



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Σχεδιασμός και Σύνθεση Νέων Αναστολέων των
Αμινοπεπτιδασών του Ενδοπλασματικού Δικτύου**

**ΚΟΚΚΑΛΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Σχεδιασμός και Σύνθεση Νέων Αναστολέων των Αμινοπεπτιδασών του
Ενδοπλασματικού Δικτύου

ΚΟΚΚΑΛΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

A.M.: 001319

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δημήτριος Γεωργιάδης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Δημήτριος Γεωργιάδης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ευστράτιος Στρατικός, Ερευνητής Α΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Βικτωρία Μαγκριώτη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δημήτριος Γεωργιάδης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ευστράτιος Στρατικός, Ερευνητής Α΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Βικτωρία Μαγκριώτη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Παναγιώτα Μουτεβελή-Μηνακάκη, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Διονύσιος Βουρλούμης, Ερευνητής Α΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Χριστόφορος Κόκοτος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 28/6/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υποοικογένεια των ωκυτοκινασών των M1 αμινοπεπτιδασών (ERAP1, ERAP2 και IRAP) που εντοπίζεται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο έχει κρίσιμο ρόλο στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων και ρυθμίζει έμμεσα τις ανθρώπινες επίκτητες ανοσολογικές αποκρίσεις. Πρόσφατη μελέτη μας έδειξε πως τα φωσφινικά ψευδοτριπεπτιδία μπορούν να αποτελέσουν ισχυρούς αναστολείς των ενζύμων αυτών. Η παρούσα διατριβή είχε ως αντικείμενο:

- Την χρήση συνθετικών μεθοδολογιών διαφοροποίησης τελικού σταδίου για την στερεοεκλεκτική παραγωγή μεγάλης ποικιλίας φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων διαφοροποιημένων στην P_1' θέση τους, με απώτερο στόχο την εύρεση αναστολέων με βελτιωμένο προφίλ εκλεκτικότητας και *in vivo* δραστικότητας, μετά από μια εκτενή μελέτη SAR. Η *in vitro* ενζυμική αξιολόγηση των συντιθέμενων ενώσεων φανέρωσε αρκετούς ισχυρούς αναστολείς της τάξεως των nM για όλες τις ERAPs και εκλεκτικούς αναστολείς κυρίως για τις ERAP2 και IRAP. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά για την περαιτέρω προκλινική ανάπτυξη των αναστολέων αυτών ως ρυθμιστών των επίκτητων ανοσολογικών αποκρίσεων.
- Την ανάπτυξη μιας νέας, ήπιας μεθόδου σχηματισμού δεσμού P-C φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών με στόχο την διαφοροποίηση του αμινοτελικού άκρου τους (P_1 θέσης), θέσης-κλειδί για την επίτευξη εκλεκτικότητας. Ακολούθησε η αξιολόγηση της γενικότητας της μεθόδου με χρήση ποικιλίας υποστρωμάτων στις θέσεις P_1 και P_1' . Επίσης, διατυπώνεται ένα νέο πιθανό μηχανιστικό μονοπάτι της αντίδρασης, με τη βοήθεια DFT υπολογισμών, που περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός δραστικού κυκλικού ενδιάμεσου στην περίπτωση των H-φωσφινικών διοξέων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση των τελικών φωσφινικών διπεπτιδίων έναντι των ERAPs.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Οργανική Σύνθεση, Αναστολέας, Φωσφινικό οξύ, Αμιδοαλκυλίωση, Αμινοπεπτιδάσες

ABSTRACT

The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases (ERAP1, ERAP2 and IRAP) located in the Endoplasmic Reticulum has a critical role in the production of antigenic peptides and indirectly regulates human adaptive immune responses. We have previously demonstrated that phosphinic pseudotripeptides can be potent inhibitors of these enzymes. The object of this thesis is:

- The use of late-stage differentiation approaches for the stereoselective synthesis of phosphinic pseudotripeptides with various modifications at P₁' position, aiming to find inhibitors with improved selectivity and *in vivo* activity profiles, conducting an extensive SAR study. *In vitro* enzymatic evaluation of the synthesized compounds revealed several potent nM inhibitors for all ERAPs and selective inhibitors mainly for ERAP2 and IRAP. These results are encouraging for further preclinical development of these inhibitors as regulators of adaptive immune responses.
- The development of a novel, mild P-C bond forming reaction for the synthesis of phosphinic pseudodipeptides is presented in order to differentiate their N-terminus (P₁ position), a key position in driving selectivity. At the next step the scope of the reaction was investigated, using a large variety of different substrates. In addition, a new mechanistic reaction pathway is formulated in conjunction with DFT calculations, which includes the formation of an active cyclic intermediate in the case of *H*-phosphinic diacids. Finally, the final phosphinic dipeptides were evaluated as inhibitors of ERAPs.

SUBJECT AREA: Organic Chemistry

KEYWORDS: Organic Synthesis, Inhibitor, phosphinic acid, Amidoalkylation, Aminopeptidases

Στους γονείς μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα μακρύ, πολύχρονο ταξίδι αποτέλεσε η εκπόνηση της διδακτορική διατριβής που παρουσιάζεται στη συνέχεια, ταξίδι που απαίτησε κόπο και πολλές προσωπικές θυσίες. Όμως, με επιμονή και υπομονή έφτασε αισίως στο τέρμα του, με αποκόμιση επιστημονικής εμπειρίας, γνώσης και ερευνητικής δουλειάς. Ολόθερμες ευχαριστίες από καρδιάς αρμόζουν στον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δημήτριο Γεωργιάδη, που στάθηκε ως επιστήμονας και άνθρωπος σε όλη μου αυτήν την πορεία. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την υποστήριξη και την καθοδήγησή του, για το αμείωτο ενδιαφέρον του και την άψογη συνεργασία μας καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Ερευνητή Α΄ Ευστράτιο Στρατίκο, μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, για την πολύτιμη συμμετοχή του και τη συμβολή του στην εξέλιξη και ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, για την άριστη συνεργασία μας, καθώς και για τη χρηματοδότηση μέρους της διατριβής μου. Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω το τρίτο μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαγκριώτη Βικτώρια για τις διορθώσεις της και την πολύτιμη συμβολή της στην αρτιότερη παρουσίαση της διατριβής αυτής, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής, για τις υποδείξεις και τις διορθώσεις τους κατά την συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μας στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» : α) τον διδάκτορα Αθανάσιο Παπακυριακού για τον σχεδιασμό μοριακών μοντέλων για την συγκεκριμένη εργασία, β) την μεταδιδάκτορα Αναστασία Μπάκαλη για την όμορφη συνεργασία μας και τις βιολογικές μετρήσεις της εργασίας, όπως και την υποψήφια διδάκτορα Δέσποινα Κουμάντου και τον Δρ. Αθανάσιο Σταμόγιαννο για την πολύτιμη συνεισφορά τους γ) τον Ερευνητή Β΄ Εμμανουήλ Σαριδάκη και μεταδιδάκτορα ερευνητή Γιάστα Πέτρο για τα κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα και τέλος τον μεταδιδάκτορα ερευνητή Rajeshkumar Thayalan από την ομάδα του Επίκουρου Καθηγητή Κωνσταντίνου Βογιατζή στο Τμήμα Χημείας του University of Tennessee, Knoxville, USA για τους θεωρητικούς υπολογισμούς της παρούσας εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου του Γεωργιάδη Δημήτρη, παλιότερα και νέα, για το φιλικό κλίμα και το ευχάριστο περιβάλλον που δημιούργησαν αυτά τα τέσσερα χρόνια. Πολύτιμη υπήρξε η συνεχής υποστήριξη όλων των δικών μου ανθρώπων και φίλων σε όλη τη διάρκεια του επιστημονικού μου έργου.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την διδάκτορα Χριστίνα Δεδάκη για την φιλία της και την συμπαράστασή της και τους γονείς μου που υπήρξαν πάντα παρόντες και ένα ανεκτίμητο στήριγμα για μένα. Για το λόγο αυτό, το ελάχιστο που μπορώ να κάνω για αυτούς είναι να τους αφιερώσω το πόνημά μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, για την χορήγηση υποτροφίας για την παρούσα διατριβή που χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα Χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση, και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ) και του Ελληνικού Δημοσίου.



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	xxii
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΕΣ ΤΗΣ ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΩΚΥΤΟΚΙΝΑΣΩΝ	1
1.1 Επίκτητη Ανοσοαπόκριση	1
1.2 Αντιγονοπαρουσίαση.....	2
1.2.1 Ενδοκυτταρική Αντιγονοπαρουσίαση μέσω των μορίων MHC I από τις ERAP1 και ERAP2	3
1.2.2 Μονοπάτι Αντιγονοπαρουσίασης Μορίων Ιστοσυμβατότητας τύπου II	3
1.2.3 Διασταυρούμενη Παρουσίαση	4
1.3 Υποοικογένεια των ωκυτοκινασών	5
1.3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά	5
1.3.2 Ανακάλυψη και Βιολογικός ρόλος.....	6
1.3.3 Εξειδίκευση υποστρώματος και ενζυματικές ιδιότητες.....	9
1.3.4 Συνολική δομή και οργάνωση του ενεργού κέντρου	12
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΑΣΩΝ	17
2.1 Εισαγωγή	17
2.2 Ανάπτυξη αναστολέων των ωκυτοκινασών με βάση τη δομή.....	17
2.2.1 Προσπάθειες για εύρεση αναστολέων των ERAP1/ERAP2/IRAP	18
2.2.2 Φωσφινικοί αναστολείς.....	21
2.2.2.1 Φωσφινικοί αναστολείς υπολοίπων μελών της οικογένειας M1 αμινοπεπτιδασών Zn	22
2.2.2.2 Φωσφινικοί αναστολείς των ERAP1/ERAP2/IRAP	24
2.2.3 Άλλες στρατηγικές εύρεσης αναστολέων.....	25
2.3 Εκλεκτικότητα αναστολέων.....	26
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΩΝ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ	31

3.1	Εισαγωγή	31
3.2	Προηγούμενες μελέτες ανάπτυξης αναστολέων φωσφινικού τύπου των ERAP από το εργαστήριό μας	32
3.3	Διερεύνηση της θέσης P ₁ '	35
3.3.1	Σχεδιασμός των υποψήφιων αναστολέων 4 και 5	35
3.4	Σύνθεση των ισοξαζολυλο-φωσφινικών τριπεπτιδίων	38
3.4.1	Μεθοδολογία	38
3.4.2	Ρετροσυνθετική ανάλυση των ισοξαζολυλο-αναστολέων 4	42
3.4.3	Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου 11 και του αμινοφωσφινικού οξέος 12 44	
3.4.4	Σύνθεση του πρόδρομου διπολαρόφιλου (R,S,S)-15.....	46
3.4.5	Αντιδράσεις σχηματισμού των ενώσεων τύπου 17 μέσω 1,3-διπολικών κυκλοπροσθηκών	47
3.5	Διερεύνηση της θέσης P ₁ ' με χρήση ογκωδών, μη γραμμικών ομάδων	51
3.5.1	Εισαγωγή	51
3.5.2	Ρετροσυνθετική ανάλυση των φωσφινικών αναστολέων που φέρουν ογκώδεις ομάδες στη θέση P ₁ '	53
3.5.3	Σύνθεση των ακρυλικών παραγώγων τύπου 30	54
3.5.4	Σύνθεση των τελικών φωσφινικών τριπεπτιδικών ενώσεων 5α-γ	61
3.6	Ενζυμικά αποτελέσματα των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδικών ενώσεων διαφοροποιημένων στη θέση P ₁ '	64
3.7	Σύνθεση των φωσφινικών τριπεπτιδικών ενώσεων 5δ-ζ που φέρουν Leu στη θέση P ₂ ' και μελέτη της αναστολής τους	77
3.7.1	Εισαγωγή	77
3.7.2	Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου 30δ	77
3.7.3	Σύνθεση των τελικών φωσφινικών τριπεπτιδικών ενώσεων 5δ-ζ.....	79
3.7.4	Ενζυμικά αποτελέσματα των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων 5δ-ζ.....	80
3.8	Συμπεράσματα	81

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Ανάπτυξη συνθετικής μεθοδολογίας για την διαφοροποίηση της P₁ θέσης φωσφινικών ψευδοπεπτιδικών αναλόγων	83
4.1 Εισαγωγή	83
4.2 Βασικές προσεγγίσεις σύνθεσης βασικών ψευδοπεπτιδικών κορμών - Αδυναμίες κλασικής πορείας και συνθετικές δυνατότητες εναλλακτικής πορείας.....	85
4.3 Βιβλιογραφική επισκόπηση αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης	88
4.4 Περιγραφή στόχου - Βιβλιογραφική θεμελίωση	93
4.5 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης με χρήση ανυδριτών	98
4.5.1 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης του PhPO ₂ H ₂	98
4.5.2 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης αλκυλοφωσφινικών οξέων τύπου 70 ή 83.....	102
4.5.2.1 Αντιδράσεις τριών συστατικών.....	103
4.5.2.2 Αντιδράσεις δύο συστατικών.	105
4.6 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης δύο συστατικών με χρήση καρβοδιιμιδίων	110
4.6.1 Αρχική διερεύνηση με χρήση του καρβοδιιμιδίου DCC	110
4.6.2 Βελτιστοποίηση αντίδρασης: Επιτάχυνση με χρήση οξέων Lewis.....	114
4.7 Μηχανιστικές θεωρήσεις.....	120
4.7.1 Βιβλιογραφικές αναφορές και σχολιασμός	120
4.7.1.1 Τα φωσφινικά οξέα (καρβοξυλικοί εστέρες) τύπου 24 αντιδρούν μέσω συμμετρικών φωσφινικών ανυδριτών	123
4.7.2 Τα φωσφινικά οξέα (καρβοξυλικά οξέα) τύπου 11 αντιδρούν μέσω κυκλικών μικτών ανυδριτών.....	127
4.7.3 Η φύση του ενδιάμεσου ανυδρίτη επηρεάζει την ικανότητα ταυτομερείωσης.....	129
4.7.4 Η παρουσία οξέος Lewis επηρεάζει την ικανότητα ταυτομερείωσης του κυκλικού ανυδρίτη 122A	131
4.7.5 Η φύση της προστατευτικής ομάδας της αμινάλης επηρεάζει την ταχύτητα αμιδοαλκυλίωσης.....	135

4.8	Αξιολόγηση της ευρύτητας της μεθόδου	136
4.8.1	Σειρά A: Διαφοροποίηση της P ₁ ' θέσης.....	137
4.8.1.1	Σύνθεση αρχικών φωσφινικών υποστρωμάτων	137
4.8.1.2	Παρακολούθηση των αντιδράσεων με φασματοσκοπία ³¹ P-NMR	145
4.8.1.3	Σύνθεση τελικών φωσφινικών διοξέων τύπου 104 της σειράς A	151
4.8.2	Σειρά B: Διαφοροποίηση της P ₁ θέσης.....	152
4.8.2.1	Σύνθεση αρχικών N-Boc-αμιναλών	152
4.8.2.2	Παρακολούθηση των αντιδράσεων με φασματοσκοπία ³¹ P-NMR	154
4.8.3	Σύνθεση τελικών φωσφινικών διοξέων τύπου 104 της Σειράς BBląd! Nie zdefiniowano zakładki.	
4.8.4	Αποπροστασία των φωσφινικών διοξέων τύπου 104 και ενζυμική αξιολόγηση των προϊόντων τύπου 146	157
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	162
5.1	Γενικό Πειραματικό Μέρος.....	162
5.1.1	Αντιδραστήρια	162
5.1.2	Χρωματογραφική ανάλυση και χρωματογραφικός καθαρισμός.....	162
5.1.3	Χαρακτηρισμοί ενώσεων	163
5.1.1	Ενζυμικά πειράματα	165
5.1.2	Πειραματικές πορείες και χαρακτηρισμοί των ενώσεων	166
6.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	227
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	229
8.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	237

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Γενική δομή 3 των φωσφινικών τριπεπτιδίων για τη διερεύνηση της θέσης P ₁ '	36
Σχήμα 2: Σχεδιασμός των τριπεπτιδικών δομών 4 και 5 για τη διερεύνηση της θέσης P ₁ '	37
Σχήμα 3: Αντίδραση διπολικής κυκλοπροσθήκης με οξείδια του νιτριλίου σε ένα ψευδοπεπτιδικό ακόρεστο σύστημα	38
Σχήμα 4: Μεθοδολογία διερεύνησης της θέσης P ₁ ' φωσφινικών τριπεπτιδίων.....	39
Σχήμα 5: Επιλογή ισοξαζολουλο-αλυσίδων για την διερεύνηση της κοιλότητας S ₁ '	41
Σχήμα 6: Ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων-στόχων 4	43
Σχήμα 7: Σύνθεση του αμινοφωσφινικού παραγώγου (R)-12.....	44
Σχήμα 8: Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου 11	46
Σχήμα 9: Συνθετική πορεία σχηματισμού του φωσφινικού τριπεπτιδίου (R,S,S)-15.....	47
Σχήμα 10: Συνθετική πορεία φωσφινικών τριπεπτιδίων 17α-ι μέσω αντιδράσεων 1,3-DCRs	48
Σχήμα 11: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των ενώσεων 17α-ι.....	49
Σχήμα 12: Σύνθεση του φωσφινικού αναστολέα (R,S,S)-29.....	51
Σχήμα 13: Δομές των υποψήφιων φωσφινικών αναστολέων τύπου 5.....	52
Σχήμα 14: Γενικό ρετροσυνθετικό σχήμα των μορίων-στόχων 5 διαφοροποιημένων στη θέση P ₁ '	53
Σχήμα 15: Δομές των ακρυλικών υποστρωμάτων 30α-γ.....	54
Σχήμα 16: Ρετροσύνθεση για την ένωση 30α βασισμένη στην αλκυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα	54
Σχήμα 17: Βιβλιογραφικές μέθοδοι για τη σύνθεση της ένωσης 30α	55
Σχήμα 18: Σύνθεση του ακρυλικού εστέρα 30α	55
Σχήμα 19: Ρετροσύνθεση για την ένωση 30β βασισμένη στην αλκυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα και πιθανά παραπροϊόντα	56
Σχήμα 20: Σύνθεση του ακρυλικού εστέρα 30β	57

Σχήμα 21: Μηχανισμός σύνθεσης του παραγώγου 30β.	58
Σχήμα 22: Πιθανές ρετροσυνθετικές αναλύσεις του ακρυλικού οξέος 30γ.....	58
Σχήμα 23: Σύνθεση της αλδεϋδης 37.....	59
Σχήμα 24: Μηχανιστικός καταλυτικός κύκλος σύνθεσης της ένωσης 47 με αντίδραση Pd-καταλυόμενης Suzuki σύζευξης	59
Σχήμα 25: Σχηματισμός διμερούς παραπροϊόντος του τύπου 52	60
Σχήμα 26: Σύνθεση της ένωσης 30γ από την αλδεϋδη 47.....	61
Σχήμα 27: Μηχανισμός αντίδρασης <i>P</i> -Michael για τη σύνθεση της ένωσης 31γ	63
Σχήμα 28: Δομές των μορίων-στόχων 5δ-ζ	77
Σχήμα 29: Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου 30δ	78
Σχήμα 30: Σύνθεση της ένωσης 31δ.....	79
Σχήμα 31: Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών III μέσω αντίδρασης <i>P</i> -Michael (προσέγγιση NP+C).....	86
Σχήμα 32: Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών III μέσω της προσέγγισης N+PC	87
Σχήμα 33: α) Γενική αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης ενώσεων φωσφόρου με δεσμό P-H. β) Αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης φωσφινικών οξέων προσαρμοσμένη στη σύνθεση φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων μέσω της προσέγγισης N+PC.	87
Σχήμα 34: Σύνθεση α) α-ουρειδοφωσφονικών παραγώγων από Birum et al. [152] β) α-αμινοφωσφινικών και αμινοφωσφονικών οξέων από Oleksyszyn et al. [153] γ) α-αμινοφωσφονικών οξέων από Yuan et al. [155].....	88
Σχήμα 35: Σύνθεση <i>N</i> -ακυλιωμένων αμινοφωσφονικών οξέων 67 από Oleksyszyn et al. [159].....	89
Σχήμα 36: Εφαρμογή της στρατηγικής N+PC στη σύνθεση φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων από (α) Chen et al. [160] και (β) Matziari et al. [161]	89
Σχήμα 37: Σύνθεση διαμορφωτικά περιορισμένων φωσφινικών δομών στην P ₁ θέση από Nasoroulou et al. [162]	90
Σχήμα 38: Σύνθεση αποπροστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων σε μια αντίδραση τριών συστατικών από Ragulin et al. [163].....	90

Σχήμα 39: Σύνθεση α) <i>N</i> -μεθυλοξυ- ή αιθοξυκαρβονυλο [164] και β) <i>N</i> -Cbz-προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων [165] με καταλυόμενη από <i>p</i> -TsOH αντίδραση τριών συστατικών από Ragulin et al.....	91
Σχήμα 40: Σύνθεση των κυκλικών φωσφινικών πεπτιδίων 79 από Ragulin et al. [166].	91
Σχήμα 41: Προτεινόμενα ενδιάμεσα 80 και 81 για την αμιδοαλκυλίωση τρισθενών ενώσεων φωσφόρου από τους Oleksyszyn [159] και Soroka [169].....	92
Σχήμα 42: Απομονωμένο ενδιάμεσο 82 της αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών από Ragulin et al. [164].....	92
Σχήμα 43: Σύνθεση <i>N</i> -Cbz-προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων σε μια αντίδραση δύο συστατικών από Ragulin et al. [170].....	92
Σχήμα 44: Εναλλακτικές προσεγγίσεις σύνθεσης <i>N</i> -Boc-προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων μέσω αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης με χρήση Α) Boc-NH ₂ και αλδεϋδών, Β) <i>N</i> -Boc ιμινών ή Γ) <i>N</i> -Boc αμιναλών	94
Σχήμα 45: Βιβλιογραφικά αναφερόμενες μέθοδοι αντίδρασης υδροφωσφινυλίωσης <i>N</i> -Boc-ιμινών για την σύνθεση <i>N</i> -Boc-αμινοφωσφονικών εστέρων [172-174].....	95
Σχήμα 46: Η <i>in situ</i> παραγωγή των <i>N</i> -Boc-ιμινών με χρήση όξινου καταλύτη από τον Maruoka et al. [179].....	97
Σχήμα 47: Βιβλιογραφικά αναφερόμενη αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών για τη σύνθεση <i>N</i> -Boc-προστατευμένων φωσφονιτών από Ragulin et al. [184].....	97
Σχήμα 48: Σύνθεση της ένωσης 94 με την μέθοδο του Maruoka	99
Σχήμα 49: Σύγκριση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης 2 και 3 συστατικών με τη χρήση PhPO ₂ H ₂	99
Σχήμα 50: Παράμετροι που συντελούν στην δραστικότητα φωσφινικών οξέων	102
Σχήμα 51: Μηχανιστική υπόθεση ενεργοποίησης <i>N</i> -Boc-αμιναλών από το φωσφινικό υπόστρωμα 70.....	111
Σχήμα 52: Σχηματισμός των σιλυλεστέρων 105 και 106.....	117
Σχήμα 53: Διαφορές μεταξύ <i>N</i> -Boc-αμιναλών αρωματικών και αλειφατικών αλδεϋδών	120
Σχήμα 54: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την αμιδοαλκυλίωση δύο συστατικών φωσφινικών οξέων με χρήση αμιναλών σε Ac ₂ O (Ragulin 2010) ή TFAA (Ragulin2012) [164-165, 170].	121

Σχήμα 55: Πιθανά μονοπάτια αντίδρασης των 108 και 110.	122
Σχήμα 56: Αποτυχία αντίδρασης του 83α με τις αμινάλες 94 και 82α και 1 equiv TFAA.	123
Σχήμα 57: Προτεινόμενη ενεργοποίηση της αμινάλης 94 από TFAA.....	125
Σχήμα 58: Αντίδραση του 83α με την αμινάλη 89α με χρήση DIC/ BF ₃ ·OEt ₂	126
Σχήμα 59: Προτεινόμενο ενδιάμεσο 118 για την αντίδραση της ένωσης 117 με Val-Val-OMe παρουσία BOP/DIPEA από Campagne et al [191].	128
Σχήμα 60: Προτεινόμενα ενδιάμεσα της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης του 70α με την αμινάλη 94 και φάσματα ³¹ P-NMR κατά την εξέλιξη της αντίδρασης.	129
Σχήμα 61: Τιμές ελευθέρων ενεργειών Gibbs για τις ταυτομερειώσεις των ενώσεων-μοντέλων 122A-C.	130
Σχήμα 62: Προτεινόμενοι, σταδιακοί μηχανισμοί καταλυόμενης ταυτομερείωσης.....	133
Σχήμα 63: Ρετροσυνθετικές πορείες για τα <i>H</i> -φωσφινικών διοξέων τύπου 5	138
Σχήμα 64: Σύνθεση <i>H</i> -φωσφινικών διοξέων 70α και 70ε.....	139
Σχήμα 65: Σύνθεση <i>H</i> -φωσφινικού διοξέος 70η.....	140
Σχήμα 66: Σύνθεση <i>H</i> -φωσφινικού διοξέος 70ι.....	141
Σχήμα 67: Σύνθεση των <i>H</i> -φωσφινικών διοξέων 70β και 70θ	142
Σχήμα 68: Σύνθεση Σύνθεση <i>H</i> -φωσφινικού διοξέος 70ζ	142
Σχήμα 69: Σύνθεση <i>H</i> -φωσφινικού διοξέος 70δ.....	143
Σχήμα 70: Σύνθεση <i>H</i> -φωσφινικού διοξέος 70κ.....	144
Σχήμα 71: Σύνθεση <i>H</i> -φωσφινικού διοξέος 70δ.....	145
Σχήμα 72: Προτεινόμενες στερεοχημικές δομές των 70θ,θ', 120θ,θ', και 138θ,θ'	151
Σχήμα 73: Σύνθεση και δομές <i>N</i> -Boc-αμιναλών 89α, 89λ-σ	153
Σχήμα 74: Σύνθεση της αλδεϋδης 140.....	154
Σχήμα 75: Σύνθεση της <i>N</i> -Boc-αμινάλης 89τ.....	154
Σχήμα 76: Σύνθεση των ενώσεων 146 μέσω αποπροστασίας των ενώσεων τύπου 104	158

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγόνων μέσω των μορίων MHC I.	3
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγόνων μέσω των μορίων MHC II.	4
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της υποοικογένειας ωκυτοκινασών.....	6
Εικόνα 4: Αναπαράσταση της αλλοστερικής ενεργοποίησης της ERAP1 [55].	10
Εικόνα 5: Σύγκριση της διαμόρφωσης του μοτίβου GAMEN μεταξύ των ERAP1, ERAP2 και IRAP [62].	11
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των γνωστών κρυσταλλικών δομών των ERAP1 και ERAP2 στην οποία παρουσιάζεται η οργάνωση των δομικών περιοχών (οι δομικές περιοχές υποδεικνύονται με λατινική αρίθμηση). Αριστερά: η κλειστή διαμόρφωση της ERAP1· μέση: η ανοιχτή διαμόρφωση της ERAP1· δεξιά: η κλειστή διαμόρφωση της ERAP2 [56, 63-64].	12
Εικόνα 7: Πλευρική όψη της εσωτερικής κοιλότητας της ERAP2 με προσδεμένα πεπτιδία. [62].	14
Εικόνα 8: Σχηματικές αναπαραστάσεις με μοντέλα κορδέλας και επιφανείας των ERAP1, ERAP2 και IRAP σύμφωνα με πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες. [66]. ..	16
Εικόνα 9: Δομές των λευκινοθειόλη, μπεστατίνη και αμαστατίνη	19
Εικόνα 10: Αναστολείς των ERAP1, ERAP2, IRAP της τάξεως των μΜ με υποσχόμενο προφίλ εκλεκτικότητας	20
Εικόνα 11: Βιβλιογραφικά αναφερόμενοι ισχυροί αναστολείς της IRAP.....	21
Εικόνα 12: Φωσφονικοί (I), φωσφοναμιδικοί (II) και φωσφινικοί (III) αναστολείς που προκύπτουν με αντικατάσταση του πεπτιδικού δεσμού	21
Εικόνα 13: Φωσφινικοί ψευδοδιπεπτιδικοί αναστολείς των LAP, APN, PAM1 και PAM17	23
Εικόνα 14: Παραδείγματα φωσφινικών αναστολέων μεταλλοπεπτιδασών Zn ²⁺	24
Εικόνα 15: Δομή και ανασταλτική δράση του DG013A	24
Εικόνα 16: Ανασταλτική δράση των φωσφινικών διπεπτιδίων 15α και 15β	25

Εικόνα 17: Ανασταλτική δράση των αμινοφωσφινικών παραγώγων 16 και 17α.....	25
Εικόνα 18: Ανασταλτική δράση των παραγώγων τύπου 18 και της θυμεροσάλης 19 ...	26
Εικόνα 19: HPLC χρωματογράφημα της ένωσης DG013 και κρυσταλλική δομή του ERAP2 με το DG013A.....	33
Εικόνα 20: Μέθοδος σύνθεσης των φωσφινικών τριπεπτιδίων τύπου 2 για την διερεύνηση της θέσης P ₂ '	34
Εικόνα 21: Δομή και ανασταλτική δράση του φωσφινικού αναστολέα RXP470.1.....	39
Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση ενός δεσμού αλογόνου.....	42
Εικόνα 23: Τρία βασικά κατάλοιπα που αποτελούν την την υποπεριοχή S ₂ ' των APAs.	68
Εικόνα 24: Ο φωσφινικός αναστολέας DG046 στο ενεργό κέντρο του ERAP1 [139].....	70
Εικόνα 25: Υπέρθωση των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της ERAP1 με την ομόλογη ERAP2 (κωδικός PDB 5AB0) και την IRAP (PDB κωδικός 5MJ6).	71
Εικόνα 26: (Α) Προβλεπόμενη διαμόρφωση της ένωσης 4η στο ενεργό κέντρο της ERAP1 (PDB ID: 2YD0), όπου η πλευρική αλυσίδα P ₁ ' εκτείνεται μέσα στην βαθιά, επιμήκη κοιλότητα S ₁ '. (Β) Το ενεργό κέντρο της ERAP2 (PDB ID: 4JBS) φαίνεται από την ίδια όψη, όπου η στενότερη κοιλότητα της S ₁ ' καθιστά την εκτεταμένη διαμόρφωση της 4η απρόσιτη, λόγω στερικών συγκρούσεων με τα κατάλοιπα R366 και W363.....	72
Εικόνα 27: Μελέτη μοριακού ελλιμενισμού, που δείχνει την χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση της 5γ στο ενεργό κέντρο της ERAP2, σε υπέρθεση με την ERAP1.....	73
Εικόνα 28: Μελέτη μοριακού ελλιμενισμού, που δείχνει τις δύο χαμηλότερες ενεργειακά διαμορφώσεις της ένωσης 5β στο ενεργό κέντρο της IRAP, σε υπέρθεση με την κλειστή δομή της ERAP1 (κυανό C).	74
Εικόνα 29: Ατομικό μοντέλο του φωσφινικού αναστολέα DG026A ([R,S,S] ισομερές) στο ενεργό κέντρο της IRAP [98].	74
Εικόνα 30: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν τον φωσφινικό αναστολέα DG026A στο ενεργό κέντρο της IRAP.	75
Εικόνα 31: Υπέρθωση του πρωτεϊνικού σκελετού της S1 κοιλότητας διαφορετικών M1 APs [145].....	84
Εικόνα 32: Ανάγκη ανάπτυξης μεθοδολογίας για την ευρεία διαφοροποίηση της P ₁ θέσης φωσφινικών ψευδοπεπτιδίων.....	85

Εικόνα 33: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του 94 και 70α με χρήση 0.5, 1.0 και 2.0 equiv TFAA.	108
Εικόνα 34: Δομές αφυδατικών αντιδραστηρίων.	111
Εικόνα 35: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του 94 και 70α με 1 equiv DCC σε rt και 45-50°C.	113
Εικόνα 36: Φάσματα ³¹ P-NMR της αντίδρασης αμιδοακυλίωσης μεταξύ του 94 και 70α με 2 equiv DCC. Μίγμα αντίδρασης σε α) 20min β) 3d γ) 4d δ) 6d.	114
Εικόνα 37: Φάσματα ³¹ P-NMR της αντίδρασης του 83α με 1 και 2 equiv TFAA.	124
Εικόνα 38: Δομή προτεινόμενου ενδιάμεσου (114) της αντίδρασης του 83α με TFAA.	124
Εικόνα 39: Φάσματα ³¹ P-NMR της αντίδρασης του 83α με το 94 και 2 equiv TFAA.	126
Εικόνα 40: Φάσματα ³¹ P-NMR της αντίδρασης του 70α με Α) 1 equiv TFAA, Β) 2 equiv TFAA, Γ) 1 equiv DCC και Δ) 1 equiv TFA και 0.5 equiv DCC.	127
Εικόνα 41: Βιβλιογραφικά παραδείγματα σχετικά με την ταυτομερείωση κυκλικών P-H ενώσεων.	131
Εικόνα 42: Αναπαράσταση των μηχανισμών ταυτομερείωσης του 122Α μέσω άμεσης μεταφοράς και μέσω διμερών και DFT-υπολογιζόμενες μεταβατικές καταστάσεις.	132
Εικόνα 43: Σύγκριση των ενεργειακών φραγμάτων των δύο βασικών μηχανισμών ταυτομερείωσης με ή χωρίς την επίδραση BF ₃	132
Εικόνα 44: Τα προτεινόμενα προφίλ ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs για την ταυτομερείωση του 122Α. Η TS1 αφορά την μη ευνοϊκή ταυτόχρονη μεταφορά 2 πρωτονίων. Ο Μηχανισμός II διαφέρει μόνο στο τελευταίο στάδιο (κόκκινη γραμμή). Στο γράφημα φαίνονται οι DFT βελτιστοποιημένες δομές: P: κιτρινο, O: κοκκινο, C: γκρι, H: λευκό, B: πράσινο, F: πορτοκαλί.	134
Εικόνα 45: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων του 70α με <i>N</i> -Cbz και <i>N</i> -Boc-αμινάλες με χρήση Α) 2 equiv TFAA, Β) 1 equiv DIC, 0.2 equiv BF ₃ ·OEt ₂ σε rt.	135
Εικόνα 46: Δομές των ενώσεων στόχων 104α-τ.	136
Εικόνα 47: Δομές των αρχικών <i>H</i> -φωσφινικών διοξέων 70α-κ.	138
Εικόνα 48: Δομή διυποκαταστημένου παραπροϊόντος 129.	139
Εικόνα 49: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του 89α και υποστρωμάτων τύπου 70 με DIC/ BF ₃ ·OEt ₂ σε rt.	147

Εικόνα 50: Δομές πιθανών διαμορφώσεων των κυκλικών ανυδριτών 120 και 138.	148
Εικόνα 51: Πιθανές διαμορφώσεις 138E και 138F	149
Εικόνα 52: Επίδραση της στερεοχημικής παρεμπόδισης στη δραστικότητα του 120. .	149
Εικόνα 53: Σύγκριση της ταχύτητας μετατροπής για τα φωσφινικά διοξεία 70θ και 70θ' κατά την αντίδρασή τους με το 89α και DIC/ BF ₃ ·OEt ₂ σε rt.	150
Εικόνα 54: Αποδόσεις απομόνωσης και χρόνοι των αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης του 89α με τα 70α-κ	152
Εικόνα 55: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του 70α και <i>N</i> -Boc-αμιναλών τύπου 89 με DIC/ BF ₃ ·OEt ₂ σε rt.....	155
Εικόνα 56: Αποδόσεις απομόνωσης και χρόνοι των αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης του 70α με τα 89α,λ-τ	157

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συνοπτικά αποτελέσματα αντιδράσεων σχηματισμού των ενώσεων 4α-ι από την ένωση 15.....	50
Πίνακας 2: Συνοπτικός πίνακας αντιδράσεων P-Michael μεταξύ των ενώσεων 12 και των 30α-γ.....	62
Πίνακας 3: Συνοπτικός πίνακας αποδόσεων 2 σταδίων σχηματισμού των ενώσεων	64
Πίνακας 4: <i>In vitro</i> εκτίμηση των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων 2α-λ, 29, 4α-ι, 5α-γ, 5α', 5β' και 5γ'	65
Πίνακας 5: Συνοπτικός πίνακας αποδόσεων 2 σταδίων σχηματισμού των ενώσεων	79
Πίνακας 6: <i>In vitro</i> εκτίμηση των ενώσεων 5δ-ζ.....	80
Πίνακας 7: Διερεύνηση αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση PhPO ₂ H ₂ (95) ..	101
Πίνακας 8: Διερεύνηση αμιδοαλκυλίωσης 3 συστατικών με τη χρήση των φωσφινικών οξέων 70α και 83α.....	104
Πίνακας 9: Διερεύνηση αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση του 70α και ανυδριτών.....	106
Πίνακας 10: Διερεύνηση αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση του 70α και αφυδατικών μέσων.....	111
Πίνακας 11: Διερεύνηση της επίδρασης όξινου καταλύτη στην αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση του 70α και DCC. ^α	116
Πίνακας 12: Διερεύνηση της επίδρασης όξινου καταλύτη στην αμιδοαλκυλίωση 2 συστατικών με τη χρήση του 70α, DIC και των <i>N</i> -Boc-αμιναλών 94 και 70α. ^α	118
Πίνακας 13: Δομές και ³¹ P χημικές μετατοπίσεις των ενδιαμέσων 120 και 138.	146
Πίνακας 14: Δομές των ψευδοδιπεπτιδίων 146 και ενζυμική αξιολόγησή τους έναντι των αμινοπεπτιδασών ERAP1, ERAP2 και IRAP.....	158

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο Ιουλίου 2014-Ιουνίου 2019 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή **κ. Δ. Γεωργιάδη**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΕΣ ΤΗΣ ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΩΚΥΤΟΚΙΝΑΣΩΝ

1.1 Επίκτητη Ανοσοαπόκριση

Η αποτελεσματική αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών και των καρκινικών κυττάρων από τον οργανισμό εξαρτάται από τη λειτουργία της επίκτητης ανοσοαπόκρισης, στοχευμένης κάθε φορά προς συγκεκριμένα αντιγόνα. Από τη λειτουργία αυτή εξαρτάται η διαφοροποίηση των υγιών από τα μη υγιή κύτταρα του οργανισμού και τελικά η καταστροφή των τελευταίων. Η επίκτητη ανοσοαπόκριση χαρακτηρίζεται από μεγάλη εξειδίκευση κάτι που οφείλεται στη δράση εξειδικευμένων μορίων (αντισώματα και υποδοχείς T λεμφοκυττάρων) που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν συγκεκριμένα αντιγόνα [1, 2, 3]. Η εξειδίκευση των αντιγόνων δίνει τη δυνατότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα να διακρίνει ακόμα και μικρές διαφορές ανάμεσα στα αντιγόνα, και η μεγάλη ποικιλομορφία των μορίων αναγνώρισης του ανοσοποιητικού συστήματος τους επιτρέπει να αναγνωρίζουν τα δισεκατομμύρια των μοναδικών δομών που εμφανίζουν τα ξένα αντιγόνα. Μια σημαντική ιδιότητα του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η διάκριση εαυτού/ξένου ώστε η απόκριση να στρέφεται μόνο εναντίον ξένων αντιγόνων. Σε κάποιες περιπτώσεις που είναι παθολογικές υπάρχει απόκριση σε αντιγόνα του ίδιου του οργανισμού η οποία ονομάζεται αυτοανοσία [4].

Στην επίκτητη ανοσοαπόκριση εμπλέκονται κυρίως τα λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα T και B λεμφοκύτταρα αποτελούν τους δύο βασικούς πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων και παράγονται στον μυελό των οστών. Όταν ένα κύτταρο είναι μολυσμένο ή αλλιώς ανώμαλο, τα CTLs (CD8⁺ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα) μπορούν να ανιχνεύσουν τις αλλαγές στα παρουσιαζόμενα πεπτίδια και να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο [5]. Πιο συγκεκριμένα, η πρωταρχική μοριακή αλληλεπίδραση για την αναγνώριση των μη φυσιολογικών κυττάρων από τα CTL, είναι η πρόσδεση του υποδοχέα του T λεμφοκυττάρου (TCR) στα (MHC) I [6, 7]. Τα μόρια MHC I είναι πρωτεΐνες που εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα εμπύρηνά κύτταρα των σπονδυλωτών. Σχηματίζουν μια εξωκυτταρική δομική περιοχή που διαθέτει έναν μεγάλο θύλακα ο οποίος στρέφεται προς το εξωτερικό του κυττάρου και καταλαμβάνεται από μικρά

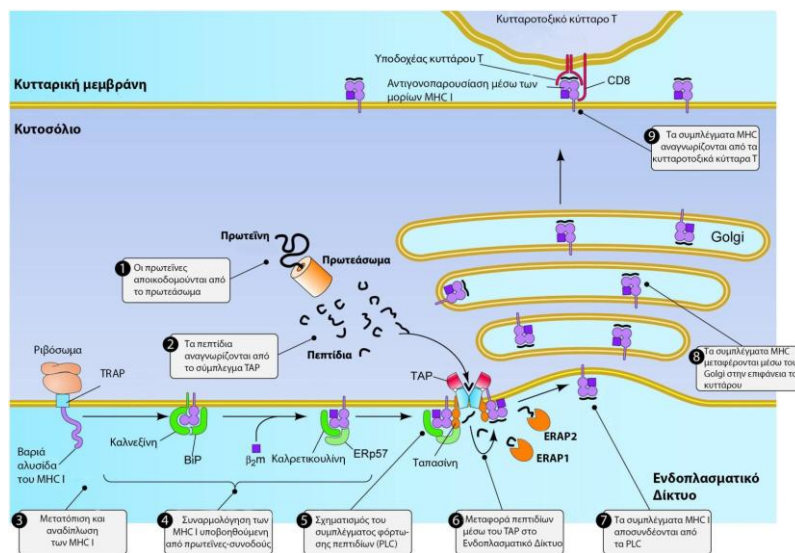
πεπτιδία μήκους 8-9 αμινοξέων, που προέρχονται από ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες [8]. Μόλις το σύμπλοκο MHC I-πεπτιδίου αναγνωρισθεί από τον TCR, επάγεται μια σειρά ενδοκυτταρικών πορειών μεταγωγής σήματος που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του CTL [9]. Ένα ενεργοποιημένο CTL περικλείει, σε πρώτη φάση, ένα κύτταρο-στόχο, για να το αναγνωρίσει και ακολουθούν: σχηματισμός ανοσολογικής σύναψης, «επίθεση» στη μεμβράνη, αποδέσμευση του CTL και καταστροφή του κυττάρου-στόχου μέσω αποπτωτικού θανάτου από καταρράκτες κασπασών που προκαλούν τη συστηματική αποδιάταξη του κυττάρου μέσω της πρωτεολυτικής τους δράσης [10]. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία περιλαμβάνουν τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα Β κύτταρα, εκφράζουν στην επιφάνειά τους τα μόρια MHC II, μόρια με δομικές ομοιότητες με τα μόρια MHC I. Κάθε μόριο MHC μπορεί να δεσμεύσει ένα φάσμα αντιγονικών πεπτιδίων που προέρχονται από την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση αντιγονικών μορίων, κυρίως πρωτεϊνών. Τα πεπτιδία που προσδένονται στα μόρια MHC και παρουσιάζονται στην επιφάνεια του κυττάρου ονομάζονται αντιγονικά πεπτιδία και προέρχονται από συγκεκριμένες περιοχές των αντιγονικών πρωτεϊνών που ονομάζονται επίτοποι [11].

1.2 Αντιγονοπαρουσίαση

Κεντρική σημασία στην λειτουργία του ανθρώπινου επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος έχει μία διαδικασία που ονομάζεται αντιγονοπαρουσίαση, η παρουσίαση δηλαδή στην κυτταρική επιφάνεια μικρών πεπτιδίων, που ονομάζονται αντιγονικά πεπτιδία ή αντιγονικοί επίτοποι, από τα μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), ώστε να μπορέσουν να αναγνωριστούν από τα (CTLs). Το είδος των μορίων που θα παρουσιάσει το αντιγόνο καθορίζεται από τον τρόπο με τον οποίο το αντιγόνο εισέρχεται στο κύτταρο. Τα βασικά μονοπάτια αντιγονοπαρουσίασης είναι τρία: 1) το μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης μορίων ιστοσυμβατότητας τύπου I, όπου παρουσιάζονται ενδογενή αντιγόνα, 2) το μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης μορίων ιστοσυμβατότητας τύπου II, όπου παρουσιάζονται εξωγενή αντιγόνα και 3) το μονοπάτι διασταυρούμενης παρουσίασης, όπου εξωγενή αντιγόνα παρουσιάζονται από μόρια του MHC I.

1.2.1 Ενδοκυτταρική Αντιγονοπαρουσίαση μέσω των μορίων MHC I από τις ERAP1 και ERAP2

Η ενδοκυτταρική αντιγονοπαρουσίαση μέσω των μορίων MHC I, συχνά ξεκινά στο κυτοσόλιο, όπου τα πεπτιδία που παράγονται εκεί από την αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών αντιγονικών πρωτεϊνών στο πρωτεάσωμα [12], μεταφέρονται στο ΕΔ μέσω του ειδικού μεταφορέα συνδεδεμένου με την Αντιγονοπαρουσίαση (Transporter Associated with Antigen Processing, TAP) [13], όπου προσδένονται σε νεοσυντιθέμενα μόρια MHC I [14] (Εικόνα 1). Το πρωτεάσωμα καθορίζει το καρβοξυτελικό άκρο των αντιγονικών πεπτιδίων, αλλά συχνά παράγει πρόδρομα αντιγονικά πεπτιδία με εκτεταμένο αμινοτελικό άκρο [15]. Ωστόσο, το βέλτιστο μήκος των 8-10 αμινοξέων που απαιτείται για την πρόσδεση στα μόρια MHC-I προϋποθέτει επεξεργασία του N-εκτεταμένου τελικού άκρου. Αυτό το βήμα-κλειδί της βελτιστοποίησης του πρόδρομου αντιγονικού πεπτιδίου πραγματοποιείται από μια ομάδα ομόλογων ενζύμων που ανήκουν στην M1 οικογένεια αμινοπεπτιδασών ψευδαργύρου: την αμινοπεπτιδάση 1 του ενδοπλασματικού δικτύου (ER aminopeptidase 1: ERAP1) και μια δεύτερη αμινοπεπτιδάση, την ERAP2 που βρίσκονται στο ER [16].

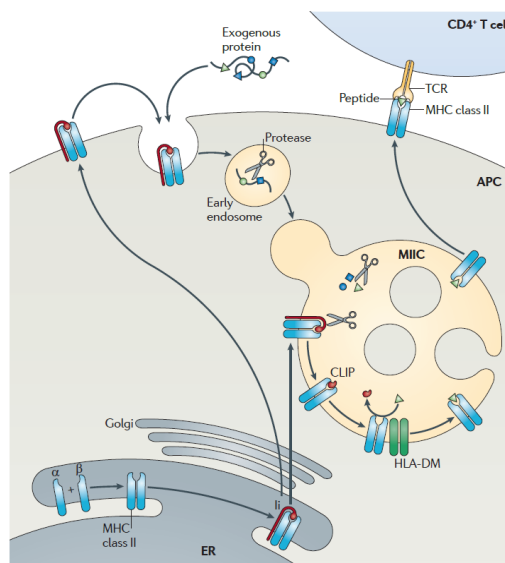


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγόνων μέσω των μορίων MHC I.

1.2.2 Μονοπάτι Αντιγονοπαρουσίασης Μορίων Ιστοσυμβατότητας τύπου II

Στο μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης μορίων ιστοσυμβατότητας τύπου II, (Εικόνα 2), εξωκυτταρικές αντιγονικές πρωτεΐνες εισέρχονται στο κύτταρο είτε με ενδοκύτωση είτε με φαγοκύτωση. Στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι (μακροφάγα,

δενδριτικά κύτταρα, και Β λεμφοκύτταρα) περιλαμβάνονται τρία διαμερίσματα αυξανόμενης οξύτητας: τα πρώιμα ενδοσώματα (pH 6.0-6.5), τα όψιμα ενδοσώματα ή ενδολυσσοσώματα (pH 5.0-6.0), και λυσοσώματα (pH 4.5-5.0). Στη συνέχεια, τα εξωγενή αντιγόνα, κατά την μετακίνησή τους από τα πρώιμα στα όψιμα ενδοσώματα, αποικοδομούνται σε μικρότερα πεπτίδια μήκους 13-18 αμινοξέων μέσα στα ενδοσώματα και τα αντιγονικά πεπτίδια που παράγονται προσδέονται σε μόρια MHC II. Τα μόρια MHC II παράγονται στο ΕΔ, στη συνέχεια δεσμεύουν την αμετάβλητη αλυσίδα, μια πρωτεΐνη που εμποδίζει τη δέσμευση ενδογενών αντιγόνων από αυτά, και ακολούθως οδηγούνται στο διαμέρισμα όπου πραγματοποιείται η αποικοδόμηση της αμετάβλητης αλυσίδας και η σύνδεση του εξωγενούς αντιγόνου. Η τελευταία λειτουργία καταλύεται από το HLA-DM, ένα μη κλασσικό μόριο MHC II [17]. Τα σύμπλοκα MHC II-πεπτιδίου παρουσιάζονται στην επιφάνεια του κυττάρου, αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς CD4 των Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων και οδηγούν στην έκκριση κυτοκινών, όπως ιντερλευκίνες (IL), παράγοντες νέκρωσης όγκων (TNF) και ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) [18].



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγόνων μέσω των μορίων MHC II.

1.2.3 Διασταυρούμενη Παρουσίαση

Στην περίπτωση της διασταυρούμενης παρουσίασης εξωγενή αντιγόνα που έχουν εσωτερικοποιηθεί, παρουσιάζονται στα μόρια MHC I από δενδριτικά κύτταρα. Τα αντιγόνα αυτά εσωτερικοποιούνται με τον ίδιο τρόπο που εσωτερικοποιούνται και τα αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα μόρια MHC II, δηλαδή με πिनोकύτωση,

ενδοκύττωση υποκινούμενη από υποδοχέα και φαγοκύττωση. Εφόσον τα περισσότερα αντιγόνα που εσωτερικοποιούνται περνάνε από το μονοπάτι ενδοσωμάτων/φαγοσωμάτων, η αποικοδόμηση πολλών αντιγόνων που παρουσιάζονται με διασταυρούμενη παρουσίαση είναι πιθανό να γίνεται εξ ολοκλήρου μέσα σε αυτά τα κυστίδια. Λόγω όμως του ιδιαίτερα όξινου περιβάλλοντος αλλά και της απουσίας των περισσότερων συστατικών του PLC στα κυστίδια αυτά, θεωρείται ότι αυτού του τύπου η διασταυρούμενη παρουσίαση είναι χαμηλής αποτελεσματικότητας. Αντίθετα, θεωρείται πολύ πιο πιθανό η διασταυρούμενη παρουσίαση στις περισσότερες περιπτώσεις να περιλαμβάνει τα συστατικά του μονοπατιού αντιγονοπαρουσίασης MHC I και επομένως να είναι απαραίτητη η μεταφορά του αντιγόνου στο κυτοσόλιο για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα [19].

Επίσης, αν και δεν είναι ακόμα σαφής η περιοχή του κυττάρου στην οποία τα μόρια MHC I φορτώνονται με τα πεπτίδια, εικάζεται ότι τα συστατικά του ΕΔ όπως ο TAP μεταφέρονται σε ενδοσώματα (ή φαγοσώματα κατά μία άλλη θεωρία), δημιουργώντας ενδοσωμικά διαμερίσματα φόρτωσης μορίων MHC I [20]. Στα διαμερίσματα αυτά εντοπίζεται η τρίτη αμινοπεπτιδάση της υποοικογένειας των ωκυτοκινασών, η PLAP (Placental Leucine AminoPeptidase) ή IRAP (Insulin Regulated AminoPeptidase), που είναι απαραίτητη για τη διασταυρούμενη παρουσίαση η οποία εξαρτάται από το πρωτεάσωμα [21].

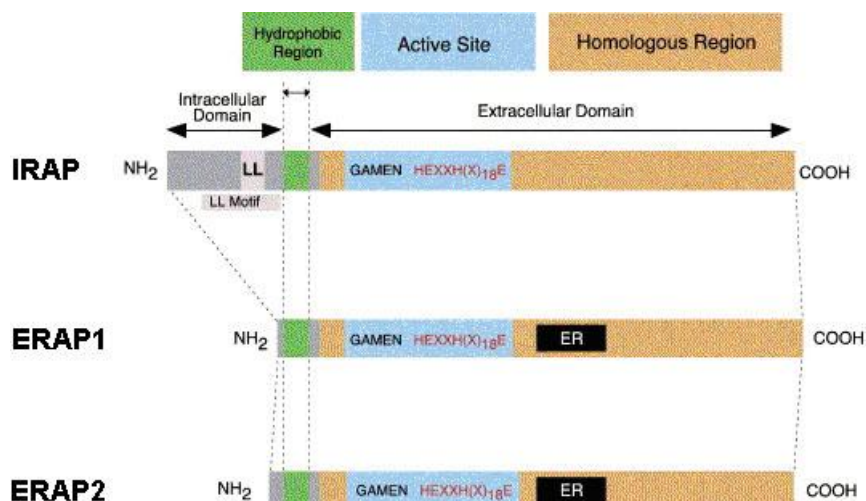
1.3 Υποοικογένεια των ωκυτοκινασών

1.3.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι αμινοπεπτιδάσες ERAP1, ERAP2 και IRAP, συνιστούν την υποοικογένεια των ωκυτοκινασών της οικογένειας των αμινοπεπτιδασών M1, η οποία αποτελείται από εννέα αμινοπεπτιδάσες. Εντοπίζονται στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο και χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη της αλληλουχίας HExxHx₁₈E η οποία είναι απαραίτητη για τη πρόσδεση του καταλυτικού ιόντος Zn²⁺ και της αλληλουχίας GAMEN απαραίτητη για την ενζυμική δραστηριότητα (Εικόνα 3).

Η ανθρώπινη ERAP1 και η ERAP2, παρουσιάζουν ομολογία της τάξεως του 51%, και εκφράζονται από τον ίδιο γονιδιακό τόπο στο χρωμόσωμα 15 του ανθρώπου (5q15) που υποδηλώνει ότι τα δύο γονίδια προήλθαν από γονιδιακό διπλασιασμό ενός αρχέγονου γονιδίου. Η έκφραση της ERAP1 σε ανθρώπινους ιστούς είναι

ευρεία με μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης να εμφανίζονται στην καρδιά, στον πλακούντα και τον σπλήνα [22]. Επίσης, η ERAP2 έχει ευρεία έκφραση σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς, καθώς το γονίδιο της είναι βασικής κυτταρικής λειτουργίας, με τη μεταγραφή της να αυξάνεται από ιντερφερόνη- γ [22].



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της υποοικογένειας ωκυτοκινασών

Η ινσουλινο-ρυθμιζόμενη αμινοπεπτιδάση (IRAP) αποτελεί το τρίτο μέλος της υποοικογένειας ωκυτοκινασών [16, 23]. Κωδικεύεται και αυτή από το γονιδιακό τόπο που εκφράζει τις ERAP1 και ERAP2 στο χρωμόσωμα 5 του ανθρώπου (5q15), ενώ παρουσιάζει υψηλή ομολογία τόσο με την ERAP1 όσο και με την ERAP2 (43% και 49% αντίστοιχα) [16]. Η IRAP εκφράζεται σε πλήθος ιστών, κυρίως σε καρδιά, σπλήνα, εγκέφαλο και σε λιπώδη ιστό [23], ενώ δεν επηρεάζεται από IFN γ , όπως οι ERAP1 και ERAP2. Η βασική διαφορά με τις ERAP1 και ERAP2 είναι ότι αυτή δεν βρέθηκε στο ΕΔ αλλά εντοπίστηκε σε ένα ενδοσωμικό διαμέρισμα σε λιποκύτταρα και μυϊκά κύτταρα [21].

1.3.2 Ανακάλυψη και Βιολογικός ρόλος

- **ERAP1**

Οι ομάδες των Shastri, Rock και Goldberg ήταν αυτές που πρώτες ταυτοποίησαν την ERAP1 το 2002 [24, 25, 26]. Νωρίτερα, η ERAP1, γνωστή με άλλα ονόματα όπως A-LAP, PILS-AP και APTS-1 [27, 28, 29], είχε προταθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης [30, 31]. Επίσης, η ενδοκυτταρική ERAP1 έχει βρεθεί να επάγει την αγγειογένεση μέσω ενεργοποίησης ενδοθηλιακών ιντεγκρινών, ενώ το εκκρινόμενο ένζυμο να την καταστέλλει μέσω

απενεργοποίησης της αγγειοτενσίνης II [32], ενώ φαίνεται επίσης να συμβάλλει και στην εγγενή ανοσοαπόκριση ενεργοποιώντας τα μακροφάγα. Είναι πιθανόν η ERAP1 να είναι υπεύθυνη για την παραγωγή συγκεκριμένων πεπτιδίων που επάγουν τη φαγοκύτωση [33].

Εντούτοις, η συσχέτιση της ERAP1 με το μονοπάτι της αντιγονοπαρουσίασης έχει μονοπωλήσει τις ερευνητικές προσπάθειες από το 2002 και μετά. Το ένζυμο αυτό έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζει την αντιγονοπαρουσίαση σε αρκετά *in vitro* και *in vivo* συστήματα. Συγκεκριμένα, αποσιώπηση της ERAP1 με siRNA ή RNAi σε κύτταρα ποντικού, οδήγησε σε αλλαγή της έκφρασης των μορίων MHC I στην επιφάνεια του κυττάρου [25, 34, 35]. Επιπλέον, η αποσιώπηση της έχει βρεθεί πως ενισχύει την ανοσογονικότητα λόγω της ύπαρξης ασταθών συμπλόκων MHC-πεπτιδίων [36]. Επίσης, *in vivo* πειράματα χρησιμοποιώντας ποντίκια ελλιπή σε ERAP1 έδειξαν μεγάλες μεταβολές στην ιεραρχία των ανοσοεξαρτώμενων ιικών επιτόπων και προκάλεσαν τροποποιημένες αποκρίσεις των T κυττάρων [37].

Η ERAP1 έχει δειχθεί να εμπλέκεται και στο μονοπάτι της διασταυρούμενης παρουσίασης, αλλά και στην παρουσίαση αντιγόνων που προέρχονται από το κυτοσόλιο αλλά παρουσιάζονται από μόρια MHC II. Στη τελευταία λειτουργία, τα αντιγόνα μπορεί να παρουσιάζονται από το ίδιο κύτταρο ή να παρουσιάζονται από ένα άλλο κύτταρο οπότε προσλαμβάνονται με φαγοκύτωση ή ενδοκύτωση (έμμεση παρουσίαση). Και στις δύο περιπτώσεις τα κυτοσολικά αντιγόνα εκτίθενται στο μονοπάτι αντιγονοπαρουσίασης τάξης I πριν οδηγηθούν στα ενδολυσosomal [38].

Τέλος, σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει την πιθανή εμπλοκή των επιπέδων έκφρασης και δραστηριότητας της ERAP1 στον έλεγχο του καρκίνου. Έχει βρεθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα τα επίπεδα έκφρασης της ERAP1 διαφοροποιούνται, με αποτέλεσμα, πιθανώς, την αλλοίωση των συνηθισμένων μοτίβων αντιγονοπαρουσίασης και τη διαφυγή των όγκων από το ανοσοποιητικό σύστημα [39]. Σε μία μελέτη, σε ποντίκια ελλιπή σε ERAAP, NK κύτταρα μπορούσαν να ενεργοποιηθούν, ώστε να καταπολεμήσουν λεμφώματα τα οποία υπό κανονικές συνθήκες έκφρασης της ERAAP ήταν ανθεκτικά και διαπιστώθηκε ότι αυτό οφειλόταν στο διαφοροποιημένο ρεπερτόριο πεπτιδίων που ήταν προσδεμένα σε MHC-I [40], ενώ σε μία άλλη μελέτη, επίσης με χρήση ποντικών ελλιπών σε ERAAP, διαπιστώθηκε η ύπαρξη μιας καινούριας απόκρισης CD8+ κυττάρων T

έναντι ενός ογκο-αντιγόνου, το οποίο καταστρέφεται, υπό κανονικές περιπτώσεις, από την ERAAP [41]. Τα ευρήματα αυτά ήταν πολύ ενθαρρυντικά για την ανάδειξη της ERAP1 ως έναν πιθανό στόχο για ανοσοθεραπεία του καρκίνου.

- **ERAP2**

Η ERAP2 ταυτοποιήθηκε το 2003 από την ομάδα του Dr. Tsujimoto και είναι λιγότερο καλά χαρακτηρισμένη ως προς τη βιολογική της λειτουργία κυρίως λόγω του γεγονότος ότι δεν εκφράζεται σε ποντίκια, όμως υπάρχουν ενδείξεις ότι συμμετέχει και αυτή ενεργά στους μηχανισμούς αντιγονοπαρουσίασης. Συγκεκριμένα, παρά τον κυρίαρχο ρόλο της ERAP1 στην αποικοδόμηση των επιτόπων στο ΕΔ έχει προταθεί ότι η συντονισμένη δράση των ERAP1 και ERAP2 είναι σημαντική για τη βέλτιστη παραγωγή επιτόπων [42, 43]. Πρόσφατες μελέτες ανάλυσης ανοσοπεπτιδιώματος έχουν δείξει ότι τόσο η ERAP1 όσο και η ERAP2 μπορούν να μεταβάλλουν το ρεπερτόριο των συμπλόκων MHC I–πεπτιδίων, υποδηλώνοντας πως η λειτουργία τους μπορεί να συμπληρώσει ή ακόμα και να υπερισχύσει της επιλογής πεπτιδίων για πρόσδεση στα μόρια MHC I [44, 45, 46, 47, 48].

- **IRAP**

Η IRAP (Insulin Regulated Aminopeptidase), η τρίτη αμινοπεπτιδάση της υποοικογένειας των ωκυτοκινάσων, αναγνωρίστηκε ως σημαντικό ένζυμο για την αντιγονοπαρουσίαση το 2009 από την ομάδα του Dr. van Endert [21]. Ο ρόλος της στους ενδοκυττάριους μηχανισμούς αντιγονοπαρουσίασης μέσω μορίων MHC I, αποκαλύφθηκε μέσω πειραμάτων με γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ώστε να μην εκφράζουν την IRAP [23, 49]. Συγκεκριμένα, σε δενδριτικά κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών (BMDCs) διαπιστώθηκε ότι η IRAP δεν συμμετέχει στο κλασσικό μονοπάτι επεξεργασίας και παρουσίασης αντιγόνων μέσω MHC-I, αλλά ο ρόλος της περιορίζεται στη διασταυρούμενη-παρουσίαση εξωκυττάριων αντιγόνων. Αυτό συμφωνεί και με τον εντοπισμό της σε ειδικά ενδοσώματα, στα οποία συνεντοπίζονται και μόρια MHC-I.

Εκτός από τα παραπάνω ευρήματα που την σχετίζουν με την αντιγονοπαρουσίαση, η IRAP έχει βρεθεί να εμπλέκεται και στην αποικοδόμηση και αδρανοποίηση αρκετών ορμονών, αγγειοδραστικών πεπτιδίων και νευροπεπτιδίων, όπως της ωκυτοκίνης, της βαζοπρεσσίνης και της αγγειοτενσίνης III [23, 50]. Μάλιστα, φαίνεται να αποτελεί έναν υψηλής συγγένειας υποδοχέα στον

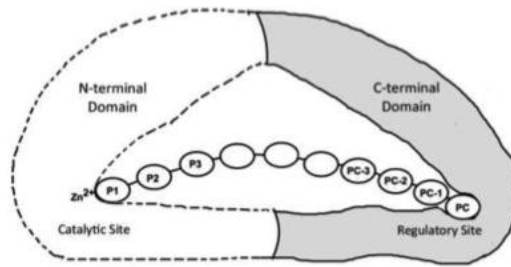
εγκέφαλο για το προϊόν της πέψης της αγγειοτενσίνης III, δηλαδή την αγγειοτενσίνη IV, με αποτέλεσμα να εμπλέκεται στους μηχανισμούς μνήμης με άγνωστη μέχρι στιγμής επίδραση [51].

1.3.3 Εξειδίκευση υποστρώματος και ενζυματικές ιδιότητες

Αν και τα τρία ένζυμα παρουσιάζουν υψηλή ομολογία (50% κατά μέσο όρο) και συντηρημένα ενεργά κέντρα, εντούτοις παρουσιάζουν ξεχωριστή εξειδίκευση υποστρώματος και ενζυματικές ιδιότητες.

- **ERAP1**

Η ERAP1 είναι μοναδική ανάμεσα στις άλλες 2 αμινοπεπτιδάσες, καθώς προτιμά μεγάλα υποστρώματα μήκους 9-16 αμινοξέων, ένα χαρακτηριστικό που ταιριάζει με την βιολογική της δράση [52, 53], ενώ παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα για πεπτίδια μήκους 8-9 αμινοξέων, που είναι το βέλτιστο μήκος για προσδεση στα μόρια MHC I [54]. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται με την ύπαρξη ενός μηχανισμού τύπου μοριακού κανόνα, ο οποίος ενεργοποιεί και απενεργοποιεί την υδρόλυση ανάλογα με το μήκος και την αλληλουχία των αμινοξέων που περιέχει το πεπτίδιο [55]. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις για ένα αλλοστερικό φαινόμενο στην ενεργότητα του ενζύμου, που έχουν προσφέρει βιοχημικές αναλύσεις, μέσω της πρόσδεσης του πεπτιδικού υποστρώματος σε μια ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου, η οποία εντοπίζεται σε απόσταση ανάλογη με το μήκος των πρόδρομων πεπτιδίων [53, 56]. Επιπλέον, αποκαλύφθηκε μια σειρά από αλληλεπιδράσεις που υποστηρίζουν την αναγνώριση του καρβοξυτελικού άκρου του πεπτιδίου, βάσει δύο κρυσταλλικών δομών ενός διαμοριακού συμπλόκου ανάμεσα στη ρυθμιστική περιοχή της ERAP1 για το C-τελικό άκρο των υποστρωμάτων της και στο καρβοξυτελικό άκρο ενός πεπτιδίου που παρουσιάζεται από μια πρωτεΐνη σύντηξης [55, 57]. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, τα πεπτιδικά υποστρώματα πρέπει να έχουν συγκεκριμένο μήκος, ώστε να σχηματιστεί ένα λειτουργικό σύμπλοκο Michaelis, ώστε το N-τελικό άκρο και το C-τελικό άκρο να συνδέονται ταυτόχρονα στο καταλυτικό κέντρο και στη ρυθμιστική περιοχή της ERAP1, αντίστοιχα. Αυτή η αλλοστερική πρόσδεση μπορεί να προκαλέσει μετάβαση από την ανοιχτή στη κλειστή διαμόρφωση της ERAP1 και ένα κατάλοιπο από το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου απομακρύνεται αποτελεσματικά (Εικόνα 4) [55].



Εικόνα 4: Αναπαράσταση της αλλοστερικής ενεργοποίησης της ERAP1 [55].

Επιπλέον, μελέτες εξειδίκευσης έδειξαν ότι η ERAP1 μπορεί να υδρολύει αποτελεσματικά τον πεπτιδικό δεσμό όταν το αμινοτελικό άκρο είναι λευκίνη, αλλά και με αρκετά μεγάλες ταχύτητες για άλλα υδρόφοβα αμινοξέα όπως είναι η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη και αλανίνη. Βάσει του γεγονότος ότι η ERAP1 φάνηκε να εμφανίζει προτίμηση για υδρόφοβα αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο των πεπτιδίων που αποικοδομεί [53], καθώς και ότι ο λόγος της ειδικής δραστηριότητας στα δεκαμερή υποστρώματα είναι μικρότερος από το λόγο της ειδικής δραστηριότητας στα διμερή υποστρώματα, έγινε η υπόθεση ότι η δράση του ενζύμου μπορεί να επηρεάζεται και από άλλες θέσεις του υποστρώματος. Επίσης δείχθηκε ότι η ERAP1 δεν εμφανίζει προτίμηση για αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ σε καμία θέση, ενώ σε συγκεκριμένες θέσεις υπήρχε προτίμηση για θετικά φορτισμένα ή υδρόφοβα αμινοξέα [58]. Τέτοια προτίμηση δεν παρατηρήθηκε για την αμινοτελική θέση, πιθανώς λόγω απώσεων με την Arg430 που βρίσκεται μόνο στο θύλακα S₁ της ERAP1.

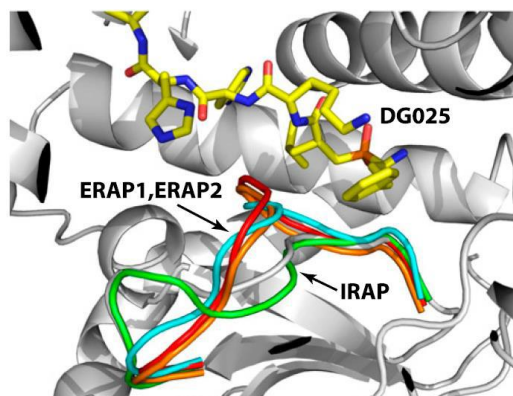
- **ERAP2**

Η εξειδίκευση της ERAP2 για τα υποστρώματά της δεν έχει διερευνηθεί λεπτομερώς. Με τα μέχρι τώρα δεδομένα, η ERAP2 φαίνεται να μη διαθέτει την ικανότητα επιλογής μήκους που έχει η ERAP1, καθώς έχει δείχθει ότι αντίθετα με την ERAP1, μπορεί να αποικοδομεί με μεγάλη ταχύτητα 8μερή και 9μερή αλλά, όπως η ERAP1, δε μπορεί να αποικοδομήσει αποτελεσματικά ένα 5μερές πεπτίδιο. Επίσης, δεν εμφανίζει κάποια ιδιαίτερη προτίμηση για το καρβοξυτελικό άκρο σε αντίθεση με την ERAP1 που προτιμά υδρόφοβα αμινοξέα σε αυτή τη θέση [53]. Αξιοσημείωτο είναι, τέλος, πως ενώ στους ανθρώπους έχουν βρεθεί μόρια MHC I που παρουσιάζουν πεπτίδια με θετικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο και η ανάγκη παρουσίασης αυτών των πεπτιδίων μπορεί να δικαιολογήσει την ύπαρξη του ERAP2, στα ποντίκια τα οποία δε διαθέτουν ERAP2 δεν έχουν βρεθεί αντίστοιχα μόρια MHC I – πεπτιδίου[42, 53]

- **IRAP**

Η IRAP παρουσιάζει διαφορετική προτίμηση μήκους υποστρωμάτων σε σχέση με την ERAP1, καθώς δείχνει να καταβολίζει ταχύτερα πεπτίδια μεσαίου μήκους (6-8 αμινοξέα), ενώ δε μπορεί να ενεργοποιηθεί όπως η ERAP1 από μικρά πεπτιδικά υποστρώματα [59]. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της IRAP είναι πως δρα αποτελεσματικά σε μεγαλύτερο εύρος pH σε σχέση με τις ERAPs, κάτι που ταιριάζει με το ρόλο της στο μονοπάτι διασταυρούμενης παρουσίασης, δρώντας μέσα στα ενδοσώματα [21], των οποίων το pH αλλάζει δυναμικά.

Επιπλέον, συγκριτική μελέτη της εξειδίκευσης υποστρωμάτων για το θύλακα S1 των τριών αμινοπεπτιδασών έδειξε ότι η IRAP συνδυάζει τις διαφορετικές προτιμήσεις των ERAP1 και ERAP2 [60]. Έτσι, ενώ η ERAP1 παρουσιάζει προτίμηση για υδρόφοβες και αρωματικές πλευρικές αλυσίδες, η ERAP2 προτιμά εκτεταμένες αλυσίδες με θετικά φορτισμένα άκρα, και στην IRAP προσδένονται υποστρώματα και με τα δυο είδη πλευρικών αλυσίδων, χωρίς αυτό να είναι πάντα ο κανόνας, καθιστώντας το προφίλ της εξειδίκευσης της IRAP ως μη ακριβές άθροισμα των ERAP1 και ERAP2. Παράλληλα, ο βρόχος που περιέχει το μοτίβο GAMEN στην IRAP είναι σημαντικά μετατοπισμένος σε σχέση με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (Εικόνα 5) με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μεγαλύτερου εξειδικευμένου θύλακα S1. Με αυτόν τον τρόπο εξηγείται το πως η IRAP μπορεί να αναγνωρίσει κυκλικά πεπτίδια, ενώ οι άλλες όχι [61].



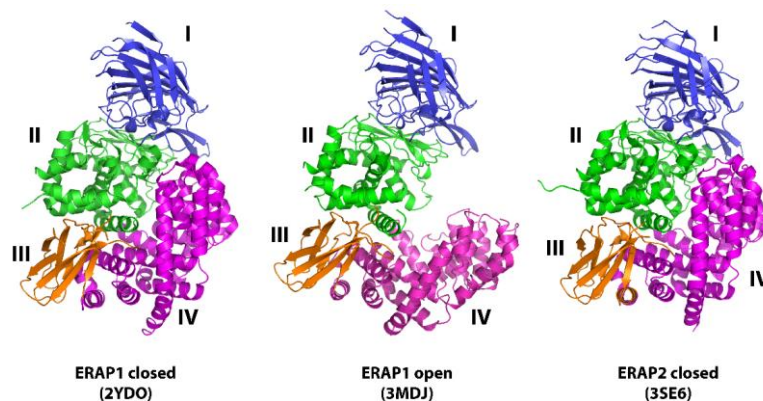
Γκρι: δομή IRAP με προσδεμένο υποκαταστάτη DG025 (hPhe-(PO₂CH₂)-LKHHAFSFK), πράσινο: GAMEN δομής IRAP χωρίς υποκαταστάτη, γαλάζιο: GAMEN ανοιχτής διαμόρφωσης ERAP1, κόκκινο: GAMEN κλειστής διαμόρφωσης ERAP1, πορτοκαλί: GAMEN ERAP2

Εικόνα 5: Σύγκριση της διαμόρφωσης του μοτίβου GAMEN μεταξύ των ERAP1, ERAP2 και IRAP [62].

1.3.4 Συνολική δομή και οργάνωση του ενεργού κέντρου

- ERAP1

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1, όπως και άλλες M1 αμινοπεπτιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί δομικά, αποτελείται από τέσσερις διακριτές δομικές περιοχές που αναδιπλώνονται σχηματίζοντας μια κοίλη δομή (Εικόνα 6) [56, 63]. Η δομική περιοχή I αποτελείται από 8 πτυχωτά φύλλα, βρίσκεται επάνω από τη δομική περιοχή II και περιλαμβάνει κατάλοιπα που προσδένουν το N-τελικό άκρο των πεπτιδικών υποστρωμάτων. Η περιοχή II, η οποία υιοθετεί διαμόρφωση α-έλικας, αποτελεί την καταλυτική περιοχή και περιλαμβάνει το ενεργό κέντρο με το μοτίβο εξωπεπτιδάσης GAMEN, καθώς και το μοτίβο πρόσδεσης ψευδαργύρου. Η μικρή συνδετική περιοχή III, η οποία αποτελείται από αρκετές α-έλικες διαφόρων μεγεθών, αποτελεί τον σύνδεσμο μεταξύ των δομικών περιοχών II και IV, και λειτουργεί ως μεντεσές, ακολουθώντας τις κινήσεις του ενζύμου. Η περιοχή IV του ενζύμου ERAP1 συνίσταται από 16 έλικες διαφόρων μεγεθών οργανωμένες σε οκτώ επαναλαμβανόμενες μονάδες τύπου αρμαντίλο ή τύπου HEAT από έλικα-στροφή-έλικα, η μια δίπλα στην άλλη, ώστε να σχηματίζουν μία κοίλη επιφάνεια που βλέπει προς το ενεργό κέντρο.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των γνωστών κρυσταλλικών δομών των ERAP1 και ERAP2 στην οποία παρουσιάζεται η οργάνωση των δομικών περιοχών (οι δομικές περιοχές υποδεικνύονται με λατινική αρίθμηση). Αριστερά: η κλειστή διαμόρφωση της ERAP1' μέση: η ανοιχτή διαμόρφωση της ERAP1' δεξιά: η κλειστή διαμόρφωση της ERAP2 [56, 63, 64].

Η αμινοπεπτιδάση ERAP1 έχει κρυσταλλωθεί σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, μια ανοιχτή και μια κλειστή, οι οποίες διαφέρουν όσον αφορά στον προσανατολισμό της περιοχής IV σε σχέση με τις περιοχές I και II [56, 63]. Στην ανοιχτή διαμόρφωση, η δομική περιοχή IV είναι απομακρυσμένη από την περιοχή

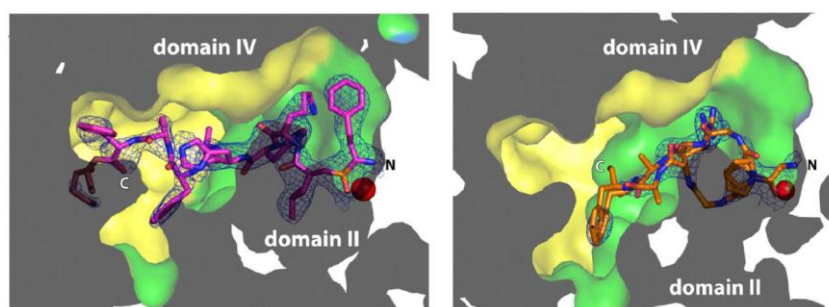
II, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας μεγάλης κοιλότητας εκτεθειμένης σε διαλύτη. Μετάπτωση από την ανοιχτή στην κλειστή διαμόρφωση της ERAP1 πραγματοποιείται μέσω μιας κίνησης γύρω από την συνδετική περιοχή III που οδηγεί σε μια μεγάλη κεντρική κοιλότητα μεταξύ των περιοχών I, II & IV. Η κοιλότητα αυτή απομονώνει πλήρως το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου από τον διαλύτη, αλλά μπορεί εύκολα να φιλοξενήσει εκτεταμένους προδρόμους του τελικού προϊόντος και είναι επικαλυμμένη με ρηχούς θύλακες οι οποίοι φέρουν κυρίως αρνητικό φορτίο και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων του πεπτιδίου [56, 58]. Η μετάπτωση αυτή σχετίζεται με δομικές αναδιατάξεις του ενεργού κέντρου, προς μία διαμόρφωση περισσότερο ενεργή, υποδηλώνοντας ότι η απόκτηση της κλειστής διαμόρφωσης του ενζύμου σχετίζεται με την ενεργοποίησή του. Έτσι, εκτιμάται πως η ανοιχτή διαμόρφωση είναι μη ενεργή, λόγω της έλλειψης ενός καλά οργανωμένου θύλακα πρόσδεσης του υποστρώματος S1, ενώ αντίθετα η κλειστή διαμόρφωση περιέχει ένα καλά δομημένο καταλυτικό κέντρο [56, 63, 65]. Το ενεργό κέντρο της ERAP1 περιλαμβάνει ένα ιόν Zn (II) το οποίο συμπλέκεται με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο γλουταμινικού οξέος του μοτίβου HExxHx₁₈E. Ένα γειτονικό κατάλοιπο τυροσίνης το οποίο είναι συντηρημένο στις αμινοπεπτιδάσες M1, θεωρείται πως συμμετέχει στη σταθεροποίηση του τετραεδρικού ενδιάμεσου κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου και πως μπορεί να αλλάζει διαμορφώσεις ανάλογα με τη διαμορφωτική κατάσταση του ενζύμου [53, 56].

- **ERAP2**

Η ERAP2 παρουσιάζει παρόμοια δομική οργάνωση με την ERAP1 (Εικόνα 6) [64], καθώς και αυτή αποτελείται από 4 δομικές περιοχές που οργανώνονται γύρω από μια κοίλη επιφάνεια, με το καταλυτικό κέντρο να εντοπίζεται στην δομική περιοχή II. Όμως, η εσωτερική κοιλότητα της έχει διαφορετικό σχήμα και αποτελείται κυρίως από περισσότερο υδρόφοβα κατάλοιπα, γεγονός που συνεισφέρει στη διαφορετική εξειδίκευσή της. Επιπλέον, όσον αφορά τον θύλακα αναγνώρισης της πλευρικής ομάδας του N-τελικού αμινοξέος (S1), το ηλεκτροστατικό δυναμικό αυτού στην ERAP2 είναι πιο αρνητικό από το αντίστοιχο της ERAP1, γεγονός που συνάδει με την προτίμηση της ERAP2 για βασικές πλευρικές αλυσίδες στη θέση P1 των αμινοξικών καταλοίπων [60, 62]. Οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην διαφορετική εξειδίκευση της ERAP2 έναντι της ERAP1 είναι η αντικατάσταση της Gln181 στην ERAP1 από το Asp198 στην ERAP2, γεγονός που εξηγεί την

προτίμηση για θετικά φορτισμένα αμινοξέα στον S₁ θύλακα της ERAP2, καθώς και η αντικατάσταση στο πάνω μέρος του θύλακα S₁ των His160 και Arg430 στην ERAP1 από Glu177 και Gln447 στην ERAP2 [53]. Τέλος, ο υδρόφοβος θύλακας στον οποίο έχει προταθεί ότι δεσμεύεται το καρβοξυτελικό άκρο του υποστρώματος στην ERAP1 και συμβάλλει στην προτίμηση συγκεκριμένου μήκους από το ένζυμο, φαίνεται πως δε σχηματίζεται στην ERAP2, γεγονός που εξηγεί τη διαφορετική προτίμηση στο μήκος των υποστρωμάτων που έχει προταθεί για τα δύο ένζυμα [53].

Σε όλες τις γνωστές κρυσταλλικές δομές της ERAP2, το ένζυμο υιοθετεί μια κλειστή διαμόρφωση, που αποκλείει την πρόσβαση του εξωτερικού διαλύτη στην κοιλότητα και το καταλυτικό κέντρο, καθιστώντας έτσι αδύνατη τη σύνδεση του υποστρώματος και την απελευθέρωση του προϊόντος χωρίς την πραγματοποίηση μιας δραστηρικής αλλαγής στη δομή του ενζύμου. Η κρυστάλλωση της ERAP2 μαζί με πεπτιδικά υποστρώματα και ανάλογα της μεταβατικής κατάστασης (φωσφινικό ψευδοπεπτίδιο) (Εικόνα 7) δεν έδωσε κάποιες ενδείξεις σχετικά με την ύπαρξη εξειδικευμένου σημείου αναγνώρισης του καρβοξυτελικού άκρου του πεπτιδίου ή ενδεχόμενη αυτοενεργοποίηση του ενζύμου. Αντιθέτως, φαίνεται ότι οι αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος με τους θύλακες και με τις πλευρικές αλυσίδες κατά μήκος της εσωτερικής κοιλότητας να χαρακτηρίζονται από τυχαιότητα [62].



Η κοιλότητα δίνεται σε απεικόνιση επιφάνειας και τα πεπτίδια σε μορφή ραβδίου. Με μπλε πλέγμα δίνεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από τα πεπτίδια. Κόκκινη σφαίρα: Zn(II), μωβ υπόστρωμα: hPhe-(PO₂CH₂)-LKHHAFSFK, πορτοκαλί υπόστρωμα: GPGRAFVTI

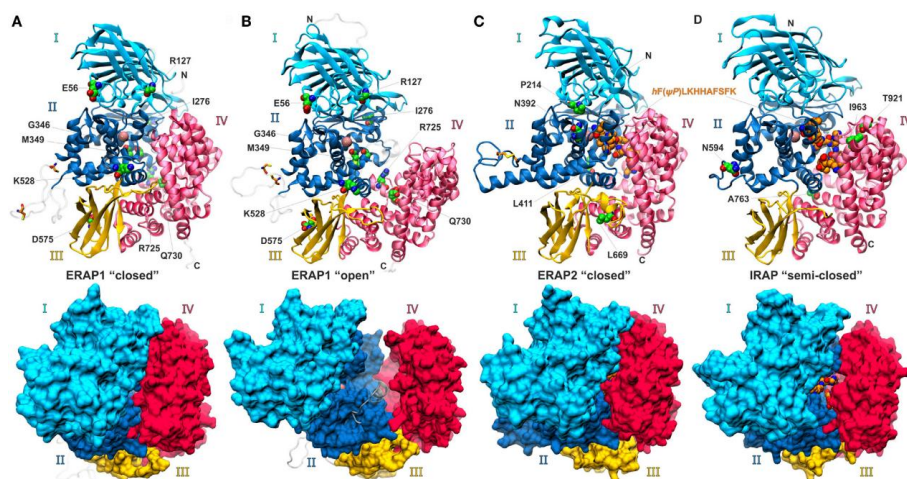
Εικόνα 7: Πλευρική όψη της εσωτερικής κοιλότητας της ERAP2 με προσδεμένα πεπτίδια.

[62]

Τέλος, το καταλυτικό κέντρο της ERAP2 είναι οργανωμένο παρόμοια με της ERAP1, με τα κατάλοιπα της His 370, His 374 και Glu 393 του μοτίβου HEXXHXX18E να αλληλεπιδρούν με τον καταλυτικό ψευδάργυρο [64]. Ένα γειτονικό κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr455) φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση του τετραεδρικού ενδιάμεσου που σχηματίζεται κατά την κατάλυση και μάλιστα, φαίνεται ότι η τυροσίνη αυτή μπορεί να αλλάζει προσανατολισμό και να τοποθετείται σε σωστή διευθέτηση μετά από πρόσδεση υποστρώματος [62, 64]. Η μετακίνηση αυτή ομοιάζει με αυτή της ομόλογης της στην ERAP1, Tyr 438, μόνο που στην περίπτωση αυτή η αλλαγή διεύθεσης προκαλούνταν από αλλαγή διαμόρφωσης του ενζύμου [56, 63].

- **IRAP**

Η κρυσταλλική δομή του εξωκυττάριου τμήματος της IRAP, του ομόλογου τμήματος με τις ERAP1 και ERAP2, χωρίς την κυτοσολική περιοχή και το διαμεμβρανικό τμήμα λύθηκε πρόσφατα από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες [61, 62]. Η γενική οργάνωση του τμήματος αυτού της IRAP είναι παρόμοια με τις ERAP1 και ERAP2 και αποτελείται από 4 δομικές περιοχές που σχηματίζουν μια μεγάλη κοιλότητα στο εσωτερικό του ενζύμου. Η δομή της IRAP φαίνεται πως λαμβάνει μια ενδιάμεση διαμόρφωση μεταξύ των ανοιχτών και κλειστών δομών που έχουμε δει για την ERAP1, όπου οι γωνίες μεταξύ των περιοχών και της Tyr549 του ενεργού κέντρου της βρίσκονται μεταξύ θέσεων που έχουν παρατηρηθεί στις δυο δομές της ERAP1 [61]. Η ημίκλειστη δομή (Εικόνα 8D) που βρέθηκε για την IRAP περιλαμβάνει μια εκτεταμένη εσωτερική κοιλότητα με περιορισμένη πρόσβαση στον διαλύτη. Για αυτό το λόγο, προτάθηκε ότι θα πρέπει να υπάρχει και σε αυτή μία πιο ανοιχτή διαμόρφωση υπεύθυνη για τη σύλληψη του υποστρώματος και την απελευθέρωση του προϊόντος. Το πεπτιδικό υπόστρωμα βρέθηκε στο εσωτερικό της κοιλότητας με το N-τελικό άκρο του πεπτιδίου διευθετημένο βέλτιστα για κατάλυση, προσανατολισμένο στο ενεργό κέντρο, και το C-τελικό άκρο να κατευθύνεται προς την περιοχή IV [62].



(A,B) Η ERAP1 συνδέεται με τον αναστολέα μπεστατίνη στην «κλειστή» και «ανοιχτή» διαμόρφωση, (C) ERAP2, (D) η IRAP συνδέεται με έναν φωσφινικό αναστολέα, ο οποίος υποδεικνύεται με πορτοκαλί σφαίρες. Οι 4 δομικές περιοχές υποδεικνύονται με λατινικούς χαρακτήρες και έχουν χρωματιστεί ως εξής: γαλάζιο περιοχή I, μπλε περιοχή II, κίτρινο περιοχή III και κόκκινο περιοχή IV. Το καταλυτικό ιόν ψευδαργύρου φαίνεται ως ροζ σφαίρα και τα πολυμορφικά κατάλοιπα υποδεικνύονται με πράσινες σφαίρες. Οι περιοχές της ERAP1 που δεν μπόρεσαν να καθοριστούν με κρυσταλλογραφία ακτίνων X φαίνονται με γκρι

Εικόνα 8: Σχηματικές αναπαραστάσεις με μοντέλα κορδέλας και επιφανείας των ERAP1, ERAP2 και IRAP σύμφωνα με πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες. [66].

Όσον αφορά την οργάνωση του καταλυτικού κέντρου της IRAP δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές από τις ERAP1 και ERAP2 [61, 62]. Ο καταλυτικός Zn σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με την His 464, την His 468 και το Glu 487 του μοτίβου HEXXH₁₈E, ενώ το Glu 465 του ίδιου μοτίβου είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του μορίου νερού που θα κάνει την πυρηνόφιλη προσβολή στον πεπτιδικό δεσμό. Τέλος, η καταλυτική Tyr 549, βρέθηκε να αλλάζει γεωμετρία μετά από την πρόσδεση του υποστρώματος, ώστε να λάβει τον κατάλληλο προσανατολισμό για την σταθεροποίηση του τετραεδρικού ενδιάμεσου που προκύπτει κατά την κατάλυση. Δύο γλουταμικά κατάλοιπα (295 και 431) φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση της N-τελικής αμινομάδας του πεπτιδίου, όπως και στην ERAP1.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΩΚΥΤΟΚΙΝΑΣΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Αρκετές μελέτες των τελευταίων ετών έχουν δείξει πως η δραστικότητα των ERAP1/ERAP2 μπορεί να επηρεαστεί από παθογόνα, ως μέσο αποφυγής αυτών από τις ανοσοαποκρίσεις και ότι τα επίπεδα έκφρασής τους διαφοροποιούνται σε καρκινικά κύτταρα [67]. Επιπλέον, η υψηλή φυσική πολυμορφικότητα της ERAP1 και λιγότερο των ERAP2 και IRAP, που οδηγεί σε αλλαγές στη λειτουργικότητά τους, έχει συσχετιστεί με προδιάθεση σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, όπως είναι οι ιϊκές μολύνσεις, ο καρκίνος, οι αυτοάνοσες ασθένειες και η υπέρταση [68]. Οι αλλαγές, λοιπόν, στη λειτουργία των συγκεκριμένων αμινοπεπτιδασών (διαφοροποίηση έκφρασης ή δραστικότητάς τους) θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ή την καταστροφή συγκεκριμένων αντιγονικών επιτόπων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων κυτταροτοξικών αποκρίσεων ή την εξάλειψη των φυσιολογικών κυτταροτοξικών αποκρίσεων [67]. Πιο συγκεκριμένα, η γενετική καταστολή του ERAP1 έδειξε ότι μπορεί να προκαλέσει νέες ή να ενισχύσει τις υπάρχουσες αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις σε αρκετά πειραματικά μοντέλα [40, 41] που υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο της αναστολής της ERAP1 και στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου [99].

Τα παραπάνω δείχνουν ότι η ERAP1 και πιθανότατα η ERAP2 και IRAP αποτελούν δυνητικά καλούς φαρμακολογικούς στόχους για ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων. Η αναστολή τους θα μπορούσε να ενισχύσει τις αποκρίσεις έναντι παθογόνων και καρκινικών κυττάρων, αλλά και να περιορίσει τις αποκρίσεις έναντι των αυτο-αντιγόνων, για τον έλεγχο της αυτοανοσίας.

2.2 Ανάπτυξη αναστολέων των ωκυτοκινάσων με βάση τη δομή

Ο σημαντικός ρόλος των αμινοπεπτιδασών του ΕΔ στη ρύθμιση της λειτουργίας του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος έγειρε το ενδιαφέρον για αναζήτηση τρόπων αναστολής ή βελτίωσης της δράσης τους ως μέσο ρύθμισης της αντιγονοπαρουσίασης, όπως και της ανοσοαπόκρισης.

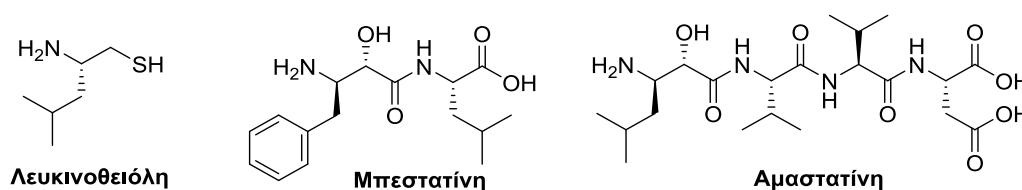
Όμως, η ανάπτυξη αναστολέων αυτών των ενζύμων βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο. Η μικρή αυτή πρόοδος υποδεικνύει τις δυσκολίες που περιλαμβάνει ο σχεδιασμός ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων κυρίως λόγω της μεγάλης ομολογίας μεταξύ των τριών ενζύμων [60, 67]. Επιπλέον, οι μεγάλες διαμορφωτικές μεταβολές του ενεργού κέντρου των ενζύμων κατά την διαδικασία πρόσδεσης του αναστολέα, κυρίως στην περίπτωση του ERAP1 έχει δημιουργήσει προβλήματα στις προσπάθειες ορθολογικού σχεδιασμού αναστολέων, καθώς προκαλούνται αλλαγές σε θέσεις-κλειδιά του ενεργού κέντρου, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την συγγένεια όπως και την κινητική πρόσδεσης του αναστολέα [67, 69].

Οι αναστολείς των αμινοπεπτιδασών του ΕΔ, που έχουν περιγραφεί στις περισσότερες μελέτες έως σήμερα εστιάζουν σε προσεγγίσεις ορθολογικού σχεδιασμού βασισμένες στη δομή. Πιο συγκεκριμένα, οι μελέτες αυτές κάνουν χρήση φαρμακοφόρων που στοχεύουν είτε το ενεργό κέντρο του ιόντος Zn (II), είτε τα στοιχεία αναγνώρισης του αμινοτελικού άκρου, είτε έναν από τους θύλακες εξειδίκευσης του ενζύμου (S_1 , S_1' ή S_2'), ή και σε συνδυασμό των παραπάνω. Μια αποτελεσματική προσέγγιση σχεδιασμού αναστολέων και της δυνατότητας πρόβλεψης του προσανατολισμού των πλευρικών τους ομάδων, ώστε να καταλάβουν τους θύλακες εξειδίκευσης, είναι η χρήση χηλικών συναρμοστών του ιόντος Zn (II) του ενεργού τους κέντρου [60, 70]. Όλες οι ομάδες δέσμευσης ψευδαργύρου που έχουν χρησιμοποιηθεί, λοιπόν, για την αναστολή άλλων αμινοπεπτιδασών Zn θα μπορούσαν θεωρητικά, να ενσωματωθούν και ως αναστολείς των ωκυτοκινασών και εν δυνάμει να οδηγήσουν σε αποτελεσματικούς αναστολείς μετά από κατάλληλη βελτιστοποίηση. Αυτές οι δομικές εναλλακτικές περιλαμβάνουν την μπεστατίνη και τα ανάλογα της, 2-αμινοθειόλες, υδροξαμικά οξέα, τα παράγωγα του βορικού οξέος καθώς και παράγωγα τετραλόνης [71, 72, 73].

2.2.1 Προσπάθειες για εύρεση αναστολέων των ERAP1/ERAP2/IRAP

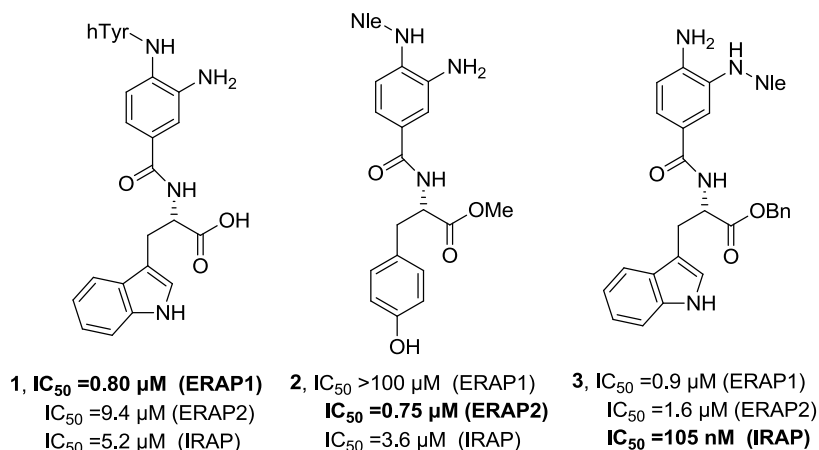
Πριν την ανάπτυξη φωσφινικών ψευδοπεπτιδίων στους οποίους θα γίνει ξεχωριστή αναφορά στην παράγραφο 2.2.2 αφού περιγραφούν πρώτα τα ξεχωριστά δομικά χαρακτηριστικά και οι ιδιοτητές τους, ως αναστολείς των ERAP1/ERAP2/IRAP είχαν χρησιμοποιηθεί γενικοί αναστολείς αμινοπεπτιδασών Zn, όπως είναι η λευκινοθειόλη, η μπεστατίνη και η αμαστατίνη (Εικόνα 9). Παρ'

όλο που αυτοί αποδείχθηκαν ασθενείς και μη εκλεκτικοί, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε διάφορες μελέτες για την βιολογική λειτουργία και τον δομικό και βιοχημικό χαρακτηρισμό των ERAPs [36, 40, 41, 56, 63, 74]. Η συμπεριφορά της λευκινθειόλης η οποία αποτελεί nanomolar αναστολέα αμινοπεπτιδάσεων Zn, όπως η APN ($K_i = 22$ nM) και η APB ($K_i = 130$ nM), δείχνει πως η ανάπτυξη ισχυρών αναστολέων για τις ERAP1/ERAP2/IRAP δεν μπορεί να βασιστεί αποκλειστικά στην απενεργοποίηση του ψευδαργύρου με χρήση μιας ισχυρής συμπλεκτικής ομάδας για αυτόν (π.χ. θειόλη), αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μια πιο λεπτομερής ανάλυση της συνολικής τοπολογίας των ενεργών κέντρων των ενζύμων.



Εικόνα 9: Δομές των λευκινθειόλη, μπεστατίνη και αμαστατίνη

Επιπλέον, έχει αναφερθεί μια εκτενής μελέτη σάρωσης παραγώγων του 3,4-διαμινοβενζοϊκού οξέος (DABA), με φυσικά και μη φυσικά αμινοξέα ως υποκαταστάτες, μεταξύ των οποίων βρέθηκαν αναστολείς μέτριας ισχύος με υποσχόμενη όμως εκλεκτικότητα (Εικόνα 10) [75, 76] για την ERAP1 (**1**), ERAP2 (**2**) και IRAP (**3**) αντίστοιχα προσφέροντας σημαντικές πληροφορίες για τις σχέσεις δομής-δραστικότητας που διέπουν τα παραπάνω ένζυμα. Όπως αποδείχθηκε πρόσφατα από μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ [70], η ομάδα πρόσδεσης συνδέεται ασθενώς και χηλικά με το ιόν Zn(II) μέσω του καρβονυλικού οξυγόνου της ομάδας DABA.



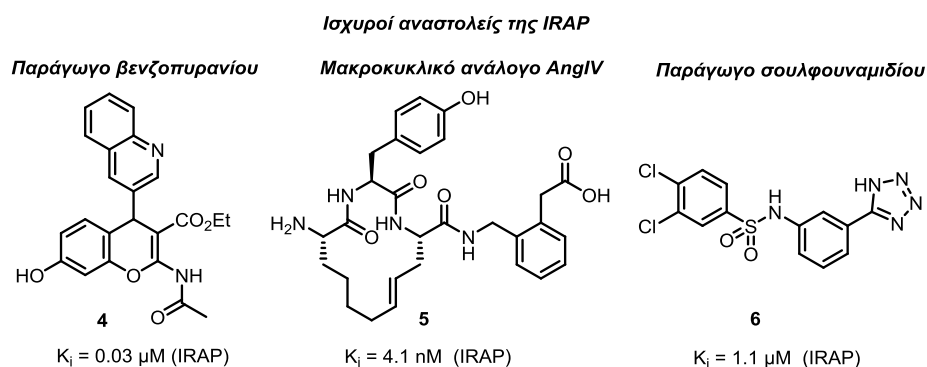
Εικόνα 10: Αναστολείς των ERAP1, ERAP2, IRAP της τάξεως των μM με υποσχόμενο προφίλ εκλεκτικότητας

Πιο συγκεκριμένα, η ένωση **1** (Εικόνα 10) πέρα από ισχυρή αναστολή για την ERAP1 παρουσίασε και καλή εκλεκτικότητα έναντι της ERAP2. Αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες τονίζουν ότι η μείωση της ισχύος ή και η απενεργοποίηση των ZBG (όπως στο παράδειγμα των μη χηλικών αναστολέων της MMP13 [77, 78]) θα μπορούσε να βοηθήσει στην βελτίωση της εκλεκτικότητας, σε βάρος όμως της ισχύος αναστολής. Η υψηλή συγγένεια της **1** για την ERAP1 δείχνει την προτίμηση της για υδρόφοβα κατάλοιπα στην θέση P₂' των αναστολέων.

Επιπλέον, η ένωση **2** εμφανίζει αναστολή σε υψηλές τιμές nM για την ERAP2 και παρουσιάζει εντυπωσιακή εκλεκτικότητα για την ERAP2 έναντι της ERAP1. Αν και αυτή η τάση δεν μπορεί να γενικευθεί για όλα τα παρόμοια παράγωγα τυροσίνης που μελετήθηκαν, εικάζεται ότι η διαμόρφωση του καταλοίπου Tyr στην S' περιοχή του θύλακα της ERAP2 επιτρέπει τον σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλομάδας της Tyr και της Arg345 ενώ συμμετέχει και σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την Trp363, η οποία αντικαθίσταται από την Gly346 στην περίπτωση της ERAP1. Τέλος, ο πιο ισχυρός αναστολέας της IRAP αυτής της μελέτης (**3**), προβλέπεται να αλληλεπιδρά κυρίως με συντηρημένα κατάλοιπα, και έτσι μπορεί να εξηγηθεί η χαμηλή συγγένεια για τις ERAP1 και ERAP2 της τάξεως των μM . Η υψηλή συγγένεια δέσμευσης της ένωσης **3** για την IRAP (105 nM) μπορεί να αποδωθεί σε μια πιθανή αλληλεπίδραση (π-stacking) του ινδολίου της Trp με την Tyr961 και σε δύο δεσμούς υδρογόνου με την Ser546, ενώ η τελική βενζυλομάδα της **3** δεν προβλέπεται να παρέχει σημαντικές αλληλεπιδράσεις.

Επιπροσθέτως, όσον αφορά την IRAP, μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί ισχυροί αναστολείς όπως είναι το παράγωγο βενζοπυρανό **4** και το μακροκυκλικό ανάλογο AngIV **5**, αλλά και το αρυλοσουλφοναμίδιο **6** [79] (Εικόνα 11), χωρίς όμως να εξεταστεί το προφίλ εκλεκτικότητάς τους, καθώς η αξιολόγησή τους περιορίστηκε σε μια προσπάθεια να ρυθμιστούν κάποιες από τις προαναφερθείσες βιολογικές λειτουργίες [80, 81]. Παράλληλα, δεν έχει μελετηθεί η επίδραση αυτών των αναστολέων στο μονοπάτι διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης που συμμετέχει η IRAP, ενώ είτε δεν έχουν ελεγχθεί για την

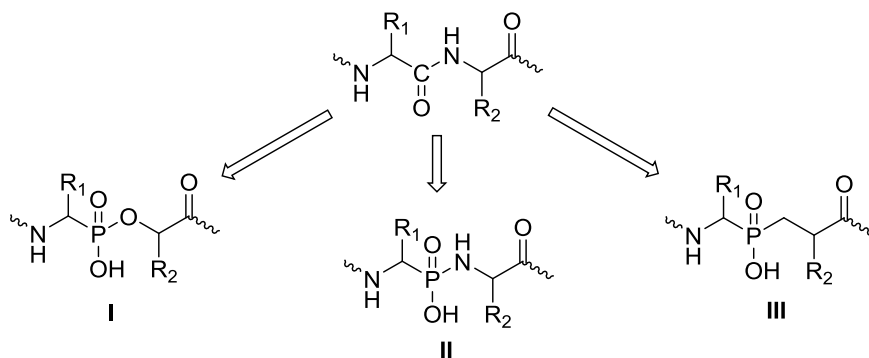
ικανότητά τους να αναστείλλουν τα ERAP1 και ERAP2 ή έχουν δοκιμαστεί και διαπιστώθηκε ότι δεν είναι ενεργοί [82].



Εικόνα 11: Βιβλιογραφικά αναφερόμενοι ισχυροί αναστολείς της IRAP

2.2.2 Φωσφινικοί αναστολείς

Τα οργανοφωσφορικά ανάλογα φυσικών πεπτιδίων έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένων μελετών λόγω της ικανότητάς τους να συμπεριφέρονται ως ανάλογα μεταβατικής κατάστασης (Εικόνα 12). Πρόκειται για ενώσεις που φέρουν μια φωσφοναμιδική [-P(O)(OH)NH-], φωσφονική [-P(O)(OH)O-] ή φωσφινική ομάδα [-P(O)(OH)CH₂-], η οποία υιοθετεί μια τετραεδρική γεωμετρία προσομοιάζοντας στη δομή της μεταβατικής κατάστασης του προς υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού.



Εικόνα 12: Φωσφονικοί (I), φωσφοναμιδικοί (II) και φωσφινικοί (III) αναστολείς που προκύπτουν με αντικατάσταση του πεπτιδικού δεσμού

Μεταξύ των τριών κατηγοριών οργανοφωσφορικών πεπτιδικών αναλόγων, τα φωσφινικά πεπτιδία έχουν επικρατήσει έναντι των φωσφονικών και φωσφοναμιδικών αναλόγων τους λόγω της υψηλότερης χημικής τους σταθερότητας αλλά και λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύονται ισχυρά στο ενεργό κέντρο των μεταλλοπεπτιδασών Zn, παρά την αντικατάσταση του

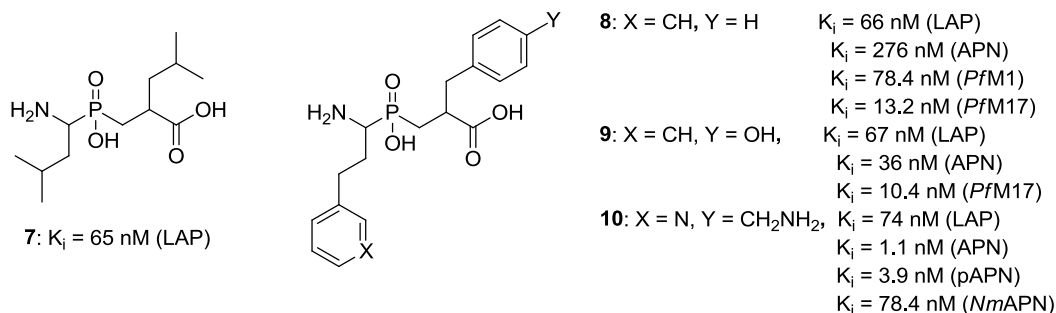
ετεροατόμου (O ή N) από μια μεθυλενο-ομάδα (-CH₂-) δίπλα στο άτομο φωσφόρου [83]. Πράγματι, σε κρυσταλλογραφικές μελέτες του συμπλόκου της ενδοπεπτιδάσης αστασίνη και ενός φωσφινικού αναστολέα αποκαλύφθηκε ότι τα μεθυλενικά υδρογόνα της φωσφινικής ομάδας μπορούν να σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο αμινοξέος του ενεργού κέντρου και μ'αυτόν τον τρόπο να επιτυγχάνουν υψηλή ενζυμική συγγένεια, ανάλογη των φωσφονικών και φωσφοναμιδικών τους αναλόγων [84].

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι φωσφινικοί αναστολείς είναι από τις ελάχιστες περιπτώσεις αναστολέων που μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλό βαθμό εξειδίκευσης για το ένζυμο-στόχο. Αυτό οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες: (α) στην ήπια συμπλεκτική ικανότητα της φωσφινικής ομάδας με το ιόν ψευδαργύρου και (β) στην υψηλή ομοιότητα ενός φωσφινικού ψευδοπεπτιδίου με το υδρολυόμενο υπόστρωμα. Αναστολείς με ομάδες που συμπλέκονται ισχυρά με τον ψευδάργυρο, όπως τα υδροξαμικά παράγωγα και οι θειόλες δίνουν πρόσβαση σε αναστολείς είτε μόνο αριστερής ή μόνο δεξιάς σύμπλεξης, επιτρέποντας διερεύνηση είτε μόνο της S ή μόνο της S' περιοχής του ενεργού κέντρου, αντίστοιχα. Αντίθετα, η χημεία των φωσφινικών πεπτιδίων δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης αναστολέων αμφίπλευρης σύμπλεξης, ικανών να αλληλεπιδράσουν ταυτόχρονα με την S και την S' περιοχή του ενεργού κέντρου, επιτρέποντας βελτιστοποίηση της εκλεκτικότητας με κατάλληλη διαφοροποίηση των P και P' θέσεων τους [83, 85].

