ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Α) ΣΥΝΘΕΣΗ α-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ-α-ΧΛΩΡΟ-β-ΚΕΤΟ ΕΣΤΕΡΩΝ ΚΑΙ 1,3-ΔΙΚΕΤΟΝΩΝ ΜΕ Oxone/$AlCl_3$ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Β) ΣΤΕΡΕΟΕΚΛΕΚΤΙΚΕΣ ΒΙΟΑΝΑΓΩΓΕΣ α-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ-α-ΧΛΩΡΟ-β-ΚΕΤΟ ΕΣΤΕΡΩΝ ΑΠΟ NADPH-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΙΟΥΛΙΑ ΣΜΟΝΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Οργανικής Χημείας-Βιοκατάλυσης του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Σμόνου Ιουλίας.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Ιουλία Σμόνου για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό της, παρά την πρωτόγνωρη και απαιτητική περίοδο για την εκπαίδευση αλλά και άλλων πτυχών της ζωής καθώς και την μεγάλη ζήτηση που υπήρχε για την θέση αυτή.

Έπειτα, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον μεταπτυχιακό φοιτητή Κατσουλάκη Νικόλαο και τον διδακτορικό φοιτητή Γιαννόπουλο Βασίλειο για την πολύτιμη βοήθεια τους και την καθοδήγηση τους στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την ηθική και οικονομική στήριξη που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**.....1
2. **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**…….....3
3. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**…….....14
4. **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**.....24
5. **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**…….....30
6. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**…….....47

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σύνθεση στην Οργανική Χημεία πολλές φορές μπορεί να καταστεί επίπονη και χρονοβόρα με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να παραλαμβάνεται σε πολύ χαμηλή απόδοση με παραπροϊόντα και να προκύπτουν πολλά τοξικά απόβλητα. Αυτά τα στοιχεία της χημικής σύνθεσης προσπαθούν οι επιστήμονες να εξαλείψουν με διάφορες καινοτόμες μεθόδους. Μια εναλλακτική της κλασσικής οργανικής σύνθεσης μέθοδος είναι η Βιοκατάλυση όπου χρησιμοποιούνται ένζυμα ως βιολογικοί καταλύτες σε οργανικές αντιδράσεις.

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν ως καταλύτες μέσα σε ένα οργανισμό με σκοπό να επιτελέσουν τις αντιδράσεις, που πραγματώνονται μέσα σε αυτόν, πολύ γρήγορα χωρίς να επηρεάζεται η ισορροπία της αντίδρασης. Καθώς προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, τα ένζυμα επιτελούν τις αντιδράσεις τους σε συνθήκες φυσιολογικές, οι οποίες συναντώνται και σε ένα κύτταρο. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό που μετατρέπει τα ένζυμα σε σημαντικά εργαλεία στην Οργανική Σύνθεση είναι η εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν. Η δομή του εκάστοτε ενζύμου καθώς και το ενεργό του κέντρο καθορίζουν την εκλεκτικότητα του, όπου το υπόστρωμα προσδένεται με κατάλληλο προσανατολισμό και πραγματοποιείται η αντίδραση, ώστε να προκύπτει μόνο εκλεκτικά μία στερεοχημικά μορφή μιας ένωσης. Στη βιομηχανία, και κυρίως στην φαρμακοβιομηχανία, είναι πολύ σημαντική η παραγωγή ενώσεων με καθορισμένη στερεοδομή, καθώς αυτή έχει αντίκτυπο στις ιδιότητες αυτών.Τα ένζυμα διαθέτουν εξαιρετική χημειο-, τοπο- και στερεοεκλεκτικότητα, λειτουργία σε ήπιες συνθήκες, υψηλή εκλεκτική κατάλυση και μπορούν με τη χρήση τους να παραληφθούν πολλά στάδια της χημικής σύνθεσης μια ένωσης. Γίνεται αντιληπτό, λοιπόν, πως τα ένζυμα προσφέρουν στην σύνθεση πολλά πλεονεκτήματα. Επιπλέον, μια συνθετική πορεία για την παραγωγή μιας ένωσης που περιλαμβάνει την χρήση ενζύμων ακολουθεί τις αρχές της Πράσινης Χημείας. Ωστόσο, τον πρώτο καιρό της βιοκατάλυσης υπήρχε μεγάλη δυσπιστία από τους οργανικούς χημικούς. Υπήρχε η εντύπωση πως τα ένζυμα είναι ακριβά και ασταθή μόρια, με πολύ μικρό εύρος υποστρωμάτων που μπορούσαν να καταλύσουν. Οι ιδέες αυτές με την εξέλιξη της ενζυμικής τεχνολογίας έχουν εξαλειφθεί και έχουν αποδειχθεί εμπράκτως εσφαλμένες.

Κατά καιρούς έχει ανακαλυφθεί και χρησιμοποιηθεί μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων. Κατέστη απαραίτητος ο διαχωρισμός τους σε κατηγορίες για την καλύτερη μελέτη και χρήση τους. Η Διεθνής Επιτροπή Ενζύμων (Enzyme Commission) δημοσίευσε για πρώτη φορά το 1961 τις έξι κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν τα ένζυμα ανάλογα με την αντίδραση που καταλύουν. Επίσης, σε όλα τα ένζυμα αποδόθηκε ένας 'EC' αριθμός, με σκοπό την περαιτέρω εξειδίκευση της κατηγοριοποίησης. Συγκεκριμένα, κάθε ένζυμο περιγράφεται από το EC και τέσσερις αριθμούς χωρισμένους μεταξύ τους με τελεία.[1] Τα ψηφία αυτά χαρακτηρίζουν την κατηγορία, το είδος της αντίδρασης, το υπόστρωμα και την ομάδα. Οι έξι κατηγορίες στις οποίες ταξινομήθηκαν τα ένζυμα είναι οι εξής:

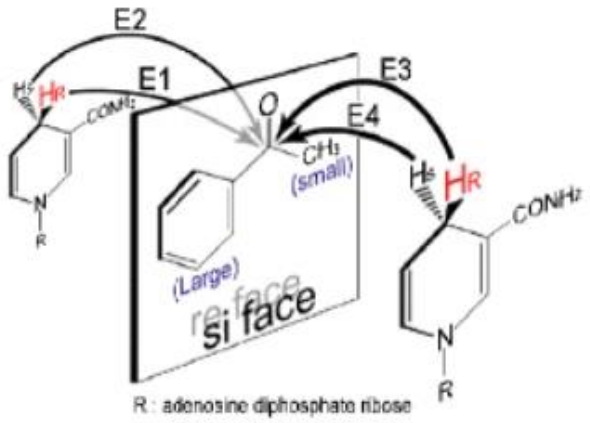
Πίνακας 1: Ταξινόμηση ενζύμων.

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

Κετοredουκτάσες

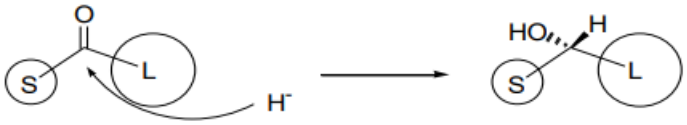
Στην Οργανική Σύνθεση ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι τα οξειδοαναγωγικά και τα υδρολυτικά ένζυμα. Στην παρούσα εργασία θα μελετηθούν και θα χρησιμοποιηθούν τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα και συγκεκριμένα οι κετορεδουκτάσες. Οι κετορεδουκτάσες αποτελούν ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα στην βιομηχανική σύνθεση φαρμάκων, καταλύοντας αντιδράσεις αναγωγής καρβονυλομάδων κετονών ή αλδεϋδών. Για να είναι δυνατή όμως η κατάλυση με τις κετορεδουκτάσες, είναι απαραίτητη η παρουσία συμπαραγόντων που βοηθούν στην μεταφορά των ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα για την αναγωγή. Με αυτόν τον τρόπο, λοιπόν, μπορούν να μετατραπούν κυρίως προχειρόμορφες κετόνες σε χειρόμορφες δευτεροταγείς αλκοόλες με μεγάλη οπτική καθαρότητα.

Όσον αφορά την στερεοεκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών, η αντίδραση που καταλύουν είναι στερεοεκλεκτική ως προς το υπόστρωμα και τον συμπαράγοντα. Ο συμπαράγοντας από τον οποίο εξαρτώνται τα οξειδοαναγωγικά αυτά ένζυμα είναι το NAD(P)H. Ο νικοτιναμιδικός δακτύλιος διαθέτει δυο διαστερεοτοπικά υδρογόνα στην θέση 4 του πυριδινιού δακτυλίου, το pro-R και το pro-S. Κατά την αναγωγική αντίδραση ένα από τα δύο υδρίδια προσβάλλει την προχειρόμορφη κετόνη είτε από την *re* είτε την *si* επιφάνειά της, με αποτέλεσμα να προκύπτει η *S*-αλκοόλη ή η *R*-αλκοόλη. Η στερεοεκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών ως προς το υπόστρωμα και τον συμπαράγοντα που περιγράφηκε, δημιουργεί τέσσερις τύπους των ενζύμων αυτών.



Σχήμα 1: Αναγωγή καρβονυλίου από το συνένζυμο NADH.[2]

Για να προβλεφθεί πολλές φορές η στερεοεκλεκτικότητα της αφυδρογονάσης χρησιμοποιείται ένα εμπειρικό μοντέλο, που ονομάζεται κανόνας του Prelog.[3] Σύμφωνα με αυτόν τον κανόνα, η αφυδρογονάση μεταφέρει το ιόν υδριδίου από την re πλευρά της προχειρόμορφης κετόνης που φέρει έναν μικρό (S) και έναν μεγάλο (L) υποκαταστάτη, κατά προτίμηση ασύμμετρης, σχηματίζοντας την αντίστοιχη *S* δευτεροταγή αλκοόλη.



Σχήμα 2: Κανόνας του Prelog

Η ασύμμετρη αναγωγή προχειρόμορφων κετονών με βιοκαταλύτες είναι πολύ χρήσιμη για την σύνθεση χειρόμορφων αλκοολών με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα. Η σύνθεση τέτοιων προϊόντων με χημικό τρόπο δεν είναι τόσο αποδοτική, απαιτεί πολλά αντιδραστήρια και προκύπτουν τοξικά απόβλητα. Οι χειρόμορφες αλκοόλες αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα για την σύνθεση φαρμακευτικών μορίων και άλλων υψηλής αξίας χημικών ουσιών. Η βιοκατάλυση για την αναγωγή των προχειρόμορφων κετονών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χρησιμοποιώντας απομονωμένα ένζυμα είτε ολόκληρα κύτταρα. Η καθεμία περίπτωση εμφανίζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Στην περίπτωση των απομονωμένων ενζύμων, η δραστικότητά τους είναι πολύ υψηλή, οι παράπλευρες αντιδράσεις αποφεύγονται, είναι πιο γρήγορη διαδικασία και απαιτείται η δημιουργία συστήματος ανακύκλωσης του νικοτιναμιδικού συμπαράγοντα. Αντίθετα, τα ολόκληρα κύτταρα μέσω του μεταβολισμού τους αναγεννούν τον συμπαράγοντα στην ανηγμένη του μορφή χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Επίσης, τα ένζυμα είναι πιο σταθερά μέσα σε αυτά και δεν απαιτούνται διαδικασίες απομόνωσης και καθαρισμού τους που είναι ακριβές και χρονοβόρες. Ωστόσο, χρονοβόρα μπορεί να είναι και η δημιουργία καλλιέργειας των μικροοργανισμών αυτών.

Όπως έχει αναφερθεί, έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο απομονωμένες κετοredουκτάσες όσο και ολόκληρα κύτταρα για την σύνθεση σε βιομηχανική κλίμακα φαρμακευτικών

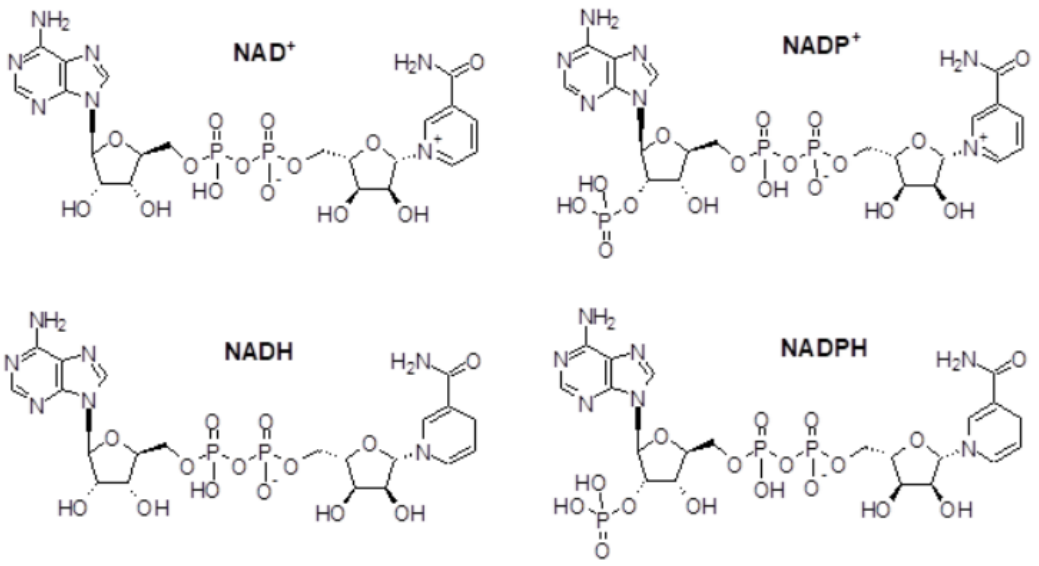
ενώσεων. Στο σχήμα που ακολουθεί, φαίνονται οι χειρόμορφες αλκοόλες υψηλής οπτικής καθαρότητας, όπως αρμόζει στην φαρμακευτική σύνθεση, που εισάγονται σε φαρμακευτικές ενώσεις χρησιμοποιώντας ορισμένες κετοredουκτάσες.

ketone	enzyme[a]	convn[b]	ee[c]	prod config[d]	pharmaceutical target	trade name(s) (config.)	application
(1)	HLADH[e] CPADH[f]	99% 99%	98% 98%	(*S*)-2 (*S*)-2		Emend, Aprepitant, L-754030 (*R*) (*S*)-*enantiomer is a constituent of analogues in clinical trials*[g]	Human neurokinin-1 (NK-1) antagonist, anti-emetic, adjuvant for cancer chemotherapy
(3)	HLADH **CPADH** **RS-1 ADH**	99% **99%** **99%**	95% **99%** **99%**	(*S*)-4 **(*S*)-4** **(*S*)-4**		Talampanel, LY-300164 (*R*)[h]	AMPA receptor antagonist, anti-convulsant, for the treatment of epilepsy, viral encephalo-phase II clinical trials, anti-cancer agent
(5)	KRED 101 **KRED 108** KRED 118 **KRED 132**	40% **86%** 85% **83%**	37% **94%** 65% **98%**	(*R*)-6 **(*R*)-6** (*R*)-6 **(*S*)-6**		Dolastatin 10 (*R*) Dysidenin barbamide	anti-cancer agent natural product, anti-proliferative antifungal agent
(7)	**CPADH** **RS-1 ADH** LKADH **KRED 132**	**99%** **92%** 90% **94%**	**98%** **98%** 86% **98%**	**(*S*)-8** **(*S*)-8** (*R*)-8 **(*S*)-8**		MA-20565 (*S*)[i]	
(9)	KRED 101 KRED 108 KRED 118 **KRED 132**	50% 40% 65% **82%**	5% 7% 30% **97%**	(*S*)-10 (*R*)-10 (*S*)-10 **(*S*)-10**		Fluoxetine, Prozac; also appl. to Strattera (*R*) or (*R,S*)[j,k]	serotonin reuptake inhibitor, anti-depressent
(11)	**KRED 108** KRED 118 KRED 132	**85%** 90% 60%	**97%** 80% 40%	**(*S*)-12** (*S*)-12 (*S*)-12		Atomoxetine, Strattera (*R*)[k]	norepinephrine reuptake inhibitor, treatment of ADHD
(13)	**KRED 132**	**70%**	**99%**	**(*S*)-14**		Atomoxetine, Strattera (*R*)[k]	

Σχήμα 3: Ενδιάμεσα φαρμακευτικών ενώσεων που συντίθονται με κετοredουκτάσες.[4]

Συνένζυμο

Απαιραίτητη στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με την χρήση βιοκαταλυτών είναι η ύπαρξη συμπαράγοντα, με αποτέλεσμα να μετατραπεί το ένζυμο σε πλήρως λειτουργικό μόριο. Αυτό βοηθά στην μεταφορά ή απομάκρυνση ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα για την επίτευξη της οξειδοαναγωγής. Συνήθη συμπαράγοντας αποτελεί το $NAD(P)^+/NAD(P)H$. Οι εξαρτώμενες νικοτιναμιδικές οξειδοαναγωγάσες καταλύουν την αναγωγή ή την οξείδωση ενός υποστρώματος ακολουθούμενες από την οξείδωση ή την αναγωγή, αντίστοιχα, ενός νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο συμπαράγοντα $NAD(P)H$ ή $NAD(P)^+$. Ο νικοτιναμιδικός δακτύλιος είναι ο δότης/δέκτης των ηλεκτρονίων και ο C4 του δακτυλίου αυτού είναι ο δότης/δέκτης του πρωτονίου.



