

Katarzyna Magdalena Błażewska

**KWASY α -FOSFONOKARBOKSYLOWE JAKO
INHIBITORY I NARZĘDZIA DO BADANIA
RAB GERANYLOGERANYLOTRANSFERAZY**

Autoreferat

Łódź, 2016

1. IMIĘ I NAZWISKO: Katarzyna Magdalena Błazewska.

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE (z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej): .

2006 Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Specjalność: chemia organiczna
Uzyskany stopień: doktor nauk chemicznych
Promotor: dr hab. Tadeusz Gajda

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Nowe zastosowania preparatywne estrów kwasów 1-(izotiocyjaniano)alkilofosfonowych**

(praca doktorska wyróżniona przez Radę Naukową Wydziału Chemicznego)

2001 Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Kierunek: chemia
Specjalność: Chemia związków biologicznie czynnych
Uzyskany stopień: magister inżynier
Promotor: dr hab. Tadeusz Gajda, prof. PŁ

Tytuł pracy dyplomowej: **Wykorzystanie *N*-dietoksyfosforylo-*O*-benzylohydroksyloaminy w syntezie *N*-alkilo-*O*-benzylohydroksyloamin** (ocena ostateczna: celujący z wyróżnieniem)

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

09.2006 – 09.2009 University of Southern California
Department of Chemistry
Stanowisko: staż podoktorski

10.2009 – 03.2010 Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Stanowisko: asystent

04.2010 – obecnie Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Stanowisko: adiunkt

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

KWASY α -FOSFONOKARBOKSYLOWE JAKO INHIBITORY I NARZĘDZIA DO BADANIA RAB GERANYLOGERANYLOTANSFERAZY

b) Spis monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy). Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów zamieszczono odpowiednio w załącznikach 7 i 5.

Podstawę osiągnięcia stanowi cykl dziewięciu oryginalnych publikacji oraz jeden artykuł przeglądowy współautorstwa habilitantki.

H1. J. Gmach, Ł. Joachimiak, **K. M. Błażewska*** "Aza-Michael addition of imidazole analogs" *Synthesis* **2016**, DOI: 10.1055/s-0035-1560451; IF₂₀₁₄ = 2.689.

H2. S. Sun, **K. M. Błażewska**, A. P. Kadina, B. A. Kashemirov, X. Duan, J. T. Triffitt, J. E. Dunford, R. G. G. Russell, F. H. Ebetino, A. J. Roelofs, F. P. Coxon, M. W. Lundy, C. E. McKenna "Fluorescent Bisphosphonate and Carboxyphosphonate Probes: A Versatile Imaging Toolkit for Applications in Bone Biology and Biomedicine" *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 329. IF₂₀₁₄ = 4.513.

H3. Ł. Joachimiak, Ł. Janczewski, J. Ciekot, J. Boratyński, **K. Błażewska*** "Applying prodrug strategy to α -phosphonocarboxylate inhibitors of Rab GGTase - synthesis and stability studies" *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 6844. IF₂₀₁₄ = 3.562.

H4. F. Coxon, Ł. Joachimiak, A. K. Najumudeen, G. Breen, J. Gmach, Ch. Oetken-Lindholm, R. Way, J. Dunford, D. Abankwa, **K. M. Błażewska*** "Synthesis and characterization of novel phosphonocarboxylate inhibitors of RGGT" *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 84, 77. IF₂₀₁₄ = 3.447.

H5. J. Gmach, K. Huben, **K. M. Błażewska*** " α -Fluoro phosphonocarboxylates: the NMR analysis of the heteronuclear ABMX spin system" *Phosphorus, Sulfur, Silicon and Rel. Elem.*, **2014**, 189, 1. IF₂₀₁₄ = 0.561.

H6. **K. M. Błażewska** „McKenna reaction – which oxygen attacks bromotrimethylsilane?" *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 408. IF₂₀₁₄ = 4.721.

H7. **K. M. Błażewska**, F. Ni, R. Haiges, B. A. Kashemirov, F. P. Coxon, C. A. Stewart, R. Baron, M. J. Rogers, M. C. Seabra, F. H. Ebetino, C. E. McKenna "Synthesis, stereochemistry and SAR of a series of minodronate analogues as RGGT inhibitors" *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4820. IF₂₀₁₁ = 3.346.

H8. **K. M. Błażewska**, R. Haiges, B. A. Kashemirov, F. H. Ebetino, C. E. McKenna "A serendipitous phosphonocarboxylate complex of boron: when vessel becomes reagent" *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6395. IF₂₀₁₁ = 6.169.

H9. C. E. McKenna, B. A. Kashemirov, **K. M. Błażewska**, I. Mallard-Favier, C. A. Stewart, J. Rojas, M. W. Lundy, F. H. Ebetino, R. A. Baron, M. C. Seabra, M. S. Marma, J. L. Bala, M. J. Rogers, F. P. Coxon, „Synthesis, Chiral HPLC Resolution and Enantiospecific Activity of a Potent New Geranylgeranyl Transferase Inhibitor, 2-Hydroxy-3-Imidazo[1,2-a]Pyridin-3-yl-2-

Phosphonopropionic Acid“, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3454. IF₂₀₁₀ = 5.207.

H10. R. A. Baron, R. Tavaré, A. C. Figueiredo, **K. M. Błażewska**, B. A. Kashemirov, C. E. McKenna, F. H. Ebetino, A. Taylor, M. J. Rogers, F. P. Coxon, M. C. Seabra, “Phosphonocarboxylates inhibit the second geranylgeranyl addition by Rab Geranylgeranyl Transferase”, *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 254. IF₂₀₀₉ = 5.328.

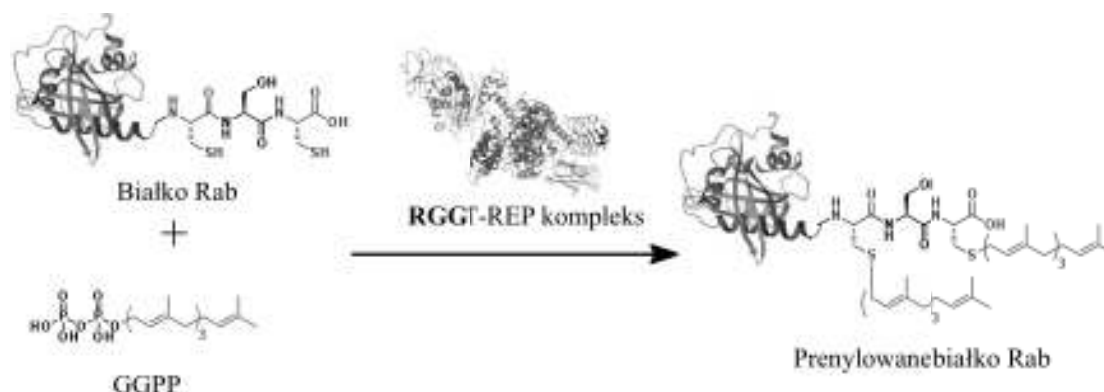
Summary impact factor: 39.543

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

I. WSTĘP

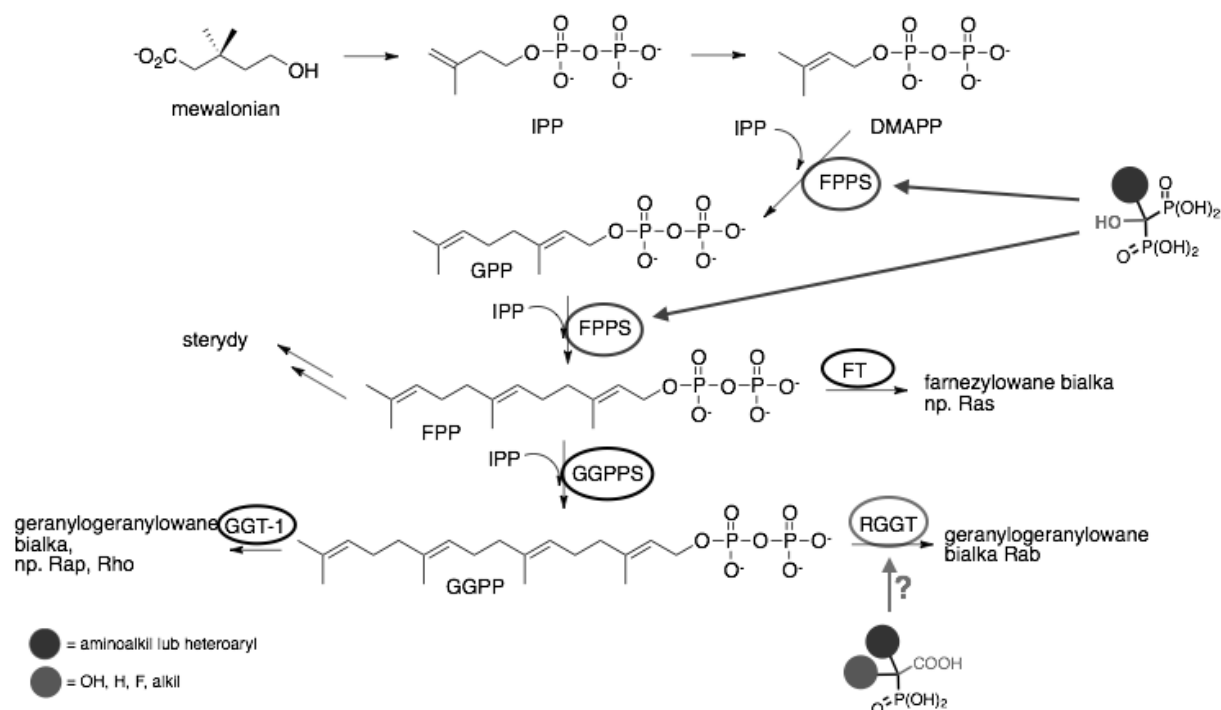
Małe białka wiążące nukleotyd guanozynowy, GTPazy, są odpowiedzialne za transport międzymembranowy. Występują one w formie aktywnej, wiążącej trifosforan guanozyny (GTP) lub w formie nieaktywnej, wiążącej difosforan guanozyny (GDP), regulując w ten sposób aktywność ścieżki sygnałowej, biorącej udział w tworzeniu pęcherzyków, ich transportu i fuzji z docelową membraną.¹

Najliczniejszą klasę białek z grupy GTPaz stanowią Rab GTPazy (białka Rab), których liczebność szacuje się obecnie na około 65 przedstawicieli. Nieprawidłowemu funkcjonowaniu białek Rab przypisuje się zaangażowanie w złośliwość związaną między innymi z migracją, inwazją i proliferacją komórek nowotworowych.² Zakłócenie poziomu białek Rab w organizmie jest również obserwowane w chorobach neurodegeneracyjnych i zakaźnych.³ W celu regulacji poziomu białek Rab w stanach chorobowych potrzebny jest punkt, który można kontrolować.¹ Jedną z możliwości takiej kontroli daje inhibicja enzymu Rab geranylogeranylotransferazy (Rab GGTaza, RGGT), który jest odpowiedzialny za post-translacyjną modyfikację białek Rab za pomocą jednego lub dwóch dwudziestowęglowych łańcuchów geranylogeranylowych (Rysunek 1). Grupy te są przyłączane do reszt cysteinowych obecnych w C-terminalnym końcu białek Rab (Rysunek 1).⁴ Taka lipofilowa modyfikacja umożliwia prawidłową lokalizację białek Rab, a inhibicja tego procesu może pozwolić na kontrolę poziomu funkcjonalnych białek Rab.



Rysunek 1

Kwasy α -fosfonokarboksylowe (**phosphonocarboxylic acid**, PC, fosfonokarboksylany^{*}) stanowią pierwszą opisaną klasę selektywnych inhibitorów RGGT.^{5,6} PC wywodzą się z bisfosfonianów (**bisphosphonates**, BP), znanych inhibitorów syntazy pirofosforanu farnezyli (FPPS), enzymu ścieżki mewalonowej odpowiedzialnego za syntezę pirofosforanów geranyli, GPP, i farnezyli, FPP (Rysunek 2). Podczas badań zależności struktura-aktywność (SAR) okazało się, że zastąpienie w bisfosfonianach jednej grupy fosfonowej grupą karboksylową zmienia również cel enzymatyczny nowej klasy związków i inhibicji ulega enzym RGGT zamiast enzymu FPPS (Rysunek 2).⁵



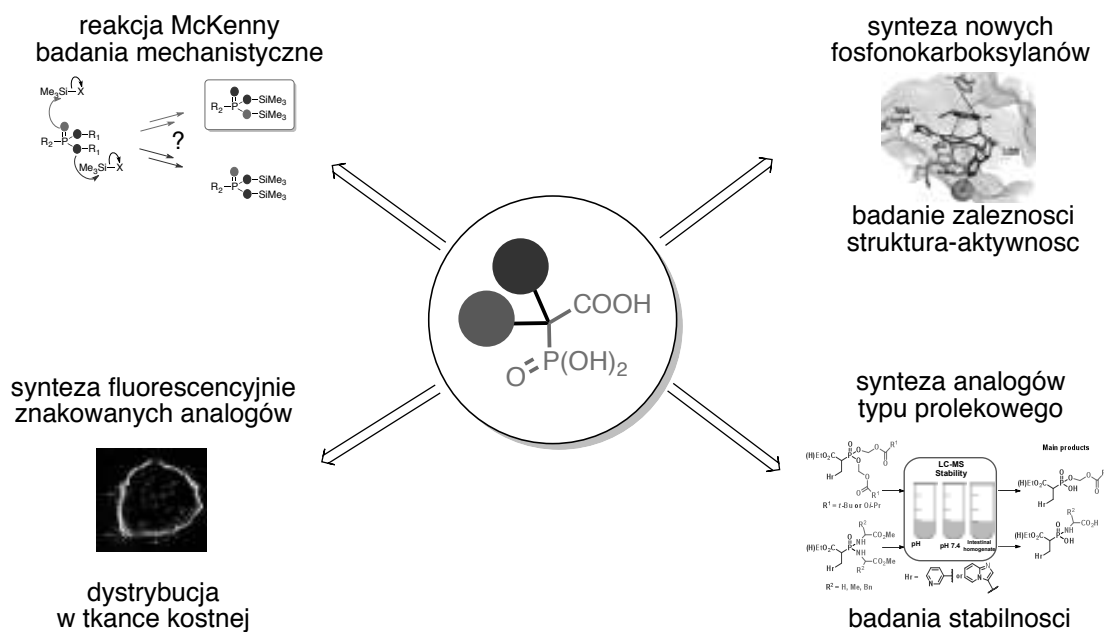
Rysunek 2

^{*} Ze względu na przyjęty w środowisku żargon, badane związki są nazywane zarówno kwasami fosfonokarboksylowymi jak i fosfonokarboksylanami. W autoreferacie używam tych określeń zamiennie.

