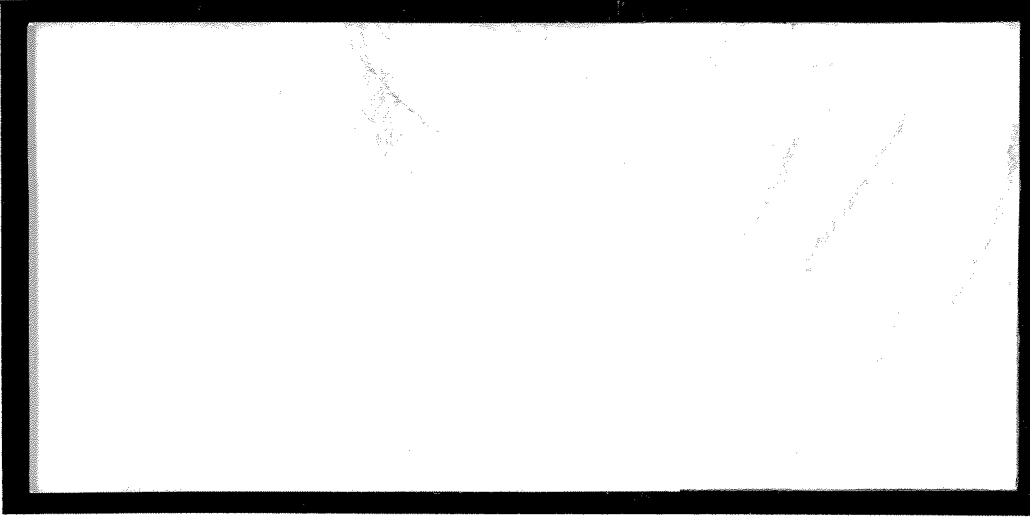


2002-108



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

**ANTİKANSER TAXOİD BİLEŞİKLERİN TEMEL
YAPITAŞLARININ BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLER
KULLANILARAK STEREOSEÇİCİ SENTEZLERİ**

PROJE NO: TBAG-1883 (100T026)

**PROF. DR. CİHANGİR TANYELİ
ARŞ.GÖR. BENGÜ SEZEN
ARŞ.GÖR. DEVRİM ÖZDEMİRHAN
ARŞ.GÖR. ÇİĞDEM İYİGÜN**

**ŞUBAT 2002
ANKARA**

ÖNSÖZ

Bu projede, antikanser özellik gösteren Taxoid yapıların önemli yapıtaşlarının öncelikle rasemik sentezleri, sonrasında, biyoteknolojik yöntem uygulanarak enantiyomerce zengin hallerinin ayırıştırma çalışmaları tamamlanmıştır. Elde edilen bulgular çok rahatlıkla uygulamaya aktarılabilir niteliktedir. Proje Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. Giriş

1.1. Konu

1.2. Amaç

1.3. Kapsam

2. Gelişme

2.1. Rasemik sentez çalışmaları

2.1.1. Metil Salisilat Sentezi

2.1.2. Metil-2-metoksi-benzoat Sentezi

2.1.3. (±)-Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat Sentezi

2.1.4. (±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat Sentezi

2.2. Hidrolaz Tipi Enzimler Kullanılarak Biyoteknolojik Yöntemle Enantiyomerik Ayrıştırma Çalışmaları

2.2.1. (±)-Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın PLE Hidrolizi

2.2.2. (±)-Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın HLE Hidrolizi

2.2.3. (±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın PLE Hidrolizi

2.2.4. (±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın HLE Hidrolizi

2.3. Mutlak Konfigürasyon ve Enantiyomerik Zenginlik Değerlerinin Belirlenme Çalışmaları

3. Sonuç

4. Referanslar

FIGÜRLER

1. Metil-2-metoksi-benzoat'ın ^1H -NMR spektrumu
2. Metil-2-metoksi-benzoat'ın ^{13}C -NMR spektrumu
3. Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın ^1H -NMR spektrumu
4. Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın ^{13}C -NMR spektrumu
5. Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın ^1H -NMR spektrumu
6. Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın ^{13}C -NMR spektrumu
7. 2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilik asit'ın ^1H -NMR spektrumu
8. 3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilik asit'ın ^1H -NMR spektrumu
9. (S)-(+)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın yapısı

ÖZ

Taxoid tipi diterpen yapıların antikanser ilaç özelliği gösterdiği literatür çalışmalarından bilinmektedir. Dünyada mevcut klinik kullanımdaki antikanser ilaçlar arasında en aktif olan Taxol bileşiği, taxoid tipi diterpenler sınıfına dahildir. Bu bileşiklerin total sentezleri üzerine önemli araştırma merkezlerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Taxol bileşiğinin A, B, C ve D halkalarından oluşan ana iskelet total sentez çalışmaları incelendiğinde; en geçerli sentetik stratejinin C halkasından başlanarak, diğer halkaların sentezlenmeleri olduğu görülmektedir.

Bu noktadan hareketle; total sentez çalışmalarına temel teşkil etmesi nedeniyle, C halkasının istenilen stereokimyasal formda ve yüksek verimle elde edilme çalışmaları en önemli gerekçeyi oluşturmaktadır. Literatürdeki çalışmalardan da görülebileceği gibi, C halkasına temel teşkil eden başlangıç maddelerinin sentezinde karşılaşılan güçlüklerin giderilmesi bu projenin temelini kapsamaktadır. Önerilen proje öncelikle, Taxoid yapıların C halkasının yapıtaşlarının rasemik sentezlerini ve bunların çeşitli hidrolaz tipi enzimler kullanılarak biyoteknolojik yöntemler ile istenilen stereokimyasal formda ayrıştırılmalarını hedeflemektedir. Hedeflenen yapıtaşlarının rasemik sentezlerinde çok kolay bulunabilen aromatik türevler seçilmiştir. Bu türevlerin literatürde çok iyi bilinen Birch indirgeme yöntemi ile konjuge olmayan dien sistemlere dönüşümü başarılmıştır. Kuaterner karbon merkezinin oluşturulmasında ise, yapı üzerinde bulunan karbonil fonksiyonel grubunun α -konumunun metallendirilmesi ve bunu takip eden alkilasyonu kullanılmıştır. Hedef yapıtaşlarının 4-konumundaki karbonil oluşumu ise, PDC (piridinyumdiklorokromat) kullanılarak alilik oksidasyon yöntemi ile sağlanmaktadır. Bu rasemik yapıların biyoteknolojik ayrıştırılmalarında çeşitli hidrolaz tipi enzimler kullanılmıştır. Bu enzimlere örnek olarak PLE, CCL, PPL, CAL, HLE gösterilebilir. Herbirinin farklı seçicilik özelliklerinin bulunmasının, olası ayrıştırma sorunlarının ortadan kaldırılmasında yararlı olacağı planlanmıştır. Elde edilen optik aktif yapıların, optik saflık ve enantiomerik zenginlikleri kiral kolon içeren HPLC ile tayin edilmiştir.

Anahtar Sözcükler

Taxoid bileşikler, biyoteknolojik sentez, stereoseçicilik, enzimler

ABSTRACT

The anticancer property of Taxoid type compounds is very well known from the literature. Among anticancer drugs in the clinical use, the most active Taxol belongs to class of taxoid type of diterpens. Many research centers work on the total synthesis of these compounds. When the total synthesis of A, B, C and D ring of Taxol is inspected, it is seen that the most feasible strategy covers the total synthesis of the carbon skeleton starting from the C ring.

Starting from this point of view, the stereoselective synthesis of the C ring with high chemical yield is the main target of this project. As it can be seen from the literature studies, the basis of this proposal is to overcome the difficulties in the synthesis of building blocks of the C ring construction. The project consists of the racemic synthesis of C ring building blocks and subsequent resolution of them via hydrolase type enzymes with preferred stereochemistry.

In the racemic synthesis of the target buildingblocks, available aromatic compounds were chosen. These aromatic compounds were converted into the corresponding unconjugated diene systems with Birch reduction method. In the quaternary carbon center formation, α -position of the carbonyl group present in the unsaturated diene system was metallated and subsequently be alkylated. The insertion of the carbonyl functionality to the fourth position of the target building blocks is able to be done by allylic oxidation with PDC (pyridinium dichloro chromate). The resultant racemic building blocks were resolved with various hydrolase type enzymes which are PLE, CCL, PPL, CAL and HLE. All have different resolving properties which can be used to overcome the solution of some possible problems during the resolution process.

Enantiomeric excess values of the resolved optically active compounds were determined by HPLC with various chiral columns.

Keywords

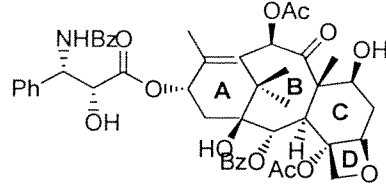
Taxoid compounds, biotechnological synthesis, stereoselectivity, enzymes

1. Giriş

1.1. Konu

Projede, Taxoid tipi antikanser özellikleri olduğu bilinen bileşiklerin total sentezlerinde kullanılacak, yapıtaşlarının istenilen stereokimyasal özellikte ve yüksek verimle elde edilmeleri planlanmıştır. Hedeflenen yapıtaşlarını amaç kısmında yapıları verilen çeşitli sikloheksadien türevleri oluşturmaktadır. Öncelikle bu yapıların en kısa yolla ve yüksek verimle sentezleri düşünülmüştür. Bu stratejide hedeflenen yapıların rasemik sentezleri tamamlanmalıdır. İkinci aşamada ise, istenilen stereokimyasal özellikler bu yapıtaşlarına kazandırılmalıdır. Bu aşamada, biyoteknolojik yaklaşımların uygulaması planlanmıştır. Bilindiği gibi, günümüz koşullarında üretim yöntemlerinin doğa ile uyumlu olması en önemli geçerlilik kriterini oluşturmaktadır. Bu kriteri en iyi sağlayan yöntemin ise biyoteknolojik uygulamalar olduğu çok iyi bilinmektedir. Proje sentetik ve biyoteknolojik yöntemlerin birarada uygulanmasını hedeflemektedir.

Taxoid tipi diterpen yapıların antikanser ilaç özelliği gösterdiği literatür çalışmalarından bilinmektedir [1-9] (Nicolaou, 1994). Dünyada mevcut klinik kullanımdaki antikanser ilaçlar arasında en aktif olan ve aşağıda yapısı verilen Taxol, taxoid tipi diterpenler sınıfına dahildir. Bu bileşiklerin total sentezleri üzerine önemli araştırma merkezlerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu tür bileşiklerin doğal kaynaklarının sınırlı olması, araştırmacıları özellikle sentetik yöntemler geliştirmeye yönlendirmiştir. Bilindiği gibi, total sentez çalışmalarındaki temel koşullar şöyle sıralanabilir; öncelikle planlanan sentez stratejisinin kısa olması gerekliliği, bunun olmazsa olmaz koşullarının başında seçilen metodların yüksek verimli ve stereoseçici özelliklerinin istenilen formatta olması, seçilen başlangıç maddelerinin kolay elde edilebilir olması.



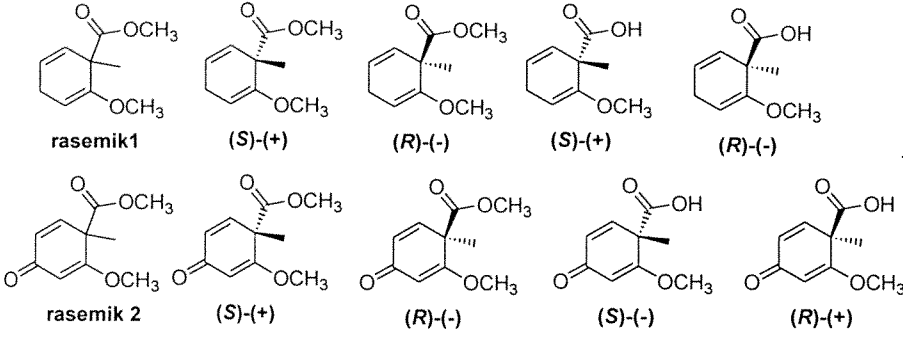
TAXOL

Bu alanda yapılan çalışmalar incelendiğinde, yukarıdaki yapıda görülen A halkasına bağlı izoserin türevinin sentezi için dahi çok sayıda çalışma yapıldığı gözlemlenebilir. Yapılan çalışmalar bizlere bu yapıların önemi hakkında önemli ipuçları vermektedir. Asıl önemli kısım olan, A, B, C ve D halkalarından oluşan ana iskeletin total sentez çalışmaları incelendiğinde ise; en geçerli sentetik stratejinin C halkasından başlanarak, diğer halkaların sentezlenmeleri olduğu görülmektedir [10] (Arseniyadis, 1998).