2.2.2.1 Φωσφινικοί αναστολείς υπολοίπων μελών της οικογένειας M1 αμινοπεπτιδασών Zn

Η χρήση ενώσεων φωσφινικού τύπου για την αναστολή των υπολοίπων μελών της οικογένειας M1 αμινοπεπτιδασών Zn, έχει πραγματοποιηθεί στο παρελθόν σε πολλές περιπτώσεις [71]. Οι αναστολείς αυτού του τύπου πρωτοαναφέρθηκαν από τον Bartlett και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν φωσφινικά ανάλογα του διπεπτιδίου Leu-Leu (**7**) (Εικόνα 13) και εντόπισαν έναν από τους πιο ισχυρούς αναστολείς της LAP που έχουν αναφερθεί έως σήμερα [86]. Ανάλογη ισχύ παρουσίασαν και οι ενώσεις **8** και **9** οι οποίες επιπλέον είναι και εξαιρετικά αποτελεσματικοί αναστολείς της APN, ενώ η ένωση **9** βρέθηκε να αναστέλλει ισχυρά τις M1 και M17 αμινοπεπτιδάσες *P. falcicarum* που αποτελούν στόχο για την αντιμετώπιση της ελονοσίας (Εικόνα 13) [87, 88]. Πρόσφατα, με κατάλληλες

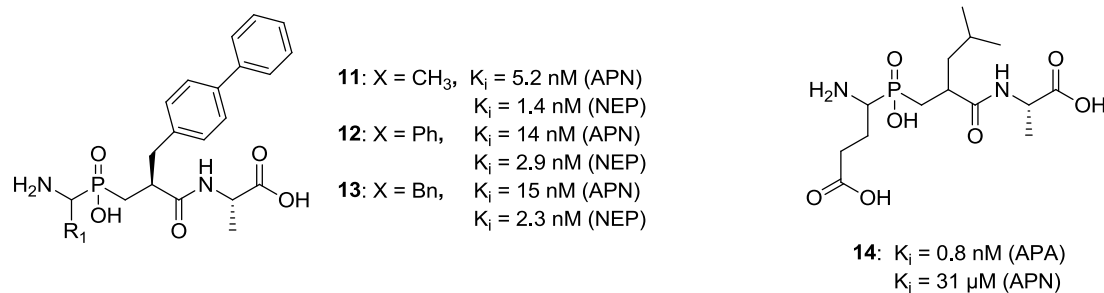
τροποποιήσεις της δομής **8** εντοπίστηκε η ένωση **10** που αποτελεί ένα ισχυρό αναστολέα των APN ανθρώπου και χοίρου και εκλεκτικό έναντι των LAP και NmAPN [89].



Εικόνα 13: Φωσφινικοί ψευδοδιπεπτιδικοί αναστολείς των LAP, APN, PfM1 και PfM17

Η νεπριλυσίνη ή εγκεφαλινάση (NEP) ως πολυλειτουργικό ένζυμο έχει διπλή δράση, εφόσον εμπλέκεται στον καταβολισμό βιοδραστικών πεπτιδίων ρυθμιστικών για την πίεση του αίματος (π.χ. βραδυκινίνη), αλλά και των ενδογενών εγκεφαλινών, μιας κατηγορίας οπιοειδών πεπτιδίων. Τα οπιοειδή πεπτίδια έχουν ανάλογες δράσεις με τα αλκαλοειδή του οπίου και απελευθερώνονται στη ροή του αίματος από τα επινεφρίδια. Το ένζυμο APN ελέγχει τον καταβολισμό των Met- και Leu-εγκεφαλινών διασπώντας τον πεπτιδικό δεσμό Tyr-Gly. Στους ιστούς όμως παρατηρείται συχνά συνύπαρξη των δύο ενζύμων (APN, NEP), έχοντας σε μεγάλο βαθμό συμπληρωματική καταβολική δράση. Λόγω της συμπληρωματικότητας αυτής, έχουν γίνει προσπάθειες σχεδιασμού διπλών-μικτών αναστολέων, ώστε να γίνεται ταυτόχρονη αναστολή των δύο ενζύμων. Από τα παράγωγα που αναπτύχθηκαν, την ισχυρότερη διπλή ανασταλτική δράση *in vitro* έδωσαν οι ενώσεις **11**, **12** και **13** (οι σταθερές αναστολής τους, K_i , είναι της τάξεως των nM) (Εικόνα 14) [90]. Όμως, *in vivo* δράση τους περιορίστηκε σημαντικά λόγω της υψηλής πολικότητας των αναστολέων.

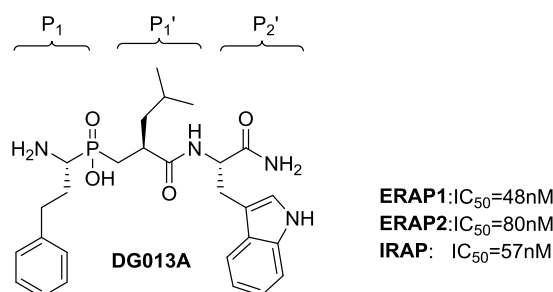
Τέλος, τα φωσφινικά ψευδοπεπτίδια έχουν χρησιμοποιηθεί και για την αναστολή της APA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το φωσφινικό πεπτίδιο **14** που αποτελεί ισχυρό ($K_i = 0.8 \text{ nM}$) και εκλεκτικό αναστολέα της APA, σε σχέση με τα άλλα ομόλογα ένζυμα APN, NEP και ACE (Εικόνα 14) [91].



Εικόνα 14: Παραδείγματα φωσφινικών αναστολέων μεταλλοπεπτιδασών Zn²⁺

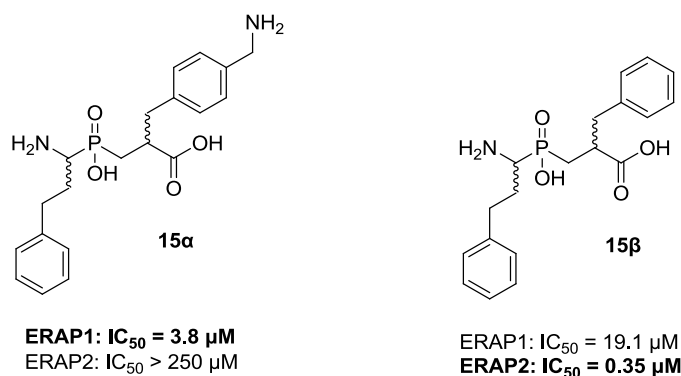
2.2.2.2 Φωσφινικοί αναστολείς των ERAP1/ERAP2/IRAP

Οι πρώτες προσπάθειες ανάπτυξης φωσφινικών αναστολέων των ERAP ξεκίνησαν από την ερευνητική μας ομάδα με προκαταρκτικές μελέτες που οδήγησαν το 2013 στον πρώτο εξαιρετικά ισχυρό αναστολέα των ERAP, τον **DG013A** (Εικόνα 15) [60]. Αυτός ο ορθολογικά σχεδιασμένος αναστολέας μεταβατικής κατάστασης επιδεικνύει αξιοσημείωτη συγγένεια για την αμινοπεπτιδάση ERAP1 (IC₅₀ = 48 nM) και ERAP2 (IC₅₀ = 80 nM) όπως και για την IRAP (IC₅₀ = 57 nM). Επίσης, αποδείχτηκε ικανός να μεταβάλλει την αντιγονοπαρουσίαση [60, 92, 93], αλλά και να πυροδοτεί κυτταροτοξικές αποκρίσεις σε σειρές καρκινικών κυττάρων [60].



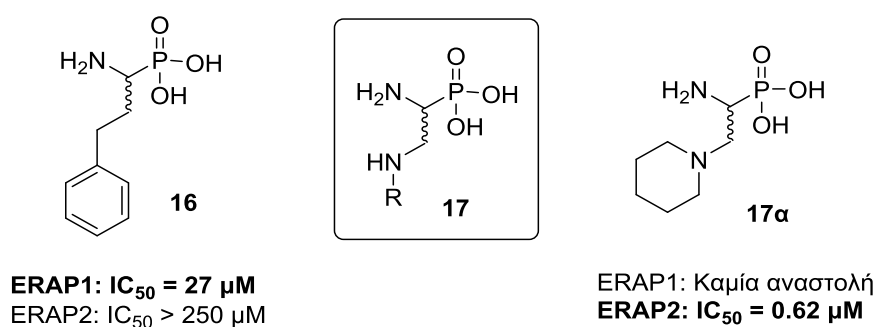
Εικόνα 15: Δομή και ανασταλτική δράση του DG013A

Αργότερα, ο Mucha και οι συνεργάτες του, πραγματοποίησαν αξιολόγηση έναντι των ERAP1/2 μια βιβλιοθήκη μείγματος διαστεροϊσομερών φωσφινικών διπεπτιδίων τα οποία είχαν αναπτυχθεί ως αναστολείς των APN στο παρελθόν (Εικόνα 16) [94]. Από αυτήν την μελέτη το φωσφινικό παράγωγο **15a** εμφάνισε υψηλότερη συγγένεια για την ERAP1 (K_i=3.73 μM) σε σχέση με την ERAP2 (K_i= >250 μM), δείχνοντας πως η παρουσία της αμινομάδας έχει αρνητική επίδραση στην αναστολή της ERAP2, ενώ η ERAP1 δεν επηρεάζεται σημαντικά (όπως διαπιστώνεται από την σύγκριση της ανασταλτικής ισχύος των **15a** και **15β**, οι οποίοι παρουσιάζουν αντίστροφη εκλεκτικότητα ως προς τις ERAP1 και ERAP2).



Εικόνα 16: Ανασταλτική δράση των φωσφινικών διπεπτιδίων 15α και 15β

Επίσης, ο Mucha και οι συνεργάτες του έχουν διερευνήσει μια σειρά ρακεμικών αμινοφωσφονικών παραγώγων, απουσία του τμήματος P' που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε σημαντικά συμπεράσματα σε σχέση με την μελέτη SAR των αλληλεπιδράσεων P1/S1 (Εικόνα 17) [94]. Αν και γενικά προέκυψαν αναστολείς χαμηλής ισχύος, η εισαγωγή μιας επιπλέον αμινομάδας στην β-θέση τους προκάλεσε αλλαγή στην εκλεκτικότητα. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση **16** είναι ένας μέτριος αναστολέας για την ERAP1, αλλά ανενεργή για την ERAP2. Αντιθέτως, οι ενώσεις τύπου **17** αποδείχτηκαν ανενεργές για την ERAP1, με το ανάλογο πιπεριδίνης **17α** να αποδεικνύεται το πιο ισχυρό για την ERAP2 σε αυτή την σειρά. Κατά συνέπεια, η αδυναμία της ERAP1 να φιλοξενήσει αμινομάδες στον S1 θύλακά της είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που θα πρέπει να ληφθεί υπόψη στις προσπάθειες ανάπτυξης ισχυρών αναστολέων της ERAP1.

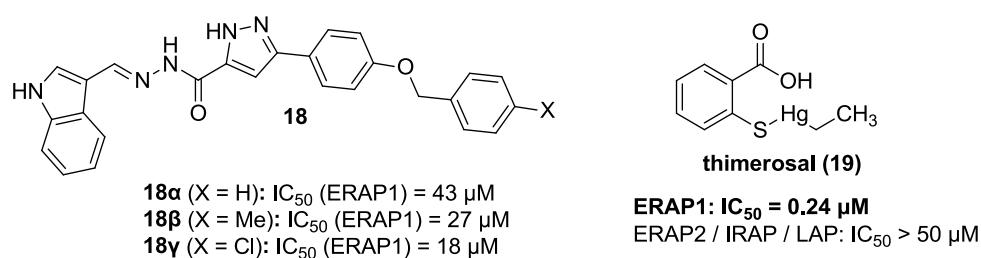


Εικόνα 17: Ανασταλτική δράση των αμινοφωσφινικών παραγώγων 16 και 17α

2.2.3 Άλλες στρατηγικές εύρεσης αναστολέων

Άλλες «στρατηγικές», εκτός από την προσέγγιση ορθολογικού σχεδιασμού, είναι η εικονική σάρωση βιβλιοθηκών χημικών ενώσεων ή σάρωση υψηλής απόδοσης, που μπορούν να οδηγήσουν σε ενδιαφέροντα αποτελέσματα γρηγορότερα και

ίσως πιο αποτελεσματικά. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί η εικονική σάρωση βάσεων δεδομένων φαρμακευτικών ενώσεων που είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη αναστολέων μέτριας ισχύος για την ERAP1 βασισμένοι στον (*E*)-*N*-[(1*H*-ινδολ-3-υλο)μεθυλενο]-1*H*-πυραζολο-5-καρβοξυ-υδραζιδικό σκελετό (δομές τύπου **18**, Εικόνα 18) [95]. Επιπλέον, ένας γνωστός φαρμακευτικός παράγοντας που χρησιμοποιούταν για καιρό ως συντηρητικό εμβολίων, η θυμεροσάλη (**19**), σε μια στοχευμένη λειτουργική σάρωση για καινοτόμες ομάδες δέσμευσης Zn αποδείχτηκε ισχυρός αναστολέας για την ERAP1 ($IC_{50}=240$ nM) και ανενεργή για την ERAP2, IRAP και LAP μέχρι συγκέντρωσης 50 μ M αναστολέα (Εικόνα **18**) [95]. Υπεύθυνη για αυτήν την εντυπωσιακή προτίμηση της θυμεροσάλης προς την ERAP1 προτάθηκε πως είναι η σύμπλεξη του ατόμου Hg(II) με τις υδροξυλομάδες δυο μη συντηρημένων κατάλοιπων σερίνης (Ser869 και Ser316) της ERAP1 αν και άλλοι μη εξειδικευμένοι μηχανισμοί είναι πιθανοί, αλλά δεν έχουν διερευνηθεί ακόμα.



Εικόνα 18: Ανασταλτική δράση των παραγώγων τύπου 18 και της θυμεροσάλης 19

2.3 Εκλεκτικότητα αναστολέων

Η κλινική ανάπτυξη των ενζυμικών αναστολέων απαιτεί την βελτιστοποίηση και της ισχύος αλλά και της εκλεκτικότητας. Βάσει των παραπάνω φαίνεται πως αν και για τις ERAP1 και ERAP2 έχει επιτευχθεί σε αρκετές περιπτώσεις αναστολή αυξημένης ισχύος εντούτοις η εκλεκτικότητα έχει αποδειχθεί πιο απαιτητική κυρίως λόγω της μεγάλης ομολογίας μεταξύ των ενζύμων [67]. Οι περισσότερες μελέτες εκλεκτικότητας αναστολέων των ERAP1 και ERAP2 περιορίζονται σε ομόλογες αμινοπεπτιδάσες της ίδιας υποοικογένειας, οι οποίες αναμένεται να είναι οι πιο πιθανοί ανεπιθύμητοι στόχοι [76, 94]. Όμως, υπάρχει και η αναγκαιότητα της εκλεκτικότητας έναντι αμινοπεπτιδασών εντός της ευρύτερης οικογένειας M1 αμινοπεπτιδασών που είναι εξίσου σημαντική, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε

παρενέργειες που μπορεί να επηρεάσουν την αντιγονοπαρουσίαση αλλά και άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

Απαραίτητη είναι και η ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων για τα ένζυμα ERAP1 και ERAP2 έναντι του ομόλογου ενζύμου IRAP. Όπως προαναφέρθηκε η IRAP συμμετέχει στην αντιγονοπαρουσίαση και πιο συγκεκριμένα στη διασταυρούμενη παρουσίαση στα δενδριτικά κύτταρα [21, 96], αλλά και σε άλλες σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, όπως στη ρύθμιση της διακίνησης των μεταφορέων γλυκόζης τύπου 4, στον έλεγχο των επιπέδων ωκυτοκίνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης καθώς και στη ρύθμιση των επιπέδων ωκυτοκίνης και βαζοπρεσίνης στον εγκέφαλο [22]. Συμπερασματικά, με σκοπό την αποφυγή των παρενεργειών και την κλινική εφαρμογή των αναστολέων των ERAP1 και ERAP2, είναι αναγκαίο αυτοί να έχουν υψηλή εκλεκτικότητα για τις ERAP1 και ERAP2 έναντι της IRAP.

Οι ομοιότητες στη δομή και στη λειτουργία των τριών ενζύμων καθιστούν δύσκολη την επίτευξη των παραπάνω, καθώς οι περισσότεροι αναστολείς της ERAP1 στη βιβλιογραφία δεν είναι εκλεκτικοί έναντι της IRAP [76, 97], αν και το ανάποδο είναι εύκολα εφικτό και πολλοί από τους δημοσιευμένους αναστολείς της IRAP δεν στοχεύουν την ERAP1 [80, 81]. Αυτό συμβαίνει, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, λόγω της μοναδικής πλαστικότητας του ενεργού κέντρου της IRAP το οποίο αναδιοργανώνεται γύρω από τους προσδεδεμένους αναστολείς [98]. Συμπερασματικά, επιπρόσθετες βελτιστοποιήσεις SAR είναι απαραίτητες ώστε να σχεδιαστούν αναστολείς που θα ξεπερνούν αυτόν τον πιθανό περιορισμό.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι ERAP1, ERAP2 και IRAP αποτελούν τρεις ομόλογες αμινοπεπτιδάσες Zn που συνιστούν την υποοικογένεια των ωκυτοκινασών, της οικογένειας των M1 αμινοπεπτιδασών του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι ασυνήθιστες ιδιότητες αυτών των ενζύμων, τους επιτρέπουν να διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αποτελεσματική παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων και συνεπώς έμμεσα να ρυθμίζουν την ανθρώπινη επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Τα τρία αυτά ένζυμα έχουν αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως ελκυστικοί στόχοι για την ανοσοθεραπεία του καρκίνου και τον έλεγχο των αυτοάνοσων αντιδράσεων, τροφοδοτώντας το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων τους [67, 99].

Οι φωσφινικοί αναστολείς είναι από τις ελάχιστες περιπτώσεις αναστολέων που μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλό βαθμό εξειδίκευσης για το ένζυμο-στόχο κάτι που έχει αποδειχθεί στο παρελθόν σε αρκετά απαιτητικές περιπτώσεις [100, 101]. Από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εργασίας [102], έχουν αναπτυχθεί μια σειρά φωσφινικού τύπου ψευδοτριπεπτιδικών αναλόγων μεταβατικής κατάστασης ως αναστολείς των αμινοπεπτιδασών ERAP, για την μελέτη των σχέσεων δομής-δραστικότητας της P₂' θέσης τους. Από τη μελέτη αυτής της σειράς αναστολέων προέκυψε η ένωση **DG013A**, όπως προαναφέρθηκε (Παράγραφος 2.2.2.2, Εικόνα 15), ο οποίος έως σήμερα είναι ο πιο ισχυρός αναστολέας (με IC₅₀ της τάξης των nM) των ERAP που έχει αναφερθεί, χωρίς όμως να εμφανίζει εκλεκτικότητα μεταξύ των ωκυτοκινασών. Η πρωτοπορία αυτή δημιουργεί ελπίδες ότι περαιτέρω έρευνα στην

βελτιστοποίηση ανάλογων δομών με το **DG013A**, μπορεί να οδηγήσει στον απώτερο στόχο, δηλαδή την εκλεκτική στόχευση των ERAP1, ERAP2 και IRAP.

Η εργασία, λοιπόν, που ακολουθεί αφορά στη διερεύνηση της δυνατότητας φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδικών ενώσεων, να οδηγήσουν σε βελτιωμένους αναστολείς όσον αφορά στην εκλεκτικότητα, έχοντας την ένωση **DG013A** ως σημείο εκκίνησης για περαιτέρω βελτιστοποίηση. Βασικό στόχο θα αποτελέσει ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η διερεύνηση των σχέσεων δομής-δραστικότητας φωσφινικών τριπεπτιδικών αναστολέων των αμινοπεπτιδασών του Ενδοπλασματικού Δικτύου αλλά και η κατανόηση της μοριακής βάσης της αναστολής τους, όπου είναι δυνατόν με μελέτες docking ή και με κρυσταλλογραφικές μελέτες. Συγκεκριμένα, το πειραματικό μέρος που ακολουθεί μπορεί να χωριστεί σε δύο βασικά μέρη:

- Στο πρώτο μέρος περιγράφεται ο σχεδιασμός και η συνθετική μεθοδολογία για τη σύνθεση φωσφινικών ψευδοπεπτιδικών αναστολέων με στόχο την διερεύνηση της σημασίας των P_1' - S_1' αλληλεπιδράσεων στην ισχύ και ταυτόχρονη εκλεκτικότητα για τις ERAP1, ERAP2 και IRAP, μίας κατηγορίας ενζύμων που τα χαρακτηριστικά τους και η λειτουργία τους αναλύθηκε στο κεφάλαιο 1. Ο σχεδιασμός αυτών των αναστολέων βασίζεται στην τροποποίηση της θέσης P_1' της πρότυπης ένωσης **DG013A**, ώστε να βρεθούν τα βέλτιστα δομικά χαρακτηριστικά για τη βελτίωση του προφίλ εκλεκτικότητάς τους έναντι των υπό μελέτη αμινοπεπτιδασών. Επιπλέον παρατίθενται τα αποτελέσματα της ενζυμικής αποτίμησης όλων των υποψήφιων αναστολέων έναντι των ERAP, η οποία πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο του Ερευνητή Α' Ευστράτιου Στρατίκου στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», και από τα οποία εξάγονται σημαντικές πληροφορίες για τις δομικές απαιτήσεις της S_1' κοιλότητας των ενζύμων αυτών.

- Στο δεύτερο μέρος επιχειρείται η διαφοροποίηση της P_1 θέσης φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων, απουσία ανάλογων βιβλιογραφικών μελετών, μέσω της ανάπτυξης ενός νέου συνθετικού πρωτοκόλλου για τη δημιουργία δεσμού C-P, που αφορά στην αμιδοαλκυλίωση *H*-φωσφινικών οξέων από *N*-Boc-αμινάλες. Επίσης, πραγματοποιείται η αξιολόγηση της ευρύτητας της νέας συνθετικής μεθόδου με τη σύνθεση ποικιλίας υποστρωμάτων, και διατυπώνεται μια νέα μηχανιστική υπόθεση που περιλαμβάνει την καταλυόμενη μέσω

$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ταυτομερίωση των κυκλικών ανυδριτών *H*-φωσφινικών διοξέων. Τέλος, πραγματοποιείται η ενζυμική αξιολόγηση, μετά από αποπροστασία, όλων των φωσφινικών διπεπτιδίων που συντέθησαν έναντι των ERAPs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΠΕΠΤΙΔΑΣΩΝ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Οι ERAPs αποτελούν τρεις ομόλογες αμινοπεπτιδάσες ψευδαργύρου που εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι αμινοπεπτιδάσες αυτές είναι οι κεντρικοί ρυθμιστές της δομικής ταυτότητας (μήκος, αλληλουχία) των αντιγονικών πεπτιδίων και ρυθμίζουν σε σημαντικό βαθμό τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης *in vivo* [103, 104]. Η ενζυμική δραστηριότητά τους και το επίπεδο έκφρασής τους, συχνά έχει αποδειχθεί να επηρεάζεται από την υψηλή πολυμορφικότητά τους και έχει συνδεθεί με προδιάθεση για αυτοάνοσες διαταραχές, ιικές μολύνσεις, καρκίνο και υπέρταση [68]. Τα παραπάνω μαζί με πληθώρα μελετών έχουν συμβάλλει στην ανάδειξη της φαρμακολογικής ρύθμισης της δραστηριότητάς τους ως πιθανή ανοσοθεραπευτική προσέγγιση για ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών [36].

Η μικρή όμως πρόοδος στον τομέα ανάπτυξης αναστολέων αυτών των ενζύμων αναδεικνύει τις δυσκολίες που περιλαμβάνει ο σχεδιασμός ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων, κυρίως λόγω της μεγάλης ομολογίας μεταξύ των τριών ενζύμων [60, 67]. Αναλυτική περιγραφή των ERAPs και των αναστολέων τους έχει προηγηθεί στο Κεφάλαιο 2.

Όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2, σε αντίθεση με τους αναστολείς υδροξαμικού, καρβοξυλικού ή θειολικού τύπου, τα φωσφινικά ψευδοπεπτιδία φαίνεται ότι διαθέτουν εκείνα τα δομικά χαρακτηριστικά που τους καθιστούν ιδανικούς υποψήφιους για την ανάπτυξη αποτελεσματικών, αλλά και εκλεκτικών αναστολέων των ERAP1/ERAP2/IRAP. Συγκεκριμένα, αποτελούν άριστους μιμητές της δομής του υποστρώματος στη μεταβατική κατάσταση, ενώ, επιπλέον, σε σύγκριση με άλλες συμπλεκτικές ομάδες Zn, η ασθενής συμπλεκτική ικανότητα της φωσφινικής ομάδας επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ μεταλλοπρωτεΐναισών ψευδαργύρου με υψηλή δομική και λειτουργική ομολογία, όπως έχει συμβεί επιτυχώς στο παρελθόν [85, 101]. Αυτή η ιδιότητα δίνει τη δυνατότητα με προσεκτική ρύθμιση των πλευρικών ομάδων του αναστολέα να επιτευχθεί υψηλή συγγένεια με ένα μόνο ένζυμο και συνεπώς υψηλή εκλεκτικότητα.

Η προσέγγιση εκλεκτικών αναστολέων των ωκυτοκινασών αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο ερευνητικό στόχο, και μπορεί να γίνει με την αξιοποίηση δομικών διαφορών των θυλάκων εξειδίκευσης των ενζύμων, οι οποίες θα επιτρέψουν την αύξηση της ενζυμικής συγγένειας του αναστολέα για ένα από τα ένζυμα, εφόσον ο αναστολέας αυτός έχει ενσωματωμένο στη δομή του ένα στοιχείο που θα δημιουργεί ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις μόνο με ένα από τα 3 ένζυμα. Επιπλέον, απαραίτητη είναι και η ανάπτυξη στερεοχημικά καθορισμένων φωσφινικών πεπτιδίων, καθώς υπάρχει διαφορά στην ανασταλτική δράση μεταξύ διαστερεοϊσομερών.

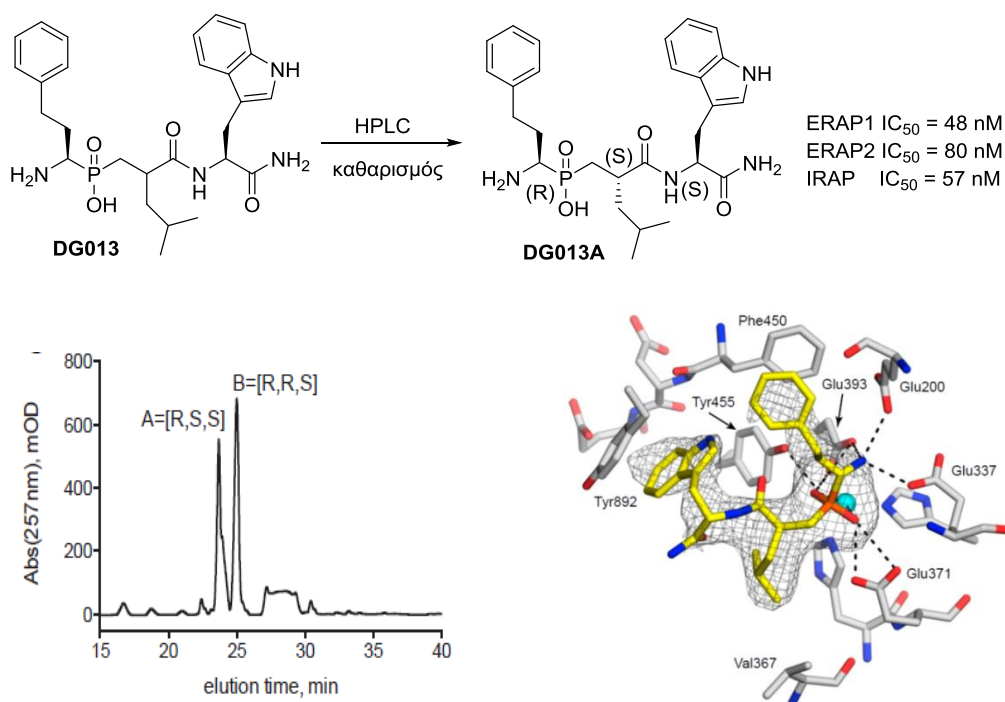
Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο σχεδιασμός, η παραγωγή ποικιλίας στερεοχημικά καθορισμένων φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδικών ενώσεων διαφοροποιημένων στη θέση P₁' , με χρήση συνθετικών μεθόδων διαφοροποίησης τελικού σταδίου, καθώς και η εκτίμηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι των ERAP1/ ERAP2/IRAP. Από τη μελέτη αυτή εξάγονται χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση του συνολικού σχήματος των υποκαταστατών της θέσης αυτής στο προφίλ εκλεκτικότητας των υποψήφιων αναστολέων, δείχνοντας ότι αυτή η κατηγορία ενώσεων μπορεί να είναι χρήσιμη για τη στοχευμένη ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων και ενθαρρύνουν την προκλινική αξιολόγησή τους για εφαρμογές για την ανοσοθεραπεία καρκίνου ή τον έλεγχο της αυτοανοσίας.

3.2 Προηγούμενες μελέτες ανάπτυξης αναστολέων φωσφινικού τύπου των ERAP

Στις πρώτες ερευνητικές προσπάθειες του εργαστηρίου μας για την εύρεση αναστολέων φωσφινικού τύπου των ERAP, πραγματοποιήθηκε ο ορθολογικός σχεδιασμός της δομής του φωσφινικού αναστολέα **DG013** (Εικόνα 19) με βάση τις κρυσταλλικές δομές και μελέτες εξειδίκευσης υποστρώματος για τα ένζυμα ERAP1 και ERAP2 που μας παρείχαν σημαντικές πληροφορίες για τους θύλακες εξειδίκευσής τους [97]. Συγκεκριμένα, το **DG013** συντέθηκε χρησιμοποιώντας ένα τυπικό πρωτόκολλο στην πεπτιδική χημεία σε στερεά φάση, με χρήση Rink ρητίνης ως μίγμα 2 διαστερεοϊσομερών [105]. Ακολούθησε ο HPLC καθαρισμός του με χρήση RP-HPLC η οποία κατέστησε δυνατό τον διαχωρισμό και την απομόνωση των δύο διαστερεοϊσομερών του ψευδοτριπεπτιδίου. Μόνο το πρώτο εκλούόμενο ισομερές (**DG013A**) το οποίο αντιστοιχούσε στην στερεοχημεία

[R,S,S] [90], βρέθηκε πως δρα ως ισχυρός αναστολέας των ERAP1, ERAP2 και IRAP, αφού παρουσίασε διαφορά 2-3 τάξεων μεγέθους στην αναστολή τους σε σχέση με το δεύτερο εκλουόμενο ισομερές [**DG013B** (ERAP1: IC₅₀ = 3600 nM, ERAP2: IC₅₀ = 1700 nM, IRAP: IC₅₀ = 2200 nM)] [97] (Εικόνα 19).

Από μετρήσεις του βαθμού αντιγονοπαρουσίασης σε κύτταρα HeLa και σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου μύς (CT26), που διενεργήθηκαν στο πανεπιστήμιο του Southampton από το εργαστήριο των Edward James και Emma Reeves, διαπιστώθηκε ότι ο αναστολέας **DG013A** επάγει αυξημένη αντιγονοπαρουσίαση εξωγενών και ενδογενών αντιγόνων στην κυτταρική επιφάνεια και ενισχύει την κυτοτοξική απόκριση Τ-κυττάρων, δείχνοντας ότι αυτές οι ενώσεις είναι πολλά υποσχόμενες για φαρμακευτικές εφαρμογές. Επίσης, στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάστηκε η κρυσταλλική δομή της ERAP2 σε σύμπλοκο με το **DG013A**, η οποία επιβεβαίωσε τη στερεοχημεία του [R,S,S], και έδειξε πως σημαντικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την κοιλότητα S₂' είναι υπεύθυνες για την ισχύ αναστολής (Εικόνα 19) αναδεικνύοντας τη σημασία της S₂' κοιλότητας για την επίτευξη ανασταλτικής ισχύος.

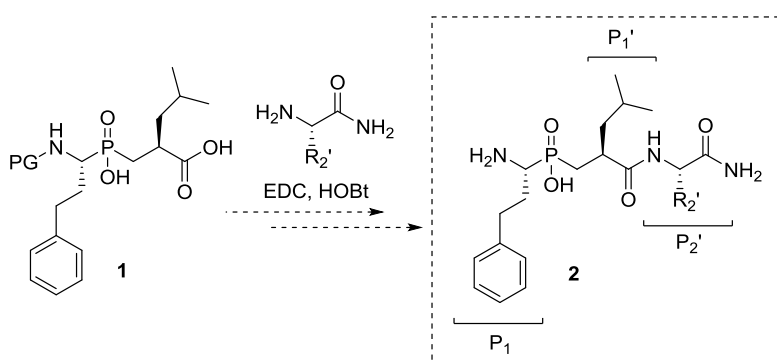


Εικόνα 19: HPLC χρωματογράφημα της ένωσης **DG013** και κρυσταλλική δομή του ERAP2 με το **DG013A**

Παρά όμως την ισχυρή του δράση, ο **DG013A** δεν εμφάνισε εκλεκτικότητα μεταξύ των ωκυτοκινασών (Εικόνα 19). Για τον λόγο αυτό, ο ψευδοτριπεπτιδικός σκελετός

του **DG013A**, αποτελεί ιδανική πρότυπη δομή (Εικόνα 19) για τη μελέτη των σχέσεων δομής-δραστικότητας (SAR) των τριών πλησιέστερων θυλάκων στο ιόν Zn(II), δηλαδή των S_1 , S_1' και S_2' με στόχο τη βελτιστοποίηση της ανασταλτικής ισχύος και της εκλεκτικότητας.

Προκαταρκτικά αποτελέσματα που προέκυψαν στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εργασίας περιγράφουν για πρώτη φορά μια SAR μελέτη στερεοχημικά καθορισμένων φωσφινικών τριπεπτιδίων με τη γενική δομή **2** (Εικόνα 20), η οποία ανέδειξε αρκετούς παράγοντες καθοριστικής σημασίας για την αποτελεσματική αναστολή των ERAP1/ERAP2/IRAP [102]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση 10 φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων τύπου **2** με ποικίλες αλυσίδες φυσικών αμινοξέων στη θέση P_2' (Εικόνα 20), διατηρώντας την φαινυλοαιθυλομάδα και την ομάδα της λευκίνης του **DG013A** στις θέσεις P_1 και P_1' αντίστοιχα, και ακολούθησε η μελέτη της επίδρασής τους στο προφίλ αναστολής των ενζύμων. Η σύνθεση των δομών **2** πραγματοποιήθηκε μέσω πεπτιδικής σύζευξης της στερεοχημικά καθαρής φωσφινικής δομής **1** με φυσικά αμινοξέα, η οποία παρελήφθη μετά από διαχωρισμό των διαστερεοϊσομερών της μέσω της μεθόδου των εκλεκτικών κρυσταλλώσεων. Αν και συνθετικά απαιτητική, η στερεοχημική καθαρότητα των υποψήφιων μορίων τύπου **2** τέθηκε ως απόλυτη προτεραιότητα για τη λήψη ασφαλών συμπερασμάτων από αυτήν την προκαταρκτική μελέτη SAR, τα αποτελέσματα της οποίας θα παρουσιαστούν στο τέλος του κεφαλαίου.



Εικόνα 20: Μέθοδος σύνθεσης των φωσφινικών τριπεπτιδίων τύπου 2 για την διερεύνηση της θέσης P_2'

Η σύνθεση στερεοχημικά καθορισμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών ενώσεων έχει μεγάλη σημασία, καθώς οι συγκεκριμένες ενώσεις βρίσκουν πολλές εφαρμογές ως αναστολείς ενζύμων, όπου η καθορισμένη στερεοχημική απεικόνιση είναι συνυφασμένη με τη βιολογική δράση και κατ' επέκταση με τη

χρήση τους ως φαρμακευτικών εργαλείων [106]. Πρόσφατα, αναδείχθηκε η μεγάλη διαφορά στην εκλεκτικότητα διαφορετικών διαστερεοϊσομερών στην περίπτωση των φωσφινικών τριπεπτιδικών αναστολέων της νεπριλυσίνης (NEP) και του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης (ECE). Αξιόλογο παράδειγμα από αυτήν τη μελέτη είναι η ανάπτυξη ενός εκλεκτικού μικτού αναστολέα του C-ενεργού κέντρου του ACE και της (ECE) που δεν αναστέλλει τη NEP και το N-ενεργό κέντρο του ACE, με σκοπό τη ρύθμιση της συγκέντρωσης των δύο περισσότερο αγγειοσυσταλτικών πεπτιδίων στο πλάσμα, της αγγειοτενσίνης II και της ενδοθηλίνης I [107]. Κλειδί στην εκλεκτικότητα αυτή αποτέλεσε η ασυνήθιστη, «μη φυσική» στερεοχημεία στη θέση P₁'.

Αξίζει να αναφερθεί πως απουσία κάποιας αξιόπιστης, γενικής μεθόδου ελέγχου της στερεοχημείας φωσφινικών διπεπτιδίων κατά τη σύνθεσή τους, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν φωσφινικούς ψευδοπεπτιδικούς αναστολείς αμινοπεπτιδασών Zn, περιλαμβάνουν εκτίμηση των διαστερεοϊσομερικών τους μιγμάτων [71], με μερικές μόνο εξαιρέσεις [90, 108]. Σε μία μόνο σχετική συστηματική μελέτη, έγινε εκτίμηση της δράσης στερεοχημικά καθαρών φωσφινικών τριπεπτιδίων, τα οποία όμως απομονώθηκαν, σε χαμηλές αποδόσεις, μέσω RP-HPLC από τα τελικά διαστερεοϊσομερικά μίγματα των αναστολέων [90].

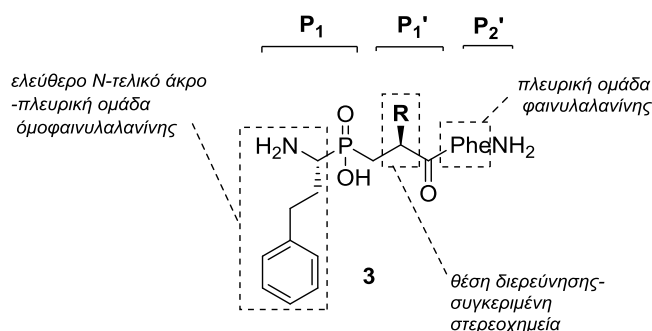
Στην περίπτωσή μας, λαμβάνοντας υπόψη την 2-3 τάξεων μεγέθους διαφορά συγγένειας μεταξύ των δύο διαφορετικών διαστερεοϊσομερών της ένωσης **DG013** [97] και με στόχο την εξάλειψη πιθανών ανακρίβειών κατά την τελική ανάλυση SAR, σχεδιάσαμε κατάλληλα προσαρμοσμένα συνθετικά πλάνα για τον έλεγχο της στερεοχημικής καθαρότητας και ταυτότητας των τελικών ενώσεων. Οι περισσότεροι από τους αναστολείς που θα παρουσιαστούν παρακάτω διαχωρίστηκαν στα διαστερεοϊσομερή τους, απευθείας κατά την σύνθεση, με τη χρήση προσεγγίσεων διαφοροποίησης σε τελικό στάδιο.

3.3 Διερεύνηση της θέσης P₁'

3.3.1 Σχεδιασμός των υποψήφιων αναστολέων 4 και 5

Μετά από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της ανάλυσης SAR της P₂' θέσης, που ελήφθησαν σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, επόμενο βήμα, για την εύρεση εκλεκτικών αναστολέων των ωκυτοκινασών, ήταν ο σχεδιασμός

και η σύνθεση ποικιλίας ενώσεων διαφοροποιημένων στη θέση P_1' , ώστε τελικά να εξαχθούν οι κρίσιμες σχέσεις δομής-δραστικότητας τους (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Γενική δομή **3** των φωσφινικών τριπεπτιδίων για τη διερεύνηση της θέσης P_1'

Συγκεκριμένα, τα φωσφινικά ψευδοτριπεπτιδία που σχεδιάστηκαν για την διερεύνηση της θέσης P_1' , έχουν την γενική δομή **3** του Σχήματος 1, όπου η λογική επιλογής των δομικών στοιχείων που έφεραν αναλύονται παρακάτω.

1) Αρχικά, ο πλήρης καθορισμός των στερεογονικών κέντρων των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων (δομή **3**, Σχήμα 1) τέθηκε ως προτεραιότητα, αν και οι συνθετικές οδοί για την επίτευξη του στόχου αυτού είναι πολύ περιορισμένες [83]. Αυτή η απαίτηση μπορεί να είναι κρίσιμη για τη λήψη ασφαλών συμπερασμάτων από την μελέτη SAR, αλλά και για την ανακάλυψη βελτιωμένων αναστολέων, ειδικά όσον αφορά την εκλεκτικότητά τους.

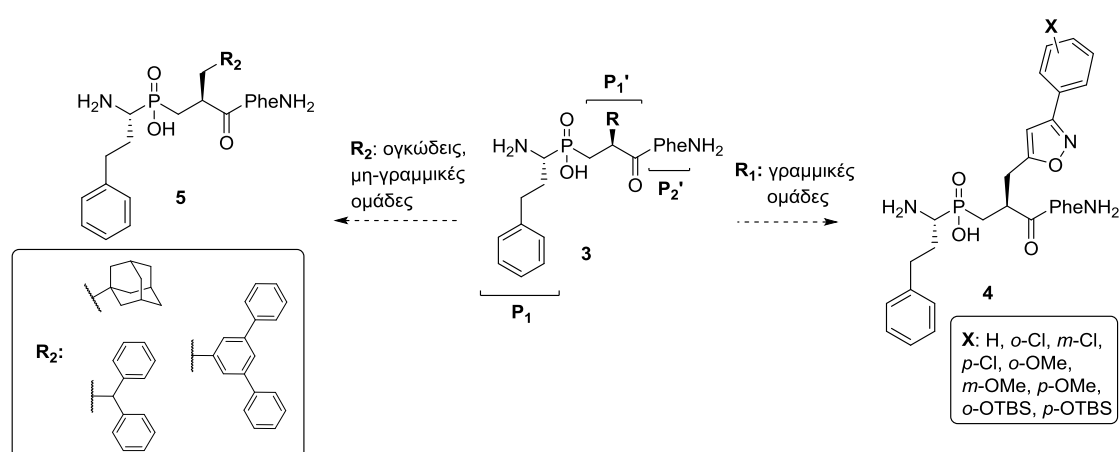
2) Επιπλέον, οι υποψήφιοι αναστολείς επιλέχθηκε να έχουν ελεύθερο N-τελικό άκρο, ένα δομικό στοιχείο που μπορεί να αναγνωριστεί από τις αμινοπεπτιδάσες (δομή **3**, Σχήμα 1), και όπως έχει διαπιστωθεί και από την κρυσταλλική δομή του ενζύμου ERAP2 με τον αναστολέα **DG013A**, μπορεί να σταθεροποιηθεί, μέσω δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu200, Glu337 και Glu393 της S_1 κοιλότητας του ενζύμου [97].

3) Στη θέση P_1 διατηρήθηκε η φαινυλοαιθυλομάδα της δομής του αναστολέα **DG013A** (δομή **3**, Σχήμα 1), καθώς και τα τρία ένζυμα την αναγνώρισαν επιτυχώς σε μελέτες εξειδίκευσης υποστρωμάτων για τον S_1 θύλακά τους [60], και επιπλέον μελέτες προσομοίωσης και κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι μπορεί εύκολα να φιλοξενηθεί στην S_1 κοιλότητα.

4) Για τη θέση P_2' επιλέχθηκε η (*L*-Phe) (Σχήμα 1) η επιλογή της οποίας βασίζεται στα προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης σχέσεων δομής-δραστικότητας [102] τα οποία θα περιγραφούν στο τέλος του κεφαλαίου. Πρέπει

να σημειωθεί ότι δεν έγινε η επιλογή της βέλτιστης ομάδας (*L*-Trp) της ένωσης **DG013A**, λόγω της αυξημένης τάσης του ινδολίου της θρυπτοφάνης να προσδένεται στην αλβουμίνη του ορού [109]. Τέλος, για το C-τελικό άκρο τους επιλέχθηκε ένα ελεύθερο αμιδίο, ώστε στη θέση αυτή να αναγνωρίζεται ο αμιδικός δεσμός από το ένζυμο.

Όσον αφορά τη διαφοροποίηση της θέσης P_1' , προκειμένου να γίνει η λεπτομερής διερεύνηση του βάθους της κοιλότητας εξειδίκευσης S_1' , οι ενώσεις που αποτέλεσαν τον πρώτο συνθετικό μας στόχο είναι αυτές με τη δομή **4** (Σχήμα 2). Συγκεκριμένα, αυτές θα φέρουν ποικίλες γραμμικές, ισοξαζολυλο-αλυσίδες στη θέση P_1' , για την εύρεση πιθανών δομικών διαφορών της κοιλότητας αυτής μεταξύ των ERAP, που μπορεί να παίξει ρόλο στην εξειδίκευση της δράσης των αναστολέων και την επίτευξη της εκλεκτικότητας. Αυτού του είδους η διαφοροποίηση της P_1' θέσης των αναστολέων θα μπορούσε να οδηγήσει σε κατάληψη της S_1' κοιλότητας ενός εκ των ενζύμων, κατά τρόπο που να επιτρέπονται αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κοιλότητας αυτής που δε θα μπορούσαν να προκύψουν από αναστολείς με μικρότερου μήκους αλυσίδες στην συγκεκριμένη θέση. Επιπλέον, για τη διερεύνηση της έκτασης της κοιλότητας εξειδίκευσης S_1' των αμινοπεπτιδασών-στόχων οι ενώσεις που αποτέλεσαν τον δεύτερο συνθετικό μας στόχο είναι αυτές με τη δομή **5** (Σχήμα 2), οι οποίες στη θέση P_1' έφεραν ογκώδεις, μη γραμμικές πλευρικές αλυσίδες, ενώ στη θέση P_2' έφεραν την (*L*-Phe).

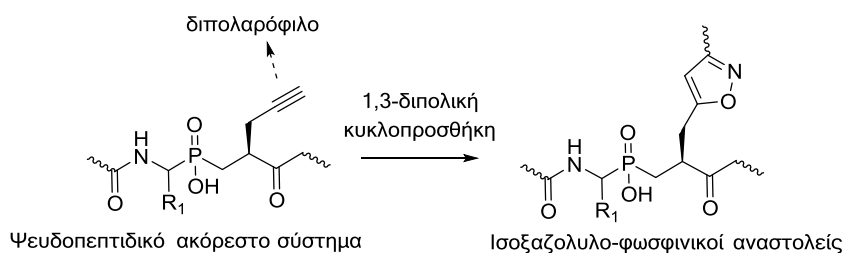


Σχήμα 2: Σχεδιασμός των τριπεπτιδικών δομών **4** και **5** για τη διερεύνηση της θέσης P_1'

3.4 Σύνθεση των ισοξαζολυλο-φωσφινικών τριπεπτιδίων

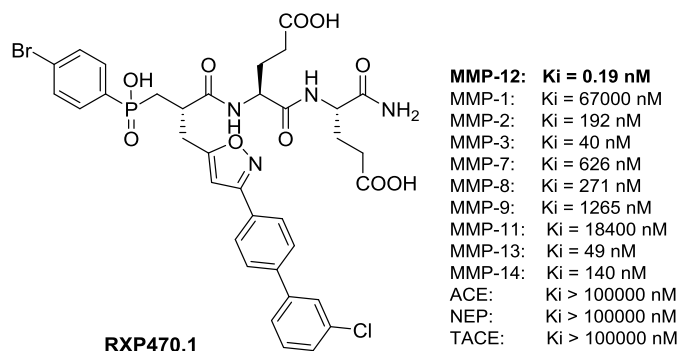
3.4.1 Μεθοδολογία

Για να γίνει η διερεύνηση των σχέσεων δομής-δραστικότητας της θέσης P₁' με τη μέγιστη δυνατή ευελιξία, η σύνθεσή μας θα έπρεπε να βασίζεται στις αρχές διαφοροποίησης σε τελικό στάδιο. Έτσι, για τη σύνθεση των ισοξαζολυλο-αναστολέων τύπου 4 του Σχήματος 2 έγινε χρήση ενός καλά μελετημένου πρωτόκολλου διαφοροποίησης σε τελικό στάδιο, που αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 2003 από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Με την χρήση αυτού του συνθετικού πρωτοκόλλου, κατέστη εφικτή η εισαγωγή ετεροκυκλικών δακτυλίων και συγκεκριμένα ισοξαζολικών δακτυλίων στην P₁' θέση ενός στερεοχημικά καθορισμένου φωσφινικού μορίου-κορμού [110], με εφαρμογή μίας αντίδρασης 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης (1,3-DCRs) οξειδίων νιτριλίου (1,3-δίπολα) σε ένα κατάλληλο ψευδοπεπτιδικό ακόρεστο σύστημα (διπολαρόφιλο) (Σχήμα 3).



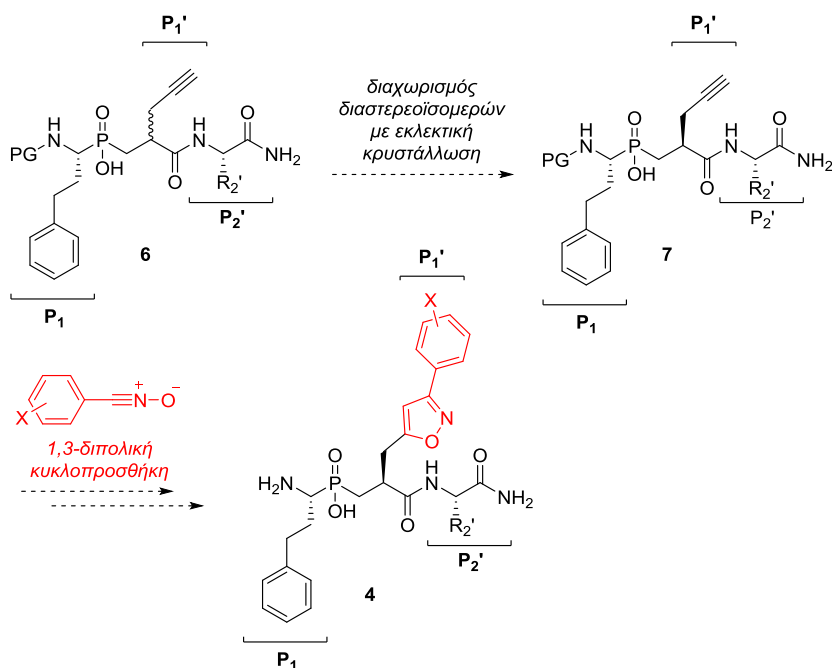
Σχήμα 3: Αντίδραση διπολικής κυκλοπροσθήκης με οξείδια του νιτριλίου σε ένα ψευδοπεπτιδικό ακόρεστο σύστημα

Η στρατηγική αυτή διαφοροποίησης της P₁' θέσης με ισοξαζολικούς δακτυλίους έχει δώσει πρόσβαση στο παρελθόν στην ανάπτυξη αναστολέων μεταλλοπρωτεασών ψευδαργύρου, όπως οι MMPs [107, 111, 112, 113, 114], όχι όμως αμινοπεπτιδασών ψευδαργύρου. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η ανάπτυξη της ένωσης **RXP470.1** (Εικόνα 21) η οποία είναι ένας από τους πρώτους ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της MMP-12 και η οποία δεν αναστέλλει άλλες πρωτεάσες, όπως τις TACE, ACE και NEP.



Εικόνα 21: Δομή και ανασταλτική δράση του φωσφινικού αναστολέα RXP470.1

Για τον σχηματισμό των υποψήφιων αναστολέων **4**, ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφεται στο Σχήμα 4, όπου απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η σύνθεση ενός στερεοχημικά καθορισμένου πρόδρομου μορίου, που θα λειτουργούσε ως διπολαρόφιλο, όπως είναι το τριπεπτιδίο **7**.

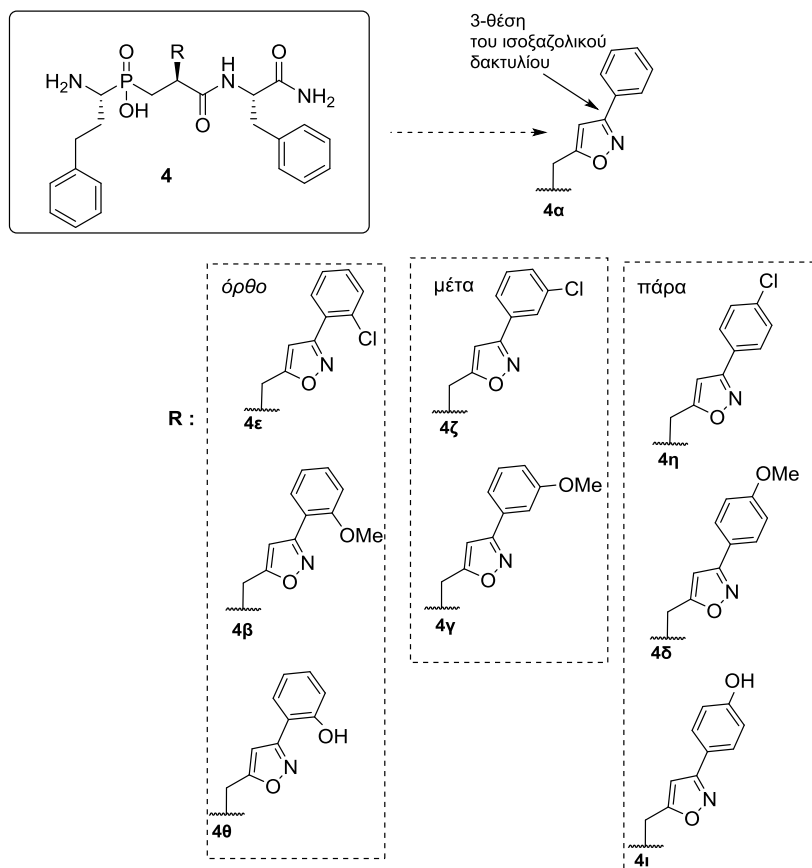


Σχήμα 4: Μεθοδολογία διερεύνησης της θέσης P₁' φωσφινικών τριπεπτιδίων.

Πιο συγκεκριμένα, επιχειρήθηκε η διερεύνηση της δυνατότητας διαχωρισμού των διαστερεοϊσομερών της ένωσης **6**, προς τον σχηματισμό της ένωσης **7**, μέσω της μεθόδου της εκλεκτικής κρυστάλλωσης. Αξίζει να σημειωθεί πως αν και βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί ορισμένες περιπτώσεις με εφαρμογή αυτής της μεθόδου κυρίως σε επίπεδο διπεπτιδίου και τριπεπτιδίου, δεν αποτελεί μια γενική, ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ελέγχου της στερεοχημείας, καθώς είναι

αρκετές φορές χρονοβόρα και η επιτυχία της είναι σημαντικά εξαρτώμενη από το υποστρώμα [107, 110].

Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται οι ισοξαζολυλο-αλυσίδες που επιλέχθηκαν για την διερεύνηση της κοιλότητας S_1' . Συγκεκριμένα, οι ενώσεις-στόχοι **4α-4ι** σχεδιάστηκαν να φέρουν ισοξαζολικούς δακτυλίους, οι οποίοι αποτέλεσαν την πρώτη βασική δομική υποκατάσταση για την εξερεύνηση των αλληλεπιδράσεων στο βάθος της κοιλότητας S_1' των ενζύμων (Σχήμα 5). Η επιλογή της ενσωμάτωσης των άκαμπτων, ετεροκυκλικών αυτών δακτυλίων στις ενώσεις-στόχους έγινε λόγω των ακόλουθων πλεονεκτημάτων τους. Αρχικά, η δυσκαμψία του δακτυλίου τους περιορίζει την δυνατότητα ελεύθερης περιστροφής τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υιοθέτηση συγκεκριμένων διαμορφώσεων στο χώρο, γεγονός που μπορεί να συνεπάγεται την ευνοϊκότερη προσαρμογή τους στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, λόγω μείωσης της εντροπικής συνεισφοράς στην ελεύθερη ενέργεια σύμπλεξης του αναστολέα με το ένζυμο, οδηγώντας σε αναστολείς υψηλής συγγένειας. Επιπλέον, παρουσιάζουν την δυνατότητα επιπλέον αλληλεπιδράσεων με διάφορες ομάδες του ενεργού κέντρου του ενζύμου, είτε μέσω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου των ετεροατόμων οξυγόνου και αζώτου, είτε μέσω π-π αρωματικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες έχουν επιβεβαιωθεί σε κρυσταλλογραφικές μελέτες για αντίστοιχα ισοξαζολυλο-φωσφινικά πεππίδια [115, 116], αυξάνοντας έτσι τη χημική συγγένεια μεταξύ αναστολέα και ενζύμου. Τέλος, πλεονεκτούν συνθετικά, καθώς μπορούν να σχηματιστούν σε τελικό στάδιο της σύνθεσης (late-stage diversification), διευκολύνοντας έτσι την επίτευξη της επιθυμητής χημικής ποικιλότητας στη θέση αυτή (Σχήμα 5).

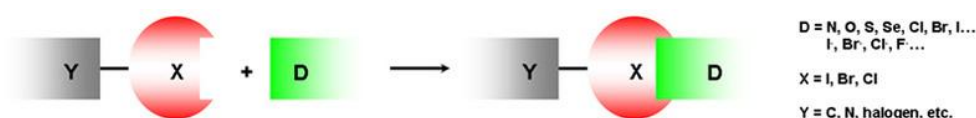


Σχήμα 5: Επιλογή ισοξαζολυλο-αλυσίδων για την διερεύνηση της κοιλότητας S_1'

Επιπλέον, για όλες τις ενώσεις **4a-4i**, επιλέχθηκε μια υδρόφοβη, άκαμπτη αλυσίδα, ένα φαινύλιο, για την 3-θέση του ισοξαζολικού δακτυλίου (Σχήμα 5). Ως ένωση-οδηγός, σχεδιάστηκε το παράγωγο **4a** το οποίο δεν φέρει υποκαταστάτες στον αρωματικό του δακτύλιο. Με τον τρόπο αυτό θα ήταν δυνατό να ανιχνευτούν πιθανές αλληλεπιδράσεις με το βάθος της κοιλότητας S_1' των ενζύμων, τοποθετώντας έπειτα υποκαταστάτες διαφορετικής φύσεως σε συγκεκριμένη θέση: την χλωρο-ομάδα σε *o,m,p*-θέση, την ομάδα του υδροξυλίου σε *o,p*-θέση και την ογκωδέστερη μεθοξυ-ομάδα σε *o,m,p*-θέση, συνεισφέροντας έτσι στον κατάλληλο προσανατολισμό των υποψήφιων αναστολέων στον S_1' θύλακα των ενζύμων.

Πιο συγκεκριμένα, η μεθοξυ-ομάδα ως υποκαταστάτης θα έδινε τη δυνατότητα διερεύνησης δεσμών υδρογόνου μέσω του οξυγόνου που διαθέτει, με τα αμινοξέα της S_1' κοιλότητας, ενώ η υδροξυλομάδα ως υποκαταστάτης σε δύο από τις τρεις θέσεις του φαινυλίου (*o,p*-θέση) θα έδειχνε αν ήταν αναγκαία η προστασία του υδροξυλίου (ως μεθυλαιθέρα) ή αν θα υπήρχε η δυνατότητα σχηματισμού επιπλέον δεσμών υδρογόνου μέσω και του οξυγόνου της υδροξυλομάδας.

Τέλος, η επιλογή της χλωρο-ομάδας ως υποκαταστάτη θα έδινε τη δυνατότητα ανάπτυξης ειδικών αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα της κοιλότητας S₁' , όπως είναι οι δεσμοί αλογόνου. Τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχτεί η σημασία διερεύνησης των δεσμών αλογόνου ως προς τον σχεδιασμό εκλεκτικών ανιχνευτών (probes) ή αναστολέων, λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων των αλογόνων στη δημιουργία ποικίλων, ειδικών αλληλεπιδράσεων με τα ενεργά κέντρα των ενζύμων, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε επίτευξη εκλεκτικότητας [117]. Συγκεκριμένα, οι δεσμοί αλογόνου ομοιάζουν ενεργειακά με τους δεσμούς υδρογόνου και περιλαμβάνουν τη συμμετοχή των αλογόνων ως ηλεκτρονιόφιλων σε μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με πλούσιους σε ηλεκτρόνια δότες [118]. Οι ενέργειες των δεσμών αυτών μπορούν να είναι αρκετά ισχυρές μέχρι και 43 kcal/mol [119]. Μια σχηματική αναπαράσταση του δεσμού αλογόνου φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 22.

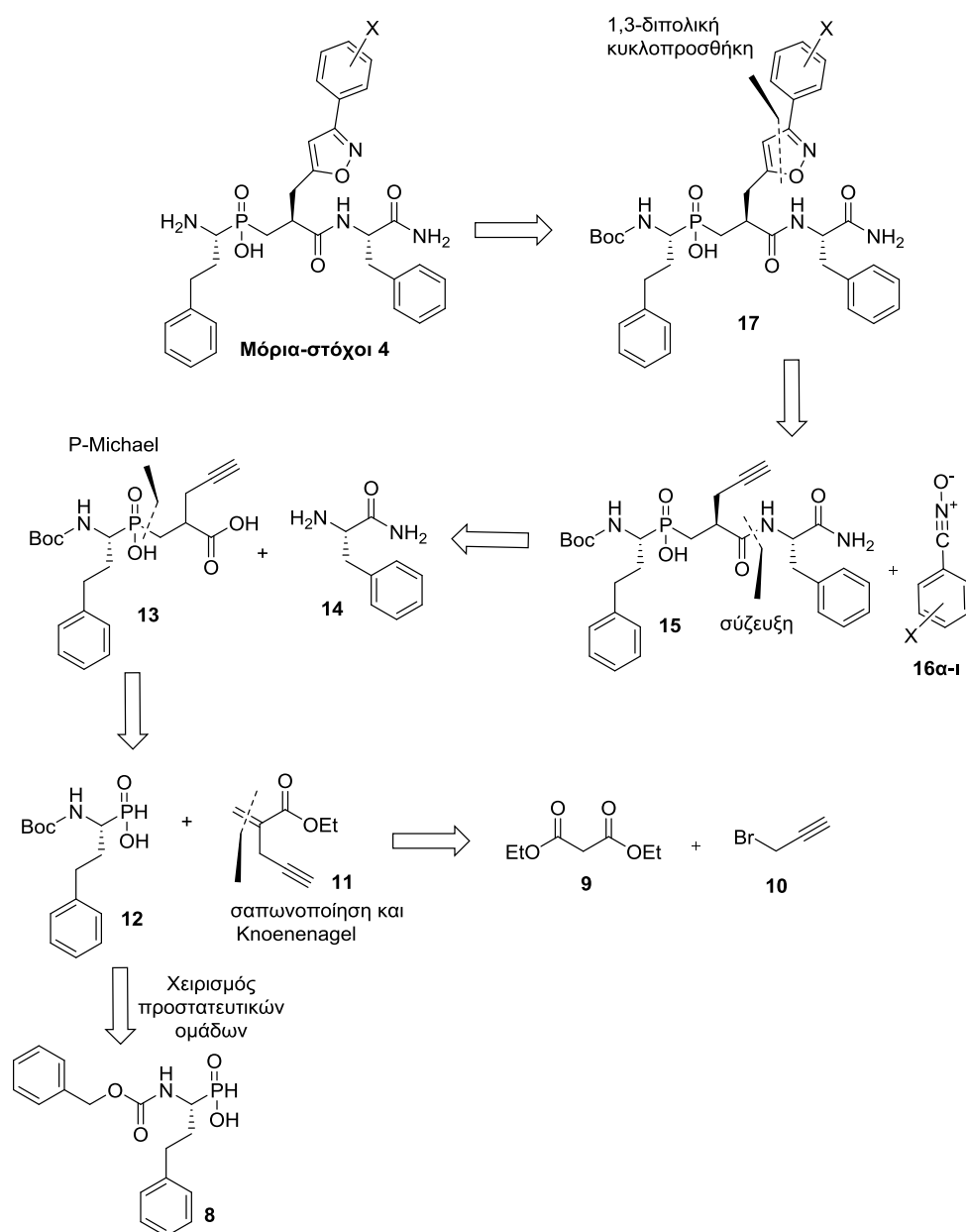


Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση ενός δεσμού αλογόνου.

3.4.2 Ρετροσυνθετική ανάλυση των ισοξαζολυλο-αναστολέων 4

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων-στόχων 4, καθώς και η δομή της πρόδρομής τους ένωσης 17. Βάσει του Σχήματος 6, τα τελικά φωσφινικά ψευδοτριπεπτιδία στόχοι, γενικής δομής 4, μπορούν να προκύψουν μετά από αποπροστασία των Boc-προστατευμένων ψευδοτριπεπτιδίων 17 σε όξινες συνθήκες. Τα φωσφινικά ψευδοτριπεπτιδία 17 μπορούν να προκύψουν από τη βασική φωσφινική μονάδα που φέρει τριπλό δεσμό στη θέση P₁' (15), μετά από την εφαρμογή 1,3-DCRs των οξειδίων του νιτριλίου 16α-ι. Τα φωσφινικά ψευδοτριπεπτιδία με το ακόρεστο σύστημα 15, μπορούν να συντεθούν με τη σειρά τους, μέσω μιας σύζευξης των διπεπτιδικών μονάδων 13 με το αμίδιο της φαινυλαλανίνης 14. Τα φωσφινικά ψευδοδιπεπτιδία 13 είναι δυνατόν να συντεθούν, μέσω μιας συζυγιακής προσθήκης τύπου P-Michael των Boc-προστατευμένων αμινοφωσφινικών οξέων 12 στον προπάργυλο-ακρυλικό εστέρα 11, ο οποίος φέρει έναν διπολαρόφιλο τριπλό δεσμό που θα συμμετέχει στην αντίδραση

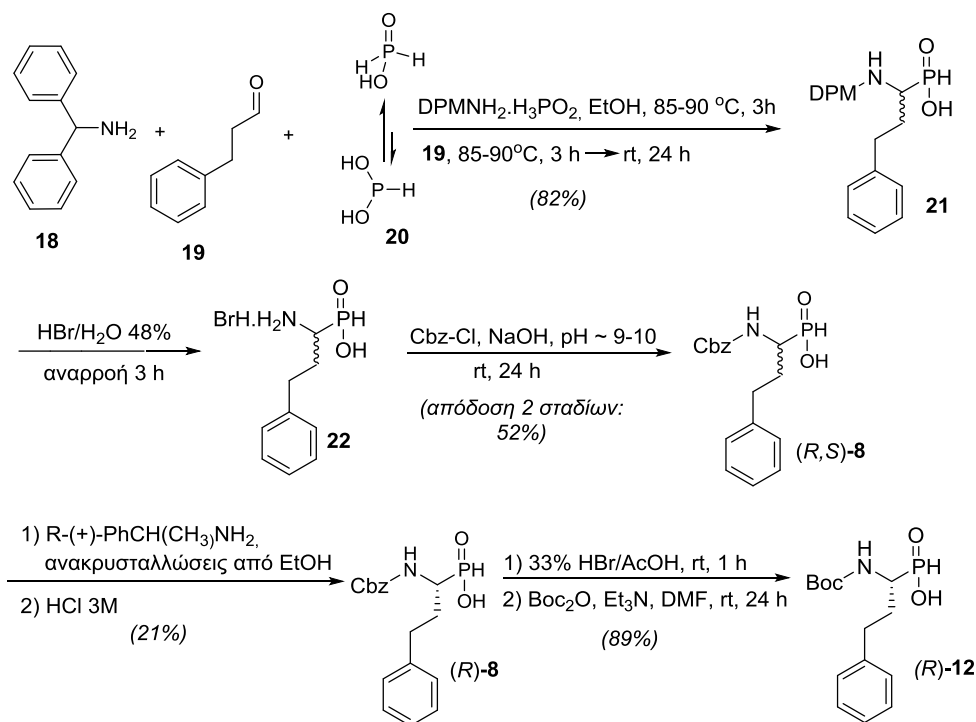
κυκλοπροσθήκης και αφ' ετέρου θα λειτουργήσει ως ηλεκτρονιόφιλος δέκτης στην προσθήκη *P*-Michael. Ο ακρυλικός εστέρας **11**, μπορεί να προέλθει από τον μηλονικό διαιθυλεστέρα **9** μετά από αλκυλίωση με το προπάργυλο-βρωμίδιο **10**, μονοσαπωνοποίηση και αντίδραση Knoevenagel με τη φορμαλδεύδη [120], ενώ η ένωση **12**, μπορεί να παραχθεί από την αντίστοιχη Cbz προστατευμένη ένωση **8** μετά από κατάλληλο χειρισμό των προστατευτικών ομάδων [121].



Σχήμα 6: Ρετροσυνθετική ανάλυση των ενώσεων-στόχων 4

3.4.3 Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου **11** και του αμινοφωσφινικού οξέος **12**

Για τη σύνθεση του αμινοφωσφινικού παραγώγου **12**, πραγματοποιήθηκε αρχικά ο σχηματισμός του Z-προστατευμένου αμινοφωσφινικού οξέος της ομοφαινυλαλανίνης **8**, με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Baylis και τους συνεργάτες του, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7. Η μέθοδος περιλαμβάνει αρχικά μία συμπύκνωση τριών συστατικών [της αλδεΐδης **19**, της αμίνης **18** (DPMNH₂) και του οξέος **20** (H₃PO₂)] και ακόλουθη διάσπαση της DPM ομάδας σε όξινες συνθήκες [122]. Σύμφωνα με τον μηχανισμό της αντίδρασης συμπύκνωσης, η αλδεΐδη **19** και η αμίνη **18** σχηματίζουν μια ιμίνη στην οποία γίνεται πυρηνόφιλη προσβολή από την τρισθενή μορφή του υποφωσφορώδους οξέος **20**. Οι όξινες συνθήκες που επικρατούν μετατοπίζουν την ισορροπία του **20** προς την πεντασθενή μορφή του η οποία δεν έχει πυρηνόφιλη δράση, αλλά η συνεχής προσθήκη της τρισθενούς μορφής στην ιμίνη μετατοπίζει την ισορροπία προς το σχηματισμό ρακεμικού μίγματος του παραγώγου **21** σε απόδοση 82% (Σχήμα 7).



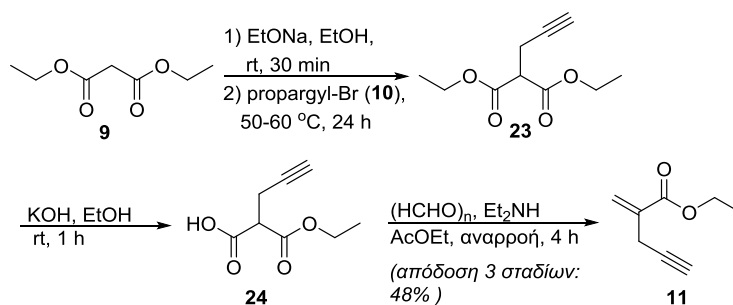
Σχήμα 7: Σύνθεση του αμινοφωσφινικού παραγώγου (R)-12

Εν συνεχεία, έγινε διάσπαση της DPM-ομάδας με υδατικό διάλυμα HBr 48% κάτω από συνθήκες βρασμού, οπότε προέκυψε η ένωση **22**. Επειδή κατά τη σύνθεση της ένωσης **21** η προσβολή του πυρηνόφιλου τρισθενούς φωσφόρου του H₃PO₂

στην ενδιάμεση ιμίνη δημιουργεί στερεογονικό κέντρο, το υδροβρωμικό άλας **22** ελήφθη ως ρακεμικό μίγμα (Σχήμα 7).

Έτσι, στο επόμενο βήμα επιχειρήθηκε ο διαχωρισμός των εναντιομερών με βάση την μέθοδο του Baylis [122]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ρακεμικού μίγματος (*R,S*)-**8** με την προστασία της αμινομάδας του **22** με την Cbz ομάδα υπό συνθήκες Schotten-Baumann και χρήση μικρής περίσσειας CbzCl (Σχήμα 7). Ο διαχωρισμός του μίγματος των εναντιομερών (*R,S*)-**8** έγινε με χειρικό διαχωρισμό μέσω της μεθόδου των επαναλαμβανόμενων κρυσταλλώσεων του άλατος αυτού με την οπτικώς καθαρή αμίνη *R*-(+)-1-φαινυλαιθυλαμίνη, οπότε καταβυθίστηκε μόνο το διαστερομερές άλας του (*R*)-**8** με την αμίνη. Μετά την απομόνωση του άλατος, το (*R*)-**8** παρελήφθη με διάσπαση του άλατος από υδατικό διάλυμα HCl 3M (Σχήμα 7). Τέλος, στο τελευταίο στάδιο σύνθεσης της ένωσης (*R*)-**12** έγινε αλλαγή της προστατευτικής ομάδας της αμινομάδας του αμινοφωσφινικού αναλόγου της hPhe και εισαγωγή της Boc ομάδας (*tert*-βουτυλοξυκαρβονυλο ομάδας) ακολουθώντας μια πορεία δύο σταδίων μετά από την αποπροστασία του αντίστοιχου Cbz προστατευμένου παραγώγου (*R*)-**8** [122]. Η αλλαγή αυτή θεωρήθηκε απαραίτητη, καθώς από πειράματα που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο έχει διαπιστωθεί ότι η Cbz ομάδα παρουσιάζει προβλήματα στο στάδιο της τελικής αποπροστασίας των τελικών φωσφινικών τριπεπτιδίων. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε απαραίτητος ο σχηματισμός της ένωσης (*R*)-**12** [102].

Ακολούθησε η σύνθεση του απαιτούμενου προπαργυλο-ακρυλικού εστέρα **11**, όπως προαναφέρθηκε, ο οποίος επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί ως ηλεκτρονιόφιλο στην προσθήκη *P*-Michael. Αυτός παρασκευάστηκε μέσω μιας πορείας τριών σταδίων που παρουσιάζεται στο Σχήμα 8 [120]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αλκυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα **9** με το προπαργυλοβρωμίδιο **10**, μονοσαπωνοποίηση του προϊόντος **23** και ακολούθως συμπύκνωση τύπου Knoevenagel της ένωσης **24** για την παραλαβή του ακρυλικού προϊόντος **11** σε μια συνολική καλή απόδοση του (48%), χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό.

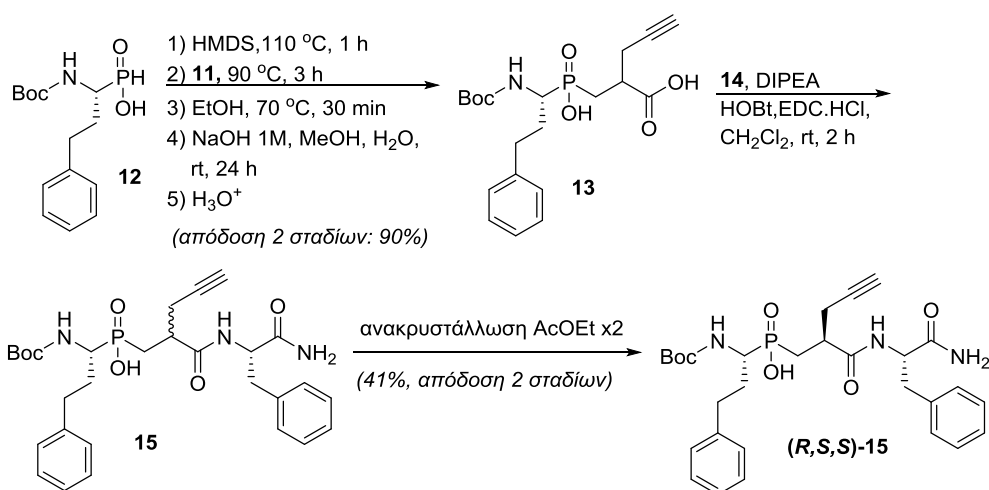


Σχήμα 8: Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου **11**

3.4.4 Σύνθεση του πρόδρομου διπολαρόφιλου (*R,S,S*)-**15**

Για τη σύνθεση του τριπεπτιδίου (*R,S,S*)-**15** που θα λειτουργούσε ως το πρόδρομο διπολαρόφιλο για τη σύνθεση των τελικών ενώσεων τύπου **4**, απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η σύνθεση της ψευδοδιπεπτιδικής μονάδας **13**, συνδυάζοντας τις ενώσεις **11** και **12** που συντέθηκαν προηγουμένως (Σχήμα 9).

Συγκεκριμένα, το (*R*)-*N*-Boc-προστατευμένο φωσφινικό αναλογο της hPhe **12** υποβλήθηκε σε μια αντίδραση P-Michael με χρήση περίσσειας (1.3 ισοδύναμα) του προπαργυλο-ακρυλικού εστέρα **11**. Η ενεργοποίηση του φωσφινικού οξέος έλαβε χώρα σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία (~110 °C) παρουσία εξαδιμεθιλοδισιλαζανίου (HMDS), και διατηρήθηκε στους 90 °C για τρεις επιπλέον ώρες. Σε συμφωνία με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές [107, 110] η αντίδραση προχώρησε με σημαντικό βαθμό διαστερεοεκλεκτικότητας (*dr* ~ 2:1, βάσει ³¹P-NMR). Έπειτα, ακολούθησε η σαπωνοποίηση του αιθυλεστέρα χρησιμοποιώντας NaOH 1M / MeOH προς τον σχηματισμό της ένωσης **13** σε απόδοση δύο σταδίων 90% (Σχήμα 9). Δυστυχώς, όλες οι προσπάθειες παραλαβής κρυσταλλικού προϊόντος και διαχωρισμού των διαστερεοϊσομερών της ένωσης **13**, με τη δοκιμή διαφόρων διαλυτών, απέτυχαν, οπότε προχωρήσαμε στο επόμενο στάδιο που ήταν η σύνθεση της βασικής προπαργυλο-ψευδοτριπεπτιδικής μονάδας **15**, όπως περιγράφεται στο Σχήμα 9.



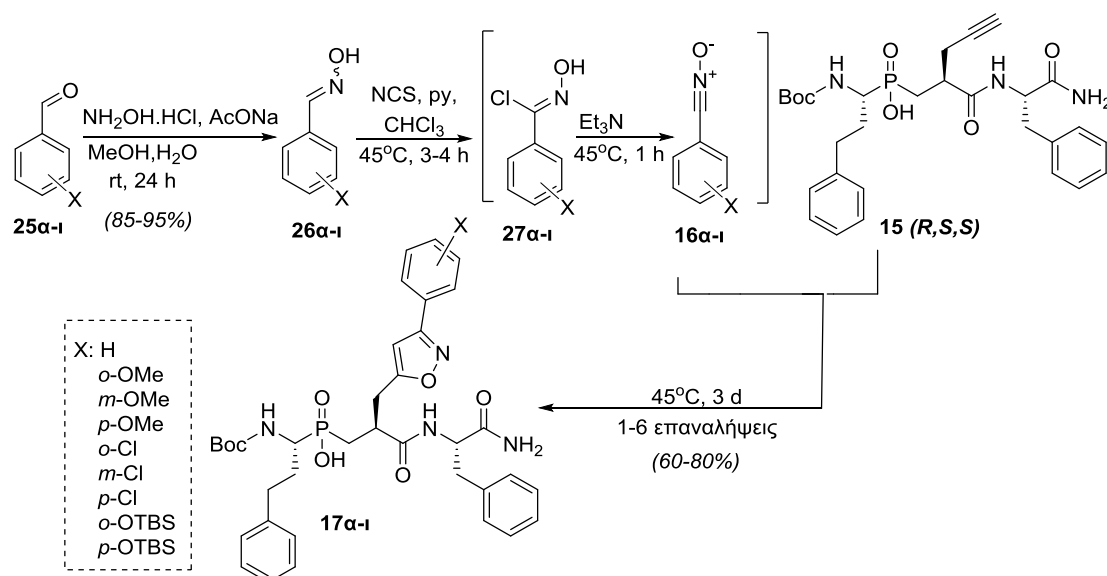
Σχήμα 9: Συνθετική πορεία σχηματισμού του φωσφινικού τριπεπτιδίου (*R,S,S*)-15

Απαραίτητη προϋπόθεση για να χρησιμοποιηθεί η ένωση **15** στη συνέχεια του συνθετικού μας πλάνου, ήταν η δυνατότητα αποδοτικού διαχωρισμού των δύο διαστερεοϊσομερών της, ώστε να απομονωθεί το επιθυμητό κύριο διαστερεοϊσομερές της (*R,S,S*). Ο σχηματισμός της προπαργυλοψευδοτριπεπτιδικής μονάδας **15**, πραγματοποιήθηκε με σύζευξη του διπεπτιδίου **13** με το αμιδίο του αμινοξέος της φαινυλαλανίνης **14**, χρησιμοποιώντας ένα απαλλαγμένο επιμερίωσης πρωτόκολλο, βασισμένο στο σύστημα σύζευξης EDC/HOBt [90, 110] (Σχήμα 9). Το επιθυμητό προϊόν **15** παρελήφθη ως μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών (*R,R,S*)-**15** και (*R,S,S*)-**15**, το οποίο καταβυθίστηκε ως λευκό στερεό σε AcOEt εμπλουτισμένο στο επιθυμητό διαστερεοϊσομερές. Για την λήψη της βέλτιστης διαστερεοϊσομερικής καθαρότητας ως προς την ένωση (*R,S,S*)-**15**, ακολούθησαν δύο ανακρυστάλλωσεις του προκύπτοντος στερεού με AcOEt με ικανοποιητική απόδοση δύο σταδίων (41%).

3.4.5 Αντιδράσεις σχηματισμού των ενώσεων τύπου **17** μέσω 1,3-διπολικών κυκλοπροσθηκών

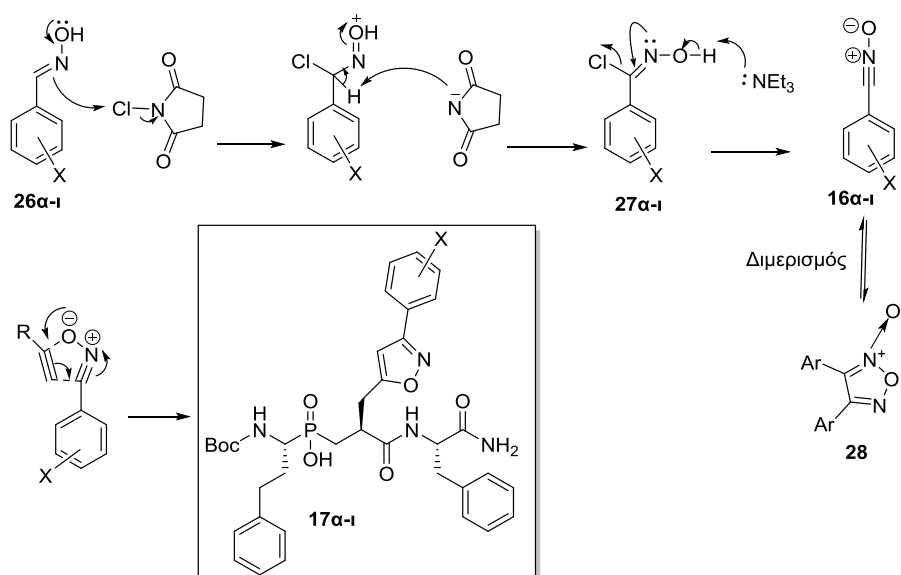
Στο επόμενο βήμα της συνθετικής μας πορείας εφαρμόστηκαν οι 1,3-διπολικές κυκλοπροσθηκές στην ένωση (*R,S,S*)-**15** με ποικιλία οξειδίων του νιτρίλιου **16α-ι**, για να δώσουν τα Boc-προστατευμένα ισοξαζολυλο-φωσφινικά ψευδοτριπεπτιδία τύπου **15** (Σχήμα 10), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει περιγραφεί από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας [110]. Η σύνθεση των οξιμών **26α-ι** πραγματοποιήθηκε από τις αντίστοιχες εμπορικά διαθέσιμες αλδεΐδες **25α-ι**, οι οποίες αντέδρασαν με το υδροχλωρικό άλας της υδροξυλαμίνης (HCl·NH₂OH) με

την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας CH_3COONa , ώστε έτσι να επιτευχθεί το επιθυμητό pH (4,5) και συνεπώς η μέγιστη απόδοση των αντιδράσεων αυτών, σε διαλύτη $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 3.5:1. Οι οξίμες παρελήφθησαν, μετά από υδατική κατεργασία, σε αποδόσεις 85-95%, ως μίγματα E/Z ισομερών και σε υψηλή καθαρότητα, για χρήση στο επόμενο στάδιο (Σχήμα 10). Όσον αφορά τη σύνθεση των οξιμών **26b** και **26i**, το ανωτέρω πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στις TBS προστατευμένες αλδεΐδες **25b** και **25i**, αντίστοιχα, που παρασκευάστηκαν από την κατάλληλα OH-υποκατεστημένη βενζαλδεΐδη σύμφωνα με γνωστό βιβλιογραφικό πρωτόκολλο [123].



Σχήμα 10: Συνθετική πορεία φωσφινικών τριπεπτιδίων **17a-i** μέσω αντιδράσεων 1,3-DCRs

Οι 1,3-κυκλοπροσθήκες πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο *Huisgen ενός βήματος*, η οποία, όπως αναφέρθηκε, έχει εφαρμοστεί επιτυχώς από το εργαστήριο μας σε ανάλογες περιπτώσεις [110, 124]. Ένας πιθανός μηχανισμός δημιουργίας των ισοξαζολικών δακτυλίων παρουσιάζεται στο ακόλουθο Σχήμα 11. Πρόκειται για μία μέθοδο που περιλαμβάνει αρχικά τον σχηματισμό των υδροξαμούλο χλωριδίων **27a-i**, με επίδραση NCS στις οξίμες των κατάλληλα υποκατεστημένων βενζαλδεΐδων **26a-i**, οι οποίες προκύπτουν από τις αντίστοιχα υποκατεστημένες βενζαλδεΐδες **25a-i**. Ακολουθεί η αφυδραλογόνωση αυτών προς τα οξειδία του νιτριλίου **16a-i** παρουσία τριαιθυλαμίνης και τέλος, η 1,3-DCR των *in situ* σχηματιζόμενων οξειδίου νιτριλίου στον τριπλό δεσμό του φωσφινικού τριπεπτιδίου **15**, προς σχηματισμό των ισοξαζολικών δακτυλίων (Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των ενώσεων **17a-i**

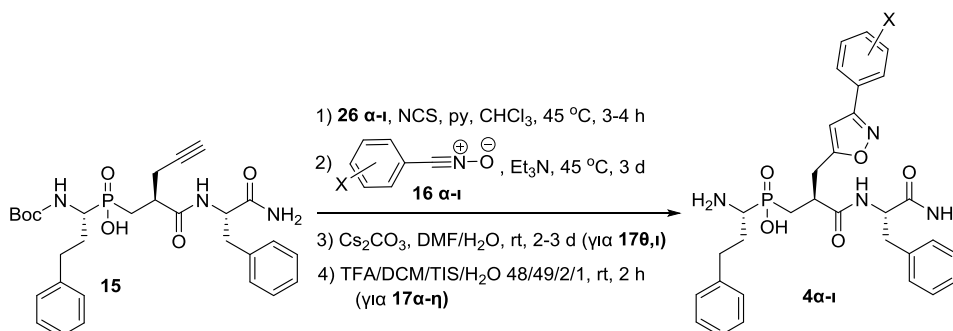
Αξίζει να σημειωθεί πως για την κατανάλωση του αρχικού διπολαρόφιλου, καθώς και για την βελτίωση της συνολικής απόδοσης της αντίδρασης σχηματισμού των ενώσεων **17a-i**, στις περισσότερες περιπτώσεις χρειάστηκε επανάληψη της αντίδρασης 1,3-DCR (1-6 επαναλήψεις) σε μίγμα των **15+17** (μετά από απομόνωσή τους με απλές εκχυλίσεις) με νέα ποσότητα διπόλου, ωστόσο να επιτευχθεί η πλήρης κατανάλωση της αρχικής ένωσης **15**. Η αναλογία **15/17** σε κάθε περίπτωση παρακολουθούνταν με φασματοσκοπία $^{31}\text{P-NMR}$.

Πρέπει να αναφερθεί πως για τις αντιδράσεις της 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης τα οξείδια του νιτριλίου **16a-i** παρασκευάζονται *in situ*, ώστε να αποφεύγεται ο διμερισμός τους, ο οποίος οδηγεί στον σχηματισμό φουροξανίων (Σχήμα 11). Ο διμερισμός αυτός μπορεί να θεωρηθεί η κυκλοπροσθήκη ενός μορίου οξειδίου νιτριλίου στον τριπλό δεσμό C-N ενός άλλου.

Στο τελικό στάδιο της συνθετικής μας πορείας (Πίνακας 1) πραγματοποιήθηκε η όξινη αποπροστασία των ενώσεων **17a-i** με χρήση διαλύματος TFA/DCM/TIS/H₂O 48:49:2:1, όπου το τριίσοπροπυλοσιλάνιο (TIS) αποτελεί αντιδραστήριο δέσμευσης ή αλλιώς «παγίδα» (scavengers) για το προκύπτον *tert*-βουτυλο κατιόν [125], προς τον σχηματισμό των τελικών υποκατεστημένων ισοξαζολίων σε ορθο, μετά, και πάρα θέση **4a-i**. Για τις ενώσεις **4b** και **4i** προηγήθηκε η απομάκρυνση των TBS ομάδων τους με χρήση βασικών συνθηκών (Cs₂CO₃) σε διαλύτη DMF/H₂O. Μετά το πέρας των αντιδράσεων αποπροστασίας, τα τελικά προϊόντα

4α-ι απομονώθηκαν μετά από καταβύθιση με χρήση Et₂O, σε ικανοποιητικές αποδόσεις, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1: Συνοπτικά αποτελέσματα αντιδράσεων σχηματισμού των ενώσεων 4α-ι από την ένωση 15



	R	Προϊόν	Απόδοση (2 στάδια)
1		4α	80%
2		4β	85%
3		4γ	75%
4		4δ	76%
5		4ε	73%
6		4ζ	67%
7		4η	66%
8		4θ	51%*
9		4ι	61%*

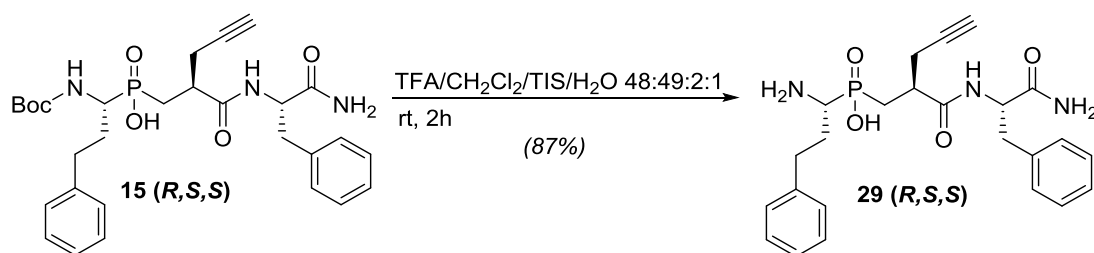
*Περιλαμβάνεται το στάδιο αποπροστασίας της TBS-ομάδας

Με στόχο την εύρεση της στερεοχημικής απεικόνισης της θέσης P₁' των τελικών ενώσεων τύπου **4** οι οποίες προέκυψαν στεροχημικά καθαρές από την ένωση **15**, η ένωση **4α** ξανασυντέθηκε μη στερεοεκλεκτικά ως μίγμα δύο διαστεροεισομερών στη θέση P₁' (**4α** και **4α'**), χρησιμοποιώντας το μίγμα διαστεροεισομερών (*RRS*

και *RSS*) της ένωσης **15**. Με την βοήθεια ημιπαρασκευαστικής RP-HPLC και με έλεγχο της σειράς έκλουσης των ενώσεων **4α** και **4α'**, βρέθηκε πως ο αναστολέας **4α** που συντέθηκε μέσω της στερεοελεγχόμενης σύνθεσης αντιστοιχούσε στο πρώτο εκλούμενο ισομερές του μίγματος διαστερεοϊσομερών στην ημιπαρασκευαστική RP-HPLC. Βάσει προηγούμενων μελετών που συσχετίζουν την στερεοχημική απεικόνιση της θέσης P₁' με τη σειρά έκλουσης στην RP-HPLC [90, 107, 110], η σειρά έκλουσης των διαστερεοϊσομερών της ένωσης **4α** ήταν μια ισχυρή ένδειξη της *R,S,S* στερεοχημικής απεικόνισης της πρόδρομης ένωσης **15**.

Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μετά από απομόνωση των δύο διαστερεοϊσομερών της ένωσης **4α** μέσω RP-HPLC και ξεχωριστή εκτίμηση της ανασταλτικής ισχύος τους. Οι τιμές αναστολής έδειξαν πως το πρώτο εκλούμενο ισομερές (*R,S,S*) ήταν 1-2 τάξεις μεγέθους πιο ισχυρό από το διαστερεοϊσομερές του (*R,R,S*) (**4α'**), όπως συνέβη και με τον αναστολέα **DG013A** [97].

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι η συνθετική μέθοδος που εφαρμόστηκε για τη σύνθεση των υποψήφιων ισοξαζολυλο-αναστολέων **4α-i**, θέτει ένα γενικό, επιτυχές και ευέλικτο συνθετικό πλαίσιο για τη γρήγορη και με υψηλές αποδόσεις διαφοροποίηση στερεοχημικά καθορισμένων φωσφινικών διπολαρόφιλων τριπεπτιδίων με ποικιλία οξειδίων νιτριλίου, με μία αντίδραση σε τελικό στάδιο της σύνθεσης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και η σύνθεση του αναστολέα **29**, ο οποίος προέκυψε σε απόδοση 87%, μετά από διάσπαση της Boc-ομάδας, μέσω μιας κλασικής όξινης αποπροστασίας, ο οποίος αξιολογήθηκε βιοχημικά έναντι των ωκυτοκινασών (Σχήμα 12).



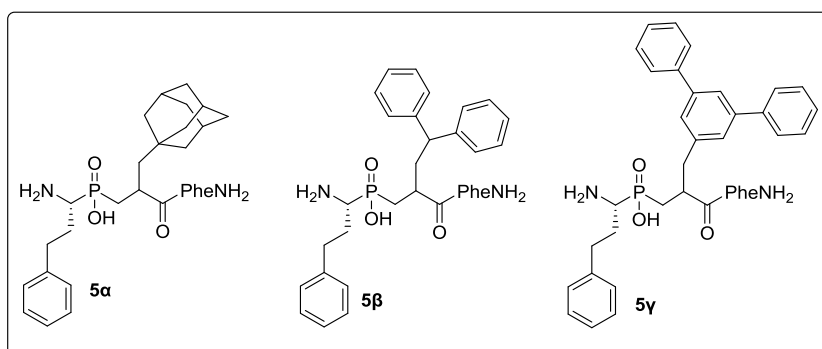
Σχήμα 12: Σύνθεση του φωσφινικού αναστολέα (*R,S,S*)-**29**

3.5 Διερεύνηση της θέσης P₁' με χρήση ογκωδών, μη γραμμικών ομάδων

3.5.1 Εισαγωγή

Για την συνέχεια της εξερεύνησης της κοιλότητας S₁' των ενζύμων σχεδιάστηκε η σύνθεση των μορίων **5α-γ** (Σχήμα 13) που θα διαθέτουν μη επιμήκεις,

ογκώδεις υποκαταστάτες στη θέση P_1' . Πιο συγκεκριμένα, έγινε η επιλογή της αδαμάντυλο ομάδας, της βενζυδρυλομάδας και της τερφαινυλο ομάδας, κατά σειρά αυξανόμενου μεγέθους (Σχήμα 13) με στόχο την διερεύνηση της επέκτασης του όγκου των πλευρικών αλυσίδων προς περισσότερες από μία κατευθύνσεις. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι δομικά, χαρακτηριστικά των ενζύμων έχουν φανερώσει μια αρκετά ευρύχωρη κοιλότητα S_1' για το ένζυμο ERAP1 σε σχέση με τις αντίστοιχες κοιλότητες των άλλων ενζύμων [64]. Υποθέσαμε, λοιπόν, πως με την παρουσία των ογκωδών αυτών υποκαταστατών θα μπορούσε λόγω στερικών παρεμποδίσεων να μειωθεί η συγγένεια των αναστολέων για τα άλλα δύο ένζυμα και να πραγματοποιηθεί καλύτερη προσαρμογή στην ευρύχωρη κοιλότητα S_1' της ERAP1, προάγοντας έτσι την εκλεκτικότητα ως προς την ERAP2/IRAP.



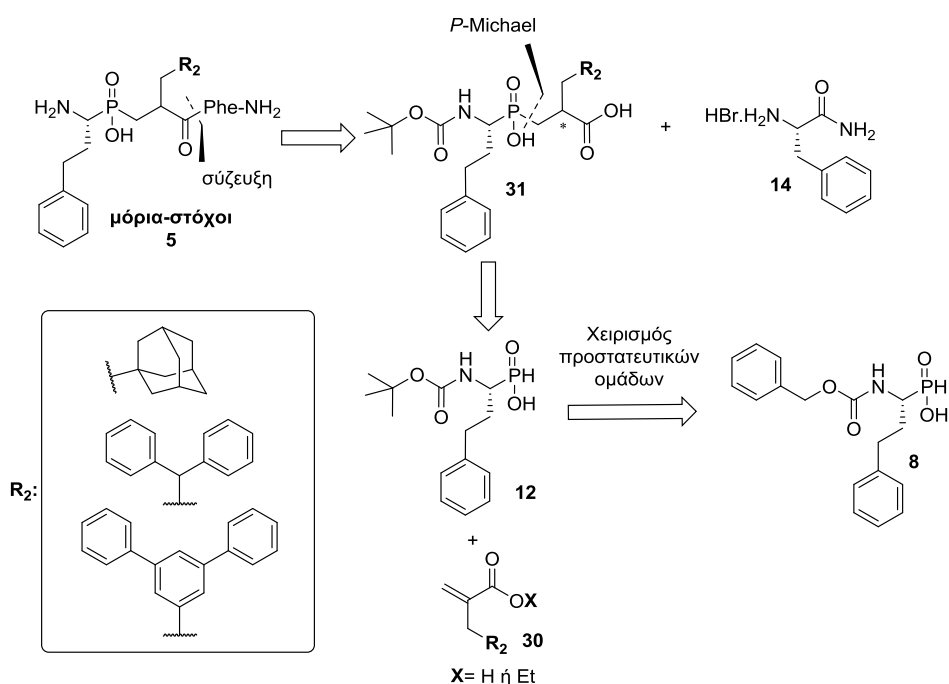
Σχήμα 13: Δομές των υποψήφιων φωσφινικών αναστολέων τύπου 5

Επιπλέον, θεωρήσαμε πως με την χρήση των υποκαταστατών αυτών, θα μπορούσαν να επιτευχθούν και ευνοϊκές, μη ομοιοπολικού τύπου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, με την υδρόφοβη κοιλότητα S_1' της ERAP1. Πιο συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός της ένωσης **5a**, που φέρει μια λιπόφιλη, άκαμπτη και μη αρωματική ογκώδη ομάδα (αδαμαντυλομάδα) στη θέση P_1' πραγματοποιήθηκε για την εκμετάλλευση πιθανών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τα άπολα αμινοξέα της κοιλότητας S_1' . Επιπλέον, σχεδιάστηκε η δομή **5b** που φέρει έναν ογκωδέστερο, αρωματικό υποκαταστάτη (βενζυδρυλομάδα) στη θέση αυτή για την εκμετάλλευση επιπλέον πιθανών π-π αρωματικών αλληλεπιδράσεων με αρωματικά αμινοξέα του θύλακα εξειδίκευσης S_1' . Τέλος, διερευνήθηκε η αντικατάσταση της βενζυδρυλομάδας από έναν ακόμα πιο ογκώδη υποκαταστάτη με ένα εκτεταμένο αρωματικό σύστημα (*m*-τερφαινυλομάδα), ενισχύοντας έτσι πιθανές π-π αρωματικές αλληλεπιδράσεις με τον S_1' θύλακα. Τέλος, όπως προαναφέρθηκε στη παράγραφο 3.3.1 οι

ψευδοτριπεπτιδική αναστολείς **5α-γ** επιλέχθηκε να φέρουν την φαινυλοαιθυλοομάδα (*hPhe*) στη θέση P_1 και το ανάλογο της Phe στην θέση P_2 (Σχήμα 13). Η διαφοροποίηση της εισαγωγής ογκωδών ομάδων σε σχέση με τη χρήση γραμμικών ομάδων στη θέση P_1 , αποκάλυψε σημαντικές μεταβολές στο προφίλ αναστολής των ενζύμων οι οποίες θα συζητηθούν παρακάτω.

3.5.2 Ρετροσυνθετική ανάλυση των φωσφινικών αναστολέων που φέρουν ογκώδεις ομάδες στη θέση P_1

Για τη σύνθεση των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων (μόρια στόχοι του τύπου **5**) που διέφεραν ως προς την παρουσία ογκωδών υποκαταστατών στη θέση P_1 , ακολουθήθηκε η ρετροσυνθετική προσέγγιση που φαίνεται στο Σχήμα 14.



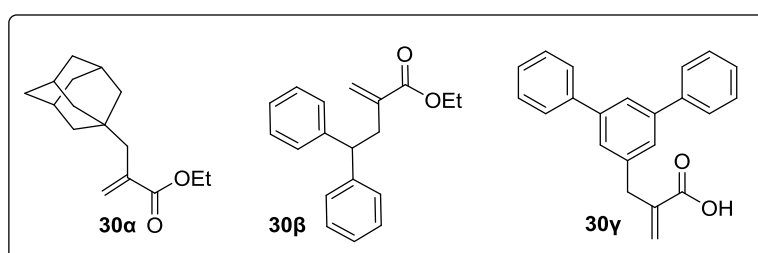
Σχήμα 14: Γενικό ρετροσυνθετικό σχήμα των μορίων-στόχων **5** διαφοροποιημένων στη θέση P_1

Σύμφωνα με το παραπάνω ρετροσυνθετικό σχήμα, οι τελικές ενώσεις **5α-ζ** μπορούν να προκύψουν από την σύζευξη κατάλληλα προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων **31** και του αμιδίου $\text{H}-(L)\text{Phe}-\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$ **14**, με επακόλουθη αποπροστασία των παραγόμενων ψευδοτριπεπτιδίων σε όξινες συνθήκες. Η σύνθεση των ενώσεων **31** μπορεί να πραγματοποιηθεί με την σύζευξη των κατάλληλων ακρυλικών οξέων ή εστέρων τύπου **30** με το αμινοφωσφινικό παράγωγο **12** με μηχανισμό *P*-Michael, όπου το φωσφινικό οξύ

υφίσταται σιλυλίωση ώστε να ενεργοποιηθεί προς το δραστικό του ενδιάμεσο το οποίο θα αντιδράσει στη συνέχεια με τα ηλεκτρονιόφιλα **30**, των οποίων η σύνθεση απαιτήσε διερεύνηση. Τέλος, η ένωση **12**, μπορεί να παραχθεί από την αντίστοιχη Cbz προστατευμένη ένωση **8** μετά από κατάλληλο χειρισμό των προστατευτικών ομάδων.

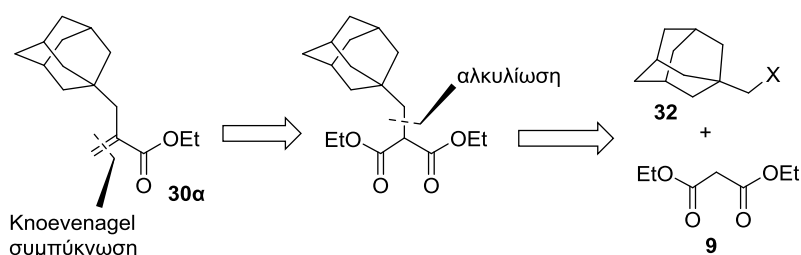
3.5.3 Σύνθεση των ακρυλικών παραγώγων τύπου **30**

Το πρώτο στάδιο της συνθετικής πορείας για την παρασκευή των τελικών ενώσεων **5α-γ**, ήταν η σύνθεση των ακρυλικών παραγώγων **30α-γ** που φαίνονται στο παρακάτω Σχήμα 15.



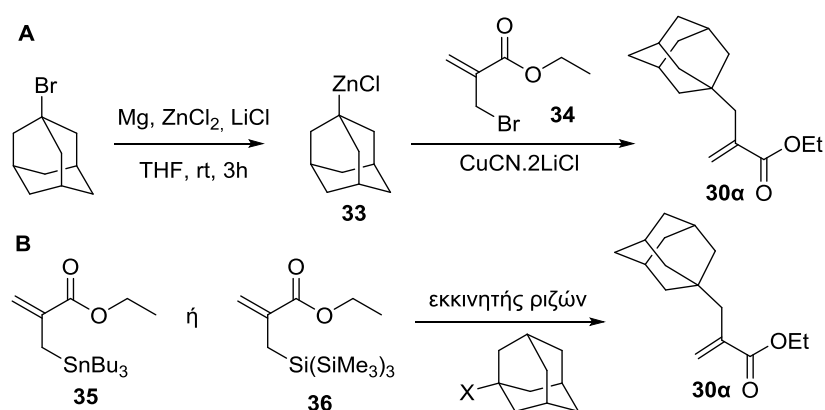
Σχήμα 15: Δομές των ακρυλικών υποστρωμάτων **30α-γ**

Αρχικά, επιχειρήθηκε η σύνθεση του αδαμαντυλο ακρυλικού εστέρα **30α**. Η κλασική ρετροσυνθετική του πορεία θα περιλάμβανε την εφαρμογή του ευρύτερα χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου για τη σύνθεση ακρυλικών εστέρων, δηλαδή την αλκυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα **9** από το αλογονίδιο **32** μέσω μίας αντίδρασης τύπου S_N2 (Σχήμα 16). Όμως, η αντίδραση αυτή θεωρήθηκε πως δεν θα οδηγούσε σε υψηλές αποδόσεις, λόγω του όγκου της αδαμαντυλομάδας που θα παρεμπόδιζε την S_N2 προσβολή. Επιπλέον, αλογονίδια του τύπου **32** δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα, ενώ ενώσεις που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ένωση **32** όπως το 1-αδαμαντυλο καρβοξυλικό οξύ ή η 1-αδαμαντυλο μεθανόλη έχουν υψηλό κόστος.



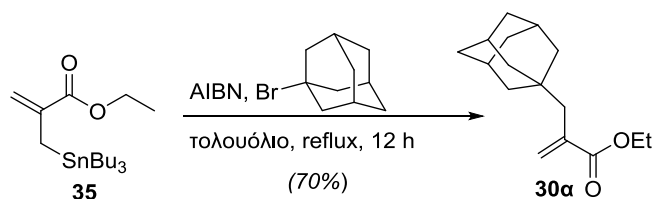
Σχήμα 16: Ρετροσύνθεση για την ένωση **30α** βασισμένη στην αλκυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα

Αντιθέτως, τα 1-αδαμαντυλο αλογονίδια, όπως το 1-αδαμαντυλοβρωμίδιο λόγω του αρκετά χαμηλότερου κόστους θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανική αρχική ύλη. Συγκεκριμένα, οι βιβλιογραφικές αναφορές που περιγράφουν τη σύνθεση της ένωσης **30α** από 1-αδαμαντυλο αλογονίδια αφορούν σε (i) αντίδραση του ψευδαργυρικού αδαμαντανίου **33** με το βρωμίδιο **34** καταλυόμενη από Cu(I), όπως περιγράφηκε σε μία πρόσφατη δημοσίευση από τον Knochei και τους συνεργάτες του [126] και (ii) ριζική αλλυλίωση 1-αδαμαντυλο αλογονιδίων με τη χρήση οργανοκασσιτερικών (**35**) [127] ή οργανοπυριτικών (**36**) ενώσεων [128] (Σχήμα 17), οι οποίες μπορούν εύκολα να παρασκευαστούν από την ένωση **34** μέσω 2 βημάτων [127].



Σχήμα 17: Βιβλιογραφικές μέθοδοι για τη σύνθεση της ένωσης **30α**

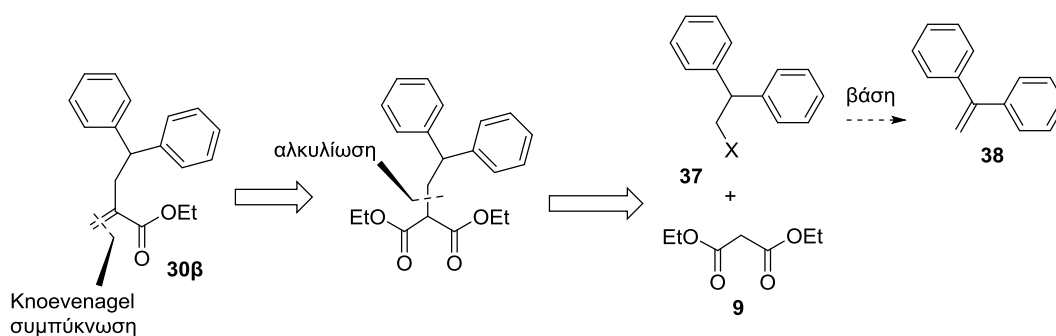
Ο αδαμάντυλο υποκατεστημένος ακρυλικός εστέρας **30α**, συντέθηκε σε απόδοση 70%, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Baldwin και τους συνεργάτες του, και συγκεκριμένα με την ριζική προσθήκη του 1-αδαμαντυλο βρωμιδίου στην οργανοκασσιτερική ένωση **35**, με χρήση ως εκκινητή της ριζικής αντίδρασης το AIBN, σε διαλύτη τολουόλιο και σε συνθήκες αναρροής για 12 ώρες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 18 [127].



