ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ <<XΗΜΕΙΑ>>

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Στερεοεκλεκτικές αναγωγές α-φθορο-β-κετο εστέρων καταλυόμενες από NADPH- εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες

ΜΕΛΑΜΠΙΑΝΑΚΗ ΣΟΦΙΑ

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

НРАКЛЕІО 2020

UNIVERSITY OF CRETE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

POSTGRADUATE PROGRAMME <<CHEMISTRY>>

ORGANIC CHEMISTRY LABORATORY



MASTER THESIS

Stereoselective reductions of α -fluoro- β -keto esters catalyzed by isolated NADPH-dependent ketoreductases

MELAMPIANAKI SOFIA

Master Thesis Superisor: SMONOU IOULIA

HERAKLION 2020

Εξεταστική επιτροπή

Σμόνου Ιουλία

Αναπλ. Καθηγήτρια (Επιβλεπουσα), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Νεοχωρίτης Κωνσταντίνος Επίκουρος Καθηγητής Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας-Βιοκατάλυσης του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών <<Χημεία>>, με ειδίκευση Οργανική Χημεία.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου καθώς και τους φίλους μου για την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, διότι χωρίς αυτούς τους ανθρώπους τίποτα από όλα αυτά δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

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 Καθηγήτρια Σμόνου Ιουλία, επβλέπουσα της παρούσας εργασίας, για την βοήθεια, τη συνεχή υποστήριξη και εμπιστοσύνη αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο της καθώς και για τις ιδέες και προτάσεις της πάνω στο θέμα της εργασίας μου αλλά και σε πρακτικά ζητήματα του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ πολύ τους Καθηγητές κ. Στρατάκη Εμμανουήλ και κ. Νεοχωρίτη Κωνσταντίνο που δέχτηκαν να αποτελέσουν την εξεταστική μου επιτροπή, καθώς και τον ομότιμο Καθηγητή κ. Ορφανόπουλο Μιχαήλ για το ενδιαφέρον που επέδειξε καθόλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Καλαϊτζάκη Δημήτριο για τις χρήσιμες συμβουλές του, για την σημαντική βοήθεια του τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους συνεργάτες και συναδέλφους στο εργαστήριο, τον Γιαννόπουλο Βασίλη, την Μυρτολλάρη Καμέλα, τον Χατζούδη Απόστολο, τον Κατσουλάκη Νίκο καθώς και τα παλαιότερα μέλη του την Ζωίδη Μαργαρίτα και τον Τυρίκο-Εργά Θοδωρή για την πολύ όμορφη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο, όπως και τα υπόλοιπα παιδιά του Τομέα για την πολύ καλή συνεργασία και τις ιδέες που μου παρείχαν διαρκώς.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά Στοιχεία

Ονοματεπωνυμο:	Μελαμπιανάκη Σοφία
Ημερομηνία Γέννησης:	02/02/1995
Τόπος Γέννησης:	Ιωάννινα Ιωαννίνων, Ελλάδα
Εθνικότητα:	Ελληνική
Ιδιότητα:	Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης Ηράκλειο-Πανεπιστημιούπολη Βουτών, Κρήτη 71003,Ελλάδα
e-mail:	sofiamela0295@gmail.com

Εκπαίδευση

10/2018-Σήμερα	Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδικευσης στην Οργανική Χημεία, Τμήμα Χημείας
	Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία:
09/2017-Σήμερα	Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα στην Οργανική Χημεία
09/2013-07/2017	Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαθμός: Λίαν Καλώς (7.44/10)
02/2017-06/2017	Πτυχιακή Ερευνητική Εργασία με θέμα: << Ανάλυση της χημικής σύστασης και φυσικής αποικοδόμησης έργων μοντέρνας τέχνης από ακόρεστες πολυεστερικές ρητίνες (UPR) με την φασματοσκοπία NMR.>> υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Α. Σπύρο, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Εμπειρία

09/2018-12/2018	Βοηθός Προπτυχιακού Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ι, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
01/2018-05/2018	Βοηθός Προπτυχιακού Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
10/2016-12/2016	Πρακτική Άσκηση στο Πρότυπο Πειραματικό Γυμνάσιο Ηρακλείου, στα πλαίσια της παιδαγωγικής επάρκειας
07/2016-10/2016	Πρακτική Άσκηση στον όμιλο KARATZIS S.A., ΒΙ.ΠΕ.Ηρακλείου, στον τομέα του ελέγχου ποιότητας

Γλώσσες

- Άριστη γνώση της Αγγλικής Γλώσσας, ΕССΕ
- Βασική γνώση της Γερμανικής Γλώσσας, Β1
- Ελληνική, Μητρική Γλώσσα

Δεξιότητες

- Βασικές γνώσεις Η/Y, Windows, Microsoft Office και Libre Office
- Δίπλωμα Οδήγησης Β
- Χειρισμός εργαστηριακών οργάνων

- NMR(Bruker), Όργανο Αέριας Χρωματογραφίας GC(Shimadzu), Όργανο Ύγρης Χρωματογραφιας Υψηλής Απόδοσης HPLC(Shimadzu), IR /UV-Vis Φασματοφωτόμετρο –

Συμμετοχή σε συνέδρια

- Αναρτημένη παρουσίαση(poster) στο 19° Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών, Μαιος 2017, Πανεπιστήμιο Κρήτης,
 << Compositional analysis and aging of two contemporary works of art by NMR spectroscopy>>, <u>Melampianaki S</u>., Tsana I.S., Knuutinen U., Kyllonen P., Spiros A.
- Αναρτημένη παρουσίαση (poster) στο 6° Πανελλήνιο Συνέδριο Πράσινης Χημείας, Οκτώβριος 2019, Έθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ελλάδα << Stereoselective enzymatic synthesis of α-fluoro-β-keto esters>>, <u>Melampianaki S</u>., Smonou I.

CURRICULUM VITAE

Personal Information

Full Name:	Melampianaki Sofia
Date/Place of birth:	02/02/1995/ Ioannina Ioanninwn, Greece
Nationality:	Greek
Status:	Postagraduate Student Department of Chemistry University of Crete Heraklion-Voutes Campus, Crete 71003, Greece
e-mail:	sofiamela0295@gmail.com
Education	
10/2018-present	M.Sc. in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete
	M.Sc Diploma Thesis:
09/2013-07/2017	B.Sc. in Chemistry, Department of Chemsitry, University

02/2017-06/2017

Senior undergraduate Diploma Thesis entitled: << Chemical composition and

Grade: Very Good (7.44/10)

environmental degradation of unsaturated polyester resins (UPR) contemporary artworks by analytical NMR spectroscopy>>, elaborated under the supervision of Assoc.Professor A. Spiros, Department of Chemistry, University of Crete

Experience

09/2018-12/2018	Assistant in Organic Chemistry Undergraduate Laboratory I, Department of Chemistry, University of Crete
01/2018-05/2018	Assistant in Organic Chemistry Undergraduate Laboratory II, Department of Chemistry, University of Crete
10/2016-12/2016	Practical Internship at Experimental General Lyceum (Upper Secondary School) of Heraklion
07/2016-10/2016	Practical Internship at KARATZIS S.A. Heraklion, Crete in the quality control laboratory

Languages

- English, ECCE
- German Basic knowledge(B1)
- Greek, Mother tongue

Skills

- Basic Level in Windows, Microsoft Office και Libre Office
- Driving License category B
- Experience in:

 NMR(Bruker), Shimadzu Gas Chromatography Instrument , Shimadzu High Performance Liquid Chromatography Instrument (HPLC) , IR /UV-Vis Spectrophotometer –

Participation in Conferences

 Poster presentation in 19th Chemistry Postgraduate Conference, May 2017, University of Crete, Greece
 << Compositional analysis and aging of two contemporary works of art by NMR spectroscopy>>, Melampianaki S., Tsana I.S., Knuutinen U., Kyllonen

P.,Spiros A.

• Poster presentation in 6th Panhellenic Symposium of Green Chemistry, October 2019, National and Kapodistrian University of Athens,Greece << Stereoselective enzymatic synthesis of α -fluoro- β -keto esters>>, <u>Melampianaki S</u>., Smonou I.

Х

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της δραστικότητας σειράς κετορεδουκτασών σε στερεοεκλεκτικές αναγωγές φθοριωμένων καρβονυλικών υποστρωμάτων με σκοπό την σύνθεση των αντίστοιχων οπτικά ενεργών αλκοολών. Οι ενώσεις αυτές έχουν προσελκύσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω των ιδιοτήτων που προσδίδει σε αυτές η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου, με αρκετές εφαρμογές στην φαρμακευτική βιομηχανία.

Παρουσιάζεται αναλυτικά η σύνθεση 10 υποστρωμάτων της δομής α-φθορο-β-κετο εστέρων και στην συνέχεια η μελέτη της καταλυτικής δράσης μιας σειράς NADPH εξαρτώμενων κετορεδουκτασών για την σύνθεση οπτικά ενεργών β-υδροξυ-α-φθορο εστέρων. Πιο συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε η στερεοεκλεκτική σύνθεση σειράς pάρυλο υποκατεστημένων α-φθορο-β-υδροξυ-εστέρων που διέφεραν στην εστερική ομάδα. Η φθορίωση πραγματοποιήθηκε σε ένα μόλις στάδιο και με υψηλή απόδοση. Προσδιορίστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης. Προσδιορίστηκαν τα κατάλληλα ένζυμα για κάθε ξεγωριστό υπόστρωμα που επέδειξαν ικανοποιητική έως εξαιρετική δραστικότητα, διαστερεοεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα. Τέλος, προσδιορίστηκε ότι η εναντιοεκλεκτικότητα ορισμένων κετορεδουκτασών για μια σειρά από υποστρώματα ήταν ανεξάρτητη από το είδος της υποκατάστασης στον δακτύλιο αλλά και από το μέγεθος της εστερικής ομάδας.

Λέξεις κλειδιά: βιοκατάλυση, κετορεδουκτάσες, ενζυμική αναγωγή β-υδροξυ-αφθορο- εστέρες, χειρόμορφα ενδιάμεσα

ABSTRACT

In the present thesis, the activity of various isolated ketoreductases on stereoselective bioreductions of perfluorinated carbonyl substrates was investigated for the synthesis of the corresponding optically pure alcohols. These compounds have been the focus of intensive research efforts, due to the benefits on physicochemical and bioactive properties induced in their molecular structure by a C-F bond.

At first, the synthesis of 10 substrates in the form of α -fluoro- β -ketoesters is presented and then their enzymatic reductions using a series of NADPH-dependent ketoreductases for the synthesis of optically pure β -hydroxy- α -fluoro esters was studied. In particular, the stereoselective synthesis of a series of p-aryl substituted- α fluoro- β -ketoesters with different ester groups, has been successfully accomplished. Moreover, the fluorination via an electrophilic fluorination step has been achieved with high yields. The reaction conditions were optimized for the reduction reaction. For some substrates ketoreductases proved to be very efficient catalysts which showed good to high activity and excellent diastereo and enantioselectivity. Finally, a number of enzymes was determined that showed specific enantioselectivity without any dependence on the size of the ester group or the substituent on the aromatic ring.

Keywords: Biocatalysis, ketoreductases, enzymatic reduction, β -hydroxy- α -fluoro esters, chiral intermediates

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εξεταστική επιτροπή
ΕυχαριστίεςΙV
Βιογραφικό Σημείωμαν
Curriculum VitaeVIII
ΠερίληψηΧΙ
AbstractXII
Κεφάλαιο 1ο
1.1 Βιοκατάλυση στην Οργανική Σύνθεση
1.1.1 Βιοκατάλυση2
1.1.2 Αρχές Βιοκατάλυσης3
1.2 Ένζυμα
1.2.1 Ορισμός και ταξινόμηση ενζύμων4
1.2.2 Κετορεδουκτάσες7
1.2.3 Καταλυτικός μηχανισμός7
1.2.4 Κετορεδουκτάσες στην ασύμμετρη σύνθεση8
1.2.5 Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών
1.3 Φθοριωμένα υποστρώματα
1.3.1 Ιδιότητες φθοριωμένων ενώσεων14
1.3.2 Μηχανισμός ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης16
Κεφάλαιο 20
2.1 Στόχος της παρούσας έρευνας
2.2 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων
2.3 Συμπεράσματα
2.4 Πειραματικό μέρος
Παράρτημα- Φάσματα ¹ Η NMR, ¹³ C NMR, ¹⁹ F NMR και αέριας χρωματογραφίας
(GC)

(00)	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	••••••	
Βιβλιογραφία			 147

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Βιοκατάλυση στην Οργανική Σύνθεση

1.1.1 Βιοκατάλυση

Ως βιοκατάλυση ορίζεται η χρήση ζωντανών (βιολογικών) συστημάτων ή μέρους αυτών ώστε να επιταχυνθούν χημικές αντιδράσεις προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι φορείς αυτών των μετατροπών είναι τα ένζυμα, με αξιοσημείωτες ιδιότητες. Παρόλο που σαν όρος χρησιμοποιείται μόλις από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, η αξιοποιήσή της από την ανθρωπότητα είναι γνωστή από αρχαιοτάτων χρόνων. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο εξειδικευμένες χημικές ουσίες όπως πρόσθετα τροφίμων, ακόμη και πρόδρομες ενώσεις για την σύνθεση πολυμερών σε μεγάλη κλίμακα παράγονται μέσω βιοκαταλυτικών διεργασιων. Το γεγονός αυτό καθιστά την Βιοτεχνολογία και την Βιοκατάλυση από τις πιο ανεπτυγμένες τεχνολογίες που εφαρμόζονται σε σημαντικούς τομείς όπως είναι η υγεία και το περιβάλλον.

Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προσελκύσει η εφαρμογή της Βιοκατάλυσης στην Οργανική Σύνθεση, με στόχο την σύνθεση πολύτιμων ενώσεων υψηλής οπτικής καθαρότητας (>99% de και >99% ee) και υψηλές χημικές αποδόσεις. Σήμερα, για την σύνθεση αυτών, απαραίτητη είναι η εφαρμογή οικονομικών, απλών, αποδοτικών και περιβαλλοντικά αποδεκτών τεχνικών σύνθεσης. Η Βιοκατάλυση αντιπροσωπεύει μια καθιερωμένη εναλλακτική προσέγγιση στην εκπλήρωση αυτών των στόχων, καθώς υιοθετεί τις αρχές της Πράσινης Χημείας.¹ Οι ήπιες συνθήκες- pH, θερμοκρασίας και υδατικά διαλύματα- και η χρήση των ενζύμων για την αποφυγή τοξικών αντιδραστηρίων, μειώνουν σημαντικά την παραγωγή ρύπων και αποβλήτων ενώ πολλές κλασσικές χημικές μεθόδοι απλοποιούνται και αναβαθμίζονται από τεχνικής άποψης, αλλά και από άποψης κόστους και χρόνου.

Η οπτική καθαρότητα των οργανικών ενώσεων που συντίθενται εργαστηριακά είναι μια σημαντική ιδιότητα που καθοριζει την βιολογική τους δραστικότητα. Με αυτό τον τρόπο είναι εφικτή η σύνθεση χειρόμορφων ενώσεων φαρμακευτικού αλλά και εμπορικού ενδιαφέροντος, σύμφωνα και με τα αυστηρά μέτρα της Διεύθυνσης Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) δηλαδή στα εναντιομερικώς καθαρά φαρμακευτικά και παραφαρμακευτικά παράγωγα. Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνουν τον σημαντικό ρόλο της Βιοκατάλυσης στην σύνθεση νέων φαρμακευτικών ενώσεων.²

Για όλους αυτούς τους λόγους, γίνονται σημαντικές προσπάθειες από πολλές ερευνητικές ομάδες να αντικαταστήσουν ή και να συμπληρώσουν κλασικές συμβατικές μεθόδους με βιοκαταλυτικές διεργασίες. Ωστόσο, για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο, το προκύπτον προϊόν οφείλει να είναι καλύτερης ποιότητας ενώ το κόστος παραγωγής του ελαττωμένο. Η χρήση των ενζύμων ως καταλυτών φαίνεται να καλύπτει αυτές τις ανάγκες και προτιμάται για ορισμένες συνθετικές διεργασίες έναντι των συμβατικών χημικών καταλυτών.

1.1.2 Εφαρμογές Βιοκατάλυσης

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται εφαρμογή σε ολοένα και περισσότερες χημικές βιομηχανίες τεχνικών που επίπτουν στον κλάδο της λεγόμενης ''άσπρης βιοτεχνολογίας'', για τον σχεδιασμό και παραγωγή προϊόντων από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι κλασικές χημικές μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί από βιοκαταλυτικές σε ήπιες συνθήκες pH και θερμοκρασίας ενώ αποφευγονται σε μεγάλο βαθμό τα τοξικά αντιδραστήρια και διαλύτες.³

Ωστόσο, για να υιοθετηθεί στην βιομηχανία μια βιοκαταλυτική διεργασία που θα αντικαθιστά μια άλλη συνθετική πορεία, θα πρέπει όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο,το προίόν αυτής να είναι καλύτερης ή και ανώτερης ποιότητας και οικονομικότερο σταδίων και κόστους.

Μια βιοκαταλυτική διεργασία, η οποία επιτυχημένα θα αντικαθιστά τη συμβατική χημική πορεία είναι η βιομετατροπή των προϊόντων ζύμωσης βένζυλο-πενικιλινών και φαινοξυμέθυλο-πενικιλινών (πενικιλίνες G και V αντίστοιχα) στο 6-αμινοπενικιλινικό οξύ (6-APA, **3**) σε ένα μόλις στάδιο, βασική πρόδρομη ένωση για μια σειρά πενικιλινούχων φαρμάκων. Υπολογίζεται πως το 6-APA παράγεται σε περισσότερο από 15.000 τόνους ετησίως.⁴⁻⁶



Σχήμα 1. Ενζυμική διεργασία έναντι χημικής για την σύνθεση του 6-άμινο-πενικιλινικού οξέος 3.

Η συμβαστατίνη 7 είναι η δραστική φαρμακευτική ουσία του Zocor, φαρμάκου που έχει εγκριθεί για την θεραπεία της δυσλιπιδαιμίας και την αποφυγή καρδιαγγειακών παθήσεων. Είναι μια ημισυνθετική ένωση που προέρχεται από την λοβαστατίνη που προέρχεται από το βακτήριο Aspergillus terreus, και η χημική σύνθεση της από αυτό το πρόδρομο περιλαμβάνει αρκετά και περίπλοκα στάδια και με μεγάλο κόστος παραγωγής. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε και ενζυμικά, με πολύ υψηλή απόδοση και υψηλή στερεοεκλεκτικότητα και με οικονομία σταδίων.^{7,8}



Σχήμα 2. Στερεοεκλεκτική σύνθεση της συμβαστατίνης 7 από την πρόδρομη ένωση 5.

1.2 Ένζυμα

1.2.1 Ορισμός και ταξινόμηση ενζύμων

Τα ένζυμα αποτελούν μια κατηγορία εξειδικευμένων πρωτεϊνών με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που προκύπτουν από την τρισδιάστατη μορφή, έναντι των συμβατικών χημικών καταλυτών. Είναι οι ισχυρότεροι καταλύτες που υπάρχουν-, αυξάνουν τον ρυθμό μιας χημικής αντίδρασης πετυχαίνοντας ταχύτητες της ταξης των 10⁸-10¹⁰, δρουν σε ήπιες συνθήκες- pH (5-8) και θερμοκρασία (20-40 °C), είναι φιλικά προς το περιβάλλον ενώ εμφανίζουν μεγάλη επιδεκτικότητα υποστρωμάτων χωρίς να περιορίζονται στο φυσικό τους ρόλο. Είναι συμβατά μεταξύ τους αφού τα περισσότερα είναι δραστικά κάτω από τις ίδιες ή παρόμοιες συνθήκες αντίδρασης γεγονός που δίνει την δυνατότητα αντιδράσεων στην ίδια φιάλη δίχως την απομόνωση ενδιαμέσων.^{3,9}

Η δυνατότητα τους να καταλύουν χημικές μετατροπές με υψηλή χήμειο-, τόπο- και στερεοεκλεκτικότητα, καθιστά τα ένζυμα σημαντικούς καταλύτες στην οργανική σύνθεση.¹⁰

Χημειοεκλεκτικότητα

Η ιδιότητα ενός ενζύμου να δρά εκλεκτικά σε μια λειτουργική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων λειτουργικών ομάδων στο ίδιο μόριο.¹¹



Σχήμα 3. Εκλεκτική εστεροποίηση με χρήση της παγκρεατικής λιπάσης PPL του υπόστρωματος 8.

Τοποεκλεκτικότητα

Λόγω της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους, τα ένζυμα έχουν την δυνατότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις στο ίδιο υπόστρωμα και να δρούν σε μια από αυτές.¹²



Σχήμα 4. Εκλεκτική οξείδωση της υδροξυλικής ομάδας του υποστρώματος 10 με την αλκοολική αφυδρογονάση 12a-HSDH.

Εναντιοεκλεκτικότητα

Η ικανότητα των ενζύμων να διακρίνουν ένα από τα εναντισμερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιστοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου. ¹³



Σχήμα 5. Ενζυμική οξείδωση του υποστρώματος **12** με χρήση της μονοοξυγενάσης της φαινυλακετόνης παρουσία ιονικού διαλύματος προς το ένα εκ των δυο εναντιομερών.

Διαστερεοεκλεκτικότητα

Η ικανότητα των ενζύμων να διακρίνουν ένα από τα διαστερεομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.¹⁴



Σχήμα 6. Ενζυμική αναγωγή του εστέρα **15** με χρήση κετορεδουκτάσης με τελικό προϊόν μόνο ένα εκ των τεσσάρων δυνατών ισομερών.