Jak dotąd próby określenia miejsca oddziaływania PC i RGGT nie powiodły się.^{7,8} Przypuszcza się, że jest ono zlokalizowane w tzw. tunelu TAG (tunnel adjacent to GGPP-binding site),^{9,10} gdzie prawdopodobnie jest przechowywana grupa geranylogeranylowa (GG) przyłączona już do białka Rab, gotowego do drugiej reakcji geranylogeranylowej. Brak aktywności fosfonokarboksylanowych inhibitorów RGGT względem innych transferaz, farnezylowej transferazy (FT) i geranylogeranylowej transferazy 1 (GGT-1) (Rysunek 2), jest prawdopodobnie wynikiem braku tunelu TAG w tych enzymach. Niestety kwestia lokalizacji tej wnęki nadal pozostaje nierozstrzygnięta.^{8,10}

II. CEL I ZAKRES BADAŃ

Celem moich badań było projektowanie i synteza nowych kwasów fosfonokarboksylowych jako potencjalnych inhibitorów RGGT. Związki te stanowią interesujący punkt wyjścia dla projektowania nowych leków jak również mogą służyć jako narzędzie do badania białek Rab i procesów biologicznych, za które są odpowiedzialne. Ponadto jako analogi bisfosfonianów o niższym powinowactwie do minerału kości znalazły zastosowanie w badaniach nad dystrybucją tych leków w organizmie (Rysunek 3).

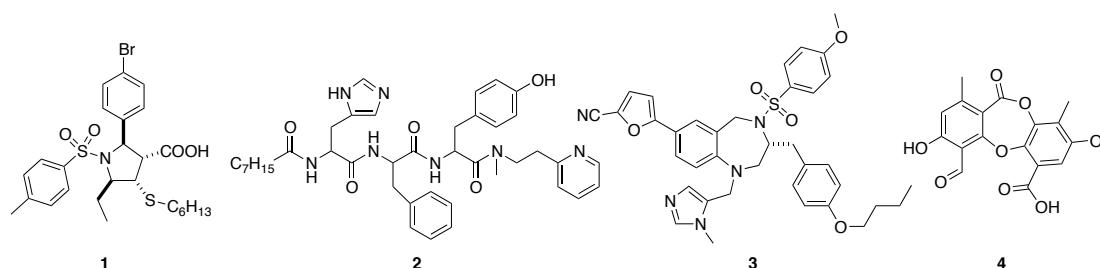


Rysunek 3

W pierwszej części mojej autoprezentacji przedstawiłam syntezę nowych kwasów fosfonokarboksylowych oraz omówiłam wyniki badań zależności struktura – aktywność (SAR) dla tej klasy związków i enzymu RGGT. Następnie przedstawiłam wyniki zastosowania strategii prolekowej (synteza i badania stabilności otrzymanych związków) w celu maskowania jonowego charakteru kwasów fosfonokarboksylowych i poprawy ich bioprzyswajalności. W trzeciej części omówiłam syntezę i zastosowanie fluorescencyjnie znakowanych fosfonokarboksylanów i bisfosfonianów jako narzędzi wykorzystywanych do badania lokalizacji tej klasy leków w kościach. Powyższe zagadnienia są oparte na zorientowanej na cel biologiczny syntezie (target-oriented synthesis). W ostatniej sekcji omówiłam badania nad określeniem mechanizmu reakcji McKenney, dogodnej metody otrzymywania wolnych kwasów fosfonowych, wykorzystanej przeze mnie w syntezie pochodnych prolekowych.

III. PROJEKTOWANIE I SYNTEZA INHIBITORÓW RGGT

Obecnie znanych jest pięć klas inhibitorów RGGT.^{6,10-14} Struktury wybranych inhibitorów przedstawiłam na Rysunku 4. Potencjał tych związków jako terapeutyków nie został jeszcze udokumentowany.

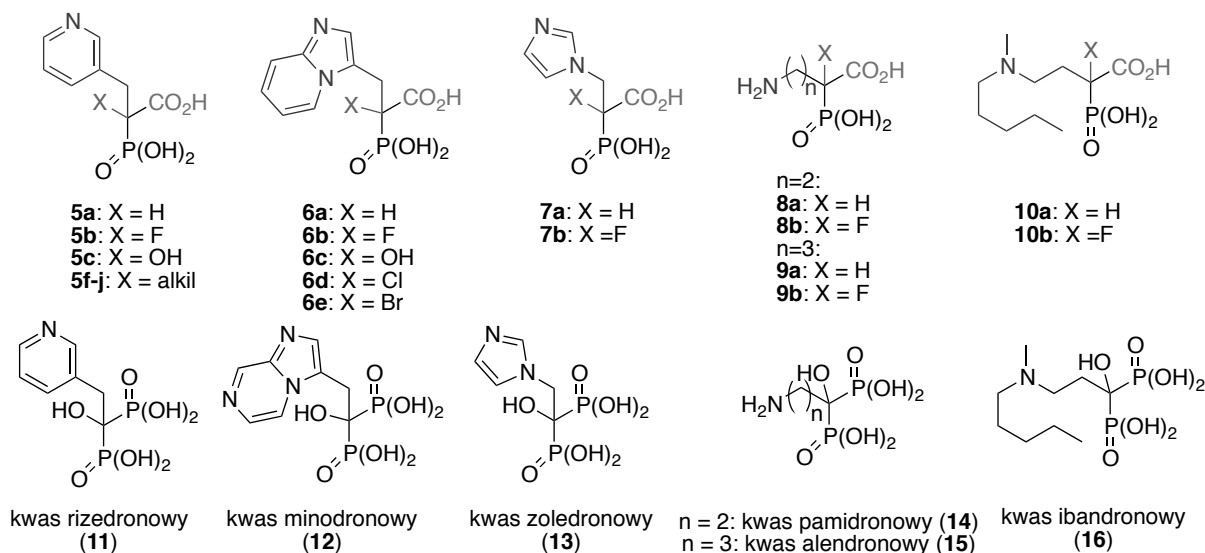


Rysunek 4

Kwasy fosfonokarboksylowe (Rysunek 5, związki **5-10**) stanowią interesującą klasę inhibitorów RGGT między innymi ze względu na wysoką selektywność względem tej transferazy. Jednak nie były one dotychczas tak szczegółowo badane jak pozostałe klasy inhibitorów tego enzymu.

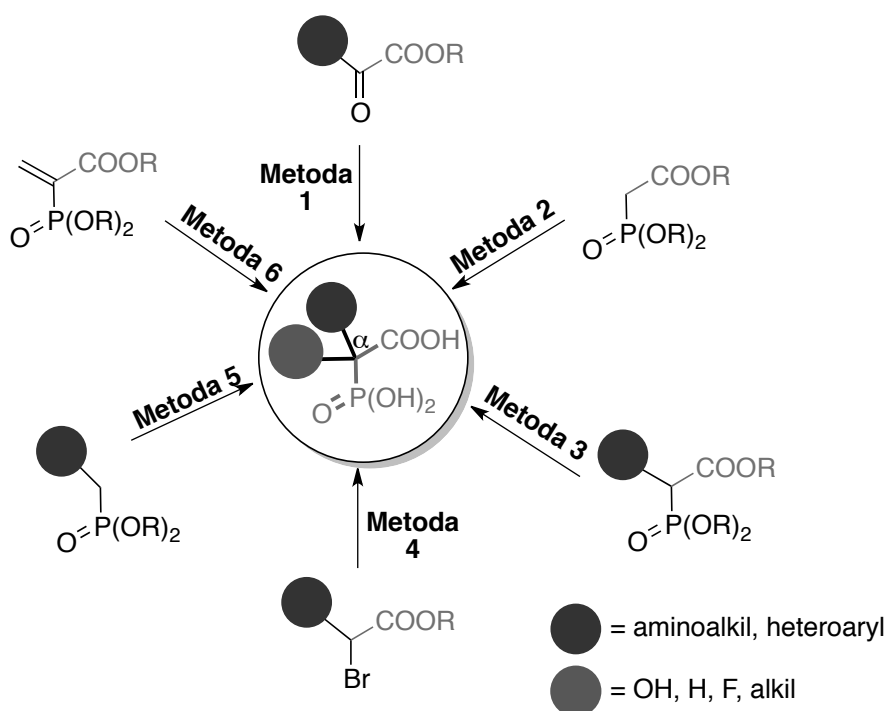
Wszystkie kwasy fosfonokarboksylowe będące przedmiotem tej dysertacji wywodzą się z leków o działaniu antyosteoporotycznym, bisfosfonianów (Rysunek 5, **11-16**), ponieważ pierwszy inhibitor tej klasy, związek **5c**, wywodzi się z kwasu rizedronowego **11**.⁵ Powyższa obserwacja, że prosta zamiana jednej grupy fosfonowej na grupę karboksylową jest

wystarczająca do otrzymania inhibitora RGGT zachęciła mnie do syntezy kolejnych fosfonokarboksyłanowych analogów wywodzących się z bisfosfonianów drugiej i trzeciej generacji (Rysunek 5).^{6,8,15}



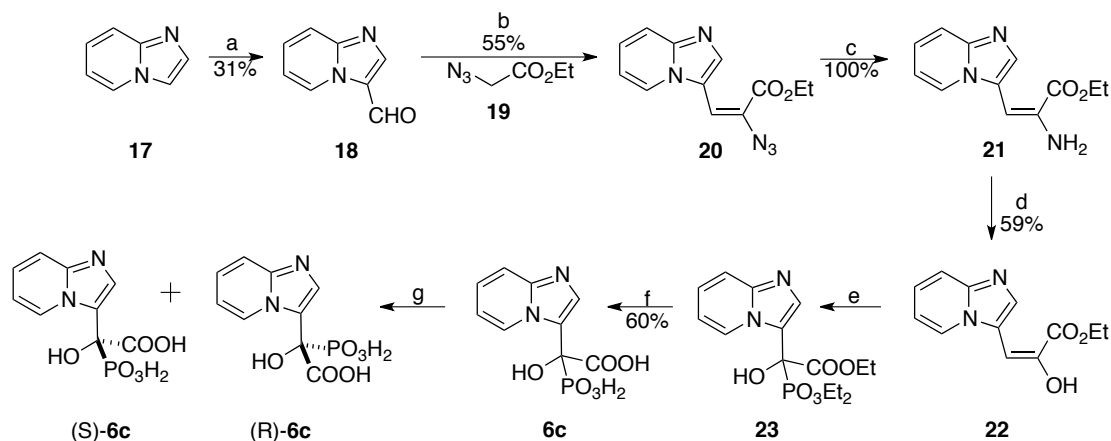
Rysunek 5

W syntezie kwasów fosfonokarboksyłowych **6-10** zastosowano wiele strategii opartych między innymi na tworzeniu wiązania z centralnym atomem C- α (Rysunek 6). Większość związków zsyntezowano stosując indywidualnie opracowane syntezy. Wykorzystano reakcję α -ketoestru z fosfonianem dietylu (Rysunek 6, metoda 1), reakcję alkilowania (metoda 2), reakcję fluorowania (metoda 3), reakcję Arbuzowa (metoda 4), reakcję karboksylowania (metoda 5) oraz reakcję Michaela (metoda 6).



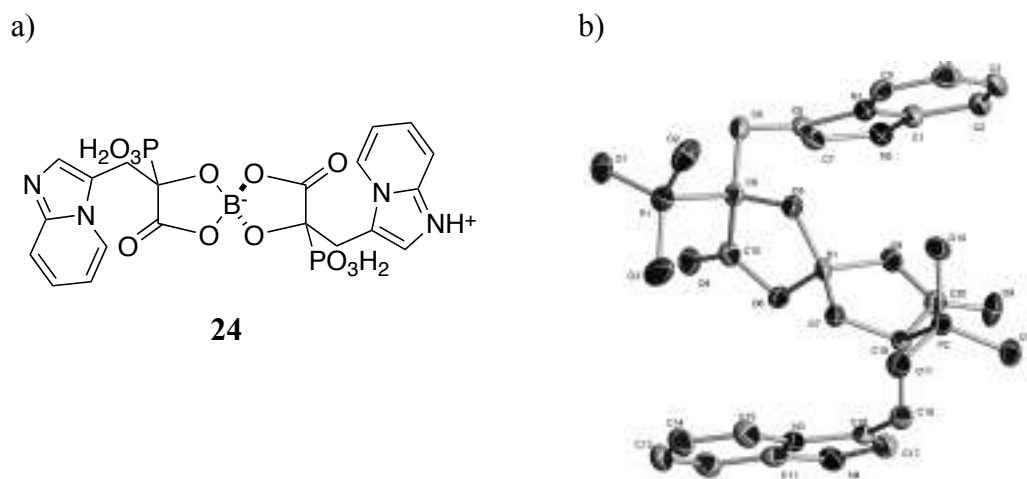
Rysunek 6 Wybrane drogi syntezy kwasów fosfonokarboksylowych

Synteza analogu kwasu minodronowego, związku **6c**, wymagała selektywnego formylowania pierścienia imidazo[1,2-a]pirydyny **17** z wykorzystaniem reakcji Vilsmeiera-Haacka (Schemat 1).^{6,16,17} Otrzymany w ten sposób aldehyd **18** w wyniku reakcji kondensacji z azydooctanem etylu **19** zachodzącej w obecności etanolanu sodu przekształcono w azydek **20**, który następnie poddano wodorolizie. Tak utworzoną enaminę **21** zhydrolizowano 87% kwasem octowym, co pozwoliło otrzymać związek **22**, który w reakcji z fosfonianem dietylu przekształcono w α -hydroksyfosfonian **23**. W celu uniknięcia przegrupowania typu fosfonian-fosforan,^{14,18} które zachodziło ilościowo podczas prób oczyszczania surowego produktu za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym, surowy produkt **29** poddano hydrolizie do wolnego kwasu **6c**. Całkowita wydajność tego sześćoetapowego procesu wynosiła 6%. Kwas **6c** rozdzielono na enancjomery z użyciem chiralnych kolumn jonowymiennych (typu weak anion exchange) opartych na alkaloidach wywodzących się z chininy i chinidyny.¹⁹ Eksperyment przeprowadzony na izolowanym enzymie wykazał, że enancjomer (*S*)-**6c** jest ponad 50x bardziej aktywny niż enancjomer (*R*)-**6c** względem RGGT.⁶ Wyniki badań biologicznych przedstawiono w Tabeli 1 na stronie 16. Konfigurację absolutną enancjomerów przypisano na podstawie badań rentgenograficznych, które wykonał Dr Ralf Haiges (University of Southern California, U.S.A.).⁸



Schemat 1 Warunki i reagenty: (a) POCl_3 , DMF, 2-140 °C; (b) EtONa/EtOH , od -30 °C do t.pok, 4h; (c) $\text{H}_2/\text{Pd-C}$, MeOH , t.pok, 2.5 h; (d) $\text{AcOH/H}_2\text{O}$ (7/1, v/v), 1.5 h, 0 °C; (e) $(\text{EtO})_2\text{P(O)H}$, 70 °C, 21 h; (f) 6 M, HCl , t. Wrz.; (g) rozdział na chiralnych kolumnach AX QN/QD Prontosil.

