



WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ
I BIOTECHNOLOGII

mgr inż. Dominika Kozicka

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Związki fosforoorganiczne jako terapeutyki
i znaczniki w diagnostyce medycznej**

Promotor: dr hab. inż. Jakub Adamek, prof. Pol. Śl.

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Kuźnik

Gliwice 2025

*Pragnę serdecznie podziękować Promotorom mojej pracy,
Panu dr. hab. inż. Jakubowi Adamkowi, Prof. Pol. Śl. oraz Pani dr inż. Annie Kuźnik,
za przekazaną wiedzę, poświęcony czas oraz nieocenioną pomoc
na wszystkich etapach realizacji niniejszej pracy.
Dziękuję za przykład rzetelnego i zaangażowanego podejścia do pracy naukowej,
a także za trud włożony w opiekę promotorską.*

*Dziękuję również najbliższym współpracownikom,
Paniom dr inż. Mirosławie Grymel oraz dr inż. Agnieszce Październiok-Holewie,
za owocną współpracę naukową, pomoc w codziennych wyzwaniach
oraz za stworzenie miłej atmosfery pracy.*

*Chciałabym również podziękować wszystkim osobom, z którymi miałam przyjemność
współpracować podczas realizacji badań będących przedmiotem niniejszej pracy:
dr hab. inż. Alicji Kazeł-Kęsik, prof. Pol. Śl., dr Izabelli Ślęzak-Prochazce,
dr Barbarze Łasut-Szysze, mgr. inż. Annie Kastelik-Hryniewieckiej
oraz dr hab. inż. Nikodemowi Kuźnikowi, prof. Pol. Śl.
Szczególne podziękowania składam dr Małgorzacie Krześniak za zaangażowanie
oraz gotowość do dzielenia się wiedzą i doświadczeniem w prowadzeniu badań biologicznych.*

*Na koniec chciałabym podziękować mojej rodzinie i bliskim, za wyrozumiałość,
wsparcie i każde dobre słowo. W sposób szczególny dziękuję mojej Mamie
za Jej obecność, troskę i nieustanną wiarę we mnie.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ	4
ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	8
CZEŚĆ LITERATUROWA.....	13
1. Biologiczne znaczenie układów bisfosforowych	13
1.1 Struktura i klasyfikacja bisfosfonianów o znaczeniu klinicznym	14
1.2 Aktywność antyresorpcyjna bisfosfonianów	16
1.2.1 Mechanizm działania	16
1.2.2 Zastosowania kliniczne.....	18
1.3 Aktywność przeciwnowotworowa bisfosfonianów	19
1.3.1 Addytywne i/lub synergistyczne interakcje bisfosfonianów ze znanymi cytostatykami	22
1.3.2 Badania kliniczne.....	24
1.4 Struktura i aktywność biologiczna α -aminobisfosfonianów	24
1.5 Strategie redukcji powinowactwa bisfosfonianów do tkanki kostnej	28
2. Metody otrzymywania układów 1-amino-1,1-bisfosforowych.....	31
2.1 Wybrane metody syntezy symetrycznych pochodnych 1-amino-1,1- bisfosfonowych	32
2.1.1 Trójskładnikowa kondensacja amin z ortomrówczanem trietylu i fosforynem dietylu	32
2.1.2 Synteza pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych z amidów	35
2.1.3 Synteza pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych z nitryli.....	36
2.1.4 Inne metody otrzymywania pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych	39
2.2 Metody syntezy fosfonowo-fosfinowych oraz fosfonowo-fosfinoilowych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych	40
3. Bisfosfoniany w ukierunkowanym dostarczaniu leków	44
3.1 Struktura koniugatów bisfosfonianów ze związkami biologicznie aktywnymi	45
3.2 Aktywność biologiczna koniugatów BPs.....	46
3.3 Wybrane metody syntezy koniugatów BPs ze związkami biologicznie aktywnymi.....	51
4. Bisfosfoniany jako znaczniki w diagnostyce medycznej	59

OMÓWIENIE WYNIKÓW	64
1. Synteza związków 1-amino-1,1-bisfosforowych	65
1.1 Otrzymywanie symetrycznych 1-amino-1,1-bisfosfonianów	66
1.2 Otrzymywanie niesymetrycznych fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów <i>N</i> -zabezpieczonych 1-amino-1,1-bisfosfonianów	72
2. Modyfikacje struktury układów bisfosfonowych	77
2.1 Sprzęganie 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny	78
2.2 Sprzęganie 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi oraz bromkami karboksyalkilo-trifenylofosfoniowymi	82
3. Próby wykorzystania potencjału połączenia ABP z DFO jako znacznika diagnostycznego	88
3.1 Synteza liganda.....	89
3.2 Badania stabilności chelatu <i>N</i> -SANHCH(PO(OEt) ₂) ₂ DFO z ⁸⁹ Zr.....	92
4. Ocena właściwości biologicznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych i ich koniugatów	95
4.1 Ocena aktywności cytotoksycznej kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych	96
4.2 Badania cytotoksyczności kombinacji kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego z wybranymi cytostatykami	99
4.3 Ocena właściwości przeciwbakteryjnych kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych	107
4.4 Badania aktywności cytotoksycznej koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny	111
PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	117
CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	122
1. Informacje ogólne.....	122
2. Procedury syntetyczne	124
2.1 Synteza symetrycznych oraz niesymetrycznych związków 1-amino-1,1-bisfosforowych.....	124
2.1.1 Acylowanie chlorowodorków imidoilanów etylu.....	124
2.1.2 Synteza 1-(<i>N</i> -acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu w układzie PTC.....	125
2.1.3 Otrzymywanie 1-(<i>N</i> -acyloamino)alkano-1,1-bisfosfonianów tetraetylu..	126

2.1.4	Otrzymywanie fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów 1-(N-benzyloksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu	128
2.1.5	Katalityczne uwodornienie N-Cbz zabezpieczonych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych.....	137
2.1.6	Otrzymywanie kwasów 1-amino-1,1-bisfosforowych	141
2.2	Otrzymywanie koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu	146
2.2.1	Otrzymywanie koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny	146
2.2.2	Otrzymywanie koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu z chlorambucylem, kwasem mykofenolowym, indometacyną oraz bromkami karboksyalkilotrifenylofosfoniowymi	149
2.2.3	Otrzymywanie koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z 5-karboksyuracylem.....	152
2.2.4	Deestryfikacja grup fosfonowych koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu	153
2.3	Sprzęganie 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z deferoksamina	155
2.3.1	Otrzymywanie N-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy.....	155
2.3.2	Otrzymywanie koniugatu N-SANHCH(PO(OEt) ₂) ₂ DFO	156
3.	Metodyka badań biologicznych.....	157
3.1	Hodowla komórkowa w warunkach <i>in vitro</i>	157
3.2	Badania cytotoksyczności.....	158
3.2.1	Test MTS	158
3.2.2	Test Alamar Blue.....	160
3.3	Badania mikrobiologiczne.....	161
3.4	Badania stabilności chelatów z ⁸⁹ Zr	162
	STRESZCZENIE	164
	ABSTRACT.....	166
	LITERATURA	168
	DOROBK NAUKOWY I INNE OSIĄGNIĘCIA.....	176
	ZAŁĄCZNIKI.....	181

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

ABP(s)	α -aminobisfosfonian(y) (z ang. <i>α-aminobisphosphonate(s)</i>)
Ac	grupa acetylowa
ALN	alendronian
AP(s)	α -aminofosfonian(y) (z ang. <i>α-aminophosphonate(s)</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BP(s)	bisfosfonian(y) (z ang. <i>bisphosphonate(s)</i>)
Boc	grupa <i>tert</i> -butoksykarbonylowa
Bn	grupa benzylowa
BN	betulina
BTZ	bortezomib
Cbz	grupa benzyloksykarbonylowa
CDI	1,1'-karbonylodiimidazol
CFU	jednostka tworząca kolonię (z ang. <i>colony-forming unit</i>)
Cis-Pt	cisplatyna
CLO	klodronian (z ang. <i>clodronate</i>)
CPT-11	irynotekan
CT	tomografia komputerowa
DCC	<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid
DCM	dichlorometan
DCU	<i>N,N'</i> -dicykloheksylomocznik
DFO	deferoksamina
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropylloetyloamina
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DMA	<i>N,N</i> -dimetyloacetamid
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMSA	grupa 2,2-dimetylobutanodioilowa (2,2-dimetylosykcyńlowa)
DMSO	dimetylosulfotlenek
DOC	docetaksel
DOTA	kwas 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowy
DOX	doksorubicyna (z ang. <i>doxorubicin</i>)

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

dr	stosunek diastereomeryczny (z ang. <i>diastereomeric ratio</i>)
DTBMP	2,6-di- <i>tert</i> -butylo-4-metylopirydyna
EDCI	chlorowodorek <i>N</i> -(3-dimetyloaminopropyl)- <i>N'</i> -etylokarbodiimidu
ES	mięsak Ewinga
ETI	etidronian
Eto	etopozyd
Flv	fluwastatyna (z ang. <i>fluvastatin</i>)
FPP	pirofosforan farnezyłu
FPPS	syntaza pirofosforanu farnezyłu
Gem	gemcytabina
GGPP	pirofosforan geranylo-geranyłu
GPP	pirofosforan geranyłu
HA	hydroksyapatyt
HDP	kwas oksydronowy
Hex	heksan
IBN	ibandronian
INC	inkadronian (z ang. <i>incadronate</i>)
IPP	pirofosforan izopentenylu
LiHMDS	bis(trimetylosililo)amidek litu
MBD	gęstość mineralna kości (z ang. <i>bone mineral density</i>)
MDP	kwas medronowy
MIC	minimalne stężenie hamujące (z ang. <i>minimum inhibitory concentration</i>)
MIN	minodronian
MM	szpiczak mnogi (z ang. <i>multiple myeloma</i>)
MRI	obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (z ang. <i>magnetic resonance imaging</i>)
MW	promieniowanie mikrofalowe
N-BPs	azotowe bisfosfoniany
NBS	<i>N</i> -bromosukcynoimid
NHS	<i>N</i> -hydroksysukcynoimid

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

NOTA	kwas 1,4,7-triazacyklononano-1,4,7-trioctowy
O.D.	gęstość optyczna (z ang. <i>optical density</i>)
PAM	pamidronian
PC	rak prostaty (z ang. <i>prostate cancer</i>)
PET	pozytonowa tomografia emisyjna (z ang. <i>positron emission tomography</i>)
PEG	glikol polietylenowy
POC	grupa izopropyloksykarbonyloksymetylowa
POM	grupa piwaloiloksymetylowa
PPi	pirofosforany
PTC	kataliza przeniesienia międzyfazowego (z ang. <i>phase transfer catalysis</i>)
PTX	paklitaksel (z ang. <i>paclitaxel</i>)
Py	pirydyna
RIS	rizedronian (z ang. <i>risedronate</i>)
RTG	rentgenografia
SA	grupa butanodioilowa (sukcynyłowa)
SIM	simwastatyna
s-NHS	N-hydroksysulfosukcynoimid
SPECT	tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (z ang. <i>single photon emission computed tomography</i>)
SRE	zdarzenia kostne (z ang. <i>skeletal related events</i>)
TBAF	fluorek tetrabutylamoniowy
TBS	grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa
Tf	grupa trifluorometanosulfonowa
TFA	kwas trifluorooctowy
Tf ₂ O	bezwodnik trifluorometanosulfonowy
THF	tetrahydrofuran
TMS	grupa trimetylosililowa
Tol	toluen
Troc	grupa 2,2,2-trichloroetoksykarbonyłowa
Ts	grupa tosyłowa

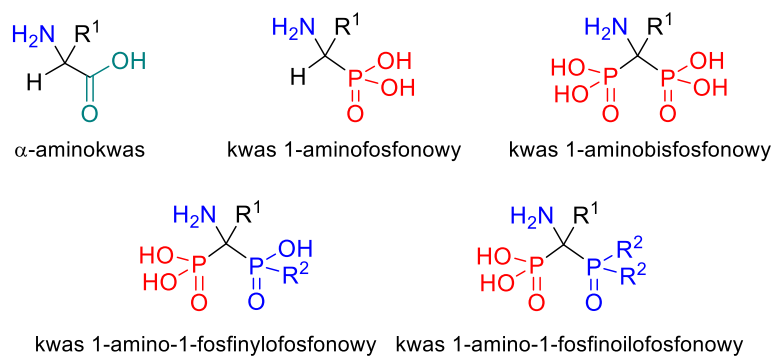
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

UFT	tegafur-uracyl
USPIO	ultramale superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (z ang. <i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>)
Zasada <i>Hüniga</i>	<i>N,N</i> -diizopropylloetyloamina
ZOL	zoledronian

ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Związki fosforoorganiczne od wielu lat stanowią przedmiot intensywnych badań ze względu na ich wszechstronne zastosowania w syntezie organicznej oraz chemii medycznej. Grupą związków o ugruntowanej pozycji, cieszącą się dużą popularnością w leczeniu chorób układu kostnego są bisfosfoniany (BPs). Choć związki te znane są głównie ze swojej aktywności antyresorpcyjnej, wykazują również szereg innych korzystnych właściwości biologicznych, a charakter i siła ich działania zależą od struktury cząsteczki, a zwłaszcza od rodzaju podstawników przy atomie węgla w ugrupowaniu P-C-P. Inną, istotną cechą bisfosfonianów jest ich silne powinowactwo do hydroksyapatytu znajdującego się w kościach. Właściwość tę można wykorzystać do tworzenia farmaceutyków oraz środków kontrastowych o ukierunkowanym działaniu.

Ważną podklasę bisfosfonianów stanowią 1-amino-1,1-bisfosfoniany (ABPs), które można traktować jako fosforowe odpowiedniki α -aminokwasów, funkcjonalizowane w pozycji α dodatkową grupą fosfonową (Rys. 1). Związki te charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznej, a dodatkowo, dzięki obecności reaktywnej grupy aminowej w swojej strukturze, mogą być w łatwy sposób modyfikowane lub wykorzystane w syntezie bardziej złożonych cząsteczek bioaktywnych.

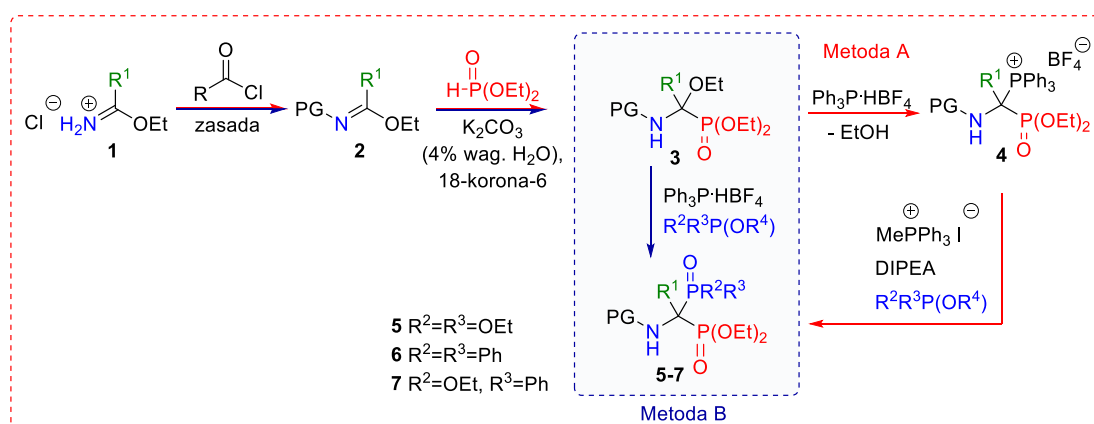


Rys. 1. Porównanie struktur α -aminokwasu oraz kwasów: 1-aminofosfonowego, 1-aminobisfosfonowego, 1-amino-1-fosfinylofosfonowego i 1-amino-1-fosfinoilofosfonowego

Obecnie znanych jest wiele metod syntezy pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych. Znaczna część z nich polega na równoczesnym tworzeniu obydwu wiązań C α -P, co w większości przypadków prowadzi do otrzymania symetrycznych pochodnych bisfosfonowych. Takie podejście istotnie ogranicza możliwość uzyskiwania niesymetrycznych analogów ABPs (Rys. 1), których potencjalna aktywność biologiczna jest wciąż słabo poznana. Co więcej, najczęściej stosowane metody wykorzystywano głównie do otrzymywania związków zawierających

jedynie atom wodoru oraz różnie podstawioną grupę aminową przy centralnym atomie węgla. Tymczasem wykazano, że strukturalne zróżnicowanie BPs, w tym ABPs, a w szczególności rodzaj łańcucha bocznego przyłączonego do atomu węgla w pozycji α ma istotny wpływ na ich aktywność biologiczną. Ponadto, niektóre z opisanych metod, zwłaszcza te wykorzystujące niereaktywne nityle, wymagają stosowania ostrych warunków reakcyjnych lub przeprowadzania syntezy w obecności skomplikowanych układów katalitycznych bądź mediatorów.

Alternatywną strategią otrzymywania pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych są metody sekwencyjne, polegające na następczym wprowadzaniu ugrupowań fosforowych do odpowiednio dobranych prekursorów. Przykładem takiego podejścia jest metoda syntezy pochodnych ABPs z chlorowodorków imidoilanów etylu **1**, opracowana przez Kuźnik, obejmująca: (1) zabezpieczenie grupy aminowej wyjściowych analogów **1** za pomocą odpowiednich chlorków kwasowych, (2) transformację *N*-zabezpieczonych imidoilanów etylu **2** w estry etylowe *N*-zabezpieczonych kwasów 1-etoksyalkanofosfonowych **3** w reakcji addycji typu *Michaelisa-Beckera* prowadzonej w warunkach PTC oraz (3) przekształcenie powstałych związków **3** w pochodne bisfosforowe **5,6** w reakcji typu *Michaelisa-Arbuzowa*, poprzez odpowiednie sole tryfenylofosfoniowe **4** (Schemat 1, metoda A, kolor czerwony).¹ Jej zaletą jest to, że w zależności od rodzaju użytego prekursora **1** oraz zastosowanego w ostatnim etapie nukleofila fosforowego ($R^2R^3P(OR^4)$) daje możliwość otrzymania produktów zróżnicowanych strukturalnie zarówno w obrębie grup fosforowych układu P-C-P cząsteczki, jak i grup przy atomie węgla C_α .



Schemat 1

Od 2020 roku prowadzone były badania nad rozszerzeniem zakresu stosowalności opisanej wyżej metody oraz uproszczeniem ostatniego etapu procedury. Zaobserwowano bowiem, że transformacja soli fosfoniowych **4** w pochodne bisfosfonowe **5** jest reakcją autokatalityczną, co pozwoliło na wyeliminowanie stosowanej dotychczas zasady *Hüniga* i jodku tryfenylometylo-

fosfoniowego. Możliwe okazało się też przekształcenie 1-etoksyalkanofosfonianów **3** w odpowiednie 1-amino-1,1-bisfosfoniany **5** w jednym etapie, z wytworzeniem *in situ* reaktywnych soli trifenylfosfoniowych **4** (Schemat 1, metoda B, kolor niebieski).

Punktem wyjścia w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy była synteza strukturalnie zróżnicowanych, *N*-zabezpieczonych bisfosforowych analogów α -aminokwasów białkowych i niebiałkowych na drodze uproszczonej procedury przedstawionej na schemacie 1 (metoda B). Zaplanowano otrzymanie zarówno symetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych **5**, jak i ich niesymetrycznych, fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów **6 i 7**.

W kolejnym etapie zaplanowano przeprowadzenie deprotekcji grupy aminowej, hydrolizy oraz dalszych modyfikacji strukturalnych wybranych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych, które mogłyby zwiększyć ich potencjał aplikacyjny.

Jeden z kierunków badań zakładał syntezę koniugatów otrzymywanych przez sprzęganie związków wykazujących potwierdzoną aktywność biologiczną (np. antynowotworową) z wybranym modelem 1-amino-1,1-bisfosfonianu (Schemat 2, Etap II A). Obecność ugrupowania P-C-P w powstałych hybrydach mogłaby umożliwiać nie tylko ich selektywne dostarczanie do tkanki kostnej, ale także zwiększyć ich potencjał terapeutyczny na skutek potencjalnych efektów addytywnych lub synergistycznych. W tym celu wytypowano związki: betulinę (naturalny triterpen o szerokim spektrum aktywności biologicznej, w tym przeciwnowotworowej), chlorambucyl (cytostatyk alkilujący), kwas mykofenolowy (immunosupresant o właściwościach przeciwnowotworowych), indometacynę (niesteroidowy lek przeciwzapalny) oraz 5-karboksyuracyl (analog zasady azotowej).

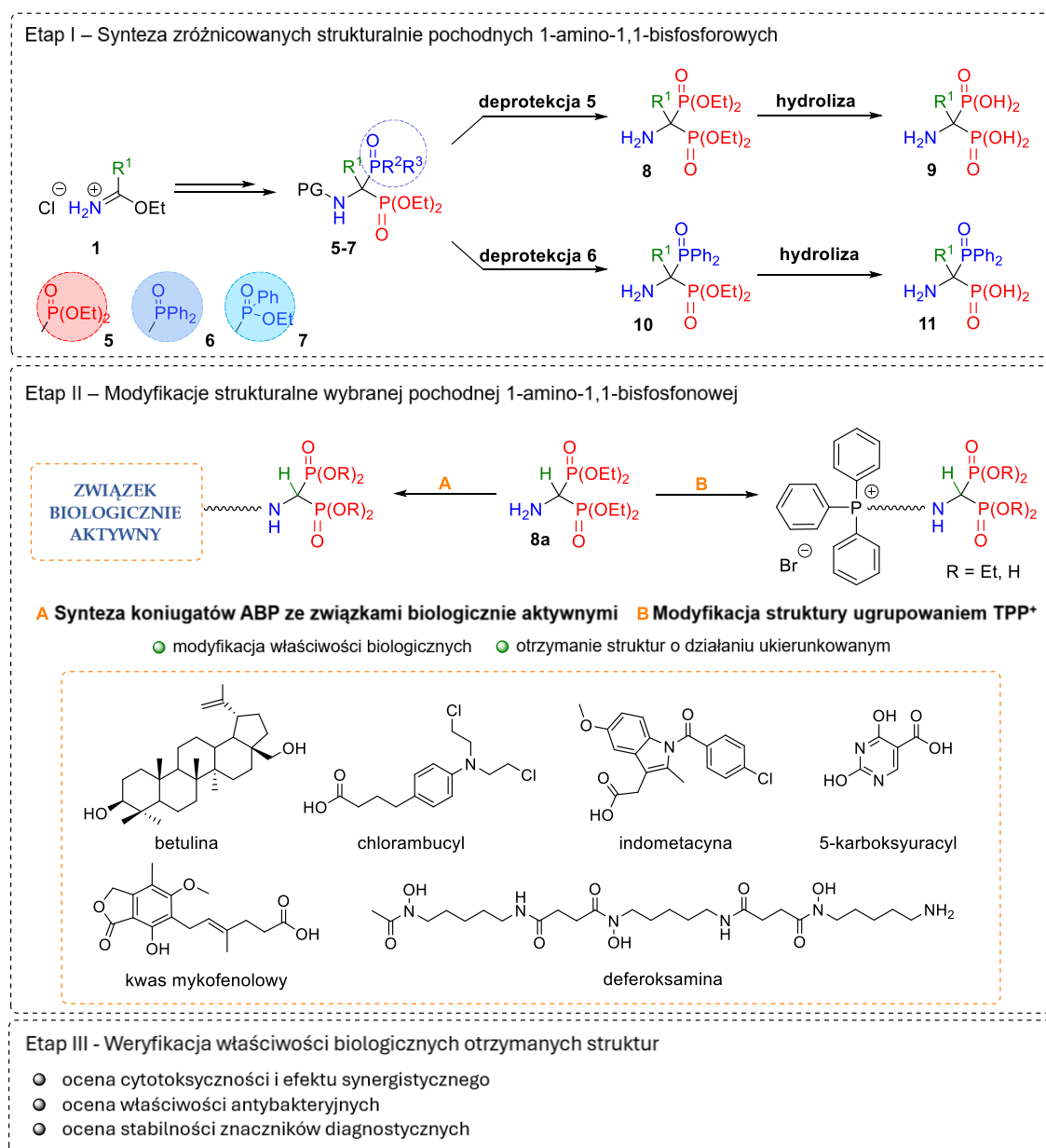
Obiektem zainteresowania miały być również drobne modyfikacje struktury wybranego modelu 1-amino-1,1-bisfosfonianu, które mogłyby doprowadzić do związków o precyzyjnie ukierunkowanej aktywności biologicznej. Zaplanowano przeprowadzenie jego funkcjonalizacji z wykorzystaniem grupy trifenylfosfoniowej (TPP⁺), której specyficzne właściwości jako kationu lipofilowego mogłyby nadać otrzymanym cząsteczkom zdolność do działania w roli tzw. ligandów mitochondrialnych (Schemat 2, Etap II B).

W ramach pracy podjęto również próbę wykorzystania wybranej pochodnej ABP do modyfikacji struktury deferoksaminy DFO, (Schemat 2, Etap II) – znanego chelatora zdolnego do tworzenia kompleksów z jonami paramagnetycznymi, np. Fe³⁺

lub jonami $^{89}\text{Zr}^{4+}$ stosowanymi w diagnostyce PET. Celem tej funkcjonalizacji miało być otrzymanie liganda o strukturze pozwalającej na wykorzystanie go jako znacznika diagnostycznego.

Ostatnim etapem planowanych prac była weryfikacja możliwości wykorzystania otrzymanych związków w roli terapeutyków lub znaczników w diagnostyce medycznej (Schemat 2, Etap III). Działania te miały obejmować badania ich cytotoksyczności, w tym interakcji ze znanymi cytostatykami (m.in. cisplatyną, etopozydem czy doksorubicyną), właściwości przeciwbakteryjnych, a w przypadku liganda, pochodnej deferoksaminy – stabilności jego chelatu z ^{89}Zr .

Zaplanowane zadania badawcze zobrazowano na schemacie 2.



Schemat 2

Podsumowując, zakres prac badawczych podjętych w ramach niniejszej pracy obejmował:

1. Syntezę symetrycznych oraz niesymetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych.
2. Syntezę koniugatów układów bisfosfonowych i znanych związków bioaktywnych.
3. Próby zsyntetyzowania liganda o strukturze pozwalającej na wykorzystanie go jako znacznika diagnostycznego.
4. Określenie właściwości biologicznych otrzymanych struktur.

CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Biologiczne znaczenie układów bisfosforowych

1,1-Bisfosfoniany (BPs) to związki fosforoorganiczne będące syntetycznymi analogami nieorganicznych pirofosforanów (PPi), które naturalnie występują w organizmach żywych i stanowią produkty uboczne metabolizmu ATP. Po raz pierwszy zostały zsyntezowane przez *Menschutkina* w 1865 roku² i początkowo, dzięki ich zdolności do kompleksowania jonów metali, wykorzystywano je w roli środków antykorozyjnych oraz kompleksujących w przemyśle nawozów sztucznych, naftowym oraz tekstylnym.³ Znaczny wzrost zainteresowania tymi związkami nastąpił dopiero w późnych latach 60. ubiegłego wieku, kiedy odkryto ich wyjątkowe właściwości biologiczne.

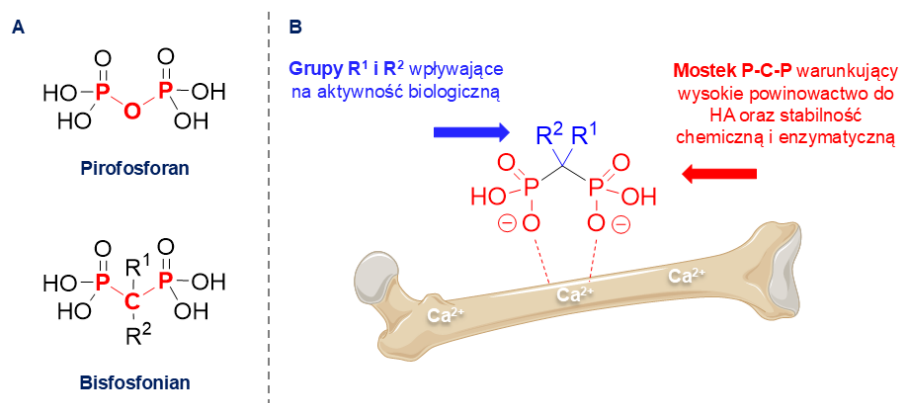
Informacje na temat biologicznej aktywności BPs zaczęły pojawiać się w literaturze naukowej wkrótce po odkryciach *Neumana* i *Fleischa*, którzy wykazali, że pirofosforany mają zdolność do wiązania się z kryształami hydroksyapatytu (HA) i regulowania procesu mineralizacji kości.⁴ Niestety, próby zastosowania PPi jako inhibitorów kalcyfikacji *in vivo* kończyły się sukcesem tylko wtedy, gdy były podawane dożylnie - po podaniu doustnym związki te ulegały w organizmie szybkiemu metabolizmowi, tracąc tym samym swoją aktywność.³ Poszukiwania analogów o podobnych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych, ale większej odporności na hydrolizę enzymatyczną, doprowadziły do bisfosfonianów. Jako organiczne odpowiedniki PPi, wykazywały podobne działanie, a dodatkowo charakteryzowały się większą stabilnością *in vivo*, za sprawą niepodatnego na działanie fosfataz układu wiązań P-C-P w miejscu szkieletu P-O-P.^{3,5}

Do tej pory zsyntezowano setki różnych analogów BPs, z których kilkanaście zostało poddanych badaniom klinicznym. Z uwagi na ich wyjątkowe właściwości, a w szczególności silne działanie antyresorpcyjne, związki te znalazły szerokie zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób układu kostnego. Obecnie BPs stanowią podstawę farmakoterapii osteoporozy, a roczna sprzedaż niektórych wiodących leków z tej grupy przekroczyła miliard dolarów.³ Pomimo, że początkowo badania nad bisfosfonianami miały głównie charakter empiryczny, wieloletnie analizy zależności między strukturą a aktywnością biologiczną tych związków pozwoliły na lepsze zrozumienie mechanizmów ich działania.^{6,7} Obecnie wiadomo, że oprócz aktywności antyresorpcyjnej, BPs wykazują również szereg innych właściwości biologicznych,⁸ w tym działanie przeciwbakteryjne,⁹⁻¹² przeciwwirusowe^{13,14} oraz przeciwnowotworowe.¹⁵ Współczesne badania naukowe

koncentrują się przede wszystkim na poszukiwaniu nowych analogów BPs o potencjalnej aktywności biologicznej, pogłębianiu wiedzy na temat właściwości biologicznych wcześniej poznanych związków, a także opracowywaniu ich nowych formułacji farmaceutycznych. Szczególne zainteresowanie budzą badania ukierunkowane na rozszerzenie zastosowań bisfosfonianów w onkologii, a zwłaszcza nad ich synergistycznym oddziaływaniem ze znanymi cytostatykami (terapię skojarzone),^{16,17} a także badania nad otrzymywaniem terapeutyków o działaniu celowanym (koniugaty BPs).¹⁸

1.1 Struktura i klasyfikacja bisfosfonianów o znaczeniu klinicznym

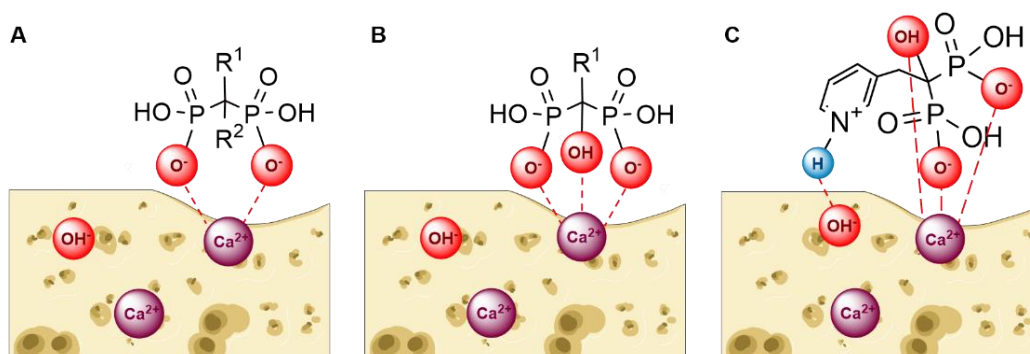
Kluczowym elementem w strukturze bisfosfonianów jest tzw. mostek P-C-P, tworzony przez dwie grupy fosfonowe połączone atomem węgla. Jego obecność ma wpływ nie tylko na stabilność hydrolityczną tych związków, ale także na ich silne powinowactwo do hydroksyapatytu (HA), stanowiącego główny składnik mineralny kości (Rys. 2). Zmiana struktury szkieletu P-C-P poprzez wprowadzenie dodatkowego atomu węgla (P-C-C-P) lub zamianę centralnego atomu węgla na azot (P-N-P) skutkuje utratą aktywności biologicznej związku. Wiązanie bisfosfonianów z tkanką kostną zachodzi poprzez chelatowanie jonów wapnia na powierzchni kryształów HA przez grupy fosfonowe, co prowadzi do utworzenia bidentnego chelatora (Rys. 3 A). Tak zaadsorbowane na powierzchni kości cząsteczki BPs wnikają następnie do osteoklastów, gdzie zakłócają procesy biochemiczne, hamując ich aktywność.³



Rys. 2. Podobieństwo strukturalne bisfosfonianów do pirofosforanu (A); kluczowe elementy strukturalne bisfosfonianów (B)

Ważnymi czynnikami determinującymi właściwości biologiczne BPs są również łańcuchy boczne R^1 oraz R^2 przy geminalnym atomie węgla. Mają one wpływ na siłę wiązania się leku z kością, jego właściwości fizykochemiczne i terapeutyczne oraz mechanizm działania.¹⁹ Obecność grupy hydroksylowej przy metinowym atomie

węgla układu P-C-P zwiększa zdolność bisfosfonianów do wiązania jonów wapnia przez utworzenie silniejszego, trójkleszczowego wiązania (Rys. 3 B). Wprowadzenie dodatkowego podstawnika zawierającego atom azotu (w grupie alkilowej lub pierścieniu heterocyklicznym) do struktury związku powoduje jeszcze większy wzrost jego powinowactwa do HA i zwiększenie potencjału antyresorpcyjnego. Silne oddziaływanie azotowych BPs (N-BPs) z HA tłumaczy się zdolnością tych pochodnych do tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych z grupami funkcyjnymi na powierzchni apatytu, do których wytworzenia konieczna jest nie tylko sama obecność atomu azotu w łańcuchu bocznym, ale także jego odpowiednie przestrzenne ułożenie (Rys. 3 C).¹⁹ Wiązanie N-BPs z kością mogą dodatkowo ułatwiać oddziaływania elektrostatyczne, tworzące się między dodatnio naładowanymi łańcuchami bocznymi bisfosfonianów zaadsorbowanych już na powierzchni HA, a ujemnie naładowanymi grupami fosfonowymi kolejnych cząsteczek.¹⁹ Należy podkreślić jednak, że wysoka skuteczność azotowych bisfosfonianów w hamowaniu resorpcji kości wynika nie tylko z ich silnego powinowactwa do tkanki kostnej, ale także z odmiennego niż w przypadku nieazotowych BPs mechanizmu działania na poziomie komórkowym.

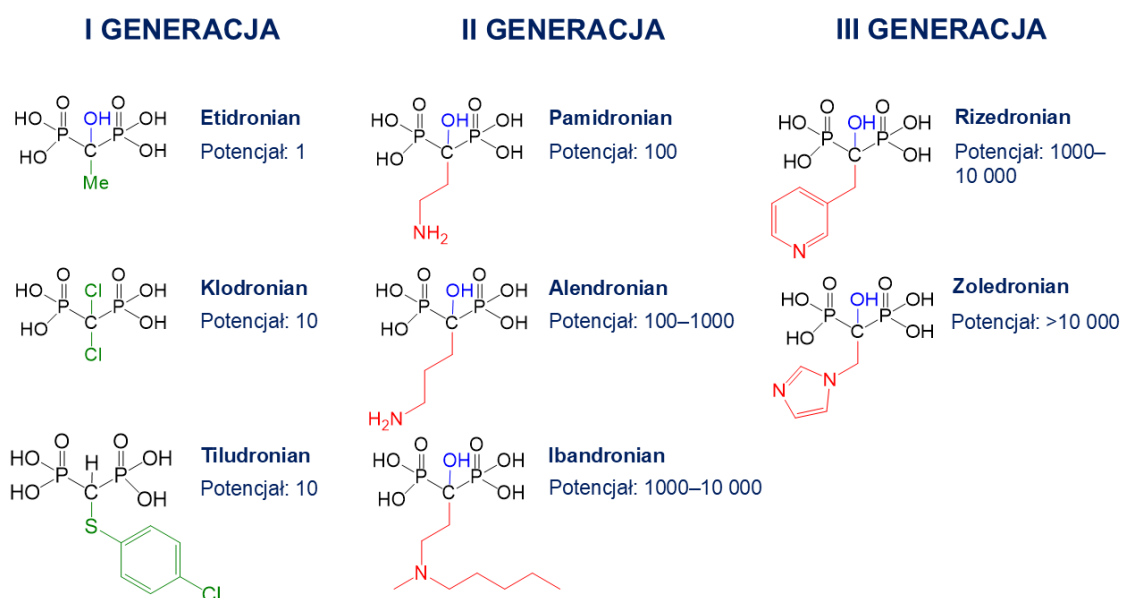


Rysunek wykonano przy wykorzystaniu Servier Medical Art.: smart.servier.com

Rys. 3. Schematyczne przedstawienie wiązania się bisfosfonianów z macierzą kostną

Bisfosfoniany, które znalazły zastosowanie kliniczne podzielone są na dwie grupy: bisfosfoniany niezawierające atomu azotu, nazywane prostymi bisfosfonianami lub bisfosfonianami I generacji oraz bisfosfoniany azotowe, znane jako bisfosfoniany II i III generacji. Sposób klasyfikacji BPs uwzględnia nie tylko różnice w ich strukturze chemicznej, ale także w sile działania antyresorpcyjnego. Struktura BPs I generacji jest stosunkowo prosta – łańcuchy boczne przyłączone do centralnego atomu węgla to najczęściej grupa hydroksylowa, atom halogenu lub krótki łańcuch alkilowy.⁷ Bisfosfoniany te nie zawierają atomu azotu w swojej strukturze i charakteryzują się najniższym potencjałem antyresorpcyjnym.^{20,21} Pomimo ogromnego sukcesu terapeutycznego, jaki BPs I generacji osiągnęły w latach

70. XX wieku, związki te zostały obecnie niemal całkowicie wyparte przez skuteczniejsze azotowe bisfosfoniany II i III generacji.^{3,6} Do bisfosfonianów II generacji należą pochodne posiadające najczęściej grupę hydroksylową w pozycji R¹ oraz grupę aminoalkilową w pozycji R², natomiast BPs III generacji charakteryzują się obecnością jednego lub dwóch atomów azotu o hybrydyzacji sp², będących elementem heterocyklicznego pierścienia aromatycznego.³ Na rysunku 4 przedstawiono struktury bisfosfonianów należących do poszczególnych generacji z uwzględnieniem ich relatywnego potencjału antyresorpcyjnego.²²



Rys. 4. Klasyfikacja bisfosfonianów na generacje oraz wartości potencjału antyresorpcyjnego dla wybranych przedstawicieli każdej z klas w odniesieniu do etidronianu²²

1.2 Aktywność antyresorpcyjna bisfosfonianów

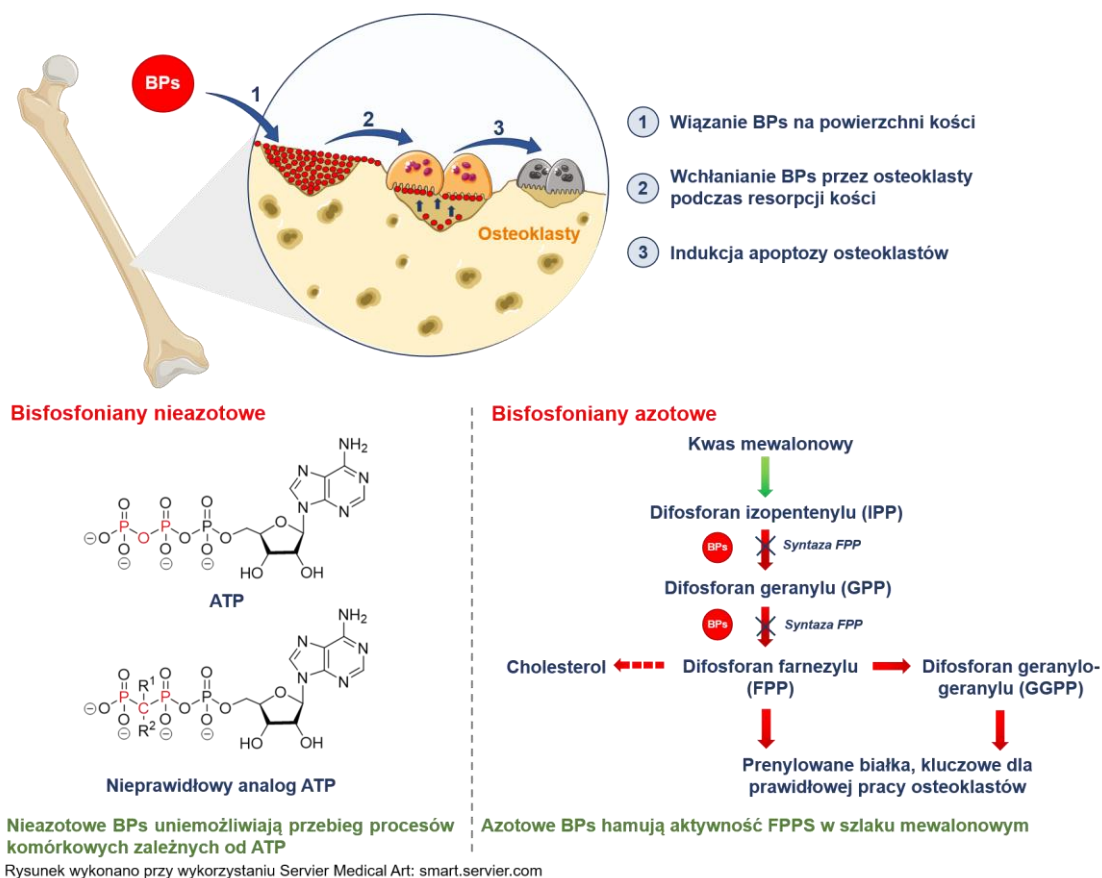
1.2.1 Mechanizm działania

Działanie antyresorpcyjne wszystkich BPs, niezależnie od klasy, wynika ze zdolności tych związków do selektywnego wiązania się z powierzchnią kości, szczególnie w miejscach jej aktywnej przebudowy, oraz hamowania aktywności osteoklastów, czyli komórek kościogubnych, odpowiedzialnych za przeprowadzanie procesu resorpcji kości. Różnice w budowie strukturalnej poszczególnych analogów mają natomiast wpływ na mechanizm ich działania wewnątrzkomórkowego (Rys. 5).⁷

Bisfosfoniany niezawierające azotu, przez swoje podobieństwo strukturalne do pirofosforanów, po wnikięciu do komórki są włączane do nowo powstających cząsteczek adenozy-5'-trifosforanu, tworząc niefunkcjonalne analogi ATP, których wewnątrzkomórkowa akumulacja skutkuje upośledzeniem funkcji osteoklastów.^{23–25}

Uniemożliwienie przeprowadzenia procesów komórkowych prowadzi w konsekwencji do apoptozy komórek kościogubnych, a więc i do zahamowania zależnego od nich procesu resorpcji kości (Rys. 5).^{24,25}

Mechanizm działania azotowych bisfosfonianów jest odmienny i polega na hamowaniu przemian szlaku miewalonowego, który odgrywa istotną rolę w produkcji cholesterolu i innych steroli, a także lipidów izoprenoidowych. N-BPs działają jako inhibitory kilku enzymów tego szlaku,²⁶ ale ich głównym celem molekularnym jest syntaza pirofosforanu farnezylu (FPPS), która katalizuje reakcje przekształcenia pirofosforanu izopentenylu (IPP) do pirofosforanu geranylu (GPP) oraz jego następczą transformację w pirofosforan farnezylu (FPP). Pirofosforan farnezylu stanowi substrat w syntezie wielu związków istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki m.in. dolichinonu, ubichinonu czy cholesterolu. Wspólnie z pirofosforanem geranylo-geranylu (GGPP) związki te biorą również udział w potranslacyjnej modyfikacji (prenylacji) małych GTP-az (białek G), takich jak m.in. Ras, Rho, Rac czy Rab, które stanowią ważne przekaźniki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Na drodze zatrzymywania tych procesów dochodzi do zaburzenia podstawowego funkcjonowania osteoklastów, a w konsekwencji również do ich apoptozy (Rys. 5).^{7,27,28}



Rys. 5. Mechanizm działania azotowych oraz nieazotowych bisfosfonianów

1.2.2 Zastosowania kliniczne

Dzięki silnemu powinowactwu do tkanki kostnej oraz właściwościom antyresorpcyjnym, bisfosfoniany w naturalny sposób znalazły zastosowanie przede wszystkim w profilaktyce i leczeniu chorób układu kostnego, związanych z zaburzoną równowagą między procesami tworzenia i niszczenia kości, m.in. osteoporozy, choroby Pageta czy wrodzonej łamliwości kości. Leki te są również skutecznie wykorzystywane w terapii hiperkalcemii różnego pochodzenia, objawiającej się podwyższonym poziomem wapnia we krwi.³

Od ponad dwóch dekad bisfosfoniany wykorzystywane są także w onkologii, pełniąc funkcję leków wspomagających. Układ kostny należy do jednego z najczęstszych miejsc lokalizacji przerzutów nowotworów złośliwych, które występują u ponad 60% pacjentów z zaawansowanym rakiem piersi, prostaty i tarczycy.²⁹ Terapia chorych z przerzutami do kości obejmuje zazwyczaj ogólnoustrojowe leczenie nowotworu (np. chemioterapię lub hormonoterapię), które jest dodatkowo często wspomagane terapią z udziałem bisfosfonianów, najczęściej zoledronianu, pamidronianu lub kłodronianu. Jej głównym celem jest łagodzenie objawów choroby oraz ograniczenie ryzyka wystąpienia tzw. zdarzeń kostnych (SRE, ang. *skeletal-related events*), do których zalicza się m.in. patologiczne złamania czy ucisk rdzenia kręgowego.³⁰ Bisfosfoniany skutecznie obniżają poziom wapnia we krwi u pacjentów z hiperkalcemią nowotworową, hamują postępującą resorpcję tkanki kostnej oraz łagodzą dolegliwości bólowe związane ze zmianami przerzutowymi.^{29,30} BPs są również powszechnie stosowane u pacjentów cierpiących na szpiczaka mnogiego (MM), czyli złośliwy nowotwór układu krwiotwórczego, który prowadzi do patologicznej proliferacji komórek plazmatycznych w szpiku kostnym.^{7,31} W wyniku rozwoju choroby dochodzi do nadmiernej aktywności osteoklastów (stymulowanej przez cytokiny wydzielane przez komórki nowotworowe), co skutkuje nasilonym procesem resorpcji kości i hamowaniem ich odbudowy. Powikłania kostne, takie jak osteoliza i patologiczne złamania występują u ponad 80% pacjentów z MM.³¹ Terapia szpiczaka mnogiego z zastosowaniem BPs nie tylko zmniejsza częstość występowania SRE oraz łagodzi ból kostny, ale również hamuje uwalnianie czynników wzrostu z macierzy kostnej, co może pośrednio wpłynąć na spowolnienie rozwoju nowotworu.^{31,32}

Po wprowadzeniu BPs do terapii wspomagającej nowotworów, w niektórych badaniach klinicznych zaczęto obserwować dodatkowe korzyści z ich stosowania, m.in. zahamowanie progresji nowotworu, redukcję częstości przerzutów do kości oraz poprawę przeżywalności pacjentów.³³⁻³⁵ Początkowo efekty te przypisywano

przede wszystkim ich działaniu antyresorpcyjnemu – zakładano bowiem, że aktywność BPs ogranicza się jedynie do hamowania funkcji osteoklastów.³⁵ Wkrótce potem, w literaturze naukowej zaczęły pojawiać się doniesienia wskazujące, że związki te oddziałują także na komórki nowotworowe, a ich skuteczność w hamowaniu progresji niektórych nowotworów może wynikać z ich potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych.³⁵

1.3 Aktywność przeciwnowotworowa bisfosfonianów

Przeciwnowotworowa aktywność bisfosfonianów jest procesem złożonym, a zgromadzone dane przedkliniczne wskazują, że związki te wywierają szereg bezpośrednich i pośrednich działań przeciwnowotworowych, które wpływają zarówno na komórki nowotworowe, jak i otaczające je mikrośrodowisko.¹⁵

W badaniach *in vitro* wykazano, że BPs mogą hamować namnażanie się komórek nowotworowych oraz indukować ich apoptozę. Efekty te obserwowano w licznych liniach komórkowych m.in. raka piersi,^{16,36} raka prostaty,^{16,37} raka płuca,^{16,38} szpiczaka mnogiego,^{16,39} białaczki¹⁶ oraz nowotworów kości: kostniakomięsaka,^{17,40} mięsaka Ewinga^{40,41} czy chrząstniakomięsaka.^{40,42} Ponadto związki te ograniczają zdolność komórek nowotworowych do adhezji, migracji i inwazji,^{16,37,43} co ma istotne znaczenie w kontekście rozwoju przerzutów. Poza wpływem na komórki nowotworowe, bisfosfoniany wywierają wpływ również na ich otoczenie oraz mikrośrodowisko kości. Poprzez hamowanie aktywności osteoklastów, BPs ograniczają proces resorpcji i uwalnianie z macierzy kostnej czynników wzrostu, takich jak TGF- β czy IGF-1, które mogą stymulować rozwój komórek nowotworowych.⁴⁴ Ponadto, hamują angiogenezę, czyli proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych w obrębie nowotworu, co utrudnia jego rozwój i zdolność do rozprzestrzeniania się. BPs wykazują także zdolność do stymulowania odpowiedzi immunologicznej, m.in. poprzez aktywację limfocytów T $\gamma\delta$, oraz modulowanie aktywnością makrofagów związanych z guzem (TAMs).^{16,17,43} Przeciwnowotworowe działanie BPs (zwłaszcza azotowych BPs) zostało również potwierdzone w badaniach *in vivo* na modelach zwierzęcych, w których obserwowano zarówno zahamowanie wzrostu pierwotnych nowotworów, jak i hamowanie przerzutów do kości czy płuc.^{16,17,43} Wybrane efekty działania BPs obserwowane w badaniach przedklinicznych zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Aktywność przeciwnowotworowa BPs w wybranych badaniach przedklinicznych

Efekt	BPs z potwierdzoną aktywnością	Rodzaj nowotworu
<i>Efekt na komórki nowotworowe</i>		
Hamowanie proliferacji ^{16,17,36,40,43,45,46}	ALN, CLO, IBN, INC, MIN, PAM, ZOL	Rak piersi, Rak prostaty, Rak trzustki, Czerniak, Kostniakomięsak, Mięsak Ewinga, Chrzęstniakomięsak
Indukcja apoptozy ^{17,36,40,43,45,46}	ALN, CLO, IBN, INC, MIN, PAM, ZOL	Rak piersi, Rak prostaty, Rak płuca, Rak trzustki, Rak jelita grubego, Szpiczak mnogi, Białaczka, Czerniak, Kostniakomięsak, Chrzęstniakomięsak
Hamowanie inwazji ^{17,36,40,43,45,47}	CLO, IBN, MIN, RIS, ZOL	Rak piersi, Rak prostaty, Mięsak Ewinga Kostniakomięsak, Chrzęstniakomięsak
Hamowanie adhezji ^{17,36,43}	ALN, CLO, IBN, OLP, PAM, RIS, ZOL	Rak piersi, Rak prostaty, Kostniakomięsak
Hamowanie migracji ^{36,43}	ALN, CLO, IBN, RIS, ZOL	Rak piersi, Rak prostaty
<i>Wpływ na mikrośrodowisko</i>		
Hamowanie angiogenezy ^{16,17,36,43}	ALN, CLO, IBN, MIN PAM, RIS, ZOL	Rak piersi, Rak szyjki macicy, Szpiczak mnogi, Kostniakomięsak
Efekty immunomodulujące ^{16,17,43,45}	ALN, IBN, PAM, RIS, ZOL	Rak piersi, Rak prostaty, Szpiczak mnogi, Mięsak Ewinga, Kostniakomięsak, Chrzęstniakomięsak
<i>Efekt w badaniach in vivo</i>		
Hamowanie wzrostu pierwotnych nowotworów <i>in vivo</i> ^{16,17,40,43}	IBN, MIN, PAM, RIS, ZOL	Rak piersi, Rak szyjki macicy, Rak płuca, Czerniak, Rak pęcherza, Rak wątrobowokomórkowy, Szpiczak mnogi, Międzybłoniak, Mięsak Ewinga, Kostniakomięsak
Hamowanie przerzutów do kości <i>in vivo</i> ^{16,35,36}	CLO, IBN, MIN, PAM, RIS, ZOL	Rak piersi, Drobnokomórkowy rak płuca, Rak pęcherza
Hamowanie przerzutów do płuc <i>in vivo</i> ^{16,17,47}	ZOL	Mięsak Ewinga, Kostniakomięsak

ALN – alendronian; CLO – kłodronian; IBN – ibandronian; INC – inkadronian; MIN – minodronian; PAM – pamidronian; RIS – rizedronian; ZOL – zoledronian

Omawiane powyżej efekty przeciwnowotworowe bisfosfonianów powiązane są, analogicznie jak ich działanie antyresorpcyjne, ze zdolnością tych związków do hamowania szlaków sygnałowych zależnych od syntazy pirofosforanu farnezyli (FPPS). Prowadzi to do zaburzenia procesu prenylacji małych białek G, takich jak Ras, Rac czy Rho, które odgrywają kluczową rolę w regulacji funkcji komórek nowotworowych, w tym proliferacji, inwazji oraz adhezji.⁴⁸ W badaniach przedklinicznych zaobserwowano m.in. akumulację pirofosforanu izopentenylu (IPP), powstawanie cytotoksycznych analogów ATP,⁴⁹ obecność nieprenylowanych form białek GTP-az,^{38,49} a także hamowanie ich translokacji do błony komórkowej.¹⁶ Ponadto odnotowano zahamowanie aktywności szlaków sygnalizacyjnych oraz procesów zależnych od prenylowanych białek, takich jak ekspresja białka CD44, transkrypcja genu CYR61 czy aktywacja kinazy ERK1/2.⁵⁰ Niektóre badania wykazały, że przeciwnowotworowe działanie bisfosfonianów może być osłabione lub nawet zniesione po podaniu metabolitów szlaku miewalonowego, takich jak geranylgeraniol.⁵¹⁻⁵³ W innych pracach sugerowano jednak, że zdolność tych związków do przywracania funkcji komórkowych zahamowanych przez BPs była jedynie częściowa.⁴⁸ Obserwacje te wskazują, że przeciwnowotworowe działanie bisfosfonianów może mieć charakter wielotorowy i obejmować mechanizmy wykraczające poza klasyczne oddziaływanie na szlak miewalonowy.