Bu noktadan hareketle; total sentez çalışmalarına temel teşkil etmesi nedeniyle, C halkasının istenilen stereokimyasal formda ve yüksek verimle elde edilme çalışmaları en önemli gerekçeyi oluşturmaktadır. Literatürdeki çalışmalardan da görülebileceği gibi, C halkasına temel teşkil eden başlangıç maddelerinin sentezinde karşılaşılan güçlüklerin giderilmesi bu projenin temelini kapsamaktadır.

1.2. Amaç

Yukarıda konu kısmında belirtildiği gibi, bu projede Taxoid tipi antikanser özelliğe sahip yapıların total sentezlerinde kullanılacak olan en temel yapıtaşlarının öncelikle yüksek verimle uygun kimyasal yöntemler kullanılarak rasemik sentezleri amaçlanmaktadır. İkinci aşamada ise; elde edilen bu rasemik karışımların biyoteknolojik yöntemler kullanılarak istenilen stereokimyasal özellikte ayrıştırılmaları planlanmaktadır. Bu işlem için önerilen yöntem ise çeşitli hidrolaz tipi enzimler yardımıyla rasemik ayrıştırılmalarının yapılmasıdır. Bu yolla total sentez için gerekli olan temel taşların temininde karşılaşılan güçlüklerin aşılması amaçlanmaktadır. Aşağıda sentezi hedeflenen yapılar görülmektedir.



1.3. Kapsam

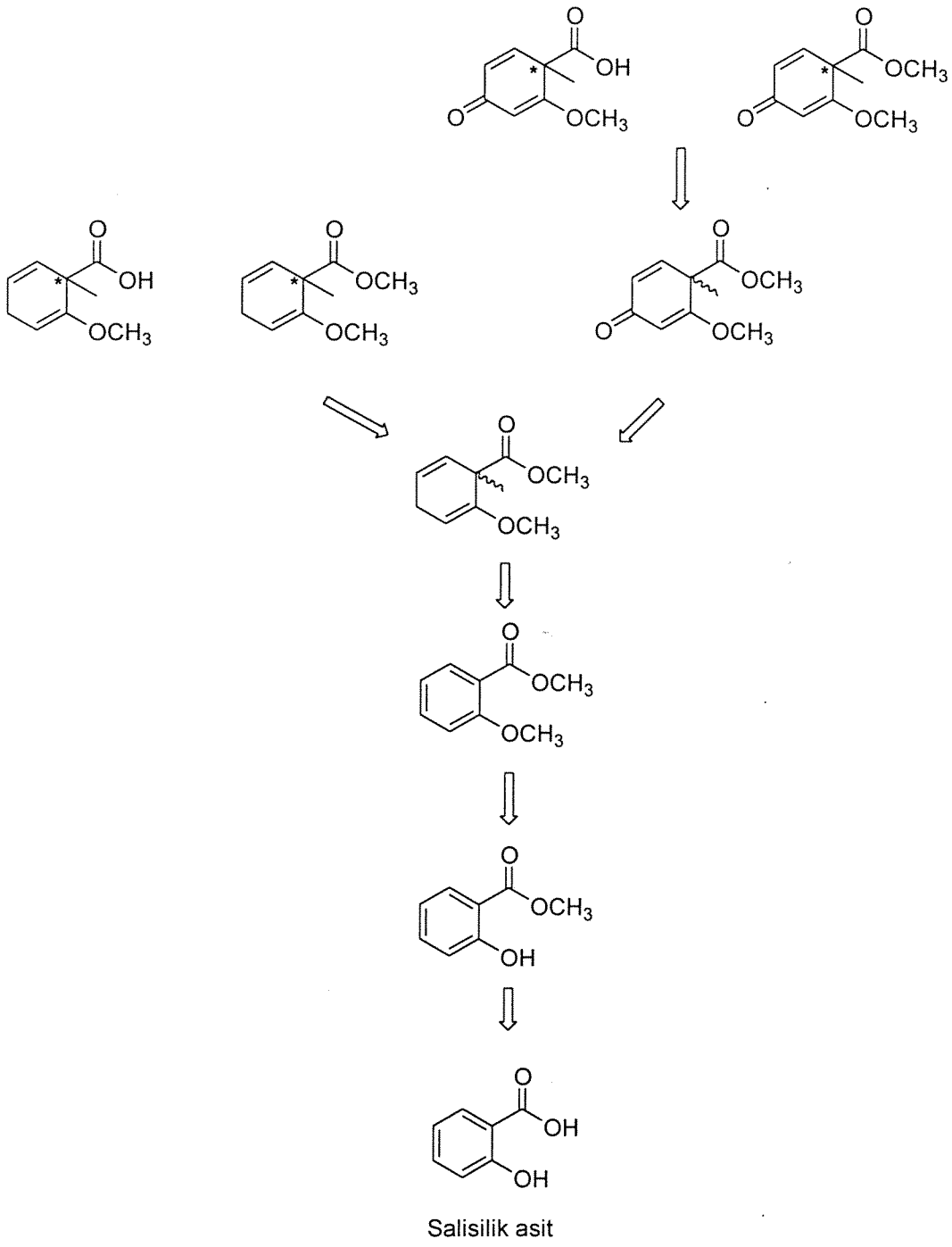
Önerilen proje öncelikle, Taxoid yapıların C halkasının yapıtaşlarının rasemik sentezlerini ve bunların çeşitli hidrolaz tipi enzimler kullanılarak biyoteknolojik yöntemler ile istenilen stereokimyasal formda ayrıştırılmalarını hedeflemektedir.

Tüm bu araştırmalar kapsamında incelenecek parametreler, olası sorunlar ve bu sorunlara alternatif çözümler şu şekilde sıralanabilir: Öncelikle hedeflenen yapıtaşlarına uygun ve ucuz başlangıç maddelerinin seçimi, rasemik sentez aşamasında literatür çalışmalarından yararlanılarak en verimli ve en sorunsuz olarak tespit edilen yöntem yada yöntemlerin seçimi (bu aşamada daha önceki deneyimlerimizin ışığında en uygun olan yöntemlerin tespit edildiği düşüncesindeyiz), rasemik olarak sentezlenen yapıtaşlarının hidrolaz tipi enzimler ile yüksek stereoseçicilikte istenilen optik saflık ve stereokimyasal formda elde edilmeleri, seçilen biyoteknolojik ayrıştırma ajanlarının çok çeşitli tutulması bu aşamada olası sorunların ortadan kaldırılmasını sağlayabilecektir.

2. Gelişme

Hedeflenen yapıtaşlarının rasemik sentezlerinde çok kolay bulunabilen aromatik türevler seçilmiştir. Bu amaçla yapılan retrosentetik analiz çalışmaları aşağıda Şema 1'de ayrıntılı olarak gösterilmektedir. Bu türevlerin literatürde çok iyi bilinen Birch indirgeme yöntemi ile konjuge olmayan dien sistemlere dönüşümü başarıyla yapılmıştır. Kuaterner karbon merkezinin oluşturulmasında ise, yapı üzerinde bulunan karbonil fonksiyonel grubunun α -konumunun metallendirilmesi ve bunu takip eden alkilasyonu kullanılmıştır. Hedef yapıtaşlarının 4-konumundaki karbonil oluşumu ise, PDC (piridinyumdiklorokromat) kullanılarak alilik oksidasyon yöntemi ile sağlanmıştır. Bu rasemik yapıların biyoteknolojik ayrıştırılmalarında çeşitli hidrolaz tipi enzimlerin kullanılmıştır. Bu enzimlere örnek olarak PLE, CCL, PPL, CAL, HLE gösterilebilir. Herbirinin farklı seçicilik özelliklerinin bulunmasının, olası ayrıştırma sorunlarının ortadan kaldırılmasında yararlı olacağı düşünülmüştür. Elde edilen optik aktif yapıların, optik saflık ve enantiomerik zenginlikleri kiral kolon içeren HPLC ile tayin edilmiştir.

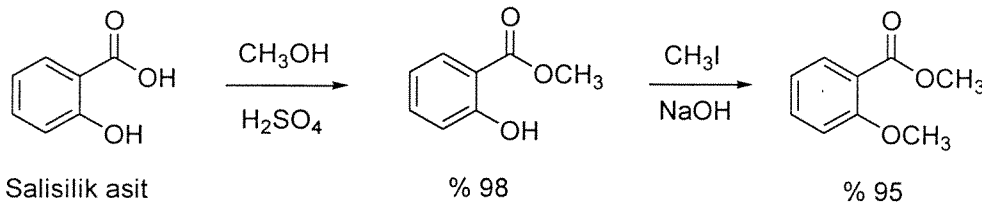
Aşağıda sırasıyla uygulanan tüm sentetik yöntemler ve sonucunda elde edilen yapıların spektroskopik analiz değerlendirmeleri ayrıntıları ile verilmektedir.



Şema 1

2.1. Rasemik sentez çalışmaları

Rasemik sentez çalışmalarında, Şema 1'den görülebileceği gibi, salisilik asit başlangıç maddesi olarak seçilmiştir. Bu yapının seçilmesindeki temel kriter; kolay bulunabilen ve ucuz başlangıç maddesi olma özelliğidir. Öncelikle, salisilik asit'in karboksilik asit fonksiyonu metanol ve sülfürik asit ile % 98 verimle metillendirilmiştir. Hidroksil grubunun metillendirilmesinde ise metil iyodürün bazik ortamdaki tepkimesi kullanılmıştır (Şema 2).



Şema 2

2.1.1. Metil Salisilat Sentezi

Salisilik asit (2.80 g, 0.02 mol), kuru metanol (8.1 ml, 0.20 mol) ve konsantre sülfürik asit (0.8 ml) ile karıştırılmaktadır. Karışım, 8 saat geri dönüşümlü soğutucu ile Dean-Stark tuzaklaması kullanılarak ısıtılmaktadır. İşlem sonucunda soğutulan tepkime karışımı, doymuş NaHCO_3 çözeltisi (3x50 ml) ve sonrasında doymuş tuzlu su ile muamele edilmektedir. Ayrılan organik faz, kuru MgSO_4 üzerinde kurutulmakta ve çözücünün düşük basınç altında uzaklaştırılması ile % 98 verimle elde edilmektedir. Saflaştırma işlemi kolon kromatografisi yardımı ile yapılmaktadır (EtOAc-Hekzan: 1:5). Ürünün bu çözücü karışımındaki R_f değeri ise 0.37 dir. Literatürde bilinen bir yapı olması nedeni ile yapı aydınlatılmasında sadece $^1\text{H-NMR}$ yöntemi kullanılmış ve literatürdeki değerlerle tam bir uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir. Bu aşamada $^1\text{H-NMR}$ spektrumu gösterilmemektedir.

$^1\text{H-NMR}$ bulguları (CDCl_3): δ ppm	3.91 (s, 3H, OCH_3)
	6.85 (t, 1H, $J=8$ Hz)
	6.86 (d, 1H, $J=8$ Hz)

7.42 (t, 1H, J=8 Hz)

7.80 (d, 1H, J=8 Hz)

2.1.2. Metil-2-metoksi-benzoat Sentezi

Metil salisilat (3.0 g, 0.02 mol), NaOH (1.2 g, 0.03 mol) ve metil iyodür (2.4 ml, 0.04 mol) ile, diklorometan (100 ml) ve su (100 ml) içerisinde, 3 gün oda sıcaklığında karıştırılmaktadır. Diklorometan fazı ayrılmakta ve su fazı yine diklorometan çözücüsü ile ekstre edilmektedir. Toplanan tüm organik fazlar, kuru MgSO₄ üzerinde kurutulmakta ve çözücünün düşük basınç altında uzaklaştırılması ile ürün % 95 verimle izole edilmektedir. Ürün saflaştırmasında, kolon kromatografisi yöntemi kullanılmıştır (EtOAc-Hekzan: 1:5). Ürünün R_f değeri 0.46 dır. Yapı aydınlatmasında ¹H ve ¹³C-NMR spektroskopik yöntemleri kullanılmış ve spektrumlar Figür 1 ve Figür 2 olarak sunulmaktadır.

