



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ
ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΟΥΡΕΑΣΗΣ**

ΝΤΑΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2019

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ
ΟΥΡΕΑΣΗΣ

ΝΤΑΤΣΟΠΟΥΛΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ
A.M.: 001517

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Βασιλείου Σταματία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Βασιλείου Σταματία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Βουγιουκαλάκης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κόκοτος Χριστόφορος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Βασιλείου Σταματία, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Βουγιουκαλάκης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεωργιάδης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κόκοτος Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Κόκοτος Χριστόφορος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μαυρομούστακος Θωμάς, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μουτεβελή-Μηνακάκη Παναγιώτα, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 17/10/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο Κεφάλαιο 1 της παρούσας εργασίας αναλύεται η δομή του ενζύμου της ουρεάσης, ο μηχανισμός της καταλυτικής δράσης της, ο ρόλος που διαδραματίζει στη Γεωργία και την Ιατρική και μελετώνται ορισμένες ομάδες αναστολέων της. Στη συνέχεια, στο Κεφάλαιο 2, πραγματοποιείται μία βιβλιογραφική επισκόπηση αντιδράσεων σχηματισμού δεσμού P-C για τη σύνθεση φωσφινικών και φωσφονικών οξέων και εστέρων. Στο τελευταίο μέρος της εργασίας περιγράφεται η σύνθεση νέων οργανοφωσφορικών αναστολέων της ουρεάσης και παρουσιάζεται η μελέτη της ανασταλτικής τους δράσης. Σκοπός της εργασίας ήταν η σύνθεση φωσφονικών οξέων ως υποψήφιων ομοιοπολικών αναστολέων βακτηριακών ουρεασών. Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση επέδειξε το φωσφονομεθυλο-κινναμωμικό οξύ **157**, με σταθερά αναστολής $K_i=0.594 \mu\text{M}$ ως προς την ουρεάση του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii* και $K_i=0.485 \mu\text{M}$ ως προς την ουρεάση του βακτηρίου *Proteus mirabilis*, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί ο σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού. Το φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικό οξύ **194** επέδειξε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii*, με σταθερά αναστολής $K_i=0.509 \mu\text{M}$ και με μικτό μηχανισμό που πιθανόν περιλαμβάνει τόσο την ομοιοπολική όσο και τη μη ομοιοπολική αναστολή. Η ένωση **194** αποτέλεσε επίσης τον ισχυρότερο αναστολέα σε σχέση με ανάλογές της ενώσεις, ως προς την ουρεάση του βακτηρίου *Proteus mirabilis* με $IC_{50}^{2h}=11.0 \text{ n}\mu\text{M}$, ενώ το φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικό οξύ **209** επέδειξε την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηρίου *Proteus mirabilis* με $LC_{50}^{2h}=28,6 \mu\text{M}$.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακευτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ουρεάση, *Sporosarcina pasteurii*, αναστολείς, φωσφινικά οξέα, φωσφονικά οξέα.

ABSTRACT

In Chapter 1 of the present thesis the urease enzyme is analyzed. Its structure and its catalytic mechanism are examined, followed by ureases' role in Agriculture and Medicine, along with certain groups of inhibitors. Afterwards, in Chapter 2, a literature review of phosphorus chemistry and the most significant reactions leading to P-C bond formation are presented. In the final Chapter, the synthesis of novel organophosphorus compounds as inhibitors of urease is outlined, together with a study of their inhibitory action. The aim of this study was the synthesis of phosphonic acids as potential covalent inhibitors of bacterial ureases. Phosphonomethyl-cinnamic acid **157** exhibited the highest potency, with $K_i=0.594 \mu\text{M}$ for *Sporosarcina pasteurii* urease and $K_i=0.485 \mu\text{M}$ for *Proteus mirabilis* urease. However, compound **157** appeared reversible and competitive. Phosphonopropyl-cinnamic acid **194** was also found to be the most potent inhibitor, with $K_i=0.509 \mu\text{M}$ for *Sporosarcina pasteurii* urease. The observed inhibition kinetics suggest a mixed mechanism, where covalent and noncovalent inhibition may occur. All compounds were also assayed against *Proteus mirabilis* urease. Compound **194** remained the most potent derivative, with $IC_{50}^{2h}=11.0 \text{ m}=\mu\text{M}$, whilst phosphonobutyl-cinnamic acid **209** displayed the highest antimicrobial activity against *Proteus mirabilis*, with $LC_{50}^{2h}=28,6 \mu\text{M}$.

SUBJECT AREA: Medicinal Chemistry

KEYWORDS: Urease, *Sporosarcina pasteurii*, inhibitors, phosphinic acids, phosphonic acids.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλείου Σταματία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής για τις υποδείξεις και τις συμβουλές τους που συντέλεσαν στην τελική διαμόρφωση της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τα σχόλια και τις διορθώσεις τους.

Ευχαριστώ θερμά επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή Łukasz Berlicki από το Τμήμα Βιοοργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Wrocław στην Πολωνία για τα βιολογικά πειράματα και τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό του, καθώς και για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου, Δρ. Σακκή Εσθήρ και Δρ. Πασχαλίδου Κατερίνα για την αμέριστη βοήθειά τους κατά τη λήψη των φασμάτων μάζας, καθώς και τη Δρ. Κόκοτου Μαρούλα για τη λήψη των φασμάτων HRMS.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και ιδιαίτερα τη συνάδελφό μου και υποψήφια διδάκτορα Παγώνη Κατερίνα για τη βοήθειά της και την εξαιρετική συνεργασία στο εργαστήριό μας.

Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένειά μου που με στήριξε όλα τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς και στους φίλους μου που με ενθάρρυναν σε κάθε στάδιο των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	28
1.1 Εισαγωγή	29
1.2 Δομικά χαρακτηριστικά των ουρεασών	30
1.3 Το ενεργό κέντρο της ουρεάσης.....	37
1.4 Ο καταλυτικός μηχανισμός υδρόλυσης της ουρίας από την SPU.....	39
1.5 Λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι ουρεάσες	42
1.5.1 Φυτικές ουρεάσες	42
1.5.2 Ουρεολυτικά βακτήρια παθογόνα για ανθρώπους και ζώα.....	43
1.5.3 Ουρεάσες από βακτήρια του εδάφους και προβλήματα από την πητικότητα της αμμωνίας	45
1.5.4 Όξινες ουρεάσες	46
1.5.5 Ουρεάσες και ορυκτοποίηση	47
1.5.6 Μη ενζυμικές ιδιότητες των ουρεασών.....	48
1.6 Αναστολείς της ουρεάσης.....	49
1.6.1 Αντιστρεπτοί αναστολείς.....	49
1.6.1.1 Βαρέα μέταλλα	49
1.6.1.2 Ιόντα φθορίου.....	49
1.6.1.3 Ενώσεις θείου	50
1.6.1.4 Κιτρικά ιόντα.....	51
1.6.1.5 Βορικό οξύ και βορονικά οξέα	53
1.6.1.6 Υδροξαμικά οξέα	54
1.6.1.7 Κινολόνες	56
1.6.1.8 Ετεροκυκλικές ενώσεις.....	58
1.6.1.9 Πολυφαινόλες.....	60
1.6.1.10 Φυσικά προϊόντα.....	61
1.6.1.11 Οργανοφωσφορικές ενώσεις.....	62
1.6.2 Ομοιοπολικοί αναστολείς	67

1.6.2.1 Ομοιοπολικοί αναστολείς ενζύμων	67
1.6.2.2 Κινόνες	72
1.6.2.3 Οργανοσεληνιακοί αναστολείς	74
1.6.2.4 Βενζιμιδαζόλια.....	75
1.6.2.5 Πολυφαινόλες.....	76
1.6.2.6 Άλλες ενώσεις που σχεδιάστηκαν να αναστέλλουν ομοιοπολικά την ουρεάση.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	81
2.1 Εισαγωγή	81
2.2 Οργανοφωσφορικές ενώσεις.....	81
2.3 Σύνθεση φωσφινικών παραγώγων.....	84
2.3.1 Άμεση εστεροποίηση με αλκοόλες	84
2.3.2 Εστεροποίηση χλωριδίων φωσφινικών οξέων με αλκοόλες.....	84
2.3.3 Υδροφωσφινυλίωση αλκενίων μέσω ριζικού μηχανισμού	85
2.3.4 Υδροφωσφινυλίωση μη ενεργοποιημένων αλκενίων με τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας	86
2.3.5 Αντίδραση Pudovik	87
2.3.6 Αντίδραση P-Michael	88
2.3.7 Υδροφωσφινυλίωση αλκενίων και αλκινίων καταλυόμενη από μέταλλα.....	90
2.4 Σύνθεση φωσφονικών παραγώγων	92
2.4.1 Αντίδραση Arbuzov	92
2.4.2 Αντίδραση Michaelis-Becker.....	93
2.4.3 Σύνθεση φωσφονικών εστέρων μέσω αντίδρασης ανταλλαγής μετάλλου-αλογόνου ή αντιδραστηρίων Grignard	93
2.4.4 Εισαγωγή φωσφονικής ομάδας μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης σε καρβονυλικές ενώσεις.....	94
2.4.5 Αντίδραση με α,β -ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις.....	95
2.4.6 Αντιδράσεις εισαγωγής φωσφονικής ομάδας καταλυόμενες από μέταλλα μετάπτωσης	97
2.4.6.1 Εισαγωγή σε sp^3 άτομο άνθρακα	97
2.4.6.1.2 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd	97

2.4.6.2 Εισαγωγή σε sp^2 άτομο άνθρακα με διατήρηση του υβριδισμού	97
2.4.6.2.1 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd	97
2.4.6.2.2 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Cu (I)	98
2.4.6.2.3 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Ni	98
2.4.6.3 Εισαγωγή σε sp^2 άτομο άνθρακα με ταυτόχρονο επανυβριδισμό	99
2.4.6.3.1 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd	99
2.4.6.4 Εισαγωγή σε sp άτομο άνθρακα	100
2.4.6.4.1 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Cu	100
2.4.6.4.2 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd	100
2.4.6.4.3 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Ni	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	105
4.1 Σχεδιασμός φωσφονομεθυλο- και φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	105
4.2 Σύνθεση φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	105
4.3 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	116
4.4 Σύνθεση φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	123
4.5 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	127
4.6 Σχεδιασμός (<i>E</i>)-φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	129
4.7 Σύνθεση (<i>E</i>)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	129
4.8 Σύνθεση (<i>E</i>)-φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	141
4.9 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης (<i>E</i>)-φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	146
4.10 Σχεδιασμός (<i>Z</i>)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	157

4.11	Σύνθεση (Z)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	158
4.12	Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης (Z)- φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων	159
4.13	Σχεδιασμός φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών νιτριλίων	161
4.14	Σύνθεση φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών νιτριλίων	162
4.15	Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών νιτριλίων	165
4.16	Σχεδιασμός αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέος	166
4.17	Σύνθεση αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων	167
4.18	Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέος	169
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5		170
5.1	Γενικό πειραματικό μέρος	171
5.1.1	Αντιδραστήρια	171
5.1.2	Χρωματογραφική ανάλυση	171
5.1.3	Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός ενώσεων	172
5.1.4	Ενζυμικά πειράματα	174
5.1.5	Πειράματα Μοριακής Μοντελοποίησης	174
5.2	Γενικό συνθετικό μέρος	175
5.2.1	Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων Morita-Baylis-Hillman	175
5.2.2	Γενική μέθοδος ακετυλίωσης αλκοολών Morita-Baylis-Hillman	183
5.2.3	Γενική μέθοδος βρωμίωσης αλκοολών Morita-Baylis-Hillman	187
5.2.4	Γενική μέθοδος σύνθεσης (E)-κυανο-κινναμωμικών αλκοολών	192
5.2.5	Γενική μέθοδος βρωμίωσης (E)-κυανο-κινναμωμικών αλκοολών	194
5.2.6	(E)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)ακρυλονιτρίλιο (243)	197
5.2.7	Γενική μέθοδος σύζευξης Stille με τετραβινυλοκασσίτερο	198
5.2.8	Γενική μέθοδος σύζευξης Stille με αλλυλοτριβουτυλοκασσίτερο	205
5.2.9	Γενική μέθοδος σύζευξης τύπου Sonogashira	208
5.2.10	Γενική μέθοδος υδροκασσιτερίωσης/σύζευξης Stille	210
5.2.11	Αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος (119)	214
5.2.12	Γενική μέθοδος σύνθεσης φωσφινικών οξέων	214
5.2.13	Γενική μέθοδος οξειδωσης φωσφινικών οξέων	218

5.2.14 Γενική μέθοδος σύνθεσης φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών διεστέρων	222
5.2.15 Γενική μέθοδος σύνθεσης φωσφονικών οξέων μέσω υδροφωσφινυλίωσης-οξειδωσης	224
5.2.16 (1-Φαινυλοβινυλο)φωσφονικό διμεθύλιο (256)	238
5.2.17 (Φαινυλαιθινυλο)φωσφονικό διμεθύλιο (259).....	239
5.2.18 Γενική μέθοδος όξινης υδρόλυσης εστέρων.....	240
5.2.19 2-(4-Μεθυλοβενζυλο)-3-φωσφονοπροπανοϊκό οξύ (160).....	244
5.2.20 Γενική μέθοδος διάσπασης των φωσφονικών εστέρων με TMSBr	244
5.2.21 Γενική μέθοδος αλκαλικής υδρόλυσης εστέρων.....	248
5.2.22 Γενική μέθοδος αλκαλικής υδρόλυσης φωσφονικών εστέρων ...	259
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	262
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	264

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Ενζυμική υδρόλυση της ουρίας.....	29
Σχήμα 2. Καθίζηση των ανθρακικών αλάτων με τη δράση των ουρεασών. ...	47
Σχήμα 3. Η χημική δομή της β-μερκαπτοαιθανόλης.....	50
Σχήμα 4. Κιτρικό οξύ.....	52
Σχήμα 5. Οι δομές του βορικού οξέος και βορονικών οξέων που έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναστολείς ουρεασών	53
Σχήμα 6. Παράγωγα του υδροξαμικού οξέος ως αναστολείς της ουρεάσης. .	54
Σχήμα 7. Λεβοφλοξασίνη (8) και σιπροφλοξασίνη (9).....	57
Σχήμα 8. Παράγωγα της σιπροφλοξασίνης (9) ως αναστολείς της ουρεάσης	57
Σχήμα 9. Μοξιφλοξασίνη.....	58
Σχήμα 10. Νιτρο-ιμιδαζόλια ως αναστολείς της ουρεάσης.	58
Σχήμα 11. Παράγωγα ισοθειαζολίου.....	59
Σχήμα 12. Οξαδιαζόλια, θειαδιαζόλια και τριαζόλια ως αναστολείς βακτηριακών και φυτικών ουρεασών.	59
Σχήμα 13. Δις-ετεροκυκλικό βενζαμίδιο.	60
Σχήμα 14. Πολυφαινολικοί αναστολείς της ουρεάσης που κατοχυρώθηκαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από το Πανεπιστήμιο Jishou της Κίνας.....	61
Σχήμα 15. Φυσικά προϊόντα ως αναστολείς ουρεασών.	62
Σχήμα 16. Φωσφοροδιαμιδικός εστέρας ως ανάλογο μεταβατικής κατάστασης της υδρόλυσης της ουρίας	63
Σχήμα 17. Φωσφοροαμιδικοί εστέρες.....	64
Σχήμα 18. Ορισμένοι από τους <i>P</i> -μεθυλο-φωσφινικούς και θειοφωσφινικούς αναστολείς που συντέθηκαν από την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και τους συνεργάτες της.	65
Σχήμα 19. Ορισμένοι από τους <i>P</i> -υδροξυμεθυλο-φωσφινικούς αναστολείς που συντέθηκαν από την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και τους συνεργάτες της.	66
Σχήμα 20. Φωσφινομεθυλο-, φωσφονομεθυλο- και φωσφονοαιθυλο-κινναμμωμικά οξέα και εστέρες.....	67

Σχήμα 21. Ομοιοπολικά φάρμακα. Επισημαίνονται οι ομάδες που συμμετέχουν στον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με το βιολογικό στόχο.	69
Σχήμα 22. Πολυαλογονωμένες και μη βενζοκινόνες και ναφθοκινόνες ως αναστολείς της ουρεάσης.....	73
Σχήμα 23. Ebselen.....	74
Σχήμα 24. Ραμπεπραζόλη.	75
Σχήμα 25. Παράγωγο κατεχόλης ως αναστολέας της SPU.....	77
Σχήμα 26. Ομοιοπολικοί αναστολείς της SPU.....	78
Σχήμα 27. Δισουλφιράμη.	79
Σχήμα 28. Οργανοφωσφορικές ενώσεις γεωργικού ενδιαφέροντος.....	82
Σχήμα 29. Οργανοφωσφορικές φαρμακευτικές ενώσεις.	83
Σχήμα 30. Οργανοφωσφορικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην ασύμμετρη κατάλυση.	83
Σχήμα 31. Άμεση εστεροποίηση από αλκοόλες.	84
Σχήμα 32. Εστεροποίηση χλωριδίων φωσφινικών οξέων με αλκοόλες.....	84
Σχήμα 33. Η αντίδραση υδροφωσφινυλίωσης αλκενίων από τους Williams και Hamilton.....	85
Σχήμα 34. Παραλλαγή της ριζικής υδροφωσφινυλίωσης αλκενίων από τον Nifant'ev.....	85
Σχήμα 35. Παραλλαγή Karanewsky με χρήση του AIBN ως εκκινητή ριζών. .	86
Σχήμα 36. Γενική αντίδραση προσθήκης φωσφινικών αιθυλεστέρων σε αλκένια με χρήση AIBN.....	86
Σχήμα 37. Υδροφωσφινυλίωση μη ενεργοποιημένων αλκενίων με τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας.	87
Σχήμα 38. Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών οξέων μέσω αντίδρασης Pudovik.....	87
Σχήμα 39. Γενικό σχήμα της αντίδρασης Michael.....	88
Σχήμα 40. Γενικό σχήμα της αντίδρασης P-Michael.	89
Σχήμα 41. Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών οξέων μέσω της αντίδρασης P-Michael.....	90
Σχήμα 42. Υδροφωσφινυλίωση ακόρεστων ενώσεων καταλυόμενη από Pd. 91	
Σχήμα 43. Υδροφωσφινυλίωση ακόρεστων ενώσεων καταλυόμενη από Ni. 91	
Σχήμα 44. Γενικό σχήμα της αντίδρασης Arbuzov.	92

Σχήμα 45. Γενικό σχήμα της αντίδρασης Michaelis-Becker.	93
Σχήμα 46. Εισαγωγή διαλκυλο-φωσφονικής ομάδας μέσω ανταλλαγής μετάλλου-αλογόνου ή αντιδραστήριου Grignard.	94
Σχήμα 47. Γενικό σχήμα της αντίδρασης σύνθεσης α-υδροξυφωσφονικών εστέρων από καρβονυλικές ενώσεις.	94
Σχήμα 48. Εναντιοεκλεκτική σύνθεση α-υδροξυφωσφονικών εστέρων.	95
Σχήμα 49. Ο καταλύτης CAT 2.	95
Σχήμα 50. Εισαγωγή της ομάδας του φωσφονικού εστέρα μέσω αντίδρασης αλλυλικής υποκατάστασης σε υποστρώματα με αποχωρούσα ομάδα σε β'-θέση.	96
Σχήμα 51. Γενικό σχήμα της καταλυτικής 1,4-προσθήκης διαλκυλο-φωσφονικών εστέρων.	96
Σχήμα 52. Καταλύτες για την 1,4-προσθήκη σε α,β-ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις.	96
Σχήμα 53. Καταλυόμενη από Pd αντίδραση μεταξύ βενζυλαλογονιδίων και διαιθυλο-φωσφονικού εστέρα.	97
Σχήμα 54. Καταλυόμενη από Pd αντίδραση υποκατάστασης σε αρυλο- και βινυλοβρωμίδια.	98
Σχήμα 55. Φωσφονυλίωση αρυλο- και βινυλο-αλογονιδίων καταλυόμενη από Cu(I).	98
Σχήμα 56. Φωσφονυλίωση αλογονιδίων από τριαλκυλοφωσφίνη καταλυόμενη από NiBr ₂	99
Σχήμα 57. Υδροφωσφονυλίωση 1,3-διενίων καταλυόμενη από Pd.	99
Σχήμα 58. Γενικό σχήμα σύνθεσης αλκυνο-φωσφονικών εστέρων από διβρωμο-αλκένια καταλυόμενη από Pd.	100
Σχήμα 59. Καταλυόμενη από Cu αντίδραση μεταξύ αλκινίων και διαλκυλο-φωσφονικών εστέρων υπό αερόβιες συνθήκες.	100
Σχήμα 60. Υδροφωσφορυλίωση ακραίων αλκινίων.	101
Σχήμα 61. Σύνθεση διφωσφονικών εστέρων από αλκύνια.	101
Σχήμα 62. Καταλυόμενη από Ni αντίδραση προσθήκης διμεθυλο-φωσφονικού εστέρα σε παράγωγα αλκινίων.	102
Σχήμα 63. Γενικοί τύποι των φωσφονικών οξέων και εστέρων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.	103

Σχήμα 64. Αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικά οξέα και εστέρες που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.....	104
Σχήμα 65. Πορεία σύνθεσης των ακετυλιωμένων παραγώγων MBH 139-144	106
Σχήμα 66. Ο μηχανισμός της αντίδρασης Morita-Baylis-Hillman.	107
Σχήμα 67. Σύνθεση των φωσφινικών οξέων 145-149	107
Σχήμα 68. Μηχανισμός σύνθεσης των φωσφινικών οξέων 145-149	108
Σχήμα 69. Οξειδωση των φωσφινικών οξέων 145-149 προς τα αντίστοιχα φωσφονικά οξέα 150-154	111
Σχήμα 70. Πιθανός μηχανισμός οξειδωσης του φωσφινικών οξέων 145-149 με DMSO και I ₂	112
Σχήμα 71. Όξινη υδρόλυση των φωσφονικών οξέων 150-152	115
Σχήμα 72. Αλκαλική υδρόλυση των φωσφονικών οξέων 153 και 154	116
Σχήμα 73. Καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης 157	116
Σχήμα 74. Σύνθεση των φωσφονικών εστέρων 161-163	124
Σχήμα 75. Μεταφορά αλκυλίου στον μεθυλο-διμεθυλοφωσφονικό εστέρα. .	124
Σχήμα 76. Αποπροστασία των ενδιάμεσων εστέρων 161-163 προς τα φωσφονικά οξέα 165-167 και 168-169	125
Σχήμα 77. Μηχανισμός διάσπασης φωσφονικών εστέρων με χρήση TMSBr.	126
Σχήμα 78. Πειραματική πορεία σύνθεσης των τελικών φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών οξέων και εστέρων.....	130
Σχήμα 79. Γενικό σχήμα και καταλυτικός κύκλος της Pd-καταλυόμενης σύζευξης Stille	132
Σχήμα 80. Υδροφωσφινυλίωση του αλκενίου 184 με τη χρήση ριζικών εκκινητών.....	133
Σχήμα 81. Πειραματική πορεία σύνθεσης των τελικών φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών οξέων και εστέρων.....	142
Σχήμα 82. Πειραματική πορεία σύνθεσης των (Z)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων.....	158
Σχήμα 83. Επάνω: Αντίδραση Michael μεταξύ α,β-ακόρεστου νιτριλίου και κυστεΐνης, Κάτω: Αντίδραση μεταξύ νιτριλίου και κυστεΐνης	162
Σχήμα 84. Πειραματική πορεία σύνθεσης των φωσφονοπροπυλο-νιτριλίων	163

Σχήμα 85. Αλληλεπίδραση της σουλφυδρυλομάδας της κυστεΐνης με αλκενυλο- και αλκυνυλο φωσφονικά οξέα.....	167
Σχήμα 86. Πορεία σύνθεσης των αλκενυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων	167
Σχήμα 87. Πορεία σύνθεσης των αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων	168

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Η δομή της ουρεάσης του βακτηρίου <i>Sporosarcina pasteurii</i> (Α), του βακτηρίου <i>Helicobacter pylori</i> (Β) και του φυτού <i>Canavalia ensiformis</i> (Γ). Οι α, β και γ υπομονάδες αναπαρίστανται ως μπλε, κίτρινες και πράσινες κορδέλες, ενώ οι θέσεις των ιόντων Ni^{2+} στις ενεργές περιοχές αναπαρίστανται ως κόκκινες σφαίρες	32
Εικόνα 2. Αναπαράσταση της ανοιχτής (Α) και κλειστής διαμόρφωσης (Β) του ευέλικτου πτερυγίου της SPU.	34
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του κλασικού μηχανισμού ενεργοποίησης της ουρεάσης	35
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του νέου προτεινόμενου μηχανισμού ενεργοποίησης της ουρεάσης	36
Εικόνα 5. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της ουρεάσης του βακτηρίου <i>Sporosarcina pasteurii</i>	37
Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του καταλυτικού μηχανισμού ενζυμικής υδρόλυσης της ουρίας από την SPU	41
Εικόνα 7. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με BME.	51
Εικόνα 8. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με κιτρικό ανιόν.....	53
Εικόνα 9. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με ΑΗΑ.	56
Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της ομοιοπολικής πρόσδεσης ενός αναστολέα σε ένα μόριο-στόχο.....	71
Εικόνα 11. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με ρ-βενζοκινόνη.....	74
Εικόνα 12. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με κατεχόλη.....	76
Εικόνα 13. Ομοιοπολική πρόσδεση του αναστολέα 95 στο ενεργό κέντρο της SPU.	77
Εικόνα 14. Δομικό μοντέλο του προϊόντος προσθήκης της ένωσης 101 με την SPU.	79

Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης της δισουλφιράμης με το ενεργό κέντρο της ουρεάσης	80
Εικόνα 16. Φάσμα ^1H NMR του φωσφινικού οξέος 147 σε CDCl_3	109
Εικόνα 17. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 147 σε CDCl_3	110
Εικόνα 18. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης 147 σε CDCl_3	111
Εικόνα 19. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 153 σε CD_3COOD	113
Εικόνα 20. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 153 σε CD_3COOD	114
Εικόνα 21. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης 153 σε CD_3COOD	115
Εικόνα 22. Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της ένωσης 157 με το ενεργό κέντρο της SPU.....	122
Εικόνα 23. Η εξειδίκευση της ένωσης 157 στην αναστολή της SPU σε σχέση με ανάλογές της ενώσεις.....	123
Εικόνα 24. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 172 σε CDCl_3	131
Εικόνα 25. Συγκριτικά φάσματα ^{31}P NMR από το μίγμα της αντίδρασης της ένωσης 188 (από κάτω προς τα πάνω: 24 h, 48 h και 72 h).....	138
Εικόνα 26. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 188 σε CD_3COOD	139
Εικόνα 27. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 188 σε CD_3COOD	140
Εικόνα 28. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης 188 σε CD_3COOD	141
Εικόνα 29. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 197 σε CDCl_3	143
Εικόνα 30. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 201 σε διαλύτη CD_3COOD	144
Εικόνα 31. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 201 σε διαλύτη CD_3COOD	145
Εικόνα 32. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης 201 σε διαλύτη CD_3COOD	146
Εικόνα 33. Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της ένωσης 191 με το ενεργό κέντρο της SPU.....	150
Εικόνα 34. Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της ένωσης 186 με το ενεργό κέντρο της SPU.....	151
Εικόνα 35. Μη ομοιοπολική δέσμευση της ένωσης 194 στο ενεργό κέντρο της SPU.	153
Εικόνα 36. Ομοιοπολική δέσμευση της ένωσης 194 στο ενεργό κέντρο της SPU.	154

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των <i>H</i> -φωσφινομεθυλο-κινναμωμικών μεθυλίων.....	117
Πίνακας 2. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών μεθυλίων.....	119
Πίνακας 3. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών οξέων.....	120
Πίνακας 4. Τιμή σταθεράς αναστολής K_i της ένωσης 157 ως προς την ουρεάση του βακτηρίου <i>P. mirabilis</i>	121
Πίνακας 5. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών μεθυλίων.....	127
Πίνακας 6. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών οξέων.....	128
Πίνακας 7. Αποτελέσματα υδροφωσφινυλίωσης του αλκενίου 184 με ή χωρίς τη χρήση ριζικών εκκινητών παρουσία θέρμανσης.....	134
Πίνακας 8. Τιμές IC_{50} και σταθερών αναστολής K_i των φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών μεθυλίων και ελεύθερων οξέων.....	147
Πίνακας 9. Σταθερά k_{off} και χρόνος παραμονής για τους βραδείας δέσμευσης αναστολείς της SPU.....	152
Πίνακας 10. Τιμές IC_{50} και LC_{50} των φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών μεθυλίων και ελεύθερων οξέων.....	154
Πίνακας 11. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των (<i>Z</i>)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και ελεύθερων οξέων.....	160
Πίνακας 12. Σύγκριση της <i>E/Z</i> αναλογίας σε αντιδράσεις βρωμίωσης των αλκοολών 231-235.....	164
Πίνακας 13. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των (<i>Z</i>)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών νιτριλίων.....	165
Πίνακας 14. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων.....	169

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε από το Μάρτιο του 2016 έως τον Απρίλιο του 2019 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας κ. Σταματίας Βασιλείου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

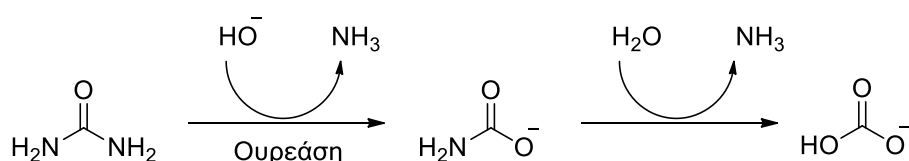
ΟΥΡΕΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ

1.1 Εισαγωγή

Η ουρεάση (αμιδοϋδρολάση της ουρίας, EC 3.5.1.5) είναι ένα νικελίου-εξαρτώμενο, μη οξειδοαναγωγικό ένζυμο που συναντάται σε βακτήρια, μύκητες, φυτά, φύκη και ασπόνδυλα. Δύο σημαντικά στοιχεία χαρακτηρίζουν την ιστορία της: το 1926 η ουρεάση από το φυτό *Canavalia ensiformis* ήταν το πρώτο ένζυμο που κρυσταλλώθηκε παρέχοντας έτσι σαφείς ενδείξεις ότι τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες,¹ ενώ το 1975 επιβεβαιώθηκε η συμμετοχή του νικελίου στην καταλυτική δράση της ουρεάσης του ίδιου φυτού, δίνοντας το πρώτο παράδειγμα της βιολογικής αναγκαιότητας αυτού του μετάλλου ως συμπαραγόνα ενζύμων.²

Η σταθερότητα της ουρίας σε υδατικά διαλύματα είναι εξαιρετικά υψηλή. Η μη ενζυμική διάσπαση της ουρίας, η οποία πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης απόσπασης προς σχηματισμό αμμωνίας και κυανικού οξέος, έχει χρόνο ημιζωής περίπου 40 χρόνια,³ ενώ η μη ενζυμική της υδρόλυση, η οποία δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ πειραματικά,⁴ έχει έναν εκτιμώμενο χρόνο ημιζωής περίπου 520 χρόνια.⁵

Ο καταλυτικός ρόλος της ουρεάσης βασίζεται στην υδρόλυση της ουρίας προς αμμωνία και καρβαμικά ανιόντα με ταχύτητα 10^{15} φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη μη καταλυόμενη αντίδραση, καθιστώντας έτσι την ουρεάση ως την πλέον αποτελεσματική υδρολάση που υπάρχει στη φύση. Τα καρβαμικά ανιόντα στη συνέχεια μετατρέπονται αυθόρμητα σε υδατικό περιβάλλον για να παραγάγουν άλλο ένα μόριο αμμωνίας και όξινα ανθρακικά ανιόντα (Σχήμα 1).⁶



Σχήμα 1. Ενζυμική υδρόλυση της ουρίας.

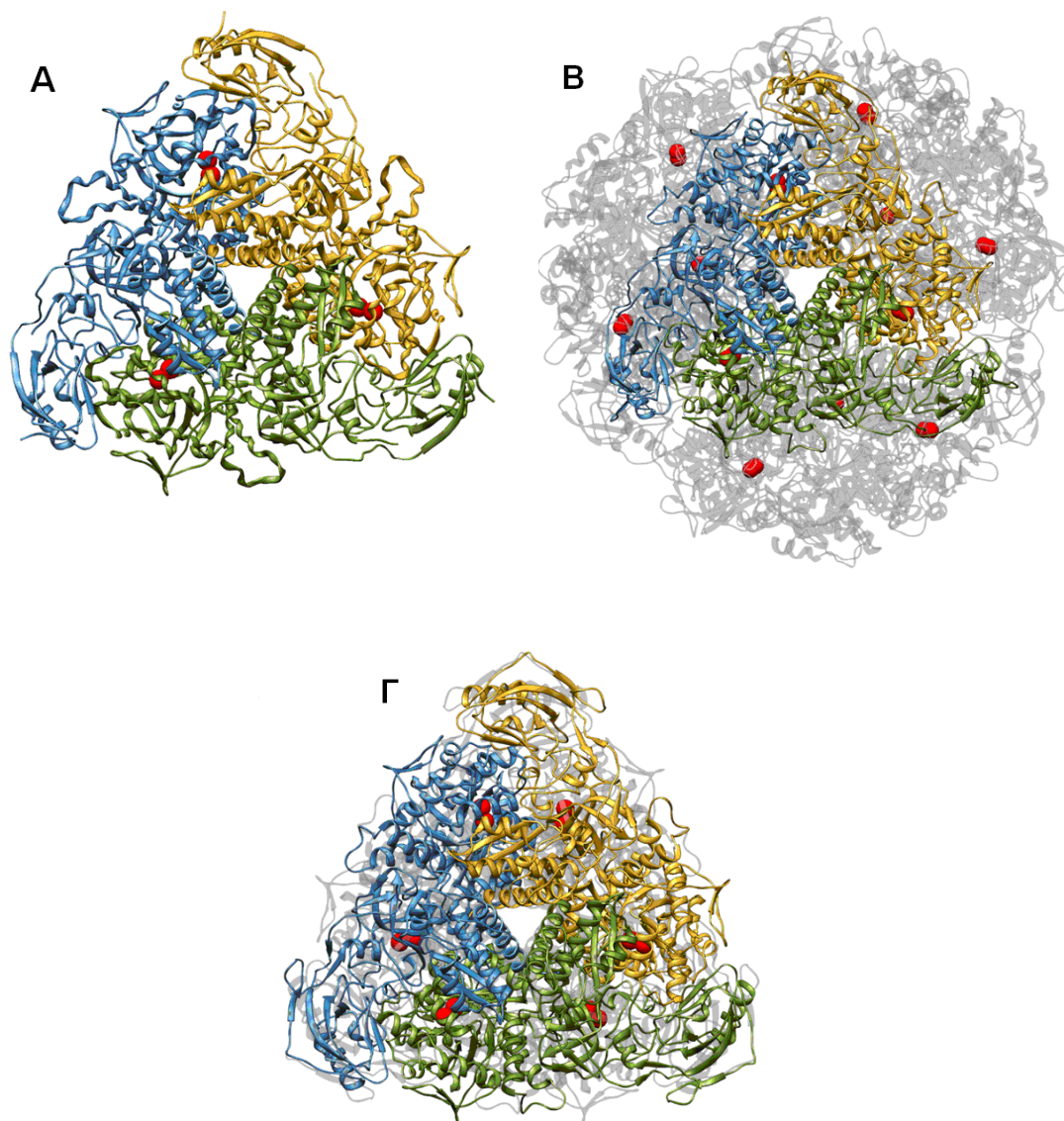
Η ουρεάση είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση.⁷⁻⁹ Η γενική βιολογική της λειτουργία αφορά στην παροχή στους οργανισμούς της απαραίτητης για την ανάπτυξή τους πηγής αζώτου.¹⁰ Στα φυτά, η ουρεάση συμμετέχει στις μεταβολικές πορείες των αζωτούχων ενώσεων, όπως είναι η διάσπαση της ουρίας, ο καταβολισμός της αργινίνης και η διάσπαση των πουρινών και των ουρεϊδινών.^{9,11-13} Επιπλέον, η ουρεάση έχει και έναν αμυντικό ρόλο απέναντι στα διάφορα παθογόνα των φυτών, με έναν μηχανισμό που δεν σχετίζεται με αυτόν της καταλυτικής της δράσης.¹⁴ Μεταξύ των ουρεολυτικών προκαρυωτικών οργανισμών, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ανθρώπινα παθογόνα βακτήρια. Οι πιο κοινές παθήσεις αφορούν στο ουροποιητικό και γαστρεντερικό σύστημα^{15,16} και εκδηλώνονται με πλήθος κλινικών καταστάσεων, όπως η πυελονεφρίτιδα, το ηπατικό κώμα, το πεπτικό έλκος, οι ουρολοιμώξεις και η ουρολιθίαση.^{8,17} Όσον αφορά στη Γεωργία, τα ουρεολυτικά βακτήρια είναι διαδεδομένα σε χώματα που λιπαίνονται με ουρία ως πηγή αζώτου. Η δραστηριότητά τους προκαλεί σημαντικά περιβαλλοντικά και οικονομικά προβλήματα, όπως απώλεια αζώτου από το έδαφος, απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων αμμωνίας στην ατμόσφαιρα, αμμωνιακή τοξίκωση των φυτών και καταστροφή των καλλιεργειών.¹⁸

Για όλους τους παραπάνω λόγους κρίνεται απαραίτητος ένας αυστηρός έλεγχος της δραστηριότητας της ουρεάσης με σκοπό την αντιμετώπιση των επιβλαβών συνεπειών της τόσο στην ανθρώπινη υγεία όσο και στη γεωργία και το περιβάλλον. Αποτελεί συνεπώς το ένζυμο αυτό έναν ελκυστικό στόχο που συγκεντρώνει το ερευνητικό ενδιαφέρον για τον σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη μελέτη νέων ενώσεων, οι οποίες θα έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δράση του.

1.2 Δομικά χαρακτηριστικά των ουρεασών

Μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί και αναλυθεί η δομή διαφόρων ουρεασών. Σε αυτές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων οι ουρεάσες βακτηρίων, όπως των *Klebsiella aerogenes* και *Helicobacter pylori* και οι ουρεάσες φυτών, όπως του *Canavalia ensiformis* (jack bean, φασολιά) και του *Cajanus cajan* (pigeon pea, μπιζέλι). Συνολικά, οι γνωστές δομές ουρεασών ανέρχονται σήμερα στις 49. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των

ουρεασών είναι παρόμοιες. Η τεταρτοταγής δομή των περισσότερων βακτηριακών ουρεασών, όπως των βακτηρίων *Klebsiella aerogenes* και *Sporosarcina pasteurii*, αποτελείται από ένα τριμερές τριμερών $(\alpha\beta\gamma)_3$, με τα α , β και γ να αποτελούν τρεις διαφορετικές υπομονάδες και την υπομονάδα α να φέρει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 1Α).^{19,20} Σε άλλες βακτηριακές ουρεάσες η τεταρτοταγής δομή αποτελείται από δύο μόνο υπομονάδες σχηματίζοντας $(\alpha\beta)_3$ τριμερή, όπου η α υπομονάδα είναι ομόλογη με αυτή που απαντάται στις ουρεάσες των βακτηρίων *K. aerogenes* και *S. pasteurii*, ενώ η υπομονάδα β είναι μία πεπτιδική αλυσίδα που έχει προκύψει από τη συγχώνευση των β και γ υπομονάδων των παραπάνω βακτηρίων. Στην περίπτωση της ουρεάσης του βακτηρίου *Helicobacter pylori*, τέσσερα $(\alpha\beta)_3$ τριμερή σχηματίζουν μία σφαιρική δομή ενός τετραμερούς τριμερών $[(\alpha\beta)_3]_4$, που περιέχει συνολικά δώδεκα ενεργά κέντρα ανά μονάδα ενεργού ενζύμου (Εικόνα 1Β).²¹ Η ουρεάση του βακτηρίου *Staphylococcus saprophyticus* αποτελείται από ένα τετραμερές τριμερών $(\alpha\beta\gamma)_4$.²² Από την άλλη τα φυτικά ένζυμα αποτελούνται από ένα διμερές ομοτριμερών $(\alpha_3)_2$ (Εικόνα 1Γ).^{6,23}



Εικόνα 1. Η δομή της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii* (A), του βακτηρίου *Helicobacter pylori* (B) και του φυτού *Canavalia ensiformis* (Γ). Οι α, β και γ υπομονάδες αναπαρίστανται ως μπλε, κίτρινες και πράσινες κορδέλες, ενώ οι θέσεις των ιόντων Ni^{2+} στις ενεργές περιοχές αναπαρίστανται ως κόκκινες σφαίρες.⁶

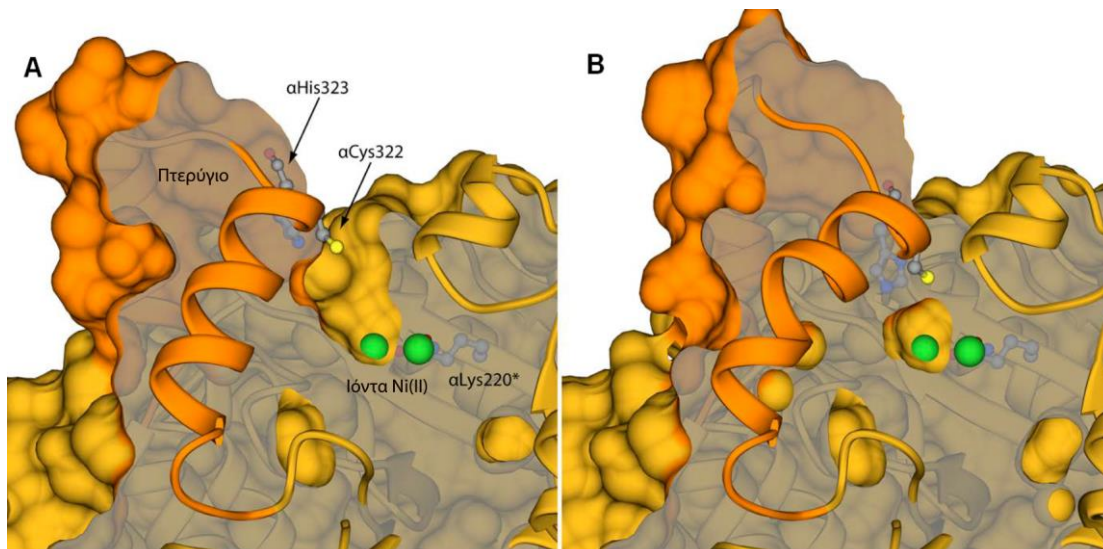
Η δομή της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii* (SPU) έχει προσδιοριστεί με την υψηλότερη μέχρι σήμερα ανάλυση (1.58 Å), με αποτέλεσμα οι δομικές της παράμετροι να έχουν υπολογιστεί με μεγάλη ακρίβεια.²³ Στην τεταρτοταγή του δομή το ένζυμο αποτελείται από ένα τριπλό συμμετρικό (αβγ)₃ μοτίβο.¹⁹ Το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται στην υπομονάδα α, δίνοντας έτσι τρία ενεργά κέντρα ανά ένζυμο. Η υπομονάδα α έχει μοριακό βάρος 61.4 kDa, η υπομονάδα β 14.0 kDa και η υπομονάδα γ

11.1 kDa.²⁰ Οι υπομονάδες α αποτελούνται από ένα (αβ)₈ β-βαρέλι και μία περιοχή με διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου, η υπομονάδα β χαρακτηρίζεται από πολυάριθμα β-πτυχωτά φύλλα, ενώ η υπομονάδα γ αποτελείται από περιοχές που έχουν τη διαμόρφωση τόσο α-έλικας όσο και β-πτυχωτού φύλλου και έχει τη μορφή ενός σάντουιτς που αποτελείται από δύο στρώματα αβ.²⁴

Η ουρεάση του βακτηρίου *Helicobacter pylori* (HPU) αποτελείται από δύο μονομερή: την 26.5 kDa α υπομονάδα και την 61.7 kDa β υπομονάδα²¹ που σχηματίζουν 12 καταλυτικά αβ ετεροδιμερή με μία μοναδική [(αβ)₃]₄ αρχιτεκτονική.²⁵ Οι N- και C-τελικές περιοχές της υπομονάδας β, που έχουν τη διαμόρφωση α-έλικας, είναι ισχυρά συνδεδεμένες με τις γειτονικές α υπομονάδες, δημιουργώντας τριμερή με τριπλή συμμετρία.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό στη δομή της ουρεάσης είναι η διαμόρφωση ενός μοτίβου α-έλικας-στροφής-α-έλικας στην α-υπομονάδα που πλαισιώνει τη σχισμή του ενεργού κέντρου και δίνει στην υπομονάδα αυτή μεγαλύτερη κινητικότητα σε σχέση με το υπόλοιπο ένζυμο.²⁶ Η ευελιξία αυτή της υπομονάδας α θεωρείται ότι παίζει ρόλο στη διαμοριακή αναγνώριση μεταξύ του αποενζύμου και της UreD, που μαζί με τις UreF, UreG και UreE σχηματίζουν το υπερσύμπλοκο που είναι απαραίτητο για την ενσωμάτωση των ιόντων Ni²⁺ στο ενεργό κέντρο και κατ' επέκταση για την ενεργοποίηση του ενζύμου.^{23,27}

Επίσης αυτό το μοτίβο βρίσκεται **σε ανοιχτή ή κλειστή διαμόρφωση** και πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του υποστρώματος και στην απομάκρυνση των προϊόντων από και προς την ενεργό περιοχή αντίστοιχα κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. **Σε αυτό συμμετέχουν τα αμινοξέα Cys^{α322} και His^{α323}** (Εικόνα 2).



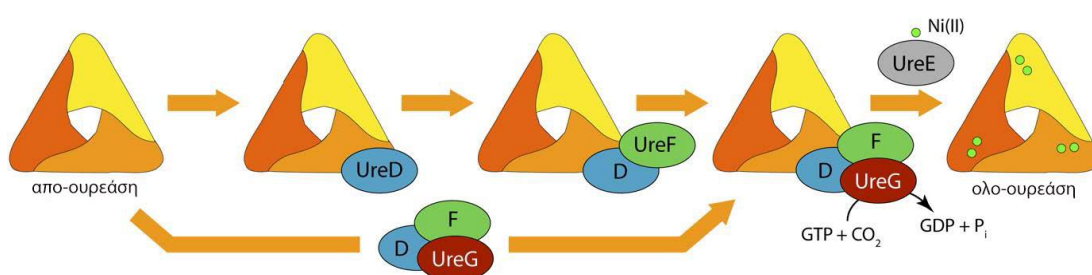
Εικόνα 2. Αναπαράσταση της ανοιχτής (A) και κλειστής διαμόρφωσης (B) του ευέλικτου πτερυγίου της SPU.²⁸

Η ουρεάση αρχικά εκφράζεται ως μία ανενεργή αποπρωτεΐνη, η οποία υφίσταται στη συνέχεια μία διαδικασία μετα-μεταφραστικής ωρίμανσης αποδίδοντας ένα πλήρως ενεργό ένζυμο.²³

Η πορεία ενεργοποίησης της ουρεάσης περιλαμβάνει δύο διακριτά βήματα: (α) καρβαμυλίωση της λυσίνης σε συνδυασμό με υδρόλυση του GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη) και (β) μεταφορά των ιόντων Ni^{2+} στο ενεργό κέντρο της ουρεάσης.⁶ Η διαδικασία ωρίμανσης της ουρεάσης πραγματοποιείται συνήθως με τη συμμετοχή τεσσάρων πρωτεϊνών-συνοδών, των UreD (ή UreH στην περίπτωση του *Helicobacter pylori*), UreF, UreG και UreE.^{23,29}

Το κλασικό μοντέλο που περιγράφει την ωρίμανση της ουρεάσης περιλαμβάνει τις UreD, UreF και UreG να δρουν συνεργικά ως ένας μοριακός συνοδός σε ένα UreD:UreF:UreG υπερσύμπλοκο (UreDFG), που άγει την υδρόλυση της GTP και την καρβαμυλίωση της λυσίνης, ενώ η UreE δρα ως η πρωτεΐνη-συνοδός που μεταφέρει τα ιόντα Ni^{2+} στο σύμπλοκο που σχηματίζεται από την απο-ουρεάση και το UreDFG.^{23,29} Παρόλο που ο λειτουργικός ρόλος κάθε μίας από τις πρωτεΐνες-συνοδούς δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και δεν έχει επιτευχθεί απόλυτη συναίνεση όσον αφορά στην αλληλουχία των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου ουρεάση-UreDFG, έχει προταθεί το ακόλουθο

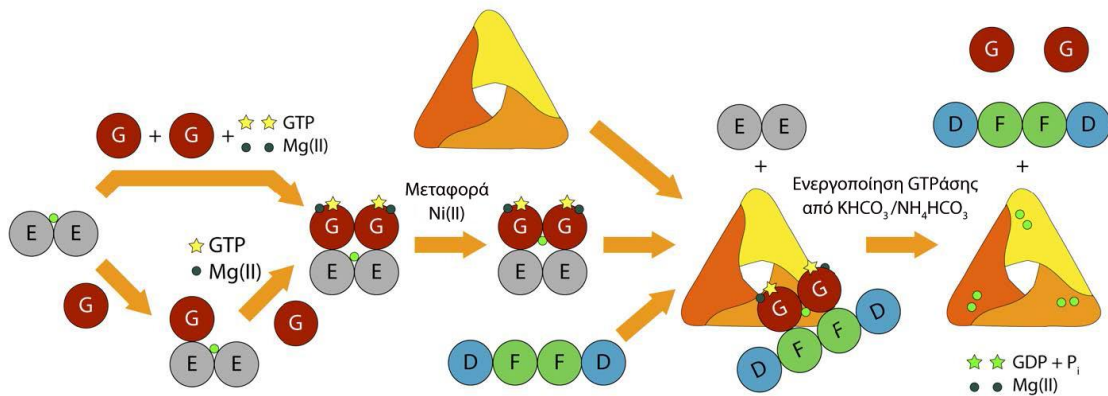
μοντέλο. Αρχικά, η UreD φέρεται να είναι η πρώτη από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά με το αποένζυμο.^{30,31} Θεωρείται πως δρα ως ο σύνδεσμος που επιτρέπει την αλληλεπίδραση των άλλων μοριακών συνοδών με το ένζυμο,^{32,33} αν και ορισμένες έρευνες προτείνουν ότι είναι πολύ πιθανό να διευκολύνει επίσης την εισαγωγή των ιόντων Ni²⁺ στο ενεργό κέντρο.³⁴ Όταν σχηματιστεί το σύμπλοκο ουρεάσης-UreD, προσδένεται σε αυτό και η UreF μέσω της UreD και προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στο ένζυμο.³⁰ Η UreF αποτελεί το σημείο πρόσδεσης για την UreG και έχει αποδειχθεί πως συνεισφέρει στην επιτάχυνση της διαδικασίας ωρίμανσης της ουρεάσης τροποποιώντας τη δραστικότητα της UreG ως GTPάσης³⁵ και παρέχοντας πρόσβαση προς το ενεργό κέντρο στα ιόντα Ni²⁺ και στο CO₂ που είναι απαραίτητο για την καρβαμυλίωση της λυσίνης.^{36,37} Η υδρόλυση του GTP αποτελεί το ενεργειακό νόμισμα για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Η UreG είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της υδρόλυσης του GTP με την καρβαμυλίωση της λυσίνης, η οποία καταλύεται παρουσία CO₂.³⁸ Το μακρομοριακό σύμπλοκο ουρεάσης-UreDFG αλληλεπιδρά τελικά με την UreE, η οποία δρα ως ο μοριακός συνοδός που θα μεταφέρει τα ιόντα Ni²⁺ στην ουρεάση έτσι ώστε να ολοκληρωθεί η ωρίμανση του ενζύμου.^{23,29} Η UreE προσδένει τα ιόντα Ni²⁺ μέσω αμινοξέων ιστιδίνης, ενώ συμπληρώνει τη σφαίρα συναρμογής με άλλα αμινοξέα ιστιδίνης που εντοπίζονται στο C-τελικό άκρο της πεπτιδικής της αλυσίδας (Εικόνα 3).³⁹⁻⁴³



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του κλασικού μηχανισμού ενεργοποίησης της ουρεάσης.⁴⁴

Το σύνολο των δομικών πληροφοριών που έχουν προκύψει από πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, φασματοσκοπίας UV-Vis, σκέδασης φωτός και δοκιμών ενεργότητας της GTPάσης στην UreG που απομονώνεται από το βακτήριο *Helicobacter pylori* οδήγησαν πρόσφατα στην πρόταση ενός νέου

μηχανισμού για τη βιοσύνθεση του ενεργού κέντρου της ουρεάσης (Εικόνα 4).⁴⁴ Με βάση τον προτεινόμενο αυτόν μηχανισμό, ένα συνδεδεμένο με ιόντα Ni^{2+} διμερές UreE προσδένει δύο μονομερή UreG, διευκολύνοντας την πρόσληψη GTP από την UreG παρουσία ιόντων Mg^{2+} . Η πρόσδεση της UreG στην UreE μπορεί θεωρητικά να πραγματοποιηθεί είτε σε ένα είτε σε περισσότερα στάδια. Εντός του συμπλόκου $(UreEG)_2$, μεταφέρονται στη συνέχεια τα ιόντα Ni^{2+} από το διμερές $(UreE)_2$ στο διμερές $(UreG)_2$. Ακολούθως, το προσχηματισμένο σύμπλοκο $(UreDF)_2$ ανταγωνίζεται με το διμερές $(UreE)_2$ για το σύμπλοκο $(UreG)_2-Ni^{2+}$ έτσι, ώστε να σχηματιστεί το υπερσύμπλοκο απο-ουρεάση- $(UreDFG)_2-Ni^{2+}$. Στο τελευταίο στάδιο του μηχανισμού, η υδρόλυση του GTP από την UreG καταλυόμενη από $KHCO_3/NH_4HCO_3$ οδηγεί στην εισαγωγή των ιόντων Ni^{2+} στην απο-ουρεάση.

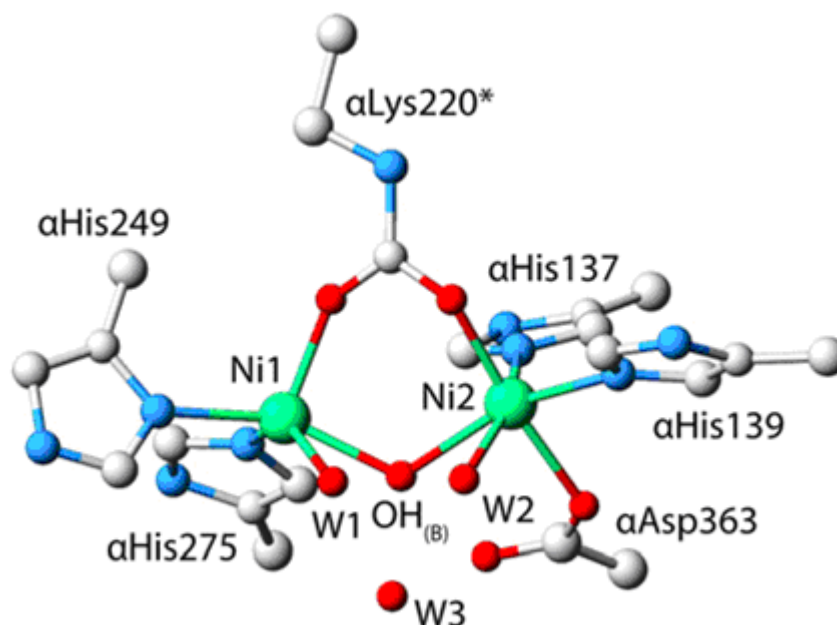


Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του νέου προτεινόμενου μηχανισμού ενεργοποίησης της ουρεάσης.⁴⁴

Από την άλλη πλευρά, έχουν επισημανθεί και ορισμένες εξαιρέσεις όσον αφορά στο σύστημα ωρίμανσης της ουρεάσης. Τα φυτά φαίνεται να στερούνται ομόλογα γονίδια για την UreE.⁹ Οι φυτικές UreG όμως, κατέχουν ένα εκτεταμένο άκρο, που προορίζεται για την πρόσδεση των ιόντων Ni^{2+} , πλούσιο σε άζωτο λόγω της ύπαρξης ιστιδίνης και ασπαρτικών ανιόντων, ενώ έχει προταθεί ότι αυτό το χαρακτηριστικό αξιοποιείται κατά τη μεταφορά των ιόντων Ni^{2+} .⁹

1.3 Το ενεργό κέντρο της ουρεάσης

Όλες οι έρευνες που έχουν πραγμα τοποποιηθεί για τη μελέτη του περιβάλλοντος συναρμογής των ιόντων Ni^{2+} στο ενεργό κέντρο ουρεασών προερχόμενων από διάφορες πηγές, συγκλίνουν στο ίδιο γενικά μοτίβο (Εικόνα 5). Κάθε υπομονάδα α φέρει ένα ενεργό κέντρο που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός διπυρηνικού κέντρου νικελίου.²⁰ Κάθε ενεργό κέντρο απέχει από το άλλο κατά 51Å. Τα μεταλλικά ιόντα είναι τοποθετημένα στα μισά περίπου της 15Å σχισμής της ενεργού περιοχής. Τα δύο ιόντα Ni^{2+} απέχουν κατά 3.67Å και είναι γεφυρωμένα μέσω των ατόμων οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας της καρβαμυλιωμένης λυσίνης Lys^{a220} , καθώς και μέσω ενός μορίου νερού (W_B). Το $Ni(1)$ συναρμόζεται επίσης με την His^{a249} , την His^{a275} και άλλο ένα μόριο νερού ($W1$), ενώ το $Ni(2)$ ενώνεται με την His^{a137} , την His^{a139} , το Asp^{a363} και ένα μόριο νερού ($W2$). Κοντά στο μόριο νερού (W_B) βρίσκεται άλλο ένα μόριο νερού ($W3$). Έτσι για το σύμπλοκο του $Ni(1)$ προκύπτει μία γεωμετρία παραμορφωμένης τετραγωνικής πυραμίδας, ενώ για το $Ni(2)$ παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία. Τα τέσσερα μόρια νερού σχηματίζουν μία κοιλότητα με τετραεδρική γεωμετρία σχεδιασμένη να σταθεροποιεί τη μεταβατική κατάσταση ή/και το ενδιάμεσο.



Εικόνα 5. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii*.⁶

Η τιμή pK_a για το σύμπλοκο $[Ni(H_2O)]^{2+}$ ($pK_a=10.6$)⁴⁵ υποδηλώνει ότι τα δύο μόρια νερού $W(1)$ και $W(2)$ είναι ουδέτερα μόρια.²⁰ Επιπλέον, το μόριο νερού (W_B) που γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni^{2+} αναμένεται στο βέλτιστο pH δράσης της ουρεάσης ($pH=8.0$), λόγω της τιμής pK_a του,⁴⁵ να βρίσκεται υπό τη μορφή ανιόντος υδροξειδίου.

Ορισμένες διαφορές στη δομή των αμινοξέων του ενεργού κέντρου παρατηρούνται στην περίπτωση της ουρεάσης του *Helicobacter pylori*. Πιο συγκεκριμένα, η καρβαμυλιωμένη λυσίνη φαίνεται να γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni^{2+} χρησιμοποιώντας μόνο ένα από τα δύο ακραία άτομα οξυγόνου. Επιπλέον, μερικές αποστάσεις μεταξύ των ιόντων Ni^{2+} και των αμινοξέων που τα συναρμόζουν είναι μεγαλύτερες (κυμαίνονται μεταξύ 2.6 και 2.7Å) σε σχέση με τις αντίστοιχες αποστάσεις που παρατηρούνται στις ουρεάσες των *Klebsiella aerogenes* και *Sporosarcina pasteurii* (2.0-2.1Å). Η απόσταση των δύο ιόντων Ni^{2+} είναι πολύ μικρότερη (2.1Å), ενώ απουσιάζει το ανιόν υδροξειδίου που γεφυρώνει τα δύο ιόντα.⁶

Η παρουσία του νικελίου στην ουρεάση ως συμπαραγοντα του ενζύμου έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον από την ανακάλυψή του.² Η ανάλυση του μηχανισμού κατάλυσης του ενζύμου έχει χρησιμοποιηθεί για να εξηγήσει την απαίτηση της ουρεάσης σε ιόντα Ni^{2+} σε σχέση με τα περισσότερο κοινά, λιγότερο τοξικά και με συμπληρωμένη τη στοιβάδα σθένους ιόντα Zn^{2+} , που απαντούν συνήθως σε υδρολυτικά ένζυμα. Τα ιόντα Zn^{2+} εμφανίζουν μεγαλύτερη πυκνότητα θετικού φορτίου έτσι ώστε να μπορούν να δράσουν ως οξέα κατά Lewis πολώνοντας τα υποστρώματα και προετοιμάζοντάς τα για την πυρηνόφιλη προσβολή από το ανιόν υδροξειδίου. Επιπλέον, είναι περισσότερο ανθεκτικά απέναντι σε οξειδοαναγωγικές μεταβολές. Παρ' όλα αυτά, αυτές οι ιδιότητες μπορούν να ισχύσουν και στα ιόντα Ni^{2+} τα οποία, επιπλέον, φέρουν μία μερικώς κατειλημμένη d^8 ηλεκτρονική διαμόρφωση που επάγει στερεοηλεκτρονικές παρεμποδίσεις που δεν εμφανίζονται στην περίπτωση των ιόντων Zn^{2+} . Αυτή η ιδιότητα θα μπορούσε να αξιοποιηθεί από τα ιόντα Ni^{2+} ώστε να οδηγηθούν τα υποστρώματα, η ουρία και το νερό, στη βέλτιστη χωρική τοπολογία που απαιτείται για την κατάλυση. Ακόμα, το Ni^{2+} εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια προς αζωτούχους προσδέτες σε σχέση με τον Zn^{2+} , συνεπώς σταθεροποιεί ισχυρότερα την πρόσδεση της αμινομάδας της

ουρίας.⁴⁶ Τέλος, τα ιόντα Ni^{2+} διαθέτουν πολλαπλές περιοχές πρόσδεσης λόγω της προτίμησης τους για οκταεδρική σφαίρα συναρμογής, (σε αντίθεση με τα ιόντα Zn^{2+} που προτιμούν κυρίως την τετραεδρική⁴⁷) και επιτρέπουν έτσι ταυτόχρονα τόσο την πρόσδεση της ουρίας όσο και τη σταθεροποίηση του μεταλλικού ιόντος μέσω πολλαπλών θέσεων πρόσδεσης με τα αμινοξέα του ενζύμου.⁶

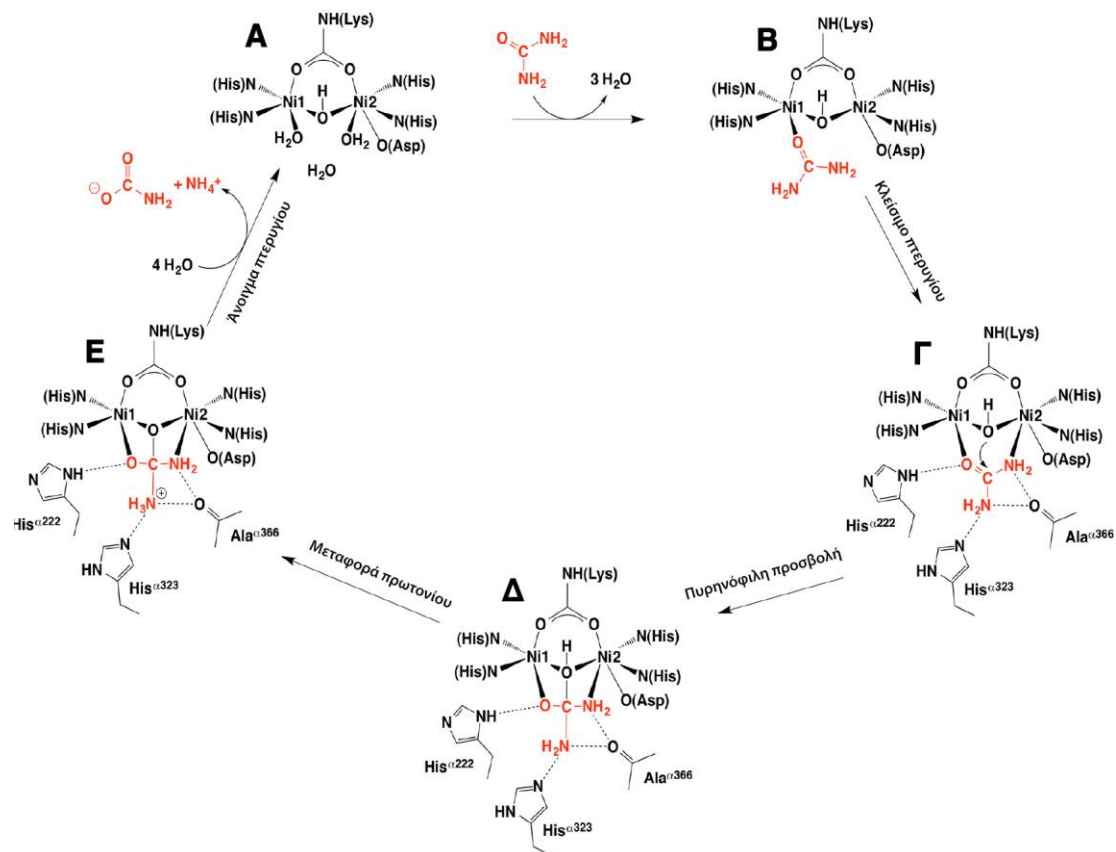
Αρκετά πρόσφατα, αναφέρθηκε η περίπτωση μιας διαφορετικής ουρεάσης στο βακτήριο *Helicobacter mustelae*, η οποία χαρακτηρίζεται από την απουσία ιόντων Ni^{2+} , την απενεργοποίησή της παρουσία οξυγόνου και την επαγόμενη από ιόντα Fe^{2+} έκφρασή της, παρατηρήσεις που οδήγησαν στο συμπέρασμα της ύπαρξης ιόντων Fe^{2+} στο ενεργό της κέντρο.⁴⁸ Πράγματι, η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε αργότερα και η προταθείσα κρυσταλλική δομή παρουσίαζε μικρές έως και καθόλου διαφορές συγκρινόμενη με ουρεάσες που φέρουν Ni^{2+} , ενώ η καταλυτική της δραστηριότητα είναι πολύ μικρότερη.⁴⁹

1.4 Ο καταλυτικός μηχανισμός υδρόλυσης της ουρίας από την SPU

Ο καταλυτικός μηχανισμός υδρόλυσης της ουρίας που προτείνεται, βασίζεται στη δομή του ενεργού κέντρου.³ Καθώς η ουρία εισέρχεται στο ενεργό κέντρο, με την κοιλότητα σε ανοιχτή διαμόρφωση (Εικόνα 6A), η ενυδατωμένη ενεργός περιοχή του ενζύμου μετατρέπεται προς ένα αρχικό ενδιάμεσο, συνδεδεμένο με το υπόστρωμα, όπου η ουρία αντικαθιστά τα τρία μόρια νερού που συνδέονται με τα ιόντα Ni^{2+} (Εικόνα 6B). Πιο συγκεκριμένα, η ουρία προσδένεται αρχικά μέσω του καρβονυλικού της οξυγόνου με το περισσότερο ηλεκτρονιόφιλο και ακόρεστο από άποψη συναρμογής $Ni(1)$, γεγονός που πρέπει να συνοδεύεται από την απομάκρυνση των μορίων νερού από την ενεργό περιοχή λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Το συνδεδεμένο με το $Ni(1)$ καρβονυλικό άτομο οξυγόνου της ουρίας σταθεροποιείται σε αυτή τη θέση μέσω σχηματισμού ενός δεσμού υδρογόνου με το πρωτόνιο του αζώτου του αρωματικού δακτυλίου της His^{222} . Στη συνέχεια, η σύμπλεξη της ουρίας μέσω της αμινομάδας της με το $Ni(2)$ διευκολύνει το κλείσιμο της κοιλότητας του ενεργού κέντρου. Αυτή η αλληλεπίδραση σταθεροποιείται με ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου (το καρβονυλικό οξυγόνο της ουρίας ως δότης και η αμινομάδα ως δέκτης

δεσμών υδρογόνου) που τοποθετεί και κατευθύνει το υπόστρωμα με ακριβή προσανατολισμό, ενώ διευκολύνει επίσης την εξέλιξη της υδρόλυσης (Εικόνα 6Γ). Η ουρία είναι ένας ασθενής προσδέτης λόγω του ασθενούς βασικού κατά Lewis χαρακτήρα των ομάδων $-NH_2$. Παρ' όλα αυτά, η δημιουργία ισχυρών δεσμών υδρογόνου με το γειτονικό καρβονυλικό άτομο οξυγόνου ενισχύει τη βασικότητα των αμινομάδων και διευκολύνει την αλληλεπίδραση του αμιδικού ατόμου του αζώτου με το $Ni(2)$. Η παρουσία του ανιόντος υδροξειδίου, που γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni^{2+} , σε κατεύθυνση σχεδόν κάθετη στο επίπεδο του μορίου υποδηλώνει το ρόλο του ως το προσβάλλον πυρηνόφιλο στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα της ουρίας, σχηματίζοντας μία τετραεδρικής γεωμετρίας μεταβατική κατάσταση-ενδιάμεσο (Εικόνα 6Δ). Ο τρόπος σύνδεσης της ουρίας ως γέφυρα έχει ως αποτέλεσμα να καθίσταται το άτομο του καρβονυλικού της άνθρακα ηλεκτρονικά φτωχό και συνεπώς επιρρεπές σε πυρηνόφιλη προσβολή από το ανιόν υδροξειδίου. Σε αυτό το πλαίσιο, μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο μόνο μόρια που είναι ικανά να αντιδράσουν με το ανιόν υδροξειδίου. Το κλείσιμο της κοιλότητας θεωρείται επίσης υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση της καταλυτικής μεταβατικής κατάστασης μέσω σχηματισμού πολλαπλών δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα της ενεργού περιοχής. Η πυρηνόφιλη προσβολή στο συνδεδεμένο με το Ni^{2+} μόριο της ουρίας ουσιαστικά τροποποιεί την ηλεκτρονική δομή του υποστρώματος και τελικά αυξάνει την τιμή pK_a του ατόμου αζώτου της ουρίας που δε συμμετέχει σε δεσμό με ιόν νικελίου.⁵¹ Επιπλέον, μετά το σχηματισμό του τετραεδρικού ενδιάμεσου, το ανιόν υδροξειδίου, τμήμα πλέον του διαμινο(υδροξυ)μεθοξειδίου, έχει πολύ χαμηλή τιμή pK_a και μπορεί συνεπώς να μεταφέρει το πρωτόνιό του στην αμινομάδα της ουρίας που δε συνδέεται με το ιόν νικελίου, σχηματίζοντας ένα δεσμό $C-NH_3^+$ (Εικόνα 6Δ).²⁰ Ταυτόχρονα, καθώς κλείνει το άνοιγμα του ενεργού κέντρου, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της His^{a323} μετακινείται πλησιέστερα στην ενεργό περιοχή και σταθεροποιεί τη δημιουργία του δεσμού $C-NH_3^+$ (Εικόνα 6E).²⁰ Ακόμα, τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι το **αμινοξύ Cys^{a322}** που βρίσκεται στο άνοιγμα που πλαισιώνει τη σχισμή του ενεργού κέντρου εμπλέκεται με κάποιο τρόπο στην κατάλυση, πιθανώς τοποθετώντας άλλα βασικά αμινοξέα που βρίσκονται στο ευκίνητο πτερύγιο του ενεργού κέντρου ή στην ενεργό περιοχή στην καταλληλότερη για την κατάλυση διαμόρφωση. Συνεπώς, σε αυτό το

μηχανισμό τον ιόν υδροξειδίου δρα τόσο ως το προσβάλλον πυρηνόφιλο όσο και ως οξύ, ενώ η His^{α323} δρα ως βάση σταθεροποιώντας το θετικό φορτίο που φέρει η μεταβατική κατάσταση. Ο σχηματισμός του δεσμού C-NH₃⁺ με τη μεταφορά του πρωτονίου και η σταθεροποίησή του από το καταλυτικό αμινοξύ ιστοιδίνης προκαλεί τη διάσπαση του δεσμού C-N, ακολουθούμενο από την απελευθέρωση αμμωνίας.⁵⁰ Το προκύπτον καρβαμικό ανιόν μετατρέπεται αυθόρμητα σε ένα επιπλέον μόριο αμμωνίας και διττανθρακικά ανιόντα. Το άνοιγμα της κοιλότητας διευκολύνει την απελευθέρωση των προϊόντων, ενώ επιτρέπει επίσης την ενυδάτωση της ενεργού περιοχής με την είσοδο μορίων νερού, με το ένζυμο να είναι έτοιμο για έναν καινούργιο καταλυτικό κύκλο.



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του καταλυτικού μηχανισμού ενζυμικής υδρόλυσης της ουρίας από την SPU.³

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες προσπάθειες για την αντικατάσταση των απαραίτητων ιόντων Ni²⁺ με άλλα ιόντα, όπως Zn²⁺, Co²⁺ και Mn²⁺, με σκοπό

να εξακριβωθεί η βιωσιμότητα του καταλυτικού μηχανισμού της ουρεάσης. Αφαίρεση και των δύο ιόντων Ni^{2+} από την ουρεάση του φυτού *Canavalia ensiformis* μετά από κατεργασία της με EDTA σε χαμηλές τιμές pH, οδήγησε σε μη ενεργή πρωτεΐνη.⁵¹ Αφαίρεση ενός Ni^{2+} από ουρεάση της ίδιας πηγής με διάλυση παρουσία κιτρικών ανιόντων και αντικατάστασή του με Zn^{2+} ή Co^{2+} , οδήγησε σε καταλυτικά αδρανή ουρεάση.⁵² Αυτή η ενζυμική απενεργοποίηση παρατηρήθηκε επίσης στην περίπτωση της ουρεάσης του *K. aerogenes*, που είχε ανασυσταθεί με Zn^{2+} , Co^{2+} και Cu^{2+} , ενώ στην περίπτωση του παραγώγου με Mn^{2+} διατηρήθηκε περίπου το 0.3% της αρχικής δραστηριότητας.³⁴ Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι, σε συνδυασμό με το είδος των μεταλλικών ιόντων, η ακριβής θέση και κινητικότητα των μεταλλικών προσδετών, καθώς επίσης και των πρωτεϊνικών αμινοξέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που δεν συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με τα ιόντα, είναι εξίσου σημαντικά για τη βέλτιστη δραστηριότητα της ουρεάσης.

1.5 Λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι ουρεάσες

Οι ουρεάσες είναι ένζυμα ευρέως διαδεδομένα στη φύση.¹⁰ Εντοπίζονται σε ποικίλους οργανισμούς, όπως φυτά, βακτήρια, φύκη, μύκητες και ασπόνδυλα, ενώ επίσης εντοπίζονται σε εδάφη ως ένζυμα του χώματος. Η ουρία, το υπόστρωμα του ενζύμου, είναι άμεσα διαθέσιμη. Η διαδεδομένη της παρουσία οφείλεται κυρίως στην απέκκριση ούρων από τα ζώα, στην αποικοδόμηση των αζωτούχων ενώσεων νεκρών οργανισμών,⁵³ καθώς και στη διαδεδομένη της χρήση ως λίπασμα. Έτσι, λόγω της παρουσίας τους, οι ουρεάσες διαδραματίζουν έναν εξέχοντα ρόλο στο μεταβολισμό του αζώτου στη φύση.

1.5.1 Φυτικές ουρεάσες

Η ουρεάση είναι ένα ένζυμο που στα φυτά καταλύει τη διάσπαση της ουρίας για αφομοίωσή της από τα φυτικά κύτταρα.^{53,54} Χωρίς να έχει διευκρινιστεί ακόμα πλήρως, φαίνεται ότι τα ανώτερα φυτά διαθέτουν ποικίλα συστήματα, τόσο ενεργητικής όσο και παθητικής μεταφοράς της ουρίας, που τους επιτρέπουν να προσαρμόζουν τις ανάγκες σε άζωτο ανάλογα με τη μορφή του αζώτου που είναι διαθέσιμη από το εξωτερικό περιβάλλον ή συντίθεται στο εσωτερικό τους. Από το εξωτερικό περιβάλλον τα φυτά αφομοιώνουν

μέσω των ριζών τους ουρία, κυρίως όμως προσλαμβάνουν αμμωνία προερχόμενη από την υδρόλυση της ουρίας από ουρεάσες που εντοπίζονται στα εδάφη, γεγονός που έχει αξιοποιηθεί στη λίπανση με λιπάσματα ουρίας. Έτσι, μεγάλες ποσότητες λιπασμάτων ουρίας μπορεί να δημιουργήσουν κίνδυνο τόσο για τα φυτά όσο και το περιβάλλον. Για βελτιστοποίηση των τεχνικών λίπανσης η ουρία εφαρμόζεται στο φύλλωμα των φυτών, από όπου απορροφάται ταχύτατα, μπορεί όμως να είναι τοξική σε υψηλές συγκεντρώσεις.⁵³ Είναι επομένως απαραίτητη η μελέτη των μηχανισμών που σχετίζονται με τις ανάγκες των φυτών σε ουρία, ώστε να αναπτυχθούν ισορροπημένες στρατηγικές λίπανσης με λιπάσματα ουρίας για καλύτερη και βιωσιμότερη αγροτική παραγωγή.

Από την άλλη πλευρά, στα φυτικά κύτταρα η ουρεάση συμμετέχει στο μεταβολισμό των αζωτούχων ενώσεων.^{18,53,54} Στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων η ουρία είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο που προκύπτει από δύο διαφορετικές μεταβολικές πορείες: τον καταλυτικό καταβολισμό της αργινίνης από την αργινάση¹¹ και την αποικοδόμηση των πουρινών και των ουριδινών.^{12,13} Καθώς λοιπόν μεταβολίζεται ταχύτατα, δεν συσσωρεύεται στα κύτταρα, ωστόσο περιστασιακά μπορεί να αποτελέσει πηγή αζώτου. Έχει επίσης προταθεί ότι λόγω της παραγωγής αμμωνίας οι ουρεάσες αποτελούν μία ασπίδα άμυνας των φυτών εναντίον διαφόρων παθογόνων οργανισμών.⁵⁵ Στο ίδιο πλαίσιο, τελευταίες ενδείξεις φανερώνουν ότι εκτός από την ουρεολυτική τους δραστηριότητα οι ουρεάσες επιδεικνύουν εντομοκτόνο^{56,57} και αντιμυκητιακή^{58,59} δράση, γεγονότα που υποδηλώνουν τη συμμετοχή τους στο αμυντικό σύστημα των φυτών.

1.5.2 Ουρεολυτικά βακτήρια παθογόνα για ανθρώπους και ζώα

Μεταξύ των πολυάριθμων ουρεολυτικών βακτηριών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν αυτά που είναι παθογόνα για τους ανθρώπους και τα ζώα. Η παθογένεια αυτή οφείλεται στις επιπτώσεις από την υδρόλυση της ουρίας, όπως η αύξηση του pH (πάνω από ~9.2) και η τοξικότητα λόγω της αμμωνίας και των παραγώγων της.¹⁵ Η ουρία, το κύριο μεταβολικό αζωτούχο προϊόν των περισσότερων χερσαίων ζώων, παράγεται στο ήπαρ, μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στους νεφρούς και εκκρίνεται με τα ούρα, με τη

συγκέντρωσή της να κυμαίνεται σε φυσιολογικά πλαίσια από 1-10 mM στον ορό και περίπου 0.5 M στα ούρα.^{15,16} Επιπλέον, το 20-25% της συνολικής ουρίας που παράγεται υπολογίζεται πως παραμένει στο γαστρεντερικό σωλήνα, με τη συγκέντρωσή της στο στομάχι να είναι περίπου 1.7-3.4 mM. Αυτό καθιστά την ουρία άμεσα διαθέσιμη στα ουρολυτικά βακτήρια καθιστώντας έτσι το γαστρεντερικό και ουροποιητικό σύστημα τις πιο κοινές περιοχές μόλυνσεων από ουρολυτικά βακτήρια στους ανθρώπους.^{15,16}

Η μόλυνση στο ουροποιητικό σύστημα προκαλεί αύξηση στο pH των ούρων και μπορεί να επιφέρει ορισμένες επιπλοκές. Μία από αυτές είναι η νέκρωση του ιστού των νεφρών, που προκαλεί οξεία πυελονεφρίτιδα. Μία άλλη περισσότερο συχνή επιπλοκή είναι η καθίζηση των φυσιολογικά διαλυτών στα ούρα ιόντων, που οδηγεί στο σχηματισμό λίθων στις ουροφόρους οδούς. Από χημικής απόψεως, οι κυριότεροι λίθοι αποτελούνται από φωσφορικό αμμώνιο μαγνήσιο $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ και ανθρακικό απατίτη $Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$,^{15,16,60,61} ενώ τα πιο κοινά βακτήρια που εμπλέκονται στο σχηματισμό τους είναι το *Proteus mirabilis* και το *Ureaplasma urealyticum*, ενώ άλλα γένη είναι τα *Pseudomonas*, *Klebsiella* και το είδος *Staphylococcus spp.*^{15,16,60,61} Οι λίθοι που οφείλονται σε βακτήρια που εκφράζουν την ουρεάση υπολογίζεται πως αφορούν στο 15-20% όλων των περιπτώσεων λιθίασης.