Pomimo licznych badań potwierdzających przeciwnowotworowe właściwości bisfosfonianów, ich skuteczność wobec hamowania wzrostu pierwotnych guzów oraz przerzutów do tkanek miękkich pozostaje kwestią sporną. Obiecujące wyniki badań *in vivo* odnotowywano w przypadku nowotworów kości, gdzie selektywna akumulacja bisfosfonianów w tkance kostnej sprzyjała osiągnięciu przez nie stężenia terapeutycznego.^{17,45} W przypadku innych nowotworów szybka akumulacja BPs w kościach jest raczej zjawiskiem niepożądanym, ponieważ prowadzi do krótkiego okresu półtrwania w osoczu, co utrudnia uzyskanie odpowiedniego stężenia leku w pobliżu nowotworu. Ponadto, w badaniach przedklinicznych, w których obserwowano widoczny efekt terapeutyczny, bisfosfoniany były stosowane w wysokich stężeniach.¹⁷ Niestety, zwiększenie dawki BPs może wiązać się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych, w szczególności martwicy kości szczęki lub zaburzeń czynności nerek. Z tych powodów bisfosfoniany nie są zalecane do samodzielnego stosowania w terapiach nowotworów. Badania mające na celu zwiększenie zakresu ich zastosowania w onkologii wciąż jednak trwają, a jedną z najbardziej obiecujących strategii terapeutycznych jest wykorzystanie ich w terapiach skojarzonych ze znanymi cytostatykami.

1.3.1 Addytywne i/lub synergistyczne interakcje bisfosfonianów ze znanymi cytostatykami

Terapie skojarzone, polegające na jednoczesnym stosowaniu dwóch lub więcej leków działających poprzez różne mechanizmy molekularne i komórkowe, stanowią skuteczną strategię terapeutyczną w leczeniu wielu chorób, w tym nowotworów. Dzięki wielokierunkowemu mechanizmowi działania terapie skojarzone pozwalają na osiągnięcie wyższej skuteczności leczenia oraz ograniczenie ryzyka rozwoju oporności na poszczególne składniki terapii. Dodatkowo, obecność potencjalnych efektów synergistycznych lub addytywnych między stosowanymi lekami umożliwia obniżenie ich dawek, co przekłada się na zmniejszenie toksyczności i poprawę profilu bezpieczeństwa terapii. Efekt synergistyczny oznacza, że działanie leków w połączeniu przewyższa sumę ich indywidualnych efektów, natomiast efekt addytywny odpowiada ich zsumowanemu działaniu.

Istnieje szereg badań *in vitro* potwierdzających synergistyczne i/lub addytywne interakcje między azotowymi bisfosfonianami (głównie zoledronianem) a różnymi chemioterapeutykami.^{43,54} Przykładowo, zoledronian w połączeniu z takimi środkami jak doksorubicyna, gemcytabina czy paklitaksel synergistycznie indukował apoptozę w liniach komórkowych raka piersi,^{55–57} prostaty,^{55,57} płuca^{57,58} czy żołądka,⁵⁹ natomiast w połączeniu z cisplatyną hamował wzrost komórek kostniakomięsaka.⁶⁰ Udokumentowano także jego współdziałanie z cytostatykami na komórki innych nowotworów, takich jak białaczka,⁶¹ międzybłoniak⁶² czy szpiczak mnogi.⁶³ Korzystny efekt terapii kombinowanych z udziałem BPów odnotowywano także w badaniach *in vivo*. Heymann i wsp. wykazali, że połączenie kwasu zoledronowego z ifosfamidem niemal całkowicie zahamowało wzrost guza w szczurzym modelu kostniakomięsaka.⁶⁴ Hiraga i wsp. zaobserwowali, że skojarzenie zoledronianu z tegafur-uracylem (UFT) znacząco ograniczało liczbę przerzutów do kości w porównaniu z monoterapią UFT w mysim modelu raka piersi.⁵⁶ Z kolei Zhou i wsp., porównując efektywność monoterapii zoledronianem i paklitakselem z leczeniem skojarzonym w modelu mięsaka Ewinga, wskazali na wyraźną przewagę terapii łączonej.⁴¹ W literaturze opisanych zostało znacznie więcej badań nad interakcją BPów ze znanymi chemioterapeutykami;^{16,43} wybrane przykłady zebrano w tabeli 2.

Tabela 2. Terapie kombinowane BP z innymi cytostatykami

BP	Cytostatyk	Rodzaj nowotworu (linia komórkowa/ model zwierzęcy)	Efekt	Uzyskane działanie	Lit
<i>In vitro</i>					
ZOL	DOX, PTX, Gem	Kostniakomięsak (MOS)	Hamowanie wzrostu komórek	Synergistyczne	[65]
ZOL	Cis-Pt	Kostniakomięsak (U-2 OS)	Hamowanie wzrostu komórek	Synergistyczne	[60]
IBN	DOC, PTX	Rak piersi (MDA-MB-231)	Hamowanie adhezji i inwazji	Addytywne	[66]
ZOL	5-FU	Rak piersi (4T1/luc)	Indukcja apoptozy	Addytywne	[56]
ZOL	Gem, Flv	Rak piersi (MCF7, SK-BR-3, BT474) Rak prostaty (PC 3, LnCaP) Rak płuca (H460)	Indukcja apoptozy	Synergistyczne	[57]
ZOL	DOX,	Rak piersi (MCF7, MDA- MB-436) Rak prostaty (PC3)	Indukcja apoptozy	Synergistyczne*	[55]
ZOL	SIM, SIM+BTZ	Szpiczak mnogi (NCI- H929)	Indukcja apoptozy, Przewycięzenie lekooporności zależnej od adhezji komórek	Synergistyczne	[63]
<i>In vivo</i>					
ZOL	PTX, Eto, Cis-Pt, CPT-11	Mysi model drobnokomórkowego raka płuca (SBC-3)	Hamowanie wzrostu komórek nowotworowych w modelu mysim	Synergistyczne	[58]
ZOL	PTX	Mysi model raka płuca (SPC-A1)	Zmniejszenie częstości przerzutów do kości, Wydłużenie przeżycia	Synergistyczne	[67]
ZOL	DOX	Mysi model raka piersi (MDA-G8)	Hamowanie wzrostu guza	Synergistyczne*	[68]
ZOL	UFT	Mysi model raka piersi z przerzutami do kości (4T1/luc)	Zmniejszenie liczby przerzutów do kości	--	[56]
ZOL	Cis-Pt	Mysi model kostniakomięsaka (143B)	Hamowanie wzrostu guza, Hamowanie osteolizy	--	[69]
ZOL	Ifosfamid	Szczurzy model kostniakomięsaka	Hamowanie wzrostu guza, Hamowanie nawrotu nowotworu, Zintensyfikowanie naprawy tkanek i regeneracji kości	--	[64]
ZOL	PTX	Mysi model mięsaka Ewinga (TC71)	Hamowanie wzrostu guza	Synergistyczne	[41]

BTZ - bortezomib, Cis-Pt - cisplatyna, CPT-11 - irynotekan, DOC - docetaksel, DOX - Doksorubicyna, Eto - Etopozyd, Flv - fluwastatyna, Gem - Gemcytabina, PTX - Paklitaksel, SIM - simwastatyna, UFT - tegafur-uracyl, ZOL - Zoledronian, -- działanie niezdefiniowane, ale efekt lepszy niż w przypadku każdego środka osobno; * - efekt zależny od sekwencji podania

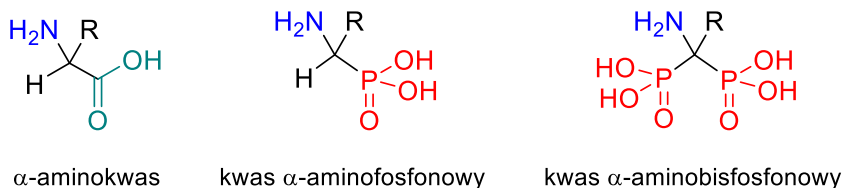
1.3.2 Badania kliniczne

Niektóre badania sugerują, że stosowanie bisfosfonianów w leczeniu uzupełniającym nowotworów (szczególnie raka piersi, raka prostaty oraz szpiczaka mnogiego) może przyczynić się do zahamowania progresji nowotworu, zmniejszenia prawdopodobieństwa jego nawrotu, przeciwdziałać występowaniu przerzutów do kości czy wydłużyć czas przeżycia pacjentów. Efekt wywierany przez bisfosfoniany jest jednak w dużej mierze zależny od stadium zaawansowania nowotworu, rodzaju zastosowanego BPs, jego dawki, drogi podania oraz częstotliwości stosowania. Analiza danych opublikowana w *Cochrane Review* w 2017 r. dotycząca wpływu terapii z udziałem BPs na pacjentki z rakiem piersi wykazała, że stosowanie zoledronianu (4 mg co 3-6 miesięcy przez 1-5 lat, dożylnie) lub kłodronianu (1600 mg dziennie przez 2-3 lata, doustnie) poprawia przeżywalność całkowitą i zmniejsza ryzyko nawrotu raka wyłącznie u pacjentek z wczesnym rakiem piersi po menopauzie. U kobiet z bardziej zaawansowaną postacią choroby oraz z przerzutami do kości nie obserwowano takich korzyści, a BPs wpłynęły jedynie na poprawę jakości życia pacjentek.⁷⁰ Zbliżone spostrzeżenia dotyczące korzystnego wpływu bisfosfonianów na leczenie wczesnego raka piersi przedstawiła grupa Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, opierając się na wynikach metaanalizy przeprowadzonej w 2015 roku.⁷¹ W przypadku pacjentów z rakiem prostaty (PC) i szpiczakiem mnogim (MM) wyniki badań są mniej jednoznaczne. Mimo że niektóre randomizowane badania sugerowały korzystny wpływ bisfosfonianów na wydłużenie całkowitego przeżycia lub czasu wolnego od progresji choroby u pacjentów z rakiem prostaty (PC) lub szpiczakiem mnogim (MM), metaanalizy opublikowane w *Cochrane Reviews* w 2017 roku,⁷² oraz *The Lancet* w 2016 roku⁷³ nie potwierdziły jednoznacznie takiego działania terapeutycznego.

1.4 Struktura i aktywność biologiczna α -aminobisfosfonianów

Ważną grupę bisfosfonianów stanowią 1-amino-1,1-bisfosfoniany, inaczej α -aminobisfosfoniany (ABPs), charakteryzujące się obecnością grupy aminowej przy centralnym atomie węgla C α . Oprócz tego, że są one syntetycznymi odpowiednikami pirofosforanów, związki te można uznać także za strukturalne analogi kwasów α -aminofosfonowych (APs) sfunkcjonalizowane dodatkową grupą fosfonową w pozycji α (Rys. 6). APs, ze względu na podobieństwo do naturalnych α -aminokwasów, wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym działanie przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe, a także działają jako herbicydy i regulatory wzrostu roślin.⁷⁴ α -Aminobisfosfoniany wykazują równie zróżnicowane działanie biologiczne, które

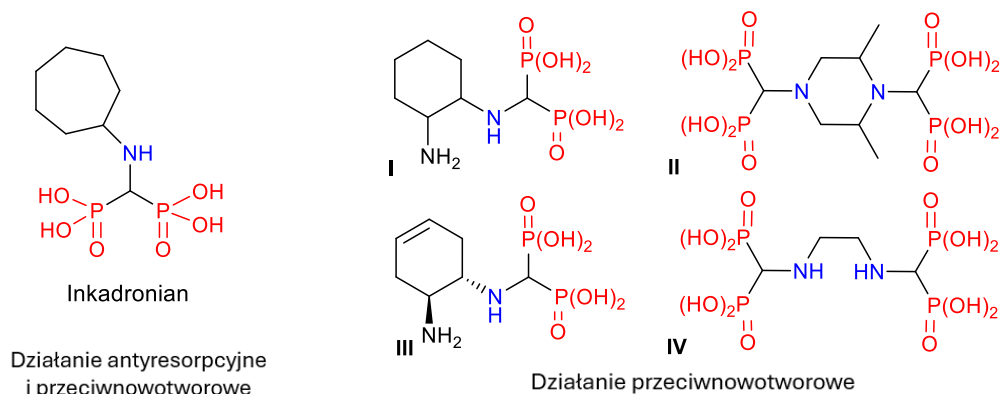
podobnie jak w przypadku APs – wynika najczęściej ze zdolności tych związków do hamowania aktywności enzymów.



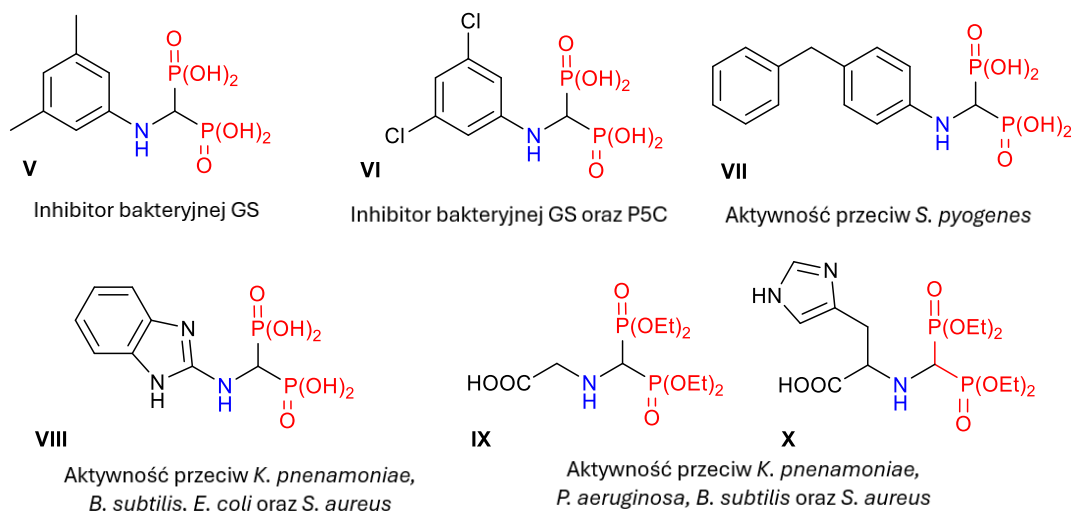
Rys. 6. Porównanie struktur α-aminokwasu, kwasu α-aminofosfonowego i kwasu α-aminobisfosfonowego

Najbardziej znanym i jedynym skomercjalizowanym przedstawicielem tej klasy związków jest inkadronian, stosowany w leczeniu osteoporozy oraz hiperkalcemii w nowotworach złośliwych, zatwierdzony przez Japońską Agencję ds. Wyrobów Farmaceutycznych i Medycznych w 1997 r. i dystrybuowany pod nazwą Bisphonal. Chociaż struktura inkadronianu (Rys. 7) różni się od struktury typowych BPs III generacji, takich jak zoledronian czy rizedronian, z uwagi na jego wysoką skuteczność w hamowaniu resorpcji kości oraz podobny mechanizm działania, uznawany jest za bisfosfonian najnowszej generacji. Związek ten, poza hamowaniem syntazy pirofosforanu farnezyli, wykazuje również działanie hamujące wobec innego enzymu tego szlaku – syntazy skwalenu – znacznie silniejsze niż w przypadku innych bisfosfonianów, takich jak pamidronian czy alendronian ($IC_{50} = 64$ nM dla INC, $IC_{50} > 10$ μM dla PAM i ALN).²⁶

Poza aktywnością antyresorpcyjną, w badaniach przedklinicznych niejednokrotnie wykazywano także przeciwnowotworowe działanie α-amino-bisfosfonianów, m.in. zdolność do indukcji apoptozy i/lub hamowania proliferacji, migracji czy adhezji komórek nowotworowych w liniach: kostniakomięsaka (MG-63, Saos-2),⁴⁰ chrzęstniakomięsaka (SW1353, OUMS27),⁴⁰ mięsaka Ewinga (RD-ES, SK-ES-1),⁴⁰ raka trzustki (SUIT-2, AsPC-1, BxPC-3)⁷⁵ i raka prostaty (PC-3)⁷⁶ przez inkadronian, czy zdolność do hamowania proliferacji makrofagów RAW 264.7, komórek raka prostaty (PC-3) i raka piersi (MCF-7) przez bis- oraz tetrafosfonowe pochodne 1,3- i 1,4-diamin, piperazyny, 1,2-diaminobenzenu, cykloheksano-1,2-diaminy i cykloheks-4-eno-1,2-diaminy.⁷⁷ Niektóre z tych analogów, jak np. związki I-IV (Rys. 7) charakteryzowały się wyższą aktywnością przeciwnowotworową od inkadronianu, zoledronianu czy cisplatyny.⁷⁷

Rys. 7. Struktury analogów α -aminobisfosfonianów o działaniu przeciwnowotworowym

α -Aminobisfosfoniany były badane również pod kątem ich aktywności przeciwbakteryjnej. W badaniach *in vitro* wykazywano, że związki te mają zdolność do hamowania enzymów istotnych dla metabolizmu bakterii, takich jak syntetaza glutaminy (GS) z *M. tuberculosis*,⁷⁸ czy reduktaza pirolino-5-karboksylanu (P5C) z *S. pyogenes* (Rys. 8, analogi **V** i **VI**).¹² Ponadto, zaobserwowano ich zdolność do bezpośredniego ograniczania wzrostu szczepów *S. pyogenes*,¹² *K. pneumoniae*,^{9,10} *B. subtilis*,^{9,10} *E. coli*,¹⁰ *S. aureus*^{9,10} oraz *P. aeruginosa*⁹ (Rys. 8, analogi **VII-X**).

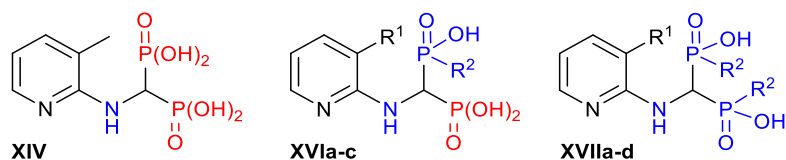
Rys. 8. Struktury analogów α -aminobisfosfonianów o działaniu przeciwbakteryjnym

W badaniach *in vitro* wykazywano również działanie α -aminobisfosfonianów na enzymy wirusowe, np. integrazę HIV-1¹⁴ oraz odwrotną transkryptazę HIV-1 (RT).¹³ Lachay i wsp. opracowali serię 25 analogów ABPs, z których kilka wykazywało aktywność w hamowaniu odwrotnej transkryptazy HIV-1 porównywalną do foscarnetu (Rys. 9, analog **XI**).¹³ Z kolei Agapkina i wsp. zsyntetyzowali 17 pochodnych bisfosfonowych, spośród których wybrane związki efektywnie blokowały aktywność integrazy HIV-1 na etapach znanych w literaturze jako "3'-processing" i "strand transfer". Analiza zależności struktura-aktywność ujawniła,

1.5 Strategie redukcji powinowactwa bisfosfonianów do tkanki kostnej

Pomimo różnokierunkowej aktywności biologicznej kwasów bisfosfonowych, w tym α -aminobisfosfonowych, ich wysokie powinowactwo do HA i szybki wychwyt w tkance kostnej ograniczają możliwość wykorzystania ich biologicznych właściwości w leczeniu chorób pozaszkieletowych. Zdolność wiązania się tych związków z tkanką kostną jest jednak zależna od ich struktury i może być zredukowana w wyniku estryfikacji grup fosfonowych tworzących mostek P-C-P lub zastąpienia jednej lub obydwu tych grup innymi grupami fosforowymi, o słabszych właściwościach chelatujących, (np. grupą fosfinową lub fosfinoilową).

„Maskowanie” grup fosfonowych w wyniku estryfikacji może być całkowite lub częściowe, w zależności od stopnia estryfikacji,⁸⁰ oraz trwałe lub przejściowe, w zależności od metabolicznej stabilności powstałego estru.⁸¹ Estry BPs można podzielić na proleki, czyli pochodne ulegające hydrolizie *in vivo* do ich aktywnych form oraz hydrolitycznie stabilne związki, które są aktywne w formie estru (jak np. opisane w rozdziale 1.4 pochodne **IX**, **X** czy **XV**). Za stabilne *in vivo* uważane są estry alkilowe bisfosfonianów, natomiast za łatwo ulegające hydrolizie – estry aryłowe,^{82,83} acetalowe,⁸⁴ acyloksymetyłowe^{85–87} oraz alkoksykarbonylometyłowe⁸⁶ (Rys. 11). Estryfikacja grup fosfonowych BPs, poza wpływem na powinowactwo do HA tych związków, wpływa również na zwiększenie ich lipofilowości, co może przekładać się na poprawę ich biodostępności. Według niektórych doniesień, estry bisfosfonianów wykazują często wyższą aktywność biologiczną niż ich odpowiedniki kwasowe.^{82,85}



Rys. 12. Struktury fosfonowo-fosfinowych oraz bisfosfinowych pochodnych α -amino-bisfosforowych badanych przez *Ebetino* i wsp⁸⁸

Tabela 3. Hamowanie wzrostu kryształów HA przez pochodne α -aminobisfosforowe **XIV**, **XVI** i **XVII**⁸⁸

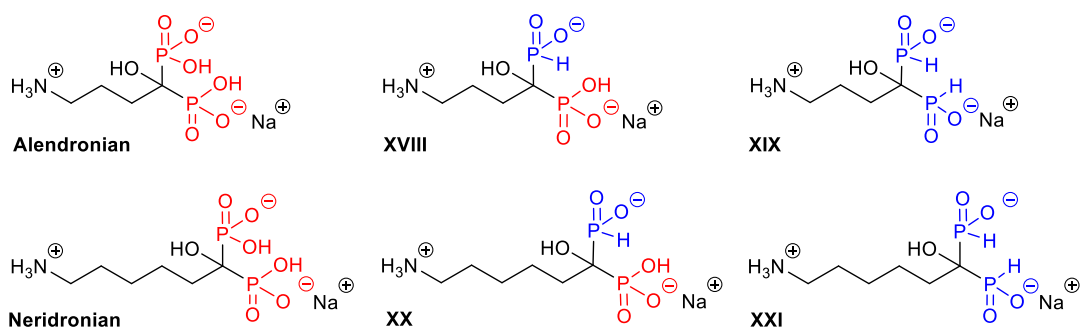
Związek			HA-CGI ^a	TPTX (LED) ^b mg/kg
Nr	R ¹	R ²		
XIV	-	-	1.3	0.001
XVIa	Me	Me	27.5	1.0
XVIb	Me	Bu	26.9	-
XVIc	H	Me	30.5	-
XVIIa	Me	Me	brak aktywności	-
XVIIb	Me	Bu	brak aktywności	-
XVIIc	H	Me	brak aktywności	-
XVIIId	H	Bu	brak aktywności	-

^aHA-CGI – inhibicja wzrostu kryształów HA. Dane podane jako stężenie $\times 10^{-6}$ M wymagane do zahamowania tworzenia się kryształów hydroksyapatytu w ciągu 50 minut w przesyconym medium. Dane zostały znormalizowane względem etidronianu, dla którego wartość HA-CGI wynosi 1.0.

^bLED - (ang. *lowest effective dose*), najniższa dawka skuteczna (mg/kg).

Istnieje uzasadniona wątpliwość, czy zastąpienie grup fosfonowych w strukturze BP's innymi grupami fosforowymi nie doprowadzi do obniżenia lub całkowitej utraty aktywności biologicznej związku. Niestety, doniesień dotyczących właściwości biologicznych tak zmodyfikowanych układów bisfosforowych jest w literaturze niewiele, a przeprowadzone do tej pory badania nie rozstrzygają tej kwestii jednoznacznie. Badania *in vivo* nad procesem hamowania mineralizacji kości przeprowadzone na modelu szczurzym TPTX (model resorpcji kości stymulowanej parathormonem) z udziałem pochodnych **XIV** oraz **XVIa** wskazały na niższą aktywność pochodnej fosfonowo-fosfinowej. W badaniach przeprowadzonych przez zespół *Lecouvery'ego* fosfonowo-*H*-fosfinowe oraz bis-*H*-fosfinowe analogi alendronianu **XVIII** i **XIX** (Rys. 13) wykazywały aktywność antyproliferacyjną wobec komórek raka płuca A549, jednak ich skuteczność była niższa niż w przypadku alendronianu. Pochodna fosfonowo-*H*-fosfinowa **XVIII** wykazywała nieco wyższą aktywność wobec komórek linii A549 w porównaniu z pochodną bis-*H*-fosfinową **XIX** ($IC_{50} = 53 \pm 17 \mu M$ vs $84 \pm 4 \mu M$). Odwrotną zależność stwierdzono natomiast w przypadku komórek raka piersi MDA-MB-231 – aktywność obserwowano jedynie dla alendronianu oraz jego analogu bis-*H*-fosfinowego **XIX**, podczas gdy pochodna

XVIII pozostawała nieaktywna. Co ciekawe, w serii analogów neridronianu, to pochodna fosfonowo-*H*-fosfinowa **XX** (Rys. 13) charakteryzowała się najwyższą aktywnością antyproliferacyjną, wyższą od neridronianu, osiągając wartości IC_{50} wynoszące odpowiednio 72 μM dla linii MDA-MB-231 oraz 26.6 μM dla linii A549. Pochodna bis-*H*-fosfinowa **XXI** była nieaktywna we wszystkich testowanych liniach komórkowych.⁸⁹



Rys. 13. Struktury fosfonowo-*H*-fosfinowych oraz bis-*H*-fosfinowych analogów alendronianu oraz neridronianu

2. Metody otrzymywania układów 1-amino-1,1-bisfosforowych

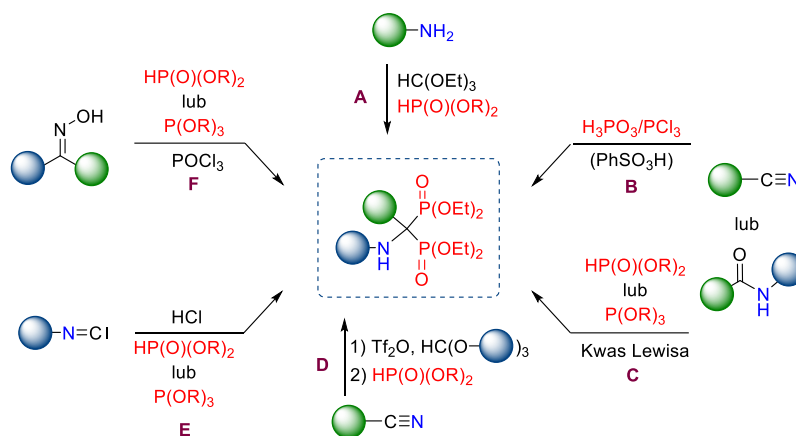
Na przestrzeni ostatnich 50 lat opracowano wiele strategii syntezy pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych. Zasadniczo można je podzielić na metody jednoetapowe (równoczesne), w których oba wiązania C_{α} -P powstają w jednym etapie, oraz metody sekwencyjne, w których tworzenie tych wiązań przebiega etapowo.

Zdecydowana większość dostępnych doniesień literaturowych dotyczy metod jednoetapowych, które w większości przypadków prowadzą do otrzymania symetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych. Choć niektóre z tych metod mogą również umożliwiać syntezę związków niesymetrycznych, gdy w reakcji zostaną użyte różne nukleofile fosforowe, są one rzadko wykorzystywane w praktyce, głównie z powodu trudności w rozdzieleniu powstającej mieszaniny produktów symetrycznych i niesymetrycznych. Alternatywę stanowią metody sekwencyjne, oparte na stopniowym wprowadzaniu grup fosforowych do odpowiednich prekursorów. Choć wymagają one większej liczby etapów, umożliwiają uzyskanie produktów w sposób bardziej selektywny, co czyni je szczególnie przydatnymi w syntezie układów niesymetrycznych.

Ze względu na zakres badawczy niniejszej pracy, w poniższym rozdziale omówione zostaną wybrane metody syntezy zarówno symetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych, jak i niesymetrycznych pochodnych fosfonowo-fosfinowych oraz fosfonowo-fosfinoilowych.

2.1 Wybrane metody syntezy symetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych

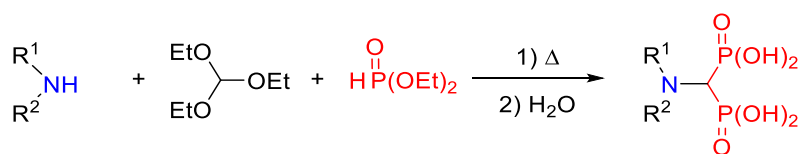
Pochodne α -aminobisfosfonowe można otrzymać na drodze szeregu różnych reakcji, m.in.: trójskładnikowej kondensacji amin z ortomrówczanem trietylu i fosforynem dietylu (Schemat 3, A), reakcji bisfosfonylowania amidów, imin, nitryli oraz izonitryli z wykorzystaniem kwasu fosforowego(III) lub fosforynów dialkilu bądź trialkilu (Schemat 3, B-E), przegrupowania Beckmanna oksymów (Schemat 3, F), a także innych, mniej typowych procedur.^{90,91} Ze względu na dużą liczbę doniesień literaturowych dotyczących metod syntezy tych związków, w dalszej części pracy omówione zostaną najczęściej stosowane strategie oraz wybrane metody opracowane w latach 2015–2025. Część z nich stanowi udoskonalone wersje wcześniej znanych procedur syntetycznych.



Schemat 3

2.1.1 Trójskładnikowa kondensacja amin z ortomrówczanem trietylu i fosforynem dietylu

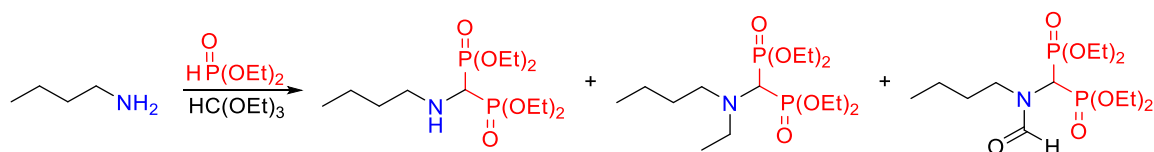
Jedną z najstarszych i najważniejszych metod syntezy α -aminobisfosfonianów oraz ich pochodnych jest trójskładnikowa kondensacja amin, ortomrówczanu trialkilu i fosforynu dialkilu. Reakcja ta została po raz pierwszy opisana w literaturze patentowej przez *Suzukiego* w 1979 roku,⁹² później była wielokrotnie rozszerzana i modyfikowana. W klasycznym wariantcie reakcję prowadzi się w podwyższonej temperaturze (powyżej 100°C) od kilku do kilkunastu godzin, a powstałą mieszaninę produktów poddaje się hydrolizie, w wyniku czego otrzymuje się *N*-mono lub *N,N*-dipodstawione kwasy 1-aminobisfosfonowe (Schemat 4).⁹⁰



Schemat 4

Metoda ta była z powodzeniem stosowana w syntezie szerokiej gamy (kilkuset) zróżnicowanych strukturalnie pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych, o różnorodnej aktywności biologicznej.^{12,79,90,93} W roli substratów wykorzystywano zarówno pierwszo- jak i drugorzędowe aminy, w tym aminy alifatyczne, cykliczne i aromatyczne oraz aminy pochodne związków heteroaromatycznych.^{79,91,93} Istnieją także warianty tej metody, w których zamiast fosforynu dietylu (lub wraz z nim) stosuje się inne nukleofile fosforowe, m.in. metylo-*H*-fosfinian etylu,⁸⁸ fosforyn trietylu⁹³ tlenek difenylofosfiny⁹⁴ czy dietoksymetylo-*H*-fosfinian etylu.⁹⁵ Reakcje z tymi ostatnimi prowadzą do otrzymania bistlenków fosfin oraz kwasów bis-*H*-fosfinowych.

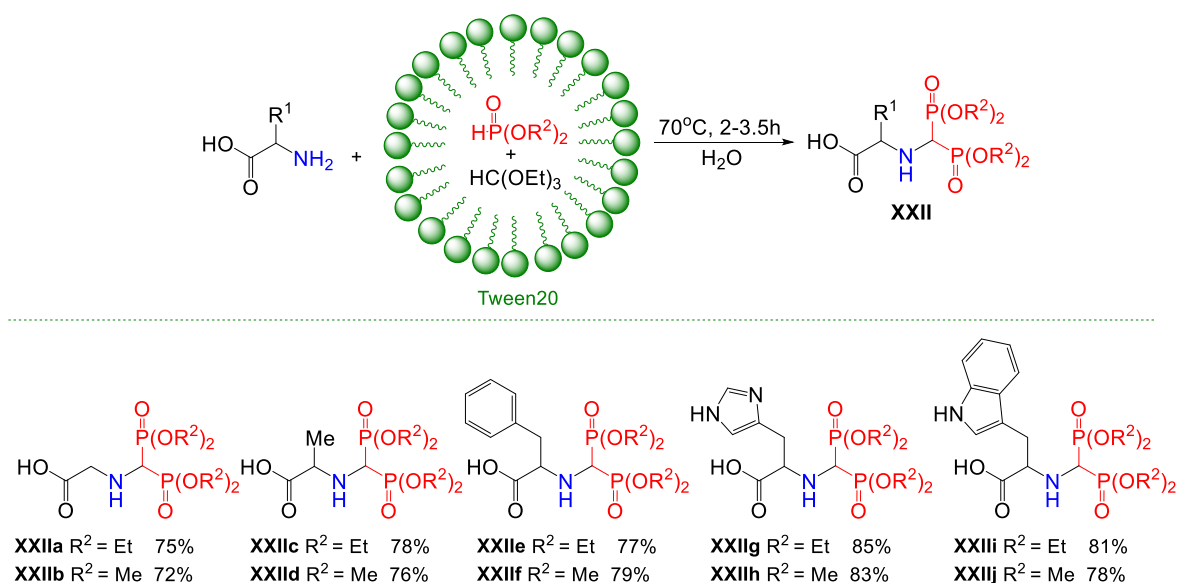
Z uwagi na dosyć złożony mechanizm omawianej reakcji, w niektórych syntezach, oprócz oczekiwanych ABPs, obserwowano powstawanie niepożądanych produktów ubocznych (najczęściej produktów *N*-alkilowania czy *N*-formylowania, jak przedstawiono na schemacie 5).^{90,94} Przebieg tych reakcji oraz skład mieszaniny poreakcyjnej jest silnie uzależniony od właściwości zastosowanej aminy oraz warunków prowadzenia syntezy.⁹⁰



Schemat 5

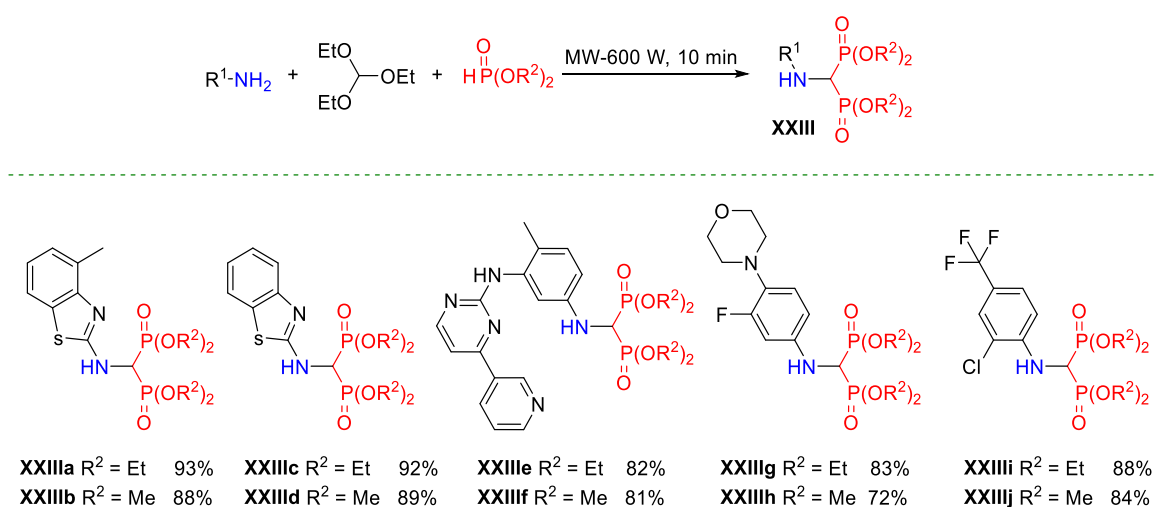
W literaturze opisano liczne modyfikacje klasycznej procedury, które pozwalają na prowadzenie reakcji w łagodniejszych warunkach, czy zwiększenie ich selektywności.⁹⁰ Obejmują one m.in. reakcje bez użycia rozpuszczalnika,⁹⁶ w środowisku micelnym,⁹ z udziałem katalizatorów (np. TiO₂¹⁰ czy eterów koronowych⁹⁷) oraz wspomagane promieniowaniem mikrofalowym.^{94,96}

Przykładem takiej modyfikacji jest trójskładnikowa reakcja kondensacji aminokwasów z ortomrówczanem trietylu oraz fosforynem dialkilu, katalizowana przez niejonowy surfaktant Tween 20 (Schemat 6).⁹ Zastosowanie tej modyfikacji pozwoliło na uzyskanie produktów z wyższymi wydajnościami oraz w krótszym czasie w porównaniu do analogicznej reakcji prowadzonej w mieszaninie etanolu i wody bez użycia surfaktanta (72-85% vs 54-77%, 2-3.5 godz. vs 6-8 godz.). Dwa spośród otrzymanych związków, pochodne **XXIIa** oraz **XXIIg**, wykazywały obiecującą aktywność przeciwbakteryjną.



Schemat 6

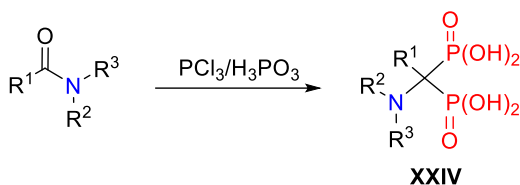
Interesującą modyfikację zaproponowali w 2020 roku *Shaik* i wsp., którzy opisali syntezę dziesięciu pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych **XXIII** w bezkatalitycznej reakcji kondensacji aromatycznych i heteroaromatycznych amin z ortomrówczanem trietylu oraz fosforynem dietylu lub dimetylu (Schemat 7). Reakcję prowadzono bez udziału rozpuszczalnika, przy jednoczesnym zastosowaniu promieniowania mikrofalowego. Oczekiwane związki uzyskano już po 10 minutach reakcji, z bardzo dobrymi wydajnościami w zakresie 72–93%. Otrzymane pochodne wykazywały istotną aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwutleniającą, a przeprowadzone badania *in silico* wskazały na wysokie powinowactwo tych związków do ludzkiej ligazy DNA.⁹⁸



Schemat 7

2.1.2 Synteza pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych z amidów

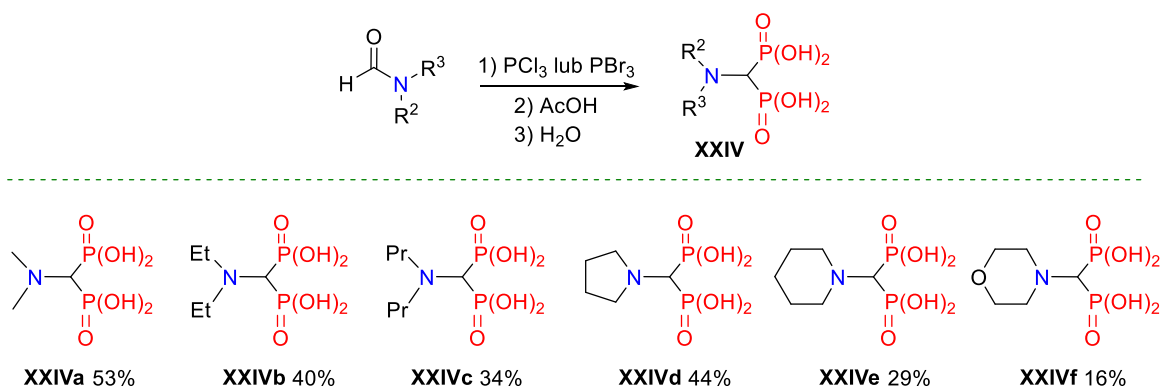
Inną znaną, powszechnie stosowaną strategią otrzymywania 1-amino-1,1-bisfosfonianów i ich pochodnych są reakcje bisfosfonylowania amidów. Pierwszą tego typu transformację opisali w 1972 roku Plöger i wsp., którzy przeprowadzili fosfonylowanie amidów z użyciem kwasu fosforowego(III) lub trichlorku fosforu (Schemat 8).⁹⁹



R¹= H, Alk, Ar; R²= H, Alk; R³= Alk, (Het)Ar, cykloalkil

Schemat 8

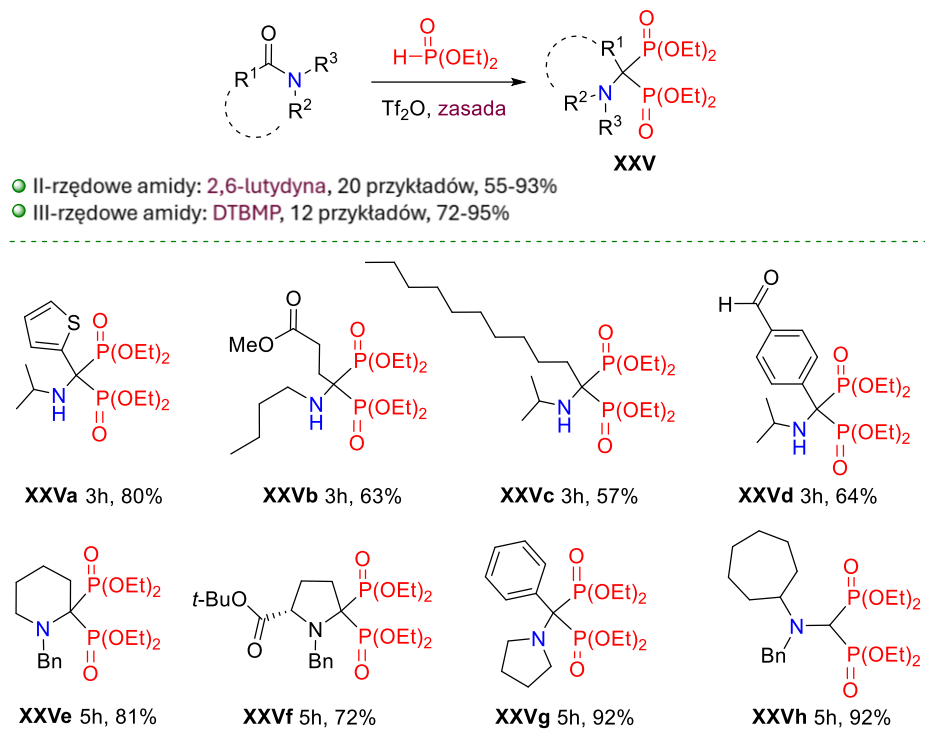
W późniejszych latach metodę tę rozszerzano i modyfikowano, wykazując przy tym możliwość zastosowania także innych odczynników fosfonylujących, takich jak np. tribromek fosforu.¹⁰⁰ Omawiana transformacja pozwala na otrzymywanie szerokiej gamy strukturalnie zróżnicowanych produktów i znajduje szczególne zastosowanie w syntezie analogów N-podstawionych (przykładowe struktury przedstawiono na schemacie 9).¹⁰⁰ Do innych zalet tej metody należą także wysoka stabilność oraz łatwa dostępność substratów amidowych, a także prostota wykonania. Zastosowanie klasycznych reagentów fosfonylujących, takich jak PCl₃/H₃PO₄, wiąże się jednak często z koniecznością prowadzenia reakcji w podwyższonej temperaturze, a uzyskiwane wydajności produktów są zazwyczaj niskie lub umiarkowane.¹⁰¹



Schemat 9

Skuteczne fosfonylowanie amidów można również przeprowadzić z użyciem fosforynów dialkilu, trialkilu lub tris(trimetylosililu), w obecności promotorów takich jak trichlorek fosforylu,¹⁰² trifosgen¹⁰³ czy kwasów Lewisa, np.

chlorku cynku¹⁰⁴ czy trifluorometanosulfonianu trimetylosilu (TMSOTf).¹⁰⁵ Ciekawym przykładem jest metoda podwójnego fosfonylowania amidów z użyciem fosforynu dietylu, opracowana przez Wanga i wsp. w 2015 roku (Schemat 10).¹⁰¹ Reakcję prowadzono w obecności bezwodnika trifluorometanosulfonowego (Tf₂O) jako katalizatora oraz 2,6-lutydyny lub 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylopirydyny (DTBMP) jako zasady. Autorzy wykazali, że reakcji ulegają zarówno drugo-, jak i trzeciorzędowe amidy alifatyczne i aromatyczne oraz laktamy, w tym pochodne zawierające wrażliwe grupy funkcyjne, takie jak grupy cyjanowe, estrowe, formylowe czy acylowe. Transformacja przebiega w łagodnych warunkach, w temperaturze pokojowej, w czasie 3-5 godzin, prowadząc do otrzymania pożądaných produktów **XXV** z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami w zakresie 55–95%. Struktury kilku wybranych analogów otrzymanych tą metodą przedstawiono na schemacie 10.

