



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

- α) Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές α-αμιδο-β-κετο εστέρων**
**β) Στερεοεκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών γ-
βουτυρολακτονών μέσω ενζυμικών αναγωγών 2-μονο- και 2,2-
δι-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών**

ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017



UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

MASTER THESIS
ISOLATION AND SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE
COMPOUNTS

- a) Stereoselective bioreduction of α -amido- β -keto esters**
b) Stereoselective synthesis of optically pure β,γ -disubstituted
and trisubstituted γ -butyrolactones via enzymatic reduction of
2-substituted and 2,2-disubstituted 1,3-diketones

GIANNOPOULOS VASILEIOS

SUPERVISOR: ASSOS. PROFESSOR SMONOY IOULIA

HERAKLION 2017

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. **Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών Προϊόντων με Βιολογική Δραστικότητα», στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας - Βιοκατάλυσης, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της Αν. Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την οικονομική και ηθική τους υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια, καθώς επίσης και τους φίλους μου Θοδωρή, Κατερίνα και Χρύσα που ήταν δίπλα μου όλη αυτή την περίοδο και ιδιαίτερα στις δύσκολες στιγμές.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για όλη την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ιουλία Σμόνου, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αρχικά την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο και εν συνεχεία και την μεταπτυχιακή μου διατριβή, καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια, όπως επίσης για τις χρήσιμες συμβουλές της στις διάφορες δυσκολίες της συγκεκριμένης διατριβής

Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ. Στρατάκη Εμμανουήλ και κ. Βασιλικογιαννάκη Γεώργιο, που δέχτηκαν να είναι στην τριμελή μου επιτροπή καθώς και για την υλική υποστήριξη τους όποτε αυτή χρειάστηκε. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον ομότιμο καθηγητή κ. Ορφανόπουλο Μιχαήλ για το ενδιαφέρον που επέδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής αυτής, καθώς πέρα από την πολύτιμη υλική υποστήριξη που παρείχε, ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και να προτείνει λύσεις σε διάφορες δυσκολίες που συνάντησα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Δημήτρη Καλαϊτζάκη για τις χρήσιμες συμβουλές του, τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τους συνεργάτες και συναδέλφους στο εργαστήριο Ζωΐδη Μαργαρίτα, Τζανακάκη Αγγελική, Διονυσοπούλου Χρυσούλα, Τυρίκο-Εργά Θοδωρή, Μυρτολλάρη Καμέλα και Δεβρίκη Αγγελική για την πολύ καλή συνεργασία και το όμορφο κλίμα που είχαμε στο εργαστήριο, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα παιδιά του τομέα για την πολύ καλή συνεργασία και τις ωραίες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: Γιαννόπουλος Βασίλειος

Ημ/α Γέννησης: 21 Μαρτίου 1992

Τόπος Γέννησης: Καλαμάτα Μεσσηνίας, Ελλάδα

Email: billgianno@hotmail.com, chemp856@edu.chemistry.uoc.gr

Εκπαίδευση

2015-σήμερα: Υποψήφιος μεταπτυχιακός στην Οργανική Χημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

2010-2014: Πτυχίο Χημείας στο Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Βαθμός: Πολύ Καλά (7.43/10.0).

2013-2014: Πτυχιακή εργασία στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με τίτλο “Χημειοενζυμική προσέγγιση για τη σύνθεση των φυσικών προϊόντων (+)-Gonagenin και (R)-Goniothalamine” στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας-Βιοκαταλυσης υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Εμπειρία

2015-2016: Βοηθός Προπτυχιακού Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας I και II, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

2014 : Πρακτική άσκηση στην Καπνοβιομηχανία Καρέλια στο εργαστήριο χημικής ανάλυσης του τμήματος Έρευνας και Ανάπτυξης, Καλαμάτα

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά σε επίπεδο Lower (Εξετάσεις του Cambridge)

Συμμετοχή σε Συνέδρια

26-30 Ιουλίου 2015: a) Bariotaki, A.; **Giannopoulos, V.**; Tyrikos-Ergas, T.; Smonou, I. *Highly stereoselective bioreductions of methyl substituted diketo esters*, Biotrans 2015, Vienna, Austria. (αναρτημένη εργασία) b) Bariotaki, A.; **Giannopoulos, V.**; Smonou, I. *A new chemoenzymatic synthesis of (R)-Goniothalamine based on bioreduction*, Biotrans 2015, Vienna, Austria. (αναρτημένη εργασία)

- 11-14 Οκτωβρίου 2016: Smonou, I.; Tzanakaki, A.; Tyrikos-Ergas, T.; **Giannopoulos, V.** *Bioreductions as the key step for the synthesis of biologically active natural products*, The 5th international conference on Novel Enzymes 2016, Groningen, Netherlands. (αναρτημένη εργασία)
- 26-28 Μαρτίου 2016: **Giannopoulos, V.**; Smonou, I. *Ενζυμικά-καταλυόμενες αναγωγές για τη σύνθεση πολύτιμων χειρόμορφων ενδιαμέσων*, 18^ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα (αναρτημένη εργασία)
- 2-4 Μαΐου 2017: **Giannopoulos, V.**; Smonou, I. *Stereoselective bioreductions of α -amido- β -keto esters by NADPH-dependent ketoreductases*, 19th Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion of Crete, Greece (προφορική παρουσίαση)
- 9-13 Ιουλίου 2017: **Giannopoulos, V.**; Tyrikos-Ergas, T.; Tzanakaki, A.; Zoidi, M.; Smonou, I. *Stereocontrolled Enzymatic Transformation of di- and tri- carbonyl compounds*, Biotrans 2017, Budapest, Hungary (αναρτημένη εργασία).

Δημοσιεύσεις σε προετοιμασία

- 1) Chemoenzymatic approach toward the synthesis of Rugulactone. T. Tyrikos-Ergas, V. Giannopoulos, A. Tzanakaki, I. Smonou, manuscript in preparation.
- 2) Novel enzymatic reduction of α -amido and α -nitro β - keto esters with ketoreductases. T. Tyrikos-Ergas, V. Giannopoulos, I. Smonou, manuscript in preparation.

CURRICULUM VITAE

Full name: Giannopoulos Vasileios

Date of Birth: 21 March 1992

Place of birth: Kalamata, Messinia, Greece

Email: billgianno@hotmail.com , chemp856@edu.chemistry.uoc.gr

Education

2015-present: M.Sc Candidate in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete under the supervision of Associate. Professor I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete.

2010-2014: B.Sc in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete
Grade: Very good (7.43/10.0)

2013-2014: Senior undergraduate Diploma Thesis entitled "*Chemoenzymatic approach for the synthesis of natural products (+)-Conagenin and (R)-Goniothalamine*" elaborated under the supervision of Assoc. Professor I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete.

Experience

2015-2016: Laboratory Assistant in Organic Chemistry Undergraduate Laboratory I & II.

2014 : Practical internship in the Karelia Tobacco Company at chemical analysis laboratory of Research and Development department, Kalamata.

Language skills

- English to the level of Lower (Cambridge Examination)

Participation in Conferences

26-30 July 2015: a) Bariotaki, A.; **Giannopoulos, V.**; Tyrikos-Ergas, T.; Smonou, I. *Highly stereoselective bioreductions of methyl substituted diketo esters*, Biotrans 2015, Vienna, Austria. (poster presentation) b) Bariotaki, A.; **Giannopoulos, V.**; Smonou, I. *A new chemoenzymatic synthesis of (R)-Goniothalamine based on bioreduction*, Biotrans 2015, Vienna,

- 11-14 October 2016: Austria. (poster presentation)
Smonou, I.; Tzanakaki, A.; Tyrikos-Ergas, T.; **Giannopoulos, V.** *Bioreductions as the key step for the synthesis of biologically active natural products*,
The 5th international conference on Novel Enzymes 2016, Groningen, Netherlands. (poster presentation)
- 26-28 March 2016: **Giannopoulos, V.**; Smonou, I. *Enzymatic-catalysed reductions for the synthesis of useful chiral intermediates*,
18th Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion of Crete, Greece (poster presentation)
- 2-4 May 2017: **Giannopoulos, V.**; Smonou, I. *Stereoselective bioreductions of α -amido- β -keto esters by NADPH-dependent ketoreductases*,
19th Chemistry Postgraduates Conference, Heraklion of Crete, Greece (oral presentation)
- 9-13 July 2015: **Giannopoulos, V.**; Tyrikos-Ergas, T.; Tzanakaki, A.; Zoidi, M.; Smonou, I. *Stereocontrolled Enzymatic Transformation of di- and tri- carbonyl compounds*, Biotrans 2017, Budapest, Hungary (poster presentation).

Publications in preparation

- 1) Chemoenzymatic approach toward the synthesis of Rugulactone. T. Tyrikos-Ergas, V. Giannopoulos, A. Tzanakaki, I. Smonou, manuscript in preparation.
- 2) Novel enzymatic reduction of α -amido and α -nitrilo β - keto esters with ketoreductases. T. Tyrikos-Ergas, V. Giannopoulos, I. Smonou, manuscript in preparation.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη στερεοεκλεκτικών ενζυμικών αναγωγών με κετορεδουκτάσες με σκοπό τη σύνθεση ενώσεων που αποτελούν χειρόμορφα ενδιάμεσα και δομικές μονάδες για τη σύνθεση φυσικών προϊόντων με υψηλή προστιθέμενη αξία.

Στο πρώτο μέρος παρουσιάζεται η μελέτη της στερεοεκλεκτικής βιοαναγωγής α-αμιδο-β-κετο εστέρων με τη χρήση διαφορετικών απομονωμένων κετορεδουκτασών για τη σύνθεση οπτικά ενεργών β-υδρόξυ-α-αμιδο εστέρων. Πιο συγκεκριμένα επιτεύχθηκε για πρώτη φορά η στερεοεκλεκτική σύνθεση β-υδροξυ-αμιδο εστέρων, οι οποίοι είναι παράγωγα της *allo*-θρεονίνης και της β-υδρόξυ λευκίνης με τη χρήση NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών, με εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής και διαστερομερική περίσσεια. Στην περίπτωση του β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρα, που είναι παράγωγο της *allo*-θρεονίνης προσδιορίστηκε το ένζυμο (κετορεδουκτάση), που οδήγησε στο σχηματισμό του *anti*-2-ακεταμιδο-3-υδροξυ-βουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα με εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η στερεοεκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών β,γ-διυποκατεστημένων και τριυποκατεστημένων γ-βουτυρολακτονών μέσω ενζυμικών αναγωγών 2-μονο- και 2,2-διυποκατεστημένων 1,3-δικετονών χρησιμοποιώντας κετορεδουκτάσες. Το αποτέλεσμα ήταν να συντεθούν τρεις διαφορετικές γ-βουτυρολακτόνες με υψηλά ποσοστά μετατροπής και διαστερομερικής περίσσειας και σε κάποιες περιπτώσεις με καλή εναντιοεκλεκτικότητα. Αξιοσημείωτο είναι ότι η διαστεροεκλεκτική σύνθεση μίας εκ των τριών γ-βουτυρολακτονών, πραγματοποιήθηκε σε ένα και μόνο στάδιο στην ίδια φιάλη αντίδρασης (*one-pot*) με την χρήση ενός μόνο ενζύμου, χωρίς την απομόνωση των ενδιάμεσων προϊόντων.

Λέξεις κλειδιά: Στερεοεκλεκτική βιοαναγωγή, Κετορεδουκτάσες, Χειρόμορφα ενδιάμεσα, β-υδρόξυ-α-αμιδο εστέρες, γ-βουτυρολακτόνες.

Abstract

The subject of the present thesis is the study of stereoselective enzymatic reductions with ketoreductases for the preparation of compounds, which are useful chiral intermediates-building blocks for the synthesis of high added value natural products.

In the first part, the stereoselective bioreduction of α -amido- β -keto esters using various isolated ketoreductases for the synthesis of optically pure β -hydroxy- α -amido esters is presented. In particular, the stereoselective synthesis of the β -hydroxy- α -amido esters, which are derivatives of *allo*-threonine and β -hydroxy leucine, using NADPH-dependent ketoreductases was achieved with excellent reaction rates and excellent diastereoselectivity. In the case of the β -hydroxy- α -amido ester, which is derivative of *allo*-threonine, the appropriate ketoreductase, which led to the synthesis of *anti*-*tert*-butyl 2-acetamido-3-hydroxybutanoate in high enantioselectivity, was also determined.

In the second part, the stereoselective synthesis of optically pure β,γ -disubstituted and trisubstituted γ -butyrolactones via enzymatic reduction of 2-substituted and 2,2-disubstituted 1,3-diketones using ketoreductases is described and has resulted in the synthesis of three different γ -butyrolactones in high chemical yields, high diastereoselectivity and in some cases with good enantioselectivity. One remarkable result is that, one of the three γ -butyrolactones was synthesized successfully in a one-pot process without isolation of the intermediate products and using only one enzyme.

Key words: Stereoselective bioreduction, Ketoreductases, Chiral intermediates, β -hydroxy- α -amido esters, γ -butyrolactones.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
Σελίδα Υπογραφών.....	iii
Ευχαριστίες.....	iv
Βιογραφικό σημείωμα στα Ελληνικά.....	v
Βιογραφικό σημείωμα στα Αγγλικά.....	vii
Περίληψη στα Ελληνικά.....	ix
Περίληψη στα Αγγλικά.....	x
Περιεχόμενα.....	xi

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Συμβολή της βιοκαταλυσης και των βιοκαταλυτικών αναγωγών στην οργανική σύνθεση	2
Μηχανισμός αναγωγής με Αλκολικές αφυδρογονασες-Κετορεδουκτασες	4
Αναγέννηση του NAD(P)H	5
Σύγκριση ολόκληρων κυττάρων και απομονωμένων ενζύμων στις βιοκαταλυτικές αναγωγές	9
Πρόβλεψη στερεοχημείας σύμφωνα με τον κανόνα του Prelog	12
Αφυδρογονάσες-κετορεδουκτάσες στην σύνθεση χρήσιμων χειρόμορφων ενδιάμεσων, φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων	13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές α-αμιδο-β-κετο εστέρων	24
Ανάλυση-Συζήτηση αποτελεσμάτων	32
Πειραματικό μέρος	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Στερεοεκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών γ-βουτυρολακτονών μέσω ενζυμικών αναγωγών 2-μονο- και 2,2-διυποκατεστημένων 1,3-δικετονών	61
Ανάλυση-Συζήτηση αποτελεσμάτων	62
Πειραματικό μέρος	79
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	
Φάσματα $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ και αέριας χρωματογραφίας (GC)	85
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	116

Κεφάλαιο 1

Συμβολή της βιοκατάλυσης και των βιοκαταλυτικών αναγωγών στην οργανική σύνθεση

Η εγγενής εκλεκτικότητα των ενζύμων είναι γνωστή εδώ και πολλές δεκαετίες και η πρακτική εφαρμογή της βιοκατάλυσης έχει παρουσιάσει εξαιρετική πρόοδο, καθιστώντας την ως μια πραγματική εναλλακτική λύση απέναντι στην καθιερωμένη χημειοκατάλυση.² Τα ένζυμα έχουν αποδειχτεί πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες εξαιτίας κάποιων πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν σε σχέση με τους κλασσικούς χημειοκαταλύτες. Οι κύριοι παράγοντες που συνηγορούν σε αυτό είναι: α) Πρώτα από όλα εμφανίζουν υψηλή καταλυτική δραστικότητα που πολλές φορές ισοδυναμεί με αύξηση της ταχύτητας μετατροπής έως και 10^{12} φορές σε σχέση με τους κλασσικούς χημικούς καταλύτες β) λειτουργούν κάτω από ήπιες συνθήκες αντίδρασης σε τιμές pH 5-8 , θερμοκρασίες 20-40 °C και σε ατμοσφαιρική πίεση, οπότε μειώνεται η πιθανότητα των ανεπιθύμητων και παράπλευρών αντιδράσεων γ) είναι καταλύτες φιλικόι προς το περιβάλλον και σε αντίθεση με τη χρήση μεθόδων που απαιτούν βαρέα μέταλλα μπορούν να βιοαποικοδομηθούν και δ) μπορεί να λειτουργήσουν αποτελεσματικά ακόμα και σε οργανικούς διαλύτες.

Τα μειονεκτήματα των ενζύμων, όπως η περιορισμένη πρόσβαση σε ένζυμα, η έλλειψη σταθερότητας και δύσκολη εύρεση των κατάλληλων ενζύμων, έχουν πλέον μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της πρωτεϊνικής μηχανικής και της βιοτεχνολογίας.^{1a,4,5}

Αυτή η εξέλιξη έχει σημαντικό αντίκτυπο όχι μόνο στο πεδίο της έρευνας αλλά και σε βιομηχανικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, η βιοκατάλυση και η βιοτεχνολογία επηρέασαν και συνεχίζουν να επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα χημικών βιομηχανιών, όπως φαρμακοβιομηχανίες, εταιρίες που παρασκευάζουν αρώματα και καλλυντικά, αλλά και εταιρίες παρασκευής μονομερών και πολυμερών χημικών ενώσεων. Σύμφωνα με έρευνα του 2009, από τα 200 κορυφαία φαρμακευτικά προϊόντα το 72% είναι χειρόμορφες χημικές ενώσεις και ο αριθμός πιθανόν να έχει αυξηθεί σήμερα. Πολλά χειρόμορφα μόρια που αποτελούν δομικές μονάδες μεγαλύτερων και πολυπλοκότερων μορίων, μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας βιοκαταλυτικές μεθόδους. Τέτοια μόρια, όπως τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα, καρβοξυλικά οξέα, αμίνες ή αλκοόλες μπορούν να συντεθούν μέσω ενζυμικών

βιομετασχηματισμών σε εξαιρετικά μεγάλη κλίμακα, τηρώντας παράλληλα τα χρονοδιαγράμματα ανακάλυψης φαρμάκων και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η βιοκατάλυση να θεωρείται πλέον μια τεχνολογία ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και εξέλιξη στο πεδίο των φαρμακευτικών προϊόντων.³

Στην ανάπτυξη της εφαρμοσμένης βιοκατάλυσης εντάσσονται και οι ενζυμικές αναγωγές με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων και μικροοργανισμών καθώς και με απομονωμένα ένζυμα. Ο τομέας αυτός έχει σημειώσει σημαντικές εξελίξεις τα τελευταία χρόνια. Για εκτενέστερη περιγραφή:^{1b}

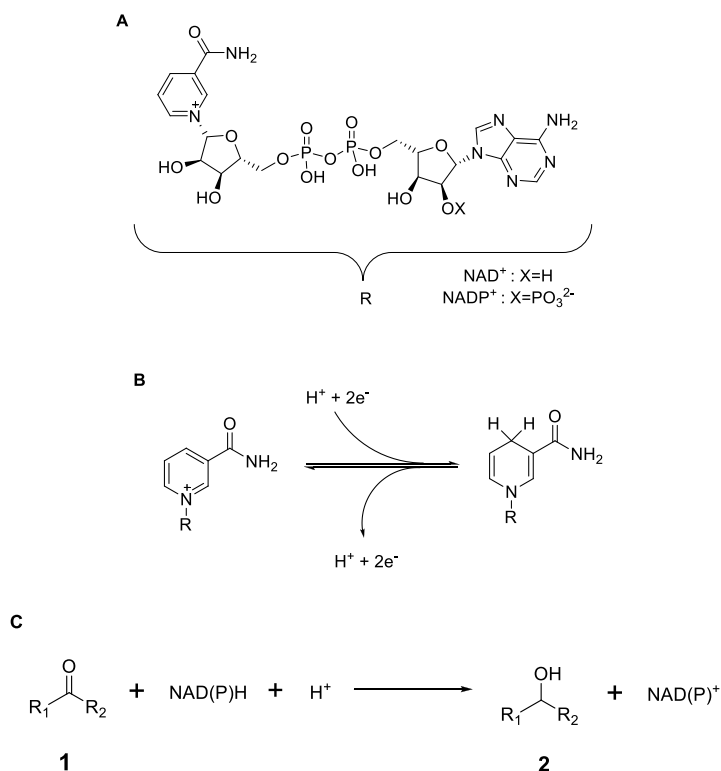
Προηγούμενος αναφέρθηκαν κάποια από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ενζύμων σε σχέση με τους κλασσικούς χημικούς καταλύτες. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα των ενζύμων είναι η υψηλή ειδικότητα και εκλεκτικότητα που εμφανίζουν. Η εκλεκτικότητα αυτή μεταφράζεται σε χημειο-, τοπο-, διαστεreo- και εναντιοεκλεκτικότητα.⁴ Κατά την αναγωγή η μετατροπή του κέντρου άνθρακα με sp^2 υβριδισμό σε sp^3 συνήθως συνοδεύεται με τη δημιουργία ενός χειρόμορφου κέντρου. Ο έλεγχος της εναντιοεκλεκτικότητας αυτής της μετατροπής είναι ένα από τα πιο μείζονα ζητήματα της οργανικής σύνθεσης. Εξαιτίας της μοναδικής ειδικότητας και εκλεκτικότητας που εμφανίζουν τα ένζυμα, οι βιοκαταλυτικές αναγωγές έχουν καταστεί ως ένα πολύτιμο εργαλείο στα χέρια των συνθετικών χημικών. Ως αποτέλεσμα αυτών των στοιχείων, πολύπλοκες συνθέσεις που έχουν περιγραφεί επιταχύνονται σημαντικά και η στοιχειομετρική αναλογία των αντιδρώντων υποκαθίσταται από καταλυτικούς παράγοντες. Επίσης μειώνεται η παραγωγή παραπροϊόντων και αποφεύγονται επιπλέον στάδια καθαρισμού του προϊόντος.²

Προχειρόμορφα υποστρώματα μπορούν να αναχθούν σε οπτικά καθαρές ενώσεις χρησιμοποιώντας αφυδρογονάσεις. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα περιλαμβάνουν αναγωγή καρβονυλομάδων κετονών που καταλύεται από αλκοολικές αφυδρογονάσεις και τις κετορεδουκτάσεις ή αναγωγή διπλών δεσμών C-C που καταλύεται από τις ene-ρεδουκτάσεις.²

Μηχανισμός αναγωγής με Αλκολικές αφυδρογονάσες- Κετορεδοκτάσες

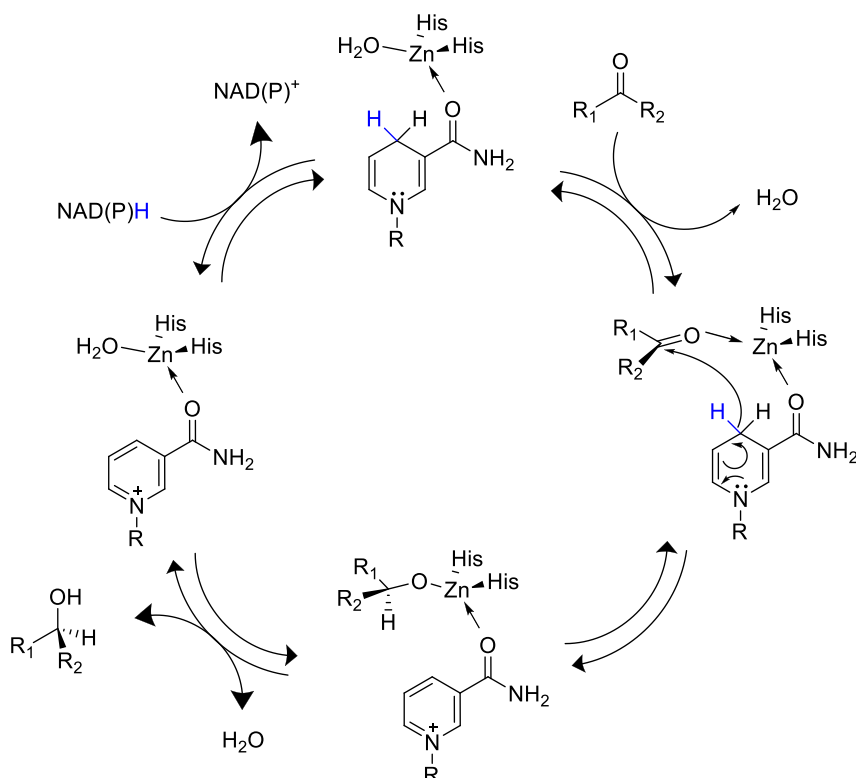
Οι αλκολικές αφυδρογονάσες (ADHs) και οι κετορεδοκτάσες (KRED) είναι από τα πιο μελετημένα οξειδοαναγωγικά ένζυμα και τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί σε μεγάλο βαθμό, έτσι ώστε να χρησιμοποιούνται και σε πολύπλοκες βιομηχανικές διεργασίες. Οι ADHs και οι KREDs είναι NAD(P)H εξαρτώμενα ένζυμα καθώς επίσης και μέταλλο-εξαρτώμενα, διότι στο ενεργό τους κέντρο περιέχουν συνήθως ένα μέταλλο Zn συναρμολογημένο με δύο μόρια ιστιδίνης^{2,7} και καταλύουν την εναντιοεκλεκτική αναγωγή διαφόρων μη φυσικών κετονών, οπότε σχηματίζονται κατά κύριο λόγο εναντιομερικώς καθαρές δευτεροταγείς αλκοόλες.⁶

Ο μηχανισμός της αναγωγής μιας κετόνης καταλυόμενη από κετορεδοκτάση, περιλαμβάνει τη μεταφορά υδριδίου μέσω του νικοτιναμιδικού συμπαραγόντα NAD(P)H (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: A) Δομές του φωσφορυλιωμένου συμπαραγόντα NAD(P)⁺ και του μη φωσφορυλιωμένου NAD⁺ B) Αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική αντίδραση μετατροπής του NAD(P)⁺ σε NAD(P)H C) Αντίδραση αναγωγής κετονών με μεταφορά υδριδίου.

Το υδρίδιο μεταφέρεται από το συμπαράγοντα NAD(P)H στο καρβονύλιο της ένωσης που πρόκειται να αναχθεί, η οποία είναι συναρμοσμένη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ο μηχανισμός της αναγωγής αποτελεί έναν καταλυτικό κύκλο όπου στο τέλος το NAD(P)H έχει μετατραπεί στην οξειδωμένη του μορφή, δηλαδή σε NAD(P)⁺, και η κετόνη έχει αναχθεί στην αντίστοιχη δευτεροταγή αλκοόλη (Σχήμα 2).^{2,7}



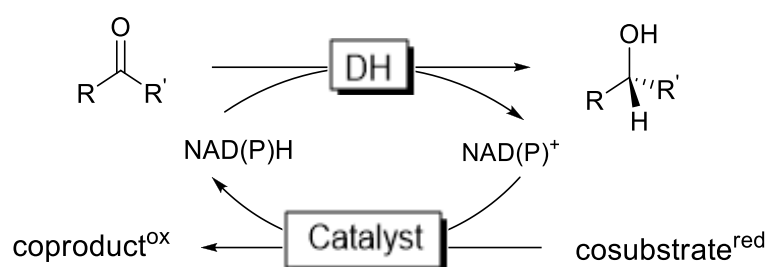
Σχήμα 2: Καταλυτικός μηχανισμός αναγωγής καρβονυλο-ενώσεων με τη χρήση NAD(P)H-εξαρτώμενων κετορεδοκτασών.

Αναγέννηση του NAD(P)H

Οι αναγωγές που καταλύονται από κετορεδοκτάσες απαιτούν στοιχειομετρικές ποσότητες ισοδυνάμων των νικοτιναμιδικών συμπαραγόντων. Εξαιτίας του υψηλού κόστους των συμπαραγόντων είναι απαραίτητη η χρήση ενός αποτελεσματικού συστήματος αναγέννησής τους. Η ανάγκη για την *in situ* αναγέννηση του συμπαράγοντα NAD(P)H οδήγησε σε εντατική έρευνα τις περασμένες δύο δεκαετίες έως και σήμερα, και αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την ανακάλυψη ενός ευρέος

φάσματος διαφορετικών προσεγγίσεων συστημάτων αναγέννησης που περιλαμβάνουν χημικούς καταλύτες, ηλεκτροχημικούς καταλύτες και ένζυμα. Μέχρι τώρα μόνο οι προσεγγίσεις αναγέννησης που χρησιμοποιούν ένζυμα έχουν πρακτική εφαρμογή σε παρασκευαστικό επίπεδο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι πιο αντιπροσωπευτικές μέθοδοι αναγέννησης του συμπαραγόνα NAD(P)H.^{9,10}

Πίνακας 1: Συνήθεις μέθοδοι αναγέννησης του NAD(P)H.



Cosubstrate	Coproduct	Catalyst
Γλυκόζη	Γλυκονικό οξύ	GDH
Ισοπροπανόλη	Ακετόνη	DH
Αιθανολη	Οξικό οξύ	ADH/AldDH
Φορμικό οξύ	CO ₂	FDH Rh
H ₂	H ₂ O	Hase
Κάθοδος	-	Rh Hase

GDH: αφυδρογονάση της γλυκόζης, ADH: αλκολική αφυδρογονάση, AldDH: αλδεϋδική αφυδρογονάση, FDH: φορμική αφυδρογονάση, Rh: [Cr*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺, Hase: υδρογενάση

Η χρησιμοποίηση ηλεκτροδίου καθόδου θα μπορούσε να είναι μια ιδανική μέθοδος αναγέννησης του συμπαραγόνα NAD(P)H και αυτό διότι απαιτεί λιγότερα αναγωγικά ισοδύναμα, παρόλα αυτά η άμεση η αναγωγή του NAD(P)⁺ δεν είναι εφικτή εξαιτίας των πολλών παράπλευρων αντιδράσεων.¹¹ Ως εκ τούτου, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι χημικοί καταλύτες ως μέσα μεταφοράς ηλεκτρονίων από την κάθοδο στο NAD(P)⁺ προκειμένου να είναι σε θέση να συμμετέχουν σε ένα αποδοτικό σύστημα αναγέννησης του NAD(P)H στις αντιδράσεις αναγωγής καταλυόμενες από αλκοολικές αφυδρογονάσεις.^{12,13,14} Ως επί το πλείστον το

σύμπλοκο του ρουθηνίου $[\text{Cr}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ χρησιμοποιείται ως μέσο μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο συγκεκριμένος καταλύτης εμφάνισε υψηλή σταθερότητα και δραστηριότητα όμως δεν ήταν συμβατό με κάποια ένζυμα και έτσι η πρακτική εφαρμογή του σε συστήματα αναγέννησης του συμπαραγόντα περιορίστηκε.^{15,16}

Η χρήση υδρογόνου H_2 ως αναγωγικού παράγοντα με καταλύτη μια υδρογενάση^{17,18} θα μπορούσε να είναι μια ελκυστική εναλλακτική μέθοδος για την αναγέννηση του NAD(P)H , όμως όλες οι έρευνες σχετικά με αυτή την μεθοδολογία είναι σε πρώιμο στάδιο και δεν αναμένονται άμεσα αποτελέσματα τα επόμενα χρόνια.

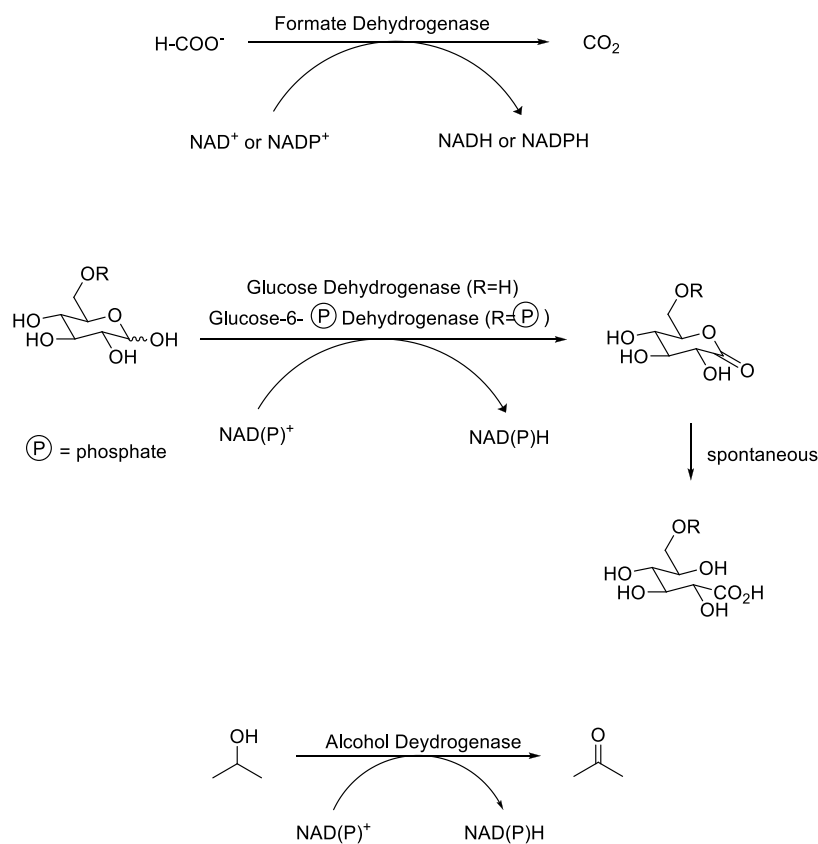
Το καλύτερο και το πιο διαδεδομένο σύστημα αναγέννησης του NADH είναι η χρήση της φορμικής αφυδρογονάσης FDH που καταλύει την οξείδωση του φορμικού οξέος σε CO_2 (Σχήμα 3). Η συγκεκριμένη μέθοδος αναγέννησης έχει πολλά πλεονεκτήματα καθώς το φορμικό οξύ και το διοξείδιο του άνθρακα είναι τελειώς αβλαβή για τα ένζυμα και μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα από την φιάλη της αντίδρασης. Επίσης η φορμική αφυδρογονάση FDH μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα και σε ακινητοποιημένη μορφή και είναι αρκετά σταθερή ως ένζυμο. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι η FDH έχει χαμηλή ειδική δραστηριότητα (3U/mg) και δεν είναι το ίδιο αποδοτική όταν χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων το NADPH .^{1a}

Μια ακόμη χρήσιμη μέθοδος για την αναγέννηση του συμπαραγόντα είναι η χρήση της αφυδρογονάσης της γλυκόζης GDH , η οποία καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης στην αντίστοιχη γλυκονολακτόνη. Η συγκεκριμένη μέθοδος αναγέννησης είναι ουσιαστικά μη αντιστρεπτή καθώς η ισορροπία είναι συνεχώς μετατοπισμένη προς το προϊόν, διότι η γλυκονολακτόνη που παράγεται υδρολύεται αυθόρμητα και δίνει γλυκονικό οξύ (Σχήμα 3). Συγκρίνοντας αυτή τη μέθοδο με την αντίστοιχη της FDH υπερτερεί στο ότι είναι το ίδιο αποδοτική για την αναγέννηση του NADH αλλά και του NAD(P)H καθώς επίσης και στο γεγονός ότι η GDH έχει μεγαλύτερη ειδική δραστηριότητα σε σχέση με την FDH .^{1a,2a}

Τέλος μια επίσης ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αναγέννηση του συμπαραγόντα είναι η χρήση μιας αλκοόλης, συνήθως της ισοπροπανόλης, ως βοηθητικό υπόστρωμα-αναγωγικό παράγοντα για την αναγέννηση του NAD(P)H (Σχήμα 3). Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της διαδικασίας είναι ότι δεν απαιτείται η χρήση ενός δεύτερου ενζύμου για την οξείδωση της ισοπροπανόλης, καθώς αυτή πραγματοποιείται από το ίδιο ένζυμο-αφυδρογονάση που καταλύει και την αντίδραση

αναγωγής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται η πολυπλοκότητα του συστήματος.^{1a,13,19}

Τα τελευταία χρόνια γίνονται σημαντικές προσπάθειες χρήσης συνθετικών αναλόγων των νικοτιναμιδικών συμπαραγόντων NAD(P)H (mNAD(P)Hs) σε πολλές βιοκαταλυτικές διεργασίες με ενθαρρυντικά σε ορισμένες περιπτώσεις αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα με τη χρήση των mNADPHs έναντι των φυσικών συμπαραγόντων NADP(H), των οποίων το κόστος είναι πολύ υψηλό όπως προαναφέρθηκε, δεν απαιτείται η αναγέννηση τους και αυτό διότι, χρησιμοποιούνται σε στοιχειομετρικές και όχι σε καταλυτικές ποσότητες. Επίσης τα ανάλογα των νικοταμιδικών συμπαραγόντων χρησιμοποιούνται και για την *in situ* αναγέννηση των φυσικών συμπαραγόντων NAD(P)H αποφεύγοντας έτσι τη χρήση άλλων ενζύμων όπως GDH και FDH το κόστος των οποίων είναι αρκετά υψηλό. Βέβαια το κυριότερο μειονέκτημα των mNADPHs είναι ότι πολλές από τις NADP(H)-εξαρτώμενες αφυδρογονάσες-κετορέδουκτάσεις δεν είναι συμβατές με αυτά και πολλές φορές αναστέλλουν την δράση τους.^{2b,2c}



Σχήμα 3: Τρόποι ενζυμικής αναγέννησης του ανηγμένου συμπαραγόντα NAD(P)H.

Σύγκριση ολόκληρων κυττάρων και απομονωμένων ένζυμων στις βιοκαταλυτικές αναγωγές

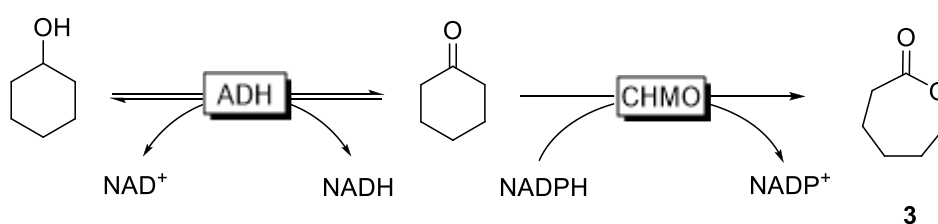
Η χρήση ολόκληρων κυττάρων ως καταλύτες βιοκαταλυτικών αναγωγών καρβόνυλο-ενώσεων είναι συχνή εξαιτίας του γεγονότος ότι τις περισσότερες φορές δεν απαιτείται εξωτερικό σύστημα αναγέννησης του συμπάροντα και δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμός του ενζύμου. Από την άλλη πλευρά, η βιοκαταλυτική δραστηριότητα των μικροβιακών κυττάρων είναι στενά συνδεδεμένη με τις μεταβολικές διεργασίες και ως εκ τούτου το ποσοστό και ο χρόνος μετατροπής του υποστρώματος προς το αντίστοιχο προϊόν της βιοαναγωγής πολλές φορές δεν είναι τα ιδανικά.^{2a}

Η παρουσία επίσης ενδογενών ενζύμων στο κύτταρο που συχνά ανταγωνίζονται ή συμπληρώνουν την βιοκαταλυτική δράση της αφυδρογονάσης-κετορεδουκτάσης στο υπόστρωμα προς αναγωγή, μπορεί να μειώσει την απόδοση και να οδηγήσει σε σύνθετα μίγματα προϊόντων.² Ένα καλό παράδειγμα στη βιβλιογραφία πάνω σε αυτό είναι η καταλυτική αναγωγή της κυκλοεξανόνης στην κυκλοεξανόλη από τον μικροοργανισμό *Geotrichium candidum*.²⁰ Το τελικό προϊόν της βιομετατροπής δεν ήταν μόνο η κυκλοεξανόλη αλλά και η ε-καπρολακτόνη **3**. Το μίγμα κυκλοεξανόλης-ε-καπρολακτόνης παρατηρήθηκε ως αποτέλεσμα συνδυασμού μιας αναγωγής καταλυόμενης από αλκοολική αφυδρογονάση και μιας αντίδρασης Baeyer-Villinger που καταλύεται από την μονοοξυγενάση της κυκλοεξανόνης (CHMO), οι οποίες πραγματοποιούνται ταυτόχρονα. Ανάλογα με τις συνθήκες της αντίδρασης ευνοείται η μία από τις δύο βιοκαταλυτικές διεργασίες και έτσι σχηματίζεται το ένα από τα δύο προϊόντα εκλεκτικά (Σχήμα 4).

Ένα άλλο ζήτημα που προκύπτει χρησιμοποιώντας ολόκληρα κύτταρα στις βιοαναγωγές είναι η χαμηλή εναντιοεκλεκτικότητα που παρατηρείται κάποιες φορές. Αυτό οφείλεται στο ότι οι ενδογενείς αφυδρογονάσες στους ζωντανούς οργανισμούς είναι αρκετά πιθανό να δρουν παράλληλα με ανταγωνιστικό ή και συμπληρωματικό τρόπο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η οπτική καθαρότητα του ανηγμένου προϊόντος να είναι χαμηλή. Το 2009 ο Yang και οι συνεργάτες του κατάφεραν μια ιδιαίτερη πρόκληση στο πεδίο των ολόκληρων κυττάρων και των μικροοργανισμών στις βιοκαταλυτικές αναγωγές.²¹ Χρησιμοποιώντας άγρια στελέχη του μικροοργανισμού

Sacchariomyces cerevisiae για την αναγωγή της 3-χλωροπροπιοφαινόνης, η εναντιοεκλεκτικότητα του ανηγμένου προϊόντος **4** ήταν μόνο 60%. Με θερμική επεξεργασία τα κύτταρα έδωσαν το ανηγμένο προϊόν **4** με εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια >99% (Σχήμα 4). Πιθανότατα η θέρμανση προκάλεσε την απενεργοποίηση της δράσης ενδογενούς αφυδρογονάσης του μικροοργανισμού που δρούσε συμπληρωματικά ως προς την επιθυμητή αφυδρογονάση που καταλύει την βιομετατροπή.

Geotrichium candidum



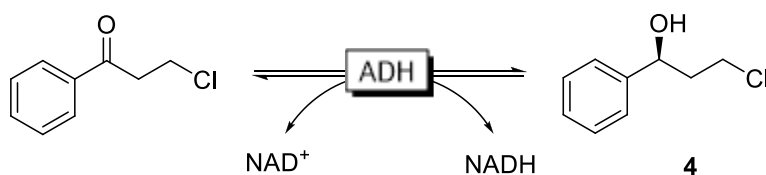
Ευνοείται σε:

μικρό χρόνο αντίδρασης
χαμηλή συγκέντρωση O₂
υψηλή συγκέντρωση αρχικού υποστρώματος

Ευνοείται σε:

μεγάλο χρόνο αντίδρασης
υψηλή συγκέντρωση O₂
χαμηλή συγκέντρωση αρχικού υποστρώματος

Sacchariomyces cerevisiae



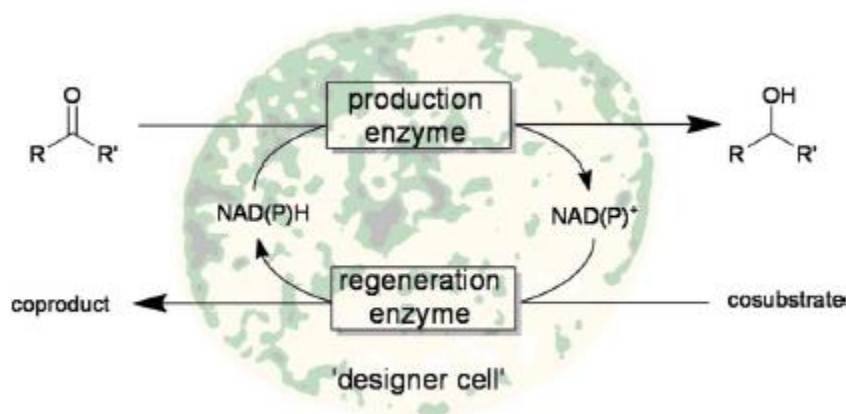
χωρίς θερμική επεξεργασία: 60% ee
μετά από 25 λεπτά στους 50 °C, >99% ee

Σχήμα 4: Επίδραση των συνθηκών της αντίδρασης στην χημειοεκλεκτικότητα της καταλυόμενης από το μικροοργανισμό *Geotrichium candidum* μετατροπής της κυκλοεξανόλης (πάνω) και επίδραση της θερμικής επεξεργασίας του καταλύτη στην εναντιοεκλεκτικότητα της αντίδρασης αναγωγής της 3-χλωροπροπιοφαινόνης καταλυόμενη από το μικροοργανισμό *Sacchariomyces cerevisiae* (κάτω).

Από την άλλη πλευρά με τη χρήση απομονωμένων ενζύμων τα ποσοστά μετατροπής των ανηγμένων προϊόντων είναι γενικώς μεγαλύτερα και επιπλέον μειώνονται οι παράπλευρες αντιδράσεις και τα παραπροϊόντα. Παρόλα αυτά, ο καθαρισμός των ενζύμων που απαιτείται είναι μια διαδικασία αρκετά χρονοβόρα και υψηλή σε κόστος. Τα απομονωμένα ένζυμα επίσης δεν είναι πάντα ανθεκτικά και η σταθερότητά τους δεν είναι δεδομένη και έτσι εφαρμόζονται περαιτέρω διεργασίες, όπως είναι η ακινητοποίηση τους.

Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας ένα διαφορετικό είδος βιοκαταλυτών είναι διαθέσιμο και πλέον είναι πολύ δημοφιλές και ευρέως χρησιμοποιούμενο. Πρόκειται για τα λεγόμενα «σχεδιασμένα κύτταρα» και προέκυψε από το συνδυασμό των πλεονεκτημάτων που προσφέρει η χρήση των ολόκληρων κυττάρων και των αντίστοιχων πλεονεκτημάτων που προσφέρει η χρήση απομονωμένων ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα σε ένα καλά καθιερωμένο σύστημα μικροβιακής έκφρασης, όπως για παράδειγμα αυτό της *Escherichia Coli*, μπορεί να υπέρ-εκφραστεί μια οποιαδήποτε αφυδρογονάση μαζί με την κατάλληλη αφυδρογονάση που είναι υπεύθυνη για την αναγέννηση του συμπαραγόντα, όπως είναι η GDH, η G6P-DH και η FDH (Σχήμα 5).

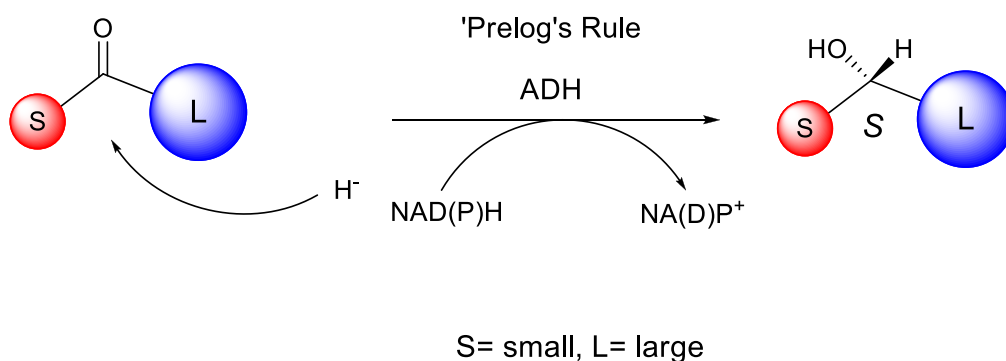
Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης «σχεδιασμένων κυττάρων» είναι το γεγονός ότι η υπερέκφραση μιας αφυδρογονάσης εξαλείφει σε πολύ μεγάλο βαθμό την δράση ενδογενών αφυδρογονασών που δρουν είτε ανταγωνιστικά είτε συμπληρωματικά και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ειδικότητας και της δραστηριότητας χωρίς να απαιτείται καθαρισμός του ενζύμου. Τα μικροβιακά κύτταρα επίσης, λόγω της κυτταρικής μεμβράνης, προστατεύουν τα ένζυμα από εξωγενείς παράγοντες στρες, όπως είναι η ανάδευση και η χρήση οργανικών διαλυτών. Η συνέκφραση του ενζύμου που είναι υπεύθυνη για την αναγέννηση του συμπαραγόντα καθιστά την καταλυτική διεργασία ανεξάρτητη από τις μεταβολικές δράσεις του κυττάρου, προσφέροντας λύση σε μια ακόμα δυσκολία χρήσης των ολόκληρων κυττάρων και επίσης, στις περισσότερες των περιπτώσεων, τα επίπεδα των ενδογενών συμπαραγόντων NAD(P)H είναι επαρκή για τη βιοκαταλυτική αντίδραση αναγωγής.^{2a}



Σχήμα 5: Μοντέλο αναπαράστασης της λειτουργίας ενός «σχεδιασμένου κυττάρου».

Πρόβλεψη στεreoχημείας σύμφωνα με τον κανόνα του Prelog

Οι προχειρόμορφες καρβόνυλο ενώσεις μπορούν να αναχθούν ενζυμικά χρησιμοποιώντας αφυδρογονάσες-κετορεδοκτάσες και να προκύψουν οπτικά ενεργές ενώσεις. Το υδρίδιο μπορεί να μεταφερθεί από το συμπάραγοντα είτε από την *re*- είτε από την *si*- επιφάνεια του καρβονυλίου του προχειρόμορφου υποστρώματος οδηγώντας σε (*S*) και (*R*) υδρόξυ προϊόντα αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις η στεreoχημική πορεία της αντίδρασης εξαρτάται από τη στερική διαμόρφωση του υποστρώματος και μπορεί να προβλεφθεί από ένα απλό μοντέλο που αναφέρεται ως κανόνας του Prelog (Σχήμα 6). Το υδρίδιο μεταφέρεται από τη *re*- επιφάνεια της καρβόνυλο ένωσης και έτσι προκύπτει το αντίστοιχο υδρόξυ προϊόν με στεreoχημεία (*S*) όταν υπάρχει ικανή διαφορά μεγέθους των υποκαταστατών του καρβονυλίου. Η πλειοψηφία των εμπορικά διαθέσιμων αφυδρογονασών-κετορεδοκτασών ακολουθούν τον κανόνα του Prelog, υπάρχουν όμως και αφυδρογονάσες-κετορεδοκτάσες που εμφανίζουν *anti*-Prelog στερεοειδικότητα.^{1a,6}



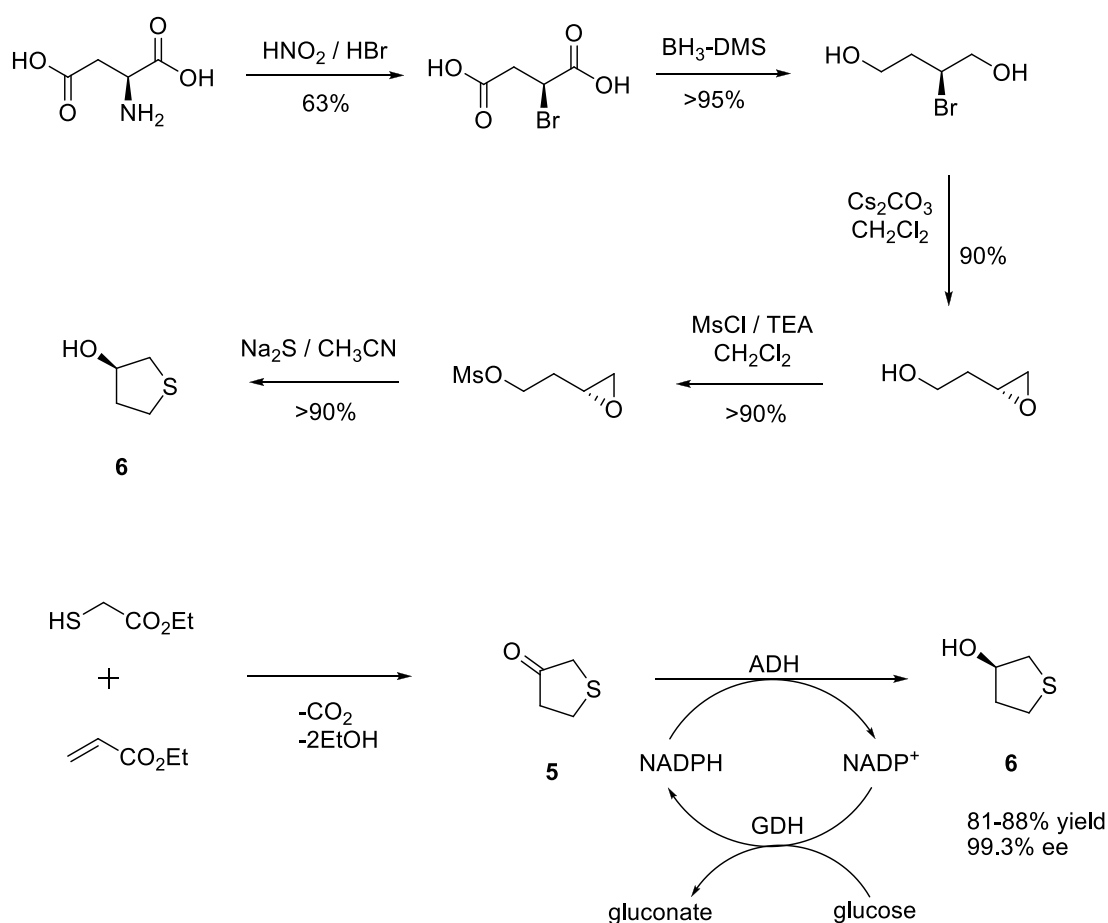
Σχήμα 6: Ο κανόνας του Prelog για την ασύμμετρη αναγωγή καρβόνυλο ενώσεων.

