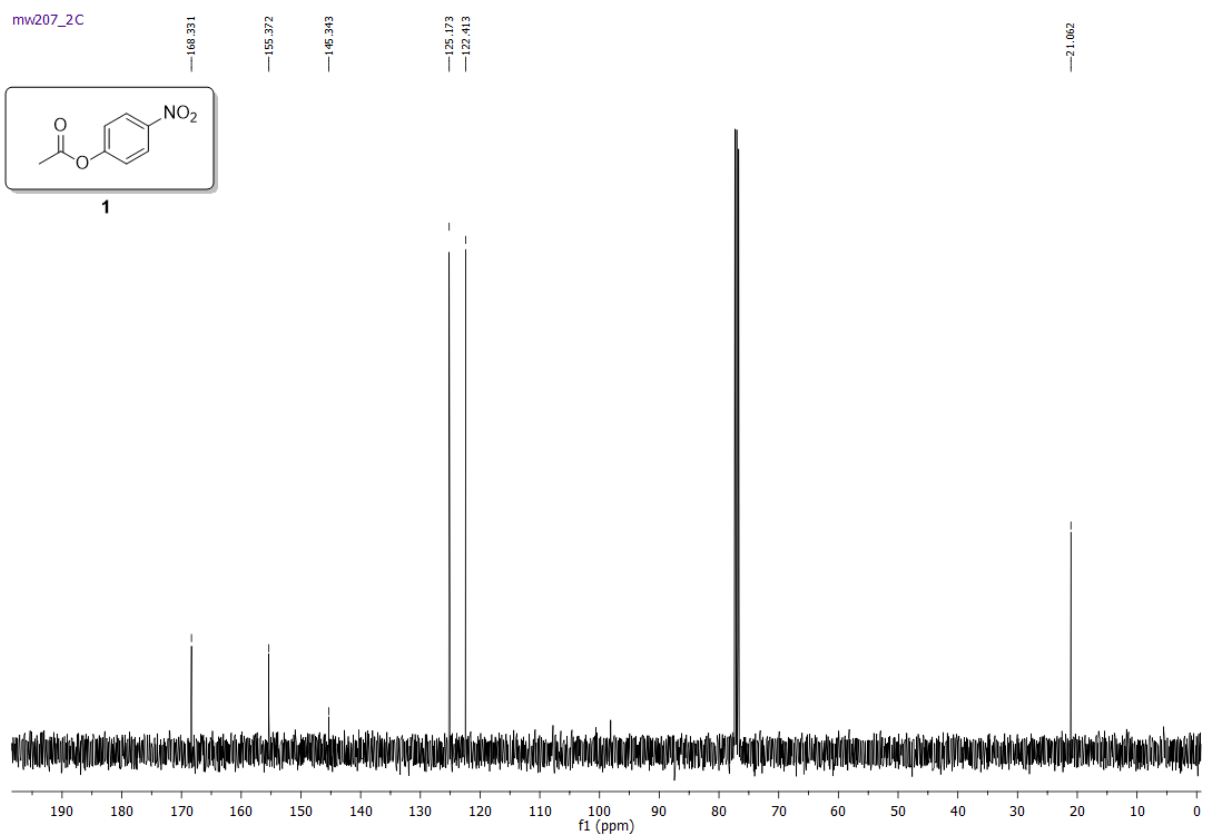
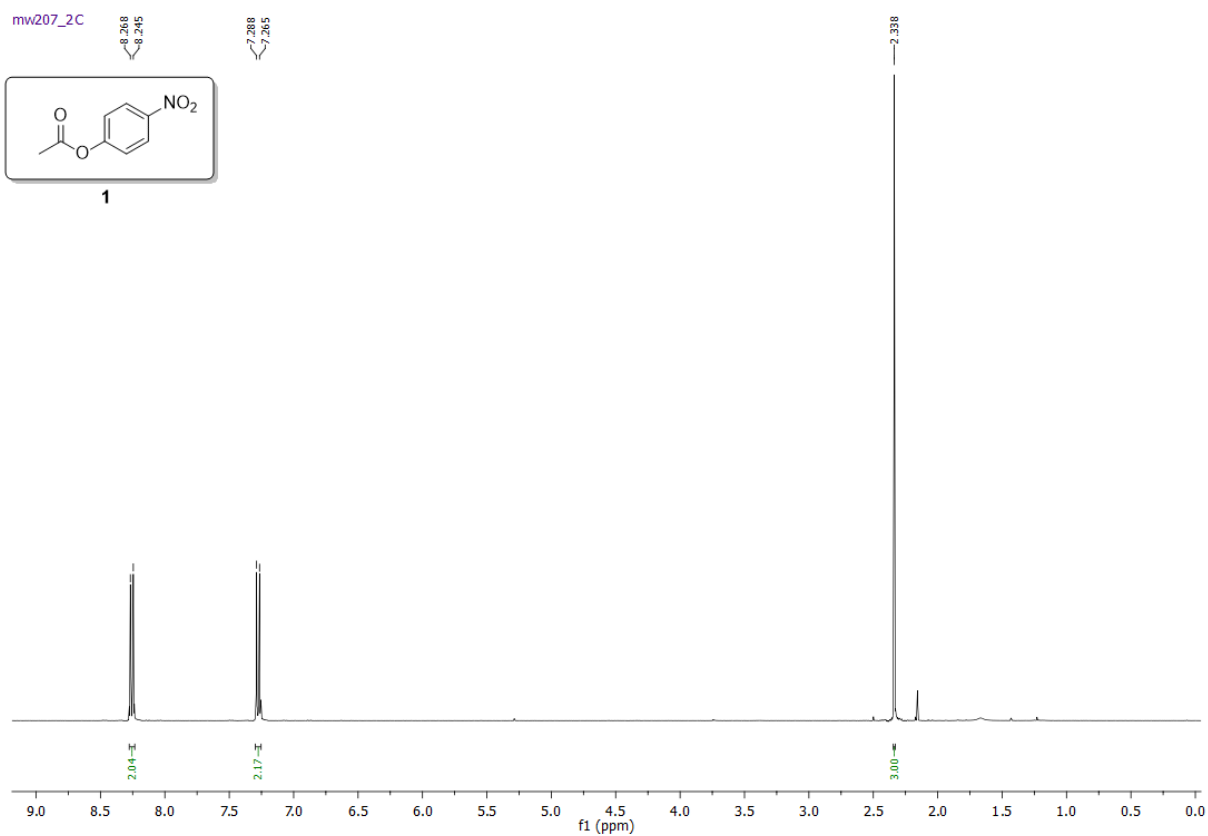