Το βακτήριο *Helicobacter pylori* είναι το κύριο ουρολυτικό βακτήριο που προσβάλλει τον εντερικό σωλήνα.^{15,16,62,63} Το βακτήριο αυτό κυρίως εντοπίζεται στην εσωτερική βλεννογόνο επιφάνεια του στομάχου, όπου η αύξηση του pH του ισχυρά όξινου περιβάλλοντος, λόγω της δράσης της ουρεάσης, επιτρέπει στο βακτήριο, του οποίου η ανάπτυξη απαιτεί pH 6-8, να αντιστέκεται στις αντίξοες συνθήκες. Ταυτόχρονα, επιφέρει βλάβες στον ξενιστή ιστό προκαλώντας έτσι γαστρίτιδα και γαστροδωδεκαδακτυλικά έλκη. Οι επιβλαβείς παράγοντες είναι η αμμωνία και η χλωραμίνη, με την τελευταία να προκύπτει από την οξειδωτική έκρηξη που προκαλείται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αμμωνία έχει αποδειχθεί ότι έχει άμεση κυτταροτοξική επίδραση στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ η χλωραμίνη μπορεί να προκαλέσει μεταλλαξιογόνο καταστροφή του DNA, και στην περίπτωση χρόνιας μόλυνσης από το *Helicobacter pylori* θεωρείται ότι συνεισφέρει στην ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου. Εκτός από τις γαστρικές

επιπλοκές η μόλυνση στον εντερικό σωλήνα μπορεί να προκαλέσει και ηπατικό κώμα.

Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η δράση της ουρεάσης στο άνω γαστρεντερικό σύστημα αξιοποιείται κατά τη χρήση ενός μη παρεμβατικού προσδιορισμού της μέσω της αναπνοής, για τη διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων που οφείλονται στο βακτήριο *Helicobacter pylori*.

Στο τεστ αυτό προσλαμβάνεται ουρία επισημασμένη με ^{13}C ή ^{14}C και εάν το βακτήριο είναι παρόν στο στομάχι η ουρία μετατρέπεται στο επισημασμένο CO_2 . Αυτό στη συνέχεια απορροφάται με την κυκλοφορία του αίματος και εκπνέεται με την αναπνοή όπου ανιχνεύεται με φασματομετρία μάζας ή απαριθμητή σπινθηρισμών.⁶⁴

Άλλοι θανατηφόροι ουρεολυτικοί μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να προσβάλουν τον ανθρώπινο οργανισμό είναι το βακτήριο *Mycobacterium tuberculosis*,⁶⁵ που είναι υπεύθυνο για τη φυματίωση, το βακτήριο *Yersinia enterocolitica*,⁶⁶ που προκαλεί εντεροκολίτιδα-τελική ειλεΐτιδα και ο μύκητας *Cryptococcus neoformans*,⁶⁷ που προκαλεί κρυπτοκοκκίαση και η οποία μπορεί να εκδηλωθεί με τρεις μορφές: λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού (πνευμονία), μηνίγγων (μηνιγγίτιδα) και γενικευμένη λοίμωξη (δέρμα, βλεννογόνοι κ.ά.).

1.5.3 Ουρεάσες από βακτήρια του εδάφους και προβλήματα από την πτητικότητα της αμμωνίας

Μεγάλη σημασία για το γεωργικό τομέα έχει η ουρεολυτική δραστηριότητα των εδαφών.⁶⁸⁻⁷¹ Η δραστηριότητα αυτή προέρχεται από μικροοργανισμούς αλλά κυρίως από την ουρεάση των βακτηρίων του χώματος.^{71,72} Όντας υπόλειμμα νεκρών φυτών και μικροβιακών κυττάρων, το ένζυμο εντοπίζεται εξωκυτταρικά αλλά βασίζει τη σταθερότητά του στην ακινητοποίησή του πάνω σε αργιλικές και χουμικές ουσίες.^{73,74} Η παρουσία αυτής της σταθερής μορφής ενζύμου στα εδάφη έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ουρία ως ένα αποτελεσματικό λίπασμα αζώτου. Χάρη στην υψηλή περιεκτικότητά της σε άζωτο, τη χημική της σταθερότητα και το χαμηλό κόστος παραγωγής, η ουρία αποτελεί σήμερα πάνω από το 50% των παγκοσμίως εφαρμοζόμενων λιπασμάτων αζώτου. Ο ρόλος της ουρεάσης που εντοπίζεται στα εδάφη είναι

να καθιστά την ουρία διαθέσιμη στα φυτά μέσω της μετατροπής της σε αμμωνία. Σημαντικό όμως είναι και το γεγονός ότι η υδρόλυση της ουρίας μπορεί να έχει παράλληλα και ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, μπορεί να προκαλέσει μη παραγωγική απώλεια αζώτου λόγω της πτητικότητας της αμμωνίας, ενώ η τοξικότητα της ίδιας της αμμωνίας μαζί με την αλκαλικότητα και τη συσσώρευση νιτρικών αλάτων μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των φυτών επηρεάζοντας τη βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξή τους, δημιουργώντας τελικά ποικίλα περιβαλλοντικά και οικονομικά προβλήματα.⁶⁸⁻⁷⁰

Η πτητικότητα της αμμωνίας αποτελεί επιπλέον ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζεται κατά τη διαχείριση των κτηνοτροφικών λυμάτων, τα οποία τελευταία παράγονται σε μεγάλες ποσότητες εξαιτίας των εντατικοποιημένων καλλιεργητικών πρακτικών.⁷⁵ Η πτητικότητα αυτή επιφέρει έναν αριθμό ανεπιθύμητων συνεπειών. Μία από αυτές είναι ότι η λάσπη από την κτηνοτροφία, ένα πολύτιμο λίπασμα για τη φυτική παραγωγή, χάνει αισθητά την αξία της λόγω της απώλειας σε άζωτο. Μία άλλη είναι ότι η αμμωνία αποτελεί πηγή μόλυνσης και επιπλέον συνοδεύεται από μία οσμή που μπορεί να γίνει δυσάρεστη για ανθρώπους και ζώα.

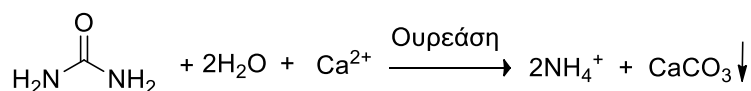
1.5.4 Όξιμες ουρεάσες

Οι όξιμες ουρεάσες αποτελούν μία διακριτή υποομάδα μέσα στην οικογένεια των ουρεασών. Το εξέχον χαρακτηριστικό τους είναι ότι, αντίθετα με τις συνηθισμένες ουρεάσες που εμφανίζουν βέλτιστη δραστικότητα κοντά σε ουδέτερες τιμές pH, οι όξιμες ουρεάσες εμφανίζουν το βέλτιστο pH τους στην περιοχή 2-4.5. Παράγονται κυρίως από βακτήρια του εντερικού σωλήνα (όπως τα γένη *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Morganella* και *Bifidobacterium*),⁷⁶⁻⁸¹ καθώς και βακτήρια του εδάφους (*Arthrobacter mobilis*),⁸² ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν έχει εξηγηθεί έως σήμερα το πώς βακτήρια που αναπτύσσονται στον πεπτικό σωλήνα του οποίου το pH είναι ουδέτερο παράγουν όξιμες ουρεάσες. Όπως οι ουδέτερες ουρεάσες, έτσι και οι όξιμες είναι ένζυμα που περιέχουν ιόντα Ni²⁺ με παραπλήσιες τιμές Km, αλλά η δραστικότητά τους είναι κατά κύριο λόγο χαμηλότερη.

Οι όξινες ουρεάσες και συγκεκριμένα αυτές που προέρχονται από το βακτήριο *Lactobacillus sp.* είναι σήμερα εμπορικής διαθέσιμες και χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση της ουρίας από αλκοολούχα ποτά.⁷⁷⁻⁸³ Αυτό γίνεται για να αποφευχθεί ο σχηματισμός του καρβαμιδικού αιθυλίου, που θεωρείται καρκινογόνο, από την αντίδραση μεταξύ της ουρίας και της αιθανόλης που λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή και συντήρηση των αλκοολούχων ποτών. Στο όξινο pH των αλκοολούχων ποτών (π.χ. pH του κρασιού 3.2, pH του σάκε 4.4),⁸¹ σε αντίθεση με τις βασικές ουρεάσες, οι όξινες ουρεάσες πληρούν τις απαιτήσεις για αυτή τη διαδικασία.

1.5.5 Ουρεάσες και ορυκτοποίηση

Άλλη μία ενδιαφέρουσα λειτουργία των ουρεασών στη φύση είναι να προάγουν τον σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3).⁸⁴ Η υδρόλυση της ουρίας θεωρείται μαζί με τη φωτοσύνθεση και την αναγωγή των θειικών αλάτων ως μία βιοχημική οδός για τη μικροβιακά επαγόμενη καθίζηση CaCO_3 που πραγματοποιείται συχνά σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα, όπως τα χώματα, τα γεωλογικά ιζήματα και τα φυσικά ύδατα.⁸⁴⁻⁸⁶ Αν και δεν έχει τελείως εξακριβωθεί, ο ρόλος των βακτηρίων στη διαδικασία αυτή θεωρείται τριπλός: (α) αυξάνουν την αλκαλικότητα του περιβάλλοντος που ευνοεί την καθίζηση του CaCO_3 , (β) αυξάνουν τη διαλυτότητα του ανόργανου άνθρακα και (γ) λειτουργούν ως πυρήνες κρυστάλλωσης. Με την αύξηση του pH και παρέχοντας ιόντα CO_3^{2-} , η υδρόλυση της ουρίας παρουσία ιόντων Ca^{2+} οδηγεί στην καθίζηση ανθρακικών αλάτων σε ποικίλους κρυσταλλικούς σχηματισμούς, σύμφωνα με την αντίδραση του Σχήματος 2.^{85,86}



Σχήμα 2. Καθίζηση των ανθρακικών αλάτων με τη δράση των ουρεασών.

Ως εξέλιξη της κατανόησης των διαδικασιών ασβεστοποίησης στη φύση, εάν αυτές πραγματοποιηθούν με βιομημητικό τρόπο, μπορούν δυνητικά να προσφέρουν σε καινοτόμες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.⁸⁷ Σε αυτές περιλαμβάνονται η κατασκευή προηγμένων υλικών από ανθρακικά ιόντα,⁸⁸⁻⁹⁰ ο καθαρισμός των αποβλήτων αλλά και φυσικών νερών από την περίσσεια

των διαλυτών ιόντων Ca^{2+} ⁹¹ και του ραδιοϊσοτόπου $^{90}\text{Sr}^{2+}$,⁹² καθώς και η χρήση τους ως μικροβιακά στεγανοποιητικά υλικά για τη συγκόλληση επιφανειακών ρωγμών και σχισμών σε κτίρια⁹³⁻⁹⁵ και την αποκατάσταση ιστορικών κτιρίων.⁹⁶

1.5.6 Μη ενζυμικές ιδιότητες των ουρεασών

Πέρα από την παγιωμένη ενζυμική δράση, έχουν επίσης αποδειχθεί διάφορες μη ενζυμικές βιολογικές ιδιότητες των ουρεασών.¹⁴ Σε γενικές γραμμές, φυτικές και μικροβιακές ουρεάσες έχουν αποδειχθεί τοξικές έναντι νηματοειδών μυκήτων και ζυμομυκήτων μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τη διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος ή/και της κυτταρικής μεμβράνης και την επακόλουθη πλασμόλυση.^{60,97} Επιπροσθέτως, φυτικές και μερικές βακτηριακές ουρεάσες επιδεικνύουν ισχυρή εντομοκτόνο δράση, εμφανίζουν νευροτοξικότητα και επηρεάζουν φυσιολογικές λειτουργίες, όπως τη διούρηση, τη σύσπασση των μυών και το ανοσοποιητικό σύστημα.⁹⁸⁻¹⁰¹ Η τοξική δράση των ουρεασών έχει χαρακτηριστεί τόσο με *in vitro* όσο και με *in vivo* πειράματα και έχει αποδειχθεί ότι δεν σχετίζεται με την ενζυμική της δράση.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Αν και οι ουρεάσες είναι εντομοτοξικές *per se*, μελέτες που διενεργήθηκαν στην κανατοξίνη (canatoxin, CNTX), μία ισομορφή της ουρεάσης που απομονώνεται από το φυτό *Canavalia ensiformis*,^{106,107} καθώς και σε μία ισομορφή της ουρεάσης της σόγιας (*Glycine max*), έδειξαν ότι η τοξικότητα απέναντι στα έντομα οφείλεται, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, σε ένα μικρό πεπτίδιο, την πεπκανατοξίνη (percanatox). Η πεπκανατοξίνη απελευθερώνεται από την προσλαμβανόμενη από τα έντομα ουρεάση μετά από υδρόλυσή της από πεπτικά ένζυμα παρόμοια με τις καθεψίνες. Ανασυνδυασμένα ανάλογα αυτών των πεπτιδίων, το Jaburetox στην περίπτωση του φυτού της φασολιάς και το Soyuretox στην περίπτωση της σόγιας, έχουν επίσης εντομοκτόνο και αντιμυκητιασική δράση.^{14,108}

Σε κάθε περίπτωση που απαιτείται ο έλεγχος της δραστηριότητας των ουρεασών (ιατρική, αγροτικός τομέας, περιβάλλον) για την αντιμετώπιση των επιβλαβών τους αποτελεσμάτων, η χρήση αναστολέων του ενζύμου κρίνεται επιβεβλημένη.

1.6 Αναστολείς της ουρεάσης

Από πλευράς χημικής δομής αλλά και τρόπου δράσης, οι αναστολείς ουρεασών μπορούν να διακριθούν στις κατηγορίες που περιγράφονται στη συνέχεια.

1.6.1 Αντιστρεπτοί αναστολείς

1.6.1.1 Βαρέα μέταλλα

Παρόλο που δεν είναι ακόμα διαθέσιμα δομικά δεδομένα για τις αλληλεπιδράσεις ουρεάσης-μεταλλικών ιόντων, βιοχημικές πληροφορίες υποστηρίζουν πως τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να δράσουν ως βραδείας δέσμευσης αναστολείς της ουρεάσης, με τα ιόντα Hg^{2+} , Ag^{2+} και Cu^{2+} να περιγράφονται ως οι ισχυρότεροι.¹⁰ Τα μεταλλικά ιόντα ασκούν την ανασταλτική τους δράση σε συνάρτηση με τη συγκέντρωσή τους, κυρίως αντιδρώντας με τις σουλφυδρυλομάδες κυστεΐνης, και συγκεκριμένα με την κυστεΐνη που βρίσκεται στο ευέλικτο πτερύγιο της υπομονάδας α της ουρεάσης, του οποίου η τροποποίηση επάγει την ανασταλτική δράση.¹⁰⁹ Επιπλέον, ο Cu^{2+} και πιθανώς και ο Ag^{+} μπορούν να αντιδράσουν με λειτουργικές ομάδες που περιέχουν άτομα αζώτου και οξυγόνου, συμβάλλοντας στη διαδικασία απενεργοποίησης της ουρεάσης μέσω της δημιουργίας πρωτεϊνικού συσσωματώματος.^{109,110}

Οι ενώσεις του βισμούθιου αντιπροσωπεύουν μία κατηγορία μορίων με βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιούνται ευρέως ως αντιβακτηριδιακοί παράγοντες για τη θεραπεία πεπτικών ελκών, καθώς και λοιμώξεων από το *H. pylori*.¹¹¹⁻¹¹³ Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ο λεπτομερής τρόπος αντιβακτηριδιακής τους λειτουργίας, έχει προταθεί πως τα ιόντα Bi (III) αναστέλλουν τη δράση της ουρεάσης αλληλεπιδρώντας με τη θειολομάδα της κυστεΐνης στο πτερύγιο που πλαισιώνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου.¹¹⁴

1.6.1.2 Ιόντα φθορίου

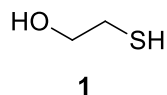
Τα ιόντα φθορίου έχουν μελετηθεί εκτεταμένα ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της ουρεάσης διαφόρων βακτηρίων, όπως τα *Klebsiella aerogenes* και *Sporosarcina pasteurii*.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Η ανασταλτική τους δράση πραγματοποιείται μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού, γεγονός που

αποδείχθηκε από βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην SPU.²⁴ Πιο συγκεκριμένα, τα ιόντα φθορίου επάγουν ένα μικτό μοντέλο ανταγωνιστικής και συναγωνιστικής αναστολής. Η εξάρτηση των σταθερών αναστολής από το pH, που μελετήθηκε στην κλίμακα 6.5-8.0, αποκαλύπτει έναν επικρατέστερο συναγωνιστικό μηχανισμό σε υψηλότερες τιμές pH ($K_i=0.28$ mM για συναγωνιστική αναστολή και $K_i \approx 0$ για ανταγωνιστική αναστολή σε pH=8.0) και έναν λιγότερο επικρατή ανταγωνιστικό μηχανισμό σε χαμηλότερες τιμές ($K_i=0.79$ mM για ανταγωνιστική αναστολή και $K_i=0.43$ mM για συναγωνιστική αναστολή σε pH=6.5).²⁴

Κατ' αυτόν τον τρόπο, το μικτό μοντέλο ανασταλτικής δράσης των φθοριούχων μπορεί να ερμηνευτεί ως ακολούθως: το ένα ανιόν φθορίου που είναι δεσμευμένο από το Ni(1) ανταγωνίζεται την πρόσδεση της ουρίας στο ενεργό κέντρο (επικρατεί με την αύξηση του pH, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των ανιόντων φθορίου). Από την άλλη, το άλλο ανιόν φθορίου γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni²⁺ αντικαθιστώντας το ανιόν υδροξειδίου (επικρατεί με τη μείωση του pH, καθώς πρωτονιώνεται το ανιόν υδροξειδίου) και εμποδίζοντάς το να πραγματοποιήσει την πυρηνόφιλη προσβολή στην ουρία.

1.6.1.3 Ενώσεις θείου

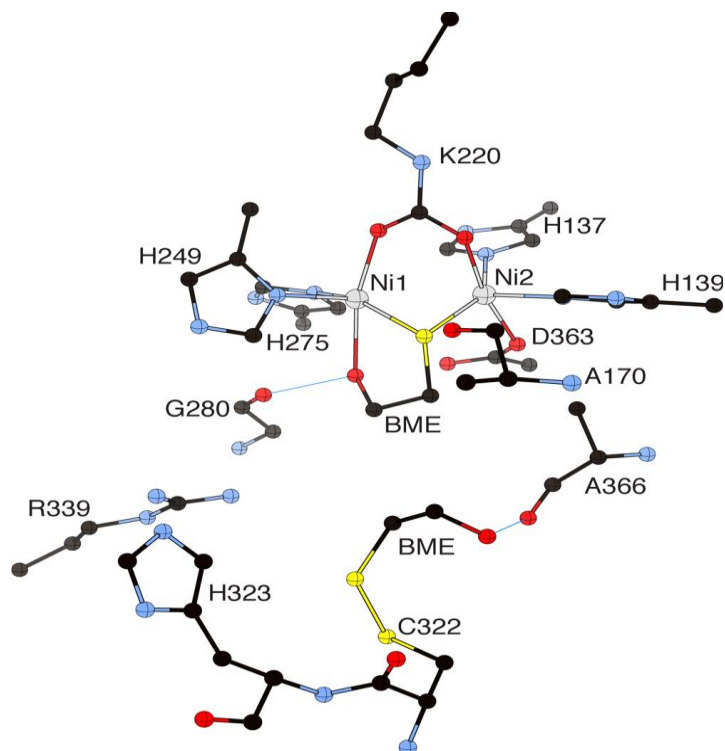
Μεταξύ όλων των ενώσεων θείου που δρουν ως αναστολείς της ουρεάσης, οι θειόλες αντιπροσωπεύουν μία κατηγορία ιστορικής σημασίας, αφού έχουν χρησιμοποιηθεί για τον δομικό χαρακτηρισμό του ενεργού κέντρου φυτικών ουρεασών.^{118,119} Οι θειόλες αναστέλλουν την ουρεάση με έναν ανταγωνιστικό μηχανισμό στην ανιοντική τους μορφή RS⁻.¹²⁰



Σχήμα 3. Η χημική δομή της β-μερκαπτοαιθανόλης.

Η θειολική ομάδα της 2-μερκαπτοαιθανόλης (BME) (1, Σχήμα 3) γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni²⁺, ενώ η υδροξυλομάδα της συνδέεται με το Ni(1), αλληλεπίδραση που σταθεροποιείται περαιτέρω με τη δημιουργία ενός δεσμού υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο της Gly²⁸⁰. Επιπλέον, ένα δεύτερο μόριο BME σχηματίζει έναν δισουλφιδικό δεσμό με την Cys³²² που

ανήκει στο ευκίνητο πτερύγιο του ενζύμου. Ο επακόλουθος σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του α-υδροξυλίου της BME και του καρβονυλικού ατόμου οξυγόνου της Ala³⁶⁶ μειώνει την ευελιξία του πτερυγίου, εμποδίζοντας την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης (Εικόνα 7).^{121,122} Η BME εμφανίζει τιμή ανταγωνιστικής σταθεράς αναστολής $K_i=0.72$ mM έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii*.



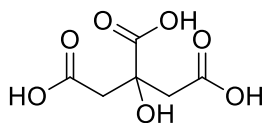
Εικόνα 7. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με BME.¹²²

Εκτός από τις θειόλες, τα θειώδη ανιόντα αναστέλλουν ανταγωνιστικά την ουρεάση.^{123,124} Βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην SPU απέδειξαν ότι η αναστολή των θειωδών εξαρτάται από το pH στην περιοχή 6.5-8.0, μειώνεται με αύξηση της τιμής του και γίνεται αμελητέα σε pH 8.0.¹²⁵

1.6.1.4 Κιτρικά ιόντα

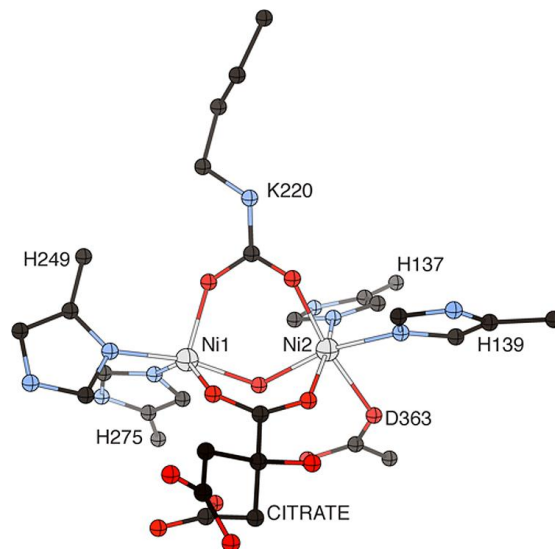
Το κιτρικό οξύ **2** (Σχήμα 4) είναι ένας ασθενής αναστολέας της ουρεάσης σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 800 mM, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η ανασταλτική του δράση είναι αρκετά χαμηλότερη, καθώς

φαίνεται πως προσδένεται στο ένζυμο με τρόπο που δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί.²⁶



Σχήμα 4. Κιτρικό οξύ.

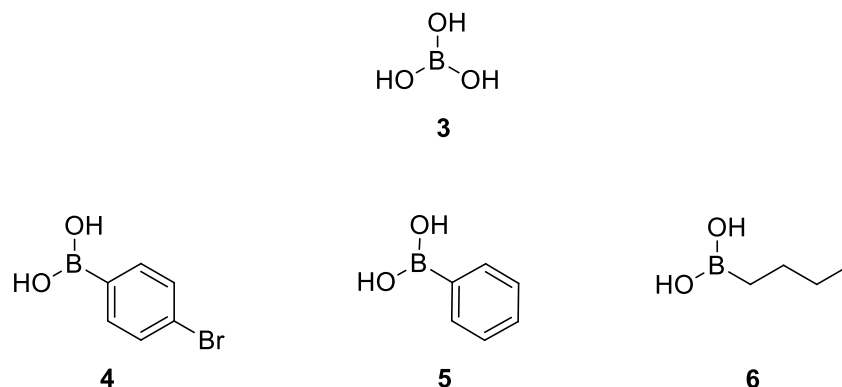
Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου SPU-κιτρικού ανιόντος (Εικόνα 8) φανερώνει την παρουσία ενός καρβοξυλικού ανιόντος που συμπλέκει τα ιόντα Ni^{2+} του ενεργού κέντρου, ενώ σχηματίζονται και αρκετοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των πολικών ομάδων του αναστολέα και των γειτονικών αμινοξέων που σταθεροποιούν τη συνολική αλληλεπίδραση, η οποία είναι σχετικά ασθενής.²⁶ Λαμβάνοντας υπόψη τις τρεις τιμές pK_a του κιτρικού οξέος ($pK_{a1}=3.13$, $pK_{a2}=4.76$ και $pK_{a3}=6.40$) μπορούμε να θεωρήσουμε πως το κιτρικό ανιόν προσδένεται αρχικά στο ενεργό κέντρο είτε ως τριανιόν είτε ως διανιόν, και πως η παρουσία των γειτονικών αρνητικά πολωμένων ή φορτισμένων αμινοξέων, όπως η Gly²⁸⁰ και η Asp²²⁴, αυξάνει τις τιμές των pK_{a2} και pK_{a3} προκαλώντας την πρωτονίωση των δύο από τα τρία καρβοξυλικά ανιόντα του μορίου. Αυτό συνάδει με την παρατήρηση ότι μόνο ουδέτεροι και χαμηλού φορτίου υποκαταστάτες και αναστολείς μπορούν να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.¹²⁶



Εικόνα 8. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με κιτρικό ανιόν.²⁶

1.6.1.5 Βορικό οξύ και βορονικά οξέα

Τόσο το βορικό οξύ (**3**) όσο και βορονικά οξέα μπορούν να δράσουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς φυτικών και βακτηριακών ουρεασών (Σχήμα 5).¹⁰ Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου SPU-βορικό οξύ¹²⁷ φανερώνει ότι ο αναστολέας γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni²⁺ μέσω δύο ατόμων οξυγόνου, εκτοπίζοντας τα τρία μόρια νερού, διατηρώντας όμως το γεφυρωτικό ανιόν υδροξειδίου. Το τρίτο άτομο οξυγόνου στρέφεται έξω από το μεταλλικό κέντρο. Μία λεπτομερής ανάλυση του δικτύου δεσμών υδρογόνου που περιβάλλουν τον αναστολέα αποδεικνύει ότι η κατάσταση πρωτονίωσης αντιστοιχεί σε αυτή του ουδέτερου B(OH)₃, επιβεβαιώνοντας μία προηγούμενα διατυπωμένη υπόθεση.^{121,128,129}



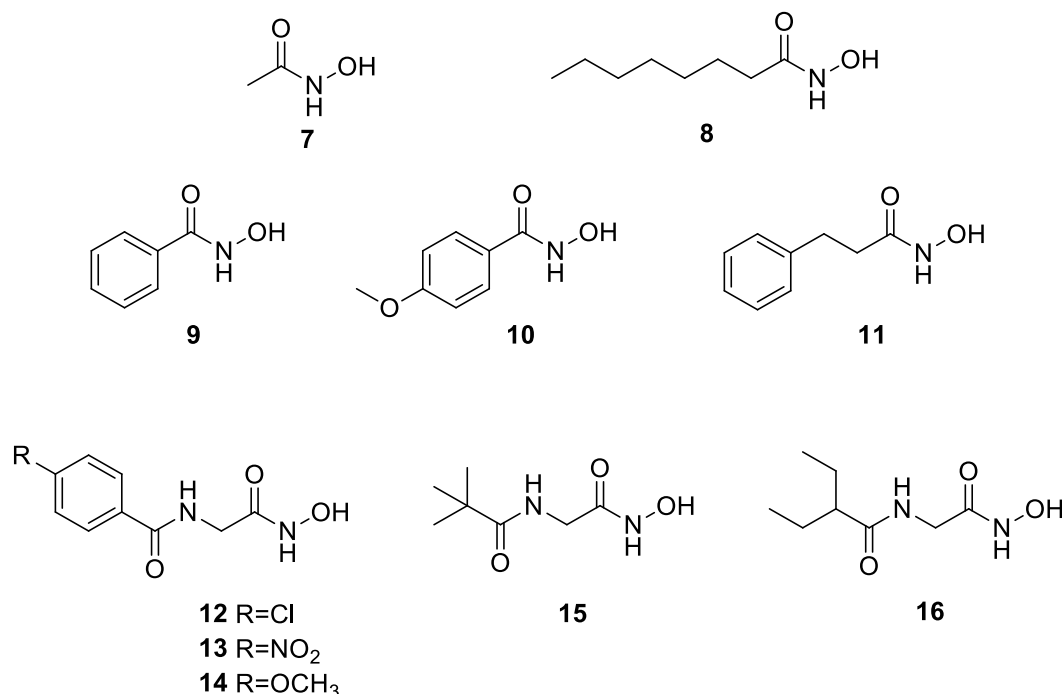
Σχήμα 5. Οι δομές του βορικού οξέος και βορονικών οξέων που έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναστολείς ουρεασών.

Το βορικό οξύ δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας των ουρεασιών του φυτού *Canavalia ensiformis*, καθώς και των βακτηρίων *Proteus mirabilis* και *Klebsiella aerogenes* με σταθερές αναστολής $K_i=0.12$, 0.1 και 0.33 mM αντίστοιχα.¹²⁷ Η δράση των βορονικών οξέων **4-6** έχει ελεγχθεί έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *P. mirabilis*. Οι σταθερές αναστολής έχουν τιμές $K_i=0.12$, 1.26 και 0.55 mM αντίστοιχα για κάθε βορονικό οξύ.¹²⁹

1.6.1.6 Υδροξαμικά οξέα

Τα υδροξαμικά οξέα θεωρούνται ως η πιο ευρέως μελετημένη κατηγορία αναστολέων της ουρεάσης, γεγονός που αντανακλάται στο μεγάλο αριθμό των σχετικών δημοσιεύσεων και διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας.¹³⁰ Οι γνωστές μεταλλοσυμπλεκτικές τους ιδιότητες αποτελούν το βασικό χαρακτηριστικό για την υψηλή ανασταλτική τους δράση απέναντι στις ουρεάσες.

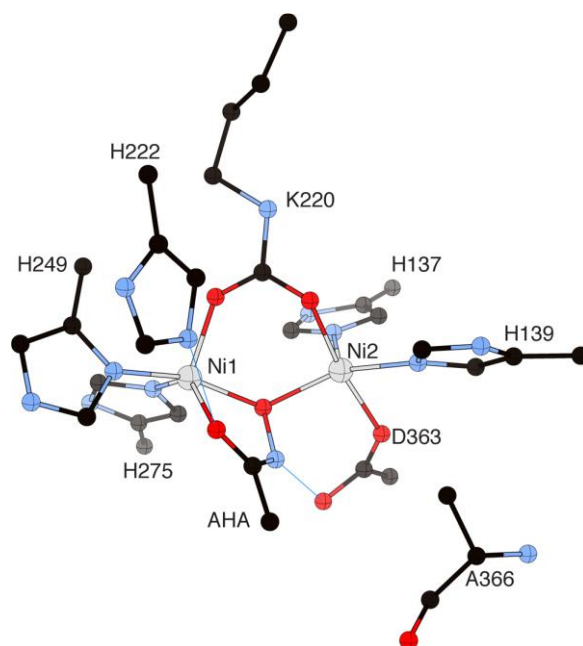
Παρακάτω (Σχήμα 6) φαίνονται διάφορα αλειφατικά, *m*- και *p*-υποκατεστημένα βενζο- και αρυλο-αλκυλο-υδροξαμικά οξέα. Από αυτά οι αναστολείς **7-11** εμφανίζουν τιμές IC_{50} της τάξης των mM.¹³¹⁻¹³⁴



Σχήμα 6. Παράγωγα του υδροξαμικού οξέος ως αναστολείς της ουρεάσης.

Το ακετοϋδροξαμικό οξύ (AHA, **7**) χρησιμοποιήθηκε ως φάρμακο για λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.^{135,136} Αν και εμφάνισε παρενέργειες, όπως τερατογενέσεις¹³⁷ και ψυχονευρολογικές και μυϊκές διαταραχές,¹³⁶ εντούτοις εγκρίθηκε από τον FDA το 1983 και κυκλοφόρησε με την εμπορική ονομασία Lithostat στην Αμερική και Urorefrex στην Ευρώπη. Μεταγενέστερα μελετήθηκαν υδροξαμικά αμινοξέα, καθώς και *N*-υποκατεστημένα παράγωγά τους και κατοχυρώθηκαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας πολλοί τέτοιοι αναστολείς για τη θεραπεία της ουρολιθίασης και της πυελονεφρίτιδας.¹³⁸ Τα περισσότερα όμως *N*-αροϋλο-γλυκίνο-υδροξαμικά οξέα αποδείχθηκαν μεταλλαξιογόνα.¹³⁹ Οι ενώσεις **12-14** αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα. Οι ενώσεις **15** και **16**, καθώς και άλλα αντίστοιχα αλειφατικά παράγωγα έδειξαν παρόμοια δραστικότητα *in vitro* και *in vivo*, ωστόσο ήταν περισσότερο ασφαλή ως προς τις παρενέργειες.¹⁴⁰

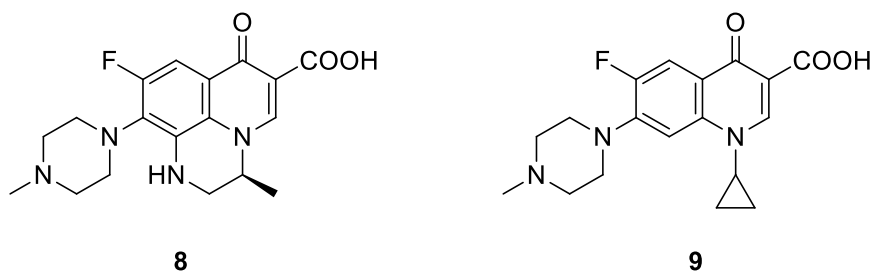
Μεταξύ όλων των παραγώγων, το AHA **7** αποτελεί τον περισσότερο μελετημένο αναστολέα, ο οποίος είναι αναστολέας βραδείας σύμπλεξης και αναστέλλει την ουρεάση ποικίλων φυτών, βακτηρίων και μυκήτων.¹⁰ Το AHA αλληλεπιδρά με τα δύο ιόντα Ni²⁺ στο ενεργό κέντρο. Το άτομο οξυγόνου του υδροξαμικού ανιόντος γεφυρώνει τα δύο ιόντα Ni²⁺, ενώ το καρβονυλικό οξυγόνο συνδέεται με ένα άτομο νικελίου με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που αναφέρθηκε για τη BME. Δύο δεσμοί υδρογόνου, μεταξύ του καρβονυλικού ατόμου του οξυγόνου και της His²²² και μεταξύ της αμινομάδας και της Asp³⁶³, σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση ενζύμου-αναστολέα (Εικόνα 9).^{21,141,142}



Εικόνα 9. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με AHA.

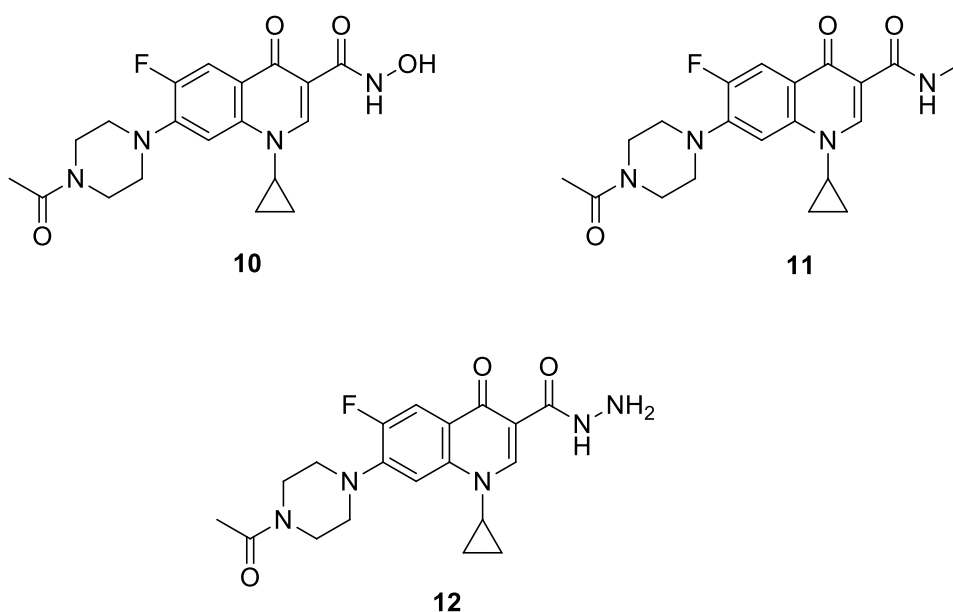
1.6.1.7 Κινολόνες

Τα αντιβιοτικά κινολόνες συνιστούν μία σημαντική κατηγορία μιας μεγάλης ομάδας συνθετικών, ευρέος φάσματος αντιβακτηριακών παραγόντων, τα οποία σήμερα είναι τα περισσότερο επιτυχημένα αντιβακτηριακά φάρμακα στην κλινική πράξη.^{143,144} Η δράση τους συνίσταται στην αναστολή της σύνθεσης του DNA. Σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά κινολόνες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι φθοροκινολόνες. Δύο σημαντικοί αντιπρόσωποι αυτής της κατηγορίας, η λεβοφλοξασίνη (**8**) (Levofloxacin) και η σιπροφλοξασίνη (**9**) (Ciprofloxacin),^{145,146} που απεικονίζονται στο Σχήμα 7, καθώς επίσης και τα ανάλογά τους,¹⁴⁷ φαίνεται να είναι αρκετά ελπιδοφόροι αναστολείς των ουρεασών των βακτηρίων *H. pylori* και *P. mirabilis*. Πειράματα μοριακής μοντελοποίησης υποδεικνύουν πως η καρβοξυλική ομάδα των ενώσεων αυτών αλληλεπιδρά με τα ιόντα Ni^{2+} του ενεργού κέντρου. Παρ' όλα αυτά, δεν φαίνεται να υπάρχει ομοιοπολική αλληλεπίδραση μεταξύ του αναστολέα και της κυστεΐνης του ενζύμου, παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται στην περίπτωση των κινονών.¹⁴⁸ Οι ενώσεις **8** και **9** εμφανίζουν τιμές $IC_{50}=2.9$ και $3.5 \mu M$ αντίστοιχα έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *P. mirabilis*.¹⁴⁶



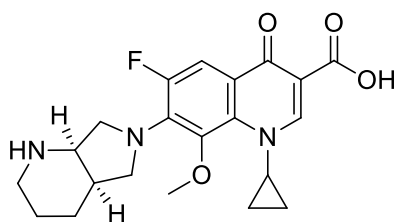
Σχήμα 7. Λεβοφλοξασίνη (8) και σιπροφλοξασίνη (9).

Τροποποίηση της ομάδας του καρβοξυλικού οξέος στις παραπάνω ενώσεις και μετατροπή τους στα αντίστοιχα υδροξαμικά οξέα, υδραζίδια και αμίδια, οδήγησε σε μία ενδιαφέρουσα κατηγορία αναστολέων της ουρεάσης του *P. mirabilis* (Σχήμα 8).¹⁴⁹ Τα περισσότερα παράγωγα υδροξαμικού οξέος, όπως η ένωση (10) επέδειξαν ικανοποιητική ανασταλτική δράση ($IC_{50}=2.22 \mu M$), παρόμοια με αυτή των μητρικών ενώσεων. Τα αμίδια εμφάνισαν χαμηλές τιμές IC_{50} , με εξαίρεση το αμίδιο (11) που παρουσίασε εξαιρετική δράση με $IC_{50}=1.2 \mu M$. Το αζίδιο (12) είχε παρόμοια δράση με το μητρικό φάρμακο ($IC_{50}=1.22 \mu M$).



Σχήμα 8. Παράγωγα της σιπροφλοξασίνης (9) ως αναστολείς της ουρεάσης.

Πρόσφατα, η μοξιφλοξασίνη (13) (Moxifloxacin, Σχήμα 9) μελετήθηκε και αποδείχθηκε ένας εξαιρετικός αναστολέας ουρεασών. Ακόμη, νανοσωματίδια Ag-μοξιφλοξασίνης έχουν αναφερθεί να αναστέλλουν την ουρεάση.¹⁵⁰

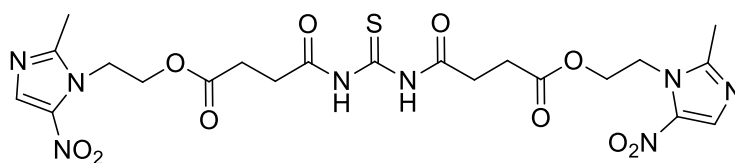


13

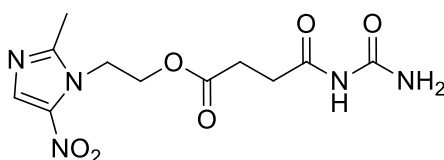
Σχήμα 9. Μοξιφλοξασίνη.

1.6.1.8 Ετεροκυκλικές ενώσεις

Οι αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις αποτελούν μία ενδιαφέρουσα κατηγορία αναστολέων ουρεάσης. Ένας τύπος ετεροκυκλικών αναστολέων ουρεάσης είναι τα παράγωγα νιτρο-ιμιδαζολίου. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* σε δύο από τις ενώσεις αυτής της κατηγορίας (ενώσεις **14** και **15**, Σχήμα 10) απέδειξαν την άμεση και ισχυρή ανασταλτική τους δράση ως προς την ουρεάση του *H. pylori*.¹⁵¹



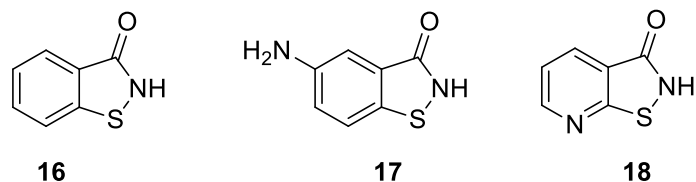
14



15

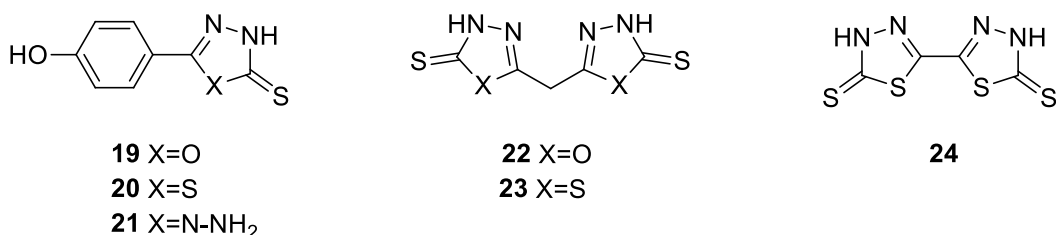
Σχήμα 10. Νιτρο-ιμιδαζόλια ως αναστολείς της ουρεάσης.

Παρόμοια δράση αναφέρθηκε σε ένα αμερικάνικο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για μία ομάδα ισοθειαζολίων (Σχήμα 11).^{152,153} Η ένωση **16** χρησιμοποιήθηκε ως ένωση-οδηγός για τη σύνθεση και μελέτη ενώσεων, όπως οι **17** και **18**, οι οποίες επιβεβαιώθηκε πως αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της ουρεάσης των *H. pylori* και *C. ensiformis*.



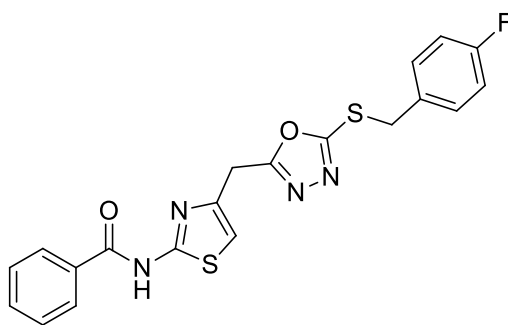
Σχήμα 11. Παράγωγα ισοθειαζολίου.

Παράγωγα οξαδιαζολίου (**19** και **22**), θειαδιαζολίου (**20**, **23** και **24**) και τριαζολίου (**21**) αποτελούν μία ακόμη ομάδα ετεροκυκλικών αναστολέων της ουρεάσης (Σχήμα 12). Ο Amtul και οι συνεργάτες του μελέτησαν μια βιβλιοθήκη 25 τέτοιων ενώσεων έναντι βακτηριακών (*B. pasteurii* και *P. mirabilis*) και φυτικών ουρεασών (*C. ensiformis*).¹⁵⁴ Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης κατέδειξαν πως οι παραπάνω ενώσεις προκαλούν ανταγωνιστική αναστολή των ουρεασών, με τιμές IC₅₀ στην κλίμακα των μΜ. Ο ισχυρότερος αναστολέας (**20**) έχει τιμή K_i=2 μΜ.



Σχήμα 12. Οξαδιαζόλια, θειαδιαζόλια και τριαζόλια ως αναστολείς βακτηριακών και φυτικών ουρεασών.

Πρόσφατα, ο Abbasi και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν τα αποτελέσματα από τη μελέτη μίας σειράς δις-ετεροκυκλικών βενζαμιδίων ως αναστολείς της JBU. Ο ισχυρότερος αναστολέας **25** εμφανίζει τιμή IC₅₀=2.17 μΜ (Σχήμα 13).¹⁵⁵



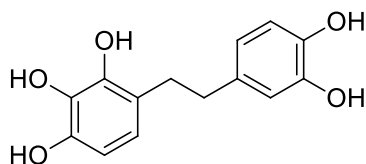
25

Σχήμα 13. Δις-ετεροκυκλικό βενζαμίδιο.

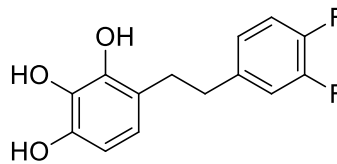
1.6.1.9 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία από τις πιο άφθονες και δομικά ποικιλόμορφες τάξεις ενώσεων, ενώ επίσης είναι βιοδιαθέσιμες σε φαρμακευτικά και εδώδιμα φυτά. Οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με ένα μεγάλο φάσμα ενζύμων και κυτταρικών υποδοχέων έχουν αντίκτυπο στις ποικίλες φαρμακευτικές και ιατρικές τους εφαρμογές. Προσδιορίστηκε έτσι ότι μερικές πολυφαινόλες ασκούν ανασταλτική δράση στις ουρεάσες.¹²⁹

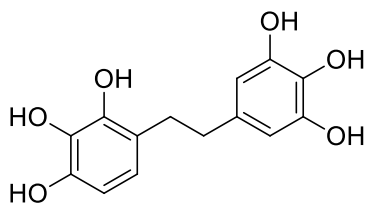
Στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας που υπεβλήθη το 2010 από το Πανεπιστήμιο Jishou (Κίνα) προτάθηκαν 93 παράγωγα του 1,3-διφαινυλοαιθανίου ως πιθανά φάρμακα που στοχεύουν στην αναστολή της ουρεάσης.^{156,157} Οι χημικές δομές των πιο ισχυρών αναστολέων (ενώσεις **26-28**, Σχήμα 14), που ελέγχθηκαν έναντι της ουρεάσης της φασολιάς (Jack bean), έχουν τιμές IC_{50} =1.1, 2.0 και 0.2 μ M αντίστοιχα και έδειξαν ότι ο αριθμός και η θέση των υδροξυλίων είναι ζωτικής σημασίας για τις ανασταλτικές ιδιότητες των τελικών ενώσεων. Αντίθετα, η επίδραση άλλων υποκαταστατών (-NO₂, -CN, -OEt, -NMe₂) αποδείχθηκε αμελητέα.



26



27



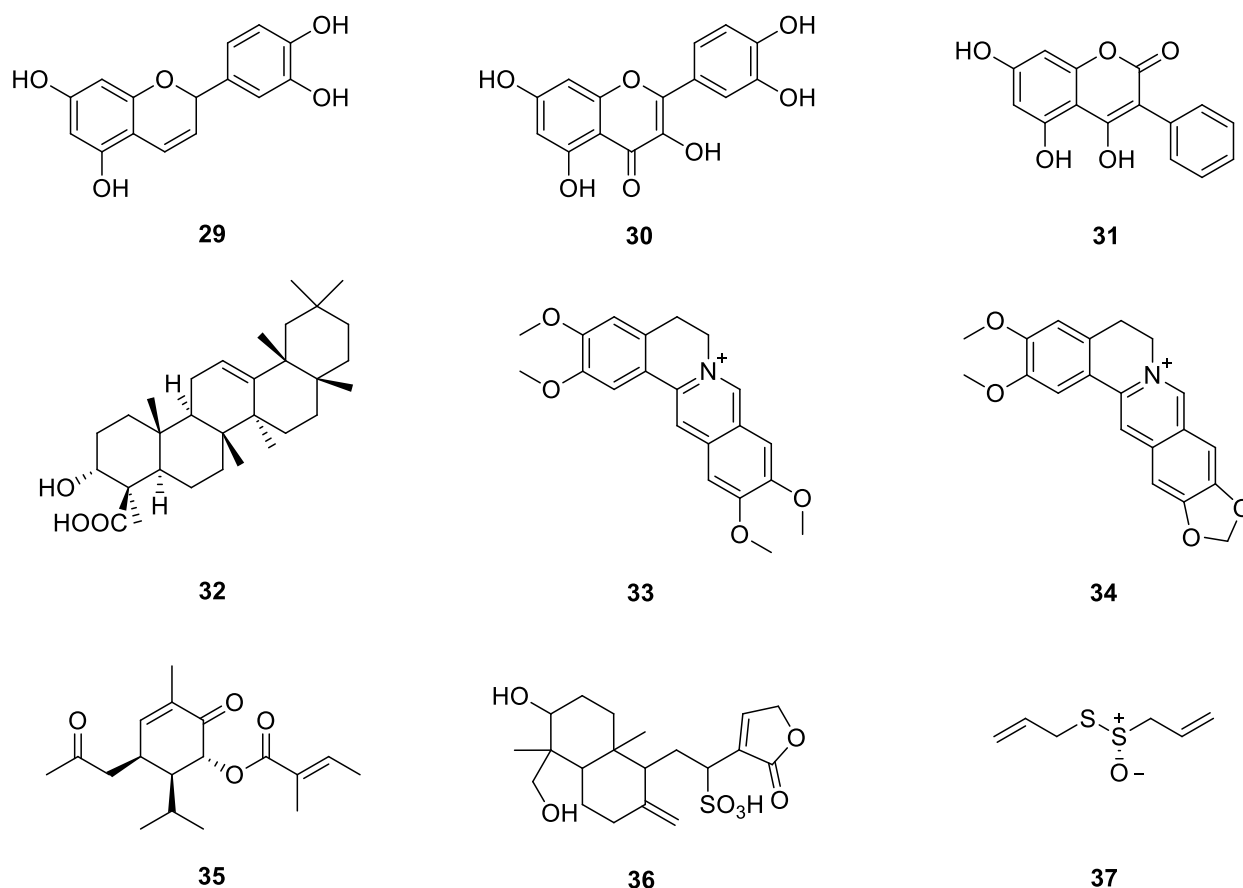
28

Σχήμα 14. Πολυφαινολικοί αναστολείς της ουρεάσης που κατοχυρώθηκαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από το Πανεπιστήμιο Jishou της Κίνας.

1.6.1.10 Φυσικά προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν σήμερα μία αρκετά διαδεδομένη πηγή φαρμακευτικών μορίων. Οι ποικίλες παρενέργειες και τα προβλήματα ανθεκτικότητας λόγω αλόγιστης χρήσης των εμπορικώς διαθέσιμων φαρμάκων έχουν στρέψει την έρευνα στη μελέτη των βιολογικών και φαρμακευτικών δράσεων ενώσεων (κυρίως δευτερογενών μεταβολιτών) που προέρχονται και απομονώνονται από ζωντανούς οργανισμούς. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις **29–37** (Σχήμα 15). Τα φλαβονοειδή **29** και **30**, που απομονώνονται από το ιαπωνικό αγιόκλημα *Lonicera japonica*, αποτελούν αναστολείς της HPU με τιμές IC_{50} της τάξης των μM .^{158,159} Η ένωση **31** ανήκει στην κατηγορία των φυτικών κουμαρινών και εμφανίζει $IC_{50}=47.8 \mu M$ έναντι της HPU.¹⁶⁰ Η ένωση **32** είναι ένα στεροειδές που απομονώνεται από το αφρικανικό φυτό *Boswellia carterii* (από το ίδιο φυτό παράγεται και το λιβάνι, η γνωστή αρωματική ρητίνη) και αναστέλλει τη JBU με $IC_{50}=9.21 \mu M$,¹⁶¹ ενώ τα αλκαλοειδή **33** και **34** από το *Coptis chinensis*, ένα φυτό που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική για την αντιμετώπιση γαστρεντερικών διαταραχών. Η ένωση **33** έχει τιμές $IC_{50}=0.53$ και $0.03 mM$ και η ένωση **34** $IC_{50}=3.0$ και $2.3 \mu M$ έναντι των HPU και JBU αντίστοιχα.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Η βερνονιόνη (ένωση **35**) είναι ένα τερπένιο που απομονώνεται από μεθανολικό εκχύλισμα των ριζών του φυτού *Vernonia*

cinerascens και αποτελεί ένα ακόμα παράδειγμα φυσικού προϊόντος ικανού να αναστέλλει τη δράση της JBU ($IC_{50}=227.6 \mu M$).^{165,166} Η διτερπενοειδής λακτόνη **36** αποτελεί το κύριο δραστικό συστατικό του φυτού *Andrographis aniculata* ($IC_{50}=3.28$ και 3.17 mM για τη JBU και HPU αντίστοιχα),¹⁶⁷ ενώ η ένωση **37**, η αλισσίνη, ένα δημοφιλές αντιβιοτικό, προέρχεται από το σκόρδο ($IC_{50}=4.15 \mu M$ έναντι της ουρεάσης του *P. mirabilis*).^{168,169}

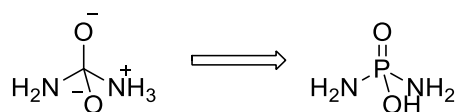


Σχήμα 15. Φυσικά προϊόντα ως αναστολείς ουρεασών.

1.6.1.11 Οργανοφωσφορικές ενώσεις

Οι διαμιδικοί και τριαμιδικοί εστέρες του φωσφορικού οξέος αποτελούν την πιο χαρακτηριστική κατηγορία αναστολέων ουρεάσης, καθώς εμφανίζουν την υψηλότερη δραστηριότητα.^{170,171} Αυτό αποτελεί συνέπεια της μεγάλης

ομοιότητάς τους με την τετραεδρικής γεωμετρίας μεταβατική κατάσταση της ενζυμικής αντίδρασης υδρόλυσης της ουρίας, όπως εικονίζεται στο Σχήμα 16:



38

Μεταβατική κατάσταση
της ενζυμικής αντίδρασης

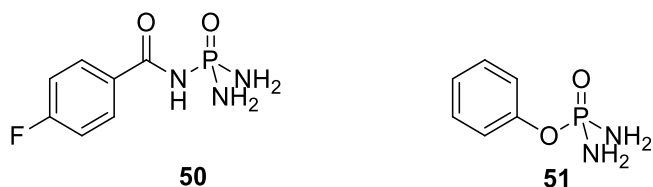
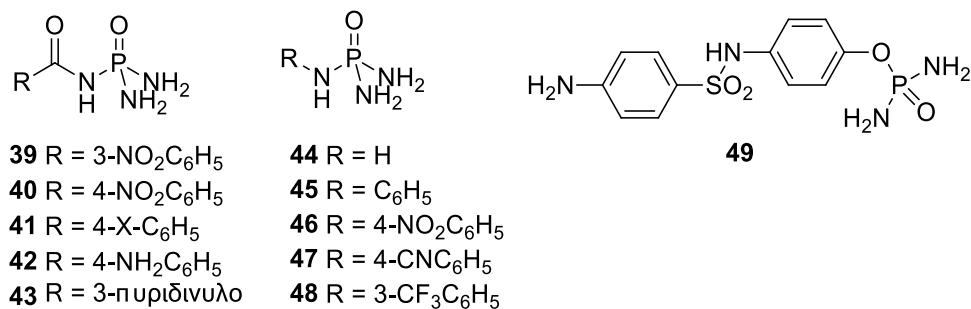
Ανάλογο μεταβατικής
κατάστασης

Σχήμα 16. Φωσφοροδιαμιδικός εστέρας ως ανάλογο μεταβατικής κατάστασης της υδρόλυσης της ουρίας.²⁰

Βάσει αυτής της λογικής, μία σειρά από αναστολείς ουρεάσης δημοσιεύθηκαν το 1980 (Σχήμα 17).¹⁷² Ενώσεις όπως οι **39-43**, όπου το R είναι κάποιος άρυλο-υποκαταστάτης (π.χ. 3- ή 4-νιτρο-, 4-αλογονο-, 4-αμινοφαινυλο-, 3-πυριδινυλο-) αναστέλλουν την ουρεάση του βακτηρίου *Proteus morganii* σε κλίμακα 14-100% σε συγκέντρωση 1 μM.

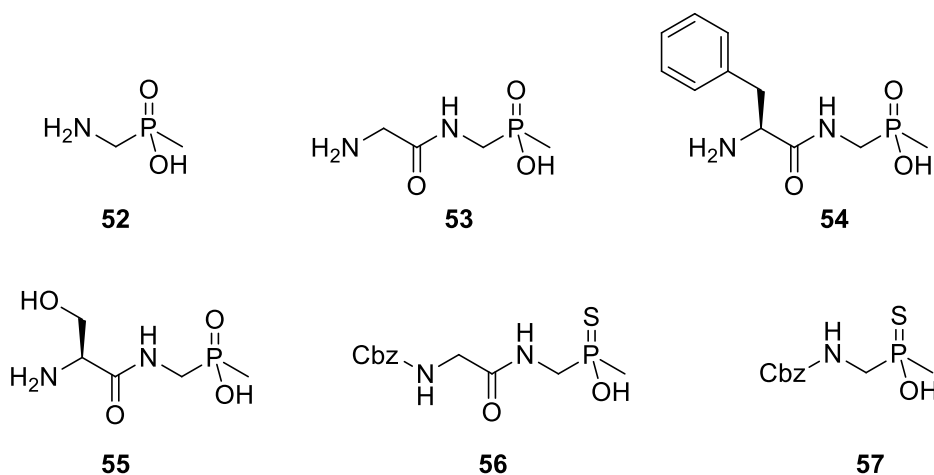
Άλλες έρευνες έδειξαν ότι ανάλογες δομές με άρυλο-υποκαταστάτες (**44-48**, Σχήμα 17) αντί για ακυλο- αποτελούν επίσης πιθανούς αναστολείς της ουρεάσης του βακτηρίου *P. mirabilis*.¹⁷³ Η ένωση **49** και το *m*-ισομερές της, επίσης αναστέλλουν την ουρεάση του *P. mirabilis* με τιμές IC₅₀ της τάξης των 0.2-0.4 μM.¹⁷⁴

Η Takeda Chemicals κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μία μεγάλη ομάδα *N*-άκυλο- και *N*-άρυλο-τριαμιδο-φωσφορικών εστέρων, όπως οι ενώσεις **39-43** και **44-48** αντίστοιχα, και ανακαλύφθηκαν έτσι περισσότερα από 90 παραδείγματα αναστολέων του *H. pylori* της τάξης των nM (για το φθοροαμίδιο **50** βρέθηκε IC₅₀=1.2 nM).¹⁷⁵ Μελέτες στην αναστολή με φαινυλο-φωσφοροδιαμιδικούς εστέρες (ένωση **51**) έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές υδρολύονται όταν ενώνονται στο ενεργό κέντρο και η πραγματική αναστολή πραγματοποιείται από το φωσφοροδιαμιδικό οξύ **38**.¹⁷⁶



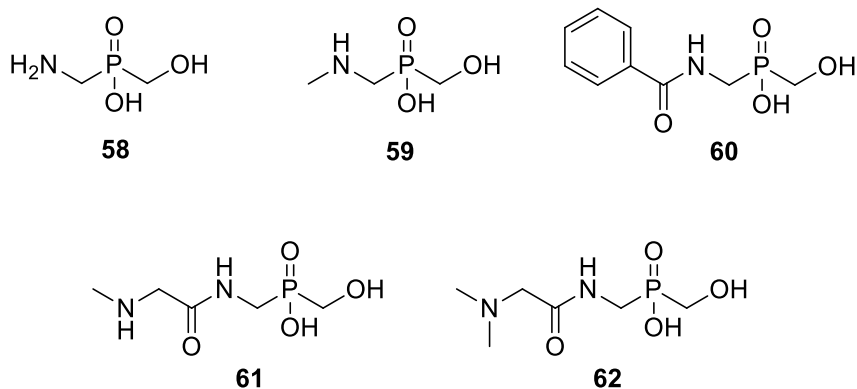
Σχήμα 17. Φωσφοραμιδικοί εστέρες.

Το κυριότερο μειονέκτημα όμως που εμποδίζει την ευρεία εφαρμογή αυτής της ομάδας αναστολέων είναι η ευαισθησία τους στην υδρόλυση, ιδιαίτερα σε χαμηλές τιμές pH. Για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός και με τη βοήθεια υπολογιστικών τεχνικών, η Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και οι συνεργάτες της αντικατέστησαν τους ασταθείς δεσμούς P-N με συνδέσμους που περιλαμβάνουν σταθερούς δεσμούς P-C.¹⁷⁷ Χρησιμοποιώντας το αμινομεθυλο(*P*-μεθυλο)φωσφινικό οξύ **52**, δομικό ανάλογο της ένωσης **38** ως ένωση-οδηγό, συνέθεσαν μία σειρά παραγώγων *P*-μεθυλο-φωσφινικών οξέων και θειοφωσφινικών οξέων (Σχήμα 18), των οποίων η ανασταλτική δράση δοκιμάστηκε έναντι των ουρεασών των βακτηρίων *Bacillus pasteurii* και *Proteus vulgaris*. Την ισχυρότερη αναστολή επέδειξε η ένωση **56**, με $K_i=0.17 \mu\text{M}$ έναντι της ουρεάσης του *B. pasteurii* και $K_i=0.45 \mu\text{M}$ έναντι της ουρεάσης του *P. vulgaris*.



Σχήμα 18. Ορισμένοι από τους *P*-μεθυλο-φωσφινικούς και θειοφωσφινικούς αναστολείς που συντέθηκαν από την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και τους συνεργάτες της.

Σε εξέλιξη της προηγούμενης έρευνάς τους, η Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και η ομάδα της, με τη βοήθεια υπολογιστικών τεχνικών βελτιστοποίησαν τις δομές των αμινοφωσφινικών οξέων, τροποποιώντας τόσο τα *N*- όσο και τα *P*-τελικά άκρα τους και κατέστησαν τους νέους αναστολείς ισχυρότερους.¹⁷⁸ Η εισαγωγή της *P*-υδροξυμεθυλο-ομάδας στο μόριο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανασταλτικής δράσης έναντι των ουρεασών των βακτηρίων *Bacillus pasteurii* και *Proteus vulgaris*, σε σχέση με τα αντίστοιχα *P*-μεθυλο-παράγωγα.¹⁷⁷ Η ένωση **59** αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα με τιμές $K_i=0.36 \mu\text{M}$ έναντι της ουρεάσης του *P. vulgaris* και $K_i=0.43 \mu\text{M}$ έναντι της ουρεάσης του *B. pasteurii* (Σχήμα 19).



Σχήμα 19. Ορισμένοι από τους *P*-υδροξυμεθυλο-φωσφινικούς αναστολείς που συντέθηκαν από την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και τους συνεργάτες της.

Πιο πρόσφατα, και με αφορμή μία δημοσιευμένη μελέτη που περιγράφει την κρυσταλλική δομή της SPU στην οποία είναι δεσμευμένα κιτρικά ιόντα,²⁶ σχεδιάστηκε και συντέθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών από την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και τους συνεργάτες της ένα σύνολο φωσφινομεθυλο-, φωσφονομεθυλο- και φωσφονοαιθυλο-κινναμμωμικών οξέων και των αντίστοιχων εστέρων τους (Σχήμα 20). Στόχος αποτέλεσε τα μόρια αυτά, που φέρουν δύο όξινες ομάδες, να προσομοιάσουν τη σύμπλεξη των κιτρικών με την SPU, ενώ ο διπλός δεσμός του κινναμμωμικού σκελετού να αλληλεπιδράσει ομοιοπολικά ως δέκτης Michael με τη σουλφυδρυλομάδα της Cys^{α322}.



- 63** R=Me, X=H
64 R=H, X=H
65 R=Me, X=OH
66 R=H, X=OH
67 R=Me, X=Me
68 R=H, X=Me
69 R=Me, X=CH₂OH
70 R=H, X=CH₂OH
71 R=Me, X=CH₂NH₂
72 R=H, X=CH₂NH₂

- 73** R=Me
74 R=H

Σχήμα 20. Φωσφिनομεθυλο-, φωσφονομεθυλο- και φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικά οξέα και εστέρες.

Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση επέδειξε η ένωση **73** με τιμές $K_i=3.05 \mu\text{M}$ έναντι της SPU και $K_i=1.52 \mu\text{M}$ έναντι της ουρεάσης του *P. mirabilis*. Παρ' όλα αυτά, δεν αποδείχθηκε η ομοιοπολική αλληλεπίδραση του αναστολέα με το ένζυμο.¹⁷⁹

1.6.2 Ομοιοπολικοί αναστολείς

1.6.2.1 Ομοιοπολικοί αναστολείς ενζύμων

Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου, δυνάμεων van der Waals και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, όλες συνεισφέρουν στη συγγένεια και την εκλεκτικότητα του αναστολέα προς το ένζυμο.¹⁸⁰ Επομένως, η ανάπτυξη φαρμάκων έχει πρωτίστως στηριχθεί στη βελτιστοποίηση μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων, ώστε να βελτιωθεί η δραστηριότητα για δεδομένο στόχο και να αυξηθεί η εκλεκτικότητα. Παρ' όλα αυτά, αυτή η προσέγγιση δεν περιλαμβάνει μια κατηγορία φαρμάκων: αυτών που μπορούν να σχηματίσουν ομοιοπολικό δεσμό με το επιθυμητό ένζυμο ή υποδοχέα.

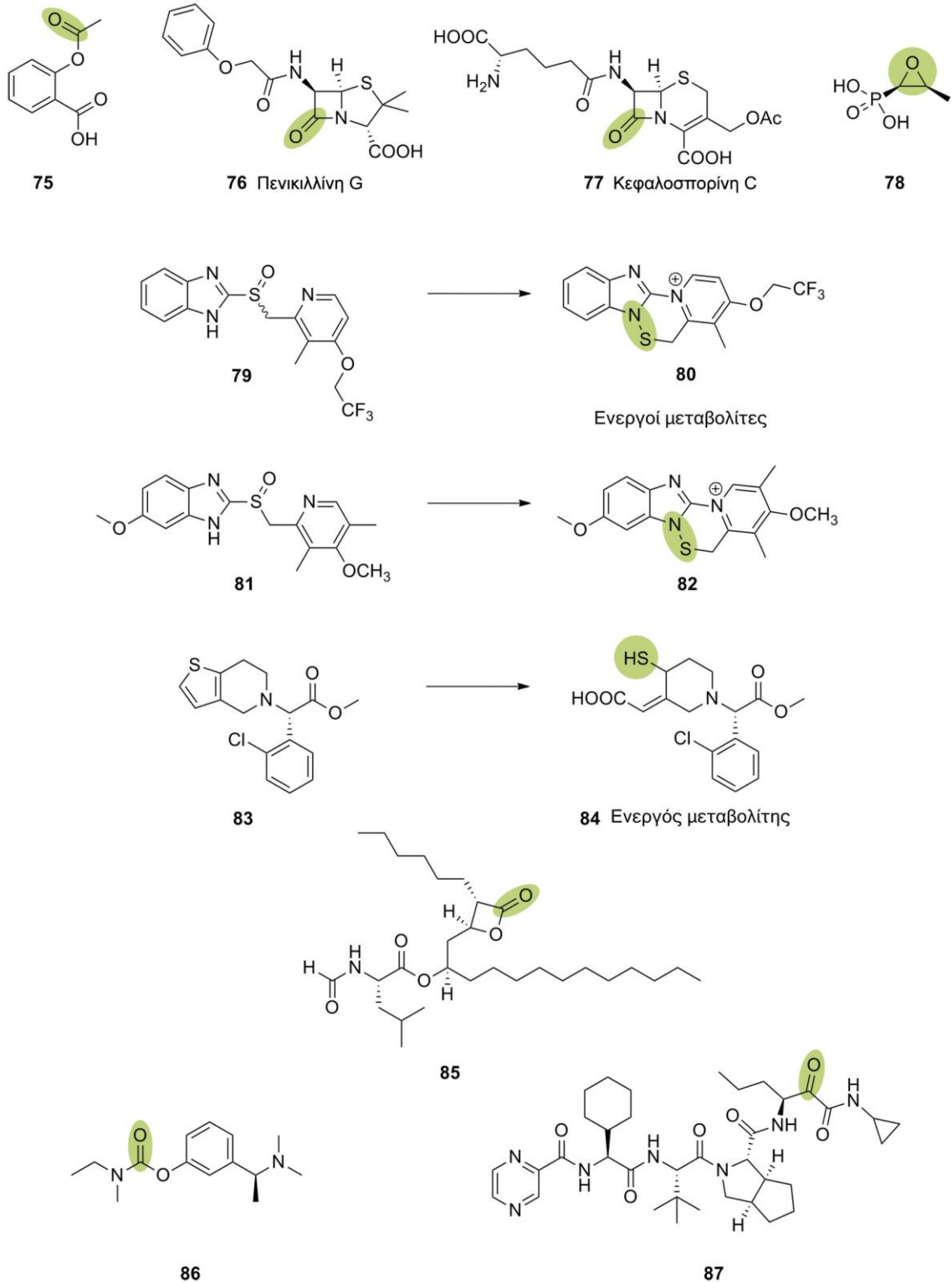
Στην ομοιοπολική αναστολή, ένα μικρό μόριο σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε, όχι μόνο να προσδένεται σε ένα ένζυμο ή υποδοχέα μέσω αντιστρεπτών αλληλεπιδράσεων, αλλά και να σχηματίζει δεσμό, που οδηγεί σε έναν ανθεκτικό σύνδεσμο του ενζύμου με τον αναστολέα.¹⁸¹ Σε αντίθεση με

τα συμβατικά φάρμακα, οι ομοιοπολικοί αναστολείς μπορούν θεωρητικά να επιτύχουν εντός ορισμένου χρόνου την πλήρη αναστολή του βιοχημικού στόχου.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μία έκρηξη στην ανάπτυξη ομοιοπολικών αναστολέων. Η ιδέα ότι ομοιοπολικά φάρμακα μπορούν να συνεισφέρουν στη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας γίνεται όλο και περισσότερο αποδεκτή, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στις εγκρίσεις για την κυκλοφορία νέων φαρμάκων και στις βιβλιογραφικές αναφορές. Ο αριθμός των δημοσιεύσεων που αφορούν στο συγκεκριμένο θέμα έχει αυξηθεί εκθετικά.^{182,183}

Η χρήση μορίων για την ομοιοπολική αναστολή βιολογικών στόχων ανάγεται στα τέλη του 1800, όταν ο Bayer άρχισε να μελετά και να παρασκευάζει ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ, **75**) για τη θεραπεία του πόνου και της φλεγμονής (Σχήμα 21). Να σημειωθεί ότι μέχρι τη δεκαετία του 1970 δεν ήταν γνωστό ότι η ασπιρίνη δρα μέσω ομοιοπολικής και μη αντιστρεπτής αναστολής των κυκλοξυγενασών COX-1 και COX-2, ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών.¹⁸⁴

Τα χρόνια που ακολούθησαν ανακαλύφθηκαν διάσημα ομοιοπολικά φάρμακα, όπως οι πενικιλίνες (**76**), οι κεφαλοσπορίνες (**77**) και η φωσφομυκίνη (**78**) (αντιβιοτικά, 1920-1970),¹⁸⁵ η ομεπραζόλη (**79**) και η λανσοπραζόλη (**81**), των οποίων οι μεταβολίτες (ενώσεις **80** και **82** αντίστοιχα) αποτελούν ομοιοπολικούς αναστολείς (αναστολείς αντλίας πρωτονίων, δεκαετία 1980),¹⁸⁶ η κλοπιδογρέλη (**83**), που ο μεταβολίτης της **84** αλληλεπιδρά ομοιοπολικά με τον υποδοχέα P2Y₁₂ (αντιθρομβωτικό, δεκαετία 1990),¹⁸⁷ η ορλιστάτη (**85**, παχυσαρκία) και η ριβασιγμίνη (**86**, άνοια σχετιζόμενη με τη νόσο Alzheimer) τη δεκαετία του 2000¹⁸⁸ και η τελαπρεβίρη (**87**), ένας αναστολέας της HCV πρωτεάσης τη δεκαετία του 2010.¹⁸⁹



Σχήμα 21. Ομοιοπολικά φάρμακα. Επισημαίνονται οι ομάδες που συμμετέχουν στον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με το βιολογικό στόχο.

Όσον αφορά στην ομοιοπολική αναστολή ως προσέγγιση, υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ των πιθανών πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων που παρουσιάζει.¹⁹⁰

Ένα από τα πιθανά οφέλη ενός στοχευμένου ομοιοπολικού αναστολέα είναι η δυνατότητα να αυξηθεί η δραστικότητα μιας ένωσης ως προς το στόχο, καθώς η ένωση αυτή θα προσδένεται ισχυρότερα στο στόχο σε σχέση με ένα μη ομοιοπολικό ανάλογο.

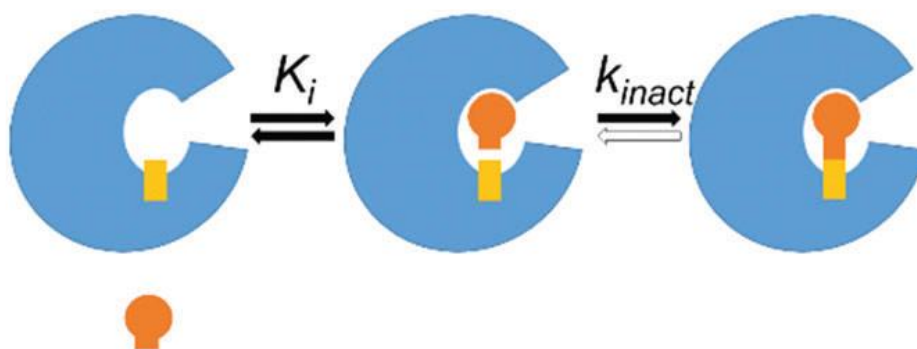
Ως «αθεράπευτοι» στόχοι θεωρούνται αυτοί που είναι αδύνατο να ανασταλούν μέσω των κλασικών αναστολέων. Παράδειγμα τέτοιων βιοχημικών στόχων αποτελούν ένζυμα με φορτισμένο ενεργό κέντρο, όπως οι φωσφατάσες. Οι ομοιοπολικοί αναστολείς μπορεί να έχουν ιδιαίτερη εφαρμογή σε αυτές τις περιπτώσεις, καθώς προσδένονται ισχυρά στο ενεργό κέντρο και με σχετικά μικρές πιθανότητες για αντιστρεπτή αλληλεπίδραση. Επιπλέον, στόχοι που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια ως προς το φυσικό τους υπόστρωμα ή συμπαράγοντα, τα οποία σε κυτταρικό περιβάλλον βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις, θεωρούνται «αθεράπευτοι», διότι ο ανταγωνισμός μεταξύ υποστρώματος και αναστολέα είναι εξαιρετικά μεγάλος ώστε να επιτευχθεί εντός των επιπέδων μέγιστης δόσης. Η ομοιοπολική αναστολή μπορεί να φανεί χρήσιμη σε αυτή την περίπτωση, καθώς η μη αντιστρεπτή πρόσδεση καταργεί την ανάγκη για αντιστρεπτό ανταγωνισμό με το υπόστρωμα.

Ο σχεδιασμός εκλεκτικών αναστολέων αποτελεί πρόκληση όταν βελτιστοποιούνται αναστολείς, ώστε να προσδένονται σε έναν μόνο στόχο, ειδικά όταν πρόκειται για στόχο που αποτελεί μέλος μιας οικογένειας στόχων με παρόμοια σημεία πρόσδεσης. Για παράδειγμα, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν συνηθισμένους ογκολογικούς στόχους. Ωστόσο, πρόκειται για μία οικογένεια πρωτεϊνών με περισσότερα από 500 μέλη, όλα τα οποία χρησιμοποιούν ATP ως συμπαράγοντα, με αποτέλεσμα να διαθέτουν σχεδόν πανομοιότυπες περιοχές πρόσδεσης. Σχεδιάζοντας αναστολείς που να μπορούν να αλληλεπιδράσουν ομοιοπολικά με συγκεκριμένα αμινοξέα, παραδείγματος χάριν μία κυστεΐνη, αποτελεί πλεονέκτημα στη στόχευση μίας συγκεκριμένης κινάσης έναντι των άλλων μελών, που δεν διαθέτουν την κυστεΐνη στην ίδια θέση.

Επιπροσθέτως, οι ομοιοπολικοί αναστολείς έχουν παρατεταμένο χρόνο δράσης, ειδικά όταν πρόκειται για πρωτεϊνικούς στόχους με χαμηλό ρυθμό αναπλήρωσης. Η δυνατότητα αναστολής ενός στόχου για μεγάλη διάρκεια, για παράδειγμα μέχρι να επανασυντεθεί μία πρωτεΐνη, θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρακτικά δοσολογικά προγράμματα. Παρ' όλα αυτά, εάν η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι λειτουργικά σημαντική και έχει χαμηλό ρυθμό επανασύνθεσης, εγείρονται τότε θέματα ασφάλειας για τον οργανισμό, γεγονός που αποτελεί τόσο πλεονέκτημα όσο και ρίσκο στον σχεδιασμό ομοιοπολικών αναστολέων.

Ένας από τους κύριους κινδύνους που σχετίζεται με την ομοιοπολική αναστολή είναι η μη εκλεκτική πρόσδεση.¹⁹¹ Εάν η λειτουργική ομάδα του αναστολέα που αναμένεται να αντιδράσει ομοιοπολικά είναι αρκετά δραστική ώστε να συνδεθεί με αμινοξέα σε άλλους στόχους, είναι πιθανό να προκληθούν προβλήματα τοξικότητας.

Μία ακόμη πρόκληση που σχετίζεται με τους ομοιοπολικούς αναστολείς αποτελεί η μέτρηση της δραστηριότητας, καθώς αναδεικνύεται πολυπλοκότερη σε σχέση με αντίστοιχους αντιστρεπτούς αναστολείς. Στην περίπτωση των αντιστρεπτών αναστολέων, η δραστηριότητα συνήθως αναφέρεται στις τιμές των K_i και IC_{50} . Ως K_i ορίζουμε τη σταθερά αναστολής, ενώ ως IC_{50} τη συγκέντρωση του αναστολέα, στην οποία το 50% του στόχου έχει απενεργοποιηθεί. Οι τιμές IC_{50} όμως είναι χρονο-εξαρτώμενες στην περίπτωση των ομοιοπολικών αναστολέων και έτσι η δραστηριότητά τους αναφέρεται σε τιμές K_i και k_{inact} , των οποίων η μέτρηση απαιτεί πιο περίπλοκους υπολογισμούς (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της ομοιοπολικής πρόσδεσης ενός αναστολέα σε ένα μόριο-στόχο.¹⁸⁰

Ένας άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στη σύνθεση ομοιοπολικών αναστολέων είναι η σχέση μεταξύ φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής.¹⁹⁰ Ο χρόνος δράσης ενός αντιστρεπτού αναστολέα εξαρτάται από το πόσο ισχυρά συνδέεται με τον βιοχημικό στόχο και από το πόσο γρήγορα μεταβολίζεται και αποβάλλεται από το σώμα. Όταν πρόκειται όμως για ομοιοπολικό αναστολέα, η ένωση θα παραμείνει συνδεδεμένη με τον στόχο πέρα από το όριο όπου όλο το ελεύθερο φάρμακο έχει αποβληθεί ενώ, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η σχέση μεταξύ φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής εξαρτάται και από τον χρόνο επανασύνθεσης του στόχου.