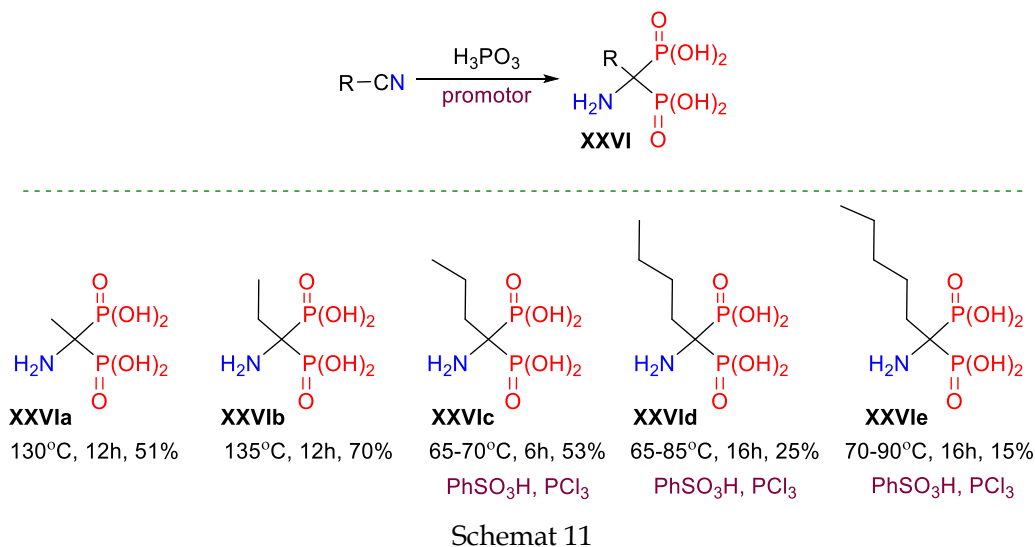


Schemat 10

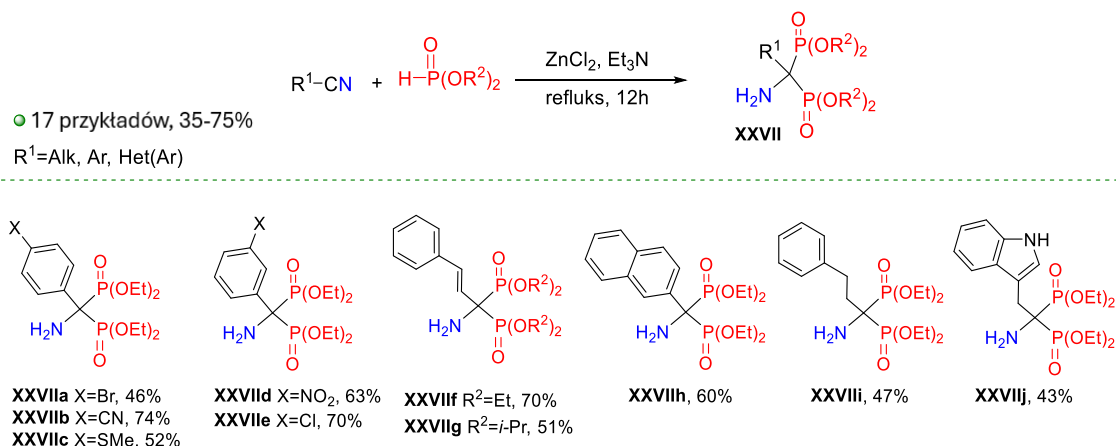
2.1.3 Synteza pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych z nityryli

Pochodne 1-amino-1,1-bisfosfonowe mogą być również otrzymywane w wyniku szeregu reakcji z udziałem nityryli. Jedną z najwcześniej opisanych metod jest reakcja nityryli z kwasem fosforowym(III), czasem wspomagana trichlorkiem fosforu lub kwasem *p*-toluenosulfonowym. Metoda ta znajduje głównie zastosowanie w syntezie pochodnych ABPs zawierających wolną grupę aminową. W 2005 roku Szajnmán i wsp. zastosowali tę strategię do otrzymania

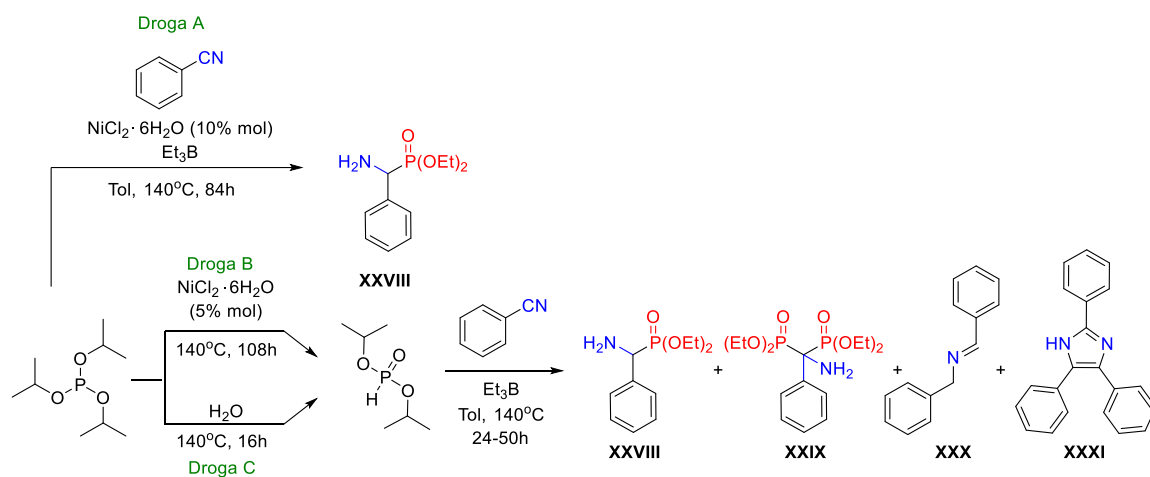
pięciu inhibitorów TcFPPS (syntazy farnezylodifosforanowej *Trypanosoma cruzi*) **XXVI**, uzyskując produkty z wydajnościami w zakresie 15–70% (Schemat 11)¹⁰⁶



Fosfonylowanie nityli, podobnie jak amidów, można przeprowadzić z użyciem fosforynów dialkilu lub trialkilu. Przykładem takiej transformacji jest podwójne hydrofosfonylowanie nityli z udziałem fosforynu dialkilu w układzie ZnCl₂/Et₃N, opisane przez *Kaboudina* i wsp. w 2019 roku (Schemat 12).¹⁰⁷ Metoda ta cechuje się szerokim zakresem stosowalności, obejmującym *para*- i *meta*-podstawione benzonitryle, nityle alifatyczne oraz pochodne α,β-nienasycone, 2-naftyłowe i heterocykliczne. W przypadku substratów o dużej sterycznej zawadzie, takich jak 2,4-dichlorobenzonitryl, difenyloacetonitryl czy cykloheksanokarbonitryl, reakcja nie zachodzi. Autorzy opisali również możliwość przeprowadzenia syntezy α-aminobisfosfonianów metodą *one-pot* z aldehydów, które w warunkach reakcji (ZnCl₂/Et₃N, fosforyn dietylu) ulegają *in situ* przekształceniu w nityle, a następnie podwójnemu hydrofosfonylowaniu.



W tym samym roku *Islas i García* badali reakcje fosfonylowania nitryli aromatycznych z wykorzystaniem trietyloboranu (Et_3B) oraz katalizatora niklowego ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).¹⁰⁸ Autorzy zaobserwowali, że hydrofosfonylowanie benzonitrylu z zastosowaniem fosforynu triizopropylu jako substratu stanowi efektywną strategię otrzymywania α -aminofosfonianu **XXVIII**. Jednakże, gdy fosforyn triizopropylu poddano hydrolizie do fosforynu diizopropylu, a otrzymany związek zastosowano w reakcji, obserwowano istotną zmianę selektywności procesu (Schemat 13, Tabela 4). W takich warunkach, w zależności od zastosowanego nadmiaru Et_3B , reakcja preferencyjnie prowadziła do powstawania α -aminobisfosfonianu **XXIX** lub pochodnych **XXX** czy **XXXI**. Ponieważ celem pracy była synteza pochodnych APs, nie kontynuowano badań nad uzyskiwaniem ABPs.



Schemat 13

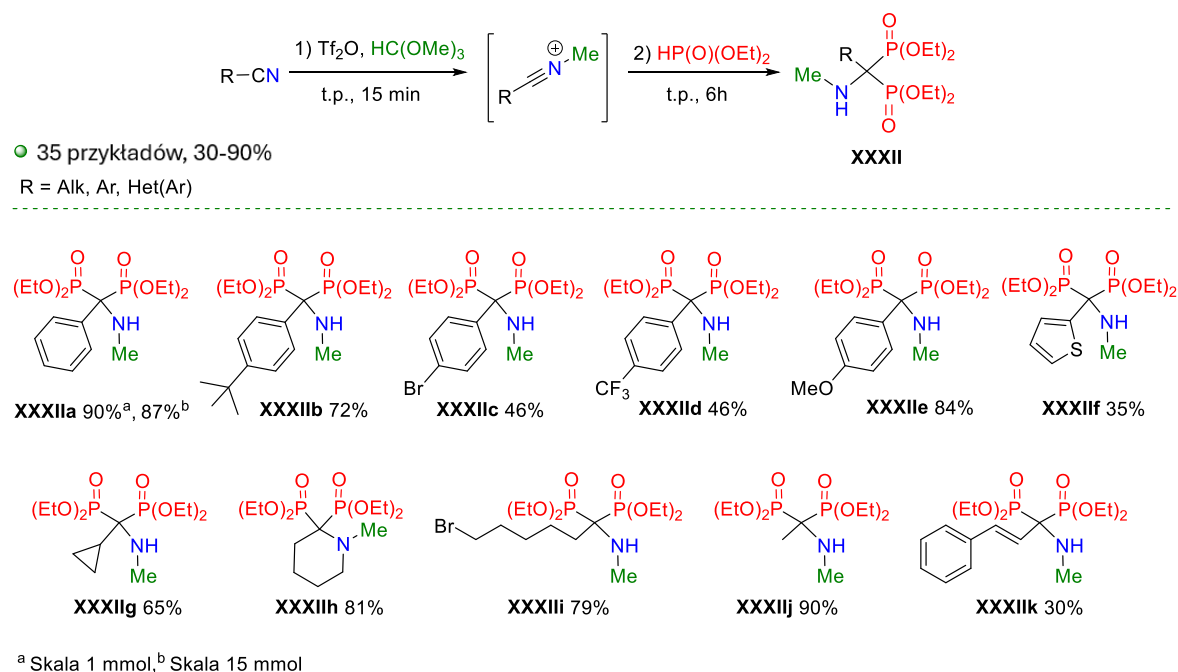
Tabela 4. Wpływ warunków na wyniki reakcji benzonitrylu z fosforynem triizopropylu lub diizopropylu

Nr	Droga	Et_3B (ekw.)	Konwersja PhCN, %	Selektywność, %			
				XXVIII	XXIX	XXX	XXXI
1	Droga A	2	98	88	– ^a	– ^a	– ^a
2	Droga B	1	94	27	65	– ^b	– ^b
3	Droga C	1	98	12	81	– ^b	– ^b
4	Droga C	3	97	28	– ^b	43	9

^a Nie określono; ^b Nie wykryto obecności

Pochodne 1-amino-1,1-bisfosfonowe można także otrzymać w zmodyfikowanej, „przerwanej” wersji reakcji *Rittera*.¹⁰⁹ Metoda ta polega na generowaniu reaktywnego jonu nitryliowego w reakcji nitrylu z ortomrówczanem trimetylu oraz bezwodnikiem trifluorometanosulfonowym (Tf_2O), który następnie reaguje *in situ* z fosforynem dialkilu, prowadząc do powstania

N-metylowanych pochodnych ABPs **XXXII**. Zaletami tego podejścia są łagodne warunki reakcji, możliwość jej skalowania oraz stosunkowo szeroki zakres stosowalności, obejmujący nityle alifatyczne, aromatyczne, heteroaromatyczne, cykliczne oraz α,β -nienasycone. Najlepsze wydajności uzyskiwano w reakcjach z udziałem nityli alifatycznych. W przypadku pochodnych benzonitrylu, wydajność zależała zarówno od efektów elektronowych, jak i od zawady sterycznej podstawników. Co ciekawe, reakcje z 4-bromobutanonitrylem oraz 5-bromopentanonitrylem prowadziły do produktów cyklizacji. Natomiast w przypadku wyższego homologu, 6-bromoheksanonitrylu, otrzymano produkt podstawiony grupą 5-bromopentylową. Struktury wybranych pochodnych ABPs otrzymanych tą metodą przedstawiono na schemacie 14.

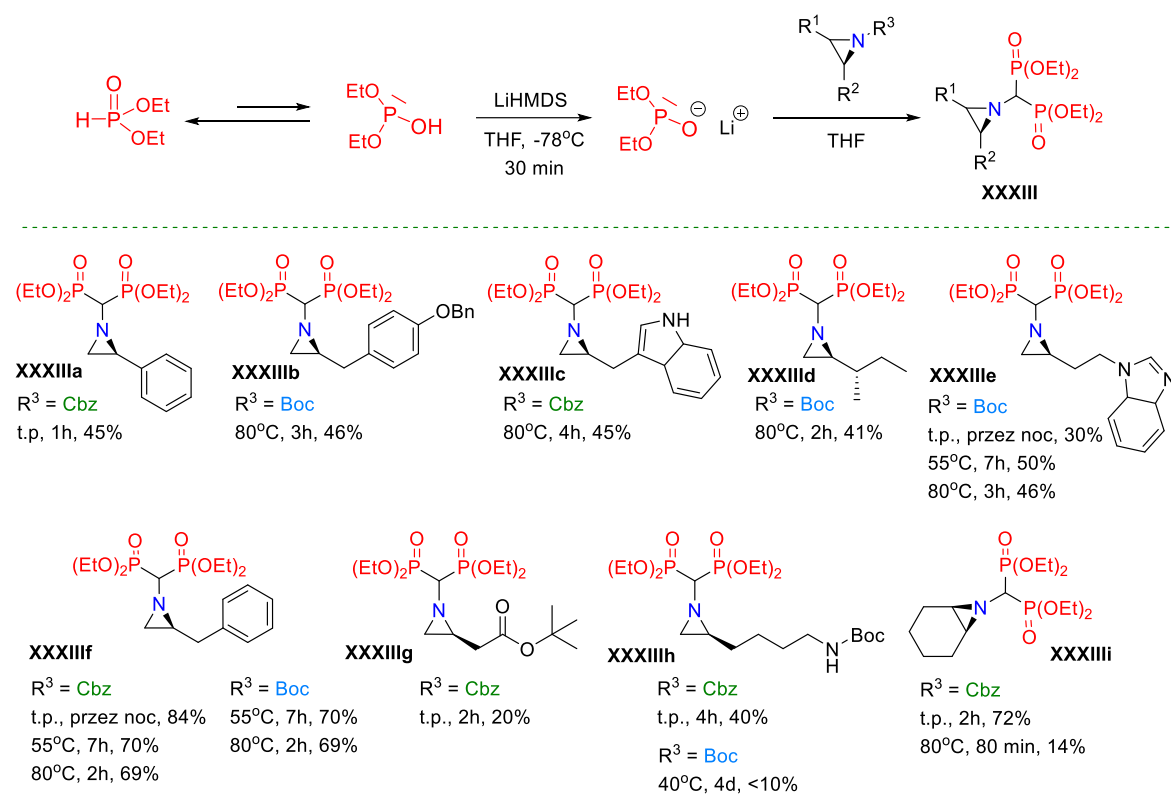


Schemat 14

2.1.4 Inne metody otrzymywania pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych

W 2021 roku *Cheviet* i *Peyrottes* opisali metodę syntezy α -metylidenobisfosfonowych pochodnych azyrydyn **XXXIII**.¹¹⁰ Azyrydyny, ze względu na swoją wysoką regio- i stereoselektywność w reakcjach otwarcia pierścienia, są użytecznymi blokami budulcowymi w syntezie organicznej i stanowią cenne źródło centrów chiralnych. Opracowana metoda polega na reakcji pochodnych *N*-karbamiloazyrydyn z anionem fosforynu dietylu, generowanym *in situ* z fosforynu dietylu przy użyciu LiHMDS, jak przedstawiono na schemacie 15. Transformacja przebiega w temperaturze pokojowej lub podwyższonej i może być stosowana wobec azyrydyn zabezpieczonych zarówno grupą *tert*-

butoksykarbonylową (Boc) jak i benzyloksykarbonylową (Cbz). W niektórych reakcjach zaobserwowano powstawanie produktów otwarcia pierścienia, jednak nie była to tendencja dominująca. Ograniczone występowanie tych produktów tłumaczy zaproponowany przez autorów mechanizm reakcji, w którym kluczową rolę odgrywa kation litu stabilizujący stany przejściowe poprzez oddziaływanie z pierścieniem azyrydynowym, zapobiegając jego otwarciu.



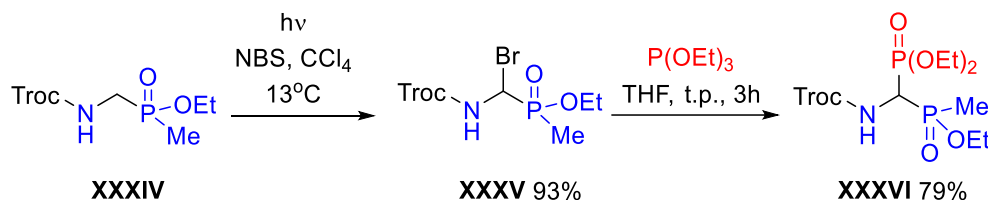
Schemat 15

2.2 Metody syntezy fosfonowo-fosfinowych oraz fosfonowo-fosfinoilowych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych

W dostępnej literaturze naukowej odnotowano nieliczne wzmianki dotyczące metod syntezy niesymetrycznych fosfonowo-fosfinowych oraz fosfonowo-fosfinoilowych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych. Przydatność większości proponowanych podejść wykazano jedynie dla ograniczonej liczby modeli, często pojedynczych związków, z których znaczna część to pochodne α -aminometylideno-bisfosforowe posiadające w pozycji α atom wodoru oraz podstawioną bądź wolną grupę aminową.

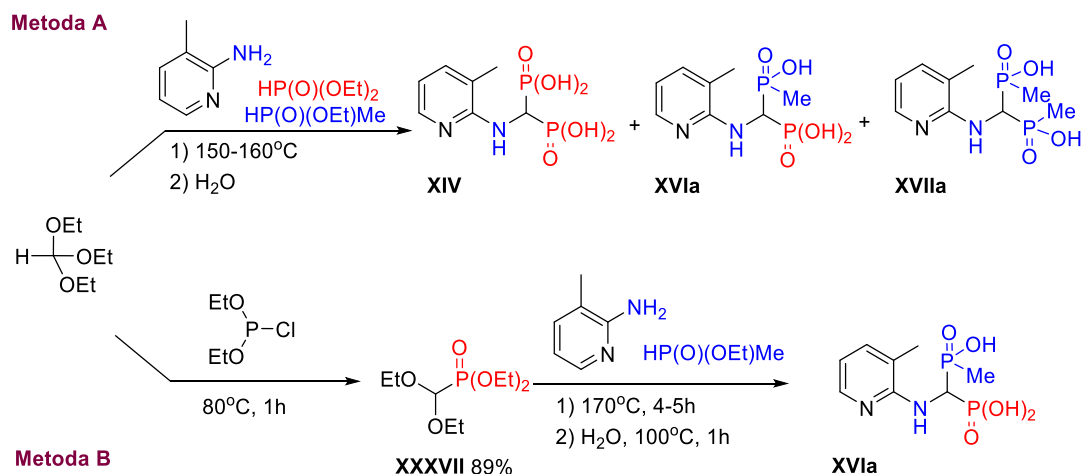
Jedną z pierwszych opisanych procedur otrzymywania fosfonowo-fosfinowych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych była synteza *N*-zabezpieczonego 1-amino-1-[etoksy(metylofosforylo)]metanofosfonianu dietylu

XXXVI opisana przez *Schradera* i wsp. w 1986 roku. Związek otrzymano w wyniku α -bromowania pochodnej metylofosfinianu etylu **XXXIV** z udziałem *N*-bromoimidu kwasu bursztynowego (NBS) oraz następczej transformacji tak aktywowanego analogu **XXXV** w reakcji typu *Michaelisa–Arbuzowa* z fosforynem trietylu (Schemat 16).¹¹¹



Schemat 16

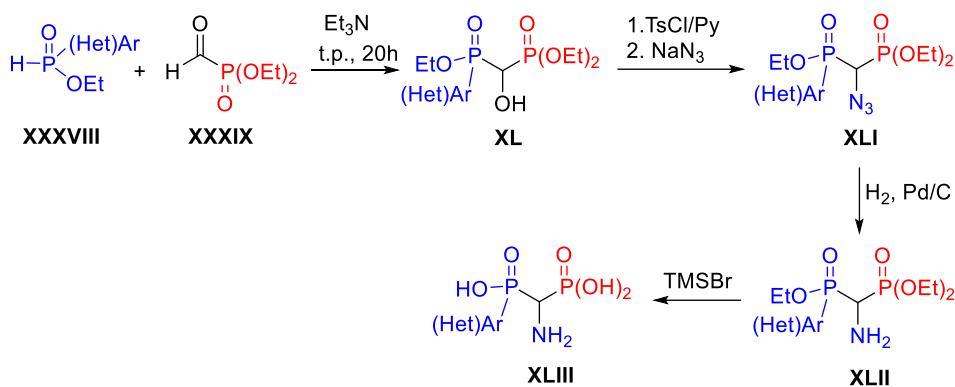
Zespół *Ebetino* w 1997 roku opracował dwie strategie syntezy kwasu 1-[*N*-(3-metylo-2-pirydynylo)amino]-1-[(hydroksy)metylofosforylo]metanofosfonowego **XVIa**. Pierwsza z nich, metoda równoczesna, polegała na jednoetapowej reakcji kondensacji 2-amino-3-metylopirydyny z ortomrówczanem trietylu, metylo-*H*-fosfinianem etylu oraz fosforynem dietylu (Schemat 17, metoda A). Wynikiem reakcji była mieszanina symetrycznych oraz niesymetrycznych produktów, które następnie poddano rozdzielowi chromatograficznemu oraz hydrolizie. Pochodną fosfonowo-fosfinową **XVIa** wyizolowano z zaledwie 17% wydajnością. Druga strategia polegała na wytworzeniu dietoksymetylofosfonianu dietylu **XXXVII** w reakcji ortomrówczanu trietylu z chlorofosforynem dietylu w pierwszym etapie, a następnie jego kondensacji z 2-amino-3-metylopirydyną oraz metylo-*H*-fosfinianem etylu w drugim etapie (Schemat 17, metoda B). Produkt otrzymano z wydajnością 40%.¹¹²



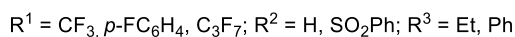
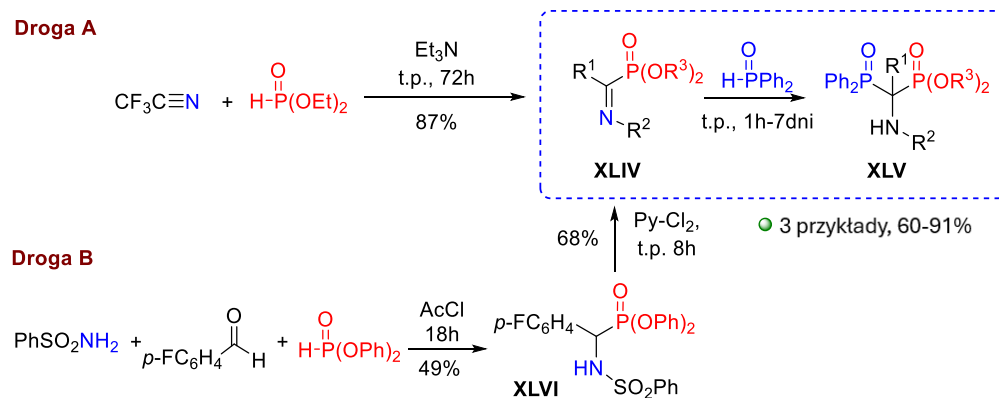
Schemat 17

W 2003 roku w literaturze patentowej opisano strategię otrzymywania kwasów 1-aminofosforylometanofosfonowych **XLIII** w ramach czteroetapowej procedury,

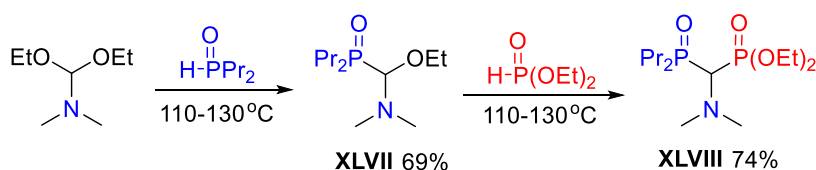
obejmującej: (1) reakcję estru etylowego kwasu formylofosfonowego **XXXIX** z estrem etylowym kwasu arylofosfinowego **XXXVIII** w obecności trietyloaminy, (2) przekształcenie grupy hydroksylowej tak otrzymanej pochodnej BP's **XL** w grupę azydkową w reakcji tosyłowania z następczą substytucją azydkiem sodu, (3) redukcję grupy azydkowej **XLI** w obecności katalizatora palladowego oraz (4) finalną hydrolizę ABP's **XLII** z zastosowaniem bromku trimetylosililu (Schemat 18).¹¹³



Pochodne fosfonowo-fosfinoilowe można otrzymać w reakcji addycji typu *Michaelisa-Beckera* tlenku difenylofosfiny do iminofosfonianów **XLIV**, zawierających grupy aktywujące, takie jak grupa *p*-fluorofenyłowa,¹¹⁴ trifluorometyłowa¹¹⁵ lub heptafluoropropylowa¹¹⁶ przy atomie węgla α . Transformacje analogów **XLIV** w **XLV** prowadzono w temperaturze pokojowej, w czasie od 1 godziny do 7 dni, uzyskując oczekiwane produkty z wydajnościami 60–91% (Schemat 19). Autorzy opisali również syntezę dwóch wyjściowych pochodnych iminofosfonowych **XLIV**. Pierwszą z nich otrzymano w reakcji trifluoroacetonitrylu z fosforynem dietylu prowadzonej wobec trietyloaminy (Schemat 19, droga A),¹¹⁵ natomiast drugą w wyniku utlenienia monofosfonowego analogu **XLVI** otrzymanego na drodze trójskładnikowej kondensacji *p*-fluorobenzaldehydu, benzenosulfonamidu oraz fosforynu difenyłu (Schemat 19, droga B).¹¹⁴

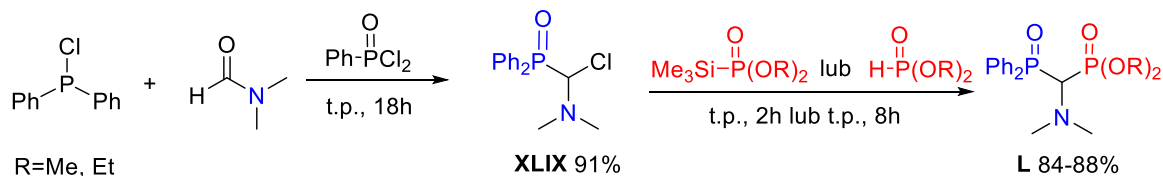


Inna metoda otrzymywania 1-amino-1-fosfinoiloalkanofosfonianów polega na reakcji *N,N*-dialkiloaminowych pochodnych tlenków fosfiny, funkcjonalizowanych w pozycji α grupą nukleofugową, np. grupą etoksyową¹⁰⁴ lub atomem chloru,¹¹⁷ z fosforynem dialkilu. Przykładem takiej transformacji jest synteza 1-(*N,N*-dimetyloamino)-1-(dipropylofosforylo)metanofosfonianu dietylu **XLVIII**, otrzymanego na drodze podstawienia grup etoksyowych wyjściowego acetalu dietylowego *N,N*-dimetyloformamidu w następnych reakcjach typu *Michaelisa-Beckera* z udziałem tlenku dipropylofosfiny oraz fosforynu dietylu (Schemat 20).¹⁰⁴



Schemat 20

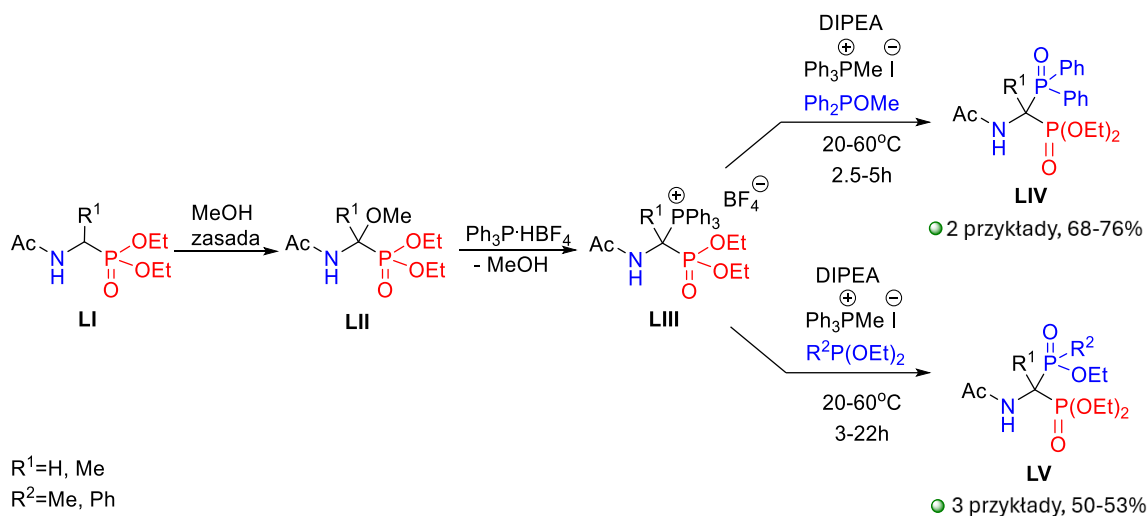
Morgalyuk i wsp. opisali syntezę dwóch analogów fosfonowo-fosfinoilowych **L** opartą na transformacji *N,N*-dimetyloformamidu do bardziej reaktywnej α -chlorowej pochodnej **XLIX** w reakcji z udziałem chlorodifenylofosfiny.¹¹⁷ Otrzymany związek został następnie poddany reakcjom typu *Michaelisa-Beckera* z (trimetylosililo)-fosfonianem dietylu lub fosforynami dimetylu lub dietylu. Transformacje te zachodziły efektywnie już w temperaturze pokojowej, dając produkty z bardzo dobrymi wydajnościami w zakresie 84–88%.



Schemat 21

W 2015 *Kuźnik* i wsp. opisali trójetapową metodę otrzymywania fosfonowo-fosfinowych **LV** oraz fosfonowo-fosfinoilowych **LIV** analogów 1-amino-1,1-bisfosforowych z *N*-zabezpieczonych aminoalkanofosfonianów **LI**. Metoda ta obejmowała (1) elektrochemiczne utlenianie związków **LI**, (2) przekształcenie tak otrzymanych α -metoksylowych pochodnych **LII** w reaktywne sole fosfoniowe **LIII** w reakcji z tetrafluoroboranem trifenylfosfoniowym oraz (3) ich następczą transformację w reakcji typu *Michaelisa-Arbuzowa* z udziałem difenylofosfininu metylu, fenylofosfoninu dietylu lub metylofosfoninu dimetylu w obecności zasady *Hüniga* i jodku trifenylometylofosfoniowego (Schemat 22). Zakres stosowalności tej metody ogranicza się jednak do analogów posiadających wodór lub grupę metylową

przy atomie węgla C $_{\alpha}$. Próby prowadzenia elektrochemicznego utleniania fosforowych odpowiedników waliny i fenyloalaniny ($R^1 = i\text{-Pr, Bn}$) nie powiodły się, przypuszczalnie ze względu na rozmiar podstawników przy atomie węgla C $_{\alpha}$.¹¹⁸



Schemat 22

3. Bisfosfoniany w ukierunkowanym dostarczaniu leków

Tkanka kostna jest wyspecjalizowaną formą tkanki łącznej, która pełni kluczowe funkcje w organizmie. Ze względu na jej unikalną strukturę, a w szczególności dużą gęstość oraz wysoki stopień zmineralizowania, skuteczne dostarczanie leków do mikrośrodowiska kostnego stanowi istotne wyzwanie terapeutyczne. Krótki okres półtrwania większości stosowanych leków oraz ich ograniczona penetracja tkanek docelowych wymuszają stosowanie zwiększonych dawek terapeutyków, co wiąże się ze wzrostem ryzyka toksyczności ogólnoustrojowej.¹¹⁹ Obiecującą strategią zwiększającą skuteczność terapii chorób kości przy jednoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych jest celowane dostarczanie leków, które polega na modyfikowaniu cząsteczek leków czy ich nośników przeciwciałami lub ligandami, które są w stanie w sposób specyficzny wiązać się z określonymi typami komórek czy tkanek w organizmie. Bisfosfoniany, jako cząsteczki wykazujące zdolności do wiązania się z hydroksyapatytem oraz penetracji do nieukrwionych obszarów w tkance kostnej, umożliwiają precyzyjne dostarczanie terapeutyków do trudno dostępnych ognisk chorobowych.¹⁸ Co więcej, związki te wykazują zdolność do preferencyjnego gromadzenia się w miejscach aktywnej przebudowy kości (często obserwowanej w trakcie choroby lub infekcji), co minimalizuje ich oddziaływanie nie tylko na tkanki miękkie, ale również na tkankę kostną nieobjętą chorobą czy infekcją.¹⁸ Ponadto, biorąc pod uwagę różnokierunkową aktywność biologiczną bisfosfonianów, ich rola nie musi ograniczać się wyłącznie do

funkcji liganda, który kieruje terapeutyk/nośnik leku do tkanki kostnej. Obecność ugrupowania BPs może przyczynić się do zwiększenia skuteczności terapii dzięki potencjalnym efektom addytywnym lub synergistycznym skoniugowanych cząsteczek.

Zastosowanie bisfosfonianów w ukierunkowanym dostarczaniu leków obejmuje przede wszystkim (1) syntezę ich koniugatów ze związkami biologicznie aktywnymi¹¹⁹ oraz (2) wykorzystanie ich do modyfikacji powierzchni liposomów, nanocząsteczek i innych nośników leków.¹²⁰ Z uwagi na zakres prac badawczych niniejszej dysertacji, szczegółowo omówione zostanie wyłącznie pierwsze z wymienionych zastosowań.

3.1 Struktura koniugatów bisfosfonianów ze związkami biologicznie aktywnymi

Koniugaty BPs składają się z dwóch elementów: cząsteczki bisfosfonianu, pełniącej przede wszystkim rolę liganda kierującego koniugat do tkanki kostnej oraz substancji bioaktywnej, odpowiedzialnej za wywołanie pożądanej odpowiedzi biologicznej. Struktury obu podjednostek, a w szczególności rodzaj, lokalizacja i reaktywność dostępnych grup funkcyjnych, będą determinować możliwe strategie ich sprzęgania. Koniugaty mogą być tworzone przez bezpośrednie połączenie bisfosfonianu i leku wiązaniem kowalencyjnym lub przez połączenie obu związków przy pomocy linkera. Sposób połączenia BP z lekiem jest kluczowy dla zapewnienia biologicznej aktywności powstałego koniugatu. Wiązania powstałe w wyniku sprzęgania obydwu cząsteczek powinny być na tyle stabilne, aby zapobiec przedwczesnemu rozdzieleniu hybrydy w krwiobiegu, lecz jednocześnie wystarczająco labilne, by umożliwić uwolnienie terapeutyku po dotarciu do tkanki kostnej. Istotne jest również, aby po rozerwaniu wiązania, zarówno BP, jak i lek zachowywały swoją pierwotną aktywność biologiczną, a sam proces nie prowadził do powstawania toksycznych produktów ubocznych.^{119,121}

W literaturze opisano przykłady koniugatów bisfosfonianów z różnymi związkami biologicznie aktywnymi, m. in. cytostatykami, antybiotykami, lekami przeciwzapalnymi, białkami oraz innymi substancjami bioaktywnymi, m.in. estrogenami czy prostaglandynami. W roli liganda celującego do kości wykorzystywano zarówno bisfosfoniany o dobrze poznanej aktywności biologicznej takie jak etidronian czy alendronian (koniugaty **LIX** oraz **LXVIII** i **LXI**, Tabela 5), α -aminobisfosfoniany o prostej strukturze (głównie α -aminometylideno-bisfosfoniany, koniugaty **XLVII**, **XL** czy **XLII**, Tabela 5), jak również inne układy zawierające ugrupowanie alkilidenobisfosfonowe funkcjonalizowane dodatkową

grupą (koniugaty **LVI** i **LXIV**, Tabela 5). Częsteczki BP i leku łączono za pomocą wiązań chemicznych o różnej stabilności – zarówno trwałych (np. koniugat **LVIII**, Tabela 5), jak i podatnych na degradację w warunkach *in vivo* (**LVI**, **LVII**, **LIX-LXIV**, Tabela 5). Skuteczniejszą i częściej stosowaną strategią jest ta oparta na koniugowaniu obydwu cząsteczek za pośrednictwem wiązań labilnych, takich jak wiązania amidowe, estrowe czy karbaminianowe. Wiazania estrowe i karbaminianowe mogą ulegać hydrolizie pod wpływem esteraz, enzymów cytochromu P450 lub środowiska o obniżonym pH; wiązania amidowe są natomiast rozkładane głównie przez proteazy i wykazują wyższą odporność na degradację w krwiobiegu w porównaniu do wiązań estrowych i karbaminianowych.¹²² Xie i wsp. oraz Hochdörfer i wsp. zastosowali strategię łączenia BP z lekiem z wykorzystaniem krótkich sekwencji aminokwasowych jako linkerów, które są rozpoznawane przez proteazy biorące udział w procesach osteolizy i przebudowy macierzy kostnej (np. katepsynę K lub B).^{123,124} W literaturze opisano także nieliczne przykłady koniugatów BP zawierających wiązania innego typu, np. hydrazonowe¹²⁴ (wrażliwe na zmiany pH) lub disiarczkowe¹²⁵ (degradowane w reakcjach redoks z udziałem przeciwutleniaczy). Warto podkreślić jednak, że koniugaty pozbawione wiązań degradowalnych *in vivo*, a więc niezdolne do uwalniania aktywnej formy leku, mogą mimo to wykazywać obiecującą aktywność biologiczną. Przykładem takiego układu jest koniugat alendronianu z 5-fluoro-2'-deoksyurydyną **LVIII** (Tabela 5), którego działanie opisano w rozdziale 3.2.

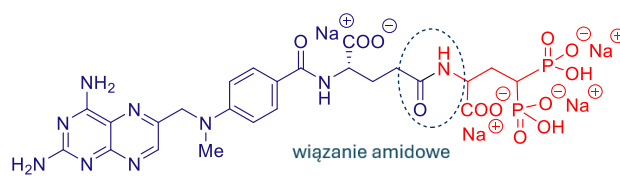
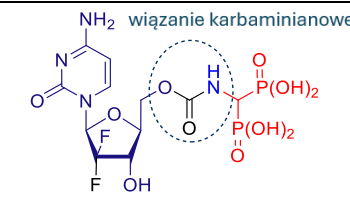
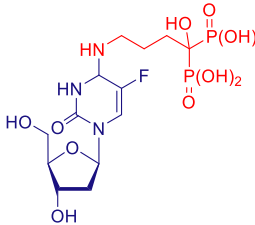
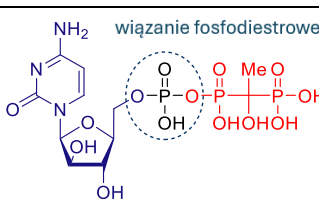
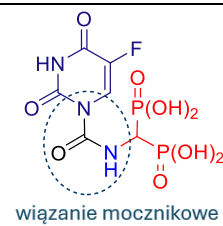
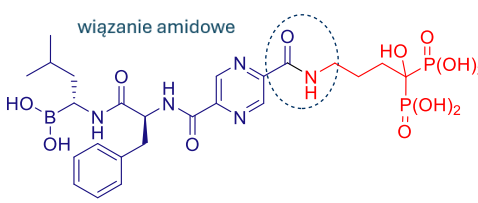
3.2 Aktywność biologiczna koniugatów BPs

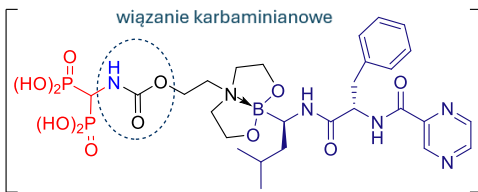
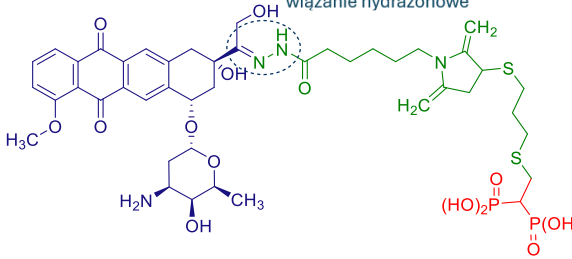
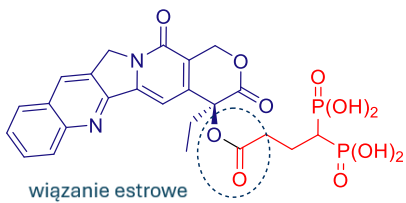
Grupą leków najczęściej poddawaną koniugowaniu z BPs są leki cytostatyczne. W literaturze opisano przykłady koniugatów BP z powszechnie stosowanymi chemioterapeutykami (m.in. metotreksatem, doksorubicyną, 5-fluorouracylem) oraz z substancjami, których pochodne są stosowane w chemioterapii (np. kamptotecyną). W badaniach przedklinicznych wielokrotnie wykazywano ich zwiększony wychwyt w tkance kostnej i szybki klirens niezwiązanych cząsteczek koniugatów z krwiobiegu, a także aktywność w hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych *in vitro* czy progresji nowotworów *in vivo*.¹¹⁹ Na przykład, Sturtz i wsp. stwierdzili, że koniugat BP z metotreksatem MTX (**LVI**, Tabela 5) wykazał wzmożoną akumulację w tkance kostnej w porównaniu z innymi organami oraz wyższą aktywność w hamowaniu wzrostu guza w mysim modelu ludzkiego kostniakomięsaka w porównaniu do samego MTX.^{126,127} El-Mabhouth i in. opisali koniugat α -aminobisfosfonianu z gemcytabiną GEM **LVII** (Tabela 5), który skuteczniej niż GEM zmniejszał liczbę i rozmiar przerzutów do kości w mysim modelu raka piersi.^{128,129} Schott i wsp. badali aktywność koniugatu 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (5-FdU) z alendronianem (**LVIII**,

Tabela 5) i stwierdzili, że wykazuje on umiarkowaną cytotoksyczność wobec komórek raka piersi i raka jajnika.¹³⁰ Inna grupa opisała również jego cytotoksyczne działanie na komórki raka żołądka; jego aktywność była jednak niższa niż aktywność ALN i 5-FdU, co tłumaczono wysoką stabilnością hydrolityczną koniugatu.¹³¹ W 2016 roku *Schem* i inni ocenili działanie 5-FdU-ALN w mysim modelu przerzutów raka piersi do kości. Autorzy wykazali, że koniugat **LVIII** hamował zarówno resorpcję kości, jak i wzrost guza. Co więcej, tworzenie nowej kości było znacznie szybsze u myszy leczonych 5-FdU-ALN niż u tych, którym podawano sam alendronian.¹³² Innym koniugatem o obiecującej aktywności biologicznej jest koniugat etidronianu i cytarabiny MBC-11 (**LIX**, Tabela 5). W badaniach *in vivo* zaobserwowano, że MBC-11 poprawił gęstość mineralną kości, zahamował proliferację komórek nowotworowych i zwiększył ogólną przeżywalność w mysim modelu szpiczaka mnogiego. Podobne rezultaty, takie jak redukcja częstości występowania przerzutów do kości i zwiększenie objętości kości odnotowano również w mysim modelu raka piersi z przerzutami do kości.¹³³ Koniugat MBC-11 jest jednym z niewielu koniugatów BPs zatwierdzonych do badań klinicznych w onkologii (zakończona I faza, NCT02673060). *Agyin* i wsp. oraz grupa *Xinga* opisali także przykłady koniugatów BP z bortezomibem (Btz) - inhibitorem proteasomu stosowanym w terapii szpiczaka mnogiego (MM).^{134,135} W badaniach *in vivo* z udziałem koniugatu **LXII** (Tabela 5) zaobserwowano, że związek ten, skuteczniej niż Btz, hamował rozrost guza, proces destrukcji kości oraz przerzuty w mysim modelu MM. Co więcej, koniugat nie wywoływał działań niepożądanych, takich jak małopłytkowość czy neurotoksyczność.^{135,136}

W literaturze opisano znacznie więcej przykładów koniugatów BPs z chemioterapeutykami o obiecującej aktywności biologicznej;^{18,119} wybrane przykłady zebrano w tabeli 5.