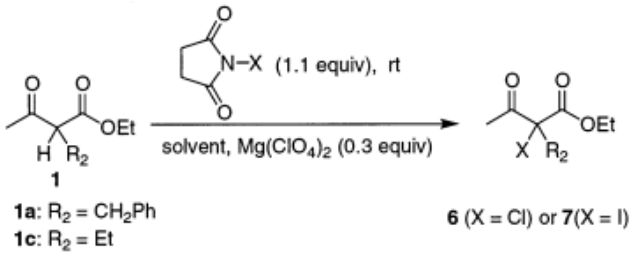
Σχήμα 4: Νικοτιναμίδο αδένινο δινουκλεοτίδιο και 2-φωσφορυλιωμένο άλας.

Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται ολόκληρα κύτταρα, έχει παρατηρηθεί ανακύκλωση των νικοτιναμιδιακών συμπαραγόντων από το μεταβολικό μονοπάτι τους. Στον αντίποδα, με την χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών για να γίνει η αναγωγή των προχειρόμορφων κετονών είναι απαραίτητη η στοιχειομετρική εισαγωγή του συμπαράγοντα αυτού. Πρόκειται, όμως, για μια πολύ δαπανηρή ένωση, με αποτέλεσμα να καταστεί απαραίτητη η πραγμάτωση της αναγέννησης του NAD(P)H, στην προκειμένη περίπτωση, ώστε να χρησιμοποιηθεί αυτό στο επόμενο καταλυτικό στάδιο.[5] Έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορες στρατηγικές για την ανακύκλωση του συμπαράγοντα και χρησιμοποιούνται ευρύτατα. Ωστόσο, την πιο διαδεδομένη μέθοδο αποτελεί η ενζυμική αναγέννηση συμπαράγοντα, στην οποία είτε μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο ξεχωριστά ένζυμα (enzyme-coupled) είτε ένα ένζυμο (substrate-coupled), με την περίπτωση του enzyme-coupled να χρησιμοποιείται πιο συχνά. Με αυτόν τον τρόπο, λοιπόν, πραγματοποιούνται παράλληλα δυο οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις από δυο διαφορετικά ένζυμα. Κατά την διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη η ύπαρξη ορισμένων προϋποθέσεων για ένα όσο γίνεται ιδανικό σύστημα αναγέννησης του συμπαράγοντα. Συγκεκριμένα, το κάθε ένζυμο να παρουσιάζει υψηλή ειδική ενεργότητα, να καταλύει το καθένα μια συγκεκριμένη αντίδραση, να είναι φθηνά και σταθερά και να χρησιμοποιούνται, ως δευτερεύοντα υποστρώματα, αντιδραστήρια απλά και φθηνά και να μην αλληλεπιδρούν με το κύριο προϊόν. Έτσι, η συνολική ποσότητα του συμπαράγοντα θα εμφανίζεται συνεχώς στο σύστημα αυξάνοντας το καταλυτικό επίπεδο αυτού και η μετατροπή του υποστρώματος θα μπορεί να ολοκληρωθεί. Το σύστημα ανακύκλωσης του συμπαράγοντα αυτού, όμως, που χρειάζεται να σχεδιαστεί στην περίπτωση των απομονωμένων ενζύμων, μπορεί να αποβεί πολλές φορές πιο ακριβό από το τελικό επιθυμητό προϊόν, και σε αυτή την περίπτωση να είναι προτιμότερη η χρήση ολόκληρων κυττάρων.

Χλωρίωση

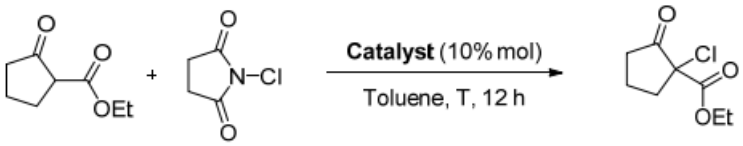
Στην χημική και φαρμακευτική βιομηχανία οι οργανικές χλωριωμένες ενώσεις αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα σε διάφορες συνθετικές πορείες. Επιπλέον, πολλές από τις φαρμακευτικές ενώσεις, που έχουν εγκριθεί από το FDA (Food and Drug Administration), περιέχουν ή συντίθεται χρησιμοποιώντας χλώριο (Cl). Η σπουδαιότητα αυτού αποτυπώνεται και στο γεγονός ότι ενώσεις που φέρουν χλώριο χρησιμοποιούνται για την θεραπεία πολλών ασθενειών, όπως υπέρταση, Αλτσχάιμερ, αλλεργίες (Chlorphenamine), καρκίνο, το άγχος (Alprazolam), βακτηριακές μολύνσεις. Το χλώριο, επίσης, όταν εισάγεται σε ορισμένες φαρμακευτικές ενώσεις προσδίδει σε αυτά μεταβολική σταθερότητα.[7] Αυτό σημαίνει πως μια φαρμακευτική ένωση που δεν παρουσιάζει σταθερότητα, μεταβολίζεται in vivo πολύ γρήγορα και απορροφάται ελάχιστα από τον οργανισμό αυτή καθαυτή, με αποτέλεσμα να απεκκρίνεται και να παρουσιάζει ελάχιστη δραστικότητα και μικρή βιοδιαθεσιμότητα. Όταν, όμως, εισαχθεί στην ένωση αυτή χλώριο, δημιουργείται ένα προφάρμακο, όπως ονομάζεται. Η νέα αυτή ένωση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, προσφέρει μεταβολική σταθερότητα σε αυτήν, και συνεπάγεται πως μεταβολίζεται αργά από τον οργανισμό, ώστε να απορροφάται και να απεκκρίνεται ικανοποιητικά από τον οργανισμό και να προσφέρει την όσο το δυνατόν μέγιστη δραστικότητα της. Γίνεται αντιληπτό, λοιπόν, πως η προσθήκη χλωρίου σε μια οργανική ένωση αποτελεί σημαντικό στάδιο. Έτσι αναζητούνται συνθετικές πορείες προσθήκης χλωρίου που να παρουσιάζουν ήπια και αποδοτικά χαρακτηριστικά, ακολουθώντας τις αρχές της Πράσινης Χημείας, κάτι που αποζητά πλέον η επιστημονική κοινότητα καθώς και οι βιομηχανίες.

Για την προσθήκη χλωρίου σε 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεις υπάρχουν αντιδράσεις, οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν ως απαιτητικές. Χρησιμοποιούνται πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, κάτι που απαιτεί πολύ ενέργεια για να επιτευχθεί και αποτελεί ασύμφορο οικονομικά. Επίσης, τα αντιδραστήρια που χρειάζονται για την κάθε μέθοδο α-χλωρίωσης σε 1,3-διακρβονυλο ενώσεις είναι τοξικά. Για να εξασφαλιστούν καλές μετατροπές και αποδόσεις από τις αντιδράσεις αυτές χρειάζονται αρκετές ώρες επώασης στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν με αποτέλεσμα να απαιτούν πολύ ενέργεια (Σχήμα 5 και Σχήμα 6).



entry	substrate	X	solvent	time	conversion (%)[b]	isolated yield 6 or 7 (%)[b]
1	**1a**	Cl	CH_3CN	1.5 h	100 (17)	99 (16)
2	**1a**	Cl	EtOAc	4.5 h	100 (11)	96 (10)
3	**1a**	I	CH_3CN	7.0 h	100 (26)	85 (20)
4	**1a**	I	EtOAc	5.5 h	100 (44)	84 (34)
5	**1c**	Cl	CH_3CN	2 h	100 (11)	86 (9)
6	**1c**	I	CH_3CN	15 min	100 (17)	86 (14)

Σχήμα 5: α-Χλωρίωση και α-Ιωδίωση β-κετο εστέρων με καταλύτη οξέος κατά Lewis.[6]



Entry	Catalyst	T (°C)	Conv. (%) [a]	*ee* (%) [a]
1	**1**	20	99	5
2	**1**	−50	99	9
3	**2**	−50	99 (95) [b]	40
4	**2**	−78	99	40
5	**3**	−50	99	12

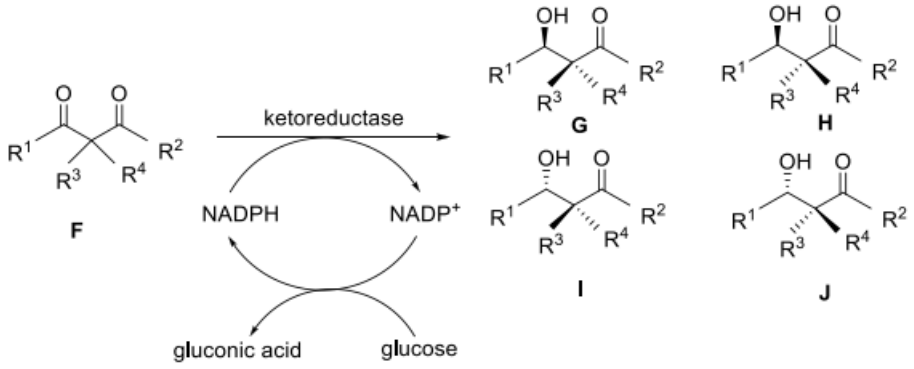
Σχήμα 6: Μελέτη συνθηκών της αντίδρασης χλωρίωσης με NCS.[7]

Η εύρεση πιο αποτελεσματικών και αποδοτικών αντιδράσεων α-χλωρίωσης σε 1,3-δικαρβονυλο ενώσεις καθίσταται απαραίτητη, καθώς οι φαρμακευτικές βιομηχανίες αποζητούν όλο και πιο 'πράσινους' τρόπους παραγωγής οργανικών χλωριωμένων ενώσεων, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Σε αυτήν την διπλωματική εργασία, λοιπόν, προτείνεται μια ήπια και αποδοτική μέθοδος παραγωγής α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών σε υδατικό μέσο όπου αποφεύγονται η χρήση τοξικών αντιδραστηρίων και μεγάλων ποσοτήτων ενέργειας. Γενικότερα, οι α-χλωρο-β-υδροξυ-εστέρες, οι α-υποκατεστημένοι-α-χλωρο-β-κετο εστέρες και 1,3-δικετόνες αποτελούν πολύ χρήσιμα ενδιάμεσα στην ευρεία χημική βιομηχανία για το λόγο αυτό μέσω της ερευνητικής μας ομάδας γίνεται προσπάθεια εύρεσης μιας νέας συνθετικής πορείας του εκάστοτε επιθυμητού προϊόντος στερεοεκλεκτικά με ήπιες και αποδοτικές συνθήκες.

Η Ερευνητική μας ομάδα

Οι αντιδράσεις στερεοεκλεκτικής αναγωγής με την χρήση κετορεδουκτασών έχουν παρουσιάσει εξαιρετικά αποτελέσματα και αποτελούν πλεόν καθιερωμένη και χρήσιμη μέθοδο σύνθεσης οπτικά ενεργών χειρόμορφων ενδιαμέσων, κάτι που έχει αποδείξει και η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας μέσω μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία 20 χρόνια. Έχουν εφαρμοστεί πλήθος βιοκαταλυτικών αναγωγών κορεσμένων δικετονών, β-κετοεστέρων και β,δ-δικετοεστέρων με απομονωμένες κετορεδουκτάσες.

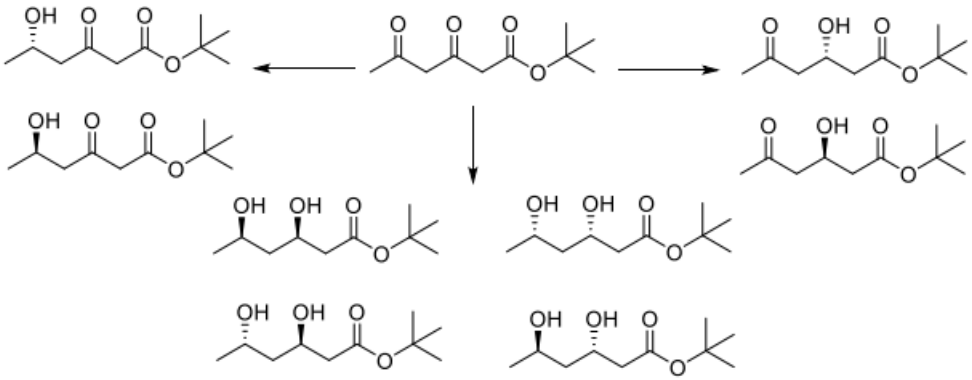
Συγκεκριμένα, το 2005 για πρώτη φορά παρουσιάστηκε από την ομάδα μας, διαστερεο- και εναντιοεκλεκτική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών και α-αλκυλο-β-κετοεστέρων με χρήση 20 εμπορικά διαθέσιμων κετορεδουκτασών σε υψηλά ποσοστά μετατροπής και εναντιοεκλεκτικής και διαστερεοεκλεκτικής περίσσειας (Εικόνα 7).[8]



Σχήμα 7: Ενζυμική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών και α-αλκυλο-β-κετο εστέρων με NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες.

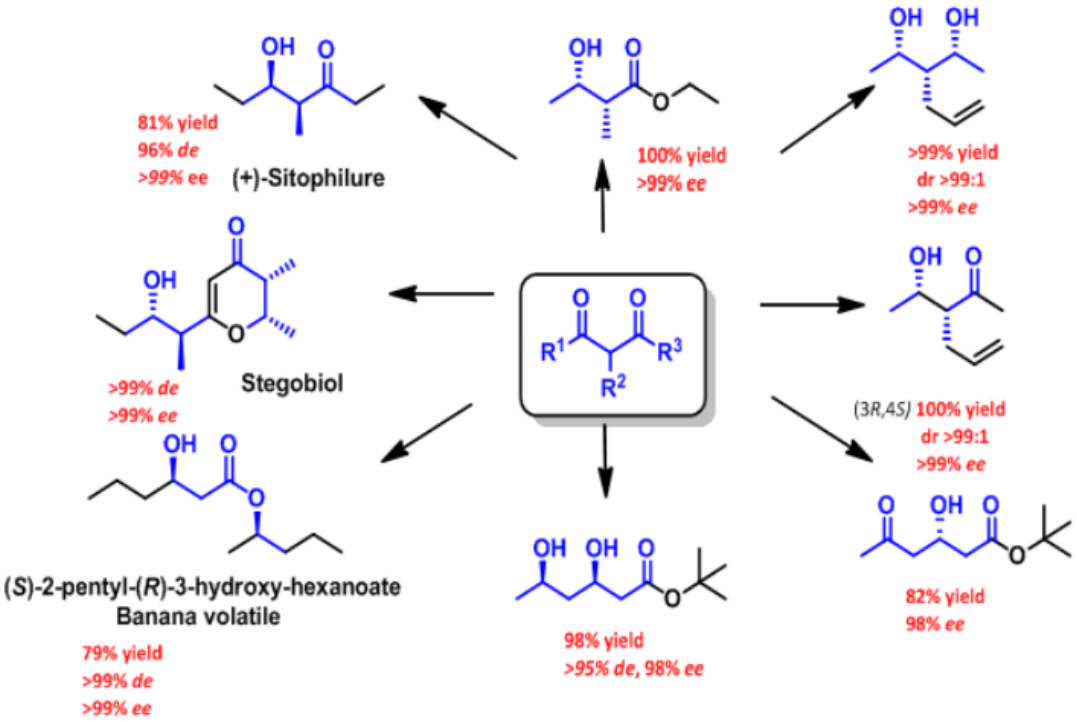
Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι επιλέγοντας διαφορετική κετορεδουκτάση καταλύεται ο σχηματισμός ενός διαφορετικού, αλλά συγκεκριμένου, οπτικά καθαρού (>99%ee) στερεοϊσομερούς έχοντας απόδοση >99%.

Το 2012, η ερευνητική μας ομάδα προχώρησε στην ενζυμική αναγωγή πιο πολύπλοκων υποστρωμάτων και συγκεκριμένα σε β,δ-δικέτο εστέρες. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με έναν από τους πιο απλούς δικετοεστέρες, τον 3,5- διοξοεξανοϊκό τριτ-βουτυλεστέρα. Με χρήση 23 εμπορικά διαθέσιμων απομονωμένων κετορεδουκτασών, ήταν δυνατό να σχηματιστούν 7 από τα 8 πιθανά στερεοϊσομερή, με υψηλή οπτική καθαρότητα και σε ένα μόλις στάδιο (one-step & onepot).[9]



Σχήμα 8: Όλα τα πιθανά προϊόντα από την αναγωγή του 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα.

