



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**

**ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ
MAURENONE ΚΑΙ RUGULACTONE**

ΜΑΡΚΟΥ ΧΡΥΣΤΑΛΛΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012



**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**GRADUATE PROGRAM
ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS WITH
BIOLOGICAL ACTIVITY**

**CHEMOENZYMATIC SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS
MAURENONE AND RUGULACTONE**

MARKOU CHRYSTALLA

SUPERVISOR PROFESSOR: SMONOU IOULIA

HERAKLION 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

1. **Σμόνου Ιουλία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας.
2. **Στρατάκης Εμμανουήλ**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
3. **Κατερινόπουλος Χαράλαμπος**, Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Σμόνου Ιουλίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιβλέπουσα, Καθηγήτρια Ι. Σμόνου, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος της διατριβής αυτής, αλλά και για την υλικοτεχνική υποδομή και την οικονομική βοήθεια που μου παρείχε. Την ευχαριστώ επίσης για την υποστήριξη και ενθάρρυνση της στις δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ. Μανώλη Στρατάκη και κ. Χαράλαμπο Κατερινόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές και για το ότι δέχτηκαν να είναι μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μ. Ορφανόπουλο και τον κ. Γ. Βασιλικογιαννάκη όχι μόνο για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχαν, αλλά και για τα μεταπτυχιακά μαθήματα.

Καθοριστικό ρόλο στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής είχε ο Δρ. Δ. Καλαϊτζάκης. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την σημαντική βοήθεια και συμπαράσταση του, το ενδιαφέρον που επέδειξε στην επίλυση όλων των προβλημάτων που παρουσιάστηκαν θεωρώ ότι ήταν καθοριστικά στην διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους φίλους και συνεργάτες Α. Μπαριωτάκη, Μ. Καλλέργη και Τ. Στεργίου, για την άψογη συνεργασία τους, τις εποικοδομητικές συζητήσεις και κυρίως για το θαυμάσιο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο.

Βιογραφικό

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα : Μάρκου Χρυστάλλα
Ημερομηνία Γέννησης: 3 Οκτωβρίου 1986
Τόπος γέννησης : Αθήνα
Στοιχεία Επικοινωνίας : mchrystalla@yahoo.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

2001-2004: Δεύτερο Λύκειο Κύκκου, Πάφος, Κύπρος
2004-2009: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βαθμός Πτυχίου 6.96
2009-2012: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα στον τομέα Οργανικής Χημείας στο Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης με επιβλέπουσα την Καθηγήτρια Ι. Σμόνου. ``Χημειοενζυμική σύνθεση των φυσικών προϊόντων Rugulactone και Maurenone``

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

- **Αγγλικά:** Πολύ Καλή (Advanced)
- **Υπολογιστές:** Γνώση και χρήση H/Y σε Windows, Internet, Office, Origin

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Διπλωματική εργασία στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας-Βιοκατάλυσης με τίτλο: Χημειοενζυμική σύνθεση των 2-μέθυλ-4-επτανόλη 2-μέθυλ-4-οκτανόλη (φυσικές φερομόνες) με επιβλέπουσα καθηγήτρια την Ιουλία Σμόνου
- Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Οργανικής Χημείας το έτος 2010, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ-ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Σμόνου Ι., Καλαϊτζάκης Δ, Καλλέργη Μ, Μπαριωτάκη Α, Μάρκου Χ. "Asymmetric Enzymatic Cascade Reductions of 1, 3-diketones". 3^ο EuCheMS Συνέδριο Χημείας, Νυρεμβέργη, Αύγουστος 29-Σεπτεμβρίου 2, 2010, Γερμανία.
- "Χημειοενζυμική Σύνθεση της Φερομόνης (R)-2-μεθυλο-4-επτανόλη" Χ. Μάρκου, Δ. Καλαϊτζάκης., Ι. Σμόνου 3^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Κύπρου- Ελλάδας, 23-27 Ιούνιος 2010, Πρωταράς, Κύπρος

CURRICULUM VITAE

PERSONAL INFORMATION

Name: Chrystalla
Last name: Markou
Birth date: 3/10/1986
Place of birth: Athens, Greece
E-mail mchrystalla@yahoo.com

EDUCATION

2004-2009 Bachelor's of Science degree in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete.
2008-2009 Undergraduate diploma thesis "Biochemical synthesis of 2-methyl-4-heptanol and 2-methyl-4-octanol (pheromones)" elaborated under the supervision of prof. I. Smonou, Organic Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete
2009-2012 M.Sc thesis, Department of Chemistry, University of Crete, Supervisor Prof. I. Smonou. Title: "Chemoenzymatic synthesis of natural products Rugulactone and Maurenone"

MORE KNOWLEDGE

- English Degree (Advanced)
- Computer Degree (Windows, Internet, Office, Origin)

TEACHING EXPERIENCE

- Laboratory Assistant in Organic Chemistry Undergraduate Laboratory II

CONFERENCES

- 4th International Conference of Biotechnology, 2-3 February, **2008**, Athens.
Poster: "Highly stereoselective biocatalytic synthesis of α -alkyl- β -hydroxy esters by isolated NADPH-dependent ketoreductases".
- 3rd Conference of Chemistry Graduate Students from Cyprus and Greece, 23-27 June, **2010**, Protaras, Paralimni
Oral: "Biochemical synthesis of 2-methyl-4-heptanol and 2-methyl-4-octanol (pheromones)".

PROFESSIONAL ASSOCIATIONS

- Greek Chemical Society

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι στερεοεκλεκτικές ενζυμικές αναγωγές με NAD(P)H-εξαρτώμενες, απομονωμένες κετορεδουκτάσες για τη σύνθεση χειρόμορφων ενδιαμέσων, για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος Maurenone. Επίσης πραγματοποιήθηκε χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος Rugulactone.

Το 2009 απομονώθηκε για πρώτη φορά η ένωση 6-(4-οξο-6-φαινυλ-εξ-2-ενυλ)-5,6-διωδρο-πυραν-2-ονη, μια νέα α-πυρόνη αλλιώς και (*R*)-rugulactone η οποία εξάγεται από το φυτό *Cryptocarya rugulosa* της οικογενείας *Lauraceae* γνωστή και ως η κοινή μας δάφνη. της (*R*)-rugulactone. Το φυσικό αυτό προϊόν βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δράση του πυρηνικού παράγοντα-kB (nF-kB) που ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-rugulactone με τη χρήση κετορεδουκτασών για τη στερεοεκλεκτική αναγωγή ενός β-κετοεστερα που είναι και η αντίδραση κλειδί του συνθετικού σχήματος.

Η χημεία των γαστερόποδων μαλακίων της οικογενείας *Siphonariidae* χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυπροπιονικών δευτερογενών μεταβολιτών. Το 1986 συλλέχθηκαν δείγματα του είδους *Siphonaria maura* από τη Jaco Beach στην Costa Rica, όπου περιέχει πέντε νέους πολυπροπιονικούς μεταβολίτες, ένας εκ των οποίων είναι η maurenone. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η πρώτη προσπάθεια για την χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος maurenone με τη χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών, χρησιμοποιώντας σαν αντίδραση κλειδί την ενζυμική αναγωγή με κετορεδουκτάσες για την στερεοεκλεκτική αναγωγή 1,3-δικετοεστέρων.

SUMMARY

In the present thesis the stereoselective enzymatic reductions with NADPH-dependent ketoreductases for the synthesis of important chiral intermediates were studied for the synthesis of the natural product Maurenone. Also the chemoenzymatic synthesis of natural product Rugulactone.

Rugulactone is a naturally occurring dihydro-(*R*)-pyrone isolated for the first time in 2009 from the plant *Cryptocarya rugulosa*. Rugulactone has proved to inhibit the nuclear factor NF- κ B activation pathway in lymphoma cell lines, which is constitutively active in many types of cancers, and thus a potential therapeutic target. In the first chapter the chemoenzymatic synthesis of this natural product is presented as the key enzymatic reaction with isolated reduction ketoreductases for stereoselective reduction of β -ketoester.

Marine pulmonates of the genus *Siphonaria* are rich sources of diverse polyketide-derived natural products. The natural product maurenone was first isolated by Faulkner et al. in 1986 from specimens of the pulmonatemollusc *Siphonaria maura*, collected from Jaco Beach, Costa Rica. The second chapter presents the first chemoenzymatic synthesis of the natural product maurenone. The composition was used as the key enzymatic reaction with isolated reduction ketoreductases for stereoselective reduction of 1,3-diketoesteron.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
Τριμελής εξεταστική επιτροπή	3
Ευχαριστίες.....	4
Βιογραφικό σημείωμα στα Ελληνικά.....	5
Βιογραφικό σημείωμα στα Αγγλικά.....	6
Περίληψη στα Ελληνικά.....	7
Περίληψη στα Αγγλικά.....	8
Περιεχόμενα.....	9

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένζυμα στην οργανική σύνθεση.....	10
Κετορεδουκτάσες.....	15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

«Χημειοενζυμική Σύνθεση του φυσικού προϊόντος (<i>R</i>)-Rugulactone	20
Εισαγωγή.....	21
Αποτελέσματα – Συζήτηση	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

«Χημειοενζυμική Σύνθεση χειρόμορφων ενδιαμέσων για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος Maurenone	30
Εισαγωγή.....	31
Αποτελέσματα – Συζήτηση	37
Πειραματικό μέρος.....	47
Βιβλιογραφία.....	62
Φάσματα NMR	65

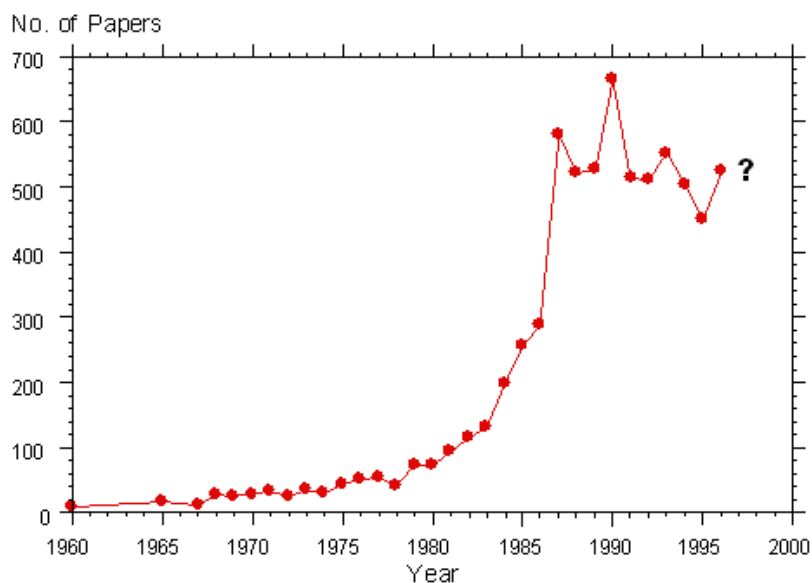
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ENZYMA ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Ένας από τους πιο αναπτυγμένους κλάδους της χημείας είναι η οργανική σύνθεση, στα πλαίσια της οποίας είναι διαρκής η ερευνητική προσπάθεια για την ανακάλυψη πιο αποδοτικών αντιδραστηρίων και καταλυτών, με κύριο σκοπό τη σύνθεση πολύπλοκων μορίων υψηλής αξίας. Ένας από τους σημαντικότερους στόχους των συνθετικών οργανικών χημικών είναι η ανακάλυψη μεθόδων για την ελεγχόμενη παρασκευή οπτικώς ενεργών ενώσεων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η βιολογική δραστικότητα οπτικώς ενεργών μορίων, όπως φαρμακευτικές ενώσεις και φυσικά προϊόντα, συνήθως εξαρτάται από τη διαμόρφωση των χειρόμορφων κέντρων τους¹. Βασική βέβαια προϋπόθεση είναι οι μέθοδοι σύνθεσης οπτικώς ενεργών μορίων να είναι, εκτός από αποδοτικές, περιβαλλοντικά και οικονομικά αποδεκτές

Τα τελευταία χρόνια γίνονται αρκετές προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων καταλυτών, είτε χημικών², είτε βιοκαταλυτών – ενζύμων³. Μια κατηγορία βιοκαταλυτών η οποία έχει αναπτυχθεί σημαντικά και εφαρμόζεται εκτενώς στην οργανική σύνθεση είναι τα ένζυμα, τα οποία χρησιμοποιούνται, είτε σαν ολόκληρα κύτταρα είτε σαν απομονωμένα ένζυμα.⁴

Η τεράστια δυναμικότητα της χρήσης των ενζύμων για μετατροπές φυσικών ή μη-φυσικών υποστρωμάτων αναγνωρίστηκε προς το τέλος της δεκαετίας του '80. Σαν αποτέλεσμα αυτής της μεγάλης ερευνητικής προσπάθειας, τα ένζυμα έχουν κερδίσει μια σημαντική θέση στην μοντέρνα οργανική σύνθεση.⁵ Στις αρχές της δεκαετίας του '90 μόνο το 8% όλων των δημοσιεύσεων στην συνθετική οργανική χημεία περιλάμβανε στοιχεία βιομετατροπής⁶, ενώ τώρα εκτιμάται ότι το ποσοστό αυτό ξεπερνάει το 15% (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Καταγραφή αριθμού δημοσιεύσεων πάνω σε βιοκαταλυτικές μετατροπές μη-φυσικών υποστρωμάτων το διάστημα 1970-2000

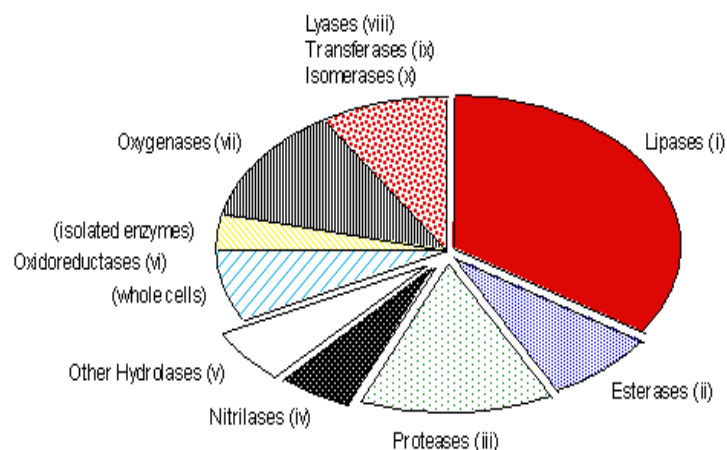
Τα κύρια χαρακτηριστικά που διακρίνουν τους βιοκαταλύτες από τους χημικούς καταλύτες, παρουσιάζονται στη συνέχεια:⁷

- Είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Γενικά οι ταχύτητες των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων είναι μεγαλύτερες κατά ένα παράγοντα της τάξης του $10^8 - 10^{10}$. Σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της ταχύτητας μπορεί να υπερβεί τον παράγοντα 10^{12} , τιμή την οποία οι χημικοί καταλύτες δεν είναι εύκολο να την επιτύχουν.⁸
- Τα ένζυμα είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί καταλύτες σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες βαρέων μεταβατικών μετάλλων καθώς είναι αποικοδομήσιμα στο περιβάλλον και λειτουργικά σε υδατικά διαλύματα.
- Είναι ενεργά κάτω από ήπιες συνθήκες, όπως σε θερμοκρασία $20 - 40\text{ }^\circ\text{C}$ καθώς και σε pH $5 - 8$. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων μη επιθυμητών αντιδράσεων, όπως οι αποικοδομήσεις, ισομεριώσεις, αντικαταστάσεις και ρακεμοποιήσεις.
- Δυνατότητα της χρήσης ενός αριθμού ενζύμων ταυτόχρονα, πραγματοποιώντας πολλά στάδια αντίδρασης, δεδομένου ότι τα περισσότερα ένζυμα δρουν κάτω από παρόμοιες συνθήκες
- Δέχονται αρκετά μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων καταλύοντας αντιδράσεις είτε φυσικών είτε τεχνητών μη φυσικών υποστρωμάτων συμβάλλοντας δυναμικά στην οργανική σύνθεση.

- Πολλοί από τους βιοκαταλύτες είναι εμπορικά διαθέσιμοι και εύκολοι στη χρήση όπως οι χημικοί καταλύτες. Για την ανακάλυψη επιπλέον νέων βιοκαταλυτών είναι απαραίτητη η καλλιέργεια κυττάρων από καλλιέργειες σπόρων (seed cultures), οι οποίοι μπορεί να είναι εμπορικά διαθέσιμοι.

Τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί από τη Διεθνή Ένωση Βιοχημείας (International Union of Biochemistry) σε έξι κύριες ομάδες:

1. **Οξειδοορεδουκτάσες**, που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου.
2. **Τρανσφεράσες** που καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων, όπως άκυλο και φωσφορικών ομάδων ή σακχάρων, από ένα μόριο σε άλλο
3. **Υδρολάσες** που καταλύουν την υδρόλυση αμιδίων, εστέρων και πεπτιδίων.
4. **Λυάσες** που καταλύουν τις αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς καθώς και τις αντίστροφες αντιδράσεις απόσπασης.
5. **Ισομεράσες** που καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού όπως τη μετακίνηση διπλών δεσμών, Z/E ισομερισμούς και αντιδράσεις ρακεμοποίησης.
6. **Λιγκάσες** που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C και δεσμούς φωσφορικών εστέρων.