¹H-NMR bulguları (CDCl₃): δ ppm

3.88 (s, 3H, OCH ₃)
3.89 (s, 3H, COOCH ₃)
6.91-6.99 (m, 2H)
7.46 (dd, 1H, J=8 Hz)
7.79 (d, 1H, J=8 Hz)

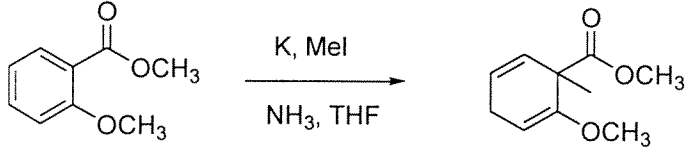
¹³C-NMR bulguları (CDCl₃): δ ppm

51.3 (OCH ₃)
55.3 (COOCH ₃)
111.5 (aromatik karbon)
119.5 (aromatik karbon)
131.0 (aromatik karbon)
132.9 (aromatik karbon)
158.5 (aromatik karbon)
166.0 (C=O)

2.1.3. (±)-Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat Sentezi

Taxol'deki C halkasının temelini teşkil eden rasemik metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat yapının sentezinde Birch indirgeme yöntemi kullanılmıştır

[11] (Hook, 1982), [12-13] (Schultz, 1984). Yukarıda sentezi yapılan madde bu amaçla kullanılmakta ve sonuç ürün olan metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat, % 72 verimle elde edilmektedir (Şema 3).



Şema 3

Şema 2 dikkatlice incelendiğinde bu tepkimede, Birch indirgeme ve quaterner karbon merkezi oluşturulmasının birlikte yapıldığı görülecektir. Bu işlem için uygulanan yöntem şu şekilde verilmektedir:

Sodamid üzerinde 1 saat süreyle kurutulan amonyak (150 ml), kuru buz-aseton banyosunda soğutulan tetrahidrofuran (25 ml) ve tert-butil alkol (2.5 ml) içerisinde çözünen metil-2-metoksi benzoat çözeltisi üzerine damıtılmaktadır. Metalik potasyum (2.5 g, 0.064 mol), bu çözeltiliye ilave edilmektedir. Bu işlem çözeltilinin rengi kalıcı koyu mavi renk oluşana kadar devam etmektedir. Bu renk, çözeltiliye birkaç damla 1,3-pentadien ilavesi ile giderilmektedir. Elde edilen bu sonuç çözeltiliye, kuru buz-aseton banyosunda soğutulan kuru tetrahidrofuran (25 ml) içerisindeki metil iyodür (4.0 ml, 0.064 mol) ilave edilmektedir. 15 Dakika sonra, soğutma banyosu kaldırılmakta ve amonyak karıştırılarak 5 saatlik sürede ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Tepkime karışımı, doymuş tuzlu su üzerine dökülmekte ve sonrasında diklorometan ile ekstre edilmektedir. Toplanan organik fazlar, kuru MgSO₄ üzerinde kurutulmakta ve ürün kolon kromatografisi ile saflaştırılarak % 72 verimle elde edilmektedir. (EtOAc-Hekzan: 1:3). Ürünün bu çözücü karışımındaki R_f değeri ise 0.29 dur. Yapı aydınlatmasında ¹H, ¹³C-NMR ve IR spektroskopik teknikleri kullanılmıştır. Ürünün ¹H-NMR spektrumu Figür 3 ve ¹³C-NMR spektrumu ise Figür 4 olarak verilmektedir.

¹ H-NMR bulguları (CDCl ₃): δ ppm	1.48 (s, 3H, CH ₃)
	2.89-2.98 (m, 2H, CH ₂)
	3.75 (s, 3H, OCH ₃)

3.81 (s, 3H, COOCH₃)

4.75 (t, 1H, J=10 Hz)

5.67-5.98 (m, 2H)

¹³C-NMR bulguları (CDCl₃): δ ppm

22.3 (CH₃)

30.1 (quaterner C)

40.5 (CH₂)

53.4 (OCH₃)

56.5 (COOCH₃)

102.9 (olefinik C)

128.8 (olefinik C)

144.8 (olefinik C)

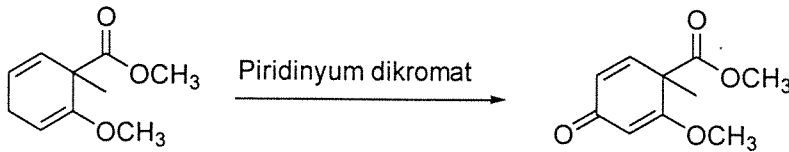
171.2 (olefinik C)

175.5 (C=O)

IR: 2954, 1700 cm⁻¹

2.1.4. (±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat Sentezi

(±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat bileşiği birönceki basamakta sentezi verilen yapının 4-konumundan yükseltgenmiş hali olup, yine hedeflenen Taxol bileşik sentezinde önemli bir yapı taşı olma özelliğini göstermektedir. Bu yükseltgenme tepkimesi için literatürde bilinen piridinyum dikromat yükseltgeyicisi kullanılmıştır [14-15] (Schultz, 1985). Bu tepkime sonucu, hedeflenen ürün % 82 verimle elde edilmiştir (Şema 4).



Şema 4

Bu sentez için uygulanan yöntem şu şekildedir:

Öncelikle piridinyum dikromat hazırlanmaktadır. Bu işlem için, krom(VI) oksit (6.00g, 0.060 mol), kuru diklorometan (150 ml) içindeki kuru piridin (15 ml) üzerine ilave edilmektedir. Sonrasında, tepkime kabı kapatılarak, 15 dakika karıştırılmaktadır. Hazırlanan bu yükseltgeyici ile metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat (2.0 g, 0.011 mol) kloroform (100 ml) içerisinde geri akışlı soğutucu kullanılarak, 24 saat ısıtılmaktadır. Bu işlem sırasında, ortamda oluşan su ise Dean-Stark tuzaklaması ile uzaklaştırılmaktadır. Çözelti 1N HCl (3x50 ml), su (3x50 ml) ve sonrasında doymuş tuz çözeltisi ile ekstre edilmektedir. Toplanan organik fazlar, susuz MgSO₄ üzerinde kurutulmakta ve çözücü düşük basınç altında uzaklaştırılmaktadır. Ürün kolon kromatografisi ile % 82 lik verimle saf olarak elde edilmektedir. (EtOAc-Hekzan: 1:3). Ürünün bu çözelti karışımındaki R_f değeri ise 0.20 dir. Ürünün yapı aydınlatmasında ¹H, ¹³C-NMR ve IR spektroskopik teknikleri kullanılmıştır. Ürünün ¹H-NMR spektrumu Figür 5 ve ¹³C-NMR spektrumu ise Figür 6 olarak verilmektedir.

¹ H-NMR bulguları (CDCl ₃): δ ppm	1.58 (s, 3H, CH ₃)
	3.71 (s, 3H, OCH ₃)
	3.75 (s, 3H, COOCH ₃)
	5.75 (s, 1H)
	6.25 (d, 1H, J=10 Hz)
	6.52 (d, 1H, J=10 Hz)

¹³ C-NMR bulguları (CDCl ₃): δ ppm	22.3 (CH ₃)
	30.1 (quaterner C)
	50.3 (OCH ₃)
	56.4 (COOCH ₃)
	126.2 (olefinik C)
	129.1 (olefinik C)
	144.4 (olefinik C)
	170.4 (olefinik C)
	173.4 (C=O)

IR: 2953, 1702 ve 1667 cm^{-1}

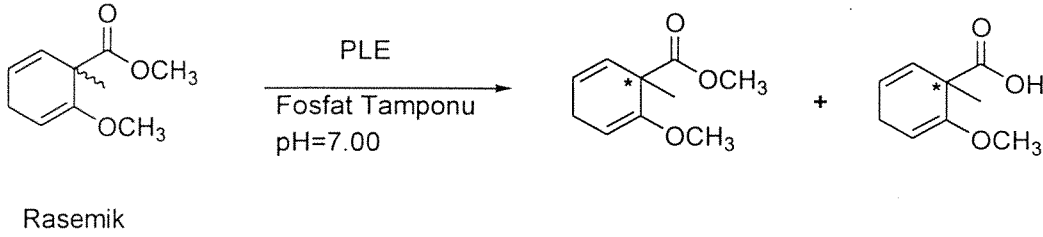
Bu işlemler sonucunda hedeflenen rasemik karışım sentezleri başarıyla ve yüksek verimle tamamlanmıştır.

2.2. Hidrolaz Tipi Enzimler Kullanılarak Biyoteknolojik Yöntemle Enantiyomerik Ayırıştırma Çalışmaları

Projenin giriş kısmında ayrıntılı olarak verilen çalışmamızın ikinci kısmını, biyoteknolojik bir yöntem olan enzimatik ayırıştırma çalışmaları oluşturmaktadır. Rasemik sentezleri yukarıda ayrıntılı olarak verilen 2 temel başlangıç maddesi, öncelikle çeşitli hidrolaz tipi enzimler ile tepkimeye sokulmuştur. Bu amaçla, PLE (Pig Liver Esterase, domuz karaciğeri esterazı), CCL (*Candida Cylinderezea* Lipase), PPL (Porcine Pancreatic Lipase, domuz pankreas lipazı), CAL (*Candida Antarctica* Lipase) ve HLE (Horse Liver Esterase, at karaciğeri esterazı) kullanılmıştır [16-20] (Tanyeli, 1996). Öncelikle her bir enzim denemesinde, standard olarak 0.5 g rasemik karışım alınarak, % 10 oranında enzim ile ön denemeler yapılmıştır. Bu işlemler için uygulanan standard yöntem aşağıda ayrıntılı olarak sunulmaktadır. Enzimatik tepkimeler sonucu, bunlar içerisinde sadece PLE ve HLE enzimlerinin bizim rasemik karışımlara karşı aktivite gösterdiği gözlenmiştir ve sonrasında çalışmalarımız bu iki enzim üzerinde yoğunlaşmıştır. Aşağıda her iki enzim ile yapılan biyoteknolojik ayırıştırma çalışmalarını ve elde edilen bulguları detaylı olarak bulabilirsiniz.

2.2.1. (±)-Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın PLE Hidrolizi

Biyoteknolojik ayırıştırma çalışmalarının ilkinin oluşturduğu bu yöntemde, PLE miktarı olabilecek en düşük katalitik orana düşürülmüştür. Bu oranın bulunmasında, en az 10 farklı PLE miktarı denenmiş olup, en uygun minimum miktar 100 μL PLE olarak tespit edilmiştir. Hidroliz sonucunda, enantiyomerce zenginleştirilmiş olan metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat ve 2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilik asit, sırasıyla % 36 ve % 32 verimlerle izole edilmişlerdir (Şema 5).



Şema 5

Bu işlem için uygulanan biyoteknolojik işlem şu şekildedir; pH=7.00 fosfat tampon çözelti (50.0 ml) içerisinde karıştırılan rasemik haldeki metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat (500 mg) üzerine, PLE (100 µL) ilave edilmektedir. Sonuç tepkime karışımı, 15 °C'de pH-stat birimi içerisinde kontrollu bir şekilde karıştırılmaktadır. Tepkimenin dönüşüm kontrolü TLC (ince tabaka kromatografisi) ile yapılmaktadır. Karışım içerisinde kontrol sonucu % 45'lik dönüşüme ulaşılnca, tepkime durdurulmaktadır. Tepkimenin durdurulması için üzerine etilasetat ilave edilmekte ve ekstre edilmektedir. Organik faz ayrılarak, susuz MgSO₄ üzerinde kurutulmakta ve çözücü düşük basınç altında uzaklaştırılmaktadır. Elde edilen ham ürünün flaş kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonucu enantiomerce zenginleştirilmiş (-)-metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat % 36 kimyasal verimle elde edilmektedir. Elde edilen bu ürünün optik aktivite gösterip göstermediğinin tespiti için, polarimetre cihazı kullanılmış ve elde edilen ürün polarimetrede (-) değer göstermiştir. Yapılan polarimetre ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = -79$ (CHCl₃, c=0.52).

Bu dönüşüm çalışmasında enzim ile hidroliz sonucu aynı zamanda 2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilik asit'te oluşmaktadır. Bu bileşiğin izolasyonu için, su fazı asitlendirilmekte ve etil asetat ile ekstre edilmektedir. Bu işlem sonucu 2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilik asit % 32 verimle elde edilmektedir. Yine yapılan polarimetre ölçümleri sonucu, bu yapısında optik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = +24$ (CHCl₃, c=0.30). Bu yapının aydınlatılmasında ¹H-NMR ve IR teknikleri kullanılmıştır. Bu yapının ¹H-NMR'ı Figür 7 olarak verilmektedir.