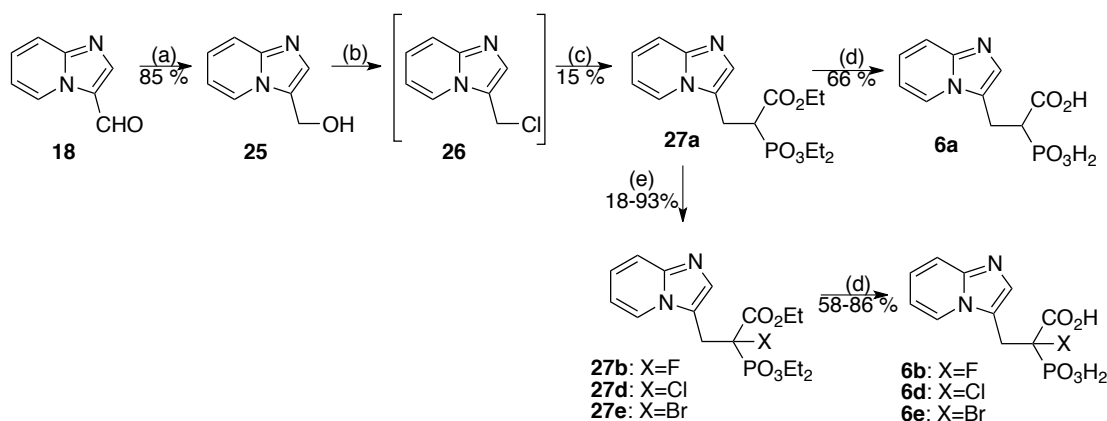
Podczas wyodrębniania enancjomerów odkryto, że związek **6c** w kontakcie ze szkłem borokrzemowym tworzy homochiralne kompleksy z borem, (*S,S*)- oraz (*R,R*)-**24**, z udziałem grupy karboksylowej i hydroksylowej (Rysunek 7).²⁰ Analogiczne zjawisko obserwowano dla związku **5c** (Rysunek 3). Tworzenie takich dimerów jest procesem odwracalnym i zwiększenie $\text{pH} \geq 6.5$, połączone z ogrzewaniem lub przechowywaniem w roztworze wodnym pozwala na przekształcenie dimeru **24** z powrotem w wyjściowy kwas. W celu uniknięcia tworzenia tego typu dimerów zaleca się przechowywanie tych związków w naczyniach polipropylenowych, teflonowych a także borokrzemowych, jednak dopiero po uprzednim potraktowaniu ich 1 M kwasem solnym.²⁰



Rysunek 7 (a) Struktura dimeru **24**. (b) Rysunek ORTEP dimeru (*R,R*)-**24**. (Przedrukowane z *Chem. Commun.* 2011, 46, 4820 za zgodą the Royal Society of Chemistry)

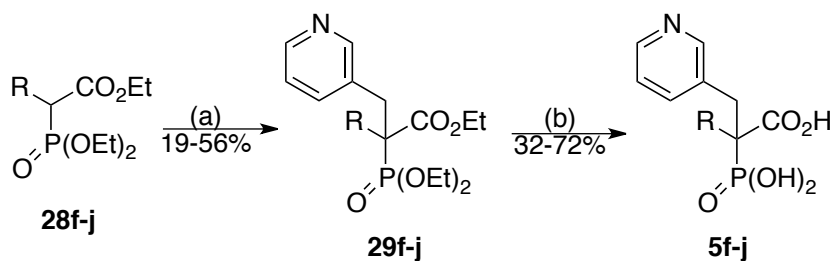
Dalsze badania służyły określeniu w jaki sposób zastąpienie grupy α -hydroksylowej atomem fluorowca, atomem wodoru lub grupę alkilową wpłynie na aktywność tej klasy związków względem RGGT.^{8,15} Halogenek **26** otrzymano z aldehydu **18**, który najpierw przekształcono w alkohol **25** za pomocą NaBH_4 , z którego następnie w reakcji z chlorkiem tionylu otrzymano chlorek **26**. Następnie fosfonooctan trietylu poddano reakcji alkilowania za pomocą halogenku **26**, z użyciem wodoru sodu (Schemat 2).

Otrzymany ester **27a** poddano halogenowaniu odpowiednim odczynnikiem (Schemat 2). Związki **27a-e** przekształcono w wolne kwasy **6a-e** w wyniku hydrolizy wrzącym kwasem solnym.⁸



Schemat 2 Warunki i reagenty: (a) NaBH_4 , MeOH, t. wrz; (b) SOCl_2 , t. wrz; (c) fosfonooctan trietylu, NaH, THF-DMF, 0°C do t.pok; (d) 12 M HCl, t. wrz; (e) Selectfluor lub N-chlorosukcynoimid, lub N-bromosukcynoimid, NaH, THF.

Analogi **5f-j**, w których grupę α -hydroksylową zastąpiono grupą alkilową otrzymano ze związków **28**, które są łatwo dostępne z odpowiednich α -bromoestrów w reakcji Arbuzowa. Związki **28** alkilowano chlorkiem pikolilu w obecności wodoru sodu jako zasady, a otrzymane estry **29** zhydrolizowano wrzącym kwasem solnym (Schemat 3).¹⁵

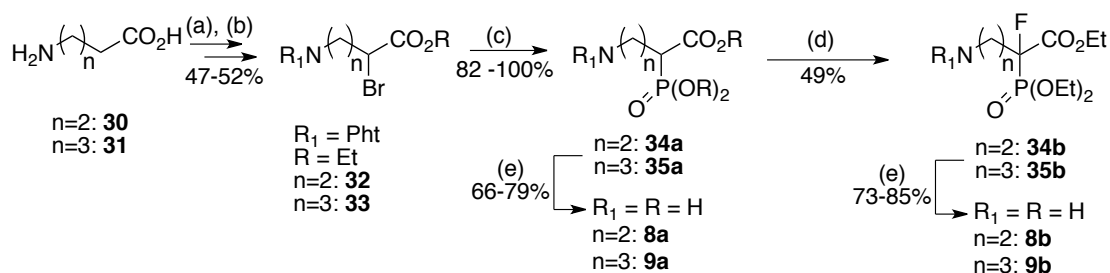


28f-j, 29f-j, 5f-j R = Me, Pr, pentyl, heksyl, oktyl

Schemat 3 Warunki i reagenty: (a) chlorek pikolilu, NaH, DMF/THF; (b) 12 M HCl, t. wrz.

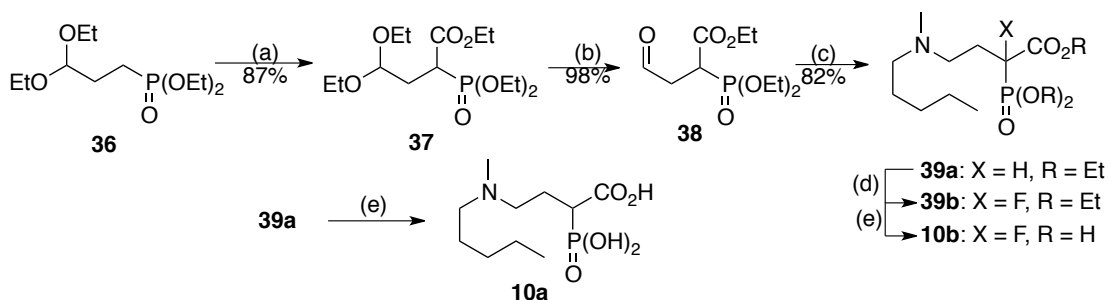
Ponieważ zarówno fosfonokarboksylanowe pochodne kwasu rizedronowego (**5a-c**) jak i minodronowego **6a-e** wykazywały aktywność względem RGGT,^{6,8} postanowiłam zbadać, czy analogi innych bisfosfonianów, kwasu zoledronowego **13**, kwasu pamidronowego **14**, kwasu alendronowego **15** oraz kwasu ibandronowego **16** również są inhibitorami RGGT (Rysunek 3). W celu otrzymania związków **7-10** zaprojektowałam kilka ścieżek syntezy (Rysunek 6).

Pochodne kwasu alendronowego i pamidronowego (schemat 4) otrzymałam z tanich i komercyjnie dostępnych aminokwasów **30/31**, w których w pierwszym etapie grupę aminową zablokowano grupą ftalilową. Otrzymane pochodne poddano reakcji bromowania i estryfikacji, a utworzone α -bromoestry **32/33** przekształcono w trójestry **34a/35a** w reakcji Arbuzowa. Fluorowane analogi **34b/35b** otrzymano w reakcji dezoksy analogów **34a/35a** z Selectfluorem. Wolne kwasy **8** i **9** otrzymano z odpowiednich estrów na drodze kwasowej hydrolizy (Schemat 4).



Schemat 4 Warunki i reagenty: (a) bezwodnik ftalowy, 180 °C, 35 min; (b) SOCl₂, CCl₄, następnie NBS i HBr (aq), t. Wrz., EtOH; (c) P(OEt)₃, 165 °C, 4 h; (d) NaH, Selectfluor, THF, 0 °C do t.pok, 1.25 h; (e) 12 M HCl, t. wrz.

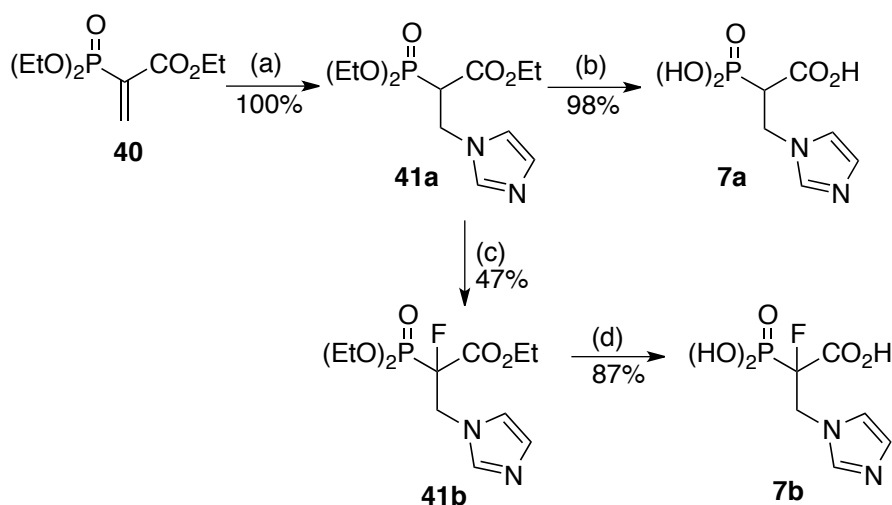
Pochodną kwasu ibandronowego **10**, otrzymano stosując w pierwszym etapie literaturową procedurę wprowadzenia grupy karboestrowej w pozycję C- α fosfonianu **36**, co prowadziło do związku **37** (Schemat 5).²¹ Hydroliza acetalu w zoptymalizowanych przez nas warunkach (80% AcOH, 60 °C, 3h), prowadziła do aldehydu **38**, który poddano reakcji reducyjnego aminowania *N*-metylo-*N*-pentyloaminą w obecności NaBH(OAc)₃. Otrzymany związek **39a** poddano reakcji fluorowania z wykorzystaniem *N*-fluoro-*N*-(fenylosulfonylo)-benzenosulfonamidu (NFSI). Estry **39** zhydrolizowano w standardowych warunkach, otrzymując końcowe produkty **10a-b**.



Schemat 5 Warunki i reagenty: (a) LDA, THF, heksan, -78°C , następnie $(\text{EtO})_2\text{CO}$, t.pok. 20 h; (b) 80% AcOH, 60°C , 3 h; (c) N-metylo-N-pentyloamina, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DCM, 4 h, t. pok; (d) 1.6 M BuLi, NFSI; (e) 12 M HCl, t. wrz.

Analogi kwasu zoledronowego otrzymano w reakcji aza-Michaela imidazolu do łatwo dostępnego akceptora Michaela, związku **40** (Schemat 6). Reakcja zachodziła ilościowo w ciągu kilku minut. Ze względu na odwracalność reakcji, produkt addycji **41a** od razu poddano reakcji hydrolizy do wolnego kwasu **7a** lub reakcji fluorowania, której produkt, związek **41b**, również poddano kwasowej hydrolizie.

Szczegółowy opis metod addycji analogów imidazolu do akceptorów Michaela zebrano i opisano w artykule przeglądowym.²²



Schemat 6 Warunki i reagenty: (a) imidazol, CHCl_3 , t. pok, 10 min; (b) 12 M HCl, wrzenie; (c) NaH, Selectfluor, THF, 0°C do t. pok; (d) 12 M HCl, t. wrz.

IV. BADANIE AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ OTRZYMANYCH ZWIĄZKÓW

Otrzymane związki poddano testom biologicznym (Tabela 1 i 2). Badania te przeprowadzono we współpracy z grupami Prof. Michaela Rogersa i Dr. Fräsera Coxona (University of Aberdeen, U.K.), Prof. Miguela Seabra (Imperial College of London, U.K.), Dr. Franka H. Ebetino (Procter & Gamble Pharmaceuticals, U.S.A. oraz Warner Chilcott Pharmaceuticals, Irlandia), Dr. Jamesa Dunforda (University of Oxford, U.K.) oraz Dr. Daniela Abankwy (University of Turku, Finlandia).