Σχήμα 2: Ομάδες και υποομάδες των χρησιμοποιούμενων ενζύμων στην οργανική σύνθεση

Δομικά χαρακτηριστικά και εκλεκτικότητα των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι μακρομόρια πρωτεϊνικής φύσης και αποτελούνται από αμινοξέα συνδεδεμένα μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς. Τα ένζυμα δρουν εκ φύσεως σε υδατικό περιβάλλον και τα δομικά τους χαρακτηριστικά είναι οι υδρόφιλες πολικές ομάδες, όπως $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{CONH}_2$, εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνειά τους, ενώ στην εσωτερική εντοπίζονται οι υδρόφοβες, όπως αρυλο και αλκυλο ομάδες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η εξωτερική επιφάνεια του ενζύμου –υδρόφιλη- να είναι καλυμμένη από ένα υδατικό στρώμα. Το νερό αυτό είναι απαραίτητο για να αποκτήσει το ένζυμο την κατάλληλη τρισδιάστατη δομή με την οποία είναι δραστικό. Ολόκληρη η δομή που αποκτά το ένζυμο σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις Van–Der–Waals των αλειφατικών αλυσίδων, π-π αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων ή γέφυρες αλάτων μεταξύ φορτισμένων ομάδων του μορίου. Εκτός από τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που αποτελούν τον σκελετό του ενζύμου (πρωτεΐνη), ισχυροί δεσμοί εντοπίζονται μεταξύ ατόμων S ($\text{S} - \text{S}$) και ονομάζονται δισουλφιδικοί δεσμοί. Αυτοί οι δεσμοί είναι αρκετά σημαντικοί, καθώς ανάλογα με τον αριθμό δισουλφιδικών δεσμών στο ένζυμο επηρεάζεται η σταθερότητά του στη θερμοκρασία.

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ενζύμων είναι η κάθε είδους εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν:

α) Χημειοεκλεκτικότητα

Δρουν εκλεκτικά σε μια δραστική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων εξίσου δραστικών ομάδων του ίδιου μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή καθαρών ενώσεων χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων.

β) Τοποεκλεκτικότητα

Εξαιτίας της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου υποστρώματος.

γ) Εναντιοεκλεκτικότητα

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.

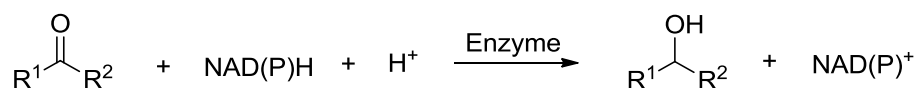
δ) Διαστερεοεκλεκτικότητα

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα διαστερεομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.

ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

Τα τελευταία χρόνια οι κετορεδουκτάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ασύμμετρη σύνθεση. Απόδειξη αποτελεί η ολοένα και αυξανόμενη χρήση τους στην σύνθεση φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων.

Οι κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Απομονώνονται από φυτά, βακτήρια, μαγιά, ψάρια κι από θηλαστικά και ο καταλυτικός τους ρόλος είναι η αναγωγή καρβόνυλο ομάδων. Τα φυσικά τους υποστρώματα είναι αλκοόλες όπως αιθανόλη, λακτικό, γλυκερόλη κ.τ.λ. καθώς και οι αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά έχουν τη ικανότητα να ανάγουν εναντιοεκλεκτικά και μη φυσικά υποστρώματα. Για την πραγματοποίηση μιας αναγωγής, τα ένζυμα αυτά απαιτούν τη χρήση συνενζύμων όπως NADH ή NADPH. Η αναγωγή πραγματοποιείται με μεταφορά ενός υδριδίου στο καρβονυλικό υπόστρωμα, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση του Σχήματος 3.

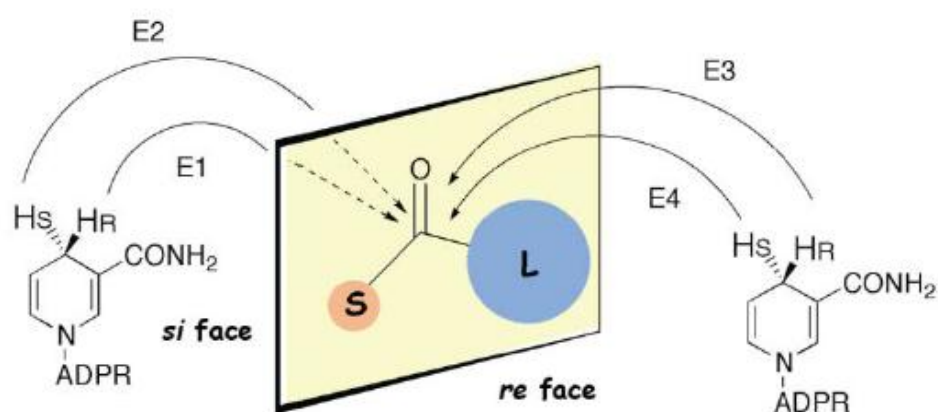


Σχήμα 3: Γενική αντίδραση αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες.

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα, όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.⁹

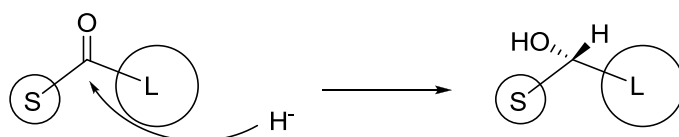
- τύπου E1 και E2, η προσβολή του υδριδίου γίνεται από την *si*-επιφάνεια της καρβονυλομάδας, με σχηματισμό *R* αλκοολών.
- τύπου E3 και E4, η προσβολή γίνεται από την *re*-επιφάνεια, οπότε προκύπτουν *S* αλκοόλες.

Τα ένζυμα τύπου E1 και E3 μεταφέρουν το pro-(*R*)-υδρίδιο του συνενζύμου, ενώ τα τύπου E2 και E4 χρησιμοποιούν το pro-(*S*)-υδρίδιο.



Σχήμα 4: Αναγωγή καρβονυλίου από NADH

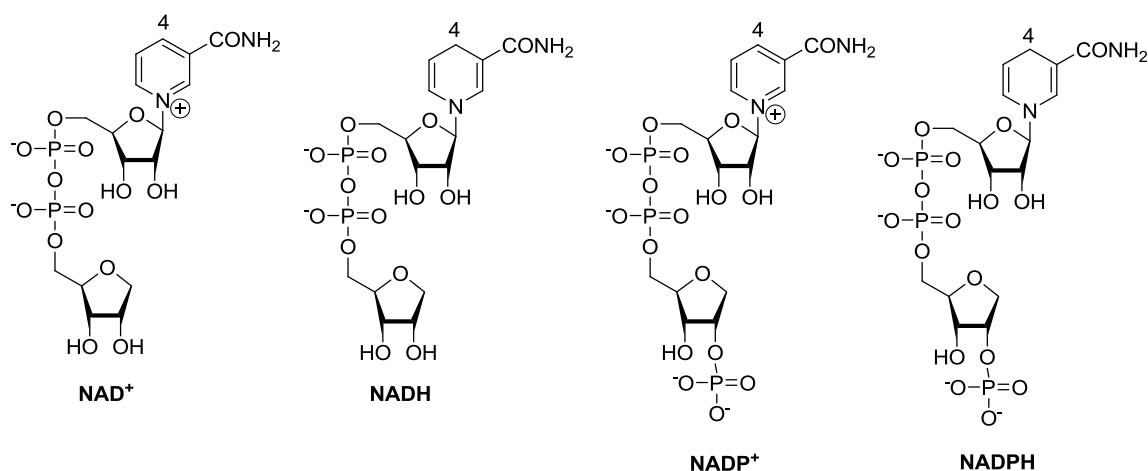
Στις περισσότερες απομονωμένες αφυδρογονάσες, το στεreoχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης μπορεί να προβλεφθεί από ένα απλό μοντέλο, αναφερόμενο σαν “κανόνας του Prelog”. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό η αφυδρογονάση μεταφέρει το υδρίδιο από την *re*-επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης.¹⁰ Το αποτέλεσμα της αναγωγής με ένα ένζυμο που υπακούει στον κανόνα του Prelog είναι ο σχηματισμός της *S* αλκοόλης (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Κανόνας του Prelog

Οι περισσότερες αφυδρογονάσεις ακολουθούν τον κανόνα του Prelog (Prelog ένζυμα) παράγοντας *S* αλκοόλες, ενώ ελάχιστα είναι τα ένζυμα με αντίθετη εκλεκτικότητα (anti-Prelog ένζυμα). Πάντως σε κάθε περίπτωση, για την πραγματοποίηση μιας ενζυμικής αντίδρασης αναγωγής, είναι απαραίτητη η ύπαρξη συνεχόμενου NADH ή NADPH.

Το νικοτιναμίδιο αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD⁺) και το 2'-φωσφορυλιωμένο άλας (NADP⁺) (Σχήμα 6) συμμετέχουν σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καταλυόμενες από αφυδρογονάσεις. Ο νικοτιναμίδικός δακτύλιος των ενώσεων αυτών είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, και μπορεί να δεχτεί ένα υδρίδιο (ή δυο ηλεκτρόνια και ένα πρωτόνιο) για το σχηματισμό των υδρογονωμένων παραγώγων NADH και NADPH. Η αντίστροφη μεταφορά υδριδίου από ένα αναγωγικό υπόστρωμα στο NAD(P)⁺, και αυτή από το NAD(P)H σε ένα οξειδωτικό, είναι στερεοεκλεκτική και χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Κάθε ένζυμο είναι ικανό να μεταφέρει στερεοεκλεκτικά ένα από τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση C-4 του NAD(P)H σε μια καρβονυλομάδα ενός υποστρώματος.¹¹ (Σχήμα 6)

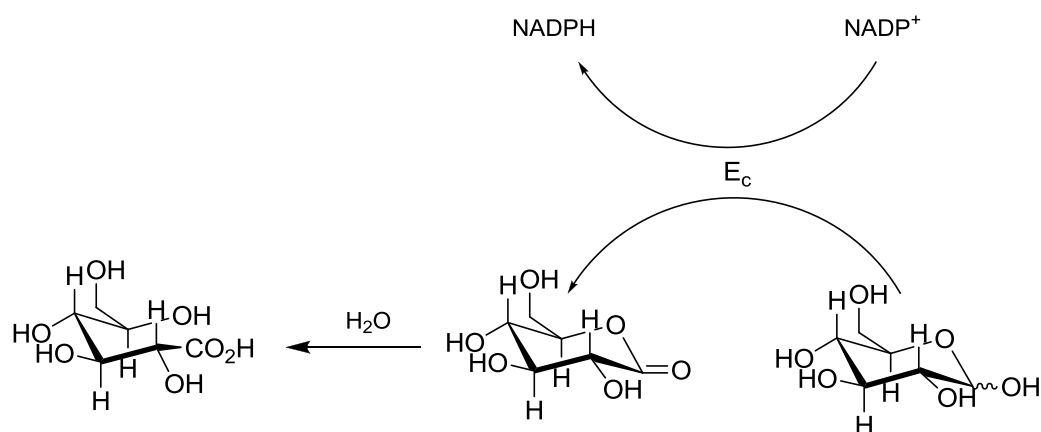


Σχήμα 6: Νικοτιναμίδικοί Συμπαράγοντες.

Γενικά οι ανηγμένες μορφές είναι σταθερές σε βασικά διαλύματα, αλλά ασταθείς σε όξινα, σε αντίθεση με τις οξειδωμένες μορφές που είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα και ασταθείς σε βασικά.¹² Γι' αυτό οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε pH περίπου 7, σε μια ενδιάμεση δηλαδή τιμή σταθερότητας. Τα συνένζυμα είναι εμπορικά διαθέσιμα, αλλά έχουν υψηλό κόστος. Γι' αυτό τον λόγο έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα αναγέννησης τους.

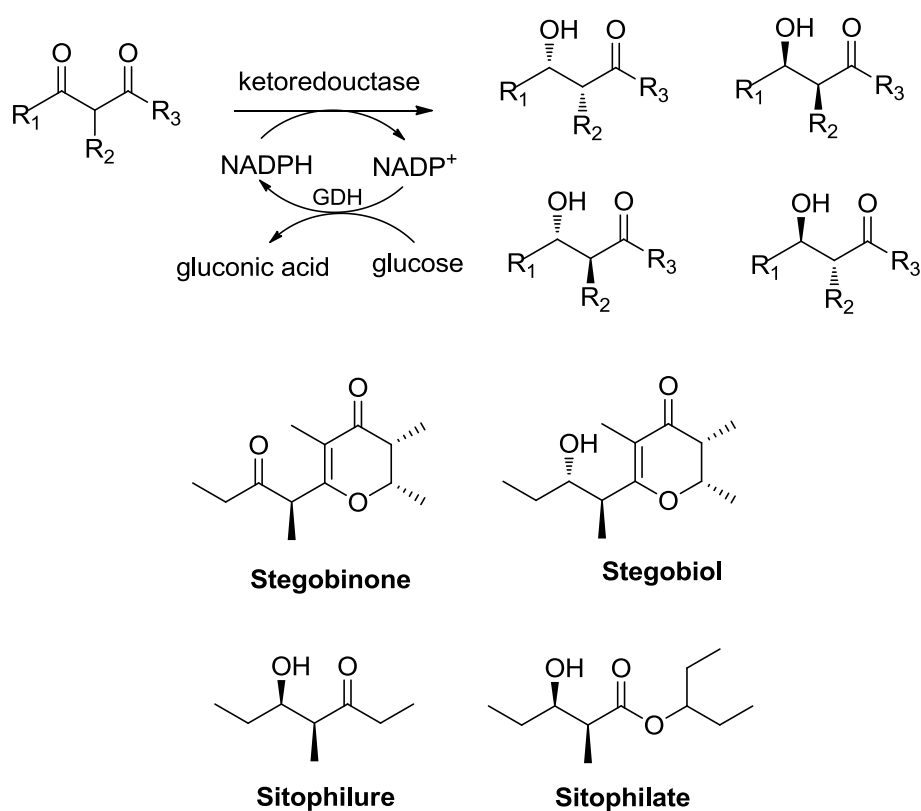
Για να είναι μια μέθοδος αναγέννησης συνενζύμων αποτελεσματική θα πρέπει να είναι αρκετά εκλεκτική ως προς το υπόστρωμα, σε σχέση με την επιθυμητή ενζυμική αντίδραση, και να έχει την ικανότητα να ανακυκλώνει τον συμπαράγοντα $10^2 - 10^5$ φορές. Προς το παρόν, μόνο η ενζυμική κατάλυση παρέχει τέτοια μεγάλη εκλεκτικότητα για την αναγωγή του NAD(P)^+ σε NAD(P)H . Το μόνο μειονέκτημα των ενζυμικών ανακυκλώσεων είναι η δαπάνη και η περιορισμένη σταθερότητα των ενζύμων.¹³

Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα για την ανακύκλωση των NADH και NADPH ^{9,14,15,16}. Το σύστημα αναγέννησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει γλυκόζη, αφυδρογονάση της γλυκόζης (E_c) από *Bacillus* (για NAD(P)H) (Σχήμα 7).¹⁷ Με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται καταλυτική ποσότητα του συνενζύμου βοηθώντας στην ελάττωση του κόστους των ενζυμικών αντιδράσεων.



Σχήμα 7

Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας πάνω σε ασύμμετρες αναγωγές, σε υποστρώματα όπως α-αλκυλο-β-κετοεστέρες, 2-υποκατεστημένες-1,3-δικετόνες, 1,3-δικετόνες, 1,3-κετο-εστέρες, α-αλκυλο-β-υδροξύ κετόνες, 1,3 διόλες, καταλυόμενες από απομονωμένες NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες, έχουν δείξει ότι αυτοί οι βιοκαταλύτες επιδεικνύουν εξαιρετική εναντιο- και διαστεροεκλεκτικότητα με ποσοτικές (~100%) μετατροπές, υψηλή καταλυτική ικανότητα.¹⁸ Τα ένζυμα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης με μεγάλη επιτυχία στη χημειοενζυμική σύνθεση φερομονών όπως η Sitophilure^{18c,19}, Sitophilate^{18c,19}, Stegobinone²⁰ και Stegobiol²⁰ (Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Στεροεκλεκτικές αναγωγές με κετορεδουκτάσες

Στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στόχος είναι η χημειοενζυμική σύνθεση δυο φυσικών προϊόντων, της Rugulactone και της Maurenone. Στα επόμενα δύο Κεφάλαια παρουσιάζονται τα δύο συνθετικά σχήματα, στα οποία οι ενζυμικές αναγωγές αποτελούν τα στάδια-κλειδιά για την εισαγωγή της απαιτούμενης στερεοαπεικόνισης των τελικών ενώσεων στόχων.