Με τα προκείμενα χαρακτηριστικά γίνεται εύκολα αντιληπτό πως οι βιοκαταλυτικές διεργασίες χρήζουν μεγάλου και αυξανόμενου ενδιαφέροντος παρά τις όποιες αμφισβητήσεις έχουν κατά καιρούς διατυπωθεί. Με την εξέλιξη της βιοτεχνολογίας, υπάρχει η δυνατότητα του πρωτεϊνικού σχεδιασμού (rational protein design) και η κατευθυνόμενη εξέλιξη (directed evolution), τεχνικές τροποποιήσης και βελτιστοποίησης υπαρχουσών ενζύμων αλλά και ανακάλυψης νέων για την αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας, εκλεκτικότητας και σταθερότητας ενώ ξεπερνώνται ταυτόχρονα αυτές οι αμφισβητήσεις.

Η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας έχει ταξινομήσει τα ένζυμα στις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύουν.¹⁵

Κατηγορία ενζύμου	Καταλυόμενη αντίδραση
Οξειδορεδουκτάσες	Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου
Τρανσφεράσες	Μεταφορά λειτουργικών ομάδων μεταξύ μορίων
Υδρολάσες	Υδρόλυση αμιδίων, πεπτιδίων και εστέρων
Λυάσες	Προσθήκη σε διπλό δεσμό και απόσπαση
Ισομεράσες	Ισομερείωση διπλών δεσμών και ρακεμοποιήση
Λιγκάσες	Σχηματισμός δεσμών C-O, C-S, C-N,C-C και P-O
Τρανσλοκάσες	Μεταφορά ιόντων ή μορίων διαμέσου μεμβρανών

Πίνακας 1. Οι κατηγορίες των ενζύμων και οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν

1.2.2 Κετορεδουκτάσες

Οι κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα χαμηλού μοριακού βάρους, ανήκουν στην κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Φυσικός ρόλος τους είναι η αναγωγή καρβόνυλο ομάδων αλδεϋδών και κετονών με την ταυτόχρονη δημιουργία ενός ή περισσότερων στερεογονικών κέντρων από μια προχειρόμορφη καρβόνυλο ένωση. Τα ένζυμα αυτά για να δράσουν απαιτούν την παρουσία ενός ή περισσότερων συμπαραγόντων όπως είναι τα συνένζυμα NADH και NADPH, οι οποίοι συμπεριφέρονται ως ενδιάμεσοι και μεταβατικοί δέκτες ηλεκτρονίων.

$$R^{(i)} R^{(i)} + NAD(P)H \xrightarrow{KRED} OH \\ R^{(i)} R^{(i)} R^{(i)} + NAD(P)^{+} \\ R \text{ or } S$$

Σχήμα 7. Γενική αντίδραση αναγωγής κετονών με κετορεδουκτάση παρουσία συνενζύμου.

1.2.3 Καταλυτικός μηχανισμός

Κατά την ενζυμική αντίδραση αναγωγής, μεταφέρεται το υδρίδιο του πυριδινικου δακτυλίου του συνενζύμου είτε από την si-επιφάνεια είτε από την re-επιφάνεια του προχειρόμορου καρβονυλικού υποστρώματος, σχηματίζοντας αντίστοιχα τις (R)- ή (S)- αλκοόλες. Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα.^{16,17} Το υδρίδιο μπορεί να μεταφερθει από το συνένζυμο στην si-επιφάνεια του καρβονυλικού υποστρώματος και αυτό να είναι το pro-R υδρογόνο (E1) ή το pro-S υδρογόνου (E2) του συνενζύμου. Επίσης, το υδρίδιο μπορεί να μεταφερθεί προς την re-επιφάνεια έιτε και πάλι από το pro-R (E3) είτε το pro-S(E4).



Σχήμα 8. Μεταφορά υδριδίου από το συνένζυμο ΝΑD(Ρ)Η στο καρβονυλικό υπόστρωμα.

Οι περισσότερες απομονωμένες αλκοολικές αφυδρογονάσες ανήκουν στην κατηγορία Ε3 σχηματίζοντας S δευτεροταγείς αλκοόλες, με το υδρίδιο δηλαδή να προσεγγίζει την re επιφάνεια της προς αναγωγή καρβονυλομάδας. Το στερεοχημικό αποτέλεσμα της αναγωγικής αντίδρασης με αλκοολικές αφυδρογονάσες μπορεί να προβλεφθει με ένα απλό μοντέλο, αναφερόμενο σαν ''κανόνας του Prelog''. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό, η αφυδρογονάση μεταφέρει το υδρίδιο από την re-επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης που φέρει μικρό (S) και μεγάλο (L) υποκαταστάτη. Το αποτέλεσμα της αναγωγής με ένα ένζυμο που υπακούει τον κανόνα του Prelog είναι ο σχηματισμός S αλκοόλης. Περιορισμένος αριθμός αφυδρογονασών οδηγούν στον σχηματισμό R αλκοολών, τα λεγόμενα ένζυμα με anti-Prelog εκλεκτικότητα. ¹⁸



Σχήμα 9. Ασύμμετρη αναγωγή κετονών με αλκοολική αφυδρογονάση που υπακούει τον κανόνα του Prelog.

1.2.4 Κετορεδουκτάσες στην ασύμμετρη σύνθεση

Η παραγωγή οπτικά ενεργών ενώσεων είναι μείζονος σημασίας στην φαρμακευτική βιομηχανία. Τα τελευταία χρόνια οι κετορεδουκτάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ασύμμετρη σύνθεση. Απόδειξη αποτελεί η ολοένα και αυξανόμενη χρήση τους στη σύνθεση φυσικων και φαρμακευτικών προϊόντων. Ο σημαντικός ρόλος τους γίνεται φανερός από τις πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές με χρήση αυτών των ενζύμων. Μερικά παραδείγματα εφαρμογής κετορεδουκτασών στην σύνθεση φαρμακευτικών ενώσεων παρουσιάζονται στην συνέχεια.

Η εζετιμίμπη (ezetimibe) 23, είναι η δραστική φαρμακευτική ουσία του φάρμάκου που κυκλοφορεί με τις επωνυμίες Ezetrol, Zetia, Zetriraf, κ.α., ένας υπολιπιδαιμικός παράγοντας στόχος του μεταφορέα των στερολών-NPC1LC1, αναστέλλοντας την απορρόφηση της χοληστερόλης στο λεπτό έντερο. Η εζετιμίμπη έχει προσθετική επίδραση στην ενέργεια των στατινών, κατηγορία σκευασμάτων που μειώνουν την χοληστερόλη ενεργώντας στο ήπαρ. Πρόσφατα, διάφορες ερευνητικές ομάδες κατέδειζαν συνθετικές πορείες όπου σε κάποια εκ αυτών, έγινε χρήση κετορεδουκτασών προερχόμενες από διαφορετικά γένη του Lactobacilus σε διαφορετικά βήματα, με πολύ υψηλά ποσοστό απόδοσης και διαστερεομερικής περίσσειας.¹⁹



Σχήμα 10. Σύνθετικά μονοπάτια για την εζετιμίμπη με χρήση διαφορετικών κετορεδουκτασών.

Η εσλικαρβαζεπίνη (eslicarbazepine) αποτελεί τη δραστική φαρμακευτική ουσία του εστέρα eslicarbazepine acetate και που κυκλοφορεί εμπορικά ως Aptiom, Zebinix. Η ένωση αυτή όσο και οι μεταβολίτες της σταθεροποιούν την αδρανοποιημένη κατάσταση τασοελεγχόμενων διαύλων νατρίου αποτρέποντας την επιστροφή τους στην ενεργοποιημένη κατάσταση και επομένως διατηρώντας επαναλαμβανόμενη νευρωνική πυροδότηση. Έχει φαρμακευτική δράση και χρησιμοποιείται ως αντιεπιληπικό. Στο τελικό στάδιο σύνθεσης της, βρέθηκε πρόσφατα πως μια ειδικά σχεδιασμένη κετορεδουκτάση από το βακτήριο Lactobacillus ανήγαγε το 24 στην δραστική ένωση με μεγάλη οπτική καθαρότητα και σε ποσοστό > 90%.¹⁹⁻²¹



Σχήμα 11. Στερεοεκλεκτική αναγωγή της κέτο ένωσης 24 με κετορεδουκτάση για τον σχηματισμό της οπτικά ενεργής αλκοόλης 25, δραστικού συστατικού του eslicarbazepine acetate.

Η δευδροεπιανδροστερόνη ή ανδροστενολόνη (DHEA) είναι μια ασθενής στεροειδής ορμόνη και παράγεται κυρίως στον φλοιό των επινεφριδίων ενώ δρα ως μεταβολικό ενδιάμεσο στην σύνθεση των ανδρογόνων και οιστρογόνων αλλά και ως νευροδιαβιβαστής. Χορηγείται είτε ελεύθερο στο σκευασμα πραστερόνης είτε ως πρόδρομο στην σύνθεση της αβιρατερόνης για την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη. Στο καθοριστικό στάδιο πραγματοποιείται η ενζυμική αναγωγή της ένωσης 26 με απομονωμένες κετορεδουκτάσες προς το προϊόν 27 μεγάλης οπτικής καθαρότητας (de >99%, ee >99%) και πρόδρομη ένωση της 28.^{22,23}





(S)-N-Boc-3-Υδρόξυ-πιπεριδίνη είναι ένα σημαντικό χειρόμορφο ενδιάμεσο για την σύνθεση του αντικαρκινικού φαρμάκου Ibrutinib (Imbruvica).Η ιβρουτινίμπη δρα αναστέλλοντας την κινάση της τυροσίνης του Bruton (Btk) που εντοπίζεται στα Β-λεμφοκύτταρα. Η αναστολή της δράσης της Btk μειώνεται η επιβίωση και η μετανάστευση των Β λεμφοκυττάρων, επιβραδύνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο το καρκίνο CLL. Για την ασύμμετρη σύνθεση της έχουν διαμορφωθεί αρκετά συνθετικά μονοπάτια ωστόσο η χημειοενζυμική σύνθεση της από διάφορες ερευνητικές ομάδες με μεγάλο



αριθμό κετορεδουκτασών, αυξάνει το ποσοστό της απόδοσης της και με υψηλή ενατιοεκλεκτικότητα (>99% ee). ^{24,25}

Σχήμα 13. Στερεοεκλεκτική αναγωγή της κετόνης **29** με απομονωμένες κετορεδουκτάσες για την σύνθεση της φαρμακευτικής ένωσης **32**.

Η αταζαναβίρη είναι ένας αναστολέας της πρωτεάσης (PI) του αζαπεπτιδίου του HIV-1. Μια χημειοενζυμική μέθοδος αναπτύχθηκε για τη σύνθεση του (1S,2R)-3-χλωρο-2-υδροζυ-1-τολουολο-προπυλ καρβαμικού οξέος αφού έγινε δοκιμή τόσο με ολόκληρα κύτταρα αλλά και με απομονωμένες κετορεδουκτάσες με >99% ee και 98% de. Το ενδιάμεσο 34 που προκύπτει από την ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή του 33 είναι σημαντικό για την τελική σύνθεση της αταζαναβίρης 37.²⁶⁻²⁸



Σχήμα 14. Διαστερεοεκλεκτική αναγωγή της κετόνης 33 προς την φαρμακευτική ένωση 37

Η ντουλοξετίνη είναι ένα αντικαταθληπτικό φάρμακο και ουσιαστικα αποτελεί έναν αναστολέα της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και της νορεπινεφρίνης και ασθενέστερα την πρόσληψη της ντοπαμίνης. Το (S)-DTHP αποτελεί μια σημαντική πρόδρομη ένωση για την σύνθεση της ντουλοξετίνης και έχει βρεθεί πως στο καθοριστικό στάδιο πραγματοποιείται μια ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή με υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα και απόδοση (>99% ee). Δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με μεγάλη ποικιλία κετορεδουκτασών, ωστόσο τα καλυτερα αποτελέσματα έδωσε μια ανασυνδυασμένη κετορεδουκτάση που προερχόταν από τον μικροοργανισμό *Candida macedoniensis* AKU 4588.^{19,29,30}



Σχήμα 15. Χημειοενζυμική σύνθεση της ντουλοξετίνης 41 με χρήση κετορεδουκτασών.

1.2.5 Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οργανικών ενώσεων βασίζεται ολοένα και περισσότερο σε απλές και αξιόπιστες μεθόδους. Αυτές περιλαμβάνουν: (i) συσχέτιση των άγνωστων νέων ενώσεων με προυπάρχουσες με γνωστή απόλυτη στερεοδομή και σύγκριση των με πολαριμετρικές μεθόδους, (ii) προσεγγίσεις βασισμένες στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, κυκλικού διγρωισμού ń διαθλασιμετρίας, και (iii) εμπειρικές τεχνικές που βασίζονται στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Μεταξύ των τεχνικών που βασίζονται στη φασματοσκοπία NMR, πιο συχνά χρησιμοποιείται εκείνη με την σύνθεση Μ(Τ)ΡΑ εστέρων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων στο φάσμα ¹Η και ¹⁹F NMR των δυο διαστερεομερών εστέρων οι οποίοι προκύπτουν με παραγοντοποίηση της αλκοόλης με τα δυο εναντισμερή του χειρόμορφου αντιδραστηρίου ανισοτροπίας επιλογής.^{31,32}

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα διαμόρφωσης για διάφορα χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας που να εξηγούν τα φάσματα ¹H NMR και ¹⁹F NMR και να προβλέπουν την απόλυτη στερεοχημεία των ενώσεων. Στη παρούσα εργασία έγινε χρήση των α-μεθοξυ φαινυλοξικών οξέων (MPA) και α-μεθοξυ-α- τριφθορομεθυλο φαινυλοξικών οξέων (MTPA) για την εύρεση της απόλυτης στερεοδομής των συντεθειμένων δευτεροταγών αλκοολών.³³

Το μοντέλο διαμόρφωσης που προτείνεται για το καθένα από τα αντιδραστήρια αυτά φαίνεται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 16. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (*R*)-MPA ή (*S*)-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.

Αρχικά στην περίπτωση των (MPA) εστέρων, η διαμόρφωση που προτείνεται είναι εκείνη που περιλαμβάνει το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και τη μεθόζυ ομάδα στο ίδιο επίπεδο, με τους υποκαταστάτες R1, R2 της αλκοόλης να έχουν απέναντι τους ένα φαινύλιο είτε ένα υδρογόνο και να προστατεύονται ή να αποπροστατευονται αντίστοιχα. Ομάδες εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο όπως συμβαίνει εδώ με την ομάδα R₂ στον S-MPA εστέρα, θα προστατεύονται και θα μετατοπίζονται σε υψηλότερα πεδία σε φάσμα ¹H NMR σε σχέση με τον *R*-MPA εστέρα. Έτσι η διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα ¹H NMR μεταξύ του *R*-MPA και του S-MPA εστέρα να είναι θετική. Το αντίθετο θα συμβαίνει στην περίπτωση της R₁ ομάδας του *R*-MPA εστέρα και η διαφορά θα είναι εφικτός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των δευτεροταγών αλκοολών.



Σχήμα 17. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (*R*)-ΜΤΡΑ ή (*S*)-ΜΤΡΑ εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.

Στην περίπτωση των MPTA- εστέρων ισχύουν ακριβώς τα παραπάνω όπως περιγράφηκαν με την διαφορά μόλις ότι αλλάζει η ιεραρχία κατά Cahn-Ingold-Prelog των υποκαταστατών. Ένα άλλο σημείο που πρέπει να αναφερθεί είναι πως στους MPTA- εστέρες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η φασματοσκοπία ¹⁹F NMR για τον προσδιορισμό των ποσοστών των διαστερεομερών που λαμβάνονται έπειτα από την παραγοντοποίηση.

1.3 ΦΘΟΡΙΩΜΕΝΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

1.3.1 Ιδιότητες φθοριωμένων ενώσεων

Για την ανακάλυψη νέων ενώσεων, σημαντική αφετηρία είναι η συσχέτιση με υπάρχουσες ενώσεις, η αξιοποίηση φυσικών προϊόντων, η μελέτη του μεταβολισμού γνωστών φαρμακευτικών ενώσεων, ο ορθολογικός σχεδιασμός τους καθώς και άλλα. Λαμβάνοντας υπόψη την δομή γνωστών ενώσεων, πραγματοποιούνται διάφορες μετατροπές με στόχο την βελτίωση των ιδιοτήτων του μορίου όπως η μεταβολική του σταθερότητα και η βιοδιαθεσιμότητα. Μεταξύ άλλων με την βιοϊσοστερή υποκατάσταση είναι δυνατή η αντικατάσταση ομάδων στην φαρμακοφόρο δομή από άλλες που θα προκαλέσουν ανάλογη ή και ενισχυμένη βιολογική δράση. Επιπλέον η προσθήκη νέων υποκαταστατών που συμμετέχουν στην φαρμακοφόρο δομή, οδηγεί σε αλλαγές στις στερεοηλεκτρονιακές ιδιότητες του μορίου, ενώ η αύξηση στον αριθμό ατόμων ανθρακικής αλυσίδας οδηγεί συνήθως σε αυξημένη εκλεκτικότητα.³⁴

Ιδιαίτερη θέση κατέχει το φθόριο ως βιοϊσοστέρας του υδρογόνου, ένα μικρό άτομο παραπλήσιου μεγέθους με το υδρογόνο ενώ το μήκος δεσμών C-F (~1.35Å) είναι εντός των αποδεκτών ορίων των αντίστοιχων δεσμών C-H (1.09Å). Ο δεσμός C-F είναι ισχυρά πολωμένος (1,85D), που προκύπτει από την σταθεροποίηση λόγω υπερσυζυγιακού φαινομένου του σ* αντιδεσμικού τρογιακού του φθορίου. Επιπλέον, είναι χημικά αδρανής υπό τις περισσότερες βιολογικές συνθήκες ενώ ακόμη ισχυροποιεί και τους γειτνιάζοντες δεσμούς C-O και C-C όχι όμως και τον C-H. Ωστόσο πρεπει να ειπωθεί πως υπάρχουν ακόμη περισσότερες τροποποιήσεις στις φυσικογημικές ιδιότητες των ενώσεων που επηρεάζουν την φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά τους. Έτσι αυξάνεται η λιποφιλία της ένωσης και παθητική συνεπώς μεγαλύτερη διέλευση μέσω βιομεμβρανών και αποτελεσματικότερη υδρόφοβη σύνδεση σε υποδοχείς. Επιπλέον φαίνεται να επηρεάζει την οξύτητα των ενώσεων αυξάνοντας την και έτσι αυξάνει σημαντικά η βιοδιαθεσιμότητα τους. 35

Η πολωσιμότητα του δεσμού C-F επηρεάζει σημαντικά την επιφάνεια από την οποία θα προσβληθεί ένας δεσμός C=O ή ένας δεσμός C=C δίπλα από εκείνον που φέρει το άτομο φθορίου. Πιο συγκεκριμένα από θεωρητικές μελέτες και πειράματα βρέθηκε πως η προσβολή από μια πυρηνόφιλη ομάδα όπως η CN⁻ και το H⁻ γινόταν με προσανατολισμό *anti* και όχι *gauche* ως προς το καρβονύλιο και συνεπώς απέδιδε τα *anti* διαστερεομερή (antiperiplanar δίπολα).^{36,37}



Σχήμα 18. Πυρηνόφιλη προσβολή α-φθορο καρβονυλικών ενώσεων όπισθεν του ατόμου του φθορίου.

Ακόμη καταγράφηκαν και τάσεις στην προτίμηση trans (=anti), έναντι cis (=syn) προσβολής σε καρβόνυλο παράγωγα που οφείλεται στην εξασθένιση των δυνάμεων διπόλου. ³⁸



Х	Preference for trans
	(kcal/mol)
NH ₂	7.5
OCH ₃	4.5
CH ₃	2.2
Н	1.68

Σχήμα 19. Υπολογισμένες προτιμήσεις των διαμορφωμερών των α-φθορο-καρβονυλικών ενώσεων

Παλαιότερα, η εισαγωγή φθορίου σε οργανικές ενώσεις δεν ήταν και τόσο διαδεδομένη καθώς δεν ήταν και τόσο γνωστές οι ιδίοτητες που προσδίδουν ένω υπήρξε μεγάλη παρανόηση λόγω της επικινδυνότητας του ατόμου φθορίου . Σήμερα όμως ένα ποσοστό της τάξης του 20% όλων των φαρμακευτικών σκευασμάτων περιέχουν ένα τουλάχιστον άτομο φθορίου. Από αυτό το γεγονός ευνοήτο είναι πως υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την χημεία φθορίου. Παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις καπεσιταβίνη(ανάλογο της φθοριουρακίλης), η βορικοναζόλη και η φθοροΰδροκορτιζόνη φαρμακευτικά σκευάσματα για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού και παχέος εντέρου, αντιμυκητιακό και ένα αλατοκορτικοειδές αντίστοιχα.³⁹ Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως υπάρχει ένα γενικότερο ενδιαφέρον για τις υποψήφιες φθοριωμένες φαρμακευτικές ενώσεις καθώς επισημασμένες με ¹⁸F ενώσεις που συγκεντρώνονται επιλεκτικά από κάποιο ιστό ή όργανο, μπορούν να ανιχνευτούν με χρήση της τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίου (PET) για την έγκαιρη διάγνωση μιας ασθένειας ή κακοήθειας.⁴⁰



Σχήμα 20. Παραδείγματα φαρμακευτικών σκευασμάτων που περιέχουν φθόριο.