Αφυδρογονάσεις-κετορεδουκτάσεις στην σύνθεση χρήσιμων χειρόμορφων ενδιάμεσων, φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων

Οι καρβόνυλο-ενώσεις σαν αρχικά υποστρώματα προς αναγωγή από NAD(P)H-εξαρτώμενες αλκοολικές αφυδρογονάσεις και κετορεδουκτάσεις προσφέρουν την δυνατότητα σύνθεσης χειρόμορφων ενδιάμεσων με υψηλή εναντιομερική περίσσεια και χημική καθαρότητα. Τα πλεονεκτήματά τους, όταν συνδυαστούν με κλασσικά χημικά πρωτόκολλα, επιτρέπουν την ανάπτυξη χημειοενζυμικών σύνθετικών μεθόδων, οι οποίες εφαρμόζονται για τη παρασκευή διαφορών φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων.⁶

Ένα καλό παράδειγμα βιοκαταλυτικής αναγωγής για τη σύνθεση χειρόμορφων ενδιάμεσων είναι η ασύμμετρη σύνθεση της (*R*)-τετραϋδροθειοφαιν-3-όλης **6** που χρησιμεύει ως χειρόμορφο ενδιάμεσο-κλειδί για τη σύνθεση του αντιβιοτικού Sulopenem και παρουσιάστηκε στη βιβλιογραφία από τον Landole και τους συνεργάτες του.²² Μάλιστα η συγκεκριμένη εφαρμογή συντομεύει σε δραματικό βαθμό την ήδη υπάρχουσα χημειοσυνθετική πορεία που, περιγράφοντας τη σύνθεση του χειρόμορφου ενδιάμεσου ξεκινώντας με το L-ασπαραγινικό οξύ.²³ Η καθαρά χημική σύνθεση αποτελείται από πέντε στάδια με πολύ μέτρια απόδοση περίπου 45% και με τη χρήση προβληματικών αντιδραστηρίων αλλά και αντιδράσεων όπως είναι η διαζώτωση και η αντίδραση με BH₃-DMS. Προκειμένου να ξεπεραστούν οι

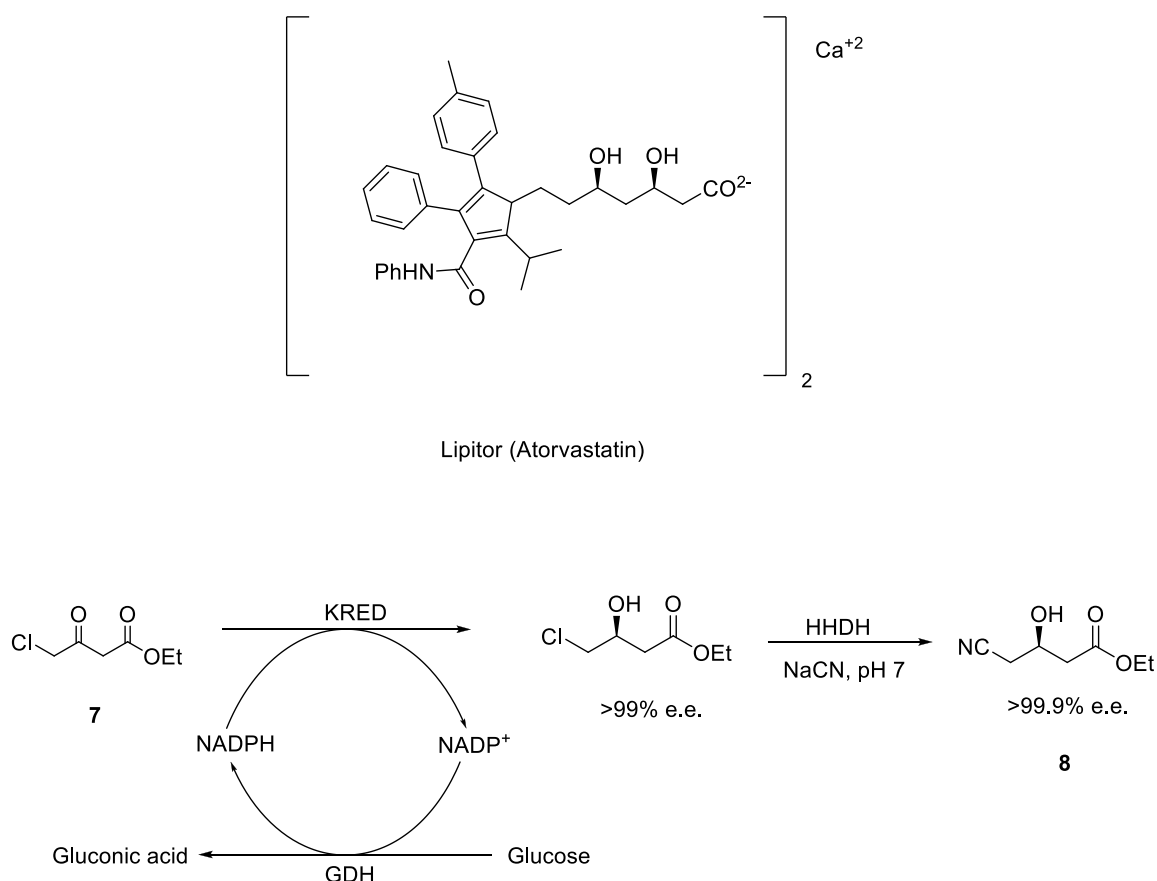
συγκεκριμένοι περιορισμοί η εταιρία Codexis υιοθέτησε την ασύμμετρη σύνθεση της (*R*)- τετραϋδροθειοφαιν-3-όλης **6** με χημειοενζυμικό τρόπο σε δύο μόλις στάδια, με στάδιο κλειδί την βιοκαταλυτική αναγωγή της διϋδροθειοφαιν-3(2*H*)-όνης **5** προς την αντίστοιχη δευτεροταγή (*R*)-αλκοόλη **6** σε υψηλή εναντιοεκλεκτική περίσσεια και υψηλή απόδοση, χρησιμοποιώντας την NADH-εξαρτώμενη αλκοολική αφυδρογονάση LkADH (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Σύγκριση της χημειοκαταλυτικής ασύμμετρης σύνθεσης του **6** (πάνω) με την αντίστοιχη βιοκαταλυτική (κάτω), με στάδιο κλειδί μια βιοκαταλυτική αναγωγή χρησιμοποιώντας μια NADH-εξαρτώμενη αλκοολική αφυδρογονάση.

Ακολουθούν άλλα τρία παραδείγματα που δείχνουν την σημαντική συμβολή των κετορεδουκτασών σε μεγάλης σημασίας φαρμακευτικά προϊόντα. Αρχικά η ενζυμική σύνθεση του (*R*)-4-κυανο-3-υδροξυβουτυρικού εστέρα **8** που είναι η

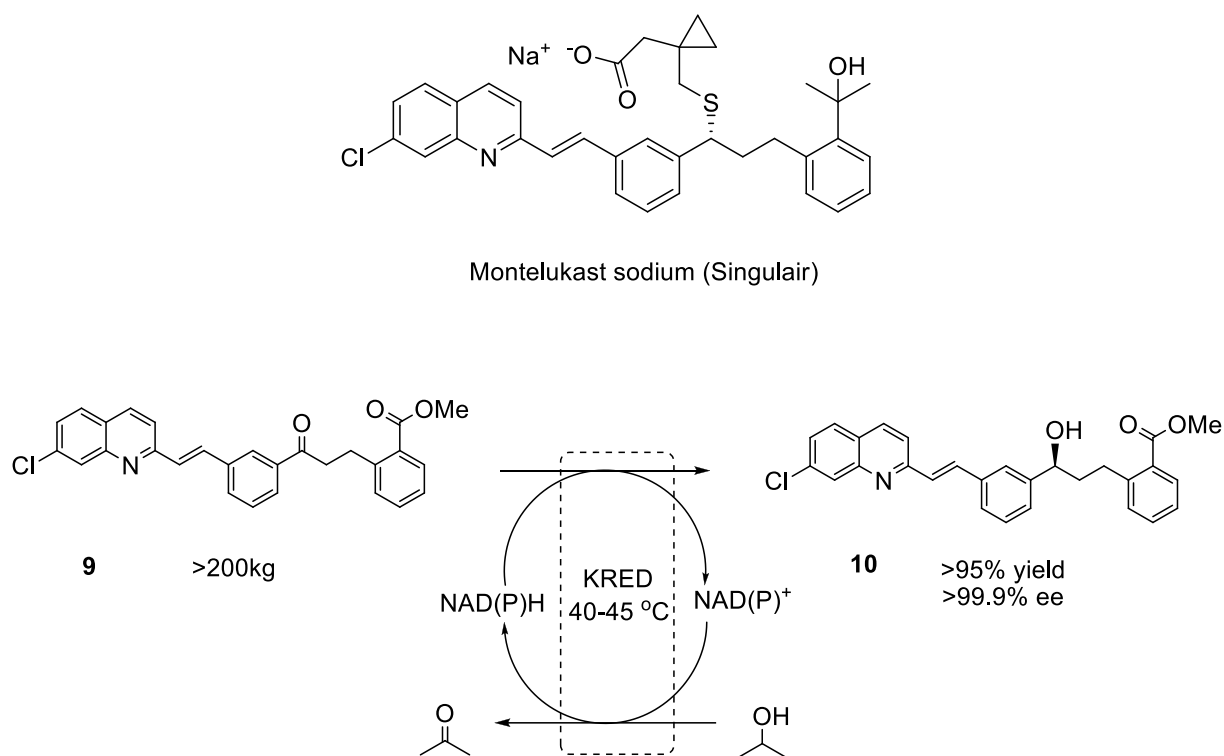
χειρόμορφη πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του φαρμάκου Lipitor εναντίον της χοληστερίνης (ατορβαστατίνη του ασβεστίου). Η ενζυμική σύνθεση περιλαμβάνει δύο βιοκαταλυτικές διεργασίες με στάδιο κλειδί την βιοκαταλυτική αναγωγή του 4-χλωρο-ακετοξικού εστέρα **7** στον αντίστοιχο **8** με τη χρήση NADPH-εξαρτώμενης κετορεδοκτάσης (Σχήμα 8).⁶



Σχήμα 8: Ενζυμική σύνθεση της χειρόμορφης πρόδρομης ένωσης **8** για τη σύνθεση του Lipitor με στάδιο κλειδί μια ενζυμική αναγωγή χρησιμοποιώντας NADPH-εξαρτώμενη κετορεδοκτάση.

Ακόμα μια νέα βιοκαταλυτική μέθοδος έχει περιγραφεί για τη σύνθεση ενός χειρόμορφου ενδιάμεσου-κλειδί που χρησιμοποιείται για την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα του Montelukast (*R*-ισομερές) που είναι το δραστικό συστατικό του φαρμάκου (API: active pharmaceutical ingredient) Singulair που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του άσθματος. Μια NAD(P)H-εξαρτώμενη κετορεδοκτάση

καταλύει την ασύμμετρη αναγωγή του **9** προς το αντίστοιχο προϊόν **10** με απεικόνιση (*S*), το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του Montelukast (Σχήμα 9).^{6,8}



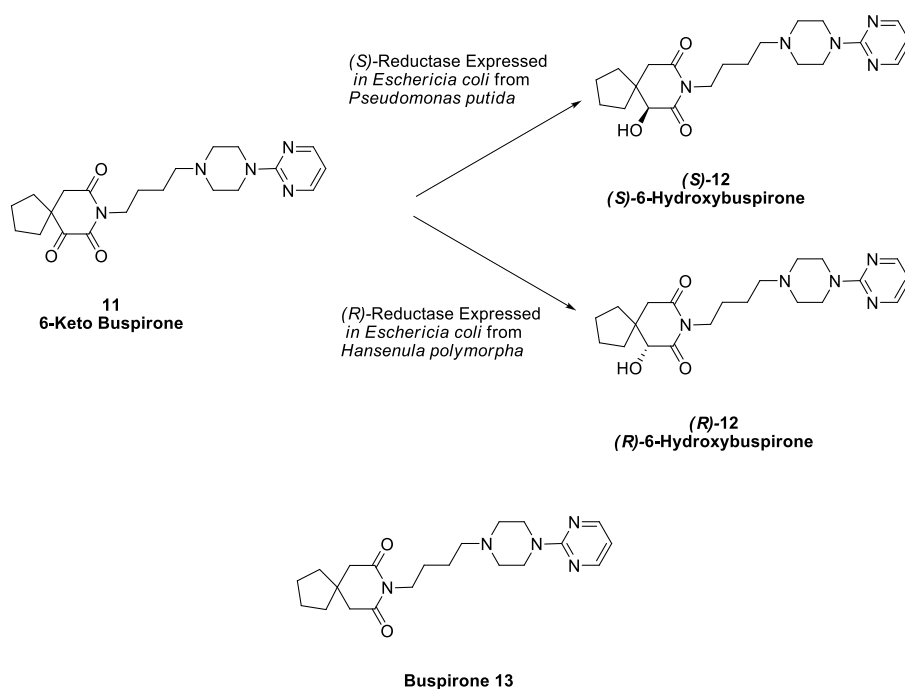
Σχήμα 9: Βιοκαταλυτική αναγωγή του **9** προς την αντίστοιχη (*S*)-αλκοόλη **10**, η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του Montelukast. Η βιοκαταλυτική αναγωγή έγινε με τη χρήση NAD(P)H-εξαρτώμενης κετορεδοκτάσης.

Ένα τελευταίο παράδειγμα χρήσης των κετορεδοκτασών στη σύνθεση φαρμακευτικών προϊόντων είναι η χημειοενζυμική σύνθεση του αγχολυτικού φαρμάκου 6-hydroxybuspirone **12** (Σχήμα 10). Η συγκεκριμένη ένωση είναι ο κύριος μεταβολίτης της Buspirone **13**, ενός φαρμάκου που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του άγχους και της κατάθλιψης και δρα με την ισχυρή πρόσδεσή της στον υποδοχέα της σεροτονίνης 5HT1A.²⁴⁻²⁶ Το κύριο μειονέκτημα αυτού του φαρμάκου είναι η χαμηλή συγκέντρωσή του στο αίμα μετά την χορήγηση του.²⁷

Μετά από πολλές κλινικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι ο κύριος μεταβολίτης της **13** που είναι η 6-hydroxybuspirone **12** παρόλα που η συγγένεια της με τον υποδοχέα 5HT1A είναι το ένα τρίτο της αντίστοιχης με την Buspirone **13**, η συγκέντρωσή της στο ανθρώπινο αίμα μετά τη χορήγηση είναι 30-40 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τη Buspirone **13** και αυτό πιθανόν εξηγεί την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητά της ως

αγγολυτικό φάρμακο.^{26,27} Μετά από κλινικές μελέτες επίσης διαπιστώθηκε ότι και τα δύο εναντιομερή είναι αρκετά δραστικά το κάθε ένα για διαφορετικό λόγο, καθώς το (*R*) εναντιομερές επέδειξε μεγαλύτερη ειδικότητα για τον υποδοχέα 5HT1A, ενώ το (*S*) εναντιομερές έχει το πλεονέκτημα να αποβάλλεται πιο αργά από το αίμα.^{24,25}

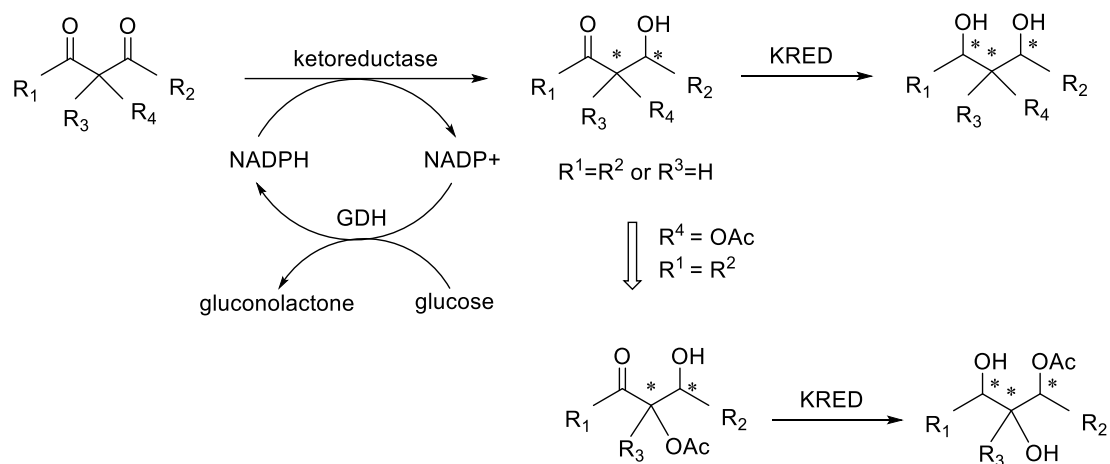
Η ανάγκη σύνθεσης και των δύο εναντιομερών με υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα και σε μεγάλη απόδοση οδήγησε στη χρήση κετορεδουκτασών, υπερεκφρασμένων σε *E.Coli* για την ασύμμετρη αναγωγή της 6-κετο buspirone **11** στην αντίστοιχη (*R*)- ή (*S*)- 6-hydroxybuspirone **12** (Σχήμα 10). Για τη σύνθεση του (*R*) εναντιομερούς χρησιμοποιήθηκε η (*R*) κετορεδουκτάση από τον μικροοργανισμό *Hansenula polymorpha* SC 13845 εκφρασμένη σε *E.Coli* και για την αναγέννηση του συμπαραγόντα NADPH χρησιμοποιήθηκε η G6P-DH από τον ζακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* εκφρασμένη στο ίδιο μικροβιακό σύστημα της *E.Coli*. Αντίστοιχα, για τη σύνθεση του (*S*) εναντιομερούς χρησιμοποιήθηκε η (*S*) κετορεδουκτάση από τον μικροοργανισμό *Pseudomonas Putida* SC 16269 εκφρασμένη σε *E.Coli* και για την αναγέννηση του συμπαραγόντα NADH χρησιμοποιήθηκε η FDH από τον μικροοργανισμό *P. pastoris* εκφρασμένη στο ίδιο μικροβιακό σύστημα της *E.Coli*. Τα δύο εναντιομερή συντέθηκαν με εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια μεγαλύτερη από 99% και σε μεγάλη απόδοση (>98%).^{26,27}



Σχήμα 10: Εφαρμογή ενζυμικής αναγωγής για τη σύνθεση και των δυο εναντιομερών του αγγολυτικού φαρμάκου 6-hydroxybuspirone.

Τα τελευταία δέκα χρόνια στην ερευνητική μας ομάδα έχουν πραγματοποιηθεί αναλυτικές μελέτες των βιοκαταλυτικών αναγωγών πλήθους υποστρωμάτων, που αφορούν κατά κύριο λόγο κορεσμένες δικετόνες, β-κετοεστέρες και β,δ-δικετοεστέρες με απομονωμένες NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες.

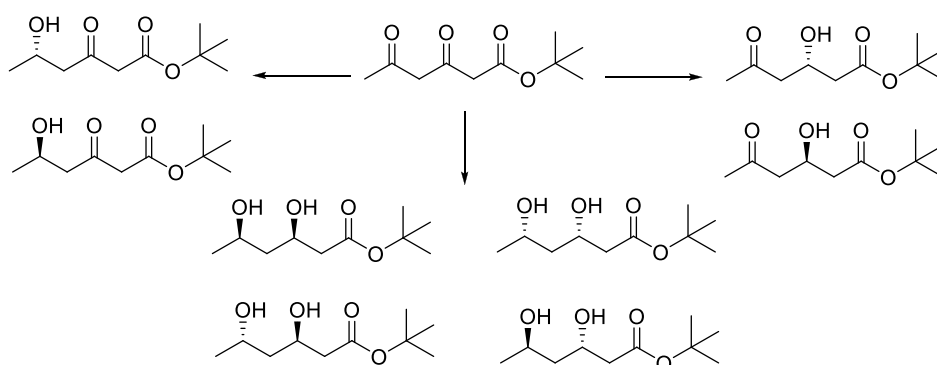
Το 2006 περιγράφηκε από την ομάδα μας η σύνθεση πολύτιμων χειρόμορφων ενδιάμεσων με τη χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν οι τοποεκλεκτικές και στερεοεκλεκτικές βιοκαταλυτικές αναγωγές α-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών στις αντίστοιχες β-κετο αλκοόλες ή 1,3-διόλες με τη χρήση 34 διαφορετικών NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών που ήταν εμπορικά διαθέσιμες. Οι χειρόμορφες κετο-αλκοόλες και οι διόλες, αντιπροσωπεύουν πολύ χρήσιμα υποστρώματα και πρόδρομα ενδιάμεσα στην οργανική σύνθεση. Τέτοιες ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί είτε ως πρόδρομες ενώσεις είτε ως δομικές μονάδες διαφόρων δραστικών βιολογικών ενώσεων και φαρμακευτικών προϊόντων.²⁸



Σχήμα 11: Ενζυμική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών με NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες

Το 2012 η ερευνητική μας δραστηριότητα προχώρησε στη μελέτη της ενζυμικής αναγωγής β,δ-δικετοεστέρων με τη χρήση κετορεδουκτασών. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε η στερεοεκλεκτική σύνθεση δ-υδροξυ κετο εστέρων, β-υδροξυ-δ-κετο εστέρων και β,δ-διυδροξυ εστέρων, ενώσεις που είναι πολύ χρήσιμα ενδιάμεσα στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση

πολλών φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων και άλλων σημαντικών χημικών ενώσεων. Χρησιμοποιώντας 23 εμπορικά διαθέσιμες απομονωμένες NADPH-κετορεδουκτάσες προέκυψαν επτά από τα οκτώ πιθανά στερεοϊσομερή από ενζυμική αναγωγή των β,δ-δικετοεστέρων σε υψηλή εναντιοεκλεκτική και διαστερεοεκλεκτική περίσσεια. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και σε ένα στάδιο (one pot), στην ίδια φιάλη αντίδρασης, χωρίς απομόνωση του ενδιάμεσου προϊόντος της πρώτης αναγωγής.²⁹



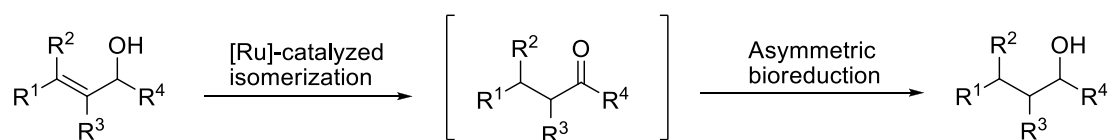
Σχήμα 12: Όλα τα πιθανά στερεοϊσομερή από την απλή και διπλή αναγωγή του 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα.

Ωστόσο, έχουν προταθεί κατά καιρούς αρκετοί τρόποι σύνθεσης των συγκεκριμένων ενώσεων με χημικό, χημειοενζυμικό και ενζυμικό τρόπο, οι οποίοι είναι αρκετά περίπλοκοι για τη στερεοεκλεκτική σύνθεση όλων των πιθανών στερεοϊσομερών. Τα τελευταία χρόνια η πρόκληση για την απλούστευση μιας πολύπλοκης συνθετικής διαδικασίας σε ένα στάδιο (one pot) και αν είναι δυνατόν ο συνδυασμός διαδοχικών βιοκαταλυτικών αναγωγών στην ίδια φιάλη αντίδρασης, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον σε ακαδημαϊκή έρευνα και στη χημική βιομηχανία. Σε γενικές γραμμές, τα ένζυμα μπορούν να διευκολύνουν μια περίπλοκη συνθετική διαδικασία, δεδομένου ότι προσφέρουν μεγάλες δυνατότητες για τον έλεγχο της εναντιοεκλεκτικότητας των προϊόντων και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί μια διεργασία «domino-cascade» ενζυμικών αντιδράσεων στην ίδια φιάλη αντίδρασης.²⁹

Σε μια συνεχή προσπάθεια αξιοποίησης της αποτελεσματικότητας που προσφέρουν οι βιοσυνθετικές μέθοδοι, έχει σημειωθεί αξιοσημείωτη πρόοδος και

στην ανάπτυξη χημειοενζυμικών διεργασιών one-pot, οι οποίες συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα της χημειο-, τοπο- και στερεοεκλεκτικότητας των ενζύμων και της παραγωγικότητας των χημικών καταλυτών. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα σε αυτόν τον τομέα έχει να επιδείξει πολλά παραδείγματα, όπου χημειοκαταλυτικοί και βιοκαταλυτικοί μετασχηματισμοί πραγματοποιούνται στην ίδια φιάλη αντίδρασης διαδοχικά ή και ταυτόχρονα, στην οποία ο χημικός καταλύτης και ο βιοκαταλύτης συνυπάρχουν από την αρχή της διεργασίας. Από αυτούς τους μετασχηματισμούς μπορεί να προκύψουν προϊόντα με εξαιρετική οπτική καθαρότητα και διαφορετική χημική ποικιλομορφία. Παρακάτω παρουσιάζονται δύο πρόσφατα παραδείγματα από την βιβλιογραφία όπου η βιοκαταλυτική αναγωγή συνδυάζεται με οργανικές και οργανομεταλλικές αντιδράσεις σε one-pot cascade διεργασίες.³⁰

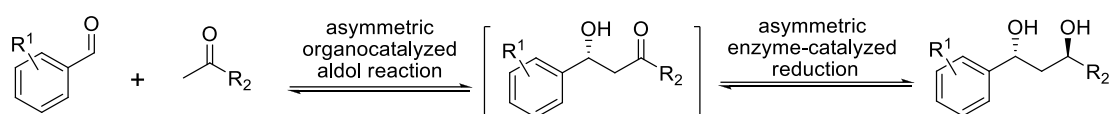
Το πρώτο παράδειγμα δημοσιεύτηκε από την ερευνητική ομάδα του Gonzales-Sabin το 2016 και περιγράφει τον συνδυασμό βιοκαταλυτικής αναγωγής με NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες με τον ισομερισμό αλλυλικών αλκοολών καταλυόμενο από σύμπλοκα Ru⁴⁺ (Σχήμα 13). Οι συγκεκριμένοι μετασχηματισμοί έγιναν στην ίδια φιάλη αντίδρασης, σε υδατικό περιβάλλον και η διεργασία ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική όσο αφορά στις οπτικές καθαρότητες και τις χημικές αποδόσεις των προϊόντων και στην περίπτωση όπου οι δύο μετασχηματισμοί πραγματοποιήθηκαν με διαδοχικό τρόπο, αλλά και στην περίπτωση που ο καταλύτης Ru και η κετορεδουκτάση συνυπήρχαν από την αρχή στην ίδια φιάλη.³¹



Σχήμα 13: Καταλυτική ισομερίωση αλλυλικών αλκοολών με σύμπλοκο ρουθηνίου συνδυασμένη με εναντιοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή σε one-pot cascade διεργασία.

Ένα δεύτερο παράδειγμα εφαρμογής συνδυασμού μιας ασύμμετρης ενζυμικής αναγωγής και μιας ασύμμετρης αλδολικής αντίδρασης καταλυόμενης από οργανικό καταλύτη, σε μια one-pot διεργασία για την εναντιοεκλεκτική και διαστερεοεκλεκτική σύνθεση άρυλο-1,3-διολών παρουσιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του Gröger (Σχήμα 14). Αρχικά το 2009, η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα κατάφερε να αναπτύξει μια cascade διεργασία όπου οι δύο μετασχηματισμοί

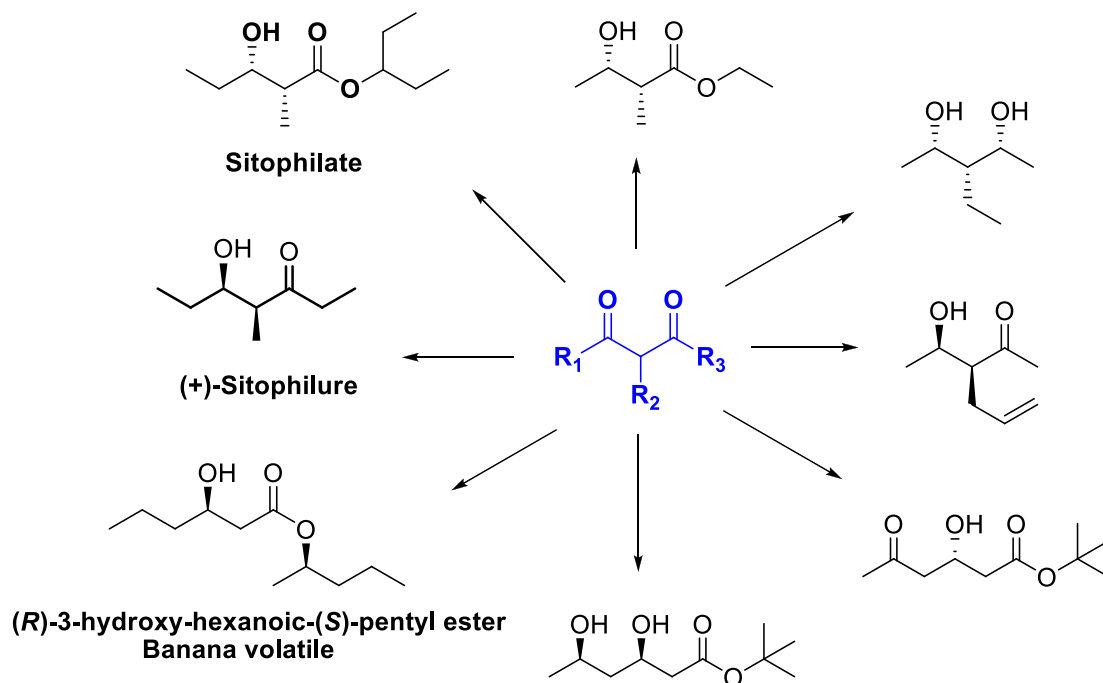
πραγματοποιούνται διαδοχικά στην ίδια φιάλη αντίδρασης για την εναντιοεκλεκτική και διαστεροεκλεκτική σύνθεση άρυλο-1,3-διολών³², και το 2017 η ίδια ομάδα παρουσίασε την ίδια διεργασία στην οποία αυτή τη φορά, ο οργανικός καταλύτης και η αλκοολική αφυδρογονάση από *Rhodococcus* sp συνυπάρχουν από την αρχή στην φιάλη αντίδρασης. Το αποτέλεσμα ήταν η σύνθεση άρυλο-1,3-διολών με εξαιρετική εναντιοεκλεκτική και διαστερομερική περίσσεια και σε καλό ποσοστό μετατροπής. Μάλιστα αυτή η εργασία ήταν το πρώτο παράδειγμα στη βιβλιογραφία όπου συνδυάζεται μια ασυμμετρική οργανική και μια ασύμμετρη βιοκαταλυτική αντίδραση και με συνύπαρξη των καταλυτών από την αρχή στην ίδια φιάλη αντίδρασης.³³



Σχήμα 14: Συνδυασμός μιας οργανοκαταλυτικής αλδολικής αντίδρασης με μια διαστεροεκλεκτική ενζυμική αναγωγή της *in situ* παρασκευαζόμενης β-υδρόξυ κετόνης σε μια one-pot cascade διεργασία.

Εφαρμογές των βιοκαταλυτικών αναγωγών με κετορεδουκτάσες έχουν πραγματοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα στη σύνθεση αρκετών φυσικών προϊόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η σύνθεση της φυσικής φερομόνης (+)-Sitophilure που περιγράφηκε το 2006, χρησιμοποιώντας απομονωμένες NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες. Η συγκεκριμένη χημειοενζυμική σύνθεση είναι η πιο εύκολη σύνθεση της συγκεκριμένης φερομόνης σε μόλις δύο στάδια.³⁴ Ακόμη το 2007 παρουσιάστηκε η σύνθεση της φυσικής φερομόνης Sitophilate σε δύο στάδια που περιλαμβάνουν μια βιοαναγωγή ακολουθούμενη από μια ενζυμική υδρόλυση.³⁵ Ένα άλλο παράδειγμα σύνθεσης φυσικών προϊόντων που περιγράφηκε το 2011, είναι η ολική σύνθεση του (*R*)-3-υδρόξυ-εξανοϊκού-(*S*)-2-πεντυλεστέρα (πητική ένωση της μπανάνας) με χημειοενζυμικό τρόπο σε μόλις τρία στάδια με αντιδράσεις κλειδιά δυο βιοαναγωγές και μια ενζυμική μετεστεροποίηση.³⁶ Άλλα φυσικά προϊόντα που έχουν συντεθεί από την ομάδα μας είναι οι Stegobinone και Stegobiol που είναι φυσικές φερομόνες του σκαθαριού *Stegobium paniceum* L.³⁷ Όλα αυτά τα φυσικά προϊόντα συντέθηκαν με υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα και

διαστερεοεκλεκτικότητα καθώς και σε υψηλές αποδόσεις, αλλά και με υψηλή χημική καθαρότητα.



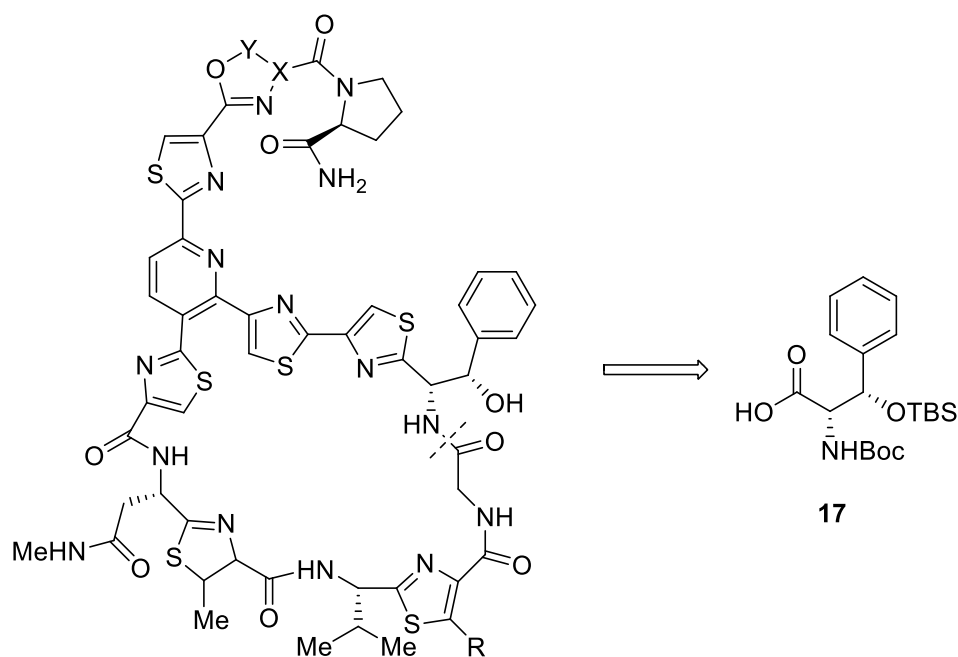
Σχήμα 15: Σύνθεση χειρόμορφων ενδιάμεσων και φυσικών προϊόντων με χρήση NADPH-εξαρτώμενων κετοεδοκτασών.

Κεφάλαιο 2

Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές α-αμιδο-β-κετο εστέρων

Η στερεοεκλεκτική αναγωγή α-αμιδο-β-κετο εστέρων οδηγεί στην σύνθεση οπτικά ενεργών β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων, ενώσεις που είναι παράγωγα β-υδροξυ αμινοξέων και είναι σημαντικά χειρόμορφα ενδιάμεσα και δομικές μονάδες για την σύνθεση πολυάριθμων φυσικών προϊόντων, ενώσεων με υψηλή βιολογική δραστικότητα, φαρμακευτικών προϊόντων και πεπτιδίων.³⁸ Τέτοια παραδείγματα είναι τα αντιβιοτικά GE2270 που ανήκουν στην οικογένεια των θειοπεπτιδίων,³⁹ τα rapuamides⁴⁰, το αντιβιοτικό vancomycin,⁴¹ και το φυσικό προϊόν (+)-lactacystin που χρησιμοποιείται επίσης ως αντιβιοτικό.⁴²

Τα αντιβιοτικά GE2270 ανήκουν στην οικογένεια των θειοπεπτιδίων που περιέχουν στο δομικό τους σκελετό ένα πυριδινικό δακτύλιο και απομονώθηκαν μαζί με μια συλλογή ενώσεων με τα συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά από το εκχύλισμα του μικροοργανισμού *Planobispora rosea* ATCC53773.⁴³ Οι ενώσεις αυτές ονομάστηκαν παράγοντες GE2270 και μετά από έρευνες βρέθηκε ότι αναστέλλουν την βακτηριακή πρωτεϊνική σύνθεση τόσο των Gramm θετικών όσο και των Gramm αρνητικών βακτηρίων.⁴⁴ Λόγω της υψηλής αντιβακτηριακής τους δράσης προσέλκυσαν και συνεχίζουν να προσελκύουν το ενδιαφέρον των συνθετικών χημικών.³⁹ Τα αντιβιοτικά αυτά συνθετικά μπορεί να προκύψουν από την τμηματική ένωση χειρόμορφων μορίων και δομικών μονάδων και ένα από αυτά τα μόρια είναι ένα β-υδροξυ αμινοξύ και πιο συγκεκριμένα η β-υδροξυ φαινυλαλανίνη, της οποίας η απόλυτη στερεοδομή προσδιορίστηκε από τους Heckmann και Bach.⁴⁵ Έτσι οι ενώσεις GE2270A **14**, GE2270T **15** και GE2270C1 **16** περιέχουν στο δομικό τους σκελετό μια χειρόμορφη β-υδροξυ φαινυλαλανίνη που μπορεί να προέλθει από την ένωση **17** (Σχήμα 16), της οποίας η σύνθεση έχει επιτευχθεί στο παρελθόν με διάφορους τρόπους.³⁹

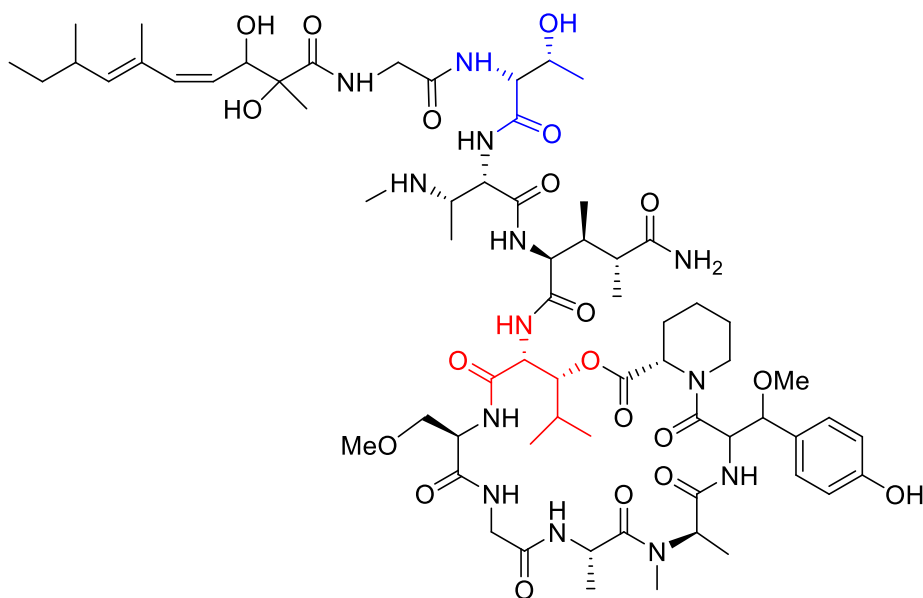


- 14:** Y-X=CH₂-CH, R = CH₂OMe [GE2270A]
15: Y-X=CH=C, R = CH₂OMe [GE2270T]
16: Y-X=CH₂-CH, R = H [GE2270C1]

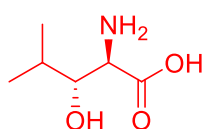
Σχήμα 16: Τα αντιβιοτικά GE2270A **14**, GE2270T **15** και GE2270C1 **16** περιέχουν στο δομικό τους σκελετό μια χειρόμορφη β-υδροξύ φαινυλαλανίνη που μπορεί να προέλθει από την ένωση **17**.

Τα οπτικώς καθαρά β-υδροξύ αμινοξέα και τα παράγωγά τους είναι επίσης δομικές μονάδες για τη σύνθεση μιας μεγάλης κατηγορίας ενώσεων, των rapuamides. Οι rapuamides είναι κυκλικά depsipeptides και απομονώθηκαν για πρώτη φορά στην Παπούα Νέα Γουινέα από συλλογές των σφουγγαριών *Theonella mirabilis* και *Theonella swinhoei* και μετά από εκτενείς έρευνες διαπιστώθηκε ότι εμφανίζουν anti-HIV καθώς και κυτταροτοξική δραστηριότητα.⁴⁰

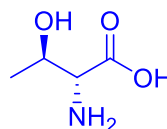
Ένα από αυτά τα μόρια είναι η rapuamide A1 που περιέχει στον δομικό της σκελετό ένα παράγωγο της λευκίνης και πιο συγκεκριμένα τη (2*R*,3*R*)-3-υδροξυλευκίνη **18** καθώς επίσης και ένα ακόμη β-υδροξύ αμινοξύ την *D-allo*-θρεονίνης (2*R*, 3*R*) **19** (Σχήμα 17).^{40,46}



rapuamide A1



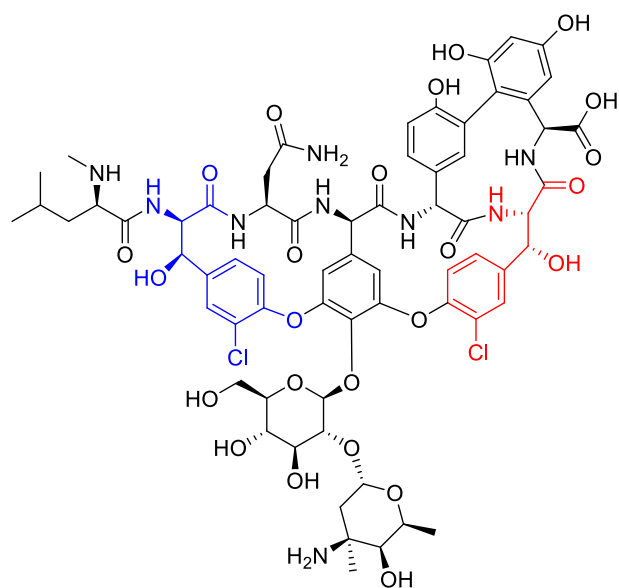
18



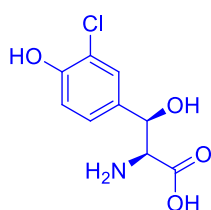
19

Σχήμα 17: Η rapuamide A1 περιέχει στον δομικό της σκελετό την (2*R*,3*R*)-3-υδροξυιευκίνη **18** καθώς επίσης και την *D*-allo-θρεονίνη (2*R*, 3*R*) **19**.

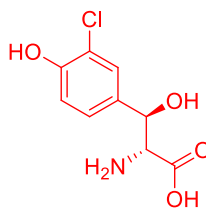
Ένα ακόμη παράδειγμα είναι η Vancomycin της οικογένειας των γλυκοπεπτιδικών αντιβιοτικών, που απομονώθηκε το 1956 από το μικροοργανισμό *Streptomyces orientalis* και είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό κατά του *Staphylococcus aureus* που είναι ανθεκτικό στην μεθικιλίνη (β-λακταμικό αντιβιοτικό).⁴⁷ Δύο β-υδρόξυ αμινοξέα περιέχονται στην δομή της Vancomycin και είναι συμμετρικά συνδεδεμένα στο κεντρικό μόριο της *p*-υδροξυ φαινυλο γλυκίνης. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για το *syn* (2*S*,3*R*)-**20** και το *anti* (2*R*,3*R*)-**21** διαστερεομερές της *p*-χλωρο-3-υδροξυ τυροσίνης (Σχήμα 18).⁴⁸



Vancomycin



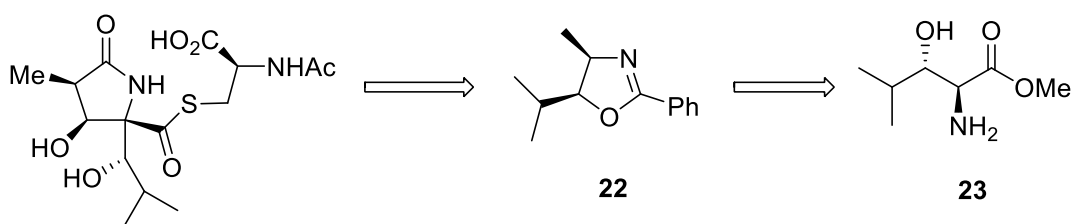
20



21

Σχήμα 18: Τα β-υδροξύ αμινοξέα **20** και **21** είναι δομικές μονάδες του αντιβιοτικού Vancomycin.

Τελευταίο παράδειγμα είναι η σύνθεση του φυσικού προϊόντος (+)-lactacystin το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Omura και τους συνεργάτες του το 1991 από βακτήρια του γένους *Streptomyces* και λειτουργεί ως νευροτροπικός παράγοντας.⁴⁹ Το 1996 η ίδια ερευνητική ομάδα παρουσίασε την σύνθεση της (+)-lactacystine, η οποία βασίζεται στην σύνθεση της αζολίνης **22** που με την σειρά της προέρχεται από την ασύμμετρη σύνθεση ενός β-υδροξυ-αμινο εστέρα του (2*S*,3*S*)-3-υδροξυ μεθυλεστέρα της λευκίνης **23** (Σχήμα 19).⁵⁰ Η ένωση **23** συντέθηκε σε 8 στάδια ενώ το 1998 ο Panek και οι συνεργάτες του παρουσίασαν την σύνθεση του β-υδροξυ-αμινο εστέρα **23** κατά τρία στάδια λιγότερα.⁵¹



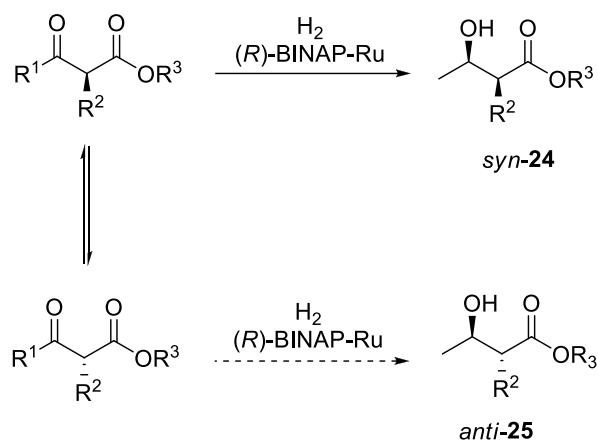
(+)-lactacystine

Σχήμα 19: Πετροσυνθετική ανάλυση του νευροτροπικού παράγοντα (+)-lactacystine.

Παλιότερες εργασίες από διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι η ασύμμετρη υδρογόνωση των α-αμιδο-β-κετο εστέρων είναι η πιο κοινή τεχνική για την στερεοεκλεκτική σύνθεση των β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων. Έρευνα κλειδί σε αυτό το πεδίο πραγματοποιήθηκε το 1989 από το Noyori και τους συνεργάτες του όπου παρουσίασαν την *syn*-διαστερεοεκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων (**24a**, **24b**, **24c**) με ασύμμετρη υδρογόνωση μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού (DKR) χρησιμοποιώντας ως καταλύτη ένα σύμπλοκο του Ru με έναν χειρόμορφο υποκαταστάτη και πιο συγκεκριμένα το (*R*)-BINAP-Ru (Σχήμα 20).⁵²

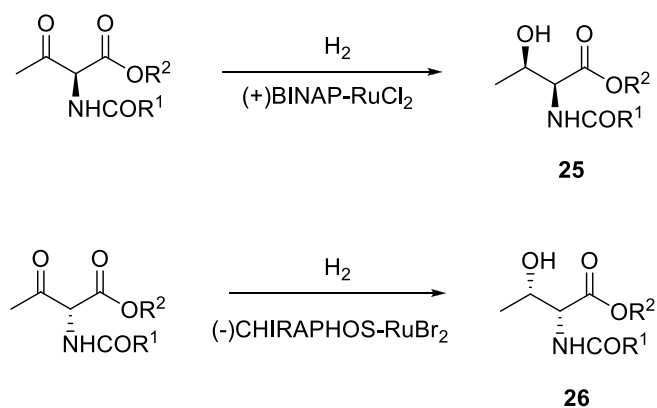
Το 1991 η ερευνητική ομάδα του Genet παρουσίασε επίσης την *syn*-διαστερεοεκλεκτική σύνθεση και των δύο εναντιομερών ενός β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρα και του αντίστοιχου β-υδροξυ αμινοξέος και πιο συγκεκριμένα της D και της L θρεονίνης. Στάδιο κλειδί της σύνθεσης ήταν η στερεοεκλεκτική υδρογόνωση των 2-αμινοακυλο-3-οξοβουτυρικών εστέρων στους αντίστοιχους β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρες **25** και **26** χρησιμοποιώντας διαφορετικούς ασύμμετρους καταλύτες Ru (Σχήμα 21).⁵³

Το 2004 η ερευνητική ομάδα του Zhang παρουσίασε για πρώτη φορά την *anti*-διαστερεοεκλεκτική σύνθεση β-υδροξυ-α-φθαλμιδο εστέρων-παραγώγα της D-*allo*-θρεονίνης και της L-*allo*-θρεονίνης πάλι μέσω DKR χρησιμοποιώντας τους χειρόμορφους καταλύτες Ru(*R*-C3-TunePhos) και Ru(*S*-C3-TunePhos) (Σχήμα 22).⁵⁴

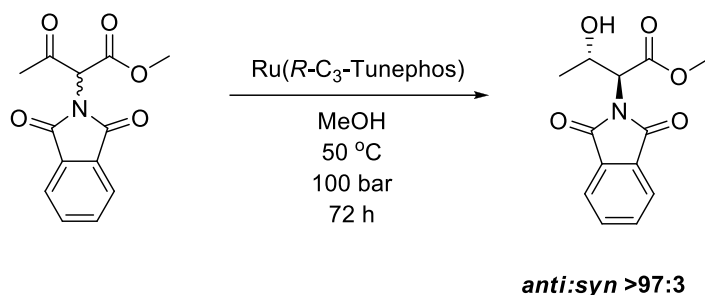
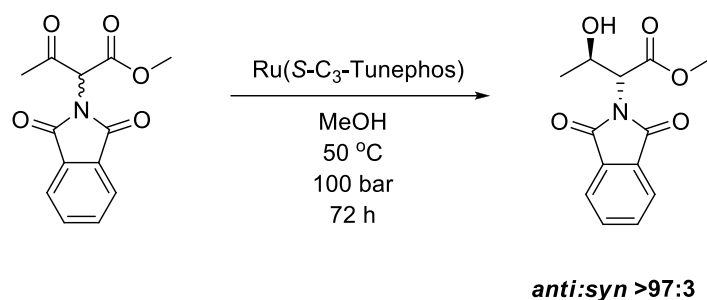


24a: R¹ = R³ = CH₃, R² = NHCOCH₃
25b: R¹ = 3,4-methylenedioxyphenyl,
R² = NHCOCH₃, R³ = CH₃
25c: R¹ = 3,4-methylenedioxyphenyl,
R² = NHCOCH₂C₆H₅, R³ = CH₃

Σχήμα 20: Στερεοεκλεκτική υδρογόνωση με καταλύτη (*R*)-BINAP-Ru για την σύνθεση *syn* β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων μέσω DKR.