Tabela 5. Wybrane przykłady koniugatów BP's z chemioterapeutykami

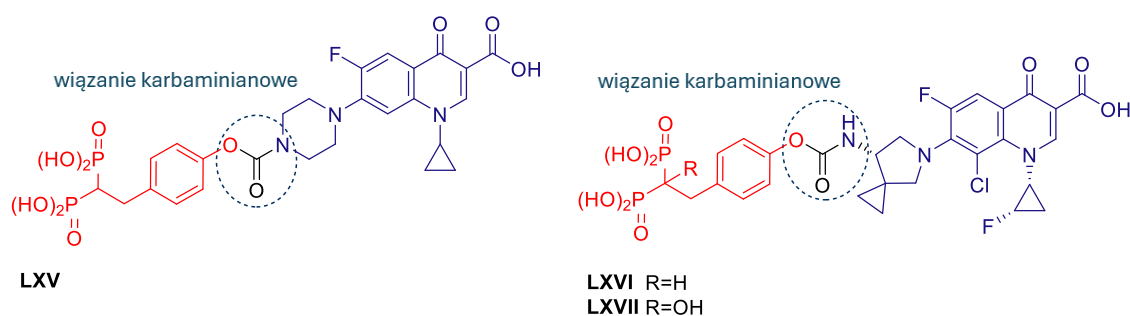
Nr	Struktura koniugatu	Uzyskane działanie	Lit
LVI	Metotreksat  wiązanie amidowe	- wzmoczona akumulacja w tkance kostnej - hamowanie wzrostu guza w mysim modelu ludzkiego OS	[126, 127]
LVII	Gemcytabina  wiązanie karbaminianowe	- wzmoczona akumulacja w tkance kostnej - szybka eliminacja niezwiązanego koniugatu z organizmu <i>in vivo</i> - redukcja rozległości przerzutów do kości w mysim modelu raka piersi	[128, 129]
LVIII	5-FDu 	- zdolność wiązania się z HA - hamowanie proliferacji komórek raka piersi, raka jajnika oraz raka żołądka - redukcja częstotliwości i rozległości przerzutów do kości w mysim modelu raka piersi	[130]
LIX	Cytarabina  wiązanie fosfodiestrowe	- zwiększenie MBD, hamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz wydłużenie przeżycia w mysim modelu MM - redukcja częstości występowania przerzutów do kości i zwiększenie MBD w mysim modelu przerzutów raka piersi do kości	[126, 127]
LX	5-Fluorouracyl  wiązanie mocznikowe	- wzmoczona akumulacja w tkance kostnej - szybka eliminacja niezwiązanego koniugatu z organizmu <i>in vivo</i>	[137]
LXI	Bortezomib  wiązanie amidowe	hamowanie proliferacji komórek szpiczaka mnogiego (linie 5TGM1 oraz RPMI 8226)	[134]

 LXII Bortezomib	• zdolność wiązania się z kością i uwalniania Btz w niskim pH • zmniejszenie masy guza, zahamowanie destrukcji kości oraz przerzutów w mysim modelu MM [135, 136] • redukcja ogólnoustrojowych skutków ubocznych
 LXIII Doksorubicyna	• zdolność wiązania się z HA • zdolność uwalniania aktywnej formy leku w warunkach fizjologicznych [124] • MTD 3-krotnie wyższa w porównaniu do DOX
 LXIV Kamptoteczyna	• zdolność wiązania się z HA • zdolność do uwalniania aktywnej formy leku w warunkach fizjologicznych [138]

MDB – gęstość mineralna kości; MTD – maksymalna tolerowana dawka

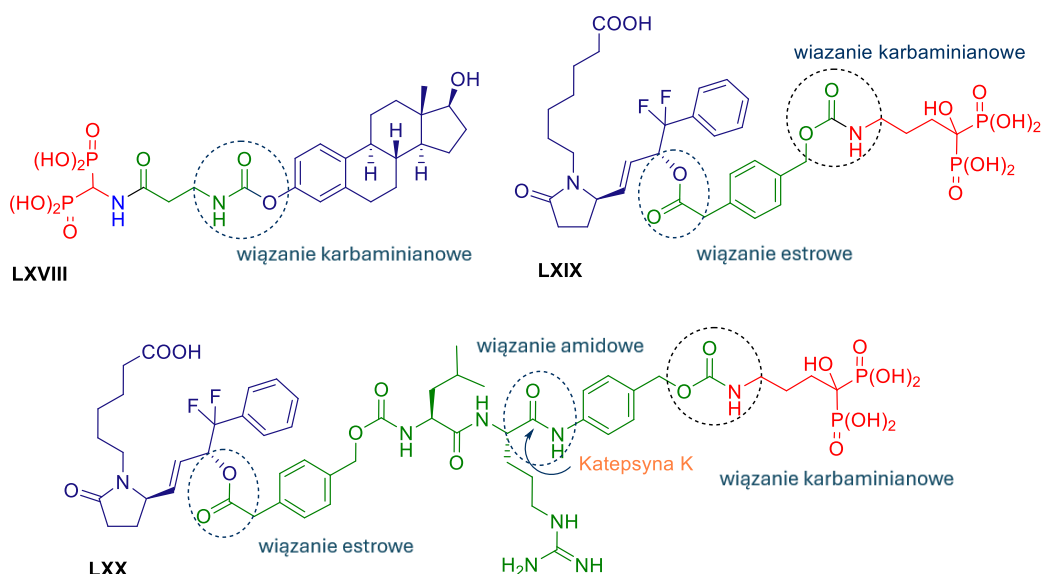
Poza potencjalnym zastosowaniem w terapii nowotworów kości, koniugaty bisfosfonianów są także badane pod kątem wykorzystania ich w leczeniu zapalenia kości i szpiku (*osteomyelitis*), którego najczęstszym źródłem są infekcje bakteryjne wywołane przez szczep *Staphylococcus aureus*. BPs, jako związki zdolne do przenikania do sieci kanalikowej kości, osteocytów oraz ich jamek, gdzie bakterie *S. aureus* tworzą biofilm, idealnie nadają się do celowanego dostarczania antybiotyków bezpośrednio do ognisk infekcji.¹⁸ BPs najczęściej poddawano koniugacji z antybiotykami z grupy fluorochinolonów,¹³⁹⁻¹⁴² takimi jak: norfloksacyna, cyprofloksacyna, enoksacyna, gatifloksacyna, sitafloksacyna oraz moksyfloksacyna, choć opisano także przykłady koniugatów BP z innymi antybiotykami, m.in. tedizolidem¹⁸ czy rifamazidem.¹⁴³ Aktywność antybakteryjna opisanych koniugatów była zróżnicowana i zależała od rodzaju patogenu, przeciwko któremu był kierowany koniugat, a także jego struktury, przede wszystkim rodzaju/stabilności stosowanych linkerów oraz miejsca przyłączenia ugrupowania BP.^{18,139-142} Najlepszą aktywność wykazywały koniugaty, w których BPs łączono z antybiotykiem za pomocą labilnych wiązań, pozwalających na uwolnienie cząsteczki leku w warunkach fizjologicznych. Szczególnie obiecującymi analogami okazały się być koniugaty bisfosfonianu z cyprofloksacyną **LXV** oraz sitafloksacyną **LXVI** i **LXVII** połączone wiązaniem

karbaminianowym (Rys. 14). Wyniki badań *in vivo* w zwierzęcym modelu okołoprotezowego zapalenia szpiku i kości z udziałem koniugatu **LXV** ujawniły, że jego pojedyncza dawka prowadziła do redukcji liczby bakterii o 99%, osiągając niemal dziesięciokrotnie wyższą aktywność niż sama cyprofloksacyna podawana w kilku dawkach.¹⁴¹ Korzystne efekty terapeutyczne, obejmujące eliminację biofilmu bakteryjnego, redukcję liczby osteoklastów, zmniejszenie częstości złamań kości udowej oraz zahamowanie utraty tkanki kostnej wokół implantu odnotowano również w badaniach z udziałem koniugatów BP z sitafloksacyną **LXVI** oraz **LXVII**.¹⁴²



Rys. 14. Struktury koniugatów BP z cyprofloksacyną **LXV** oraz sitafloksacyną **LXVI** i **LXVII**

Koniugaty bisfosfonianów były także badane pod kątem zastosowania w leczeniu osteoporozy oraz innych chorób kości. Wykorzystywano je jako skuteczne nośniki do celowanego dostarczania m.in. estrogenów,¹⁴⁴ których deficyt jest główną przyczyną ubytku masy kostnej u kobiet po menopauzie, a także związków stymulujących osteogenezę, takich jak prostaglandyna E₂ (PGE₂)¹⁴⁵ oraz agonści receptora EP4.^{123,146} Morioka i wsp. opisali koniugat BP z estradiolem **LXVIII** (Rys. 15), który zwiększał masę kostną u szczurzych samic po ovariectomii skuteczniej niż sam estradiol, przy jednoczesnym braku wpływu na masę macicy.¹⁴⁴ W literaturze opisano także przykłady koniugatów alendronianu z agonistą receptora EP4, różniące się rodzajem zastosowanych linkerów.¹²¹ Najwyższą aktywność wykazywał koniugat **LXIX** (Rys. 15), który powodował m.in. zahamowanie utraty masy kostnej wywołanej ovariectomią, a także zwiększenie gęstości kości bełczkowej i wytrzymałości mechanicznej kręgów u samic szczurów.¹⁴⁷ Ciekawym przykładem jest również koniugat **LXX** z linkerem peptydowym, wrażliwym na katepsynę K, ulegającą ekspresji w osteoklastach (Rys. 15). Chociaż badanie potwierdziło zdolność katepsyny K do uwalniania leku z koniugatu związanego z kością, zaobserwowano jednocześnie jego wysoką niestabilność w krwiobiegu, prowadzącą do przedwczesnego uwalniania agonisty receptora EP4.¹²³



Rys. 15. Struktury koniugatów BP z estradiolem **LXVIII** oraz agonistami receptora EP4 **LXIX** i **LXX**

3.3 Wybrane metody syntezy koniugatów BP ze związkami biologicznie aktywnymi

Analiza dostępnej literatury pozwala stwierdzić, że nie można wyróżnić jednej, uniwersalnej strategii syntezy koniugatów BP ze związkami biologicznie aktywnymi. Ze względu na dużą różnorodność strukturalną zarówno leków, jak i bisfosfonianów poddawanych koniugacji, a także celowy dobór różnych linkerów i typów wiązań chemicznych łączących obydwie cząsteczki, większość koniugatów opisywanych w literaturze była otrzymywana z wykorzystaniem odmiennych podejść syntetycznych. Strategie te można ogólnie podzielić na trzy grupy:

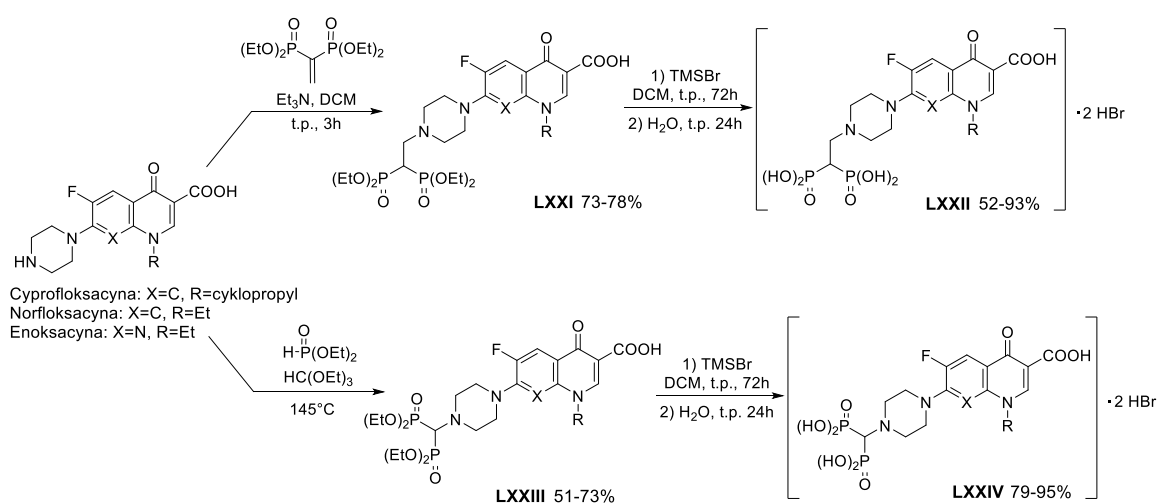
- 1) bezpośrednie sprzężenie BP ze związkiem biologicznie aktywnym za pomocą grup funkcyjnych obecnych w strukturze wyjściowych związków, niekiedy poprzedzone ich odpowiednią aktywacją lub modyfikacją,
- 2) sprzężenie BP ze związkiem biologicznie aktywnym z wykorzystaniem linkera,
- 3) synteza totalna koniugatu BP ze związkiem biologicznie aktywnym z prostych bloków budulcowych.

Spośród opisanych podejść, najczęściej stosowano strategię bezpośredniego sprzężenia obydwu związków lub ich sprzężenia z użyciem linkera. W literaturze opisywano przykłady koniugatów otrzymywanych na drodze prostych, trzy- lub czteroetapowych procedur, które obejmowały zazwyczaj drobne modyfikacje grup

funkcyjnych BP lub leku, takie jak np. przekształcenie grupy karboksylowej w chlorek kwasowy czy grupy aminowej w izocyjanianową, czy też wprowadzenie prostego linkera do ich struktury, jak również koniugatów otrzymywanych na drodze wieloetapowych procedur, których złożoność wynikała ze skomplikowanej struktury projektowanego koniugatu. Strategia trzecia, rzadziej stosowana, okazywała się skuteczna w syntezie koniugatów BP ze związkami pozbawionymi odpowiednich grup funkcyjnych lub związkami zawierającymi liczne grupy reaktywne, mogące negatywnie wpływać na selektywność reakcji sprzęgania.

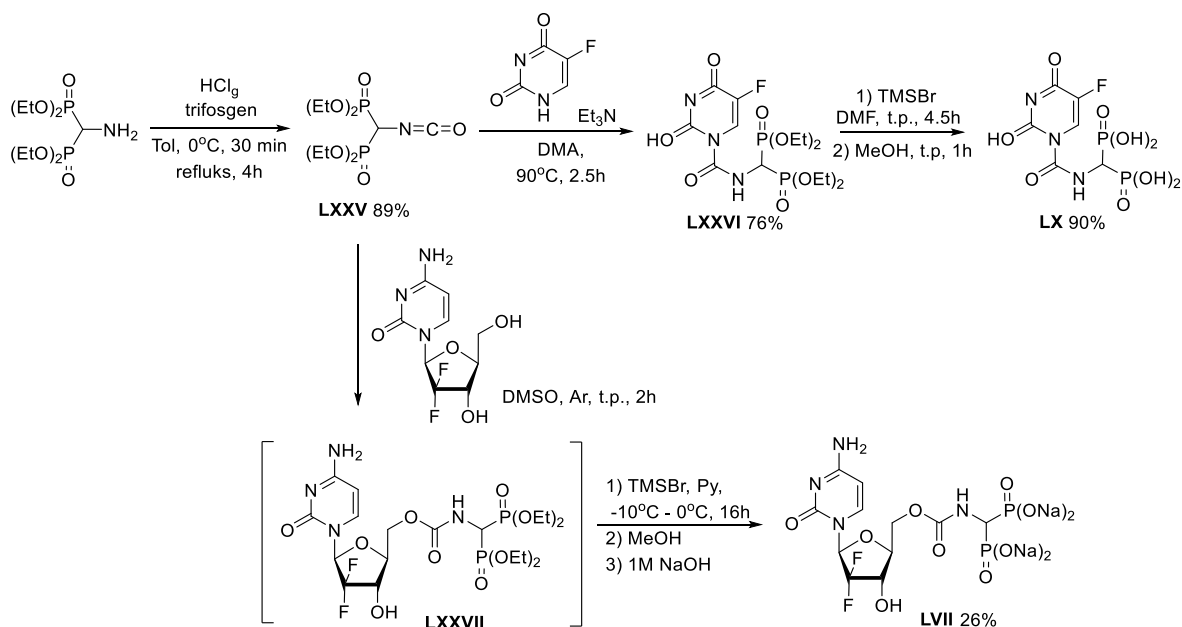
Ze względu na dużą liczbę opisanych w literaturze syntez koniugatów BP ze związkami biologicznie aktywnymi, w dalszej części omówiono wybrane przykłady, ukazujące różnorodność stosowanych podejść syntetycznych. Aktywność biologiczna większości z tych koniugatów została omówiona w rozdziale 3.2.

Jako przykład realizacji pierwszej ze wspomnianych strategii można przytoczyć pracę *Herczegha* i wsp. z 2002 roku, w której opisano syntezę sześciu koniugatów bisfosfonianów z antybiotykami z grupy fluorochinolonów: norfloksacyną, enoksacyną i cyprofloksacyną (Schemat 23). Związki te otrzymano na drodze dwóch różnych strategii. Pierwsza z nich polegała na bezpośrednim sprzęganiu fluorochinolonów z winylobisfosfonianem tetraetylu, prowadzonym w temperaturze pokojowej, przez 3 godziny, w obecności trietyloaminy. Druga metoda opierała się na kondensacji ortomrówczanu trietylu, fosforynu dietylu oraz wybranego antybiotyku, którą prowadzono w temperaturze 145°C. Powstałe koniugaty **LXXII** oraz **LXIV** poddano następnie reakcji z bromkiem trimetylosililu (TMSBr) oraz hydrolizie, uzyskując docelowe produkty w postaci bromowodorków.¹³⁹



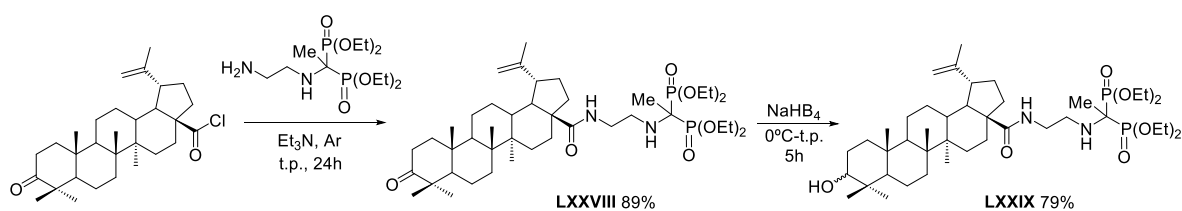
Schemat 23

Przykładami związków otrzymanych w wyniku sprzęgania BPs ze związkami biologicznie aktywnymi, po przeprowadzeniu ich drobnych modyfikacji strukturalnych, są koniugaty α -aminometylidenobisfosfonianu tetraetylu z 5-fluorouracylem **LX** oraz gemcytabiną **LVII**, opisane przez zespół *El-Mabhougha* w 2004 oraz 2006 roku.^{129,137} Zaproponowana przez autorów strategia syntezy opierała się na przekształceniu grupy aminowej bisfosfonianu w bardziej reaktywną grupę izocyjanianową przy użyciu trifosgeny. Otrzymany w ten sposób produkt pośredni **LXXV** poddano następnie reakcjom sprzęgania: z 5-fluorouracylem (5-FU, poprzez jego grupę aminową) lub z gemcytabiną (Gem, poprzez grupę hydroksylową), uzyskując koniugaty zawierające odpowiednio wiązanie mocznikowe oraz karbaminianowe. Reakcję sprzęgania **LXXV** z 5-FU przeprowadzano w obecności trietyloaminy, w *N,N*-dimetyloacetamidzie (DMA), w temperaturze 90°C przez 2.5 godziny. Natomiast sprzęganie z gemcytabiną prowadzono w DMSO, w atmosferze argonu, w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Otrzymany koniugat 5-FU przekształcono w wolny kwas bisfosfonowy **LX** w reakcji z bromkiem trimetylosililu, a następnie metanolem. Ze względu na niestabilność estru tetraetylowego koniugatu BP-Gem **LXXVII**, związek ten nie został wyizolowany ani oczyszczony, a oczekiwany produkt **LVII** otrzymano w postaci soli tetrasodowej metodą *one-pot* z 1-izocyjanianometylidenobisfosfonianu tetraetylu **LXXV** z wydajnością 26% (Schemat 24).



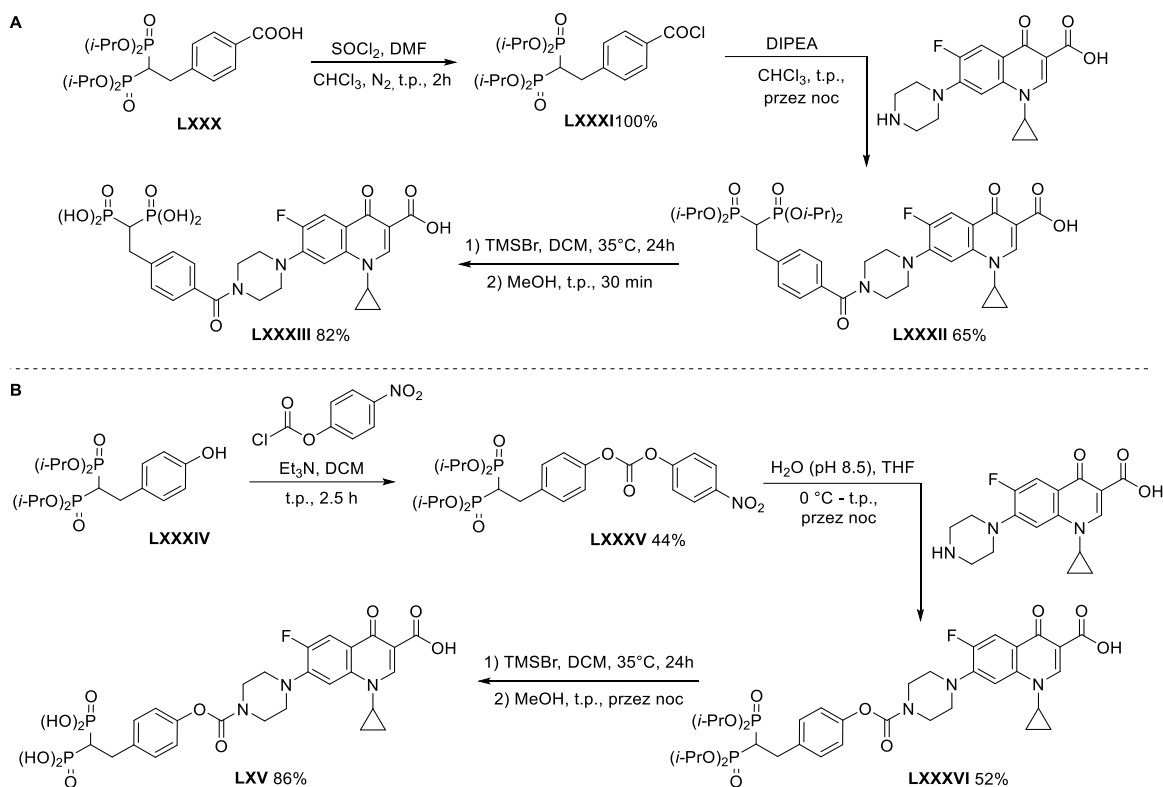
Schemat 24

W 2015 roku *Becker* i wsp. opisali syntezę koniugatu kwasu betulinowego z pochodną 1-amino-1,1-bisfosfonianu **LXXIX**, wykorzystując jako substraty 1-(2-aminoetyloamino)-1,1-etylidenobisfosfonian tetraetylu oraz chlorek kwasu betulonowego (Schemat 25).¹⁴⁸ Reakcję kondensacji przeprowadzono w obecności trietyloaminy, uzyskując koniugat **LXXVIII** z wydajnością 89%. Następnie związek ten poddano redukcji przy użyciu NaBH_4 w THF, co pozwoliło otrzymać odpowiednią pochodną bisfosfonową kwasu betulinowego **LXXIX** z wydajnością 79%. W pracy nie przedstawiono jednak danych dotyczących aktywności biologicznej otrzymanego produktu.



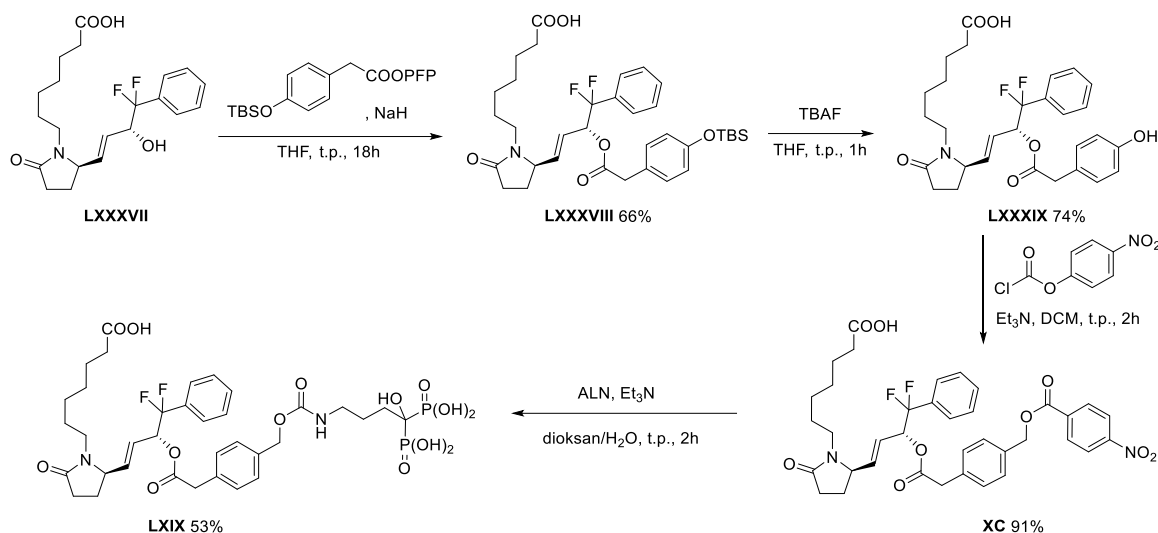
Schemat 25

Kolejnymi przykładami związków uzyskanych z wykorzystaniem strategii bezpośredniej koniugacji są opisane przez *Sedhizadeha* i wsp. w 2017 roku koniugaty bisfosfonianu z cyprofloksacyną **LXXXIII** oraz **LXV**.¹⁴¹ Pierwszy z nich otrzymano na drodze 3-etapowej procedury, która obejmowała (1) przekształcenie grupy karboksylowej pochodnej bisfosfonowej **LXXX** w chlorek kwasowy w reakcji z chlorkiem tionylu, (2) sprzęganie tak uzyskanej pochodnej **LXXI** z cyprofloksacyną wobec zasady *Hüniga* w temperaturze pokojowej przez noc, oraz (3) następcze przekształcanie estrów w wolne kwasy fosfonowe w reakcji z bromkiem trimetylosililu oraz metanolem (Schemat 26 A). Kolejny koniugat z cyprofloksacyną **LXV** otrzymano w wyniku (1) acylowania grupy hydroksylowej bisfosfonianu **LXXXIV** chloromrówczanem 4-nitrofenyłu (czynnikiem sprzęgającym stosowanym w reakcjach tworzenia wiązań mocznikowych czy karbaminianowych) w obecności trietyloaminy w pierwszym etapie, (2) substytucji grupy 4-nitrofenoksylowej tak uzyskanej pochodnej **LXXXV** grupą aminową fragmentu piperazynowego cyprofloksacyny w drugim etapie, oraz (3) deprotekcji grup fosfonowych koniugatu **LXXXVI** w reakcji z TMSBr oraz metanolem (Schemat 26 B). Autorzy w publikacji opisali również syntezę wyjściowych analogów bisfosfonowych **LXXX** oraz **LXXXIV**, które otrzymano z metylidenobisfosfonianu izopropylu odpowiednio na drodze dwu- oraz trzyetapowych procedur, z sumarycznymi wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 34% oraz 43%.



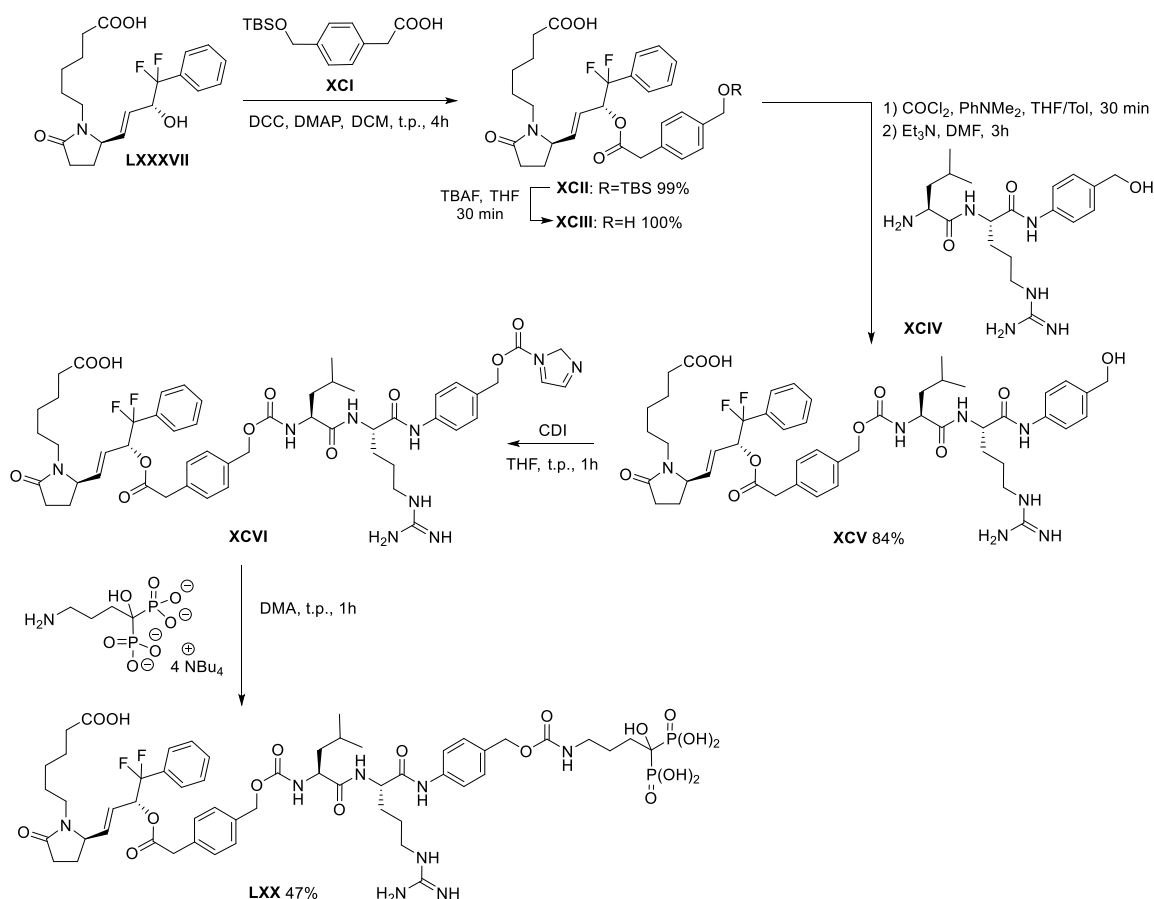
Schemat 26

W 2012 roku *Arns* i wsp. opisali czteroetapową procedurę otrzymywania koniugatu alendronianu z agonistą receptora EP4 **LXIX**, który zawierał w swojej strukturze prosty linker.¹⁴⁹ Syntezę rozpoczęto od wprowadzenia linkera do struktury agonisty receptora EP4 w wyniku acylowania grupy hydroksylowej związku **LXXXVII** estrem pentafluorofenylowym kwasu 4-(*tert*-butylodimetylosililoksy)fenylooctowego w obecności wodoroku sodu. Otrzymany produkt **LXXXVIII** poddano następnie działaniu fluorku tetrabutylamoniumowego (TBAF), w celu usunięcia grupy *tert*-butylodimetylosililowej (TBS), a następnie reakcji z chloromrówczanem 4-nitrofenylu prowadzonej w obecności trietyloaminy. Ostatecznie uzyskany produkt **XC** sprzęgano z kwasem alendronowym w obecności Et₃N, otrzymując oczekiwany koniugat **LXIX** z wydajnością 53% (Schemat 27). Autorzy w publikacji opisali również syntezę trzech innych koniugatów ALN z agonistą receptora EP4: dwóch, będących swoimi izomerami, zawierających grupę tetrazolową oraz trzeciego, w którym ALN połączono bezpośrednio z agonistą za pomocą wiązania karbaminianowego. Koniugaty te otrzymano z wykorzystaniem odmiennych procedur.



Schemat 27

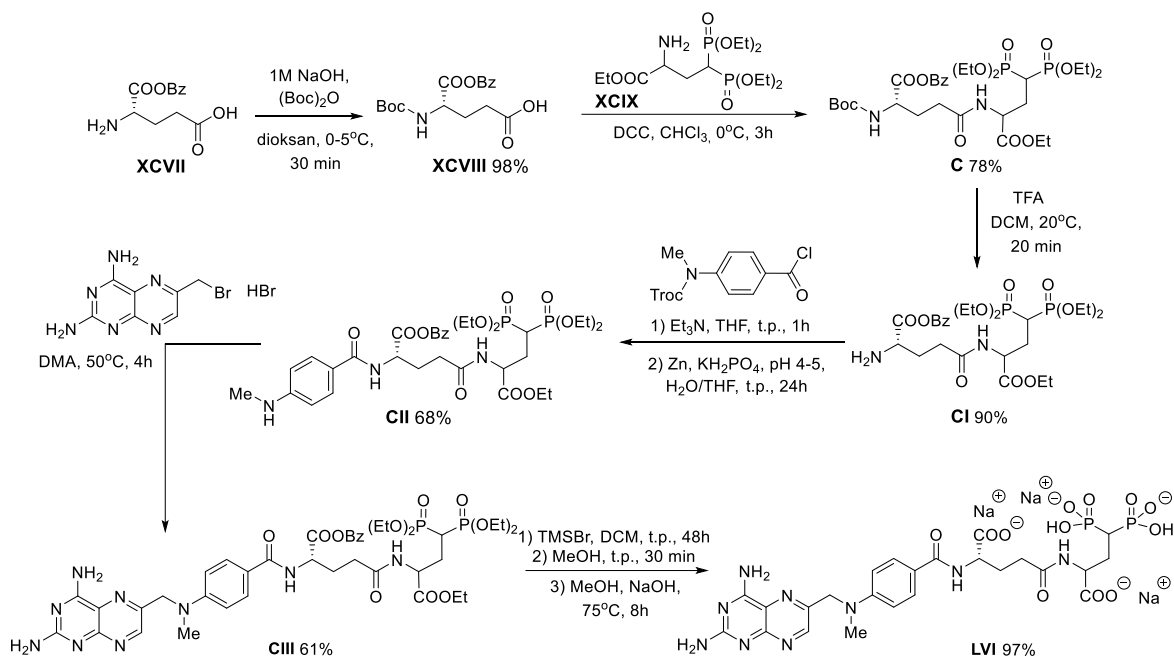
Przykładem związku o bardziej złożonej strukturze jest kolejny koniugat alendronianu z agonistą receptora EP4 **LXX**, zawierający linker peptydowy, opisany przez Xie i wsp. w 2017 roku (Schemat 28).¹²³ Syntezę koniugatu rozpoczęto od estryfikacji/funkcjonalizacji grupy hydroksylowej agonisty receptora EP4 **LXXXVII** w reakcji z kwasem 4-(*tert*-butyldimetylosililoksy)fenylooctowym **XCI**, prowadzonej w obecności DCC i dimetyloaminopirydyny (DMAP). W kolejnym etapie usunięto grupę trimetylosililową uzyskanego produktu **XCII** przy użyciu fluorku tetrabutylamonowego (TBAF). Tak otrzymany blok budulcowy **XCIII** poddano reakcji z fosgenem w obecności *N,N*-dimetyloaniliny, co doprowadziło do powstania produktu pośredniego, który sprzęgano następnie z przygotowanym uprzednio linkerem peptydowym **XCIV** wobec trietyloaminy. Finalnie, analog **XCIV** przekształcono w reakcji z 1,1'-karbonylodiimidazolem (CDI) w bardziej reaktywną pochodną **XCVI**, co w wyniku następczej reakcji z solą tetrabutylamonową alendronianu, doprowadziło do otrzymania oczekiwanego produktu **LXX**.



Schemat 28

Ostatnia ze wspomnianych strategii, polegająca na syntezie totalnej koniugatów z prostych bloków budulcowych, została wykorzystana przez *Sturtza* i wsp. w 1992 roku do otrzymania trzech koniugatów BP z metotreksatem. Jeden z nich, koniugat **LVI**, którego działanie opisano w rozdziale 3.2, otrzymano na drodze 6-etapowej syntezy, w której związkiem wyjściowym był ester benzylový kwasu *L*-glutaminowego (Schemat 29). W pierwszym etapie, związek **XCVII** poddano reakcji z węglanem di-*tert*-butylu, a tak otrzymany *N*-Boc zabezpieczony analog **XCVIII** sprzęgano następnie z estrem etylowym kwasu 2-amino-4,4-bis(dietoksyfosforylo)-butanowego **XCIX** z wykorzystaniem *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako czynnika sprzęgającego. Uzyskany produkt **C** traktowano w kolejnym etapie kwasem trifluorooctowym (TFA) w celu usunięcia zabezpieczenia *tert*-butoksykarbonylowego. Następnie, przeprowadzono kondensację pochodnej **CI** z *N*-zabezpieczonym chlorkiem kwasu *N*-metylo-4-aminobenzoowego wobec trietyloaminy, a uzyskany produkt pośredni poddano redukcji w celu usunięcia grupy 2,2,2-trichloroetoksykarbonylowej (Troc). Finalnie, przeprowadzono reakcję sprzęgania analogu **CII** z bromowodorkiem 6-(bromometylo)pterydino-2,4-diaminy, co pozwoliło otrzymać estryfikowaną formę docelowego związku **CIII**, która poddana reakcji z TMSBr i metanolem oraz następnie zmydleniu grup

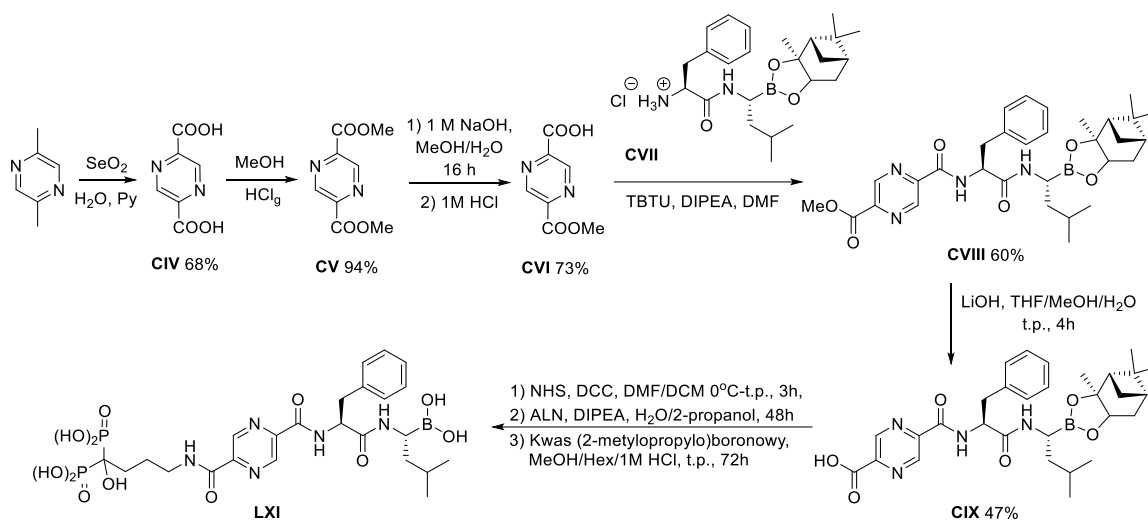
fosfoestrowych i karboksylowych doprowadziła do oczekiwanego produktu **LVI** w postaci soli sodowej.¹²⁷



Schemat 29

Innym przykładem koniugatu otrzymanego na drodze syntezy totalnej jest opisany w 2013 roku przez *Agyin* i wsp. koniugat alendronianu z bortezomibem **LXI** (Schemat 30).¹³⁴ Strategia syntezy zastosowana przez autorów obejmowała utlenienie wyjściowej 2,5-dimetylopirazyny do kwasu pirazyno-2,5-dikarboksylowego w reakcji z tlenkiem selenu(IV) w pierwszym etapie, estryfikację grup karboksylowych pochodnej **CIV** w środowisku kwaśnym, oraz następczą częściową hydrolizę związku **CV** do jej monoestrowej pochodnej **CVI**. Tak uzyskany analog poddano następnie sprzęganiu z estrem pinakolowym dipeptydu kwasu boronowego **CVII**, który został uprzednio otrzymany zgodnie z 6-etapową procedurą opisaną w literaturze.^{150,151} Reakcję kondensacji analogów **CVI** z **CVII** prowadzono wobec zasady *Hüniga* oraz tetrafluoroboranu *O*-(benzotriazol-1-ilo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego (TBTU), a uzyskany produkt sprzęgania **CVIII** poddano hydrolizie z udziałem wodorotlenku litu. Docelowy koniugat **LXI** otrzymano w wyniku sprzęgania kwasu alendronowego z analogiem **CVIX** w obecności zasady *Hüniga*, po wcześniejszej aktywacji jego grupy karboksylowej za pomocą *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i *N*-hydroksysukcynimidu (NHS) oraz następczej hydrolizy grupy pinakolowej uzyskanego koniugatu przy użyciu kwasu 2-metylopropyloboronowego (Schemat 30). Autorzy nie podali jednak wydajności ostatniego etapu opisanej syntezy, ani wydajności z jaką otrzymano blok budulcowy **CVII**. Dodatkowo, fragment procedury dotyczący etapu aktywacji grupy karboksylowej **CIX** z użyciem DCC i NHS jest opisany nieprecyzyjnie

– nie wiadomo jaki rozpuszczalnik zastosowano (DMF, jak w SI, czy DME, jak na schemacie w publikacji). Ponadto, istnieją pewne rozbieżności dotyczące wydajności otrzymywania związku **CVIII** (60% w tekście vs. 89% w SI). Autorzy w publikacji opisali także syntezę dwóch innych koniugatów ALN-Btz na drodze różnych, również wieloetapowych procedur syntetycznych.



Schemat 30

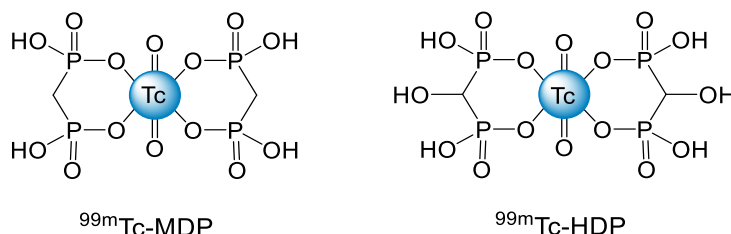
Analiza dostępnych strategii syntezy koniugatów bisfosfonianów ze związkami biologicznie aktywnymi wskazuje na znaczne zróżnicowanie stosowanych podejść syntetycznych oraz brak uniwersalnych rozwiązań. Znaczna część opisanych procedur koniugacji została opracowana z myślą o otrzymaniu konkretnych modeli związków, które najczęściej poddawano ocenie ich aktywności biologicznej. Choć właściwości biologiczne otrzymywanych koniugatów stanowią istotny cel prowadzonych badań, nie mniej ważne pozostają aspekty związane z ich syntezą, które jednak często traktowane są jako drugorzędne. Nie odnaleziono prac, które koncentrowałyby się wyłącznie na opracowywaniu uniwersalnych narzędzi syntetycznych umożliwiających otrzymywanie szerszego spektrum struktur koniugatów. W związku z tym, zasadne wydaje się opracowanie uniwersalnych i efektywnych strategii syntetycznych, które pozwoliłyby na ich szersze zastosowanie zarówno w badaniach podstawowych, jak i w zastosowaniach praktycznych.

4. Bisfosfoniany jako znaczniki w diagnostyce medycznej

Radiologiczne i nuklearne techniki obrazowania od wielu dekad odgrywają istotną rolę w diagnostyce chorób układu kostnego. Choć konwencjonalne metody, takie jak rentgenografia (RTG), tomografia komputerowa (CT) i rezonans magnetyczny (MRI), cechują się dobrą czułością, przystępnym kosztem i szeroką dostępnością, ich swoistość diagnostyczna w wykrywaniu metabolicznych zmian kostnych jest jednak ograniczona. W przeciwieństwie do nich, techniki medycyny

nuklearnej, takie jak tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (SPECT) czy pozytonowa tomografia emisyjna (PET), szczególnie w wariacie obrazowania hybrydowego (np. SPECT/CT czy PET/CT) pozwalają na znacznie dokładniejszą lokalizację i charakterystykę zmian patologicznych w kościach, a także ich wykrycie już na bardzo wczesnym etapie.¹⁵²

Obecnie, w diagnostyce obrazowej kości najpowszechniej stosowane są dwa radiofarmaceutyki oparte na bisfosfonianach: kompleksy kwasu medronowego (MDP) i oksydronowego (HDP) z izotopem technetu-99m (^{99m}Tc), wykorzystywane w scyntygrafii planarnej i scyntygrafii SPECT (Rys. 16), a także ^{18}F fluorek sodu, stosowany w PET. Oba rodzaje znaczników wykazują zdolność gromadzenia się w miejscach przebudowy kości, jednak poza różnicami wynikającymi z właściwości zastosowanych izotopów oraz z metody detekcji emitowanego przez nie promieniowania, znaczniki te różnią się również sposobem oddziaływania z tkanką kostną. Interakcja ^{18}F NaF z tkanką kostną polega na wymianie jonów hydroksylowych na fluorkowe w strukturze hydroksyapatytu, co prowadzi do powstania fluoroapatytu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$). Z tego powodu ^{18}F NaF wykazuje wysoką specyficzność względem HA w porównaniu z innymi minerałami wapnia. Z kolei znaczniki ^{99m}Tc -MDP i ^{99m}Tc -HDP, ze względu na mechanizm wiązania oparty na kompleksowaniu jonów wapnia przez grupy fosfonowe, wykazują powinowactwo nie tylko do hydroksyapatytu, ale także innych biologicznie istotnych soli wapnia.¹⁵³



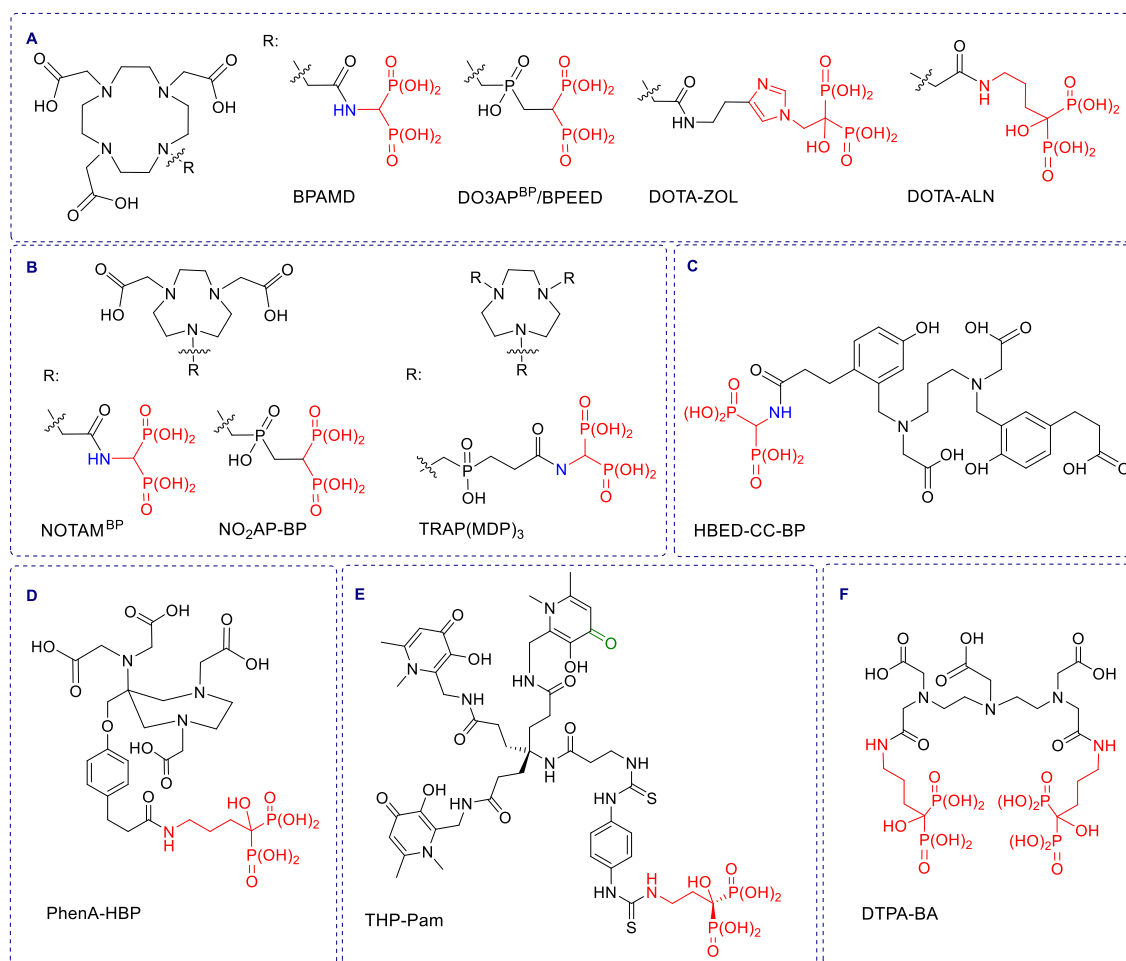
Rys. 16. Struktury kompleksów technetu-99m z kwasem medronowym [^{99m}Tc]Tc-MDP i oksydronowym [^{99m}Tc]Tc-HDP

Znaczniki [^{99m}Tc]Tc-MDP oraz [^{99m}Tc]Tc-HDP są stosowane w praktyce klinicznej od końca lat 70. XX wieku i do dziś odgrywają istotną rolę w diagnostyce szerokiego spektrum schorzeń kostnych, w tym zakażeń (np. zapalenia kości i szpiku), niezakaźnych stanów zapalnych (np. zapalenia stawów), urazów, chorób metabolicznych, a także łagodnych i złośliwych nowotworów oraz ich przerzutów do kości.¹⁵⁴ Pomimo ich dużej użyteczności diagnostycznej, w obliczu postępu technologicznego w ostatnich latach podjęto działania mające na celu opracowanie środków kontrastowych i radiofarmaceutyków, funkcjonalizowanych bisfosfonianami, dedykowanych innym metodom obrazowania, w tym

magnetycznemu rezonansowi jądrowemu (MRI) oraz pozytonowej tomografii emisyjnej (PET).¹⁵⁵

Najwięcej opisanych w literaturze znaczników funkcjonalizowanych ugrupowaniem bisfosfonowym otrzymywano w wyniku koniugowania BPs ze znanymi ligandami zdolnymi do tworzenia kompleksów z metalami lantanowców stosowanymi w obrazowaniu MRI (m.in. Gd(III) lub Ln(III)) i/lub radionuklidami emitującymi pozytony (np. ⁶⁸Ga, ¹¹¹In) stosowanymi w PET. W większości tych znaczników ugrupowanie bisfosfonowe pełniło wyłącznie funkcję liganda zapewniającego powinowactwo znacznika do tkanki kostnej, w odróżnieniu od kompleksów ^{99m}Tc-MDP oraz ^{99m}Tc-HDP, gdzie grupy fosfonowe uczestniczyły także w kompleksowaniu izotopu promieniotwórczego. Sprzęganiu z BPs najczęściej poddawano ligandy będące pochodnymi kwasów 1,4,7,10-tetraazacyklododekano-1,4,7,10-tetraoctowego (DOTA) oraz 1,4,7-triazacyklononano-1,4,7-trioctowego (NOTA), szeroko stosowane w biologii i medycynie nuklearnej.¹⁵⁵ Jednym z pierwszych opisanych modeli był ligand DOTA-NHCH(PO₃)₂ (nazywany BPAMD), opisany przez zespół *Kubička* w 2005 roku (Rys. 17 A).¹⁵⁶ Badania nad jego kompleksem z Gd(III) wykazały, że charakteryzuje się dobrą stabilnością i ma zdolność do odwracalnego wiązania się z hydroksyapatytem. Co więcej, relaksacyjność Gd(III)-BPAMD związanego z kością była ponad czterokrotnie wyższa niż kompleksu wolnego, co wskazuje na jego potencjał diagnostyczny jako środka kontrastowego w MRI.^{156,157} W późniejszych latach opisywano jeszcze inne znaczniki, które badano pod kątem zastosowania w MRI, m.in. Gd-DO3APBP (Rys. 17 A)¹⁵⁸ czy Gd₂-DTPA-BA (Rys. 17 F).¹⁵⁹ Skuteczność tego ostatniego w obrazowaniu zmian nowotworowych potwierdzono w mysim modelu kostniakomięsaka z przerzutami do płuc.