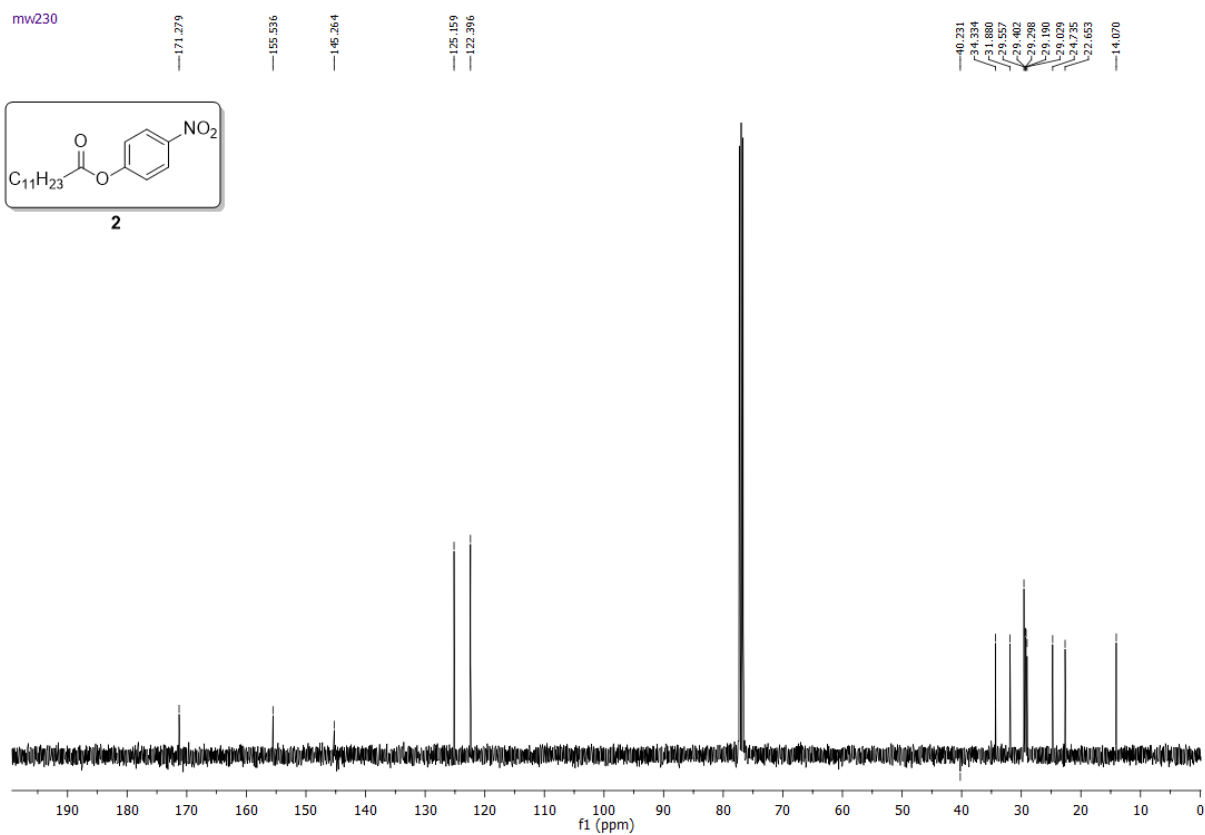
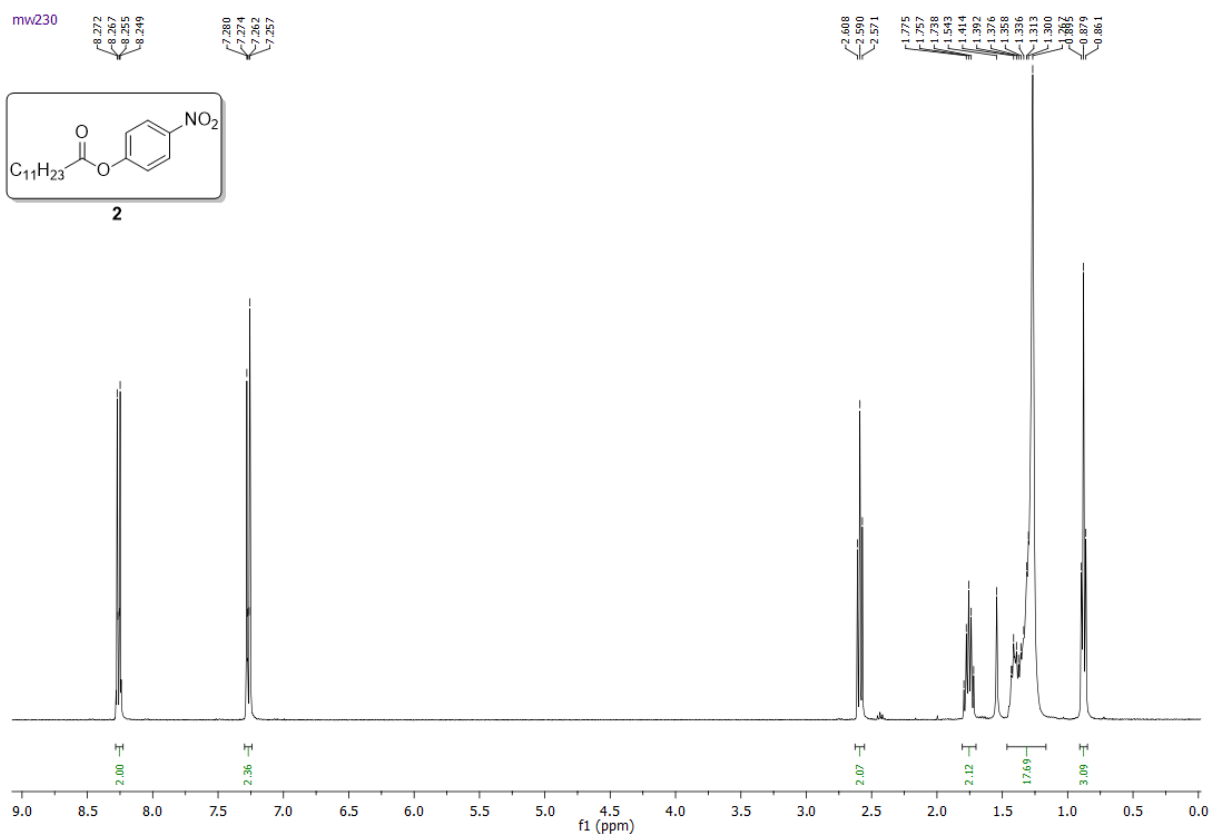
