ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

"ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΑΝΑΓΩΓΕΣ α-ΜΕΘΟΞΥ-β-ΚΕΤΟΕΣΤΕΡΩΝ"

ΖΩΪΔΗ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

UNIVERSITY OF CRETE- DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY- BIOCATALYSIS LABORATORY

MASTER THESIS

"BIOCATALYTIC REDUCTIONS OF α-METHOXY-β-KETOESTERS"

ZOIDI MARGARITA

Supervisor: SMONOU IOULIA

HERAKLION 2018

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σμόνου Ιουλία

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κατερινόπουλος Χαράλαμπος

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών "Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα" (ΑΣΦΔ), πραγματοποιήθηκε η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο "Βιοκαταλυτικές αναγωγές αλκυλο α-μεθοξυ-β-κετοεστέρων", στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Βιοκατάλυσης στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της Αν. Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Για τις υλικοτεχνικές υποδομές και τις αξιόλογες εγκαταστάσεις που είχα στην διάθεσή μου εγώ αλλά και όλοι οι φοιτητές του Τμήματος Χημείας, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας αλλά και το Πανεπιστήμιο Κρήτης, διότι διευκόλυνε σε αυτό το κομμάτι την διαδικασία της ερευνητικής μελέτης στην οποία πήρα μέρος.

Τις ευχαριστίες μου, ακόμα, θα ήθελα να αποδώσω στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κυρία Ιουλία Σμόνου, για την βοήθεια και συνεχή υποστήριξη και εμπιστοσύνη καθ΄όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής, καθώς και για τις ιδέες και προτάσεις της πάνω στο αντικείμενο μελέτης μου αλλά και σε πρακτικά θέματα του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ πολύ τους Καθηγητές κ. Κατερινόπουλο Χαράλαμπο και κ. Στρατάκη Εμμανουήλ που δέχτηκαν να αποτελέσουν την εξεταστική μου επιτροπή, καθώς και τον ομότιμο καθηγητή κ. Ορφανόπουλο Μιχαήλ και τον Δρ. Καλαϊτζάκη Δημήτριο για τις προτάσεις και την βοήθειά τους.

Ακόμη, για την συναδελφικότητα και τις όμορφες στιγμές που βιώσαμε στο εργαστήριο, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παλιά και νέα μέλη του εργαστηρίου, Τζανακάκη Αγγελική, Τυρίκο-Εργά Θοδωρή, Γιαννόπουλο Βασίλη, Μυρτολλάρη Καμέλα και Χατζούδη Αποστόλη, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του τομέα της Οργανικής Χημείας για τις συμβουλές τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένειά μου, που με υποστήριξε ψυχολογικά και υλικά όλο αυτό το διάστημα, αλλά και τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου σε όλες τις στιγμές που τους είχα ανάγκη.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ ΖΩΙΔΗ

Ηλέκτρας 21, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

margarita.zoidi17@gmail.com

Φύλο ΘΗΛΥ | Ημερομηνία γέννησης 23/06/1993 | Εθνικότητα ΕΛΛΗΝΙΚΗ

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

2015-2016 — Βοηθός εργαστηρίου Βιοχημείας Ι και ΙΙ. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

2014-2015 — Διπλωματική εργασία. Με τίτλο "Βιοκαταλυτικές αναγωγές 6-χλωρο-3,5-δικετοεξανοικού *τριτ*- βουτυλεστέρα με χρήση κετορεδουκτασών", Εργαστήριο Οργανικής Χημείας- Βιοκατάλυσης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σμόνου Ιουλία

01/07/2014-31/09/2014 — Πρακτική άσκηση. Φαρμακείο Ορφανουδάκης Χαράλαμπος "Παρασκευή φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων"

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

2015-2018 — Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Οργανική Χημεία και Βιοκατάλυση

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σμόνου Ιουλία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

2011-2015 — Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βαθμός: Λίαν Καλώς (7.48/10.00)

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα — ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Λοιπές γλώσσες	
ΑΓΓΛΙΚΑ	CERTIFICATE OF PROFICIENCY IN ENGLISH, C1
ΓΕΡΜΑΝΙΚΑ	ZERTIFIKAT DEUTSCH, B1
Οργανωτικές / διαχειριστικές δεξιότητες	▪ Καθοδηγητικές ικανότητες (προσφάτως υπεύθυνη για μια ομάδα 12 ατόμων) ▪ Ομαδικότητα (μέλος εργαστηρίου για 3 χρόνια)
Ψηφιακές δεξιότητες	▪ καλός χειρισμός του Office (Microsoft Word, Microsoft Powerpoint, Microsoft Excel) ▪ καλή γνώση λογισμικού Προγράμματος Topspin
Δίπλωμα οδήγησης	Κατηγορία διπλώματος οδήγησης: B
ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	
Συνέδρια	
20-22/10/2017	5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Πράσινης Χημείας και Βιώσιμης Ανάπτυξης, Πάτρα, Ελλάδα
02-04/05/2017	19ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο-Κρήτη, Ελλάδα
26-28/03/2016	18ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο-Κρήτη, Ελλάδα

Αναφορές σε Συνέδρια

1) **Zoidi M**., Smonou I., "Biocatalytic reductions of alkyl α-methoxy-β-ketoesters''. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Πράσινης Χημείας και Βιώσιμης Ανάπτυξης, 20-22 Οκτωβρίου 2017, Πάτρα. **Αναρτημένη εργασία**
2) Smonou I., Giannopoulos V., Tyrikos-Ergas T., Tzanakaki A., **Zoidi M.**, ''Stereocontrolled enzymatic transformations of di- and tricarbonyl compounds''. 13 th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, 9-13 July 2017, Budapest. **Αναρτημένη εργασία**
3) **Zoidi M**., Smonou I., ''Enzymatic reductions for the synthesis of aryl α-methoxy-β-hydroxyesters''. 19ο Συνέδριο Μεταπτιχιακών Φοιτητών Χημείας, 2-4 Μαΐου 2017, Ηράκλειο. **Προφορική παρουσίαση**
4) **Zoidi M.,** Bariotaki A., Smonou I., ''Biocatalytic reductions of *tert*-butyl-6-chloro-3,5-dioxohexanoate using ketoreductases''. 18ο Συνέδριο Μεταπτιχιακών Φοιτητών Χημείας, 26-28 Μαρτίου 2016, Ηράκλειο. **Αναρτημένη εργασία**

Σεμινάρια "ISO 22716:2007 COSMETICS – GMP", 24-25/10/2015, Ηράκλειο

Συνδρομές Μέλος της "Ένωσης Ελλήνων Χημικών"

CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION

MARGARITA ZOIDI

Ilektras 21, Heraklion, Crete, Greece

margarita.zoidi17@gmail.com

Sex Female | Date of birth 23/06/1993 | Nationality Greek

WORK EXPERIENCE

2015-2016 — Laboratory assistant in Biochemistry I and II. Department of Chemistry, University of Crete
Supervisor: Kavelaki Popi

2014-2015 — Senior Undergraduate Diploma Thesis entitled «Biocatalytic reductions of *tert*-butyl- 6-chloro- 3,5-dioxohexanoate using ketoreductases». Laboratory of Organic Chemistry-Biocatalysis
Supervisor: Ioulia Smonou, Department of Chemistry, University of Crete

01/07/2014-31/09/2014 — Practical Internship. Pharmacy Orfanoudakis Charalampos
''Preparation of pharmaceutical and cosmetic formulations''

EDUCATION AND TRAINING

2015-2018 — Postgraduate studies for MSc degree in Organic Chemistry
Supervisor: I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete

2011-2015 — BSc in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete.
Grade very good (7.48/10.00)

PERSONAL SKILLS

Mother tongue — Greek

Other language(s)

ENGLISH	CERTIFICATE OF PROFICIENCY IN ENGLISH, C1
GERMAN	ZERTIFIKAT DEUTSCH, B1

Organisational / managerial skills

- Guiding skills (currently responsible for a team of 12 people)
- teamwork (member of a laboratory team for three years)

Digital skills

- good command of office suite (Microsoft Word, Microsoft Powerpoint, Microsoft Excel)
- good command of Topspin Program

Driving licence

Driving licence category: B

ADDITIONAL INFORMATION

Conferences

20-22/10/2017

- 5th Panhellenic Conference on Green Chemistry and Sustainable Development, Patras, Greece

02-04/05/2017

- 19th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion-Crete, Greece

26-28/03/2016

- 18th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion-Crete, Greece

References at Conferences

1) **Zoidi M**., Smonou I., ‘’Biocatalytic reductions of alkyl α-methoxy-β-ketoesters’’. 5th Panhellenic Conference, 20-22 October 2017, Patras. **poster**
2) Smonou I., Giannopoulos V., Tyrikos-Ergas T., Tzanakaki A., **Zoidi M.**, ‘’Stereocontrolled enzymatic transformations of di- and tricarbonyl compounds’’. 13 th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, 9-13 July 2017, Budapest. **poster**
3) **Zoidi M**., Smonou I., ‘’Enzymatic reductions for the synthesis of aryl α-methoxy-β-hydroxyesters’’. 19th Postgraduates Conference on Chemistry, 2-4 May 2017, Heraklion. **oral presentation**
4) **Zoidi M.,** Bariotaki A., Smonou I., ‘’Biocatalytic reductions of *tert*-butyl-6-chloro-3,5-dioxohexanoate using ketoreductases’’. 18th Postgraduates Conference on Chemistry, 26-28 March 2016, Heraklion. **poster**

Seminars

"ISO 22716:2007 COSMETICS – GMP", 24-25/10/2015, Heraklion

Memberships

Member of "Association of Greek Chemists" since 2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καθιέρωση της Βιοκατάλυσης ως εργαλείο της Πράσινης χημείας έχει εδραιωθεί από τα σημαντικότατα πλεονεκτήματα που παρέχει η χρήση ενζύμων ως καταλύτες αντιδράσεων σε σχέση με τους συμβατικούς χημικούς καταλύτες. Η χημειο-, τοπο-, αλλά, κυρίως, η στερεοεκλεκτικότητά τους τα καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικά στον τομέα της Οργανικής Χημείας και χειρόμορφης σύνθεσης, και πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τον τομέα της φαρμακευτικής ανάπτυξης.

Στην εργασία που παρουσιάζεται παρακάτω έχουν χρησιμοποιηθεί ως καταλύτες τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα, κετορεδουκτάσες. Φυσική λειτουργία των ενζύμων αυτών είναι η αναγωγή κετονών ή αλδεϋδών προς τις χειρόμορφες, αντίστοιχα, αλκοόλες.

Παρουσιάζεται, αναλυτικά, η σύνθεση έξι υποστρωμάτων της δομής άλκυλο α-μεθοξυ-β-κετοεστέρων, καθώς και η μελέτη της καταλυτικής δράσης των κετορεδουκτασών σε αυτά τα υποστρώματα. Με την βοήθεια της φασματοσκοπίας Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR), της αέριας χρωματογραφίας (GC) και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χαρακτηρίζεται η σχετική στερεοδομή των προϊόντων αναγωγής και ανιχνεύεται τόσο η δράση, όσο και η εκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών κατά την κατάλυση της αναγωγής των συγκεκριμένων υποστρωμάτων.

ABSTRACT

Biocatalysis has been established as a tool of Green Chemistry because of the advantages that enzymes, used as catalysts, offer, compared to other common chemical catalysts. Their chemo-, regio-, but mostly, their stereoselectivity, make enzymes very useful for organic chemists as far as chiral synthesis or pharmateutical progress is concerned.

In this project the enzymes that have been used as catalysts are ketoreductases. Their natural role is the reduction of ketones or some aldehydes to the corresponding chiral alcohols.

The synthesis of six substrates in the form of alkyl α-methoxy-β-ketoesters, and also, the study of catalytic activity and selectivity of ketoreductases on these substrates, is presented. The relative configuration of the products has been determined by nuclear magnetic resonance (NMR), gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC), as well as the catalytic activity and selectivity of ketoreductases towards these specific substrates.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ…….σελ.3

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ…….σελ.4

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ……σελ.5

CURRICULUM VITAE.....σελ.8

ΠΕΡΙΛΗΨΗ……...σελ.11

ABSTRACT……...σελ.12

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Βιοκατάλυση

1.1. Ορισμός και ιστορία…….σελ.16

1.2. Σημαντικότητα και εφαρμογές της Βιοκατάλυσης- Αντικατάσταση κλασσικών τεχνικών σύνθεσης - Πράσινη Χημεία……..σελ.17

1.3. Εφαρμογές Βιοκατάλυσης με τροποποιημένα ένζυμα……σελ.20

2. Ένζυμα

2.1. Γενικές πληροφορίες……σελ.21

2.2. Ταξινόμηση ενζύμων……σελ.24

3. Αφυδρογονάσες- Κετορεδουκτάσες

3.1. Γενικές πληροφορίες……σελ.25

3.2. Συστήματα αναγέννησης των νικοτιναμιδικών συμπαραγόντων…….σελ.25

3.3. Κατηγορίες αφυδρογονασών με βάση τον μηχανισμό δράσης τους….σελ.26

3.4. Κανόνας του Prelog……σελ.28

3.5. Χρήση κετορεδουκτασών στην σύνθεση σημαντικών χειρόμορφων ενδιαμέσων και φαρμακευτικών σκευασμάτων……..σελ.28

4. β-κετοεστέρες

4.1. Γενικό μοντέλο δομής……σελ.35

4.2. Χρήση και σημαντικότητα β-κετοεστέρων……σελ.35

5. Προηγούμενες μελέτες και χημειοενζυμικές συνθέσεις του εργαστηρίου μας……σελ.36

Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

6. Εισαγωγή

6.1. Σημασία των αλκυλο α-μεθοξυ-β-υδροξυ εστέρων - Τα φάρμακα Tesaglitazar και Navaglitazar……σελ.39

7. Συζήτηση- Αποτελέσματα

7.1. Σύνθεση των υποστρωμάτων……σελ.42

7.2. Ενζυμικές αναγωγές με κετορεδουκτάσες……..σελ.46

7.3. Γενικό συμπέρασμα……σελ.52

7.4. Προσπάθεια σύνθεσης του υποστρώματος 70 ……...σελ.54

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ……...σελ.56

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ……σελ.71

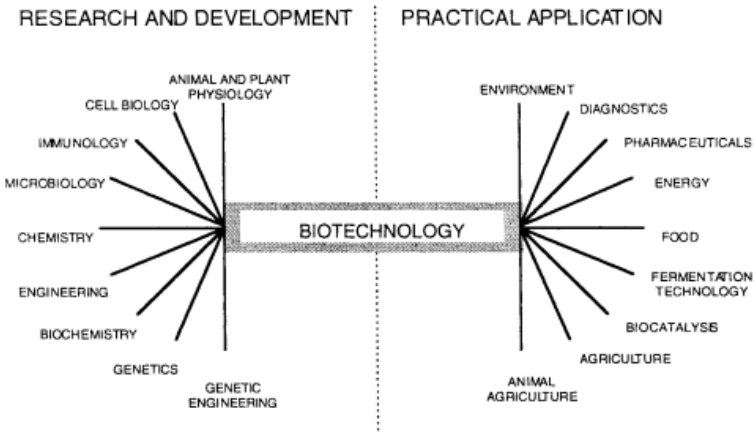
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……σελ.95

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Βιοκατάλυση

1.1 Ορισμός και Ιστορία

Ως Βιοκατάλυση ορίζεται η κατάλυση αντιδράσεων σε ζωντανά (βιολογικά) συστήματα, χρησιμοποιώντας φυσικούς καταλύτες, τα ένζυμα. Βιοκατάλυση είναι, ακόμα, ο γενικότερος όρος για μετατροπές φυσικών αλλά και μη φυσικών ενώσεων από ένζυμα, και για αυτόν τον λόγο αναφέρεται επίσης και ως η εφαρμογή των ενζύμων στην Χημεία (Bommarius and Riebel, 2004). Πρόκειται για την "καρδιά" της Βιοτεχνολογίας καθώς παρέχει παραγωγή προϊόντων και προσφορά υπηρεσιών και αγαθών για την ανθρωπότητα, όπως άλλωστε υποδεικνύεται και από τον ορισμό της Βιοτεχνολογίας που δίδεται από την Ευρωπαϊκή Συνομοσπονδία Βιοτεχνολογίας.



Εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης των ειδών έχουν δημιουργήσει χιλιάδες μικροοργανισμούς που περιέχουν ένζυμα γνωστά για το ότι καταλύουν σχεδόν κάθε χημική αντίδραση.[1,2] Έτσι, λοιπόν, η Βιοκατάλυση αποτελεί μια από τις παλαιότερες χημικές διεργασίες γνωστές στον άνθρωπο καθώς έχει εφαρμογή στην παραγωγή πολλών βρώσιμων ουσιών, όπως για παράδειγμα στην ζυθοποιία, τέχνη που προηγείται της καταγεγραμμένης ιστορίας. Τα παλαιότερα αρχεία όσον αφορά την ζυθοποιία είναι περίπου 6000 ετών και αναφέρονται στους Σουμέριους, παρόλα αυτά είναι πιθανό ο ζύθος να ήταν γνωστός και σε προγενέστερους λαούς της Μεσοποταμίας. Αναφορά στη μπύρα περιέχεται και στο έπος του Γκιλγκαμές (ένα επικό ποίημα από την περιοχή της Βαβυλωνίας που αποτελεί το αρχαιότερο γνωστό λογοτεχνικό έργο, και που ανάγεται σήμερα στην Ασσυρο-Βαβυλωνιακή φιλολογία) καθώς και σε ποίημα Σουμέριων περίπου πριν από 4000 χρόνια, το οποίο μάλιστα θεωρείται και ως η αρχαιότερη γραπτή συνταγή για την παρασκευή μπύρας.[3]

Εκτός, όμως, από την χρησιμότητα της Βιοκατάλυσης στον τομέα των τροφίμων και ποτών, ένζυμα αλλά και ολόκληρα κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί και σε πολλούς άλλους κλάδους εδώ και αιώνες. Πριν από περισσότερα από εκατό χρόνια η Βιοκατάλυση χρησιμοποιήθηκε

για την πραγματοποίηση χημικών μετασχηματισμών σε μη φυσικές οργανικές ενώσεις, ενώ τα τελευταία 40 χρόνια παρατηρείται σημαντική αύξηση στην εφαρμογή της βιοκατάλυσης για την παραγωγή χημικών ουσιών μέγιστης καθαρότητας, ειδικά για τη φαρμακευτική βιομηχανία.[4]

Επειδή η Βιοκατάλυση εμπλέκεται με ένζυμα και μικροοργανισμούς, ταξινομείται ιστορικά ως ξεχωριστή κατηγορία από την "ομογενή" και "ετερογενή" κατάλυση. Παρόλα αυτά, από μηχανιστικής απόψεως, θα μπορούσαμε να την εντάξουμε ως μια ειδική περίπτωση ετερογενούς κατάλυσης.[5]

1.2 Σπουδαιότητα και εφαρμογές της Βιοκατάλυσης- Αντικατάσταση κλασσικών τεχνικών σύνθεσης – Πράσινη Χημεία

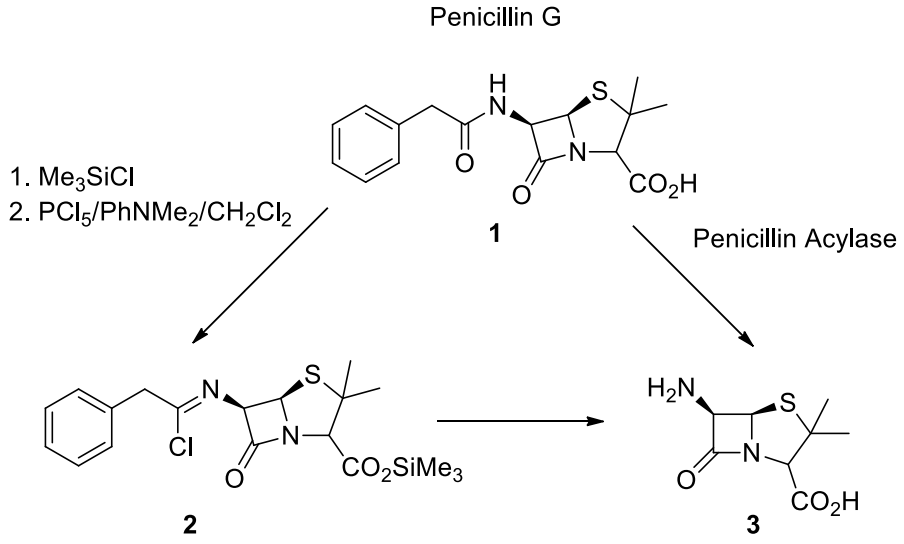
Η Βιοκατάλυση συμβάλει κατά ένα σημαντικό ποσοστό στην ανθρώπινη τεχνολογική προσπάθεια, καλύπτοντας τομείς από την υγεία και την σύνθεση ειδικών χημικών ουσιών έως την ενέργεια και το περιβάλλον. Είναι μια φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία δεδομένου ότι πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες αντίδρασης, θερμοκρασίας, πίεσης και pH, αλλά και λόγω αντικατάστασης τοξικών αντιδραστηρίων από τους "πράσινους" βιοκαταλύτες (αναλύεται περαιτέρω στην Ενότητα 2.1).

Οι βιοκαταλύτες είναι περίπλοκα πρωτεϊνικά μόρια που παράγονται από τους ζωντανούς οργανισμούς ώστε να καταλύουν τις βιοχημικές διεργασίες που απαιτούνται για την επιβίωσή τους. Παρότι, όμως, τα ένζυμα σχηματίζονται μέσα σε κύτταρα για να επιτελέσουν την φυσική τους λειτουργία, μπορούν να δράσουν και μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα *in vitro* υπό κατάλληλες συνθήκες. Η ικανότητά τους να πραγματοποιούν πολύ συγκεκριμένους μετασχηματισμούς, τα κάνει ιδιαίτερα χρήσιμα για διάφορες βιομηχανικές διεργασίες. Επιπλέον, η χρήση της τεχνολογίας ανασυνδυασμένων γονιδίων έχει βελτιώσει περαιτέρω τις διαδικασίες παραγωγής ενζύμων και επέτρεψε την εμπορευματοποίηση των ενζύμων που δεν μπορούσαν προηγουμένως να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα στη φαρμακευτική βιομηχανία αποτελεί μια μεγαλύτερης κλίμακας βιοκαταλυτική διεργασία, η μετατροπή των προϊόντων ζύμωσης, βενζυλο-πενικιλινών και φαινοξυμεθυλο-πενικιλινών (πενικιλίνες G (**1**) και V αντίστοιχα) στο 6-αμινο-πενικιλαμικό οξύ (6-APA) (**3**) με το ένζυμο ακυλάση της πενικιλίνης (EC 3.5.1.11). Το 6-APA αποτελεί το βασικό πρόδρομο προϊόν για την παρασκευή ενός ευρέος φάσματος ημισυνθετικών αντιβιοτικών, π.χ. αμπικιλλίνη, σε κλίμακα 16.000 τόνων το χρόνο.[6,7]

Αυτή η βιομετατροπή αποτελεί εξαιρετικό παράδειγμα απλοποίησης μιας διαδικασίας σε ένα μόνο στάδιο. Η χημική διεργασία την οποία αντικατέστησε, περιελάμβανε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο περιελάμβανε προστασία της καρβοξυλικής ομάδας της πενικιλίνης G με σιλυλίωση, η οποία απαιτούσε επίσης διμεθυλοανιλίνη για να απομακρυνθεί το HCl που παράγεται. Στη βιοκαταλυτική διαδικασία, γενετικά τροποποιημένη και ακινητοποιημένη

ακυλάση της πενικιλίνης χρησιμοποιείται για να αποακυλιώσει κατευθείαν την πενικιλίνη G, μειώνοντας έτσι τα τρία στάδια σε ένα.



ΣΧΗΜΑ 1: Χημική και βιοκαταλυτική διαδικασία παραγωγής 6-APA

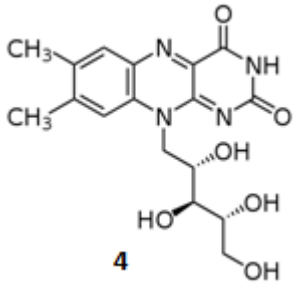
Κάποια "πράσινα" οφέλη που προκύπτουν από την βιομετατροπή αυτή είναι τα εξής:

- Απλοποίηση διεργασίας σε ένα μόνο στάδιο
- Αποφυγή του διαλύτη διχλωρομεθάνιο
- Αποφυγή προστασίας της καρβοξυλικής ομάδας
- Εξοικονόμηση ενέργειας (30°C έναντι των 50°C που απαιτούνται για το στάδιο της προστασίας)
- Λιγότερα προβλήματα ασφάλειας (PCl_5)- αποφυγή ρύπων επιβαρυντικών για το περιβάλλον
- Ανακύκλωση παραπροϊόντων (φαινυλοξικό οξύ και φαινοξυοξικό οξύ) στη διαδικασία ζύμωσης.
- Χρήση εναλλακτικών πρώτων υλών- Οι ευρωτομήκυτες που παράγουν πενικιλίνη αναπτύσσονται σε θρεπτικά μέσα καλλιέργειας που περιέχουν καλαμποκάλευρο (corn steep liquor), ένα υποπροϊόν που ήταν απόβλητο της επεξεργασίας καλαμποκιού

Ακόμα, ένας μεγάλος αριθμός βιταμινών παράγεται σήμερα από μικροβιακές ζυμώσεις, καλύπτοντας ένα μεγάλο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής. Ειδικότερα, η βιταμίνη B_2 (ριβοφλαβίνη) (**4**) ως διαιτητικό συμπλήρωμα τόσο στην ανθρώπινη διατροφή, όσο και στις ζωικές τροφές παράγεται σήμερα με διάφορους τρόπους[8]:

- Με χημικό τρόπο και καλύπτει το 20% της παγκόσμιας παραγωγής

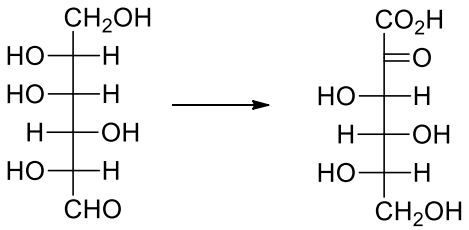
- Με συνδυασμό χημικών και ενζυμικών (μικροβιακών) μεθόδων, καλύπτοντας το 50% της παγκόσμιας παραγωγής
- Με μικροοργανισμούς (De novo σύνθεση) και τη χρήση διαφόρων οργανικών υποστρωμάτων, καλύπτοντας το 30% της παγκόσμιας παραγωγής



4 Ριβοφλαβίνη

Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι έχει επιτευχθεί ο προσδιορισμός των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ενζυμική παραγωγή της βιταμίνης αυτής[9] και έτσι η παραγωγή της έχει αυξηθεί σημαντικά. Με βιοτεχνολογικές μεθόδους επιτεύχθηκε αύξηση της παραγωγικότητας του υπεύθυνου μικροοργανισμού κατά 20%, με τα ένζυμα να διαδραματίζουν έναν βασικό ρόλο σε αυτήν την απόπειρα. Συγκεκριμένα, ορισμένα ένζυμα επέτρεψαν στο μύκητα *Ashbya gossypii* να ζήσει σε φυτικά έλαια και έτσι είχαν την δυνατότητα να παράγουν τη βιταμίνη B_2 από αυτές τις ανανεώσιμες πρώτες ύλες.

Βιοκαταλυτική διεργασία υπάρχει ακόμα και στη σύνθεση της Βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ), που αποτελείται από ένα στάδιο ενζυμικής μετατροπής από τη D-σορβιτόλη σε L-σορβόζη με το *Acetobacter suboxydans* (οξείδωση) και τέσσερα χημικά στάδια, τα οποία καταλήγουν στο σχηματισμό του ασκορβικού οξέος.[10] Σε αυτήν την περίπτωση, με κλωνοποίηση ενός γονιδίου από το *Corynebacterium* στο *Erwinia herbicola*, η διαδικασία απλοποιείται σε ένα χημικό στάδιο, όπου η D-γλυκόζη μετατρέπεται σε 2-κετο-L-γλυκονικό οξύ,



5, D-Glucose **6,** 2-Keto-L-gluconate

δηλαδή στην έμμεσα πρόδρομη ένωση της βιταμίνης C με απόδοση μεγαλύτερη από 60%. Πρόσφατα έγιναν προσπάθειες εφαρμογής μηχανικής στο μεταβολισμό των μικροβίων για τη σύνθεση του L-κετογλυκονικού οξέος άμεσα από τη D-γλυκόζη ως πρώτη ύλη.[11]

Αυτά είναι τρία μόνο παραδείγματα χρήσης της βιοκατάλυσης στην βιομηχανία, αλλά υπάρχουν ακόμα πάρα πολλές εφαρμογές, από την βιοκαταλυτική παραγωγή

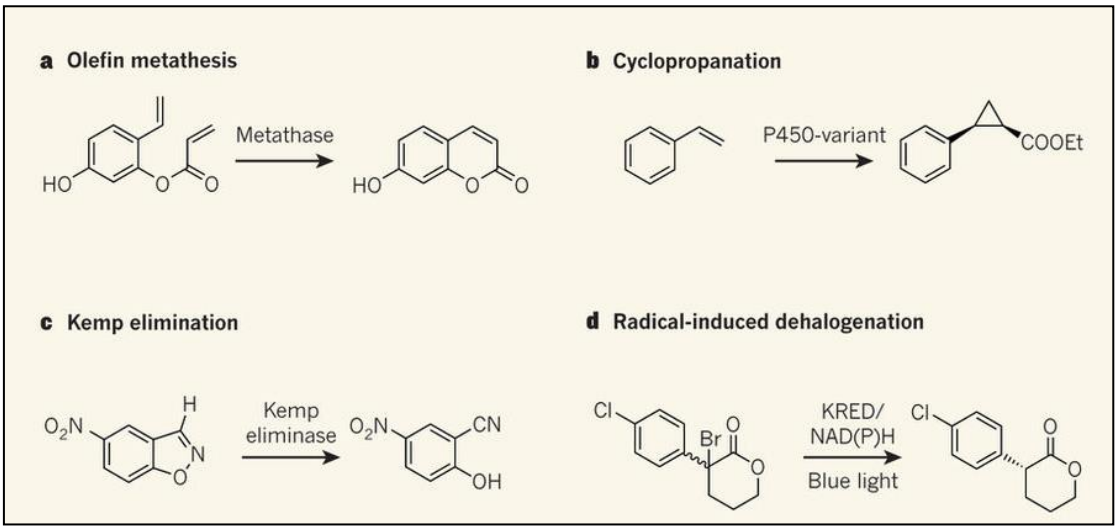
ακρυλαμιδίου[12] μέχρι την παρασκευή χημικών προϊόντων από υδρογονάνθρακες[13-16] και την παραγωγή βιοπολυμερών.[17-21]

1.3 <u>Εφαρμογές Βιοκατάλυσης με τροποποιημένα ένζυμα</u>

Η ανάπτυξη των σύγχρονων βιοτεχνολογιών, όπως η πρωτεϊνική μηχανική και η κατευθυνόμενη εξέλιξη, έχουν επιφέρει επιπλέον καινοτομίες στην ανάπτυξη βιομηχανικών ενζύμων. Αυτές οι εξελίξεις έχουν καταστήσει δυνατή την παροχή εξατομικευμένων ενζύμων που εμφανίζουν νέες δραστικότητες και προσαρμόζονται σε νέες συνθήκες αντίδρασης, επιτρέποντας την περαιτέρω επέκταση της βιομηχανικής τους χρήσης, αλλά και την περαιτέρω ενίσχυση του ενδιαφέροντος ως αντικείμενο επισταμένης ερευνητικής προσέγγισης.

Διάφορες στρατηγικές έχουν επινοηθεί για την ανάπτυξη ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις, τις οποίες η φυσική τους λειτουργία δεν θα τους επέτρεπε να καταλύσουν.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν, η παρασκευή μεταθετικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται για την κατάλυση μετάθεσης ολεφινών[22] (a), ακόμη η χρήση των ενζύμων P450 που έχουν κατασκευαστεί για να προάγουν την αντίδραση κυκλοπροπανίωσης[23] (b), αλλά και επιπλέον, τα ένζυμα απόσπασης Kemp που έχουν σχεδιαστεί *de novo* υπολογιστικά, για να εκτελέσουν την αντίδραση απόσπασης Kemp (c).[24] Τέλος, από την ομάδα του Emmanuiel et al. αναφέρεται ότι ο συμπαράγοντας NAD(P)H μπορεί να διεγερθεί με μπλε φως στα ένζυμα κετορεδουκτάσης (KRED). Αυτό επιτρέπει στο ένζυμο να καταλύει μια αντίδραση που δεν πραγματοποιείται στην φύση, γνωστή ως αποαλογόνωση επαγόμενη από ρίζες (radical-induced dehalogenation), η οποία αποδίδει κυρίως το ένα εναντιομερές του προϊόντος (d) (**Εικόνα 1**).[25]



<u>ΕΙΚΟΝΑ 1:</u> Παραδείγματα ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις μη συμβατές με την φυσική τους λειτουργία

2. Ένζυμα

2.1 Γενικές πληροφορίες

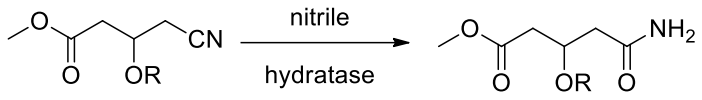
Με την ελληνική, διεθνή σήμερα, ονομασία ένζυμα, φέρονται ειδικές πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικής βάσης πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, οι οποίες δρούν ως καταλύτες στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό των οργανισμών. Για αυτόν τον λόγο, μπορεί να προκύψει και η συνώνυμη ονομασία τους, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, βιοκαταλύτες.

Σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις στα κύτταρα απαιτούν τη ρυθμιστική δράση των ενζύμων. Όπως όλοι οι καταλύτες, έτσι και τα ένζυμα λειτουργούν μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης. Συγκεκριμένα, οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις μπορούν να αποκτήσουν ταχύτητες μετατροπής αυξημένες κατά ένα παράγοντα της τάξης του 10^8-10^{10} αλλά ακόμα και έως 10^{12} φορές μεγαλύτερες από αυτές που καταφέρνουν οι χημικοί καταλύτες.[26] Συγκρίνοντας με τους υπάρχοντες χημικούς καταλύτες, μπορούμε να διαπιστώσουμε και κάποια επιπλέον πλεονεκτήματα των ενζύμων έναντι αυτών. Καταρχάς, πρόκειται για τους πιο φιλικούς προς το περιβάλλον καταλύτες, καθώς είναι βιοαποοικοδομήσιμοι και λειτουργούν κάτω από ήπιες συνθήκες αντίδρασης. Λόγω αυτών των συνθηκών pH (5-8), θερμοκρασίας (20-40 ^oC) αλλά και πίεσης (ατμοσφαιρική πίεση), η πιθανότητα εμφάνισης παράπλευρων αντιδράσεων και παραπροϊόντων μειώνεται σημαντικά. Ακόμα, η ικανότητά τους να δρουν καταλύοντας αντιδράσεις τόσο σε φυσικά όσο και σε μη φυσικά τους υποστρώματα τα κάνει ακόμα πιο ελκυστικά στον τομέα της Οργανικής Σύνθεσης, καθώς χρησιμοποιούνται επίσης και για την ελάττωση των σταδίων πολύπλοκων συνθέσεων, κάποια παραδείγματα των οποίων αναφέρθηκαν και στην Ενότητα 1.2.

Ένα από τα σημαντικότερα γνωρίσματα των ενζύμων είναι η εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν κατά την διάρκεια μιας καταλυτικής διεργασίας. Η δυνατότητα να επιλέγουν εκλεκτικά την σύνθεση συγκεκριμένων στερεοδομών τα καθιστά πολύτιμα εργαλεία στα χέρια πολλών Οργανικών Χημικών, αν αναλογιστούμε την τεράστια ανάγκη για ασύμμετρη σύνθεση κυρίως στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας.

Κάθε ένζυμο μπορεί να εμφανίσει τρείς μορφές εκλεκτικότητας, την χημειο-, τοπο- και στερεοεκλεκτικότητα.