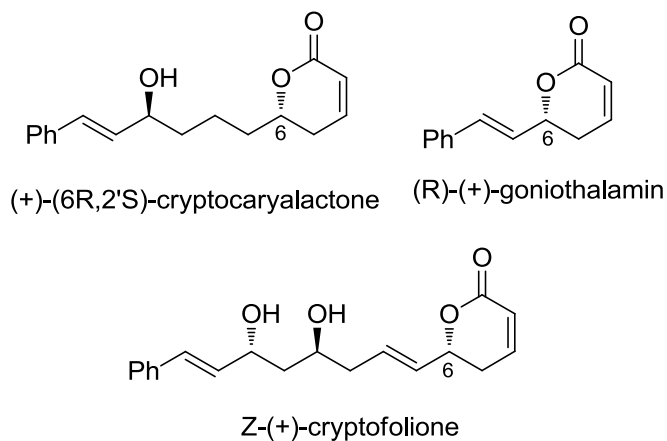
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ (*R*)-RUGULACTONE

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την διάρκεια της ιστορίας του ανθρώπινου γένους, τα φυτά έχουν αποτελέσει μια ανεξάντλητη πηγή φυσικών προϊόντων για την παραγωγή φαρμακευτικών θεραπευτικών ουσιών. Τα χημικά συστατικά των φυτικών κυττάρων τα οποία εκδηλώνουν βιολογικές δράσεις σε ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα, ανάλογα με την σχετική τους συγκέντρωση στα φυτά και την πρωταρχική λειτουργία τους, κατανέμονται σε δυο κύριες ομάδες: στους πρωτογενείς μεταβολίτες, η συσσώρευση των οποίων καλύπτει θρεπτικές και δομικές ανάγκες και στους δευτερογενείς μεταβολίτες που δρουν σαν ορμόνες, φαρμακευτικές ουσίες και τοξίνες.²¹

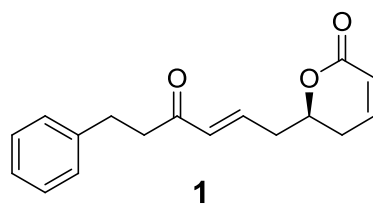
Την τελευταία δεκαετία πολλοί ερευνητές έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους σε φυσικά προϊόντα με σκελετό α,β-κορεσμένες α-πυρόνες. Οι ενώσεις αυτές περιέχουν σαν δομική μονάδα ένα εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο όπου έχουν στερεογονικό κέντρο στον C₆ και είναι υποκατεστημένες από μια αλκυλο αλυσίδα στον C₆. Είναι γνωστό ότι αυτοί οι μεταβολίτες έχουν μια ποικιλία βιολογικών δράσεων όπως αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιακή, αντιοξειδωτική, αντιδιαβητική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική κ.ά.^{22,23} (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Δομές φυσικών δ-λακτονών

Το 2009 ο Cardellina και οι συνεργάτες του απομόνωσαν για πρώτη φορά την ένωση 6-(4-οξο-6-φαινυλ-εξ-2-ενυλ)-5,6-διυδρο-πυραν-2-όνη, μια νέα α-πυρόνη αλλιώς και (*R*)-rugulactone (**1**) η οποία εξάγεται από το φυτό *Cryptocarya rugulosa* της οικογενείας *Lauraceae* γνωστή και ως η κοινή μας δάφνη²⁴ (Σχήμα 10).

Η δάφνη από την αρχαιότητα ήταν γνωστή για τις αντισηπτικές, αντιφλεγμονώδεις και καταπραϋντικές ιδιότητες των φύλλων και των καρπών της. Ο Ιπποκράτης τη χορηγούσε ως αναλγητικό μετά τον τοκετό, σε διάφορα γυναικολογικά προβλήματα και για πλύσεις της κεφαλής και με το δαφνέλαιο θεράπευε τη στειρότητα. Ο Διοσκουρίδης συνιστούσε το αφέψημα της σε παθήσεις της κύστης και της μήτρας, τους λιωμένους καρπούς της στο άσθμα και στη φυματίωση και το χυμό τους σε περιπτώσεις βαρηκοΐας και κόπωσης. Το χρησιμοποιούσαν επίσης για να τονώσουν τα μαλλιά αλλά και να σκουραίνουν το χρώμα τους (και των βλεφαρίδων) βράζοντας μαζί φύλλα δάφνης και καρυδιάς.



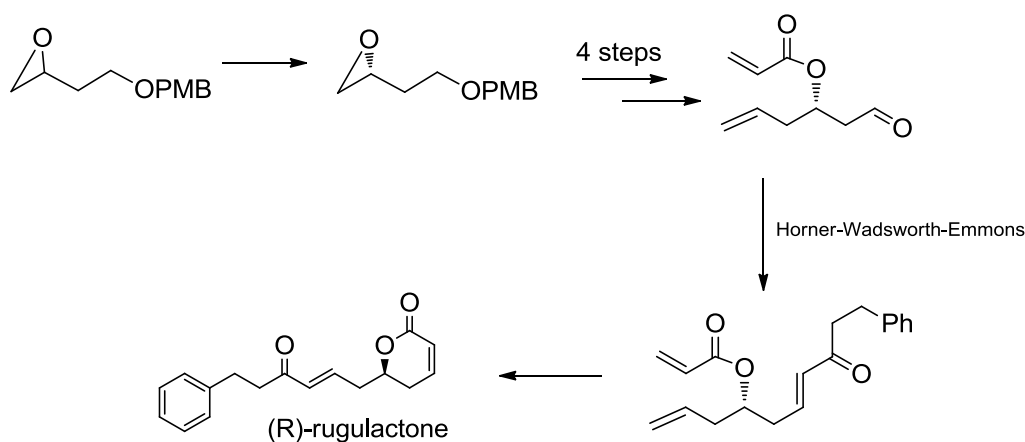
Σχήμα 10: Χημική δομή της (*R*)-rugulactone

Ο παράγοντας nF-KB χρησιμοποιείται ευρέως από τα ευκαρυωτικά κύτταρα ως ρυθμιστής των γονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Στα κύτταρα όγκων ο παράγοντας nF-KB είναι ενεργός και αυτό είτε οφείλεται στις μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν τους παράγοντες μεταγραφής nF-KB, είτε στα γονίδια που ελέγχουν τη δραστηριότητα nF-KB (όπως τα γονίδια IκB). Επιπλέον μερικά κύτταρα όγκων εκκρίνουν τους παράγοντες που αναγκάζουν τον παράγοντα nF-KB να γίνει ενεργός. Κατά συνέπεια, ο παράγοντας nF-KB αποτελεί το αντικείμενο πολύ ενεργού έρευνας στις φαρμακοβιομηχανίες με στόχο την θεραπεία κατά του καρκίνου. Πολλά φυσικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένης και της (*R*)-rugulactone, βρέθηκε ότι αναστέλλουν τη δράση του πυρηνικού παράγοντα-kB (nF-kB) που ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων.^{24,25}

Η απομόνωση της ουσίας από τα εκχυλίσματα φύλλων δάφνης για την παραγωγή κατάλληλων αντικαρκινικών φαρμάκων δεν είναι οικονομικά συμφέρουσα

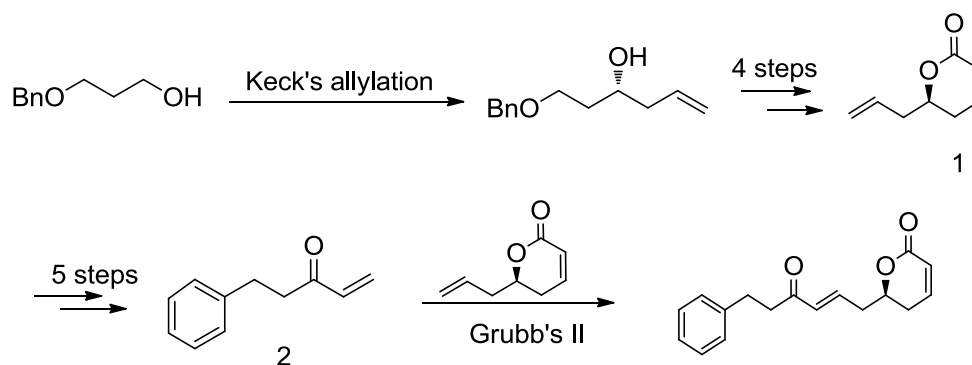
διότι γίνεται σε μικροποσότητες (7 mg απομονώνονται από το εκχύλισμα 725g φύλλων).

Από το 2009 που απομονώθηκε έχουν πραγματοποιηθεί συνολικά επτά συνθέσεις της (*R*)-rugulactone.²⁶ Η πρώτη σύνθεση έγινε από τον Yadav και την ερευνητική ομάδα του το 2009 και περιλαμβάνει τον κινητικό διαχωρισμό μέσω υδρόλυσης του εποξειδίου (Jacobsen's hydrolytic kinetic resolution), την αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons καθώς και μια αντίδραση κυκλοποίησης σαν στάδια-κλειδιά^{26α} (Σχήμα 11).



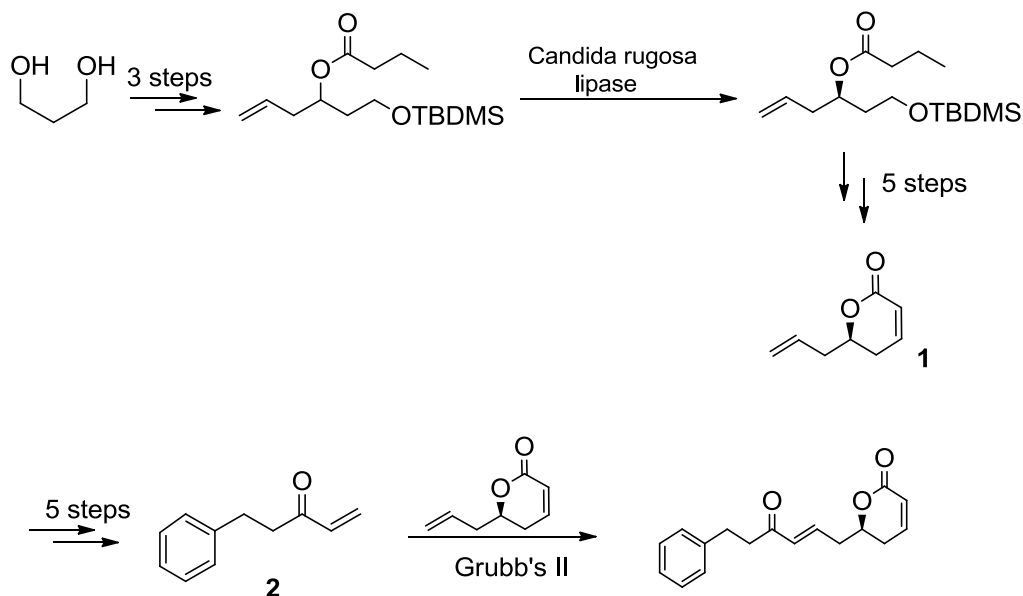
Σχήμα 11: Συνθετική πορεία του Yadav.

Η δεύτερη σύνθεση έγινε από την ερευνητική ομάδα του Venkateswarlu στην Ινδία το 2010 με στάδια κλειδιά την ασύμμετρη αλλυλίωση Keck's και την cross μετάθεση Grubb's^{26β} (Σχήμα 12)



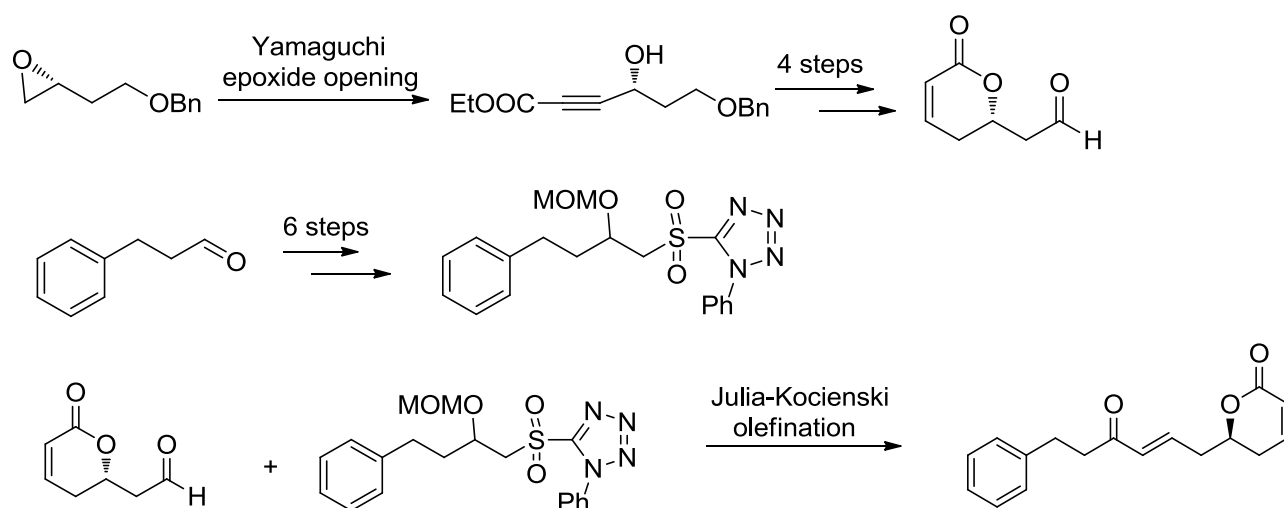
Σχήμα 12: Συνθετική πορεία του Venkateswarlu.

Μια διαφορετική προσέγγιση είναι αυτή που προτάθηκε από την ερευνητική ομάδα του Fadnavis, όπου έγινε χημειοενζυμική σύνθεση των δύο εναντιομερών (*R*) και (*S*) του φυσικού προϊόντος καταλυόμενη από την λιπάση *Candida rugosa*^{26c} (Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Χημειοενζυμική σύνθεση του Fadnavis

Η πιο πρόσφατη σύνθεση έγινε από τον Barua το 2011 με στάδια κλειδιά μια αντίδραση διάνοιξης εποξειδίου Yamaguchi και μια αντίδραση ολεφινίωσης Julia-Kocienski^{26d} (Σχήμα 14).



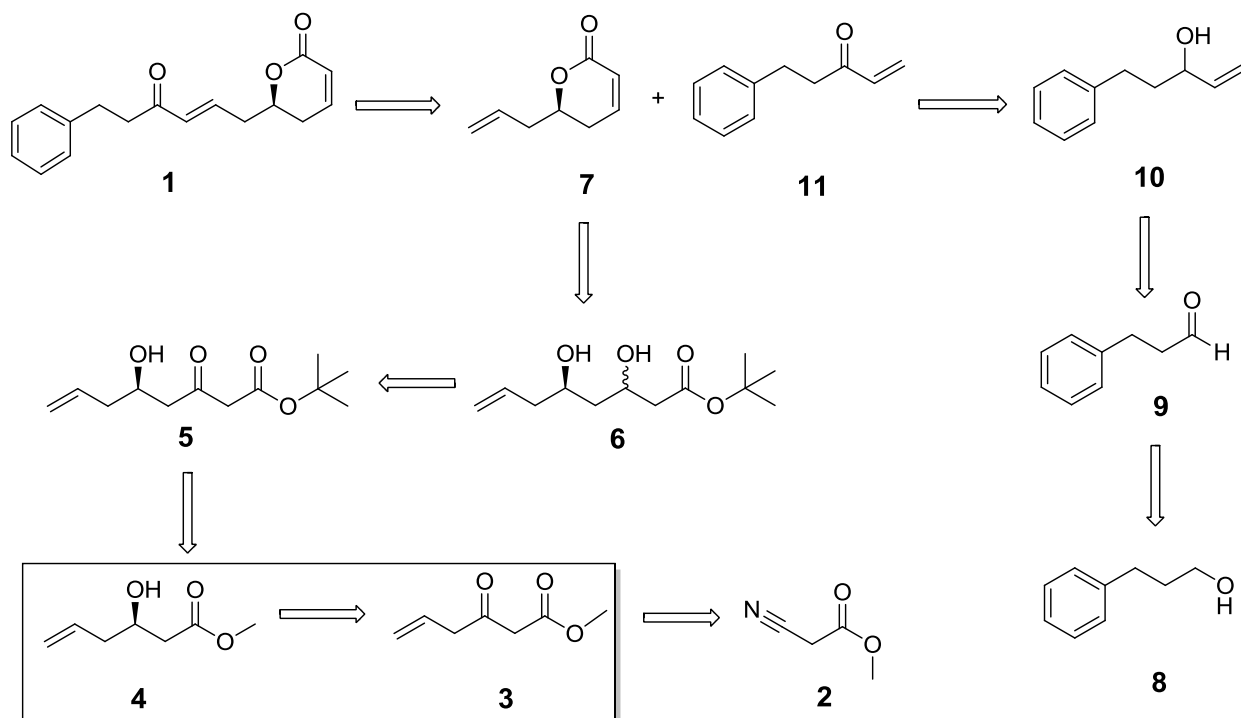
Σχήμα 14: Συνθετική πορεία του Barua

Οι άλλες τρεις συνθέσεις περιλαμβάνουν μια αντίδραση κυκλοποίησης που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ποικίλων ενδιάμεσων.^{26e,26f,26g} Καμία από τις μέχρι τώρα γνωστές μεθόδους για τη σύνθεση της (*R*)-rugulactone δεν είναι αρκετά πρακτική γιατί πραγματοποιήθηκαν με πολλά συνθετικά βήματα και με χαμηλές αποδόσεις, αλλά ούτε και οικονομική γιατί χρησιμοποιήθηκαν ακριβά αντιδραστήρια.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-rugulactone με τη χρήση κετορεδουκτασών για τη στερεοεκλεκτική αναγωγή ενός β-κετο εστέρα που είναι και η αντίδραση κλειδί του συνθετικού σχήματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

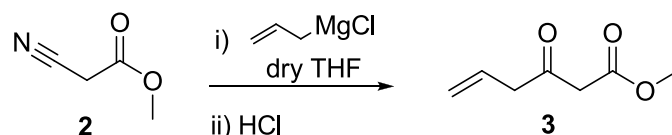
Βασιζόμενοι στην προηγούμενη εμπειρία της ερευνητικής μας ομάδας στο πεδίο των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, όπως παρουσιάστηκε στην εισαγωγή, επιλέχθηκε η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή με απομονωμένες κετορεδουκτάσες, μια από τις αποτελεσματικότερες μεθόδους για την στερεοεκλεκτική αναγωγή β-κετο εστέρων, σαν στάδιο κλειδί στην πορεία για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-rugulactone (**1**). Δεδομένου ότι το φυσικό προϊόν είναι μία οπτικά ενεργή δ-λακτόνη, θα μπορούσε να συντεθεί από τα εμπορικά διαθέσιμα 2-κυανο-οξικό μεθυλο εστέρα (**2**) και 3-φαινυλο-προπαν-1-όλη (**8**) Παρακάτω παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σύνθεσης της (*R*)-rugulactone (Σχήμα 15).