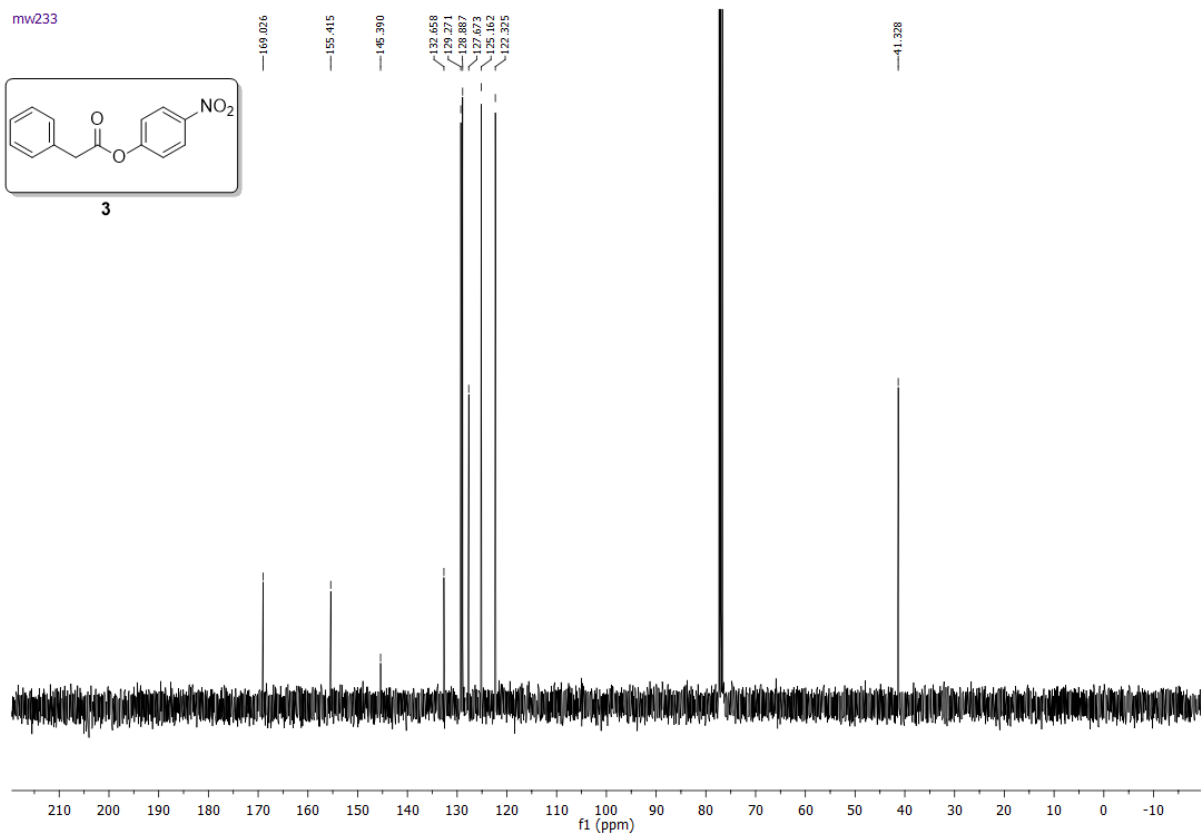
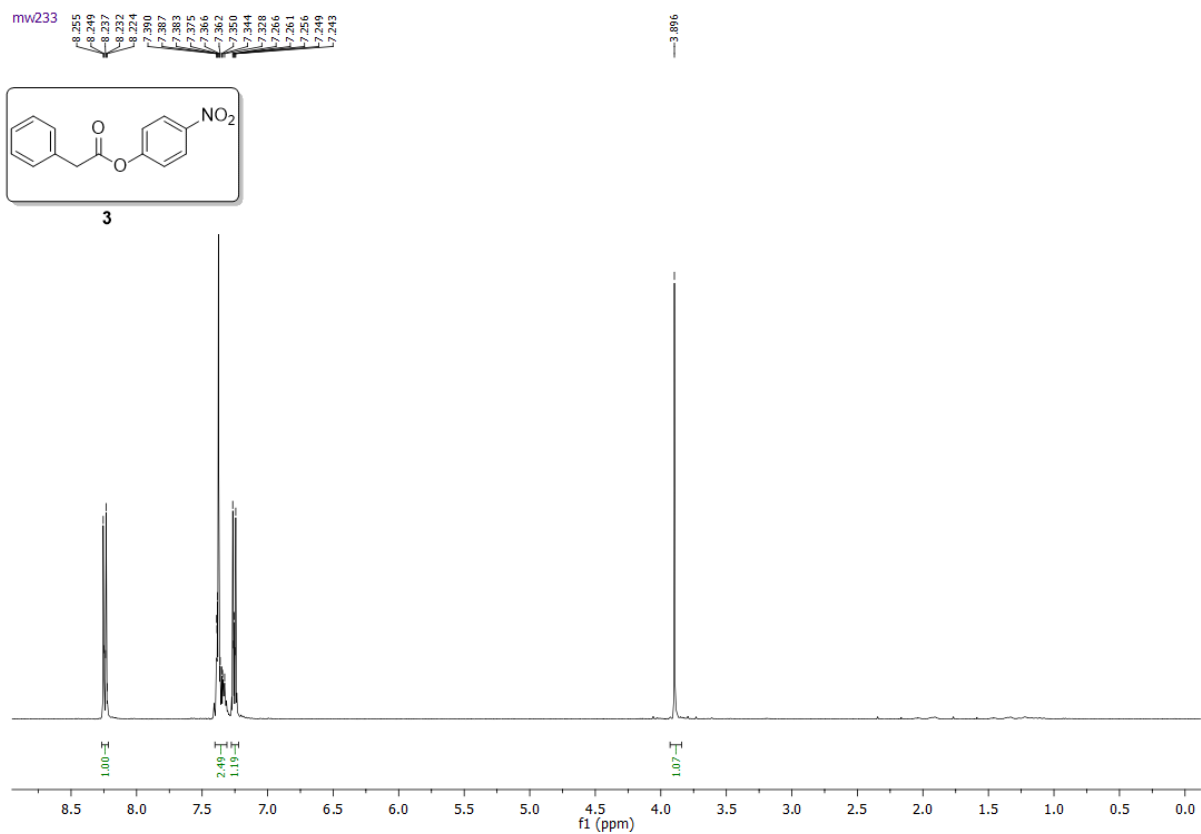