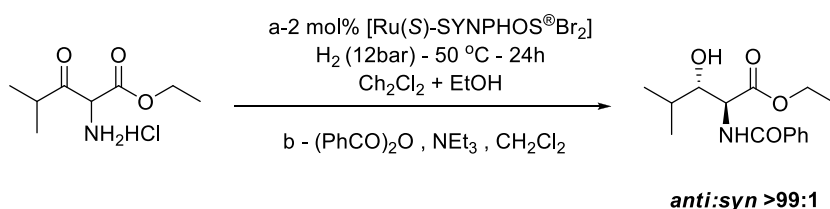
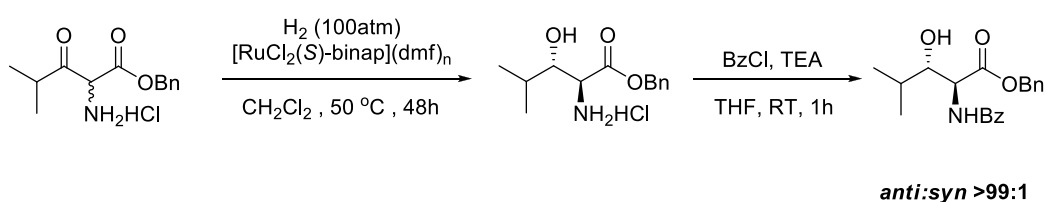


Σχήμα 21: Στερεοεκλεκτική υδρογόνωση για τη σύνθεση των οπτικά καθαρών β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων **25** και **26**.



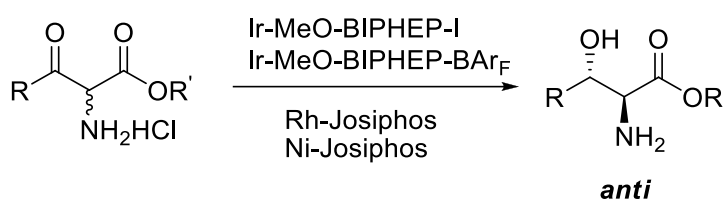
Σχήμα 22: Στερεοεκλεκτική σύνθεση *anti* β-υδροξυ-α-φθαλαμιδο εστέρων-παράγωγά της D-*allo*-θρεονίνης και της L-*allo*-θρεονίνης.

Την ίδια χρονιά η ερευνητική ομάδα του Hamada αλλά και η ερευνητική ομάδα του Genet δημοσίευσαν την *anti*-διαστεροεκλεκτική σύνθεση β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων από τα αντίστοιχα υδροχλωρικά άλατα των α-αμινο-β-κετο εστέρων μέσω στερεοεκλεκτικής υδρογόνωσης χρησιμοποιώντας και πάλι ασύμμετρους καταλύτες Ru (Σχήμα 23).^{55,56}



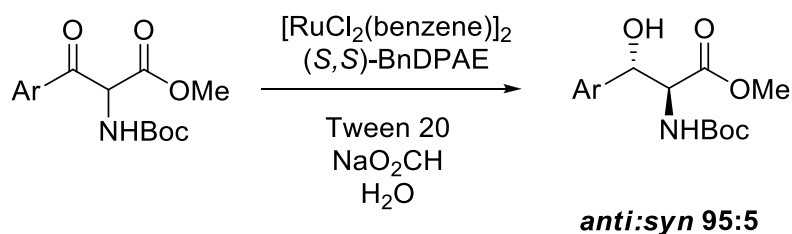
Σχήμα 23: Στερεοεκλεκτική σύνθεση *anti* β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων από τα αντίστοιχα υδροχλωρικά άλατα των α-αμινο-β-κετο εστέρων μέσω στερεοεκλεκτικής υδρογόνωσης χρησιμοποιώντας ασύμμετρους καταλύτες Ru.

Μάλιστα ο Hamada και οι συνεργάτες του κατάφεραν μέσα στα επόμενα χρόνια την ανάπτυξη της άμεσης *anti*-εκλεκτικής ασύμμετρης υδρογόνωσης των υδροχλωρικών αλάτων των α-αμινο-β-κετο εστέρων καταλυόμενων όχι μόνο από καταλύτες Ru αλλά και με σύμπλοκα άλλων μετάλλων όπως Rh,⁵⁷ Ir⁵⁸ και Ni⁵⁹ με ένα υποκαταστάτη διφωσφίνης (Σχήμα 24).



Σχήμα 24: Άμεση *anti*-εκλεκτική ασύμμετρη υδρογόνωση με τη χρήση συμπλόκων του Rh, του Ir και του Ni.

Πιο πρόσφατα από την ερευνητική ομάδα του Somfai^{60,61} παρουσιάστηκε η *anti*-διαστερεοεκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών αρωματικών β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων μέσω ασύμμετρης μεταφοράς υδριδίου (ATH: asymmetric transfer hydrogenation) από έναν αναγωγικό παράγοντα (Σχήμα 25).



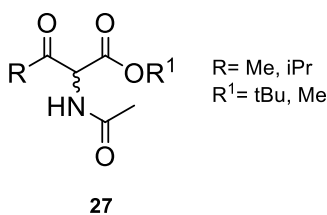
Σχήμα 25: *Anti*-εκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών αρωματικών β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων μέσω ασύμμετρης μεταφοράς υδριδίου.

Σε όλα τα παραπάνω παραδείγματα χρησιμοποιούνται πολύπλοκα σύμπλοκα μετάλλων με χειρόμορφους υποκαταστάτες και στις περισσότερες περιπτώσεις οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ακραίες, όπως για παράδειγμα στην ασύμμετρη υδρογόνωση, όπου η πίεση του H₂ μπορεί να φτάσει έως και τις 100 atm. Έτσι η βιοκαταλυτική αναγωγή μπορεί να αποδειχθεί μια εναλλακτική αποτελεσματική μέθοδος για την σύνθεση οπτικά ενεργών β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων, εξαιτίας των πλεονεκτημάτων των ενζύμων, να λειτουργούν κάτω από ήπιες συνθήκες αντίδρασης

και της υψηλής διαστεροεκλεκτικότητας και εναντιοεκλεκτικότητας που εμφανίζουν.

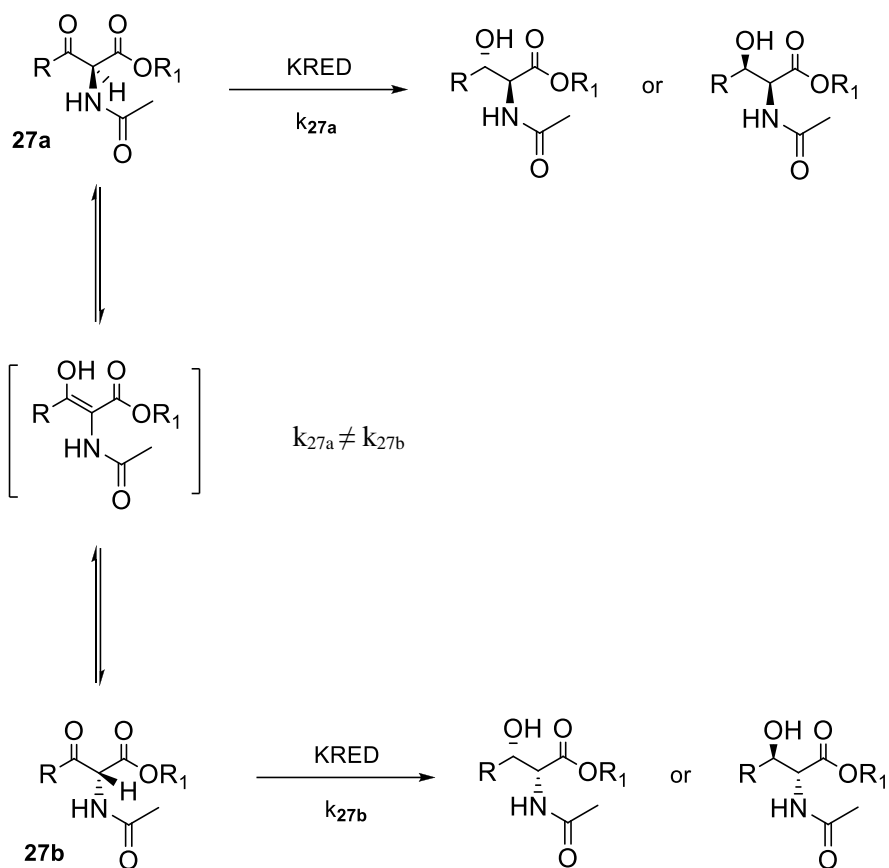
Ανάλυση-Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η εφαρμογή της βιοκαταλυτικής αναγωγής χρησιμοποιώντας αλκοολικές αφυδρογονάσες-κετορεδουκτάσες για την στερεοεκλεκτική σύνθεση β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων δεν έχει αναφερθεί στο παρελθόν στην βιβλιογραφία παρόλο που μπορεί να αποδειχθεί μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος, όπως προαναφέρθηκε. Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη της στερεοεκλεκτικής βιοαναγωγής α-αμιδο-β-κετο εστέρων με τη χρήση διαφορετικών απομονωμένων κετορεδουκτασών για τη σύνθεση οπτικά ενεργών β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων. Πιο συγκεκριμένα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν σε αυτού του τύπου την αντίδραση είναι οι α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρες τύπου **27** (Σχήμα 26).



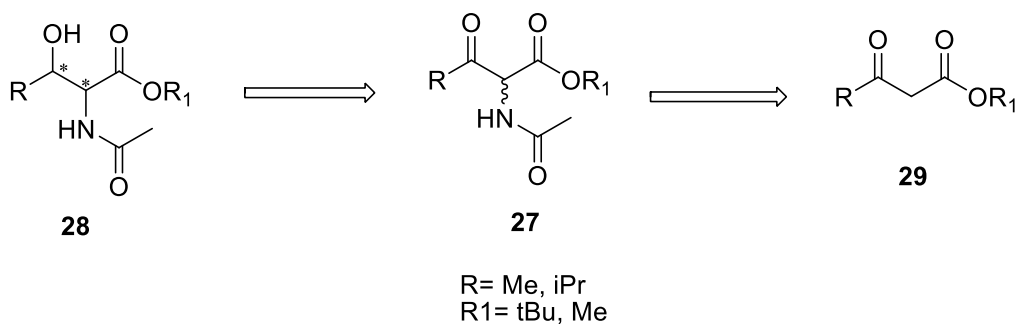
Σχήμα 26: Οι α-ακεταμιδο-β-κετοεστέρες **27** είναι τα πρόδρομα μόρια για την στερεοεκλεκτική σύνθεση των β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρων.

Η ασύμμετρη αναγωγή των α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων **27** με την χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών πραγματοποιείται μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού (DKR), εξαιτίας της *in situ* ρακεμοποίησης των α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων **27**, λόγω της ισορροπίας ανάμεσα την ενολική και στην κετο μορφή στο υδατικό περιβάλλον του ρυθμιστικού διαλύματος, που είναι το μέσο της αντίδρασης (Σχήμα 27). Με αυτό τον τρόπο η μετατροπή θεωρητικά μπορεί να φτάσει έως και 100% όπως επίσης και τα ποσοστά της διαστερομερικής και της εναντιομερικής περίσσειας.



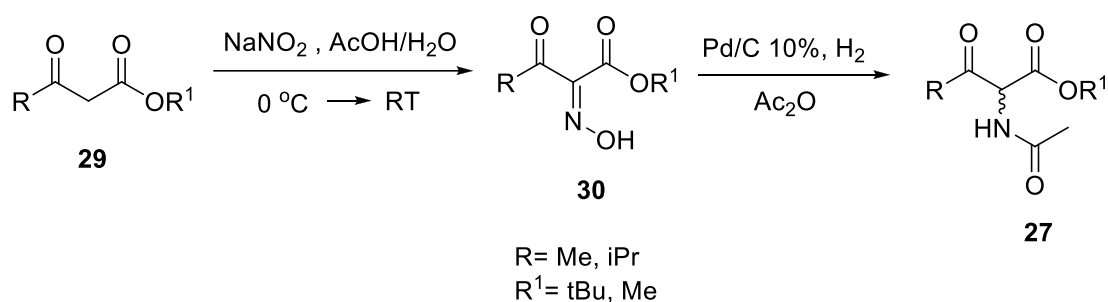
Σχήμα 27: Στερεοεκλεκτική βιοαναγωγή α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων μέσω DKR.

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν οι β-υδροξυ-α-ακετάμιδο εστέρες **28** μέσω στερεοεκλεκτικών βιοαναγωγών των α-ακετάμιδο-β-κετο εστέρων **27**, οι οποίοι με τη σειρά τους μπορεί να προκύψουν μέσω δύο συνθετικών βημάτων από τους β-κετο εστέρες **29** (Σχήμα 28).



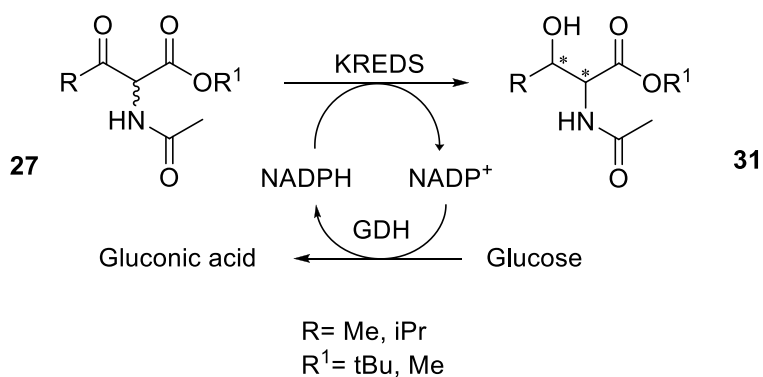
Σχήμα 28: Ρετρο-συνθετική ανάλυση των β-υδροξυ-α-ακεταμιδο εστέρων **28**.

Το γενικό μονοπάτι για τη σύνθεση των α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων **27** περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά πραγματοποιείται κατεργασία των β-κετο εστέρων **29** με NaNO_2 σε οξικό οξύ, ακολουθούμενη από μια αναγωγή των ενδιάμεσων οξιμών **30** με H_2/Pd 10% παρουσία οξικού ανυδρίτη και προκύπτουν οι αντίστοιχοι α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρες **27** (Σχήμα 29).⁵³



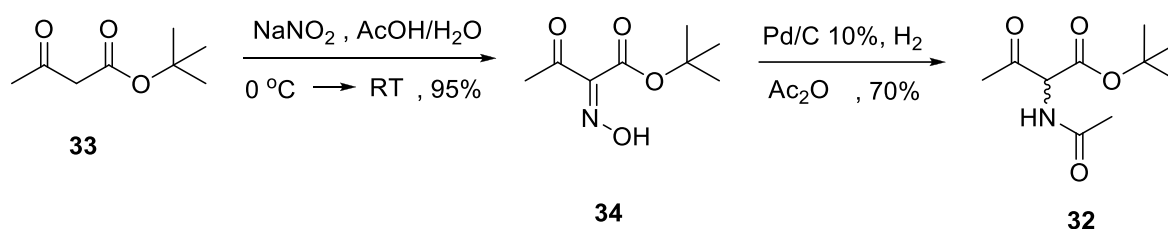
Σχήμα 29: Γενικό μονοπάτι για τη σύνθεση των α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων.

Έπειτα οι α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρες **27** ανάγονται στερεοεκλεκτικά με την χρήση διαφορετικών NADPH-εξαρτώμενων κετορεδοκτασών προκειμένου να προκύψουν οι οπτικά ενεργοί β-υδροξυ-ακεταμιδο εστέρες **31**. Ο συμπαράγοντας NADPH χρησιμοποιείται σε καταλυτικές ποσότητες και έτσι είναι απαραίτητη η *in situ* αναγέννησή του. Η μέθοδος αναγέννησης που επιλέχθηκε είναι με τη χρήση της αφυδρογονάσης της γλυκόζης GDH που είναι ιδιαίτερος αποτελεσματική (Σχήμα 30).



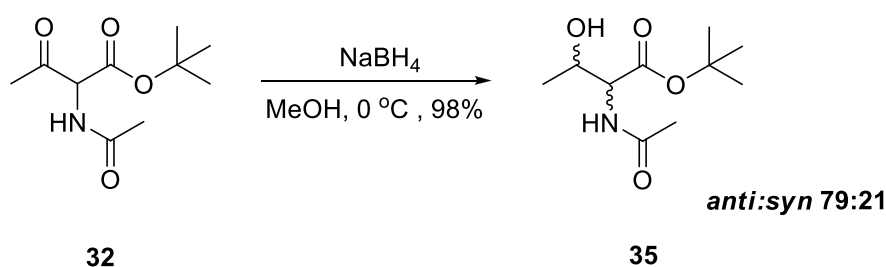
Σχήμα 29: Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές α-ακεταμιδο-β-κετο **27** εστέρων με τη χρήση NADPH-εξαρτώμενων κετορεδοκτασών για τη σύνθεση οπτικά ενεργών β-υδροξυ-α-ακεταμιδο εστέρων **31**.

Σαν πρώτο υπόστρωμα για τον έλεγχο της στερεοεκλεκτικής αναγωγής επιλέχθηκε ο 2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας **32**, που συντέθηκε σύμφωνα με το γενικό μονοπάτι που αναφέρθηκε προηγουμένως. Ξεκινώντας από τον εμπορικά διαθέσιμο ακετοξικό *tert*-βουτυλεστέρα **33** με προσθήκη NaNO₂ σε οξικό οξύ σχηματίστηκε ο 2-υδροξυμινο-3-οξοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας **34** με 95% απόδοση και στη συνέχεια η οξίμη **34** ανάχθηκε με H₂/Pd 10% παρουσία οξικού ανυδρίτη προς τον αντίστοιχο 2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκό *tert*-βουτυλεστέρα **32** με απόδοση 70% (Σχήμα 30).



Σχήμα 30: Σύνθεση του 2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **32**.

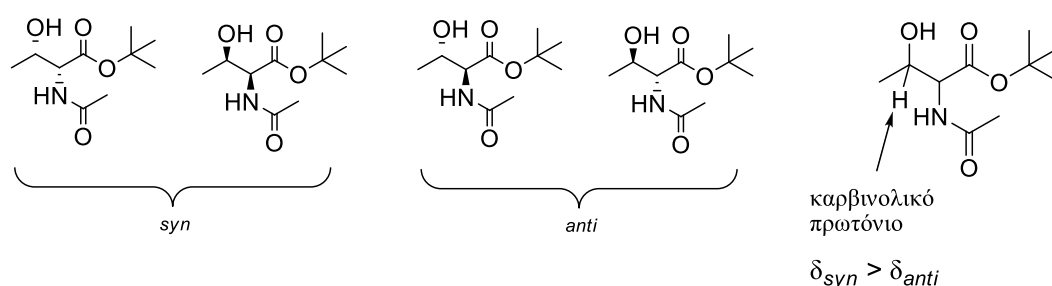
Έπειτα πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή της ένωσης **32** με NaBH₄ για τη σύνθεση του ρακεμικού μίγματος του 2-ακεταμιδο-3-υδροξυβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **35**, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπο για σύγκριση με τα προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής. Η ένωση **35** σχηματίστηκε σε 98 % απόδοση και σε αναλογία διαστερομερών *anti:syn* 79:21 (Σχήμα 31).



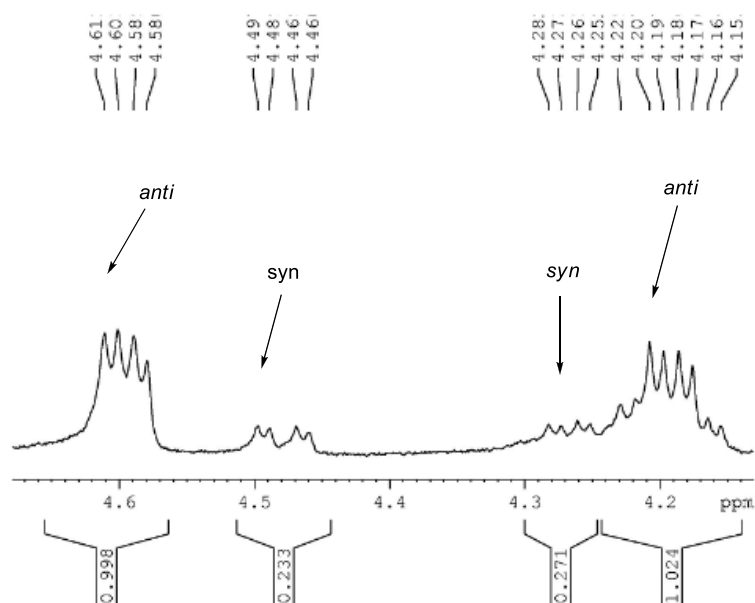
Σχήμα 31: Χημική αναγωγή της ένωσης **32** για τη σύνθεση του ρακεμικού μίγματος του 2-ακεταμιδο-3-υδροξυ βουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **35**

Η σχετική στερεοδομή, καθώς και ο διαστερομερικός λόγος του προϊόντος της χημικής αναγωγής προσδιορίστηκαν με βάση το φάσμα ¹H-NMR σύμφωνα με τον εμπειρικό κανόνα για τις α-υποκατεστημένες β-υδρόξυ καρβονυλικές ενώσεις, στις

οποιές το καρβινολικό υδρογόνο των *anti* ισομερών εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το αντίστοιχο των *syn* ισομερών⁶² (Σχήμα 32) αλλά και με σύγκριση με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα για την ένωση **35**.⁵³ Έτσι από το ¹H-NMR της ένωσης **35** προκύπτει ότι η πολλαπλή κορυφή του καρβινολικού πρωτονίου στα 4,25-4,28 ppm αντιστοιχεί στα *syn* διαστερομερή και η πολλαπλή κορυφή στα 4,15-4,22 ppm αντιστοιχεί στα *anti*. Επίσης η κορυφή του πρωτονίου σε α-θέση στα 4,59 ppm που είναι μια διπλή της διπλής αντιστοιχεί στα *anti* ισομερή ενώ στα 4,47 ppm αντιστοιχεί στα *syn* ισομερή (Σχήμα 33).



Σχήμα 32: Το καρβινολικό υδρογόνο του *anti* ισομερούς εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το αντίστοιχο του *syn* ισομερούς.

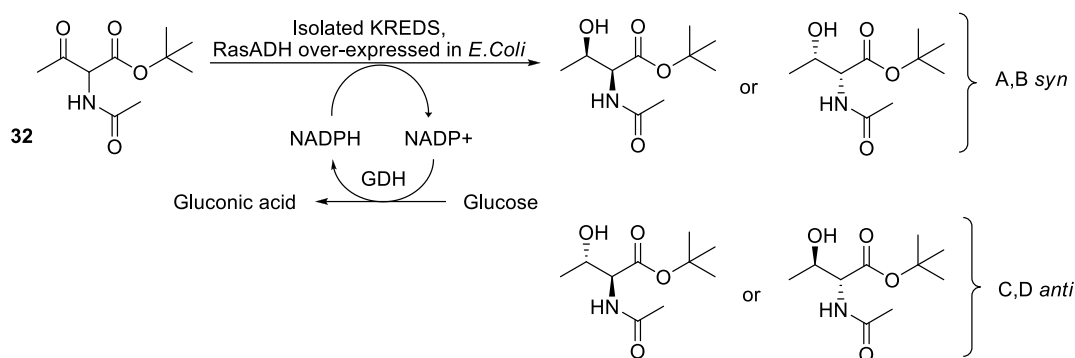


Σχήμα 33: Αντιστοίχιση κορυφών στο ¹H-NMR στα *anti* και *syn* διαστερομερή της ένωσης **35** για το καρβινολικό πρωτόνιο και για το πρωτόνιο σε α-θέση.

Τα πιθανά στερεοϊσομερή του 2-ακετάμιδο-3-υδροξυ βουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **35**, που θα είναι το προϊόν της ενζυμικής αναγωγής είναι τέσσερα καθώς το μόριο διαθέτει δύο στερεογονικά κέντρα. Τα 4 στερεοϊσομερή φαίνονται ξεκάθαρα στο χρωματογράφημα του ρακεμικού μίγματος που προέκυψε από την χημική αναγωγή της ένωσης **35** χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία (GC) με χειρόμορφη στήλη. Για το διαχωρισμό των τεσσάρων στερεοϊσομερών του β-υδροξυ-α-ακεταμιδο εστέρα **35** απαιτήθηκε η παραγοντοποίηση του με ακετυλίωση χρησιμοποιώντας οξικό ανυδρίτη.

Τα 4 στερεοϊσομερή είναι τα A, B, C και D σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησης R_f στο χρωματογράφημα. Συγκρίνοντας τα ποσοστά % των στεροϊσομερών με τον διαστερομερικό λόγο που υπολογίστηκε από το $^1\text{H-NMR}$ διαπιστώθηκε ότι λόγος $(C+D)/(A+B)$ είναι 78:22 και συμπίπτει σχεδόν απόλυτα με τον διαστερομερικό λόγο από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που υπολογίστηκε 79:21 *anti:syn*. Με βάση αυτά τα δεδομένα λοιπόν, τα A και B είναι τα *syn* διαστερομερή, που είναι μεταξύ τους εναντιομερή και C και D είναι τα *anti* διαστερομερή, τα οποία είναι επίσης μεταξύ τους εναντιομερή, χωρίς να είναι όμως γνωστή η απόλυτη στερεοδομή τους (Σχήμα 35).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές του α-αμιδο-β-κετο εστέρα **32** δοκιμάζοντας διαφορετικές κετορεδουκτάσες, η επιλογή των οποίων βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας σε α-άλκυλο-β-κετο εστερες.⁶⁴ Επίσης δοκιμάστηκε και μια NADPH-εξαρτώμενη αλκοολική αφυδρογονάση η RasADH, του στελέχους *Ralstonia sp.* DSM 6428 που υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *E.Coli* χρησιμοποιώντας GDH για την αναγέννηση του συμπαραγόνα (Σχήμα 35). Συνολικά δοκιμάστηκαν 19 διαφορετικές κετορεδουκτάσες-αφυδρογονάσες και τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 2.



Σχήμα 35: Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές του 2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **32**.

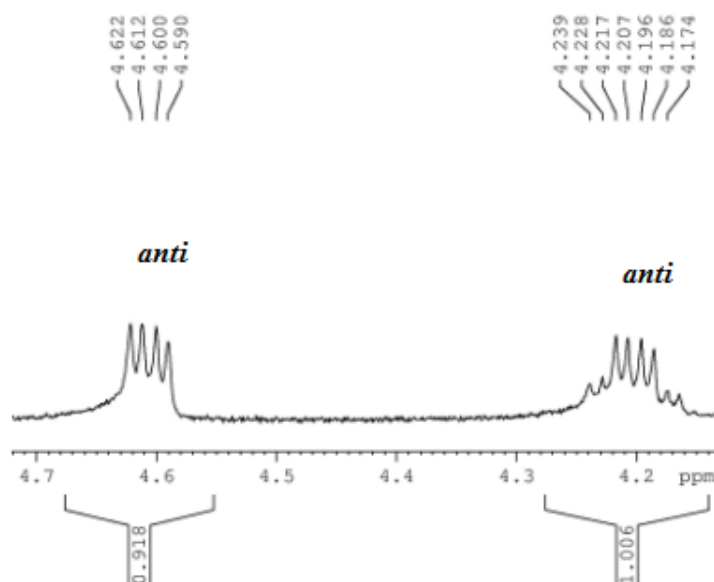
Πίνακας 2: Αποτελέσματα βιοαναγωγών του α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρα **32**.

KREDS	Conv % (24h)	Αναλογία Διαστερεομερών %			
		A ^a	B ^a	C ^a	D ^a
102	>99	23	42	11	24
101	>99	-	-	23,9	76,1
111	>99	-	-	36,3	63,7
112	>99	-	-	37	63
119	40	-	8,6	-	91,4
121	45	2,98	8,35	33,5	55,15
123	81,7	1,17	1,26	25,6	71,7
RasADH	78	17,4	53,6	6,4	22,6

^a Ο υπολογισμός της διαστερεοεκλεκτικότητας έγινε μετά από εστεροποίηση των υδρόξυ προϊόντων με οξικό ανυδρίτη και σύγκριση με ρακεμικό μίγμα εστεροποιημένης υδρόξυ ένωσης. Λόγω τεχνικού προβλήματος του αέριου χρωματογράφου, τα ακριβή ποσοστά κάθε στερεοϊσομερούς θα προσδιοριστούν μετά από επιδιόρθωση του οργάνου.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι τα περισσότερα ένζυμα εμφανίζουν εξαιρετική δραστηριότητα, καθώς οι κετορεδοκτάσες 101, 102, 111, 112 καταλύουν την αναγωγή του α-αμιδο-β-κετο εστέρα **32** προς τον αντίστοιχο β-υδρόξυ-α-αμιδο εστέρα **35** με εξαιρετική μετατροπή >99%. Τα ποσοστά μετατροπής υπολογίστηκαν από τα αντίστοιχα φάσματα ¹H-NMR. Από αυτές τα ένζυμα που προαναφέρθηκαν οι KRED 101, KRED 111 και KRED 112 εμφάνισαν και εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα >99% de, καθώς από τις ενζυμικές αναγωγές προέκυψαν μόνο τα προϊόντα C και D που αντιστοιχούν στα *anti* διαστερεομερή και είναι

παράγωγα της *allo*-θρεονίνης. Η *anti*-εκλεκτικότητα (*anti:syn* >99:1) φαίνεται ξεκάθαρα και από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ των ενώσεων που προέρχονται από τις ενζυμικές αναγωγές της ένωσης **32** (Σχήμα 36).

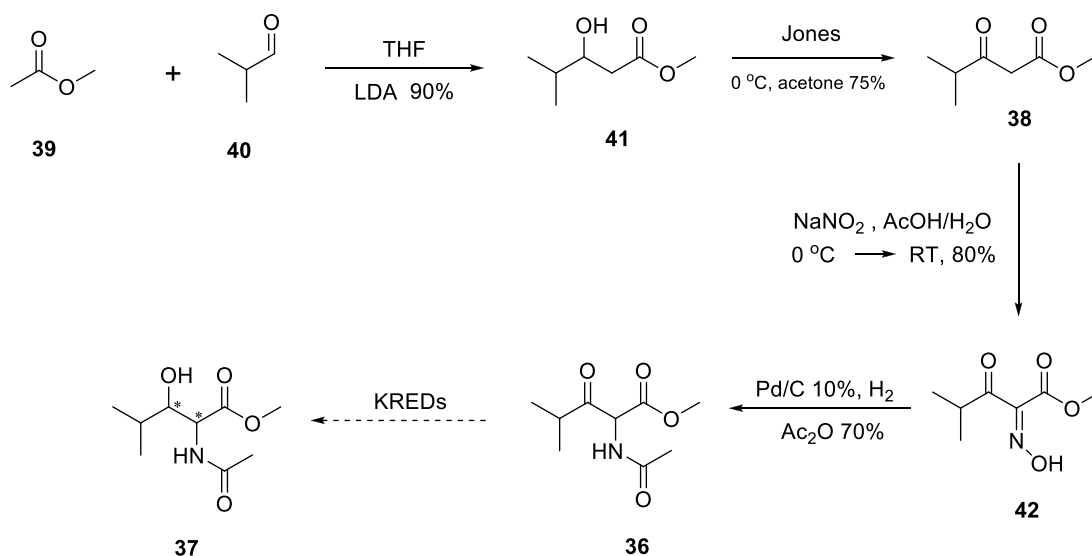


Σχήμα 36: Περιοχή από 4.1-4.7ppm φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του προϊόντων από τις ενζυμικές αναγωγές με KRED 101, KRED 102, KRED 111 και KRED 112, όπου φαίνεται ξεκάθαρα η *anti*-εκλεκτικότητα με αναλογία διαστερομερών *anti:syn* >99:1.

Από την ενζυμική αναγωγή με τη χρήση της KRED-123 σχηματίστηκαν τα *anti* ισομερή C και D με υψηλό ποσοστό διαστερομερικής περίσσειας 95% de και με υψηλό ποσοστό μετατροπής περίπου 82% conv. Επίσης η KRED-121 οδηγεί στο σχηματισμό των *anti* ισομερών με αναλογία διαστερομερών *anti:syn* 89:11 αλλά με μέτριο ποσοστό μετατροπής (45%). Αξιοσημείωτο αποτέλεσμα είναι το προϊόν αναγωγής με την KRED-119, η οποία οδήγησε στον σχηματισμό αποκλειστικά των **B** και **D** στερεοϊσομερών με αναλογία διαστερομερών *anti:syn* 91:9 και με εξαιρετικό ποσοστό εναντιοεκλεκτικότητας >99% ee. Βέβαια το ποσοστό μετατροπής ήταν σχετικά μέτριο (40%). Τέλος η KRED-102 και η RasADH είναι τα μόνα ένζυμα που οδήγησαν στον εκλεκτικό σχηματισμό των *syn* ισομερών του 2-ακεταμιδο-3-υδρόξυ βουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **35** που είναι παράγωγα της θρεονίνης, με υψηλή δραστηριότητα.

Με βάση τη μέθοδο ακολούθησε η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **36**, η στερεοεκλεκτική βιοαναγωγή του οποίου μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση του οπτικά ενεργού 2-ακετάμιδο-4-μεθυλο-3-υδροξυπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **37** που είναι παράγωγο της β-υδροξυ λευκίνης.

Έτσι η σύνθεση του μεθυλεστέρα **36** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την συνθετική μέθοδο του Σχήματος 30, με τη διαφορά ότι ο β-κετο εστέρας **38** δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμος και συντέθηκε σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο ήταν μια αλδολική συμπύκνωση ανάμεσα στον οξικό μεθυλεστέρα **39** και την ισοβουτυραλδεύδη **40** με επίδραση LDA που παράγεται *in situ*, προς τον αντίστοιχο β-υδροξυ εστέρα **41** και στη συνέχεια μια οξείδωση με αντιδραστήριο Jones προς τον σχηματισμό του β-κετο-εστέρα **38** (Σχήμα 37).

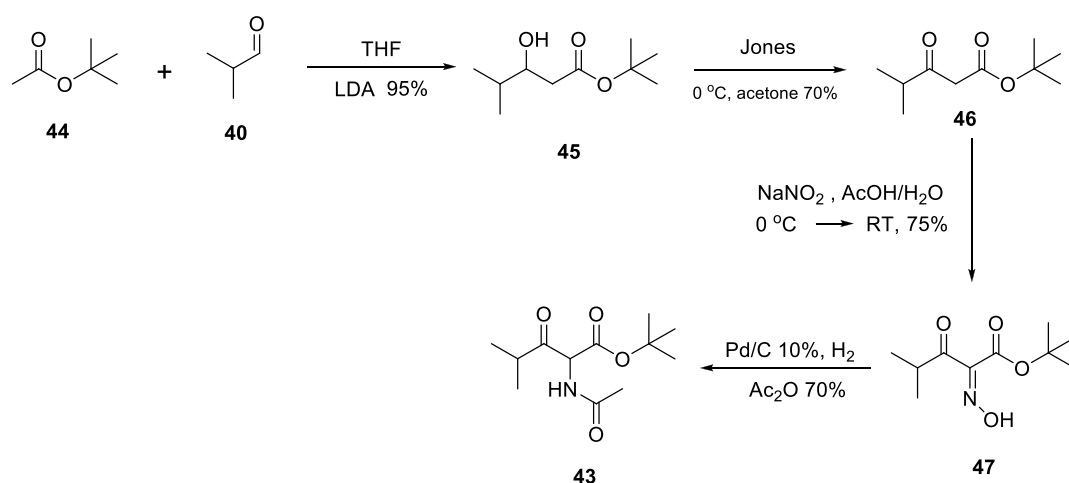


Σχήμα 37: Σύνθεση του 2-ακετάμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **36**.

Η ένωση **36** δεν ήταν ιδιαίτερα σταθερή στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που είναι το μέσο της αντίδρασης της ενζυμικής αναγωγής, και αυτό διότι ένα μέρος του υδρολύεται προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ. Δοκιμάστηκαν και ρυθμιστικά διαλύματα βασικότερου pH (7.5 και 8.0), αλλά το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο. Επίσης δοκιμάζοντας μια σειρά από διαφορετικές κετορεδοκτάσες διαπιστώθηκε ότι η δραστηριότητα των ενζύμων σε αυτό το υπόστρωμα ήταν πολύ χαμηλή καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε καθόλου ο σχηματισμός του προϊόντος της αναγωγής, ενώ σε κάποιες το ποσοστό της μετατροπής ήταν πολύ χαμηλό και δεν

ξεπερνούσε το 10%. Για αυτό το λόγο συντέθηκε ο δομικά τροποποιημένος α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρας **43**, στον οποίο η μεθυλομάδα του εστέρα έχει αντικατασταθεί με την *tert*-βούτυλο ομάδα, δεδομένου ότι όπως έχουμε παρατηρήσει σε προηγούμενα πειράματα και με μια μικρή αλλαγή στο μέγεθος του υποστρώματος μπορεί να αυξηθεί η δραστηριότητα των ενζύμων.

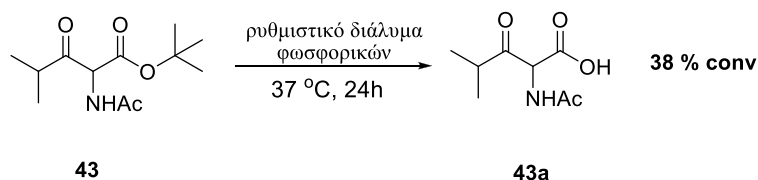
Έτσι η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **43** πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την συνθετική μέθοδο του Σχήματος 37 χρησιμοποιώντας ως αρχικό υπόστρωμα τον οξικό *tert*-βουτυλεστέρα **44** (Σχήμα 38).



Σχήμα 38: Σύνθεση του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **43**.

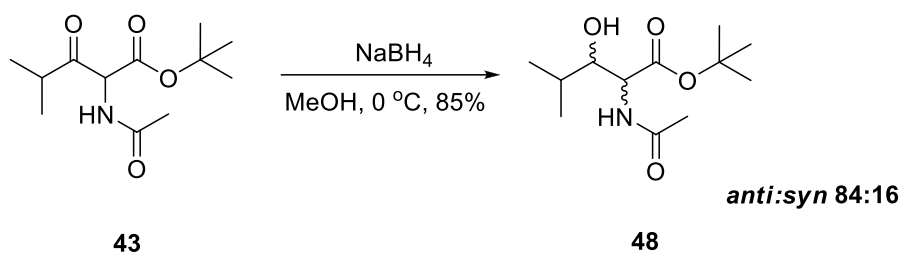
Δοκιμάζοντας τη σταθερότητα του υποστρώματος **43** σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα (pH 6.9, pH 7.5 και pH 8.0) διαπιστώθηκε ότι και εδώ ο *tert*-βουτυλεστέρας **43** υδρολύεται προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ **43a** με ποσοστό μετατροπής 38% στις 24 h και η υδρόλυση αρχίζει μετά από τις 8 ώρες παραμονής της ένωσης **43** στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Σχήμα 39).

Με βάση αυτή την παρατήρηση, το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι τα ένζυμα πρέπει να δράσουν στο υπόστρωμα αποτελεσματικά πριν περάσουν οι 8 ώρες. Μετά το πέρας των 8 ωρών η ενζυμική αναγωγή της ένωσης **43** ανταγωνίζεται την υδρόλυση προς το οξύ **43a** που συμβαίνει στο ρυθμιστικό διάλυμα. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το αποτέλεσμα δοκιμάστηκαν διαφορετικές κετορεδουκτάσες και κάποιες από αυτές εμφάνισαν υψηλή δραστηριότητα.



Σχήμα 39: Ο α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρας **43** αρχίζει και υδρολύεται προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ **43a** μετά από 8 ώρες.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή της ένωσης **43** με NaBH_4 για τη σύνθεση του ρακεμικού μίγματος του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **48**, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπο για σύγκριση με τα προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής. Η ένωση **48** συντέθηκε με 85 % απόδοση και σε αναλογία διαστερομερών *anti:syn* 84:16 (Σχήμα 40).

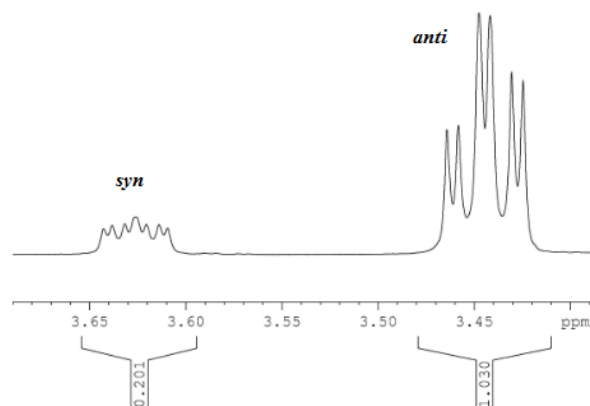


Σχήμα 40: Χημική αναγωγή της ένωσης **43** για τη σύνθεση του ρακεμικού μίγματος του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **48**.

Η σχετική στερεοδομή, καθώς και ο διαστερομερικός λόγος του προϊόντος της χημικής αναγωγής προσδιορίστηκαν με βάση το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σύμφωνα με τον εμπειρικό κανόνα που περιγράφηκε αναλυτικά προηγουμένως αλλά και με σύγκριση βιβλιογραφικών δεδομένων.^{46,56,63} Έτσι από το $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **48** προκύπτει ότι η πολλαπλή κορυφή του καρβινολικού πρωτονίου στα 3,61-3,64 ppm αντιστοιχεί στα *syn* διαστερομερή και η πολλαπλή κορυφή στα 3,42-3,46 ppm αντιστοιχεί στα *anti* (Σχήμα 41).

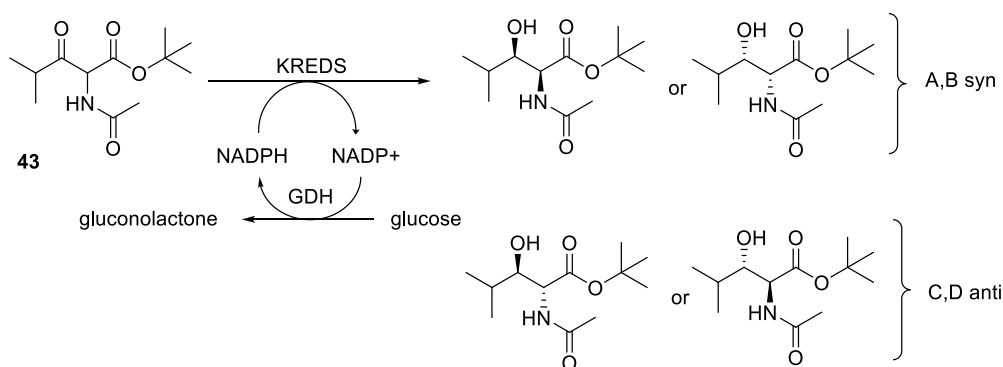
Τα πιθανά στεροϊσομερή του 2-ακετάμιδο-4-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **48**, του προϊόντος αναγωγής είναι και εδώ τέσσερα καθώς το μόριο διαθέτει δύο στερεογονικά κέντρα. Για το διαχωρισμό των τεσσάρων στερεοϊσομερών του β-υδρόξυ-α-ακετάμιδο εστέρα **48** μέσω GC με χειρόμορφη

στήλη απαιτήθηκε η παραγοντοποίηση του με ακετυλίωση χρησιμοποιώντας οξικό ανυδρίτη.



Σχήμα 41: Αντιστοίχιση κορυφών καρβινολικού πρωτονίου στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στα *anti* και *syn* διαστερομερή της ένωσης **48**.

Τα 4 στερεοϊσομερή είναι τα A, B, C και D σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησης R_f στο χρωματογράφημα. Συγκρίνοντας τα ποσοστά % των στερεοϊσομερών με τον διαστερομερικό λόγο που υπολογίστηκε από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ διαπιστώθηκε ότι ο λόγος (C+D)/(A+B) είναι 84:16 και συμπίπτει απόλυτα με τον διαστερομερικό λόγο που υπολογίστηκε από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$. Με βάση αυτά τα δεδομένα λοιπόν, τα A και B είναι τα *syn* διαστερομερή, που είναι μεταξύ τους εναντιομερή και C και D είναι τα *anti* διαστερομερή, τα οποία είναι επίσης μεταξύ τους εναντιομερή, χωρίς να είναι όμως γνωστή η απόλυτη στερεοδομή τους (Σχήμα 42).



Σχήμα 42: Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **42**.

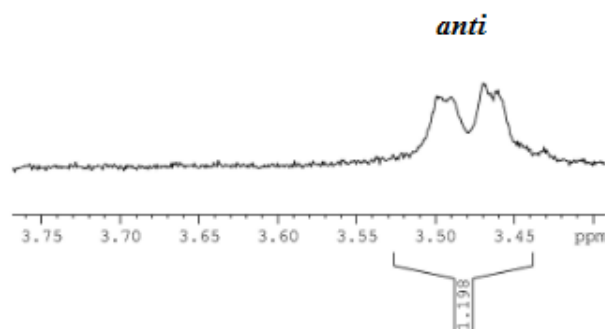
Από τις 15 διαφορετικές κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν μόνο οι τέσσερις εμφάνισαν υψηλή δραστικότητα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Αποτελέσματα βιοαναγωγών του α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρα **43**.

KREDs	Conv % (24h)	παραπροϊόν (42a) %	Χρόνος αντίδρασης (h)	Προϊόν ενζυμικής αναγωγής %	Αναλογία Διαστερομερών %			
					A ^α	B ^α	C ^α	D ^α
101	>99	-	5	>99	-	-	49	51
111	87	31	24	56	-	-	39	61
112	96	19	24	77	-	-	44	56
114	86	26	24	60	-	-	35	65

^α Ο υπολογισμός της διαστεροεκλεκτικότητας έγινε μετά από εστεροποίηση των υδρόξυ προϊόντων με οξικό ανυδρίτη και σύγκριση με ρακεμικό μίγμα εστεροποιημένης υδρόξυ ένωσης. Λόγω τεχνικού προβλήματος του αέριου χρωματογράφου, τα ακριβή ποσοστά κάθε στερεοϊσομερούς θα προσδιοριστούν μετά από επιδιόρθωση του οργάνου.

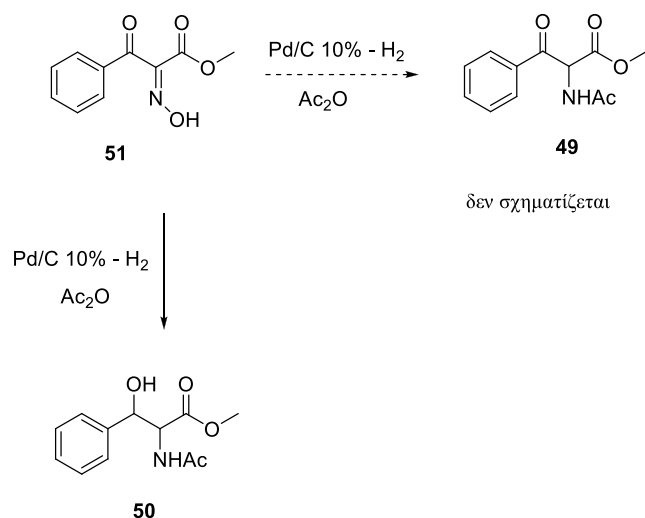
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, η KRED-101 εμφάνισε εξαιρετική δραστικότητα καθώς η αναγωγή του υποστρώματος **42** πραγματοποιήθηκε σε 5 ώρες με ποσοστό μετατροπής >99%. Αυτό σημαίνει ότι δεν παρατηρήθηκε καθόλου ο σχηματισμός του παραπροϊόντος **43a** καθώς η αναγωγή ολοκληρώθηκε πριν αρχίσει η υδρόλυση της ένωσης **43** από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ο σχηματισμός και του παραπροϊόντος **43a** καθώς η αναγωγή δεν είχε ολοκληρωθεί πριν τις 8 ώρες. Σε όλες τις περιπτώσεις η ενζυμική αναγωγή οδήγησε αποκλειστικά στον σχηματισμό των *anti* διαστερομερών με εξαιρετική διαστερομερική περίσσεια >99% de, κάτι που διαπιστώνεται και από τα φάσματα ¹H-NMR των προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών (Σχήμα 43). Ωστόσο η εναντιοεκλεκτικότητα σε κάθε περίπτωση ήταν σχετικά χαμηλή.



Σχήμα 43: Περιοχή από 3.40-3.75 ppm του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ των προϊόντων από τις ενζυμικές αναγωγές με τις KREDs 101, 111, 112 και 114 .