Σχήμα 15: Ρετροσύνθεση της (*R*)-rugulactone

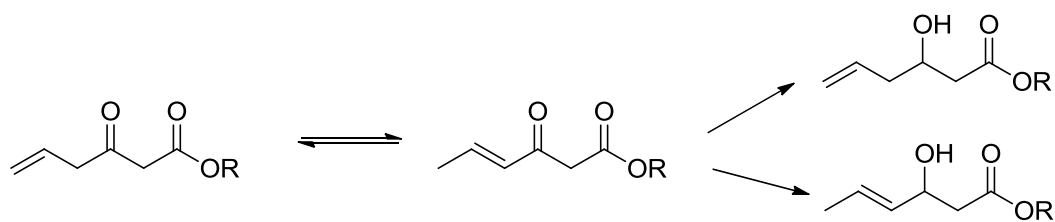
Στην παρούσα εργασία η σύνθεση του φυσικού προϊόντος μπορεί να γίνει με αντίδραση cross μετάθεσης με καταλύτη Grubbs 2^{ης} γενιάς ανάμεσα στα ενδιάμεσα **11** και **7**. Το ενδιάμεσο **7** μπορεί να σχηματιστεί με κυκλοποίηση του β,δ-διυδροξυ εστέρα **6**, ο οποίος μπορεί να προέλθει από τον δ-υδρόξυ-β-κετο εστέρα **5** με χημική αναγωγή. Η ένωση **5** μπορεί να σχηματιστεί με συμπύκνωση Claisen του υδροξυ εστέρα **4** με τον εμπορικά διαθέσιμο tert-βουτυλο-οξικό μεθυλο εστέρα. Το στάδιο κλειδί της σύνθεσης είναι η ενζυμική αναγωγή του 3-οξο-5-εξενοϊκού μεθυλο εστέρα **3**, ο οποίος μπορεί να σχηματιστεί με αντίδραση Grignard από τον εμπορικά διαθέσιμο από τον 2-κυανο-οξικό μεθυλο εστέρα **2**. Το ενδιάμεσο **11** μπορεί να προέλθει από την αλκοόλη **10** με οξείδωση, η οποία μπορεί να σχηματιστεί με αντίδραση Grignard της αλδεύδης **9** με το κατάλληλο βρωμίδιο. Η αλδεύδη **9** μπορεί να σχηματιστεί με οξείδωση της εμπορικά διαθέσιμης 3-φαινυλ-προπαν-1-όλης (**8**).

Αναλυτικά λοιπόν η σύνθεση περιγράφεται παρακάτω. Ο 3-οξο-5-εξενοϊκός μεθυλεστέρας (**3**) δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος όμως μπορεί να παρασκευαστεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 2-κυανο-οξικό μεθυλο εστέρα **2** με αντίδραση Grignard και κατόπιν υδρόλυση ²⁸ (Σχήμα 16).



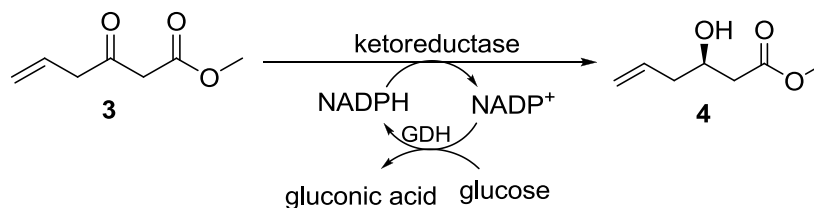
Σχήμα 16: Σύνθεση του 3-οξο-5-εξενοϊκού μεθυλεστέρα (**3**)

Όπως γνωρίζουμε από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου τα ένζυμα μας, παρουσιάζουν τη βέλτιστη δραστηριότητα τους στους 37 °C, αλλά το συγκεκριμένο υπόστρωμα όπως παρατηρήθηκε ότι ισομεριώνεται (Σχήμα 17). Με σειρά δοκιμαστικών πειραμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι κατάλληλες συνθήκες αναγωγής για το υπόστρωμα μας είναι σε θερμοκρασία 8-10 °C και pH = 6,9.



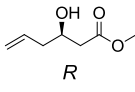
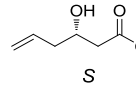
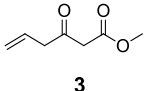
Σχήμα 17: Ισομερείωση του κετοεστέρα **3**

Στη συνέχεια με τον παραγόμενο κετο εστέρα **3** πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αναγωγές χρησιμοποιώντας σειρά κετορεδουκτασών. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου επιλέχθηκαν ενζυμα που επιδεικνύουν anti-Prelog εκλεκτικότητα για το σχηματισμό του *R* υδροξυ εστέρα. (Σχήμα 18) Τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων του β-κετο εστέρα **3** παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.



Σχήμα 18: Ενζυμική αναγωγή του 3-οξο-5-εξενοϊκού μεθυλεστέρα **3**

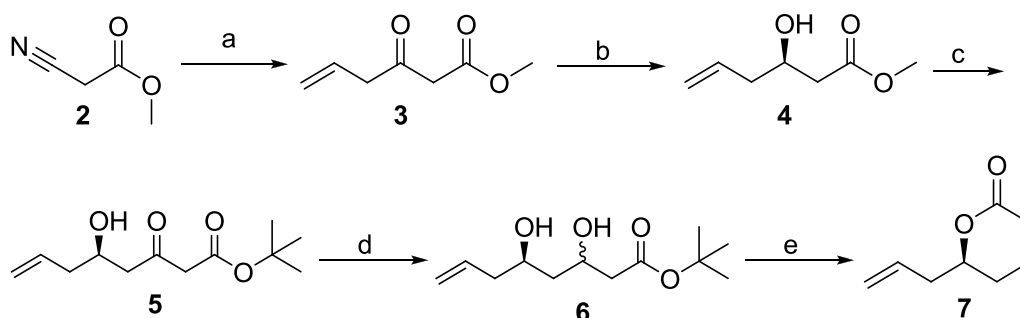
Πίνακας 2: Ενζυμική αναγωγή του 3-οξο-5-εξενοϊκού μεθυλεστέρα **3**

Υπόστρωμα	KRED	Συνθήκες αντίδρασης	Ποσοστό μετατροπής (24h) ^[α]	Εναντιομερική περίσσεια ee% ^[α]	 <i>R</i>	 <i>S</i>
 3	A1C	pH = 6,9	99%	99%	>99%	-
	A1D	8-10 °C	99%	60%	80%	20%

[α] Η εναντιομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη στήλη.

Ο κετο εστέρας **3** είναι σταθερός σε pH 6,9 και pH 7,2 αλλά ασταθής σε υψηλές θερμοκρασίες. Χαρακτηριστικά αποτελεσματικό ένζυμο ήταν η Kred-A1C που ολοκλήρωσε την αντίδραση σε 24 ώρες και σε θερμοκρασία 8-10 °C σχηματίζοντας μόνο το επιθυμητό προϊόν (>99%) με ποσοστό μετατροπής >99%.

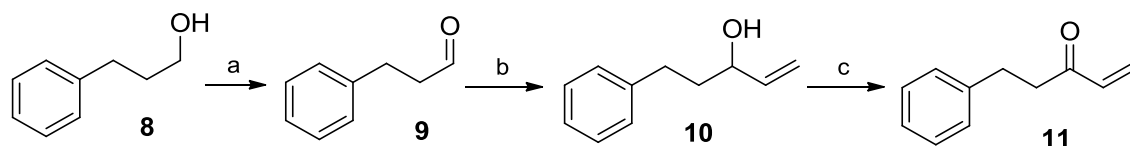
Στη συνέχεια, έχοντας συνθέσει ενζυμικά την ενδιάμεση ένωση **4** σε μεγάλη απόδοση και οπτική καθαρότητα, ακολουθήσαμε την παρακάτω συνθετική πορεία για τη σύνθεση του οπτικά ενεργού του ενδιάμεσου **7** (Σχήμα 19). Η συνολική απόδοση της σύνθεσης είναι 25,6%.



α) i) Αλλυλομαγνήσιο βρωμίδιο, ξηρό THF, 0°C-r.t 12h ii) HCl (1N), rt, 3h., απόδοση 40%, β) KRED-A1C, NADPH, 8-10 °C, 99% μετατροπή, >99% ee. γ) LDA, τριτ- οξικός βουτυλο εστέρας, ξηρό THF, -78 - -40°C, 80% απόδοση. δ) NaBH₄, ξηρή αιθανόλη, 0°C-r.t, 90% απόδοση. ε) p-TSOH, τολουόλιο, reflux. 90% απόδοση.

Σχήμα 19: Χημειοενζυμική σύνθεση της 6-αλλυλο-5, 6-διυδρο-πυραν-2-όνης (**7**)

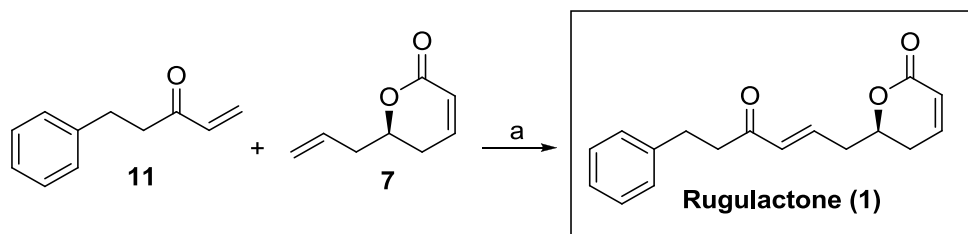
Για τη σύνθεση της ενδιάμεσης 5-φαινυλο-πεντ-1-εν-3-όνης (**11**) ακολουθήθηκε μια γνωστή συνθετική πορεία (Σχήμα 20) αρχίζοντας από την εμπορικά διαθέσιμη 3-φαινυλο-προπαν-1-ολη **8**.^{26b} Η συνολική απόδοση της σύνθεσης είναι 69,6%.



a) PCC, ξηρό CH₂Cl₂, r.t απόδοση 90%, b) βινυλομαγνήσιο βρωμίδιο, ξηρό THF, 0°C - rt, 1 h, 86%; c) PCC, ξηρό CH₂Cl₂, r.t απόδοση 90% .

Σχήμα 20: Σύνθεση της ενδιάμεσης 5-φαινυλο-πεντ-1-εν-3-όνης (**11**) .

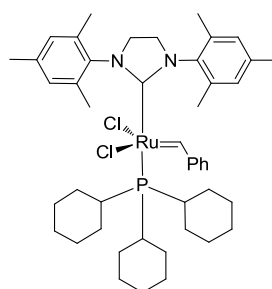
Η τελική σύνθεση της *R*-rugulactone έγινε από τις πρόδρομες ενώσεις **7** και **11** με αντίδραση cross μετάθεσης με καταλύτη Grubbs 2^{ης} γενιάς (Σχήμα 21).



a) Grubb's 2^{ης} γενιάς καταλύτης (5 mol %), ξηρό CH₂Cl₂, reflux, 12 h, 74%.

Σχήμα 21: Τελική σύνθεση της *R*-rugulactone .

Καταλύτης Grubbs 2^{ης} γενιάς



Συνοψίζοντας στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάστηκε η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-rugulactone, το οποίο εξάγεται από το φυτό *Cryptocarya rugulosa*, απομονώθηκε πρόσφατα και έχει βιολογική δραστηριότητα. Για τη σύνθεση της χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένες κετορεδουκτάσες, οι οποίες συνέβαλαν στη δημιουργία του στερεογονικού κέντρου της ένωσης αυτής με πολύ υψηλή στερεοεκλεκτικότητα, και υψηλή οπτική καθαρότητα. Το στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα σε μεγαλύτερη κλίμακα. Αναπτύχθηκε μία συνθετική μέθοδος, η οποία αρχίζει από τις εμπορικά διαθέσιμες αρχικές ενώσεις 2-κυανο-οξικό μεθυλο εστέρα **2** για τη σύνθεση της ενδιάμεσης 6-αλλυλο-5,6-διυδρο-πυραν-2-όνης (**7**), και 3-φαινυλ-προπαν-1-όλης (**8**) για τη σύνθεση της ενδιάμεσης 5-φαινυλ-πεντ-1-εν-3-όνης (**10**). Η σύνθεση του τελικού προϊόντος (*R*)-rugulactone ολοκληρώθηκε με την αντίδραση cross μετάθεσης με καταλύτη Grubbs 2^{ης} γενιάς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

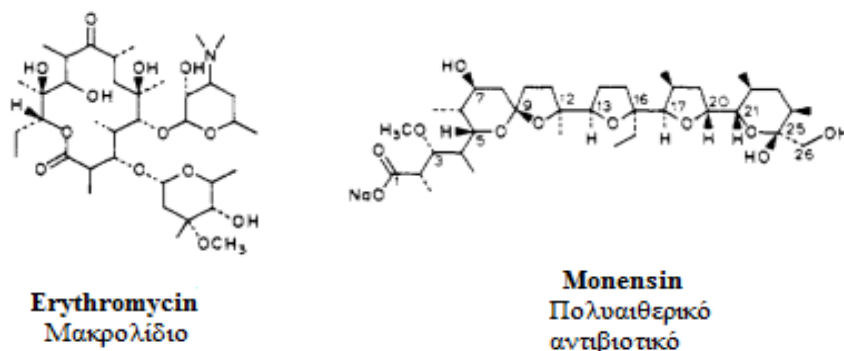
ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ *MAURENONE*

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο μέρος της ερευνητικής κοινότητας έχει δείξει ενδιαφέρον για τα προϊόντα που απομονώνονται από θαλάσσια μαλάκια, όπως τα είδη *Siphonaria*. Υπάρχουν περίπου σαράντα είδη *Siphonaria* της οικογενείας *Siphonariidae*, και τα περισσότερα εκτίθενται στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας του Ρόττερταμ στην Ολλανδία. Είναι ενδημικά σε εύκρατες ζώνες, όπως η Νέα Ζηλανδία και η Λατινική Αμερική και το κάθε είδος έχει διαφορετικό όστρακο και χαρακτηριστικά. Μοιάζουν με πεταλίδες και θεωρούνται αμφίβια γιατί έχουν πνεύμονες και βράγχια. Προσκολλούνται στους βράχους για να προστατευτούν από την ξηρασία στη διάρκεια αμπτώτιδας προσαρμόζοντας καλά το όστρακο τους στα βράχια σκάβοντας ένα μικρό κοίλωμα και όταν γίνεται πλημμυρίδα μετακινούνται έρποντας και τρέφονται κυρίως με άλγη που βρίσκεται στους βράχους και στις πισίνες²⁹ (Εικόνα 1).



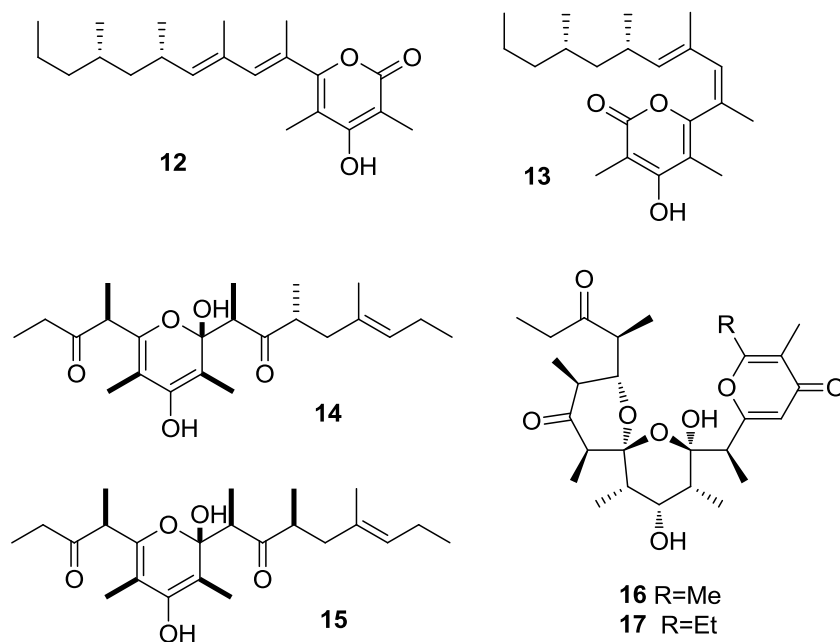
Εικόνα 1: Είδη *Siphonaria* .

Η χημεία των γαστερόποδων μαλακίων της οικογενείας *Siphonariidae* χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυπροπιονικών δευτερογενών μεταβολιτών, που έχουν κοινή βιοσύνθεση με τα μακρολίδια, τα οποία είναι διακλαδισμένες αλυσίδες πολυοξυγονωμένων καρβοξυλικών λακτονών, και τα πολυαιθερικά αντιβιοτικά που είναι διακλαδισμένες αλυσίδες πολυοξυγονωμένων καρβοξυλικών οξέων³⁰ (Σχήμα 22).