Figure S1.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of compound 1.

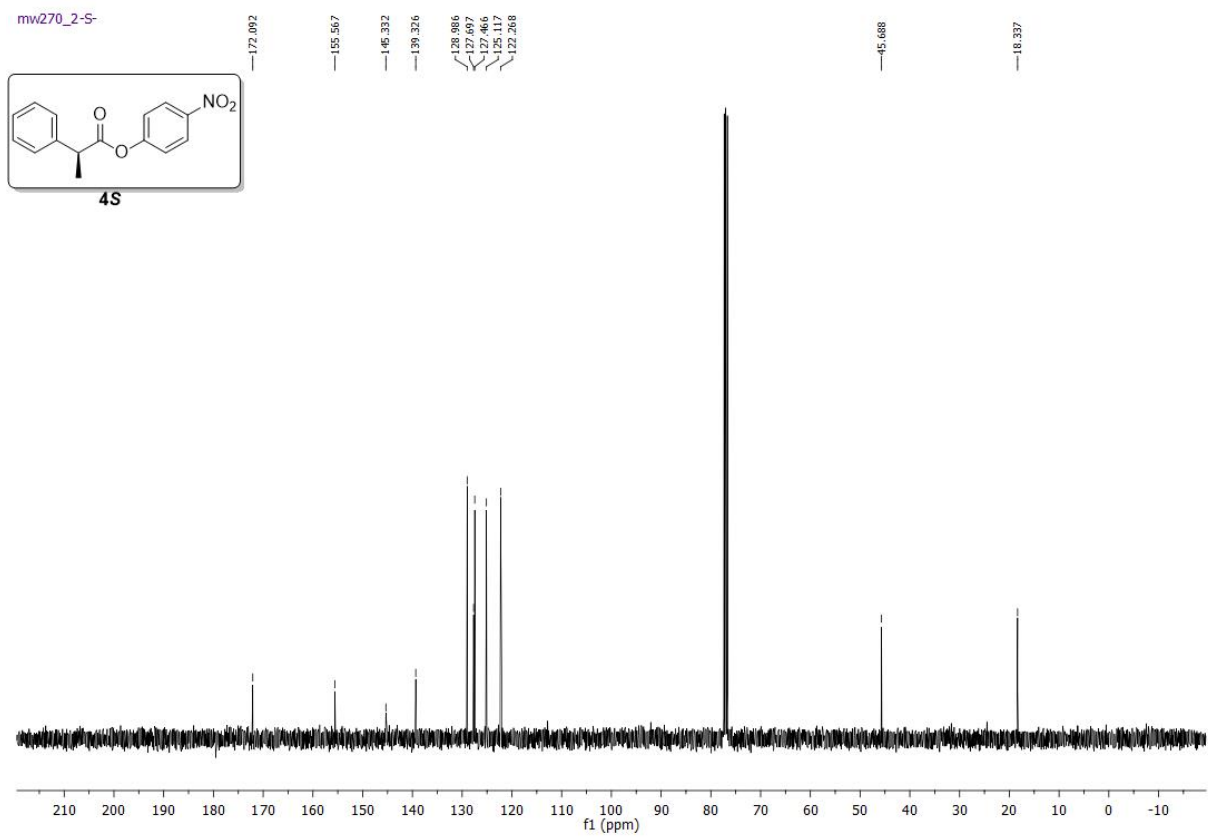
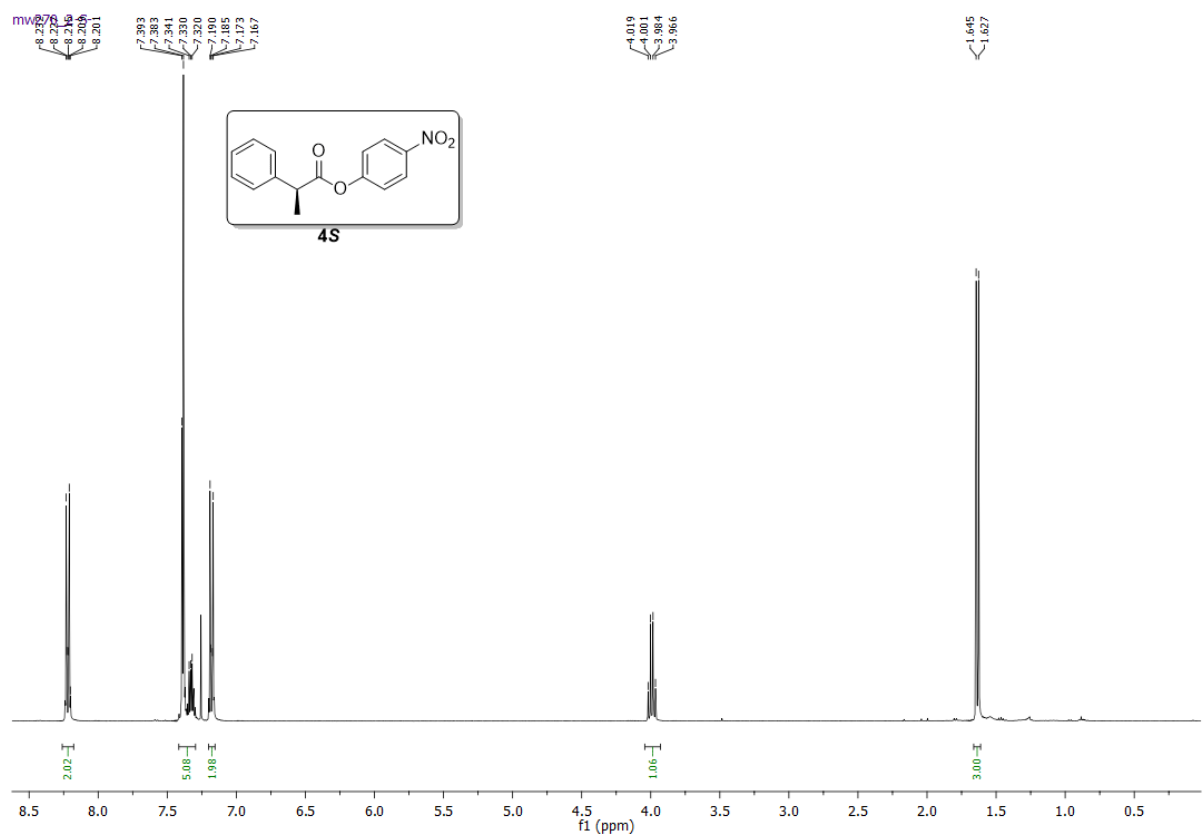