¹H-NMR bulguları (CDCl₃): δ ppm 1.55 (s, 3H, CH₃)

2.80-3.05 (m, 2H, CH₂)

3.65 (s, 3H, OCH₃)

4.73 (t, 1H, J=10 Hz)

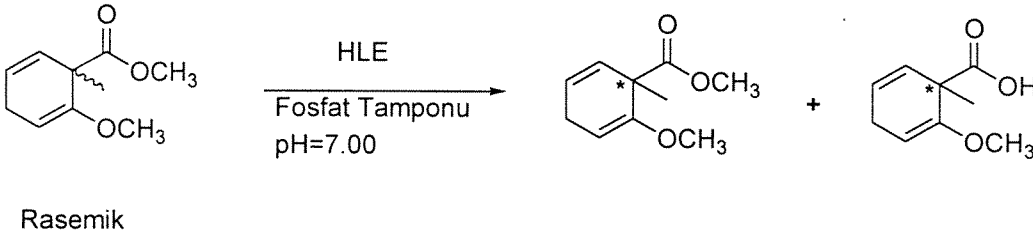
5.12-5.72 (m, 2H)

10.25 (s, 1H, OH)

IR: 3453, 2977 ve 1704 cm⁻¹

2.2.2. (±)-Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın HLE Hidrolizi

Biyoteknolojik yöntemlerin ön çalışmaları sonucu, kullanılan çeşitli hidrolaz tipi enzimler arasında HLE'ninde PLE gibi kullandığımız yapılara karşı aktivite gösterdiği gözlenmişti. Bu amaçla; rasemik metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat HLE ile fosfat tampon çözeltisi içerisinde tepkimeye sokulmuş ve oldukça ilginç sonuçlar elde edilmiştir (Şema 6).



Şema 6

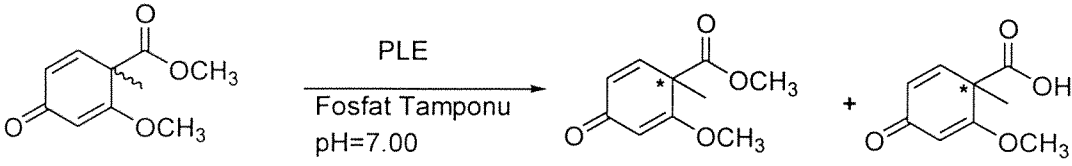
Uygulanan tepkime koşulu şu şekildedir; pH=7.00 fosfat tampon çözelti (50.0 ml) içerisinde karıştırılan rasemik haldeki metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat (500 mg) üzerine, HLE (10 mg) ilave edilmektedir. Sonuç tepkime karışımı, 15 °C'de pH-stat birimi içerisinde kontrollu bir şekilde karıştırılmaktadır. Tepkimenin dönüşüm kontrolü TLC (ince tabaka kromatografisi) ile yapılmaktadır. Karışım içerisinde kontrol sonucu % 45'lik dönüşüme ulaşıncaya, tepkime durdurulmaktadır. Tepkimenin durdurulması için üzerine etilasetat ilave edilmekte ve ekstre edilmektedir. Organik faz ayrılarak, susuz MgSO₄ üzerinde kurutulmakta ve çözücü düşük basınç altında

uzaklaştırılmaktadır. Elde edilen ham ürünün flaş kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonucu enantiomerce zenginleştirilmiş (+)-metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat % 42 kimyasal verimle elde edilmektedir. Elde edilen bu ürünün optik aktivite gösterip göstermediğinin tespiti için, polarimetre cihazı kullanılmış ve elde edilen ürün polarimetrede (+) değer göstermiştir. Yapılan polarimetre ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = +82$ (CHCl_3 , $c=0.57$). **Bu değer incelendiğinde şu sonuca varılmaktadır; HLE ile yapılan enzimatik saflaştırma işlemi sonucu elde edilen ürünün mutlak konfigürasyonu, PLE ile elde edilen aynı ürünün mutlak konfigürasyonunun tersidir. Bu aşamada yapılabilecek değerlendirme sonucu, değişik enzimler kullanılarak aynı başlangıç maddesinden birbirine ters konfigürasyonda entantiyomerce zengin ürünler elde edilebilmektedir. Bu bulgu, uygulanan yöntemin önemini çok iyi bir şekilde vurgulamaktadır. İsteğe bağlı olarak, istenilen konfigürasyonda madde elde etmek bu yolla mümkün olabilmektedir.**

Bu dönüşüm çalışmasında enzim ile hidroliz sonucu aynı zamanda 2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilik asit'te oluşmaktadır. Bu bileşiğin izolasyonu için, su fazı asitlendirilmekte ve etil asetat ile ekstre edilmektedir. Bu işlem sonucu 2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilik asit % 32 verimle elde edilmektedir. Yine yapılan polarimetre ölçümleri sonucu, bu yapısında optik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = -20$ (CHCl_3 , $c=0.30$). Bu sonuç incelendiğinde; yine PLE ile elde edilen aynı yapının tersi mutlak konfigürasyona sahip ürün elde edilmektedir. Bu yapının tanımlanmasında yine $^1\text{H-NMR}$ ve IR teknikleri kullanılmış ve bir önceki PLE çalışması sonucu elde edilen yapı ile tam bir uyum gösterdiği tespit edilmiştir.

2.2.3. (±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın PLE Hidrolizi

(±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat yapının yine Taxol sentezinde önemli bir yer tuttuğu yukarıda ayrıntılı olarak verilmektedir. Bu rasemik karışımın biyoteknolojik yolla ayrıştırılmasında yine PLE ve HLE enzim çifti kullanılmıştır. Öncelikle rasemik yapı PLE ile tepkimeye sokulmuştur (Şema 7).



Rasemik

Şema 7

Uygulanan tepkime koşulu şu şekildedir; pH=7.00 fosfat tampon çözelti (50.0 ml) içerisinde karıştırılan rasemik haldeki metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat (500 mg) üzerine, PLE (100 µL) ilave edilmektedir. Sonuç tepkime karışımı, 15 °C'de pH-stat birimi içerisinde kontrollu bir şekilde karıştırılmaktadır. Tepkimenin dönüşüm kontrolü TLC (ince tabaka kromatografisi) ile yapılmaktadır. Karışım içerisinde kontrol sonucu % 45'lik dönüşüme ulaşılnca, tepkime durdurulmaktadır. Tepkimenin durdurulması için üzerine etilasetat ilave edilmekte ve ekstre edilmektedir. Organik faz ayrılarak, susuz MgSO₄ üzerinde kurutulmakta ve çözücü düşük basınç altında uzaklaştırılmaktadır. Elde edilen ham ürünün flaş kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonucu enantiomerce zenginleştirilmiş (-)-metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat % 36 kimyasal verimle elde edilmektedir. Elde edilen bu ürünün optik aktivite gösterip göstermediğinin tespiti için, polarimetre cihazı kullanılmış ve elde edilen ürün polarimetrede (-) değer göstermiştir. Yapılan polarimetre ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = -67$ (CHCl₃, c=0.45).

Bu dönüşüm çalışmasında enzim ile hidroliz sonucu aynı zamanda 3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilik asit'te oluşmaktadır. Bu bileşiğin izolasyonu için, su fazı asitlendirilmekte ve etil asetat ile ekstre edilmektedir. Bu işlem sonucu 3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilik asit % 30 verimle elde edilmektedir. Yine yapılan polarimetre ölçümleri sonucu, bu yapısında optik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = -12$ (CHCl₃, c=0.30). Bu yapının aydınlatılmasında ¹H-NMR ve IR teknikleri kullanılmıştır. Yapının ¹H-NMR spektrumu Figür 8 olarak verilmektedir.

¹H-NMR bulguları (CDCl₃): δ ppm 1.60 (s, 3H, CH₃)

3.78 (s, 3H, OCH₃)

5.67 (s, 1H)

6.26 (d, 1H, J=9 Hz)

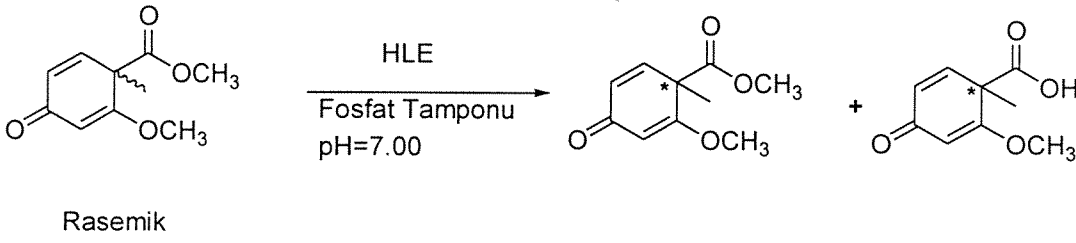
6.54 (d, 1H, J=9 Hz)

10.22 (s, 1H, OH)

IR: 3419, 2999, 1707 ve 1655 cm⁻¹

2.2.4. (±)-Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın HLE Hidrolizi

Aynı başlangıç maddesi alternatif olarak HLE ilede tepkimeye sokulmuştur (Şema 8).



Şema 8

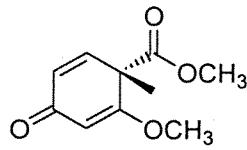
pH=7.00 fosfat tampon çözelti (50.0 ml) içerisinde karıştırılan rasemik haldeki metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat (500 mg) üzerine, HLE (10 mg) ilave edilmektedir. Sonuç tepkime karışımı, 15 °C'de pH-stat birimi içerisinde kontrollü bir şekilde karıştırılmaktadır. Tepkimenin dönüşüm kontrolü TLC (ince tabaka kromatografisi) ile yapılmaktadır. Karışım içerisinde kontrol sonucu % 45'lik dönüşüme ulaşılnca, tepkime durdurulmaktadır. Tepkimenin durdurulması için üzerine etilasetat ilave edilmekte ve ekstre edilmektedir. Organik faz ayrılarak, susuz MgSO₄ üzerinde kurutulmakta ve çözücü düşük basınç altında uzaklaştırılmaktadır. Elde edilen ham ürünün flaş kolon kromatografisi ile saflaştırılması sonucu enantiomerce zenginleştirilmiş (+)-metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat % 38 kimyasal verimle elde edilmektedir. Elde edilen bu ürünün optik aktivite gösterip göstermediğinin tespiti

için, polarimetre cihazı kullanılmış ve elde edilen ürün polarimetrede (+) değer göstermiştir. Yapılan polarimetre ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = +65$ (CHCl_3 , $c=0.45$).

Bu dönüşüm çalışmasında enzim ile hidroliz sonucu aynı zamanda 3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilik asit'te oluşmaktadır. Bu bileşiğin izolasyonu için, su fazı asitlendirilmekte ve etil asetat ile ekstre edilmektedir. Bu işlem sonucu 3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilik asit % 34 verimle elde edilmektedir. Yine yapılan polarimetre ölçümleri sonucu, bu yapısında optik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ölçüm sonucu şu şekildedir; $[\alpha]_D^{20} = +12$ (CHCl_3 , $c=0.30$). Bu yapının aydınlatılmasında $^1\text{H-NMR}$ ve IR teknikleri kullanılmıştır.

2.3. Mutlak Konfigürasyon ve Enantiyomerik Zenginlik Değerlerinin Belirlenme Çalışmaları

Rasemik sentezleri ve biyoteknolojik yöntemle saflaştırma işlemleri yapılan hedef bileşik çalışmalarının son aşamasını, enantiyomerce zengin hallerinin mutlak konfigürasyonlarının ve enantiyomerik zenginlik değerlerinin bulunması oluşturmaktadır. Yapmış olduğumuz literatür araştırması sonucunda, (+)-metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın *S* mutlak konfigürasyonuna sahip olduğu bulunmuştur (Figür 9) [21] (Schultz, 1985).