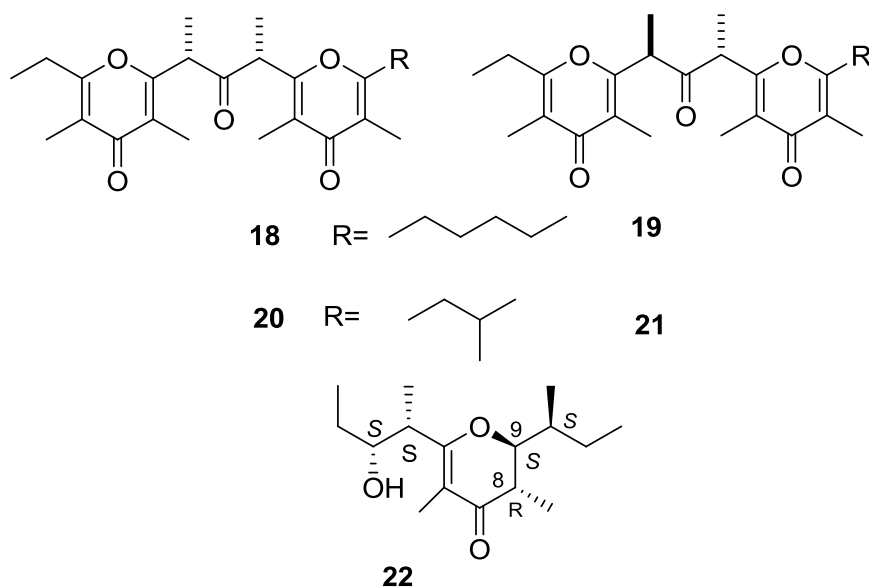
Σχήμα 22: Δομές erythromycin και monensin

Οι πολυπροπιονικοί μεταβολίτες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες,³¹ τις α-πυρόνες, όπως οι ενώσεις diemenensis A (**12**) και B (**13**) του είδους *Siphonaria diemenensis*³², τους απλούς πολυπροπιονικούς εστέρες, όπως οι ενώσεις denticulatin A (**14**) και B (**15**) που προέρχονται από το είδος *Siphonaria denticulate*³³ και τις γ-πυρόνες όπως οι siphonarins A (**16**) και B (**17**) από το *Siphonaria zelandica*³⁴ (Σχήμα 23). Το κύριο πρόβλημα στη διεκρίνιση της δομής των πολυπροπιονικών μεταβολιτών είναι ο προσδιορισμός της στερεοδομής μη κρυσταλλικών ενώσεων, ειδικά αυτών που δεν έχουν συνεχόμενα χειρόμορφα κέντρα.³⁵



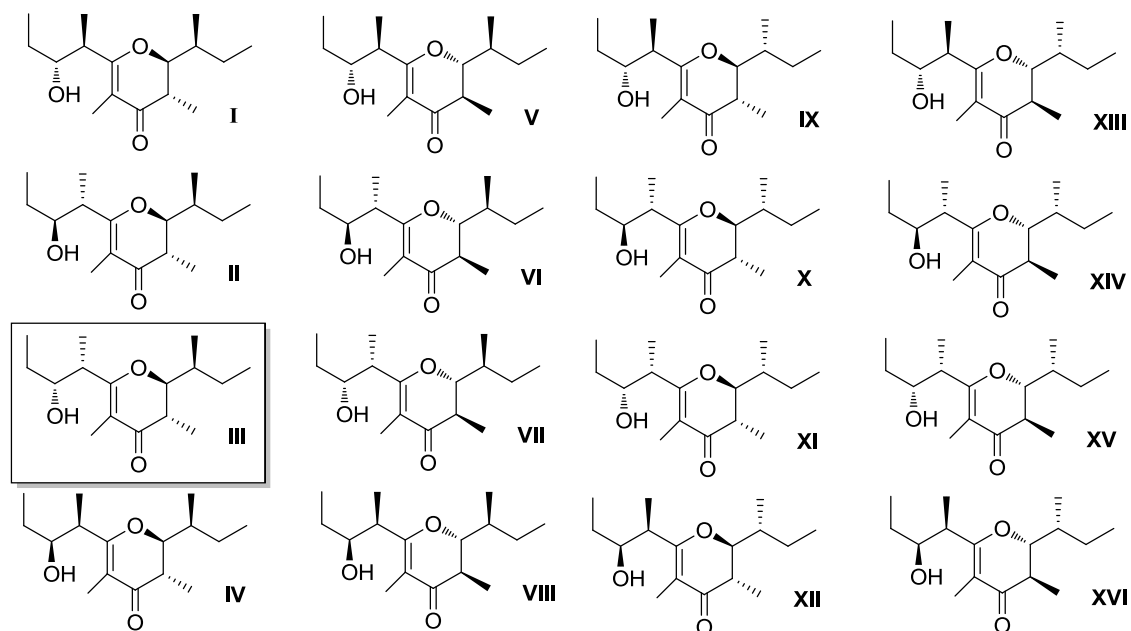
Σχήμα 23: Δομές πολυπροπιονικών μεταβολιτών

Το 1986 συλλέχθηκαν από τον Faulkner και τους συνεργάτες του δείγματα του είδους *Siphonaria maura* από την παραλία Jaco στην Costa Rica, το όστρακο του οποίου έχει στρογγυλό σχήμα και ακτινωτές προεξοχές στην εξωτερική του επιφάνεια, στην περιφέρειά του έχει δόντια και στο εσωτερικό του γαλάζιους ιριδισμούς. Το είδος αυτό περιέχει πέντε νέους πολυπροπιονικούς μεταβολίτες, οι οποίοι αποτελούνται από δυο ζεύγη διαστερεοισομερών, τις mauryarones A-D (**18-21**) και την maurenone (**22**)³⁶ (Σχήμα 24).



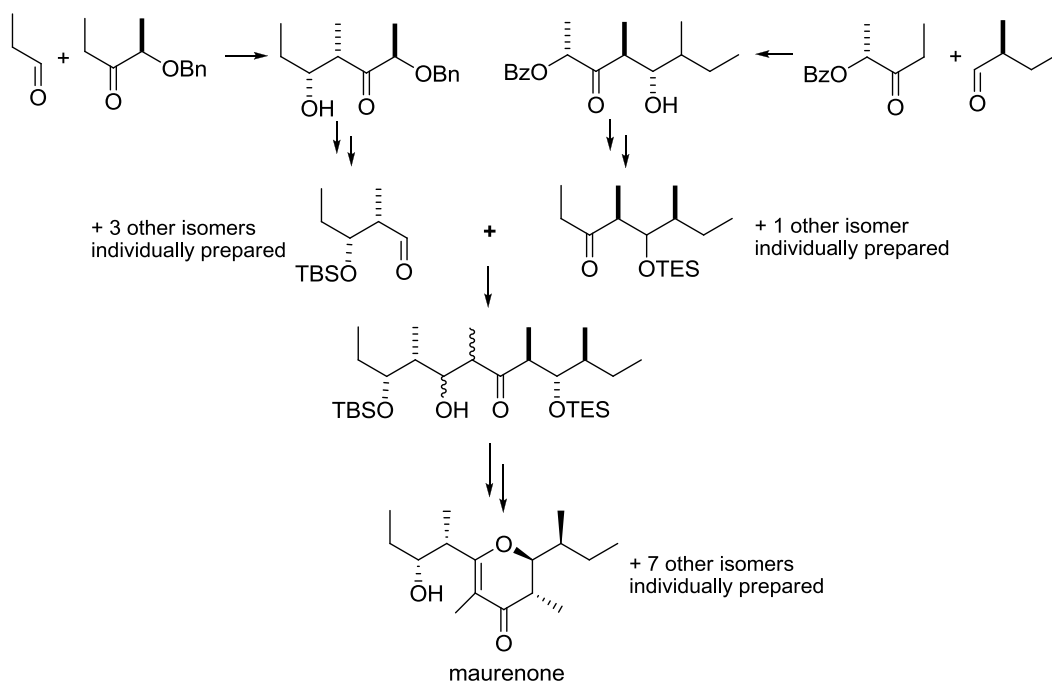
Σχήμα 24: Δομές των mauryarones A-D και της maurenone

Δεδομένου ότι η σχετική στερεοδομή της maurenone ανάμεσα στον C₈ και C₉ είναι αντι τότε υπάρχουν 16 πιθανά στερεοϊσομερή εκ των οποίων ένα αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν (Σχήμα 25).



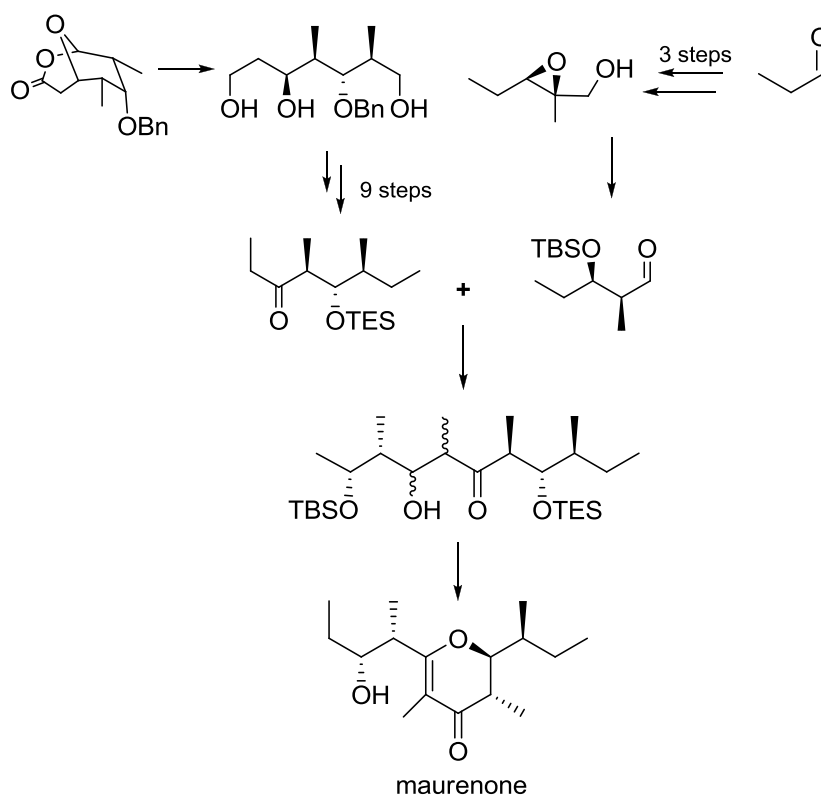
Σχήμα 25: Πιθανά στερεοϊσομερή της maurenone

Ο Perkins και οι συνεργάτες του συνέθεσαν οκτώ στερεοϊσομερή (**I-VIII**), προκειμένου να προσδιορίσουν την απόλυτη στερεοδομή το φυσικού ισομερούς. Με σύγκριση των φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών δεδομένων μεταξύ του φυσικού προϊόντος και των στερεοϊσομερών ενώσεων, απέδειξαν ότι η βιολογικά δραστική μορφή είναι η (2*S*,3*S*)-2,3-διυδρο-6-((1'*S*,2'*R*)-2-υδοξυ-1-μεθυλβουτυλο)-3,5-διμεθυλο-2-((1''*S*)-1-μεθυλπροπυλο)-4*H*-πυραν-4-όνης³⁷ (Σχήμα 26).



Σχήμα 26: Συνθετική πορεία του Perkins

Από τότε έχει δημοσιευτεί άλλη μια σύνθεση της ένωσης αυτής από την ερευνητική ομάδα του Reddy όπου τα στάδια κλειδιά ήταν μια διάνοιξη εποξειδίου και μια ασύμμετρη υδροβορίωση ενός meso-δικυκλικού διυδροφουρανίου.³⁸

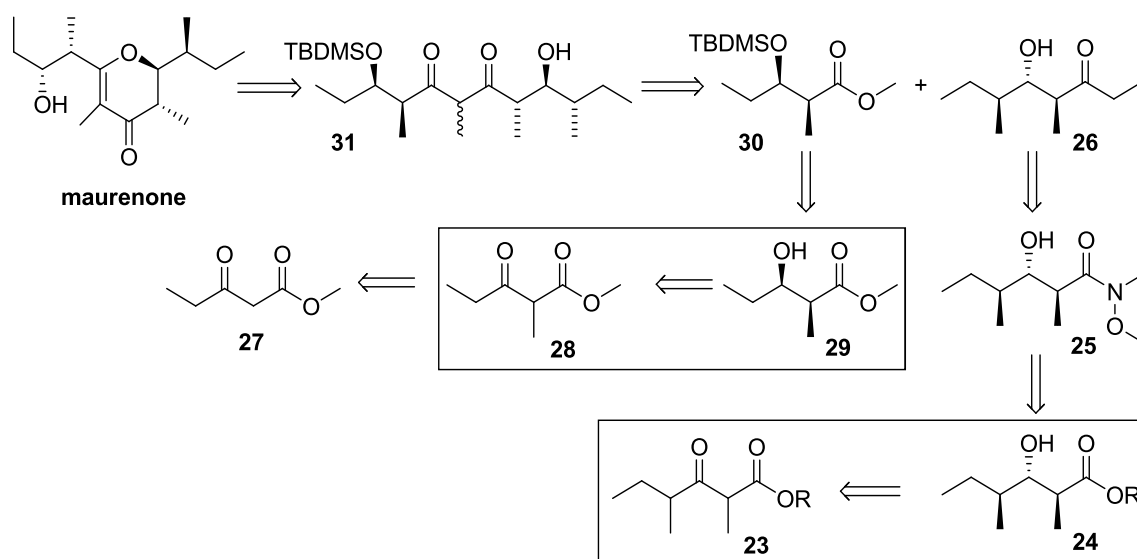


Σχήμα 27: Συνθετική πορεία του Reddy

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η πρώτη προσπάθεια για την χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος Maurenone με τη χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών, χρησιμοποιώντας σαν αντίδραση κλειδί την στερεοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή με κετορεδουκτάσες 1,3-δικετο εστέρων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεδομένου ότι το φυσικό προϊόν maurenone (**22**) είναι μια οπτικά ενεργή γ-υδροξυ πυρόνη με 5 στερεογονικά κέντρα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η ασύμμετρη ενζυμική αναγωγή ως στάδιο-κλειδί για την επίτευξη της σύνθεσης των οπτικά ενεργών ενδιάμεσων. Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου πάνω σε ενζυμικές αναγωγές σε α-αλκυλο-β-κετο εστέρες και τη χημειοενζυμική σύνθεση της φερομόνης stegobiol¹⁸ η οποία έχει παρόμοια δομή με την maurenone, επιλέχθηκε η χημειοενζυμική μεθοδολογία για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος. Παρακάτω παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σύνθεσης της maurenone. (Σχήμα 28)

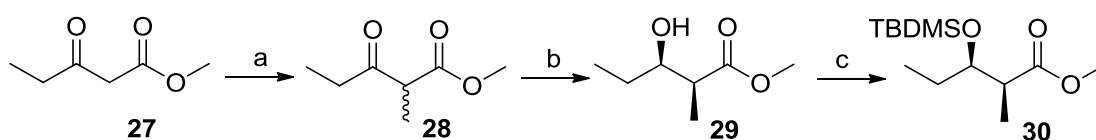


Σχήμα 28: Ρετροσυνθετική πορεία της maurenone.

Στην παρούσα εργασία η σύνθεση του φυσικού προϊόντος προσεγγίστηκε με την κυκλοποίηση και αποπροστασία της υδροξυ-διόνης **31** η οποία μπορεί να προέρθει από τον προστατευμένο υδροξυ-εστέρα **30** και την υδροξυ-κετόνη **26** με αντίδραση Claisen. Η υδροξυ κετόνη **26** μπορεί να προέλθει από το Weinreb αμίδιο **25**, το οποίο μπορεί να σχηματιστεί από τον υδροξυ εστέρα **24**, ο οποίος μπορεί να προέλθει από τον αντίστοιχο κετο εστέρα **23** με ενζυμική αναγωγή.

Η χημειοενζυμική σύνθεση του ενδιάμεσου **29** είχε πραγματοποιηθεί στο παρελθόν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου στα πλαίσια της χημειοενζυμικής σύνθεσης της φερομόνης *sitophilate*.²⁰ Το τελικό ενδιάμεσο **30** σχηματίζεται με αντίδραση προστασίας.

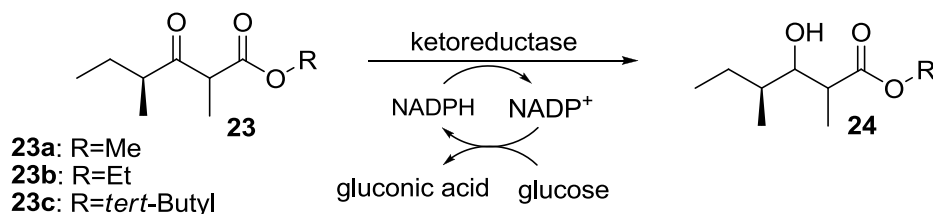
Για τη σύνθεση λοιπόν του ενδιάμεσου **30** ξεκινήσαμε αρχικά από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξο πεντανοϊκό μεθυλεστέρα **27**, ο οποίος εύκολα και ποσοτικά μετατράπηκε με αντίδραση μεθυλίωσης στον 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκό μεθυλεστέρα **28**. Ο κετο εστέρας **28** μετατράπηκε στον οπτικά ενεργό υδροξυ εστέρα **29** με ενζυμική αναγωγή με την KRED-A1C (2 ώρες επώασης στους 37 °C). Κατά τη βιομετατροπή αυτή, η διαστερεομερική περίσσεια του προϊόντος ήταν 90%, ενώ η εναντιομερική περίσσεια >99% όπως προσδιορίστηκε από αέρια χρωματογραφία. Τελικά η ένωση **30** σχηματίστηκε με αντίδραση προστασίας του υδροξυλίου με *τρι-βουτυλο διμεθυλο σιλυλο χλωρίδιο* (TBDMSCl) (Σχήμα 29).



a. K₂CO₃, MeI, ξηρή ακετόνη, reflux, >99% απόδοση; b. KRED-A1C, NADPH, rt, 99% απόδοση, 90% de, >99% ee; c. TBDMSCl, imidazole, DMF, rt, 85% απόδοση; (ολική απόδοση 83%).