1.3.2 Μηχανισμός ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Για την φθορίωση οργανικών ενώσεων, έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές οι οποίες παλαιότερα περιλάμβαναν τοξικά αντιδραστήρια μεταξύ άλλων τα F_2 , Xe F_2 , O=NF, ClO₄F, HSO₃F, DAST που τείνουν πλέον να αντικατασταθούν από πιο φιλικά για το περιβάλλον αντιδραστήρια όπως εκείνα της οικογένειας F-TEDA-X. Στην συγκεκριμένη εργασία, έγινε χρήση του αντιδραστηρίου Selectfluor (F-TEDA-BF₄). Το αντιδραστήριο αυτό είναι ένα σταθερό μη υγροσκοπικό κρυσταλλικό στερεό και

σχετικά μη βλαβερό. Έχει βρεθεί πως χρησιμοποιείται για φθορίωση καρβονυλικών ενώσεων και δικαρβονυλικών παραγώγων, αρωματικών ενώσεων, αλκενίων, ινδολίων ενώ βοηθά στην οξειδωτική φωσφορυλίωση όπως και ως οξειδωτικό μέσο για αρωματικές αλκοόλες, για ιωδίωση άρυλο ενώσεων αλλά και για την αποπροστασία αλκοολών.^{40,41}



Σχήμα 21. Selectfluor, 1-χλωρομεθυλ-4-φθορο-1,4-διαζονιαδικυκλο [2.2.2 οκτάνιο] διςτετραφθοροβορίδιο.

Όσον αφορά στον μηχανισμό της φθορίωσης έχει βρεθεί από μηχανιστικές και θεωρητικές μελέτες πως το Selectfluor μπορεί να δώσει το άτομο φθορίου είτε μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου με το φθόριο υπό την μορφή ρίζας F είτε μέσω S_N2 υποκατάστασης, ωστόσο δεν έχει διερευνηθεί ενδελεχώς και με ακρίβεια σε κάθε περίπτωση πως συμπεριφέρεται το συγκεκριμένο φθοριωτικό μέσο.^{42,43} Ένα παράδειγμα που απεικονίζει μηχανιστικά τις δυο προσεγγίσεις φθορίωσης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα **22**.



Σχήμα 22. Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την φθορίωση (a) μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου, (b) μέσω $S_N 2$ υποκατάστασης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. ΣΤΕΡΕΟΕΚΛΕΚΤΙΚΕΣ ΑΝΑΓΩΓΕΣ α-ΦΘΟΡΟ-β-ΚΕΤΟ ΕΣΤΕΡΩΝ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΝΑDPH-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

Λόγω της σπουδαιότητας των ιδιοτήτων που προσδίδει η προσθήκη ατόμων φθορίου στις ενώσεις, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί η έκταση αυτών. Έτσι σημαντική θα ήταν και η διερεύνηση της συμβολής τους στην σύνθεση νέων ενώσεων που δρούν ως υποστρώματα ενζυμικών αναγωγών. Τα υποστρώματα αυτά είναι καρβονυλικά παράγωγα, χειρόμορφα ενδάμεσα υψηλής προστιθέμενης αξίας και μπορούν να υπάρξουν ως ενδιάμεσα για την σύνθεση πολυάριθμων ενώσεων με υψηλή βιολογική δραστικότητα και φαρμακευτικών προϊόντων.^{44,45}

Ένα σημαντικό παράδειγμα εφαρμογής αναφέρεται από την ερευνητική ομάδα των Villinger και Langer στην σύνθεση δικυκλικών συστημάτων από συμπύκνωση 2φθορο-1,3-δισιλυλοξυ 1,3-διενίων με μια κυανο υποκατεστημένη 1-βενζοπυραν-4όνη μηχανιστικά μέσω μιας αντίδρασης τύπου αλδολικής και μιας τύπου προσθήκης νιτριλίου.⁴⁶



Σχήμα 23. Σύνθεση δικυκλικών συστημάτων με αφετηρία τον α- φθορο-β-κετο εστέρα 49.

Ένα ακόμη παράδειγμα παρουσιάστηκε από την ερευνητική ομάδα των Han και Lu, για την διαστερεοεκλεκτική και εναντιοεκλεκτική προσθήκη κατά Michael σε αφθορο-β-κετοεστέρες προς νιτροολεφίνες, οι οποίες έπειτα μπορούν να αποδώσουν χειρόμορφες πυρρολιδίνες και λακτάμες.⁴⁷



Σχήμα 24. Μετατροπή του ενδιάμεσου προϊόντος **50** από προσθήκη Michael σε ενώσεις ενδιαφέροντος.

Τελευταίο παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση 3-υδροξυ ινδολίων μέσω της αλδολικής συμπύκνωσης μεταξύ μονο- και δι- φθοριωμένων β-κετοοξέων και απροστάτευτων ισατινών από την ερευνητική ομάδα των Li και Deng.⁴⁸



Σχήμα 25. Στερεοεκλεκτική συμπύκνωση για την σύνθεση οπτικά καθαρών μονοφθορο-3-υδροξυ ινδολίων.

2.1 Στόχος της παρούσας εργασίας

Η εφαρμογή της βιοκαταλυτικής αναγωγής χρησιμοποιώντας κετορεδουκτάσες για την στερεοεκλεκτική σύνθεση β-υδρόξυ-α-φθόρο εστέρων, δεν είχε αναφερθεί στο παρελθόν στην βιβλιογραφία όταν άρχισε η παρούσα ερευνητική εργασία. Πρόσφατα, δημοσιεύτηκε μια σχετική εργασία (Μάΐος 2019)⁴⁹ από την ομάδα του Thomas Green και των συνεργατών του. Στην συγκεκριμένη δημοσίευση, παρουσιάστηκαν οι στερεοεκλεκτικές αναγωγές α-φθορο-β-κετο εστέρων αντίστοιχων με της παρούσας εργασίας, με κετορεδουκτάσες εξαρτημένες από NADH και NADPH με θετικά αποτελέσματα.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια της ομάδας μας στην οποία περιγράφεται η χημειοενζυμική σύνθεση α-φθορο-β-υδροζυ εστέρων. Πιο συγκεκριμένα, τα υποστρώματα που μελετήθηκαν σε αυτού του τύπου την αντίδραση είναι οι α-φθόρο-β-κέτο εστέρες τύπου **56**.



- Αρχικά γίνεται η σύνθεση α-φθόρο-β-κέτο εστέρων από απλούς κέτο εστέρες
- Ακολουθεί η χημική αναγωγή του φθόρο εστέρα για την απόκτηση του ρακεμικού υδρόζυ φθόρο εστέρα που θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης από αέριο χρωματογράφο ή και με παραγοντοποίηση με χρήση M(T)PA εστέρων.
- Επόμενος στόχος είναι η εκλεκτική αναγωγή των α-φθόρο-β-κέτο εστέρων με μια σειρά NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών για να μελετηθεί η ικανότητα των ενζύμων να ανάγουν τέτοια υποστρώματα καθώς και η ενάντιο- και διαστερεοεκλεκτικότητα της ενζυμικά καταλυόμενης αναγωγής.

Η σύνθεση αυτών των υποστρωμάτων έχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς τα προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής αποτελούν υψηλής προστιθέμενης αξίας ενδιάμεσα για την σύνθεση αρκετών νέων ενώσεων με φαρμακευτικό κυρίως ενδιαφέρον.

2.2 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων

Σε πρώτη φάση, στόχος ήταν η σύνθεση των α-φθορο-β-κετο εστέρων. Επειδή η εργασία αυτή υπήρξε ένα πρώτο εγχείρημα από την ομάδα μας ως αφετηρία επιλέχθηκε μια πρότυπη ένωση και η αναγωγή της προς την ρακεμική μορφή του αφθορο-β-υδροξυ εστέρα για διερεύνηση κι έπειτα έγινε σχεδιασμός ενώσεων ενδιαφέροντος.

\succ <u>1° MEPO</u>

Η ένωση που επιλέχθηκε ήταν ο **2-φθορο-3-οξοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας.** Η στερεοεκλεκτική αναγωγή σε μεγάλη κλίμακα έχει πραγματοποιηθεί στο παρελθόν με χρήση αφυδρογονάσης με 85% διαστερεοκλεκτικότητα και >98%εναντιοεκλεκτικότητα.^{50,51}

Αρχικά, παρασκευάστηκε ο αντίστοιχος β-υδροξυ α-φθορο εστέρας με απλή χημική αναγωγή για να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την παρακολούθηση της αντίδρασης.



Σχήμα 26. Χημική αναγωγή της ένωσης **57** για την σύνθεση του του 2-φθορο-3-υδροξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα **58** ως προτύπου.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές του α-φθορο-β-κετο εστέρα με την χρήση διαφορετικών NADPH–εξαρτώμενων κετορεδουκτασών προκειμένου να προκύψουν οι οπτικά ενεργοί α-φθορο-β-υδροξυ εστέρες. Η σχετική στερεοδομή καθώς και ο διαστερεομερικός λόγος του προϊόντος της χημικής αναγωγής προσδιορίστηκαν με βάση τα φάσματα ¹Η και ¹⁹F NMR και ήταν σε συμφωνία με την βιβλιογραφία. Στην περίπτωση των φθόρο υποκατεστημένων ενώσεων, σε φάσματα ¹Η NMR, οι κορυφές του καρβινολικού πρωτονίου καθώς και του πρωτονίου σε αθέση ως προς το καρβονύλιο για τα syn διαστερεομερή θα βρίσκονται σε περιοχές υψηλού πεδίου έναντι των αντίστοιχων anti διαστερεομερών, ενώ υπολογίστηκαν αντίστοιχες σταθερές συζέυξεων 3,3 Ηz για τα syn και ~4Hz για τα anti λόγω της σχάσης του ατόμου του F με τα γειτονικά του πρωτόνια.⁵⁰ To άτομο φθορίου θα σχάζεται από τα γειτονικά του πρωτόνια καθώς έχουν το ίδιο spin (1/2). Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί πως στα φάσματα ¹⁹F οι αντίστοιχες σταθερές σύζευξης όπως υπολογίστηκαν λόγω της απόστασης τριών δεσμών ¹⁹F-¹Η για τα syn διαστερεομερή είναι 22,1Hz ενώ για τα anti διαστερεομερή 18Hz.


Σχήμα 27.Το καρβινολικό υδρογόνο και το υδρογόνο σε α-θέση ως προς το καρβονίλιο των syn διαστερεομερών εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με τα αντίστοιχα των anti διαστερεομερών.

Πιο συγκεκριμένα, για το υπόστρωμα αυτό, η κορυφή του καρβινολικού πρωτονίου για τα syn διαστερεομερή συμπλέκεται με εκείνη των anti διαστερεομερών και εμφανίζεται ως μια πολλαπλή στα 4,25-4,33 ppm. Ωστόσο, η διπλή της διπλής κορυφή του πρωτονίου σε α-θέση στα 4,65 ppm αντιστοιχεί στα syn διαστερεομερή ενώ εκείνη στα 4,83 ppm αντιστοιχεί στα anti διαστερεομερή.

Ο διαχωρισμός των τεσσάρων παραγόμενων στερεοϊσομερών δεν ήταν εφικτός με αέριο χρωματογράφο με χρήση χειρόμορφης τριχοειδούς κολώνας αλλά ούτε και με υγρή χρωματογραφία κι έτσι απαιτήθηκε η παραγοντοποιήση τους προς MPA/MTPA εστέρες και η μελέτη τους τόσο με χρήση φασματοσκοπίας ¹H όσο και με ¹⁹F NMR. Η λήψη φασμάτων ¹⁹F NMR σε αυτή τη περίπτωση απεδείχθη ιδιαίτερα χρήσιμη καθώς ήταν δυνατή η ποσοτικοποίηση και ο διαχωρισμός των εναντιομερών ενώ τα αποτελέσματα συμφωνουσαν με το διαστερεομερικό λόγο που είχε προσδιοριστεί από φάσμα ¹H NMR, ενώ τα δεδομένα συμφωνούσαν και βιβλιογραφικά.

Σε ένα επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος σταθερότητας του υποστρώματος στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 37 °C και pH 6.9 για 24 ώρες). Το υπόστρωμα αυτό δεν ήταν σταθερό όπως παρατηρήθηκε κατά την παρακολούθηση περιοδικών δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία και ¹Η NMR φασμάτων. Σε πρόσφατη δημοσίευση,⁴⁹ προτάθηκε για το συγκεκριμένο υπόστρωμα 57 ότι είναι πιθανή η υδρόλυση και αποκαρβοξυλίωση του εστέρα (όπως φαίνεται στο σχήμα 29) κατά την παραμονή του στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης χωρίς όμως επαρκείς ενδείξεις.



Σχήμα 28. Πιθανά προϊόντα του υποστρώματος 57 στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης.49

Έπειτα, μελετήθηκε η δραστικότητα των ενζύμων στην αναγωγή του υποστρώματος 57 αλλά και ο ελάχιστος χρόνος στον οποίο αποδίδεται το προϊόν της αναγωγής. Έτσι πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές του α-φθορο-β-κετο εστέρα με διαφορετικές κετορεδουκτάσες ενώ δοκιμάστηκε και η NADPH-εξαρτώμενη αλκοολική αφυδρογονάση RasADH του στελέχους Ralstonia sp. DSM 6428 εκφρασμένη σε κύτταρα E.coli. Συνολικά δοκιμάστηκαν 10 κετορεδουκτάσες-Καθώς δεν ήταν εφικτός ο διαγωρισμός των τεσσάρων αφυδρογονάσες. με κάποια χρωματογραφική μέθοδο, προχωρήσαμε στερεοϊσομερών στον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής του προϊόντος αναγωγής λαμβάνοντας υπόψιν την εκάστοτε σχετική στερεοδομή των προϊόντων αναγωγής του υποστρώματος από τις αντίστοιχες κετορεδουκτάσες. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε η παραγοντοποίηση των προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών με το γειρόμορφο αντιδραστήριο (R)/(S)- μεθόξυ φαινυλο οξικό οξύ (MPA) για την παραγωγή των αντίστοιχων MPA εστέρων και έγινε σύγκριση των μετατοπίσεων με χρήση τόσο των φασμάτων ¹H NMR όσο και ¹⁹F NMR, και τέλος επιβεβαιώθηκαν με την υπάργουσα βιβλιογραφία. Τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών παρουσιάζονται στον παρακάτω συνοπτικό πίνακα 1.



Σχήμα 29. Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές του 2-φθορο-3-οξοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα 57

	Ποσοστό	Δι	αστερεομερικ	κή αναλογίο	a%	Στερεοεκλεκτικότητα	
KRED	μετατροπής	syn		ar	nti		
	(24h)	(2S, 3R)	(2R, 3S)	(2S, 3S)	(2R, 3R)	de %	ee %
112	>99	-	91,5	8,5	-	83	>99
114	>99	-	-	-	-	21.9	-
118	>99	-	12.8	87.2	-	74.4	>99
121	>99	-	-	-	-	25.7	-
123	>99	-	-	-	-	3.8	-
130	>99	-	11.7	88.3	-	76.6	>99
131*	>99	-	11.8	5.8	82.3	76.3	86.8
A1D	>99	-	13.9	83.9	2.2	72.2	94.8
B1F	>99	2.1	3.2	75.4	19.3	89.4	59.2
RasADH	73.3	3.4	31.4	44.3	20.9	30.4	43.9

Πίνακας 1. Αποτελέσματα βιοαναγωγών του α-φθορο-β-κετο εστέρα 57

*Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 15 λεπτά με το ποσοστό μετατροπής να παραμένει ίδιο και έπειτα από 24 ώρες. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση της αέριας χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας ¹Η και ¹⁹F NMR.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται πως όλα τα ένζυμα εμφανίζουν εξαιρετική δραστικότητα με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα. Παρατηρείται επίσης μια τάση να αποδίδουν εκλεκτικά τα anti διαστερεομερή. Από τις κετορεδουκτάσες αυτές οι kreds 118,130, A1D και B1F κατέλυσαν την αναγωγή με προτίμηση στα anti προϊόντα (>72% de), ενώ μόνο η κετορεδουκτάση 112 έδωσε σε μεγάλο ποσοστό τα syn προϊόντα (83% de). Ειδικότερα, η KRED 112 έδωσε τον υδρόξυ εστέρα (2R, 3S)-63 με 91,5% ποσοστό μετατροπής και με εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99% ee). Με τις kreds 118, 130 και A1D σχηματίστηκε ο υδρόξυ εστέρας (2S,3S)-66 με αρκετά ικανοποιητική διαστερεοεκλεκτικότητα και εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα, η kred 131 έδωσε σε μεγαλύτερο βαθμό τον (2R,3R)-65 με αρκετά καλά ποσοστά εναντιομερικής και διαστερεομερικής περίσσειας ενώ καμία kred δεν έδωσε σε ικανοποιητικο βαθμό το (2S,3R)-64. Τέλος, η RasADH δεν υπήρξε και τόσο δραστική συγκριτικά με τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν και πιο συγκεκριμένα με ποσοστό μετατροπής 73,3% και αρκετά χαμηλότερα ποσοστά εναντιομερικής και διαστερεομερικής περίσσειας (43.9% de και 30,4% ee). Τα αποτελέσματα εξήλθαν αρχικά με σύγκριση των ¹Η NMR φασμάτων στην περιοχή όπου εντοπίζονται οι κορυφές του καρβινολικού πρωτονίου και του πρωτονίου σε α-θέση ως προς το καρβονύλιο για τα προϊόντα της χημικής αναγωγής με τα αντίστοιχα προϊόντα των ενζυμικών αναγωγών όπου βρέθηκε η σχετική στερεοδομή τους (σχήμα **30**). Η παραπάνω παραδοχή επιβεβαιώθηκε με το χρωματογράφημα, ενώ και από την σύγκριση των ¹⁹F NMR φασμάτων προσδιορίστηκε η διαστερεοεκλεκτικότητα των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων σε πλήρη συμφωνία με τα ¹Η NMR φάσματα.



Σχήμα 30. Συγκριτικό φάσμα ¹Η NMR των κορυφών του ρακεμικού μείγματος και των προϊόντων με χρήση των κετορεδουκτασών 112 και B1F

Έπειτα, όπως προαναφέρθηκε μέσω των MPA –εστέρων του προϊόντος της χημικής αναγωγής κι εκείνων των ενζυμικών αναγωγών, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των εναντιομερών και η ταυτοποίηση και των τεσσάρων στεροϊσομερών με βάση τις χημικές μετατοπίσεις τους ώς προς το άτομο φθορίου. Ειδικότερα όπως φαίνεται στο σχήμα **31**, τα syn διαστερεομερή προστατεύονται και θα μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία έναντι των anti ενώ για τους (S)-MPA εστέρες, τα (2S,<u>3S</u>) και (2R,<u>3S</u>) διαστερεομερή μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία καθώς προστατεύονται έναντι των (2R,<u>3R</u>) και (2S,<u>3R</u>) διαστερεομερών.



Σχήμα 31. Φάσμα ¹⁹F NMR όπου απεικονίζονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές των στερεοϊσομερών προϊόντων αναγωγής του κέτο εστέρα **57** με κετορεδουκτάσες.

<u>2° ΜΕΡΟΣ</u>

Σε επόμενο βήμα, έγινε η επιλογή εννέα υποστρωμάτων για την εκτενέστερη διερεύνηση της δραστικότητας των κετορεδουκτασών σε υποστρώματα με δομικές διαφοροποιήσεις. Έτσι συντέθηκαν τα υποστρώματα 67-75 της μορφής *p*-άρυλο αφθορο-β-κετο εστέρων. Στους κετο εστέρες αυτούς μεταβάλλεται το είδος της εστερικής ομάδας (Me, Et, tBu) και το είδος της para υποκατάστασης στο αρωματικό σύστημα (-H, -OMe, -F). Τα υποστρώματα που συντέθηκαν φαίνονται στο σχήμα 32.



Σχήμα 32. para-άρυλο υποκατεστημένοι α-φθόρο-β-κέτο εστέρες που συντέθηκαν.

• Σύνθεση υποστρωμάτων

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε, αποτελούνταν από 3 στάδια: α) μια αλδολική συμπύκνωση μεταξύ μιας σειράς εστέρων και μιας σειράς υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών, ακολουθούμενη από β) μια οξείδωση και γ) μια φθορίωση (σχήμα **33**).

Για την σύνθεση των αρωματικών κέτο εστέρων αρχικά δοκιμάστηκε η οξείδωση των προϊόντων της αλδολικής συμπύκνωσης με το αντιδραστήριο Dess-Martin σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο και σε αδρανή ατμόσφαιρα. Ωστόσο, η απόδοση της αντίδρασης δεν ήταν και τόσο ικανοποιητική (45-50%), η αντίδραση ήταν χρονοβόρα ενώ και η διαδικασία παρασκευής του συγκεκριμένου οξειδωτικού μέσου ήταν ιδιαίτερα δύσκολη και δαπανηρή και συνεπώς η τεχνική αυτή εγκαταλήφθηκε.

Στην συνέχεια αφού έγιναν δοκιμές και με άλλα οξειδωτικά αντιδραστήρια επιλέχθηκε το PCC σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο και σε αδρανή ατμόσφαιρα ως οξειδωτικό μέσο. Η αντίδραση είχε ικανοποιητική απόδοση (65-70%) και ευκολότερη απομόνωση του οξειδωμένου προϊόντος.

Επόμενο βήμα μετά από την σύνθεση των υποκατεστημένων αρωματικών κέτο εστέρων, ήταν η ηλεκτρονιόφιλη φθορίωση με το F-TEDA-BF4. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την φθορίωση των οξειδωμένων υποστρωμάτων ήταν αρκετά ενθαρρυντικά καθώς η απόδοση προσέγγιζε το 90%. Ένα δεύτερο σημαντικό χαρακτηριστικό ήταν πως το προϊόν της εκάστοτε φθορίωσης ήταν αρκετά σταθερό και υψηλής καθαρότητας σε βαθμό που δεν χρειάστηκε κάποια τεχνική καθαρισμού.