Οι καταλυτικές μέθοδοι που αναφέρθηκαν έχουν ήδη εφαρμοστεί στη χημειοενζυμική σύνθεση φυσικών προϊόντων, όπως τα προϊόντα Stegobinone, Stegobiol, Sitophilure, και ο (R)-3-υδροξυ-εξανοϊκός-(S)-2-πεντυλεστέρας.[10] Έτσι, τα φυσικά αυτά προϊόντα συντέθηκαν με υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα, καθώς και σε υψηλές αποδόσεις και έχοντας υψηλή χημική καθαρότητα.



Σχήμα 9: Σύνθεση χρήσιμων χειρόμορφων ενδιαμέσων και φυσικών προϊόντων από NADPH-εξαρτώμενες κετοredουκτάσες.

Γενικά, παρόλη την πολυπλοκότητα της σύνθεσης των ουσιών αυτών, είτε με χημικές[11], είτε με χημειοενζυμικές[12] είτε με ενζυμικές[13] συνθετικές πορείες, οι οπτικά ενεργοί δ-υδροξυ-β-κετοεστέρες, β-υδροξυ-δ-κετοεστέρες και β,δ-διυδροξυ εστέρες, είναι πολύ χρήσιμα ενδιάμεσα στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση και έχουν χρησιμοποιηθεί στην σύνθεση πολλών φυσικών προϊόντων, φαρμακευτικών, και άλλων χρήσιμων χημικών ενώσεων, όπως είδαμε παραπάνω. Με την μέθοδο που σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε στην ομάδα μας, είναι δυνατή η σύνθεση κατά βούλησιν του εκάστοτε επιθυμητού προϊόντος στερεοεκλεκτικά, είτε μέσω μιας βιοκαταλυτικής αναγωγής, είτε με ακολουθία δύο στερεοεκλεκτικών ενζυμικών αναγωγών, και με συνδυασμό κατάλληλων κετοredουκτασών σε μια ακολουθία δύο βημάτων σε μια φιάλη αντίδρασης χωρίς απομόνωση των ενδιαμέσων.

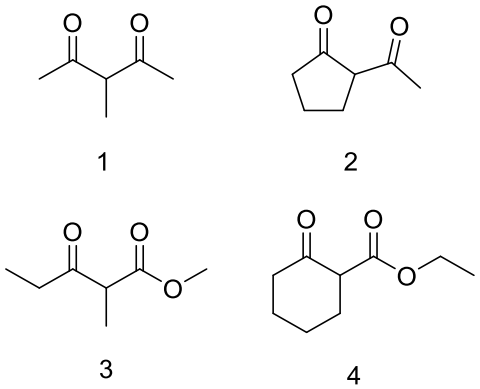
Στόχος της παρούσας εργασίας

Σύμφωνα με όσα αναγράφονται στην ενότητα ‘Εισαγωγή’, μπορεί να γίνει αντιληπτή τόσο η χρησιμότητα της χλωρίωσης σε διάφορες ενώσεις για την υγεία, όσο και της βιοαναγωγής χλωριωμένων οργανικών ενώσεων από κετοredουκτάσες. Η οργανική σύνθεση και η φαρμακευτική βιομηχανία αναζητούν πλέον μεθόδους πιο αποδοτικές και ήπιες ώστε να παράξουν διάφορα ενδιάμεσα παρακάμπτοντας επίπονα στάδια που προκύπτουν με την κλασική χημική σύνθεση. Έτσι και η ερευνητική μας ομάδα όπως

προαναφέρθηκε ασχολείται ενεργά με την μελέτη της βιοκατάλυσης, έναν πολλά υποσχόμενο τομέα για το μέλλον της χημικής και φαρμακευτικής βιομηχανίας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία λοιπόν, πραγματοποιήθηκε η εύρεση μιας μεθόδου χλωρίωσης σε ήπιες συνθήκες και η αναγωγή σε α-θέση χλωριωμένων β-κετο εστέρων από NADPH-εξαρτώμενες κετοredουκτάσες. Η αναγωγή α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα είναι πολύ χρήσιμη, καθώς οι χλωριωμένοι β-υδροξυ εστέρες συμβάλλουν στην παραγωγή με πιο οικονομικό και απλό τρόπο γλυκιδικών εστέρων, οι οποίοι με την σειρά τους μπορούν να μετατραπούν σε μια ποικιλία σημαντικών προϊόντων.[14]

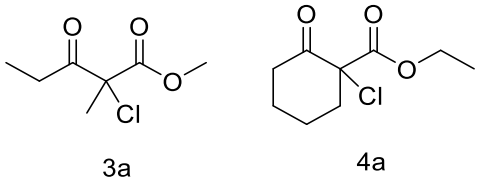
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία χωρίζεται σε δύο σκέλη: α) μελετήθηκε τόσο η σύνθεση α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών με Oxone/AlCl3 σε υδατικό περιβάλλον όσο και β) οι στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων, που συντέθηκαν στο πρώτο σκέλος, από NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες. Οι δικαρβόνυλο ενώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμή της νέας αντίδρασης χλωρίωσης είναι οι εξής:



Σχήμα 10: 1,3-δικετόνες και α-υποκατεστημένοι-β-κετο εστέρες που μελετήθηκαν ως προς την χλωρίωση.

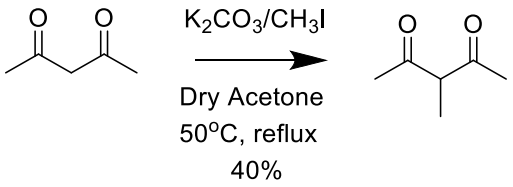
Η 2-ακετυλο κυκλοπενταν-1-ονη **2** και ο 2-οξο κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικός **4** ήταν ενώσεις που υπήρχαν εμπορικά διαθέσιμες, ενώ πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 3-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόνης **1** και του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα **3** μέσω αντίδρασης αλκυλίωσης. Ως προιόντα χλωρίωσης, απομονώθηκαν οι 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας **3α** και 1-χλωρο-2-οξο κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας **4α**, που απεικονίζονται παρακάτω, και ακολούθησε η βιοαναγωγή τους από απομονωμένες κετορεδουκτάσες.



Σχήμα 11: α-υποκατεστημένοι-α-χλωρο-β-κετο εστέρες που μελετήθηκαν ως προς την βιοαναγωγή τους από NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες.

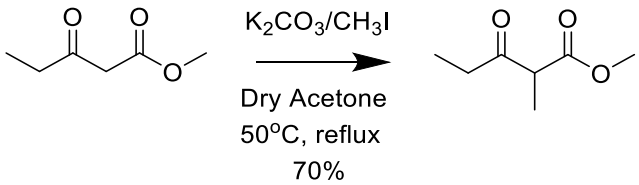
Αντιδράσεις μεθυλίωσης

Για την σύνθεση της 3-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόνης ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναγράφεται περιληπτικά στο σχήμα και απομονώθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται στην ενότητα ‘’Πειραματικό μέρος’’ με απόδοση 40%.



Σχήμα 12: Αντίδραση μεθυλίωσης της 3-μεθυλ-2,4-πεντανοδιόνης.

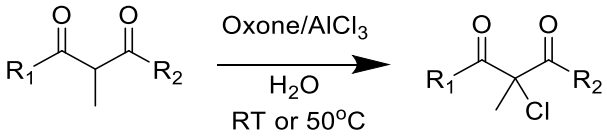
Για την σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα, επίσης, ακολουθήθηκε η διαδικασία του σχήματος και απομονώθηκε το προϊόν με τον τρόπο που αναφέρεται στο ’’Πειραματικό μέρος’’ με απόδοση 70%.



Σχήμα 13: Αντίδραση μεθυλίωσης του 2-μεθυλ-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα.

Αντιδράσεις χλωρίωσης

Κατόπιν, σειρά έχουν οι αντιδράσεις χλωρίωσης με Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό μέσο, όπου οι α-υποκατεστημένες-1,3-δικετόνες και οι α-υποκατεστημένοι-β-κετο εστέρες εξετάζονται ως προς τις κατάλληλες συνθήκες της αντίδρασης, ώστε να παραχθούν οι αντίστοιχες ενώσεις, που θα περιέχουν χλώριο, με όσο το δυνατόν υψηλότερες αποδόσεις λαμβάνοντας πάντα υπόψη τη σωστή διαχείριση των αντιδραστηρίων. Στόχος είναι η εύρεση μιας αποδοτικής αντίδρασης χλωρίωσης με ήπιες συνθήκες, αποφεύγοντας τοξικά αντιδραστήρια και απόβλητα. Η νέα αυτή αντίδραση περιγράφεται σχηματικά παρακάτω:



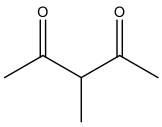
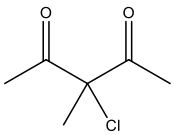
Σχήμα 14: Αντίδραση χλωρίωσης με Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό περιβάλλον.

Αρχικά, τα υποστρώματα που απεικονίζονται στο Σχήμα 10 εξετάστηκαν σε διάφορες συνθήκες, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί ισοδυνάμων των αντιδραστηρίων και δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, 25 °C και 50 °C. Η εφαρμογή ήπιας θέρμανσης μέσω των δοκιμών κατέστη αναγκαία καθώς έδινε στην αντίδραση την κατάλληλη

ενέργεια ώστε να προχωρήσει στην σύνθεση του προϊόντος πραγματοποιώντας με τον τρόπο αυτόν αύξηση της μετατροπής στις περισσότερες περιπτώσεις. Σε κάθε περίπτωση, οι αντιδράσεις ελέγχονταν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) αλλά και με φασματοσκοπία ^{1}H-NMR, κατόπιν απομόνωσης των προϊόντων. Έτσι, γινόταν πιο εύκολα η ταυτοποίηση των των προϊόντων, και μπορούσε να γίνει ακριβέστερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Αναλυτικότερα, στο εργαστήριό μας είχε πραγματοποιηθεί μια αρχική έρευνα για την αντίδραση χλωρίωσης με Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό μέσο από την οποία είχαν εξαχθεί ορισμένα αποτελέσματα. Μέσω αυτής της μελέτης διαφόρων υποστρωμάτων είχε προκύψει πως τα ιδανικά ισοδύναμα των αντιδραστηρίων είναι 2,1 eq για το Oxone και 2,3 eq για το $AlCl_3$. Έτσι, στην παρούσα εργασία, βάσει του συμπεράσματος αυτού, πραγματοποιείται μια μικρή μετατροπή των ισοδύναμων αυτών των αντιδραστηρίων με σκοπό την λήψη καλύτερων αποτελεσμάτων. Το πρώτο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν η 3-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόνη **1**, η οποία συντέθηκε και απομονώθηκε όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στην αντίδραση αυτή παρουσιάστηκε η βέλτιστη μετατροπή με την χρήση ελάχιστα περισσότερων ισοδυνάμων των αντιδραστηρίων και σε θερμοκρασία δωματίου. Ωστόσο, η αντίδραση δεν παρουσίασε ολοκληρωτική μετατροπή του αντιδρώντος, λαμβάνοντας το καλύτερο αποτέλεσμα με ποσοστό μετατροπής 90%. Μετά από αντίδραση 4 ωρών, δεν παρουσίασε περαιτέρω μετατροπή.

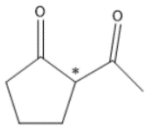
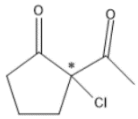
Πίνακας 2: Αποτελέσματα χλωρίωσης ένωσης 1.

Substrate	Equiv.	Temperature	Time	Conversion[a]	Product
	2,5 $AlCl_3$ 2,3 Oxone	RT	4h	90%	

[a] Οι μετατροπές υπολογίστηκαν από τα φάσματα GC-MS.

Το δεύτερο υπόστρωμα το οποίο εξετάστηκε ως προς την αντίδραση με Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό περιβάλλον αποτέλεσε η 2-ακετυλο κυκλοπενταν-1-ονη **2**, η οποία ήταν εμπορικά διαθέσιμη. Το υπόστρωμα αυτό έδειξε το καλύτερο ποσοστό μεταροπής με χρήση των λιγότερων ισοδυνάμων συστήματος χλωρίωσης, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αντιδράσεις. Η αντίδραση δεν απαιτούσε την εφαρμογή ήπιας θέρμανσης, καθώς σε αντίθετη περίπτωση παρατηρούνταν περισσότερες κορυφές στα φάσματα που δεν αντιστοιχούσαν στις ενώσεις ενδιαφέροντος, αλλά σε παραπροϊόντα, πιθανότατα λόγω της διάσπασης του υποστρώματος. Έτσι, λοιπόν, σε ήπιες συνθήκες η αντίδραση της 2-ακετυλο κυκλοπενταν-1-ονης **2** οδήγησε σε ολοκληρωτική μετατροπή του αντιδρώντος σε προϊόν σε διάστημα 1 ώρας.

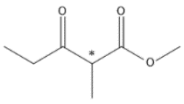
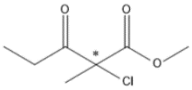
Πίνακας 3: Αποτελέσματα χλωρίωσης ένωσης 2.

Substrate	Equiv.	Temperature	Time	Conversion[a]	Product
	1,6 $AlCl_3$ 1,4 Oxone	RT	1h	100%	

[a] Οι μετατροπές υπολογίστηκαν από τα φάσματα GC-MS.

Επόμενο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας **3**, ο οποίος συντέθηκε και απομονώθηκε όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Στην περίπτωση αυτή, απαιτήθηκε σχετικά ελάχιστα μεγαλύτερος αριθμός ισοδύναμων των αντιδραστηρίων Oxone/$AlCl_3$ και χρήση ήπιας θέρμανσης (50 °C) κατά την αντίδραση, ώστε να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό ποσοστό μετατροπής. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε πως με την εφαρμογή ήπιας θέρμανσης, δινόταν η απαραίτητη ενέργεια στο σύστημα ώστε να προχωρήσει η αντίδραση και να προκύψει η ολοκληρωτική μετατροπή του αντιδρώντος. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε μετά από 24 ώρες αντίδρασης.

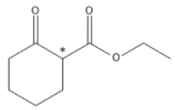
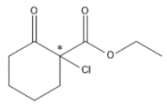
Πίνακας 4: Αποτελέσματα χλωρίωσης ένωσης 3.

Substrate	Equiv.	Temperature	Time	Conversion[a]	Product
	2,8 $AlCl_3$ 2,6 Oxone	50°C	24h	100%	

[a] Οι μετατροπές υπολογίστηκαν από τα φάσματα GC-MS.

Το τελευταίο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν ο 2-οξο κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας **4**, ο οποίος ήταν εμπορικά διαθέσιμος. Το καλύτερο ποσοστό μετατροπής αυτής της ένωσης παρατηρήθηκε με την εισαγωγή ελάχιστα περισσότερων ισοδυνάμων στο σύστημα αντίδρασης. Επίσης, καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν όταν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ήπια θέρμανση. Για την αντίδραση αυτή, λοιπόν, απαιτήθηκαν ήπιες συνθήκες ώστε να ληφθεί το μέγιστο ποσοστό μετατροπής σε μόλις 2 ώρες αντίδρασης.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα χλωρίωσης ένωσης 4.

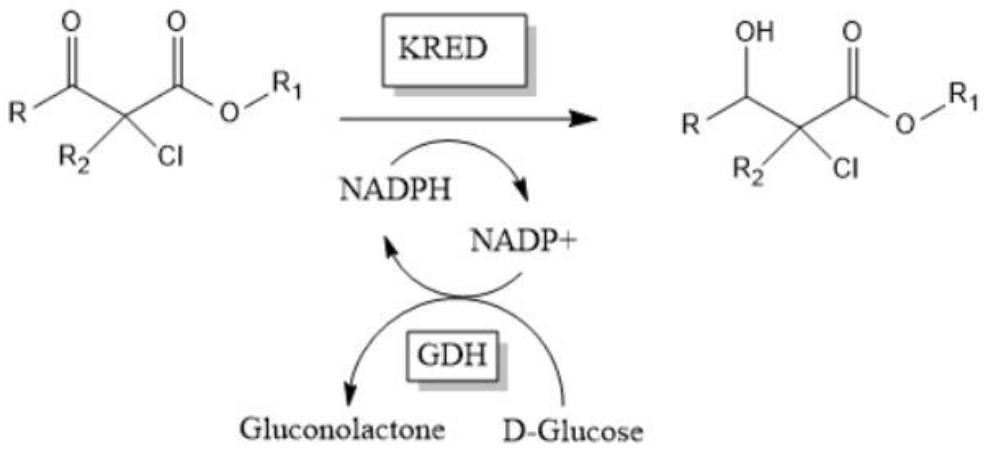
Substrate	Equiv.	Temperature	Time	Conversion[a]	Product
	2,5 $AlCl_3$ 2,3 Oxone	50°C	2h	100%	

[a] Οι μετατροπές υπολογίστηκαν από τα φάσματα GC-MS.