Τέλος, οι ομοιοπολικοί αναστολείς τείνουν να υφίστανται εξωηπατική διάσπαση πιο εύκολα από τους μη ομοιοπολικούς, γεγονός που οδηγεί σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα.¹⁹² Για παράδειγμα, ηλεκτρονιόφιλα τμήματα ομοιοπολικών αναστολέων αντιδρούν εύκολα με τη γλουταθειόνη, η οποία συμμετέχει σε βιοχημικές αντιδράσεις του μεταβολισμού. Επομένως, η δραστηριότητα των ομάδων των αναστολέων που συμμετέχουν στον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, ώστε να επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ της μεγιστοποίησης της στοχευμένης δέσμευσης του αναστολέα και της ελαχιστοποίησης της εξωηπατικής διάσπασής του.

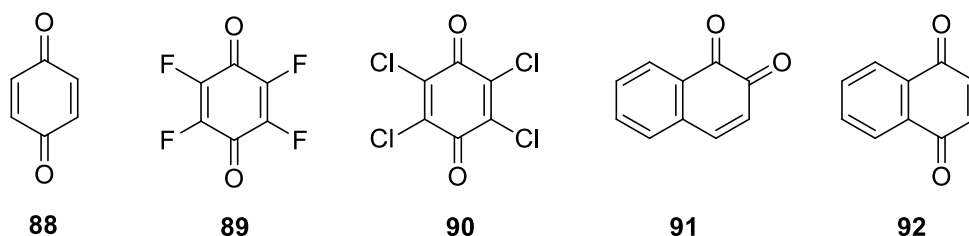
1.6.2.2 Κινόνες

Οι κινόνες αποτελούν μία τάξη βιολογικών ενεργών ενώσεων με υψηλό δυναμικό οξειδωσης. Η εμπλοκή τους ως αναστολέων της ουρεάσης σχετίζεται με την ισχυρή τους αλληλεπίδραση με τη σουλφυδρυλομάδα αμινοξέων κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου.¹⁹³

Η μελέτη των ανασταλτικών ιδιοτήτων των πολυαλογονωμένων βενζοκινονών και ναφθοκινονών επί της ουρεάσης περιγράφηκε από τους Ashiralieva και Kleiner.^{194,195}

Μελέτες με αλογονωμένες κινόνες που πραγματοποιήθηκαν στη φυτική ουρεάση του *Canavalia ensiformis*, καθώς και στις βακτηριακές ουρεάσες των *Sporosarcina pasteurii*, *Helicobacter pylori* και *Klebsiella oxytoca* έδειξαν μία ισχυρή, μη αντιστρεπτή αναστολή. Η φύση του αλογόνου δεν έδειξε να

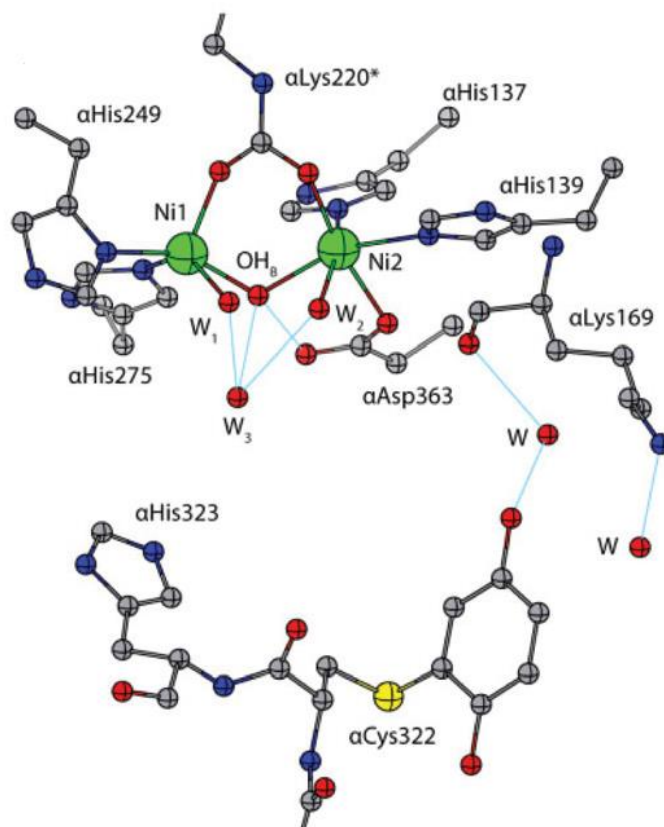
επιηρεάζει τη δράση των αναστολέων, ενώ η αντικατάστασή του από μία ομάδα όπως το -OH, -CN, αλκoxy-ομάδα ή αλκύλιο οδήγησε σε μείωση της συγγένειας σε σχέση με τις μη υποκατεστημένες κινόνες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις **88-92** του Σχήματος 22.¹³¹



Σχήμα 22. Πολυαλογονωμένες και μη βενζοκινόνες και ναφθοκινόνες ως αναστολείς της ουρεάσης.

Οι παραπάνω ενώσεις παρουσιάζουν τιμές IC₅₀ της τάξης των μΜ, ωστόσο η βασική αιτία που αποτρέπει τη φαρμακευτική τους χρήση σχετίζεται με τις κυτταροτοξικές και καρκινογενετικές τους ιδιότητες.¹³⁰

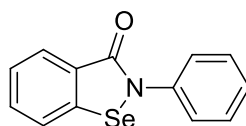
Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ανασταλτική δράση των κινονών οφείλεται στην ομοιοπολική τροποποίηση της θειολικής ομάδας της κυστεΐνης που περιβάλλει το άνοιγμα του ενεργού κέντρου και στην οξειδωση της θειόλης από την κινόνη, γεγονότα που συμβαίνουν ταυτόχρονα και εμποδίζουν το κλείσιμο του πτερυγίου του ενεργού κέντρου, πράγμα απαραίτητο για να πραγματοποιηθεί η κατάλυση (Εικόνα 11).¹⁴⁸



Εικόνα 11. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με *p*-βενζοκινόνη.¹⁹⁶

1.6.2.3 Οργανοσεληνιακοί αναστολείς

Έχουν επίσης σχεδιαστεί και συντεθεί οργανοσεληνιακοί ομοιοπολικοί αναστολείς βακτηριακών ουρεασών, βασισμένοι στο σχηματισμό δεσμού με κάποιο αμινοξύ κυστεΐνης των ουρεασών των HPU και SPU.¹⁹⁷ Η ένωση **93** (ebselen) αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα αυτής της κατηγορίας (Σχήμα 23). Η εκλεκτικότητά της απορρέει τόσο από τη σύμπλεξη των ιόντων Ni²⁺ του ενεργού κέντρου μέσω του καρβονυλίου της όσο και από τη δημιουργία ενός ομοιοπολικού Se-S δεσμού με την κυστεΐνη.



93

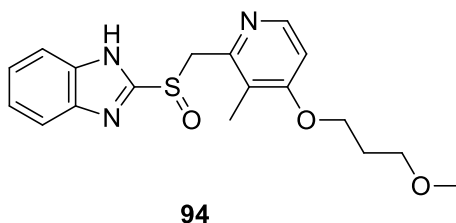
Σχήμα 23. Ebselen.

1.6.2.4 Βενζιμιδαζόλια

Τα βενζιμιδαζόλια συνιστούν μία τάξη χημικών ενώσεων που έχει μελετηθεί ευρέως στη φαρμακολογία ως αναστολείς αντλιών πρωτονίου που αδρανοποιούν μη αντιστρεπτά το ενζυμικό σύστημα της (H⁺, K⁺)-ATPάσης. Εξαιτίας της ισχυρής γαστρικής αντiekκριτικής τους δράσης, τα βενζιμιδαζόλια (ομεπραζόλη **79** και λανσοπραζόλη **81**, Σχήμα 21 και ραμπεπραζόλη **94**, Σχήμα 24) έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία και την πρόληψη του γαστροδωδεκαδακτυλικού και πεπτικού έλκους και της γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης.¹⁹⁸

Μία από τις πρώτες αναφορές που περιγράφουν τη χρήση της ομεπραζόλης και των αναλόγων της για την αναστολή της ουρεάσης δημοσιεύτηκε από τον Kühler και τους συνεργάτες του.¹⁹⁹ Οι ανασταλτικές τους ιδιότητες οφείλονται, όπως περιγράφηκε, στη μορφή του σουλφenaμιδίου που έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με το μεταλλικό κέντρο και τα αμινοξέα κυστεΐνης της ουρεάσης και οδηγεί σε στερεοχημική παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου του ενζύμου.

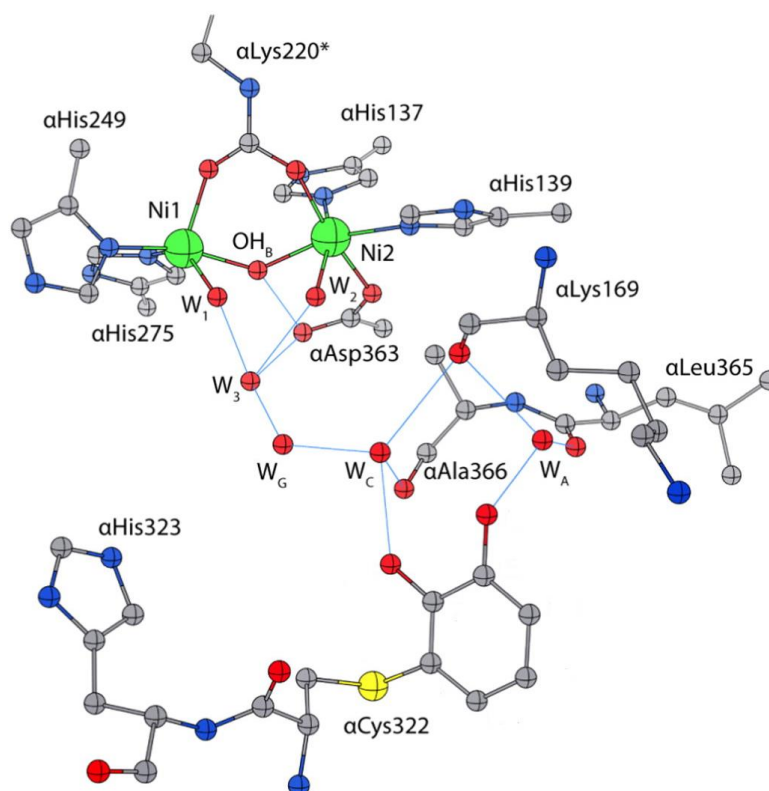
Ο ίδιος τρόπος δράσης προτάθηκε για τη λανσοπραζόλη (**81**, AG-2000) και το ενεργοποιημένο ανάλογό της (**82**, AG-1749) που συντέθηκαν από την Takeda Chemicals. Αναφέρθηκαν σε ένα ιαπωνικό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας ως αναστολείς της ουρεάσης του *H. pylori* με τιμές IC₅₀ 4.6 και 8.0 μM αντίστοιχα.^{200,201} Η ραμπεπραζόλη (ένωση **94**) επίσης επέδειξε ανασταλτική δράση έναντι της ουρεάσης του *H. pylori* (IC₅₀=0.29 μM).²⁰²



Σχήμα 24. Ραμπεπραζόλη.

1.6.2.5 Πολυφαινόλες

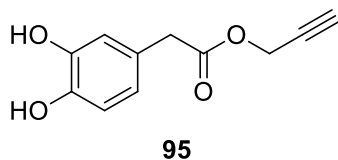
Πρόσφατα, μελετήθηκε από τον Ciurli και τους συνεργάτες²⁰³ του ο μηχανισμός αναστολής της JBU και της SPU από την κατεχόλη, που αποτελεί τμήμα πολλών πολυφαινολικών μορίων.²⁸ Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η κατεχόλη αναστέλλει την ουρεάση μέσω ενός ριζικού μηχανισμού που οδηγεί στο σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού με την Cys^{α322}, που βρίσκεται στο περύγιο που πλαισιώνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου και το καθλώνει στην ανοιχτή διαμόρφωση εμποδίζοντας να πραγματοποιηθεί η κατάλυση (Εικόνα 12). Παρ' όλα αυτά, ο μηχανισμός με τον οποίο οι ενώσεις αυτές ασκούν τις ανασταλτικές τους ιδιότητες απαιτεί ακόμα περαιτέρω έρευνα.



Εικόνα 12. Κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου της SPU συμπλεγμένου με κατεχόλη.²⁰³

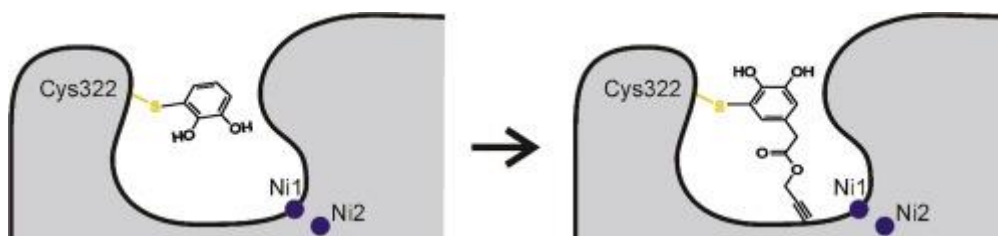
Σε μία πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών από την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και τους συνεργάτες της, συντέθηκαν εστερικά και αμιδικά παράγωγα κατεχόλης και μελετήθηκε η ανασταλτική τους δράση έναντι της

SPU.²⁰⁴ Μεταξύ όλων των παραγώγων, ισχυρότερος αναστολέας αναδείχθηκε ο προπαργυλικός εστέρας **95** με $k_{inact}/K_i=1379 \pm 26 [M^{-1}s^{-1}]$ (Σχήμα 25).



Σχήμα 25. Παράγωγο κατεχόλης ως αναστολέας της SPU.

Όσον αφορά στον τρόπο δέσμευσης της ένωσης **95** από την SPU, δύο είναι τα πιθανά σημεία του δακτυλίου στα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η προσβολή από τη θειολική ομάδα της Cys³²², ωστόσο η θέση αυτή δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια, διότι η αντίδραση σχηματισμού του ομοιοπολικού δεσμού πραγματοποιείται μέσω ριζικού μηχανισμού. Με βάση όμως τη μελέτη του Ciurli και των συνεργατών του,²⁰³ πιθανότερη θεωρείται η προσβολή στη θέση 5 (Εικόνα 13).

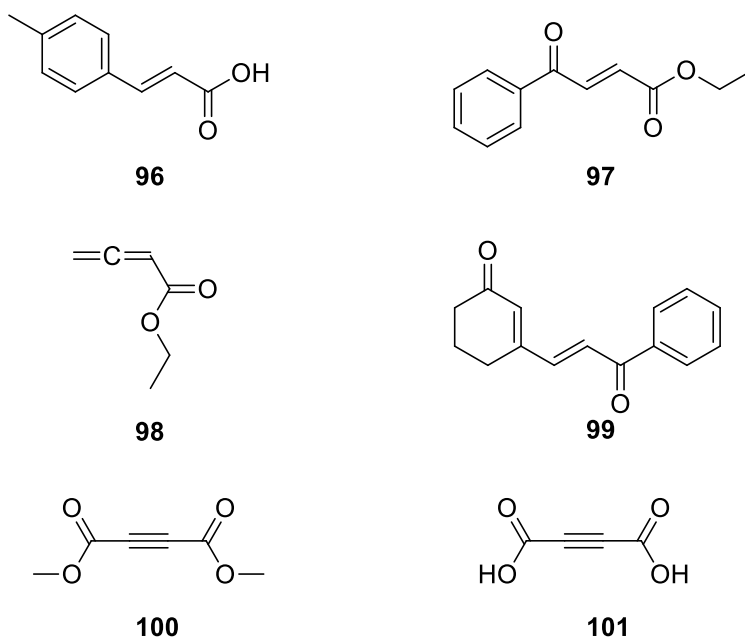


Εικόνα 13. Ομοιοπολική πρόσδεση του αναστολέα **95** στο ενεργό κέντρο της SPU.²⁰⁴

1.6.2.6 Άλλες ενώσεις που σχεδιάστηκαν να αναστέλλουν ομοιοπολικά την ουρεάση

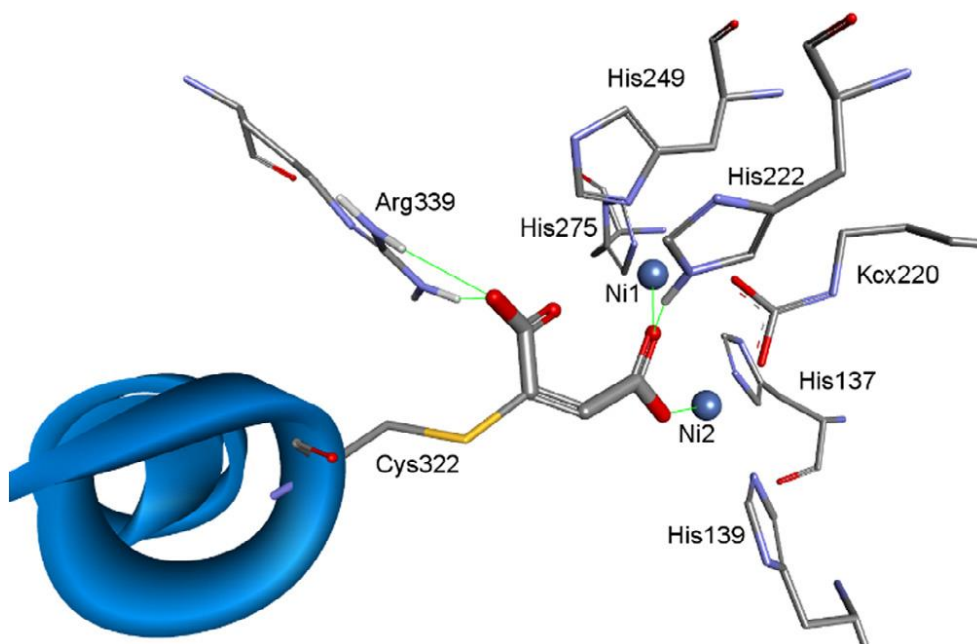
Στην περίπτωση των ομοιοπολικών αναστολέων της ουρεάσης, διάφορα μόρια σχεδιάστηκαν ώστε να φέρουν ομάδες-δέκτες Michael, όπως διπλούς δεσμούς όλων των γεωμετριών, τριπλούς δεσμούς και αλλένια, και έχουν επιδείξει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της SPU.^{144,205} Σε όλες τις περιπτώσεις η δραστηριότητα των διπλών και τριπλών δεσμών ενεργοποιείται μέσω ενός καρβονυλίου (καρβοξυλικά οξέα και οι αντίστοιχοι εστέρες τους και

κετόνες). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις **96-101**, με τις ενώσεις **100** και **101** να είναι οι ισχυρότεροι αναστολείς (Σχήμα 26).



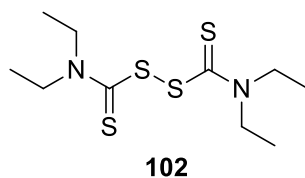
Σχήμα 26. Ομοιοπολικοί αναστολείς της SPU.²⁰⁵

Πειράματα μοριακής μοντελοποίησης έδειξαν ότι η ανασταλτική δράση της ένωσης **101** συνδυάζει τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με την Cys³²², καθώς και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με το μεταλλικό ενεργό κέντρο της SPU (Εικόνα 14).



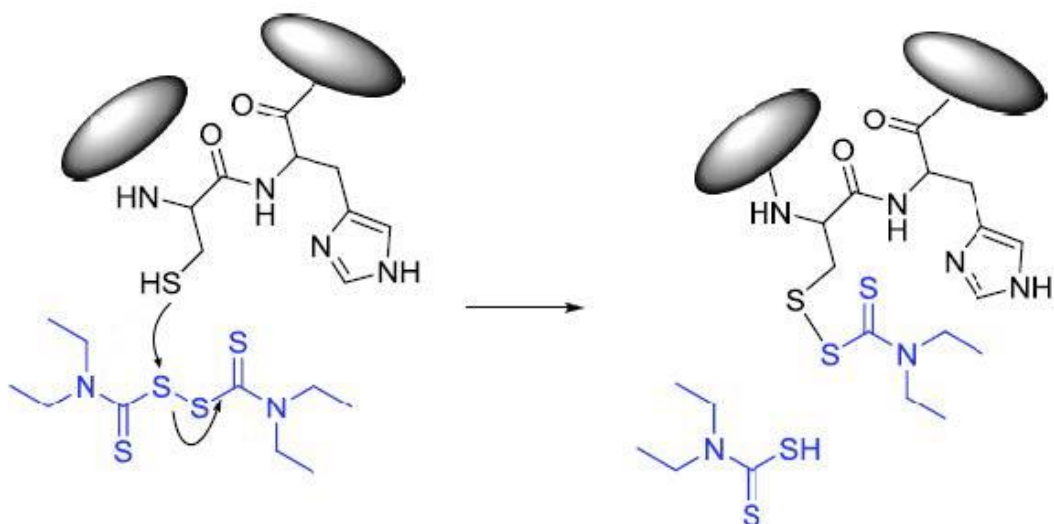
Εικόνα 14. Δομικό μοντέλο του προϊόντος προσθήκης της ένωσης 101 με την SPU.²⁰⁵

Ένα άλλο παράδειγμα ομοιοπολικού αναστολέα της ουρεάσης είναι η δισουλφιράμη (**102**) (Disulfiram, Σχήμα 27), ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στην υποστήριξη της θεραπείας του χρόνιου αλκοολισμού, αναστέλλοντας την αφυδρογονάση της ακεταλδεΐδης.



Σχήμα 27. Δισουλφιράμη.

Κινητικά πειράματα απέδειξαν ότι η ένωση **102** καρβαμυλιώνει την Cys⁵⁹² της φυτικής ουρεάσης *Citrullus vulgaris* με τρόπο παρόμοιο με τη δράση της στην αφυδρογονάση (Εικόνα 15).²⁰⁶



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης της δισουλφιράμης με το ενεργό κέντρο της ουρεάσης.¹⁴⁴

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΔΕΣΜΟΥ P-C

2.1 Εισαγωγή

Η χημεία του φωσφόρου είναι ένας από τους παλαιότερους κλάδους της οργανικής χημείας, με πλούσια παράδοση που μετρά περισσότερα από έναν αιώνες ιστορίας.²⁰⁷ Έχει προσφέρει πολλές γνωστές αντιδράσεις, όπως η αντίδραση Arbuzov, η αντίδραση Michaelis-Becker, η αντίδραση Kabachnik-Fields και η αντίδραση Wittig. Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, από επιβραδυντές καύσης, εκχυλιστικά και συμπλεκτικά αντιδραστήρια μετάλλων, μέχρι αγροχημικά και φάρμακα. Επιπλέον, αποτελούν βασικά συστατικά, αλλά και ενδιάμεσα, που χρησιμοποιούνται στην Οργανική Σύνθεση.

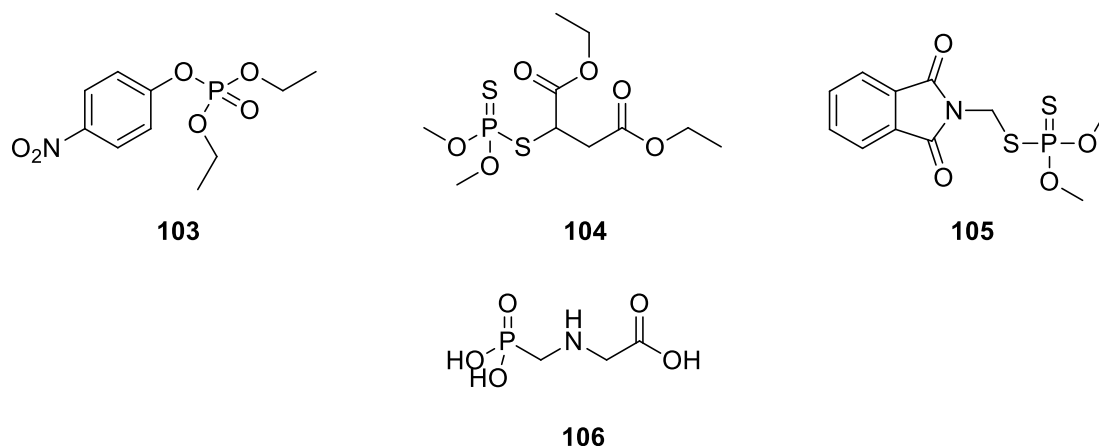
Ο σχηματισμός δεσμού φωσφόρου-άνθρακα παραμένει ένας σημαντικός ερευνητικός τομέας, καθώς αναπτύσσονται συνεχώς νέες αντιδράσεις για τη σύνθεση οργανοφωσφορικών ενώσεων, όπως είναι τα φωσφινικά και φωσφονικά οξέα και οι εστέρες τους.

2.2 Οργανοφωσφορικές ενώσεις

Ο φώσφορος μπορεί να σχηματίσει δεσμούς με πολλά άλλα στοιχεία. Οργανοφωσφορικές ονομάζονται οι χημικές ενώσεις που περιέχουν δεσμούς άνθρακα-φωσφόρου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ενώσεις όπως τα φωσφινικά και φωσφονικά οξέα και οι εστέρες τους, οι φωσφίνες, οι φωσφίτες, τα φωσφινοξείδια και τα οργανοφωσφονικά άλατα.²⁰⁸

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις βρίσκουν ευρεία χρήση σε διάφορους τομείς. Στη γεωργία χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, καθώς και ως ρυθμιστικά για την ανάπτυξη των φυτών (Σχήμα 28).²⁰⁹ Το παραθείο (**103**) ήταν ένα από τα πρώτα παραγόμενα σε βιομηχανική κλίμακα εντομοκτόνα. Υπήρξε πολύ δημοφιλές τη δεκαετία του 1960, πλέον όμως έχει αντικατασταθεί από άλλα περισσότερο ασφαλή για τον άνθρωπο, όπως το μαλαθείο (**104**) και το Phosmet (**105**). Η γλυφοσάτη (**106**) ήταν η πρώτη οργανοφωσφορική ένωση που χρησιμοποιήθηκε ως ζιζανιοκτόνο. Αναστέλλει

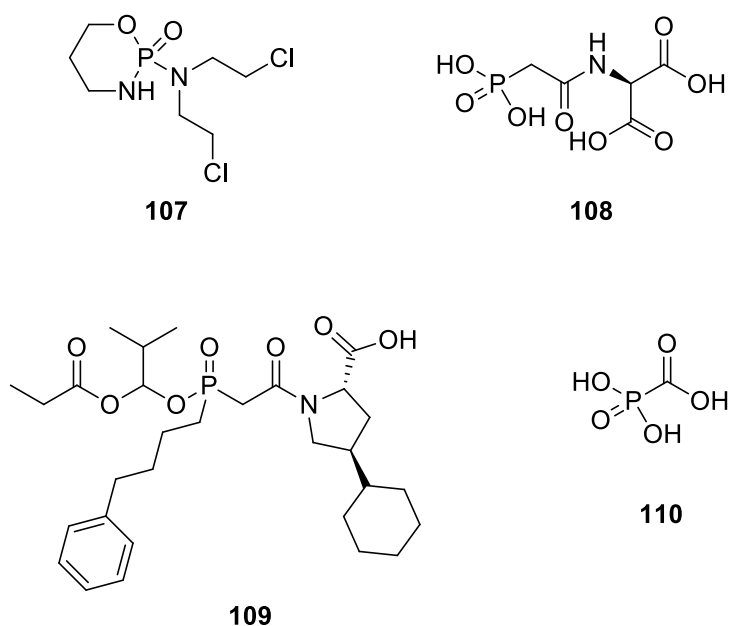
μία συνθετάση των φυτών, η οποία συμμετέχει στη βιοσύνθεση των φυτικών αρωματικών αμινοξέων.



Σχήμα 28. Οργανοφωσφορικές ενώσεις γεωργικού ενδιαφέροντος.

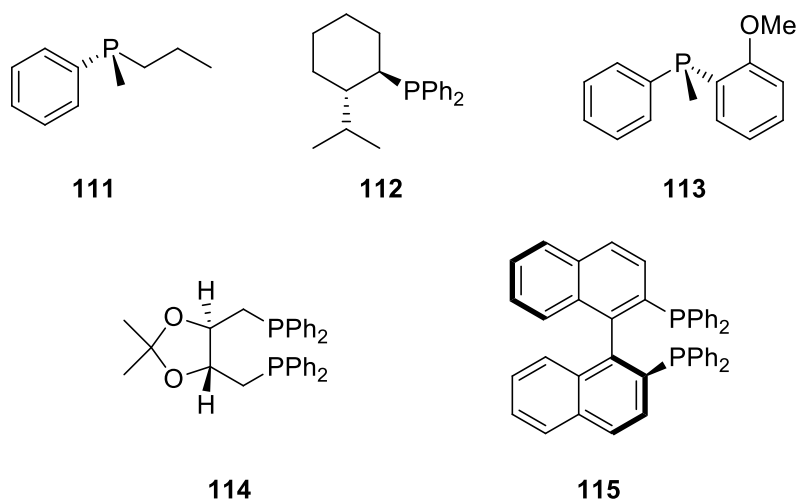
Το 1969 ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά οργανοφωσφορική ένωση φυσικής προέλευσης.^{210,211} Από τα προϊόντα της ζύμωσης μιας καλλιέργειας βακτηρίων *Streptomyces fradiae* απομονώθηκε ένα νέο φωσφορικό οξύ με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Η ένωση αυτή ονομάστηκε φωσφομυκίνη (**78**, Σχήμα 21) και η ανακάλυψή της έδωσε ώθηση στην έρευνα για νέες οργανοφωσφορικές φαρμακευτικές ενώσεις.

Υψηλή αντικαρκινική δραστηριότητα έχει βρεθεί για έναν μεγάλο αριθμό οργανοφωσφορικών ενώσεων. Η πρώτη ίσως ένωση που έλαβε αναγνώριση ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας είναι η κυκλοφωσφαμίδη (**107**), που ανακαλύφθηκε το 1958.^{210,212} Επιπλέον, έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί αρκετά φωσφορικά οξέα με ποικίλες φαρμακευτικές χρήσεις. Το *N*-(φωσφονοακετυλο)-*L*-ασπαρτικό οξύ (PALA, **108**) χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό φάρμακο, ενώ η φοσινοπρίλη (**109**) έχει αντιυπερτασικές ιδιότητες. Η φοσκαρνέτη (**110**) έχει αντιικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται στη θεραπεία του ερπητοϊού και του HIV (Σχήμα 29).²¹⁰



Σχήμα 29. Οργανοφωσφορικές φαρμακευτικές ενώσεις.

Η χρήση των οργανοφωσφορικών ενώσεων στην οργανοκατάλυση έχει αναπτυχθεί ραγδαία, τόσο στην εργαστηριακή σύνθεση, όσο και στη βιομηχανική παραγωγή. Μεταξύ πολλών διαφορετικών εναντιομερικών καθαρών υποκαταστατών, οι χειρόμορφες τεταρτοταγείς φωσφίνες έχουν καθιερωθεί στις περισσότερες ασύμμετρες αντιδράσεις ομογενούς κατάλυσης.²¹³⁻²¹⁵ Μερικοί χειρόμορφοι υποκαταστάτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές ασύμμετρες αντιδράσεις υδρογόνωσης καταλυόμενες από μέταλλα μετάπτωσης είναι οι ενώσεις **111-115** (Σχήμα 30).



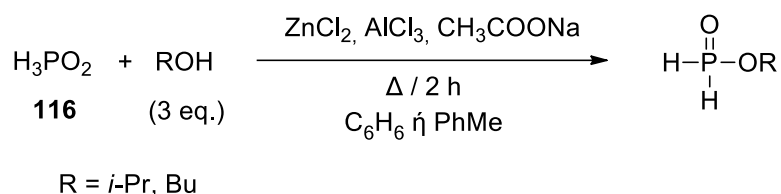
Σχήμα 30. Οργανοφωσφορικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην ασύμμετρη κατάλυση.

2.3 Σύνθεση φωσφινικών παραγώγων

Τα φωσφινικά παράγωγα (φωσφινικά οξέα, *H*-φωσφινικά οξέα και φωσφινικοί εστέρες) αποτελούν ενδιαφέρουσες πρώτες ύλες και ενδιάμεσα στην οργανική σύνθεση, καθώς μπορούν να μετατραπούν σε μία ποικιλία άλλων οργανοφωσφορικών ενώσεων. Μερικές χαρακτηριστικές αντιδράσεις σύνθεσής τους παρουσιάζονται στη συνέχεια.

2.3.1 Άμεση εστεροποίηση με αλκοόλες

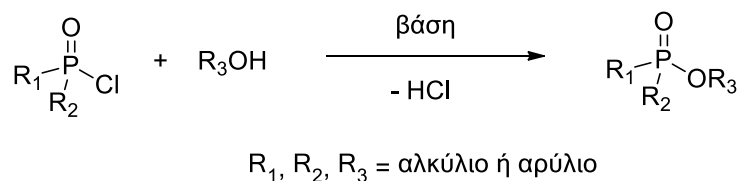
Διάφορα παραδείγματα στη βιβλιογραφία αναφέρουν την άμεση εστεροποίηση αλκοολών για τη σύνθεση φωσφινικών οξέων. Ένα από αυτά αναφέρθηκε από τον Nifant'ev και αφορά στην άμεση εστεροποίηση υποφωσφορώδους οξέος (**116**) παρουσία όξινων καταλυτών, με αζεοτροπική απομάκρυνση του νερού σε διαλύτη βενζόλιο ή τολουόλιο (Σχήμα 31).²¹⁶



Σχήμα 31. Άμεση εστεροποίηση από αλκοόλες.

2.3.2 Εστεροποίηση χλωριδίων φωσφινικών οξέων με αλκοόλες

Μία συνηθισμένη αντίδραση σύνθεσης φωσφινικών εστέρων είναι η εστεροποίηση χλωριδίων φωσφινικών οξέων με αλκοόλες (Σχήμα 32).²¹⁰ Τα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η χρήση συνήθως αρωματικών διαλυτών και ο σχηματισμός υδροχλωρικού οξέος. Παρ' όλα αυτά όμως χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της εφαρμοσιμότητάς της. Ως βάσεις χρησιμοποιούνται τριτοταγείς αμίνες. Οι αποδόσεις της αντίδρασης ποικίλουν (27%-85%).

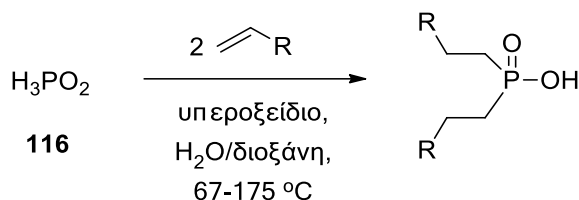


Σχήμα 32. Εστεροποίηση χλωριδίων φωσφινικών οξέων με αλκοόλες.

2.3.3 Υδροφωσφινυλίωση αλκενίων μέσω ριζικού μηχανισμού

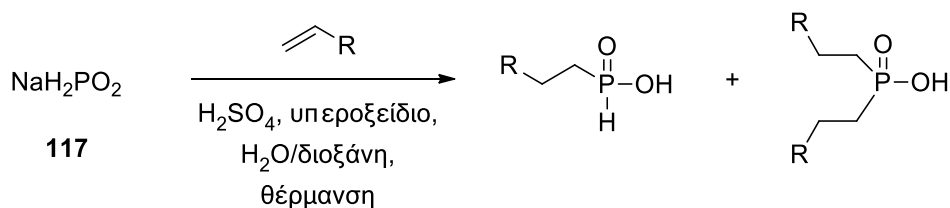
Η χρήση αντιδράσεων που χωρούν μέσω ριζικού μηχανισμού για τον σχηματισμό δεσμού P-C είναι διαδεδομένη εδώ και δεκαετίες. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι το H_3PO_2 (**116**) αντιδρά με αλκένια υπό την επίδραση ριζικών εκκινητών.

Το 1955 οι Williams και Hamilton μελέτησαν πρώτοι την αντίδραση του 50% υδατικού διαλύματος H_3PO_2 με αλκένια (Σχήμα 33). Ωστόσο, ο Nifant'ev και οι συνεργάτες του ήταν αυτοί που ανέπτυξαν συνθετικά τη συγκεκριμένη αντίδραση, με αποτέλεσμα να έχει εξελιχθεί σήμερα σε μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους για τη σύνθεση φωσφινικών οξέων.²¹⁷



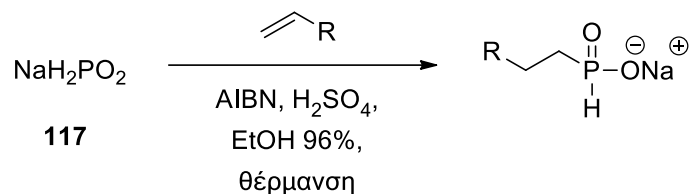
Σχήμα 33. Η αντίδραση υδροφωσφινυλίωσης αλκενίων από τους Williams και Hamilton.

Παρ' όλα αυτά, οι συνθήκες της αντίδρασης αυτής δεν ήταν συμβατές με πολλές λειτουργικές ομάδες, εξαιτίας της ισχυρά όξινης φύσης του αντιδραστήριου. Έτσι, προτάθηκε από τον Nifant'ev η χρήση μιας ουδέτερης πηγής ριζών φωσφόρου, όπως το NaH_2PO_2 (**117**, Σχήμα 34). Η παραλλαγή αυτή έδινε ικανοποιητικές αποδόσεις, ωστόσο απαιτούνταν πολύ υψηλές θερμοκρασίες (130-150 °C), αυτόκλειστο σκεύος, καθώς το NaH_2PO_2 είναι διαλυτό μόνο σε νερό ή χαμηλού σημείου ζέσεως αλκοόλες, και τέλος πολλαπλές προσθήκες εκκινητών υπεροξειδίων. Για να παρακαμφθούν οι δυσκολίες αυτές ο Nifant'ev πρότεινε την *in situ* παραγωγή H_3PO_2 από NaH_2PO_2 και H_2SO_4 .



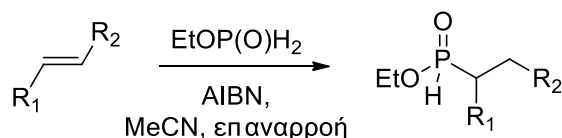
Σχήμα 34. Παραλλαγή της ριζικής υδροφωσφινυλίωσης αλκενίων από τον Nifant'ev.

Περαιτέρω τροποποίηση της αντίδρασης αυτής πραγματοποιήθηκε το 1988 από τον Karanewsky ο οποίος πρότεινε τη χρήση του 2,2'-αζω-διισοβουτυλονιτριλίου (AIBN) ως ριζικού εκκινητή, με την αντίδραση να λαμβάνει χώρα σε αιθανόλη υπό αναρροή (Σχήμα 35).²¹⁸



Σχήμα 35. Παραλλαγή Karanewsky με χρήση του AIBN ως εκκινητή ριζών.

Μια άλλη αντίδραση υδροφωσφινυλίωσης που χρησιμοποιεί το AIBN ως ριζικό εκκινητή παρουσιάστηκε από τον Antczak και τους συνεργάτες του το 2006, οι οποίοι μελέτησαν την αντίδραση των φωσφινικών εστέρων και κυρίως των φωσφινικών αιθυλεστέρων με αλκένια παρουσία θερμικών συνθηκών (Σχήμα 36). Μάλιστα, χρησιμοποίησαν ποικίλα αλκένια ως υποστρώματα, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται μέτριες έως ικανοποιητικές αποδόσεις του επιθυμητού προϊόντος.²¹⁹

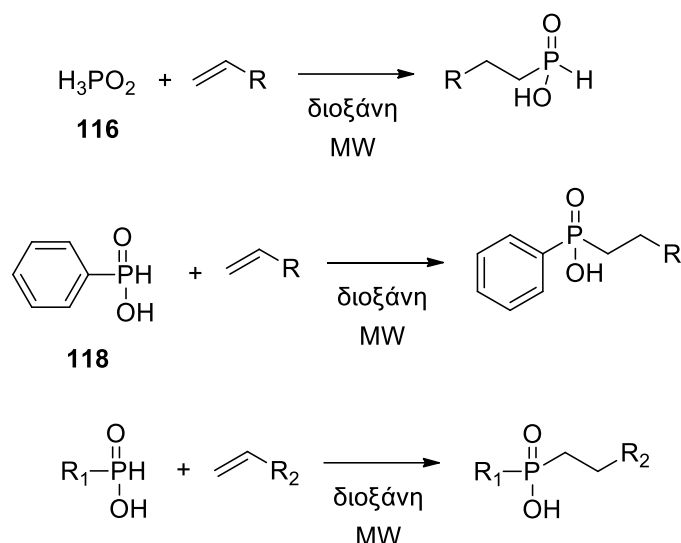


Σχήμα 36. Γενική αντίδραση προσθήκης φωσφινικών αιθυλεστέρων σε αλκένια με χρήση AIBN.

2.3.4 Υδροφωσφινυλίωση μη ενεργοποιημένων αλκενίων με τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας

Η χρήση της μικροκυματικής ακτινοβολίας στην οργανική σύνθεση έχει βρει μεγάλη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια λόγω της συμβατότητάς της με τις αρχές της Πράσινης Χημείας. Πρόσφατα, η Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου και οι συνεργάτες της ανέπτυξαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών μία μεθοδολογία για την υδροφωσφινυλίωση μη ενεργοποιημένων αλκενίων με τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας απουσία ριζικών εκκινητών.²²⁰ Ως πηγή

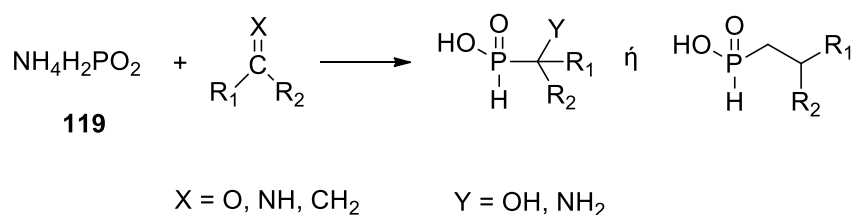
φωσφόρου χρησιμοποιείται 50% υδατικό υποφωσφορώδες οξύ (**116**), φαινυλοφωσφινικό οξύ (**118**), καθώς και *H*-φωσφινικά οξέα (Σχήμα 37). Η διοξάνη βρέθηκε ως ο βέλτιστος διαλύτης για την αντίδραση.



Σχήμα 37. Υδροφωσφινυλίωση μη ενεργοποιημένων αλκενίων με τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας.

2.3.5 Αντίδραση Pudovik

Η αντίδραση Pudovik είναι μία από τις πιο ευέλικτες μεθόδους δημιουργίας δεσμού P-C και περιλαμβάνει την προσθήκη ενώσεων που περιέχουν έναν ασταθή δεσμό P-H (π.χ. υποφωσφορώδες αμμώνιο, **119**) σε ένα ακόρεστο σύστημα (αλκένιο, αλκύνιο, καρβονύλιο, ιμίνη, Σχήμα 38).²²¹



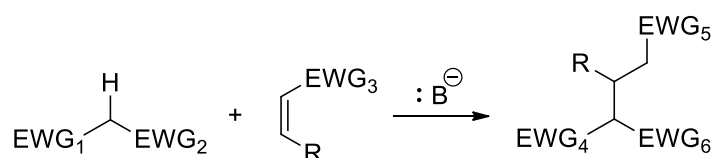
Σχήμα 38. Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών οξέων μέσω αντίδρασης Pudovik.

Η αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα είτε μέσω ιοντικού είτε μέσω ριζικού μηχανισμού. Το ποιος από τους δύο μηχανισμούς θα ακολουθηθεί εξαρτάται από τη φύση του ακόρεστου υποστρώματος. Όταν η ακόρεστη ένωση φέρει έναν ηλεκτρονιοελκτικό υποκαταστάτη προτιμάται ο πολικός μηχανισμός.

Αντίθετα, όταν το ακόρεστο υπόστρωμα έχει πυρηνόφιλο χαρακτήρα ο μηχανισμός που ακολουθείται είναι ριζικός.²²²

2.3.6 Αντίδραση P-Michael

Η συζυγής προσθήκη ενός πυρηνόφιλου ενολικού ιόντος στο β-άνθρακα μιας α,β-ακόρεστης καρβονυλο-ένωσης είναι μια αντίδραση γνωστή ως αντίδραση Michael (Σχήμα 39). Η αντίδραση Michael πραγματοποιείται με μια μεγάλη ποικιλία α,β-ακόρεστων καρβονυλο-ενώσεων, όπως συζυγιακές αλδεΐδες, εστέρες, κετόνες, νιτρίλια, αμίδια και νιτρο-ενώσεις (δέκτες Michael). Ως δότες Michael μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποικιλία ενώσεων, όπως β-δικετόνες, β-κετοεστέρες, μηλονικοί εστέρες, β-κετονιτρίλια και νιτροενώσεις.



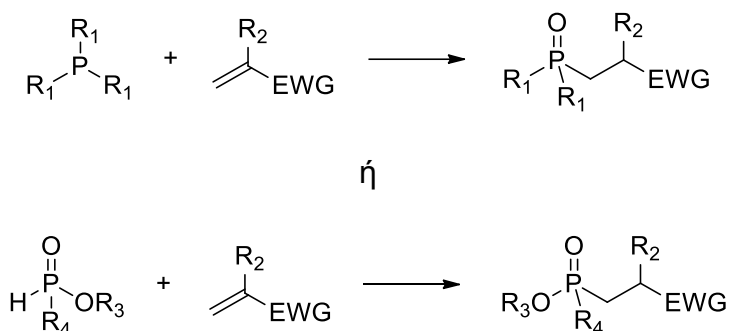
EWG = RCO, RCO₂, CN, NO₂, CONR₂

R = H, αλκύλιο, αρύλιο

B = βάση ως καταλύτης

Σχήμα 39. Γενικό σχήμα της αντίδρασης Michael.

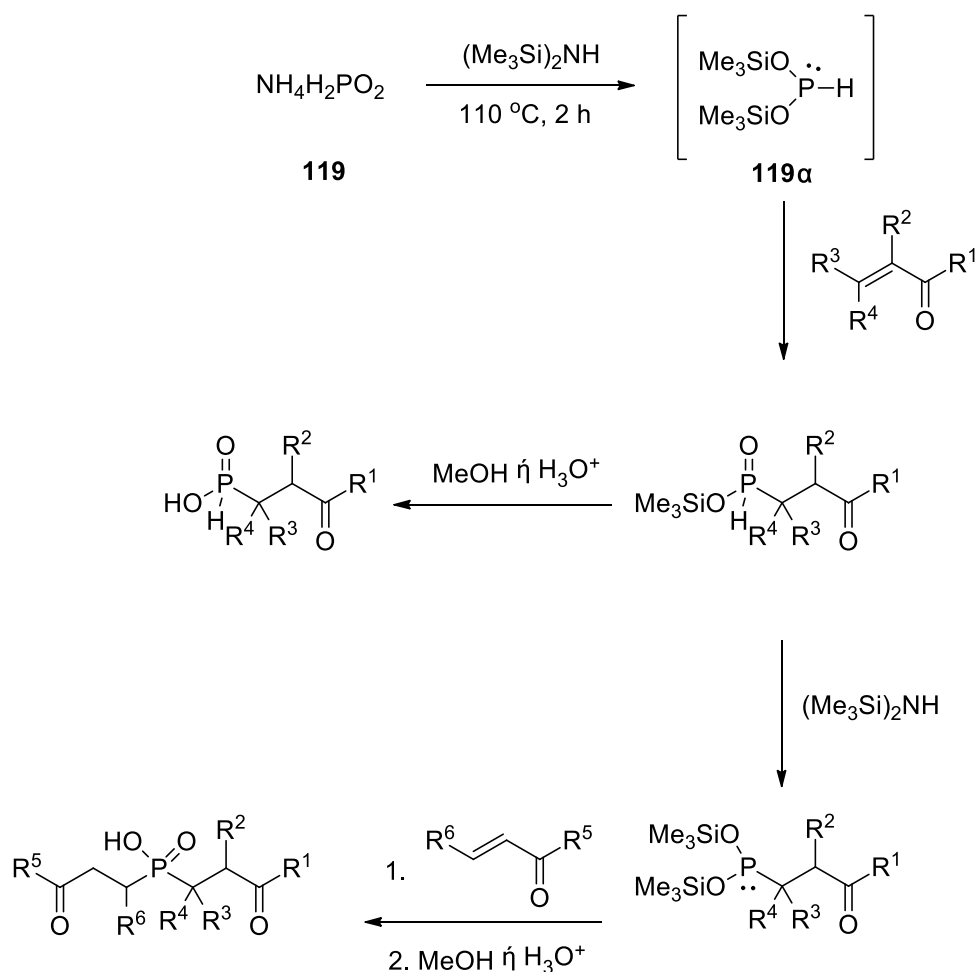
Αντίστοιχα, η συζυγής προσθήκη μιας πυρηνόφιλης οργανοφωσφορικής ένωσης σε ενεργοποιημένα αλκένια και αλκύνια καλείται αντίδραση Phospha-Michael (Σχήμα 40).²²³



R_1 = H, αρύλιο, αλκύλιο, αλκοξυ
 R_2 = H, αλκύλιο, αρύλιο
 R_3 = H, αλκύλιο
 R_4 = αλκύλιο, αρύλιο, αλκοξυ
 EWG = RCO, RCO₂, CN, NO₂, CONR₂

Σχήμα 40. Γενικό σχήμα της αντίδρασης P-Michael.

Η σύνθεση φωσφινικών οξέων μέσω μιας αντίδρασης προσθήκης P-Michael πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Σχήμα 41). Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την *in situ* μετατροπή του υποφωσφορώδους αμμωνίου **119** σε δις(τριμεθυλοσιλυλο)φωσφονίτη (BTSP) **119α**, με τη χρήση ενός σιλυλιωτικού μέσου, το οποίο «κλειδώνει» τον φώσφορο στην τρισθενή του μορφή. Η σιλυλίωση μπορεί να επιτευχθεί με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) και θέρμανση στους 110 °C, με χρήση του N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλο)ακεταμιδίου (BSA) ή με τριμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο (TMSCl) παρουσία μιας τριτοταγούς αμίνης (π.χ. τριαιθυλαμίνη Et₃N, N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη DIPEA). Στη συνέχεια, στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, ο φώσφορος με το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων που διαθέτει αποτελεί το προσβάλλον πυρηνόφιλο και μπορεί να αντιδράσει τόσο με άκυκλες όσο και κυκλικές α,β-ακόρεστες καρβονυλο-ενώσεις παρέχοντας ενδιάμεσους φωσφινικούς σιλυλεστέρες. Τελικά, με προσθήκη MeOH ή υδατικού HCl για τη διάσπαση των σιλυλεστέρων παραλαμβάνονται γ-κετο-υποκατεστημένα φωσφινικά οξέα σε ικανοποιητικές έως και εξαιρετικές αποδόσεις. Είναι δυνατό να διεξαχθεί και δεύτερη προσθήκη Michael στο φωσφινικό οξύ παρέχοντας διυποκατεστημένα φωσφινικά οξέα μέσω ενός διπλά σιλυλιωμένου ενδιάμεσου εστέρα.



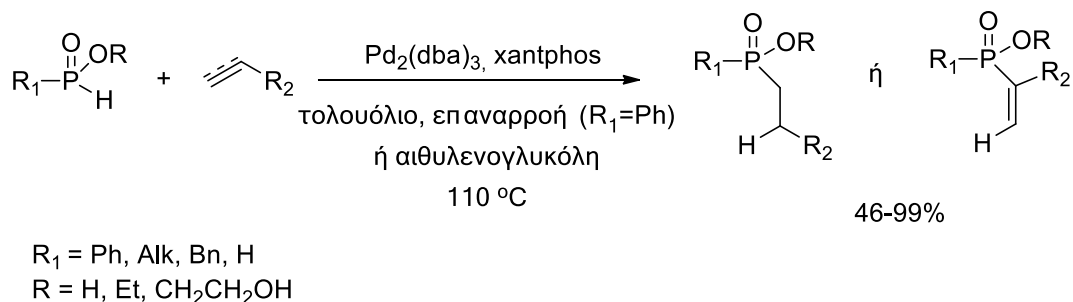
Σχήμα 41. Γενικό σχήμα σύνθεσης φωσφινικών οξέων μέσω της αντίδρασης *P*-Michael.

2.3.7 Υδροφωσφινυλίωση αλκενίων και αλκυνίων καταλυόμενη από μέταλλα

Η προσθήκη φωσφινικών εστέρων σε ακόρεστους υδρογονάνθρακες αποτελεί ίσως την πιο σημαντική αντίδραση σύνθεσης οργανοφωσφορικών ενώσεων. Η καταλυόμενη από μέταλλα αντίδραση υδροφωσφινυλίωσης έχει ευρύ φάσμα εφαρμογής και δουλεύει ακόμα και με το εμπορικής διαθέσιμο υδατικό διάλυμα H_3PO_2 (**116**). Ο στερεοεκλεκτικός έλεγχος της αντίδρασης επιτυγχάνεται με την επιλογή του κατάλληλου προσδέτη και διαλύτη.

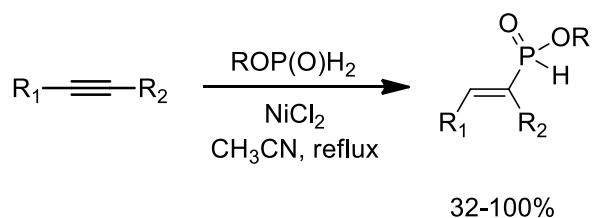
Η καταλυόμενη από παλλάδιο (Pd) αντίδραση *H*-φωσφινικών εστέρων με ακόρεστες ενώσεις πραγματοποιείται πιο δύσκολα συγκριτικά με την αντίστοιχη αντίδραση με H_3PO_2 . Έχει ωστόσο αποδειχθεί ότι η καταλυόμενη από $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ αντίδραση προσθήκης *H*-φωσφινικών οξέων παρουσία

προσδέτη χαντphos πραγματοποιείται τόσο σε αλκένια όσο και σε αλκύνια χρησιμοποιώντας αιθυλενογλυκόλη ως πρόσθετο (Σχήμα 42).²²⁴ Στην περίπτωση των ακραίων αλκυνίων επικρατεί το προϊόν της κατά Markovnikov προσθήκης, ενώ διυποκατεστημένα αλκύνια παρέχουν αποκλειστικά προϊόντα *E*-στεreoχημείας.

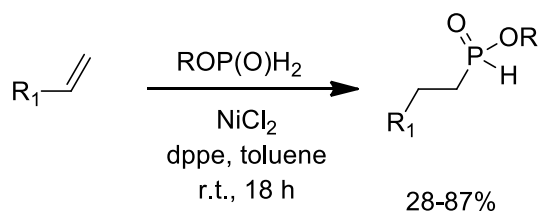


Σχήμα 42. Υδροφωσφινιλίωση ακόρεστων ενώσεων καταλυόμενη από Pd.

Παρόλο που η κατάλυση με Pd προσφέρει πολλές ευκαιρίες στη σύνθεση φωσφινικών εστέρων και έχουν αναφερθεί πολλά παραδείγματα αντιδράσεων όπου χρησιμοποιείται χαμηλό καταλυτικό φορτίο ή και επαναχρησιμοποιούμενοι καταλύτες, η ανάγκη για φθηνότερες αντιδράσεις οδήγησε στη χρήση καταλυτών Ni (Σχήμα 43).²²⁵



R=Me, Et, Bu



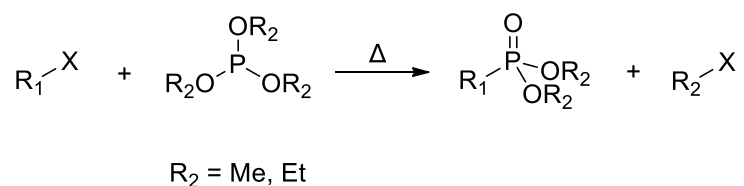
Σχήμα 43. Υδροφωσφινιλίωση ακόρεστων ενώσεων καταλυόμενη από Ni.

2.4 Σύνθεση φωσφονικών παραγώγων

Ενώσεις που φέρουν τη λειτουργική ομάδα του φωσφονικού οξέος εμπλέκονται σε μία πληθώρα εφαρμογών. Στη φύση, ένας μεγάλος αριθμός μορίων, που έχει ενσωματώσει την ομάδα του φωσφονικού οξέος, συμμετέχει σε διάφορες βιολογικές λειτουργίες. Τα φωσφονικά οξέα είναι βιοδραστικά μόρια και χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικοί παράγοντες (φάρμακα και προφάρμακα), στο σχεδιασμό υπερμοριακών και υβριδικών υλικών, ως επιφανειοδραστικά υλικά, σε αναλυτικές τεχνικές και στην ακτινοδιαγνωστική. Από την πλευρά της συνθετικής οργανικής χημείας, έχει δημοσιευθεί ένα ευρύ φάσμα μεθοδολογιών για την εισαγωγή της φωσφονικής ομάδας (φωσφονικά οξέα και φωσφονικοί εστέρες) ήδη από το 1898. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα αντιδράσεων αναφέρονται στη συνέχεια.²⁰⁸

2.4.1 Αντίδραση Arbuzov

Η αντίδραση Arbuzov ανακαλύφθηκε το 1898, ωστόσο χρησιμοποιείται έως και σήμερα λόγω της απλότητας της (Σχήμα 44). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ ενός πυρηνόφιλου φωσφίτη και ενός ηλεκτρονιόφιλου αλκυλαλογονιδίου σε υψηλές θερμοκρασίες (135-150 °C) για να δώσει τον αντίστοιχο διαλκυλο-φωσφονικό εστέρα σε μέτριες έως υψηλές αποδόσεις (50-95%).²²⁶

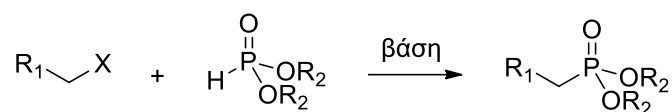


Σχήμα 44. Γενικό σχήμα της αντίδρασης Arbuzov.

Τα αλκυλαλογονίδια μπορούν να είναι τόσο κορεσμένα όσο και ενεργοποιημένα. Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες που απαιτεί, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει άλλες ευαίσθητες λειτουργικές και προστατευτικές ομάδες που φέρουν τα υποστρώματα.²²⁷

2.4.2 Αντίδραση Michaelis-Becker

Η αντίδραση Michaelis-Becker είναι παρόμοιας λογικής με την αντίδραση Arbuzov. Παρ' όλα αυτά, το πυρηνόφιλο αντί για τριαλκυλο-φωσφίτης είναι ένας διαλκυλο-φωσφονικός εστέρας που χρησιμοποιείται παρουσία μιας βάσης (Σχήμα 45). Η πιο συνηθισμένη βάση που χρησιμοποιείται είναι το NaH, η οποία αποπρωτονιώνει το φωσφονικό εστέρα, διευκολύνοντας έτσι την πυρηνόφιλη προσβολή στο αλκυλαλογονίδιο μέσω μιας S_N2 αντίδρασης.²²⁸



R₂ = Me, Et, *t*-Bu

X = αποχωρούσα ομάδα

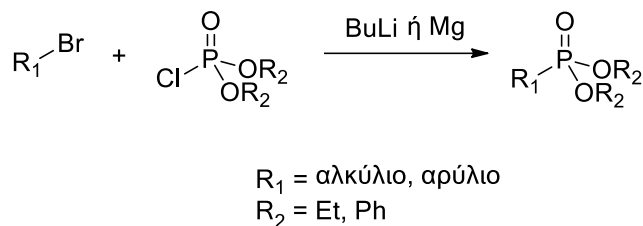
Σχήμα 45. Γενικό σχήμα της αντίδρασης Michaelis-Becker.

Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι το γεγονός ότι η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, γεγονός που την καθιστά συμβατή με θερμικά ευαίσθητα υποστρώματα. Η επιλογή του υποστρώματος περιορίζεται μόνο από τη χρήση της ισχυρής βάσης.

2.4.3 Σύνθεση φωσφονικών εστέρων μέσω αντίδρασης ανταλλαγής μετάλλου-αλογόνου ή αντιδραστήριων Grignard

Η ομάδα του διαλκυλο-φωσφονικού εστέρα μπορεί να εισαχθεί σε μόρια με τη δημιουργία ενός πυρηνόφιλου άνθρακα μέσω μιας αντίδρασης ανταλλαγής μετάλλου-αλογόνου (Σχήμα 46). Ο πυρηνόφιλος άνθρακας μπορεί να αντιδράσει με τον ηλεκτρονιόφιλο διαλκυλο-χλωροφωσφονικό εστέρα. Η ανταλλαγή μετάλλου-αλογόνου πραγματοποιείται παρουσία ισχυρής βάσης, όπως το *n*-BuLi ή το *t*-BuLi στους -78 °C.

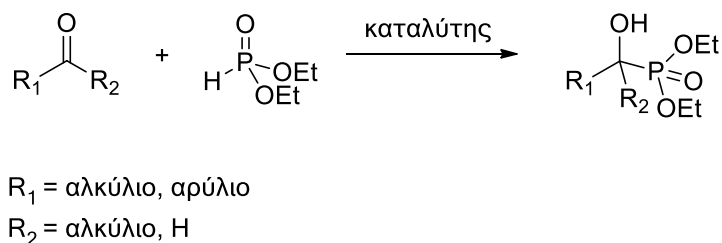
Εναλλακτικά, τα αντιδραστήρια Grignard μπορούν να σχηματιστούν μέσω οξειδωτικής προσθήκης του Mg στο δεσμό άνθρακα-αλογόνου σε θερμοκρασία δωματίου.^{229,230}



Σχήμα 46. Εισαγωγή διαλκυλο-φωσφονικής ομάδας μέσω ανταλλαγής μετάλλου-αλογόνου ή αντιδραστηρίου Grignard.

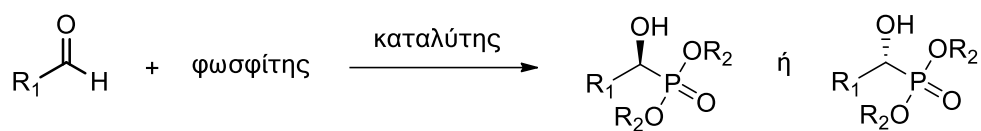
2.4.4 Εισαγωγή φωσφονικής ομάδας μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης σε καρβονυλικές ενώσεις

Ενώσεις που φέρουν α-υδροξυ-φωσφονική ομάδα μπορούν να συντεθούν μέσω μιας καρβονυλικής ένωσης και ενός φωσφίτη παρουσία καταλύτη (Σχήμα 47). Μία μέθοδος χρησιμοποιεί καταλυτική ποσότητα MoO_2Cl_2 , απουσία διαλύτη, δίνοντας ικανοποιητικές έως και υψηλές αποδόσεις.²³¹ Μία άλλη μέθοδος χρησιμοποιεί ως καταλύτη το αμίδιο $[(TMS)_2N]_3Ln(\mu-Cl)Li(THF)_3$, που δρα εξαιρετικά σε περιπτώσεις υδροφωσφονίωσης αρωματικών αλδευδών, ανεξαρτήτως ηλεκτρονικών ή στερεοχημικών αλληλεπιδράσεων του υποστρώματος.²³²



Σχήμα 47. Γενικό σχήμα της αντίδρασης σύνθεσης α-υδροξυφωσφονικών εστέρων από καρβονυλικές ενώσεις.

Τα τελευταία χρόνια, παράλληλα με τις παραπάνω μεθοδολογίες, έχουν αναπτυχθεί καταλύτες για την εναντιοεκλεκτική σύνθεση α-υδροξυφωσφονικών εστέρων (Σχήμα 48).



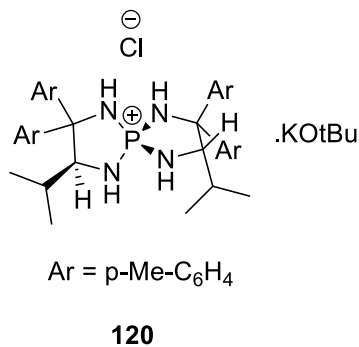
φωσφίτης = P(OEt)₃, HPO(OMe)₂, HPO(OCH₂CF₃)₂

R₁ = αρύλιο

R₂ = αλκύλιο

Σχήμα 48. Εναντιοεκλεκτική σύνθεση α-υδροξυφωσφονικών εστέρων.

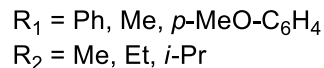
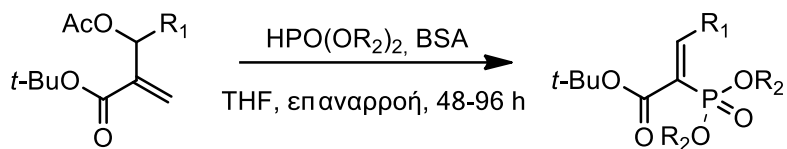
Από αυτούς, ο πιο αποτελεσματικός έχει αποδειχθεί η ένωση **120** (CAT 2, Σχήμα 49). Πρόκειται για ένα χειρόμορφο φωσφονιακό άλας που δίνει αποδόσεις άνω του 98% και εξαιρετικές στερεοεκλεκτικότητες (94-98% ee). Ο καταλύτης αυτός είναι συμβατός με α,β-ακόρεστες, καθώς και με αλειφατικές αλδεΐδες.²³³



Σχήμα 49. Ο καταλύτης CAT 2.

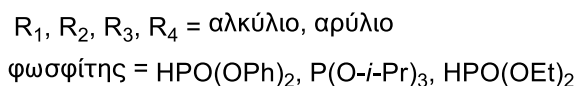
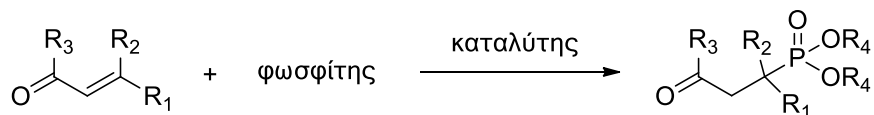
2.4.5 Αντίδραση με α,β-ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις

Η αντίδραση αλλυλικής υποκατάστασης ενός φωσφίτη σε μία ενόνη αποτελεί μία ακόμα στρατηγική για τη σύνθεση ενώσεων που περιλαμβάνουν ένα τμήμα β-καρβονυλοφωσφονικού οξέος.^{234,235} Μία μέθοδος που έχει αναφερθεί (Σχήμα 50) χρησιμοποιεί παράγωγα της αντίδρασης Morita-Baylis-Hillman, N,O-δισ(τριμεθυλοσιλυλο)ακεταμίδιο (BSA) και τον κατάλληλο φωσφίτη για τη σύνθεση ακόρεστων β-καρβονυλοφωσφονικών εστέρων, κυρίως Z-στερεοχημείας, σε σχετικά καλές αποδόσεις (56-85%). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF) υπό αναρροή.²³⁶



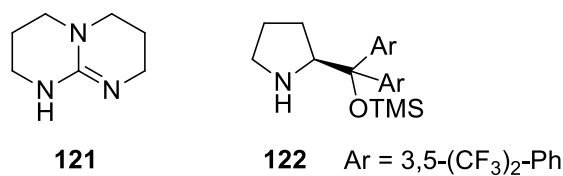
Σχήμα 50. Εισαγωγή της ομάδας του φωσφονικού εστέρα μέσω αντίδρασης αλληλικής υποκατάστασης σε υποστρώματα με αποχωρούσα ομάδα σε β'-θέση.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν επίσης αναπτυχθεί καταλυτικές μεθοδολογίες για την 1,4-προσθήκη φωσφονικής ομάδας (Σχήμα 51).²³⁴



Σχήμα 51. Γενικό σχήμα της καταλυτικής 1,4-προσθήκης διαλκυλο-φωσφονικών εστέρων.

Παραδείγματα καταλυτών που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις 1,4-προσθήκης είναι οι ενώσεις **121** και **122** (Σχήμα 52).^{234,235}



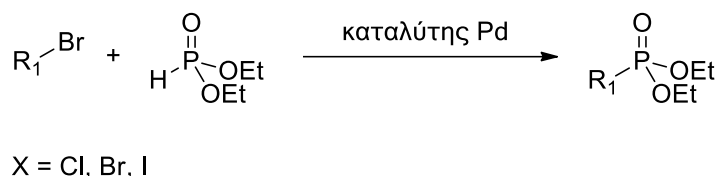
Σχήμα 52. Καταλύτες για την 1,4-προσθήκη σε α,β-ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις.

2.4.6 Αντιδράσεις εισαγωγής φωσφονικής ομάδας καταλυόμενες από μέταλλα μετάπτωσης

2.4.6.1 Εισαγωγή σε sp^3 άτομο άνθρακα

2.4.6.1.2 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd

Μία άλλη προσέγγιση για την εισαγωγή της ομάδας του διαλκυλοφωσφονικού εστέρα σε βενζυλαλογονίδια είναι οι καταλυόμενες από Pd(0) αντιδράσεις.²³⁷ Ο καταλύτης με τη μεγαλύτερη επαναληψιμότητα ως προς τα αποτελέσματα είναι ο $[Pd_2(dba)_3(CHCl_3)]$, ο οποίος χρησιμοποιείται μαζί με τον προσδέτη Χαντρηος και DIPEA ως βάση (Σχήμα 53).^{237,238}



Σχήμα 53. Καταλυόμενη από Pd αντίδραση μεταξύ βενζυλαλογονιδίων και διαιθυλοφωσφονικού εστέρα.

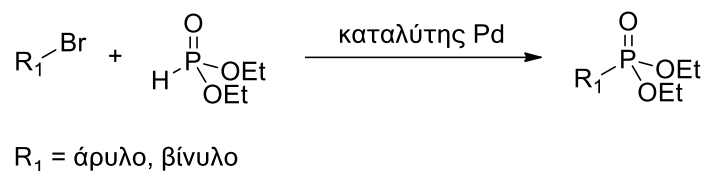
Η μεθοδολογία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα βενζυλαλογονίδια, ενεργοποιημένα ή μη, και δίνει προϊόντα σε υψηλές αποδόσεις (86-99%). Επιπλέον, η αντίδραση είναι χημειοεκλεκτική. Αντιδρά μόνο το βενζυλαλογονίδιο χωρίς να επηρεάζονται άλλα τυχόν παρόντα αρυλαλογονίδια.²³⁷

2.4.6.2 Εισαγωγή σε sp^2 άτομο άνθρακα με διατήρηση του υβριδισμού

2.4.6.2.1 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd

Το πρώτο παράδειγμα αντίδρασης μεταξύ ενός αρυλαλογονιδίου και ενός *H*-φωσφονικού διεστέρα δημοσιεύτηκε από τον Hiraο και τους συνεργάτες του στις αρχές του 1980, χρησιμοποιώντας ως καταλύτη $Pd(PPh_3)_4$ και βάση τριαιθυλαμίνη απουσία διαλυτών.²³⁹ Από τότε έχουν αναφερθεί πολλές βελτιώσεις στη διεθνή βιβλιογραφία, με το $Pd(OAc)_2$ να αποτελεί τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο καταλύτη. Οι προσδέτες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως οι 1,3-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)προπάνιο (dppp) ή 1,1'-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)φερροκένιο (dppf), διαλύτες THF ή αιθανόλη, βάσεις

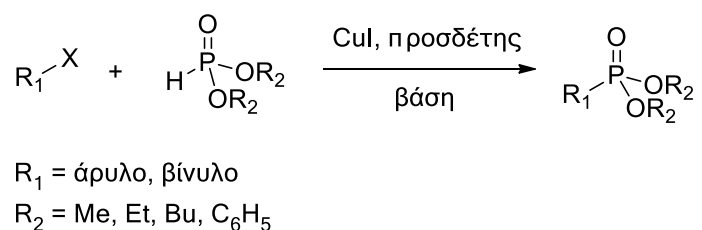
Et₃N ή Cs₂CO₃, ενώ για την επιτάχυνση της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικροκυματική ακτινοβολία (Σχήμα 54).²⁴⁰⁻²⁴²



Σχήμα 54. Καταλυόμενη από Pd αντίδραση υποκατάστασης σε αρυλο- και βινυλοβρωμίδια.

2.4.6.2.2 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Cu (I)

Ο Gelman και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν μία μέθοδο για τη σύνθεση αρυλο- και βινυλο-φωσφονικών οξέων χρησιμοποιώντας καταλύτη CuI και βάση Cs₂CO₃ σε διαλύτη τολουόλιο (Σχήμα 55).²⁴³ Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης αυξάνεται με την προσθήκη προσδέτη *N,N*-διμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης. Η μεθοδολογία αυτή είναι συμβατή τόσο με ογκώδη όσο και με ενεργοποιημένα αρυλαλογονίδια και παρέχει προϊόντα σε υψηλές αποδόσεις (85-88%). Επιπλέον, η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη σύνθεση βινυλο-φωσφονικών οξέων μέσω βρωμο- και ιωδο-βινυλο-ενώσεων σε μέτριες έως και υψηλές αποδόσεις (64-92%) με διατήρηση της αρχικής στερεοχημείας.

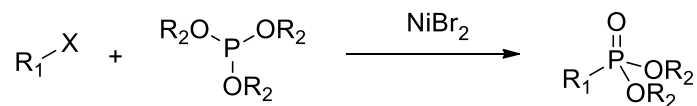


Σχήμα 55. Φωσφονυλίωση αρυλο- και βινυλο-αλογονιδίων καταλυόμενη από Cu(I).

2.4.6.2.3 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Ni

Το NiBr₂ έχει αναφερθεί πως καταλύει αντιδράσεις εισαγωγής της φωσφονικής ομάδας (Σχήμα 56).²⁴⁴ Αυτού του είδους οι πυρηνόφιλες αντιδράσεις υποκατάστασης, που θεωρούνται μια παραλλαγή της αντίδρασης

Arbuzov,²⁴⁵ είναι συμβατές τόσο με αρυλαλογονίδια όσο και με βινυλαλογονίδια, απαιτούν πολύ έντονες συνθήκες και δίνουν προϊόντα σε μέτριες έως υψηλές αποδόσεις (59-95%) διατηρώντας την αρχική στερεοχημεία.²⁴⁶ Αξίζει να σημειωθεί πως είναι δυνατή η ταυτόχρονη εισαγωγή περισσότερων της μίας ομάδας φωσφονικού εστέρα.²⁴⁴⁻²⁴⁵



R₁ = άρυλο, βίνυλο

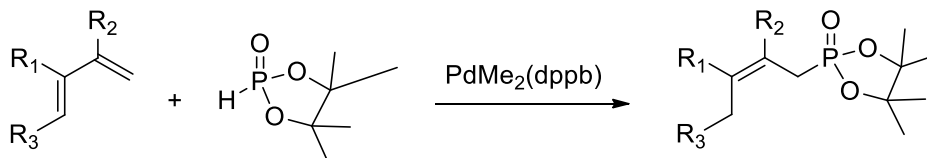
R₂ = Et, *i*-Pr

Σχήμα 56. Φωσφονυλίωση αλογονιδίων από τριαλκυλοφωσφίνη καταλυόμενη από NiBr₂.

2.4.6.3 Εισαγωγή σε *sp*² άτομο άνθρακα με ταυτόχρονο επανυβριδισμό

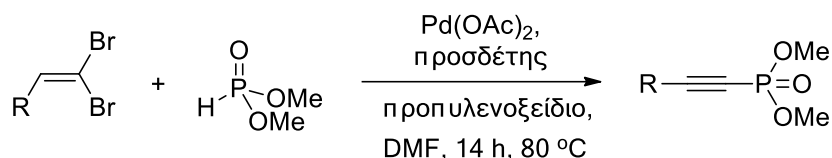
2.4.6.3.1 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd

Μία εφαρμογή της κατάλυσης με ενώσεις Pd αποτελεί η αντίδραση προσθήκης *H*-φωσφονικών εστέρων σε 1,3-διένια (Σχήμα 57).²⁴⁷ Η αντίδραση καταλύεται από PdMe₂(dppb) σε διαλύτη διοξάνη και παρέχει προϊόντα υψηλής στερεοεκλεκτικότητας (81-96% ως προς το *E*-ισομερές).



Σχήμα 57. Υδροφωσφονυλίωση 1,3-διενίων καταλυόμενη από Pd.

Η σύνθεση αλκυνο-φωσφονικών εστέρων μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί μέσω μιας καταλυόμενης από Pd αντίδρασης ενός 1,1-διβρωμο-1-αλκενίου και ενός *H*-φωσφονικού εστέρα. Το βέλτιστο πρωτόκολλο περιλαμβάνει τη χρήση καταλύτη Pd(OAc)₂, προσδέτη dppf παρουσία προπυλενοξειδίου σε διαλύτη DMF στους 80 °C (Σχήμα 58).²⁴⁸



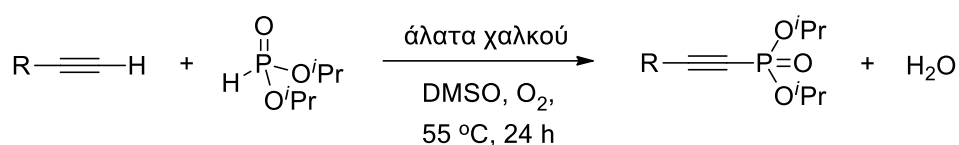
R = άλκυλο, άρυλο

Σχήμα 58. Γενικό σχήμα σύνθεσης αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων από διβρωμο-αλκένια καταλυόμενη από Pd.

2.4.6.4 Εισαγωγή σε *sp* άτομο άνθρακα

2.4.6.4.1 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Cu

Μία μέθοδος για τη σύνθεση αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων, η οποία χρησιμοποιεί άλατα χαλκού ως καταλύτη, παρουσία βάσης, σε διαλύτη DMSO στους 55 °C και υπό αερόβιες συνθήκες, δημοσιεύτηκε από τον Gao και τους συνεργάτες του (Σχήμα 59).²⁴⁹ Τα άλατα χαλκού που είναι συμβατά με την αντίδραση είναι τα CuI, CuBr, CuCl και Cu(OAc)₂·H₂O, ενώ βάσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι οι K₂CO₃, Cs₂CO₃, Et₂NH και Et₃N. Ο διαλύτης παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αντίδραση και μόνο το DMSO και το DMF παρέχουν τα επιθυμητά προϊόντα σε ικανοποιητικές έως και υψηλές αποδόσεις (72-90%). Η αντίδραση είναι εκλεκτική για τα αλκίνια και συμβατή με λειτουργικές ομάδες, όπως αλκοόλες, κυανίδια, αμίδια, χλωρίδια και α,β-ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις.



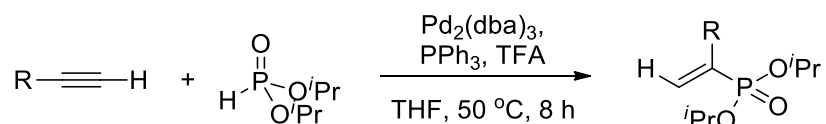
R = άλκυλο, άρυλο, καρβόνυλο

Σχήμα 59. Καταλυόμενη από Cu αντίδραση μεταξύ αλκυνίων και διαλκυλο-φωσφονικών εστέρων υπό αερόβιες συνθήκες.

2.4.6.4.2 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Pd

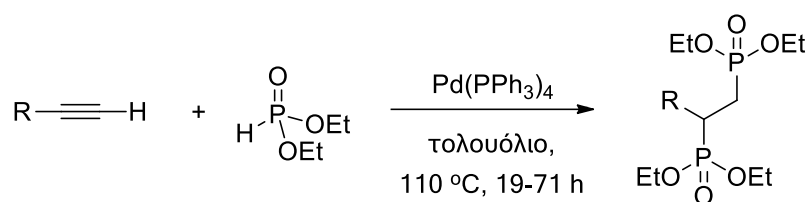
Η καταλυόμενη από μέταλλα μετάπτωσης υδροφωσφορυλίωση αλκυνίων αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1996 από τους Han και Tanaka.²⁵⁰ Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη χρήση καταλύτη PdMe₂(PPh₂Me)₂ σε διαλύτη THF υπό αδρανή ατμόσφαιρα, και στην περίπτωση των ακραίων αλκυνίων

παρέχει το 2-υποκατεστημένο προϊόν (Σχήμα 60).²⁵¹ Ο Ananikov και οι συνεργάτες του ανέφεραν ένα βελτιωμένο καταλυτικό σύστημα για την αντίδραση αυτή, χρησιμοποιώντας καταλύτη Pd₂(dba)₃ και PPh₃ σε διαλύτη THF υπό όξινες συνθήκες.²⁵¹ Πολλές ενώσεις είναι συμβατές με τη μέθοδο αυτή, όπως χλωρίδια, αλκοόλες, κυανίδια και σιλυλο-παράγωγα, ενώ το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται σε μέτριες ως υψηλές αποδόσεις (65-91%).