W pierwszym etapie badań biologicznych wykorzystano związki (*S*)-**6c** oraz **5c** (Rysunek 3) jako narzędzia do określenia mechanizmu geranylogeranylation za pomocą RGGT.⁹ Na podstawie wyników tych badań wykazano, że związek (*S*)-**6c** zachowuje się jak mieszany inhibitor względem GGPP oraz jak inhibitor akompetycyjny względem białek Rab. Ponadto, kwasy fosfonokarboksylowe ingerują jedynie w proces drugiej geranylogeranylation białek Rab, co sprawia, że białka, które mają tylko jedną resztę cysteinową przy C-terminalnym końcu (np. Rab 8) nie są wrażliwe na działanie tej klasy inhibitorów. Kwasy fosfonokarboksylowe wiążą się prawdopodobnie z miejscem oddziałującym z łańcuchem geranylogeranylowym przyłączonym już do białka Rab, odpowiedzialnym za prawidłowe ułożenie GG-Rab do drugiej geranylogeranylation.⁹

W badaniach zależności struktura – aktywność (SAR) związki badano pod kątem ich aktywności względem RGGT (testy oznaczone jako A1-A4) oraz ich selektywności, tutaj wyznaczonej jako aktywność względem innych transferaz białek z grupy GTPaz, transferazy farnezylowej (FT) oraz transferazy geranylogeranylowej 1 (GGT-1) (testy oznaczone jako B1-B2).^{6,8,15} Wykorzystano następujące testy:

A1) określenie aktywności związków przez badanie żywotności komórek w modelu komórkowym HeLa lub J744;

A2) określenie stopnia inhibicji prenylation z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał względem nieprenylowanych białek Rab;

A3) określenie aktywności związków w testach *in vitro* przeprowadzonych z wykorzystaniem białek izolowanych (RGGT i REP1) i znaczonego izotopowo substratu [³H] GGPP;

A4) określenie stopnia inhibicji prenylation w nienaruszonej komórce z wykorzystaniem biosensorów FRET w celu obserwacji wpływu inhibitorów na zdolność prawidłowej

lokalizacji białek Rab w błonach komórkowych (Rab5a-NANOPS and Rab21-NANOPS, Rab8a-NANOPS);

B1) określenie selektywności inhibicji prenylacji z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał względem nieprenylowanego białka Rap1A, za którego prenylację odpowiedzialny jest enzym GGT-1;

B2) określenie stopnia inhibicji prenylacji w nienaruszonej komórce z wykorzystaniem biosensorów FRET w celu obserwacji wpływu inhibitorów na zdolność prawidłowej lokalizacji białek Ras w błonach komórkowych (Ras-NANOPS). Za prenylację białek Ras odpowiedzialny jest enzym FT.

Badania przeprowadzone dla pierwszej grupy fosfonokarboksylianów, w których grupę hydroksylową w pozycji C- α zastąpiono atomem halogenu lub wodoru wykazały, że zmiana ta nie miała znaczącego wpływu na aktywność fosfonokarboksylianów względem RGGT. (Tabela 1, L.p. 1-7). Analog fluorowany **6b** wykazywał najbardziej zbliżoną aktywność do wyjściowego związku **6c**, względem RGGT. W przypadku wprowadzenia atomu wodoru, najmniejszego, niepolarnego podstawnika, nadal obserwowano aktywność względem RGGT, choć w przypadku badań przeprowadzonych na izolowanym enzymie była ona niższa w porównaniu z pozostałymi związkami (Tabela 1, L.p. 1).⁸ Podobny trend obserwowano dla analogów kwasu rizedronowego.²³

W przypadku analogów modyfikowanych grupą alkilową w pozycji C- α , otrzymane związki **5f-j** nie wykazywały aktywności względem enzymu RGGT (Tabela 1).¹⁵ Jedynie związek modyfikowany łańcuchem oktylowym, **5j**, wykazywał słabą aktywność względem enzymu ścieżki mewalonowej, syntazy pirofosforanu geranylogeranylu (GGPPS, Rysunek 2). Związek ten był modyfikowany najdłuższym łańcuchem alkilowym, wśród badanych analogów **5f-j**, przypominającym substrat enzymu GGPPS.^{24,25}

Podsumowując tę część badań SAR grupa α -hydroksylowa w kwasach fosfonokarboksylowych może być bez szkody dla aktywności zastąpiona atomem fluoru (Tabela 1, L.p. 2), co ułatwia syntezę nowych analogów i zapobiega możliwości tworzenia się dimeru typu **24**.

Tabela 1 Określenie wpływu wymiany grupy hydroksylowej na aktywność kwasów fosfonokarboksylowych względem RGGT

L.p.	Związek	X	Żywotność komórek J744 (IC ₅₀ /μM)	Inhibicja prenylacji Rab11 (LED/μM)	Inhibicja RGGT (IC ₅₀ /μM)
1	6a	H	>600	12	13.36
2	6b	F	60	6	6.11
3	(±)- 6c	OH	47	3	12.5
4	(S)- 6c	OH	31	3	1.1
5	(R)- 6c	OH	>800	50	67.7
6	6d	Cl	40	12	7.50
7	5e	Br	<400	25	5.56
8	5f-2i	R ^a	n.d.	>1000	n.d.
9	5j	Oktyl ^b	n.d.	500	n.d.

^a R = Me, Pr, pentyl, heksyl

^b słaba aktywność względem GGPPS

Kolejną grupę nowych kwasów fosfonokarboksylowych stanowiły analogi, w których zamieniono drugi podstawnik na węglu C-α. Tak jak poprzednio,^{5,6} analogi trzeciej generacji bisfosfonianu, kwasu zoledronowego, związki **7a-b** wykazały aktywność względem RGGT, przy czym pochodna fluorowana **7b** okazała się bardziej aktywna od pochodnej **7a** (Tabela 2). Taki sam trend obserwowano we wcześniejszych badaniach, dla pochodnych kwasu minodronowego **6a-b** (Tabela 1). Związki **7** nie były aktywne względem innych transferaz, FT i GGT-1 (brak aktywności w testach z wykorzystaniem Ras NANOPS i przeciwciał Rap1a). Analogi bisfosfonianów drugiej generacji **8-10** nie wykazywały aktywności względem RGGT w przeprowadzonych testach.

Tabela 2 Wpływ wybranych kwasów fosfonokarboksylowych na przeżywalność komórek HeLa, prenylację Rab11 Rap1a oraz odpowiedź sensorów FRET-NANOPS

L.p.	Związek	Żywotność komórek HeLa (IC ₅₀ /μM)	Inhibicja prenylacji Rab11 (LED/μM)	Inhibicja prenylacji Rap1A (LED/μM)	FRET-NANOPS			
					Rab5a (IC ₅₀ /μM)	Rab21 (IC ₅₀ /μM)	Rab8a (IC ₅₀ /μM)	Ras (IC ₅₀ /μM)
1	10a	n.e.	1000	1000	n.e. ^b	n.e. ^b	n.e. ^b	n.e. ^b
2	5c	>2000	250	n.e.	630 ± 300	1060 ± 500	n.e. ^b	n.e. ^b
3	5j	n.e.	500	500	360 ± 60	980 ± 180	n.e. ^b	n.e. ^b
4	7a	650	25	n.e.	360 ± 40	253 ± 45	n.e. ^b	n.e. ^b
5	7b	850	10	n.e.	40 ± 3	72 ± 1	n.e. ^b	n.e. ^b
6	6c	500	25	400 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a LED inhibicji prenylacji Rap1A w komórkach J774;⁶

^b brak efektu dla stężeń 500 i 1000 mM;

n.e. = brak efektu; n.d. = nie oznaczono; LED = najniższa efektywna dawka w inhibicji prenylacji.

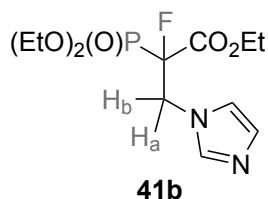
Otrzymane inhibitory będą w przyszłości wykorzystane jako narzędzia do badania procesów, w które są zaangażowane białka Rab, w ramach współpracy z Prof. Kimberly

Beaumont (Centenary Institute of Cancer Medicine and Cell Biology, Australia), Dr. Arie Horowitzem (Thomas Jefferson University, U.S.A.), Prof. Michaelem Rogersem (obecnie: Garvan Institute of Chemical Research, Australia).

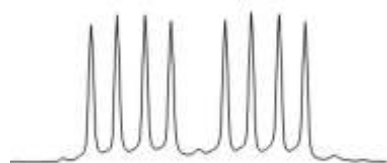
V. BADANIA FOSFONOKARBOKSYLANÓW Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI NMR: BADANIA KONFORMACYJNE I OKREŚLANIE CZYSTOŚCI ENANCJOMERYCZNEJ

Wybrane α -fluoropochodne, związki **41b** oraz **42**, poddano dodatkowej analizie NMR. W literaturze widmo ^{19}F NMR dla analogicznych związków jest opisywane jako widmo pierwszego rzędu, natomiast w badanym przez nas związkach obserwowaliśmy widmo wyższego rzędu,²⁶ w którym atom ^{19}F stanowił część układu spinowego ABMX (Rysunek 8a). W celu określenia stałych sprzężenia i przesunięć chemicznych tego układu zastosowano obok analizy NMR iteracyjne obliczenia z wykorzystaniem oprogramowania TOPSPIN/DAISY.²⁷

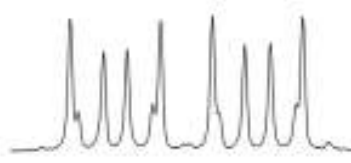
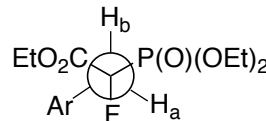
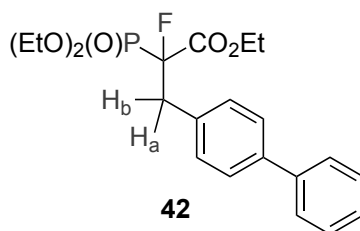
a)



^{19}F NMR (235.31 MHz)



b)



Rysunek 8

Umożliwiło to analizę konformacyjną badanych związków. Zróżnicowanie wartości stałych sprzężenia pozwoliły stwierdzić, że w roztworze CDCl_3 preferowana jest konformacja antyperiplanarna (Rysunek 8b).

Ponieważ chiralność ma znaczący wpływ na inhibicję RGGT,⁶ opracowałam metodę określenia czystości enancjomerycznej tej klasy związków z użyciem cyklodekstryn (CD) jako chiralnych odczynników solwatujących.⁸ Cyklodekstryny były wcześniej wykorzystywane do określenia czystości enancjomerycznej kwasów aminofosfonowych i

aminofosfinowych za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR.²⁸ Dla kwasu **5c** zawierającego mniejszy pierścień pirydylowy, wykorzystano α -cyklodekstrynę, natomiast w przypadku analogów **6**, zawierających w swej strukturze większy pierścień imidazo[1,2-a]pirydylowy, dopiero użycie β -cyklodekstryny gwarantowało separację sygnałów w widmie ^{31}P NMR w większości badanych przypadków (Tabela 3).

Tabela 3 Różnice przesunięć chemicznych w widmie ^{31}P NMR zarejestrowanych dla mieszanin racemicznych fosfonokarboksylanów w obecności α i β -cyklodekstryn

L.p.	Związek	α -CD, ^{31}P NMR $\delta\Delta$ (ppm)	β -CD, ^{31}P NMR $\delta\Delta$ (ppm)
1	5c	0.13	0.061 ^a
2	6c	0.062	0.13
3	6a	0.045	0.03 ^a
4	6b	n.d.	0.082 ^b
5	6d	0.081	0.379
6	6e	0.055 ^a	0.666

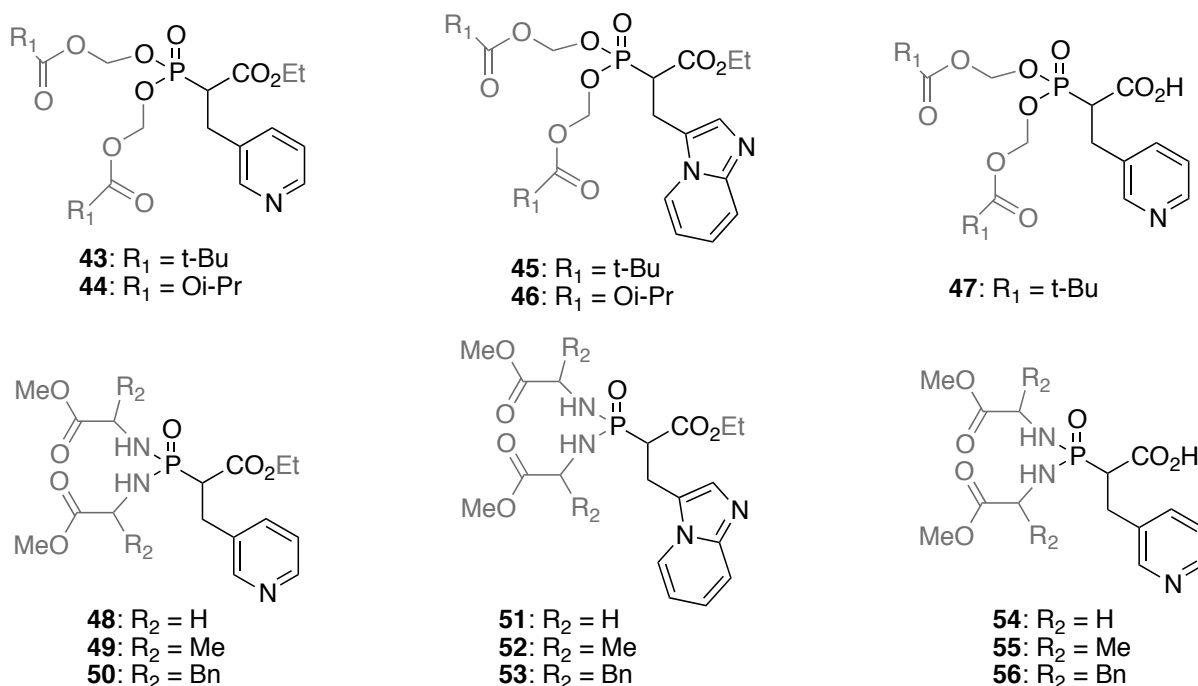
^a brak pełnej separacji sygnałów, tj. do poziomu linii podstawowej;

^b dodatkowe sprzężenie z atomem ^{19}F powoduje, że sygnały nie są w pełni rozdzielone. Dlatego w tym przypadku zalecane jest użycie widma ^{19}F NMR jako alternatywnej drogi określenia ee ($\delta\Delta$ 0.1 ppm w widmie ^{19}F NMR).

VI. ZASTOSOWANIE STRATEGII PROLEKOWEJ DLA KWASÓW FOSFONOKARBOKSYLOWYCH

Kwasy fosfonokarboksylowe charakteryzują się obecnością dwóch jonowych grup w swojej strukturze, które z jednej strony ułatwiają ich rozpuszczalność w środowisku wodnym w fizjologicznym pH, ale z drugiej strony mogą ujemnie wpływać na ich efektywny transport przez błony komórkowe. W celu zniwelowania tego drugiego efektu, wybrane analogi poddano modyfikacjom strukturalnym, stosując strategię prolekową.²⁹

Wykorzystano dwa rodzaje grup maskujących grupę fosfonową: bis(acyloksyalkilowy) ester lub diamid kwasu fosfonowego otrzymany z odpowiednich aminokwasów (Rysunek 5). W przedstawionej strategii grupę karboksylową pozostawiono w wolnej lub zestryfikowanej formie.