Συνολικά, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την χλωρίωση των υποστρωμάτων από Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό περιβάλλον είναι πολύ ενθαρρυντικά. Παρατηρείται πλήρης μετατροπή σε όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν, κάτι το οποίο γενικότερα επηρεάζεται από την διαμόρφωση και τις λειτουργικές ομάδες του κάθε υποστρώματος. Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, πως η εφαρμογή θερμότητας, ώστε να βοηθηθεί η πορεία της αντίδρασης και να προχωρήσει, απαιτήθηκε στους κετο εστέρες, σε αντίθεση με τις δικετόνες όπου η αντίδραση προχώρησε σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον, είναι γνωστό πως την πορεία μιας αντίδρασης μπορούν να επηρεάσουν και στερικοί παράγοντες. Στην περίπτωση, λοιπόν, υποστρωμάτων που ήταν ογκώδη, όπως οι ενώσεις **3** και **4**, απαιτήθηκε η προσθήκη περισσότερων ισοδυνάμων από την ιδανική ποσότητα που μελετήθηκε, καθώς και η χρήση θερμότητας. Τέλος, παρατηρείται και η χρήση λιγότερων ισοδυνάμων στην περίπτωση της ένωσης **2**, καθώς απέδιδε καλύτερο ποσοστό μετατροπής, χωρίς την δημιουργία παραπροϊόντων. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως σε ευαίσθητα υποστρώματα, όπως αυτή η δικετόνη, η χρήση λιγότερων ισοδυνάμων μπορεί να επηρεάσει την πορεία της αντίδρασης.

Ενζυμικές αντιδράσεις

Εν συνεχεία των αντιδράσεων χλωρίωσης, ακολουθούν οι στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων, όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως, από NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες. Κατά την διαδικασία αυτή θα εξεταστούν μια σειρά από κετορεδουκτάσες ως προς την δραστικότητα και εκλεκτικότητα τους σε αντιδράσεις αναγωγής κετονών προς δευτεροταγείς αλκοόλες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι τα υποστρώματα είναι υποκατεστημένα με διάφορες ομάδες τόσο στο κέτο όσο και στο εστερικό τμήμα, έτσι ώστε να παρατηρηθεί πόσο μπορεί να επηρεάσει η διαμόρφωση αυτή την ενεργότητα του ενζύμου κάθε φορά, καθώς δεν είναι όλα τα υποστρώματα συμβατά με το ενεργό κέντρο του εκάστοτε ενζύμου. Στόχος, λοιπόν, είναι η σύνθεση οπτικά ενεργών α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρων με όσο το δυνατόν πιο ήπιες συνθήκες και την αποφυγή τοξικών αντιδραστηρίων και αποβλήτων, εξασφαλίζοντας παράλληλα υψηλά ποσοστά μετατροπής. Η αντίδραση που μελετάται περιγράφεται σχηματικά παρακάτω:



Σχήμα 15: Ενζυμικές αντιδράσεις αναγωγής κετο εστέρων.

Συγκεκριμένα, κατά την ενζυμική αναγωγή με καταλύτη την κετοredουκτάση πραγματοποιείται μεταφορά υδριδίου από το συνένζυμο NADPH στον άνθρακα του υποστρώματος που φέρει την καρβονυλομάδα της κετόνης, με αποτέλεσμα να δημιουργείται χειρόμορφο κέντρο και να προκύπτει ο αντίστοιχος α-υποκατεστημένος-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρας. Οι κετοredουκτάσες είναι χημειοεκλεκτικές καθώς μεταξύ των δύο καρβονυλομάδων που παρουσιάζονται στο υπόστρωμα επιλέγουν να ανάξουν αυτό που αντιστοιχεί στην κετόνη και όχι του εστέρα. Για τον λόγο αυτόν, λοιπόν, αναμένεται η συγκεκριμένη δομή των προϊόντων.

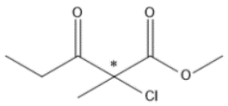
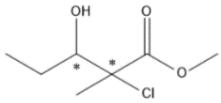
Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα ανακυκλωτικό σύστημα γλυκόζης/αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH) για την συνεχή τροφοδότηση με τον νικοτιναμιδικό συμπαράγοντα NADPH. Σε αυτό το σύστημα, η αφυδρογονάση της γλυκόζης μετατρέπει την γλυκόζη σε γλουκονικό οξύ, χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντα το $NADP^+$, που παράγεται από την κύρια αντίδραση, παρέχοντας έτσι συνεχώς NADPH, όπως φαίνεται στο σχήμα παραπάνω. Με αυτόν τον τρόπο, χρησιμοποιούνται καταλυτικές ποσότητες του νικοτιναμιδικού συμπαράγοντα, με αποτέλεσμα αυτός να μην επιβαρύνει σημαντικά το συνολικό κόστος της αντίδρασης, παρότι θεωρείται σχετικά ακριβό αντιδραστήριο.

Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν απεικονίζονται στο Σχήμα 11. Σε κάθε περίπτωση εξετάστηκαν διάφορες κετοredουκτάσες όπου αξιολογήθηκαν σύμφωνα με την εκλεκτικότητα τους, τη δραστικότητά τους και τον χρόνο αντίδρασης. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη δράση των ενζύμων ήταν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6,9 και σε θερμοκρασία 37 °C. Ωστόσο, πριν την έναρξη των αντιδράσεων αυτών, έγινε έλεγχος για την σταθερότητα των υποστρωμάτων στις συνθήκες αυτές, όπου το κάθε υπόστρωμα τοποθετήθηκε στο διάλυμα της αντίδρασης, χωρίς όμως να περιέχεται το ένζυμο και το ανακυκλωτικό σύστημα. Τα υποστρώματα αυτά δεν παρουσίασαν σημάδια διάσπασης και ήταν σταθερά σε pH=6,9 και σε θερμοκρασία 37 °C. Τόσο ο έλεγχος της σταθερότητας των υποστρωμάτων όσο και οι ενζυμικές αντιδράσεις ελέγχονταν με αέρια χρωματογραφία (GC) αλλά και με φασματοσκοπία ^{1}H-NMR, κατόπιν απομόνωσης των προϊόντων.

Έτσι, γινόταν πιο εύκολη η ταυτοποίηση των ενώσεων, μεταξύ των αντιδρώντων και των προϊόντων, και μπορούσε να γίνει ακριβέστερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Επίσης, για την διαπίστωση της δράσης των κετοredουκτασών στο υπόστρωμα που εξετάζεται, συγκρίθηκαν τα φάσματα NMR πρότυπου ρακεμικού μίγματος, στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί πρώτα χημική αναγωγή χρησιμοποιώντας το κοινό αναγωγικό αντιδραστήριο βοριοϋδρίδιο του νατρίου ($NaBH_4$), με αυτό που είχε αναχθεί με την χρήση ενζύμου. Η χημική αναγωγή δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία, ωστόσο τα ανηγμένα υποστρώματα υπήρχαν διαθέσιμα και λήφθηκαν τα φάσματα NMR για την σύγκριση και ταυτοποίηση αυτών με τα προϊόντα που προέκυψαν από τις βιοαναγωγές. Με την σύγκριση των φασμάτων NMR μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αντίδραση.

Συγκεκριμένα, το πρώτο υπόστρωμα που εξετάστηκε ως προς την ενζυμική αναγωγή από NADPH-εξαρτώμενες κετοredουκτάσες ήταν ο 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας **3α**, ο οποίος συντέθηκε και απομονώθηκε όπως αναφέρεται στην ενότητα 'Πειραματικό Μέρος'. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκε μια σειρά από κετοredουκτάσες οι οποίες αξιολογήθηκαν ως προς τους καλύτερους χρόνους, την στερεοεκλεκτικότητα και το βέλτιστο ποσοστό μετατροπής. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα που προέκυψαν.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα βιοαναγωγής ένωσης 3α.

Substrate	KRED	Diastereomeric Ratio (%)				Conversion[a] (time)	Product
		A	B	C	D		
	101	48	52	-	-	100% (30min)	
	112	45	55	-	-	100% (30min)	
	121	46	43	9	2	100% (3h)	
	123	47	48	4	1	100% (1,5h)	
	114	43	38	16	2	100% (2h)	

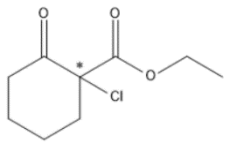
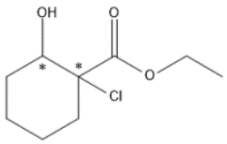
[a] Οι μετατροπές υπολογίστηκαν από τα φάσματα GC.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, οι κετοredουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνισαν εξαιρετική δραστικότητα και αρκετά καλή εκλεκτικότητα. Οι ενζυμικές αναγωγές πραγματοποιήθηκαν σε πολύ μικρούς χρόνους αντίδρασης που κυμαίνονταν από 30 min-2h. Στην περίπτωση αυτή, επίσης, μελετήθηκε και η στερεοεκλεκτικότητα των ενζύμων. Συγκεκριμένα, το μείγμα των προϊόντων που προέκυψε, μελετήθηκε σε χειρόμορφη στήλη με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC), υπολογίζοντας έτσι και τα ποσοστά του κάθε διαστερεομερούς που σχηματίστηκε. Γενικότερα, στις αντιδράσεις με τις κετοredουκτάσες KRED 101 και KRED 112 παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του ενός μόνο στερεοισομερούς τόσο από το ένα όσο και από το άλλο ζεύγος διαστερεομερών σε ποσοστό περίπου 50%. Στις KRED121, KRED123 και KRED114 παρατηρείται και

ο σχηματισμός και του δεύτερου στερεοϊσομερούς και στα δύο ζεύγη διαστερεομερών, αλλά σε αρκετά μικρότερο ποσοστό.

Το τελευταίο υπόστρωμα που μελετήθηκε ως προς την ενζυμική αντίδραση με NADPH-εξαρτώμενες κετοredουκτάσες ήταν ο 1-χλωρο-2-οξο κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας **4α**, ο οποίος συντέθηκε και απομονώθηκε όπως αναφέρεται στην ενότητα 'Πειραματικό Μέρος'. Το υπόστρωμα αυτό δοκιμάστηκε εξίσου με μια σειρά κετοredουκτασών και εξετάστηκε το ποσοστό μετατροπής του, οι χρόνοι για την βέλτιστη μετατροπή καθώς και η διαστερεοεκλεκτικότητα των ενζύμων. Παρακάτω παρατίθενται συγκεντρωμένα τα αποτελέσματα που προέκυψαν.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα βιοαναγωγής ένωσης 4α.

Substrate	KRED	Diastereomeric Ratio (%)		Conversion[a]	Product
		A	B		
	101	88	12	100% (2h)	
	112	78	22	96% (2h)	
	121	56	44	100% (1,5h)	
	123	73	27	98% (2h)	
	114	45	55	94% (2h)	
	131	92	8	80% (2,5h)	

[a] Οι μετατροπές υπολογίστηκαν από τα φάσματα GC.

Βάσει των αποτελεσμάτων που αναγράφονται στον Πίνακα 7 γίνεται αντιληπτό πως οι κετοredουκτάσες είναι εξαιρετικοί βιοκαταλύτες για τα συγκεκριμένα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και εμφάνισαν υψηλό ποσοστό μετατροπής. Συγκεκριμένα, εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής (94%-100%) παρατηρήθηκε στις με τις περισσότερες κετοredουκτάσες . Η KRED131 εμφανίζει το μικρότερο ποσοστό μετατροπής (80%) , ωστόσο από τα φάσματα GC των εκάστοτε κετοredουκτασών εμφάνισε την καλύτερη εκλεκτικότητα, παρουσιάζοντας σε μεγαλύτερο ποσοστό το ένα ζεύγος διαστερεομερών, ενώ στις υπόλοιπες κετοredουκτάσες τα δύο ζεύγη διαστερεομερών του προϊόντος εμφανίζονταν περίπου στο 50%. Στο GC τα δύο ζεύγη διαστερεομερών, Α και Β όπως αναγράφεται και στον Πίνακα 7, του προϊόντος διαχωρίστηκαν πολύ ικανοποιητικά. Οι αναγωγές πραγματοποιήθηκαν σε πολύ μικρό χρόνο (1,5-2,5h), που αποτελεί πολύ σημαντικό αποτέλεσμα. Προχωρώντας, λοιπόν, στην ανάλυση αυτού με αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιώντας χειρόμορφη κολώνα (chiral GC analysis), στο φάσμα που προέκυψε δεν παρατηρήθηκαν ξεκάθαρα οι κορυφές των διαστερεομερών. Έγινε, λοιπόν, αντίδραση παραγοντοποίησης ώστε να βοηθηθεί η ανάλυση, και να διαχωριστούν όλα τα πιθανά στερεοϊσομερή στα φάσμα. Ωστόσο, έπειτα από πολλές προσπάθειες η συγκεκριμένη αντίδραση δεν έδωσε το επιθυμητό προϊόν, με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιηθεί η ανάλυση αυτή.

Συνοψίζοντας ως προς τις βιοαναγωγές που πραγματοποιήθηκαν, στο κάθε υπόστρωμα η συμπεριφορά των ενζύμων ήταν διαφορετική. Βάσει των χρόνων που χρειαζόταν κάθε ένζυμο για την μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν, παρουσιάστηκαν

ελάχιστα καλύτεροι χρόνοι στην περίπτωση της ένωσης **3α**. Επίσης, παρατηρώντας τα δεδομένα των Πινάκων 6 και 7, τα ποσοστά μετατροπής των ενζύμων ήταν καλύτερα στην ένωση **3α**. Στις περιπτώσεις αυτές, η συμπεριφορά των ενζύμων ήταν πιο αποδοτική στην ένωση που ήταν λιγότερο ογκώδης. Αυτό έχει άμεση σχέση με την διαμόρφωση του ενεργού κέντρου των ενζύμων και ποια υποστρώματα είναι κατάλληλα γι' αυτά. Τέλος, αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι και αυτή που σχετίζεται με την εκλεκτικότητα των ενζύμων που εξετάστηκαν. Από τα δεδομένα των Πινάκων 6 και 7, καλύτερη διαστερεοεκλεκτικότητα παρουσίασε η KRED 131 στην βιοαναγωγή της ένωσης **4α**.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης άνυδρη ακετόνη, η ξήρανση έγινε με χρωματογραφία στήλης. Η ακετόνη περνούσε μέσα από την στατική φάση (silica gel) για να απομακρυνθεί τυχόν υγρασία και συλλεγόταν σε μια σφαιρική φιάλη η οποία πωματιζόταν. Η σφαιρική φιάλη τοποθετούνταν προηγουμένως στον φούρνο και μέσα σε αυτήν προυπήρχαν μοριακά κόσκινα.

Οι κετοredουκτάσες της εταιρίας Biocatalytics, το συνένζυμο NADPH των εταιριών Prozomix και JOHNSON Matthey και η αφυδρογονάση της γλυκόζης ήταν των εταιριών Evocatal και Johnson Matthey.

Όργανα

Ο προσδιορισμός της δομής των μορίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων ^{1}H NMR και ^{13}C NMR και που ελήφθησαν σε φασματόμετρα 300MHz και 500MHz της εταιρίας Bruker, χρησιμοποιώντας τετραμέθυλο σιλάνιο (TMS) σαν σήμα αναφοράς και $CDCl_3$ ως διαλύτη (7.26 ppm για ^{1}H και 77.16 ppm για ^{13}C).

Η πορεία των αντιδράσεων χλωρίωσης σε α-θέση των α-υποκατεστημένων 1,3 δικαρβόνυλο ενώσεων μελετήθηκε με όργανο αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μάζας (GC-MS) μοντέλου Shimadzu GC-MS QP5050 εφοδιασμένο με τριχοειδή στήλη Supelco (MDN-5, 30nm x 0.25mm, 0.25μm film thickness) και ανιχνευτή μάζας χημικού ιοντισμού (5971A MS). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο EtOAc.

Για τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 F254 της εταιρίας EMD Millipore. Ο καθαρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Flash column chromatograph) χρησιμοποιώντας silica gel 60, particle size 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM) ως υλικό πλήρωσης.

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων μελετήθηκε με συσκευή αέριας χρωματογραφίας (GC) μοντέλου Shimadzu 2014 εφοδιασμένο με τριχοειδείς στήλες HP-5 capillary (30mx0.32mmx0.25μm, 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane-Nonpolar) μηκους 30m, DB-200 (30mx0.25mmx0.25μm fused with silica, mild polarity) και CP-Chiralsil Dex CB (25mx0.25mmx0.25μm fused with silica). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο οξικός αιθυλεστέρας EtOAc.

Η ανάλυση των διαστερεομερών των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρων μελετήθηκε σε συσκευή αέριας χρωματογραφίας με τη χρήση χειρόμορφης κολώνας (chiral-GC) μοντέλου Shimadzu Nexis GC-2030 εφοδιασμένο με τριχοειδή στήλη Cyclodex-B (30mx0.25mmx0.25μm). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο EtOAc.