Σχήμα 60. Υδροφωσφορυλίωση ακραίων αλκυνίων.

Μία άλλη μέθοδος που έχει αναφερθεί, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση 1,2-διφωσφονικών εστέρων, βιοδραστικών ενώσεων στη θεραπεία ασθενειών των οστών.²⁵² Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη χρήση αλκυνίων, *H*-φωσφονικού εστέρα, καταλύτη Pd(PPh₃)₄ σε διαλύτη τολουόλιο στους 110 °C (Σχήμα 61).²⁵³ Τα επιθυμητά προϊόντα παραλαμβάνονται σε ικανοποιητικές έως και υψηλές αποδόσεις (72-90%). Αξίζει να αναφερθεί ότι μόνο ο διαιθυλοφωσφίτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί, καθώς ο διμεθυλο-φωσφίτης δίνει το μονοϋποκατεστημένο προϊόν.²⁵³



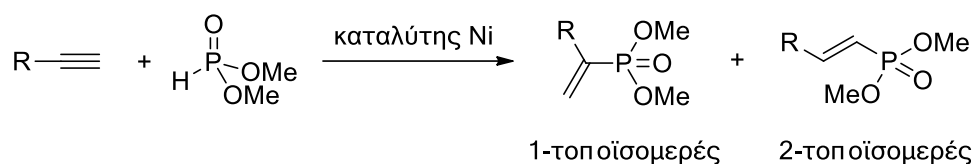
R = άρυλο

Σχήμα 61. Σύνθεση διφωσφονικών εστέρων από αλκύνια.

2.4.6.4.3 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Ni

Μία αποτελεσματική μέθοδος για την προσθήκη διμεθυλο-φωσφονικού εστέρα σε ακραία αλκίνια αναπτύχθηκε το 2004 από τον Han και τους συνεργάτες του (Σχήμα 62). Η μέθοδος αυτή οδηγεί είτε στο 1- είτε στο 2-τοποϊσομερές μεταβάλλοντας απλά τις συνθήκες της αντίδρασης. Το 1-

τοποϊσομερές παραλαμβάνεται χρησιμοποιώντας καταλύτη Ni(PPh₂Me) σε διαλύτη EtOH, ενώ το 2-τοποϊσομερές παραλαμβάνεται παρουσία συνδυασμού των καταλυτών Ni(cod)₂, PPhMe₂ και Ph₂PO(OH) σε διαλύτη THF. Και οι δύο μέθοδοι είναι αποτελεσματικές τόσο με αρυλο- όσο και με αλειφατικά αλκίνια, δίνουν μέτριες έως υψηλές αποδόσεις (72-96%) και υψηλή στερεοεκλεκτικότητα (90-99%).²⁵⁴

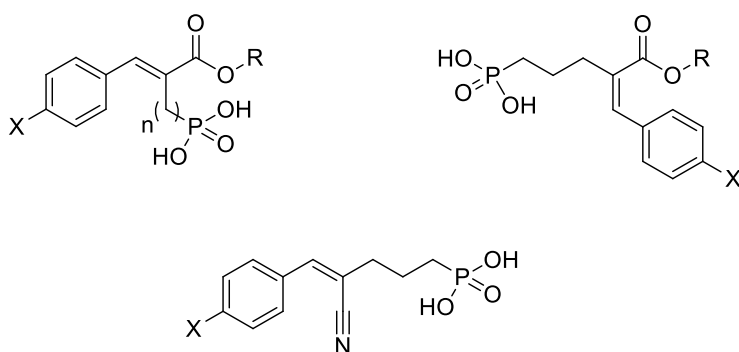


Σχήμα 62. Καταλυόμενη από Ni αντίδραση προσθήκης διμεθυλο-φωσφονικού εστέρα σε παράγωγα αλκινίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

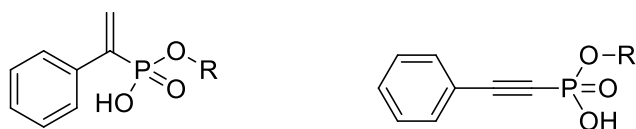
Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση φωσφονικών οξέων ως υποψήφιων ομοιοπολικών αναστολέων βακτηριακών ουρεασών. Πιο αναλυτικά, σχεδιάστηκε η σύνθεση φωσφονοαλκυλο-κινναμωμικών εστέρων, οξέων και νιτριλίων (α,β -ακόρεστοι εστέρες, α,β -ακόρεστα καρβοξυλικά οξέα και α,β -ακόρεστα νιτρίλια), που φέρουν ομάδες οι οποίες μπορούν να δράσουν ως δέκτες Michael για τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με τη σουλφυδρυλομάδα της Cys³²² που βρίσκεται στο πτερύγιο που περιβάλλει το ενεργό κέντρο των ουρεασών. Επιπλέον, σκοπός μας ήταν η μελέτη και βελτιστοποίηση της επίδρασης της γεωμετρίας του διπλού δεσμού, του υποκαταστάτη στον αρωματικό δακτύλιο και του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας μεταξύ φωσφονικής ομάδας και διπλού δεσμού στην ανασταλτική δράση (Σχήμα 63).



n = 1,2,3,4
R = H, Me, Et
X = H, Me, MeO, F, Cl, AcNH

Σχήμα 63. Γενικοί τύποι των φωσφονικών οξέων και εστέρων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Τέλος, συντέθηκαν αλκενυλο- και αλκυνο-φωσφονικά οξέα και μελετήθηκε η επίδραση του διπλού και τριπλού δεσμού αντίστοιχα στην αναστολή βακτηριακών ουρεασών και η δυνατότητα σχηματισμού ομοιοπολικού δεσμού με τη σουλφυδρυλομάδα της Cys³²² (Σχήμα 64).



R = H, Me

Σχήμα 64. Αλκενυλο- και αλκινυλο-φωσφονικά οξέα και εστέρες που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΩΣΦΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

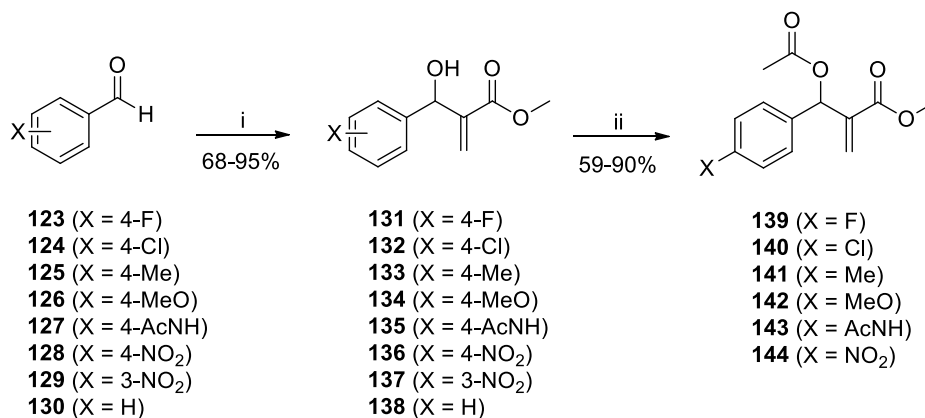
4.1 Σχεδιασμός φωσφονομεθυλο- και φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Ο σχεδιασμός των υποψήφιων φωσφονικών αναστολέων βασίστηκε στην περιγραφή της σύμπλεξης κιτρικών ανιόντων στο ενεργό κέντρο της SPU (Παράγραφος 1.6.1.4),²⁶ και αποτελεί εξέλιξη μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας (Παράγραφος 1.6.1.11, Σχήμα 20).¹⁷⁹

Με βάση αυτά τα δεδομένα σχεδιάστηκε η σύνθεση μορίων που φέρουν δύο όξινες ομάδες, του καρβοξυλικού οξέος για τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και του φωσφονικού οξέος για τη σύμπλεξη των μεταλλικών ιόντων νικελίου του ενεργού κέντρου. Επίσης σχεδιάστηκε η εισαγωγή ενός α,β-διπλού δεσμού, ώστε να μπορούν επιπλέον να δράσουν ως δέκτες Michael για τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με τη σουλφυδρυλομάδα της Cys³²², που βρίσκεται στο πτερύγιο που περιβάλλει το ενεργό κέντρο των ουρεασών και συμμετέχει στον καταλυτικό μηχανισμό.

4.2 Σύνθεση φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μία αντίδραση Morita-Baylis-Hillman (MBH) μεταξύ 3- και 4-υποκατεστημένων αρωματικών αλδευδών (**123-130**) και ακρυλικού μεθυλεστέρα παρουσία καταλύτη 1,4-διαζαδικυκλο[2.2.2]οκτανίου (DABCO), οπότε και παρήχθησαν τα προϊόντα προσθήκης MBH **131-138**. Οι αλλυλικές αλκοόλες **131-136** στη συνέχεια ακετυλιώθηκαν με ακετυλοχλωρίδιο και πυριδίνη, σε διαλύτη ξηρό CH₂Cl₂, και παρελήφθησαν τα ακετυλιωμένα παράγωγα MBH **139-144** (Σχήμα 65).



i) CH₂=CHCOOCH₃, DABCO, r.t., 72 h (20 d για το **135**), ii) AcCl, πυριδίνη, ξηρό CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h, r.t., 18 h.

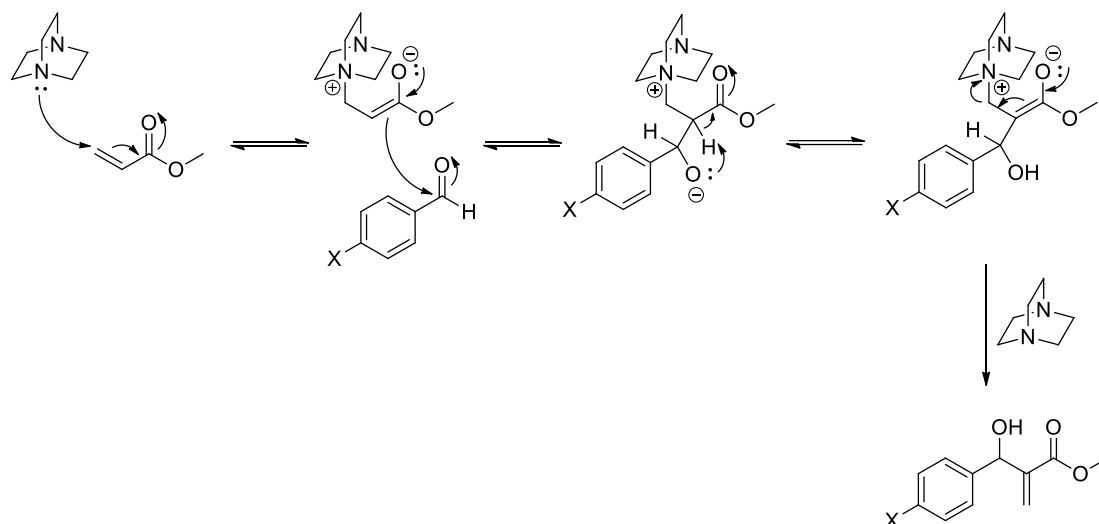
Σχήμα 65. Πορεία σύνθεσης των ακετυλιωμένων παραγώγων MBH 139-144.

Η ακετυλίωση των ενδιάμεσων αλκοολών **131-136** δοκιμάστηκε επίσης με οξικό ανυδρίτη και καταλύτη NaHCO₃ σε διαλύτη τολουόλιο υπό αναρροή,²⁵⁵ ωστόσο η απόδοση της αντίδρασης αυτής ήταν μικρότερη από την αντίδραση ακετυλίωσης με AcCl και πυριδίνη και ο καθαρισμός των τελικών ακετυλιωμένων προϊόντων δυσκολότερος, καθώς προέκυπταν παραπροϊόντα.

Η αντίδραση MBH, μία αντίδραση σχηματισμού δεσμού άνθρακα-άνθρακα μεταξύ μιας αλδεΐδης και ενός ενεργοποιημένου αλκενίου παρουσία μιας τριτοταγούς βάσης, παρέχει ένα ιδιαίτερα πολυλειτουργικό προϊόν, καθώς παράγει μόρια που περιέχουν τουλάχιστον τρεις λειτουργικές ομάδες.²⁵⁶ Οι φθηνές και εύκολα διαθέσιμες πρώτες ύλες, η ευκολία της εκτέλεσης (μπορούν να πραγματοποιηθούν ακόμα και σε υδατικό περιβάλλον), η οικονομία των ατόμων, ο σχηματισμός χημειοειδικών λειτουργικών ομάδων στο μόριο, η δυνατότητα εισαγωγής ασυμμετρίας στο μόριο και η καταλληλότητα για χρήση σε στερεά φάση ως πρόδρομο συνδυαστικής χημείας, αποτελούν μερικούς από τους λόγους που έχουν οδηγήσει σε εκθετική αύξηση της συνθετικής χρησιμότητας αυτής της αντίδρασης.

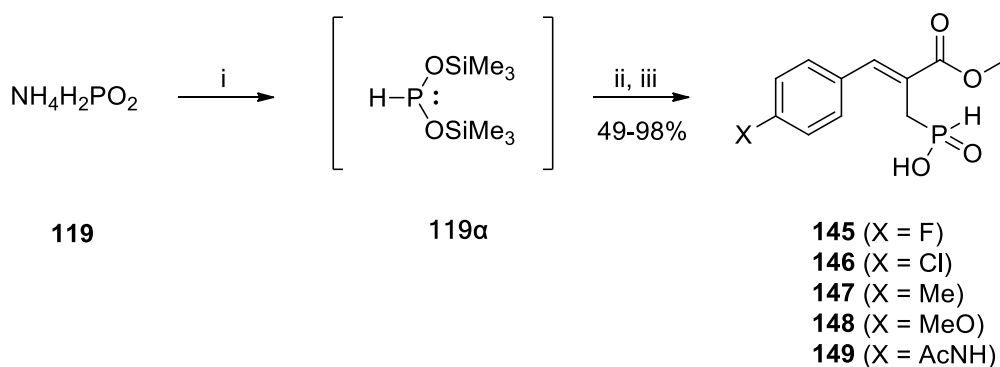
Όπως έχει περιγραφεί από τον Basavaiah και τους συνεργάτες του,²⁵⁷ η αντίδραση MBH είναι μία αντίδραση τριών σταδίων και περιλαμβάνει την προσθήκη του καταλύτη στο ενεργοποιημένο αλκένιο, μέσω μιας αντίδρασης Michael, για να δώσει το διπολικό ενολικό ιόν, το οποίο στη συνέχεια μέσω

μίας αλδολικής αντίδρασης σχηματίζει έναν δεσμό C-C με την καρβονυλική ένωση. Τέλος μέσω μίας αντίδρασης απόσπασης παράγεται το προϊόν MBH και αναγεννάται ο καταλύτης.^{257,258} Στο Σχήμα 66 που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης MBH μιας 4-υποκατεστημένης αρωματικής αλδεΐδης και ακρυλικού μεθυλεστέρα με καταλύτη DABCO.



Σχήμα 66. Ο μηχανισμός της αντίδρασης Morita-Baylis-Hillman.

Τα ακετυλιωμένα παράγωγα MBH **139-143** (Σχήμα 65) αποτέλεσαν τις πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση των φωσφινικών οξέων **145-149** σύμφωνα με το Σχήμα 67 που ακολουθεί:

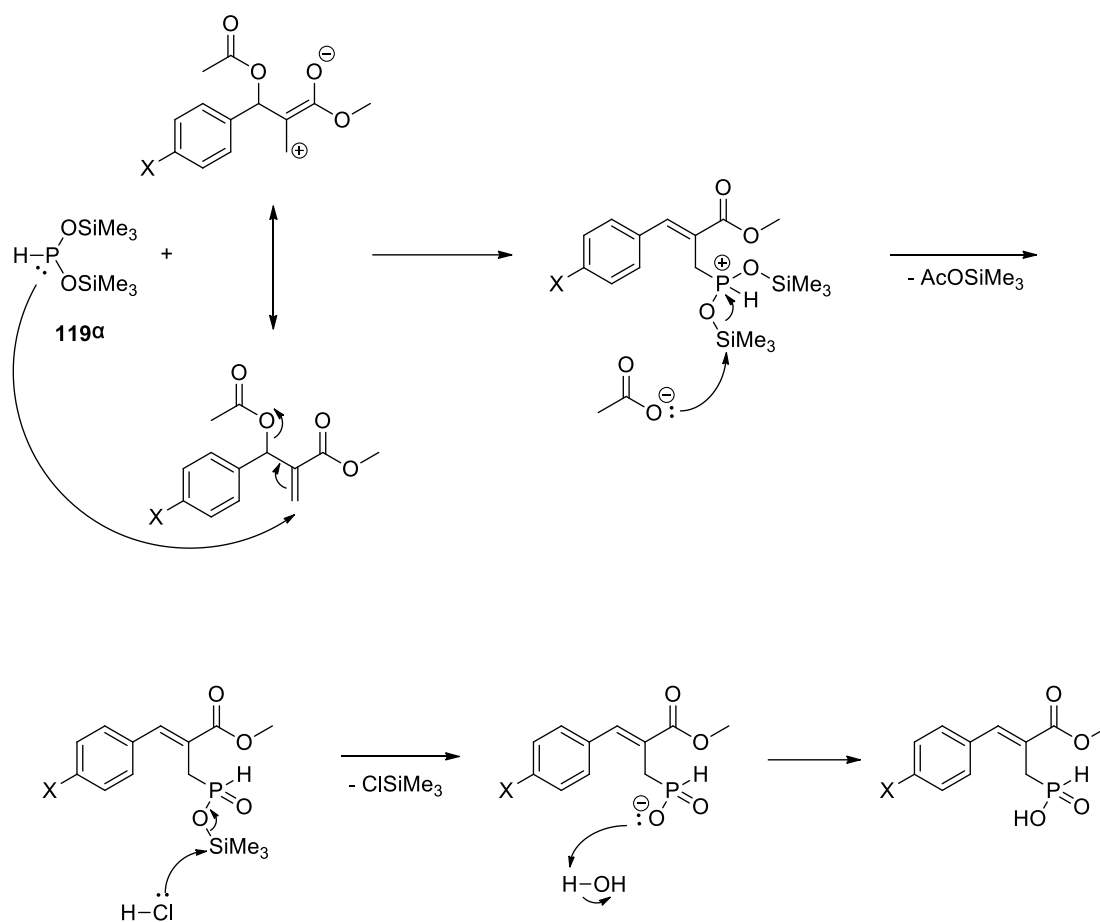


i) HMDS, 110 °C, 2 h, Ar, ii) ενώσεις **139-143** σε ξηρό CH₂Cl₂, 0 °C → r.t., 24 h, iii) HCl 3N.

Σχήμα 67. Σύνθεση των φωσφινικών οξέων **145-149**.

Ο σιλυλεστέρας του υποφωσφορώδους οξέος **119α** σχηματίζεται *in situ* από τη σύντηξη υποφωσφορώδους αμμωνίου **119** με HMDS. Το σιλυλο-ενδιάμεσο

119α «κλειδώνει» τον φώσφορο στην τρισθενή του μορφή και αποτελεί το προσβάλλον πυρηνόφιλο που θα αντιδράσει με τα ενεργοποιημένα αλκένια **139-143** μέσω μιας αντίδρασης αλλυλικής υποκατάστασης. Τελικά, η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη διαλύματος HCl 3N, το οποίο διασπά τους σιλυλαιθέρες (Σχήμα 68).

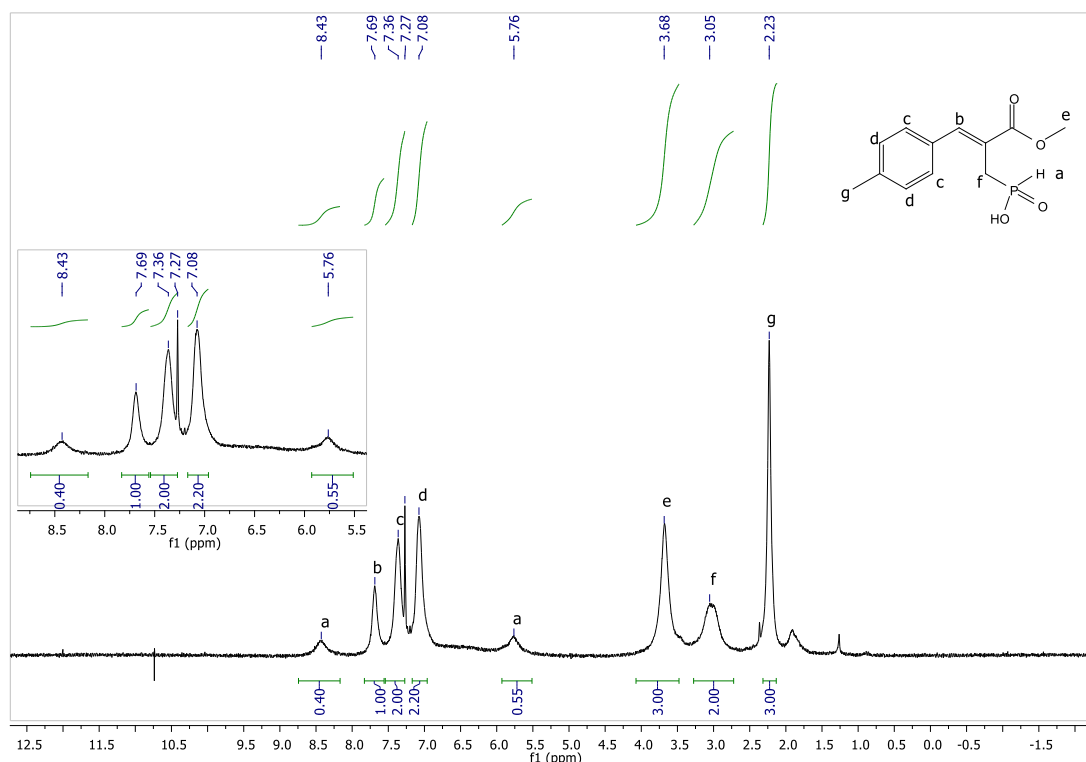


Σχήμα 68. Μηχανισμός σύνθεσης των φωσφινικών οξέων 145-149.

Η σιλυλίωση του υποφωσφορώδους αμμωνίου για την αντίδραση αλλυλικής υποκατάστασης δοκιμάστηκε αρχικά με τη χρήση τριών διαφορετικών σιλυλιωτικών αντιδραστήριων: με HMDS και θέρμανση στους 110 °C υπό αργό, με BSA υπό αργό και με TMSCl παρουσία απεσταγμένης DIPEA υπό αργό. Και στις τρεις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση το ακετυλιωμένο παράγωγο MBH **142**. Ωστόσο, οι καλύτερες συνθήκες που οδηγούσαν και στη βέλτιστη απόδοση διαπιστώθηκε, μετά από λήψη φασμάτων ^{31}P NMR από τα μίγματα των τριών αντιδράσεων, ότι ήταν αυτές που περιγράφονται στο Σχήμα 67.

Η δημιουργία του δεσμού P-C ελέγχθηκε μέσω λήψης φασμάτων ^{31}P NMR, καθώς και με φασματομετρία μάζας.

Από τα φάσματα ^1H NMR των φωσφινικών οξέων **145-149** παρατηρούμε ότι το πρωτόνιο του διπλού δεσμού συντονίζεται σε χημική μετατόπιση ~ 7.70 ppm που αντιστοιχεί στα Z-ισομερή, ενώ δεν εμφανίζεται κορυφή για το πρωτόνιο αυτό σε υψηλότερα πεδία (θα αναμενόταν περίπου στα 6.80 ppm). Συμπεραίνουμε επομένως πως οι ενώσεις **145-149** παραλήφθηκαν πρακτικά πλήρως ως το Z-ισομερές. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα της μελέτης του Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτρη Γεωργιάδη και των συνεργατών του,²⁵⁹ σχετικά με τη στερεοχημική προτίμηση ακετυλιωμένων παραγώγων MBH σε αντιδράσεις υποκατάστασης με σιλυλεστέρες φωσφινικών οξέων. Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **147** (Εικόνα 16).

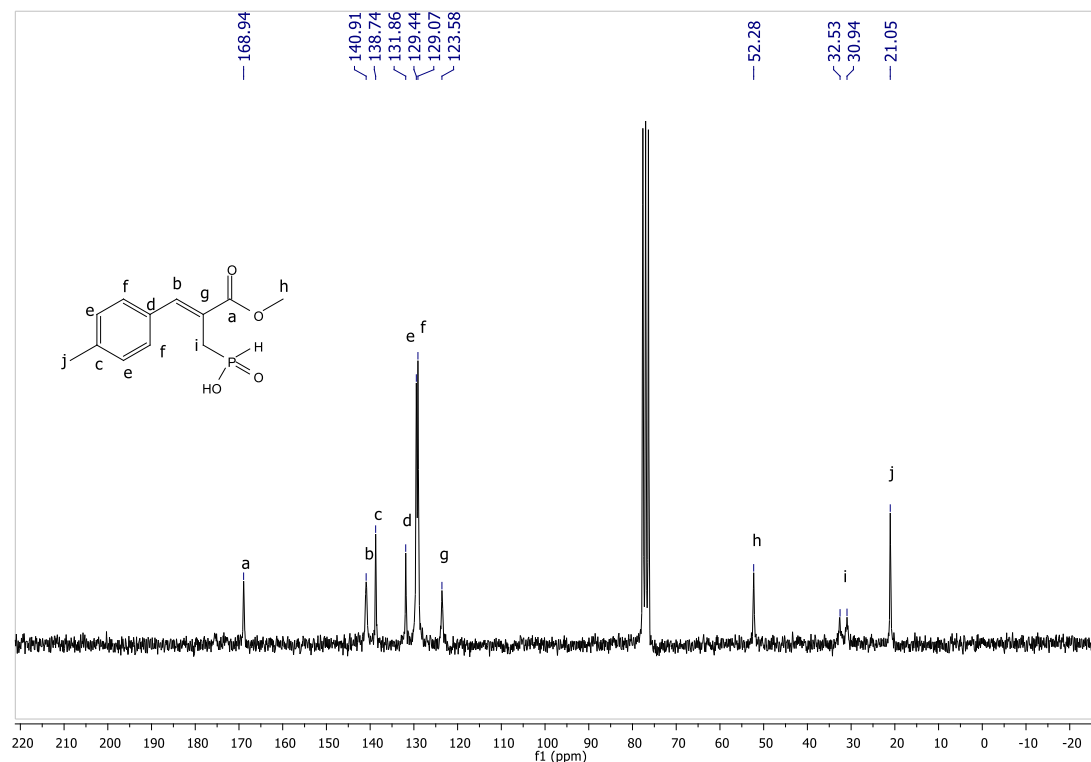


Εικόνα 16. Φάσμα ^1H NMR του φωσφινικού οξέος **147** σε CDCl_3 .

Χαρακτηριστική σε αυτό το φάσμα είναι η σταθερά σύζευξης $J=532.9$ Hz, η οποία οφείλεται στη διπλή κορυφή με άκρα στα 8.43 ppm και 5.76 ppm, λόγω

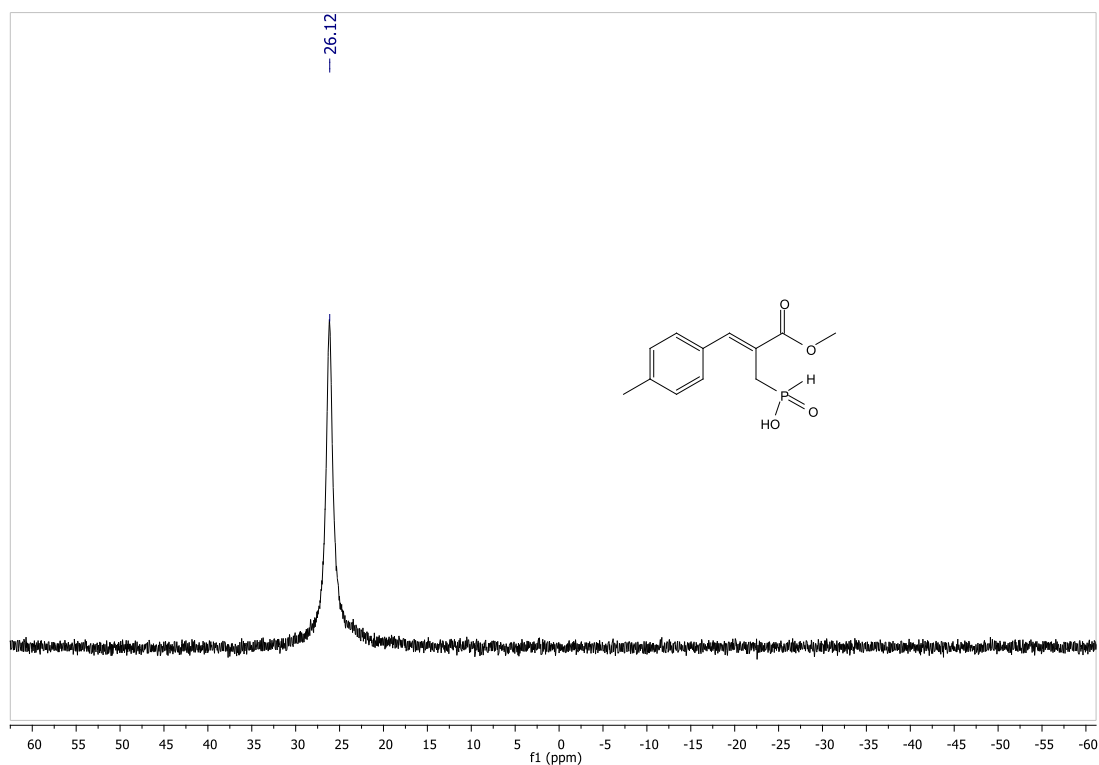
της σχάσης του πυρήνα του ατόμου του H της ομάδας του φωσφινικού οξέος από το γειτονικό πυρήνα του φωσφόρου.

Ακολουθως παρατίθενται τα φάσματα ^{13}C και ^{31}P NMR της ένωσης **147** (Εικόνες 17 και 18, αντίστοιχα).



Εικόνα 17. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **147** σε CDCl_3 .

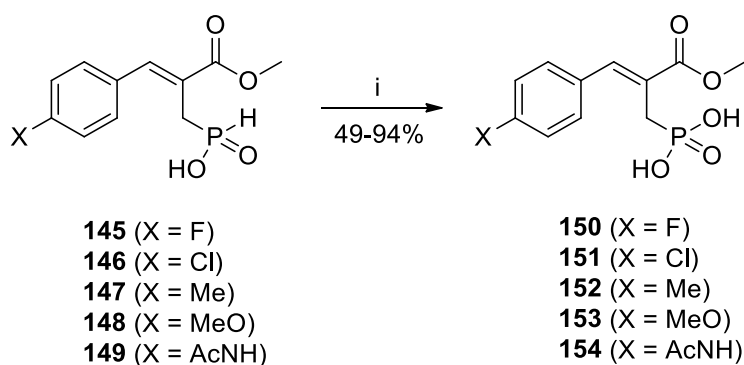
Στα 168.9 ppm συντονίζεται ο άνθρακας του καρβονυλίου της ένωσης, ενώ στην περιοχή από 140.9-123.6 ppm συντονίζονται οι άνθρακες του αρωματικού δακτυλίου και του διπλού δεσμού. Η κορυφή που παρατηρείται στα 52.3 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα του μεθυλεστέρα της ένωσης, η διπλή κορυφή στα 31.7 ppm με σταθερά σύζευξης $J=79.9$ Hz αντιστοιχεί στον άνθρακα του μεθυλενίου και σχάζεται λόγω του σήματος του γειτονικού φωσφόρου και τέλος η κορυφή στα 21.1 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα του μεθυλίου που βρίσκεται ως υποκαταστάτης στον αρωματικό δακτύλιο.



Εικόνα 18. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης **147** σε CDCl_3 .

Στο φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης **147** παρατηρούμε μία μόνο κορυφή στα 26.12 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο άτομο φωσφόρου της ένωσης.

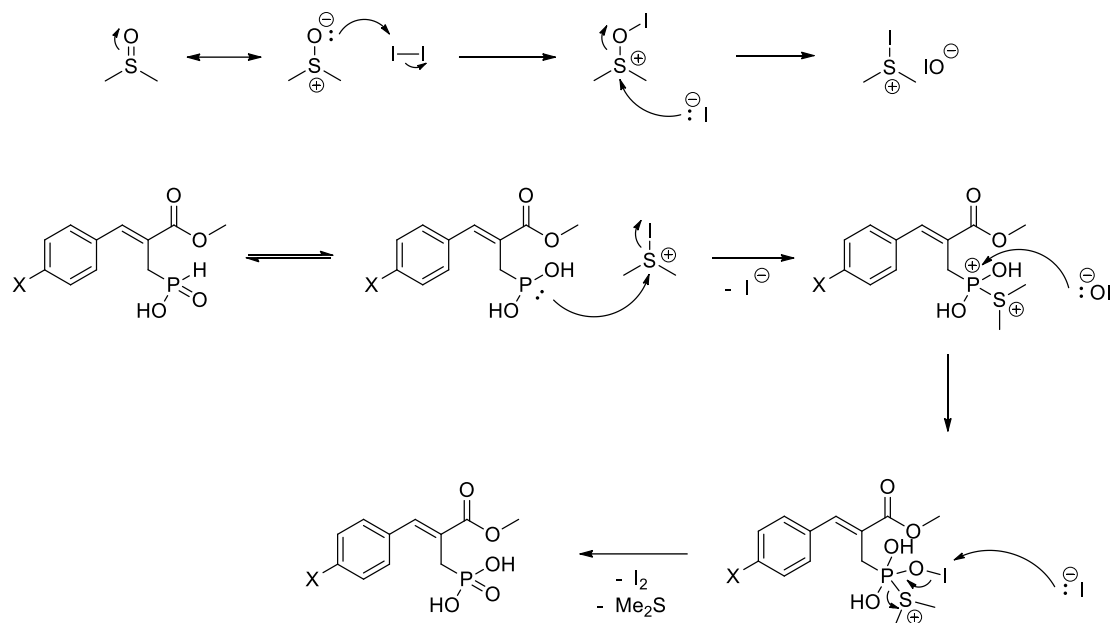
Ακολούθησε στη συνέχεια η σύνθεση του φωσφονικών οξέων **150-154**, τα οποία προέκυψαν από την οξειδωση των φωσφινικών οξέων **145-149** (Σχήμα 69).



i) DMSO, I_2 , THF, αναρροή, 24 h.

Σχήμα 69. Οξειδωση των φωσφινικών οξέων **145-149** προς τα αντίστοιχα φωσφονικά οξέα **150-154**.

Η οξείδωση των φωσφινικών οξέων **145-149** πραγματοποιήθηκε παρουσία DMSO και καταλυτικής ποσότητας I₂ με βρασμό υπό αναρροή σε THF για 24 h.²⁶⁰ Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στο Σχήμα 70.

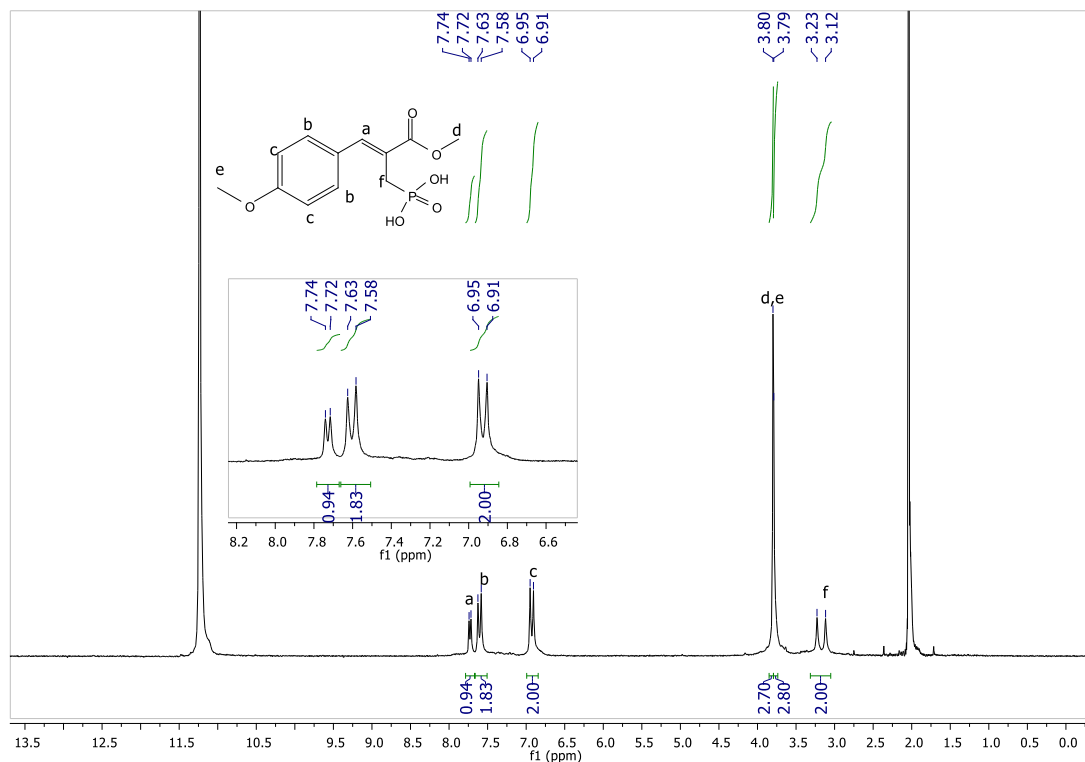


Σχήμα 70. Πιθανός μηχανισμός οξείδωσης του φωσφινικών οξέων 145-149 με DMSO και I₂.

Στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης το DMSO αντιδρά με το I₂ και σχηματίζεται το ηλεκτρονιόφιλο ιόν ιωδοδιμεθυλοσουλφονίου. Στη συνέχεια, η οξείδωση πιθανώς πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού ενός ενδιάμεσου άλατος φωσφονίου, το οποίο προκύπτει από την ηλεκτρονιόφιλη προσβολή του ιωδοδιμεθυλοσουλφονίου στον τρισθενή φωσφόρο (ταυτομερής ισορροπία με τον πεντασθενή φωσφόρο). Ακολουθεί η προσθήκη του ανιόντος υποϊωδιώδους και σχηματίζεται το ενδιάμεσο φωσφοράνιο. Η πυρηνόφιλη προσβολή του ανιόντος ιωδίου στο φωσφοράνιο έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση διμεθυλοθειοαιθέρα, την αναγέννηση του καταλύτη και οδηγεί τελικά στο σχηματισμό των φωσφονικών οξέων **150-154**.

Η οξείδωση του δεσμού P-H ελέγχθηκε μέσω φασματοσκοπίας ³¹P NMR και φασματομετρίας μάζας. Η οξείδωση οδηγεί στην προάσπιση του πυρήνα του φωσφόρου, με αποτέλεσμα να συντονίζεται πλέον σε χαμηλότερα πεδία, ενώ δεν επιφέρει αλλαγές στη διαστεreoμέρεια. Στα φάσματα ¹H NMR η κορυφή του πρωτονίου του διπλού δεσμού εμφανίζεται σε χημική μετατόπιση 7.73

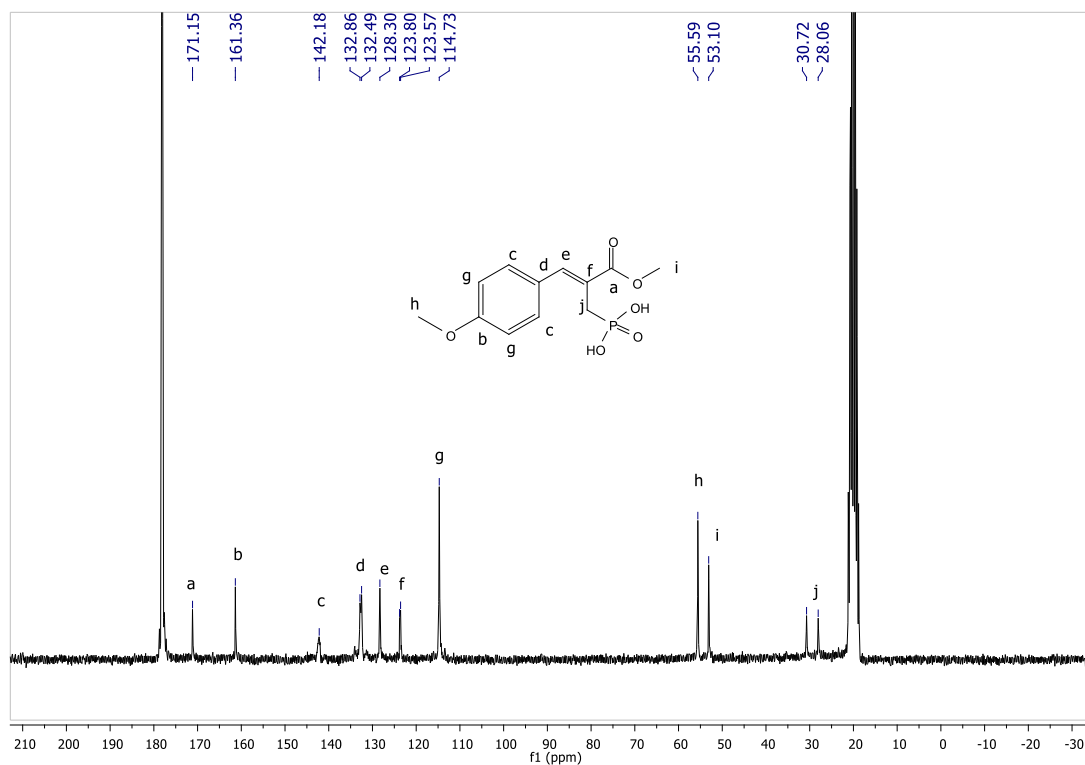
ppm που υποδηλώνει πως πρόκειται για τα Z-ισομερή, όπως φαίνεται και από το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **153** στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **153** σε CD_3COOD .

Η διπλή κορυφή σε χημική μετατόπιση 3.17 ppm με σταθερά σύζευξης $J=22.3$ Hz αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια του μεθυλενίου και σχάζεται εξαιτίας του γειτονικού πυρήνα του ατόμου του φωσφόρου.

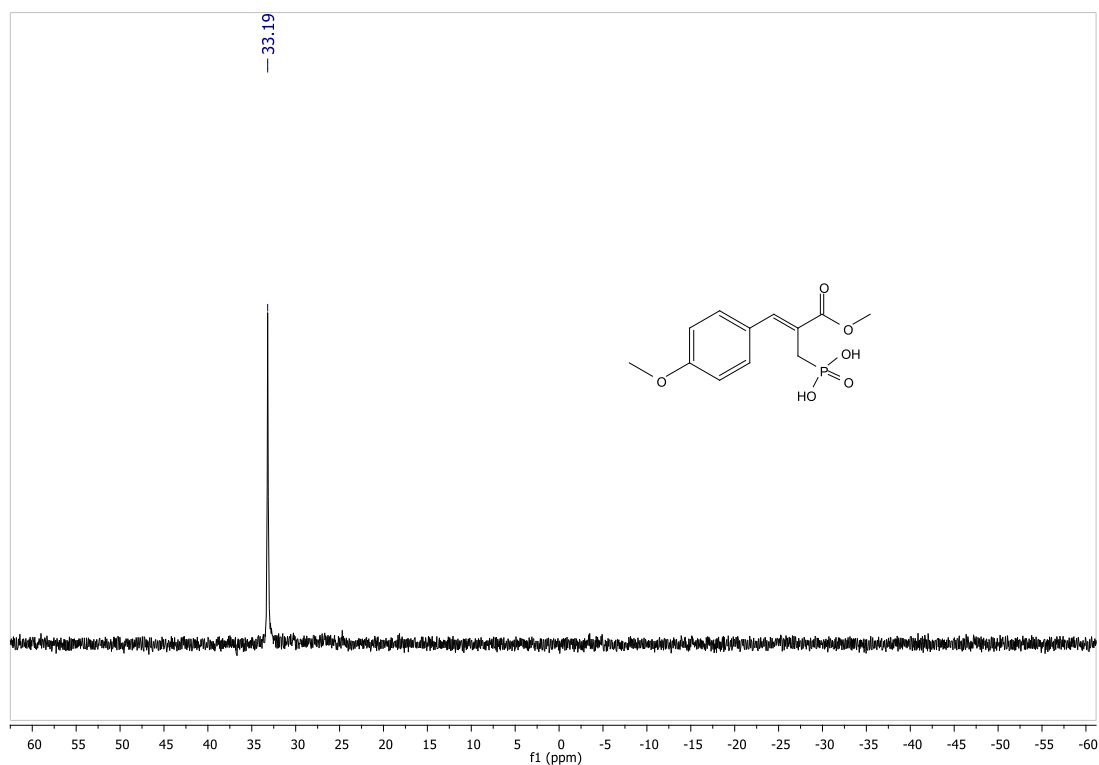
Ακολουθούν οι Εικόνες 20 και 21 που απεικονίζουν τα φάσματα ^{13}C και ^{31}P NMR της ένωσης **153**.



Εικόνα 20. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 153 σε CD_3COOD .

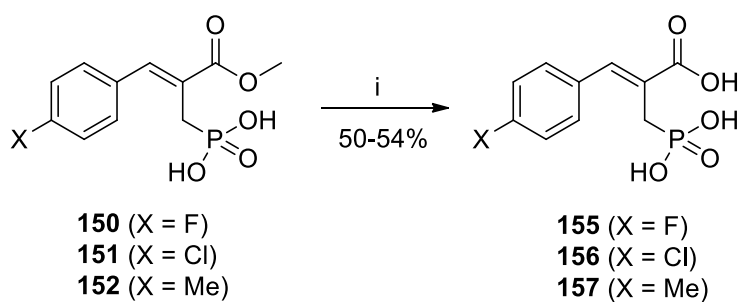
Σε χημική μετατόπιση 171.2 ppm συντονίζεται ο καρβονυλικός άνθρακας της ένωσης, ενώ στα 161.4 ppm ο αρωματικός άνθρακας που φέρει τη μεθοξο-ομάδα. Στην περιοχή 142.2-114.7 ppm συντονίζονται οι υπόλοιποι αρωματικοί άνθρακες, καθώς και οι άνθρακες του διπλού δεσμού. Η κορυφή στα 55.6 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα του μεθυλίου της μεθοξο-ομάδας, ενώ η κορυφή στα 53.1 ppm στον άνθρακα του μεθυλεστέρα. Τέλος, η διπλή κορυφή στα 29.4 ppm με σταθερά σύζευξης $J=133.8$ Hz αντιστοιχεί στον άνθρακα του μεθυλενίου που βρίσκεται σε α -θέση ως προς το άτομο του φωσφόρου.

Στο φάσμα ^{31}P NMR της Εικόνας 21 παρατηρούμε μία μοναδική κορυφή σε χημική μετατόπιση 33.19 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο άτομο του φωσφόρου της ένωσης.



Εικόνα 21. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης **153** σε CD_3COOD .

Οι ενώσεις **155-157** παραλήφθηκαν μετά από όξινη υδρόλυση των ενώσεων **150-152** (Σχήμα 71). Οι ενώσεις **150-152** διαλύθηκαν σε διάλυμα HCl 6N και ακολούθησε βρασμός υπό αναρροή για 24 h.

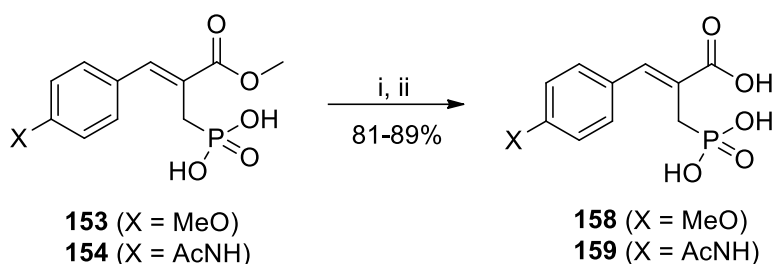


i) HCl 6N, αναρροή, 24 h

Σχήμα 71. Όξινη υδρόλυση των φωσφονικών οξέων **150-152**.

Η μετατροπή των ενώσεων **153** και **154** στις **158** και **159** πραγματοποιήθηκε μέσω αλκαλικής υδρόλυσης εστέρων (Σχήμα 72). Οι ενώσεις **153** και **154** διαλύθηκαν σε MeOH και προστέθηκε διάλυμα NaOH 4N. Τα προϊόντα **158** και **159** παραλήφθηκαν ως τα μετά νατρίου άλατα, ενώ μετά από οξίνιση και

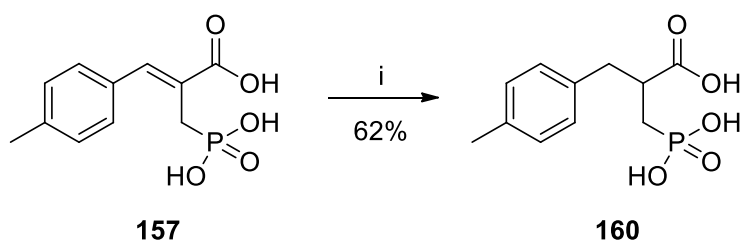
χρωματογραφικό καθαρισμό παραλήφθηκαν τα ελεύθερα καρβοξυλικά οξέα. Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχεται με TLC.



i) NaOH 4N, MeOH, r.t., 72 h, ii) HCl 6N.

Σχήμα 72. Αλκαλική υδρόλυση των φωσφονικών οξέων **153** και **154**.

Για να αποδειχθεί η σημασία του διπλού δεσμού του κινναμωμικού σκελετού στην ανασταλτική δράση, συντέθηκε το κορεσμένο ανάλογο της ένωσης **157**, η ένωση **160**. Η ένωση **160** παραλήφθηκε μετά από υδρογόνωση της **157** με καταλύτη 10% Pd/C σε διαλύτη MeOH (Σχήμα 73).



i) H₂, 10% Pd/C, MeOH, 1 atm, r.t., 48 h.

Σχήμα 73. Καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης **157**.

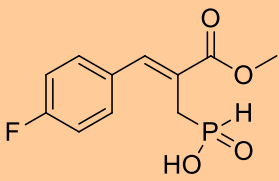
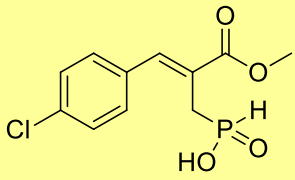
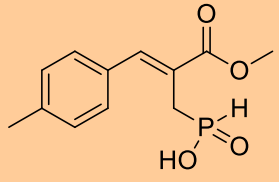
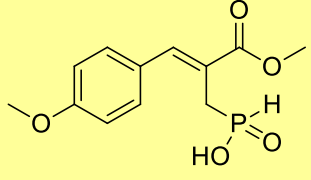
4.3 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

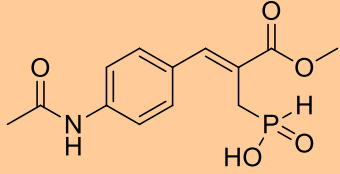
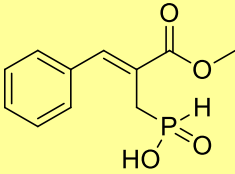
Τα φωσφονομεθυλο-κινναμωμικά οξέα και οι μεθυλεστέρες τους, καθώς και τα ενδιάμεσα φωσφονικά οξέα ελέγχθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι του ενζύμου της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii* σε βιολογικά πειράματα *in vitro* που πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Βιοοργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Wrocław στην Πολωνία. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ακετοϋδροξαμικό οξύ (**7**), το οποίο εγκρίθηκε από τον FDA το 1983 και κυκλοφόρησε με την εμπορική ονομασία Lithostat για τη θεραπεία χρόνιων λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Το

ακετοϋδροξαμικό οξύ είναι ένας βραδείας δέσμευσης αναστολέας της ουρεάσης του βακτηρίου *K. aerogenes* με $K_i=2.6 \mu\text{M}$.

Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές αναστολής K_i των ενδιάμεσων φωσφινικών οξέων **145-149** που συντέθηκαν. Για σύγκριση, παρατίθεται και η ένωση **63**, η οποία είχε συντεθεί στα πλαίσια μελέτης που είχε πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και αποτελεί την ένωση αναφοράς.¹⁷⁹

Πίνακας 1. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των *H*-φωσφινομεθυλο-κινναμωμικών μεθυλίων.

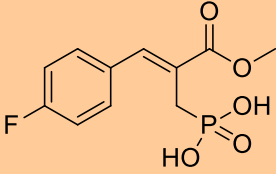
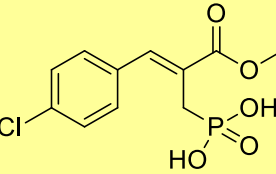
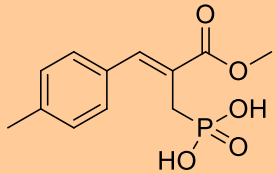
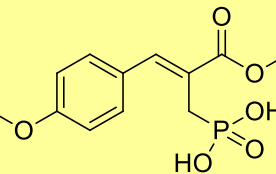
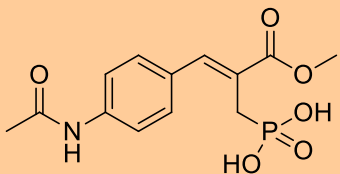
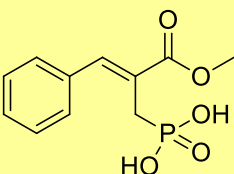
No	Ένωση	K_i [μM]	
		Με επώαση	Χωρίς επώαση
145		14.5 ± 1.2	17.9 ± 0.74
146		16.7 ± 1.3	24.0 ± 1.6
147		23.4 ± 1.4	41.6 ± 2.2
148		149 ± 8.2	157 ± 2.6

149		13.4 ± 0.85	20.6 ± 1.0
63		97.5 ± 14	177 ± 21

Χρησιμοποιήθηκαν ομάδες, όπως αλκύλιο (μέθυλο-ομάδα), αλογόνα (φθόρο- και χλώρο-ομάδες) και ομάδες που φέρουν άλλα ετεροάτομα (μεθόξυ- και ακετάμιδο-ομάδα) για να τροποποιηθούν οι ιδιότητες του αρωματικού τμήματος του κινναμωμικού σκελετού των μορίων. Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 1 μπορούμε να συμπεράνουμε πως η εισαγωγή των παραπάνω ομάδων οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας των αναστολέων. Οι τιμές των σταθερών αναστολής K_i κυμαίνονται μεταξύ 13.4-23.4 μM και είναι 5 έως και 7 φορές χαμηλότερες σε σχέση με τη σταθερά αναστολής της ένωσης αναφοράς **63**. Το μεθόξυ-παράγωγο **148** είναι το μόνο που δεν ακολούθησε αυτή την τάση. Φαίνεται γενικά πως η έλλειψη τρίτου ατόμου οξυγόνου στη φωσφορυλο-ομάδα όλων των παραπάνω μορίων αποτρέπει την αλληλεπίδραση με την His²²² του ενζύμου, ενώ λόγω του μικρού μεγέθους του ατόμου του υδρογόνου, οι αναστολείς μετακινούνται πλησιέστερα στα ιόντα Ni²⁺ και δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός δεσμός υδρογόνου με την Arg³³⁹. Αυτές οι παράμετροι καθιστούν τα παραπάνω φωσφινικά οξέα μέτριους αναστολείς. Να σημειωθεί πως όλα τα παραπάνω φωσφινικά οξέα αλληλεπιδρούν με το ένζυμο μέσω αντιστρεπτής ανταγωνιστικής αναστολής.

Ακολουθεί ο Πίνακας 2 με τις τιμές αναστολής K_i των φωσφονομεθυλοκινναμωμικών μεθυλίων **150-154**. Για σύγκριση, παρατίθεται η ένωση **65**, που αποτελεί την ένωση αναφοράς.

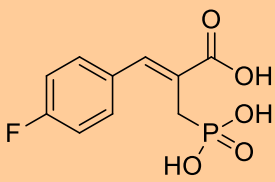
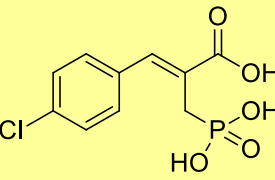
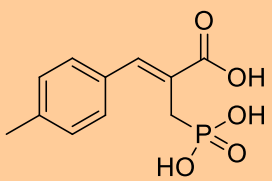
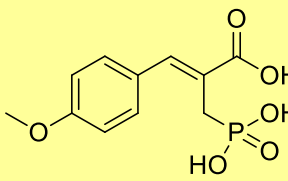
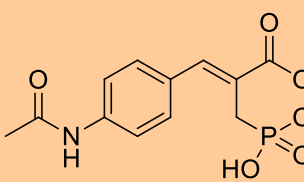
Πίνακας 2. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών μεθυλίων.

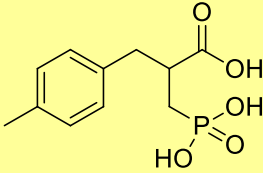
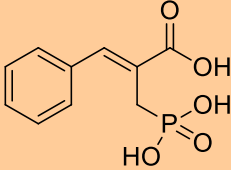
No	Ένωση	K_i [μM]	
		Με επώαση	Χωρίς επώαση
150		62.9 ± 3.2	73.2 ± 3.9
151		81.2 ± 4.9	88.9 ± 5.7
152		20.7 ± 1.3	21.4 ± 1.4
153		229 ± 13	239 ± 13
154		386 ± 19	404 ± 25
65		Δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση	

Οι ενώσεις **150-154** εμφάνισαν αντιστρεπτή ανταγωνιστική αναστολή. Είναι και εδώ εμφανής η βελτίωση της ανασταλτικής δράσης με την εισαγωγή υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο, σε σχέση με την ένωση αναφοράς **65**, η οποία δεν αναστέλλει το ένζυμο.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης των φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών οξέων **155-159** έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii*. Παρατίθεται συγκριτικά η ένωση **66**.

Πίνακας 3. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονομεθυλο-κινναμωμικών οξέων.

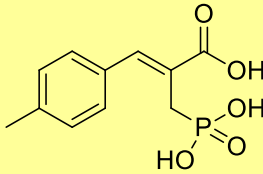
No	Ένωση	K_i [μ M]	
		Με επώαση	Χωρίς επώαση
155		9.79 ± 0.65	13.4 ± 0.52
156		16.2 ± 0.98	19.6 ± 0.95
157		0.594 ± 0.028	0.674 ± 0.031
158		34.4 ± 2.1	28.9 ± 1.7
159		17.7 ± 1.2	21.2 ± 4.2

160		90.2 ± 5.3	88.0 ± 4.6
66		13.1 ± 2.3	16.1 ± 1.4

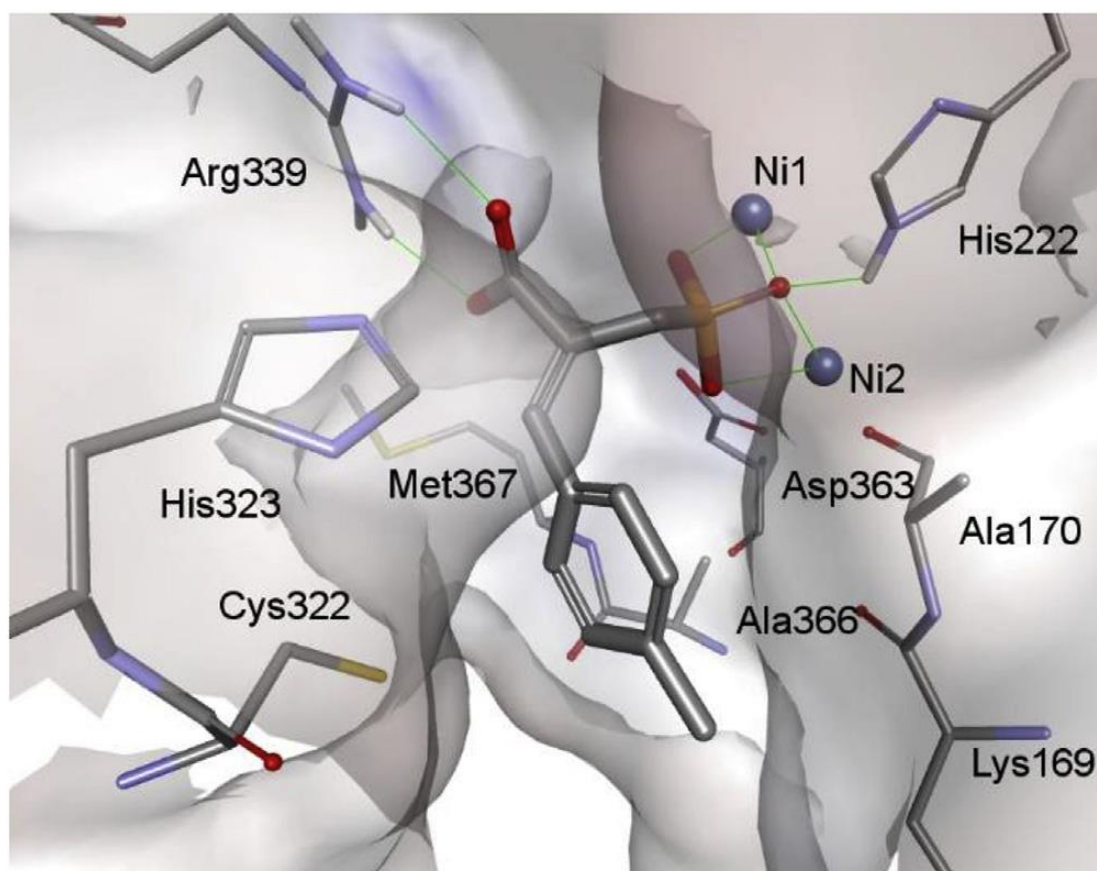
Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3 συμπεραίνουμε πως η τροποποίηση της ένωσης **66** με την εισαγωγή υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο οδήγησε στην περίπτωση της ένωσης **157**, που αποτελεί τον ισχυρότερο αναστολέα αυτής της ομάδας μορίων, αλλά και έναν από τους ισχυρότερους οργανοφωσφορικούς αναστολείς που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Η υποκατάσταση της ένωσης **66** με αλογόνα και την ακεταμιδο-ομάδα (ενώσεις **155**, **156** και **159** αντίστοιχα) διατήρησε την ανασταλτική δράση σε χαμηλές τιμές K_i , ενώ το μεθοξυ-παράγωγο **158** είναι περισσότερο δραστικό σε σχέση με τα ανάλογά του **148** και **153**. Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν αντιστρεπτή ανταγωνιστική αναστολή.

Η ένωση **157** ελέγχθηκε επίσης ως προς την αναστολή της ουρεάσης στελεχών του παθογόνου βακτηρίου *Proteus mirabilis* επιδεικνύοντας παρόμοια δραστικότητα λόγω της υψηλής συγγένειας μεταξύ των δύο ενζύμων. (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Τιμή σταθεράς αναστολής K_i της ένωσης **157** ως προς την ουρεάση του βακτηρίου *P. mirabilis*.

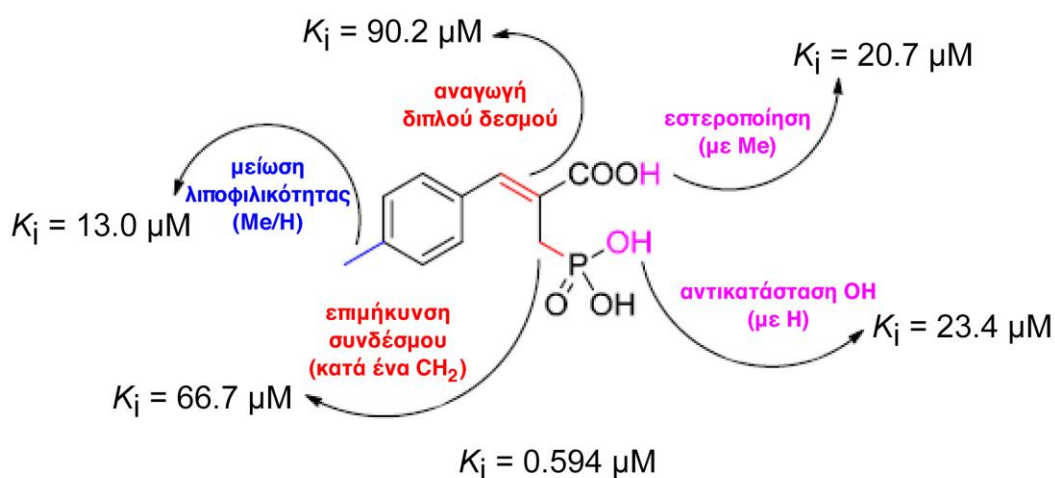
No	Ένωση	K_i [μM]
157		0.485 ± 0.029

Πειράματα μοριακής μοντελοποίησης του συμπλόκου της ένωσης **157** με την SPU έδειξαν ότι η φωσφονική ομάδα του μορίου συμπλέκει άριστα τα ιόντα Ni^{2+} του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Το ένα άτομο οξυγόνου της φωσφορυλο-ομάδας σχηματίζει μία γέφυρα με τα μεταλλικά ιόντα, ενώ ταυτόχρονα συμμετέχει σε ένα δεσμό υδρογόνου με το άτομο αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His²²². Κάθε ένα από τα δύο εναπομείναντα άτομα της φωσφορυλο-ομάδας συμπλέκει μονοσχιδώς από ένα Ni^{2+} . Η ομάδα του καρβοξυλικού οξέος είναι προσανατολισμένη απέναντι από τη γουανιδινική ομάδα της Arg³³⁹ και σχηματίζει μία γέφυρα άλατος υποβοηθούμενη από δύο δεσμούς υδρογόνου. Η *p*-μεθυλοφαινυλομάδα προσαρμόζεται μέσω λιπόφιλων αλληλεπιδράσεων στην υδρόφοβη επιφάνεια της κοιλότητας που περικλείει την είσοδο στην ενεργό περιοχή και απαρτίζεται από τα αμινοξέα Ala¹⁷⁰ και Ala³⁶⁶. Παρά τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις της **157** με το ενεργό κέντρο της SPU, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού με την Cys³²² (Εικόνα 22).¹⁷⁹



Εικόνα 22. Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της ένωσης **157** με το ενεργό κέντρο της SPU.

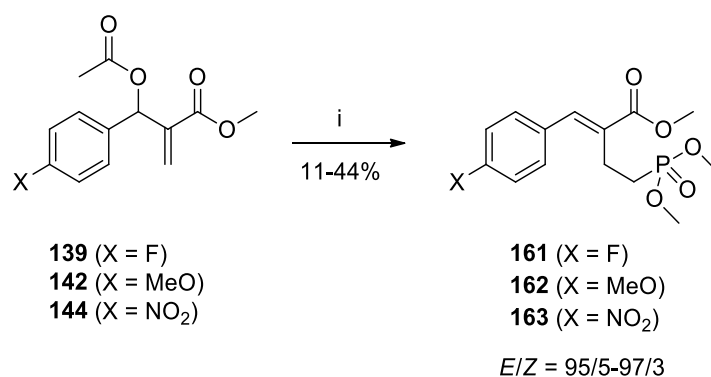
Το α,β -ακόρεστο σύστημα της ένωσης **157**, που βρίσκεται σε συζυγία με την ομάδα του καρβοξυλικού οξέος και τον αρωματικό δακτύλιο, συγκεκριμένου μεγέθους και συγκεκριμένης ακαμψίας, φαίνεται να καθιστά την ένωση κατάλληλη απέναντι στις στερεοχημικές και ηλεκτρονικές απαιτήσεις του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Για να αποδειχθεί περαιτέρω η σπουδαιότητα της ακαμψίας του κορμού της ένωσης **157**, συντέθηκε το ανηγμένο ανάλογό της, η ένωση **160**. Αποδείχθηκε τότε ότι η ανασταλτική δράση μειώθηκε κατά 150 φορές (Εικόνα 23).¹⁷⁹



Εικόνα 23. Η εξειδίκευση της ένωσης **157** στην αναστολή της SPU σε σχέση με ανάλογές της ενώσεις.

4.4 Σύνθεση φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

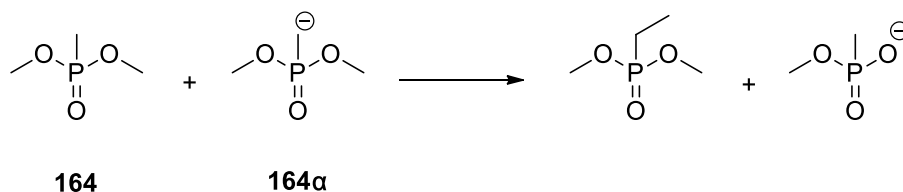
Για τη σύνθεση των φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων ήταν απαραίτητη η σύνθεση των ενδιάμεσων φωσφονικών εστέρων **161-163**, οι οποίοι προέκυψαν από τα κατάλληλα MBH παράγωγα (Σχήμα 74).



i) (CH₃O)₂POCH₃ **164**, LiHMDS, ξηρό THF, Ar, -15 °C, 1 h.

Σχήμα 74. Σύνθεση των φωσφονικών εστέρων 161-163.

Η αντίδραση του Σχήματος 74 πραγματοποιείται μέσω αποπρωτονίωσης του μεθυλίου του μεθυλο-διμεθυλοφωσφονικού εστέρα (DMMP) **164** από το LiHMDS.²⁶¹ Σχηματίζεται έτσι ένα ανιόν (**164α**) το οποίο προσβάλλει τα ενεργοποιημένα αλκένια **139**, **142** και **144**. Στα μειονεκτήματα της αντίδρασης συγκαταλέγεται το γεγονός ότι ο μεθυλο-διμεθυλοφωσφονικός εστέρας έχει την τάση να υφίσταται μεταφορά αλκυλίου, ακόμα και στους -60 °C γεγονός που οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της αντίδρασης και στη δημιουργία παραπροϊόντων (Σχήμα 75).



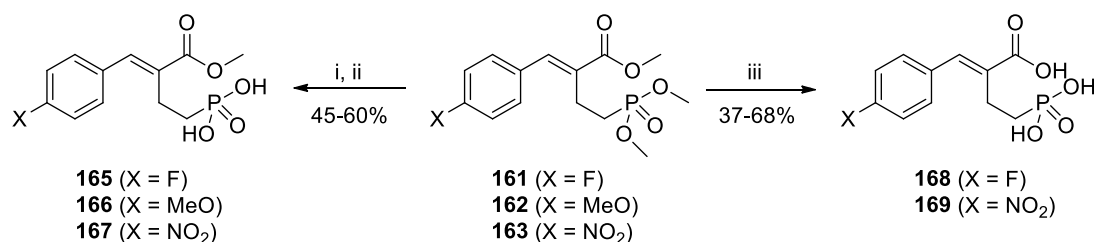
Σχήμα 75. Μεταφορά αλκυλίου στον μεθυλο-διμεθυλοφωσφονικό εστέρα.

Η αποπρωτονίωση του **164** δοκιμάστηκε και με βάση το NaHMDS. Ωστόσο, η μετατροπή, όπως αυτή μετρήθηκε μετά τη λήψη φάσματος ³¹P NMR στο μίγμα της αντίδρασης βρέθηκε μικρότερη και προτιμήθηκε τελικά η χρήση του LiHMDS.

Ο σχηματισμός του δεσμού P-C επιβεβαιώθηκε με τη λήψη φάσματος ³¹P NMR, ενώ ανιχνεύθηκαν και τα αντίστοιχα μοριακά ιόντα στη φασματομετρία μάζας.

Οι φωσφονικοί εστέρες **161-163** παραλαμβάνονται σε αναλογίες 95/5-97/3, κυρίως ως *E*-ισομερή, όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση των αντίστοιχων πρωτονίων του διπλού δεσμού στα φάσματα ¹H NMR των ενώσεων. Τα πρωτόνια των *E*-ισομερών συντονίζονται σε χημικές μετατοπίσεις 7.59-7.72 ppm σε διαλύτη CDCl₃, ενώ αυτά των *Z*-ισομερών σε χημικές μετατοπίσεις 6.53-6.65 ppm.

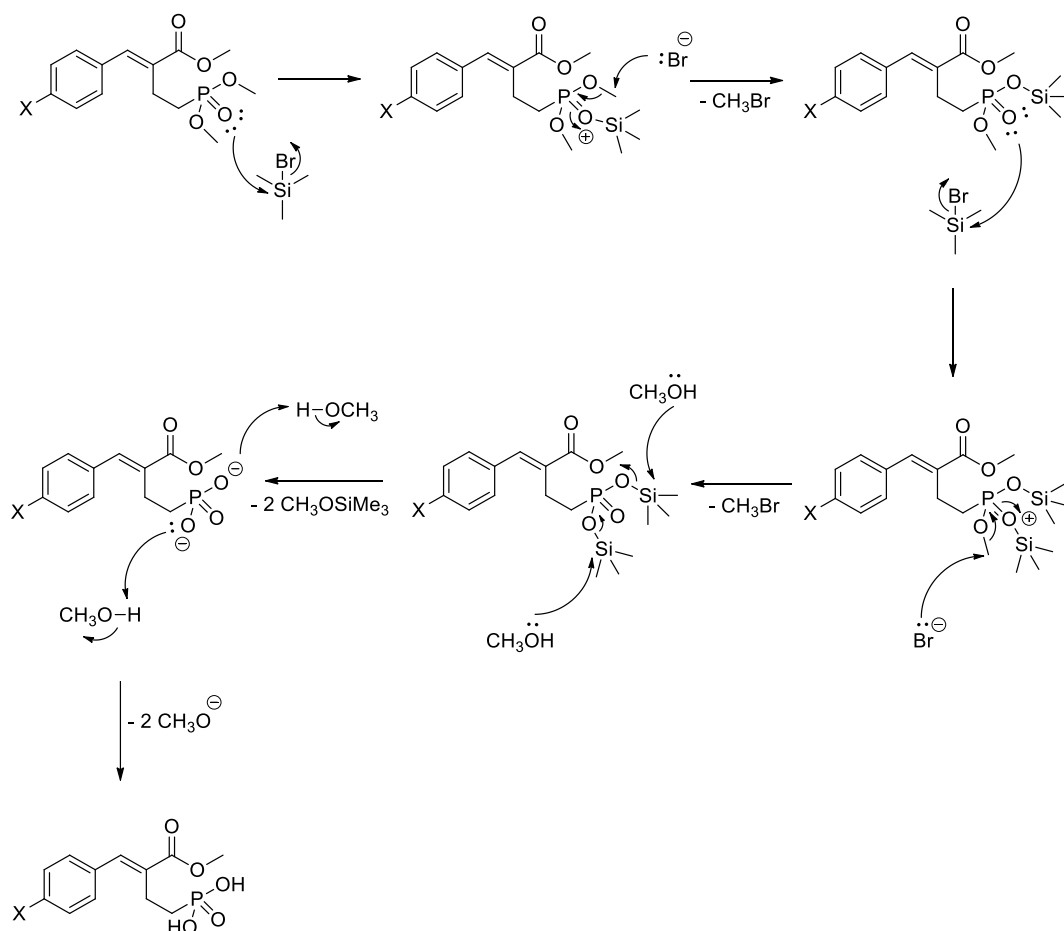
Οι διμεθυλοφωσφονικοί εστέρες **161-163** χρησιμοποιήθηκαν ως ενδιάμεσα για τη σύνθεση των φωσφονικών οξέων **165-167** και **168-169** (Σχήμα 76).



i) TMSBr, ξηρό CH₂Cl₂, 0 °C → r.t., 24 h, ii) MeOH, r.t., 30 min, iii) HCl 6N, αναρροή, 48 h.

Σχήμα 76. Αποπροστασία των ενδιάμεσων εστέρων 161-163 προς τα φωσφονικά οξέα 165-167 και 168-169.

Η διάσπαση των φωσφονικών εστέρων **161-163** με TMSBr περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός δι(τριμεθυλοσιλυλο)φωσφονικού εστέρα (BTSP), ο οποίος με προσθήκη MeOH μπορεί να υδρολυθεί και να δώσει τα αντίστοιχα φωσφονικά οξέα (Σχήμα 77). Να τονιστεί ότι η χρήση του TMSBr δεν επηρεάζει τους μεθυλεστέρες των καρβοξυλικών οξέων των ενώσεων **161-163**.



Σχήμα 77. Μηχανισμός διάσπασης φωσφονικών εστέρων με χρήση TMSBr.

Ο μηχανισμός αυτής της αντίδρασης δύο σταδίων είναι ανάλογος με το μηχανισμό της αντίδρασης Arbuzov, όπου το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων της φωσφορυλο-ομάδας προσβάλλει το μερικώς θετικά φορτισμένο άτομο πυριτίου του TMSBr. Το ανιόν βρωμίου προσβάλλει στη συνέχεια μία από τις μεθοξυ-ομάδες του εστέρα του φωσφονικού οξέος και σχηματίζεται ο μεθυλοτριμεθυλοσιλυλο-φωσφονικός εστέρας. Η επανάληψη αυτού του κύκλου οδηγεί στην υποκατάσταση και του δεύτερου μεθυλίου από την τριμεθυλοσιλυλο-ομάδα και σχηματίζεται ο δι(τριμεθυλοσιλυλο)φωσφονικός εστέρας που αντιδρώντας με MeOH διασπάται και δίνει το ελεύθερο φωσφονικό οξύ.

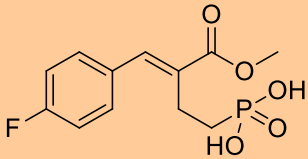
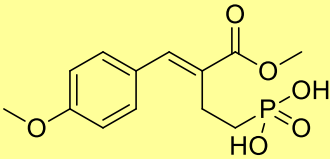
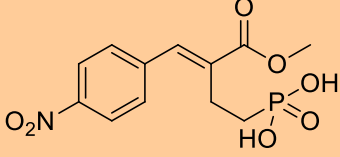
Οι ενώσεις **165-167** παραλήφθηκαν σε αναλογία ισομερών $E/Z = 95/5-97/3$, όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση των κορυφών των E - και Z -πρωτονίων στα φάσματα $^1\text{H NMR}$.

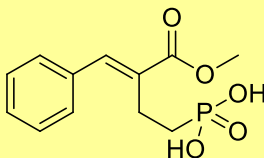
Οι ενώσεις **168** και **169** παραλήφθηκαν μετά από όξινη υδρόλυση των εστέρων **161** και **163**. Να σημειωθεί πως η αντίδραση δεν επηρεάζει τη στερεοχημεία των τελικών φωσφονικών οξέων, τα οποία παραλαμβάνονται κυρίως ως *E*-ισομερή. Το μεθοξυ-ανάλογο των ενώσεων **168** και **169** επιχειρήθηκε να συντεθεί τόσο με όξινη υδρόλυση του ενδιάμεσου εστέρα **162** όσο και με αλκαλική υδρόλυση της ένωσης **166**, ωστόσο σε καμία περίπτωση δεν παραλήφθηκε το επιθυμητό προϊόν.

4.5 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Στους Πίνακες 5 και 6 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων **165-167** έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *S. pasteurii*. Για σύγκριση παραβάλλονται οι ενώσεις **73** και **74**.

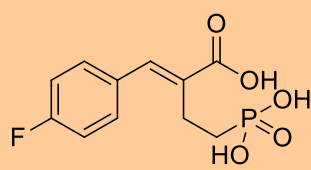
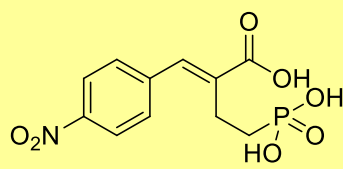
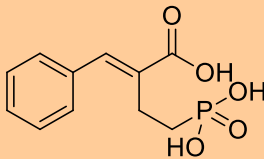
Πίνακας 5. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών μεθυλίων.

No	Ένωση	K_i [μ M]	
		Με επώαση	Χωρίς επώαση
165		47.4 ± 1.3	48.4 ± 1.6
166		292 ± 18	327 ± 15
167		54.1 ± 3.6	362 ± 4.7

73		3.05 ± 0.16	3.67 ± 0.18
----	---	-----------------	-----------------

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5 φαίνεται πως η εισαγωγή υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο μειώνει την ανασταλτική δράση των ενώσεων **165-167** τουλάχιστον κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με την ένωση αναφοράς **73**. Οι παραπάνω ενώσεις εμφάνισαν αντιστρεπτή ανταγωνιστική αναστολή. Η ένωση **167** είναι βραδείας δέσμευσης αντιστρεπτός αναστολέας.

Πίνακας 6. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών οξέων.