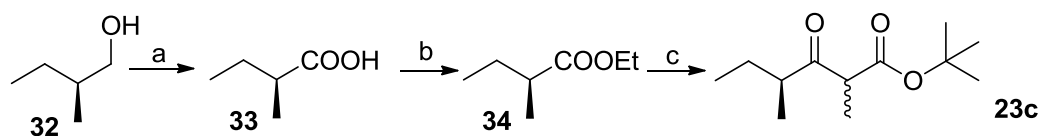
Σχήμα 29: Χημειοενζυμική σύνθεση του ενδιαμέσου **30**.

Για τη σύνθεση του ενδιάμεσου **26**, μελετήθηκε η ενζυμική αναγωγή τριών α,γ-διμεθυλο-β-κετοεστέρων με 25 NADPH -εξαρτώμενες, απομονωμένες κετορεδουκτάσες, παρουσία αφυδραγονάσης της γλυκόζης σαν ανακυκλωτικό του NAD(P)H. Ο στόχος ήταν να εντοπιστεί το ένζυμο που θα ανάγει στερεοεκλεκτικά τον αρχικό εστέρα προς τον αντίστοιχο *anti* υδροξυ-εστέρα (Σχήμα 30).



Σχήμα 30: Ενζυμική αναγωγή των α-μεθυλο-β-κετοεστέρων **23a**, **23b**, και **23c** με κετορεδοκτάσες.

Το πρώτο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν ο 2,4-διμεθυλο-3-οξο-εξανικός τριτ-βουτυλεστέρας (**23c**). Η σύνθεση του ξεκίνησε από την εμπορικά διαθέσιμη (*S*)-2-μεθυλο-1-βουτανόλη **32** η οποία εύκολα και ποσοτικά οξειδώθηκε προς το (*S*)-2-μεθυλο-1-βουτανικό οξύ (**33**) και στη συνέχεια με αντίδραση εστεροποίησης σχηματίστηκε ο (*S*)-2-μεθυλο-1-βουτανικός αιθυλεστέρας (**34**). Ακολούθησε αντίδραση Claisen και μεθυλίωση οπότε συντέθηκε ο επιθυμητός εστέρας **23c** (Σχήμα 31). Η συνολική απόδοση της σύνθεσης ήταν 65%.

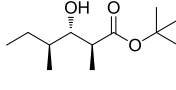
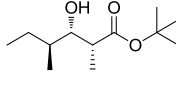
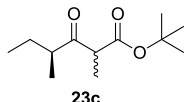


a. Jones, ακετόνη, rt, 90% απόδοση; b. K_2CO_3 , EtI, ξηρή ακετόνη, rt, 90% απόδοση; c. LDA, προπιονικός τριτ-βουτυλο εστερας, ξηρό THF, 0 - -78 °C, 85% απόδοση (ολική απόδοση 68%).

Σχήμα 31: Σύνθεση του κετοεστέρα **23c**.

Με τον κετοεστέρα **23c** πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις και τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 2 που ακολουθεί. Τα ποσοστά μετατροπής και η διαστεreoμερική περίσσεια προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία.

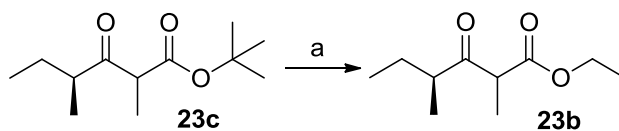
Πίνακας 2: Ενζυμική αναγωγή του κετοεστέρα **23c**

Υπόστρωμα	KRE D	Ποσοστό μετατροπής (24h) ^[α]	Διαστερομερικ ή περίσσεια de% ^[α]	 <i>anti</i>	 <i>syn</i>
 23c	101	64%	72%	86%	14%
	112	10%	76%	88%	12%
	115	11%	20%	40%	60%
	118	24%	>99%	>99%	-

[α] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι οι κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν δεν επέδειξαν την επιθυμητή δραστικότητα και στερεοεκλεκτικότητα στην αντίδραση αναγωγής του κετοεστέρα **23c** οδηγώντας σε προϊόντα με χαμηλή διαστερομερική περίσσεια και χαμηλά ποσοστά μετατροπής. Μόνο η KRED-118 ολοκλήρωσε την αντίδραση σε 24 ώρες και σχημάτισε μόνο ένα από τα δύο διαστερομερή, το *anti*, σε οπτικά καθαρή μορφή αλλά με χαμηλό ποσοστό μετατροπής. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι με στήλη χρωματογραφίας διαχωρίστηκε το *syn* από το *anti* διαστερομερές του οπτικά ενεργού κετο εστέρα **24c**. Αυτό έγινε ώστε να προσδιοριστεί μέσω φασματοσκοπίας ¹H NMR η σχετική στερεοαπεικόνιση των δύο διαστερομερών (*syn* – *anti*).^{18c} Για τη βελτίωση της στερεοεκλεκτικότητας και δραστικότητας επιλέχθηκε μια μικρή τροποποίηση του υποστρώματος, οπότε συντέθηκε ο μικρότερου μεγέθους κετοεστέρας **23b**

Η σύνθεση του εστέρα **23b** πραγματοποιήθηκε με αντίδραση μετεστεροποίησης από τον κετο εστέρα **23c**. Η συνολική απόδοση της σύνθεσης ήταν 52% (Σχήμα 32).

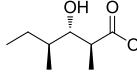
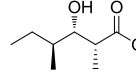
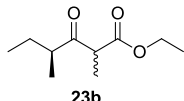


a. Bu₂SnO, ξηρή αιθανόλη, reflux, 24h, 80% απόδοση

Σχήμα 32: Σύνθεση του κετοεστέρα **23b**

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις με τον κετοεστέρα **23b** και τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 3 που ακολουθεί.

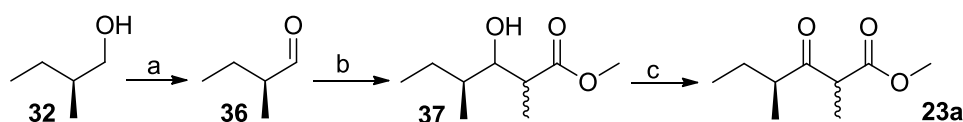
Πίνακας 3: Ενζυμική αναγωγή του κετοεστέρα **23b**

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (24h) ^[α]	Διαστερομερική περίσσεια de% ^[α]	 <i>anti</i>	 <i>syn</i>
 23b	101	20%	20%	60%	40%
	114	60%	30%	65%	35%
	115	44%	34%	67%	33%
	A1F	10%	78%	89%	11%

[α] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειαρόμορφη στήλη

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3 φαίνεται ότι οι κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν δεν επέδειξαν την επιθυμητή δραστηριότητα και στερεοεκλεκτικότητα στην αντίδραση αναγωγής του κετοεστέρα **23b** οδηγώντας σε προϊόντα με χαμηλή διαστερομερική περίσσεια και χαμηλά ποσοστά μετατροπής. Μόνο η Kred-A1F που ολοκλήρωσε την αντίδραση σε 24 ώρες και σχημάτισε το *anti* διαστερομερές, σε μεγαλύτερο ποσοστό αλλά με χαμηλό ποσοστό μετατροπής. Για τη βελτίωση της στερεοεκλεκτικότητας και δραστηριότητας επιλέχθηκε άλλη μια μικρή τροποποίηση του υποστρώματος οπότε συντέθηκε ο ακόμη μικρότερου μεγέθους κετο εστέρας **23a**.

Για τη σύνθεση του μεθυλο κετο εστέρα **23a** ξεκινήσαμε αρχικά από την εμπορικά διαθέσιμη (*S*)-2-μεθυλο-1-βουτανόλη (**32**) η οποία εύκολα και ποσοτικά μετατράπηκε στην (*S*)-2-μεθυλο-1-βουτανάλη με οξείδωση. Με αλδολική αντίδραση σχηματίστηκε ο υδροξυ εστέρας **37** ο οποίος οξειδώθηκε προς τον επιθυμητό κετο εστέρα **23a** (Σχήμα 33).

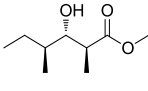
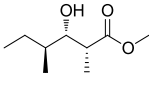
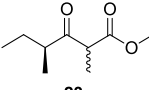


a. PCC, ξηρό διχλωρομεθάνιο, 0 °C- rt, 90% απόδοση; b. LDA, προπιονικός μεθυλ- εστερας, ξηρό THF, 0°C- -78 °C, 87% απόδοση c. Jones, ακετόνη, rt, 90% απόδοση

Σχήμα 33: Σύνθεση του κετοεστέρα **23a**

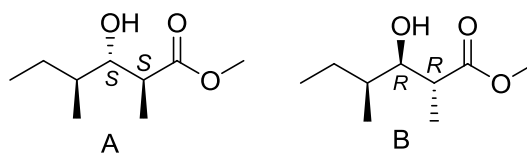
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις με τον κετοεστέρα **23b** και τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4 που ακολουθεί.

Πίνακας 4: Ενζυμική αναγωγή του κετοεστέρα **23a**

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (24h) ^[a]	Διαστερομερική περίσσεια de% ^[a]	 <i>anti</i>	 <i>syn</i>
 23a	101	20%	30%	65%	35%
	107	25%	30%	60%	40%
	108	30%	34%	65%	35%
	111	90%	80%	90%	10%

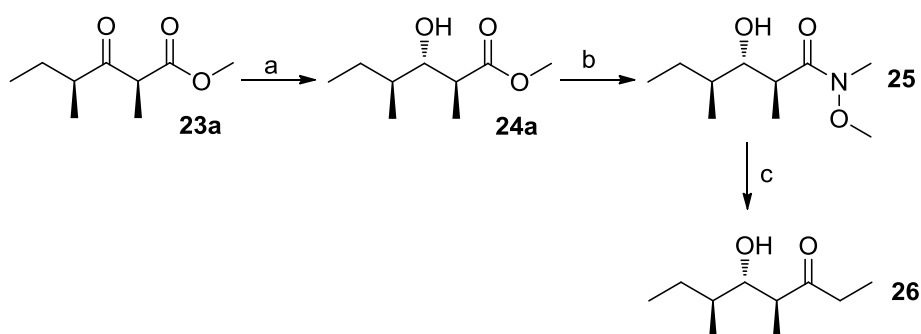
[a] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται ότι η Kred-111 επέδειξε υψηλή δραστηριότητα και στερεοεκλεκτικότητα στην αντίδραση αναγωγής του κετοεστέρα **23a**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24 ώρες σχηματίζοντας σε υψηλό ποσοστό 90% το *anti* στερεοϊσομερές, δηλαδή τον (2*S*,3*S*)-υδροξύ εστέρα ή τον (2*R*,3*R*)-υδροξύ εστέρα (Σχήμα 34). Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου, γνωρίζουμε ότι η Kred-111 επιδεικνύει εκλεκτικότητα Prelog για το σχηματισμό του *S* υδροξύ εστέρα, επομένως το προϊόν αναγωγής του κετοεστέρα **23a** με το ένζυμο Kred-111 είναι ο *anti*-(2*S*,3*S*)-υδροξύ εστέρας.



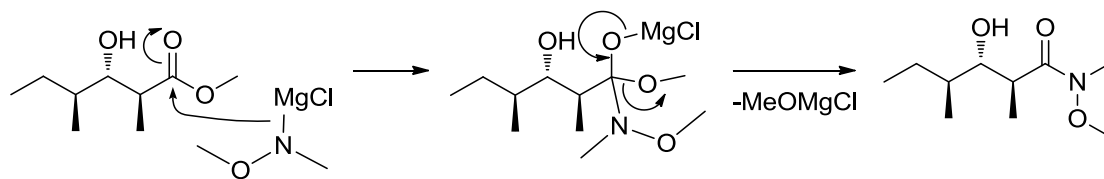
Σχήμα 34: Πιθανές δομές των *anti* διαστερεομερών.

Στη συνέχεια, έχοντας συνθέσει ενζυμικά την ενδιάμεση ένωση **24a** σε μεγάλη χημική και οπτική καθαρότητα, ακολουθήσαμε την παρακάτω συνθετική πορεία για τη σύνθεση του οπτικά ενεργού ενδιάμεσου **26**, όπως παρουσιάζεται παρακάτω στο Σχήμα 35.³⁹

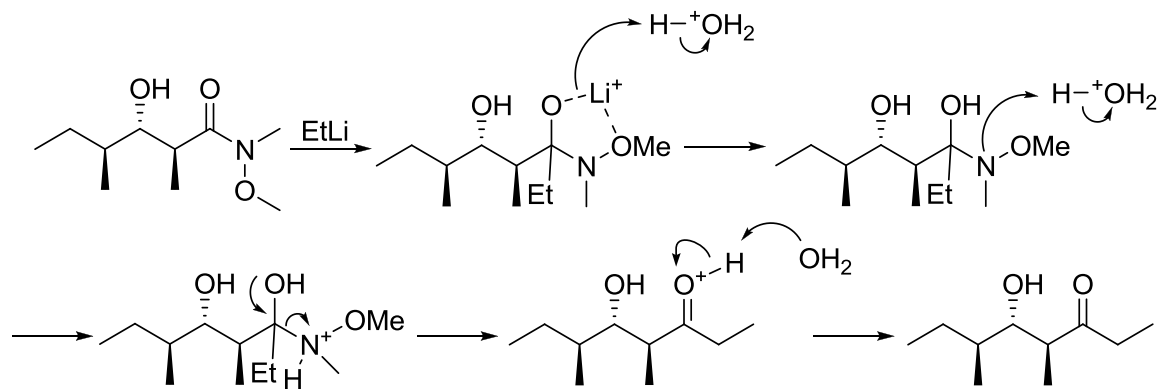


a. KRED-111, NADPH, 37°C, 90% μετατροπή, >80% ee. b. *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride, ισοπρόπυλομαγνησιο χλωρίδιο, ξηρό THF, -20 - -10 °C, 80% απόδοση; c. EtLi, ξηρό THF, -10 °C, 85% απόδοση (ολική απόδοση 49%).

Σχήμα 35: Σύνθεση του ενδιάμεσου **26**

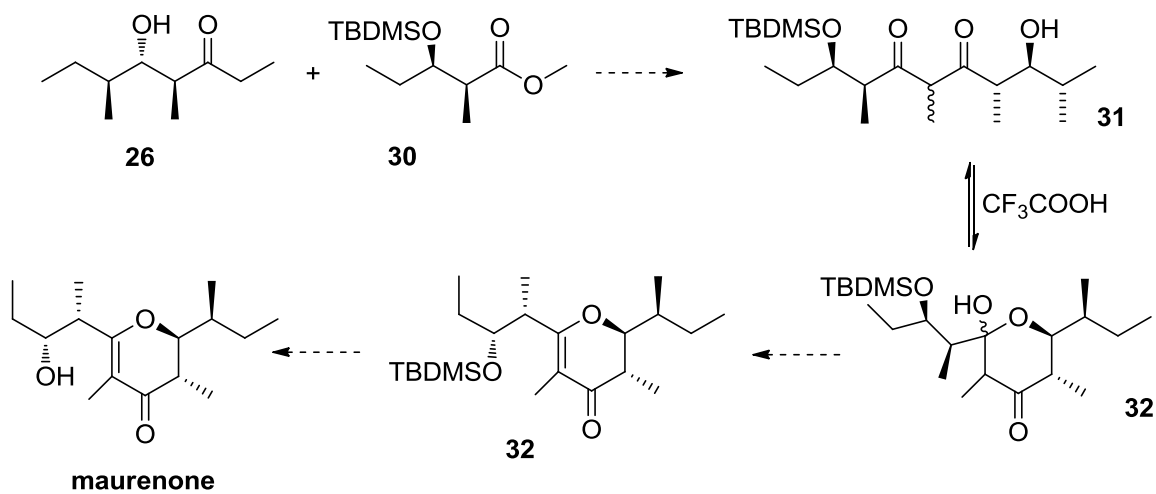


Σχήμα 36: Μηχανισμός σύνθεσης του Weinreb αμιδίου **25**



Σχήμα 37: Μηχανισμός σύνθεσης της Weinreb κετόνης **26**

Τα τελευταία βήματα, η αλδολική συμπύκνωση της κετόνης **26** με τον εστέρα **30**, η κυκλοποίηση της ένωσης **31**, και η αποπροστασία της ένωσης **32** για το σχηματισμό του φυσικού προϊόντος maurenone, βρίσκονται υπό μελέτη (Σχήμα 38).