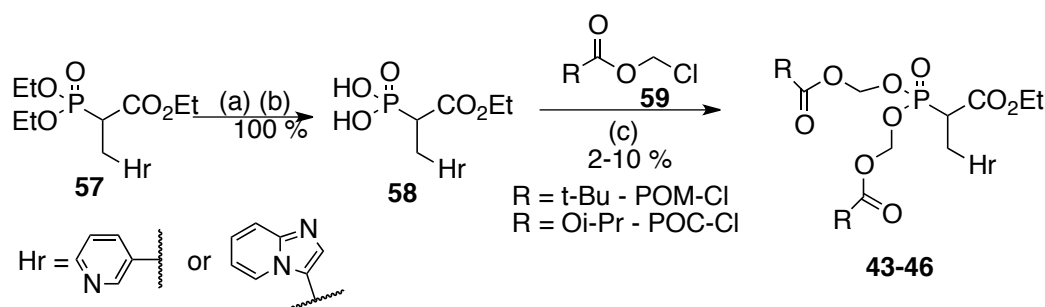


Rysunek 5 Fosfonokarboksylany zmodyfikowane resztą prolekową. (Przedrukowano z *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6844 za zgodą the Royal Society of Chemistry)

W przypadku modyfikacji estrowej dobór grup maskujących był podyktowany tym, że proleki modyfikowane grupą acyloksyalkilową zostały już dopuszczone na rynek farmaceutyczny. W przypadku bisamidów korzystnym jest uwalnianie cząsteczki naturalnie występujących aminokwasów w procesie przekształcania proleku do aktywnej cząsteczki. Dodatkowo użycie aminokwasów pozwala modulować cechy proleku przez dostępność szeregu naturalnych aminokwasów i aminoestrów oraz możliwość użycia różnych grup estrowych.

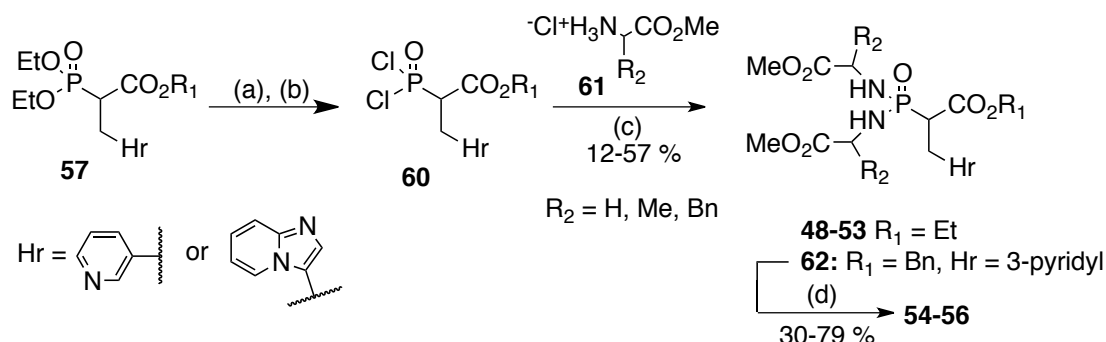
Estry acyloksyalkilowe **43-46** otrzymano ze związku **57** na drodze dwuetapowej syntezy (Schemat 7).²⁹ Reakcji McKenny poddano grupę estrową kwasu fosfonowego.³⁰ Tak otrzymane wolne kwasy fosfonowe **58** przekształcono w reakcji z chlorkiem piwaloksymetylowym (POM-Cl) lub chlorkiem izopropylloksykarbonylometylowym (POC-Cl)³¹ w związki końcowe **43-46**. Pomimo wielu prób optymalizacji tej procedury, docelowe związki **43-46** otrzymano z wydajnościami nieprzekraczającymi 10%. Są to typowe wydajności otrzymywane w syntezie tego rodzaju estrów.³²

Analog **47**, z wolną grupą karboksylową otrzymano z odpowiedniego estru benzyłowego, stosując warunki opracowane dla analogów **43-46** (Schemat 7). Grupę benzyłową usunięto w warunkach wodorolitycznych.



Schemat 7 Warunki i reagenty: (a) BTMS (6 eq), t. pok, 4h; (b) EtOH, H₂O, t. pok., 3h; (c) TEA (3 eq), DMF, 80°C, 30 min. (Przedrukowano z Org. Biomol. Chem. **2015**, 13, 6844 za zgodą the Royal Society of Chemistry)

Diamidy otrzymano ze związku **57**,²⁹ który najpierw poddano reakcji z bromotrimetylosilanem, a tak otrzymany ester bis(trimetylosililowy) kwasu fosfonowego przekształcono w odpowiedni chlorek **60** w reakcji z chlorkiem oksalilu (Schemat 8).³³ Następnie chlorki **60** poddano reakcji sprzęgania z chlorowodorkami estrów metylowych odpowiednich aminokwasów w obecności TEA.³⁴ Związki otrzymano z umiarkowanymi (12-57%), choć typowymi dla tego typu przemian wydajnościami,³² pomimo wielu prób optymalizacji.



Schemat 8. Warunki i reagenty: (a) BTMS; (b) (COCl)₂, DMF, DCM; (c) **61**, TEA, DCM; (d) H₂, Pd/C, MeOH. (Przedrukowano z Org. Biomol. Chem. **2015**, 13, 6844 za zgodą the Royal Society of Chemistry)

W przypadku analogów z wolną grupą karboksylową (**54-56**), jako związek wyjściowy został wykorzystany benzyłowy ester **57** (R₁=Bn). Związek ten przekształcono w diamid stosując warunki uprzednio zoptymalizowane (Schemat 8). Grupę benzyłową ze związku **62** usunięto wodorolitycznie. Metoda jest ograniczona do analogów pirydylowych ze względu na podatność pierścienia imidazo[1,2-a]pirydyny na uleganie częściowej redukcji w zastosowanych warunkach.³⁵

Stabilność chemiczną i enzymatyczną czternastu nowych analogów (Rysunek 10) zbadano w buforach o fizjologicznym pH (pH 6.5 i 7.4) oraz w homogenacie otrzymanym ze szczurzych jelit (pH 6.5), wyznaczając czasy połówkowe reakcji zaniku substratu oraz produkty rozpadu przy użyciu techniki LC MS.²⁹ Badania w buforach wykonano we

współpracy z mgr. inż. Łukaszem Piotrowskim (Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej), natomiast badania w szczurzym homogenacie jelitowym przeprowadzono we współpracy z Prof. Januszem Boratyńskim oraz Dr. Jarosławem Ciekotem (*Neo-Lek*, Polska Akademia Nauk, Wrocław).

Wszystkie związki **43-56** wykazywały korzystną stabilność w buforach o fizjologicznym pH ($t_{1/2}$ powyżej 18 h, Tabela 4), podczas gdy pod działaniem homogenatu jelitowego stabilność była bardzo zróżnicowana, a czasy połowkowe ($t_{1/2}$) reakcji zaniku substratu oscylowały pomiędzy 5 minutami a 150 godzinami (Tabela 4).

Tabela 4 Stabilność związków **43-56** w buforach i homogenacie jelitowym

Związek	$t_{1/2}$ (h) ^a		
	Bufor		Homogenat jelitowy ^b
	pH 6.5	pH 7.4	pH 6.5
43	st (68)	st (59)	<20
44	st	st (69)	30
45	21 (44)	18.5 (40)	<20
46	st (67)	st (53)	20
47	st	st	110
48	st	21 (45)	st (78)
49	st	st	24.5 h (49)
50	st	st	70
51	st	18 (40)	st (76)
52	st	st	18 h (37)
53	st	st	62
54	st	st (73)	st (88)
55	st	st	st (90)
56	st	st	24.6 h (49)

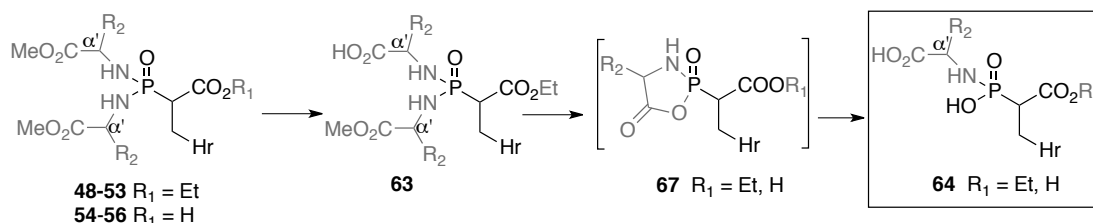
^a wyrażone jako $t_{1/2}$ dla związków o $t_{1/2}$ poniżej 24 h lub jako “st” (stabilny); w nawiasach podano zawartość procentową związku wyjściowego **43-56** po 24 h inkubacji, jeśli wartość ta jest niższa niż 80%;

^b podano w minutach, chyba że zaznaczono inaczej.

Przeprowadzone badania wskazują, że bisamidy posiadające wolną grupę karboksylową **54-56** są bardziej stabilne niż ich analogi estrowe **48-53**. Różnica stabilności jest mniej widoczna dla analogów acyloksyalkilowych **43-47** podczas inkubacji w homogenacie.

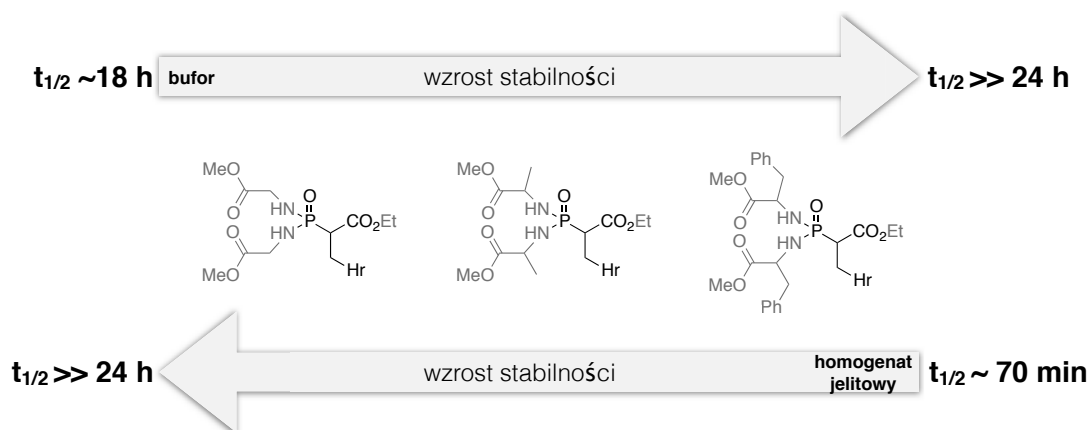
Proponowaną ścieżkę rozpadu analogu typu prolekowego przedstawiłam na przykładzie rozpadu fosfonodiamidów (schemat 9). Opierając się na wcześniejszych badaniach nad fosforodiamidami,³⁶ zaproponowano, że pierwszym etapem uwalniania związku aktywnego jest rozszczepienie wiązania estrowego w jednej z reszt aminokwasowych, z utworzeniem

związku **63**. Następnie następuje wewnątrzcząsteczkowy atak anionu karboksylanowego związku **63** na atom fosforu z utworzeniem produktu przejściowego **67**, który prawdopodobnie ulega spontanicznej hydrolizie do monoamidu **64** (schemat 9), będącego głównym produktem rozpadu.



Schemat 9

Badania wykazały, że na stabilność proleków **48-56** ma między innymi wpływ podstawnik R_2 znajdujący się na atomie C- α' w reszcie aminokwasowej (Rysunek 11). W homogenacie jelitowym analogi fenyloalaniny wykazywały największą podatność na hydrolizę estru metylowego reszty aminokwasowej, a określone czasy półtrwania były podobne jak dla pochodnych acyloksyalkilowych (Rysunek 11, Tabela 4). Natomiast pochodne alaniny i glicyny wykazywały kilkukrotnie dłuższe czasy półtrwania. Zjawisko to było wcześniej obserwowane i jest prawdopodobnie wynikiem większej podatności grupy estrowej fenyloalaniny na działanie esteraz (np. katepsyny A).³⁷



Rysunek 11

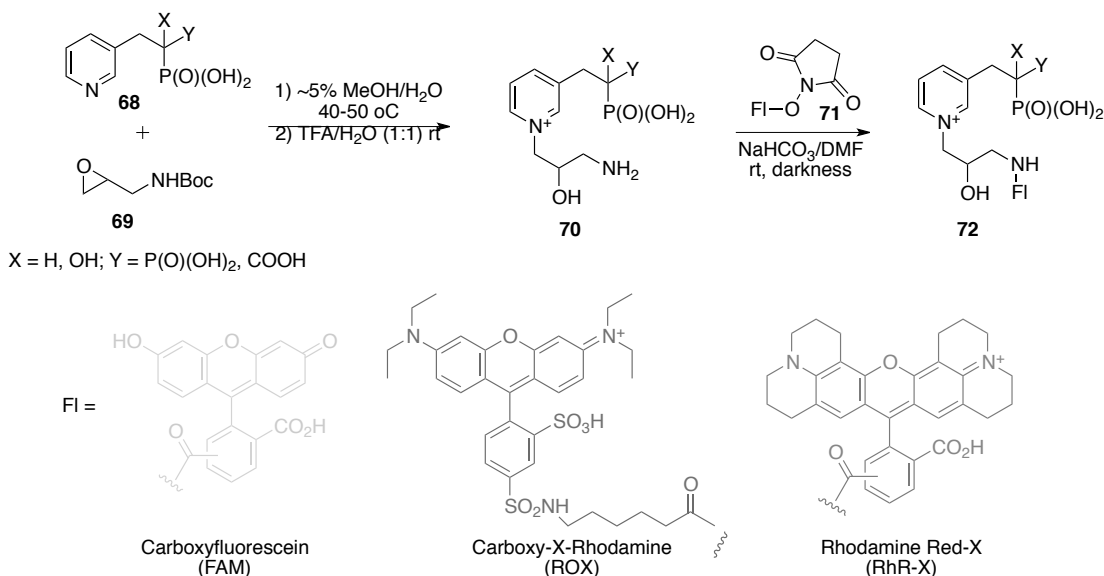
Podsumowując, w zastosowanych modelach wykorzystanych do badania stabilności chemicznej i enzymatycznej otrzymanych pochodnych **43-56** praktycznie nie obserwowano tworzenia aktywnych związków (np. śladowe ilości po 60 h inkubacji w buforach o neutralnym pH). Badania przeprowadzone w homogenacie jelitowym pokazywały rozpad

jednego wiązania estrowego dla analogów acyloksylakilowych lub jednego wiązania P-N w przypadku analogów diamidowych. Grupa karboestrowa reszty fosfonokarboksylianowej nie ulegała rozpadowi. Nie można wykluczyć, że tworzenie aktywnych związków, **5a** lub **6a**, mogłoby zachodzić w innych komórkach czy tkankach, pod działaniem innych enzymów, np. fosforoamidaz.^{37,38}

VII. KWASY FOSFONOKARBOKSYLOWE I BISFOSFONOWE ZNAKOWANE FLUORESCENCYJNIE

Bisfosfoniany są popularnymi lekami antyresorpcyjnymi, wiążącymi się z jonami wapnia. Leki te różnią się między sobą powinowactwem do minerału kości, hydroksyapatytu. W celu określenia, czy powinowactwo do hydroksyapatytu ma wpływ na dystrybucję bisfosfonianów na powierzchni kości opracowano metodę syntezy fluorescencyjnie znakowanych bisfosfonianów,³⁹ analogów kwasu rizedronowego **11**, minodronowego **12** i zoledronowego **13** połączonych w różnych kombinacjach z sześcioma barwnikami fluorescencyjnymi o różnej charakterystyce spektralnej. Mój udział w tych badaniach obejmował syntezę wybranych analogów wywodzących się z kwasu rizedronowego **11**, związku **5c** oraz pochodnej **68** (X=H, Y=P(O)(OH)₂), na schemacie 10 wspólnie określanych symbolem **68**, połączonych z trzema barwnikami fluorescencyjnymi, karboksyfluoresceiną, karboksy-X-rodaminą oraz rodaminą Red-X (Schemat 10). Dlatego w autoreferacie ograniczę się do opisu tego fragmentu badań syntetycznych.