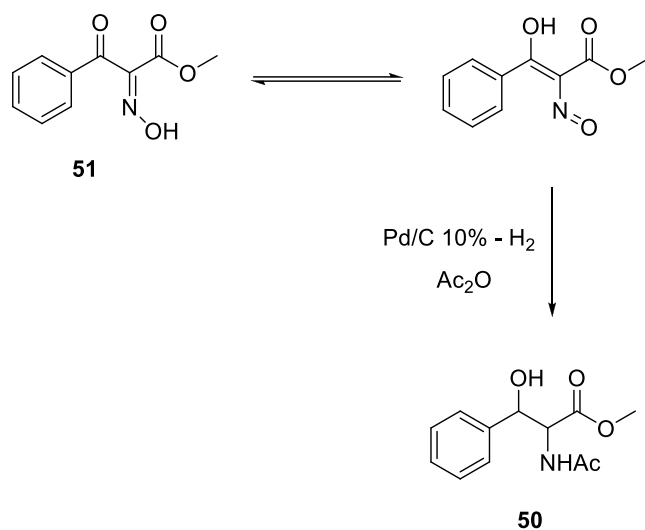
Στη συνέχεια ακολούθησε η προσπάθεια σύνθεσης του 2-ακεταμιδο-3-οξο-3-φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα **49** ακολουθώντας την συνθετική μέθοδο του Σχήματος 37 χρησιμοποιώντας ως αρχικά υποστρώματα τον οξικό μεθυλεστέρα **39** και τη βενζαλδεύδη. Το τελευταίο στάδιο όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις περιλαμβάνει την αναγωγή της οξίμης **51** με H_2/Pd 10% παρουσία οξικού ανυδρίτη προς τον αντίστοιχο α-ακεταμιδο-β-κετοεστέρα **49**. Μετά από μελέτες φασμάτων του $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ του προϊόντος που απομονώθηκε, διαπιστώθηκε ότι δεν πρόκειται για τον επιθυμητό α-ακεταμιδο-β-κετοεστέρα **49** αλλά για τον αντίστοιχο β-υδροξυ-α-ακετάμιδο εστέρα δηλαδή τον 2-ακετάμιδο-3-υδροξυ-3-φαινυλοπροπιονικό μεθυλεστέρα **50** (Σχήμα 44).

Με μια πρώτη ανάγνωση αυτού του αποτελέσματος θα μπορούσε να πει κάποιος ότι δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί αναγωγή καρβονυλίου με H_2 παρουσία καταλύτη Pd/C και επομένως το προϊόν δεν θα αναμενόταν. Πράγματι ο σχηματισμός του **50** στην προκειμένη περίπτωση αποδόθηκε σε αναγωγή διπλού δεσμού C-C ταυτόχρονα με την αναγωγή της οξίμης. Ο διπλός δεσμός C-C εμφανίζεται στην ενολική μορφή του α-οξίμινο-β-κετο εστέρα **51**. Η ενολική αυτή μορφή είναι σταθερή θερμοδυναμικά λόγω της εκτενούς π συζυγίας που δημιουργείται και με τον αρωματικό δακτύλιο (Σχήμα 45).



Σχήμα 44: Αντίδραση υδρογόνωσης του αρυλο α-οξίμινο-β-κετο εστέρα **51**.

Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η ένωση **51** να ταυτομερίζεται στην ενολική της μορφή και αυτή με την σειρά της να ανάγεται προς τον 2-ακεταμιδο-3-υδροξυ-3-φαινυλοπροπιονικό μεθυλεστέρα **50** (Σχήμα 45). Επίσης από τα φάσματα NMR διαπιστώθηκε ότι η ένωση **50** σχηματίστηκε διαστερεοεκλεκτικά με αναλογία διαστερεομερών >99:1 και αυτό διότι η υδρογόνωση πραγματοποιείται είτε από την πάνω είτε από την κάτω επιφάνεια του διπλού δεσμού με *syn* προσθήκη.⁶⁴



Σχήμα 45: Η ένωση **51** ταυτομερίζεται στην ενολική της μορφή και αυτή με την σειρά της ανάγεται προς τον 2-ακεταμιδο-3-υδροξυ-3-φαινυλοπροπιονικό μεθυλεστέρα **50**.

Συνεπώς, η υδρογόνωση ως μέθοδος για την αναγωγή της ένωσης **51** προς τον αντίστοιχο α-ακετάμιδο-β-κετο εστέρα δεν μπορεί να εφαρμοστεί. Όμως η ένωση **49** μπορεί να προκύψει από την αναγωγή του α-οξιμινο-β-κετο εστέρα **51** χρησιμοποιώντας σκόνη Zn και οξικό ανυδρίτη σε οξικό οξύ, μια αντίδραση που περιγράφεται στην βιβλιογραφία^{48,56} και αναμένεται να εφαρμοστεί στο άμεσο μέλλον από την ερευνητική μας ομάδα προκειμένου να μελετηθούν οι στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές του 2-ακετάμιδο-3-οξο-3-φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα **49**, μέσα από τις οποίες μπορεί να προκύψει το παράγωγο της β-υδροξυ φαινυλαλανίνης με υψηλή οπτική καθαρότητα.

Συμπερασματικά επιτεύχθηκε η στερεοεκλεκτική σύνθεση των β-υδροξυ-αμιδο εστέρων **35** και **48** με τη χρήση NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών σε 3 και 5 στάδια αντίστοιχα. Είναι η πρώτη φορά, που χρησιμοποιείται η βιοκαταλυτική αναγωγή ως μέθοδος για την στερεοεκλεκτική σύνθεση β-υδροξυ-αμιδο εστέρων από τους αντίστοιχους α-αμιδο-β-κετο εστέρες και τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η *anti*-εκλεκτική σύνθεση του β-υδροξυ-α-αμιδο εστέρα **35** και του β-υδροξυ-αμιδο εστέρα **48** με εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής >99% και με εξαιρετική διαστεροεκλεκτικότητα >99%. Επίσης από την ενζυμική αναγωγή του α-αμιδο-β-κετο εστέρα **32** χρησιμοποιώντας την κετορεδουκτάση KRED-119 συντέθηκε ο *anti*-2-ακεταμιδο-3-υδροξυβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας **35** με εξαιρετική οπτική καθαρότητα (>99% ee) και με υψηλή διαστεροεκλεκτικότητα (82% de). Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι ενώ τα ένζυμα δεν εμφάνισαν δραστηριότητα στον 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκό μεθυλεστέρα **36**, η δραστηριότητά τους αυξήθηκε σε μεγάλο βαθμό στον δομικά τροποποιημένο α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρα **43** παρόλο που και τα δύο υποστρώματα ήταν ασταθή στο υδατικό περιβάλλον. Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την εύρεση νέων ή και τροποποιημένων κετορεδουκτασών-αφυδρογονασών για την στερεοεκλεκτική σύνθεση αυτών των υποστρωμάτων με ακόμα μεγαλύτερη οπτική καθαρότητα, ιδιαίτερα για τα παράγωγα της β-υδροξυ λευκίνης, καθώς επίσης και περαιτέρω μελέτες της βιοκαταλυτικής αναγωγής και σε άλλα υποστρώματα τροποποιώντας την R πλευρική αλκυλομάδα (π.χ. με άρυλο ομάδες).

Πειραματικό μέρος

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 τετραϋδοφουράνιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο.⁶³ Επίσης στις αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκε ξηρή δισοπροπυλαμίνη, παρασκευάστηκε με απόσταξη παρουσία NaOH και μοριακών κοσκίνων. Επίσης η ξηρή ισοβουτυραλδεύδη που χρησιμοποιήθηκε, παρασκευάστηκε με απόσταξη παρουσία μοριακών κοσκίνων και στη συνέχεια διατηρήθηκε σε θερμοκρασία από 0 ως -8 °C.

Οι κετορεδουκτάσες είναι της εταιρίας Biocatalytics, το συνένζυμο NADPH από την εταιρία Prozomix και η αφυδρογονάση της γλυκόζης GDH της εταιρίας Evocatal. Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες της εταιρίας Merck, Silica gel 60 F₂₅₄ και ως διαλύτης ανάπτυξης Hex:EtOAc σε αναλογία v/v 2/1 και 1/1.

Όργανα

Τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR ελήφθησαν με τα φασματομέτρα 300MHz και 500Hz της Bruker. Σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) σε διαλύτη CDCl₃. Οι εκλεκτικότητες των ενζυμικών αντιδράσεων προσδιορίστηκαν με αέριο χρωματογράφο της εταιρίας Shimadzu 2014 με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα Hewlett-Packard fused silica capillary column HP CHIRAL (20% permethylated beta-cyclodextrin) 30m x 0.25mm x 0.25μm.

Γενικές συνθετικές μέθοδοι

Αντίδραση για τη σύνθεση α-οξιμινο-β-κετο εστέρων από τους β-κετο εστέρες

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη, εφαρμόζοντας ψυκτήρα προστίθενται 5-8 ml οξικού οξέος και έπειτα ο β-κετο εστέρας (3.8 mmol) και το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε η προσθήκη διαλύματος νιτρώδους νατρίου NaNO_2 σε απιονισμένο νερό ($C = 4.56 \text{ M}$, 9.5 mmol) στάγδην και η θερμοκρασία του μίγματος πρέπει να διατηρηθεί κάτω από τους 5 °C, καθώς παρατηρούνται καφέ ατμοί. Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες στους 0 °C και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Για την απομόνωση του προϊόντος προστέθηκε Et_2O (3 x15 ml) και πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις συλλέγοντας την οργανική φάση, η όποια στη συνέχεια εκπλύθηκε με όξινο ανθρακικό νάτριο NaHCO_3 (3 x20 ml) έπειτα με διάλυμα Brine (20 ml), ξηράθηκε με MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Τα προϊόντα που προκύπτουν μπορεί να χρειάζονται καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 75-95%.

Αντίδραση αναγωγής α-οξιμινο-β-κετο εστέρων με υδρογόνωση

Σε τρίλιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αζώτου ή αργού προστίθεται ο α-οξιμινο-β-κετο εστέρας (3.75 mmol) διαλυμένος σε οξικό ανυδρίτη Ac_2O (22.5mmol, 2.1 ml) και έπειτα προστέθηκε ο καταλύτης Pd/C 10% (0.9 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για λίγα λεπτά και στη συνέχεια το αργό ή το άζωτο αντικαθίσταται από αέριο H_2 διοχετευμένο σε μπαλόνι με την βοήθεια τρίοδης στρόφιγγας χρησιμοποιώντας κενό βρύσης. Το H_2 εισέρχεται στη φιάλη μέσω της μιας οδού της στρόφιγγας και στη συνέχεια το άζωτο απομακρύνεται μέσω δεύτερης οδού υπό κενό βρύσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Στη συνέχεια τοποθετούνται άλλα δύο μπαλόνια με H_2 στους λαιμούς της σφαιρικής προκειμένου η ατμόσφαιρα να είναι κορεσμένη με H_2 και με όσο το δυνατό μεγαλύτερη πίεση. Το μίγμα αναδεύτηκε για 48h μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία ελέγχεται

με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται διχλωρομεθάνιο (10 ml), το μίγμα φιλτράρεται σε celite υπό κενό και έπειτα το διχλωρομεθάνιο απομακρύνθηκε υπό κενό. Το συμπύκνωμα που μένει στη σφαιρική διαλύεται σε 10 ml EtOAc και στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις με ανθρακικό νάτριο Na₂CO₃ (2 x10 ml) και άλλη μια με διάλυμα Brine (10 ml). Εν συνεχεία η οργανική φάση ξηραίνεται σε MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Τα προϊόντα που προκύπτουν μπορούν να αναχθούν ενζυμικά χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τελείως καθαρά προϊόντα απομονώνονται μετά από χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 70-75%.

Αντίδραση αναγωγής α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων με NaBH₄

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε δίλιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται NaBH₄ (0.43 mmol, 16 mg) σε 5ml ξηρής μεθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην ο α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρας διαλυμένος σε 1-2 ml μεθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 1-2 ml κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl και το διάλυμα συμπυκνώνεται στο ρότορα υπό κενό. Κατόπιν προστίθενται 20ml νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc (2 x20 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 85-98%.

Αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης με LDA για τη σύνθεση β-υδροξυ εστέρων

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (10 ml) διαλύεται δισοπροπυλαμίνη (4.13 mmol) και, στους 0 °C προστίθεται στάγδην BuLi (1.6M σε εξάνιο, 4.13 mmol). Το μίγμα αναδεύεται στους 0 °C για περίπου 15 λεπτά και έπειτα ψύχεται στους -78 °C. Ακολουθεί η προσθήκη του κατάλληλου εστέρα (2.6 mmol) σε ξηρό THF (3-4 ml) στάγδην και ανάδευση για άλλα 20 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται η κατάλληλη αλδεύδη (3.87 mmol) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται για ακόμη 20 λεπτά στους -78 °C και μετά αυξάνεται σταδιακά για να φτάσει ως τους 0 °C μέχρι

την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl (20 ml) και πραγματοποιούνται τρεις εκχυλίσεις της υδατικής φάσης με EtOAc (3 x 20 ml). Έπειτα η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα Brine, ξεραίνεται σε MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος επιτυγχάνεται με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 75-95 %.

Αντίδραση οξείδωσης με Jones για τη σύνθεση β-κετο εστέρων

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται ο β-υδρόξυ εστέρας (2.0 mmol) σε 2-3 ml ακετόνης και το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C με ανάδευση. Έπειτα προστίθεται στάγδην διάλυμα αντιδραστήριου Jones (730 μl) σε 1 ml ακετόνης και το μίγμα αναδεύτηκε μέχρι το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας). Για την απομόνωση του προϊόντος προστέθηκε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 8 και το μίγμα αναδεύεται μέχρι την πλήρη διάλυση των χρωμικών αλάτων. Έπειτα πραγματοποιούνται τρεις εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα (3 x 20 ml), η οργανική φάση ξεραίνεται σε MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Τα προϊόν που απομονώνεται δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 65-75 %.

Ενζυμική αναγωγή α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων με κετορεδουκτάσες

Σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM ή 150 Mm, pH 6.9) προστίθενται υπόστρωμα (25 Mm), κετορεδουκτάση (2 mg/ml), NADPH (2.5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 Mm, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/ml). Η αντίδραση ανακινείται στους 37 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc (2 x 1 ml) και τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία NMR.

Ενζυμική αναγωγή α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων με την αλκοολική αφυδρογονάση RasADH

Λυοφιλοποιημένα κύτταρα *E.coli/RasADH* (15 mg) επανυδατώνονται σε Eppendorf με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (1 ml, 50 mM, pH 7.5), και τοποθετούνται στον αναδευτήρα για 30 min στους 30 °C και στις 170 rpm. Έπειτα προστίθεται ο α-ακεταμιδο β-κετο εστέρας (5 mg), η γλυκόζη (24 mg), το NADPH (2 mg) και η GDH(1 mg). Η αντίδραση αφήνεται προς ανάδευση στους 30 °C για 24 h. Τέλος ακολουθούν εκχλίσεις με EtOAc (2 x 0.5 ml) και οι οργανικές φάσεις διαχωρίζονται από τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (2 min, 1300 rpm). Η ταυτοποίηση του προϊόντος και το ποσοστό μετατροπής προσδιορίζονται με φασματοσκοπία ¹H-NMR.

Σύνθεση Υποστρωμάτων

α-οξιμινο-β-κετο εστέρες

2-υδροξιμινο-3-οξοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας **34**

Η σύνθεση του 2-υδροξιμινο-3-οξοβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **34** πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη NaNO₂ (9.5 mmol, 656 mg σε 2.1ml H₂O) στον εμπορικά διαθέσιμο ακετοξικό *τριτ*-βουτυλεστέρα **33** (3.8 mmol, 600 mgr) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α-οξιμινο-β-κετο εστέρων. Το υπόστρωμα αυτό απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 95 %.

¹H NMR (300 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 9.4 (s.br., 1H), 2.37 (s, 3H), 1.55 (s, 9H).

¹³CNMR (500MHz, CDCl₃): δ 193.7, 160.7, 151.6, 85, 28, 25.4.

2-υδροξιμινο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας **42**

Η σύνθεση του 2-υδροξιμινο-3-οξοβουτανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **42** έγινε με την προσθήκη NaNO₂ (26 mmol, 1791 mg σε 5.7 ml H₂O) στον 4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκο μεθυλεστέρα **38** (6.49 mmol, 936 mgr) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α-οξιμινο-β-κετο εστέρων. Το υπόστρωμα αυτό καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 20:1). Απόδοση 80 %.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 3.9 (s, 3H), 3.33-3.47 (m, 1H), 1.15 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 199.7, 162.1, 149.7, 52.8, 35.6, 18.3.

2-υδροξίμινο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας 46

Η σύνθεση του 2-υδροξίμινο-3-οξοβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **46** έγινε με την προσθήκη NaNO_2 (14.3 mmol, 988 mg σε 3.2 ml H_2O) στον 4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκό *tert*-βουτυλεστέρα **45** (4.65 mmol, 665 mgr) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α -οξίμινο- β -κετο εστέρων. Το υπόστρωμα αυτό καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 30:1). Απόδοση 75 %.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 3.31-3.40 (m, 1H), 1.55 (s, 9H), 1.14 (d, $J = 7.0$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 199.7, 160.7, 150.3, 84.8, 35.7, 28.1, 18.3.

2-υδροξίμινο-3-οξο-3-φαινυλοπροπίονικός μεθυλεστέρας 51

Η σύνθεση του 2-υδροξίμινο-3-οξοβουτανοϊκού *τριτ*-βουτυλεστέρα **51** έγινε με την προσθήκη NaNO_2 (8.2 mmol, 566 mg σε 1.8 ml H_2O) στον 3-οξο-3-φαινυλοπροπίονικό μεθυλεστέρα **53** (2.05 mmol, 365 mg) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α -οξίμινο- β -κετο εστέρων. Το υπόστρωμα αυτό καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 5:1). Απόδοση 82 % σαν μίγμα ισομερών *E/Z*.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 9.7 (s.br, 1H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.66 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H) 7.50-7.55 (m, 2H), 3.83 (s, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 189.7, 161, 149.6, 134.9, 134, 133.9, 130.3, 129.2, 129.1, 128.4, 53.2, 53.

α -ακεταμιδο- β -κετο εστέρες

2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας 32

Η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **32** έγινε με την αναγωγή του 2-υδροξίμινο-3-οξοβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **34** (3.75 mmol, 701 mg) σε Pd/C 10% (0.9 mmol, 96 mg) σε οξικό ανυδρίτη (22.5 mmol, 2.1 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α -ακεταμιδο- β -κετο εστέρων με

υδρογόνωση. Το υπόστρωμα αυτό καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 2:1). Απόδοση 70%.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 6.59 (s.br., 1H), 5.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.487 (s, 9H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 199.3, 169.8, 164.9, 84, 63.7, 27.8, 27.4, 22.7.

2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας 36

Η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **36** έγινε με την αναγωγή του 2-υδροξιμινο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **42** (3.6 mmol, 623 mg) σε Pd/C 10% (0.86 mmol, 92 mg) σε οξικό ανυδρίτη (21.6 mmol, 2.2 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α -ακεταμιδο- β -κετο εστέρων με υδρογόνωση. Το υπόστρωμα αυτό καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 4:1). Απόδοση 70%.

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 6.67 (s.br., 1H), 5.42 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.8 (s, 3H), 3.01-3.11 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.195 (d, $J = 7$ Hz, 3H), 1.1 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (500MHz, CDCl_3): δ 205, 169.7, 167, 60.6, 53.2, 38.8, 22.8, 18.8, 17.6.

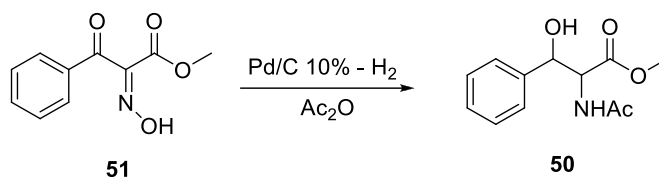
2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας 43

Η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **43** έγινε με την αναγωγή του 2-υδροξιμινο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **47** (0.7 mmol, 151 mg) σε Pd/C 10% (0.17 mmol, 20 mg) σε οξικό ανυδρίτη (4.2 mmol, 0.5 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α -ακεταμιδο- β -κετο εστέρων με υδρογόνωση. Το υπόστρωμα αυτό απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 70%.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 6.6 (s.br, 1H), 5.31 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.03-3.12 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.19 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 206, 169.6, 165.2, 83.9, 61.4, 39.1, 27.8, 22.8, 18.8, 17.6.

2-ακεταμιδο-3-υδροξύ-3-φαινυλοπροπιονικός μεθυλεστέρας 50



Η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-3-υδροξύ-3-φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα **50** έγινε με την αναγωγή του 2-υδροξυμινο-3-φαινυλο-3-οξοπροπιονικού μεθυλεστέρα **51** (1.92 mmol, 398 mg) σε Pd/C 10% (0.46 mmol, 52 mg) σε οξικό ανυδρίτη (11.5 mmol, 1.1 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων με υδρογόνωση. Το υπόστρωμα αυτό απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 75%.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 7.28-7.35 (m, 3H), 7.20-7.23 (m, 2H), 6.26 (s.br., 1H), 5.27 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 5.02 (dd, $J_1 = 6.7$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 171.8, 169.9, 139, 128.3, 128.1, 125.8, 75.1, 59.2, 52.7, 22.9.

β-υδροξύ-α-ακεταμιδο εστέρες

2-ακεταμιδο-3-υδροξύ βουτανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας 35

Η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-3-υδροξύ βουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **35** έγινε με αναγωγή του 2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **32** (1.3 mmol, 280mg) με NaBH_4 (0.43 mmol, 16mg) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για την αντίδραση αναγωγής α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων με NaBH_4 . Το προϊόν καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 1:1). Απόδοση 98% σαν μίγμα διαστερεομερών *anti:syn* 79:21.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 6.53 (d.br., 1H_{anti}), 6.38 (d.br., 1H_{syn}), 4.59 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 3$ Hz, 1H_{anti}), 4.48 (dd, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, 1H_{syn}), 4.25-4.28 (m, 1H_{syn}), 4.15-4.23 (m, 1H_{anti}), 2.08 (s, $3\text{H}_{\text{anti-syn}}$), 1.477 (s, $9\text{H}_{\text{anti-syn}}$), 1.21 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H_{syn}), 1.12 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H_{anti}).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 171.7 (anti), 170.7(syn), 170(syn), 169.1(anti) 83.3(anti), 82.6(syn), 69.4(anti), 68.4(syn), 59(anti), 57.8(syn), 27.9(anti-syn), 23.1(anti), 23.8(syn), 20(syn), 18(anti).

2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-υδροξύ πεντανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας 48

Η σύνθεση του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-υδροξύ πεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **48** έγινε με αναγωγή του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **43** (0.27 mmol, 65 mg) με NaBH₄ (0.09 mmol, 5 mg) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για την αντίδραση αναγωγής α-ακεταμιδο-β-κετο εστέρων με NaBH₄. Το προϊόν καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (Hex/EtOAc, v/v 2:1). Απόδοση 85% σαν μίγμα διαστερεομερών *anti:syn* 84:16.

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 6.609 (d.br., 1H_{anti}), 6.388 (d.br., 1H_{syn}), 4.67 (dd, *J*₁ = 9.3 Hz, *J*₂ = 2,25 Hz, 1H_{syn}), 4.606 (dd, *J*₁ = 7.3 Hz, *J*₂ = 3 Hz, 1H_{anti}), 3.61-3.64 (m, 1H_{syn}), 3.42-3.46 (m, 1H_{anti}), 2.02 (s, 3H_{anti-syn}), 1.61-1.73 (m, 1H_{anti-syn}), 1.46 (s, 9H_{anti}), 1.45 (s, 9H_{syn}), 0.998 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H_{anti-syn}), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H_{anti-syn}).

¹³CNMR (500MHz, CDCl₃): δ 170.51 (anti), 170.49 (syn), 169.9 (anti-syn), 83 (anti), 82.1 (syn), 78.9 (anti), 77.7 (syn), 56.7 (anti), 54.8 (syn), 31.6 (anti), 30.9 (syn), 27.95 (anti-syn), 23.07 (syn), 23.02 (anti), 19.2 (anti), 18.9 (anti-syn), 18.77 (syn)

β-υδροξύ εστέρες

3-υδροξύ-4-μέθυλο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας 41

Η σύνθεση του 3-υδροξύ-4-μέθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα **41** έγινε με την αλδολική συμπύκνωση του οξικού μεθυλεστέρα **39** (8.1 mmol, 600 mg, 644 μl) και της ισοβουτυραλδεΐδης **40** (12.15 mmol, 876 mg, 1.1 ml) χρησιμοποιώντας ξηρή δισοπροπυλαμίνη (12.96 mmol, 1.8 ml) και BuLi (12.96 mmol, 8.1 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση β-υδροξύ εστέρων με αλδολική συμπύκνωση. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc v/v 20:1). Απόδοση 90%.

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 3.76-3.79 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.48-2.52 (m, 1H), 2.4 (dd, *J*₁ = 16 Hz, *J*₂ = 9.7 Hz, 1H), 1.66-1.74 (m, 1H), 0.93 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H), 0.915 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H).

¹³CNMR (500MHz, CDCl₃): δ 173.9, 72.7, 51.7, 38.2, 33.1, 18.3, 17.7.

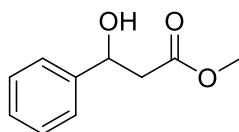
3-υδροξυ-4-μέθυλο πεντανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας 45

Η σύνθεση του 3-υδροξυ-4-μέθυλο πεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **44** έγινε με την αλδολική συμπύκνωση του οξικού *tert*-βουτυλεστέρα **44** (2.6 mmol, 300 mg, 346 μ l) και της ισοβουτυραλδεΐδης **40** (3.87 mmol, 279 mg, 353 μ l) χρησιμοποιώντας ξηρή δισοπροπυλαμίνη (4.13 mmol, 0.6 ml) και BuLi (4.13 mmol, 2.6 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση β -υδροξυ εστέρων με αλδολική συμπύκνωση. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc v/v 20:1). Απόδοση 95%.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 3.69-3.74 (m, 1H), 3.066 (d.br., 1H), 2.26-2.44 (m, 2H), 1.63-1.74 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 173, 81.2, 72.8, 39.3, 33.1, 28.1, 18.3, 17.8.

3-υδροξυ-3-φαινυλο προπιονικός μεθυλεστέρας 52



Η σύνθεση του 3-υδροξυ-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα **52** έγινε με την αλδολική συμπύκνωση του οξικού μεθυλεστέρα **39** (13.5 mmol, 1000 mg, 1.1 ml) και της βενζαλδεΐδης (20.25 mmol, 2149 mg, 2.1 ml) χρησιμοποιώντας ξηρή δισοπροπυλαμίνη (21.6 mmol, 3.0 ml) και BuLi (21.6 mmol, 13.5 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση β -υδροξυ εστέρων με αλδολική συμπύκνωση. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc v/v 15:1). Απόδοση 75%.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 7.28-7.38 (m, 5H), 5.11-5.17 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.23 (d.br, $J = 3.4$ Hz, 1H), 2.67-2.82 (m, 2H).

^{13}C NMR (500MHz, CDCl_3): δ 172.8, 142.4, 128.5, 127.8, 125.6, 70.3, 51.9, 43.1.

β-κετο εστέρες

4-μέθυλο-3-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας 38

Η σύνθεση του 4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **38** έγινε με οξείδωση του 3-υδροξυ-4-μεθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα **41** (7.33 mmol, 1071 mg) με αντιδραστήριο Jones (2.6 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση β-κετο εστέρων μέσω οξείδωσης με αντιδραστήριο Jones. Το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 75%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 3.73 (s, 2H), 2.67-2.76 (m, 1H), 1.13 (d, $J = 7$ Hz, 6H)

$^{13}\text{CNMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 206.4, 167.8, 52.3, 46.8, 41.2, 17.9.

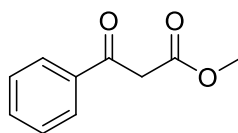
4-μέθυλο-3-οξοπεντανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας 46

Η σύνθεση του 4-μέθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **46** έγινε με οξείδωση του 3-υδροξυ-4-μέθυλο πεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **45** (4.6 mmol, 870 mg) με αντιδραστήριο Jones (1.6 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση β-κετο εστέρων μέσω οξείδωσης με αντιδραστήριο Jones. Το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 70%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 3.39 (s, 2H), 2.66-2.76 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.12 (d, $J = 7$ Hz, 6H).

$^{13}\text{CNMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 207.2, 166.7, 81.8, 48.5, 41.1, 27.9, 17.9.

3-οξο-3-φαινυλο προπιονικός μεθυλεστέρας 53



53

Η σύνθεση του 3-οξο-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα **53** έγινε με οξείδωση του 3-υδροξυ-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα **52** (6.9 mmol, 1245 mg) με αντιδραστήριο Jones (2.5 ml) σύμφωνα με την γενική μέθοδο για τη σύνθεση β-κετο εστέρων μέσω οξείδωσης με αντιδραστήριο Jones. Το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 65% σαν μίγμα με την ενολική μορφή.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 7.26-8.12 (m, $5\text{H}_{\text{keto-enol}}$), 5.68 (s, 1H_{enol}), 4.02 (s, 2H_{keto}), 3.76 (s, $3\text{H}_{\text{keto-enol}}$)

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 192.4 (keto), 171.1 (enol), 167.9 (keto), 135.9, 133.8, 133.7, 131.3, 130.2, 128.5, 126 (keto-enol), 87 (enol), 52.5 (keto), 51.4 (enol), 45.7 (keto).

Προϊόντα από ενζυμικές αναγωγές

2-ακεταμιδο-3-υδροξυ βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας **35** (από ενζυμική με **112**)

Η σύνθεση των *anti*-ισομερών του 2-ακεταμιδο-3-υδροξυ βουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **35** έγινε με ενζυμική αναγωγή του 2-ακεταμιδο-3-οξοβουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **32** (25 mM, 3 mg) με την κετορεδοκτάση 112 σε pH 6.9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 6.47 (s.br., 1H), 4.61 (dd, $J_1 = 6.5$ Hz, $J_2 = 3$ Hz, 1H) 4.16-4.23 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.12 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 171.7, 169.1, 83.4, 69.4, 59.1, 27.9, 23.1, 18.

2-ακεταμιδο-4-μεθυλ-3-υδροξυ πεντανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας **48**

(από ενζυμική με **101**)

Η σύνθεση των *anti*-ισομερών του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλ-3-υδροξυ πεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **48** έγινε με ενζυμική αναγωγή του 2-ακεταμιδο-4-μεθυλο-3-οξοπεντανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα **43** (25 mM, 3 mg) με την κετορεδοκτάση 101 σε pH 6.9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 6.50 (d.br., 1H_{anti}), 4.60 (dd, $J_1 = 6.6$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, 1H_{anti}), 3.46-3.50 (m, 1H_{anti}), 2.05 (s, 3H_{anti}), 1.62-1.72 (m, 1H_{anti}), 1.48 (s, 9H_{anti}), 1.02 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H_{anti}), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H_{anti}).

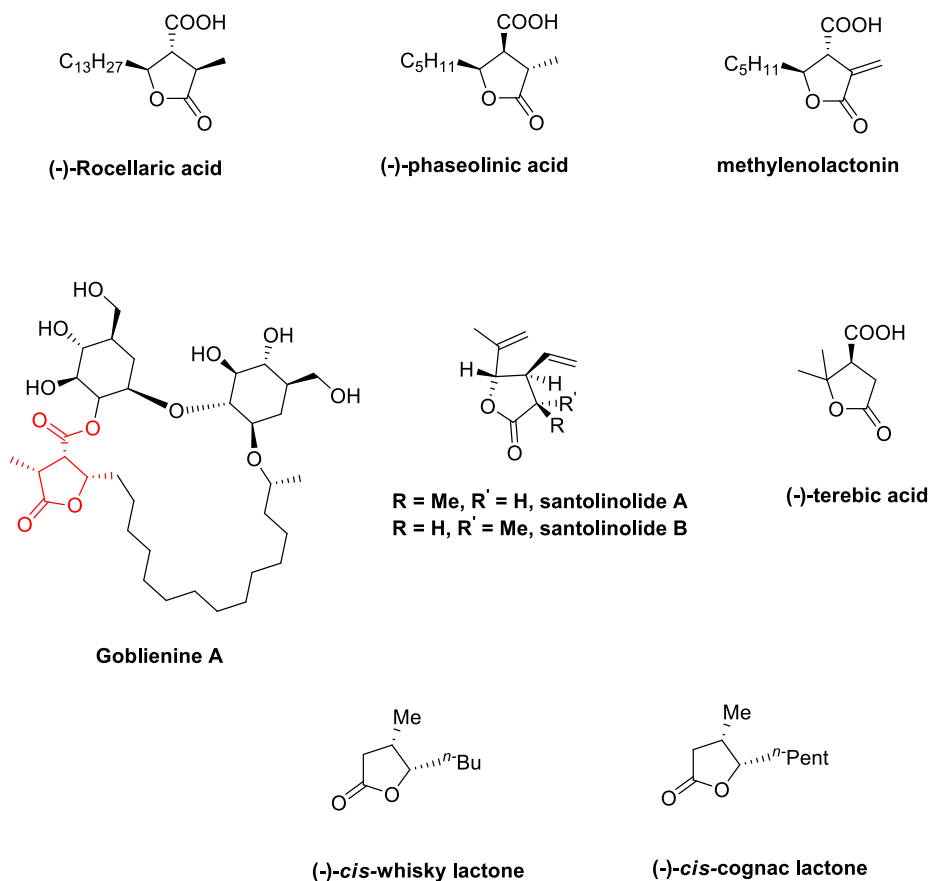
^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 170.6, 170, 83.2, 78.9, 56.8, 31.7, 28, 23.1, 19.3, 18.9.

Κεφάλαιο 3

Στερεοεκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών γ - βουτυρολακτονών μέσω ενζυμικών αναγωγών 2-μονο- και 2,2-διυποκατεστημένων 1,3-δικετονών

Οι οπτικά ενεργές γ -βουτυρολακτόνες είναι πολύ χρήσιμα μόρια, διότι είναι χειρόμορφα ενδιάμεσα-δομικές μονάδες για τη σύνθεση πολλών διαφορετικών τύπων φυσικών προϊόντων, όπως αλκαλοειδή, μακροκυκλικές ενώσεις αντιβιοτικά, φερομόνες, ενώσεις για τη θεραπεία της λευχαιμίας και συστατικά γεύσης.⁶⁵

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και οι β,γ -διυποκατεστημένες και τριυποκατεστημένες γ -βουτυρολακτόνες, που περιέχονται σε πολλά φυσικά και φαρμακευτικά προϊόντα με υψηλή βιολογική δραστηριότητα και επιπλέον είναι πολύ χρήσιμα ενδιάμεσα στην οργανική σύνθεση⁶⁶ (Σχήμα 46).



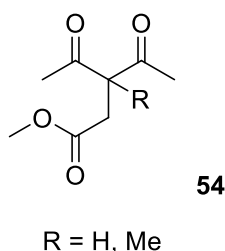
Σχήμα 46: Οι β,γ -διυποκατεστημένες και τριυποκατεστημένες γ -βουτυρολακτόνες ως φυσικά προϊόντα αλλά και ως δομικοί σκελετοί άλλων φυσικών προϊόντων.^{67,71,73}

Για την στερεοεκλεκτική σύνθεση αυτών των ενώσεων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες συνθετικές μέθοδοι που περιλαμβάνουν κυρίως χειρόμορφα οργανικά μόρια,⁶⁷ οργανομεταλλικές ενώσεις⁶⁶ και χειρόμορφους καταλύτες διάφορων μετάλλων.⁶⁸ Εναλλακτικές χημειοενζυμικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση τέτοιων ενώσεων περιλαμβάνουν κυρίως τη χρήση υδρολυτικών ενζύμων,^{69,70} αλλά και αλκοολικών αφυδρογονασών ως ολόκληρα κύτταρα.⁷¹

Σε πρόσφατη εργασία της ερευνητικής μας ομάδας μελετήθηκε η στερεοεκλεκτική αναγωγή α-υποκατεστημένων β-κετο εστέρων με τη χρήση διαφορετικών απομονωμένων κετορεδουκτασών για τη σύνθεση οπτικά ενεργών β,γ-διυποκατεστημένων γ-βουτυρολακτονών που είναι παράγωγά του παρακονικού οξέος.⁷² Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας είναι η στερεοεκλεκτική σύνθεση οπτικά ενεργών β,γ-διυποκατεστημένων και τριυποκατεστημένων γ-βουτυρολακτονών μέσω ενζυμικών αναγωγών 2-μονο- και 2,2-διυποκατεστημένων 1,3-δικετονών.

Ανάλυση-Συζήτηση αποτελεσμάτων

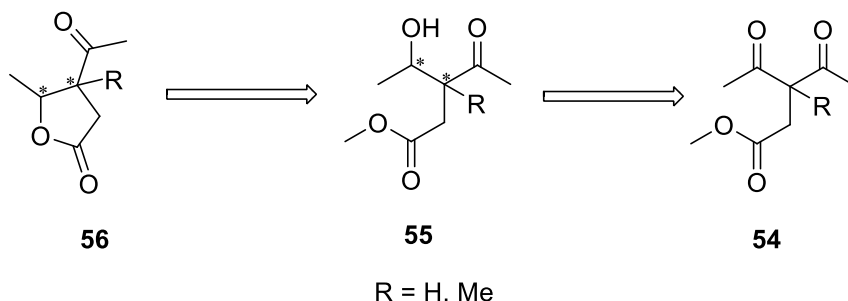
Οι οπτικά ενεργές β,γ-διυποκατεστημένες και τριυποκατεστημένες γ-βουτυρολακτόνες μπορεί να προκύψουν από την στερεοεκλεκτική βιοαναγωγή 2-μονο και 2,2-δι-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 47).



Σχήμα 47: Υποστρώματα που μελετήθηκαν για την στερεοεκλεκτική σύνθεση γ-βουτυρολακτονών.

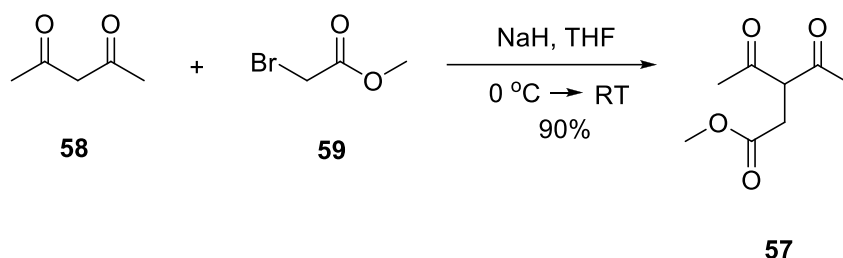
Με την ενζυμική αναγωγή αυτών των υποστρωμάτων προκύπτουν οι αντίστοιχοι 3-υδροξυ 2-μονο και 2,2 δι-υποκατεστημένες κέτο ενώσεις **55**, οι οποίες με μια

αντίδραση λακτονοποίησης μετατρέπονται στις αντίστοιχες β,γ-διυποκατεστημένες και τρι-υποκατεστημένες γ-βουτυρολακτόνες **56**.



Σχήμα 48: Ρετρο-συνθετική ανάλυση των γ-βουτυρολακτονών **56**.

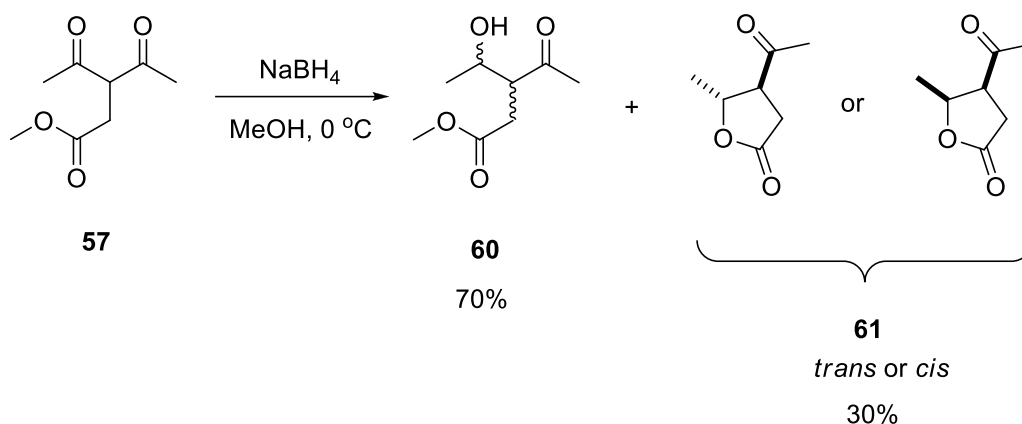
Το πρώτο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν ο 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας **57** η σύνθεση του οποίου πραγματοποιήθηκε με μία αντίδραση αλκυλίωσης σε α-θέση της ακετυλο ακετόνης **58** με το βρωμο οξικό μεθυλεστέρα **59** σε απόδοση 90% (Σχήμα 49).



Σχήμα 49: Σύνθεση του 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **57**.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή του μεθυλεστέρα **57** προς τον αντίστοιχο 3-ακετυλο-4-υδροξυ πεντανοϊκό μεθυλεστέρα **60** με στόχο την λακτονοποίησή του για το σχηματισμό του ρακεμικού μίγματος της αντίστοιχης γ-βουτυρολακτόνης **61**, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπο για σύγκριση με τα προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής και της λακτονοποίησης. Χρησιμοποιώντας τα απαραίτητα ισοδύναμα NaBH_4 προκειμένου η αναγωγή να πραγματοποιηθεί μόνο σε μία από τις δύο καρβonyλομάδες και μετά από καθαρισμό του προϊόντος που απομονώθηκε, διαπιστώθηκε ότι ένα μέρος του υδρόξυ μεθυλεστέρα **60** είχε

λακτονοποιηθεί προς την αντίστοιχη 4-ακέτυλο-5-μεθυλοδιϋδροφουραν-2(3*H*)-όνη **61** στις συνθήκες της αντίδρασης (Σχήμα 50).



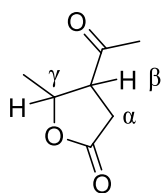
Σχήμα 50: Αντίδραση αναγωγής του μεθυλεστέρα **57** με NaBH₄.

Η αναλογία της ένωσης **60** προς την αντίστοιχη γ-βουτρολακτόνη **61** είναι 70:30 με βάση το φάσμα ¹H-NMR, από το οποίο επίσης φαίνεται ξεκάθαρα ότι έχουν σχηματιστεί μόνο ένα από τα δύο ισομερή της λακτόνης τα *cis* ή τα *trans*. Προκειμένου να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της λακτόνης **61** πραγματοποιήθηκε η αντίδραση λακτονοποίησης του υδρόξυ μεθυλεστέρα **60** ως μίγμα με την λακτόνη **61** με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας *p*-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) σε διχλωρομεθάνιο και έτσι προέκυψε εξ'ολοκλήρου η γ-βουτρολακτόνη **61** σε αναλογία ισομερών 63:37.

Η σχετική στερεοδομή του προϊόντος προσδιορίστηκε από το φάσμα ¹H-NMR με βάση εμπειρικούς κανόνες για τις β,γ-διυποκατεστημένες γ-βουτρολακτόνες, σύμφωνα με τους οποίους το πρωτόνιο σε β-θέση των *cis* ισομερών εμφανίζεται σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με το αντίστοιχο των *trans* ισομερών⁷⁴ και το πρωτόνιο σε γ-θέση των *trans* ισομερών εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το αντίστοιχο των *cis* ισομερών⁷¹ (Σχήμα 51).

Έτσι από το φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **61** προκύπτει ότι η πολλαπλή κορυφή του πρωτονίου σε β-θέση στα 3.62-3.71 ppm αντιστοιχεί στα *cis* ισομερή και η πολλαπλή κορυφή στα 3.08-3.17 ppm αντιστοιχεί στα *trans*. Επίσης η πολλαπλή κορυφή του πρωτονίου σε γ-θέση στα 4.64-4.73 ppm αντιστοιχεί στα *trans* ισομερή ενώ στα 4.91-5.0 ppm αντιστοιχεί στα *cis* ισομερή (Σχήμα 52). Με βάση αυτά τα

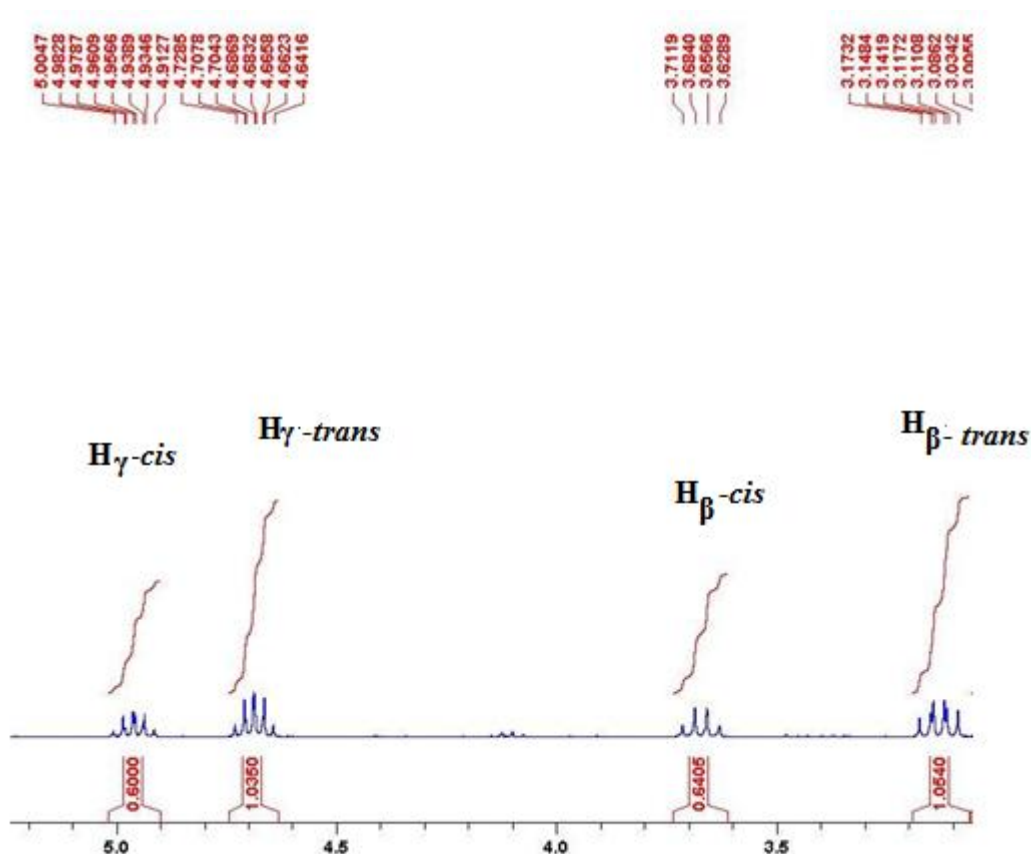
στοιχεία από την αντίδραση λακτονοποίησης προέκυψε η γ -βουτυρολακτόνη **61** σε αναλογία ισομερών *cis:trans* 37:63 (Σχήμα 53).



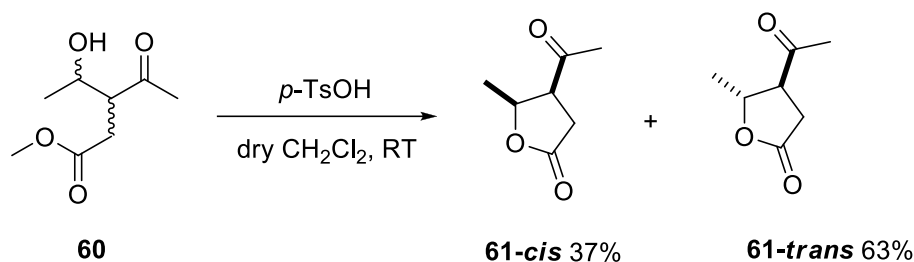
$$\delta_{H\beta(cis)} > \delta_{H\beta(trans)}$$

$$\delta_{H\gamma(trans)} < \delta_{H\gamma(cis)}$$

Σχήμα 51: Διαφορά στη χημική μετατόπιση στο $^1\text{H-NMR}$ μεταξύ των πρωτονίων των ισομερών *cis* και *trans* στις β, γ -διυποκατεστημένες γ -βουτυρολακτόνες.



Σχήμα 52: Αντιστοίχιση κορυφών στο $^1\text{H-NMR}$ στα *cis* και *trans* ισομερή της ένωσης **61** για το πρωτόνιο σε β - και γ -θέση.



Σχήμα 53: Από την αντίδραση λακτονοποίησης προέκυψε η γ-βουτυρολακτόνη **61** σε αναλογία ισομερών *cis:trans* 37:63.

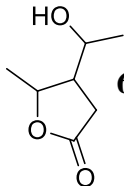
Τα πιθανά στερεοϊσομερή της ένωσης **61** είναι τέσσερα καθώς το μόριο διαθέτει δύο στερεογονικά κέντρα. Τα 4 στερεοϊσομερή φαίνονται στο χρωματογράφημα του ρακεμικού μίγματος χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία (GC) με χειρόμορφη κολώνα και είναι τα A, B, C και D σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησης R_f στο χρωματογράφημα. Συγκρίνοντας το χρωματογράφημα με το αντίστοιχο φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **61** προκύπτει ότι τα A και B είναι τα *trans* ισομερή, που είναι μεταξύ τους εναντιομερή και C και D είναι τα *cis* ισομερή, τα οποία είναι επίσης μεταξύ τους εναντιομερή, χωρίς να είναι όμως γνωστή η απόλυτη στερεοδομή τους.

Από προηγούμενη εργασία της ερευνητικής μας ομάδας για τις γ-βουτυρολακτόνες είναι γνωστό ότι η αντίδραση κυκλοποίησης της ενδιάμεσης β-υδρόξυ ένωσης, που είναι το προϊόν της ενζυμικής αναγωγής, πραγματοποιείται στο ρυθμιστικό διάλυμα που είναι το μέσο της αντίδρασης⁷² χωρίς να είναι όμως αποσαφηνισμένη η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται η κυκλοποίηση στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δεδομένο είναι ότι σε διάστημα 24 ωρών η κυκλοποίηση είχε ολοκληρωθεί σε ποσοστό >95%.

Στην παρούσα μελέτη δεν γινόταν να αφηθεί η αντίδραση για 24 ώρες γιατί θα υπήρχε αυξημένη η πιθανότητα διπλής αναγωγής καθώς στο υπόστρωμα **57** υπάρχουν διαθέσιμα δύο καρβονύλια που μπορούν να αναχθούν από τα ένζυμα. Έτσι πραγματοποιήθηκε έλεγχος των ενζυμικών αντιδράσεων ανά τακτά χρονικά διαστήματα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) μέχρις ότου καταναλωθεί πλήρως το αρχικό υπόστρωμα **57**. Κάποιες από τις κετορεδουκτάσες αποδείχθηκαν πολύ δραστικές και οδήγησαν πολύ γρήγορα στο προϊόν της διπλής αναγωγής. Από τα φάσματα ¹H-NMR των προϊόντων από τις ενζυμικές αναγωγές με διαφορετικές κετορεδουκτάσες προκύπτει ότι τρία είναι τα πιθανά προϊόντα: ο ενδιάμεσος υδρόξυ μεθυλεστέρας **60**, η γ-βουτυρολακτόνη **61** και ένα μικρό ποσοστό της γ-

βουτυρολακτόνης **62** που αποτελεί το προϊόν της διπλής αναγωγής. Δοκιμάστηκαν 14 διαφορετικές κετορεδουκτάσες και στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα καλύτερα αποτελέσματα όσο αφορά τα ποσοστά μετατροπής των αντιδράσεων, τα οποία εξήχθησαν από το φάσμα ¹H-NMR. (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **57**.