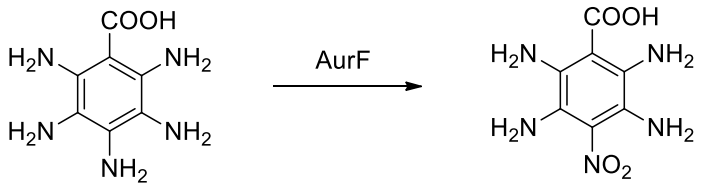
Όσον αφορά την χημειοεκλεκτικότητα, τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να δρουν εκλεκτικά σε μια δραστική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων εξίσου δραστικών λειτουργικών ομάδων του ίδιου μορίου. Ένα παράδειγμα είναι η εκλεκτική υδρόλυση της κυανομάδας και η μη υδρόλυση του εστέρα που βρίσκεται στο ίδιο μόριο (**7**) από ένα υδρολυτικό ένζυμο, την νιτριλοϋδρατάση.[27]



7 **8**

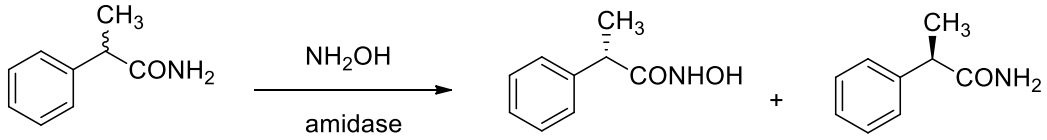
R= Bz, Bn

Εξαιτίας της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους, τα ένζυμα μπορούν να επιδεικνύουν και <u>τοποεκλεκτικότητα</u>, δηλαδή έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου υποστρώματος. Παράδειγμα εδώ αποτελεί η τοποεκλεκτική N-οξυγόνωση του παρακάτω οργανικού οξέος **9**, που λαμβάνει χώρα μόνο στην αμινο- ομάδα που βρίσκεται στην πάρα θέση του βενζοϊκού δακτυλίου.[28]



9 **10**

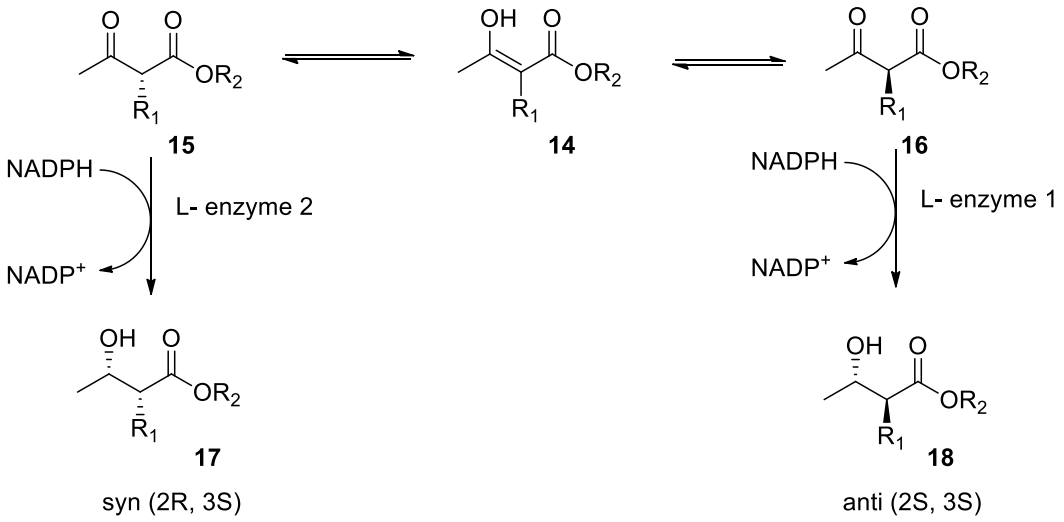
Η <u>στερεοεκλεκτικότητα</u> των ενζύμων διακρίνεται σε εναντιοεκλεκτικότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα. <u>Εναντιοεκλεκτικότητα</u> είναι η ικανότητα που έχουν να διακρίνουν ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου, όπως φαίνεται στην αντίδραση μεταξύ του ρακεμικού 2-φαινυλοπροπιοναμιδίου (**11**) και της υδροξυλαμίνης, καταλυόμενη από μια αμιδάση.[29]



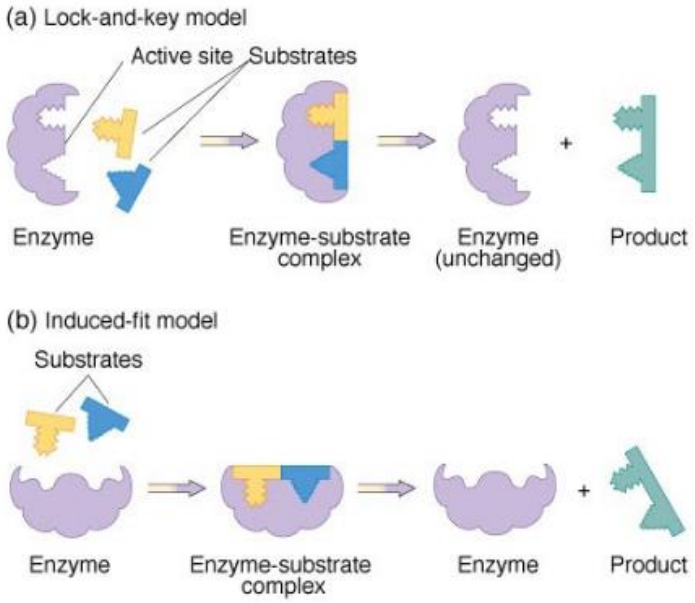
11 **12** **13**

<u>Διαστερεοεκλεκτικότητα</u> είναι η ικανότητά τους να διακρίνουν ένα από τα διαστερεομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου, όπως στην αντίδραση αναγωγής του παρακάτω κετοεστέρα, όπου το ένζυμο L-enzyme1 προτιμά

να προσδεθεί με το (*S*) στερεοϊσομερές (**15**), ενώ το L-enzyme2 με το (*R*) (**16**) αποδίδοντας τους αντίστοιχους υδροξυ εστέρες.[30]



Η θεμελιώδης επεξήγηση, όσον αφορά στην εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν τα ένζυμα, περιγράφεται στο μοντέλο του Emil Fisher (μοντέλο "κλειδιού-κλειδαριάς") που αναφέρεται στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και τον τρόπο με τον οποίο μπορεί το υπόστρωμα- "κλειδί" να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο του ενζύμου- "κλειδαριά". Παρόλα αυτά, μια πιο εξελιγμένη προσέγγιση, φαίνεται να είναι αυτή της επαγόμενης πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (induced-fit), η οποία προϋποθέτει μικρές τροποποιήσεις στην διαμόρφωση είτε του υποστρώματος, είτε του ενεργού κέντρου ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η κατάλληλη πρόσδεση (**Εικόνα 2**).



ΕΙΚΟΝΑ 2: Μοντέλο κλειδιού- κλειδαριάς (a) και μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής (b)

2.2 Ταξινόμηση ενζύμων

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 1950 κατέστη προφανές ότι η ονοματολογία των ενζύμων χωρίς καμιά κατευθυντήρια αρχή, σε μια περίοδο όπου ο αριθμός των γνωστών ενζύμων αυξανόταν ταχέως, οδήγησε σε έλλειψη σαφήνειας. Η ονομασία των ενζύμων από μεμονωμένους επιστήμονες αποδείχθηκε αναποτελεσματική, καθώς το ίδιο ένζυμο γινόταν γνωστό με διάφορα ονόματα, ενώ αντίστροφα το ίδιο όνομα δινόταν μερικές φορές σε διαφορετικά ένζυμα. Έτσι, λοιπόν, ιδρύθηκε η Διεθνής Επιτροπή για τα Ένζυμα το 1956 από τον Πρόεδρο της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας με σκοπό την επίλυση του ζητήματος της ονοματολογίας.

Σε κάθε ένζυμο αντιστοιχεί, πλέον, ένας χαρακτηριστικός και μοναδικός κωδικός ενζύμου (Enzyme Code, EC) ο οποίος αποτελείται από τέσσερα ψηφία.[31] Το πρώτο ψηφίο υποδηλώνει την κατηγορία του ενζύμου, η οποία αφορά στη φύση της αντιδράσεως που καταλύει, ενώ τα υπόλοιπα ψηφία εξειδικεύουν το είδος της αντιδράσεως, τα υποστρώματα και τις ομάδες.

Παρακάτω φαίνεται ο πίνακας με τις έξι κύριες κατηγορίες ενζύμων ανάλογα με την αντίδραση που καταλύουν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ταξινόμηση ενζύμων

Πρώτο ψηφίο	Κατηγορία ενζύμου	Φύση αντίδρασης
1	Οξειδορεδουκτάσες:	Οξείδωση, αναγωγή
2	Τρανσφεράσες:	Μεταφορά ατόμου ή ομάδας μεταξύ δύο μορίων
3	Υδρολάσες:	Διάσπαση δεσμών με συμμετοχή νερού
4	Λυάσες:	Απόσπαση ομάδων χωρίς συμμετοχή νερού
5	Ισομεράσες:	Ισομεριώσεις
6	Λιγάσες ή συνθετάσες:	Συνένωση δυο μορίων και σχηματισμός νέου δεσμού, συνοδευόμενη από διάσπαση πυροφωσφορικού δεσμού του ATP ή άλλου τριφωσφορικού νουκλεοζίτη

3. Αφυδρογονάσες- Κετορεδουκτάσες

3.1 Γενικές πληροφορίες

Οι κετορεδουκτάσες (EC 1.1.1.2) περιλαμβάνονται στην ευρύτερη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και συγκεκριμένα ανήκουν στην οικογένεια των αλκοολικών αφυδρογονασών. Πρόκειται για ένζυμα που φυσικό ρόλο έχουν την αναγωγή προχειρόμορφων κετονών προς τις αντίστοιχες χειρόμορφες αλκοόλες τους, έχοντας την δυνατότητα να καταλύουν και την αντίστροφη διαδικασία της οξείδωσης.

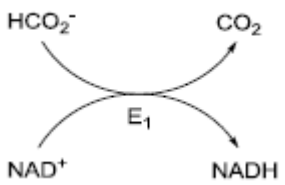
Για να μπορέσουν αυτά τα ένζυμα να είναι λειτουργικά, απαιτείται η ύπαρξη ενός νικοτιναμιδικού συμπαράγοντα από όπου θα μπορέσουν να αντλήσουν το πρωτόνιο για την πραγματοποίηση της αναγωγής. Στην περίπτωση των κετορεδουκτασών το συνέζυμο αυτό είναι το NADPH, όπου στη χρήση ολόκληρων κυττάρων (whole cell) συνυπάρχει με το ένζυμο, ενώ στην περίπτωση χρήσης απομονωμένων ενζύμων πρέπει να προστίθεται επιπλέον.

3.2 Συστήματα αναγέννησης των νικοτιναμιδικών συμπαραγόντων

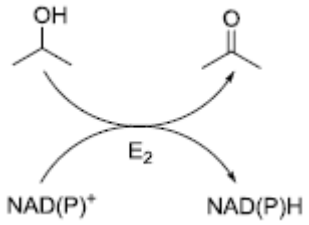
Για την συνεχή ανακύκλωση του NAD(P)H, στην περίπτωση των απομονωμένων ενζύμων, χρησιμοποιούνται διάφορα συστήματα ανακύκλωσης μέσω των οποίων ο συμπαράγοντας μπορεί να αναγεννάται και να επαναχρησιμοποιείται. Τα συστήματα αυτά λειτουργούν χρησιμοποιώντας μια αντίδραση, η οποία εμπλέκεται με την αρχική ενζυμική αντίδραση αναγωγής μέσω της οξείδωσης του NAD(P)H προς $NAD(P)^+$. Ουσιαστικά, λοιπόν, η όλη βιομετατροπή αποτελείται απο δύο ταυτόχρονες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα.

Τα τρία πιο γνωστά ανακυκλωτικά συστήματα του νικοτιναμιδικού συμπαράγοντα NAD(P)H είναι τα εξής:

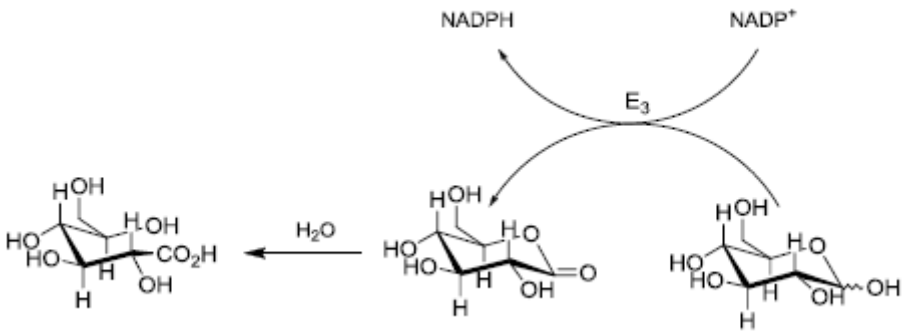
- Άλας του φορμικού οξέος/ φορμική αφυδρογονάση (FDH)[32]: Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση οξείδωσης του φορμικού οξέος προς διοξείδιο του άνθρακα



- Ισοπροπανόλη/ αλκοολική αφυδρογονάση (ADH)[33]: Το ένζυμο αυτό καταλύει την μετατροπή ισοπροπανόλης σε ακετόνη



- Γλυκόζη/ αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH)[34]: Το ένζυμο αυτό καταλύει την μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκουνολακτόνη και έπειτα σε γλουκονικό οξύ

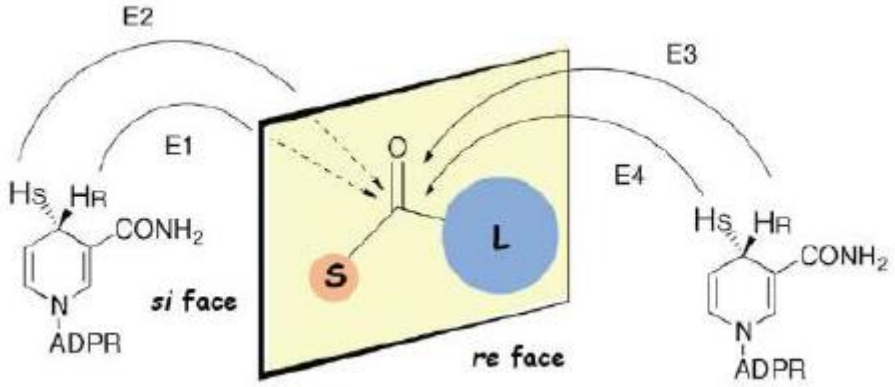


Και τα τρία συστήματα είναι αποτελεσματικά και αποδοτικά, παρόλα αυτά η χρήση του συστήματος γλυκόζης/GDH προτιμάται στην περίπτωση των κετοredουκτασών, καθώς το ένζυμο αυτό έχει την υψηλότερη ειδική δραστικότητα και είναι πολύ αποδοτικό όταν ο συμπαράγοντας είναι το NADPH (συγκριτικά με το FDH που δεν φαίνεται να είναι τόσο αποδοτικό όταν χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων το NADPH).

3.3 <u>Κατηγορίες αφυδρογονασών με βάση τον μηχανισμό δράσης τους</u>

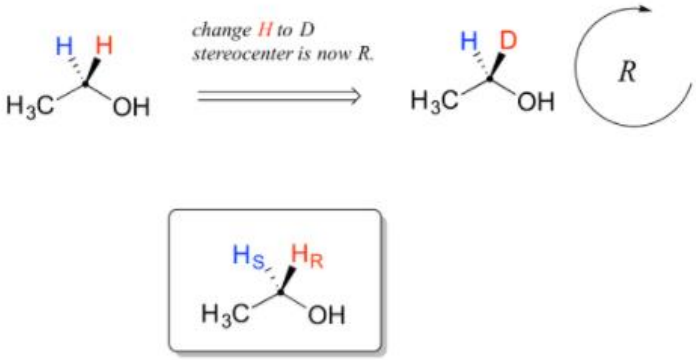
Οι αφυδρογονάσες διακρίνονται σε τέσσερεις κατηγορίες (E_1, E_2, E_3, E_4) ανάλογα με τον μηχανισμό που ακολουθούν κατά την αναγωγή, ανάλογα, δηλαδή, με τον τρόπο ενεργοποίησης του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα (**Εικόνα 3**).
Στις κατηγορίες E_1 και E_2 η αφυδρογονάση, που μεταφέρει το υδρίδιο από τον συμπαράγοντα, προσεγγίζει το υπόστρωμα από την *si* επιφάνεια, δίνοντας την *R* αλκοόλη, ενώ στις κατηγορίες E_3 και E_4 από την *re* επιφάνεια, δίνοντας την *S* αλκοόλη. Ως *si*- και *re*-επιφάνειες ορίζουμε τις επιφάνειες ενός τριγωνικού επιπέδου μορίου, με κεντρικό άτομο έναν υβριδοποιημένο κατά sp^2 άνθρακα, στο οποίο, όταν κοιτάμε την εκάστοτε επιφάνεια,

οι υποκαταστάτες διατάσσονται είτε με την φορά του ρολογιού- δεξιόστροφα (*re face*), είτε αντίστροφα από την φορά του ρολογιού- αριστερόστροφα (*si face*).



ΕΙΚΟΝΑ 3: Κατηγορίες αφυδρογονασών

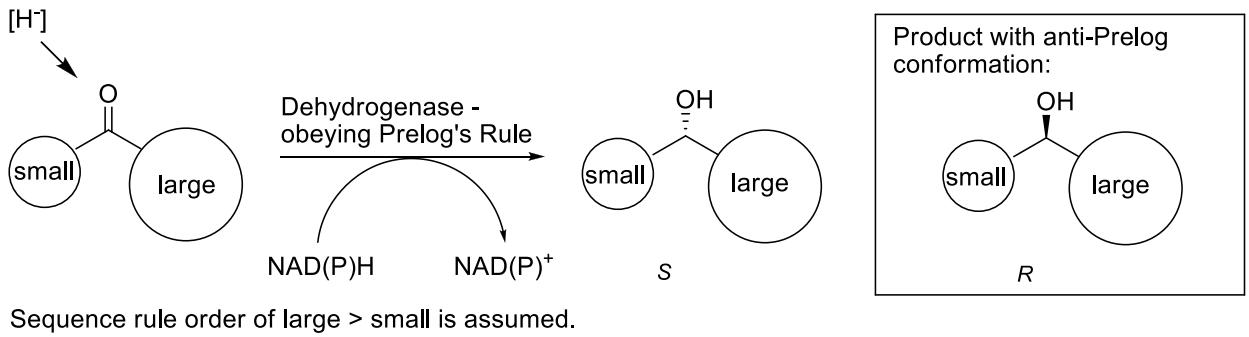
Επιπλέον, στις κατηγορίες E_1 και E_3 το πρωτόνιο του νικοτιναμιδικού συμπαράγοντα που κάνει την προσβολή είναι το *pro-R* ενώ στις κατηγορίες E_2 και E_4 είναι το *pro-S* . Ως *pro-R* και *pro-S* ορίζουμε τους υποκαταστάτες ενός μη χειρόμορφου μορίου, οι οποίοι, αν αντικατασταθούν από υποκαταστάτες μεγαλύτερου μοριακού βάρους, θα δημιουργηθεί ένα χειρόμορφο κέντρο, με προτεραιότητα υποκαταστατών από την οποία θα προκύπτει είτε το *R* είτε το *S* στεροϊσομερές αντίστοιχα.



Στο παραπάνω παράδειγμα αντικατάσταση του Η από D δημιούργησε χειρόμορφο μόριο στερεοχημείας *R*. Συνεπώς, το Η αυτό αναφέρεται ως *pro-R*.

3.4 Κανόνας του Prelog

Με βάση το μοντέλο του Prelog μπορούμε να προβλέψουμε την στερεοχημεία της χειρόμορφης αλκοόλης που προκύπτει από την ενζυμική αναγωγή, εάν γνωρίζουμε την κατηγορία στην οποία ανήκει η αφυδρογονάση που χρησιμοποιείται για την μετατροπή. Οι περισσότερες αφυδρογονάσες υπακούουν στον κανόνα του Prelog,[35] που υποδεικνύει ότι η αφυδρογονάση μεταφέρει το υδρίδιο από την *re* επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης, καταλήγοντας έτσι στην *S* αλκοόλη. Τα ένζυμα που υπακούουν στον κανόνα του Prelog (Prelog ένζυμα) καταλύουν την αναγωγή κετονών παράγοντας, λοιπόν, *S* αλκοόλες, ενώ ελάχιστα είναι τα ένζυμα με αντίθετη εκλεκτικότητα (anti-Prelog ένζυμα) που οδηγούν στον σχηματισμό *R* αλκοολών (**Σχήμα 2**). Οι περισσότερες απομονωμένες μέχρι σήμερα αλκοολικές αφυδρογονάσες ακολουθούν τον κανόνα του Prelog.



ΣΧΗΜΑ 2: Κανόνας του Prelog

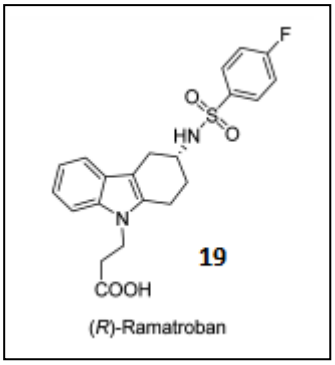
3.5 Χρήση κετοredουκτασών στην σύνθεση σημαντικών χειρόμορφων ενδιαμέσων και φαρμακευτικών σκευασμάτων

Πολλές δραστικές ουσίες φαρμάκων έχουν παρασκευαστεί βιοκαταλυτικά τα τελευταία χρόνια[36,37,38] και αρκετές από αυτές, μάλιστα, χρησιμοποιώντας κετοredουκτάσες ως βιοκαταλύτες. Παρακάτω εμφανίζονται ορισμένα τέτοια παραδείγματα συνθέσεων.

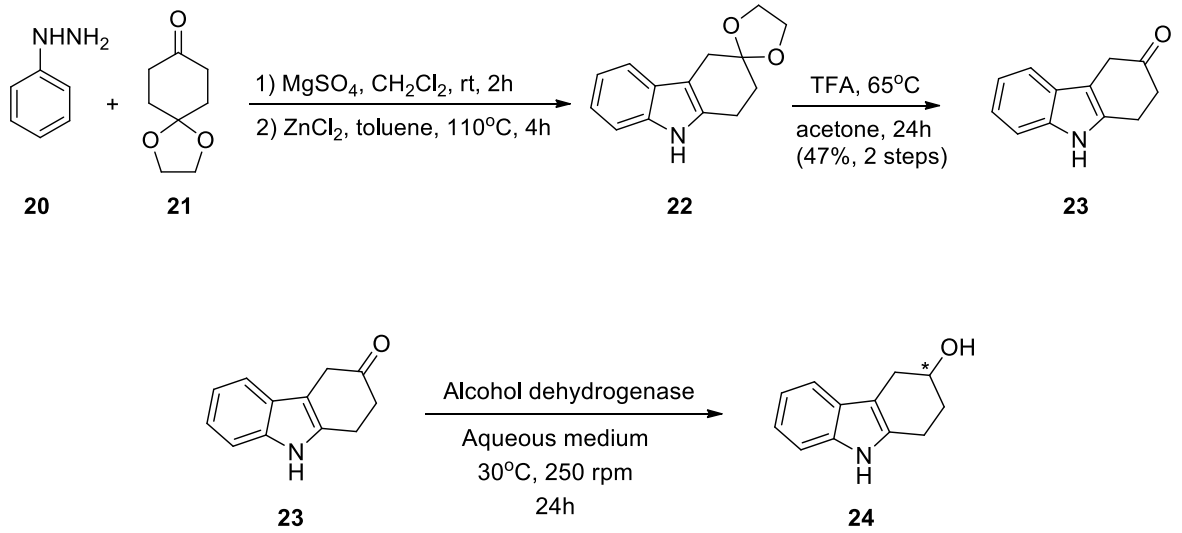
-Χημειοενζυμική σύνθεση της ένωσης (*R*)-Ramaroban, δραστικής ουσίας φαρμάκου για την καταπολέμηση της αλλεργικής ρινίτιδας και του άσθματος

Το 2012 η ερευνητική ομάδα του Gotor δημοσίευσε την χημειοενζυμική σύνθεση της ένωσης (*R*)-Ramaroban (**19**),[39] η οποία αποτελεί την δραστική ουσία του φαρμάκου Baynas που είναι διαθέσιμο στην Ιαπωνία και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της

αλλεργικής ρινίτιδας και του άσθματος. Ακόμη, εμφανίζει πιθανή δράση κατά της στεφανιαίας νόσου.



Η πορεία η οποία ακολουθήθηκε είχε ως αφετηρία την χημική σύνθεση της αντίστοιχης κετόνης **23** η οποία, στην συνέχεια, ανάχθηκε ενζυμικά με δοκιμή διαφόρων οξειδορεδουκτασών με καλύτερα αποτελέσματα να εμφανίζει η κετορεδουκτάση ADH-A.

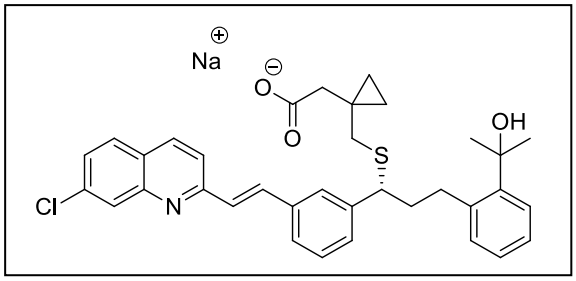


<u>ΣΧΗΜΑ 3:</u> Τα πρώτα στάδια της χημειοενζυμικής σύνθεσης της ένωσης (*R*)-Ramaroban

Στην συνέχεια, ακολουθήθηκαν τα αντίστοιχα βήματα για την ολοκλήρωση της σύνθεσης της επιθυμητής ένωσης.

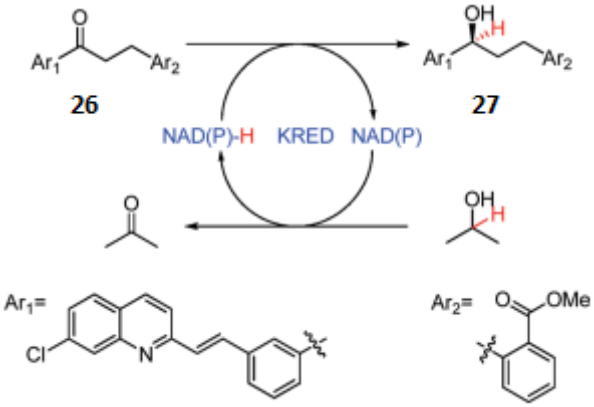
-Εφαρμογή της Βιοκατάλυσης στη σύνθεση του δραστικού ενδιαμέσου του φαρμάκου με την εμπορική ονομασία Singulair

Ένα ακόμα πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελέι η σύνθεση του φαρμάκου κατά του άσθματος και των αλλεργιών της εταιρείας Merck (Singulair).[40]



25, Montelukast sodium (Singulair)

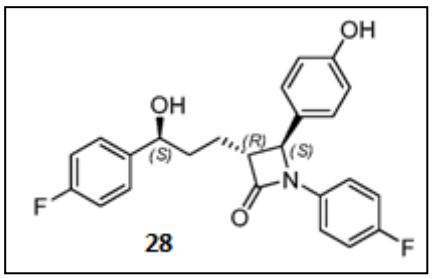
Η ένωση αυτή (montelukast sodium) (**25**) είναι η δραστική ουσία του φαρμάκου και το 2010 δημοσιεύθηκε η εναλλακτική βιοκαταλυτική διεργασία για την σύνθεσή του. Η αλκοόλη που προκύπτει από την ενζυμική αναγωγή της κετόνης (E)-methyl2-(3-(3-(2-(7-chloroquinolin-2-yl)vinyl)phenyl)-3-oxopropyl)benzoate (**26**), με κετορεδουκτάση, είναι η (*S*)- αλκοόλη (**27**) και είναι το στερεοϊσομερές που απαιτείται για το συγκεκριμένο φάρμακο. Από το 2015, μετά από συμφωνία της Merck με την εταιρία Codexis, το Montelukast παράγεται πλέον χημειοενζυμικά. Έχει, δηλαδή, υιοθετηθεί σαν το κύριο στάδιο δημιουργίας της απόλυτης στεροδομής του τελικού προϊόντος, η ενζυμική αναγωγή καταλυόμενη απο μια κατάλληλη κετορεδουκτάση.



ΣΧΗΜΑ 4: Ενζυμική αναγωγή με χρήση κετορεδουκτάσης για την σύνθεση του δραστικού ενδιαμέσου Montelukast του φαρμάκου Singulair

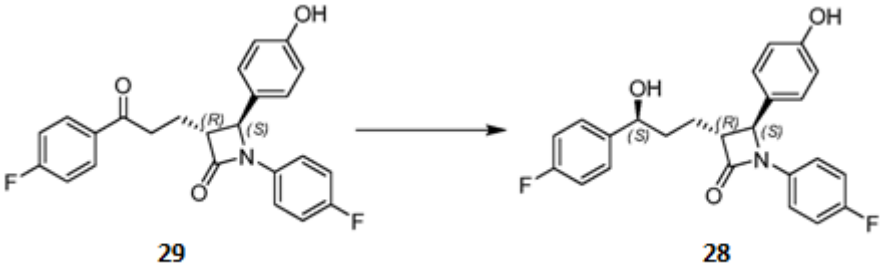
-Χρήση τροποποιημένης κετορεδουκτάσης για την σύνθεση της ουσίας Ezetimibe

Η ένωση l-(4-fluorophenyl)-3(R)-[3-(4-fluorophenyl)-3(S)-hydroxypropyl]-4(S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone (Ezetimibe) (**28**) είναι η δραστική ουσία του φαρμάκου ZETIA, το οποίο χρησιμοποιείται σε ασθενείς με υψηλή χοληστερίνη για μείωση της LDL αλλά και της ολικής χοληστερόλης.



Ezetimibe

Η συγκεκριμένη συνθετική πρόταση,[41] εμπεριέχει τροποποιημένα πολυπεπτίδια με δράση κετορεδουκτάσης, τα οποία έχουν προκύψει από αλλαγή στην σειρά των αμινοξέων που δομούν φυσιολογικά τις κετορεδουκτάσες, και μπορούν να καταλύουν την αναγωγή της κετόνης 5-((4S)-2-oxo-4-phenyl(l,3-oxazolidin-3-yl))-l-(4-fluorophenyl)pentane-l,-5-dione (**29**), στην αντίστοιχη χειρόμορφη αλκοόλη (4S)-3-[(5S)-5-(4-fluorophenyl)-5-hydroxypentanoyl]-4-phenyl-l,3-oxazolid- in-2-one (**28**). Σημαντικό είναι το γεγονός, ότι τα φυσικώς σχηματιζόμενα πολυπεπτίδια των κετορεδουκτασών δεν μπορούν να καταλύσουν την συγκεκριμένη μετατροπή.

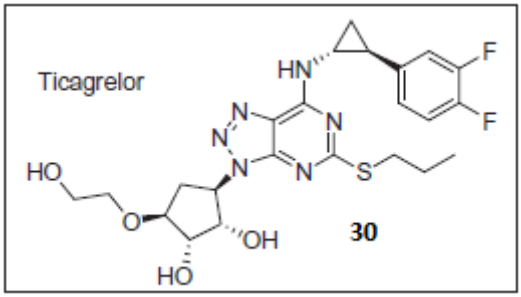


ΣΧΗΜΑ 5: Αναγωγή με τροποποιημένη κετορεδουκτάση για την σύνθεση της ουσίας Ezetimibe

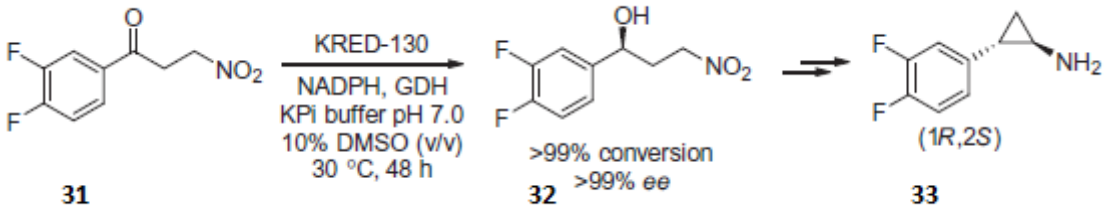
Το επιθυμητό προϊόν σχηματίστηκε με την συγκεκριμένη μέθοδο σε ποσοστό μετατροπής >90% σε 24h και με πολύ υψηλές στερεοεκλεκτικότητες (>99% de, >99% ee).

-Χρήση κετορεδουκτάσης για την εκλεκτική σύνθεση ενδιαμέσου του φαρμάκου Ticagrelor

Το φάρμακο Ticagrelor είναι ουσιαστικά ένας αναστολέας συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων που χρησιμοποιείται για την θεραπεία του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Με μια ρετροσυνθετική προσέγγιση η ερευνητική ομάδα του Nicholas Turner πρότεινε πολύ πρόσφατα, ότι η κυκλοπρόπυλο υπομονάδα του φαρμάκου αυτού είναι ένα καλό σημείο εκκίνησης για να εισαχθεί η χειρομορφία στο μόριο.[42a,b]



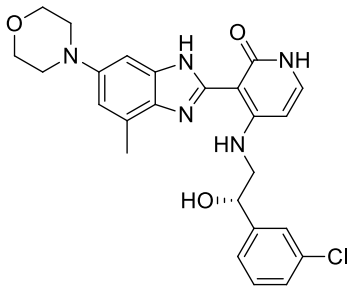
Ένας από τους πιθανούς τρόπους που μπορεί να συμβεί αυτό είναι με βιοαναγωγή του μορίου 1-(3,4-difluorophenyl)-3-nitropropan-1-one (**31**), χρησιμοποιώντας την κετορεδουκτάση-130 (KRED-130), η οποία απέδωσε το επιθυμητό προϊόν με εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής και εκλεκτικότητας, αφού απομονώθηκε μόνο η (*S*)- αλκοόλη (**32**), η οποία, στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε για την υπόλοιπη συνθετική πορεία.



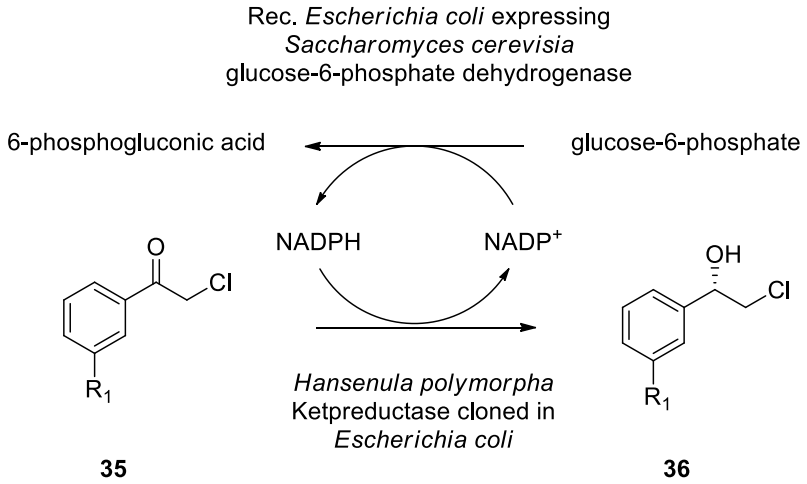
ΣΧΗΜΑ 6: Χρήση της KRED-130 για την εκλεκτική σύνθεση ενδιαμέσου του φαρμάκου Ticagrelor

-Ενζυμική σύνθεση της (S)-2-χλωρο-1-(3-χλωροφαινυλο)αιθανόλης (**36**), κρίσιμου ενδιαμέσου αντικαρκινικής ένωσης

Στην προσπάθεια σύνθεσης μιας πολλά υποσχόμενης ένωσης (**34**)[43] στο πλαίσιο ενός αντικαρκινικού προγράμματος (IGF-1 receptor inhibitors),[44,45] σημαντικό ενδιάμεσο αποτέλεσε η ένωση (*S*)-2-χλωρο-1-(3-χλωροφαινυλο) αιθανόλη (**36**). Μετά από έλεγχο πολλών μικροοργανισμών για την αναγωγή της αντίστοιχης κετόνης (**35**) προς την επιθυμητή ένωση, τα καλύτερα αποτελέσματα εναντιοεκλεκτικότητας προέκυψαν από τους μικροοργανισμούς *Hansenula polymorpha* SC13824 (73.8% ee) και *Rhodococcus globerulus* SC SC16305 (71.8% ee). Μια κετορεδουκτάση από τον μικροοργανισμό *Hansenula polymorpha*, έπειτα από καθαρισμό, έδωσε την (*S*)-αλκοόλη (**36**) σε ποσοστό εναντιοεκλεκτικότητας 100%. Η κετορεδουκτάση αυτή, αφού κλωνοποιήθηκε, εκφράστηκε σε *E.coli* μαζί με μια κλωνοποιημένη γλυκονο-6-φωσφορική αφυδρογονάση από *Saccharomyces cerevisiae*, ώστε να είναι εφικτή η ανατροφοδότηση του απαιτούμενου NADPH. Στην συνέχεια, εκχύλισμα από το *E. Coli* που περιείχε και τα δύο ένζυμα, χρησιμοποιήθηκε για να καταλύσει την αναγωγή της κετόνης (**35**) στην αντίστοιχη (*S*)-αλκοόλη (**3**) με απόδοση 89% και εναντιομερική περίσσεια 100%.[46]



34

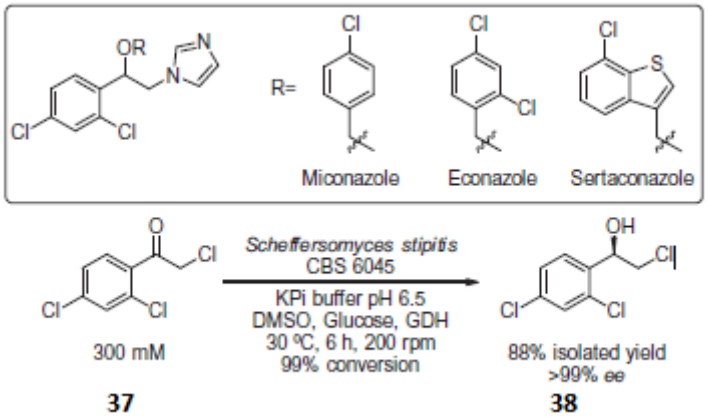


35 **36**

ΣΧΗΜΑ 7: Ενζυμική σύνθεση του ενδιαμέσου (*S*)-2-χλωρο-1-(3-χλωροφαινυλο) αιθανόλη (**36**)

-Δράση κετορεδουκτασών για την σύνθεση ιμιδαζολικών αντιμυκητιακών φαρμάκων

Μια άλλη βιοκαταλυτική διαδικασία που χρησιμοποιεί ολόκληρο μικροοργανισμό για να εκφράσει την αναγωγική δράση των κετορεδουκτασών είναι και αυτή της σύνθεσης χειρόμορφων ενδιαμέσων διαφόρων φαρμάκων αζόλης (azole drugs).[47] Πιο συγκεκριμένα, φάρμακα που περιέχουν ιμιδαζόλιο όπως τα miconazole, econazole και sertraconazole είναι αποτελεσματικοί αντιμυκητιακοί παράγοντες και χρησιμοποιούνται για την θεραπεία μυκητισιακών λοιμώξεων του κόλπου και του δέρματος. Βιοαναγωγές της αντίστοιχης κετόνης με χρήση λυοφυλοποιημένων κυττάρων *E.coli*, που εκφράζουν μια κετορεδουκτάση από τον μικροοργανισμό *Scheffersomyces stiptis* CBS 6045, έδωσαν το οπτικά καθαρό (*R*)-2-chloro-(2,4-chlorophenyl)ethanol με απόδοση 88%.