**Figure S2.**  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of compound **2**.



**Figure S3.**  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of compound **3**.





**Figure S4.**  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of compound **4S**.

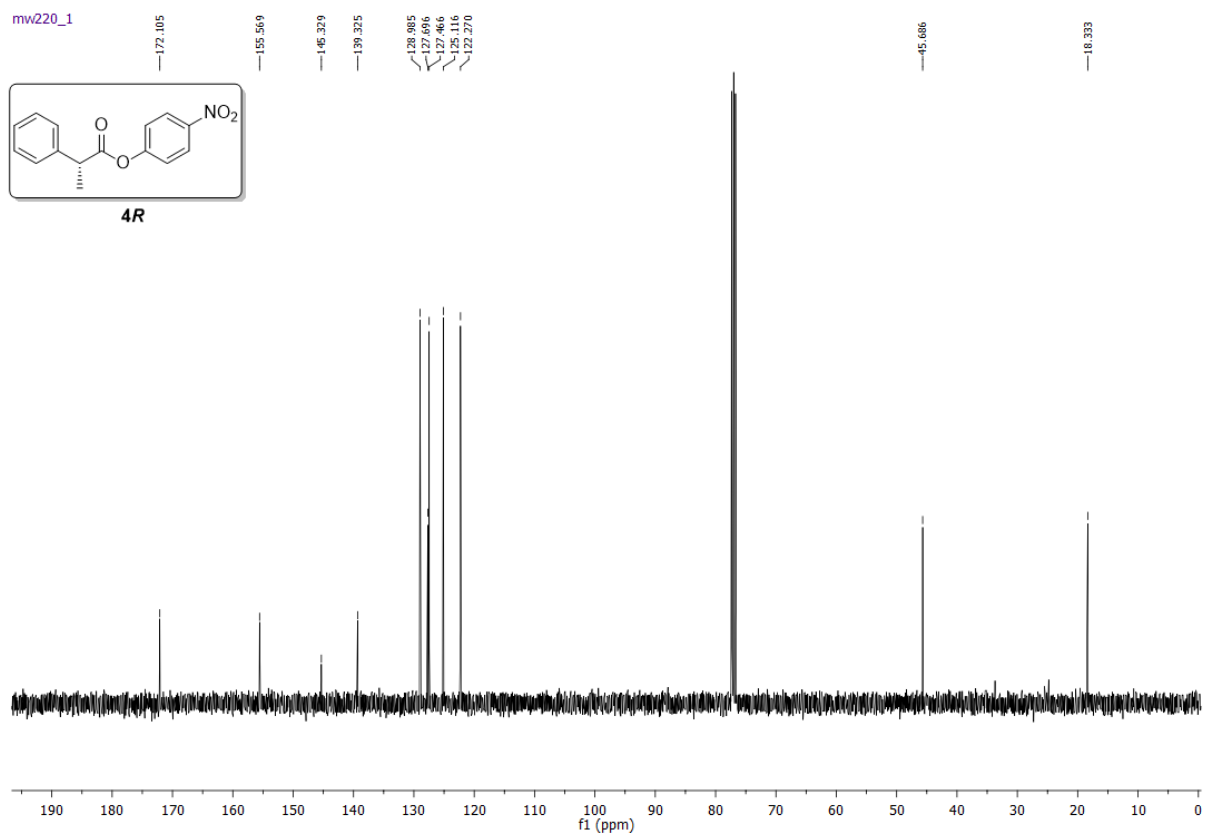
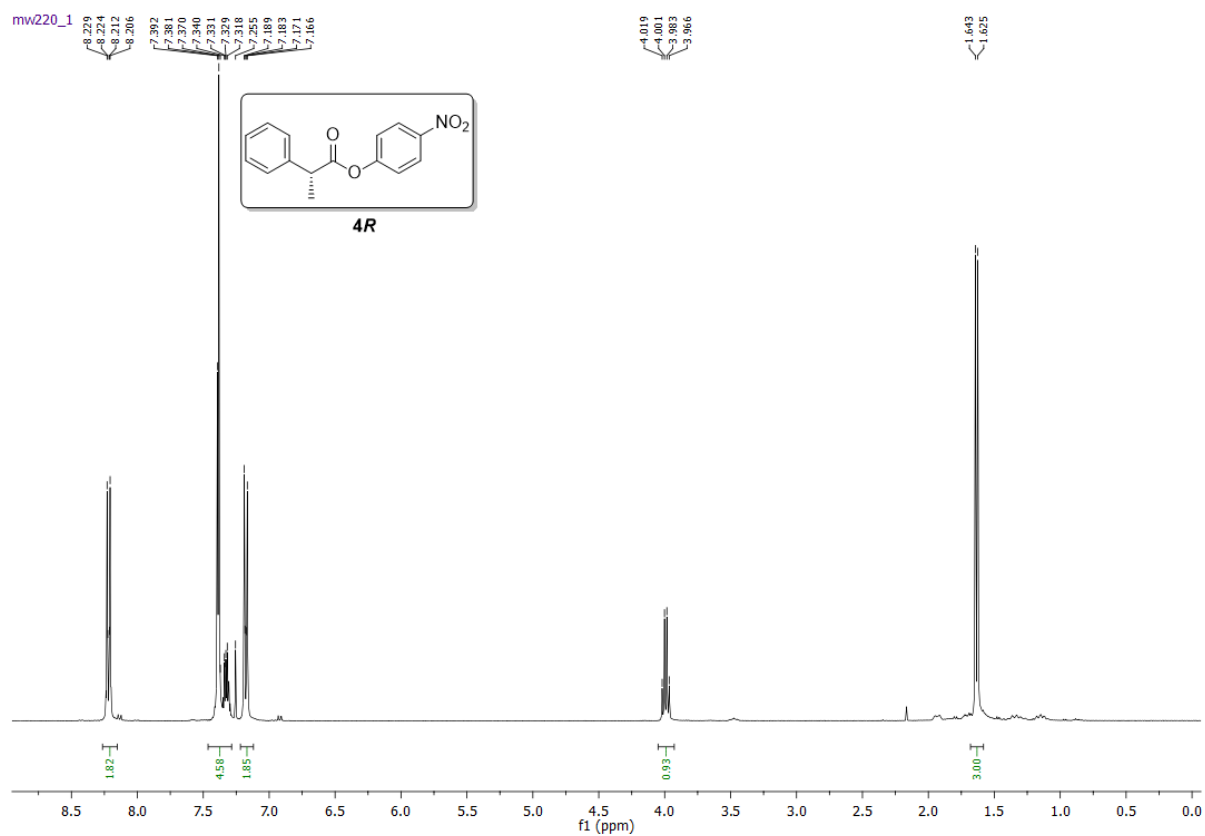