Σύνθεση Υποστρωμάτων

Σύνθεση 3-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόνης

Κατά την διαδικασία αυτή απαραίτητες ήταν οι ξηρές συνθήκες, συνεπώς όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνταν και η εισαγωγή των αντιδραστηρίων στο σύστημα αντίδρασης ήταν όσο το δυνατόν γινόταν απαλλαγμένα από υγρασία. Συγκεκριμένα, τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πλύθηκαν αρχικά με ακετόνη και στην συνέχεια αφέθηκαν στον φούρνο. Διαλύτης της αντίδρασης αυτής ήταν η ξηρή ακετόνη, η οποία κατέστη ξηρή με την διαδικασία που αναγράφεται παραπάνω. Όλες οι διεργασίες έλαβαν χώρα στον απαγωγό.

Η κύρια αντίδραση έλαβε χώρα σε μια δίλαιμη σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα, της οποίας οι υποδοχές κλείστηκαν με ελαστικά πώματα. Καθώς η αντίδραση πραγματώνεται υπό ατμόσφαιρα αζώτου, τοποθετήθηκε με σύριγγα στο ένα πώμα μπαλόνι με αέριο N_2. Αφού πραγματώθηκε η παραπάνω προεργασία, σε επόμενο στάδιο προστέθηκαν 10 ml άνυδρης ακετόνης με σύριγγα στην δίλαιμη σφαιρική φιάλη. Σε αυτήν διαλύθηκαν 308 μl 2,4-πεντανοδιόνης (3 mmol, 1eq), όπου μεταφέρθηκαν με σύριγγα, ακολούθησε αναμονή για λίγα λεπτά και, αφού ζυγίστηκαν 385 mg K_2CO_3 (2,8 mmol, 0,93 eq), προστέθηκαν. Το σύστημα βρισκόταν υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας 5 λεπτών, προστέθηκαν στάγδην 230 μl CH_3I (3,7 mmol, 1,23 eq). Εμβαπτίστηκε η δίλαιμη φιάλη σε ελαιόλουτρο και τέθηκε σε θέρμανση το σύστημα στους 60 °C. Το μείγμα αναδεύτηκε υπό αυτές τις συνθήκες για 24 ώρες για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Απαραίτητο κατέστη να δημιουργηθούν συνθήκες reflux χρησιμοποιώντας ψυκτήρα για να μην εξατμιστεί ο διαλύτης (άνυδρη ακετόνη). Ο ψυκτήρας πωματίστηκε.

Για την απομόνωση του προϊόντος, προστέθηκε μικρή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα στην δίλαιμη σφαιρική φιάλη όπου πραγματώθηκε η αντίδραση. Στην συνέχεια, έγινε διήθηση υπό κενό και το διήθημα μεταφέρθηκε στον ρότορα για να συμπυκνωθεί. Σε προζυγισμένο φιαλίδιο προστέθηκε το συμπύκνωμα, όπου μεταφέρθηκε με χλωροφόρμιο, και ξανά συμπυκνώθηκε. Ζυγίστηκε το φιαλίδιο. Για να παρθεί φάσμα NMR σε ειδική κυψελίδα μεταφέρθηκε η ένωση με χλωροφόρμιο δευτεριωμένο. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός ποσότητας της ουσίας με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας (50/1, v/v). Η ουσία απομονώθηκε με συνολική απόδοση 40% (114 mg).

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.66 (q, 7.08Hz, 1H), 2.19 (s, 6H), 2.11 (s, 6H), 1.83 (s, 3H), 1.33 (d, 7.08Hz, 3H)

Σύνθεση 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα

Χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία. Για 288 μl 3-οξο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας (2,3 mmol, 1 eq), προστέθηκαν στο σύστημα 414 mg K_2CO_3 (3 mmol, 1,3 eq) και 300 μl CH_3I (3,7 mmol, 1,6 eq). Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός ποσότητας της ουσίας με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας (50/1, v/v). Η ουσία απομονώθηκε με συνολική απόδοση 70% (230 mg).

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.73 (s, 3H), 3.54 (q, 7.14Hz, 1H), 2.45-2.68 (m, 2H), 1.34 (d, 7.17, 3H), 1.07 (t, 7.23Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 206.5, 171.3, 52.6, 52.5, 34.8, 13.1, 7.8.

Σύνθεση 3-μεθυλο-3-χλωρο-2,4-πεντανοδιόνης

Όλες οι διεργασίες έλαβαν χώρα σε απαγωγό. Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη μεταφέρθηκαν προσεκτικά 30 mg 3-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόνης (0,26 mmol, 1 eq), που παράχθηκαν προηγουμένως. Τοποθετήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας. Κατόπιν, μεταφέρθηκαν 13,15 ml νερό, ως διαλύτης, τέτοια ποσότητα ώστε η συγκέντρωση του διαλύματος της αντίδρασης να είναι ίση με 20 mM. Το σύστημα τέθηκε υπό ανάδευση. Ζυγίστηκαν και προστέθηκαν πρώτα 372 mg Oxone (0,60 mmol, 2,3 eq) και στην συνέχεια 88 mg $AlCl_3$ (0,66 mmol, 2,5 eq). Οι υποδοχές της δίλαιμης σφαιρικής φιάλης πωματίστηκαν και γινόταν τακτικός έλεγχος της αντίδρασης στον αέριο χρωματογράφο με φασματόμετρο μάζας (GC-MS). Παρατηρήθηκε 90% μετατροπή μέσω ανάλυσης με φασματοσκοπία GC-MS μετά από 4 ώρες. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την απομόνωση του προϊόντος, το διάλυμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε σε εκχυλιστική χοάνη και πραγματώθηκε 3 φορές εκχύλιση αυτού με EtOAc/διαιθυλαιθέρα (1/1), όπου συλλέχθηκε σε κωνική φιάλη η οργανική φάση. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό για την απομάκρυνση του ξηραντικού και το διήθημα μεταφέρθηκε στον ρότορα όπου και συμπυκνώθηκε. Για να παρθεί φάσμα NMR σε ειδικό σωληνάκι μεταφέρθηκε η ένωση που περιέχεται στο vial με χλωροφόρμιο δευτεριωμένο. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός ποσότητας της ουσίας με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 2.36 (s, 6H), 1.75 (s, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 201.3, 75.8, 25.7, 23.6.

Σύνθεση 2-ακετυλο-2-χλωρο κυκλοπενταν-1-ονης

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναγράφεται στην 'Σύνθεση 3-μεθυλ-3-χλωρο-2,4-πεντανοδιόνης'. Σε συγκέντρωση διαλύματος της αντίδρασης 20 mM, εισήχθησαν στην φιάλη 15,85 ml νερό. Κατόπιν, για 40 mg 2-ακετυλο κυκλοπενταν-1-ονη (0,32 mmol, 1 eq), που υπήρχε εμπορικά διαθέσιμο, προστέθηκαν στο σύστημα 273 mg Oxone (0,44 mmol, 1,4 eq) και 68 mg $AlCl_3$ (0,51 mmol, 1,6 eq). Παρατηρήθηκε 100% μετατροπή μέσω φάσματος GC-MS ύστερα από 1 ώρα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 2.76-2.86 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 1.96-2.58 (m, 5H)

^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 207.9, 201.7, 74.0, 36.4, 36.1, 27.3, 18.7.

Σύνθεση 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναγράφεται στην 'Σύνθεση 3-μεθυλ-3-χλωρο-2,4-πεντανοδιόνης'. Σε συγκέντρωση διαλύματος της αντίδρασης 20 mM, εισήχθησαν στην φιάλη 24,27 ml νερό. Κατόπιν, για 70 mg 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (0,48 mmol, 1 eq), που παράχθηκαν προηγουμένως, προστέθηκαν στο σύστημα 777 mg Oxone (1,3 mmol, 2,6 eq) και 181 mg $AlCl_3$ (1,36 mmol, 2,8 eq). Παρατηρήθηκε 100% μετατροπή μέσω φάσματος από GC-MS μετά από 24 ώρες. Το σύστημα της αντίδρασης είχε τεθεί υπό ήπια θέρμανση στους 50 °C.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.81 (s, 3H), 2.62-2.89 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.12 (t, 7.2Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 202.4, 168.9, 70.7, 53.9, 31.1, 24.8, 8.4.

Σύνθεση 1-χλωρο-2-οξο κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναγράφεται στην 'Σύνθεση 3-μεθυλο-3-χλωρο-2,4-πεντανοδιόνης'. Σε συγκέντρωση διαλύματος της αντίδρασης 20 mM, εισήχθησαν στην φιάλη 17,6 ml νερό. Κατόπιν, για 60 mg 2-οξο κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (0,35 mmol, 1 eq), που υπήρχε εμπορικά διαθέσιμο, προστέθηκαν στο σύστημα 498 mg Oxone (0,81 mmol, 2,3 eq) και 117 mg $AlCl_3$ (0,88 mmol, 2,5 eq). Παρατηρήθηκε 100% μετατροπή μέσω φάσματος GC-MS ύστερα από 2 ώρες. Το σύστημα της αντίδρασης είχε τεθεί υπό ήπια θέρμανση στους 50°C.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.26-4.33 (m, 2H), 1.72-2.90 (m, 6H), 1.29-1.33 (m, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 199.8, 167.4, 73.6, 63.0, 39.8, 39.0, 26.9, 22.3, 14.0.

Σύνθεση 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ πεντανοϊκού μεθυλεστέρα

Σε μικρό φιαλίδιο μεταφέρθηκαν προσεκτικά 5 mg 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα. Σε επόμενο βήμα, με την χρήση πιπέτας Gilson μεταφέρθηκαν στο vial 20 μl DMSO, το οποίο βοηθά στην διάλυση του υποστρώματος στο υδατικό μέσο της αντίδρασης, και 980 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200mM, pH=6,9), το οποίο αποτελεί το υδατικό μέσο της αντίδρασης. Τελικός όγκος της αντίδρασης είναι συνολικά 1 ml. Κατόπιν, γρήγορα και με μεγάλη προσοχή εισήχθησαν 20-22 mg γλυκόζης και ελάχιστες ποσότητες της αντίστοιχης κετοredουκτάσης, της αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH) και του αναγωγικού NADPH. Το φιαλίδιο μεταφέρθηκε σε θερμοκυκλοποιητή, το οποίο τέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 37 °C. Για την εκτίμηση του ποσοστού μετατροπής της εκάστοτε αντίδρασης γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα εκχύλιση είτε μικρής ποσότητας του μείγματος είτε ολόκληρου του μείγματος με EtOAc και έλεγχος σε αέριο χρωματογράφο (GC).

Για την απομόνωση του προϊόντος, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης για το εκάστοτε ένζυμο, εκχυλίστηκε η ποσότητα του προϊόντος με EtOAc και μεταφέρθηκε στον ρότορα όπου και συμπυκνώθηκε. Ζυγίστηκε ένα φιαλίδιο. Για να παρθεί φάσμα NMR μεταφέρθηκε η ένωση από το φιαλίδιο με δευτεριωμένο χλωροφόρμιο. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός ποσότητας της ουσίας με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας. Τέλος, η καθαρή αυτή ποσότητα μελετήθηκε με φασματοσκοπία ^{1}H NMR ως προς την στερεοεκλεκτικότητα της κετορεδουκτάσης (anti:syn 24:76).

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.86-3.92 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 1.73 (s, $3H_{anti}$), 1.70 (s, $3H_{syn}$), 1.35-1.58 (m, 2H), 1.05 (m, 7.4Hz, 3H).

Σύνθεση 1-χλωρο-2-υδροξυ κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα

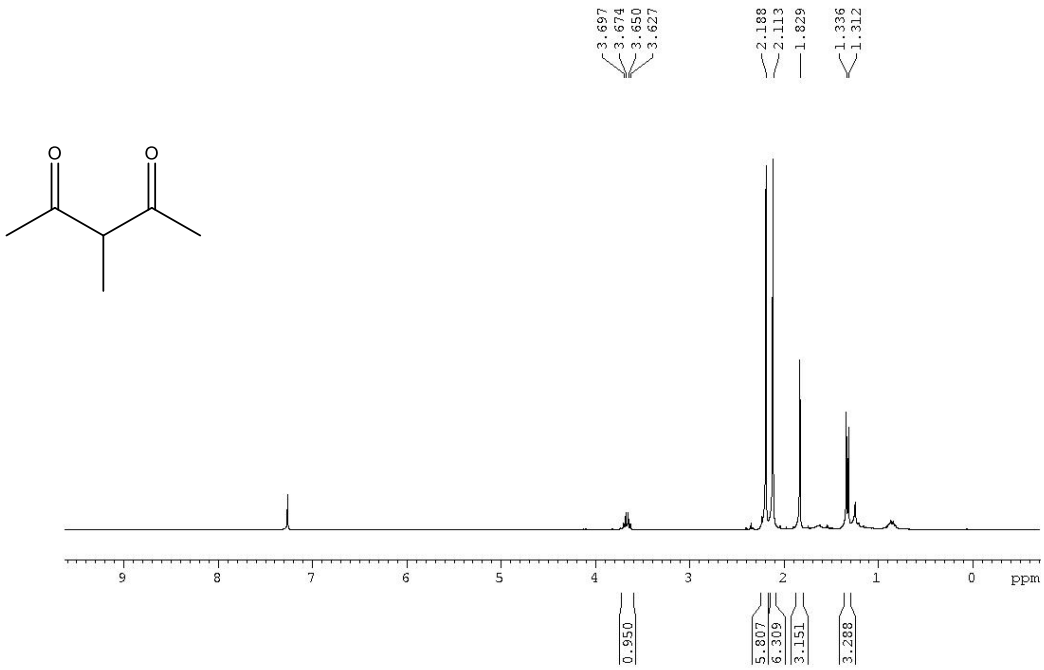
Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναγράφεται στις ‘Σύνθεση 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ πεντανοϊκού μεθυλεστέρα’. Για 5 mg 1-χλωρο-2-οξο κυκλοεξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα κάθε φορά εξετάστηκε η αντίστοιχη κετορεδουκτάση με έλεγχο σε αέριο χρωματογράφο (GC). Στην περίπτωση αυτή, ωστόσο, δεν εξετάστηκε η διαστερεοεκλεκτική αναλογία των προϊόντων για την εκάστοτε κετορεδουκτάση, καθώς κατέστη δύσκολος ο διαχωρισμός αυτού του προϊόντος στον αέριο χρωματογράφο (chiral GC) και απαιτούσε περαιτέρω επεξεργασία.

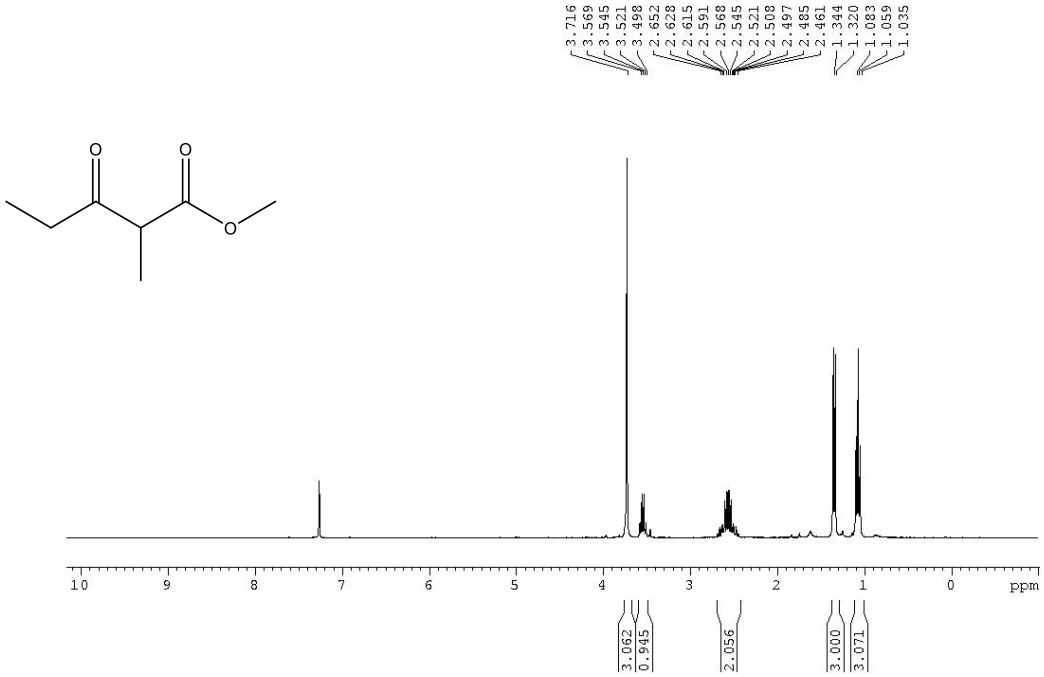
^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.27 (q, J_1=7.1Hz, J_2=9.0Hz, 2H), 1.42-2.36 (m, 9H), 1.32 (t, 7.1Hz, 3H)

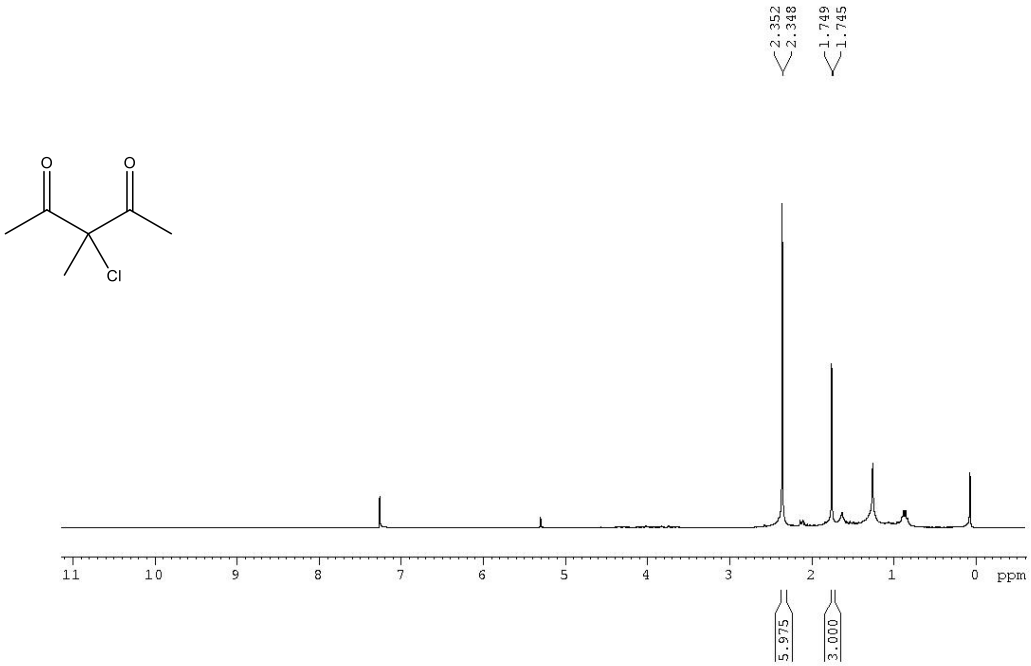
^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 171.2, 75.5, 72.3, 62.6, 62.3, 35.3, 29.7, 23.2, 20.9, 14.1, 14.0.