W ostatnim czasie coraz więcej prowadzonych jest badań nad otrzymywaniem znaczników do obrazowania metodą PET, szczególnie tych znakowanych izotopem galu-68 (⁶⁸Ga). W literaturze opisano liczne kompleksy galu-68 z ligandami funkcjonalizowanymi ugrupowaniem bisfosfonowym, zwłaszcza będących pochodnymi wspomnianych wcześniej chelatorów DOTA i NOTA, takich jak np. BPAMD,^{160,161} DO3APBP/BPPED¹⁶², DOTA-(ZOL),¹⁶³ DOTA-ALN¹⁶⁴ (Rys. 17 A), NOTAMPBP,¹⁶⁵ NO₂AP-BP^{165,166} czy TRAP(MDP)₃ (Rys. 17 B).¹⁶⁷ Opisywano także kompleksy z ligandami opartymi na innych chelatorach, spośród których najczęściej badaniom poddawane były kompleksy z ligandami HBED-CC-BP,^{154,168} PhenA-HBP¹⁶⁹ oraz THP-Pam (Rys. 17 C-E).^{153,170}



Rys. 17. Struktury ligandów funkcjonalizowanych ugrupowaniem bisfosfonowym

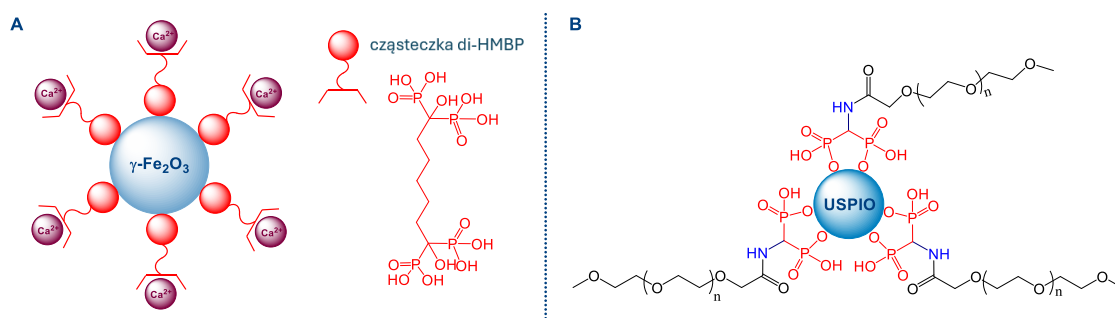
Badania koncentrowały się przede wszystkim na ocenie stabilności tych kompleksów, ich dystrybucji *in vivo*, oraz przydatności diagnostycznej. Spośród wymienionych znaczników, klinicznej ocenie poddano kompleksy [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD,^{160,161} [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP-BP,¹⁶⁶ [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-(ZOL)¹⁶³ oraz [⁶⁸Ga]Ga-HBED-CC-BP (⁶⁸Ga-P15-041).¹⁶⁸ Wszystkie cztery znaczniki charakteryzowały się dobrą stabilnością, zdolnością do akumulacji w kościach oraz korzystnym klirensiem. Ich skuteczność diagnostyczna w wykrywaniu przerzutów nowotworów do kości była zbliżona, a w niektórych przypadkach nawet lepsza w porównaniu z tradycyjnymi środkami, takimi jak [^{99m}Tc]Tc-MDP lub Na[¹⁸F]F.^{161,166,168} Spośród analizowanych związków, [⁶⁸Ga]Ga-P15-041 wyróżniał się dodatkowymi atutami, m.in. szybkim i efektywnym tworzeniem kompleksów z galem-68, co wynika z zastosowania ligandu HBED, który tworzy trwalsze kompleksy niż ligandy z DOTA czy NOTA.^{171,172} Co więcej, znakowanie HBED galem-68 można przeprowadzić w temperaturze pokojowej, w przeciwieństwie do znakowania ligandów DOTA i NOTA, które przeprowadza się w podwyższonej temperaturze.^{171,172} W 2022 roku zakończono wczesną fazę I badań klinicznych, gdzie

oceniano skuteczność znacznika [^{68}Ga]Ga-P15-041 w obrazowaniu przerzutów kostnych raka prostaty; wyniki nie zostały jednak dotąd opublikowane.

Obiecujące wyniki uzyskano również w badaniach opublikowanych w 2023 roku przez Keelinga i wsp., w których zastosowano znacznik [^{68}Ga]Ga-THP-Pam w szczurzym modelu zwapnień pozakostnych (EC - *extraosseous calcification*). Wykazano, że [^{68}Ga]Ga-THP-Pam umożliwia bardziej czułe wykrywanie złogów wapnia o składzie mineralnym różnym od hydroksyapatytu, co wskazuje na jego potencjał jako skuteczniejszego i bardziej uniwersalnego znacznika PET w obrazowaniu EC niż [^{18}F]NaF.¹⁵³

Zastosowanie bisfosfonianów w tworzeniu znaczników ukierunkowanych na tkankę kostną obejmuje również funkcjonalizację powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, wykazujących potencjał jako środki kontrastowe do obrazowania T2-zależnego w MRI. Dobry przykład stanowią nanocząstki $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ modyfikowane kwasem 1,5-dihydroksy-1,5,5-trisfosfonopentanofosfonowym (di-HMBP), zawierającym dwa terminalne ugrupowania bisfosfonowe, opisane przez Lalatonne i wsp. (Rys. 18 A). Taka modyfikacja umożliwiła internalizację powstałych hybryd w komórkach kostnych *in vitro*, nie powodując przy tym działania toksycznego. Autorzy sugerują, że tego typu układy mają obiecujący potencjał w diagnostyce chorób kości i mogą również pełnić funkcję terapeutyczną poprzez hamowanie nadmiernego zwapnienia.¹⁷³

Bisfosfoniany zostały także wykorzystane jako łączniki pomiędzy powierzchnią ultramałych superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (USPIO), a łańcuchem glikolu polietylenowego (PEG) (Rys. 18 B), co pozwoliło na zwiększenie hydrofilowości nanocząstek oraz wydłużenie ich czasu krążenia we krwi. Badania *in vivo* z udziałem tych hybryd wykazały, że charakteryzują się one wysoką relaksacyjnością r_1 oraz niską r_2 , a uzyskany kontrast był na tyle intensywny, że ich zastosowanie mogłoby umożliwić czterokrotne zmniejszenie wymaganej dawki środka kontrastowego.¹⁷⁴



Rys. 18. Struktury superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza modyfikowanych ugrupowaniami bisfosfonowymi

OMÓWIENIE WYNIKÓW

1-Amino-1,1-bisfosfoniany należą do grupy związków szczególnie interesujących z punktu widzenia chemii medycznej i farmaceutycznej. Ich wyjątkowe właściwości, takie jak silne powinowactwo do tkanki kostnej oraz zróżnicowana aktywność biologiczna, przyczyniają się do dużego zainteresowania badaniami ukierunkowanymi zarówno na poszukiwanie nowych analogów ABPs o potencjalnej aktywności biologicznej, jak i na lepsze poznanie właściwości biologicznych związków już znanych. Istotnym kierunkiem badań pozostają także modyfikacje strukturalne tych związków, jak również synteza ich koniugatów z innymi związkami biologicznie czynnymi, co może w znaczący sposób przyczynić się do zwiększenia potencjału terapeutycznego wyjściowych struktur. Kluczowe znaczenie dla aktywności biologicznej 1-amino-1,1-bisfosfonianów ma ich zróżnicowanie strukturalne. Tymczasem znaczna część dostępnych metod ich otrzymywania prowadzi do pochodnych zawierających jedynie atom wodoru oraz różnie podstawioną grupę aminową w pozycji α . Ponadto, jak dotąd, nie opisano ogólnych metod otrzymywania ich niesymetrycznych fosfonowo-fosfinowych oraz fosfonowo-fosfinoilowych analogów, których właściwości biologiczne są przez to słabo poznane.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy stanowią próbę opracowania uniwersalnych narzędzi syntetycznych umożliwiających otrzymywanie związków 1-amino-1,1-bisfosforowych i ich koniugatów. Ocena właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych struktur umożliwi określenie ich potencjału jako związków terapeutycznych oraz znaczników wykorzystywanych w diagnostyce medycznej.

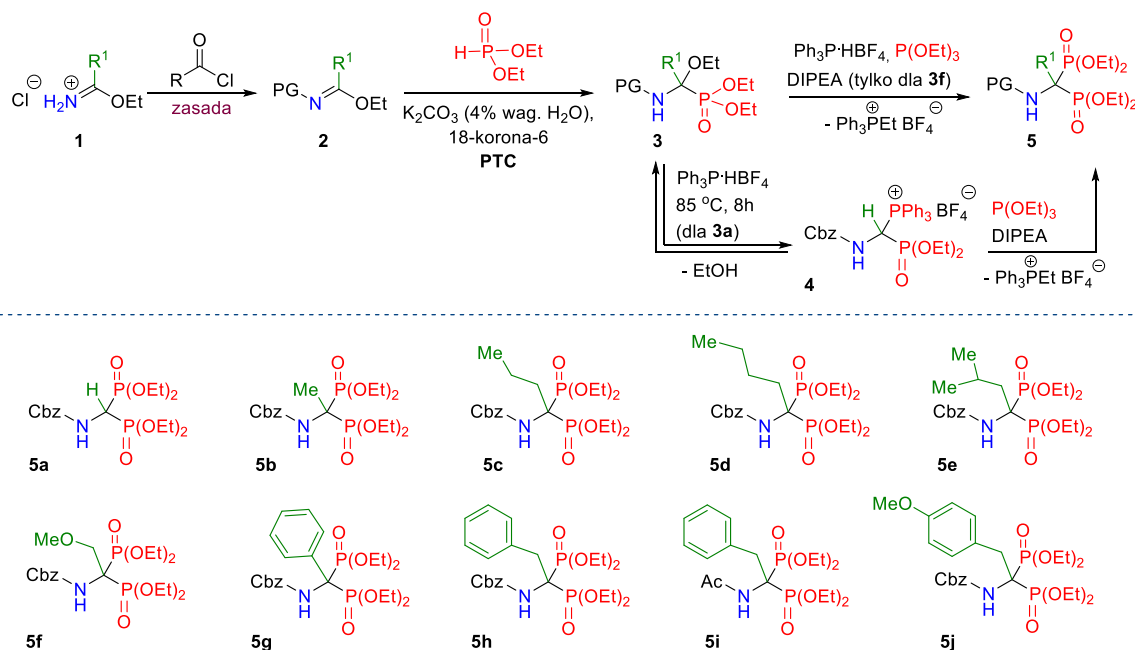
Ze względu na fakt, iż 1-amino-1,1-bisfosfoniany można uznać za fosforowe analogi α -aminokwasów, zaplanowano otrzymanie pochodnych zawierających w pozycji α podstawniki odpowiadające grupom charakterystycznym dla białkowych oraz niebiałkowych α -aminokwasów (Schemat 31).

1.1 Otrzymywanie symetrycznych 1-amino-1,1-bisfosfonianów

1-(N-Acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfoniany tetraetylu **5** otrzymano zgodnie z trzyetapową procedurą, obejmującą:

- zabezpieczenie grupy aminowej wyjściowych chlorowodorków imidoilanów etylu **1** za pomocą odpowiednich chlorków kwasowych,
- transformację N-zabezpieczonych imidoilanów etylu **2** w estry etylowe kwasów 1-(N-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonowych **3** w reakcji addycji typu *Michaelisa-Beckera* prowadzonej w warunkach PTC,
- przekształcenie 1-(N-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu **3** w pochodne 1-(N-acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonowe **5** w reakcji typu *Michaelisa-Arbuzowa*, poprzez odpowiednie sole trifenylfosfoniowe **4** (Schemat 32).

Reakcje prowadzono zgodnie z procedurami opracowanymi przez Kuźnik.¹⁷⁵



Schemat 32

Reakcje acylowania chlorowodorków imidoilanów etylu **1** prowadzono zazwyczaj w temperaturze pokojowej, przez 24 godziny, w obecności zasady, najczęściej zasady *Hüniga* (diizopropyletyloaminy). Odpowiednie N-acyloimidoilany etylu **2** otrzymywano na ogół z dobrymi lub bardzo dobrymi

wydajnościami (Tabela 6). Wyjątek stanowił związek **2a** ($R^1 = H$), którego syntezę, ze względu na jego niestabilność, prowadzono przez 2 godziny, w temperaturze $0^\circ C$, uzyskując produkt z wydajnością 34%.

Reakcje addycji fosforynu dietylu do *N*-acyloimidoilanów etylu **2** prowadzono w warunkach katalizy przeniesienia międzyfazowego, z zastosowaniem eteru koronowego 18-korona-6 jako katalizatora i uwodnionego (4% wag.) węglanu potasu w roli zasady. Dla większości zsyntezowanych analogów **3**, korzystne okazało się prowadzenie reakcji w obniżonej temperaturze, a w niektórych przypadkach również użycie dwukrotnego, a nawet trzykrotnego molowego nadmiaru nukleofila. Oczekiwane 1-(*N*-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfoniany dietylu **3** izolowano poprzez ekstrakcję z fazy stałej za pomocą heksanu lub dichlorometanu, a następnie oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej (DCM/MeOH/Et₃N 100:1:1, v/v/v), uzyskując je na ogół z dobrymi wydajnościami (Tabela 6).

N-Zabezpieczone 1-etoksyalkanofosfoniany dietylu **3** przekształcono w odpowiednie estry 1-(*N*-acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonowe **5** w reakcji z tetrafluoroboranem trifenylofosfoniowym oraz fosforynem trietylu. W większości przypadków transformacje te udało się przeprowadzić metodą *one-pot*, z wytworzeniem *in situ* reaktywnych soli trifenylofosfoniowych **4**. Co więcej, najczęściej reakcje przebiegały efektywnie bez dodatku stosowanego do tej pory jodku trifenylofosfoniowego oraz zasady *Hüniga*. Kluczowe znaczenie dla efektywności tej przemiany miało zastosowanie niewielkiego nadmiaru (5–10% mol.) tetrafluoroboranu trifenylofosfoniowego. Reakcje prowadzono najczęściej w acetonitrylu, w temperaturze pokojowej lub podwyższonej (40 – $70^\circ C$) w czasie od 5 do 24 godzin, stosując 50% molowy nadmiar fosforynu trietylu (Tabela 6). W przypadku syntezy związku **5f** ($R^1 = CH_2OMe$), konieczne było przeprowadzenie transformacji z dodatkiem zasady *Hüniga* – w przeciwnym razie, reakcja zatrzymywała się na etapie generowania soli fosfoniowej. W układzie *one-pot* nie udało się otrzymać 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)metylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **5a** ($R^1 = H$). W tym przypadku, skuteczniejszą metodą okazała się być procedura etapowa, obejmująca syntezę odpowiedniej soli fosfoniowej **4** ($R^1 = H$) poprzez stapianie 1-etoksyfosfonianu **3a** z tetrafluoroboranem trifenylofosfoniowym w temperaturze $85^\circ C$ pod obniżonym ciśnieniem, a następnie jej reakcję z fosforynem trietylu, w obecności zasady *Hüniga*. Surowe produkty **5** wydzielano z mieszaniny poreakcyjnej poprzez ekstrakcję z fazy stałej za pomocą toluenu, a następnie oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej (DCM/MeOH 20:1, v/v).

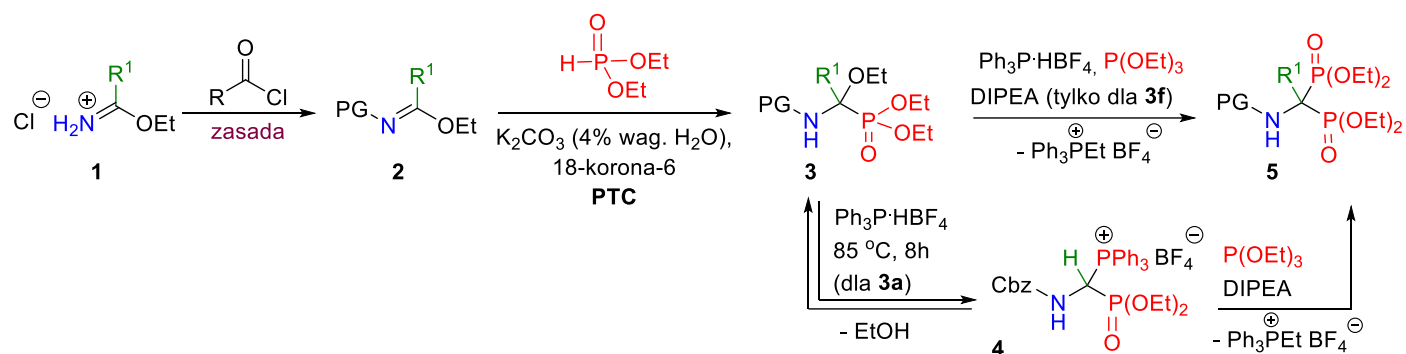
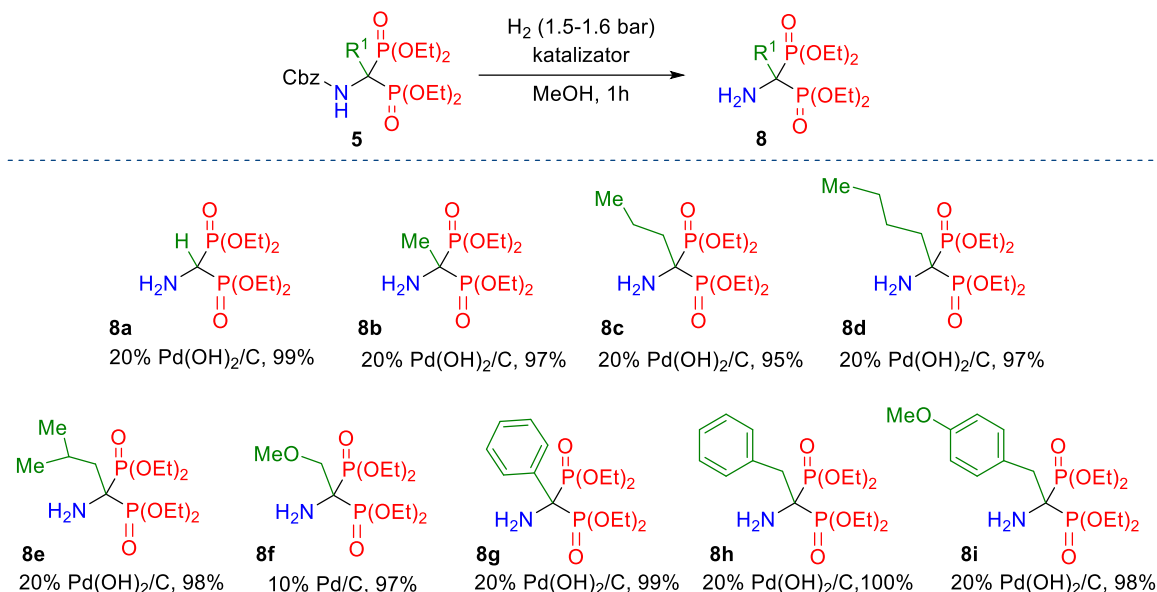


Tabela 6. Warunki i wydajności otrzymywania *N*-acyloimidoilanów etylu 2, 1-(*N*-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu 3 oraz 1-(*N*-acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu 5

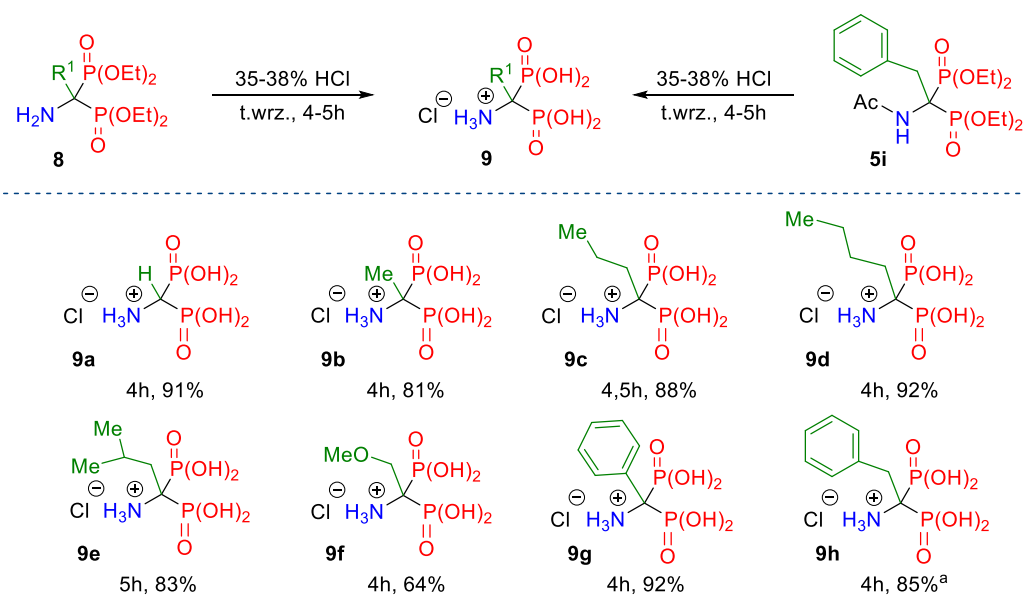
Chlorowodorek imidoilanu etylu 1		<i>N</i> -acyloimidoilan etylu 2				1-(<i>N</i> -acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonian dietylu 3					1-(<i>N</i> -acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu 5				
Nr	R ¹	Nr	PG	Zasada	Wyd., %	Nr	Stosunek mol. 2 : HP(O)(OEt) ₂	Temp., °C	Czas, dni	Wyd., %	Nr	Temp., °C	Czas, h	Rozp.	Wyd., %
1a	H	2a	Cbz	DIPEA	34	3a	1.0 : 1.2	-10	2	93	5a	70	8	MeCN	82
1b	Me	2b	Cbz	DIPEA	90	3b	1.0 : 1.2	t.p.	2	94	5b	40	6.5	MeCN	95
1c	Pr	2c	Cbz	DIPEA	95	3c	1.0 : 2.0	-10	4	68	5c	t.p.	6	MeCN	95
1d	Bu	2d	Cbz	DIPEA	91	3d	1.0 : 2.0	-10	4	54	5d	t.p.	24	MeCN	90
1e	<i>i</i> -Bu	2e	Cbz	DIPEA	99	3e	1.0 : 3.0	-40	7	32	5e	t.p.	24	MeCN	74
1f	CH ₂ OMe	2f	Cbz	2,4,6-kolidyna	74	3f	1.0 : 1.2	-10	4	91	5f	70	5	MeCN	52
1g	Ph	2g	Cbz	DIPEA	58	3g	1.0 : 1.2	t.p.	3	82	5g	60	8	MeCN	40
1h	Bn	2h	Cbz	DIPEA	88	3h	1.0 : 2.0	-20	4	88	5h	t.p.	6	DCM	86
1i	Bn	2i	Ac	Et ₃ N	85	3i	1.0 : 1.2	t.p.	4	53	5i	t.p.	24	MeCN	59
1j	CH ₂ C ₆ H ₄ OMe	2j	Cbz	DIPEA	96	3j	1.0 : 3.0	-25	3	70	5j	t.p.	24	DCM	84

W kolejnym etapie 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfoniany tetraetylu **5a-h** oraz **5j** poddano katalitycznemu uwodornieniu, celem usunięcia grupy zabezpieczającej. Reakcje prowadzono w aparacie ciśnieniowym Parr w atmosferze wodoru (1.5-1.6 bar), w metanolu, przez godzinę, stosując 20% Pd(OH)₂/C (0.1 g na 1 mmol **5**) lub 10% Pd/C (0.2 g na 1 mmol **5**) w roli katalizatora. Po zakończeniu reakcji katalizator oddzielano przez filtrację, a rozpuszczalnik odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oczekiwane produkty **8** otrzymano z bardzo dobrymi, często ilościowymi wydajnościami (Schemat 33) i nie wymagały one dalszego oczyszczania.



Schemat 33

Finalną transformację 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **8** w odpowiednie kwasy 1-amino-1,1-bisfosfonowe przeprowadzono stosując klasyczną hydrolizę w stężonym kwasie solnym w temperaturze wrzenia - jedną z najczęściej wykorzystywanych metod hydrolizy estrów fosfonowych.¹⁷⁶ W większości przypadków oczekiwane produkty **9** otrzymywano po 4-5 godzinach reakcji, z dobrymi lub bardzo dobrymi wydajnościami (64-92%, Schemat 34). Zastosowane warunki umożliwiły także jednoczesną hydrolizę grup estrowych oraz odbezpieczenie grupy aminowej 1-(*N*-acetyloamino)-2-fenyletylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **5i**, wskazując na możliwość bezpośredniego otrzymywania kwasów 1-amino-1,1-bisfosfonowych również z odpowiednio *N*-zabezpieczonych pochodnych zabezpieczonych (**5i** → **9h**, Schemat 34).

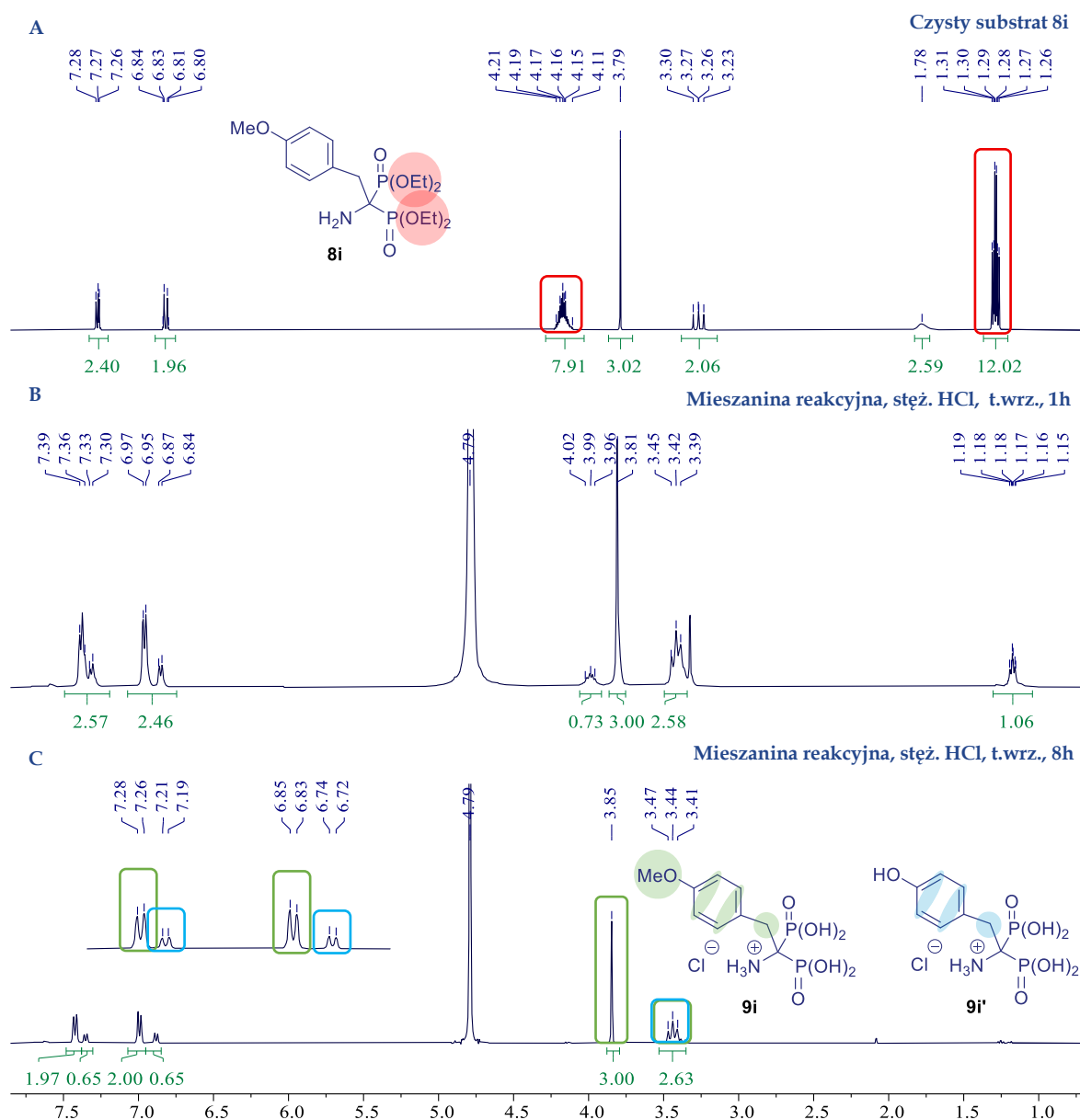


^a Otrzymany z 1-(N-acetyloamino)-2-fenyletylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **5i**

Schemat 34

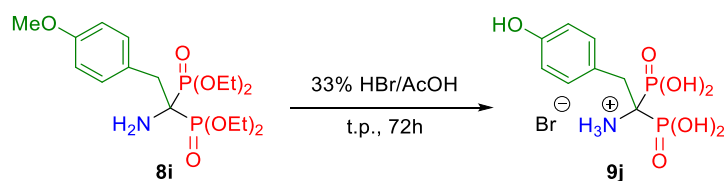
W przypadku 1-amino-2-(4-metoksyfeylo)etylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8i** ($R^1 = \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OMe}$), hydroliza w stężonym kwasie solnym prowadziła do częściowego dealkilowania grupy metoksyłowej znajdującej się w łańcuchu bocznym. Obecność produktu dealkilowania w mieszaninie reakcyjnej potwierdzono już po godzinie reakcji, mimo że estry fosfonowe ulegały w tym czasie jedynie częściowej hydrolizie (Rys. 19 B). Udział produktu dealkilowania zwiększał się w czasie, osiągając maksymalną zawartość 25% mol. po 8 godzinach reakcji (Rys. 19 C). Próby rozdzielenia powstałych związków metodą krystalizacji nie powiodły się. W łagodniejszych warunkach hydrolizy (5% HCl, temperatura pokojowa) nie obserwowano powstawania produktu z dealkilowaną grupą metoksyłową, jednak nawet po 72 godzinach reakcja prowadziła jedynie do częściowej hydrolizy grup estrowych. Podobne rezultaty uzyskano po godzinnej hydrolizie w 18% HCl w temperaturze wrzenia. O obecności mieszaniny produktów, zawierających częściowo zhydrolizowane grupy estrowe, świadczyło pojawienie się na widmach ^{31}P NMR dodatkowych charakterystycznych dubletów o różnych intensywnościach, przy 18.7 ppm, 18.3 ppm, 9.1 ppm oraz 7.6 ppm, o stałej sprzężenia wynoszącej 4.9 Hz.

OMÓWIENIE WYNIKÓW



Rys. 19. Porównanie widm ^1H NMR (A) 1-amino-2-(4-metoksyfeylo)etylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8i** [400 MHz/ CDCl_3/δ (ppm) względem TMS] oraz mieszanin reakcyjnych otrzymanych w wyniku hydrolizy pochodnej **8i** w stężonym kwasie solnym po (B) 1 godz. reakcji i (C) 8 godz. reakcji [400 MHz/ $\text{D}_2\text{O}/\delta$ (ppm) względem sygnału resztkowego D_2O (4.79 ppm)]

Problem udało się rozwiązać stosując 33% HBr w kwasie octowym. Po 72 godzinach reakcji w temperaturze pokojowej otrzymano produkt całkowitej hydrolizy grup estrowych oraz pełnego dealkilowania grupy metoksyłowej, z wydajnością 89%.



Schemat 35

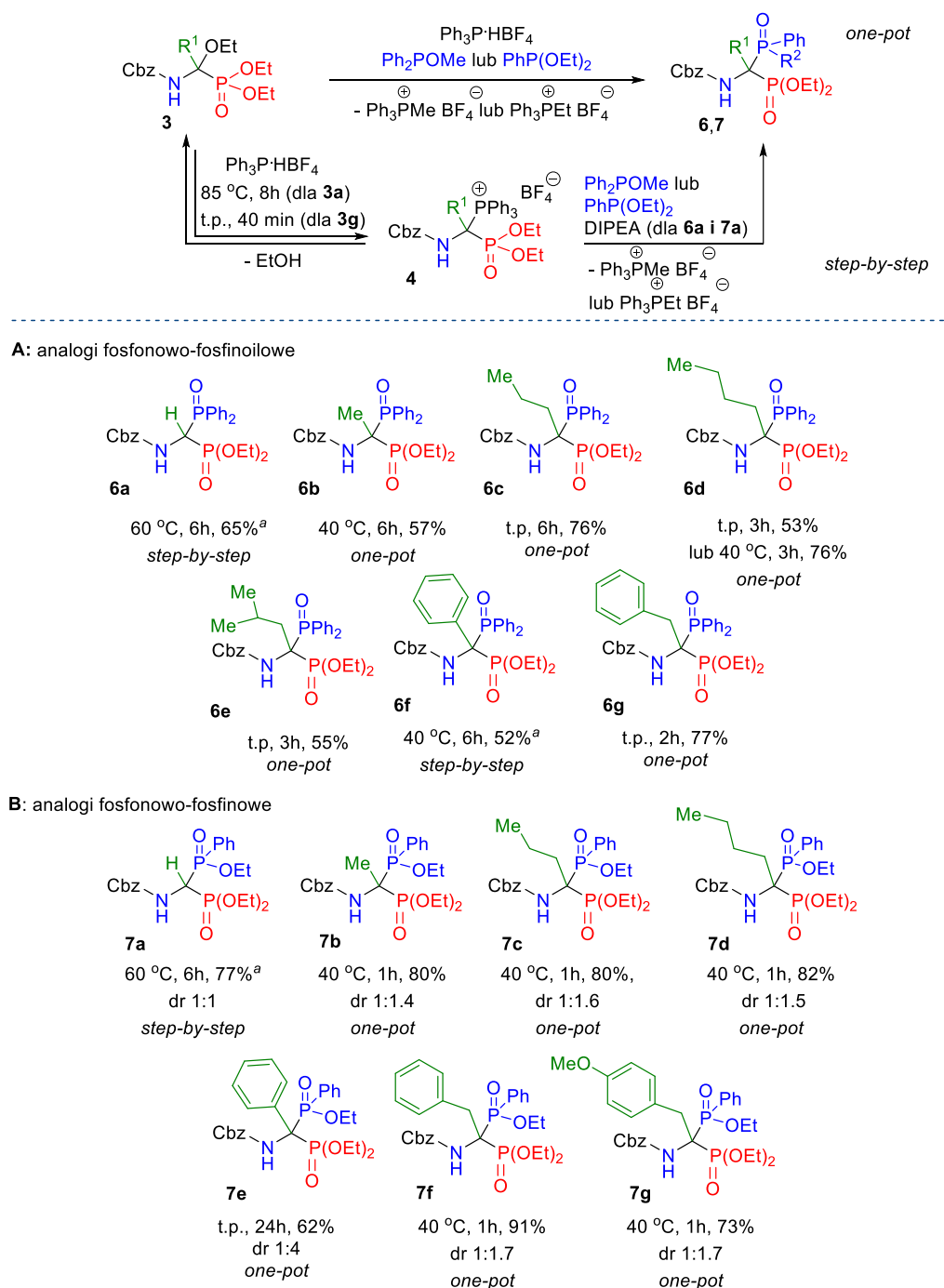
Otrzymane *N*-acyloimidoilany etylu **2**, 1-(*N*-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfoniany dietylu **3**, 1-(*N*-acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfoniany tetraetylu **5**, 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfoniany tetraetylu **8** oraz kwasy 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowe **9** identyfikowano na podstawie ich właściwości spektroskopowych (^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR, IR) oraz za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS). Charakterystykę związków **8a-i** oraz **9a-h,j** podano w części eksperymentalnej niniejszej pracy.

1.2 Otrzymywanie niesymetrycznych fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów *N*-zabezpieczonych 1-amino-1,1-bisfosfonianów

Ze względu na ograniczoną liczbę opisanych dotychczas metod otrzymywania niesymetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych, w kolejnym etapie postanowiono zbadać możliwość transformacji *N*-zabezpieczonych 1-amino-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu **3** w odpowiednie pochodne fosfonowo-fosfinoilowe **6** oraz fosfonowo-fosfinowe **7**. W reakcjach w roli nukleofila fosforowego stosowano difenylofosfinin metylu lub fenylofosfonin dietylu.

Eksperymenty rozpoznawcze przeprowadzono w warunkach, które sprawdziły się w syntezie symetrycznych pochodnych bisfosforowych **5**, t.j. z zastosowaniem 10% nadmiaru molowego tetrafluoroboranu trifenylofosfoniowego oraz 50% nadmiaru molowego nukleofila. W przypadku reakcji z difenylofosfininem metylu, transformacja zachodziła efektywnie w dichlorometanie, w temperaturze pokojowej lub w temperaturze 40°C, w ciągu 2–6 godzin (Schemat 36). Wyjątek stanowiły reakcje z udziałem 1-etoksyfosfonowych analogów glicyny **3a** ($\text{R}^1 = \text{H}$) i fenyloglicyny **3g** ($\text{R}^1 = \text{Ph}$), dla których w warunkach *one-pot*, nawet w podwyższonej temperaturze, nie udało się otrzymać oczekiwanych produktów **6a** oraz **6f**. W przypadku pochodnej **6a** wynik ten nie był zaskoczeniem, ponieważ analogiczna reakcja 1-etoksyfosfonianu **3a** z tetrafluoroboranem trifenylofosfoniowym i fosforynem trietylu również zakończyła się niepowodzeniem. Oczekiwany fosfonowo-fosfinoilowy analog **6a** udało się otrzymać wyłącznie metodą etapową (*step-by-step*), obejmującą syntezę odpowiedniej soli fosfoniowej **4** ($\text{R}^1 = \text{H}$) poprzez stapianie 1-etoksyfosfonianu **3a** z tetrafluoroboranem trifenylofosfoniowym w temperaturze 85°C, pod obniżonym ciśnieniem, a następnie jej reakcję z difenylofosfininem metylu w temperaturze 60°C w obecności zasady *Hüniga* (Schemat 36). W przypadku fosfonowo-fosfinoilowego analogu fenyloglicyny **6f**, oczekiwany produkt również otrzymano po przeprowadzeniu syntezy etapowo. Odpowiednią sól fosfoniową **4** ($\text{R}^1 = \text{Ph}$) uzyskano po 40 minutach reakcji 1-etoksyfosfonianu **3g** z tetrafluoroboranem trifenylofosfoniowym w temperaturze

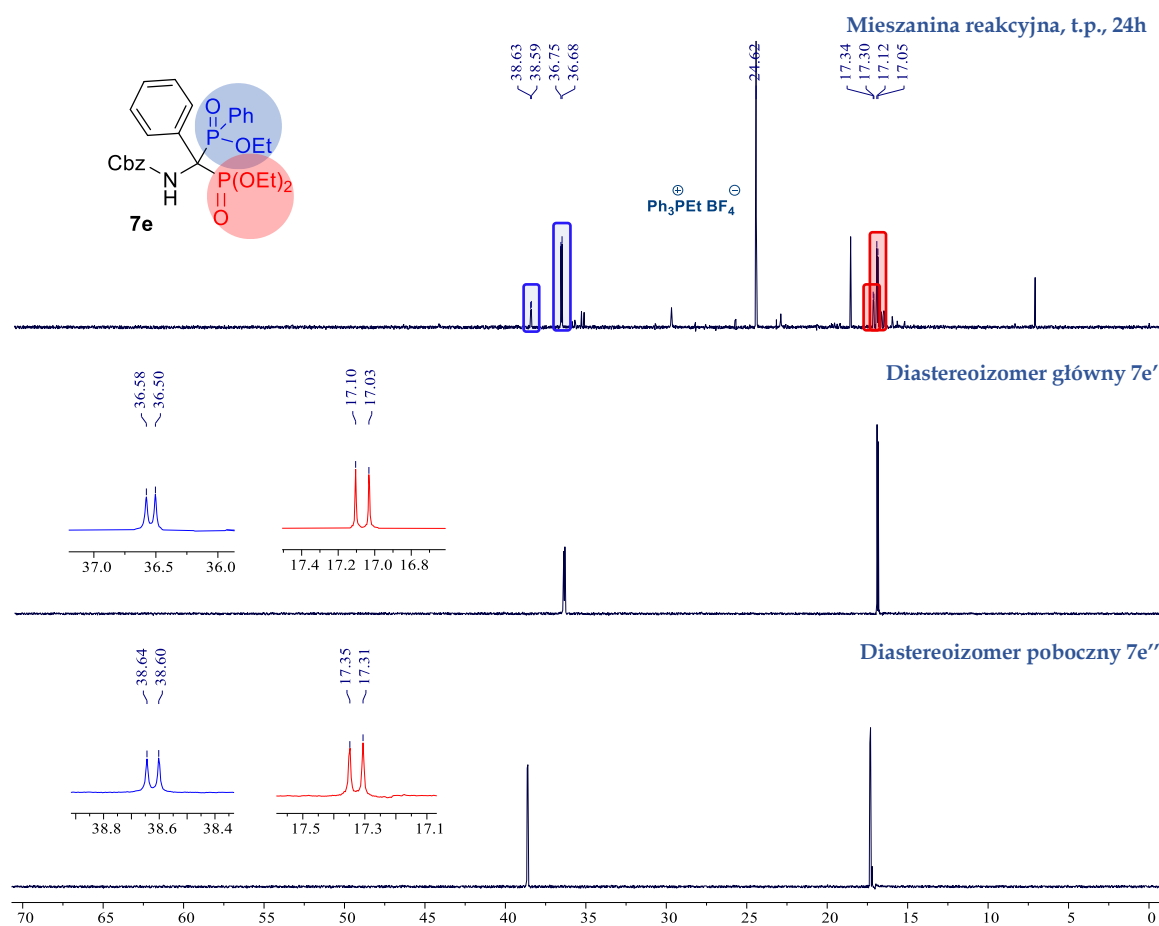
pokojoyej, a następnie przekształcono ją w docelowy 1-(N-benzylksykarbonylo-amino)-1-(difenylfosforylo)fenylometanofosfonian dietylu **6f** w reakcji typu *Michaelisa-Arbuzowa* z difenylfosfininem metylu (Schemat 36).



Schemat 36

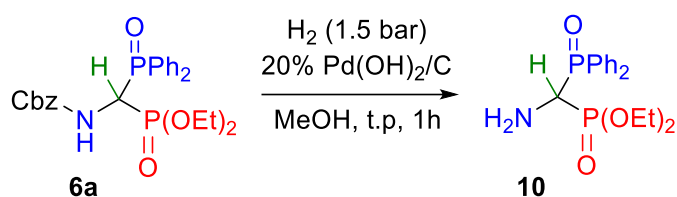
Reakcje 1-(N-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu **3** z tetrafluoroboranem trifenylofosfoniowym oraz fenylfosfoninem dietylu zachodziły efektywnie zarówno w temperaturze pokojowej jak i podwyższonej, przy czym mniej zanieczyszczeń obserwowano (¹H oraz ³¹P NMR mieszanin poreakcyjnych)

w reakcjach prowadzonych w temperaturze 40°C. W przypadku fosfonowo-fosfinowego analogu fenyloglicyny **7e** ($R^1 = \text{Ph}$), najwyższą konwersję substratu **3g** stwierdzono w reakcji przeprowadzonej w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Syntezę 1-(N-benzylloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenyl)fosforylo]metanofosfonianu dietylu **7a** ($R^1 = \text{H}$) wykonano etapowo, stosując warunki analogiczne do tych użytych w syntezie jego fosfonowo-fosfinoilowego odpowiednika **6a**. 1-(N-Benzylloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenyl)fosforylo]alkanofosfoniany dietylu **7** otrzymywano jako mieszaniny diastereoizomerów (dr 1:1–1:4), których stosunek określono na podstawie analizy widm ^1H lub ^{31}P NMR. Zaobserwowano wzrost wartości dr wraz ze wzrostem zawady sterycznej podstawnika R^1 znajdującego się przy centrum reakcyjnym. Tylko mieszaninę diastereoizomerów **7e** (dr 1:4) udało się rozdzielić i wyizolować jako pojedyncze izomery **7e'** oraz **7e''** (Rys. 19) za pomocą chromatografii kolumnowej (AcOEt/Hex/MeOH 14:4:1, potem DCM/MeOH 40:1). Niestety, próby rozdziału pozostałych mieszanin diastereoizomerów **7**, zarówno za pomocą chromatografii kolumnowej, jak i HPLC, nie powiodły się.



Rys. 20. Widma ^{31}P NMR mieszaniny reakcyjnej uzyskanej w reakcji syntezy związku **7e** prowadzonej w temperaturze pokojowej przez 24 godziny (A), wyizolowanego głównego diastereoizomeru **7e'** (B) oraz wyizolowanego pobocznego diastereoizomeru **7e''** (C); 162 MHz/ CDCl_3/δ (ppm) względem sygnału H_3PO_4

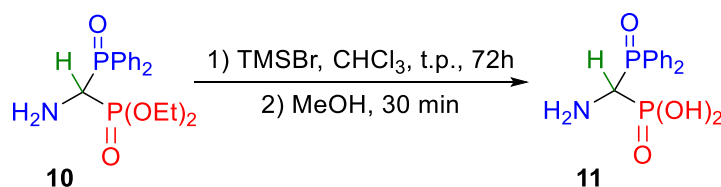
Następnie podjęto próby katalitycznego uwodornienia fosfonowo-fosfinoilowych pochodnych ABPs **6**. Niestety, w warunkach, które umożliwiły skuteczną redukcję symetrycznych pochodnych 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych **5** (H_2 1.5-1.6 bar, MeOH, 1h, 0.1 g 20% $Pd(OH)_2/C$ na 1 mmol **5**), nie udało się przeprowadzić całkowitej redukcji żadnego z badanych analogów **6**. Jedynym związkiem, który zredukowano w pełni, był 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)metanofosfonian dietylu **6a**. Reakcję przeprowadzono jednak przy zastosowaniu pięciokrotnie większej ilości katalizatora. Finalnie, po oczyszczeniu metodą chromatografii kolumnowej, związek ten uzyskano z wydajnością 87% (Schemat 37).