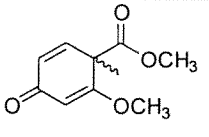
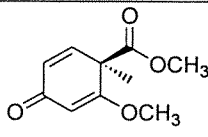
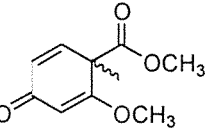
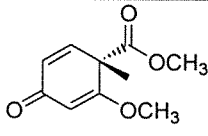
(*S*)-(+)

Figür 9

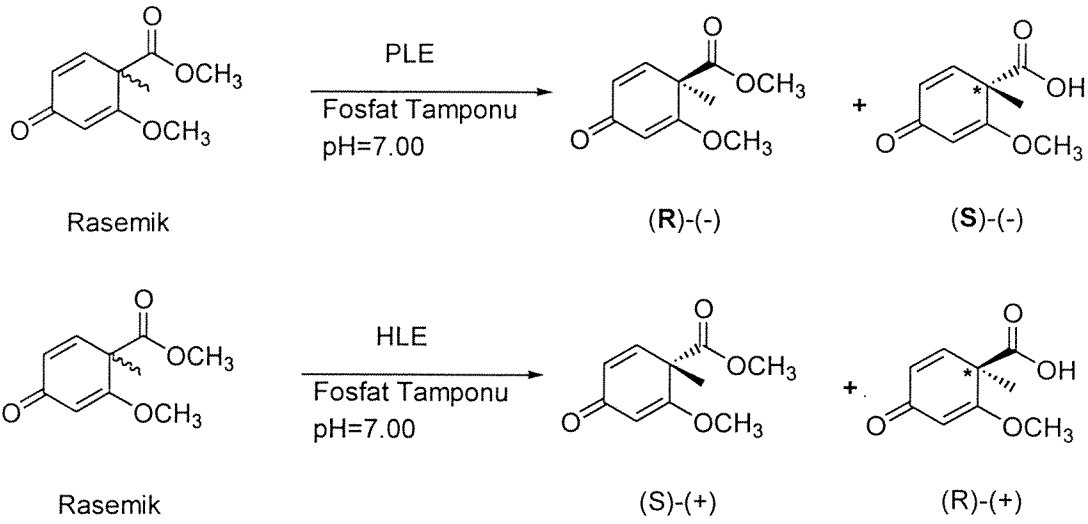
Bu değer bizim için önemli bir referansı oluşturmaktadır. Bu değere bakıldığında, rasemik karışımın HLE ile hidrolizi sonucu elde edilen ester yapı aynı optik dönme değerini yani (+) değeri gösterdiği için mutlak konfigürasyonu *S* olarak belirlenmektedir. Rasemik karışım PLE ile hidroliz edildiğinde elde edilen ester yapı ise (-) optik dönme değeri yani buna ters bir dönme değerini göstermektedir. Literatür değeri ile yapılan bu karşılaştırma sonucu, PLE hidroliz ürününün ise *R* mutlak konfigürasyonuna sahip

olduğu tespit edilmektedir. Heriki ürün içinde enantiyomerik zenginlik tespiti, kiral kolon içeren HPLC cihazı ile yapılmıştır. Bu ölçümlerde kullanılan kolon tipi ise Chiralcel OC kolonudur. **Bu ölçümler maalesef yurt dışında yaptırılmak zorunda bırakılmıştır. Bu projenin başvurusunda, bu cihaz talep edilmiş, ancak reddedilmiştir. Çalışma incelendiğinde bu cihazın ne kadar gerekli olduğu görülebilir.** Bu yapılar için elde edilen değerler Tablo 1 de gösterilmektedir.

Tablo 1.

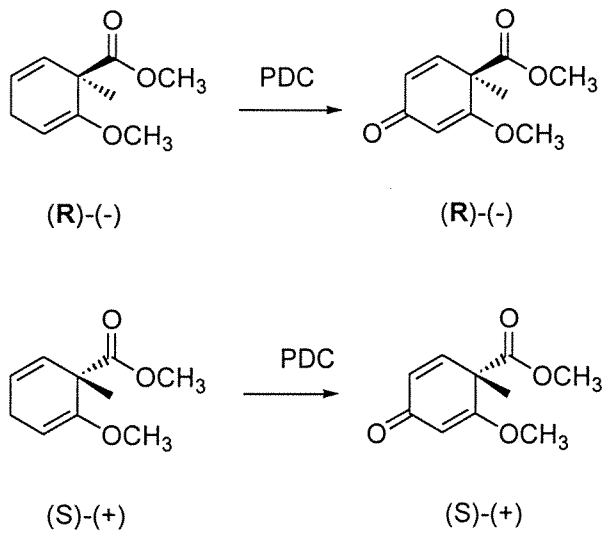
Rasemik başlangıç maddesi	Enzim	Tepkime süresi (saat)	Ester yapısı	$[\alpha]_D^{20}$	Enantiyomerik zenginlik (%)
	PLE	52	 (R)-(-)	-67	94
	HLE	40	 (S)-(+)	+65	92

Herbir tepkime koşulunda elde edilen karboksilik asit türevlerinin, aynı koşullarda elde edilen ester yapıları zıt konfigürasyona sahip olmaları gerekliliğinden hareketle; karboksilik asit türevlerinin mutlak konfigürasyonları da bu karşılaştırma yöntemi ile bulunmuştur (Şema 9).



Şema 9

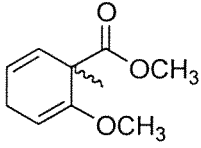
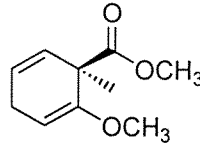
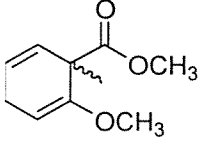
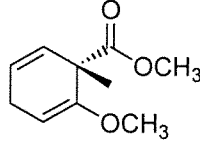
Geriye dönüşlü olarak yapılan mutlak konfigürasyon belirlemelerinin, ikinci aşamasında, biyoteknolojik yolla PLE ve HLE ile ayrı ayrı enantiyomerce zenginleştirilen metil-2-metoksi-1-metil-2,5-siklohekzadien-1-karboksilat yapılar, PDC piridinyum dikromat ile yükseltgeme ürünlerine çevrilmiş ve yine literatürde bilinen mutlak konfigürasyon değerleri ile karşılaştırılarak Şema 10'da gösterilen konfigürasyonlara sahip oldukları bulunmuştur.



Şema 10

Bu yapıların enantiyomerik zenginlik değerleri yine kiral kolon içeren HPLC cihazı ile bulunmuş olup tüm bulgular Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2

Rasemik başlangıç maddesi	Enzim	Tepkime süresi (saat)	Ester yapı	$[\alpha]_D^{20}$	Enantiyomerik zenginlik (%)
	PLE	43	 (R)-(-)	-79	93
	HLE	48	 (S)-(+)	+82	96

3. Sonuç

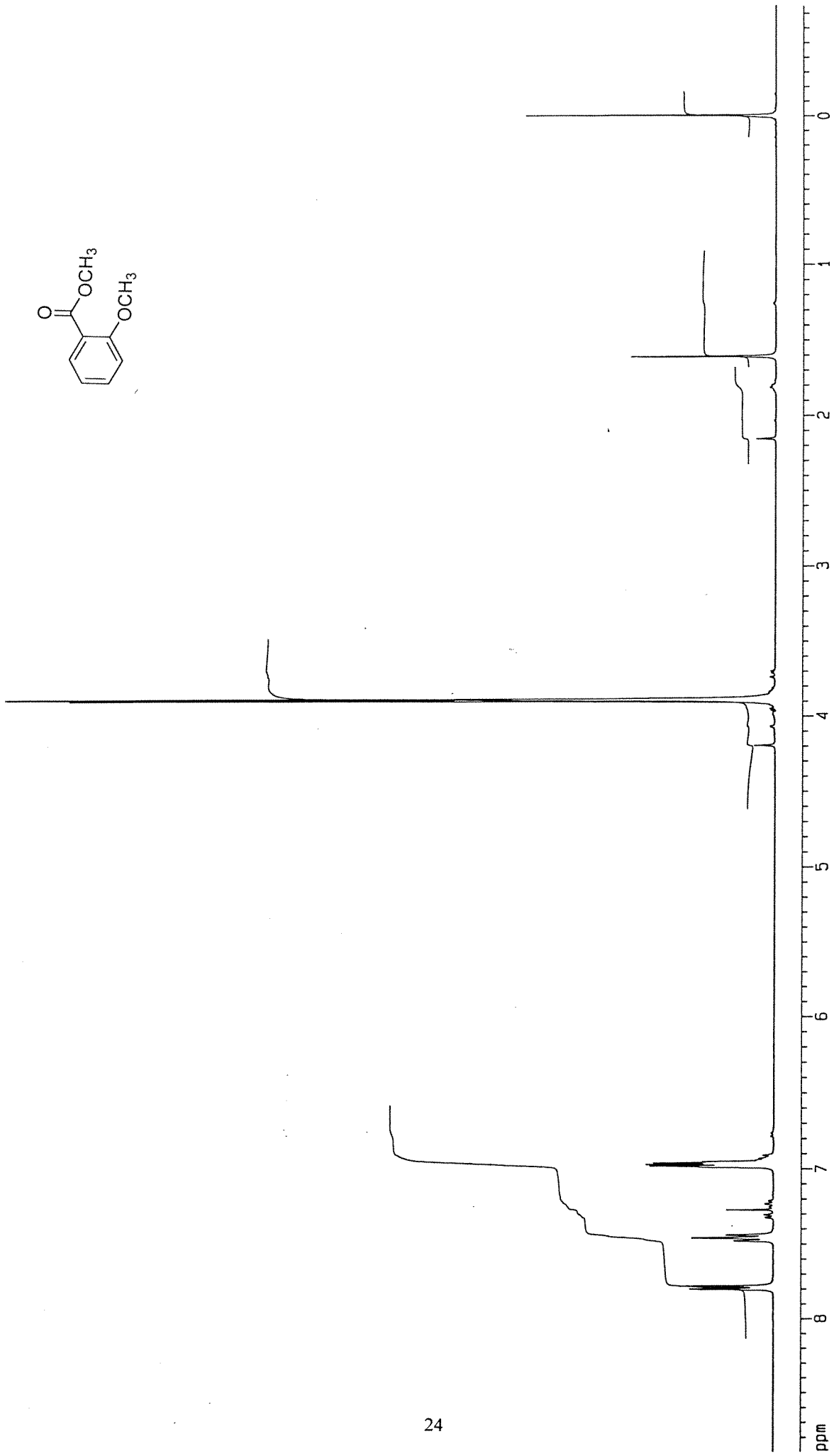
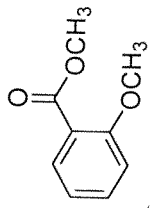
Projenin amaç kısmında detaylı bir şekilde anlatılan Taxol maddesinin enantiyomerce zengin başlangıç maddelerinin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak sentezlenmeleri hedefine, bu çalışma sonucunda başarıyla ulaşılmış bulunmaktadır. Gerek ilk yapılan retro analiz çalışmaları sonucu seçilen başlangıç maddesinin ucuz ve kolay bulunabilir olma özelliği, gerekse rasemik sentez yöntemlerinin yüksek verimli olması projenin uygulamaya aktarılması aşamasında dikkat çeken önemli unsurlardır. Bu projenin ilginç olan bir diğer yanı ise, biyoteknolojik yöntemin istenilen konfigürasyona sahip temel maddelerin eldesinde kullanılabilirliğinin gösterilmesidir. Uygulanan biyoteknolojik enantiyomer saflaştırma yöntemi, çevre ile tam bir uyum içerisinde olup, uygulamaya geçildiğinde son derece güvenilir bir ortamı sağlayabilecektir. Çalışmalar sırasında elde edilen enantiyomerce zengin yapılar üzerinde iki çok önemli noktaya dikkat çekmek isterim. Bunlardan ilki; istenilen konfigürasyonun enzim değiştirilerek elde edilebilir olma özelliğidir. Bu metodun esnek olma özelliğini çok iyi bir şekilde

yansıtmaktadır. İkinci önemli nokta ise; heriki enzim uygulaması sonucu elde edilen enantiyomerce zengin maddelerin, enantiyomerik zenginlik oranlarının % 100 saflığa yakın olmalarıdır. Bu değerlerde bize uygulanan yöntemin ne kadar etkili olduğunu göstermektedir. Önerilen tüm çalışmaların, istenilen boyutta gerçekleşmiş olması son derece sevindiricidir. Bilime olan büyük katkısının yanısıra, uygulama alanındada önemli bir yer tutacağını söylemek mümkün görünmektedir. İleriye dönük olarak bakıldığında, bu tür çalışmaların devam etmesi gerekliliği ortadadır. Dünyadaki gelişmeler göz önüne alındığında, çalışmalarımıza bu yönde devam etmeyi düşünmekteyiz. Ancak bu tür çalışmaların desteklenmesinde, TÜBİTAK kurumunun, bazı klasik değerlendirmelerin dışına çıkması gerektiğini düşünmekteyim. Buna örnek olarak, bu projede talep edilen HPLC cihazının ne kadar gerekli olduğunu gösterebiliriz. Bu cihaz ile yapılması gerekli olan tüm ölçümlerin yurt dışına yollanıyor olması, zaman kaybının yanısıra, ülkemiz adınada prestij kaybına neden olabilmektedir. Bu tür cihazlar yurt dışındali gruplarda, enaz 5 adet olurken, burada bulunmamasını izah etmek mümkün görünmemektedir. Özellikle bu son paragrafın kurumca gözönüne alınacağı umudunu taşımaktayız.