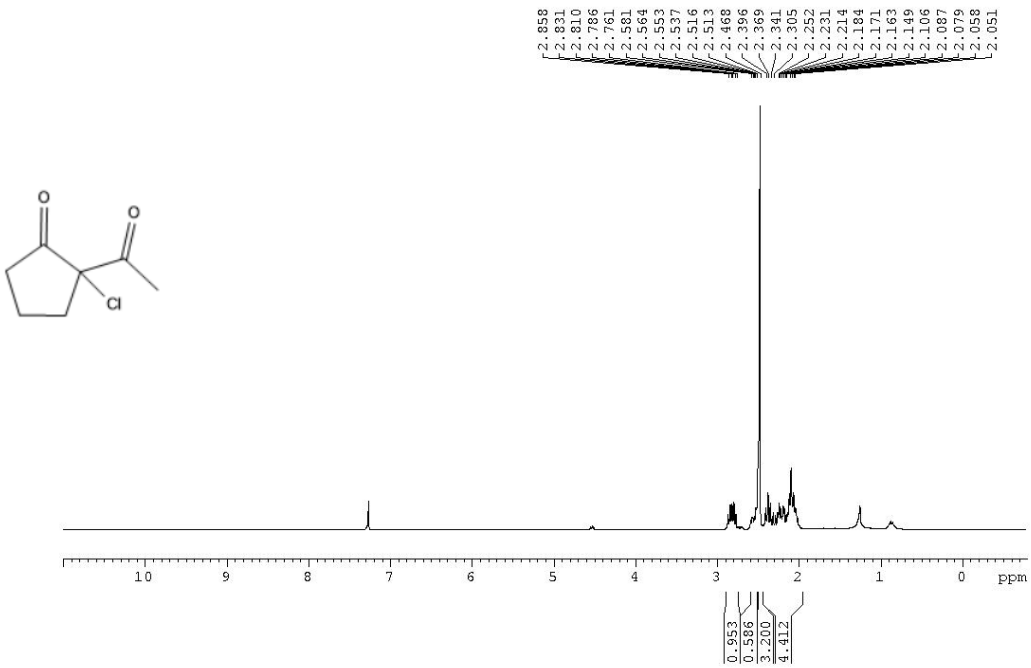
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

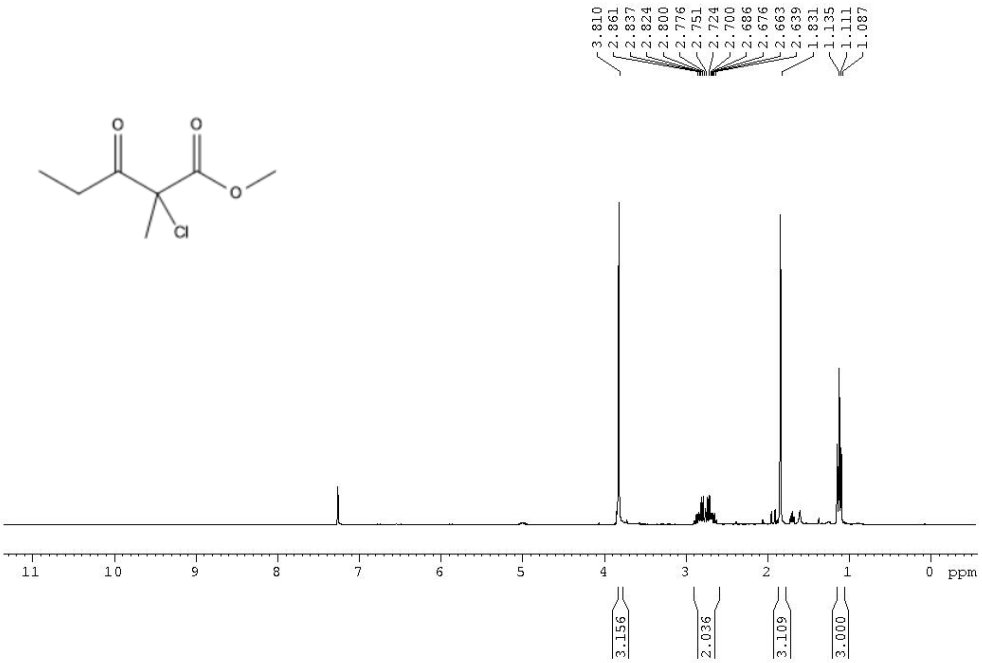
ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}H-NMR

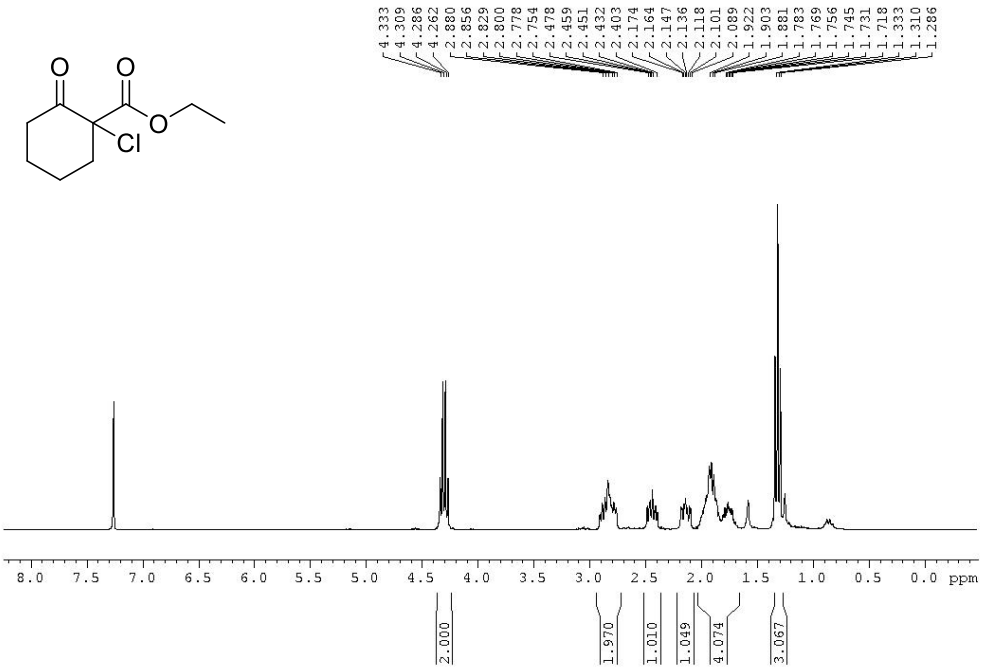

3.697
3.674
3.650
3.627
2.188
2.113
1.829
1.336
1.312
O
O
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
0.950
5.807
6.309
3.151
3.288

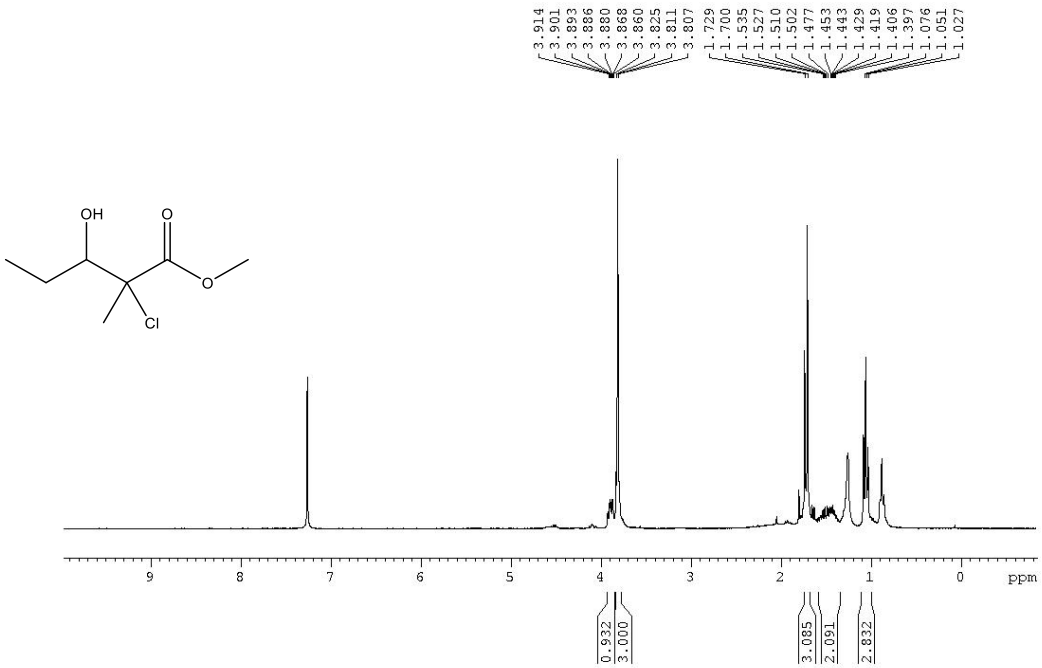

3.716
3.569
3.545
3.521
3.498
2.652
2.628
2.615
2.591
2.568
2.545
2.521
2.508
2.497
2.485
2.461
1.344
1.320
1.083
1.059
1.035
O
O
O
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
3.062
0.945
2.056
3.000
3.071

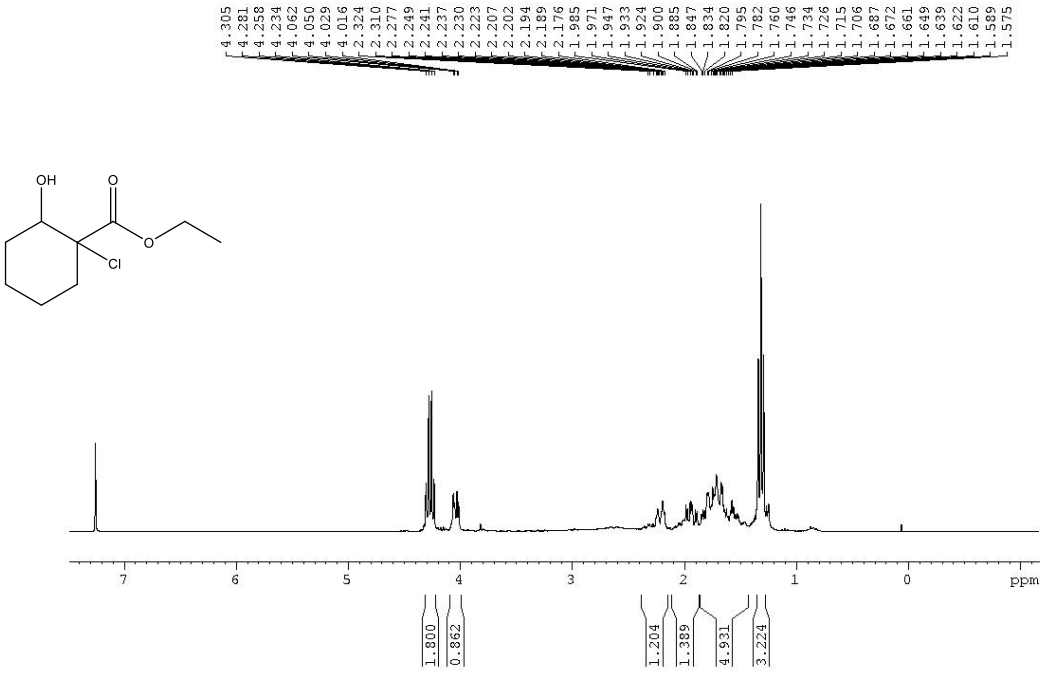

2.352
2.348
1.749
1.745
O
O
Cl
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
5.975
3.000


2.858
2.831
2.810
2.786
2.761
2.581
2.564
2.553
2.537
2.516
2.513
2.468
2.396
2.369
2.341
2.305
2.252
2.231
2.214
2.184
2.171
2.163
2.149
2.106
2.087
2.079
2.058
2.051
O
O
Cl
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
0.953
0.586
3.200
4.412

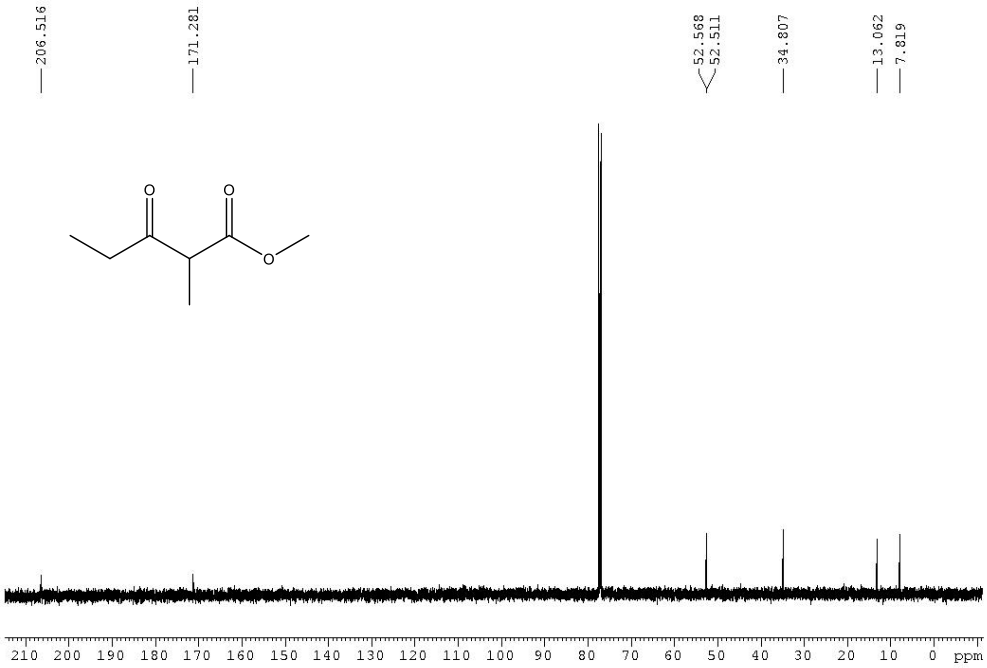

3.810
2.861
2.837
2.824
2.800
2.776
2.751
2.724
2.700
2.686
2.676
2.663
2.639
1.831
1.135
1.111
1.087
O
O
O
Cl
11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0 ppm
3.156
2.036
3.109
3.000