No	Ένωση	K_i [μ M]	
		Με επώαση	Χωρίς επώαση
168		27.9 ± 1.3	32.3 ± 2.6
169		59.9 ± 3.2	433 ± 14
74		66.7 ± 6.6	55.6 ± 5.4

Τα φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικά οξέα εμφάνισαν τιμές σταθεράς αναστολής παραπλήσιες με αυτές των αντίστοιχων εστέρων τους, αλλά και με τη μη υποκατεστημένη στον αρωματικό δακτύλιο ένωση αναφοράς **74** και κυμάνθηκαν σε μέτρια επίπεδα. Πρόκειται για αντιστρεπτούς ανταγωνιστικούς

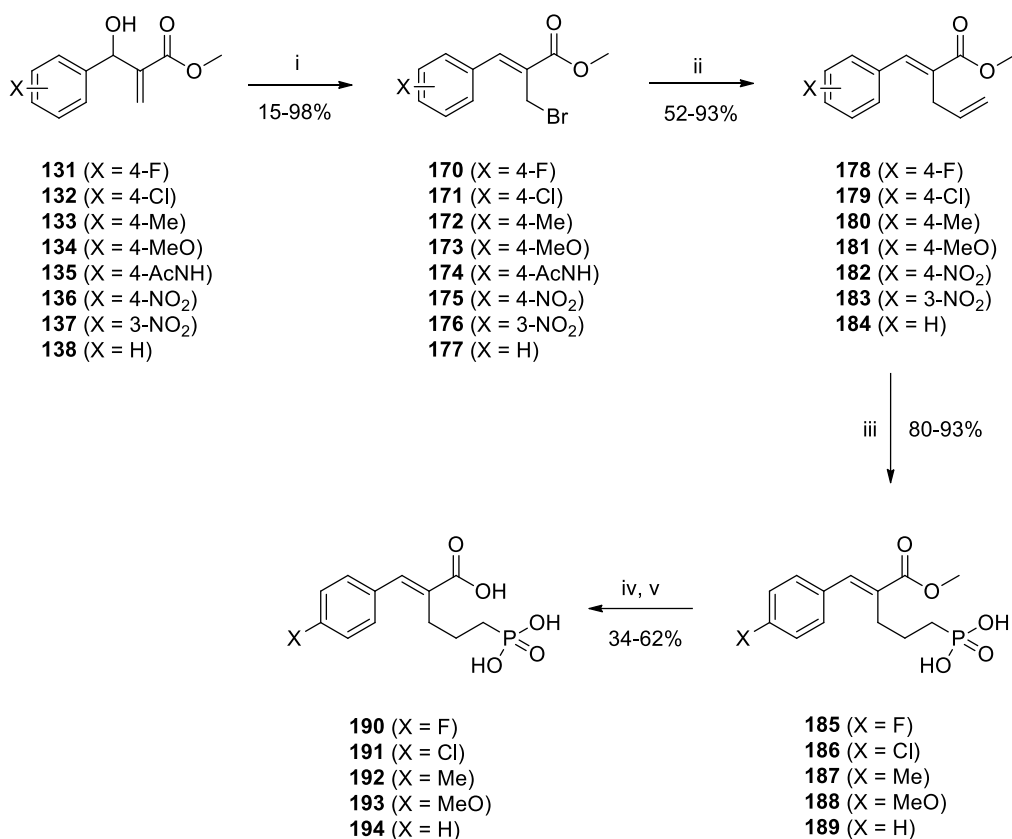
αναστολείς. Η ένωση **169** αποδείχθηκε βραδείας δέσμευσης αντιστρεπτός αναστολέας της ουρεάσης.

4.6 Σχεδιασμός (E)-φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Μελέτες σχέσης δομής-δράσης και βελτιστοποίησης της δομής των προηγούμενων αναστολέων οδήγησαν στον σχεδιασμό νέων μορίων. Η κύρια τροποποίηση αφορά στην αύξηση του μήκους του α -καρβονυλικού υποκαταστάτη, του συνδέσμου δηλαδή μεταξύ της φωσφονικής ομάδας και του κινναμωμικού σκελετού, η οποία αναμενόταν να επιδράσει στον τρόπο πρόσδεσης των υποψήφιων αναστολέων στην ενεργό περιοχή. Επιπλέον, η υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο αναμενόταν να επηρεάσει τη λιποφιλικότητα των ενώσεων, ενώ ο α,β -διπλός δεσμός σε συζυγία με το καρβονύλιο μπορεί να λειτουργήσει ως δέκτης Michael για τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με τη σουλφυδρυλομάδα της Cys³²².

4.7 Σύνθεση (E)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

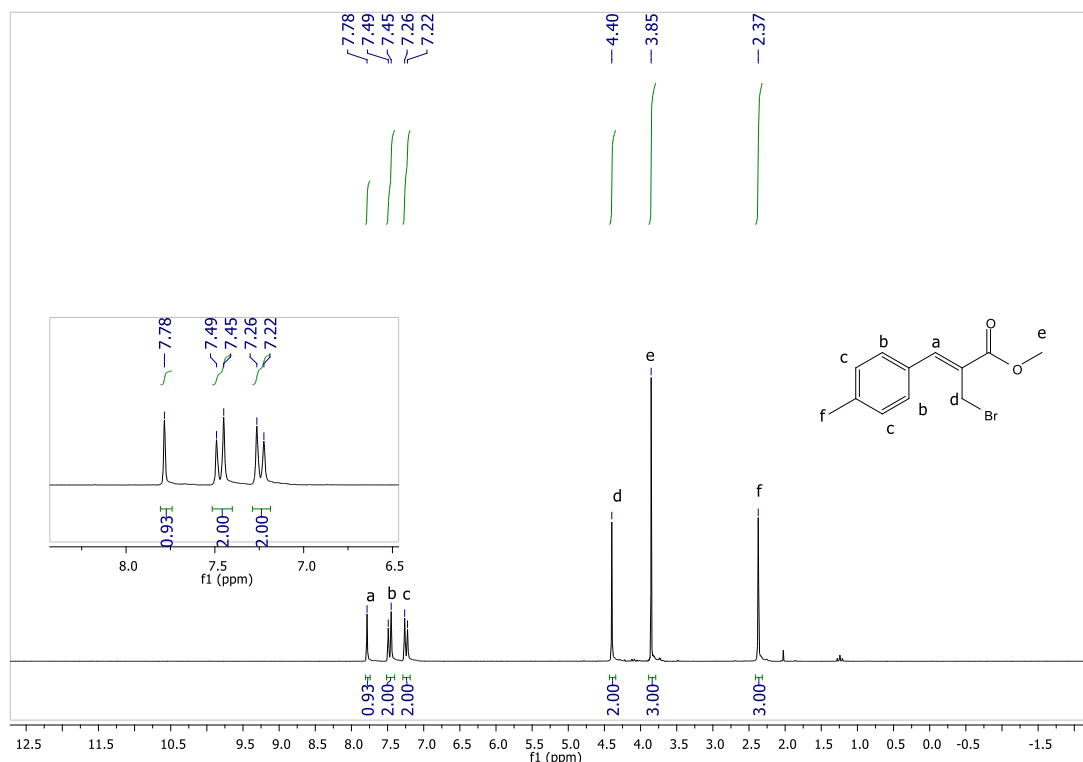
Για τη σύνθεση των τελικών φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών οξέων και εστέρων ακολουθήθηκε η πορεία που παρουσιάζεται στο Σχήμα 78, ξεκινώντας από πρώτη ύλη τις αλλυλικές αλκοόλες MBH **131-138**.



i) 48% w/w HBr, πυκνό H₂SO₄, r.t., 24 h, ii) (CH₂=CH₂)₄Sn, Pd(dba)₂, PPh₃, LiCl, ξηρό THF, Ar, r.t., 24 h, iii) 50% w/w H₃PO₂ (**116**), Pd₂(dba)₃, xantphos, DMF, O₂, 110 °C, 48-96 h, iv) NaOH 4N, MeOH, r.t., 15-20 d, v) HCl 6N.

Σχήμα 78. Πειραματική πορεία σύνθεσης των τελικών φωσφονοπροπυλοκινναμωμικών οξέων και εστέρων.

Οι αλλυλικές αλκοόλες **131-138**, οι οποίες συντέθηκαν όπως περιγράφεται στο Σχήμα 66, κατεργάστηκαν με 48% υδατικό διάλυμα HBr και καταλυτική ποσότητα πυκνού διαλύματος H₂SO₄ παρέχοντας τα βρωμίδια **170-177** σε εξαιρετικές αποδόσεις. Η αντίδραση αυτή, η οποία πραγματοποιείται μέσω αλλυλικής μετάθεσης, είναι τόσο τοποειδική όσο και στερεοειδική, καθώς παρέχει τα προϊόντα αποκλειστικά με Z-γεωμετρία. Αυτό αποδεικνύεται από τα φάσματα ¹H NMR των ενώσεων **170-177**, όπου παρατηρούμε το πρωτόνιο του διπλού δεσμού να συντονίζεται σε χημικές μετατοπίσεις 7.7-7.9, ενώ δεν παρατηρείται κορυφή σε υψηλότερα πεδία (Εικόνα 24).



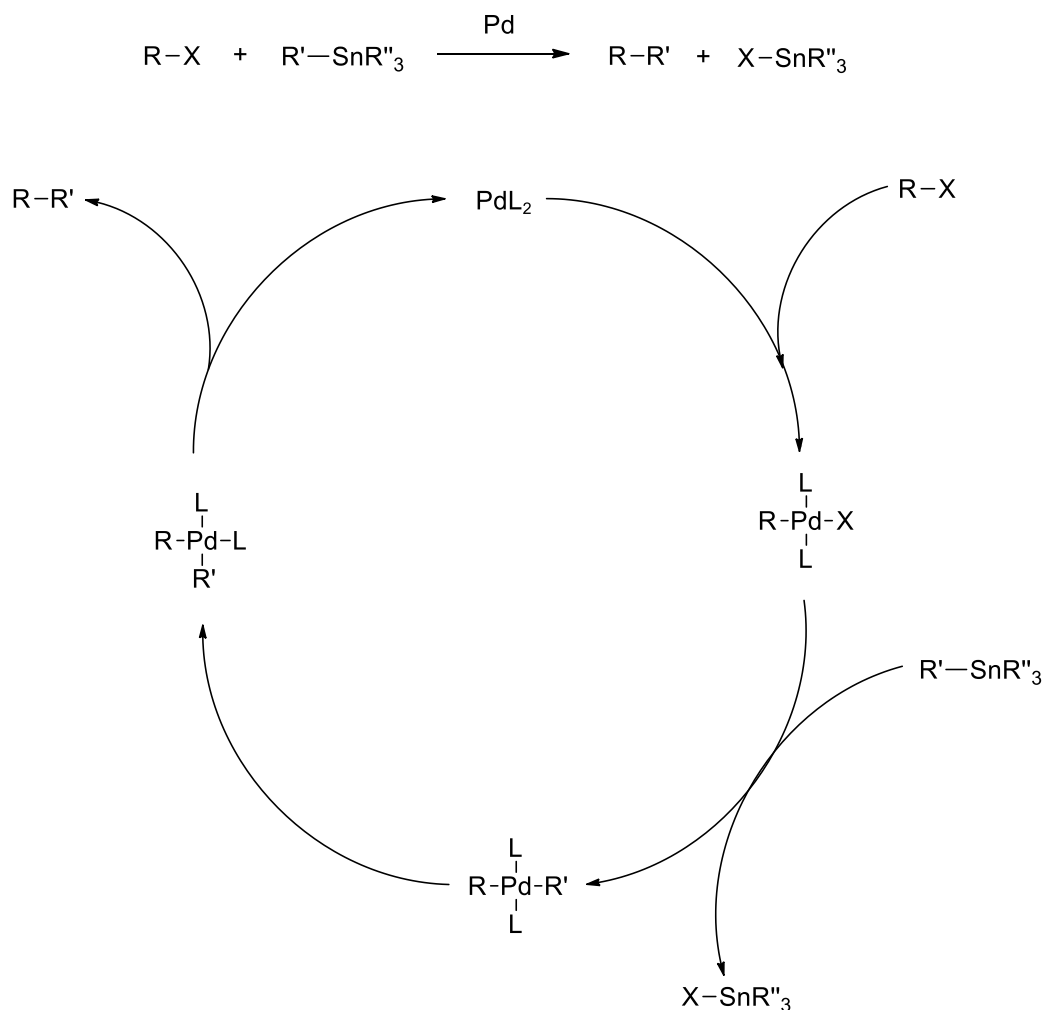
Εικόνα 24. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 172 σε CDCl₃.

Το δεύτερο στάδιο της παραπάνω πορείας αποτελεί μια αντίδραση σύζευξης Stille μεταξύ των βρωμιδίων **170-177** και τετραβινυλοκασιτέρου, παρουσία καταλύτη Pd(dba)₂ και PPh₃, με LiCl ως πρόσθετο και άνυδρο THF ως διαλύτη. Με αυτό τον τρόπο, παράγονται οι βινυλο-κινναμωμικοί εστέρες **178-184** σε ικανοποιητικές αποδόσεις. Από τα φάσματα ¹H NMR των ενώσεων **178-184** αποδεικνύεται πως αυτές παραλαμβάνονται αποκλειστικά με *E*-στεreoχημεία. Να σημειωθεί ότι το βρωμίδιο **174** δεν έδωσε το προϊόν της αντίδρασης Stille.

Μεταξύ των καταλυόμενων από μέταλλα μετάπτωσης αντιδράσεων, οι καταλυόμενες από Pd αντιδράσεις σύζευξης για τον σχηματισμό δεσμού C-C έχουν φτάσει σε τέτοιο επίπεδο εξειδίκευσης, ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν σε μια πληθώρα μετασχηματισμών που περιλαμβάνουν την ολική σύνθεση φυσικών προϊόντων, τη φαρμακευτική χημεία, τη χημική βιολογία, βιομηχανικές διαδικασίες, υλικά και νανοτεχνολογία.²⁶²

Η αντίδραση σύζευξης Stille έχει καθιερωθεί μαζί με την αντίδραση Suzuki ως μία από τις περισσότερο γενικές και εκλεκτικές αντιδράσεις καταλυόμενες από

Pd. Τα πρώτα παραδείγματα σύζευξης οργανοκασιτεριικών ενώσεων με ηλεκτρονιόφιλα παρουσιάσθηκαν κατά την περίοδο 1976-1977 από τις ερευνητικές ομάδες των Eaborn²⁶³ και Kosugi,²⁶⁴ ωστόσο ήταν η εκτεταμένη συνθετική και μηχανιστική έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Stille και τους συνεργάτες του²⁶⁵ το 1978 αυτή που καθιέρωσε την αντίδραση στην οργανική σύνθεση (Σχήμα 79).



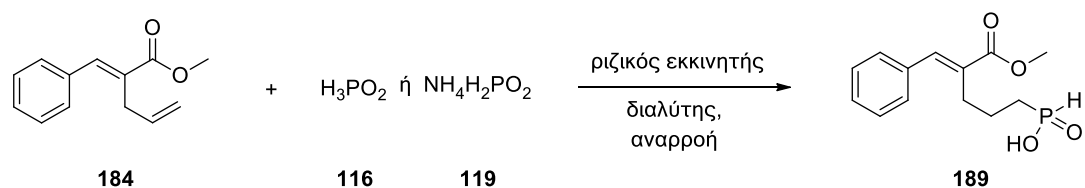
Σχήμα 79. Γενικό σχήμα και καταλυτικός κύκλος της Pd-καταλυόμενης σύζευξης Stille.

Το ενεργό καταλυτικό είδος της αντίδρασης φαίνεται να είναι ένα σύμπλοκο PdL_2 . Το πρώτο στάδιο του καταλυτικού κύκλου περιλαμβάνει την οξειδωτική προσθήκη του συμπλόκου PdL_2 στο ηλεκτρονιόφιλο αλογονίδιο ή ψευδοαλογονίδιο. Το επόμενο στάδιο είναι μια αντίδραση *trans*-μεταλλείωσης. Σε αυτό το στάδιο, η μία ομάδα του οργανοκασιτεριικού αντιδραστήριου

μεταφέρεται στο σύμπλοκο του Pd, ενώ το αλογόνο ή ψευδοαλογόνο ενώνεται με το άτομο κασσιτέρου. Ακολουθεί μία *cis*-ισομερείωση, ενώ στο τελευταίο στάδιο του καταλυτικού κύκλου πραγματοποιείται μία αναγωγική απόσπαση, οπότε σχηματίζεται το προϊόν της σύζευξης Stille και αναγεννάται ο καταλύτης.

Μεταξύ των πλεονεκτημάτων που καθιστούν την αντίδραση Stille ανταγωνιστική έναντι άλλων καταλυόμενων από Pd αντιδράσεων σύζευξης περιλαμβάνονται οι ήπιες συνθήκες της αντίδρασης, που την αναδεικνύουν συμβατή με τις περισσότερες λειτουργικές ομάδες και περιορίζουν τα επιπλέον βήματα προστασίας και αποπροστασίας, η σταθερότητα των οργανοκασσιτερικών ενώσεων στην υγρασία και στο οξυγόνο, η εμπορική διαθεσιμότητα των οργανοκασσιτερικών αντιδραστήριων, καθώς και η ευκολία σύνθεσής τους. Από την άλλη πλευρά όμως δεν πρέπει να παραβλέπεται η πιθανή επιμόλυνση των τελικών προϊόντων της αντίδρασης με Sn και η τοξικότητα των τρι-*n*-βουτυλο-κασσιτερικών ενώσεων που είναι τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.^{262,266}

Το επόμενο στάδιο προς τη σύνθεση των φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων απαιτούσε την υδροφωσφινυλίωση των αλκενίων **178-184** και το σχηματισμό φωσφινικών οξέων, τα οποία μετά θα οξειδώνονταν προς τα αντίστοιχα φωσφονικά οξέα. Για τον σχηματισμού του δεσμού C-P μεταξύ των μη ενεργοποιημένων ακραίων αλκενίων **178-184** και πηγής φωσφόρου, δοκιμάστηκαν αρχικά θερμικές αντιδράσεις υδροφωσφινυλίωσης με τη χρήση ριζικών εκκινητών. Χρησιμοποιήθηκε το αλκένιο **184**, ως πηγή φωσφόρου χρησιμοποιήθηκε είτε 50% w/w υδατικό διάλυμα H₃PO₂ είτε υποφωσφορώδες αμμώνιο NH₄H₂PO₂, ενώ οι ριζικοί εκκινητές που δοκιμάστηκαν ήταν το AIBN, το δι-*tert*-βούτυλο-υπεροξειδίο και το διβενζόυλο-υπεροξειδίο σε διάφορους διαλύτες (Σχήμα 80).



Σχήμα 80. Υδροφωσφινυλίωση του αλκενίου **184** με τη χρήση ριζικών εκκινητών.

Οι δοκιμαστικές αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα υδροφωσφινυλίωσης του αλκενίου 184 με ή χωρίς τη χρήση ριζικών εκκινητών παρουσία θέρμανσης.

Ισοδύναμα αλκενίου 184	Ισοδύναμα πηγής P	Διαλύτης	Θέρμανση (απουσία ριζικού εκκινητή)	Ισοδύναμα AIBN	Ισοδύναμα <i>t</i> -βουτυλο-υπεροξειδίου	Ισοδύναμα διβενζόυλο-υπεροξειδίου	31P NMR μετατροπή %
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη	●				17 %
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη		1			25%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη			1		17%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη				1	16%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη			0.25		3%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη				0.25	5%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	EtOH	●				0%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	EtOH		1			0%

Πίνακας 7. Αποτελέσματα υδροφωσφινυλίωσης του αλκενίου 184 με ή χωρίς τη χρήση ριζικών εκκινητών παρουσία θέρμανσης (συνέχεια).

Ισοδύναμα αλκενίου 184	Ισοδύναμα πηγής P	Διαλύτης	Θέρμανση (απουσία ριζικού εκκινητή)	Ισοδύναμα AIBN	Ισοδύναμα <i>t</i> -βουτυλο-υπεροξειδίου	Ισοδύναμα διβενζόυλο-υπεροξειδίου	31P NMR μετατροπή %
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	EtOH			1		0%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	EtOH				1	0%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη		1 + 0.5 στις 24h + 0.5 στις 6h			21% (48h) 21% (54h)
1	5 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη		0.25			14%
1	10 (50% w/w H ₃ PO ₂)	Διοξάνη		0.25			15%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	MeCN		0.25			4%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	MeOH	•				0%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	MeOH		0.25			4%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	MeOH			0.25		0%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	MeOH				0.25	5%
1	2 (50% w/w H ₃ PO ₂)	MeOH		0.25			4%

Πίνακας 7. Αποτελέσματα υδροφωσφινυλίωσης του αλκενίου 184 με ή χωρίς τη χρήση ριζικών εκκινητών παρουσία θέρμανσης (συνέχεια).

Ισοδύναμα αλκενίου 184	Ισοδύναμα πηγής P	Διαλύτης	Θέρμανση (απουσία ριζικού εκκινητή)	Ισοδύναμα AIBN	Ισοδύναμα ε-βουτυλο-υπεροξειδίου	Ισοδύναμα διβενζόυλο-υπεροξειδίου	31P NMR μετατροπή %
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	MeOH	●				0%
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	MeOH		0.4 + 0.25 (στις 24h)			16% (24h) 17% (48h)
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	MeOH			0.4 + 0.25 (στις 24h)		0% (24h) 0% (48h)
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	MeOH				0.4 + 0.25 (στις 24h)	11% (24h) 11% (48h)
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Διοξάνη	●				19%
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Διοξάνη		0.4			12%
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Διοξάνη			0.4		5%
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Διοξάνη				0.4	14%
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Προπυλε- νογλυκόλη	●				0%

Πίνακας 7. Αποτελέσματα υδροφωσφινυλίωσης του αλκενίου 184 με ή χωρίς τη χρήση ριζικών εκκινήτων παρουσία θέρμανσης (συνέχεια).

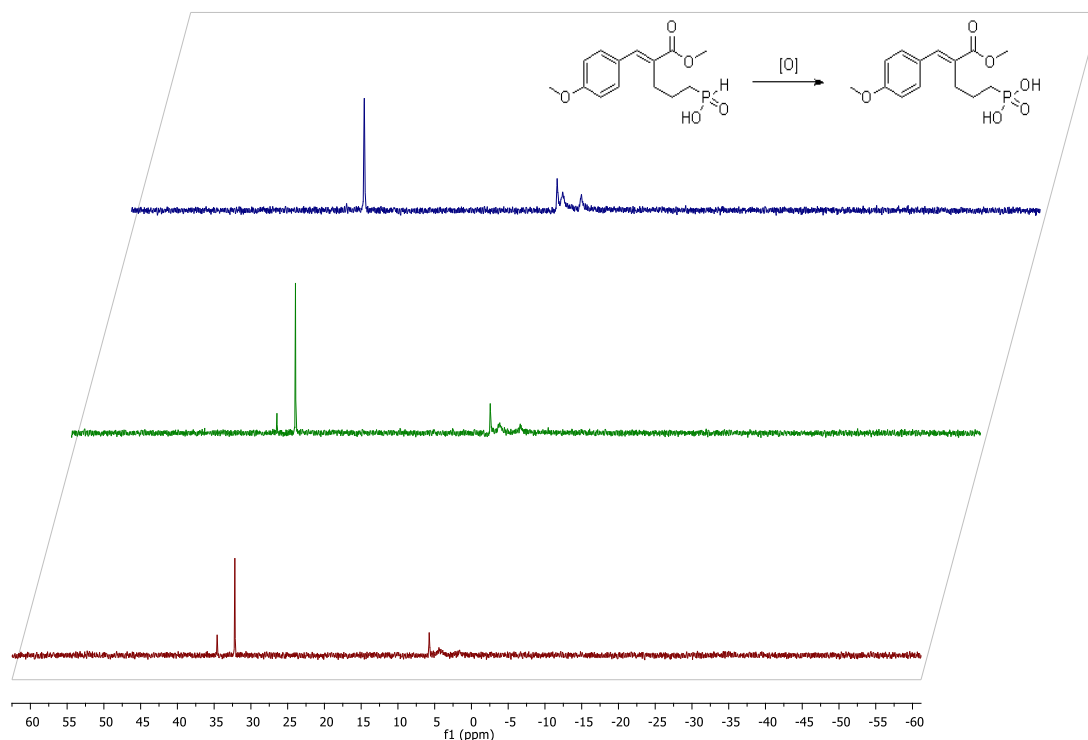
Ισοδύναμα αλκενίου 184	Ισοδύναμα πηγής P	Διαλύτης	Θέρμανση (απουσία ριζικού εκκινήτη)	Ισοδύναμα AIBN	Ισοδύναμα <i>t</i> -βουτυλο-υπεροξειδίου	Ισοδύναμα διβενζύλο-υπεροξειδίου	³¹ P NMR μετατροπή %
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Προπυλε-νογλυκόλη		0.4			18%
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Προπυλε-νογλυκόλη			0.4		12%
1	4 (NH ₄ H ₂ PO ₂)	Προπυλε-νογλυκόλη				0.4	10%

Η αντίδραση του Σχήματος 80 πραγματοποιήθηκε και με τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας. Χρησιμοποιήθηκε το αλκένιο **184**, 50% w/w H₃PO₂ σε διαλύτη διοξάνη. Το μίγμα της αντίδρασης ακτινοβολήθηκε για 1 h στους 180 °C, σε πίεση 30 psi και ισχύ 100 W. Ωστόσο, και σε αυτή την περίπτωση η μετατροπή δεν ξεπέρασε το 5%.

Σε όλες τις παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος ³¹P NMR από το μίγμα της αντίδρασης και μετρήθηκε η % μετατροπή, ενώ λήφθηκαν και φάσματα φασματομετρίας μάζας. Σε ορισμένες περιπτώσεις απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το τελικό προϊόν. Σε κάθε περίπτωση πάντως οι αποδόσεις των αντιδράσεων ήταν χαμηλές, ενώ διαπιστώθηκε ότι έδιναν παραπροϊόντα, καθώς και μίγματα τοποϊσομερών ή προϊόντων πολυμερισμού.

Για τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική λύση η καταλυόμενη από Pd ενός σταδίου μέθοδος υδροφωσφινυλίωσης-οξειδωσης που αναπτύχθηκε από τον Montchamp και τους συνεργάτες του.²⁶⁷ Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί 50% w/w υδατικό διάλυμα H₃PO₂ ως πηγή φωσφόρου, Pd₂(dba)₃ ως καταλύτη, xantphos ως προσδότη, αέρα ως οξειδωτικό παράγοντα και έδωσε τους φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικούς εστέρες **185-189** σε πολύ καλές αποδόσεις και αποκλειστικά σε *E*-γεωμετρία,

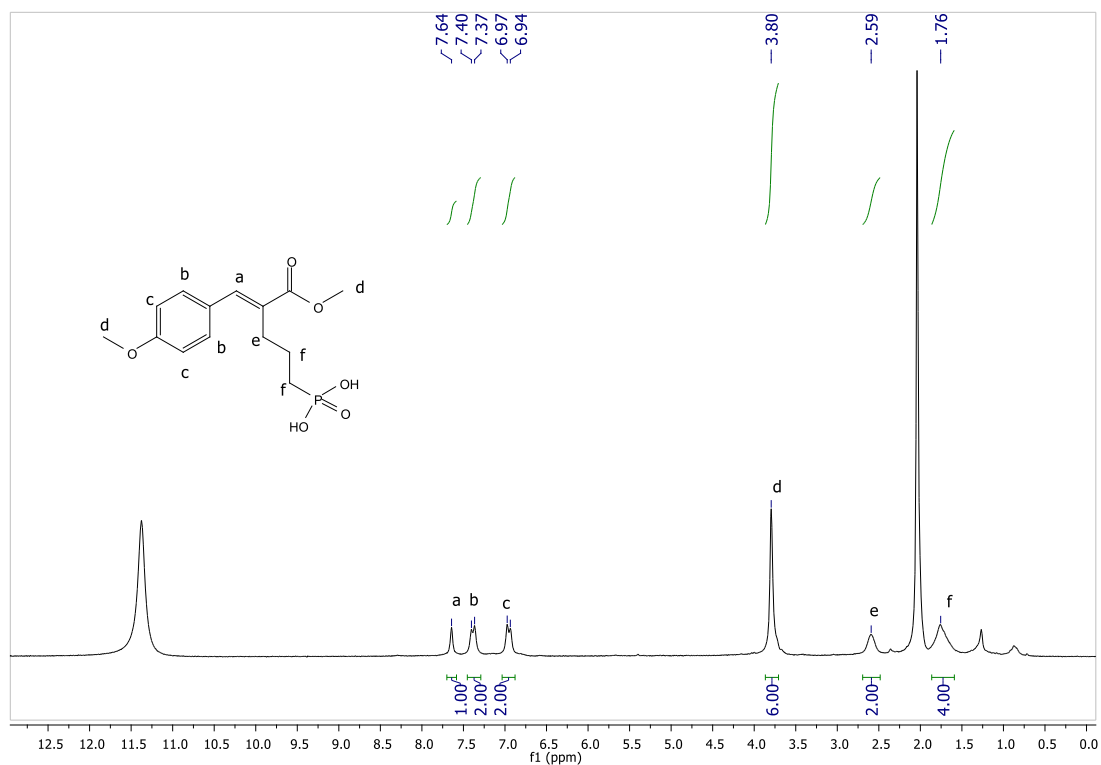
όπως διαπιστώνεται από τα φάσματα ^1H NMR. Να σημειωθεί πως τα δύο νιτρο-παράγωγα **182** και **183** δεν έδωσαν τα αντίστοιχα φωσφονικά οξέα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με τη λήψη φάσματος ^{31}P NMR από το μίγμα της αντίδρασης. Η εξαφάνιση του σήματος του φωσφόρου που αντιστοιχεί στο φωσφινικό οξύ σήμαινε την πλήρη οξειδωσή του προς το αντίστοιχο φωσφονικό οξύ (Εικόνα 25).



Εικόνα 25. Συγκριτικά φάσματα ^{31}P NMR από το μίγμα της αντίδρασης της ένωσης **188 (από κάτω προς τα πάνω: 24 h, 48 h και 72 h).**

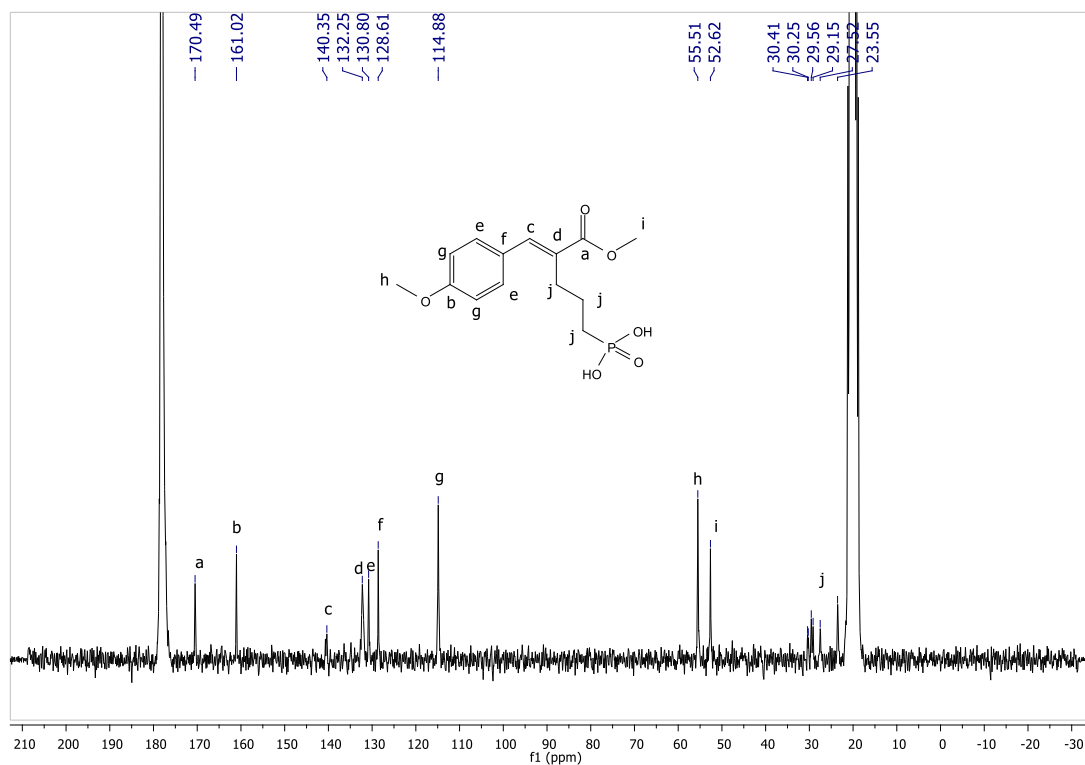
Αν και ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, θα μπορούσε να πραγματοποιείται είτε μέσω της απευθείας ενεργοποίησης του δεσμού P-H, με το Pd να εισέρχεται στο δεσμό P-H του *H*-φωσφινικού οξέος, είτε μέσω μιας έμμεσης πορείας, όπου το μεταλλικό σύμπλοκο ενεργοποιεί πρώτα το μοριακό οξυγόνο που είναι παρόν στο διάλυμα της αντίδρασης και σχηματίζει δραστικά είδη, όπως μία ρίζα, η οποία στη συνέχεια αντιδρά με το *H*-φωσφινικό οξύ.²⁶⁷

Στις Εικόνες 26, 27 και 28 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H , ^{13}C και ^{31}P NMR της ένωσης **188**, αντίστοιχα.



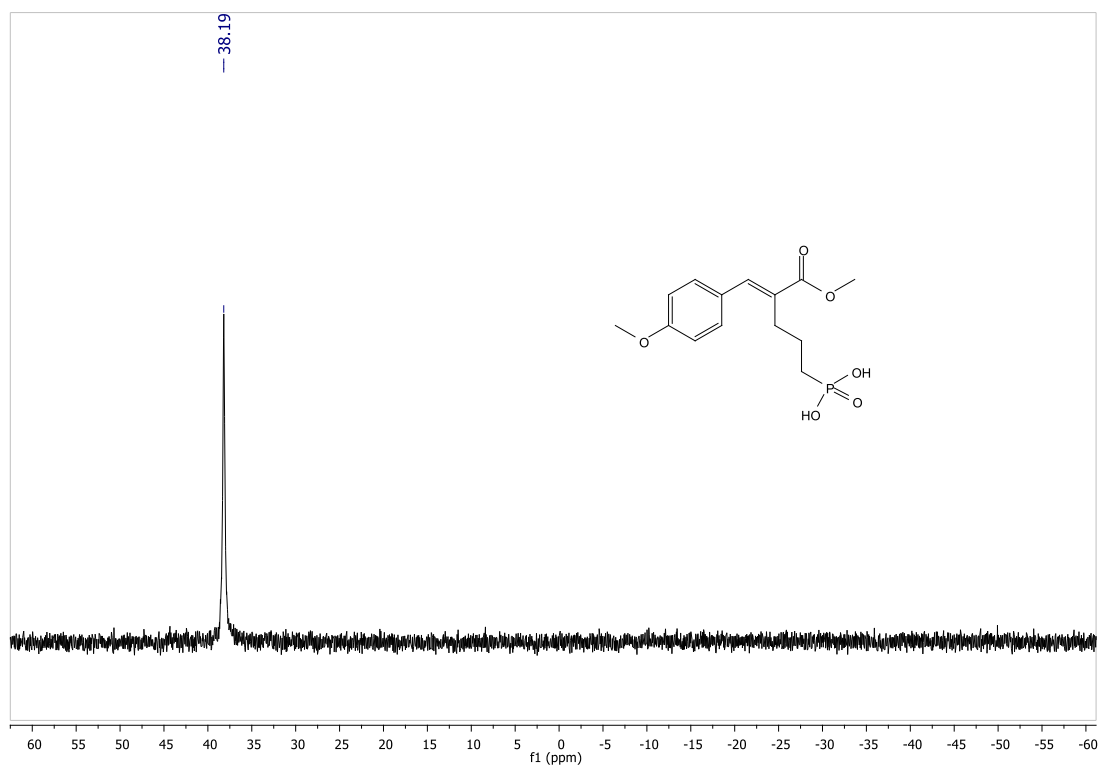
Εικόνα 26. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 188 σε CD₃COOD.

Στο φάσμα ¹H NMR της ένωσης **188** και σε χημική μετατόπιση 7.64 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο του διπλού δεσμού, ενώ οι διπλές κορυφές 7.38 και 6.95 ppm αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης. Η κορυφή στα 3.80 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλεστέρα, καθώς και σε αυτά του μεθυλίου της μεθοξυ-ομάδας. Τέλος, σε χημικές μετατοπίσεις 2.68-2.50 ppm και 1.88-1.60 ppm συντονίζονται τα έξι πρωτόνια των μεθυλενίων της ένωσης.



Εικόνα 27. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **188** σε CD_3COOD .

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **188**, σε χημική μετατόπιση 170.5 ppm συντονίζεται ο άνθρακας του καρβονυλίου της ένωσης, ενώ σε χημική μετατόπιση 161.0 ppm ο αρωματικός άνθρακας που φέρει τη μεθοξυ-ομάδα. Οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή 140.4-114.9 ppm αντιστοιχούν στους υπόλοιπους αρωματικούς άνθρακες, καθώς και στους δύο άνθρακες του διπλού δεσμού. Σε χημική μετατόπιση 55.5 ppm συντονίζεται ο άνθρακας της μεθοξυ-ομάδας, ενώ στα 52.6 ppm ο άνθρακας του μεθυλεστέρα. Τέλος, οι κορυφές στην περιοχή 30.4-23.6 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες των τριών μεθυλενίων της ένωσης.



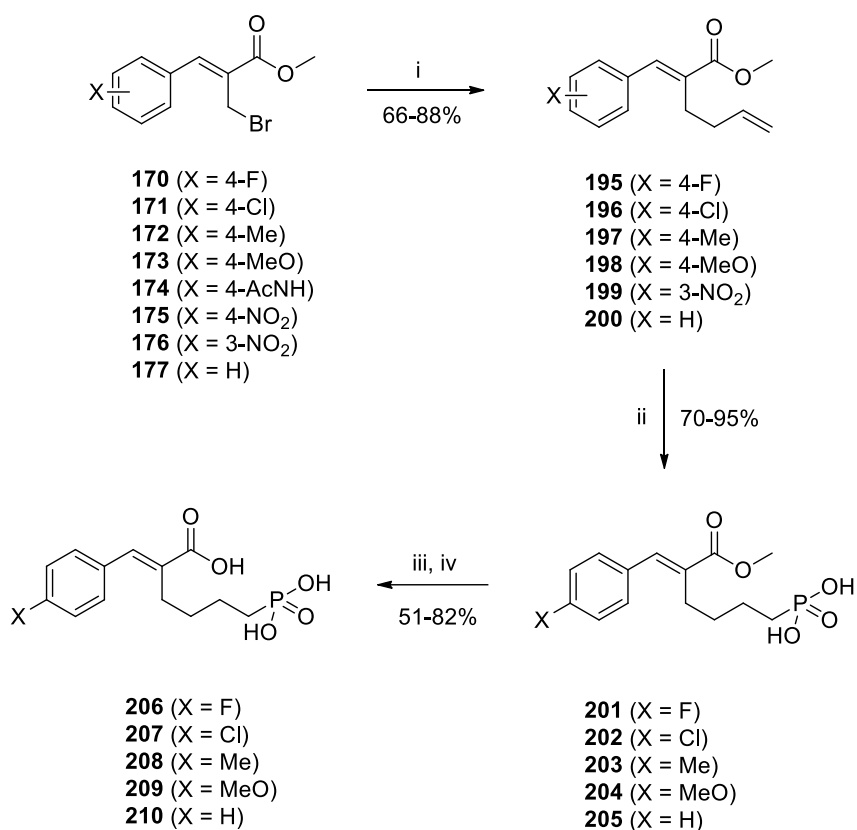
Εικόνα 28. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης **188 σε CD_3COOD .**

Στο φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης **188** παρατηρούμε μία κορυφή σε χημική μετατόπιση 38.19 ppm, που αντιστοιχεί στο άτομο φωσφόρου του φωσφονικού οξέος της ένωσης.

Το τελευταίο στάδιο για τη σύνθεση των φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών οξέων **190-194** ήταν η αλκαλική υδρόλυση των ενώσεων **185-189**. Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχθηκε με TLC. Τα τελικά προϊόντα παραλήφθηκαν σε μέτριες έως ικανοποιητικές αποδόσεις, ενώ διατηρείται η *E*-γεωμετρία (Σχήμα 78).

4.8 Σύνθεση (*E*)-φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

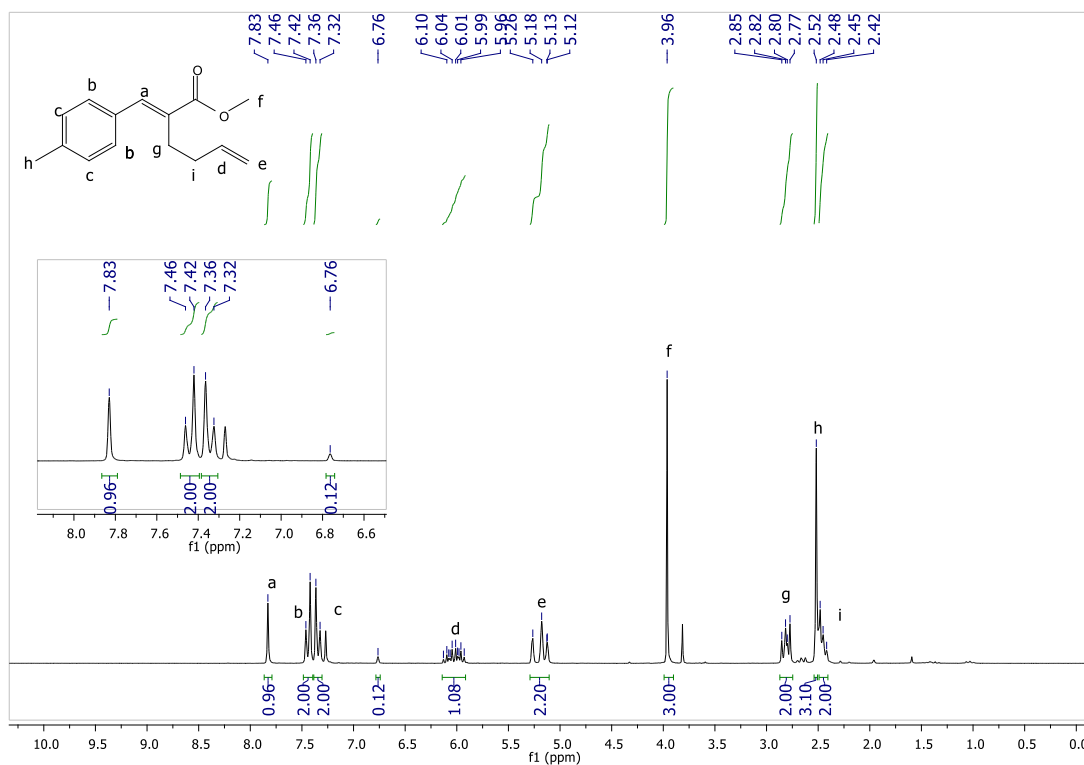
Η πορεία σύνθεσης των φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών οξέων και εστέρων ήταν παρόμοια με αυτή που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των φωσφονοπροπυλο-ενώσεων (Σχήμα 81).



i) (CH₂=CHCH₂)SnBu₃, Pd(dba)₂, PPh₃, LiCl, ξηρό THF, Ar, r.t., 24 h, ii) 50% w/w H₃PO₂ **116**, Pd₂(dba)₃, xantphos, DMF, O₂, 110 °C, 48-96 h, iii) NaOH 4N, MeOH, r.t., 15-20 d, iv) HCl 6N.

Σχήμα 81. Πειραματική πορεία σύνθεσης των τελικών φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών οξέων και εστέρων.

Η διαφορά της παραπάνω πειραματικής πορείας σε σχέση με αυτή του Σχήματος 78 αφορά στο πρώτο στάδιο, την αντίδραση σύζευξης Stille. Στη θέση του τετραβινυλοκασιτέρου χρησιμοποιήθηκε αλλυλοτριβουτυλοκασίτερος παρέχοντας τους αλλυλο-κινναμωμικούς εστέρες **195-200** σε πολύ καλές αποδόσεις. Από τα φάσματα ¹H NMR των ενώσεων **195-200** αποδεικνύεται πως αυτές παραλαμβάνονται σε αναλογία E/Z που κυμαίνεται από 78/22 για την ένωση **199** έως και 100/0 για την **198**. Η αναλογία των ισομερών προσδιορίστηκε ολοκληρώνοντας στα φάσματα ¹H NMR τις κορυφές που προέρχονται από τα σήματα των πρωτονίων του διπλού δεσμού των δύο ισομερών (Εικόνα 29).



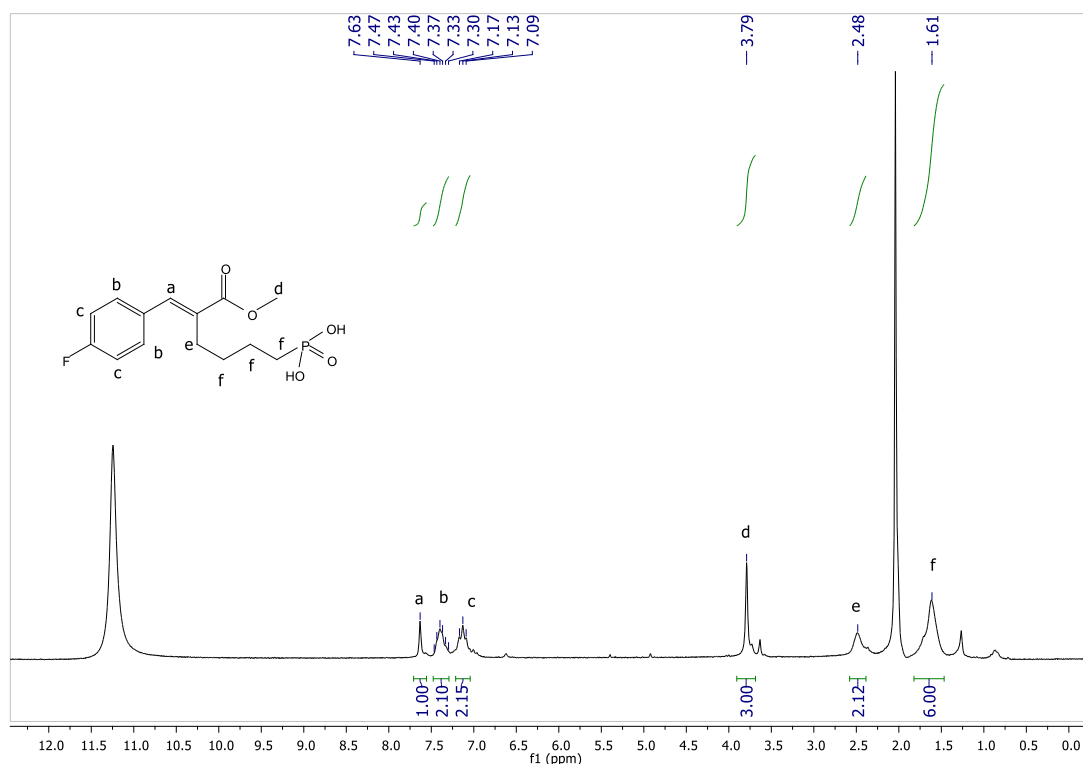
Εικόνα 29. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης **197** σε CDCl₃.

Στο φάσμα ¹H NMR της ένωσης **197** παρατηρούμε μία κορυφή σε χημική μετατόπιση 7.83 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού του *E*-ισομερούς, καθώς και μία κορυφή σε χημική μετατόπιση 6.76 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού του *Z*-ισομερούς. Η αναλογία 0.96/0.12, που προκύπτει μετά από ολοκλήρωση των δύο κορυφών, αντιστοιχεί στην αναλογία *E/Z*=89:11.

Να σημειωθεί ότι λόγω δυσκολίας στο διαχωρισμό των ισομερών με χρωματογραφία στήλης, οι ενώσεις **195-200** χρησιμοποιήθηκαν ως μίγμα διαστερεομερών. Ακόμη, τα βρωμίδια **174** και **175** δεν έδωσαν τα προϊόντα της αντίδρασης Stille.

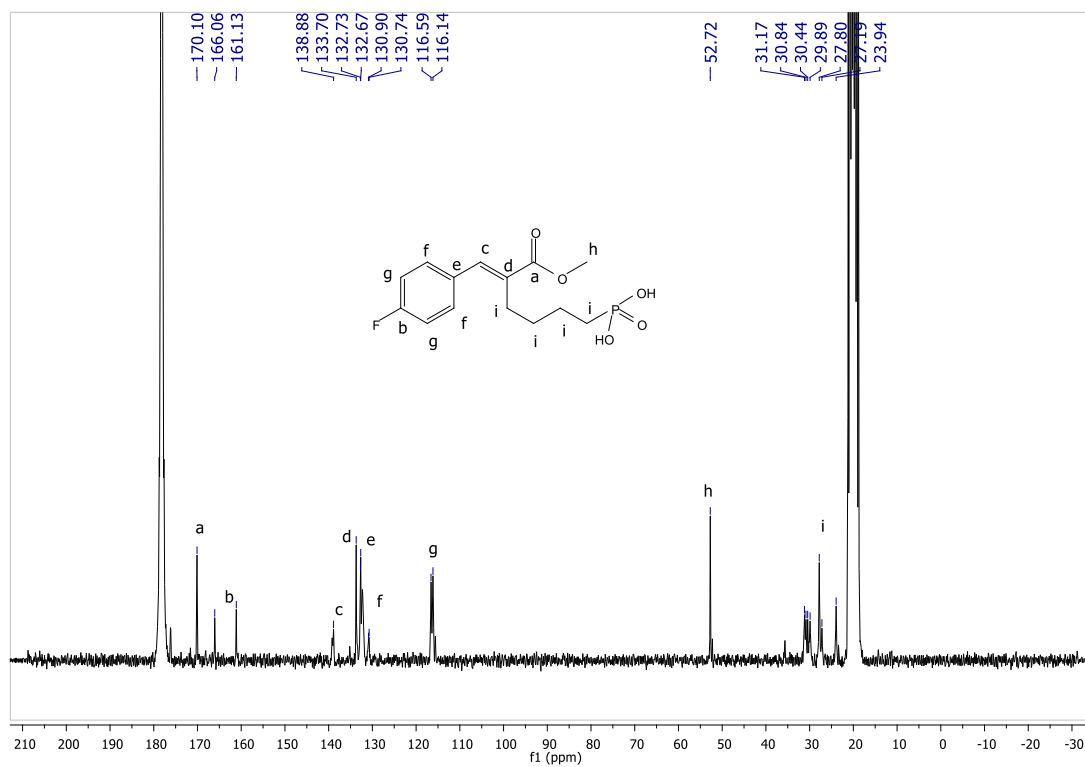
Στο δεύτερο στάδιο της πορείας, όπου συντίθενται οι φωσφονοβουτυλοκινναμωμικοί εστέρες παρατηρείται η ίδια *E/Z* αναλογία, η οποία διατηρήθηκε και μετά την αλκαλική υδρόλυση των ενώσεων **201-205**. Το *m*-νιτροπαράγωγο **199** δεν έδωσε την αντίδραση σχηματισμού του αντίστοιχου φωσφονικού οξέος. Στις Εικόνες 29, 30 και 31 που ακολουθούν παρατίθενται αντίστοιχα τα φάσματα ¹H, ¹³C και ³¹P NMR της ένωσης **201**.

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης **201** και σε χημική μετατόπιση 7.63 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο του διπλού δεσμού της ένωσης, ενώ στην περιοχή 7.47-7.09 ppm συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια. Η κορυφή σε χημική μετατόπιση 3.79 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλεστέρα, ενώ οι πολλαπλές κορυφές στις περιοχές 2.60-2.37 και 1.83-1.43 ppm αντιστοιχούν στα οκτώ πρωτόνια των μεθυλενίων (Εικόνα 30).



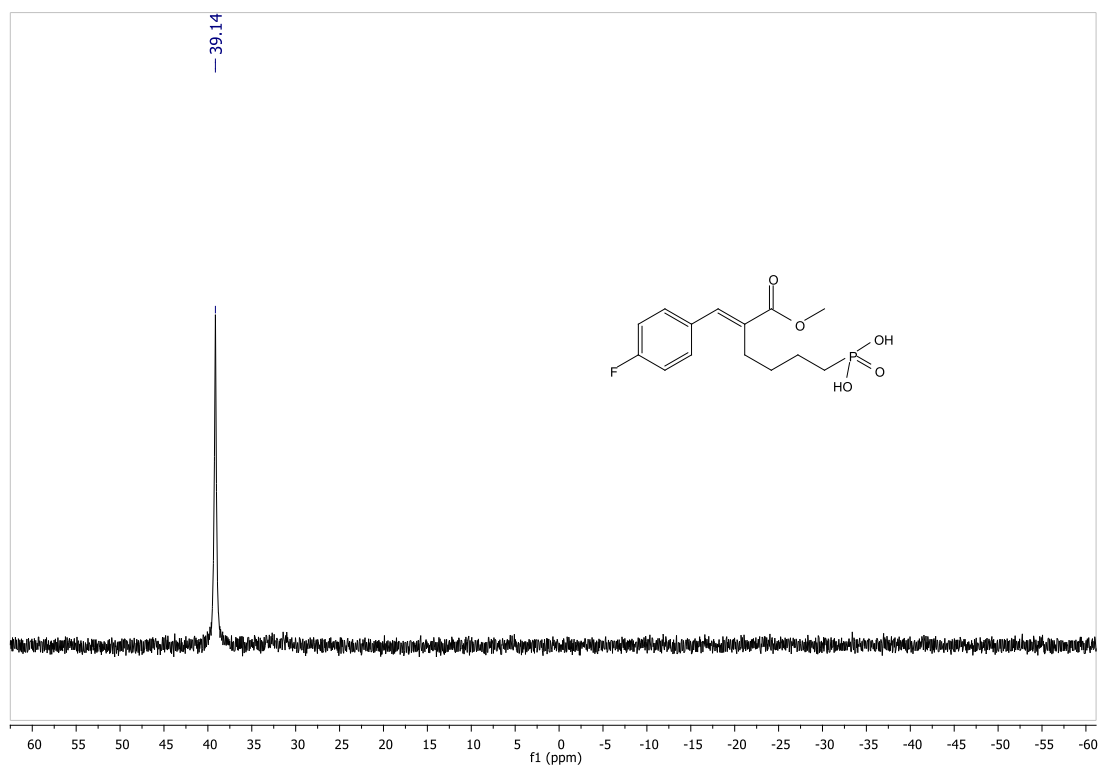
Εικόνα 30. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **201** σε διαλύτη CD_3COOD .

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **201** (Εικόνα 31) και σε χημική μετατόπιση 170.1 ppm συντονίζεται ο καρβονυλικός άνθρακας, ενώ η διπλή κορυφή στα 163.6 ppm ($J=248.0$ Hz) αντιστοιχεί στον άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου που φέρει το άτομο του φθορίου. Στην περιοχή 138.9-116.1 ppm συντονίζονται οι υπόλοιποι αρωματικοί άνθρακες, καθώς και οι άνθρακες του διπλού δεσμού του μορίου. Ο άνθρακας του μεθυλεστέρα συντονίζεται σε χημική μετατόπιση 52.7 ppm, ενώ οι κορυφές της περιοχής 31.2-23.9 ppm αντιστοιχούν στους άνθρακες των μεθυλενίων του μορίου και σχάζονται σε διπλές λόγω του γειτονικού ατόμου του φωσφόρου.



Εικόνα 31. Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 201 σε διαλύτη CD₃COOD.

Στο φάσμα ³¹P NMR της ένωσης **201** και σε χημική μετατόπιση 39.14 ppm συντονίζεται το άτομο φωσφόρου της ένωσης (Εικόνα 32).

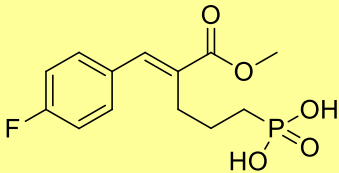
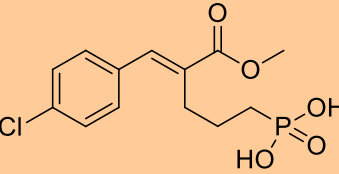
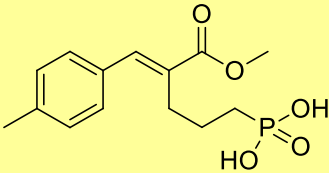
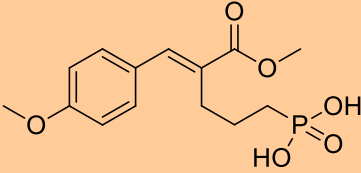
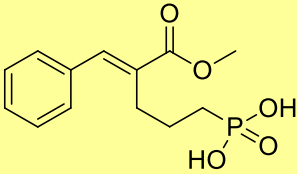
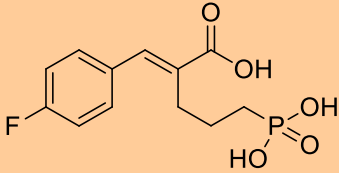


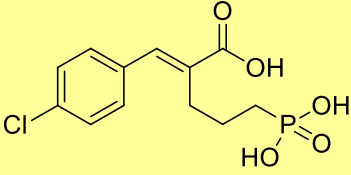
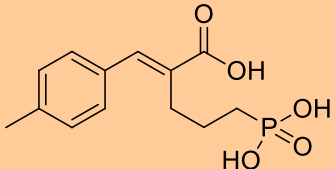
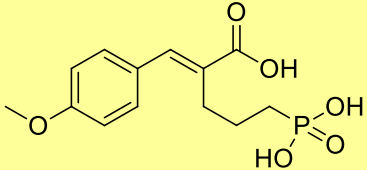
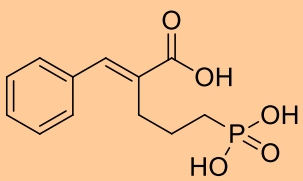
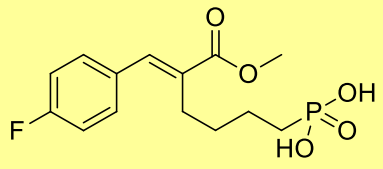
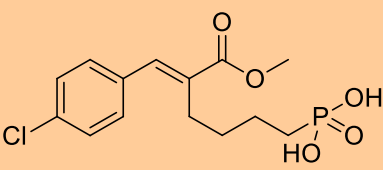
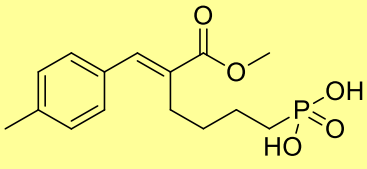
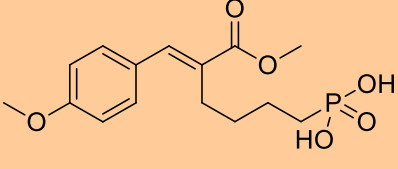
Εικόνα 32. Φάσμα ^{31}P NMR της ένωσης 201 σε διαλύτη CD_3COOD .

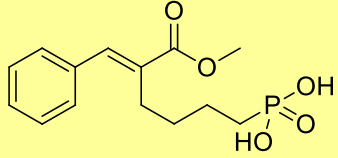
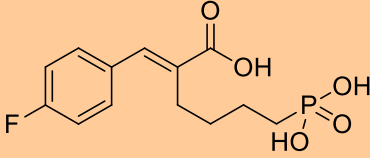
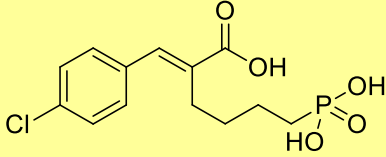
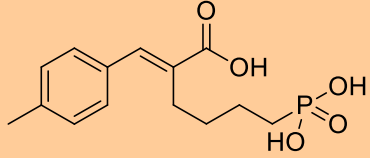
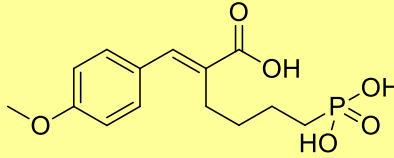
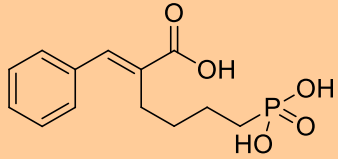
4.9 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης (*E*)-φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Οι ενώσεις **185-194** και **201-210** ελέγχθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της SPU. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Τιμές IC_{50} και σταθερών αναστολής K_i των φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλο-κινναμωμικών μεθυλίων και ελεύθερων οξέων.

No	Ένωση	IC_{50}^{0h} [μ M]	IC_{50}^{2h} [μ M]	K_i [μ M]
185		221 ± 12	105 ± 7.2	87.2 ± 3.3
186		109 ± 5.6	49.8 ± 1.3	42.5 ± 1.5
187		265 ± 13	248 ± 11	227 ± 11
188		35.3 ± 1.3	10.8 ± 0.46	6.04 ± 0.36
189		449 ± 22	328 ± 13	289 ± 12
190		4.90 ± 0.15	3.82 ± 0.14	1.80 ± 0.059

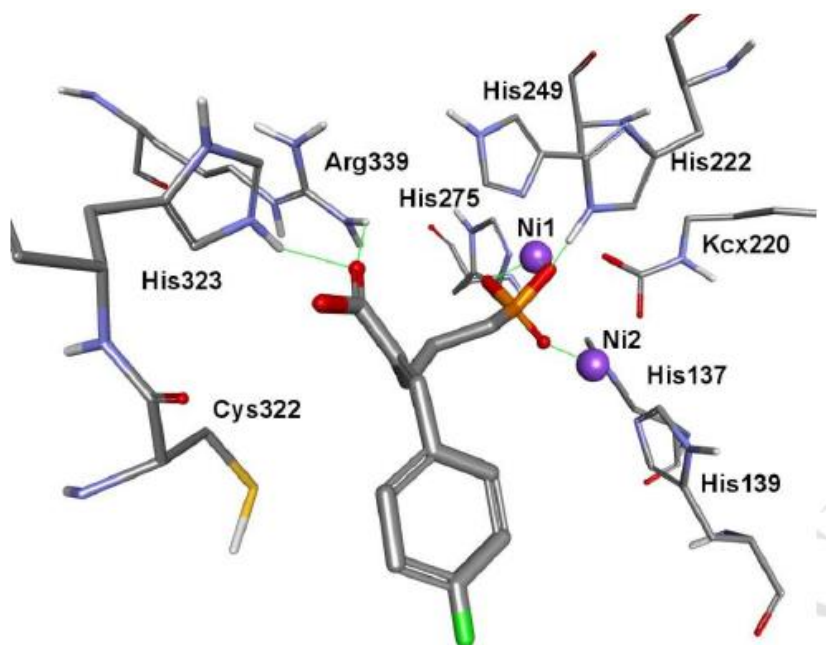
191		2.49 ± 0.079	1.62 ± 0.069	1.43 ± 0.056
192		30.0 ± 1.3	24.6 ± 0.90	19.4 ± 0.72
193		10.0 ± 0.45	4.98 ± 0.18	3.40 ± 0.10
194		3.10 ± 0.12	0.743 ± 0.023	0.509 ± 0.019
201		164 ± 5.8	130 ± 4.5	116 ± 5.0
202		58.3 ± 2.8	6.35 ± 0.23	4.71 ± 0.18
203		294 ± 14	261 ± 11	219 ± 9.8
204		24.5 ± 1.1	22.6 ± 0.99	21.4 ± 0.84

205		55.0 ± 1.5	54.0 ± 1.3	50.5 ± 2.7
206		9.98 ± 0.36	2.91 ± 0.11	2.58 ± 0.11
207		5.83 ± 0.19	2.34 ± 0.085	1.75 ± 0.67
208		9.24 ± 0.39	8.53 ± 0.28	7.21 ± 0.22
209		16.6 ± 0.66	14.5 ± 0.63	9.31 ± 0.35
210		4.89 ± 0.16	3.83 ± 0.12	3.51 ± 0.13

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω Πίνακα μπορούμε να συμπεράνουμε πως η καρβοξυλική ομάδα (ελεύθερη ή προστατευμένη) αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη δραστικότητα. Γενικά, οι εστέρες **185-189** και **201-205** εμφανίζονται λιγότερο δραστικοί σε σχέση με τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα **190-194** και **206-210**. Από τις παραπάνω ενώσεις, οι **188**, **194**, **202** και **206** είναι βραδείας δέσμευσης αναστολείς.

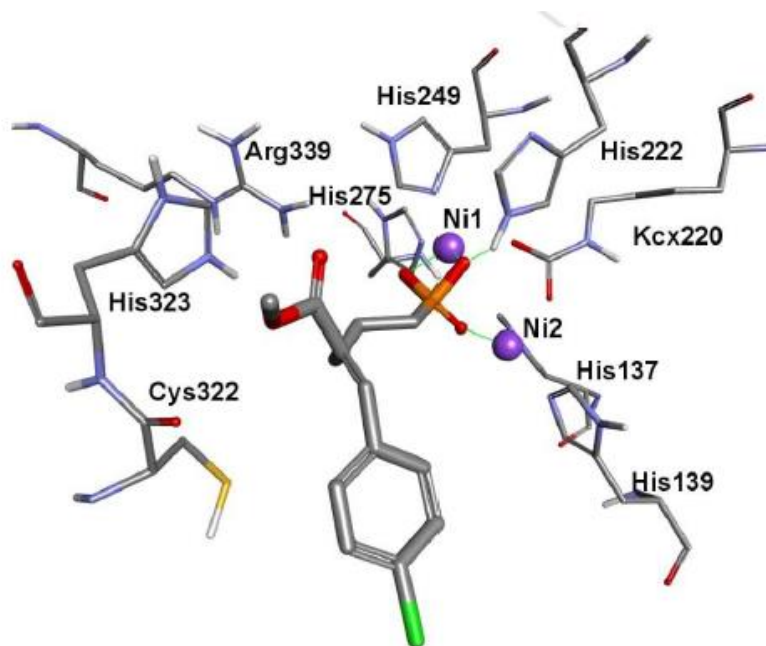
Για να μελετηθεί η διαφορά δραστηριότητας μεταξύ καρβοξυλικών οξέων και εστέρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης σε δύο ταχείας δέσμευσης αναστολείς, τις ενώσεις **186** και **191**.

Τόσο η ένωση **186** όσο και η **191** εφαρμόζουν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με την ομάδα του φωσφονικού οξέος να συμπλέκει τα δύο ιόντα Ni^{2+} , καθώς και την His^{222} . Η διαφορά στη δραστηριότητα φαίνεται να οφείλεται στην καρβοξυλική ομάδα. Στην περίπτωση της ένωσης **191**, η ομάδα του καρβοξυλικού οξέος σχηματίζει επιπλέον δύο δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Arg^{339} και His^{323} (Εικόνα 33).



Εικόνα 33. Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της ένωσης **191** με το ενεργό κέντρο της SPU.

Αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις απουσιάζουν στην περίπτωση της ένωσης **186**, όπου η ομάδα του καρβοξυλικού οξέος είναι προστατευμένη (Εικόνα 34).



Εικόνα 34. Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της ένωσης 186 με το ενεργό κέντρο της SPU.

Η υψηλή δραστηριότητα των καρβοξυλικών οξέων **190-194** και **206-210** δεν φαίνεται να εξαρτάται σε απόλυτο βαθμό από το μήκος του συνδέσμου μεταξύ της ομάδας του φωσφονικού οξέος και του διπλού δεσμού (σύνδεσμοι είτε με τρία είτε με τέσσερα άτομα άνθρακα). Ωστόσο, η υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο δημιουργεί μία ανομοιογένεια στις δραστηριότητες. Τόσο μεταξύ των ενώσεων **190-194** όσο και μεταξύ των ενώσεων **206-210**, τα *p*-μεθυλο- (ενώσεις **192** και **208**) και *p*-μεθοξυ-ανάλογα (ενώσεις **193** και **209**) είναι λιγότερο δραστικά σε σχέση με τα αλο-υποκατεστημένα ανάλογα (ενώσεις **190**, **191**, **206**, **207**). Το γεγονός αυτό οφείλεται ίσως στις διαφορές στον ηλεκτρονικό χαρακτήρα του αρωματικού δακτυλίου που προκαλούν οι υποκαταστάτες.

Μεταξύ των οξέων **190-194** και **206-210**, η ένωση **194** επέδειξε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της SPU, ενώ αποδείχθηκε βραδείας δέσμευσης αναστολέας. Γενικά, οι παραπάνω ενώσεις χαρακτηρίζονται από συγκρίσιμες τιμές IC_{50} είτε με είτε χωρίς επώαση, γεγονός που τις καθιστά αναστολείς ταχείας δέσμευσης. Αντίθετα, για τους βραδείας δέσμευσης αναστολείς, η επώαση βελτίωσε σημαντικά την ανασταλτική δράση. Με σκοπό να αξιολογηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός βραδείας δέσμευσης,

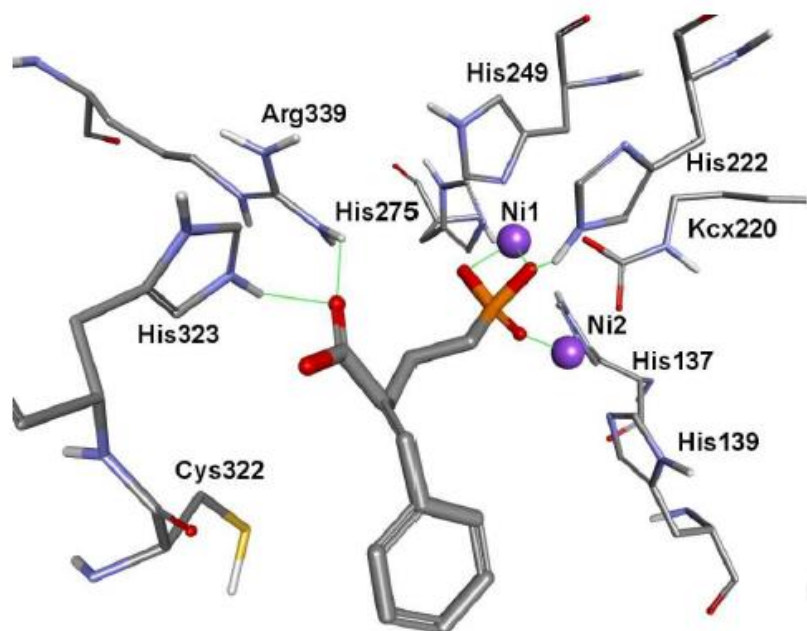
πραγματοποιήθηκαν για τις ενώσεις **188**, **194**, **200** και **206** μετρήσεις της σταθεράς k_{off} και του χρόνου παραμονής (residence time) (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Σταθερά k_{off} και χρόνος παραμονής για τους βραδείας δέσμευσης αναστολείς της SPU.

Ένωση	k_{off} [s^{-1}]	Χρόνος παραμονής [s]
188	0.00244 ± 0.00048	409
194	0.000682 ± 0.000042	1466
202	0.00206 ± 0.00044	485
206	0.00135 ± 0.00018	740

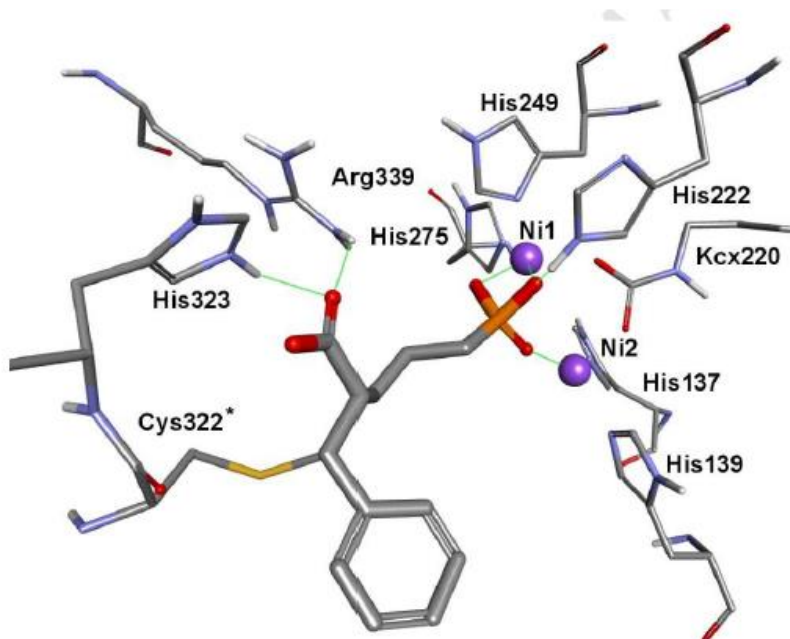
Από τα δεδομένα του Πίνακα 9 προκύπτει ότι η ένωση **194**, με τη χαμηλότερη τιμή σταθεράς αναστολής K_i , εμφανίζει και τον υψηλότερο χρόνο παραμονής (1466 s), και κατ' αυτό τον τρόπο η δραστηκότητά της ξεπερνά αυτή άλλων ταχείας δέσμευσης αναστολέων.

Για να μελετηθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης της ένωσης **194** με το ενεργό κέντρο της SPU πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης. Από τα πειράματα αυτά μπορεί να προταθεί ένας μικτός μηχανισμός, που περιλαμβάνει τόσο ομοιοπολική όσο και μη ομοιοπολική αναστολή. Η μη ομοιοπολική δέσμευση της ένωσης **194** στην SPU είναι σε μεγάλο βαθμό όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε για την ένωση **191**. Η φωσφονική ομάδα του αναστολέα αλληλεπιδρά με τα ιόντα Ni^{2+} και την His²²², ενώ δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας και των αμινοξέων Arg³³⁹ και His³²³ (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Μη ομοιοπολική δέσμευση της ένωσης 194 στο ενεργό κέντρο της SPU.

Παρ' όλα αυτά, ο ενεργοποιημένος διπλός δεσμός του κινναμωμικού σκελετού βρίσκεται σε εγγύτητα με τη δραστική θειολική ομάδα της Cys³²². Μπορεί λοιπόν να προταθεί πως η μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση ακολουθείται από μία προσθήκη Michael με σκοπό το σχηματισμό ενός ομοιοπολικού, αντιστρεπτού όμως συμπλόκου αναστολέα-ενζύμου. Στην Εικόνα 36 παρουσιάζεται το σύμπλοκο αυτό αναστολέα-ενζύμου.

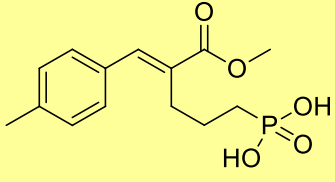
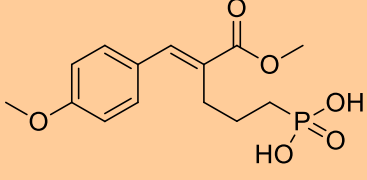
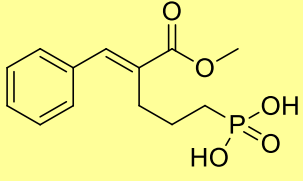
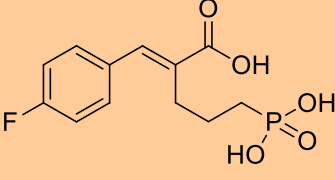
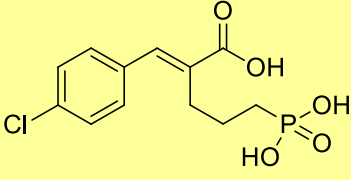
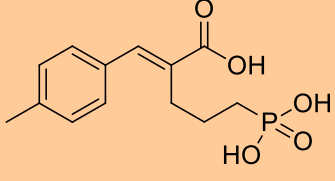
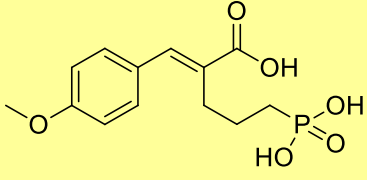
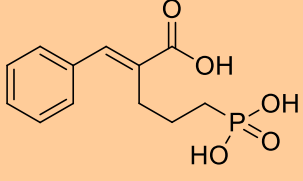


Εικόνα 36. Ομοιοπολική δέσμευση της ένωσης 194 στο ενεργό κέντρο της SPU.

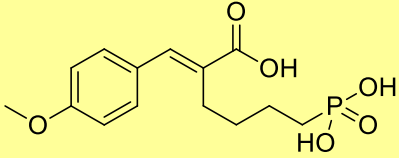
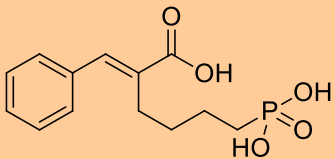
Οι ενώσεις **185-194** και **201-210** ελέγχθηκαν επιπλέον ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της ουρεάσης του βακτηρίου *P. mirabilis* και εμφάνισαν αξιόλογη δραστηριότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Τιμές IC_{50} και LC_{50} των φωσφονοπροπυλο- και φωσφονοβουτυλοκινναμωμικών μεθυλίων και ελεύθερων οξέων.

No	Ένωση	IC_{50}^{2h} [μM]	LC_{50}^{2h} [μM]
185	 <chem>COP(=O)(O)CC/C=C/c1ccc(F)cc1</chem>	735 ± 65	215 ± 17
186	 <chem>COP(=O)(O)CC/C=C/c1ccc(Cl)cc1</chem>	521 ± 47	89.6 ± 7.5

187		1429 ± 121	292 ± 25
188		75.1 ± 6.8	236 ± 19
189		1592 ± 133	556 ± 64
190		38.0 ± 3.2	121 ± 14
191		18.6 ± 1.4	122 ± 14
192		156 ± 13	139 ± 11
193		39.7 ± 2.9	65.2 ± 7.7
194		11.0 ± 0.82	135 ± 16

201		630 ± 62	1059 ± 144
202		27.4 ± 2.1	638 ± 79
203		1552 ± 122	659 ± 66
204		162 ± 15	160 ± 22
205		476 ± 45	469 ± 40
206		14.1 ± 1.1	192 ± 23
207		22.2 ± 1.9	435 ± 51
208		52.6 ± 4.6	49.8 ± 4.2

209		114 ± 9.4	28.6 ± 3.0
210		32.6 ± 2.6	97.6 ± 8.4

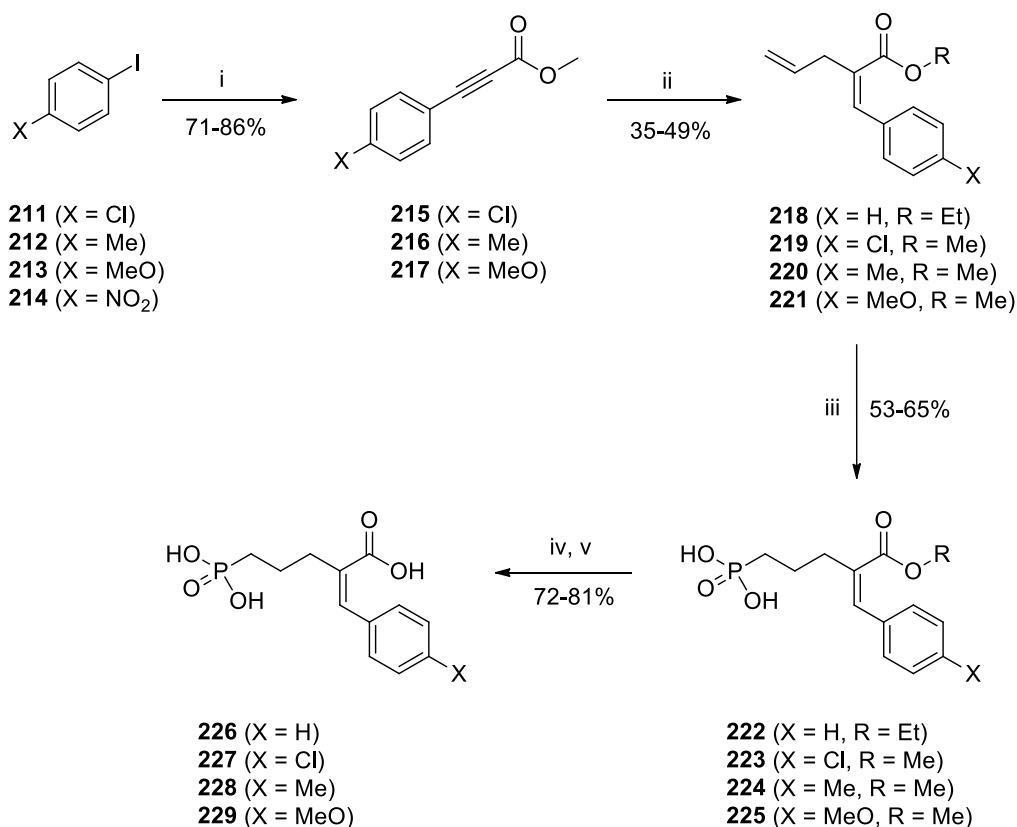
Η σχέση δομής-δράσης που εξάγεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10 είναι αντίστοιχη με αυτή που παρατηρείται στην περίπτωση αναστολής της SPU. Τα καρβοξυλικά οξέα είναι δραστικότερα σε σχέση με τους αντίστοιχους εστέρες τους, ομόλογες ενώσεις εμφανίζουν παραπλήσιες δραστικότητες, ενώ η υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου με αλογόνα αυξάνει τη δραστικότητα. Η ένωση **194** εμφανίζεται και εδώ ως ο ισχυρότερος αναστολέας. Οι παραπάνω ενώσεις επέδειξαν επίσης σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηρίου *P. mirabilis*, με τη σχέση δομής δράσης ωστόσο να διαφέρει σε αυτή την περίπτωση. Πέντε ενώσεις, ο εστέρας **186** και τα καρβοξυλικά οξέα **193**, **208**, **209** και **210** εμφάνισαν μέτρια δράση, με $LC_{50}^{2h} < 100 \mu\text{M}$. Την ισχυρότερη δράση εμφάνισαν τα οξέα **208** και **209** με $LC_{50}^{2h} \approx 50 \mu\text{M}$ και $29 \mu\text{M}$, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη λιποφιλικότητα των ενώσεων αυτών και την ικανότητά τους να διαπερνούν τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα.