Figure S5.  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of compound **4R**.

## 5. Table of contents:

**Table S1.** Summary of net rates for the native and promiscuous activity of enzymes toward *p*-nitrophenyl dodecanoate (**2**).

Entry	Enzyme	$V_{net}$ [nMs <sup>-1</sup> ] <sup>[a]</sup>	
		$V_1$ <sup>[b]</sup>	$V_2$ <sup>[c]</sup>
0	$V_{n0E}$	0.8	1.1
1	Novozym 435	65	77
2	<i>C.cylindracea</i> L.	198	264
3	<i>C. rugosa</i> L.	98	174
4	<i>P. cepacia</i> L.	194	104
5	<i>P. fluorescens</i> L.	145	148
6	PPL	234	168
7	<i>Rhizopus niveus</i> L.	40	81
8	Acylase I	86	97

Conditions: 0.06 mM substrate in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), 37 °C, enzyme 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0.18 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  [a]  $V_{net} = V_{obs} - V_{n0E}$ ; [b]  $V_1$  calculated for hydrolysis reaction ; [c]  $V_2$  calculated for perhydrolysis reaction.

**Table S2.** Summary of net rates for the native and promiscuous activity of enzymes toward *p*-nitrophenyl phenylacetate (**3**).

Entry	Enzyme	$V_{net}$ [nMs <sup>-1</sup> ] <sup>[a]</sup>	
		$V_1$ <sup>[b]</sup>	$V_2$ <sup>[c]</sup>
0	$V_{n0E}$	0.4	0.5
1	Novozym 435	33	24
2	<i>C.cylindracea</i> L.	22	6
3	<i>C. rugosa</i> L.	2	14
4	<i>P. cepacia</i> L.	24	21
5	<i>P. fluorescens</i> L.	9	24
6	PPL	9	12
7	<i>Rhizopus niveus</i> L.	8	4
8	Acylase I	2	23

Conditions: 0.06 mM substrate in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), 37 °C, enzyme 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0.18 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  [a]  $V_{net} = V_{obs} - V_{n0E}$ ; [b]  $V_1$  calculated for hydrolysis reaction ; [c]  $V_2$  calculated for perhydrolysis reaction.

**Table S3.** Summary of net rates for the native and promiscuous activity of enzymes toward (*S*)-p-nitrophenyl 2-phenylpropanoate (**4S**).

Entry	Enzyme	$V_{net}$ [nMs <sup>-1</sup> ] <sup>[a]</sup>	
		$V_1$ <sup>[b]</sup>	$V_2$ <sup>[c]</sup>
0	$V_{n0E}$	0.2	0.5
1	Novozym 435	10	14
2	<i>C.cylindracea</i> L.	276	333
3	<i>C. rugosa</i> L.	45	67
4	<i>P. cepacia</i> L.	58	58
5	<i>P. fluorescens</i> L.	10	14
6	PPL	70	66
7	<i>Rhizopus niveus</i> L.	1	2
8	Acylase I	8	14

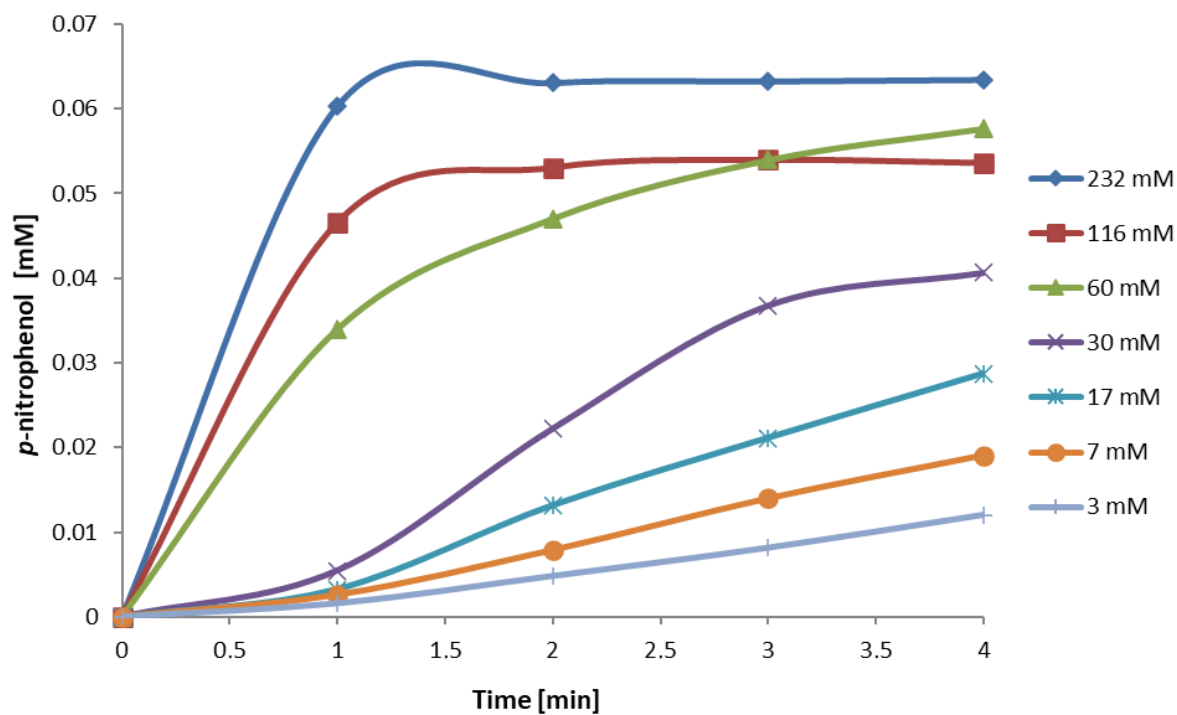
Conditions: 0.06 mM substrate in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), 37 °C, enzyme 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0.18 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  [a]  $V_{net} = V_{obs} - V_{n0E}$ ; [b]  $V_1$  calculated for hydrolysis reaction ; [c]  $V_2$  calculated for perhydrolysis reaction.