Χημική αναγωγή

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν οι β-υδρόξυ α- φθόρο εστέρες με απλή χημική αναγωγή ώστε να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για την παρακολούθηση των ενζυμικών αντίδρασεων. Η διαστερεοεκλεκτικότητα (σχήμα 34) της αντίδρασης προσδιορίστηκε με χρήση αέριου χρωματογράφου εφοδιασμένου με χειρόμορφη στήλη και έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα που προκύπτουν από τα φάσματα ¹Η και ¹⁹F NMR.



Σχήμα 34. Χημική αναγωγή των α-φθορο-β-κετο εστέρων 67-75 για την σύνθεση των αντίστοιχων α-φθορο-β-υδροξυ εστέρων

Από τα ¹Η NMR φάσματα των υποστρωμάτων μεθυλο εστέρων βρέθηκαν οι πολλαπλές κορυφές των καρβινολικών πρωτονίων και των πρωτονίων σε α-θέση που θεωρούνται διπλές των διπλών καθώς υφίστανται σχάση και από το άτομο φθορίου που βρίσκεται σε θέση α. Τα *anti* και *syn* διαστερεομερή προσδιορίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν από την χαρακτηριστική σύζευξη λόγω της απόστασης τριών

δεσμών ¹H - ¹H 5 και ~3,5-3,9 Hz αντίστοιχα, ενώ η αντίστοιχη σχάση λόγω της απόστασης τριων δεσμών ¹H - ¹⁹F ήταν 16-18Hz και 20,5-23Hz.

Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών για το καρβινολικό πρωτόνιο (H_b) και για το πρωτόνιο που βρίσκεται σε α-θέση ως προς το καρβονύλιο (H_a) για τα *anti* και syn διαστερεομερή όλων των *p*-άρυλο α-φθορο-β-υδρόξυ εστέρων έπειτα από την χημική αναγωγή παρουσιάζονται στον παρακάτω συνοπτικό πίνακα **2**.



Πίνακας 2. Χαρακτηριστικές μετατοπίσεις ¹Η NMR στα προϊόντα βιοαναγωγής του α-φθορο-β-κετο εστέρα **57**

	Χημικές μετατοπίσεις (ppm)						
Υπόστρωμα	H	Ia	H _b				
	syn	anti	syn	anti			
67	5.04	5.07	5.12	5.13			
68	4.97	5.01	5.07	5.09			
69	4.99	5.02	5.09	5.14			
70	5.02	5.05	5.14	5.13			
71	4.97	5.01	5.08	5.09			
72	4.97	5.01	5.12	5.12			
73	4.81	4.96	5.10	5.11			
74	4.87 4.93		5.03	5.04			
75	4.86	4.93	5.02	5.10			



Σχήμα 35. Αντιστοίχιση κορυφών στο ¹Η NMR στα *anti* και *syn* διαστερεομερή της ένωσης **67iii** για το καρβινολικό πρωτόνιο και το πρωτόνιο σε α-θέση

Ομοίως, και για τα υπόλοιπα υποστρώματα έγινε η αντιστοίχιση των κορυφών για τα *anti* και *syn* διαστερεομερή με την ίδια μέθοδο, οι μετατοπίσεις φαίνονται στον πίνακα **2** και τα αναλυτικά φάσματα παρουσιάζονται στο παράρτημα.

• Ενζυμικές αναγωγές

Ο α-φθορο-β-κετο μεθυλο εστέρας 67 όπως και όλα τα πιθανά υποστρώματα, τέθηκε σε έλεγχο σταθερότητας στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.9, 37 °C για 24 ώρες). Αφού επιβεβαιώθηκε η σταθερότητα του υποστρώματος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ενζυμικών αναγωγών με μια σειρά NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών και τα καλύτερα αποτελέσματα αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα **3**.



syn

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του κέτο εστέρα 67 με κετορεδουκτάσες

	Ποσοστό	Διαστερεομερική αναλογία%			Στερεοεκλεκτικότητα		
KRED	μετατροπής	sy	syn		anti		
	%(24h)	А	В	С	D	de%	ee%
102*	92.2	5.8	83	2.5	8.7	77.5	86.9
106	65.8	33	32.9	28.1	6	31.8	<1
112	>99	84	1.6	13.6	0.8	71.2	96.3
114	>99	56.2	26.4	3.3	14.1	65.2	36
118	98.1	41	2.9	52.5	3.6	12.2	87.1

anti

121	>99	18.6	26.4	0.3	54.7	10	98.8
123	>99	55	8.2	29	7.8	26.4	74
130	>99	-	87.1	-	12.9	74.2	95.7
131*	>99	1.3	1	-	97.7	95.4	>99
A1D	98. 7	5.2	1.2	91.5	2	87.1	95.5
A1X	74.4	1.1	69.4	0.3	29.2	41	96.9
B1F	95	1.2	13.6	8.1	77.1	70.4	81.1

*Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 15 λεπτά, με το ποσοστό μετατροπής να παραμένει ίδιο και έπειτα από 24 ώρες. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας με χειρόμορφη στήλη και φασματοσκοπίας ¹Η και ¹⁹F NMR.

Στην περίπτωση του εστέρα 67 ήταν εφικτός ο διαχωρισμός των εναντιομερών με χειρόμορφη στήλη σε αέριο χρωματογράφο ανάλογα με τους χρόνους κατακράτησης R_{F.} Τα τέσσερα στερεοϊσομερή είναι τα A, B, C και D με το A να βγαίνει πρώτο. Παρακάτω, στο σχήμα 36, απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα όπου συγκρίνονται οι κορυφές των τεσσάρων στερεοϊσομερών μεταξύ των προϊόντων της χημικής αναγωγής και εκείνων από τις ενζυμικές αναγωγές.



Σχήμα 36. Τα τέσσερα στερεοϊσομερή A,B,C,D του ρακεμικού μείγματος από αναγωγή του υποστρώματος 67 καθώς και τα προϊόντα αντιδράσεων ορισμένων κετορεδουκτασών σύμφωνα με τον χρόνο κατακράτησης R_F στο χρωματογράφημα με χειρόμορφη στήλη

Συγκρίνοντας τα ποσοστά % των στερεοϊσομερών με τον διαστερεομερικό λόγο που υπολογίστηκε από το φάσμα ¹Η NMR διαπιστωθηκε ότι ο λόγος 70:30 συμπίπτει σχεδόν απόλυτα με τον διαστερεομερικό λόγο από το φάσμα ¹Η NMR 68,9:31,1 *anti/syn.* Με βάση αυτά τα δεδομένα, τα Α, Β είναι τα *syn* στερεοϊσομερή που είναι μεταξύ τους εναντιομερή ενώ τα C και D είναι τα *anti* στερεοϊσομερή επίσης εναντιομερή μεταξύ τους. Ωστόσο, αυτό είναι σχετικό καθώς υπολείπεται η απόλυτη στερεοδομή.

Από τα παραπάνω ευρήματα, εμφανές είναι πως οι περισσότερες κετορεδουκτάσες αποδίδουν το επιθυμητό προϊόν της αναγωγής με ικανοποιητικά ποσοστά διαστερεοκαι εναντιοεκλεκτικότητας. Πιο συγκεκριμένα, οι κετορεδουκτάσες 102, 112, 130, 131, A1D και BIF εμφάνισαν εξαιρετική δραστικότητα κατά την αναγωγή με υψηλή διαστερεο- και εναντιοεκλεκτικότητα. Από τις κετορεδουκτάσες αυτές, οι 102, 112 και 130 οδήγησαν στα syn διαστερεομερή ενώ οι κετορεδουκτάσες 131, A1D, B1F έδωσαν τα anti διαστερεομερή. Η κετορεδουκτάση 131 έδειξε υψηλή δραστικότητα στην αναγωγή του εστέρα (>99% μετατροπή), με εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα (95,4% de) και εναντιοεκλεκτικότητα (>99% ee). Η σχετική στερεοδουκτάση 131 προσδιορίστηκε anti όπως φαίνεται και από τα φάσματα ¹H-NMR και ¹⁹F-NMR.



Σχήμα 37. Αντιστοίχιση κορυφών στο ¹Η NMR στα *anti* και syn διαστερεομερή για το καρβινολικό πρωτόνιο του ρακεμικού υδρόξυ εστέρα 67iii και του υδρόξυ εστέρα που προκύπτει από την ενζυμική αναγωγή με την kred131

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των προϊόντων της ενζυμικής αναγωγής χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χειρόμορφης παραγοντοποίησης. Με την γρήση του α-μεθοξυ φαίνυλο οξικού οξέος πραγματοποιήθηκαν οι εστεροποιήσεις στα προϊόντα αναγωγής των κετορεδουκτασών 131 και 102. Τα anti και syn διαστερεομερή προϊόντα μετατράπηκαν στους αντίστοιχους MPA -εστέρες Προσδιορίστηκε μέσω της φασματοσκοπίας ¹Η NMR και ¹⁹F NMR ότι στο προϊόν της κετορεδουκτάσης 131 το ποσοστό του (3R) είναι >99% και στην περίπτωση της κετορεδουκτάσης 102 το ποσοστό του (3R) είναι 91,7% και του $(3S) \sim 8,3\%$. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με μεγαλύτερη ακρίβεια από την αέρια γρωματογραφία. Συνεπώς η αντιστοίγιση των κορυφών είναι $A \rightarrow (2R, 3S), B \rightarrow (2S, 3R), C \rightarrow (2S, 3S), D \rightarrow (2R, 3R).$

Έτσι, για το προϊόν αναγωγής της κετορεδουκτάσης 131 προσδιορίστηκε ότι είναι >99% (2R,3R)-87 και <1% (2S,3S)-88, ενώ για τα προϊόντα αναγωγής με την κετορεδουκτάση 102 προσδιορίστηκε ότι είναι 83% (2R,3S)-85, 8,7% (2R,3R)-87, 5.8% (2S,3R)-86 και 2.5% (2S,3S)-88.



Σχήμα 38. Προσδιορισμός της στερεοαπεικόνισης του C₃ του 2-φθορο-3-υδροξυ-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα με χρήση των αντίστοιχων MPA-εστέρων.



Σχήμα 39. Προσδιορισμός της στερεοαπεικόνισης του C₃ του β-υδρόξυ-α-φθόρο εστέρα **67iii** που προέκυψε από την αναγωγή με την Kred131 και την Kred 102

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα φάσματα ¹Η NMR των *R*-MPA και *S*-MPA εστέρων από τα οποία προκύπτει η απόλυτη στερεοδομή του προϊόντος αναγωγής με την kred131. Από την σύγκριση των δυο φασμάτων είναι φανερό ότι το $\Delta\delta^{R-S}$ των υδρογόνων H₂, H₃ και H₄ είναι αρνητικό ενώ για τα H₁ είναι θετικό, οπότε απόλυτη στερεοδομή για τον C₂ της ένωσης είναι (*R*), σύμφωνα και με την ανάλυση που περιγράφηκε ήδη προηγουμένως.



Σχήμα 40. Προσδιορισμός της απόλυτης στερεδομής του υποστρώματος **87** -kred131 με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις όλες παρακολουθήθηκαν για 24 ώρες, και για την κετορεδουκτάση 131 έγινε κινητικός έλεγχος. Βρέθηκε πως σε 15 λεπτά η αντίδραση της αναγωγής του συγκεκριμένου υποστρώματος είχε ολοκληρωθεί. Στο σχήμα που

ακολουθεί απεικονίζεται ένα φάσμα ¹⁹F NMR των S-MPA εστέρων των προϊόντων αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες 131 και 102 για τη σύγκριση των μετατοπίσεων τους.



Σχήμα 41. Φάσμα ¹⁹F NMR όπου απεικονίζονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές των εναντιομερών των προϊόντων αναγωγής του κέτο εστέρα **67** με τις κετορεδουκτάσες 102 και 131

Αλλάζοντας τον υποκαταστάτη στον αρωματικό δακτύλιο με μια ηλεκτρονιοδοτική ομάδα όπως η –OMe, συντέθηκε το υπόστρωμα 68. Έπειτα από τον έλεγχο σταθερότητας του υποστρώματος πραγματοποιηθηκαν οι ενζυμικές δοκιμές και τα καλύτερα αποτελέσματα απεικονίζονται στον πίνακα 4.



	Ποσοστό	Διαστ	Διαστερεομερική αναλογία %				εκτικότητα
Kred	μετατροπής%	syn		anti			
	(24h)	А	В	С	D	de%	ee%
102	76.1	10.2	75.1	7.6	7.1	70.5	76.1
112	93.1	63.6	1.9	34.1	0.4	31.2	93.8
118	>99	53.4	3.8	36	6.8	15.7	87.2
131*	>99	1	1.3	0.5	97.1	95.3	>99
A1D	95.7	4.2	0.8	88.6	2.4	89.5	94.9
A1X	76.6	3.1	66.4	6.5	23.9	39	91
B1F	>99	10.1	40.2	49.1	0.6	<1	97.6

Πίνακας 4. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα 68 με κετορεδουκτάσες

*Η ενζυμική αναγωγή ολοκληρώθηκε σε 4 ώρες, με τα ποσοστά μετατροπής να παραμένουν ίδια και έπειτα από 24 ώρες. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας εφοδιασμένη με χειρόμορφη στήλη και φασματοσκοπίας ¹Η και ¹⁹F

Όπως και για το υπόστρωμα **68**, η διαστερεοεκλεκτικότητα προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία NMR. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις παρατίθενται στο παράρτημα όπως και τα φάσματα ¹H και ¹⁹F NMR.

Από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν για τις ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος **68** παρατηρήθηκε πως η δραστικότητα των περισσότερων κετορεδουκτασών ήταν υψηλή (ποσοστό μετατροπής 77% - 99%), ενώ και η εναντιομερική περίσσεια σε όλες τις περιπτώσεις ήταν εξαιρετική. Επίσης κατά την ενζυμική αναγωγή με χρήση της kred 130, θα πρέπει να αναφερθεί πως παρά τις πολλαπλές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν δεν μπόρεσε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα των προϊόντων της αντίδρασης ώστε να παρατηρηθούν και αναλυθούν όπως στις υπόλοιπες δοκιμές. Τέλος, οι κετορεδουκτάσες 118,131, A1D και B1F, ήταν εξαιρετικά δραστικές με υψηλή διαστερεο- και εναντιοεκλεκτικότητα.

Ало́ та ларала́чю δεδομένα εύκολα προσδιορίστηκε η σχετική στερεοδομή των προϊόντων ενζυμικής αναγωγής. Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των προϊόντων της αναγωγής από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν και διαχωρίστηκαν και στον αέριο χρωματογράφο, χρησιμοποιήθηκε όπως και νωρίτερα η τεχνική της χειρόμορφης παραγοντοποίησης. Τα *anti* διαστερεομερή προϊόντα της αντίδρασης με την κετορεδουκτάση 131 μετατράπηκαν στους αντίστοιχους MPA – εστέρες. Προσδιορίστηκε μέσω της φασματοσκοπίας ¹H NMR και ¹⁹F NMR ότι το ποσοστό του (3*R*) είναι ~98% και του (3*S*) ~2%. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με μεγαλύτερη ακρίβεια από την αέρια χρωματογραφία. Συνεπώς, με Α \rightarrow (2*R*,3*S*), B \rightarrow (2*S*,3*R*), C \rightarrow (2*S*,3*S*), D \rightarrow (2*R*,3*R*), το προϊόν αναγωγής της κετορεδουκτάσης 131 θα είναι >99%- (2*R*,3*R*)-**91**.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις όλες πραγματοποιήθηκαν σε 24 ώρες , ωστόσο για την κετορεδουκτάση 131 έγινε κινητικός έλεγχος και βρέθηκε πως σε 4 ώρες η αντίδραση της αναγωγής είχε ολοκληρωθεί.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος **69** που φέρει ως para υποκαταστάτη την ηλεκτρονιοελκτική ομάδα –F στον αρωματικό δακτύλιο. Τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα **5**.



	Ποσοστό	Διασ	τερεομερικ	τή αναλογί	ία %	Στερεοεκλεκτικότητα			
Kred	μετατροπής%	syn		a	anti				
	(24h)	А	В	С	D	de%	ee%		
102	84.2	5.5	81.3	4.1	9.1	73.6	87.2		
112	>99	79.1	0.9	19.2	0.8	60	97.9		
118	96	54.4	0.8	42.6	2	10.6	97.1		
130	>99	-	96.3	-	3.7	92.6	>99		
131*	>99	1.3	1.1	0.4	97.2	95.2	>99		
A1D	98	4.4	0.9	92.3	2.4	89.5	94.9		
A1X	95.2	3.4	63	3.2	30.3	32.9	89.7		
B1F	>99	0.5	16.3	12.8	70.4	66.4	70		

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα 69 με κετορεδουκτάσες

*Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 30 λεπτά με το ποσοστό μετατροπής να παραμένει ίδιο κι έπειτα από 24 ώρες. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας GC σε συνδυασμό με φασματοσκοπία ¹Η και¹⁹F NMR

Όπως και στα προηγούμενα υποστρώματα, η διαστερεοεκλεκτικότητα προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία NMR. Τα ποσοστά % των στερεοϊσομερών συμφωνούν με το διαστερεομερικό λόγο που υπολογίστηκε από το φάσμα ¹H NMR αλλά και ¹⁹F NMR, και καταλήγουμε συνεπώς στο συμπέρασμα πως τα A, B αποτελούν τα syn διαστερεομερή και είναι εναντιομερή μεταξύ τους, ενώ τα C και D αποτελούν τα anti διαστερεομερή και είναι είναι εναντιομερή μεταξύ τους. Οι χρωματογραφικές αναλύσεις παρατίθενται στο παράρτημα όπως και τα φάσματα ¹H και ¹⁹F NMR.

Για το υπόστρωμα **69**, οι περισσότερες από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν έδωσαν εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής, ικανοποιητική διαστερεομερική περίσσεια και εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια. Τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από τις κετορεδουκτάσες 130, 131 και A1D. Οι κετορεδουκτάσες 102,112 και B1F παρουσίασαν επίσης υψηλή δραστικότητα (84-99% ποσοστό μετατροπής) και ικανοποιητική διαστερεοεκλεκτικότητα.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η σχετική στερεοχημεία του προϊόντος αναγωγής με την kred131 είναι anti, έγινε ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των προϊόντων της αναγωγής από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν. Παρασκευάστηκαν οι *R*-

MPA και S-MPA εστέρες των προϊόντων της ενζυμικής αναγωγής με χρήση της kred131. Έτσι βρέθηκε ότι στην περίπτωση της κετορεδουκτάσης 131 το ποσοστό του (3R) είναι >98% και του (3S) Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν όπως και για τα προγούμενα υποστρώματα με μεγαλύτερη ακρίβεια από την αέρια χρωματογραφία. Συνεπώς, το προϊόν αναγωγής με την κετορεδουκτάση 131 προσδιορίστηκε ότι είναι το (2R,3R)-95 σε ποσοστό 97.2% ενώ τα υπόλοιπα διαστερεομερή είναι σε πολύ μικρό ποσοστο. Με όμοιο τρόπο, έγινε ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής για τα προϊόντα των υπόλοιπων ενζυμικών αντιδράσεων.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις όλες παρακολουθήθηκαν για 24 ώρες, και για την κετορεδουκτάση 131 έγινε κινητικός έλεγχος και βρέθηκε πως στην μισή ώρα η αντίδραση της αναγωγής είχε ολοκληρωθεί.

Στο παρελθόν, έχει βρεθεί πως μεταβάλλοντας το μέγεθος της εστερικής ομάδας του υποστρώματος, υπάρχουν αλλαγές στη δραστικότητα ενός ενζύμου αλλά και στην εκλεκτικότητά του.^{14,52} Έτσι, συντέθηκαν και μελετήθηκαν τα υποστρώματα **70-75** με παρόμοιο τρόπο όπως και η προηγούμενη ομάδα υποστρωμάτων ξεκινώντας από τον αντίστοιχο αίθυλο ή tBu εστέρα.

Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής του κετο εστέρα 70 παρουσιάζονται στον πίνακα 6.



Πίνακας 6. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα 70 με κετορεδουκτάσες

	Ποσοστό	Δια	αστερεομερι	α%	Στερεοεκλε	εκτικότητα	
Kred	μετατροπής%	syn		anti			
	(24h)	(2R,3S)	(2S, 3R)	(2S, 3S)	(2R,3R)	de%	ee%
112	97.8	78.6	nd	21.3	Nd	57.3	>99
118	93.6	18	18.3		81.7		-
121	93.3	69	.55	30.45		39.1	-
130	>99	nd	>99	Nd	<1	84.8	>99
131*	>99	nd	nd	Nd	>99	>99	>99
A1D	96.4	1.2		98.8		97.6	-
B1F	96.3	88	3.9	11.1		77.8	-

*Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε στα 15 λεπτά με το ποσοστό μετατροπής να παραμένει ίδιο κι έπειτα από 24 ώρες. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας GC σε συνδυασμό με φασματοσκοπία ¹Η και¹⁹F NMR.

Ο λόγος των διαστερεομερών και το ποσοστό της μετατροπής προσδιορίστηκαν όπως και για τα προηγούμενα υποστρώματα με χρήση αέριας χρωματογραφίας με χρήση χειρόμορφης κολώνας και επιβεβαιώθηκαν και με την χρήση της φασματοσκοπίας ¹Η

και ¹⁹ F NMR. Τα φάσματα ¹H NMR και ¹⁹F NMR με βάση τα οποία έγινε ο προσδιορισμός της διαστερεομερικής αναλογίας και προσδιορίστηκε η σχετική στερεοδομή για κάποια προϊόντα των ενζυμικών αναγωγών παρατίθενται στο παράρτημα.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις παρακολουθήθηκαν για 24 ώρες στο ρυθμιστικό διάλυμα και έδωσαν τόσο τα anti όσο και τα syn διαστερεομερή. Από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν οι kred 131 και A1D έδωσαν τα anti διαστερεομερή με αρκετά υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα ενώ η kred 130 οδήγησε στα syn διαστερεομερή με εξίσου μεγάλη διαστερεοεκλεκτικότητα. Καθώς δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των εναντιομερών με χειρόμορφη κολώνα, αλλά ούτε και με υγρή χρωματογραφία, προσδιορίστηκε η απόλυτη στερεοδομή του προϊόντος αναγωγής λαμβάνοντας υπόψιν την εκάστοτε σχετική στερεοδομή των προϊόντων με τις κετορεδουκτάσες που επιθυμούμε να μελετήσουμε. Σε αυτή την φάση, έγινε διερεύνηση των προϊόντων αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες 112, 130 και 131.