KREDS	Χρόνος Αντίδρασης (h)	Conv %	Αναλογία προϊόντων %		
			60	61	 62
102	5	>99	26.5	64.5	9
106	24	40	-	>99	-
112	2	>99	47	53	-
107	24	55	-	55	-
121	8	>99	57	34	9
123	4	>99	57	22	21
111	24	85	-	85	-
116	24	45	-	45	-

Από τον Πίνακα 4 είναι φανερό ότι η αντίδραση κυκλοποίησης ολοκληρώνεται πλήρως μόνο στις περιπτώσεις που οι αντιδράσεις έπρεπε να αφηθούν για 24 ώρες και η ταχύτητα λακτονοποίησης δεν εξαρτάται μόνο από το πόσο χρόνο θα παραμένει το προϊόν της ενζυμικής αναγωγής **60** στο ρυθμιστικό διάλυμα αλλά και από την ταχύτητα δράσης του ενζύμου στο υπόστρωμα **57**.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της διαστερομερικής και της εναντιομερικής περισσειας στον αέριο χρωματογράφο με στόχο την πλήρη κυκλοποίηση των προϊόντων στις περιπτώσεις όπου η διαστεροεκλεκτικότητα και η εναντιοεκλεκτικότητα θα ήταν υψηλή. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα όσο αφορά στην διαστερομερική και εναντιομερική περισσεια (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Έλεγχος της διαστερεομερικής και εναντιοεκλεκτικής περίσσειας της γ -βουτυρολακτόνης **61** που σχηματίστηκε στις συνθήκες της ενζυμικής αναγωγής.

KREDs	Αναλογία Διαστερεομερών % της 61			
	A ^a	B ^a	C ^a	D ^a
102	18.3	75	-	6.2
106	20.7	67.9	1	10
112	-	>99	-	-
107	24.1	68.6	1.1	6.1
121	12.6	25.3	16.2	45.8
123	7.34	33.4	5.7	53.6
111	14.1	46.4	11.1	28.4
116	14.9	61.4	2.8	20.9

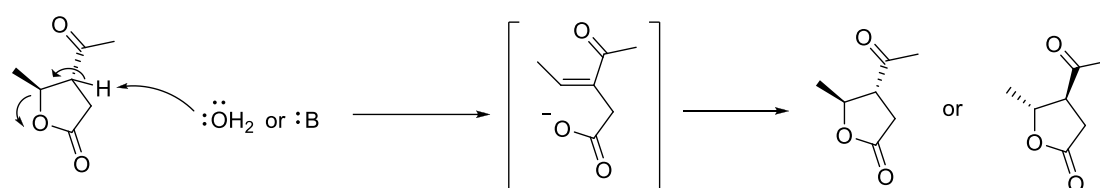
^a Λόγω τεχνικού προβλήματος του αέριου χρωματογράφου, τα ακριβή ποσοστά κάθε στερεοϊσομερούς θα προσδιοριστούν μετά από επιδιόρθωση του οργάνου.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 με την χρήση των KREDs 102 και 112 το ποσοστό της εναντιομερικής και της διαστερεοεκλεκτικής περίσσειας είναι ιδιαίτερα υψηλό για *trans* ισομερή της γ -βουτυρολακτόνης **61**. Ειδικά στην περίπτωση της ενζυμικής αναγωγής με την KRED 112 το αρχικό υπόστρωμα καταναλώθηκε σε 2h, οδηγώντας στο σχηματισμό του ενδιάμεσου υδρόξυ μεθυλεστέρα **60** και ένα μεγάλο μέρος αυτού κυκλοποιήθηκε προς την αντίστοιχη *trans*- γ -βουτυρολακτόνη **61** με >99% εναντιο- και διαστεροκλεκτικότητα.

Δεδομένου ο ενδιάμεσος υδρόξυ μεθυλεστέρας **60** δεν σχηματίζεται με εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα, με τη πλήρη κυκλοποίησή του θα μεταβληθεί η διαστερεοεκλεκτικότητα αλλά το ποσοστό της εναντιοεκλεκτικότητας δεν θα αλλάξει, ακολούθησε η αντίδραση της πλήρους λακτονοποίησης του υδρόξυ μεθυλεστέρα **60** που προέρχεται από τις ενζυμικές αναγωγές με τις KREDs 102 και 112, προς την αντίστοιχη γ -βουτυρολακτόνη **61**.

Η κυκλοποίηση πραγματοποιήθηκε με *p*-TsOH σε ξηρό διχλωρομερθάνιο και οδήγησε στον σχηματισμό της γ -βουτυρολακτόνης **61**. Στην περίπτωση που το προϊόν της κυκλοποίησης προέρχεται από την ενζυμική αναγωγή με την KRED 102, η γ -βουτυρολακτόνη **61** σχηματίστηκε με αναλογία διαστερεομερών 75:25 *trans:cis* μειώνοντας την αρχική διαστερεοεκλεκτικότητα. Στην περίπτωση όμως που η γ -

βουτυρολακτόνη **61** προέρχεται από την ενζυμική αναγωγή με την KRED 112 το προϊόν σχηματίστηκε με αναλογία διαστερεομερών 93:7 *trans:cis*. Το πρόβλημα στην συγκεκριμένη περίπτωση όμως είναι ότι μειώθηκε η εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99%) που είχε βρεθεί πριν την πλήρη κυκλοποίηση κάτι που δεν ήταν αναμενόμενο καθώς το νέο ποσοστό εναντιομερικής περίσσεια που προσδιορίστηκε από το GC είναι 67% ee για το *trans* ισομερές **B**. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι κατά την απομόνωση του προϊόντος που χρησιμοποιείται νερό ή υδατικά διαλύματα το προϊόν ενδεχομένως ρακεμοποιείται εν μέρει λόγω μιας αντίδρασης retro-Michael καθώς το πρωτόνιο σε β-θέση είναι αρκετά όξινο (Σχήμα 54).



Σχήμα 54: Σε υδατικές συνθήκες η γ-βουτυρολακτόνη **61** ρακεμοποιείται εν μέρει εξαιτίας μιας αντίδρασης retro-Michael.

Το ίδιο αποτέλεσμα εμφανίστηκε και στις περιπτώσεις όπου η λακτονοποίηση έγινε παρουσία *p*-TsOH είτε τριφθοροξικού οξέος (TFA) ακόμα και στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για 24 ώρες. Η καλύτερη λύση θα ήταν η λακτονοποίηση να πραγματοποιηθεί αυθόρμητα χωρίς την παρουσία υδατικού περιβάλλοντος η όξινων συνθηκών. Έτσι δοκιμάστηκε η λακτονοποίηση μόνο με θέρμανση στους 40 βαθμούς με διαλύτη χλωροφόρμιο και το μίγμα αφέθηκε για παραπάνω από 24 ώρες χωρίς όμως να προχωρήσει η αντίδραση σε κάποιο ποσοστό. Έχοντας αυτά ως δεδομένα το καλύτερο αποτέλεσμα λοιπόν ήταν η διαστερεοεκλεκτική σύνθεση της *trans*-**61** με αναλογία διαστερεομερών 93:7 και με 67% ee, σε τρία στάδια χρησιμοποιώντας την KRED-112.

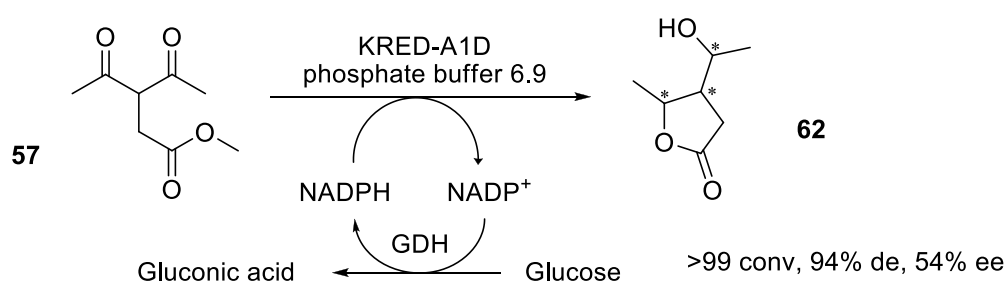
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως κάποιες από τις κετορεδουκτάσες αποδείχθηκαν πολύ δραστικές διότι οδηγούσαν πολύ γρήγορα στο προϊόν της διπλής αναγωγής. Αυτές οι KRED ήταν οι 101, 114, A1C και η AID. Αξιοποιώντας το γεγονός ότι σε 24 ώρες πραγματοποιείται πλήρης κυκλοποίηση των προϊόντων της αναγωγής έγινε προσπάθεια στερεοεκλεκτικής σύνθεσης της 4-(1-υδροξυμεθυλο)-5-

μεθυλοδιυδροφουραν-2(3*H*)-όνης **62** «one-pot», όπου οι αναγωγικές αντιδράσεις και η λακτονοποίηση θα πραγματοποιηθούν στην ίδια φιάλη αντίδρασης.

Πράγματι στις περιπτώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν οι κετορεδουκτάσες A1C και A1D το αποτέλεσμα ήταν αξιοσημείωτο καθώς σε 24 ώρες σχηματίστηκε η γ-βουτυρολακτόνη **62** με πολύ καλό ποσοστό μετατροπής και με μεγάλη διαστεροεκλεκτικότητα. Ειδικά στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε η KRED-A1D η γ-βουτυρολακτόνη σχηματίστηκε με εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής >99 % και υψηλό ποσοστό διαστερομερικής περισσειας 94 % (Σχήμα 55), δεδομένου ότι η ένωση **62** διαθέτει 3 στερεογονικά κέντρα άρα τα πιθανά στερεοϊσομερή μπορεί να είναι έως 8.

Από την αέρια χρωματογραφική ανάλυση του προϊόντος (ο διαχωρισμός των στερεοϊσομερών έγινε με παραγοντοποίηση χρησιμοποιώντας οξικό ανυδρίτη) και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε η KRED-A1D, αλλά και η KRED-A1C, φαίνεται ότι έχουν σχηματιστεί μόνο τα δύο από τα πιθανά 8 στερεοϊσομερή, τα οποία είναι μεταξύ τους εναντιομερή με μέτριο όμως ποσοστό εναντιοεκλεκτικότητας.

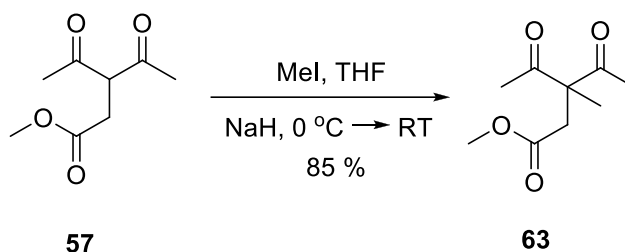
Το αποτέλεσμα όμως είναι έτσι και αλλιώς αξιοσημείωτο διότι χρησιμοποιώντας μόνο ένα αναγωγικό ένζυμο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της διπλής αναγωγής με μεγάλη διαστεροεκλεκτικότητα καθώς και η αντίδραση λακτονοποίησης σε ένα και μόνο στάδιο με εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής.



Σχήμα 55: Στερεοεκλεκτική σύνθεση της γ-βουτυρολακτόνης **62** σε ένα και μόνο στάδιο χρησιμοποιώντας την KRED-A1D.

Η γ-βουτυρολακτόνη **61** αποδείχθηκε αρκετά ευαίσθητο υπόστρωμα εξαιτίας της παρουσίας του όξινου πρωτονίου σε β-θέση, για αυτό το λόγο στη συνέχεια συντέθηκε ο 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας **63** με σκοπό την στερεοεκλεκτική σύνθεση της 4-ακετυλο-4,5 διμεθυλοδιυδροφουραν-2(3*H*)-όνης **64**,

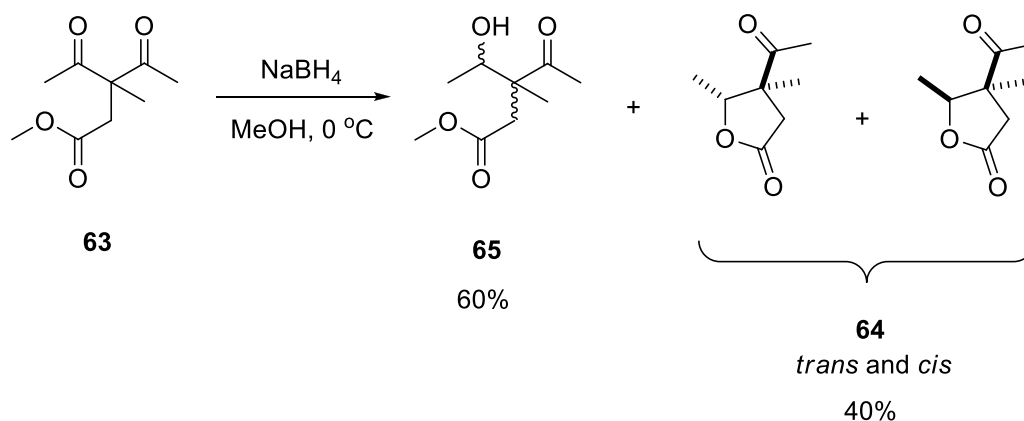
που δεν έχει διαθέσιμο πρωτόνιο σε β-θέση. Η σύνθεση της ένωσης **63** πραγματοποιήθηκε με αντίδραση αλκυλίωσης στην α-θέση της ένωσης **57** με ιωδομεθάνιο σε απόδοση 85% (Σχήμα 56).



Σχήμα 56: Σύνθεση του 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **63**.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή του μεθυλεστέρα **63** προς τον αντίστοιχο 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-υδροξυ πεντανοϊκό μεθυλεστέρα **65** με στόχο την λακτονοποίησή του για το σχηματισμό του ρακεμικού μίγματος της αντίστοιχης γ-βουτυρολακτόνης **64**, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπο για σύγκριση με τα προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής ακολουθούμενα από την αντίδραση λακτονοποίησης. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση έτσι και εδώ ένα μέρος του υδρόξυ μεθυλεστέρα **65** κυκλοποιείται προς την αντίστοιχη γ-βουτυρολακτόνη **64**.

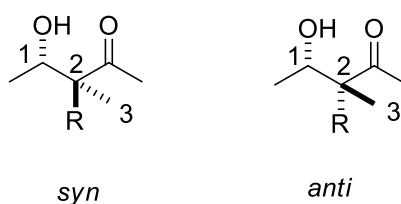
Η αναλογία της ένωσης **65** προς την γ-βουτυρολακτόνη **64** είναι 60:40 με βάση το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, από το οποίο επίσης φαίνεται ξεκάθαρα ότι έχουν σχηματιστεί και τα δύο ισομερή της λακτόνης τα *cis* και τα *trans* (Σχήμα 57).



Σχήμα 57: Αντίδραση αναγωγής του μεθυλεστέρα **63** με NaBH_4 .

Προκειμένου να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της λακτόνης **64** πραγματοποιήθηκε η αντίδραση λακτονοποίησης του υδρόξυ μεθυλεστέρα **65** ως μίγμα με την λακτόνη **64** με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας *p*-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) σε διχλωρομεθάνιο και έτσι προέκυψε εξ'ολοκλήρου η 4-ακετυλο-4,5-διμεθυλοδιυδροφουράν-2(3*H*)-όνη **64** σε αναλογία ισομερών 59:41.

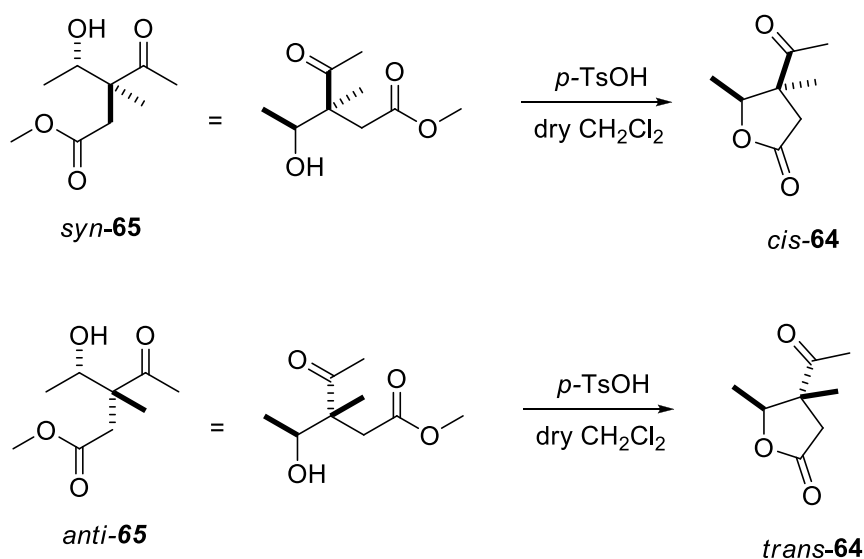
Ο προσδιορισμός της σχετικής στερεοδομής της γ-βουτυρολακτόνης **64** αρχικά βασίστηκε στον εμπειρικό κανόνα του Heathcock⁷⁵ για τις άκυκλες β-υδρόξυ καρβόνυλο ενώσεις που έχουν σε α -θέση μια μεθυλομάδα. Αν προσδιοριστεί η σχετική στερεοδομή λοιπόν του ενδιάμεσου υδρόξυ μεθυλεστέρα **65** μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί και η σχετική στερεοδομή της γ-βουτυρολακτόνης **64** συγκρίνοντας και την αναλογία των ισομερών των δύο ενώσεων από τα φάσματα ¹H-NMR. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε φασματοσκοπία ¹³C-NMR και αυτό που συμβαίνει είναι ότι οι άνθρακες C₁, C₂ και C₃ του *anti* ισομερούς (*anti* σχετική στερεοχημεία μεταξύ υδροξυλομάδας και μεθυλομάδας) εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τους αντίστοιχους του *syn* ισομερούς (*syn* σχετική στερεοδομή μεταξύ υδροξυλομάδας και μεθυλομάδας, Σχήμα 58).



$$\begin{aligned} \delta_{C1syn} &< \delta_{C1anti} \\ \delta_{C2syn} &< \delta_{C2anti} \\ \delta_{C3syn} &< \delta_{C3anti} \end{aligned}$$

Σχήμα 58: Διαφορά στη χημική μετατόπιση στο ¹³C-NMR μεταξύ των ανθράκων των ισομερών *syn* και *anti* της ένωσης **65**.

Τα *syn* ισομερή θα οδηγήσουν στα *cis* ισομερή της γ-βουτυρολακτόνης **64** ενώ τα *anti* ισομερή θα οδηγήσουν στα *trans* ισομερή (Σχήμα 59).



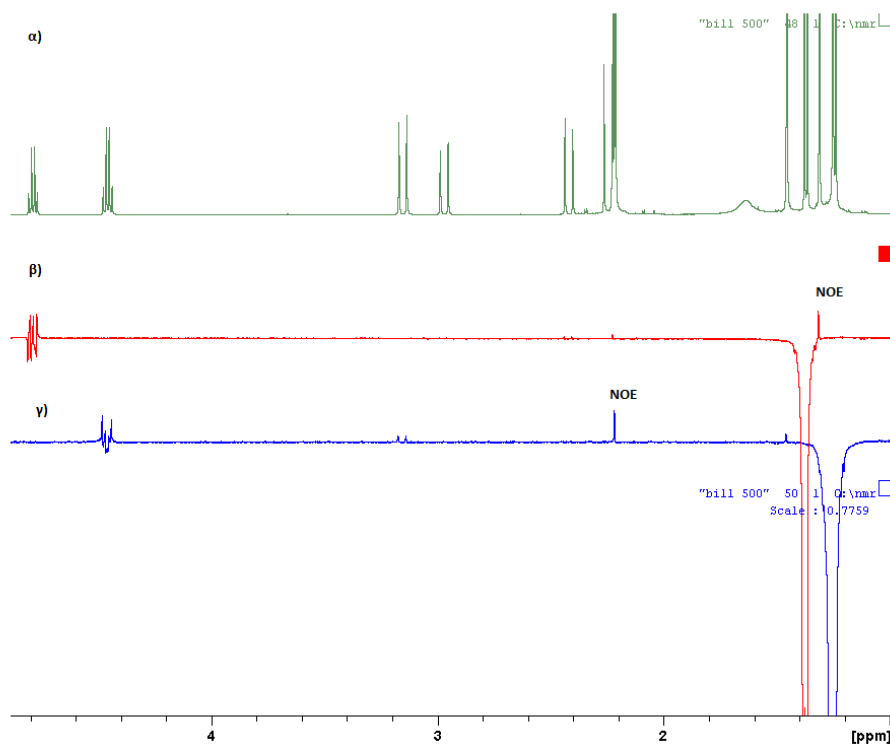
Σχήμα 59: Τα *syn* ισομερή θα οδηγήσουν στα *cis* ισομερή της γ-βουτυρολακτόνης **64** ενώ τα *anti* ισομερή θα οδηγήσουν στα *trans* ισομερή.

Από το φάσμα του $^{13}\text{C-NMR}$ του υδρόξυ μεθυλεστέρα **65** σαν μίγμα με την γ-βουτυρολακτόνη **64** φαίνονται ξεκάθαρα οι τρεις άνθρακες και των δύο ισομερών της ένωσης **65**. Ο άνθρακας C_1 για το κύριο ισομερές εμφανίζεται στα 28.3 ppm ενώ για το δευτερεύον ισομερές εμφανίζεται στα 26 ppm. Ο άνθρακας C_2 για το κύριο ισομερές εμφανίζεται στα 53 ppm ενώ για το δευτερεύον ισομερές εμφανίζεται στα 54.8 ppm και τέλος ο άνθρακας C_3 για το κύριο ισομερές εμφανίζεται στα 72.1 ppm ενώ για το δευτερεύον ισομερές εμφανίζεται στα 71.2 ppm. Άρα είναι φανερό ότι ενώ οι άνθρακες C_1 και C_3 του κύριου ισομερούς εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία, ο άνθρακας C_2 του κύριου ισομερούς εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία. Συνεπώς δεν ήταν δυνατή η εύρεση της σχετικής στερεοδομής με βάση αυτόν τον εμπειρικό κανόνα, διότι στο συγκεκριμένο υπόστρωμα δεν μπορεί να εφαρμοστεί.

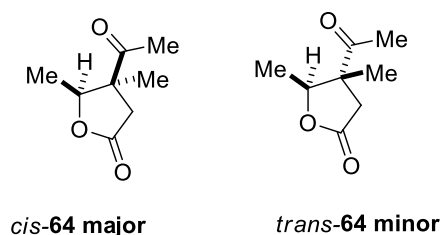
Για αυτό το λόγο ο προσδιορισμός της σχετικής στερεοδομής της γ-βουτυρολακτόνης **64** πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ με πείραμα NOE (Nuclear Overhauser Effect). Είναι γνωστό ότι το NOE θα είναι πολύ πιο ισχυρό όταν οι υποκαταστάσεις είναι *cis* σε σχέση με όταν είναι *trans* όπου το φαινόμενο πολύ ανίσχυρο. Με βάση αυτά τα στοιχεία ακτινοβολήθηκε η απορρόφηση του μεθυλίου σε γ-θέση για κάθε ένα από τα δύο ισομερή. Όταν ακτινοβολήθηκε η μέθυλο-απορρόφηση χαμηλότερου πεδίου (1.36 ppm) που

αντιστοιχεί στο δευτερεύον ισομερές, παρατηρήθηκε ένα ισχυρό NOE με τη μεθυλομάδα σε β-θεση που απορροφά στα 1.3 ppm (Σχήμα 60) Αυτό το ισχυρό φαινόμενο υποδηλώνει ότι τα μεθύλια σε β- και γ-θέση είναι *cis* μεταξύ τους, άρα το μεθύλιο σε γ-θέση είναι *trans* με την ακετυλο ομάδα σε β-θεση.

Όταν στη συνέχεια ακτινοβολήθηκε η μέθυλο-απορρόφηση υψηλότερου πεδίου (1.24 ppm) που αντιστοιχεί στο κύριο ισομερές, παρατηρήθηκε ένα ισχυρό NOE με το μεθύλιο της ακετυλο ομάδας που απορροφά στα 2.24 ppm. (Σχήμα 60). Αυτό το ισχυρό φαινόμενο υποδηλώνει ότι η μεθυλομάδα σε γ-θέση και η ακετυλο ομάδα σε β-θέση είναι *cis* μεταξύ τους. Επομένως με βάση αυτά τα δεδομένα το κύριο ισομερές της γ-βουτυρολακτόνης **64** είναι το *cis* (*cis* σχετική στεreoχημεία μεταξύ της μεθυλομάδας σε γ-θεση και της ακετυλο ομάδας σε β-θεση) και το δευτερεύον ισομερές είναι το *trans* (*trans* σχετική στεreoχημεία μεταξύ της μεθυλομάδας σε γ-θέση και της ακετυλο ομάδας σε β-θεση) (Σχήμα 61)

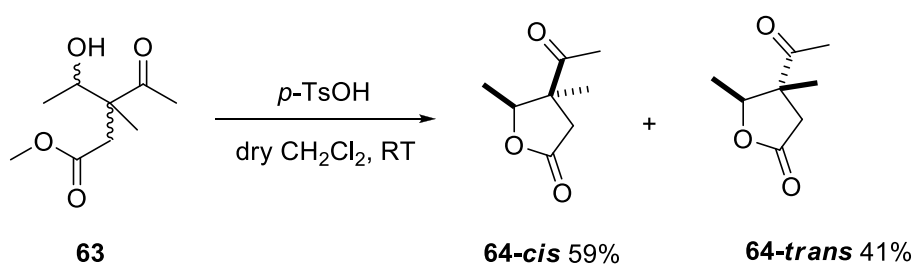


Σχήμα 60: α) Φάσμα πρωτονίου της γ-βουτυρολακτόνης **64** χωρίς ακτινοβολία των επιμέρους κορυφών β) φάσμα πρωτονίου μετά από ακτινοβολία της απορρόφησης της μεθυλομάδας χαμηλότερου πεδίου που αντιστοιχεί στο δευτερεύον ισομερές γ) φάσμα πρωτονίου μετά από ακτινοβολία της απορρόφησης της μεθυλομάδας υψηλότερου πεδίου που αντιστοιχεί στο κύριο ισομερές.



Σχήμα 61: Από την φασματοσκοπία NOE $^1\text{H-NMR}$ προέκυψε ότι το κύριο ισομερές είναι το *cis* και το δευτερεύον ισομερές το *trans*.

Συνεπώς από την αντίδραση λακτονοποίησης προέκυψε η γ -βουτυρολακτόνη **64** σε αναλογία ισομερών *cis:trans* 59:41 (Σχήμα 61).



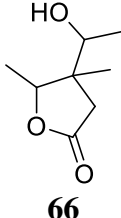
Σχήμα 61: Από την αντίδραση λακτονοποίησης προέκυψε η γ -βουτυρολακτόνη **64** σε αναλογία ισομερών *cis:trans* 59:41.

Τα πιθανά στερεοϊσομερή της ένωσης **64** είναι τέσσερα καθώς το μόριο διαθέτει δύο στερεογονικά κέντρα. Τα 4 στερεοϊσομερή φαίνονται στο χρωματογράφημα του ρακεμικού μίγματος χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία (GC) με χειρόμορφη κολώνα και είναι τα A, B, C και D σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησης R_f στο χρωματογράφημα. Συγκρίνοντας τις ολοκληρώσεις και τις σχετικές αναλογίες των κορυφών στο χρωματογράφημα με το αντίστοιχο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **64** προκύπτει ότι τα A και B είναι τα *cis* ισομερή, που είναι μεταξύ τους εναντιομερή και C και D είναι τα *trans* ισομερή, τα οποία είναι επίσης μεταξύ τους εναντιομερή, χωρίς να είναι όμως γνωστή η απόλυτη στερεοδομή τους.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **63** με σειρά κετορεδουκτασών, ακολουθούμενη από την πλήρη κυκλοποίηση του ενδιάμεσου υδρόξυ μεθυλεστερά **65** στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε. Οι αντιδράσεις ελέγχθησαν με TLC με σκοπό την αποφυγή σχηματισμού του προϊόντος της διπλής αναγωγής που είναι η γ -βουτυρολακτόνη **66**. Κάποιες από τις

κετορεδουκτάσες αποδείχθηκαν πολύ δραστικές τείνοντας να οδηγήσουν στο προϊόν της διπλής αναγωγής σε υψηλό ποσοστό. Συνολικά δοκιμάστηκαν 15 διαφορετικές κετορεδουκτάσες και στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα.

Πίνακας 6: Ενζυμική αναγωγή του 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **63** ακολουθούμενη από αντίδραση λακτονοποίησης.

KREDs	Χρόνος αντίδρασης (h ή min)	Conv %	γ-βουτυρολακτόνη 64	 66	Αναλογία Διαστερομερών % της 64			
					A ^a	B ^a	C ^a	D ^a
101 ^β	20min	86	73	13	2.24	8.7	22.5	66.5
111 ^{δ,ε}	12h	76	76	-	21	79	-	-
123 ^α	6h	77	41	36	13.7	77.8	0.7	7.6
115 ^γ	24h	43	43	-	21	79	-	-
107 ^β	6h	>99	>99	-	1.7	13.5	17.2	67
A1C ^γ	24h	12	12	-	-	99	-	-

^α Λόγω τεχνικού προβλήματος του αέριου χρωματογράφου, τα ακριβή ποσοστά κάθε στερεοϊσομερούς θα προσδιοριστούν μετά από επιδιόρθωση του οργάνου.

^β Η πλήρης κυκλοποίηση πραγματοποιήθηκε παρουσία *p*-TsOH.

^γ Η κυκλοποίηση ολοκληρώθηκε στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

^δ Η κυκλοποίηση ολοκληρώθηκε σε ποσοστό 95% στο ρυθμιστικό διάλυμα.

^ε Από το φάσμα ¹H-NMR η αναλογία διαστερομερών προκύπτει 97:3 *cis:trans*.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6, η ενζυμική αναγωγή του μεθυλεστέρα **63** με την KRED-101 πραγματοποιείται πολύ γρήγορα και μόλις σε 20 λεπτά η αναγωγή προς τον ενδιάμεσο μεθυλεστέρα **65** είχε σχεδόν ολοκληρωθεί και μάλιστα ήδη είχε αρχίσει να σχηματίζεται η γ-βουτυρολακτόνη **66** που είναι το προϊόν της διπλής αναγωγής. Έτσι η αντίδραση σταμάτησε σε αυτό το χρονικό σημείο και ακολούθησε η πλήρης κυκλοποίηση του μεθυλεστέρα **65** προς την αντίστοιχη γ-βουτυρολακτόνη **64** με ποσοστό μετατροπής 73% και με υψηλή *trans*-στερεοεκλεκτικότητα με αναλογία ισομερών *trans:cis* 89:11.

Στην περίπτωση της ενζυμικής αναγωγής με την KRED-111, σε 12 ώρες έχει σχηματιστεί η γ-βουτυρολακτόνη **64** με πολύ υψηλή *cis*-στερεοεκλεκτικότητα 94% και με 58% εναντιοεκλεκτικότητα καθώς η κυκλοποίηση είχε σχεδόν ολοκληρωθεί

στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών χωρίς τον σχηματισμό της γ-βουτυρολακτόνης **66**. Η αντίδραση αρχικά είχε αφηθεί περισσότερο από 12 ώρες, όμως παρατηρήθηκε και σχηματισμός της γ-βουτυρολακτόνης **66** χωρίς να προχωρήσει περαιτέρω η απλή αναγωγή του αρχικού υποστρώματος **63**.

Η αναγωγή με την KRED-115 σε συνδυασμό με την κυκλοποίηση που πραγματοποιείται στο ρυθμιστικό διάλυμα σε 24 ώρες οδηγεί στο σχηματισμό αποκλειστικά των *trans* ισομερών με αναλογία ισομερών *trans:cis* 1:99 με μέτριο όμως ποσοστό μετατροπής (43%).

Η αναγωγή με την KRED-123 δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί εύκολα και αυτό διότι το ένζυμο αποδείχθηκε ιδιαίτερα δραστικό καθώς από τη πρώτη ώρα αντίδρασης ήδη είχε αρχίσει να σχηματίζεται και η γ-βουτυρολακτόνη **66** χωρίς όμως το αρχικό υπόστρωμα να καταναλώνεται με τον ίδιο ρυθμό. Η αντίδραση εν τέλει σταμάτησε στις 6 ώρες, όπου είχε απομείνει 23% του αρχικού υποστρώματος **63**. Μετά την ολοκλήρωση της κυκλοποίησης με *p*-TsOH σχηματίστηκε η γ-βουτυρολακτόνη **64** σε ποσοστό 41% με υψηλή *trans*-στερεοεκλεκτικότητα και αναλογία ισομερών *trans:cis* 8:92, αρκετά καλό ποσοστό ενενατιομερικής περίσσειας 70% ee, και σε μίγμα με την γ-βουτυρολακτόνη **66** (36%).

Η αναγωγή του μεθυλεστέρα **63** με την KRED-107 ολοκληρώθηκε στις 6 ώρες χωρίς το σχηματισμό του προϊόντος της διπλής αναγωγής. Η πλήρης κυκλοποίηση του ενδιάμεσου υδροξυ μεθυλεστέρα **65** οδήγησε στον σχηματισμό της γ-βουτυρολακτόνης **65** με εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής >99%, με *trans*-στερεοεκλεκτικότητα και αναλογία ισομερών *cis:trans* 14:86. Τέλος στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε η A1C σχηματίστηκε η γ-βουτυρολακτόνη **64** με >99% de και >99% ee αλλά το ποσοστό της μετατροπής δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικό.

Όπως προαναφέρθηκε κάποιες από τις κετορεδουκτάσες αποδείχθηκαν πολύ δραστικές διότι οδηγούσαν πολύ γρήγορα στο προϊόν της διπλής αναγωγής. Αυτές οι KRED ήταν οι 101, 114, 123, 102 και 113. Στο άμεσο μέλλον λοιπόν είναι δυνατή η μελέτη των ενζυμικών αναγωγών του υποστρώματος **63** για την στερεοεκλεκτική σύνθεση της γ-βουτυρολακτόνης **66** «one-pot» στην ίδια φιάλη αντίδρασης.

Συμπερασματικά επιτεύχθηκε για πρώτη φορά η στερεοεκλεκτική σύνθεση των γ-βουτυρολακτονών **61**, **62** και **64** χρησιμοποιώντας NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της *trans*-4-ακέτυλο-5-μεθυλοδιϋδροφουραν-2(3*H*)-όνης **61** με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα 86% de και αρκετά καλή 67% ee δεδομένης και της ευαισθησίας που επέδειξε το

υπόστρωμα, σε τρία στάδια με στάδιο κλειδί την στερεοεκλεκτική αναγωγή του 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **57** προς τον ενδιάμεσο 3-ακετυλο-4-υδροξυπεντανοϊκό μεθυλεστέρα **60** με εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής >99% μόλις σε 2 ώρες.

Επίσης επιτεύχθηκε η στερεοεκλεκτική σύνθεση της 4-(1-υδροξυμεθυλο)-5-μεθυλοδιυδροφουραν-2(3*H*)-όνης **62** από τον 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκό μεθυλεστέρα **57** σε ένα και μόνο στάδιο στην ίδια φιάλη αντίδρασης (one-pot) με την χρήση ενός μόνο ενζύμου της KRED-A1D, σε εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής >99%, υψηλή διαστεροεκλεκτικότητα 94 % *de* και 57 % *ee*. Τέλος πραγματοποιήθηκε η στερεοεκλεκτική σύνθεση και των δύο ισομερών *cis* και *trans* της 4-ακετυλο-4,5-διμεθυλοδιυδροφουραν-2(3*H*)-όνης **64** χρησιμοποιώντας τις KRED 111 και 101 αντίστοιχα σε καλή απόδοση και υψηλή διαστεροεκλεκτικότητα.

Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την εύρεση νέων ή και τροποποιημένων κετορεδουκτασών-αφυδρογονασών, για την στερεοεκλεκτική σύνθεση γ-βουτυρολακτονών με ακόμα μεγαλύτερη οπτική καθαρότητα καθώς επίσης και περαιτέρω μελέτες της ενζυμικής αναγωγής και σε άλλα υποστρώματα τροποποιώντας τους υποκαταστάτες στην γ-θέση.

Πειραματικό μέρος

Γενικές συνθετικές μέθοδοι

Αντίδραση αλκυλίωσης της ακετυλο ακετόνης και του 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε άνυδρο THF (25ml) διαλύθηκε NaH και το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C. Έπειτα προστίθεται η ακετυλο ακετόνη (6 mmol) ή ο 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας (1.86 mmol) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην ο βρωμοοξικός μεθυλεστέρας (3 mmol) διαλυμένος σε THF ή το ιωδομεθάνιο (0.93 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθενται 20 ml μέχρι την πλήρη διάλυση των στερεών και στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις εκχυλίσεις με EtOAc (3 x 20 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Τα προϊόντα που προκύπτουν χρειάζονται περαιτέρω καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 85-90 %.

Αντίδραση αναγωγής της 2-μονο και 2,2-δι-υποκατεστημένης 1,3-δικετόνης με NaBH₄ και αντίδραση λακτονοποίησης των ενδιάμεσων υδρόξυ προϊόντων με *p*-TsOH

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε δίκαιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται NaBH₄ (0.15 mmol, 6 mg) σε 5ml ξηρής μεθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην η 2-μονο- ή 2,2-δι-υποκατεστημένη 1,3-δικετόνη διαλυμένη σε 1-2 ml μεθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 1-2 ml κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl και το διάλυμα συμπυκνώνεται στο ρότορα υπό κενό. Κατόπιν προστίθενται 20ml νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc (3 x20 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄

και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 50-60%. Η λακτονοποίηση των υδροξυ προϊόντων ολοκληρώνεται με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας *p*-TsOH (10 %) σε 5 ml ξηρό διχλωρομεθανίο. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 4-5 ώρες. Για την απομόνωση της γ -βουτυρολακτόνης συμπυκνώνεται ο διαλύτης υπό κενό και στη συνέχεια προστίθενται 4-5 ml νερού. Έπειτα πραγματοποιούνται τρεις εκχυλίσσεις της οργανικής φάσης με EtOAc (3 x 6 ml) και η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄. Κατόπιν ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 85-90 %.

Ενζυμική αναγωγή της 2-μονο και 2,2-δι-υποκατεστημένης 1,3 δικετόνης

Σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM ή 150 Mm, pH 6.9) προστίθενται υπόστρωμα (25 Mm), κετορεδουκτάση (2 mg/ml), NADPH (2.5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 Mm, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/ml). Η αντίδραση ανακινείται στους 37 °C και η αντίδραση ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στη συνέχεια το μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc (2 x1 ml) και τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία NMR.

Αντίδραση λακτονοποίησης των ενδιάμεσων υδροξυ προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών με *p*-TsOH

Αν η αντίδραση ενζυμικής αναγωγής αφεθεί για πάνω από 12 ώρες η λακτονοποίηση πραγματοποιείται στην ίδια φιάλη αντίδρασης παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις η κυκλοποίηση ολοκληρώνεται με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας *p*-TsOH σε 2 ml ξηρό διχλωρομεθανίο. Έπειτα πραγματοποιούνται δυο εκχυλίσσεις της οργανικής φάσης με EtOAc (2 x 6 ml) και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Τα προϊόντα μπορεί να χρειάζονται περαιτέρω καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία NMR.

Σύνθεση Υποστρωμάτων

3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας 57

Η σύνθεση του 3-ακέτυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **57** πραγματοποιήθηκε με την αλκυλίωση της ακετυλο ακετόνης **58** της ακετυλο ακετόνης **58** (6 mmol, 600 mg) με το βρωμο οξικό μεθυλεστέρα **59** (3 mmol, 460 mg, 280 μl) παρουσία NaH (9 mmol, 216 mg) σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αλκυλίωσης. Το υπόστρωμα αυτό καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 10:1). Απόδοση 90 % σαν μίγμα με την ενολική μορφή.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 4.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H_{keto}), 3.69 (s, 3H_{enol}), 3.66 (s, 3H_{keto}), 3.25 (s, 2H_{enol}), 2.87 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H_1), 2.26 (s, 6H_{keto}), 2.14 (s, $6\text{H}_{1\text{enol}}$).

$^{13}\text{CNMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 202(keto), 192(enol), 171.9(enol), 171.7(keto), 104.2(enol), 63.2(keto), 52.2(keto-enol), 33(keto), 32.3(enol), 29.7(enol), 23.3(keto).

3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας 63

Η σύνθεση του 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **63** πραγματοποιήθηκε με την αλκυλίωση του 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **57** (1.86 mmol, 320 mg) με το ιωδομεθάνιο (0.93 mmol, 132 mg, 60 μl) παρουσία NaH (2.8 mmol, 70 mg) σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αλκυλίωσης. Το υπόστρωμα αυτό καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 25:1). Απόδοση 85 %.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 3.66 (s, 3H), 2.94 (s, 2H), 2.17 (s, 6H), 1.48 (s, 3H).

$^{13}\text{CNMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 205.5, 171.4, 64.5, 51.9, 39.6, 26.3, 18.9.

4-ακέτυλο-5-μεθυλοδιϋδροφουραν-2(3H)-όνη 61

Η σύνθεση της 4-ακέτυλο-5-μεθυλοδιϋδροφουραν-2(3H)-όνης **61** πραγματοποιήθηκε με την αναγωγή του 3-ακέτυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **57** (0.58 mmol, 100 mg) με NaBH_4 (0.15 mmol, 6mg) ακολουθούμενη από την πλήρη κυκλοποίηση του 3-ακετυλο-4-υδροξυ πεντανοϊκό μεθυλεστέρα **60** με τη χρήση *p*-TsOH (10%, 3mg) σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αναγωγής με NaBH_4 και λακτονοποίησης με *p*-TsOH. Το προϊόν της αναγωγής καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 5:1). Απόδοση 50 %. Το προϊόν της

λακτονονοποίησης δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 90 % σαν μίγμα ισομερών *trans:cis* 63:37.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 4.91-5.0 (m, 1H_{cis}), 4.64-4.73(m, 1H_{trans}), 3.62-3.71 (m, 1H_{cis}), 3.08-3.17 (m, 1H_{trans}), 2.99 (dd, $J_1 = 17.8$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz, 1H_{cis}), 2.71-2.88 (m, $1\text{H}_{\text{cis-trans}}$), 2.48 (dd, $J_1 = 18.2$ Hz, $J_2 = 8.3$ Hz, 1H_{cis}), 2.25 (s, 3H_{trans}), 2.23 (s, 3H_{cis}), 1.49 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H_{trans}), 1.25 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H_{cis}).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 204.4(cis), 203.8(trans), 175(trans), 174.1(cis), 77.3(cis), 75.6(trans), 54.6(cis), 51.1(trans), 31.9(cis), 30.5(trans), 29.7(cis), 29.5(trans), 21(cis), 16.8(trans).

4-ακετυλο-4,5 διμεθυλοδιϋδροφουραν-2(3H)-όνη 64

Η σύνθεση της 4-ακετυλο-4,5 διμεθυλοδιϋδροφουραν-2(3H)-όνης **64** πραγματοποιήθηκε με την αναγωγή του 3-ακέτυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **63** (0.58 mmol, 100 mg) με NaBH_4 (0.15 mmol, 6mg) ακολουθούμενη από την πλήρη κυκλοποίηση του 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-υδροξυ πεντανοϊκού μεθυλεστέρα **65** με τη χρήση *p*-TsOH (10%, 2mg) σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αναγωγής με NaBH_4 και λακτονοποίησης με *p*-TsOH. Το προϊόν της αναγωγής καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc, v/v 9:1). Απόδοση 60 %. Το προϊόν της λακτονοποίησης δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 85 % σαν μίγμα ισομερών *cis:trans* 59:41.

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 4.78 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H_{trans}), 4.45 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H_{cis}), 3.14 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H_{cis}), 2.96 (d, $J = 17$ Hz, 1H_{trans}), 2.41 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H_{trans}), 2.24 (d, $J = 17.6$, 1H_{cis}), 2.217 (s, 3H_{trans}), 2.209 (s, 3H_{cis}), 1.45 (s, 3H_{cis}), 1.36 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H_{trans}), 1.3 (s, 3H_{trans}), 1.239 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H_{cis}).

^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3): δ 207.5 9 (trans), 206.7 (cis), 174.8 9 (cis), 173.8 (trans), 82.5 (cis), 79.4 (trans), 55.4 (cis), 54.6 (trans), 40.2 (trans), 37.5 (cis), 27.5 (cis), 26.3 (trans), 22.4 (cis), 17.4 (trans), 16.7 (cis), 15.2 (trans).

4-(1-υδροξυμεθυλο)-5-μεθυλοδιϋδροφουραν-2(3H)-όνη 62

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται NaBH_4 (0.03 mmol, 2 mg) σε 5ml ξηρής μεθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 5-10 λεπτά και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην η 4-ακέτυλο-5-μεθυλοδιϋδροφουραν-2(3H)-όνη **61** (0.1 mmol, 15 mg) διαλυμένη σε 1-2 ml μεθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

(TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 1-2 ml κορεσμένου διαλύματος NH_4Cl και το διάλυμα συμπυκνώνεται στο ρότορα υπό κενό. Κατόπιν προστίθενται 5 ml νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με EtOAc (3 x 5 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 85% σαν μίγμα διαστερεομερών.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 4.50-4.88 (m, 4H), 3.78-3.93 (m, 4H), 2.08-2.69 (m, 12H), [1.466 (d, $J = 6.23$ Hz), 1.409 (d, $J = 6.3$ Hz), 1.367 (d, $J = 6.64$ Hz), 12H] 1.21-1.26 (m, 12H).

$^{13}\text{CNMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 176.3, 175.9, 175.7, 79.5, 78.5, 78.2, 69.1, 67, 65.7, 49.2, 49, 46, 32, 30.1, 29.1, 23, 22, 21.9, 21.6, 20.2, 15.2.

4-(1-υδροξυμεθυλο)-5-μεθυλοδιυδροφουραν-2(3H)-όνη 62

(από ενζυμική με A1D)

Η διαστερεοεκλεκτική σύνθεση (94% de) της 4-(1-υδροξυμεθυλο)-5-μεθυλοδιυδροφουραν-2(3H)-όνης **62** έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3-ακετυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **57** (25 mM, 3 mg) με την κετορεδουκτάση A1D σε pH 6.9 σε 24 ώρες σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής και λακτονοποίησης στο ρυθμιστικό διάλυμα.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 4.56-4.64 (m, 1H), 3.76-3.85 (m, 1H), 2.59-2.68 (m, 1H), 2.26-2.38 (m, 1H), 2.07-2.18 (m, 1H), 1.47 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.23 (d, $J = 6.28$ Hz, 3H).

$^{13}\text{CNMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 176.1, 79.8, 69.3, 49.3, 32.2, 22.2, 21.9

cis-4-ακετυλο-4,5 διμεθυλοδιυδροφουραν-2(3H)-όνη 64 (από ενζυμική με 111)

Η διαστερεοεκλεκτική σύνθεση (94% de) των *cis* ισομερών της 4-ακετυλο-4,5 διμεθυλοδιυδροφουραν-2(3H)-όνης **64** έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **63** (25 mM, 3 mg) με την κετορεδουκτάση 111 σε pH 6.9 σε 12 ώρες σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής και λακτονοποίησης στο ρυθμιστικό διάλυμα.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz; CDCl_3 ; Me_4Si): δ 4.45 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H), 3.15 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 2.24 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 2.21 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.24 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

$^{13}\text{CNMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 206.6, 174.8, 82.4, 55.4, 37.5, 37.5, 22.4, 16.7.

***trans*-4-ακετυλο-4,5 διμεθυλοδιϋδροφουραν-2(3*H*)-όνη **64** (από ενζυμική με **101**)**

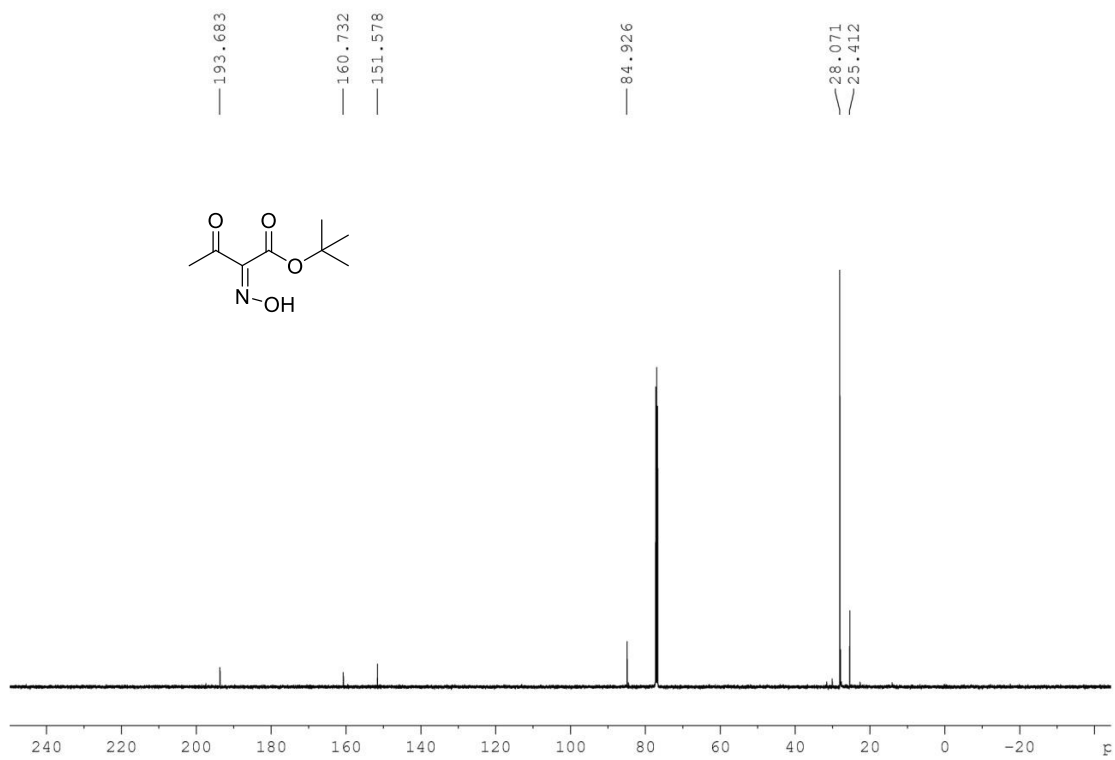
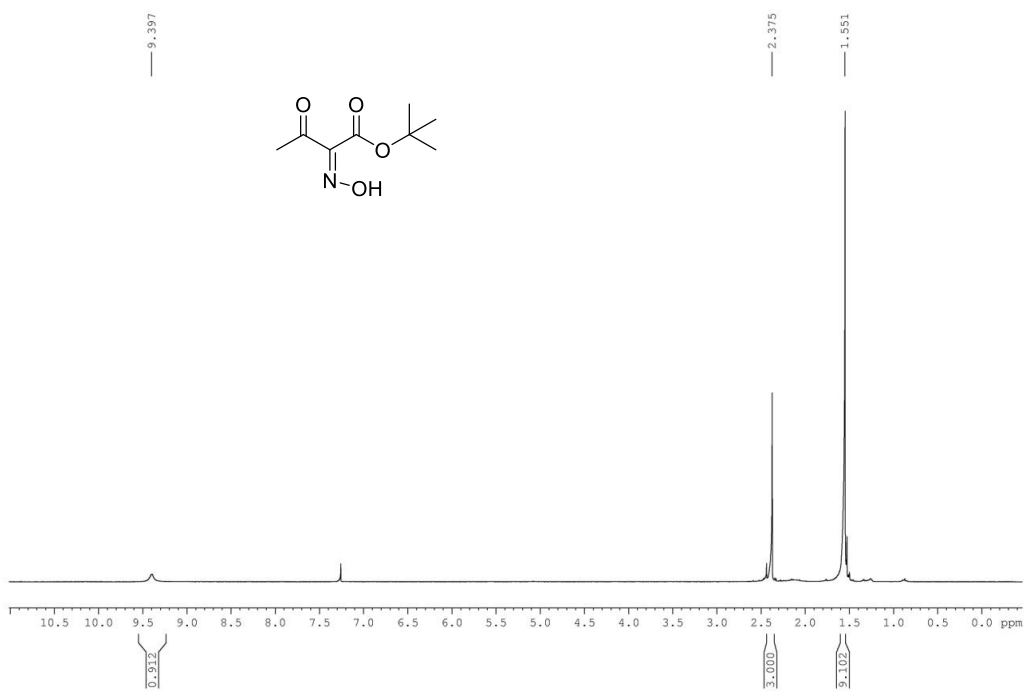
Η διαστερεοεκλεκτική σύνθεση (78% de) των *trans* ισομερών της 4-ακετυλο-4,5 διμεθυλοδιϋδροφουραν-2(3*H*)-όνης **64** έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3-ακετυλο-3-μεθυλο-4-οξοπεντανοϊκού μεθυλεστέρα **63** (25 mM, 3 mg) με την κετορεδουκτάση 101 σε pH 6.9 σε 20 λεπτά ακολοθούμενη από την πλήρη κυκλοποίηση με *p*-TsOH (10%) σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής και της αντίδρασης λακτονοποίησης.