Zastosowałam opisaną wcześniej strategię modyfikacji wyjściowych związków poprzez reakcję wolnych kwasów **68** z epoksydem **69**,⁴⁰ a następnie deprotekcji grupy aminowej w środowisku TFA. Przemiany te prowadziły do funkcjonalizacji atomu azotu w pierścieniu pirydylowym i utworzenia związku **70**, który dzięki obecności pierwszorzędowej grupy aminowej można było łatwo poddać reakcji z aktywowanym analogiem odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego **71**. Fluorescencyjnie znakowane próbki **72** otrzymano z dobrymi wydajnościami (50-77%) i z wysoką czystością.



Schemat 10

Zróznicowana charakterystyka spektralna zastosowanych barwników przejawiająca się w emisji promieniowania elektromagnetycznego o różnych długościach fali pozwala na jednoczesną detekcję i porównanie powinowactwa badanych związków do różnych tkanek i komórek.

Pośród wielu aplikacji wybrane analogi wykorzystano do badań dystrybucji bisfosfonianów w kościach. Badania te wykazały, że związki charakteryzujące się niższym powinowactwem do hydroksyapatytu dyfundują głębiej w matrycę kości i chętniej rozlokowują się wokół osteocytów. Badania *in vitro* określające wiązanie analogów do zębiny potwierdziły, że to powinowactwo zależy głównie od cech wyjściowego związku, bisfosfonianu lub fosfonokarboksylanu, ale fluorescencyjny barwnik również wpływa na wiązanie do minerału kości, choć w znacznie mniejszym stopniu (np. związki znakowane rodaminą ROX cechowało wyższe powinowactwo do hydroksyapatytu w porównaniu ze związkami znakowanymi karboksyfluoresceiną FAM).

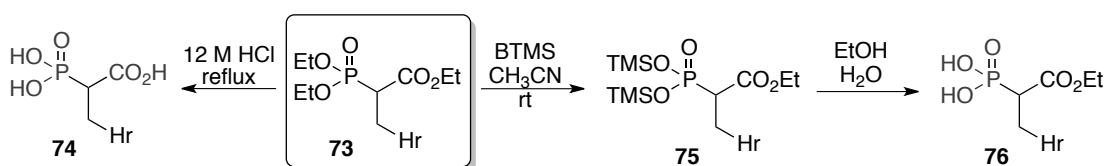
Fluorescencyjnie znakowane analogi **72** wiązały się z powierzchnią kości, ale wykazywały minimalną retencję w niezmineralizowanych tkankach, np. nerek, wątroby czy dwunastnicy.⁴¹

Obserwowane różnice w powinowactwie do minerału kości mogą wpływać na kliniczny wynik zażywania bisfosfonianów, wpływając na ich internalizację i retencję przez szkielet, rozmieszczenie w kościach jak również prawdopodobnie recykling tych związków. Badania biologiczne zostały wykonane we współpracy z Dr Anke Roelofs, Dr. Fraser Coxonem, Prof. Michael Rogersem (University of Aberdeen, U.K.) Prof. R. G. G. Russellem (University of Oxford, U.K.), Dr. Markiem Lundy (Indiana University, U.S.A.), Dr. Frankiem H Ebetino

(Warner Chilcott, Irlandia oraz BioVinc, U.S.A.)⁴¹⁻⁴³ i nie są przedmiotem przedstawionego tutaj głównego osiągnięcia naukowego.

VIII. REAKCJA MCKENNY

Jednym z głównych etapów syntezy wolnych kwasów fosfonokarboksylowych jest deprotekcja grup estrowych kwasu fosfonowego i grupy karboksylowej. Z punktu widzenia moich badań rozróżniamy dwie sytuacje, całkowitą i selektywną deprotekcję grup estrowych (Schemat 11).



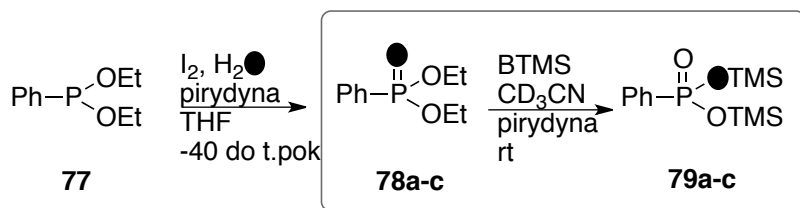
Schemat 11

Jednoczesna deprotekcja wszystkich grup estrowych wymaga drastycznych warunków hydrolizy, np. kilkugodzinnego ogrzewania w stężonym kwasie solnym. To podejście było zastosowane w ostatnim etapie syntezy fosfonokarboksylanowych inhibitorów (Sekcja III). Selektywna dealkilacja wyłącznie grupy fosfonianowej wymaga zastosowania łagodniejszych warunków, wykorzystanych w syntezie analogów typu prolekowego (Sekcja VI).

W reakcji McKenny do dealkilacji niektórych grup estrowych (metylowej, etylowej, izopropylowej, benzyłowej) wykorzystuje się bromotrimetylosilan (BTMS), otrzymując ester trimetylosililowy, który następnie można przekształcić w łagodnych warunkach w wolny kwas fosfonowy, stosując rozpuszczalnik protonowy.

Z uwagi na fakt, że etapu dealkilacji reakcji McKenny nie badano wcześniej, a dane literaturowe nie są spójne,^{30,44} zbadalam mechanizm tej przemiany.⁴⁵

Jako substrat do transformacji grup estrowych w trimetylosililowe zastosowałam znakowany izotopowo fenylofosfonian dietylu **78**. Selektywnego wprowadzenia odpowiedniego izotopu ¹⁸O lub ¹⁷O w fosforylową pozycję P=O fosfonianu dokonałam via utlenienie związku **77** za pomocą izotopowo wzbogaconej wody w obecności jodu (Schemat 12),⁴⁶ otrzymując izotopowo wzbogacone związki **78a-c** z wydajnością 60-88%.



H_2 (>99 atom % ^{16}O): **78a**

H_2 (0.2 atom % ^{17}O , 98.6 atom % ^{18}O , 1.2 atom % ^{16}O): **78b**

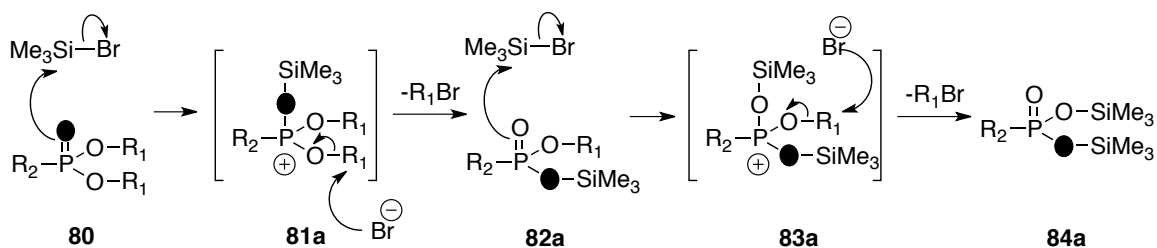
H_2 (20.56 atom % ^{17}O , 15.65 atom % ^{18}O , 63.78 atom % ^{16}O): **78c**

Schemat 1 (Przedrukowane i dostosowane z K. Błażewska *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 408-412 za zgodą American Chemical Society. Copyright 2014 American Chemical Society)

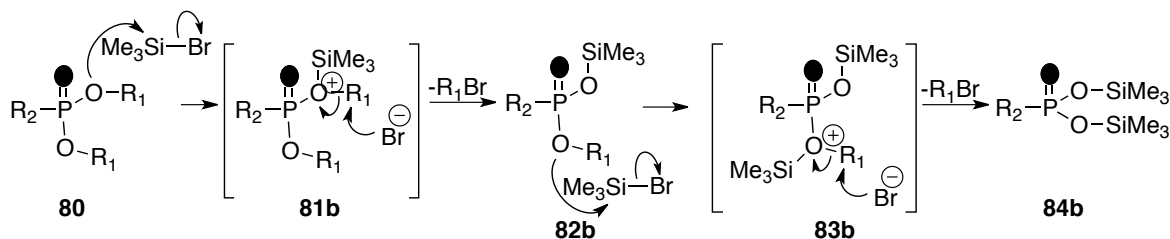
Otrzymane fosfoniany **78** poddano reakcji z BTMS w rurce NMR (Schemat 12). Przebieg reakcji monitorowano za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR, co ułatwiało charakterystyczne przesunięcie sygnału fosforu o około 9 ppm w kierunku wyższego pola przy wymianie każdej grupy etylowej na grupę trimetylosililową.

Izotop tlenu ^{18}O nie wykazuje właściwości magnetycznych i dlatego nie może być bezpośrednio obserwowany techniką NMR. Natomiast jego obecność w wiązaniu P-O wywołuje przesunięcie sygnału ^{31}P w kierunku wyższego pola w widmie NMR.^{47,48} Wielkość takiego przesunięcia zależy między innymi od rzędu wiązania z fosforem.⁴⁹ Rząd wiązania między fosforem a tlenem może być użyty jako próbnik do określenia mechanizmu reakcji. W zależności od tego wg którego mechanizmu przebiega pierwszy etap reakcji McKenny, rząd wiązania P=O ulega zmianie, gdy fosforylowy atom tlenu P=O atakuje atom krzemu w BTMS (mechanizm A, schemat 13) lub pozostaje niezmienny jeśli mostkowy atom tlenu jest odpowiedzialny za atak na atom krzemu (mechanizm B, Schemat 13).

Mechanizm A

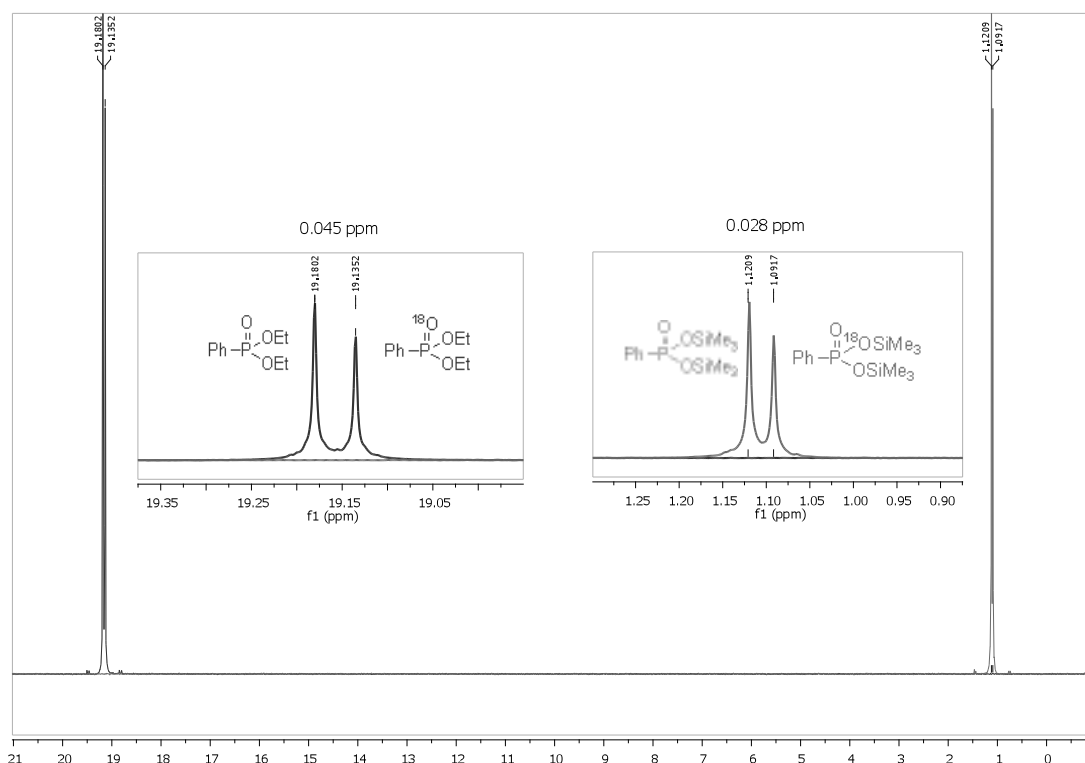


Mechanizm B



Schemat 13 (Przedrukowane z K. Błażewska *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 408-412 za zgodą the American Chemical Society. Copyright 2014 American Chemical Society)

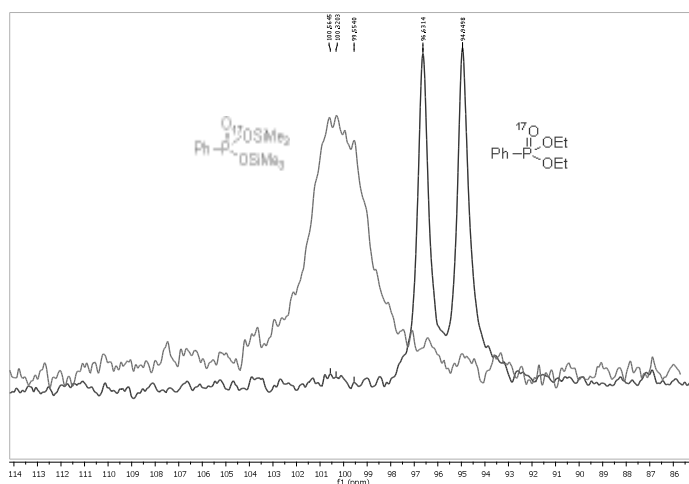
Różnica przesunięć chemicznych między pentawalencyjnym atomem fosforu w $P=^{16}O$ oraz $P=^{18}O$ powinna zawierać się w granicach 0.043 - 0.052 ppm, podczas gdy dla $P-^{16}O-R$ / $P-^{18}O-R$ wartość ta powinna być mniejsza, 0.016 – 0.032 ppm.⁴⁹ Zgodnie z przeprowadzonym eksperymentem różnica pomiędzy przesunięciami chemicznymi w ^{31}P NMR mieszaniny ^{16}O -fosfonianu dietylu **78a** i ^{18}O -fosfonianu dietylu **78c** wynosiła 0.045 ppm (Rysunek 12), co odpowiada wartości dla fosfonianu znakowanego na fosforylowym atomie tlenu, $P=O$.⁴⁹ W wyniku reakcji z BTMS różnica przesunięć maleje do 0.028 ppm (Rysunek 12), co odpowiada wartości dla fosfonianu znakowanego na mostkowym atomie tlenu i wskazuje na tworzenie związku **84a**.