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των anti διαστερεομερών που προέκυψαν από την κετορεδουκτάση 131 πραγματοποιήθηκε ενζυμική αντίδραση και απομονώθηκε η αντίστοιχη αλκοόλη με υψηλή απόδοση και εξαιρετική διαστερεομερική περίσσεια (>99% απόδοση, >99% de). Από τα φάσματα ¹ Η NMR και ¹⁹F NMR του απομονωμένου προϊόντος αποδεικνύεται ότι η σχετική στερεοαπεικόνιση του προϊόντος αναγωγής είναι anti.

Η απόλυτη στερεοδομή του υδρόξυ εστέρα προσδιορίστηκε με την εύρεση της στερεοδομής του C₃ με την μέθοδο της χειρόμορφης παραγοντοποίησης όπως και με τα προηγούμενα μέθυλο υποστρώματα. Έτσι με την χρήση του α- μεθοξυ τριφθορομεθυλο φαινυλοξικού οξέος (MPTA), το *anti* διαστερεομερές μετατράπηκε στον αντίστοιχο MPTA-εστέρα και προσδιορίστηκε μέσω της φασματοσκοπίας ¹ Η και ¹⁹F NMR ότι είναι >99% το(2*R*,3*R*)-**99** με δεδομένη σχετική στερεοδομή *anti*.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε και με τα προϊόντα αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες 112 και 130. Οι κετορεδουκτάσες αυτές απέδιδαν τα syn διαστερεομερή και από τα φάσματα ¹Η και ¹⁹F NMR αποδεικνύεται ότι οι σχετικές στερεοαπεικονίσεις των προϊόντων αναγωγής είναι syn.

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των syn προϊόντων από τις kred 112 και 130 πραγματοποιήθηκε όπως και με την προηγούμενη κετορεδουκτάση με σύγκριση των φασμάτων ¹⁹F έπειτα από παραγοντοποίηση του υδρόξυ εστέρα με τον αντίστοιχο MPTA –εστέρα και βρέθηκε πως η kred 112 οδήγησε στο προϊόν (2R, 3S)-**97** σε ποσοστό 78.6% και στο (2S,3S)-**100** 2 σε ποσοστό 21.3% H kred130 οδήγησε στο προϊόν (2S,3R)-**98** με ποσοστό >99%.

Όσον αφορά στα φάσματα ¹⁹F NMR για τους MPTA εστέρες παρατηρούμε πως σε αντίθεση με τους MPA εστέρες αλλάζει το περιβάλλον σύμφωνα και με τις προτεραιότητες των υποκαταστατών. Ακόμη, όπως φαίνεται και στο σχήμα **42**, οι κορυφές για τα syn διαστερεομερή εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία έναντι των αντίστοιχων για τα anti διαστερεομερή, ενώ για τους (S)-MPA εστέρες, τα (2S,3S) και (2R,3S) διαστερεομερή μετατοπίζονται προς χαμηλότερα πεδία καθώς προστατεύονται έναντι των (2R,3R) και (2S,3R) διαστερεομερών.

Η κινητική της αντίδρασης αναγωγής με τις συγκεκριμένες κετορεδουκτάσες παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία και προσδιορίστηκε ότι ο χρόνος που απαιτείται για την αναγωγή του συγκεκριμένου υποστρώματος ήταν 15 λεπτά.



Σχήμα 42. Φάσματα ¹⁹F –NMR όπου απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του προϊόντος αναγωγής του υποστρώματος 70 καθώς και των προϊόντων αναγωγής από τις επιλεγμένες κετορεδουκτάσες.

Κατ'αναλογία με το υπόστρωμα 70, μελετήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος 71. Τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών αποτυπώνονται στον παρακάτω συνοπτικό πίνακα 7.



Πίνακας 7. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα 71 με κετορεδουκτάσες

	Ποσοστό	Δια	Διαστερεομερική αναλογία %			Στερεοεκλει	κτικότητα
Kred	μετατροπής%	syn		anti			
	(24h)	(2R,3S)	(2S, 3R)	(2S, 3S)	(2R,3R)	de%	ee%
112	96	70.3	-	29.7	-	40.6	>99
118	89.1	36	.95	63.05		26.1	-
121	>99	67	67.9		32.1		-
130	75	-	>99	-	-	90	>99
131*	>99	-	-	-	>99	>99	>99

A1D	72.1	-	>99	>99	-
B1F	41	-	>99	>99	-

* Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 30λεπτά με το ποσοστό μετατροπής να παραμένει ίδιο κι έπειτα από 24 ώρες.Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση της αέριας χρωματογραφίας και σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία ¹Η και¹⁹F NMR

Ο λογος των διαστερεομερών και το ποσοστό μετατροπής προσδιορίστηκαν με χρήση της αέριας χρωματογραφίας με χειρόμορφη στήλη και επιβεβαιώθηκαν και με την φασματοσκοπία ¹Η και ¹⁹ F NMR . Η σχετική στερεοδομή προέκυψε από τα φάσματα ¹Η NMR σύμφωνα με τον κανόνα που αναφέρθηκε και σε προηγούμενο τμήμα της μελέτης για τις α-φθορο υποκατεστημένες β-υδροξυ καρβόνυλο ενώσεις στις οποίες το καρβινολικό υδρογόνο των syn διαστερεομερών εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σύγκριση με εκείνο των anti διαστερεομερών. Τα αντίστοιχα φάσματα παρατίθενται στο παράρτημα.

Από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν, όλες επέδειξαν υψηλή δραστικότητα στην μετατροπή του υποστρώματος **71**, με ικανοποιητικά ποσοστά διαστερεο- και εναντιοεκλεκτικότητας. Ειδικότερα, οι κετορεδουκτάσες 130, 131, A1D και B1F έδωσαν υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα, με την kred130 να οδηγεί στα syn διαστερεομερή και τις υπόλοιπες στα anti διαστερεομερή. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των τεσσάρων στερεοϊσομερών προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών με τις κετορεδουκτάσες 112,130 και 131.

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των anti διαστερεομερών που προέκυψαν από την κετορεδουκτάση 131 πραγματοποιήθηκε ενζυμική αντίδραση και απομονώθηκε η αντίστοιχη αλκοόλη με υψηλή απόδοση και εξαιρετική διαστερεομερική περίσσεια (>99% απόδοση, >99% de). Από τα φάσματα ¹ Η NMR και ¹⁹F NMR του απομονωμένου προϊόντος αποδεικνύεται ότι η σχετική στερεοαπεικόνιση του προϊόντος αναγωγής είναι anti. Με την χρήση MPTA, το anti διαστερεομερές μετατράπηκε στον αντίστοιχο MPTA-εστέρα και προσδιορίστηκε ότι είναι το (2R,3R)-103 σε ποσοστό >99%. Το αντίστοιχο φάσμα ¹⁹F NMR που απεικονίζει οι χαρακτηριστικές κορυφές του ρακεμικού μείγματος έπειτα από αναγωγή του υποστρώματος **71** καθώς και των προϊόντων αναγωγής από τις επιλεγμένες κετορεδουκτάσες παρατίθεται στο παράρτημα.

Η κινητική της αντίδρασης με τις συγκεκριμένες κετορεδουκτάσες παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία και προσδιορίστηκε ότι ο χρόνος που απαιτείται ώστε τα συγκεκριμένα ένζυμα να καταλύσουν την αναγωγή του **71** ήταν 30 λεπτά.

Τα αποτελέσματα των επιλεγμένων ενζυμικών αναγωγών παρουσιάζονται πιο αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα, ενώ στο σχήμα **58** απεικονίζεται ένα συγκριτικό φάσμα ¹⁹F NMR με τους S-MTPA εστέρες του ρακεμικού μείγματος και των προϊόντων αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες 112, 130 και 131.

Τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών του αίθυλο εστέρα 72 απεικονίζονται στον πίνακα 8.



Πίνακας 8. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα 72 με κετορεδουκτάσες

	Ποσοστό	Δια	στερεομερι	τερεομερική αναλογία %			κτικότητα
Kred	μετατροπής%	syn		anti			
	(24h)	(2R,3S)	(2S, 3R)	(2S, 3S)	(2R,3R)	de%	ee%
112	>99	80.9	-	19.1	-	61.8	>99
118	>99	19	9.7	80.3		60.6	-
121	>99	38	8.1	61.9		23.8	-
130	>99	-	97.15	2.85	-	94.3	>99
131*	>99	-	-	-	>99	>99	>99
A1D	>99	14.5		85.5		71	-
B1F	78		-	>99		>99(anti)	-

*Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 15 λεπτά, με το ποσοστό μετατροπής να παραμένει ίδιο κι έπειτα από 24 ώρες. Τα ποοστά προσδιορίστηκαν με χρήση της αέριας χρωματογραφίας και σε συνδυσσμό με την φασματοσκοπία ¹Η ¹⁹F NMR.

Όπως και με τα προηγούμενα υποστρώματα, η διαστερεοεκλεκτικότητα προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία ¹Η και ¹⁹F NMR. Από τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών, φαίνεται πως οι συγκεκριμένες κετορεδουκτάσες επιδεικνύουν υψηλή δραστικότητα στην αναγωγή των para-φθόρο υποστρωμάτων με ικανοποιητική στερεοεκλεκτικότητα. Οι ενζυμικές αντιδράσεις παρακολουθήθηκαν για 24 ώρες στο ρυθμιστικό διάλυμα και έδωσαν τόσο τα *anti* όσο και τα *syn* διαστερεομερή. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε πως οι κετορεδουκτάσες 130 131 και B1F εμφάνισαν υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα, με την kred130 να αποδίδει τα *syn* διαστερεομερή και τις άλλες να οδηγούν στα *anti* διαστερεομερή.

Και εδώ, ο μοναδικός τρόπος να προσδιοριστεί η εναντιοεκλεκτικότητα ήταν μέσω του προσδιορισμού της απόλυτης στερεοδομής του προϊόντος αναγωγής λαμβάνοντας υπόψιν την εκάστοτε σχετική στερεοδομή των προϊόντων ενζυμικής αναγωγής. Για την ολοκληρωμένη και συγκριτική μελέτη των αίθυλο εστέρων, έγινε διερεύνηση των προϊόντων αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες 112, 130 και 131.

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των anti διαστερεομερών που προέκυψαν από την κετορεδουκτάση 131 πραγματοποιήθηκε ενζυμική αντίδραση και απομονώθηκε η αντίστοιχη αλκοόλη με υψηλή απόδοση και εξαιρετική διαστερεομερική περίσσεια (>99% απόδοση, >99% de). Από τα φάσματα ¹ Η NMR και ¹⁹F NMR του απομονωμένου προϊόντος αποδεικνύεται ότι η σχετική στερεοαπεικόνιση του προϊόντος αναγωγής είναι anti. Έτσι με την χρήση του MPTA-εστέρα και μέσω της φασματοσκοπίας ¹ Η και ¹⁹F NMR προσδιορίστηκε ότι είναι το (2R,3R)-107 προϊόν σε ποσοστό >99%. Αντίστοιχα η KRED 130 έδωσε το (2S,3R)-106 προϊόν αναγωγής σε ποσοστό επίσης >99% και τέλος η KRED112 έδωσε σε ποσοστό 80.9% το (2R,3S)-105 και 19,1% το (2S,3S)-108.

Η κινητική της αντίδρασης με τις συγκεκριμένες κετορεδουκτάσες παρακολουθήθηκε με αέρια χρωματογραφία και προσδιορίστηκε ο χρόνος αντίδρασης για τον κετο εστέρα 72 σε 15 λεπτά.

Για τους α-φθορο-β-κετο τριτ-βουτυλεστέρες **73-75**, πραγματοποιήθηκαν οι χημικές αναγωγές προς τους αντίστοιχους α-φθορο-β-υδροξυ τριτ-βουτυλεστέρες όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο και έπειτα έγιναν ενζυμικές αναγωγές.

Τα αποτελέσματα για τον τριτ-βουτυλεστέρα 73 απεικονίζονται στον πίνακα 9.



Πίνακας 9. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα 73 με κετορεδουκτάσες

	Ποσοστό	Διαστερεομερική αναλογία %				Στερεοεκλεκτ	τικότητα
Kred	μετατροπής%	syn		anti			
	(24h)	(2R,3S)	(2S, 3R)	(2S, 3S)	(2R,3R)	de%	ee%
112	94	69.3	-	30.7	-	38.6	>99
118	90	13	3.2	86.8		73.6	-
121	>99	5	2	48		4	-
130	88.5	-	60.9	-	39.1	21.8	>99
131*	91.5	-	-	-	>99	>99	>99
A1D	98	-		>99		>99	-
B1F	88	26	5.4	73.6		47.2	-

*Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα, με το ποσοστό μετατροπής να παραμένει ίδιο κι έπειτα από 24 ώρες. Τα ποοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας και σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία ¹Η και ¹⁹F NMR.

Στον πίνακα 9, αναγράφονται τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν, το ποσοστό της μετατροπής καθώς και το ποσοστό της διαστερεομερικής περίσσειας. Ο λογος των διαστερεομερών και το ποσοστό της μετατροπής προσδιορίστηκαν με χρήση της αέριας χρωματογραφίας με χρήση χειρόμορφης κολώνας και επιβεβαιώθηκαν και με την χρήση της φασματοσκοπίας ¹Η και ¹⁹ F NMR. Όπως και για τα προηγούμενα υποστρώματα, η σχετική στερεοδομή προέκυψε από τα φάσματα ¹Η NMR σύμφωνα με τον κανόνα που προαναφέρθηκε και σε προηγούμενο τμήμα της μελέτης. Τα φάσματα NMR παρατίθενται στο παράρτημα.

Από τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών, φαίνεται πως οι συγκεκριμένες κετορεδουκτάσες επιδεικνύουν υψηλή δραστικότητα στην αναγωγή των φθόρο υποστρωμάτων. Οι ενζυμικές αντιδράσεις παρακολουθήθηκαν για 24 ώρες στο ρυθμιστικό διάλυμα και οδήγησαν τόσο στα anti όσο και στα syn διαστερεομερή. Από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν μόνο οι kred 112 και 130 έδωσαν τα syn διαστερεομερή ενώ όλες οι υπόλοιπες κετορεδουκτάσες έδωσαν τα anti υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα. διαστερεομερή uε αρκετά Αξιοσημείωτη δραστικότητα επιπλέον επέδειξαν και οι κετορεδουκτάσες 118 και A1D με ικανοποιητική διαστερεοεκλεκτικότητα (73.9% de και >99% de αντίστοιχα), ενώ και η κετορεδουκτάση 131 έδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα στην αναγωγή του εστέρα 73 (>99% de каі>99% ee).

Καθώς δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των εναντιομερών με χειρόμορφη κολώνα με αέρια αλλά και με υγρή χρωματογραφία, ο μοναδικός τρόπος να προσδιορίσουμε την εναντιομερή είναι να προχωρήσουμε στον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής του προϊόντος της αναγωγής λαμβάνοντας υπόψιν την εκάστοτε σχετική στερεοδομή των προϊόντων με τις κετορεδουκτάσες που επιθυμούμε να μελετήσουμε. Αυτό πραγματοποιήθηκε με χειρόμορφη παραγοντοποίηση των προϊόντων των ενζυμικών αναγωγών από τις επιλεγμένες κετορεδουκτάσες. Σε αυτή την φάση, έγινε διερεύνηση των προϊόντων αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες 112, 130 και 131 για την συγκριτική μελέτη με τα μέθυλο και αίθυλο υποστρώματα όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο τμήμα της μελέτης.

Έτσι με την χρήση του α-μεθόξυ τριφθορομέθυλο φαινυλοξικού οξέος (MPTA), το anti διαστερεομερές μετατράπηκε στον αντίστοιχο MPTA-εστέρα και προσδιορίστηκε μέσω της φασματοσκοπίας ¹ Η και ¹⁹F NMR ότι είναι το (2R,3R)-111 σε ποσσοστό >99% με δεδομένη σχετική στερεοδομή anti. Στην περίπτωση της κετορεδουκτάσης 130 ωστόσο βρέθηκε κυρίως το (2S,3R)-110 σε ποσοστό 60.9% και το (2R,3R)-111 σε ποσοστό 39.1% ενώ η kred112 έδωσε το (2R,3S)-109 σε ποσοστό 69.3% και σε μικρότερο ποσοστό το (2S,3S)-112.

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η σύνθεση του εστέρα 74, η χημική αναγωγή του και στη συνέχεια οι ενζυμικές αναγωγές του.



Η σύνθεση του τριτ-βουτυλεστέρα 74 πραματοποιήθηκε όπως είχε αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα σύμφωνα με την γενική συνθετική μέθοδο του σχήματος 67. Ωστόσο, η ένωση αυτή δεν ήταν ιδιαίτερα σταθερή στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ενώ και κατά την κατεργασία της προς ανάλυση φαίνεται ότι

υδρολυόταν κι έτσι δεν ήταν εφικτό να απομονωθεί καθαρό με κάποιον από τους τρόπους που δοκιμάστηκαν. Επιπλέον, δοκιμάζοντας μια σειρά από κετορεδουκτάσες διαπιστώθηκε ότι η δραστικότητα των ενζύμων σε αυτό το υπόστρωμα ήταν αρκετά χαμηλή καθώς στις περισσότερες δεν παρατηρήθηκε καθόλου ο σχηματισμός του προϊόντος αναγωγής, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις το ποσοστό μετατροπής ήταν τόσο μικρό που με δυσκολία ανιχνευόταν. Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα αυτό καθίσταται ασταθές και δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση.

Τελευταίο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν ο εστέρας 75.



KRED	Ποσοστό	Διαστερεομερι	de%	
KKLD	(24h)	syn	anti	ue /0
112	>99	89.7	10.3	79.4
118	>99	-	>99	>99
130	99.2	7.5	92.5	85
131*	>99	-	>99	>99
A1D	98	-	>99	>99
B1F	76.8	19.1	80.9	61.8

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών στον εστέρα 75 με κετορεδουκτάσες

*Η ενζυμική αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με το ποσοστό μετατροπλης να παραμένει ίδιο κι έπειτα από 24 ώρες. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με την φασματοσκοπία ¹Η και ¹⁹F NMR

Στον πίνακα 10, αναγράφονται τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν, το ποσοστό μετατροπής καθώς και η διαστερεομερική περίσσεια. Ο λογος των διαστερεομερών και το ποσοστό μετατροπής προσδιορίστηκαν με αέρια χρωματογραφία με χρήση χειρόμορφης κολώνας και επιβεβαιώθηκαν με την φασματοσκοπία ¹Η και ¹⁹ F NMR. Η σχετική στερεοδομή προέκυψε από τα φάσματα ¹Η NMR σύμφωνα με τον κανόνα που αναφέρθηκε και σε προηγούμενο τμήμα της μελέτης για τις α-φθόρο υποκατεστημένες β-υδρόξυ καρβόνυλο ενώσεις.

Το υπόστρωμα αυτό δεν ήταν ιδιαίτερα σταθερό στο ρυθμιστικό διάλυμα αφού βρέθηκε ποσοστό παραπροϊόντος της τάξης του 41,8% έναντι του αρχικού υποστρώματος. Ακόμη, για την ένωση 75, αντιμετωπίστηκαν αρκετές δυσκολίες και κατά την διαδικασία της σύνθεσης και απομόνωσης του κύριου προϊόντος καθώς ήταν ασταθες. Έτσι δεν απομονώθηκε αυτούσια η ένωση και στις ενζυμικές αντιδράσεις θα μεταφέρονταν και οι επιμολύνσεις σε μικρότερο βεβαιως βαθμό. Παρόλα αυτά, στις συγκεκριμένες ενζυμικές δοκιμές η δραστικότητα των ενζύμων ήταν καλή και σχηματίζονταν τα προϊόντα της αναγωγής. Από τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών, φαίνεται πως οι συγκεκριμένες κετορεδουκτάσες επιδεικνύουν υψηλή δραστικότητα στην αναγωγή των φθόρο υποκατεστημένων υποστρωμάτων.

Οι ενζυμικές αντιδράσεις παρακολουθηθηκαν για 24 ώρες στο ρυθμιστικό διάλυμα και έδωσαν τόσο τα anti όσο και τα syn διαστερεομερή. Από τις κετορεδουκτάσες που δοκιμάστηκαν, όλες επέδειξαν εξαιρετική δραστικότητα στην αναγωγή του εστέρα **75** (ποσοστό μετατροπής >79%). Όλες οι κετορεδουκτάσες έδωσαν τα anti διαστερεομερή με εξαιρετικά ποσοστά διαστερεοεκλεκτικότητας και με μοναδική εξαίρεση την kred 112 που έδωσε syn διαστερεομερή (79.4% de).

Ωστόσο, στην περίπτωση του υποστρώματος 75 δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευθούν τα ποσοστα των εναντιομερών παρά μόνο των διαστερεομερών λόγω της αστάθειας του με όλες από τις διαθέσιμες τεχνικές. Σε κάθε περίπτωση, υπάρχουν περιθώρια για νέο κύκλο μελέτης για το συγκεκριμένο υπόστρωμα λόγω των εξαιρετικών ποσοστών διαστερεομερικής περίσσειας.