Σχήμα 18: Σύνθεση του ακρυλικού εστέρα **30α**

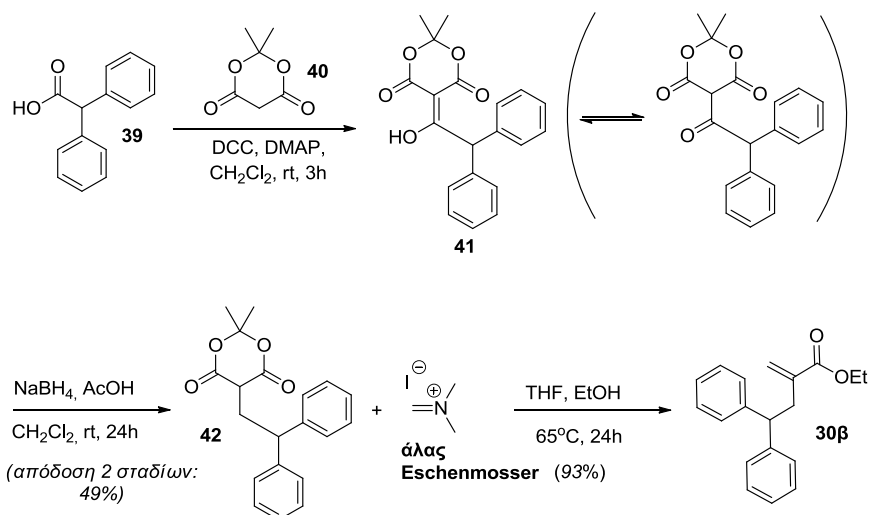
Η σύνθεση των υπόλοιπων ακρυλικών παραγώγων **30β,γ**, δεν έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία, επομένως αρχικός μας στόχος ήταν η διερεύνηση της σύνθεσής τους. Αρχικά, προχωρήσαμε στην σύνθεση του ακρυλικού εστέρα **30β** όπου η

εφαρμογή του ευρύτερα χρησιμοποιούμενου πρωτοκόλλου για τη σύνθεση ακρυλικών εστέρων θα περιλάμβανε την αλκυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα **9** από το αλογονίδιο **37** μέσω μίας αντίδρασης τύπου S_N2 (Σχήμα 19). Όμως, η πιθανότητα απόσπασης στο αλογονίδιο **37** προς το αλκένιο **38** στις βασικές συνθήκες της αντίδρασης είναι ιδιαίτερα αυξημένη, συνεπώς μία τέτοια μέθοδος δεν κρίθηκε αποτελεσματική.



Σχήμα 19: Ρετροσύνθεση για την ένωση 30β βασισμένη στην αλκυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα και πιθανά παραπροϊόντα

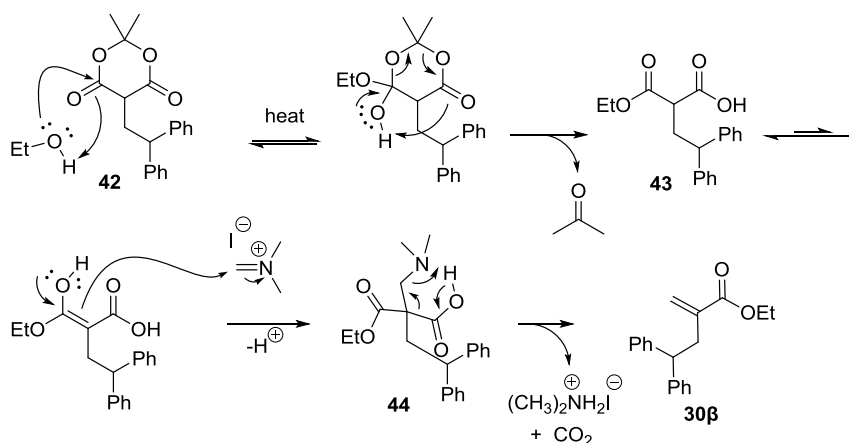
Έτσι, στραφήκαμε σε μια εναλλακτική στρατηγική για την παρασκευή του ακρυλικού υποστρώματος **30β** (Σχήμα 20), έχοντας ως πρώτη ύλη το 2,2-διφαινυλοξικό οξύ (**39**), η οποία πραγματοποιήθηκε με καλή συνολική απόδοση. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε προτάθηκε από τον Hin και τους συνεργάτες του και περιλαμβάνει αρχικά μια αντίδραση σύζευξης του **39** με το οξύ Meldrum **40** (Σχήμα 20) [129], ένα κυκλικό ανάλογο του μηλονικού διαιθυλεστέρα που χαρακτηρίζεται από υψηλή οξύτητα [130]. Το πλεονέκτημα αυτής της πορείας, σε σχέση με την πορεία μέσω του μηλονικού διαιθυλεστέρα που χρησιμοποιείται συνήθως για τον σχηματισμό ακρυλικών παραγώγων, είναι ότι αποφεύγεται ο σχηματισμός διαλκυλιωμένων παραπροϊόντων.



Σχήμα 20: Σύνθεση του ακρυλικού εστέρα 30β

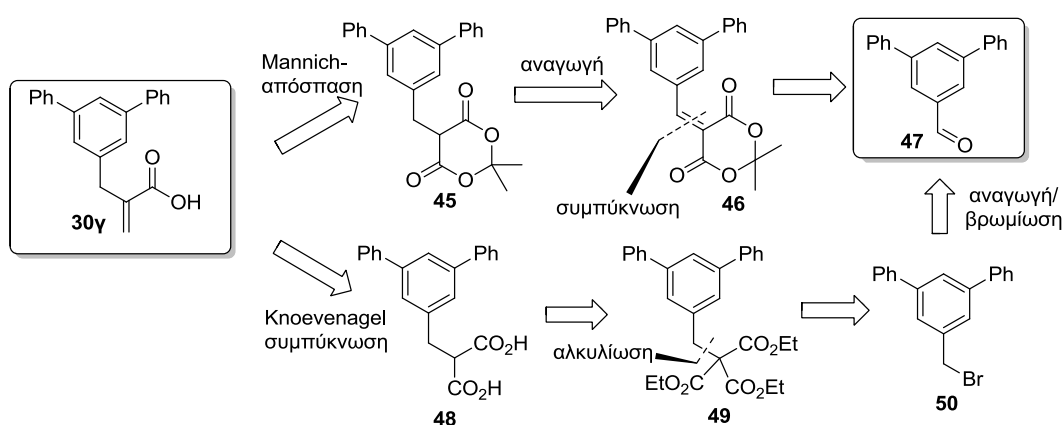
Η αντίδραση σύζευξης έγινε σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που προτάθηκαν από τον Steglich [131] για αντίστοιχες εστεροποιήσεις δηλαδή με χρήση δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου (DCC) σαν αντιδραστήριο σύζευξης παρουσία 4,4-διμεθυλοαμινοπυριδίνης (DMAP) ως βασικό καταλύτη (Σχήμα 20) [132]. Ακολούθησε αναγωγή της παραγόμενης ενόλης **41** με σταδιακή προσθήκη περίσσειας NaBH_4 και AcOH , προς τον σχηματισμό της ένωσης **42** με απόδοση δύο σταδίων 49%, έπειτα από χρωματογραφικό καθαρισμό [129, 132] και τέλος μια αντίδραση Mannich του παραγώγου **42** με το άλας Eschenmosser σε διάλυμα EtOH/THF , σε απόδοση 93% μετά από χρωματογραφία στήλης (Σχήμα 20) [129]. Πρέπει να σημειωθεί ότι η προσθήκη THF ήταν απαραίτητη για την επιτυχή έκβαση της τελευταίας αντίδρασης λόγω της μεγάλης δυσδιαλυτότητας της ένωσης **42**.

Η σύνθεση της ένωσης **30β** μέσω της τελευταίας αντίδρασης ακολουθεί τον μηχανισμό που περιγράφεται στο Σχήμα 21. Στις συνθήκες θέρμανσης που επικρατούν στην αντίδραση, αρχικά πραγματοποιείται μία διάνοιξη του δακτυλίου της **42** από την πυρηνόφιλη προσβολή της αιθανόλης στο καρβόνιο του υποκατεστημένου οξέος Meldrum. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ακετόνης και του μηλονικού μονοοξέος **43** το οποίο στη συνέχεια αποτελεί το υπόστρωμα που θα προσβάλλει το άλας Eschenmosser μέσω μίας αντίδρασης Mannich. Το ενδιάμεσο **44** που παράγεται πρωτονιώνεται ενδομοριακά από το όξινο πρωτόνιο του καρβοξυλικού οξέος με αποτέλεσμα να προάγεται έτσι η αποκαρβοξυλίωσή του και η απόσπαση διμεθυλαμίνης σε μία διαδικασία παρόμοια με την απόσπαση Hofmann.



Σχήμα 21: Μηχανισμός σύνθεσης του παραγώγου 30β.

Ακολούθησε η διερεύνηση της συνθετικής πορείας για το ακρυλικό οξύ **30γ**, η οποία δεν περιγράφεται στη βιβλιογραφία, επομένως βασικός μας στόχος ήταν η διερεύνηση της σύνθεσής του μέσω της αλδεΐδης **47** (Σχήμα 22).

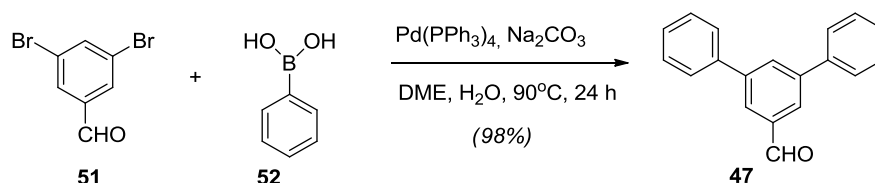


Σχήμα 22: Πιθανές ρετροσυνθετικές αναλύσεις του ακρυλικού οξέος 30γ

Οι πιθανές ρετροσυνθετικές αναλύσεις για την ένωση **30γ** απεικονίζονται στο Σχήμα 22. Με βάση την πρώτη μέθοδο που περιλαμβάνει λιγότερα συνθετικά βήματα, το ακρυλικό οξύ **30γ** θα μπορούσε να προέλθει από την αντίδραση Mannich με χρήση του άλατος Eschenmosser στο υποκατεστημένο παράγωγο του οξέος Meldrum **45**. Το παράγωγο **45** θα μπορούσε να προέλθει από τη συμπύκνωση του οξέος Meldrum με την αλδεΐδη **47** και στη συνέχεια αναγωγή του παραγόμενου προϊόντος **46**. Η δεύτερη ρετροσυνθετική ανάλυση περιλαμβάνει συμπύκνωση Knoevenagel του διοξέος **48** με φορμαλδεΐδη. Το διοξύ **48** μπορεί να προέλθει από σαπωνοποίηση/αποκαρβοξυλίωση του τριεστέρα **49** που μπορεί να συντεθεί με αλκυλίωση του μεθανοτρικαρβοξυλικού αιθυλεστέρα από το βρωμίδιο **50** σε βασικές συνθήκες με μηχανισμό S_N2 . Τέλος,

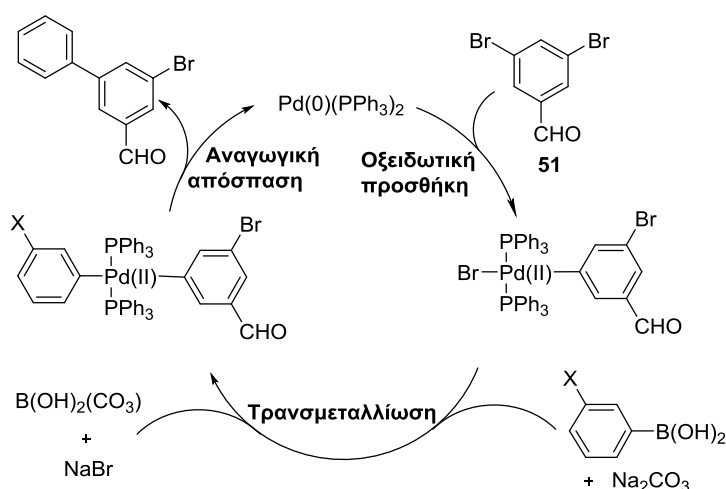
το απαιτούμενο βρωμίδιο **50** μπορεί να προέλθει από την αλδεΐδη **47** με αναγωγή και ακόλουθη βρωμίωση της προκύπτουσας αλκοόλης.

Με βάση το παραπάνω ρετροσυνθετικό Σχήμα 22, αρχικός μας στόχος, ήταν η σύνθεση της αλδεΐδης **47**, μέσω μιας Pd-καταλυόμενης Suzuki σύζευξης της 3,5-διβρωμοβενζαλδεΐδης **51** με το κατάλληλο βορονικό οξύ **52** (Σχήμα 23) [133].



Σχήμα 23: Σύνθεση της αλδεΐδης **37**

Οι αντίδραση αυτή βασίστηκε σε βιβλιογραφικά αναφερθείσα μέθοδο και πραγματοποιήθηκε σε αδρανή ατμόσφαιρα με χρήση καταλύτη παλλαδίου ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) και περίσσεια βάσης Na_2CO_3 , σε DME και H_2O [133]. Για το προϊόν **47** απαιτήθηκαν 24 ώρες για την ολοκλήρωση αντίδρασης και η τελική αλδεΐδη παρελήφθη ως λευκό στερεό σε απόδοση 98%. Ο μηχανισμός της αντίδρασης αναλύεται στο Σχήμα 24.



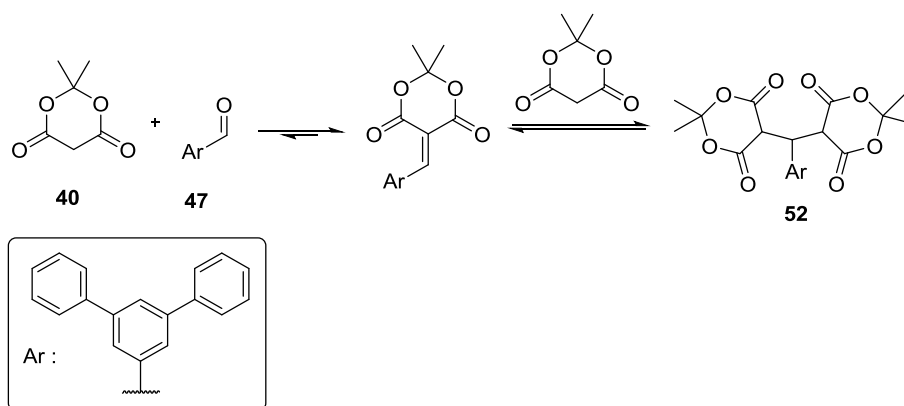
Σχήμα 24: Μηχανιστικός καταλυτικός κύκλος σύνθεσης της ένωσης **47** με αντίδραση Pd-καταλυόμενης Suzuki σύζευξης

Ο καταλυτικός κύκλος (Σχήμα 24) ξεκινάει με την οξειδωτική προσθήκη της 3,5-διβρωμοβενζαλδεΐδης **51** στον καταλύτη Pd(0). Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την τρανσμεταλλίωση κατά την οποία η φαίνυλο ομάδα μετακινείται από το ενεργοποιημένο οργανοβοράνιο στο μέταλλο. Η ενεργοποίηση γίνεται με τη βάση (Na_2CO_3), η οποία καθιστά το άτομο του βορίου καλύτερο πυρηνόφιλο (Σχήμα 24). Στο τελικό στάδιο του καταλυτικού κύκλου, το ενδιάμεσο σύμπλοκο παλλαδίου

υφίστανται αναγωγική απόσπαση, όπου προκύπτει το τελικό προϊόν της αντίδρασης και αναγεννάται και ο καταλύτης Pd(0). Ωστόσο, το τελικό αυτό προϊόν εισέρχεται εκ νέου στον καταλυτικό κύκλο ως αρυλαλογονίδιο και ακολουθεί την ίδια διαδικασία, οπότε προκύπτει η τελική ένωση **49**.

Ιδιαίτερη σημασία για την εξέλιξη της αντίδρασης έχει η διατήρηση αδρανών συνθήκων έτσι ώστε να αποφευχθούν προϊόντα οξειδωσης, ιδιαίτερα του ευοξειδωτου καταλύτη παλλαδίου. Σημαντική, επίσης, απαίτηση για την επιτυχή διεξαγωγή των αντιδράσεων είναι η ολοκλήρωση της αντίδρασης, ώστε να μην παραμείνει μονοαρυλιωμένο παράγωγο στο μίγμα της αντίδρασης που θα δημιουργούσε προβλήματα κατά τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος.

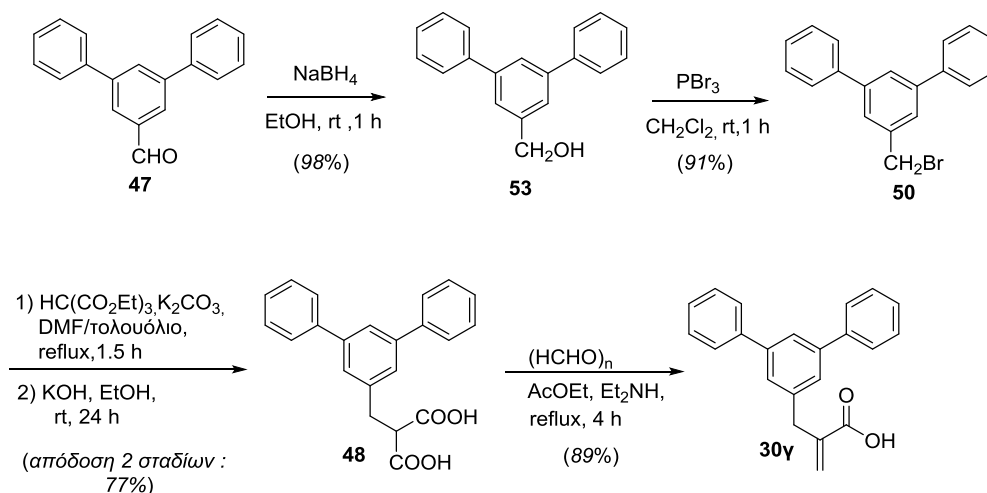
Μετά από την επιτυχή σύνθεση της αλδεΐδης **47**, πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές αντιδράσεις της αντίδρασης σύζευξης της αλδεΐδης **47** με το οξύ Meldrum **40**, από τις οποίες δεν σχηματίστηκε ο επιθυμητός ακρυλικός εστέρας, γεγονός που αποδόθηκε στον σχηματισμό του διυποκατεστημένου παραγώγου τύπου **52** (Σχήμα 25), όπως διαπιστώθηκε από τη λήψη φασμάτων ^1H NMR και MS. Συνεπώς η πορεία αυτή απορρίφθηκε.



Σχήμα 25: Σχηματισμός διμερούς παραπροϊόντος του τύπου **52**

Μετά από την αποτυχημένη προσπάθεια σύζευξης της αλδεΐδης **47** με το οξύ Meldrum, ακολουθήθηκε η δεύτερη ρετροσυνθετική ανάλυση του σχήματος 22. Πιο συγκεκριμένα, η αλδεΐδη **47** μετατράπηκε στο αντίστοιχο βρωμίδιο **50** (Σχήμα 26) [134]. Αρχικά παρελήφθη η αλκοόλη **53** μετά από αναγωγή με NaBH_4 σε EtOH χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό και ακολούθησε αντίδραση βρωμίωσης της αλκοόλης **53** με PBr_3 προς το αντίστοιχο βρωμίδιο **50** το οποίο παρελήφθη σε απόδοση 91%. Ακολουθως, το μηλονικό οξύ τύπου **48** προέκυψε από το βρωμίδιο **50** μέσω μίας πορείας δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο περιλάμβανε την αλκυλίωση

του μεθανοτρικαρβοξυλικού αιθυλεστέρα από τα βρωμίδια, παρουσία βάσης και το δεύτερο στάδιο περιλάμβανε αρχικά σαπωνοποίηση και ακολούθως αποκαρβοξυλίωση προς σχηματισμό της ένωσης **48** (Σχήμα 26) [135, 136].



Σχήμα 26: Σύνθεση της ένωσης **30γ** από την αλδεύδη **47**

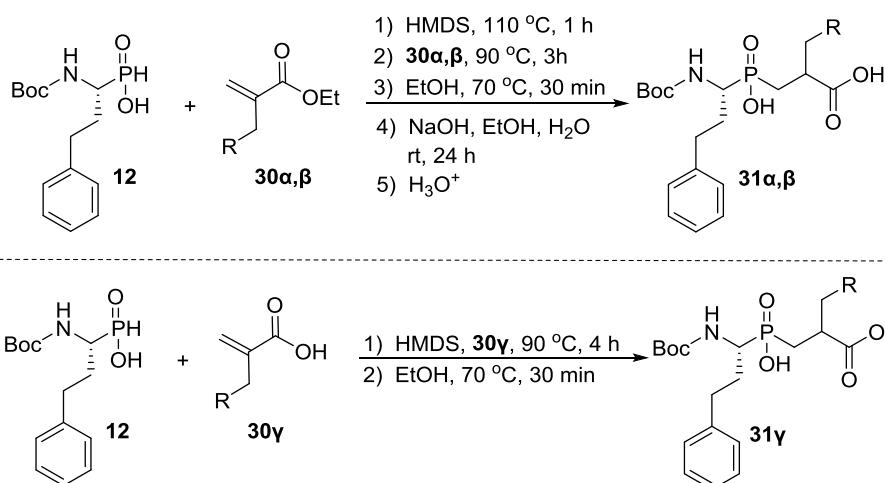
Τέλος, η σύνθεση του ακρυλικού οξέος **30γ** πραγματοποιήθηκε μέσω μίας αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel του ακατέργαστου μηλονικού οξέος **48** με χρήση παραφορμαλδεΐδης, παρουσία Et_2NH σε απόδοση 89% (Σχήμα 26) [120]. Το τελικό προϊόν **30γ** παρελήφθη σε υψηλό βαθμό καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

3.5.4 Σύνθεση των τελικών φωσφινικών τριπεπτιδικών ενώσεων **5α-γ**

Το επόμενο στάδιο για τη σύνθεση των τελικών ενώσεων **5α-γ** ήταν η σύνθεση των φωσφινικών διοξέων **31α-γ**. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τη σύνθεση των ενώσεων **31α,β**, οι ακρυλικοί εστέρες **30α,β** που συντέθηκαν υποβλήθηκαν σε μία κλασική αντίδραση *P*-Michael με το φωσφινικό οξύ **12** [105] και ακολούθησε σαπωνοποίηση των προϊόντων *P*-Michael με υδατικό διάλυμα NaOH 4M σε EtOH (Πίνακας 2). Για τη σύνθεση της διπεπτιδικής ένωσης **31γ** το ακρυλικό παράγωγο **30γ** που συντέθηκε, υποβλήθηκε επίσης σε μία αντίδραση *P*-Michael με το **12**. Πρέπει να σημειωθεί ότι για την αντίδραση αυτή έγινε με μια τροποποίηση της αντίδρασης με χρήση του ακρυλικού παραγώγου **30γ** με τη μορφή ελεύθερου καρβοξυλικού οξέος. Αυτή η τροποποίηση διερευνήθηκε, ώστε να αποφευχθούν τα βήματα προστασίας/αποπροστασίας του ακρυλικού παραγώγου και να παραληφθεί η τελική ένωση σε υψηλότερη απόδοση. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία του HMDS, το οποίο δρα και ως βάση αλλά και ως

σιλυλιωτικό, σε θερμοκρασία 90 °C για 4 ώρες. Ιδιαίτερη σημασία για την εξέλιξη της αντίδρασης έχει η διατήρηση της θερμοκρασίας στους 90 °C καθώς και οι αδρανείς συνθήκες (διαβίβαση αερίου αργού) έτσι ώστε να αποφευχθούν προϊόντα οξειδωσης του ενδιάμεσου ευοξειδωτου φωσφονίτη. Τα διοξεία τύπου **31α-γ** προέκυψαν ως μίγματα δύο διαστερεοϊσομερών, μετά από τον καθαρισμό τους με χρωματογραφία στήλης, με d.r που κυμαίνονταν από 1:1 έως 4:1 και σε αποδόσεις που φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Συνοπτικός πίνακας αντιδράσεων P-Michael μεταξύ των ενώσεων 12 και των 30α-γ



α/α	Ακρυλικό Υπόστρωμα	R	Προϊόν	β d.r.	Απόδοση*
1	30α		31α	1:1	^α 79%
2	30β		31β	1:1	^α 61%
3	30γ		31γ	5:1	88%

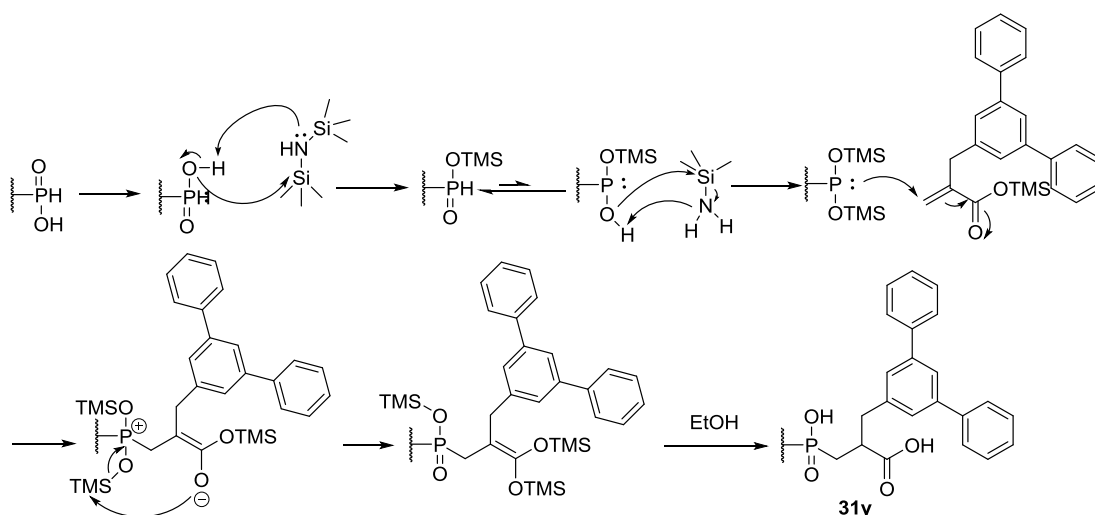
* Απόδοση απομονωμένου προϊόντος μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό

^α Απόδοση 2 σταδίων

^β Οι λόγοι d.r. υπολογίστηκαν με ολοκλήρωση των αντίστοιχων κορυφών στο φάσμα ³¹P NMR

Όσον αφορά τον μηχανισμό της αντίδρασης P-Michael με χρήση ακρυλικών παραγώγων με τη μορφή ελεύθερου καρβοξυλικού οξέος αυτός ξεκινάει με την σιλυλίωση του φωσφινικού οξέος **12** με HMDS στους 90 °C προκειμένου να ενεργοποιηθεί προς τον πυρηνόφιλο ενδιάμεσο δις(τριμεθυλοσιλυλο) φωσφονίτη (Σχήμα 27). Στην συνέχεια γίνεται η πυρηνόφιλη προσβολή του τρισθενούς

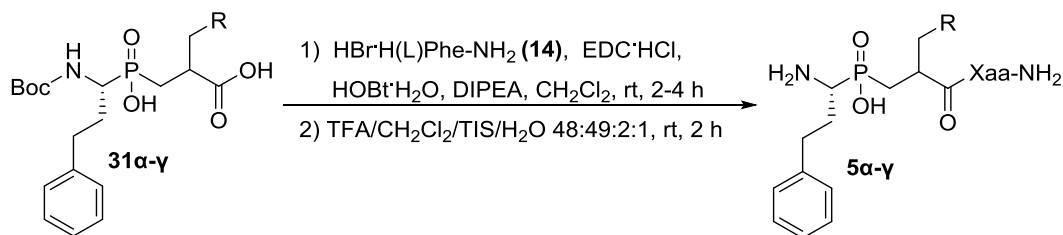
φωσφόρου στον ακραίο άνθρακα του *in situ* σχηματιζόμενου ακρυλικού TMS-εστέρα της ένωσης **30γ** σχηματίζοντας ένα φωσφινιακό κατιόν και ένα διπλό δεσμό (σε β-θέση ως προς την φωσφινική ομάδα). Έπειτα ακολουθεί μία μετάθεση Arbuzov της σιλυλομάδας με την οποία επανέρχεται το άτομο φωσφόρου σε πεντασθενή μορφή. Στο τελικό στάδιο λόγω προσθήκης της αιθανόλης γίνεται διάσπαση όλων των σιλυλεστέρων και σχηματίζεται το τελικό προϊόν **31γ**.



Σχήμα 27: Μηχανισμός αντίδρασης *P*-Michael για τη σύνθεση της ένωσης **31γ**

Τα δύο τελευταία βήματα της σύνθεσης των τελικών τριπεπτιδικών ενώσεων **5α-γ** περιλαμβάνουν τη σύζευξη των διοξέων τύπου **31** με το αμίδιο της (*S*)-Phe (**14**) και την τελική απομάκρυνση της Boc ομάδας (Πίνακας 3). Η σύζευξη των ενώσεων τύπου **31** με το αμίδιο **14** έλαβε χώρα με χρήση του υδατοδιαλυτού EDC ως αντιδραστήριο ενεργοποίησης, σε συνδυασμό με το HOBt, το οποίο μειώνει τον κίνδυνο της ρακεμίσωσης και των παράπλευρων αντιδράσεων, για να δώσουν τις τελικές ενώσεις **5α-γ** μετά από όξινη αποπροστασία με τη χρήση διαλύματος TFA/DCM/TIS/H₂O 48:49:2:1 [125]. Οι ενώσεις **5α-γ** παρελήφθησαν ως δύο διαστερεοϊσομερή που διαχωρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική HPLC και οι τιμές αναστολής τους μετρήθηκαν ξεχωριστά (επισημαίνονται ως **5α'**, **5β'**, **5γ'**, στον Πίνακα 4).

Πίνακας 3: Συνοπτικός πίνακας αποδόσεων 2 σταδίων σχηματισμού των ενώσεων 5α-γ, από τις ενώσεις 31α-γ



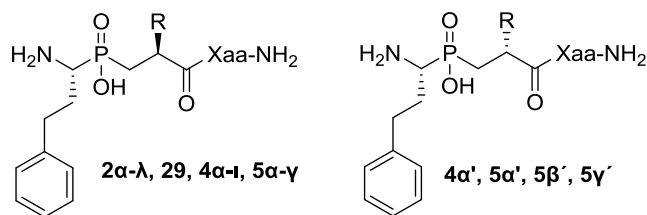
	Φωσφινικό Υπόστρωμα	R	Χαα	Προϊόν	Απόδοση*
1	31α		L-Phe	5α	79%, 2 στάδια
2	31β		L-Phe	5β	85%, 2 στάδια
3	31γ		L-Phe	5γ	76%, 2 στάδια

* Απόδοση απομονωμένου προϊόντος (μίγμα 2 διαστερεοϊσομερών) μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό

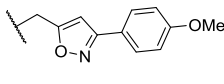
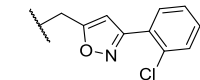
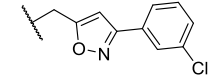
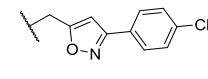
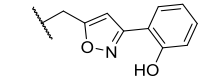
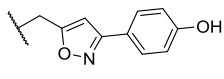

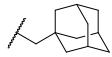
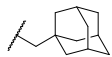


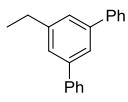
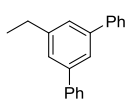
3.6 Ενζυμικά αποτελέσματα των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδικών ενώσεων διαφοροποιημένων στη θέση P₁'

Παρακάτω παρουσιάζεται η μελέτη SAR με βάση τους ενζυμικούς προσδιορισμούς των ενώσεων **29**, **4α-ι**, **4α'**, **5α-γ**, **5α'**, **5β'** και **5γ'** που πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό κέντρο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από την ερευνητική ομάδα του Ερευνητή Α' Ε. Στρατίκου (Πίνακας 4) καθώς και οι μελέτες μοριακής μοντελοποίησης για συγκεκριμένες από τις τελικές ενώσεις που πραγματοποιήθηκαν από τον Δρ. Α. Παπακυριακού στο ερευνητικό κέντρο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Στον Πίνακα 4 παρατίθενται επίσης τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης SAR [102] των ενώσεων **2α-λ** διαφοροποιημένων στη θέση P₂'.

Πίνακας 4: *In vitro* εκτίμηση των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων 2α-λ, 2θ, 4α-ι, 5α-γ, 5α', 5β' και 5γ'



α/α	R	Xaa	IC ₅₀ (nM)		
			ERAP1	ERAP2	IRAP
2α		L-Ala	2518	96	102
2β		L-Leu	682	118	32
2γ		L-Phe	155	109	41
2δ		L-Pro	949	144	14
2ε		L-Trp	48	80	57
2ζ		L-Tyr	340	55	29
2η		L-Ser	7473	129	1754
2θ		L-Lys	3093	271	1800
2ι		L-His	1969	128	381
2κ		L-Glu	2660	243	4024
2λ		D-Phe	2650	211	185
4α		L-Phe	126	190	18
4α'		L-Phe	2087	878	434
4β		L-Phe	178	130	13
4γ		L-Phe	98	217	20

4δ		L-Phe	48	84	10
4ε		L-Phe	102	123	13
4ζ		L-Phe	143	225	41
4η		L-Phe	71	345	34
4θ		L-Phe	65	83	9
4ι		L-Phe	33	56	4
29		L-Phe	43	37	2
5α		L-Phe	726	412	46
5α'		L-Phe	27008	2271	561
5β		L-Phe	3694	740	32
5β'		L-Phe	>100000	1922	221
5γ		L-Phe	>35000	105	21
5γ'		L-Phe	>100000	4622	281

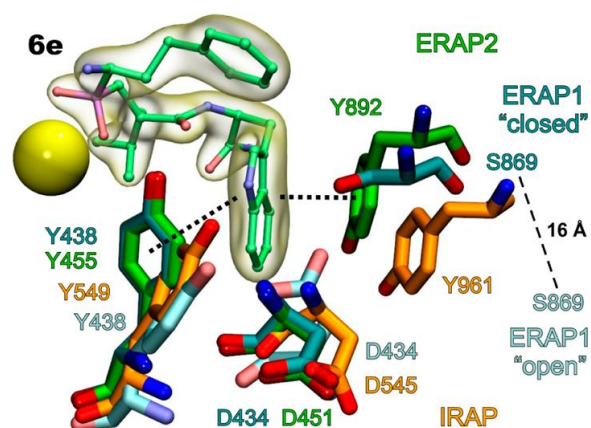
Οι πιο σημαντικές παρατηρήσεις που μπορούν να γίνουν βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι οι εξής:

- **Σχέσεις δομής-δραστικότητας: P₂' θέση**

Από την ενζυμική αξιολόγηση της θέσης P₂' των φωσφινικών τριπεπτιδίων τύπου **2** προέκυψε πως οι ισχυρότεροι αναστολείς για την ERAP1 είναι αυτοί που φέρουν υδρόφοβα, αρωματικά αμινοξέα στη θέση αυτή (**2γ**, **2ε**, **2ζ**), αν και ένα μικρό υδρόφοβο κατάλοιπο (**2β**) μπόρεσε επίσης εύκολα να φιλοξενηθεί. Πολικά ή φορτισμένα κατάλοιπα (**2η-κ**) μείωσαν σημαντικά την συγγένεια για την ERAP1,

όπως και ο αναστολέας που έφερε τη μη φυσική στερεοχημεία στη θέση P_2' (**2λ**). Αντιθέτως, φάνηκε ότι η ERAP2 μπορεί να φιλοξενήσει μεγαλύτερη ποικιλία πλευρικών αλυσίδων στην θέση S_2' , αφού όλοι οι αναστολείς που συντέθηκαν αποδείχτηκαν ισχυροί της τάξεως των nM (ενώσεις **2α–λ**, Πίνακας 4). Στην περίπτωση της IRAP οι υδρόφοβες, αλυσίδες προτιμήθηκαν επίσης σε αντίθεση με τα πολικά και φορτισμένα κατάλοιπα που οδήγησαν σε σημαντικά μειωμένες τιμές αναστολής (ενώσεις **2α, 2γ, 2ε**, Πίνακας 4). Συνολικά, η ανάλυσή μας έδειξε ότι η θέση P_2' είναι πιο σημαντική για τον έλεγχο της ισχύος του αναστολέα για το ERAP1, σε σχέση με τις ERAP2 και IRAP.

Το αποτέλεσμα αυτό αποτέλεσε έκπληξη για εμάς, δεδομένου ότι η κρυσταλλική δομή του ERAP2 με την ένωση **2ε** έδειξε ότι το ινδόλιο της Tyr στη θέση P_2' «παρεμβάλλεται» μεταξύ δύο καταλοίπων Tyr που σχηματίζουν τις δύο αντίθετες πλευρές της κοιλότητας S_2' . Ένα από αυτά τα κατάλοιπα της Tyr (Y438) είναι συντηρημένο στις ERAP1 και IRAP και είναι πραγματικά σημαντικό για την κατάλυση [56]. Αυτό το παράδοξο φαινόμενο μπορεί να εξορθολογιστεί λαμβάνοντας υπόψη τις μεταβολές διαμόρφωσης της ERAP1 (και πιθανώς και της ERAP2 και IRAP) που υφίστανται κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου [65]. Η ERAP1 έχει κρυσταλλωθεί σε δύο διαφορετικές διαμορφωτικές καταστάσεις, μια «κλειστή» και μια «ανοιχτή» κατάσταση. Η «ανοιχτή» κατάσταση θεωρείται λιγότερο ενεργή και χαρακτηρίζεται από αναδιάταξη στη θέση εξειδίκευσης S_1 και μια διακριτή διαμόρφωση για την καταλυτική Tyr (Y438). Η «κλειστή» κατάσταση χαρακτηρίζεται αντίστοιχα από την έλλειψη πρόσβασης του καταλυτικού κέντρου στον εξωτερικό διαλύτη. Εφόσον το σύμπλοκο μεταξύ του αναστολέα και του ERAP1 θα πρέπει να σχηματιστεί στην «ανοιχτή» κατάσταση, οι αλληλεπιδράσεις που μπορεί να διευκολύνουν την μετάβαση στην «κλειστή» κατάσταση που προωθεί τον σχηματισμό της κοιλότητας εξειδίκευσης S_1 θα ευνοούσε τη συγγένεια του αναστολέα. Είναι λογικό, επομένως, οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες στην P_2' να επηρεάζουν την συγγένεια του αναστολέα διαφορετικά, ανάλογα με τη διαμόρφωση που λαμβάνει το καταλυτικό κατάλοιπο της Tyr. Πράγματι, ο προσανατολισμός της καταλυτικής Tyr είναι διαφορετικός μεταξύ των τριών ενζύμων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 23. Η σημασία των αρωματικών καταλοίπων στη θέση P_2' φαίνεται να συσχετίζεται με τον γνωστό προσανατολισμό του συγκεκριμένου καταλοίπου Tyr (κυρίως για την ERAP1, λιγότερο για την IRAP και καθόλου για την ERAP2).



Η κρυσταλλική δομή ακτίνων Χ του συμπλόκου της ERAP2 με την **2ε** (πράσινο, PDB κωδικός 4JBS) σε υπέρθεση με τα σύμπλοκα της ERAP1 με την μπεστατίνη (Κωδικοί PDB 2YD0, 3MDJ) στις κλειστές και ανοιχτές καταστάσεις (σκούρο και ανοικτό κυανό, αντιστοίχως) και της IRAP χωρίς προσδέτη (πορτοκαλί, Κωδικός PDB 5C97). Στην Εικόνα σημειώνονται οι διαφορετικοί προσανατολισμοί του καταλυτικού αμινοξέος Y438, του συντηρημένου D434, και του μη συντηρημένου S869, ειδικά στην ανοιχτή και κλειστή κατάσταση του ERAP1.

Εικόνα 23: Τρία βασικά κατάλοιπα που αποτελούν την υποπεριοχή S_2' των APAs [137].

Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι η SAR μελέτη για τους αναστολείς που καταλαμβάνουν την κοιλότητα S_2' αυτών των ενζύμων μπορεί να είναι πολύπλοκη λόγω των διαμορφωτικών καταστάσεων που είναι διαθέσιμες σε κάθε ένζυμο. Τέλος, το πιο ενδιαφέρον αποτέλεσμα από τη σάρωση της θέσης αυτής, είναι η εκλεκτική αναστολή της ERAP2 από τον αναστολέα **2η**, ο οποίος είναι 60 φορές πιο ισχυρός για την ERAP2 σε σχέση με την ERAP1 και 10 φορές πιο ισχυρός σε σχέση με τον IRAP.

- **Σχέσεις δομής-δραστικότητας: P_1' θέση.**

Από τη διερεύνηση της φύσης των P_1' πλευρικών αλυσίδων των φωσφινικών τριπεπτιδίων τύπου **4** και **5** (Πίνακας 4) προέκυψε το συμπέρασμα ότι το συνολικό σχήμα του υποκαταστάτη της θέσης P_1' μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το προφίλ της εκλεκτικότητας. Πιο συγκεκριμένα, όλες οι ενώσεις τύπου **4** φιλοξενούνται καλά στον θύλακα S_1' των τριών ενζύμων, δίνοντας σε όλες τις περιπτώσεις αναστολή μέτριων ή χαμηλών τιμών nM, όμως η μεγαλύτερη βελτίωση παρατηρήθηκε στην περίπτωση της IRAP, όπου οι τιμές IC_{50} κυμαίνονται από 4 - 41 nM.

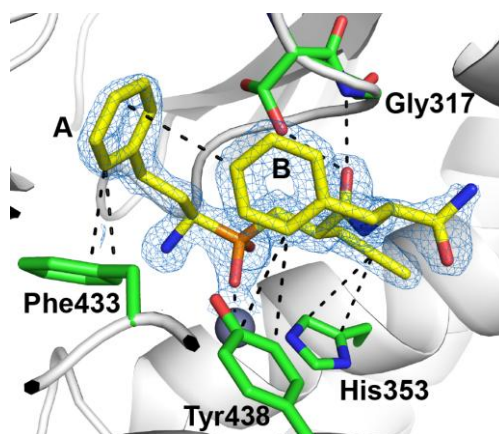
Τα αποτελέσματά μας έδειξαν επίσης ότι οι ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες των αναστολέων **5α-γ** δεν μπόρεσαν να φιλοξενηθούν από την ERAP1, ενώ οι εκτεταμένες πλευρικές αλυσίδες των ισοξαζολίων **4α-ι** ήταν καλά ανεκτές (Πίνακας 4). Ένα παρόμοιο αλλά λιγότερο εντονο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για την ERAP2, με ορισμένες εξαιρέσεις, όπως η ένωση **5γ**. Αντιθέτως, η IRAP επέδειξε συγγένεια της τάξεως των nM για όλες τις ενώσεις (**5α-γ**), και αποδείχτηκε ικανή να φιλοξενήσει της P₁' πλευρικές αλυσίδες και των δύο ομάδων ενώσεων (**4α-ι** και **5α-γ**).

Αξιοσημείωτο είναι πως η αναστροφή της στερεοχημείας στη θέση P₁' έδειξε σημαντική πτώση στην αναστολή για όλες τις ενώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 (**4α'**, **5α'**, **5β'** και **5γ'**), κάτι που είναι σύμφωνο με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας για το ζεύγος διαστεροϊσομερών της ένωσης **DG013** [97] και αναδεικνύει την σημασία του στερεοχημικού ελέγχου για την ανάπτυξη βελτιωμένων αναστολέων, όσον αφορά τη ισχύ και την εκλεκτικότητα. Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και από τον Mucha και τους συνεργάτες του, οι οποίοι αξιολόγησαν έναντι των ERAP1/2 μια βιβλιοθήκη μιγμάτων διαστεροϊσομερών φωσφινικών διπεπτιδίων που είχαν αναπτυχθεί παλαιότερα ως αναστολείς της APN [94].

Ενδιαφέρον, παρουσιάζει η συγγένεια που επέδειξε ο αναστολέας **29 (DG046)** ο οποίος εμφάνισε ισχυρή αναστολή και για τα τρία ένζυμα και ειδικά για την IRAP (Πίνακας 4). Είναι αξιοσημείωτο ότι η παρουσία της πλευρικής προπάργυλο ομάδας στη θέση P₁' της ένωσης **29** βελτίωσε κατά ~ 3.5 φορές την τιμή IC₅₀ για την ERAP1 σε σχέση με την ένωση **2ε** (που φέρει την ισοβούτυλο ομάδα στην ίδια θέση), καθιστώντας την ένωση **29** εξίσου ισχυρό αναστολέα για την ERAP1 με την ένωση **DG013A**. Επιπλέον, η ένωση **29** είναι ο πιο ισχυρός αναστολέας που έχει περιγραφεί για την ERAP2 (IC₅₀ = 37 nM), και κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα αναστολης με τα μακροκυκλικά ανάλογα αγγειοτενσίνης τα οποία έχουν περιγραφεί από τον Hallberg και τους συνεργάτες του ως οι πιο ισχυροί αναστολείς για την IRAP [138, 139].

Για τη διερεύνηση αυτού του αποτελέσματος λύθηκε μιας υψηλής ανάλυσης (1.60 Å) κρυσταλλική δομή της κλειστής διαμόρφωσης της ERAP1 με τον αναστολέα **29** προσδεδμεμένο στο ενεργό της κέντρο, από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Ε. Στρατίκου στο ερευνητικό κέντρο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» [140]. Ο αναστολέας

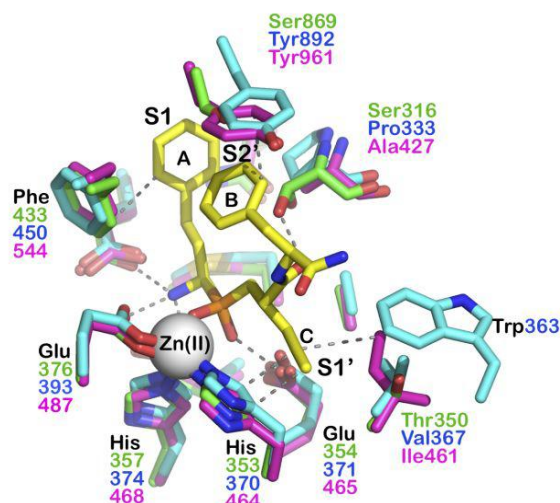
αυτός βρέθηκε να σταθεροποιείται μέσω ενός μη συνηθισμένου εκτεταμένου δικτύου αρωματικών αλληλεπιδράσεων T-σχήματος, ενώ η προπάργυλο ομάδα στη θέση P₁' να κατευθύνεται προς την S₁' περιοχή υιοθετώντας μία διαμόρφωση που βελτιστοποιεί τις π-π αλληλεπιδράσεις της με το αρωματικό νέφος της ιστοδίνης His353 που συμπλέκεται με τον ψευδάργυρο (Εικόνα 24)



Ο αναστολέας απεικονίζεται σε κίτρινο χρώμα και τα κύρια υπολείμματα της ERAP1 που δημιουργούν αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται με πράσινο χρώμα. Το άτομο του οξυγόνου απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα, το άζωτο με μπλε χρώμα και ο φωσφόρος με πορτοκαλί χρώμα. Ο Zn(II) του ενεργού κέντρου εμφανίζεται ως γκρι σφαίρα.

Εικόνα 24: Ο φωσφινικός αναστολέας DG046 στο ενεργό κέντρο του ERAP1 [140].

Επιπλέον, φάνηκε πως η έλλειψη ενός αρωματικού καταλοίπου στην κοιλότητα S₂' του ERAP1, αντίθετα με τις ERAP2 και IRAP (Ser869 σε ERAP1 έναντι Tyr892 σε ERAP2 και Tyr961 στο IRAP), απελευθερώνει την θέση P₂' του αναστολέα από το να «πακετάρεται» με παράλληλο τρόπο με οποιαδήποτε αρωματικό κατάλοιπο της περιοχής IV, λαμβάνοντας μια εντελώς διαφορετική διαμόρφωση (Εικόνα 25). Αυτή η διαφορετική διαμόρφωση έχει ως αποτέλεσμα μια πιο απομακρυσμένη τοποθέτηση της C-τελικής καρβοξυλομάδας, η οποία στον αναστολέα **29** βρίσκεται κατά περίπου ~3 Å μακριά από το μεταλλικό ιόν Zn, σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα του **DG013A**, όταν συνδέεται στην ERAP2. Αυτό το δίκτυο των αρωματικών αλληλεπιδράσεων T-σχήματος, περιορίζει σημαντικά την ελευθερία διαμόρφωσης του αναστολέα και φαίνεται βελτιστοποιημένο για το ενεργό κέντρο της ERAP1. Αυτό πιθανώς συμβάλλει στην ισχύ αυτού του αναστολέα, η οποία είναι συγκρίσιμη με την ένωση **DG013A**.



Τα αμινοξέα της ERAP1 φαίνονται με πράσινο χρώμα, της ομόλογης ERAP2 με κυανό χρώμα και της IRAP με μωβ χρώμα. Το άτομο του καταλυτικού ψευδαργύρου (II) εμφανίζεται ως γκρι σφαίρα. Η αρίθμηση του κάθε κατάλοιπου υποδεικνύεται σε διαφορετικά χρώματα ανάλογα με το ένζυμο. Τα άτομα άνθρακα του φωσφινικού αναστολέα απεικονίζονται με κίτρινο, τα άτομα οξυγόνου με κόκκινο, το άζωτο με μπλε χρώμα, ο φωσφόρος με πορτοκαλί. Απεικονίζονται μόνο τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε απόσταση 4Å από τον αναστολέα. Ο Zn (II) του ενεργού κέντρου εμφανίζεται ως γκρι σφαίρα. Οι θέσεις των θυλάκων εξειδίκευσης του ενεργού κέντρου S₁, S₁' και S₂' υποδεικνύονται κατά προσέγγιση.

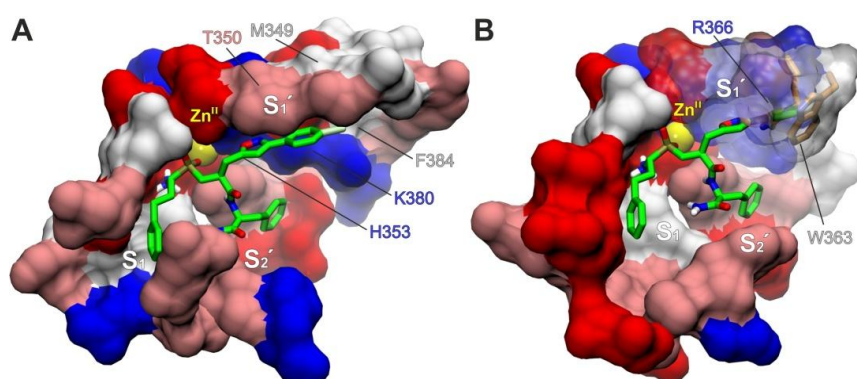
Εικόνα 25: Υπέρθυση των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της ERAP1 με την ομόλογη ERAP2 (κωδικός PDB 5AB0) και την IRAP (PDB κωδικός 5MJ6)[140].

- **Κρίσιμοι παράμετροι για την μεγιστοποίηση της εκλεκτικότητας**

Όσον αφορά την εκλεκτικότητα, τα αποτελέσματά μας αποκάλυψαν αρκετές ενώσεις εκλεκτικές για την ERAP2 και IRAP σε σχέση με την ERAP1, αλλά μόνο μερικές ενώσεις που επιδεικνύουν εκλεκτικότητα για την ERAP1, κάτι που είναι σύμφωνο με προηγούμενες αναφορές (Πίνακας 4) [67, 76, 97]. Αυτό πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της διαμορφωτικής δυναμικής της ERAP1, που δείχνει να λαμβάνει περισσότερες ανοικτές διαμορφώσεις από τις ERAP2 και IRAP, με μερικώς αποδιοργανωμένες S₁ και S₂' κοιλότητες καθιστώντας την ανάπτυξη αναστολέων μεγάλη πρόκληση [67, 69].

Όσον αφορά τους ισοξαζόλυλο-αναστολείς **4α-ι** η θέση P₁' αποδείχτηκε χρήσιμη στη βελτίωση της εκλεκτικότητας για την ERAP1 έναντι της ERAP2. Συγκεκριμένα, το *p*-χλωρο-παράγωγο **4η** είναι ο πιο ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας για την ERAP1 (IC₅₀ = 71 nM) σε σχέση με την ERAP2 (IC₅₀ = 345 nM) που περιγράφεται στην παρούσα εργασία. Σε μια προσπάθεια να εκλογικευτεί η παρατήρηση αυτή

εξετάστηκαν οι πιθανές διαμορφώσεις της ένωσης **4η**, μέσω μελέτης μοριακού ελλιμενισμού της διαμόρφωσής της στο ενεργό κέντρο των ERAP1 και ERAP2, που έδειξε πως η αλυσίδα P₁' εκτείνεται γραμμικά στην στενή, επιμήκη κοιλότητα S₁' της ERAP1. Αυτή η κοιλότητα όμως είναι αρκετά στενότερη στην ERAP2, κάνοντας μη επιτρεπτή αυτήν την διαμόρφωση για την φιλοξενία μακριών αλυσίδων, ερμηνεύοντας έτσι την παρατηρούμενη εκλεκτικότητα (Εικόνα 26).



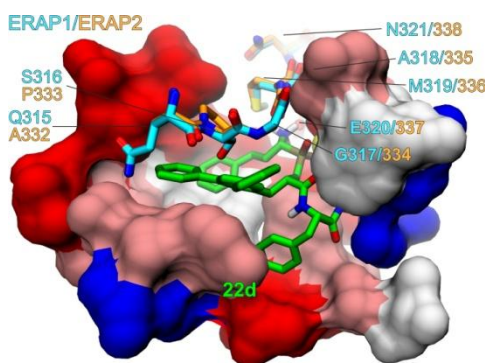
Ο αναστολέας απεικονίζεται σε μορφή ραβδίου με πράσινο C, μπλε N, κόκκινο O, πορτοκαλί P, κίτρινη σφαίρα Zn (II)

Εικόνα 26: (A) Προβλεπόμενη διαμόρφωση της ένωσης **4η** στο ενεργό κέντρο της ERAP1 (PDB ID: 2YD0), όπου η πλευρική αλυσίδα P₁' εκτείνεται μέσα στην βαθιά, επιμήκη κοιλότητα S₁'. **(B)** Το ενεργό κέντρο της ERAP2 (PDB ID: 4JBS) φαίνεται από την ίδια όψη, όπου η στενότερη κοιλότητα της S₁' καθιστά την εκτεταμένη διαμόρφωση της **4η** απρόσιτη, λόγω στερικών συγκρούσεων με τα κατάλοιπα R366 και W363.

Μια ακόμα παρατήρηση που υποστηρίζει την παραπάνω περιγραφή του σχήματος της κοιλότητας S₁' για τις ERAP1 και ERAP2 είναι πως τα ορθο-υποκατεστημένα ισοξαζόλια (**4β**, **4ε**, **4θ**) επιδεικνύουν την μικρότερη εκλεκτικότητα για την ERAP1. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές σε αντίθεση με την ένωση **4η** απαιτούν μια πιο πλατιά, πιο ευρύχωρη κοιλότητα S₁' για να φιλοξενηθούν οι P₁' αλυσίδες τους.

Όσον αφορά τις ογκώδεις ομάδες στη θέση P₁', για τις ERAP1/ ERAP2 δεν αποδεικνύονται ιδανικές στη θέση αυτή, αν και υπάρχουν μερικές εξαιρέσεις, που οδήγησαν σε εκλεκτικούς αναστολείς, όπως είναι το τερφαίνυλο παραγωγο **5γ** που είναι 350 φορές δραστικότερο για την ERAP2 σε σχέση με την ERAP1 (Πίνακας 4). Μελέτη docking έδειξε ότι η **5γ** συνδέεται με την ERAP2 με την P₁' αλυσίδα της να έρχεται σε επαφή με την επέκταση του βρόχου GAMEN (Εικόνα 27). Σε αυτή τη θέση, η παρουσία δύο μη συντηρημένων καταλοίπων στην ERAP1 (Q315 και

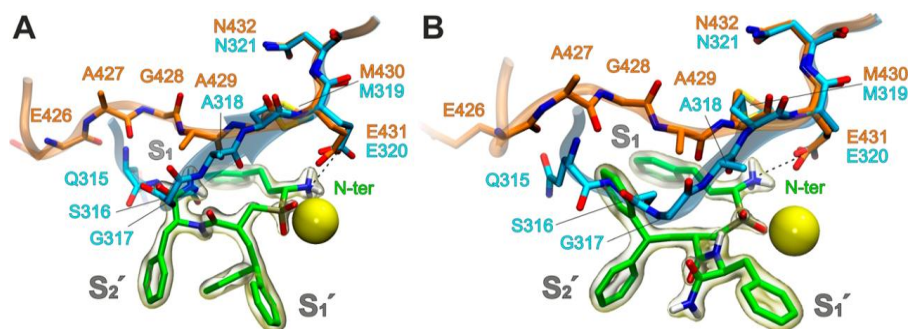
S316), ίσως να εμποδίζει την λήψη παρόμοιων διαμορφώσεων της **5γ**, αιτιολογώντας έτσι την παρατηρούμενη εκλεκτικότητα.



Απεικονίζεται το συντηρημένο μοτίβο GAMEN των δύο μη συντηρημένων καταλοίπων της ERAP1 (κυανό, Q315 και S316) σε σχέση με την ERAP2 (πορτοκαλί) που πιθανώς περιορίζουν την λήψη παρόμοιων διαμορφώσεων της **5γ** (πράσινο) στην ERAP1 (κωδικοί PDB: 2YD0 για ERAP1, 4JBS για ERAP2).

Εικόνα 27: Μελέτη docking, που δείχνει την χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση της 5γ στο ενεργό κέντρο της ERAP2, σε υπέρθεση με την ERAP1

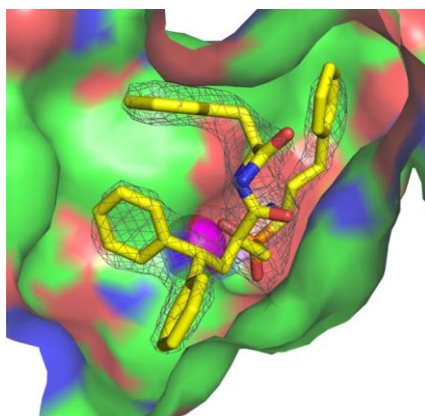
Επιπλέον, για την IRAP η θέση P_1' αποδείχτηκε εξαιρετική για την εύρεση εκλεκτικών αναστολέων της. Από τη μελέτη αυτών των ενώσεων προέκυψε η ένωση **5β** (**DG026A**) που αποτελεί ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα της IRAP έναντι των ERAP2 και ERAP1. Συγκεκριμένα, το *RSS* ισομερές της ένωσης **5β** αναστέλλει την IRAP με $IC_{50} = 32$ nM, δηλαδή 23 φορές ισχυρότερα από την ERAP2 ($IC_{50} = 740$ nM) και >1000 φορές ισχυρότερα από την ERAP1 ($IC_{50} = 36$ μM), όπως φαίνεται στον Πίνακα 4. Για την ερμηνεία της διαφοροποίησης που παρατηρείται στην ενζυμική συγγένεια του αναστολέα **5β**, πραγματοποιήθηκε αρχικά μελέτη docking χρησιμοποιώντας την ανοικτή διαμόρφωση της IRAP, όπου βρέθηκαν δύο χαμηλής ενέργειας διαμορφώσεις που απεικονίζονται στην Εικόνα 28, στην οποία έγινε η υπόθεση ότι η εκλεκτικότητα του **DG026A** για την IRAP έναντι της ERAP1 προκύπτει από τον διαφορετικό προσανατολισμό αυτού του μοτίβου. Και στις δύο διαμορφώσεις η πλευρική αλυσίδα P_1' δεν αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα του μοτίβου GAMEN αλλά αναγκάζει την P_1 ή P_2' αλυσίδα του αναστολέα να καταλάβει τον ανοικτό χώρο γύρω από αυτό το μοτίβο.



Η πιο «κλειστή διαμόρφωση» του μοτίβου GAMEN και των δύο προϋπάρχοντων καταλοίπων στην ERAP1 (κυανό) σε σχέση με την IRAP (πορτοκαλί) πιθανώς δεν επιτρέπουν την λήψη αντίστοιχων διαμορφώσεων της **5β** (πράσινο) στην ERAP1 (κωδικοί PDB: 2YD0 για ERAP1, 5C97 για IRAP).

Εικόνα 28: Μελέτη docking, που δείχνει τις δύο χαμηλότερες ενεργειακά διαμορφώσεις της ένωσης 5β στο ενεργό κέντρο της IRAP, σε υπέρθεση με την κλειστή δομή της ERAP1 (κυανό C).

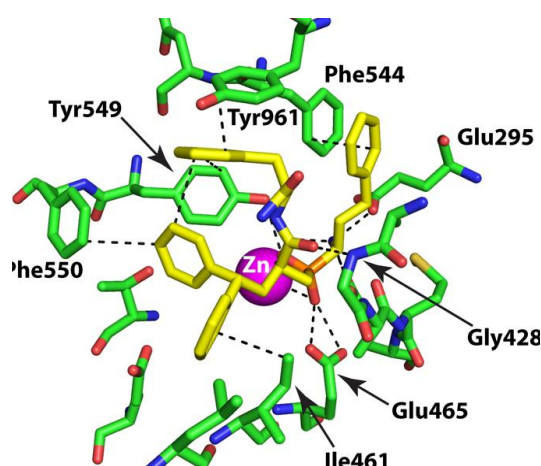
Για να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση σχετικά με την παρατηρούμενη εκλεκτικότητα του **DG026A** πραγματοποιήθηκε, σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Δρ. Ε. Στρατίκου από το ερευνητικό κέντρο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», η επίλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου της IRAP με την ένωση **DG026A** (Εικόνα 29) με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, σε ανάλυση 2.53 Å, η οποία επιβεβαίωσε και την στεreoχημεία του [R,S,S] [98].



Εικόνα 29: Ατομικό μοντέλο του φωσφινικού αναστολέα DG026A ([R,S,S] ισομερές) στο ενεργό κέντρο της IRAP [98].

Αρκετές αλληλεπιδράσεις με την κύρια αλυσίδα και τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων της IRAP βρέθηκαν να σταθεροποιούν τον αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 30). Οι περισσότερες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις ήταν ίδιες με τις αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν για ένα φωσφινικό 10-πεπτίδιο με μερικές αξιοσημείωτες διαφορές: (i) την αλληλεπίδραση της Tyr961 με τη Phe της P₂' θέσης του αναστολέα, (ii) την αλληλεπίδραση της Phe550 με έναν από τους

δακτυλίους του φαινυλίου της 2,2-διφαινυλοαιθυλο ομάδας του αναστολέα, καθώς και την υδρόφοβη αλληλεπίδραση της Leu457 και Ile461 με το άλλο φαινύλιο της 2,2-διφαινυλοαιθυλο ομάδας και (iii) δεσμό υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού του αναστολέα και του αμιδίου της Gly428 της κύριας αλυσίδας, όπως επίσης και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των ατόμων άνθρακα του αναστολέα με τις Ala427 και Ala429 (Εικόνα 30).



Ο αναστολέας εμφανίζεται σε κίτρινο χρώμα και τα άτομα της πλευρικής αλυσίδας της IRAP εντός 4 Å από τον αναστολέα εμφανίζονται με πράσινο χρώμα. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις της πλευρικής αλυσίδας μεταξύ 3 και 4 Å. Το καταλυτικό άτομο Zn (II) παρουσιάζεται ως ροζ σφαίρα και οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τις αλληλεπιδράσεις ενζύμου-αναστολέα.

Εικόνα 30: Δίκτυο αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν τον φωσφινικό αναστολέα DG026A στο ενεργό κέντρο της IRAP [98].

Επιπλέον, από τη μελέτη αυτή προέκυψε το ενδιαφέρον αποτέλεσμα πως με την πρόσδεση του αναστολέα **DG026A**, το ένζυμο υφίσταται μια διαμορφωτική αλλαγή. Αν και έχουν περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες τρεις κρυσταλλικές δομές της IRAP μία χωρίς και δύο με συνδεδεμένους προσδέτες δεν έχει παρατηρηθεί κάποια σημαντική διαμορφωτική αλλαγή σε αυτές [59, 61]. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες δομές, στη συγκεκριμένη περίπτωση, βρέθηκε πως η IRAP υιοθέτησε μία νέα κλειστή διαμόρφωση στην οποία οι τομείς II και IV τοποθετήθηκαν παραπλεύρως, σχηματίζοντας μια κοίλη δομή η οποία απέκλεισε την πρόσβαση του εξωτερικού διαλύτη στο καταλυτικό κέντρο [98]. Ο καθοριστικός παράγοντας για αυτήν την διαμορφωτική αλλαγή είναι μία π-αρωματική αλληλεπίδραση μεταξύ του αμινοξέος Tyr961 της περιοχής IV και του Phe της πλευρικής αλυσίδας P₂' του αναστολέα (Εικόνα 30). Μια παρόμοια διαμορφωτική αλλαγή έχει προταθεί επίσης και για την ERAP1 ως βασικό μέρος του καταλυτικού

του κύκλου. Δεδομένων, λοιπόν, των δομικών και λειτουργικών ομοιοτήτων μεταξύ των δύο ενζύμων, έγινε η υπόθεση ότι η αλλαγή διαμόρφωσης από ανοιχτή σε κλειστή αποτελεί επίσης βασικό συστατικό του καταλυτικού κύκλου του IRAP. Η ανοιχτή διαμόρφωση, επομένως, θεωρείται πως είναι υπεύθυνη για την αρχική δέσμευση του υποστρώματος, η οποία μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω κλείσιμο που ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις και διευκολύνει την κατάλυση.

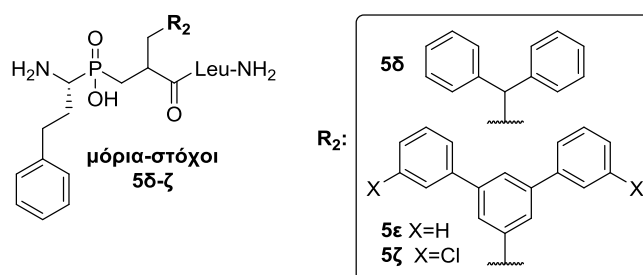
Αξίζει να αναφερθεί πως η κρυσταλλική δομή της ένωσης **DG026A** στο ενεργό κέντρο της IRAP (Εικόνα 29), δεν επικύρωσε την υπόθεση της μοριακής μοντελοποίησης της Εικόνας 28 όσον αφορά την ερμηνεία της εκλεκτικότητας της, καθώς ο βρόχος GAMEN βρέθηκε αναπροσανατολισμένος και σε παρόμοια διαμόρφωση με τον βρόχο GAMEN στις ERAP2 και ERAP1 [98]. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ο βρόχος GAMEN λαμβάνει μία ξεχωριστή διαμόρφωση στην IRAP επιτρέποντας επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τον αναστολέα, αποκαλύπτοντας ότι το ενεργό κέντρο της IRAP έχει ξεχωριστή πλαστικότητα. Οι ατομικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναστολέα και της IRAP που είναι μοναδικές σε αυτήν την μοναδική διαμόρφωση εξηγούν και την μεγάλη εκλεκτικότητα έναντι των ομόλογων αμινοπεπτιδασών ERAP1 και ERAP2 [98]. Η μοναδική αυτή διαμόρφωση της IRAP φαίνεται, επίσης, να μπορεί να εξηγήσει την πολύπλευρη βιολογική λειτουργία του, καθώς ένα εξαιρετικής πλαστικότητας μοτίβο GAMEN μπορεί να επιτρέψει τη φιλοξενία ενός ευρέος φάσματος υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των κυκλικών πεπτιδίων [61]. Είναι επίσης πιθανό η δομική πλαστικότητα του μοτίβου GAMEN να επιτρέπει την αποτελεσματική επεξεργασία μιας μεγαλύτερης ποικιλίας πρόδρομων αντιγονικών πεπτιδίων από την IRAP [141]. Πράγματι, αν και η ERAP1 συνεργάζεται με την ERAP2 για τη δημιουργία αντιγονικών πεπτιδίων [43], η IRAP μάλλον εκτελεί παρόμοια λειτουργία μόνη της και ενδεχομένως για τον λόγο αυτό, συνδυάζει την εξειδίκευση του N-τελικού άκρου των ERAP1 και ERAP2 [21].

Τέλος, πραγματοποιήθηκε βιολογική αξιολόγηση του, που έδειξε πως ο αναστολέας **DG026A** ήταν ικανός να ρυθμίσει την διασταυρούμενη παρουσίαση *ex vivo* με δοσοεξαρτώμενο και ειδικό με τον στόχο τρόπο.

3.7 Σύνθεση των φωσφινικών τριπεπτιδικών ενώσεων 5δ-ζ που φέρουν Leu στη θέση P₂' και μελέτη της αναστολής τους

3.7.1 Εισαγωγή

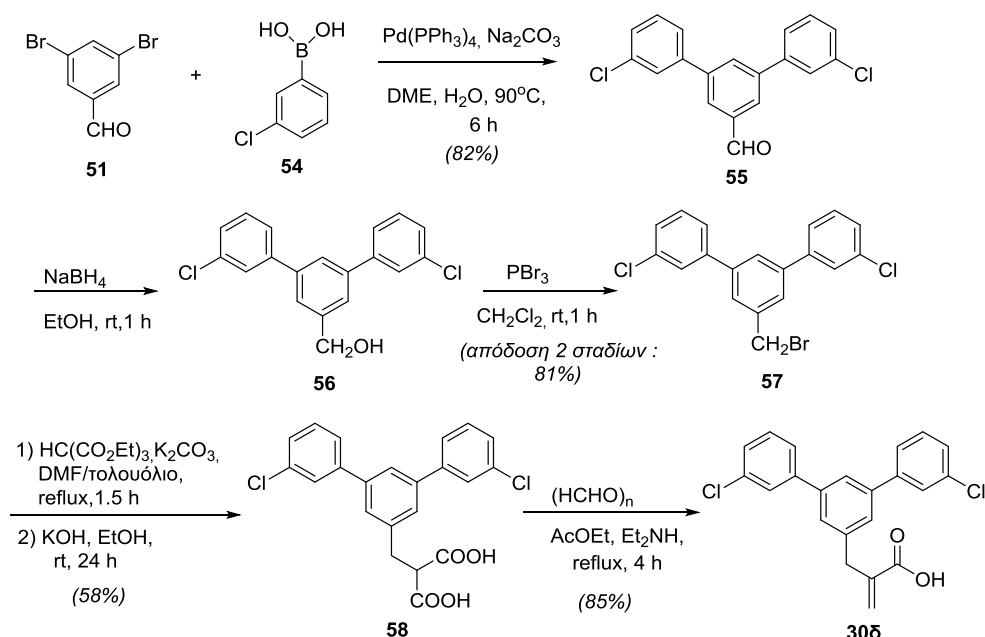
Βάσει των ενζυμικών αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο 3.6, τα οποία έδειξαν πως η IRAP ανεστάλη με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα από τις ενώσεις που έφεραν τις ογκώδεις ομάδες (βενζυδρολομάδα και *m*-τερφαινυλομάδα) στη θέση P₁', σε σχέση με τις ERAP1/ERAP2, θελήσαμε να διερευνήσουμε την δυνατότητα ενίσχυσης της εκλεκτικότητας των ενώσεων αυτών, με τη σύνθεση δύο επιπλέον μορίων που θα έφεραν στη θέση P₁' τη βενζυδρολο ή την τερφαινυλο-ομάδα και την (L-Leu) στη θέση P₂' (**5δ,ε**) (Σχήμα 28). Η επιλογή της L-Leu για τη θέση αυτή βασίστηκε στα προκαταρκτικά αποτελέσματα της μελέτης σχέσεων δομής-δραστικότητας (ένωση **2β**, Πίνακας 4) [102], καθώς αυτή επέδειξε εκλεκτικότητα για την IRAP έναντι των άλλων δύο αμινοπεπτιδασών. Επιπλέον, σχεδιάστηκε και η σύνθεση ενός επιπλέον μορίου που θα φέρει χλωρο-υποκαταστάτες στα ακραία φαινύλια της *m*-τερφαινυλομάδας (**5ζ**), οι οποίοι θα μπορούσαν ίσως να ενισχύσουν την εκλεκτικότητα αυτή έναντι της IRAP με κάποιες επιπλέον αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 28).



Σχήμα 28: Δομές των μορίων-στόχων 5δ-ζ

3.7.2 Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου 30δ

Για την σύνθεση της τελικής ένωσης **5ζ**, απαραίτητη προϋπόθεση αποτέλεσε η σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου **30δ**, για την σύνθεση της οποίας ακολουθήθηκε παρόμοια συνθετική πορεία με την ένωση **30γ** (παραγραφος 3.5.3). Συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της αλδεΐδης **55**, μέσω μιας Pd-καταλυόμενης Suzuki σύζευξης της 3,5-διβρωμοβενζαλδεΐδης **51** με το κατάλληλο βορονικό οξύ **54** (Σχήμα 29) [133].

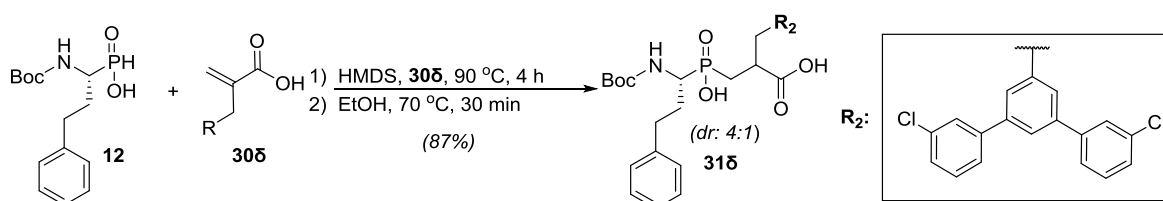


Σχήμα 29: Σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου 30δ

Οι αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε, σε αδρανή ατμόσφαιρα με χρήση καταλύτη παλλαδίου ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) και περίσσεια βάσης Na_2CO_3 , σε DME και H_2O , όπως και για τη σύνθεση της αλδεΐδης **47** [133]. Στην περίπτωση της **55** χρησιμοποιήθηκε το 3-χλωροφαινυλο βορονικό οξύ (**54**) και η αντίδραση ολοκληρώθηκε εντός 6 ωρών οπότε παρελήφθη το τελικό προϊόν ως λευκό στερεό σε απόδοση 82%. Έπειτα, για την σύνθεση του ακρυλικού **30δ**, αρχικά η αλδεΐδη **55** μετατράπηκε στο αντίστοιχο βρωμίδιο **57** (Σχήμα 30) [134]. Αρχικά παρελήφθη η αλκοόλη **56** μετά από αναγωγή με NaBH_4 σε EtOH χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό και ακολούθησε αντίδραση βρωμίωσης της αλκοόλης **56** με PBr_3 προς το αντίστοιχο βρωμίδιο **57** το οποίο παρελήφθη σε υψηλή απόδοση (81%). Ακολούθως, το μηλονικό διοξύ **58** προέκυψε από το βρωμίδιο **57** μέσω μίας πορείας δύο σταδίων (Σχήμα 29) [135, 136]. Τέλος, το ακρυλικό οξύ **30δ** προέκυψε μέσω μίας αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel του ακατέργαστου μηλονικού οξέος **58** με χρήση παραφορμαλδεΐδης $(\text{HCHO})_n$ παρουσία Et_2NH (Σχήμα 29) [120]. Οι αντιδράσεις οδήγησαν στο τελικό προϊόν σε υψηλές αποδόσεις και βαθμό καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

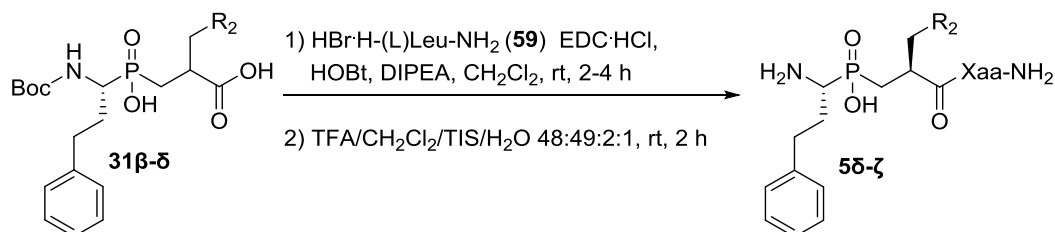
3.7.3 Σύνθεση των τελικών φωσφινικών τριπεπτιδικών ενώσεων 5δ-ζ

Τα μόρια **5δ-ζ** παρασκευάστηκαν με παρόμοια συνθετική μεθοδολογία με αυτήν που περιγράφηκε για τα αντίστοιχα μόρια **5α-γ** στην παράγραφο 3.5.4. Όσον αφορά τον σχηματισμό της διπεπτιδικής ένωσης **31δ**, αυτή προέκυψε από μία αντίδραση *P*-Michael του ακρυλικού παράγωγου τύπου **30δ** με το φωσφινικό οξύ **12** (Σχήμα 30). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία του HMDS σε θερμοκρασία 90 °C για 4 ώρες, και το διοξύ **31δ** προέκυψε και παρελήφθη σε καθαρή μορφή, ως μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών με dr 4:1, μετά από καθαρισμό του με χρωματογραφία στήλης σε αποδόση 87%.



Σχήμα 30: Σύνθεση της ένωσης **31δ**

Πίνακας 5: Συνοπτικός πίνακας αποδόσεων 2 σταδίων σχηματισμού των ενώσεων **5δ-ζ**, από τις ενώσεις **31β-δ**



	Φωσφινικό Υπόστρωμα	R	Xaa	Προϊόν	Απόδοση*
1	31β		L-Leu	5δ	75%, 2 στάδια
2	31γ		L-Leu	5ε	73%, 2 στάδια
3	31δ		L-Leu	5ζ	67%, 2 στάδια

* Απόδοση απομονωμένου προϊόντος μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό

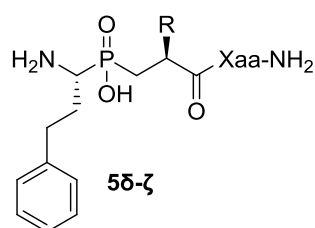
Τα δύο τελευταία βήματα της σύνθεσης των τελικών τριπεπτιδικών ενώσεων **5δ-ζ** περιλαμβάνουν τη σύζευξη των διοξέων τύπου **31** με το αμίδιο της (*L*)-Leu (**59**) και

την τελική απομάκρυνση της Boc ομάδας (Πίνακας 5). Τέλος, η σύζευξη των ενώσεων τύπου **31** με το αμίδιο **59** έλαβε χώρα με χρήση του υδατοδιαλυτού EDC παρουσία HOBt, για να προκύψουν οι τελικές ενώσεις **5δ-ζ** μετά από όξινη αποπροστασία με τη χρήση διαλύματος TFA/DCM/TIS/H₂O 48:49:2:1 [125]. Αξίζει να σημειωθεί πως οι τελικές ενώσεις **5δ-ζ** διαχωρίστηκαν επιτυχώς στα διαστερεοϊσομερή τους κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των προϊόντων σύζευξης.

3.7.4 Ενζυμικά αποτελέσματα των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων **5δ-ζ**

Οι ενζυμικοί προσδιορισμοί των ενώσεων **5δ-ζ**, πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό κέντρο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Ε. Στρατίκου και φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 6, ενώ για λόγους σύγκρισης παρατίθενται και οι αντίστοιχες σταθερές αναστολής για τις ενώσεις που φέρουν Phe αντί για Leu στην θέση P₂'.

Πίνακας 6: *In vitro* εκτίμηση των ενώσεων **5δ-ζ**



α/α	R	Xaa	IC ₅₀ (nM)		
			ERAP1	ERAP2	IRAP
5β		L-Phe	3694	740	32
5γ		L-Phe	>35000	105	21
5δ		L-Leu	31212	246	16
5ε		L-Leu	21227	2565	317
5ζ		L-Leu	25111	13814	577

Από την παραπάνω *in vitro* εκτίμηση των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων **5δ-ζ** (Πίνακας 6), προκύπτει πως η ένωση **5δ** αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα για την IRAP, αλλά και για την ERAP2, από τις ενώσεις **5δ-ζ** που φέρουν την L-Leu στη θέση P₂'. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση **5δ** αναστέλλει ισχυρότερα τις ERAP2 και IRAP, ενώ παρατηρήθηκε και δραστική αύξηση της εκλεκτικότητας για την IRAP μόνο όμως έναντι της ERAP1, σε σύγκριση με την αντίστοιχη ένωση (**5β**), που φέρει την L-Phe στη θέση P₂'. Όσον αφορά την ένωση **5ε**, αυτή επέδειξε αρκετά μειωμένη ανασταλτική ισχύ για τις ERAP2 και IRAP και πιο συγκεκριμένα ανέστειλλε 15 φορές ασθενέστερα την IRAP και 25 φορές ασθενέστερα την ERAP2 σε σύγκριση με την (**5γ**). Επιπλέον, η ένωση **5ε**, παρουσίασε ελαφρώς βελτιωμένη εκλεκτικότητα για την IRAP, σε σύγκριση με τον αναστολέα (**5γ**), αλλά την μικρότερη εκλεκτικότητα για την IRAP, σε σύγκριση με τις ενώσεις **5δ,ζ** (Πίνακας 4). Τέλος, η ένωση **5ζ** αποδείχτηκε ο πιο εκλεκτικός αναστολέας από τις ενώσεις (**5δ-ζ**) για την IRAP έναντι της ERAP2, επιδεικνύοντας όμως παράλληλα την χαμηλότερη συγγένεια και για τα τρία ένζυμα από τις όλες τις ενώσεις **5α-ζ** που μελετήθηκαν.

3.8 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε η διερεύνηση εκτενών τροποποιήσεων της θέσης P₁' φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδικών ενώσεων, με στόχο την εύρεση ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων μεταξύ των ERAPs. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην στερεοχημική καθαρότητα των ενώσεων-στόχων, λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορά στην αναστολή 2-3 τάξεων μεγέθους, που είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενη μελέτη για το ζεύγος διαστεροϊσομερών της ένωσης **DG013** [97] και επαληθεύτηκε και σε αυτή τη μελέτη για αρκετές ακόμα περιπτώσεις φωσφινικών τριπεπτιδίων. Αυτή η απαίτηση είναι πρωταρχικής σημασίας για την ακριβή εκτίμηση των σχέσεων δομής-δραστικότητας και την ανακάλυψη βελτιωμένων αναστολέων, ειδικά όσον αφορά την εκλεκτικότητα. Η στρατηγική μας κατάφερε να παράγει αρκετούς ισχυρούς αναστολείς της τάξεως των nM για όλες τις APA, όπως είναι η ένωση **29** που είναι από τους πιο ισχυρούς αναστολείς που αναφέρθηκαν ποτέ και για τα τρία ένζυμα. Όσον αφορά την εκλεκτικότητα βρέθηκαν επίσης σημαντικοί αναστολείς, όπως είναι ο εκλεκτικός αναστολέας της ERAP2 **4η** και ο εκλεκτικός αναστολέας της IRAP **5β**.

Μία αξιοσημείωτη παρατήρηση σχετικά με την επίδραση του σχήματος των πλευρικών αλυσίδων της P_1' θέσης στην εκλεκτικότητα των ERAP1/ERAP2 είναι ότι η ERAP1 φιλοξενεί καλύτερα τους επιμήκεις γραμμικούς υποκαταστάτες από την ERAP2, ενώ αυτή η προτίμηση αντιστρέφεται στην περίπτωση των "εκτεταμένων" ογκωδών ομάδων (πχ **5δ**). Σύγκριση με την προηγούμενη μελέτη SAR δείχνει πως η θέση P_2' είναι πιο σημαντική για τον έλεγχο της ισχύος αναστολής για την ERAP1, παρά για την ERAP2 και την IRAP. Επιπλέον, η εκλεκτικότητα για την ERAP2 μπορεί να ελεγχθεί από πολικές αλυσίδες στη θέση P_2' , ενώ η εκλεκτικότητα για την IRAP καθορίζεται κυρίως από την παρουσία ογκωδών ομάδων στη θέση P_1' . Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι αυτή η κατηγορία ενώσεων μπορεί να είναι χρήσιμη για τη στοχευμένη ρύθμιση των επίκτητων ανοσολογικών αποκρίσεων και ενθαρρύνει την προκλινική τους αξιολόγηση για εφαρμογές στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου ή στον έλεγχο της αυτοανοσίας.

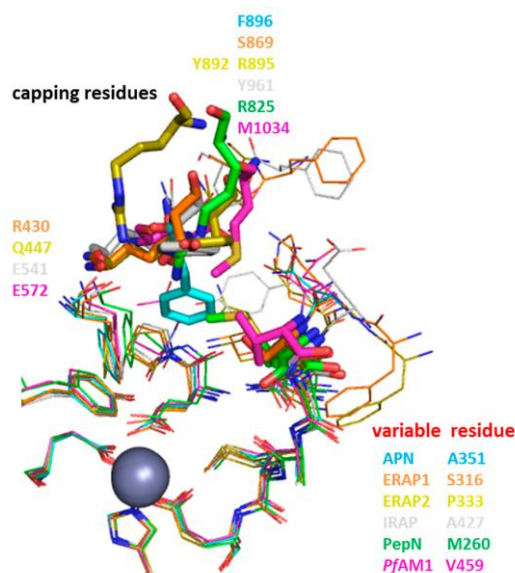
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ανάπτυξη συνθετικής μεθοδολογίας για τη διαφοροποίηση της P₁ θέσης φωσφινικών ψευδοπεπτιδικών αναλόγων

4.1 Εισαγωγή

Όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, τα φωσφινικά ψευδοπεπτίδια αποτελούν μια κατηγορία αναστολέων που μπορεί να οδηγήσει αποτελεσματικά σε ισχυρούς αναστολείς των αμινοπεπτιδασών ERAP. Στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρουσιάστηκε η SAR μελέτη των θέσεων P₁' και P₂' φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων από την οποία προέκυψαν εκλεκτικοί αναστολείς για τα ένζυμα ERAP2 και IRAP, όμως δεν εξήχθησαν συμπεράσματα σχετικά με την εκλεκτική αναστολή του ERAP1 του οποίου η δραστηριότητα έχει συνδεθεί με τη παθογένεση ανθρώπινων νόσων, τόσο σε γενετικό, όσο και σε λειτουργικό επίπεδο [103, 142]. Η επικρατούσα άποψη είναι πως το ένζυμο ERAP1 παίζει ρόλο-κλειδί στη διαφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος από ιούς [143], παθογόνα βακτήρια [144] ή από τον καρκίνο, αφού γενετική καταστολή του ενζύμου έδειξε ότι μπορεί να προκαλέσει νέες ή να ενισχύσει τις υπάρχουσες αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις σε αρκετά πειραματικά μοντέλα [40, 41] που υποδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο της αναστολής της ERAP1 και στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου [99].

Προκειμένου να σχηματίσουμε μια ολοκληρωμένη εικόνα των σχέσεων δομής-δραστηριότητας των φωσφινικών ψευδοτριπεπτιδίων, είναι σημαντική και η διερεύνηση της θέσης P₁, η οποία παραμένει ανεξερεύνητη έως τώρα και αποτελεί, κατά πάσα πιθανότητα, τη θέση-κλειδί για τη διαφοροποίηση των αμινοπεπτιδασών μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, σε πρόσφατη δομική μελέτη πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των κρυσταλλογραφικών δομών 14 διαφορετικών αμινοπεπτιδασών της οικογένειας M1 που παρουσιάζουν μεγάλη δομική ομολογία, και στις οποίες ανήκουν και οι ERAP, αποκαλύπτοντας ότι ένα αμινοξύ της S₁ κοιλότητάς τους που ποικίλει και σε μέγεθος, αλλά και σε πολικότητα μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη διαφορετική εξειδίκευση υποστρώματος που επιδεικνύουν τα ένζυμα αυτά και, κατ' επέκταση, τη διαφορετική βιολογική τους λειτουργία [145]. Το αμινοξύ αυτό είναι πολικό για την ERAP1 (Ser) και υδρόφοβο για τις ERAP2 (Pro) και IRAP (Ala) (Εικόνα 31).



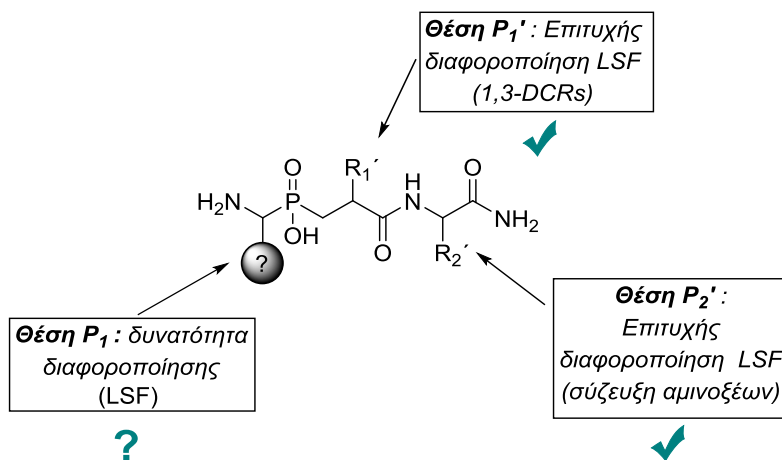
Εικόνα 31: Υπέρθηση του πρωτεϊνικού σκελετού της S1 κοιλότητας διαφορετικών M1 APs [146]

Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν την αρχική μας υπόθεση ότι η πιθανή εκμετάλλευση αυτής της δομικής ιδιαιτερότητας του θύλακα εξειδίκευσης S₁ των ERAP αμινοπεπτιδασών θα μπορούσε ίσως να ενισχύσει την εκλεκτικότητα μεταξύ των τριών αμινοπεπτιδασών και πιο συγκεκριμένα έναντι της ERAP1. Για να επιτευχθεί αυτό, ως αρχικό μας μέλημα τέθηκε η αναζήτηση μιας συνθετικής πορείας που θα επιτυγχάνει τη διαφοροποίηση της P₁ θέσης φωσφινικών πεπτιδίων.

Έχοντας συνθέσει επιτυχώς μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων με διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες στις θέσεις P₁' και P₂' με την χρήση συνθετικών στρατηγικών διαφοροποίησης τελικού σταδίου (Late Stage Functionalization, LSF), στόχο μας αποτέλεσε η εύρεση μιας παρόμοιας συνθετικής προσέγγισης για τη διαφοροποίηση της θέσης P₁ (Εικόνα 32), ένας ιδιαίτερα δύσκολος συνθετικά στόχος απουσία ανάλογων βιβλιογραφικών μελετών.

Γενικότερα, η LSF αποτελεί μια γενική συνθετική τεχνική στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας που παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων προσεγγίσεων, με το βασικότερο να είναι η δυνατότητα ταχείας και ευρείας διαφοροποίησης σε προχωρημένο στάδιο της συνθετικής πορείας, αποτελώντας έτσι ένα πολύτιμο εργαλείο στην ταχύτερη ανακάλυψη νέων βιοδραστικών ενώσεων με πιθανή φαρμακολογική δράση. Επίσης, η στρατηγική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και στη διαφοροποίηση φωσφινικών κορμών, κυρίως

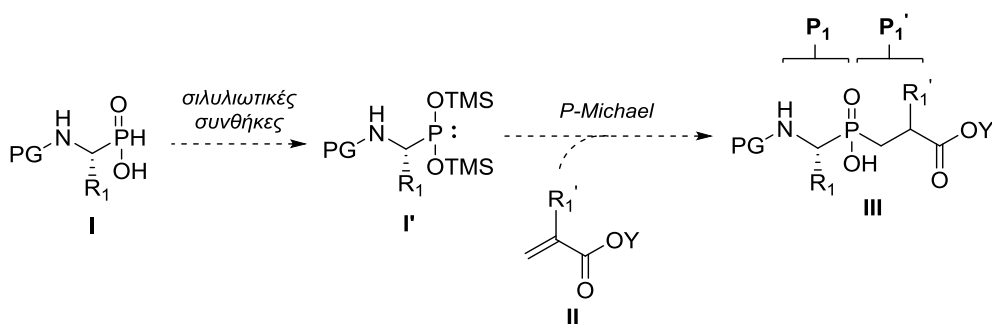
όμως για την παραγωγοποίηση των θέσεων P_1' και P_2' (Εικόνα 32) [110, 121, 147, 148, 149].



Εικόνα 32: Ανάγκη ανάπτυξης μεθοδολογίας για την ευρεία διαφοροποίηση της P_1 θέσης φωσφινικών ψευδοπεπτιδίων

4.2 Βασικές προσεγγίσεις σύνθεσης βασικών ψευδοπεπτιδικών κορμών - Αδυναμίες κλασικής πορείας και συνθετικές δυνατότητες εναλλακτικής πορείας

Πρωτεύοντα ρόλο στη σύνθεση των φωσφινικών ψευδοπεπτιδίων διαδραματίζει η παρασκευή της κατάλληλα προστατευμένης βασικής ψευδοδιπεπτιδικής μονάδας **III** που αποτελεί το βασικό συστατικό τους, αφού είναι δυνατόν να ενσωματωθεί στη συνέχεια μέσα σε πεπτιδικές αλληλουχίες, μέσω μιας κλασικής πεπτιδικής σύνθεσης με χρήση εδραιωμένων συνθετικών πρωτοκόλλων [83]. Η προσέγγιση **NP+C** (Σχήμα 31) είναι αναμφίβολα η επικρατούσα μεθοδολογία για την παρασκευή των βασικών ψευδοδιπεπτιδικών μονάδων **III** και συνήθως περιλαμβάνει την ήπια αντίδραση προσθήκης τύπου Michael ενός δις(τριμεθυλοσιλυλο)φωσφονίτη (**I'**), ο οποίος σχηματίζεται *in situ* από α -αμινοφωσφινικά οξέα (**I**) υπό σιλυλιωτικές συνθήκες (TMSCl/ i Pr₂EtN ή HMDS ή BSA), σε α -υποκατεστημένα ακρυλικά παράγωγα τύπου **II** (Σχήμα 31) [106, 150, 151].



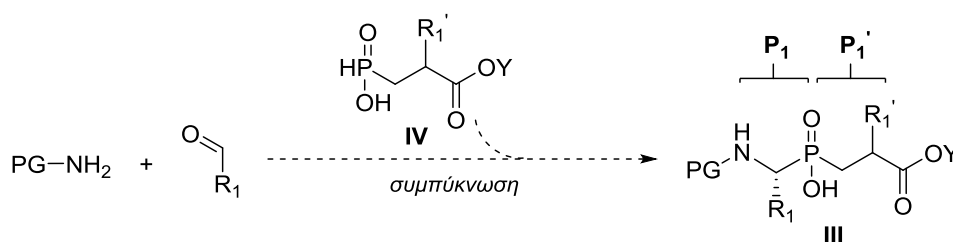
Σχήμα 31: Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών III μέσω αντίδρασης *P*-Michael (προσέγγιση NP+C).

Η παραπάνω συνθετική μέθοδος δεν μπορεί όμως να αποτελέσει μέθοδο επιλογής στα πλαίσια της LSF στρατηγικής για την θέση P_1 των ενώσεων τύπου III. Συγκεκριμένα, η σύνθεση φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών με ένα μεγάλο αριθμό αλυσίδων στην θέση P_1 , θα προϋπέθετε την αρχική σύνθεση πολλών κατάλληλα προστατευμένων α -αμινοφωσφινικών οξέων I (Σχήμα 31). Τα τελευταία παραλαμβάνονται, συνήθως, μέσω της μεθόδου που εισήγαγε ο Baylis και η ομάδα του [122], η οποία περιλαμβάνει μια αρκετά χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία, αποτελώντας μία μη ελκυστική μέθοδο για την εισαγωγή ποικιλίας πλευρικών αλυσίδων P_1 σε τελικό στάδιο της σύνθεσης.

Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι πλευρικές αλυσίδες της θέσης P_1 με τη χρήση της προσέγγισης **NP+C** είναι εξαρχής παρούσες στα αντιδρώντα αμινοφωσφινικά οξέα I. Στις περιπτώσεις, λοιπόν, που ενσωματώνεται κάποια λειτουργική ομάδα σε αυτές, αυτή θα πρέπει να είναι συμβατή με όλα τα ακόλουθα στάδια της σύνθεσης τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία συνθηκών. Με άλλα λόγια, είναι αναγκαία η ύπαρξη ενός υψηλού βαθμού ορθογωνικότητας, κάτι που δεν είναι πάντα επιτεύξιμο. Τέλος, έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά περιπτώσεις αδυναμίας σύνθεσης φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων, μέσω της *P*-Michael αντίδρασης, σε περίπτωση που τα α -αμινοφωσφινικά οξέα έφεραν πλευρικές αλυσίδες με λειτουργικές ομάδες στην P_1 θέση, (π.χ. Asp, Glu [121]).

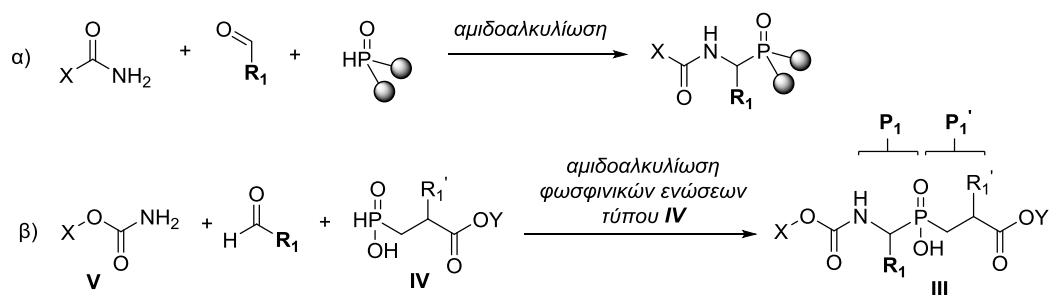
Εκτός από το παραπάνω πρωτόκολλο που είναι κυρίαρχο στη σύνθεση των φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών, έχει αναφερθεί και ένα συμπληρωματικό πρωτόκολλο το οποίο χαρακτηρίζεται από την συναρμολόγηση του αμινο-τελικού τμήματος με τη χρήση πυρηνόφιλων P που ενσωματώνουν πλήρως δομικά την θέση P_1' (προσέγγιση **N+PC**, Σχήμα 32). Η προσέγγιση αυτή, αν και εφαρμόζεται

σπανιότερα, εμφανίζεται ως καταλληλότερη σε σχέση με την κλασική προσέγγιση **NP+C** για την επίτευξη του στόχου μας, δηλαδή της δομικής διαφοροποίησης της θέσης P₁ σε προχωρημένο στάδιο της σύνθεσης.



Σχήμα 32: Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών III μέσω της προσέγγισης N+PC

Συγκεκριμένα, το εναλλακτικό αυτό πρωτόκολλο βασίζεται σε μια συμπυκνωτική αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης μεταξύ ενός αμιδίου, μιας αλδεΐδης και μιας οργανοφωσφορικής ένωσης που φέρει έναν δραστικό δεσμό P-H (Σχήμα 33α). Η συγκεκριμένη αντίδραση «τριών συστατικών» ανήκει στην κατηγορία των “multicomponent reactions” (MCRs) οι οποίες προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα δομικής διαφοροποίησης στη φαρμακευτική συνθετική χημεία [152]. Με κατάλληλη προσαρμογή της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης για τη σύνθεση των επιθυμητών N-προστατευμένων ψευδοδιπεπτιδικών κορμών τύπου III, η προσέγγιση **NP+C** περιλαμβάνει την αντίδραση H-φωσφινικών διοξέων τύπου IV, καρβαμικών εστέρων (V) και αλδεϋδών (Σχήμα 33β).

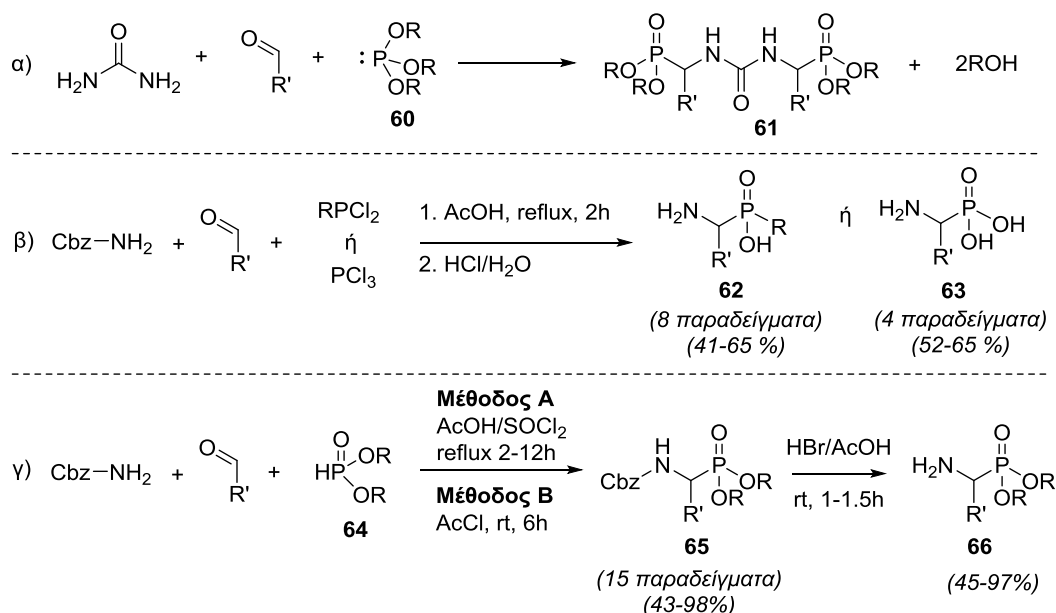


Σχήμα 33: α) Γενική αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης ενώσεων φωσφόρου με δεσμό P-H. β) Αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης φωσφινικών οξέων προσαρμοσμένη στη σύνθεση φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών μέσω της προσέγγισης N+PC.

Συμπερασματικά, η διερεύνηση της πορείας του Σχήματος 33 παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω της δυνατότητας εισαγωγής ποικίλων αλυσίδων στην P₁ θέση των ενώσεων III σε τελικό στάδιο της σύνθεσης, αλλά και της διαθεσιμότητας των απαιτούμενων αλδεϋδών και καρβαμικών εστέρων που επιτρέπει την ευκολότερη πρόσβαση στις επιθυμητές φωσφινικές δομές.

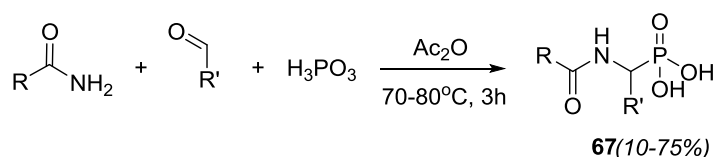
4.3 Βιβλιογραφική επισκόπηση αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης

Η προαναφερθείσα συμπυκνωτική αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών πρωτοαναφέρθηκε το 1974 από τον Birum και τους συνεργάτες του κατά τη σύνθεση α -ουρεΐδοφωσφονικών εστέρων (**61**) από την αντίδραση ενώσεων του P(III) (φωσφιτών **60**), αλδευδών και ουρίας (Σχήμα 34α) [153]. Το 1978, η αντίδραση επεκτάθηκε από τον Oleksyszyn και τους συνεργάτες του στη σύνθεση α -αμινοφωσφονικών (**62**) και α -αμινοφωσφονικών οξέων (**63**) [154, 155]. Ο Oleksyszyn χρησιμοποίησε ως πηγή φωσφόρου χλωριωμένα παράγωγα του P(III) (PCl_3 , RPCl_2), ως πηγή αζώτου τον καρβαμιδικό βενζυλεστέρα (Cbz-NH_2) και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη AcOH και θέρμανση. Η μέθοδος τροποποιήθηκε περαιτέρω το 1990 από τον Yuan και τους συνεργάτες του, με την χρήση για πρώτη φορά ενώσεων P(V) (H -φωσφονικών εστέρων τύπου **64**) [156]. Αντίδραση των **64** και Cbz-NH_2 με αλειφατικές αλδεΐδες σε AcOH και θειονυλοχλωρίδιο (SOCl_2) (Μέθοδος Α, Σχήμα 34γ) ή με αρωματικές αλδεΐδες σε AcCl (Μέθοδος Β, Σχήμα 34γ) οδήγησε σε N -Cbz-προστατευμένα αμινοφωσφονικά οξέα **65** με τις μεγαλύτερες αποδόσεις να προκύπτουν από τη χρήση αρωματικών αλδευδών [156, 157, 158, 159]. Ακολουθούσε ένα στάδιο εκλεκτικής απομάκρυνσης της Cbz-ομάδας για την παραλαβή των α -αμινοφωσφονικών εστέρων **66**.



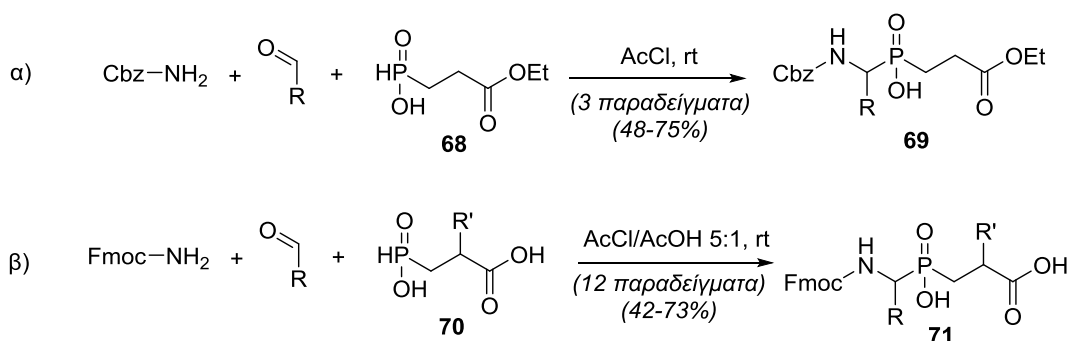
Σχήμα 34: Σύνθεση α) α -ουρεΐδοφωσφονικών παραγώγων από Birum et al. [153] β) α -αμινοφωσφονικών και αμινοφωσφονικών οξέων από Oleksyszyn et al. [154] γ) α -αμινοφωσφονικών οξέων από Yuan et al. [156]

Οι παραπάνω μέθοδοι αφορούσαν κυρίως στη σύνθεση ελεύθερων α-αμινοφωσφονικών οξέων μετά από μεσολάβηση ενός σταδίου όξινης υδρόλυσης των προϊόντων συμπύκνωσης. Το 1981, ο Oleksyszyn και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι η απευθείας σύνθεση *N*-προστατευμένων αμινοφωσφονικών οξέων (**67**) μπορεί να επιτευχθεί με βρασμό μίγματος φωσφορώδους οξέος, αμιδίων και αλδευδών σε Ac_2O (Σχήμα 35) [160]. Εκτός της άμεσης πρόσβασης σε αμινοφωσφονικά οξέα, στην εργασία αυτή χρησιμοποιείται για πρώτη φορά ένας ανυδρίτης ως μέσο αντίδρασης, αντί για τις καθιερωμένες όξινες συνθήκες.



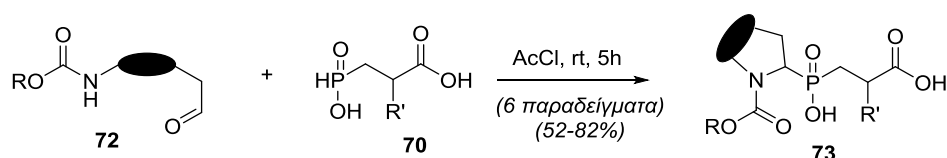
Σχήμα 35: Σύνθεση *N*-ακυλιωμένων αμινοφωσφονικών οξέων **67 από Oleksyszyn et al. [160]**

Το 1996, οι Chen και Coward εισήγαγαν για πρώτη φορά μια μέθοδο για τη σύνθεση *N*-Cbz-προστατευμένων φωσφονικών ψευδοδιπεπτιδίων, με μια τριών συστατικών συμπύκνωση $Cbz-NH_2$, αλδευδών και του αλκυλοφωσφονικού οξέος **68** με μέσο αντίδρασης το $AcCl$ (Σχήμα 36α) [161]. Το 2005, το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του ΕΚΠΑ τροποποίησε την προηγούμενη μέθοδο με στόχο τη σύνθεση *N*-Fmoc-προστατευμένων φωσφονικών δομικών μονάδων και πεπτιδίων με ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο **71**, σε μίγμα $AcCl/AcOH$ (Σχήμα 36β) [162]. Οι ενώσεις **69** και **71** παρελήφθησαν σε παρόμοιες αποδόσεις με τις δύο μεθόδους.



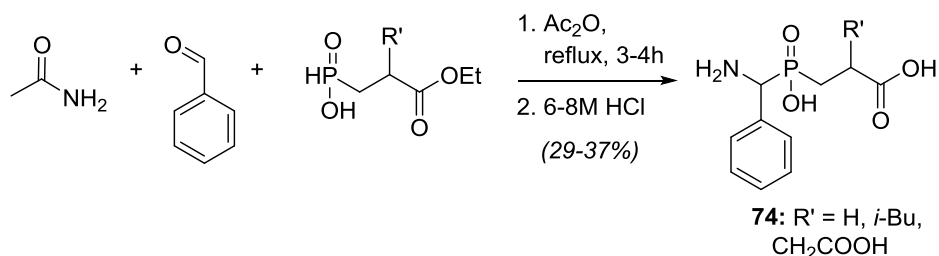
Σχήμα 36: Εφαρμογή της στρατηγικής $N+PC$ στη σύνθεση φωσφονικών ψευδοδιπεπτιδίων από (α) Chen et al. [161] και (β) Matziari et al. [162]

Το 2007 αναφέρθηκε επίσης από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του ΕΚΠΑ για πρώτη φορά μια ενδομοριακή αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης «τριών κέντρων - δύο συστατικών» μεταξύ α,ω -καρβαμουϋλοαλδεϋδων (**72**) και φωσφινικών διοξέων **70** σε AcCl (Σχήμα 37) [163]. Με τη μεθοδολογία αυτή, έγινε δυνατή η σύνθεση μιας ευρείας ποικιλίας κυκλικών, διαμορφωτικά περιορισμένων συστημάτων (**73**) σε ένα συνθετικό βήμα και σε υψηλές αποδόσεις.