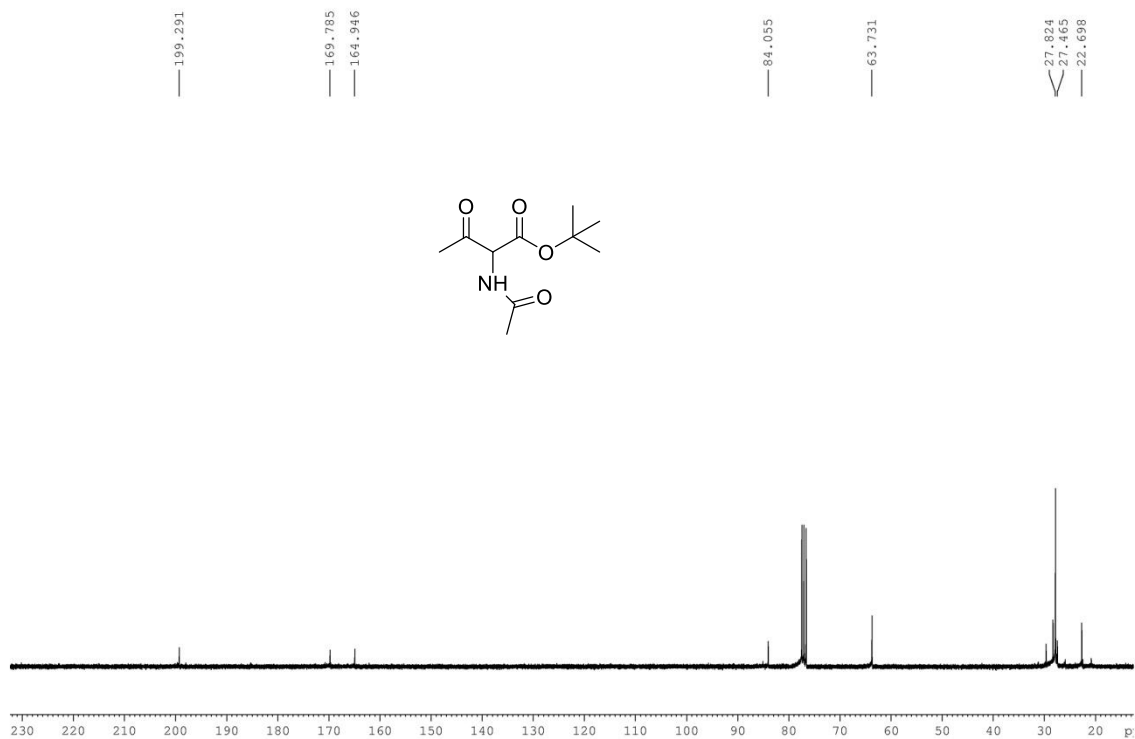
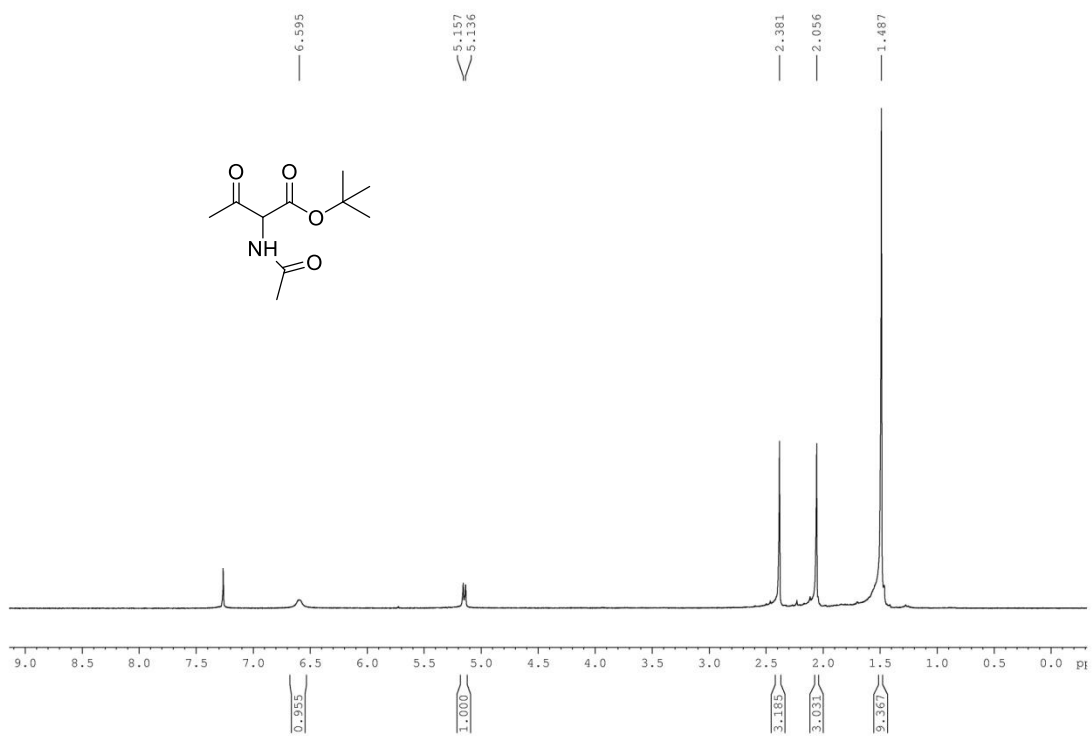
¹H NMR (500 MHz; CDCl₃; Me₄Si): δ 4.79 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 2.97 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 2.42 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.37 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.31 (s, 3H).

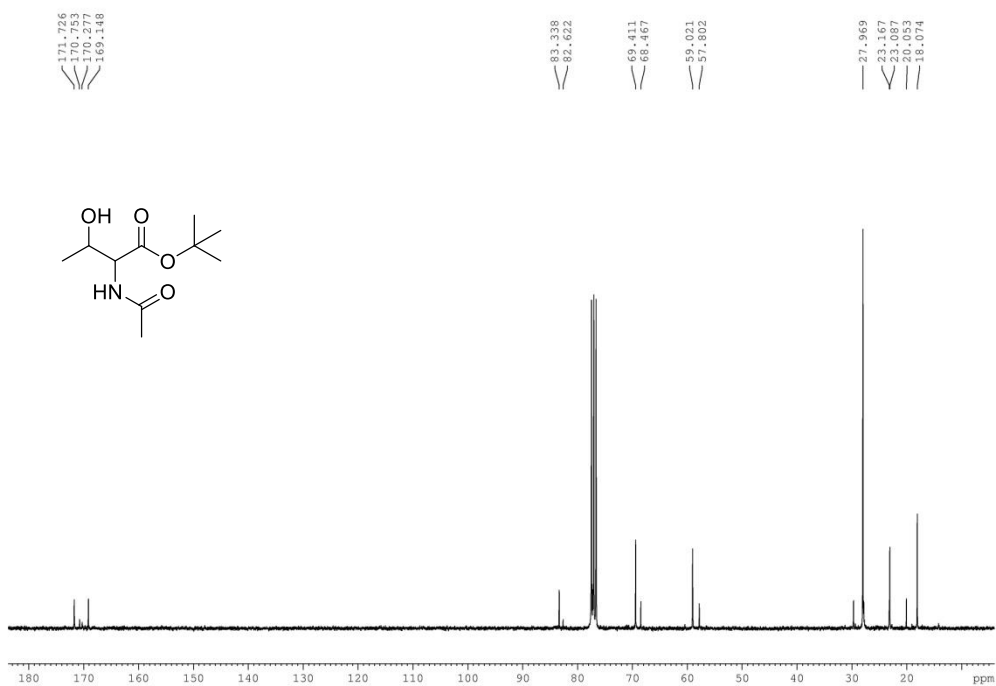
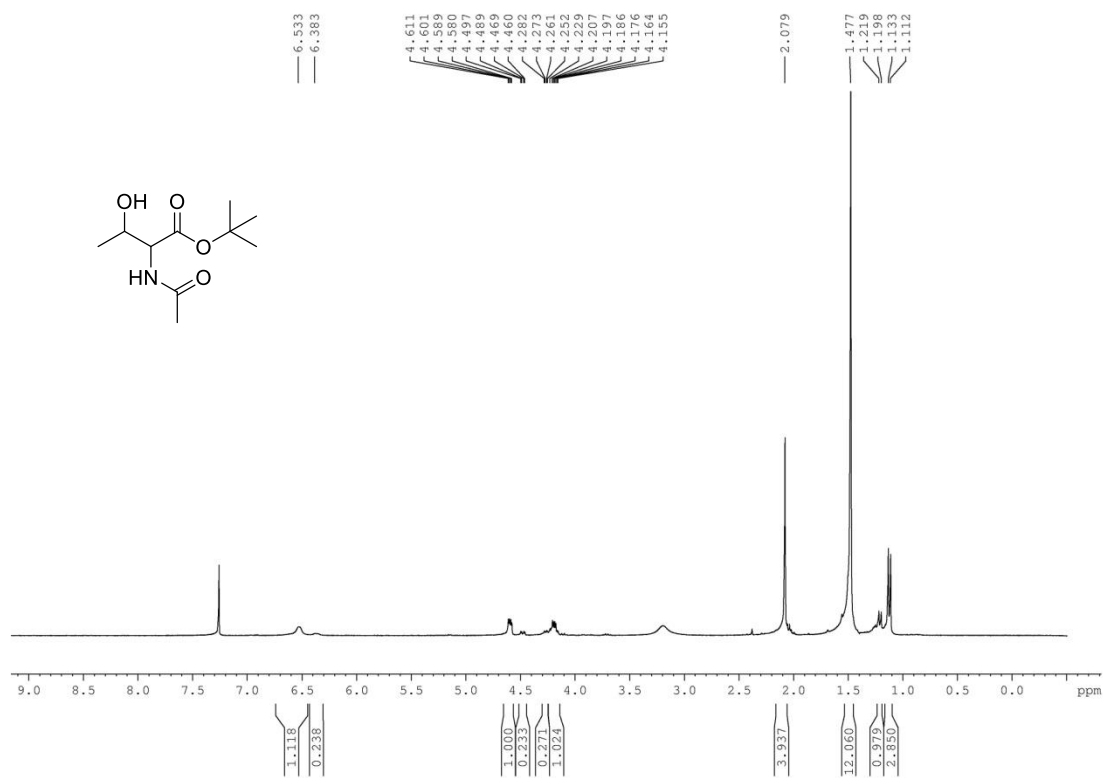
¹³CNMR (300MHz, CDCl₃): δ 207.6, 173.8, 79.3, 54.6, 40.2, 26.3, 17.3, 15.2.

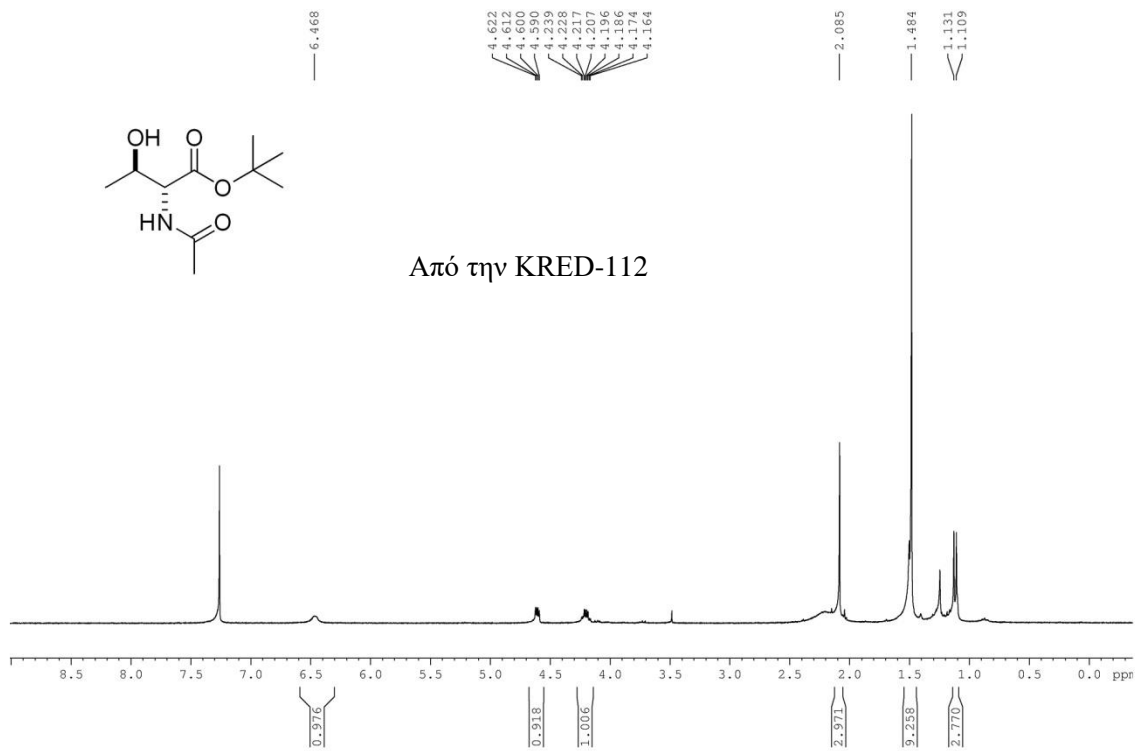
Παράρτημα

Φάσματα $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$
και αέριας χρωματογραφίας (GC)

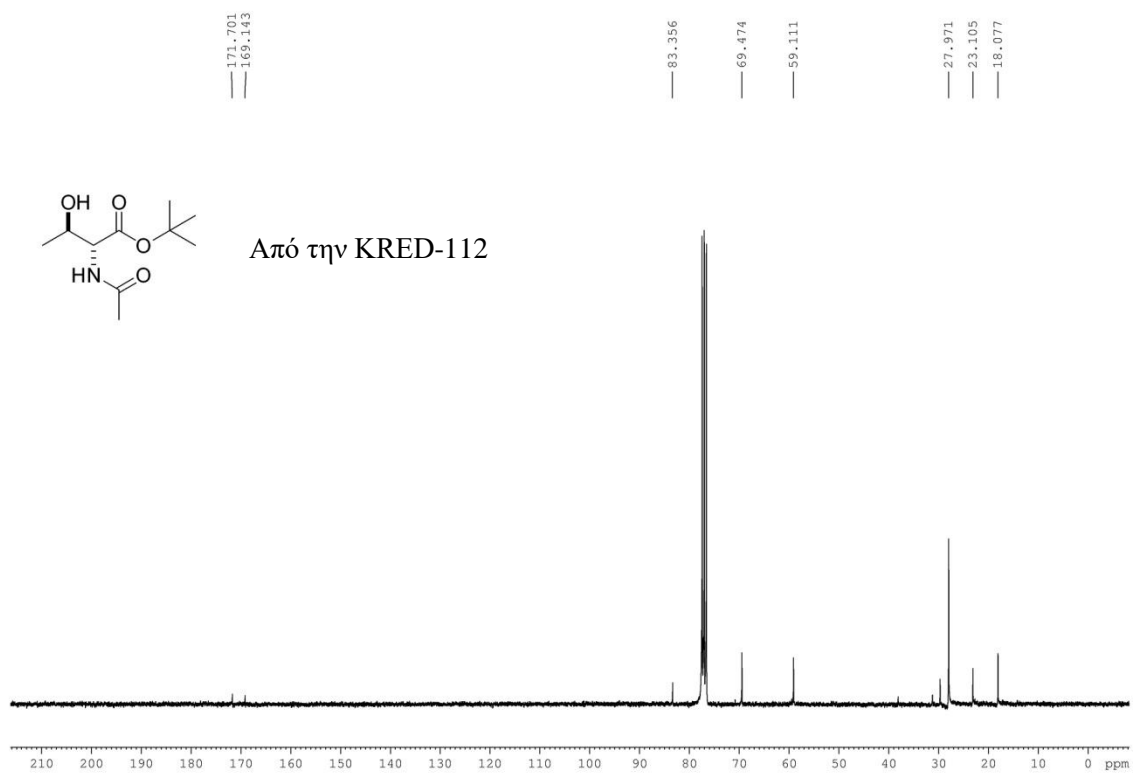




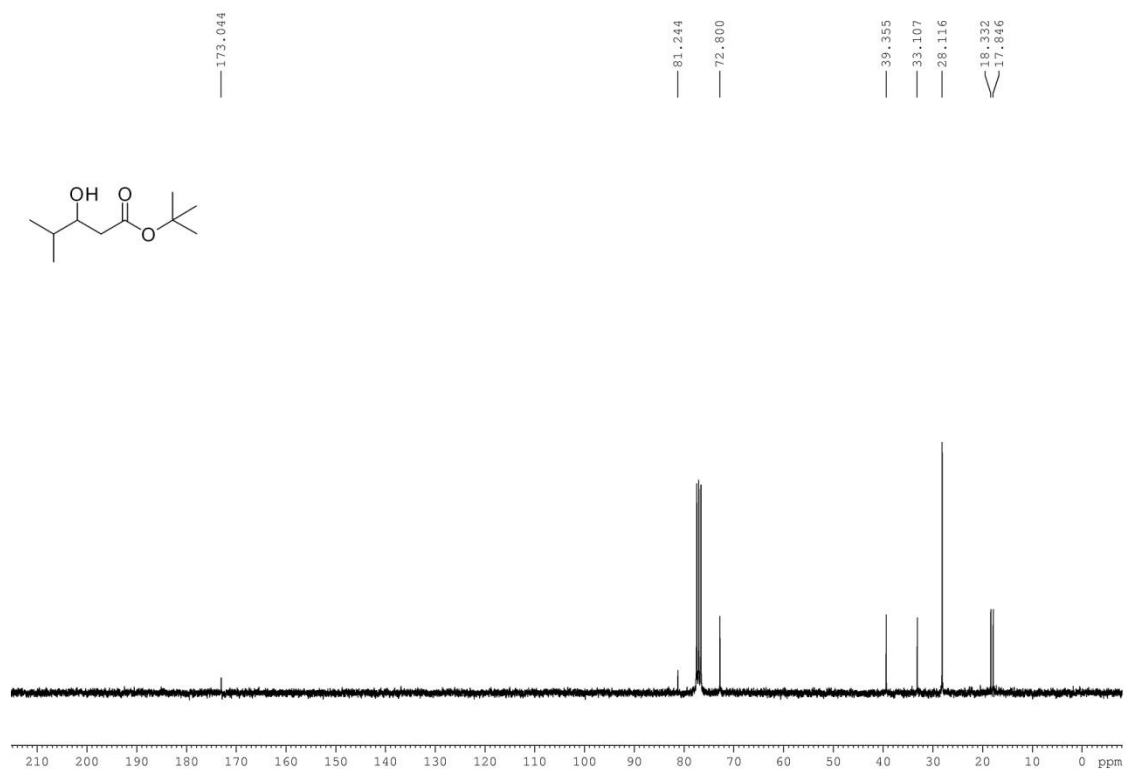
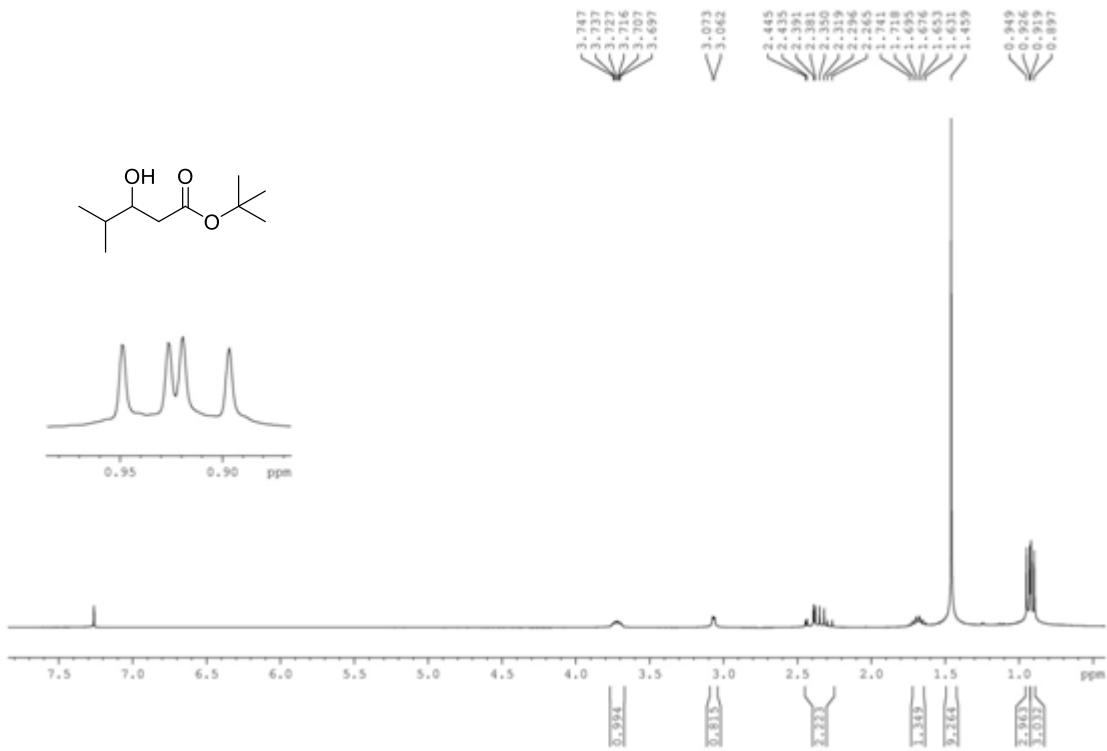


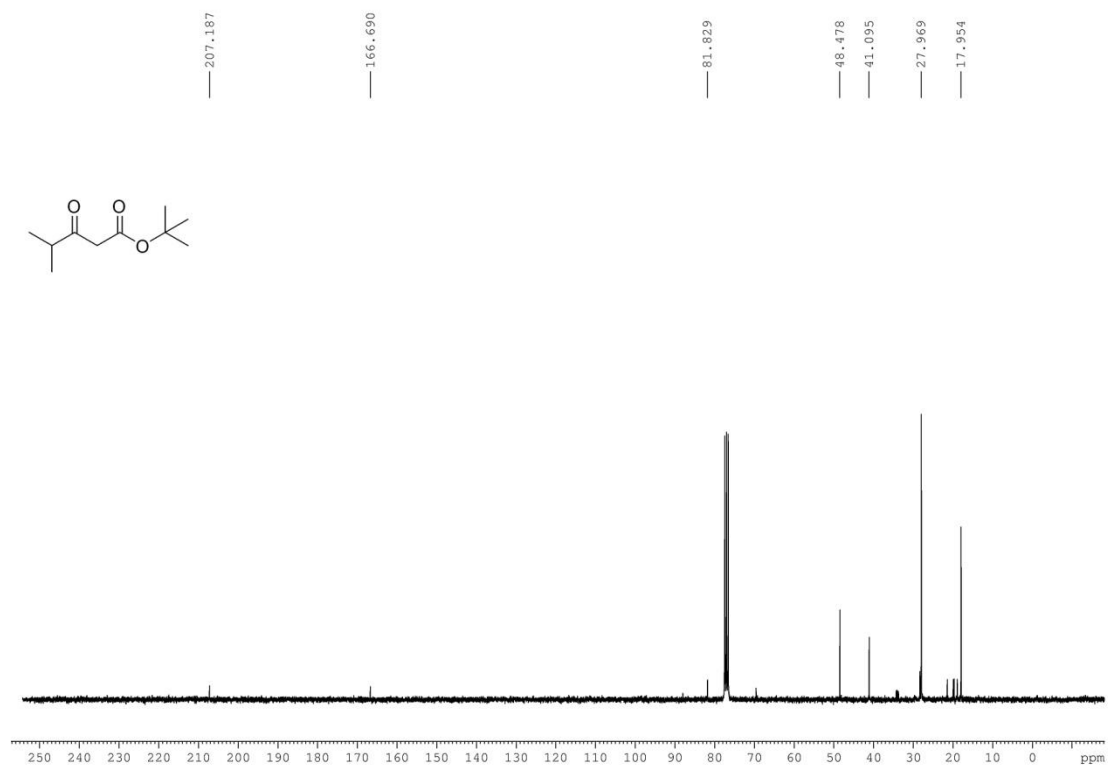
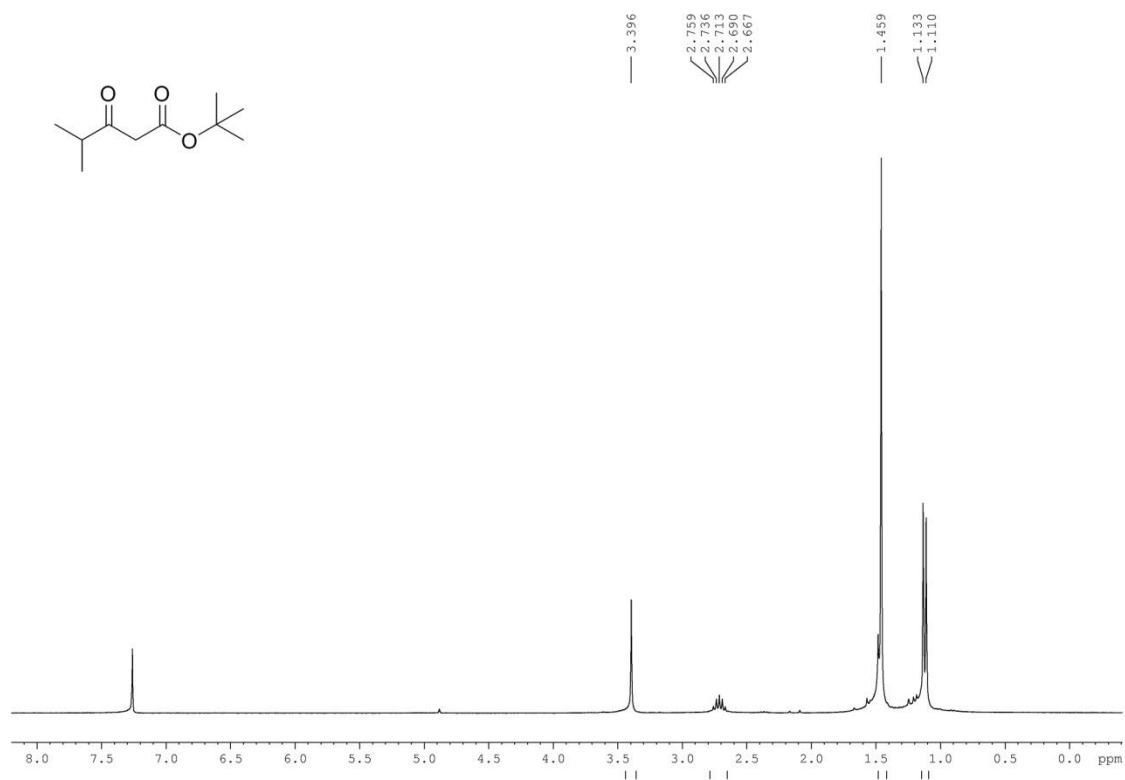


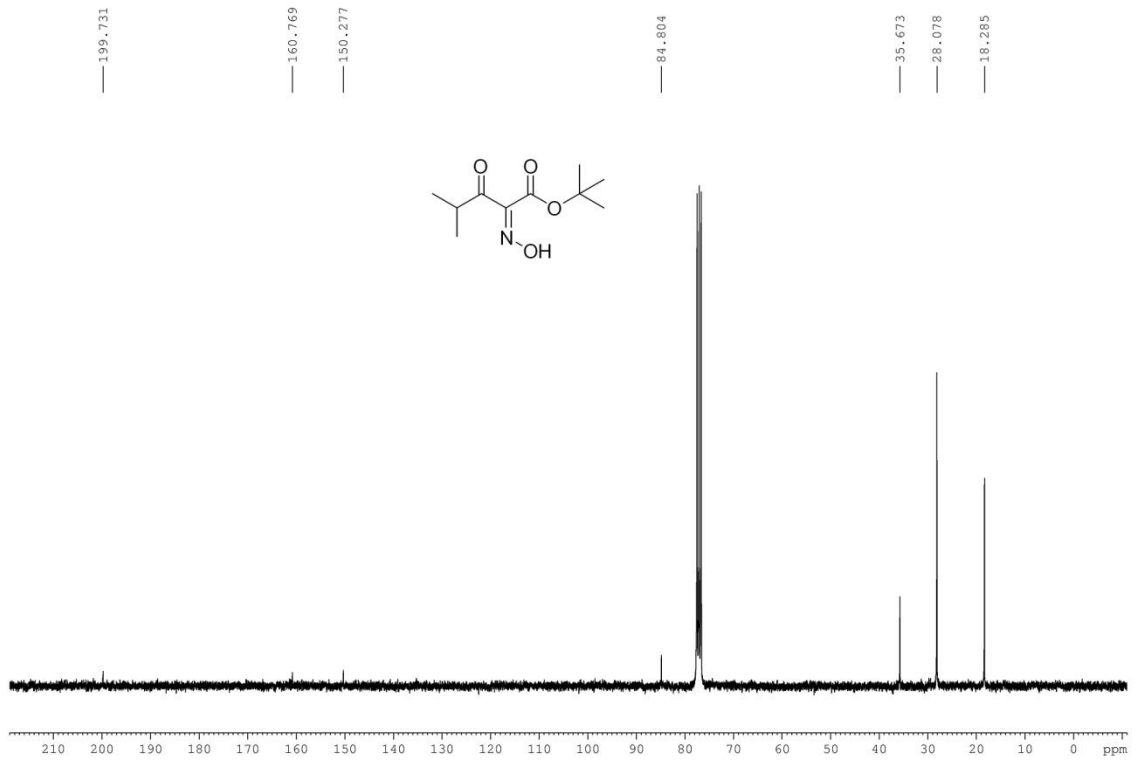
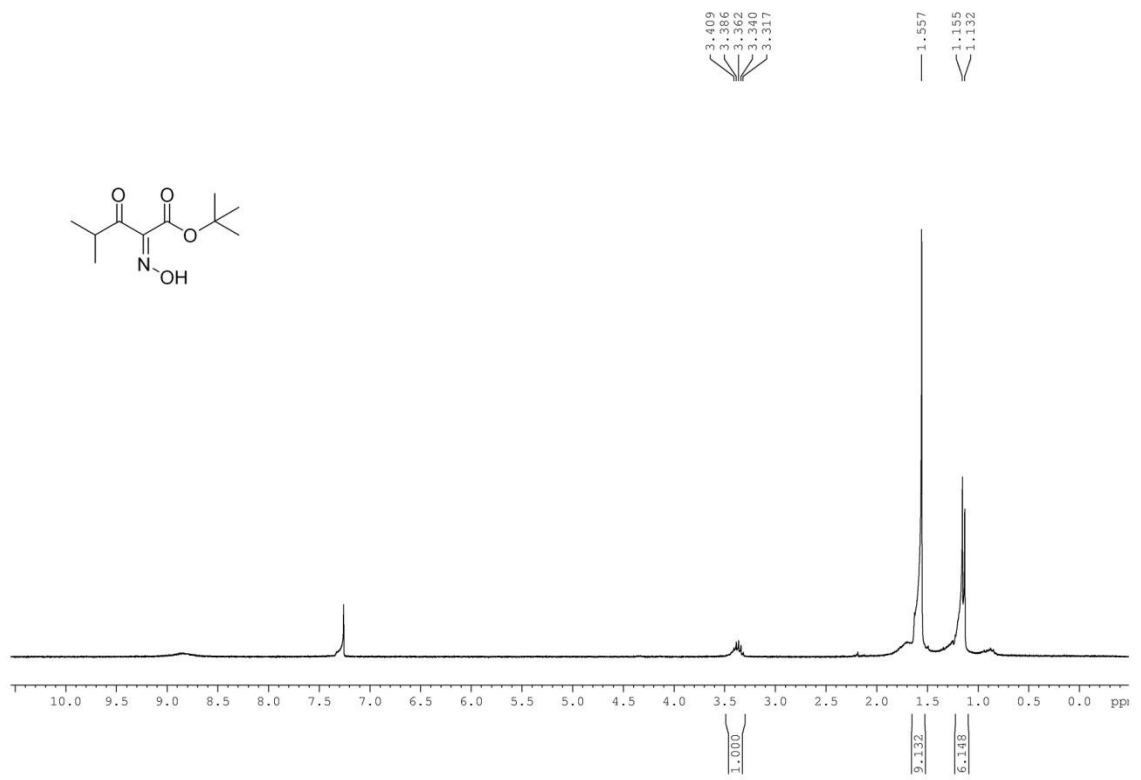
Από την KRED-112

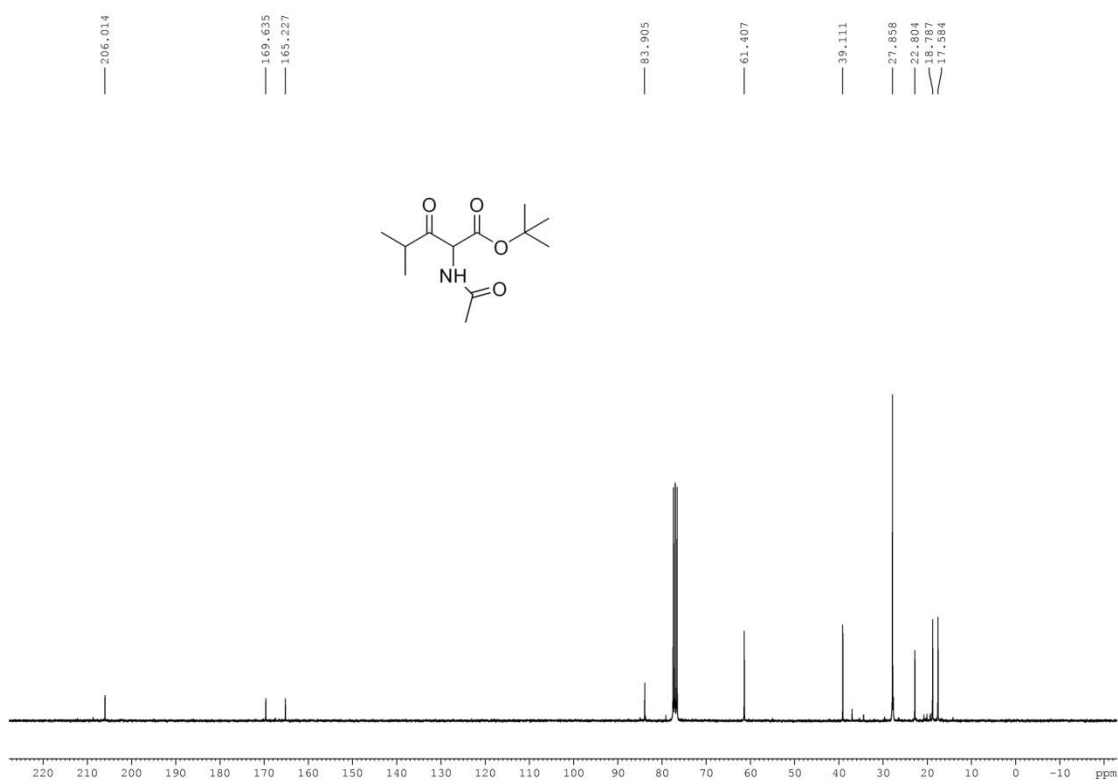
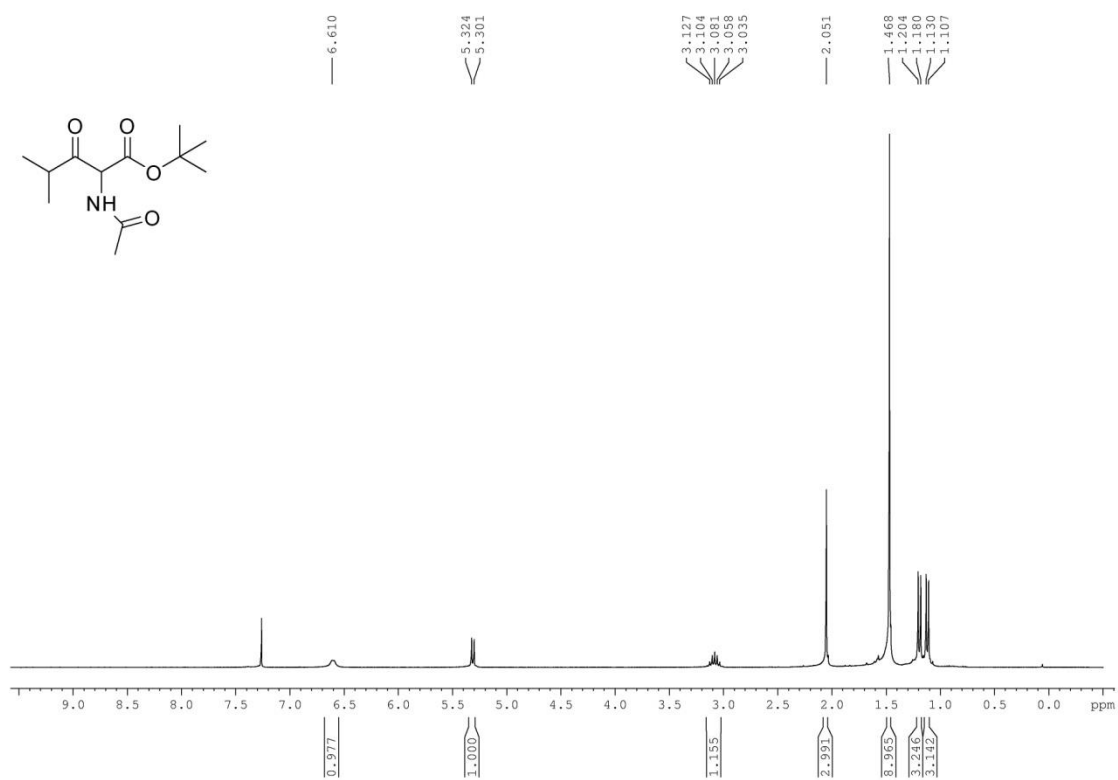


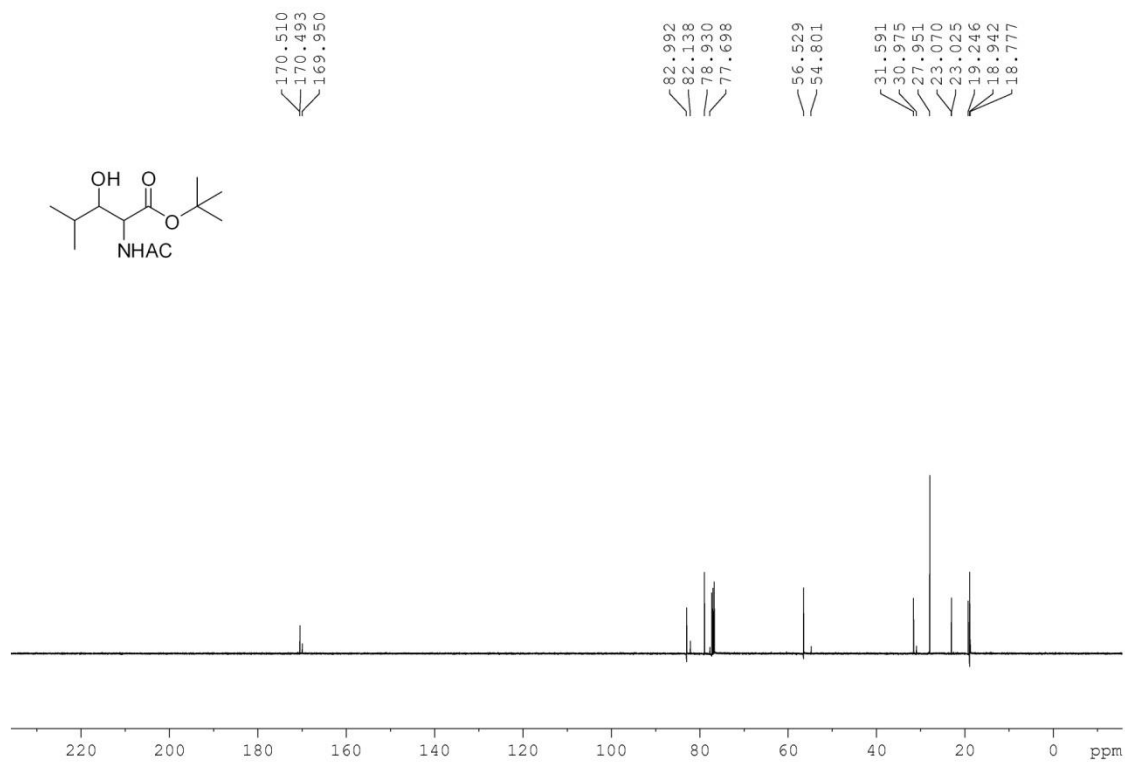
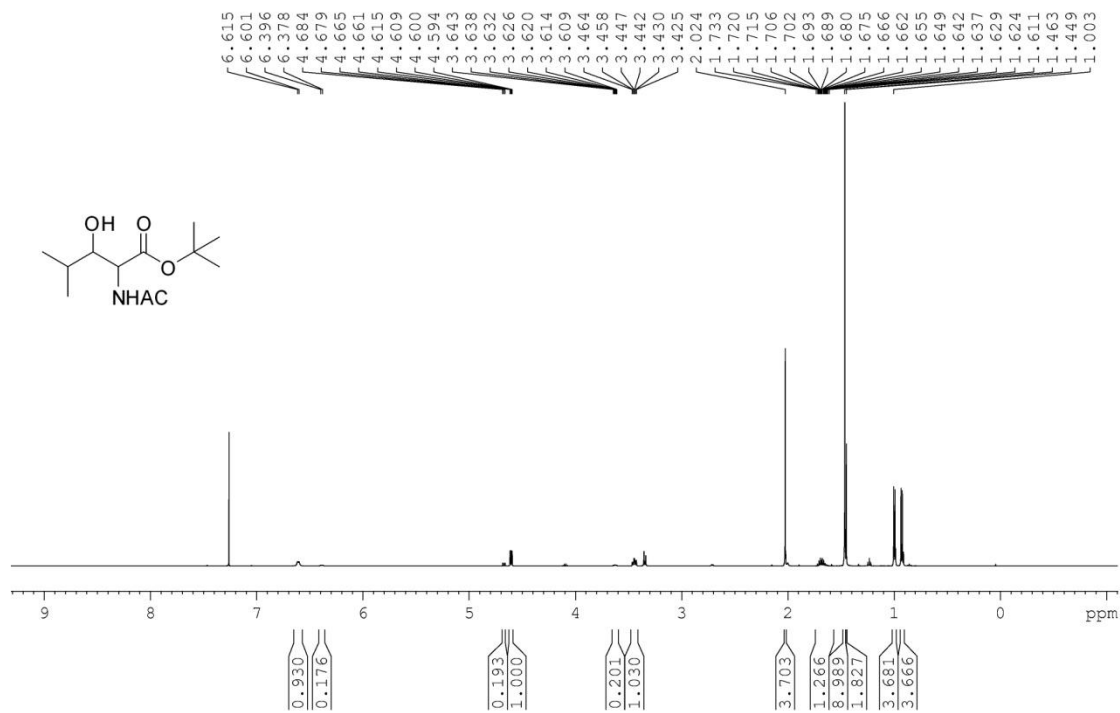
Από την KRED-112

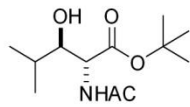




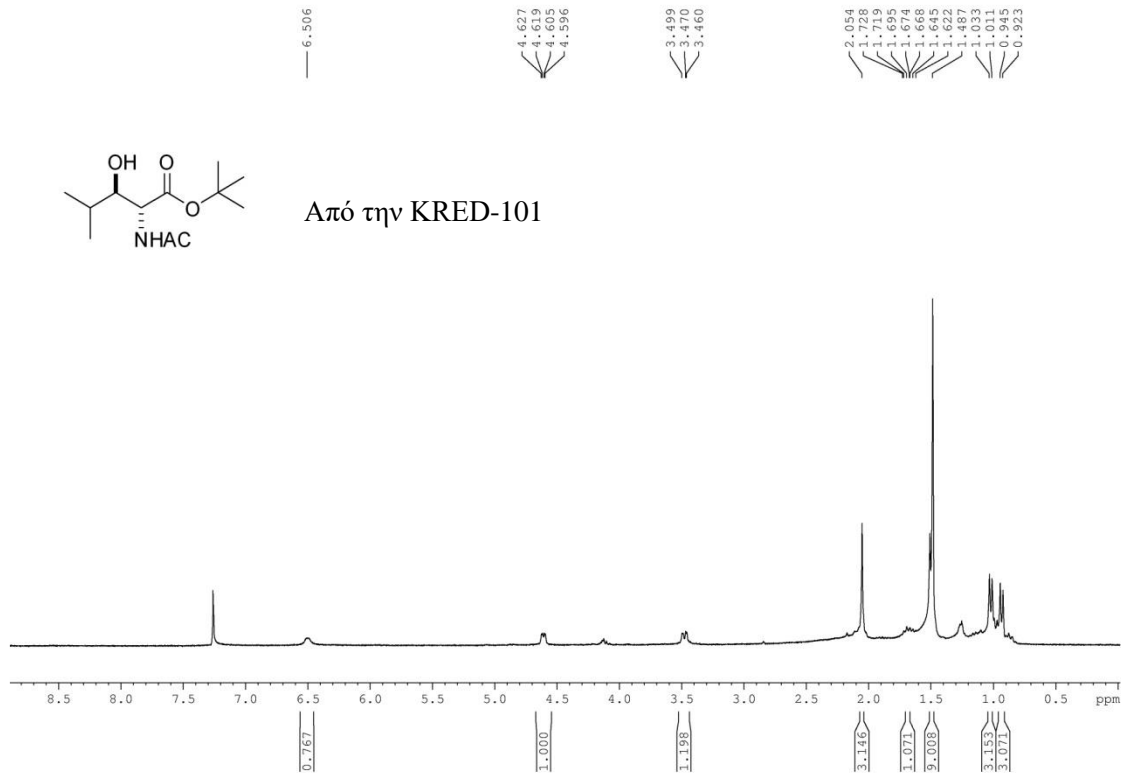








Από την KRED-101

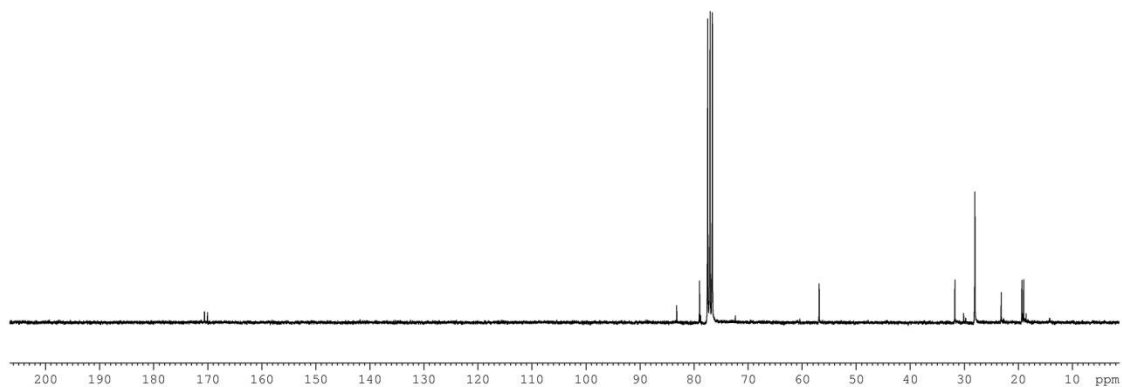
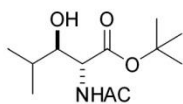