2.3 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, με την παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή σειράς υποστρωμάτων α-φθορο-β-κετο εστέρων προς τους αντίστοιγους βυδροξυ-α-φθορο εστέρες και προσδιορίστηκαν οι κατάλληλες κετορεδουκτάσες οι οποίες αποδείχτηκαν εξαιρετικοί βιοκαταλύτες για αυτή την μετατροπή. Η τροποποίηση του μεγέθους της εστερικής ομάδας αποδείχθηκε ότι δεν επιφέρει σημαντική αλλαγή στην δραστικότητα των ενζύμων ενώ αυτό που μεταβλήθηκε ήταν η διαστερεοεκλεκτικότητα της βιοαναγωγής. Αυξανομένου μάλιστα του μεγέθους της ομάδας εστεοικής παρατηρήθηκε αύξηση της διαστερεοεκλεκτικότητας. Αξιοσημείωτη ήταν η κινητική των ενζυμικών αναγωγών σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν καθώς σε πολλές περιπτώσεις οι αντιδράσεις ολοκληρώνονταν σε λιγότερο από μια ώρα. Η μελέτη των υποκαταστατών του αρωματικού δακτυλίου, έδειξε ότι δεν μεταβάλλεται η δραστικότητα των κετορεδουκτασών, ενώ παρατηρήθηκε μικρή μόνο μείωση της διαστερεοεκλεκτικότητας στα p-OMe υποκατεστημένα υποστρώματα. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 11 για τα ένζυμα kred 112, 130 και 131, τα οποία αποδείχθηκαν πολύ δραστικοί βιοκαταλύτες για όλους τους α-φθόρο-β-κέτο εστέρες που συντέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τέλος, απο την μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν για κάθε διαφορετικό υπόστρωμα τα κατάλληλα αναγωγικά ένζυμα που οδηγούν σε προϊόντα υψηλής οπτικής καθαρότητας. Πολύ σημαντικό αποτέλεσμα είναι οτι με διαφορετικά ένζυμα μπορούν κατ'επιλογήν να συντεθούν διαφορετικά στερεοϊσομερή κάθε ένωσης.





Ένζυμο	Υπόστρωμα	Μετατροπή(%)	(<i>de</i> %)	(ee%)
Kred112	57	>00	83(svn)	>00
	67	>99	$\frac{33(3\text{yll})}{71.2(\text{sym})}$	967
	68	03.1	$\frac{71.2(\text{syn})}{31.2(\text{syn})}$	03.8
	60	93.1	$\frac{51.2(\text{syll})}{60(\text{syll})}$	93.8
	70	07.9	57.2(grm)	> 00
	70	97.8	37.5(Syll)	>99
	71	96	40.6(syn)	>99
	72	>99	61.8(syn)	>99
	73	94	38.6(syn)	>99
	75	>99	79.4(syn)	-
Kred130	57	>99	76.6(anti)	>99
	67	>99	74.2(syn)	95.7
	68	Nd	nd	nd
	69	>99	92.6(syn)	>99
	70	>99	84.8(syn)	>99
	71	75	90(syn)	>99
	72	>99	94.3(syn)	>99
	73	88.5	21.8(syn)	>99
	75	>99	85(anti)	-
Kred131	57	>99	76.3(anti)	86.8
	67	>99	95.4(anti)	>99
	68	91.2	95.3(anti)	>99
	69	>99	95.2(anti)	99.2
	70	>99	>99(anti)	>99
	71	>99	>99(anti)	>99
	72	>99	>99(anti)	>99
	73	91.5	>99(anti)	>99
	75	>99	>99(anti)	-

Πίνακας 11. Σύγκριση δραστικότητας και διαστερεοεκλεκτικότητας των kred 112,130 και 131

2.4 Πειραματικό μέρος

Ένζυμα και αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αγοράστηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Για την χρήση του ξηρού διαλύτη τετραϋδροφουρανίου (THF) προηγήθηκε η απόσταξη του τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Να ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet, και επίσης για την ξήρανση της διισοπροπυλαμίνης πραγματοποιήθηκε απόσταξη παρουσία ΝαΟΗ και μοριακών κοσκίνων. Επιπλέον, οι αλδεύδες που χρησιμοποιήθηκαν, ξηράνθηκαν με την μέθοδο της απόσταξης και διατηρήθηκαν στους -4 °C, ενώ και οι διαλύτες EtOH MeCN που χρησιμοποιήθηκαν σε επόμενα στάδια ξηράνθηκαν συμφωνα με το προβλεπόμενο πρωτόκολλο και φυλάχθηκαν σε σκοτεινό και ξηρό μέρος.

Οι κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν είναι απομονωμένα, εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα της εταιρείας Biocatalytics και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το συνένζυμο NADPH αγοράστηκε από την εταιρεία Prozomix και η αφυδρογονάση της γλυκόζης, GDH από την εταιρεία Evocatal.

Όργανα και διατάξεις

Ο προσδιορισμός της δομής των μορίων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια φασμάτων ¹H NMR, ¹⁹F NMR και ¹³C NMR που ελήφθησαν σε φασματόμετρο 300MHz της εταιρείας Bruker, χρησιμοποιώντας τετραμέθυλο σιλάνιο (TMS) σαν σήμα αναφοράς και CDCl₃ ως διαλύτη (7.26 ppm για ¹H και 77.16 ppm για ¹³C). Ορισμένα φάσματα ελήφθησαν σε φασματόμετρο 500 MHz της ίδιας εταιρείας.

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων παρακολουθήθηκε με αέριο χρωματογράφο Shimadzu 2014 με ανιχνευτή FID. Για την παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε χειρόμορφη στήλη J&W CP-Chirasil-Dex CB (25X 0.25X 0.25 μm) μήκους 25m, η οποία επέτρεπε τον διαχωρισμό των εναντιομερών.

Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος TLC, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 της εταιρείας EMD Milipore. Ο καθαρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Flash column chromatography) χρησιμοποιώντας silica gel 60, particle size 0.040-0.063 mm (230-400mesh ASTM) ως υλικό πλήρωσης.

<u>Γενικές συνθετικές μεθοδοι</u>

Ι. Αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Σε ξηρή μονόλαιμη σφαιρική φιάλη εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρακαι κάθετο ψυκτήρα, τοποθετούνται υπό αδρανή ατμόσφαιρα 1 mmol β-κέτο εστέρα σε 3ml άνυδρο ακετονιτριλίου. Ακολουθεί η προσθήκη 1,1 mmol Selectfluor σε

θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Στην συνέχεια, η αντίδραση θερμαίνεται μέχρι βρασμού (~82 °C) και η πορεία της ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό, προστίθεται νερό και το προκύπτον μίγμα εκχυλίζεται τρείς φορές με EtOAc. Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται με MgSO4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό.

II. Αναγωγή καρβονυλικών ενώσεων με NaBH4

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται 0,33 mmol NaBH₄ σε 2ml άνυδρης αιθανόλης. Το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C και προστίθενται υπό ισχυρή ανάδευση, 1 mmol καρβονυλικής ένωσης σε 1 ml άνυδρης αιθανόλης. Το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 0 °C και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη 1ml κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl και απόσταξη του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Στο υπόλειμμα προστίθεται νερό και εκχυλίζεται τρείς φορές με EtOAc. Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό.

III. Ενζυμική αναγωγή

Σε 5 mgr α-φθόρο-β-κέτο εστέρα(25mM) προστίθενται 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200mM, pH=6.9), γλυκόζη (100mM, 19mg) και η αντίτοιχη κετορεδουκτάση (2mg/mL). Ακολουθεί η προσθήκη του NADPH (2,5mM, 2mg) και της αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH, 1mg/ml). Η αντίδραση επωάζεται στους 37 °C σε θερμοκυκλοποιητή και η πορεία της παρακολουθείται μετά από 24 ώρες έπειτα από εκχυλίσεις με EtOAc του δείγματος της αντίδρασηςμε αέριο χρωματογράφο και φασματοσκοπία NMR.

ΙV. Σύνθεση των (*R*)-ΜΡΑ και (*S*)-ΜΡΑ εστέρων

Σε άνυδρο CH₂Cl₂ προστίθενται 0.1 mmol υδρόξυ εστέρα. Στην συνέχεια προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11mmol), καταλυτική ποσότητα DMAP, και 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmol). Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 24 ώρες, το μείγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό.Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης.

V. Σύνθεση των (R)-ΜΤΡΑ και (S)-ΜΤΡΑ εστέρων

Σε άνυδρο CDCl₃ προστίθενται 0.025 mmol υδρόξυ εστέρα. Στην συνέχεια προστίθενται 0,004 mmol DCC, καταλυτική ποσότητα DMAP και 0,004 mmol του (*R*) ή (*S*) MTPA. Μικρή ποσότητα 3 Å μοριακών κόσκινων τοποθετείται στο διάλυμα της αντίδρασης. Μετά από ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες το μείγμα φιλτράρεται και δεν καθαρίζεται περαιτέρω για ανάλυση με φασματοσκοπία NMR.

Σύνθεση των υποστρωμάτων

$1^{o} MEPO\Sigma$

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (58) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50mg του εστέρα **57** (0.34mmol) και 3.1mg NaBH₄ (0.0084mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 48,6/51,3(*anti/syn*).

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃):</u> δ 4.83 (dd, J=3.92Hz, J=48.6Hz, 1H), 4.75 (dd, J=3.36Hz, J=48.2Hz, 1H), 4.25-4.33 (m, 3H), 2.24 (d.br., 1H), 1.27-1.34 (m, 6H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 168.6, 91.9 (dd, J=188.22Hz, J=5.25Hz), 68.4(d, J=2.47Hz), 68.1(d, J=0.95Hz), 62.2, 18.9 (d, J=4.74Hz), 17.7 (d, J=5.81Hz), 14.5

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -201.015 (dd, J=48.83Hz, J=18.12Hz), -206.56 (dd, J=48.22Hz, J=22.04Hz)

Αναγωγή του εστέρα (57) με τις κετορεδουκτάση 112 και 118

Η αναγωγή του εστέρα 57 επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω ΙΙΙ. Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα (83% *de*, >99% *ee* και 74.4% *de*, >99% *ee*).

<u>¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ *anti* 4.83 (dd, J=3.91Hz, J=48.63Hz, 1H) , *syn* 4.75 (dd, J= 3.28Hz, J=48.33Hz, 1H), 4.15-4.40 (m, 3H), *anti* 2.26 (d.br, J=5.66Hz, 1H) *syn* 2.04 (d.br, J=7.84Hz, 1H), 1.31 (m, 6H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -200.98 (dd, J= 17.89Hz, J=48.35Hz), *syn* - 206.55(dd, J=22.03Hz, J=48.18Hz)

 2° MEPOS

Σύνθεση του 3-υδρόξυ-3-φαίνυλο-προπιονικού μεθυλεστέρα (67i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF(12 ml) προστίθεται ξηρή δυσοπροπυλαμίνη (10.8 mmol, 1.5 ml) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο(10.8 mmol, 6.75ml) στους -15 °C για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 °C και προστίθεται στάγδην ο αιθανικός μεθυλεστέρας **76** (6.75 mmol, 500mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή βενζαλδεΰδη (10.1 mmol, 1ml) και η

αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για 2 ώρες. Η λήξη της διαπιστώνεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC).

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH4Cl και ακολουθούν τρεις εκχυλίσεις του μείγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, ο οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO4, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 60%.

¹<u>H NMR (300MHz, CDCl₃):</u> δ 7.30 (m, 2H), 6.88 (m,2H), 5.09 (m,1H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.11 (s,1H), 2.66-2.80 (m, 2H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 173.2, 159.6, 134.9, 127.3(2C), 114.3(2C), 70.3, 55.7, 52.3 43.5

Σύνθεση του 3-οξο-3-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (67ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο Dess-Martin

Σε ξηρή μονόλαιμη φιάλη κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό CH₂Cl₂(10ml), προστίθεται το αντιδραστήριο Dess-Martin (3.33 mmol, 1412.2 mg) και αφήνεται προς ισχυρή ανάδευση για 10 λεπτά περίπου. Στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη του υδρόξυ εστέρα **67i** (2.77 mmol, 500 mg) και το διάλυμα αφήνεται υπό ισχυρή ανάδευση για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η λήξη της διαπιστώνεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC).

Για την απομόνωση του προϊόντος, προστίθεται νερό και CH₂Cl₂ και το διάλυμα αναδεύεται ώστε το παραγόμενο παραπροϊόν IBA να καταβυθιστεί. Έπειτα, γίνεται προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NaS₂O₃ και κορεσμένου διαλύματος NaHCO₃ και ακολουθούν τρεις εκχυλίσεις με διαλύτη CH₂Cl₂. Η οργανική φάση ακολούθως ξηραίνεται με MgSO₄ και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 52%.

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.26-8.12 (m, 5H), 5.68(s, 1H), 4.02(s, 2H), 3.76(s, 3H),

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃θδ 192.8, 168.4, 136.2, 134.2, 131.7, 129.2, 128.9, 126.4, 87.4, 52.9, 51.8, 46.1

Σύνθεση του υποστρώματος 67 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **67** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 200mg του 3-όξο-3-φαίνυλο προπϊονικού μεθυλεστέρα **67ii** (1.12 mmol), 437.4 mg Selectfluor (1.24 mmol). Επιτεύχθηκε ποσοστό μετατροπής 95% σε 3 ώρες αντίδρασης. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 95% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. <u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 8.04 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.65 (m, 1H), 7.51 (m, 2H), 5.89 (d, J=48.8 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 189.4 (d, J=19.6Hz), 165.4 (d, J=24.3Hz), 134.6, 133.2 (d, J=2.3Hz), 129.5 (d, J=3.5Hz), 128.8, 89.9 (d, J=197.5Hz), 53.3

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -190.3 (d, J=48.3 Hz)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (67iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50 mg του εστέρα **67** (0.25 mmol) και 2.4 mg NaBH₄ (0.0063 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 68.9/31.1(*anti/syn*).

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.35-7.40 (m,5H), 4.99-5.18 (m, 2H_{ANTI-SYN}), 3.77 (2s, J=19.2Hz, 3H), 2.69 (2s, J=75.8Hz, 1H_{ANTI-SYN})

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 168.2(d, J=23.1 Hz), 137.5, 128.7(d, J=8Hz), 128.5, 126.5(d, J=35.7Hz), 90.4-91.9(dd, J=193.1Hz), 52.5(d, 18.3Hz)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -197.71 (dd, J=16.05Hz, J=47.82Hz), *syn* -203.95 (dd, J=23.16Hz, J=48.16Hz)

Αναγωγή του εστέρα (67) με τις κετορεδουκτάσες 130 και 131

Η αναγωγή του εστέρα 67 επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω ΙΙΙ. Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα (kred130 \rightarrow syn 87.1% de, 95.7% ee και kred131 95.4% de, >99% ee αντίστοιχα).

¹<u>H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.31-7.41 (m, 5H), *syn* 5.16 (dd, J=3.47Hz, J= 22.25Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.13 (dd, J= 5.25Hz, J= 16.33Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.067 (dd, J= 5.25Hz, J= 47.66Hz, 1H- α), *syn* 5.047 (dd, J= 3.47Hz, J=47.53Hz, 1H- α), 3.75 (s, 3H), 2.81 (d.br, J=68.15Hz, 1H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -197.65 (dd, J= 15.49Hz, J=48.02Hz), *syn* -203.84 (dd, J=22.94Hz, J=48.83Hz)

Σύνθεση του 3-υδρόξυ-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο-προπιονικού μεθυλεστέρα (68i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **68i** με αλδολική συμπύκνωση. Για αυτήν την παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 0.9 ml διισοπροπυλαμίνης (6.48 mmol), 4.05 ml

n-BuLi (6.48 mmol), 300mg οξικού μεθυλεστέρα (4.05 mmol) και 0.74 ml p-μεθόξυ -βενζαλδεϋδη (6.07mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 63%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.30 (m, 2H), 6.88 (m, 2H), 5.09 (m,1H), 3.80(s, 3H), 3.72(s, 3H), 3.11(s,1H), 2.66-2.80(m, 2H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 173.2, 159.6, 134.9, 127.3(2C), 114.3(2C), 70.3, 55.7, 52.3 43.5

Σύνθεση του 3-οξο-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (68ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο Dess-Martin

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **67ii.** Για την σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1877.3 mg του Dess-Martin periodinane (4.43 mmol) και 775.4 mg του υδρόξυ εστέρα **67i** (3.69 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 6 ώρες όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 45%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.92 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 3.96(s, 3H), 3.88(s, 3H), 3.74 (s, 3H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 191.2, 168.6, 164.4, 131.3, 129.4, 128.2, 114.3, 55.9, 52.8, 45.9

Σύνθεση του υποστρώματος 68 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **68** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 200mg του 3-όξο-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο προπϊονικού μεθυλεστέρα **68ii** (0.96 mmol), 374.3mg Selectfluor (1.05 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 87% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

 $\frac{1}{H}$ NMR (500MHz, CDCl₃): δ 8.02-8.05 (m, 2H), 6.96-6.99 (m, 2H), 5.84 (d, J=48.9Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3,83 (s, 3H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 187.6 (d, J=19.6Hz), 165.6 (d, J=24.3Hz), 164.7, 133.2 (d, J=2.3Hz), 126.2 (d, J=2.39Hz), 114.1, 90.1 (d, J=197.7Hz), 55.6, 53.2

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -189.5 (d, J=48.4 Hz)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (68iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50 mg του εστέρα **68** (0.22 mmol) και 2 mg NaBH₄ (0.055 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 65.1/34.9 (*anti/syn*).

¹<u>H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.87-7.92 (m,2H), 7.28-7.33 (m,2H), 4.90-5.13 (m,2H_{ANTI-SYN}), 3.80 (s,3H), 3.75 (2s, J=9.1Hz, 3H_{ANTI-SYN}), 2.88 (1H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 168.3 (dd, J=23.1 Hz), 159.8 (d, J=4.6Hz), 129.8 (d, J=34.7Hz), 127.9 (d, J=30.1Hz), 113.9 (d, J=10.5Hz), 90.3-92.4(dd,J=192.8Hz), 73.1-73.5(m), 55.2 (d,J=3.4Hz), 52.5(d, J=14.1Hz),

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -198.3 (dd, J=17.29Hz, J=47.22Hz), -202.0 (dd, J= 21.67Hz, J=48.3Hz)

Αναγωγή του εστέρα (68) με την κετορεδουκτάση 131

Η αναγωγή του εστέρα **68** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω **ΙΙΙ.** Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα (*anti*) και εναντιοεκλεκτικότητα (95.3% *de*, >99% *ee*).

¹<u>H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.30-7.32 (m, 2H), 6.89-6.91 (m, 2H), *anti* 5.067 (dd, J= 5.29Hz, J= 18.21Hz, 1H-carbinol), 5.022 (dd, J= 5.29Hz, J= 28.18Hz, 1H- α), 3.81 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 2.63 (d.br, 1H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ anti -198.24 (dd, J= 14.66Hz, J=49.32Hz),

Σύνθεση του 3-υδρόζυ-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο-προπιονικού μεθυλεστέρα (69i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **69i** με αλδολική συμπύκνωση. Για αυτήν την παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 1.5ml διισοπροπυλαμίνης (10.79 mmol), 6.75ml n-BuLi (10.79 mmol), 500 mg οξικού μεθυλεστέρα (6.75 mmol) και 0.72ml p-φθόρο –βενζαλδεϋδη (6.75 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 51%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.32-7.36 (m, 2H), 7.00-7.06 (m, 2H), 5.11 (m,1H), 3.72 (s, 3H), 3.4 (d. br, 1H), 2.69-2.73 (m, 2H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.6, 162.3, 138.2, 127.3, 115.4, 69.64, 51.9, 43.1

Σύνθεση του 3-οξο-3-(p-φθορο)-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (69ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο PCC

Σε ξηρή μονόλαιμη σφαιρική φιάλη κάτω από αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και σε θερμοκρασία 0 °C σε ξηρό CH₂Cl₂ (12 ml), προστέθηκαν 815 mg PCC (3.78 mmol) και το μείγμα αφέθηκε προς ανάδευση για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 500 mg του υδρόξυ εστέρα **69ii** (2.52 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ισχυρή ανάδευση. Η λήξη της αντίδρασης διαπιστώνεται με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδος (TLC).

Για την απομόνωση του προϊόντος, αρχικά προστέθηκε στο διάλυμα ξηρός Et₂O και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση στους -20°C. Στην συνέχεια, προστέθηκε ποσότητα Celite, το μείγμα διηθήθηκε και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Περαιτέρω καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E: EtOAc, v/v, 10:1). Απόδοση 65%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.95-8 (m, 2H), 7.07-7.18 (m, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.75 (s, 3H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 191.2, 168.2, 164.8, 132.2, 128.6, 116.4, 87.2, 52.4, 46.0

Σύνθεση του υποστρώματος 69 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **69** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 200 mg του 3-όξο-3-(p-φθορο)-φαίνυλο προπϊονικού μεθυλεστέρα **69ii** (1.02 mmol), 397.3 mg Selectfluor (1.05 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 80% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

¹<u>H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 8.07-8.12 (m, 2H), 7.15-7.21 (m, 2H), 5.84 (d, J=48.8Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3,85 (s, 3H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 189.4 (d, J=19.7Hz), 165.4 (d, J=24.3Hz) , 134.6, 133.2 (d, J=2.3Hz), 129.5 (d, J=3.43Hz), 128.8, 89.9 (d, J=197.8Hz), 53.2

¹⁹F NMR (470MHz,CDCl₃): δ -189.6 (d, J=48.4 Hz)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (69iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50mg του εστέρα **69** (0.23 mmol) και 2.2mg NaBH₄ (0.058 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 52.5/47.5 (*anti/syn*).
<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.36-7.40 (m,2H), 7.05-7.09 (m,2H), 4.94-5.16 (m,2H_{ANTI-SYN}), 3.77 (2s, J=13.9Hz, 3H_{ANTI-SYN}), 2.72 (d.br., J= 83.39, 1H)

 $\frac{{}^{13}\text{C NMR (125MHz, CDCl}_3)}{\text{J}=40.8\text{Hz}, 128.5 \text{ (d, J}=8.8\text{Hz}), 128.3 \text{ (d, J}=8.4\text{Hz}), 115.4-115.7 \text{ (m)}, 90.0-92.1 \text{ (dd,J}=192.8\text{Hz}), 72.8-73.3 \text{ (dd, J}=34.8\text{Hz}), 52.6 \text{ (d, J}=13.4\text{Hz}),$

 $\frac{^{19}\text{F}}{\text{NMR}}$ (470MHz, CDCl₃): δ -197.9 (dd, J=15.66Hz, J=47.85Hz), -203.2 (dd, J=21.75Hz, J=47.23Hz)

Αναγωγή του εστέρα (69) με τις κετορεδουκτάσες 130 και 131

Η αναγωγή του εστέρα **69** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω **III.** Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα (kred130 \rightarrow syn 90% de, >99% ee και kred131 95.3% de, >99% ee αντίστοιχα).