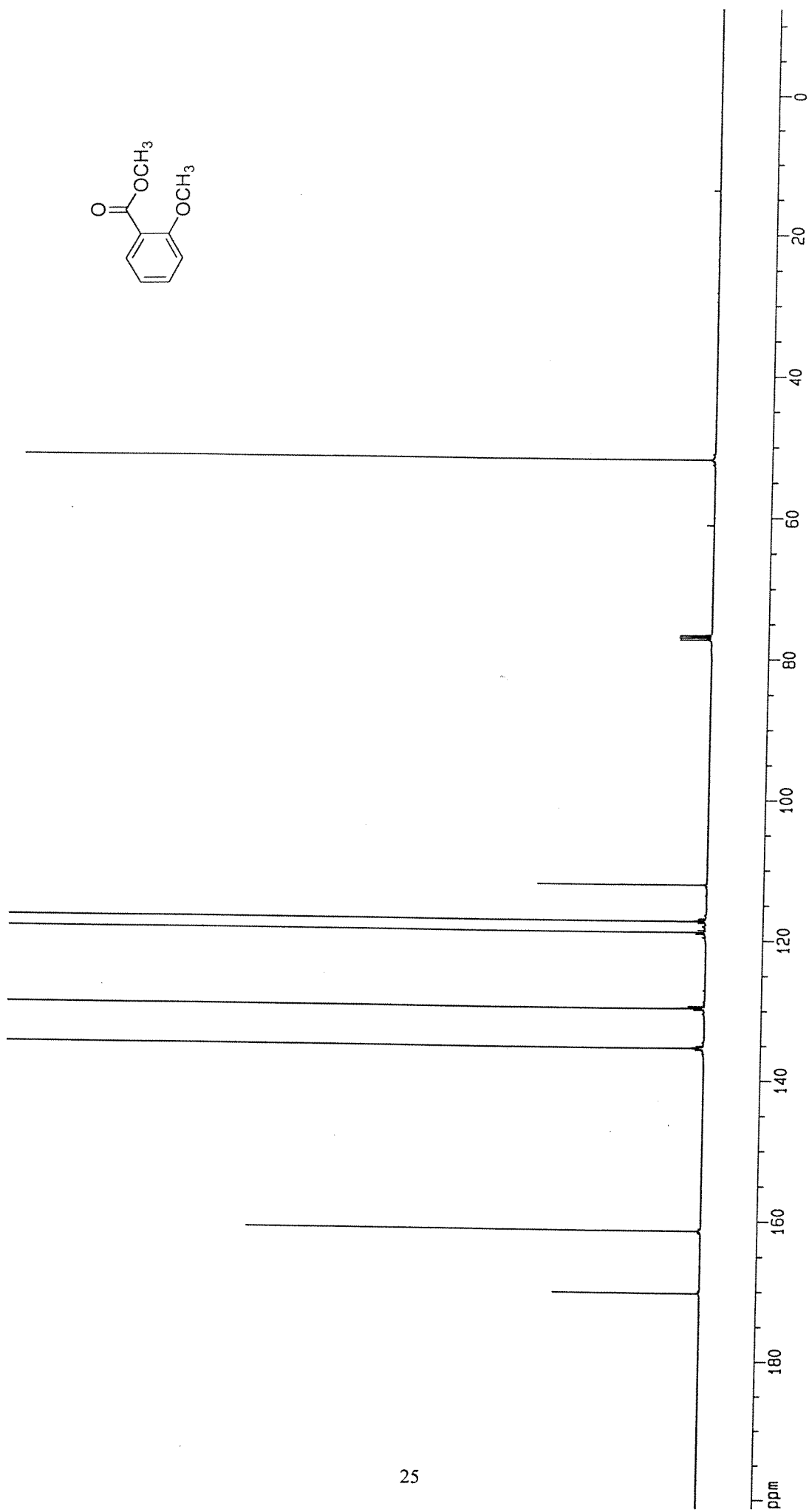
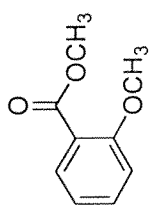
4. Referanslar

1. Nicolaou, K. C., Yang, Z., Liu, J. J., Ueno, H., Nantermet, P. G., Guy, R. K., Claiborne, C. F., Renaud, J., Couladouros, E.A., Paulvannan, K., Sorensen, E. J.; *Nature*, 1994, 367, 630.
2. Holton, R. A., Somoza, C., Kim, H. B., Liang, F., Biediger, R. J., Boatman, P. D., Shindo, M., Smith, C. C., Kim, S., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao, C., Vu, P., Tang, S., Zhang, P., Murthi, K. K., Gentile, L. N., Liu, J. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 1597.
3. Masters, J. J., Link, J. T., Snyder, L. B., Young, W. B., Danishefsky, S. J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 1723.
4. Swindell, C. S., deSolms, S. J.; *Tetrahedron Lett.*, 1984, 25, 3801.
5. Swindell, C. S., Patel, B. P., deSolms, S. J., Springer, J. P.; *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 2346.
6. Swindell, C. S., Patel, B. P.; *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 3.
7. Kojima, T., Inouye, Y., Kakisawa, H.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1985, 58, 1738.
8. Wender, P. A., Ihle, N. C.; *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, 2451.
9. Wender, P. A., Correia, C. R. D.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 2523.
10. Arseniyadis, S., Ferreira, M., Moral, J., Yashunsky, D., Potier, P.; *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 571.
11. Hook, J., Mander, L., Woolias, M.; *Tetrahedron Lett.*, 1982, 23, 1095.
12. Schultz, A., Dittami, J., Lavieri, F., Salowey, C., Sundororaman, P., Szymula, M.; *J. Org. Chem.*, 1984, 49, 4429.
13. Schultz, A., Macielog, M., Sundororaman, P., Taveras, A., Welch, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 7828.
14. Schultz, A., Lavieri, F., Snead, T.; *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 3086.
15. Schultz, A., Lavieri, F., Macielog, M., Plummer, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 3991.
16. Tanyeli, C., Demir, A. S., Dikici, E.; *Tetrahedron:Asymmetry*, 1996, 8, 2399.
1. Tanyeli, C., Demir, A. S., Arkin, A. H.; *Enantiomer*, 1997, 2, 433.
18. Tanyeli, C., Sezen, B., Dikici, E., Fleischauer, J., Repges, C., Wang, Y., Gawronski, J., Kacprzak, K.; *Enantiomer*, 2001, 6, 219.

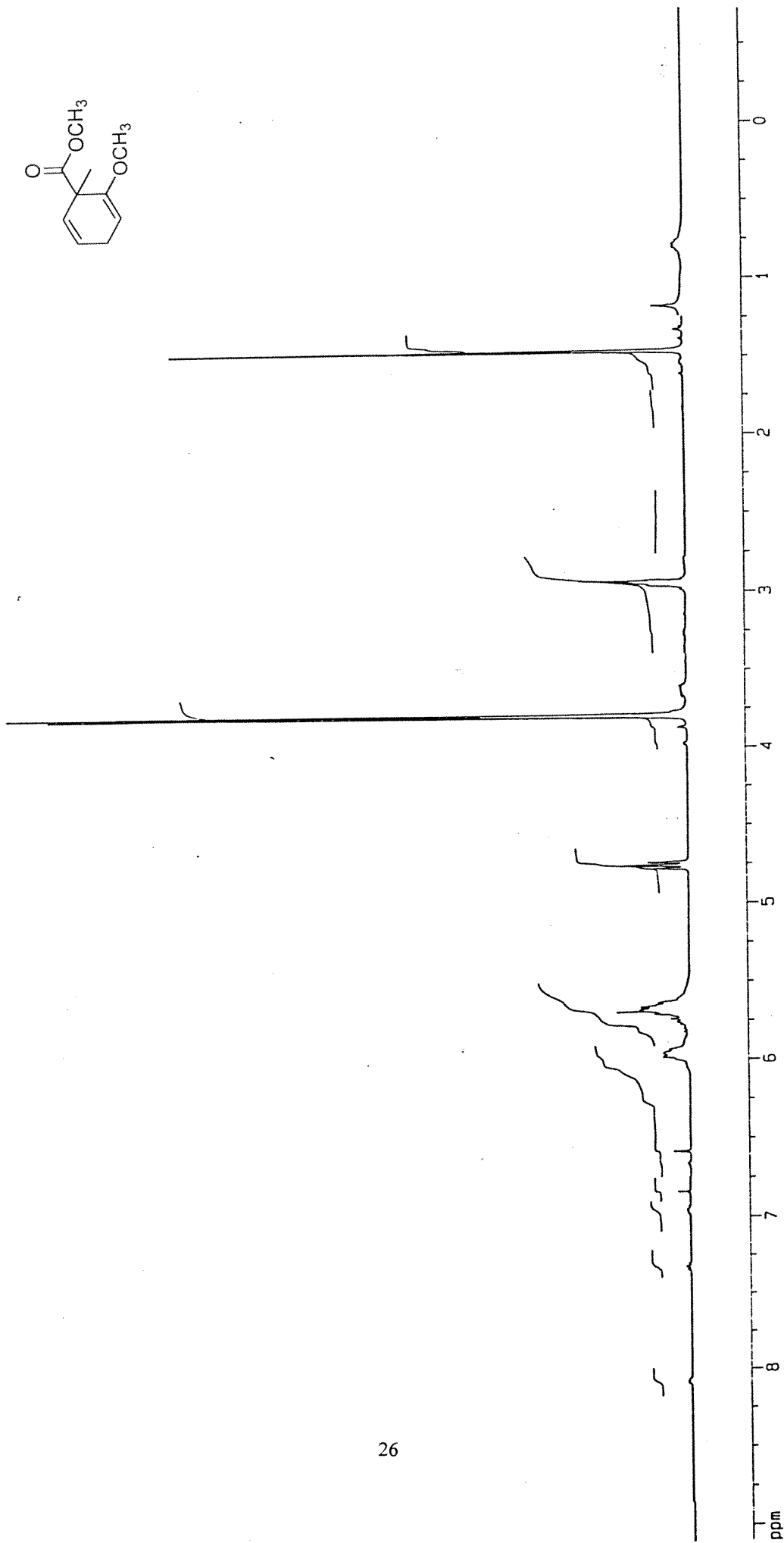
19. Tanyeli, C., Sezen, B.; *Enantiomer*, 2001, 6, 229.
20. Tanyeli, C., Çelikel, G., Akhmedov, İ. M.; *Tetrahedron:Asymmetry*, 2001, 12, 2305.
21. Schultz, A., Puig, S.; *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 915.