4.10 Σχεδιασμός (Z)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Στο επόμενο στάδιο της παρούσας διατριβής συντέθηκαν (Z)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικοί εστέρες και οξέα. Στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της γεωμετρίας του διπλού δεσμού του κινναμωμικού σκελετού στην αλληλεπίδραση των υποψήφιων αναστολέων με τη σουλφυδρυλομάδα της Cys³²² για το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού.

4.11 Σύνθεση (Z)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για το σχηματισμό των φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων με Z-γεωμετρία παρουσιάζεται στο Σχήμα 82.



i) CH₃C≡CCOOMe, Cu₂O, ξηρό DMF, Ar, 110 °C, 18 h, ii) Bu₃SnH, CH₂=CHCH₂Br, CuCl, PPh₃, Pd(dba)₂, ξηρό THF, Ar, r.t., 72 h, (για το **218** χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη το εμπορικά διαθέσιμο C₆H₅C≡CCOOEt), iii) 50% w/w H₃PO₂ **116**, Pd₂(dba)₃, xantphos, DMF, O₂, 110 °C, 48-96 h, iv) NaOH 4N, MeOH (EtOH για το **222**), r.t., 360-480 h, v) HCl 6N.

Σχήμα 82. Πειραματική πορεία σύνθεσης των (Z)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων.

Το πρώτο στάδιο της παραπάνω πορείας περιλαμβάνει τη σύζευξη των 4-υποκατεστημένων ιωδο-βενζολίων **211-214** με προπιλικό μεθύλιο. Πρόκειται για μία αντίδραση σύζευξης τύπου Sonogashira, η οποία πραγματοποιείται παρουσία καταλύτη Cu₂O, ενώ δεν χρησιμοποιείται καταλύτης Pd και βάση.²⁶⁸

Παραλαμβάνονται με αυτό τον τρόπο σε καλές αποδόσεις τα αλκίνια **215-217**. Το 4-ιωδο-νιτροβενζόλιο δεν έδωσε την αντίδραση σύζευξης.

Τα αλκίνια αυτά, μαζί με το εμπορικά διαθέσιμο 3-φαινυλοπροπιλικό αιθύλιο, χρησιμοποιούνται ακολούθως σε μία ενός σταδίου αντίδραση υδροκασιτερίωσης/σύζευξης Stille. Παράγονται έτσι τα αλκένια **218-221**, τα οποία παραλαμβάνονται σε αναλογία *E/Z* που κυμαίνεται μεταξύ 31/69 για την ένωση **220** και 1/99 για την ένωση **219**. Η αναλογία των ισομερών προσδιορίστηκε ολοκληρώνοντας στα φάσματα ^1H NMR τις κορυφές που προέρχονται από τα σήματα των πρωτονίων του διπλού δεσμού του κινναμωμικού σκελετού των δύο ισομερών. Να σημειωθεί ότι λόγω δυσκολίας στον διαχωρισμό των ισομερών με χρωματογραφία στήλης, οι ενώσεις **218-221** χρησιμοποιήθηκαν ως μίγμα διαστερεομερών.

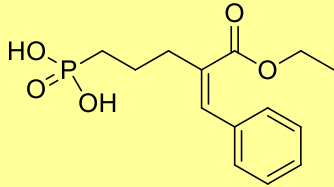
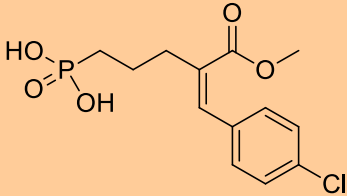
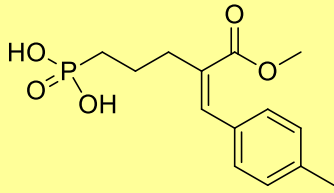
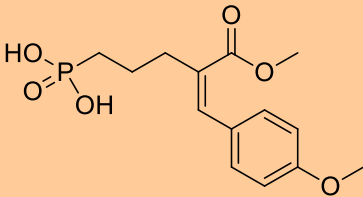
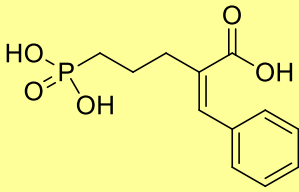
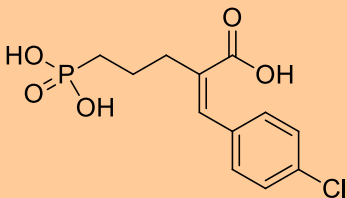
Στο τρίτο στάδιο της παραπάνω πορείας συντίθενται οι (*Z*)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικοί εστέρες μέσω της μεθόδου υδροφωσφινυλίωσης-οξειδωσης. Η μέθοδος αυτή έδωσε τις ενώσεις **222-225** σε καλές αποδόσεις, ενώ διατηρείται η *E/Z* αναλογία στη γεωμετρία, όπως διαπιστώνεται από τα φάσματα ^1H NMR. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε και εδώ με τη λήψη φάσματος ^{31}P NMR από το μίγμα της αντίδρασης. Η εξαφάνιση του σήματος του φωσφόρου που αντιστοιχεί στο φωσφινικό οξύ σήμαινε την πλήρη οξειδωσή του προς το αντίστοιχο φωσφονικό οξύ.

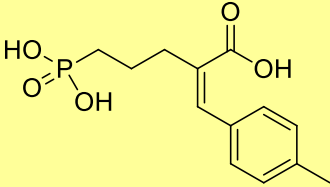
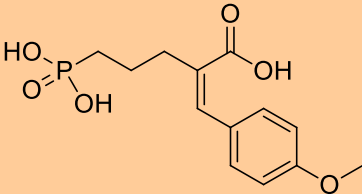
Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται αλκαλική υδρόλυση των ενώσεων **222-225**, οπότε παράγονται τα (*Z*)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικά οξέα **226-229**. Και σε αυτή την περίπτωση η *E/Z* αναλογία στη γεωμετρία διατηρείται σταθερή, ενώ τα τελικά προϊόντα παραλαμβάνονται σε πολύ καλές αποδόσεις.

4.12 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης (*Z*)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και οξέων

Τόσο οι (*Z*)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικοί εστέρες όσο και τα αντίστοιχα οξέα τους ελέγχθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της SPU. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των (Z)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών εστέρων και ελεύθερων οξέων.

No	Ένωση	K_i [μ M]
222		38.0 ± 2.8
223		61.3 ± 4.3
224		147 ± 8.5
225		Δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση σε συγκέντρωση < 1 mM
226		Δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση σε συγκέντρωση < 1 mM
227		64.9 ± 5.6

228		1.26 ± 0.01
229		7.42 ± 0,021

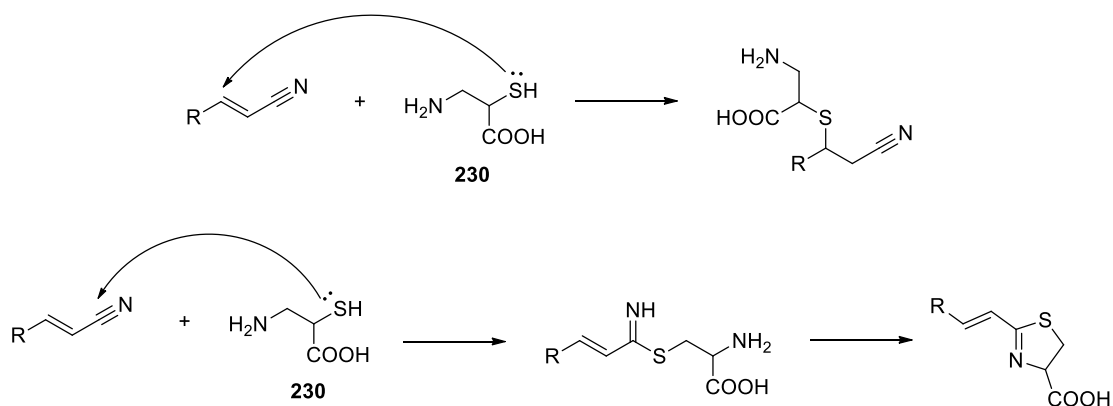
Από τα αποτελέσματα του παραπάνω Πίνακα μπορούμε να συμπεράνουμε πως υπάρχει σημαντική διαφορά στην ανασταλτική συμπεριφορά ανάλογα με τη γεωμετρία του διπλού δεσμού. Ενώ για παράδειγμα το *E*-ισομερές **194** εμφανίζει σταθερά αναστολής $K_i=0.509 \mu\text{M}$, το ανάλογό του *Z*-ισομερές **226** δεν παρουσιάζει πρακτικά ανασταλτική δράση.

4.13 Σχεδιασμός φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών νιτριλίων

Τα νιτρίλια αποτελούν μία από τις πιο κοινές λειτουργικές ομάδες. Στη φαρμακευτική χημεία, το ενδιαφέρον για τα νιτρίλια αποκαλύπτεται από τον μεγάλο αριθμό ενώσεων (περίπου 30) που φέρουν τη συγκεκριμένη λειτουργική ομάδα και χρησιμοποιούνται για μια πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, ενώ περισσότερες από 20 ενώσεις βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο μικρός σε μήκος και πολωμένος τριπλός δεσμός μπορεί να συμμετέχει σε διάφορα είδη αλληλεπιδράσεων, όπως δεσμοί υδρογόνου ή άλλες πολικές αλληλεπιδράσεις, όπου το νιτρίλιο μπορεί να λειτουργήσει ως βιοϊσοστερές του καρβοξυλίου.

Για όλους τους παραπάνω λόγους σχεδιάστηκαν ενώσεις, οι οποίες εκτός από τη φωσφονική ομάδα, η οποία είναι απαραίτητη για τη σύμπλεξη με τα ιόντα Ni^{2+} του ενεργού κέντρου της ουρεάσης, φέρουν ένα α,β -ακόρεστο νιτρίλιο, το οποίο είναι δυνατό να δράσει με δύο πιθανούς μηχανισμούς. Ο α,β -διπλός δεσμός του νιτριλίου μπορεί να δράσει ως δέκτης Michael και να δώσει το προϊόν προσθήκης κατά την αντίδραση με τη σουλφυδρυλομάδα της

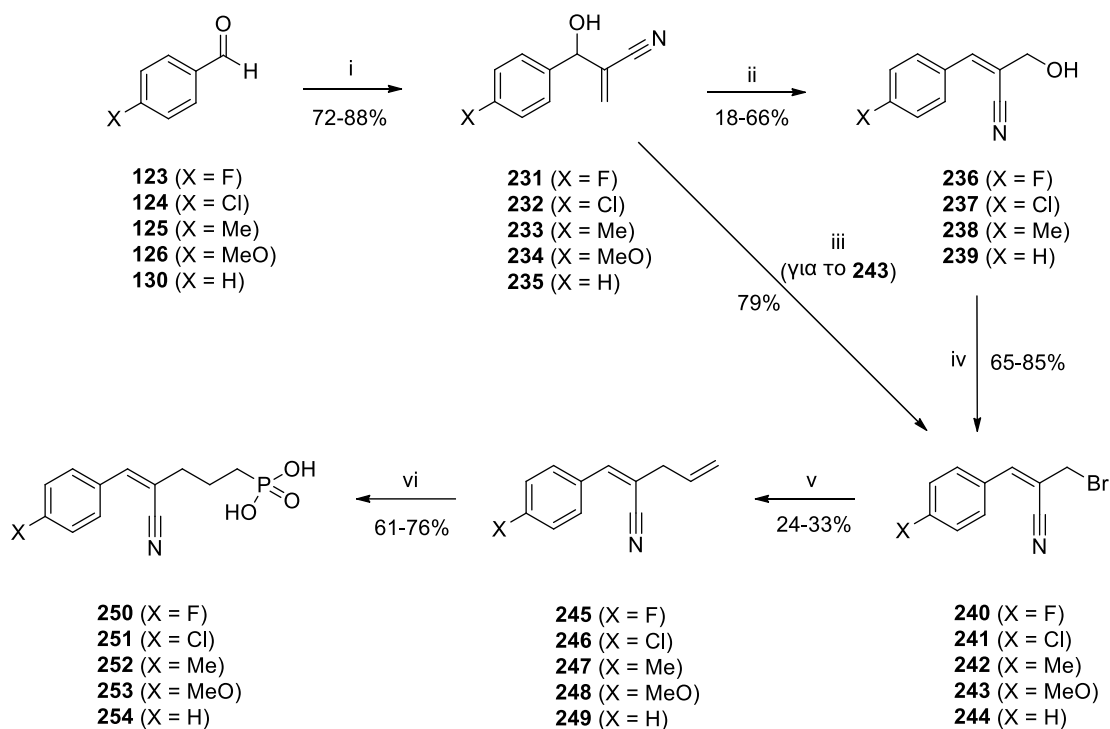
κυστεΐνης Cys³²² (**230**), ενώ το ίδιο το νιτρίλιο μπορεί να αντιδράσει αντιστρεπτά με τη σουλφυδρυλομάδα της Cys³²² δίνοντας αρχικά ένα θειοϊμίδιο, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει με μία ελεύθερη αμινομάδα σχηματίζοντας ένα προϊόν θειαζολίνης, που λόγω της χημικής του σταθερότητας καθιστά τη συνολική αντίδραση ως μια μη αντιστρεπτή διαδικασία (Σχήμα 83).



Σχήμα 83. Επάνω: Αντίδραση Michael μεταξύ α,β -ακόρεστου νιτρίλιου και κυστεΐνης, Κάτω: Αντίδραση μεταξύ νιτρίλιου και κυστεΐνης.

4.14 Σύνθεση φωσφονοπρωπυλο-κινναμωμικών νιτρίλιων

Για τη σύνθεση των φωσφονοπρωπυλο-νιτρίλιων ξεκινήσαμε με πρώτη ύλη τη βενζαλδεΐδη **167** και τις 4-υποκατεστημένες αρωματικές αλδεΐδες **123-126** και ακολουθήθηκε η συνθετική πορεία που περιγράφεται στο Σχήμα 84.



i) $\text{CH}_2=\text{CHCN}$, DABCO, r.t., 72 h, ii) 20% v/v H_2SO_4 , αναρροή, 2-5 h, iii) 33% w/w $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$, r.t., 2 h, iv) PBr_3 , ξηρός Et_2O , 0 °C → r.t., 2-3 h, v) $(\text{CH}_2=\text{CH}_2)_4\text{Sn}$, $\text{Pd}(\text{dba})_2$, PPh_3 , LiCl , ξηρό THF, Ar, r.t., 24 h, vi) 50% w/w H_3PO_2 (**116**), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, xantphos, DMF, O_2 , 110 °C, 48-96 h.

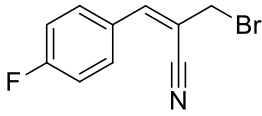
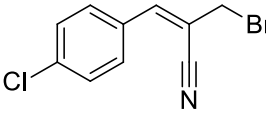
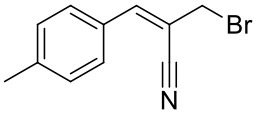
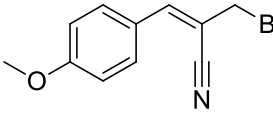
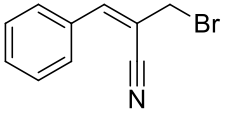
Σχήμα 84. Πειραματική πορεία σύνθεσης των φωσφονοπροπυλο-νιτριλίων.

Στο πρώτο στάδιο της παραπάνω πορείας πραγματοποιείται μία αντίδραση Morita-Baylis-Hillman μεταξύ των αλδεϋδών **123-126**, **130** και ακρυλονιτριλίου παρουσία καταλύτη DABCO, οπότε παράγονται σε πολύ καλές αποδόσεις οι αλκοόλες **231-235**. Ακολουθούν μετά δύο διαφορετικές πορείες. Το μεθόξυ-παράγωγο **234** βρωμιώνεται με τη χρήση 33% w/w διαλύματος $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$, οπότε παράγεται το βρωμίδιο **243** σε ικανοποιητική απόδοση και σε αναλογία ισομερών $E/Z=93/7$. Οι υπόλοιπες αλκοόλες **231-233** και **235** αρχικά θερμαίνονται με αναρροή παρουσία 20% v/v διαλύματος H_2SO_4 και ισομερειώνονται προς τις αντίστοιχες κυανοκινναμωμικές αλκοόλες **236-239**, οι οποίες, όπως διαπιστώθηκε από τη λήψη φασμάτων ^1H και ^{13}C , παραλαμβάνονται αποκλειστικά σε *E*-γεωμετρία. Ακολουθεί βρωμίωση των αλκοολών **236-239** με τη χρήση PBr_3 σε Et_2O . Τα βρωμίδια **240-242** και **244**

που σχηματίζονται παραλαμβάνονται σε αναλογία ισομερών από $E/Z=91/9$ έως και $E/Z=97/3$.

Η αντίδραση βρωμίωσης των αλκοολών **231-235** δοκιμάστηκε και με άλλες μεθόδους, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Σύγκριση της E/Z αναλογίας σε αντιδράσεις βρωμίωσης των αλκοολών 231-235.

ΠΡΟΙΟΝ	ΜΕΘΟΔΟΣ Α	ΜΕΘΟΔΟΣ Β	ΜΕΘΟΔΟΣ Γ	ΜΕΘΟΔΟΣ Δ
 240	$E/Z=78/22$	$E/Z=48/52$	$E/Z=74/26$	$E/Z=91/9$
 241	$E/Z=49/51$	$E/Z=48/52$	$E/Z=82/18$	$E/Z=91/9$
 242	$E/Z=89/11$	$E/Z=67/33$	$E/Z=76/24$	$E/Z=97/3$
 243	$E/Z=90/10$	$E/Z=93/7$	-	-
 244	$E/Z=76/24$	$E/Z=44/56$	$E/Z=66/34$	$E/Z=95/5$

Μέθοδος Α: 48% w/w HBr, καταλυτικό π. H₂SO₄, r.t., 24 h, Μέθοδος Β: 33% w/w HBr/CH₃COOH, r.t., 2-4 h, Μέθοδος Γ: PBr₃, ξηρός Et₂O, 0 °C → r.t., 3 h, Μέθοδος Δ: i) 20% v/v H₂SO₄, αναρροή, 2-5 h, ii) PBr₃, ξηρός Et₂O, 0 °C → r.t., 2-3 h.

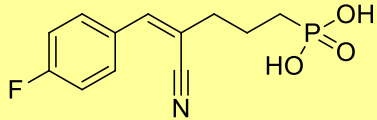
Όπως γίνεται αντιληπτό από τον παραπάνω Πίνακα, τα καλύτερα αποτελέσματα στον λόγο *E/Z* των τελικών βρωμιδίων παραλαμβάνονται με τη μέθοδο Δ. Το μόνο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι οι μικρές αποδόσεις κατά το πρώτο στάδιο, αυτό της ισομερείωσης, σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους όπου το προϊόν παραλαμβάνεται σχεδόν ποσοτικά.

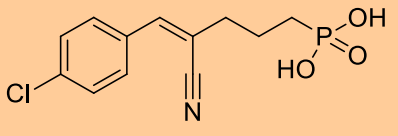
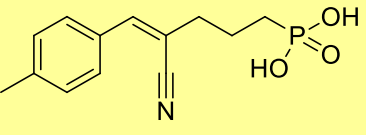
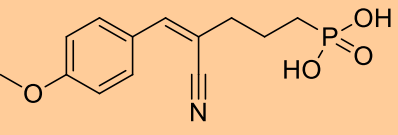
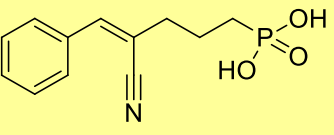
Αφού συντεθούν τα βρωμίδια **240-244**, αυτά λαμβάνουν μέρος σε μία αντίδραση Stille και παραλαμβάνονται τα αλκένια **245-249**, στα οποία η *E/Z*-αναλογία κυμαίνεται μεταξύ *E/Z*=15/85 και *E/Z*>1/99. Τελικά, μέσω της μεθόδου υδροφωσφινυλίωσης-οξειδωσης σχηματίζονται τα φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικά νιτρίλια **250-254** σε ικανοποιητικές αποδόσεις, ενώ διατηρείται η αναλογία ισομερών *E/Z* που παρατηρείται στα αλκένια **245-249**.

4.15 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών νιτρίλιων

Τα φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικά νιτρίλια που συντέθηκαν δοκιμάστηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της SPU. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Τιμές σταθερών αναστολής *K_i* των (*Z*)-φωσφονοπροπυλο-κινναμωμικών νιτρίλιων.

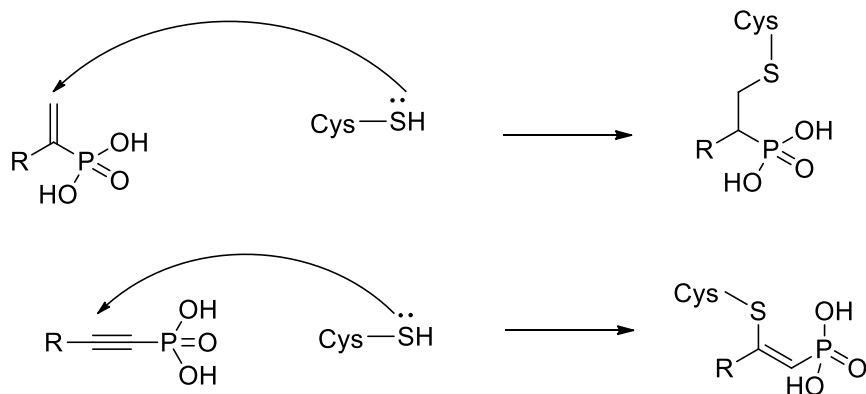
No	Ένωση	<i>K_i</i> [μM]
250		19.3 ± 1.8

251		22.8 ± 2.3
252		32.1 ± 2.6
253		Εκκρεμεί
254		3.07 ± 0.017

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 13 παρατηρούμε ότι οι ενώσεις **250-254** εμφάνισαν μέτριες τιμές σταθερών αναστολής ως προς την SPU. Ο ακριβής όμως μηχανισμός ανασταλτικής δράσης των παραπάνω ενώσεων βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη.

4.16 Σχεδιασμός αλκενυλο- και αλκυλυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέος

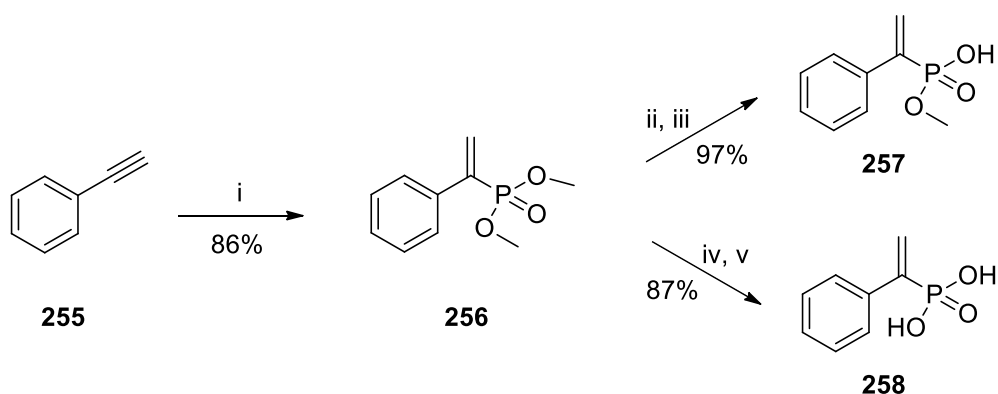
Σε αυτό το στάδιο της διατριβής σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν αλκενυλο- και αλκυλυλο-φωσφονικοί εστέρες, καθώς και τα αντίστοιχα φωσφονικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές φέρουν σε α -θέση ως προς τη φωσφονική ομάδα πολλαπλό δεσμό (είτε διπλό είτε τριπλό). Στόχος ήταν και σε αυτή την περίπτωση η ομοιοπολική αναστολή της ουρεάσης. Η φωσφονική ομάδα αναμένεται να δεσμεύει τα ιόντα Ni (II) του ενεργού κέντρου του ενζύμου, ενώ οι πολλαπλοί δεσμοί μπορούν να δράσουν ως ηλεκτρονιόφιλα για προσβολή από τη σουλφυδρυλομάδα της Cys³²² (Σχήμα 85).



Σχήμα 85. Αλληλεπίδραση της σουλφυδρυλομάδας της κυστεΐνης με αλκενυλο- και αλκυνυλο φωσφονικά οξέα.

4.17 Σύνθεση αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων

Η πορεία για τη σύνθεση των αλκενυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων περιγράφεται στο Σχήμα 86 που ακολουθεί.



i) $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{POH}$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, dpppp , ξηρό τολουόλιο, Ar, $100\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h, ii) στερεό NaOH , MeOH , r.t., 96 h, iii) π. HCl , iv) TMSBr , ξηρό CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, 24 h, v) MeOH , r.t., 30 min.

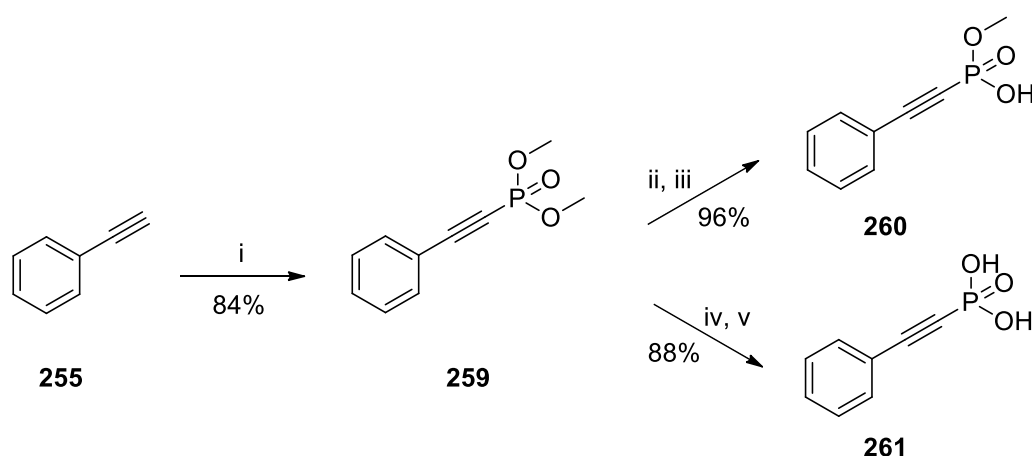
Σχήμα 86. Πορεία σύνθεσης των αλκενυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων.

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αντίδραση υδροφωσφινυλίωσης του φαινυλακετυλενίου **255**. Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται φωσφονικό διμεθύλιο ως πηγή φωσφόρου, καταλύτης $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ και 1,3-δισ(δифαινυλοφωσφίνο)προπάνιο (dpppp) ως προσδέτης. Παραλαμβάνεται έτσι ο φωσφονικός διμεθυλεστέρας **256** σε πολύ καλή απόδοση και σε αναλογία

τοποϊσομερών $\alpha/\beta=97/3$, όπως αυτή υπολογίστηκε από τα αντίστοιχα σήματα στο ^{31}P NMR.

Ο διεστέρας **256** χρησιμοποιείται ως αρχική ύλη σε δύο διαφορετικές πορείες. Σαπωνοποίηση της ένωσης **256** παρουσία στερεού NaOH δίνει τον μονοεστέρα **257** σχεδόν ποσοτικά. Κατεργασία της ένωσης **256** παρουσία TMSBr έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη διάσπαση των μεθυλεστέρων, οπότε παραλαμβάνεται το ελεύθερο φωσφονικό οξύ **258**.

Η σύνθεση των αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω πορεία (Σχήμα 87).



i) $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{POH}$, Cu_2O , CH_3CN , O_2 , 70°C , 48 h, ii) στερεό NaOH, MeOH, r.t., 96 h, iii) π. HCl, iv) TMSBr, ξηρό CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, 24 h, v) MeOH, r.t., 30 min.

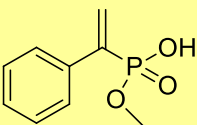
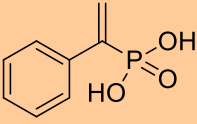
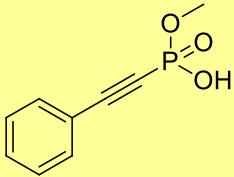
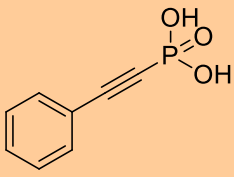
Σχήμα 87. Πορεία σύνθεσης των αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων.

Το πρώτο στάδιο της παραπάνω πορείας αποτελεί μία αντίδραση σύζευξης μεταξύ φαινυλακετυλενίου (**255**) και φωσφονικού διμεθυλίου καταλυόμενη από Cu_2O . Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται παρουσία αέρα, σε ανοιχτή σφαιρική φιάλη. Παραλαμβάνεται έτσι ο φωσφονικός διμεθυλεστέρας **259**, ο οποίος στη συνέχεια κατεργάζεται παρουσία είτε στερεού NaOH για τη σύνθεση του φωσφονικού μονοεστέρα **260** είτε TMSBr για τη σύνθεση του ελεύθερου φωσφονικού οξέος **261**.

4.18 Ενζυμικά αποτελέσματα – Μελέτη σχέσης δομής-δράσης αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέος

Οι φωσφονικοί μονοεστέρες **257** και **260**, καθώς και τα φωσφονικά οξέα **258** και **261** δοκιμάστηκαν σε πειράματα για την ανασταλτική τους δράση έναντι της SPU. Ο Πίνακας 14 παρουσιάζει τα αποτελέσματα που εξήχθησαν.

Πίνακας 14. Τιμές σταθερών αναστολής K_i των αλκενυλο- και αλκυνυλο-φωσφονικών εστέρων και οξέων.

No	Ένωση	K_i [μM]
257		76.8 ± 3.9
258		93 ± 3.6
260		20.5 ± 2.8
261		38.1 ± 3.1

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 14 παρατηρούμε ότι οι ενώσεις **257**, **258**, **260** και **261** εμφάνισαν μέτριες τιμές σταθερών αναστολής ως προς την SPU. Οι μονοεστέρες **257** και **260** επέδειξαν καλύτερη δράση συγκρινόμενοι με τα αντίστοιχα οξέα τους. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός ανασταλτικής δράσης των παραπάνω ενώσεων βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ-ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΙ ΕΝΩΣΕΩΝ

5.1 Γενικό πειραματικό μέρος

5.1.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ενώσεων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία ήταν εμπορικώς διαθέσιμα προϊόντα των εταιριών Aldrich, Merck, Fluka και Alfa-Aesar. Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων ήταν 99% και άνω και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι διαλύτες ήταν υψηλής καθαρότητας (99%) των εταιριών Labscan και Merck. Το CH_2Cl_2 που χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στις αντιδράσεις είχε ως σταθεροποιητή αμυλένιο. Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε η χρήση ξηρών διαλυτών, οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία: το THF, ο Et_2O και το τολουόλιο αποστάχθηκαν υπεράνω μεταλλικού Na με δείκτη βενζοφαινόνη, ενώ το CH_2Cl_2 φυλάχθηκε πάνω από μοριακά κόσκινα. Πραγματοποιήθηκε επίσης απόσταξη DIPEA υπεράνω υδροξειδίου του καλίου και παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$.

5.1.2 Χρωματογραφική ανάλυση

Για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC). Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου, πάχους 0.25 mm, επιστρωμένες με silica gel και φθορίζον υλικό που απορροφά στα 254 nm (Silica gel 60 F₂₅₄) της εταιρίας Merck. Ο χρωματογραφικός χαρακτηρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση του συντελεστή ανάσχεσης (R_f) σε διάφορα συστήματα ανάπτυξης. Για την εμφάνιση των χρωματογραφιών χρησιμοποιήθηκε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (254 nm). Οι ενώσεις που συντέθηκαν καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε είτε με τη δύναμη της βαρύτητας (στήλη gravity) είτε με εφαρμογή πίεσης (στήλη flash). Στις στήλες gravity χρησιμοποιήθηκε ως υλικό πλήρωσης Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) της εταιρίας Merck, ενώ η

πλήρωση των στηλών flash πραγματοποιήθηκε με Silica gel RP-18 (0.040-0.063 mm) της ίδιας εταιρίας. Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι διαφορετικά για κάθε ένωση και αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους.

5.1.3 Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός ενώσεων

Φασματομετρία Μάζας: Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε φασματόμετρο ThermoFinnigan Surveyor MSQ, που διαθέτει το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, με την τεχνική ESI για την παραγωγή των ιόντων (ElectroSpray Ionization, ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό). Τα φάσματα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) των τελικών προϊόντων ελήφθησαν με ηλεκτροψεκασμό ως πηγή ιόντων (ESI) σε φασματόμετρο Maxis Impact QTOF της Bruker.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Οι ενώσεις που παρασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με ^1H , ^{13}C και ^{31}P φασματοσκοπία NMR. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε όργανο 200 MHz Varian Mercury, που διαθέτει το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Η συχνότητα συντονισμού NMR για τα φάσματα ^1H ήταν στα 200 MHz, για τα φάσματα ^{13}C στα 50 MHz και για τα φάσματα ^{31}P στα 81 MHz. Τα φάσματα ^{13}C και ^{31}P NMR είναι πλήρως αποσυζευγμένα από πρωτόνιο. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν CDCl_3 , CD_3OD , $d_6\text{-DMSO}$ και CD_3COOD των εταιριών Aldrich και Acros Organics. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράζονται σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η κλίμακα δ (ppm) 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 μέσω βιβλιογραφικών δεδομένων και είναι: α) CDCl_3 : 7.27 ppm (χημική μετατόπιση πρόσμιξης CHCl_3), β) CD_3OD : 3.31 ppm (ο μέσος όρος των χημικών μετατοπίσεων όλων των πιθανών πρωτονιωμένων μορφών της CD_3OD), γ) $d_6\text{-DMSO}$: 2.50 ppm (ο μέσος όρος των χημικών μετατοπίσεων όλων των πιθανών πρωτονιωμένων μορφών του $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ και δ) CD_3COOD : 2.04 ppm και 11.65 ppm. Η κλίμακα δ (ppm) στα φάσματα ^{13}C

NMR είναι βαθμονομημένη σύμφωνα με τη χημική μετατόπιση των δευτεριωμένων διαλυτών. Οι τιμές αυτές ορίστηκαν μέσω βιβλιογραφικών δεδομένων και είναι: α) CDCl_3 : 77.0 ppm, β) CD_3OD : 49.0 ppm, γ) d_6 -DMSO: 39.5 ppm και δ) CD_3COOD : 20.0 ppm και 178.4 ppm. Η βαθμονόμηση της κλίμακας δ (ppm) στα φάσματα ^{31}P NMR 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). Η πλήρης αποτίμηση των πολλαπλοτήτων στα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR των τελικών φωσφινικών και φωσφονικών παραγώγων δε στάθηκε δυνατή σε όλες τις περιπτώσεις λόγω της πολυπλοκότητας και της δυσδιαλυτότητας των ενώσεων αυτών. Οι δυσκολίες αυτές συνοψίζονται στα εξής:

- Μερικές από τις ενώσεις που συντέθηκαν κατά την παρούσα εργασία ήταν δυσδιάλυτες με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η εύρεση κατάλληλου διαλύτη για τη λήψη των φασμάτων ^1H , ^{13}C και ^{31}P NMR. Ως λύση βρέθηκε η χρήση διαλύτη CD_3COOD , το οποίο δεν έδωσε πάντα επαρκή διαχωρισμό των γειτονικών κορυφών.
- Στα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR υπάρχουν διασχίσεις των κορυφών λόγω συζεύξεων του πυρηνικού σπιν του ατόμου του φωσφόρου με τα σπιν των πυρήνων των γειτονικών ^1H και ^{13}C αντίστοιχα. Οι διασχίσεις αυτές είναι εξαιρετικά μεγάλες όταν πρόκειται για σταθερές σύζευξης 1J . Τα πειράματα ^1H και ^{13}C NMR δεν μπορούν να γίνουν με αποσύζευξη φωσφόρου, διότι χρειάζεται να εφαρμοστεί μεγάλη ισχύς αποσύζευξης, κάτι που δεν ήταν εφικτό να γίνει στο όργανο NMR που χρησιμοποιήθηκε.
- Το εύρος κορυφών είναι αρκετά μεγάλο λόγω του μεγάλου χρόνου χαλάρωσης των περισσότερων μαγνητικών πυρήνων στις ενώσεις της παρούσας διατριβής. Αυτό έχει ως συνέπεια το μειωμένο διαχωρισμό μεταξύ κοντινών κορυφών, με αποτέλεσμα η αποτίμηση των κορυφών να δυσχεραίνεται, ειδικά όταν χρησιμοποιείται όργανο μικρού μαγνητικού πεδίου (200 MHz).

5.1.4 Ενζυμικά πειράματα

Ο έλεγχος της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοοργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Wrocław στην Πολωνία, από την ερευνητική ομάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή Łukasz Berlicki. Παρακάτω περιγράφεται συνοπτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τις ενζυμικές δοκιμές.

Για τις δοκιμές των αναστολέων χρησιμοποιήθηκε ουρεάση από καλλιέργειες κυττάρων των βακτηρίων *Sporosarcina pasteurii* και *Proteus mirabilis*, μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό πέντε σταδίων. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 3 mM, pH=7.5 και θερμοκρασίας 37 °C. Οι μετρήσεις των σταθερών αναστολής έγιναν σύμφωνα με το εξής πειραματικό πρωτόκολλο: αρχικά πραγματοποιήθηκε προσθήκη διαλύματος της ουρεάσης, συγκέντρωσης 113.5 μM, σε διαλύματα ουρίας συγκέντρωσης 1-60 mM, που περιείχαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις των υπό μελέτη αναστολέων. Οι αντιδράσεις τερματίζονται με την προσθήκη 500 μL διαλύματος φαινόλης-νιτροπρωσσικού νατρίου, ενώ ακολουθεί προσθήκη 500 μL διαλύματος NaOH-NaClO. Η ποσότητα της αμμωνίας που παράγεται υπολογίζεται φωτομετρικά στα 650 nm, μετά από επώαση στους 37 °C για 15 min.

5.1.5 Πειράματα Μοριακής Μοντελοποίησης

Τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης πραγματοποιήθηκαν επίσης στο Τμήμα Βιοοργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Wrocław στην Πολωνία, από την ερευνητική ομάδα του Αναπληρωτή Καθηγητή Łukasz Berlicki. Η κρυσταλλική δομή της ουρεάσης του βακτηρίου *Sporosarcina pasteurii* σε σύμπλεξη με το κιτρικό οξύ και σε ανάλυση 1.50 Å αποτέλεσε το σημείο αναφοράς για όλους τους υπολογισμούς. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Discovey Studio v. 4.1 (BIOVIA). Όλα τα άτομα υδρογόνου προστέθηκαν αυτόματα θεωρώντας το pH=7, συνεπώς η κατάσταση πρωτονίωσης των αμινοξέων του ενεργού κέντρου ελέγχθηκε και προσαρμόστηκε χειροκίνητα. Το μόριο του κιτρικού οξέος τροποποιήθηκε ανάλογα κάθε φορά, ώστε να σχηματιστεί το μόριο του φωσφορικού αναστολέα. Τα μερικά φορτία όλων των ατόμων υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Momany-Rone.

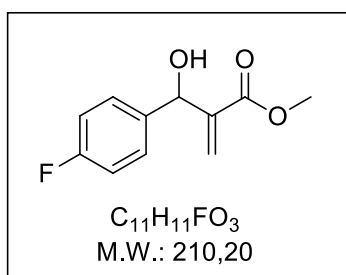
Ελαχιστοποίηση της ενέργειας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Smart Minimizer και το πρόγραμμα CHARMM force field.

5.2 Γενικό συνθετικό μέρος

5.2.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης παραγώγων Morita-Baylis-Hillman

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται κατά σειρά η αλδεΐδη (1.00 mmol), ακρυλικός μεθυλεστέρας (0.18 mL, 2.00 mmol) ή ακρυλονιτρίλιο (0.13 mL, 2.00 mmol) και DABCO (0.12 g, 1.05 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 72 h (20 d για το **135**) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το μίγμα αραιώνεται με AcOEt (20 mL), μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική στιβάδα εκπλένεται κατά σειρά με διάλυμα NaHCO₃ 5% (10 mL), H₂O (10 mL), διάλυμα HCl 0.6 N (10 mL) και τέλος H₂O (10 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται για κάθε ένωση ξεχωριστά.

2-((4-Φθοροφαινυλο)(υδροξυ)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (**131**)²⁶⁹



Κίτρινο παχύρρευστο υγρό

α=95%

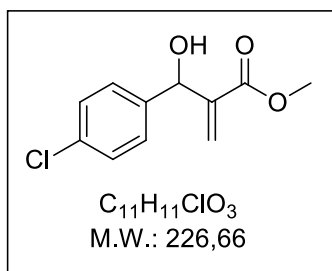
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 6:4, R_f=0.61 (PE/AcOEt 6:4)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.26 (m, 2H), 6.98 (t, J=8.7 Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.44 (br s, 1H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.5, 162.1 (d, $^1J_{\text{F-C}}=245.9$ Hz), 141.7, 136.9 (d, $^4J_{\text{F-C}}=3.1$ Hz), 128.3 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.2$ Hz), 125.9, 115.1 (d, $^2J_{\text{F-C}}=21.5$ Hz), 72.2, 51.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FO}_3^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 211.1, βρέθηκε 211.0.

2-((4-Χλωροφαινυλο)(υδροξυ)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (132)²⁶⁹



Άχρωμο παχύρευστο υγρό

$\alpha=94\%$

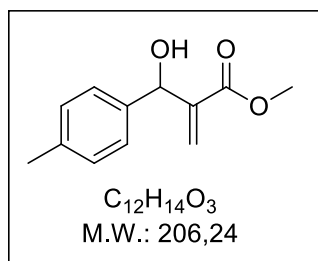
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 6:4, $R_f=0.39$ (PE/Et₂O 6:4)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.27-7.23 (m, 4H), 6.31 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.42 (br s, 1H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.5, 141.4, 139.7, 133.4, 128.4, 127.9, 126.2, 72.3, 52.0.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClO}_3^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 227.1, βρέθηκε 226.9.

2-(Υδροξυ(ρ-τολυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (133)²⁶⁹



Άχρωμο λάδι

$\alpha=69\%$

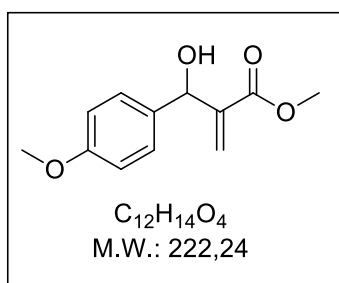
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 8:2, $R_f=0.39$ (PE/AcOEt 8:2)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.25 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 6.32 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.52 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.05 (d, $J=5.5$ Hz, 1H), 2.33 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.7, 141.9, 138.3, 137.5, 129.1, 126.5, 125.8, 73.0, 51.9, 21.1.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 207.1, βρέθηκε 207.1.

2-(Υδροξυ(4-μεθοξυφαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (134)²⁶⁹



Άχρωμο παχύρρευστο υγρό

$\alpha=70\%$

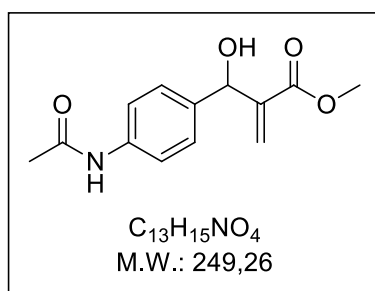
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 8:2, $R_f=0.21$ (PE/AcOEt 8:2)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.26 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.49 (d, $J=5.1$ Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.09 (d, $J=5.2$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.7, 159.1, 142.1, 133.4, 127.8, 125.4, 113.7, 72.5, 55.1, 51.8.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 240.1, βρέθηκε 240.3.

2-((4-Ακεταμιδοφαινυλο)(υδροξυ)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (135)²⁷⁰



Υπόλευκο κολλώδες στερεό

$\alpha=68\%$

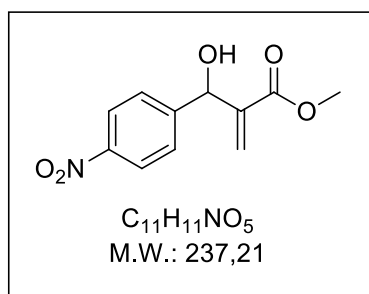
Σύστημα έκλουσης: $CHCl_3/MeOH$ 9.5:0.5, $R_f=0.27$ ($CHCl_3/MeOH$ 9.5:0.5)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.42 (s, 1H), 7.33 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.27 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.45 (d, $J=4.7$ Hz, 1H), 3.96 (d, $J=5.1$ Hz, 1H) 3.62 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 169.3, 166.7, 141.9, 137.5, 137.0, 127.2, 125.5, 119.9, 72.2, 51.8, 24.1.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{14}NO_4^-$ [M-H]⁻ 248.1, βρέθηκε 248.0.

2-(Υδροξυ(4-νιτροφαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (136)²⁷⁰



Πορτοκαλοκίτρινο στερεό

$\alpha=63\%$

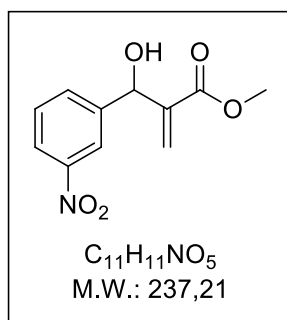
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 1:1, $R_f=0.65$ (PE/AcOEt 1:1)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.21 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.40 (s, 1H), 5.89 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.41 (br s, 1H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 148.6, 147.2, 140.7, 127.3, 127.2, 123.5, 72.4, 52.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 238.1, βρέθηκε 237.9.

2-(Υδροξυ(3-νιτροφαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (137)²⁷¹



Άχρωμο παχύρρευστο υγρό

$\alpha=55\%$

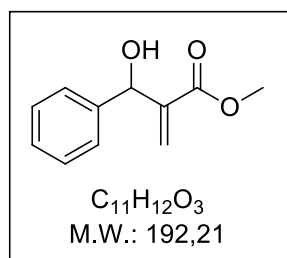
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 1:1, $R_f=0.61$ (PE/AcOEt 1:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (s, 1H), 8.00 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 3.99 (s, 1H), 3.60 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.0, 147.9, 143.6, 140.9, 132.7, 129.1, 126.6, 122.4, 121.4, 71.7, 51.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 238.1, βρέθηκε 238.7.

2-(Υδροξυ(φαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (138)²⁶⁹



Κίτρινο λάδι

$\alpha=89\%$

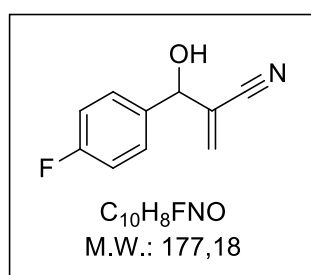
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 8:2, R_f=0.67 (PE/Et₂O 8:2)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.32-7.22 (m, 5H), 6.31 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.52 (s, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.32 (br s, 1H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 166.5, 141.8, 141.2, 128.2, 127.6, 126.5, 125.7, 72.7, 51.7.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₆NO₃⁺ [M+NH₄]⁺ 210.1, βρέθηκε 210.1.

2-((4-Φθοροφαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)ακρυλονιτρίλιο (231)²⁷²



Κίτρινο λάδι

α=85%

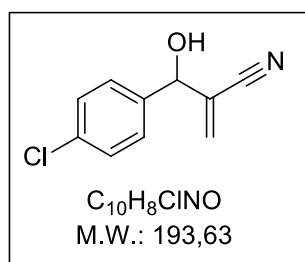
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 1:1, R_f=0.42 (PE/Et₂O 1:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.31-7.22 (m, 2H), 7.01 (t, J=8.7 Hz, 2H), 5.99 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 3.63 (s, 1H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 162.5 (d, ¹J_{F-C}=247.3 Hz), 134.8 (d, ⁴J_{F-C}=3.1 Hz), 130.3, 128.2 (d, ³J_{F-C}=8.4 Hz), 125.7, 116.7, 115.5 (d, ²J_{F-C}=21.7 Hz), 73.0.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₀H₉FNO⁺ [M+H]⁺ 178.1, βρέθηκε 178.2.

2-((4-Χλωροφαινυλο)(υδροξυ)μεθυλο)ακρυλονιτρίλιο (232)²⁷²



Υποκίτρινο λάδι

$\alpha=88\%$

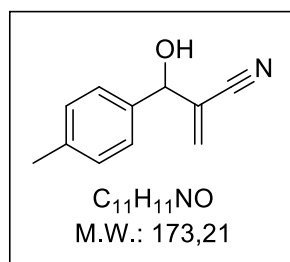
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 1:1, R_F=0.35 (PE/Et₂O 1:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.23 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.16 (s, 1H), 3.46 (s, 1H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 137.4, 134.4, 130.5, 128.8, 127.7, 125.6, 116.6, 73.1.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C₁₀H₉ClNO⁺ [M+H]⁺ 194.0, βρέθηκε 194.1.

2-(Υδροξυ(ρ-τολυλο)μεθυλο)ακρυλονιτρίλιο (233)²⁷¹



Λευκό στερεό

$\alpha=84\%$

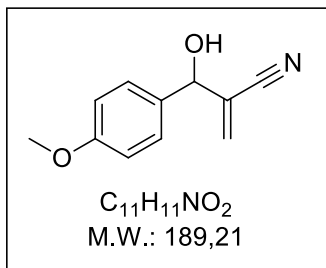
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 6:4, R_F=0.31 (PE/Et₂O 6:4)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.22 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 7.17 (d, *J*=8.1 Hz, 2H), 5.97 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.05 (s, 1H), 2.35 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 137.9, 135.8, 129.6, 128.9, 126.0, 125.7, 116.7, 73.1, 20.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{12}NO^+$ $[M+H]^+$ 174.1, βρέθηκε 174.4.

2-(Υδροξυ(4-μεθοξυφαινυλο)μεθυλο)ακρυλονιτρίλιο (234)²⁷²



Υποκίτρινο λάδι

$\alpha=85\%$

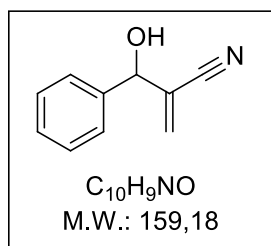
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 1:1, $R_f=0.35$ (PE/Et₂O 1:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.18 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 5.95 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.05 (s, 1H), 3.79 (br s, 1H), 3.68 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 159.2, 131.0, 129.5, 127.5, 125.9, 116.8, 113.7, 72.9, 54.9.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{15}N_2O_2^+$ $[M+NH_4]^+$ 207.1, βρέθηκε 206,7.

2-(Υδροξυ(φαινυλο)μεθυλο)ακρυλονιτρίλιο (235)²⁷²



Υποκίτρινο υγρό

$\alpha=72\%$

Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 1:1, $R_f=0.44$ (PE/Et₂O 1:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.42-7.25 (m, 5H), 5.98 (s, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.14 (s, 1H), 3.79 (d, $J=3.7$ Hz, 1H).

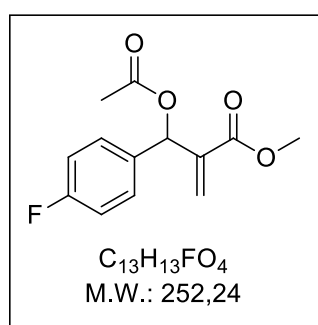
^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 138.9, 130.0, 128.5, 128.4, 126.2, 125.7, 116.8, 73.5.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 177.1, βρέθηκε 177,1.

5.2.2 Γενική μέθοδος ακετυλίωσης αλκοολών Morita-Baylis-Hillman

Σε διάλυμα της αλκοόλης MBH (1.00 mmol) σε ξηρό CH_2Cl_2 (0.5 mL), προστίθεται πυριδίνη (93 μL , 1.15 mmol) και υπό ψύξη στους 0°C προστίθεται στάγδην ακετυλοχλωρίδιο (83 μL , 1.15 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης παραμένει επί 1 h στους 0°C , ενώ ύστερα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και η ανάδευση συνεχίζεται για 24 h. Έπειτα το μίγμα αραιώνεται με CH_2Cl_2 (30 mL), μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική στιβάδα εκπλένεται με διάλυμα NaHCO_3 5% (10 mL), H_2O (10 mL), διάλυμα HCl 2N (10 mL) και τέλος H_2O (10 mL). Η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως περιγράφεται στη συνέχεια για κάθε ένωση ξεχωριστά.

2-(Ακετοξυ(4-φθοροφαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (139)²⁷³



Άχρωμο λάδι

$\alpha=90\%$

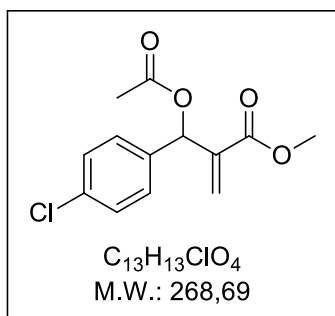
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 8:2, $R_f=0.54$ (PE/AcOEt 8:2)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.21 (m, 2H), 6.86 (t, $J=7.7$ Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.77 (s, 1H), 3.52 (s, 3H), 1.93 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.7, 164.6 (d, $^1J_{\text{F-C}}=7.4$ Hz), 159.6, 139.0, 133.4 (d, $^4J_{\text{F-C}}=3.2$ Hz), 129.2 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.3$ Hz), 125.0, 114.8 (d, $^2J_{\text{F-C}}=21.6$ Hz), 71.9, 51.4, 20.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{FNO}_4^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 270.1, βρέθηκε 270.1.

2-(Ακετοξυ(4-χλωροφαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (140)²⁷³



Άχρωμο λάδι

$\alpha=81\%$

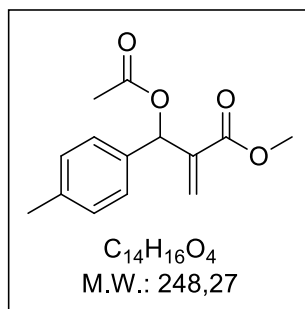
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 6:4, $R_f=0.58$ (PE/Et₂O 6:4)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.28 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.8, 164.7, 138.9, 136.1, 133.8, 128.8, 128.2, 125.5, 72.0, 51.6, 20.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{ClNO}_4^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 286.1, βρέθηκε 286.3.

2-(Ακετοξυ(*p*-τολυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (141)²⁷³



Άχρωμο λάδι

$\alpha=60\%$

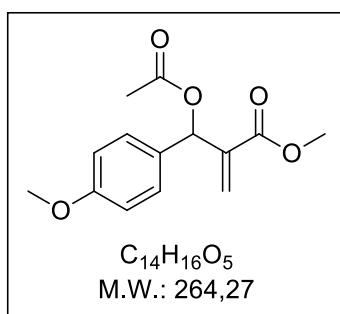
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 7:3, R_f=0.70 (PE/Et₂O 7:3)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.23 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.06 (d, J=8.1 Hz, 2H), 6.65 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 5.82 (s, 1H), 3.57 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.98 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 168.5, 164.6, 139.3, 137.5, 134.4, 128.5, 127.1, 124.6, 72.3, 51.2, 20.4, 20.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₄H₂₀NO₄⁺ [M+NH₄]⁺ 266.1, βρέθηκε 266.2.

2-(Ακετοξυ(4-μεθοξυφαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (142)²⁷⁰



Λευκό κρυσταλλικό στερεό

$\alpha=59\%$

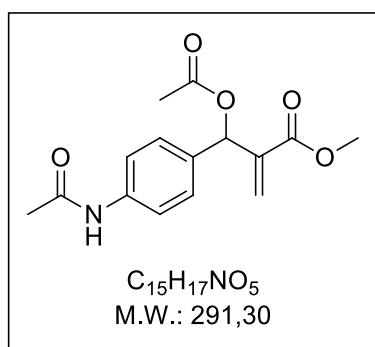
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 8:2, R_f=0.37 (PE/Et₂O 8:2)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (d, J=8.6 Hz, 2H), 6.85 (d, J=8.6 Hz, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 5.86 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 168.9, 164.9, 159.2, 139.4, 129.4, 128.7, 124.6, 113.4, 72.4, 54.7, 51.4, 20.5.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₄H₂₀NO₅⁺ [M+NH₄]⁺ 282.1, βρέθηκε 282.2.

2-((4-Ακεταμιδοφαινυλο)(ακετοξυ)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (143)²⁷⁰



Κίτρινο τσιχλώδες στερεό

$\alpha=70\%$

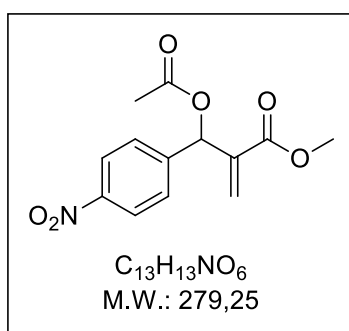
Σύστημα έκλουσης: $CHCl_3/MeOH$ 9.8:0.2, $R_f(CHCl_3/MeOH$ 9.5:0.5)=0.33

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.39 (br s, 1H), 7.45 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 169.6, 169.0, 165.4, 139.2, 138.2, 133.0, 128.2, 125.7, 119.7, 72.7, 51.9, 24.2, 21.0.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{15}H_{16}NO_5^-$ $[M-H]^-$ 290.1, βρέθηκε 290.2.

2-(Ακετοξυ(4-νιτροφαινυλο)μεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (144)²⁷⁰



Κίτρινο στερεό

$\alpha=81\%$

Σύστημα έκλουσης: PE/Et_2O 1:1, $R_f(PE/Et_2O$ 8:2)=0.25

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 8.10 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).

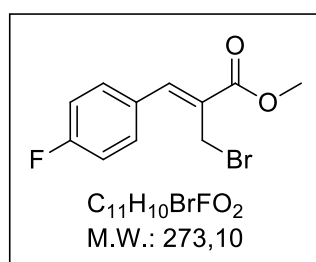
^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 169.0, 164.7, 147.4, 144.9, 138.3, 128.2, 126.7, 123.4, 71.9, 51.9, 20.7.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 297.1, βρέθηκε 297.2.

5.2.3 Γενική μέθοδος βρωμίωσης αλκοολών Morita-Baylis-Hillman

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει την αλκοόλη Morita-Baylis-Hillman (1.00 mmol) προστίθενται υδατικό διάλυμα HBr 48% w/w (1 g) και πυκνό H_2SO_4 (0.05 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίζεται με CH_2Cl_2 (2 x 10 mL). Οι οργανικές στιβάδες ενώνονται, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL), ξηραίνονται με Na_2SO_4 , διηθούνται και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης αυτό που περιγράφεται για κάθε ένωση ξεχωριστά.

(Z)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(4-φθοροφαινυλο)ακρυλικό μεθύλιο (170)²⁷⁴



Καφέ-κίτρινο λάδι

$\alpha=95\%$

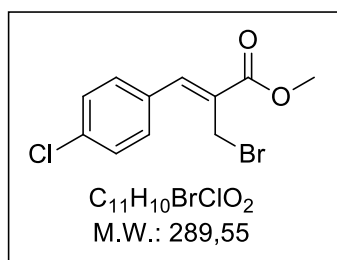
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 7:3, $R_f=0.73$ (PE/AcOEt 7:3)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (s, 1H), 7.61-7.54 (m, 2H), 7.15 (t, 8.7 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.87 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.4, 163.1 (d, $^1J_{\text{F-C}}=251.7$ Hz), 141.7, 131.8 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.5$ Hz), 130.2 (d, $^4J_{\text{F-C}}=3.4$ Hz), 128.2, 116.0 (d, $^2J_{\text{F-C}}=21.7$ Hz), 52.5, 26.5.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{BrFNO}_2^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 290.0, βρέθηκε 290.0.

(Z)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(4-χλωροφαινυλο)ακρυλικό μεθύλιο (171)²⁷⁴



Λευκό στερεό

$\alpha=86\%$

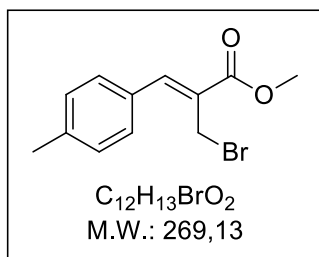
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 8:2, $R_f=0.67$ (PE/AcOEt 8:2)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (s, 1H), 7.53 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.89 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.3, 141.5, 135.7, 132.5, 130.9, 129.1, 129.0, 52.6, 26.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{BrClNO}_2^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 306.0, βρέθηκε 306.4.

(Z)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(p-τολυλο)ακρυλικό μεθύλιο (172)²⁷⁴



Υποκίτρινο στερεό

$\alpha=97\%$

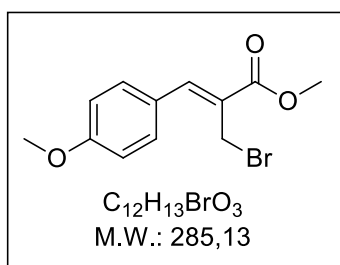
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 9:1, $R_f=0.50$ (PE/AcOEt 9:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (s, 1H), 7.47 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 4.40 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.37 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.6, 143.0, 140.0, 131.2, 129.7, 129.5, 127.4, 52.3, 27.0, 21.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{BrNO}_2^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 286.0, βρέθηκε 286.1.

(Z)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλο)ακρυλικό μεθύλιο (173)²⁷⁵



Υποκίτρινο στερεό

$\alpha=90\%$

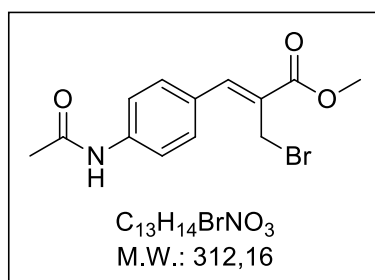
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 8:2, $R_f=0.50$ (PE/AcOEt 8:2)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (s, 1H), 7.56 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.43 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 166.9, 160.8, 142.9, 132.0, 126.6, 126.0, 114.4, 55.3, 52.4, 27.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{BrNO}_3^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 302.0, βρέθηκε 302.1.

(Z)-3-(4-Ακεταμιδοφαινυλο)-2-(βρωμομεθυλο)ακρυλικό μεθύλιο (174)



Κίτρινο φυλλώδες στερεό

$\alpha=65\%$

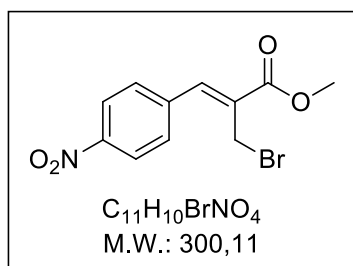
Σύστημα έκλουσης: $CHCl_3/MeOH$ 9.5:0.5, $R_f=0.47$ ($CHCl_3/MeOH$ 9.5:0.5)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.66 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.64 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.18 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 169.3, 166.8, 142.5, 139.5, 130.8, 129.5, 127.0, 119.8, 52.4, 27.1, 24.4.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{13}BrNO_3^-$ [M-H]⁻ 310.0, βρέθηκε 310.1.

(Z)-2-(βρωμομεθυλο)-3-(4-νιτροφαινυλο)ακρυλικό μεθύλιο (175)²⁷⁶



Κίτρινο στερεό

$\alpha=15\%$

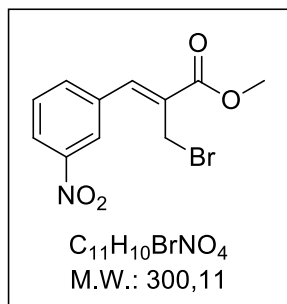
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 8:2, $R_f=0.45$ (PE/AcOEt 8:2)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.33 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.73 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.92 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 165.8, 147.8, 140.5, 139.8, 131.9, 130.1, 124.0, 52.8, 25.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{14}BrN_2O_4^+$ $[M+NH_4]^+$ 317.0, βρέθηκε 317.1.

(Z)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(3-νιτροφαινυλο)ακρυλικό μεθύλιο (176)²⁷⁶



Λευκό στερεό

$\alpha=41\%$

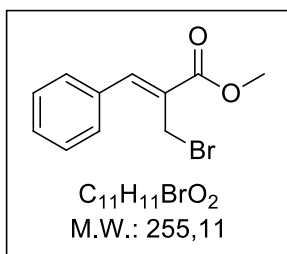
Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 6:4, $R_f=0.59$ (PE/AcOEt 6:4)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.36 (t, $J=1.8$ Hz, 1H), 8.21 (dd, $J=8.2, 1.3$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.65 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 4.28 (s, 2H), 3.86 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 165.7, 148.3, 139.6, 135.6, 134.8, 131.2, 129.9, 124.1, 123.9, 52.7, 25.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{14}BrN_2O_4^+$ $[M+NH_4]^+$ 317.0, βρέθηκε 316.8.

(Z)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-φαινυλακρυλικό μεθύλιο (177)²⁷⁶



Κίτρινο λάδι

$\alpha=98\%$

Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 7:3, R_f=0.59 (PE/Et₂O 7:3)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (s, 1H), 7.56-7.34 (m, 5H), 4.35 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).

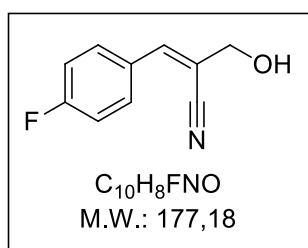
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 166.2, 142.6, 133.9, 129.4, 128.6, 128.3, 127.9, 52.2, 26.6.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₅BrNO₂⁺ [M+NH₄]⁺ 272.0, βρέθηκε 272.1.

5.2.4 Γενική μέθοδος σύνθεσης (*E*)-κυανο-κινναμωμικών αλκοολών

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει την αλλυλική αλκοόλη MBH (1.00 mmol) προστίθεται διάλυμα 20% v/v H₂SO₄ (2.00 mL) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται με επαναροή για 2-5 h. Στη συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίζεται με AcOEt (20 mL). Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL), συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό και αποκλειστικά στην *E*-γεωμετρία με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης όπως αναφέρεται για κάθε ένωση ξεχωριστά.

(*E*)-3-(4-Φθοροφαινυλο)-2-(υδροξυμεθυλο)ακρυλονιτρίλιο (236)



Λευκό στερεό

α=59%

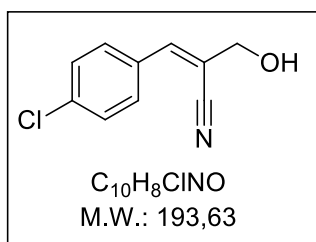
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 1:1, R_f=0.36 (PE/Et₂O 3:7)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.82-7.71 (m, 2H), 7.17-7.07 (m, 3H), 4.41 (s, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 163.5 (d, $^1J_{\text{F-C}}=252.5$ Hz), 144.6, 142.4, 130.9 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.6$ Hz), 129.1 (d, $^4J_{\text{F-C}}=3.4$ Hz), 115.9 (d, $^2J_{\text{F-C}}=21.9$ Hz), 106.4, 64.0.

Θέρμανση με επαναροή για 4 h

(E)-3-(4-Χλωροφαινυλο)-2-(υδροξυμεθυλο)ακρυλονιτρίλιο (237)²⁷⁷



Λευκό στερεό

$\alpha=66\%$

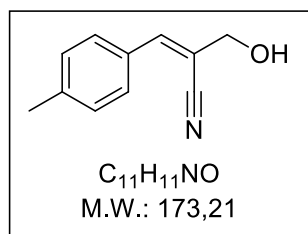
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 3:7, R_f=0.41 (PE/Et₂O 3:7)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 2.76 (s, 1H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 142.4, 136.3, 131.1, 129.9, 128.9, 117.5, 110.8, 63.8.

Θέρμανση με επαναροή για 5 h

(E)-2-(Υδροξυμεθυλο)-3-(p-τολυλο)ακρυλονιτρίλιο (238)²⁷⁷



Λευκό στερεό

$\alpha=18\%$

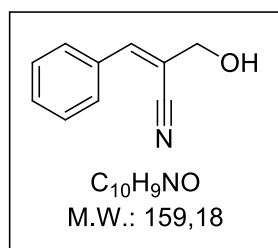
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 1:1, R_f=0.42 (PE/Et₂O 1:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.61 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.12 (s, 1H), 4.33 (s, 2H), 3.45 (s, 1H), 2.34 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 144.0, 140.9, 130.1, 129.4, 128.8, 118.0, 109.0, 64.2, 21.3.

Θέρμανση με επαναροή για 2 h

(*E*)-2-(Υδροξυμεθυλο)-3-φαινυλακρυλονιτρίλιο (239)²⁷⁷



Άχρωμο λάδι

$\alpha=53\%$

Σύστημα έκλουσης: PE/ Et_2O 1:1, $R_f=0.24$ (PE/ Et_2O 1:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.70-7.64 (m, 2H), 7.38-7.28 (m, 3H), 7.16 (s, 1H), 4.34 (s, 2H), 4.07 (br s, 1H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 143.8, 132.7, 130.3, 128.6, 117.7, 110.2, 63.8.

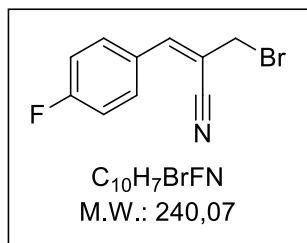
Θέρμανση με επαναροή για 2 h

5.2.5 Γενική μέθοδος βρωμίωσης (*E*)-κυανο-κινναμωμικών αλκοολών

Σε παγωμένο στους 0 °C διάλυμα της αλκοόλης (1.00 mmol) σε ξηρό Et_2O (10 mL) προστίθεται στάγδην PBr_3 (94 μL , 1.00 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται έπειτα να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 3 h. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εκπλένεται με H_2O (10 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό και σε υψηλή αναλογία ως προς την επιθυμητή γεωμετρία μετά από

χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης αυτό που αναφέρεται στη συνέχεια για κάθε ένωση.

(E)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(4-φθοροφαινυλο)ακρυλονιτρίλιο (240)²⁷⁸



Λευκό στερεό

α=65%

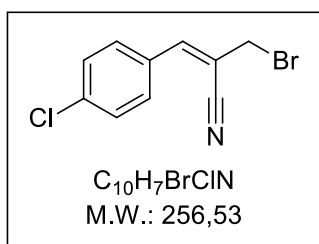
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 1:1, R_f=0.69 (PE/Et₂O 1:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.83-7.70 (m, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.10 (t, *J*=8.6 Hz, 2H), 4.20 (s, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 163.9 (d, ¹*J*_{F-C}=254.0 Hz), 145.0, 131.3 (d, ³*J*_{F-C}=8.8 Hz), 128.5 (d, ⁴*J*_{F-C}=3.4 Hz), 116.9, 116.1 (d, ²*J*_{F-C}=22.0 Hz), 107.4 (d, ⁵*J*_{F-C}=2.4 Hz), 32.6.

E/Z=91/9

(E)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(4-χλωροφαινυλο)ακρυλονιτρίλιο (241)²⁷⁹



Λευκό στερεό

α=85%

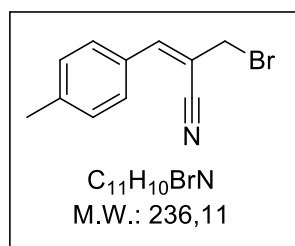
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 7:3, R_f=0.47 (PE/Et₂O 7:3)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 4.19 (s, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 144.8, 137.0, 130.5, 130.2, 129.0, 116.7, 108.2, 32.5.

$E/Z=91/9$

(*E*)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(*p*-τολυλο)ακρυλονιτρίλιο (242)²⁷⁹



Λευκό κρυσταλλικό στερεό

$\alpha=75\%$

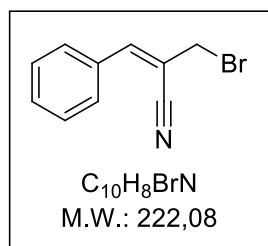
Σύστημα έκλουσης: PE/ Et_2O 8:2, $R_f=0.54$ (PE/ Et_2O 8:2)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 4.20 (s, 2H), 2.37 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 146.3, 141.6, 129.5, 129.4, 129.0, 117.2, 106.2, 33.1, 21.4.

$E/Z=97/3$

(*E*)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-φαινυλακρυλονιτρίλιο (244)²⁷⁸



Λευκό στερεό

$\alpha=78\%$

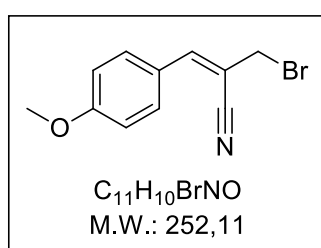
Σύστημα έκλουσης: PE/Et₂O 7:3, R_f=0.53 (PE/Et₂O 7:3)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.79-7.74 (m, 2H), 7.45-7.41 (m, 3H), 7.19 (s, 1H), 4.19 (s, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 146.4, 132.2, 131.2, 129.0, 128.9, 117.0, 107.7, 32.8.

E/Z=95/5

5.2.6 (E)-2-(Βρωμομεθυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)ακρυλονιτρίλιο (243)²⁷⁹



Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει την ένωση **234** (1.00 mmol) προστίθεται 33% w/w διάλυμα HBr σε AcOH (0.53 mL, 3.00 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για 3 h. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη που περιέχει 1:1 ογκομετρικό μίγμα H₂O και CH₂Cl₂ (20 mL συνολικά). Οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και η υδατική στιβάδα εκπλένεται με CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται, εκπλένονται με H₂O (20 mL), με κορεσμένο διάλυμα NaCl (20 mL), συλλέγονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄, διηθούνται και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/Et₂O 6:4.

Λευκό στερεό

α=79%

R_f=0.52 (PE/Et₂O 6:4)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.89 (d, J=8.8 Hz, 2H), 4.19 (s, 2H), 3.80 (s, 3H).

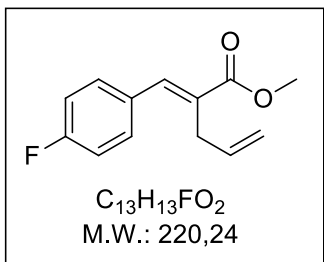
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 161.6, 145.9, 130.9, 124.7, 117.5, 114.0, 104.1, 55.2, 33.6.

E/Z=93/7

5.2.7 Γενική μέθοδος σύζευξης Stille με τετραβινυλοκασσίτερο

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το βρωμίδιο (1.00 mmol) διαλυμένο σε ξηρό THF (4 mL) προστίθενται κατά σειρά τετραβινυλοκασσίτερος (219 μ L, 1.20 mmol), LiCl (21.2 mg, 0.50 mmol), 5% Pd(dba)₂ (28.8 mg) και Ph₃P (52.5 mg, 0.20 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης απαερώνεται και αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα Ar. Στη συνέχεια ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt 9.5:0.5, εκτός από τις ενώσεις **182** και **183** για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε σύστημα έκλουσης PE/AcOEt 8.5:1.5.

(E)-2-(4-ΦθοροβενζυλιδENO)πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (178)



Άχρωμο υγρό

α =85%

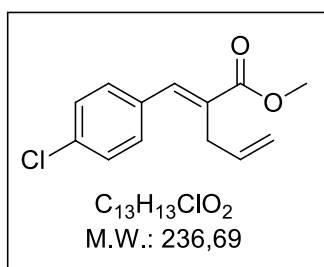
R_F=0.54 (PE/AcOEt 9:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (s, 1H), 7.37-7.29 (m, 2H), 7.01 (t, J =8.7 Hz, 2H), 6.02-5.86 (m, 1H), 5.10-4.99 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.22 (d, J =5.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 168.1, 162.6 (d, ¹J_{F-C}=249.5 Hz), 139.2, 137.7, 135.2, 131.2 (d, ⁴J_{F-C}=3.4 Hz), 131.0 (d, ³J_{F-C}=8.3 Hz), 129.6, 115.3 (d, ²J_{F-C}=21.4 Hz), 51.8, 31.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₃H₁₄FO₂⁺ [M+H]⁺ 221.1, βρέθηκε 221.1.

(E)-2-(4-ΧλωροβενζυλιδENO)Πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (179)²⁸⁰



Άχρωμο λάδι

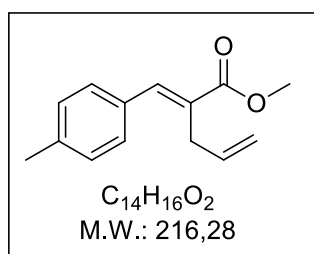
$\alpha=93\%$

$R_f=0.60$ (PE/AcOEt 9:1)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.72 (s, 1H), 7.31-7.28 (m, 4H), 6.06-5.87 (m, 1H), 5.13-5.01 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.23 (d, $J=5.4$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 168.1, 139.1, 137.9, 135.1, 134.5, 133.6, 130.4, 128.6, 115.7, 52.0, 31.4.

(E)-2-(4-ΜεθυλοβενζυλιδENO)Πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (180)²⁸⁰



Άχρωμο λάδι

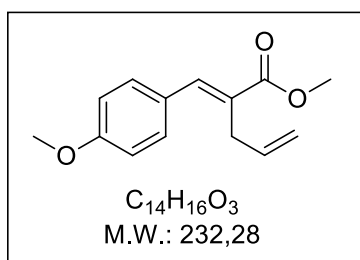
$\alpha=91\%$

$R_f=0.59$ (PE/AcOEt 9:1)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (s, 1H), 7.33 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 6.09-5.93 (m, 1H), 5.18-5.08 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.32 (d, $J=5.4$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 168.3, 140.4, 138.6, 135.4, 132.3, 129.2, 129.0, 128.8, 115.4, 51.7, 31.4, 21.1.

(E)-2-(4-Μεθοξυβενζυλιδενο)πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (181)²⁸⁰



Άχρωμο λάδι

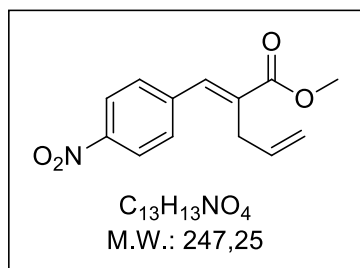
$\alpha=77\%$

$R_f=0.43$ (PE/AcOEt 9:1)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (s, 1H), 7.37 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.10-5.91 (m, 1H), 5.15-5.05 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.30 (d, $J=5.3$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 168.6, 159.9, 140.2, 135.4, 131.1, 127.7, 127.5, 115.4, 113.8, 55.1, 51.9, 31.5.

(E)-2-(4-Νιτροβενζυλιδενο)πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (182)



Κίτρινο στερεό

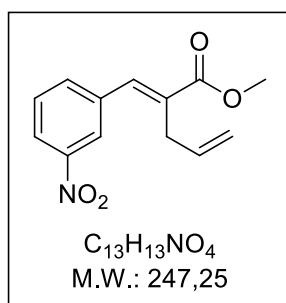
$\alpha=52\%$

$R_f=0.54$ (PE/AcOEt 8:2)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.21 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.52 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.04-5.90 (m, 1H), 5.15-5.02 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.23 (d, $J=5.1$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 167.6, 147.4, 143.3, 141.8, 134.8, 130.5, 129.8, 123.6, 116.2, 52.4, 31.6.

(E)-2-(3-Νιτροβενζυλιδενο)πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (183)



Κίτρινο στερεό

$\alpha=77\%$

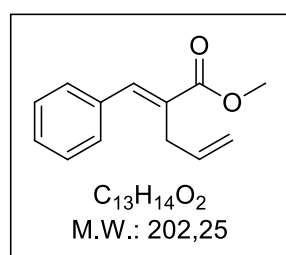
$R_f=0.57$ (PE/AcOEt 8:2)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 8.22 (s, 1H), 8.13 (dd, $J=8.1, 0.9$ Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.66 (d, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.52 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 6.05-5.86 (m, 1H), 5.14-5.05 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.22 (d, $J=5.3$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 167.6, 148.1, 137.5, 136.7, 134.9, 134.6, 130.4, 129.4, 123.8, 123.1, 116.2, 52.3, 31.5.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{17}N_2O_4^+$ $[M+NH_4]^+$ 265.1, βρέθηκε 265.1.