Schemat 37

W kolejnym etapie przeprowadzono wstępne badania nad hydrolizą 1-amino-1-(difenylfosforylo)alkanofosfonianów dietylu. Reakcje dla wybranych modeli niesymetrycznych fosfonowo-fosfinoilowych pochodnych 1-aminobisfosfonianów wykonywane w obecności stężonego kwasu solnego (t.wrz., 4h), bromowodoru w kwasie octowym (t.p., 24h) oraz 1% roztworu wodorotlenku sodu (t.wrz., 4h) prowadziły do otrzymania mieszaniny produktów, których struktur nie udało się zidentyfikować.

Najbardziej efektywną metodą deestryfikacji grup fosfonowych przetestowaną dla modelu 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)metanofosfonianu dietylu **10** okazała się reakcja z bromkiem trimetylosililu, a następnie metanolem (Schemat 38).



Schemat 38

Przeprowadzone badania wskazały, że redukcja oraz hydroliza 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)alkanofosfonianów dietylu **6** jest możliwa, choć wymaga dalszej optymalizacji. Prace w tym zakresie są kontynuowane.

Struktury fosfonowo-fosfinoilowych i fosfonowo-fosfinowych analogów *N*-zabezpieczonych 1-amino-1,1-bisfosfonianów **6** i **7**, 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)metanofosfonianu dietylu **10** oraz kwasu 1-amino-1-(difenylfosforylo)metanofosfonowego **11** potwierdzono na podstawie ich właściwości spektroskopowych (^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR, IR) oraz za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS). Ich szczegółową charakterystykę przedstawiono w części eksperymentalnej niniejszej pracy.

Podsumowując, udało się opracować uniwersalną metodę otrzymywania strukturalnie zróżnicowanych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych, obejmującą zarówno symetryczne 1-amino-1,1-bisfosfoniany, jak i ich niesymetryczne analogi fosfonowo-fosfinoilowe oraz fosfonowo-fosfinowe. Warto podkreślić, że zaproponowana procedura należy do nielicznych znanych metod sekwencyjnej syntezy związków 1-amino-1,1-bisfosforowych. Udało się także dobrać warunki deprotekcji grupy aminowej oraz następczej hydrolizy 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu. Wskazano również na możliwość przeprowadzenia analogicznych transformacji dla fosfonowo-fosfinoilowych pochodnych ABPs.

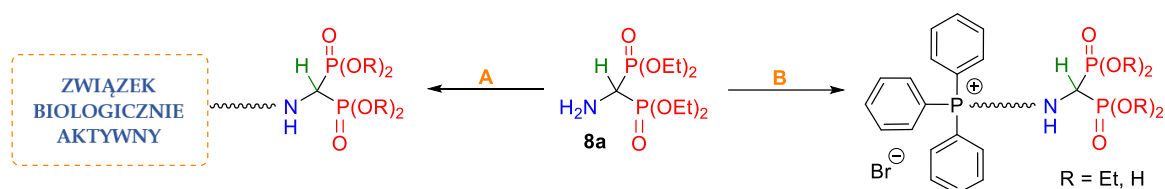
2. Modyfikacje struktury układów bisfosfonowych

Kolejny etap zaplanowanych prac badawczych obejmował przeprowadzenie modyfikacji strukturalnych wybranego modelu 1-amino-1,1-bisfosfonianu.

Pierwszy z kierunków badań zakładał syntezę koniugatów ABP z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi (Schemat 39 A). Do potencjalnych korzyści wynikających z chemicznego połączenia tych związków można zaliczyć nie tylko zmianę właściwości terapeutycznych powstałego koniugatu, będącą efektem możliwej synergii między obiema cząsteczkami, lecz także ukierunkowane dostarczanie terapeutyku do kości, dzięki obecności ugrupowania bisfosfonowego.

Drugim kierunkiem badań była modyfikacja struktury ABP poprzez wprowadzenie grupy trifenylofosfoniowej (TPP⁺), pełniącej funkcję tzw. „liganda mitochondrialnego” (Schemat 39 B). Grupa TPP⁺, ze względu na silnie lipofilowy charakter oraz trwały ładunek dodatni zdelokalizowany w trzech pierścieniach fenylowych ma bowiem zdolność przenikania przez błonę mitochondrialną i selektywnej akumulacji w ich wnętrzu. Modyfikacja struktury ABP poprzez wprowadzenie grupy TPP⁺ mogłaby korzystnie wpłynąć nie tylko na poprawę biodostępności wyjściowej cząsteczki (która w przypadku kwasów BP jest niska z uwagi na ich silnie hydrofilowy charakter), lecz także jej właściwości biologicznych, zważywszy, że jeden z proponowanych mechanizmów działania bisfosfonianów wiąże się z powstawaniem antymetabolitów ATP właśnie w mitochondriach.

Związkiem poddanym opisanym wyżej modyfikacjom był 1-amino-metylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu **8a**, wybrany ze względu na jego prostą strukturę, warunkującą jego potencjalnie wyższą reaktywność, a także wysoką aktywność biologiczną odpowiadającej mu formy kwasowej (co potwierdziły badania opisane w podrozdziale 4 omówienia wyników).



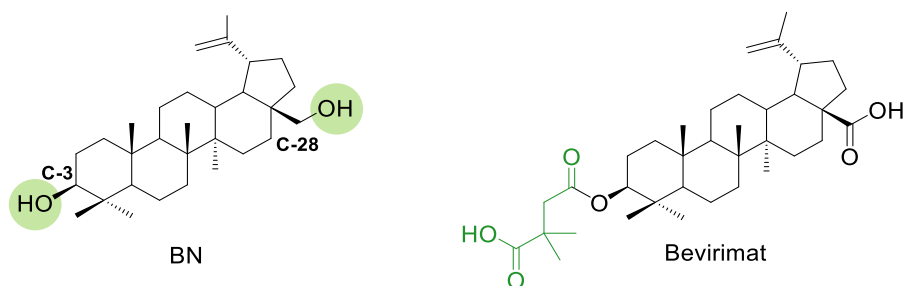
A Synteza koniugatów ABP ze związkami biologicznie aktywnymi **B** Modyfikacja struktury ugrupowaniem TPP⁺

Schemat 39

2.1 Sprzęganie 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny

Badania rozpoczęto od syntezy koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi. Pierwszym z nich była betulina (BN, Rys. 21), będąca naturalnym triterpenem typu lupanu, wykazującym szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne oraz przeciwwirusowe.^{177–179} Jako związek pochodzenia naturalnego, BN charakteryzuje się wysokim profilem bezpieczeństwa, co czyni ją substancją o dużym potencjale terapeutycznym. Największym ograniczeniem w zastosowaniu betuliny jest jej niska rozpuszczalność w środowisku wodnym, a tym samym ograniczona biodostępność, co wynika z silnie hydrofobowego charakteru cząsteczki.¹⁸⁰

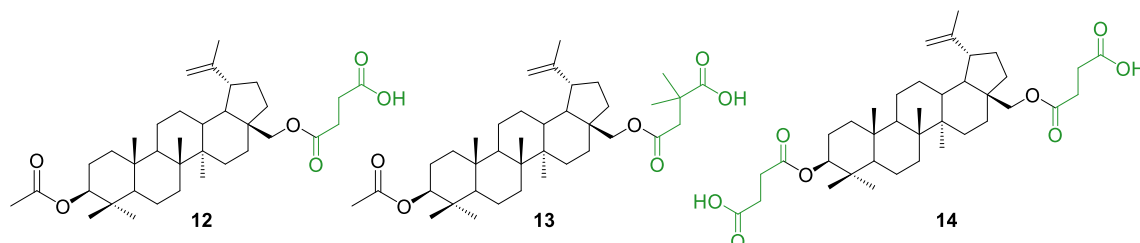
W celu poprawy rozpuszczalności, aktywności biologicznej oraz selektywności działania, betulina i jej analogi poddawane są licznym modyfikacjom strukturalnym, najczęściej obejmującym grupy hydroksylowe w pozycjach C-3 i C-28 szkieletu cząsteczki. Przykładem takiej funkcjonalizacji jest wprowadzenie do struktury BN grup acylowych, takich jak acetylowe czy 3-karboksyacylowe, co wyraźnie zwiększa jej aktywność biologiczną.¹⁸¹ Jednym z najlepiej poznanych związków tego typu jest bevirimat (Rys. 21) – pochodna kwasu betulinowego, zawierająca resztę 3-O-(3'-karboksy-3',3'-dimetylopropanoilową), wykazująca silne działanie przeciwwirusowe, zwłaszcza wobec wirusa HIV. Poza wpływem na właściwości biologiczne wyjściowej cząsteczki, dodatkową zaletą zastosowania linkera zakończonego grupą karboksylową jest możliwość dalszej modyfikacji jej struktury.



Rys. 21. Struktury betuliny (BN) oraz bevirimatu

Mając na uwadze potencjalne korzyści wynikające z modyfikacji struktury betuliny, zaplanowano syntezę trzech koniugatów, otrzymanych w wyniku sprzęgania 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** z karboksyacylowymi pochodnymi betuliny za pomocą wiązania amidowego. W reakcjach wykorzystano następujące pochodne BN różniące się rodzajem oraz miejscem przyłączenia linkera:

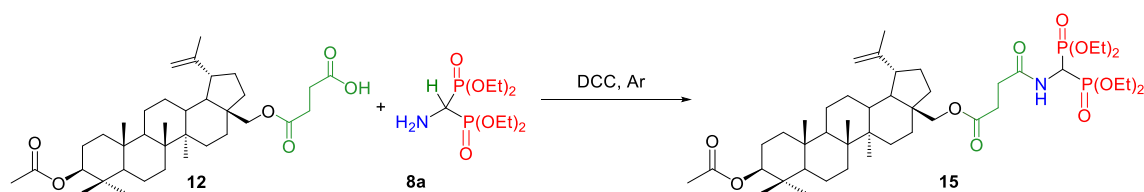
3-*O*-acetylo-28-*O'*-(3'-karboksypropanoilo)betulinę **12**, 3-*O*-acetylo-28-*O'*-(3'-karboksy-3',3'-dimetylopropanoilo)betulinę **13** oraz 3,28-*O,O'*-bis(3'-karboksypropanoilo)betulinę **14** (Rys. 22). Związki te zostały udostępnione przez Panią dr inż. Mirosławę Grymel z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Politechniki Śląskiej w Gliwicach, która otrzymała je zgodnie z opisaną procedurą.¹⁸²



Rys. 22. Struktury 3-*O*-acetylo-28-*O'*-(3'-karboksypropanoilo)betuliny **12**, 3-*O*-acetylo-28-*O'*-(3'-karboksy-3',3'-dimetylopropanoilo)betuliny **13** oraz 3,28-*O,O'*-bis(3'-karboksypropanoilo)betuliny **14**

Dotychczas w literaturze opisano tylko jeden koniugat ABP z pochodnymi BN (koniugat kwasu betulinowego z 1-(2-aminoetyloamino)-1,1-etylidenobisfosfonianem tetraetylu **LXXIX**), którego syntezę przedstawiono w rozdziale 3.3 części literaturowej. Pomimo wysokiej wydajności z jaką autorzy otrzymali produkt **LXXIX**, nie podali oni żadnych informacji na temat jego aktywności biologicznej.

Badania nad syntezą koniugatów ABP-BN rozpoczęto od eksperymentów rozpoznawczych, w których sprawdzono różne warunki reakcji tworzenia wiązania amidowego pomiędzy 1-aminobisfosfonianem **8a** i 3-*O*-acetylo-28-*O'*-(3'-karboksypropanoilo)betuliną **12**, wybraną jako modelowy substrat (Schemat 40). Reakcje prowadzono w atmosferze argonu, z wykorzystaniem *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako czynnika sprzęgającego. Procedura obejmowała aktywację analogu betuliny w reakcji z DCC, prowadzonej przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzano roztwór bisfosfonianu **8a** i kontynuowano reakcję w tych samych warunkach (metoda A). Dobór warunków obejmował zmiany stosunków molowych reagentów, rodzaju rozpuszczalnika, czasu reakcji oraz ocenę wpływu dodatku 1-hydroksybenzotriazolu (HOBt) na przebieg reakcji (Tabela 7). Odczynnik ten często zwiększa wydajność i selektywność reakcji tworzenia wiązań amidowych z użyciem DCC. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą spektroskopii ¹H oraz ³¹P NMR.



Schemat 40

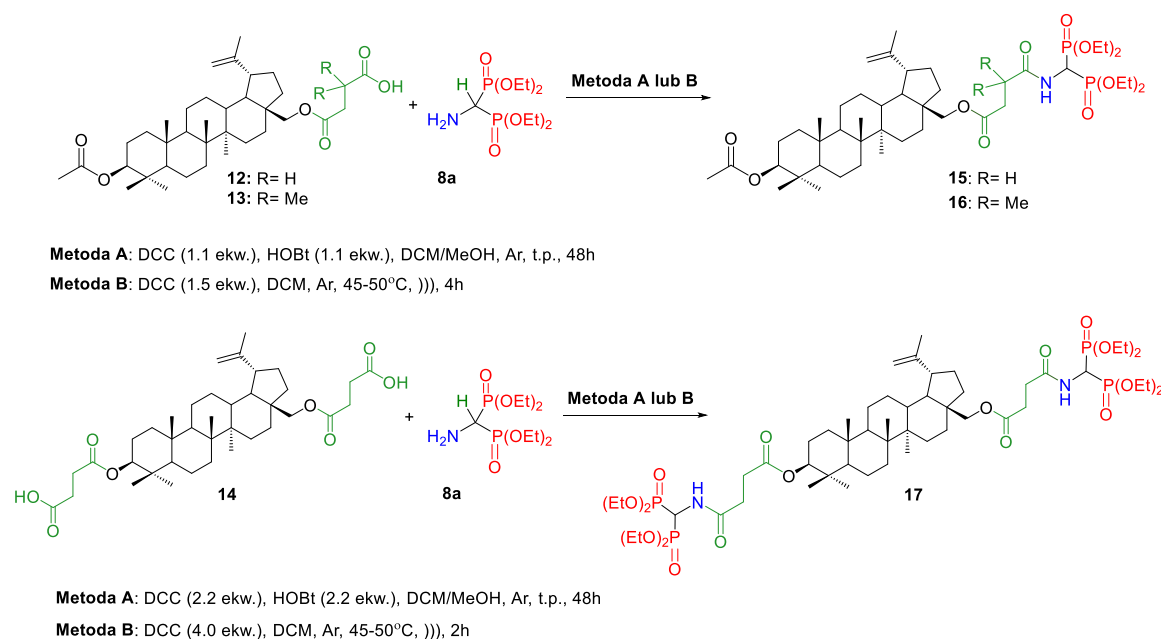
Tabela 7. Dobór warunków reakcji sprzęgania 3-O-acetylo-28-O'-(3'-karboksypropanoilo)-betuliny z 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianem tetraetylu **8a**

Nr	Stosunek molowy 12 : 8a : DCC : HOBt	Rozpuszczalnik	Czas, h	Konwersja 12, ^a %
1	1.0 : 1.5 : 1.5 : -	DCM + MeOH	24/48/144	42/54/55
2	1.0 : 1.5 : 1.5 : -	AcOEt + MeOH	24/48/144	47/51/52
3	1:0 : 1.5 : 1.5 : -	MeCN + MeOH	24/48/144	41/42/42
4	1:0 : 2:0 : 1.5 : -	DCM + MeOH	24	56
5	1:0 : 1.5 : 1.5 : 1.1	DCM + MeOH	24	56
6	1.0 : 2.0 : 1.1 : 1.1	DCM + MeOH	48	73

^a Określona na podstawie analizy widm ¹H NMR

Kluczowym aspektem był dobór odpowiedniego środowiska reakcji, zapewniającego właściwy kontakt między reagentami. Najlepszą konwersję substratu **12** uzyskano prowadząc reakcję w dichlorometanie z dodatkiem alkoholu metylowego (10%, v/v) (Tabela 7, pozycje 1-3). Zgodnie z oczekiwaniami, wydłużenie czasu reakcji zwiększyło stopień przereagowania substratu **12**, jednak po 48 godzinach dalszy wzrost konwersji był już nieznaczny (Tabela 7, pozycje 1-3). Zwiększenie molowego nadmiaru 1-amino-1,1-bisfosfonianu oraz dodatek 1-hydroksybenzotriazolu korzystnie wpłynęły na efektywność reakcji, zwiększając konwersję substratu o około 10% w czasie 24 godzin w porównaniu do pierwszego wariantu reakcji (Tabela 7, pozycje 4 i 5 vs 1). Najlepsze efekty osiągnięto, stosując DCC i HOBt w 10% nadmiarze molowym oraz 2-krotny nadmiar molowy 1-amino-1,1-bisfosfonianu **8a** (Tabela 7, pozycja 6).

Po przeprowadzeniu doboru warunków reakcji zastosowano je w syntezie trzech modeli koniugatów **15-17** (Schemat 41, Tabela 8, Metoda A). Główną trudnością podczas izolacji analogów ABP-BN było ich oddzielenie od *N,N'*-dicykloheksylo-mocznika (DCU), powstającego jako produkt uboczny. Najskuteczniejszą metodą wydzielania produktów koniugacji z mieszaniny reakcyjnej okazała się ekstrakcja z fazy stałej przy użyciu octanu etylu, a następnie oczyszczanie za pomocą chromatografii kolumnowej (AcOEt/MeOH, gradient 20:1 do 5:1, v/v). Oczekiwane produkty uzyskano finalnie z wydajnościami w zakresie 34–77% (Tabela 8).



Schemat 41

Tabela 8. Warunki i wydajności otrzymywania koniugatów ABP-BN **15-17**

Nr	Analog BN	Stosunek molowy analog BN:8a:DCC:HOBT	Rozpuszczalnik	Czas, h	Temp., °C	Konw., ^a %	Wyd., ^b %
Metoda A							
1	12	1.0 : 2.0 : 1.1 : 1.1	DCM + MeOH	48	t.p.	73	61
2	13	1.0 : 2.0 : 1.1 : 1.1	DCM + MeOH	48	t.p.	79	77
3	14	1.0 : 4.0 : 2.2 : 2.2	DCM + MeOH	48	t.p.	- ^c	34
Metoda B							
4	12	1.0 : 2.0 : 1.5	DCM	2/4	45-50	94/96	-/91
5	13	1.0 : 2.0 : 1.5	DCM	2/4	45-50	90/97	-/92
6	14	1.0 : 4.0 : 4.0	DCM	2	45-50	- ^c	69

^a Określona na podstawie analizy widm ¹H NMR. ^b Wydajność wyizolowanego produktu. ^c Konwersja niemożliwa do określenia ze względu na nakładanie się sygnałów na widmie ¹H NMR.

Z powodu niepełnej konwersji substratów **12-14** oraz niskiej wydajności produktu dipodstawionego **17**, w kolejnym etapie prac badawczych zdecydowano się przeprowadzić reakcje wspomagane ultradźwiękami, bazując na literaturowych doniesieniach o ich korzystnym wpływie na tworzenie wiązań amidowych. Tym razem w roli czynnika sprzęgającego wykorzystano wyłącznie DCC (1.5 ekw.) oraz uproszczono procedurę syntezy. Wszystkie reagenty rozpuszczono w dichlorometanie, a reakcję przeprowadzono w temperaturze 45-50°C i wspomagano ultradźwiękami (metoda B). W przypadku analogów **12** oraz **13** wysoką konwersję substratu (96-97% na podstawie analizy widm ¹H NMR) zaobserwowano już po 4 godzinach (Tabela 8). Dla pochodnej **14** za optymalny czas

reakcji uznano 2 godziny, ponieważ jego dalsze wydłużenie skutkowało powstawaniem produktów ubocznych.

Aby ocenić wpływ samej temperatury na przebieg reakcji, przeprowadzono eksperyment kontrolny, w którym zastosowano identyczne warunki (**12** : **8a** : DCC 1.0 : 2.0 : 1.5, temp. 45–50°C), jednak bez wspomagania procesu ultradźwiękami. Po 2 godzinach reakcji konwersja substratu **12** wyniosła jedynie 35%, co potwierdza istotną rolę ultradźwięków w zwiększeniu efektywności omawianej transformacji.

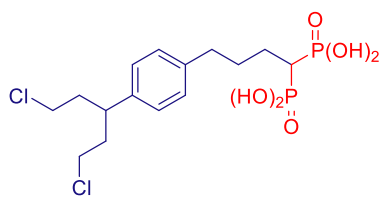
Po zakończeniu reakcji produkty izolowano analogicznie jak w metodzie A. Koniugaty **15-17** uzyskano z wydajnościami w zakresie 69–92% (Tabela 8). Warto podkreślić, że chociaż proces oczyszczania produktów końcowych w obu metodach obejmował ekstrakcję i chromatografię kolumnową, izolacja czystych koniugatów otrzymanych metodą B była ułatwiona dzięki niższej zawartości nieprzereagowanych substratów i braku 1-hydroksybenzotriazolu w mieszaninie poreakcyjnej.

Otrzymane koniugaty **15-17** poddano następnie ocenie ich właściwości cytotoksycznych, co opisano w rozdziale 4 omówienia wyników. Opracowane metody syntezy oraz aktywność biologiczna koniugatów **15-17** stanowią przedmiot dwóch zgłoszeń patentowych.

2.2 Sprzęganie 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z wybranymi związkami biologicznie aktywnymi oraz bromkami karboksyalkilotrifenylfosfoniowymi

Po otrzymaniu koniugatów ABP z pochodnymi betuliny rozpoczęto badania nad możliwością wykorzystania opracowanej metody sprzęgania wspomaganej ultradźwiękami w syntezie koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu z innymi związkami biologicznie aktywnymi. Biorąc pod uwagę budowę (odpowiednie do modyfikacji grupy funkcyjne) i właściwości biologiczne, wytypowano następujące związki:

- Chlorambucyl – alkilujący lek przeciwnowotworowy, należący do pochodnych iperytu azotowego, stosowany głównie w leczeniu nowotworów hematologicznych (Schemat 42). Wprowadzenie ugrupowania bisfosfonowego do tego typu układów może prowadzić do poprawy ich właściwości biologicznych, czego przykładem jest związek przedstawiony na rysunku 23, o obiecującej aktywność przeciwnowotworowej.^{183,184}



- wydłużenie przeżycia oraz zahamowanie wzrostu guza w szczurzym modelu kostniakomięsaka i mięsaka Walkera
- redukcja objętości guza w szczurzym modelu raka sutka

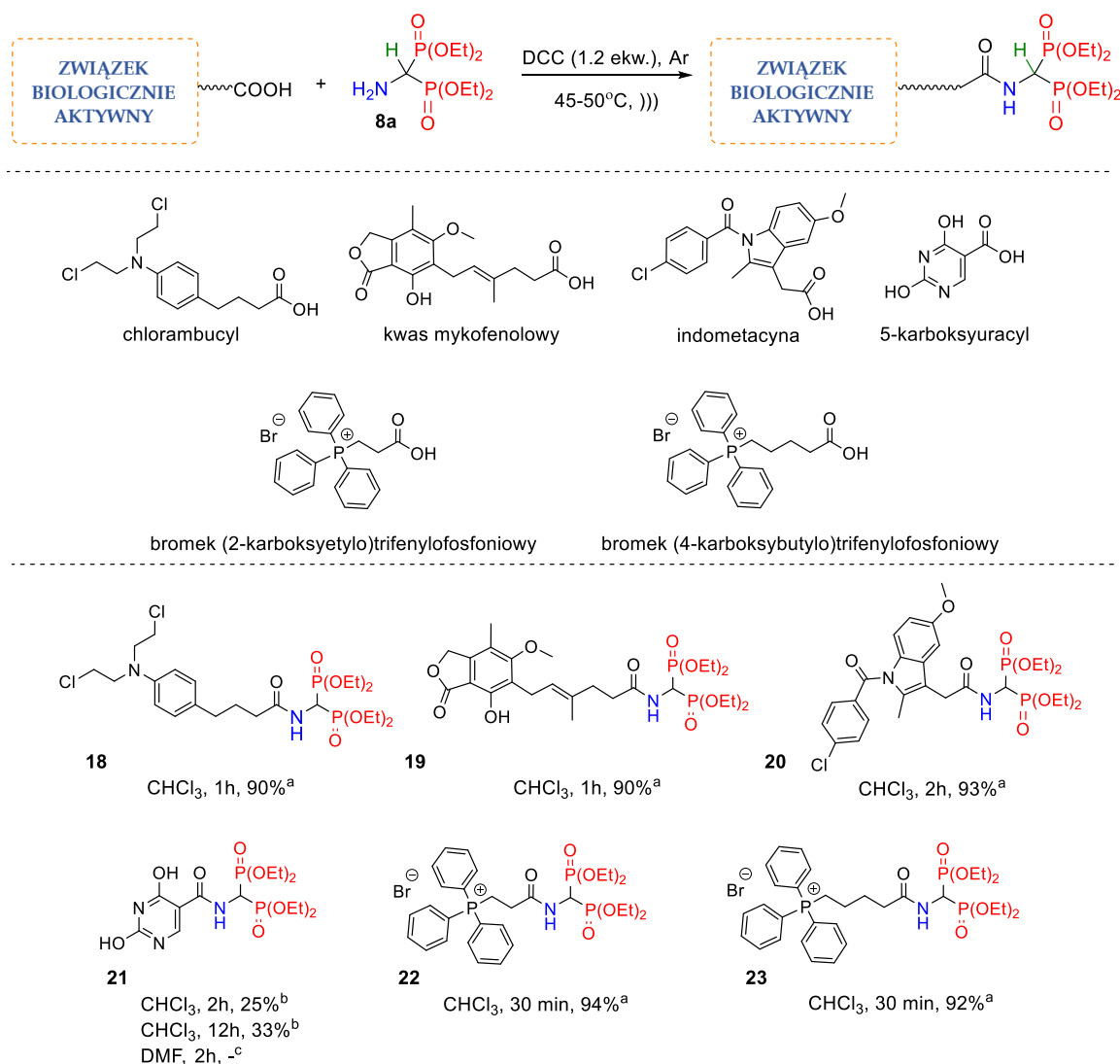
Rys. 23. Pochodna iperytu azotowego funkcjonalizowana ugrupowaniem bisfosfonowym

- Kwas mykofenolowy – naturalny związek chemiczny należący do grupy antybiotyków poliketydowych, stosowany jako lek o działaniu immunosupresyjnym oraz cytostatycznym (Schemat 42). Modyfikacje jego struktury mogą prowadzić do poprawy właściwości biologicznych, w tym działania immunosupresyjnego, cytostatycznego, przeciwwirusowego, przeciwgrzybiczego czy przeciwbakteryjnego.^{185–188}

- Indometacyna – związek należący do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), stosowany jako środek przeciwbólowy i przeciwzapalny, m.in. w leczeniu stanów zapalnych i obrzęków towarzyszących chorobom układu kostno-stawowego (Schemat 42).

- 5-Karboksyuracyl – pochodna zasady pirymidynowej (uracylu) wchodzącej w skład RNA (Schemat 42). Zmodyfikowane zasady azotowe (jak np. 5-fluorouracyl) działają jako antymetabolity pirymidyn i mają zdolność hamowania aktywności enzymów niezbędnych do syntezy kwasów nukleinowych. Dzięki temu mogą wykazywać działanie przeciwnowotworowe.

Ponadto, poza syntezą wspomnianych koniugatów, zaplanowano również zastosowanie opracowanej metody do modyfikacji struktury 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** grupą trifenylofosfoniową (TPP⁺). W tym celu wykorzystano bromek (2-karboksyetylo)trifenylofosfoniowy oraz bromek (4-karboksybutylo)trifenylofosfoniowy (Schemat 42).

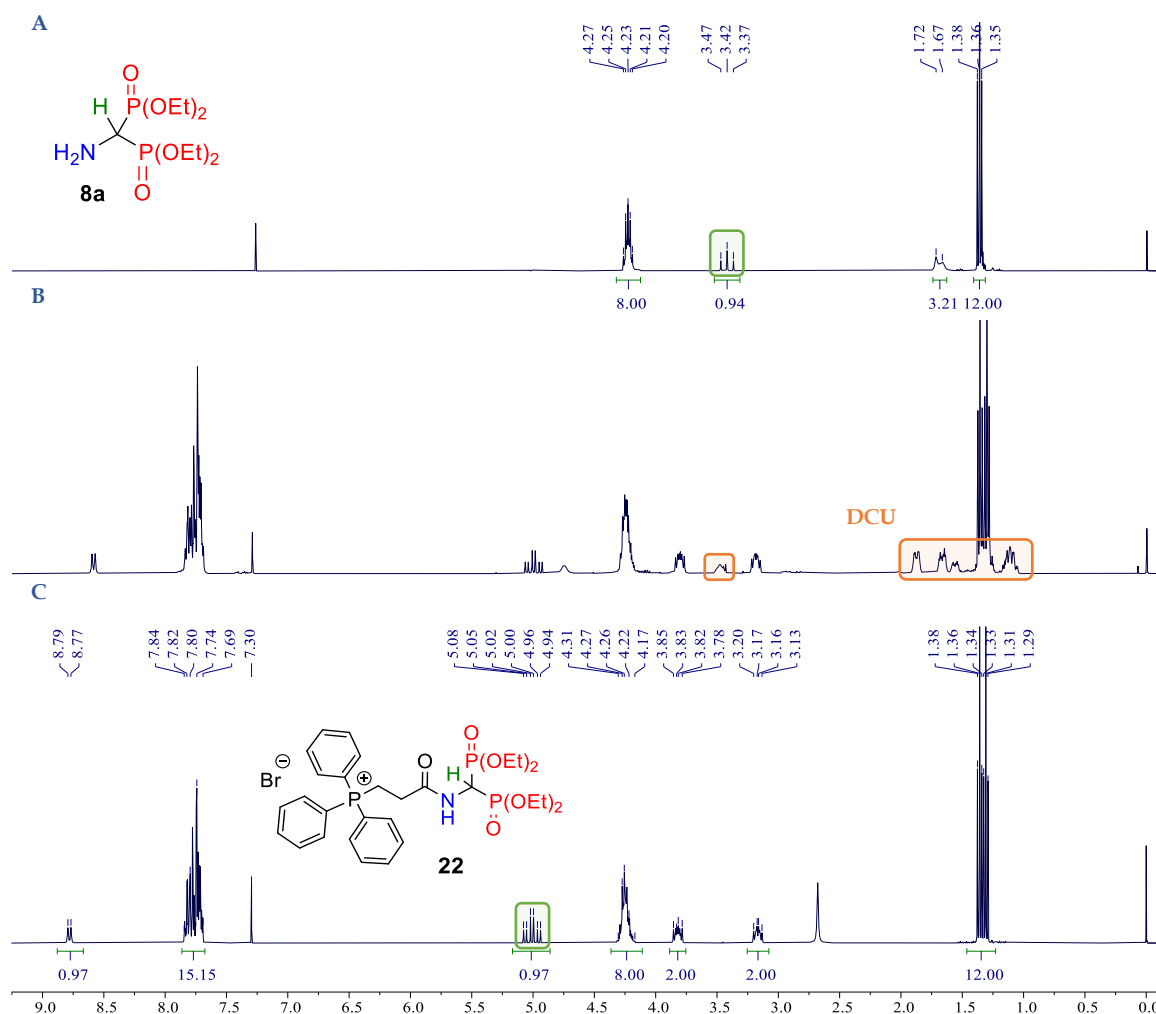

^a Wydajność produktu wyizolowanego ^b Konwersja określona na podstawie analizy widm ¹H i/lub ³¹P NMR

^c Konwersja niemożliwa do określenia

Schemat 42

Badania rozpoczęto od eksperymentów rozpoznawczych, których celem było dopracowanie optymalnych warunków reakcji. Już na początkowym etapie zaobserwowano, że zmniejszenie nadmiaru DCC do 20% mol. oraz zastosowanie równomolowej ilości 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** nie miało negatywnego wpływu na przebieg reakcji. Wręcz przeciwnie – w reakcjach z chlorambucylem, indometacyną, kwasem mykofenolowym oraz bromkami (2-karboksyetylo)- i (4-karboksybutylo)trifenylfosfoniowymi pełną konwersję substratów (wyznaczoną na podstawie widm ¹H oraz ³¹P NMR) obserwowano już po 0.5-2 godzinach reakcji. Zredukowanie nadmiaru ABP **8a** oraz DCC korzystnie wpłynęło również na uproszczenie procesu izolacji produktów z mieszaniny reakcyjnej, w której, poza oczekiwanym koniugatem, znajdował się wyłączenie *N,N'*-dicykloheksylomocznik (DCU; Rys. 24 B). Ostatecznie, po oczyszczeniu metodą

chromatografii kolumnowej (DCM/MeOH, 20:1 lub 10:1, v/v), oczekiwane związki **18-20**, **22** oraz **23** uzyskano z bardzo dobrymi wydajnościami, w zakresie 90–94% (Schemat 42).

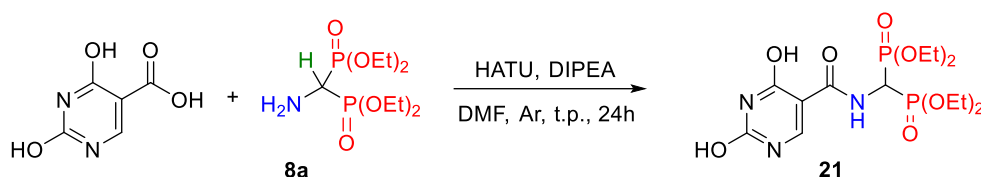


Rys. 24. Widma ^1H NMR 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** (A), mieszaniny uzyskanej w reakcji syntezy pochodnej **22** po 30 minutach reakcji (B), wyizolowanego koniugatu **22** (C)

W przeciwieństwie do wcześniej opisanych przypadków, zastosowanie omawianej metody w syntezie koniugatu z 5-karboksyuracylem okazało się znacznie mniej efektywne. Głównym problemem była bardzo słaba rozpuszczalność 5-karboksyuracylu w większości rozpuszczalników organicznych, standardowo stosowanych w reakcjach z udziałem DCC. Co ciekawe, mimo jego ograniczonej rozpuszczalności w chloroformie, widma ^1H oraz ^{31}P NMR wskazywały na powstawanie produktu sprzęgania **21** w reakcji prowadzonej w tym rozpuszczalniku. Koniugatu nie udało się jednak wyizolować z mieszaniny poreakcyjnej. Zastosowanie *N,N*-dimetyloformamidu, choć zapewniało dobrą rozpuszczalność reagentów, nie

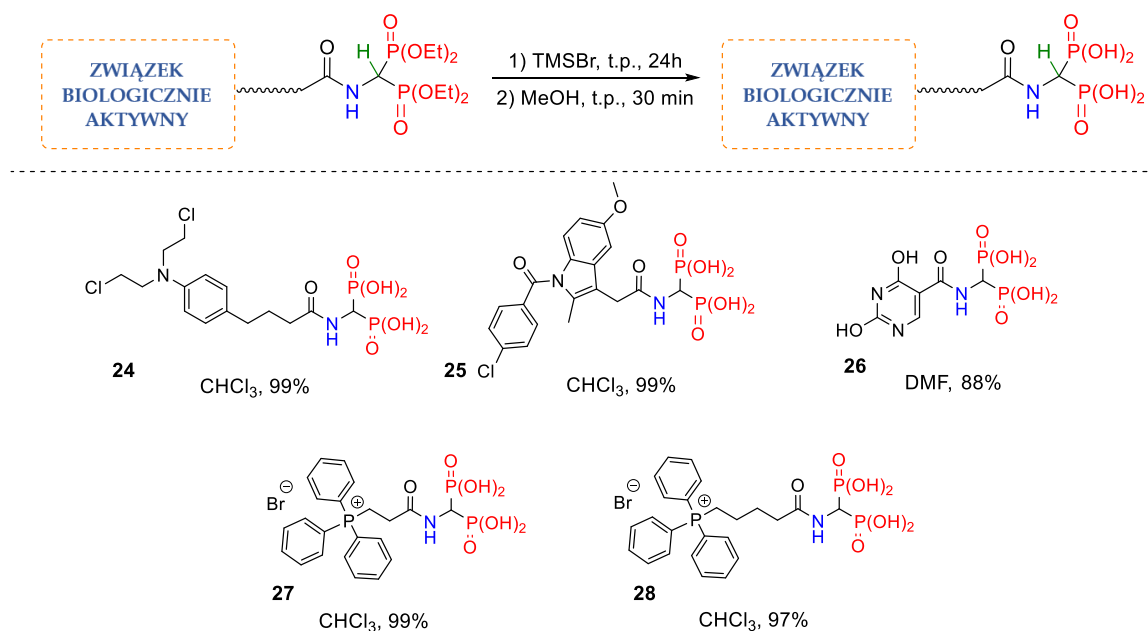
poprawiło efektywności syntezy – w tym przypadku wynikiem reakcji była złożona mieszanina produktów, trudnych w identyfikacji.

Skuteczniejszą metodą syntezy koniugatu **21** okazała się reakcja 5-karboksyuracylu z 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianem tetraetylu **8a** z wykorzystaniem heksafluorofosforanu *O*-(benzotriazol-1-ilo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego (HATU) i zasady *Hüniga*, prowadzona w temperaturze pokojowej w DMF przez 24 godziny (Schemat 43). Ostatecznie, oczekiwany produkt **21**, po oczyszczeniu przez krystalizację (z układu metanol/eter dietylowy, następnie z metanolu), uzyskano z wydajnością 61%.



Schemat 43

Po otrzymaniu serii koniugatów ABP z chlorambucylem, kwasem mykofenolowym, indometacyną i 5-karboksyuracylem **18-21** oraz pochodnych 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu modyfikowanych ugrupowaniem trifenylofosfoniowym **22** i **23**, przeprowadzono deestryfikację grup fosfonowych z wykorzystaniem bromku trimetylosililu, a następnie metanolu (Schemat 44). W większości przypadków oczekiwane produkty otrzymywano z bardzo dobrymi wydajnościami 88-99%. W przypadku koniugatu ABP z kwasem mykofenolowym **19** reakcja deestryfikacji z zastosowaniem TMSBr nie przebiegła pomyślnie. Na widmie ^{31}P NMR obserwowano liczne sygnały wskazujące na obecność produktów ubocznych i/lub rozkładu. Ze względu na obecność wiązania podwójnego oraz pierścienia laktonowego w strukturze koniugatu **19** zrezygnowano z prób hydrolizy w warunkach kwaśnych (HCl, HBr/AcOH). Hydroliza przeprowadzona w warunkach zasadowych (1% NaOH, 24h, t.p.) również się nie powiodła.



Schemat 44

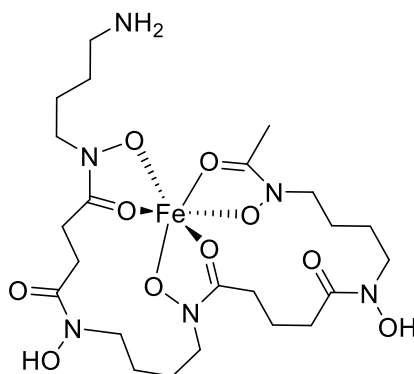
Struktury otrzymanych koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu z pochodnymi betuliny, chlorambucylem, kwasem mykofenolowym, indometacyną, 5-karboksyuracylem oraz bromkami *N*-karboksyalikotritrifenylfosfoniowymi **15-28** potwierdzono na podstawie ich właściwości spektroskopowych (^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR, IR) oraz za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS). Ich szczegółową charakterystykę przedstawiono w części eksperymentalnej niniejszej pracy. W przyszłości planowane jest poddanie zsyntezowanych koniugatów badaniom ich właściwości biologicznych.

Podsumowując ten etap badań, za sukces należy uznać opracowanie prostej i uniwersalnej metody sprzęgania 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu ze związkami funkcjonalizowanymi grupą karboksylową, opartej na tworzeniu wiązania amidowego z wykorzystaniem ultradźwięków. Procedura ta może znaleźć zastosowanie zarówno do przeprowadzenia prostych modyfikacji struktury ABP, jak również do otrzymania jego koniugatów z bardziej złożonymi związkami biologicznie czynnymi.

3. Próby wykorzystania potencjału połączenia ABP z DFO jako znacznika diagnostycznego

W kolejnym etapie podjęto próbę przeprowadzenia modyfikacji struktury deferoksaminy z udziałem 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu celem otrzymania liganda o strukturze pozwalającej na wykorzystanie go jako znacznika diagnostycznego.

Deferoksamina (DFO) jest związkiem naturalnym należącym do grupy sideroforów, wydzielanym przez bakterie z rodzaju *Streptomyces*. Dzięki obecności trzech grup hydroksamowych, cząsteczka DFO wykazuje zdolność do wiązania jonów Fe^{3+} , tworząc stabilny, dobrze rozpuszczalny w wodzie chelat – feroksaminę (Rys. 25). Deferoksamina od lat znajduje zastosowanie kliniczne, szczególnie w leczeniu schorzeń związanych z nadmiernym gromadzeniem żelaza w organizmie, takich jak talasemia czy hemochromatoza.¹⁸⁹



Rys. 25. Struktura feroksaminy

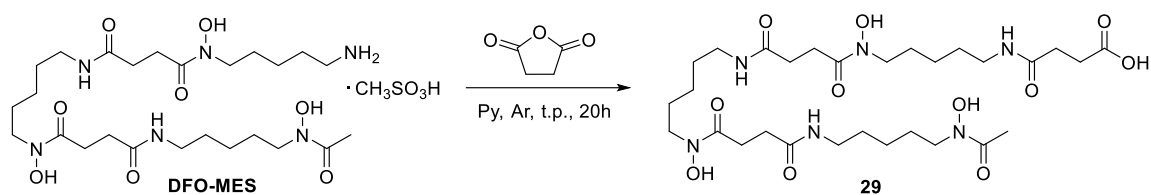
DFO jest nie tylko skutecznym chelatorem Fe(III) , ale także jednym z najlepiej przebadanych ligandów zdolnych do tworzenia kompleksów z radioaktywnym izotopem cyrkonu ^{89}Zr . Ze względu na korzystne właściwości fizykochemiczne, takie jak długi czas półtrwania ($t_{1/2} = 78.4$ h) oraz stosunkowo niska energia rozpadu β^+ , ^{89}Zr posiada znaczący potencjał do zastosowań w obrazowaniu metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET), zwłaszcza w połączeniu z dużymi cząsteczkami biologicznymi o powolnej farmakokinetyce (np. przeciwciałami).^{190,191} Dobrym przykładem jest [^{89}Zr]Zr-DFO-trastuzumab, który jest obecnie badany jako znacznik do obrazowania nowotworów HER2-dodatnich.¹⁹² Największym ograniczeniem kompleksów [^{89}Zr]Zr-DFO pozostaje ich umiarkowana stabilność *in vivo*, która prowadzi do stopniowego uwalniania jonów Zr^{4+} i ich akumulacji w tkance kostnej. Zjawisko to nie tylko utrudnia interpretację i ilościową analizę obrazów PET, lecz także wiąże się z ryzykiem wystąpienia toksyczności wynikającej z niepożądanego

dawki promieniowania w szpiku kostnym.¹⁹¹ Uważa się, że ograniczona stabilność kompleksu [⁸⁹Zr]Zr-DFO wynika z jego struktury koordynacyjnej. Zgodnie z wynikami obliczeń kwantowo-mechanicznych, jon Zr⁴⁺ wiąże się jedynie z trzema grupami hydroksamowymi, podczas gdy pozostałe miejsca w jego sferze koordynacyjnej zajmują cząsteczki wody, co może sprzyjać jego częściowej dysocjacji *in vivo*.^{191,193}

W świetle tych doniesień, modyfikacja struktury deferoksaminy poprzez wprowadzenie ugrupowania 1-aminobisfosfonowego, wykazującego właściwości chelatujące i mogącego pełnić funkcję dodatkowego miejsca koordynacyjnego, może stanowić obiecujący kierunek badań nad poprawą stabilności kompleksów DFO z cyrkonem ⁸⁹Zr. Ponadto, biorąc pod uwagę zdolność deferoksaminy do chelatowania jonów Fe³⁺ oraz rosnące znaczenie takich kompleksów jako potencjalnych środków kontrastowych oferujących bezpieczniejszą alternatywę dla powszechnie stosowanych związków gadolinu,¹⁸⁹ otrzymany ligand mógłby okazać się interesujący również w kontekście obrazowania metodą rezonansu magnetycznego.

3.1 Synteza liganda

W celu otrzymania docelowego liganda, w pierwszym etapie mezylan deferoksaminy poddano reakcji z bezwodnikiem bursztynowym w pirydynie, zachodzącej z otwarciem pierścienia bezwodnika, zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (Schemat 45).¹⁹⁰



Schemat 45

W kolejnym etapie przeprowadzono reakcję sprzęgania *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy **29** z 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianem tetraetylu **8a**. Początkowo próbowano przeprowadzić koniugację obydwu związków z wykorzystaniem opisaną w poprzednim rozdziale metody sprzęgania z użyciem ultradźwięków. Istotnym ograniczeniem okazała się niska rozpuszczalność substratu **29**, który rozpuszczał się jedynie w DMSO oraz częściowo w DMF, ale dopiero w podwyższonej temperaturze. Reakcja prowadzona w DMSO (45–50°C, sonikacja, 4 godziny) przy stosunku molowym **29** : **8a** : DCC równym 1.0 : 1.0 : 1.2 zakończyła się niepowodzeniem – na widmie ³¹P NMR mieszaniny reakcyjnej obserwowano

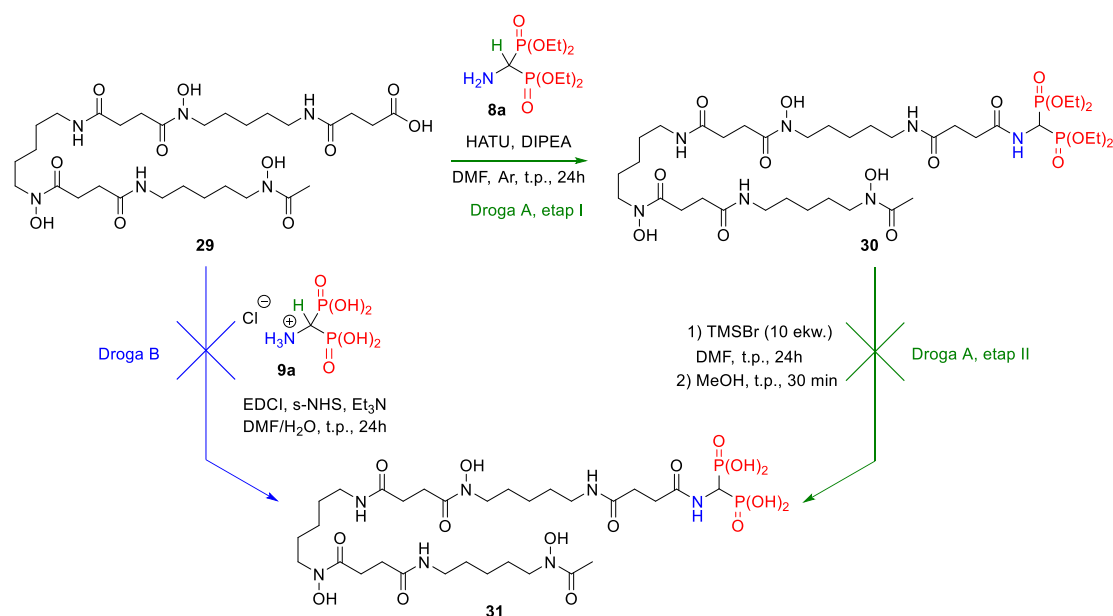
liczne sygnały, których nie udało się zidentyfikować. W kolejnej próbie wykorzystano w roli rozpuszczalnika DMF, podwyższono temperaturę (65–70°C) oraz zastosowano większy nadmiar 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetulu **8a** (1.5 ekw.). Po 5 godzinach reakcji, na podstawie analizy widma ^1H NMR stwierdzono obecność w mieszaninie reakcyjnej zarówno produktu sprzęgania **30**, jak i *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy **29**. Trudno było jednak jednoznacznie określić konwersję substratu **29** ze względu na częściowe nakładanie się sygnałów obydwu związków. Dodatkowym problemem okazało się również oddzielenie koniugatu **30** od *N,N'*-dicykloheksylomocznika (DCU), powstającego jako produkt uboczny. Słaba rozpuszczalność otrzymanego produktu **30** umożliwiła jego oczyszczenie wyłącznie poprzez wytrącanie i przemywanie. Niestety, w testowanych układach (H_2O lub MeOH) wytrąceniu ulegał również *N,N'*-dicykloheksylomocznik, co uniemożliwiało skuteczną separację obu związków.