Rysunek 12 Nalożone widma mieszaniny **78a** i **78c** (stosunek molowy 1/0.8; substrat: niebieski, po lewej) oraz **79a** i **79c** (stosunek molowy 1/0.8; produkt: czerwony, po prawej). (Przedrukowane z K. Błażewska *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 408 za zgodą the American Chemical Society. Copyright 2014 American Chemical Society)

Drugi eksperyment polegał na użyciu tlenu ^{17}O ($I = 5/2$) jako próbnika dla studiowania mechanizmu reakcji McKenny i obserwacji zmiany przesunięć chemicznych w widmie ^{17}O NMR.⁴⁹ Spektroskopia ^{17}O NMR związków zawierających wiązanie P-O jest wykorzystywana do badań ich struktury, stereochemii, procesów dynamicznych,^{50,51} dzięki rozróżnieniu terminalnego ($P=O$) i mostkowego ($P-O-R$) tlenu,⁵² na podstawie kształtu sygnału (z reguły wyraźny dublet dla tlenu w grupie $P=O$ vs. szeroki sygnał charakterystyczny dla tlenu mostkowego) lub przesunięcia chemicznego.⁵² W przypadku

fosfonianów zastąpienie grupy alkilowej za pomocą grupy trimetylosililowej przesunęła sygnał terminalnego i mostkowego tlenu w kierunku niższego pola o około $\sim 20\text{--}26$ ppm.⁵² Przesunięcia chemiczne dla fosforylowego tlenu w związku **78b** i mostkowego tlenu w bis(trimetylosililowym) estrze **79b** są prawie takie same.⁵² W przeprowadzonym eksperymencie po dodaniu BTMS do próbki, sygnał tlenu pierwotnie obecnego w $\text{P}=\text{O}$, przesunęła się w kierunku niższego pola o około 4 ppm, a kształt pików zmienia się z wyraźnego dubletu (dla **78b**) w szeroki singlet (dla **79b**) (Rysunek 13), co świadczy o utworzeniu analogu **84a**, a nie **84b**.



Rysunek 13 Nalozone widma ^{17}O NMR mieszaniny **78b** (niebieski) i **79b** (czerwony). (Przedrukowane z K. Błażewska *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 408 za zgodą the American Chemical Society. Copyright 2014 American Chemical Society)

Wyniki obydwu eksperymentów wskazują, że reakcja McKenna w badanych warunkach zachodzi zgodnie z mechanizmem oryginalnie zaproponowanym przez McKennę, w którym fosforylowy atom tlenu atakuje atom krzemu w BTMS, co powoduje zmianę rzędu wiązania z podwójnego obecnego w $\text{P}=\text{O}$ w pojedyncze, obecne w $\text{P}-\text{O}-\text{SiMe}_3$ w związku **84a** (schemat 13, mechanizm A).⁴⁵

IX. PODSUMOWANIE

Główne osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego:

- 1) Synteza nowych kwasów fosfonokarboksylowych jako inhibitorów enzymu RGGT i wykazanie, że analogi, w których geminalna grupa hydroksylowa została zastąpiona atomem fluoru mają podobną aktywność względem RGGT jak związek, z którego się wywodzą.

- 2) Synteza nowych kwasów fosfonokarboksylowych jako inhibitorów RGGT i ustalenie, że tylko analogi wywodzące się z bisfosfonianów trzeciej generacji wykazują aktywność względem badanego enzymu, podczas gdy analogi zawierające łańcuch aminoalkilowy nie są aktywne.
- 3) Synteza pierwszych analogów typu prolekowego wywodzących się z kwasów fosfonokarboksylowych i oznaczenie ich stabilności chemicznej i enzymatycznej. Badania wykazały, że w zastosowanych warunkach związki te nie ulegają transformacji do związku aktywnego.
- 4) Synteza analogów kwasu rizedronowego znakowanych fluorescencyjnymi barwnikami jako związków modelowych do badania dystrybucji bisfosfonianów w kościach i innych tkankach;
- 5) Określenie mechanizmu pierwszego etapu reakcji McKenney i udowodnienie, że w badanych warunkach to tlen fosforylowy jest odpowiedzialny za atak na atom krzemu.

X. PLANY NAUKOWE

Moje plany naukowe koncentrują się na zaprojektowaniu i syntezie pierwszych próbników, wywodzących się z kwasów fosfonokarboksylowych **6** i **7**, służących do badania oddziaływania tych inhibitorów z RGGT. Wyjściowe związki zostaną zmodyfikowane w taki sposób, żeby umożliwić określenie miejsca oddziaływania między tą klasą niekowalencyjnych inhibitorów a enzymem RGGT. Dodatkowo otrzymany próbnik powinien pozwolić na określenie potencjalnych oddziaływań z innymi enzymami. W tym celu inhibitory zostaną zmodyfikowane za pomocą dwóch grup, *fotolabilnej*, która pod wpływem promieniowania UV o określonej długości fali utworzy wiązanie z najbliższą położoną resztą aminokwasową oddziałującej proteiny oraz *bioortogonalnej*, która umożliwi detekcję i izolację białka, do którego próbnik się przyłączy.

Opracowanie takiego próbnika powinno ułatwić dalsze badania typu SAR dla tej najmniej jak dotychczas przebadanej klasy inhibitorów. Otrzymany próbnik może stać się markerem dla detekcji zwiększonego poziomu RGGT, obserwowanego w niektórych stanach patologicznych oraz powinien umożliwić opracowanie bardziej dostępnego i wygodnego sposobu określania aktywności względem RGGT od dotychczas stosowanych. Badania te są obecnie finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach grantu Sonata Bis.

Otrzymane inhibitory i próbniki będą w przyszłości wykorzystane jako narzędzia do badania procesów, w które są zaangażowane białka Rab, w ramach współpracy z Prof. Michaeliem Rogersem (obecnie Garvan Institute of Chemical Research, Australia), Prof. Kimberly Beaumont (Centenary Institute of Cancer Medicine and Cell Biology, Australia), Dr Edytą Gendaszewską-Darmach i Dr Marzeną Krzepkowską-Jędrzejczak (Politechnika Łódzka, Polska) oraz Dr. Arie Horowitzem (Thomas Jefferson University, U.S.A.).

XI. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

W czasie moich studiów magisterskich zajmowałam się opracowaniem metody syntezy ortogonalnie blokowanych *N*-alkilohydroksyloamin.⁵³

Podczas moich studiów doktoranckich opracowałam metodę syntezy 1-amino-2-hydroksyfosfonianów dietylu z łatwo dostępnych izotiocyjanianofosfonianów dietylu.⁵⁴ Izotiocyjanofosfonian dietylu wykorzystałam również do stereoselektywnej syntezy *N*-blokowanych alkenylofosfonianów.⁵⁵

Drugim obszarem moich zainteresowań podczas studiów doktoranckich było zastosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, (*S*)-Ibuprofenu oraz (*S*)-Naproxenu, jako łatwo dostępnych chiralnych odczynników derywatyzujących (CDA) do określania czystości enancjomerycznej⁵⁶ oraz konfiguracji absolutnej⁵⁷ amino- i hydroksyfosfonianów. W ramach programu Erasmus spędziłam 5 miesięcy w grupie Prof. Ricardo Riguera (University of Santiago de Compostela, Spain), zaznajamiając się ze stosowanymi technikami obliczeniowymi i NMR, które uzupełniły moje prace syntetyczne prowadzone w Polsce. Część obliczeniową badań wykonałam we współpracy z Prof. Piotrem Panethem z Politechniki Łódzkiej.

Kolejnym etapem mojej kariery naukowej był trzyletni staż podoktorski, który odbyłam w grupie Prof. Charles McKenny (University of Southern California, U.S.A.). W tym czasie zajmowałam się syntezą analogów typu prolekowego znanego leku przeciwwirusowego, Cidofoviru oraz pochodnych bisfosfonianów. Jednocześnie rozpoczęłam prace nad tematyką będącą przedmiotem składanej habilitacji. Poza wynikami, które zostały zawarte w głównej części tej dysertacji (**H1-H10**), byłam współautorem dwóch innych artykułów opisujących zastosowanie fluorescencyjnie znakowanych związków^{41,42} oraz jednego artykułu pokazującego potencjał użycia kwasu **6c** jako narzędzia do badania wirusa grypy szczepu H1N1.⁵⁸

Po ukończeniu stażu podoktorskiego wróciłam na moją macierzystą uczelnię, Politechnikę Łódzką i rozpoczęłam tworzenie własnej grupy badawczej. Poza badaniami przedstawionymi w głównej części mojej autoprezentacji, zajmowałam się również syntezą α - i β -dialkoksyo-fosforylowanych izotiocyjanianów, związków o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej.⁵⁹

W 2010 roku spędziłam 6 tygodni na stażu w grupie Prof. Andrew Griffithsa (University of Strasbourg, Francja), gdzie szkoliłam się w technikach mikroprzepływowych.

W latach 2013-2014 spędziłam 7 miesięcy w ramach stypendium Fulbrighta w Boston College w grupie Prof. Eranthie Weerapana. Stypendium to umożliwiło mi zapoznanie się z najnowszymi technikami wykorzystywanymi w biologii chemicznej. Kontynuując ten kierunek badań w roku 2015 spędziłam 4 tygodnie w Imperial College of London (jako stypendystka akcji COST CM1004), gdzie badałam aktywność kwasów fosfonokarboksylowych względem RGGT, wykorzystując model opracowany w grupie Prof. Edwarda Tate.

Poza badaniami eksperymentalnymi jestem również współautorką trzech artykułów przeglądowych, w tym jednego rozdziału w *Science of Synthesis* "Product class 16: phosphoric acid and derivatives".⁶⁰ Monografia ta dotyczy metod syntezy analogów kwasu fosforowego. Drugi artykuł przeglądowy w *Tetrahedron Asymmetry* dotyczy określania czystości enancjomerycznej i konfiguracji absolutnej pentawalencyjnych związków fosforoorganicznych wykorzystując NMR.⁶¹ Trzeci z artykułów przeglądowych (zawarty w głównej części mojej autoprezentacji) opisuje addycję Michaela pochodnych imidazolu.²²

XII. LITERATURA

1. Seixas, E.; Barros, M.; Seabra, M. C.; Barral, D. C. Rab and Arf proteins in genetic diseases. *Traffic* **2013**, 14, 871-885.
2. Recchi, C.; Seabra, M. C. Novel functions for Rab GTPases in multiple aspects of tumour progression. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, 40, 1398-1403.
3. Kelly, E. E.; Horgan, C. P.; Goud, B.; McCaffrey, M. W. The Rab family of proteins: 25 years on. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, 40, 1337-1347.
4. Triola, G.; Waldmann, H.; Hedberg, C. Chemical biology of lipidated proteins. *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 87-99.
5. Coxon, F. P.; Helfrich, M. H.; Larijani, B.; Muzylak, M.; Dunford, J. E.; Marshall, D.; McKinnon, A. D.; Nesbitt, S. A.; Horton, M. A.; Seabra, M. C.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J. Identification of a novel phosphonocarboxylate inhibitor of Rab geranylgeranyl transferase that specifically prevents Rab prenylation in osteoclasts and macrophages. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 48213-48222.
6. [H9] McKenna, C. E.; Kashemirov, B. A.; Blazewska, K. M.; Mallard-Favier, I.; Stewart, C. A.; Rojas, J.; Lundy, M. W.; Ebetino, F. H.; Baron, R. A.; Dunford, J. E.; Kirsten, M. L.; Seabra, M. C.; Bala, J. L.; Marma, M. S.; Rogers, M. J.; Coxon, F. P. Synthesis, Chiral High Performance Liquid Chromatographic Resolution and