(E)-2-Βενζυλιδενοπεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (184)²⁸⁰



Άχρωμο λάδι

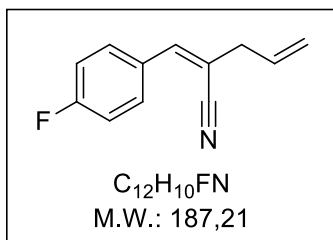
$\alpha=78\%$

$R_f=0.67$ (PE/AcOEt 9:1)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (s, 1H), 7.41-7.31 (m, 5H), 6.11-5.92 (m, 1H), 5.15-5.06 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.29 (d, $J=5.4$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.5, 140.5, 135.5, 135.3, 129.9, 129.2, 128.6, 128.4, 115.6, 52.1, 31.6.

(Z)-2-(4-Φθοροβενζυλιδενο)πεντ-4-ενονιτρίλιο (245)



Κίτρινο λάδι

$\alpha=26\%$

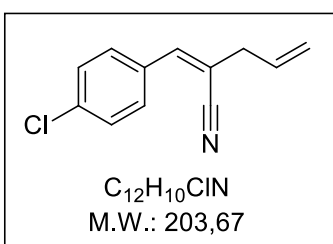
$R_f=0.44$ (PE/AcOEt 9:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.76-7.69 (m, 2H), 7.08 (t, $J=8.7$ Hz, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.00-5.77 (m, 1H), 5.30-5.21 (m, 2H), 3.12 (dd, $J=6.7, 1.0$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 163.3 (d, $^1J_{\text{F-C}}=251.6$ Hz), 142.6, 132.6, 130.6 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.5$ Hz), 129.7 (d, $^4J_{\text{F-C}}=3.3$ Hz), 118.9, 118.2, 115.9 (d, $^2J_{\text{F-C}}=21.8$ Hz), 109.0, 39.8.

$E/Z=15/85$

(Z)-2-(4-Χλωροβενζυλιδενο)πεντ-4-ενονιτρίλιο (246)



Υποκίτρινο λάδι

$\alpha=30\%$

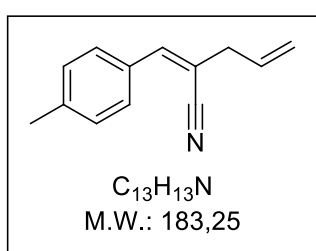
$R_f=0.44$ (PE/AcOEt 9:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 5.98-5.76 (m, 1H), 5.29, 5.29-5.21 (m, 2H), 3.12 (dd, $J=6.7, 1.2$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 142.4, 135.8, 132.4, 130.2, 129.7, 128.9, 119.0, 118.3, 110.0, 39.8.

$E/Z=17/83$

(Z)-2-(4-Μεθυλοβενζυλιδενο)πεντ-4-ενονιτρίλιο (247)



Άχρωμο λάδι

$\alpha=33\%$

$R_f=0.53$ (PE/AcOEt 9:1)

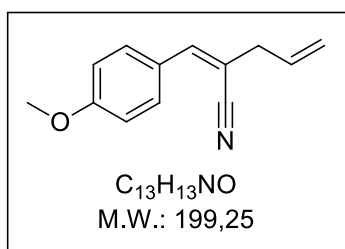
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 5.99-5.79 (m, 1H), 5.32-5.21 (m, 2H), 3.11 (dd, $J=6.6, 1.1$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 143.8, 140.3, 132.8, 130.7, 129.3, 128.9, 128.4, 118.5, 107.8, 39.8, 21.3.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2^+$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 201.1, βρέθηκε 201.1.

$E/Z=17/83$

(Z)-2-(4-Μεθοξυβενζυλιδενο)πεντ-4-ενονιτρίλιο (248)



Άχρωμο λάδι

α=24%

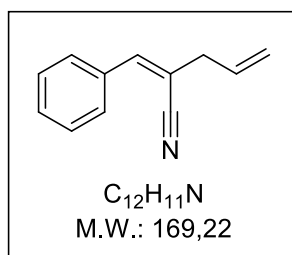
R_F=0.40 (PE/AcOEt 9:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 5.99-5.78 (m, 1H), 5.31-5.20 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.11 (dd, *J*=6.6, 1.3 Hz, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 160.8, 143.5, 133.1, 130.2, 126.2, 119.1, 118.4, 114.0, 106.1, 55.2, 39.8.

E/Z>1/99

(Z)-2-Βενζυλιδενοπεντ-4-ενονιτρίλιο (249)²⁸¹



Άχρωμο λάδι

α=31%

R_F=0.48 (PE/AcOEt 9:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.79-7.71 (m, 2H), 7.47-7.37 (m, 3H), 6.96 (s, 1H), 6.01-5.79 (m, 1H), 5.33-5.22 (m, 2H), 3.13 (dd, *J*=6.6, 1.2 Hz, 2H).

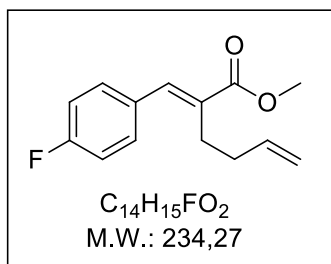
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 143.9, 133.4, 132.7, 129.9, 128.8, 128.7, 128.5, 118.7, 109.2, 39.9.

E/Z=15/85

5.2.8 Γενική μέθοδος σύζευξης Stille με αλλυλοτριβουτυλοκασσίτερο

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το βρωμίδιο (1.00 mmol) διαλυμένο σε ξηρό THF (4 mL) προστίθενται κατά σειρά αλλυλοτριβουτυλοκασσίτερος (372 μ L, 1.20 mmol), LiCl (21.2 mg, 0.50 mmol), 5% Pd(dba)₂ (28.8 mg) και Ph₃P (52.5 mg, 0.20 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης απαερώνεται και αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα Ar. Στη συνέχεια ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE→PE/AcOEt 9.5:0.5, εκτός από την ένωση **199** για την οποία χρησιμοποιήθηκε σύστημα έκλουσης PE→PE/AcOEt 9:1.

(E)-2-(4-ΦθοροβενζυλιδENO)εξ-5-ENOϊκό μεθύλιο (195)²⁸²



Άχρωμο λάδι

α =88%

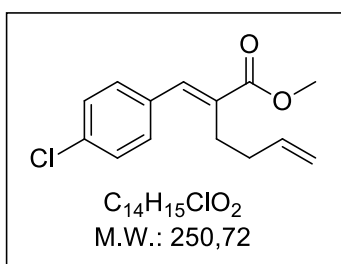
R_F=0.56 (PE/AcOEt 9:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (s, 1H), 7.36-7.29 (m, 2H), 7.05 (t, J =8.7 Hz, 2H), 5.92-5.72 (m, 1H), 5.08-4.94 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.64-2.56 (m, 2H), 2.33-2.25 (m, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 168.5, 162.5 (d, ¹J_{F-C}=249.3 Hz), 138.1, 137.5, 132.3, 131.5 (d, ⁴J_{F-C}=3.5 Hz), 131.0 (d, ³J_{F-C}=8.2 Hz), 115.5 (d, ²J_{F-C}=21.6 Hz), 115.0, 51.9, 33.0, 26.7.

E/Z=84/16

(E)-2-(4-Χλωροβενζυλιδενο)εξ-5-ενοϊκό μεθύλιο (196)²⁸²



Άχρωμο υγρό

$\alpha=86\%$

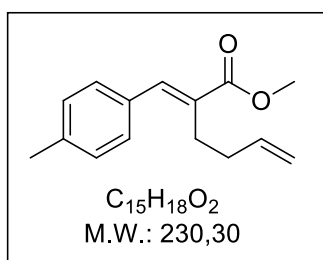
$R_f=0.65$ (PE/AcOEt 9:1)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.60 (s, 1H), 7.33 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.87-5.71 (m, 1H), 5.07-4.94 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.62-2.54 (m, 2H), 2.32-2.21 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 168.3, 137.9, 137.4, 134.2, 133.9, 133.1, 130.4, 128.6, 115.0, 52.0, 33.0, 26.7.

$E/Z=86/14$

(E)-2-(4-Μεθυλοβενζυλιδενο)εξ-5-ενοϊκό μεθύλιο (197)



Άχρωμο υγρό

$\alpha=87\%$

$R_f=0.66$ (PE/AcOEt 9:1)

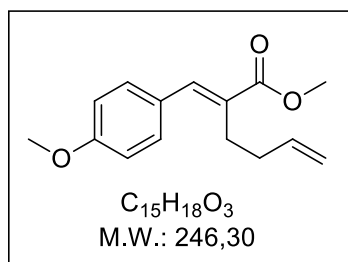
1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.83 (s, 1H), 7.44 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 6.13-5.93 (m, 1H), 5.26-5.12 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.85-2.77 (m, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.48-2.42 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.8, 139.3, 138.5, 137.7, 132.6, 131.6, 129.3, 129.2, 114.8, 51.8, 33.1, 26.8, 21.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_2^+ [\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 248.2, βρέθηκε 248.1.

$E/Z=89/11$

(E)-2-(4-ΜεθοξυβενζυλιδENO)εξ-5-ENOϊκό μεθύλιο (198)²⁸²



Άχρωμο λάδι

$\alpha=83\%$

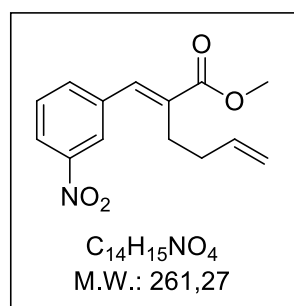
$R_f=0.56$ (PE/AcOEt 9:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.65 (s, 1H), 7.36 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 5.99-5.79 (m, 1H), 5.13-4.98 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.71-2.63 (m, 2H), 2.38-2.27 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.9, 159.7, 139.0, 137.7, 131.0, 130.2, 127.9, 114.8, 113.9, 55.2, 51.8, 32.9, 26.7.

$E/Z>99/1$

(E)-2-(3-ΝιτροβενζυλιδENO)εξ-5-ENOϊκό μεθύλιο (199)



Κίτρινο στερεό

$\alpha=66\%$

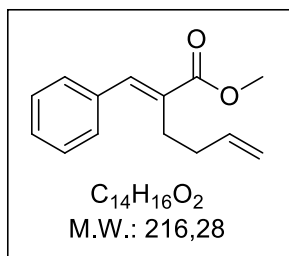
$R_f=0.51$ (PE/AcOEt 8:2)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (s, 1H), 8.09 (dd, $J=8.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.64 (d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.49 (t, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.94-5.79 (m, 1H), 5.11-4.97 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.82-2.74 (m, 2H), 2.59-2.47 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.9, 143.3, 136.5, 134.7, 130.5, 128.9, 128.3, 125.3, 123.7, 123.0, 115.7, 52.2, 33.0, 27.0.

$E/Z=78/22$

(*E*)-2-Βενζυλιδενοεξ-5-ενοϊκό μεθύλιο (200)²⁸²



Άχρωμο λάδι

$\alpha=80\%$

$R_f=0.58$ (PE/AcOEt 9:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (s, 1H), 7.39-7.32 (m, 5H), 5.96-5.75 (m, 1H), 5.10-4.96 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.68-2.60 (m, 2H), 2.36-2.25 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.5, 139.3, 137.5, 135.4, 132.4, 129.1, 128.4, 128.3, 114.8, 51.8, 33.0, 26.7.

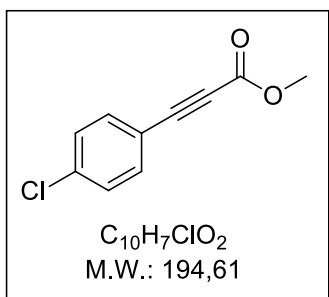
$E/Z=91/9$

5.2.9 Γενική μέθοδος σύζευξης τύπου Sonogashira

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει διάλυμα αρυλοϊωδιδίου (1.00 mmol) σε ξηρό DMF (5 mL) προστίθενται κατά σειρά προπιολικό μεθύλιο (177 μL , 2.00 mmol) και Cu_2O (143.1 mg, 1.00 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης απαερώνεται και αναδεύεται για 18 h σε ελαιόλουτρο των 110 $^\circ\text{C}$ υπό

ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται από celite. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται σε υψηλό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης αραιώνεται με AcOEt (20 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται πρώτα με H₂O (10 mL) και έπειτα με κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL). Η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό μετά από χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης αυτό που αναφέρεται για κάθε ένωση ξεχωριστά.

3-(4-Χλωροφαινυλο)προπιολικό μεθύλιο (215)²⁸³



Λευκό στερεό

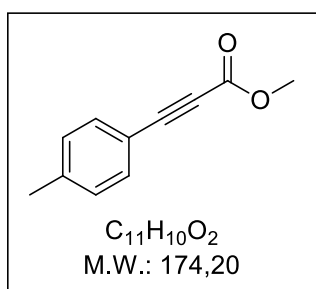
α=71%

Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 6:1, R_f=0.60 (PE/AcOEt 6:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (d, J=8.6 Hz, 2H), 7.29 (d, J=8.6 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 154.0, 136.9, 134.0, 128.9, 117.8, 84.9, 81.0, 52.7.

3-(*p*-Τολουλο)προπιολικό μεθύλιο (216)²⁸³



Λευκό στερεό

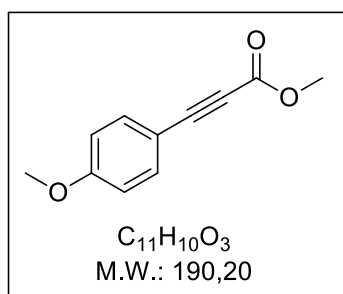
$\alpha=86\%$

Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 9:1, $R_f=0.57$ (PE/AcOEt 9:1)

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.36 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 154.5, 141.3, 132.9, 129.3, 116.2, 86.9, 79.9, 52.6, 21.6.

3-(4-Μεθοξυφαινυλο)προπιολικό μεθύλιο (217)²⁸⁴



Λευκό στερεό

$\alpha=72\%$

Σύστημα έκλουσης: PE/AcOEt 10:1, $R_f=0.35$ (PE/AcOEt 10:1)

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.44 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.73 (s, 3H).

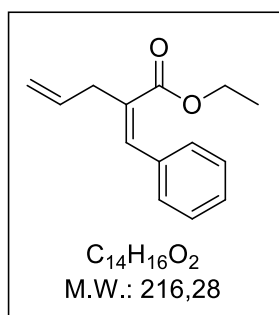
$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 161.3, 154.3, 134.6, 114.0, 110.8, 87.0, 79.6, 55.0, 52.3.

5.2.10 Γενική μέθοδος υδροκασιτερίωσης/σύζευξης Stille

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη που περιέχει διάλυμα PhP_3 (31.5 mg, 0.12 mmol) σε ξηρό THF (7 mL) προστίθεται καταλύτης $\text{Pd}(\text{dba})_2$ (17.3 mg, 0.030 mmol) και ακολουθεί ανάδευση για 15 min. Έπειτα προστίθεται το αλκίνιο (ή το εμπορικά διαθέσιμο 3-φαινυλοπροπιολικό αιθύλιο) (1.00 mmol) και το μίγμα ψύχεται στους 0 °C. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην υδρίδιο του

τριβουτυλοκασσίτερου (0.26 mL, 1.00 mmol), ενώ το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου για διάστημα 1 h. Στο τέλος, γίνεται προσθήκη αλλυλοβρωμιδίου (0.85 mL, 10.0 mmol) και CuCl (198.0 mg, 2.00 mmol), το μίγμα της αντίδρασης απαερώνεται και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 96 h υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολουθώς, το μίγμα διηθείται από celite. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση, ενώ το υπόλειμμα διαλύεται σε AcOEt (25 mL) και η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με H₂O (10 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL). Η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt 9:1.

(Z)-2-Βενζυλιδενοπεντ-4-ενοϊκό αιθύλιο (218)²⁸⁵



Άχρωμο λάδι

α =38%

R_f=0.64 (PE/AcOEt 9:1)

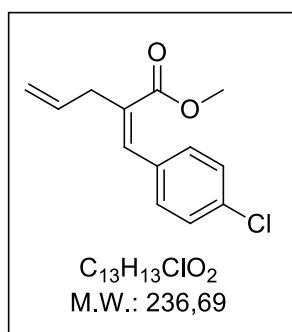
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.29-7.22 (m, 5H), 6.67 (s, 1H), 5.96-5.80 (m, 1H), 5.23-5.08 (m, 2H), 4.11 (q, *J*=7.1 Hz, 2H), 3.17 (dd, *J*=6.6, 1.3 Hz, 2H), 1.09 (t, *J*=7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 169.2, 140.1, 134.5, 133.9, 133.0, 128.1, 128.0, 127.6, 117.3, 60.6, 39.1, 13.7.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C₁₄H₂₀NO₂⁺ [M+NH₄]⁺ 234.1, βρέθηκε 234.2.

E/Z=12/88

(Z)-2-(4-Χλωροβενζυλιδενο)πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (219)



Άχρωμο λάδι

$\alpha=35\%$

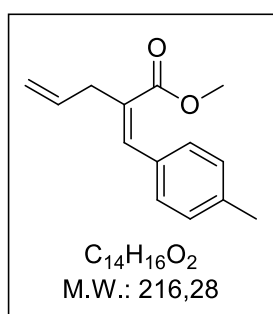
$R_f=0.61$ (PE/AcOEt 9:1)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.26 (d, $J=8.6$ HZ, 2H), 7.15 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.60 (s, 1H), 5.93-5.76 (m, 1H), 5.21-5.10 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 3.15 (dd, $J=7.9, 1.3$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 169.2, 134.4, 134.2, 133.5, 133.2, 133.1, 129.4, 128.2, 117.5, 51.6, 39.0.

$E/Z > 1/99$

(Z)-2-(4-Μεθυλοβενζυλιδενο)πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (220)



Άχρωμο λάδι

$\alpha=48\%$

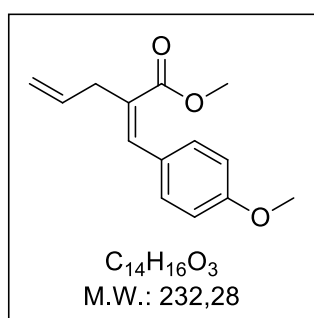
$R_f=0.59$ (PE/AcOEt 9:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.34-7.17 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 6.00-5.79 (m, 1H), 5.16-5.06 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.16 (dd, $J=6.6$ Hz, 1.3 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 169.8, 140.5, 137.6, 134.2, 131.5, 129.3, 128.8, 128.0, 117.2, 51.5, 39.2, 21.1.

$E/Z=31/69$

(Z)-2-(4-Μεθοξυβενζυλιδενο)πεντ-4-ενοϊκό μεθύλιο (221)



Άχρωμο λάδι

$\alpha=49\%$

$R_f=0.49$ (PE/AcOEt 9:1)

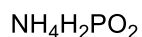
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.59 (s, 1H), 5.97-5.77 (m, 1H), 5.20-5.06 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.13 (dd, $J=6.6$, 1.3 Hz, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 169.8, 159.2, 134.7, 134.1, 130.3, 129.6, 128.3, 117.0, 113.4, 55.0, 51.4, 39.2.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_3^+ [\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 250.1, βρέθηκε 249.9.

$E/Z=13/87$

5.2.11 Αμμωνιακό άλας του υποφωσφορώδους οξέος (119)²⁸⁶



M.W.: 83,03

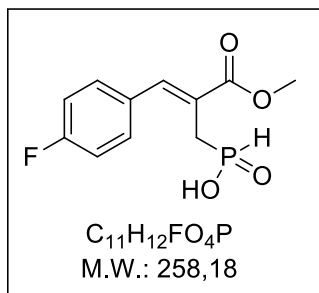
Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει διάλυμα NH_3 25% w/w (4.06 mL, 54.0 mmol) υπό ψύξη στους 0 °C προστίθεται διάλυμα H_3PO_2 50% w/w (5.70 mL, 54.0 mmol). Το μίγμα συμπυκνώνεται σε υψηλό κενό για απομάκρυνση του H_2O . Το στερεό υπόλειμμα διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner, εκπλένεται με ακετόνη, συλλέγεται και ξηραίνεται υπό κενό υπεράνω P_2O_5 . Παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό.

$\alpha=92\%$

5.2.12 Γενική μέθοδος σύνθεσης φωσφινικών οξέων

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθεται $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ (83.0 mg, 1.00 mmol) και HMDS (0.62 mL, 3.00 mmol), ακολουθεί απαέρωση και το μίγμα θερμαίνεται για 2 h στους 110 °C υπό ατμόσφαιρα Ar. Με το πέρας των 2 h το σύστημα ψύχεται στους 0 °C και προστίθεται το ακετυλιωμένο παράγωγο MBH (0.40 mmol) διαλυμένο σε ξηρό CH_2Cl_2 (3 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα Ar για 24 h. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα HCl 3N (5 mL) και το μίγμα αναδεύεται για ακόμη 30 min. Έπειτα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίζεται με CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί χρωματογραφικός καθαρισμός με σύστημα έκλουσης $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:1:0.5, εκτός από την ένωση **149** για την οποία χρησιμοποιείται σύστημα έκλουσης $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:1.5:1.

(Z)-(3-(4-Φθοροφαινυλο)-2-(μεθοξυκαρβονυλ)αλλυλο)φωσφινικό οξύ
(145)



Λευκό στερεό (τσιχλώδες)

$\alpha=78\%$

$R_f=0.32$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:1:0.5)

1H NMR (200 MHz, CD_3OD) δ 7.73-7.17 (m, 5H), 7.24 (d, $^1J_{P-H}=519.9$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.03 (m, 2H).

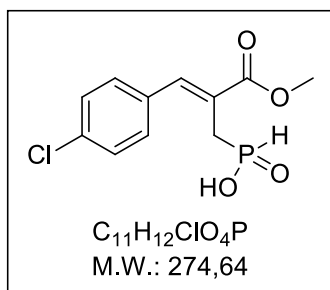
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 169.6, 164.0 (d, $^1J_{F-C}=249.5$ Hz), 141.5, 132.6, 132.3, 125.0, 116.3, 52.9, 32.3 (d, $^1J_{P-C}=84.7$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3OD) δ 23.63.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{11}FO_4P^-$ $[M-H]^-$ 257.0, βρέθηκε 257.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{11}FO_4P^-$ $[M-H]^-$ 257.0384, βρέθηκε 257.0384.

(Z)-(3-(4-Χλωροφαινυλο)-2-(μεθοξυκαρβονυλ)αλλυλο)φωσφινικό οξύ
(146)



Λευκό αφρώδες στερεό

$\alpha=94\%$

R_f=0.31 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (br s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.42 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.25 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.12 (d, ¹J_{P-H}=549.7 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.97 (d, ²J_{P-H}=18.6 Hz, 2H).

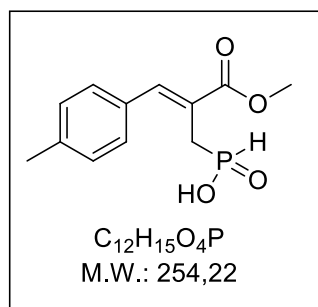
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 168.3, 140.3 (d, ³J_{P-C}=8.3 Hz), 134.8, 133.0, 130.7, 128.7, 124.3 (d, ²J_{P-C}=9.0 Hz), 52.5, 31.3 (d, ¹J_{P-C}=89.5 Hz).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 27.78.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₁ClO₄P⁻ [M-H]⁻ 273.0, βρέθηκε 273.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₁ClO₄P⁻ [M-H]⁻ 273.0089, βρέθηκε 273.0087.

(Z)-(2-(Μεθοξυκαρβονυλο)-3-(ρ-τολυλ)αλλυλο)φωσφινικό οξύ (147)



Υποκίτρινο αφρώδες στερεό

α=98%

R_f=0.35 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (s, 1H), 7.36-7.08 (m, 4H), 7.09 (d, ¹J_{P-H}=532.9 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.05 (m, 2H), 2.23 (s, 3H).

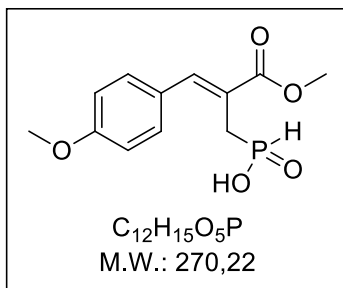
¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 168.9, 140.9, 138.7, 131.9, 129.4, 129.1, 123.6, 52.3, 31.7 (d, ¹J_{P-C}=79.9 Hz), 21.1.

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 26.12.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₄O₄P⁻ [M-H]⁻ 253.1, βρέθηκε 253.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₄O₄P⁻ [M-H]⁻ 253.0635, βρέθηκε 253.0642.

**(Z)-(2-(Μεθοξυκαρβονυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)αλλυλο)φωσφινικό οξύ
(148)**



Λευκό στερεό

$\alpha=68\%$

$R_f=0.29$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:1:0.5)

1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 7.60-6.79 (m, 5H), 7.07 (d, $^1J_{P-H}=534.0$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.02 (m, 2H).

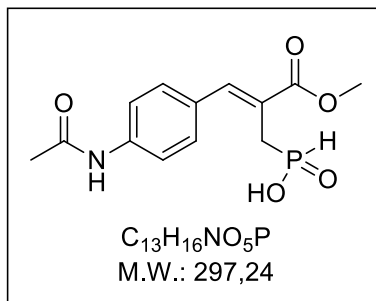
^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 169.5, 160.1, 140.8, 131.4, 127.3, 122.1, 113.9, 55.1, 52.4, 32.0 (d, $^1J_{P-C}=84.5$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, $CDCl_3$) δ 24.80.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{14}O_5P^-$ [M-H] $^-$ 269.1, βρέθηκε 269.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{14}O_5P^-$ [M-H] $^-$ 269.0584, βρέθηκε 269.0586.

**(Z)-(3-(4-Ακεταμιδοφαινυλο)-2-(μεθοξυκαρβονυλ)αλλυλο)φωσφινικό οξύ
(149)**



Λευκό στερεό

$\alpha=49\%$

R_F=0.35 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1.5:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.89 (d, ⁴J_{P-H}=4.5 Hz, 1H), 7.68 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.54 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, ¹J_{P-H}=587.7 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.28 (d, ²J_{P-H}=20.0 Hz, 2H), 2.21 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 172.8, 169.3, 143.5, 140.2, 131.4, 131.3, 122.2 (d, ²J_{P-C}=10.1 Hz), 120.7, 53.2, 30.9 (d, ¹J_{P-C}=91.6 Hz), 23.9.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 44.64.

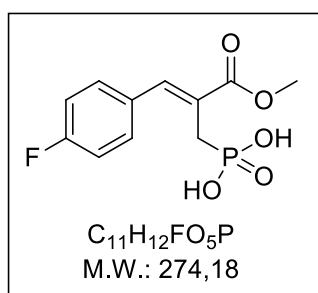
MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₃H₁₅NO₅P⁻ [M-H]⁻ 296.1, βρέθηκε 296.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₃H₁₅NO₅P⁻ [M-H]⁻ 296.0693, βρέθηκε 296.0693.

5.2.13 Γενική μέθοδος οξείδωσης φωσφινικών οξέων

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει διάλυμα του φωσφινικού οξέος (1.00 mmol) διαλυμένο σε THF (10 mL) προστίθενται DMSO (142 μL, 2.00 mmol) και I₂ (2.0 mg) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται για 24h με επαναροή. Στη συνέχεια ακολουθεί συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του THF. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:1, ενώ για την ένωση **154** χρησιμοποιήθηκε σύστημα έκλουσης CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1.5:1.

(Z)-(3-(4-Φθοροφαινυλο)-2-(μεθοξυκαρβονυλ)αλλυλο)φωσφονικό οξύ (150)



Λευκό στερεό

α=90%

$R_f=0.39$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.77-7.63 (m, 3H), 7.12 (t, $J=8.7$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.17 (d, $^2J_{P-H}=21.8$ Hz, 2H).

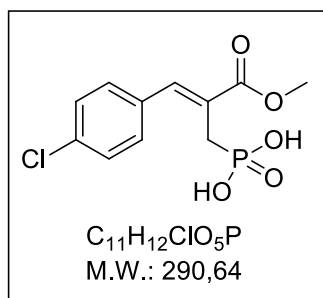
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.5, 164.0 (d, $^1J_{F-C}=248.2$ Hz), 140.9, 132.3, 126.3 (d, $^2J_{P-C}=10.4$ Hz), 116.3 (d, $^2J_{F-C}=21.9$ Hz), 114.8, 53.1, 29.4 (d, $^1J_{P-C}=134.0$ Hz).

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 33.45.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₁FO₅P⁻ [M-H]⁻ 273.0, βρέθηκε 273.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₁FO₅P⁻ [M-H]⁻ 273.0334, βρέθηκε 273.0331.

**(Z)-(3-(4-Χλωροφαινυλο)-2-(μεθοξυκαρβονυλ)αλλυλο)φωσφονικό οξύ
(151)**



Λευκό στερεό

$\alpha=94\%$

$R_f=0.32$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.71-7.38 (m, 5H), 3.81 (s, 3H), 3.12 (m, 2H).

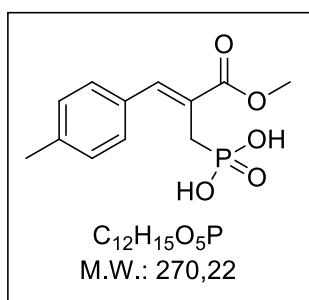
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 168.7, 140.5, 135.0, 134.2, 131.7, 129.0, 126.9, 52.9, 30.4 (d, $^1J_{P-C}=36.8$ Hz).

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 31.85.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₁ClO₅P⁻ [M-H]⁻ 289.0, βρέθηκε 289.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₁ClO₅P⁻ [M-H]⁻ 289.0038, βρέθηκε 289.0041.

(Z)-(2-(Μεθοξυκαρβονυλο)-3-(p-τολυλ)αλλυλο)φωσφονικό οξύ (152)



Λευκό στερεό

α=89%

R_F=0.35 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.74 (s, 1H), 7.51 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.19 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.16 (d, ²*J*_{P-H}=22.2 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H).

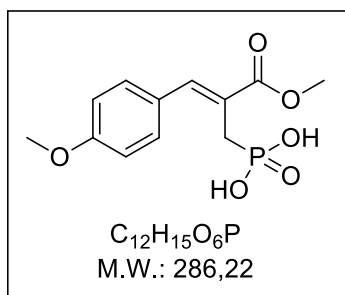
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.8, 142.3 (d, ³*J*_{P-C}=12.1 Hz), 140.0, 132.9, 130.5, 129.9, 125.3 (d, ²*J*_{P-C}=11.1 Hz), 53.0, 29.4 (d, ¹*J*_{P-C}=133.8 Hz), 20.7.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 33.20.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C₁₂H₁₄O₅P⁻ [M-H]⁻ 269.1, βρέθηκε 269.1.

HRMS *m/z* υπολογίζεται για C₁₂H₁₄O₅P⁻ [M-H]⁻ 269.0584, βρέθηκε 269.0584.

(Z)-(2-(Μεθοξυκαρβονυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλ)αλλυλο)φωσφονικό οξύ (153)



Λευκό στερεό

α=91%

R_f=0.27 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.73 (d, ⁴J_{P-H}=5.0 Hz, 1H), 7.60 (d, J=8.6 Hz, 2H), 6.93 (d, J=8.6 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.17 (d, ²J_{P-H}=22.3 Hz, 2H).

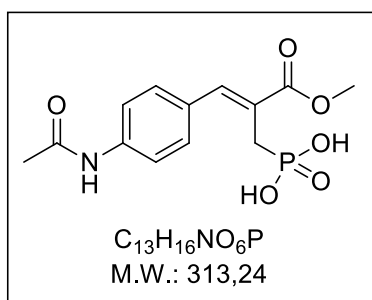
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 171.2, 161.4, 142.2, 132.7 (d, ³J_{P-C}=18.4 Hz), 128.3, 123.7 (d, ²J_{P-C}=11.4 Hz), 114.7, 55.6, 53.1, 29.4 (d, ¹J_{P-C}=133.8 Hz).

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 33.19.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₄O₆P⁻ [M-H]⁻ 285.1, βρέθηκε 285.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₄O₆P⁻ [M-H]⁻ 285.0533, βρέθηκε 285.0534.

**(Z)-(3-(4-Ακεταμιδοφαινυλο)-2-(μεθοξυκαρβονυλ)αλλυλο)φωσφονικό οξύ
(154)**



Λευκό στερεό

α=49%

R_f=0.23 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1.5:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.73-7.62 (m, 5H), 3.79 (s, 3H), 3.17 (d, ²J_{P-H}=21.6 Hz, 2H), 2.19 (s, 3H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 172.6, 170.8, 141.3, 139.8, 131.8, 131.4, 125.3, 120.5, 53.0, 29.4 (d, ¹J_{P-C}=112.6 Hz), 23.9.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 33.19.

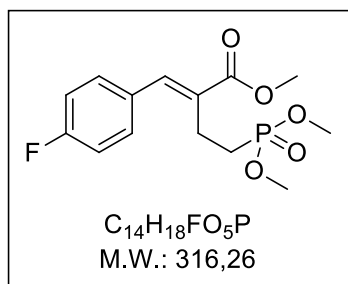
MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₃H₁₅NO₆P⁻ [M-H]⁻ 312.1, βρέθηκε 312.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₃H₁₅NO₆P⁻ [M-H]⁻ 312.0642, βρέθηκε 312.0636.

5.2.14 Γενική μέθοδος σύνθεσης φωσφονοαιθυλο-κινναμωμικών διεστέρων

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη που περιέχει διάλυμα του ακετυλιωμένου παραγωγού MBH (1.00 mmol) σε ξηρό THF (1.70 mL) προστίθεται μεθυλοφωσφονικό διμεθύλιο **164** (0.12 mL, 1.10 mmol). Ακολουθεί απαέρωση του μίγματος με διαβίβαση αερίου Ar και έπειτα ψύξη στους -15 °C με μίγμα πάγου/NaCl. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην και σε διάστημα μερικών λεπτών LiHMDS (διάλυμα 1.0 M σε THF, 2.05 mL, 2.05 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 1 h υπό ατμόσφαιρα Ar στους -15 °C. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη διαλύματος HCl 1N (10 mL), το οποίο έχει προψυχθεί. Το μίγμα αραιώνεται έπειτα με AcOEt (40 mL) και διαχωρίζονται οι δύο στιβάδες. Η οργανική στιβάδα εκπλένεται με H₂O (10 mL), κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL), συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και διαλύτες έκλουσης αρχικά AcOEt και έπειτα CHCl₃/MeOH 9.5:0.5.

(E)-4-(Διμεθοξυφωσφορυλο)-2-(4-φθοροβενζυλιδενο)βουτανοϊκό μεθύλιο (161)



Κίτρινο λάδι

$\alpha=25\%$

$R_f=0.43$ (CHCl₃/MeOH 9:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (s, 1H), 7.32-7.25 (m, 2H), 7.01 (t, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.81-3.59 (m, 9H), 2.76-2.63 (m, 2H), 2.03-1.85 (m, 2H).

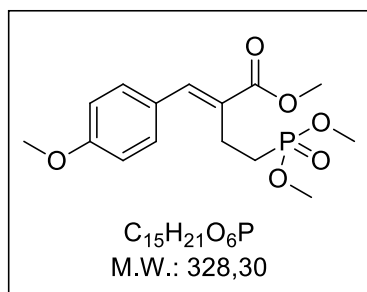
^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 167.6, 162.4 (d, $^1J_{\text{F-C}}=249.9$ Hz), 138.8, 130.9 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.3$ Hz), 130.7, 130.6, 115.5 (d, $^2J_{\text{F-C}}=21.6$ Hz), 52.1, 52.0, 51.9, 23.5 (d, $^1J_{\text{P-C}}=138.7$ Hz), 20.3 (d, $^2J_{\text{P-C}}=3.6$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3) δ 33.96.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{FO}_5\text{P}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 317.1, βρέθηκε 317.1.

$E/Z=96/4$

**(E)-4-(Διμεθοξυφωσφορυλο)-2-(4-μεθοξυβενζυλιδENO)βουτανοϊκό
μεθύλιο (162)**



Κίτρινο λάδι

$\alpha=44\%$

$R_f=0.30$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (s, 1H), 7.37 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 3.83-3.70 (m, 12H), 2.90-2.77 (m, 2H), 2.12-1.95 (m, 2H).

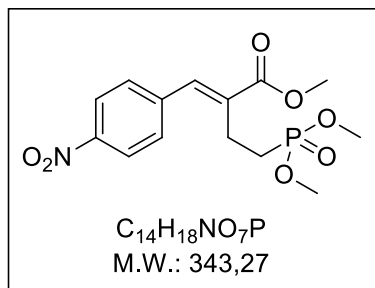
^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 168.3, 160.0, 139.9, 131.1, 129.0, 127.3, 114.1, 55.3, 52.4, 52.3, 52.0, 23.8 (d, $^1J_{\text{P-C}}=138.2$ Hz), 20.7.

^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3) δ 34.34.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{P}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 329.1, βρέθηκε 329.2.

$E/Z=95/5$

**(E)-4-(Διμεθοξυφωσφορυλο)-2-(4-νιτροβενζυλιδENO)βουτανοϊκό μεθύλιο
(163)**



Πορτοκαλόχρωμο υαλώδες στερεό

$\alpha=11\%$

R_f=0.83 (CHCl₃/MeOH 9:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.53 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 3.85-3.69 (m, 9H), 2.83-2.70 (m, 2H), 2.11-1.94 (m, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 167.2, 147.4, 141.4, 137.6, 134.6 (d, ³*J*_{P-C}=17.3 Hz), 129.9, 123.8, 52.5, 52.4, 52.4, 23.8 (d, ¹*J*_{P-C}=139.8 Hz), 20.9 (d, ²*J*_{P-C}=3.4 Hz).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ 33.61.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C₁₄H₁₉NO₇P⁺ [M+H]⁺ 344.1, βρέθηκε 344.1.

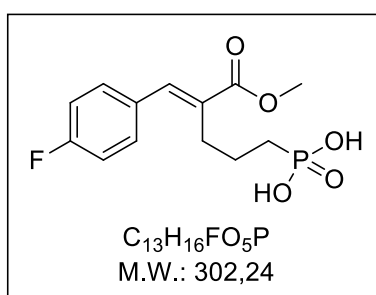
E/Z=97/3

5.2.15 Γενική μέθοδος σύνθεσης φωσφονικών οξέων μέσω υδροφωσφινυλίωσης-οξειδωσης

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το αλκένιο (1.00 mmol) διαλυμένο σε DMF (2.0 mL) προστίθενται κατά σειρά διάλυμα H₃PO₂ 50% w/w (216 μL, 2.00 mmol), καταλύτης Pd₂dba₃ (9.2 mg, 0.010 mmol) και xantphos (12.7 mg, 0.022 mmol). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 110 °C παρουσία αέρα (χρησιμοποιείται septum με βελόνα) μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, δηλαδή την πλήρη οξείδωση του ενδιάμεσου *H*-φωσφονικού οξέος. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με φασματοσκοπία NMR ³¹P. Ακολούθως το μίγμα της αντίδρασης αραιώνεται με AcOEt (20 mL) και η

οργανική φάση εκπλένεται με διάλυμα HCl 2N. Η υδατική στιβάδα διαχωρίζεται και εκχυλίζεται άλλη μία φορά με AcOEt (20 mL). Οι οργανικές στιβάδες ενώνονται, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (10 mL), ξηραίνονται με Na₂SO₄, διηθούνται και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5.

(E)-(5-(4-Φθοροφαινυλο)-4-(μεθοξυκαρβονυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (185)



Λευκό στερεό

α =47%

R_f=0.27 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.66 (s, 1H), 7.45-7.39 (m, 2H), 7.13 (t, *J*=8.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.69-2.45 (m, 2H), 1.86-1.59 (m, 4H).

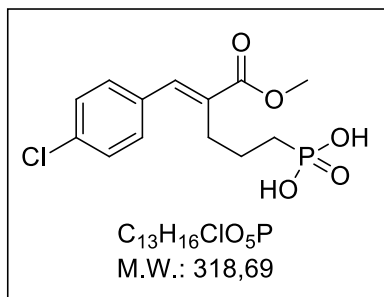
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.0, 163.6 (d, ¹*J*_{F-C}=247.9 Hz), 139.7, 139.3, 133.2, 132.5 (d, ⁴*J*_{F-C}=3.1 Hz), 116.4 (d, ²*J*_{F-C}=21.6 Hz), 52.7, 30.4, 29.4, 29.1, 28.8 (d, *J*_{P-C}=135.4 Hz), 23.6.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 38.33.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C₁₃H₁₅FO₅P⁻ [M-H]⁻ 301.1, βρέθηκε 301.0.

HRMS *m/z* υπολογίζεται για C₁₃H₁₅FO₅P⁻ [M-H]⁻ 301.0647, βρέθηκε 301.0642.

(E)-(5-(4-Χλωροφαινυλο)-4-(μεθοξυκαρβονυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (186)



Λευκό στερεό

$\alpha=47\%$

$R_f=0.35$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:1:0.5)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.64 (s, 1H), 7.46-7.29 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 2.65-2.44 (m, 2H), 1.89-1.55 (m, 4H).

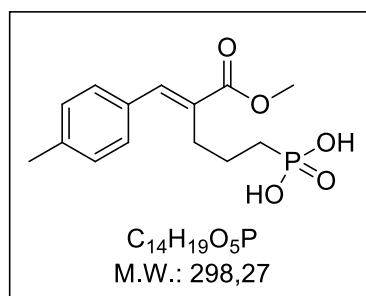
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 169.8, 139.1, 135.1, 134.9, 134.1, 131.7, 129.6, 52.7, 30.4, 29.5, 29.1, 28.7 (d, $J_{P-C}=138.0$ Hz), 23.6.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.04.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{15}ClO_5P^-$ $[M-H]^-$ 317.0, βρέθηκε 316.9.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{15}ClO_5P^-$ $[M-H]^-$ 317.0351, βρέθηκε 317.0342.

(E)-(4-(Μεθοξυκαρβονυλο)-5-(p-τολυλο)πεν-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (187)



Λευκό στερεό

$\alpha=42\%$

$R_f=0.27$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.66 (s, 1H), 7.30 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.68-2.49 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.88-1.61 (m, 4H).

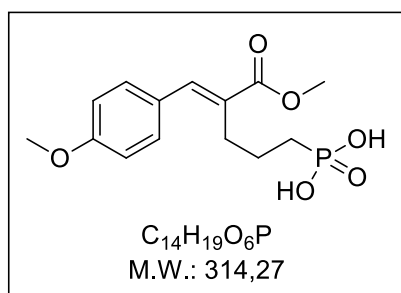
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.3, 140.9, 139.7, 133.4, 132.4, 130.4, 130.2, 52.7, 30.4, 29.6, 29.2, 28.9 (d, $J_{P-C}=136.2$ Hz), 23.6, 21.2.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 38.35.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₅P⁻ [M-H]⁻ 297.1, βρέθηκε 297.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₅P⁻ [M-H]⁻ 297.0897, βρέθηκε 297.0895.

(E)-(4-(Μεθοξυκαρβονυλο)-5-(4-μεθοξυφαινυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (188)



Λευκό στερεό

$\alpha=39\%$

$R_f=0.30$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.64 (s, 1H), 7.38 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 3.80 (s, 6H), 2.68-2.50 (m, 2H), 1.88-1.60 (m, 4H).

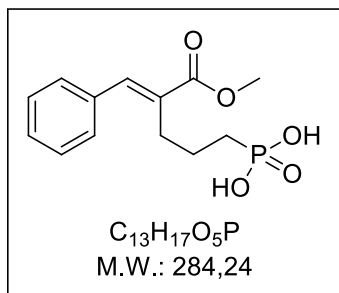
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.5, 161.0, 140.6, 132.3, 130.8, 128.6, 114.9, 55.5, 52.6, 30.4, 29.6, 29.2, 28.9 (d, $J_{P-C}=137.5$ Hz), 23.6.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 38.19.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₆P⁻ [M-H]⁻ 313.1, βρέθηκε 313.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₆P⁻ [M-H]⁻ 313.0846, βρέθηκε 313.0840.

**(E)-(4-(Μεθοξυκαρβονυλο)-5-φαινυλοπεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ
(189)**



Λευκό στερεό

$\alpha=53\%$

$R_f=0.30$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:1:0.5)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.69 (s, 1H), 7.52-7.11 (m, 5H), 3.80 (s, 3H), 2.73-2.42 (m, 2H), 1.94-1.49 (m, 4H).

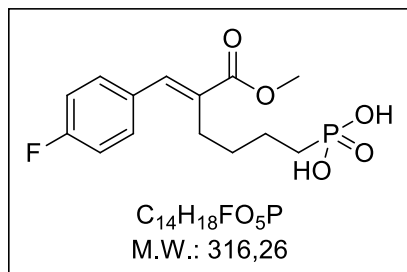
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 170.2, 140.8, 136.4, 133.4, 130.2, 129.8, 129.5, 52.7, 30.4, 29.6, 29.2, 28.9 (d, $J_{P-C}=139.6$ Hz), 23.7.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.89.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{16}O_5P^-$ $[M-H]^-$ 283.1, βρέθηκε 283.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{16}O_5P^-$ $[M-H]^-$ 283.0741, βρέθηκε 283.0730.

(E)-(6-(4-Φθοροφαινυλο)-5-(μεθοξυκαρβονυλ)εξ-5-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (201)



Λευκό στερεό

$\alpha=38\%$

$R_f=0.24$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:1:0.5)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.63 (s, 1H), 7.47-7.30 (m, 2H), 7.13 (t, $J=7.8$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.60-2.37 (m, 2H), 1.83-1.43 (m, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 170.1, 163.6 (d, $^1J_{\text{F-C}}=248.0$ Hz), 138.9, 133.7, 132.7 (d, $^4J_{\text{F-C}}=3.0$ Hz), 130.8 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.6$ Hz), 116.4 (d, $^2J_{\text{F-C}}=22.3$ Hz), 52.7, 31.2, 30.8, 30.4, 28.5 (d, $J_{\text{P-C}}=136.1$ Hz), 27.8, 23.9.

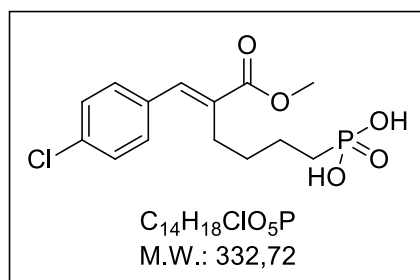
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.14.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 315.1, βρέθηκε 315.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 315.0803, βρέθηκε 315.0803.

$E/Z=84/16$

(E)-(6-(4-Χλωροφαινυλο)-5-(μεθοξυκαρβονυλ)εξ-5-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (202)



Λευκό στερεό

$\alpha=43\%$

$R_f=0.27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:1:0.5)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.61 (s, 1H), 7.45-7.29 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 2.56-2.40 (m, 2H), 1.75-1.52 (m, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 169.9, 139.0, 135.1, 134.5, 131.6, 130.4, 129.5, 52.7, 31.1, 30.8, 30.4, 28.5 (d, $J_{\text{P-C}}=138.8$ Hz), 27.9, 23.9.

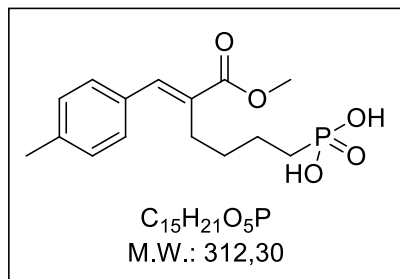
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.01.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 331.1, βρέθηκε 331.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 331.0508, βρέθηκε 331.0500.

E/Z=86/14

(E)-(5-(Μεθοξυκαρβονυλο)-6-(p-τολυλ)εξ-5-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (203)



Λευκό στερεό

$\alpha=30\%$

$R_f=0.28$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.63 (s, 1H), 7.28 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.61-2.43 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.76-1.51 (m, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.4, 140.2, 139.7, 133.5, 132.8, 130.3, 130.1, 52.7, 31.3, 30.9, 30.4, 28.6 (d, $J_{P-C}=136.2$ Hz), 27.9, 24.0, 21.3.

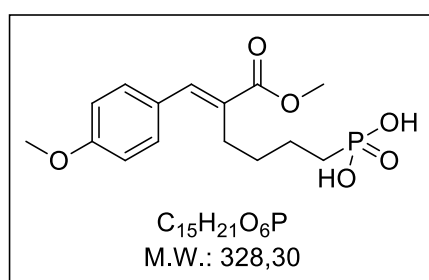
³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 39.09.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{15}H_{20}O_5P^-$ [M-H]⁻ 311.1, βρέθηκε 311.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{15}H_{20}O_5P^-$ [M-H]⁻ 311.1054, βρέθηκε 311.1050.

E/Z=89/11

(E)-(5-(Μεθοξυκαρβονυλο)-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξ-5-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (204)



Λευκό στερεό

$\alpha=41\%$

$R_f=0.28$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.60 (s, 1H), 7.43-7.25 (m, 2H), 7.03-6.83 (m, 2H), 3.79 (s, 6H), 2.66-2.40 (m, 2H), 1.79-1.50 (m, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.6, 161.0, 140.2, 132.1, 131.4, 128.8, 114.9, 55.6, 52.6, 31.2, 30.8, 30.4, 28.6 (d, $J_{P-C}=132.7$ Hz), 27.9, 24.0.

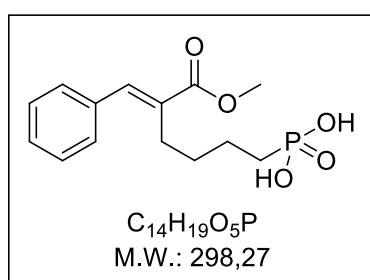
³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 39.21.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₅H₂₀O₆P⁻ [M-H]⁻ 327.1, βρέθηκε 327.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₅H₂₀O₆P⁻ [M-H]⁻ 327.1003, βρέθηκε 327.0998.

E/Z>99/1

(E)-(5-(Μεθοξυκαρβονυλο)-6-φαινυλεξ-5-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (205)



Λευκό στερεό

$\alpha=58\%$

$R_f=0.27$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:0.5)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.67 (s, 1H), 7.47-7.26 (m, 5H), 3.79 (s, 3H), 2.62-2.41 (m, 2H), 1.80-1.48 (m, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.2, 140.1, 136.4, 133.8, 130.1, 129.4, 129.0, 52.6, 31.3, 31.0, 30.4, 28.6 (d, $J_{P-C}=134.1$ Hz), 27.9, 24.0.

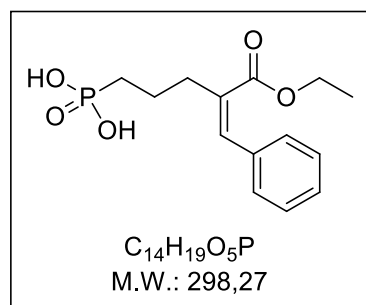
³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 39.14.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₅P⁻ [M-H]⁻ 297.1, βρέθηκε 297.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{14}H_{18}O_5P^- [M-H]^-$ 297.0897, βρέθηκε 297.0888.

$E/Z=91/9$

(Z)-(4-(Αιθοξυκαρβονυλο)-5-φαινυλοπεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ
(222)



Λευκό στερεό

$\alpha=65\%$

$R_f=0.47$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.34-7.08 (m, 5H), 6.66 (s, 1H), 4.12 (d, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.68-2.27 (m, 2H), 1.90-1.49 (m, 4H), 1.07 (t, $J=6.7$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 171.4, 137.1, 135.1, 134.1, 129.5, 128.9, 128.5, 61.8, 36.9 (d, $J=15.1$ Hz), 30.4, 28.1 (d, $J=133.0$ Hz), 22.6, 13.9.

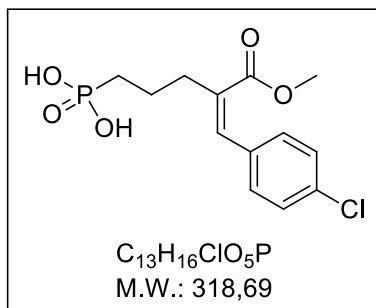
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.26.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{14}H_{18}O_5P^- [M-H]^-$ 297.1, βρέθηκε 297.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{14}H_{18}O_5P^- [M-H]^-$ 297.0897, βρέθηκε 297.0905.

$E/Z=12/88$

(Z)-(5-(4-Χλωροφαινυλο)-4-(μεθοξυκαρβονυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (223)



Λευκό στερεό

$\alpha=63\%$

$R_f=0.37$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.29 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.64 (s, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.56-2.38 (m, 2H), 1.85-1.54 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 171.4, 135.7, 135.6, 134.2, 133.2, 130.4, 129.2, 52.4, 36.9 (d, $J=15.7$ Hz), 30.4, 28.1 (d, $J=140.0$ Hz), 22.7.

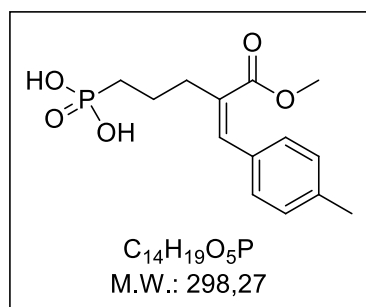
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.93.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{15}ClO_5P^-$ $[M-H]^-$ 317.0, βρέθηκε 317.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{15}ClO_5P^-$ $[M-H]^-$ 317.0351, βρέθηκε 317.0362.

$E/Z > 1/99$

(Z)-(4-(Μεθοξυκαρβονυλο)-5-(p-τολυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (224)



Λευκό στερεό

$\alpha=53\%$

$R_f=0.44$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.18-6.98 (m, 4H), 6.63 (s, 1H), 3.67 (s, 3H), 2.71-2.40 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.91-1.61 (m, 4H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 172.1, 139.8, 138.6, 134.1, 133.8, 129.7, 129.0, 52.3, 37.0 (d, $J=18.0$ Hz), 30.5, 28.1 (d, $J=136.7$ Hz), 22.7, 21.2.

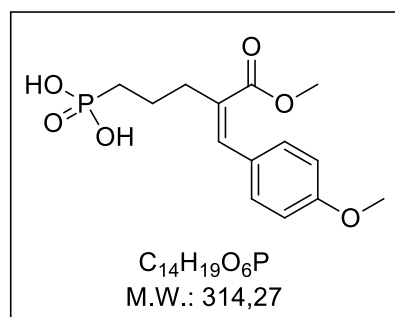
³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 40.01.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₅P⁻ [M-H]⁻ 297.1, βρέθηκε 297.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₅P⁻ [M-H]⁻ 297.0897, βρέθηκε 297.0888.

$E/Z=31/69$

(Z)-(4-(Μεθοξυκαρβονυλο)-5-(4-μεθοξυφαινυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (225)



Λευκό στερεό

$\alpha=54\%$

$R_f=0.42$ (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.17 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 2.56-2.33 (m, 2H), 1.92-1.54 (m, 4H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 172.1, 160.3, 134.2, 132.5, 130.5, 129.4, 114.4, 55.5, 52.2, 37.0 (d, $J=18.9$ Hz), 30.4, 28.0 (d, $J=136.6$ Hz), 22.8.

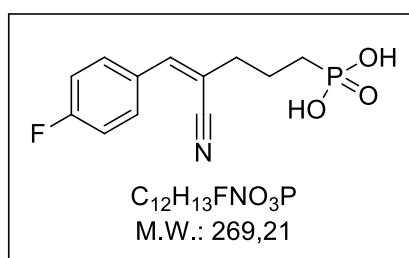
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.47.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 313.1, βρέθηκε 313.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 313.0846, βρέθηκε 313.0841.

$E/Z=13/87$

(Z)-(4-Κυανο-5-(4-φθοροφαινυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (250)



Λευκό στερεό

$\alpha=76\%$

$R_f=0.40$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.94-7.60 (m, 2H), 7.26-6.98 (m, 3H), 2.67-2.39 (m, 2H), 1.95-1.47 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 164.2 (d, $^1J_{\text{F-C}}=249.3$ Hz), 143.7, 132.6 (d, $^3J_{\text{F-C}}=8.6$ Hz), 131.2, 119.1, 116.5 (d, $^2J_{\text{F-C}}=20.5$ Hz), 111.2, 30.4, 29.0, 27.7 (d, $J_{\text{P-C}}=134.3$ Hz), 22.8.

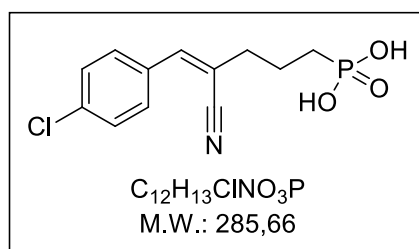
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 37.98.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{FNO}_3\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 268.1, βρέθηκε 268.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{FNO}_3\text{P}^-$ [M-H] $^-$ 268.0544, βρέθηκε 268.0536.

$E/Z=15/85$

(Z)-(5-(4-Χλωροφαινυλο)-4-κυανοπεν-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (251)



Λευκό στερεό

$\alpha=73\%$

$R_f=0.45$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.72 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 2.70-2.35 (m, 2H), 1.93-1.67 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 143.5, 136.3, 133.4, 130.8, 129.7, 118.9, 112.2, 30.4, 28.9, 27.7 (d, $J_{P-C}=140.1$ Hz), 22.8.

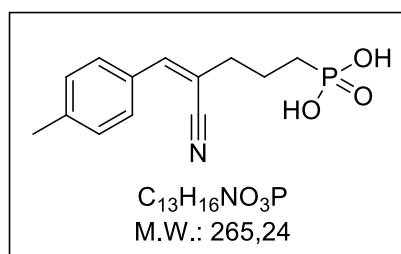
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 37.98.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{12}ClNO_3P^-$ $[M-H]^-$ 284.0, βρέθηκε 283.8.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{12}ClNO_3P^-$ $[M-H]^-$ 284.0249, βρέθηκε 284.0244.

$E/Z=17/83$

(Z)-(4-Κυανο-5-(*p*-τολυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (252)



Λευκό στερεό

$\alpha=61\%$

$R_f=0.35$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.64 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 2.58-2.38 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.93-1.60 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 145.0, 141.3, 132.1, 130.2, 129.5, 119.4, 110.1, 30.4, 29.6, 27.7 (d, $J_{\text{P-C}}=135.4$ Hz), 22.9, 21.3.

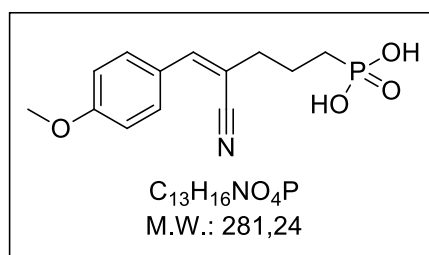
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.08.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 264.1, βρέθηκε 263.9.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 264.0795, βρέθηκε 264.0788.

$E/Z=17/83$

(Z)-(4-Κυανο-5-(4-μεθοξυφαινυλο)πεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (253)



Λευκό στερεό

$\alpha=67\%$

$R_f=0.34$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.72 (d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.08-6.84 (m, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.57-2.31 (m, 2H), 1.95-1.54 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 144.9, 131.3, 127.6, 122.8, 119.7, 115.0, 112.6, 55.7, 30.5, 29.6, 27.6 (d, $J=145.0$ Hz), 22.9.

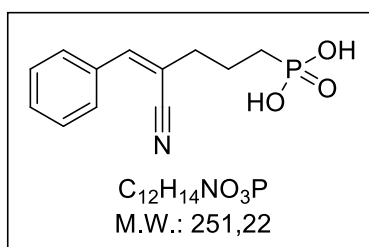
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.01.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 280.1, βρέθηκε 280.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 280.0744, βρέθηκε 280.0736.

$E/Z>1/99$

(Z)-(4-Κυανο-5-φαινυλοπεντ-4-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (254)



Λευκό στερεό

α =67%

R_F=0.45 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.96-7.54 (m, 2H), 7.51-7.28 (m, 3H), 7.07 (s, 1H), 2.77-2.33 (m, 2H), 1.95-1.51 (m, 4H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 145.0, 134.7, 130.7, 129.4, 129.3, 119.1, 111.3, 30.3, 29.0, 27.6 (d, J_{P-C}=138.8 Hz), 22.7.

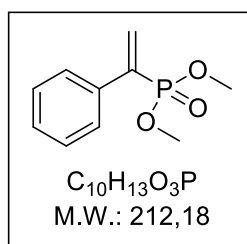
³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 38.03.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₃NO₃P⁻ [M-H]⁻ 250.1, βρέθηκε 250.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₃NO₃P⁻ [M-H]⁻ 250.0639, βρέθηκε 250.0633.

E/Z=15/85

5.2.16 (1-Φαινυλοβινυλο)φωσφονικό διμεθύλιο (256)²⁸⁷



Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται Pd₂(dba)₃ (9.2 mg, 0.010 mmol), dppp (8.2 mg, 0.020 mmol) και ξηρό τολουόλιο (1 mL) και το μίγμα απαερώνεται και αναδεύεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αργού. Έπειτα προστίθενται φωσφονικό διμεθύλιο (92 μL, 1.00 mmol) και φαινυλακετυλένιο (0.11 mL, 1.00 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 100 °C για 24 h υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολουθεί

συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt 4:6.

Άχρωμο λάδι

$\alpha=86\%$

$R_f=0.19$ (PE/AcOEt 4:6)

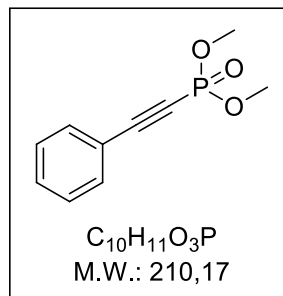
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.42-7.35 (m, 2H), 7.25-7.17 (m, 3H), 6.16 (dd, $J=3.0, 1.5$ Hz, 1H), 6.10 (dd, $J=65.1, 1.5$ Hz, 1H), 3.60 (d, $^3J_{\text{P-H}}=11.1$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 138.2 (d, $J=174.9$ Hz), 136.0 (d, $J=11.8$ Hz), 131.9 (d, $J=8.0$ Hz), 128.1, 128.0, 126.9 (d, $J=5.8$ Hz), 52.2 (d, $^2J_{\text{P-C}}=5.8$ Hz).

$^{31}\text{P NMR}$ (81 MHz, CDCl_3) δ 20.88.

Αναλογία τοποϊσομερών $\alpha/\beta=97/3$

5.2.17 (Φαινυλαιθινυλο)φωσφονικό διμεθύλιο (259)



Σε αναδευόμενο εναιώρημα Cu_2O (20.0 mg, 0.14 mmol) σε CH_3CN (4 mL) προστίθεται φωσφονικό διμεθύλιο (0.13 mL, 1.40 mmol) και φαινυλακετυλένιο (0.11 mL, 1.00 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται για 48 h στους 70 °C παρουσία αέρα (χρησιμοποιείται septum με βελόνα). Σε αυτό το χρονικό διάστημα το μίγμα μετατρέπεται σε διαυγές πράσινο διάλυμα. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη σε υψηλό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης PE/AcOEt 4:6.

Καφέ λάδι

$\alpha=84\%$

$R_f=0.33$ (PE/AcOEt 4:6)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.47-7.39 (m, 2H), 7.36-7.22 (m, 3H), 3.74 (d, $^3J_{\text{P-H}}=12.3$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 132.3 (d, $J_{\text{P-C}}=2.5$ Hz), 130.6, 128.3, 118.8 (d, $J_{\text{P-C}}=5.7$ Hz), 99.7 (d, $J_{\text{P-C}}=53.2$ Hz), 76.5 (d, $J_{\text{P-C}}=302.0$ Hz), 53.2 (d, $^2J_{\text{P-C}}=5.6$ Hz).

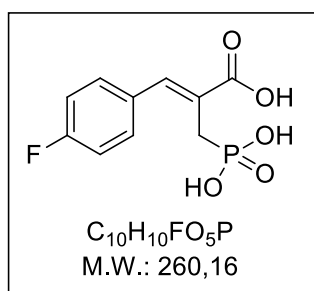
^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3) δ -1.74.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{P}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 211.1, βρέθηκε 211.1.

5.2.18 Γενική μέθοδος όξινης υδρόλυσης εστέρων

Ο μεθυλεστέρας (1.00 mmol) διαλύεται σε διάλυμα HCl 6N (10 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 (ή 48 h για τις ενώσεις **168** και **169**) με θέρμανση υπό αναρροή. Στη συνέχεια συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης αντίστροφης φάσης και σύστημα έκλουσης $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:9 έως 9:1.

(Z)-3-(4-Φθοροφαινυλο)-2-(φωσφονομεθυλ)ακρυλικό οξύ (**155**)



Λευκό στερεό

$\alpha=50\%$

$R_f=0.50$ (n-BuOH/AcOH/ H_2O 4:1:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.93 (d, $^4J_{\text{P-H}}=5.1$ Hz, 1H), 7.73-7.66 (m, 2H), 7.17 (t, $J=8.8$ Hz, 2H), 3.31 (d, $^2J_{\text{P-H}}=22.8$ Hz, 2H).

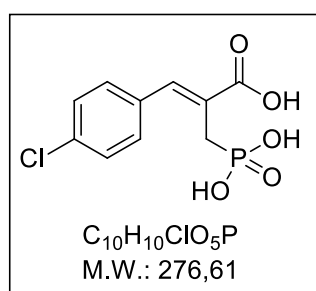
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.3, 164.3 (d, $^1J_{\text{F-C}}=249.0$ Hz), 133.1, 131.9, 124.1 (d, $^2J_{\text{P-C}}=11.2$ Hz), 119.9, 116.6 (d, $^2J_{\text{F-C}}=18.1$ Hz), 27.9 (d, $^1J_{\text{P-C}}=139.7$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.35.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 259.0, βρέθηκε 259.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 259.0177, βρέθηκε 259.0178.

(Z)-3-(4-Χλωροφαινυλο)-2-(φωσφονομεθυλ)ακρυλικό οξύ (156)



Λευκό στερεό

$\alpha=54\%$

$R_f=0.54$ (n-BuOH/AcOH/ H_2O 4:1:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.90 (d, $^4J_{\text{P-H}}=5.7$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 3.30 (d, $^2J_{\text{P-H}}=22.8$ Hz, 2H).

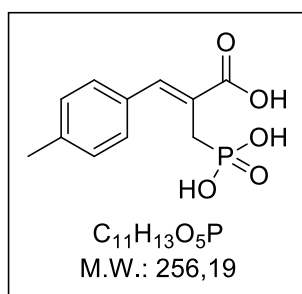
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.0, 136.1, 134.2, 132.1 (d, $^3J_{\text{P-C}}=14.9$ Hz), 129.9, 129.6, 125.1 (d, $^2J_{\text{P-C}}=11.4$ Hz), 28.0 (d, $^1J_{\text{P-C}}=137.3$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.68.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 275.0, βρέθηκε 275.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 274.9882, βρέθηκε 274.9883.

(Z)-2-(Φωσφονομεθυλο)-3-(*p*-τολυλ)ακρυλικό οξύ (157)



Λευκό στερεό

$\alpha=52\%$

$R_f=0.47$ (n-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.90 (s, 1H), 7.56 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.30 (d, $^2J_{P-H}=17.7$ Hz, 2H), 2.36 (s, 3H).

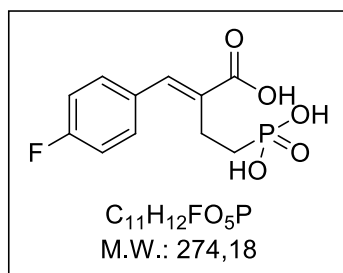
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 170.7, 140.8, 132.8, 131.1, 130.8, 130.2, 123.6, 28.5 (d, $^1J_{P-C}=132.8$ Hz), 21.4.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 37.93.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{12}O_5P^-$ [M-H]⁻ 255.0, βρέθηκε 255.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{11}H_{12}O_5P^-$ [M-H]⁻ 255.0428, βρέθηκε 255.0428.

(E)-2-(4-ΦθοροβενζυλιδENO)-4-φωσφονοβουτανοϊκό οξύ (168)



Λευκό στερεό

$\alpha=37\%$

$R_f=0.54$ (n-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.75 (s, 1H), 7.54-7.38 (m, 2H), 7.17 (t, $J=8.5$ Hz, 2H), 2.90-2.66 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 172.8, 163.7 (d, $^1J_{\text{F-C}}=248.9$ Hz), 141.0, 133.8, 132.5, 132.1 (d, $^3J_{\text{F-C}}=7.4$ Hz), 116.6 (d, $^2J_{\text{F-C}}=17.8$ Hz), 27.8 (d, $^1J_{\text{P-C}}=135.6$ Hz), 21.9.

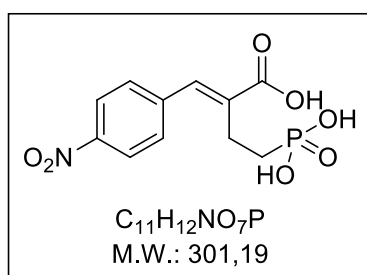
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 37.72.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 273.0, βρέθηκε 273.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 273.0334, βρέθηκε 273.0324.

$E/Z=96/4$

(*E*)-2-(4-Νιτροβενζυλιδενο)-4-φωσφονοβουτανοϊκό οξύ (169)



Υποκίτρινο στερεό

$\alpha=68\%$

$R_f=0.53$ (n-BuOH/AcOH/ H_2O 4:1:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 8.29 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.66 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 2.92-2.79 (m, 2H), 2.28-2.10 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 172.4, 148.8, 142.2, 140.5, 140.1, 135.2 (d, $^3J_{\text{P-C}}=18.6$ Hz), 131.6, 131.1, 124.7, 26.7 (d, $^1J_{\text{P-C}}=137.9$ Hz), 21.5.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 44.58.

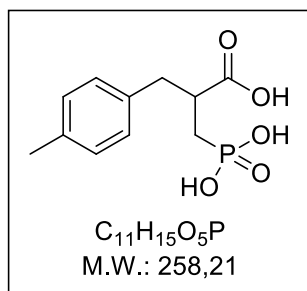
MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_7\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 300.0, βρέθηκε 300.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_7\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 300.0279, βρέθηκε 300.0274.

$E/Z=97/3$

5.2.19 2-(4-Μεθυλοβενζυλο)-3-φωσφονοπροπανοϊκό οξύ (160)

Η ένωση **157** (1.00 mmol) διαλύεται σε MeOH (10 mL) και προστίθεται καταλύτης Pd σε ενεργό άνθρακα (10% mmol). Το μίγμα της αντίδρασης απαερώνεται με κενό και Ar. Έπειτα διοχετεύεται H₂ και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h. ακολουθεί διήθηση του μίγματος από celite και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση της MeOH. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό.



Λευκό στερεό

$\alpha=62\%$

$R_f=0.49$ (n-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.09 (m, 4H), 3.14-2.93 (m, 3H), 2.31-2.28 (m, 5H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 172.9, 137.0, 136.2, 130.0, 43.6, 39.8 (d, ²J_{P-C}=11.8 Hz), 30.4 (d, ¹J_{P-C}=138.3 Hz), 21.8.

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 36.45.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₄O₅P⁻ [M-H]⁻ 257.1, βρέθηκε 257.3.

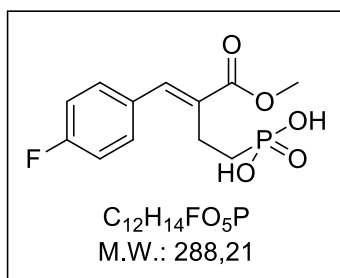
HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₄O₅P⁻ [M-H]⁻ 257.0584, βρέθηκε 257.0581.

5.2.20 Γενική μέθοδος διάσπασης των φωσφονικών εστέρων με TMSBr

Ο φωσφονικός εστέρας (1.00 mmol) διαλύεται σε ξηρό CH₂Cl₂ (7 mL), ψύχεται στους 0°C και προστίθεται TMSBr (0.78 mL, 6.00 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Έπειτα στο μίγμα προστίθεται MeOH (5 mL), ακολουθεί ανάδευση για ½ h και

συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με χρωματογραφία στήλης είτε κανονικής είτε αντίστροφης φάσης και σύστημα έκλουσης αυτό που αναφέρεται για κάθε ένωση ξεχωριστά.

(E)-(4-(4-Φθοροφαινυλο)-3-(μεθοξυκαρβονυλο)βουτ-3-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (165)



Λευκό στερεό

$\alpha=59\%$

Σύστημα έκλουσης: CH_3CN/H_2O 1:9 έως 9:1, $R_f=0.54$ ($n-BuOH/AcOH/H_2O$ 4:1:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.69 (s, 1H), 7.50-7.43 (m, 2H), 7.15 (t, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.88-2.76 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 169.8, 163.7 (d, $^1J_{F-C}=248.4$ Hz), 140.3, 139.8, 132.1, 131.8, 116.4 (d, $^2J_{F-C}=20.7$ Hz), 52.9, 26.8 (d, $^1J_{P-C}=135.8$ Hz), 21.5.

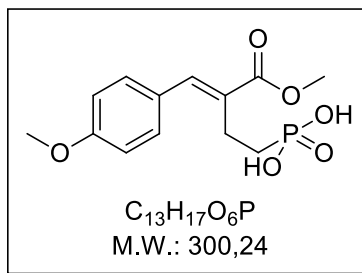
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 41.46.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{13}FO_5P^-$ $[M-H]^-$ 287.0, βρέθηκε 287.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{13}FO_5P^-$ $[M-H]^-$ 287.0490, βρέθηκε 287.0488.

$E/Z=96/4$

(E)-(3-(Μεθοξυκαρβονυλο)-4-(4-μεθοξυφαινυλο)βουτ-3-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (166)



Λευκό κρυσταλλικό στερεό

$\alpha=60\%$

Σύστημα έκλουσης: CH_3CN/H_2O 1:9 έως 9:1, $R_f=0.53$ (n-BuOH/AcOH/ H_2O 4:1:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.65 (s, 1H), 7.44 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 3.82 (s, 6H), 2.84 (m, 2H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 170.4, 161.1, 141.2, 133.5, 129.8 (d, $^3J_{P-C}=19.5$ Hz), 128.1, 114.8, 55.6, 52.8, 27.2 (d, $^1J_{P-C}=137.0$ Hz), 21.8.

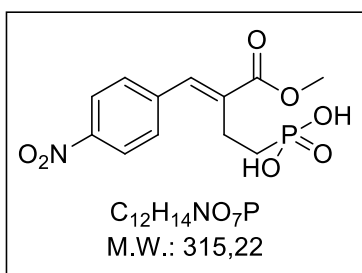
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 40.21.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{16}O_6P^-$ [M-H] $^-$ 299.1, βρέθηκε 299.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{16}O_6P^-$ [M-H] $^-$ 299.0690, βρέθηκε 299.0677.

$E/Z=95/5$

(E)-(3-(Μεθοξυκαρβονυλο)-4-(4-νιτροφαινυλο)βουτ-3-εν-1-υλο)φωσφονικό οξύ (167)



Λευκό στερεό

$\alpha=45\%$

Σύστημα έκλουσης: CH₃CN/H₂O 1:9 έως 9:1, R_f=0.47 (n-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 8.27 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.64 (d, J=8.7 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.87-2.70 (m, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 169.1, 148.3, 143.7, 142.3, 135.8 (d, ³J_{P-C}=18.8 Hz), 131.4, 124.6, 53.1, 27.0 (d, ¹J_{P-C}=135.0 Hz), 21.9.

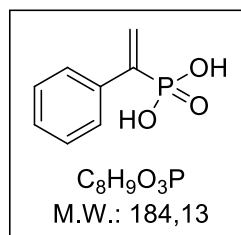
³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 40.35.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₃NO₇P⁻ [M-H]⁻ 314.0, βρέθηκε 314.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₂H₁₃NO₇P⁻ [M-H]⁻ 314.0435, βρέθηκε 314.0435.

E/Z=97/3

(1-Φαινυλοβινυλο)φωσφονικό οξύ (258)²⁸⁸



Λευκό στερεό

$\alpha=87\%$

Σύστημα έκλουσης: CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:1, R_f=0.25 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:1:1)

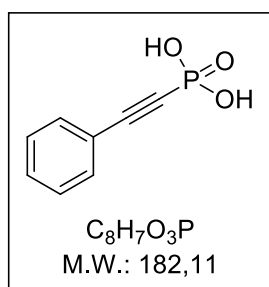
¹H NMR (200 MHz, DMSO) δ 7.61-7.58 (m, 2H), 7.38-7.30 (m, 3H), 6.06 (dd, J=4.2, 1.8 Hz, 1H), 5.96 (dd, J=78.4, 1.1 Hz, 1H), 1.86 (br s, 2H).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO) δ 143.7 (d, J=172.4 Hz), 137.8 (d, J=12.0 Hz), 128.3, 127.8, 127.3 (d, J=6.2 Hz), 127.1 (d, J=7.0 Hz).

³¹P NMR (81 MHz, DMSO) δ 9.77.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₈H₈O₃P⁻ [M-H]⁻ 183.0, βρέθηκε 183.1.

(Φαινυλαιθινυλο)φωσφονικό οξύ (261)²⁸⁹



Λευκό στερεό

$\alpha=88\%$

Σύστημα έκλουσης: $CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1, $R_f=0.27$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, DMSO) δ 8.71 (br s, 2H), 7.59-7.51 (m, 2H), 7.48-7.40 (m, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO) δ 132.9 (d, $^4J_{P-C}=2.8$ Hz), 130.2, 128.9, 128.0 (d, $^3J_{P-C}=6.0$ Hz), 119.9, 93.8 (d, $^1J_{P-C}=55.0$ Hz), 84.8 (d, $^2J_{P-C}=308.4$ Hz).

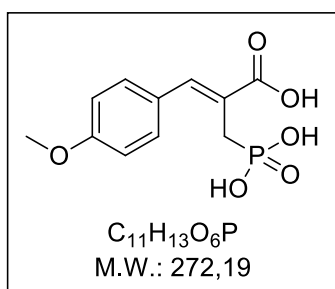
^{31}P NMR (81 MHz, DMSO) δ -11.30.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_8H_6O_3P^-$ $[M-H]^-$ 181.0, βρέθηκε 181.1.

5.2.21 Γενική μέθοδος αλκαλικής υδρόλυσης εστέρων

Σε διάλυμα του μεθυλεστέρα ή αιθυλεστέρα (1 mmol) σε MeOH ή EtOH αντίστοιχα (3.75 mL) προστίθεται υπό ανάδευση διάλυμα NaOH 4N (1.25 mL, 5.00 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι εξαφανίσεως του αρχικού εστέρα (έλεγχος της πορείας της αντίδρασης με TLC). Ακολουθεί συμπύκνωση της MeOH και οξίνιση του υπολείμματος με διάλυμα HCl 6N έως $pH \approx 1$. Η υδατική φάση εκχυλίζεται με AcOEt (3 x 15 mL). Η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό είτε με χρωματογραφία στήλης κανονικής φάσης και σύστημα έκλουσης $CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1 είτε με χρωματογραφία στήλης αντίστροφης φάσης και σύστημα έκλουσης CH_3CN/H_2O από 1:9 έως 9:1.

(Z)-3-(4-Μεθοξυφαινυλο)-2-(φωσφονομεθυλ)ακρυλικό οξύ (158)



Λευκό στερεό

$\alpha=89\%$

$R_f=0.50$ (n-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.93 (d, ⁴J_{P-H}=5.1 Hz, 1H), 7.65 (d, J=8.5 Hz, 2H), 6.99 (d, J=8.5 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.38 (d, ²J_{P-H}=23.0 Hz, 2H).

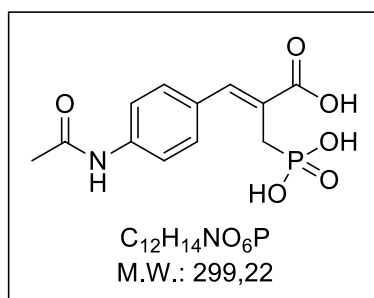
¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 173.7, 162.0, 144.7, 132.9 (d, ³J_{P-C}=22.0 Hz), 127.9, 121.0 (d, ²J_{P-C}=11.5 Hz), 115.1, 55.7, 27.7 (d, ¹J_{P-C}=140.0 Hz).

³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 40.57.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₂O₆P⁻ [M-H]⁻ 271.0, βρέθηκε 271.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για C₁₁H₁₂O₆P⁻ [M-H]⁻ 271.0377, βρέθηκε 271.0377.