¹<u>H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.362-7.391 (m, 2H), 7.048-7.093 (m, 2H), *syn* 5.1 (dd, J=3.70Hz, J= 22.18Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.11 (dd, J= 5.25Hz, J= 15.49Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.022 (dd, J= 5.51Hz, J= 47.95Hz, 1H- α), *syn* 5.003 (dd, J= 3.70Hz, J= 47.90Hz, 1H- α), 3.78 (s, 3H), 2.74 (d.br, 1H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -197.95 (dd, J= 14.84Hz, J=48.32Hz), *syn* -203.23 (dd, J=21.65Hz, J=48.15Hz)

Σύνθεση του 3-υδρόξυ-3-φαίνυλο-προπιονικού αιθυλεστέρα (70i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (12ml) προστίθεται ξηρή δυσοπροπυλαμίνη (9.08 mmol, 1.27 ml) και στάγδην n-BuLi 1.6M σε εξάνιο (9.08 mmol, 5.67 ml) στους -15 °C για την παρασκευή του διαλύτη LDA. Στην συνέχεια, η θερμοκρασία ελαττώνεται στους -78 °C και προστίθεται στάγδην ο οξικός αιθυλεστέρας **77** (5.67 mmol, 500 mg) διαλυμένος σε ξηρό THF για περίπου 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην η ξηρή βενζαλδεϋδη (5.67 mmol, 0.58 ml) και η αντίδραση αφήνεται σε αυτήν την θερμοκρασία για 2 ώρες. Η λήξη της διαπιστώνεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC).

Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH4Cl και ακολουθούν τρεις εκχυλίσεις του μείγματος με διαλύτη EtOAc. Στην συνέχεια, ο οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 75%.

 $\frac{^{1}\text{H NMR (300MHz, CDCl}_{3})}{7.08\text{Hz}, 2\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 5H)}, 5.11-5.15 \text{ (m, 1H) }, 4.18 \text{ (q, J} = 7.08\text{Hz}, 2\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 1.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H) } 2.60-2.73 \text{ (m, 2H)}, 3.26 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{H}), 3.3 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{Hz}, 3\text{Hz}, 3\text{Hz}), 3.3 \text{ (t, J} = 7.08\text{Hz}, 3\text{Hz$

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.8, 142.8, 128.2, 126.05, 70.7, 61.3, 43.7, 14.5

Σύνθεση του 3-οξο-3-φαίνυλο προπιονικού αιθυλεστέρα (70ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο PCC

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **70ii.** Για την σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1331.8 mg του PCC (6.18 mmol) και 800mg του υδρόξυ εστέρα **70i** (4.18 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 66%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.94 (m,2H), 7.38-7.50 (m, 3H), 4.21 (q, J=7.28Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 1.25 (t, J= 7.10Hz, 3H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 192.9, 167.9, 134.1, 129.2, 128.8, 61.8, 46.4, 14.4

Σύνθεση του υποστρώματος 70 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **70** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 300mg του 3-όξο-3-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα **70ii** (1.56 mmol), 608 mg Selectfluor (1.72 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 93% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 8.02-8.05 (m, 2H), 7.62-7.66 (m, 1H), 7.48-7.52 (m,2H), 5.86 (d, J=48.86Hz, 1H), 4.26-4,33 (m, J=2.54Hz, J=7.18Hz, 2H), 1.26 (t, J=7.07Hz, 3H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 189.5(d, J=19.9Hz), 164.9 (d, J=24.3Hz), 134.5, 133.3, 129.5 (d, J=3.3Hz), 128.8, 90.1 (d, J=197.8Hz), 62.8, 13.9

¹⁹F NMR (470MHz,CDCl₃): δ -190.3 (d, J=48.7)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-φαίνυλο προπιονικού αιθυλεστέρα (70iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50mg του εστέρα **70** (0.24 mmol) και 2.2mg NaBH₄ (0.059 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 55.1/44.9 (*anti/syn*).

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.26-7.40 (m,5H), 4.96-5.17 (m, 2H_{ANTI-SYN}), 4.18-4.25 (q, J= 7.21Hz, 2H_{ANTI-SYN}), 2.74 (d.br., 1H), 1.18-1.25 (t, J= 7.17Hz, 3H_{ANTI-SYN})

 $[\]frac{{}^{13}\text{C NMR (125MHz, CDCl_3)}}{(d, J=44.7Hz), 128.54 (d, J=17.31Hz), 126.63 (d, J=32.7Hz), 91.95 (d, J=67.8Hz), 90.43 (d, J=66.6Hz), 73.57-73.6 (dd, J=35.65Hz), 61.83 (d, J=12.51Hz), 13.94 (d, J=1.93Hz)$

 $\frac{^{19}\text{F}}{\text{NMR}}$ (470MHz, CDCl₃): δ -197.6 (dd, J=16.02Hz, J=48.05Hz), -202.7 (dd, J=22.55Hz, J=48.33Hz)

Αναγωγή του εστέρα (70) με τις κετορεδουκτάσες 130 και 131

Η αναγωγή του εστέρα 70 επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω ΙΙΙ. Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα (kred130 \rightarrow syn 84.8% de, >99% ee και kred131 >99% de, >99% ee αντίστοιχα).

¹<u>H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.348-7.421 (m, 5H), *syn* 5.152 (dd, J=3.96Hz, J= 22.30Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.135 (dd, J= 4.95Hz, J= 16.37Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.06 (dd, J= 4.95Hz, J= 48.45Hz, 1H- α), *syn* 5.022 (dd, J= 3.80Hz, J= 48.05Hz, 1H- α), 4.20 (q, J=7.17Hz, 2H), 2.75 (d.br,1H), 2.59 (d.br., 1H) 1.19 (t, J=7.13Hz, 3H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -197.71 (dd, J= 16.46Hz, J=47.87Hz), *syn* -202.76 (dd, J=22.23Hz, J=48.31Hz)

Σύνθεση του 3-υδρόξυ-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο-προπιονικού αιθυλεστέρα (71i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **71i** με αλδολική συμπύκνωση. Για αυτήν την παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 1.27ml διισοπροπυλαμίνης (9.08 mmol), 5.67ml n-BuLi (9.08 mmol), 500mg οξικού αιθυλεστέρα (5.67 mmol) και 0.69 ml p-μεθόξυ – βενζαλδεΰδη (5.67mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.:EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 82%

 $\frac{^{1}\text{H NMR (300MHz, CDCl}_{3})}{7.12\text{Hz}, 2\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H)}, 2.71-2.75 \text{ (m, 5H)}, 5.11-5.15 \text{ (m, 1H)}, 4.18 \text{ (q, J} = 7.12\text{Hz}, 2\text{H}), 3.3 \text{ (d. br, 1H)}, 2.71-2.75 \text{ (m, 2H)}, 1.26 \text{ (t, J} = 7.26\text{Hz}, 3\text{H})}$

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.8, 159.6, 142.8, 135.1, 127.3, 114.3, 70.3, 61.2, 55.6, 43.7, 14.5

Σύνθεση του 3-οξο-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο προπιονικού αιθυλεστέρα (71ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο PCC

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **70ii.** Για την σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1550 mg του PCC (7,19 mmol) και 1075 mg του υδρόξυ εστέρα **71i** (4.79 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 63% <u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.70-7.92 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 6.95 (m, 2H), 4.19 (q, J= 7.08Hz, 2H), 3.93 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 1.24 (t, J= 7.14Hz, 3H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 191.1, 168.1, 164.3, 131.3, 129.5, 128.1, 114.3, 61.7, 55.9, 46.2, 14.4,

Σύνθεση του υποστρώματος 71 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **71** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 300mg του 3-όξο-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο προπϊονικού αιθυλεστέρα **71ii** (1,35 mmol), 526 mg Selectfluor (1.48 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 90% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

<u>1H NMR (500MHz, CDCl3)</u>: δ 8.08-8.11 (m, 2H), 7.16-7.19 (m, 2H), 5.81 (d, J =48.92Hz, 1H), 4.27-4.33 (m, J=7.18Hz, 2H), 4.27-4.33 (m, 2H), 1.26 (t, J=7.14Hz, 3H)

<u>13C NMR (125MHz, CDCl3)</u>: δ 188 (d, J=19.5Hz), 166.5 (d, J=256.2Hz), 164.8 (d, J= 25.9Hz), 166.4 (dd, ²J _{C-F} = 3.57Hz, ³J _{C-F} =9.42Hz), 132, 129.7, 116.1 (d, J =22.7Hz), 90.3 (d, J=199Hz), 62.8, 13.9

<u>19F NMR (470MHz, CDCl3)</u>: δ -189.6 (d, J= 49.13Hz), -101.82-101.87(m)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-(p-μεθοξυ)-φαίνυλο προπιονικού αιθυλεστέρα (71iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50mg του εστέρα **71** (0.21 mmol) και 2mg NaBH₄ (0.052 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 63.8/36.2 (*anti/syn*).

¹<u>H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.31-7.34 (m,2H), 6.89-6.93 (m,2H), 4.92-5.11(m, 2H), 4.18-4.23 (m, J= 7.20Hz, 2H), 3.81 (2s, 3H), 1.22-1.25 (m, J=7.09Hz, 3H)

 $\frac{{}^{13}\text{C NMR (125MHz, CDCl_3)}}{\text{J=2.82Hz}}$; δ 167.9, 167.2, 159.8, 129.6 (d, J=3.36Hz),128.9 (d, J=2.82Hz), 128.1, 127.9, 114, 113.9, 91.25 (dd, J=190.46Hz, J=83.78Hz), 73.29 (d, J=21.97Hz), 61.8 (d, J=7.46Hz), 14

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -198.32 (dd, J=17.59Hz, J=47.81Hz),

-202.94 (dd, J=21.51Hz, , J=48.15Hz)

Αναγωγή του εστέρα (71) με τις κετορεδουκτάσες 130 και 131

Η αναγωγή του εστέρα **71** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω **III.** Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα (kred130 \rightarrow syn 90% de, >99% ee και kred131 \rightarrow anti >99% de, >99% ee αντίστοιχα).

¹<u>H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.31-7.34 (m, 2H), 6.89-6.92 (m, 2H), *syn* 5.084 (dd, J=3.86Hz, J= 21.65Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.068 (dd, J= 4.89Hz, J= 17.56Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.015 (dd, J= 5.18Hz, J= 36.42Hz, 1H- α), *syn* 4.977 (dd, J= 3.86Hz, J= 48.27Hz, 1H- α), 4.21(q, J=7.16Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.66 (d.br., 1H) 1.22 (t, J=7.15Hz, 3H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -198.32 (dd, J= 17.62Hz, J=46.98Hz), *syn* -202.02 (dd, J=21.67Hz, J=48.25Hz)

Σύνθεση του 3-υδρόξυ-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο-προπιονικού αιθυλεστέρα (72i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **72i** με αλδολική συμπύκνωση. Για αυτήν την παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 1.27 ml διισοπροπυλαμίνης (9.07 mmol), 5.67ml n-BuLi (9.07 mmol), 500mg οξικού αιθυλεστέρα (5.67 mmol) και 0.81ml p-φθόρο – βενζαλδεϋδη (5.67 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 50%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.34 (m,2H), 7.03 (m, 2H), 5.12 (m, 1H), 4.17 (q, J= 7.01Hz, 2H), 3.40 (d.br., 1H), 2.69-2.71 (m, 2H), 1.26 (t, J=7.12Hz, 3H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.7, 164, 161, 138.6 (d ,J=3.28Hz), 127.7 (d) , 115.7 (d, J=21.6Hz), 70, 61.3, 43.7, 14.5

Σύνθεση του 3-οξο-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (72ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο PCC

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **72ii.** Για την σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 235 mg του PCC (1.12mmol) και 361.5 mg του υδρόξυ εστέρα **72i** (1.67 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.:EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 63%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.95-8 (m, 2H), 7.12-7.18 (m, 2H), 4.17-4.30 (m, J=7.24Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 1.25 (t, J=7.25Hz, 3H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 191.3, 167.9 (d, J=36.1Hz), 164.7, 131.6 (d, J=8.7Hz), 128.6 (d, J=8.7Hz), 116.3 (d, J=21.9Hz), 61.9, 46.3, 14.4

Σύνθεση του υποστρώματος 72 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **72** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 90 mg του 3-όξο-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο προπϊονικού αιθυλεστέρα **72ii** (0.43mmol), 166.8 mg Selectfluor (0.47 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 90% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 8.08-8.11(m, 2H), 7.16-7.19 (m, 2H), 5.81(d, J = 48.92Hz, 1H), 4.27-4.33 (m, J=3.11Hz, J=7.15Hz, 2H), 1.26 (t, J= 7.11Hz, 3H)

 $\frac{{}^{13}\text{C NMR (125MHz, CDCl_3)}}{{}^{25.9}\text{Hz}}; \delta 188 \text{ (d, J=19.5Hz)}, 166.5 \text{ (d, J=256.2Hz)}, 164.8 \text{ (d, J=25.9Hz)}, 164.4 \text{ (dd, } {}^{2}\text{J}_{\text{C-F}} = 3.57\text{Hz}, {}^{3}\text{J}_{\text{C-F}} = 9.42\text{Hz}), 132, 129.7, 116.1 \text{ (d, J =22.7Hz)}, 90.3 \text{ (d, J=199\text{Hz})}, 62.8, 13.9$

¹⁹F NMR (470MHz,CDCl₃): δ -189.6 (d, J= 49.13Hz), -101.82-101.87 (m)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο προπιονικού αιθυλεστέρα (72iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50mg του εστέρα **72** (0.22mmol) και 2 mg NaBH₄ (0.055 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 58.2/41.8 (*anti/syn*).

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.31-7.34 (m,2H), 6.89-6.93 (m,2H), 4.92-5.11 (m, 2H), 4.18-4.23 (m, J= 7.22Hz, 2H), 3.81 (2s, 3H), 1.22-1.25 (m, J=7.11Hz, 3H)

 $\frac{{}^{13}\text{C NMR (125MHz, CDCl}_3)}{\text{J=2.82Hz}}$; δ 167.9, 167.2, 159.8, 128.6 (d, J=3.36Hz), 128.4 (d, J=2.82Hz), 128.1, 127.9, 114, 113.9, 91.25 (dd, J=190.46Hz, J=83.78Hz), 73.29 (d, J=21.97Hz), 61.8 (d, J=7.46Hz), 14

 $\frac{^{19}\text{F}}{\text{NMR}}$ (470MHz, CDCl₃): δ -198.32 (dd, J=17.59Hz, J=47.81Hz), -202.94 (dd, J=21.51Hz, J=48.15Hz)

Αναγωγή του εστέρα (72) με τις κετορεδουκτάσες 130 και 131

Η αναγωγή του εστέρα 72 επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω ΙΙΙ. Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και εναντιοεκλεκτικότητα (kred130 \rightarrow syn 94.3% de, >99% ee και kred131 \rightarrow anti >99% de, >99% ee αντίστοιχα).

¹<u>H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.37-7.397 (m, 2H), 7.047-7.082 (m, 2H), *syn* 5.129(dd, J=4.18Hz, J= 20.73Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.115 (dd, J= 4.92Hz, J= 15.58Hz, 1H-carbinol), *anti* 5.009 (dd, J= 4.92Hz, J= 48.17Hz, 1H- α), *syn* 4.979 (dd, J= 3.99Hz, J= 47.93Hz, 1H- α), 4.21 (q, J=7.13Hz, 2H), 2.81 (d.br., 1H) 1.22 (t, J=7.13Hz, 3H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -197.98 (dd, J= 15.74Hz, J=48.17Hz), *syn* -202.22 (dd, J=21.32Hz, J=46.89Hz)

Σύνθεση του 3-υδρόζυ-3-φαίνυλο-προπιονικού τριτ-βουτυλεστέρα (73i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **73i** με αλδολική συμπύκνωση. Για αυτήν την παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 0.96 ml διισοπροπυλαμίνης (6.88 mmol), 4.3ml n-BuLi (6.88 mmol), 500mg οξικού τριτ-βουτυλεστέρα **78** (4.3 mmol) και 0.43ml βενζαλδεϋδη (4.3mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 75%

¹<u>H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.27-7.37 (m, 5H), 5.06-5.11 (m,1H), 3.46 (d. br, 1H), 2.71-2.75 (m, 2H), 1.45 (s,9H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.3, 142.9, 128.8, 128, 126.1, 81.9, 70.7, 44.6, 28.4

Σύνθεση του 3-οξο-3- φαίνυλο προπιονικού τριτ-βουτυλεστέρα (73ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο PCC

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **73ii.** Για την σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1920 mg του PCC (8.91 mmol) και 1320 mg του υδρόξυ εστέρα **73i** (5.94 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 50%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.4-7.6 (m, 5H), 3.9 (s, 2H), 1.42 (s,9H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 192.7, 167.1, 133.9, 128.9, 82.4, 47.7, 28.2

Σύνθεση του υποστρώματος 73 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **73** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 220 mg του 3-όξο-3-φαίνυλο προπϊονικού τριτ-βουτυλεστέρα **73ii** (1.01 mmol), 394.5 mg Selectfluor (1.11 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 82% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. <u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 8.01-8.03 (m, 2H), 7.61-7.64 (m, 1H), 7.48-7.51 (m,2H), 5.74 (d, J=49.05Hz, 1H), 1.42 (s, 9H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 189.9 (d, J=19.8Hz), 163.7 (d, J= 24.4Hz), 134.3, 133.6, 129.4 (d, J=2.7Hz), 128.7, 90.07 (d, J=196.5Hz), 84.5, 27.7

¹⁹F NMR (470MHz,CDCl₃): δ -189.3 (d, J= 49.46Hz)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3--φαίνυλο προπιονικού τριτ-βουτυλεστέρα (73iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50mg του εστέρα **73** (0.21 mmol) και 2mg NaBH₄ (0.052 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 83.1/16.9 (*anti/syn*).

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.32-7.42 (m,5H), 4.85-5.13 (m, 2H_{ANTI-SYN}), 2.68-2.81 (br.d, J=62.9Hz, 1H), 1.38 (2s, 9H_{ANTI-SYN})

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 166.53 (d, J=23.3Hz), 137.65 (d, J=3.45Hz), 128.3-128.5 (m), 126.79 (d,J=13.9Hz), 90.98 (d, J=190.66Hz), 83.34, 74.06 (d, J=20.66Hz), 73.74 (d, J=21.97Hz), 28.1

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -196.15 (dd, J =16.69Hz, J=48.77Hz),-199.56 (dd, J=20.5Hz, J=48.3Hz)

Αναγωγή του εστέρα (73) με τις κετορεδουκτάσες 130 και 131

Η αναγωγή του εστέρα **73** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ενζυμικής αντίδρασης σε μικρή κλίμακα που περιγράφηκε παραπάνω **ΙΙΙ.** Το προϊόν της αναγωγής σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με ικανοποιητική διαστερεοεκλεκτικότητα και υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα (kred130 → syn 33,5% *de*, >99% *ee* και kred131 → anti >99% *de*, >99% *ee* αντίστοιχα).

¹<u>H NMR (500 MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.32-7.42 (m, 5H), *anti* 5.115 (dd, J=4.66Hz, J= 16.49Hz, 1H-carbinol), *syn* 5.076 (dd, J= 4.71Hz, J= 20.54Hz, 1H-carbinol), *anti* 4.966 (dd, J= 4.54Hz, J= 48.68Hz, 1H- α), *syn* 4.915 (dd, J= 4.29Hz, J= 48.43Hz, 1H- α), 2.78 (d.br., 1H) 1.37 (s, 9H)

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ *anti* -196.16 (dd, J= 16.27Hz, J=46.93Hz), *syn* -199.56 (dd, J=19.94Hz, J=48.56Hz)

Σύνθεση του 3-υδρόζυ-3-(p-μεθόζυ)-φαίνυλο-προπιονικού τριτ-βουτυλεστέρα (74i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **74i** με αλδολική συμπύκνωση. Για αυτήν

την παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 0,78 ml διισοπροπυλαμίνης (5.59 mmol), 3.49ml n-BuLi (5.59 mmol), 500 mg οξικού τριτ-βουτυλεστέρα **78** (3.72 mmol) και 0.45ml p-μεθόξυ-βενζαλδεϋδη (3.72mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 62%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.28 (m,2H), 6.87 (m, 2H), 5.00- 5.05 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.37 (d.br., 1H), 2.52-2.72 (m,2H), 1.44 (s,9H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.3, 159.5, 135.2, 127.3, 114.2, 81.8, 70.4, 55.6, 44.6, 28.4

Σύνθεση του 3-οξο-3-(p-μεθόξυ) φαίνυλο προπιονικού τριτ-βουτυλεστέρα (74ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο PCC

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **74ii.** Για την σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 215.5 mg του PCC (1.85 mmol) και 310 mg του υδρόξυ εστέρα **74i** (1.24 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 64%

<u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.62-7.94 (m, 2H), 6.93 (m, 2H), 3.83-3.86 (m, 5H) , 1.43 (s, 9H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 191.8, 167.3, 164.2, 131.2, 129.7, 127.9, 114.2, 82.2, 55.8, 47.5, 28.3

Σύνθεση του υποστρώματος 74 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος 74 επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 220mg του 3-όξο-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο προπϊονικού τριτβουτυλεστέρα 74ii (0.9 mmol), 336.3 mg Selectfluor (0.95 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με απόδοση 75% χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

 $\frac{^{1}\text{H} \text{ NMR (500MHz, CDCl}_{3})}{\text{J}=49.27\text{Hz}, 1\text{H}), 3.88 (s, 3\text{H}), 1.43 (s, 9\text{H}),}$

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 188.75, 178.2, 164.8, 132.4 (d, J=3.46Hz), 114.4, 90.6(d, J=196.62Hz), 84.73, 55.91, 28.21

¹⁹F NMR (470MHz,CDCl₃): δ -189.53 (d, J=49.9Hz)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-(p-μεθόξυ)-φαίνυλο προπιονικού τριτβουτυλεστέρα (74iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50mg του εστέρα **74** (0.18 mmol) και 1.7 mg NaBH₄ (0.046 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 79.8/20.2 (*anti/syn*).