- Enantiospecific Activity of a Potent New Geranylgeranyl Transferase Inhibitor, 2-Hydroxy-3-imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl-2-phosphonopropionic Acid. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3454-3464.
7. Guo, Z.; Wu, Y.-W.; Das, D.; Delon, C.; Cramer, J.; Yu, S.; Thuns, S.; Lupilova, N.; Waldmann, H.; Brunsvel, L.; Goody, R. S.; Alexandrov, K.; Blankenfeldt, W. Structures of RabGGTase-substrate/product complexes provide insights into the evolution of protein prenylation. *EMBO J.* **2008**, 27, 2444-2456.
8. [H7] Błażewska, K. M.; Ni, F.; Haiges, R.; Kashemirov, B. A.; Coxon, F. P.; Stewart, C. A.; Baron, R.; Rogers, M. J.; Seabra, M. C.; Ebetino, F. H.; McKenna, C. E. Synthesis, stereochemistry and SAR of a series of minodronate analogues as RGGT inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4820-4826.
9. [H10] Baron, R. A.; Tavare, R.; Figueiredo, A. C.; Błażewska, K. M.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E.; Ebetino, F. H.; Taylor, A.; Rogers, M. J.; Coxon, F. P.; Seabra, M. C. Phosphonocarboxylates Inhibit the Second Geranylgeranyl Addition by Rab Geranylgeranyl Transferase. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 6861-6868.
10. Tan, K.-T.; Guiu-Rozas, E.; Bon, R. S.; Guo, Z.; Delon, C.; Wetzel, S.; Arndt, S.; Alexandrov, K.; Waldmann, H.; Goody, R. S.; Wu, Y.-W.; Blankenfeldt, W. Design, Synthesis, and Characterization of Peptide-Based Rab Geranylgeranyl Transferase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 8025-8037.
11. Watanabe, M.; Fiji, H. D. G.; Guo, L.; Chan, L.; Kinderman, S. S.; Slamon, D. J.; Kwon, O.; Tamanoi, F. Inhibitors of Protein Geranylgeranyltransferase I and Rab Geranylgeranyltransferase Identified from a Library of Allenoate-derived Compounds. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 9571-9579.
12. Stigter, E. A.; Guo, Z.; Bon, R. S.; Wu, Y.-W.; Choidas, A.; Wolf, A.; Menninger, S.; Waldmann, H.; Blankenfeldt, W.; Goody, R. S. Development of Selective, Potent RabGGTase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 8330-8340.
13. Deraeve, C.; Guo, Z.; Bon, R. S.; Blankenfeldt, W.; DiLucrezia, R.; Wolf, A.; Menninger, S.; Stigter, E. A.; Wetzel, S.; Choidas, A.; Alexandrov, K.; Waldmann, H.; Goody, R. S.; Wu, Y.-W. Psoromic Acid is a Selective and Covalent Rab-Prenylation Inhibitor Targeting Autoinhibited RabGGTase. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 7384-7391.
14. Zhou, X.; Born, E. J.; Allen, C.; Holstein, S. A.; Wiemer, D. F. N-Oxide derivatives of 3-(3-pyridyl)-2-phosphonopropanoic acids as potential inhibitors of Rab geranylgeranylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2331-2334.
15. [H4] Coxon, F. P.; Joachimiak, L.; Najumudeen, A. K.; Breen, G.; Gmach, J.; Oetken-Lindholm, C.; Way, R.; Dunford, J. E.; Abankwa, D.; Błażewska, K. M. Synthesis and characterization of novel phosphonocarboxylate inhibitors of RGGT. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 84, 77-89.
16. Almirante, L.; Mugnaini, A.; De Toma, N.; Gamba, A.; Murmann, W.; Hidalgo, J. Imidazole derivatives. IV. Synthesis and pharmacologic activity of oxygenated derivatives of imidazo[1,2-a]pyridine. *J. Med. Chem.* **1970**, 13, 1048-51.
17. Gueiffier, A.; Lhassani, M.; Elhakmaoui, A.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Chavignon, O.; Teulade, J.-C.; Kerbal, A.; Essassi, E. M.; et al. Synthesis of Acyclo-C-nucleosides in the Imidazo[1,2-a]-pyridine and Pyrimidine Series as Antiviral Agents. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2856-2859.
18. Pudovik, A. N.; Gur'yanova, I. V.; Banderova, L. V.; Romanov, G. V. Phosphonate-phosphate rearrangement of α -hydroxylalkylphosphinic acids. *Zh. Obshch. Khim.* **1968**, 38, 143-50.
19. Piette, V.; Lammerhofer, M.; Bischoff, K.; Lindner, W. High-performance liquid chromatographic enantioseparation of N-protected α -amino acids using nonporous silica modified by a quinine carbamate as chiral stationary phase. *Chirality* **1997**, 9, 157-161.
20. [H8] Błażewska, K. M.; Haiges, R.; Kashemirov, B. A.; Ebetino, F. H.; McKenna, C. E. A serendipitous phosphonocarboxylate complex of boron: when vessel becomes reagent. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6395-6397.
21. Krawczyk, H.; Wasek, K.; Kedzia, J.; Wojciechowski, J.; Wolf, W. M. A general stereoselective method for the synthesis of cyclopropanecarboxylates. A new version of the homologous Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 308-318.
22. [H1] Gmach, J.; Joachimiak, L.; Błażewska, K. Aza-Michael addition of imidazole analogs. *Synthesis* **2016**, DOI: 10.1055/s-0035-1560451
23. Marma, M. S.; Xia, Z.; Stewart, C.; Coxon, F.; Dunford, J. E.; Baron, R.; Kashemirov, B. A.; Ebetino, F. H.; Triffitt, J. T.; Russell, R. G. G.; McKenna, C. E. Synthesis and Biological Evaluation of α -Halogenated Bisphosphonate and Phosphonocarboxylate Analogues of Risedronate. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 5967-5975.
24. Chen, C. K. M.; Hudock, M. P.; Zhang, Y.; Guo, R.-T.; Cao, R.; No, J. H.; Liang, P.-H.; Ko, T.-P.; Chang, T.-H.; Chang, S.-c.; Song, Y.; Axelson, J.; Kumar, A.; Wang, A. H. J.; Oldfield, E. Inhibition of Geranylgeranyl Diphosphate Synthase by Bisphosphonates: A Crystallographic and Computational Investigation. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5594-5607.
25. Barney, R. J.; Wasko, B. M.; Dudakovic, A.; Hohl, R. J.; Wiemer, D. F. Synthesis and biological evaluation of a series of aromatic bisphosphonates. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 7212-7220.
26. [H5] Gmach, J.; Huben, K.; Błażewska, K. M. α -Fluoro Phosphonocarboxylates: the NMR Analysis of the Heteronuclear ABMX Spin System. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2014**, 189, 1216-1225.

27. Zinin, V.; Il'yasov, A.; Thiele, H.; Hagele, G.; Weber, U. WIN-DAISY: Application to oriented molecules: Analysis and simulation of NEMA-NMR spectra. *Appl. Magn. Reson.* **1995**, *8*, 311-17.
28. Berlicki, L.; Rudzinska, E.; Kafarski, P. Enantiodifferentiation of aminophosphonic and aminophosphinic acids with α - and β -cyclodextrins. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1535-1539.
29. [H3] Joachimiak, L.; Janczewski, L.; Ciekot, J.; Boratynski, J.; Błażewska, K. Applying the prodrug strategy to α -phosphonocarboxylate inhibitors of Rab GGTase - synthesis and stability studies. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6844-6856.
30. McKenna, C. E.; Higa, M. T.; Cheung, N. H.; McKenna, M. C. The facile dealkylation of phosphonic acid dialkyl esters by bromotrimethylsilane. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 155-8.
31. Baudy, R. B.; Butera, J. A.; Abou-Gharbia, M. A.; Chen, H.; Harrison, B.; Jain, U.; Magolda, R.; Sze, J. Y.; Brandt, M. R.; Cummons, T. A.; Kowal, D.; Pangalos, M. N.; Zupan, B.; Hoffmann, M.; May, M.; Mugford, C.; Kennedy, J.; Childers, W. E., Jr. Prodrugs of Perzinfotel with Improved Oral Bioavailability. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 771-778.
32. Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
33. Bhongle, N. N.; Notter, R. H.; Turcotte, J. G. Expedient and high-yield synthesis of alkylphosphonyl dichlorides under mild, neutral conditions: reaction of bis(trimethylsilyl)alkyl phosphonates with oxalyl chloride/dimethylformamide. *Synth. Commun.* **1987**, *17*, 1071-6.
34. Sikora, D.; Nonas, T.; Gajda, T. O-Ethyl 1-azidoalkylphosphonic acids-versatile reagents for the synthesis of protected phosphoramidate peptides. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1619-1625.
35. Misra, A. P.; Raj, K.; Bhaduri, A. P. In search of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives exhibiting resistance for catalytic hydrogenation. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 3227-3236.
36. McGuigan, C.; Bourdin, C.; Derudas, M.; Hamon, N.; Hinsinger, K.; Kandil, S.; Madela, K.; Meneghesso, S.; Pertusati, F.; Serpi, M.; Slusarczyk, M.; Chamberlain, S.; Kolykhalov, A.; Vernachio, J.; Vanpouille, C.; Introini, A.; Margolis, L.; Balzarini, J. Design, synthesis and biological evaluation of phosphorodiamidate prodrugs of antiviral and anticancer nucleosides. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 326-340.
37. Mackman, R. L.; Ray, A. S.; Hui, H. C.; Zhang, L.; Birkus, G.; Boojamra, C. G.; Desai, M. C.; Douglas, J. L.; Gao, Y.; Grant, D.; Laflamme, G.; Lin, K.-Y.; Markevitch, D. Y.; Mishra, R.; McDermott, M.; Pakdaman, R.; Petrakovsky, O. V.; Vela, J. E.; Cihlar, T. Discovery of GS-9131: design, synthesis and optimization of amidate prodrugs of the novel nucleoside phosphonate HIV reverse transcriptase (RT) inhibitor GS-9148. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3606-3617.
38. Mehellou, Y.; Balzarini, J.; McGuigan, C. Aryloxy Phosphoramidate Triesters: a Technology for Delivering Monophosphorylated Nucleosides and Sugars into Cells. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779-1791.
39. [H2] Sun, S.; Błażewska, K. M.; Kadina, A. P.; Kashemirov, B. A.; Duan, X.; Triffitt, J. T.; Dunford, J. E.; Russell, R. G. G.; Ebetino, F. H.; Roelofs, A. J.; Coxon, F. P.; Lundy, M. W.; McKenna, C. E. Fluorescent Bisphosphonate and Carboxyphosphonate Probes: A Versatile Imaging Toolkit for Applications in Bone Biology and Biomedicine. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 329-340.
40. Kashemirov, B. A.; Bala, J. L. F.; Chen, X.; Ebetino, F. H.; Xia, Z.; Russell, R. G. G.; Coxon, F. P.; Roelofs, A. J.; Rogers, M. J.; McKenna, C. E. Fluorescently Labeled Risedronate and Related Analogues: "Magic Linker" Synthesis. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2308-2310.
41. Roelofs, A. J.; Stewart, C. A.; Sun, S.; Błażewska, K. M.; Kashemirov, B. A.; McKenna, C. E.; Russell, R. G. G.; Rogers, M. J.; Lundy, M. W.; Ebetino, F. H.; Coxon, F. P. Influence of bone affinity on the skeletal distribution of fluorescently labeled bisphosphonates in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 835-847.
42. Roelofs, A. J.; Coxon, F. P.; Ebetino, F. H.; Lundy, M. W.; Henneman, Z. J.; Nancollas, G. H.; Sun, S.; Błażewska, K. M.; Bala, J. L. F.; Kashemirov, B. A.; Khalid, A. B.; McKenna, C. E.; Rogers, M. J. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 606-616.
43. Sun, S.; Błażewska, K. M.; Kashemirov, B. A.; Roelofs, A. J.; Coxon, F. P.; Rogers, M. J.; Ebetino, F. H.; McKenna, M. J.; McKenna, C. E. Synthesis and Characterization of Novel Fluorescent Nitrogen-Containing Bisphosphonate Imaging Probes for Bone Active Drugs. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2011**, *186*, 970-971.
44. Conibear, A. C.; Lobb, K. A.; Kaye, P. T. ³¹P NMR kinetic study of the tandem cleavage of phosphonate esters by bromotrimethylsilane. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8446-8449.
45. [H6] Błażewska, K. M. McKenna Reaction-Which Oxygen Attacks Bromotrimethylsilane? *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 408-412.
46. Bentrude, W. G.; Sopchik, A. E.; Gajda, T. Stereo- and regiochemistries of the oxidations of 2-methoxy-5-tert-butyl-1,3,2-dioxaphosphorinanes and the cyclic methyl 3',5'-phosphite of thymidine by water/iodine and oxygen/AIBN to P-chiral phosphates. Oxygen-17 NMR assignment of phosphorus configuration to the diastereomeric thymidine cyclic methyl 3',5'-monophosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3981-7.

47. Coln, M.; Hu, A. Isotopic (oxygen-18) shift in phosphorus-31 nuclear magnetic resonance applied to a study of enzyme-catalyzed phosphate-phosphate exchange and phosphate (oxygen)-water exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 200-3.
48. Love, G.; Sproat, B. S. Oxygen-18 isotope shifts on the phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of adenosine-5'-phosphate and inorganic phosphate. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 565-6.
49. Cullis, P. M. In *Applications of oxygen isotopes and ³¹P NMR spectroscopy in stereochemical and mechanistic studies*, VCH: **1994**; pp 315-32.
50. Geothanassis, I. P. Oxygen-17 NMR spectroscopy: Basic principles and applications (Part I). *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, *56*, 95-197.
51. Sanmons, R. D.; Frey, P. A.; Bruzik, K.; Tsai, M. D. Effects of oxygen-17 and oxygen-18 on phosphorus-31 NMR: further investigation and applications. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5455-61.
52. Daln, H.; Toan, V. V.; Ung Truong, M. N. NMR of terminal oxygen. Oxygen-17 NMR of the phosphorus-oxygen double bond: phosphine oxides, phosphinates, phosphonates, acylphosphonates and related compounds. *Magn. Reson. Chem.* **1992**, *30*, 1089-96.
53. Błażewska, K.; Gajda, T. N-(Diethoxyphosphoryl)-O-benzylhydroxylamine - a convenient substrate for the synthesis of N-substituted O-benzylhydroxylamines. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10249-10254.
54. Błażewska, K.; Sikora, D.; Gajda, T. A concise synthesis of protected diethyl 1-amino-2-hydroxyalkylphosphonates. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4747-4750.
55. Błażewska, K.; Gajda, T. A concise synthesis of diethyl 1-(tert-butoxycarbonylamino)-1-alkenylphosphonates. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11701-11707.
56. Błażewska, K.; Gajda, T. (S)-Naproxen and (S)-Ibuprofen chlorides-convenient chemical derivatizing agents for the determination of the enantiomeric excess of hydroxy and aminophosphonates by ³¹P NMR. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 671-674.
57. Błażewska, K.; Paneth, P.; Gajda, T. The assignment of the absolute configuration of diethyl hydroxy- and aminophosphonates by ¹H and ³¹P NMR using Naproxen as a reliable chiral derivatizing agent. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 878-887.
58. Wird, S. E.; Kim, H. S.; Komurov, K.; Mendiratta, S.; Tsai, P.-L.; Schmolke, M.; Satterly, N.; Manicassamy, B.; Forst, C. V.; Roth, M. G.; Garcia-Sastre, A.; Błażewska, K. M.; McKenna, C. E.; Fontoura, B. M.; White, M. A. Host modulators of H1N1 cytopathogenicity. *PLoS One* **2012**, *7*, e39284.
59. Pszski, M.; Błażewska, K.; Gajda, A.; Gajda, T.; Wietrzyk, J.; Oleksyszyn, J. Synthesis and antiproliferative activity of novel α - and β -dialkoxyposphoryl isothiocyanates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4572-4576.
60. McKenna, C. E.; Kashemirov, B. A.; Błażewska, K. M. Product class 16: phosphoric acid and derivatives. *Science of Synthesis* **2009**, *42*, 779-921.
61. Błażewska, K. M.; Gajda, T. Assignment of the absolute configuration of hydroxy- and aminophosphonates by NMR spectroscopy. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1337-1361.

Katarzyna Błażewska