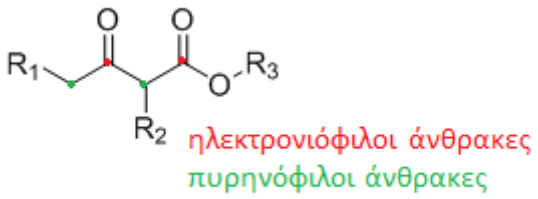


ΣΧΗΜΑ 8: Βιοκαταλυτική σύνθεση ενδιαμέσου για φάρμακα κατά των μυκητισιακών λοιμώξεων

4. β-Κετοεστέρες

4.1 Γενικό μοντέλο δομής

Ως β-κετοεστέρες ορίζονται οι εστέρες αυτοί, οι οποίοι φέρουν μια καρβονυλομάδα στην β θέση τους. Η σημαντικότητα αυτών των μορίων έγκειται στην ικανότητά τους να σχηματίζουν δεσμούς και στα τέσσερα άτομα άνθρακα από τα οποία αποτελείται ο βασικός τους σκελετός. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούνται από δύο ηλεκτρονιόφιλους καρβονυλικούς άνθρακες και δύο πυρηνόφιλους άνθρακες. Αυτά τα είδη ατόμων άνθρακα μπορούν να αντιδρούν επιλεκτικά, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, δίνοντας έτσι ένα μεγάλο εύρος επιθυμητών προϊόντων.



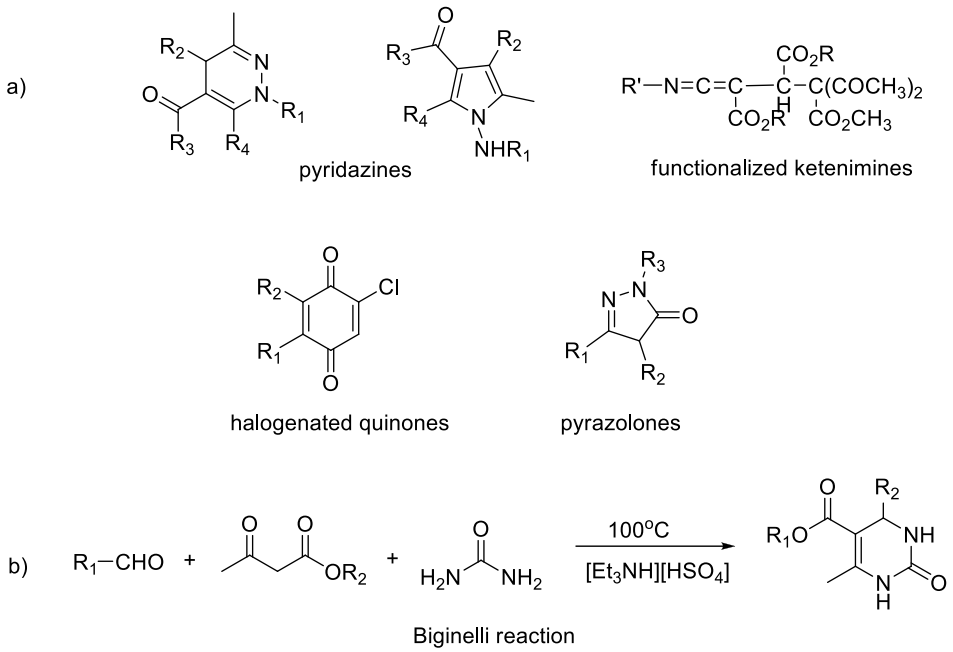
4.2 Χρήση και σημαντικότητα β-κετοεστέρων

Οι β-κετοεστέρες αποτελούν σημαντικές οργανικές δομικές μονάδες, που έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση διάφορων σύνθετων φυσικών προϊόντων, όπως είναι οι εστέρες του κερμεσικού και καρμινικού οξέος, οι οποίοι χρησιμεύουν πολύ συχνά ως πρόσθετα για τον χρωματισμό τροφίμων.[48]

Γενικότερα, αυτού του είδους οι ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως στις φαρμακοβιομηχανίες, στις βιομηχανίες αγροχημικών, χημικών αλλά και πολυμερών. Πρόκειται για κατάλληλα υποστρώματα όσον αφορά την σύνθεση πυριδαζινών,[49] ενεργοποιημένων κετενεμινών,[50] αμινοπυραζολικών παραγόντων και άλλων ετεροκυκλικών μορίων,[51] καθώς επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και σε αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης σε αλογονομένες κινόνες[52] (**Σχήμα 9a**).

Επιπλέον, τα χηλικά σύμπλοκα που δημιουργούν με μέταλλα εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς έχουν βρει εφαρμογή ως πολυλειτουργικά πρόσθετα σε διάφορες συνθέσεις λιπαντικών ενώσεων, ως πιθανά αντιιικά φάρμακα, αλλά και ως καταλύτες σε διάφορες στερεοεκλεκτικές αντιδράσεις.[53]

Ακόμα, χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την αντίδραση Biginelli[54] (**Σχήμα 9b**), δίνοντας προϊόντα με αντιβακτηριδιακή και αντιιική δραστικότητα καθώς δρουν ως παρεμποδιστές των καναλιών ασβεστίου, ως αναστολείς της μιτωτικής κινεσίνης και ως ανταγωνιστές των αδρενεργικών υποδοχέων.[55]

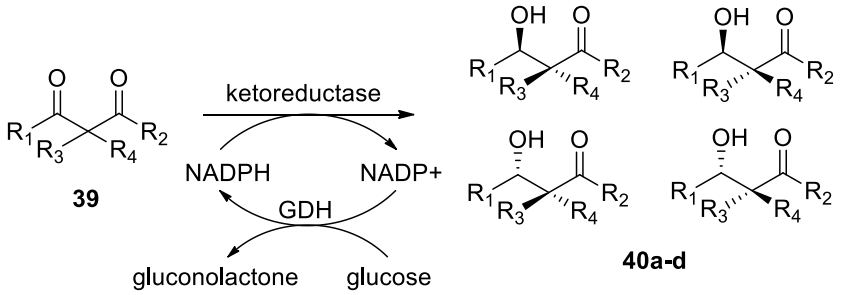


ΣΧΗΜΑ 9: a) Παραδείγματα ενώσεων που προέρχονται από β-κετοεστέρες, b) Αντίδραση Biginelli

5. Προηγούμενες μελέτες και χημειοενζυμικές συνθέσεις της ερευνητικής μας ομάδας

Η δραστηριοποίηση του εργαστηρίου μας πάνω στον τομέα της Βιοκατάλυσης τα τελευταία χρόνια έχει ως αποτέλεσμα την απόκτηση σημαντικών γνώσεων και αποτελεσμάτων στο πεδίο αυτό. Οι ερευνητικές μας μελέτες έχουν οδηγήσει σε αξιόλογες χημειοενζυμικές συνθέσεις φυσικών προϊόντων και σημαντικών ενδιαμέσων φαρμακευτικών ουσιών, καθώς επίσης και σε χρήσιμες βιομετατροπές χρησιμοποιώντας κυρίως κετορεδουκτάσες.

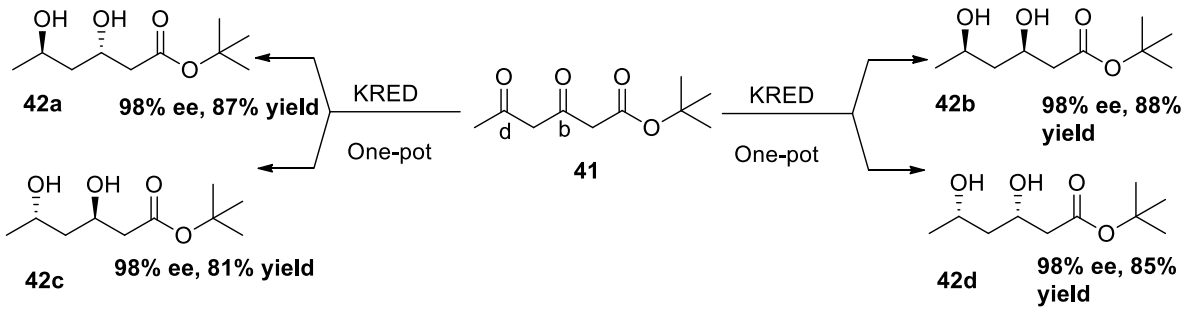
Τα πρώτα αποτελέσματα της χρήσης κετορεδουκτασών ως αναγωγικών βιοκαταλυτών από την ερευνητική μας ομάδα, δημοσιεύτηκαν το 2005, σχετικά με τις βιοκαταλυτικές αναγωγές α-αλκυλο-1,3-δικετονών και α-αλκυλο-β-κετοεστέρων (**Σχήμα 10**). Χρησιμοποιώντας 20 εμπορικά διαθέσιμες απομονωμένες NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες, σχηματίστηκαν προϊόντα αναγωγής με πολύ υψηλά ποσοστά μετατροπής αλλά και εξαιρετική στερεοεκλεκτικότητα.[56]



ΣΧΗΜΑ 10: Βιοκαταλυτικές αναγωγές α-αλκυλο-1,3-δικετονών και α-αλκυλο-β-κετοεστέρων

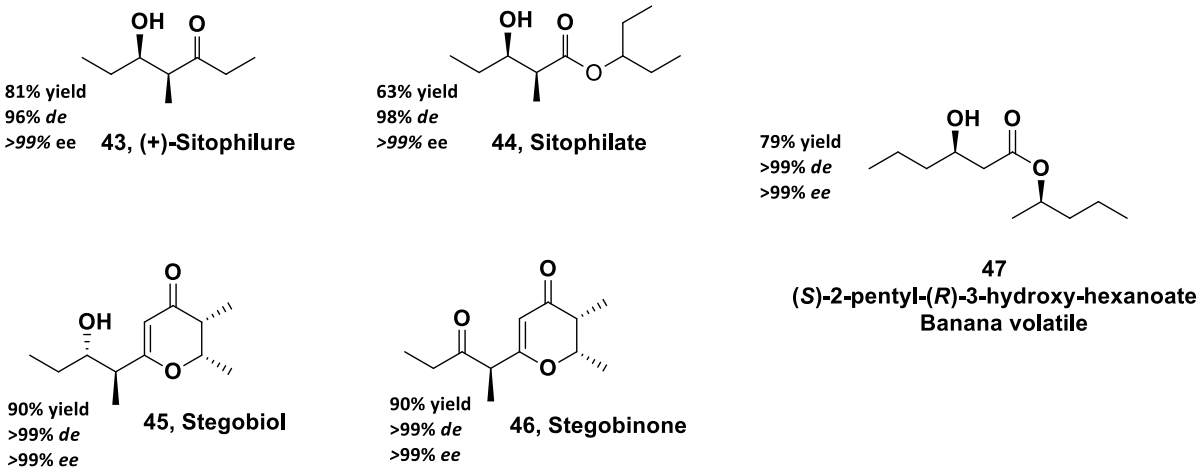
Επόμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πάνω στις στερεοεκλεκτικές αναγωγές δικαρβόνυλο ενώσεων με χρήση κετορεδουκτασών, επιβεβαίωσαν την σπουδαιότητα αυτής της κατηγορίας ενζύμων ως εξαιρετικών καταλυτών, και η οπτική καθαρότητα των προϊόντων που σχηματίστηκαν από την ενζυμική αναγωγή ήταν εξαιρετική.[57]

Στην συνέχεια, με μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2012, αποδείχτηκε όχι μόνο η υψηλή εναντιο- και διαστερεοεκλεκτικότητα, αλλά και η τοποεκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών, σε καταλυτικές αναγωγές πιο περίπλοκων και απαιτητικών συστημάτων, όπως είναι οι β,δ-δικετοεστέρες (**Σχήμα 11**).[58]



ΣΧΗΜΑ 11: Βιοκαταλυτικές αναγωγές δικετοεστέρων

Παράλληλα, η ερευνητική μας ομάδα προχώρησε σε εφαρμογή των παραπάνω αποτελεσμάτων για την σύνθεση διάφορων φυσικών προϊόντων, όπως οι φυσικές φερομόνες (+)-sitophilure[59] και sitophilate,[60] τις πρόδρομες ενώσεις φερομονών Stegobinone και Stegobiol,[61] αλλά και του φυσικού προϊόντος (*S*)-2-pentyl (*R*)-3-hydroxyhexanoate[62] που αποτελεί πτητική ένωση της μπανάνας (**Σχήμα 12**).



ΣΧΗΜΑ 12: Φυσικά προϊόντα που έχουν συντεθεί χημειοενζυμικά[59-62]

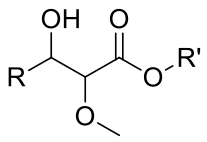
Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

6. Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία μελετώνται οι βιοκαταλυτικές αναγωγές έξι α-μεθοξυ-β-κετοεστέρων και παρουσιάζονται όλες οι προσπάθειες σύνθεσης των υποστρωμάτων, αλλά και οι ενζυμικές δοκιμές σε αυτά, με τα αντίστοιχα αποτελέσματα εκλεκτικότητας, μελετώντας την σχετική στερεοδομή των προϊόντων.

6.1 Σημασία των α-μεθοξυ-β-υδροξυ εστέρων - Τα φάρμακα Tesaglitazar και Navaglitazar

Τα μόρια, με τα οποία θα ασχοληθούμε στην πορεία της εργασίας, έχουν την δομή που φαίνεται στο **Σχήμα 13** και αποτελούν πολύ καλές δομικές μονάδες για διάφορες ενώσεις ενδιαφέροντος, όπως φάρμακα και προηγμένα υλικά.



ΣΧΗΜΑ 13: Δομή των α-μεθοξυ-β-υδροξυ εστέρων

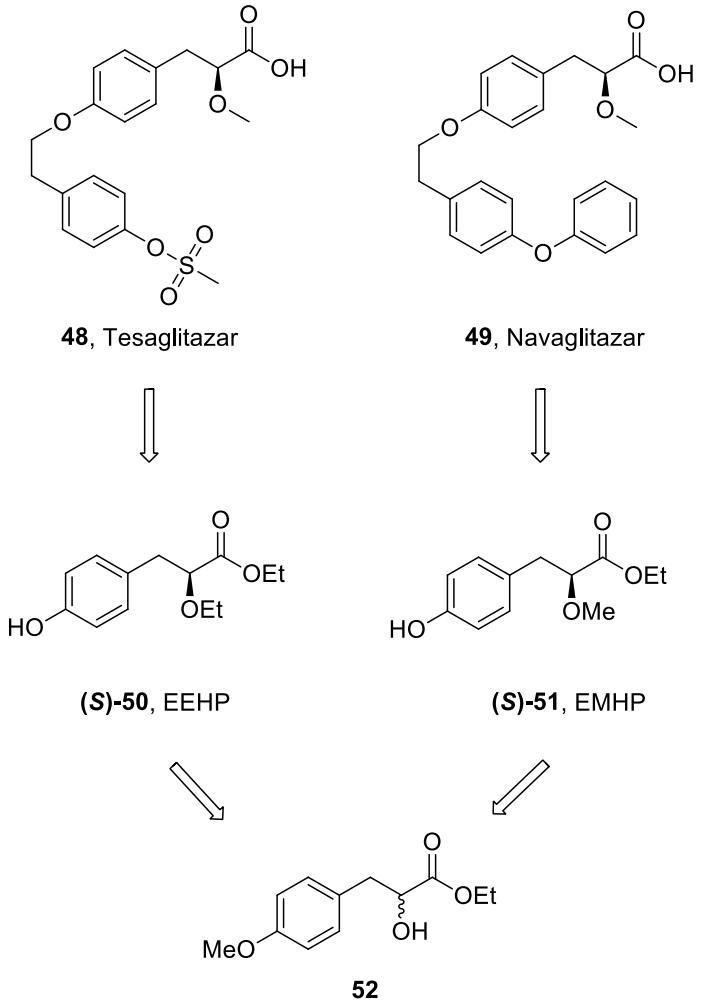
Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να αποτελέσουν ενδιάμεσα για την σύνθεση μορίων που παίζουν τον ρόλο αγωνιστών των ενεργοποιημένων υποδοχέων πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωματίων (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) agonists), όπως είναι τα φάρμακα Tesaglitazar και Navaglitazar, τα οποία χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του διαβήτη Τύπου ΙΙ.[63]

Οι PPARs είναι πυρηνικοί υποδοχείς, οι οποίοι λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων . Οι υποδοχείς αυτοί διαδραματίζουν βασικούς ρόλους στην ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, ανάπτυξης και μεταβολισμού (υδατάνθρακες, λιπίδια, πρωτεΐνες), καθώς και ογκογένεσης ανώτερων οργανισμών. Διαχωρίζονται σε τρείς κατηγορίες, τους PPARα,γ και β/δ.

Οι PPAR αγωνιστές αποτελούν φάρμακα τα οποία δρούν στους PPARs και βρίσκουν χρήση στην θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου και, κυρίως, στην μείωση των τριγλυκεριδίων και του σακχάρου του αίματος. Αντίστοιχα, διακρίνονται στους PPARα,γ και β/δ αγωνιστές.

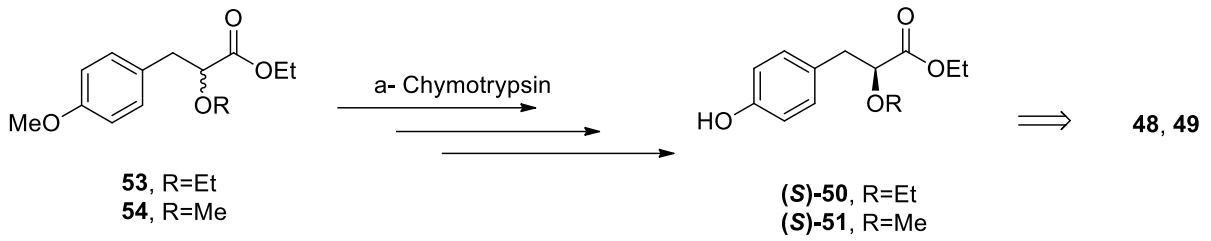
Πρόδρομα μόρια των συγκεκριμένων φαρμάκων αποτελούν οι ενώσεις ethyl (*S*)-2-ethoxy-3-(4-hydroxyphenyl) propanoate (EEHP) **((*S*)-50)** και ethyl (*S*)-2-methoxy-3-(4-hydroxyphenyl) propanoate (EMHP) **((*S*)-51)** και, παρά το γεγονός ότι η κυκλοφορία πολλών τέτοιων ενώσεων έχει διακοπεί, διότι τα οφέλη τους δεν εξισώνονταν με τους κινδύνους,[64]

τα συγκεκριμένα πρόδρομα μόρια εξακολουθούν να είναι σημαντικά για την παραγωγή ασφαλέστερης και αποτελεσματικότερης γενιάς PPAR αγωνιστών (**Εικόνα 4**).

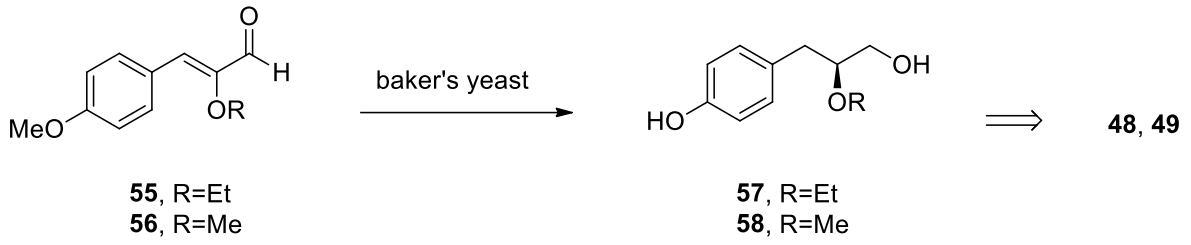


ΕΙΚΟΝΑ 4: Δομές των φαρμάκων Tesaglitazar και Navaglitazar, PPAR αγωνιστών, που βασίζονται στα ενδιάμεσα EEHP και EMHP, αντίστοιχα

Η ομάδα της Elisabetta Brenna το 2009, πρότεινε δύο βιοκαταλυτικές μεθόδους για την σύνθεση των αναμενόμενων *S*-εστέρων EEHP και EMHP με εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια. Μια μέσω υδρόλυσης του ρακεμικού ethyl 2-ethoxy-3-(p-methoxyphenyl) propanoate (**53**) ή του ρακεμικού ethyl 2-methoxy-3-(p-methoxyphenyl) propanoate (**54**) με την χρήση α-χυμοθρυψίνης[65] (**Εικόνα 5**), αλλά και μια δεύτερη μέσω μιας αναγωγής α-αλκοξυ κινναμαλδεϋδών με χρήση baker's yeast[66] (**Εικόνα 6**), παίρνοντας πάλι πολύ καλά αποτελέσματα εναντιοεκλεκτικότητας.

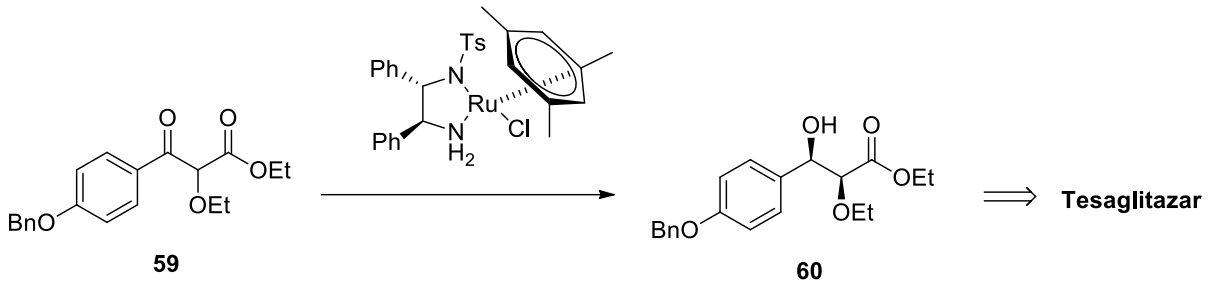


ΕΙΚΟΝΑ 5: Προετοιμασία των **(S)-50** και **(S)-51** μέσω υδρόλυσης των **53** και **54** καταλυόμενης απο α-χυμοθρυψίνη



ΕΙΚΟΝΑ 6: Καταλυτική δράση του ενζύμου baker's yeast για την σύνθεση των φαρμάκων **48** και **49**

Ακόμα, το 2010 αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο χρήσης καταλυτών του Ρουθινίου (Ru) για την στερεοεκλεκτική αναγωγή αρυλο α-αλκοξυ υποκατεστημένων β-κετοεστέρων,[67a] το οποίο χρησιμοποιήθηκε το 2015 σε συνδυασμό με την χρήση καταλυτών του Ροδίου (Rh), και ακολούθησε η εφαρμογή του στην σύνθεση του φαρμάκου Tesaglitazar (**Εικόνα 7**).[67b]



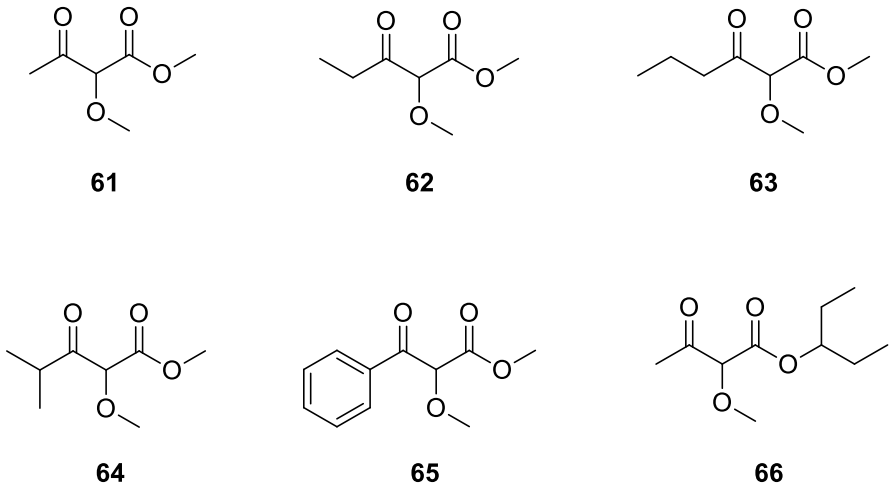
ΕΙΚΟΝΑ 7: Χρήση ενός καταλύτη Ru στην σύνθεση του φαρμάκου Tesaglitazar

7. Συζήτηση-Αποτελέσματα

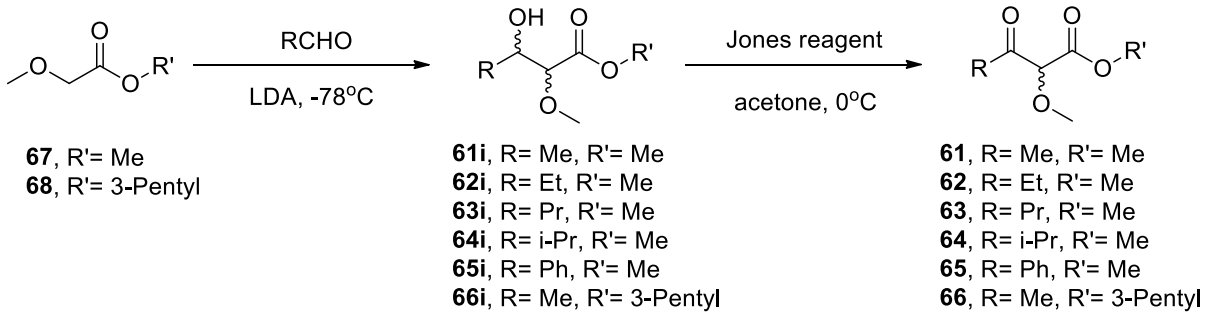
7.1 Σύνθεση των υποστρωμάτων

Στην ερευνητική αυτή εργασία, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση έξι υποστρωμάτων της δομής α-μεθοξυ-β-κετοεστέρων και η δοκιμή μιας σειράς κετοαναγωγασών μελετώντας την εκλεκτική τους αναγωγική δράση.

Τα υποστρώματα, που συντέθηκαν μέσω αλδολικής συμπύκνωσης μεταξύ του 2-μεθοξυαιθανικού μεθυλεστέρα (**67**) και των αντίστοιχων αλδεϋδών, ακολουθούμενης από οξείδωση Jones, φαίνονται στο **Σχήμα 14** και η γενική διαδικασία σύνθεσης στο **Σχήμα 15**.

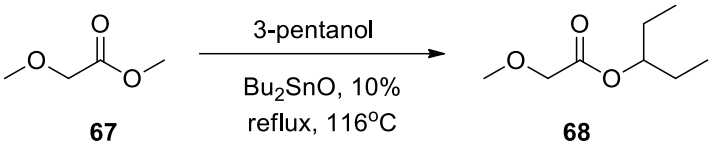


ΣΧΗΜΑ 14: α-Μεθοξυ-β-κετοεστέρες που συντέθηκαν



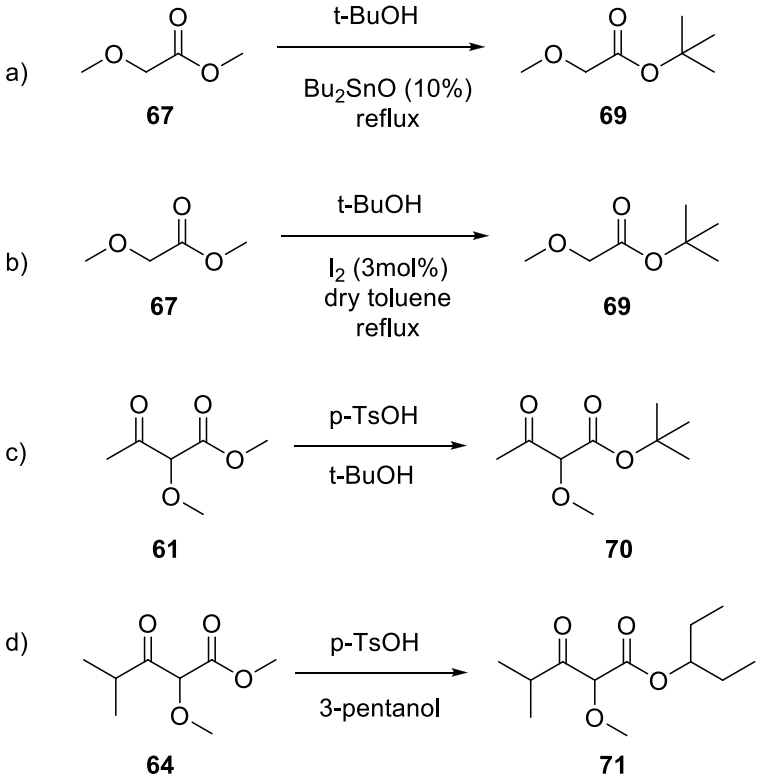
ΣΧΗΜΑ 15: Γενική διαδικασία σύνθεσης των υποστρωμάτων

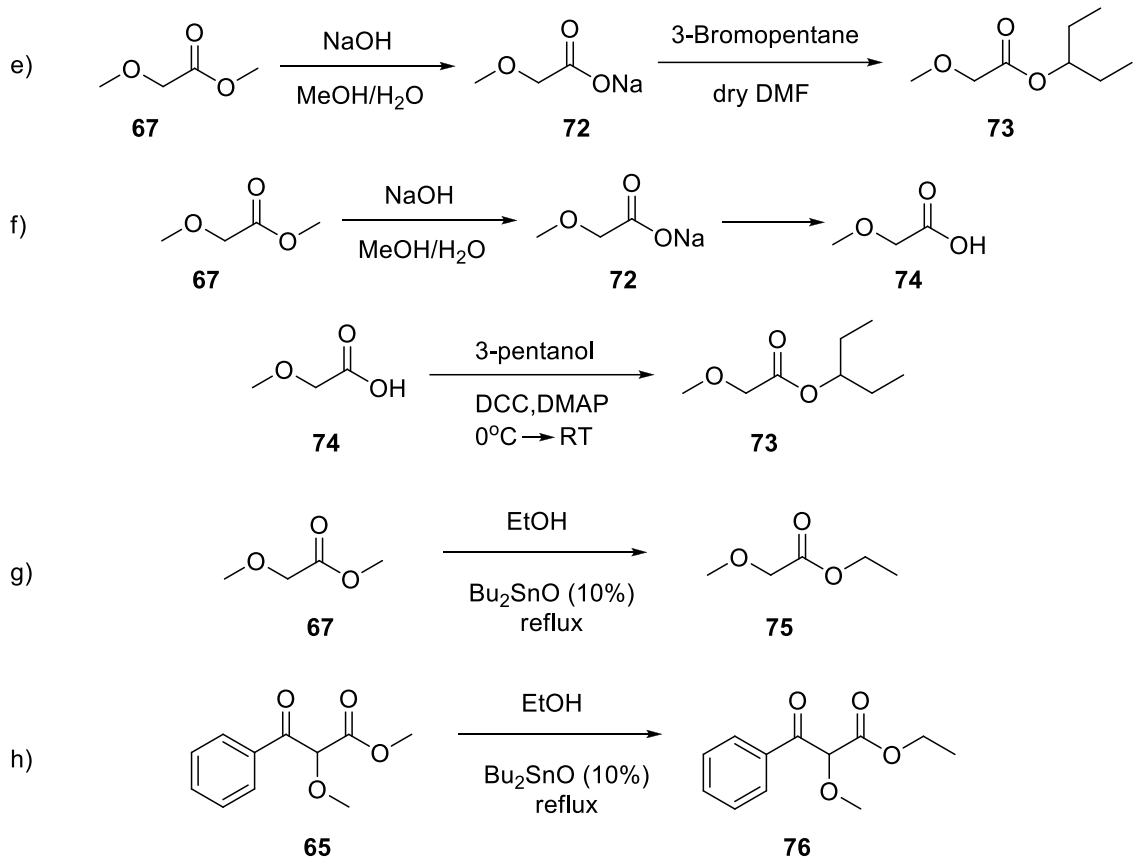
Όσον αφορά στο υπόστρωμα **66**, στην διαδικασία προστέθηκε ένα ακόμα βήμα και αυτό ήταν η μετεστεροποίηση του αρχικού εστέρα **67** (2-μεθοξυαιθανικός μεθυλεστέρας) στον εστέρα **68** (2-μεθοξυαιθανικός 3-πεντυλεστέρας), ο οποίος, ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε ως αρχική ουσία για την διαδικασία σύνθεσης που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 15**.



ΣΧΗΜΑ 16: Μετεστεροποίηση του 2-μεθοξυαιθανικού μεθυλεστέρα

Για την σύνθεση του υποστρώματος **66** πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές. Μετεστεροποιήσεις κάτω από διάφορες συνθήκες και με την χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων, υδρολύσεις ακολουθούμενες από εστεροποιήσεις σε μια φιάλη αντίδρασης, καθώς και υδρολύσεις και στην συνέχεια ξεχωριστές εστεροποιήσεις. Σε όλες αυτές τις μεθόδους το αποτέλεσμα ήταν απογοητευτικό όσον αφορά την απόδοση, είτε λόγω χαμηλής μετατροπής, είτε λόγω χαμηλού ποσοστού απομόνωσης του προϊόντος κατά την επεξεργασία της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, ορισμένες από τις αντιδράσεις που δοκιμάστηκαν φαίνονται στο **Σχήμα 17**.





ΣΧΗΜΑ 17: Ορισμένες δοκιμές μετεστεροποίησης

Στην περίπτωση b που χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης I_2 δεν παρατηρήθηκε καθόλου προϊόν, όπως και τις περιπτώσεις c, d όπου χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο παρα-τολουοσουλφονικό οξύ.

Στην περίπτωση e όπου πραγματοποιήθηκαν σε μια φιάλη αντίδρασης η υδρόλυση και η εστεροποίηση του αρχικού εστέρα, το προϊόν σχηματίστηκε αλλά υπήρξε πρόβλημα κατά την απομόνωσή του, λόγω δυσκολίας της απομάκρυνσης του μίγματος που δημιουργείται μεταξύ της $MeOH/H_2O$, αλλά και κατά τις εκχυλίσεις για την απομάκρυνση του διαλύτη DMF, συνεπώς δεν μπόρεσε να απομονωθεί επαρκής ποσότητα του προϊόντος. Να σημειωθεί εδώ το μικρό μέγεθος του συγκεκριμένου υποστρώματος και οι αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει λόγω πολικότητας.