Σχήμα 37: Σύνθεση διαμορφωτικά περιορισμένων φωσφινικών δομών στην P₁ θέση από Nasopoulou et al. [163]

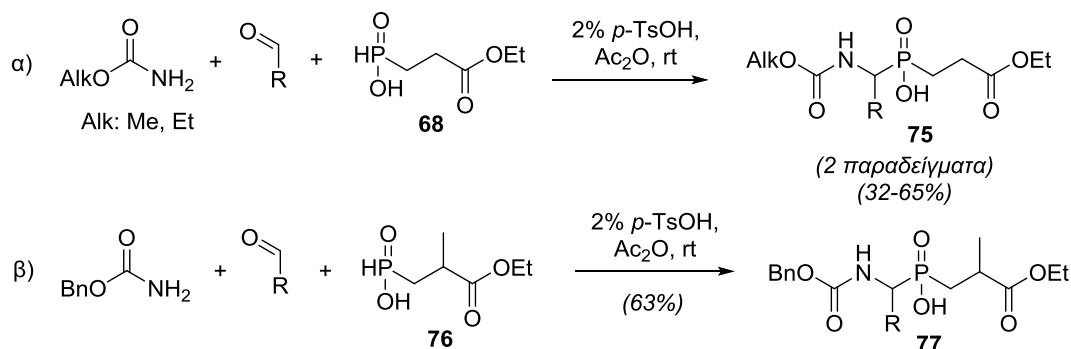
Το 2005 οι Rozhko και Ragulin, τροποποίησαν τα πρωτόκολλα που παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 36 [161], χρησιμοποιώντας Ac₂O αντί για AcCl ως μέσο αντίδρασης, όπως είχε προτείνει ο Oleksyszyn και οι συνεργάτες του για την σύνθεση α -αμινοφωσφονικών οξέων (Σχήμα 34) [160]. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση ακεταμιδίου και βενζαλδεϋδης και τα πλήρως αποπροστατευμένα φωσφινικά ψευδοδιπεπτιδία **74** παρελήφθησαν έπειτα από όξινη υδρόλυση και χρωματογραφία ιονανταλλαγής σε χαμηλές αποδόσεις (29-37%) [164].



Σχήμα 38: Σύνθεση αποπροστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων σε μια αντίδραση τριών συστατικών από Ragulin et al. [164]

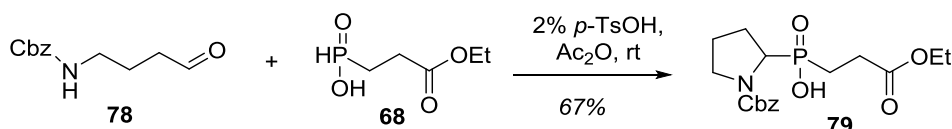
Το 2010, οι Ragulin και Dmitriev επέκτειναν την παραπάνω μεθοδολογία και για καρβαμιδικούς εστέρες, περιγράφοντας την σύνθεση των *N*-μεθοξυ- ή αιθοξυκαρβονυλο προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων (**75**) σε διαλύτη Ac₂O με όξινη κατάλυση (2% *p*-TsOH) και σε θερμοκρασία δωματίου (Σχήμα 39α) [165]. Την επόμενη χρονιά, οι ίδιοι συγγραφείς συνέθεσαν σε παρόμοιες συνθήκες και *N*-Cbz-προστατευμένα φωσφινικά παράγωγα (**77**, Σχήμα 39β) [166]. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι συγγραφείς αναφέρουν πως οι προσπάθειες χρήσης και άλλων αμιδίων, όπως ακεταμίδιο, φθαλιμίδιο, τριφθοροακεταμίδιο ή

καρβαμιδικός *tert*-βουτυλεστέρας (Boc-NH₂) με αυτήν τη μέθοδο αποδείχτηκαν «ανεπιτυχείς ή αναποτελεσματικές».



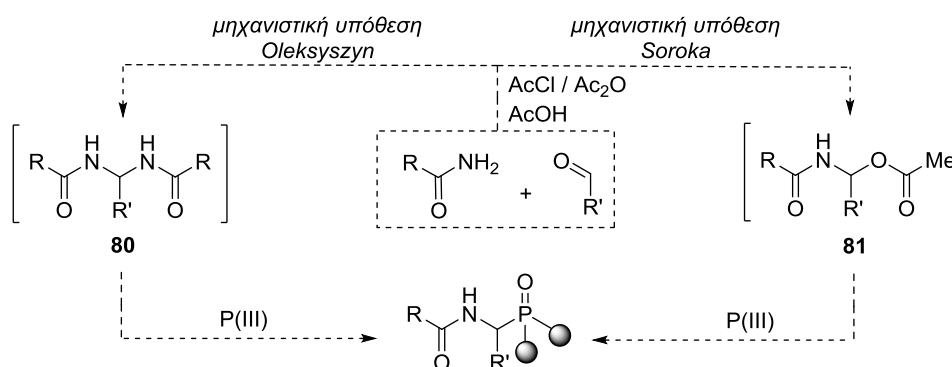
Σχήμα 39: Σύνθεση α) *N*-μεθυλοξυ- ή αιθοξυκαρβονυλο [165] και β) *N*-Cbz-προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων [166] με καταλυόμενη από *p*-TsOH αντίδραση τριών συστατικών από Ragulin et al.

Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε από την ομάδα του Ragulin, η χρήση της ίδιας μεθόδου για τη σύνθεση κυκλικών φωσφινικών διπεπτιδίων, με χρήση *H*-φωσφινικών οξέων (π.χ. **68**) και κατάλληλων διλειτουργικών αντιδραστηρίων [163, 167, 168, 169]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αντίδραση της α,ω -καρβαμοϋλοαλδεΐδης **78** και του φωσφινικού οξέος **68** για την σύνθεση του *N*-Cbz-προστατευμένου φωσφινικού ψευδοπεπτιδικού αναλόγου του διπεπτιδίου Pro-Gly **79** (Σχήμα 40) [167].



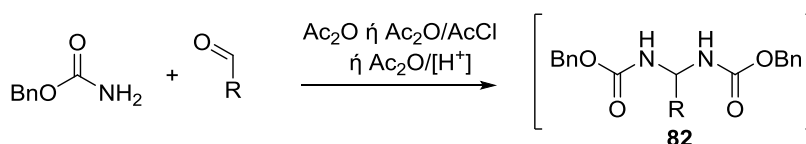
Σχήμα 40: Σύνθεση των κυκλικών φωσφινικών πεπτιδίων **79** από Ragulin et al. [167]

Όσον αφορά τα μηχανιστικά ενδιάμεσα της αντίδρασης αμιδοακυλίωσης τριών συστατικών, το 1981 προτάθηκαν για πρώτη φορά από τον Oleksyszyn οι *N,N'*-δισ(ακυλο) αμινάλες τύπου **80** (Σχήμα 41) [160]. Ο Oleksyszyn παρατήρησε ότι οι ενώσεις **80** συντίθενται εύκολα από καρβονυλικές ενώσεις και αμίδια σε διαλύτη Ac₂O και αντιδρούν ικανοποιητικά με πυρηνόφιλα P(III) [154, 155]. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις δεν απομονώθηκαν ποτέ από το μέσο της αντίδρασης. Το 1990, ο Soroka απέκλεισε τα παράγωγα *N,N'*-δισ(ακυλο) αμιναλών **80** ως ενδιάμεσα της αντίδρασης και πρότεινε τις *O*-ακετυλο,*N*-ακυλο ημιαμινάλες **81** ως τα πιθανότερα ενδιάμεσα της αντίδρασης (Σχήμα 41) [170]. Όμως, και αυτές οι ενώσεις δεν απομονώθηκαν ποτέ από το μίγμα της αντίδρασης.



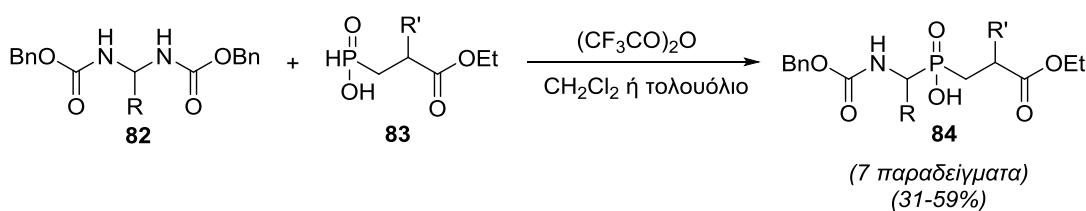
Σχήμα 41: Προτεινόμενα ενδιάμεσα 80 και 81 για την αμιδοαλκυλίωση τρισθενών ενώσεων φωσφόρου από τους Oleksyszyn [160] και Soroka [170]

Όμως, οι παραπάνω υποθέσεις του Soroka σχετικά με το ενδιάμεσο της αμιδοαλκυλίωσης απορρίφθηκαν από τους Ragulin και Dmitriev το 2010, οι οποίοι χρησιμοποιώντας ήπιες συνθήκες για τη σύνθεση *N*-προστατευμένων α -αμινοφωσφινικών ενώσεων σε Ac₂O και θερμοκρασία δωματίου κατάφεραν για πρώτη φορά να απομονώσουν τις σταθερές στις συνθήκες της αντίδρασης *N*-Cbz-αμινάλες **82** ως ενδιάμεσα της αντίδρασης (Σχήμα 42) [165].



Σχήμα 42: Απομονωμένο ενδιάμεσο 82 της αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών από Ragulin et al. [165]

Βασισμένοι στις παραπάνω μηχανιστικές παρατηρήσεις, το 2012 η ίδια ομάδα παρουσίασε το πρώτο παράδειγμα αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης σε διαλύτη (τολουόλιο ή διχλωρομεθάνιο). Συγκεκριμένα, προσχηματισμένα ενδιάμεσα τύπου **82** και αλκυλοφωσφινικά οξέα **83** οδήγησαν στα *N*-Cbz-προστατευμένα φωσφινικά οξέα **84** παρουσία στοιχειομετρικών ποσοτήτων τριφθοροξικού ανυδρίτη (TFAA) (Σχήμα 43) [171].



Σχήμα 43: Σύνθεση *N*-Cbz-προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων σε μια αντίδραση δύο συστατικών από Ragulin et al. [171]

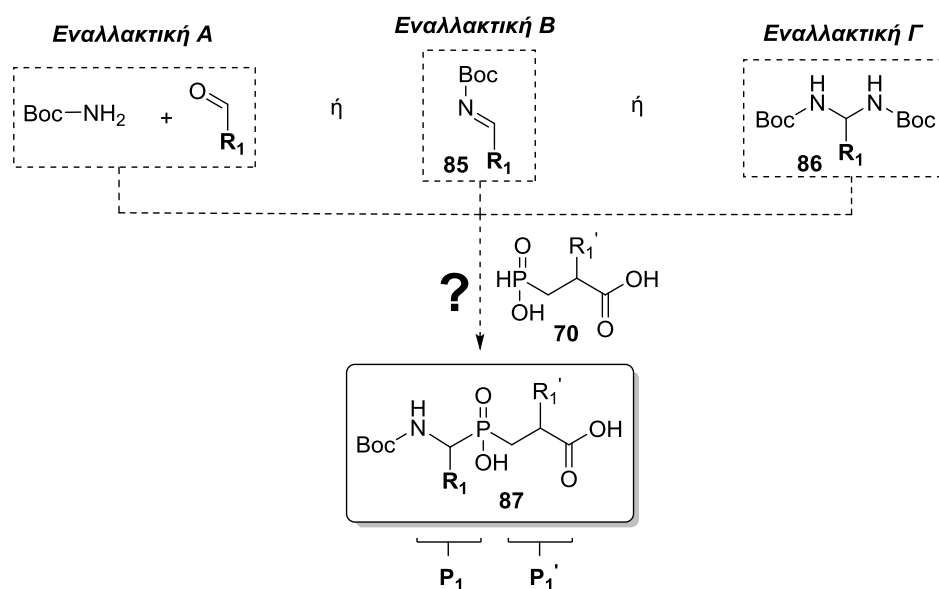
Συμπερασματικά, όπως φαίνεται από την παραπάνω βιβλιογραφική επισκόπηση, η αντίδραση αμιδοακυλίωσης (προσέγγιση **N+PC**) μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό εργαλείο προσφέροντας εναλλακτικές ενός διαφορετικού σχεδιασμού στη σύνθεση φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων διαφοροποιημένων στην P₁ θέση τους, όμως υπόκειται σε ορισμένους περιορισμούς που θα αναλυθούν περαιτέρω στην επόμενη παράγραφο.

4.4 Περιγραφή στόχου - Βιβλιογραφική θεμελίωση

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.1, ευρύτερο στόχο μας αποτέλεσε η εύρεση μιας γενικής μεθόδου σύνθεσης κατάλληλα προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών, μέσω μιας συνθετικής προσέγγισης που θα επιτρέψει την διαφοροποίηση της P₁ θέσης τους σε τελικό στάδιο της σύνθεσης (LSF). Η καταλληλότερη προσέγγιση που επιλέξαμε να διερευνήσουμε για τον σκοπό αυτό, είναι η αντίδραση αμιδοακυλίωσης *H*-φωσφινικών ενώσεων (Σχήμα 33), εντούτοις, οι εναλλακτικές που προσφέρονται από την αντίδραση αυτή, με βάση τα βιβλιογραφικά αναφερόμενα πρωτόκολλα, δεν επιτρέπουν την άμεση εφαρμογή της στη δική μας περίπτωση, λόγω των περιορισμών που αναφέρονται παρακάτω.

Συγκεκριμένα, οι βιβλιογραφικά υπάρχουσες μεθοδολογίες φαίνεται ότι περιορίζονται κυρίως στην χρήση των Fmoc-NH₂ και Cbz-NH₂ που οδηγούν σε αντίστοιχα προστατευμένα αμινοφωσφινικά προϊόντα. Ο βασικός λόγος που οι Fmoc και Cbz ομάδες έχουν επικρατήσει είναι η συμβατότητά τους με τη χρήση όξινων συνθηκών που συνήθως εφαρμόζονται στην αντίδραση, είτε λόγω του διαλύτη (π.χ. AcCl/AcOH, *in situ* παραγωγή HCl) είτε λόγω του καταλύτη (π.χ. *p*-TsOH). Συνεπώς, ευαίσθητες σε οξέα προστατευτικές (π.χ. η κοινή και εύχρηστη ομάδα Boc) ή λειτουργικές ομάδες που μπορεί να περιλαμβάνονται στις πλευρικές αλυσίδες των θέσεων P₁ και P₁' αναμένεται να μην είναι συμβατές με τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην εν λόγω αντίδραση. Ακριβώς αυτός ήταν ο περιορισμός που μας απασχόλησε κατά τον σχεδιασμό μιας **N+PC** συνθετικής πορείας κατάλληλης για την ανάπτυξη αναστολέων των ERAP αμινοπεπτιδίων, περιορισμός όμως που αποτέλεσε και το έναυσμα για την ανάπτυξη μιας νέας μεθοδολογίας, όπως θα περιγραφεί παρακάτω.

Συγκεκριμένα, κατά τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης φωσφινικών αναστολέων των ERAPs που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 3 διαπιστώθηκε ότι η χρήση άλλων κοινών προστατευτικών ομάδων (π.χ. Cbz) για το *N*-τελικό άκρο του ψευδοτριπεπτιδικού κορμού, εκτός της Boc ομάδας, ήταν αδύνατη. Η προϋπόθεση αυτή συνδέεται κυρίως με την εμφάνιση πλήθους παραπροϊόντων κατά την τελική αποπροστασία σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν, οδηγώντας σε χαμηλές αποδόσεις για τα επιθυμητά προϊόντα [102], όπως προαναφέρθηκε και στην Παράγραφο 3.4.3 του Κεφαλαίου 3. Έτσι, αποφασίσαμε να αναπτύξουμε ένα πρωτόκολλο αμιδοαλκυλίωσης *H*-φωσφινικών ενώσεων που να μην υπόκειται στους υπάρχοντες περιορισμούς επιτρέποντας την ενσωμάτωση της Boc ομάδας. Για τον σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν τρεις εναλλακτικές προσεγγίσεις οι οποίες συνοψίζονται στο Σχήμα 44.

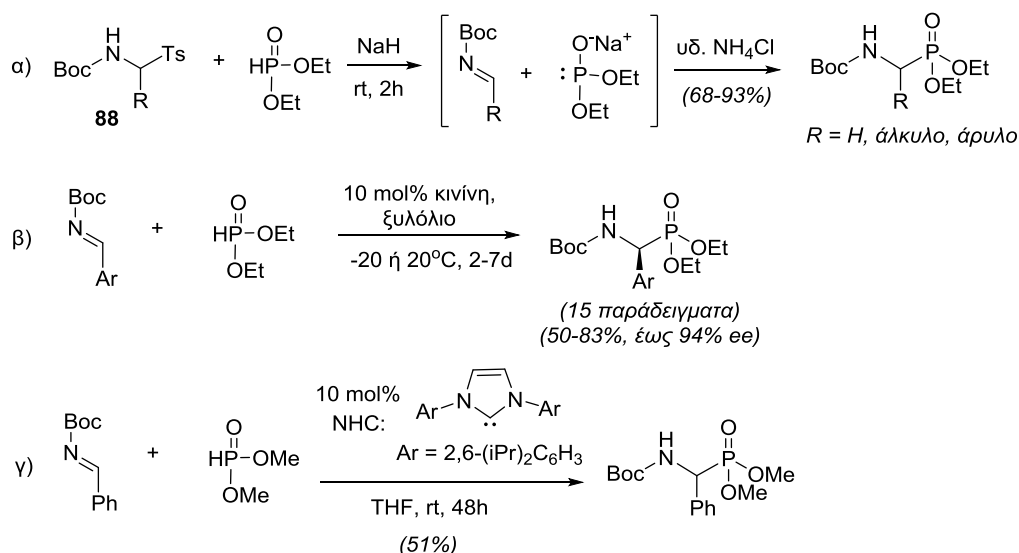


Σχήμα 44: Εναλλακτικές προσεγγίσεις σύνθεσης *N*-Boc-προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων μέσω αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης με χρήση Α) Boc-NH₂ και αλδεϋδών, Β) *N*-Boc ιμινών ή Γ) *N*-Boc αμιναλών

Η εναλλακτική Α αφορά μια αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών με χρήση Boc-NH₂, αλδεϋδών και αλκυλοφωσφινικών διοξέων **70** (Σχήμα 44A). Είναι χαρακτηριστικό όμως ότι έως και σήμερα δεν έχει αναφερθεί ποτέ αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών με την χρήση του Boc-NH₂ και οποιουδήποτε πυρηνόφιλου φωσφόρου. Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται στη χρήση όξινων συνθηκών στις αντιδράσεις αυτές που δυνητικά δεν είναι συμβατές με την Boc ομάδα. Υπενθυμίζεται επίσης ότι ο Ragulin επιχείρησε ανεπιτυχώς να χρησιμοποιήσει το Boc-NH₂ σε αντίστοιχες αντιδράσεις [166].

Οι *N*-Boc-ιμίνες, συνθετικές μονάδες της εναλλακτικής προσέγγισης B (ενώσεις **85**, Σχήμα 44B), αποτελούν χρήσιμα υποστρώματα σε μια ποικιλία αντιδράσεων όπως Mannich, αζα-Henry, Strecker κ.α., λόγω της υψηλής δραστηριότητάς τους [172]. Όμως, είναι ενδιαφέρον ότι παρά την ευρύτατη χρήση τους στην οργανική σύνθεση, εντοπίσαμε μόνο τρεις βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούσαν στη σύνθεση *N*-Boc-προστατευμένων οργανοφωσφορικών ενώσεων, και συγκεκριμένα φωσφονικών εστέρων, από την αντίδραση *N*-Boc-ιμινών και πυρηνόφιλων φωσφόρου, ενώ ανάλογες αντιδράσεις σε φωσφινικά υποστρώματα δεν έχουν πραγματοποιηθεί ποτέ.

Η πρώτη μέθοδος αναφέρθηκε το 2002 από τον Zwierzak και τους συνεργάτες του και αφορά την τύπου *P*-Michael αντίδραση φωσφινών με *in situ* παραγόμενες *N*-Boc-ιμίνες από τις σουλφόνες **88** με χρήση NaH (Σχήμα 45α) [173]. Αργότερα, αναφέρθηκαν δύο οργανοκαταλυτικές προσεγγίσεις για την παραγωγή *N*-Boc-αμινοαρυλοφωσφονικών εστέρων μέσω υδροφωσφινυλίωσης *N*-Boc-ιμινών με την χρήση *H*-φωσφονικών εστέρων ως πυρηνόφιλων και χρήση οργανοκαταλύτη, είτε κίνινης (Σχήμα 45β) είτε καρβενίων NHC (Σχήμα 45γ) από τις ερευνητικές ομάδες των Pettersen [174] και Cai [175], αντίστοιχα.

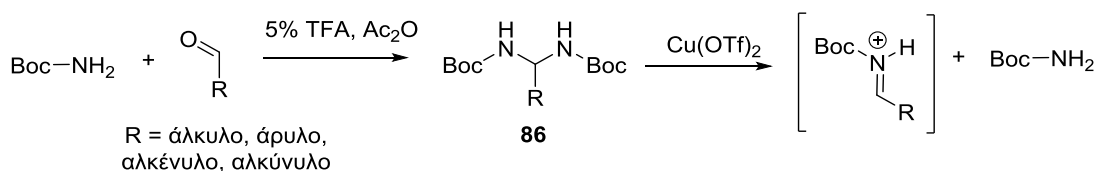


Σχήμα 45: Βιβλιογραφικά αναφερόμενες μέθοδοι αντίδρασης υδροφωσφινυλίωσης *N*-Boc-ιμινών για την σύνθεση *N*-Boc-αμινοφωσφονικών εστέρων [173, 174, 175].

Οι παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές αλλά και η γενικότερη συμπεριφορά των *N*-Boc-ιμινών, όπως καταγράφεται στην βιβλιογραφία θέτουν ορισμένες επιφυλάξεις όσον αφορά τη χρήση τους: α) Οι *N*-Boc-ιμίνες είναι υδρολυτικά εξαιρετικά ευαίσθητες ενώσεις και η αστάθειά τους αποτελεί ένα γνωστό

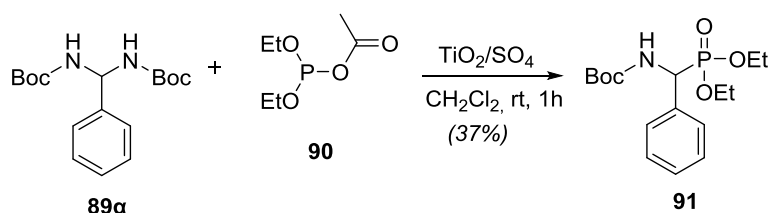
πρόβλημα, όπως προκύπτει από την βιβλιογραφία [172]. β) Στις αντιδράσεις του Σχήματος 45 γίνεται χρήση βασικών συνθηκών με στόχο την ενεργοποίηση της οργανοφωσφορικής ένωσης. Η στρατηγική αυτή αντιτίθεται στη λογική της κλασικής αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης, όπου ενεργοποιείται σε όξινες συνθήκες η ιμίνη (ως ιμινιακό κατιόν) και όχι η οργανοφωσφορική ένωση. γ) Εάν επιχειρηθεί εφαρμογή των κλασικών όξινων συνθηκών και χρήση απροστάτευτων φωσφινικών οξέων (αντί εστέρων που απαιτούνται στις βασικές συνθήκες του Σχήματος 45, η αστάθεια των *N*-Boc-ιμινών αναμένεται να καταστήσει τη χρήση τους προβληματική. δ) Οι παραδοσιακές μέθοδοι σύνθεσης των *N*-Boc-ιμινών παρουσιάζουν βασικά μειονεκτήματα, όπως χαμηλές αποδόσεις, δύσκολες διαδικασίες καθαρισμού τους ή χρήση εκρηκτικών αρχικών υλών, όπως το Boc-N₃. ε) Κυρίως οι *N*-Boc-αρυλιμίνες είναι αρκετά σταθερές ενώ οι αντίστοιχες αλκυλιμίνες ισομεριώνονται προς τα αντίστοιχα παράγωγα εναμίνης [165, 176, 177, 178, 179]. Το γεγονός αυτό μειώνει σημαντικά τις δυνατότητες ευρείας διαφοροποίησης της θέσης P₁ που αποτελεί και το τελικό ζητούμενο της επιδιωκόμενης μεθοδολογίας.

Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με πρόσφατες εξελίξεις στη χημεία των *N*-Boc-αμιναλών (**86**), πρόδρομα υποστρώματα της Εναλλακτικής Γ (Σχήμα 44), καθιστούν την τελευταία μια περισσότερο ελκυστική προσέγγιση του τελικού στόχου. Συγκεκριμένα, μόλις το 2013 ο Maruoka και οι συνεργάτες του παρουσίασαν για πρώτη φορά μια γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών [180], βασισμένοι σε προηγούμενες μελέτες του Ragulin που με παρόμοιο τρόπο είχε παρασκευάσει *N*-Cbz-αμινάλες [165]. Η μέθοδος σύνθεσης *N*-Boc-αμιναλών από τον Maruoka αποδείχτηκε ιδιαίτερα πρακτική και αποδοτική και εφαρμόστηκε άμεσα για την σταδιακή *in situ* παραγωγή δραστικών *N*-Boc-ιμινιακών κατιόντων παρουσία ενός οξέος Lewis [Cu(OTf)₂] (Σχήμα 46) [180]. Είναι αξιοσημείωτη η δυνατότητα πρόσβασης για πρώτη φορά σε αλκυλο, αλκενυλο ή αλκυνολυποκατεστημένες *N*-Boc-ιμίνες, οι οποίες έως τότε ήταν απρόσιτες, λόγω της άμεσης ισομερίωσής τους στις αντίστοιχες εναμίνες. Αναμφίβολα, η δομική ποικιλία που μπορεί να επιτευχθεί αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για την αποτελεσματική χρήση της μεθόδου στη διαφοροποίηση τελικού σταδίου φωσφινικών πεπτιδίων.



Σχήμα 46: Η *in situ* παραγωγή των *N*-Boc-ιμιών με χρήση όξινου καταλύτη από τον Maruoka et al. [180]

Όμως, αν και οι *N*-Boc-αμινάλες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε αντιδράσεις τύπου Mannich [181, 182, 183, 184], δεν υπάρχει βιβλιογραφικό προηγούμενο χρήσης των *N*-Boc-αμιναλών, όχι μόνο για την σύνθεση φωσφινικών οξέων, αλλά και για οποιαδήποτε αντίδραση σχηματισμού δεσμού C-P. Μόνη εξαίρεση αποτελεί μια αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης που αφορά τη σύνθεση του *N*-Boc-προστατευμένου φωσφονικού εστέρα **91** από διαιθυλοακετυλοφωσφίτη (**90**), και την *N*-Boc-αμινάλη **89α** παρουσία καταλύτη TiO_2/SO_4 σε διαλύτη CH_2Cl_2 , όπως περιγράφεται στο Σχήμα 47 [185]. Όμως, η μέθοδος αυτή παρόλο που κάνει χρήση ενός ενεργοποιημένου φωσφίτη, μιας αρωματικής αμινάλης και ενός ισχυρά όξινου καταλύτη (υπεροξέος) σε μεγάλη περίσσεια (7 ισοδύναμα), είχε μόλις 37% απόδοση ενώ απαιτήθηκε και ένα ξεχωριστό στάδιο προενεργοποίησης για τον σχηματισμό της ένωσης **91** (χρήση Ac_2O). Λόγω των παραπάνω, υπάρχουν ελάχιστα περιθώρια γενίκευσης αυτής της μεθόδου και εφαρμογής στους συνθετικούς στόχους που έχουμε θέσει.



Σχήμα 47: Βιβλιογραφικά αναφερόμενη αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών για τη σύνθεση *N*-Boc-προστατευμένων φωσφονιτών από Ragulin et al. [185]

Ουσιαστικά, οι Εναλλακτικές Α και Γ (Σχήμα 44) σχετίζονται άμεσα καθώς οι ενώσεις **86** σχηματίζονται *in situ* από αλδεΐδες και Boc-NH_2 , με βάση τις μηχανιστικές υποθέσεις που παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 41 [165]. Θεωρητικά, η “τριών συστατικών” Εναλλακτική Α φαίνεται πιο ελκυστική επιλογή καθώς δεν απαιτεί ένα επιπλέον βήμα για τη σύνθεση των **86**, όπως απαιτείται στη “δύο συστατικών” Εναλλακτική Γ. Όμως, η Εναλλακτική Γ προσφέρει ένα επιπλέον ισχυρό πλεονέκτημα: τη δυνατότητα χρήσης διαλύτη, όπως περιγράφηκε στην αντίδραση του Σχήματος 43, τη μοναδική αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης σε διαλύτη

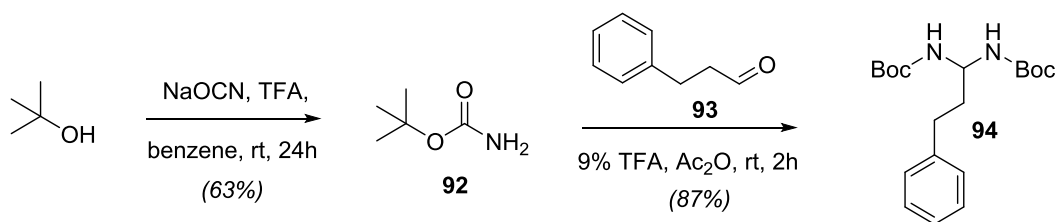
που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [171]. Η δυνατότητα αυτή θα μπορούσε να ανοίξει τον δρόμο σε μια καταλυτική, εναντιοεκλεκτική εκδοχή της μεθόδου (π.χ. μέθοδος Maruoka με χρήση οξέος Lewis) [180]. Η προοπτική αυτή δεν είναι καθόλου προφανής και απαιτεί δραστική διαφοροποίηση της μεθόδου του Ragulin η οποία, όπως υποστηρίζουν οι συγγραφείς, είναι αυτοκαταλυόμενη από το TFA που παράγεται κατά την ενεργοποίηση του αντιδρώντος φωσφινικού οξέος από το TFAA [171].

Ανακεφαλαιώνοντας, στόχο μας αποτέλεσε η διερεύνηση της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης *H*-φωσφινικών διοξέων είτε τριών συστατικών με χρήση Boc-NH₂, είτε δύο συστατικών με χρήση των *N*-Boc-αμιναλών ως συνθετικών ισοδυνάμων των δραστικών *N*-Boc-ιμινών και η επίτευξη ήπιων συνθηκών, συμβατών με την χρήση της Boc ομάδας (Σχήμα 44). Ως κεντρικής σημασίας προϋπόθεση ετέθη η δυνατότητα ευρείας διαφοροποίησης χωρίς περιορισμό σε συγκεκριμένες ομάδες (π.χ άρυλο) που επικρατούν στην βιβλιογραφία, αλλά να επεκτείνεται σε όλες τις κατηγορίες αλυσίδων που εξυπηρετούν τους σκοπούς ενός άρθρου SAR. Τέλος, απώτερο στόχο αποτέλεσε η δυνατότητα πραγματοποίησης της αντίδρασης σε διαλύτη, μια εναλλακτική που δύναται να προσφέρει ευελιξία κατά τη διερεύνηση καταλυτικών εκδοχών της αντίδρασης με χειρόμορφους καταλύτες.

4.5 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης με χρήση ανυδριτών

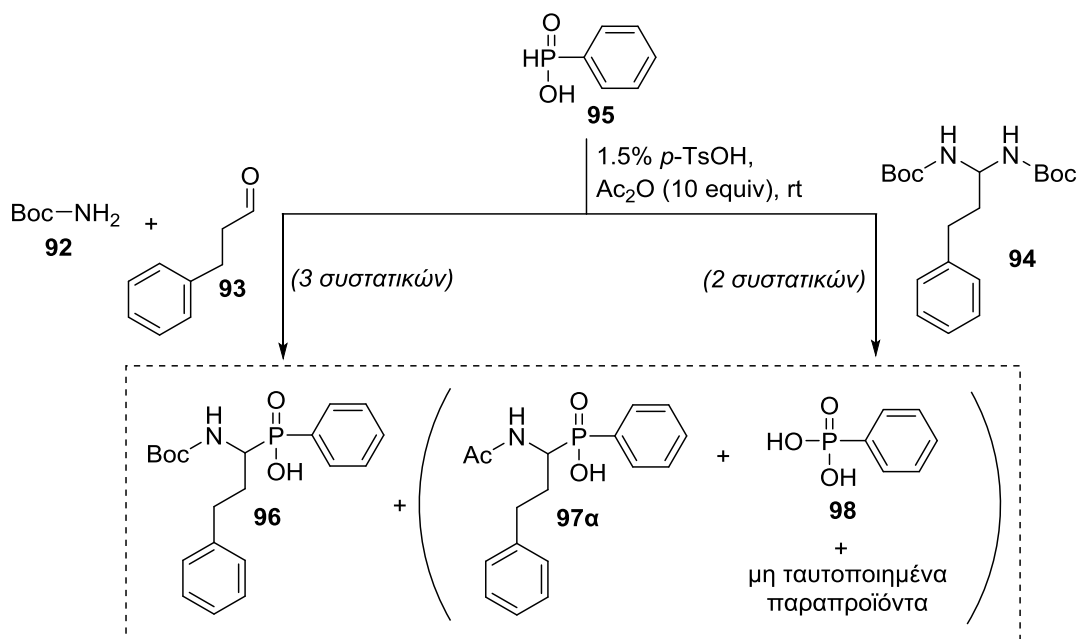
4.5.1 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης του PhPO₂H₂

Αρχικά, επιχειρήθηκε η σύγκριση των εναλλακτικών προσεγγίσεων αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών (Εναλλακτική Α, Σχήμα 43) και δύο συστατικών (Εναλλακτική Γ, Σχήμα 43), με τη χρήση ενός απλού και εμπορικά διαθέσιμου φωσφινικού οξέος, του φαινυλοφωσφινικού οξέος. Στην περίπτωση της αντίδρασης τριών συστατικών, εκτός του Boc-NH₂ (**92**) χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη υδροκινναμωμική αλδεΐδη (**93**) ενώ στην αντίδραση δύο συστατικών χρησιμοποιήθηκε η αντίστοιχη *N*-Boc-αμινάλη **94** η οποία παρασκευάστηκε με βάση το πρωτόκολλο του Maruoka [180], σύμφωνα με την πορεία του Σχήματος 48.



Σχήμα 48: Σύνθεση της ένωσης **94** με την μέθοδο του Maruoka

Συγκεκριμένα, το Boc-NH₂ παρασκευάστηκε από *t*-BuOH και κυανικό νάτριο παρουσία περίσσειας (2.1 equiv) TFA. Στις συνθήκες αυτές, το τριτοταγές βούτυλο κατιόν που σχηματίζεται από την *t*-BuOH παρουσία TFA προσβάλλεται από το πυρηνόφιλο κυανικό άλας και με την παρουσία ιχνών H₂O οδηγείται προς το προϊόν **92** [186]. Έπειτα, αντίδραση του παραγώγου **92** και της αλδεΐδης **93** σε διαλύτη Ac₂O παρουσία καταλυτικής ποσότητας TFA οδήγησε στην *N*-Boc-αμινάλη **94** σε απόδοση 87% (Σχήμα 48) [180, 187].



		96 (%)	97α (%)	98 (%)	95 (%)	μη ταυτοποιημένα παραπροϊόντα
4h	3 συστατικών	28	11	-	49	12
	2 συστατικών	27	9	2	62	-
24h	3 συστατικών	23	13	2	27	35
	2 συστατικών*	29	13	3	3	52

* Χρησιμοποιήθηκε 3% *p*-TsOH

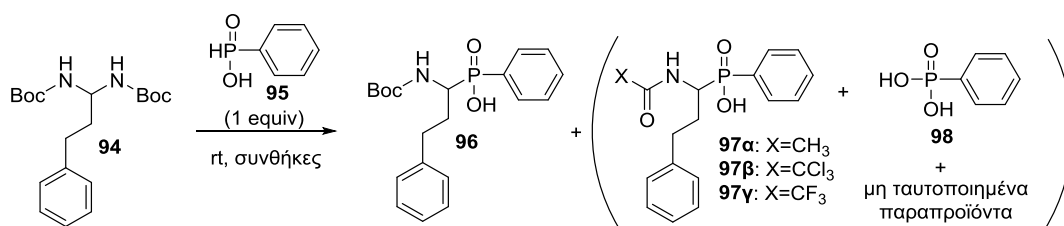
Σχήμα 49: Σύγκριση αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης 2 και 3 συστατικών με τη χρήση PhPO₂H₂.

Ακολούθησε η πραγματοποίηση των αντιδράσεων δύο και τριών συστατικών με το οξύ **95** και με χρήση όμοιων συνθηκών για λόγους σύγκρισης (Σχήμα 49). Συγκεκριμένα, σε διάλυμα του **95** σε Ac₂O (10 ισοδύναμα) που περιείχε ως καταλύτη *p*-TsOH (1.5%) προστέθηκε είτε το Boc-NH₂ και έπειτα η αλδεΐδη **93** (3 συστατικών) είτε η αμινάλη **94** (2 συστατικών). Έπειτα από 4h ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου ακολούθησε διακοπή με προσθήκη H₂O και ανάλυση των μιγμάτων με ³¹P-NMR (ολοκλήρωση κορυφών) και MS.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 49, παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος **96** εντός 4 ωρών και στις δύο αντιδράσεις σε παρόμοιο ποσοστό το οποίο όμως ήταν πολύ χαμηλό (27 και 28%). Από ανάλυση των φασμάτων MS προέκυψε ότι εκτός από το προϊόν και τα υψηλά ποσοστά αντιδρώντος **95** υπήρχε στο μίγμα της αντίδρασης και το ακετυλιωμένο παραπροϊόν **97α**. Στο φάσμα ³¹P NMR, η ένωση **97α** εμφανίζεται στα 40.6 ppm, περίπου 1 ppm προς υψηλότερα πεδία σε σχέση με το προϊόν **96**. Είναι σαφές ότι στις συνθήκες της αντίδρασης ευνοείται η μερική διάσπαση της Boc ομάδας και η ακόλουθη ακετυλίωση από τον Ac₂O. Είναι επίσης χαρακτηριστικό ότι επιπλέον χρόνος (24h) στην αντίδραση 3 συστατικών οδήγησε σε πιο πολύπλοκο μίγμα αντίδρασης με μείωση του **96** προς όφελος του ακετυλιωμένου παραπροϊόντος **97α** και σχηματισμό άγνωστων παραπροϊόντων. Παρόμοια αποτελέσματα έπειτα από 24h έδωσε και η αντίδραση 2 συστατικών με χρήση επιπλέον καταλύτη (3% *p*-TsOH) που είχε στόχο την επιτάχυνση του σχηματισμού του **96**. Φαίνεται λοιπόν ότι η απόδοση σε **96** που επιτυγχάνεται στις 4 πρώτες ώρες (~30%) αποτελεί ένα μέγιστο καθώς στη συνέχεια ενισχύονται οι παράπλευρες αντιδράσεις.

Με δεδομένο ότι η αντίδραση 2 συστατικών έδωσε μικρότερο ποσοστό παραπροϊόντων στις 4h, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση των συνθηκών με χρήση της αμινάλης **94** και του οξέος **95**. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 7: Διερεύνηση αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση PhPO₂H₂ (95)



	Συνθήκες	Χρόνος (h)	Διαλύτης	Μετατροπή ^α (%)	96 ^α (%)	97 : 98 : μη ταυτοποιημένα παραπροϊόντα ^α (%)
1	AcCl/Ac ₂ O 1/5 (v/v)	1.5	-	100	26	29 ^β : 3 : 42
2	AcCl/Ac ₂ O 1/7 (v/v)	3	-	78	42	23 ^β : 13 : -
3	AcCl/Ac ₂ O 1/14 (v/v)	24	-	97	17	20 ^β : 12 : 48
4	TCAA (1 equiv)	120	CH ₂ Cl ₂	68	-	68 ^γ : - : -
5	TFAA (1 equiv)	3	CH ₂ Cl ₂	62	15	18 ^δ : 13 : 16
6	TFAA (1 equiv)	48	CH ₂ Cl ₂	53	26	3 ^δ : 27 : 3
7	TFAA (1 equiv), <i>p</i> -TsOH 2%	3	CH ₂ Cl ₂	37	7	2 : 17 : 11

^α ολοκληρώσεις κορυφών στο φάσμα ³¹P-NMR του μίγματος αντίδρασης έπειτα από διακοπή με H₂O και συμπύκνωση με τολουόλιο. ^β αναφέρεται στο **97α**. ^γ αναφέρεται στο **97β**. ^δ αναφέρεται στο **97γ**.

Αρχικά, με στόχο την μείωση του χρόνου αντίδρασης που πιθανώς συνδέεται με την εμφάνιση παραπροϊόντων, επιχειρήθηκε η εφαρμογή εντονότερων συνθηκών για μικρότερο χρόνο. Έτσι, έγινε χρήση Ac₂O παρουσία AcCl (καταχώρηση 1, Πίνακας 7), όπου διαπιστώθηκε γρήγορη (1.5 h) και ποσοτική μετατροπή του φωσφινικού οξέος **95**, χαμηλή απόδοση σε προϊόν (26%) και αρκετά αυξημένο ποσοστό ακετυλιωμένου παραπροϊόντος **97α**. Προκειμένου να μειωθεί το ποσοστό του **97α**, επιχειρήθηκε η μείωση του AcCl (καταχώρηση 2, Πίνακας 7). Παρατηρήθηκε αύξηση του προϊόντος **96** (42%), όμως δεν καταναλώθηκε πλήρως το **95**. Έτσι, μειώθηκε περαιτέρω το AcCl με ταυτόχρονη αύξηση του χρόνου σε 24 h (καταχώρηση 3, Πίνακας 7), όμως παρελήφθη μόλις 17% του **96** και πλήθος παραπροϊόντων.

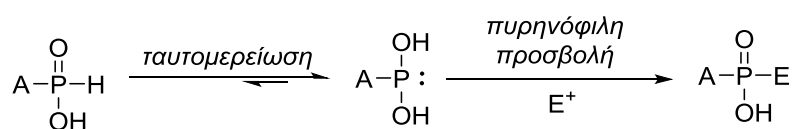
Θεωρήσαμε ότι πιο ήπιες συνθήκες που θα μετρίαζαν τον σχηματισμό παραπροϊόντων θα μπορούσαν να επιτευχθούν με στοιχειομετρική ποσότητα ανυδρίτη σε διάλυμα. Όμως, τότε θα έπρεπε να αντικατασταθεί ο Ac₂O από έναν ισχυρότερο, όπως ο τριχλωροοξικός (TCAA) ή ο τριφθοροοξικός ανυδρίτης

(TFAA). Η χρήση του TCAA οδήγησε σε πολύ αργή μετατροπή (5d) αποκλειστικά προς το παραπροϊόν **97β** γεγονός που συνδέεται με την απομάκρυνση της Βοc ομάδας από το επιθυμητό προϊόν αμιδοακυλίωσης και την ακυλίωση από τον TCAA (καταχώρηση 4, Πίνακας 7). Μειώνοντας τον χρόνο αντίδρασης (3h) και αντικαθιστώντας τον TCAA με τον δραστικότερο TFAA, παρελήφθη 15% προϊόν όμως τα ποσοστά του **97γ** παρέμειναν υψηλά (καταχώρηση 5, Πίνακας 7). Τέλος, παρόμοιες χαμηλές μετατροπές παρατηρήθηκαν είτε σε μεγαλύτερο χρόνο αντίδρασης (καταχώρηση 6, Πίνακας 7) είτε με χρήση καταλύτη *p*-TsOH (καταχώρηση 7, Πίνακας 7). Εν τούτοις, ο σχηματισμός του ακυλιωμένου **97γ** περιορίστηκε.

4.5.2 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης αλκυλοφωσφινικών οξέων τύπου **70** ή **83**.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 49 και τον Πίνακα 7, η διερεύνηση της αμιδοακυλίωσης του φωσφινικού οξέος **95** έδωσε απογοητευτικά αποτελέσματα με χαμηλές μετατροπές στο επιθυμητό προϊόν **96**, είτε λόγω ατελών αντιδράσεων, είτε λόγω μεγάλου χρόνου αντίδρασης που συνδεόταν με την παραγωγή σε σημαντικό ποσοστό των **97** και **98** ως κύριων παραπροϊόντων. Υποθέσαμε ότι η συμπεριφορά αυτή μπορεί εν μέρει να οφείλεται στη φύση του φωσφινικού οξέος (**95**) που επιλέχθηκε για τη διερεύνηση και διαφέρει από τη φύση των υποστρωμάτων **70** ή **83** τα οποία συμπεριλαμβάνονται στον τελικό συνθετικό στόχο.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται σχηματικά στο Σχήμα 50 οι δύο παράμετροι που συνεισφέρουν στην δραστικότητα των φωσφινικών οξέων είναι: α) η ευκολία ταυτομερείωσής τους και β) η πυρηνοφιλία της P(III) μορφής τους.



Σχήμα 50: Παράμετροι που συντελούν στην δραστικότητα φωσφινικών οξέων

Βάσει κινητικών μελετών μέσω NMR και θεωρητικών υπολογισμών, έχει εκτιμηθεί ότι η ταχύτητα ταυτομερείωσης αρυλο υποκατεστημένων P-H φωσφινοξειδίων είναι μεγαλύτερη από αυτήν των αλκυλο υποκατεστημένων αναλόγων τους [188].

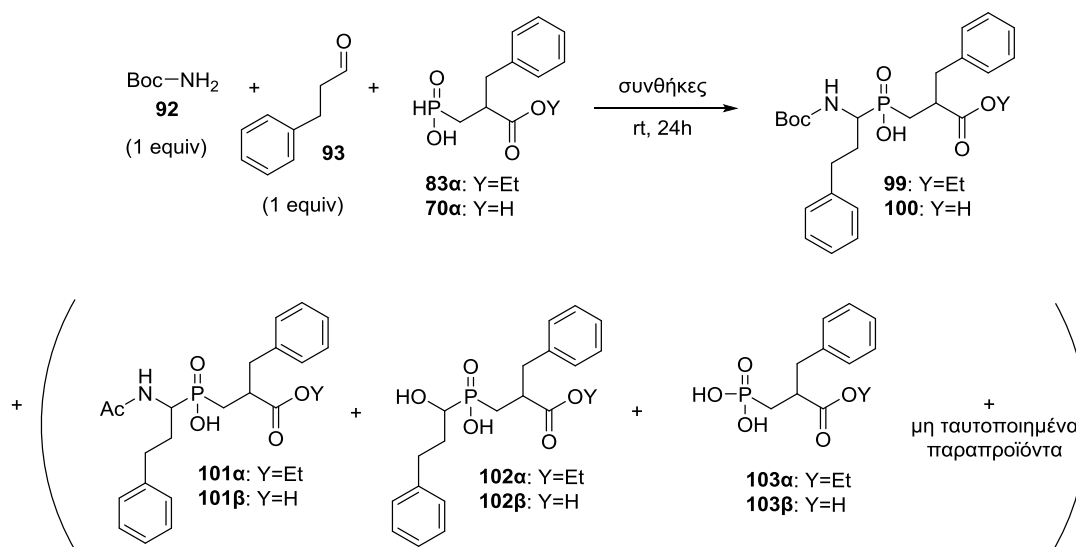
Στην δική μας περίπτωση, αυτό θα σήμαινε ότι η μετάβαση από το **95** στα αλκυλο παράγωγα **70** ή **83** θα είχε αρνητική επίδραση στην απόδοση της αντίδρασης. Όμως, αναμένεται η επίδραση του υποκαταστάτη A στην πυρηνοφιλία να ακολουθεί αντίστροφη τάση, όπως άλλωστε υπονοείται και από την υψηλότερη δραστικότητα των τριαλκυλοφωσφινών σε σχέση με την τριφαινυλοφωσφίνη [189]. Ενδεχομένως, περνώντας από το **95** όπου το ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου P απεντοπίζεται στον αρωματικό δακτύλιο σε άλκυλο φωσφινικά οξέα (π.χ. **70**, **83**), να επηρεάζονταν θετικά η πυρηνοφιλία του φωσφινικού οξέος, η ταχύτητα της αντίδρασης και η μείωση των παραπροϊόντων που οφείλονται στον παρατεταμένο χρόνο αντίδρασης.

4.5.2.1 Αντιδράσεις τριών συστατικών.

Αρχικά, διερευνήθηκε η αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών με την χρήση είτε του καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **83a** είτε του καρβοξυλικού οξέος **70a**. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με ισοδύναμες ποσότητες Boc-NH₂, αλδεΐδης **93** και φωσφινικού οξέος. Τα αποτελέσματα της διερεύνησης συνοψίζονται στον Πίνακα 8.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε Ac₂O και 2% *p*-TsOH ως καταλύτης ώστε οι αντιδράσεις να είναι συγκρίσιμες με την αντίστοιχη αντίδραση του PhPO₂H₂ που περιγράφηκε στο Σχήμα 49. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων (καταχωρήσεις 1 και 2, Πίνακας 8) έδειξαν ότι υπάρχει μια ισχυρή εξάρτηση της πορείας της αντίδρασης από τη φύση του φωσφινικού υποστρώματος. Συγκεκριμένα, για το υπόστρωμα **83a** παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος **99** σε ποσοστό 20%, το οποίο εμφανίζεται ως δύο σχεδόν ισοϋψείς κορυφές στο φάσμα ³¹P-NMR (CDCl₃) στα 54.0 και 54.3 ppm (λόγω μίγματος 2 ρακεμικών διαστερεοϊσομερών) και ακόμα δύο μικρότερες κορυφές περίπου 1.5 ppm προς υψηλότερα πεδία. Οι τελευταίες αντιστοιχούν σε στροφομερή, δηλαδή διαμορφωμερή λόγω της περιορισμένης περιστροφής του αμιδικού δεσμού της Boc ομάδας και εμφανίζονται σε όλες τις ενώσεις αυτού του τύπου. Όμως, ταυτόχρονα παρατηρήθηκε και σχηματισμός του διοξέος **100** σε ποσοστό 15% (51.8 & 52.5 ppm + στροφομερή στα 50.2 & 50.7 ppm) λόγω της μερικής διάσπασης του καρβοξυλικού αιθυλεστέρα από το προϊόν **99**.

Πίνακας 8: Διερεύνηση αμιδοαλκυλίωσης 3 συστατικών με τη χρήση των φωσφινικών οξέων 70α και 83α.



	Υπόστρωμα	Συνθήκες	Διαλύτης	99 ^α (%)	100 ^α (%)	101 : 102 : 103 : μη ταυτοποιημένα παραπροϊόντα ^α (%)	
1	83α	Ac ₂ O (10 equiv), <i>p</i> -TsOH 2%	-	20	15	3 ^β : - : 7 : 14	
2	70α	Ac ₂ O (10 equiv), <i>p</i> -TsOH 2%	-		70	12 : - : 11 : 4	
3	70α ^γ	Ac ₂ O (10 equiv), <i>p</i> -TsOH 2%	AcOH ^δ		68	16 : - : 8 : 2	
4	70α	Ac ₂ O (10 equiv)	-		30	- : 36 : 4 : 22	
5	70α	Ac ₂ O (10 equiv), <i>p</i> -TsOH 2%	CH ₂ Cl ₂ ^ε		-	- : - : 5 : 74	
6	70α	TFAA (1 equiv)	CH ₂ Cl ₂		δεν αντέδρασε		

^α ολοκληρώσεις κορυφών στο φάσμα ³¹P-NMR του μίγματος αντίδρασης έπειτα από διακοπή με H₂O και συμπύκνωση με τολουόλιο. ^β αναφέρεται στο σύνολο των **101α** και **101β**. ^γ χρόνος αντίδρασης 48 h. ^δ 1:1 (v:v) σε αναλογία με τον Ac₂O

Το πρόβλημα της διάσπασης των καρβοξυλικών αιθυλεστέρων αναφέρεται και στη βιβλιογραφία κυρίως όταν χρησιμοποιείται AcCl, ενώ αναφέρεται ότι μειώνεται όταν η αντίδραση πραγματοποιείται σε Ac₂O και καταλύτη *p*-TsOH [166]. Παρόλα αυτά, στην δική μας περίπτωση το διοξύ **100** παρελήφθη σε σημαντικό ποσοστό. Εάν εκτιμηθούν αθροιστικά τα ποσοστά των **99** και **100** για την αποτελεσματικότητα της αμιδοαλκυλίωσης, εξάγεται ότι η αντίδραση είναι

αποδοτικότερη σε σχέση με την εκείνη του PhPO₂H₂ (35% έναντι 23%), όχι όμως σε σημαντικό βαθμό όπως θα περιμέναμε. Επομένως, η μετάβαση από το αρυλο παράγωγο **95** στο αλκυλο παράγωγο **83α** έχει συνολικά μια μικρή θετική επίδραση. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και με το υπόστρωμα **70α** (καταχώρηση 2, Πίνακας 8). Στην περίπτωση αυτή, η μετατροπή σε **100** άγγιξε το 70%, δηλαδή τριπλάσια σε σχέση με το PhPO₂H₂. Επίσης, σε σχέση με το **83α**, η μετατροπή σε προϊόν διπλασιάστηκε, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλα δομικά χαρακτηριστικά του φωσφινικού υποστρώματος που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης, όπως θα συζητηθεί αργότερα.

Παρά την σημαντικά βελτιωμένη εικόνα της αντίδρασης με τη χρήση του φωσφινικού υποστρώματος **70α**, ο σχηματισμός του ακετυλιωμένου παραπροϊόντος **101β** σε ποσοστό 12% υποδηλώνει ότι και σε αυτήν την περίπτωση η διάσπαση της Boc ομάδας δεν μπορεί να αποφευχθεί (καταχώρηση 2, Πίνακας 8). Αραίωση του Ac₂O με AcOH σε αναλογία 1:1 (καταχώρηση 3, Πίνακας 8) δεν μετέβαλε σημαντικά την συνολική εικόνα της αντίδρασης ενώ, προς έκπληξή μας, η αραίωση με CH₂Cl₂ (καταχώρηση 5, Πίνακας 8) έδωσε μίγμα που δεν περιείχε καθόλου προϊόν **100** παρά μόνο κυρίως αδιευκρίνιστα παραπροϊόντα. Απουσία όξινου καταλύτη δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του παραπροϊόντος **101β**, όπως αναμένονταν, όμως η μετατροπή σε προϊόν **100** υποδιπλασιάστηκε ενώ σχηματίστηκε το παραπροϊόν **102β** σε ποσοστό 36% (καταχώρηση 4, Πίνακας 8). Τέλος, χρήση ισοδύναμης ποσότητας TFAA αντί του Ac₂O δεν οδήγησε σε καμία μετατροπή (καταχώρηση 7, Πίνακας 8).

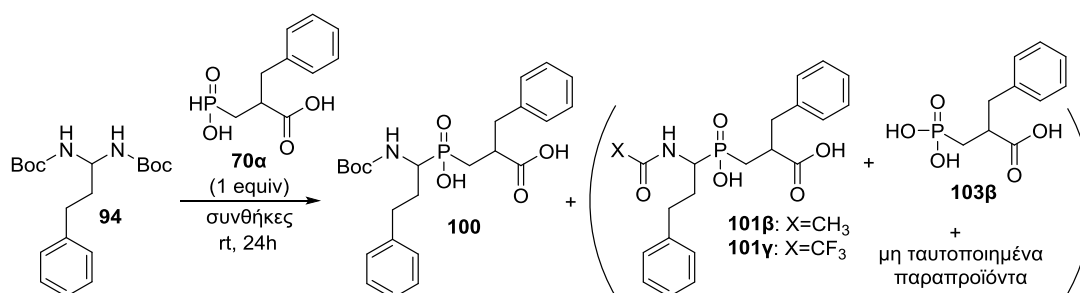
4.5.2.2 Αντιδράσεις δύο συστατικών.

Αν και η αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης τριών συστατικών του **70α** παρουσίασε σαφώς βελτιωμένη εικόνα σε σχέση με την αντίδραση του **95**, οι αποδόσεις είναι μέτριες ενώ ο σχηματισμός παραπροϊόντων όπως το ακετυλιωμένο παράγωγο **101β** και, σε κάποιες περιπτώσεις, το υδροξυ παράγωγο **102β** δεν μπορεί να αποκλειστεί. Έτσι, προχωρήσαμε στην διερεύνηση της αντίδρασης δύο συστατικών, όπου χρησιμοποιείται η προσχηματισμένη *N*-Boc-αμινάλη **94**, επομένως ο σχηματισμός του παραπροϊόντος **102β** που σχετίζεται με την συναγωνιστική αντίδραση της αλδεΐδης θα μπορούσε να αποφευχθεί. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο σχηματισμός του **101β** σχετίζεται με την παρουσία του όξινου

καταλύτη στους παρατεταμένους χρόνους αντίδρασης που εφαρμόζονται και ότι ο όξινος καταλύτης χρειάζεται για τον σχηματισμό της ενδιάμεσης *N*-Boc-αμινάλης, η χρήση προσχηματισμένης *N*-Boc-αμινάλης πιθανώς να επιτρέπει την μείωση του όξινου καταλύτη που συνδέεται με την διάσπαση της Boc ομάδας.

Τα αποτελέσματα της αρχικής διερεύνησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Διερεύνηση αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση του 70α και ανυδριτών.



	Ανυδρίτης (equiv)	Καταλύτης	Διαλύτης	Μετατροπή ^α (%)	100 ^α (%)	101 : 103β : μη ταυτοποιημένα παραπροϊόντα ^α (%)
1	Ac ₂ O (10)	<i>p</i> -TsOH 2%	-	96	71	22 : 3 : -
2	Ac ₂ O (10)	-	-	99	67	13 : 19 : -
3 ^β	Ac ₂ O (10)	-	CH ₂ Cl ₂ ^γ	39	37	1 : 1 : -
4	Ac ₂ O (1)	<i>p</i> -TsOH 2%	CH ₂ Cl ₂	36	28	- : 6 : 2
5	TFAA (1)	-	CH ₂ Cl ₂	71	59	4 : 5 : 3
6	TFAA (1)	-	τολουόλιο	δεν αντέδρασε		

^α ολοκληρώσεις κορυφών στο φάσμα ³¹P-NMR του μίγματος αντίδρασης έπειτα από διακοπή με H₂O και συμπύκνωση με τολουόλιο. ^β χρόνος αντίδρασης 48 h. ^γ 1:1 (v:v) σε αναλογία με τον Ac₂O

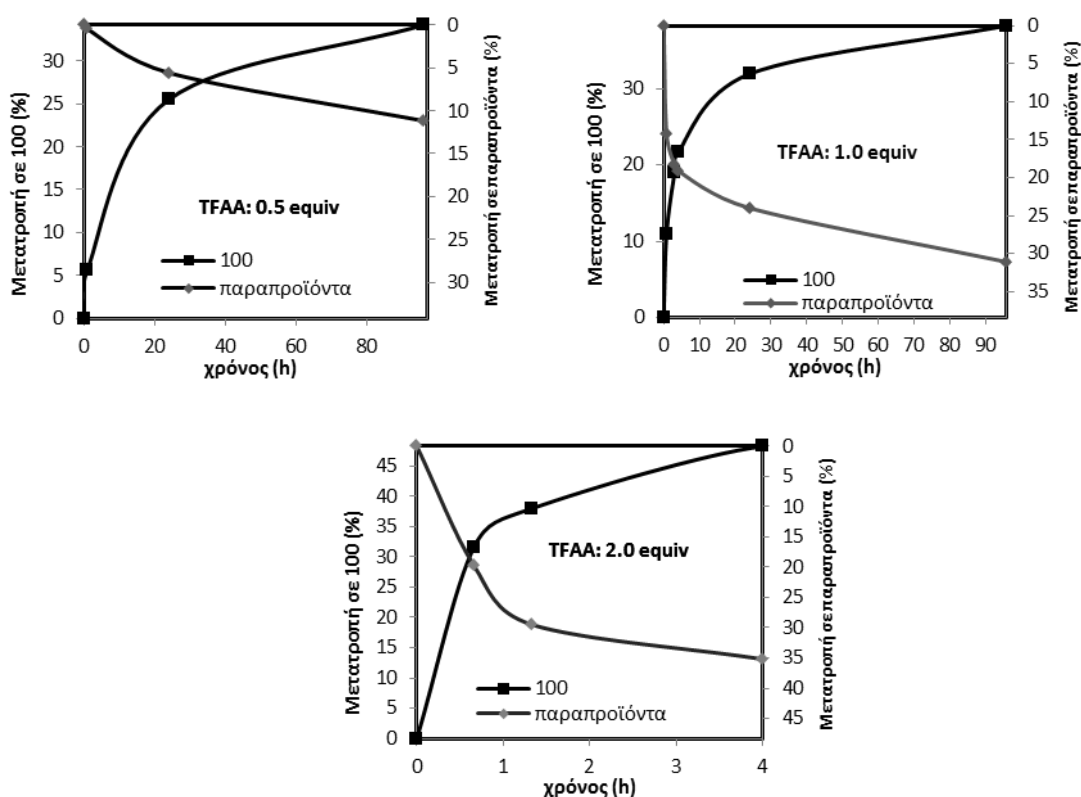
Αρχικά, παρατηρείται μια σαφής βελτίωση σε σχέση με τις αντιδράσεις 3 συστατικών (Πίνακας 8) καθώς σε καμία από τις αντιδράσεις του Πίνακα 9 δεν σχηματίστηκε το υδροξυ παραπροϊόν **103β** και επιπλέον σχεδόν απαλείφθηκε ο σχηματισμός άγνωστων παραπροϊόντων. Αναλυτικότερα, με χρήση Ac₂O παρουσία καταλύτη 2% *p*-TsOH (καταχώρηση 1, Πίνακας 9) παρατηρήθηκε 71% μετατροπή σε προϊόν **100**, δηλαδή όμοια με αυτήν της αντίστοιχης αντίδρασης 3 συστατικών (70%, καταχώρηση 2, Πίνακας 8). Όμως, το ποσοστό του παραπροϊόντος **101β** αυξήθηκε από 12% σε 22%. Εφόσον ο σχηματισμός του **101β** συνδέεται με την επίδραση του όξινου καταλύτη, έγινε αντίδραση απουσία *p*-

TsOH (καταχώρηση 2, Πίνακας 9) και, πράγματι, το ποσοστό του **101β** μειώθηκε σε 13%. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά την απουσία όξινου καταλύτη δεν επηρεάστηκε σημαντικά η μετατροπή σε προϊόν **100** (67% έναντι 71% παρουσία καταλύτη), γεγονός που υποδεικνύει ότι ο όξινος καταλύτης είναι περισσότερο σημαντικός στον σχηματισμό της ενδιάμεσης *N*-Boc-αμινάλης παρά στο σχηματισμό του δεσμού C-P. Είναι χαρακτηριστικό ότι όταν η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε CH₂Cl₂ (καταχώρηση 3, Πίνακας 9), όπου η αντίδραση 3 συστατικών απέτυχε να οδηγήσει σε προϊόν ακόμα και παρουσία *p*-TsOH (καταχώρηση 4, Πίνακας 8), παρατηρήθηκε 39% μετατροπή σε προϊόν **100**. Η παρατήρηση αυτή είναι μια ακόμα ένδειξη της υψηλότερης δραστηριότητας των *N*-Boc-αμιναλών στην αντίδραση αμιδοακυλίωσης, σε σχέση με την εκδοχή των 3 συστατικών. Επιπλέον, η αραίωση της αντίδρασης παρεμπόδισε σημαντικά τον σχηματισμό του παραπροϊόντος **101β** (~1%), όπως συνέβη άλλωστε και στην αντίδραση 3 συστατικών.

Η αντιμετώπιση του σχηματισμού του **101β** μέσω αραίωσης και απουσία καταλύτη ήταν μεν αποτελεσματική, αλλά παράλληλα υποδιπλασίασε τον σχηματισμό του προϊόντος **100**. Έτσι, επιστρέψαμε στη χρήση καταλύτη και επιχειρήσαμε την μείωση του Ac₂O για να μειωθεί η πιθανότητα παραλαβής ακετυλιωμένου παραπροϊόντος **101β** (καταχώρηση 4, Πίνακας 9). Αυτό κατέστη εφικτό, όμως η μετατροπή σε **100** παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα (28%). Συμπερασματικά, φαίνεται οι καλές αποδόσεις με χρήση Ac₂O ως αφυδατικού μέσου να συνοδεύονται από αυξημένο ποσοστό παραπροϊόντων και το αντίστροφο, γεγονός που θέτει πρακτικούς περιορισμούς στη μέθοδο. Έτσι, στραφήκαμε στη χρήση του TFAA, δηλαδή ενός δραστηρότερου ακυλιωτικού μέσου, εφαρμόζοντας τη μέθοδο που πρωτοαναφέρθηκε από τον Ragulin και τους συνεργάτες του [171, 190]. Στις μελέτες βελτιστοποίησης της αντίδρασης αυτής οι συγγραφείς διαπίστωσαν πως η χρήση στοιχειομετρικής ποσότητας TFAA και *N*-Cbz-αμιναλών σε διαλύτη CH₂Cl₂ ή τολουόλιο φαίνεται να υπερτερεί σε σύγκριση με την χρήση στοιχειομετρικής ποσότητας Ac₂O [190].

Εφαρμογή των συνθηκών του Ragulin έδειξε ότι το τολουόλιο δεν οδηγεί σε καμία μετατροπή, ενώ σε διαλύτη CH₂Cl₂ το ποσοστό μετατροπής σε **100** έφτασε το 59% (δηλαδή 20-30% υψηλότερες αποδόσεις σε σύγκριση με τη καταχώρηση 3), ενώ παράλληλα το ποσοστό του **101γ** έπεσε σε ποσοστό μόλις 4% (καταχωρήσεις 5 και 6, Πίνακας 9). Αν και οι αποδόσεις εξακολουθούν να είναι μέτριες, φάνηκε ότι

η χρήση του TFAA μπορεί να αποτελέσει μια καλή αφετηρία για περαιτέρω βελτιστοποίηση. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε διαλύτη CDCl_3 με χρήση διαφορετικών ισοδυνάμων TFAA, με στόχο την αμεσότερη παρακολούθηση των μετασχηματισμών με φασματοσκοπία $^{31}\text{P-NMR}$. Στόχο αποτέλεσε η εύρεση της βέλτιστης ισορροπίας χρόνου αντίδρασης/ισοδύναμο TFAA ώστε να έχουμε μέγιστη μετατροπή και ελαχιστοποίηση των παραπροϊόντων. Σε όλες τις αντιδράσεις, η αμινάλη **94** προστέθηκε σε διάλυμα του φωσφινικού οξέος **70a** σε CDCl_3 και ακολούθως η προσθήκη του TFAA υπό ατμόσφαιρα αργού, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αποτελέσματα της κινητικής παρακολούθησης παρουσιάζονται με τη μορφή διαγραμμάτων στην Εικόνα 33.



Εικόνα 33: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του **94** και **70a** με χρήση 0.5, 1.0 και 2.0 equiv TFAA.

Ο τρόπος απεικόνισης που επιλέχθηκε περιλαμβάνει μια καμπύλη με θετική κλίση (■) που αφορά τον σχηματισμό του προϊόντος **100** και μια καμπύλη με αρνητική κλίση (◆, δεξιά κλίμακα y) που ξεκινά από το σημείο που η μετατροπή σε προϊόν **100** μεγιστοποιείται. Με τον τρόπο αυτό, το σημείο τομής των δύο καμπυλών μπορεί να δείξει σε ποιο χρόνο υπάρχει εξισορρόπηση μεταξύ καλής απόδοσης και χαμηλού σχηματισμού παραπροϊόντων. Από την αποτίμηση των παραπάνω διαγραμμάτων μπορούν να εξαχθούν τα εξής σχόλια:

α) Ο βέλτιστος χρόνος είναι αντιστρόφως ανάλογος της ποσότητας του TFAA. Έτσι, βέλτιστη σχέση **100**/παραπροϊόντων με 0.5 equiv TFAA λαμβάνεται σε ~30-35 h, με 1.0 equiv TFAA σε ~3 h και με 2.0 equiv TFAA σε ~35 min. Εν τούτοις, στα σημεία αυτά οι μετατροπές σε προϊόν είναι χαμηλές (20-30%) ενώ το ποσοστό των παραπροϊόντων κυμαίνεται μεταξύ 7-18%.

β) Το ποσοστό των παραπροϊόντων αυξάνεται με αύξηση των ισοδυνάμων TFAA. Συγκεκριμένα, στις αντιδράσεις με 0.5 και 1.0 equiv TFAA, τα ποσοστά του προϊόντος **100** στις 96 h φτάνουν έως τα 34 και 38%, αντίστοιχα. Για τα παραπροϊόντα όμως τα ποσοστά στον ίδιο χρόνο είναι 11% και 31%, δηλαδή υπάρχει ένας μεγαλύτερος ρυθμός αύξησης των παραπροϊόντων με τη χρήση περισσότερου TFAA.

γ) Είναι χαρακτηριστικό ότι στην περίπτωση του 2 equiv TFAA, τα παραπροϊόντα έπειτα από 72 h φτάνουν το 70% ενώ παράλληλα το προϊόν μειώνεται από 48% στις 4 h σε 24% στις 72 h. Αυτό σημαίνει ότι όσο αυξάνεται το TFAA παράγονται παραπροϊόντα λόγω αποικοδόμησης του **100**, με επικρατέστερο το **101γ**. Σημειώνεται ότι όταν επιχειρήθηκε η ίδια αντίδραση με 4 equiv TFAA, τα παραπροϊόντα άγγιξαν το 70% μέσα μόνο σε 3 h αντίδρασης.

δ) Σχετικά με την σύσταση των παραπροϊόντων, με 0.5 και 1.0 equiv TFAA ανιχνεύονται κυρίως τα **101γ** και **103β**. Όμως, όταν το TFAA αυξάνεται σε 2 ή 4 equiv, μια νέα ομάδα άγνωστων παραπροϊόντων εντοπίζεται στο φάσμα ³¹P-NMR των μιγμάτων αντίδρασης (πολλαπλές κορυφές μεταξύ 40-50 ppm). Οι περισσότερες εξ'αυτών εξαφανίζονται έπειτα από την προσθήκη D₂O, ενώ η κορυφή του **70α**, αυξάνεται. Έτσι, εικάζουμε ότι πρόκειται για μη δραστικά, ασταθή ενδιάμεσα προϊόντα του TFAA με το **70α** τα οποία επανέρχονται έπειτα από υδρόλυση.

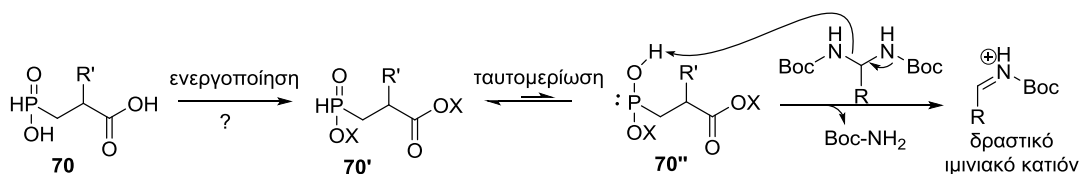
Συμπερασματικά, η χρήση του TFAA διέπεται από περιορισμούς που συνδέονται με την ποσότητα του ανυδρίτη και με τον χρόνο αντίδρασης, ενώ οι μετατροπές είναι χαμηλές καθιστώντας την μέθοδο μη πρακτική.

4.6 Διερεύνηση αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης δύο συστατικών με χρήση καρβοδιιμιδίων

4.6.1 Αρχική διερεύνηση με χρήση του καρβοδιιμιδίου DCC

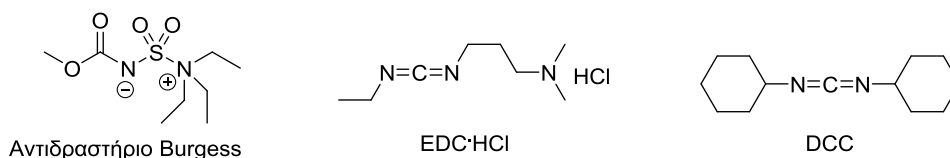
Όπως συζητήθηκε στην Παράγραφο 3.5, η αντίδραση αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών φωσφινικών διοξέων του τύπου **70** με *N*-Boc-αμινάλες με την χρήση ανυδριτών (Ac_2O ή TFAA) απαιτεί γενικά μεγάλους χρόνους αντίδρασης, οδηγεί σε χαμηλές έως μέτριες μετατροπές στο επιθυμητό προϊόν, ενώ δεν μπορεί να αποφευχθεί η παραγωγή μη διαχωρίσιμων παραπροϊόντων με βασικότερα τα ακυλιωμένα ανάλογα τύπου **101**. Χωρίς να έχουμε σαφείς μηχανιστικές ενδείξεις, φαίνεται ότι ο σχηματισμός παραπροϊόντων τύπου **101** συνδέεται α) με τη χρήση όξινου καταλύτη και β) με την παρουσία του ανυδρίτη που ακυλιώνει την αμινομάδα μετά τη διάσπαση της Boc ομάδας στον παρατεταμένο χρόνο αντίδρασης. Επίσης, αν και το TFAA οδηγεί σε καλύτερες μετατροπές από τον Ac_2O , η καταλληλότητά του περιορίζεται από αύξηση της οξύτητας λόγω παραγωγής TFA και από τη δραστηκότητά του που αυξάνει τις παράπλευρες αντιδράσεις όταν χρησιμοποιείται σε περίσσεια. Έτσι, η αντικατάσταση του ανυδρίτη φαίνεται να αποτελεί μονόδρομο για τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης.

Χωρίς να γνωρίζουμε με ποιον ακριβώς τρόπο οι ανυδρίτες ενεργοποιούν το φωσφινικό αντιδρών, υποθέσαμε ότι ένα δυνάμει «αντιδραστήριο ενεργοποίησης» θα πρέπει να έχει αφυδατικές ιδιότητες. Προκειμένου όμως να αποφευχθούν παράπλευρες αντιδράσεις, το αντιδραστήριο αυτό θα πρέπει να μην είναι οξύ ή να μην παράγει οξέα, να μην είναι ακυλιωτικός παράγοντας και να μην αντιδρά με το πυρηνόφιλο άτομο P. Επιπλέον, σκεφτήκαμε ότι ακόμα και η χρήση ενός όξινου καταλύτη πιθανώς να μπορούσε να αποφευχθεί εάν το ίδιο το φωσφινικό υποστρώμα θα μπορούσε να ενεργοποιήσει την αμινάλη με βάση το μηχανιστικό σενάριο του Σχήματος 51. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός του δραστικού *N*-Boc-ιμινιακού κατιόντος θα μπορούσε να προαχθεί από μεταφορά πρωτονίου από το P-OH της ταυτομερούς P(III) μορφής του φωσφινικού υποστρώματος **70''**. Ασφαλώς, η απουσία οξέος αναμένεται να αυξήσει τον χρόνο της αντίδρασης, καθώς το οξύ φαίνεται να εμπλέκεται και στην ενεργοποίηση του φωσφινικού υποστρώματος.



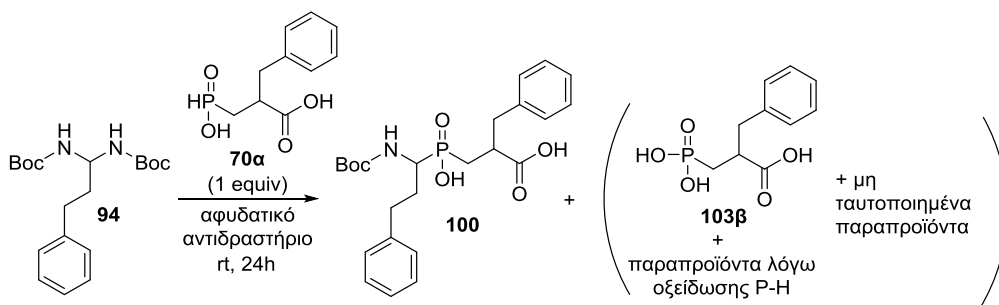
Σχήμα 51: Μηχανιστική υπόθεση ενεργοποίησης *N*-Boc-αμιναλών από το φωσφονικό υπόστρωμα 70

Με βάση τις παραπάνω υποθέσεις, διερευνήθηκαν αρχικά 3 κοινοί αφυδατικοί παράγοντες: το αντιδραστήριο Burgess και τα καρβοδιμίδια DCC και EDC·HCl. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των αφυδατικών είναι ότι δεν παράγουν όξινα παραπροϊόντα και δεν προκαλούν ακυλίωση (Εικόνα 34). Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στον Πίνακα 10.



Εικόνα 34: Δομές αφυδατικών αντιδραστηρίων.

Πίνακας 10: Διερεύνηση αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση του 70α και αφυδατικών μέσων.

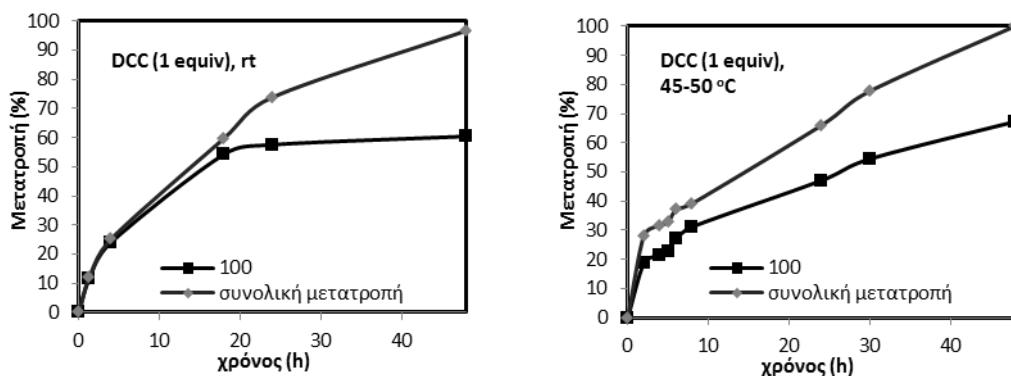


	Αφυδατικό μέσο (equiv)	Διαλύτης	Μετατροπή (%)	100 ^α (%)	103β + παραπροϊόντα οξειδωσης P-H ^{α,β} (%)	μη ταυτοποιημένα παραπροϊόντα ^α (%)
1	Burgess (1.1)	CH ₂ Cl ₂	δεν αντέδρασε			
2	EDC·HCl (1)	CH ₂ Cl ₂	15	-	3	12
3	DCC (1)	CH ₂ Cl ₂	50	41	9	-
4	DCC (3)	CH ₂ Cl ₂	100	-	100	-
5 ^γ	DCC (3.5)	CH ₂ Cl ₂	100	-	100	-
6	DCC (1)	THF	δεν αντέδρασε			
7	DCC (1)	τολουόλιο	47	11	25	11

^α ολοκληρώσεις κορυφών στο φάσμα ³¹P-NMR του μίγματος αντίδρασης έπειτα από διακοπή με H₂O και συμπύκνωση με τολουόλιο. ^β εμφανίζονται στο ³¹P-NMR στην περιοχή 25-35 ppm. ^γ χρόνος αντίδρασης 48 h.

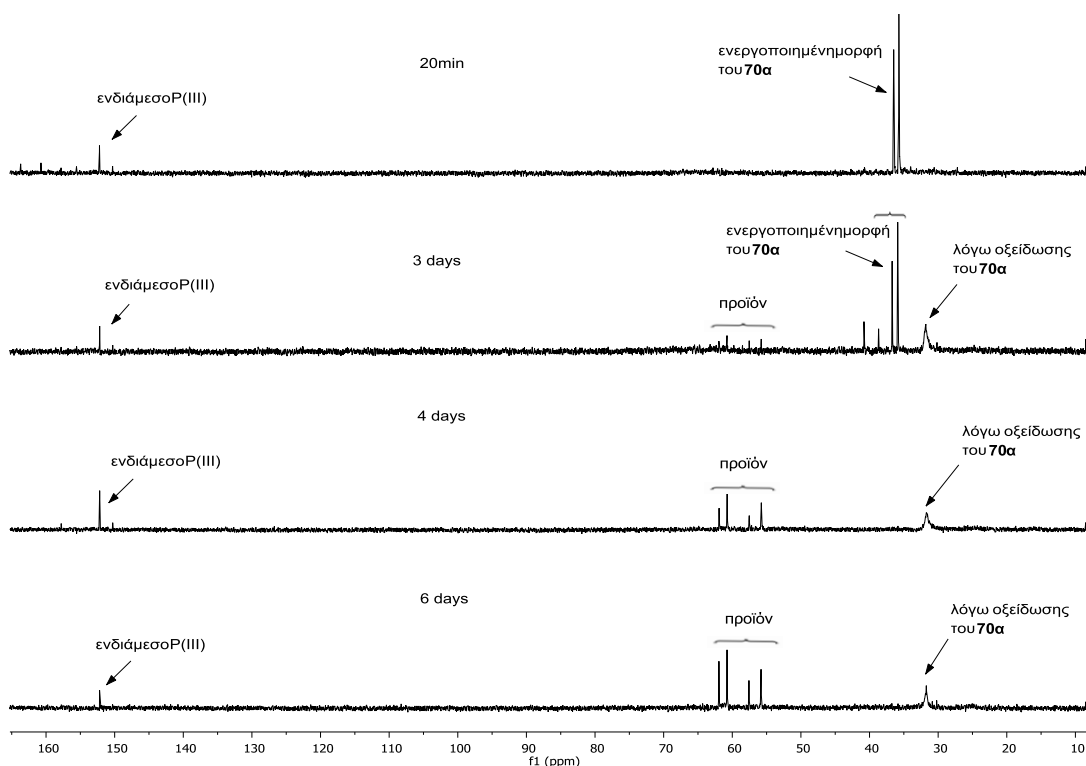
Χρήση του αντιδραστηρίου Burgess δεν οδήγησε σε καμία μετατροπή ενώ με το EDC·HCl δεν σχηματίστηκε το επιθυμητό προϊόν **100** (καταχωρήσεις 1,2, Πίνακας 10). Το DCC όμως επιβεβαίωσε τον αρχικό μας σχεδιασμό καθώς 1 equiv του αντιδραστηρίου οδήγησε στο επιθυμητό προϊόν σε ποσοστό 41% (καταχώρηση 3, Πίνακας 10). Επίσης, ιδιαίτερα ευχάριστη εξέλιξη ήταν η γενικά «καθαρή» εικόνα της αντίδρασης αφού παρατηρήθηκαν μόνο σε μικρό ποσοστό παραπροϊόντα λόγω οξειδωσης του **70α**. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει και το γεγονός ότι χρήση περίσσειας DCC ανέστειλε πλήρως τον σχηματισμό προϊόντος, όμως το αρχικό υπόστρωμα οξειδώθηκε πλήρως όπως είναι εμφανές από την εξαφάνιση του P-H από το φάσμα ¹H-NMR και την εμφάνιση σημάτων στην χαρακτηριστική περιοχή των 25-35 ppm στο φάσμα ³¹P-NMR (καταχωρήσεις 4,5, Πίνακας 10). Αυτό πιθανώς να σημαίνει ότι οι ενεργοποιημένες μορφές του φωσφινικού υποστρώματος με διαφορετικά equiv DCC είναι διαφορετικές. Το ενεργοποιημένο ενδιάμεσο στην περίπτωση του 1 equiv DCC φαίνεται να είναι ικανό να οδηγήσει σε προϊόν, ενώ αντίθετα στην περίπτωση της περίσσειας αντιδρά ταχύτερα με το O₂. Τέλος, το CH₂Cl₂ φαίνεται να είναι ο καταλληλότερος διαλύτης εφόσον σε THF δεν υπήρξε μετατροπή ενώ σε τολουόλιο το προϊόν σχηματίστηκε σε ποσοστό μόλις 11%, ενώ υπήρξαν και 37% παραπροϊόντα (καταχωρήσεις 6,7, Πίνακας 10).

Ακολούθησε η μελέτη της κινητικής της αντίδρασης με τη βοήθεια φασματοσκοπίας ³¹P-NMR. Στην Εικόνα 35 αναπαρίσταται η εξέλιξη του σχηματισμού του προϊόντος **100** καθώς και η συνολική μετατροπή του αρχικού φωσφινικού υποστρώματος **70α** με χρήση 1 equiv DCC είτε σε θερμοκρασία δωματίου, είτε σε 45-50°C.



Εικόνα 35: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του 94 και 70α με 1 equiv DCC σε rt και 45-50°C.

Από τα γραφήματα είναι εμφανές ότι η αύξηση της θερμοκρασίας δεν βελτίωσε σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης, αντιθέτως, σε 24h η μετατροπή σε **100** σε θερμοκρασία δωματίου υπερέχει (58%) έναντι της αντίστοιχης σε 45-50°C (47%). Είναι επίσης χαρακτηριστικό ότι σε θερμοκρασία δωματίου ότι ο σχηματισμός παραπροϊόντων (κυρίως οξειδωμένων παραγώγων του **70α**) είναι αρκετά περιορισμένος έως τις ~20h, ενώ αργότερα η αντίδραση φτάνει σε ένα πλατώ όπου δεν σχηματίζεται **100** όμως καταναλώνεται η ενεργοποιημένη μορφή του **70α** προς οξειδωμένα παραπροϊόντα. Αντίθετα, η αύξηση της θερμοκρασίας φαίνεται να ευνοεί από τα αρχικά στάδια της αντίδρασης τον σχηματισμό παραπροϊόντων έως την πλήρη μετατροπή του αρχικού **70α** όπου τα ποσοστά του **100** είναι μόνο ελαφρώς βελτιωμένα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρακολούθηση μέσω ^{31}P -NMR της αντίδρασης αμιδοακυλίωσης με 2 equiv DCC, όπου εντοπίστηκαν επιπλέον κορυφές σε σχέση με το 1 equiv DCC. Η χρονική εξέλιξη των φασμάτων ^{31}P -NMR φαίνεται στην Εικόνα 36.



Εικόνα 36: Φάσματα ^{31}P -NMR της αντίδρασης αμιδοακυλίωσης μεταξύ του 94 και 70α με 2 equiv DCC. Μίγμα αντίδρασης σε α) 20min β) 3d γ) 4d δ) 6d.

Συγκεκριμένα, η προσθήκη 2 equiv DCC οδήγησε, εκτός από τις δύο κορυφές σε ~35 ppm που παρατηρούνται και με το 1 equiv DCC και αντιστοιχούν σε κάποια ενεργοποιημένη P(V) μορφή του αρχικού υποστρώματος **70α** (όπως θα συζητηθεί παρακάτω), και σε μια επιπλέον κορυφή σε ~152 ppm, δηλαδή σε χαρακτηριστική περιοχή που εμφανίζονται P(III) ενώσεις. Οι ενώσεις P(III) είναι περισσότερο πυρηνόφιλες από τις P(V), εν τούτοις έπειτα από 4d αντέδρασε πλήρως η P(V) μορφή. Συνεπώς, στις συνθήκες της αντίδρασης φαίνεται η P(V) μορφή να είναι δραστηρότερη, πιθανώς λόγω του P-H της P(V) μορφής που μπορεί να ενεργοποιεί την *N*-Boc-αμινάλη. Επίσης, δεν αποκλείεται η αλληλομετατροπή των P(V)/P(III) ενδιάμεσων, καθώς από 4d σε 6d το P(III) ενδιάμεσο μειώνεται προς όφελος του προϊόντος, πιθανώς μέσω του P(V).

4.6.2 Βελτιστοποίηση αντίδρασης: Επιτάχυνση με χρήση οξέων Lewis.

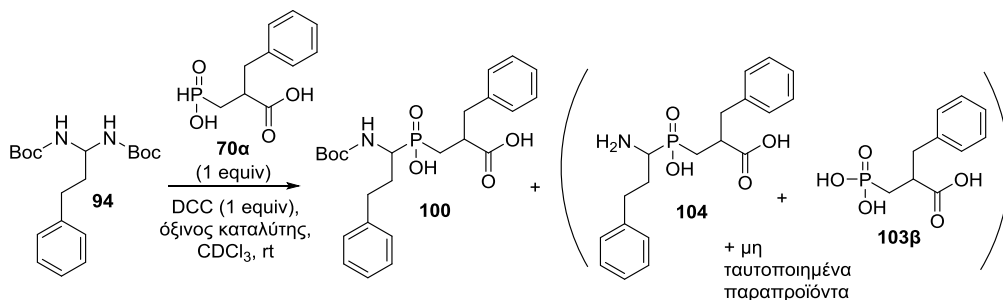
Αν και η χρήση DCC βελτίωσε αισθητά την εικόνα της αντίδρασης αμιδοακυλίωσης σε σχέση με τη χρήση Ac_2O ή TFAA, φαίνεται ότι απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι αντίδρασης (>2d) για να επιτευχθούν οι βέλτιστες αποδόσεις, οι

οποίες δεν ξεπερνούν το 60% (δηλαδή λίγο καλύτερες από την περίπτωση του TFAA). Θα πρέπει όμως να συνυπολογιστεί ότι με τη χρήση του TFAA παράγεται *in situ* TFA το οποίο δρα και ως καταλύτης της αντίδρασης, ενώ στην περίπτωση του DCC δεν υπάρχει αντίστοιχη δυνατότητα επιτάχυνσης. Στην περίπτωση του TFAA, η φύση και η ποσότητα του οξέος είναι προφανώς συνυφασμένη με τον ίδιο τον TFAA, γεγονός που δεν δίνει ευελιξία στην ρύθμιση της οξύτητας του μίγματος και εν τέλει προκαλεί την ανεπιθύμητη διάσπαση της Boc ομάδας. Όμως, με τη χρήση του DCC το βήμα της ενεργοποίησης είναι ανεξάρτητο και μπορεί να συνδυαστεί με ποικιλία οξέων, χωρίς περιορισμούς στην ποσότητα και τις ιδιότητες. Έτσι, προκειμένου να απαλειφθεί η διάσπαση της Boc ομάδας στο τελικό προϊόν, αναζητήθηκαν όξινοι καταλύτες που θα μπορούσαν να μειώσουν αποτελεσματικά τους χρόνους αντίδρασης.

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης του **70a** με την *N*-Boc-αμινάλη **94** και χρήση 1 equiv DCC συνοψίζονται στον Πίνακα 11.

Η πρώτη αντίδραση περιελάμβανε την χρήση καταλυτικής ποσότητας ενός πρωτικού οξέος (*p*-TsOH) όπου έπειτα από 24h η απόδοση δεν ξεπέρασε το 21% (καταχώρηση 1, Πίνακας 11), ποσοστό που είναι πολύ μικρότερο από αυτό της μη καταλυόμενης αντίδρασης. Η παράπλευρη αντίδραση του DCC με το *p*-TsOH μπορεί να αποτελεί μια πιθανή ερμηνεία αυτής της μειωμένης δραστηριότητας. Βασισμένοι στις ερευνητικές εργασίες του Maguoka σχετικά με Cu(OTf)₂-καταλυόμενες αντιδράσεις τύπου Mannich *N*-Boc-αμιναλών με ενεργά μεθυλένια για τον σχηματισμό δεσμού C-C [180, 181, 182], εγκαταλείψαμε τα πρωτικά οξέα και εξετάσαμε την καταλληλότητα χρήσης οξέων Lewis στον σχηματισμό δεσμού C-P. Δυστυχώς, η χρήση 0.1 equiv Cu(OTf)₂ έδωσε 12% από το προϊόν **100**, ενώ η χρήση 1 equiv AlMe₃ οδήγησε σε πολύπλοκο μίγμα (καταχωρήσεις 2,3, Πίνακας 11). Καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν με χρήση 0.5 ή 1.5 equiv LiCl, όπου και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε καθαρό προφίλ αντίδρασης, όμως η μετατροπή σε προϊόν **100** ήταν ~50% ανεξάρτητα με την ποσότητα του LiCl (καταχωρήσεις 4,5, Πίνακας 11), γεγονός που πιθανώς να οφείλεται σε περιορισμούς διαλυτότητας.

Πίνακας 11: Διερεύνηση της επίδρασης όξινου καταλύτη στην αντίδραση αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών με τη χρήση του 70α και DCC.^α

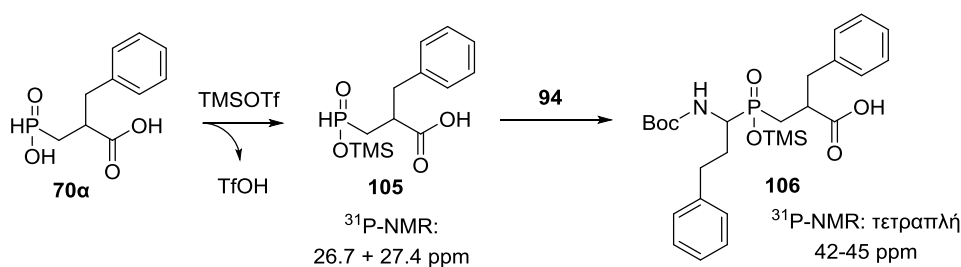


	Όξινος καταλύτης (equiv)	Χρόνος	Μετατροπή (%)	100 (%)	104 : 103β : μη ταυτοποιημένα παραπροϊόντα (%)
1	<i>p</i> -TsOH (0.1)	24 h	22	21	- : 1 : -
2	Cu(OTf) ₂ (0.1)	24 h	25	12	13 : - : -
3	AlMe ₃ (1.0)	24 h	πολύπλοκο μίγμα αντίδρασης		
4^{β,γ}	LiCl (0.5)	24 h	60	55	- : 5 : -
5^{β,γ}	LiCl (1.5)	24 h	52	49	- : - : 3
6	TMSOTf (0.2)	3 h	52	32	- : - : 20 ^δ
7	TMSOTf (0.2)	22 h	80	45	- : 15 : 20 ^δ
8	TMSOTf (0.5)	5 min	100	60	- : - : 40 ^δ
9	TMSOTf (0.5)	1 h	100	67 ^ε	- : - : 33 ^δ
10^γ	TMSOTf (1.0)	1 h	92	58	29 : - : 5
11	BF ₃ ·OEt ₂ (0.5)	6 h	69	53	- : - : 16
12	BF ₃ ·OEt ₂ (0.5)	48 h	98	79	- : - : 19
13	BF ₃ ·OEt ₂ (0.8)	40 min	39	29	- : - : 10
14	BF ₃ ·OEt ₂ (0.8)	4 h	76	65	- : - : 11
15	BF ₃ ·OEt ₂ (0.8)	24 h	94	82	- : - : 12
16	BF ₃ ·OEt ₂ (1.0)	4 h	90	70	- : - : 20

^α Σε μίγμα των **94+70α** προστέθηκαν κατά σειρά DCC και ο καταλύτης υπό ατμόσφαιρα Ar. Οι αντιδράσεις παρακολούθηθηκαν με ³¹P-NMR και οι μετατροπές υπολογίστηκαν με ολοκλήρωση των φασμάτων των μιγμάτων αντίδρασης. ^β διαλύτης CH₂Cl₂. ^γ Οι μετατροπές υπολογίστηκαν έπειτα από διακοπή με H₂O ή D₂O και συμπύκνωση με τολουόλιο. ^δ αποδίδεται στο προϊόν **105**. ^ε συνυπολογίζεται και ο σιλυλεστέρας **106**.

Τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα ελήφθησαν με την χρήση 0.2 equiv TMSOTf. Παρακολούθηση της αντίδρασης με φασματοσκοπία ³¹P-NMR έδειξε 32% μετατροπή σε προϊόν **100** σε μόλις 3h χωρίς την παραγωγή γνωστών παραπροϊόντων εκτός ενός νέου που αντιστοιχούσε σε μια διπλή κορυφή στα ~27ppm σε ποσοστό ~20% (καταχώρηση 6, Πίνακας 11). Το ποσοστό αυτό παρέμεινε σταθερό έπειτα από 22 h, όπου παράλληλα η μετατροπή σε προϊόν **100** έφτασε στο 45% (καταχώρηση 7, Πίνακας 11). Πιθανολογούμε ότι το άγνωστο

προϊόν οφείλεται στο σιλυλεστέρα **105** που αποτελεί παράγωγο του **70α**, αλλά όχι αρκετά ενεργοποιημένο (Σχήμα 52). Το γεγονός ότι σχηματίστηκε σε ποσοστό 20%, όσο ακριβώς ήταν και το TMSOTf, ενισχύει αυτήν την υπόθεση. Αυτό σημαίνει ότι από το σημείο που όλο το TMSOTf έχει δράσει ως σιλυλιωτικό, το πραγματικό οξύ της αντίδρασης είναι το πρωτικό οξύ TfOH. Αυτό ίσως δικαιολογεί την πολύ μικρή αύξηση του **100** από τις 3h στις 22h.



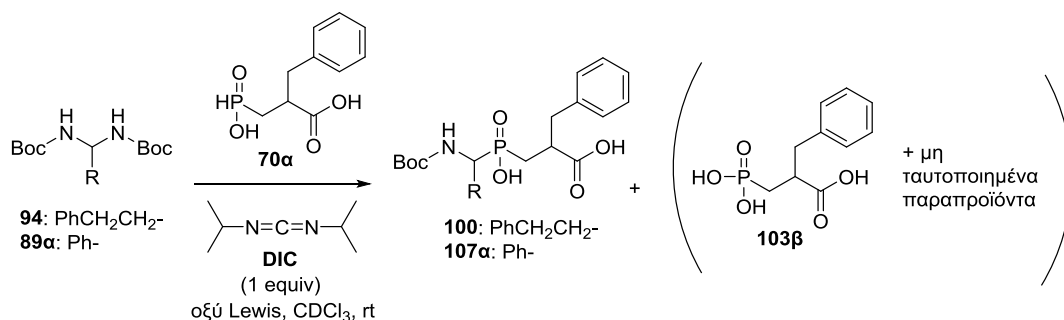
Σχήμα 52: Σχηματισμός των σιλυλεστέρων 105 και 106

Ιδιαίτερα εντυπωσιακή ήταν η εξέλιξη της αντίδρασης όταν η ποσότητα του TMSOTf ανήλθε στα 0.5 equiv, όπου σε μόλις 5 min σχηματίστηκε 60% προϊόν **100**, ενώ ανιχνεύθηκε και η ένωση **105** σε ποσοστό 40% (καταχώρηση 8, Πίνακας 11). Σε 1h, η ολοκλήρωση των κορυφών του προϊόντος **100** έπεσε στο 37% ενώ σχηματίστηκε μια νέα ομάδα κορυφών σε 42-45 ppm σε ποσοστό 30% (καταχώρηση 9, Πίνακας 11). Όμως, διακοπή της αντίδρασης με D₂O και ανάδευση για 24h έδειξε τον σχηματισμό του προϊόντος **100** σε ποσοστό 69%, που σημαίνει ότι η νέα ομάδα κορυφών σε 42-45 ppm αντιστοιχεί σε μια μορφή που μεταπίπτει στο **100** κατά τη διακοπή με D₂O. Θεωρούμε ότι πρόκειται για τους σιλυλεστέρες **106** που είτε σχηματίζονται από το χαμηλής δραστηριότητας παράγωγο **105** με τη δράση του TfOH, είτε από το προϊόν που σιλυλιώνεται στο μίγμα της αντίδρασης. Περαιτέρω αύξηση του TMSOTf (1.0 equiv) αυξάνει την απόδοση αμιδοακυλίωσης σε 87%, όμως σε σημαντικό ποσοστό (29%) η Boc ομάδα διασπάται (καταχώρηση 10, Πίνακας 11).

Λόγω της δράσης του TMSOTf και ως οξύ Lewis και ως σιλυλιωτικό, επιχειρήθηκε η αντικατάστασή του από BF₃·OEt₂. Η χρήση 0.5 equiv οδήγησε σε 53% **100** σε 6h ενώ υπήρχε ενεργοποιημένο **70α** που τελικά έδωσε 79% **100** σε 48 h (καταχωρήσεις 11,12, Πίνακας 11). Με χρήση 0.8 equiv επιτεύχθηκε 82% μετατροπή σε **100** σε 24h (καταχωρήσεις 13-14, Πίνακας 11) ενώ η χρήση 1.0 equiv, αν και επιτάχυνε την αντίδραση έτι περαιτέρω, συνοδεύτηκε με αύξηση των παραπροϊόντων (καταχώρηση 16, Πίνακας 11). Γενικά, αν και οι αντιδράσεις με το

$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ είναι βραδύτερες σε σχέση με το TMSOTf, το τελικό μίγμα είναι 'καθαρότερο' καθιστώντας την μέθοδο πιο πρακτική.

Πίνακας 12: Διερεύνηση της επίδρασης οξίνου καταλύτη στην αμιδοακυλίωση 2 συστατικών με τη χρήση του 70α, DIC και των *N*-Boc-αμιναλών 94 και 70α.^a



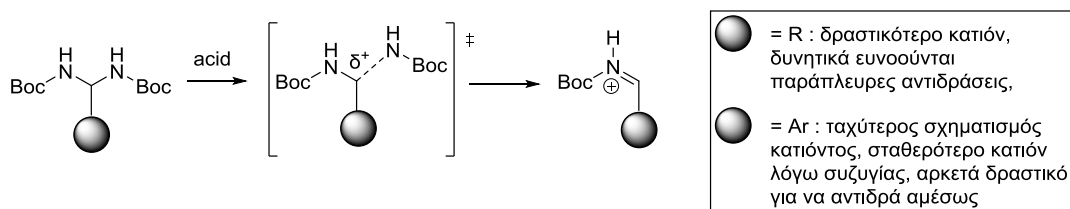
	Αμινάλη	Όξινος καταλύτης (equiv)	Χρόνος	Μετατροπή (%)	100/107α (%)	103β : μη ταυτοποιημένα παραπροϊόντα (%)
1	94	TMSOTf (0.1)	24 h	69	55	- : - : 14 ^β
2	94	TMSOTf (0.1)	48 h	78	64	- : - : 14 ^β
3	94	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.8)	40 min	52	45	- : - : 7
4	94	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.8)	4 h	82	71	- : - : 11
5	94	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.8)	48 h	96	88	- : - : 8
6	89α	-	3.5 h	10	10	- : - : -
7	89α	-	3 d	100	87	- : 4 : 9
8	89α	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.1)	4 h	90	84	- : 3 : 3
9	89α	$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.2)	1.3 h	98	93	- : 1 : 4

^a Σε μίγμα της κατάλληλης *N*-Boc-αμινάλης και του 70α προστέθηκαν κατά σειρά DIC και ο καταλύτης υπό ατμόσφαιρα Ar. Οι αντιδράσεις παρακολούθηθηκαν με ³¹P-NMR και οι μετατροπές υπολογίστηκαν με ολοκλήρωση των φασμάτων των μιγμάτων αντίδρασης. ^β αποδίδεται στο προϊόν 105.

Έχοντας πετύχει μια αισθητή βελτίωση με τη χρήση οξέων Lewis και DCC, θελήσαμε να εξετάσουμε εάν η καταβύθιση της στερεής ουρίας DCU στο μίγμα της αντίδρασης εμπόδιζε μερικώς την αποτελεσματική δράση του οξέος Lewis. Η DCU περιέχει ετεροάτομα που δυνάμει θα μπορούσαν να δράσουν ως βάσεις Lewis και να προκαλέσουν την συγκαταβύθιση του εκάστοτε οξέος Lewis. Έτσι, επιχειρήθηκε η αντικατάσταση του DCC από το καρβοδιιμίδιο DIC του οποίου η ουρία (DIU) είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε

TMSOTf σε πολύ χαμηλή στοιχειομετρία (0.1 equiv) για να μειωθεί το ποσοστό της ανεπιθύμητης παράπλευρης σιλυλίωσης (Σχήμα 23). Όμως, αν και το φάσμα ^{31}P -NMR του μίγματος αντίδρασης ήταν καθαρότερο απ' ό,τι με το DCC, η μετατροπή δεν ξεπέρασε το 64% έπειτα από 48h (καταχωρήσεις 1,2, Πίνακας 12). Η υπεροχή του DIC σε σχέση με το DCC έγινε φανερή όταν χρησιμοποιήθηκαν 0.8 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, όπου η μετατροπή σε **100** σε 40 min ήταν 45% (29% με DCC) και σε 4 h ήταν 71% (65% με DCC) (καταχωρήσεις 3,4, Πίνακας 12). Χρειάστηκαν 48h ώστε η μετατροπή σε **100** να φτάσει το 88% που πρόκειται για την υψηλότερη μετατροπή που έχει επιτευχθεί έως αυτήν τη στιγμή (καταχώρηση 5, Πίνακας 12).

Έχοντας βελτιστοποιήσει όλες τις παραμέτρους του συστήματος (φωσφινικό υπόστρωμα, αφυδατικό μέσο, καταλύτης, στοιχειομετρίες, θερμοκρασία, διαλύτης) στραφήκαμε στην τελευταία παράμετρο που κρατήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων μας: την *N*-Boc-αμινάλη. Αν και ο στόχος μας είναι μια γενική μέθοδος, εν τούτοις διαφορετικές *N*-Boc-αμινάλες αναμένεται να εμφανίζουν διαφορετική δραστικότητα. Για παράδειγμα, ο Maguoka και οι συνεργάτες του παρατήρησαν διαφορετική δραστικότητα σε *N*-Boc-αμινάλες που προέρχονται από αρωματικές αλδεΐδες σε σχέση με τις αντίστοιχες αλειφατικών αλδεϋδών, με τις πρώτες να δίνουν υψηλότερες αποδόσεις [180]. Οι ίδιοι συγγραφείς σε μηχανιστικά πειράματα που πραγματοποίησαν διαπίστωσαν ότι το ενδιάμεσο ιμινιακό κατιόν (Σχήμα 53) δεν ανιχνεύεται, κάτι που συμφωνεί και με τις δικές μας παρατηρήσεις. Τα γεγονότα αυτά σημαίνει ότι τα ιμινιακά κατιόντα, είτε λιγότερο είτε περισσότερο σταθερά, είναι εξαιρετικά δραστικά και δεν αναμένεται να επηρεάζουν την ταχύτητα της αντίδρασης. Εν τούτοις, ο σχηματισμός αυτών με τη δράση οξέων μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης που έχει ιοντικό χαρακτήρα αναμένεται να επηρεάζεται τα μέγιστα από τη σταθεροποίηση του κατιόντος και να επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης. Έτσι, στην περίπτωση των *N*-Boc-αμιναλών αρωματικών αλδεϋδών, το ιμινιακό κατιόν αναμένεται να σχηματίζεται ταχύτερα σε σχέση με το αντίστοιχο των αλειφατικών αλδεϋδών. Η υψηλότερη δραστικότητα του τελευταίου μπορεί να είναι και ο λόγος που οι αποδόσεις της αντίδρασης δεν μπορούν να βελτιστοποιηθούν περαιτέρω καθώς μπορεί να ευνοούνται παράπλευρες αντιδράσεις που να εξαντλούν την αμινάλη.



Σχήμα 53: Διαφορές μεταξύ N-Boc-αμιναλών αρωματικών και αλειφατικών αλδεϋδών

Έτσι, χρησιμοποιήθηκε η *N*-Boc-αμινάλη της βενζαλδεϋδης **89a** και αρχικά εξετάστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης απουσία καταλύτη (καταχωρήσεις 6,7, Πίνακας 12). Προς έκπληξή μας, η αντίδραση ήταν βραδύτερη (10%, 3.5h) έναντι της αντίδρασης με το **94** και DCC (Εικόνα 6, 24%, 4h). Τελικά, απαιτήθηκαν 3d για να ολοκληρωθεί η αντίδραση δίνοντας 87% μετατροπή σε **107a**. Όμως, όταν χρησιμοποιήθηκε $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ως καταλύτης, διαπιστώθηκε το ακριβώς αντίθετο. Με μόλις 0.1 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ η μετατροπή σε **107a** έφτασε το 84% σε 4h, όταν στον ίδιο χρόνο η αμινάλη **94** χρειάστηκε 0.8 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ για να φτάσει το 71% (καταχωρήσεις 4,8, Πίνακας 12). Με 0.2 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ το ποσοστό μετατροπής σε **107a** αυξήθηκε σε 93% σε μόλις 1.3 h, οδηγώντας στις βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης. Τα παραπάνω αποτελέσματα πιθανώς να αποτελούν ένδειξη διαφορετικού μηχανισμού για την καταλυόμενη και τη μη καταλυόμενη αντίδραση: στην καταλυόμενη η αντίδραση φαίνεται να εξαρτάται κυρίως από την ταχύτητα διάσπασης της *N*-Boc-αμινάλης, ενώ στη μη καταλυόμενη από τη δραστικότητα του ιμινιακού ιόντος.

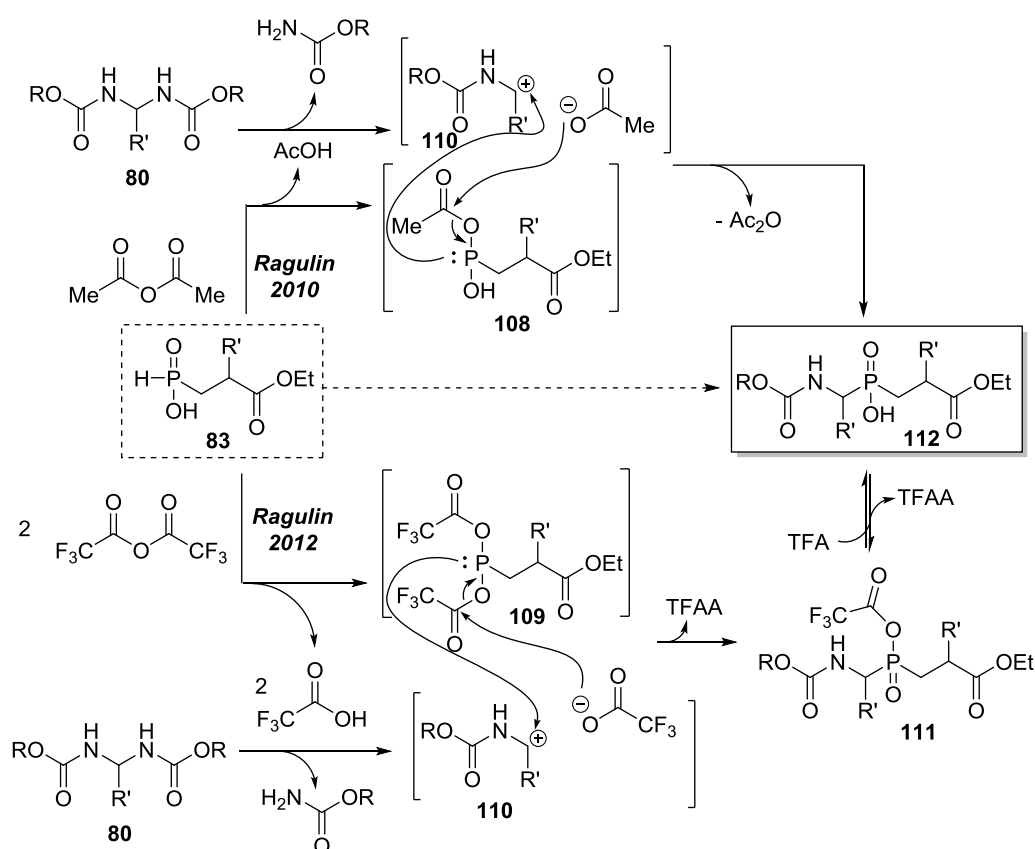
4.7 Μηχανιστικές θεωρήσεις

Από την παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης είτε με TFAA είτε με DCC μέσω φασματοσκοπίας ^{31}P -NMR προέκυψαν αρκετά στοιχεία τα οποία δεν μπορούν να εξηγηθούν με τις μηχανιστικές πληροφορίες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Τα στοιχεία αυτά καθώς και τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να προταθεί ένα νέο μηχανιστικό μονοπάτι αναλύονται παρακάτω.