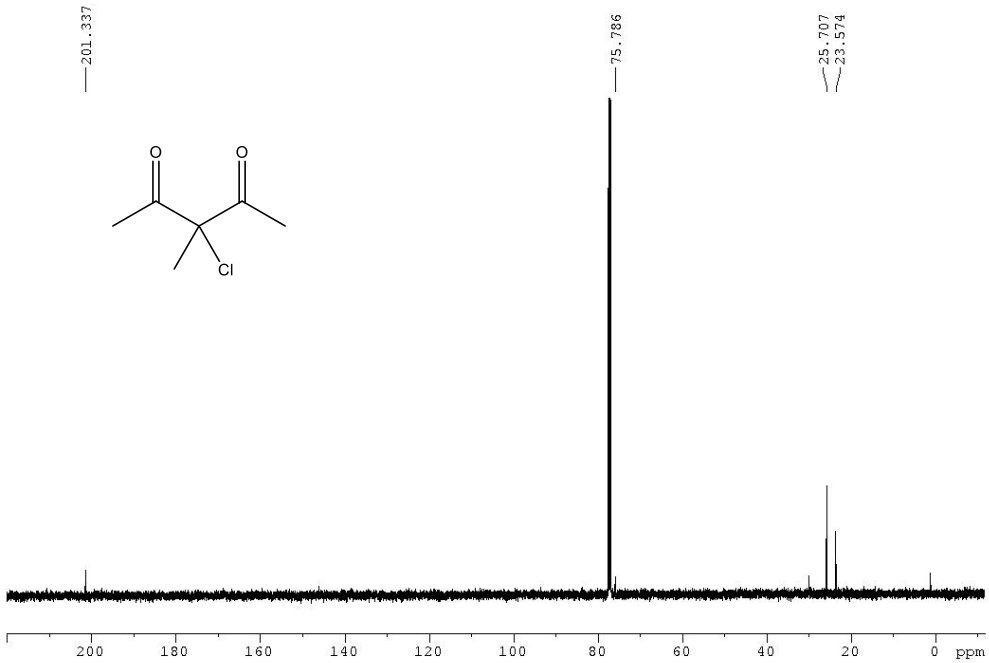

4.333
4.309
4.286
4.262
2.880
2.856
2.829
2.800
2.778
2.754
2.478
2.459
2.451
2.432
2.403
2.174
2.164
2.147
2.136
2.118
2.101
2.089
1.922
1.903
1.881
1.783
1.769
1.756
1.745
1.731
1.718
1.333
1.310
1.286
O
O
O
Cl
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
2.000
1.970
1.010
1.049
4.074
3.067


3.914
3.901
3.893
3.886
3.880
3.868
3.860
3.825
3.811
3.807
1.729
1.700
1.535
1.527
1.510
1.502
1.477
1.453
1.443
1.429
1.419
1.406
1.397
1.076
1.051
1.027
OH
O
O
Cl
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
0.932
3.000
3.085
2.091
2.832

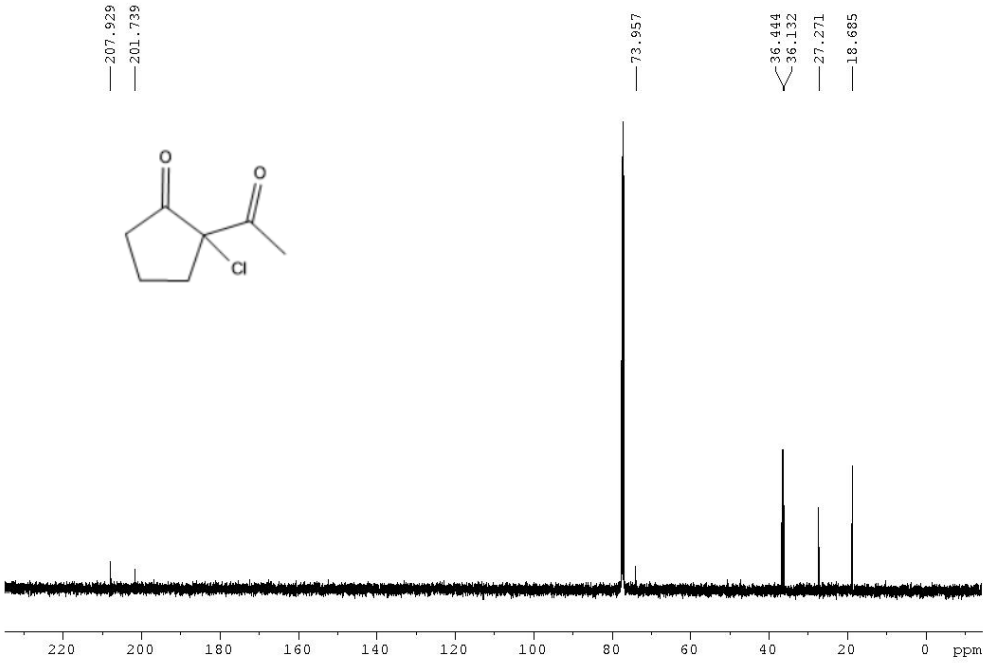

4.305
4.281
4.258
4.234
4.062
4.050
4.029
4.016
2.324
2.310
2.277
2.249
2.241
2.237
2.230
2.223
2.207
2.202
2.194
2.189
2.176
1.985
1.971
1.947
1.933
1.924
1.900
1.885
1.847
1.834
1.820
1.795
1.782
1.760
1.746
1.734
1.726
1.715
1.706
1.687
1.672
1.661
1.649
1.639
1.622
1.610
1.589
1.575
OH
O
O
Cl
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.800
0.862
1.204
1.389
4.931
3.224

ΦΑΣΜΑΤΑ ^{13}C-NMR

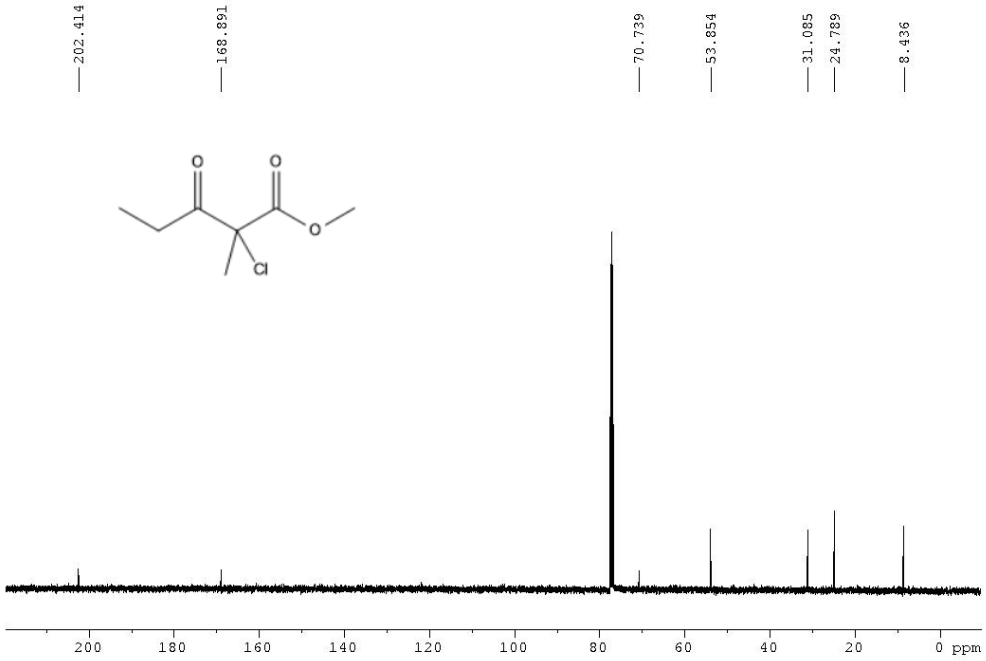




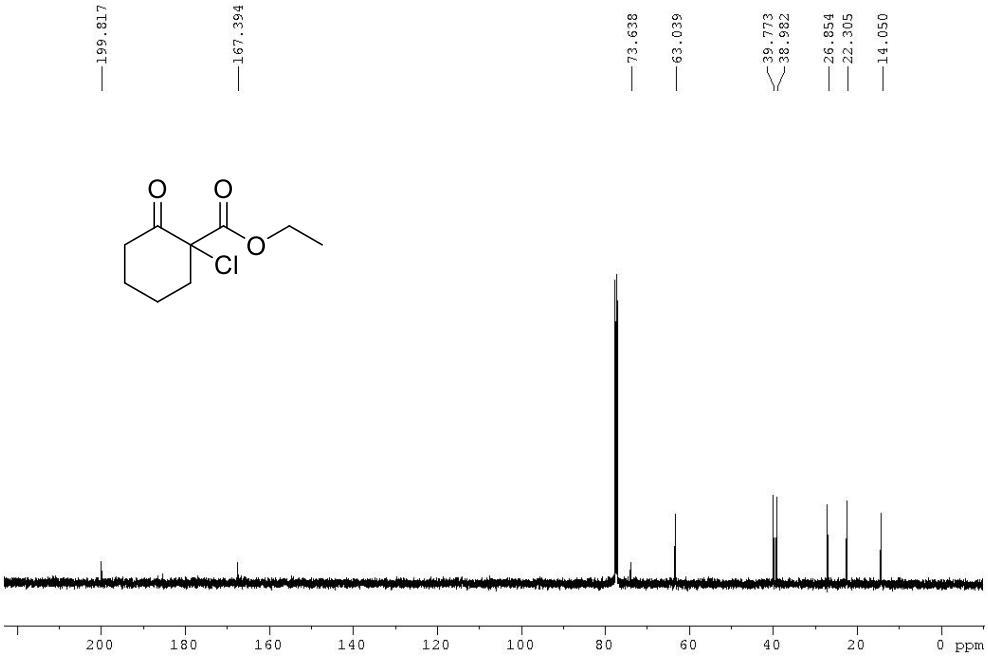
Χαρακτηριστική κορυφή χλωριωμένου άνθρακα στα70-75ppm.



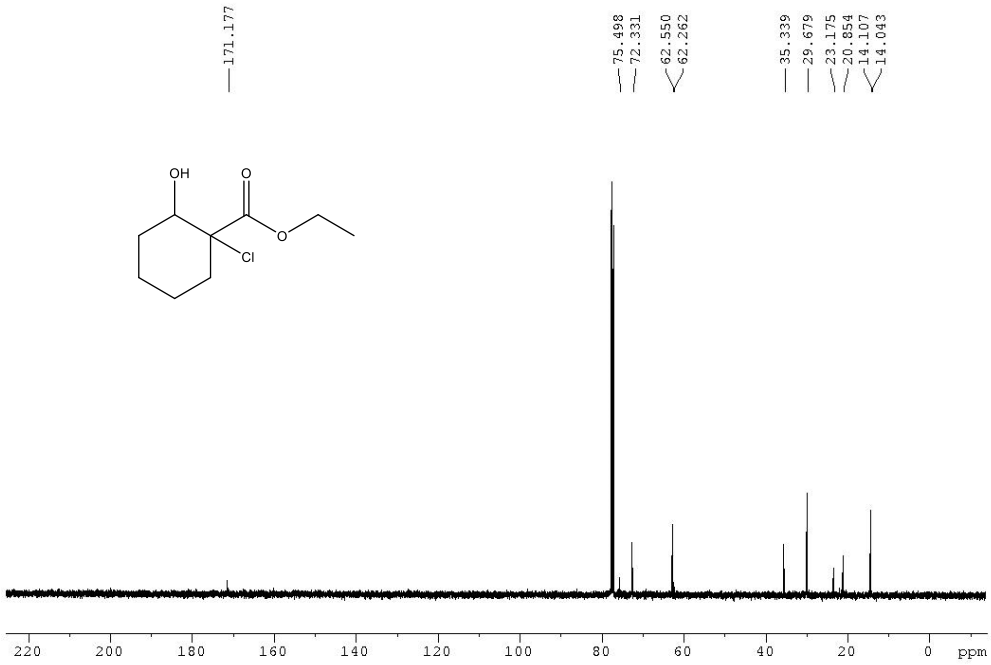
Χαρακτηριστική κορυφή χλωριωμένου άνθρακα στα 70-75ppm.



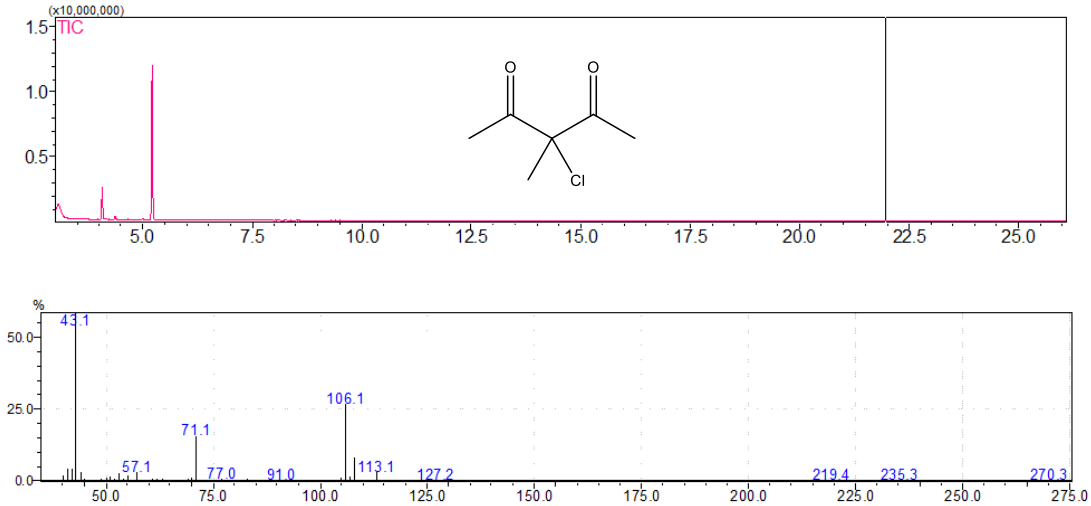
Χαρακτηριστική κορυφή χλωριωμένου άνθρακα στα 70-75ppm.



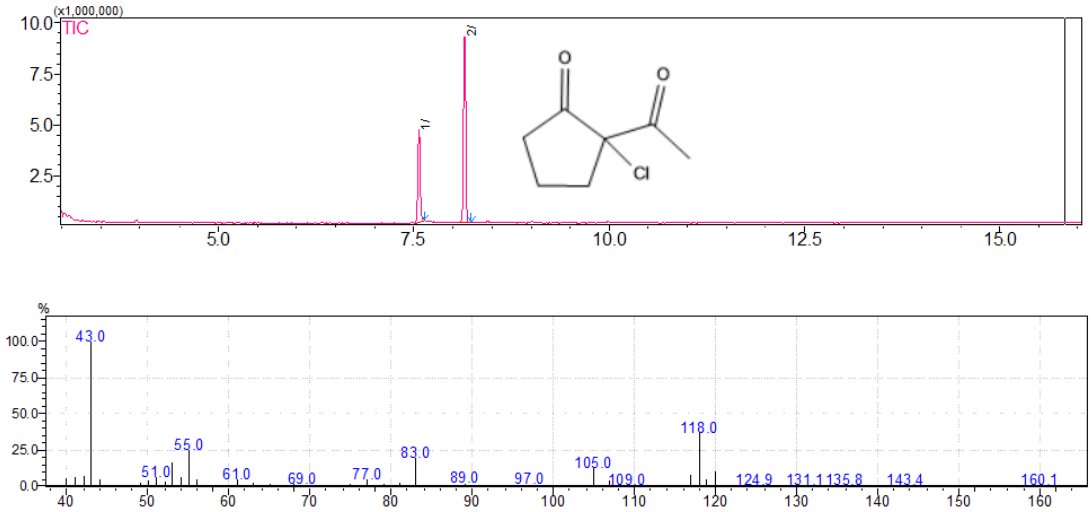
Χαρακτηριστική κορυφή χλωριωμένου άνθρακα 70-75ppm.