Στην περίπτωση f, όπου η υδρόλυση και εστεροποίηση πραγματοποιήθηκαν σε δύο βήματα, τα προϊόντα και από τις δύο αντιδράσεις ήταν καθαρά, όσον αφορά στην ύπαρξη αρχικής ουσίας, όπως φάνηκε από την φασματοσκοπία NMR των ακατέργαστων δειγμάτων, παρόλα αυτά, στο πρώτο βήμα της υδρόλυσης, το προϊόν που ήταν οξύ (μικρού μοριακού βάρους) συγκρατούνταν έντονα στην υδατική φάση, παρά το γεγονός ότι δοκιμάστηκε οξίνιση του διαλύματος με πυκνό υδροχλωρικό οξύ και κορεσμός του διαλύματος με χλωριούχο νάτριο. Έτσι, δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί απομόνωση

ικανοποιητικής ποσότητας προϊόντος. Κατά το δεύτερο βήμα της πορείας αυτής, την εστεροποίηση, επιτεύχθηκε σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος, ενώ σχηματίστηκε επίσης αρκετή δικυκλοεξυλοουρία. Παρόλα αυτά, ήδη απο το πρώτο βήμα η τελική απόδοση θεωρήθηκε μή ικανοποιητική (10.7%).

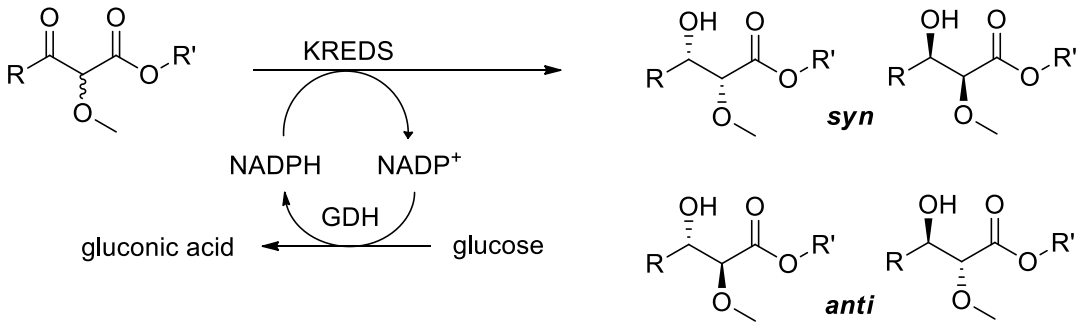
Στις περιπτώσεις g και h, που χρησιμοποιήθηκε ως αλκοόλη η αιθανόλη, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός παραπροϊόντος σε σημαντικό ποσοστό συγκριτικά με το προϊόν, το οποίο πιθανόν προέρχεται από την διπλή προσβολή της αιθυλομάδας τόσο στον εστέρα όσο και στην μεθόξυ ομάδα του αρχικού υποστρώματος.

Τελικά, η πραγματοποίηση της μετεστεροποίησης που φαίνεται στο **Σχήμα 16**, απέδωσε το επιθυμητό προϊόν και μάλιστα σε καλό ποσοστό απόδοσης (≈60%) έχοντας επαναλήψιμα αποτελέσματα. Το ενδιαφέρον σε αυτήν την διαδικασία είναι ότι, ενώ και στην περίπτωση a χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης το οξείδιο του διβουτυλοκασσιτέρου (Bu_2SnO), παρόλα αυτά η χρήση της αλκοόλης *τριτ*-βουτανόλης δεν βοήθησε την διαδικασία της αντίδρασης, σε αντίθεση με την 3-πεντανόλη που αποδείχθηκε κατάλληλη.

Λόγω, λοιπόν, του ότι η διαδικασία της μετεστεροποίησης που μας ενδιέφερε, πραγματοποιήθηκε με την χρήση 3-πεντανόλης σε Bu_2SnO σε ικανοποιητικό ποσοστό για την συνέχεια της έρευνάς μας, σταματήσαμε κάθε άλλη προσπάθεια βελτιστοποίησης των παραπάνω δοκιμών.

7.2 <u>Ενζυμικές αναγωγές με κετορεδουκτάσες</u>

Κατά την αναγωγή των α-μεθοξυ-β-κετοεστέρων αναμένεται ο σχηματισμός τεσσάρων πιθανών στερεοϊσομερών. Έτσι, λοιπόν, και στην περίπτωση των υποστρωμάτων **61**-**66** τα πιθανά προϊόντα αναγωγής είναι αυτά που απεικονίζονται στο **Σχήμα 18**.

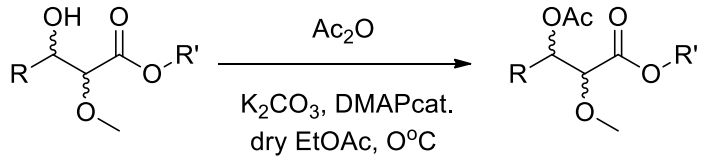


R=Me, Et, Pr, i-Pr, Ph
R'=Me, 3-Pentyl

<u>ΣΧΗΜΑ 18:</u> Πιθανά στερεοϊσομερή κατά την αναγωγή α-μεθοξυ-β-κετοεστέρων

Η χρήση του νικοτιναμιδικού συμπαράγοντα NAPDH, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, είναι απαραίτητη για την δράση των κετορεδουκτασών για την αναγωγή των υπό μελέτη υποστρωμάτων, καθώς επίσης, και η χρήση του συστήματος αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) /γλυκόζη για την ανακύκλωση του NADPH.

Για την διευκόλυνση την ανάλυσης των υδροξυ εστέρων στον αέριο χρωματογράφο, όπου μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκε, επιπλέον, η ακετυλίωση της υδρόξυ ομάδας τους με την χρήση οξικού ανυδρίτη, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 19**. Αυτοί οι ακετυλιωμένοι ρακεμικοί υδροξυ εστέρες που συντέθηκαν, λειτούργησαν ως πρότυπα αναφοράς για την σύγκριση και την επανάληψη της ίδιας διαδικασίας κατά τις ακετυλιώσεις των υδροξυ εστέρων που προέρχονταν από τις αντίστοιχες ενζυμικές αναγωγές.



61i, R= Me, R'= Me
62i, R= Et, R'= Me
63i, R= Pr, R'= Me
64i, R= i-Pr, R'= Me
66i, R= Me, R'= 3-Pentyl

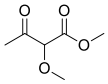
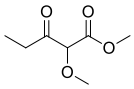
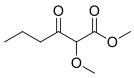
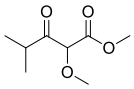
61ii, R= Me, R'= Me
62ii, R= Et, R'= Me
63ii, R= Pr, R'= Me
64ii, R= i-Pr, R'= Me
66ii, R= Me, R'= 3-Pentyl

ΣΧΗΜΑ 19: Εστεροποίηση των υδροξυ εστέρων **61i-64i** και **66i**

Η ακετυλίωση του υποστρώματος **65** δεν κρίθηκε απαραίτητη, καθώς αυτό το υπόστρωμα μελετήθηκε με υγρή χρωματογραφία (HPLC) και μπόρεσαν να διαχωριστούν τα εναντιομερή του με την μορφή του υδροξυ εστέρα.

Τα υποστρώματα **61**-**64** υποβλήθηκαν σε ενζυμικές αναγωγές με διάφορες κετοredουκτάσες και τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 2**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών στα υποστρώματα **61**-**64**

Substrate	KRED	Conversion % (24h)	Diastereomeric ratio %[a]				de % *syn/anti*
			A	B	C	D	
61 	121	>99	24.5	50.5	6.3	18.7	50.0
	118	>99	22.0	78.0	-	-	>99
	B1F	60	-	71.7	-	28.3	43.4
	106	66	11.9	21.2	42.2	24.7	33.8[b]
	114	>99	24.5	42.4	7.0	26.1	33.8
62 	119	>99	47.0	53.0	-	-	>99
	118	>99	27.6	72.4	-	-	>99
	112	>99	22.1	40.8	9.2	27.9	25.8
	114	>99	24.5	34.7	15.5	25.3	18.4
	123	>99	24.0	37.3	15.0	23.7	22.6
	121	>99	33.0	52.0	4.0	11.0	70.0
	101	>99	29.5	34.0	15.3	21.2	27.0
	111	>99	21.9	36.5	13.8	27.8	16.8
63 	112	95.8	29.4	38.1	10.7	21.8	35.0
	101	>99	21.1	45.8	10.4	22.7	33.8
	123	>99	47.2	36.3	6.4	10.1	67.0
	121	>99	38.9	48.9	3.4	8.8	75.6
64 	114	>99	26.2	50.4	5.3	18.1	53.2
	121	99.1	31.2	63.7	1.6	3.5	89.8
	112	>99	21.9	51.9	6.5	19.7	47.6
	123	85.3	44.6	37.9	6.0	11.5	65.0
	101	>99	33.4	53.2	4.6	8.8	73.2

[a] Τα A, B, C, D είναι τα τέσσερα πιθανά στερεοϊσομερή με βάση την σειρά έκλουσής τους από την χειρόμορφη κολώνα αέριας χρωματογραφίας. Τα ποσοστά των προϊόντων που φαίνονται στον πίνακα έχουν προέλθει από χειρόμορφη αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Τα αποτελέσματα έχουν προκύψει μετά από δύο επαναλήψεις.
[b] Σε αυτή την περίπτωση de= *anti/ syn*

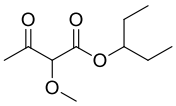
Σημαντικό είναι να αναφερθεί εδώ, ότι η απόλυτη στερεοδομή των στερεοϊσομερών A, B, C και D δεν είναι γνωστή, αλλά σύμφωνα με συνδυασμό των τεχνικών αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας NMR, παρατηρήθηκε ότι τα ζεύγη (A+B) και (C+D) αποτελούν διαστερεομερείς μορφές. Μάλιστα, το ζεύγος (A+B) αποτελεί το ζεύγος των *syn* διαστερεομερών, ενώ το ζεύγος (C+D) το ζεύγος των *anti*, όσον αφορά τα υποστρώματα **61**, **63** και **64**. Το συμπέρασμα αυτό προήλθε από την φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), με βάση παλαιότερη έρευνα του εργαστηρίου μας για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής αντίστοιχων άκυκλων α-αλκυλο-β-

υδροξυκαρβονυλο ενώσεων, σύμφωνα με την οποία παρατηρείται ότι το καρβινολικό πρωτόνιο των μορίων αυτών θα ανιχνεύεται σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου για το *anti* διαστερεομερές, ενώ σε χαμηλότερες τιμές πεδίου για το *syn*.[68] Για το υπόστρωμα **62** δεν μπορεί να προσδιοριστεί με βεβαιότητα η σχετική στερεοδομή των προϊόντων, διότι δεν μπορούν να διακριθούν ευκρινώς από το αντίστοιχο φάσμα NMR τα διαφορετικά καρβινολικά πρωτόνια.

Στην περίπτωση του υποστρώματος **66**, δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευθούν τα ποσοστά των εναντιομερών παρά μόνο τα ποσοστά διαστερεομερών, επαληθευμένα από την φασματοσκοπία NMR, λόγω τεχνικού προβλήματος της διαθέσιμης χειρόμορφης στήλης αέριας χρωματογραφίας, που χρησιμοποιούνταν για τις συγκεκριμένες μελέτες.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις ενζυμικές αναγωγές αυτές φαίνονται στον **Πίνακα 3**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών στο υπόστρωμα **66**

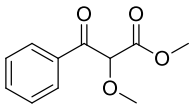


KRED	Conversion % (24h)	(A+B) %[a]	(C+D) %[a]	de % *syn/anti*
118	>99	85.1	14.9	70.2
121	>99	88.5	11.5	77
123	>99	83.9	16.1	67.8
119	>99	86.3	13.7	72.6
B1F	96	85.3	14.7	70.6
114	>99	82.4	17.6	64.8
101	>99	79.6	20.4	59.2
106	>99	11.3	88.7	77.4[b]
102	>99	6.6	93.4	86.6[b]

[a] Τα ποσοστά των προϊόντων που φαίνονται στον πίνακα έχουν προέλθει από αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. [b] Σε αυτή την περίπτωση de= *anti/ syn*

Όσον αφορά το μεγαλύτερου μεγέθους υπόστρωμα **65**, τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών μπόρεσαν να παρατηρηθούν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 4**), φαίνονται τα αποτελέσματα των αναγωγών όσον αφορά την εκλεκτικότητα και δραστικότητα των ενζύμων στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών στο υπόστρωμα **65**



Enzyme	Conversion % (24h)	Diastereomeric ratio %[a]				de%
		A	B	C	D	
KRED121	88.5	57.1	-	42.9	-	14.2
KRED123	>99	43.3	5.6	49.7	1.4	2.2[b]
KRED112	90%	41.1	6.9	32.8	19.2	4[b]
RasADH	48.1	79.9	-	20.1	-	59.8
		A	**C**	**B**	**D**	
KRED114	96	44	4.2	49.1	2.7	3.6[b]

[a] Τα A, B, C, D είναι τα τέσσερα πιθανά στερεοϊσομερή με βάση την σειρά έκλουσής τους από την χειρόμορφη κολώνα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Τα ποσοστά των προϊόντων που φαίνονται στον πίνακα έχουν προέλθει από χειρόμορφη υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. [b] Σε αυτή την περίπτωση de= *anti*/ *syn*

Είναι σημαντικό να τονιστεί σε αυτό το σημείο, ότι στην περίπτωση της αναγωγής του υποστρώματος **65**, με την κετοredουκτάση **114**, τα ζεύγη διαστερεομερών όπως εμφανίζονται στον υγρό χρωματογράφο, είναι τα (A+C) και (B+D) και όχι τα (A+B) και (C+D) όπως για τις υπόλοιπες κετοredουκτάσες του **Πίνακα 4**, εξαιτίας διαφορετικού προγράμματος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την περίπτωση, αλλάζοντας έτσι την σειρά έκλουσης των εναντιομερών.

Σχολιάζοντας τους παραπάνω πίνακες, μπορούμε να πούμε συνολικά ότι, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, οι κετοredουκτάσες εμφάνισαν υψηλή δραστικότητα (>99% μετατροπή σε 24 h). Ως προς την στερεοελεκτικότητα, αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση της αναγωγής του υποστρώματος **61** (**Πίνακας 2**) από την κετοredουκτάση **B1F**, καθώς παρατηρήθηκε εξαιρετικό ποσοστό εναντιοεκλεκτικότητας (>99% ee) και στα δύο ζεύγη διαστερεομερών, με συνολική διαστερεοεκλεκτικότητα της **B1F** σε αυτό το υπόστρωμα 43.4%. Επιπλέον, όσον αφορά το υπόστρωμα **61**, ενδιαφέρον έχει και το γεγονός ότι, ενώ τα περισσότερα ένζυμα ήταν εκλεκτικά ως προς το *syn* διαστερεομερές, η κετοredουκτάση **106**, φάνηκε να παρουσιάζει αναστροφή διαστερεοεκλεκτικότητας, αφού κατά την αναγωγή αυτή, το ένζυμο επέλεξε τον σχηματισμό του *anti* διαστερεομερούς. Τέλος, η κετοredουκτάση **118** έδειξε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό διαστερεοεκλεκτικοτητας (>99% de) ως προς το *syn* διαστερεομερές, με σχετικά χαμηλή ωστόσο εναντιοεκλεκτικότητα (56% ee).

Όσον αφορά το υπόστρωμα **62** (**Πίνακας 2**), πολύ ενδιαφέρουσα είναι η εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα που εμφάνισαν οι κετοredουκτάσες **118** και **119**, οδηγώντας στον σχηματισμό μόνο ενός διαστερεομερούς (>99% de). Ωστόσο, ιδιαίτερα στην περίπτωση της κετοredουκτάσης **119**, η εναντιοεκλεκτικότητα ήταν πολύ χαμηλή. Ακόμα, η

κετοredουκτάση **121** εμφάνισε καλή διαστερεοεκλεκτικότητα (70% de) κατά την αναγωγή του συγκεκριμένου υποστρώματος (**62**).

Για το υπόστρωμα **63** (**Πίνακας 2**), την καλύτερη διαστερεοεκλεκτικότητα εμφάνισαν οι κετοredουκτάσες **123** και **121** (67% de και 75.6 % de αντίστοιχα), ενώ για το υπόστρωμα **64** (**Πίνακας 2**) οι κετοredουκτάσες **121**, **123** και **101** (89.8 % de, 65.0 % de, και 73.2 % de αντίστοιχα), με ιδιαίτερα υψηλή διαστερεοκλεκτικότητα ως προς το *syn* διαστερεομερές η κετοredουκτάση **121** (89.8% de).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις ενζυμικές αναγωγές των υποστρωμάτων **61** και **66**, τα οποία έχουν την ίδια δομή με μόνη διαφορά στην εστερική ομάδα (μεθυλο το **61** έναντι 3-πεντυλο το **66**), και που αναγράφονται αντίστοιχα στους **Πίνακες 2** και **3**, διαπιστώνουμε ότι, εν γένει, οι κετοredουκτάσες είναι δραστικές και στα δύο υποστρώματα, παρόλα αυτά στο υπόστρωμα **66** φαίνεται να είναι πιο δραστικές. Ακόμα, παρατηρώντας την εκλεκτικότητα των ενζύμων όσον αφορά την σχετική στερεοδομή των προϊόντων, διαπιστώθηκε ότι τα περισσότερα ένζυμα ήταν εκλεκτικά ως προς τον σχηματισμό του *syn* διαστερεομερούς, εκτός από την κετοredουκτάση **106**, που απέδωσε το *anti* διαστερεομερές και στις δύο περιπτώσεις. Ακόμα, παρατηρήθηκε μια γενικευμένη αύξηση της διαστερεοεκλεκτικότητας των ενζύμων στο υπόστρωμα με την πιο ογκώδη εστερική ομάδα, δηλαδή το υπόστρωμα **66**, καθώς παρατηρούμε ότι τα ποσοστά διαστερεοεκλεκτικότητας των ενζύμων στο υπόστρωμα αυτό ήταν υψηλότερα του 64.8%, όσον αφορά τα ένζυμα που ήταν κοινά με αυτά του υποστρώματος **61**, όπου το χαμηλότερο ποσοστό άγγιξε την τιμή του 33.8%. Μόνη εξαίρεση εδώ φαίνεται να είναι η ενζυμική αναγωγή με την κετοredουκτάση **118**, όπου η εκλεκτικότητα του ενζύμου στο υπόστρωμα με την πιο ογκώδη εστερική ομάδα, **66**, φάνηκε να μειώνεται.

Συγκεκριμένα, για το υπόστρωμα **66** την υψηλότερη διαστερεοεκλεκτικότητα εμφάνισε η κετοredουτάση **102**, ευνοώντας μάλιστα τον σχηματισμό του *anti* διαστερεομερούς (**Πίνακας 3**, 86.6% de).

Κατά την ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **65** (**Πίνακας 4**), εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99% ee), αλλά όχι και διαστερεοεκλεκτικότητα (14.2% de), παρουσίασε η κετοredουκτάση **121**, καθώς από τα δύο πιθανά εναντιομερή του κάθε διαστερεομερικού ζεύγους σχηματίστηκε μόνο το ένα σε κάθε περίπτωση. Ακόμα, ενδιαφέρουσα φαίνεται να είναι και η περίπτωση της αναγωγής με την κετοredουκτάση **123**, που ενώ εμφάνισε ιδιαίτερα χαμηλή διαστερεοεκλεκτικότητα (2.2% de), παρόλα αυτά φάνηκε να έχει καλή εκλεκτικότητα όσον αφορά τα δύο εναντιομερή του κάθε διαστερεομερικού ζεύγους. Ακόμα, το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσίασε αναστροφή εκλεκτικότητας, αφού απέδωσε κυρίως το *anti* διαστερεομερές. Γενικότερα στο συγκεκριμένο υπόστρωμα (**65**), από τις πέντε κετοredουκτάσες που αναγράφονται στον **Πίνακα 4**, οι τρείς από αυτές (KREDs **123**, **112** και **114**) εμφάνισαν διαστερεοεκλεκτικότητα ως προς τον σχηματισμό του *anti* διαστερεομερούς. Ένα διαφορετικό είδος αφυδρογονάσης, που δέχεται υποστρώματα μεγαλύτερου μεγέθους και απομονώθηκε από

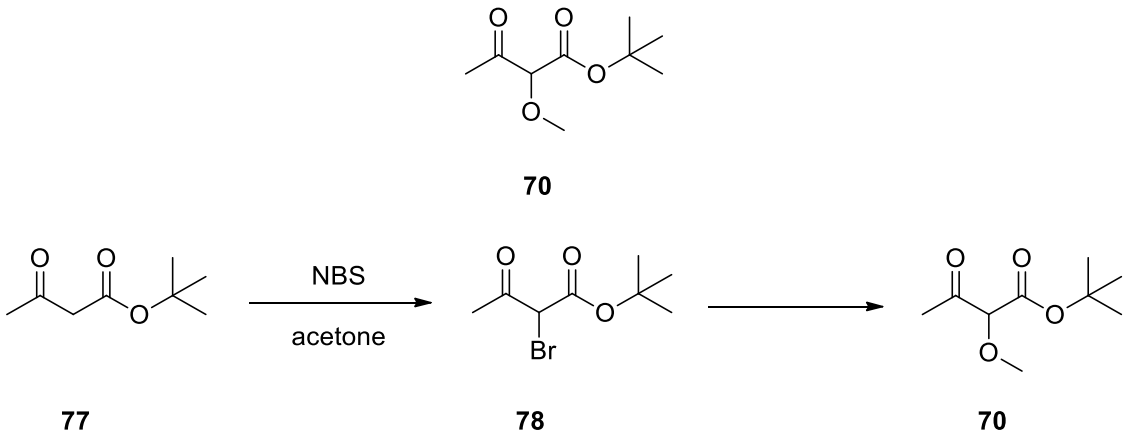
μέλος της ερευνητικής μας ομάδας από το στέλεχος *Ralstonia sp.*DSM 6428, η αφυδρογονάση RasADH, δοκιμάστηκε στο υπόστρωμα **65**. Σε αυτήν την περίπτωση παρουσιάστηκε εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99% ee), αλλά σχετικά καλή διαστερεοεκλεκτικότητα (59.8% de) και μέτρια καταλυτική δραστικότητα (48.1% conv.).

7.3 <u>Προσπάθεια σύνθεσης του υποστρώματος 70</u>

Τελικός στόχος αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί περαιτέρω η εκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών σε περίπτωση υποστρωμάτων *τριτ*-βουτυλο εστερικής ομάδας.

Για τον στόχο αυτόν, δοκιμάστηκαν δύο πορείες για την σύνθεση του υποστρώματος 2-μεθοξυ-3-κετοβουτανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα (**70**).

Η πρώτη πορεία φαίνεται στο **Σχήμα 20**.



<u>ΣΧΗΜΑ 20:</u> Πρώτη προσπάθεια σύνθεσης του 2-μεθοξυ-3-κετοβουτανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα (**70**)

Το πρώτο βήμα της σύνθεσης αυτής αποτελεί η βρωμίωση του ακετοξικού *τριτ*-βουτυλεστέρα (**77**), η οποία πραγματοποιήθηκε με την χρήση N-βρωμοσουκινιμιδίου (NBS) σε διαλύτη ακετόνης.

Μετά την επιτυχημένη σύνθεση του βρωμιδίου **78**, σειρά είχε η πυρηνόφιλη υποκατάσταση της ομάδας βρωμίου από μια μεθοξυ ομάδα.

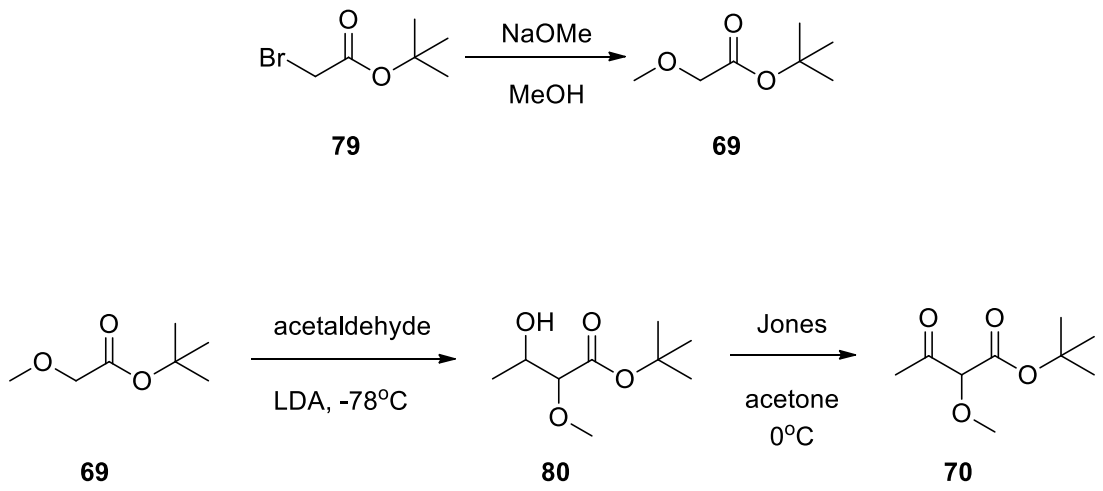
Δοκιμάστηκαν τέσσερεις μέθοδοι για αυτόν τον σκοπό. Η πρώτη ήταν η χρήση του πολικού απρωτικού διαλύτη διμεθυλο σουλφοξείδιο (DMSO) ως μέσο για την αντίδραση του **78** με το μεθοξείδιο του νατρίου (NaOMe), ωστόσο η μέθοδος αυτή δεν απέδωσε το επιθυμητό προϊόν.

Κατά την δεύτερη προσπάθεια σύνθεσης, επιχειρήθηκε η αντίδραση του βρωμιδίου με μεθοξείδιο του νατρίου σε διαλύτη ξηρής μεθανόλης και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε αυτήν την περίπτωση το προϊόν συντέθηκε, αλλά παράλληλα σχηματίστηκε περίσσεια παραπροϊόντος. Ο διαχωρισμός των δύο ουσιών για τον πλήρη καθαρισμό του προϊόντος κατέστη αδύνατος (βλ. Πειραματικό μέρος).

Η ίδια μέθοδος δοκιμάστηκε και με θέρμανση μέχρι βρασμού του διαλύτη, χωρίς να αποδώσει όμως βελτιωμένα αποτελέσματα. Αντιθέτως, το ποσοστό σχηματισμού του προϊόντος μειώθηκε.

Τέλος, δοκιμάστηκε, ακόμα, η αντίδραση του βρωμιδίου **78** με ξηρή μεθανόλη και αφέθηκε για τρείς μέρες. Το επιθυμητό προϊόν δεν ανιχνεύθηκε, αλλά παρατηρήθηκε ξανά το αρχικό βρωμίδιο.

Η δεύτερη πορεία σύνθεσης του υποστρώματος **70** φαίνεται στο **Σχήμα 21**.



<u>ΣΧΗΜΑ 21:</u> Η δεύτερη προσπάθεια σύνθεσης του υποστρώματος **70**

Σε αυτήν την πορεία το ζητούμενο ήταν να πραγματοποιηθεί το πρώτο βήμα της πυρηνόφιλης υποκατάστασης του βρωμίου του υποστρώματος **79** από μια μεθοξυ ομάδα προς τον σχηματισμό του υποστρώματος **69**. Στην συνέχεια, η διαδικασία ήταν γνωστή, καθώς αποτελούνταν από μια αλδολική συμπύκνωση ακολουθούμενη από οξείδωση Jones, σύμφωνα με την σύνθεση των προηγούμενων υποστρωμάτων (**Σχήμα 15**).

Για την σύνθεση του υποστρώματος **69** δοκιμάστηκαν οι μέθοδοι που αναφέρθηκαν παραπάνω κατά την πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο υπόστρωμα **78**. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μεθοξείδιο του νατρίου, τόσο σε διαλύτη ξηρής μεθανόλης, όσο και σε διαλύτη DMSO, δίνοντας, ωστόσο, ξανά αρνητικά αποτελέσματα. Αυτή τη φορά

δοκιμάστηκε και η χρήση του διαλύτη τετραϋδροφουρανίου, παρόλα αυτά, η μετατροπή που παρατηρήθηκε κατά τη συγκεκριμένη αντίδραση ήταν μηδενική, καθώς έγινε επανάκτηση του αρχικού βρωμιδίου **79**.

Στην προκειμένη περίπτωση η συγκεκριμένη αντίδραση παρέμεινε ημιτελής.

7.4 Γενικό συμπέρασμα

Από την μελέτη που παρουσιάστηκε στην Ενότητα 7.2, ένα γενικό συμπέρασμα από τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών υποστρωμάτων με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά με χρήση κετορεδουκτασών, είναι ότι οι περισσότερες κετορεδουκτάσες είναι δραστικές σε αυτή τη μορφή α-μεθοξυ-β-κετοεστέρων, με εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής στις περισσότερες περιπτώσεις. Ακόμα, ένα γενικό συμπέρασμα που εξάγεται απο τα αποτελέσματα, είναι ότι υπάρχει καθαρή διαστερεοεπιλογή στην δημιουργία των *syn* διαστερεομερών συγκριτικά με τα *anti*, εκτός από κάποιες περιπτώσεις όπου προτιμήθηκε ο σχηματισμός του *anti* διαστερεομερούς.

Με την αύξηση του μεγέθους της αλκυλο ομάδας στα υποστρώματα, η εκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών φάνηκε να μειώνεται. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των κετορεδουκτασών **118**, **119** και **B1F**, που ενώ κατά την αναγωγή των υποστρωμάτων **61** και **62** έδειξαν εξαιρετικά ποσοστά στερεοεκλεκτικότητας, αντιθέτως στην αναγωγή του υποστρώματος **64** δεν φάνηκε να έχουν καμία δραστικότητα (0% conv.). Ένα παράδοξο του συμπεράσματος αυτού είναι ότι, στην περίπτωση της κετορεδουκτάσης **121**, η διαστερεοεκλεκτικότητα του ενζύμου κατά την αναγωγή υποστρωμάτων με μεγαλύτερο μέγεθος άλκυλο ομάδας, αυξήθηκε σε σχέση με τα υποστρώματα μικρότερου μεγέθους αλκυλο ομάδας. Πιο συγκεκριμένα, για το μικρότερου μεγέθους υπόστρωμα **61**, η **Kred 121** έδειξε διαστερεοεκλεκτικότητα 50%, ενώ για το μεγαλύτερου μεγέθους υπόστρωμα **64**, επέδειξε διαστερεοεκλεκτικότητα 89.8%.

Με την τροποποίηση της εστερικής ομάδας των υπό μελέτη υποστρωμάτων από μέθυλο σε 3-πέντυλο, στοχεύαμε στη βελτίωση της στερεοεκλεκτικότητας των κετορεδουκτασών στο υπόστρωμα με την πιο ογκώδη εστερική ομάδα. Από την στιγμή που δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί σύγκριση όσον αφορά την εναντιοεκλεκτικότητα των ενζύμων στα συγκεκριμένα υποστρώματα, έγινε σύγκριση μόνο όσον αφορά την διαστερεοεκλεκτικότητά τους. Τελικά, διαπιστώθηκε ότι, όντως, υπήρξε μια γενικότερη βελτίωση των ποσοστών διαστερεοεκλεκτικότητας κατά τις αναγωγές του 3-πεντυλο εστέρα **66**, στις περισσότερες περιπτώσεις, σε σχέση με τον αντίστοιχο μεθυλο εστέρα **61**.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών *S*igma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Για την χρήση του ξηρού διαλύτη τετραϋδροφουρανίου (THF), προηγήθηκε η απόσταξη του τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet, και επίσης για την ξήρανση της διισοπροπυλαμίνης πραγματοποιήθηκε απόσταξη παρουσία NaOH και μοριακών κοσκίνων. Επιπλέον, οι αλδεΰδες που χρησιμοποιήθηκαν, ξηράνθηκαν με την μέθοδο της απόσταξης και διατηρήθηκαν στους -4°C. Τέλος, οι κετορεδουκτάσες (KREDs) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας BioCatalytics, η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) της εταιρίας Evocatal και ο συμπαράγοντας (NADPH) της εταιρίας Prozomix, και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.
Από την εταιρεία Merck χρησιμοποιήθηκαν, ακόμη, πλάκες TLC Silica gel 60 F_{254}, για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδος, και η ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε σε διάφορες αναλογίες διαλυτών Hex/EtOAc.

Όργανα

Τα φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR ελήφθησαν με φασματόμετρα 300 MHz και 500 MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TM*S*) σε διαλύτη $CDCl_3$. Το ποσοστό μετατροπής των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες των ενζύμων για κάθε υπόστρωμα μελετήθηκαν με τον αέριο χρωματογράφο της Shimadzu 2014, με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα Hewlett-Packard special performance capillary column HP CHIRAL (20% permethylated beta-cyclodextrin) 30m x 0.25mm x 0.25μm, και με την απλή κολώνα αέριας χρωματογραφίας Hewlett-Packard high performance capillary column HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane) 30m x 0.32mm x 0.25μm, καθώς και με τον υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης Shimadzu LC-20AD Prominence Liquid chromatograph pump και DGU-20A_{5R} Prominence Degasser, με ανιχνευτή Shimadzu Prominence SPD-M20A Diode Array Detector και χειρόμορφη κολώνα CHIRALPAK AD-H (Particle size: 5μm, Dimensions: 4.6mm x 250mmL).

Γενικές συνθετικές μέθοδοι:

-Ενζυμική αναγωγή

Σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH= 6.9) προστίθενται υπόστρωμα κετοεστέρα (25 mM, 5 mg), γλυκόζη (100 mM, 19 mg), κετορεδουκτάση (2 mg/ml), αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 1 mg/ml) και NADPH (2.5 mM, 2 mg). Η αντίδραση επωάζεται στους 37 ^{o}C και ο έλεγχος αυτής γίνεται, μετά από 24 ώρες, έπειτα από εκχυλίσεις με EtOAc, με φασματοσκοπία NMR.

-Εστεροποίηση με οξικό ανυδρίτη υδροξυ εστέρων προερχόμενων από αλδολική συμπύκνωση

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη που περιέχει ξηρό EtOAc, υπό ατμόσφαιρα αζώτου και στους 0 ^{o}C, προστίθεται ο υδροξυ εστέρας. Στην συνέχεια, προστίθενται 4 ισοδύναμα της βάσεως ανθρακικού καλίου (K_2CO_3), ο καταλύτης 4-διμεθυλαμινο πυριδίνη (DMAP) και στάγδην 2 ισοδύναμα του οξικού ανυδρίτη (Ac_2O).
Η ολοκλήρωση της αντίδρασης ελέγχεται με TLC και το προϊόν απομονώνεται με προσθήκη κορεσμένου Na_2CO_3, 3 εκχυλίσεις με EtOAc, ξήρανση της οργανικής φάσης με $MgSO_4$, διήθηση και συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος επιτυγχάνεται με χρωματογραφία στήλης και ελέγχεται με φασματοσκοπία NMR.

-Εστεροποίηση με οξικό ανυδρίτη υδροξυ εστέρων προερχόμενων από ενζυμική αναγωγή

Σε φιαλίδιο με μαγνητικό αναδευτήρα, το οποίο περιέχει τον υδροξυ εστέρα, που παρήχθη από τις ενζυμικές αναγωγές, προστίθεται ξηρό EtOAc (1.5 ml), στους 0 ^{o}C. Στην συνέχεια προστίθεται η βάση K_2CO_3 (4 eq), καταλυτική ποσότητα DMAP και το Ac_2O (2 eq). Η αντίδραση αφήνεται έως το πέρας της και για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο Na_2CO_3 και πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με EtOAc σε νέο φιαλίδιο. Το προϊόν ελέγχεται με φασματοσκοπία NMR.

Σύνθεση υποστρωμάτων:

Σύνθεση του υποστρώματος 61i μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (7 ml) προστίθεται ξηρή διισοπροπυλαμίνη (4.9 mmol, 686.6 μl) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο (4.3 mmol, 2.7 ml), στους -15 ^{o}C, για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 ^{o}C και προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (2.88 mmol, 300 mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή ακεταλδεΰδη (3.7 mmol, 210.2 μl) και η αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για δύο ώρες τουλάχιστον. Η λήξη της αντίδρασης διαπιστώνεται με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις του μίγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 4/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 41% (175 mg).