4.7.1 Βιβλιογραφικές αναφορές και σχολιασμός

Αν και η αναζήτηση των μηχανιστικών λεπτομερειών της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης έχει ξεκινήσει από το 1981 με τις μελέτες του Oleksyszyn [160]

(Παράγραφος 3.3), οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν κυρίως στον εντοπισμό των αμιναλών ως ενδιάμεσων της αντίδρασης και όχι τόσο στον τρόπο ενεργοποίησης του φωσφινικού υποστρώματος και σχηματισμού του δεσμού C-P. Μόλις το 2010, ο Ragulin επιχείρησε για πρώτη φορά τη διατύπωση ενός συνολικού μηχανισμού στην προσπάθειά του να ερμηνεύσει τη δράση του Ac_2O με χρήση όξινου καταλύτη [165, 166], ενώ 2 χρόνια αργότερα επέκτεινε τις υποθέσεις του και στην περίπτωση της αμιδοαλκυλίωσης 2 συστατικών με χρήση TFAA [171]. Οι δύο αυτές μηχανιστικές υποθέσεις παρουσιάζονται συγκριτικά στο Σχήμα 54.

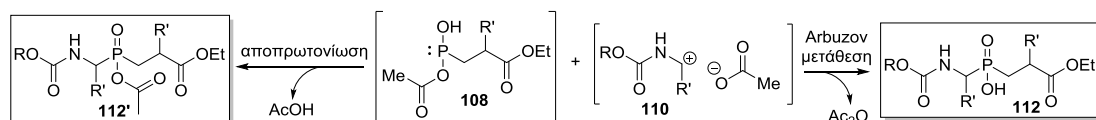


Σχήμα 54: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την αμιδοαλκυλίωση δύο συστατικών φωσφινικών οξέων με χρήση αμιναλών σε Ac_2O (Ragulin 2010) ή TFAA (Ragulin 2012) [165, 166, 171].

Κοινό χαρακτηριστικό των μηχανιστικών σεναρίων που προτείνει ο Ragulin είναι ο σχηματισμός P(III) δραστικών ενδιάμεσων (π.χ. **108** ή **109**) τα οποία αποτελούν τα *P*-πυρηνόφιλα της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ανωτέρω *P*-πυρηνόφιλα παγιδεύουν το ασταθές ιμινιακό κατιόν **110** που παράγεται από την όξινη διάσπαση της αμινάλης **80**. Το κατιόν αυτό αντισταθμίζεται από ένα καρβοξυλικό ανιόν (AcO^- ή CF_3COO^-) που στο ακόλουθο βήμα-κλειδί πυροδοτεί μια μετάθεση Arbuzov προσβάλλοντας την ακυλο ομάδα

των **108/109** ώστε να αναγεννηθεί ο ανυδρίτης, να σχηματιστεί ο P-C δεσμός και να επανέλθει το άτομο φωσφόρου στην μορφή P(V). Είναι χαρακτηριστικό ότι ο Ragulin προτείνει το μονοακυλο P(III) ενδιάμεσο **108** για την αντίδραση σε Ac₂O και το δις(ακυλο) ενδιάμεσο **109** για την αντίδραση σε TFAA. Στη δεύτερη περίπτωση οι συγγραφείς ισχυρίζονται ότι από τη μετάθεση Arbuzon παράγεται η ένωση **111** η οποία βρίσκεται σε ισορροπία με το φωσφινικό οξύ **112** και αυτό αποτελεί απόδειξη ότι το ενδιάμεσο που οδηγεί στη **111** θα πρέπει να είναι δις-ακυλιωμένο. Για την ύπαρξη του **111**, οι συγγραφείς βασίστηκαν στο φάσμα ³¹P-NMR του μίγματος αντίδρασης που εμφάνιζε πολύπλοκο προφίλ και αποδόθηκε στις σχάσεις από τα γειτονικά ¹⁹F.

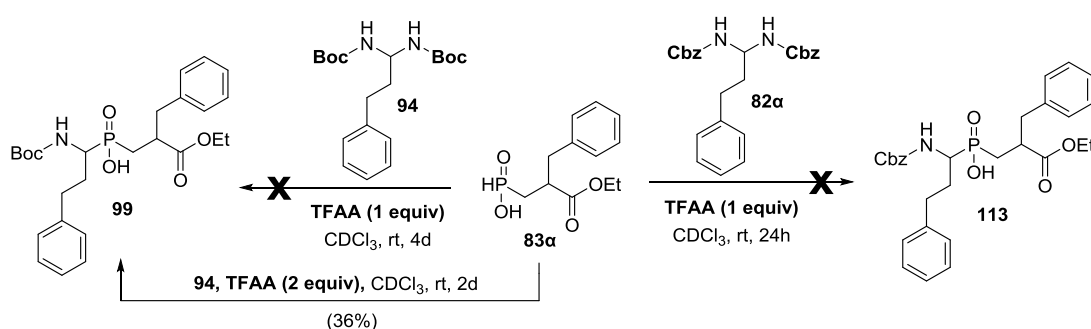
Η μηχανιστική υπόθεση του Ragulin δημιουργεί ορισμένα ερωτηματικά. Για τους φωσφινίτες τύπου **108** θα αναμένονταν η ταχεία ταυτομερείωση με την P(V) μορφή, συνεπώς η πραγματική συγκέντρωση της P(III) μορφής **108** θα πρέπει να είναι πολύ μικρή. Εν τούτοις, λόγω της υψηλής δραστηριότητας της μορφής **108**, δεν θα προκαλούσε εντύπωση η ταχεία κατανάλωσή της. Όμως, θα αναμένονταν η αποκατάσταση της P(V) μορφής να γίνεται μέσω αποπρωτονίωσης της ομάδας P-OH και όχι μέσω Arbuzon μετάθεσης η οποία είναι περισσότερο απαιτητική καθώς αναγεννά τον αρχικό δραστικό ανυδρίτη. Σε μια τέτοια περίπτωση, το προϊόν της αντίδρασης δεν θα ήταν το **112** αλλά το **112'** που θα οδηγούσε στο **112** έπειτα από υδρόλυση (Σχήμα 55). Από την άλλη, ενδιάμεσα όπως το **108** θα αναμένονταν να σταθεροποιούνται και να μπορούν να παρατηρηθούν φασματοσκοπικά, καθώς δεν υπάρχει δυνατότητα ταυτομερείωσης. Όμως, τέτοια ενδιάμεσα θα έπρεπε να εμφανίζονται σε χαρακτηριστικές περιοχές στο ³¹P-NMR (>100 ppm) αλλά δεν παρατηρήθηκαν ούτε από τον Ragulin ούτε και από εμάς, όπως θα συζητηθεί αργότερα.



Σχήμα 55: Πιθανά μονοπάτια αντίδρασης των **108** και **110**.

4.7.1.1 Τα φωσφινικά οξέα (καρβοξυλικοί εστέρες) τύπου 83 αντιδρούν μέσω συμμετρικών φωσφινικών ανυδριτών

Οι αρχικές προσπάθειές μας, οι οποίες μας οδήγησαν στις πρώτες μηχανιστικές ενδείξεις, αφορούσαν την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών κατά Ragulin (1 equiv TFAA) με την *N*-Boc-αμινάλη **94**. Προς έκπληξή μας, η αντίδραση μεταξύ των **83α** και **94** δεν οδήγησε σε προϊόν **99** ακόμα και έπειτα από 4d αντίδραση. Καθώς ο Ragulin χρησιμοποιεί *N*-Cbz-αμινάλες, θελήσαμε να εξετάσουμε εάν η αποτυχία της αντίδρασης μπορεί να αποδοθεί στις *N*-Boc-αμινάλες, όμως και με την *N*-Cbz-αμινάλη **82α** η αντίδραση δεν προχώρησε καθόλου έπειτα από 4d (Σχήμα 56).

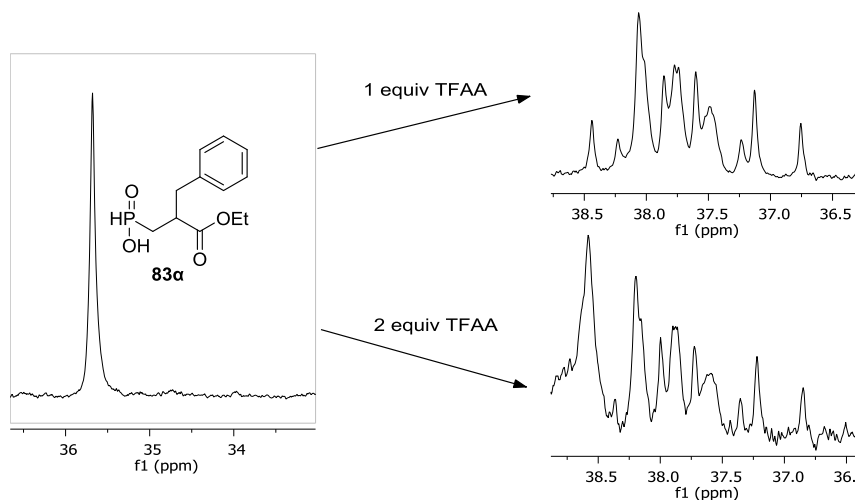


Σχήμα 56: Αποτυχία αντίδρασης του **83α** με τις αμινάλες **94** και **82α** και 1 equiv TFAA.

Η έλλειψη δραστηριότητας του **83α** έναντι της *N*-Boc-αμινάλης **94** μας προκάλεσε ιδιαίτερη εντύπωση καθώς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 33 κάτω από τις ίδιες συνθήκες το δομικά παρόμοιο φωσφινικό οξύ **70α** μετατράπηκε σε προϊόν **100** σε ποσοστό 32% εντός 24 h. Όπως επίσης φαίνεται στην Εικόνα 33, η ίδια μετατροπή του **70α** επιτυγχάνεται σε μόλις 40 min όταν χρησιμοποιήθηκαν 2 equiv TFAA, επομένως θελήσαμε να ελέγξουμε εάν το **83α** μπορεί να αντιδράσει στις ίδιες εντονότερες συνθήκες. Πράγματι, παρατηρήθηκε μετατροπή σε **99**, όμως απαιτήθηκαν 2d για να φτάσει το 36% (Σχήμα 56).

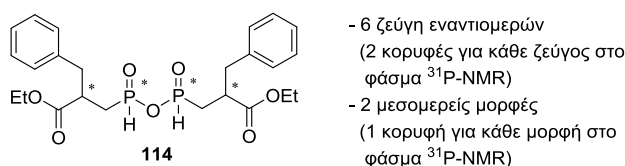
Για να ερμηνεύσουμε τις ανωτέρω διαφορές δραστηριότητας, επιχειρήσαμε να αντλήσουμε πληροφορίες για τα ενδιάμεσα της αντίδρασης και τη συμπεριφορά τους από τα φάσματα ³¹P-NMR των μιγμάτων αντίδρασης. Η πρώτη ενδιαφέρουσα πληροφορία είναι ότι η προσθήκη είτε 1 είτε 2 equiv TFAA στην ένωση **83α** οδηγεί στο ίδιο ενδιάμεσο. Αυτό γίνεται εμφανές όχι τόσο από τις χημικές μετατοπίσεις, οι οποίες διαφοροποιούνται ελάχιστα, αλλά από το προφίλ των χημικών μετατοπίσεων που η πολυπλοκότητά τους το καθιστά «δακτυλικό αποτύπωμα» για την αναγνώριση του ενδιαμέσου. Αυτό το «ενεργοποιημένο»

ενδιάμεσο σταδιακά απενεργοποιείται μεταπίπτοντας σε μια απλή κορυφή (είναι εμφανής στα 38,4 ppm στην περίπτωση των 2 equiv της Εικόνας 37, όπου η απενεργοποίηση γίνεται ταχύτερα και ολοκληρώνεται σε 48h). Αυτή η απενεργοποίηση είναι εν μέρει υπεύθυνη για τις χαμηλές μετατροπές με χρήση 2 equiv TFAA.



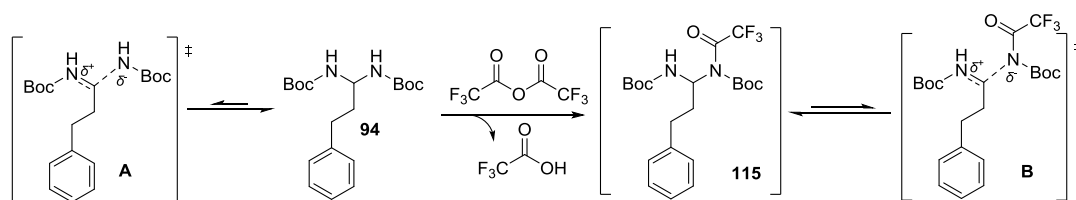
Εικόνα 37: Φάσματα ^{31}P -NMR της αντίδρασης του 83α με 1 και 2 equiv TFAA.

Το προφίλ του ενδιάμεσου στο φάσμα ^{31}P -NMR δεν μπορεί να συσχετιστεί με το προτεινόμενο ενδιάμεσο του Ragulin (**109**, Σχήμα 54) το οποίο θα αναμένονταν να εμφανίζεται σε χημικές μετατοπίσεις >100 ppm, δεν θα είχε σήμα P-H στο φάσμα ^1H -NMR και πιθανώς να εμφάνιζε σχάσεις ^{31}P - ^{19}F στο φάσμα ^{19}F -NMR, οι οποίες όμως δεν παρατηρήθηκαν. Αντίθετα, το προφίλ του ^{31}P -NMR της Εικόνας 37 σε συνδυασμό και με άλλα φασματοκοπικά δεδομένα (πολύπλοκο προφίλ των πρωτονίων P-H στο φάσμα ^1H -NMR, απουσία σχάσεων στο φάσμα ^{19}F -NMR), θα μπορούσε να ερμηνευτεί από ένα ενδιάμεσο του τύπου **114** (Εικόνα 38). Συγκεκριμένα, στη πολλαπλή της Εικόνας 37 μπορούν να εντοπιστούν 13 από τις 14 θεωρητικά αναμενόμενες κορυφές της ένωσης **114** η οποία περιλαμβάνει 4 στερεογονικά κέντρα, 6 ζεύγη εναντιομερών, 2 μεσομορφές και 2 άτομα P ανά ένωση.



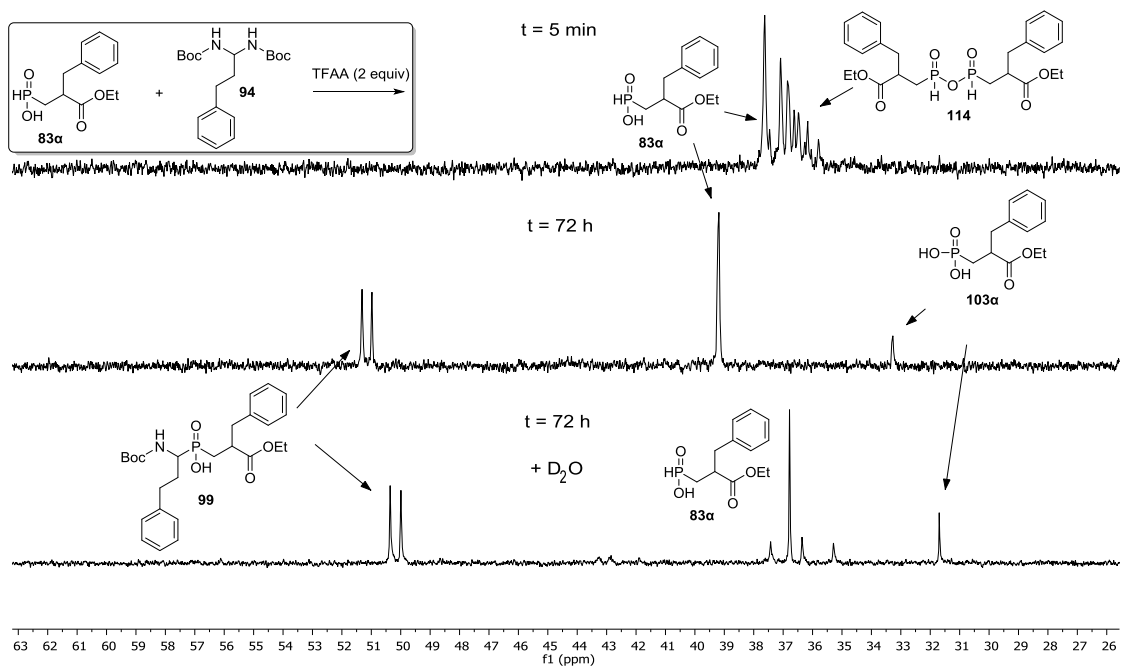
Εικόνα 38: Δομή προτεινόμενου ενδιάμεσου (114) της αντίδρασης του 83α με TFAA.

Εφόσον όμως στις αντιδράσεις με 1 ή 2 eqivn TFAA και χρήση του **83α** σχηματίζεται το ίδιο ενδιάμεσο, για ποιο λόγο παρατηρείται προϊόν μόνο στη 2^η περίπτωση; Υπενθυμίζεται ότι μεγάλη διαφορά στην ταχύτητα της αντίδρασης παρατηρήθηκε και την περίπτωση του **70α** πηγαίνοντας από το 1 στα 2 eqivn TFAA (Εικόνα 33). Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι *το TFAA έχει και δεύτερο ρόλο στην αντίδραση που δεν περιλαμβάνει το φωσφινικό υπόστρωμα, αλλά την αμινάλη*. Υποθέτουμε ότι ο ρόλος αυτός θα πρέπει να σχετίζεται με τη διάσπαση της *N*-Boc-αμινάλης, πιθανώς μέσω του ενδιαμέσου **115** όπου ο δεσμός C-N που συμμετέχει το δις-ακυλιωμένο N πολώνεται περισσότερο και διασπάται ευκολότερα. Πρέπει να αναφερθεί ότι ο Maruoka και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν πρόσφατα δομές ανάλογες με την **115** προσθέτοντας δεύτερη Boc-ομάδα στο ένα άζωτο μιας *N*-Boc-αμινάλης [191]. Τέλος, η πιθανότητα να συνδέεται η επιτάχυνση της αντίδρασης με 2 eqivn TFAA με την αύξηση του *in situ* παραγόμενου TFA αποκλείστηκε με πείραμα όπου προστέθηκε επιπλέον 0.5 eqivn TFA και η ταχύτητα της αντίδρασης δεν επηρεάστηκε.



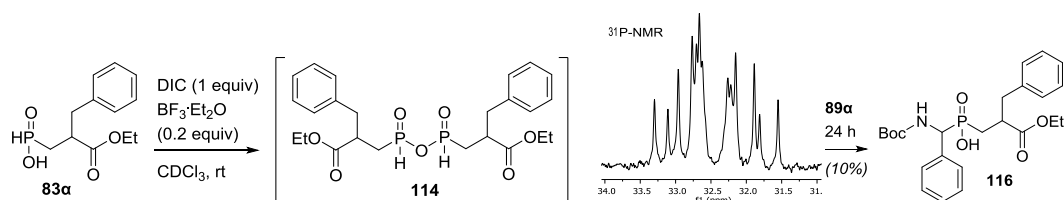
Σχήμα 57: Προτεινόμενη ενεργοποίηση της αμινάλης 94 από TFAA.

Ένα ακόμα αξιοσημείωτο στοιχείο που προκύπτει από την ανάλυση των φασμάτων ³¹P-NMR είναι ότι *τα προϊόντα της αντίδρασης του 83α με το 94 και 2 eqivn TFAA πριν και μετά την διακοπή της αντίδρασης με D₂O ταυτίζονται και αντιστοιχούν στη δομή 99*. Αυτό γίνεται εμφανές από τη σύγκριση των φασμάτων ³¹P-NMR κατά την παρακολούθηση της αντίδρασης όπου το **99** εμφανίζεται ως μια διπλή λόγω των δύο στερεογονικών κέντρων που διαθέτει (Εικόνα 39). Το γεγονός αυτό απομακρύνει περαιτέρω το ενδεχόμενο του μηχανισμού που προτείνει ο Ragulin για την περίπτωση μας, όπου τα προϊόντα πριν τη διακοπή της αντίδρασης είναι τα ακυλιωμένα παράγωγα **111** και όχι τα μη προστατευμένα παράγωγα **112** (Σχήμα 54).



Εικόνα 39: Φάσματα ^{31}P -NMR της αντίδρασης του **83α** με το **94** και 2 equiv TFAA.

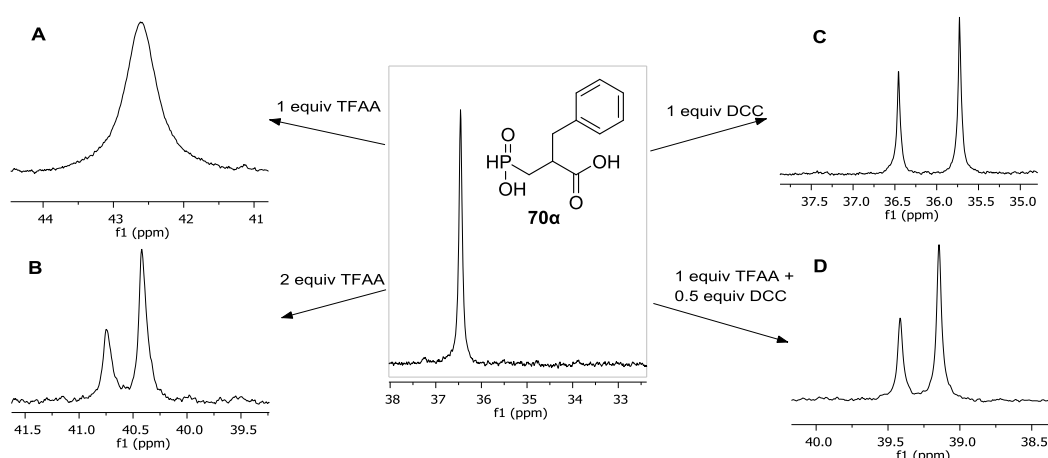
Επιπλέον στοιχεία προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκε 1 equiv DIC και 0.2 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ για την αμιδοακυλίωση του **83α**. Και στην περίπτωση αυτή, το **83α** μετατράπηκε στο προτεινόμενο ενδιάμεσο **114**, όπως φαίνεται από το παρόμοιο προφίλ του φάσματος ^{31}P -NMR με την αντίστοιχη αντίδραση με TFAA (Σχήμα 58). Συνεπώς, το ενδιάμεσο της αντίδρασης είναι ανεξάρτητο από το αφυδατικό μέσο, γεγονός που είναι αντίθετο με την βιβλιογραφικά προτεινόμενη υπόθεση (Σχήμα 54) και συμφωνεί με την προτεινόμενη δομή **114**. Όμως, σε αυτήν την περίπτωση, δεν παρατηρήθηκε «απενεργοποίηση» του **114**, όπως με το TFAA, έστω και έπειτα από 24h, γεγονός που συνδέει την αποικοδόμηση του **114** με το πρωτικό οξύ TFA. Επίσης, αποδείχτηκε ότι το **114** δεν ήταν αρκετά αποτελεσματικό υπό αυτές τις συνθήκες καθώς επιτεύχθηκε μόλις 10% μετατροπή σε 24h. Και στην περίπτωση αυτή, είναι εμφανής η τεράστια διαφορά δραστηριότητας του **83α** με το **70α** καθώς με το **70α** και την ίδια αμινάλη (**89α**) επιτεύχθηκε 93% μετατροπή εντός 1.3 h (Πίνακας 12).



Σχήμα 58: Αντίδραση του **83α** με την αμινάλη **89α** με χρήση DIC/ $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$.

4.7.2 Τα φωσφινικά οξέα (καρβοξυλικά οξέα) τύπου **70** αντιδρούν μέσω κυκλικών μικτών ανυδριτών

Όλες οι ενδείξεις που αναφέρθηκαν νωρίτερα σχετικά με τη διαφορά δραστηριότητας των **83α** και **70α** μας ώθησαν στην προσεκτική ανάλυση των φασμάτων ^{31}P -NMR των μιγμάτων αντίδρασης του **70α** με στόχο την ταυτοποίηση μηχανιστικών στοιχείων που να ερμηνεύουν αυτήν τη διαφορά. Αρχικά, εξετάστηκε η μορφή του «ενεργοποιημένου» ενδιαμέσου η οποία αποδείχτηκε να είναι εντελώς διαφορετική απ'ότι στην περίπτωση του **83α**, όπως φαίνεται στην Εικόνα 40.

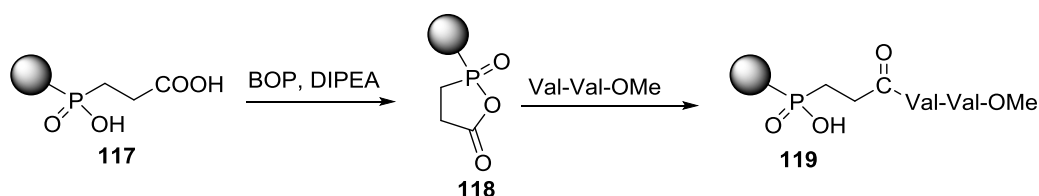


Εικόνα 40: Φάσματα ^{31}P -NMR της αντίδρασης του **70α** με **A)** 1 equiv TFAA, **B)** 2 equiv TFAA, **C)** 1 equiv DCC και **D)** 1 equiv TFA και 0.5 equiv DCC.

Όπως είναι προφανές, με χρήση 2 equiv TFAA δεν λαμβάνεται το πολύπλοκο προφίλ που αποδόθηκε νωρίτερα στον συμμετρικό φωσφινικό ανυδρίτη **114** αλλά μια διπλή κορυφή (Εικόνα 40B). Αντίθετα, με 1 equiv TFAA (Εικόνα 40A) η κορυφή απλά διευρύνθηκε και μετατοπίστηκε περίπου ~6 ppm, δείγμα μιας ενδιάμεσης κατάστασης που προκαλεί διεύρυνση λόγω σχηματισμού συσσωματωμάτων μέσω Η-δεσμών (aggregates). Διπλή κορυφή, χωρίς όμως να συμβεί μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία, παρατηρήθηκε και με 1 equiv DCC (Εικόνα 40C), που σημαίνει ότι η μετατόπιση της κορυφής στην περίπτωση B οφείλεται στο TFA που παράγεται και πιθανώς πολώνει τον δεσμό P=O. Προς έκπληξή μας, όταν το **70α** αντέδρασε με μίγμα 0.5 equiv DCC και 1.0 equiv TFAA παρήχθη μόνο ένα ζεύγος κορυφών σε ενδιάμεσες χημικές μετατοπίσεις (Εικόνα 40D), το οποίο σημαίνει ότι

η δομή του ενδιάμεσου που προέρχεται από το **70α** δεν εξαρτάται από το αφυδατικό μέσο που χρησιμοποιείται, καθώς παράγεται είτε με TFAA είτε με DCC.

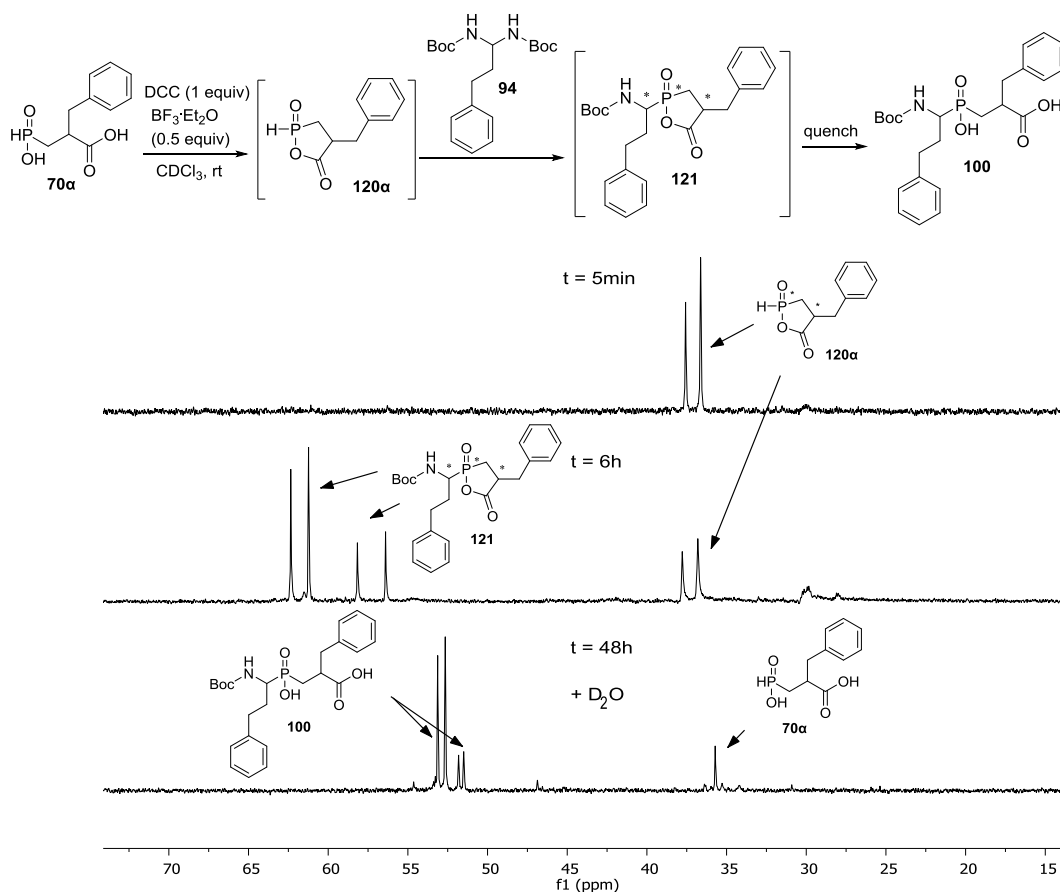
Αναζητώντας στοιχεία στη βιβλιογραφία για την πιθανή δομή του ενδιάμεσου, βρήκαμε ότι όταν ο Campagne και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν το συζευκτικό αντιδραστήριο BOP/DIPEA για πεπτιδική σύζευξη του φωσφινικού διοξέος **117** με H-Val-Val-OMe, απέδωσαν τον σχηματισμό του προϊόντος **119**, χωρίς τον σχηματισμό φωσφοναμιδικού δεσμού παρά τη χρήση δύο ισοδυνάμων του αντιδραστηρίου σύζευξης, στον κυκλικό, μικτό ανυδρίτη **118** (Σχήμα 59) [192]. Πρέπει να σημειωθεί πως ο Ramage και οι συνεργάτες του, είχαν καταφέρει επιτυχώς να παράξουν *in situ* και να παρατηρήσουν παρόμοια ενδιάμεσα μέσω φασματοσκοπίας ^{31}P -NMR [193].



Σχήμα 59: Προτεινόμενο ενδιάμεσο **118** για την αντίδραση της ένωσης **117** με Val-Val-OMe παρουσία BOP/DIPEA από Campagne et al [192].

Με βάση τα παραπάνω, προτείνουμε ως ενδιάμεσο της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης του διοξέος **70α** τον κυκλικό ανυδρίτη **120α** ο οποίος θα αναμένονταν να εμφανίζεται ως διπλή στο φάσμα ^{31}P -NMR λόγω των δύο στερεογονικών κέντρων που διαθέτει (Σχήμα 60). Η μεσολάβηση ενός διαφορετικού ενδιάμεσου για τις αντιδράσεις αμιδοαλκυλίωσης των **83α** και **70α**, το οποίο και στις δύο περιπτώσεις δεν εξαρτάται από το αφυδατικό μέσο, είναι υπεύθυνη για την διαφορετική συμπεριφορά των αντιδράσεων, με αυτές του **70α** που λαμβάνουν χώρα μέσω του κυκλικού ανυδρίτη **120α** να είναι εντυπωσιακά ταχύτερες. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι τα προϊόντα της αντίδρασης δεν είναι ελεύθερα φωσφινικά οξέα, όπως στην περίπτωση του **83α**, αλλά επίσης κυκλικοί ανυδρίτες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 60. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί και με τον πλήθος (4) των κορυφών του **121** στο φάσμα ^{31}P -NMR του μίγματος αντίδρασης (3 στερεογονικά κέντρα, 4 διαστεροϊσομερικά ζεύγη εναντιομερών) αλλά και από την χημική μετατόπιση αυτών (56-62 ppm) που διαφέρει σημαντικά από το προϊόν μετά την διακοπή της αντίδρασης με D_2O (51-54 ppm), όπως θα

αναμένονταν λόγω της ηλεκτρονιοελκτικής φύσης της καρβονυλικής ομάδας στην περίπτωση του ανυδρίτη. Σημειώνεται ότι το μικρό ζεύγος κορυφών σε υψηλότερα πεδία για την ένωση **100** οφείλεται σε στροφομερή που παρατηρούνται σταθερά σε ενώσεις παρόμοιας δομής.

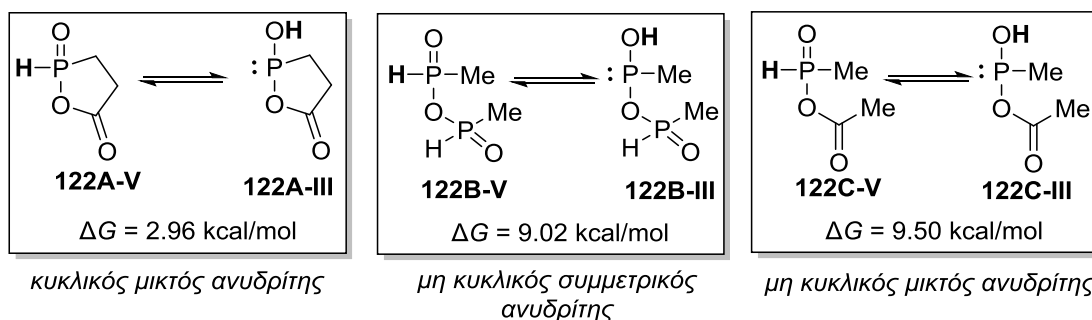


Σχήμα 60: Προτεινόμενα ενδιάμεσα της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης του **70a** με την αμινάλη **94** και φάσματα ^{31}P -NMR κατά την εξέλιξη της αντίδρασης.

4.7.3 Η φύση του ενδιάμεσου ανυδρίτη επηρεάζει την ικανότητα ταυτομερείωσης

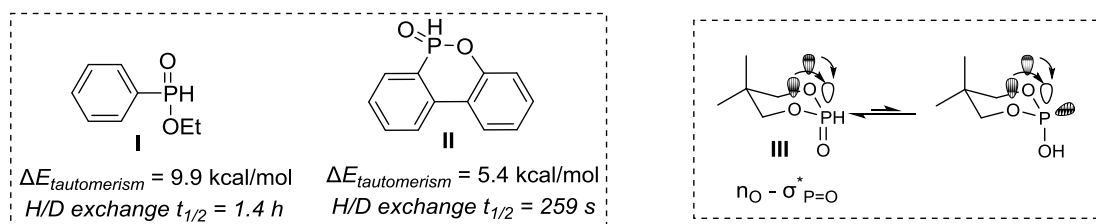
Θεωρούμε ότι η υψηλότερη δραστηριότητα του **70a** σε σχέση με το **83a** αποδίδεται στη διαφορά δραστηριότητας των **120a** και **114**, όμως πώς μπορεί να ερμηνευτεί αυτή η διαφορετική συμπεριφορά; Βασισμένοι στην υπόθεση ότι η δραστηριότητα των P(V) ενώσεων **120a** και **114** εκδηλώνεται μέσω της πυρηνόφιλης P(III) ταυτομερούς δομής τους, στραφήκαμε σε υπολογιστικές μεθόδους για να υπολογίσουμε θερμοδυναμικές παραμέτρους της ταυτομερείωσης. Όλοι οι DFT υπολογισμοί που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του Επικ. Καθηγητή του Πανεπιστημίου του Tennessee,

Κnoxville, από τον Dr Rajeshkumar Thayalan. Για την συντομία των υπολογισμών, μετρήθηκαν οι ελεύθερες ενέργειες Gibbs των ισορροπιών ταυτομερίωσης σε ενώσεις-μοντέλα (**122A-C**) και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Σχήμα 61.



Σχήμα 61: Τιμές ελευθέρων ενεργειών Gibbs για τις ταυτομερειώσεις των ενώσεων-μοντέλων 122A-C.

Όπως γίνεται φανερό από την σύγκριση των τιμών ΔG των ισορροπιών ταυτομερείωσης ενός κυκλικού μικτού ανυδρίτη (**122A**), ενός μη κυκλικού συμμετρικού ανυδρίτη (**122B**) και ενός μη κυκλικού μικτού ανυδρίτη (**122C**), η 1^η ισορροπία είναι σαφώς περισσότερο μετατοπισμένη προς την πυρηνόφιλη μορφή P(III) σε σχέση με τις δύο τελευταίες. Βασισμένοι αποκλειστικά στις θερμοδυναμικά σταθερότερες διαμορφώσεις, έτσι όπως προέκυψαν από τους υπολογισμούς, δεν έγινε εφικτός ο εντοπισμός δομικών ή ηλεκτρονιακών παραμέτρων που να συνεισφέρουν στην αυξημένη δυνατότητα ταυτομερείωσης του **122A**. Βιβλιογραφικά, σε μια εκτενή πειραματική και θεωρητική μελέτη των Montchamp et al σχετικά με την ταυτομερείωση ποικιλίας P-H ενώσεων, αναφέρεται ότι οι ενώσεις I και II της Εικόνας 41 εμφανίζουν μεγάλη διαφορά στους χρόνους $t_{1/2}$ της ανταλλαγής P-H/P-D, αλλά και στις θεωρητικά υπολογισμένες ΔE ταυτομερείωσης, χωρίς όμως να δίνεται κάποια ερμηνεία για αυτό [188]. Σε μια άλλη αναφορά, τονίζεται ότι ο κυκλικός φωσφονικός εστέρας III εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με άκυκλα ανάλογα, λόγω της ικανότητάς του να ταυτομερειώνεται ευκολότερα [194]. Σε αυτό πιθανώς να συνεισφέρει το ανωμερικό φαινόμενο που αυξάνει το μερικό αρνητικό φορτίο του οξυγόνου του P=O, διευκολύνοντας την μετακίνηση του πρωτονίου στο οξυγόνο αυτό (Εικόνα 41). Στην περίπτωσή μας, όπου σχηματίζεται 5μελής δακτύλιος δεν είναι προφανής η συνεισφορά του ανωμερικού φαινομένου.



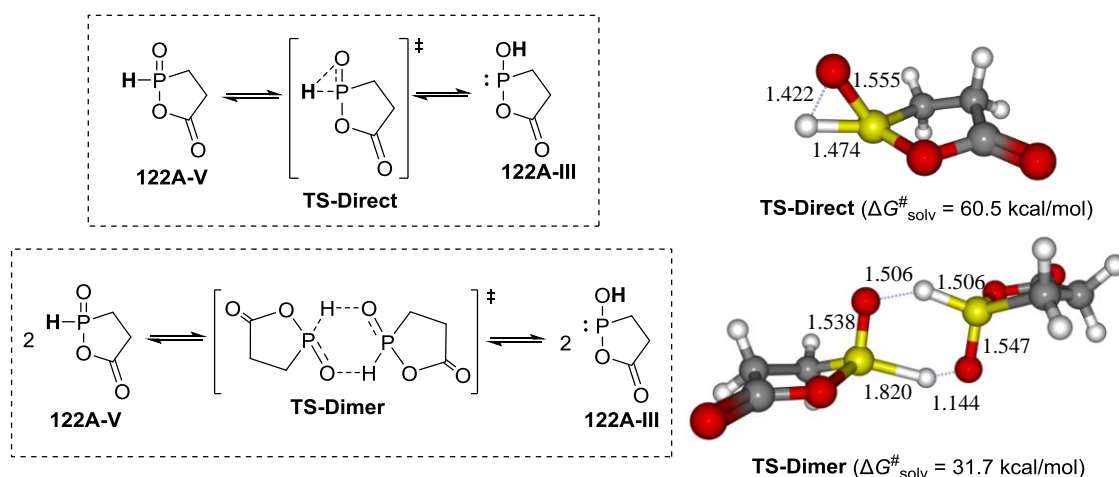
Εικόνα 41: Βιβλιογραφικά παραδείγματα σχετικά με την ταυτομερείωση κυκλικών P-H ενώσεων.

Ανεξάρτητα με την αιτία που προκαλεί αυτήν την ευκολία ταυτομερείωσης του **122A** θα πρέπει να τονιστεί ότι με βάση την μελέτη του Montchamp, όλες οι πειραματικά υπολογιζόμενες τιμές P-H έχουν τιμή $\Delta E > 5 \text{ kcal/mol}$ [188], γεγονός που καθιστά τον κυκλικό ανυδρίτη **122A** ιδιαίτερα δραστικό, όπως επιβεβαιώθηκε και πειραματικά.

4.7.4 Η παρουσία οξέος Lewis επηρεάζει την ικανότητα ταυτομερείωσης του κυκλικού ανυδρίτη **122A**

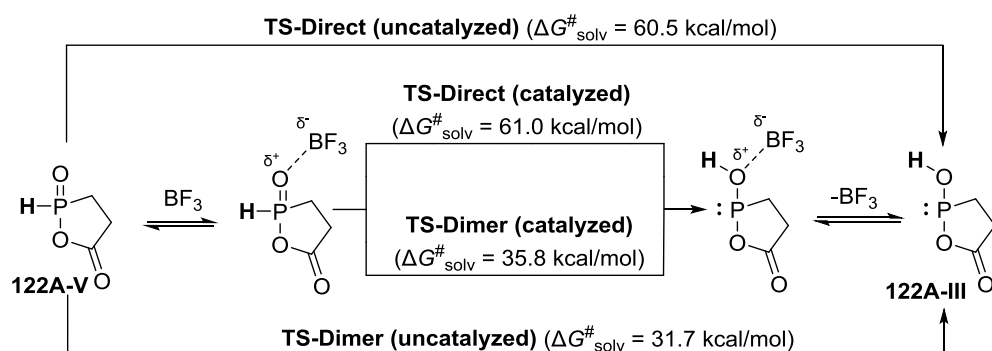
Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.6.2, η παρουσία $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ οξέων Lewis επιταχύνει σημαντικά την αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης του φωσφινικού οξέος **70a**. Άλλωστε, η αλληλεπίδραση του ενδιάμεσου κυκλικού ανυδρίτη **120a** με το οξύ Lewis γίνεται εμφανής από την μετατόπιση των δύο κορυφών που αντιστοιχούν στον **120a** κατά $\sim 1 \text{ ppm}$ προς χαμηλότερα πεδία στο φάσμα $^{31}\text{P-NMR}$. Με την υπόθεση ότι το $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ καταλύει την ταυτομερείωση προς την δραστική P(III) μορφή και με αυτόν τον τρόπο επιταχύνεται η αμιδοαλκυλίωση, στρέψαμε τις προσπάθειές μας στη διαλεύκανση του μη καταλυόμενου και BF_3 -καταλυόμενου μηχανισμού ταυτομερείωσης μέσω υπολογιστικών μεθόδων.

Από προηγούμενες πειραματικές αλλά και θεωρητικές μελέτες σε αντίστοιχα υποστρώματα έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί μη καταλυόμενοι μηχανισμοί ταυτομερείωσης: α) άμεση P→O μεταφορά πρωτονίου και β) σύγχρονη ανταλλαγή πρωτονίων μέσω διμερών μεταβατικών καταστάσεων (TS) (Εικόνα 42) [187, 188, 195]. Υπολογίστηκαν τα ενεργειακά φράγματα ΔG των δύο αυτών πορειών για την περίπτωση του **122A** και βρέθηκαν 60.5 και 31.7 kcal/mol, αντίστοιχα, τιμές που είναι σε συμφωνία με βιβλιογραφικά αναφερόμενες σε παρόμοια συστήματα [188].



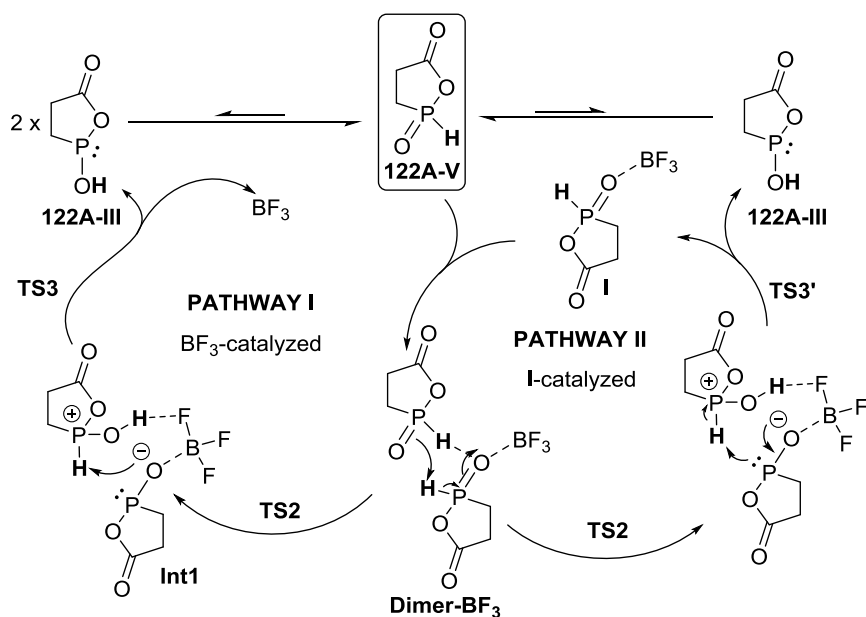
Εικόνα 42: Αναπαράσταση των μηχανισμών ταυτομερείωσης του 122A μέσω άμεσης μεταφοράς και μέσω διμερών και DFT-υπολογιζόμενες μεταβατικές καταστάσεις.

Όμως, η τιμή για την TS-Direct είναι σχεδόν απαγορευτική, ενώ για την TS-Dimer είναι σημαντικά υψηλή, γεγονός που πιθανώς εξηγεί τις αργές αντιδράσεις του **114** απουσία όξινου καταλύτη. Στην μελέτη του Montchamp, προκειμένου να εξηγηθεί η ανταλλαγή H/D μέσω ταυτομερείωσης, προτάθηκε ότι η παρουσία ενός μορίου νερού μπορεί να μειώσει το ενεργειακό φράγμα και να συνεισφέρει στην αποτελεσματική μεταφορά πρωτονίου [188]. Στην δική μας περίπτωση, όπου η αντίδραση γίνεται απουσία νερού, υποθέσαμε ότι το BF_3 θα αναλαμβάνει αυτόν τον ρόλο, μέσω όμως ενός μηχανισμού που δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία. Έτσι, αρχικά μελετήθηκε ο ρόλος που θα μπορούσε να έχει το BF_3 στους μηχανισμούς της Εικόνας 42. Θεωρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση του BF_3 με το **122A** γίνεται μέσω του οξυγόνου του δεσμού P=O (Εικόνα 43) και υπολογίστηκαν εκ νέου οι μεταβατικές καταστάσεις. Όμως, διαπιστώθηκε ότι το BF_3 δεν επηρεάζει καθόλου τα ενεργειακά φράγματα και των δύο μηχανισμών, γεγονός που δείχνει ότι ο BF_3 -καταλυόμενος μηχανισμός είναι διαφορετικός.

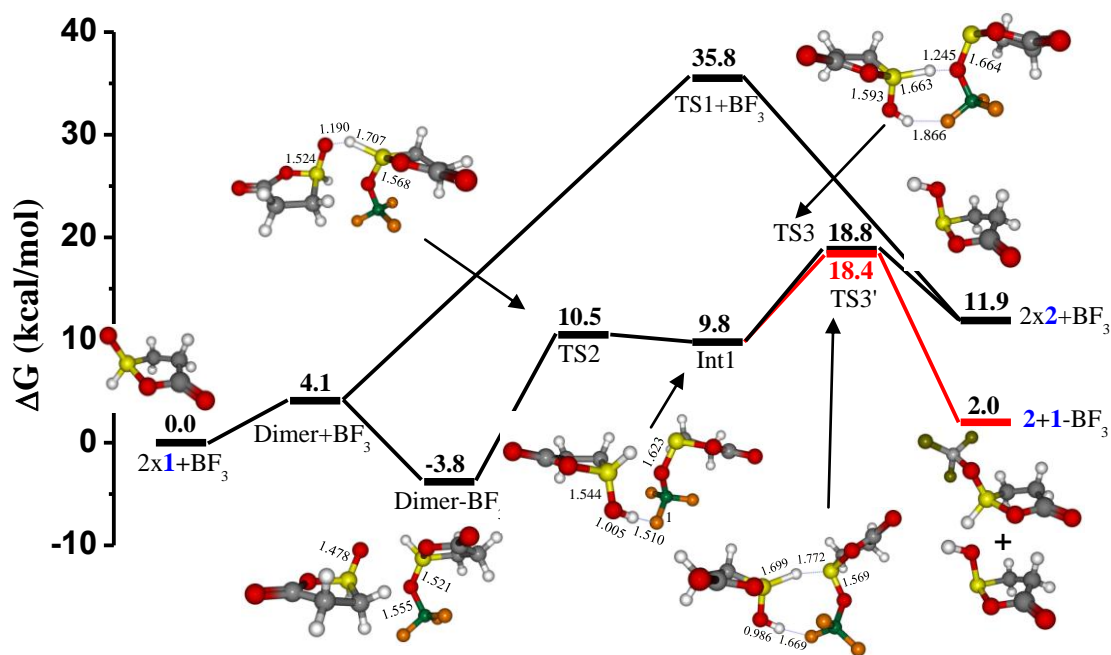


Εικόνα 43: Σύγκριση των ενεργειακών φραγμάτων των δύο βασικών μηχανισμών ταυτομερείωσης με ή χωρίς την επίδραση BF_3 .

Κατά τους DFT υπολογισμούς, όταν προστέθηκε BF_3 στο διμερές, εντοπίστηκε ένας σταδιακός μηχανισμός με δύο TS όπου οι μεταφορές πρωτονίων γίνονται διαδοχικά και όχι ταυτόχρονα. Σχεδιάστηκαν λοιπόν δύο μηχανιστικές υποθέσεις, οι οποίες φαίνονται στο Σχήμα 62. Τα πρώτα βήματα είναι κοινά και στους δύο μηχανισμούς (I και II). Αρχικά, αφού πλησιάσουν δύο μονάδες **122A-V** προς ένα διμερές, μια απωστική διαδικασία ($\Delta G=4.1$ kcal/mol) σε σχέση με τα μονομερή (Εικόνα 44), σχηματίζεται ένα υπερσύμπλοκο με την αλληλεπίδραση του BF_3 με ένα βασικό κατά Lewis άτομο οξυγόνου ($\text{P}=\text{O}$) το οποίο σταθεροποιείται κατά -3.8 kcal/mol. Έπειτα, μεταφέρεται ένα εκ των δύο ατόμων H (**TS2**) στο άτομο O που δεν συνδέεται με το BF_3 , δημιουργώντας ένα ζεύγος ιόντων (**Int1**, Σχήμα 62 και Εικόνα 44). Το ενεργειακό φράγμα βρέθηκε 14.3 kcal/mol, σημαντικά χαμηλότερο από το φράγμα που υπολογίστηκε για τους μηχανισμούς με απευθείας μεταφορά H που περιγράφηκαν στις Εικόνες 42 και 43. Αυτό αποδίδεται κυρίως στην σταθεροποίηση με έναν H-δεσμό μεταξύ ενός ατόμου F του BF_3 και του H της ομάδας OH. Οι μηχανισμοί διαφοροποιούνται στο τελευταίο βήμα: Στον μηχανισμό I μεταφέρεται το άτομο H από την θετικά φορτισμένη μονάδα στο άτομο οξυγόνο ($\text{P}=\text{O}$) της αρνητικά φορτισμένης μονάδας, οδηγώντας σε δύο ταυτομερείς P(III) δομές μέσω της **TS3**. Καθώς το ενεργειακό φράγμα για την 1^η μεταφορά πρωτονίου (**TS2**, 14.3 kcal/mol) είναι μεγαλύτερο από αυτό της δεύτερης (**TS3**, 9.0 kcal/mol), η πρώτη μεταφορά θα είναι και το καθοριστικό βήμα για την ταχύτητα ταυτομερείωσης.



Σχήμα 62: Προτεινόμενοι, σταδιακοί μηχανισμοί καταλυόμενης ταυτομερείωσης.



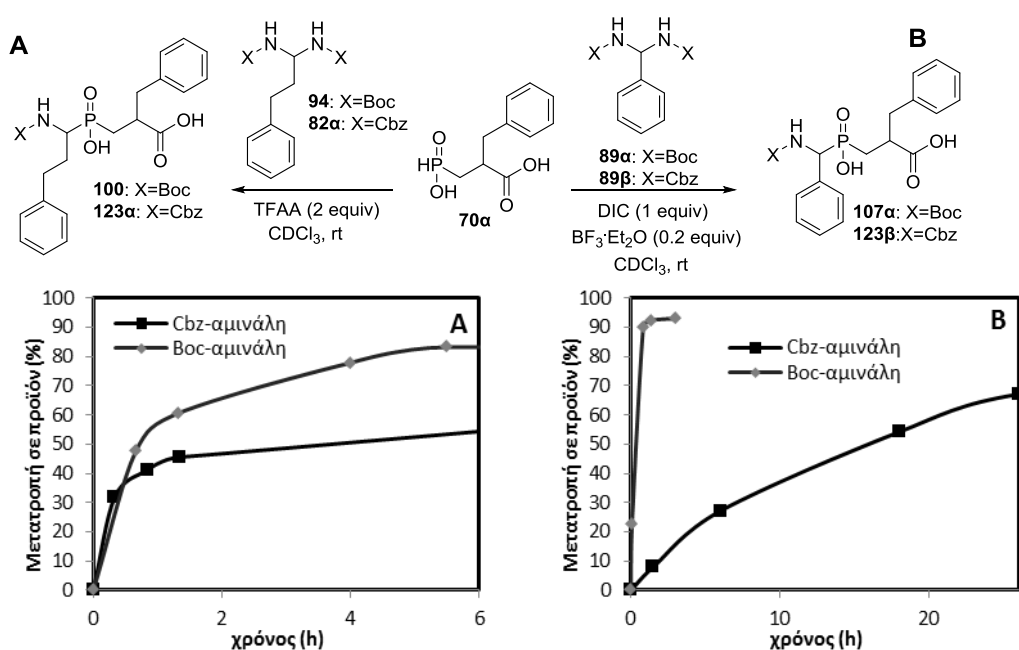
Εικόνα 44: Τα προτεινόμενα προφίλ ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs για την ταυτομερείωση του 122A. Η TS1 αφορά την μη ευνοϊκή ταυτόχρονη μεταφορά 2 πρωτονίων. Ο Μηχανισμός II διαφέρει μόνο στο τελευταίο στάδιο (κόκκινη γραμμή). Στο γράφημα φαίνονται οι DFT βελτιστοποιημένες δομές: P: κίτρινο, O: κοκκίνο, C: γκρι, H: λευκό, B: πράσινο, F: πορτοκαλί.

Ο Μηχανισμός I αφορά την BF_3 -καταλυόμενη μετατροπή δύο μορίων **122A-V** σε δύο θερμοδυναμικά ασταθή μόρια **122A-III** και για τον λόγο αυτό η διαδικασία φαίνεται να είναι θερμοδυναμικά απαιτητική (11.9 kcal/mol). Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται στον Μηχανισμό II όπου στο τελευταίο στάδιο (**TS3'**) η μεταφορά του ατόμου H δεν πραγματοποιείται στο άτομο O της μονάδας που φέρει το BF_3 , αλλά στο άτομο P. Το αποτέλεσμα είναι ότι παράγεται μόνο μια ασταθής μονάδα **122A-III**, ενώ αναπαράγεται η ένωση I η οποία συναρμολογείται με το BF_3 και μπορεί να εισέλθει σε έναν νέο καταλυτικό κύκλο. Συνεπώς, ο πραγματικός καταλύτης δεν είναι το BF_3 αλλά το σύμπλοκο I (**122A-V** + BF_3), καθιστώντας το ίδιο το υπόστρωμα **122A-V** προκαταλύτη. Το ενεργειακό φράγμα για την **TS3'** βρέθηκε 8.6 kcal/mol, επομένως και σε αυτήν τη περίπτωση η 1^η μεταφορά πρωτονίου είναι το καθοριστικό βήμα για την ταχύτητα της ταυτομερείωσης. Καθώς τα ενεργειακά φράγματα **TS3** και **TS3'** δεν διαφέρουν σημαντικά, δεν υπάρχει κινητική διάκριση των δύο μηχανισμών. Όμως, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι οι ταυτομερειώσεις είναι ισορροπίες, επομένως η κατά 9.9 kcal/mol σταθεροποίηση των προϊόντων στον Μηχανισμό II τον καθιστά περισσότερο πιθανό. Με άλλα λόγια, το καθοριστικό για

την ταχύτητα βήμα της αντίστροφης αντίδρασης μέσω του Μηχανισμού I είναι μόλις 6.9 kcal/mol ενώ για τον μηχανισμό II είναι 16.4 kcal/mol και συνεπώς δεν ευνοείται. Τέλος, τονίζεται ότι δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε στη βιβλιογραφία παρόμοιο μηχανιστικό σενάριο με αυτό που περιγράφεται στον Μηχανισμό II.

4.7.5 Η φύση της προστατευτικής ομάδας της αμινάλης επηρεάζει την ταχύτητα αμιδοαλκυλίωσης

Εκτός από τη φύση του φωσφινικού υποστρώματος που επηρεάζει τα μέγιστα την πορεία της αμιδοαλκυλίωσης, εντοπίστηκαν διαφορές δραστηκότητας και με την χρήση διαφορετικά προστατευμένων αμιναλών. Οι διαφορές αυτές εξετάστηκαν για δύο παραδείγματα, ένα με χρήση 2 equiv TFAA και ένα με χρήση 1 equiv DIC και 0.2 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, και αναπαρίστανται στις καμπύλες της Εικόνας 45.



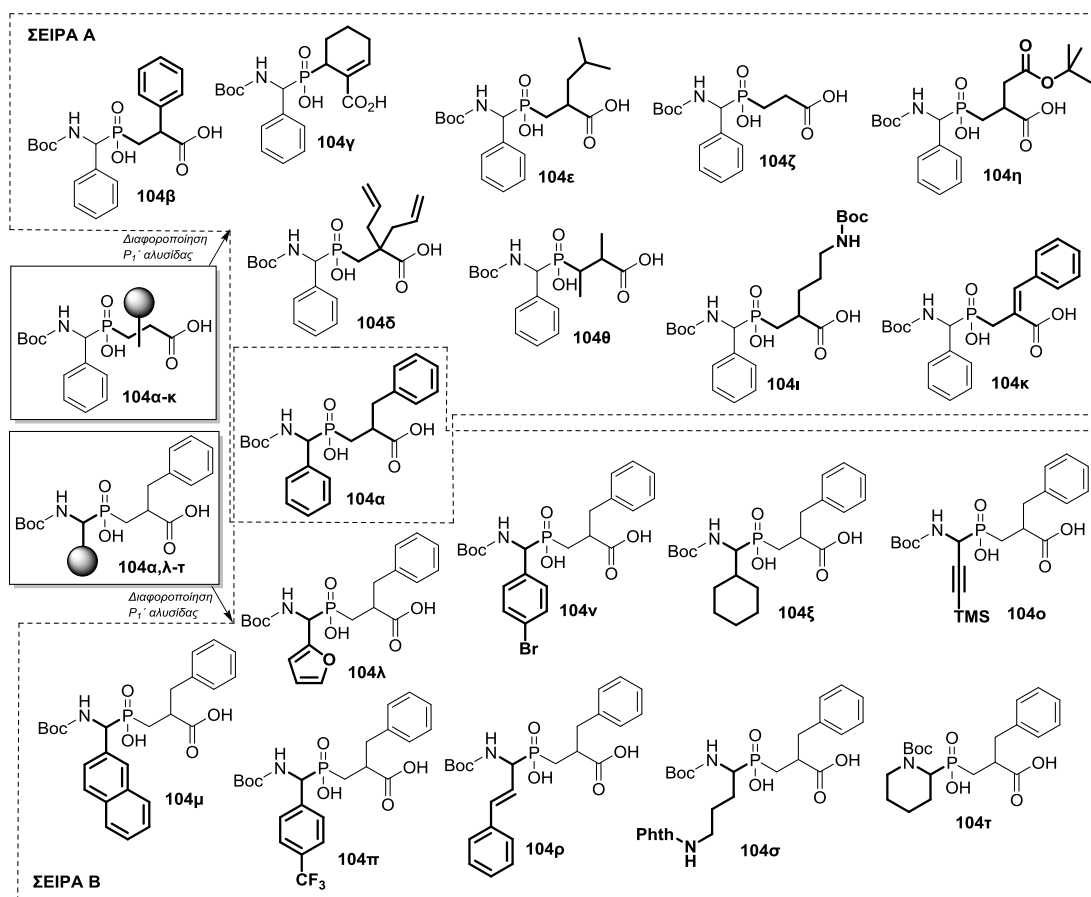
Εικόνα 45: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων του 70α με *N*-Cbz και *N*-Boc-αμινάλες με χρήση A) 2 equiv TFAA, B) 1 equiv DIC, 0.2 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ σε rt.

Από την καμπύλη A της Εικόνας 45 γίνεται φανερό ότι η *N*-Cbz-αμινάλη **82α** αντιδρά πιο αργά από την *N*-Boc-αμινάλη **94** όταν χρησιμοποιήθηκαν 2 equiv TFAA. Όμως, στην περίπτωση της καμπύλης B όπου χρησιμοποιήθηκε 1 equiv DIC και 0.2 equiv $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ως καταλύτης, η διαφορά δραστηκότητας μεταξύ των αμιναλών **89α** και **89β** ήταν εντυπωσιακή. Η διαφορετική συμπεριφορά των

αμιναλών στα δύο σετ συνθηκών αποτελεί μια ακόμα ένδειξη διαφορετικών μηχανιστικών οδών στην αντίδραση αμιδοακυλίωσης.

4.8 Αξιολόγηση της ευρύτητας της μεθόδου

Με στόχο τον έλεγχο της γενικότητας της μεθόδου, προχωρήσαμε στον σχεδιασμό δύο σειρών Boc-προστατευμένων φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδίων που θα φέρουν δομική ποικιλότητα είτε στην P₁' (Σειρά A) είτε στην P₁ θέση (Σειρά B). Η επιλογή των δομικών χαρακτηριστικών αυτών των ενώσεων βασίστηκε στην επίτευξη όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποικιλίας σε σχέση με την φύση των υποκαταστατών, τον βαθμό υποκατάστασης, τη στερεοχημική παρεμπόδιση, τη διαμορφωτική ελευθερία και την παρουσία λειτουργικών ομάδων. Οι δομές που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν συνοψίζονται στην Εικόνα 46.



Εικόνα 46: Δομές των ενώσεων στόχων 104α-τ.

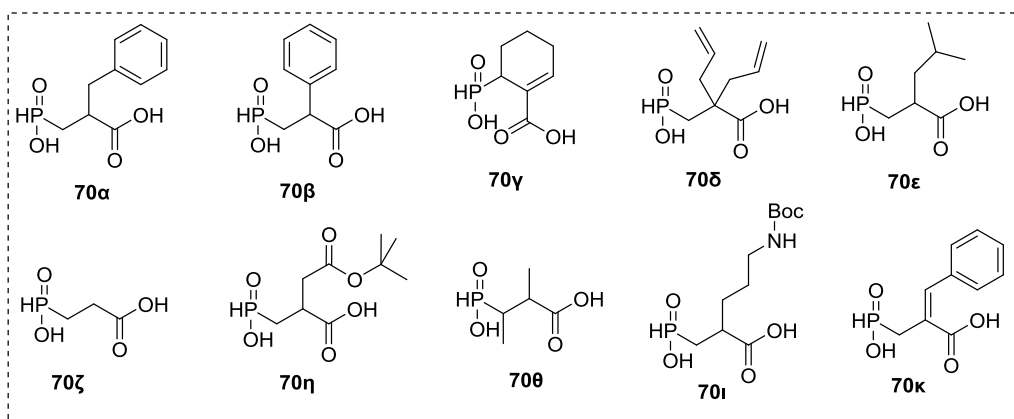
Συγκεκριμένα, στη Σειρά A περιλαμβάνονται ενώσεις που φέρουν στην P₁ θέση φαινύλιο (το αμινοφωσφινικό ανάλογο της φαινυλογλυκίνης, Phg) και στην P₁' θέση: i) βενζυλική ομάδα (**104α**), ii) αλειφατική ομάδα (**104ε**), iii) αρωματική ομάδα (**104β**), iv) καμία υποκατάσταση (**104ζ**), v) α,α-διπλή υποκατάσταση (**104δ**), vi) α,β-διπλή υποκατάσταση (**104θ**), vii) διπλό δεσμό (**104γ,κ**), viii) δακτύλιο (**104γ**) και ix) πλευρικές αλυσίδες με λειτουργικές ομάδες όπως αυτές των προστατευμένων αμινοξέων Asp (όξινο αμινοξύ, **104η**) και Orn (βασικό αμινοξύ, **104ι**). Υπενθυμίζεται ότι κατά την αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης διαπιστώθηκε η μεσολάβηση ενός κυκλικού ενδιάμεσου, επομένως η επιλογή διαφοροποιημένων ανθρακικών σκελετών θεωρήθηκε απαραίτητη ώστε να εντοπισθούν πιθανοί στερεοχημικοί περιορισμοί. Αντίθετα, η επιλογή λειτουργικών ομάδων στοχεύει περισσότερο στον έλεγχο συμβατότητας των συνθηκών της αντίδρασης με αυτές.

Στη Σειρά B (Εικόνα 46) περιλαμβάνονται ενώσεις που φέρουν στην P₁' θέση βενζυλομάδα (το ανάλογο της Phe) και στην P₁ θέση: i) φαινυλομάδα μη υποκατεστημένη (**104α**), ii) φαινυλομάδα υποκατεστημένη με ομάδες που ασκούν επαγωγική επίδραση (**104ν,π**), iii) πολυκυκλική αρωματική ομάδα (**104μ**), iv) ετεροαρωματική ομάδα (**104λ**), v) συζυγιακό διπλό δεσμό (**104ρ**), vi) τριπλό δεσμό (**104ο**), vii) δακτύλιο (αμινοφωσφινικό ανάλογο πιπεκολικού οξέος, **104τ**) viii) αλειφατική αλυσίδα χωρίς λειτουργική ομάδα (**104ξ**), και ix) αλειφατική αλυσίδα με λειτουργική ομάδα (Phth-προστατευμένο αμινοφωσφινικό ανάλογο Orn, **104σ**). Η επιλογή δομικά διαφοροποιημένων αλυσίδων αναμένεται να επηρεάσει την ταχύτητα διάσπασης της *N*-Boc-αμινάλης και κατά συνέπεια της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης, με αποτέλεσμα να προκύψουν γενικές τάσεις δραστηριότητας του συνθετικού μας πρωτοκόλλου.

4.8.1 Σειρά A: Διαφοροποίηση της P₁' θέσης

4.8.1.1 Σύνθεση αρχικών φωσφινικών υποστρωμάτων

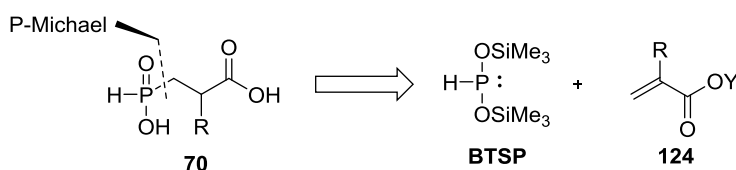
Για τη σύνθεση των μορίων της Σειράς A απαιτήθηκε η παρασκευή των 10 *H*-φωσφινικών διοξέων τύπου **70** που φαίνονται συγκεντρωτικά στην Εικόνα 47:



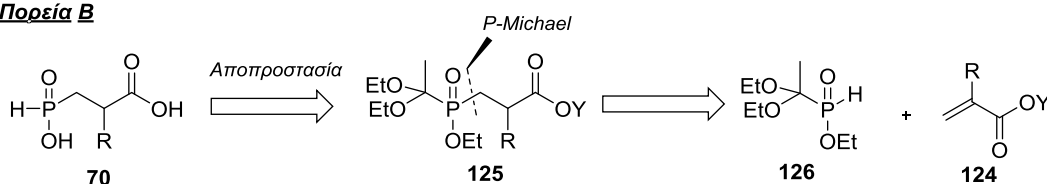
Εικόνα 47: Δομές των αρχικών *H*-φωσφινικών διοξέων 70α-κ

Η σύνθεση των διοξέων **70α-κ** βασίστηκε σε δύο ρετροσυνθετικές πορείες (Σχήμα 63). Και οι δύο περιλαμβάνουν ένα βήμα μιας αντίδρασης *P*-Michael ενός *P*-πυρηνόφιλου με ένα ακρυλικό υπόστρωμα (**124**): στην πορεία Α το *P*-πυρηνόφιλο είναι ο δις(τριμεθυλοσιλυλο) φωσφονίτης (BTSP) ενώ στην πορεία Β το αντιδραστήριο “Ciba-Geigy” (**126**, Σχήμα 63).

Πορεία Α



Πορεία Β

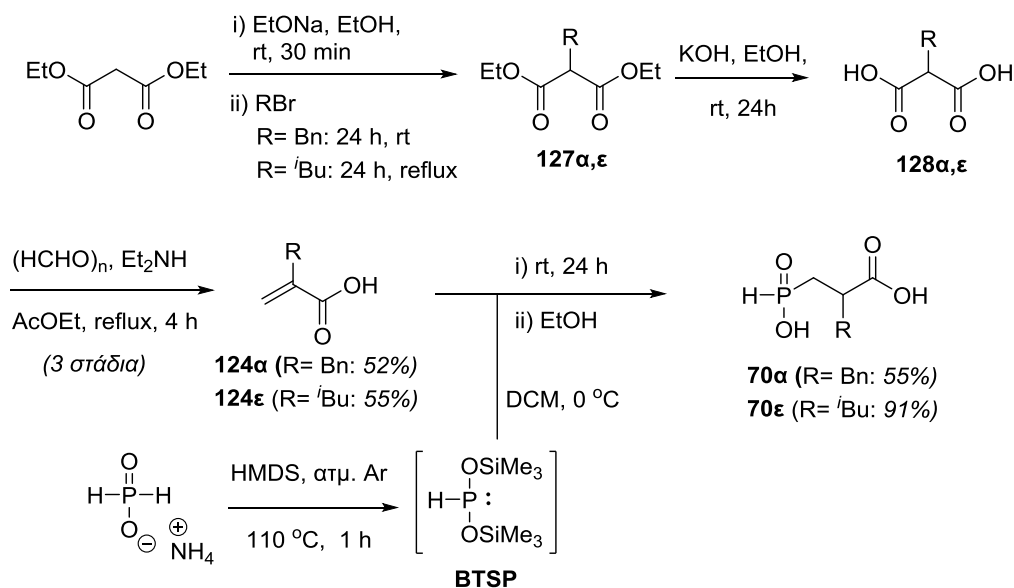


Σχήμα 63: Ρετροσυνθετικές πορείες για τα *H*-φωσφινικών διοξέων τύπου 5

α) Σύνθεση των *H*-φωσφινικών διοξέων 70α, 70ε.

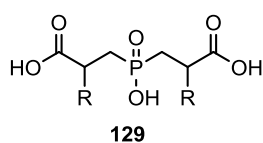
Η σύνθεση των **70α**, **70ε** πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πορεία του σχήματος 64 [162]. Συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιήθηκε αποπρωτονίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα χρησιμοποιώντας EtONa ως βάση και διαλύτη EtOH. Ακολούθησε η αργή προσθήκη του κατάλληλου αλογονιδίου και ανάδευση για 24 h είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (για την περίπτωση του BnBr) είτε με βρασμό υπό αναρροή (για την περίπτωση του *t*BuBr). Το προϊόν της αντίδρασης (**127α,ε**) υποβλήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό σε σαπωνοποίηση προς το διοξύ **128α,ε** με χρήση KOH/EtOH. Έπειτα από συμπύκνωση τύπου Knoevenagel με HCHO και

Et₂NH παρελήφθησαν τα προϊόντα **124α,ε** σε καθαρή μορφή και συνολική απόδοση 3 σταδίων 52% και 55% για **128α** και **128ε**, αντίστοιχα [120].



Σχήμα 64: Σύνθεση *H*-φωσφινικών διοξέων **70α** και **70ε**

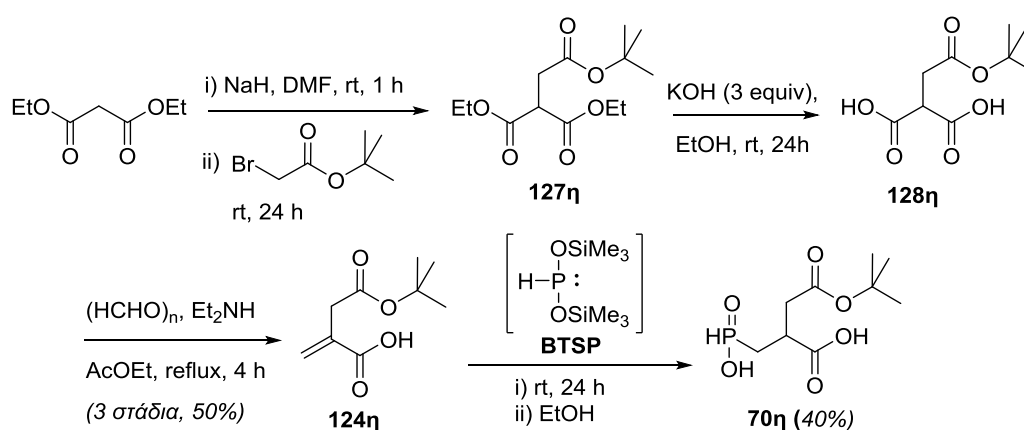
Ακολούθησε η προσθήκη του εκάστοτε ακρυλικού οξέος σε περίσσεια *in situ* παραγόμενου BTSP (6 equiv), ενός εξαιρετικά δραστικού φωσφονίτη που αντιδρά βίαια με το O₂ [196]. Η παραγωγή του BTSP έγινε με την σύντηξη ξηρού άλατος H₂PO₂NH₄ με HMDS σε θερμοκρασία 110 °C και σε αδρανή ατμόσφαιρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η βιβλιογραφικά αναφερόμενη σύνθεση *H*-φωσφινικών διοξέων τύπου **70** περιλαμβάνει την προσθήκη *P*-Michael σε ακρυλικούς εστέρες και ακόλουθη σαπωνοποίηση [162, 164]. Με βάση πρόσφατα αποτελέσματα από την ερευνητική μας ομάδα, επιτεύχθηκε η απευθείας χρήση ακρυλικού οξέος για την ίδια αντίδραση, μειώνοντας έτσι τα επιπλέον βήματα προστασίας/αποπροστασίας και λαμβάνοντας τα τελικά προϊόντα σε ένα στάδιο. Αν και οι μετατροπές σε προϊόν ήταν ποσοτικές, οι τελικές αποδόσεις εξαρτώνται από την υδατοδιαλυτότητα των διοξέων (55% και 91% για **70α** και **70ε**, αντίστοιχα). Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι η χρήση μεγάλης περίσσειας BTSP στην αντίδραση αυτή στοχεύει στην αποφυγή σχηματισμού διυποκατεστημένων παραπροϊόντων, όπως το **129** (Εικόνα 48).



Εικόνα 48: Δομή διυποκατεστημένου παραπροϊόντος **129**.

β) Σύνθεση του Η-φωσφινικού διοξέος 70η.

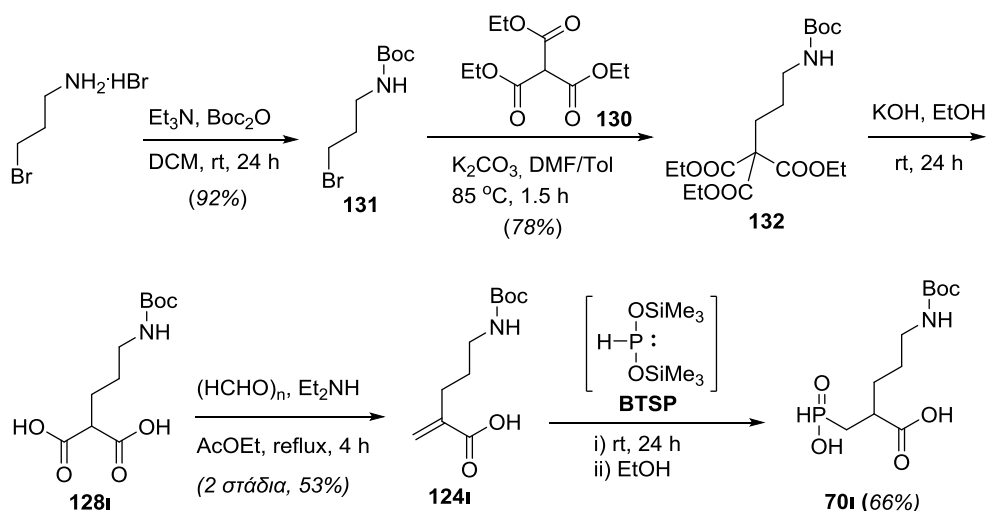
Η σύνθεση του διοξέος **70η** πραγματοποιήθηκε με παρόμοιο τρόπο με αυτόν του σχήματος 64, τροποποιημένο κατάλληλα ώστε να αποφευχθούν παράπλευρες αντιδράσεις στην πλευρική αλυσίδα του καρβοξυλικού *tert*-βουτυλεστέρα (Σχήμα 65). Οι τροποποιήσεις έγκεινται α) στην χρήση NaH αντί του EtONa κατά την αρχική αποπρωτονίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα για την αποφυγή αντιδράσεων μετεστεροποίησης [197] και β) στην προσεκτική σαπωνοποίηση των αιθυλεστέρων (3 equiv KOH ώστε να αποφευχθεί σαπωνοποίηση και του πλευρικού εστέρα).



Σχήμα 65: Σύνθεση Η-φωσφινικού διοξέος 70η

γ) Σύνθεση του Η-φωσφινικού διοξέος 70ι.

Σε παρόμοια λογική κινήθηκε και η σύνθεση του **70ι**, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε ο τρικαρβοξυλικός αιθυλεστέρας **130** για την αρχική αλκυλίωση αντί του μηλονικού διαιθυλεστέρα, καθώς στις ισχυρότερες συνθήκες που απαιτεί η αποπρωτονίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα παρατηρείται κυκλοποίηση (λακταμοποίηση) με την πλευρική αλυσίδα. Η συνθετική πορεία συνοψίζεται στο Σχήμα 66.

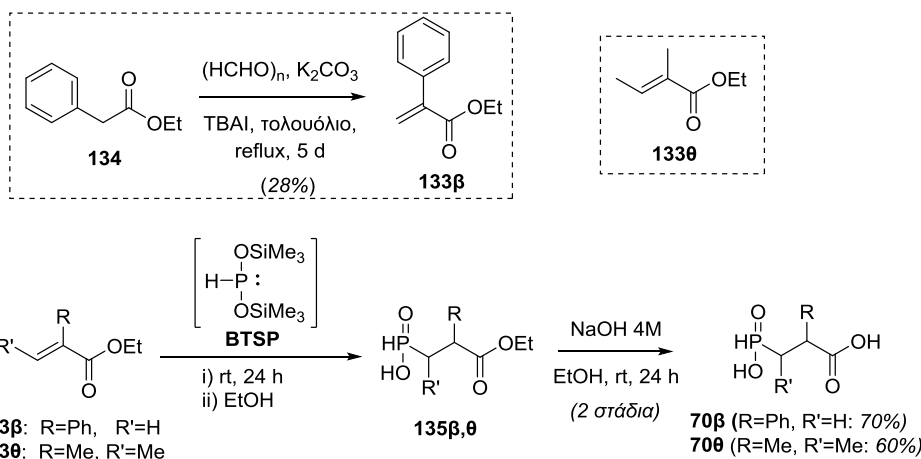


Σχήμα 66: Σύνθεση H-φωσφινικού διοξέος 70i

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προστασία της αμινομάδας της 3-βρωμοπροπυλαμίνης με την Boc ομάδα, με χρήση $\text{Boc}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$ σε DCM. Ακολούθησε αποπρωτονίωση του τρικαρβοξυλικού αιθυλεστέρα **130** με την επίδραση K_2CO_3 σε μίγμα DMF/τολουολίου και *in situ* αλκυλίωση από το βρωμίδιο **131**. Σαπωνοποίηση του τριεστέρα **132** παρουσία KOH/EtOH , συμπύκνωση Knoevenagel του παραγόμενου διοξέος **128i** και αντίδραση P-Michael του ακρυλικού οξέος **124i** με BTSP οδήγησε στο τελικό διοξύ **70i** σε απόδοση 3 σταδίων 35%.

δ) Σύνθεση των H-φωσφινικών διοξέων 70β, 70θ.

Για τα φωσφινικά διοξέα **70β** και **70θ** χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση P-Michael οι ακρυλικοί αιθυλεστέρες **133β** και **133θ**, αντί των αντίστοιχων ακρυλικών οξέων, καθώς το **133β** παρασκευάζεται εύκολα, σε ένα βήμα από τον εμπορικά διαθέσιμο 2-φαινυλο-οξικό αιθυλεστέρα (**134**), ενώ ο αιθυλεστέρας του τιγκλικού οξέος (**133θ**) ήταν επίσης διαθέσιμος. Ασφαλώς, στο τέλος της σύνθεσης πραγματοποιήθηκε σαπωνοποίηση για την παραλαβή των επιθυμητών διοξέων, όπως περιγράφεται στο Σχήμα 67.

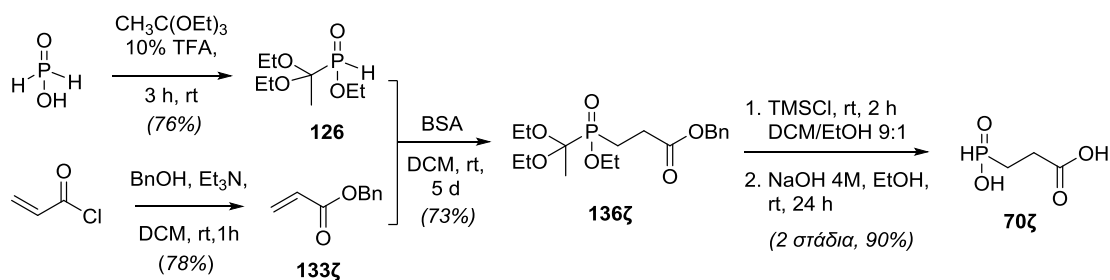


Σχήμα 67: Σύνθεση των *H*-φωσφινικών διοξέων 70β και 70θ

Συγκεκριμένα, για τη σύνθεση του ακρυλικού παραγώγου **133β** πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του εστέρα **134** με παραφορμαλδεΐδη, K_2CO_3 ως βάση και TBAI ως καταλύτη μεταφοράς φάσης [198]. Οι ενώσεις **133β** και **133θ** υποβλήθηκαν σε αντίδραση *P*-Michael με χρήση περίσσειας BTSP (5 equiv) ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός διυποκατεστημένων παραπροϊόντων. Σαπωνοποίηση των εστέρων **135β** και **135θ** οδήγησε στα τελικά προϊόντα **70β** και **70θ** σε αποδόσεις 2 σταδίων 70% και 60%, αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι στο προϊόν **70θ** διαπιστώθηκε, όπως αναμενόταν, η ύπαρξη δύο διαστερεοϊσομερών με φασματοσκοπία ^{31}P -NMR σε αναλογία 70:30. Έγιναν προσπάθειες κρυστάλλωσης στο διοξύ **70θ** σε Et_2O , όπου παρατηρήθηκε ο εμπλουτισμός του στερεού προϊόντος στο κύριο διαστερεοϊσομερές της ένωσης σε αναλογία 93/7.

ε) Σύνθεση του *H*-φωσφινικού διοξέος 70ζ.

Προσπάθειες σύνθεσης του φωσφινικού διοξέος **70ζ** από BTSP και ακρυλικό οξύ αποδείχτηκαν ανεπιτυχείς λόγω παράπλευρων αντιδράσεων. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μια ηπιότερη μέθοδος που περιγράφεται στο Σχήμα 68 και βασίζεται στην ρετροσυνθετική πορεία Β του Σχήματος 63.

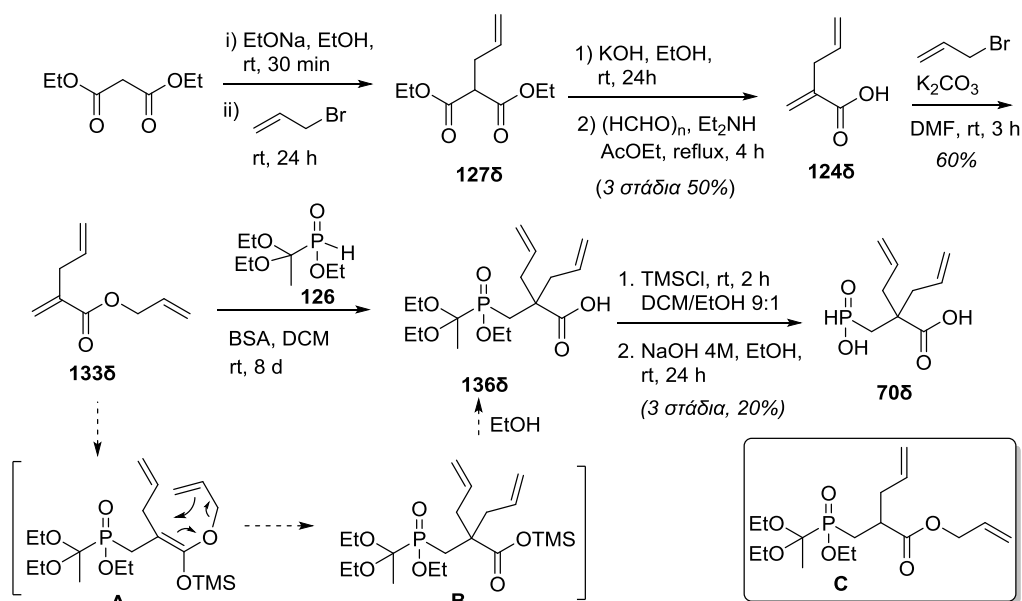


Σχήμα 68: Σύνθεση Σύνθεση *H*-φωσφινικού διοξέος 70ζ

Συγκεκριμένα, αρχικά, συντέθηκε το παράγωγο **126** (αντιδραστήριο Ciba-Geigy) από άνυδρο H_3PO_2 και περίσσεια ορθοοξικού τριαιθυλεστέρα παρουσία TFA σε αδρανή ατμόσφαιρα ώστε να αποφευχθεί η οξειδωση του ατόμου P από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο [199]. Επίσης, παρασκευάστηκε ο εστέρας **133ζ** με εστεροποίηση του ακρυλίου χλωριδίου και της βενζυλικής αλκοόλης παρουσία Et_3N , σε απόδοση 78%. Ακολούθησε αντίδραση των **126** και **133ζ** με τη χρήση του σιλυλιωτικού αντιδραστήριου BSA για την μετατροπή του **126** στην σιλυλιωμένη P(III) δραστική μορφή και ανάδευση επί 5 ημέρες σε rt, οπότε παρελήφθη το προϊόν **136ζ** σε απόδοση 73% μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Τέλος, η ένωση **136ζ** αποπροστατεύτηκε με χρήση αρχικά TMSCl σε διαλύτη DCM/EtOH 9/1 για τη διάσπαση της διαιθοξυαιθυλο ομάδας και στη συνέχεια συνθηκών σαπωνοποίησης για την παραλαβή του **70ζ** σε απόδοση 2 σταδίων 90%.

στ) Σύνθεση του Η-φωσφινικού διοξέος 70δ.

Για τη σύνθεση του **70δ** συντέθηκε αρχικά το ακρυλικό οξύ **124δ** μέσω της πορείας που περιλαμβάνει αλλυλίωση του μηλονικού διαιθυλεστέρα, σαπωνοποίηση και συμπύκνωση Κορνεβελ με απόδοση 3 σταδίων 50%. Ακολούθησε εστεροποίηση του οξέος **124δ** με χρήση αλλυλο-βρωμιδίου παρουσία βάσης K_2CO_3 σε διαλύτη DMF και απόδοση 60% (Σχήμα 69).

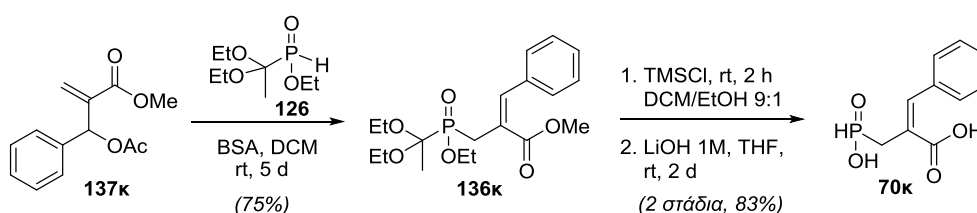


Σχήμα 69: Σύνθεση Η-φωσφινικού διοξέος 70δ

Στη συνέχεια, με βάση μια βιβλιογραφική μέθοδο που έχει αναπτυχθεί από το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του ΕΚΠΑ [200], πραγματοποιήθηκε αντίδραση του **126** με το **133δ** κατά την οποία συμβαίνουν διαδοχικά μια *P*-Michael προσθήκη του **126** στο **133δ** προς τον σχηματισμό του ενολικού ενδιάμεσου **A** και μια μετάθεση Ireland-Claisen προς το προϊόν **136δ** έπειτα από διάσπαση των σιλυλεστέρων με EtOH (Σχήμα 69). Επιλέχθηκε το BSA ως σιλυλιωτικό αντιδραστήριο (αντί του BTSP) ώστε να αποφευχθούν οι έντονες συνθήκες που θα ευνοούσαν την *in situ* πρωτονίωση του **A** προς το ανεπιθύμητο προϊόν **C**. Η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών της αντίδρασης (equiv BSA, χρόνος αντίδρασης) κρίθηκαν με την πραγματοποίηση δοκιμαστικών αντιδράσεων σε διαλύτη CDCl₃ παρακολουθώντας τις μεταβολές στη χημική μετατόπιση του ατόμου P σε φάσμα ³¹P-NMR. Βρέθηκε λοιπόν ότι απαιτούνται 4 ισοδύναμα BSA για την πλήρη μετατροπή του **126** στον ενδιάμεσο σιλυλιωμένο φωσφονίτη (~149 ppm) και 8 ημέρες ανάδευσης σε rt. Ακολούθησε η αποπροστασία της ένωσης **136δ**, όπως και στην περίπτωση του **136ζ**, και παρελήφθη το επιθυμητό προϊόν **70δ** με απόδοση 3 σταδίων 20%.

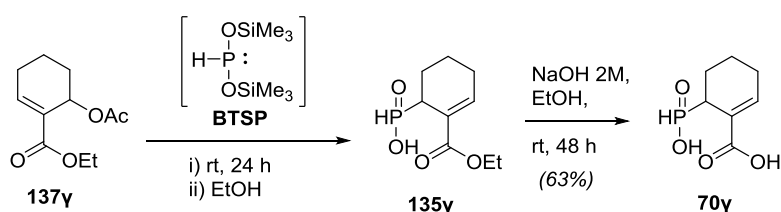
ζ) Σύνθεση των Η-φωσφινικών διοξέων 70γ, 70κ.

Για την σύνθεση του ακόρεστου φωσφινικού διοξέος **70κ** χρησιμοποιήθηκε μια εναλλακτική πορεία που δεν βασίζεται στην κλασική πορεία μέσω αντίδρασης *P*-Michael, αλλά σε μια αλλυλική υποκατάσταση με χρήση του οξικού αλλυλεστέρα **137κ** [201]. Η ένωση **136κ** παρελήφθη σε απόδοση 75%, έπειτα από χρωματογραφικό καθαρισμό και οδήγησε στο διοξύ **70κ** έπειτα από αποπροστασία σε απόδοση 2 σταδίων 83% (Σχήμα 70). Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την τελική σαπωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε 1M LiOH/THF ώστε να αποφευχθεί η χρήση αλκοόλης που θα μπορούσε να οδηγήσει σε παραπροϊόντα προσθήκης αλκοξειδίου στον διπλό δεσμό.



Σχήμα 70: Σύνθεση Η-φωσφινικού διοξέος **70κ**

Στην παραπάνω σύνθεση επιλέχθηκε η ρετροσυνθετική πορεία B αντί της A (μέθοδος με BTSP, Σχήμα 63) διότι στην πορεία A όπου εφαρμόζονται έντονες συνθήκες και χρησιμοποιείται περίσσεια BTSP θα σχηματίζονταν παραπροϊόντα λόγω της ανεπιθύμητης προσθήκης P(III) στο συζυγιακό σύστημα του προϊόντος **136κ**. Το πρόβλημα αυτό δεν εμφανίζεται στην περίπτωση της ένωσης **70γ** η οποία δεν υφίσταται επιπλέον *P*-Michael προσθήκη, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία [201]. Το τελικό προϊόν **70γ** παρελήφθη έπειτα από σαπωνοποίηση της ένωσης **135δ**, η οποία ήταν ήδη διαθέσιμη στο εργαστήριο, σε απόδοση 63%.



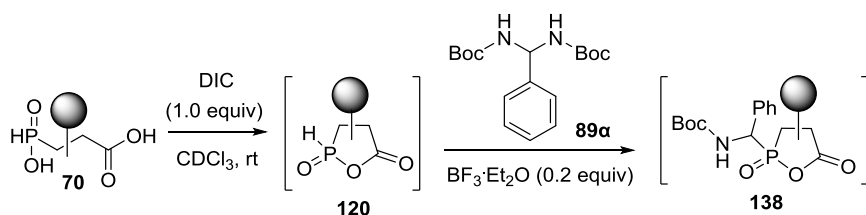
Σχήμα 71: Σύνθεση *H*-φωσφινικού διοξέος **70γ**

4.8.1.2 Παρακολούθηση των αντιδράσεων με φασματοσκοπία ^{31}P -NMR

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η μελέτη των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης των **70α-κ** με την *N*-Boc-αμινάλη **89α**, η οποία πραγματοποιήθηκε με παρακολούθηση των αντιδράσεων μέσω φασματοσκοπίας NMR και είχε στόχο να σε απαντήσει σε 2 βασικά ερωτήματα: α) πώς επηρεάζεται ο σχηματισμός του προτεινόμενου ενδιάμεσου κυκλικού ανυδρίτη τύπου **120α** από τα δομικά χαρακτηριστικά του φωσφινικού διοξέος, β) πώς διαφοροποιείται η ταχύτητα αμιδοακυλίωσης ανάλογα με τη δομή του **120** (και κατ'επέκταση του **70**).

Προσθήκη 1 equiv DIC σε διάλυμα των διοξέων τύπου **70** σε CDCl_3 οδήγησε σε όλες τις περιπτώσεις σε αυθόρμητο σχηματισμό ενός ενδιάμεσου που αποδίδεται στον κυκλικό ανυδρίτη τύπου **120**. Καταγράφηκαν οι τιμές των ^{31}P -χημικών μετατοπίσεων των **120** (Πίνακας 13) και στη συνέχεια προστέθηκε η *N*-Boc-αμινάλη **89α** και ο καταλύτης 20% $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Η πρόοδος της αντίδρασης καταγράφηκε από την παρακολούθηση των κορυφών του σχηματιζόμενου ενδιάμεσου προϊόντος τύπου **138** (επίσης κυκλικός μικτός ανυδρίτης). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων και η αναλογία των κορυφών που αντιστοιχούν στο **138** φαίνονται στον Πίνακα 13.

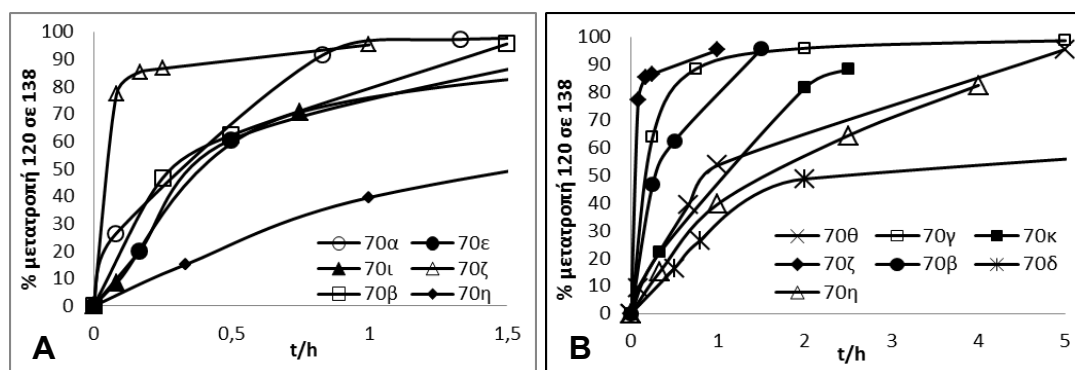
Πίνακας 13: Δομές και ^{31}P χημικές μετατοπίσεις των ενδιάμεσων 120 και 138^α.



	Ανυδρίτης 120	$\delta(^{31}\text{P})$ (ppm) (αναλογία)	Ανυδρίτης 138	$\delta(^{31}\text{P})$ (ppm) (αναλογία)
α		36.6, 37.5 (60:40)		53.4, 55.2, 58.5, 59.1 (14:10:39: 37)
β		34.0, 36.4 (50:50)		51.1, 53.8, 55.3, 58.0 (9:8:40:39)
γ		34.9, 43.7 (60:40)		51.7, 53.0, 56.4, 56.6 (7:35:7:51)
δ		34.2		51.1, 56.2 (19:81)
ε		34.3, 36.6 (55:45)		53.3, 55.3, 58.9, 59.5 (11:9:38:42)
ζ^β		31.0		60.3, 62.0 (37:63)
η		35.8, 37.9 (28:72)		53.3, 53.4, 56.7, 57.6 (50:9:29:12)
θ^γ		41.5, 47.8 (40:60)		56.1, 57.6, 58.2, 61.9 (33:26:14:27) (6:34:6:54) ^ε
θ^δ		38.0, 47.6 (64:36)		53.6, 55.0, 58.4, 59.7 (49:3:5:43)
ι		34.3, 36.5 (53:47)		53.4, 54.6, 57.5, 58.9 (18:12:37:33)
κ		31.3		49.6, 53.9 (21:79)

^α Οι αντιδράσεις παρακολούθηθηκαν με ^{31}P -NMR. ^β διαλύτης DMF/ CDCl_3 5/1 ^γ Αντιστοιχεί στο κύριο ισομερές από κρυστάλλωση του **70θ**. ^δ Αντιστοιχεί στο δευτερεύον ισομερές από διηθήματα της κρυστάλλωσης του **70θ**. ^ε Η 1^H αναλογία ελήφθη σε 40 min και η 2^H σε 5 h.

Επίσης, μέσω των ολοκληρώσεων των φασμάτων ^{31}P -NMR κατά την πορεία της αντίδρασης, εξήχθησαν οι παρακάτω καμπύλες μετατροπής του κυκλικού *H*-φωσφινικού ανυδρίτη **120** στο ενδιάμεσο **138** σε κάθε περίπτωση (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του **89α** και υποστρωμάτων τύπου **70** με $\text{DIC}/\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ σε rt.

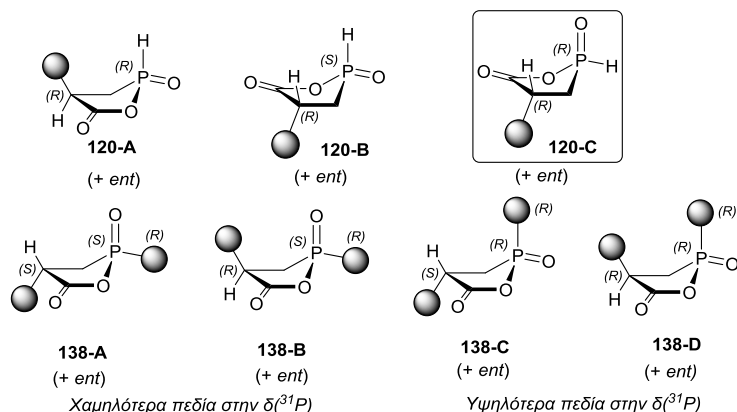
Από τα παραπάνω δεδομένα μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα.

α) Σε όλες τις περιπτώσεις ο αριθμός των κορυφών είτε για το **120** είτε για το **138** είναι ο αναμενόμενος, γεγονός που επιβεβαιώνει έτι περαιτέρω την υπόθεση του ενδιάμεσου κυκλικού ανυδρίτη.

β) Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση ενός εκ των δύο ισομερών του **120** με διαφορετική ταχύτητα, συνεπώς η στεreoχημεία του ατόμου *P* δεν φαίνεται να επηρεάζει την ταχύτητα της αντίδρασης.

γ) Τα διοξεία με έναν υποκαταστάτη στην α-θέση **70α,β,ε** και **ι** έχουν παρόμοια δραστηριότητα, όπως φαίνεται από την Εικόνα 49Α. Επίσης, σε αυτές τις περιπτώσεις τα δύο διαστεροϊσομερή του **120** δημιουργήθηκαν σε παρόμοια ποσοστά κατά την κυκλοποίηση καθώς οι αναλογίες κυμαίνονται από 60:40 έως 50:50. Οι χημικές μετατοπίσεις του **120** στο φάσμα ^{31}P -NMR είναι παραπλήσιες και θεωρούμε ότι αποδίδονται στις διαμορφώσεις **120-A** και **120-B** της Εικόνας 50. Στις δομές αυτές η σχετική θέση των ατόμων *O* στο σύστημα του ανυδρίτη είναι ίδια με αποτέλεσμα να αναμένεται παρόμοια συμπεριφορά στην μετατόπιση του ^{31}P . Οι διαμορφώσεις **120-B** και **-C**, αν και έχουν παρόμοιες στεreoχημικές απαιτήσεις, θα περιμέναμε να διαφέρουν στη χημική μετατόπιση του ^{31}P λόγω της διαφορετικής διεύθυνσης του συστήματος του ανυδρίτη. Βιβλιογραφικό ανάλογο αποτελεί η μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία έως και ~ 6 ppm κυκλικών

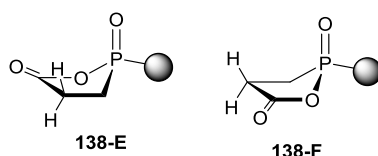
φωσφονικών εστέρων όπου ο δεσμός P=O βρίσκεται σε ισημερινή θέση σε σχέση με την αξονική διαμόρφωση [202, 203].



Εικόνα 50: Δομές πιθανών διαμορφώσεων των κυκλικών ανυδριτών 120 και 138.

δ) Στις ίδιες περιπτώσεις, παράγεται το ενδιαμέσο προϊόν **138** με παρόμοιο προφίλ στο φάσμα ^{31}P -NMR: δύο μικρότερες κορυφές σε υψηλότερα πεδία και δύο μεγαλύτερες 4-5 ppm προς χαμηλότερα πεδία. Έτσι, εδώ αναμένεται να έχουμε διαμορφώσεις με διαφορετική διευθέτηση O στο σύστημα του ανυδρίτη. Με δεδομένο ότι όλα τα προϊόντα μετά την κατεργασία ελήφθησαν ως μίγμα 1:1 διαστερεοϊσομερών, η περίπτωση να έχει πραγματοποιηθεί η αμιδοακυλίωση διαστερεοεκλεκτικά σε σχέση με το στερεογονικό κέντρο της **70** αποκλείεται. Επίσης, με δεδομένο ότι η στερεοχημική απεικόνιση του ατόμου P πηγαίνοντας από το **120** στο **138** δεν μεταβάλλεται, οι διαμορφώσεις που έχουν την μικρότερη στερεοχημική παρεμπόδιση και ικανοποιούν όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις θα είναι οι **138-A** και **-B** για τις κορυφές σε χαμηλότερα πεδία και οι **138-C** και **-D** για εκείνες που εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία (Εικόνα 50). Πράγματι, οι διαμορφώσεις **138-C** και **-D** χαρακτηρίζονται από υψηλότερη στερεοχημική παρεμπόδιση από τις **138-A** και **-B** και για τον λόγο αυτό οι δεύτερες παράγονται σε χαμηλότερο ποσοστό.

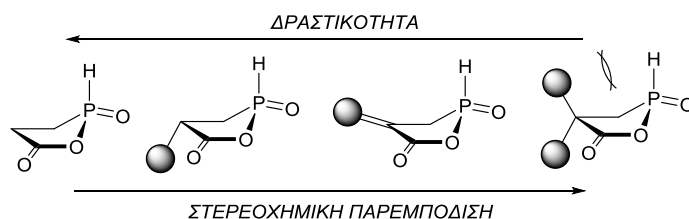
ε) Απομάκρυνση του υποκαταστάτη προκαλεί επιτάχυνση στην αντίδραση αμιδοακυλίωσης σε σχέση με την ύπαρξη ενός υποκαταστάτη. Αυτό γίνεται εμφανές από τη σύγκριση της μετατροπής του **70z** με όλες τις άλλες περιπτώσεις της Εικόνας 49B. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι δύο κορυφές του **138z** εμφανίζονται σε χαμηλά πεδία που παραπέμπει σε δομές όπως οι **138E** και **138F** (Εικόνα 51).



Εικόνα 51: Πιθανές διαμορφώσεις 138E και 138F.

στ) Στην Εικόνα 49B, εξαίρεση αποτελεί το **70η** που αντιδρά πολύ πιο αργά σε σχέση με τα υπόλοιπα. Εξετάζοντας τις ^{31}P -NMR μετατοπίσεις του **120η** παρατηρούμε ότι ενώ βρίσκεται σε παρόμοιες μετατοπίσεις με τα υπόλοιπα, η αναλογία είναι 28:72. Ίσως, λόγω της αυξημένης στερεοχημικής παρεμπόδισης ο σχηματισμός του πιο παρεμποδισμένου **120A** πιθανώς να μην ευνοείται. Εάν το **120A** είναι σε έλειμμα αυτό σημαίνει ότι οι παραγόμενες από αυτό **138-A** (χαμηλότερα πεδία) και **-D** (υψηλότερα πεδία) θα είναι επίσης σε έλειμμα σε σχέση με τις **138-B** και **-C**, ένα προφίλ που επιβεβαιώνεται.

ζ) Αρκετές διαφοροποιήσεις στην ταχύτητα των αμιδοαλκυλιώσεων παρατηρούνται στο γράφημα της Εικόνας 49B. Και εδώ, το μη υποκατεστημένο υπόστρωμα **70ζ** αντέδρασε ταχύτερα από τα υπόλοιπα. Η επιβράδυνση της αντίδρασης με την προσθήκη υποκαταστατών γίνεται εμφανής από το γεγονός ότι όταν προστέθηκαν δύο υποκαταστάτες (**70δ**) παρατηρήθηκε η πιο αργή αντίδραση σε σχέση με όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν. Επίσης, η ταχύτητα για το **70κ** φαίνεται να είναι ενδιάμεσα από το μονοϋποκατεστημένο **70β** και το διϋποκατεστημένο **70δ**, γεγονός που δικαιολογείται από την επίδραση της στερεοχημικής παρεμπόδισης στην διαμόρφωση του κυκλικού ανυδρίτη **120** (Εικόνα 52).

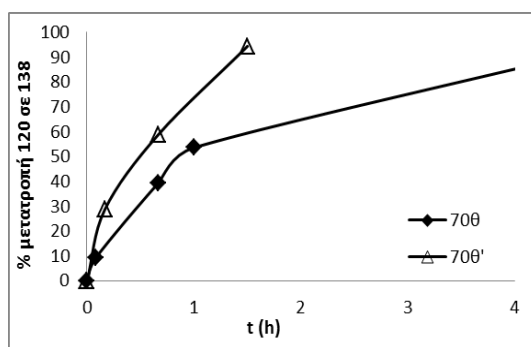


Εικόνα 52: Επίδραση της στερεοχημικής παρεμπόδισης στη δραστηκότητα του **120**.

η) Εντυπωσιακή ήταν η δραστηκότητα που επέδειξε το **70γ** ($2^{\text{η}}$ ταχύτερη αντίδραση μετά το μη υποκατεστημένο **70ζ**). Αν και η διαμορφωτική ανάλυση του δικυκλικού συστήματος είναι πολύπλοκη, έχει ενδιαφέρον ότι η ^{31}P -NMR χημική μετατόπιση του δευτερεύοντος ισομερούς **120γ** βρίσκεται 8.8 ppm προς χαμηλότερα πεδία σε σχέση με το κύριο ισομερές που παραπέμπει σε μια δομή αντίστοιχη με το **120C**,

η 2^η μεγαλύτερη τιμή που συναντήσαμε κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης. Ενδεχομένως, η γωνιακή τάση λόγω διαμορφωτικών περιορισμών του συστήματος να ελατώνεται μετά την αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης και αυτό να προκαλεί την παρατηρούμενη αυξημένη ταχύτητα.

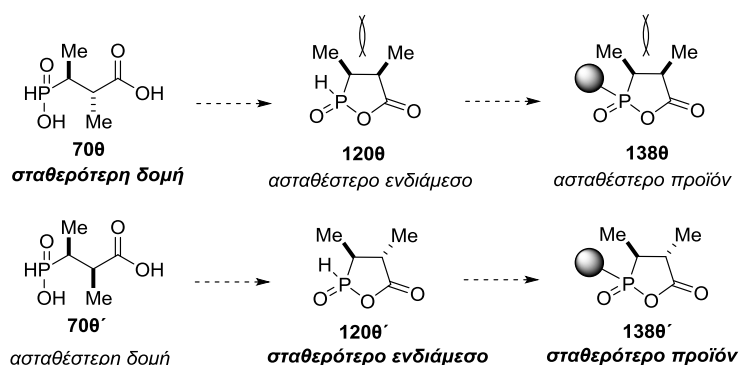
θ) Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του **70θ** (κύριο διαστερεοϊσομερές) και **70θ'** (εμπλουτισμένο στο δευτερεύον διαστερεοϊσομερές) τα οποία υποβλήθηκαν ξεχωριστά σε αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης και η σύγκριση της ταχύτητας μετατροπής τους φαίνεται στην Εικόνα 53.