**Table S4.** Summary of net rates for the native and promiscuous activity of enzymes toward (*R*)-p-nitrophenyl 2-phenylpropanoate (**4R**).

Entry	Enzyme	$V_{net}$ [nMs <sup>-1</sup> ] <sup>[a]</sup>	
		$V_1$ <sup>[b]</sup>	$V_2$ <sup>[c]</sup>
0	$V_{n0E}$	0.2	0.5
1	Novozym 435	2	3
2	<i>C.cylindracea</i> L.	0	0
3	<i>C. rugosa</i> L.	0	1
4	<i>P. cepacia</i> L.	16	16
5	<i>P. fluorescens</i> L.	10	13
6	PPL	30	24
7	<i>Rhizopus niveus</i> L.	18	27
8	Acylase I	6	13

Conditions: 0.06 mM substrate in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), 37 °C, enzyme 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0.18 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  [a]  $V_{net} = V_{obs} - V_{n0E}$ ; [b]  $V_1$  calculated for hydrolysis reaction ; [c]  $V_2$  calculated for perhydrolysis reaction.

## 6. Figures



**Figure S6.** The time-course of *p*-nitrophenol released from *p*-nitrophenyl acetate (**1**), measured at 37 °C ( $\lambda = 401$  nm) in PBS (pH 7.0) in the presence of Novozym 435 ( $17 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and various concentration of hydrogen peroxide.



Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Mgr Monika Wilk  
doktorant

+48 22 343 20 10  
mwilk@icho.edu.pl

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

Warszawa 30 czerwca 2021 r.

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, A. Madej, D. Paprocki, A. Żądło-Dobrowolska, R. Ostaszewski, *The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102817.

polegał na udziale w opracowaniu koncepcji oraz celu badań. Zaplanowałam i wykonałam eksperymenty. Przeprowadziłam syntezy izocyjanoestrów o numerach **1b-1f** oraz **1h**. Związki w pełni scharakteryzowałam. Przeprowadziłam enzymatyczną reakcję syntezy produktów reakcji Ugięgo o numerach **2b**, **3a-b** oraz **4b-c**. Wydzieliłam wszystkie produkty i zanalizowałam wykorzystując metody:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS. Zinterpretowałam otrzymane wyniki oraz uczestniczyłam w redagowaniu manuskryptu. Opracowałam „Supporting information” oraz współuczestniczyłam w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

2. M. Wilk, D. Trzepizur, D. Koszelewski, A. Brodzka, R., Ostaszewski, *Synthesis of (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid via promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/Knoevenagel reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102816.

brałam udział w opracowaniu koncepcji badań. Zaplanowałam i wykonałam wszystkie eksperymenty. Wyizolowałam i scharakteryzowałam produkty reakcji kaskadowej wykorzystując metody:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS, GC. Przeprowadziłam badania kinetyczne reakcji oraz zanalizowałam otrzymane dane eksperymentalne. Uczestniczyłam w redagowaniu manuskryptu oraz „Supporting information”. Współuczestniczyłam w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

3. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, J. Samsonowicz-Górski, R. Ostaszewski, *Model Studies on the Enzyme-Regulated Diastereodivergent Cascade Passerini Reaction*, *Eur. J. Org. Chem.* 2021, DOI: 10.1002/ejoc.202100760.

brałam udział w opracowaniu koncepcji oraz celu badań. Zaplanowałam i wykonałam eksperymenty. Wydzieliłam wszystkie produkty i zanalizowałam wykorzystując metody:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS oraz HPLC. Zinterpretowałam otrzymane wyniki oraz uczestniczyłam w redagowaniu manuskryptu. Opracowałam „Supporting information” oraz współuczestniczyłam w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.



4. Monika Wilk, Ryszard Ostaszewski, „Efficient Assay for the Detection of Hydrogen Peroxide by Estimating Enzyme Promiscuous Activity in the Perhydrolysis Reaction”, *ChemBioChem* 2021, 22, 1464–1469.

brałam udział w opracowaniu koncepcji oraz celu badań. Zaplanowałam i wykonałam eksperymenty. Przeprowadziłam syntezy różnych estrów *p*-nitrofenolu, wydzieliłam oraz scharakteryzowałam produkty. Przeprowadziłam badania kinetyki reakcji enzymatycznej hydrolizy oraz perhydrolizy przy pomocy metod spektralnych *UV/Vis*. Zinterpretowałam i opracowałam otrzymane wyniki. Zredagowałam artykuł oraz opracowałam „*Supporting information*”. Brałam udział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje.

---

Monika Wilk

Powyższy opis wkładu doktorantki w powstanie artykułów jest zgodny ze stanem faktycznym.

Ryszard Ostaszewski



Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski  
Kierownik zespołu XX

+48 22 343 20 54  
r.ostaszewski@icho.edu.pl

Warszawa 30 czerwca 2021 r.