^{1}H-NMR (500MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *syn/anti ratio*= 2.6, *δ*= 4.06-4.11 (m, $1H_{syn}$), 3.96-4.01 (m, $1H_{anti}$), 3.78 (2s, $3H_{syn+anti}$), 3.78 (d, $1H_{syn}$), 3.61, (d, *J*=5.4Hz, $1H_{anti}$), 3.46 (2s, $3H_{syn+anti}$), 1.23 (d, *J*=6.5Hz, $3H_{anti}$), 1.20 (d, J=6.5Hz, $3H_{syn}$)

^{13}C-NMR (500MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 170.70, 84.02, 67.98, 58.64, 51.72, 17.83

Σύνθεση του υποστρώματος 61 μέσω οξείδωσης Jones

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, που περιέχει ακετόνη (2 ml) στους 0°C, διαλύεται ο υδροξυ εστέρας **61i** (0.67 mmol, 100 mg). Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην το αντιδραστήριο Jones (διάλυμα CrO_3 σε διάλυμα θειικού οξέος) (243 μl), διαλυμένο σε 1 ml ακετόνης, που βρίσκεται και αυτή σε θερμοκρασία 0°C. Το μίγμα αρχικά παίρνει ένα καστανοκόκκινο χρώμα και η αντίδραση αφήνεται έως ότου ολοκληρωθεί.
Για την απομόνωση του προϊόντος το διάλυμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8 έως ότου διαλυθούν τυχόν στερεά. Στην συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται 3 φορές με διαλύτη Et_2O και η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Το προϊόν απομονώθηκε με απόδοση 76% (75 mg) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 4.29 (s, 1H), 3.81, (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 2.27 (s, 3H)

^{13}C-NMR (500MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 201.66, 167.07, 86.62, 58.37, 52.54, 25.89

Σύνθεση του υποστρώματος 62i μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (7 ml) προστίθεται ξηρή διισοπροπυλαμίνη (8.16 mmol, 1.15 ml) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο (7.2 mmol, 4.5 ml), στους -15 ^{o}C, για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 ^{o}C και προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (4.8 mmol, 500 mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή προπανάλη (6.2 mmol, 450.5 μl) και η αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για δύο ώρες τουλάχιστον. Η λήξη της αντίδρασης διαπιστώνεται με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις του μίγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 15/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 30.8% (240 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): *diastereomeric ratio*= 1.3 , δ= 3.82 (2t, $1H_{diastereomers\ A+B}$), 3.82 (d, $1H_{diastereomer\ A\ or\ B}$), 3.78 (2s, $3H_{diastereomers\ A+B}$), 3.69 (d, J=4.4Hz, $1H_{diastereomer\ A\ or\ B}$), 3.45 (2s, $3H_{diastereomers\ A+B}$), 1.47-1.59 (m, $2H_{diastereomers\ A+B}$), 0.99 (2t, J=7.4Hz, $3H_{diastereomers\ A+B}$)

^{13}C-NMR (500MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ= $171.29_{(diastereomer\ B)}$, $170.80_{(diastereomer\ A)}$, $83.36_{(diastereomer\ A)}$, $82.78_{(diastereomer\ B)}$, $73.46_{(diastereomer\ B)}$, $73.31_{(diastereomer\ A)}$, $58.61_{(diastereomer\ B)}$, $58.53_{(diastereomer\ A)}$, $51.79_{(diastereomer\ B)}$, $51.69_{(diastereomer\ A)}$, $25.87_{(diastereomer\ B)}$, $25.01_{(diastereomer\ A)}$, $9.81_{(diastereomer\ A)}$, $9.69_{(diastereomer\ B)}$

Σύνθεση του υποστρώματος 62 μέσω οξείδωσης Jones

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, που περιέχει ακετόνη (1 ml) στους 0 ^{o}C, διαλύεται ο υδροξυ εστέρας **62i** (0.74 mmol, 120 mg). Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην το αντιδραστήριο Jones (διάλυμα CrO_3 σε διάλυμα θειικού οξέος) (266.37 μl), διαλυμένο σε 1 ml ακετόνης, που βρίσκεται και αυτή σε θερμοκρασία 0 ^{o}C. Το μίγμα αρχικά παίρνει ένα καστανοκόκκινο χρώμα και η αντίδραση αφήνεται έως ότου ολοκληρωθεί.
Για την απομόνωση του προϊόντος το διάλυμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8 έως ότου διαλυθούν τυχόν στερεά. Στην συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται 3 φορές με διαλύτη Et_2O και η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Το προϊόν απομονώθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 13/1) με απόδοση 52.3% (62 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ= 4.32 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 2.56-2.74 (m, 2H), 1.06 (t, J=7.2Hz, 3H)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 204.52, 167.60, 86.54, 58.69, 52.78, 32.05, 7.08

Σύνθεση του υποστρώματος 63i μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (7 ml) προστίθεται ξηρή διισοπροπυλαμίνη (4.9 mmol, 686.6 μl) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο (4.3 mmol, 2.7 ml), στους -15 ^{o}C, για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 ^{o}C και προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (2.9 mmol, 300 mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή βουτανάλη (3.7 mmol, 335.6 μl) και η αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για δύο ώρες τουλάχιστον. Η λήξη της αντίδρασης διαπιστώνεται με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις του μίγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 12/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 49.4% (251 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *syn/anti ratio*= 1.4, *δ*= 3.87-3.92 (m, $1H_{syn+anti}$), 3.80 (d, *J*=4.3Hz, $1H_{syn}$), 3.79 (2s, $3H_{syn+anti}$), 3.67 (d, *J*=4.4Hz, $1H_{anti}$), 3.45 (2s, $3H_{syn+anti}$), 1.33-1.58 (m, $4H_{syn+anti}$), 0.90-0.96 (2t, $3H_{syn+anti}$)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= $171.56_{(anti)}$, $171.05_{(syn)}$, $83.93_{(syn)}$, $83.46_{(anti)}$, $72.15_{(anti)}$, $71.93_{(syn)}$, $58.91_{(anti)}$, $58.86_{(syn)}$, $52.10_{(anti)}$, $52.01_{(syn)}$, $35.22_{(anti)}$, $34.29_{(syn)}$, $18.88_{(syn)}$, $18.79_{(anti)}$, $13.95_{(anti)}$, $13.92_{(syn)}$

Σύνθεση του υποστρώματος 63 μέσω οξείδωσης Jones

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, που περιέχει ακετόνη (4 ml) στους 0 ^{o}C, διαλύεται ο υδροξυ εστέρας **63i** (1.13 mmol, 200 mg). Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην το αντιδραστήριο Jones (διάλυμα CrO_3 σε διάλυμα θειικού οξέος) (408.6 μl), διαλυμένο σε 3 ml ακετόνης, που βρίσκεται και αυτή σε θερμοκρασία 0 ^{o}C. Το μίγμα αρχικά παίρνει ένα καστανοκόκκινο χρώμα και η αντίδραση αφήνεται έως ότου ολοκληρωθεί.
Για την απομόνωση του προϊόντος το διάλυμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8 έως ότου διαλυθούν τυχόν στερεά. Στην συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται 3 φορές με διαλύτη Et_2O και η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Το προϊόν απομονώθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 12/1) με απόδοση 56.7% (112 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ= 4.30 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 2.56-2.62 (m, 2H), 1.57-1.64 (q, *J*=7.3Hz, 2H), 0.89-0.94 (t, *J*=7.4Hz, 3H)

^{13}C-NMR (500MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ= 203.58, 167.28, 86.42, 58.38, 52.44, 40.19, 16.19, 13.24

<u>Σύνθεση του υποστρώματος 64i μέσω αλδολικής συμπύκνωσης</u>

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (7 ml) προστίθεται ξηρή διισοπροπυλαμίνη (8.2 mmol, 1.15 ml) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο (7.2 mmol, 4.5 ml), στους -15 ^{o}C, για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 ^{o}C και προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (4.8 mmol, 500 mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή ισοβουτυραλδεΰδη (6.24 mmol, 570 μl) και η αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για δύο ώρες τουλάχιστον. Η λήξη της αντίδρασης διαπιστώνεται με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις του μίγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 16/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 42% (355 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): *syn/anti ratio*= 2, δ= 3.84-3.86 (2d, $1H_{syn+anti}$, *J*= 5.2Hz), 3.79 (s, $3H_{syn}$), 3.78 (s, $3H_{anti}$), 3.59-3.63 (dd, $1H_{syn}$, *J*= 5.3), 3.48-3.52 (dd, $1H_{anti}$, *J*= 3.7Hz), 3.45 (s, $3H_{anti}$), 3.42 (s, $3H_{syn}$), 1.79-1.87 (m, $1H_{syn+anti}$), 0.94-1.02 (m, $6H_{syn+anti}$)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ= $171.80_{(anti)}$, $171.49_{(syn)}$, $82.16_{(syn)}$, $81.33_{(anti)}$, $77.69_{(anti)}$, $76.95_{(syn)}$, $58.76_{(anti)}$, $58.52_{(syn)}$, $52.05_{(anti)}$, $51.98_{(syn)}$, $30.83_{(anti)}$, $29.71_{(syn)}$, $19.33_{(anti)}$, $19.29_{(syn)}$, $18.07_{(anti)}$, $17.37_{(syn)}$

<u>Σύνθεση του υποστρώματος 64 μέσω οξείδωσης Jones</u>

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, που περιέχει ακετόνη (3 ml) στους 0 ^{o}C, διαλύεται ο υδροξυ εστέρας **64i** (1.12 mmol, 197 mg). Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην το αντιδραστήριο Jones (διάλυμα CrO_3 σε διάλυμα θειικού οξέος) (402.5 μl), διαλυμένο σε 3 ml ακετόνης, που βρίσκεται και αυτή σε θερμοκρασία 0 ^{o}C. Το μίγμα αρχικά παίρνει ένα καστανοκόκκινο χρώμα και η αντίδραση αφήνεται έως ότου ολοκληρωθεί.
Για την απομόνωση του προϊόντος το διάλυμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8 έως ότου διαλυθούν τυχόν στερεά. Στην συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται 3 φορές με διαλύτη Et_2O και η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.

Το προϊόν απομονώθηκε με απόδοση 64.7% (126 mg) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 4.42 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.04-3.14 (m, 1H), 1.12 (d, *J*=3Hz, 3H), 1.09 (d, *J*=3.1Hz, 3H)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 207.39, 167.76, 85.49, 58.78, 52.69, 37.02, 18.11, 17.91

<u>Σύνθεση του υποστρώματος 65i μέσω αλδολικής συμπύκνωσης</u>

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (15 ml) προστίθεται ξηρή διισοπροπυλαμίνη (8.2 mmol, 1.15 ml) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο (7.2 mmol, 4.5 ml), στους -15 ^{o}C, για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 ^{o}C και προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (4.8 mmol, 500 mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή βενζαλδεΰδη (6.24 mmol, 637 μl) και η αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για δύο ώρες τουλάχιστον. Η λήξη της αντίδρασης διαπιστώνεται με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις του μίγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 10/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 71% (717 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *syn/anti ratio*= 1.75, *δ*= 7.29-7.36 (m, $5H_{syn+anti}$), 4.99 (d, $1H_{syn}$, *J*=5.7Hz), 4.92 (d, $1H_{anti}$, *J*=5.5Hz), 4.00 (d, $1H_{syn}$, *J*=5.7Hz), 3.9 (d, $1H_{anti}$, *J*=5.5Hz), 3.68 (s, $3H_{syn}$), 3.65 (s, $3H_{anti}$), 3.42 (s, $3H_{anti}$), 3.38 (s, $3H_{syn}$)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= $170.83_{(syn)}$, $170.76_{(anti)}$, $139.36_{(syn)}$, $139.02_{(anti)}$, $128.37_{(anti)}$, $128.29_{(syn)}$, $128.23_{(anti)}$, $128.16_{(syn)}$, $126.55_{(syn)}$, $126.47_{(anti)}$, $85.23_{(anti)}$, $84.48_{(syn)}$, $74.71_{(anti)}$, $74.07_{(syn)}$, $58.94_{(syn+anti)}$, $52.02_{(anti)}$, $51.94_{(syn)}$

<u>Σύνθεση του υποστρώματος 65 μέσω οξείδωσης Jones</u>

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, που περιέχει ακετόνη (7 ml) στους 0 ^{o}C, διαλύεται ο υδροξυ εστέρας **65i** (2.38 mmol, 500 mg). Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην το αντιδραστήριο Jones (διάλυμα CrO_3 σε διάλυμα θειικού οξέος) (856 μl), διαλυμένο σε 3 ml ακετόνης, που βρίσκεται και αυτή σε θερμοκρασία 0 ^{o}C. Το μίγμα αρχικά παίρνει ένα καστανοκόκκινο χρώμα και η αντίδραση αφήνεται έως ότου ολοκληρωθεί.
Για την απομόνωση του προϊόντος το διάλυμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8 έως ότου διαλυθούν τυχόν στερεά. Στην συνέχεια, το διάλυμα

εκχυλίζεται 3 φορές με διαλύτη Et_2O και η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Το προϊόν απομονώθηκε με απόδοση 78.4% (388 mg) χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 8.05-8.08 (dd, 2H, *J*=8.4), 7.58-7.63 (m, 1H), 7.45-7.50 (m, 2H), 4.95 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.53 (s, 3H)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 192.4, 167.98, 134.09, 129.43, 128.71, 85.05, 58.72, 52.82

<u>Σύνθεση του υποστρώματος 68 μέσω μετεστεροποίησης</u>

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται η 3-πεντανόλη (7 ml), που δρα σαν διαλύτης της αντίδρασης. Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (5.76 mmol, 600 mg) και ο καταλύτης διβουτυλοξείδιο του κασσιτέρου (Bu_2SnO) (0.58 mmol, 143.5 mg). Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού για 24 ώρες, μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που παρατηρείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Το προϊόν απομονώθηκε με απόδοση 57.7% (533 mg), μετά από χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 30/1).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 4.83-4.92 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.45 (s, 3H), 1.56-1.62 (m, 4H), 0.88 (t, *J*=7.4Hz, 6H)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 170.18, 77.45, 69.86, 59.28, 26.40, 9.58

<u>Σύνθεση του υποστρώματος 66i μέσω αλδολικής συμπύκνωσης</u>

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (7 ml) προστίθεται ξηρή διισοπροπυλαμίνη (5.3 mmol, 743.6 μl) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο (4.7 mmol, 2.9 ml), στους -15 ^oC, για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 ^oC και προστίθεται στάγδην ο εστέρας **68** (3.12 mmol, 500 mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή ακεταλδεΰδη (4.06 mmol, 227.7 μl) και η αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για δύο ώρες τουλάχιστον. Η λήξη της αντίδρασης διαπιστώνεται με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις του μίγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση.

Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 20/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 81.3% (518 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *syn/anti ratio*= 1.6, *δ*= 4.84-4.92 (m, $1H_{syn+anti}$), 4.03-4.13 (m, $1H_{syn}$), 3.95-4.03 (m, $1H_{anti}$), 3.76 (d, *J*=4.3Hz $1H_{syn}$), 3.57 (d, *J*=5.6Hz $1H_{anti}$), 3.46 (2s, $3H_{syn+anti}$), 1.57-1.64 (m, $4H_{syn+anti}$), 1.22 (2d, $3H_{syn+anti}$), 0.91 (2t, $6H_{syn+anti}$)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= $170.73_{(anti)}$, $170.40_{(syn)}$, $85.31_{(anti)}$, $84.42_{(syn)}$, $78.01_{(anti)}$, $77.95_{(syn)}$, $68.37_{(anti)}$, $68.32_{(anti)}$, $58.79_{(syn)}$, $58.65_{(anti)}$, $26.39_{(anti)}$, $26.34_{(syn)}$, $18.69_{(anti)}$, $18.09_{(syn)}$, $9.63_{(anti)}$, $9.61_{(syn)}$

<u>Σύνθεση του υποστρώματος 66 μέσω οξείδωσης Jones</u>

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, που περιέχει ακετόνη (3 ml) στους 0 ^{o}C, διαλύεται ο υδροξυ εστέρας **66i** (0.98 mmol, 200 mg). Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην το αντιδραστήριο Jones (διάλυμα CrO_3 σε διάλυμα θειικού οξέος) (352.5μl), διαλυμένο σε 3 ml ακετόνης, που βρίσκεται και αυτή σε θερμοκρασία 0 ^{o}C. Το μίγμα αρχικά παίρνει ένα καστανοκόκκινο χρώμα και η αντίδραση αφήνεται έως ότου ολοκληρωθεί.
Για την απομόνωση του προϊόντος το διάλυμα αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8 έως ότου διαλυθούν τυχόν στερεά. Στην συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται 3 φορές με διαλύτη Et_2O και η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Το προϊόν απομονώθηκε μετά από χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 20/1) με απόδοση 56.6% (112 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *ratio keto form/enol form*= 5.5, *δ*= 4.84-4.93 (m, $1H_{keto+enol}$), 4.72 (s, $1H_{keto}$), 3.55 (s, $3H_{enol}$), 3.48 (s, $3H_{keto}$), 2.27 (s, $3H_{keto}$), 2.05 (s, $3H_{enol}$), 1.57-1.66 (m, $4H_{keto+enol}$), 0.90 (2t, $6H_{keto+enol}$)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, *δ* ppm): *δ*= 202.08, 166.78, 87.25, 79.03, 58.40, 26.38, 26.09, 9.57, 9.51

<u>Προσπάθειες σύνθεσης των υποστρωμάτων που φαίνονται στο σχήμα 16</u>

<u>Μετεστεροποίηση του υποστρώματος **67** με χρήση καταλύτη Bu_2SnO και *τριτ*-βουτανόλης</u>

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται η *τριτ*- βουτανόλη (7 ml), που δρα σαν διαλύτης της αντίδρασης. Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (6.72 mmol, 700 mg) και ο καταλύτης διβουτυλοξείδιο του κασσιτέρου (Bu_2SnO) (0.67 mmol, 167.4 mg). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για

24 ώρες και για 4 ημέρες, και η πορεία της αντίδρασης παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Και στις δύο περιπτώσεις η μετατροπή της αρχικής ουσίας προς το επιθυμητό προϊόν ήταν μηδαμινή.

Μετεστεροποίηση του υποστρώματος **67** με χρήση καταλύτη Bu_2SnO και αιθανόλης

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται η αιθανόλη(7 ml), που δρα σαν διαλύτης της αντίδρασης. Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **67** (5.76 mmol, 600 mg) και ο καταλύτης διβουτυλοξείδιο του κασσιτέρου (Bu_2SnO) (0.57 mmol, 143.5 mg). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 24 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το παραπροϊόν διπλής προσβολής της αιθυλομάδας ήταν σε περίσσεια και το μικρού μοριακού βάρους προϊόν ιδιαίτερα πολικό προκαλώντας δυσκολίες κατά την απομόνωση.

Μετεστεροποίηση του υποστρώματος **67** με χρήση καταλύτη I_2

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται ο 2-μεθοξυ αιθανικός μεθυλεστέρας **21** (951.5 mmol, 1 g) καθώς και η τριτ- βουτανόλη (11.53 mmol, 1.1 ml). Στην συνέχεια προστίθεται το ιώδιο (0.29 mmol, 73.5 mg) και ο διαλύτης τολουόλιο (10 ml). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 24 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Για την απομόνωση του προϊόντος, το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και πραγματοποιούνται τρείς εκχυλίσεις με κορεσμένο διάλυμα $Na_2S_2O_3$, με H_2O και με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Δεν παρατηρήθηκε το επιθυμητό προϊόν.

Μετεστεροποίηση του υποστρώματος **65** με χρήση καταλύτη Bu_2SnO

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται η αιθανόλη(10 ml), που δρα σαν διαλύτης της αντίδρασης. Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην ο εστέρας **65** (1.54 mmol, 320 mg) και ο καταλύτης διβουτυλοξείδιο του κασσιτέρου (Bu_2SnO) (0.15 mmol, 38.3 mg). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 24 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$

και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Και σε αυτήν την περίπτωση το παραπροϊόν βρέθηκε σε μεγάλη περίσσεια.

Μετεστεροποίηση του υποστρώματος **61** με χρήση καταλύτη p-TsOH

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται η *τριτ*- βουτανόλη (5 ml), που δρα σαν διαλύτης της αντίδρασης. Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην ο εστέρας **61** (0.62 mmol, 90 mg) και ο καταλύτης παρατολουολσουλφονικού οξέος (p-TsOH) (0.06 mmol, 10.6 mg). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 24 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Επανακτήθηκε ο αρχικός εστέρας.

Μετεστεροποίηση του υποστρώματος **64** με χρήση καταλύτη p-TsOH

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται η 3-πεντανόλη (6 ml), που δρα σαν διαλύτης της αντίδρασης. Στην συνέχεια, προστίθεται στάγδην ο εστέρας **64** (0.77 mmol, 135 mg) και ο καταλύτης παρατολουολσουλφονικού οξέος (p-TsOH) (0.08 mmol, 13.3 mg). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 24 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρατηρήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και ακολουθούν 3 εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Επανακτήθηκε ο αρχικός εστέρας.

Υδρόλυση και εστεροποίηση του εστέρα **67** σε μία φιάλη

Σε δίλαιμη φιάλη που περιέχει μείγμα MeOH/H_2O (1:1) (15 ml) προστίθεται στάγδην ο εστέρας **67** (4.8 mmol, 500 mg) και το NaOH (4.8 mmol, 192.1 mg). Η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται και ξηραίνεται και, στην συνέχεια, προστίθεται ξηρό DMF (10 ml). Έπειτα, προστίθεται το 3-βρωμοπεντάνιο (5.33 mmol, 805.12 mg) και η αντίδραση θερμαίνεται στους 50 ^oC και αφήνεται για 24 ώρες.

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται H_2O και ακολουθούν εκχυλίσεις με Et_2O. Στην συνέχεια, η οργανική φάση εκλούεται με H_2O και κορεσμένο διάλυμα NaCl και ξηραίνεται με $MgSO_4$. Τέλος, διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν σχηματίστηκε αλλά η περίσσεια ποσότητας χάθηκε κατά την απομόνωσή του.

Υδρόλυση και εστεροποίηση του εστέρα **67** σε διαφορετικές φιάλες

Σε μονόλαιμη φιάλη που περιέχει μείγμα MeOH/H_2O (1:1) (10 ml) προστίθεται στάγδην ο εστέρας **67** (4.8 mmol, 500 mg) και το NaOH (4.8 mmol, 192.1 mg). Η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Για την απομόνωση του προϊόντος το διάλυμα συμπυκνώνεται και στην συνέχεια, προστίθετια H_2O και εκχυλίζεται με Et_2O. Η υδατική φάση οξινίζεται έως pH= 3 με πυκνό HCl (12M) και ακολουθούν εκχυλίσεις με Et_2O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν απομονώθηκε με απόδοση 25% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, που περιέχει ξηρό CH_2Cl_2, προστίθεται στους 0 ^oC το οξύ (1.22 mmol, 110 mg) που παρήχθη από την παραπάνω υδρόλυση. Στην συνέχεια, προστίθεται ο καταλύτης DMAP (cat), το DCC (1.34 mmol, 277.15 mg) και στάγδην η 3-πεντανόλη (3.66 mmol, 322.9 mg) και η αντίδραση αφήνεται για μία ώρα στους 0 ^oC και στην συνέχεια αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος.

Για την απομόνωση του προϊόντος, το διάλυμα διηθείται, συμπυκνώνεται υπό πίεση και προστίθεται CH_2Cl_2. Ακολουθούν εκχυλίσεις με 0.5N HCl και κορεσμένο διάλυμα $NaHCO_3$, και στην συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$, διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό με απόδοση 43%. Η συνολική απόδοση των δύο αντιδράσεων ήταν 10.7%.

Σύνθεση του υποστρώματος 78 μέσω βρωμίωσης

Σε 15 ml διαλύτη ακετόνης προστίθεται ο ακετοξικός *τριτ*-βουτυλεστέρας **77** (3.79 mmol, 600 mg) και στην συνέχεια προστίθεται και το στερεό N-βρωμοσουκινιμίδιο (4.17 mmol, 742.6 mg). Η αντίδραση αφήνεται για 24 ώρες σε ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου.
Για την απομόνωση του προϊόντος, αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό που εμφανίζεταιο διαλύεται με απιονισμένο νερό και στην συνέχεια εκχυλίζεται με με διαλύτη EtOAc. Ακολούθως, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.
Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr:EtOAc, v/v, 50/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 55.2% (496 mg).

^{1}H-NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ= 4.67 (s, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.49 (s, 9H)

^{13}C-NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): δ= 196.65, 163.98, 84.47, 50.69, 27.70, 26.27

Προσπάθειες σύνθεσης του υποστρώματος 70

Πυρηνόφιλη υποκατάσταση με NaOMe του βρωμιδίου **78** με χρήση διαλύτη DMSO

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη που περιέχει ξηρό DMSO (7 ml), προστίθεται το ξηρό NaOMe (1.47 mmol, 79.3 mg) και, στην συνέχεια, το βρωμίδιο **78** (1.26 mmol, 300 mg). Η αντίδραση αφήνεται σε θερομκρασία δωματίου για 24 ώρες και η πορεία της ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος.

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται H_2O και ακολουθούν εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Δεν παρατηρήθηκε το επιθυμητό προϊόν.

Πυρηνόφιλη υποκατάσταση με NaOMe του βρωμιδίου **78** με χρήση διαλύτη MeOH

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη που περιέχει ξηρή MeOH (5 ml), προστίθεται το ξηρό NaOMe (1.26 mmol, 68.35 mg) και, στην συνέχεια, το βρωμίδιο **78** (0.84 mmol, 200mg). Η αντίδραση αφήνεται σε θερομκρασία δωματίου για 24 ώρες και η πορεία της ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος.

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται H_2O και ακολουθούν εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν σχηματίστηκε, αλλά ο πλήρης καθαρισμός του προϊόντος κατέστη αδύνατος, λόγω ύπαρξης παραπροϊόντος όπου, κατά την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με ανάπτυξη διαλυτών Hex:EtOAc σε αναλογία 8:1, παρατηρήθηκε, για τις δύο ουσίες, ένα μόνο spot.

Πυρηνόφιλη υποκατάσταση του βρωμιδίου **78** με χρήση διαλύτη MeOH

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη που περιέχει ξηρή MeOH (4 ml), προστίθεται το βρωμίδιο **78** (0.84 mmol, 200mg). Η αντίδραση αφέθηκε σε θερομκρασία δωματίου για 3 ημέρες και η πορεία της ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος.

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται H_2O και ακολουθούν εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Επανακτήθηκε το αρχικό βρωμίδιο **78**.

Πυρηνόφιλη υποκατάσταση με NaOMe σε MeOH για την σύνθεση του υποστρώματος **69**

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη που περιέχει ξηρή MeOH (7 ml), προστίθεται το ξηρό NaOMe (3.84 mmol, 207.7 mg) και, στην συνέχεια, το βρωμίδιο **79** (2.56 mmol, 500mg). Η αντίδραση αφήνεται σε θερομκρασία δωματίου για 24 ώρες και η πορεία της ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος.

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται H_2O και ακολουθούν εκχυλίσεις με EtOAc. Στην συνέχεια, η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης

απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Η μετατροπή του αρχικού βρωμιδίου προς το επιθυμητό προϊόν ήταν μηδαμινή.

Πυρηνόφιλη υποκατάσταση με NaOMe σε DMSO για την σύνθεση του υποστρώματος **69**

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη που περιέχει ξηρό DMSO (8 ml), προστίθεται το ξηρό NaOMe (3.84 mmol, 207.7 mg) και, στην συνέχεια, το βρωμίδιο **79** (2.56 mmol, 500mg). Η αντίδραση θερμάνθηκε μέχρι βρασμού, όπου αφέθηκε για 24 ώρες. Η πορεία της ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος.

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται H_2O και ακολουθούν εκχυλίσεις με $CHCl_3$. Στην συνέχεια, η οργανική φάση εκχυλίζεται με H_2O, ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Δεν παρατηρήθηκε το επθυμητό προϊόν.

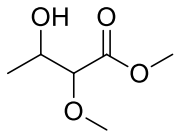
Πυρηνόφιλη υποκατάσταση με NaOMe σε THF για την σύνθεση του υποστρώματος **69**

Σε ξηρή δίλαιμη φιάλη που περιέχει ξηρό THF (7 ml), προστίθεται στους 0 ^oC το βρωμίδιο **79** (2.56 mmol, 500mg). Στην συνέχεια, προστίθεται το ξηρό NaOMe (3.84 mmol, 207.7 mg) και η αντίδραση αφήνεται στους 0 ^oC για 2 ώρες, και έπειτα να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

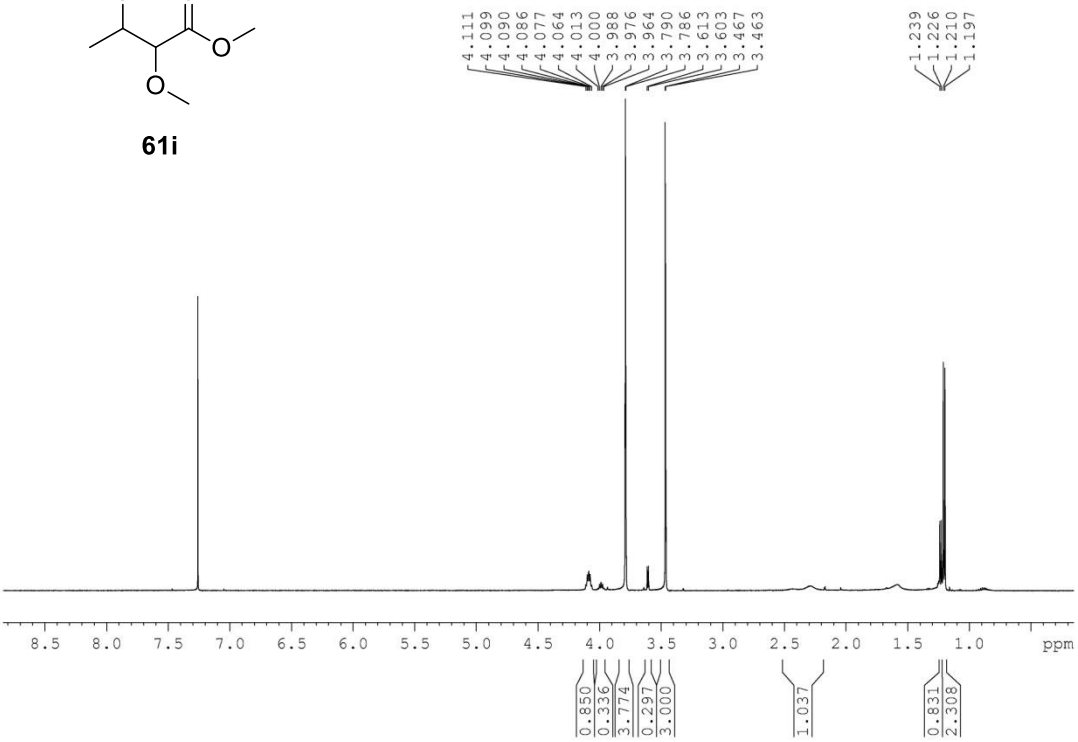
Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl. Ακολουθούν εκχυλίσεις με EtOAc και η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και διηθείται, ενώ ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Επανακτήθηκε το αρχικό βρωμίδιο.

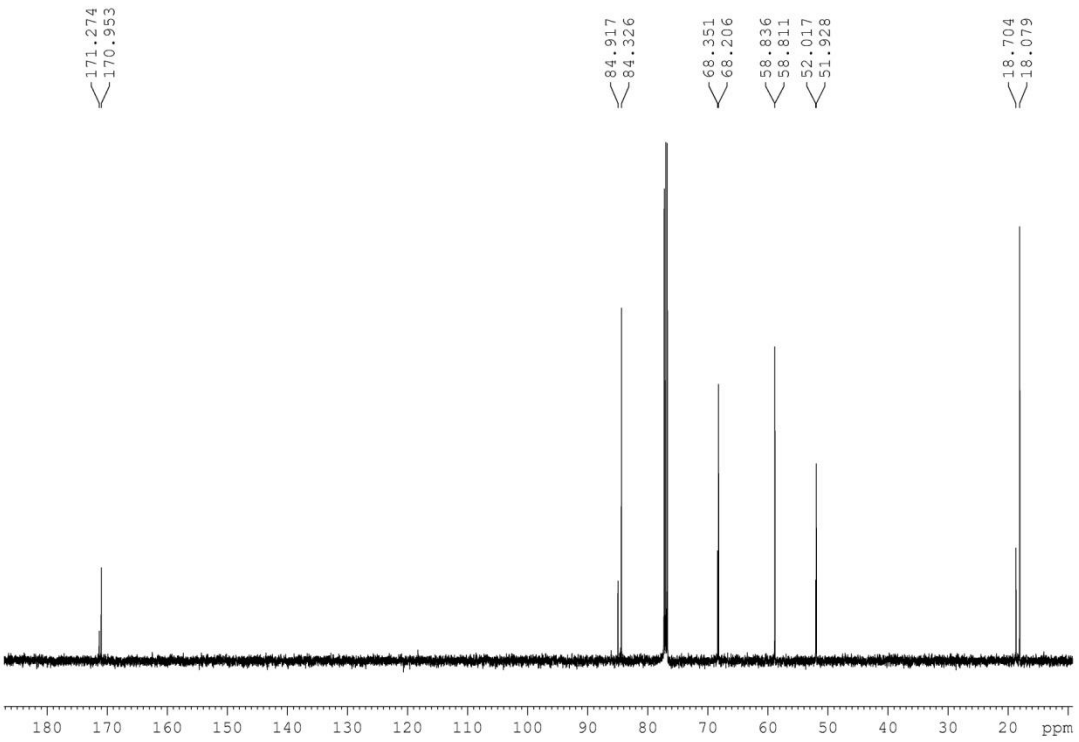
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

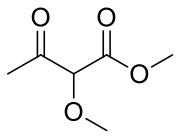
Φάσματα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR