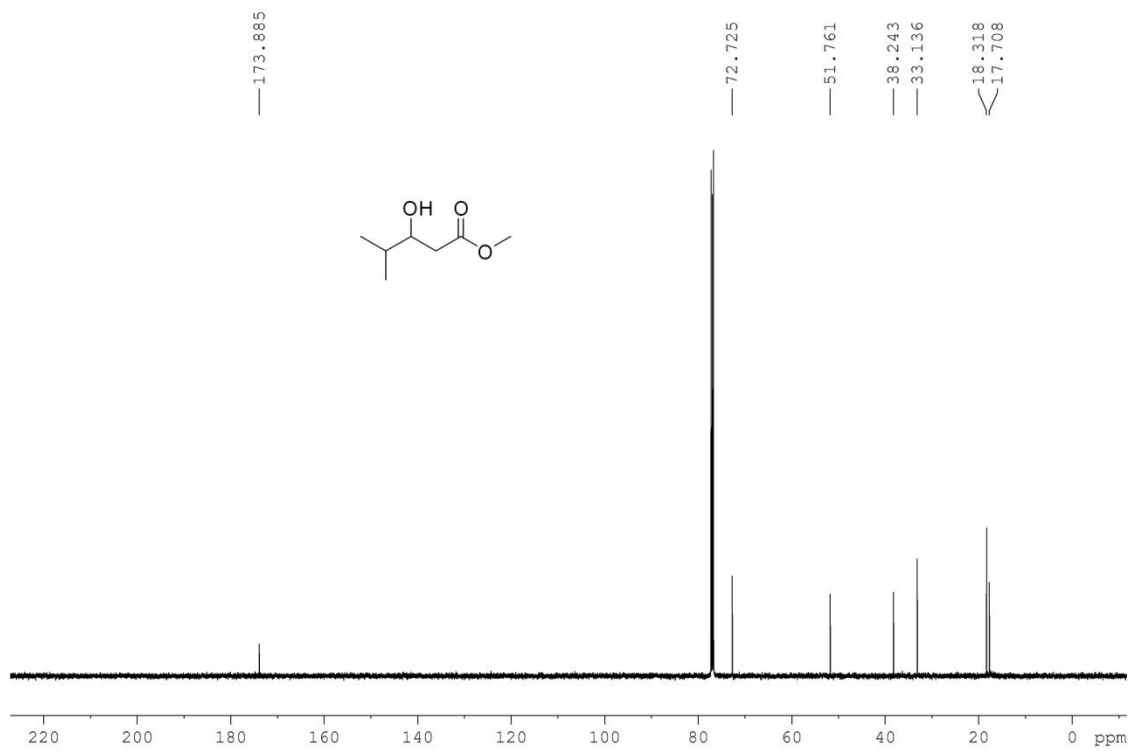
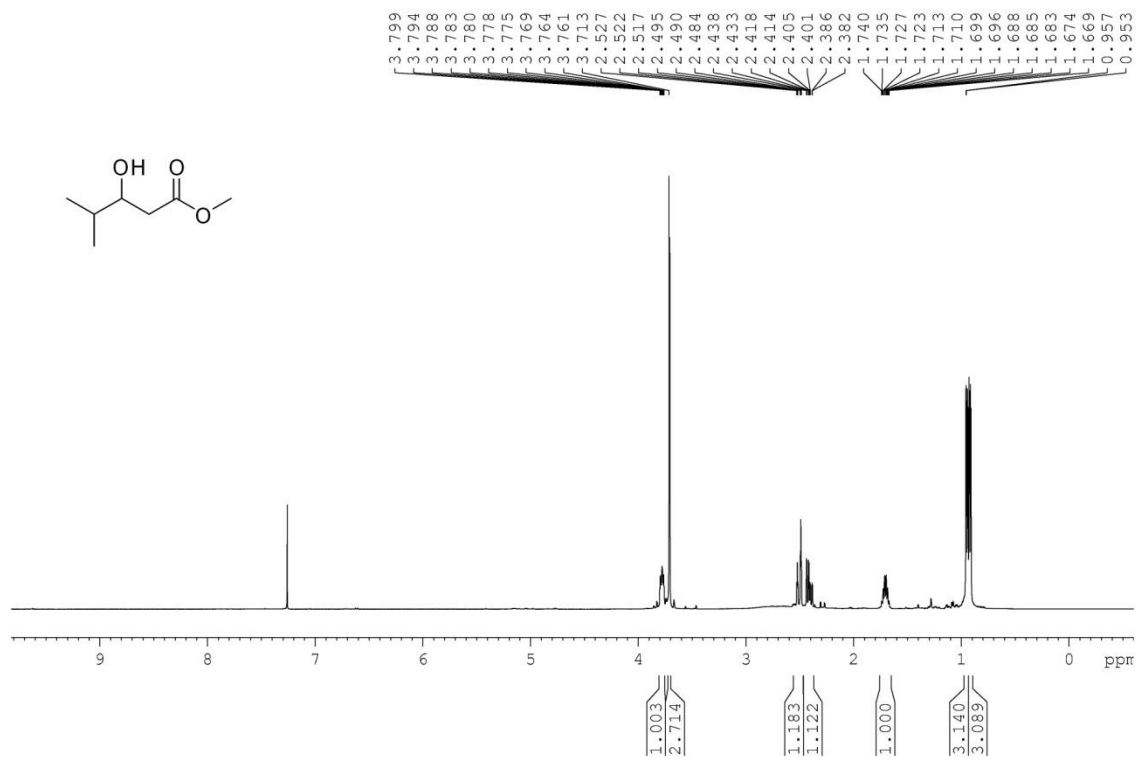
170.581
170.009

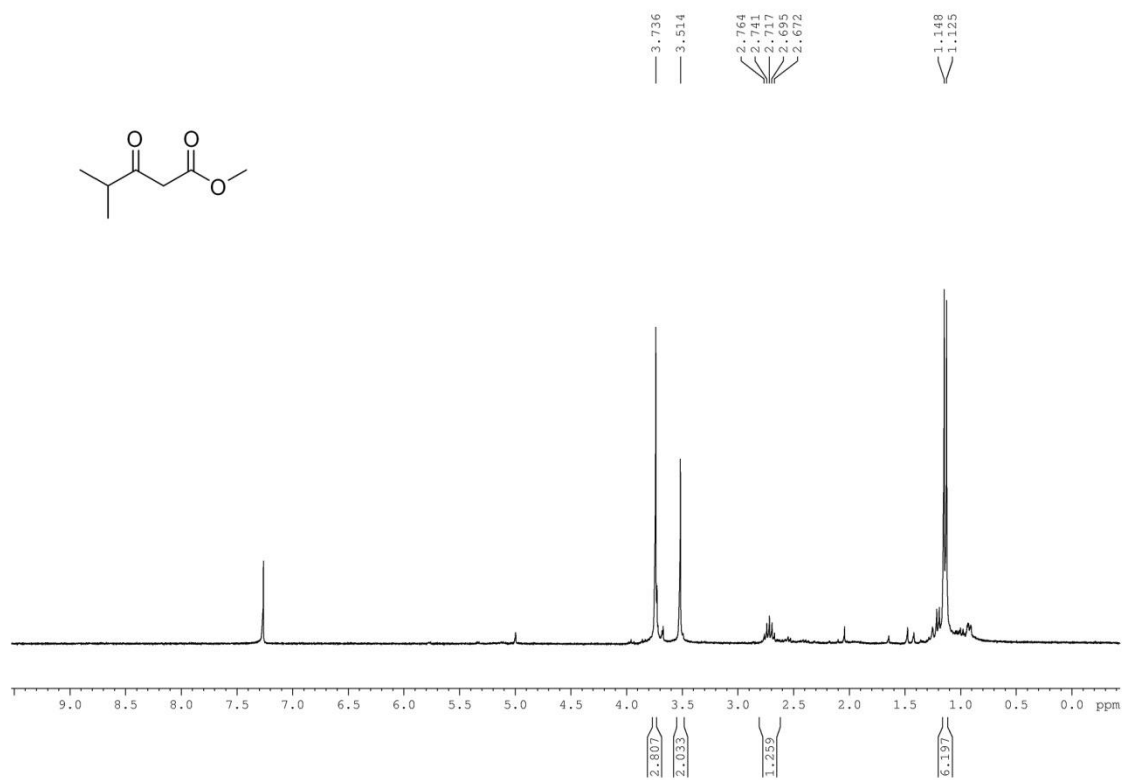
83.180
78.953

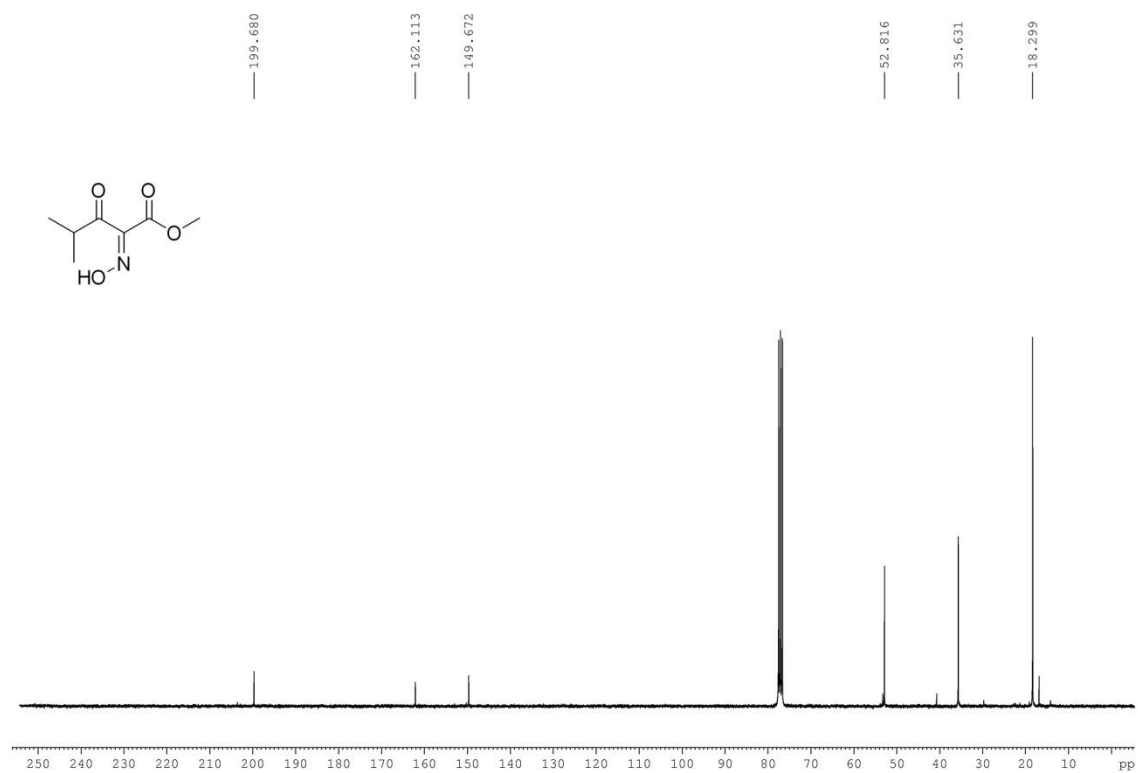
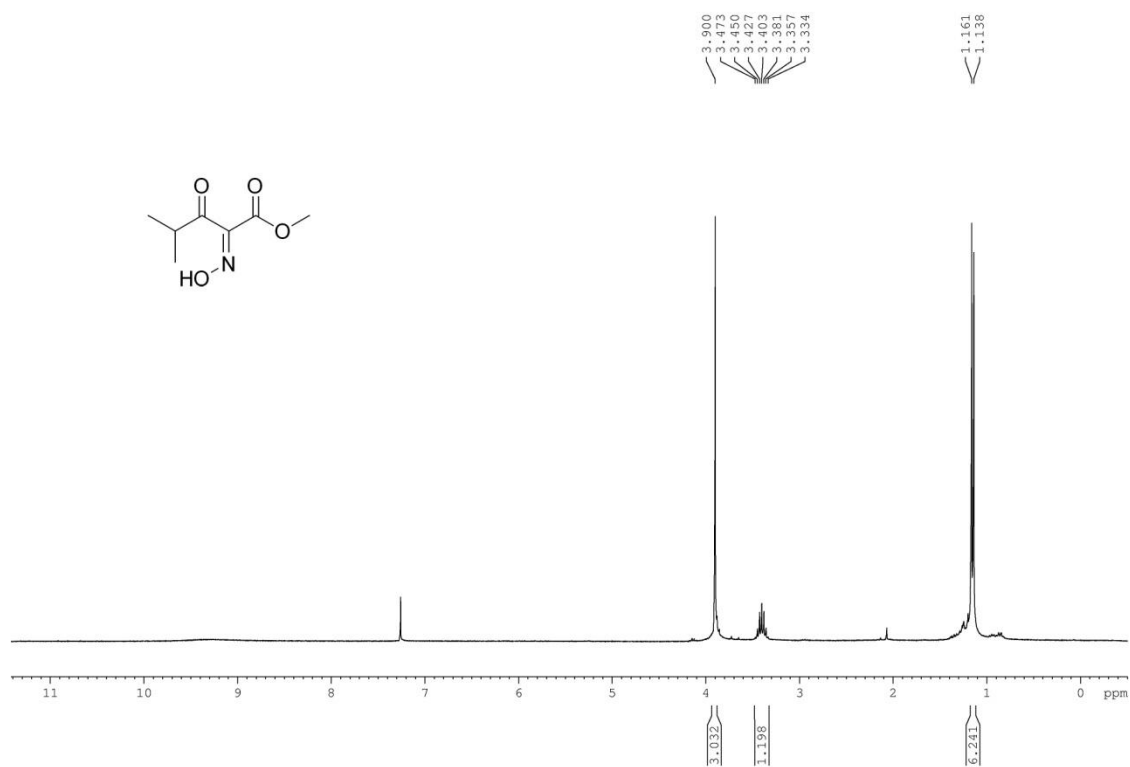
56.811

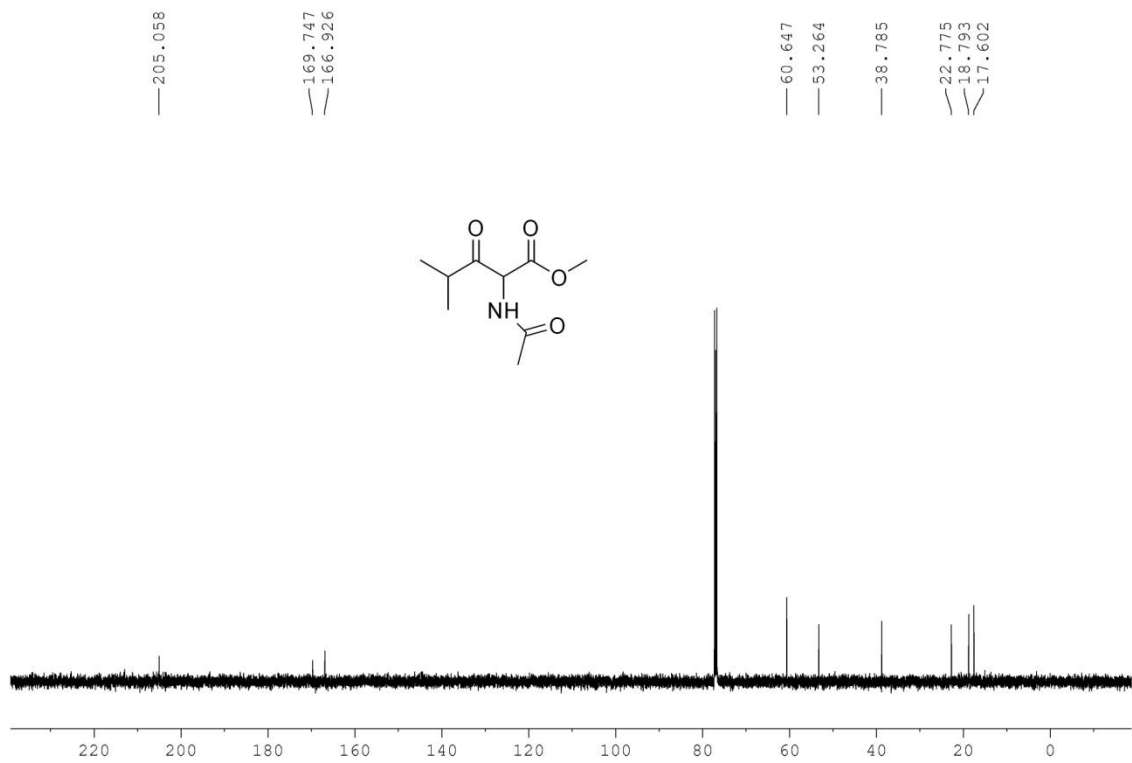
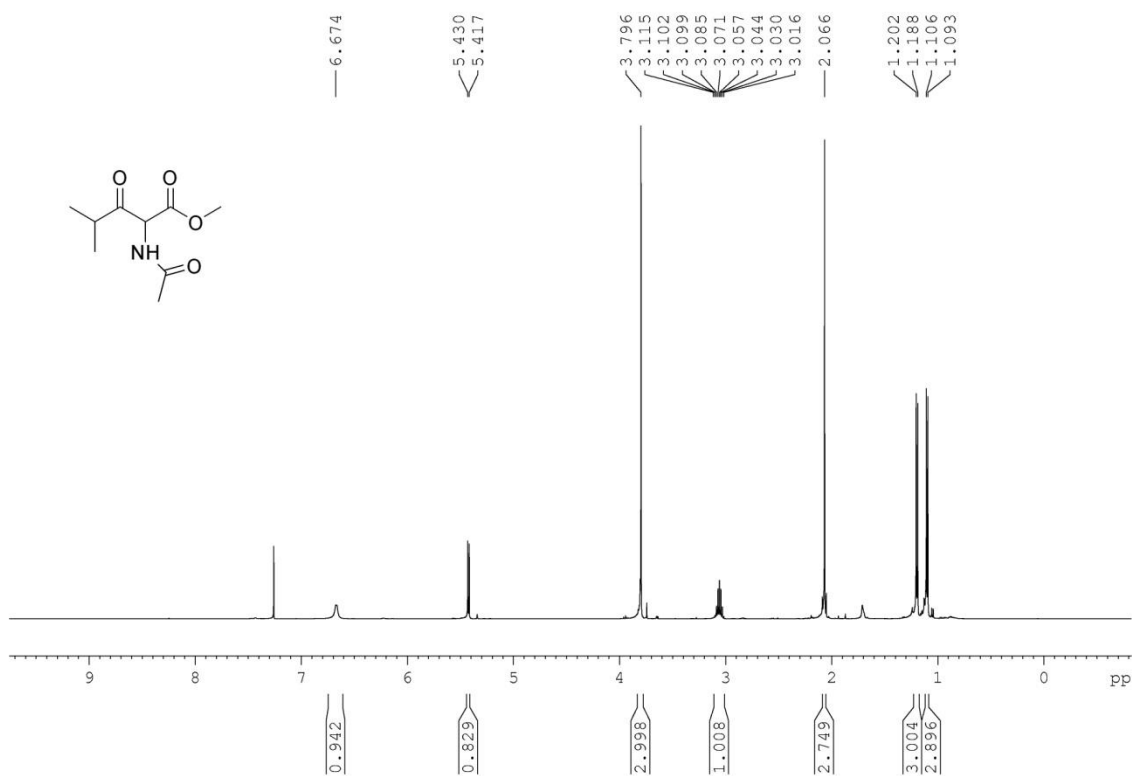
31.700
27.985
23.114
19.288
18.956

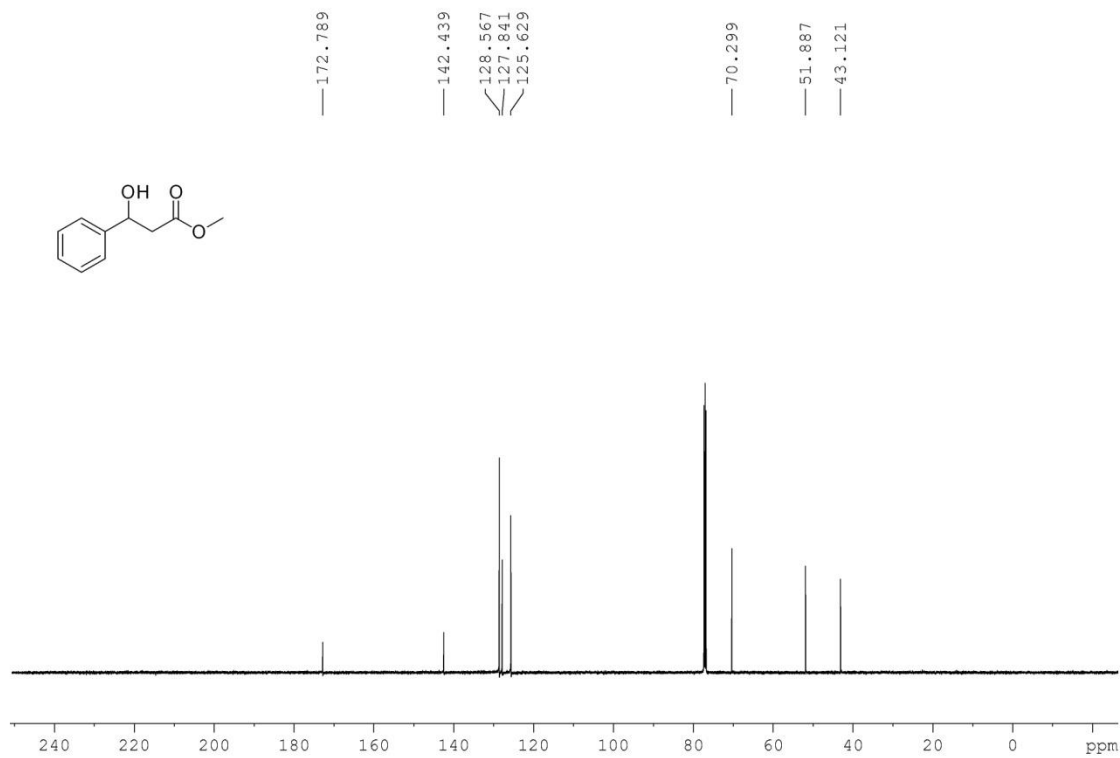
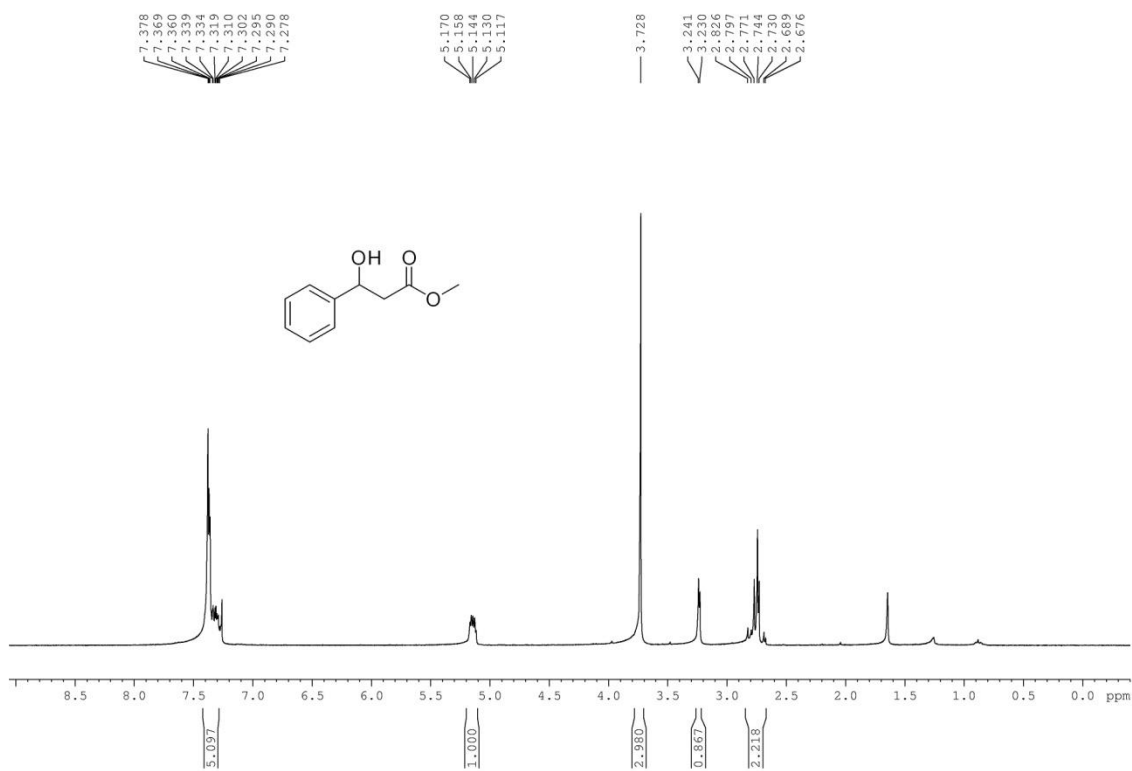


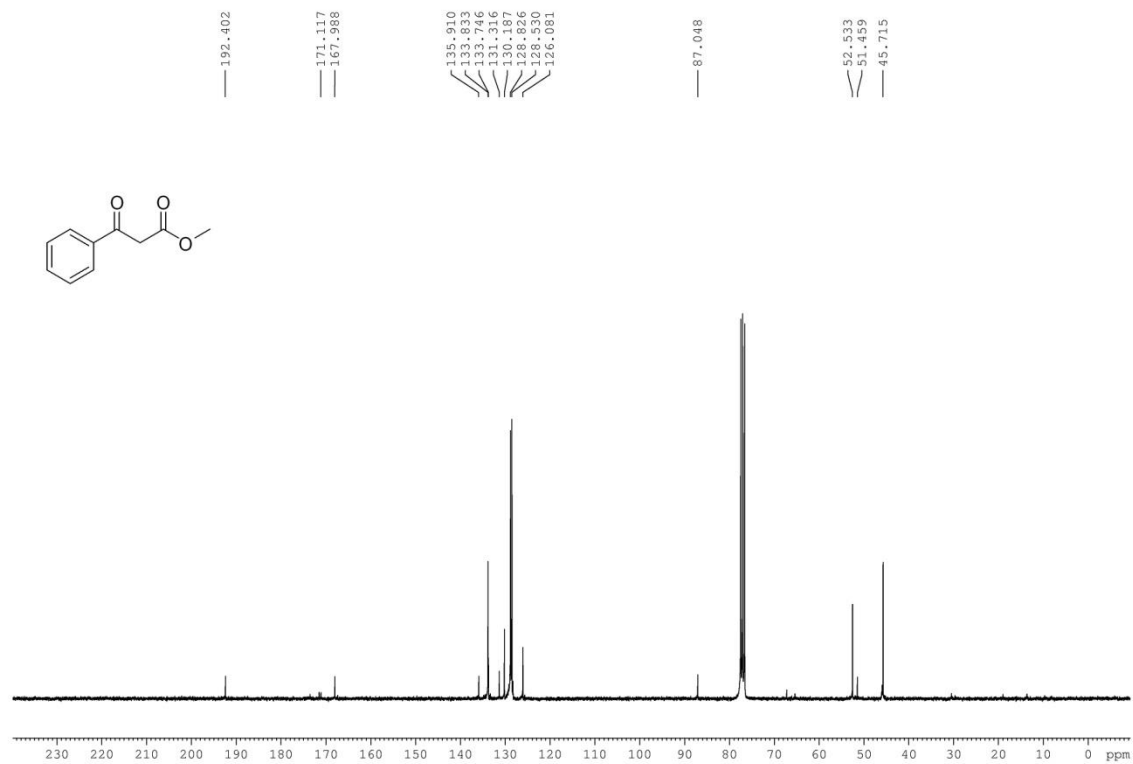
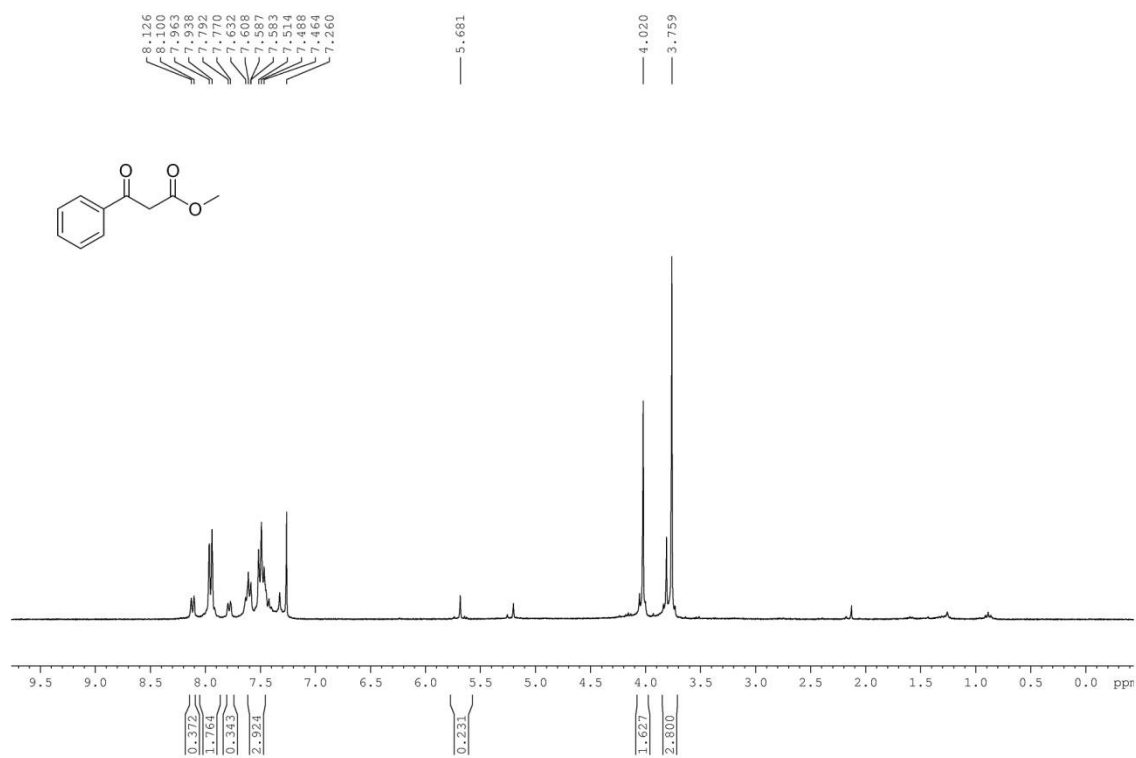


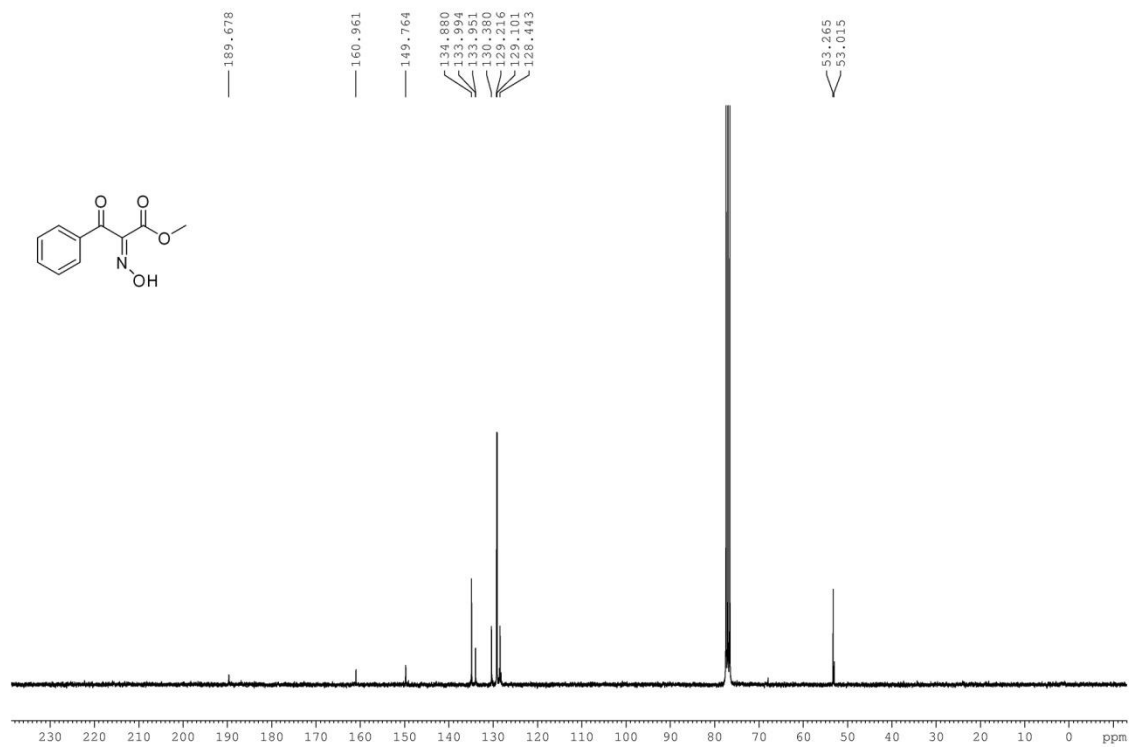
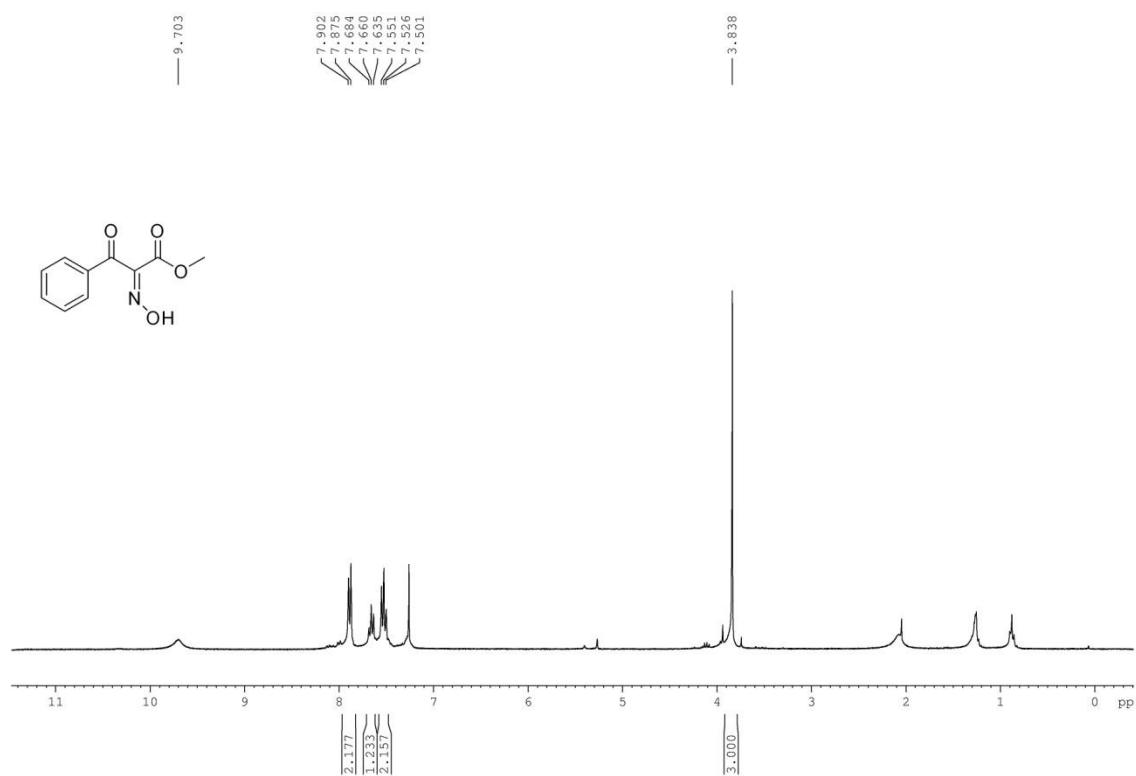


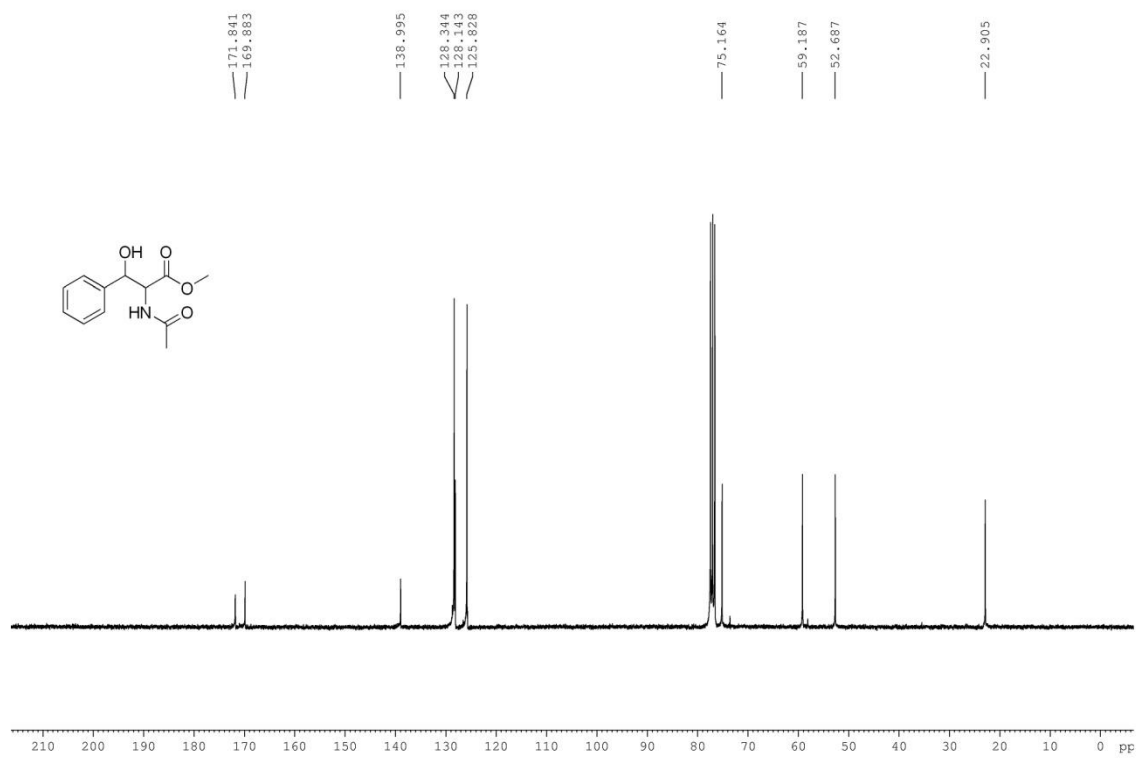
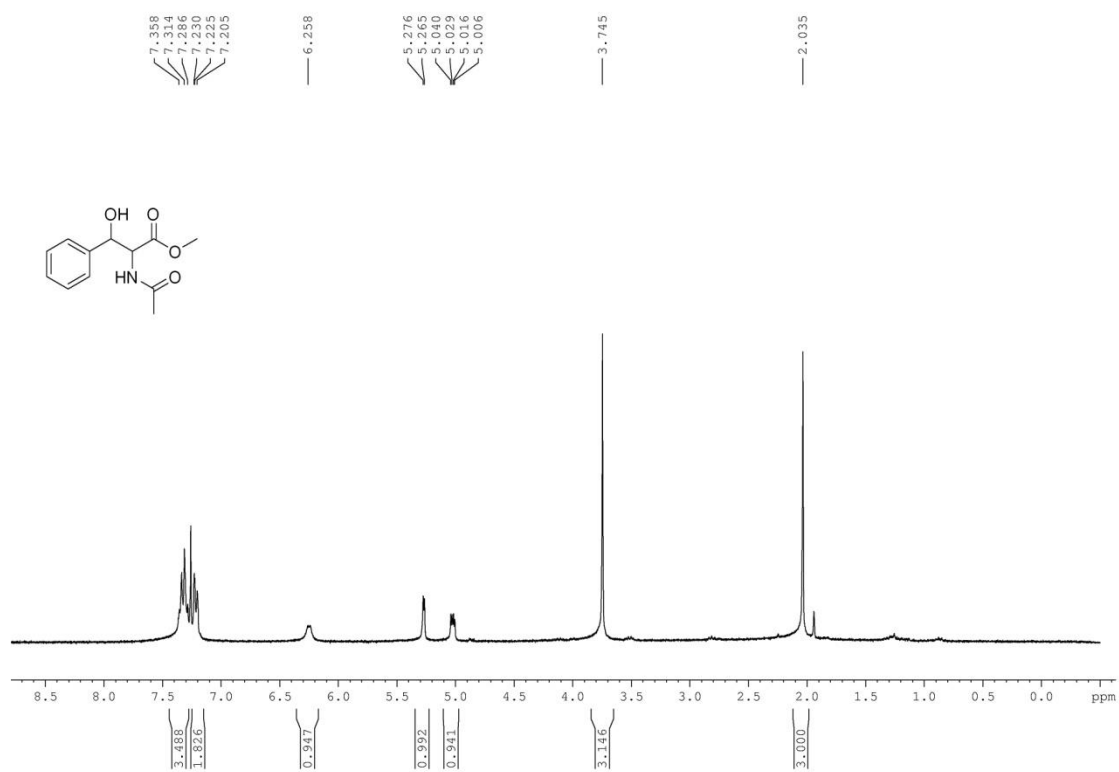


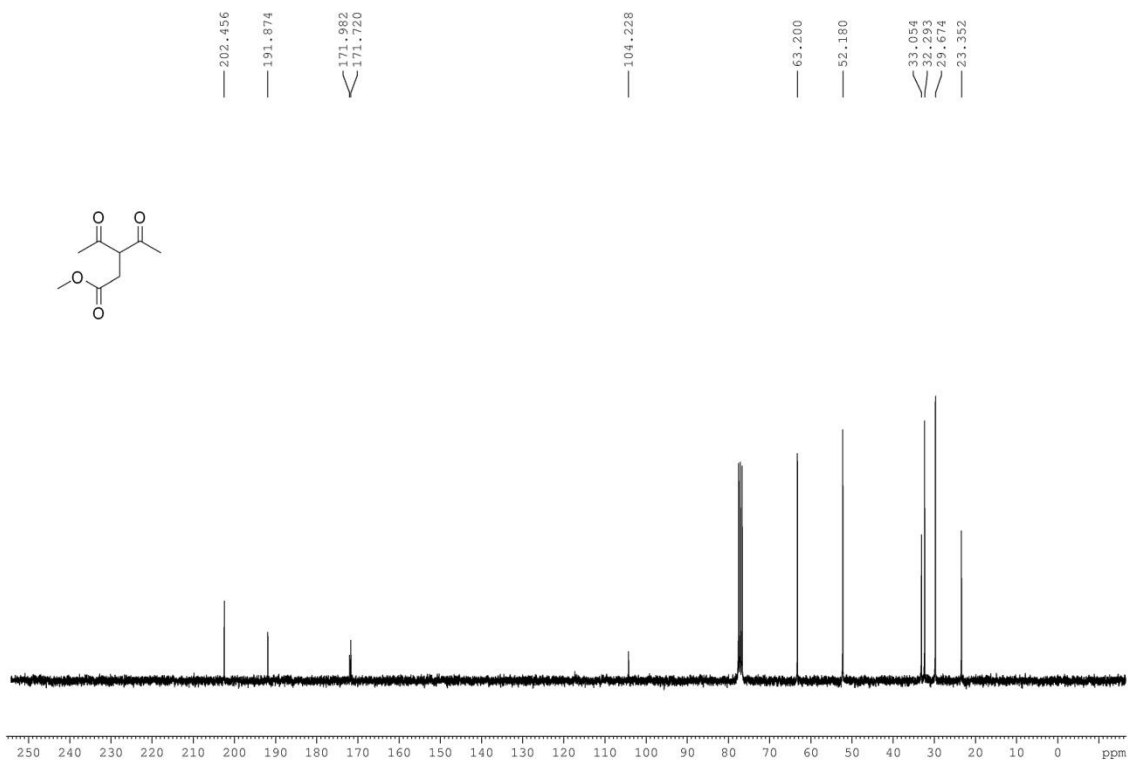
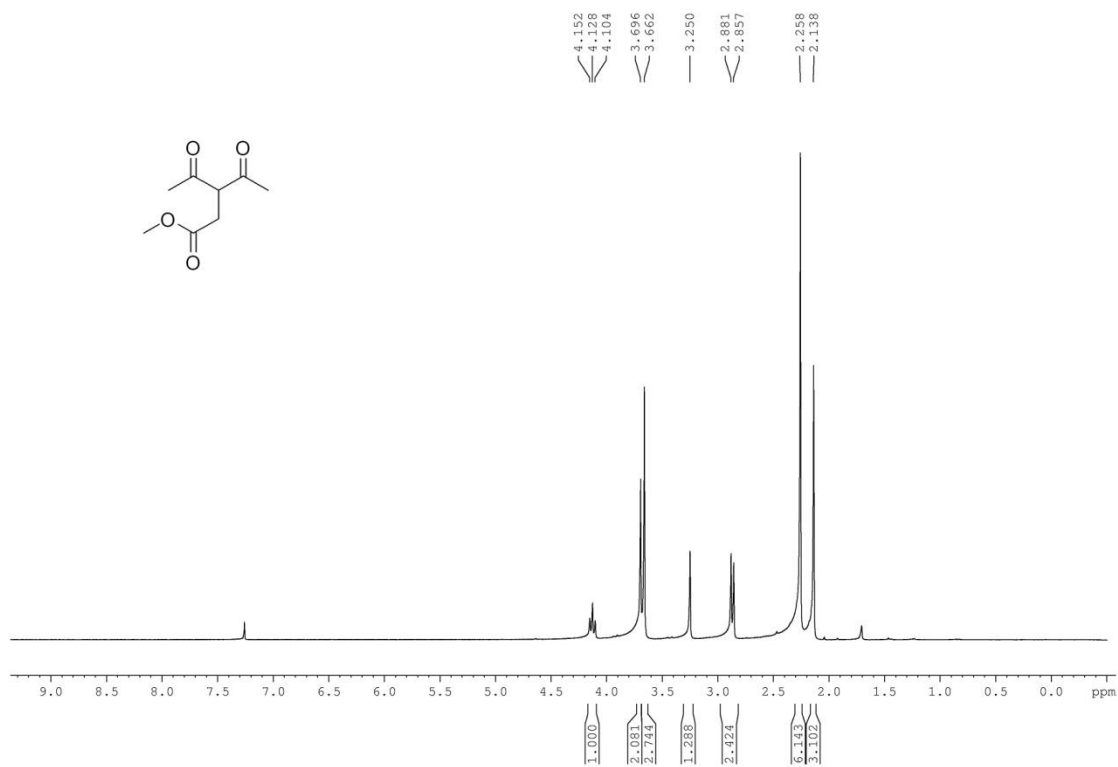


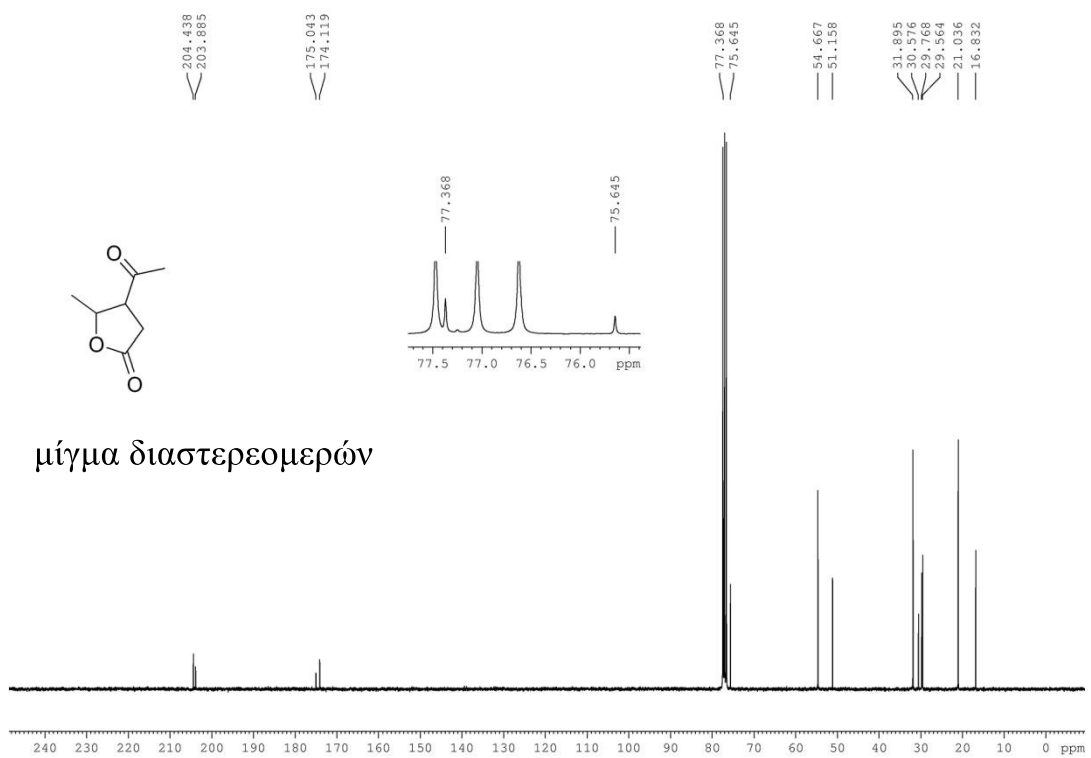
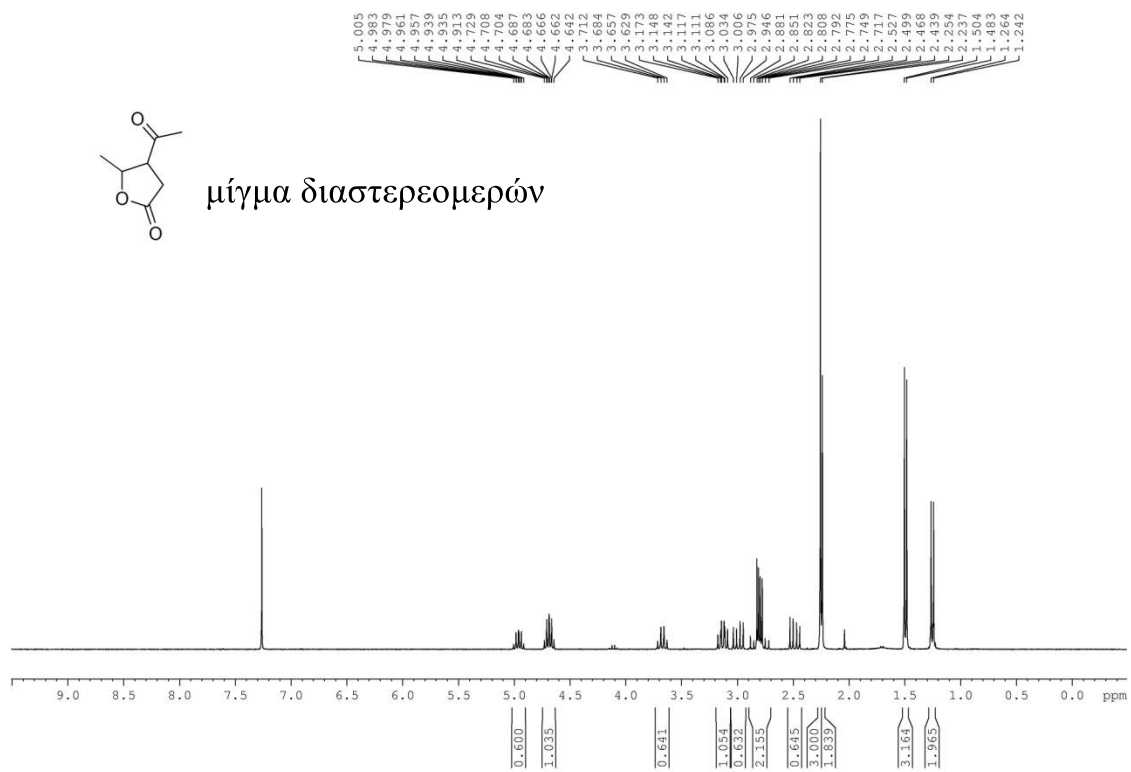