Σχήμα 38: Προτεινόμενα στάδια για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος maurenone

Συνοψίζοντας, στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάστηκε η χημειοενζυμική σύνθεση δύο χειρόμορφων ενδιάμεσων απαραίτητων για την ολική σύνθεση του φυσικού προϊόντος maurenone, το οποίο απομονώνεται από το είδος *Siphonaria maura* και έχει αντικαρκινική δράση. Για τη σύνθεση τους χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένες κετορεδουκτάσες, οι οποίες με στερεοεκλεκτική αναγωγή συνέβαλαν στη δημιουργία όλων των στερεογονικών κέντρων των μεθυλο εστέρων **30** και **23a** με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα. Κάθε στάδιο ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα με ποσότητες σε μεγαλύτερη κλίμακα. Αναπτύχθηκε μία συνθετική μέθοδος, η οποία αρχίζει από τις εμπορικά διαθέσιμες αρχικές ενώσεις όπως (S)-2-μεθυλο-1-βουτανόλη **32** για τη σύνθεση του ενδιάμεσου (4S,5S,6S)-5 υδροξυ-4,6-διμεθυλοκταν-3-όνη **26** και τον 3-οξο πεντανοϊκο μεθυλο εστέρα **27** για τη σύνθεση του προστατευμένου μεθυλο εστέρα **30**.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϋδροφουρανιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο.¹ Οι διαχωρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογραφία στήλης, με χρήση silica gel και μίγμα διαλυτών εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα. Για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες της εταιρίας Merck silica gel (grade 60 F₂₄₅).

Οι κετορεδουκτάσες, το συνένζυμο NADPH και η αφυδρογονάση της γλυκόζης ήταν της εταιρίας Biocatalytics και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Όργανα

Τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR εληφθησαν με το φασματόμετρο 300MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμέθυλοσιλιανιο (TMS) σε διαλύτη CDCl₃. Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες προσδιορίστηκαν με αέριο χρωματογράφο της Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα (20% permethylated κυκλοδεξτρίνη) 30m x 0.25mm x 0.25μm.

Γενικές συνθετικές μέθοδοι

Ενζυμικές αντιδράσεις σε μικρή κλίμακα.

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH=6,9) προστίθενται το υπόστρωμα (25 mM), η κετορεδουκτάση (2 mg/mL), NADPH (2,5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Το διάλυμα αναδεύεται στην κατάλληλη θερμοκρασία και ο έλεγχος της αντίδρασης πραγματοποιείται κάθε 1 ώρα με λήψη δείγματος από την αντίδραση, το οποίο αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση με EtOAc. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο.

Ενζυμικές αντιδράσεις σε μεγάλη κλίμακα.

Σε 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH 6.9 ή σε pH 6.5) προστίθενται 25 mM υποστρώματος, γλυκόζη (100 mM, 114 mg), NADPH (0.5 mM, 4 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (4 mg) και η κατάλληλη κετορεδουκτάση (10 mg). Το μίγμα αναδεύεται μέχρι το πέρας της αντίδρασης, το οποίο αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση με EtOAc. Περιοδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμίζεται σε τιμή 6,9 ή 6,5 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x100 mL). Μερικές φορές απαιτείται φυγοκέντριση (6000 rpm, 10 λεπτά) για τον καλό διαχωρισμό υδατικής οργανικής φάσης, εξαιτίας δημιουργίας γαλακτώματος. Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό οπότε απομονώνεται η αλκοόλη.

Αντίδραση οξείδωσης αλκοολών με Jone's

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύεται η αλκοόλη (0.5 mmoles) σε 2.5 ml ακετόνης και το διάλυμα ψύχεται στους 0°C με παγόλουτρο και τίθεται υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται προσθήκη σταγόνων του αντιδραστήριου Jone's (0.5 mmoles, 180 μL, 3 mM), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε 0.5 mL ακετόνης, οπότε το διάλυμα χρωματίζεται αρχικά καστανοκόκκινο. Το αντιδραστήριο Jone's προστίθεται στάγδην στους 0°C στο διάλυμα της αλκοόλης έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC).

Η απομόνωση του προϊόντος γίνεται ως εξής: Στο διάλυμα προστίθενται σταγόνες 2-προπανόλης και στη συνέχεια αραιώνεται στο διπλάσιο με ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8). Τέλος εκχυλίζεται 2 φορές με Et₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄. Ακολουθεί διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση.

Χημική αναγωγή με NaBH₄

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου NaBH₄ (0.098 mmol) προστέθηκε σε άνυδρη αιθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0°C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο κετο-εστερας ή η κετονη (0.3 mmol) διαλυμένη σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2-4 ώρες στους 0°C και η αντίδραση ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της

αντίδρασης προστέθηκε αργά στους 0 °C κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό.

Αντίδραση οξείδωσης αλκοολών με PCC

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου PCC (1.0 mmol,) προστέθηκε σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (10 mL) και το μίγμα ψύχθηκε στους 0 °C. Ακολούθησε προσθήκη, σε 5 λεπτά, της αντίστοιχης αλκοόλης (1.50 mmol αλκοόλης) διαλυμένης σε ξηρό CH₂Cl₂ (5 mL) και το μίγμα αναδεύτηκε στους 0 °C, για 1-2 ώρες, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Στο διάλυμα προστέθηκε αιθέρας (10 mL) και το προϊόν απομονώθηκε με διπλή διήθηση, πάνω από στερεό Florisil. Τα στερεά ξεπλύθηκαν με Et₂O και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό.

Εστεροποίηση υδρόξυ-κετο εστέρων (ρακεμικών και οπτικά καθαρών) με οξικό ανυδρίτη

Σε υπόστρωμα υδρόξυ-κετο εστέρα (25mM) διαλυμένο σε 1 mL ξηρό EtOAc στους 0°C, προστίθεται οξικός ανυδρίτης (30μL) και καταλυτική ποσότητα 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) και ανθρακικού καλίου. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι το πέρας της, το οποίο διαπιστώνεται με αέρια χρωματογράφια μετά από 2 εκχυλίσεις του μίγματος με H₂O.

Σύνθεση υποστρωμάτων

Σύνθεση του 3-οξο-5-εξενοϊκού μεθυλεστέρα (3)²⁸

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε διάλυμα άλλυλο-μαγνησίου χλωριδίου 2.0M (16.9 mL, 33.8 mmoles) σε άνυδρο THF, στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην ο 2-κυανο-οξικός μεθυλεστέρας **2** (1.98 mL, 22.5 mmoles) διαλυμένος σε άνυδρο THF. Το μίγμα αναδεύτηκε για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστέθηκε 1 mL κορεσμένο NH₄Cl και το μίγμα εκχυλίστηκε με νερό (1x5 mL) και με HCl 1N (1x5 mL). Για την υδρόλυση του ενδιάμεσου απομονώθηκε η οργανική φάση και προστέθηκαν 5 mL HCl 1N και το μίγμα αφέθηκε σε ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίστηκε. Ακολούθως η υδατική φάση εκχυλίστηκε με Et₂O (2x5 mL) και οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν για να εκχυλιστούν με 5 mL νερό και 5 mL Na₂CO₃. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hex /EtOAc, v/v, 30/1). Απόδοση 40%, 1.28g.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, ppm): δ = 5.84-5.97 (m, 1H), 5.25-5.21 (d, J = 12 Hz 1H), 5.15 (br s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.48 (s, 2H), 3.29-3.31 (d, J = 7 Hz, 2H)

Σύνθεση οπτικά καθαρού (R)-3-οξο-5-υδοξυ-εξενοϊού μεθυλεστέρα (4) με ενζυμική αναγωγή

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού υδρόξυ κετο εστέρα **4** πραγματοποιήθηκε με ενζυμική αναγωγή του (R)-3-οξο-5-εξενοϊού μεθυλεστέρα **3** με την κετορεδουκτάση A1C σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 8-10⁰C και η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 24 ώρες. Απόδοση >90%

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, ppm): δ = 5.75-5.89 (m, 1H), 5.14-5.16 (d, J = 6 Hz 1H), 5.11 (br s, 1H), 4.04-4.14 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.54 (dd, J = 4 Hz, 1H), 2.44 (dd, J = 7 Hz, 1H), 3.32 (t, 2H)

Σύνθεση του (R)-5-υδροξυ-3-οξο-7-οκτενοικού τριτ-βουτυλεστέρα (5)

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (5 ml) διαλύθηκε ξηρή διυσοπροπυλαμίνη (4.2 mmoles, 600 μ L) και αφού ψύχθηκε στους 0°C σε παγόλουτρο, προστέθηκε στάγδην το BuLi 1,6 M σε εξάνιο (4.06 mmoles, 2.52 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 20 λεπτά στους 0°C και στη συνέχεια ψύχθηκε στους -78°C . Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος ακέτο τριτ-βουτυλεστέρα (4.2 mmoles, 566 μ L) σε ξηρό THF και ανάδευση για 60 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκε διάλυμα (R)-3-οξο-5-υδροξυ-εξενοϊού μεθυλεστέρα **4** (0.70 mmoles, 100mg) σε ξηρό THF στους -78°C και ακολούθως το μίγμα τέθηκε υπό ανάδευση στους -40°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που ανιχνεύτηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένου NH_4Cl και 2 εκχυλίσες του διαλύματος με EtOAc. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO_4 και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 10/1). Απόδοση 80%, 120mg.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): δ = 5.74-5.88 (m, 1H), 5.14-5.15 (br d, J = 3 Hz 1H), 5.10 (br s, 1H), 4.29-4.45 (m, 1H), , 4.08-4.22 (m, 1H), 3.38 (s, 2H), 2.76 (dd, J = 3 Hz, 2H), 2.26 (t, 2H), 1.46 (s, 9H)

Σύνθεση του (5R)3,5-διυδροξυ-7-οκτενοικού τριτ-βουτυλεστέρα (6)

Σε δίλαμη σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστίθεται ποσότητα NaBH_4 (0.21 mmoles, 8 mgr) και 5 ml ξηρή αιθανόλη και αφήνονται λίγη ώρα για ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην και η οπτικώς ενεργή αλκοόλη **5** (0.56 mmoles, 120 mg), διαλυμένη σε 1ml ξηρή EtOH. Το σύστημα αφήνεται για ανάδευση στους 0°C , μέχρι το πέρας της αντίδρασης που διαπιστώνεται με TLC.

Για την απομόνωση της διόλης προστέθηκαν μερικές σταγόνες κορεσμένου NH_4Cl , όπου παρατηρήθηκε και η έκλυση αερίου και στη συνέχεια η EtOH απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το διάλυμα εκχυλίστηκε 2 φορές με Et_2O . Η συγκεντρωμένη οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO_4 , και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός της ουσίας. Απόδοση 90%, 108mg.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): δ = 5.75-5.89 (m, 1H), 5.12-5.14 (d, J = 6 Hz 1H), 5.09 (br s, 1H), 4.29-4.45 (m, 1H), , 4.05-4.25 (m, 1H), 3.80- 3.81 (d, J = 3 Hz, 1H), 3.52-3.54 (d, J = 6 Hz, 1H), 2.48 (dd, J = 6 Hz, 2H), 1.59 (t, 2H), 1.46 (s, 9H)

Σύνθεση της 6-αλλυλο-5, 6-διυδρο-πυραν-2-όνης (7)

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετείται ποσότητα διόλης **7** (0.46 mmoles, 100 mg) διαλυμένη σε 10 ml τολουόλιο και προστίθεται καταλυτική ποσότητα παρα-τολουλο σουλφονικού οξέος (TSOH) (40mg). Το σύστημα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού για περίπου 3h, μέχρι το πέρας της αντίδρασης, όπως διαπιστώνεται με TLC. Για την απομόνωση της ουσίας αραιώνεται το διάλυμα με EtOAc και εκχυλίζεται με διάλυμα 10% NaHCO₃ και με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 10/1). Απόδοση 90%, 58mg.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, ppm): δ = 6.92-6.85 (m, 1H), 6.03 (d, J = 9.8 Hz 1H), 5.90-5.77 (m, 1H), 5.22-5.14 (m, 2H), , 4.56-4.44 (m, 1H), 2.60- 2.45 (m, 2H), 2.39-2.33 (m, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz, ppm): δ = 166.7, 144.9, 133.9, 121.3, 118.7, 76.3, 28.6

Σύνθεση της 3-φαινυλ-προπανάλης (9)

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκε PCC (5.52 mmol, 1.19 g) σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (10 mL) και ακολούθησε προσθήκη, για 5 λεπτά, της 3-φαινυλ-προπαν-1-όλης (3.68 mmol, 500 mg) διαλυμένης σε ξηρό CH₂Cl₂ (2 mL) και το μίγμα αναδεύτηκε για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Στο διάλυμα προστέθηκε αιθέρας (10mL) και το προϊόν απομονώθηκε με διπλή διήθηση, πάνω από στερεό Florisil. Τα στερεά ξεπλύθηκαν με Et₂O και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός της ουσίας. Απόδοση 90%, 444mg.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, ppm): δ = 9.69 (d, J= 6Hz, 1H), 7.33-7.14 (m, 5H), 2.85 (m, 2H), 2.7 (t, J=7.2Hz, 2H)

Σύνθεση της 5-φαινυλ-πεντ-1-εν-3-όλης (10)

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε διάλυμα βινυλο-μαγνήσιο χλωριδίου 1.0 M (5.6 mL, 5.6 mmol) σε άνυδρο THF, στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην η 3-φαινυλ-προπανάλη (3.73 mmol, 400mg,) διαλυμένη σε άνυδρο THF. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου όπου διαπιστώνεται με χρωματογραφία λεπτής

στοιβάδας (TLC). Κατόπιν προστέθηκε 1 mL κορεσμένο NH_4Cl και το μίγμα εκχυλίστηκε με Et_2O (3x5 mL) Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/ EtOAc , v/v, 10/1). Απόδοση 86%, 515mg.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): δ = 7.33-7.14 (m, 5H), 5.96-5.82 (m, 1H), 5.28-5.10 (m, 2H), 4.13-4.07 (m, 1H), , 2.7 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.88-1.80 (m, 2H)

Σύνθεση της 5-φαινυλ-πεντ-1-εν-3-όνης (11)

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκε PCC (2.22 mmol, 478mg) σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (10 mL) και ακολούθησε προσθήκη, για 5 λεπτά, της 5-φαινυλ-πεντ-1-εν-3-όλης **10** (1.48 mmol, 240 mg) διαλυμένης σε ξηρό CH_2Cl_2 . Το μίγμα αναδεύτηκε για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Στο διάλυμα προστέθηκε αιθέρας (10mL) και το προϊόν απομονώθηκε με διπλή διήθηση, πάνω από στερεό Florisil. Τα στερεά ξεπλύθηκαν με Et_2O και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Απόδοση 90%, 213mg.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): δ = 7.31-7.11 (m, 5H), 6.41-6.40 (m, 2H), 5.90-5.75 (m, 1H), 3.00-2.80 (m, 4H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, ppm): δ = 199.9, 141.0, 139.0, 136.4, 128.4, 128.3, 126.1, 41.1, 28.7

Σύνθεση της (R)-Rugulactone

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκαν οι ενώσεις 5-φαινυλ-πεντ-1-εν-3-όνης (**11**) (1.09mmol, 174.4mg) και 6-αλλυλο-5, 6-διυδρο-πυραν-2-όνης (**7**) (0.36mmol, 50mg) σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (10 mL). Ακολούθησε απαέρωση του μίγματος και κατά τη διάρκεια αυτή προστέθηκε ο καταλύτης Grubb's 2^{ns} γενιάς (0.018mmol, 15mg) (1,3-Bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinylidene) dichloro(phenylmethylene) (tricyclohexylphosphine) ruthenium. Μετά το τέλος της απαέρωσης το μίγμα θερμάνθηκε στους 40°C και αναδεύτηκε για 12 ώρες, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και

το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hex/EtOAc, v/v, 4/1). Απόδοση 76%, 75mg.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, ppm): δ = 7.32-7.15 (m, 5H), 6.98-6.84 (m, 1H), 6.80(dt, $J=16.0\text{Hz}, 7.1\text{ Hz}$, 1H), 6.20 (d, $J=16.0\text{Hz}$, 1H), 6.04((d, $J=9.8\text{ Hz}$, 1H), 4.54(m, 1H), 3.02-2.83 (m, 4H), 2.73-2.58 (m, 2H), 2.40-2.31 (m, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, ppm): δ = 199.0, 163.3, 141.0, 140.0, 133.5, 128.5, 128.3, 126.1, 121.4, 76.1, 41.7, 37.5, 29.9, 28.9.

$[\alpha]^{20} = -61.2$ (C 0.5, CHCl_3)

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ταυτίζονται με αυτά της βιβλιογραφίας για το φυσικό προϊόν.

Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλο εστέρα (28)

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, ο 3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας (**27**) (5 mmol, 0.63 mL) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (10 mL) και στο διάλυμα προστέθηκε ανθρακικό κάλλιο (4.7 mmol, 645mg). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκε, σε διάρκεια 2 λεπτών το μεθυλο ιωδίδιο (6.2 mmol, 372 μL) και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε αιθέρας (10 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Απόδοση >99%, 712mg.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 3.72 (s, 3H), 3.53 (q, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 2.46–2.64 (m, 2H), 1.34 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 1.07 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλο εστέρα (28)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού υδρόξυ κετο εστέρα **29** έγινε με ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλεστέρα (**28**) με την Kred-A1C σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Απόδοση >99%

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 3.72 (s, 3H), 3.69 (t, $J=5.0\text{Hz}$, 1H), 2.54–2.59 (m, 1H), 1.40 – 1.53 (m, 4H), 1.18 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 1.17 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.98 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.97 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Χημική αναγωγή του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλο εστέρα (28)

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου NaBH_4 (0.646 mmol, 24 mg) προστέθηκε σε άνυδρη μεθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός

μεθυλεστέρας (**28**) (2.1mmol, 303mg) διαλυμένος σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 3 ώρες στους 0 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε, στην ίδια θερμοκρασία, κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x15 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hex/EtOAc, v/v, 6/1). Απόδοση 80%, 246mg.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, ppm): δ= 3.72 (s, 3H), 3.69 (t, *J*=5.0Hz, 1H), 2.54 – 2.59 (m, 1H), 1.40 – 1.53 (m, 4H), 1.18 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.17 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 0.98 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 0.97 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Σύνθεση της προστατευμένης αλκοόλης (30)

Υπό ατμόφαιρα αζώτου, σε διάλυμα αλκοόλης **29** (1 mmol, 146 mg) σε ξηρό DMF (10ml), προστίθεται *τριτ* βουτυλο διμεθυλο σιλυλο χλωριδιο (1.5 mmol, 226.0 mg) και ιμιδαζόλιο (3 mmol, 204.2 mg) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή αέρια χρωματογραφία. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη σταγόνων μεθανόλης και 3 εκχυλίσσεις με νερό και EtOAc. Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με MgSO₄ και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν απομονώνεται μετά από χρωματογραφία στήλης (Hex /EtOAc, v/v, 10/1). Απόδοση 85%, 205mg.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, ppm): δ =4.12 (q, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.70-3.77 (m, 1H), 1.48-1.50 (m, 2H), 1.07 (d, *J*=7Hz, 3H), 0.95 (t, 3H), 0.92 (s, 9H), 0.18 (s, 6H)

Σύνθεση του (S)-2-μεθυλο-1-βουτανικού οξέος (33)

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύεται η (S)-2-μεθυλο-1-βουτανόλη **32** (10 mmoles, 880mg) σε 60 ml ακετόνης και το διάλυμα ψύχεται στους 0°C με παγόλουτρο και τίθεται υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται προσθήκη σταγόνων στους 0°C το αντιδραστήριο Jones's (10 mmoles, 3.6 mL, 3 mM), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε 0.5 mL ακετόνης και το μίγμα αναδεύτηκε για 1-2 ώρες, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Για την απομόνωση της ουσίας στο διάλυμα προστίθενται σταγόνες 2-

προπανόλης και έπειτα αραιώνεται στο διπλάσιο με ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8). Στη συνέχεια εκχυλίζεται 2 φορές με Et₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄. Ακολουθεί διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Απόδοση 90%, 905mg

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, ppm): δ= 2.33-2.45 (m, 1H), 2.33-2.45 (m, 1H), 1.65-1.78 (m, 1H), 1.42-1.63 (m, 1H), 1.17 (d, J=7Hz, 3H), 0.94 (t, 3H)

Σύνθεση του (S)-2-μεθυλο-βουτανοϊκου αιθυλεστέρα (34)

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκε το οξύ **33** (5 mmoles, 510mg), με το ανθρακικό κάλλιο (5.5 mmoles, 760mg) σε ξηρή ακετόνη (10mL) και προστέθηκε στάγδην το αιθυλοϊωδίδιο (5.5 mmoles, 1mL). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 60°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Στο διάλυμα προστέθηκε αιθέρας (10mL) και το προϊόν απομονώθηκε με διπλή διήθηση, πάνω από στερεό Florisil. Τα στερεά ξεπλύθηκαν με Et₂O και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Απόδοση 90%, 640mg.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, ppm): δ= 4.12 (q, 2H), 2.29-2.48 (m, 1H), 1.60-1.72 (m, 1H), 1.39-1.53 (m, 1H), 1.25 (t, 3H), 1.13 (d, J=7Hz, 3H), 0.90 (t, 3H)

Σύνθεση του (4S),2-διμέθυλο-3-οξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα (23c)

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, δισοπροπυλαμίνη (18 mmoles, 2.5 mL) διαλύθηκε σε ξηρό THF και, στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην BuLi (1.6 M σε εξάνιο, 17.5 mmol, 10.85 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά και έπειτα ψύχθηκε στους -78 °C. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος του προπιονικού-τριτ-βουτυλεστέρα (18 mmol, 2.7 mL) σε ξηρό THF και ανάδευση για άλλα 30 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκε, για 10 λεπτά, διάλυμα ξηρού THF που περιείχε τον εστέρα **34** (3 mmol, 390 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως φαίνεται από χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένο NH₄Cl και 2 εκχυλίσεις του διαλύματος με EtOAc. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO₄ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 10/1). Απόδοση 85%, 540mg.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 3.50–3.62 (m, 1H), 2.49-2.58 (m, 1H), 1.72-1.84 (m, 1H), 1.55-1.56 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.13 (d, $J=7\text{Hz}$, 3H), 0.96 (d, $J=6.5$, 3H), 0.90 (t, 3H)

Σύνθεση του (4S)-3-υδροξυ-2,4διμεθυλο οξοεξανοικού-τριτ-βουτυλεστέρα (24c)

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστίθεται ποσότητα NaBH_4 (0,37 mmoles, 14.2 mgr) και 5 ml ξηρή αιθανόλη και αφήνονται λίγη ώρα για ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην ο κετο εστέρας **23c** (0.5 mmol, 107mg) σε διάλυμα ξηρής EtOH. Το σύστημα αφήνεται για ανάδευση στους 0°C , μέχρι το πέρας της αντίδρασης που διαπιστώνεται με TLC.

Για την απομόνωση της αλκοόλης προστέθηκαν μερικές σταγόνες κορεσμένου NH_4Cl , όπου παρατηρήθηκε και η έκλυση αερίου και στη συνέχεια η EtOH απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το διάλυμα εκχυλίστηκε 2 φορές με Et_2O . Η συγκεντρωμένη οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO_4 , και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 10/1). Απόδοση 90%, 95mg.

Syn-υδροξυ εστέρας 24c

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 3.25-3.53 (m, 1H), 2.49-2.62 (m, 1H), 1.56-1.72 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 2.24 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.87-0.92 (m, 6H)

anti-υδροξυ εστέρας 24c

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 3.60 (q, 1H), 2.49-2.58 (m, 1H), 1.56-1.72 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 2.24 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.87-0.92 (m, 6H)

Σύνθεση του (4S)-2,4-διμεθυλο-3-οξοεξανοικού-αιθυλεστέρα (23b)

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκε ο κετοεστέρας **23c** (1 mmole, 214mg), με Bu_2SnO (0.1 mmole, 25mg) σε ξηρή αιθανόλη (5mL). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 85°C έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένου Na_2CO_3 και 3 εκχυλίσεις του διαλύματος με EtOAc και διήθηση του μίγματος από celite. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO_4 και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Απόδοση 85%, 157mg.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 4.19 (q, 2H), 3.47 (s, 1H), 2.54-2.64 (m, 1H), 1.65-1.77 (m, 1H), 1.55-1.60 (m, 2H), 1.29 (t, 3H), 1.26 (d, $J=7\text{Hz}$, 3H), 1.11 (d, $J=7\text{Hz}$, 3H), 0.90 (t, 3H)

Σύνθεση της (2S)-μεθυλο-βουτανάλης (36)

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκε PCC (21 mmoles, 4.5g) σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (10 mL) και ακολούθησε προσθήκη, για 5 λεπτά, της (2S)-μεθυλο-1-βουτανόλη (14 mmoles, 1.0g) διαλυμένης σε ξηρό CH_2Cl_2 και το μίγμα αναδεύτηκε για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Στο διάλυμα προστέθηκε αιθέρας (10mL) και έγινε διπλή διήθηση, πάνω από στερεό Florisil και το προϊόν απομονώθηκε με απόσταξη. Απόδοση 90%, 1.08g. ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 9.62 (d, $J=2\text{Hz}$, 1H) , 2.27 (q, 1H), 1.68-1.79 (m, 2H), 1.20 (t, 3H), 1.08 (d, $J=12$, 3H)

Σύνθεση του (4S)-3-υδροξυ-2,4διμεθυλο-οξοεξανικού μεθυλοεστέρα (37)

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, δισοπροπυλαμίνη (5.5 mmoles, 760 μL) διαλύθηκε σε ξηρό THF (5mL) και, στους 0 $^\circ\text{C}$, προστέθηκε στάγδην BuLi (1.6 M σε εξάνιο, 5.5 mmoles, 3.45 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά και έπειτα ψύχθηκε στους -78 $^\circ\text{C}$. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος του προπιονικού-μεθυλεστέρα (7.5 mmoles, 2.7 mL) σε ξηρό THF (10 mL) και ανάδευση για άλλα 20 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκε, για 5 λεπτά, διάλυμα ξηρού THF (10 mL) που περιείχε την αλδεύδη **36** (5.5 mmol, 473 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε για άλλα 20 λεπτά. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένου NH_4Cl και 2 εκχυλίσεις του διαλύματος με EtOAc. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO_4 και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμενη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex/EtOAc, v/v, 10/1). Απόδοση 85%, 813mg.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, ppm): δ = 3.72 (s, 3H) , 3.68-3.71 (m, 1H), 2.59-2.72 (m, 1H), 1.40-1.50 (m, 3H), 1.15-1.23 (m, 3H), 0.86-0.97 (m, 6H)

Σύνθεση του (4S)-2,4διμεθυλο-3-οξοεξανοικού μεθυλοεστέρα (23a)

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύεται ο κετο εστέρας **37** (3 mmoles, 552mg) σε 18 ml ακετόνης και το διάλυμα ψύχεται στους 0°C με παγόλουτρο και τίθεται υπό ανάδευση. Κατόπιν προστίθεται στάγδην στους 0°C το αντιδραστήριο Jone's (3 mmoles, 1.1 mL, 0.3 mM), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε ακετόνη και το μίγμα αναδευτήκε για 1-2 ώρες, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Για την απομόνωση της ουσίας το διάλυμα αραιώνεται στο διπλάσιο με ρυθμιστικό διάλυμα (pH = 8). Στη συνέχεια εκχυλίζεται 2 φορές με Et₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄. Ακολουθεί διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Απόδοση 90%, 464mg.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, ppm): δ= 3.71 (s, 3H), 3.66 (m, 1H), 2.64-2.72 (m, 1H), 1.64-1.78 (m, 2H), 1.32 (d, J=2Hz, 3H), 1.08 (q, 3H), 0.87 (t, 3H)

Σύνθεση οπτικά καθαρού (2S,3S,4S)-3-υδροξυ-2,4-διμεθυλο-οξοεξανοικού-μεθυλεστέρα (24a) με ενζυμική αναγωγή

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού υδροξυ κετο εστέρα **24a** έγινε με ενζυμική αναγωγή του (4S),2-διμεθυλο-3-οξοεξανοικού-μεθυλο εστέρα **23a** με την Kred-111 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Ποσοστό μετατροπής 90%

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, ppm): δ= 3.71 (s, 3H), 3.59-3.64 (m, 1H), 2.56-2.74 (m, 1H), 1.41-1.51 (m, 3H), 1.16 (d, J=7.2Hz, 3H), 0.86-0.94 (m, 6H)

Σύνθεση του (4S)-3-υδροξυ-N-μεθοξυ-N,2,4-τριμεθυλ-εξανοικού αμιδίου (25)

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, ο υδροξυ εστέρας **24** (1.34 mmoles, 255mg) και η N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride (2.12 mmoles, 207 mg) διαλύθηκαν σε ξηρό THF (5mL) στους -20°C, και προστέθηκε στάγδην ισοπροπυλομαγνήσιο χλωρίδιο (4.02 mmoles, 2.01 mL) και το μίγμα αναδευτήκε στους -20°C για 2 ώρες. Έπειτα στους -10°C προστέθηκαν N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride (2.12 mmoles, 207 mg) και προστέθηκε στάγδην ισοπροπυλομαγνήσιο χλωρίδιο (4.02 mmoles, 2.01 mL) και το μίγμα αναδευτήκε για άλλες 2 ώρες. Ακολούθησε τελευταία προσθήκη στους -10°C του N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride (2.12 mmoles, 207 mg) και του ισοπροπυλομαγνήσιο χλωριδίου (4.02 mmoles, 2.01 mL) έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία

λεπτής στοιβάδας στους Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένου NH_4Cl και 1N HCl και 2 εκχυλίσεις του διαλύματος με αιθέρα. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO_4 και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμενη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 10/1). Απόδοση 80%.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, ppm): δ = 3.73 (s, 3H), 3.54-3.61 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.18-3.21 (m, 1H), 1.42-1.50 (m, 2H), 1.17 (d, $J=7\text{Hz}$, 3H), 0.87-0.94 (m, 6H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, ppm): δ = 199.9, 78.7, 61.5, 38.7, 37.5, 36.6, 26.6, 15.1, 13.0, 11.7

Σύνθεση της (4S)-5-υδροξυ-4,6-διμεθυλο-οκταν-3-όνης (26)

Σε σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστέθηκε το αμίδιο **25** (1mmol, 184.5mg) σε ξηρό THF (5mL) και προστέθηκε στάγδην το EtLi (2.3 mmoles, 4.6mL) στους -10°C και αφέθηκε υπό ανάδευση έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένο NH_4Cl και 1N HCl και 2 εκχυλίσεις του διαλύματος με αιθέρα. Ακολούθησε ξήρανση με MgSO_4 και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμενη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 4/1). Η ουσία απομονώθηκε σαν crude μίγμα με απόδοση 85%.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Crossley, R. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8155.
2. Tatsuta, K.; Hosokawa, S. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4707.
3. a) Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry*, 3rd Edition, Springer, **1997**. b) Wong and Whitesides *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series, volume 12
4. S. G. Neidleman. In *Biocatalysis*. (D. Abramowicz, ed.), pp. **1-24**, Van Nostrand Reinhold, New York 1990.
5. Urdiales, E. G.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313.
6. C. Crosby. In *Chirality in Industry* (A. N. Collins, G. N. Sheldrake and J. Crosby, eds.), pp. **1-66**. Wiley, Chichester 1992.
7. Faber, K., *Pure, Appl., Chem.*, **1997**, *69*, 1613.
8. Menger, F. M. *Acc. Chem. Res.* **1977**, 44.
9. Bradshaw, C. W.; Fu, H.; Shen, G. J.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526.
10. Prelog, V., *Pure Appl. Chem.*, **1964**, *9*, 119.
11. Wong, C. H.; Whitesides, G. M. "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", Tetrahedron Organic Chemistry Series, London, **1993**.
12. Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890.
13. Zhao, H.; Donk, W. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 583.
14. Shaked, Z.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104.
15. Lamed, R.; Keinan, E.; Zeikus, J. E. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 144.
16. Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Holtmann, D. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2314.
17. Wong, C. H.; Drueckhammer, D. G.; Sweers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028.
18. a) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799. b) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1958. c) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem* **2006**, 2309. d) D. Kalaitzakis, D. J. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Tetrahedron Asymmetry*, **2007**, *18*, 2418-2426.
19. D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2008**, *73*, 3919-3921

20. D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 43–46
21. <http://estia.hua.gr:8080/dspace/bitstream/123456789/501/1/panourgia.pdf>
accessed (February 2012)
22. Rychnovsky, S. D. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2021–2040.
23. Marco, J. A.; Carda, M.; Murga, J.; Falomir, E. *Tetrahedron* **2007**, 63, 2929–2958.
24. Meragelman, T. L.; Scudiero, D. A.; Davis, R. E.; Staudt, L. M.; McCloud, T. G.; Cardellina, J. H., II; Shoemaker, R. H. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 336–339.
25. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. Βιοχημεία Τόμος I, 832
26. (a) Mohapatra, D. K.; Das, P. P.; Reddy, D. S.; Yadav, J. S. *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 5841–5944; (b) Reddy, D. K.; Shekhar, V.; Reddy, T. S.; Reddy, S. P.; Venkateswarlu, Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2315–2319; (c) Reddipalli, G.; Venkataiah, M.; Fadnavis, N. W. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 320–324; (d) Goswami, A.; Saikia, P. P.; Saikia, B.; Chaturvedi, D.; Barua, N. C. *Tetrahedron: Letters* **2011**, 52, 5133–5135 (e) Reddy, D. K.; Shekhar, V.; Prabhakar, P.; Babu, B. C.; Siddhardha, B.; Murthy, U. S. N.; Venkateswarlu, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 4657–4663; (f) Bose, D.; Fernandez, E.; Pietruszka, J. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 3463–3469; (g) Cros, F.; Pelotier, B.; Piva, O. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5063–5070
27. Wong, C. H.; Drueckhammer, D. G.; Sweers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4028.
28. Anderson, G. W.; Halvstadt, I. F.; Miller, W. H.; Roblin, R. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1945**, 67, 2197.
29. Cimino, G.; Gagagnin, M.; Mollucs:from chemo-ecological study to biotechnological application, Springer, **2006**, pp.159-163.
30. Tenson, T.; Lovmar, M., Ehrenberg, M. *J. Mol. Biol.* **2003**, 330, 1005-1014.
31. Faulkner, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **1984**, 1, 551; **1986**, 3, 1; **1987**, 4, 539; **1988**, 5, 613.
32. Hochlowski, J. E.; Faulkner, D. J. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 1917-1920
33. Hochlowski, J. E.; Faulkner, D. J.; Mataumoto, G. K.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7413.
34. Hochlowski, J. E.; Coll, J. C.; Faulkner, D. J.; Biskupiak, J. E.; Ireland, C. M.; Zheng, Q.; He, C.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6748.
35. Manker, D.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5374

36. Manker, D. C.; Faulkner, D.J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 814-816
37. Crossman, J. S.; Perkins, M. V *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 117-124
38. Yadav, J. S.; Ravindar, K.; Reddy, B. V. S. *Synlett.* **2007**, *12*, 1957–1959
39. Labeeuw, O.; Blanc, D.; Phansavath, P.; Ratovelomanana-Vidal, V.; Gene, J. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2352-2358

ΦΑΣΜΑΤΑ NMR