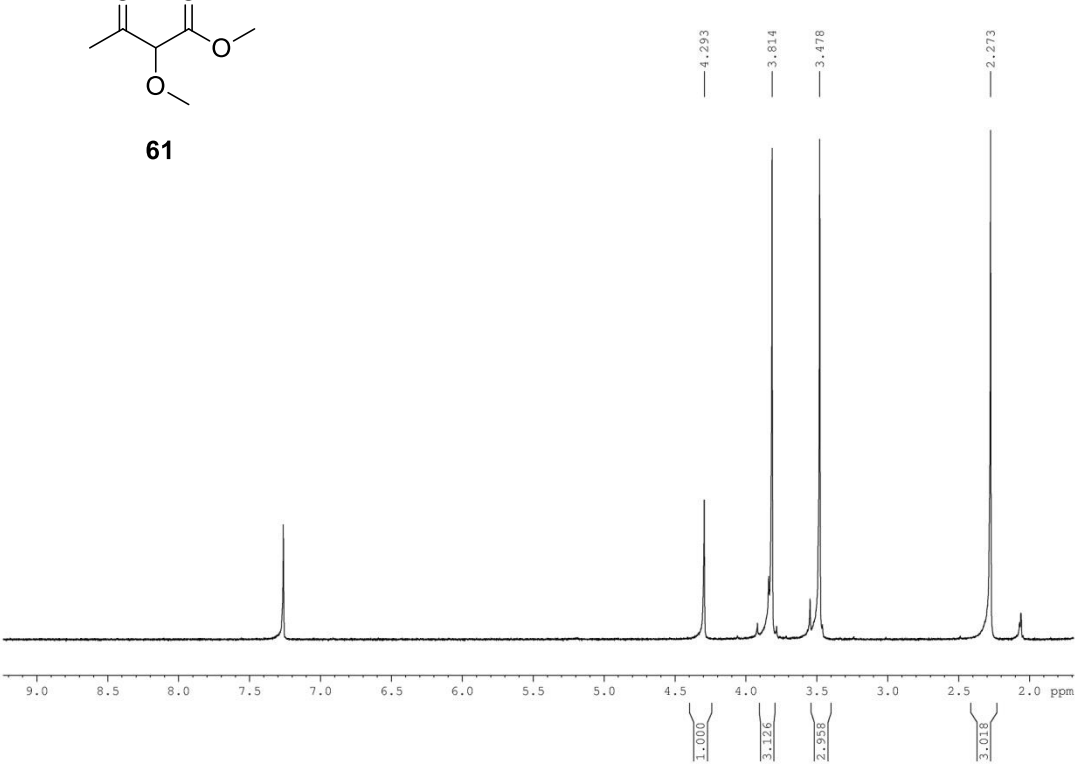
61i

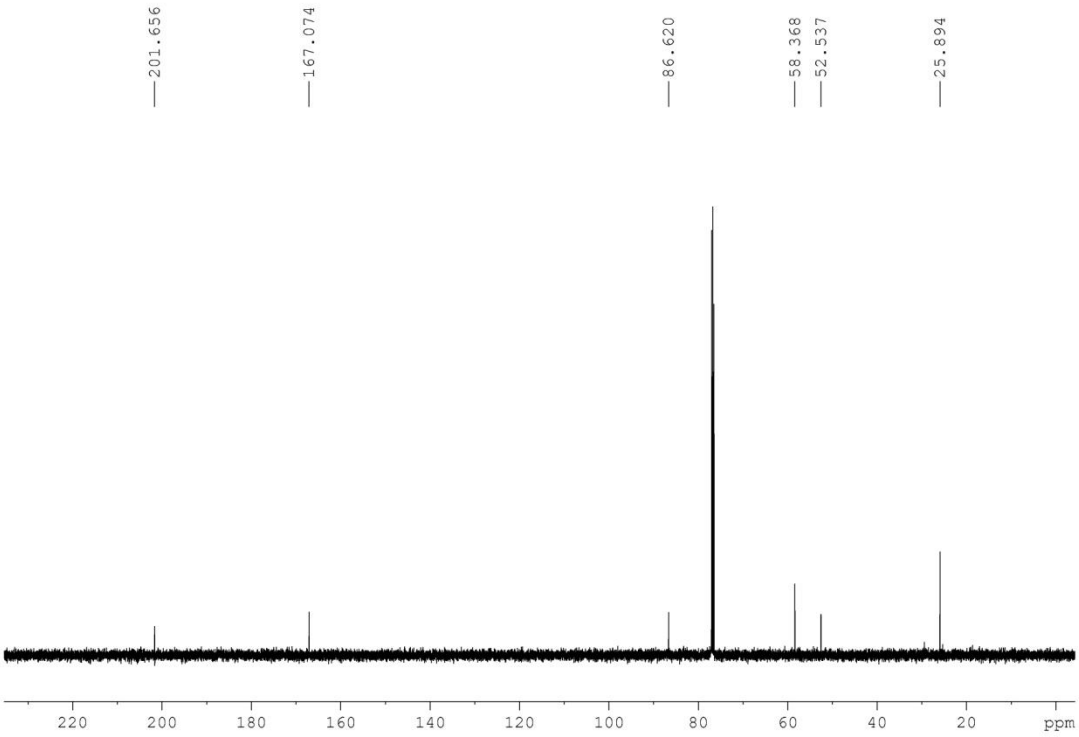




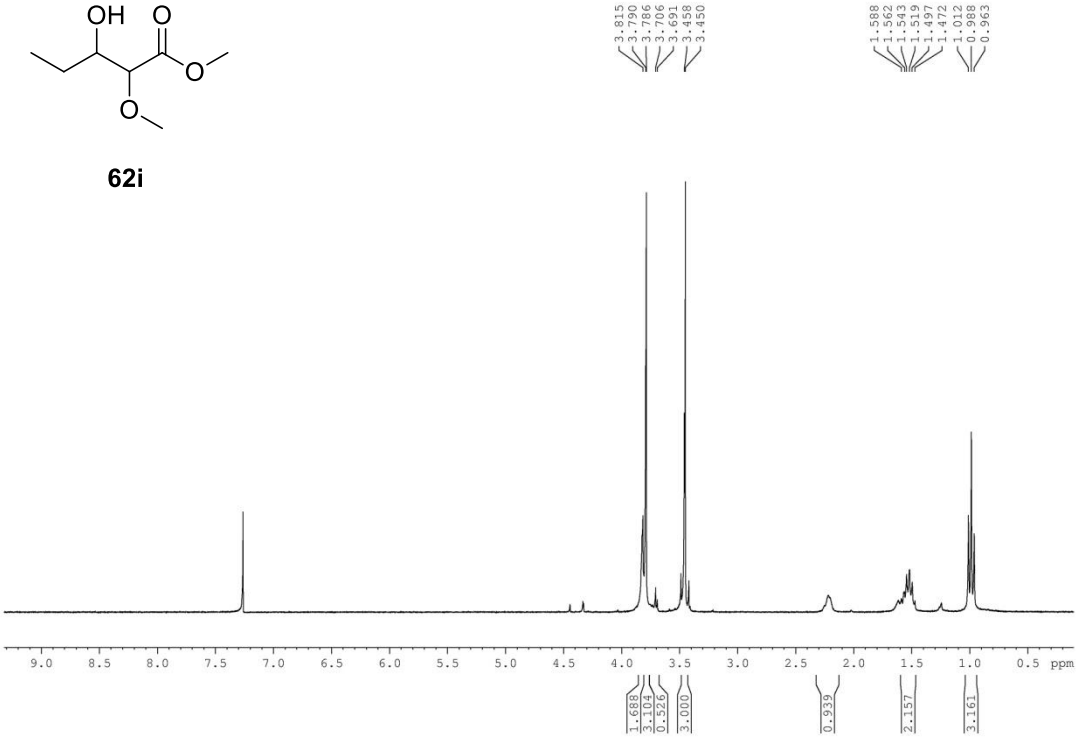


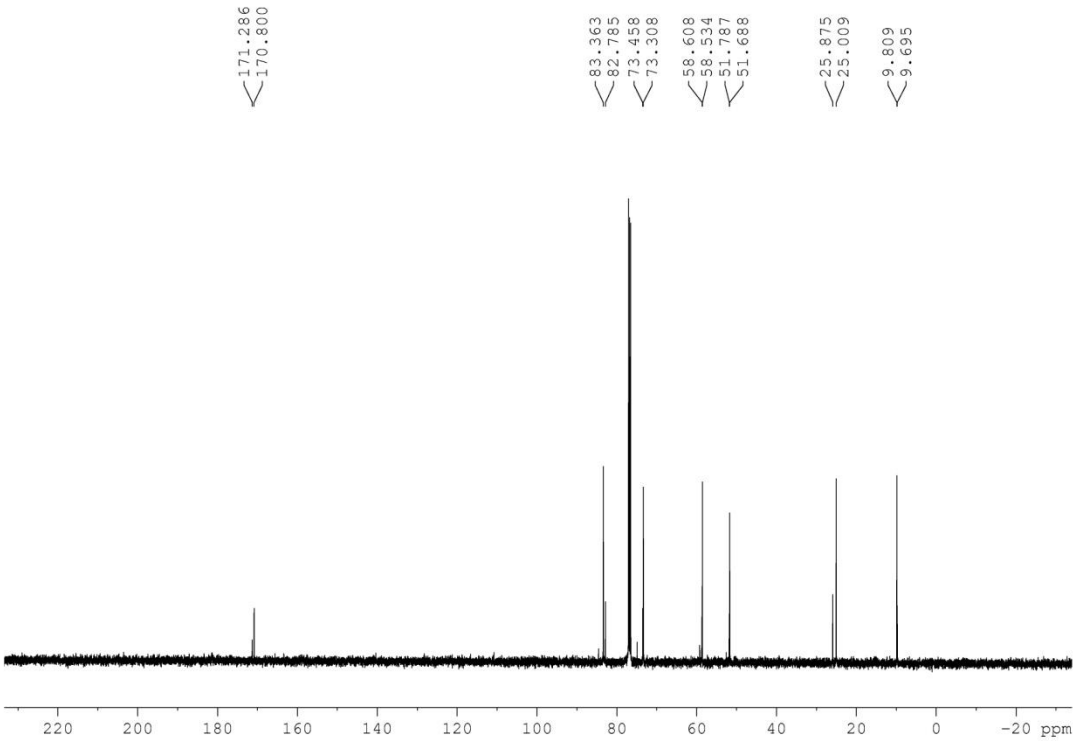
61


4.293
3.814
3.478
2.273
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0 ppm
1.000
3.126
2.958
3.018

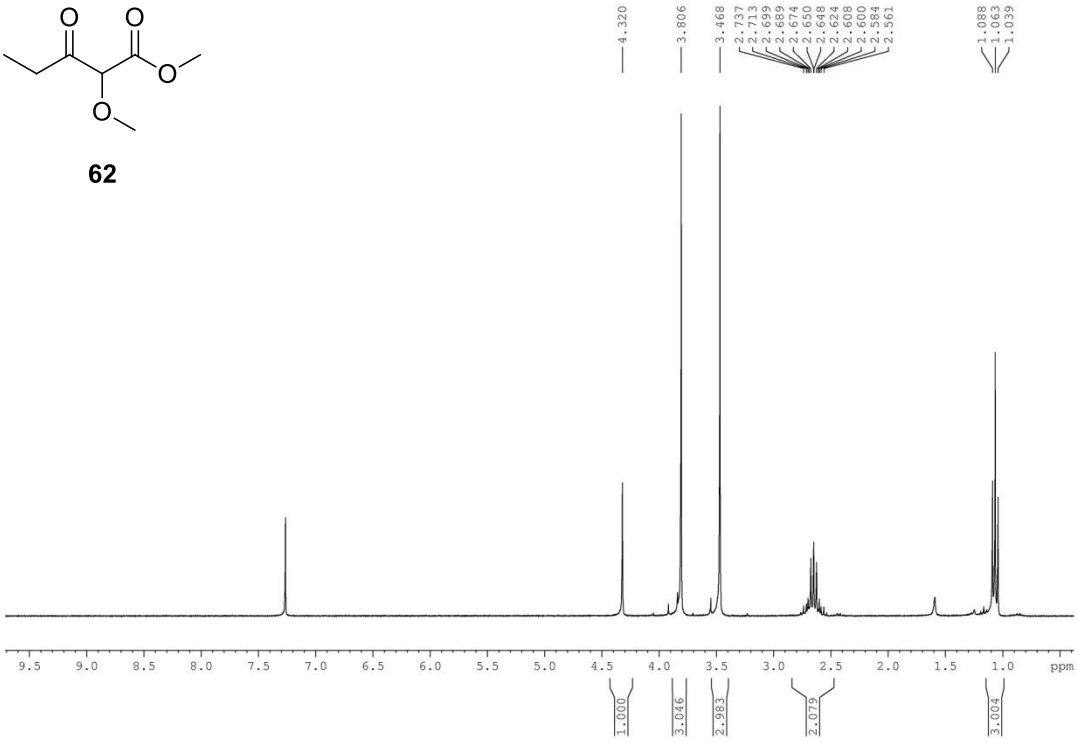

201.656
167.074
86.620
58.368
52.537
25.894
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm

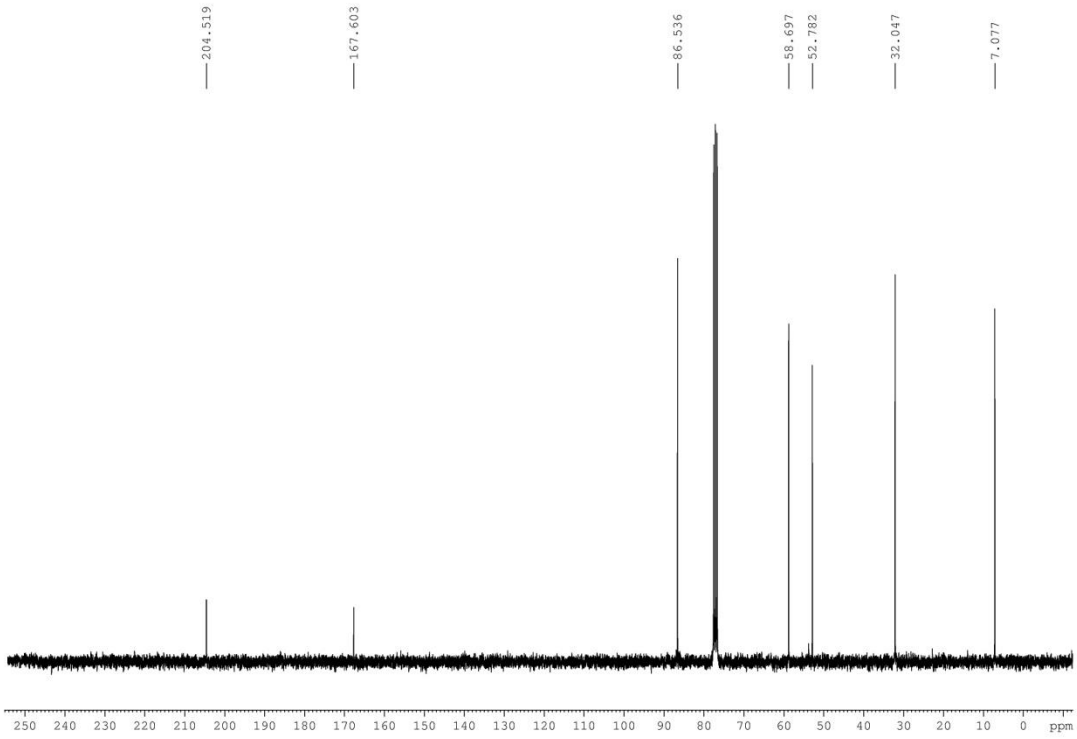
62i


3.815
3.790
3.786
3.706
3.691
3.458
3.450
1.588
1.562
1.543
1.519
1.497
1.472
1.012
0.988
0.963
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
1.688
3.104
0.526
3.000
0.939
2.157
3.161

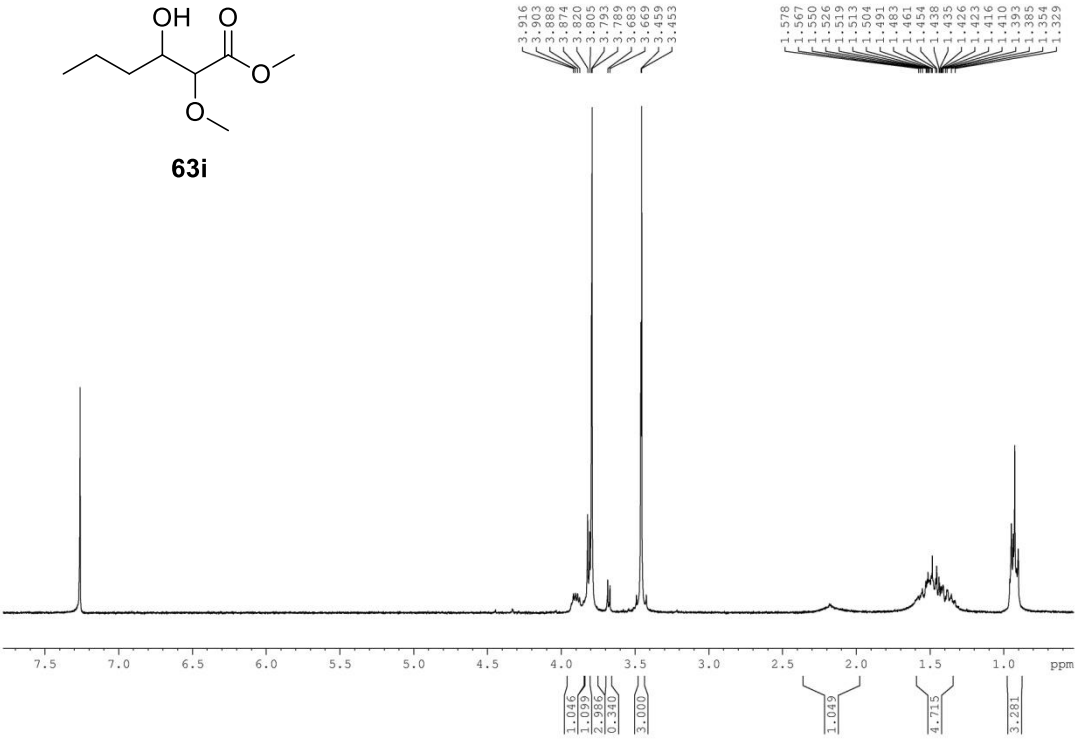

171.286
170.800
83.363
82.785
73.458
73.308
58.608
58.534
51.787
51.688
25.875
25.009
9.809
9.695
220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 -20 ppm

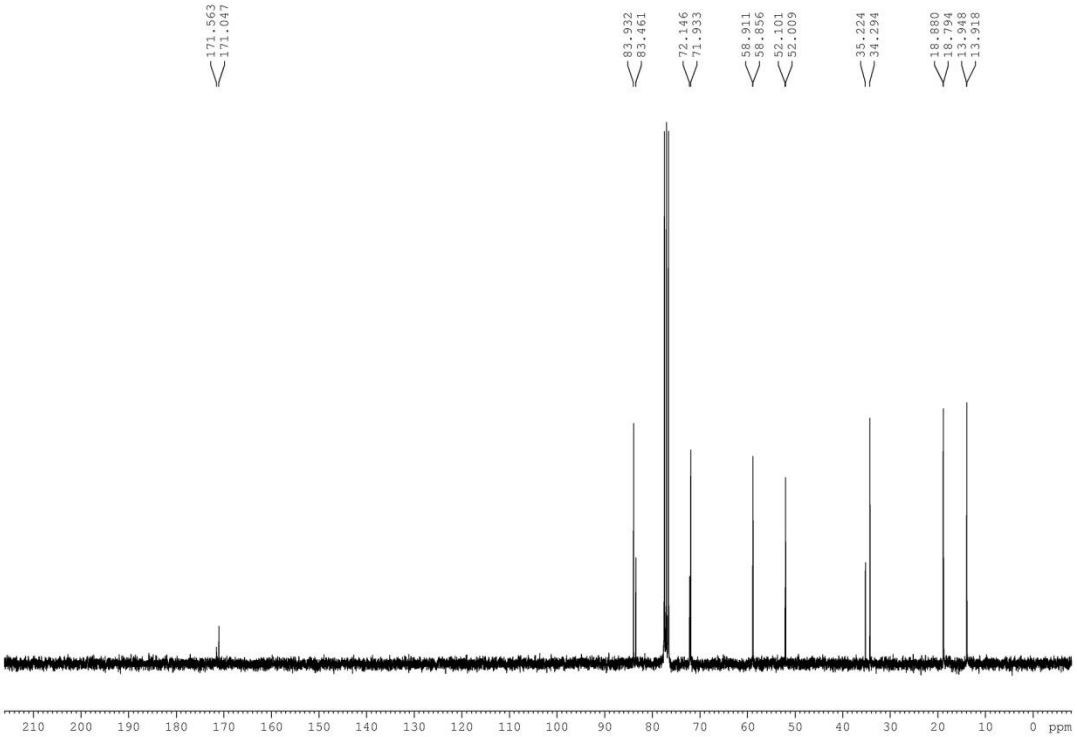
62


4.320
3.806
3.468
2.737
2.713
2.699
2.689
2.674
2.650
2.648
2.624
2.608
2.600
2.584
2.561
1.088
1.063
1.039
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
1.000
3.046
2.983
2.079
3.004

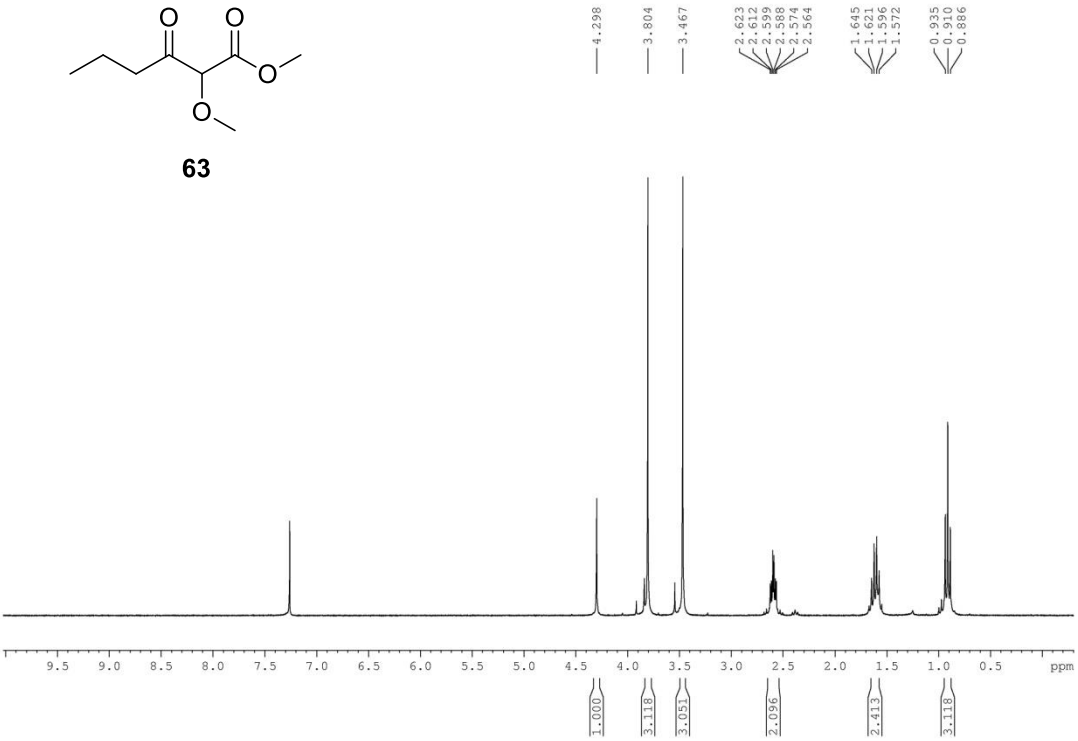

204.519
167.603
86.536
58.697
52.782
32.047
7.077
250 240 230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

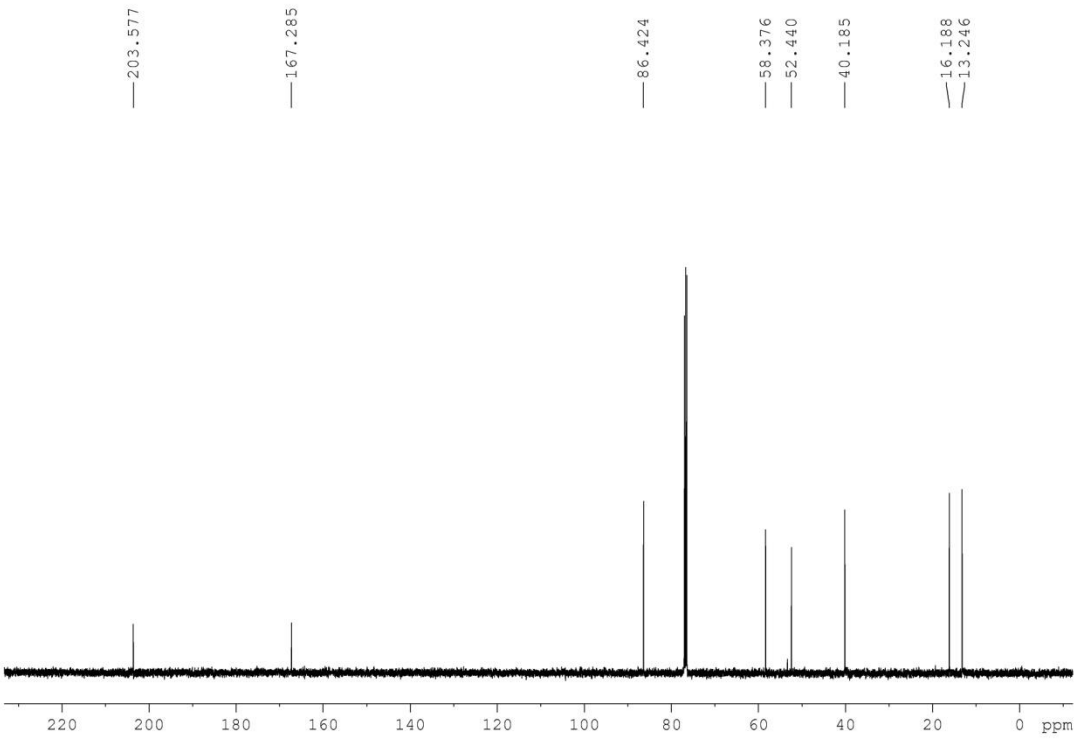
63i


3.916
3.903
3.888
3.874
3.820
3.805
3.793
3.789
3.683
3.669
3.459
3.453
1.578
1.567
1.550
1.526
1.519
1.513
1.504
1.491
1.483
1.461
1.454
1.438
1.435
1.426
1.423
1.416
1.410
1.393
1.385
1.354
1.329
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
1.046
1.099
2.986
0.340
3.000
1.049
4.715
3.281

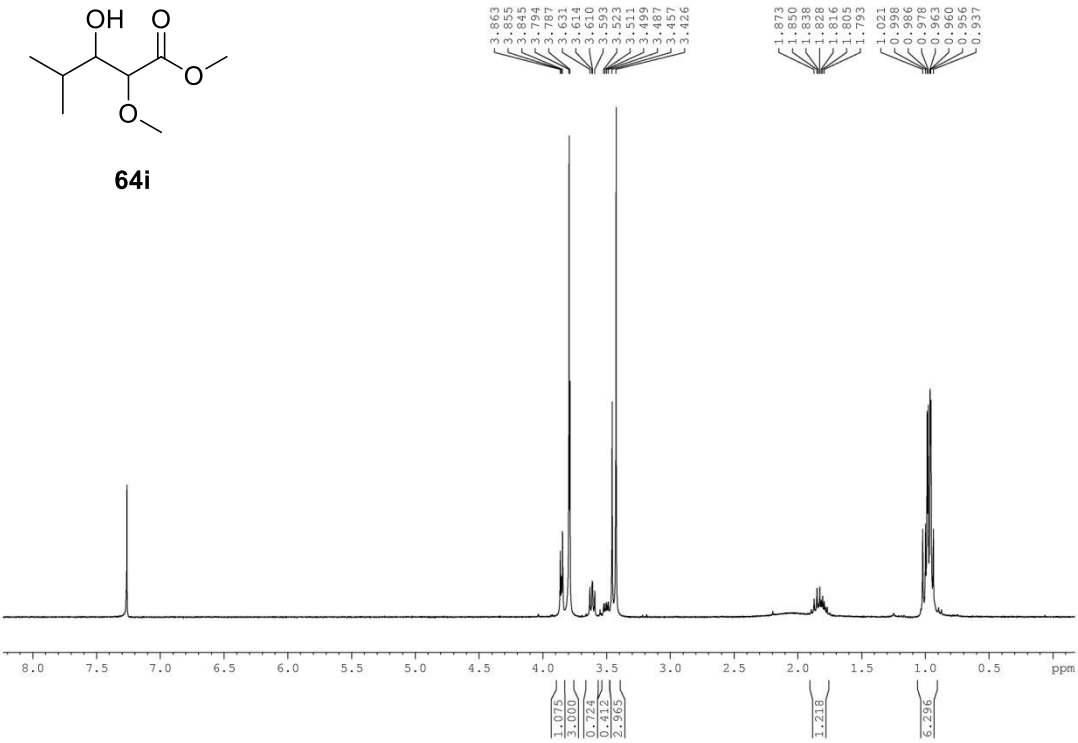

171.563
171.047
83.932
83.461
72.146
71.933
58.911
58.856
52.101
52.009
35.224
34.294
18.880
18.794
13.948
13.918
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

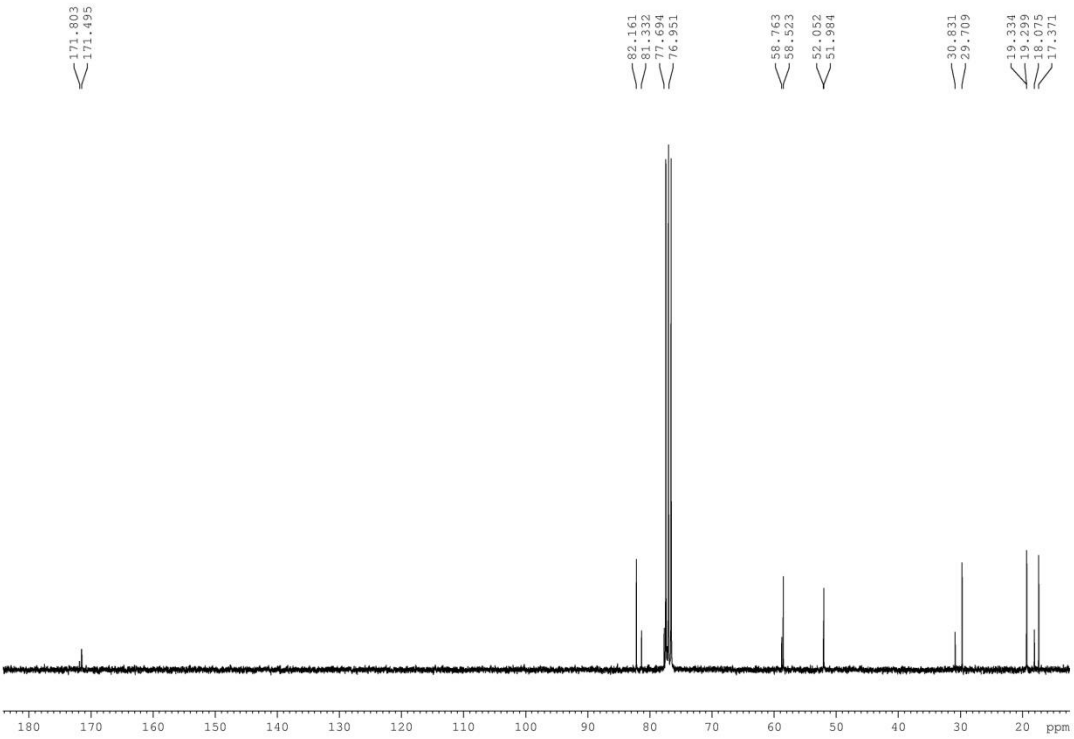
63


4.298
3.804
3.467
2.623
2.612
2.599
2.588
2.574
2.564
1.645
1.621
1.596
1.572
0.935
0.910
0.886
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
1.000
3.118
3.051
2.096
2.413
3.118

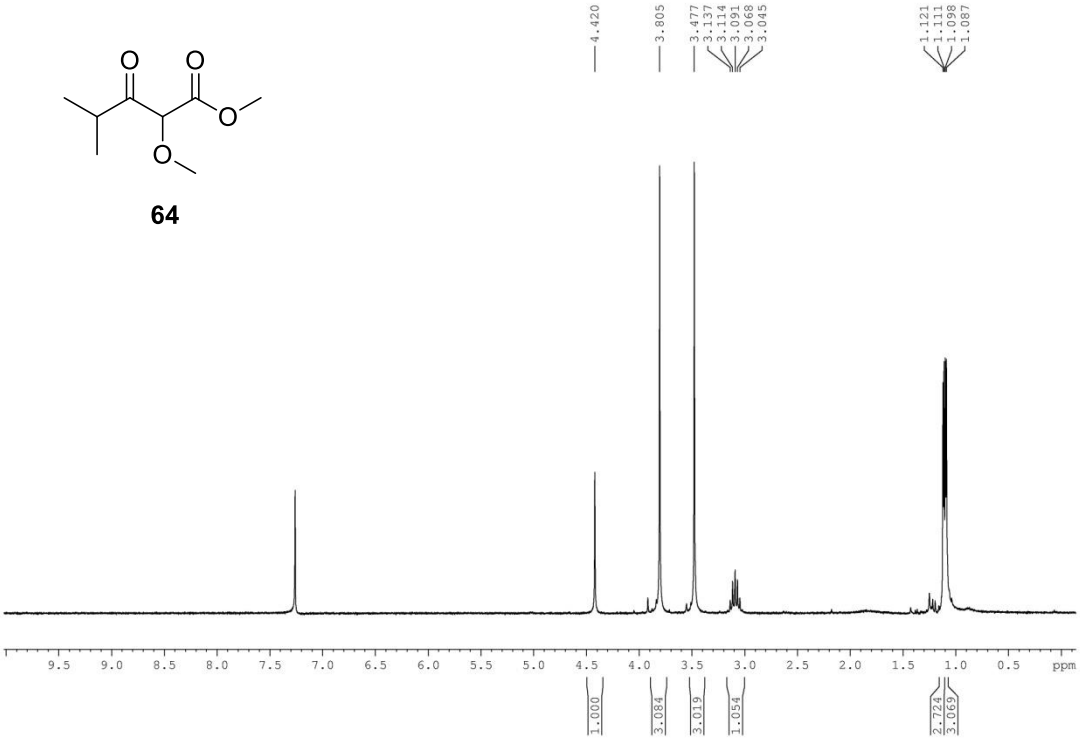

203.577
167.285
86.424
58.376
52.440
40.185
16.188
13.246
220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm

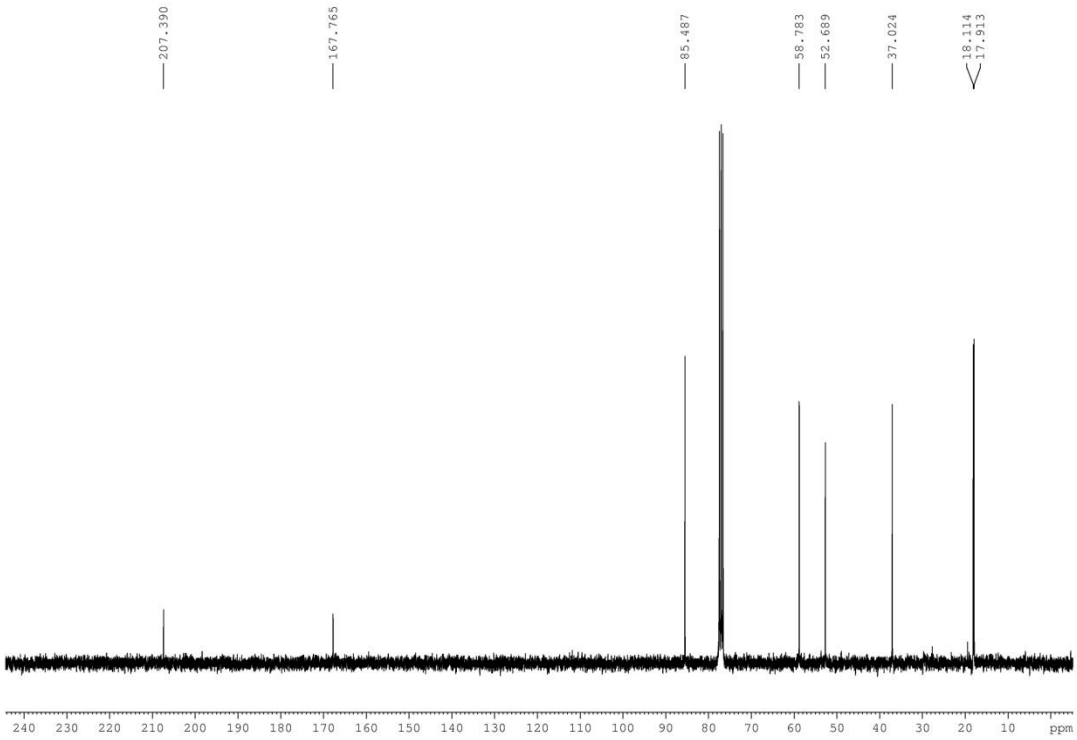
64i


3.863
3.855
3.845
3.794
3.787
3.631
3.614
3.610
3.593
3.523
3.511
3.499
3.487
3.457
3.426
1.873
1.850
1.838
1.828
1.816
1.805
1.793
1.021
0.998
0.986
0.978
0.963
0.960
0.956
0.937
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
1.075
3.000
0.724
0.412
2.965
1.218
6.296

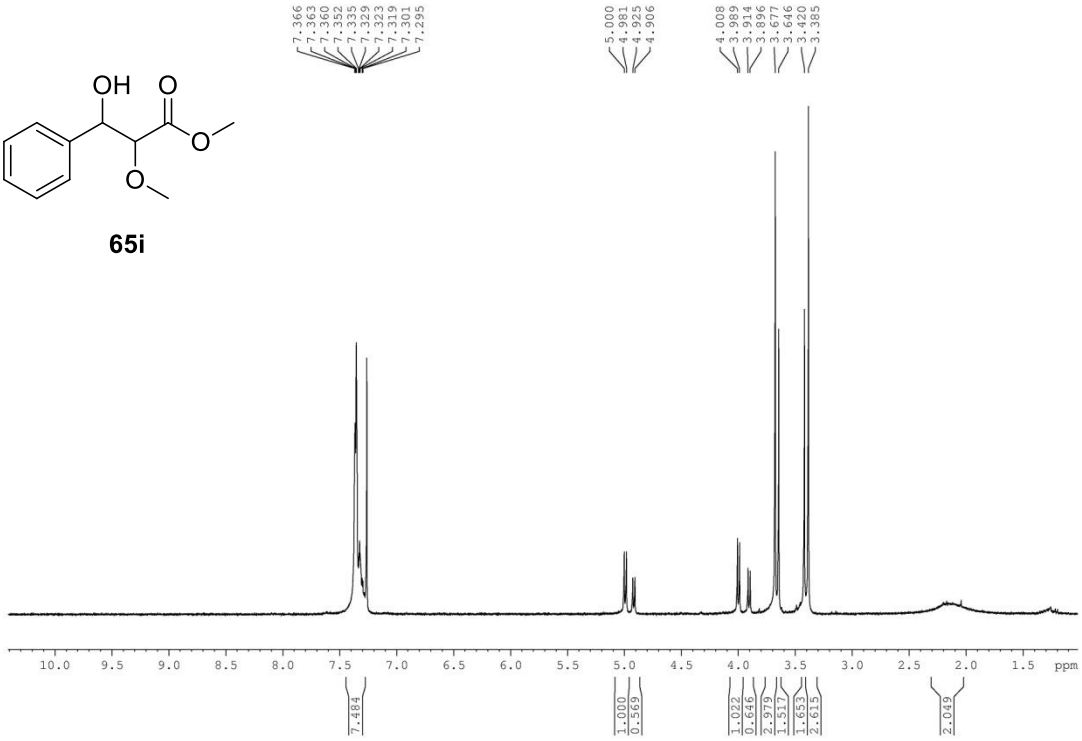

171.803
171.495
82.161
81.332
77.694
76.951
58.763
58.523
52.052
51.984
30.831
29.709
19.334
19.299
18.075
17.371
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