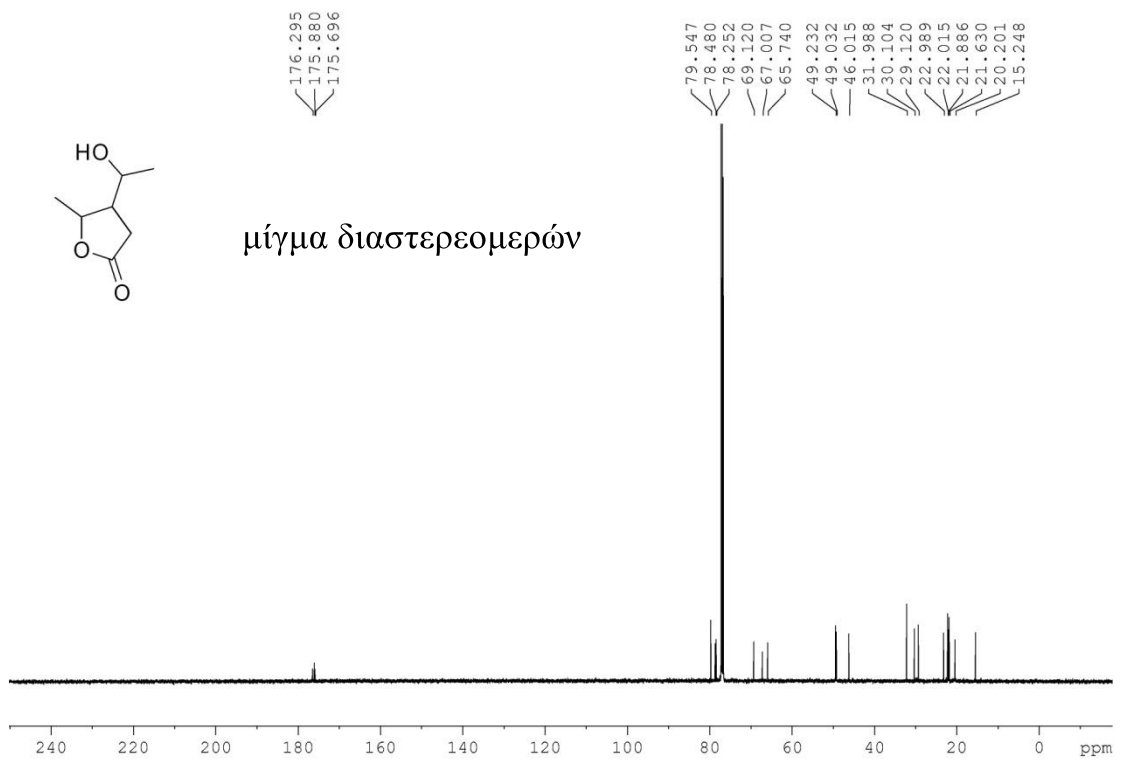
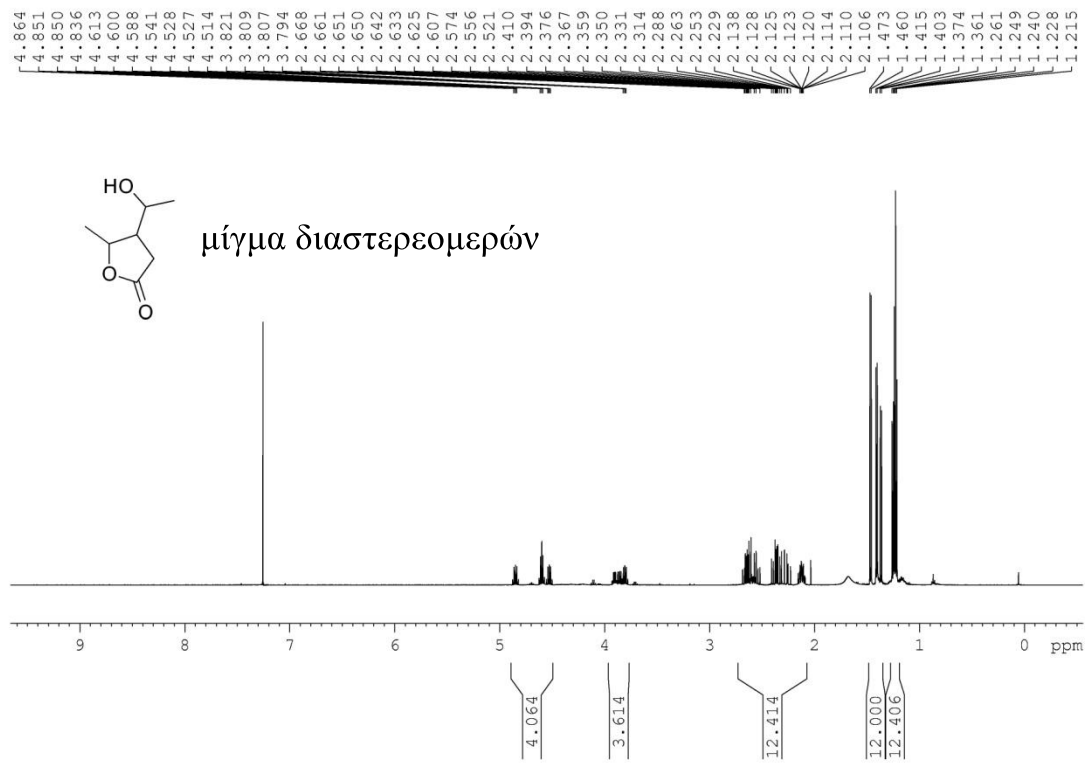


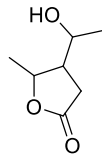




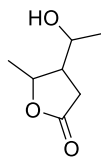
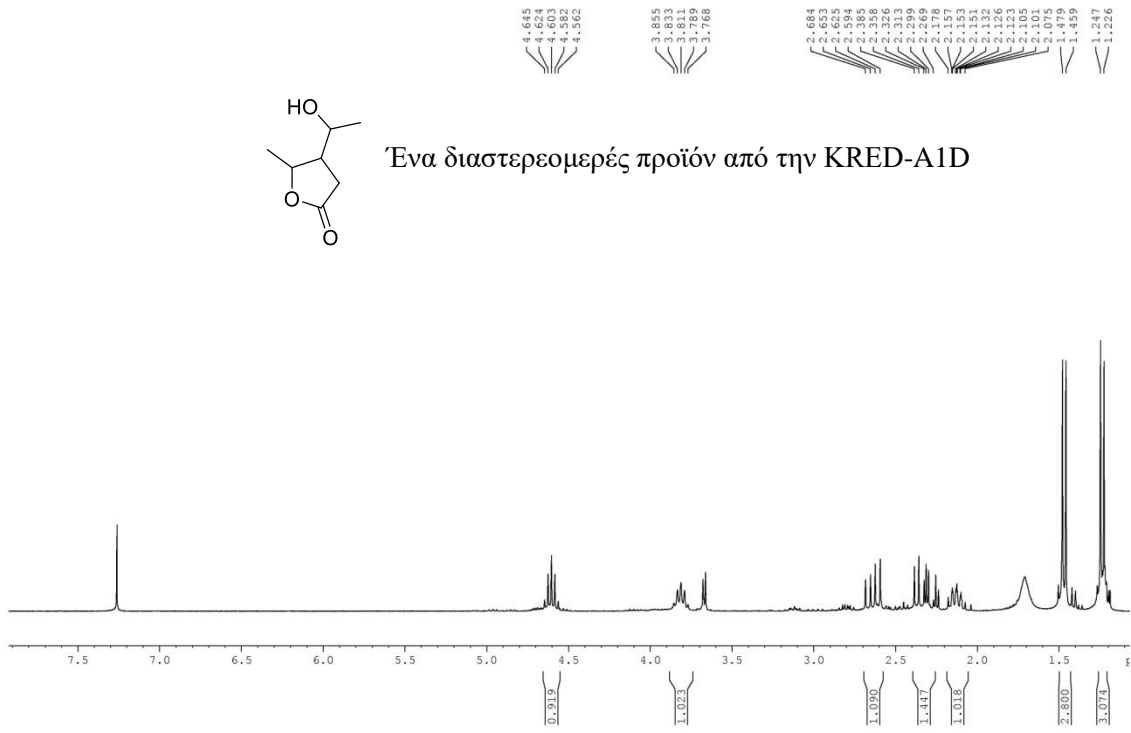




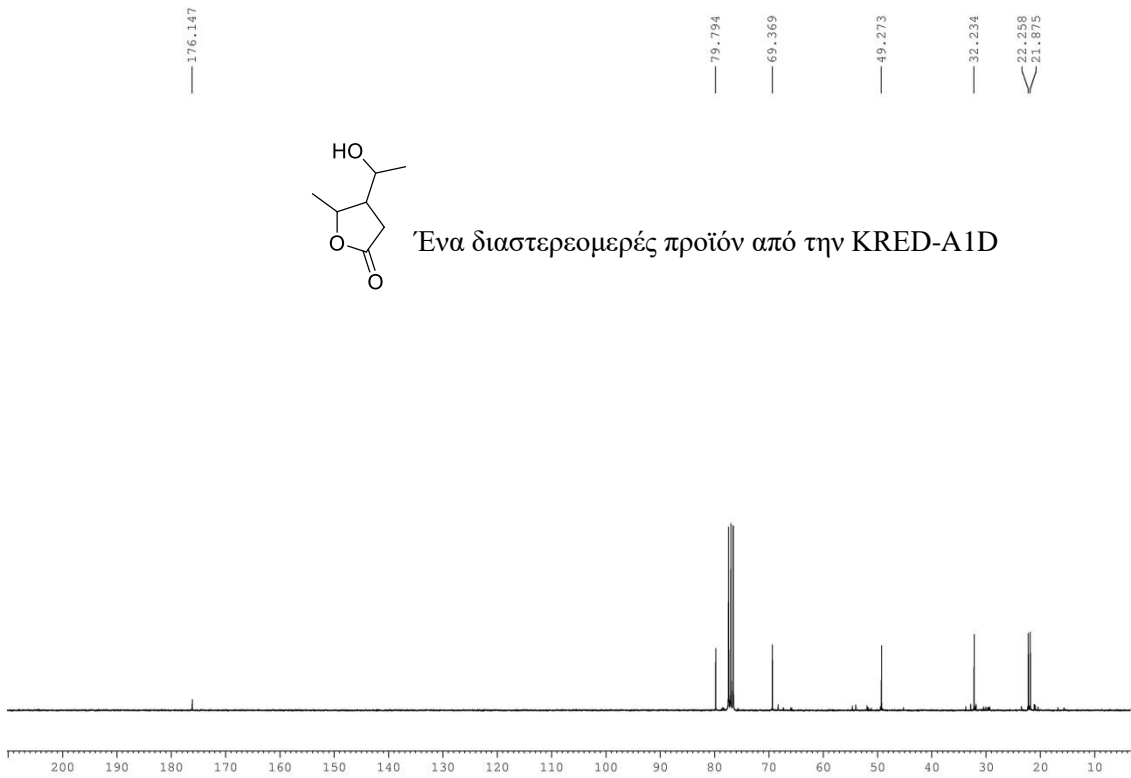


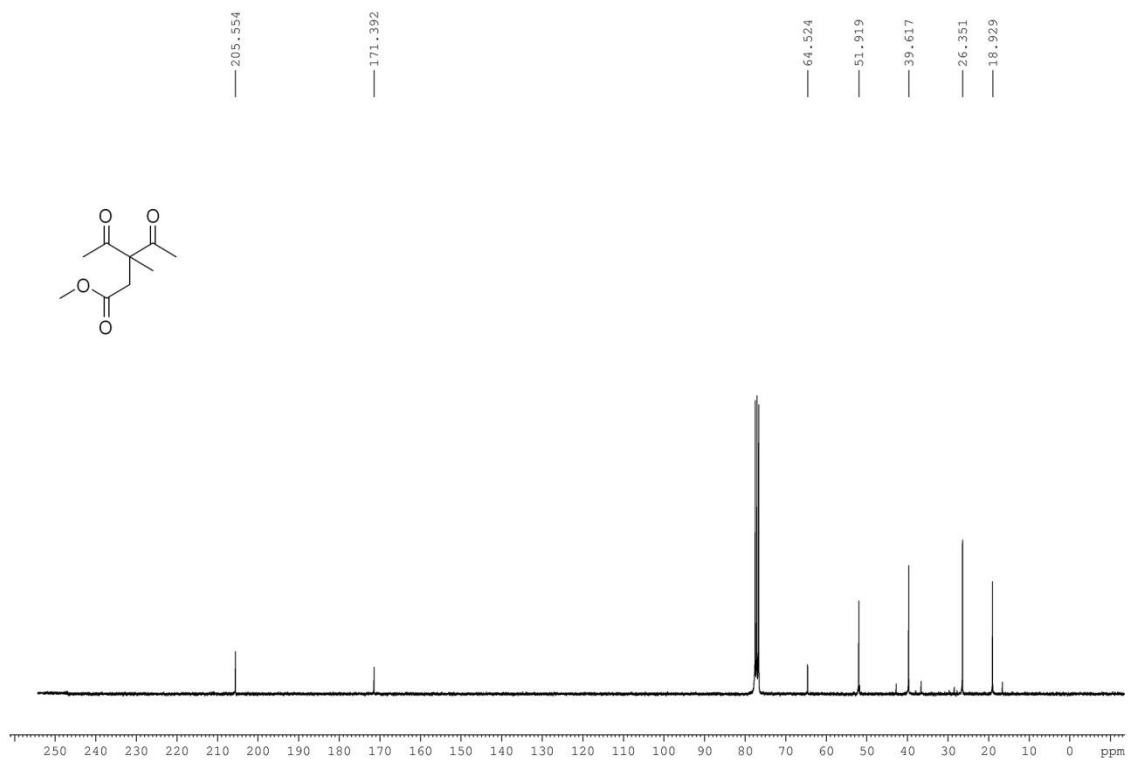
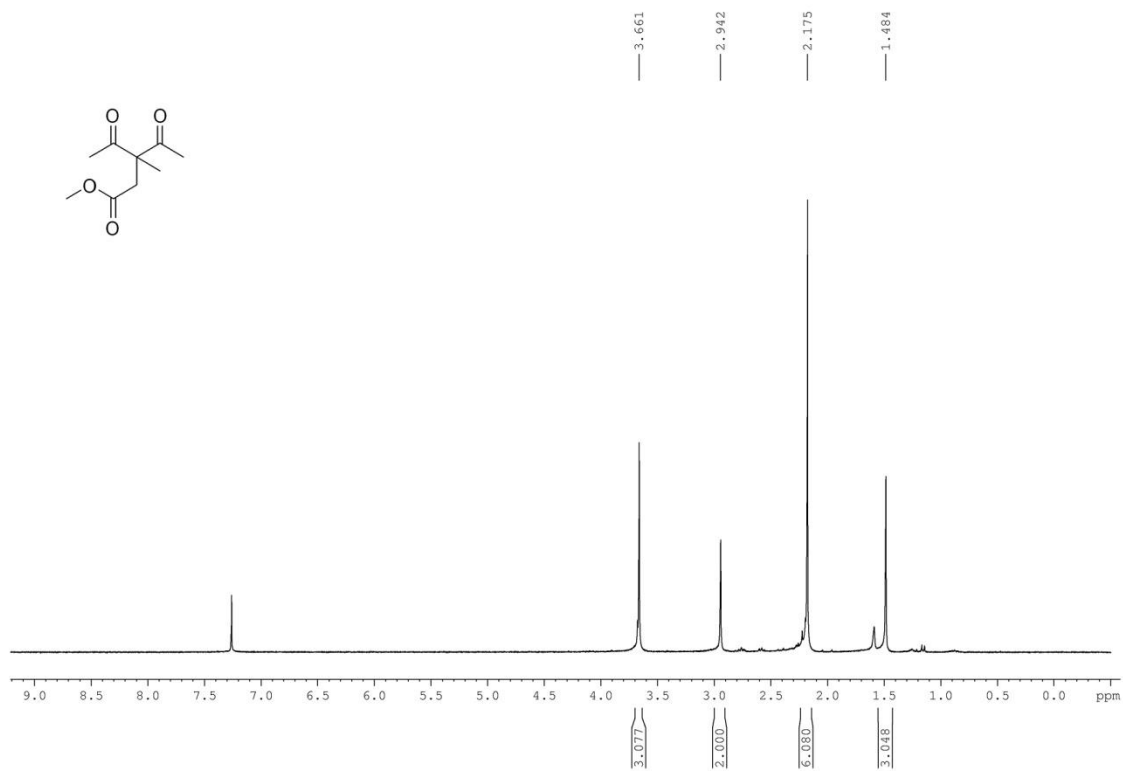


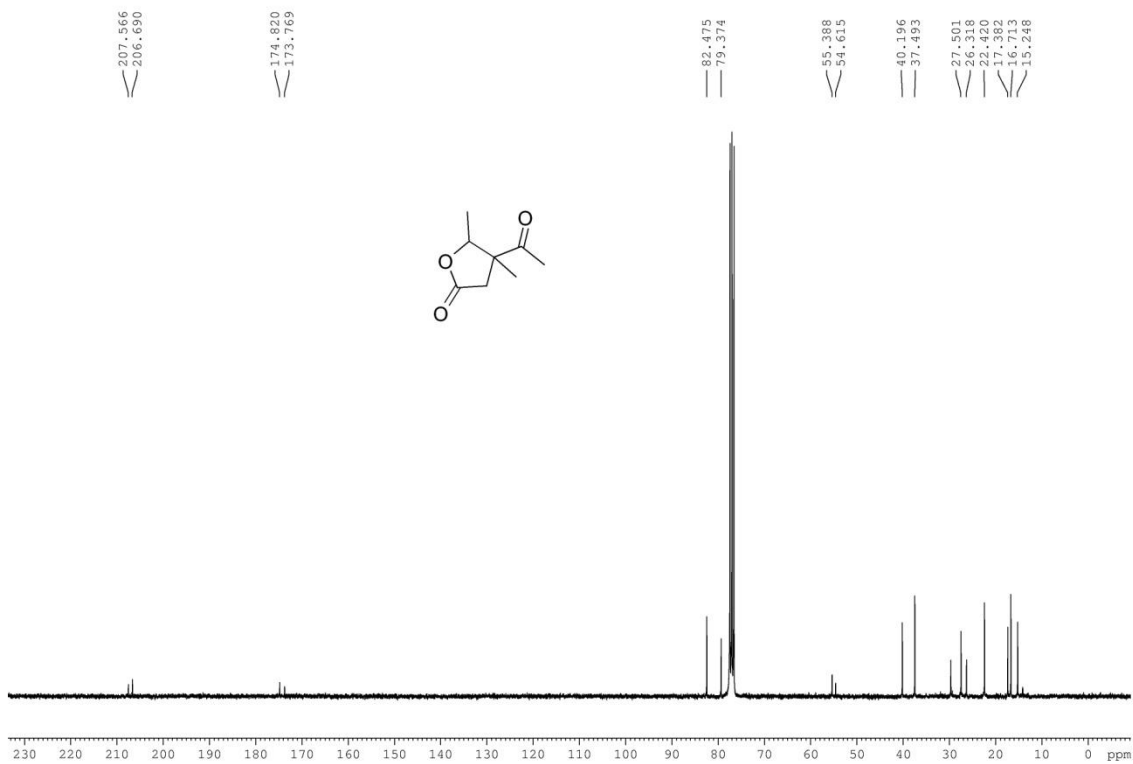
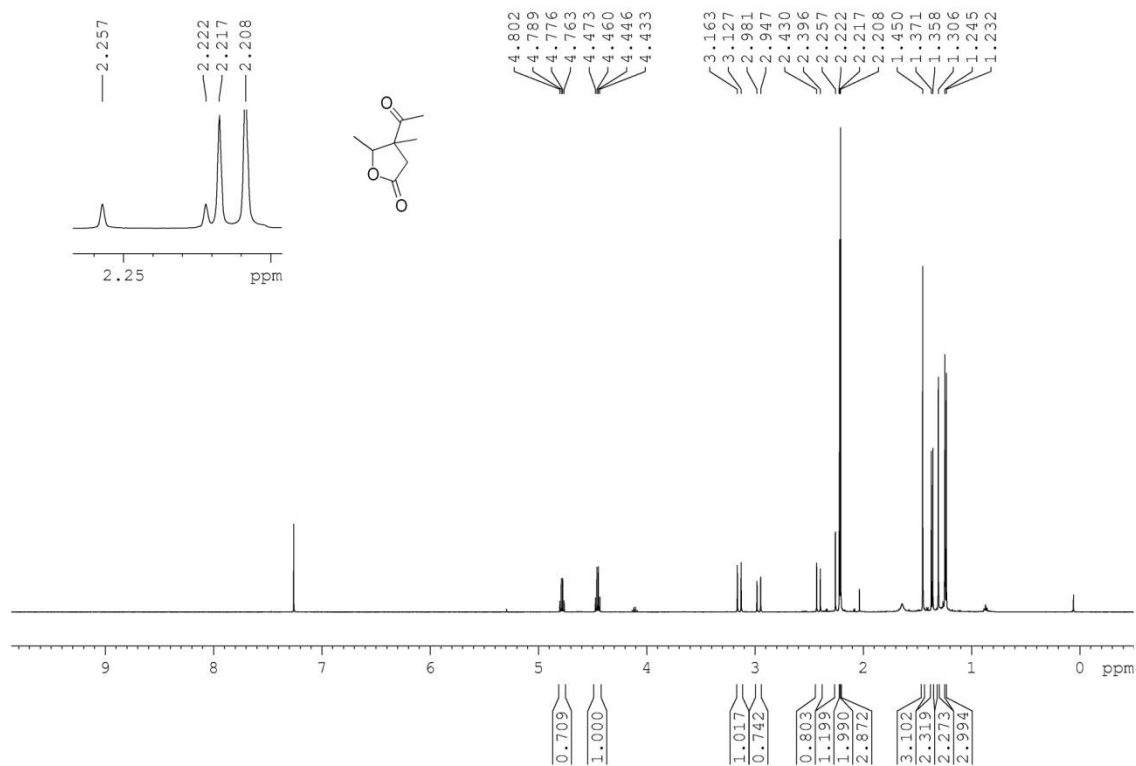
Ένα διαστερομερές προϊόν από την KRED-A1D

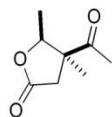


Ένα διαστερομερές προϊόν από την KRED-A1D



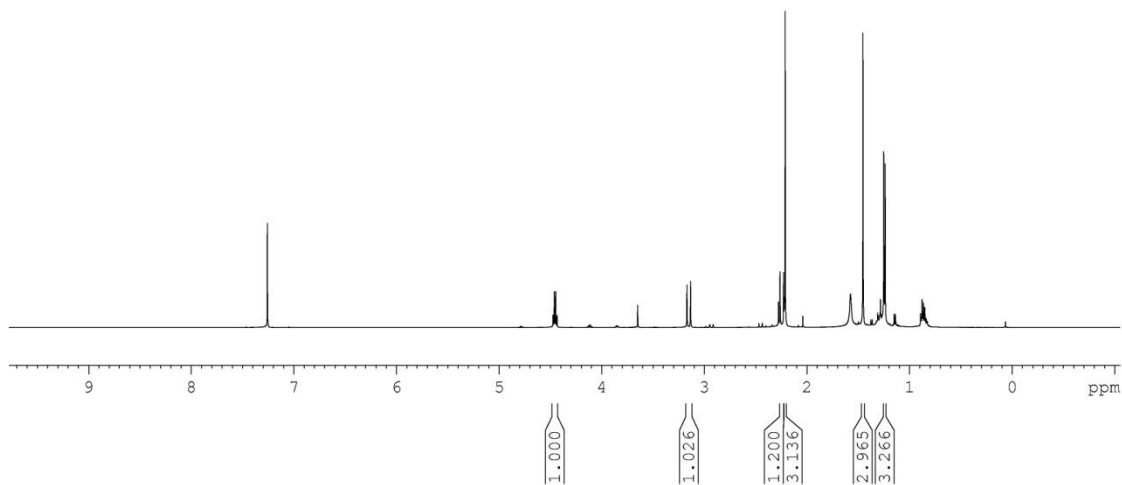




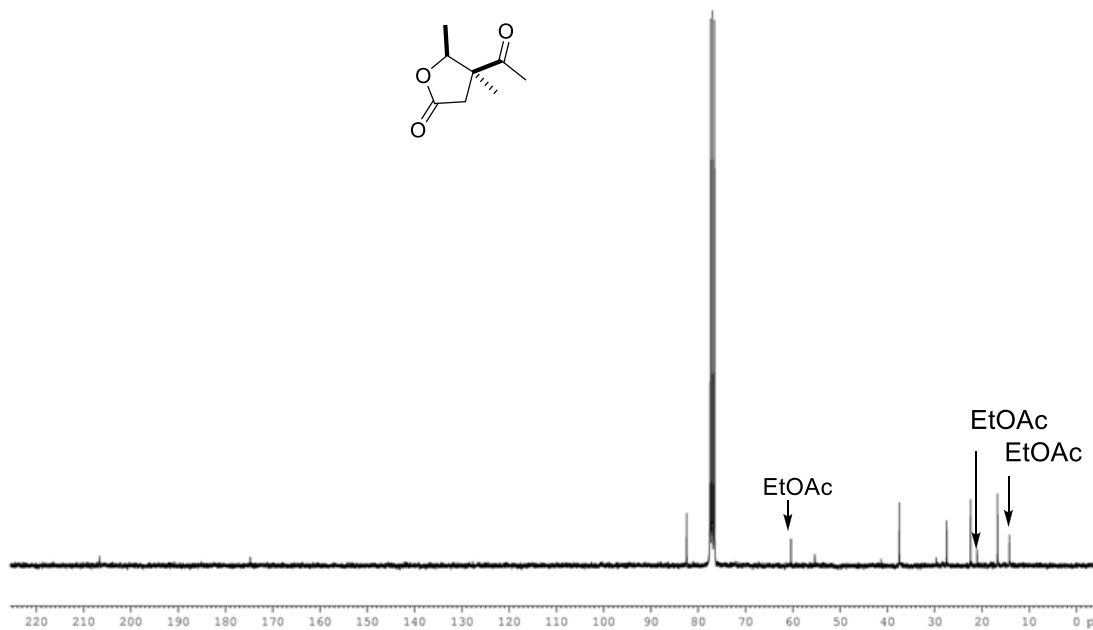
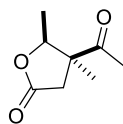


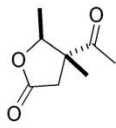
Από την KRED-111

4.475
4.462
4.449
4.436
3.170
3.135
2.263
2.227
2.213
1.454
1.251
1.238

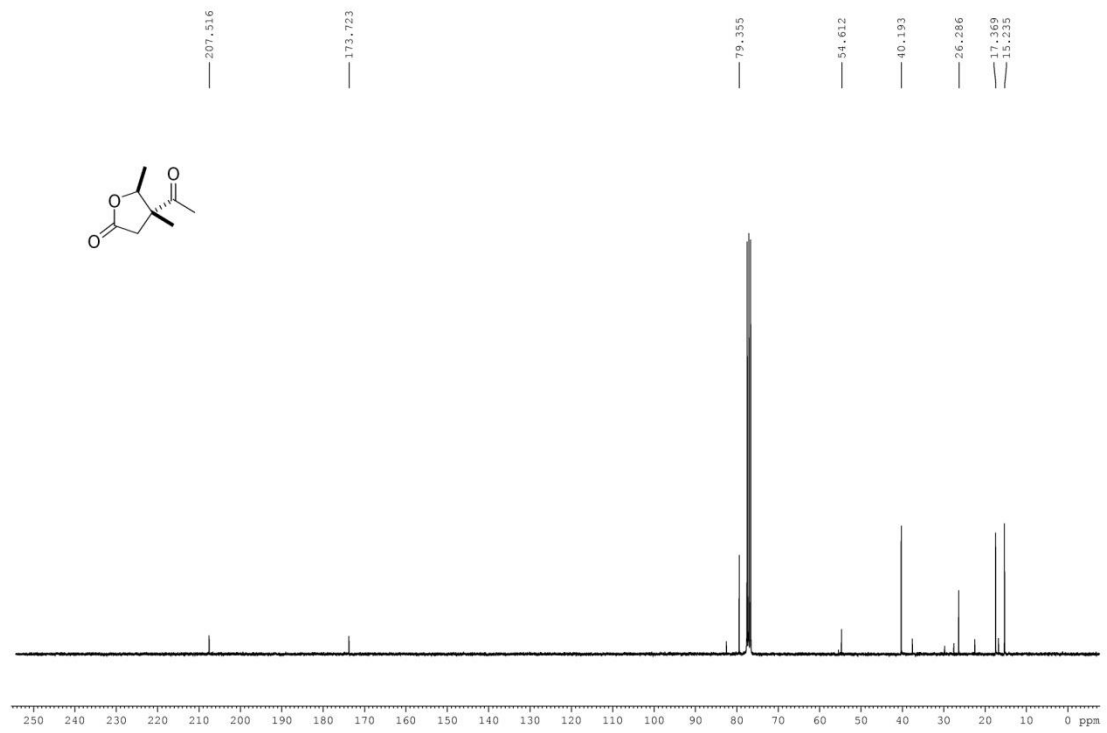
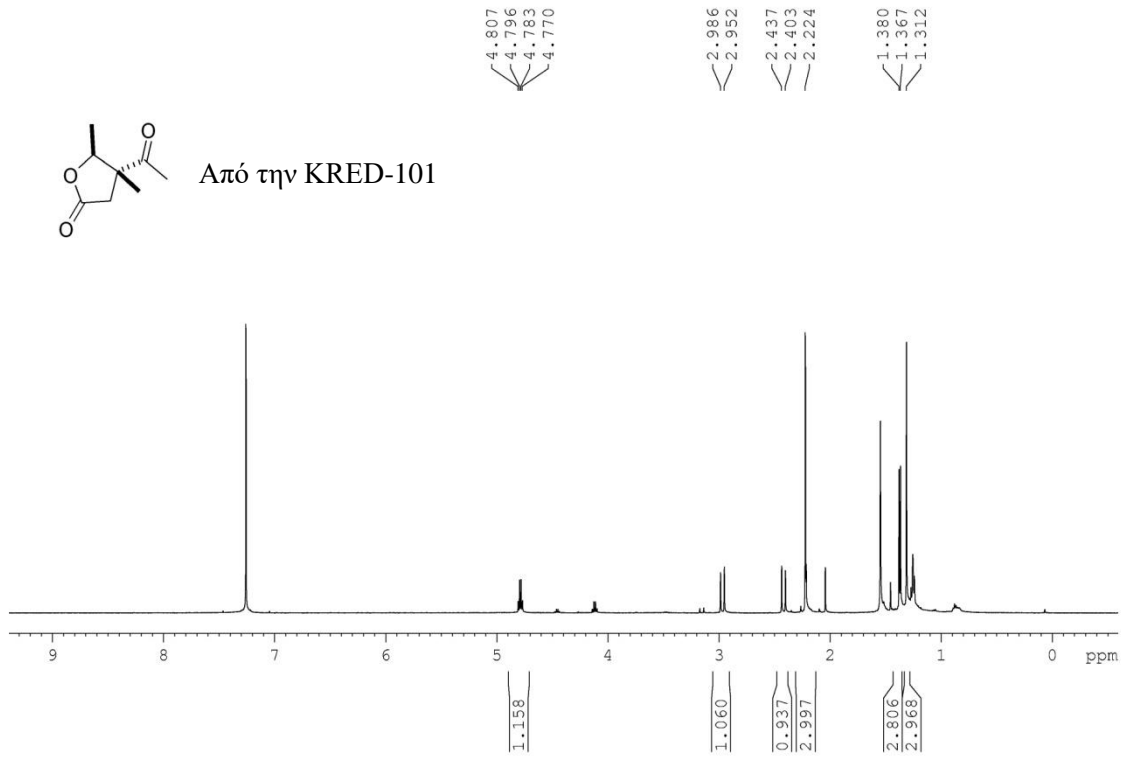


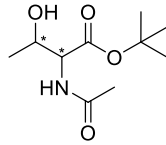
206.635
174.773
82.458
55.380
37.480
27.472
22.423
16.704



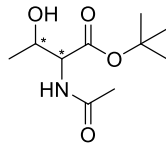
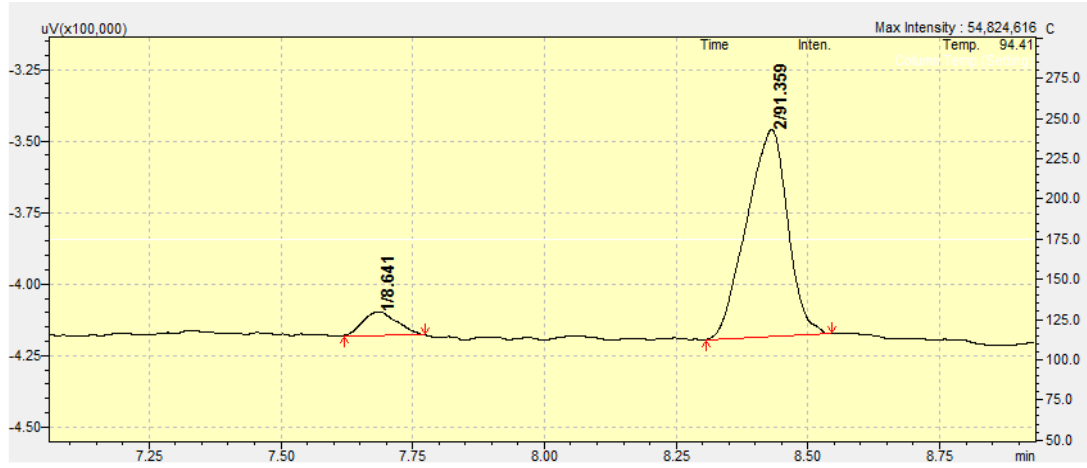


Από την KRED-101

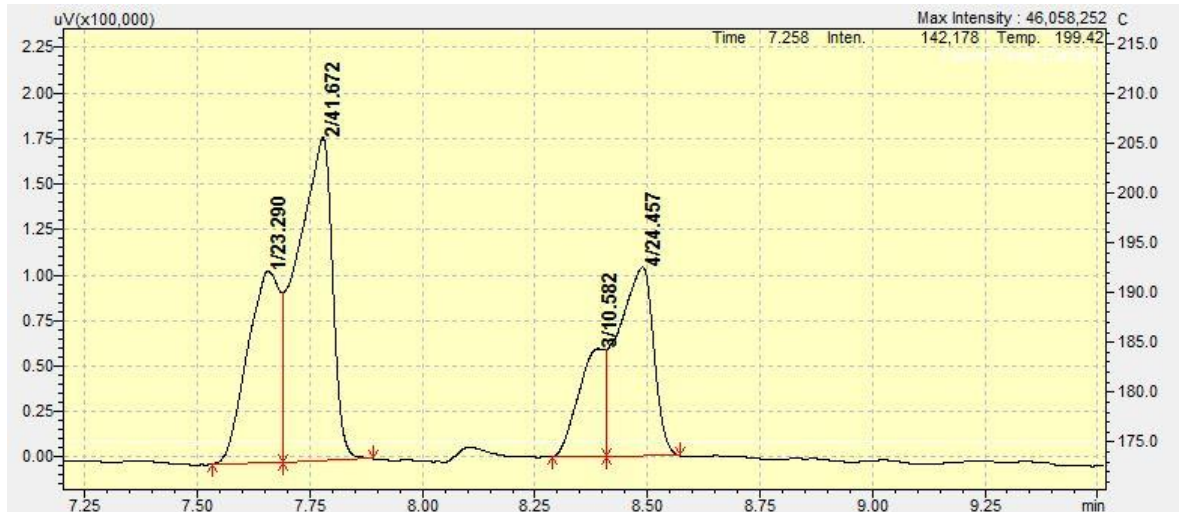


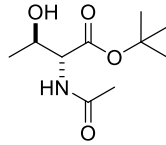


Από KRED-119

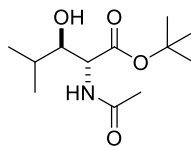


Από KRED-102



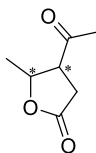


Από KRED-101

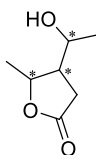
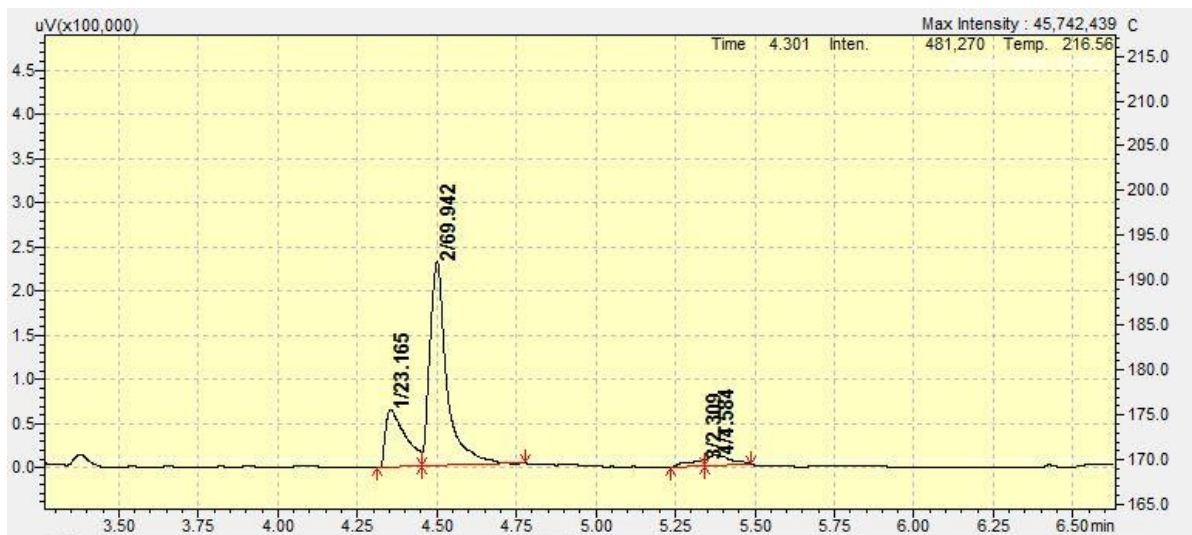


Από KRED-114

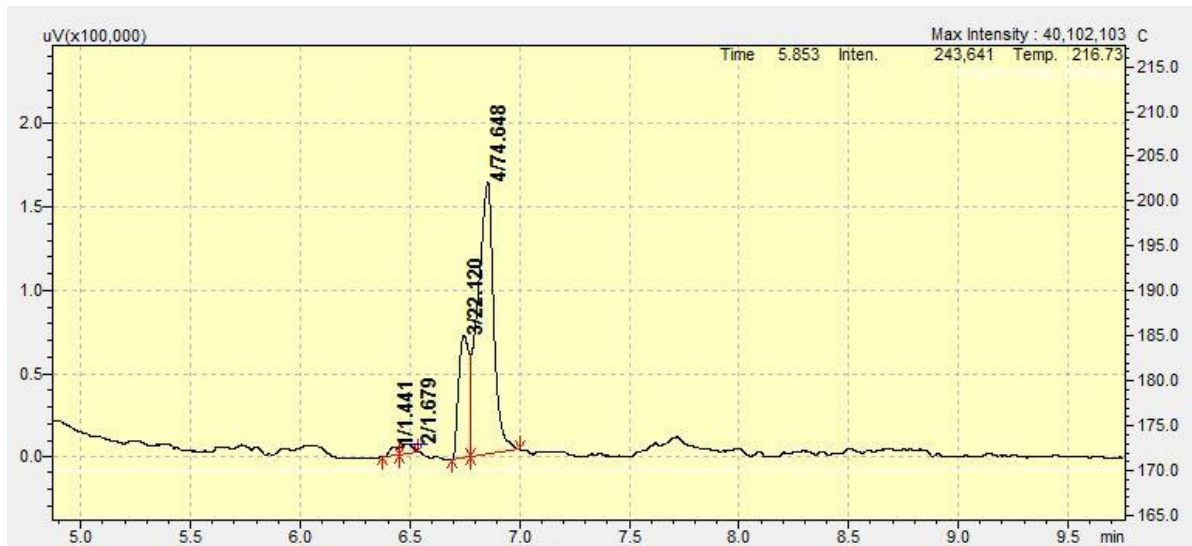


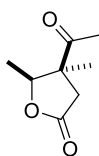


Από KRED-112

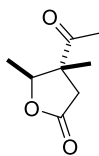


Από KRED-A1D

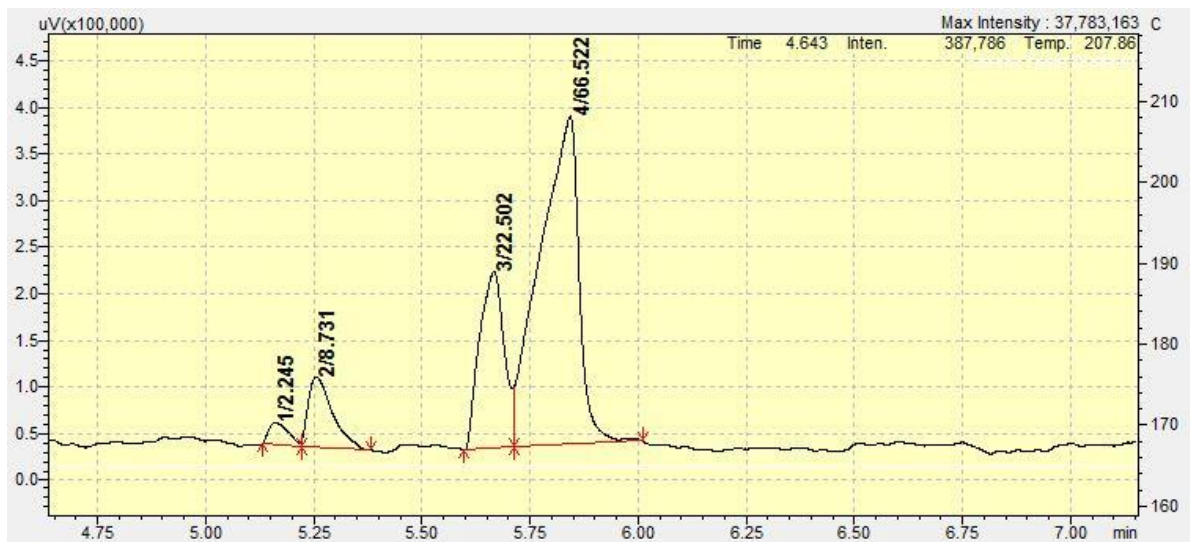




Από KRED-111



Από KRED-101



Βιβλιογραφία

- ¹ a) K. Faber, *Biotransformation in organic chemistry*, 6th Edition, Springer, **2011** b) F. Brenna, *Synthetic Methods for Biologically Active Molecules. Exploring the Potential of Bioreductions*, **2012**, Wiley-VCH.
- ² a) I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.*, **2011**, *13*, 2285-2314 b) C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ACS Catal.*, **2014**, *4*, 788-797 c) C. E. Paul, F. Hollmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, *100*, 4773-4778.
- ³ A. Wells and H. P. Meyer, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 918-920.
- ⁴ S. E. Milner, A. R. Maguire, *ARKIVOC*, **2012**, 321-382.
- ⁵ T. Hudlicky and J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 3117-3132.
- ⁶ M. Hall, A.S. Bommarius, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 4088-4110.
- ⁷ R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press, San Diego, **2000**.
- ⁸ R. N. Patel, *ACS Catalysis*, **2011**, *1*, 1056-1074.
- ⁹ G. W. Huisman, J. Liang and A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *14*, 122-129.
- ¹⁰ C. Wandrey, *Chem. Rec.*, **2004**, *4*, 254-265.
- ¹¹ F. Hollmann and A. Schmid, *Biocatal. Biotransform.*, **2004**, *22*, 63-88.
- ¹² V. Höllrig, K. Otto and A. Schmid, *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1337-13340.
- ¹³ F. Hildebrand and S. Lütz, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 1187-1193.
- ¹⁴ H. K. Song, S. H. Lee, K. Won, J. H. Park, J. K. Kim, H. Lee, S. J. Moon, D. K. Kim and C.B. Park, *Angew. Chem, Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1749-1752.
- ¹⁵ F. Hildebrand and S. Lütz, *Chem.-Eur. J.*, **2009**, *15*, 4998-5001.
- ¹⁶ M. Poizat, I. W. C. E. Arends and F. Hollmann, *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, **2010**, *63*, 149-156.
- ¹⁷ R. Mertens and A. Liese, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, *15*, 343-348.
- ¹⁸ R. Mertens, L. Greiner, E. C. D. van den Ban, H. Haaker and A. Liese, *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, **2003**, *24-25*, 39-52.
- ¹⁹ P. Bisel, L. Walter, M. Nieger, W. Hummel and M. Muller, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 1142-1144.
- ²⁰ J. D. Carballeira, E. Alvarez and J. V. Sinisterra, *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, **2004**, *28*, 25-32.
- ²¹ G. S. Yang, Z. M. Ou, S. J. Yao and J. Y. Xu, *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, **2009**, *57*, 83-88.
- ²² J. Liang, E. Mundorff, R. Voladri, S. Jenne, L. Gilson, A. Conway, A. Krebber, J. Wong, G. Huisman, S. Truesdell and J. Landole, *Org. Process Res. Dev.*, **2010**, *14*, 188-192.
- ²³ R. A. Volkmann, P. R. Kelbaugh, D. M. Nason, and V. J. Jasys, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 4352-4361.
- ²⁴ H. Jajoo, R. Mayol, J. LaBudde, I. Blair, *Drug Metab. Dispos.*, **1989**, *17*, 634-640.
- ²⁵ J. Yevich, J. New, W. Lobeck, P. Dextraze, E. Bernstein, D. Taylor, F. Yocca, M. Eison, D. Temple, Jr. *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 4516-4525.

- ²⁶ R. Patel, L. Chu, V. Nanduri, L. Jianqing, A. Kotnis, W. Parker, M. Liu, R. Mueller, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 2778–2783.
- ²⁷ S. Goldberg, V. Nanduri, L. Chu, R. Johnston, R. Patel, *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, *39*, 1441–1450.
- ²⁸ D. Kalaitzakis, J. D. Rozzel, S. Kampourakis, I. Smonou, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1958 – 1969.
- ²⁹ A. Bariotaki, D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 1792–1795.
- ³⁰ C. A. Denard, J. F. Hartwig and H. Zhao, *ACS Catal.*, **2013**, *3*, 2856–2864.
- ³¹ N. Rios-Lombardia, C. Vidal, E. Liardo, F. Moris, J. Garcia-Alvarez, J. Gonzalez-Sabin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 8691-8695
- ³² K. Baer, M. Krauíer, E. Burda, W. Hummel, A. Berkessel, and H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 9355-9358.
- ³³ G. Rulli, N. Duangdee, W. Hummel, A. Berkessel, and H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.*, **2017**, *4*, 812-817.
- ³⁴ Kalaitzakis, J. D. Rozzel, S. Kampourakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, *10*, 2309–2313. “METHOD OF MAKING (+)-SITOPHILURE” US.Patent application No. 60/75,877, with Biocatalytics, International Publication Number WO 2007/076109 with Biocatalytics.
- ³⁵ Kalaitzakis, J. D. Rozzel, S. Kampourakis, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 2418–2426.
- ³⁶ M. Kallergi, D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *20-21*, 3946–3950.
- ³⁷ D. Kalaitzakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, *1*, 43-46.
- ³⁸ B. Seashore-Ludlow, P. Villo, P. Somfai, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 7219-7223.
- ³⁹ K. C. Nicolaou, D. H. Dethe, G. Y. C. Leung, B. Zou, D. Y.-K. Chen, *Chem. Asian J.*, **2008**, *3*, 413 – 429.
- ⁴⁰ P. W. Ford, K. R. Gustafson, T. C. McKee, N. Shigematsu, L. K. Maurizi, L. K. Pannell, D. E. Williams, E. Dilip de Silva, P. Lassota, T. M. Allen, R. Van Soest, R. J. Andersen, M. R. Boyd, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 5899 –5909.
- ⁴¹ K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2096–2152.
- ⁴² E. J. Corey, G. A. Reichard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10677-106778.
- ⁴³ E. Selva, G. Beretta, N. Montanini, G. S. Saddler, L. Gastaldo, P. Ferrari, R. Lorenzetti, P. Landini, F. Ripamonti, B. P. Goldstein, M. Berti, L. Montanaro, M. Denaro, *J. Antibiot.*, **1991**, *44*, 693 –701.
- ⁴⁴ a) P. H. Anborgh, A. Parmeggiani, *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 24622-24628 b) S. E. Heffron, F. Journak, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 37-45 c) A. Parmeggiani, I. M. Krab, S. Okamura, R. C. Nielsen, J. Nyborg, P. Nissen, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 6846-6857.
- ⁴⁵ G. Heckmann, T. Bach, *Angew. Chem.*, **2005**, *117*, 1223 –1226.
- ⁴⁶ K. Makino, N. Okamoto, O. Hara, Y. Hamada, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12* 1757–1762.
- ⁴⁷ A.V.R. Rao, M.K. Gurjar, K.L. Reddy, A.S. *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, 2135-2167.
- ⁴⁸ A. Girard, C. Greck, D. Ferroud, J. P. Genet, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 7967-7970.

- ⁴⁹ S. Omura, T. Fujimoto, K. Otoguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Y. Sasaki, *J. Antibiot.*, **1991**, *44*, 113-116.
- ⁵⁰ T. Nagamitsu, T. Sunazuka, H. Tanaka, S. Omura, P. A. Sprengeler, A. B. III. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3584-3590.
- ⁵¹ J. S. Panek and C. E. Masse, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 2382.
- ⁵² R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widhalm, M. Kitamura, H. Takaya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 9134-9135.
- ⁵³ J. P. Genet, C. Pinel, S. Mallart, S. Juge, S. Thorimbert, J. A. Laffitte, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, *2*, 555-567.
- ⁵⁴ A. Lei, S. Wu, M. He, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 1626-1627.
- ⁵⁵ K. Makino, T. Goto, Y. Hiroki, Y. Hamada, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 882-884.
- ⁵⁶ C. Mordant, P. Dunkelmann, V. Ratovelomanana-Vidal, J. P. Genet, *Chem. Commun.* **2004**, 1296-1297.
- ⁵⁷ K. Makino, T. Fujii, Y. Hamada, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 481-485.
- ⁵⁸ K. Makino, Y. Hiroki, Y. Hamada, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 5784-5785.
- ⁵⁹ Y. Hamada, Y. Koseki, T. Fujii, T. Maeda, T. Hibino, K. Makino, *Chem. Commun.*, **2008**, 6206-6208.
- ⁶⁰ B. Seashore-Ludlow, P. Villo, C. Häcker, P. Somfai, *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 5274-5277.
- ⁶¹ B. Seashore-Ludlow, F. Saint-Dizier, P. Somfai, *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 6334-6337.
- ⁶² D. Kalaitzakis, I. Smonou, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 3919-3921.
- ⁶³ S. Raghavan, K. A. Tony, *Tetrahedron Letters*, **2004**, *45*, 2639-2641.
- ⁶⁴ J. McMurry, *Organic Chemistry*, 4th Edition, Brooks/Cole, **2011**.
- ⁶⁵ S. S. Canan Koch, A. R. Chamberlin, *Studies in Natural Products Chemistry*, **1995**, *16*, 687.
- ⁶⁶ X. Wu, W. Cao, H. Zhang, J. Chen, H. Jiang, H. Deng, M. Shao, J. Zhang, H. Chen, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 10331-10338.
- ⁶⁷ M. Ozeki, D. Hashimoto, K. Nishide, T. Kajimoto and M. Node, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 1663-1671.
- ⁶⁸ a) O. V. Turova, E. V. Starodubtseva, M. G. Vinogradov, V. A. Ferapontov, M. Struchkova, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 2121-2124 b) A. Méou, L. Lamargue, P. Brun, *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 5301-5304.
- ⁶⁹ A. Comini, C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco and E. Valentin, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 617-625.
- ⁷⁰ F. Berti, F. Felluga, C. Forzato, G. Furlan, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 2344-2353.
- ⁷¹ C. Forzato, G. Furlan, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, E. Zangrando, P. Buzzini, M. Goretti, B. Turchetti, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 2026-2036.
- ⁷² A. Tzanakaki, *Master thesis*, **2016**, Πανεπιστήμιο Κρήτης-Τμήμα Χημείας.
- ⁷³ R. A. Fernandes, A. B. Ingle, V. P. Chavan, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 2835-2844.
- ⁷⁴ S. Shimada, Y. Hashimoto, A. Sudo, M. Hasegawa, K. Saigo, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 7129.
- ⁷⁵ C. H. Heathcock, S. D. Young, J. P. Hagen, M. C. Pirrung, C. T. White, D. J. VanDerveer, *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 3846-3856.