Εικόνα 53: Σύγκριση της ταχύτητας μετατροπής για τα φωσφινικά διοξείδια **70θ** και **70θ'** κατά την αντίδρασή τους με το **89α** και $\text{DIC}/\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ σε rt.

Πριν την κυκλοποίηση, η δομή που αντιστοιχεί στο κρυσταλλικό κύριο ισομερές **70θ** είναι αυτή που απεικονίζεται στο Σχήμα 72 (με βάση δεδομένα από την ερευνητική εργασία του υποψήφιου διδάκτορα Κωνσταντίνου Βορεάκου) και, επομένως, το δευτερεύον ισομερές αντιστοιχεί στο **70θ'**. Είναι χαρακτηριστικό ότι ένα από τα ισομερή των **120θ** και **120θ'** εμφανίζεται στο φάσμα ^{31}P -NMR σε ιδιαίτερως χαμηλά πεδία (47.8 και 47.6 ppm αντίστοιχα) σε σχέση με όλα τα ενδιάμεσα **120** που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 13, γεγονός που φαίνεται να σχετίζεται με την επίδραση του υποκαταστάτη στην β-θέση. Πρέπει να τονιστεί, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 72, ότι από άποψη σταθερότητας λόγω στερικών παρεμποδίσεων, η σταθερότερη δομή **70θ** αναμένεται να οδηγήσει στους ασταθέστερους κυκλικούς *cis*-υποκατεστημένους ανυδρίτες **120θ** και **138θ**, ενώ το αντίστροφο θα ισχύει για το **70θ'**. Η αστάθεια του *cis*-υποκατεστημένου συστήματος και στην μεταβατική κατάσταση πιθανώς να ερμηνεύει και τη διαφορετική ταχύτητα αντίδρασης των **70θ** και **70θ'**. Η ασταθέστερη *cis*-διευθέτηση των Me υποκαταστατών στο **138θ** προκαλεί μια ιδιαίτερη συμπεριφορά που δεν

παρατηρήθηκε ούτε στο **138θ'**, αλλά ούτε και σε κανένα ενδιάμεσο τύπου **138** από όσα μελετήθηκαν και παρατίθενται στον Πίνακα 13: την αλληλομετατροπή των ισομερών, προκειμένου το σύστημα να μεταπέσει σε μια όσο το δυνατόν σταθερότερη κατάσταση. Η ισομερείωση αυτή αφορά το στερεογονικό κέντρο του P (πιθανή ισομερείωση του χειρόμορφου κέντρου στον α-C του ανυδρίτη θα οδηγούσε σε ισομερή με *trans*-διευθέτηση των Me) και είναι εμφανής από την αναλογία των ισομερών του **138θ** σε 40min και 5h αντίδρασης (Πίνακας 13). Η ισομερείωση του ατόμου P θα ήταν εφικτή μέσω ενδιάμεσων όπου αυτό αποκτά δομή τριγωνικής διπυραμίδας, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως ψευδοπεριστροφή κατά Berry. Η ενέργεια για μια τέτοια μετατροπή μπορεί να προσφερθεί από την υψηλή γωνιακή τάση του *cis*-υποκατεστημένου συστήματος και το γεγονός ότι παρατηρείται μόνο στην περίπτωση του κρυσταλλικού προϊόντος ενισχύει την αρχική στερεοχημική αποτίμηση των **70θ** και **70θ'**.



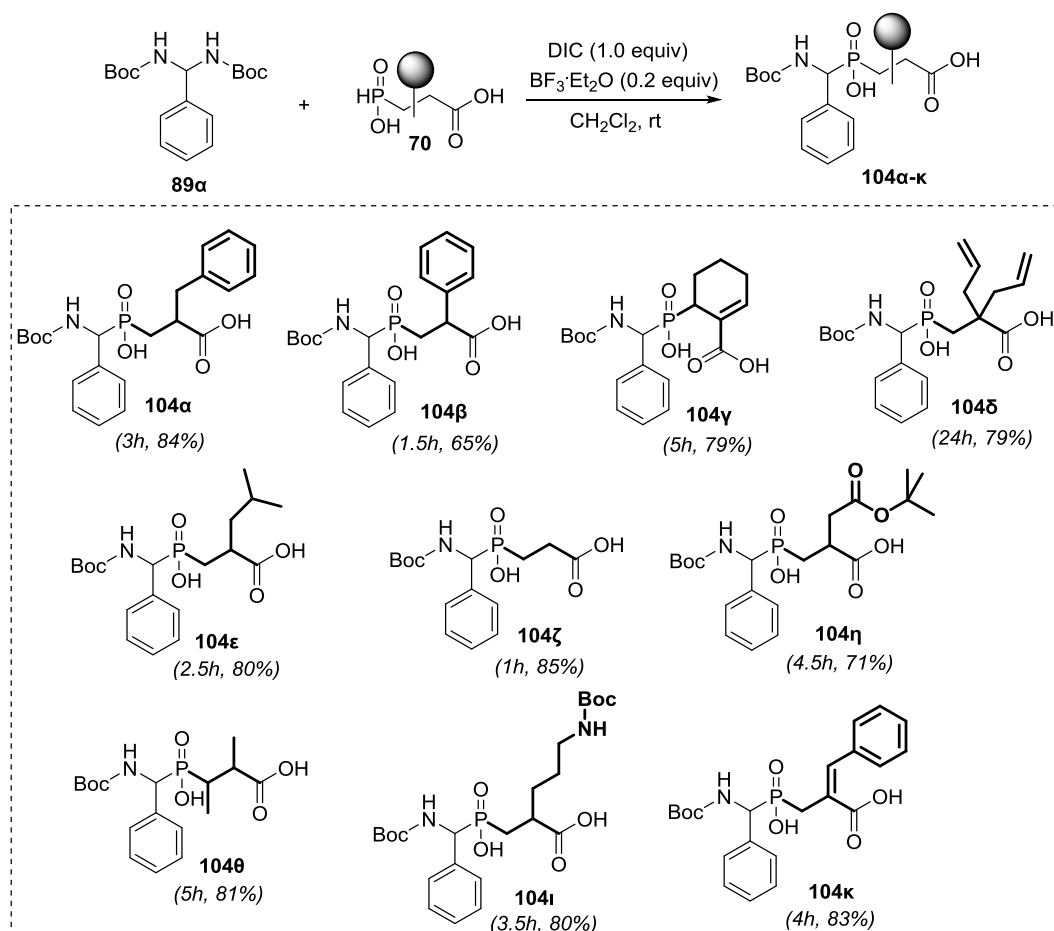
Σχήμα 72: Προτεινόμενες στερεοχημικές δομές των **70θ,θ', **120θ,θ'**, και **138θ,θ'****

ι) Όπως εξάγεται από τη συσχέτιση των διαστερεοϊσομερικών αναλογιών των **120** και **138** για τις περιπτώσεις **α,β,ε** και **ι**, το άτομο P δεν υφίσταται ισομερείωση κατά την αντίδραση της αμιδοαλκυλίωσης. Η μεταφορά της στερεοχημικής πληροφορίας από το **120** στο **138** σημαίνει ότι η κατανάλωση της P(III) μορφής κατά την $P(V) \rightarrow P(III)$ ταυτομερείωση του **120** είναι ταχύτατη και δεν επιτρέπει στο άτομο P να υποστεί πυραμιδική αναστροφή.

4.8.1.3 Σύνθεση τελικών φωσφινικών διοξέων τύπου **104** της Σειράς A

Από τη μελέτη της ταχύτητας μετατροπής των ενώσεων τύπου **70** που αναλύθηκε νωρίτερα, εκτιμήθηκε ο κατάλληλος χρόνος για αποτελεσματική μετατροπή στα προϊόντα **104** και οι αντιδράσεις επαναλήφθηκαν σε παρασκευαστική κλίμακα υπό τις βελτιστοποιημένες συνθήκες και σε διαλύτη CH_2Cl_2 . Οι τελικές ενώσεις **104α-κ**

παρελήφθησαν σε καλές αποδόσεις μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 54:

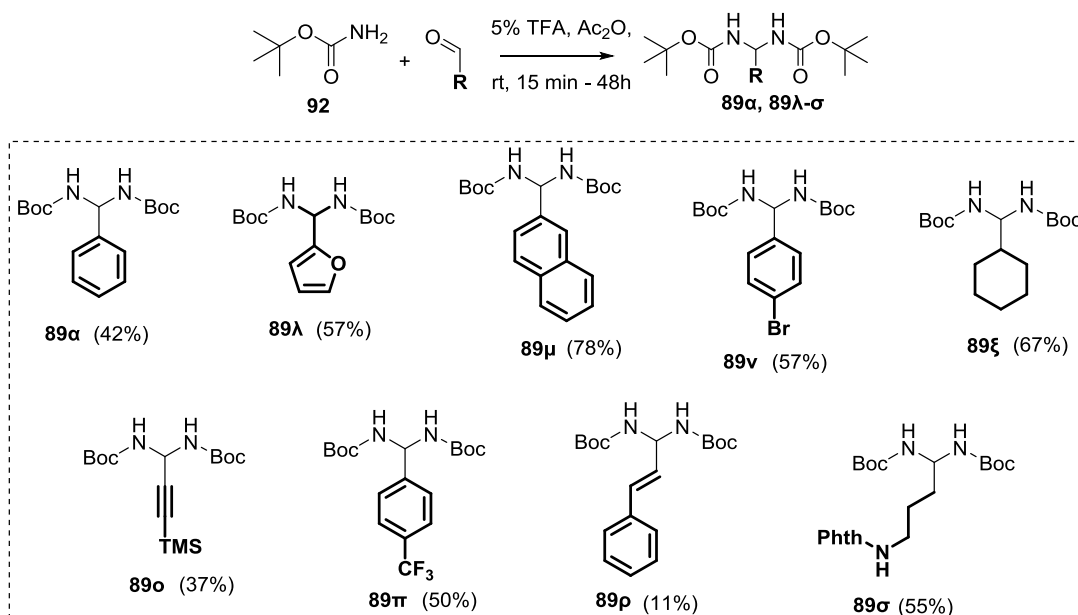


Εικόνα 54: Αποδόσεις απομόνωσης και χρόνοι των αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης του **89α** με τα **70α-κ**

4.8.2 Σειρά Β: Διαφοροποίηση της P_1 θέσης

4.8.2.1 Σύνθεση αρχικών *N*-Boc-αμιναλών

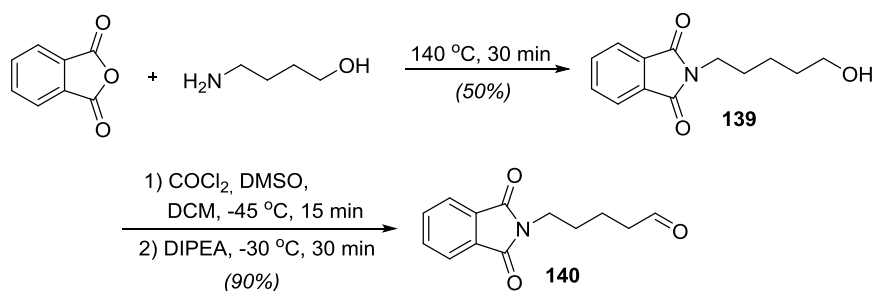
Για τη σύνθεση των μορίων της Σειράς Β απαιτήθηκε η παρασκευή των 10 *N*-Boc-αμιναλών τύπου **89** μέσω της βιβλιογραφικής μεθόδου που περιγράφεται από τον Maruoka και τους συνεργάτες του, μέσω μιας απλής διαδικασίας ενός σταδίου [180]. Η αντίδραση σύνθεσης των 9 εξ'αυτών, καθώς και οι δομές τους φαίνονται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 73:



Σχήμα 73: Σύνθεση και δομές N-Boc-αμιναλών 89α, 89λ-σ

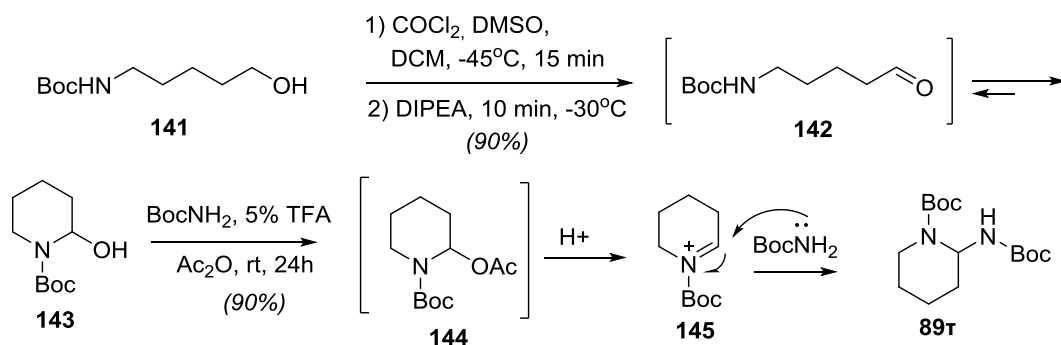
Πιο συγκεκριμένα, οι *N*-Boc-αμινάλες **89α**, **89λ-σ** προέκυψαν από την αντίδραση του Boc-NH₂ (1.67 equiv) με την αντίστοιχη εμπορικά διαθέσιμη αλδεΐδη, σε Ac₂O παρουσία καταλυτικής ποσότητας οξέος TFA (5% mol) σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά έως 48 ώρες ανάδευσης. Οι τελικές *N*-Boc-αμινάλες παρελήφθησαν ως στερεά, σε ικανοποιητικές αποδόσεις (εκτός από την ένωση **89ρ** που ελήφθη σε απόδοση 11%) (Σχήμα 73).

Όσον αφορά τη σύνθεση της *N*-Boc-αμινάλης **89σ**, χρειάστηκε να παρασκευαστεί η κατάλληλα προστατευμένη 5-αμινοπεντανάλη **140** (Σχήμα 74). Ως προστατευτική ομάδα της αμινομάδας, επιλέχθηκε η φθαλούλο ομάδα (Phth), η οποία οδηγεί σε ένα φθαλιμιδικό δακτύλιο. Η επιλογή βασίστηκε στην αδυναμία αυτής της ομάδας να συμμετάσχει σε αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης, όπως θα αναφερθεί παρακάτω για την ένωση **89τ** (Σχήμα 75) η οποία περιέχει μια κλασική προστασία τύπου ουρεθάνης. Η σύνθεση του **140** ξεκίνησε από την σύντηξη της 5-αμινοπεντανόλης με φθαλικό ανυδρίτη στους 140 °C και ακολούθησε οξείδωση Swern της παραγόμενης Phth-προστατευμένης αμινοαλκοόλης **139** [204]. Η αλδεΐδη **140** παρελήφθη σε απόδοση 90% χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό.



Σχήμα 74: Σύνθεση της αλδεύδης **140**

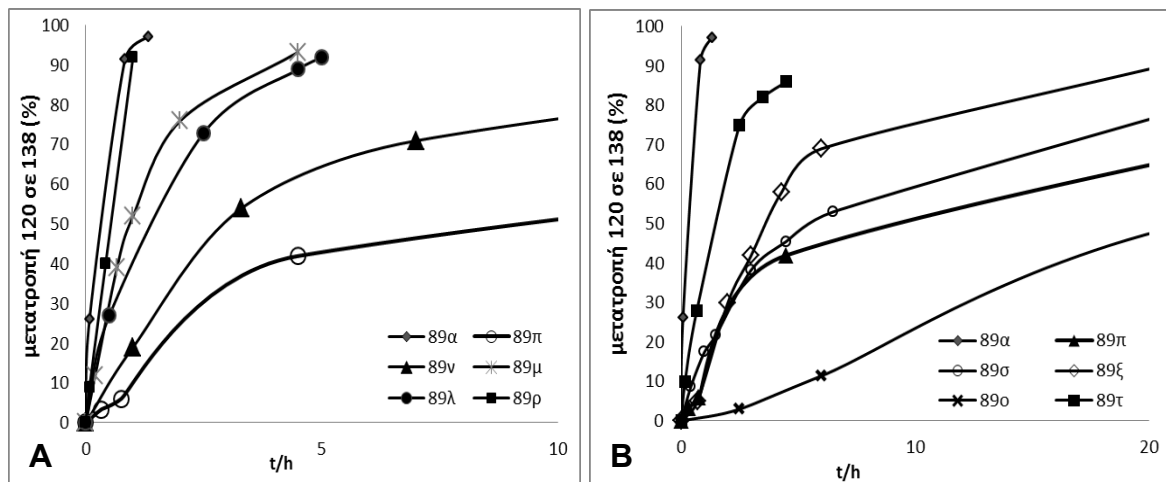
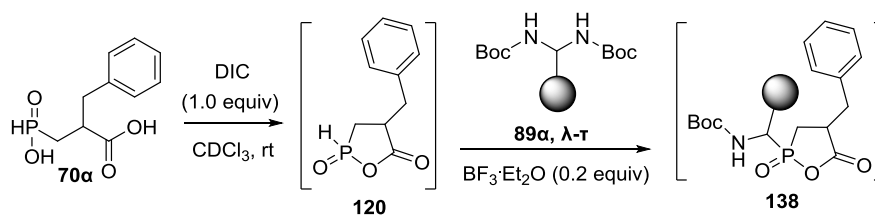
Τέλος, για την σύνθεση της ένωσης **89τ** απαιτήθηκε η σύνθεση της κατάλληλης 5-*N*-Boc-αμινοαλδεύδης **142** (Σχήμα 75). Συγκεκριμένα, αρχικά η 5-*N*-Boc-αμινοπεντανόλη **141** υποβλήθηκε σε οξειδωση Swern όπου παρατηρήθηκε ότι η **142** αυθόρμητα κυκλοποιείται μετά την αντίδραση προς την αντίστοιχη *N*-Boc-2-υδροξυ-πυρρολιδίνη **143** [205]. Με τη χρήση της τελευταίας, ακολούθησε η σύνθεση της *N*-Boc-αμινάλης **89τ** με τη γενική μέθοδο που περιγράφηκε στο Σχήμα 75. Ο μηχανισμός της κυκλοποίησης περιλαμβάνει ακετυλίωση της υδροξυλομάδας της ένωσης **143**, απόσπαση προς το ιμινιακό κατιόν **145** και στη συνέχεια προσβολή από το BocNH₂ προς το σχηματισμό της ένωσης **89τ**.



Σχήμα 75: Σύνθεση της *N*-Boc-αμινάλης **89τ**.

4.8.2.2 Παρακολούθηση των αντιδράσεων με φασματοσκοπία ³¹P-NMR

Όπως έγινε και με τα προϊόντα της Σειράς A, έτσι θελήσαμε και στη Σειρά B να παρακολουθήσουμε τους μετασχηματισμούς μέσω φασματοσκοπίας NMR και να εντοπίσουμε στοιχεία σχετικά με την επίδραση του υποκαταστάτη της *N*-Boc-αμινάλης στην ταχύτητα της αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης. Η μελέτη έγινε με την ίδια μεθοδολογία που ακολουθήθηκε και για τις ενώσεις **104α-κ** (Παράγραφος 4.8.1.2) και τα αποτελέσματα της κινητικής παρακολούθησης των μετατροπών φαίνεται στην Εικόνα 55.



Εικόνα 55: Κινητική παρακολούθηση των αντιδράσεων αμιδοακυλίωσης 2 συστατικών μεταξύ του 70α και *N*-Boc-αμιναλών τύπου 89 με DIC/ BF₃·OEt₂ σε rt

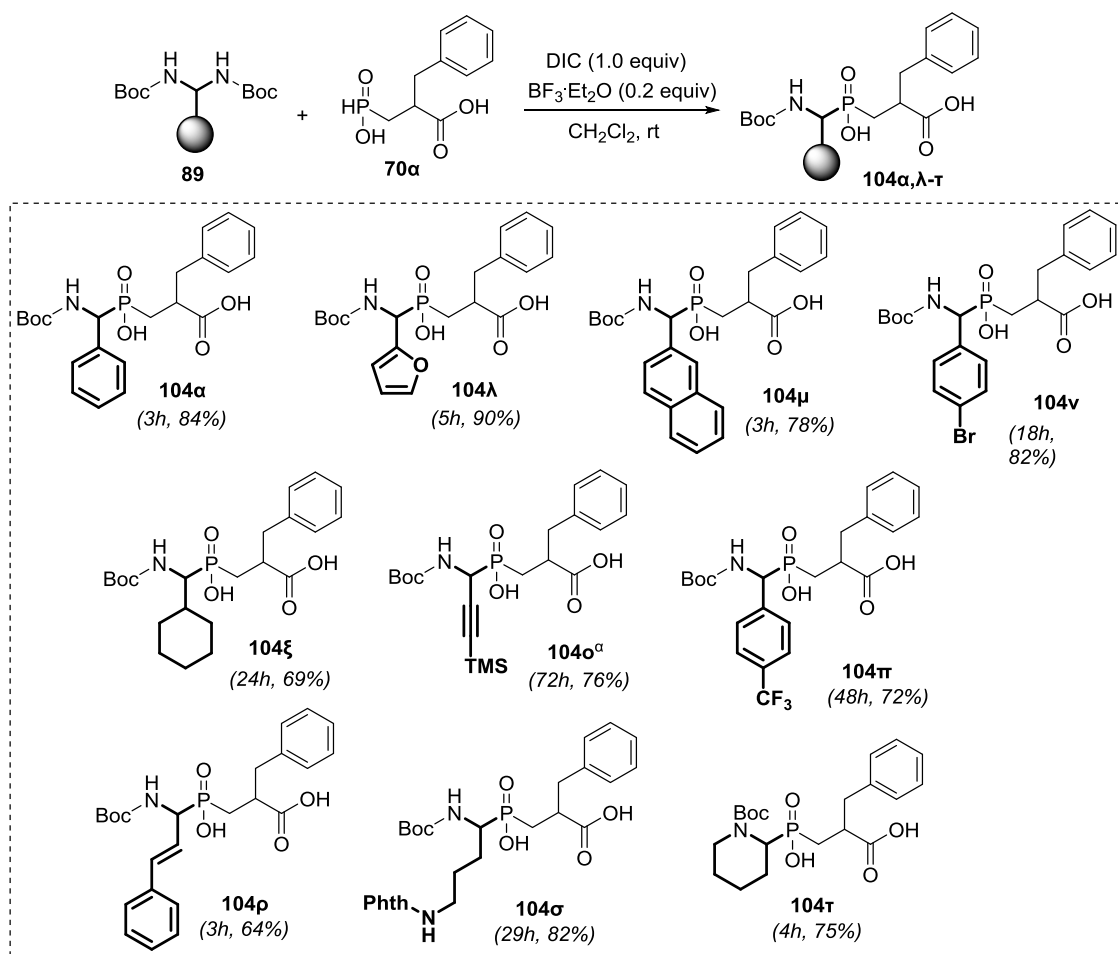
Η πρώτη σειρά των *N*-Boc-αμιναλών των οποίων συγκρίθηκε η δραστηριότητα ήταν οι αμινάλες αρωματικών/αλκένυλο αλδεϋδών **89α**, **89λ-ν** και **89π,ρ** (Εικόνα 55Α). Από τις διαφοροποιήσεις στην ταχύτητα των αντιδράσεων που παρατηρούνται στο γράφημα γίνεται σαφές ότι η δραστηριότητα των *N*-Boc-αμιναλών εξαρτάται από ηλεκτρονιακές και στερικές παραμέτρους του άρυλο/αλκένυλο αυστήματος. Την υψηλότερη ταχύτητα μετατροπής εμφάνισε η μη υποκατεστημένη αμινάλη **89α**, ενώ το νάφθυλο παράγωγο **89μ** αντέδρασε πιο αργά, πιθανώς λόγω στερικών παρεμποδίσεων. Εντυπωσιακά υψηλή δραστηριότητα, παρόμοια με του **89α**, επέδειξε και το στυρένυλο παράγωγο **89ρ** που αναδεικνύει τον ρόλο της συζυγίας στην σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης κατά το σχηματισμό του ενδιάμεσου ιμινιακού κατιόντος (Σχήμα 53). Αντίθετα, αρνητική επίδραση στην ταχύτητα της αντίδρασης είχε η παρουσία ενός επαγωγικού δέκτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας στον αρωματικό δακτύλιο, όπως -Br (**89ν**) ή -CF₃ (**89π**), με το τελευταίο να αποτελεί ένα από τα λιγότερο δραστικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν [206]. Πιθανώς, η παρουσία ηλεκτρονιοελκτικών υποκαταστατών να αποσταθεροποιεί την μεταβατική κατάσταση η οποία θα πρέπει να έχει χαρακτήρα προϊόντος (δηλαδή να έχει χαρακτηριστικά ιμινιακού ιόντος). Αυτό πιθανώς να εξηγεί και την δραστηριότητα του ηλεκτρονικά πλούσιου φουρανικού παραγώγου

89λ, το οποίο μπορεί να σταθεροποιεί την μεταβατική κατάσταση σχηματισμού του ιμινιακού κατιόντος λόγω της ηλεκτρονιοδοτικής επίδρασης του οξυγόνου.

Σημαντικά χαμηλότερες ταχύτητες μετατροπής επέδειξαν οι *N*-Boc-αμινάλες που έφεραν 1^η (**89σ**) ή 2^η (**89ξ**) άλκυλο υποκαταστάτη σε σχέση με τον φαινυλο υποκαταστάτη (**89α**). Η διαφορά αυτή είναι αναμενόμενη με βάση τα όσα συζητήθηκαν νωρίτερα στην Παράγραφο 4.6.12 (Σχήμα 53). Αντίθετα, η κυκλική αλειφατική *N*-Boc-αμινάλη **89τ** αποδείχτηκε πολύ δραστικότερη από την αντίστοιχη (λόγω πρωτοταγούς υποκατάστασης) μη κυκλική **89σ**, γεγονός που ενδεχομένως σχετίζεται στην διαμορφωτικά περιορισμένη δομή του κυκλικού ιμινιακού ιόντος που προκύπτει από το **89τ**. Τέλος, εντυπωσιακή ήταν η χαμηλή δραστικότητα της προπάργυλο αμινάλης **89ο** που έδωσε την πιο αργή αντίδραση σε σχέση με όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Είναι ενδιαφέρον ότι ο Maruoka και οι συνεργάτες του αναφέρουν τη σειρά δραστικότητας αρυλο ~ αλκυνολο > αλκένυλο > αλκυλο στην όξινα καταλυόμενη αντίδραση *N*-Boc-αμιναλών με κετοεστέρες, αν και δεν περιγράφουν λεπτομερώς την παρακολούθηση της κινητικής της αντίδρασης [180]. Με αυτό το δεδομένο, στη δική μας περίπτωση η χαμηλή δραστικότητα του **89ο** πιθανώς να σχετίζεται με την αντίδραση και όχι με τα εγγενή χαρακτηριστικά της ιμίνης.

4.8.2.3 Σύνθεση τελικών φωσφινικών διοξέων τύπου **104** της Σειράς **B**

Όλες οι *N*-Boc-αμινάλες που συντέθηκαν υποβλήθηκαν στην συνέχεια στην τελική αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης με το *H*-φωσφινικό διοξύ **70α** σε διαλύτη CH₂Cl₂ και ο κατάλληλος χρόνος αντίδρασης εκτιμήθηκε από την παρακολούθηση της κινητικής μέσω ³¹P-NMR. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα τελικά Boc-προστατευμένα φωσφινικά ψευδοδιπεπτίδια του τύπου **104** παρελήφθησαν σε καλές αποδόσεις έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Πρέπει να τονιστεί ότι οι ήπιες συνθήκες της αντίδρασης και η ιδιαίτερη δραστικότητα των *N*-Boc-αμιναλών επέτρεψε τη σύνθεση ενώσεων, όπως η **104ο** η οποία περιλαμβάνει μια αμινοφωσφινική ομάδα άγνωστη στη βιβλιογραφία και εξαιρετικά χρήσιμη σε συνθετικές προσεγγίσεις διαφοροποίησης σε τελικό στάδιο. Οι δομές των τελικών ενώσεων τύπου **104**, οι χρόνοι αντίδρασης και οι αποδόσεις απομόνωσης για κάθε περίπτωση συνοψίζονται στην Εικόνα 56.



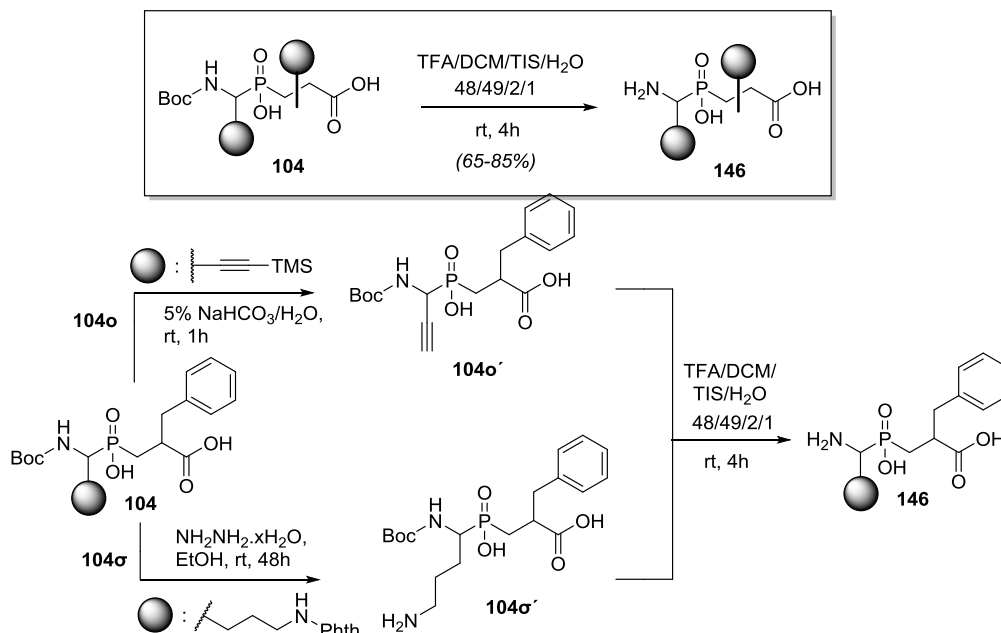
^a χρήση 0.5 eq BF_3 στο TMS προπαργυλο παράγωγο **104ο**

Εικόνα 56: Αποδόσεις απομόνωσης και χρόνοι των αντιδράσεων αμιδοαλκυλίωσης του **70α** με τα **89α,λ-τ**

4.8.3 Αποπροστασία των φωσφινικών διοξέων τύπου **104** και ενζυμική αξιολόγηση των προϊόντων τύπου **146**

Με στόχο την ενζυμική αξιολόγηση των ενώσεων τύπου **104** έναντι των ERAPs, δείγματα σε κλίμακα ~20-40 μmol υποβλήθηκαν σε αποπροστασία προς τα τελικά φωσφινικά διπεπτίδια **146** (Πίνακας 14). Ένα επιπλέον βήμα αποπροστασίας απαιτήθηκε για τις ενώσεις **104ο** και **104σ**, όπως φαίνεται στο Σχήμα 76. Όσον αφορά την αποπροστασία της ένωσης **104ο**, η TMS ομάδα αποσπάστηκε έπειτα από επίδραση 5% υδατικού διαλύματος NaHCO_3 , ενώ για την **104σ** η απομάκρυνση της φθαλόυλο ομάδας πραγματοποιήθηκε με την επίδραση υδατικής υδραζίνης. Τελικά, απομακρύνθηκαν η Boc ομάδα και οι υπόλοιπες προστατευτικές ομάδες από τις ενώσεις τύπου **104** χρησιμοποιώντας διάλυμα

TFA/DCM/TIS/H₂O: 48/49/2/1 (Σχήμα 76). Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα μείγματα συμπυκνώθηκαν και τα υπολείμματα κατεργάστηκαν με ελάχιστη ποσότητα άνυδρου μίγματος PE/Et₂O, οπότε καταβυθίστηκε λευκό στερεό που ξηράνθηκε υπεράνω P₂O₅.

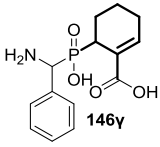
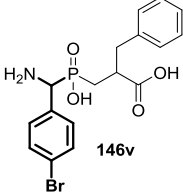
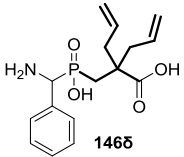
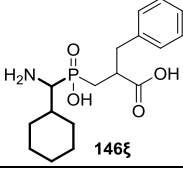
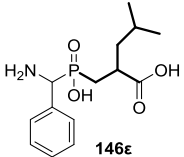
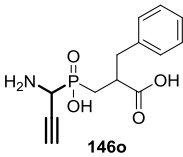
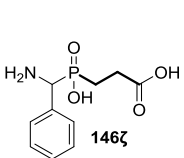
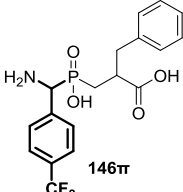
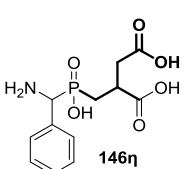
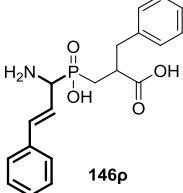
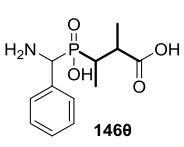
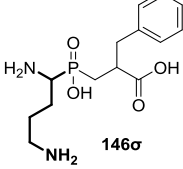
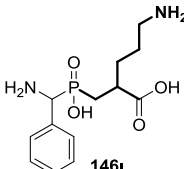
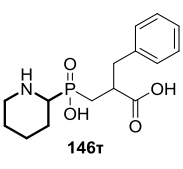
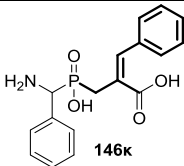


Σχήμα 76: Σύνθεση των ενώσεων 146 μέσω αποπροστασίας των ενώσεων τύπου 104

Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αξιολόγησης των διπεπτιδίων τύπου **104** που πραγματοποιήθηκε στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Ε. Στρατίκου φαίνονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Δομές των ψευδοδιπεπτιδίων 146 και ενζυμική αξιολόγησή τους έναντι των αμινοπεπτιδασών ERAP1, ERAP2 και IRAP.

Ένωση	ERAP1 IC ₅₀ (μM)	ERAP2 IC ₅₀ (μM)	IRAP IC ₅₀ (μM)	Ένωση	ERAP1 IC ₅₀ (μM)	ERAP2 IC ₅₀ (μM)	IRAP IC ₅₀ (μM)
 146α	1.39 (3.87) ^a	1.89 (8.08)	0.157 (0.540)	 146λ	4.61 (3800)	4.00 (95.5)	1.42 (1.20)
 146β	4.23 (22.2)	17.9 (19.1)	6.14 (5.08)	 146μ	5.06 (4.86)	2.27 (4.42)	2.24 (3.33)

 146y	-	-	97.3 (181)	 146v	5.49 (7.15)	1.77 (4.69)	4.17 (3.73)
 146δ	-	-	3.30 (19.8)	 146ξ	6.39 (19.3)	2.91 (7.06)	10.1 (-)
 146ε	4.10 (11.3)	5.17 (7.38)	17.3 (16.5)	 146ο	31.9 (42.0)	21.5 (23.0)	81.3 (159)
 146ζ	34.5 (-)	- (597)	44.8 (43.4)	 146π	8.36 (6.39)	2.86 (6.91)	5.26 (5.80)
 146η	-	122 (-)	104 (78.9)	 146ρ	4.59 (6.05)	1.73 (4.36)	2.42 (2.46)
 146θ	-	-	85.3 (116)	 146σ	-	1.50 (6.69)	0.88 (1.27)
 146ι	-	-	3.06 (5.15)	 146τ	-	-	-
 146κ	-	-	46.5 (64.5)				

^a Οι τιμές IC₅₀ εκτός παρένθεσης αντιστοιχούν στις μετρηθείσες με χρόνο προεπώσσης 20 min και οι τιμές εκτός παρένθεσης τις μετρηθείσες χωρίς προεπώσση.

Από τις τιμές των IC₅₀ του Πίνακα 14 μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

Είναι σαφές πως παρατηρείται μια μεγάλη μείωση της ανασταλτικής ισχύος σχεδόν για όλες τις διπεπτιδικές ενώσεις, σε σχέση με τις τριπεπτιδικές που παρουσιάστηκαν στους Πίνακες 4 και 6. Το γεγονός αυτό εν μέρει οφείλεται στην απουσία P2' θέσης που μειώνει το σύνολο των αλληλεπιδράσεων αναστολέα/ενζύμου και επομένως την παρατηρούμενη ενζυμική συγγένεια, εν μέρει στην απουσία στερεοχημικής καθαρότητας των **146** (μίγματα τεσσάρων διαστερεοϊσομερών) και εν μέρει σε ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων **146** που δεν συναντώνται στις ενώσεις του Κεφαλαίου 3. Σε κάθε περίπτωση, η σύγκριση της ανασταλτικής ισχύος των δομών **146** μπορεί να αποκαλύψει συγκεκριμένες τάσεις που καταγράφονται παρακάτω.

- Μεταξύ των ενώσεων **146α-κ** οι οποίες μοιράζονται τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά στην P₁ θέση και διαφοροποιούνται στην P₁' θέση, μόνο 3 φαίνονται ικανές να αναστείλουν και τα 3 ένζυμα με IC₅₀ < 20μM (**146α, β** και **ε**). Οι ενώσεις περιλαμβάνουν μια αλυσίδα στον α-άνθρακα της P₁' θέσης, δηλαδή εμφανίζουν το κλασικό μοτίβο φωσφινικών πεπτιδίων. Η αλυσίδα αυτή είναι υδρόφοβη και αποτελεί προϋπόθεση για την αναστολή των ERAP1 και ERAP2, καθώς με όξινη (**146η**) ή βασική (**146ι**) πλευρική αλυσίδα δεν παρατηρείται ανασταλτική δράση (μικρή ανασταλτική δράση μόνο για το **146η** έναντι της ERAP2).

- Για τις τρεις παραπάνω ενώσεις, δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά των τιμών IC₅₀ με ή χωρίς προεπώαση, με εξαίρεση ίσως την **146β** για την ERAP1. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο εξ'αρχής αυξημένο ποσοστό κατάλληλων διαμορφώσεων για την ταχεία πρόσδεση των αναστολέων στο ενεργό κέντρο των ERAP1 και ERAP2. Η μικρότερη διαμορφωτική ελευθερία της **146β** πιθανώς να εξηγεί την σημασία της προεπώασης για την αναστολή της ERAP1.

- Οι ενώσεις **146γ, δ, θ, και κ** χαρακτηρίζονται όλες από μικρή διαμορφωτική ελευθερία στην P₁' θέση. Η αδυναμία αυτών των ενώσεων να αναστείλουν τις ERAP1 και ERAP2 πιθανώς να σχετίζεται με την δυσκολία διαμορφωτικής προσαρμογής των ενώσεων αυτών ώστε να αποκτήσουν κατάλληλη διεύθυνση για αποτελεσματική πρόσδεση. Ακόμα και με προεπώαση, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε αναστολή, καθιστώντας τέτοιες δομές ακατάλληλες για ανάπτυξη αναστολέων των ERAP1, ERAP2.

- Σε αντίθεση με τις ERAP1 και ERAP2, η IRAP δεν φαίνεται να επηρεάζεται τόσο έντονα από τους διαμορφωτικούς περιορισμούς των **146γ, δ, θ, και κ** καθώς

σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αναστολή, έστω και ασθενής (με εξαίρεση την **146δ** όπου η αναστολή ήταν σημαντικά ισχυρότερη). Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις η IC₅₀ βελτιώθηκε με προεπάωση, που σημαίνει ότι και στην IRAP απαιτείται διαμορφωτική προσαρμογή για να προσδεθεί ο αναστολέας όμως αυτή μπορεί να είναι πολύ μικρότερη.

- Στην περίπτωση **146ζ**, όπου η απουσία πλευρικής αλυσίδας θα αναμένονταν να οδηγεί σε ευκολότερη προσαρμογή, η ανασταλτική ισχύς είναι πολύ χαμηλή. Προφανώς, η απουσία αλυσίδας μειώνει τις ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις που θα οδηγούσαν σε αυξημένη συγγένεια.

- Περνώντας στις ενώσεις **146λ-τ**, εντύπωση προκαλεί η περίπτωση του φουρανικού παραγώγου **146λ**, όπου π.χ. για την ERAP1 παρατηρήθηκε μια αύξηση της ανασταλτικής ισχύος κατά 3 τάξεις μεγέθους έπειτα από επώαση 20 min. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην αργή διευθέτηση του φουρανικού οξυγόνου προς έναν προσανατολισμό που να είναι κατάλληλος για ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της ERAP1. Μεγάλη βελτίωση της ανασταλτικής ισχύος με προεπάωση παρατηρείται και για την ERAP2.

- Οι υπόλοιπες ενώσεις αυτής της σειράς, με εξαίρεση τις **146σ,τ**, είναι ικανές να αναστείλουν και τα τρία ένζυμα με παρόμοιο ανασταλτικό προφίλ (IC₅₀ 1-10 μM). Απόκλιση από την παραπάνω συμπεριφορά παρατηρείται για την ένωση **148ο** όπου η ανασταλτική ισχύς είναι κατά μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη για όλα τα ένζυμα. Είναι ενδιαφέρον ότι το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο στην IRAP η οποία φαίνεται να έχει πολύ ευρύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τις ERAPs.

- Το προφίλ αναστολής για την ένωση **146σ** φανερώνει την αδυναμία της ERAP1 να δεχτεί αλειφατικά βασικά κατάλοιπα στην S1 κοιλότητά της, σε σχέση με τις ERAP2 και IRAP που αναστέλλονται ισχυρά.

- Τέλος, η ένωση **146τ** δεν κατάφερε να αναστείλλει καμία εκ των αμινοπεπτιδασών, γεγονός που αναδεικνύει την σημασία της πρωτοταγούς αμινομάδας ως βασικό στοιχείο αναγνώρισης των υποστρωμάτων/αναστολέων από τις αμινοπεπτιδάσες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος

5.1.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ενώσεων που περιγράφονται σ' αυτήν την εργασία ήταν εμπορικά προϊόντα των εταιρειών Aldrich, Fluka, Merck, Acros και Alfa Aesar. Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων ήταν 99% και άνω και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι διαλύτες ήταν υψηλής καθαρότητας (99%) των εταιρειών LabScan και Merck. Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε η χρήση ξηρών διαλυτών, οι εμπορικοί διαλύτες υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία (THF: απόσταξη υπεράνω μεταλλικού νατρίου, CH₂Cl₂: ανάδευση με ενεργοποιημένα μοριακά κόσκινα MS 4Å). Οι χλωριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις είχαν ως σταθεροποιητή αμυλένιο.

5.1.2 Χρωματογραφική ανάλυση και χρωματογραφικός καθαρισμός

Για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος (thin layer chromatography, TLC). Οι χρωματογραφικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες πάχους 0.25mm επιστρωμένες με silica gel και φθορίζον υλικό που απορροφά στα 254nm της εταιρείας Merck (Silica gel 60 F254).

Για την εμφάνιση των χρωματογραφιών χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι, ανάλογα με την περίπτωση:

α) Υπεριώδης ακτινοβολία (254nm)

β) Έκθεση σε ατμούς ιωδίου

γ) Ψεκασμός με υδατικό διάλυμα 1% θειϊκού δημητρίου [Ce(SO₄)₂], 5% μολυβδαινικού αμμωνίου [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O] και 10% π. H₂SO₄ και θέρμανση

Μερικά από τα φωσφινικά ψευδοπεπτιδία που συντέθηκαν σε αυτή την εργασία είναι μίγματα διαστερεοϊσομερών. Οι τιμές R_f που αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους αντιστοιχούν στο μέσο όρο των R_f των διαστερεοϊσομερών.

Οι ενώσεις που περιγράφηκαν σ'αυτήν την εργασία καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης Silica gel 60 (0.063-0.200mm) της εταιρείας Merck. Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους για κάθε ένωση ξεχωριστά.

Η στερεοχημική καθαρότητα ορισμένων ενδιάμεσων και τελικών αναστολέων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας RP-HPLC. Οι χρωματογραφικές RP-HPLC αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα χρωματογραφίας Hewlett Packard 1100 (C18-Cromasil-RP, 5 μm με ροή 0.5mL/min). Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπεριώδους-ορατού σε μήκη κύματος 280 και 254 nm. Η καθαρότητα ορισμένων εκ των ενώσεων μετά από την χρήση ημιπαρασκευαστικής HPLC αντίστροφης φάσης αξιολογήθηκε με αναλυτική HPLC (στήλη Merck Chromolith C-18) χρησιμοποιώντας μίγμα διαλυτών βαθμιδωτά μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης 0.05% TFA – CH₃CN (5-40%).

Τα συστήματα διαλυτών καθώς και οι μέθοδοι με μίγματα διαλυτών βαθμιδωτά μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης (gradient) που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

Σύστημα διαλυτών A: 10% CH₃CN, 90% H₂O, 0.1% TFA

Σύστημα διαλυτών B: 90% CH₃CN, 10% H₂O, 0.09% TFA

Αναλυτική HPLC

Μέθοδοι:

1. t = 0 min (30% B), t = 25 min (100% B)
2. t = 0 min (15% B), t = 25 min (80% B)
3. t = 0 min (0% B), t = 25 min (100% B)
4. t = 0 min (30% B), t = 25 min (70% B)
5. t = 0 min (40% B), t = 25 min (70% B)
6. t = 0 min (40% B), t = 25 min (100% B)

5.1.3 Χαρακτηρισμοί ενώσεων

Σημείο τήξεως: Τα σημεία τήξεως των ενώσεων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν σε συσκευή Electrothermal. Πριν τη μέτρηση, τα

δείγματα ξηράθηκαν σε υψηλό κενό υπεράνω P_2O_5 στους $40^\circ C$ σε συσκευή Statotherm (ξηραντικό πιστόλι)..

Φασματομετρία μάζας: Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε όργανο φασματομετρίας μαζών ThermoFinnigan Surveyor MSQ που διαθέτει το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, είτε με τη μέθοδο APCI (χημικός ιονισμός σε ατμοσφαιρική πίεση) είτε με τη μέθοδο ESI (ιονισμός μέσω ηλεκτροψεκασμού). Τα φάσματα HRMS ελήφθησαν σε φασματογράφο μαζών QTOF Maxis Impact (Bruker), ή σε 4800 MALDI-TOF φασματογράφο μαζών (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Όλες οι ενώσεις που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με 1H , ^{13}C και ^{31}P φασματοσκοπία NMR. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε όργανο 200 MHz Varian τύπου Mercury. Τα φάσματα ^{13}C και ^{31}P είναι πλήρως αποσυζευγμένα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν $CDCl_3$, D_2O και d_6 -DMSO της εταιρείας Eurotop. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) δίνονται σε ppm και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz, ενώ τα δεδομένα των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα 1H NMR παρουσιάζονται ως εξής: s (απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), quint (πενταπλή), sept (επταπλή), m (πολλαπλή), br s (ευρεία απλή). Η κλίμακα δ (ppm) των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα 1H -NMR είναι βαθμονομημένη σύμφωνα με τη χημική μετατόπιση του πρωτονιωμένου συστατικού που βρίσκεται ως πρόσμιξη στους δευτεριωμένους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Οι τιμές αυτές ορίστηκαν βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων και είναι: α) $CDCl_3$ (7.27 ppm, χημική μετατόπιση πρόσμιξης $CHCl_3$) β) D_2O (4.78 ppm, χημική μετατόπιση πρόσμιξης HDO) και γ) d_6 -DMSO (2.50, μέσος όρος χημικών μετατοπίσεων όλων των πιθανών πρωτονιωμένων μορφών του $(CD_3)_2SO$). Η κλίμακα δ (ppm) στα φάσματα ^{13}C -NMR είναι βαθμονομημένη σύμφωνα με την χημική μετατόπιση των δευτεριωμένων διαλυτών. Οι τιμές αυτές ορίστηκαν βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων και είναι: α) $CDCl_3$ (77.00 ppm) β) d_6 -DMSO (39.52). Η βαθμονόμηση της κλίμακας στα φάσματα ^{31}P έγινε βάσει εξωτερικού προτύπου που περιέχει διάλυμα H_3PO_4 85% όπου η χημική μετατόπιση του H_3PO_4 ορίζεται κατά σύμβαση να βρίσκεται στην αρχή της κλίμακας ($\delta = 0$ ppm) [207]. Η αποτίμηση που έχει επιχειρηθεί στα φάσματα 1H NMR και ^{13}C NMR άγνωστων ενώσεων βασίζεται σε συσχετισμούς με αποτιμήσεις παρόμοιων ενώσεων που αναφέρονται στη

βιβλιογραφία και με εκτιμήσεις λογισμικών πρόβλεψης φασμάτων (ChemBioDraw Ultra). Στα φάσματα NMR, οι τιμές που συνοδεύονται από (*) αποδίδονται στο διαστερεοϊσομερές που βρίσκεται σε μικρότερη αναλογία.

5.1.1 Ενζυμικά πειράματα

Ο έλεγχος της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό κέντρο ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» από την Δρ Αναστασία Μπακάλη, από την ερευνητική ομάδα του Ερευνητή Α' Ευστράτιου Στρατίκου. Η ικανότητα των παραγώγων που συντέθηκαν να αναστέλλουν τα υπό μελέτη ένζυμα διαπιστώθηκε μέσω μιας ενζυμικής διαδικασίας, κατά την οποία ένα κατάλληλο φθορίζον, μη φυσικό υπόστρωμα υδρολύεται παρουσία του ενζύμου. Με αποικοδόμηση του ψευδοπεπτιδικού δεσμού από το ένζυμο, το προϊόν εκπέμπει φθορισμό στα 460nm, ο οποίος ανιχνεύεται μετά από διέγερση στα 380nm. Παρουσία ενός ισχυρού αναστολέα, το ένζυμο απενεργοποιείται με αποτέλεσμα τη μη εκπομπή φθορισμού. Ως φθορίζον υποστρώμα κατάλληλο για την ERAP1 και την IRAP χρησιμοποιείται το υπόστρωμα L-λευκίνο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (L-AMC), ενώ για την ERAP2 το L-αργινίνο-7-αμινο-4-μεθυλοκουμαρίνη (R-AMC). Παρακάτω περιγράφεται συνοπτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τις ενζυμικές δοκιμές. Η ακριβής τιμή IC₅₀ προέκυψε από την μέτρηση των παραγώγων σε όργανο Tecan infinite® M200 ανιχνευτή φθορισμού. Στην περίπτωση αυτή, οι μετρήσεις διεξάγονται σε μικροπλάκες 96 πηγαδιών και απαιτούνται 2-10 nM από κάθε ένζυμο (10.0 nM από ERAP1, 2.0 nM από ERAP2 και 2.0 nM από IRAP), τα οποία διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl και προστίθενται σε κάθε πηγάδι της πλάκας, μαζί με 50 μM υποστρώματος διαλυμένα σε buffer (150 μl) και διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναστολέων (0.01, 0.1, 1, 10, και 100, 1.5 μl). Υπόστρωμα επίσης προστίθεται και στο πηγάδι του δείγματος αναφοράς (control), στο οποίο δεν έχει προστεθεί αναστολέας, έτσι ώστε να μπορεί να επιτευχθεί άμεση σύγκριση ανάμεσα στα αποτελέσματα των μετρήσεων τα οποία συλλέγονται από κάθε πηγάδι. Συνολικά, από κάθε πηγάδι συλλέγονται 20 διαφορετικά σημεία, συναρτήσεως του χρόνου. Όλες οι μικροπλάκες και τα υποστρώματα L-AMC και R-AMC προμηθεύτηκαν από την Sigma Aldrich.

Για τον υπολογισμό της *in vitro* δραστηρότητας των παραγώγων, οι τιμές των μετρήσεων επεξεργάζονται μέσω των προγραμμάτων Excel και GraphPad Prism χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{κλίση}))}$$

Όπου Y είναι η ενζυμική δραστηρότητα και X η συγκέντρωση του αναστολέα. Τα όρια εμπιστοσύνης υπολογίζονται από 3 διαφορετικά πειράματα. Σε κάθε περίπτωση ο φθορισμός είναι ανάλογος με τον χρόνο, γεγονός που δείχνει ότι η κινητική της αντίδρασης είναι σταθερή. Από την επεξεργασία αυτή και τη μοντελοποίηση της παραπάνω εξίσωσης, προκύπτουν οι σιγμοειδείς καμπύλες που περιγράφουν την ενζυμική δραστηρότητα συναρτήσει της συγκέντρωσης. Η κλίση της καμπύλης της χρονικής πορείας της αντίδρασης χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί το ποσοστό της αναστολής και έτσι προσδιορίζεται η ακριβής τιμή του IC₅₀.

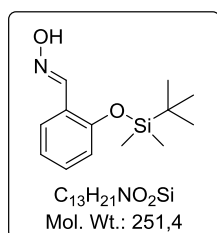
5.1.2 Πειραματικές πορείες και χαρακτηρισμοί των ενώσεων

Συνθετικές μέθοδοι για τις ενώσεις του κεφαλαίου 3

Γενική μέθοδος σύνθεσης των οξιμών τύπου 26 από τις αντίστοιχες αλδεΐδες τύπου 25

Διάλυμα μιας αλδεΐδας τύπου **25** (1.0 mmol), υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (97 mg, 1.4 mmol) και οξικού νατρίου (164 mg, 2.0 mmol) σε MeOH/H₂O 3.5:1 αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί συμπύκνωση. Το υπόλειμμα αραιώνεται με Et₂O (30 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με H₂O (3 × 10 mL), ξηραίνεται υπεράνω ανύδρου Na₂SO₄ και εξατμίζεται υπό κενό. Οι επιθυμητές οξίμες του τύπου **26** ελήφθησαν (αποδόσεις 85-95%) ως μίγματα *E/Z* ισομερών επαρκούς καθαρότητας, για να χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα φυσικά και φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με αυτά που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τις ενώσεις **26α** [208, 209], **26β-δ** [208, 210] και **26ε-η** [211]. Για τη σύνθεση των οξιμών **26θ** και **26ι**, το παραπάνω πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στις TBS-προστατευμένες αλδεΐδες **25θ** και **25ι**, αντιστοίχως, που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με συνθετικές πορείες της βιβλιογραφίας [123].

2-(*tert*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλόξυ) οξίμη της βενζαλδεΐδης (**26θ**).



Η ένωση **26θ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης οξιμών τύπου **26** σε κλίμακα (1.40 g, 5.00 mmol) 2-(*tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλόξυ) βενζαλδεΐδης. Παραλαμβάνονται 1.10 g (84 %) της οξίμης **26θ** ως καφέ στερεό.

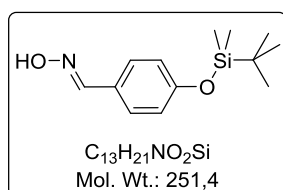
TLC R_f (PE 40-60°C/AcOEt: 8/2) = 0.5.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.25 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 1.03 (s, 9H, C(CH₃)₃), 6.62 - 7.96 (m, 4H, Ar), 8.51 (s, 1H, CH=N).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ - 4.14, 18.5, 25.9, 119.7, 121.7, 123.1, 126.6, 131.3, 146.8.

ES-MS m/z: υπολογίστηκε για [C₁₃H₂₁NO₂Si+H]⁺ 252.1, βρέθηκε: 252.2.

4-(*tert*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλόξυ) οξίμη της βενζαλδεΐδης (**26ι**)



Η ένωση **26ι** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης οξιμών τύπου **26** σε κλίμακα (1.01 g, 3.80 mmol) 4-(*tert*-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλόξυ) βενζαλδεΐδης. Παραλαμβάνονται 950 mg (95 %) της οξίμης **26ι** ως καφέ στερεό.

TLC R_f (PE 40-60°C / AcOEt: 8/2) = 0.6.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.22 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.99 (s, 1H, 9H, C(CH₃)₃), 6.68 - 7.13 (d, 2H, Ar), 7.30 - 7.59 (d, 2H, Ar), 8.11 (s, 1H, CH=N).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ - 4.26, 18.4, 25.8, 120.6, 128.6, 190.0.

ES-MS m/z: υπολογίστηκε για [C₁₃H₂₁NO₂Si+H]⁺ 252.4, βρέθηκε: 252.2.

Γενική Μέθοδος A: Προσθήκη P-Michael P-H Φωσφινικών Οξέων σε Ακρυλικά Παράγωγα

Μίγμα του κατάλληλου *N*-προστατευμένου αμινοφωσφινικού οξέος (1.0 mmol), του κατάλληλου ακρυλικού παραγώγου (1.1 - 1.5 mmol) και HMDS (1.05 mL, 5.0 mmol) θερμαίνεται στους 110 °C για 1 h και έπειτα στους 90 °C για 3 h υπό Ar. Στη συνέχεια, το μίγμα ψύχεται στους 70 °C, προστίθεται αργά EtOH (1.5 mL) και το

προκύπτουν μίγμα αναδεύεται στους 70 °C επί 20 min. Μετά από συμπύκνωση του διαλύτη, το υπόλειμμα αραιώνεται με AcOEt (20 ml) και η οργανική φάση εκπλένεται με 2M HCl (2 × 10 mL) και κορ. NaCl (10 mL). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται. Λεπτομέρειες καθαρισμού περιγράφονται για κάθε περίπτωση ξεχωριστά.

Γενική μέθοδος Β: Σαπωνοποίηση των προϊόντων P-Michael

Το προϊόν της προσθήκης P-Michael (1.0 mmol) διαλύεται σε EtOH (10 mL) και το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C. Στη συνέχεια προστίθεται 1M NaOH (5 mL) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h. Μετά την συμπύκνωση υπό κενό, το υπόλειμμα αραιώνεται σε H₂O (10 mL) και AcOEt (20 mL) και οξινίζεται με 2M HCl μέχρι pH 1. Η υδατική φάση εκχυλίζεται με AcOEt (2 × 10 mL) και οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και εξατμίζονται υπό κενό.

Γενική μέθοδος Γ: Αποπροστασία φωσφινικών τριπεπτιδίων

Διάλυμα του κατάλληλου προστατευμένου ψευδοπεπτιδίου (0.2 mmol) σε TFA/CH₂Cl₂/TIS/H₂O 48:49:2:1 (2 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Ακολουθεί συμπύκνωση με προσθήκη τολουολίου για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα νερού και TFA. Το προϊόν καταβυθίζεται με προσθήκη ξηρό Et₂O. Ακολουθούν 3 φυγοκεντρήσεις και το προϊόν παραλαμβάνεται με απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Τέλος γίνεται ξήρανση του στερεού υπεράνω P₂O₅.

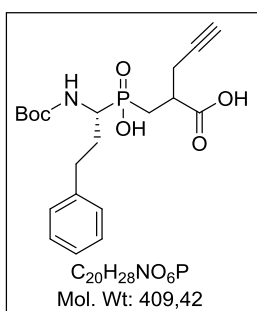
Γενική μέθοδος Δ: Σύζευξη των καρβοξαμιδίων των αμινοξέων σε φωσφινικά ψευδοδιπεπτιδία

Το κατάλληλο φωσφινικό ψευδοδιπεπτιδίο (0.5 mmol) διαλύεται σε CH₂Cl₂ (1.0 mL) και προστίθενται DIPEA (174 μL, 1.0 mmol), το κατάλληλο καρβοξαμίδιο αμινοξέος (0.65 mmol), HOBt (68 mg, 0.5 mmol) και EDC·HCl (480 mg, 2.5 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και η αντίδραση παρακολουθείται TLC μέχρι την πλήρη κατανάλωση του αρχικού φωσφινικού οξέος (2 - 4 h). Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται, προστίθεται AcOEt (10 mL) και 1M HCl (10 mL) και η οργανική στιβάδα διαχωρίζεται και εκπλένεται με 1 M HCl (3 × 10 mL), H₂O (5 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄, εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.1:0.1 → 7:0.5:0.5).

Γενική μέθοδος Ε: 1,3-Διπολική κυκλοπροσθήκη για τη σύνθεση των ισοξαζολυλο-αναστολέων

Η κατάλληλη οξύμη (3.0 mmol) διαλύεται σε CHCl₃ (10 mL) και προστίθενται δύο σταγόνες πυριδίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται NCS (401 mg, 3.0 mmol) σε θερμοκρασία δωματίου και μετά από 10 min το προκύπτον μίγμα αναδεύεται στους 40 – 50 °C για 3 h. Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται το φωσφινικό τριπεπτιδίο **15** (167 mg, 0.3 mmol), ακολουθούμενο από αργή προσθήκη Et₃N (0.49 mL, 3.5 mmol) στην ίδια θερμοκρασία. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 d στους 40 - 50 °C. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται, προστίθεται AcOEt (10 mL) και 1M HCl (10 mL) και η οργανική στιβάδα διαχωρίζεται και εκπλένεται με 1M HCl (3 × 10 mL), H₂O (5 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και εξατμίζεται υπό κενό. Σε περίπτωση ατελούς αντίδρασης, η διαδικασία επαναλαμβάνεται όσες φορές είναι απαραίτητο, χρησιμοποιώντας το προϊόν κάθε αντίδρασης ως αρχική ύλη για την επόμενη αντίδραση. Όταν το αντιδρών **15** καταναλώνεται πλήρως, ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.1:0.1 → 7:0.5:0.5).

2'-{[(1*R*)-1-[(*tert*-Βουτοξυ)καρβονυλο]αμινο]-3-φαινυλοπροπυλο}(υδροξυ)φωσφινυλο]μεθυλο}πεντ-4'-ινοϊκό οξύ (**13**)



Η ένωση **13** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο Α αντιδράσεων *P*-Michael και ακόλουθη σαπωνοποίηση, σύμφωνα με τη γενική μέθοδο Β. Χρησιμοποιήθηκε το φωσφινικό οξύ **12** (1.00 g, 3.30 mmol) και ο ακρυλικός εστέρας **11** [120] (590 mg, 4.30 mmol). Παραλαμβάνονται 1.34 g (99%) της ένωσης **13** ως αφρώδες στερεό (μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών, *RS/RR* = 67:33).

TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

¹H NMR (500 MHz, *d*⁶-DMSO) δ [1.36* (s) + 1.40 (s), 9H, C(CH₃)₃], 1.66 - 1.88 (m, 2H, PCH₂), 1.88 - 2.13 (m, 2H, CH₂CH₂Ph), 2.44 – 2.65 (m, 3H, CH₂CCH), 2.66 – 2.90 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 3.42 - 3.71 (m, 1H, CHP), [6.65* (d, *J* = 9.8 Hz) + 6.69 (d, *J* = 9.1 Hz), 1H, NH], 7.05 – 7.42 (m, 5H, Ar).

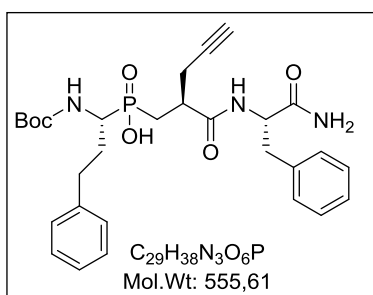
^{13}C NMR (50 MHz, d^6 -DMSO, κύριο ισομερές) δ 21.5, 21.6, 26.5 ($^1J_{\text{PC}} = 89.0$ Hz), 28.3, 29.0, 31.7, 31.9, 37.6, 49.2 ($^1J_{\text{PC}} = 107$ Hz), 72.9, 78.4, 81.4, 126.0, 128.4, 128.6, 141.4, 155.7, 155.8, 174.2, 174.5.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO) δ 47.5, 47.1.

ES-MS m/z: $[\text{M}-\text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{P}^-$ 408.2, βρέθηκε 408.3.

HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NO}_6\text{P}^+$ 410.1727, βρέθηκε 410.1733.

**((1*R*)-1-(((*tert*-Βουτοξυ)καρβονυλο)αμινο)-3-φαινυλοπροπυλο)((2'*S*)-2'-
[[((2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο)καρβαμοϋλο]πεντ-4'-ιν-1'-
υλο}φωσφινικό οξύ (15)**



Η ένωση **15** παρασκευάστηκε από την αντίδραση σύζευξης της ένωσης **13** (1.30 g, 3.20 mmol) και του αμίδιου $\text{HBr}\cdot\text{H}-(\text{L})\text{Phe-NH}_2$ (**14**) σύμφωνα με την Γενική μέθοδο Δ και ακολούθη ανακρυστάλλωση του προϊόντος με AcOEt ($\times 2$). Παραλαμβάνονται 730 mg (41%) της ένωσης **15** ως λευκό στερεό.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:0.5:0.5) = 0.3.

^1H NMR (500 MHz, d^6 -DMSO) δ (1.42 (s), 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.70 – 1.84 (m, 3H, PCH_2 , CHHCH_2Ph), 1.88 - 2.00 (m, 1H, CHHCH_2Ph), 2.21 (dd, $J = 6.3, 16.5$, 1H, CHHCCH), 2.33 (dd, $J = 6.3, 16.7$, 1H, CHHCCH), 2.43 – 2.49 (m, 1H, CHCONH), 2.65 - 2.77 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.74 (s, 1H, CH_2CCH), 2.83 (dd, $J = 9.4, 13.7$, 1H, CHP), 3.08 (dd, $J = 4.7, 13.7$, 1H, NHCHCHH), 3.58 (dd, $J = 9.2, 20.5$, 1H, NHCHCHH), 4.33 (dt, $J = 5.2, 8.7$, 1H, NHCH), 7.02 (br s, 1H, NHH), 7.07 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, NHCHP), 7.11 - 7.33 (m, 10H, Ar), 7.55 (br s, 1H, NHH), 8.07 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NHCHCO).

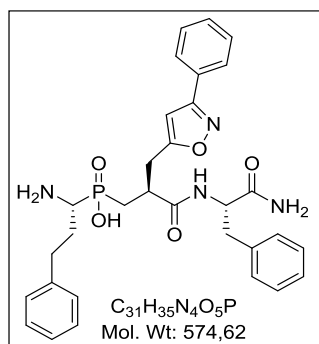
^{13}C NMR (125 MHz, d^6 -DMSO) δ 22.2, 22.3, 27.2 ($^1J_{\text{PC}} = 87.4$ Hz), 28.3, 29.2, 31.7, 31.8, 37.0, 38.8, 49.6 ($^1J_{\text{PC}} = 106.2$ Hz), 54.1, 72.5, 78.3, 81.9, 125.9, 126.1, 128.0, 128.3, 128.5, 129.2, 138.3, 141.4, 155.7, 172.1, 172.1, 172.9.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO) δ 47.3.

ES-MS m/z: $[\text{M}-\text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}^-$ 554.3, βρέθηκε 554.3.

HRMS (m/z): $[M+H]^+$ υπολογίστηκε για $C_{29}H_{39}N_3O_6P^+$ 556.2571, βρέθηκε 556.2566.

((1*R*)-1-αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο)αμινο]-3'-οξο-2'-[(3-φαινυλοϊσοξαζολ-5-υλο)μεθυλο]προπυλο}φωσφινικό οξύ (4α)



Η ένωση **4α** παρασκευάστηκε μετά από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16α** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (δεν χρειάστηκε επανάληψη για την ολοκλήρωσή της) και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4α** (80%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC R_f ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:0.5:0.5) = 0.2.

HPLC t_R (1) 11.3 min.

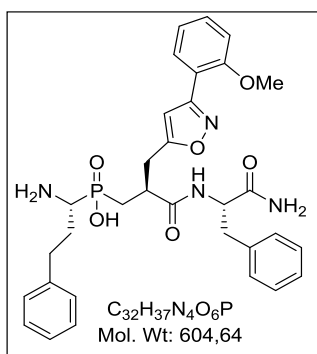
1H NMR (500 MHz, d^6 -DMSO/3% TFA) δ 1.81 - 1.93 (m, 2H, PCH_2), 1.96 - 2.10 (m, 2H, CH_2CH_2Ph), 2.60 - 2.70 (m, 1H, $CHCONH$), 2.76 - 2.90 (m, 2H, CH_2CH_2Ph), 3.00 - 3.09 (m, 2H, $CH_2C=C$), 3.09 - 3.15 (m, 1H, $CHCONH$), 3.19 (dd, $J = 4.7, 14.8$ Hz, 1H, CHP), 3.22 - 3.30 (m, 1H $NHCHCH_2$), 4.43 (dt, $J = 5.7, 8.7$ Hz, 1H, $NHCH$), 6.70 (s, 1H, $CHC=N$), 7.01 - 7.85 (m, 17H, Ar, $CONH_2$), 8.28 (br s, 3H, NH_3), 8.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, NH).

^{13}C NMR (125 MHz, d^6 -DMSO/2% TFA) δ 29.3 (d, $^1J_{PC} = 92.3$ Hz), 29.7, 31.6, 31.7, 37.5, 37.9, 48.7 (d, $^1J_{PC} = 94.9$ Hz), 54.2, 100.4, 126.2, 126.3, 126.6, 128.1, 128.3, 128.5, 128.9, 129.1, 129.2, 130.1, 138.1, 140.9, 161.9, 171.4, 172.3, 172.4, 173.0.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO/3% TFA) δ 40.5.

HRMS (m/z): $[M-H]^-$ υπολογίστηκε για $C_{31}H_{34}N_4O_5P^-$ 573.2272, βρέθηκε 573.2216.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο)αμινο]-2'-[3-(2-μεθοξυφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο}-3'-οξοπροπυλο}φωσφινικό οξύ (4β)



Η ένωση **4β** παρασκευάστηκε μετά από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16β** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (δεν χρειάστηκε επανάληψη για την ολοκλήρωσή της) και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4β** (85%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

HPLC t_R (2) 17.5 min.

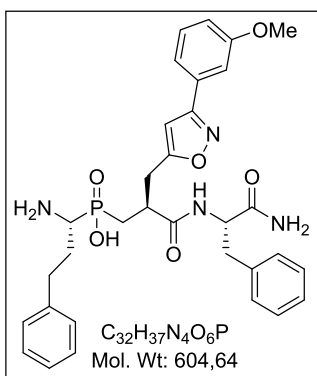
¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO + CDCl₃/3% TFA) δ 1.55 – 2.20 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.54 – 3.34 (m, 8H, CH₂Ph, PCH₂CH, CHP, CH₂C=C, NHCHCH₂), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 4.26 – 4.56 (m, 1H, NHCH), 6.58 (s, 1H, CHC=N), 6.84 - 7.79 (m, 16H, Ar, CONH₂), 8.02 – 8.53 (m, 4H, NH₃, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO + CDCl₃/3% TFA) δ 29.1 (d, ¹J_{PC} = 92.5 Hz), 29.9, 31.7, 31.9, 37.6, 38.0, 48.7 (d, ¹J_{PC} = 96.1 Hz), 54.3, 55.7, 103.5, 112.1, 117.5, 120.8, 126.3, 128.1, 128.4, 128.6, 128.9, 129.4, 131.5, 138.2, 140.9, 157.0, 159.6, 170.1, 172.3, 172.5, 173.0.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO/3% TFA) δ 40.1.

HRMS (*m/z*): [M-H]⁻ υπολογίστηκε για C₃₂H₃₆N₄O₆P⁻ 603.2378, βρέθηκε 603.2351.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο)αμινο]-2'-{[3-(3-μεθοξυφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο}-3'-οξοπροπυλο}φωσφινικό οξύ (4γ**).**



Η ένωση **4γ** παρασκευάστηκε μετά από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16γ** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (χρειάστηκε μία επανάληψη για την ολοκλήρωσή της) και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4γ** (75%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

HPLC t_R (2) 17.2 min.

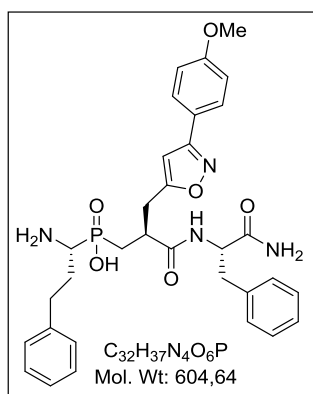
1H NMR (200 MHz, d^6 -DMSO/5% TFA) δ 1.66 - 2.14 (m, 4H, PCH_2 , CH_2CH_2Ph), 2.52 - 2.94 (m, 3H, CH_2Ph , PCH_2CH), 2.95 - 3.38 (m, 5H, CHP , $CH_2C=C$, $NHCHCH_2$), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.33 - 4.56 (m, 1H, $NHCH$), 6.74 (s, 1H, $CHC=N$), 6.84 - 7.68 (m, 16H, Ar, $CONH_2$), 8.30 (br s, 3H, NH_3), 8.48 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH).

^{13}C NMR (50 MHz, d^6 -DMSO /5% TFA) δ 29.4 (d, $^1J_{PC} = 93.9$ Hz), 29.9, 31.7, 31.9, 37.0, 37.7, 38.0, 48.9 (d, $^1J_{PC} = 93.9$ Hz), 54.4, 55.5, 100.7, 112.1, 116.2, 119.1, 126.4, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 129.4, 130.1, 130.5, 131.5, 137.7, 138.3, 141.0, 159.9, 162.0, 171.6, 172.5, 172.7, 173.1, 173.2.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO /5% TFA) δ 40.5.

HRMS (m/z): $[M-H]^-$ υπολογίστηκε για $C_{32}H_{36}N_4O_6P^-$ 603.2378, βρέθηκε 603.2379.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο)αμινο]-2'-[3-(4-μεθοξυφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο}-3'-οξοπροπυλο}φωσφινικό οξύ (4δ**)**



Η ένωση **4δ** παρασκευάστηκε μετά από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16δ** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (χρειάστηκαν δύο επαναλήψεις για την ολοκλήρωσή της) και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4δ** (76%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC R_f ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:0.5:0.5) = 0.1

HPLC t_R (2) 17.0 min

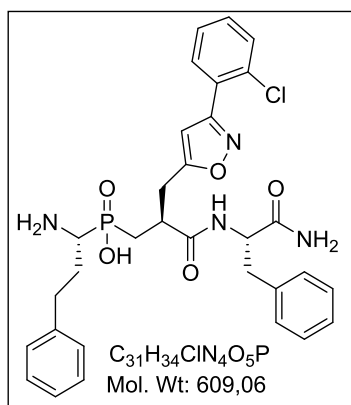
1H NMR (200 MHz, d^6 -DMSO/5% TFA) δ 1.70 - 2.21 (m, 4H, PCH_2 , CH_2CH_2Ph), 2.35 - 2.94 (m, 3H, CH_2Ph , PCH_2CH), 2.94 - 3.40 (m, 5H, PCH , $CH_2C=C$, $NHCHCH_2$), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 4.33 - 4.55 (m, 1H, $NHCH$), 6.63 (s, 1H, $CHC=N$), 6.82 - 7.85 (m, 16H, Ar, $CONH_2$), 8.27 (br s, 3H, NH_3), 8.47 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO/5% TFA) δ 29.3 (d, ¹J_{PC} = 94.6 Hz), 29.9, 31.7, 31.9, 37.7, 38.1, 48.8 (d, ¹J_{PC} = 95.6 Hz), 54.4, 55.4, 100.4, 114.7, 121.4, 126.4, 128.3, 128.5, 128.8, 129.5, 138.3, 141.0, 160.9, 161.7, 171.1, 172.4, 172.6, 173.2.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/5% TFA) δ 41.2.

HRMS (m/z): [M-H]⁻ υπολογίστηκε για C₃₂H₃₆N₄O₆P⁻ 603.2378, βρέθηκε 603.2382.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3'' φαινυλπροπαν-2''-υλο)αμινο]-2'-{[3-(2-χλωροφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο}-3'-οξοπροπυλο}φωσφινικό οξύ (4ε)



Η ένωση **4ε** παρασκευάστηκε μετά από μία αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16ε** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (δεν χρειάστηκε επανάληψη για την ολοκλήρωσή της) και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4ε** (73%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

HPLC *t_R* (2) 18.3 min.

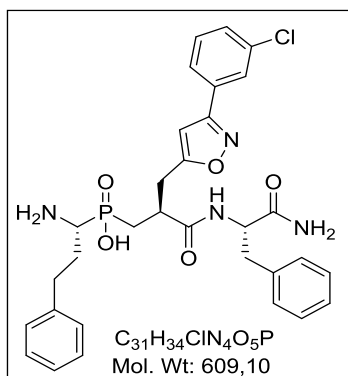
¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO/4% TFA) δ 1.69 - 2.21 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.53 - 2.93 (m, 3H, CH₂Ph, PCH₂CH), 2.93 - 3.36 (m, 5H, PCH, CH₂C=C, NHCHCH₂), 4.29 - 4.52 (m, 1H, NHCH), 6.58 (s, 1H, CHC=N), 6.81 - 7.71 (m, 16H, Ar, CONH₂), 8.28 (br s, 3H, NH₃), 8.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO/4% TFA) δ 29.8 (d, ¹J_{PC} = 92.6 Hz), 29.9, 31.6, 31.8, 37.0, 37.7, 38.0, 48.7 (d, ¹J_{PC} = 94.7 Hz), 54.2, 103.4, 126.4, 127.8, 128.2, 128.3, 128.4, 128.7, 129.4, 130.6, 131.2, 131.6, 132.0, 138.2, 140.9, 160.7, 170.9, 172.2, 172.4, 172.9.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/4% TFA) δ 40.8.

HRMS (m/z): [M-H]⁻ υπολογίστηκε για C₃₁H₃₃ClN₄O₅P⁻ 607.1883, βρέθηκε 607.1876.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο)αμινο]-2'-[3-(3-χλωροφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο}-3'-οξοπροπυλο} φωσφινικό οξύ (4ζ)



Η ένωση **4ζ** παρασκευάστηκε μετά από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16ζ** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (χρειάστηκαν πέντε επαναλήψεις για την ολοκλήρωσή της) και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4ζ** (67%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

HPLC t_R (2) 19.1 min.

¹H NMR (500 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 1.75 – 1.95 (m, 2H, PCH₂), 1.96 – 2.11 (m, 2H, CH₂CH₂Ph), 2.57 – 2.72 (m, 1H, CHCONH), 2.75 – 2.91 (m, 2H, CH₂CH₂Ph), 2.95 – 3.40 (m, 5H, CH₂C=C, CHP, NHCHCH₂), 4.32 – 4.49 (m, 1H, NHCH), 6.76 (s, 1H, CHC=N), 7.00 - 7.93 (m, 16H, Ar, CONH₂), 8.30 (br s, 3H, NH₃), 8.45 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH).

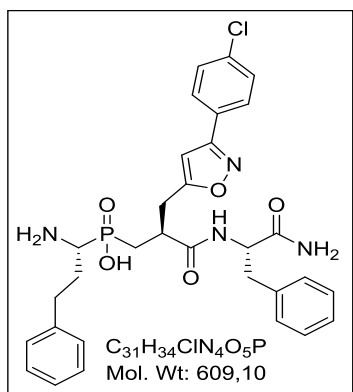
¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 29.3 (d, ¹*J*_{PC} = 93.1 Hz), 29.8, 31.5, 31.7, 37.5, 37.8, 37.9, 48.7 (d, ¹*J*_{PC} = 94.2 Hz), 54.2, 100.5, 125.2, 126.2, 128.1, 128.3, 128.5, 129.2, 130.0, 130.8, 131.1, 133.9, 138.1, 140.9, 160.8, 171.8, 172.2, 172.4, 173.0.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 39.8.

HRMS (*m/z*): [M-H]⁻ υπολογίστηκε για C₃₁H₃₃ClN₄O₅P⁻ 607.1883, βρέθηκε 607.1880.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο)αμινο]-2'-[3-(4-χλωροφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο}-3'-οξοπροπυλο}φωσφινικό οξύ (4η)

Η ένωση **4η** παρασκευάστηκε από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16η** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (χρειάστηκαν τέσσερις επαναλήψεις για την ολοκλήρωσή της) και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με



την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4h** (67%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2

HPLC t_R (2) 19.0 min.

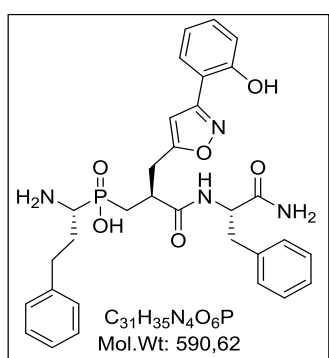
¹H NMR (200 MHz, d^6 -DMSO/5% TFA) δ 1.69 - 2.18 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.57 – 2.95 (m, 3H, CH₂Ph, PCH₂CH), 2.95 – 3.37 (m, 5H, CH₂C=C, CHP, NHCHCH₂), 4.28 – 4.52 (m, 1H, NHCH), 6.71 (s, 1H, CHC=N), 6.88 - 7.91 (m, 16H, Ar, CONH₂), 8.30 (br s, 3H, NH₃), 8.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, d^6 -DMSO/5% TFA) δ 29.4 (d, $^1J_{PC}$ = 93.5 Hz), 30.0, 31.8, 32.0, 37.1, 37.7, 48.9 (d, $^1J_{PC}$ = 96.2 Hz), 54.5, 100.7, 126.4, 126.5, 128.0, 128.3, 128.6, 128.8, 129.5, 135.1, 138.4, 141.1, 161.2, 172.0, 172.5, 172.7, 173.4.

³¹P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO/5% TFA) δ 40.8.

HRMS (m/z): [M-H]⁻ υπολογίστηκε για C₃₁H₃₃ClN₄O₅P⁻, 607.1883, βρέθηκε 607.1863.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλοπροπαν-2''-υλο]αμινο]-2'-[[3-(2-υδροξυφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο-3'-οξοπροπυλο}φωσφινικό οξύ (4h**)**



Η ένωση **4h** παρασκευάστηκε μετά από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της ένωσης **15** και της οξίμης **16h** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (δεν χρειάστηκε επανάληψη για την ολοκλήρωσή της). Το προϊόν **17h** διαλύθηκε σε DMF/H₂O 10:1 (2 mL/mmol) και ακολούθως προστέθηκε Cs₂CO₃ (2.0 equiv). Μετά από ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h, το μίγμα οξινίστηκε με 1 M HCl μέχρι pH~1 και εκχυλίστηκε με AcOEt (3 × 5 mL). Μετά από συμπύκνωση της οργανικής φάσης υπό κενό, ακολούθησε αποπροστασία του υπολλείμματος σύμφωνα με την γενική μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4h** (51%, τρία στάδια) ως λευκό στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.3.

HPLC t_R (2) 17.1 min.

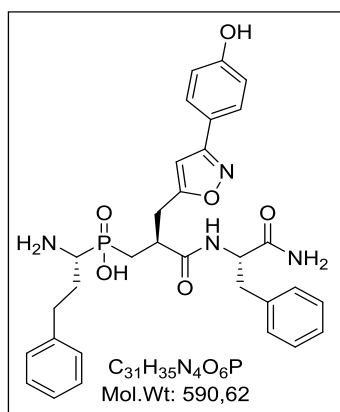
^1H NMR (200 MHz, d^6 -DMSO/2% TFA) δ 1.64 – 2.20 (m, 4H, PCH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.36 – 2.93 (m, 3H, CH_2Ph , PCH_2CH), 2.94 – 3.42 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, CHP , NHCHCH_2), 4.28 – 4.50 (m, 1H, NHCH), 6.75 (s, 1H, $\text{CHC}=\text{N}$), 6.62 - 7.56 (m, 16H, Ar, CONH_2), 7.69 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH), 8.29 (br s, 3H, NH_3).

^{13}C NMR (50 MHz, d^6 -DMSO/2% TFA) δ 29.2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 91.2$ Hz), 29.9, 31.6, 31.8, 37.5, 48.7 (d, $^1J_{\text{PC}} = 94.3$ Hz), 54.3, 102.9, 115.2, 116.8, 119.5, 126.3, 128.2, 128.4, 128.6, 129.3, 131.3, 138.2, 141.0, 155.7, 160.4, 170.1, 172.4, 172.5, 172.9.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO/2% TFA) δ 40.1.

HRMS (m/z): $[\text{M} - \text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}^-$ 589.2221, βρέθηκε 589.2219.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-3'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο]αμινο]-2'-[[3-(4-υδροξυφαινυλο)ισοξαζολ-5-υλο]μεθυλο]-3'-οξοπροπυλο} φωσφινικό οξύ (4i**)**



Η ένωση **4i** παρασκευάστηκε μετά από την αντίδραση 1,3-DCR μεταξύ της **15** και της οξίμης **16i** σύμφωνα με τη γενική μέθοδο E (χρειάστηκαν δύο επαναλήψεις για την ολοκλήρωσή της). Ακολούθησε η αντίδραση του προϊόντος **17i** με Cs_2CO_3 , σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω για την σύνθεση της **40**, και έπειτα αποπροστασία σύμφωνα με την γενική μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **4i** (61%, τρία

στάδια) ως λευκό στερεό

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1) = 0.3.

HPLC t_R (2) 14.0 min.

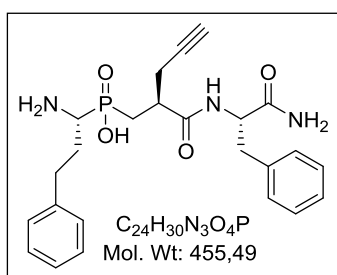
^1H NMR (500 MHz, d^6 -DMSO/3.5% TFA) δ 1.76 – 1.96 (m, 2H, PCH_2), 1.98 – 2.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.59 – 2.73 (m, 1H, CHCONH), 2.73 – 2.95 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.95 – 3.68 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, CHP , NHCHCH_2), 4.35 – 4.54 (m, 1H, NHCH), 6.54 (s, 1H, $\text{CHC}=\text{N}$), 6.78 - 7.69 (m, 16H, Ar, CONH_2), 8.30 (br s, 3H, NH_3), 8.44 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO/3.5% TFA) δ 29.5 (d, ¹J_{PC} = 92.0 Hz), 30.1, 31.9, 32.1, 37.8, 49.0 (d, ¹J_{PC} = 95.8 Hz), 54.6, 100.3, 116.2, 119.9, 126.5, 126.6, 128.4, 128.6, 128.8, 129.6, 138.4, 141.2, 159.5, 162.1, 171.1, 172.7, 172.8, 173.4.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/3.5% TFA) δ 40.1.

HRMS (*m/z*): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₃₁H₃₄N₄O₆P⁻, 589.2221, βρέθηκε, 589.2233.

((1*R*)-1-Αμινο-3-φαινυλοπροπυλο){(2'*S*)-2'-[[(2''*S*)-1''-αμινο-1''-οξο-3''-φαινυλπροπαν-2''-υλο]καρβαμοϋλο]πεντ-4'-iv-1'-υλ30φωσφινικό οξύ (29)



Η ένωση **29** παρασκευάστηκε από την αντίδραση αποπροστασίας του φωσφινικού τριπεπτιδίου **15** (24 mg, 43 μmol), σύμφωνα με την γενική μέθοδο Γ. Παραλαμβάνονται 17 mg (87%) της ένωσης **29** ως λευκό στερεό.

TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

HPLC *t_R* (3) 14.6 min.

¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO/5% TFA) δ 1.76 – 2.19 (m, 4H), 2.35 – 2.70 (m, 3H), 2.72 – 2.91 (m, 4H), 3.03 (dd, *J* = 5.2, 13.7, 1H), 3.11 – 3.26 (m, 1H), 4.38 (dd, *J* = 8.1, 13.5, 1H), 7.01 - 7.45 (m, 12H), 8.14 – 8.33 (m, 4H).

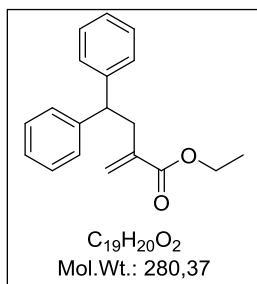
¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO/5% TFA) δ 22.7, 22.9, 28.4 (d, ¹J_{PC} = 92.9 Hz), 29.7, 31.6, 31.7, 48.7 (d, ¹J_{PC} = 95.6 Hz), 54.4, 73.2, 81.8, 126.3, 128.2, 128.4, 128.7, 129.4, 138.2, 140.9, 155.7, 172.3, 172.4, 172.8.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/5% TFA) δ 41.7.

HRMS (*m/z*): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₂₄H₂₉N₃O₄P⁻ 454.1901, βρέθηκε 454.1893.

2-Μεθυλενο-4,4-διφαινυλοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας (30β)

Διάλυμα DCC (1.18 g, 5.72 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (11 mL) προστίθεται στους 0 °C και σε διάστημα 60 min σε διάλυμα CH₂Cl₂ (22 mL) που περιέχει 2,2 διφαινυλοοξικό οξύ (1.01 g, 4.71 mmol), το οξύ Meldrum (750 mg, 5.18 mmol) και



DMAP (921 mg, 7.54 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h. Ακολουθεί διήθηση του αιωρήματος από celite για την απόμακρυνση της δικυκλοεξυλουρίας και το μίγμα αφήνεται στην κατάψυξη για 24 h. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται συμπύκνωση του διαλύματος υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε AcOEt (20 mL) και ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο NaHSO₄ (2 × 10 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 × 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης διαλύεται σε άνυδρο CH₂Cl₂ (15 mL), ψύχεται στους 0 °C και ακολούθως προστίθεται AcOH (3.5 mL). Κατόπιν, προστίθεται στην ίδια θερμοκρασία NaBH₄ (600 mg, 15.8 mmol) σε διάστημα 2 h. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη H₂O, η υδατική φάση απομακρύνεται και η οργανική φάση εκπλένεται με H₂O (2 × 10 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 × 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE 40-60/AcOEt 3:7 Παραλαμβάνονται 750 mg (49%) του αλκυλιωμένου παραγώγου Meldrum **42** ως λευκό στερεό.

Σ.τ. 145-147 °C.

R_f (PE 40-60°C/AcOEt 2:1) = 0.4.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.57 [s, 3H, C(CH₃)(CH₃)], 1.71 [s, 3H, C(CH₃)(CH₃)], 2.79 (dd, *J* = 6.0, 8.5 Hz, 2H, CH₂), 3.28 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CHCO), 4.59 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, CHPh₂), 7.12 – 7.41 (m, 10H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 26.4, 28.8, 32.1, 44.5, 48.4, 105.2, 127.1, 128.2, 129.1, 143.2, 165.8.

ES-MS m/z: [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₂₀H₁₉O₄⁻ 323.1, βρέθηκε 323.1.

Σε διάλυμα του παραπάνω παραγώγου Meldrum **42** (500 mg, 1.54 mmol) σε THF/απ.. EtOH 1:3 (15 mL) προστίθεται άλας Eschenmoser (712 mg, 3.85 mmol). Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 65 °C και αναδεύεται για 24 h. Ακολουθεί ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώση με AcOEt (20 mL) και διαδοχικές εκπλύσεις με 10% Na₂CO₃ (1 × 10 mL), H₂O (2 × 10 mL) και 2M HCl (1

× 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται ο διαλύτης υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης PE 40-60°C:AcOEt 1/0 → 2/1. Παραλαμβάνονται 402 mg (93%) του ακρυλικού εστέρα **30β** ως υποκίτρινο κολλώδες στερεό.

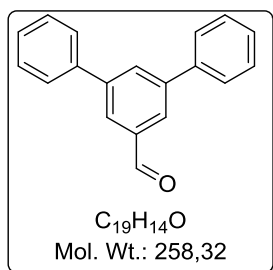
TLC R_f (PE 40-60 °C/AcOEt 10:1) = 0.6.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.14 (dd, *J* = 0.7, 7.8 Hz, 2H, CH₂CHPh₂), 4.23 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.33 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, CHPh₂), 5.36 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, C=CHH), 6.13 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, C=CHH), 7.11 – 7.41 (m, 10H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.3, 38.1, 50.0, 60.7, 126.3, 127.0, 128.1, 128.5, 138.6, 144.1, 167.1.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₁₉H₂₀NaO₂⁺ 303.1356, βρέθηκε 303.1359.

3,5-Διφαινυλοβενζαλδεΐδη (**47**)^[133]



Σε σφαιρική φιάλη τύπου Schlenk προστίθεται 3,5-διβρωμοβενζαλδεΐδη (600 mg, 2.27 mmol), και διαλύεται σε DME (24 mL) και H₂O (5 mL). Ακολούθως, προστίθεται φαινυλοβορονικό οξύ (748 mg, 6.15 mmol), Na₂CO₃ (963 mg, 9.08 mmol) και Pd(PPh₃)₄ (262 mg, 0.227 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για 5 min στους – 78 °C υπό ροή Ar και στη συνέχεια το ψυκτικό μέσο αφαιρείται και το μίγμα αφήνεται να πάρει θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Στη συνέχεια, αφαιρείται η παροχή Ar και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 90 °C για 24 h. Έπειτα, το μίγμα αραιώνεται σε Et₂O (20 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με H₂O (3 × 10 mL), ξηραίνεται με Na₂SO₄ και ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπο κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE 40-60°C/AcOEt: 9.8/0.2 → 0/10. Παραλαμβάνονται 570 mg (98%) της ένωσης **47** ως λευκό στερεό.

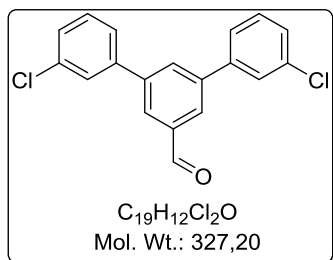
Σ.τ. 96 - 98 °C

TLC R_f (PE 40-60 °C/AcOEt 9:1) = 0.5

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.39 - 7.59 (m, 6H, Ar), 7.62 - 7.76 (m, 4H, Ar), 8.07 (s, 3H, Ar), 10.13 (s, 1H, CHO).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 127.1, 127.2, 128.1, 129.0, 131.7, 137.4, 139.6, 142.6, 192.2

3,5-Δι-(3'-χλωροφαινυλο)βενζαλδεΐδη (55) ^[133]



Η ένωση **55** παρασκευάστηκε εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο σύνθεσης της ένωσης **47**. Χρησιμοποιήθηκαν η 3,5-διβρωμοβενζαλδεΐδη (750 mg, 2.84 mmol) και το 3-χλωρο-φαινυλοβορονικό οξύ (1.60 g, 10.2 mmol). Παραλαμβάνονται 760 mg (82%) της ένωσης **55** ως λευκό στερεό.

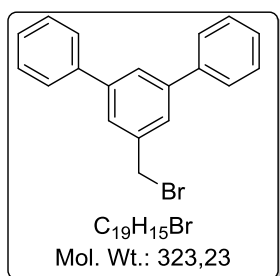
Σ.Τ. 131-134 °C.

TLC R_f (PE 40-60 °C/AcOEt 9.5:0.5) = 0.5.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.31 – 7.69 (m, 8H, Ar), 7.92 – 8.15 (m, 3H, Ar), 10.16 (s, 1H, CHO).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 125.4, 127.3, 127.5, 128.3, 130.4, 131.4, 135.0, 137.6, 141.2, 141.5, 191.8.

3,5-Διφαινυλοβενζυλοβρωμίδιο (50)



Σε διάλυμα της ένωσης **47** (504 mg, 1.95 mmol) σε EtOH (20 ml) προστίθεται σταδιακά και υπό ψύξη στους 0 °C NaBH_4 (74 mg, 1.95 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5 h, και η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη αραιωμένου υδατικού διαλύματος HCl. Το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό, το υπόλειμμα αραιώνεται με προσθήκη Et_2O (30 mL) και H_2O (10 mL) και η υδατική φάση εκχυλίζεται με Et_2O (3 × 10 mL). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται με Na_2SO_4 και ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό κενό. Το προκύπτον λευκό στερεό διαλύεται σε άνυδρο CH_2Cl_2 (10.2 ml) προστίθεται στάγδην PBr_3 (0.18 mL, 1.95 mmol) υπο ψύξη και σε διάστημα 5 λεπτών. Το μίγμα

της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Στη συνέχεια, η οργανική φάση εκπλένεται με H₂O (2 × 10 mL), ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπο κενό. Παραλαμβάνονται 570 mg (91%) της ένωσης **50** ως μπεζ στερεό.

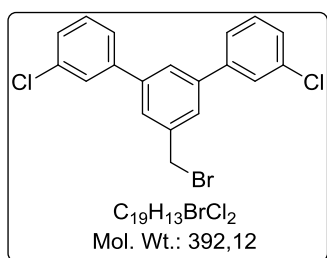
Σ.τ. 92 - 94 °C.

R_f (PE 40-60 °C/AcOEt 4:1) = 0.5.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 4.62 (s, 2H, CH₂), 7.30 – 7.81 (m, 13H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 33.6, 125.6, 126.4, 126.9, 127.4, 127.8, 129.0, 138.8, 140.6, 142.6.

3,5-Δι-(3'-χλωροφαινυλο)βενζυλοβρωμίδιο (**57**)



Η ένωση **57** παρασκευάστηκε από την ένωση **55** (770 mg, 2.34 mmol) εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο σύνθεσης της ένωσης **50**. Παραλαμβάνονται 740 mg (81%) της ένωσης **57** ως λευκό στερεό.

R_f (PE 40-60 °C/AcOEt 4:1) = 0.6

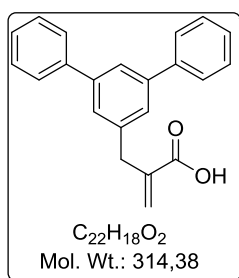
Σ.τ. 96–100 °C.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 4.60 (s, 2H, CH₂), 7.16 - 7.66 (m, 11H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 33.1, 125.5, 126.1, 127.3, 127.5, 128.0, 130.3, 134.9, 139.3, 141.3, 142.1.

ES-MS m/z: [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₁₉H₁₂BrCl₂⁻ 391.0, βρέθηκε 390.8.

2-([1,1':3',1''-Τερφαινυλο]-5'-υλο)μεθακρυλικό οξύ (**30γ**)



Σε διάλυμα της ένωσης **50** (575 mg, 1.78 mmol), σε DMF-τολουόλιο 1:1 (30 mL), προστίθεται μεθανοτρικαρβοξυλικός τριαιθυλεστέρας (415 μL, 1.95 mmol), K₂CO₃ (272 mg, 1.97 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται με αναρροή στους 85 °C για 1.5 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (50 mL), απομακρύνεται η οργανική φάση και η υδατική φάση εκχυλίζεται με AcOEt (2 ×

15 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, εκπλένεται με H₂O (×5), ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπο κενό και το προκύπτον πορτοκαλόχρωμο έλαιο διαλύεται σε EtOH (10 mL). Έπειτα, προστίθεται σταδιακά και υπο ψύξη διάλυμα KOH (1.09 g, 19.5 mmol) σε EtOH (3 mL) και αφήνεται υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h. Το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώνεται και το προκύπτον υπόλειμμα διαλύεται σε H₂O (20 mL). Η υδατική φάση εκπλένεται με Et₂O (3 × 5 mL) και έπειτα οξινίζεται με HCl 2M μέχρι pH 1 και ακολουθούν εκχυλίσεις με AcOEt (4 × 20 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπο κενό, και το προκύπτον υποκίτρινο στερεό διαλύεται σε AcOEt (7 mL) και προστίθεται στάγδην και υπο ψύξη Et₂NH (0.24 mL, 2.35 mmol). Στη συνέχεια, το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται η παραφορμαλδεΐδη (86 mg, 2.88 mmol). Το μίγμα βράζεται με αναρροή για 4 h. Έπειτα, συμπυκνώνεται ο διαλύτης υπο κενό και το υπόλειμμα διαλύεται σε H₂O (30 mL), οξινίζεται με HCl (pH=1) και εκχυλίζεται με AcOEt (2 × 20 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπο κενό. Παραλαμβάνονται 0.38 g (89%) της ένωσης **30γ** ως λευκό στερεό.

Σ.τ. 165-167 °C.

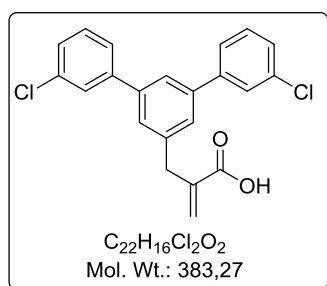
R_f (PE 40-60 °C/AcOEt 1:1) = 0.6

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 3.79 (s, 2H, ArCH₂), 5.72 (s, 1H, =CHH), 6.46 (s, 1H, =CHH), 7.29 - 7.75 (m, 13H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 37.8, 124.5, 127.0, 127.4, 127.5, 128.9, 129.2, 139.4, 139.5, 141.1, 142.1, 172.3.

ES-MS m/z: [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₂₂H₁₇O₂⁻ 313.1, βρέθηκε 313.1.

2-(3,3'-Διχλωρο-[1,1':3',1''-τερφαινουλο]-5'-υλο)μεθακρυλικό οξύ (**30δ**)



Η ένωση **30δ** παρασκευάστηκε από την ένωση **57** (741 mg, 1.89 mmol) εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο σύνθεσης της ένωσης **30γ**. Παραλαμβάνονται 308 mg (85%) της ένωσης **30δ** ως αφρώδες μπεζ στερεό

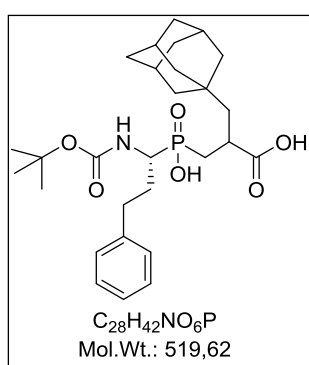
R_f (PE 40-60 °C/AcOEt 1:1) = 0.6.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 3.64 (s, 2H, ArCH_2), 5.60 (s, 1H, $=\text{CHH}$), 6.35 (s, 1H, $=\text{CHH}$), 7.09 - 7.60 (m, 11H, Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 37.8, 124.5, 127.0, 127.4, 127.5, 128.9, 129.2, 139.4, 139.5, 141.1, 142.1, 172.3.

ES-MS m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{O}_2^-$ 381.1, βρέθηκε 381.0.

3'--(Αδαμαντ-1-υλο)-2'--[[1((R)-1-[[*tert*-βουτοξυ)καρβονυλαμινο]-3-φαινυλοπροπυλο](υδροξυ)φωσφινυλο]μεθυλο]-προπανοϊκό οξύ (31α)



Η ένωση **31α** παρασκευάστηκε μετά από προσθήκη *P*-Michael του φωσφινικού παραγώγου **12** (300 mg, 1.00 mmol) στο ακρυλικό παράγωγο **30α** [127] (320 mg, 1.30 mmol) σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο A και ακόλουθη σαπωνοποίηση σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο B. Παραλαμβάνονται 410 mg (79%, δύο στάδια) της ένωσης **31α** ως αφρώδες στερεό (μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, d^6 -DMSO) δ 1.19 – 2.09 (m, 30H, $3\times\text{CH}_3$, PCH_2 , CH_2Ad , $6\times\text{CH}_2$ of Ad, $3\times\text{CH}$ της Ad ομάδας, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.30 – 2.54 & 2.55 – 2.82 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, CHCO), 3.32 - 3.67 (m, 1H, CHP), 6.90 - 7.35 (m, 5H, Ar).

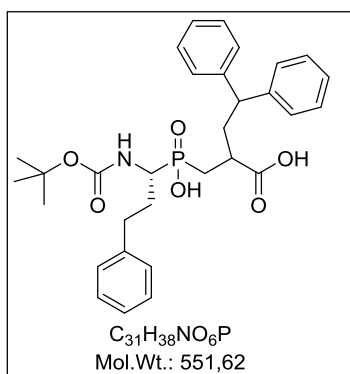
$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, d^6 -DMSO) δ 28.1, 28.3, 29.2, 29.8, 29.9, 32.5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 77$ Hz), 32.5, 32.7 (d, $^1J_{\text{PC}} = 80$ Hz), 36.6, 41.8, 47.0, 47.6, 49.3 (d, $^1J_{\text{PC}} = 105$ Hz), 49.7 (d, $^1J_{\text{PC}} = 105$ Hz), 78.2, 78.6, 125.9, 128.4, 128.5, 141.4, 141.5, 155.7, 155.8, 177.4, 177.5, 177.6, 177.7.

$^{31}\text{P NMR}$ (81 MHz, d^6 -DMSO) δ 46.5.

HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{NNaO}_6\text{P}^+$ 542.2642, βρέθηκε 542.2645.

2'--[[[(1R)-1-[[*tert*-Βουτοξυ)καρβονυλο]αμινο]-3-φαινυλοπροπυλο](υδροξυ)φωσφινυλο]μεθυλο]-4',4'-διφαινυλοβουτανοϊκό οξύ (31β)

Η ένωση **31β** παρασκευάστηκε μετά από προσθήκη *P*-Michael του φωσφινικού παραγώγου **12** (300 mg, 1.00 mmol) στο ακρυλικό παράγωγο **30β** (308 mg, 1.10



mmol) σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο A και ακόλουθη σαπωνοποίηση σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο B. Παραλαμβάνονται 336 mg (61%, δύο στάδια) της ένωσης **31β** ως αφρώδες στερεό (μίγμα δύο διαστεροϊσομερών).

R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.3:0.3) = 0.2.

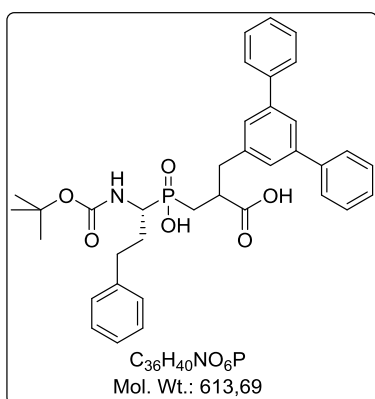
¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 1.40 + 1.43 [2 × s, 9H, C(CH₃)₃], 1.63 – 2.06 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.07 – 2.28 (m, 1H, CHHCHPh₂), 2.35 – 2.81 (m, 4H, CH₂CH₂Ph, CHCO, CHHCHPh₂), 3.41 – 3.70 (m, 1H, CHP), 3.89 – 4.08 (m, 1H, CHPh₂), 6.66 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, NH), 6.97 – 7.42 (m, 15H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 27.9, 28.0, 28.3, 29.2, 29.3, 29.6, 29.7, 31.8, 32.0, 48.6, 49.5 (d, ¹*J*_{PC} = 105 Hz), 49.8 (d, ¹*J*_{PC} = 106 Hz), 78.3, 78.4, 125.9, 126.2, 127.5, 128.0, 128.4, 128.6, 141.4, 143.6, 145.3, 155.7, 155.8, 176.0, 176.1, 176.2.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 46.5.

HRMS (*m/z*): [M + H]⁺ υπολογίστηκε για C₃₁H₃₉NO₆P⁺ 552.2510, βρέθηκε 552.2515.

3'-([1,1':3',1''-Τερφαινυλο]-5'-υλο)-2'-{[(1*R*)-1-(*tert*-βουτοξυ)καρβονυλο]αμινο}-3-φαινυλοπροπυλο}(υδροξυ)φωσφινυλο]μεθυλο} προπανοϊκό οξύ (31γ**)**



Η ένωση **31γ** παρασκευάστηκε μετά από προσθήκη *P*-Michael του φωσφινικού παραγώγου **12** (200 mg, 0.67 mmol) στο ακρυλικό παράγωγο **30γ** (277 mg, 0.81 mmol) σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο A και ακόλουθη σαπωνοποίηση σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο B. Παραλαμβάνονται 362 mg (88%, δύο στάδια) της ένωσης **31γ** ως μπεζ αφρώδες στερεό (μίγμα δύο διαστεροϊσομερών).

R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.4.

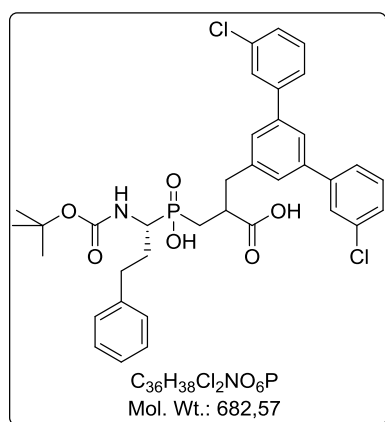
¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 1.34+1.41 (2×s, 9H, C(CH₃)₃), 1.58 - 2.08 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.37 - 2.58 (m, 1H, CH₂CHHPPh), 2.58 - 2.80 (m, 1H, CH₂CHHPPh), 2.92 - 3.20 (m, 3H, ArCH₂CHCOOH), 3.47 - 3.73 (m, 1H, NCH), 7.06-7.83 (m, 19H, Ar, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 26.4, 27.9, 28.2, 29.0, 29.2, 31.6, 31.9, 49.1 (¹J_{PC} = 107 Hz), 49.5 (¹J_{PC} = 107 Hz), 78.3, 78.4, 123.5, 125.9, 126.9, 127.1, 127.7, 128.4, 128.6, 128.8, 129.0, 140.1, 140.3, 141.0, 141.4, 141.5, 155.7, 155.8, 175.2, 175.4, 175.5, 175.6.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 46.7, 47.0.

HRMS (m/z): [M + H]⁺ υπολογίστηκε για C₃₆H₄₁NO₆P⁺ 614.2666, βρέθηκε 614.2666.

3'-[[(1*R*)-1-[(*tert*-βουτυξυ)καρβονυλ]αμινο]-3-φαινυλοπροπυλο](υδροξυ)φωσφινυλο]-2'-[(3,3''-Διχλωρο-[1,1':3',1''-τερφαινυλο]-5'-υλο)μεθυλο] προπανοϊκό οξύ (31δ)



Η ένωση **31δ** παρασκευάστηκε μετά από προσθήκη *P*-Michael του φωσφινικού παραγώγου **12** (175 mg, 0.58 mmol) στο ακρυλικό παράγωγο **30δ** (292 mg, 0.71 mmol) σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο A και ακόλουθη σαπωνοποίηση σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο B. Παραλαμβάνονται 344 mg (87%, δύο στάδια) της ένωσης **31δ** ως μπεζ αφρώδες στερεό (μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών).

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.5.

¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 1.33+1.41 (2×s, 9H, C(CH₃)₃), 1.59 - 2.08 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.31 - 2.51 (m, 1H, CH₂CHHPPh), 2.58 - 2.80 (m, 1H, CH₂CHHPPh), 2.92 - 3.16 (m, 3H, ArCH₂CHCOOH), 3.44 - 3.71 (m, 1H, NCH), 7.03-7.93 (m, 17H, Ar, NH).