Lepsze rezultaty uzyskano, gdy reakcję *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy **29** z 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianem tetraetylu **8a** prowadzono wobec HATU i zasady *Hünig*a (Schemat 46, droga A, etap I). W tych warunkach nie występowały trudności z usuwaniem produktów ubocznych reakcji sprzęgania – powstały produkt **30** strącano wodą, a następnie oddzielano poprzez wirowanie i przemywanie. Problematyczne okazało się jednak jednoznaczne potwierdzenie czystości otrzymanego związku oraz przeprowadzenie syntezy w sposób powtarzalny (co najprawdopodobniej wynika z ograniczonej rozpuszczalności pochodnych deferoksaminy). Syntezę koniugatu **30** powtarzano bowiem kilkakrotnie i za każdym razem stosunek integracji sygnałów na widmach ^1H NMR otrzymywanego produktu nieznacznie się różnił i odbiegał od wartości teoretycznych, co sugerowało obecność, obok oczekiwanego produktu sprzęgania **30**, również pewnych ilości substratu **29**. Na widmach ^{13}C NMR nie obserwowano sygnałów charakterystycznych dla *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy **29** (np. sygnału przy 173.8 ppm). Mogło to jednak wynikać z niskiej zawartości tego związku w próbce. Podjęto próby oczyszczenia koniugatu *N*-SANHCH(PO(OEt) $_2$) $_2$ DFO **30** za pomocą chromatografii jonowymiennej na anionicie Amberlite IRA-67 (H_2O) lub DEAE (H_2O lub NH_4HCO_3 aq., gradient 100 mM do 500 mM), jednak nie przyniosły one zadowalającego rezultatu. Dalsze badania, w tym badania nad deestryfikacją koniugatu **30** oraz analizę stabilności jego chelatu z cyrkonem ^{89}Zr , prowadzono z udziałem próbki o najwyższej czystości (oszacowanej na ok. 85% na podstawie widma ^1H NMR).

W ostatnim etapie przeprowadzono próby deestryfikacji grup fosfonowych produktu sprzęgania **30** (Schemat 46, droga A, etap II). Ze względu na obecność grup

hydroksamowych w strukturze deferoksaminy, podatnych na degradację zarówno w warunkach silnie kwaśnych jak i zasadowych, zdecydowano się na przeprowadzenie reakcji z udziałem bromku trimetylosililu i metanolu. Chociaż analiza widm NMR sugerowała skuteczne usunięcie grup etoksylogowych (zanik multipletu w zakresie 4.10–4.00 ppm oraz dwóch trypletów przy ok. 1.2 ppm, o stałej sprzężenia $J = 7.0$ Hz na widmie ^1H NMR; przesunięcie sygnału przy 16.7 ppm do 14.0 ppm na widmie ^{31}P NMR), jednocześnie obserwowano pojawienie się dodatkowych sygnałów, które mogłyby wskazywać na obecność kwasu bursztynowego (lub jego pochodnych) w mieszaninie poreakcyjnej, a tym samym świadczyć o rozpadzie liganda. Były to singlet przy ok. 2.6 ppm na widmie ^1H NMR oraz dwa sygnały o przesunięciach 34.7 ppm oraz 178.2 ppm na widmie ^{13}C NMR. Finalnie, nie udało się dobrać optymalnych warunków hydrolizy liganda **30**.

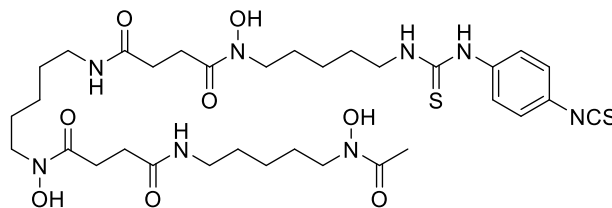
Ze względu na niepowodzenie prób przekształcenia koniugatu $N\text{-SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$ **30** w jego formę kwasową, docelowy ligand **31** próbowano otrzymać w reakcji $N\text{-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy}$ **29** z chlorowodorkiem kwasu 1-aminometylidenobisfosfonowego **9a**, w obecności trietyloaminy oraz soli sodowej $N\text{-hydroksysulfosukcynoimidu}$ (s-NHS, 1.05 ekw.) i chlorowodoru $N\text{-(3-dimetyloaminopropylo)-}N'\text{-etylokarbodiimidu}$ (EDCI, 1.05 ekw.) jako czynników sprzęgających (Schemat 46, droga B). Niestety, ze względu na różnice w rozpuszczalności substratów **29** i **9a**, kluczowym i jak do tej pory nierozwiązanym problemem okazało się dobranie odpowiednich warunków reakcji. Badania nad syntezą liganda $N\text{-SANHCH}(\text{PO}(\text{OH})_2)_2\text{DFO}$ **31** będą dalej kontynuowane.



Schemat 46

3.2 Badania stabilności chelatu N -SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO z ⁸⁹Zr

Ponieważ, mimo licznych wysiłków, prace nie doprowadziły do otrzymania docelowego liganda N -SANHCH(PO(OH)₂)₂DFO **31**, badania stabilności chelatu ⁸⁹Zr przeprowadzono z jego estryfikowaną formą N -SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO **30**. Trwałość [⁸⁹Zr]Zr-SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO badano w porównaniu z chelatem komercyjnie dostępnego liganda p -NCS-Bn-DFO (Rys. 26) znakowanego cyrkonem-89.

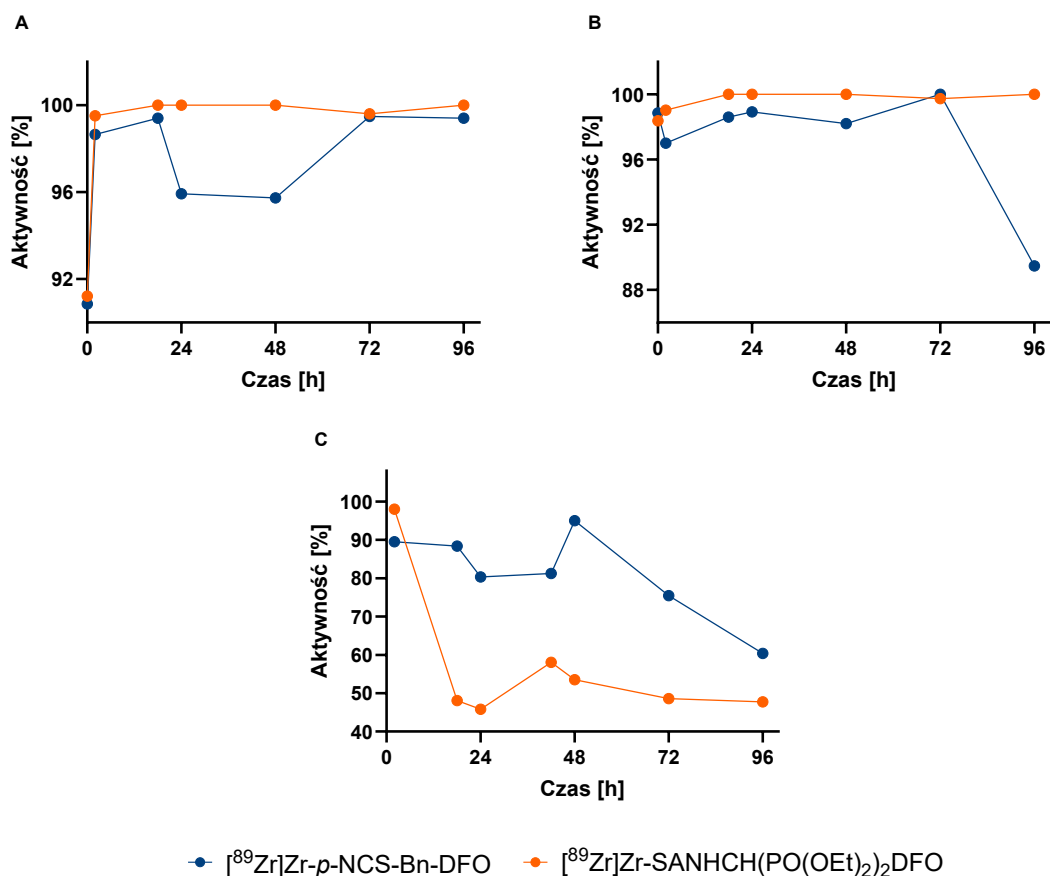


Rys. 26. Struktura liganda p -NCS-Bn-DFO

Stabilność chelatów [⁸⁹Zr]Zr-SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO oraz [⁸⁹Zr]Zr- p -NCS-Bn-DFO oznaczono w trzech warunkach:

- (1) w buforze HEPES (kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazyno]etanosulfonowy, pH ~ 7, temp. pokojowa) - ocena stabilności chelatów w warunkach optymalnych dla kompleksowania ⁸⁹Zr przez DFO i jego pochodnych,
- (2) w ludzkiej surowicy (37°C) - ocena trwałości chelatów w środowisku zbliżonym do fizjologicznego, pozwala na wstępne określenie bezpieczeństwa i potencjalnej przydatności chelatora w badaniach *in vitro* i *in vivo*,
- (3) w buforze HEPES i obecności 100-krotnego nadmiaru molowego EDTA - ocena podatności chelatu na wypieranie izotopu ⁸⁹Zr przez silniejszy ligand.

Stabilność badanych chelatów z ⁸⁹Zr oceniano metodą radio-TLC. Próbkę nanoszono na odpowiednie płytki chromatograficzne, a następnie rozwijano w odpowiednio dobranym układzie, umożliwiającym rozdział różnych form radioaktywnego izotopu w próbce (w tym przypadku chelatu z ⁸⁹Zr od uwolnionego ⁸⁹Zr). Po rozwinięciu płytki, przeprowadzano ilościową analizę udziału poszczególnych form izotopu na podstawie pomiaru radioaktywności. Wykresy obrazujące przebieg zmian aktywności chelatów [⁸⁹Zr]Zr-SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO oraz [⁸⁹Zr]Zr- p -NCS-Bn-DFO w zależności od czasu i warunków inkubacji przedstawiono na rysunku 27.



Rys. 27. Wykresy przedstawiające porównanie stabilności chelatów $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-SANHCH(PO(OEt)}_2)_2\text{DFO}$ oraz $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-p-NCS-Bn-DFO}$ inkubowanych (A) w buforze HEPES w temperaturze pokojowej, (B) w ludzkiej surowicy w temperaturze 37°C oraz (C) w obecności 100-krotnego nadmiaru molowego EDTA

Na podstawie danych przedstawionych na rysunku 27 można stwierdzić, że obydwa ligandy wykazały bardzo dobrą zdolność kompleksowania jonów $^{89}\text{Zr}^{4+}$ w buforze HEPES. Niemal całkowite znakowanie obserwowano już po 2 godzinach reakcji (Rys. 27, A), a wysoka stabilność chelatów utrzymywała się przez 96 godzin. W przypadku chelatora $N\text{-SANHCH(PO(OEt)}_2)_2\text{DFO}$, ^{89}Zr pozostał związany przez cały czas inkubacji, podczas gdy dla $p\text{-NCS-Bn-DFO}$ zaobserwowano niewielkie uwalnianie izotopu (Rys. 27, A).

Obydwa chelaty charakteryzowały się również bardzo dobrą stabilnością w warunkach quasi-fizjologicznych, tj. w ludzkiej surowicy w 37°C (Rys. 27, B). Chelator DFO funkcjonalizowany grupą bisfosfonową wykazał w tych warunkach nieznaczną przewagę nad komercyjnym $p\text{-NCS-Bn-DFO}$.

Największe różnice między badanymi chelatorami uwidoczniły się w teście transchelatacji ze 100-krotnym nadmiarem molowym EDTA. Już po 18 godzinach inkubacji około połowa izotopu została uwolniona z kompleksu $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-SANHCH(PO(OEt)}_2)_2\text{DFO}$, a poziom ten utrzymywał się do końca eksperymentu.

Chelat [^{89}Zr]Zr-*p*-NCS-Bn-DFO wykazywał w tych warunkach lepszą stabilność (Rys. 27, C).

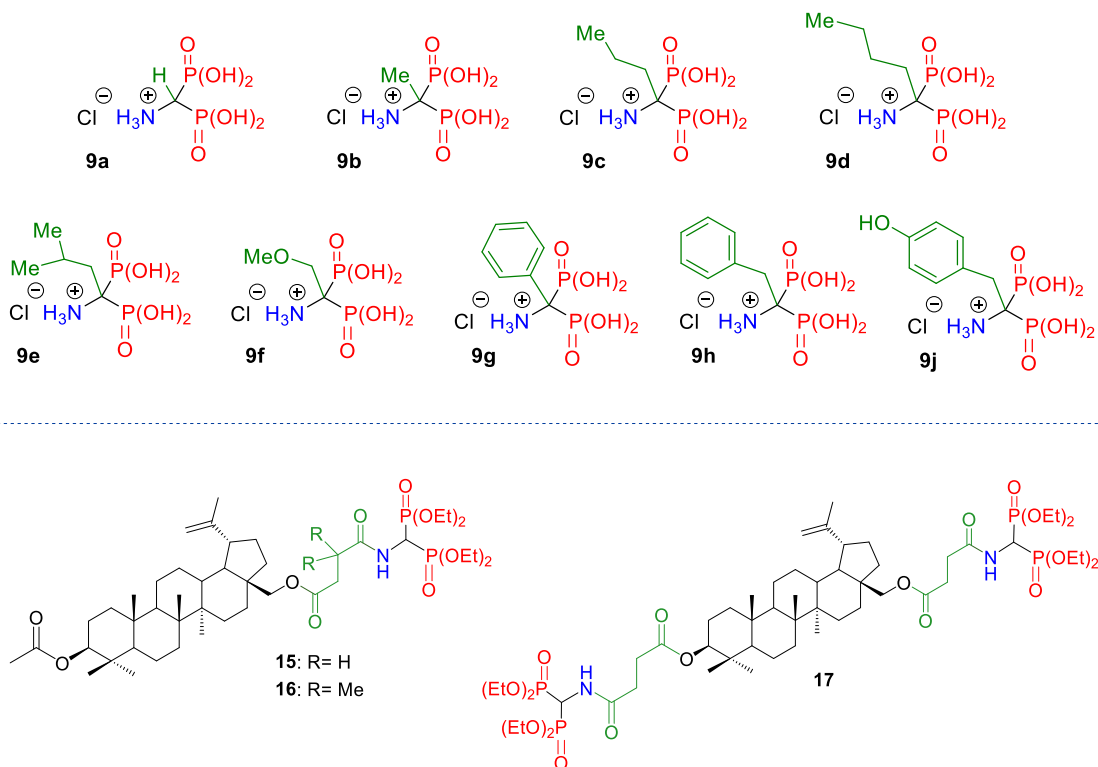
Uzyskane wyniki wskazują, że modyfikacja struktury deferoksaminy ugrupowaniem 1-aminometylidenobisfosfonowym nie przyczyniła się do poprawy stabilności kompleksu z ^{89}Zr . Nie jest to jednak zaskakujące, biorąc pod uwagę, że grupy fosfonowe w ligandzie SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO występują w postaci estrowej, co najprawdopodobniej ogranicza ich zdolność do efektywnej koordynacji jonów metalu. Badania nad syntezą liganda *N*-SANHCH(PO(OH)₂)₂DFO **31**, o potencjalnie lepszych właściwościach chelatujących, będą kontynuowane.

4. Ocena właściwości biologicznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych i ich koniugatów

Ostatnim etapem realizowanych zadań badawczych była weryfikacja aktywności biologicznej wybranych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych oraz ich koniugatów. Zakres podjętych prac obejmował:

- ocenę działania cytotoksycznego kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych **9**, w tym interakcji ze znanymi cytostatykami,
- analizę właściwości przeciwbakteryjnych kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych **9**,
- ocenę działania cytotoksycznego koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny **15-17** (Rys. 28).

Badania przeprowadzono w dwóch jednostkach badawczych: Narodowym Instytucie Onkologii w Gliwicach (badania cytotoksyczności kwasów ABPs oraz koniugatów ABP z betuliną) oraz w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej w Gliwicach (badania właściwości przeciwbakteryjnych kwasów ABPs).



Rys. 28. Struktury kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych oraz koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny poddanych ocenie ich właściwości biologicznych

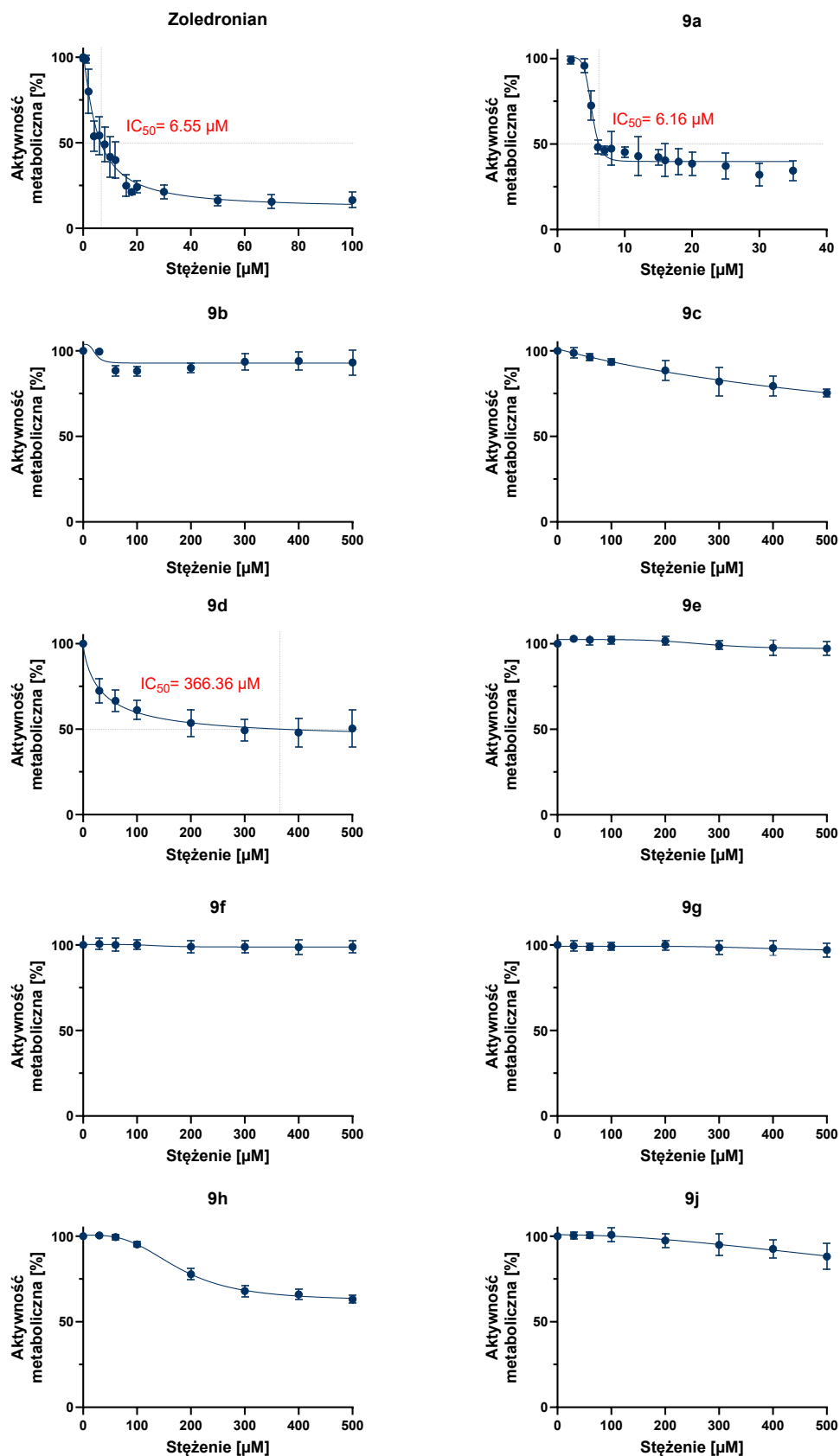
4.1 Ocena aktywności cytotoksycznej kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych

Aktywność cytotoksyczną kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych 9 oceniano za pomocą testu MTS, który pozwala określić żywotność komórek na podstawie ich aktywności metabolicznej. Metoda opiera się na zdolności żywych komórek do redukcji barwnika MTS (3-(4,5-dimetylotioazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2*H*-tetrazolu) do rozpuszczalnego w wodzie formazanu, której towarzyszy zmiana zabarwienia roztworu. Ilość powstałego barwnika formazanowego (brunatnego), mierzona spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm, jest proporcjonalna do liczby żywych komórek metabolizujących MTS.

Cytotoksyczność badanych związków oceniono na ludzkiej linii komórkowej kostniakomięsaka U-2 OS. Roztwory wyjściowe badanych związków przygotowano w wodzie, a następnie zostały one rozcieńczone w pożywce hodowlanej do odpowiednich stężeń, których zakres ustalono eksperymentalnie. Maksymalne testowane stężenie wynosiło 500 μ M. Aktywność metaboliczną komórek oceniano po 48 godzinach od ich ekspozycji na badane związki. Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach technicznych oraz co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych.

Dla celów porównawczych wykonano analogiczne oznaczenie dla znanego w praktyce klinicznej zoledronianu – bisfosfonianu o najlepiej udokumentowanej aktywności przeciwnowotworowej.

Wyniki badań, przedstawiające zależność aktywności metabolicznej komórek U-2 OS od stężenia zastosowanego związku, zaprezentowano na rysunku 29.

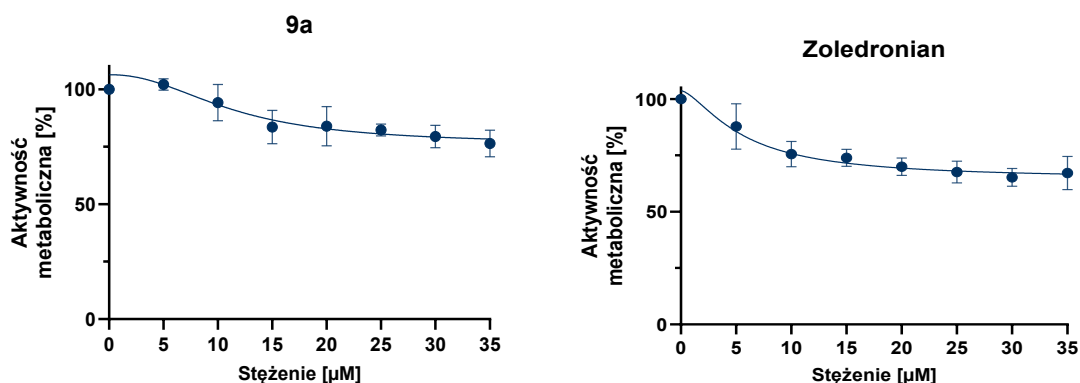


Rys. 29. Wykresy przedstawiające zależność aktywności metabolicznej komórek U-2 OS od stężenia pochodnych **9a-h, 9j** oraz zoledronianu

Na podstawie analizy wykresów na rysunku 29 można stwierdzić, że w serii testowanych związków, najwyższą aktywność cytotoksyczną wykazywała pochodna **9a**. Wyznaczona dla niej wartość IC_{50} w badanej linii komórkowej jest porównywalna z wartością IC_{50} wyznaczoną dla zoledronianu ($6.16 \mu M$ vs. $6.55 \mu M$). Związki te charakteryzują się natomiast odmiennym przebiegiem krzywej cytotoksyczności. W przypadku pochodnej **9a** maksymalny efekt cytotoksyczny (aktywność metaboliczna komórek na poziomie $\sim 40\%$) obserwowano już przy stosunkowo niskich stężeniach związku (poniżej $10 \mu M$), a dalsze ich zwiększanie nie prowadziło do istotnego obniżenia żywotności komórek. Stosując zoledronian można uzyskać redukcję aktywności metabolicznej do 20% , ale dopiero przy stężeniu $100 \mu M$. Pozostałe pochodne **9b-h** oraz **9j** wykazywały jedynie słabą aktywność cytotoksyczną lub nie wykazywały efektu cytotoksycznego w zastosowanym układzie eksperymentalnym.

W celu oceny selektywności działania pochodnej **9a** oraz porównania jej właściwości z zoledronianem, przeprowadzono badania cytotoksyczności na nienowotworowej ludzkiej linii fibroblastów skóry BJ1-hTERT (Rys. 30). Obydwa związki wykazały niższą toksyczność względem komórek BJ1-hTERT w porównaniu do komórek U-2 OS, co może świadczyć o ich potencjalnej selektywności działania. Jednak wyciągnięcie bardziej dalekosiężnych wniosków wymagałoby zweryfikowania tej obserwacji przy użyciu innych linii komórkowych oraz przeprowadzenia badań na modelach *in vivo*.

BJ1-hTERT



Rys. 30. Wykresy przedstawiające zależność aktywności metabolicznej komórek BJ1-hTERT od stężenia pochodnej **9a** oraz zoledronianu

Warto nadmienić, że choć pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące struktury kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego **9a** pojawiły się już pod koniec XX wieku, a związek ten był wykorzystywany do modyfikacji różnych układów biologicznych (co opisano w rozdziałach 3 oraz 4 części literaturowej

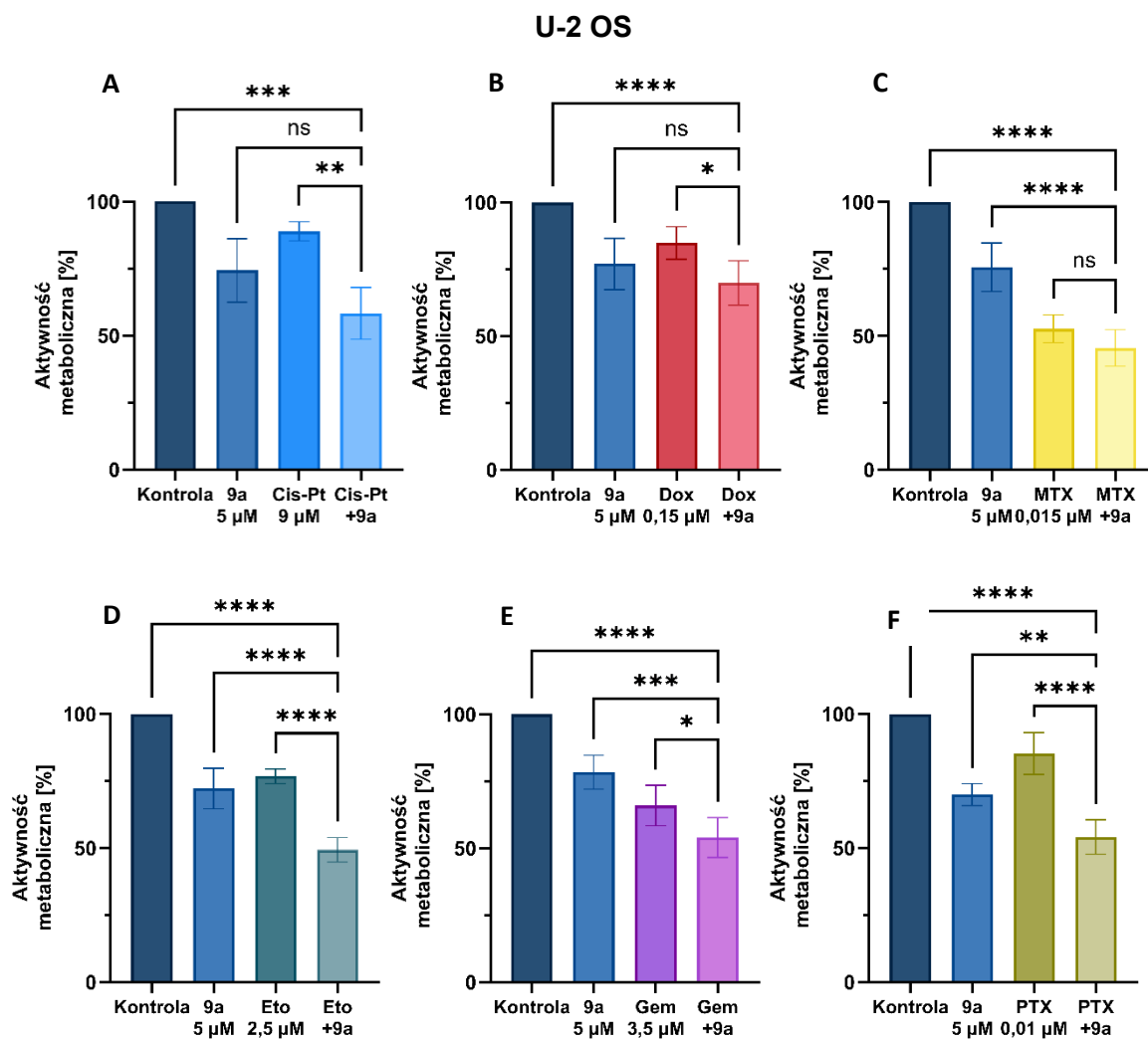
niniejszej pracy), nie znaleziono szczegółowych danych dotyczących jego aktywności przeciwnowotworowej. Jedynym doniesieniem sugerującym takie działanie jest obserwacja niewielkiego zmniejszenia masy guza w szczurzym modelu kostniakomięsaka Walkera.¹⁹⁴ Ze względu na obiecujące wyniki wstępnej oceny działania tej pochodnej, a także na fakt, że bisfosfoniany wykazują zdolność do wzmacniania efektu terapeutycznego innych leków poprzez addytywne lub synergistyczne oddziaływanie (co omówiono w rozdziale 1.3.1 części literaturowej niniejszej pracy), podjęto decyzję o przeprowadzeniu dalszych badań obejmujących ocenę cytotoksyczności kombinacji pochodnej **9a** z innymi związkami wykazującymi potwierdzoną aktywność przeciwnowotworową.

4.2 Badania cytotoksyczności kombinacji kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego z wybranymi cytostatykami

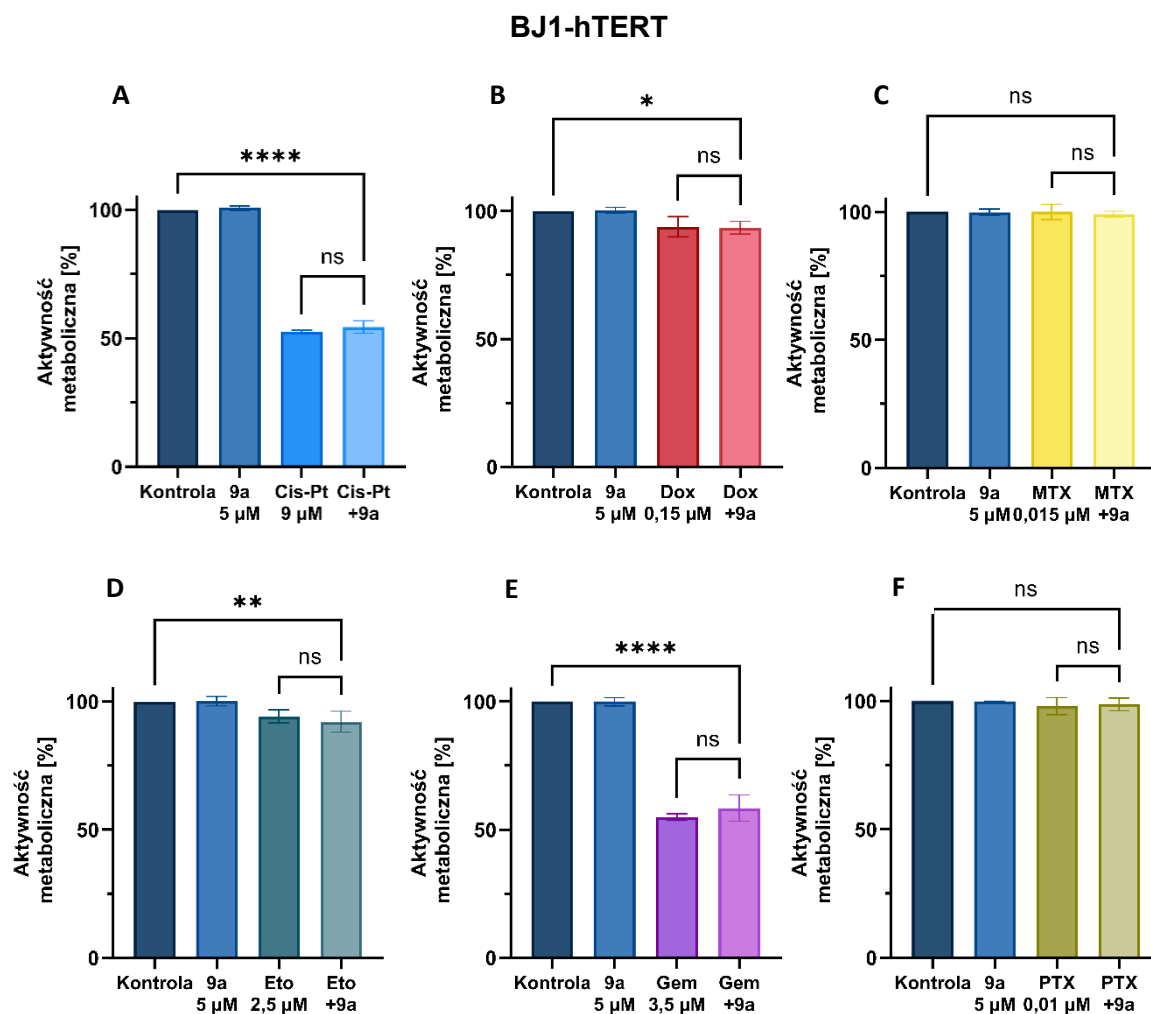
W celu wstępnej oceny interakcji między pochodną **9a** a wybranymi cytostatykami, przeprowadzono badania cytotoksyczności z wykorzystaniem testu MTS. Eksperymenty wykonano na dwóch liniach komórkowych: ludzkiej linii kostniakomięsaka U-2 OS oraz nienowotworowej linii ludzkich fibroblastów skóry BJ1-hTERT, stosując trzy warianty traktowania komórek: sam cytostatyk, samą pochodną **9a** oraz obydwa związki łącznie. Aktywność metaboliczną komórek oceniano po 48 godzinach od ich ekspozycji na badane związki.

W badaniach wykorzystano powszechnie stosowane chemioterapeutyki, w tym cytostatyki używane w leczeniu kostniakomięsaka: cisplatynę (Cis-Pt), doksorubicynę (DOX), metotreksat (MTX) oraz etopozyd (Eto), a także leki wykorzystywane w terapii nowotworów dających często przerzuty do kości (takich jak rak piersi czy rak płuca): gemcytabinę (Gem) oraz paklitaksel (PTX). Zaplanowano także zbadanie interakcji z kamptotecyną, której pochodne, takie jak topotekan czy irynotekan, są szeroko stosowane w terapii nowotworów, a także substancjami, które obecnie znajdują się w fazie badań klinicznych: nutliną-3a oraz RG7112. Stężenia tych związków dobrano eksperymentalnie.

Na podstawie wcześniejszych badań, w których oceniono wpływ różnych stężeń pochodnej **9a** na aktywność metaboliczną komórek U-2 OS i BJ1-hTERT, wytypowano stężenie 5 μ M do wstępnych eksperymentów. Przy tym stężeniu związek wykazywał zauważalną cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych, przy jednoczesnym ograniczonym wpływie na komórki prawidłowe. Wyniki pierwszej serii przeprowadzonych eksperymentów zebrano na rysunkach 31 i 32.



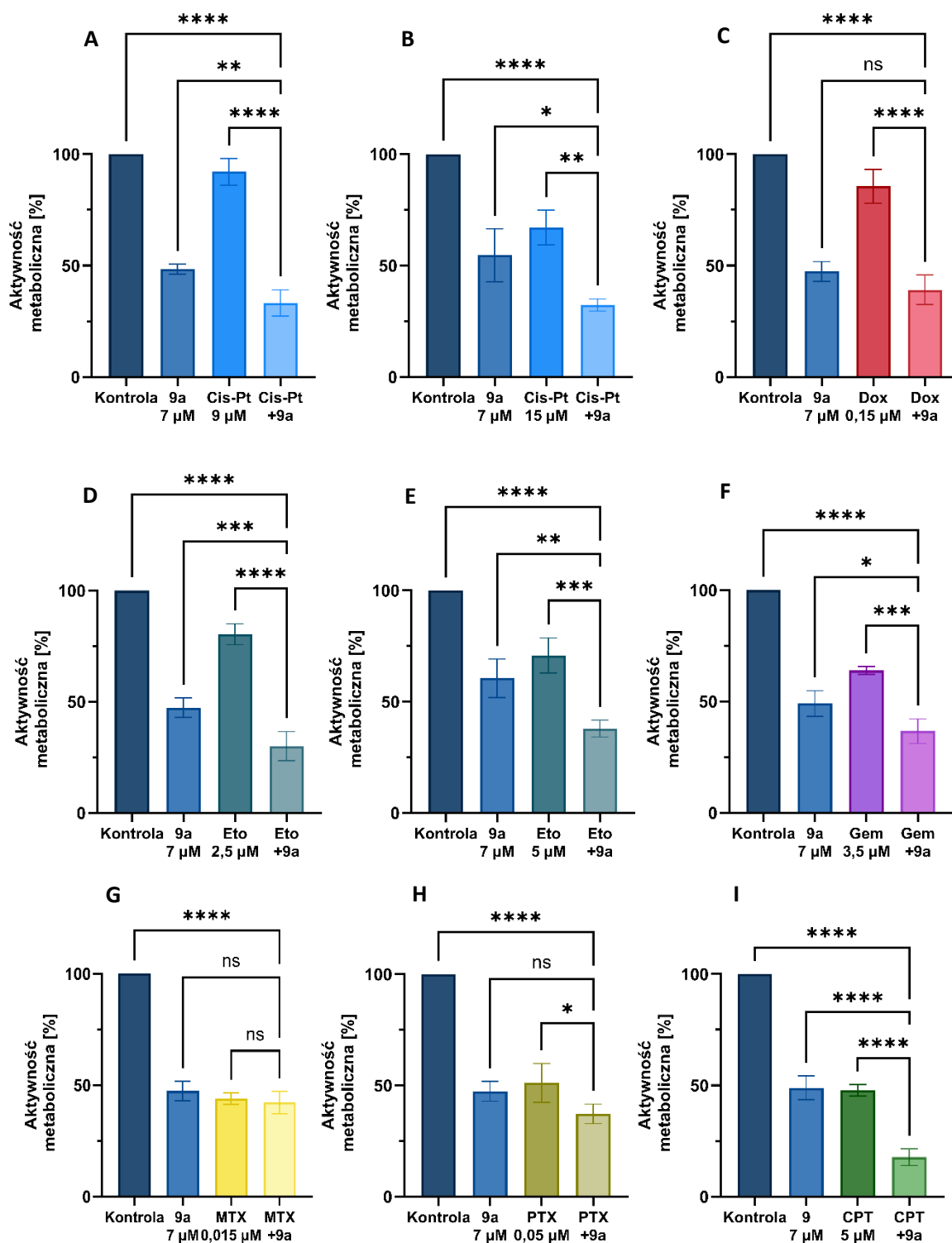
Rys. 31. Aktywność metaboliczna komórek U-2 OS po 48 godzinach traktowania związkiem 9a w kombinacji z cisplatyną (Cis-Pt), dokсорubicyną (Dox), metotreksatem (MTX), etopozydem (Eto), gemcytabiną (Gem) oraz paklitakselem (PTX). Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną między poszczególnymi grupami - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.



Rys. 32. Aktywność metaboliczna komórek BJ1-hTERT po 48 godzinach traktowania związkiem **9a** w kombinacji z cisplatyną (Cis-Pt), doksorubicyną (Dox), metotreksatem (MTX), etopozydem (Eto), gemcytabiną (Gem), paklitakselem (PTX). Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną między poszczególnymi grupami - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.

Na podstawie analizy wykresów przedstawionych na rysunku 31 można zaobserwować, że dla większości testowanych kombinacji aktywność metaboliczna komórek U-2 OS traktowanych mieszaniną **9a** i cytostatyku była niższa niż po zastosowaniu każdego ze związków osobno. Najsilniejszy efekt cytotoksyczny stwierdzono dla kombinacji **9a** z etopozydem (Eto). Dla metotreksatu (MTX) nie odnotowano istotnych korzyści wynikających z jego zastosowania razem z **9a** – aktywność cytotoksyczna komórek po traktowaniu MTX+**9a** była porównywalna z działaniem samego MTX. We wszystkich testowanych kombinacjach **9a** z cytostatykami nie odnotowano zwiększonej toksyczności wobec komórek prawidłowych (BJ1-hTERT) w porównaniu do toksyczności wywoływanej przez same leki (Rys. 32). Z tego powodu, w kolejnej serii badań zwiększono stężenie **9a** z 5 μ M do 7 μ M. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 33.

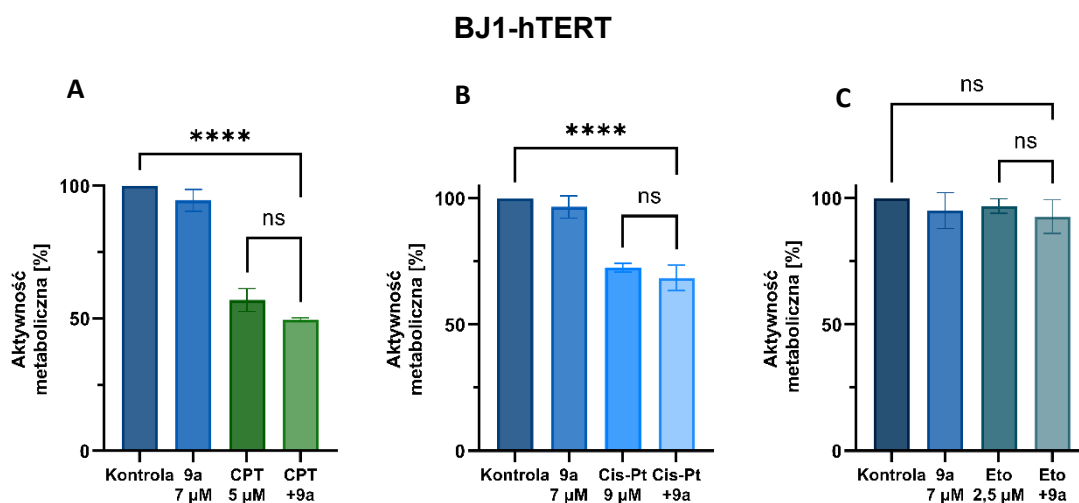
U-2 OS



Rys. 33. Aktywność metaboliczna komórek U-2 OS po 48 godzinach traktowania związkiem 9a w kombinacji z cisplatyną (Cis-Pt), dokсорubicyną (Dox), etopozydem (Eto), gemcytabiną (Gem), metotreksatem (MTX), paklitakselem (PTX) oraz kamptotecyną (CPT). Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną między poszczególnymi grupami - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.

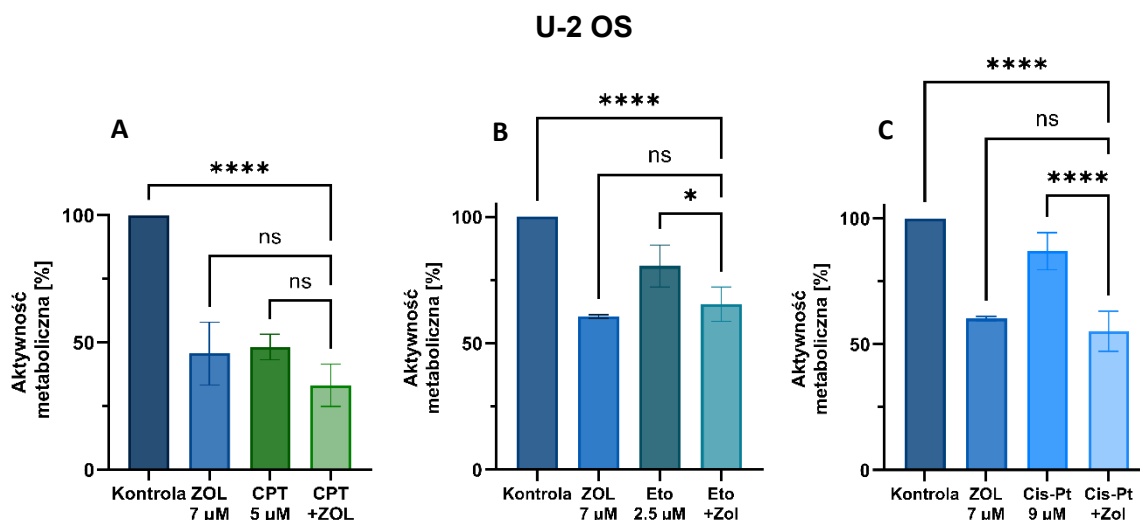
W tej serii badań ponownie zaobserwowano, że dla większości testowanych kombinacji aktywność metaboliczna komórek U-2 OS traktowanych jednocześnie kwasem bisfosfonowym **9a** i cytostatykiem była niższa niż po zastosowaniu każdego ze związków osobno. Najsilniejszy efekt cytotoksyczny zaobserwowano w komórkach poddanych działaniu mieszaniny **9a** wraz z kamptotecyną, cisplatyną oraz etopozydem. W przypadku dwóch ostatnich kombinacji, zwiększenie stężenia cytostatyków nie wpłynęło znacząco na obniżenie aktywności metabolicznej komórek (Rys. 33 A vs B oraz D vs E).

Dla trzech najlepiej rokujących mieszanin – **9a** (7 μ M) z kamptotecyną (5 μ M), cisplatyną (9 μ M) oraz etopozydem (2.5 μ M) – przeprowadzono analogiczne badania na nienowotworowej linii komórkowej BJ1-hTERT (Rys. 34). Nie zaobserwowano istotnego wzrostu toksyczności wobec prawidłowych komórek traktowanych kombinacjami **9a** z CPT, Cis-Pt lub Eto, w porównaniu do samodzielnego działania tych związków. Szczególnie korzystny efekt stwierdzono w przypadku zastosowania bisfosfonianu **9a** wraz z etopozydem, gdzie aktywność metaboliczna komórek nie odbiegała istotnie od wartości kontrolnych.



Rys. 34. Aktywność metaboliczna komórek BJ1-hTERT po 48 godzinach traktowania związkiem **9a** w kombinacji z kamptotecyną (CPT), cisplatyną (Cis-Pt) oraz etopozydem (Eto). Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną między poszczególnymi grupami - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.

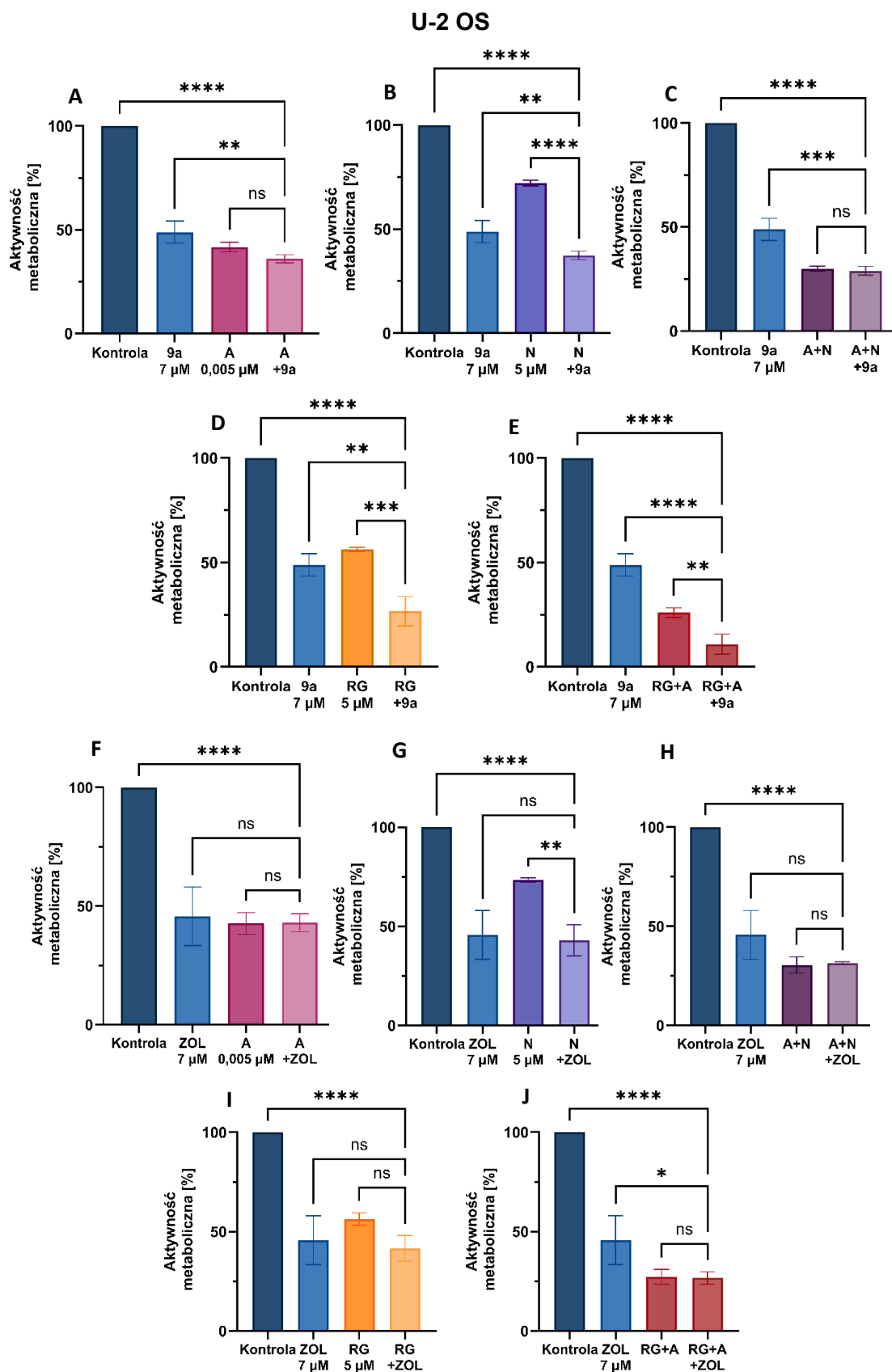
Przeprowadzono także dodatkowe eksperymenty na linii U-2 OS z zastosowaniem zoledronianu zamiast pochodnej **9a**, aby porównać efekty obydwu związków (Rys. 35). Generalnie nie zaobserwowano istotnego statystycznie obniżenia aktywności metabolicznej komórek po zastosowaniu zoledronianu w kombinacji z badanymi cytostatykami. W przypadku mieszaniny zoledronianu z etopozydem odnotowano nawet niewielkie zwiększenie aktywności metabolicznej komórek w porównaniu do efektu wywoływanego przez sam zoledronian.