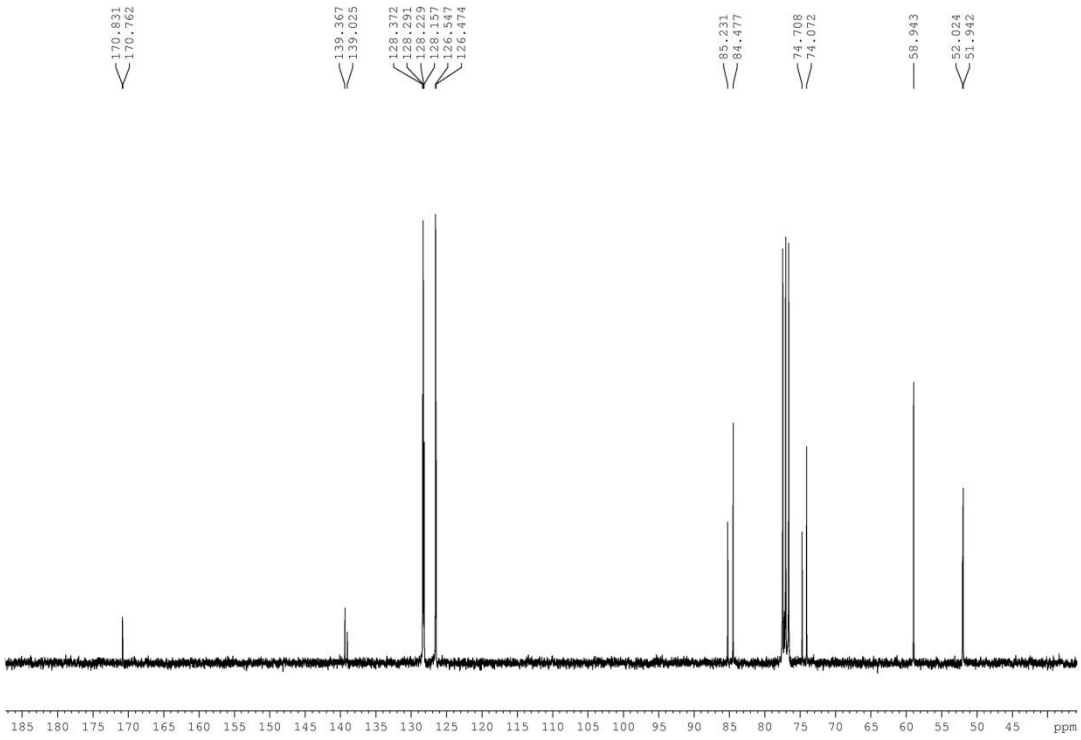
64

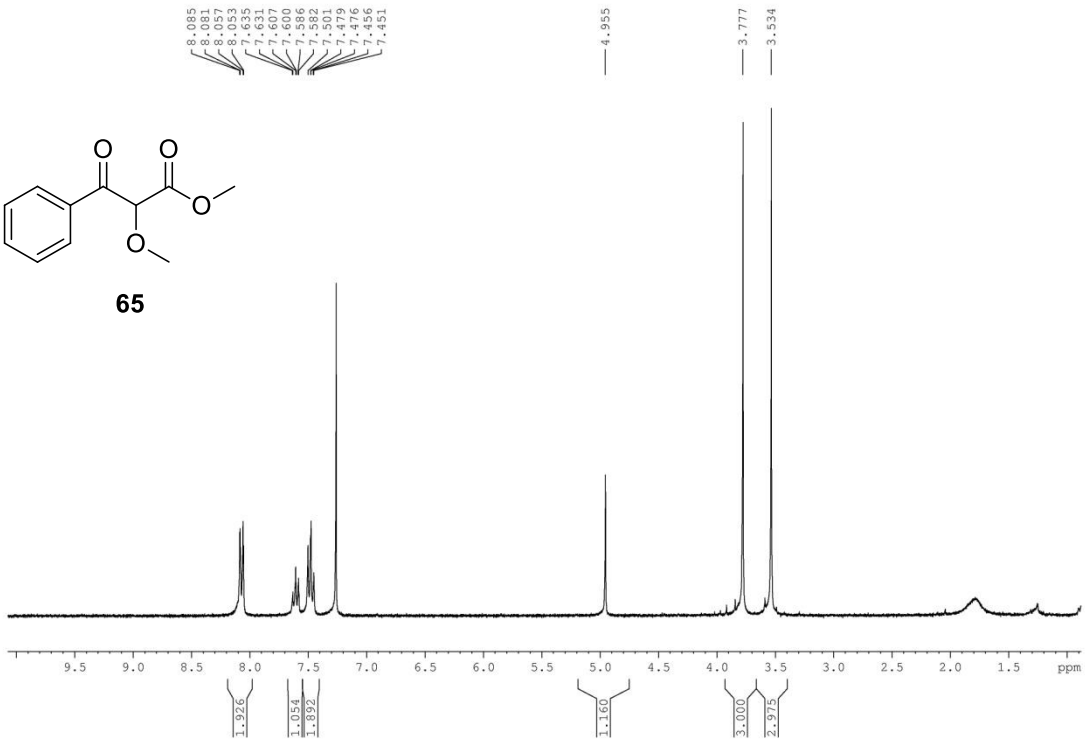

4.420
3.805
3.477
3.137
3.114
3.091
3.068
3.045
1.121
1.111
1.098
1.087
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
1.000
3.084
3.019
1.054
2.724
3.069

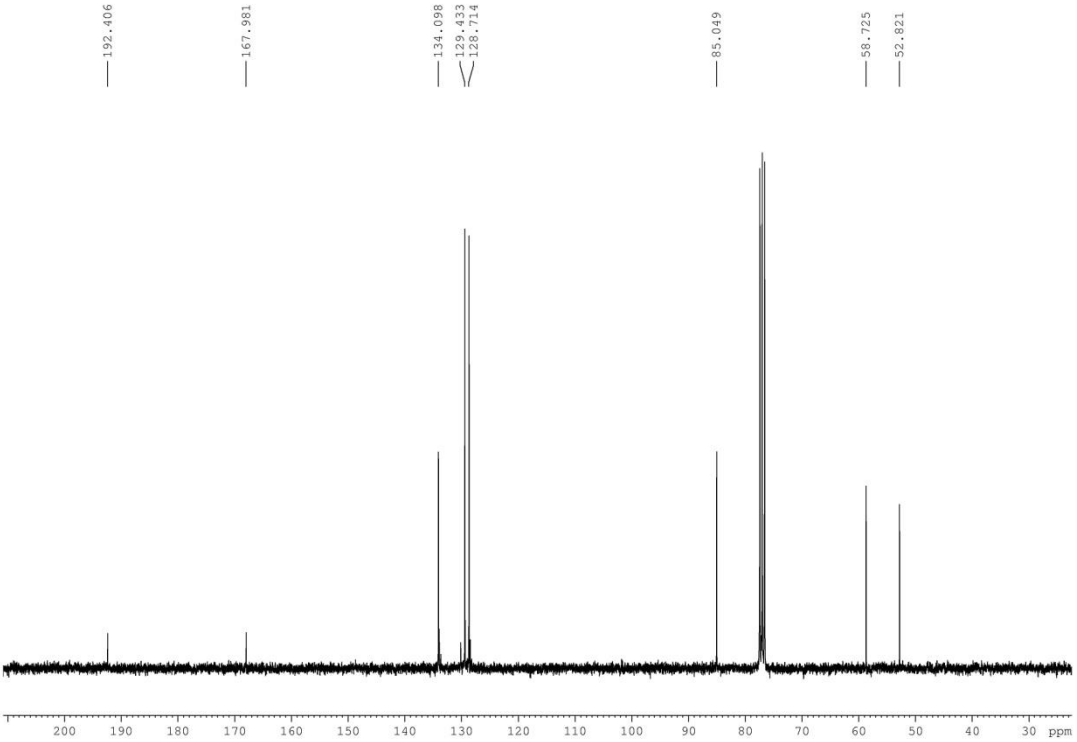

207.390
167.765
85.487
58.783
52.689
37.024
18.114
17.913
240 230 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

65i

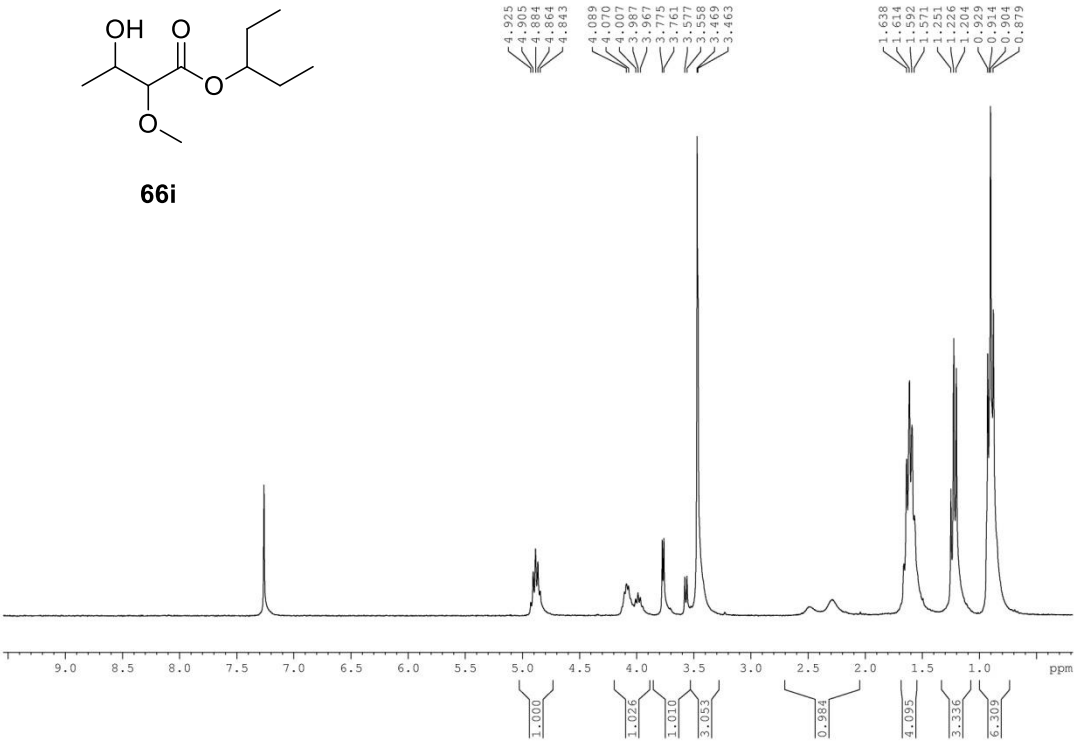

7.366
7.363
7.360
7.352
7.335
7.329
7.323
7.319
7.301
7.295
5.000
4.981
4.925
4.906
4.008
3.989
3.914
3.896
3.677
3.646
3.420
3.385
10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 ppm
7.484
1.000
0.569
1.022
0.646
2.979
1.517
1.653
2.615
2.049

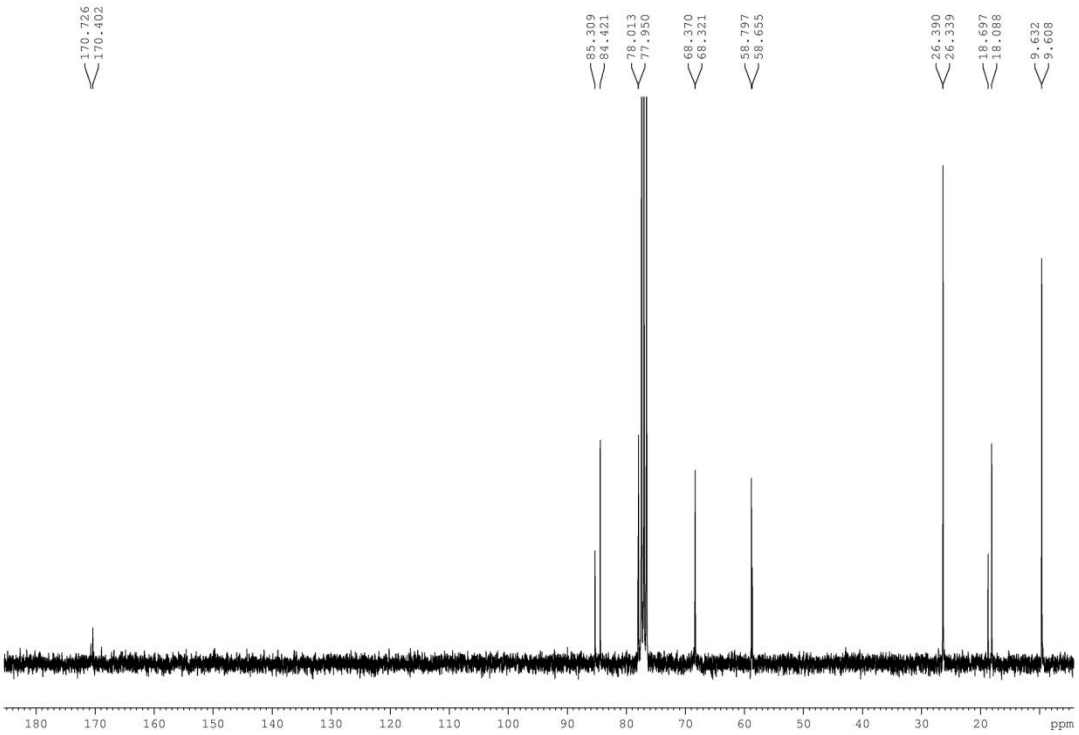

170.831
170.762
139.367
139.025
128.372
128.291
128.229
128.157
126.547
126.474
85.231
84.477
74.708
74.072
58.943
52.024
51.942
185 180 175 170 165 160 155 150 145 140 135 130 125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 ppm


8.085
8.081
8.057
8.053
7.635
7.631
7.607
7.600
7.586
7.582
7.571
7.479
7.476
7.456
7.451
4.955
3.777
3.534
O
O
O
O
65
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 ppm
1.926
1.054
1.892
1.160
3.000
2.975


192.406
167.981
134.098
129.433
128.714
85.049
58.725
52.821
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 ppm

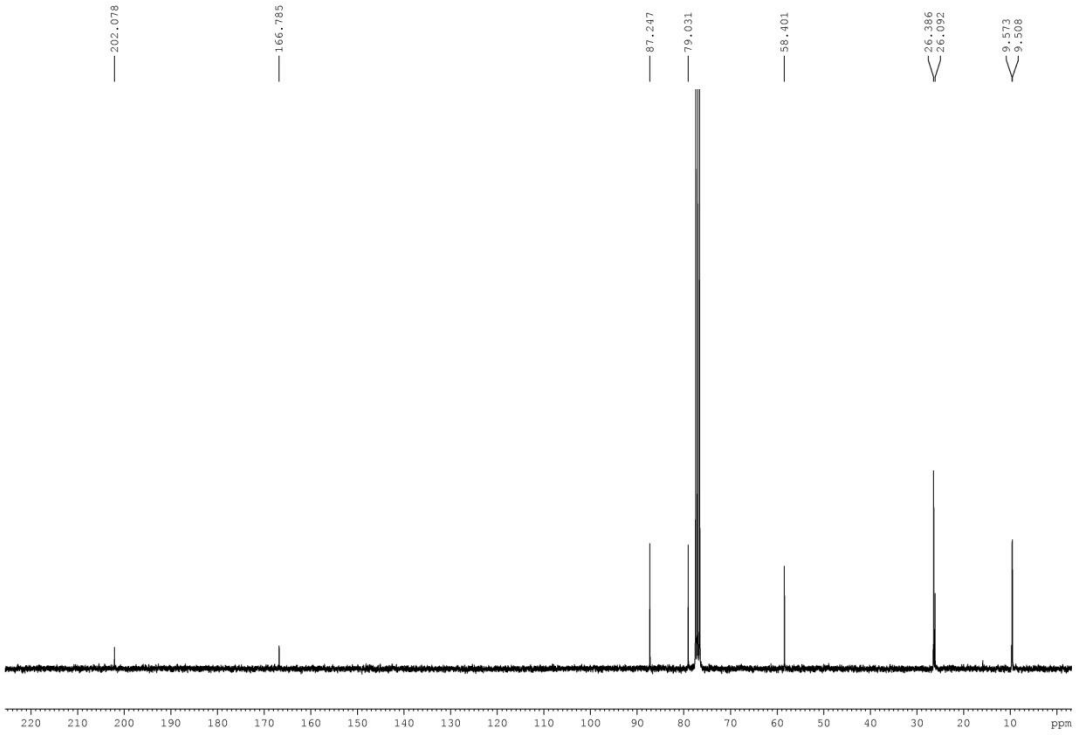
66i


4.925
4.905
4.884
4.864
4.843
4.089
4.070
4.007
3.987
3.967
3.775
3.761
3.577
3.558
3.469
3.463
1.638
1.614
1.592
1.571
1.251
1.226
1.204
0.929
0.914
0.904
0.879
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 ppm
1.000
1.026
1.010
3.053
0.984
4.095
3.336
6.309

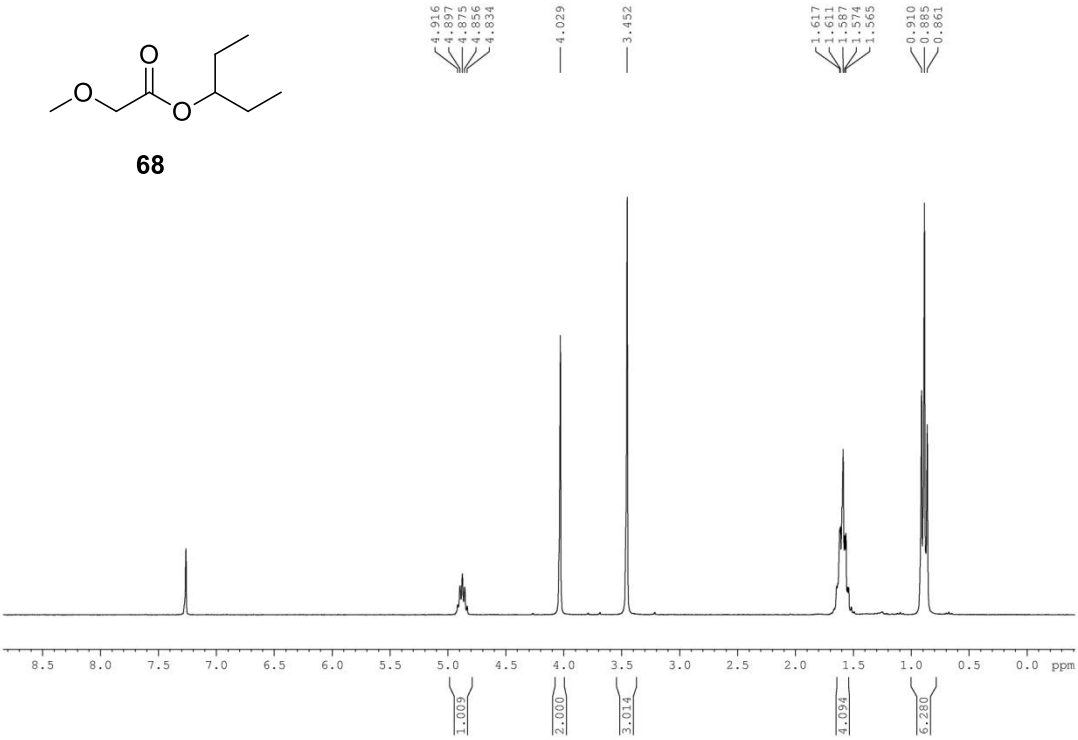

170.726
170.402
85.309
84.421
78.013
77.950
68.370
68.321
58.797
58.655
26.390
26.339
18.697
18.088
9.632
9.608
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

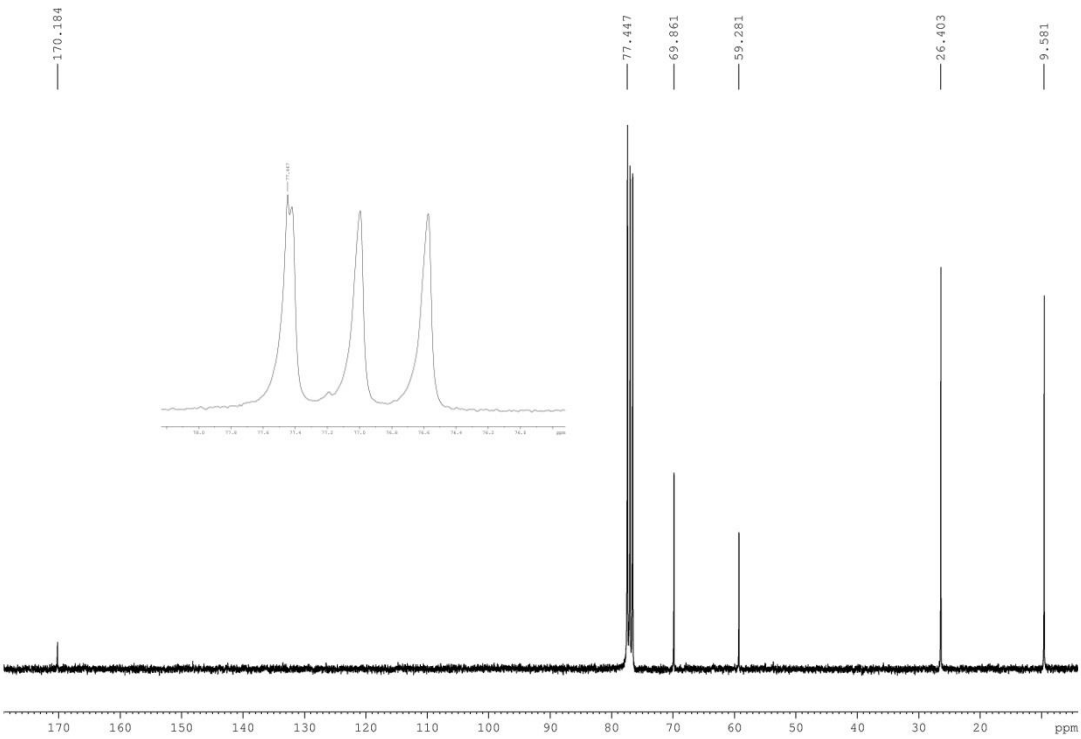
66

4.926
4.905
4.884
4.864
4.842
4.269
3.555
3.476
2.267
2.053
1.657
1.634
1.609
1.584
1.567
0.951
0.926
0.907
0.882
0.858
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm
1.275
1.000
0.495
3.063
3.143
0.431
5.805
7.788

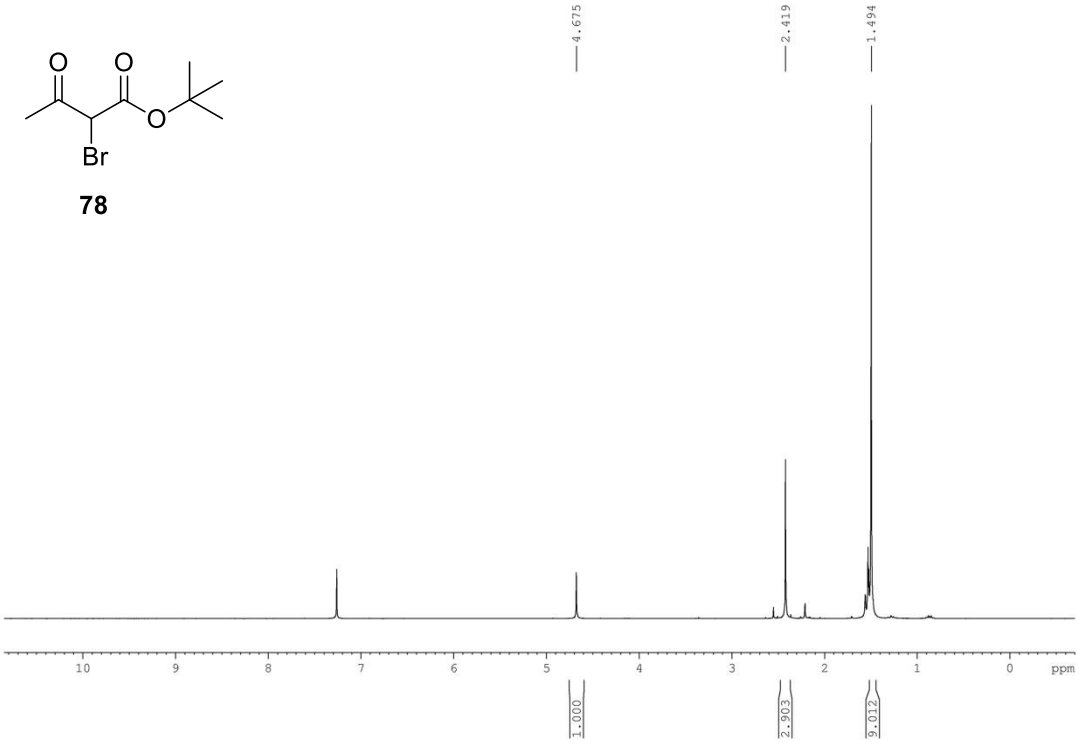

202.078
166.785
87.247
79.031
58.401
26.386
26.092
9.573
9.508
220
210
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
ppm

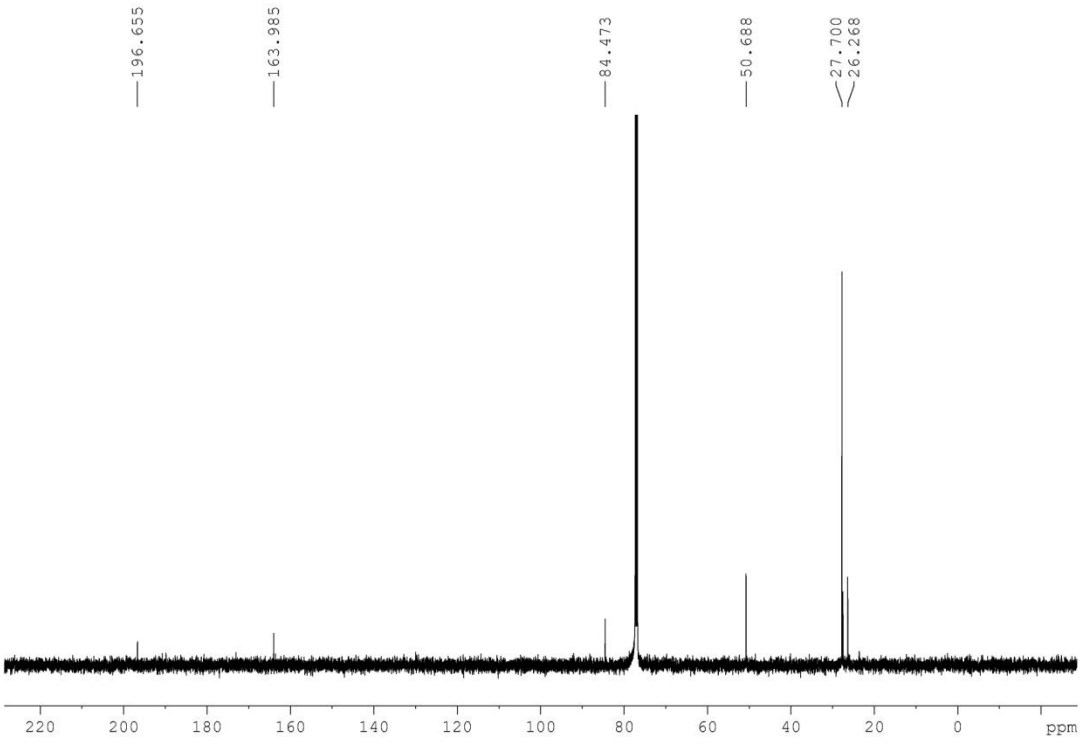
68


4.916
4.897
4.875
4.856
4.834
4.029
3.452
1.617
1.611
1.587
1.574
1.565
0.910
0.885
0.861
8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
1.009
2.000
3.014
4.094
6.280


170.184
77.447
69.861
59.281
26.403
9.581
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

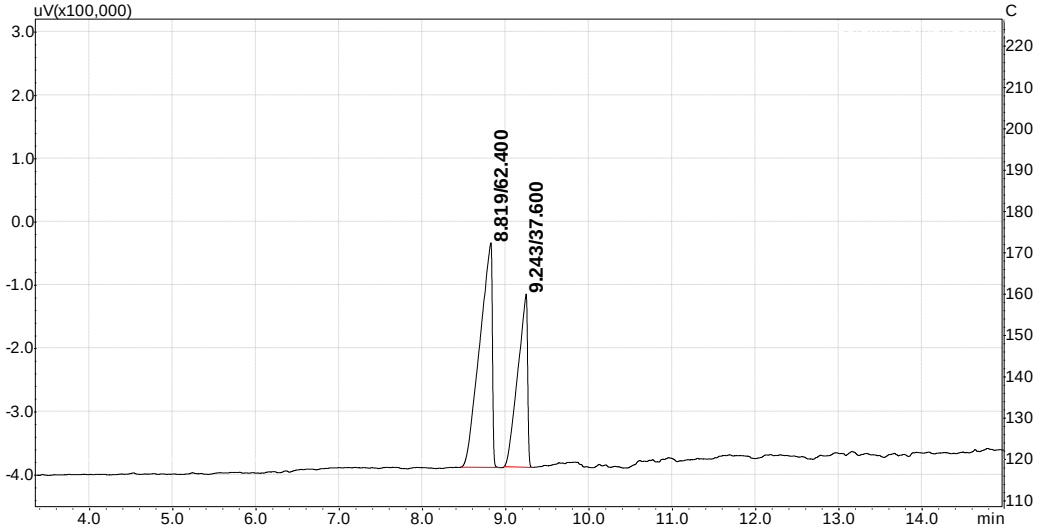
78


4.675
2.419
1.494
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.000
2.903
9.012


196.655
163.985
84.473
50.688
27.700
26.268
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm

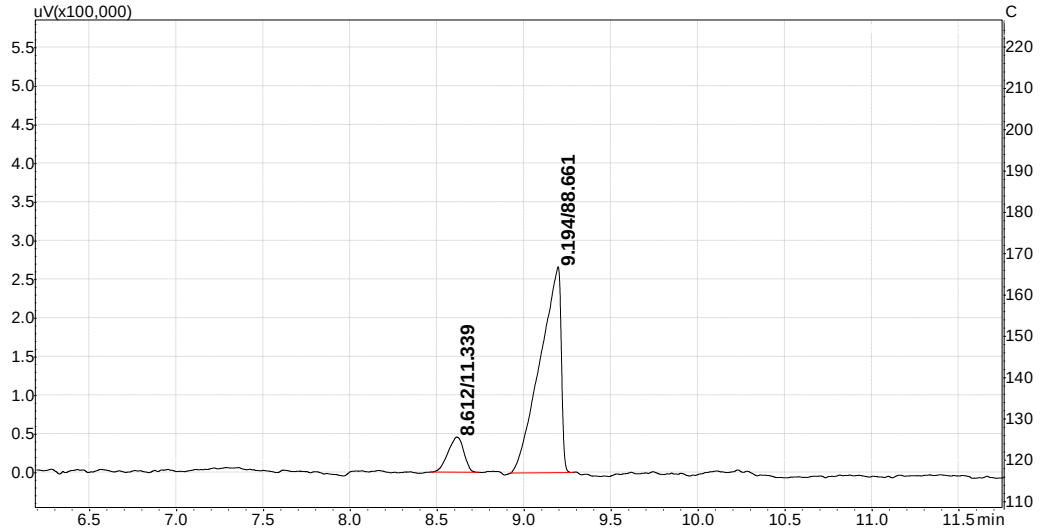
Φάσματα GC για τις ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος 66

Ρακεμικό μίγμα των δύο διαστερεομερών από την χημική σύνθεση του υποστρώματος μέσω αλδολικής αντίδρασης.