(Z)-3-(4-Ακεταμιδοφαινυλο)-2-(φωσφονομεθυλ)ακρυλικό οξύ (159)



Λευκό στερεό

$\alpha=81\%$

$R_f=0.36$ (n-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.92 (d, $^4J_{\text{P-H}}=5.4$ Hz, 1H), 7.73-7.56 (m, 4H), 3.36 (d, $^2J_{\text{P-H}}=23.7$ Hz, 2H), 2.22 (s, 3H).

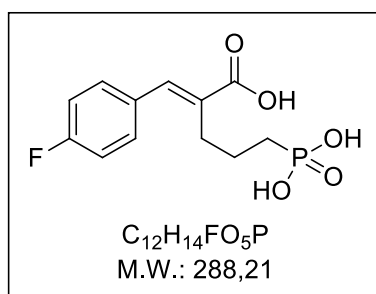
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 172.8, 167.0, 144.0, 140.4, 131.8, 131.4, 122.9, 120.6, 30.2 (d, $^1J_{\text{P-C}}=116.2$ Hz), 24.0.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.91.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_6\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 298.1, βρέθηκε 298.3.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_6\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 298.0486, βρέθηκε 298.0488.

(E)-2-(4-Φθοροβενζυλιδανο)-5-φωσφοπεντανοϊκό οξύ (190)



Λευκό στερεό

$\alpha=56\%$

$R_f=0.35$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.76 (s, 1H), 7.53-7.38 (m, 2H), 7.14 (t, $J=8.2$ Hz, 2H), 2.67-2.47 (m, 2H), 1.90-1.63 (m, 4H).

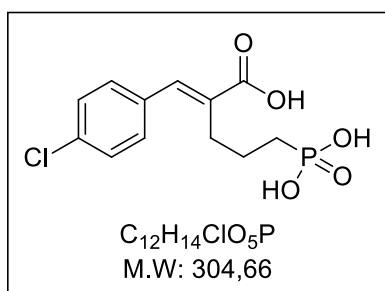
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.7, 163.8 (d, $^1J_{\text{F-C}}=248.4$ Hz), 141.1, 140.7, 132.7, 132.5, 116.5 (d, $^2J_{\text{F-C}}=21.8$ Hz), 30.4, 29.2, 28.9, 28.8 (d, $J_{\text{P-C}}=135.2$ Hz), 23.5.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.65.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 287.1, βρέθηκε 287.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 287.0490, βρέθηκε 287.0485.

(E)-2-(4-ΧλωροβενζυλιδENO)-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (191)



Λευκό στερεό

$\alpha=62\%$

$R_f=0.35$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.74 (s, 1H), 7.49-7.33 (m, 4H), 2.67-2.48 (m, 2H), 1.89-1.58 (m, 4H).

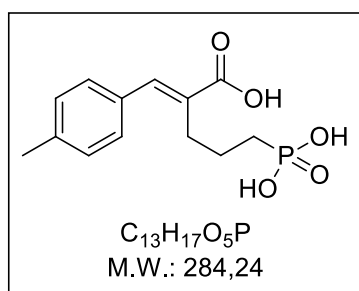
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.4, 140.8, 135.4, 134.8, 133.6, 131.9, 129.7, 30.4, 29.2, 28.9, 28.8 (d, $J_{P-C}=135.5$ Hz), 23.5.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.68.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{13}ClO_5P^-$ $[M-H]^-$ 303.0, βρέθηκε 303.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{13}ClO_5P^-$ $[M-H]^-$ 303.0195, βρέθηκε 303.0190.

(E)-2-(4-ΜεθυλοβενζυλιδENO)-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (192)



Λευκό στερεό

$\alpha=42\%$

$R_f=0.41$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.76 (s, 1H), 7.33 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.67-2.51 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.92-1.65 (m, 4H).

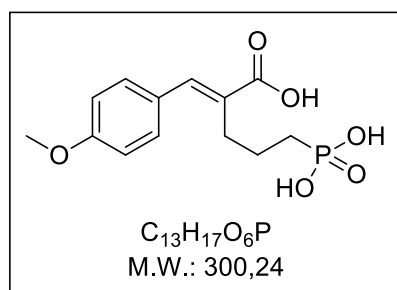
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 174.2, 142.3, 140.2, 133.4, 131.8, 130.6, 130.3, 30.4, 29.4, 29.0, 28.9 (d, $J_{\text{P-C}}=136.7$ Hz), 23.6, 21.2.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.25.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 283.1, βρέθηκε 283.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 283.0741, βρέθηκε 283.0736.

(*E*)-2-(4-Μεθοξυβενζυλιδενο)-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (193)



Λευκό στερεό

$\alpha=34\%$

$R_f=0.47$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.75 (s, 1H), 7.42 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.71-2.54 (m, 2H), 1.87-1.64 (m, 4H).

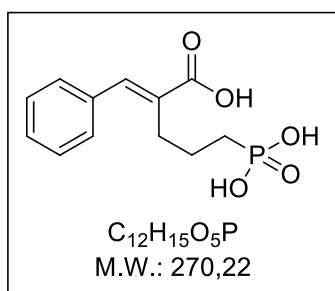
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.6, 161.4, 139.4, 132.6, 130.2, 128.5, 115.0, 55.6, 32.7, 30.3, 29.2, 29.1 (d, $J_{\text{P-C}}=136.0$ Hz), 23.6.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 38.68.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 299.1, βρέθηκε 298.9.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 299.0690, βρέθηκε 299.0692.

(E)-2-Βενζυλιδενο-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (194)



Λευκό στερεό

$\alpha=48\%$

$R_f=0.31$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.80 (s, 1H), 7.49-7.30 (m, 5H), 2.67-2.50 (m, 2H), 1.90-1.63 (m, 4H).

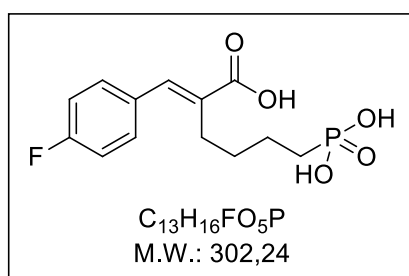
^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.8, 142.3, 136.2, 132.8, 130.4, 129.8, 129.6, 30.5, 29.3, 29.0, 28.9 (d, $J_{P-C}=133.7$ Hz), 23.6.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.01.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{14}O_5P^-$ $[M-H]^-$ 269.1, βρέθηκε 269.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{14}O_5P^-$ $[M-H]^-$ 269.0584, βρέθηκε 269.0581.

(E)-2-(4-Φθοροβενζυλιδενο)-6-φωσφονοεξανοϊκό οξύ (206)



Λευκό στερεό

$\alpha=82\%$

$R_f=0.40$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.74 (s, 1H), 7.53-7.36 (m, 2H), 7.13 (t, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.64-2.38 (m, 2H), 1.82-1.48 (m, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.2, 163.7 ($^1J_{\text{F-C}}=237.8$ Hz), 138.6, 132.5, 129.7, 129.0, 116.7, 31.1, 30.7, 30.4, 28.5 (d, $J_{\text{P-C}}=143.4$ Hz), 27.5, 23.9.

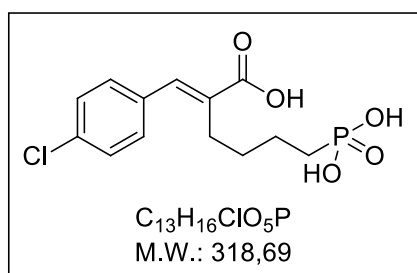
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.43.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 301.1, βρέθηκε 300.8.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{FO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 301.0647, βρέθηκε 301.0644.

$E/Z=84/16$

(E)-2-(4-Χλωροβενζυλιδενο)-6-φωσφονοεξανοϊκό οξύ (207)



Λευκό στερεό

$\alpha=69\%$

$R_f=0.48$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.71 (s, 1H), 7.47-7.34 (m, 4H), 2.62-2.39 (m, 2H), 1.78-1.53 (m, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.4, 135.2, 134.9, 134.1, 131.7, 129.6, 129.0, 31.1, 30.8, 30.6, 29.0 (d, $J_{\text{P-C}}=139.6$ Hz), 27.1, 23.9.

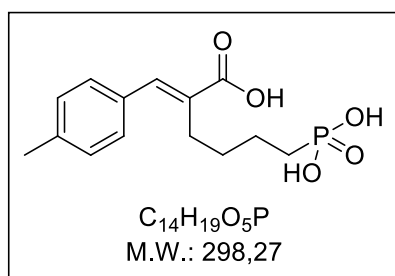
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.23.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 317.0, βρέθηκε 317.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 317.0351, βρέθηκε 317.0345.

$E/Z=86/14$

(E)-2-(4-Μεθυλοβενζυλιδενο)-6-φωσφονοεξανοϊκό οξύ (208)



Λευκό στερεό

$\alpha=71\%$

R_F=0.46 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1)

¹H NMR (200 MHz, CD₃COOD) δ 7.74 (s, 1H), 7.32 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 7.22 (d, *J*=7.5 Hz, 2H), 2.62-2.44 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.82-1.52 (m, 6H).

¹³C NMR (50 MHz, CD₃COOD) δ 174.2, 140.0, 138.6, 133.4, 132.2, 130.3, 130.2, 31.2, 30.9, 30.5, 28.6 (d, *J*_{P-C}=136.7 Hz), 27.7, 24.0, 21.3.

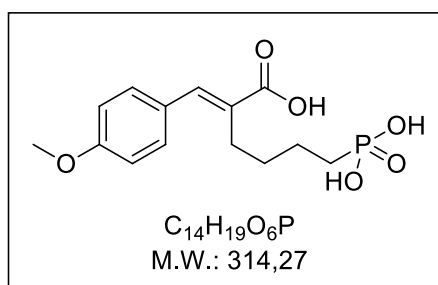
³¹P NMR (81 MHz, CD₃COOD) δ 39.44.

MS (ESI) *m/z* υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₅P⁻ [M-H]⁻ 297.1, βρέθηκε 297.0.

HRMS *m/z* υπολογίζεται για C₁₄H₁₈O₅P⁻ [M-H]⁻ 297.0897, βρέθηκε 297.0894.

E/Z=89/11

(E)-2-(4-Μεθοξυβενζυλιδενο)-6-φωσφονοεξανοϊκό οξύ (209)



Λευκό στερεό

$\alpha=64\%$

R_F=0.41 (CHCl₃/MeOH/AcOH 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.72 (s, 1H), 7.40 (d, $J=7.7$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=7.7$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.67-2.44 (m, 2H), 1.82-1.52 (s, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 174.4, 161.2, 141.7, 132.6, 130.7, 128.6, 114.9, 55.6, 31.1, 30.7, 30.5, 28.6 (d, $J_{\text{P-C}}=137.0$ Hz), 27.6, 24.0.

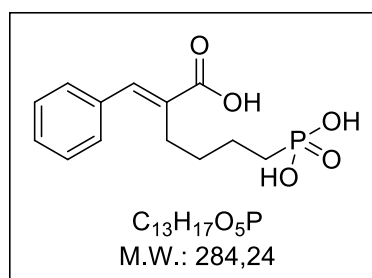
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.46.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 313.1, βρέθηκε 312.9.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 313.0846, βρέθηκε 313.0841.

$E/Z > 99/1$

(E)-2-Βενζυλιδανο-6-φωσφονοεξανοϊκό οξύ (210)



Λευκό στερεό

$\alpha=51\%$

$R_f=0.40$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.77 (s, 1H), 7.46-7.30 (m, 5H), 2.66-2.39 (m, 2H), 1.80-1.49 (m, 6H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 174.0, 141.8, 136.4, 133.4, 130.3, 129.5, 129.2, 31.2, 30.9, 30.5, 28.6 (d, $J_{\text{P-C}}=137.0$ Hz), 27.7, 24.0.

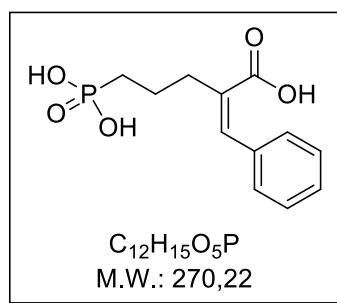
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 39.84.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 283.1, βρέθηκε 283.3.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 283.0741, βρέθηκε 283.0737.

$E/Z=91/9$

(Z)-2-Βενζυλιδενο-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (226)



Λευκό στερεό

$\alpha=77\%$

$R_f=0.21$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.34-7.25 (m, 5H), 6.80 (s, 1H), 2.70-2.41 (m, 2H), 1.97-1.80 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.1, 138.8, 136.8, 135.8, 131.9, 131.2, 130.2, 38.6 (d, $J=14.2$ Hz), 32.1, 29.7 (d, $J=132.4$ Hz), 24.4.

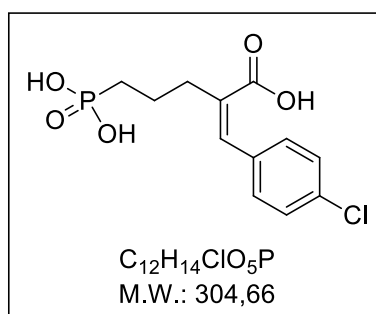
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 46.94.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{14}O_5P^-$ $[M-H]^-$ 269.1, βρέθηκε 269.0.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{12}H_{14}O_5P^-$ $[M-H]^-$ 269.0584, βρέθηκε 269.0592.

$E/Z=12/88$

(Z)-2-(4-Χλωροβενζυλιδενο)-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (227)



Λευκό στερεό

$\alpha=81\%$

$R_f=0.20$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.38-7.20 (m, 4H), 6.78 (s, 1H), 2.67-2.44 (m, 2H), 1.97-1.78 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.1, 137.5, 137.3, 135.9, 134.7, 132.2, 130.9, 38.6 (d, $J=14.6$ Hz), 32.1, 29.8 (d, $J=140.0$ Hz), 24.4.

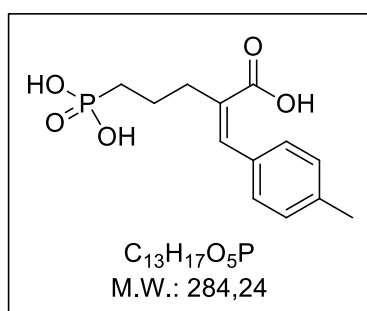
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 47.15.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 303.0, βρέθηκε 303.1.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClO}_5\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 303.0195, βρέθηκε 303.0199.

$E/Z > 1/99$

(Z)-2-(4-Μεθυλοβενζυλιδενο)-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (228)



Λευκό στερεό

$\alpha=72\%$

$R_f=0.27$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:2:1)

^1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.21-7.01 (m, 4H), 6.63 (s, 1H), 2.71-2.40 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.93-1.59 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.8, 141.5, 140.3, 136.0, 135.5, 131.4, 130.7, 38.8 (d, $J=16.4$ Hz), 32.2, 29.8 (d, $J=137.8$ Hz), 24.4, 22.9.

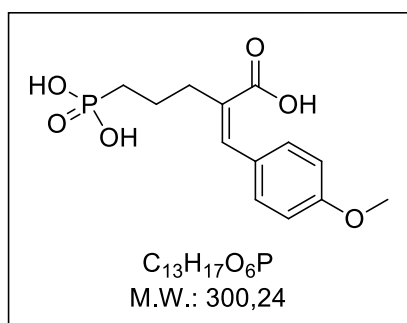
^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 47.01.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 283.1, βρέθηκε 283.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 283.0741, βρέθηκε 283.0733.

$E/Z=31/69$

(Z)-2-(4-Μεθοξυβενζυλιδενο)-5-φωσφονοπεντανοϊκό οξύ (229)



Λευκό στερεό

$\alpha=79\%$

$R_f=0.18$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:2:1)

1H NMR (200 MHz, CD_3COOD) δ 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.53-2.34 (m, 2H), 2.04-1.54 (m, 4H).

^{13}C NMR (50 MHz, CD_3COOD) δ 173.8, 162.0, 135.9, 134.1, 132.1, 131.0, 116.1, 57.1, 38.7 (d, $J=18.8$ Hz), 32.1, 29.7 (d, $J=136.6$ Hz), 24.5.

^{31}P NMR (81 MHz, CD_3COOD) δ 46.98.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{16}O_6P^-$ $[M-H]^-$ 299.1, βρέθηκε 299.2.

HRMS m/z υπολογίζεται για $C_{13}H_{16}O_6P^-$ $[M-H]^-$ 299.0690, βρέθηκε 299.0688.

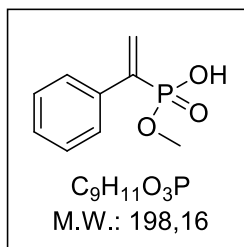
$E/Z=13/87$

5.2.22 Γενική μέθοδος αλκαλικής υδρόλυσης φωσφονικών εστέρων

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει φωσφονικό διμεθυλεστέρα (1.00 mmol) διαλυμένο σε MeOH (5 mL) προστίθεται στερεό NaOH (0.40 g, 10.0 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 h. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια απομακρύνεται η MeOH με συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης αραιώνεται με H_2O (5 mL), οξινίζεται με παγωμένο πυκνό HCl έως $pH \approx 1$ και εκχυλίζεται με AcOEt (3 x 15 mL). Οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται, ενώνονται, ξηραίνονται με Na_2SO_4 , διηθούνται και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται καθαρό με

χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης αυτό που αναφέρεται για κάθε ένωση χωριστά.

(1-Φαινυλοβινυλο)φωσφονικό μεθύλιο (257)



Λευκό στερεό

$\alpha=97\%$

Σύστημα έκλουσης: $CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:1:0.5, $R_f=0.20$ ($CHCl_3/MeOH/AcOH$ 7:1:0.5)

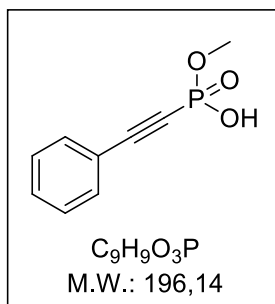
1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 12.37 (br s, 1H), 7.58-7.54 (m, 2H), 7.41-7.22 (m, 3H), 6.26 (dd, $J=4.7, 1.2$ Hz, 1H), 6.20 (dd, $J=73.5, 1.2$ Hz, 1H), 3.66 (d, $^3J_{P-H}=11.4$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 139.1 (d, $J=180.8$ Hz), 136.3 (d, $J=12.3$ Hz), 131.2 (d, $J=8.1$ Hz), 128.3, 128.2, 127.3 (d, $J=5.9$ Hz), 52.3 (d, $^2J_{P-C}=6.0$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, $CDCl_3$) δ 10.21.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $C_9H_{10}O_3P^-$ $[M-H]^-$ 197.0, βρέθηκε 197.0.

Όξινο (φαινυλαιθινυλο)φωσφονικό μεθύλιο (260)



Καφέ λάδι

$\alpha=96\%$

Σύστημα έκλουσης: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:1:1, $R_f=0.38$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 7:1:1)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 11.68 (br s, 1H), 7.51-7.28 (m, 5H), 3.80 (d, $^3J_{\text{P-H}}=12.6$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 132.44 (d, $J_{\text{P-C}}=2.5$ Hz), 130.48, 128.31, 119.27 (d, $J_{\text{P-C}}=5.8$ Hz), 98.90 (d, $J_{\text{P-C}}=55.9$ Hz), 78.20 (d, $J_{\text{P-C}}=310.8$ Hz), 53.21 (d, $^2J_{\text{P-C}}=5.6$ Hz).

^{31}P NMR (81 MHz, CDCl_3) δ -3.30.

MS (ESI) m/z υπολογίζεται για $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3\text{P}^-$ $[\text{M-H}]^-$ 195.0, βρέθηκε 195.1.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AHA	Ακετοϋδροξαμικό οξύ
AIBN	2,2'-αζω-δισοβουτυλονιτρίλιο
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BME	2-μερκαπτοαιθανόλη
BSA	<i>N,O</i> -δισ(τριμεθυλοσιλυλο)ακεταμίδιο
BTSP	Δισ(τριμεθυλοσιλυλο)φωσφονίτης
DABCO	1,4-διαζαδικυκλο[2.2.2.]οκτάνιο
DIPEA	<i>N,N</i> -δισοπροπυλαιθυλαμίνη
dppf	1,1'-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)φερροκένιο
dppp	1,3-δισ(διφαινυλοφωσφίνο)προπάνιο
ESI	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
HMDS	Εξαμεθυλοδισιλαζάνιο
HPU	Ουρέαση του βακτηρίου <i>Helicobacter pylori</i>
HRMS	Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας
JBU	Ουρέαση της φασολιάς
MBH	Morita-Baylis-Hillman
SPU	Ουρέαση του βακτηρίου <i>Sporosarcina pasteurii</i>
TMSBr	Τριμεθυλοσιλυλοβρωμίδιο
TMSCI	Τριμεθυλοσιλυλοχλωρίδιο
xantphos	4,5-δι(διφαινυλοφωσφίνο)-9,9-διμεθυλοξανθένιο

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) J. B. Sumner, The isolation and crystallization of the enzyme urease, *J. Biol. Chem.*, **1926**, *69*, 435-441.
- (2) N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakeley, B. Zerner, Jack bean urease (E.C. 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 4131-4133.
- (3) W. H. R. Shaw, J. J. Bordeaux, The decomposition of urea in aqueous media, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 4729-4733.
- (4) R. L. Blakeley, A. Treston, R. K. Andrews, B. Zerner, Nickel(II)-promoted ethanolysis and hydrolysis of N-(2-pyridylmethyl)urea. A model for urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 612-614.
- (5) B. P. Callahan, Y. Yuan, R. Wolfenden, The Burden Borne by urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10828-10829.
- (6) M. J. Maroney, S. Ciurli, Nonredox Nickel Enzymes, *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 4206-4228.
- (7) R. P. Hausinger, Nickel utilization by microorganisms, *Microbiol. Rev.*, **1987**, *51*, 22-42.
- (8) H. L. T. Mobley, R. P. Hausinger, Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiol. Rev.*, **1989**, *53*, 85-108.
- (9) C. P. Witte, Urea metabolism in plants, *Plant Sci.*, **2011**, *180*, 431-438.
- (10) B. Krajewska, Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, *59*, 9-21.
- (11) L. E. Zonia, N. E. Stebbins, J. C. Polacco, Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds, *Plant Physiol.*, **1995**, *107*, 1097-1103.
- (12) R. G. Winkler, D. G. Blevins, J. C. Polacco, D. D. Randall, Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes, *Trends Biochem. Sci.*, **1988**, *13*, 97-100.

- (13) C. D. Todd, P. A. Tipton, D. G. Blevins, P. Piedras, M. Pineda, J. C. Polacco, Update on ureide degradation in legumes, *J. Exp. Bot.*, **2006**, *57*, 5-12.
- (14) C. R. Carlini, R. Ligabue-Braun, Ureases as multifunctional toxic proteins: A review, *Toxicon*, **2016**, *110*, 90-109.
- (15) R. A. Burne, Y.-Y. M. Chen, Bacterial ureases in infectious diseases, *Microbes Infect.*, **2000**, *2*, 533-542.
- (16) C. M. Collins, S. E. D'Orazio, Bacterial ureases: structure, regulation of expression and role in pathogenesis, *Mol. Microbiol.*, **1993**, *9*, 907-913.
- (17) H. L. T. Mobley, M. D. Island, R. P. Hausinger, Molecular biology of microbial ureases, *Microbiol. Rev.*, **1995**, *59*, 451-480.
- (18) C. Follmer, Insights into the role and structure of plant ureases, *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 18-28.
- (19) E. Jabri, M. B. Carr, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, *Science*, **1995**, *268*, 998-1004.
- (20) S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Miletta, S. Ciurli, S. Mangani, A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels, *Structure*, **1999**, *7*, 205-216.
- (21) N.-C. Ha, S.-T. Oh, J. Y. Sung, K. A. Cha, M. H. Lee, B.-H. Oh, Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease, *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, *8*, 505-509.
- (22) U. K. Schäfer, H. Kaltwasser, Urease from *Staphylococcus saprophyticus*: purification, characterization and comparison to *Staphylococcus xylosus* urease, *Arch. Microbiol.*, **1994**, *161*, 393-399.
- (23) B. Zambelli, F. Musiani, S. Benini, S. Ciurli, Chemistry of Ni²⁺ in urease: Sensing, trafficking, and catalysis, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, *44*, 520-530.
- (24) S. Benini, M. Cianci, L. Mazzei, S. Ciurli, Fluoride inhibition of *Sporosarcina pasteurii* urease: structure and thermodynamics, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2014**, *19*, 1243-1261.

- (25) M. W. H. Pinkse, C. S. Maier, J.-I. Kim, B.-H. Oh, A. J. R. Heck, Macromolecular assembly of *Helicobacter pylori* urease investigated by mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **2003**, 38, 315-320.
- (26) S. Benini, P. Kosikowska, M. Cianci, L. Mazzei, A. G. Vara, Ł. Berlicki, S. Ciurli, The crystal structure of *Sporosarcina pasteurii* urease in a complex with citrate provides new hints for inhibitor design, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2013**, 18, 391-399.
- (27) S. Quiroz-Valenzuela, S. C. Sukuru, R. P. Hausinger, L. A. Kuhn, W. T. Heller, The structure of urease activation complexes examined by flexibility analysis, mutagenesis, and small-angle X-ray scattering, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2008**, 480, 51-57.
- (28) L. Mazzei, F. Musiani, S. Ciurli, *The Biological Chemistry of Nickel*, The Royal Society of Chemistry, London, **2017**.
- (29) M. A. Farrugia, L. Macomber, R. P. Hausinger, Biosynthesis of the Urease Metallocenter, *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 13178-13185.
- (30) Z. Chang, J. Kuchar, R. P. Hausinger, Chemical cross-linking and Mass Spectrometric identification of sites of interaction for UreD, UreF, and urease, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 15305-15313.
- (31) S. R. Heimer, H. L. T. Mobley, Interaction of *Proteus mirabilis* urease apoenzyme and accessory proteins identified with yeast two-hybrid technology, *J. Bacteriol.*, **2001**, 183, 1423-1433.
- (32) I. S. Park, M. B. Carr, R. P. Hausinger, In vitro activation of urease apoprotein and role of UreD as a chaperone required for nickel metallocenter assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1994**, 91, 3233-3237.
- (33) F. Musiani, M. Bellucci, S. Ciurli, Model structures of *Helicobacter pylori* UreD(H) domains: A putative molecular recognition platform, *J. Chem. Inf. Model.*, **2011**, 51, 1513-1520.
- (34) I.-S. Park, R. P. Hausinger, Metal ion interactions with urease and UreD-urease apoproteins, *Biochemistry*, **1996**, 35, 5345-5352.

- (35) M. Salomone-Stagni, B. Zambelli, F. Musiani, S. Ciurli, A model-based proposal for the role of UreF as a GTPase-activating protein in the urease active site biosynthesis, *Proteins*, **2007**, *68*, 749-761.
- (36) E. L. Carter, J. L. Boer, M. A. Farrugia, N. Flugga, C. L. Towns, R. P. Hausinger, Function of UreB in *Klebsiella aerogenes* Urease, *Biochemistry*, **2011**, *50*, 9296-9308.
- (37) B. Zambelli, A. Berardi, V. Martin-Diaconescu, L. Mazzei, F. Musiani, M. J. Maroney, S. Ciurli, Nickel binding properties of *Helicobacter pylori* UreF, an accessory protein in the nickel-based activation of urease, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2014**, *19*, 319-334.
- (38) A. Soriano, R. P. Hausinger, GTP-dependent activation of urease apoprotein in complex with the UreD, UreF, and UreG accessory proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *96*, 11140-11144.
- (39) P. Volland, D. L. Weeks, E. A. Marcus, C. Prinz, G. Sachs, D. Scott, Interactions among the seven *Helicobacter pylori* proteins encoded by the urease gene cluster, *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.*, **2003**, *284*, G96-G106.
- (40) B. Zambelli, K. Banaszak, A. Merloni, A. Kiliszek, W. Rypniewski, S. Ciurli, Selectivity of Ni(II) and Zn(II) binding to *Sporosarcina pasteurii* UreE, a metallochaperone in the urease assembly: a calorimetric and crystallographic study, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2013**, *18*, 1005-1017.
- (41) K. Banaszak, V. Martin-Diaconescu, M. Bellucci, B. Zambelli, W. Rypniewski, M. J. Maroney, S. Ciurli, Crystallographic and X-ray absorption spectroscopic characterization of *Helicobacter pylori* UreE bound to Ni²⁺ and Zn²⁺ reveals a role for the disordered C-terminal arm in metal trafficking, *Biochem. J.*, **2012**, *441*, 1017-1026.
- (42) F. Musiani, B. Zambelli, M. Stola, S. Ciurli, Nickel trafficking: insights into the fold and function of UreE, a urease metallochaperone, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 803-813.
- (43) M. Stola, F. Musiani, S. Mangani, P. Turano, N. Safarov, B. Zambelli, S. Ciurli, The nickel site of *Bacillus pasteurii* UreE, a urease metallo-chaperone,

as revealed by metal-binding studies and X-ray absorption spectroscopy, *Biochemistry*, **2006**, *45*, 6495-6509.

(44) X. Yang, H. Li, T.-P. Lai, H. Sun, UreE-UreG complex facilitates nickel transfer and preactivates GTPase of UreG in *Helicobacter pylori*, *J. Biol. Chem.*, **2015**, *290*, 12474-12485.

(45) F. Basolo, R. G. Pearson, *Mechanisms of Inorganic Reactions*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd., New York, **1967**.

(46) A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Plenum Press: New York, **1974**.

(47) M. Laitaoja, J. Valjakka, J. Jänis, Zinc coordination spheres in protein structures, *J. Inorg. Chem.*, **2013**, *52*, 10983-10991.

(48) J. Stoof, S. Breijer, R. G. Pot, D. van der Neut, E. J. Kuipers, J. G. Kusters, A. H. Van Vliet, Inverse nickel-responsive regulation of two urease enzymes in the gastric pathogen *Helicobacter mustelae*, *Environ. Microbiol.*, **2008**, *10*, 2586-2597.

(49) E. L. Carter, D. E. Tronrud, S. R. Taber, P. A. Karplus, R. P. Hausinger, Iron-containing urease in a pathogenic bacterium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2011**, *108*, 13095-13099.

(50) F. Musiani, E. Arnofi, R. Casadio, S. Ciurli, Structure-based computational study of the catalytic and inhibition mechanisms of urease, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, *6*, 300-314.

(51) N. E. Dixon, C. Gazzola, C. J. Asher, D. W. Lee, R. L. Blakeley, B. Zerner, Jack bean urease (EC 3.5.1.5). II. The relationship between nickel, enzymatic activity, and the "abnormal" ultraviolet spectrum. The nickel content of jack beans, *Can. J. Biochem.*, **1980**, *58*, 474-480.

(52) G. J. King, B. Zerner, Jack bean urease: mixed-metal derivatives, *Inorg. Chim. Acta*, **1997**, *255*, 381-388.

(53) W.-H. Wang, B. Köhler, F.-Q. Cao, L.-H. Liu, Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants, *Plant Sci.*, **2008**, *175*, 467-477.

- (54) S. Kojima, A. Bohner, N. von Wirén, Molecular mechanisms of urea transport in plants, *J. Membr. Biol.*, **2006**, *212*, 83-91.
- (55) J. C. Polacco, M. A. Holland, Roles of urease in plant cells, *Int. Rev. Cytol.*, **1993**, *145*, 65-103.
- (56) C. Follmer, R. Real-Guerra, G. E. Wasserman, D. Olivera-Severo, C. R. Carlini, Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: Biological effects unrelated to ureolytic activity, *Eur. J. Biochem.*, **2004**, *271*, 1357-1363.
- (57) C. Follmer, G. E. Wassermann, C. R. Carlini, Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity, *Plant Sci.*, **2004**, *167*, 241-246.
- (58) A. Menegassi, G. E. Wassermann, D. Olivera-Severo, A. B. Becker-Ritt, A. H. S. Martinelli, V. Feder, C. R. Carlini, Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: Isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 4399-4405.
- (59) A. B. Becker-Ritt, A. H. S. Martinelli, S. Mitidieri, V. Feder, G. E. Wassermann, L. Santi, M. H. Vainstein, J. T. A. Oliveira, L. M. Fiuza, G. Pasquali, C. R. Carlini, Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicon*, **2007**, *50*, 971-983.
- (60) J. S. Rodman, Struvite Stones, *Nephron*, **1999**, *81*, 50-59.
- (61) I. J. M. Rosenstein, J. M. T. Hamilton-Miller, D. M. Musher, Inhibitors of urease as chemotherapeutic agents, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **1984**, *11*, 1-12.
- (62) B. E. Dunn, S. H. Phadnis, Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease, *Yale J. Biol. Med.*, **1998**, *71*, 63-73.
- (63) D. J. McGee, H. L. T. Mobley, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Curr. Opin. Gastroenterol.*, **2000**, *16*, 24-31.
- (64) M. Granstrom, P. Lehours, C. Bengtsson, F. Mégraud, Diagnosis of *Helicobacter pylori*, *Helicobacter*, **2008**, *13*, 7-12.

- (65) W. Lin, V. Mathys, E. L. Y. Ang, V. H. Q. Koh, J. M. Martínez Gómez, M. L. T. Ang, S. Z. Zainul Rahim, M. P. Tan, K. Pethe, S. Alonso, Urease activity represents an alternative pathway for *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen metabolism, *Infect. Immun.*, **2012**, *80*, 2771-2779.
- (66) G. M. Young, D. Amid, V. L. Miller, A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH, *J. Bacteriol.*, **1996**, *178*, 6487-6495.
- (67) G. M. Cox, J. Mukherjee, G. T. Cole, A. Casadevall, J. R. Perfect, Urease as a virulence factor in experimental Cryptococcosis, *Infect. Immun.*, **2000**, *68*, 443-448.
- (68) K. L. Sahrawat, Control of urea hydrolysis and nitrification in soil by chemicals-Prospects and problems, *Plant Soil*, **1980**, *57*, 335-352.
- (69) R. L. Mulvaney, J. M. Bremner, Control of urea transformations in soils, *Soil Biochem.*, **1981**, *5*, 153-196.
- (70) J. M. Bremner, M. J. Krogmeier, Evidence that the adverse effect of urea fertilizer on seed germination in soil is due to ammonia formed through hydrolysis of urea by soil urease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1989**, *86*, 8185-8188.
- (71) H. A. H. Hasan, Ureolytic microorganisms and soil fertility: A review, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **2000**, *31*, 2565-2589.
- (72) S. Ciurli, C. Marzadori, S. Benini, S. Deiana, C. Gessa, Urease from the soil bacterium *Bacillus pasteurii*. Immobilization on Ca-polygalacturonate, *Soil Biol. Biochem.*, **1996**, *28*, 811-817.
- (73) N. M. Pettit, A. R. J. Smith, R. B. Freedman, R. G. Burns, Soil urease: Activity, stability and kinetic properties, *Soil Biol. Biochem.*, **1976**, *8*, 479-484.
- (74) L. Gianfreda, A. De Cristofaro, M. A. Rao, A. Violante, Kinetic behavior of synthetic organo- and organo-mineral-urease complexes, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **1995**, *59*, 811-815.
- (75) D. F. McCrory, P. J. Hobbs, Additives to reduce ammonia and odor emissions from livestock wastes, *J. Environ. Qual.*, **2001**, *30*, 345-355.

- (76) S. Kakimoto, K. Okazaki, T. Sakane, K. Imai, Y. Sumino, S. Akiyama, Y. Nakao, Isolation and taxonomic characterization of acid urease-producing bacteria, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, 53, 1111-1117.
- (77) S. Kakimoto, Y. Sumino, K. Kawahara, E. Yamazaki, I. Nakatsui, Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus fermentum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1990**, 32, 538-543.
- (78) S. Kakimoto, Y. Sumino, S. Akiyama, Y. Nakao, Purification and characterization of acid urease from *Lactobacillus reuteri*, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, 53, 1119-1125.
- (79) E. Yamazaki, T. Kurasawa, S. Kakimoto, Y. Sumino, I. Nakatsui, Characteristics of acid urease from *Streptococcus mitior*, *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, 54, 2433-2435.
- (80) S. Takebe, K. Kobashi, Acid urease from *Lactobacillus* of rat intestine, *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 693-699.
- (81) M. Fidaleo, M. Esti, M. Moresi, Assessment of urea degradation rate in model wine solutions by acid urease from *Lactobacillus fermentum*, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 6226-6235.
- (82) K. Miyagawa, M. Sumida, M. Nakao, M. Harada, H. Yamamoto, T. Kusumi, K. Yoshizawa, T. Amachi, T. Nakayama, Purification, characterization, and application of an acid urease from *Arthrobacter mobilis*, *J. Biotechnol.*, **1999**, 68, 227-236.
- (83) M. Esti, M. Fidaleo, M. Moresi, P. Tamborra, Modeling of urea degradation in white and rosé wines by acid urease, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 2590-2596.
- (84) S. Castanier, G. Le Métayer-Levrel, J.-P. Perthuisot, Ca-carbonates precipitation and limestone genesis – the microbiogeologist point of view, *Sediment. Geol.*, **1999**, 126, 9-23.
- (85) F. Hammes, W. Verstaete, Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **2002**, 1, 3-7.

- (86) F. Hammes, N. Boon, J. de Villiers, W. Verstaete, S. D. Siciliano, Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69, 4901-4909.
- (87) F. Hammes, N. Boon, G. Clement, J. de Villiers, Molecular, biochemical and ecological characterization of a bio-catalytic calcification reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 62, 191-201.
- (88) I. Sondi, E. Matijević, Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction, *J. Coll. Interf. Sci.*, **2001**, 238, 208-214.
- (89) I. Sondi, B. Salopek-Sondi, Influence of the primary structure of enzymes on the formation of CaCO₃ polymorphs: A comparison of plant (*Canavalia ensiformis*) and bacterial (*Bacillus pasteurii*) ureases, *Langmuir*, **2005**, 21, 8876-8882.
- (90) A. Yu, I. Gentle, G. Lu, F. Caruso, Nanoassembly of biocompatible microcapsules for urease encapsulation and their use as biomimetic reactors, *Chem. Commun.*, **2006**, 20, 2150-2152.
- (91) F. Hammes, A. Seka, S. de Knijf, W. Verstaete, A novel approach to calcium removal from calcium-rich industrial wastewater, *Water Res.*, **2003**, 37, 699-704.
- (92) Y. Fujita, F. G. Ferris, R. D. Lawson, F. S. Colwell, R. W. Smith, Subscribed content calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria, *Geomicrobiol.*, **2000**, 17, 305-318.
- (93) S. Stocks-Fischer, J. K. Galinat, S. S. Bang, Microbiological precipitation of CaCO₃, *Soil Biol. Biochem.*, **1999**, 31, 1563-1571.
- (94) S. S. Bang, J. K. Galinat, V. Ramakrishnan, Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*, *Enzyme Microb. Technol.*, **2001**, 28, 404-409.
- (95) K. L. Bachmeier, A. E. Williams, J. R. Warmington, S. S. Bang, Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation, *J. Biotechnol.*, **2002**, 93, 171-181.
- (96) G. Le Métayer-Levrel, S. Castanier, G. Orial, J.-F. Loubière, J.-P. Perthuisot, Applications of bacterial carbonatogenesis to the protection and

regeneration of limestones in buildings and historic patrimony, *Sediment. Geol.*, **1999**, 126, 25-34.

(97) A. B. Becker-Ritt, C. R. Carlini, Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides, *Biopolymers (Peptide Science)*, **2012**, 98, 367-384.

(98) F. Staniscuaski, V. Te Brugge, C. R. Carlini, I. Orchard, *In vitro* effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules, *J. Insect. Physiol.*, **2009**, 55, 255-263.

(99) F. Staniscuaski, V. Te Brugge, C. R. Carlini, I. Orchard, Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut, *J. Insect. Physiol.*, **2010**, 56, 1078-1086.

(100) M. S. Defferrari, R. da Silva, I. Orchard, C. R. Carlini, Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*, *Toxicon*, **2014**, 82, 18-25.

(101) M. S. Defferrari, D. H. Lee, C. L. Fernandes, I. Orchard, C. R. Carlini, A phospholipase A₂ gene is linked to Jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1840, 396-405.

(102) C. R. Carlini, J. A. Guimaraes, J. M. Ribeiro, Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoyxygenase pathway, *Br. J. Pharmacol.*, **1985**, 84, 551-560.

(103) C. Barja-Fidalgo, J. A. Guimaraes, C. R. Carlini, Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets, *Endocrinology*, **1991**, 128, 675-679.

(104) C. Barja-Fidalgo, J. A. Guimaraes, C. R. Carlini, Lipoyxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds, *Toxicon*, **1991**, 29, 453-459.

(105) F. A. Ghazaleh, I. M. Francischetti, M. E. Gombarovits, C. R. Carlini, Stimulation of calcium influx and platelet activation by Canatoxin:

Methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, *339*, 362-367.

(106) C. R. Carlini, J. A. Guimaraes, Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A, *Toxicon*, **1981**, *19*, 667-675.

(107) C. Follmer, G. B. S. Barcellos, R. B. Zingali, O. L. T. Machado, E. W. Alves, C. Barja-Fidalgo, J. A. Guimaraes, C. R. Carlini, Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity, *Biochem. J.*, **2001**, *360*, 217-224.

(108) F. Mulinari, F. Staniscuaski, L. R. Bertholdo-Vargas, M. Postal, O. B. Oliveira-Neto, D. J. Rigden, M. F. Grossi-de-Sa, C. R. Carlini, Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*, *Peptides*, **2007**, *28*, 2042-2050.

(109) B. Krajewska, Mono- (Ag, Hg) and di- (Cu, Hg) valent metal ions effects on the activity of jack bean urease. Probing the modes of metal binding to the enzyme, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2008**, *23*, 535-542.

(110) C. Follmer, C. R. Carlini, Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5), *Arch. Biochem. Biophys.*, **2005**, *435*, 15-20.

(111) J. R. Lambert, P. Midolo, The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **1997**, *11* (suppl. 1), 27-33.

(112) G. G. Briand, N. Burford, Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance, *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2601-2658.

(113) H. Sun, L. Zhang, K. Y. Szeto, Bismuth in Medicine, *Met. Ions Biol. Syst.*, **2004**, *41*, 333-378.

(114) L. Zhang, S. B. Mulrooney, A. F. K. Leung, Y. Zeng, B. B. C. Ko, R. P. Hausinger, Inhibition of urease by bismuth(III): Implications for the mechanism of action of bismuth drugs, *BioMetals*, **2006**, *19*, 503-511.

- (115) N. E. Dixon, R. L. Blakeley, B. Zerner, Jack bean urease (EC 3.5.1.5). III. The involvement of active-site nickel ion in inhibition by β -mercaptoethanol, phosphoramidate, and fluoride, *Can. J. Biochem.*, **1980**, *58*, 481-488.
- (116) M. J. Todd, R. P. Hausinger, Fluoride inhibition of *Klebsiella aerogenes* urease: Mechanistic implications of a pseudo-uncompetitive, slow-binding inhibitor, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 5389-5396.
- (117) B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko, Inhibition of chitosan-immobilized urease by slow-binding inhibitors: Ni^{2+} , F^- and acetohydroxamic acid, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, *14*, 101-109.
- (118) R. L. Blakeley, N. E. Dixon, B. Zerner, Jack bean urease VII. Light scattering and nickel(II) spectrum Thiolate \rightarrow nickel(II) charge-transfer peaks in the spectrum of the β -mercaptoethanol-urease complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1983**, *744*, 219-229.
- (119) M. G. Finnegan, A. T. Kowal, M. T. Werth, P. A. Clark, D. E. Wilcox, M. K. Johnson, Variable-temperature magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of the electronic and magnetic properties of nickel in jack bean urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 4030-4032.
- (120) M. J. Todd, R. P. Hausinger, Competitive inhibitors of *Klebsiella aerogenes* urease, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 15835-15842.
- (121) S. Benini, S. Ciurli, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Mangani, Crystallization and preliminary high-resolution X-ray diffraction analysis of native and β -mercaptoethanol-inhibited urease from *Bacillus pasteurii*, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, **1998**, *54*, 409-412.
- (122) S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Ciurli, S. Mangani, The complex of *Bacillus pasteurii* urease with β -mercaptoethanol from X-ray data at 1.65-Å resolution, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1998**, *3*, 268-273.
- (123) G. B. Kistiakowsky, R. Lumry, Anomalous temperature effects in the hydrolysis of urea by urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, *71*, 2006-2013.
- (124) J. F. Ambrose, G. B. Kistiakowsky, A. G. Kridl, Inhibition of urease by sulfur compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, *72*, 317-321.

- (125) L. Mazzei, M. Cianci, S. Benini, L. Bertini, F. Musiani, S. Ciurli, Kinetic and structural studies reveal a unique binding mode of sulfite to the nickel center in urease, *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, *154*, 42-49.
- (126) S. Ciurli, *Nickel and its surprising impact in nature*, John Wiley & Sons, Ltd., New York, **2007**.
- (127) S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Mangani, S. Ciurli, Molecular details of urease inhibition by boric acid: insights into the catalytic mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3714-3715.
- (128) B. Krajewska, W. Zaborska, M. Leszko, Z. Brzózka, Inhibition of Jack Bean urease by a mixture of boric acid and phosphate buffer pH 6.96, *Pol. J. Chem.*, **1999**, *73*, 359-366.
- (129) J. M. Breitenbach, R. P. Hausinger, *Proteus mirabilis* urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids, *Biochem. J.*, **1988**, *250*, 917-920.
- (130) P. Kosikowska, Ł. Berlicki, Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review, *Expert Opin. Ther. Patents*, **2011**, *21*, 945-957.
- (131) K. Kobashi, J. Hase, K. Uehare, Specific inhibition of urease by hydroxamic acids, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1962**, *65*, 380-393.
- (132) W. N. Fishbein, P. P. Carbone, Urease Catalysis: II. Inhibition of the enzyme by hydroxyurea, hydroxylamine, and acetohydroxamic acid, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 2407-2414.
- (133) K. Kobashi, J. Hase, T. Komai, Evidence for the formation of an inactive urease-hydroxamic acid complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1966**, *23*, 34-38.
- (134) K. Kumaki, S. Tomioka, K. Kobashi, J. Hase, Structure-activity correlations between hydroxamic acids and their inhibitory powers on urease activity. I. A quantitative approach to the effect of hydrophobic character of acyl residue, *Chem. Pharm. Bull.*, **1972**, *20*, 1599-1606.
- (135) D. P. Griffith, D. M. Musher, Acetohydroxamic acid. Potential use in urinary infection caused by urea-splitting bacteria, *Urology*, **1975**, *5*, 299-302.

- (136) J. J. Williams, J. S. Rodman, C. M. Peterson, A randomized double-blind study of acetohydroxamic acid in struvite nephrolithiasis, *N. Engl. J. Med.*, **1984**, 311, 760-764.
- (137) N. C. Bailie, C. A. Osborne, J. R. Leininger, Teratogenic effect of acetohydroxamic acid in clinically normal beagles, *Am. J. Vet. Res.*, **1986**, 47, 2604-2611.
- (138) K. Munakata, S. Tanaka, S. Toyoshima, Therapy for urolithiasis with hydroxamic acids. I. Synthesis of new N-(aroyl)glycinohydroxamic acid derivatives and related compounds, *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, 3, 444-450.
- (139) K. Munakata, H. Mochida, S. Kondo, Mutagenicity of N-acylglycinohydroxamic acids and related compounds, *J. Pharmacobiodyn.*, **1980**, 3, 557-561.
- (140) M. Satoh, K. Munakata, H. Takeuchi, Evaluation of effects of novel urease inhibitor, N-(pivaloyl)glycinohydroxamic acid on the formation of an infection bladder stone using a newly designed urolithiasis model in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 894-896.
- (141) S. Benini, W. R. Rypniewski, K. S. Wilson, S. Miletti, S. Ciurli, S. Mangani, The complex of *Bacillus pasteurii* urease with acetohydroxamate anion from X-ray data at 1.55Å resolution, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2000**, 5, 110-118.
- (142) M. A. Pearson, L. Overbye Michel, R. P. Hausinger, P. A. Karplus, Structures of Cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *Klebsiella aerogenes* urease, *Biochemistry*, **1998**, 37, 6214-6220.
- (143) P. Kafarski, M. Talma, Recent advances in design of new urease inhibitors: A review, *J. Adv. Res.*, **2018**, 13, 101-112.
- (144) L. S. Redgrave, S. B. Sutton, M. A. Webber, L. J. V. Piddock, Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success, *Trends Microbiol.*, **2014**, 22, 438-445.
- (145) M. Abu-Sini, A. Mayyas, N. Al-Karablieh, R. Darwish, Y. Al-Hiari, T. Aburjai, S. Arabiyat, L. Abu-Qatouseh, Synthesis of 1,2,3-triazolo[4,5-

h]quinolone derivatives with novel anti-microbial properties against metronidazole resistant *Helicobacter pylori*, *Molecules*, **2017**, 22, 841-852.

(146) M. A. A. Abdullah, R. M. A. El-Baky, H. A. Hassan, E.-S. M. N. Abdelhafez, G. E.-D. A. Abuo-Rahma, Fluoroquinolones as urease inhibitors: Anti-*Proteus mirabilis* activity and molecular docking studies, *Am. J. Microbiol. Res.*, **2016**, 4, 81-84.

(147) H. G. Kathrotiya, M. P. Patel, Synthesis and identification of β -aryloxyquinoline based diversely fluorine substituted *N*-aryl quinolone derivatives as a new class of antimicrobial, antituberculosis and antioxidant agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 63, 675-684.

(148) W. Zaborska, B. Krajewska, M. Kot, W. Karcz, Quinone-induced inhibition of urease: Elucidation of its mechanisms by probing thiol groups of the enzyme, *Bioorg. Chem.*, **2007**, 35, 233-242.

(149) M. A. A. Abdullah, G. E.-D. A. A. Abuo-Rahma, E.-S. M. N. Abdelhafez, H. A. Hassan, R. M. Abdel-Baky, Design, synthesis, molecular docking, anti-*Proteus mirabilis* and urease inhibition of new fluoroquinolone carboxylic acid derivatives, *Bioorg. Chem.*, **2017**, 70, 1-11.

(150) M. Nisar, S. Ali Khan, M. Raza Shah, A. Khan, U. Farooq, G. Uddin, B. Ahmad, Moxifloxacin-capped noble metal nanoparticles as potential urease inhibitors, *New J. Chem.*, **2015**, 39, 8080-8086.

(151) Ems SA. Antibacterial and/or antiprotozoal nitroimidazole derivative compounds with urease inhibitor activity, process for preparing these compounds and use in pharmaceutical compositions and medicines. US072929, **2007**.

(152) Otsuka Pharma Co. Ltd. Urease inhibitors. US058952, **2004**.

(153) M. Kajiwara. Urease inhibitors. US060482, **2003**.

(154) Z. Amtul, M. Rasheed, M. I. Choudhary, S. Rosanna, K. M. Khan, A.-u.-Rahman, Kinetics of novel competitive inhibitors of urease enzymes by a focused library of oxadiazoles/thiadiazoles and triazoles, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2004**, 319, 1053-1063.

- (155) M. A. Abbasi, H. Raza, A.-u.-Rehman, S. Z. Siddiqui, S. A. A. Shah, M. Hassan, S.-Y. Seo, Synthesis of novel *N*-(1,3-thiazol-2-yl)benzamide clubbed oxadiazole scaffolds: Urease inhibition, Lipinski rule and molecular docking analyses, *Bioorg. Chem.*, **2019**, *83*, 63-75.
- (156) Jishou University. 1,2-diphenylethane type urease inhibitor and synthesis and applications thereof. CN101665413, **2010**.
- (157) Z.-P. Xiao, T.-W. Ma, W.-C. Fu, X.-C. Peng, A.-H. Zhang, H.-L. Zhu, The synthesis, structure and activity evaluation of pyrogallol and catechol derivatives as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 5064-5070.
- (158) Z.-P. Xiao, X.-D. Wang, Z.-Y. Peng, S. Huang, P. Yang, Q.-S. Li, L.-H. Zhu, X.-J. Hu, L.-J. Wu, Y. Zhou, H.-L. Zhou, Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of Quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 10572-10577.
- (159) Z.-P. Xiao, Z.-Y. Peng, J.-J. Dong, J. He, H. Ouyang, Y.-T. Feng, C.-L. Lu, W.-Q. Lin, J.-X. Wang, Y.-P. Xiang, H.-L. Zhu, Synthesis, structure-activity relationship analysis and kinetics study of reductive derivatives of flavonoids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, *63*, 685-695.
- (160) S. D. Jadhav, R. J. Meshram, D. S. Gond, R. N. Gacche, Inhibition of growth of *Helicobacter pylori* and its urease by coumarin derivatives: Molecular docking analysis, *J. Pharm. Res.*, **2013**, *7*, 705-711.
- (161) S. Golbabaee, R. Bazl, S. Golestanian, F. Nabati, Z. B. Omrany, B. Yousefi, R. Hajiaghae, S. Rezazadeh, M. Amanlou, Urease inhibitory activities of β -boswellic acid derivatives, *J. Pharm. Sci.*, **2013**, *21*, 2-7.
- (162) C. Li, J. Xie, X. Chen, Z. Mo, W. Wu, Y. Liang, Z. Su, Q. Li, Y. Li, Z. Su, X. Yang, Comparison of *Helicobacter pylori* urease inhibition by Rhizoma coptidis, Cortex phellodendri and Berberine: Mechanisms of interaction with the sulfhydryl group, *Planta Med.*, **2016**, *82*, 305-311.

- (163) L. Tan, C. Li, H. Chen, Z. Mo, J. Zhou, Y. Liu, Z. Ma, Y. Xu, X. Yang, J. Xie, Z. Su, Epiberberine, a natural protoberberine alkaloid, inhibits urease of *Helicobacter pylori* and jack bean: Susceptibility and mechanism, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2017**, *110*, 77-86.
- (164) J.-T. Zhou, C.-L. Li, L.-H. Tan, Y.-F. Xu, Y.-H. Liu, Z.-Z. Mo, Y.-X. Dou, R. Su, Z.-R. Su, P. Huang, J.-H. Xie, Inhibition of *Helicobacter pylori* and its associated urease by Palmatine: Investigation on the potential mechanism, *PLoS ONE*, **2017**, *12*, e0168944.
- (165) L. V. Modolo, A. X. de Souza, L. P. Horta, D. P. Araujo, Â. de Fátima, An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review, *J. Adv. Res.*, **2015**, *6*, 35-44.
- (166) I. Ahmad, B. A. Chaudhary, M. Ashraf, M. Uzair, K. H. Janbaz, Vernionione, a new urease inhibitory carvotacetone derivative from *Vernonia cinerascens*, *J. Chem. Soc. Pakistan*, **2012**, *34*, 639-642.
- (167) Z.-Z. Mo, X.-F. Wang, X. Zhang, J.-Y. Su, H.-M. Chen, Y.-H. Liu, Z.-B. Zhang, J.-H. Xie, Z.-R. Su, Andrographolide sodium bisulphite-induced inactivation of urease: inhibitory potency, kinetics and mechanism, *BMC Compl. Alternat. Med.*, **2015**, *15*, 238-247.
- (168) M. Ranjbar-Omid, M. Arzanlou, M. Amani, S. K. S. Al-Hashem, N. A. Mozafari, H. P. Doghaheh, Allicin from garlic inhibits the biofilm formation and urease activity of *Proteus mirabilis* *in vitro*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **2015**, *362*, fnv049.
- (169) R. Mathialagan, N. Mansor, B. Al-Khateeb, M. H. Mohamad, M. R. Shamsuddin, Evaluation of allicin as soil urease inhibitor, *Procedia Eng.*, **2017**, *184*, 449-459.
- (170) N. E. Dixon, C. Gazzola, J. J. Watters, R. L. Blakeley, B. Zerner, Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. Equivalent weight for urease, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 4130-4131.

- (171) R. K. Andrews, A. Dexter, R. L. Blakeley, B. Zerner, Jack bean urease (EC 3.5.1.5) VIII. On the inhibition of urease by amides and esters of phosphoric acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 7124-7125.
- (172) Morton Norwich Products, Inc. N-(diaminophosphinyl)arylcarboxamides. US4182881, **1980**.
- (173) Morton Norwich Products, Inc. Phosphorotriamides as urease inhibitors. US4242325, **1980**.
- (174) Morton Norwich Products, Inc. [[(4-Aminophenyl)sulfonyl]amino]phenylphosphorodiamidates. US4222948, **1980**.
- (175) Takeda Chemical Industries Ltd. Phosphorylamides, their preparation and use. US5840917, **1998**.
- (176) W. S. Faraci, B. V. Yang, D. O'Rourke, R. W. Spencer, Inhibition of *Helicobacter pylori* urease by phenyl phosphorodiamidates: Mechanism of action, *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, *3*, 605-610.
- (177) S. Vassiliou, A. Grabowiecka, P. Kosikowska, A. Yiotakis, P. Kafarski, Ł. Berlicki, Design, synthesis, and evaluation of novel organophosphorus inhibitors of bacterial ureases, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 5736-5744.
- (178) S. Vassiliou, P. Kosikowska, A. Grabowiecka, A. Yiotakis, P. Kafarski, Ł. Berlicki, Computer-aided optimization of phosphinic inhibitors of bacterial ureases, *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 5597-5606.
- (179) V. Ntatsopoulos, S. Vassiliou, K. Macegoniuk, Ł. Berlicki, A. Mucha, Novel organophosphorus scaffolds of urease inhibitors obtained by substitution of Morita-Baylis-Hillman adducts with phosphorus nucleophiles, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *133*, 107-120.
- (180) R. Lonsdale, R. A. Ward, Structure-based design of targeted covalent inhibitors, *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, *47*, 3816-3830.
- (181) R. A. Bauer, Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies, *Drug Discovery Today*, **2015**, *20*, 1061-1073.

- (182) A. J. T. Smith, X. Zhang, A. G. Leach, K. N. Houk, Beyond picomolar affinities: Quantitative aspects of noncovalent and covalent binding of drugs to proteins, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 225-233.
- (183) A. J. Wilson, J. K. Kerns, J. F. Callahan, C. J. Moody, Keep calm, and carry on covalently, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 7463-7476.
- (184) G. J. Roth, N. Stanford, P. W. Majerus, Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1975**, *72*, 3073-3076.
- (185) P. M. Wright, I. B. Seiple, A. G. Myers, The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 8840-8869.
- (186) L. Olbe, E. Carlsson, P. Lindberg, A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, *2*, 132-139.
- (187) P. Savi, J. M. Pareillo, M. F. Uzabiaga, J. Combalbert, C. Picard, J. P. Maffrand, M. Pascal, J. M. Herbert, Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel, *Thromb. Haemost.*, **2000**, *84*, 891-896.
- (188) A. Ballinger, S. R. Peikin, Orlistat: its current status as an anti-obesity drug, *Eur. J. Pharmacol.*, **2002**, *440*, 109-117.
- (189) A. D. Kwong, R. S. Kauffman, P. Hurter, P. Mueller, Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus, *Nat. Biotechnol.*, **2011**, *29*, 993-1003.
- (190) T. Barf, A. Kaptein, Irreversible protein kinase inhibitors: Balancing the benefits and risks, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 6243-6262.
- (191) J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, The resurgence of covalent drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 307-317.
- (192) Y. Shibata, M. Chiba, The role of extrahepatic metabolism in the pharmacokinetics of the targeted covalent inhibitors Afatinib, Ibrutinib, and Neratinib, *Drug Metab. Dispos.*, **2015**, *43*, 375-384.

- (193) W. Zaborska, M. Kot, K. Superata, Inhibition of Jack Bean urease by 1,4-benzoquinone and 2,5-dimethyl-1,4-benzoquinone. Evaluation of the inhibition mechanism, *J. Enzyme Inh. Med. Chem.*, **2002**, *17*, 247-253.
- (194) A. Ashiralieva, D. Kleiner, Polyhalogenated benzo- and naphthoquinones are potent inhibitors of plant and bacterial ureases, *FEBS Lett.*, **2003**, *555*, 367-370.
- (195) D. Kleiner, A. Ashiralieva, Use of quinones and their derivatives as urease inhibitors, particularly for treating infections with urease-producing bacteria, e.g., *Helicobacter pylori*. DE10333448, **2005**.
- (196) L. Mazzei, M. Cianci, F. Musiani, S. Ciurli, Inactivation of urease by 1,4-benzoquinone: chemistry at the protein surface, *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 5455-5459.
- (197) K. Macegoniuk, E. Grela, J. Palus, E. Rudzińska-Szostak, A. Grabowiecka, M. Biernat, Ł. Berlicki, 1,2-Benzisosenazol-3(2H)-one derivatives as a new class of bacterial urease inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2016**, *59*, 8125-8133.
- (198) E. Z. Dajani, M. J. Klamut, Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: an update, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **2000**, *9*, 1537-1544.
- (199) T. C. Kühler, J. Fryklund, N. Bergman, J. Weilitz, A. Lee, H. Larsson, Structure-activity relationship of Omeprazole and analogs as *Helicobacter pylori* urease inhibitors, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4906-4916.
- (200) Takeda Chemical Industries Ltd. Urease inhibitor. JP7025767, **1995**.
- (201) K. Nagata, H. Satoh, T. Iwahi, T. Shimoyama, T. Tamura, Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*: unique action for *H. pylori* cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, *37*, 769-774.
- (202) M. Tsuchiya, L. Imamura, J.-B. Park, K. Kobashi, *Helicobacter pylori* urease inhibition by Rabeprazole, a proton pump inhibitor, *Biol. Pharm. Bull.*, **1995**, *18*, 1053-1056.

- (203) L. Mazzei, M. Cianci, F. Musiani, G. Lente, M. Palombo, S. Ciurli, Inactivation of urease by catechol: Kinetics and structure, *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *166*, 182-189.
- (204) A. Pagoni, T. Daliani, K. Macegoniuk, S. Vassiliou, Ł. Berlicki, Catechol-based inhibitors of bacterial urease, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, *29*, 1085-1089.
- (205) K. Macegoniuk, R. Kowalczyk, A. Rudzińska, M. Psurski, J. Wietrzyk, Ł. Berlicki, Potent covalent inhibitors of bacterial urease identified by activity-reactivity profiling, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*, 1346-1350.
- (206) Á. G. Díaz-Sánchez, E. Alvarez-Parrilla, A. Martínez-Martínez, L. Aguirre-Reyes, J. A. Orozpe-Olvera, M. A. Ramos-Soto, J. A. Núñez-Gastélum, B. Alvarado-Tenorio, L. A. de la Rosa, Inhibition of urease by Disulfiram, an FDA-approved thiol reagent used in humans, *Molecules*, **2016**, *21*, 1628-1642.
- (207) J.-L. Montchamp, Phosphinate chemistry in the 21st century: A viable alternative to the use of phosphorus trichloride in organophosphorus synthesis, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 77-87.
- (208) C. S. Demmer, N. Krogsgaard-Larsen, L. Bunch, Review on modern advances of chemical methods for the introduction of a phosphonic acid group, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 7981-8006.
- (209) H. Morales-Rojas, R. A. Moss, Phosphorolytic reactivity of *o*-iodosylcarboxylates and related nucleophiles, *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 2497-2521.
- (210) L. D. Quin, *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., New York, **2000**.
- (211) D. Hendlin, E. O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A. K. Miller, F. J. Wolf, T. W. Miller, L. Chaiet, F. M. Kahan, E. L. Foltz, H. B. Woodruff, J. M. Mata, S. Hernandez, S. Mochales, Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*, *Science*, **1969**, *166*, 122-123.

- (212) H. Arnold, F. Bourseaux, Synthese und Abbau cytotostatisch wirksamer cyclischer N-Phosphamidester des Bis-(β -chloräthyl)-amins, *Angew. Chem.*, **1958**, 70, 539-544.
- (213) J. D. Morrison, R. E. Burnett, A. M. Aguiar, C. J. Morrow, C. Phillips, Asymmetric homogeneous hydrogenation with rhodium(I) complexes of chiral phosphines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 1301-1303.
- (214) F. Lagasse, H. B. Kagan, Chiral monophosphines as ligands for asymmetric organometallic catalysis, *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48, 315-324.
- (215) T. Hayashi, Chiral monodentate phosphine ligand MOP for transition-metal-catalyzed asymmetric reactions, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 354-362.
- (216) M. J. Gallagher, M. G. Ranasinghe, I. D. Jenkins, Mono- and dialkylation of isopropyl phosphinate – A simple preparation of alkylphosphinate esters, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, **1996**, 115, 255-259.
- (217) S. Deprèle, J.-L. Montchamp, Triethylborane-initiated room temperature radical addition of hypophosphites to olefins: Synthesis of monosubstituted phosphinic acids and esters, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 6745-6755.
- (218) D. S. Karanewsky, M. C. Badia, D. W. Cushman, J. M. DeForrest, T. Dejneka, M. J. Loots, M. G. Perri, E. W. Petrillo Jr., J. R. Powell, (Phosphinyloxy)acyl amino acid inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE). 1. Discovery of (S)-1-[6-amino-2-[[hydroxy(4-phenylbutyl)phosphinyloxy]-1-oxohexyl]-L-proline, a novel orally active inhibitor of ACE, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 204-212.
- (219) M. I. Atczak, J.-L. Montchamp, AIBN-initiated radical reactions of ethyl phosphinate, *Synthesis*, **2006**, 18, 3080-3084.
- (220) P. Troupa, G. Katsioulari, S. Vassiliou, Rapid and efficient microwave-assisted hydrophosphinylation of unactivated alkenes with *H*-phosphinic acids without added metal or radical initiator, *Synlett*, **2015**, 26, 2714-2719.
- (221) A. N. Pudovik, I. V. Konovalova, Addition reactions of esters of phosphorus(III) acids with unsaturated systems, *Synthesis*, **1979**, 1979, 81-96.

- (222) D. Semenzin, G. Etemad-Moghadam, D. Albouy, O. Diallo, M. Koenig, Dual radical/polar Pudovik reaction: Application field of new activation methods, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 2414-2422.
- (223) D. Enders, A. Saint-Dizier, M.-I. Lannou, A. Lenzen, The Phospha-Michael addition in organic synthesis, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 29-49.
- (224) C. Petit, F. Fécourt, J.-L. Montchamp, Synthesis of disubstituted phosphinates via palladium-catalyzed hydrophosphinylation of H-phosphinic acids, *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, 353, 1883-1888.
- (225) S. Ortial, H. C. Fisher, J.-L. Montchamp, Hydrophosphinylation of unactivated terminal alkenes catalyzed by nickel chloride, *J. Org. Chem.*, **2013**, 78, 6599-6608.
- (226) Alok K. Bhattacharya, G. Thyagarajan, The Michaelis-Arbuzov rearrangement, *Chem. Rev.*, **1981**, 81, 415-430.
- (227) J. F. Mike, J. J. Inteman, A. Ellern, M. Jeffrie-EL, Facile synthesis of 2,6-disubstituted benzobisthiazoles: Functional monomers for the design of organic semiconductors, *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 495-497.
- (228) (a) V. André, H. Lahrache, S. Robin, G. Rousseau, Reaction of unsaturated phosphonate monoesters with bromo- and iodo(bis-collidine)hexafluorophosphates, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 10059-10066, (b) Z. Hasník, R. Pohl, M. Hocek, Synthesis of (purin-6-yl)methylphosphonate bases and nucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 2464-2466.
- (229) C. W. Barfoot, J. E. Harvey, M. N. Kenworthy, J. P. Kilburn, M. Ahmed, R. J. K. Taylor, Highly functionalised organolithium and organoboron reagents for the preparation of enantiomerically pure α -amino acids, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 3403-3417.
- (230) P. Sampson, G. B. Hammond, D. F. Wiemer, A new synthesis of β -keto phosphonates and β -keto silanes, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 4342-4347.
- (231) R. G. de Noronha, P. J. Costa, C. C. Romão, M. J. Calhorda, A. C. Fernandes, MoO_2Cl_2 as a novel catalyst for C-P bond formation and for hydrophosphonylation of aldehydes, *Organometallics*, **2009**, 28, 6206-6212.

- (232) Q. Wu, J. Zhou, Z. Yao, F. Xu, Q. Shen, Lanthanide amides $[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{N}]_3\text{Ln}(\mu\text{-Cl})\text{Li}(\text{THF})_3$ catalyzed hydrophosphonylation of aryl aldehydes, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 7498-7501.
- (233) D. Uraguchi, T. Ito, T. Ooi, Generation of chiral phosphonium dialkyl phosphite as a highly reactive *P*-nucleophile: Application to asymmetric hydrophosphonylation of aldehydes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 3836-3837.
- (234) Z. Jiang, Y. Zhang, W. Ye, C.-H. Tan, P-C Bond formation via direct and three-component conjugate addition catalyzed by 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD), *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 51-54.
- (235) E. Maerten, S. Cabrera, A. Kjærsgaard, K. A. Jørgensen, Organocatalytic asymmetric direct phosphonylation of α,β -unsaturated aldehydes: Mechanism, scope, and application in synthesis, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 8893-8903.
- (236) P. A. Badkar, N. P. Rath, C. D. Spilling, Asymmetric synthesis of 2-alkyl-3-phosphonopropanoic acids via P-C bond formation and hydrogenation, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3619-3622.
- (237) G. Lavén, M. Kalek, M. Jezowska, J. Stawinski, Preparation of benzylphosphonates *via* a palladium(0)-catalyzed cross-coupling of H-phosphonate diesters with benzyl halides. Synthetic and mechanistic studies, *New J. Chem.*, **2010**, *34*, 967-975.
- (238) G. Lavén, J. Stawinski, Palladium (0)-catalyzed benzylation of H-phosphonate diesters: An efficient entry to benzylphosphonates, *Synlett*, **2009**, *2*, 225-228.
- (239) T. Hirao, T. Masunaga, Y. Ohshiro, T. Agawa, Stereoselective synthesis of vinylphosphonate, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 3595-3598.
- (240) Y. Belabassi, S. Alzghari, J.-L. Montchamp, Revisiting the Hirao cross-coupling: improved synthesis of aryl and heteroaryl phosphonates, *J. Organomet. Chem.*, **2008**, *693*, 3171-3178.

- (241) A. Bessmertnykh, C. M. Douaihy, S. Muniappan, R. Guillard, Efficient palladium-catalyzed synthesis of aminopyridyl phosphonates from bromopyridines and diethyl phosphite, *Synthesis*, **2008**, *10*, 1575-1579.
- (242) M. Kalek, A. Ziadi, J. Stawinski, Microwave-assisted palladium-catalyzed cross-coupling of aryl and vinyl halides with H-phosphonate diesters, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 4637-4640.
- (243) D. Gelman, L. Jiang, S. L. Buchwald, Copper-catalyzed C-P bond construction via direct coupling of secondary phosphines and phosphites with aryl and vinyl halides, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 2315-2318.
- (244) I. G. Trostyanskaya, D. Y. Titskiy, E. A. Anufrieva, A. A. Borisenko, M. A. Kazankova, I. P. Beletskaya, Cross-coupling of E,E-1,4-diiodobuta-1,3-diene with nucleophiles catalyzed by Pd or Ni complexes: a new route to functionalized dienes, *Russ. Chem. Bull.*, **2001**, *50*, 2095-2100.
- (245) M. Henn, K. Jurkschat, D. Mansfeld, M. Mehring, M. Schürmann, Synthesis and structure of and DFT-studies on 1,3,5-[P(O)(i-PrO)₂]₃C₆H₃ and its CHCl₃ adduct: analysis of the Cl₃C-H...OP hydrogen bond, *J. Mol. Struct.*, **2004**, *697*, 213-220.
- (246) N. Rabasso, A. Fadel, Synthesis of new β- and γ-aminopyrrolidinephosphonates via 1,3-dipolar cycloaddition of substituted vinylphosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 60-63.
- (247) F. Mirzaei, L.-B. Han, M. Tanaka, Palladium-catalyzed hydrophosphorylation of 1,3-dienes leading to allylphosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 297-299.
- (248) M. Lera, C. J. Hayes, A new one-pot synthesis of alkynylphosphonates, *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 3873-3875.
- (249) Y. Gao, G. Wang, L. Chen, P. Xu, Y. Zhao, Y. Zhou, L.-B. Han, Copper-catalyzed aerobic oxidative coupling of terminal alkynes with H-phosphonates leading to alkynylphosphonates, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 7956-7957.
- (250) L.-B. Han, M. Tanaka, Palladium-catalyzed hydrophosphorylation of alkynes via oxidative addition of HP(O)(OR)₂, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1571-1572.

- (251) V. P. Ananikov, L. L. Khemchyan, I. P. Beletskaya, Celebrating 20 years of *SYNLETT* – Special Essay: General procedure for the palladium-catalyzed selective hydrophosphorylation of alkynes, *Synlett*, **2009**, *15*, 2375-2381.
- (252) J. H. Lin, Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties, *Bone*, **1996**, *18*, 75-85.
- (253) A. Allen, D. R. Manke, W. Lin, Synthesis of functional bisphosphonates via new palladium-catalyzed bis-hydrophosphorylation reactions, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 151-154.
- (254) L.-B. Han, C. Zhang, H. Yazawa, S. Shimada, Efficient and selective nickel-catalyzed addition of H-P(O) and H-S bonds to alkynes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 5080-5081.
- (255) F. N. Lagemwa, K. Shaikh, E. Hochstedt, Facile and efficient acetylation of primary alcohols and phenols with acetic anhydride catalyzed by dried sodium bicarbonate, *Catalysts*, **2013**, *3*, 954-965.
- (256) D. Basavaiah, G. Veeraraghavaiah, The Baylis-Hillman reaction: a novel concept for creativity in chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 68-78.
- (257) D. Basavaiah, K. V. Rao, R. J. Reddy, The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1581-1588.
- (258) L. S. Santos, C. H. Pavam, W. P. Almeida, F. Coelho, M. N. Eberlin, Probing the mechanism of the Baylis-Hillman reaction by Electrospray Ionization Mass and Tandem Mass Spectrometry, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4330-4333.
- (259) M. Kalyva, A. L. Zografos, E. Kapourani, E. Giambazolias, L. Devel, A. Papakyriakou, V. Dive, Y. G. Lazarou, D. Georgiadis, 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.
- (260) D. Albouy, A. Brun, A. Munoz, G. Etemad-Moghadam, New (α -hydroxyalkyl)phosphorus amphiphiles: Synthesis and dissociation constants, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 7223-7230.

- (261) R. R. Milburn, K. McRae, J. Chan, J. Tedrow, R. Larsen, M. Faul, A practical preparation of aryl β -ketophosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 870-872.
- (262) M. M. Heravi, E. Hashemi, F. Azimian, Recent developments of the Stille reaction as a revolutionized method in total synthesis, *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 7-21.
- (263) D. Azarian, S. S. Dua, C. Eaborn, D. R. M. Walton, Reactions of organic halides with R_3MMR_3 compounds (M = Si, Ge, Sn) in the presence of tetrakis(triarylphosphine)palladium, *J. Organomet. Chem.*, **1976**, *117*, C55-C57.
- (264) (a) M. Kosugi, K. Sasazawa, Y. Shimizu, T. Migita, Reactions of allyltin compounds III. Allylation of aromatic halides with allyltributyltin in the presence of tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0), *Chem. Lett.*, **1977**, *6*, 301-302, (b) M. Kosugi, Y. Shimizu, T. Migita, Alkylation, arylation, and vinylation of acyl chlorides by means of organotin compounds in the presence of catalytic amounts of tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0), *Chem. Lett.*, **1977**, *6*, 1423-1424.
- (265) D. Milstein, J. K. Stille, A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium, *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, *100*, 3636-3638.
- (266) C. Cordovilla, C. Bartolomé, J. M. Martínez-Ilarduya, P. Espinet, The Stille reaction, 38 years later, *ACS Catal.*, **2015**, *5*, 3040-3053.
- (267) K. Bravo-Altamirano, J.-L. Montchamp, A novel approach to phosphonic acids from hypophosphorous acid, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 5755-5759.
- (268) Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., EP2098517, **2009**.
- (269) J.-C. Hsu, Y.-H. Yen, Y.-H. Chu, Baylis-Hillman reaction in [bdmim][PF₆] ionic liquid, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 4673-4676.
- (270) W. P. Hong, K.-J. Lee, Synthesis of methyl (*E*)-2-nitromethylcinnamates derived from Baylis-Hillman acetates and conversion into several coumarin derivatives, *Synthesis*, **2005**, *1*, 33-38.

- (271) X. Mi, S. Luo, H. Xu, L. Zhang, J.-P. Cheng, Hydroxyl ionic liquid (HIL)-immobilized quinuclidine for Baylis-Hillman catalysis: synergistic effect of ionic liquids as organocatalyst supports, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 2537-2544.
- (272) Y. Jeong, J.-S. Ryu, Synthesis of 1,3-dialkyl-1,2,3-triazolium ionic liquids and their applications to the Baylis-Hillman reaction, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 4183-4191.
- (273) V. Singh, S. Kanojiya, S. Batra, Studies on the reduction of the nitro group in 3-aryl-2-methylene-4-nitro-alkanoates afforded by the Baylis-Hillman adducts: synthesis of 4-aryl-3-methylene-2-pyrrolidinones and 3-(1-alkoxycarbonyl-vinyl)-1*H*-indole-2-carboxylates, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 10100-10110.
- (274) H. Huang, X. Liu, J. Deng, M. Qiu, Z. Zheng, Rhodium-catalyzed enantioselective hydrogenation of β -phthalimide acrylates to synthesis of β^2 -amino acids, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3359-3362.
- (275) E. Ramesh, R. Raghunathan, A facile synthesis of chromeno[4,3-*b*]pyrroles derived from allyl derivatives of Baylis-Hillman adducts through intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition using ultrasonication, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 1125-1128.
- (276) B. Das, K. Damodar, N. Bhunia, B. Shashikanth, Mild and practical stereoselective synthesis of (*Z*)- and (*E*)-allyl bromides from Baylis-Hillman adducts using Appel agents ($\text{PPh}_3/\text{CBr}_4$): a facile synthesis of semiplenamides C and E, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 2072-2074.
- (277) D. Basavaiah, N. Kumaragurubaran, K. Padmaja, Applications of the Baylis-Hillman adducts in organic synthesis: A facile synthesis of [*E*]- α -cyanocinnamic aldehydes, *Synlett*, **1999**, 1630-1632.
- (278) A. Santhoshi, S. N. Kumar, P. Sujitha, Y. Poornachandra, P. S. Sadhu, C. G. Kumar, V. J. Rao, Synthesis of 1-benzhydryl piperazine derivatives and evaluation of their ACE inhibition and antimicrobial activities, *Med. Chem. Res.*, **2014**, *23*, 3207-3219.
- (279) A. Santhoshi, P. S. Sadhu, R. Sriram, C. N. S. S. P. Kumar, B. Mahendar, M. Sarangapani, V. J. Rao, A facile route for the synthesis of 1,4-

disubstituted tetrazolone derivatives and evaluation of their antimicrobial activity, *Med. Chem. Res.*, **2013**, *22*, 3329-3340.

(280) A. Datta, H. Ila, H. Junjappa, Polarized ketene dithioacetals 63: Stereoselective synthesis of α -ylidene- γ -butyrolactones, *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 5367-5374.

(281) M. A. Ganiek, M. R. Becker, M. Ketels, P. Knochel, Continuous flow magnesiation or zincation of acrylonitriles, acrylates, and nitroolefins. Application to the synthesis of butenolides, *Org. Lett.*, **2016**, *18*, 828-831.

(282) P. Srihari, A. P. Singh, A. K. Basak, J. S. Yadav, Zinc mediated propenylation of Baylis-Hillman acetates, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 5999-6001.

(283) X. Xu, X. Zhang, Direct synthesis of 4-quinolones via copper-catalyzed anilines and alkynes, *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 4984-4987.

(284) W. Du, Q. Gu, Y. Li, Z. Lin, D. Yang, Enantioselective palladium-catalyzed oxidative cascade cyclization of aliphatic alkenyl amides, *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 316-319.

(285) S. Khamri, T. Turki, H. Amri, Stereoselective synthesis of functionalized 1,4-dienes, *Synth. Commun.*, **2008**, *38*, 3277-3284.

(286) Y. Yoshida, K. Inoue, N. Kyritsakas, M. Kurmoo, Syntheses, structures and magnetic properties of zig-zag chains of transition metals with O-P-O bridges, *Inorganica Chim. Acta*, **2009**, *362*, 1428-1434.

(287) Y. Zhou, F. Ye, X. Wang, S. Xu, Y. Zhang, J. Wang, Synthesis of alkenylphosphonates through palladium-catalyzed coupling of α -diazo phosphonates with benzyl or allyl halides, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 6109-6118.

(288) K. Dong, Z. Wang, K. Ding, Rh(I)-catalyzed enantioselective hydrogenation of α -substituted ethenylphosphonic acids, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 12474-12477.

(289) S. Chen, Y. Ruan, J. D. Brown, C. M. Hadad, J. D. Badjić, Recognition characteristics of an adaptive vesicular assembly of amphiphilic baskets for

selective detection and mitigation of toxic nerve agents, *J. Am. Chem. Soc.*,
2014, *136*, 17337-17342.