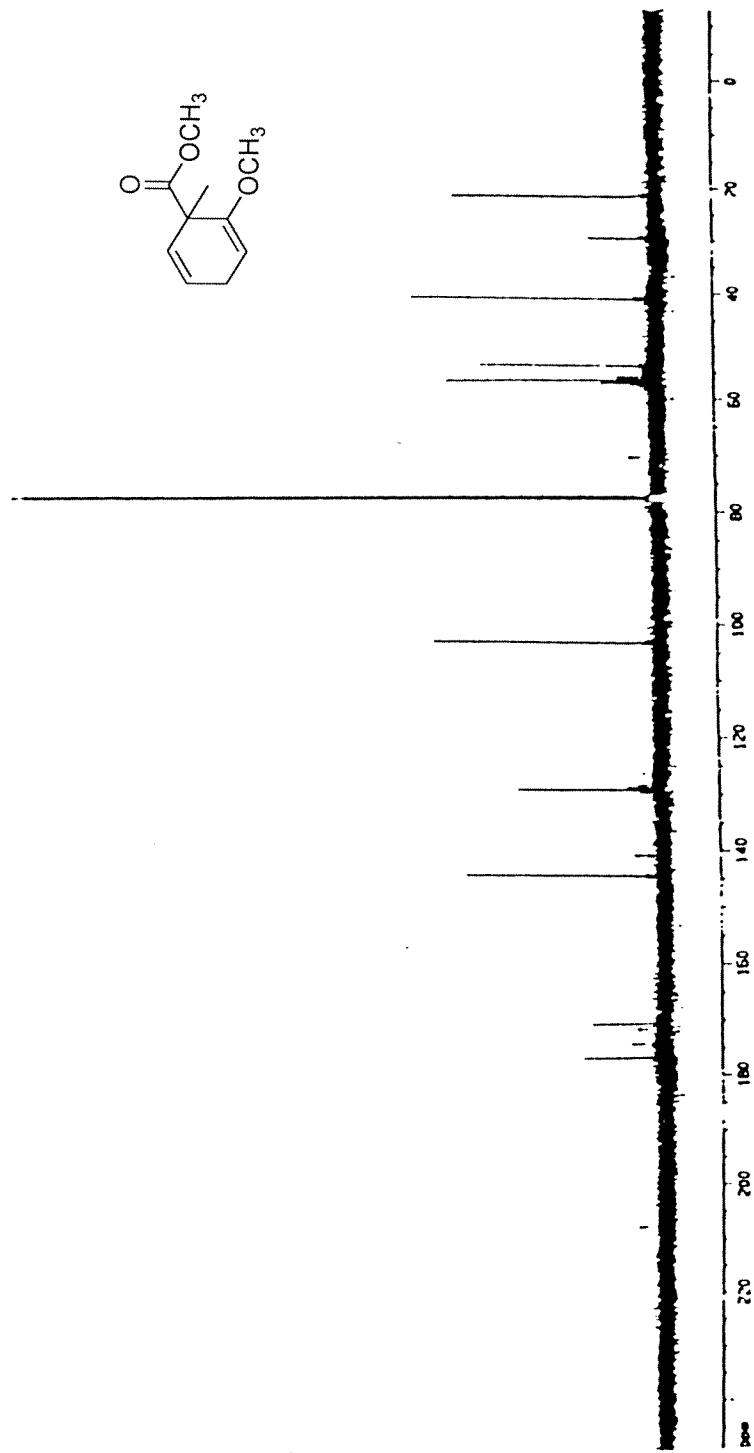
Figür 1. Metil-2-metoksi-benzoat'ın ¹H-NMR spektrumu



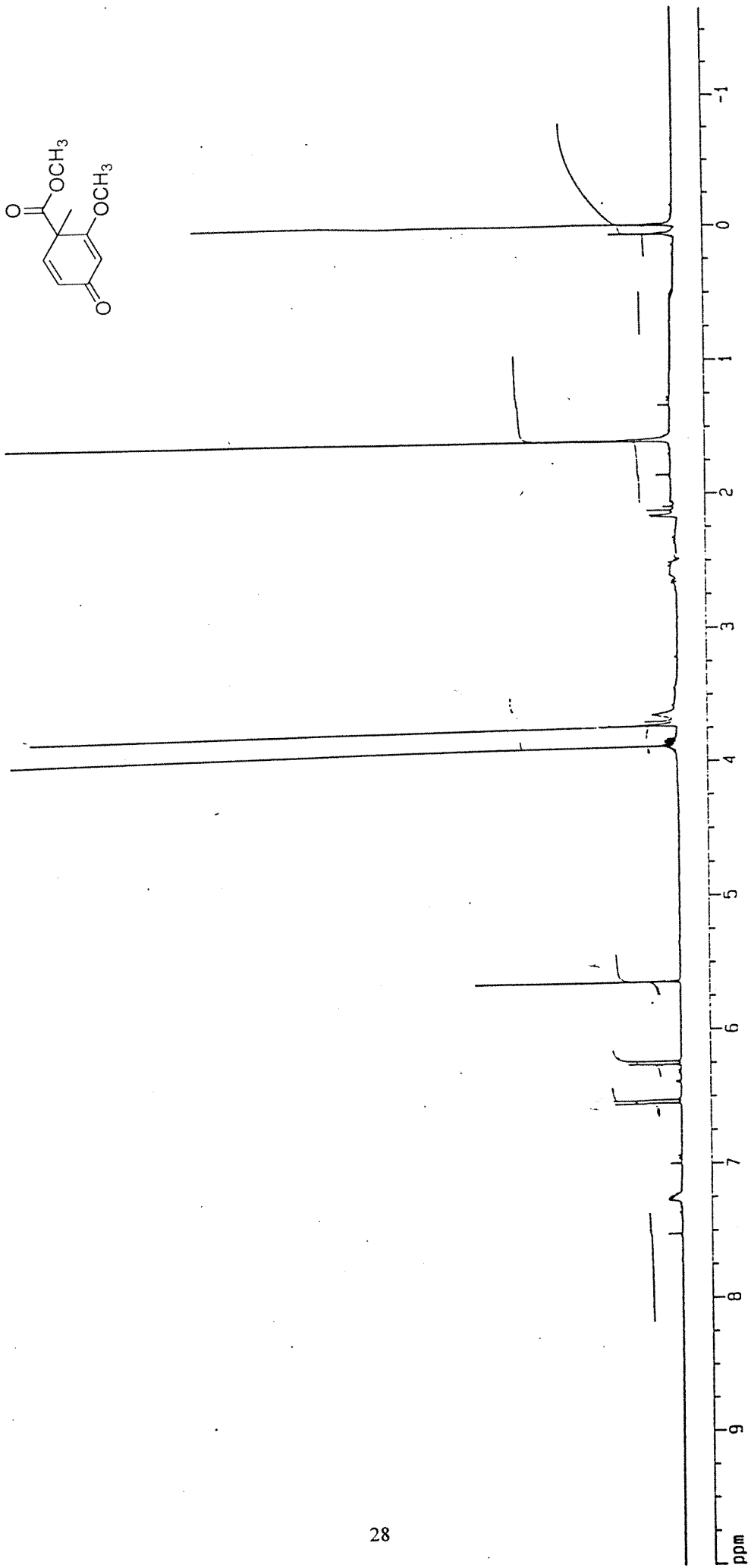
Figür 2. Metil-2-metoksi-benzoat'ın ¹³C-NMR spektrumu



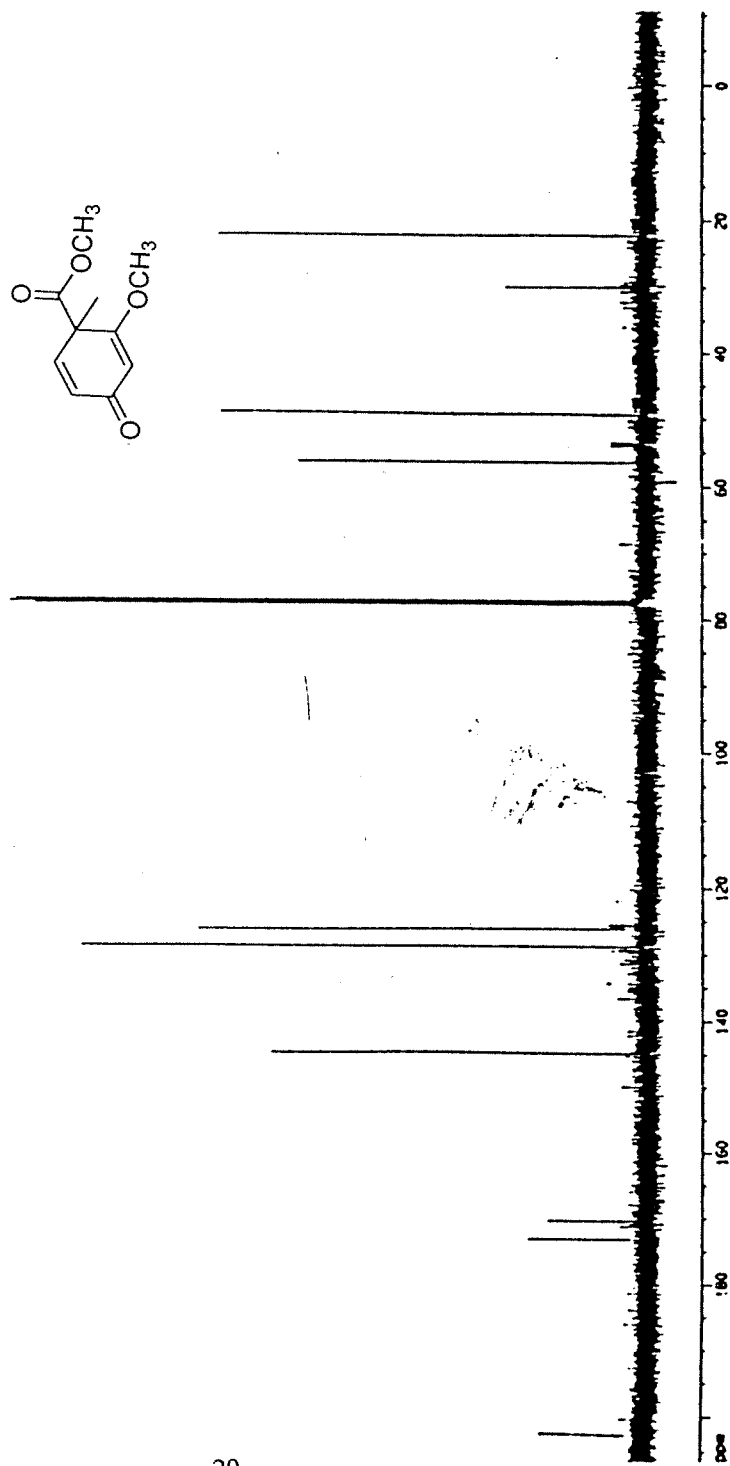
Figür 3. Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın ¹H-NMR spektrumu



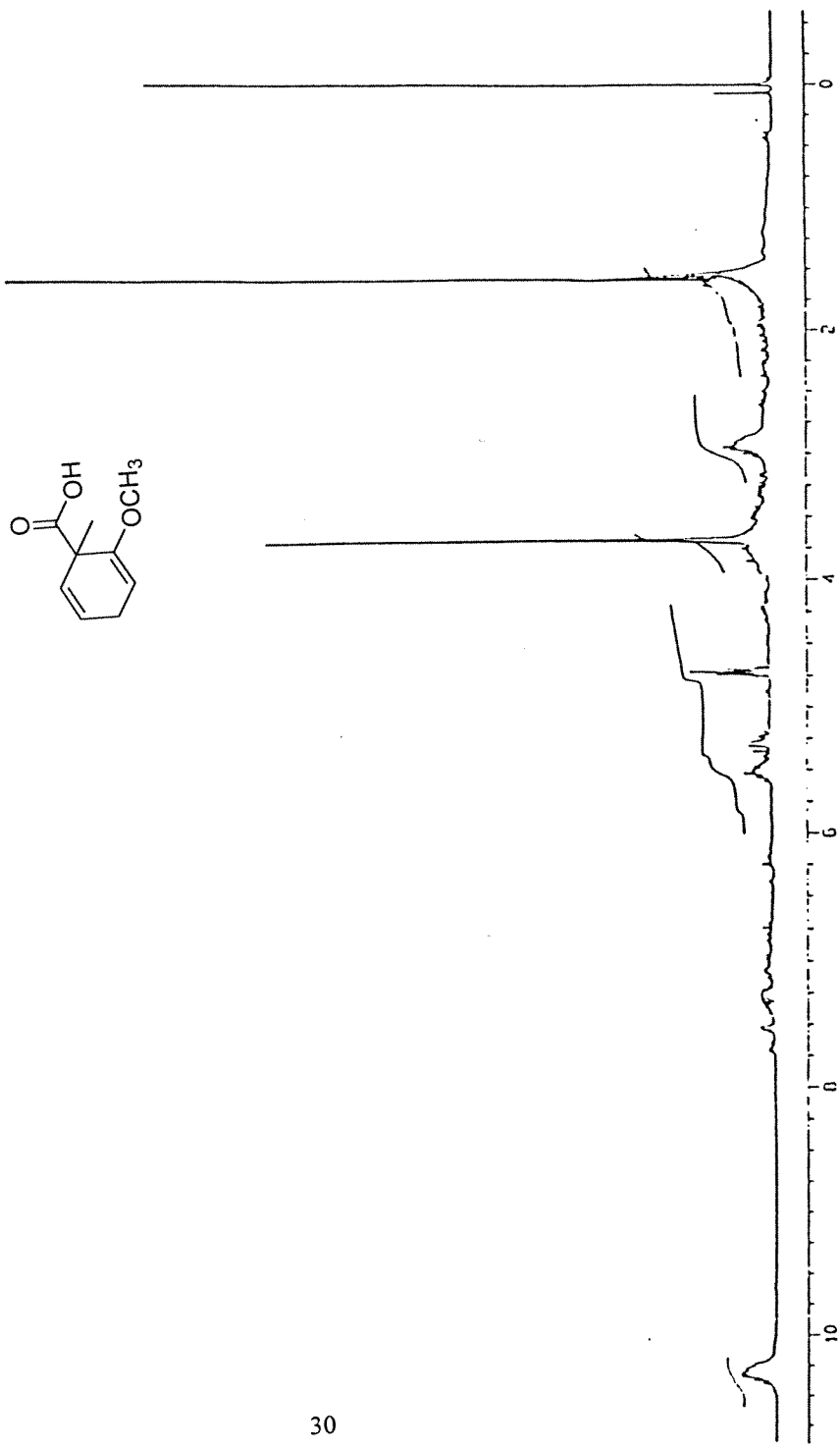
Figür 4. Metil-2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilat'ın ^{13}C -NMR spektrumu