¹<u>H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.32-7.34 (m, 2H_{ANTI-SYN}), 6.88-6.91 (m,2H), 4.81-5.06 (m, 2H_{ANTI-SYN}), 3.81 (2s, 3H_{ANTI-SYN}), 2.55-2.67 (d. br., J=58,1Hz, 1H), 1.39 (2s, 9H_{ANTI-SYN})

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 159.7, 130.01 (d, J =32.65Hz), 128.1-128.4 (m), 113.9, 113.8, 90.97 (d, J=190.63), 83.8, 73.36 (d, J=22.23Hz), 55.3, 27.8

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -199.01 (dd, J =20.03Hz, J=49.30Hz), -197.1 (dd, J =16.87Hz, J =48.54Hz)

Σύνθεση του 3-υδρόξυ-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο-προπΙονικού τριτ-βουτυλεστέρα (75i) μέσω αλδολικής συμπύκνωσης

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **75i** με αλδολική συμπύκνωση. Για αυτήν την παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 0.58 ml διισοπροπυλαμίνης (4.13 mmol), 2.58ml n-BuLi (4.13 mmol), 300mg οξικού τριτ-βουτυλεστέρα (3.72 mmol) και 0.27ml pφθόρο-βενζαλδεϋδη (2.58 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 2 ώρες. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 62%

¹<u>H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.34 (m,2H), 7.03 (m, 2H), 5.03- 5.10 (m, 1H), 3.50 (d.br., 1H), 2.62-2.64 (m,2H), 1.45 (s, 9H)

1³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 172.3, 159.5, 135.2, 127.3, 114.2, 81.8, 70.4, 55.6, 44.6, 28.4

Σύνθεση του 3-οξο-3-(p-φθόρο) φαίνυλο προπιονικού τριτ-βουτυλεστέρα (75ii) μέσω οξείδωσης με το αντιδραστήριο PCC

Με ανάλογο τρόπο όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **75ii.** Για την σύνθεση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 1290 mg του PCC (5.98 mmol) και 960 mg του υδρόξυ εστέρα **75i** (3.98 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (P.E.: EtOAc, v/v, 15/1). Απόδοση 66% <u>¹H NMR (300MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.94-7.99 (m, 2H), 7.05-7.17 (m, 2H), 3.86 (s, 2H), 1.43 (s, 9H)

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃): δ 191.7, 167.3, 166.8, 165.3, 133.04 (d, J=2.22Hz), 131.6, 131.5, 128.4 (d, J=8.23Hz), 116.2 (d, J=22.13Hz)-keto, 115.9 (d, J=22.02Hz)-enol, 82.5(keto), 81.6(enol), 47.7, 28.7(enol), 28.2(keto)

Σύνθεση του υποστρώματος 75 μέσω ηλεκτρονιόφιλης φθορίωσης

Η σύνθεση του υποστρώματος **75** επιτεύχθηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 200mg του 3-όξο-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο προπϊονικού τριτβουτυλεστέρα **75ii** (0.8 mmol), 327.1 mg Selectfluor (0.92 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες. Απόδοση 85%. Έγινε προσπάθεια καθαρισμού με (P.E: EtOAc 2%), ωστόσο λόγω της αυθόρμητης υδρόλυσης του δεν ήταν εφικτό να απομονωθεί κι έτσι λαμβανόταν πάντα μείγμα (1:1) με τα υδρολυμένα παραπροϊόντα.

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.93-8.14 (m, 4H), 7.15-7.19 (m, 4H), 6.13-6.34 (t), 5.67 (d, J=49.12Hz, 1H), 5.47 (d, J=46.93Hz, 1H), 1.43 (9H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 192.09 (d, J=14.55Hz), 188.4 (d, J=20.33Hz), 166.7 (d, J= 19.9Hz), 165.3 (d,J=18.6Hz), 163.7 (d,J=24.11Hz), 132.3 (d, J=9.47Hz), 130.7 (d, J=9.10Hz), 116.1, 90.26 (d, J=196.64Hz), 84.7, 84.3, 82.8, 27.7

¹⁹F NMR (470MHz,CDCl₃): δ -188,36(d, J=49,4Hz)

Σύνθεση του 2-φθόρο-3-υδρόξυ-3-(p-φθόρο)-φαίνυλο προπιονικού τριτβουτυλεστέρα (75iii) μέσω αναγωγής με NaBH4

Η παρασκευή του επιτεύχθηκε με αναγωγή με NaBH₄ σύμφωνα με την γενική μέθοδο **ΙΙ.** Χρησιμοποιήθηκαν 50 mg του εστέρα **75** (0.19 mmol) και 1.8 mg NaBH₄ (0.049 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με απόδοση 100% και το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Μίγμα διαστερεομερών 72.6/27.4 (*anti/syn*).

<u>¹H NMR (500MHz, CDCl₃)</u>: δ 7.34-7.41 (m, 2H), 7.03-7.14 (m, 2H), 4.78-5.15 (m, 2H), 1.38 (s, 9H)

¹³C NMR (125MHz, CDCl₃): δ 166.7, 164.7 (d, J= 3.22hZ), 129,128.4, 116.1, 115.9, 115.5, 91.45 (dd,J= 191.25Hz, J=41.65Hz), 88.6, 86.2, 83.9, 73.07, 28.2

¹⁹F NMR (470MHz, CDCl₃): δ -199.115 (dd,J=19.87Hz, J=48.4), -196,95 (dd, J=16.37Hz, J=48.4Hz)

<u>ПАРАРТНМА</u>













































7,335 6,913 6,913 6,095 5,006





































190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm








7.3391 7.3375 7.3375 7.3375 7.3375 7.3373 7.3373 7.3373 7.3373 7.3373 7.3172 5.1725 5.1725 5.1725 5.1725 5.1725 5.















































-5,140 -5,133 -5,133 -5,131 -5,131 -5,092 -5,093 -5,003 -5









7,367 7,269 7,705 7,705 7,705 7,705 7,705 7,705 7,705 5,137 7,705 5,137 7,705 5,137 5,137 5,137 5,135 5,137 5,135,















Г

-187.5

-188.0

-188.5

-189.0

-189.5

-190.0

-190.5

-191.0

-191.5

ppm



-5,122 -5,123 -5,0000 -5,0000 -5,0000 -5,000 -5,000 -5,000 -5,000 -5,000 -5,000










































6112---6112---6112---6112---61022--61022---61022---61022---61022---61022---61022---61022---61022---61022---







RACEMIC 57iii + R-MPA













RACEMIC 70iii + S-MTPA





RACEMIC 72iii + S-MTPA













KRED 118



KRED 131



KRED A1D



KRED B1F















KRED 131











KRED 102



KRED 112



KRED 131



KRED A1D



References

- Anastas, P. T.; Warner, J. C. Green Chemistry: Theory and Practice: Paperback: Paul Anastas -Oxford University Press. 1998, p 148.
- (2) Chapman, J.; Ismail, A.; Dinu, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* **2018**, *8* (6), 238. https://doi.org/10.3390/catal8060238.
- (3) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6.
- (4) Zhang, Y.-W.; Liu, R.-J.; Xu, X.-M. One-Pot, Two-Step Enzymatic Synthesis of Amoxicillin by Complexing with Zn2+. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 88 (1), 49–55. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2727-8.
- (5) Innovations in cephalosporin and penicillin production painting Technische Informationsbibliothek (TIB) https://www.tib.eu/en/search/id/BLSE%3ARN079990413/Innovations-in-cephalosporin-andpenicillin-production/ (accessed Jan 23, 2020).
- (6) Deng, S.; Ma, X.; Su, E.; Wei, D. Efficient Cascade Synthesis of Ampicillin from Penicillin G Potassium Salt Using Wild and Mutant Penicillin G Acylase from Alcaligenes Faecalis. J. Biotechnol. 2016, 219, 142–148. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.12.034.
- (7) Xie, X.; Tang, Y. Efficient Synthesis of Simvastatin by Use of Whole-Cell Biocatalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (7), 2054–2060. https://doi.org/10.1128/AEM.02820-06.
- (8) Askin, D.; Verhoeven, T. R.; Liu, T. M. H.; Shinkai, I. Synthesis of Synvinolin: Extremely High Conversion Alkylation of an Ester Enolate. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (16), 4929–4932.

https://doi.org/10.1021/jo00016a023.

- (9) Davis, B. G.; Boyer, V. Biocatalysis and Enzymes in Organic Synthesis. Natural Product Reports. 2001, pp 618–640. https://doi.org/10.1039/b003667f.
- (10) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J. E. Dynamic Kinetic Resolutions. In *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; John Wiley and Sons, 2008; pp 87–113. https://doi.org/10.1002/9783527622481.ch4.
- (11) Parmar, V. S.; Prasad, A. K.; Pati, H. N.; Kumar, R.; Azim, A.; Roy, S.; Errington, W. Enzyme-Catalyzed Chemoselective Transesterification Reactions on Hydroxymethylated Phenolic Compounds. In *Bioorganic Chemistry*; Academic Press Inc., 1999; Vol. 27, pp 119–134. https://doi.org/10.1006/bioo.1998.1117.
- (12) Wang, J.; Li, G.; Reetz, M. T. Enzymatic Site-Selectivity Enabled by Structure-Guided Directed Evolution. *Chem. Commun.* 2017, 53 (28), 3916–3928. https://doi.org/10.1039/C7CC00368D.
- (13) Rodríguez, C.; De Gonzalo, G.; Fraaije, M. W.; Gotor, V. Ionic Liquids for Enhancing the Enantioselectivity of Isolated BVMO-Catalysed Oxidations. *Green Chem.* 2010, *12* (12), 2255–2260. https://doi.org/10.1039/c0gc00560f.
- (14) Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. Highly Stereoselective Reductions of α-Alkyl-1,3-Diketones and α-Alkyl-β-Keto Esters Catalyzed by Isolated NADPH-Dependent Ketoreductases. Org. Lett. 2005, 7 (22), 4799–4801. https://doi.org/10.1021/ol051166d.
- (15) Enzyme Nomenclature Title; Webb, E. C., Ed.; Academic Press: San Diego, 1992.
- (16) Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. Recent Progress in Biocatalysis for Asymmetric Oxidation and Reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009, 20 (5), 513–557. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2008.12.035.
- (17) Wang, L. J.; Li, C. X.; Ni, Y.; Zhang, J.; Liu, X.; Xu, J. H. Highly Efficient Synthesis of Chiral Alcohols with a Novel NADH-Dependent Reductase from Streptomyces Coelicolor. *Bioresour. Technol.* 2011, 102 (14), 7023–7028. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.046.
- (18) Prelog, V. Specification of the Stereospecificity of Some Oxido-Reductases by Diamond Lattice Sections. *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9* (1), 119–130. https://doi.org/10.1351/pac196409010119.
- (19) de María, P. D.; de Gonzalo, G.; Alcántara, A. R. Biocatalysis as Useful Tool in Asymmetric Synthesis: An Assessment of Recently Granted Patents(2014-2019). *Catalysts* 2019, 9 (10). https://doi.org/10.3390/catal9100802.
- (20) Almeida, L.; Soares-da-Silva, P. Eslicarbazepine Acetate (BIA 2-093). *Neurotherapeutics* **2007**, *4* (1), 88–96. https://doi.org/10.1016/j.nurt.2006.10.005.
- (21) US20140199735A1 Biocatalytic process for preparing eslicarbazepine and analogs thereof -Google Patents https://patents.google.com/patent/US20140199735A1/en (accessed Jan 24, 2020).
- (22) Fryszkowska, A.; Peterson, J.; Davies, N. L.; Dewar, C.; Evans, G.; Bycroft, M.; Triggs, N.; Fleming, T.; Gorantla, S. S. C.; Hoge, G.; et al. Development of a Chemoenzymatic Process for Dehydroepiandrosterone Acetate Synthesis. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20* (8), 1520–1528. https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00215.
- (23) Fryszkowska. / HAO WANATATALIA DI U N MINUTEN MINUT US009879045B2 (12) United States Patent (56) References Cited (54) PROCESSES FOR THE PREPARATION OF DEHYDROEPIANDROSTERONE AND ITS INTERMEDIATES; 2018.
- (24) Chen, L.-F.; Fan, H.-Y.; Zhang, Y.-P.; Wu, K.; Wang, H.-L.; Lin, J.-P.; Wei, D.-Z.

Development of a Practical Biocatalytic Process for (S)-N-Boc-3-HydroxypiperidineSynthesis.TetrahedronLett.2017,58(16),1644–1650.https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.03.037.

- (25) Xu, G.-P.; Wang, H.-B.; Wu, Z.-L. Efficient Bioreductive Production of (S)-N-Boc-3-Hydroxypiperidine Using Ketoreductase ChKRED03. *Process Biochem.* 2016, 51 (7), 881– 885. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.008.
- (26) Patel, R. N. Green Processes for the Synthesis of Chiral Intermediates for the Development of Drugs. *Green Biocatal.* **2016**, 71–114. https://doi.org/10.1002/9781118828083.ch4.
- (27) Patel, R. N. Biocatalysis: Synthesis of Key Intermediates for Development of Pharmaceuticals. *ACS Catal.* **2011**, *1* (9), 1056–1074. https://doi.org/10.1021/cs200219b.
- (28) Patel, R. N.; Chu, L.; Mueller, R. Diastereoselective Microbial Reduction of (S)-[3-Chloro-2-Oxo-1- (Phenylmethyl)Propyl]Carbamic Acid, 1,1-Dimethylethyl Ester. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14* (20), 3105–3109. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2003.07.016.
- (29) Carter, N. J.; McCormack, P. L. Duloxetine. CNS Drugs 2009, 23 (6), 523–541. https://doi.org/10.2165/00023210-200923060-00006.
- (30)Zhimin, O.; Haibing, Z.; Lan, T.; Wei, Z.; Gensheng, Y. Asymmetric Synthesis of Duloxetine Intermediate (S)-(-)-3-N-Methylamino-1-(2-Thienyl)-1-Propanol Using Immobilized Saccharomyces Cerevisiae in Liquid-Core Sodium Alginate/Chitosan/Sodium Alginate Microcapsules. **Bioprocess** Biosyst. Eng. 2014, (11), 2243-2250. 37 https://doi.org/10.1007/s00449-014-1202-9.
- (31) Rieser, M. J.; Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Kozlowski, J. F.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoye, T. R. Determination of Absolute Configuration of Stereogenic Carbinol Centers in Annonaceous Acetogenins by Proton and Fluorine 19-NMR Analysis of Mosher Ester Derivatives. J. Am. Chem. Soc. 1992, 114 (26), 10203–10213. https://doi.org/10.1021/ja00052a018.
- (32) Sullivan, G. R.; Dale, J. A.; Mosher, H. S. Correlation of Configuration and Fluorine-19 Chemical Shifts of .Alpha.-Methoxy-.Alpha.-Trifluoromethylphenyl Acetate Derivatives. J. Org. Chem. 1973, 38 (12), 2143–2147. https://doi.org/10.1021/jo00952a006.
- (33) Hoye, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. Mosher Ester Analysis for the Determination of Absolute Configuration of Stereogenic (Chiral) Carbinol Carbons. *Nat. Protoc.* 2007, 2 (10), 2451–2458. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.354.
- (34) Meanwell, N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. J. Med. Chem. 2018, 61 (14), 5822–5880. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788.
- (35) Smart, B. E. Fluorine Substituent Effects (on Bioactivity). J. Fluor. Chem. 2001, 109 (1), 3–11. https://doi.org/10.1016/S0022-1139(01)00375-X.
- (36) O'Hagan, D. Understanding Organofluorine Chemistry. An Introduction to the C-F Bond. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 308–319. https://doi.org/10.1039/B711844A.
- (37) Wong, S. S.; Paddon-Row, M. N. Theoretical Evidence in Support of the Anh–Eisenstein Electronic Model in Controlling π-Facial Stereoselectivity in Nucleophilic Additions to Carbonyl Compounds. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1990, No. 6, 456–458. https://doi.org/10.1039/C39900000456.
- (38) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. J. Med. Chem. 2011, 54 (8), 2529–2591. https://doi.org/10.1021/jm1013693.
- (39) Wang, J.; Sánchez-Roselló, M.; Aceña, J. L.; del Pozo, C.; Sorochinsky, A. E.; Fustero, S.; Soloshonok, V. A.; Liu, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chem. Rev.* 2014, *114* (4), 2432–

2506. https://doi.org/10.1021/cr4002879.

- (40) Nyffeler, P. T.; Durón, S. G.; Burkart, M. D.; Vincent, S. P.; Wong, C.-H. Selectfluor: Mechanistic Insight and Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2005, 44 (2), 192–212. https://doi.org/10.1002/anie.200400648.
- (41) Banks, R. E.; Lawrence, N. J.; Popplewell, A. L. Efficient Electrophilic Fluorination of β-Dicarbonyl Compounds with the Selectfluor Reagent F-TEDA-BF 4 {1-Chloromethyl-4-Fluoro-1,4-Diazoniabicyclo[2.2.2]Octane Bis(Tetrafluoroborate)}. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994, No. 3, 343–344. https://doi.org/10.1039/C39940000343.
- (42) Differring, E.; Wehrli, M. Nucleophilic Substitution versus Electron Transfer: 2. SN2 at Flouride and Electron Transfer Are Competing and Different Pathways in Electrophilic Flourinations. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (31), 3819–3822. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79384-1.
- (43) Rozatian, N.; Ashworth, I. W.; Sandford, G.; Hodgson, D. R. W. A Quantitative Reactivity Scale for Electrophilic Fluorinating Reagents. *Chem. Sci.* 2018, 9 (46), 8692–8702. https://doi.org/10.1039/C8SC03596B.
- (44) Kitazume, T.; Nakayama, Y. Synthetic Approach to Versatile Chiral Molecules Containing a Fluorine Atom. J. Org. Chem. **1986**, 51 (14), 2795–2799. https://doi.org/10.1021/jo00364a034.
- (45) O'Hagan, D. Modern Fluoroorganic Chemistry. Synthesis, Reactivity, Applications. By Peer Kirsch.; 2005; Vol. 6. https://doi.org/10.1002/cbic.200500068.
- (46) Ibad, M. F.; Abid, O.-R.; Adeel, M.; Nawaz, M.; Wolf, V.; Villinger, A.; Langer, P. Synthesis of Highly Functionalized Biaryls by Condensation of 2-Fluoro-1,3-Bis(Silyloxy) 1,3-Dienes with 3-Cyanochromones and Subsequent Domino "Retro-Michael/Aldol/Fragmentation." J. Org. Chem. 2010, 75 (23), 8315–8318. https://doi.org/10.1021/jo1018443.
- (47) Han, X.; Luo, J.; Liu, C.; Lu, Y. Asymmetric Generation of Fluorine-Containing Quaternary Carbons Adjacent to Tertiary Stereocenters: Uses of Fluorinated Methines as Nucleophiles. *Chem. Commun.* 2009, No. 15, 2044. https://doi.org/10.1039/b823184b.
- (48) Li, Y. L.; Wang, X. L.; Xiao, D.; Liu, M. Y.; Du, Y.; Deng, J. Organocatalytic Biomimetic Decarboxylative Aldol Reaction of Fluorinated β-Keto Acids with Unprotected Isatins. *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360* (21), 4147–4152. https://doi.org/10.1002/adsc.201800831.
- (49) Green, T. K.; Damarancha, A.; Vanagel, M.; Showalter, B.; Kolberg, S.; Thompson, A. Stereoselective Reduction of α-Fluoro-β-Keto Esters by NADH and NADPH-Dependent Ketoreductases. *European J. Org. Chem.* **2019**, 2019 (25), 4080–4084. https://doi.org/10.1002/ejoc.201900644.
- (50) Ocampo, R.; Dolbier, W. R.; Abboud, K. A.; Zuluaga, F. Catalyzed Reformatsky Reactions with Ethyl Bromofluoroacetate for the Synthesis of α-Fluoro-β-Hydroxy Acids. J. Org. Chem. 2002, 67 (1), 72–78. https://doi.org/10.1021/j0015778x.
- (51) Dascier, D.; Kambourakis, S.; Hua, L.; Rozzell, J. D.; Stewart, J. D. Influence of Cofactor Regeneration Strategies on Preparative-Scale, Asymmetric Carbonyl Reductions by Engineered Escherichia Coli. Org. Process Res. Dev. 2014, 18 (6), 793–800. https://doi.org/10.1021/op400312n.
- (52) Bariotaki, A.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. Enzymatic Reductions for the Regio- and Stereoselective Synthesis of Hydroxy-Keto Esters and Dihydroxy Esters. Org. Lett. 2012, 14 (7), 1792–1795. https://doi.org/10.1021/ol3003833.