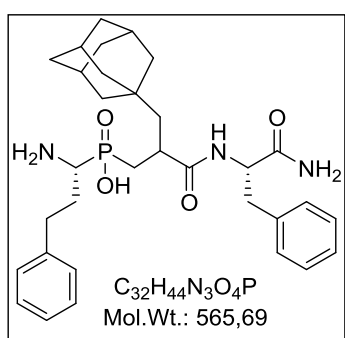
¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 26.5, 27.9, 28.2, 28.9, 29.1, 31.6, 31.8, 49.4 (¹J_{PC} = 106 Hz), 78.2, 78.3, 123.8, 125.8, 126.8, 127.5, 128.3, 128.5, 130.7, 133.8, 139.4, 140.4, 141.4, 142.2, 155.7, 175.3, 175.5.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO) δ 46.9, 47.1.

ES-MS m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{Cl}_2\text{NO}_6\text{P}$ 680.2, βρέθηκε 680.3.

HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{Cl}_2\text{NNaO}_6\text{P}^+$ 704.1706, βρέθηκε 704.1694.

{2-(Αδαμαντ-1-υλο)μεθυλο-3-[(2S)-1-αμινο-1-οξο-3-φαινυλοπροπ-2-υλο]αμινο-3-οξοπροπυλο}[(1R)-1-αμινο-3-φαινυλοπροπυλο] φωσφινικό οξύ (5α)



Η ένωση **5α** παρασκευάστηκε μετά από σύζευξη της **31α** με $\text{HBr}\cdot\text{H}-(\text{L})\text{Phe}-\text{NH}_2$ (**14**) σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο Δ και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **5α** (79%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό (μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών). Τα δύο διαστερεοϊσομερή της **5α** διαχωρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική HPLC και

ελέγχθηκαν ξεχωριστά.

HPLC $t_{\text{R}}(4)$ 21.0 min

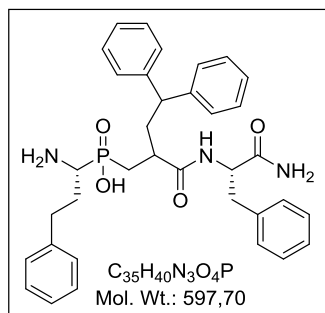
^1H NMR (200 MHz, d^6 -DMSO) δ 1.14 – 1.70 (m, 16H, PCH_2 , CH_2Ad , $6\times\text{CH}_2$ of Ad), 1.71 – 2.26 (m, 5H, $3\times\text{CH}$ της Ad ομάδας, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.60 – 2.98 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, CHCO , CHCHHPH), 3.00 – 3.36 (m, 2H, CHP , CHCHHPH), 4.34 – 4.56 (m, 1H, CHCONH_2), 6.97 – 8.01 (m, 13H, Ar, NH_3), 7.34 – 8.01 (m, 3H, NH, CONH_2).

^{13}C NMR (50 MHz, d^6 -DMSO /2% TFA) δ 28.3, 30.0, 30.1, 31.7, 31.9, 32.6, 32.7, 33.9, 34.9, 36.7, 37.1, 37.6, 41.7, 41.9, 47.5, 47.6, 48.5, 48.8, 48.8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 94$ Hz), 49.0 (d, $^1J_{\text{PC}} = 95$ Hz), 54.4, 126.4, 128.3, 128.6, 128.8, 129.3, 129.5, 138.5, 138.9, 141.1, 141.2, 143.1, 173.4, 174.3, 175.0, 175.2, 175.5, 175.6.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO /2% TFA) δ 45.8, 45.9.

HRMS (m/z): $[\text{M} - \text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_4\text{P}^-$ 564.2997, βρέθηκε 564.2996.

**2-[(2S)-1-Αμινο-1-οξο-3-φαινυλοπροπ-2-υλο]καρβαμοϋλο]-4,4-
διφαινυλοβουτυλο}[(1R)-1-αμινο-3-φαινυλοπροπυλο] φωσφινικό οξύ (5β)**



Η ένωση **5β** παρασκευάστηκε μετά από σύζευξη της ένωσης **31β** με HBr·H-(L)Phe-NH₂ (**14**) σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο Δ και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **5β** (80%, δύο στάδια), ως μπεζ αφρώδες στερεό (μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών). Τα δύο διαστερεοϊσομερή της **5β**

διαχωρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική HPLC και ελέγχθηκαν ξεχωριστά.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.6

HPLC t_R(4) 18.5 min

¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO/2% TFA) δ 1.71 – 2.20 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.26 – 2.97 (m, 6H, CH₂CH₂Ph, PCH₂CHCO, COCHCHPh, CH₂CHPh₂), 3.00 – 3.40 (m, 2H, CHP, COCHCHPh), 3.48 – 3.66 + 3.75 – 3.92 (m, 1H, CH₂CHPh₂), 4.37 – 4.63 (m, 1H, CHCONH₂), 6.89 – 7.45 (m, 20H, Ar), 7.54 – 8.45 (m, 6H, NH₃, NH, CONH₂).

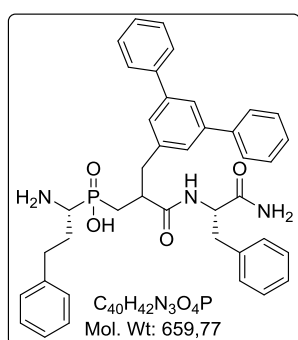
¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 29.7, 31.6, 31.8, 36.9, 37.1, 37.1, 37.8, 47.6, 47.6, 47.7, 47.9, 49.6, 49.8, 54.0, 126.3, 127.6, 127.6, 127.8, 128.1, 128.2, 128.5, 128.5, 128.7, 129.3, 138.4, 138.9, 140.9, 141.0, 144.2, 144.4, 144.6, 145.2, 173.3, 173.4, 173.6, 173.9, 174.1, 174.1.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/2% TFA) δ 41.0.

ES-MS m/z για C₃₅H₄₁N₃O₄P [M+H]⁺: υπολογίστηκε 598.3, βρέθηκε 598.3.

HRMS (m/z): [M + H]⁺ υπολογίστηκε για C₃₅H₄₁N₃O₄P⁺ 598.2829, βρέθηκε 598.2830.

**{2-[(2S)-1-Αμινο-1-οξο-3-φαινυλοπροπ-2-υλο]καρβαμοϋλο]-3-([1,1':3',1''-
τερφαινυλο]-5'-υλο)προπυλο}[(1R)-1-αμινο-3-φαινυλοπροπυλο]φωσφινικό
οξύ (5γ)**



Η ένωση **5γ** παρασκευάστηκε μετά από σύζευξη της ένωσης **31γ** με HBr·H-(L)Phe-NH₂ (**14**) σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο Δ και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **5γ**

(78%, δύο στάδια), ως καφέ στερεό (μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών). Τα δύο διαστερεοϊσομερή της **5γ** διαχωρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική HPLC και ελέγχθηκαν ξεχωριστά.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.4.

HPLC $t_R(5)$ 21.8 min.

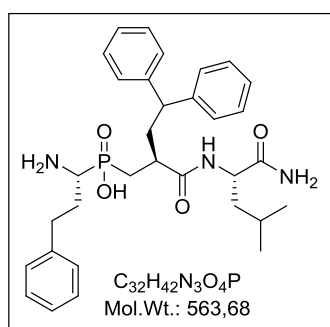
¹H NMR (200 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 1.56 - 2.11 (m, 4H, PCH₂, CH₂CH₂Ph), 2.28 - 2.89 (m, 4H, PCH₂CHCO, CH₂CH₂Ph, COCHCHPh), 2.93 - 3.50 (m, 4H, PCH₂CHCH₂, COCHCHPh, NCHP), 4.28 - 4.57 (m, 1H, CHCONH₂), 6.91 - 7.89 (m, 25H, Ar, CONH₂), 8.22 (br s, 3H, NH₃), 8.40 (d, J = 8.9 Hz, 1H, CONH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*⁶-DMSO) δ 27.1 (¹ J_{PC} = 92 Hz), 29.7, 31.6, 31.7, 37.7, 41.2, 48.6 (¹ J_{PC} = 95 Hz), 54.2, 123.6, 126.3, 127.0, 127.2, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6, 129.0, 129.4, 138.2, 140.3, 140.4, 140.9, 141.1, 172.9, 173.4, 173.5.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 41.3, 41.9.

HRMS (m/z): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₄₀H₄₁N₃O₄P⁻ 658.2840, βρέθηκε 658.2846.

{2-[(2S)-1-Αμινο-4-μεθυλο-1οξοπεντ-2-υλο-]καρβαμοϋλο]-4,4-διφαινυλοβουτυλο-3-φαινυλοπροπ-2-υλο}[(1R)-1-αμινο-3-φαινυλοπροπυλο]φωσφινικό οξύ (5δ**)**



Η ένωση **5δ** παρασκευάστηκε μετά από σύζευξη της ένωσης **31β** με HBr·H-(L)Leu-NH₂ (**59**) σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο Δ και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **5δ** (75%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό. Λόγω του ικανοποιητικού χρωματογραφικού διαχωρισμού των διαστερεοϊσομερών, πριν από το στάδιο της αποπροστασίας, έγινε εφικτή η απομόνωση του επιθυμητού RSS (πρώτου εκλούόμενου ισομερούς).

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

HPLC $t_R(4)$ 17.0 min.

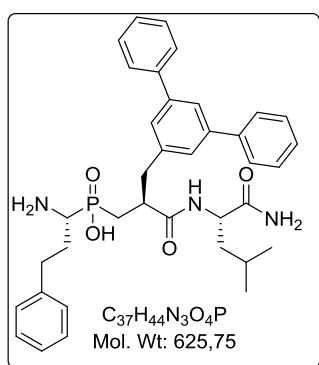
¹H NMR (500 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 0.84 [t, *J* = 5.9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂], 1.41 – 1.53 – 1.65 (m, 3H, NHCHCH₂, CH(Me)₂), 1.69 – 2.27 (m, 6H, CH₂CH₂Ph, PCH₂, CH₂Ph), 2.54 – 2.67 (m, 2H, CH₂CHPh₂), 2.79 (dt, *J* = 4.7, 13.0 Hz, 1H, CHCONH), 3.12 – 3.35 (m, 1H, CHP), 3.95 (dd, *J* = 4.7, 10.0 Hz, 1H, CH₂CHPh₂), 4.26 (dd, *J* = 8.0, 15.1 Hz, 1H, CHCONH₂), 7.01 – 7.55 (m, 17H, Ar, CONH₂), 7.80 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 8.24 (br s, 3H, NH₃).

¹³C NMR (125 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 21.6, 23.1, 24.3, 29.6, 30.3, 31.6, 31.6, 38.5, 38.5, 40.6, 48.0, 48.6 (d, ¹*J*_{PC} = 94.5 Hz), 51.2, 126.1 126.2, 127.4, 128.0, 128.3, 128.5, 128.5, 128.6, 140.8, 145.0, 146.5, 173.4, 173.4, 174.3.

³¹P NMR (81 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 41.4.

HRMS (*m/z*): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₃₂H₄₁N₃O₄P⁻ 562.2840, βρέθηκε 562.2840.

{2-[(2*S*)-1-Αμινο-4-μεθυλο-1οξοπεντ-2-υλο-]]καρβαμοϋλο}-3-([1,1':3',1''-τερφαινυλο]-5'-υλο)μεθυλο}[(1*R*)-1-αμινο-3-φαινυλοπροπυλο] φωσφινικό οξύ (5ε**)**



Η ένωση **5ε** παρασκευάστηκε από την σύζευξη της ένωσης **31γ** με HBr·H-(L)Leu-NH₂ (**59**) σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο Δ και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **5ε** (65%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό. Λόγω του ικανοποιητικού χρωματογραφικού διαχωρισμού των διαστερεοϊσομερών, πριν από το στάδιο της αποπροστασίας, έγινε εφικτή η απομόνωση του επιθυμητού *RSS* (πρώτου εκλουόμενου) ισομερούς.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.3.

HPLC t_R(6) 15.4 min.

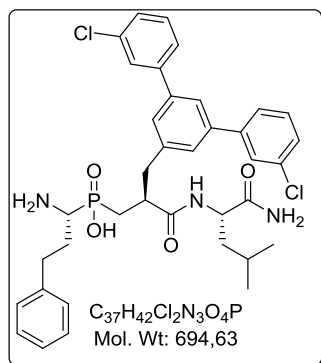
¹H NMR (500 MHz, *d*⁶-DMSO/3% TFA) δ 0.80 (dd, *J* = 6.4, 21.2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1.39 – 1.61 (m, 3H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.71 – 1.87 (m, 2H, PCH₂), 1.93 – 2.05 (m, 1H, CHHCH₂Ph), 2.29 (dt, *J* = 9.9, 15.2 Hz, 1H, CHHCH₂Ph), 2.53 – 2.62 (m, 1H, PCH₂CHCO), 2.76 (dt, *J* = 4.8, 12.9 Hz, 1H, CHHPh), 2.91 (dt, *J* = 7.7, 13.0 Hz, 1H, CHHPh), 3.09 – 3.29 (m, 3H, COCHCH₂, NCHP), 4.22 (dd, *J* = 8.7,

14.4 Hz, 1H, $CHCONH_2$), 6.84 - 7.91 (m, 20H, Ar, $CONH_2$), 8.25 (br s, 3H, NH_3), 8.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $CONH$).

^{13}C NMR (50 MHz, d^6 -DMSO /3% TFA) 21.6, 23.2, 24.2, 28.2 (d, $^1J_{PC} = 94.4$ Hz), 29.6, 31.6, 31.7, 41.0, 48.6 (d, $^1J_{PC} = 90.5$ Hz), 51.2, 124.1, 126.2, 127.0, 127.1, 127.6, 128.2, 128.5, 128.9, 140.1, 140.3, 140.8, 141.0, 173.3, 173.4, 174.2. ^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO/3% TFA) δ 41.9.

HRMS (m/z): $[M - H]^-$ υπολογίστηκε για $C_{37}H_{43}N_3O_4P^-$ 624.2997, βρέθηκε 624.2999.

{2-[(2S)-1-Αμινο-4-μεθυλο-1οξοπεντ-2-υλο-]}καρβαμούλο-3-([3,3''-διχλωρο-[1,1':3',1''-τερφαινυλο]-5'-υλο)μεθυλο}{[(1R)-1-αμινο-3-φαινυλοπροπυλο] φωσφινικό οξύ (5ζ)}



Η ένωση **5ζ** παρασκευάστηκε από τη σύζευξη της ένωσης **31δ** με την ένωση $HBr \cdot H-(L)Leu-NH_2$ (**59**) σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο Δ και ακόλουθη αποπροστασία σύμφωνα με την Γενική Μέθοδο Γ. Παραλαμβάνεται η ένωση **5ζ** (40%, δύο στάδια) ως λευκό στερεό. Λόγω του ικανοποιητικού χρωματογραφικού διαχωρισμού των διαστερεοϊσομερών, πριν από το στάδιο της αποπροστασίας, έγινε εφικτή η απομόνωση του επιθυμητού *RSS* (πρώτου εκλουόμενου) ισομερούς.

HPLC $t_R(6)$ 19.7 min.

1H NMR (200 MHz, d^6 -DMSO/2% TFA) δ 0.63 – 0.98 (m, 6H, $CH(CH_3)_2$), 1.35 – 1.64 [m, 3H, $CH_2CH(CH_3)_2$], 1.65 – 2.09 (m, 3H, PCH_2 , $CHHCH_2Ph$), 2.18 – 2.40 (m, 1H, $CHHCH_2Ph$), 2.50 – 3.37 (m, 6H, PCH_2CHCO , CH_2Ph , $COCHCH_2$, CHP), 4.06 – 4.32 (m, 1H, $CHCONH_2$), 6.84 - 7.91 (m, 19H, Ar, $CONH_2$, $CONH$), 8.29 (br s, 3H, NH_3).

^{13}C NMR (50 MHz, d^6 -DMSO/2% TFA) δ 21.6, 23.3, 24.4, 28.3 ($^1J_{PC} = 91.4$ Hz), 29.8, 31.7, 31.9, 41.1, 41.2, 48.8 ($^1J_{PC} = 95.4$ Hz), 51.4, 126.1, 126.4, 127.0, 127.7, 127.8, 128.4, 128.7, 139.7, 140.6, 140.9, 142.4, 173.4, 173.5, 174.5.

^{31}P NMR (81 MHz, d^6 -DMSO/2% TFA) δ 41.9.

HRMS (m/z): $[M - H]^-$ υπολογίστηκε για $C_{37}H_{41}Cl_2N_3O_4P^-$ 692.2217, βρέθηκε 692.2228.

Μέθοδοι σύνθεσης των ενώσεων του Κεφαλαίου 4

Γενική μέθοδος σύνθεσης ακρυλικών οξέων τύπου 124 μέσω αλκυλίωσης μηλονικού διαιθυλεστέρα (Μέθοδος Α)

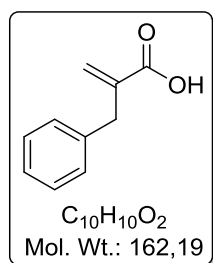
Σε διάλυμα Na (23 mg, 1.0 mmol) σε απ. EtOH (1.1 mL), προστίθεται μηλονικός διαιθυλεστέρας (1.0 mmol) στάγδην. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min και στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα του κατάλληλου βρωμιδίου (1.0 mmol) σε ποσότητα EtOH (0.2 mL), στάγδην και υπό ψύξη. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h. Ακολουθεί συμπύκνωση και το υπόλειμμα που προκύπτει αραιώνεται με H₂O (5 mL) και εκχυλίζεται με Et₂O (3 × 5 mL). Οι οργανικές στιβάδες εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται. Το άχρωμο υγρό που παραλαμβάνεται διαλύεται σε μέρος της EtOH (0.2 mL) και προστίθεται διάλυμα KOH (0.28 g, 5.0 mmol) σε EtOH (1.8 mL) στάγδην και υπό ψύξη στους 0 °C. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h. Ακολουθεί συμπύκνωση, διάλυση του υπολείμματος σε H₂O (10 mL) και εκπλύσεις με Et₂O (3 × 5 mL). Η υδατική φάση οξινίζεται στους 0 °C με διάλυμα 2M HCl έως pH~1 και ακολουθούν εκχυλίσεις με AcOEt (3 × 5 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα (θεωρείται ότι όλη η ποσότητα η οποία ζυγίζεται αποτελεί το υποκατεστημένο μηλονικό οξύ) διαλύεται σε AcOEt (1.8 mL) και προστίθεται στάγδην και υπό ψύξη Et₂NH (1.15 mmol). Προστίθεται (HCHO)_n (1.4 mmol) και το προκύπτον μίγμα βράζεται με αναρροή για 4 h. Οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό, το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει διαλύεται σε H₂O και NaHCO₃ 5% (έως pH>8) (15 mL) και εκπλένεται με Et₂O (3 × 5 mL). Η υδατική φάση οξινίζεται στους 0 °C με 2M HCl (έως pH 1) και εκχυλίζεται με AcOEt (3 × 5 mL). Ακολουθεί ξήρανση με Na₂SO₄ και συμπύκνωση.

Γενική μέθοδος σύνθεσης ακρυλικών οξέων τύπου 124 μέσω αλκυλίωσης μεθανοτρίκαρβοξυλικού τριαιθυλεστέρα (Μέθοδος Β)

Σε διάλυμα του κατάλληλου αλογονιδίου (1.0 mmol) σε DMF/Tol (1:1, 4.8 mL), προστίθεται TMT (130) (255 mg, 1.1 mmol) και K₂CO₃ (178 mg, 1.3 mmol). Το μίγμα βράζεται υπό αναρροή για 1.5 h. Στη συνέχεια, προστίθεται AcOEt (15 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με H₂O (7 × 5 mL) προς πλήρη απομάκρυνση του DMF, συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Ο

υποκατεστημένος τριαιθυλεστέρας που προκύπτει (1.0 mmol) διαλύεται σε απόλυτη EtOH (2.5 mL) και προστίθεται διάλυμα KOH (550 mg, 10 mmol) σε απόλυτη EtOH (2 mL) στάγδην και στους 0 °C. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 18 h και ακολουθεί συμπύκνωση, διάλυση του υπολείμματος σε H₂O (10 mL) και εκπλύσεις με Et₂O (3 × 5 mL). Η υδατική φάση οξινίζεται στους 0 °C με διάλυμα 2M HCl έως pH 1 και ακολουθούν εκχυλίσεις με AcOEt (3 × 5 mL). Έπειτα, οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον μηλονικό παράγωγο τύπου 128 διαλύεται σε AcOEt (1.8 mL) και προστίθεται στάγδην και στους 0 °C Et₂NH (90 μL, 1.15 mmol). Έπειτα, προστίθεται (HCHO)_n (42 mg, 1.4 mmol) και το προκύπτον μίγμα βράζεται με αναρροή για 4 h. Στη συνέχεια, συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύεται σε 5% NaHCO₃ (5 mL) και εκπλένεται με μικρές ποσότητες Et₂O (3 × 5 mL). Η υδατική φάση οξινίζεται υπό ψύξη με 2M HCl και εκχυλίζεται με AcOEt (3 × 5 mL). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται.

2-Βενζυλο ακρυλικό οξύ (**124α**)^[120]



Η ένωση **124α** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο A σύνθεσης ακρυλικών οξέων σε κλίμακα 54.3 mmol (13.6 g) μηλονικού διαιθυλεστέρα. Χρησιμοποιήθηκαν 54.3 mmol (1.25 g) Na και 54.3 mmol (9.30 g) βενζυλοβρωμιδίου. Παραλαμβάνονται 4.52 g (52%, τρία στάδια) της ένωσης **124α** ως λευκό στερεό.

Σ.τ. 64 - 68 °C.

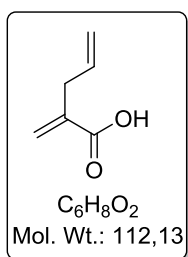
TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.3:0.3) = 0.6.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 3.89 (s, 2H, CH₂Ph), 5.78 (s, 1H, =CHH), 6.66 (s, 1H, =CHH), 7.36 – 7.59 (m, 5H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 37.5, 126.5, 128.5, 128.8, 129.1, 138.4, 139.6, 172.9.

HRMS (m/z): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₁₀H₉O₂⁻ 161.0608, βρέθηκε 161.0605.

2-Μεθυλενοπεντ-4-ενοϊκό οξύ (124δ) ^[212]



υγρό.

Η ένωση **124δ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο A σύνθεσης ακρυλικών οξέων σε κλίμακα 28.7 mmol (4.61 g) μηλονικού διαιθυλεστέρα. Χρησιμοποιήθηκαν 49.9 mmol (660 mg) Na και 28.7 mmol (3.47 g) αλλυλοβρωμιδίου. Παραλαμβάνονται 1.60 g (50%, τρία στάδια) της ένωσης **124δ** ως άχρωμο ελαιώδες

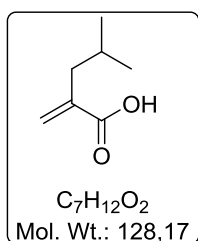
TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.4.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 3.06 (d, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂CH=CH₂), 5.04 - 5.10 (m, 1H, CH=CHH), 5.11 - 5.17 (m, 1H, CH=CHH), 5.71 (q, J = 1.4 Hz, 1H, C=CHH), 5.87 (ddt, J = 17.6, 9.6, 6.6 Hz, 1H, CH=CH₂), 6.36 (s, 1H, C=CHH), 11.41 (s, 1H, OH).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 35.5, 117.2, 128.2, 134.9, 138.5, 172.8.

HRMS (m/z): [M + H]⁺ υπολογίστηκε για C₆H₉O₂⁺ 113.0597, βρέθηκε 113,0597.

2-Μεθυλενο-4-μεθυλο-πεντανοϊκό οξύ (124ε) ^[120]



υγρό.

Η ένωση **124ε** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο A σύνθεσης ακρυλικών οξέων σε κλίμακα 13.9 mmol (3.00 g) μηλονικού διαιθυλεστέρα. Χρησιμοποιήθηκαν 13.9 mmol (320 mg) Na και 13.9 mmol (1.90 g) ισοβουτυλοβρωμιδίου. Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε στους 50 - 60 °C και αναδεύτηκε για 24 h.

Παραλαμβάνονται 1.06 g (55%, τρία στάδια) της ένωσης **124ε** ως υποκίτρινο

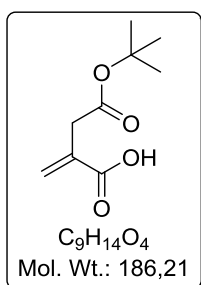
TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.3:0.3) = 0.6.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1.82 (sept, J = 6.8 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 2.17 (d, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH), 5.60 (d, J = 1.3 Hz, 1H, C=CHH), 6.32 (d, J = 1.6 Hz, 1H, CH₂C=CH).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.4, 27.2, 41.0, 128.4, 139.2, 173.1.

HRMS (m/z): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₇H₁₁O₂⁻ 127.0765, βρέθηκε 127.0762.

4-(*tert*-Βουτοξυ)-2-μεθυλενο-4-οξοβουτανοϊκό οξύ (**124η**) ^[197]



Μηλονικός διαιθυλεστέρας (1.10 g, 6.90 mmol) διαλύεται σε άνυδρο DMF (5.8 mL) και προστίθεται στάγδην 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο NaH (280 mg, 6.90 mmol) στους 0 °C. Έπειτα από ανάδευση για 15 min, προστίθεται 2-βρωμοοξικός *tert*-βουτυλεστέρας (1.35 g, 6.90 mmol) στους 0 °C και για διάστημα 2 h. Το μίγμα αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια αραιώνεται με Et₂O και H₂O. Η οργανική φάση εκπλένεται με H₂O (5 × 10 mL), ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα διαλύεται σε EtOH (4 mL) και ακολουθεί αργή προσθήκη διαλύματος KOH (1.20 g, 21.0 mmol) σε EtOH (20 mL) στους 0 °C και για διάστημα 2 h. Έπειτα από ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h, το μίγμα συμπυκνώνεται, το υπόλειμμα διαλύεται σε H₂O (20 mL) και εκπλένεται με Et₂O (3 × 10 mL). Η υδατική φάση οξινίζεται υπό ψύξη με διάλυμα 2M HCl έως pH = 1 και ακολουθούν εκχυλίσεις με AcOEt (3 × 10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα υποβάλλεται σε αντίδραση Knoevenagel, όπως περιγράφεται στην γενική μέθοδο A σύνθεσης ακρυλικών οξέων. Παραλαμβάνονται 700 mg (50%, 3 στάδια) της ένωσης **124η**, χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό, ως διάφανο κρυσταλλικό στερεό.

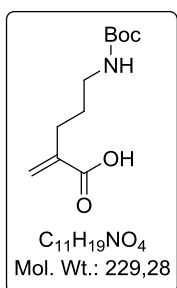
TLC R_f (PE/AcOEt/AcOH 3:3:0.2) = 0.6.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 3.25 (d, J = 0.7 Hz, 2H, CH₂CO), 5.78 (d, J = 1.1 Hz, 1H, C=CHH), 6.42 (s, 1H, C=CHH).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 27.9, 38.6, 81.3, 130.0, 134.0, 170.0, 171.6.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₉H₁₄O₄Na⁺ 209.0784, βρέθηκε 209.0787.

5-(*tert*-Βουτοξυκαρβονυλαμινο)-2-μεθυλενο πεντανοϊκό οξύ (**124ι**)



Η ένωση **124ι** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο B σύνθεσης ακρυλικών οξέων σε κλίμακα 18.7 mmol (2.03 g) TMT. Χρησιμοποιήθηκαν 17.0 mmol (4.01 g) (3-βρωμοπροπυλο)καρβαμικού *tert*-βουτυλεστέρα (**131**).

Παραλαμβάνονται 1.72 g (44%, τρία στάδια) της ένωσης **124i** ως άχρωμο κολλώδες στερεό.

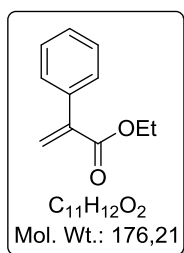
TLC R_f (PE/AcOEt/AcOH 3:3:0.2) = 0.6.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.57 – 1.76 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.31 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, CCH_2), 3.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, NCH_2), 5.64 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.27 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 28.5, 28.8, 40.1, 41.0, 79.4, 127.3, 139.6, 156.2, 171.9.

HRMS (m/z): $[\text{M} - \text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NO}_4^-$ 228.1241, βρέθηκε 228.1244.

2-Φαινυλο ακρυλικός αιθυλεστέρας (**133β**)^[198]



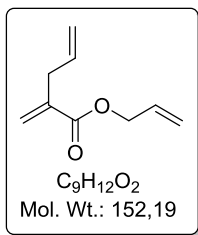
Σε διάλυμα του 2-φαινυλο οξικού αιθυλεστέρα (**134**) (1.00 g, 6.00 mmol) σε τολουόλιο (12 mL) προστίθενται διαδοχικά, παραφορμαλδεΐδη (550 mg, 18.0 mmol), K_2CO_3 (1.24 g, 18.0 mmol) και TBAI (53 mg, 0.30 mmol) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το μίγμα θερμαίνεται υπο αναρροή για 5 d. Ακολούθως, προστίθεται H_2O (20 mL) και η υδατική εκχυλίζεται με Et_2O (3×10 mL). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται. Τέλος, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης PE(40-60)/ Et_2O 9.5/0.5 \rightarrow 9/1. Παραλαμβάνονται 400 mg (38%) της ένωσης **133β** ως άχρωμο υγρό.

TLC R_f [PE (40 - 60 °C)/ Et_2O 1:1] = 0.4.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 4.30 (q, $J = 7.1$ Hz 0.7 Hz, 2H, CH_2CH_3), 5.90 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.36 (s, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 7.28 – 7.52 (m, 5H, Ar).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14.3, 61.2, 126.7, 128.2, 128.3, 128.4, 136.9, 141.6, 166.9.

2-Μεθυλενοπεντ-4-ενοϊκός αλλυλεστέρας (**133δ**)



Σε διάλυμα του ακρυλικού οξέος **124δ** (590 mg) σε άνυδρο DMF (9 mL) προστίθεται K_2CO_3 (740 mg) και ακολούθως αλλυλοβρωμίδιο (0.45 mL) και η αντίδραση αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h. Ακολουθεί αραίωση του μίγματος σε AcOEt (15 mL) και H_2O (10 mL). Η οργανική φάση εκπλένεται με HCl 2M (4 × 5 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 × 5 mL) και συμπυκνώνεται. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης PE(40-60)/Et₂O 10/0 → 9.8/0.2. Παραλαμβάνονται 510 mg (60%) της ένωσης **133δ** ως άχρωμο υγρό.

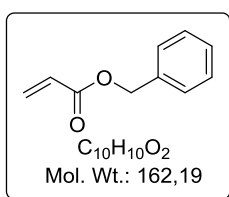
TLC R_f (PE/AcOEt 1:1) = 0.7

¹H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 3.02 - 3.11 (m, 2H, =CCH₂CH), 4.66 (dt, J = 5.6, 1.4 Hz, 2H, OCH₂), 4.99 - 5.20 (m, 2H, CCH₂CH=CH₂), 5.15 - 5.44 (m, 2H, OCH₂C=CH₂), 5.59 (q, J = 1.5 Hz, 1H, C=CHH), 5.70 - 6.10 (m, 2H, OCH₂CH, CCH₂CH), 6.23 (dt, J = 1.4, 0.8 Hz, 1H, C=CHH).

¹³C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 35.9, 65.4, 117.0, 118.1, 125.8, 132.2, 135.1, 139.0, 166.5.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για $C_9H_{12}O_2Na^+$ 175.0729, βρέθηκε 175.0722.

2-Βενζυλο-ακρυλικός εστέρας (133ζ)[213]



Σε διάλυμα βενζυλικής αλκοόλης (512 mg, 4.70 mmol) και Et_3N (1.00 mL, 7.10 mmol) σε άνυδρο DCM (5 mL) προστίθεται στάγδην ακρυλόυλο-χλωρίδιο (40 μL, 5.0 mmol) στους 0 °C. Έπειτα από ανάδευση για 30 min στους 0 °C και για 1 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το μίγμα αραιώνεται με AcOEt (15 mL) και H_2O (10 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με $NaHCO_3$ 5% (1 × 5 mL) και H_2O (4 × 5 mL). Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται υπεράνω Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης PE(40-60)/AcOEt 9/1 → 1/1. Παραλαμβάνονται 633 mg (78%) της ένωσης **133ζ** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f [PE (40-60 °C)/AcOEt 1:1] = 0.8.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 5.21 (s, 2H, CH_2), 5.85 (dd, $J = 10.3, 1.7$ Hz, 1H, CH), 6.18 (dd, $J = 17.3, 10.3$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 6.47 (dd, $J = 17.3, 1.7$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$), 7.62 – 7.21 (m, 5H, Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 66.3, 128.2, 128.3, 128.6, 131.1, 135.9, 166.0.

Γενική μέθοδος σύνθεσης των *H*-φωσφινικών διοξέων τύπου 70 μέσω *P*-Michael (Μέθοδος A)

Σε ξηρό αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος (0.50 g, 6.0 mmol) προστίθεται εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) (1.27 mL, 6.0 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 110 °C, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 1 h. Ακολούθως το μίγμα ψύχεται στους 0 °C και αραιώνεται με CH_2Cl_2 (0.9 mL). Ακολουθεί στάγδην προσθήκη του ακρυλικού παραγώγου (**124** ή **133**) (1.0 mmol) σε CH_2Cl_2 (0.7 mL) σε διάστημα 1 h και έπειτα το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό αδρανείς συνθήκες για 24 h. Στη συνέχεια, το μίγμα ψύχεται σε παγόλουτρο, προστίθεται αργά EtOH (1.3 mL) και το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό. Ακολουθεί αραίωση με H_2O (10 mL) και εκχυλίσεις με Et_2O (3 × 5 mL). Στη συνέχεια γίνεται οξίνιση της υδατικής φάσης με HCl 6M υπό ψύξη μέχρι pH~1, και πραγματοποιούνται εκχυλίσεις της υδατικής φάσης με AcOEt (5 × 5 mL). Έπειτα πραγματοποιείται κορεσμός της υδατικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα NaCl και εκ νέου εκχυλίσεις με AcOEt (2 × 5 mL). Τέλος, οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 × 5 mL), ξηραίνονται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό.

Γενική μέθοδος σύνθεσης των *H*-φωσφινικών διοξέων τύπου 70 μέσω πορείας δύο σταδίων *P*-Michael/σαπωνοποίησης (Μέθοδος B)

Σε ξηρό αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος (0.42 g, 5.0 mmol) προστίθεται εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) (1.06 mL, 5.0 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 110 °C, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 1 h. Ακολούθως το μίγμα ψύχεται στους 0 °C και αραιώνεται με CH_2Cl_2 (0.9 mL). Ακολουθεί στάγδην προσθήκη του ακρυλικού παραγώγου τύπου **133** (1.0 mmol) σε CH_2Cl_2 (0.7 mL) σε διάστημα 1 h και έπειτα το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό αδρανείς συνθήκες για 24 h. Στη συνέχεια, το μίγμα ψύχεται στους 0 °C, προστίθεται αργά EtOH (1.3 mL) και το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό. Ακολουθεί αραίωση με 5% NaHCO_3 (10 mL), εκχυλίσεις με Et_2O (2 × 5

mL), οξίνιση της υδατικής φάσης με HCl 6M υπό ψύξη μέχρι pH~1, και εκχυλίσαις της υδατικής φάσης με AcOEt (4 × 5 mL). Τέλος οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό.

Το προϊόν της προσθήκης *P*-Michael (1.0 mmol) διαλύεται σε EtOH (1.8 mL) και στη συνέχεια προστίθεται στους 0 °C, NaOH 4M (1.25 mL, 5.0 mmol) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό, αραιώση με H₂O (10 mL), εκχυλίσαις με Et₂O (3 × 5 mL), οξίνιση της υδατικής φάσης με HCl 6M έως pH~1 και εκχυλίσαις με AcOEt (4 × 5 mL). Τέλος, οι οργανικές φάσεις, συλλέγονται, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 × 5 mL), ξηραίνονται υπεράνω Na₂SO₄ και εξατμίζονται υπό κενό.

Γενική μέθοδος σύνθεσης των *H*-φωσφινικών διοξέων τύπου 70 μέσω πορείας τριών σταδίων *P*-Michael/αποπροστασίας (Μέθοδος Γ)

Διάλυμα του ακρυλικού παραγώγου τύπου **133** (1.0 mmol) και του παραγώγου **126** (240 mg, 1.13 mmol) σε DCM (1.8 mL) ψύχεται στους 0 °C και σε ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια, προστίθεται BSA (976 μL, 4.0 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 - 8 d. Ακολουθεί προσθήκη EtOH (1 mL) και ανάδευση για 15 min. Έπειτα, το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε AcOEt (15 mL) και H₂O (10 mL). Η υδατική φάση εκχυλίζεται με AcOEt (3 × 5 mL) και η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται. Το προϊόν τύπου **136** παραλαμβάνεται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης PE (40-60 °C)/AcOEt 1:1 → AcOEt.

Σε διάλυμα της ένωσης τύπου **136** (1.0 mmol) σε CH₂Cl₂/EtOH 1:1 (6 mL) προστίθεται TMSCl (2.5 mL, 20 mmol) υπό ατμόσφαιρα αργού και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης διαλύεται σε EtOH (10 mL) και ψύχεται στους 0 °C. Στη συνέχεια προστίθεται NaOH 4M (2.5 mL, 10 mmol) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό, αραιώση με H₂O, εκχυλίσαις της υδατικής φάσης με Et₂O (3 × 5 mL), οξίνιση της υδατικής φάσης με HCl 6M έως pH~1 και εκχυλίσαις της υδατικής φάσης με AcOEt (5 × 5 mL). Έπειτα πραγματοποιείται κορεσμός της υδατικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα NaCl και εκ νέου εκχυλίσαις με AcOEt (2 × 5 mL). Τέλος, οι οργανικές φάσεις συλλέγονται,

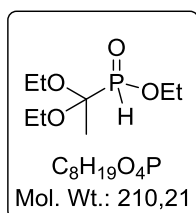
εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 × 5 mL), ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό.

Υποφωσφορώδες αμμώνιο ^[196]

Υδατικό διάλυμα H₃PO₂ 50% wt (2.5 ml, 24 mmol) ψύχεται στους 0 °C σε παγόλουτρο και ακολούθως προστίθεται υπό ανάδευση NH₄⁺HCO₃⁻ (1.91 g, 24 mmol). Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το παγόλουτρο αφαιρείται και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται και συλλέγεται λευκό στερεό. Το παραχθέν άλας H₂PO₂⁻NH₄⁺ ξηραίνεται υπεράνω P₂O₅. Παραλαμβάνεται (1.96 g, 98%) του υποφωσφορώδους αμμωνίου ως λευκό στερεό.

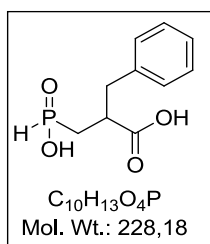
Σ.τ. 155-164 °C

Αιθυλο-(1,1-δαιθοξυαιθυλο) φωσφινικός εστέρας (126) ^[199]



Σε άνυδρο H₃PO₂ (66.7 mg, 1.00 mmol) προστίθεται υπό ατμόσφαιρα αργού και σε θερμοκρασία δωματίου κατά σειρά 1,1,1-τριαιθοξυαιθάνιο (0.38 mL, 2.5 mmol) και TFA (10 μL, 0.14 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση υπό ατμόσφαιρα αργού για 3 h. Ακολουθεί προσθήκη υδατικού διαλύματος NaHCO₃ 5% για την διακοπή της αντίδρασης, αραίωση με CHCl₃ (10 mL) και εκπλύσεις της οργανικής στιβάδας με NaHCO₃ 5% (3 × 5 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 × 5 mL). Τέλος, η οργανική στιβάδα ξηραίνεται με Na₂SO₄, συμπυκνώνεται υπό κενό, και προκύπτει η ένωση **126** ως άχρωμο έλαιο.

2-Βενζυλο-3-(υδροξυφωσφινυλο) προπιονικό οξύ (70α) ^[163]



Η ένωση **70α** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο Α σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος σε κλίμακα 81.6 mmol (6.60 g) και το ακρυλικό οξύ **124α** σε κλίμακα 13.6 mmol (2.10 g). Παραλαμβάνονται 2.82 g (91%) της ένωσης **70α** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.3

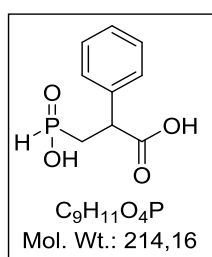
¹H NMR (200 MHz, D₂O + NaOD 3eq) δ 1.27 - 1.97 (m, 2H, PCH₂), 2.50 - 3.09 (m, 3H, CHCO, CH₂Ph), 6.83 (d, J = 509 Hz, 1H, PH), 7.24 (m, 5H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, D₂O + NaOD 3eq) δ 34.5 (d, $^1J_{PC}$ = 89.8 Hz), 39.9 (d, $^2J_{PC}$ = 10.9 Hz), 45.2, 126.5, 128.6, 129.2, 139.9, 183.0 (d, $^3J_{PC}$ = 8.3 Hz).

³¹P NMR (81 MHz, D₂O + NaOD 3eq) δ 28.8.

ES-MS m/z : [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₁₀H₁₂O₄P⁻ 227.2, βρέθηκε 227.1.

2-Φαινυλο-3-(υδροξυφωσφινυλο) προπιονικό οξύ (70β)



Η ένωση **70β** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο δύο σταδίων Β σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος σε κλίμακα 14.2 mmol (1.21 g) και ο ακρυλικός εστέρας **133β** σε κλίμακα 2.80 mmol (500 mg). Παραλαμβάνονται 415 mg (70%, δύο στάδια) της ένωσης **70β** ως άχρωμο κολλώδες στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.1.

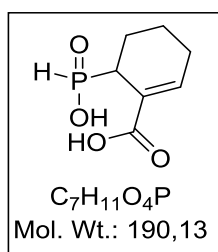
¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ 1.98 (td, J = 7.1 Hz, 15.3, 1H, PCHH), 2.33 (td, J = 8.1 Hz, 15.9, 1H, PCHH), 3.81 (dt, J = 7.6 Hz, 10.4, 1H, CH), 6.90 – 7.28 (m, 5H, Ar), 6.7 (d, J = 560 Hz, 1H, PH).

¹³C NMR (50 MHz, D₂O) δ 32.5 (d, $^1J_{PC}$ = 92.4 Hz), 44.9, 127.9, 128.1, 129.2, 137.6, 137.8, 176.2, 176.4.

³¹P NMR (81 MHz, D₂O) δ 33.6.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₉H₁₁O₄PNa⁺ 237.0293, βρέθηκε 237.0291.

6-Υδροξυφωσφινυλο-κυκλοεξ-2-ενοκαρβοξυλικό οξύ (70γ)



Η ένωση **70γ** παρασκευάστηκε μετά από σαπωνοποίηση του 6-υδροξυφωσφινουλομεθυλο-κυκλοεξ-2-ενοκαρβοξυλικού αιθυλεστέρα (366 mg, 1.68 mmol) με χρήση NaOH 2M (5.00 mmol, 4.2 mL) σε EtOH (5.5 mL) και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 d. Ακολούθησε συμπύκνωση υπό κενό, οξίνιση

της υδατικής φάσης με HCl 6N έως pH~1 και εκχύλιση με AcOEt (x3). Παραλαμβάνονται 200 mg (63%) της ένωσης **70γ** ως λευκό αφρώδες στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.3

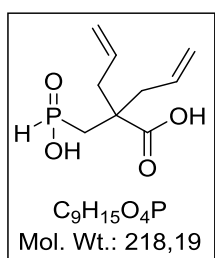
¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ 1.42 - 1.89 (m, 3H, PCHCH₂CH₂), 1.90 - 2.41 (m, 3H, PCHCH₂CH₂CH₂), 2.80 - 3.07 (m, 1H, PCH), 7.1 (d, $J = 559$ Hz, 1H, PH), 7.12 - 7.29 (m, 1H, CH=C).

¹³C NMR (50 MHz, D₂O) δ 18.3 (d, $^2J_{PC} = 3.9$ Hz), 20.5 (d, $^4J_{PC} = 3.1$ Hz), 25.0 (d, $^3J_{PC} = 3.3$ Hz), 35.1 (d, $^1J_{PC} = 90$ Hz), 35.2 (d, $^1J_{PC} = 89.4$ Hz), 124.8 (d, $^3J_{PC} = 7.1$ Hz), 146.1 (d, $^2J_{PC} = 9.4$ Hz), 170.3 (d, $^3J_{PC} = 1.3$ Hz).

³¹P NMR (81 MHz, D₂O) δ 37.1.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₇H₁₁O₄PNa⁺ 213.0293, βρέθηκε 213.0290

2-(Αλλυλο)-2-[(υδροξυφωσφινυλο)μεθυλο]-πεντ-4-ενοϊκό οξύ (70δ)



Η ένωση **70δ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο τριών σταδίων Γ σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 8 d. Χρησιμοποιήθηκαν το παράγωγο **126** σε κλίμακα 3.50 mmol (720 mg) και ο ακρυλικός εστέρας **133δ** σε κλίμακα 2.30 mmol (350 mg).

Παραλαμβάνονται 110 mg (20%, τρία στάδια) της ένωσης **70δ**

ως υποκίτρινο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.2

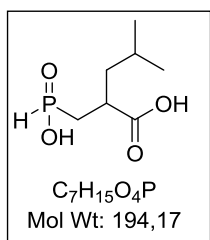
¹H NMR (200 MHz,) δ 2.09 (d, 2H, $J = 15.9$ Hz, PCH₂), 2.49 (d, 4H, $J = 6.7$ Hz, 2 x CH₂CH), 5.01 - 5.38 (m, 4H, 2 x CH=CH₂), 5.60 - 5.99 (m, 2H, 2 x CH), 7.3 (d, $J = 571$ Hz, 1H, PH).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 34.7 (d, $^1J_{PC} = 94.1$ Hz), 40.5 ($^2J_{PC} = 7.4$ Hz), 47.5 ($^3J_{PC} = 2.5$ Hz), 120.2, 132.5, 179.7 (d, $^3J_{PC} = 3.4$ Hz).

³¹P NMR (81 MHz, D₂O) δ 32.5.

HRMS (m/z): [M + H]⁺ υπολογίστηκε για C₉H₁₆O₄P⁺ 219.0786, βρέθηκε 219.0783.

2-[(Υδροξυφωσφινυλο)μεθυλο]-4-μεθυλο-πεντανοϊκό οξύ (70ε)



Η ένωση παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Α σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος σε κλίμακα 11.4 mmol (950 mg) και το ακρυλικό οξύ **124ε** σε κλίμακα 2.00 mmol (240 mg). Παραλαμβάνονται 210 mg (55%) της ένωσης **70ε** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.5

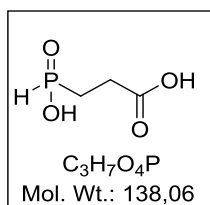
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 0.91 [t, J = 6.3 Hz, 6H, CH(CH₃)₂], 1.21 - 1.76 [m, 3H, CH₂CH(CH₃)₂], 1.77 - 2.01 (m, 1H, PCHH), 2.01 - 2.31 (m, 1H, PCHH), 2.67 - 3.00 (m, 1H, CHCO), 7.2 (d, J = 566 Hz, 1H, PH).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.3, 22.4, 25.7, 31.2 (d, $^1J_{PC}$ = 95 Hz), 37.0, 42.5 (d, $^2J_{PC}$ = 12.5 Hz), 179.6 (d, $^3J_{PC}$ = 4.6 Hz).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 36.0.

ES-MS m/z : [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₇H₁₄O₄P 193.2, βρέθηκε 193.2.

3-(Υδροξυφωσφινυλο)-προπιονικό οξύ (70ζ)



Η ένωση **70ζ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο τριών σταδίων Γ σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το παράγωγο **126** σε κλίμακα 2.7 mmol (600 mg) και ο ακρυλικός εστέρας **133ζ** σε κλίμακα 2.4 mmol (390 mg). Το προϊόν της αποπροστασίας συμπυκνώνεται, αραιώνεται με H₂O και ακολουθούν εκχυλίσεις της υδατικής φάσης με Et₂O (×3). Έπειτα πραγματοποιείται οξίνιση της υδατικής φάσης με HCl 6M έως pH~1, η υδατική φάση συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα της συμπύκνωσης διαλύεται σε AcOH. Το προκύπτον στερεό διηθείται και ακολούθως το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Παραλαμβάνονται 220 mg (66%, τρία στάδια) της ένωσης **70ζ** ως υποκίτρινο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.2.

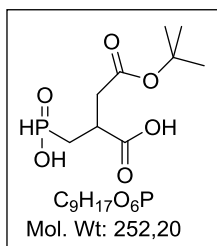
¹H NMR (200 MHz, D₂O) δ 1.83 – 2.12 (m, 2H, PCH₂), 2.45 (dt, J = 7.6, 15.1 Hz, 2H, CH₂CO), 7.1 (d, J = 548 Hz, 1H, PH).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 25.8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 92.0$ Hz), 26.5, 173.7 (d, $^3J_{\text{PC}} = 13.4$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, d_6 -DMSO) δ 27.7.

HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_4\text{PNa}^+$ 160.9976, βρέθηκε 160.9980.

4-(*tert*-Βουτοξυ)-2-[(υδροξυφωσφινυλο)μεθυλο]-4-οξο-βουτανοϊκό οξύ (70η) [197]



Η ένωση **70η** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Α σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος σε κλίμακα 12.6 mmol (1.05 g) και το ακρυλικό οξύ **124η** σε κλίμακα 2.1 mmol (400 mg). Παραλαμβάνονται 300 mg (57%) της ένωσης **70η** ως

λευκό στερεό.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1) = 0.3.

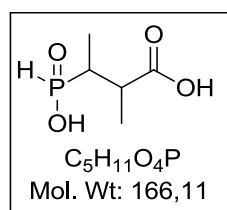
^1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.38 [s, 9H, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$], 1.54 – 2.13 (m, 2H, PCH_2), 2.53 – 2.71 (m, 2H, CHCH_2CO), 2.76 – 3.04 (m, 1H, CHCO), 7.1 (d, $J = 536$ Hz, 1H, PH).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 27.8, 31.3 (d, $^1J_{\text{PC}} = 90.9$ Hz), 35.1 (d, $^3J_{\text{PC}} = 2.5$ Hz), 37.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 8$ Hz), 80.1, 170.5, 174.8 (d, $^3J_{\text{PC}} = 9.8$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3) δ 35.2.

HRMS (m/z): $[\text{M} - \text{H}]^-$ υπολογίστηκε για $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6\text{P}^-$ 251.0690, βρέθηκε 251.0689.

3-(Υδροξυφωσφινυλο)-2-μεθυλο-βουτανοϊκό οξύ (70θ)



Η ένωση **70θ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο δύο σταδίων Β σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος σε κλίμακα 44.0 mmol (3.50 g) και ο τιγκλικός εστέρας **133θ** σε κλίμακα 8.80 mmol (1.05 g). Το προϊόν της

σαπωνοποίησης κρυστάλλωσε σε Et₂O, από όπου προέκυψαν 240 mg (60%, δύο στάδια) της ένωσης **70θ** ως λευκό στερεό εμπλουτισμένο στο κύριο διαστερεοϊσομερές (dr ~ 9.5:1).

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.14

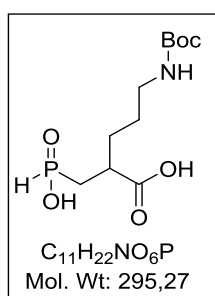
¹H NMR (200 MHz, D₂O, κύριο ισομερές) δ 0.98 (td, 6H, $J = 7.3, 19.7$ Hz, 2 x CH₃), 1.71 – 2.02 (m, 1H, PCH), 2.67 (m, 1H, CHCO), 6.8 (d, $J = 554$ Hz, 1H, PH).

¹³C NMR (50 MHz, D₂O, κύριο ισομερές) δ 8.6, 14.3, 14.5, 35.8 (d, $^1J_{PC} = 92.9$ Hz), 39.5, 178.7 (d, $^3J_{PC} = 8.9$ Hz).

³¹P NMR (81 MHz, D₂O (κύριο ισομερές) δ 41.2.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₅H₁₁O₄PNa⁺ 189.0293, βρέθηκε 189.0295

5-[(*tert*-Βουτοξυ)καρβονυλο]αμινο]-2-[(υδροξυφωσφινυλο)μεθυλο]πεντανοϊκό οξύ (**70ι**)



Η ένωση **70ι** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο Α σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος σε κλίμακα 21.6 mmol (1.81 g) και το ακρυλικό οξύ **124ι** σε κλίμακα 3.60 mmol (750 mg). Παραλαμβάνονται 700 mg (66%) της ένωσης **70ι** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.3.

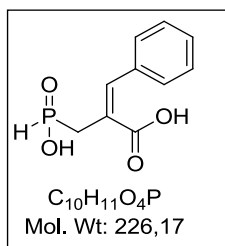
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 0.85 – 2.42 [m, 15H, (CH₃)₃], PCH₂, CHCH₂CH₂], 2.53 – 3.46 (m, 3H, CH₂NH, CHCO), 7.2 (d, $J = 566$ Hz, 1H, PH).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 27.0, 28.5, 30.2, 32.0, 38.5, 39.6 (d, $^1J_{PC} = 104.4$ Hz), 80.2, 157.2, 177.4, 177.5.

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 35.6.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₁₁H₂₂NO₆PNa⁺ 318.1082, βρέθηκε 318.1080.

(*E*)-2-[(Υδροξυφωσφινυλο)μεθυλο]-3-φαινυλο-ακρυλικό οξύ (**70κ**)



Η ένωση **70k** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύμφωνα με τη γενική μέθοδο τριών σταδίων Γ σύνθεσης *H*-φωσφινικών διοξέων. Χρησιμοποιήθηκαν το παράγωγο **126** σε κλίμακα 1.90 mmol (400 mg) και το ακρυλικό οξύ **137** σε κλίμακα 2.10 mmol (490 mg), ενώ έγινε χρήση LiOH 1M (4.00 mmol, 6.2 ml) σε THF (2.6 ml) στο τελικό στάδιο της σαπωνοποίησης. Παραλαμβάνονται 260 mg (61%, τρία σταδια) της ένωσης **70k** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.3

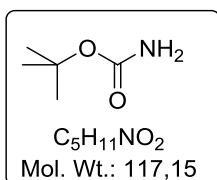
¹H NMR (200 MHz, D₂O + NaOD 3eq) δ 2.81 (d, 2H, PCH₂, $J = 19.7$ Hz), 7.0 (d, 1H, $J = 526$ Hz, PH), 7.1 – 7.58 (m, 5H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, D₂O + NaOD 3eq) δ 33.2 (d, $^1J_{PC} = 86.8$ Hz), 128.2, 128.6, 129.3, 131.2, 131.4, 136.2, 136.3, 136.4, 136.6, 176.3, 176.3.

³¹P NMR (81 MHz, D₂O + NaOD 3eq) δ 27.2.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₁₀H₁₁O₄PNa⁺ 249.0292, βρέθηκε 249.0293.

Γενική μέθοδος σύνθεσης του καρβαμικού-*tert*-βουτυλεστέρα (**92**) ^[186]



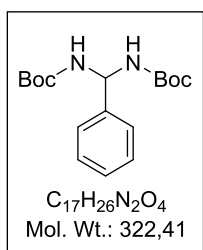
Σε διάλυμα *t*-BuOH (74 mg, 1.0 mmol) σε βενζόλιο (0.62 mL) προστίθεται αρχικά στερεό NaOCN (130 mg, 2.0 mmol). Το αιώρημα που προκύπτει αναδεύεται αρκετά αργά, καθώς προστίθεται στάγδην TFA (0.16 mL, 2.1 mmol) με γρήγορο ρυθμό. Όταν η προσθήκη του οξέος ολοκληρώνεται (10-12 min), η αντίδραση αφήνεται υπο αργή ανάδευση για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24h, προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης H₂O (0.20 mL) και η ανάδευση συνεχίζεται για 15 min. Έπειτα, αφαιρείται η στιβάδα του βενζολίου και η υδατική φάση εκπλένεται με βενζόλιο (2 × 0.7 mL). Οι οργανικές φάσεις που έχουν συλλεχθεί, εκπλένονται στη συνέχεια με 5% NaOH (1 × 0.6 mL) και με H₂O (1 × 0.6 mL), ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται. Προκύπτει η ένωση **92** ως λευκό στερεό (νηματοειδείς βελόνες). Τα φυσικά και φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [214].

Σ.τ: 104-109 °C

Γενική μέθοδος σύνθεσης των *N*-Boc αμιναλών τύπου 89

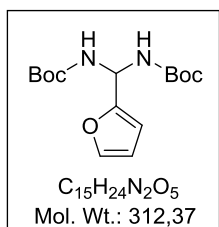
Σε αιώρημα της αλδεΐδης (1.0 mmol) και του καρβαμικού *tert*-βουτυλεστέρα (195 mg, 1.67 mmol) σε Ac₂O (250 μ L), προστίθεται TFA (6.9 μ L, 0.090 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 15 min – 48 h. Το στερεό που προκύπτει διηθείται υπό κενό, ακολούθως προστίθεται σε PE (10 mL) και αναδεύεται για επιπλέον 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η *N*-Boc-αμινάλη τύπου **89** λαμβάνεται ως στερεό μετά από διήθηση και εκπλύσεις με PE (7 \times 5 mL).

(Φαινυλομεθυλενο)δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (**89α**)



Η ένωση **89α** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (416 mg, 3.91 mmol) βενζαλδεΐδης μετά από 48h ανάδευσης. Παραλαμβάνονται 530 mg (42%) της ένωσης **89α** ως λευκό στερεό. Τα φυσικά και φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

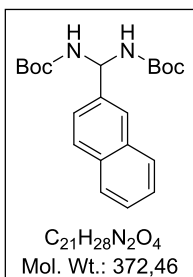
(Φουρανο-2-υλομεθυλενο)-δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (**89λ**)



Η ένωση **89λ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (192 μ L, 2.30 mmol) της 2-φουρανοκαρβοξαλδεΐδης, μετά από 10 min ανάδευσης. Παραλαμβάνονται 410 mg (57%) της ένωσης **89λ** ως καφέ στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

Σ.τ: 135 - 137 °C

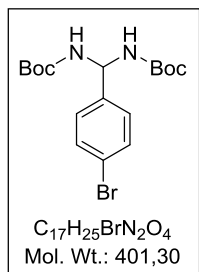
(Ναφθαλενο-2-υλομεθυλενο)-δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (**89μ**)



Η ένωση **89μ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (180 μ L, 1.32 mmol) της 2-ναφθαλδεΐδης μετά από 24 h ανάδευσης. Παραλαμβάνονται 380 mg (78%) της ένωσης **89μ** ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που

αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

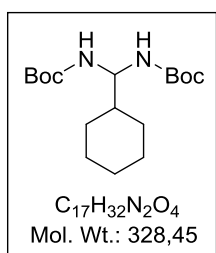
[(4-Βρωμοφαινυλο)μεθυλενο]-δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (89ν)



Η ένωση **89ν** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (250 mg, 1.40 mmol) της 4-βρωμοβενζαλδεΐδης μετά από 3 h ανάδευσης. Παραλαμβάνονται 320 mg (57%) της ένωσης **89ν** ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

Σ.τ.: 147 - 149 °C

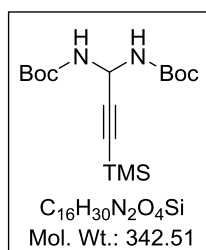
(Κυκλοεξυλομεθυλενο)-δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (89ξ)



Η ένωση **89ξ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (123 mg, 1.11 mmol) της κυκλοεξανοκαρβοξαλδεΐδης μετά από 1 h ανάδευσης. Παραλαμβάνονται 220 mg (67%) της ένωσης **89ξ** ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

(3-(Τριμεθυλοσιλυλο)προπ-2-υν-1,1-διϋλο)-δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (89ο)

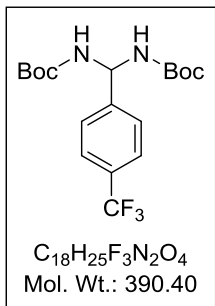


Η ένωση **89ο** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (245 μ L, 1.73 mmol) της 3-(τριμεθυλοσιλυλο)-προπιολαλδεΐδης μετά από 24 h ανάδευσης. Παραλαμβάνονται 210 mg (37%) της ένωσης **89ο** ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

Σ.τ. : 118 - 120 °C

[(4-(Τριφθορομεθυλο)φαινυλο)μεθυλενο]δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (89π)



Η ένωση **89π** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (200 mg, 1.11 mmol) της 4-(τριφλουορομεθυλο)βενζαλδεΐδης. Παραλαμβάνονται 200 mg (50%) της ένωσης **89π** ως λευκό στερεό.

Σ.τ. : 152 - 154 °C.

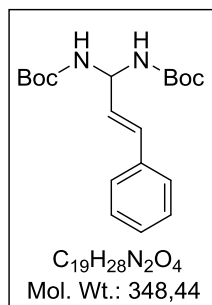
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (s, 18H, 2 x (CH₃)₃), 5.63 (br s, 1H, 2 x NH), 6.08 (t, *J* = 8.0 Hz, CHAr), 7.47 - 7.68 (m, 4H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 28.3, 61.1, 80.4, 124.1 (q, ¹*J*_{CF} = 271.6 Hz), 125.4, 125.5, 126.5, 130.0 (q, ³*J*_{CF} = 32.9 Hz), 144.1, 155.1.

¹⁹F NMR (188 MHz, CDCl₃) δ -20.6

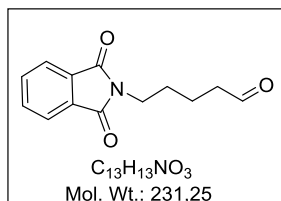
HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₁₈H₂₅N₂O₄Na⁺, 413.1658, βρέθηκε 413.1660.

(*E*)(3-Φαινυλοπροπ-2-ενο-1,1-διυλο)δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (89ρ)



Η ένωση **89ρ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (556 mg, 4.12 mmol) της *trans*-κινναμπαλδεΐδης. Παραλαμβάνονται 260 mg (11%) της ένωσης **89ρ** ως λευκό στερεό. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [180].

5-(1,3-Διοξοϊσοϊνδολινο-2-υλο)πεντανάλη (139)

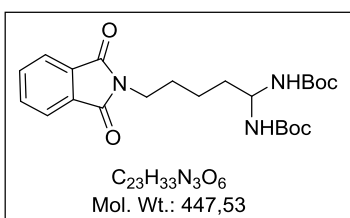


Σε σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται φθαλικός ανυδρίτης (1.05 g, 6.91 mmol) και 5-αμινο-πεντανόλη (700 mg, 6.91 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 140 °C για 30 min. Ακολουθεί καθαρισμός του μίγματος με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης P.E.40-60°C/AcOEt (2/1) → AcOEt. Παραλαμβάνονται 800 mg (50%) της 2-(5-υδροξυ-πεντυλο)-ισοϊνδολο-1,3-δίωνης ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃:MeOH 9.5:0.5) = 0.4

Σε διάλυμα DMSO (0.32 mL, 4.70 mmol) σε άνυδρο DCM (3 mL) προστίθεται αργά και υπο ψύξη στους -75 °C διάλυμα (COCl)₂ (2M σε DCM, 2.5 mL). Έπειτα από 5 min ανάδευσης του μίγματος στην ίδια θερμοκρασία προστίθεται στάδην διάλυμα της 2-(5-υδροξυ-πεντυλο)-ισοϊνδολο-1,3-διόνης (500 mg, 2.20 mmol) σε άνυδρο DCM (2 mL). Μετά την πάροδο 15 min προστίθεται DIPEA (2 mL, 6.50 mmol). Σε αυτό το σημείο η θερμοκρασία αφήνεται να ανέλθει στους -30 °C και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min ακόμα. Ακολουθεί συμπύκνωση, διάλυση του υπολλείμματος σε AcOEt (15 mL) και εκπλύσεις με H₂O (3 × 5 mL), με κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 mL), ξήρανση με Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό κενό. Παραλαμβάνονται 450 mg (88%) της ένωσης **139** ως λευκό στερεό. Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε απευθείας στην επόμενη αντίδραση σύνθεσης της *N*-Boc-αμινάλης. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι πανομοιότυπα με αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία [204].

[5-(1,3-Διοξοϊσοϊνδολιν-2-υλο)πεντανο-1,1-διϋλο]δικαρβαμικός δι-*tert*-βουτυλεστέρας (89σ)



Η ένωση **89σ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (400 mg, 1.69 mmol) της 5-(1,3-διοξοϊσοϊνδολινο-2-υλο)πεντανάλης. Παραλαμβάνονται 420 mg (55%) της ένωσης **89σ** ως λευκό στερεό.

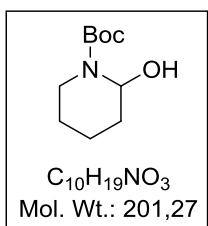
Σ.τ. : 168 - 170 °C

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.20 - 1.99 (m, 24H, CH₂CH₂CH₂CH, 2 x (CH₃)₃), 3.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂N), 4.80 (m, 1H, CHNH), 5.02 – 5.37 (br s, 1H, NHBoc), 7.63 - 7.91 (m, 4H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.9, 28.0, 28.34, 34.0, 37.6, 79.6, 123.2, 132.1, 133.92, 154.9, 168.4.

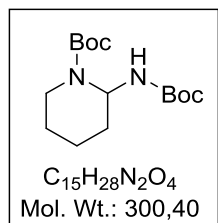
HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₃H₃₃N₃O₆Na⁺, 470.5212, βρέθηκε 470.2276.

2-(Υδροξυπιπεριδιν-1-καρβοξυλικός *tert*-βουτυλεστέρας (142) [205]



Σε διάλυμα DMSO (0.4 mL, 5.60 mmol) σε άνυδρο DCM (2.5 ml) προστίθεται αργά και υπο ψύξη στους -78 °C διάλυμα (COCl)₂ (2M σε DCM, 3.3 mL). Έπειτα από 5 min ανάδευσης του μίγματος στην ίδια θερμοκρασία προστίθεται στάδην διάλυμα του (5-υδροξυπεντυλο)καρβαμικού *tert*-βουτυλεστέρα (810 mg, 4 mmol) σε άνυδρο DCM (24 mL). Μετά την πάροδο 25 min προστίθεται DIPEA (3.7 mL, 2.0 mmol). Σε αυτό το σημείο η θερμοκρασία αφήνεται να ανέλθει στους -30 °C και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min ακόμα. Ακολουθεί συμπύκνωση, αραίωση του υπολείμματος σε AcOEt (40 mL) και εκπλύσεις με H₂O (10 mL), NaHCO₃ (2 × 10 mL), H₂O (3 × 10mL), με κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 mL), ξήρανση με Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό κενό. Παραλαμβάνονται 680 mg (85%) της ένωσης **142** ως υποκίτρινο έλαιο. Λόγω της αστάθειας της συγκεκριμένης αλδεΐδης δεν έγινε χρωματογραφικός καθαρισμός και το προϊόν χρησιμοποιήθηκε απευθείας στην επόμενη αντίδραση σύνθεσης της αντίστοιχης *N*-Boc-αμινάλης.

2-[(*tert*-Βουτοξυκαρβονυλο)αμινο]πιπεριδινό-1-καρβοξυλικός *tert*-βουτυλεστέρας (**89T**)



Η ένωση **89T** παρασκευάστηκε σύμφωνα με την γενική μέθοδο παρασκευής *N*-Boc-αμιναλών σε κλίμακα (140 mg, 0.70 mmol) του 2-(υδροξυπιπεριδινό)-1-καρβοξυλικού *tert*-βουτυλεστέρα. Παραλαμβάνονται 220 mg (95%) της ένωσης **89T** ως λευκό στερεό.

Σ.τ. 123-126 °C

TLC *R_f* [PE (40-60°C):AcOEt:AcOH 3:3:0.2] = 0.8

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.15 – 1.83 (m, 24H, 2 x (CH₃)₃, CH₂CH₂CH₂CH), 2.79 (t, *J* = 12.2 Hz, 1H, NCHH), 3.90 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, NCHH), 5.03 – 5.22 (m, 1H, NH), 5.73 – 5.95 (m, 1H, CHNH).

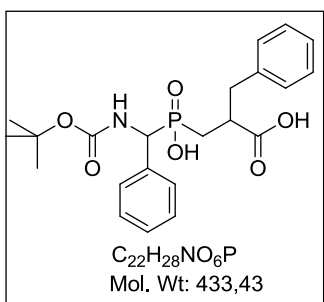
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 18.6, 24.8, 28.3, 30.0, 39.1, 58.7, 77.2, 79.4, 79.8, 154.4.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₁₅H₂₈N₂O₄Na⁺, 323.1941, βρέθηκε 323.1949.

Γενική μέθοδος αντίδρασης αμιδοαλκυλίωσης των Η-φωσφινικών διοξέων τύπου 70 και N-Boc αμιναλών 89 παρουσία DIC και BF₃·OEt₂ 20%

Σε αιώρημα του φωσφινικού διοξέος τύπου **70** (1.0 mmol) και της κατάλληλης N-Boc αμινάλης τύπου **89** (1.0 mmol) σε ξηρό CH₂Cl₂ (1.0 - 1.5 mL) φωσφινικού υποστρώματος) προστίθενται υπό ατμόσφαιρα αργού, αρχικά το καρβοδιϊμίδιο DIC (152 μ L, 1.0 mmol) και έπειτα το οξύ Lewis BF₃·OEt₂ (25 μ L, 0.20 mmol). Μετα από ανάδευση του μίγματος της αντίδρασης για 1 - 72 h σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού, ακολουθεί διακοπή της αντίδρασης υπό ψύξη, με στάγδην προσθήκη αραιού διαλύματος HCl 0.1M και ακόλουθη ανάδευση για ~10 min. Το μίγμα αραιώνεται με AcOEt (20 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται με HCl 1M (3 \times 5 mL), και H₂O (1 \times 5 mL) ξηραίνεται υπεράνω Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται χρωματογραφικά με σύστημα έκλουσης CHCl₃/MeOH/AcOH 7/0.05/0.05 \rightarrow 7/0.4/0.4. Ακολουθεί διάλυση του υπολείμματος σε NaHCO₃ 5% (10 mL), εκπλύσεις της υδατικής φάσης με Et₂O (5 \times 5 mL), οξίνιση της υδατικής υπό ψύξη με HCl 2M έως pH~1 και εκχυλίσεις με AcOEt (3 \times 10 mL). Τέλος, οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, εκπλένονται με HCl 1M (1 \times 5 mL), H₂O (1 \times 5 mL), ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται.

**2-Βενζυλο-3-[[1-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)-2-φαινυλο]-
(υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104α)**



Η ένωση **104α** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70α** σε κλίμακα 0.18 mmol (40 mg) και η N-Boc αμινάλη **89α** σε κλίμακα 0.18 mmol (50 mg). Παραλαμβάνονται 59 mg (84%) της ένωσης **104α** ως υποκίτρινο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.53

¹H NMR (200 MHz, d₆.DMSO) δ 1.15 – 2.26 (m, 11H, (CH₃)₃, PCH₂), 2.65 – 3.05 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 4.89 (m, 1H, CHP), 7.04 – 7.48 (m, 9H, Ar), 7.66 – 7.87 (m, 1H, NH).

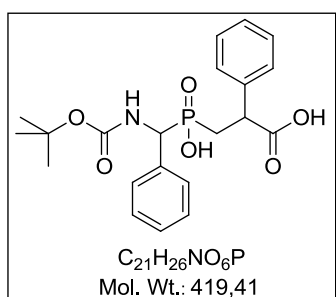
¹³C NMR (50 MHz, d₆.DMSO) δ 27.3 (d, ¹J_{PC} = 78.2 Hz), 28.2 (d, ¹J_{PC} = 91.7 Hz), 28.3, 54.8 (d, ¹J_{PC} = 97.7 Hz), 55.2 (d, ¹J_{PC} = 97.7 Hz), 78.6, 78.7, 126.4, 127.1,

128.0, 128.3, 129.0, 129.1, 136.5, 136.6, 138.8, 138.9, 155.3, 155.5, 175.1, 175.2, 175.3, 175.4.

^{31}P NMR (81 MHz, d_6 -DMSO) δ 42.5, 42.8.

HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{PNa}^+$ 456.1551, βρέθηκε 456.1556.

2-Φαινυλο-3-[[1-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)-2-φαινυλο]-(υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104β)



Η ένωση **104β** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 1.5 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70β** σε κλίμακα 1.12 mmol (230 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89α** σε κλίμακα 1.12 mmol (380 mg). Προκύπτει υποκίτρινο στερεό (300 mg, 64%), το οποίο ανακρυσταλλώθηκε από AcOEt. Παραλαμβάνονται 305 mg (65%) της ένωσης **104β** ως λευκό στερεό.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1) = 0.3

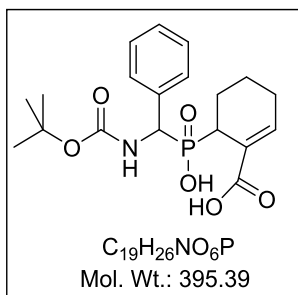
^1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.28 (m, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.72 – 2.13 (m, 1H, PCHH), 2.49 – 2.73 (m, 1H, PCHH), 3.52 – 3.82 (m, 1H, CHCO), 4.72 – 5.05 (m, 1H, CHP), 7.03 - 7.44 (m, 10H, Ar) 7.54 – 7.77 (m, 1H, NH).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 28.3, 30.2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 91.5$ Hz), 30.4 (d, $^1J_{\text{PC}} = 90.0$ Hz), 44.9, 45.1, 54.5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 98.3$ Hz), 55.5 (d, $^1J_{\text{PC}} = 99.4$ Hz), 78.8, 127.3, 127.7, 128.2, 128.4, 128.5, 128.5, 128.7, 136.5, 136.7, 140.2, 140.4 155.4, 155.5, 155.6, 173.9, 174.0, 174.1, 174.2.

^{31}P NMR (81 MHz, d_6 -DMSO + 6% HCOOH) δ 42.8, 43.2.

HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{PNa}^+$ 442.1395, βρέθηκε 442.1390.

6-[[1-(*tert*-Βουτοξυκαρβονυλαμινο)-(φαινυλομεθυλο)]-(υδροξυ)φωσφινυλο]-κυκλοεξ-1-ενο-1-καρβοξυλικό οξύ (104γ)



Η ένωση **104γ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 5 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70γ** σε κλίμακα 0.35 mmol (70 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89α** σε κλίμακα 0.35 mmol (130 mg). Παραλαμβάνονται 110 mg (79%) της ένωσης **104γ** ως υποκίτρινο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.7

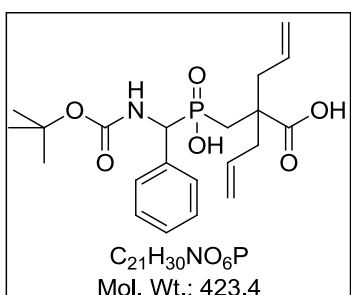
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 1.08 – 2.35 (m, 15H, (CH₃)₃), CH₂CH₂CH₂), 2.93 – 3.22 (m, 1H, PCHCH₂), 4.90 – 5.16 (m, 1H, CHP), 6.93 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H CH=C), 7.16 – 7.54 (m, 5H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 18.4 (d, ³*J*_{PC} = 37.7 Hz), 22.9 (d, ²*J*_{PC} = 48.3 Hz), 24.6, 28.2, 32.0 (d, ¹*J*_{PC} = 85.9 Hz), 32.9 (d, ¹*J*_{PC} = 85.9 Hz), 53.8 (d, ¹*J*_{PC} = 121.8 Hz), 55.7 (d, ¹*J*_{PC} = 121.8 Hz), 78.6, 78.7, 126.9, 127.0, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 128.5, 128.5, 137.1, 137.2, 139.8, 139.9, 140.2, 140.4 155.1, 155.3, 168.5, 168.6.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 41.9, 43.3.

HRMS (*m/z*): [M + K]⁺ υπολογίστηκε για C₁₉H₂₆NO₆PK⁺ 434.1135, βρέθηκε 434.1131.

2-Αλλυλο-2-[[(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)-(φαινυλομεθυλο)]-(υδροξυ)φωσφινυλο)-μεθυλο]-πεντ-4-ενοϊκό οξύ (**104δ**)



Η ένωση **104δ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70δ** σε κλίμακα 0.41 mmol (100 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89α** σε κλίμακα 0.41 mmol (140 mg). Παραλαμβάνονται 135 mg (79%) της ένωσης **104δ** ως άχρωμο έλαιο.

άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.3

¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 1.38 [s, 9H, (CH₃)₃], 1.78 – 2.05 (m, 2H, PCH₂), 2.21 – 2.46 (m, 4H, 2 x CH₂C=), 4.79 (dd, 1H, *J* = 9.9, 16.1 Hz, CHP), 4.91 – 5.16 (m, 4H, 2 x (=CH₂)), 5.55 – 5.87 (m, 2H, 2 x CH=), 7.17 – 7.49 (m, 5H, Ar) 7.66 (d,

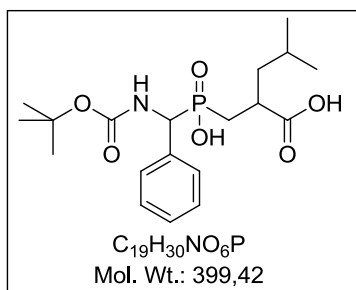
$J = 9.8$ Hz, 1H, *NH*).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 28.3, 29.6 (d, $^1J_{\text{PC}} = 91.0$ Hz), 47.5 (d, $^2J_{\text{PC}} = 3.9$ Hz), 56.1 (d, $^1J_{\text{PC}} = 98.2$ Hz), 78.6, 118.6, 127.0, 127.9, 128.2, 128.3, 134.0, 134.1, 136.5, 155.3, 155.4, 175.6, 175.8.

^{31}P NMR (81 MHz, d_6 -DMSO) δ 42.6.

HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{PNa}^+$ 446.1708, βρέθηκε 446.1708.

2-[[*tert*-Βουτοξυκαρβονυλαμινο)-(φαινυλομεθυλο)](υδροξυ)-φωσφινυλο-μεθυλο]-4-μεθυλοπεντανοϊκό οξύ (104ε)



Η ένωση **104ε** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοακυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 2.5 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70ε** σε κλίμακα 0.69 mmol (134 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89α** σε κλίμακα 0.69 mmol (227 mg). Παραλαμβάνονται 220 mg (80%) της ένωσης **104ε** ως

αφρώδες στερεό.

TLC R_f ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1) = 0.4

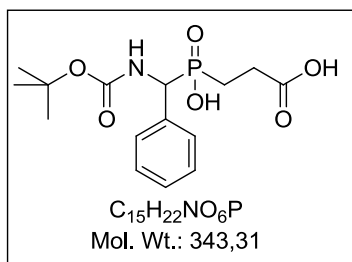
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.82 (dd, 6H, $J = 6.1, 9.5$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.16 - 2.14 (m, 14H, $(\text{CH}_3)_3$, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, PCH_2), 2.5 - 2.72 (m, 1H, CHCO), 4.85 (m, 1H, CHP), 7.17 - 7.52 (m, 5H, Ar), 7.65 - 7.83 (m, 1H, *NH*).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 21.8, 23.2, 25.6, 28.3, 28.90 (d, $^1J_{\text{PC}} = 90.7$ Hz), 29.0 (d, $^1J_{\text{PC}} = 90.7$ Hz), 37.0, 42.6 (d, $^2J_{\text{PC}} = 8.3$ Hz), 43.0 (d, $^2J_{\text{PC}} = 9.9$ Hz), 78.7, 127.1, 127.2, 128.0, 128.2, 128.3, 128.3, 136.6, 137.7, 155.3, 155.5, 176.3, 176.4, 176.6.

^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3) δ 42.7, 42.7.

HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{K}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_6\text{P}^-$ 438.1448, βρέθηκε 438.1443

3-[[*tert*-Βουτοξυκαρβονυλαμινο)-(φαινυλομεθυλο)](υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104ζ)



Η ένωση **104z** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 1 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70z** σε κλίμακα 0.44 mmol (60 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89a** σε κλίμακα 0.44 mmol (140 mg). Παραλαμβάνονται 130 mg (85%) της ένωσης **104z** ως

λευκό στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.3.

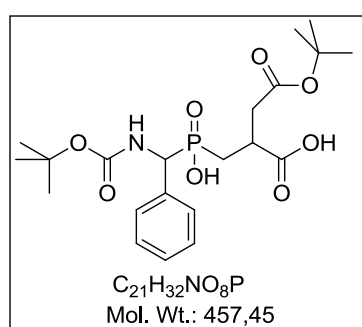
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO + 2% HCOOH) δ 1.37 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.59 – 2.08 (m, 2H, PCH₂), 2.17 – 2.42 (m, 2H, CH₂CO), 4.90 (dd, *J* = 16.6, 10.1 Hz, 1H, NHCH), 7.10 – 7.55 (m, 5H, Ar), 7.80 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 22.0 (d, ¹*J*_{PC} = 92 Hz), 26.5, 26.6, 28.3, 54.5 (d, ¹*J*_{PC} = 98.5 Hz), 78.8, 127.3, 128.1, 128.2, 128.3, 136.5, 155.4, 155.5, 173.5, 173.9.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO + 2% HCOOH) δ 44.0.

HRMS (m/z): [M + K]⁺ υπολογίστηκε για C₁₅H₂₂NO₆PK⁺ 382.0822, βρέθηκε 382.0806

4-(*tert*-Βουτοξυ)-2-[[(*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο](φαινυλομεθυλο)]-(υδροξυ)φωσφινυλο)-μεθυλο]-4-οξοβουτανοϊκό οξύ (**104η**)



Η ένωση **104η** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 4.5 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70η** σε κλίμακα 0.28 mmol (70 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89a** σε κλίμακα 0.28 mmol (90 mg). Παραλαμβάνονται 91 mg (71%) της ένωσης **104η** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.4.

¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO + 2% HCOOH) δ 1.37 (d, *J* = 4.5 Hz, 18H, 2 x (CH₃)₃), 1.48 – 2.25 (m, 2H, PCH₂), 2.52 – 3.05 (m, 3H, CHCO, CH₂CO), 4.74 – 4.99 (m, 1H, CHP), 7.04 – 7.57 (m, 5H, Ar), 7.80 (m, 1H, NH).

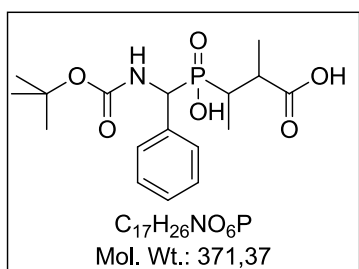
¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 26.4, 27.8, 28.3, 35.0 (d, ²*J*_{PC} = 2.8 Hz), 37.0 (d,

$^3J_{PC} = 1.9$ Hz), 55.0 (d, $^1J_{PC} = 99.3$ Hz), 55.1 (d, $^1J_{PC} = 101.5$ Hz), 79.3, 79.9, 127.2, 128.0, 128.1, 128.2, 136.4, 155.3, 155.5, 170.6, 175.0, 175.3

^{31}P NMR (81 MHz, d_6 -DMSO) δ 42.6, 43.2.

HRMS (m/z): $[M + Na]^+$ υπολογίστηκε για $C_{21}H_{32}NO_8PNa^+$ 480.1763, βρέθηκε 480.1767

2- $\{[(tert\text{-Bουτοξυκαρβονυλαμινο})-(\text{φαινυλομεθυλο})]-(\text{υδροξυ})\text{φωσφινυλο}-\text{μεθυλο}\}-4\text{-μεθυλοπεντανοϊκό οξύ (1040)}$



Η ένωση **1040** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 5 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **700** σε κλίμακα 0.61 mmol (100 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89a** σε κλίμακα 0.61 mmol (190 mg). Παραλαμβάνονται 184 mg (81%) της ένωσης

1040 ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1) = 0.3

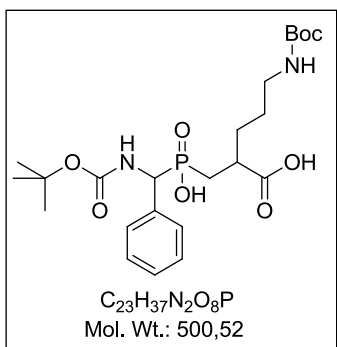
1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 0.81 – 1.5 (m, 15H, 2 x CH_3 , $(CH_3)_3$), 1.84 – 2.26 (m, 1H, *PCH*), 2.53 – 2.80 (m, 1H, *CHCO*), 4.74 – 5.19 (m, 1H, *NHCHP*), 7.16 – 7.57 (m, 5H, Ar), 7.75 (m, 1H, *NH*).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.1, 11.1, 12.2, 16.4, 16.6, 16.6, 16.7, 28.3, 33.6 (d, $^1J_{PC} = 90.4$ Hz), 52.9 (d, $^1J_{PC} = 98.2$ Hz), 53.5 (d, $^1J_{PC} = 96.6$ Hz), 78.8, 127.3, 128.0, 128.5, 128.6, 128.7, 136.3, 136.5, 155.3, 155.4, 155.4, 155.5, 175.4, 175.6, 175.6, 175.8.

^{31}P NMR (81 MHz, d_6 -DMSO) δ 46.3, 47.1.

HRMS (m/z): $[M + Na]^+$ υπολογίστηκε για $C_{17}H_{26}NO_6PNa^+$ 394.1395, βρέθηκε 394.1381

5- $\{[(tert\text{-Bουτοξυκαρβονυλο})\text{αμινο}]-2-\{[(tert\text{-βουτοξυκαρβονυλοαμινο})(\text{φαινυλομεθυλο})]-(\text{υδροξυ})\text{φωσφινυλο}-4\text{-μεθυλο}\}-\text{πεντανοϊκό οξύ (104i)}$



Η ένωση **104i** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 3.5 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70i** σε κλίμακα 0.320 mmol (100 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89a** σε κλίμακα 0.320 mmol (100 mg). Παραλαμβάνονται 128 mg (80%) της ένωσης **104i** ως αφρώδες στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.4

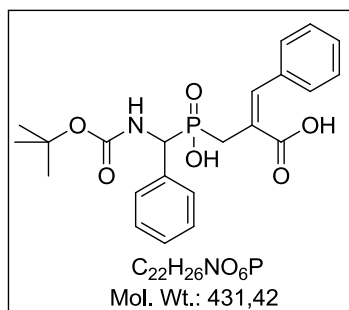
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO +2% HCOOH) δ 1.09 – 2.21 [m, 24H, 2 x (CH₃)₃, PCH₂, CHCH₂CH₂], 2.35 – 2.47 (m, 1H, CHCO), 2.68 – 3.15 (m, 2H, CH₂NH), 4.74 – 5.04 (m, 1H, CHP), 6.75 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz, CH₂NH), 7.15 – 7.50 (m, 5H, Ar), 7.57 – 7.76 (m, 1H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 27.2, 28.1, 28.3, 28.4, 28.2 (d, ¹*J*_{PC} = 93.3 Hz), 30.5 (d, ²*J*_{PC} = 8.5 Hz), 30.8 (d, ²*J*_{PC} = 9.5 Hz), 54.6 (d, ¹*J*_{PC} = 97.2 Hz), 55.3 (d, ¹*J*_{PC} = 98.0 Hz), 78.7, 78.8, 127.3, 127.1, 128.0, 128.3, 128.3, 136.6, 136.7, 155.3, 155.5, 155.6, 175.9, 176.0, 176.1.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 42.6, 42.7.

HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₃H₃₇N₂O₈PNa⁺ 523.2185, βρέθηκε 523.2153.

**(*E*)-2-([*tert*-Βουτοξυκαρβονουλαμινο)-(φαινυλο)μεθυλο]-
(υδροξυ)φωσφινυλο)-μεθυλο}-3-φαινυλο ακρυλικό οξύ (**104k**)**



Η ένωση **104k** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 4 h. Χρησιμοποιήθηκαν το φωσφινικό διοξύ **70k** σε κλίμακα 0.18 mmol (40 mg) και η *N*-Boc αμινάλη **89a** σε κλίμακα 0.18 mmol (50 mg). Παραλαμβάνονται 65 mg (83%) της ένωσης **104k** ως αφρώδες στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.5

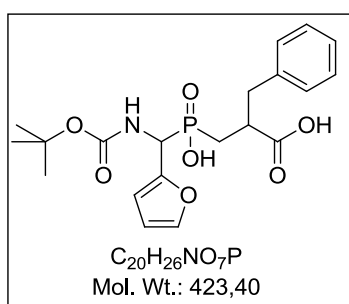
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 1.35 [s, 9H, (CH₃)₃], 2.82 - 3.20 (m, 2H, P CH₂), 5.02 (dd, *J* = 16.8, 9.9 Hz, 1H), 7.04 – 7.93 (m, 12H, Ar, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 27.1 (d, ¹*J*_{PC} = 88.5 Hz), 28.3, 55.8 (d, ¹*J*_{PC} = 99.0 Hz), 79.4, 125.1, 125.3, 127.4, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6, 128.9, 129.7, 134.8, 134.9, 136.7, 139.8, 139.9, 155.4, 155.5, 169.2, 169.2

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 40.4

HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₂H₂₆NO₆PNa⁺ 454.1395, βρέθηκε 454.1404.

**2-Βενζυλο-3-[[(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)(φουραν-2-υλο)μεθυλο]-
(υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104λ)**



Η ένωση **104λ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοακυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.56 mmol (130 mg) του φωσφινικού διοξέος **70λ** και 0.56 mmol (190 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89λ**. Παραλαμβάνονται 213 mg (90%)

της ένωσης **104λ** ως καφέ αφρώδες στερεό.

TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.4

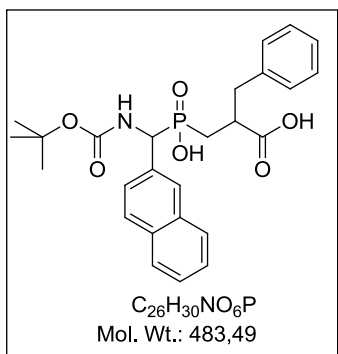
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO + 2% HCOOH) δ 1.38 (s, 9H, (CH₃)₃), 1.53 – 2.20 (m, 2H, PCH₂), 2.70 – 3.07 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 4.77 – 5.10 (m, 1H, CHP), 6.27 – 6.52 (m, 2H, =CHCH), 7.00 – 7.34 (m, 5H, Ar), 7.44 – 7.70 (m, 2H, CHO, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 27.7 (d, ¹*J*_{PC} = 91.2 Hz), 28.3, 28.3 (d, ¹*J*_{PC} = 91.2 Hz), 49.2 (d, ¹*J*_{PC} = 102.1 Hz), 49.6 (d, ¹*J*_{PC} = 102.6 Hz), 78.9, 79.0, 108.2, 108.3, 108.4, 110.8, 126.4, 128.3, 129.1, 129.2, 138.8, 138.9, 142.5, 149.9, 150.0, 155.3, 155.4, 175.2, 175.3, 175.4, 175.4.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 41.1, 41.3.

HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₀H₂₆NO₇PNa⁺ 446.1344, βρέθηκε 446.1343.

**2-Βενζυλο-3-[[(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)-(ναφθαλενο-2-υλο)μεθυλο]-
(υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104μ)**



Η ένωση **104μ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.59 mmol (130 mg) της ένωσης του φωσφινικού διοξέος **70μ** και 0.59 mmol (220 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89μ**. Παραλαμβάνονται 222 mg (78%) της ένωσης **104μ** ως αφρώδες στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.4

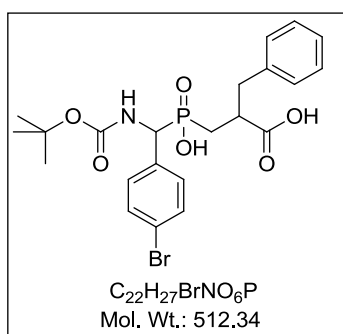
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO + 2% HCOOH) δ 1.38 [s, 9H, (CH₃)₃], 1.56 – 2.32 (m, 2H, PCH₂), 2.69 – 3.00 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 4.92 – 5.17 (m, 1H, CHP), 6.94 – 8.00 (m, 13H, Ar, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 27.6 (d, ¹J_{PC} = 89.7 Hz), 28.2, 28.3 (d, ¹J_{PC} = 90.6 Hz), 55.0 (d, ¹J_{PC} = 98.2 Hz), 55.4 (d, ¹J_{PC} = 98.2 Hz), 78.7, 78.8, 125.9, 126.2, 126.3, 126.5, 126.7, 126.9, 127.4, 127.6, 127.7, 128.2, 129.0, 129.1, 132.3, 132.7, 132.7, 134.2, 134.3, 155.4, 155.5, 175.1, 175.2, 175.3, 175.4.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 42.6, 42.8.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₆H₃₀NO₆PNa⁺ 506.1708, βρέθηκε 506.1707.

2-Βενζυλο-3-[[4-βρωμοφαινυλο]((*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)μεθυλο]- (υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (**104ν**)



Η ένωση **104ν** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.51 mmol (100 mg) του φωσφινικού διοξέος **70ν** και 0.51 mmol (200 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89ν**. Παραλαμβάνονται 214 mg (82%) της ένωσης **104ν** ως αφρώδες στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.3.

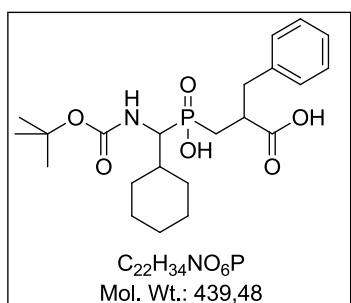
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO + 2% HCOOH) δ 1.16 – 2.21 (m, 11H, (CH₃)₃, PCH₂), 2.67 – 3.05 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 4.71 – 5.01 (m, 1H, CHP), 6.99 – 7.58 (m, 9H, Ar), 7.68 – 7.88 (m, 1H, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 26.4, 27.7 (d, ¹J_{PC} = 90.9 Hz), 28.2, 54.2 (d, ¹J_{PC} = 98.4 Hz), 54.7 (d, ¹J_{PC} = 97.8 Hz), 78.8, 78.8, 120.4, 120.5, 120.5, 126.4, 128.2, 129.0, 129.1, 130.2, 130.3, 130.4, 130.5, 130.9, 136.0, 136.1, 138.7, 138.8, 155.2, 155.4, 175.1, 175.2, 175.2, 175.3.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 41.9, 42.1.

HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₂H₂₇BrNO₆PNa⁺ 534.0657, βρέθηκε 534.0661.

2-Βενζυλο-3-{{{*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)(κυκλοεξυλο)μεθυλο]- (υδροξυ)φωσφινυλο}-προπανοϊκό οξύ (104ξ)



Η ένωση **104ξ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοακυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.41 mmol (83 mg) του φωσφινικού διοξέος **70ξ** και 0.41 mmol (130 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89ξ**. Παραλαμβάνονται 124mg (69%) της

ένωσης **104ξ** ως άχρωμο έλαιο.

TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.5

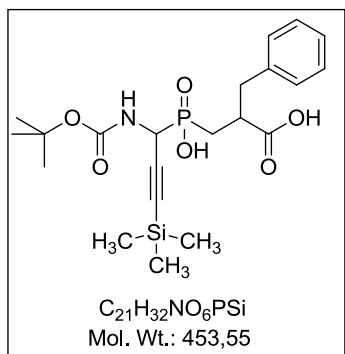
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 0.81 – 2.09 (m, 21H, (CH₃)₃, Cy, PCH₂), 2.69 – 3.08 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 3.39 – 3.66 (m, 1H, CHP), 6.82 (d, 1H, 10.4 Hz, NH), 7.05 – 7.35 (m, 5H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 25.7, 25.8, 28.2, 28.5 (d, ¹J_{PC} = 89.5 Hz), 29.0 (d, ¹J_{PC} = 99.0 Hz), 30.6 (d, ²J_{PC} = 7.1 Hz), 37.0 (d, ²J_{PC} = 3.7 Hz), 54.0 (d, ¹J_{PC} = 103.7 Hz), 54.4 (d, ¹J_{PC} = 103.7 Hz), 78.2, 78.3, 126.3, 128.2, 129.0, 129.1, 138.9, 138.9, 155.8, 155.9, 155.9, 156.0, 175.2, 175.2, 175.3, 175.4.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 47.0, 47.1

HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₂H₃₄NO₆PNa⁺ 439.2124, βρέθηκε 439.2020

2-Βενζυλο-3-[[1-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο)-3-(τριμεθυλοσιλυλο) προπ- 2-iv-1-υλο]-υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104ο)



Η ένωση **104o** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 72 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.69 mmol (150 mg) του φωσφινικού διοξέος **70o**, 0.69 mmol (230 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89o** και 0.5 equiv $BF_3O(Et)_2$. Παραλαμβάνονται 238 mg (76%) της ένωσης **104o** ως

άχρωμο έλαιο.

TLC R_f ($CHCl_3/MeOH/AcOH$: 7/0.5/0.5) = 0.5

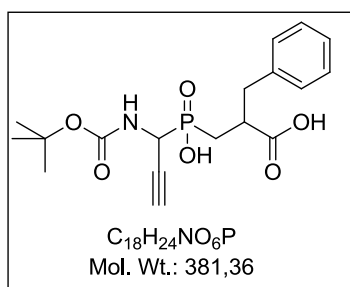
1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO + 4% HCOOH) δ 0.11 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 1.37 [s, 9H, $(CH_3)_3$], 1.60 – 2.27 (m, 2H, PCH_2), 2.69 – 3.13 (m, 3H, CH_2Ph , $CHCO$), 4.36 – 4.78 (m, 1H, CHP), 6.87 – 7.84 (m, 6H, Ar, NH).

^{13}C NMR (50 MHz, d_6 -DMSO) δ 27.0 (d, $^1J_{PC} = 80$ Hz), 27.5 (d, $^1J_{PC} = 93.4$ Hz), 27.5, 28.2, 44.0 (d, $^1J_{PC} = 100.9$ Hz), 44.2 (d, $^1J_{PC} = 100.9$ Hz), 79.0, 89.0, 101.3, 126.3, 128.2, 129.1, 138.7, 138.8, 154.9, 155.0, 175.0, 175.1, 175.2, 175.3.

^{31}P NMR (81 MHz, d_6 -DMSO) δ 39.7, 39.8.

HRMS (*m/z*): $[M - H]^-$ υπολογίστηκε για $C_{21}H_{31}NO_6PSi$ 452.1664, βρέθηκε 452.1667

2-Βενζυλο-3-{[1-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο]-3-προπ-2-ιν-1-υλο]- (υδροξυ)φωσφινυλο}-προπανοϊκό οξύ (**104o'**)



Η ένωση **104o** παρασκευάστηκε μετά από αντίδραση της ένωσης **104o** με 2.5 ml υδατικού διαλύματος $NaHCO_3$ 5%, για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.22 mmol (100 mg) της ένωσης **104o**. Παραλαμβάνονται 76 mg (90%) της ένωσης **104o'** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f ($CHCl_3/MeOH/AcOH$: 7/0.5/0.5) = 0.4

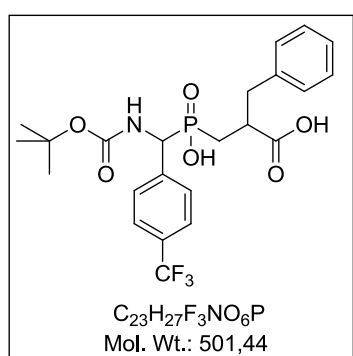
1H NMR (200 MHz, d_6 -DMSO) δ 1.38 (s, 9H, $(CH_3)_3$), 1.64 – 2.29 (m, 2H, PCH_2), 2.68 – 3.11 (m, 3H, CH_2Ph , $CHCO$), 4.36 – 4.65 (m, 1H, CHP), 6.98 – 7.65 (m, 7H, Ar, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 26.8 (d, ¹J_{PC} = 81 Hz), 27.5 (d, ¹J_{PC} = 69 Hz), 28.2, 43.1 (d, ¹J_{PC} = 102.1 Hz), 44.2 (d, ¹J_{PC} = 103.0 Hz), 55.0, 75.9, 76.0 79.0, 126.4, 128.3, 129.1, 129.1, 138.7, 138.8, 155.1, 155.2, 175.1, 175.2, 175.3, 175.4.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 40.1, 40.2.

HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₁₈H₂₄NO₆PNa⁺ 404.1239, βρέθηκε 404.1239

2-Βενζυλο-3-[[(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)(4-(τριφθορομεθυλο-φαινυλο)-μεθυλο)]-(υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104π)



Η ένωση **104π** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.37 mmol (84.2 mg) του φωσφινικού διοξέος **70π** και 0.37 mmol (147 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89π**. Παραλαμβάνονται 134 mg (72%) της ένωσης **104π** ως άχρωμο αφρώδες στερεό.

TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2

¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO + 3% HCOOH) δ 1.05 – 2.27 (m, 12H, (CH₃)₃, PCH₂), 2.68 – 3.07 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 4.82 – 5.18 (m, 1H, CHP), 6.85 – 7.75 (m, 9H, Ar), 7.90 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NH).

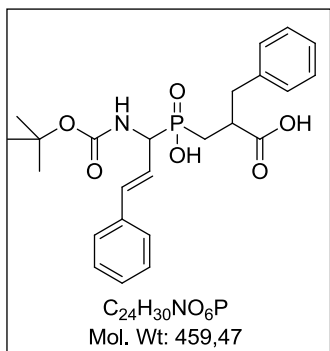
¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) δ 27.6 (d, ¹J_{PC} = 103.5 Hz), 28.3 (d, ¹J_{PC} = 93.2 Hz), 28.3, 54.7 (d, ¹J_{PC} = 97.1 Hz), 55.2 (d, ¹J_{PC} = 96.4 Hz), 79.1, 124.1 (q, ¹J_{CF} = 272.3 Hz), 124.9, 126.5, 127.4 (q, ²J_{CF} = 12.2, 19.9 Hz), 128.3, 128.8, 128.9, 129.1, 129.2, 138.7, 138.8, 141.4, 141.5, 155.4, 155.6, 175.2, 175.3, 175.3, 175.5.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO+ 3% HCOOH) δ 42.3, 42.5.

¹⁹F NMR (188 MHz, *d*₆-DMSO+ 3% HCOOH) δ -14.2

HRMS (*m/z*): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₂₂H₂₇F₃NO₆P⁺ 500.1455, βρέθηκε 500.1440.

(*E*)-2-Βενζυλο-3-[[1-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλοαμινο)-3-(φαινυλαλλυλο)]-(υδροξυ)φωσφινυλο]-προπανοϊκό οξύ (104ρ)



Η ένωση **104p** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 h. Χρησιμοποιήθηκαν 0.48 mmol (96 mg) του φωσφινικού διοξέος **70p** και 0.48 mmol (170 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89p**. Παραλαμβάνονται 141 mg (64%) της ένωσης **104p** ως άχρωμο έλαιο.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH: 7/2/1) = 0.4

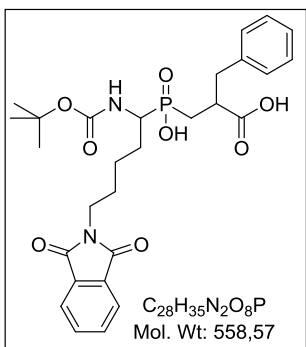
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 1.40 (d, J = 2.5 Hz, 9H, C(CH₃)₃), 1.56 – 2.17 (m, 2H, PCH₂), 2.71 – 3.10 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 4.32 – 4.68 (m, 1H, CHP), 6.14 – 6.42 (m, 1H, CH=CHPh), 6.44 – 6.70 (m, 1H, CH=CHPh), 7.01 – 7.58 (m, 11H, Ar, NH).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) 26.6, 28.1 (d, $^1J_{PC}$ = 89.2 Hz), 28.3, 53.3 (d, $^1J_{PC}$ = 100.8 Hz), 53.7 (d, $^1J_{PC}$ = 101.1 Hz), 78.6, 78.7, 123.8, 123.9, 126.3, 127.7, 128.3, 128.8, 129.1, 129.1, 130.9, 131.1, 131.3, 136.5, 136.5, 138.8, 138.9, 155.2, 155.3, 175.2, 175.2, 175.4, 175.4.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 43.5, 43.7.

HRMS (m/z): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₄H₃₀NO₆PNa⁺ 482.1708, βρέθηκε 482.1700

2-Βενζυλο-3- {[1-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)-5-(1,3-διοξοϊσοϊνδολινο- 2-υλο)πεντυλο]-(υδροξυ)φωσφινυλο}-προπανοϊκό οξύ (**104σ**)



Η ένωση **104σ** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοαλκυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 29 h σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκαν 0.49 mmol (110 mg) του φωσφινικού διοξέος **70σ** και 0.49 mmol (210 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89σ**. Παραλαμβάνονται 220 mg (82%) της ένωσης **104σ** ως λευκό στερεό.

TLC R_f (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:0.5:0.5) = 0.2.

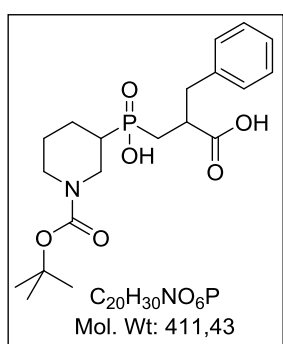
¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 0.9 – 2.11 (m, 17H, (CH₃)₃, NCH₂CH₂CH₂CH₂, PCH₂), 2.65 – 3.03 (m, 3H, CH₂Ph, CHCO), 3.32 – 3.74 (m, 3H, NCH₂, CHP), 6.82 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH), 6.95 – 7.32 (m, 5H, Ar), 7.60– 7.88 (m, 4H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, *d*₆-DMSO) 23.2 (d, ²*J*_{PC} = 11.9 Hz), 26.6 (d, ³*J*_{PC} = 6.4 Hz), 27.7, 28.0 (d, ¹*J*_{PC} = 88.0 Hz), 28.2, 37.5, 49.3 (d, ¹*J*_{PC} = 106.0 Hz), 49.7 (d, ¹*J*_{PC} = 106.3 Hz), 78.2, 78.2, 123.1, 126.3, 128.3, 129.1, 129.2, 131.7, 134.4, 138.9, 139.0, 155.7, 168.0, 175.2, 175.4, 175.5.

³¹P NMR (81 MHz, *d*₆-DMSO) δ 47.7, 47.7.

HRMS (*m/z*): [M - H]⁻ υπολογίστηκε για C₂₇H₃₅N₂O₈P⁻ 557.2058, βρέθηκε 557.2056.

2-Βενζυλο-3-{[1-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)πιπεριδινό-2-υλο]}-(υδροξυ)φωσφινυλο}-προπανοϊκό οξύ (**104t**)



Η ένωση **104t** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αμιδοακυλίωσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 4 h. Χρησιμοποιήθηκαν 0.5 mmol (110 mg) του φωσφινικού διοξέος **70t** και 0.5 mmol (140 mg) της *N*-Boc αμινάλης **89t**. Παραλαμβάνονται 154 mg (75%) της ένωσης **104t** ως αφρώδες στερεό.

TLC *R_f* (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1) = 0.5.

¹H NMR (200 MHz, *d*₆-DMSO) δ 1.04 – 2.20 [m, 17H, (CH₃)₃, NCH₂CH₂CH₂, PCH₂], 2.71 – 3.48 (m, 4H, CH₂Ph, CHP, CHCO), 3.07 – 4.32 (m, 2H, NCH₂CHP), 7.01–7.37 (m, 5H, Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) 20.6, 22.8, 22.9, 23.3, 25.2, 28.4, 29.9, 39.5, 39.7, 39.9, 40.3, 40.7, 41.1, 41.9, 48.9 (d, ¹*J*_{PC} = 112.8 Hz), 49.8 (d, ¹*J*_{PC} = 103.8 Hz), 50.1, 52.1, 80.6, 80.9, 126.8, 128.6, 129.2, 137.8, 154.4, 155.1, 178.5, 178.6, 178.8.

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 57.7, 57.6, 57.1.