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzących w skład \_\_\_\_\_ rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk:

1. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, A. Madej, D. Paprocki, A. Żądło-Dobrowolska, R. Ostaszewski, *The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102817.
2. M. Wilk, D. Trzepizur, D. Koszelewski, A. Brodzka, R., Ostaszewski, *Synthesis of (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid via promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/ Knoevenagel reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102816.
3. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, J. Samsonowicz-Górski, R. Ostaszewski, *Model Studies on the Enzyme-Regulated Diastereodivergent Cascade Passerini Reaction*, *Eur. J. Org. Chem.* 2021, DOI: 10.1002/ejoc.202100760.
4. Monika Wilk, Ryszard Ostaszewski, „Efficient Assay for the Detection of Hydrogen Peroxide by Estimating Enzyme Promiscuous Activity in the Perhydrolysis Reaction”, *ChemBioChem* 2021, 22, 1464–1469.

\_\_\_\_\_ polegał na opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu nadzoru merytorycznego nad realizacją badań. Uczestniczyłem w analizie wyników eksperymentalnych, przygotowaniu tekstu artykułów oraz przeprowadziłem je przez proces publikacji (kontakt z wydawcą, współudział w tworzeniu odpowiedzi na recenzje). Kierowałem grantami, których badania obejmuje niniejsza rozprawa doktorska.





Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

dr Anna Brodzka  
asystent

+48 22 343 21 20  
a.brodzka@icho.edu.pl

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

Warszawa 30 czerwca 2021 r.

### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk:

1. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, A. Madej, D. Paprocki, A. Żądło-Dobrowolska, R. Ostaszewski, *The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102817.

polegał na współudziale w redagowaniu artykułu oraz „Supporting information”;

2. M. Wilk, D. Trzepizur, D. Koszelewski, A. Brodzka, R. Ostaszewski, *Synthesis of (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid via promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/ Knoevenagel reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102816.

obejmował współuczestnictwo w planowaniu koncepcji oraz analizie otrzymanych wyników eksperymentalnych;

3. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, J. Samsonowicz-Górski, R. Ostaszewski, *Model Studies on the Enzyme-Regulated Diastereodivergent Cascade Passerini Reaction*, *Eur. J. Org. Chem.* 2021, DOI: 10.1002/ejoc.202100760.

polegał na współuczestnictwie w opracowaniu metody analitycznej (metoda HPLC) podziału diastereoizomerycznych produktów oznaczonych symbolem 15.

*Anna Brodzka*



Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

Dr hab. Dominik Koszelewski  
adiunkt

+48 22 343 20 12  
d.koszelewski@icho.edu.pl

Warszawa 30 czerwca 2021 r.

### OŚWIADCZENIE

\_\_\_\_\_ Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk jest następujący:

1. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, A. Madej, D. Paprocki, A. Żądło-Dobrowolska, R. Ostaszewski, *The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102817.
2. M. Wilk, D. Trzepizur, D. Koszelewski, A. Brodzka, R. Ostaszewski, *Synthesis of (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid via promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/ Knoevenagel reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102816.
3. M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, J. Samsonowicz-Górski, R. Ostaszewski, *Model Studies on the Enzyme-Regulated Diastereodivergent Cascade Passerini Reaction*, *Eur. J. Org. Chem.* 2021, DOI: 10.1002/ejoc.202100760.

Współuczestniczenie w tworzeniu koncepcji badań oraz interpretacji uzyskanych danych eksperymentalnych. Uczestnictwo w przygotowywaniu manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

\_\_\_\_\_



Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

mgr inż. Damian Trzepizur  
dotorant

+48 22 343 20 27  
d.trzepizur@icho.edu.pl

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

Warszawa 30 czerwca 2021 r.

### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk:

M. Wilk, D. Trzepizur, D. Koszelewski, A. Brodzka, R. Ostaszewski, *Synthesis of (E)- $\alpha,\beta$ -unsaturated carboxylic esters derivatives from cyanoacetic acid via promiscuous enzyme-promoted cascade esterification/ Knoevenagel reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102816.

obejmował przeprowadzenie enzymatycznej reakcji Knoevenagla pomiędzy cyjanooctanem metylu oraz benzaldehydem. Wydzieliłem oraz scharakteryzowałem otrzymany produkt.

*Damian Trzepizur*



Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

dr Daniel Paprocki

+48 22 343 20 10  
d.paprocki@icho.edu.pl

Warszawa, dn. 30 czerwca 2021 r.

### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk: **M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, A. Madej, D. Paprocki, A. Żądło-Dobrowolska, R. Ostaszewski, *The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction*, Bioorg. Chem. 2019, 93, 102817**; polegał na współuczestnictwie w doborze metody oczyszczania związków oraz współudziale w analizie otrzymanych widm NMR.

Paprocki



Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Mgr Arleta Madej  
doktorant

+48 22 343 20 10  
a.madej@icho.edu.pl

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

Warszawa 30 czerwca 2021 r.

### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk:

M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, A. Madej, D. Paprocki, A. Żądło-Dobrowolska, R. Ostaszewski, *The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction*, *Bioorg. Chem.* 2019, 93, 102817.

Obejmował syntezę oraz wydzielenie substratu oznaczonego symbolem 1g.



Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk

Dr Anna Żądło-Dobrowolska  
asystent

+48 22 343 20 12  
[a.zadlo@icho.edu.pl](mailto:a.zadlo@icho.edu.pl)

Instytut Chemii Organicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Kasprzaka 44/52  
Warszawa

Warszawa, dn. 30 czerwca 2021 r.

---

### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk: **M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, A. Madej, D. Paprocki, A. Żądło-Dobrowolska, R. Ostaszewski, *The influence of the isocyanoesters structure on the course of enzymatic Ugi reaction*, Bioorg. Chem. 2019, 93, 102817**; polegał na przeprowadzeniu syntezy, wyizolowaniu oraz analizie produktu o numerze: **2c**.



inż. Jan Samsonowicz-Górski  
student

+48 508 562 873  
jan.samsonowicz-gorski.stud@pw.edu.pl

Warszawa 30 czerwca 2021 r.

#### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż mój wkład w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Wilk jest następujący:

M. Wilk, A. Brodzka, D. Koszelewski, J. Samsonowicz-Górski, R. Ostaszewski, *Model Studies on the Enzyme-Regulated Diastereodivergent Cascade Passerini Reaction*, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, DOI: 10.1002/ejoc.202100760.

polegał na przeprowadzenie syntezy modelowych związków oznaczonych w publikacji symbolem **15** oraz **16**. Wydzieliłem produkty oraz przygotowałem próbki do analizy HPLC.

Jan Samsonowicz-Górski



B. Ong  
431/21

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

Org.-B.431/21



80000000343523