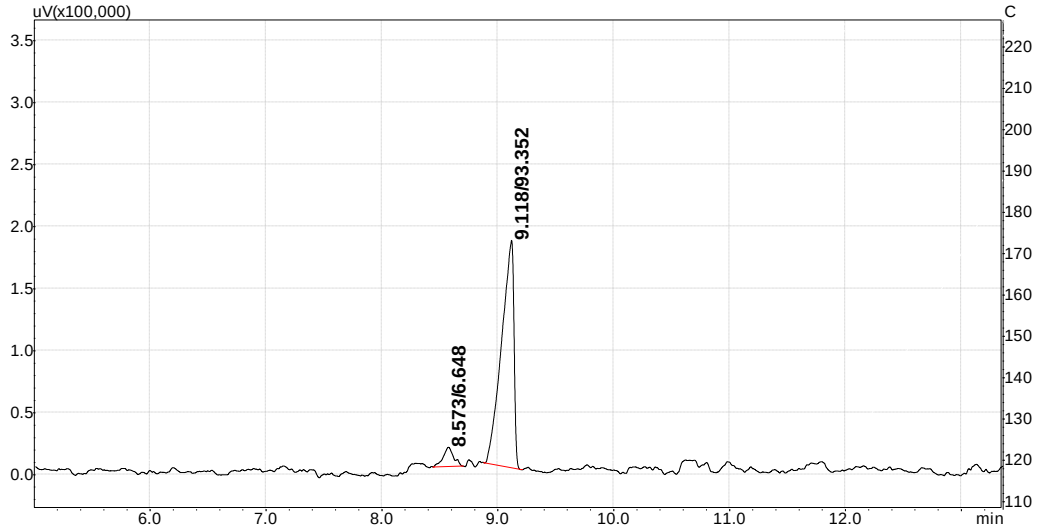


Ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος **66**:

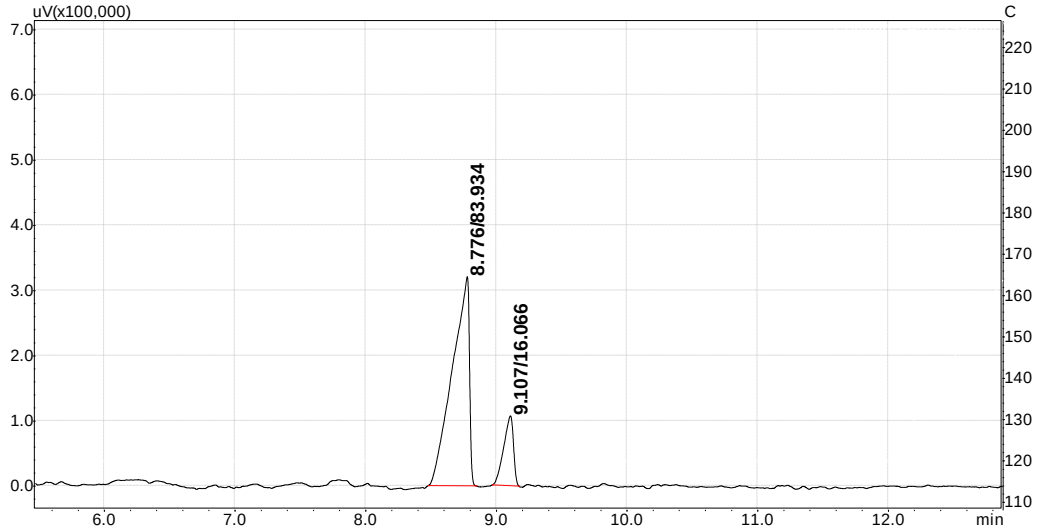
-Kred 106



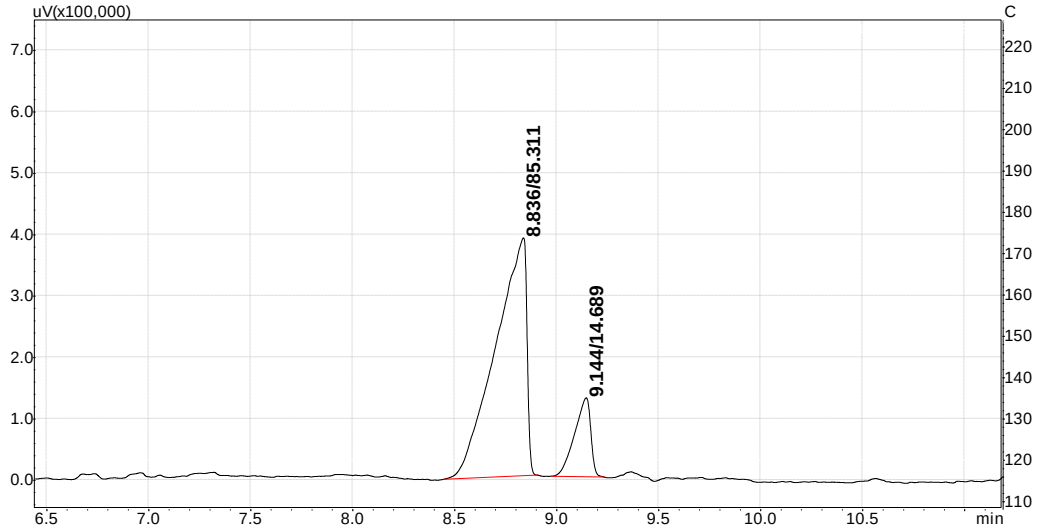
-Kred 102



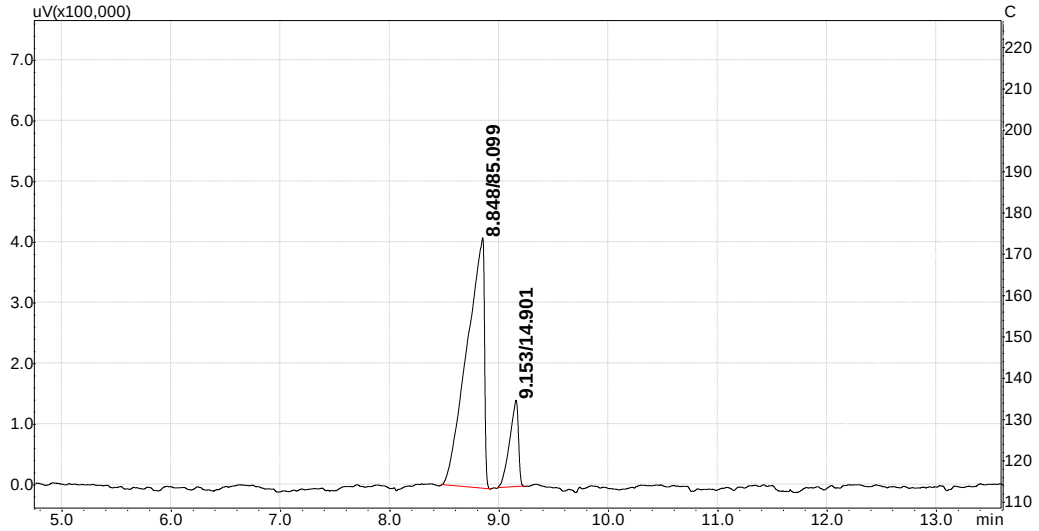
-Kred 123



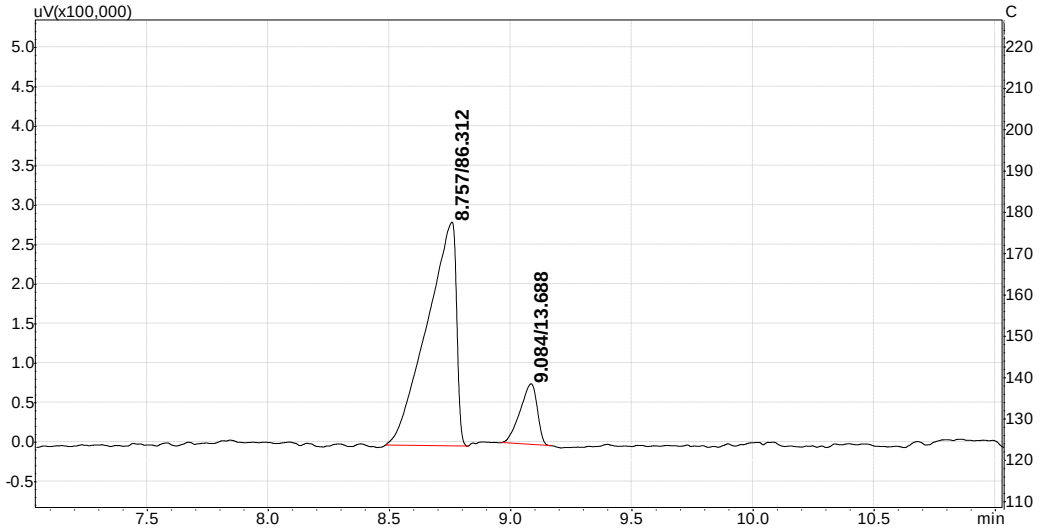
-Kred B1F



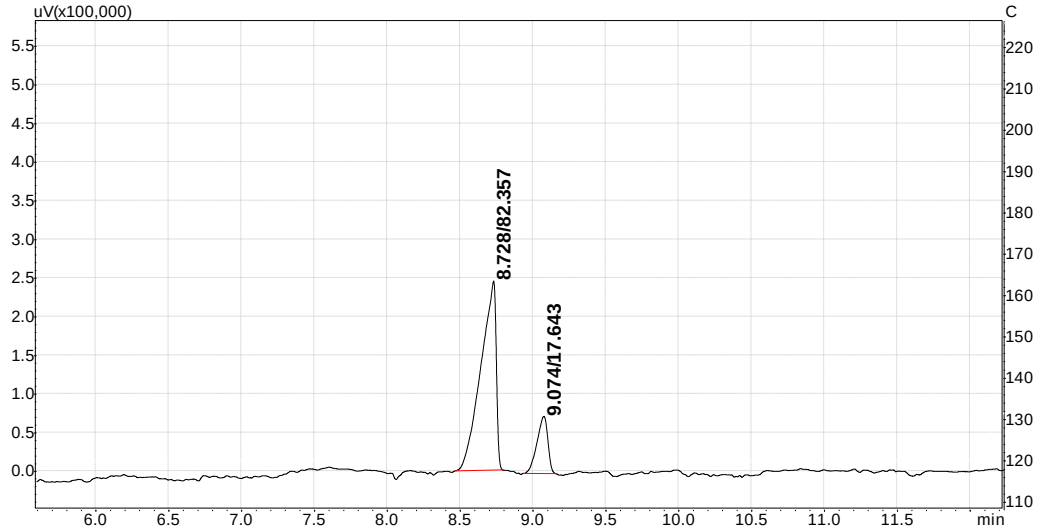
-Kred 118



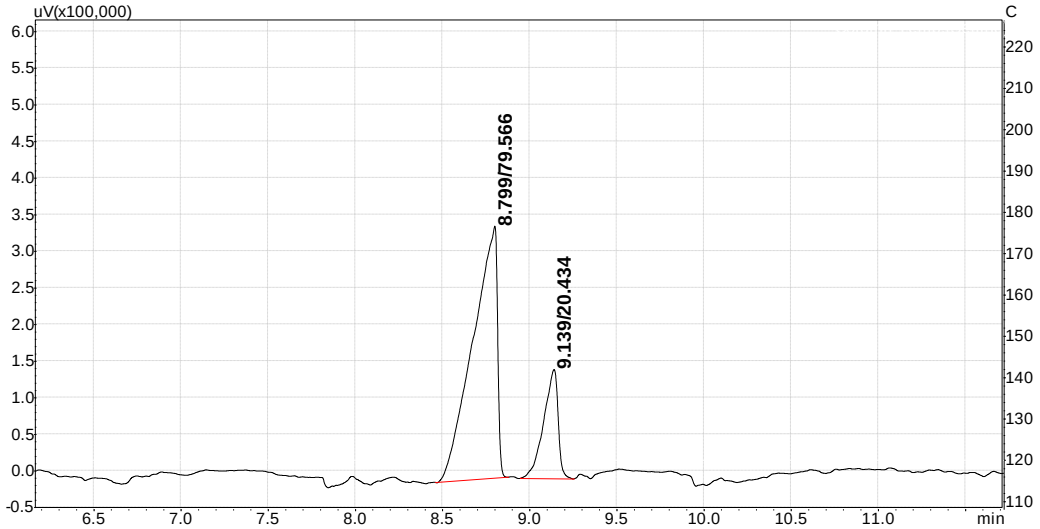
-Kred 119



-Kred 114

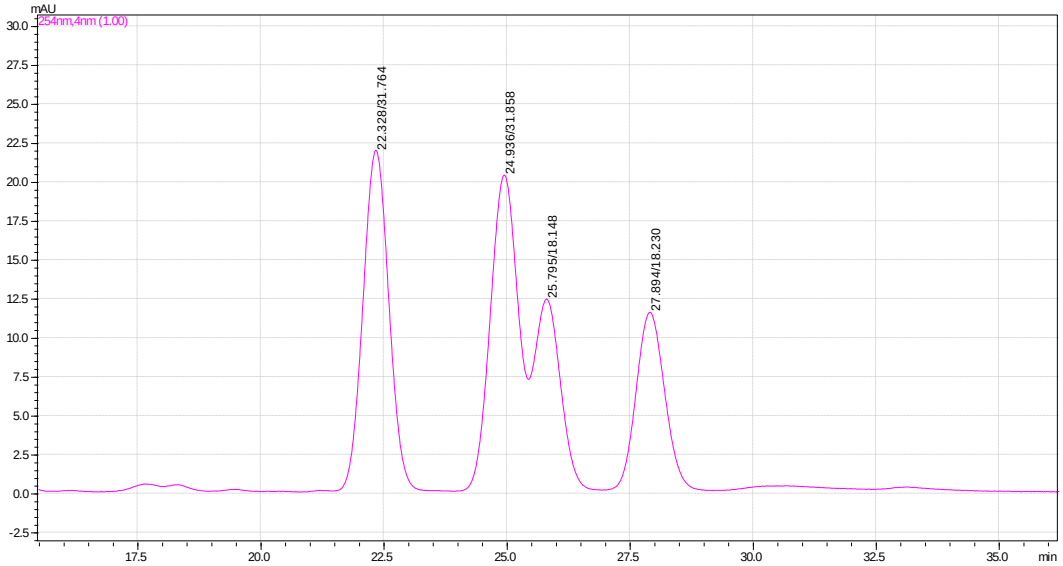


-Kred 101



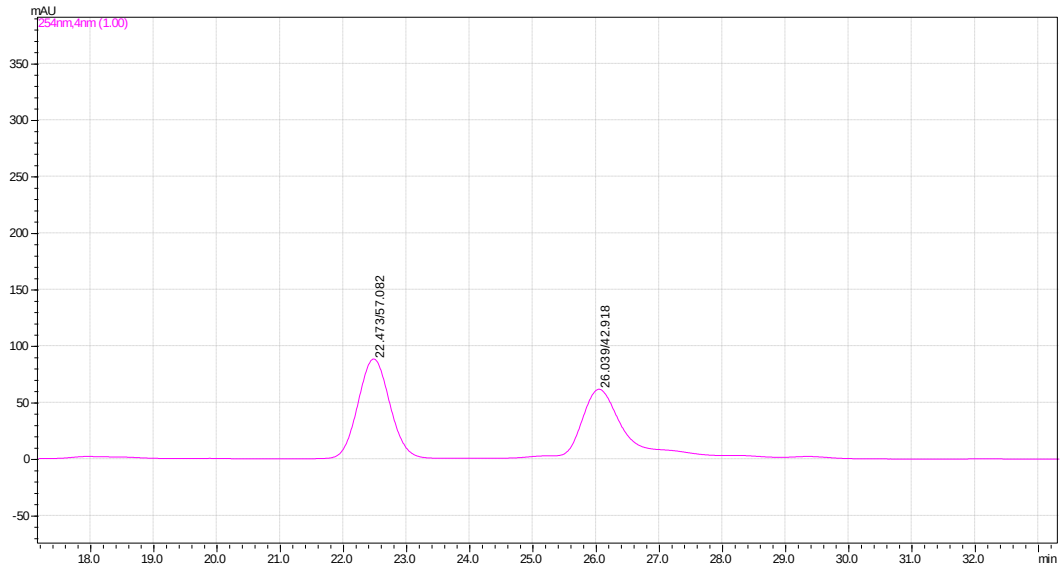
Φάσματα HPLC για τις ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος 65

Ρακεμικό μίγμα των τεσσάρων εναντιομερών από την χημική σύθεση του υποστρώματος μέσω αλδολικής αντίδρασης.

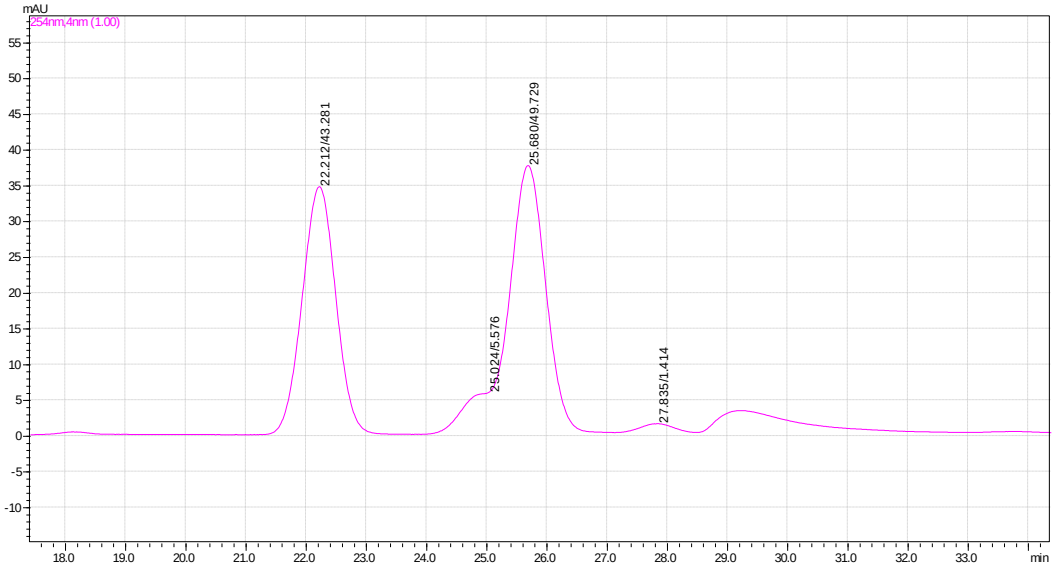


Ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος **65**:

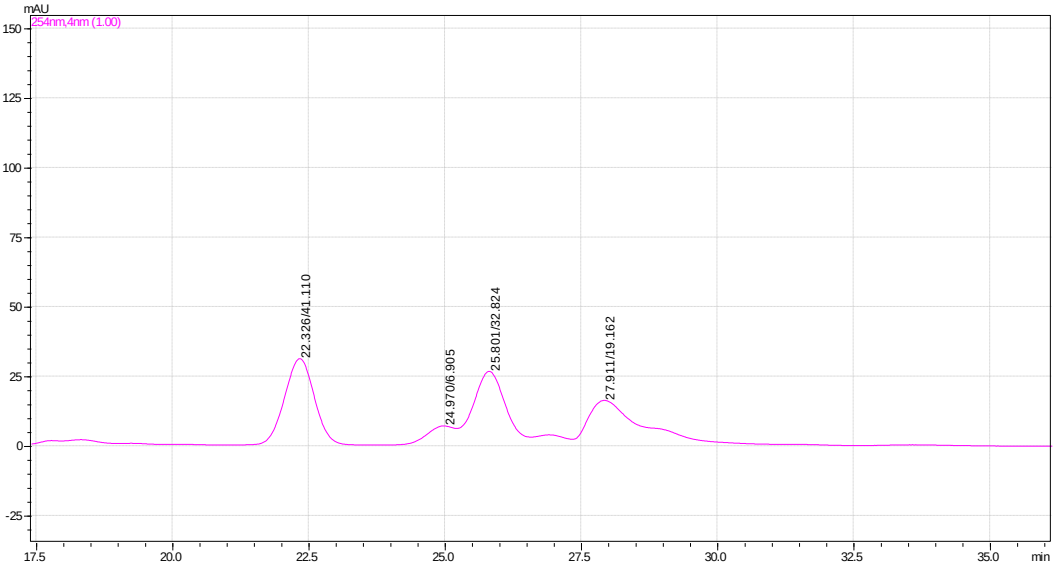
-Kred 121



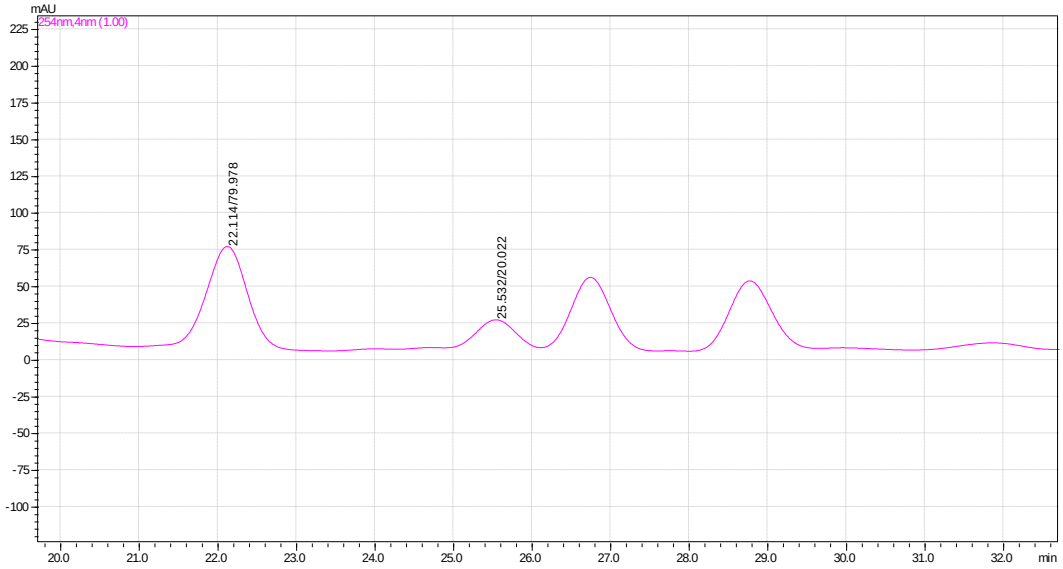
-Kred 123



-Kred 112

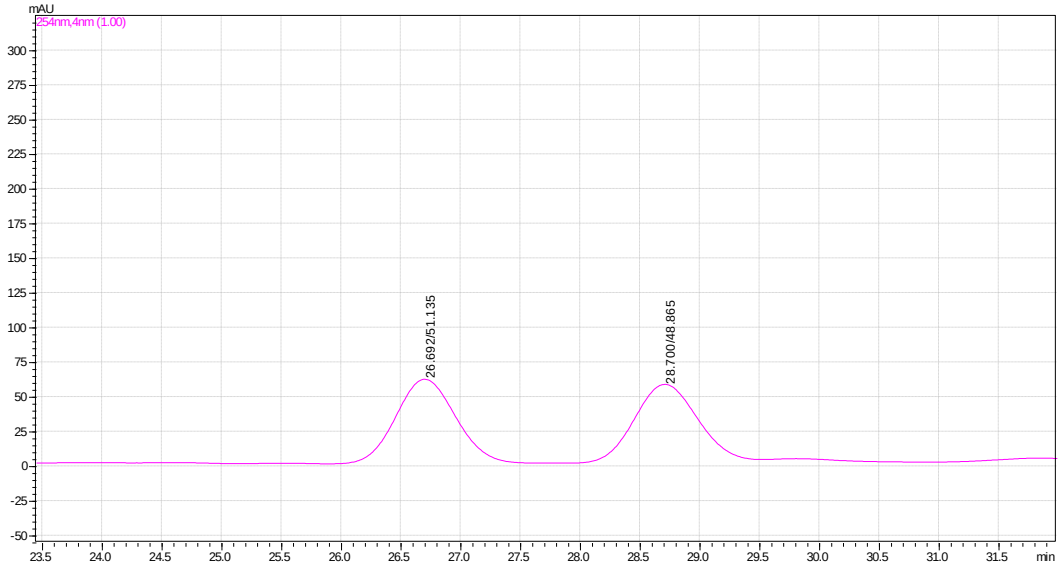


-RasADH

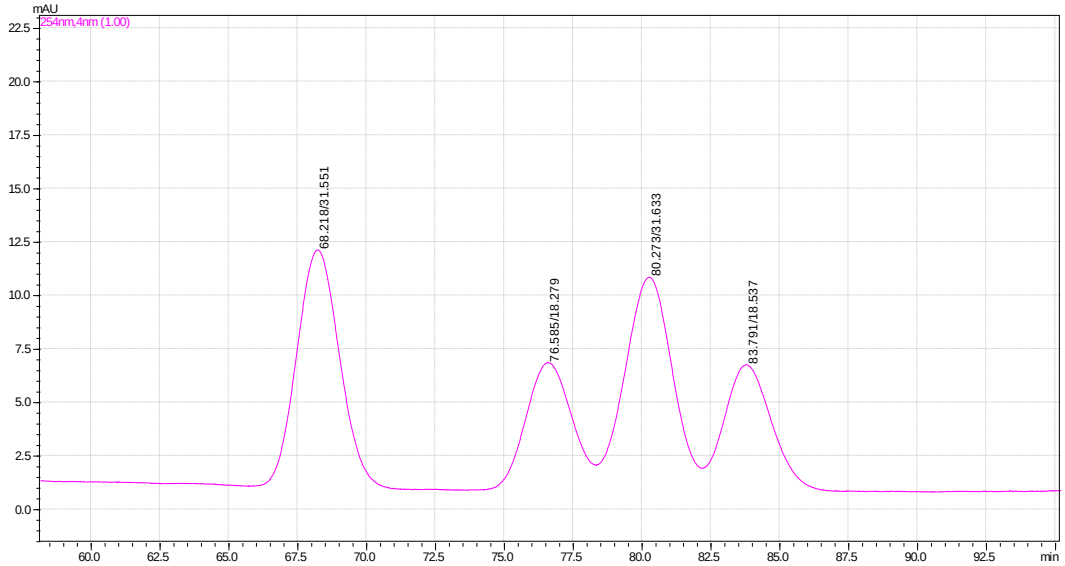


Οι κορυφές που δεν έχουν ολοκληρωθεί στα παραπάνω φάσματα αντιστοιχούν στο αρχικό υπόστρωμα προς αναγωγή, τον κετοεστέρα **65**.

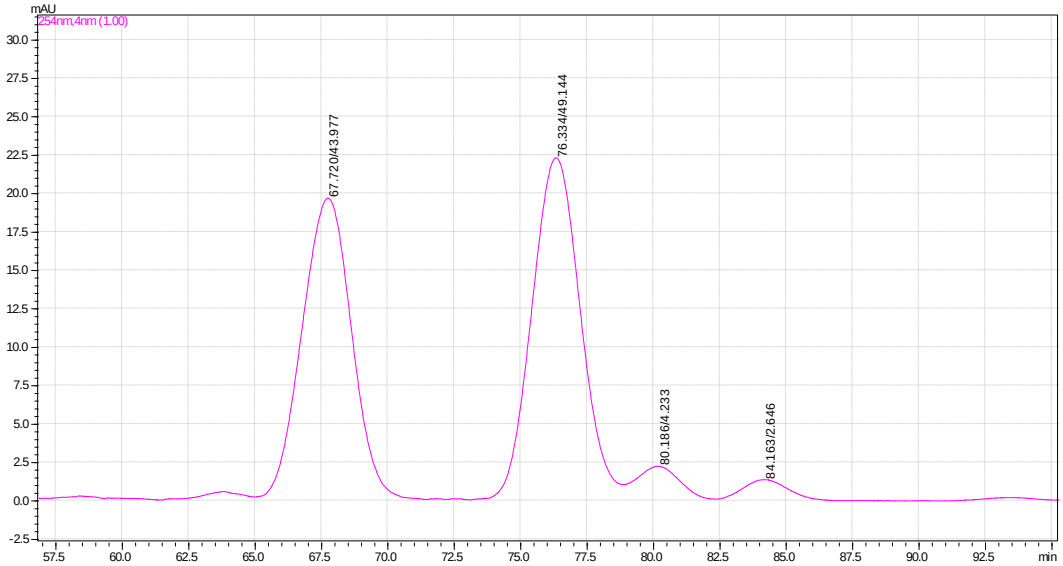
-Αρχικό υπόστρωμα 65



Ρακεμικό μίγμα των τεσσάρων εναντιομερών από την χημική σύθεση του υποστρώματος μέσω αλδολικής αντίδρασης (2ο πρόγραμμα ανάλυσης).



-Kred 114



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1) Koeller, K.M., Wong, C-H. *Nature*, **2001**, *409*, 232-238

2) Huisman, G.W., Gray, D. *Curr Opin Biotechnol*, **2002**, *13*, 352-358

3) Civil, M., "Modern Brewers recreate ancient Beer"*, The oriental institute of the University of Chicago*, Autumn **1991**, No. *132*

4) Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., eds. *Industrial Biotransformations* (2nd ed.). John Wiley & Sons., New York, **2006**, p. 556

5) Rothenberg, G., *Catalysis: Concepts and green applications*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2008**

6) Bruggink, A., Roos, E.C., de Vroom, E., *Org. Proc. Res. Dev.*, **1998**, *2*, 128-133

7) Van de Sandt, E.J., de Vroom. E., *Chimica Oggi.,* **2000***, 18*, 72-75

8) Scragg, A., *Environmental Biotechnology*, Longman, Edinburg, **1999**

9) Thayer, A.M., Biocatalysis.*Chemical Engineering News,* **2001**, *79*, 27-34,

10) Reichstein, T. and Grussner, A., *Helv. Chim. Acta*., *17*, **1934**, 311-328

11) Wilke, D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **1999**, *52*, 135-145

12) Chaplin, M., Bucke, C., *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, Cambridge, **1990**

13) Draths, K.M., Knop, D.R., Frost, J. W., *J. Am. Chem. Soc.* (Communication), **1999**, *121*, 1603-1604

14) Niu, W., Draths, K.M., Frost, J.W., *Biotechnol. Prog.,* **2002**, 18*,* 201-211

15) Yi, J., Li, K., Draths, K.M., Frost, J.W., *Biotechnol. Prog.,* **2002**, 18, 1141-1148

16) Yi, J., Draths, K.M., Li, K., Frost, J.W., *Biotechnol. Prog.,* **2003**, 19, 1450-1459

17) Holland, H.L., In *Handbook of Green Chemistry & Technology*. Clark J, Macquarrie D. Ed., Blackwell Publishing, Oxford, **2002**, p. 188-205

18) Willke, T., Vorlop, K.D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **2004**, *66*, 131–142

19) Sustainable polymer recycling using enzyme: poly (ε-caprolactone). *Macromol. Rapid. Commun.*, *21*, 860–863

20) Soeda, Y., Toshima, K., Matsumura, S., *Macromol. Biosci.,* **2004**, *4*, 721–728

21) Matsumura, S., Soeda, Y., Toshima, K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **2006**, *70*, 12–20

22) Jeschek, M., Reuter, R., Heinisch, T., Trindler, C., Klehr, J., Panke, S. & Ward, T. R., *Nature,* **2016,** *537*, 661–665

23) Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. & Arnold, F. H. *Science,* **2013**, *339*, 307–310

24) Röthlisberger, D., Khersonsky, O., Wollacott, A. M., Jiang, L., DeChancie, J., Betker, J., Gallaher, J. L., Althoff, E. A., Zanghellini, A., Dym, O., Albeck, S., Houk, K. N, Tawfik, D. S., Baker, D., *Nature*, **2008**, *453,* 190–195

25) Emmanuel, M. A., Greenberg, N. R., Oblinsky, D. G. & Hyster, T. K., *Nature,* **2016,** *540,* 414–417

26) Menger, F. M., *Acc. Chem. Res*., **1977**, 44

27) Martinkova, L., Klempier, N., Bardakji, J., Kandelbauer, A., Ovesna, M., Podarilova, T., Kuzma, M., Prepechalova, I., Griengl, H., Kren, V., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2001**, *14*, 95-99

28) Winkler, R., Richter, M. E. A., Knupfer, U., Merten, D., Hertweck, C., *Angew. Chem*., **2006**, *118*, 8184 –8186

29) Hirrlinger, B., Stolz, A., *Appl. Envion. Microbiol*., **1997**, *63*, 3390-3393

30) Shieh, W. R., Sih, C. J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 1259-1269

31) Κλώνης, Ι. *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2η αναθεωρημένη έκδοση, Ηράκλειο, **2010**

32) Shaked, Z., Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104

33) Lamed, R., Keinan, E., Zeikus, J. E. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 144

34) Wong, C. H., Drueckhammer, D. G., Sweers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028

35) Prelog, V., *Helv. Chim. Acta*, **1953**, *36*, 308

36) Huisman, G.W., Liang, J., Krebber, A., *Current Opinion in Chemical Biology*, **2010**, *14*,122–129

37) Patel, R., Biocatalysis: synthesis of chiral intermediates for drugs. In *Biocatalysis and Bioenergy*. Shaw J.F., Hou CT, Ed., **2008**, p. 319-353

38) Albarrán-Velo, J., González-Martínez, D., Gotor-Fernández, V*., Biocatalysis and Biotransformation*, **2018**, *36*, 102-130

39) Gotor, V., Busto, V., Gotor-Fernandez, V., *J. Org. Chem*., **2012**, *77*, 4842-4848

40) Liang, J., Lalinde, J., Borup, B., Mitcell, V., Mundorff, E., Trinh, N., Kochrekar, D.A., Cherat, R.N., Pai, G.G., *Org. Prossess Res. Dev*., **2010**, *14*, 193-198

41) Crowe, M.A., Alvizo, O., Behrouzian, B., Bong, Y., Collier, S.J., Gohel, A., Mavinahalli, J., Modukuru, N., Mundorff, E., Smith, D., Song, S., Yeo, W., 2011. Biocatalysts for ezetimibe synthesis. WO2011140219 A1 PCT/US2011/035194

42) (a) Hugentobler, K.G., Sharif, H., Rasparini, M., Heath, R.S., Turner, N.J., *Org. Biomol. Chem*., **2016**, *14*, 8064–8067 (b) Hugentobler, K.G., Rasparini, M., Thompson, L.A., Jolley, K.E., Blacker, A.J., Turner, N.J., *Org. Process Res. Dev*., **2017**, *21*, 195–199

43) Wittman, M., Carboni, J.M., Attar, R., Balasubramanian, B., Balimane, P., Brassil, P., Beaulieu, F., Chang, C., Clarke, W., Dell, J., Eummer, J., Frennesson, D., Gottardis., M., Greer, A., Hansel, S., Hurlburt, W., Jacobson, B., Krishnananthan, S., Lee, F. Y., Li, T-A., Liu, P., Ouellet, C., Sang, X., Saulnier, M. G., Stoffan, K., Sun, Y., Velaparthi, U., Wong, H., Yang, Z., Zimmermann, K., Zoeckler, M., Vyas, D., *J. Med. Chem*., **2005**, *48*, 5639–5643

44) Carboni, J. M. , Hurlburt , W. W. , and Gottardis , M. M., Synergistic methods and compositions using IGF - 1 receptor inhibitors and EGF receptor inhibitors for treating cancer. *PCT Int. Appl*., **2004**, 39 pp. WO 2004030625 A2 20040415 CAN 140:315050 AN 2004:308360

45) Beaulieu, F., Ouellet, C., Zimmermann, K., Velaparthi, U., and Wittman, M. D., Preparation of isopurines and related compounds as tyrosine kinase inhibitors for the treatment of cancer. *PCT Int. Appl*., **2004**, 65 pp. WO 2004063151 A2 20040729 CAN 141:140461 AN 2004:606437

46) Hanson, R. L., Goldberg, S., Goswami, A., Tully, T. P., and Patel, R. N., *Adv. Synthes. Catalys*, **2005b**, *347*, 1073 – 1080

47) Shang, Y.P., Chen, Q., Kong, X.D., Zhang, Y.J., Xu, J.H., Yu, H.L., *Adv. Synth. Catal*., **2017**, *359*, 426–431

48) (a) Bingham, S. J., Tyman, J. H. P., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1,***1997**, 3637 (b) Roberge, G., Brassard, P., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1,* **1978**, 1041–1046 (c) Andrushko, V., Andrushko, N., *Stereoselective Synthesis of Drugs and Natural Products*, John Wiley & Sons, **2013**, p. 136 (d) Marigo, M., Juhl, K., Jørgensen, K. A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 1367–1369, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1405 (e) Shinkai, I., *The Structure, Reactions, Synthesis and Uses of Heterocyclic Compounds*. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, vol. 3. I. Shinkai, Ed., Pergamon, Oxford, **1996**, p. 1–75

49) Attanasi, O. A., Filippone, P., Fiorucci, C., Foresti, E., Mantellini, F., *J. Org. Chem.,* **1998**, *63*, 9880–9887

50) Yavari, I., Nourmohammadian, F., *J. Chem. Res.,* **2000**, 218–219

51) (a) Mathey, F., Robin, F., Mercier, F., Spagnol, M., PCT Int. Appl., WO 98 00,375; *Chem. Abstr.* **1998**, *128*, 127603 (b) Niigata, K., Kimura, T., Hayashibe, S., Shikama, H., Takasu, T., Hirasaki, E., Jpn. Kokai Tokkyo Koho, **1994**, JP 06,298,737; *Chem. Abstr.,* **1995**, *122*, 13318 (c) Binghama, S. J., Tymana, J. H. P., *Org. Prep. Proced. Int.,* **2001**, *33*, 357–361 (d) Ragavan, R. V., Kumar, K. M., Vijayakumar, V., Sarveswari, S., Ramaiah, S., Anbarasu, A., Karthikeyan, S., Giridharan, P., Kumari, N. S., *Org. Med. Chem. Lett.,* **2013**, *3*, 6

52) Couturier, M., Brassard, P., *Synthesis,* **1994**, 703

53) (a) Koval, L. I., Dzyuba, V. I., Ilnitska, O. L., Pekhnyo, V. I., *Tetrahedron Lett.,* **2008**, *49*, 1645–1647 (b) Hutchinson, D. W., *Antiviral Res.,* **1985**, *5*, 193–205 (c) Tramontano, E., Esposito, F., Badas, R., Di Santo, R., Costi, R., La Colla, P., *Antiviral Res.,* **2005**, *65*, 117–124

54) Biginelli, P., *Gazz. Chim. Ital.,* **1893**, *23*, 360–416

55) (a) Kaan, H. Y. K., Ulaganathan, V., Rath, O., Prokopcova, H., Dallinger, D., Kappe, C. O., Kozielski, F., *J. Med. Chem.,* **2010**, *53*, 5676 (b) Kappe, C. O., *Eur. J. Med. Chem.,* **2000**, *35*, 1043– 1052 (c)

Butters, M., Davies, C. D., Elliott, M. C., *Org. Biomol. Chem.,* **2009**, *7*, 5001–5009 (d) Sandhu, J. S. S., *ARKIVOC (Gainesville, FL, U.S.),* **2012**, *1*, 66–133

56) Kalaitzakis, D., Rozzell, J. D., Kambourakis, S., Smonou. I., *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4799

57) (a) Kalaitzakis, D., Rozzell, J. D., Smonou, I., Kambourakis, S., *Adv. Synth. Catal.*, **2006,** 348, 1958 (b) Kalaitzakis, D., Smonou, I., *Tetrahedron,* **2010**, *66*, 9431-9439 (c) Kalaitzakis, D., Smonou, I., *J. Org. Chem*., **2010**, *75*, 8658–8661

58) Bariotaki, A., Kalaitzakis, D., Smonou, I., *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 1792–1795

59) Kalaitzakis, D., Rozzell, D., Kambourakis, S., Smonou I., *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 2309-2313

60) Kalaitzakis, D., Kambourakis, S., Rozzell, D., Smonou, I., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 2418-2426

61) Kalaitzakis, D., Smonou, I., *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 43-46

62) Kallergi, M., Kalaitzakis, D., Smonou, I., *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 3946-3950

63) (a) K. Andersson, E.-L. Lindsteds-Alstermark, WO9962870 and WO9962872, **1999** (b) B. Ljung, K. Bamberg, B. Dahllof, A. Kjellstedt, N. Oakes, J. Ostling, *J. Lipid Res*. **2002**, *43*, 1855–1863

64) Το Tesaglitazar κυκλοφόρησε στο εμπόριο με την εμπορική ονομασία Galida® από την AstraZeneca, αλλά η παραγωγή του διεκόπη το 2006, γιατί τα οφέλη δεν εξισώνονταν με τους κινδύνους.

65) Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. , Parmeggiani, F., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 2594–2599

66) Brenna, E., Fuganti, C., Gatti, F. , Parmeggiani, F., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 2694–2698

67) (a) Cartigny, D., Puntener, K., Ayad, T., Scalone, M., Ratovelomanana-Vidal, V., *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 3788-3791 (b) Monnereau, L., Cartigny, D., Scalone, M., Ayad, T., Ratovelomanana-Vidal, V., *Chem. Eur. J*., **2015**, *21*, 11799-11806

68) Kalaitzakis, D., Smonou, I., *J. Org. Chem.,* **2008**, *73*, 3919-3921