HRMS (*m/z*): [M + Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₀H₃₀NO₆PNa⁺ 434.1708, βρέθηκε 434.1707

Γενική μέθοδος αποπροστασίας των φωσφινικών διπεπτιδίων 104α-τ

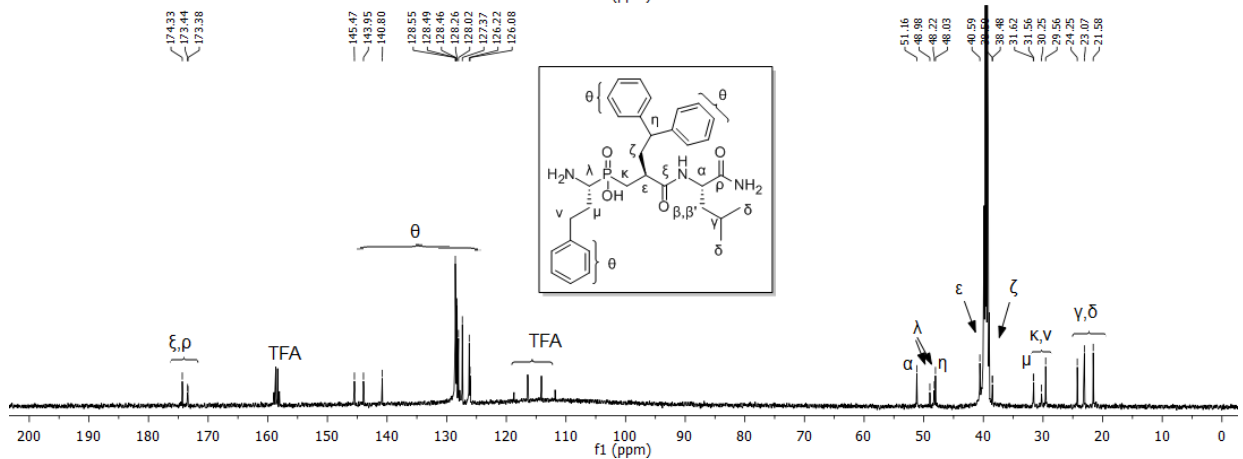
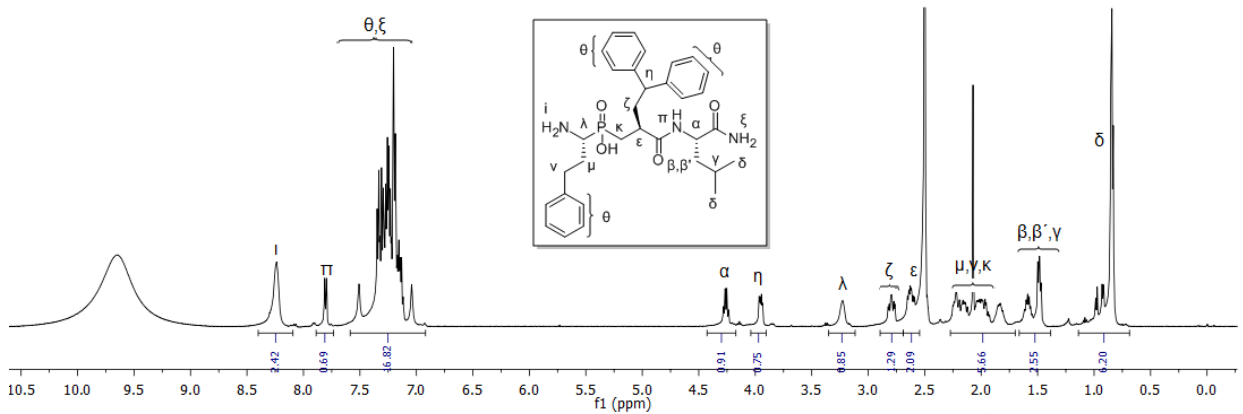
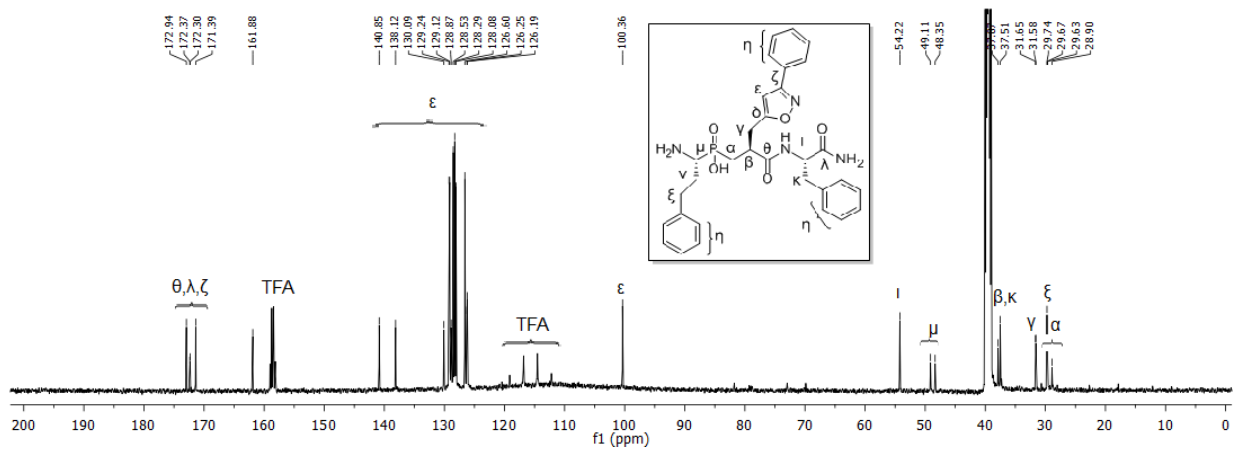
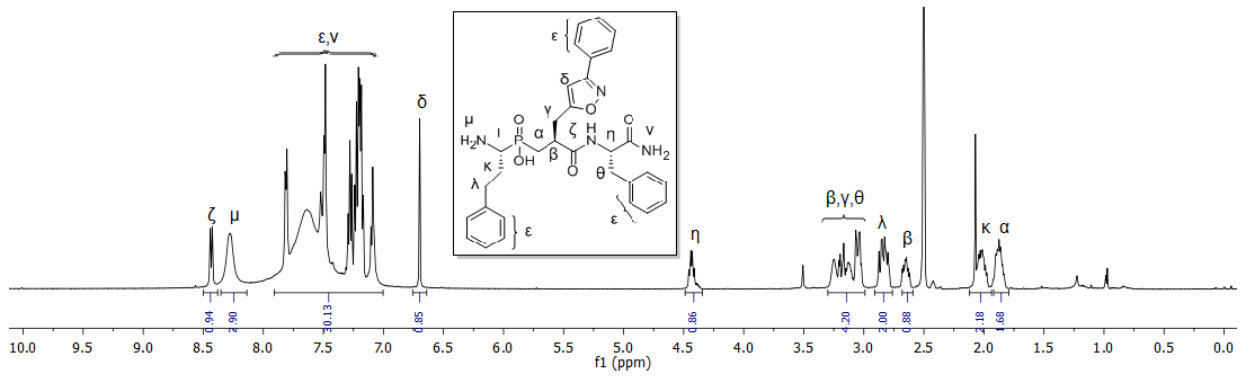
Σε διάλυμα της ένωσης που προέκυψε από την αντίδραση αμιδοαλκυλίωσης (20-40 μmol) σε ξηρό CH_2Cl_2 προστίθεται στάγδην και υπό ανάδευση κρύο μείγμα TFA/DCM/TIS/ H_2O : 48/49/2/1, συνολικού όγκου 21 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$ αντιδρώντος (η μισή ποσότητα DCM χρησιμοποιείται για να διαλυθεί το αντιδρών και η υπόλοιπη για το διάλυμα της αποπροστασίας) και το μείγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 4 h. Ακολουθεί συμπύκνωση με προσθήκη τολουολίου για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα νερού και TFA. Το προϊόν καταβυθίζεται με προσθήκη ξηρού PE/ Et_2O . Ακολουθούν 3 φυγοκεντρήσεις και το προϊόν παραλαμβάνεται με απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Τέλος, γίνεται ξήρανση του στερεού υπεράνω P_2O_5 . Τα τελικά φωσφινικά ψευδοδιπεπτιδία παρελήφθησαν ως στερεά σε αποδόσεις 65-85 % και ελέγχθηκαν με φασματομετρία MS.

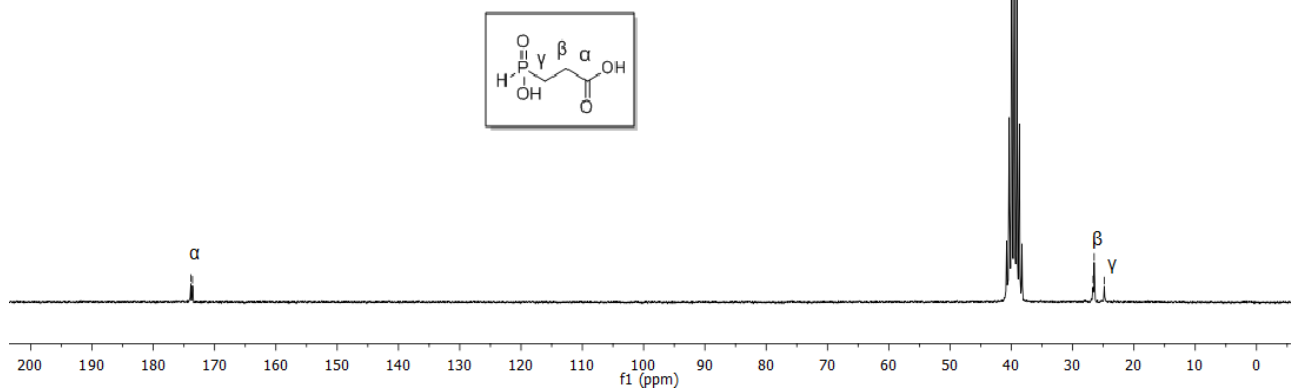
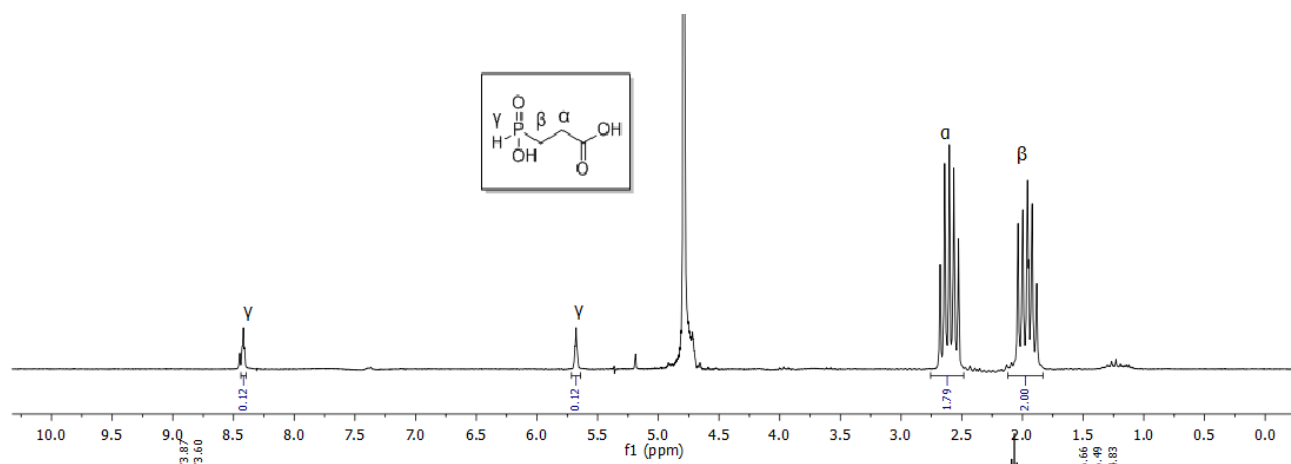
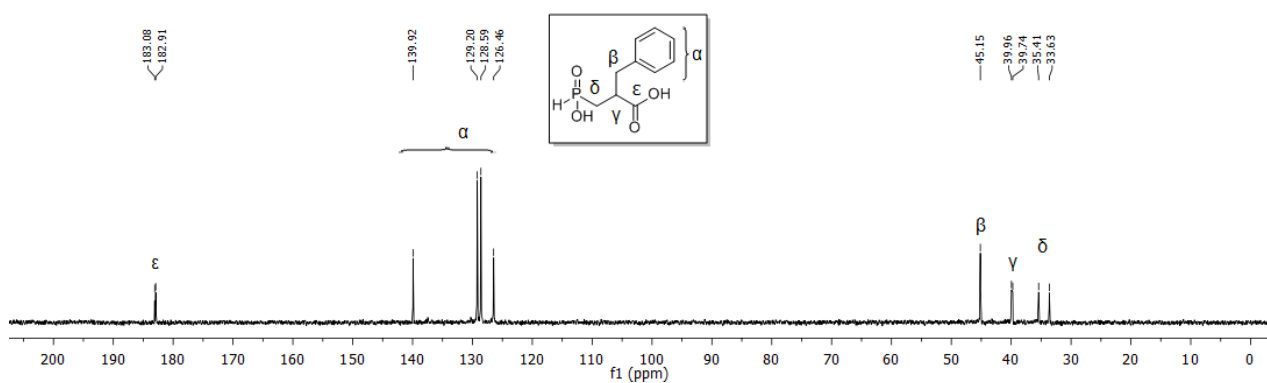
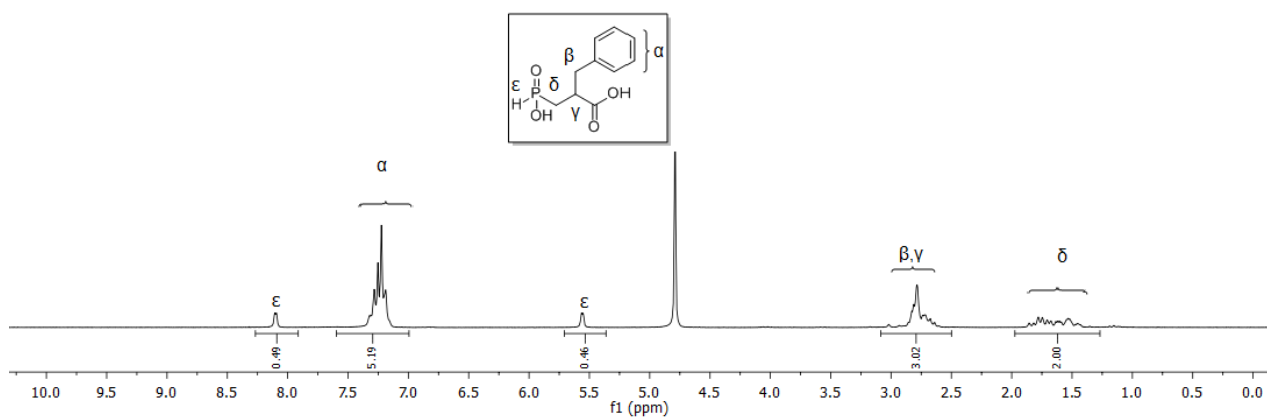
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

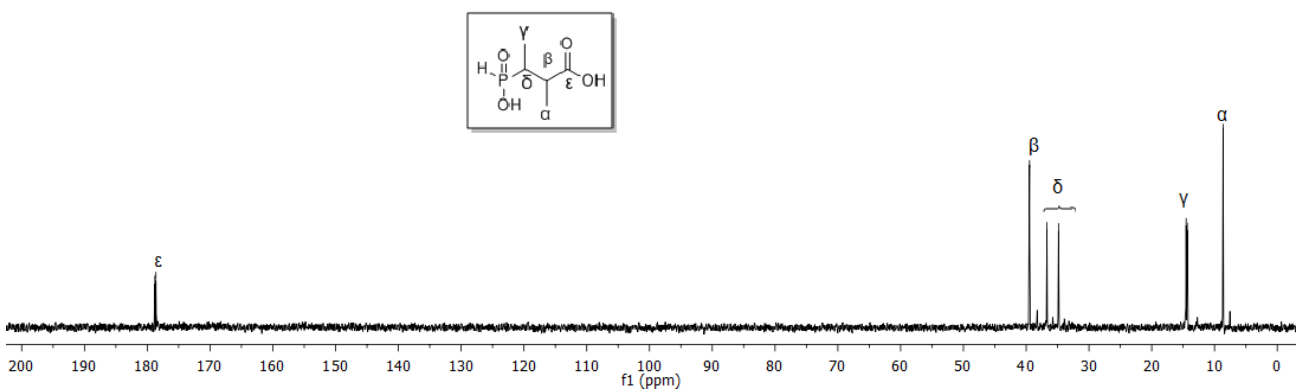
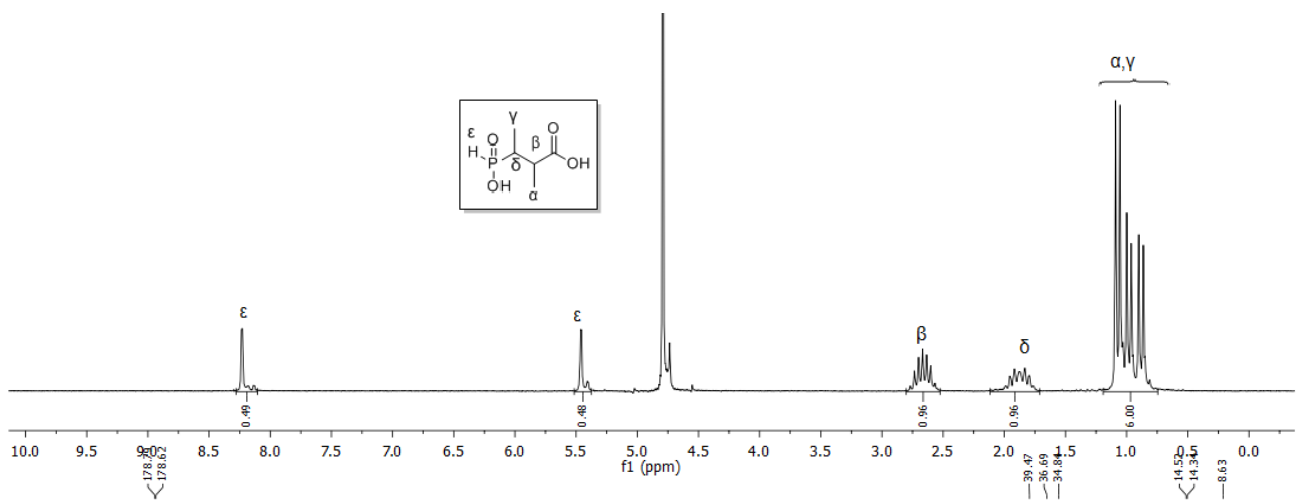
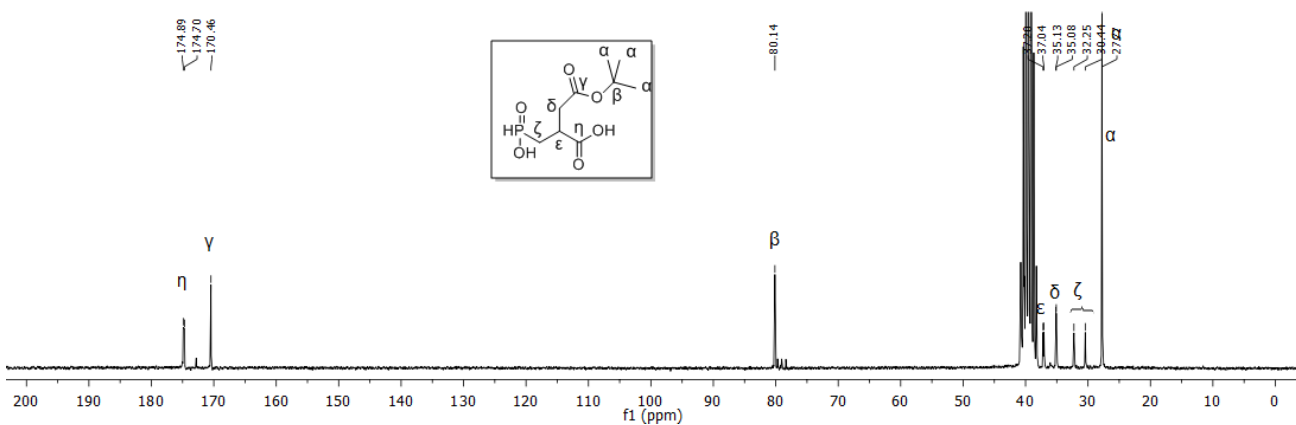
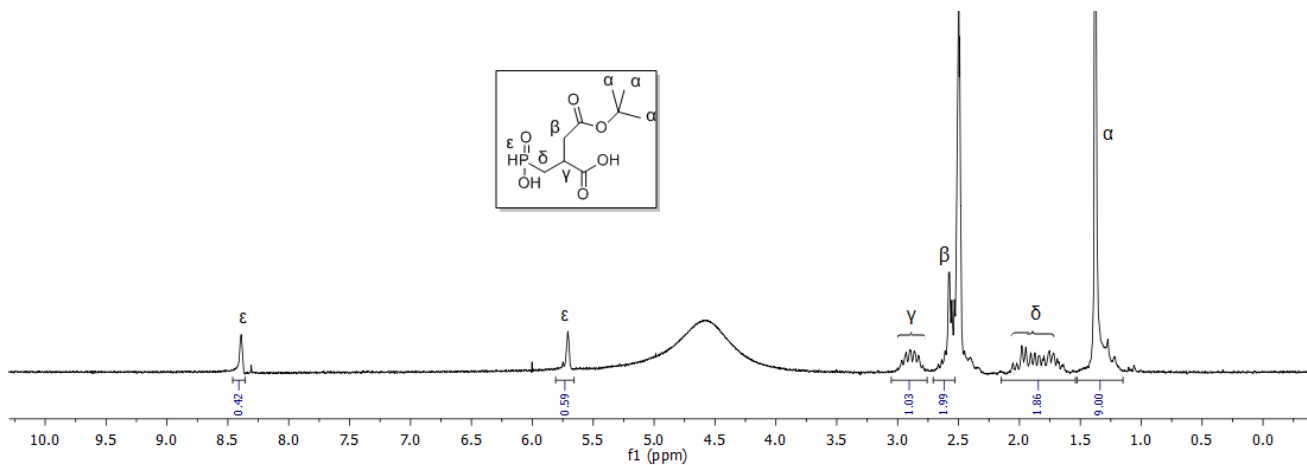
Ac	ακέτυλο
ACE	Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
Ad	αδαμάντυλο
AIBN	αζω-δισ(ισοβουτυρονιτριλιο)
APA	αμινοπεπτιδάση Α
APB	αμινοπεπτιδάση Β
APN	αμινοπεπτιδάση Ν ή ουδέτερη αμινοπεπτιδάση
Arg	αργινίνη
Asp	ασπαραγινικό οξύ
BMDC	δενδριτικά κύτταρα που έχουν αποσπαστεί από τον μυελό των οστών
Boc	tert-βουτυλοξυκαρβόνυλο
BSA	δισ(τριμεθυλοσιλυλο)ακεταμίδιο
Cbz, Z	βενζυλοξυκαρβόνυλο
CD4	υποδοχέας Τ λεμφοκυττάρου
CD8+	είδος Τ κυττάρων
CTL	κυτοτοξικά Τ λεμφοκύτταρα
DABA	διαμινοβενζοϊκά παράγωγα
DCC	N, N' δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DCM	μεθυλενοχλωρίδιο ή διχλωρομεθάνιο
DCR	διπολική κυκλοπροσθήκη
DIPEA	διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη
DMAP	4-διμεθυλο-αμινο-πυριδίνη
DME	διμεθοξυαιθάνιο
DMF	N,N'-διμεθυλοφορμαμίδιο
DPM	διφαινυλομεθυλο
ECE	Μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης
EDC.HCl	υδροχλωρικό N-αιθυλο-N'-διμεθυλαμινο-προπυλο-καρβοδιιμίδιο
EDU	1-[3-(διμεθυλαμινο)-προπυλο]-αιθυλο-ουρία
ERAP	αμινοπεπτιδάση του ενδοπλασματικού δικτύου
Et	αίθυλο
ΕΔ	ενδοπλασματικό δίκτυο
Gln	γλουταμίνη
Glu	γλουταμικό οξύ
His	ιστιδίνη
HLA	ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
HMDS	δισ(τριμεθυλοσιλυλο)αμίνη
hPhe	homo-φαινυλαλανίνη
HPLC	υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HOBt	1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο

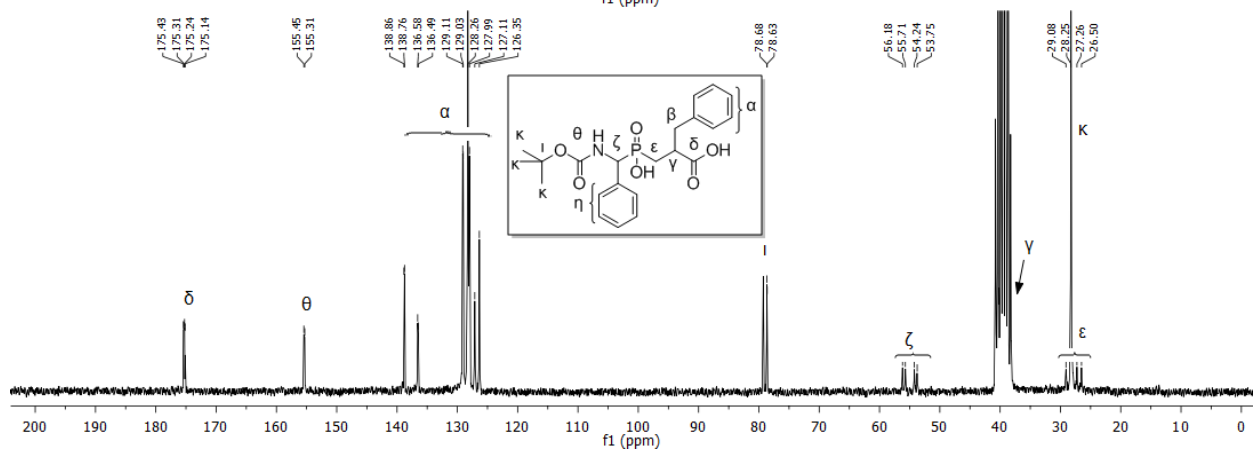
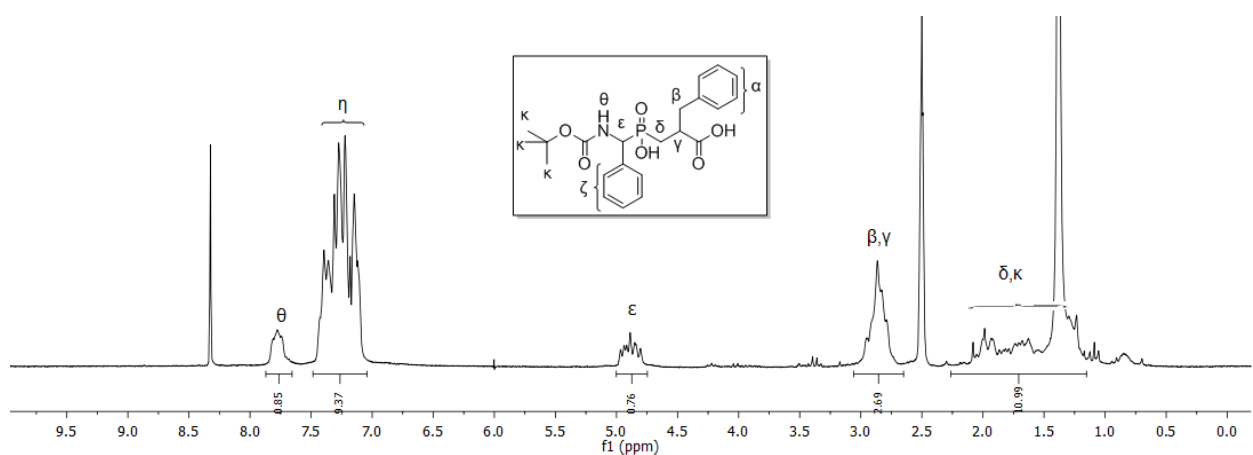
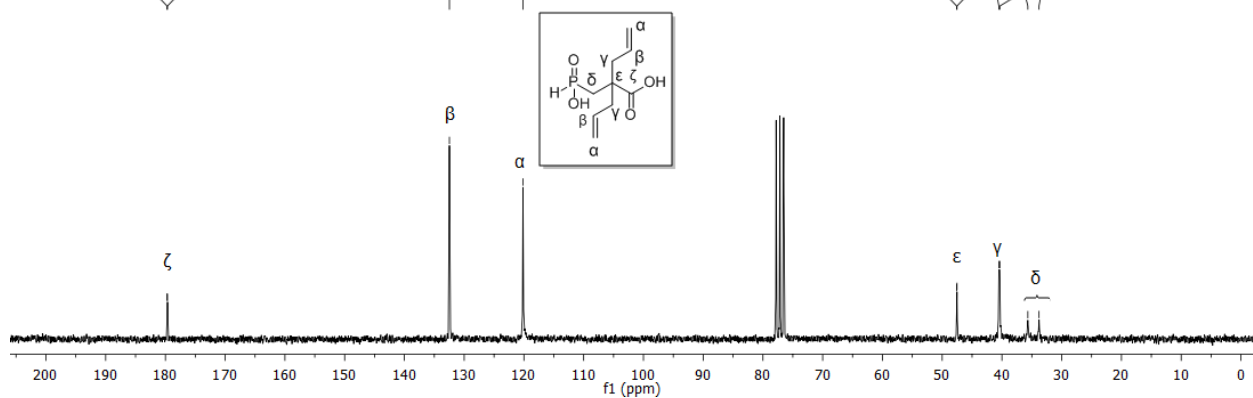
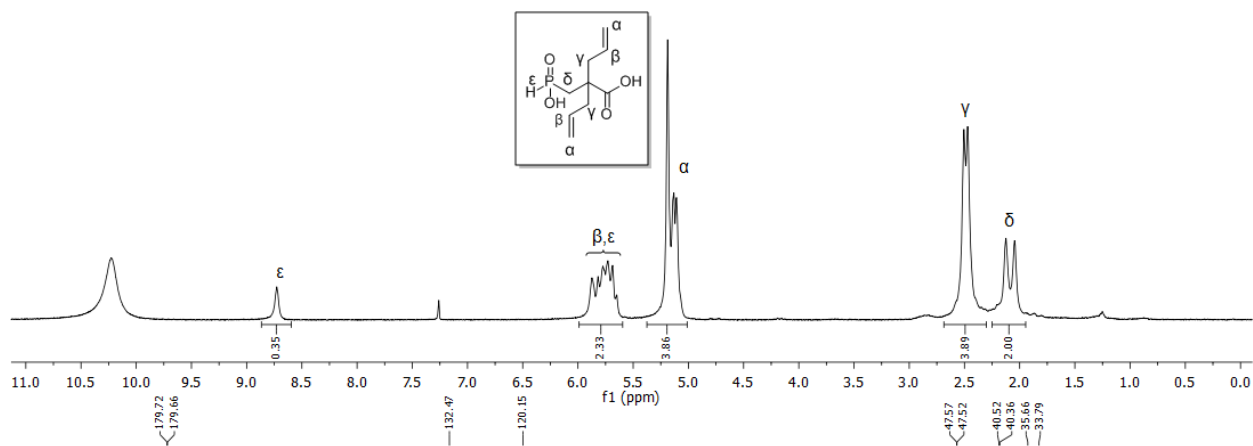
IFN- γ	ιντερφερόνης- γ
IL	ιντερλευκίνες
IRAP	αμινοπεπτιδάση που ρυθμίζεται από την ινσουλίνη
LAP	αμινοπεπτιδάση της λευκίνης
Leu	λευκίνη
Lys	λυσίνη
Me	μέθυλο
MHC	μόρια μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας
MMP	ματριξίνη
NCS	N-χλωροηλεκτριμίδιο
NEP	ουδέτερη ενδοπεπτιδάση
NK cell	natural killer cell
NMR	πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
PC	καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου
PE	πετρελαϊκός αιθέρας
Ph	φαινυλο
Phe	φαινυλαλανίνη
PLAP	αμινοπεπτιδάση λευκίνης πλακούντα
PLC	σύμπλοκο φόρτωσης αντιγονικών πεπτιδίων
p-Ts	παρα-τολουολοσουλφονυλο
Pyr	πυριδίνη
r.t.	Θερμοκρασία δωματίου
SAR	structure activity relationship
Ser	σερίνη
siRNA	silencing RNA
SNP	πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου
TAP	μεταφορέας που σχετίζεται με την επεξεργασία αντιγόνων
TACE	μετατρεπτικό ένζυμο του παράγοντα TNF- α
TCR	υποδοχέας T λεμφοκυττάρου
TEA	τριαιθυλαμίνη
TFA	τριφθοροξικό οξύ
THF	τετραϋδροφουράνιο
Th	T βοηθητικό κύτταρο
TIS	τριισοπροπυλοσίλυλο
TMS	τριμεθυλοσίλυλο
TLC	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
TNF	παράγοντες νέκρωσης όγκων
Trp	θρυπτοφάνη
Tyr	τυροσίνη
ZBGs	ομάδες δέσμευσης ψευδαργύρου

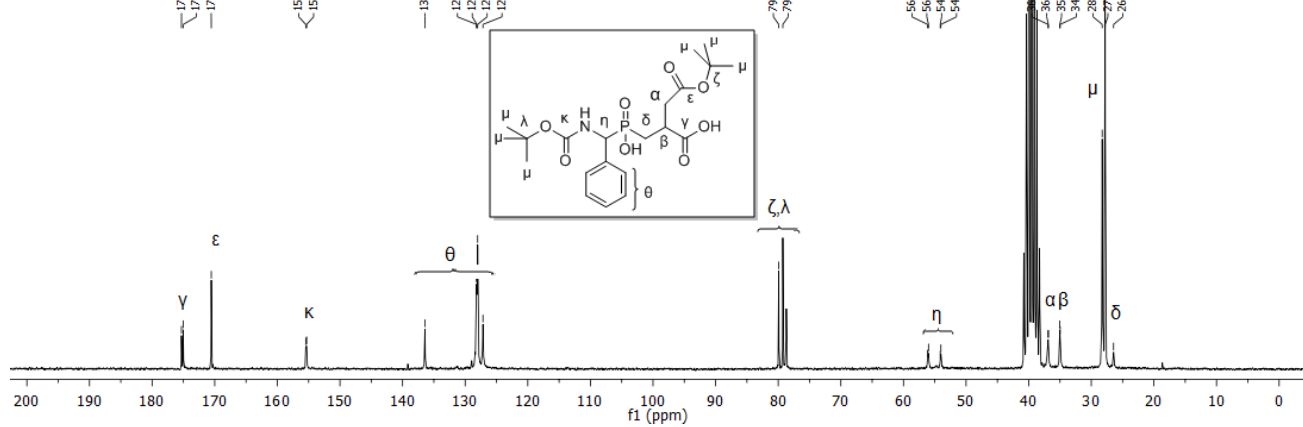
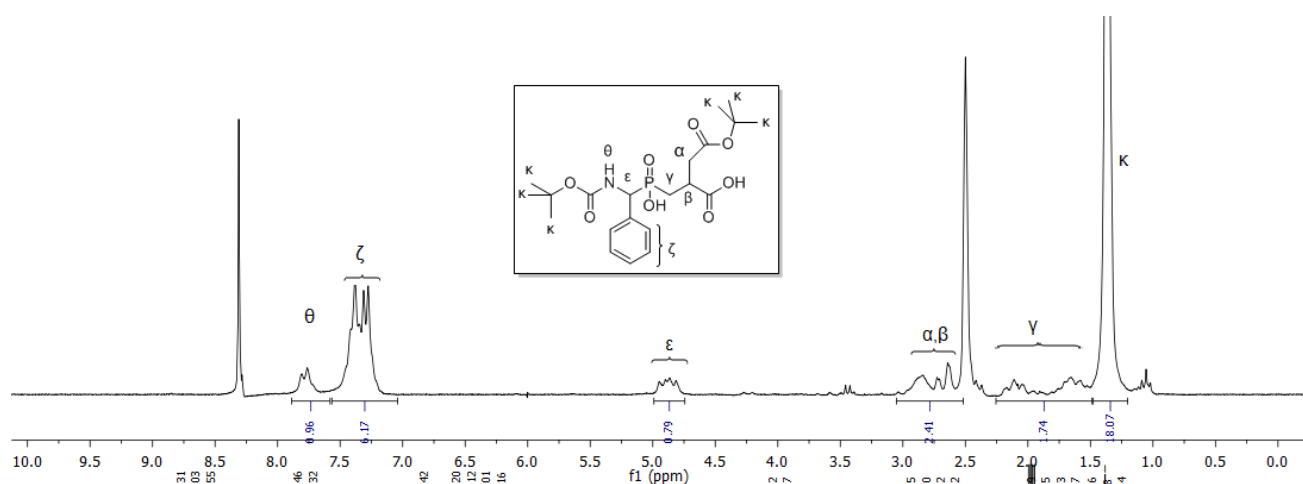
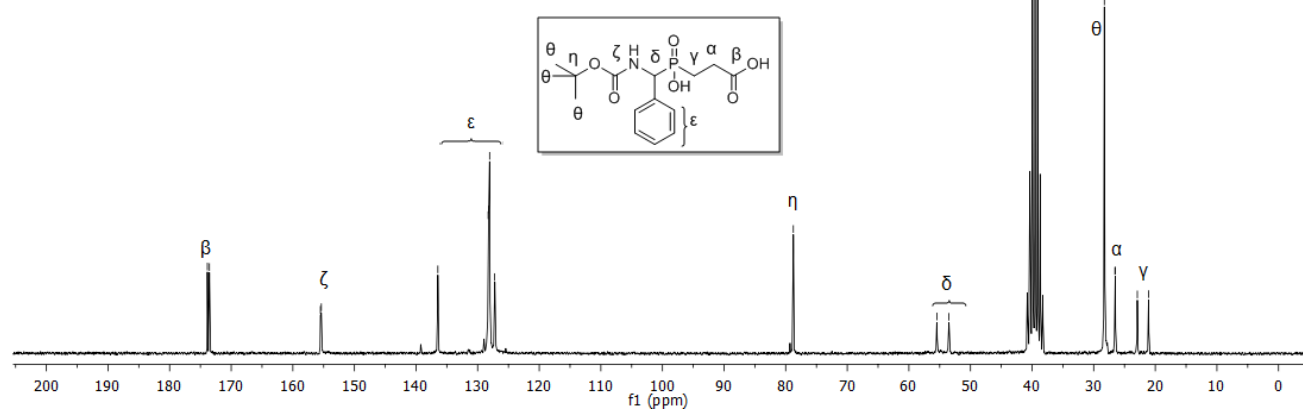
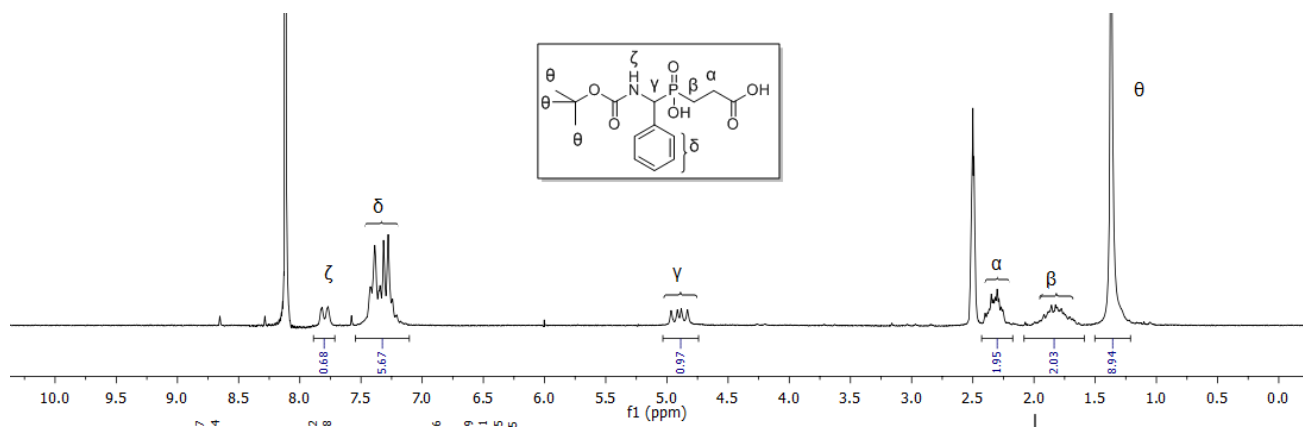
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

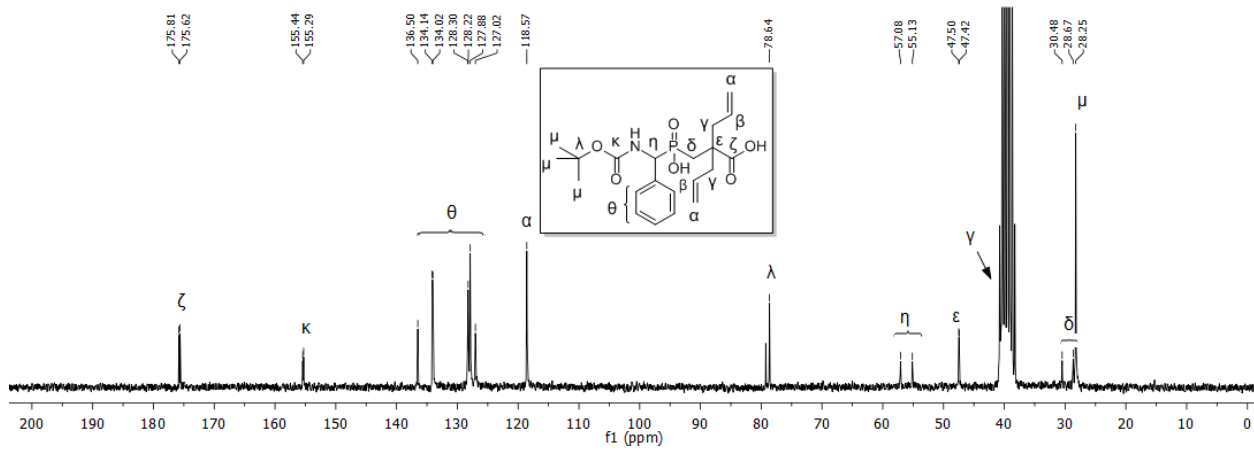
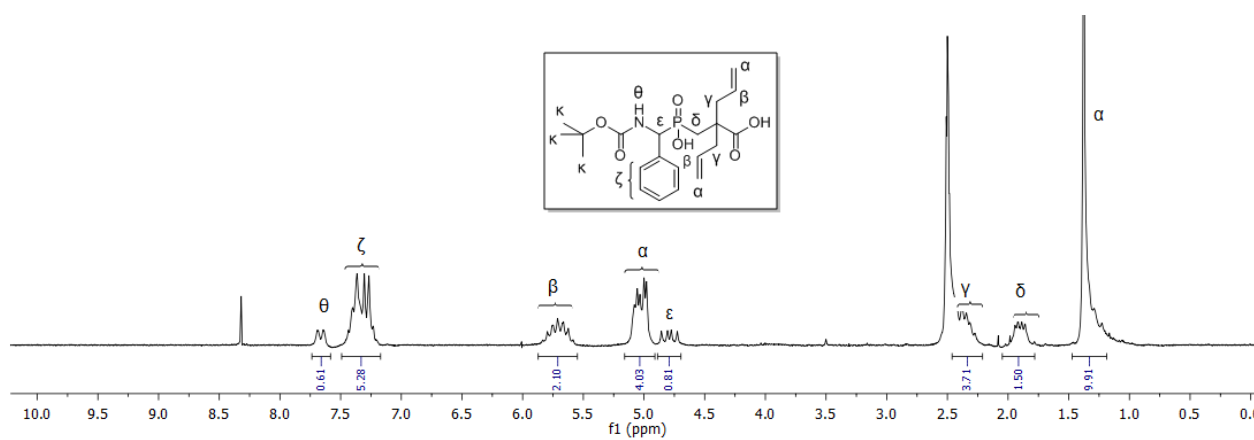
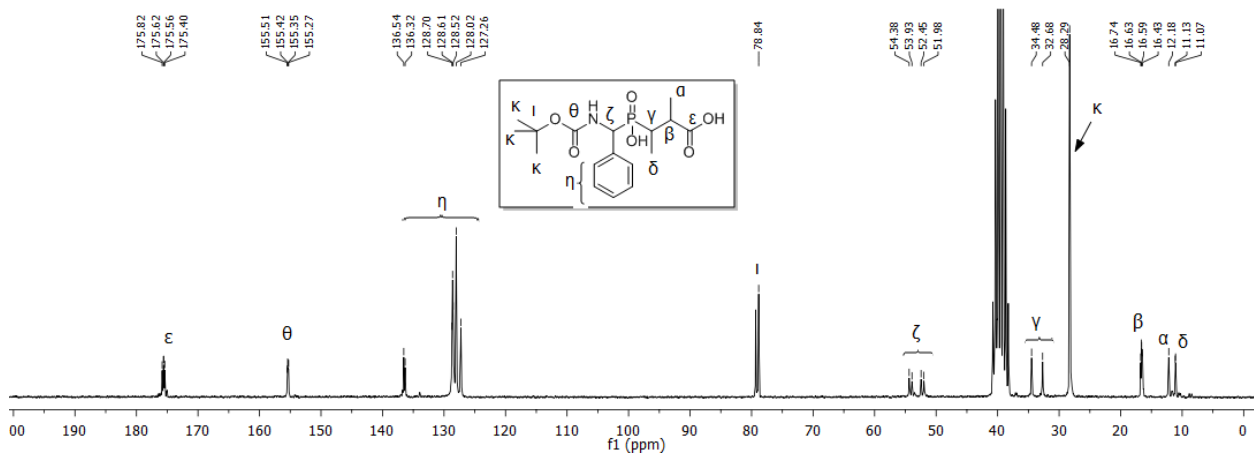
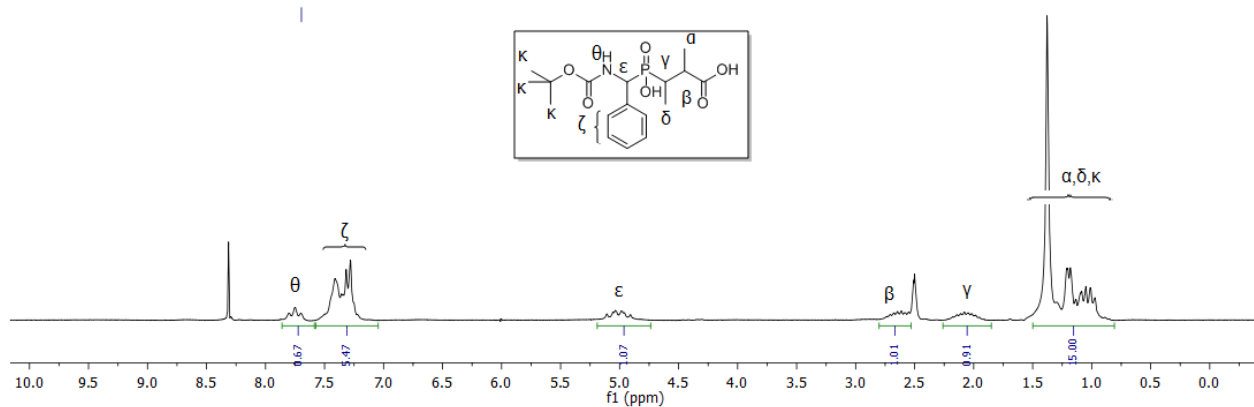


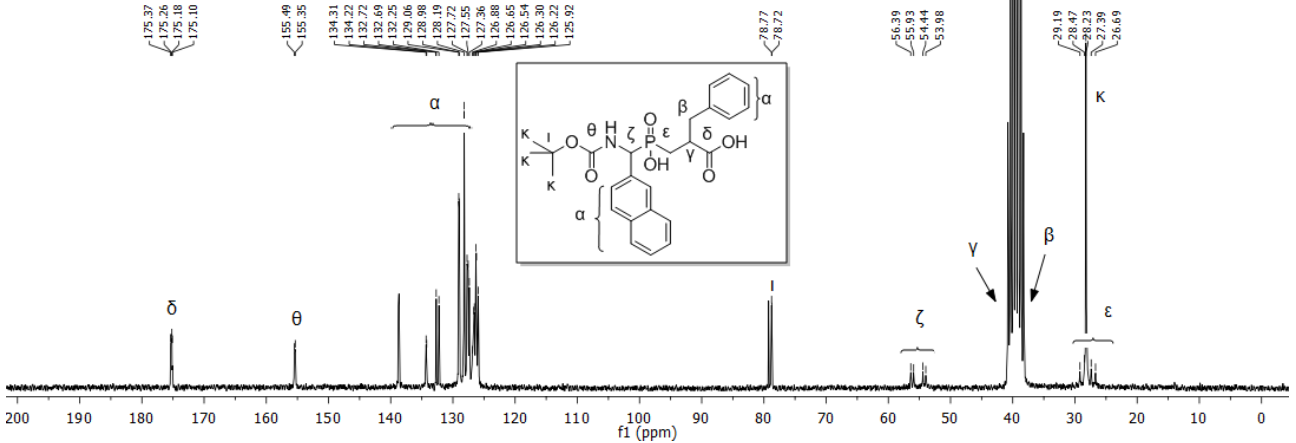
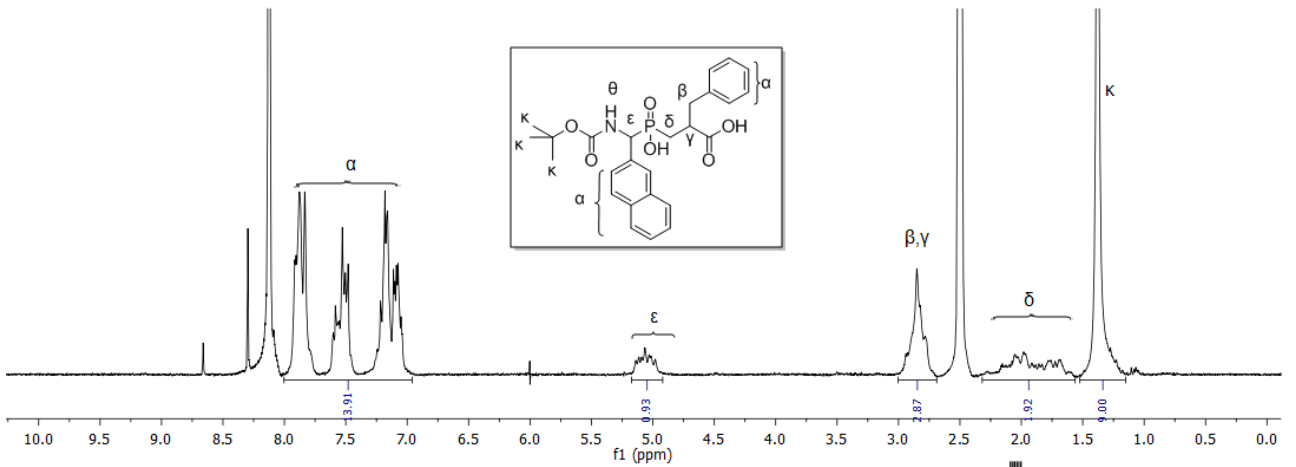
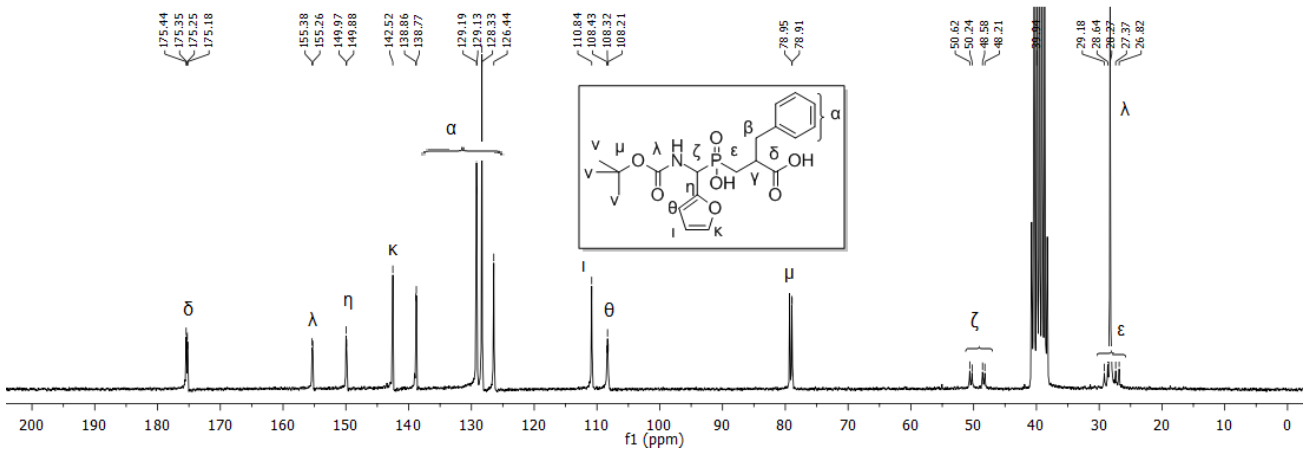
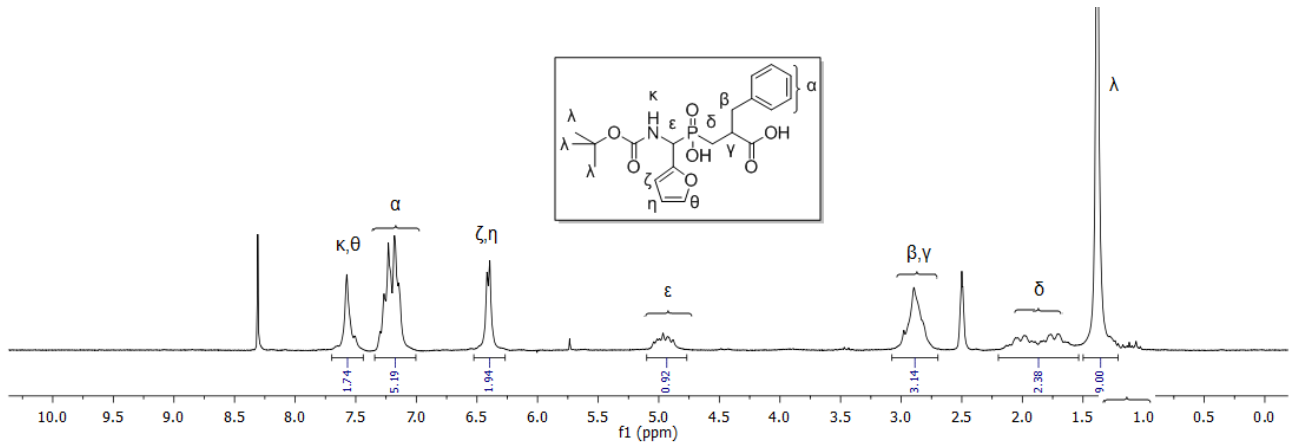


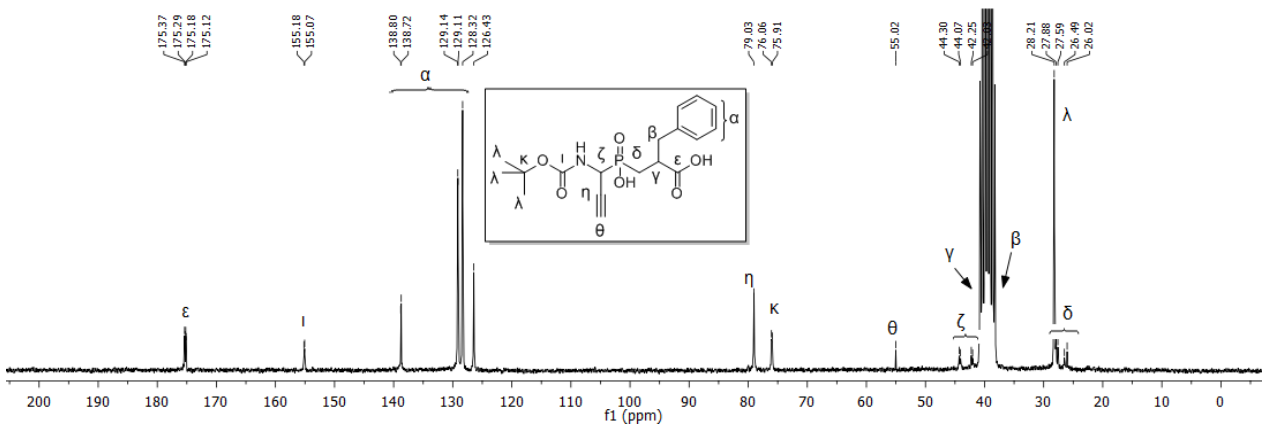
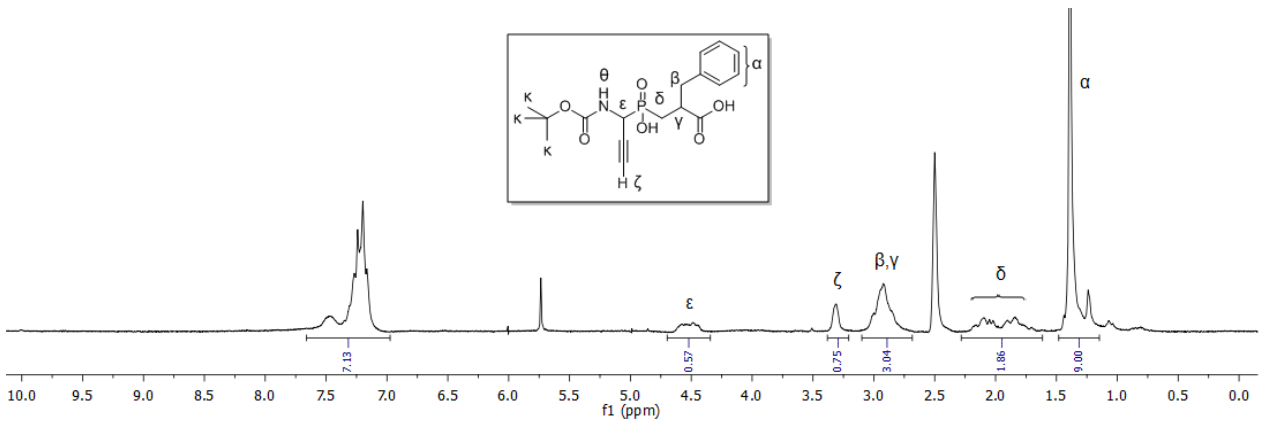
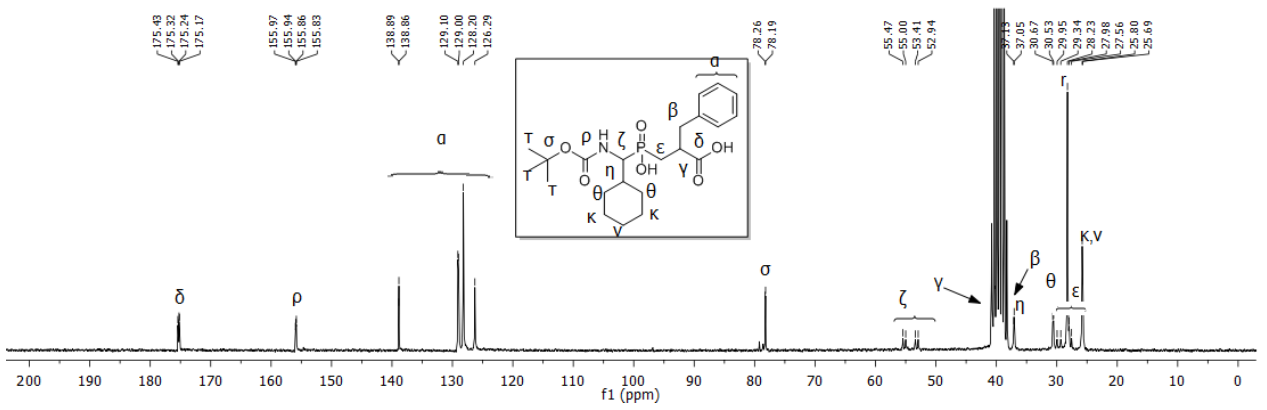
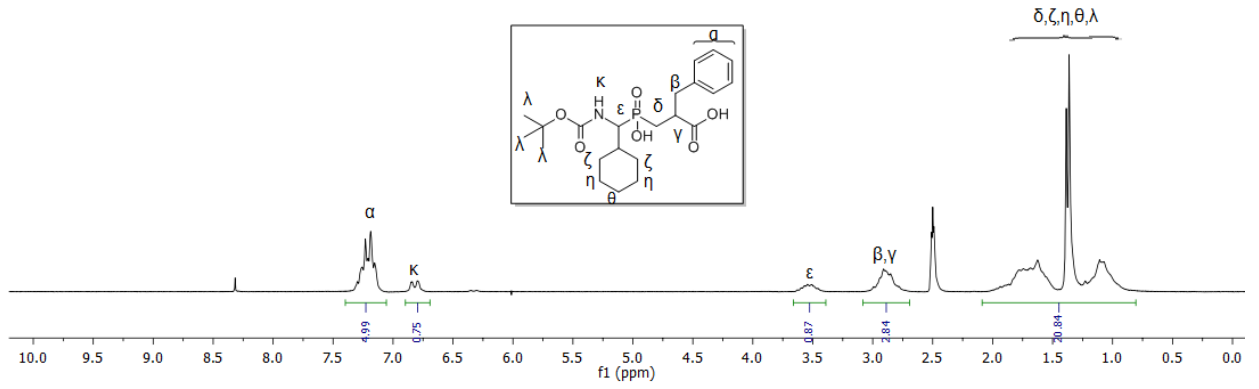












ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Bergstrom, C. T., and Antia, R. How do adaptive immune systems control pathogens while avoiding autoimmunity?, *Trends Ecol. Evol.*, **2006**, 21, 22-28.
- [2] Cooper, M. D., and Alder, M. N. The evolution of adaptive immune systems, *Cell*, **2006**, 124, 815-822.
- [3] Fearon, D. T. Seeking wisdom in innate immunity, *Nature*, **1997**, 388, 323-324.
- [4] Barry, M., and Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death, *Nat. Rev. Immunol.*, **2002**, 2, 401-409.
- [5] Rock, K. L., Reits, E., and Neefjes, J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules, *Trends Immunol.*, **2016**, 37, 724-737.
- [6] Marrack, P., Scott-Browne, J. P., Dai, S., Gapin, L., and Kappler, J. W. Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction, *Annu. Rev. Immunol.*, **2008**, 26, 171-203.
- [7] Davis, S. J., Ikemizu, S., Evans, E. J., Fugger, L., Bakker, T. R., and van der Merwe, P. A. The nature of molecular recognition by T cells, *Nat. Immunol.*, **2003**, 4, 217-224.
- [8] Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature*, **1987**, 329, 506-512.
- [9] Jordan, M. S., Singer, A. L., and Koretzky, G. A. Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells, *Nat. Immunol.*, **2003**, 4, 110-116.
- [10] Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G. M. The secretory synapse: the secrets of a serial killer, *Immunol. Rev.*, **2002**, 189, 152-160.
- [11] Young, J. D., and Cohn, Z. A. How killer cells kill, *Sci. Am.*, **1988**, 258, 38-44.
- [12] Rock, K. L., and Goldberg, A. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides, *Annu. Rev. Immunol.*, **1999**, 17, 739-779.
- [13] Androlewicz, M. J., Anderson, K. S., and Cresswell, P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, 90, 9130-9134.
- [14] Lundegaard, C., Lund, O., Buus, S., and Nielsen, M. Major histocompatibility complex class I binding predictions as a tool in epitope discovery, *Immunology*, **2010**, 130, 309-318.
- [15] Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A. F., Rock, K. L., and Goldberg, A. L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide, *EMBO J.*, **2001**, 20, 2357-2366.
- [16] Tsujimoto, M., and Hattori, A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, **2005**, 1751, 9-18.
- [17] Weber, D. A., Evavold, B. D., and Jensen, P. E. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM, *Science*, **1996**, 274, 618-620.
- [18] Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W., and Hansbro, P. M. Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response?, *Immunology*, **2008**, 123, 326-338.
- [19] Monu, N., and Trombetta, E. S. Cross-talk between the endocytic pathway and the endoplasmic reticulum in cross-presentation by MHC class I molecules, *Curr. Opin. Immunol.*, **2007**, 19, 66-72.
- [20] Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R., and Kurts, C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation, *Nat. Immunol.*, **2008**, 9, 558-566.
- [21] Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S. R., Niedermann, G., and van Endert, P. IRAP identifies an

endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation, *Science*, **2009**, 325, 213-217.

[22] Hattori, A., and Tsujimoto, M. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biochemistry, physiology and pathology, *J. Biochem. (Tokyo)*, **2013**, 154, 219-228.

[23] Saveanu, L., and van Endert, P. The role of insulin-regulated aminopeptidase in MHC class I antigen presentation, *Front. Immunol.*, **2012**, 3, 57-57.

[24] Saric, T., Chang, S.-C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A. L. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides, *Nat. Immunol.*, **2002**, 3, 1169-1176.

[25] Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum, *Nature*, **2002**, 419, 480-483.

[26] York, I. A., Chang, S.-C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues, *Nat. Immunol.*, **2002**, 3, 1177-1184.

[27] Hattori, A., Matsumoto, H., Mizutani, S., and Tsujimoto, M. Molecular Cloning of Adipocyte-Derived Leucine Aminopeptidase Highly Related to Placental Leucine Aminopeptidase/Oxytocinase, *J. Biochem. (Tokyo)*, **1999**, 125, 931-938.

[28] Matsumoto, H., Rogi, T., Yamashiro, K., Kodama, S., Tsuruoka, N., Hattori, A., Takio, K., Mizutani, S., and Tsujimoto, M. Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 46-52.

[29] Schomburg, L., Kollmus, H., Friedrichsen, S., and Bauer, K. Molecular characterization of a puromycin-insensitive leucyl-specific aminopeptidase, PILS-AP, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 3198-3207.

[30] Hallberg, P., Lind, L., Michaelsson, K., Kurland, L., Kahan, T., Malmqvist, K., Ohman, K. P., Nystrom, F., Liljedahl, U., Syvanen, A. C., and Melhus, H. Adipocyte-derived leucine aminopeptidase genotype and response to antihypertensive therapy, *BMC Cardiovasc. Disord.*, **2003**, 3, 11.

[31] Lew, R. A., Mustafa, T., Ye, S., McDowall, S. G., Chai, S. Y., and Albiston, A. L. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP), *J. Neurochem.*, **2003**, 86, 344-350.

[32] Watanabe, Y., Shibata, K., Kikkawa, F., Kajiyama, H., Ino, K., Hattori, A., Tsujimoto, M., and Mizutani, S. Adipocyte-derived leucine aminopeptidase suppresses angiogenesis in human endometrial carcinoma via renin-angiotensin system, *Clin. Cancer Res.*, **2003**, 9, 6497-6503.

[33] Goto, Y., Yoshioka, R., Arisaka, N., Hattori, A., and Tsujimoto, M. Involvement of Glutamine-238 in the Substrate Specificity of Human Laeverin/Aminopeptidase Q, *Biol. Pharm. Bull.*, **2011**, 34, 24-27.

[34] Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A. L. An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides, *Nat. Immunol.*, **2002**, 3, 1169-1176.

[35] York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues, *Nat. Immunol.*, **2002**, 3, 1177-1184.

[36] Hammer, G. E., Gonzalez, F., James, E., Nolla, H., and Shastri, N. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides, *Nat. Immunol.*, **2007**, 8, 101-108.

[37] York, I. A., Brehm, M. A., Zendzian, S., Towne, C. F., and Rock, K. L. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, 103, 9202-9207.

[38] Dragovic, S. M., Hill, T., Christianson, G. J., Kim, S., Elliott, T., Scott, D., Roopenian, D. C., Van Kaer, L., and Joyce, S. Proteasomes, TAP, and endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase associated with antigen processing control CD4⁺ Th cell responses by regulating

indirect presentation of MHC class II-restricted cytoplasmic antigens, *J. Immunol.*, **2011**, *186*, 6683-6692.

[39] Fruci, D., Giacomini, P., Nicotra, M. R., Forloni, M., Fraioli, R., Saveanu, L., van Endert, P., and Natali, P. G. Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues, *J. Cell. Physiol.*, **2008**, *216*, 742-749.

[40] Cifaldi, L., Lo Monaco, E., Forloni, M., Giorda, E., Lorenzi, S., Petrini, S., Tremante, E., Pende, D., Locatelli, F., Giacomini, P., and Fruci, D. Natural Killer Cells Efficiently Reject Lymphoma Silenced for the Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase Associated with Antigen Processing, *Cancer Res.*, **2011**, *71*, 1597-1606.

[41] James, E., Bailey, I., Sugiyarto, G., and Elliott, T. Induction of protective antitumor immunity through attenuation of ERAAP function, *J. Immunol.*, **2013**, *190*, 5839-5846.

[42] Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., and Van Endert, P. M. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum, *Nat. Immunol.*, **2005**, *6*, 689-697.

[43] Lorente, E., Barriga, A., Johnstone, C., Mir, C., Jimenez, M., and Lopez, D. Concerted in vitro trimming of viral HLA-B27-restricted ligands by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidases, *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e79596.

[44] Barnea, E., Melamed Kadosh, D., Haimovich, Y., Satumtira, N., Dorris, M. L., Nguyen, M. T., Hammer, R. E., Tran, T. M., Colbert, R. A., Taugog, J. D., and Admon, A. The Human Leukocyte Antigen (HLA)-B27 Peptidome in Vivo, in Spondyloarthritis-susceptible HLA-B27 Transgenic Rats and the Effect of Erp1 Deletion, *Mol. Cell. Proteomics*, **2017**, *16*, 642-662.

[45] Chen, L., Fischer, R., Peng, Y., Reeves, E., McHugh, K., Ternette, N., Hanke, T., Dong, T., Elliott, T., Shastri, N., Kollnberger, S., James, E., Kessler, B., and Bowness, P. Critical Role of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 in Determining the Length and Sequence of Peptides Bound and Presented by HLA-B27, *Arthritis Rheumatol*, **2014**, *66*, 284-294.

[46] Martin-Esteban, A., Guasp, P., Barnea, E., Admon, A., and Lopez de Castro, J. A. Functional Interaction of the Ankylosing Spondylitis Associated Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 with the HLA-B*27 Peptidome in Human Cells, *Arthritis Rheumatol*, **2016**.

[47] Blanchard, N., Kanaseki, T., Escobar, H., Delebecque, F., Nagarajan, N. A., Reyes-Vargas, E., Crockett, D. K., Raulet, D. H., Delgado, J. C., and Shastri, N. Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells, *J. Immunol.*, **2010**, *184*, 3033-3042.

[48] Nagarajan, N. A., de Verteuil, D. A., Sriranganadane, D., Yahyaoui, W., Thibault, P., Perreault, C., and Shastri, N. ERAAP Shapes the Peptidome Associated with Classical and Nonclassical MHC Class I Molecules, *J. Immunol.*, **2016**, *197*, 1035-1043.

[49] Saveanu, L., Babdor, J., Lawand, M., and van Endert, P. Insulin-regulated aminopeptidase and its compartment in dendritic cells, *Mol. Immunol.*, **2013**, *55*, 153-155.

[50] Tsujimoto, M., Mizutani, S., Adachi, H., Kimura, M., Nakazato, H., and Tomoda, Y. Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**, *292*, 388-392.

[51] Albiston, A. L., McDowall, S. G., Matsacos, D., Sim, P., Clune, E., Mustafa, T., Lee, J., Mendelsohn, F. A., Simpson, R. J., Connolly, L. M., and Chai, S. Y. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 48623-48626.

[52] Stamogiannos, A., Koumantou, D., Papakyriakou, A., and Stratikos, E. Effects of polymorphic variation on the mechanism of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1, *Mol. Immunol.*, **2015**, *67*, 426-435.

[53] Chang, S. C., Momburg, F., Bhutani, N., and Goldberg, A. L. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, *102*, 17107-17112.

[54] Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P., and Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, *Nat. Rev. Immunol.*, **2011**, *11*, 823-836.

- [55] Sui, L., Gandhi, A., and Guo, H.-C. Crystal structure of a polypeptide's C-terminus in complex with the regulatory domain of ER aminopeptidase 1, *Mol. Immunol.*, **2016**, *80*, 41-49.
- [56] Nguyen, T. T., Chang, S.-C., Evnouchidou, I., York, I. A., Zikos, C., Rock, K. L., Goldberg, A. L., Stratikos, E., and Stern, L. J. Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2011**, *18*, 604-613.
- [57] Gandhi, A., Lakshminarasimhan, D., Sun, Y., and Guo, H.-C. Structural insights into the molecular ruler mechanism of the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1, *Sci. Rep.*, **2011**, *1*, 186.
- [58] Evnouchidou, I., Momburg, F., Papakyriakou, A., Chroni, A., Leondiadis, L., Chang, S. C., Goldberg, A. L., and Stratikos, E. The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1, *PLoS ONE*, **2008**, *3*, e3658.
- [59] Mpakali, A., Saridakis, E., Harlos, K., Zhao, Y., Papakyriakou, A., Kokkala, P., Georgiadis, D., and Stratikos, E. Crystal Structure of Insulin-Regulated Aminopeptidase with Bound Substrate Analogue Provides Insight on Antigenic Epitope Precursor Recognition and Processing, *J. Immunol.*, **2015**, *195*, 2842.
- [60] Zervoudi, E., Papakyriakou, A., Georgiadou, D., Evnouchidou, I., Gajda, A., Poreba, M., Salvesen, G. S., Drag, M., Hattori, A., Swevers, L., Vourloumis, D., and Stratikos, E. Probing the S1 specificity pocket of the aminopeptidases that generate antigenic peptides, *Biochem. J.*, **2011**, *435*, 411-420.
- [61] Hermans, S. J., Ascher, D. B., Hancock, N. C., Holien, J. K., Michell, B. J., Chai, S. Y., Morton, C. J., and Parker, M. W. Crystal structure of human insulin-regulated aminopeptidase with specificity for cyclic peptides, *Protein Sci.*, **2015**, *24*, 190-199.
- [62] Mpakali, A., Giastas, P., Mathioudakis, N., Mavridis, I. M., Saridakis, E., and Stratikos, E. Structural Basis for Antigenic Peptide Recognition and Processing by Endoplasmic Reticulum (ER) Aminopeptidase 2, *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*, 26021-26032.
- [63] Kochan, G., Krojer, T., Harvey, D., Fischer, R., Chen, L., Vollmar, M., von Delft, F., Kavanagh, K. L., Brown, M. A., Bowness, P., Wordsworth, P., Kessler, B. M., and Oppermann, U. Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2011**, *108*, 7745-7750.
- [64] Birtley, J. R., Saridakis, E., Stratikos, E., and Mavridis, I. M. The Crystal Structure of Human Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 2 Reveals the Atomic Basis for Distinct Roles in Antigen Processing, *Biochemistry*, **2011**, *51*, 286-295.
- [65] Stratikos, E., and Stern, L. J. Antigenic peptide trimming by ER aminopeptidases—Insights from structural studies, *Mol. Immunol.*, **2013**, *55*, 212-219.
- [66] Papakyriakou, A., and Stratikos, E. The Role of Conformational Dynamics in Antigen Trimming by Intracellular Aminopeptidases, *Front Immunol*, **2017**, *8*, 946.
- [67] Stratikos, E. Regulating adaptive immune responses using small molecule modulators of aminopeptidases that process antigenic peptides, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2014**, *23*, 1-7.
- [68] Haroon, N., and Inman, R. D. Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biology and pathogenic potential, *Nat. Rev. Rheumatol.*, **2010**, *6*, 461-467.
- [69] Stamogiannos, A., Maben, Z., Papakyriakou, A., Mpakali, A., Kokkala, P., Georgiadis, D., Stern, L. J., and Stratikos, E. Critical Role of Interdomain Interactions in the Conformational Change and Catalytic Mechanism of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1, *Biochemistry*, **2017**, *56*, 1546-1558.
- [70] Mpakali, A., Giastas, P., Deprez-Poulain, R., Papakyriakou, A., Koumantou, D., Gealageas, R., Tsoukalidou, S., Vourloumis, D., Mavridis, I. M., Stratikos, E., and Saridakis, E. Crystal Structures of ERAP2 Complexed with Inhibitors Reveal Pharmacophore Requirements for Optimizing Inhibitor Potency, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, *8*, 333-337.
- [71] Mucha, A., Drag, M., Dalton, J. P., and Kafarski, P. Metallo-aminopeptidase inhibitors, *Biochimie*, **2010**, *92*, 1509-1529.

- [72] Peng, G., McEwen, A. G., Olieric, V., Schmitt, C., Albrecht, S., Cavarelli, J., and Tarnus, C. Insight into the remarkable affinity and selectivity of the aminobenzosuberone scaffold for the M1 aminopeptidases family based on structure analysis, *Proteins*, **2017**, *85*, 1413-1421.
- [73] Deprez-Poulain, R., Flipo, M., Piveteau, C., Leroux, F., Dassonneville, S., Florent, I., Maes, L., Cos, P., and Deprez, B. Structure-activity relationships and blood distribution of antiplasmodial aminopeptidase-1 inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 10909-10917.
- [74] Evnouchidou, I., Berardi, M. J., and Stratikos, E. A continuous fluorogenic assay for the measurement of the activity of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1: Competition kinetics as a tool for enzyme specificity investigation, *Anal. Biochem.*, **2009**, *395*, 33-40.
- [75] Papakyriakou, A., Zervoudi, E., Theodorakis, E. A., Saveanu, L., Stratikos, E., and Vourloumis, D. Novel selective inhibitors of aminopeptidases that generate antigenic peptides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 4832-4836.
- [76] Papakyriakou, A., Zervoudi, E., Tsoukalidou, S., Mauvais, F.-X., Sfyroera, G., Mastellos, D. C., van Endert, P., Theodorakis, E. A., Vourloumis, D., and Stratikos, E. 3,4-Diaminobenzoic Acid Derivatives as Inhibitors of the Oxytocinase Subfamily of M1 Aminopeptidases with Immune-Regulating Properties, *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 1524-1543.
- [77] Georgiadis, D., and Yiotakis, A. Specific targeting of metzincin family members with small-molecule inhibitors: Progress toward a multifarious challenge, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 8781-8794.
- [78] Jacobsen, J. A., Major Jourden, J. L., Miller, M. T., and Cohen, S. M. To bind zinc or not to bind zinc: An examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, **2010**, *1803*, 72-94.
- [79] Borhade, S. R., Rosenström, U., Sävmarker, J., Lundbäck, T., Jenmalm-Jensen, A., Sigmundsson, K., Axelsson, H., Svensson, F., Konda, V., Sköld, C., Larhed, M., and Hallberg, M. Inhibition of Insulin-Regulated Aminopeptidase (IRAP) by Arylsulfonamides, *ChemistryOpen*, **2014**, *3*, 256-263.
- [80] Albiston, A. L., Diwakarla, S., Fernando, R. N., Mountford, S. J., Yeatman, H. R., Morgan, B., Pham, V., Holien, J. K., Parker, M. W., Thompson, P. E., and Chai, S. Y. Identification and development of specific inhibitors for insulin-regulated aminopeptidase as a new class of cognitive enhancers, *Br. J. Pharmacol.*, **2011**, *164*, 37-47.
- [81] Diwakarla, S., Nylander, E., Gronbladh, A., Vanga, S. R., Khan, Y. S., Gutierrez-de-Teran, H., Savmarker, J., Ng, L., Pham, V., Lundback, T., Jenmalm-Jensen, A., Svensson, R., Artursson, P., Zellerroth, S., Engen, K., Rosenstrom, U., Larhed, M., Aqvist, J., Chai, S. Y., and Hallberg, M. Aryl Sulfonamide Inhibitors of Insulin-Regulated Aminopeptidase Enhance Spine Density in Primary Hippocampal Neuron Cultures, *ACS Chem. Neurosci.*, **2016**, *7*, 1383-1392.
- [82] Albiston, A. L., Morton, C. J., Ng, H. L., Pham, V., Yeatman, H. R., Ye, S., Fernando, R. N., De Bundel, D., Ascher, D. B., Mendelsohn, F. A., Parker, M. W., and Chai, S. Y. Identification and characterization of a new cognitive enhancer based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase, *FASEB J.*, **2008**, *22*, 4209-4217.
- [83] Yiotakis, A., Georgiadis, D., Matziari, M., Makaritis, A., and Dive, V. Phosphinic peptides: Synthetic approaches and biochemical evaluation as Zn-metalloprotease inhibitors, *Curr. Org. Chem.*, **2004**, *8*, 1135-1158.
- [84] Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallouros, I., Vassiliou, S., Zwilling, R., Bode, W., and Stocker, W. Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor, *Nat. Struct. Biol.*, **1996**, *3*, 671-675.
- [85] Dive, V., Georgiadis, D., Matziari, M., Makaritis, A., Beau, F., Cuniasse, P., and Yiotakis, A. Phosphinic peptides as zinc metalloproteinase inhibitors, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2004**, *61*, 2010-2019.
- [86] Giannousis, P. P., and Bartlett, P. A. Phosphorus amino acid analogues as inhibitors of leucine aminopeptidase, *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 1603-1609.
- [87] Grembecka, J., Mucha, A., Cierpicki, T., and Kafarski, P. The most potent organophosphorus inhibitors of leucine aminopeptidase. Structure-based design, chemistry, and activity, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 2641-2655.

- [88] Skinner-Adams, T. S., Lowther, J., Teuscher, F., Stack, C. M., Grembecka, J., Mucha, A., Kafarski, P., Trenholme, K. R., Dalton, J. P., and Gardiner, D. L. Identification of phosphinate dipeptide analog inhibitors directed against the *Plasmodium falciparum* M17 leucine aminopeptidase as lead antimalarial compounds, *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 6024-6031.
- [89] Vassiliou, S., Weglarz-Tomczak, E., Berlicki, L., Pawelczak, M., Nocek, B., Mulligan, R., Joachimiak, A., and Mucha, A. Structure-guided, single-point modifications in the phosphinic dipeptide structure yield highly potent and selective inhibitors of neutral aminopeptidases, *J. Med. Chem.*, **2014**.
- [90] Chen, H., Noble, F., Mothé, A., Meudal, H., Coric, P., Danascimento, S., Roques, B. P., George, P., and Fournié-Zaluski, M. C. Phosphinic derivatives as new dual enkephalin-degrading enzyme inhibitors: Synthesis, biological properties, and antinociceptive activities, *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 1398-1408.
- [91] Georgiadis, D., Vazeux, G., Llorens-Cortes, C., Yiotakis, A., and Dive, V. Potent and selective inhibition of zinc aminopeptidase A (EC 3.4.11.7, APA) by glutamyl aminophosphinic peptides: Importance of glutamyl aminophosphinic residue in the P1 position, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 1152-1155.
- [92] Aldhamen, Y. A., Pepelyayeva, Y., Rastall, D. P. W., Seregin, S. S., Zervoudi, E., Koumantou, D., Aylsworth, C. F., Quiroga, D., Godbehere, S., Georgiadis, D., Stratikos, E., and Amalfitano, A. Autoimmune Disease-Associated Variants of Extracellular Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Induce Altered Innate Immune Responses by Human Immune Cells, *J. Innate Immun.*, **2015**, *7*, 275-289.
- [93] Chen, L., Ridley, A., Hammitzsch, A., Al-Mossawi, M. H., Bunting, H., Georgiadis, D., Chan, A., Kollnberger, S., and Bowness, P. Silencing or inhibition of endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) suppresses free heavy chain expression and Th17 responses in ankylosing spondylitis, *Ann. Rheum. Dis.*, **2016**, *75*, 916-923.
- [94] Weglarz-Tomczak, E., Vassiliou, S., and Mucha, A. Discovery of potent and selective inhibitors of human aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 by screening libraries of phosphorus-containing amino acid and dipeptide analogues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 4122-4126.
- [95] Stamogiannos, A., Papakyriakou, A., Mauvais, F.-X., van Ender, P., and Stratikos, E. Screening Identifies Thimerosal as a Selective Inhibitor of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2016**, *7*, 681-685.
- [96] Segura, E., Albiston, A. L., Wicks, I. P., Chai, S. Y., and Villadangos, J. A. Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2009**, *106*, 20377-20381.
- [97] Zervoudi, E., Saridakis, E., Birtley, J. R., Seregin, S. S., Reeves, E., Kokkala, P., Aldhamen, Y. A., Amalfitano, A., Mavridis, I. M., James, E., Georgiadis, D., and Stratikos, E. Rationally designed inhibitor targeting antigen-trimming aminopeptidases enhances antigen presentation and cytotoxic T-cell responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2013**, *110*, 19890-19895.
- [98] Mpakali, A., Saridakis, E., Harlos, K., Zhao, Y., Kokkala, P., Georgiadis, D., Giastas, P., Papakyriakou, A., and Stratikos, E. Ligand-Induced Conformational Change of Insulin-Regulated Aminopeptidase: Insights on Catalytic Mechanism and Active Site Plasticity, *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 2963-2972.
- [99] Stratikos, E. Modulating antigen processing for cancer immunotherapy, *Oncoimmunology*, **2014**, *3*, e27568.
- [100] Dive, V., Cotton, J., Yiotakis, A., Michaud, A., Vassiliou, S., Jiracek, J., Vazeux, G., Chauvet, M. T., Cuniasse, P., and Corvol, P. RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, 4330-4335.
- [101] Devel, L., Garcia, S., Czarny, B., Beau, F., Lajeunesse, E., Vera, L., Georgiadis, D., Stura, E., and Dive, V. Insights from Selective Non-phosphinic Inhibitors of MMP-12 Tailored to Fit with an S1' Loop Canonical Conformation, *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 35900-35909.

- [102] Κοκκάλα, Π., "Σύνθεση Φωσφινικών Ψευδοπεπτιδίων Στα Πλαίσια Μελέτης Sar Για Την Ανάπτυξη Αναστολέων Αμινοπεπτιδασών Του Ενδοπλασματικού Δικτύου", Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδικεύσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.,
- [103] Fruci, D., Romania, P., D'Alicandro, V., and Locatelli, F. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 function and its pathogenic role in regulating innate and adaptive immunity in cancer and major histocompatibility complex class I-associated autoimmune diseases, *Tissue Antigens*, **2014**, *84*, 177-186.
- [104] Serwold, T., Gaw, S., and Shastri, N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules, *Nat. Immunol.*, **2001**, *2*, 644-651.
- [105] Yiotakis, A., Vassiliou, S., Jiráček, J., and Dive, V. Protection of the hydroxyphosphinyl function of phosphinic dipeptides by adamantyl. Application to the solid-phase synthesis of phosphinic peptides, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 6601-6605.
- [106] Georgiadis, D., and Dive, V. Phosphinic Peptides as Potent Inhibitors of Zinc-Metalloproteases, *Top. Curr. Chem.*, **2015**, *360*, 1-38.
- [107] Jullien, N., Makritis, A., Georgiadis, D., Beau, F., Yiotakis, A., and Dive, V. Phosphinic tripeptides as dual angiotensin-converting enzyme C-domain and endothelin-converting enzyme-1 inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 208-220.
- [108] Mucha, A., Lämmerhofer, M., Lindner, W., Pawelczak, M., and Kafarski, P. Individual stereoisomers of phosphinic dipeptide inhibitor of leucine aminopeptidase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1550-1554.
- [109] McMenemy, R. H., and Oncley, J. L. The Specific Binding of I-Tryptophan to Serum Albumin, *J. Biol. Chem.*, **1958**, *233*, 1436-1447.
- [110] Makaritis, A., Georgiadis, D., Dive, V., and Yiotakis, A. Diastereoselective solution and multipin-based combinatorial array synthesis of a novel class of potent phosphinic metalloprotease inhibitors, *Chem. Eur. J.*, **2003**, *9*, 2079-2094.
- [111] David, A., Steer, D., Bregant, S., Devel, L., Makaritis, A., Beau, F., Yiotakis, A., and Dive, V. Cross-linking yield variation of a potent matrix metalloproteinase photoaffinity probe and consequences for functional proteomics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2007**, *46*, 3275-3277.
- [112] Devel, L., Rogakos, V., David, A., Makaritis, A., Beau, F., Cuniasse, P., Yiotakis, A., and Dive, V. Development of selective inhibitors and substrate of matrix metalloproteinase-12, *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 11152-11160.
- [113] Marchant, D. J., Bellac, C. L., Moraes, T. J., Wadsworth, S. J., Dufour, A., Butler, G. S., Bilawchuk, L. M., Hendry, R. G., Robertson, A. G., Cheung, C. T., Ng, J., Ang, L., Luo, Z., Heilbron, K., Norris, M. J., Duan, W., Bucyk, T., Karpov, A., Devel, L., Georgiadis, D., Hegele, R. G., Luo, H., Granville, D. J., Dive, V., McManus, B. M., and Overall, C. M. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity, *Nat. Med.*, **2014**, *20*, 493-502.
- [114] Mores, A., Matziari, M., Beau, F., Cuniasse, P., Yiotakis, A., and Dive, V. Development of potent and selective phosphinic peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 2216-2226.
- [115] Tochowicz, A., Maskos, K., Huber, R., Oltenfreiter, R., Dive, V., Yiotakis, A., Zanda, M., Pourmotabbed, T., Bode, W., and Goettig, P. Crystal structures of MMP-9 complexes with five inhibitors: contribution of the flexible Arg424 side-chain to selectivity, *J. Mol. Biol.*, **2007**, *371*, 989-1006.
- [116] Akif, M., Schwager, S. L., Anthony, C. S., Czarny, B., Beau, F., Dive, V., Sturrock, E. D., and Acharya, K. R. Novel mechanism of inhibition of human angiotensin-I-converting enzyme (ACE) by a highly specific phosphinic tripeptide, *Biochem. J.*, **2011**, *436*, 53-59.
- [117] Tranchant, I., Vera, L., Czarny, B., Amoura, M., Cassar, E., Beau, F., Stura, Enrico A., and Dive, V. Halogen Bonding Controls Selectivity of FRET Substrate Probes for MMP-9, *Chem. Biol.*, **2014**, *21*, 408-413.
- [118] Cavallo, G., Metrangolo, P., Milani, R., Pilati, T., Priimagi, A., Resnati, G., and Terraneo, G. The Halogen Bond, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 2478-2601.

- [119] Kraut, D. A., Churchill, M. J., Dawson, P. E., and Herschlag, D. Evaluating the potential for halogen bonding in the oxyanion hole of ketosteroid isomerase using unnatural amino acid mutagenesis, *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 269-273.
- [120] Kummer, D. A., Chain, W. J., Morales, M. R., Quiroga, O., and Myers, A. G. Stereocontrolled alkylative construction of quaternary carbon centers, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 13231-13233.
- [121] Georgiadis, D., Matziari, M., Vassiliou, S., Dive, V., and Yiotakis, A. A convenient method to synthesize phosphinic peptides containing an aspartyl or glutamyl aminophosphinic acid. Use of the phenyl group as the carboxyl synthon, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 14635-14648.
- [122] Baylis, E. K., Campbell, C. D., and Dingwall, J. G. 1-Aminoalkylphosphonous acids. Part 1. Isosteres of the protein amino acids, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1984**, 2845-2853.
- [123] Schmidt, B., Hölter, F., Kelling, A., and Schilde, U. Pd-Catalyzed Arylation Reactions with Phenol Diazonium Salts: Application in the Synthesis of Diarylheptanoids, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 3357-3365.
- [124] Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1963**, *2*, 565-598.
- [125] Wutts, P. G. M., and Greene, T. W., *Greene's Protective Group in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, **2007**.
- [126] Sämann, C., Dhayalan, V., Schreiner, P. R., and Knochel, P. Synthesis of Substituted Adamantylzinc Reagents Using a Mg-Insertion in the Presence of ZnCl₂ and Further Functionalizations, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 2418-2421.
- [127] Baldwin, J. E., Adlington, R. M., Birch, D. J., Crawford, J. A., and Sweeney, J. B. Radical reactions in synthesis: carbon-carbon bond formation from 2-substituted allyl trialkyl stannanes, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 1339-1340.
- [128] Chatgililoglu, C., Ferreri, C., Ballestri, M., and Curran, D. P. 2-Functionalized allyl tris(trimethylsilyl)silanes as radical-based allylating agents, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6387-6390.
- [129] Hin, B., Majer, P., and Tsukamoto, T. Facile Synthesis of α -Substituted Acrylate Esters, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7365-7368.
- [130] Bordwell, F. G. Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution, *Acc. Chem. Res.*, **1988**, *21*, 456-463.
- [131] Neises, B., and Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, *17*, 522-524.
- [132] Smrcina, M., Majer, P., Majerová, E., Guerassina, T. A., and Eissenstat, M. A. Facile stereoselective synthesis of γ -substituted γ -amino acids from the corresponding α -amino acids, *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 12867-12874.
- [133] Hamilton, J. Y., Sarlah, D., and Carreira, E. M. Iridium-catalyzed enantioselective allyl-alkene coupling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 3006-3009.
- [134] Zhang, Q., and Tiefenbacher, K. Hexameric resorcinarene capsule is a Bronsted acid: investigation and application to synthesis and catalysis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 16213-16219.
- [135] Devel, L., Garcia, S., Czarny, B., Beau, F., LaJeunesse, E., Vera, L., Georgiadis, D., Stura, E., and Dive, V. Insights from selective non-phosphinic inhibitors of MMP-12 tailored to fit with an S1' loop canonical conformation, *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 35900-35909.
- [136] Newkome, G. R., Lin, X., Yaxiong, C., and Escamilla, G. H. Erratum: Two-directional cascade polymer synthesis: Effects of core variation, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 7626.
- [137] Kokkala, P., Mpakali, A., Mauvais, F. X., Papakyriakou, A., Daskalaki, I., Petropoulou, I., Kavvalou, S., Papathanasopoulou, M., Agrotis, S., Fonsou, T. M., van Endert, P., Stratikos, E., and Georgiadis, D. Optimization and Structure-Activity Relationships of Phosphinic Pseudotriptide Inhibitors of Aminopeptidases That Generate Antigenic Peptides, *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 9107-9123.

- [138] Andersson, H., Demaegdt, H., Vauquelin, G., Lindeberg, G., Karlén, A., Hallberg, M., Erdélyi, M., and Hallberg, A. Disulfide Cyclized Tripeptide Analogues of Angiotensin IV as Potent and Selective Inhibitors of Insulin-Regulated Aminopeptidase (IRAP), *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 8059-8071.
- [139] Andersson, H., Demaegdt, H., Johnsson, A., Vauquelin, G., Lindeberg, G., Hallberg, M., Erdélyi, M., Karlén, A., and Hallberg, A. Potent Macrocyclic Inhibitors of Insulin-Regulated Aminopeptidase (IRAP) by Olefin Ring-Closing Metathesis, *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 3779-3792.
- [140] Giastas, P., Neu, M., Rowland, P., and Stratikos, E. High-Resolution Crystal Structure of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 with Bound Phosphinic Transition-State Analogue Inhibitor, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2019**, *10*, 708-713.
- [141] Georgiadou, D., Hearn, A., Evnouchidou, I., Chroni, A., Leondiadis, L., York, I. A., Rock, K. L., and Stratikos, E. Placental leucine aminopeptidase efficiently generates mature antigenic peptides in vitro but in patterns distinct from endoplasmic reticulum aminopeptidase 1, *J. Immunol.*, **2010**, *185*, 1584-1592.
- [142] Alvarez-Navarro, C., and López de Castro, J. A. ERAP1 structure, function and pathogenetic role in ankylosing spondylitis and other MHC-associated diseases, *Mol. Immunol.*, **2014**, *57*, 12-21.
- [143] Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y.-K., Kim, Y.-E., Ahn, J.-H., Riddell, S. R., Stratikos, E., Kim, V. N., and Ahn, K. Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell response by targeting the aminopeptidase ERAP1, *Nat. Immunol.*, **2011**, *12*, 984-991.
- [144] Blanchard, N., Gonzalez, F., Schaeffer, M., Joncker, N. T., Cheng, T., Shastri, A. J., Robey, E. A., and Shastri, N. Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum, *Nat. Immunol.*, **2008**, *9*, 937-944.
- [145] Dalal, S., Ragheb, D. R. T., Schubot, F. D., and Klemba, M. A Naturally Variable Residue in the S1 Subsite of M1 Family Aminopeptidases Modulates Catalytic Properties and Promotes Functional Specialization, *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 26004-26012.
- [146] Salomon, E., Schmitt, M., Marapaka, A. K., Stamogiannos, A., Revelant, G., Schmitt, C., Alavi, S., Florent, I., Addlagatta, A., Stratikos, E., Tarnus, C., and Albrecht, S. Aminobenzosuberone Scaffold as a Modular Chemical Tool for the Inhibition of Therapeutically Relevant M1 Aminopeptidases, *Molecules (Basel, Switzerland)*, **2018**, *23*, 2607.
- [147] Matziari, M., Georgiadis, D., Dive, V., and Yiotakis, A. Convenient synthesis and diversification of dehydroalaninyl phosphinic peptide analogues, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 659-660.
- [148] Matziari, M., Beau, F., Cuniasse, P., Dive, V., and Yiotakis, A. Evaluation of P1'-Diversified Phosphinic Peptides Leads to the Development of Highly Selective Inhibitors of MMP-11, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 325-336.
- [149] Vassiliou, S., Xeilari, M., Yiotakis, A., Grembecka, J., Pawelczak, M., Kafarski, P., and Mucha, A. A synthetic method for diversification of the P1' substituent in phosphinic dipeptides as a tool for exploration of the specificity of the S1' binding pockets of leucine aminopeptidases, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 3187-3200.
- [150] Thottathil, J. K., Ryono, D. E., Przybyla, C. A., Moniot, J. L., and Neubeck, R. Preparation of phosphinic acids: Michael additions of phosphonous acids/esters to conjugated systems, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 4741-4744.
- [151] Enders, D., Saint-Dizier, A., Lannou, M.-I., and Lenzen, A. The Phospha-Michael Addition in Organic Synthesis, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, *2006*, 29-49.
- [152] Armstrong, R. W., Combs, A. P., Tempest, P. A., Brown, S. D., and Keating, T. A. Multiple-Component Condensation Strategies for Combinatorial Library Synthesis, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, *29*, 123-131.
- [153] Birum, G. H. Urylenediphosphonates. General method for the synthesis of .alpha.-ureidophosphonates and related structures, *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 209-213.
- [154] Oleksyszyn, J., Tyka, R., and Mastalerz, P. Direct Synthesis of 1-Aminoalkanephosphonic and 1-Aminoalkanephosphinic Acids from Phosphorus Trichloride or Dichlorophosphines, *Synthesis*, **1978**, *1978*, 479-480.

- [155] Oleksyszyn, J., Subotkowska, L., and Mastalerz, P. Diphenyl 1-Aminoalkanephosphonates, *Synthesis*, **1979**, 1979, 985-986.
- [156] Yuan, C., Wang, G., and Chen, S. Studies on Organophosphorus Compounds; XLVI. A Facile and Direct Route to Dialkyl 1-(Benzyloxycarbonylamino)alkylphosphonates and Dialkyl or Diphenyl α -(Benzyloxycarbonylamino)benzylphosphonates, *Synthesis*, **1990**, 1990, 522-524.
- [157] Yuan, C., and Chen, S. Studies on Organophosphorus Compounds; LXIII. A New and Facile Synthetic Route to Protected Phosphonodipeptides: A Backbone for the Formation of Oligophosphonopeptides, *Synthesis*, **1992**, 1992, 1124-1128.
- [158] Yuan, C., Chen, S., and Wang, G. Studies on Organophosphorus Compounds XLVII: Acetyl Chloride - A Versatile Reagent for the Synthesis of 1-Aminoalkyl- and Amino(aryl)methylphosphonic Acid Derivatives, *Synthesis*, **1991**, 1991, 490-493.
- [159] Chung, S.-K., and Kang, D.-H. Asymmetric synthesis of α -aminophosphonates via diastereoselective addition of phosphite to chiral imine derivatives, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 21-24.
- [160] Oleksyszyn, J., and Gruszecka, E. Amidoalkylation of phosphorous acid, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 3537-3540.
- [161] Chen, S., and Coward, J. K. A general method for the synthesis of N-protected α -aminoalkylphosphinic acids, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 4335-4338.
- [162] Matziari, M., and Yiotakis, A. Shortcut to Fmoc-protected phosphinic pseudodipeptidic blocks, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4049-4052.
- [163] Nasopoulou, M., Georgiadis, D., Matziari, M., Dive, V., and Yiotakis, A. A versatile annulation protocol toward novel constrained phosphinic peptidomimetics, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 7222-7228.
- [164] Rozhko, L. F., and Ragulin, V. V. Method for the synthesis of phosphinic acids from hypophosphites V. the synthesis of pseudo- α,α -dipeptides, *Amino Acids*, **2005**, 29, 139-143.
- [165] Dmitriev, M. E., and Ragulin, V. V. New opinions on the amidoalkylation of hydrophosphorylic compounds, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 2613-2616.
- [166] Dmitriev, M. E., Rossinets, E. A., and Ragulin, V. V. Amidoalkylation of hydrophosphoryl compounds, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2011**, 81, 1092-1104.
- [167] Vinyukov, A. V., Dmitriev, M. E., Afanas'ev, A. V., Ragulin, V. V., Andreeva, L. A., and Myasoedov, N. F. Synthesis of P,N-protected phosphinic pseudoprolylglycine block, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2017**, 87, 266-269.
- [168] Dmitriev, M. E., Vinyukov, A. V., Lednev, B. V., and Ragulin, V. V. Synthesis of prolyl-glutamate phosphoisostere, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2017**, 87, 2489-2492.
- [169] Vinyukov, A. V., Dmitriev, M. E., Yarkevich, A. N., and Ragulin, V. V. Cyclic Amidoalkylation of Hydrophosphorylic Compounds. Synthesis of Proline Analogs, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2017**, 87, 2898-2901.
- [170] Soroka, M. The synthesis of 1-aminoalkylphosphonic acids. A revised mechanism of the reaction of phosphorus trichloride, amides and aldehydes or ketones in acetic acid (Oleksyszyn reaction), *Liebigs Ann. Chem.*, **1990**, 1990, 331-334.
- [171] Dmitriev, M. E., and Ragulin, V. V. Arbuzov-type reaction of acylphosphonites and N-alkoxycarbonylimine cations generated in situ with trifluoroacetic anhydride, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, 53, 1634-1636.
- [172] Vesely, J., and Rios, R. Enantioselective methodologies using N-carbamoyl-imines, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 611-630.
- [173] Klepacz, A., and Zwierzak, A. An expeditious one-pot synthesis of diethyl N-Boc-1-aminoalkylphosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 1079-1080.
- [174] Pettersen, D., Marcolini, M., Bernardi, L., Fini, F., Herrera, R. P., Sgarzani, V., and Ricci, A. Direct Access to Enantiomerically Enriched α -Amino Phosphonic Acid Derivatives by Organocatalytic Asymmetric Hydrophosphonylation of Imines, *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 6269-6272.

- [175] Cai, Z.-H., Du, G.-F., Dai, B., and He, L. Nucleophilic Carbene-Mediated Hydrophosphonylation of Aldimines, *Synthesis*, **2012**, *44*, 694-698.
- [176] George, N., Bekkaye, M., Masson, G., and Zhu, J. A Practical, One-Pot Multicomponent Synthesis of α -Amidosulfides and Their Application as Latent N-Acylimines in the Friedel–Crafts Reaction, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *2011*, 3695-3699.
- [177] Huang, Y.-Y., Chakrabarti, A., Morita, N., Schneider, U., and Kobayashi, S. A Catalytic Asymmetric Borono Variant of Hosomi–Sakurai Reactions with N,O-Aminals, *Angew. Chem.*, **2011**, *123*, 11317-11320.
- [178] Terada, M., Machioka, K., and Sorimachi, K. Activation of Hemiaminal Ethers by Chiral Brønsted Acids for Facile Access to Enantioselective Two-Carbon Homologation Using Enecarbamates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, *48*, 2553-2556.
- [179] Song, J., Shih, H.-W., and Deng, L. Asymmetric Mannich Reactions with in Situ Generation of Carbamate-Protected Imines by an Organic Catalyst, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 603-606.
- [180] Kano, T., Yurino, T., Asakawa, D., and Maruoka, K. Acid-catalyzed in situ generation of less accessible or unprecedented N-Boc imines from N-Boc aminals, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2013**, *52*, 5532-5534.
- [181] Kano, T., Aota, Y., Asakawa, D., and Maruoka, K. Brønsted acid-catalyzed Mannich reaction through dual activation of aldehydes and N-Boc-imines, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 16472-16474.
- [182] Yurino, T., Aota, Y., Asakawa, D., Kano, T., and Maruoka, K. N-Boc-aminals as easily accessible precursors for less accessible N-Boc-imines: facile synthesis of optically active propargylamine derivatives using Mannich-type reactions, *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 3687-3700.
- [183] Ranieri, B., Sartori, A., Curti, C., Battistini, L., Rassu, G., Pelosi, G., Casiraghi, G., and Zanardi, F. 3-Alkenyl-2-silyloxyindoles in Vinylogous Mannich Reactions: Synthesis of Aminated Indole-Based Scaffolds and Products, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 932-935.
- [184] Bai, J.-F., Sasagawa, H., Yurino, T., Kano, T., and Maruoka, K. In situ generation of N-Boc-protected alkenyl imines: controlling the E/Z geometry of alkenyl moieties in the Mukaiyama–Mannich reaction, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 8203-8206.
- [185] Dmitriev, M. E., Yurkova, L. L., Lermontov, S. A., and Ragulin, V. V. Formation of phosphorus-carbon bond in the course of amidoalkylation of hydrophosphorylic compounds, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2015**, *85*, 497-499.
- [186] Loev, B., Kormendy, M. F., and Goodman, M. M. t-Butyl Carbamate, *Org. Synth.*, **1968**, *48*, 32.
- [187] Prisyazhnyuk, A. V., and Babin, Y. V. Tunneling effects of dyadic prototropic rearrangement of hypophosphorous acid, *J. Struct. Chem.*, **2005**, *46*, 164-167.
- [188] Janesko, B. G., Fisher, H. C., Bridle, M. J., and Montchamp, J.-L. P(=O)H to P–OH Tautomerism: A Theoretical and Experimental Study, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 10025-10032.
- [189] Methot, J. L., and Roush, W. R. Nucleophilic Phosphine Organocatalysis, *Adv. Synth. Catal.*, **2004**, *346*, 1035-1050.
- [190] Dmitriev, M. E., and Ragulin, V. V. Acyloxy derivatives of trivalent phosphorus in amidoalkylation of hydrophosphoryl compounds, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2013**, *83*, 1888-1894.
- [191] Kano, T., Kobayashi, R., and Maruoka, K. Versatile In Situ Generated N-Boc-Imines: Application to Phase-Transfer-Catalyzed Asymmetric Mannich-Type Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, *54*, 8471-8474.
- [192] Campagne, J.-M., Coste, J., Guillou, L., Heitz, A., and Jouin, P. Solid phase synthesis of phosphinic peptides, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 4181-4184.
- [193] Ramage, R., Hopton, D., Parrott, M. J., Richardson, R. S., Kenner, G. W., and Moore, G. A. Application of diphenylphosphinic carboxylic mixed anhydrides to peptide synthesis, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1985**, 461-470.
- [194] Schlemminger, I., Saida, Y., Gröger, H., Maison, W., Durot, N., Sasai, H., Shibasaki, M., and Martens, J. Concept of Improved Rigidity: How to Make Enantioselective

Hydrophosphonylation of Cyclic Imines Catalyzed by Chiral Heterobimetallic Lanthanoid Complexes Almost Perfect, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 4818-4825.

[195] Babin, Y. V., Prisyazhnyuk, A. V., and Ustynyuk, Y. A. A density functional theory study of dimers of hydrophosphoryl compounds and proton transfer in them, *Russ. J. Phys. Chem. A*, **2008**, 82, 94-100.

[196] Andrew Boyd, E., Corless, M., James, K., and Regan, A. C. A versatile route to substituted phosphinic acids, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 2933-2936.

[197] Goh, K. K. K., Kim, S., and Zard, S. Z. Free-Radical Variant for the Synthesis of Functionalized 1,5-Diketones, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 4818-4821.

[198] Hu, X.-H., Zhang, J., Yang, X.-F., Xu, Y.-H., and Loh, T.-P. Stereo- and Chemoselective Cross-Coupling between Two Electron-Deficient Acrylates: An Efficient Route to (Z,E)-Muconate Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 3169-3172.

[199] Baylis, E. K. 1,1-Diethoxyethylphosphinates and phosphonites. Intermediates for the synthesis of functional phosphorus acids, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 9385-9388.

[200] Rogakos, V., Georgiadis, D., Dive, V., and Yiotakis, A. A modular rearrangement approach toward medicinally relevant phosphinic structures, *Org. Lett.*, **2009**, 11, 4696-4699.

[201] Kalyva, M., Zografos, A. L., Kapourani, E., Giambazolias, E., Devel, L., Papakyriakou, A., Dive, V., Lazarou, Y. G., and Georgiadis, D. Probing the Mechanism of Allylic Substitution of Morita-Baylis-Hillman Acetates (MBHAs) by using the Silyl Phosphonite Paradigm: Scope and Applications of a Versatile Transformation, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 3278-3289.

[202] Maryanoff, B., Hutchins, R. O., and Maryanoff, C. A., "Stereochemical aspects of phosphorus-containing cyclohexanes", *Top. Stereochem.*, 1979 doi:10.1002/9780470147207.ch4, p. doi:10.1002/9780470147207.ch9780470147204.

[203] Wang, H., Huang, L., Cao, X., Liang, D., and Peng, A.-Y. Synthesis of phostones via DABCO-catalyzed bromocyclization of alkenylphosphonic acid monoesters, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 7396-7403.

[204] Xiao, X., Antony, S., Kohlhagen, G., Pommier, Y., and Cushman, M. Design, synthesis, and biological evaluation of cytotoxic 11-aminoalkenylindenoisoquinoline and 11-diaminoalkenylindenoisoquinoline topoisomerase I inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 5147-5160.

[205] Okitsu, O., Suzuki, R., and Kobayashi, S. Efficient Synthesis of Piperidine Derivatives. Development of Metal Triflate-Catalyzed Diastereoselective Nucleophilic Substitution Reactions of 2-Methoxy- and 2-Acyloxy piperidines, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 809-823.

[206] Wang, Q., Leutzsch, M., van Gemmeren, M., and List, B. Disulfonimide-Catalyzed Asymmetric Synthesis of β 3-Amino Esters Directly from N-Boc-Amino Sulfones, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 15334-15337.

[207] Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., and Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 7512-7515.

[208] Hou, Y., Lu, S., and Liu, G. Iodine(III)-Mediated [3 + 2] Cyclization for One-Pot Synthesis of Benzo[d]isoxazole-4,7-diols in Aqueous Medium, *J. Org. Chem.*, **2013**, 78, 8386-8395.

[209] Puerto Galvis, C. E., and Kouznetsov, V. V. An unexpected formation of the novel 7-oxa-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-ene skeleton during the reaction of furfurylamine with maleimides and their bioprospection using a zebrafish embryo model, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 407-411.

[210] Patil, V. V., Gayakwad, E. M., and Shankarling, G. S. Highly efficient and stable peracid for rapid and selective oxidation of aliphatic amines to oximes, *New J. Chem.*, **2015**, 39, 6677-6682.

[211] Zhang, L., Chen, H., Zha, Z., and Wang, Z. Electrochemical tandem synthesis of oximes from alcohols using KNO₃ as the nitrogen source, mediated by tin microspheres in aqueous medium, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 6574-6576.

[212] Formica, M., Sorin, G., Farley, A. J. M., Díaz, J., Paton, R. S., and Dixon, D. J. Bifunctional iminophosphorane catalysed enantioselective sulfa-Michael addition of alkyl thiols to alkenyl benzimidazoles, *Chem Sci*, **2018**, 9, 6969-6974.

[213] Chanthamath, S., Takaki, S., Shibatomi, K., and Iwasa, S. Highly Stereoselective Cyclopropanation of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds with Methyl (Diazoacetoxy)acetate Catalyzed by a Chiral Ruthenium(II) Complex, *Angewandte Chemie International Edition*, **2013**, *52*, 5818-5821.

[214] Inaloo, I. D., Majnooni, S., and Esmaeilpour, M. Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles in a Deep Eutectic Solvent: An Efficient and Recyclable Catalytic System for the Synthesis of Primary Carbamates and Monosubstituted Ureas, *Eur. J. Org. Chem.*, **2018**, *2018*, 3481-3488.