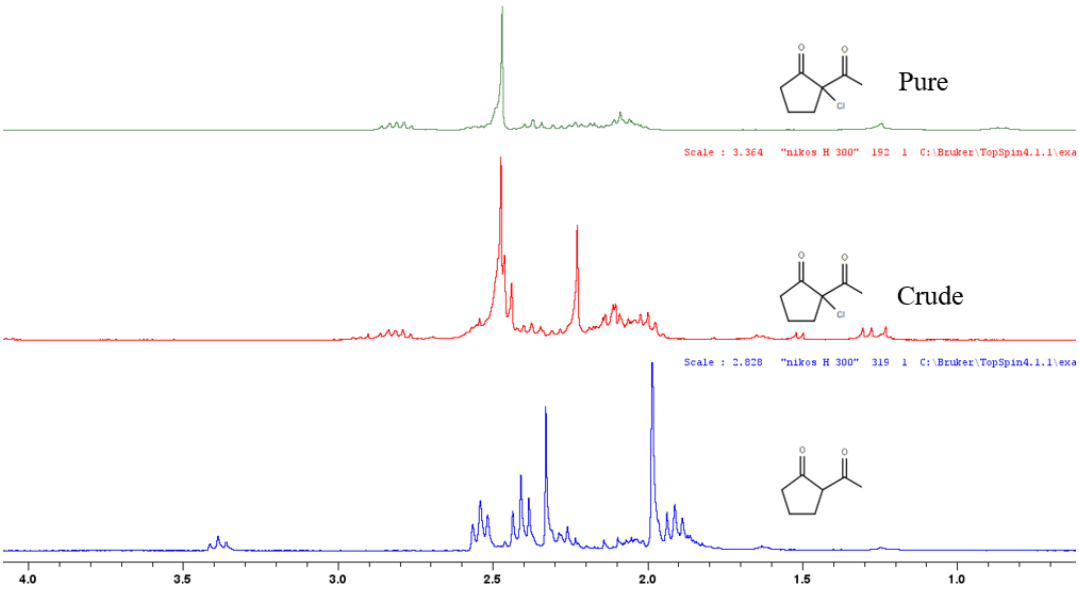
ΦΑΣΜΑΤΑ GC-MS

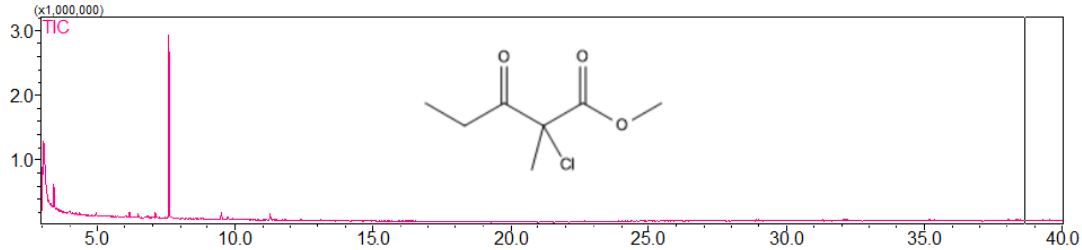


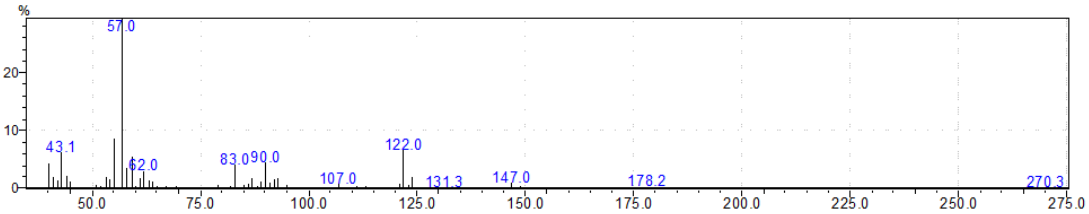
Η μεγάλη κορυφή κοντά στο 5.0 ανήκει στο προϊόν, ενώ η μικρή κορυφή ανήκει στο αντιδρών.

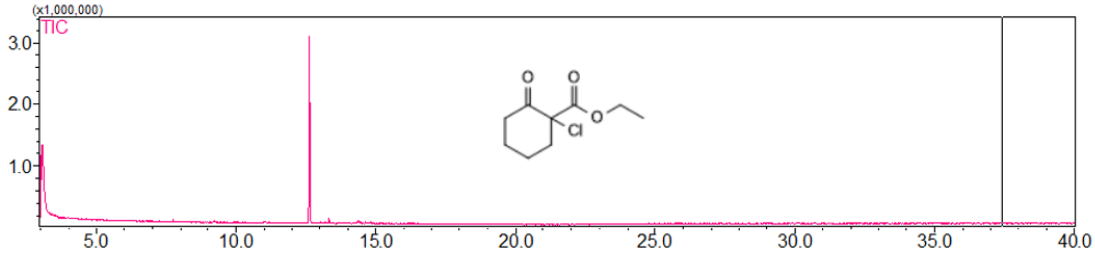


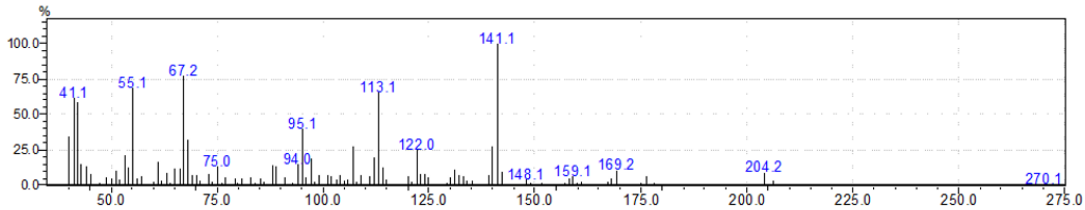
Με φάσματα NMR στην ένωση αυτή (εμπορικά διαθέσιμο, crude μετά από την αντίδραση, μετά από καθαρισμό του προϊόντος) διαπιστώθηκε πως η κορυφή κοντά στο 7,5 δεν ανήκει στο αρχικό υπόστρωμα, αλλά σε τυχόν παραπροϊόντα, άρα η μετατροπή είναι 100%. Τα φάσματα NMR φαίνονται παρακάτω.


Pure
Crude
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0


(x1,000,000)
TIC
3.0
2.0
1.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0

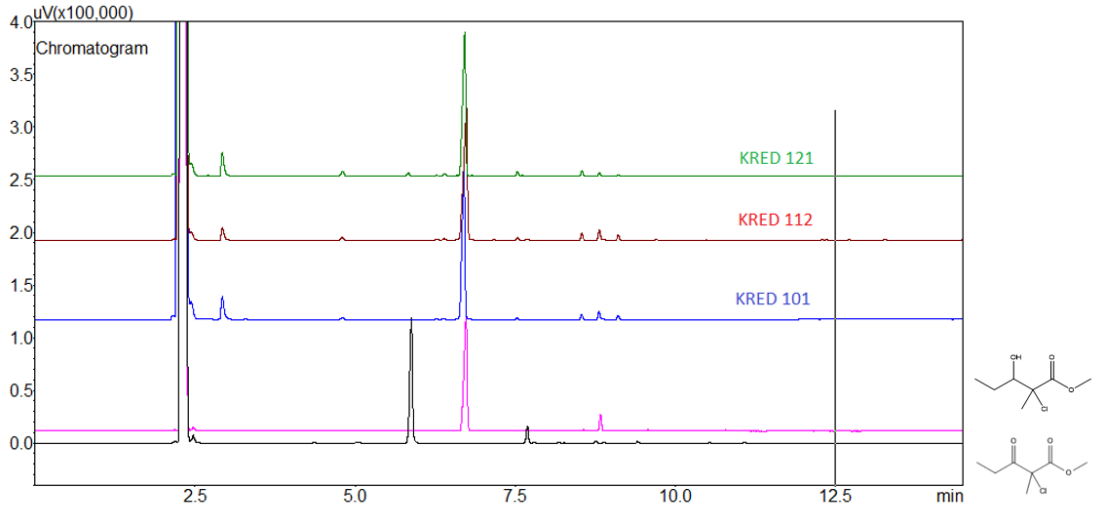

%
57.0
43.1
62.0
83.0
90.0
107.0
122.0
131.3
147.0
178.2
270.3
50.0
75.0
100.0
125.0
150.0
175.0
200.0
225.0
250.0
275.0

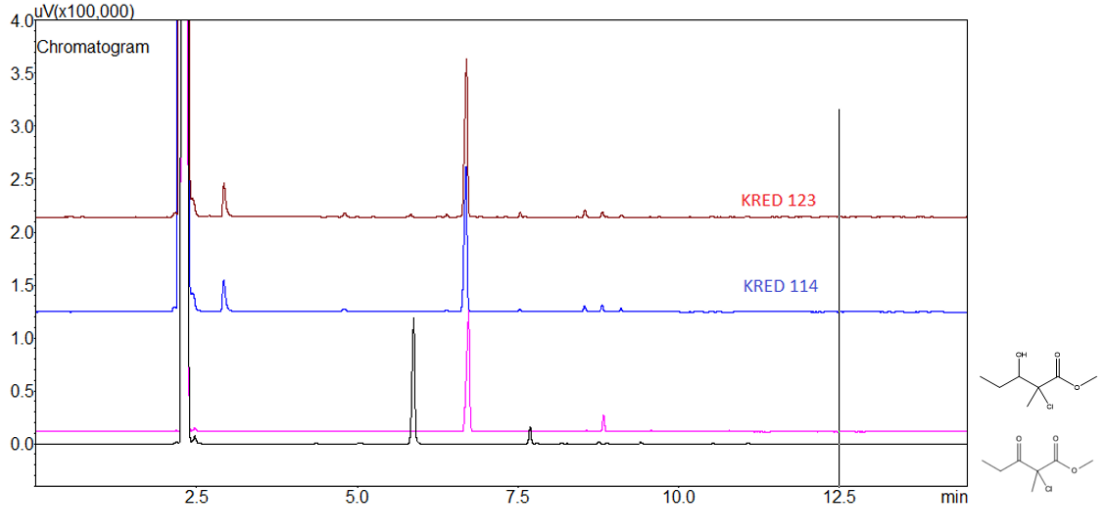

(x1,000,000)
TIC
3.0
2.0
1.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
O
O
O
Cl

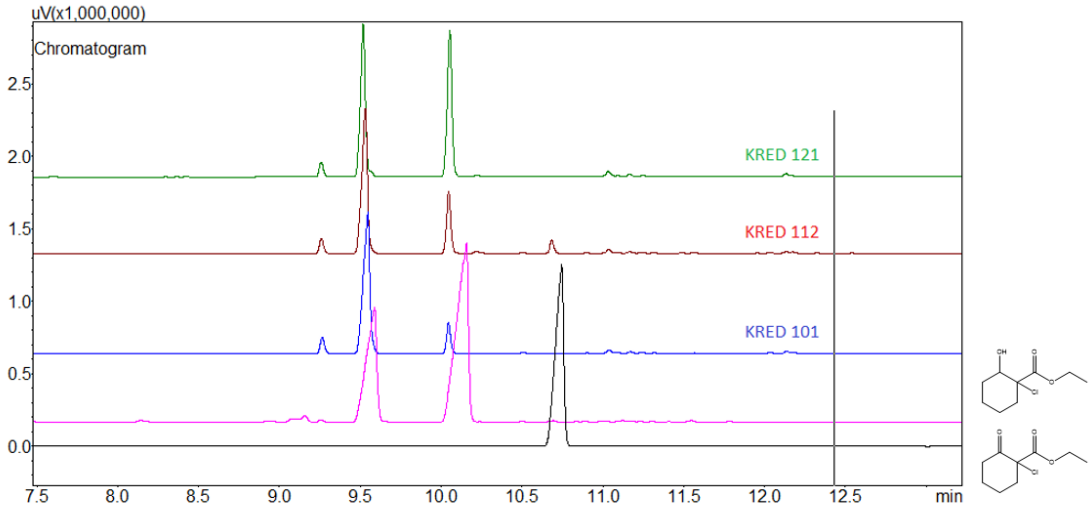

%
100.0
75.0
50.0
25.0
0.0
41.1
55.1
67.2
75.0
94.0
95.1
113.1
122.0
141.1
148.1
159.1
169.2
204.2
270.1
50.0
75.0
100.0
125.0
150.0
175.0
200.0
225.0
250.0
275.0

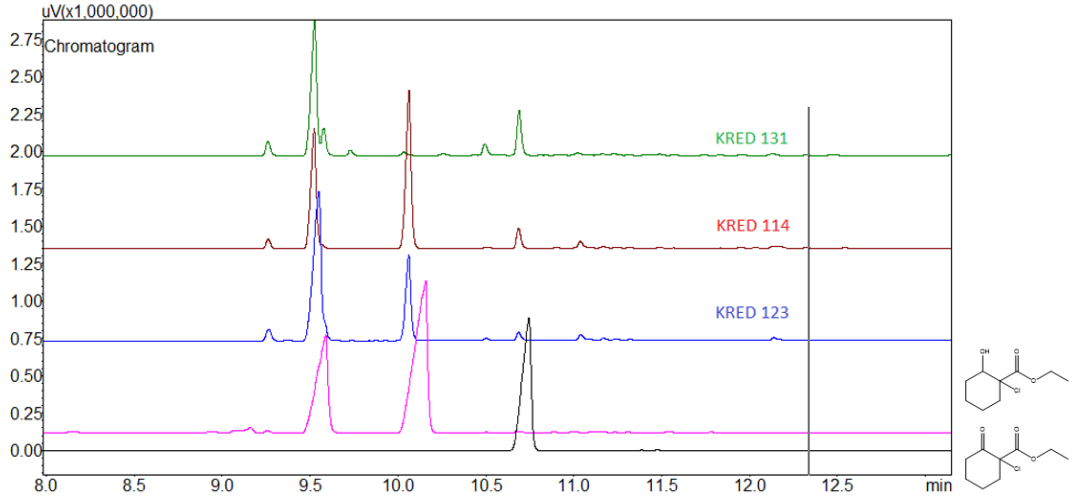
ΦΑΣΜΑΤΑ GC

Οι μαύρες γραμμές των φασμάτων GC ανήκουν στους χλωριωμένους κετο εστέρες και οι ροζ στους χλωριωμένους υδροξυ εστέρες.

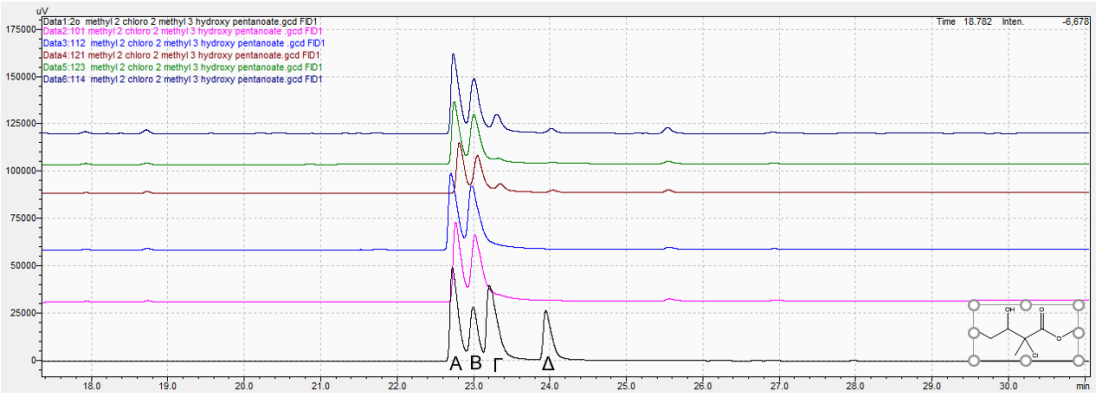





uV(x1,000,000)
Chromatogram
KRED 121
KRED 112
KRED 101
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
12.5
min


uV(x1,000,000)
Chromatogram
KRED 131
KRED 114
KRED 123
2.75
2.50
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
12.5
min

ΦΑΣΜΑΤΑ CHIRAL GC



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κλώνης, Ι. Ενζυμική Βιοτεχνολογία, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2η αναθεωρημένη έκδοση, 2010
2. Itoh, N., Appl Microbiol Biotechnol 98**,** 3889–3904 (2014).
3. Prelog, V. Appl. Chem,1964, 9: 119
4. Broussy S, Cheloha RW, Berkowitz DB. Enantioselective, ketoreductase-based entry into pharmaceutical building blocks: ethanol as tunable nicotinamide reductant. *Org Lett*. 2009;11(2):305-308.
5. Liu, W.; Wang, P. Biotechnol. Adv., 2007, 25, 369.
6. Yang, D.; Yan, Y.-L.; Lui, B., The Journal of Organic Chemistry 2002 67 (21), 7429-7431.
7. Sánchez, DS.; Baeza, A.; Alonso, DA., Symmetry., 2016; 8(1):3.
8. Kalaitzakis, D.; Rozzell, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. Organic Letters, 2005, 7, 4799-4801.
9. Bariotaki, A.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. Org. Lett., 2012, 14, 1792-1795.
10. Kalaitzakis, D.; Smonou, I. Eur. J. Org. Chem., 2012, 43-46.
11. a) Xu, Q.; Yu, J.; Han, F.; Hua, J.; Chen, W.; Yang, L. Tetraedron: Assymetry, 2010, 21, 156. B) Kumar, P.; Pandey, M.; Gupta, P.; Dhavale, D.D. Tetraedron Lett.i, 2010, 51, 5838. 20.
12. a) Wolberg, M.; Filbo, M.V.; Bode, S.; Geilenkirchen, P.; Feldmann, R.; Liese, A.; Hummel, W.; Muller, M. Bioprocess Biosyst. Eng., 2008, 31, 183. B) Sun, F.; Xu, G.; Wu, J.; Yang, L. Tetraedron: Assymetry., 2007, 18, 2454. C) Ohrlein, R.; Baisch, G. Adv. Synth. Catal., 2003, 345, 713. 21.
13. a) Wu, X.; Wang, L.; Wang, S.; Chen, Y. Amino Acids, 2010, 39, 305. B) Liljeblad, A.; Kallinen, A.; Kanerva, L.T. Curr. Org. Synth., 2009, 6, 362. C) Ludeke, S.; Richter, M.; Muller, M. Adv. Synth. Catal., 2009, 351, 253.
14. Iwona A. Kaluzna; Brent D. Feske; Weerawut Wittayanan; Ion Ghiviriga; Jon D. Stewart, The Journal of Organic Chemistry, 2005; 70 (1), 342-345