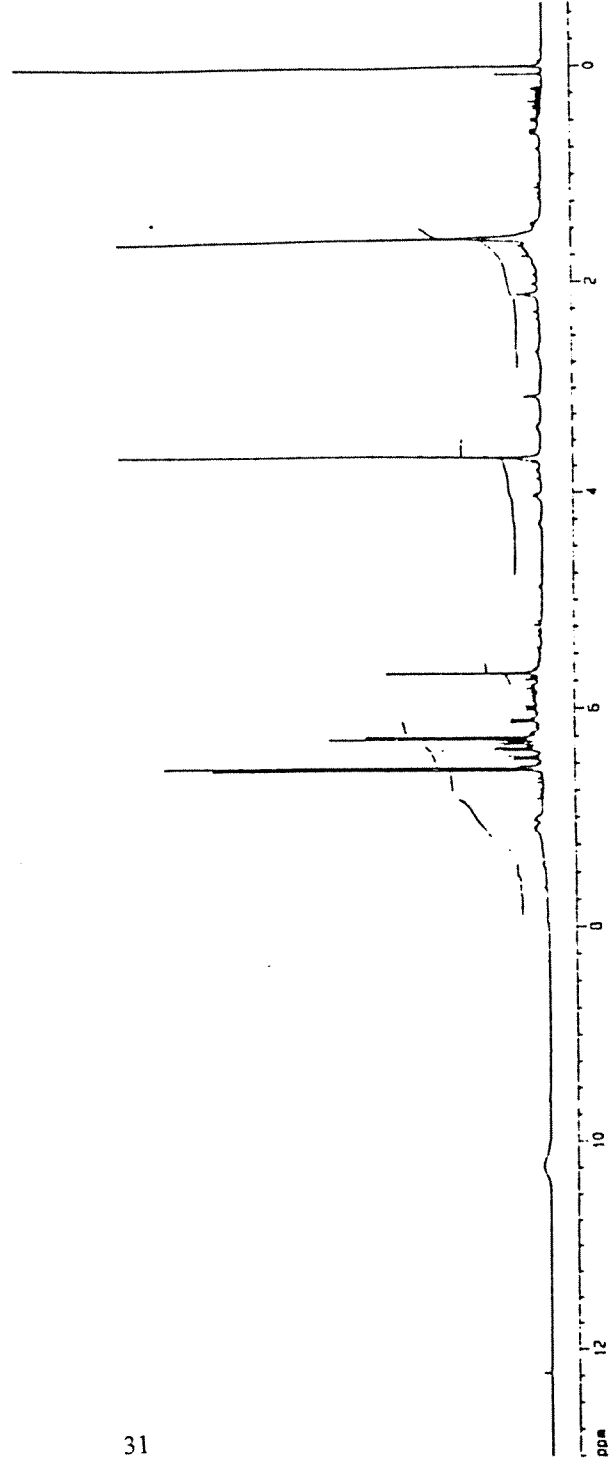
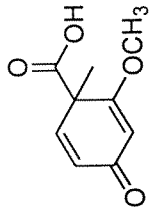
Figür 5. Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın ¹H-NMR spektrumu



Figür 6. Metil-3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilat'ın ^{13}C -NMR spektrumu



Figür 7. 2-metoksi-1-metil-2,5-sikloheksadien-1-karboksilik asit'in ¹H-NMR spektrumu



31

Figür 8. 3-metoksi-4-metil-2,5-sikloheksadien-1-on-4-karboksilik asit'in ¹H-NMR spektrumu

1- Proje No : TBAG-1883 (100T026)
2- İlgili Araştırma Grubu : Temel Bilimler Araştırma Grubu
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri : 01.11.2000-01.02.2002
4- Projenin Adı : Antikanser Taxoid Bileşiklerin Temel Yapıtaşlarının Biyoteknolojik Yöntemler Kullanılarak Stereoseçici Sentezleri
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar : Prof. Dr. Cihangir Tanyeli , Bengü Sezen, Devrim Özdemirhan, Çiğdem İyigün
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi : Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 06531-Ankara
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi :-
8- Özet (Abstract) : Taxoid tipi diterpen yapıları antikanser ilaç özelliği gösterdiği literatür çalışmalarından bilinmektedir. Dünyada mevcut klinik kullanımdaki antikanser ilaçlar arasında en aktif olan Taxol bileşiği, taxoid tipi diterpenler sınıfına dahildir. Bu bileşiklerin total sentezleri üzerine önemli araştırmalar merkezlerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Taxol bileşiminin A, B, C ve D halkalarından oluşan ana iskelet total sentez çalışmalarında incelendiğinde; en geçerli sentetik stratejinin C halkasından başlanarak, diğer halkaların sentezlenmeleri olduğu görülmektedir. Bu noktadan hareketle; total sentez çalışmalarına temel teşkil etmesi nedeniyle, C halkasının istenilen stereokimyasal formda ve yüksek verimle elde edilme çalışmaları en önemli gereği oluşturmaktadır. Literatürdeki çalışmalardan da görülebileceği gibi, C halkasına temel teşkil eden başlangıç maddelerinin sentezinde karbonil gruplarının giderilmesi bu projenin temelini kapsamaktadır. Önerilen proje öncelikle, Taxoid yapıları C halkasının yapıtaşlarının rasemik sentezlerini ve bunların çeşitli hidrolaz tipi enzimler kullanılarak biyoteknolojik yöntemler ile istenilen stereokimyasal formda ayrıştırılmaları hedeflemektedir. Hedeflenen yapıtaşlarının rasemik sentezlerinde çok kolay bulunabilen aromatik türevler seçilmiştir. Bu türevlerin literatürde çok iyi bilinen Birch indirgeme yöntemi ile konjuge olmayan dien sistemlere dönüşümü başarılmıştır. Kuaterner karbon merkezinin oluşturulmasında ise, yapı üzerinde bulunan karbonil fonksiyonel grubunun α -konumunun metallendirilmesi ve bunu takip eden alkilasyonu kullanılmıştır. Hedef yapıtaşlarının 4-konumundaki karbonil oluşumu ise, PDC (piridinyumdiklorokromat) kullanılarak alilik oksidasyon yöntemi ile sağlanmaktadır. Bu rasemik yapıları biyoteknolojik ayrıştırılmaları için çeşitli hidrolaz tipi enzimler kullanılmıştır. Bu enzimlere örnek olarak PLE, CCL, PPL, CAL, HLE gösterilebilir. Herbirinin farklı seçicilik özelliklerinin bulunmasının, olası ayrıştırma sorunlarının ortadan kaldırılmasında yararlı olacakları planlanmıştır. Elde edilen optik aktif yapıları, optik saflık ve enantiomerik zenginlikleri kiral kolon içeren HPLC ile tayin edilmiştir.

9- Anahtar Kelimeler :

Taxoid bileşikler, biyoteknolojik sentez, stereoseçicilik, enzimler

10- Projede Yapılan Çalışmaların Sonuçları ile İlgili Yayınlar (makale, tebliğ) :

Tanyeli, C., Çelikel, G., Akhmedov, . M.; Tetrahedron:Asymmetry, 2001, 12, 2305.

Tanyeli, C., Sezen, B., Yigün, Ç., Elmal , O.; Tetrahedron Lett., 2001, 42, 6397.

11- Proje Sonuçlarının Gizlilik Durumu :

Gizli

Gizli Değil

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu : TBAG-1883 (100T026)
Proje Başlığı : Antikanser Taksoid Bileşiklerin Temel Yapıtaşlarının Biyoteknolojik Yöntemler Kullanarak Stereoseçici Sentezleri
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar : Prof. Dr. Cihangir Tanyeli Arş. Gör. Bengü Sezen, Devrim Özdemirhan, Çiğdem İyigün
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi : Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi : -
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri : 01.11.2000-01.02.2002
Öz : Taxoid tipi diterpen yapıların antikanser ilaç özelliği gösterdiği literatür çalışmalarından bilinmektedir. Dünyada mevcut klinik kullanımdaki antikanser ilaçlar arasında en aktif olan Taxol bileşiği, taxoid tipi diterpenler sınıfına dahildir. Bu bileşiklerin total sentezleri üzerine önemli araştırma merkezlerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Taxol bileşiğinin A, B, C ve D halkalarından oluşan ana iskelet total sentez çalışmaları incelendiğinde; en geçerli sentetik stratejinin C halkasından başlanarak, diğer halkaların sentezlenmeleri olduğu görülmektedir. Bu noktadan hareketle; total sentez çalışmalarına temel teşkil etmesi nedeniyle, C halkasının istenilen stereokimyasal formda ve yüksek verimle elde edilme çalışmaları en önemli gerekçeyi oluşturmaktadır. Literatürdeki çalışmalardan da görülebileceği gibi, C halkasına temel teşkil eden başlangıç maddelerinin sentezinde karşılaşılan güçlüklerin giderilmesi bu projenin temelini kapsamaktadır. Önerilen proje öncelikle, Taxoid yapıların C halkasının yapıtaşlarının rasemik sentezlerini ve bunların çeşitli hidrolaz tipi enzimler kullanılarak biyoteknolojik yöntemler ile istenilen stereokimyasal formda ayrıştırılmalarını hedeflemektedir. Hedeflenen yapıtaşlarının rasemik sentezlerinde çok kolay bulunabilen aromatik türevler seçilmiştir. Bu türevlerin literatürde çok iyi bilinen Birch indirgeme yöntemi ile konjuge olmayan dien sistemlere dönüşümü başarılmıştır. Kuaterner karbon merkezinin oluşturulmasında ise, yapı üzerinde bulunan karbonil fonksiyonel grubunun α -konumunun metallendirilmesi ve bunu takip eden alkilasyonu kullanılmıştır. Hedef yapıtaşlarının 4-konumundaki karbonil oluşumu ise, PDC (piridinyumdiklorokromat) kullanılarak alilik oksidasyon yöntemi ile sağlanmaktadır. Bu rasemik yapıların biyoteknolojik ayrıştırılmalarında çeşitli hidrolaz tipi enzimler kullanılmıştır. Bu enzimlere örnek olarak PLE, CCL, PPL, CAL, HLE gösterilebilir. Herbirinin farklı seçicilik özelliklerinin bulunmasının, olası ayrıştırma sorunlarının ortadan kaldırılmasında yararlı olacağı planlanmıştır. Elde edilen optik aktif yapıların, optik saflık ve enantiomerik zenginlikleri kiral kolon içeren HPLC ile tayin edilmiştir.
Anahtar Kelimeler : Taxoid bileşikler, biyoteknolojik sentez, stereoseçicilik, enzimler
Projeden Kaynaklanan Yayınlar : Tanyeli, C., Çelikel, G., Akhmedov, I. M.; Tetrahedron:Asymmetry, 2001, 12, 2305. Tanyeli, C., Sezen, B., İyigün, Ç., Elmalı, O.; Tetrahedron Letters, 2001, 42, 6397.
Bilim Dalı : Organik Kimya Doçentlik B. Dalı Kodu : 1.112