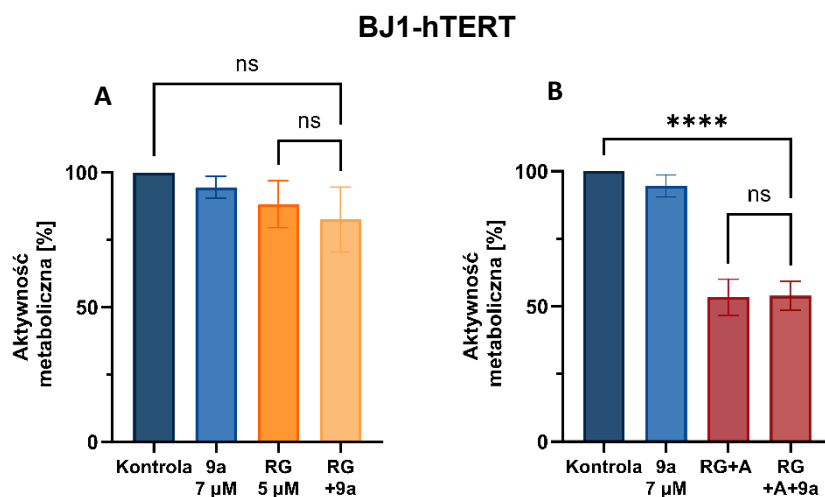
Rys. 35. Aktywność metaboliczna komórek U-2 OS po 48 godzinach traktowania zoledronianem w kombinacji z kamptotecyną (CPT), etopozydem (Eto) oraz cisplatyną (Cis-Pt). Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną między poszczególnymi grupami - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.

W ostatniej serii eksperymentów zbadano interakcje pochodnej **9a** oraz zoledronianu z aktynomycyną D – antybiotykiem cytostatycznym stosowanym w terapii nowotworów (w tym mięsaka Ewinga), a także z substancjami znajdującymi się obecnie w fazie badań klinicznych: nutliną-3a (N) oraz RG7112 (RG), będącymi inhibitorami białka MDM2. Zarówno kombinacja aktynomycyny D z nutliną-3a (A+N), jak i RG7112 z aktynomycyną D (RG+A) wykazują zdolność do synergistycznej aktywacji szlaku p53.^{195,196}

W badaniach przeprowadzonych na linii U-2 OS (Rys. 36) nie zaobserwowano istotnego spadku aktywności metabolicznej komórek po zastosowaniu pochodnej **9a** lub zoledronianu zarówno w kombinacji z aktynomycyną D, jak i mieszaniną aktynomycyny D z nutliną-3a (Rys. 36 A i C oraz F i H). Niewielki wzrost cytotoksyczności odnotowano jedynie w przypadku komórek traktowanych mieszaniną **9a** i nutliny-3a (Rys. 36 B). Najsilniejsze działanie wykazała potrójna kombinacja RG7112, aktynomycyny D i **9a** (RG+A+**9a**; Rys. 36 E). Zastąpienie **9a** zoledronianem w tej konfiguracji (RG+A+ZOL) nie zwiększyło efektu w porównaniu do samej kombinacji RG+A (Rys. 36 J). Wyraźny spadek aktywności metabolicznej komórek zaobserwowano również po zastosowaniu mieszaniny RG7112 z **9a** (RG+**9a**; Rys. 36 D), podczas gdy połączenie RG7112 z zoledronianem (RG+ZOL) nie przyniosło podobnego efektu (Rys. 36 I). W badaniach na zdrowej linii BJ1-hTERT (Rys. 37) nie zaobserwowano istotnej zmiany cytotoksyczności po traktowaniu komórek mieszaninami RG+**9a** oraz RG+A+**9a** w porównaniu do komórek traktowanych samym RG7112 lub jego mieszaniną z aktynomycyną D (RG+A).



Rys. 36. Aktywność metaboliczna komórek U-2 OS po 48 godzinach traktowania związkiem 9a lub zoledronianem wraz z aktynomycyną D (A), nutliną-3a (N), RG7112 (RG) i ich kombinacjami (A+N lub RG+A). Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną między poszczególnymi grupami - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.



Rys. 37. Aktywność metaboliczna komórek BJ1-hTERT po 48 godzinach traktowania związkiem **9a** wraz z RG7112 (RG) oraz mieszaniną RG7112 z aktynomycyną D (RG+A). Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną między poszczególnymi grupami - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.

Przeprowadzone badania wykazały, że spośród testowanych kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych największy potencjał wykazuje kwas 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowy **9a**. Dalsze eksperymenty potwierdziły, że jego obecność nasila cytotoksyczne działanie innych stosowanych środków terapeutycznych.

Wyniki te stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. Cenne może okazać się zbadanie efektu kombinacji pochodnej **9a** z cytostatykami na innych liniach komórek nowotworowych kości, a także przeprowadzenie analiz pozwalających na lepsze poznanie mechanizmu ich działania wywołującego obserwowane efekty.

4.3 Ocena właściwości przeciwbakteryjnych kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych

Kolejnym etapem zaplanowanych prac badawczych była ocena właściwości przeciwbakteryjnych kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych **9a-h** oraz **9j**.

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono z wykorzystaniem wzorcowego szczepu bakterii *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Infekcje wywoływane przez *S. aureus* są uznawane za jeden z głównych czynników etiologicznych zapalenia kości i szpiku (*osteomyelitis*). Ze względu na zdolność tych bakterii do adhezji na powierzchni biomateriałów oraz tworzenia biofilmu, odgrywają one istotną rolę również w rozwoju zakażeń okołowszczepowych, które mogą prowadzić do procesów zapalnych tkanek znajdujących się w pobliżu implantu, a w konsekwencji – do jego odrzutu.¹⁹⁷ Bisfosfoniany, dzięki wysokiemu powinowactwu do składników mineralnych kości, mogą zatem stanowić interesującą grupę związków do opracowywania materiałów o właściwościach bakteriostatycznych, w tym stosowanych w implantach.

Do oceny właściwości przeciwbakteryjnych badanych związków zastosowano dwie metody: pomiar gęstości optycznej (O.D.) w podłożu płynnym oraz test stref zahamowania wzrostu na podłożu stałym. Pierwsza metoda polegała na inkubacji zawiesiny bakterii w mieszaninie pożywki hodowlanej i roztworu badanego związku (w stosunku objętościowym 1:1) przez 18 godzin w temperaturze 37°C. Wzrost bakterii oceniano na podstawie pomiaru gęstości optycznej (O.D.). Oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem wodnych roztworów związków **9a-h** i **9j** o stężeniach 1 mM oraz 2 mM. Druga metoda polegała na naniesieniu wodnego roztworu badanego związku **9a-h** lub **9j** do dołków wyciętych w agarze, na którego powierzchni uprzednio rozprowadzono zawiesinę bakterii. Po 18 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C oceniano obecność i średnicę stref zahamowania wzrostu wokół dołków z badanym związkiem chemicznym. Oznaczenia wykonano stosując roztwory wodne związków **9a-h** i **9j** o stężeniu 1 mM. Wyniki przeprowadzonych badań zebrano w tabeli 9.

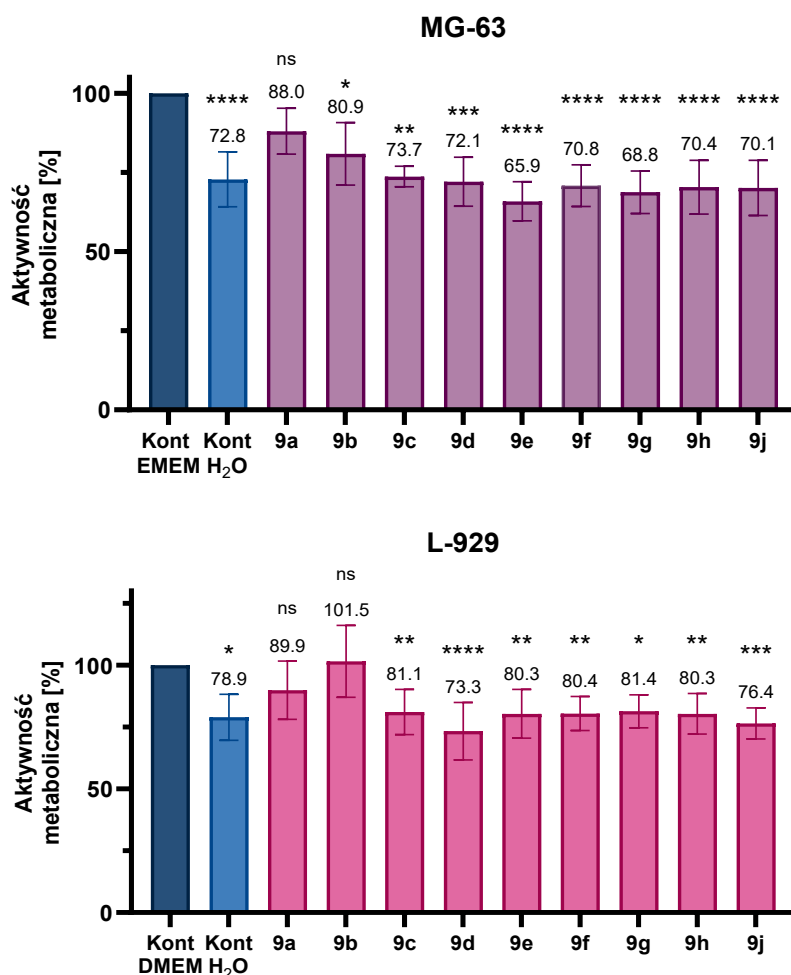
Tabela 9. Wartości gęstości optycznej (O.D.) oraz średnice stref zahamowania wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* dla związków **9a-h** i **9j**

Związek	O.D. po 18h inkubacji		Strefa zahamowania wzrostu, mm
	C = 1 mM	C = 2 mM	
9a	4,6±0,1	2,5±0,4	brak
9b	4,5±0,2	0,0±0,0	brak
9c	4,3±0,2	1,5±0,6	12,7±0,5
9d	4,7±0,1	0,6±0,3	brak
9e	4,2±0,1	0,9±0,2	brak
9f	5,1±0,1	2,3±0,8	brak
9g	4,9±0,1	4,9±0,1	brak
9h	4,4±0,4	1,3±0,4	brak
9j	4,2±0,1	0,6±0,4	brak
Kontrola	7,5±0,3	7,0±0,1	brak

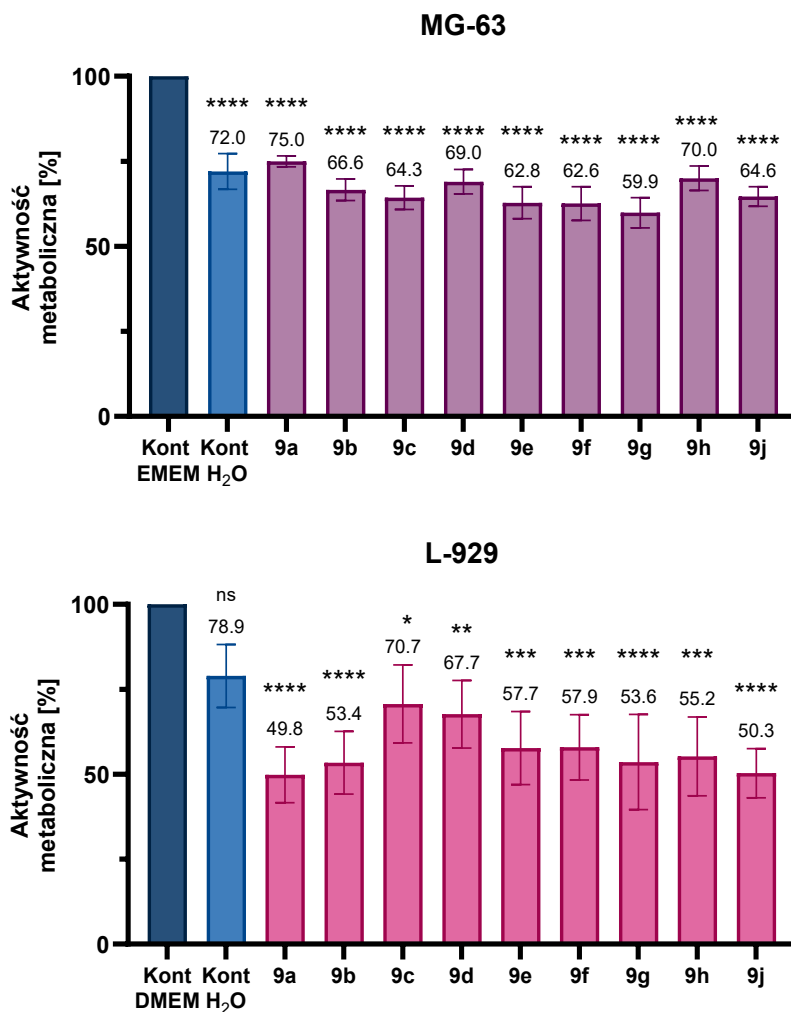
Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że związki **9a-h** i **9j** wykazują właściwości hamujące wzrost bakterii *Staphylococcus aureus*. Średnie wartości gęstości optycznej (O.D.) zmierzone dla roztworów badanych związków o stężeniu 1 mM mieściły się w zakresie 4.2–5.1, podczas gdy w próbie kontrolnej wynosiły 7.5, co wskazuje na zahamowanie wzrostu części populacji bakterii. Najsilniejszy efekt w tej grupie wykazały pochodne **9c**, **9e** oraz **9j**. Dodatkowo, dla związku **9c** potwierdzono obecność stref inhibicji wzrostu w teście na podłożu stałym. Zwiększenie stężenia badanych związków do 2 mM skutkowało silniejszym efektem przeciwdrobnoustrojowym. W przypadku związku **9b** odnotowano całkowite zahamowanie wzrostu *S. aureus* (ATCC 25923). Obiecujące wyniki uzyskano również dla pochodnych **9d**, **9e** oraz **9j**, które wykazywały istotną aktywność w zastosowanych warunkach eksperymentalnych.

Następnie, dokonano oceny cytotoksyczności badanych związków w ludzkiej linii komórkowej kostniakomięsaka MG-63 (o morfologii podobnej do komórek fibroblastów) oraz w mysiej linii fibroblastów L-929, zalecanej zgodnie z normą ISO 10993-5 jako model referencyjny do oceny biokompatybilności materiałów stosowanych w wyrobach medycznych. Zgodnie z tą normą, materiał uznaje się za cytotoksyczny, jeśli powoduje spadek żywotności komórek poniżej 70%.

Cytotoksyczność określano na podstawie pomiaru aktywności metabolicznej komórek z wykorzystaniem testu Alamar Blue, którego działanie opiera się na redukcji resazury (niebieskiej) do fluorescencyjnej resorufiny (różowej) przez enzymy obecne w żywych komórkach. Komórki MG-63 oraz L-929 inkubowano przez 24 godziny z wodnymi roztworami badanych związków **9a-h** i **9j** o stężeniach 1 mM oraz 2 mM, zmieszanych z pożywką hodowlaną w stosunku objętościowym 1:1. Po tym czasie mierzono absorbancję, a uzyskane wyniki znormalizowano względem kontroli negatywnej, którą stanowiły komórki traktowane wyłącznie pożywką hodowlaną (EMEM dla MG-63, DMEM dla L-929). Przeprowadzono także dodatkową próbę kontrolną, w której komórki traktowano pożywką rozcieńczoną wodą (1:1, v/v).



Rys. 38. Wykresy przedstawiające aktywność metaboliczną komórek MG-63 oraz L-929 traktowanych wodnymi roztworami związków **9a-h** i **9j** o stężeniu 1 mM. Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną względem próby kontrolnej EMEM lub DMEM - *p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001, ns p > 0.05.



Rys. 39. Wykresy przedstawiające aktywność metaboliczną komórek MG-63 oraz L-929 traktowanych wodnymi roztworami związków **9a-h** i **9j** o stężeniu 2 mM. Znaki „*” oznaczają istotność statystyczną względem próby kontrolnej EMEM lub DMEM - * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, ns $p > 0.05$.

Na podstawie analizy wykresów przedstawiających aktywność metaboliczną komórek MG-63 i L-929 traktowanych roztworami związków **9a-h** i **9j** o stężeniu wyjściowym 1 mM (Rys. 38) można stwierdzić, że większość badanych związków wykazywała niewielką lub umiarkowaną toksyczność wobec badanych komórek. W linii L-929 żaden z badanych związków nie powodował spadku żywotności komórek poniżej 70% w porównaniu do kontroli, co zgodnie z normą ISO 10993-5 wskazuje na brak istotnej cytotoksyczności.

W przypadku komórek traktowanych roztworami kwasów 1-amino-1,1-bisfosfonowych **9a-h** i **9j** o wyższym stężeniu obserwowano bardziej wyraźny spadek ich aktywności metabolicznej w stosunku do kontroli (Rys. 39). Większy wzrost cytotoksyczności badanych roztworów odnotowano w linii L-929 (aktywność metaboliczna 49.8-70.7% dla stężenia 2 mM vs. 73.3-101.5% dla 1 mM), w porównaniu

do linii MG-63 (aktywność metaboliczna 59.9-75.0% dla stężenia 2 mM vs. 65.9-88.0% dla 1 mM), co może wskazywać na większą wrażliwość tych komórek na badane związki.

Zaobserwowano również, że na aktywność metaboliczną komórek MG-63 oraz L-929 wpływ miało także rozcieńczenie pożywki wodą (Rys. 38, 39; kontrola H₂O). Obniżona aktywność metaboliczna komórek traktowanych roztworami wodnymi związków **9a-h** i **9j** może być zatem wynikiem nie tylko działania samych związków, lecz także odmiennych warunków hodowli podczas wykonywania oznaczeń próbek badanych i kontroli.

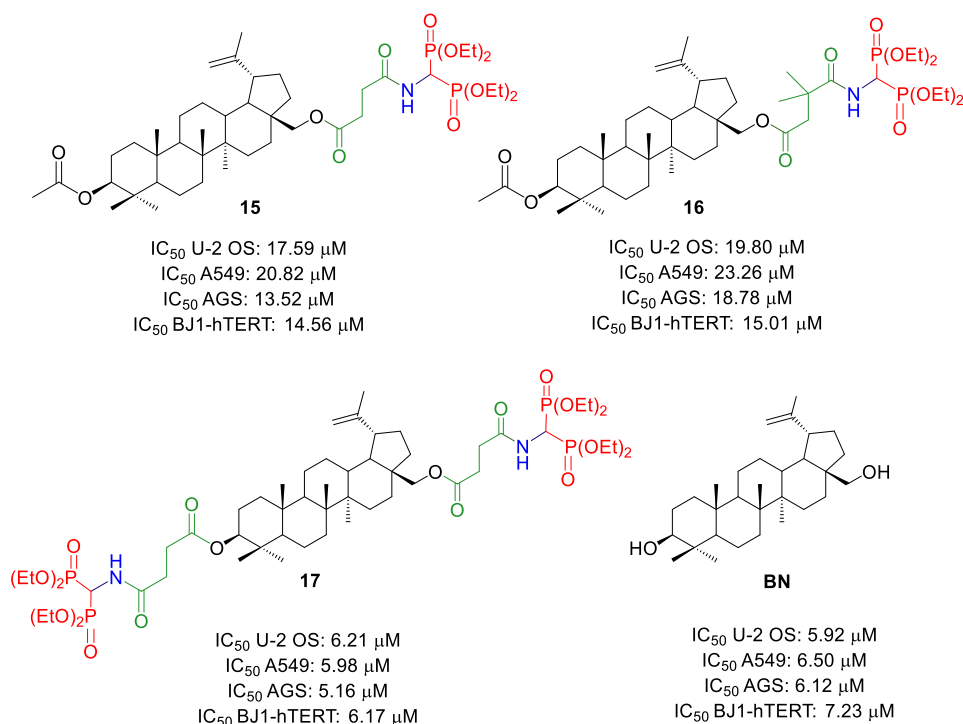
Spośród badanych związków szczególnie korzystny profil wykazywały pochodne **9c** oraz **9d**, które przy obydwu badanych stężeniach charakteryzowały się stosunkowo niską toksycznością wobec obu linii komórkowych, a jednocześnie wykazywały zdolność do hamowania wzrostu bakterii *S. aureus* w badaniach mikrobiologicznych.

4.4 Badania aktywności cytotoksycznej koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny

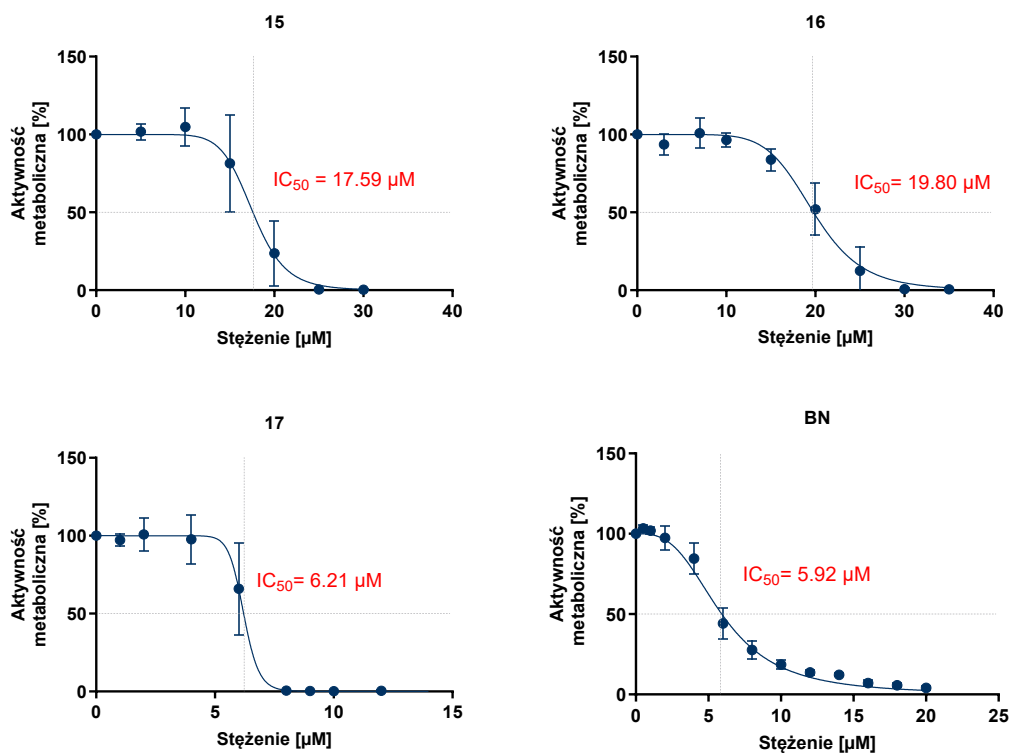
Aktywność cytotoksyczna koniugatów bisfosfonianu **8a** z pochodnymi betuliny **15**, **16** i **17** została zbadana w 3 różnych ludzkich nowotworowych liniach komórkowych: U-2 OS (kostniakomięsak), A549 (gruczolakorak płuca), AGS (rak żołądka) oraz 1 linii komórek prawidłowych: BJ1-hTERT (prawidłowe fibroblasty). Dobór linii komórkowych wynikał z wcześniejszych doniesień dotyczących aktywności biologicznej bisfosfonianów i betuliny, które wykazują działanie przeciwnowotworowe wobec różnych typów komórek, w tym nowotworów kości, płuca i przewodu pokarmowego.^{45,58,198,199}

W strukturze badanych koniugatów grupy fosfonowe występowały w postaci estrów etylowych, a nie w formie kwasowej. Według danych literaturowych, estryfikacja grup fosfonowych prowadzi do zmniejszenia powinowactwa do hydroksyapatytu i ogranicza wychwyt związków w tkance kostnej. Z tego powodu, cytotoksyczność koniugatów **15**, **16** oraz **17** oceniono nie tylko na komórkach nowotworowych układu kostnego, ale również na liniach komórkowych reprezentujących nowotwory niezwiązane z kością (A549 i AGS). Co więcej, według niektórych doniesień, estry bisfosfonianów wykazują często wyższą aktywność biologiczną niż ich odpowiedniki kwasowe.^{82,85}

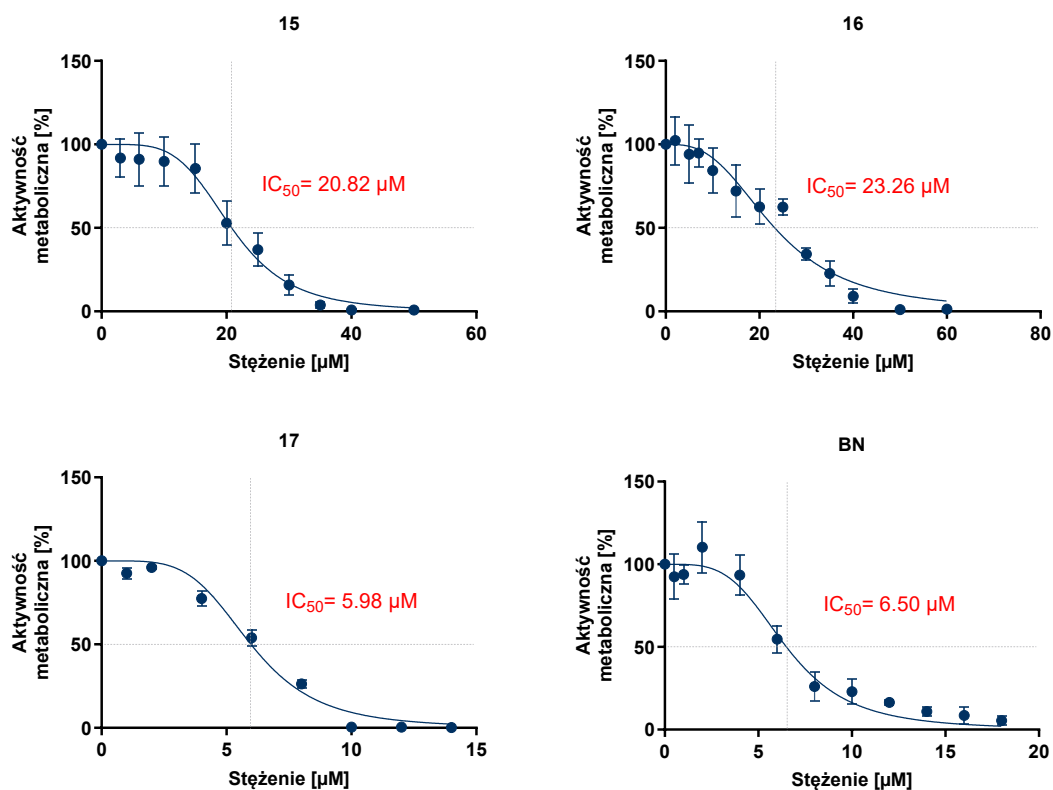
W celu wyznaczenia wartości IC_{50} dla każdego koniugatu w każdej z badanych linii komórkowych zastosowano test MTS. Działanie cytotoksyczne badanych związków porównano z działaniem betuliny (BN). Roztwory wyjściowe betuliny i koniugatów **15**, **16** i **17** przygotowano w DMSO. Następnie zostały rozcieńczone w pożywkach hodowlanych do stężeń, które zostały eksperymentalnie określone dla każdej substancji w każdej z linii komórkowych, w których oceniano działanie cytotoksyczne. Zawartość DMSO w badanych roztworach nie przekraczała 0.5%. Struktury badanych koniugatów wraz z wyznaczonymi wartościami IC_{50} zostały pokazane na rysunku 40, a przebieg odpowiednich krzywych przedstawiają rysunki 41-44.



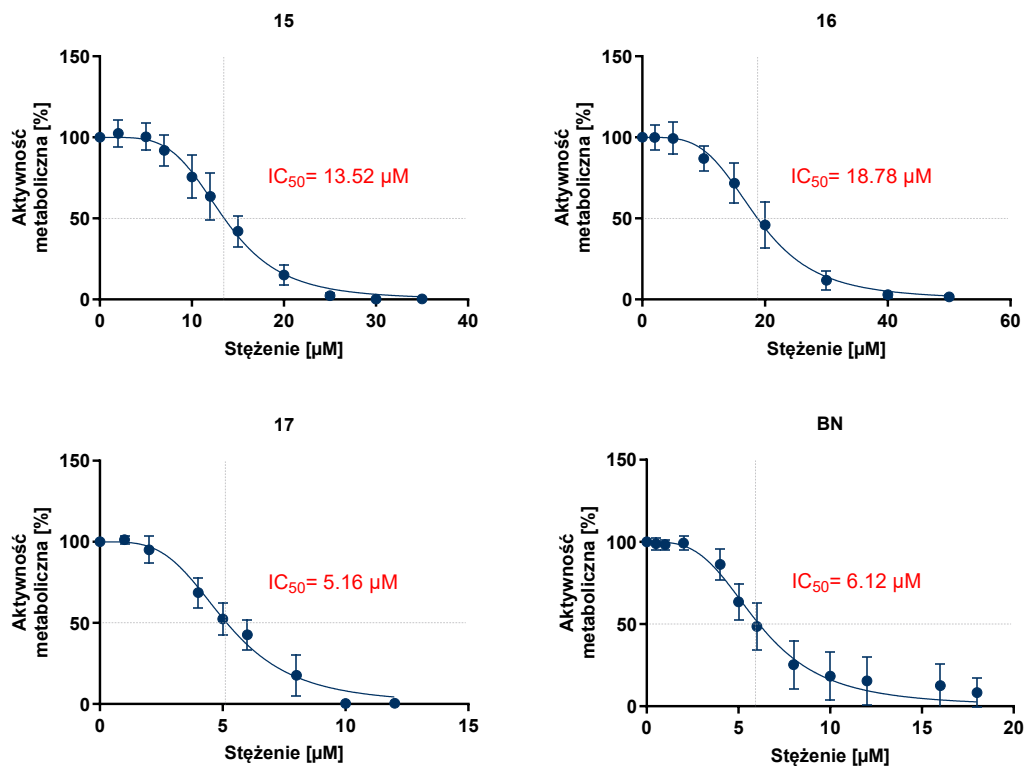
Rys. 40. Struktury koniugatów **15**, **16**, **17** oraz betuliny (BN) wraz z wyznaczonymi dla nich wartościami IC_{50} w liniach komórkowych, odpowiednio U-2 OS, A549, AGS oraz BJ1-hTERT



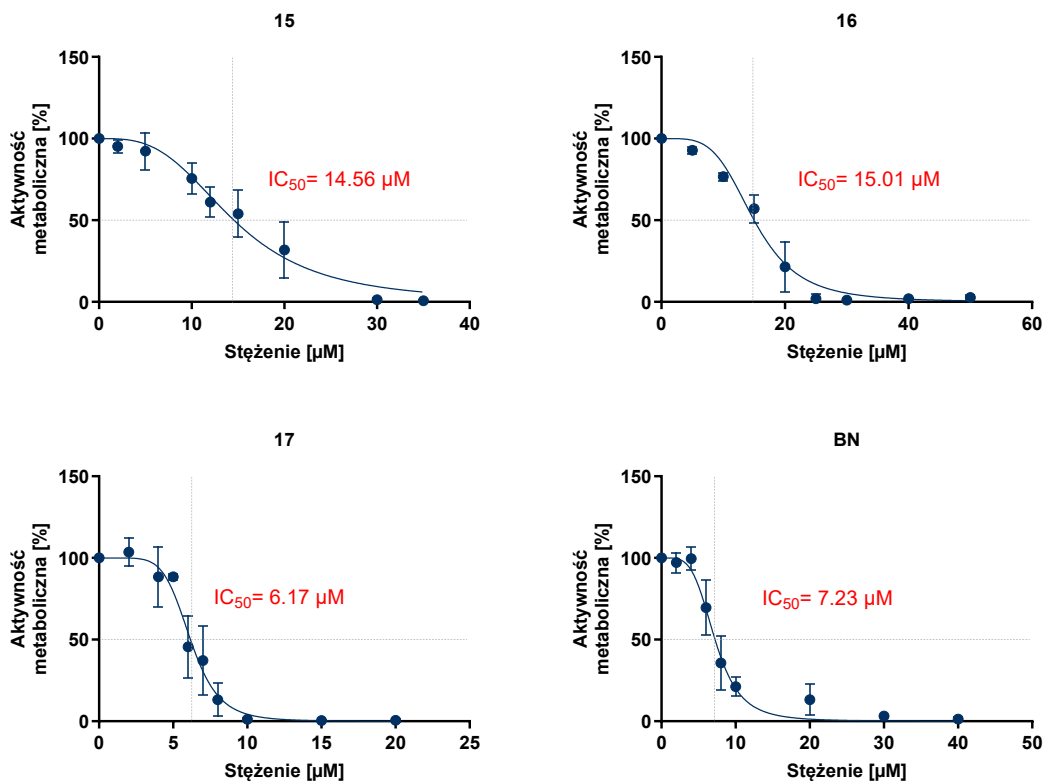
Rys. 41. Wykresy przedstawiające zależność aktywności metabolicznej komórek U-2 OS od stężenia koniugatów **15**, **16**, **17** oraz betuliny (BN)



Rys. 42. Wykresy przedstawiające zależność aktywności metabolicznej komórek A549 od stężenia koniugatów **15**, **16**, **17** oraz betuliny (BN)



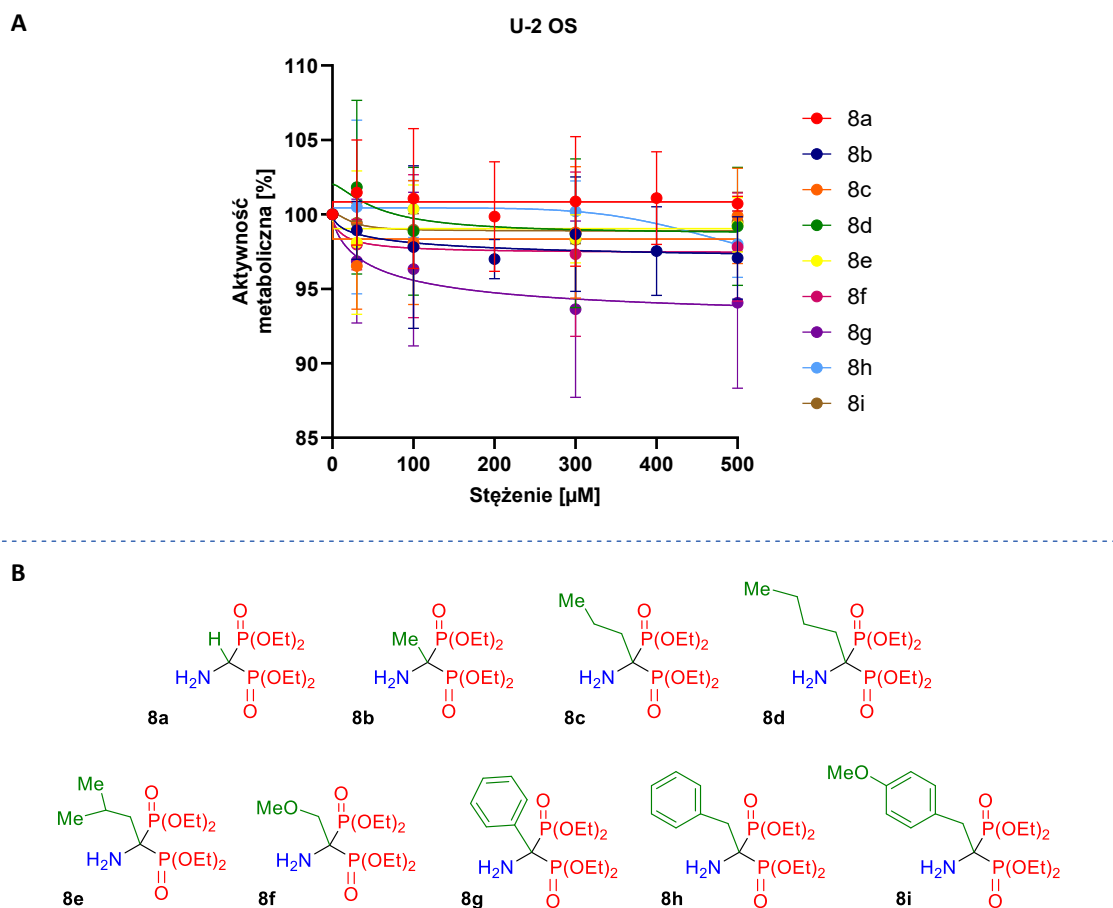
Rys. 43. Wykresy przedstawiające zależność aktywności metabolicznej komórek AGS od stężenia koniugatów 15, 16, 17 oraz betuliny (BN)



Rys. 44. Wykresy przedstawiające zależność aktywności metabolicznej komórek BJ1-hTERT od stężenia koniugatów 15, 16, 17 oraz betuliny (BN)

Z przeprowadzonych badań biologicznych wynika, że najwyższą cytotoksycznością charakteryzuje się koniugat **17**. Wartości IC_{50} (pomiędzy 5.16 μM a 6.21 μM) w różnych liniach komórkowych świadczą o tym, że cytotoksyczność tego koniugatu jest porównywalna do cytotoksyczności samej betuliny (pomiędzy 5.92 μM a 7.23 μM). Jego zastosowanie może być ograniczone przez brak selektywności w stosunku do nowotworowych linii komórkowych – wartości IC_{50} są zbliżone nie tylko w obrębie linii nowotworowych, lecz także w stosunku do komórek zdrowych. Koniugaty **15** i **16** wykazują zbliżoną cytotoksyczność, jednakże w tych przypadkach skoniugowanie betuliny z bisfosfonianem powoduje obniżenie jej cytotoksyczności. Ponadto, podobnie jak koniugat **17**, związki te nie wykazują selektywności w stosunku do komórek nowotworowych. Największy wpływ na aktywność biologiczną otrzymanych koniugatów ma liczba i/lub miejsce przyłączonych grup bisfosfonowych. Koniugat **17**, z dwoma grupami ABPs, w pozycjach C-3 oraz C-28 wykazuje około 3-krotnie wyższą cytotoksyczność w porównaniu z koniugatami **15** i **16** funkcjonalizowanymi wyłącznie w pozycji C-28. Rodzaj zastosowanego linkera ma niewielki, ale zauważalny wpływ na aktywność cytotoksyczną tych koniugatów. Chociaż koniugacja nie poprawiła znacząco aktywności cytotoksycznej betuliny, wszystkie otrzymane związki charakteryzowały się lepszą rozpuszczalnością w DMSO (>20 mM) w porównaniu z betuliną (5 mM).

Ze względu na brak istotnej poprawy aktywności cytotoksycznej betuliny po jej koniugacji z 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianem tetraetylu **8a**, podjęto dalsze badania mające na celu ocenę cytotoksyczności 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **8**. W tym celu przebadano serię dziewięciu pochodnych estrowych **8a-i**, odpowiadających wcześniej analizowanym kwasom bisfosfonowym **9a-h** i **9j** (badanym uprzednio wyłącznie na linii komórkowej U-2 OS, co opisano w rozdziale 4.1 omówienia wyników). Ich aktywność cytotoksyczną oceniono za pomocą testu MTS na komórkach U-2 OS. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że żaden z badanych estrów **8** nie wykazywał istotnego działania cytotoksycznego wobec tej linii komórkowej (Rys. 45). Uzyskane wyniki mogą częściowo tłumaczyć brak poprawy aktywności cytotoksycznej betuliny po przeprowadzeniu jej modyfikacji ugrupowaniem 1-aminobisfosfonowym (w formie estru). Cenna jest również informacja, że w przypadku badanych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych, to odpowiednie kwasy ABPs wykazują wyższą cytotoksyczność wobec komórek U-2 OS.



Rys. 45. Wykres przedstawiający zależność aktywności metabolicznej komórek U-2 OS od stężenia 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **8** (A); struktury 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **8** (B)

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badania opisane w niniejszej pracy koncentrowały się na opracowaniu efektywnych metod syntezy związków 1-amino-1,1-bisfosforowych oraz ich koniugatów z cząsteczkami o znaczeniu biologicznym. Przedstawiono uniwersalną metodę, umożliwiającą otrzymywanie zróżnicowanych strukturalnie *N*-zabezpieczonych układów 1-amino-1,1-bisfosforowych. Opisano także skuteczne warunki deprotekcji i hydrolizy symetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych oraz efektywne strategie sprzęgania wybranego modelu ABP z pochodnymi betuliny, chlorambucylem, kwasem mykofenolowym, 5-karboksyuracylem, bromkami karboksyalkilotrifenylfosfoniowymi oraz deferoksaminą. Przeprowadzona ocena właściwości biologicznych otrzymanych kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych oraz koniugatów wybranego modelu ABP z pochodnymi betuliny pozwoliła na wytypowanie związków o największym potencjale aplikacyjnym.

Synteza związków 1-amino-1,1-bisfosforowych

1. Wykazano, że metoda syntezy pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych z chlorowodorków imidoilanów etylu, poprzez odpowiednie 1-etoksyalkanofosfoniany dietylu, może być z powodzeniem zastosowana do otrzymania zarówno symetrycznych *N*-zabezpieczonych 1-amino-1,1-bisfosfonianów tetraetylu, jak i ich niesymetrycznych fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów.
2. Transformacje 1-(*N*-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu w oczekiwane pochodne bisfosforowe zachodzą efektywnie z zastosowaniem niewielkiego nadmiaru (5–10% mol.) tetrafluoroboranu trifenylfosfoniowego oraz 50% nadmiaru molowego odpowiedniego nukleofila fosforowego (fosforynu trietylu, difenylfosfininu metylu lub fenylofosfoninu dietylu), w temperaturze pokojowej lub podwyższonej, w czasie od 1 do 24 godzin. W większości przypadków, oczekiwane pochodne bisfosforowe otrzymano w reakcji bezkatalitycznej, metodą *one-pot*, z wytworzeniem *in situ* reaktywnych soli trifenylfosfoniowych.
3. 1-[(*N*-Benzyloksykarbonyloamino)-1-etoksy(fenyl)fosforylo]alkano-fosfoniany dietylu otrzymano w postaci mieszaniny diastereoizomerów, o stosunku dr w zakresie od 1:1 do 1:4. Zaobserwowano, że stosunek diastereoizomerów zwiększa się wraz ze wzrostem zawady sterycznej podstawnika R¹ przy centrum reakcyjnym. Próby rozdziału uzyskanych

mieszanin diastereoizomerów zakończyły się powodzeniem jedynie w przypadku fosfonowo-fosfinowego analogu fenyloglicyny ($R^1 = Ph$, dr 1:4).

4. Wykazano, że 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfoniany tetraetylu mogą być przekształcone w odpowiednie pochodne z wolną grupą aminową w reakcji katalitycznego uwodornienia (H_2 , 1.5–1.6 bar, MeOH, 1h) w obecności $Pd(OH)_2/C$ (0.1 g/mmol) lub Pd/C (0.2 g/mmol), z bardzo dobrymi, często ilościowymi wydajnościami (95–100%), a otrzymane produkty nie wymagają oczyszczenia. Z powodzeniem przeprowadzono również analogiczną transformację dla 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)metanofosfonianu dietylu, ale przy zastosowaniu 5-krotnie większej ilości katalizatora ($Pd(OH)_2/C$; 0.5 g/mmol).
5. 1-Aminoalkilideno-1,1-bisfosfoniany tetraetylu przekształcono w odpowiednie kwasy 1-aminobisfosfonowe w wyniku hydrolizy w stężonym kwasie solnym w temperaturze wrzenia lub stosując 33% roztwór HBr w kwasie octowym.
6. Na przykładzie hydrolizy 1-(*N*-acetyloamino)-2-fenyletylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu (35–38% HCl, t.wrz.), wykazano możliwość otrzymywania kwasów 1-amino-1,1-bisfosfonowych również z pochodnych zabezpieczonych grupą acylową.
7. Deestryfikację grup fosfonowych 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)metanofosfonianu dietylu przeprowadzono za pomocą bromku trimetylosililu, a następnie desililowania powstałego produktu pośredniego metanolem.

Modyfikacje struktury układów bisfosfonowych

1. Opracowano prostą i efektywną metodę koniugacji 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu poprzez tworzenie wiązania amidowego, w obecności DCC i z wykorzystaniem ultradźwięków. Metodę tę można zastosować zarówno do prostej modyfikacji struktury bisfosfonianu bromkami karboksyalkylotrifenylofosfoniowymi, jak również do uzyskania jego koniugatów ze związkami biologicznie czynnymi o bardziej złożonej strukturze, co potwierdzono w reakcjach z udziałem pochodnych betuliny, chlorambucylu, kwasu mykofenolowego oraz indometacyny.

2. Zaletami opracowanej metody są: prosta procedura syntezy, krótki czas reakcji (30 minut do 4 godzin) oraz wysokie wydajności otrzymywanych produktów (69-94%). Zmniejszenie nadmiaru bisfosfonianu oraz DCC ułatwiło izolację produktów z mieszaniny reakcyjnej.
3. Ze względu na słabą rozpuszczalność 5-karboksyuracylu, zastosowanie omawianej metody w syntezie jego koniugatu z 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianem tetraetylu było znacznie mniej efektywne. Skuteczniejszą metodą otrzymywania tego związku okazała się reakcja 5-karboksyuracylu z wyżej wspomnianym ABP wobec HATU oraz zasady *Hüniga* jako czynników sprzęgających.
4. Deestryfikację grup fosfonowych wybranych koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu przeprowadzono w reakcji z bromkiem trimetylosililu, a następnie z metanolem.

Próby wykorzystania potencjału połączenia ABP z DFO jako znacznika diagnostycznego

1. *N*-(3-Karboksypropanoilo)deferoksaminy można otrzymać w reakcji mezylanu deferoksaminy z bezwodnikiem bursztynowym w pirydynie.
2. Najbardziej efektywną metodą sprzęgania *N*-(3-karboksypropanoilo)-deferoksaminy z 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianem tetraetylu okazała się reakcja prowadzona z udziałem HATU i zasady *Hüniga*.
3. Ograniczona rozpuszczalność pochodnych deferoksaminy, w tym *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy, utrudnia przeprowadzenie syntezy koniugatu $\text{SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$ w sposób powtarzalny, a także jego skuteczne oczyszczenie. W najlepszej próbie koniugat uzyskano z 42% wydajnością oraz czystością oszacowaną na 85%.
4. Pomimo wielu prób (deestryfikacja koniugatu $\text{SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$, koniugacja *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy z kwasem 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowym), nie udało się dotychczas dobrać optymalnych warunków syntezy docelowego liganda $\text{SANHCH}(\text{PO}(\text{OH})_2)_2\text{DFO}$.
5. Na podstawie przeprowadzonych badań nad stabilnością chelatu $\text{SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$ z ^{89}Zr stwierdzono, że modyfikacja struktury deferoksaminy poprzez wprowadzenie ugrupowania 1-aminometylideno-

bisfosfonowego w formie estru nie poprawiła stabilności otrzymanego kompleksu.

Ocena właściwości biologicznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych i ich koniugatów

1. Spośród badanych pochodnych 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych, najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek linii U-2 OS wykazał kwas 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowy. Wyznaczona dla niego wartość IC_{50} była zbliżona do wartości IC_{50} wyznaczonej dla zoledronianu (odpowiednio 6.16 μ M i 6.55 μ M). Jednocześnie, związek ten wykazywał relatywnie niską toksyczność wobec komórek prawidłowej linii BJ1-hTERT.
2. Obecność kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego wywołała wzrost cytotoksyczności stosowanych środków terapeutycznych wobec komórek linii U-2 OS. Najsilniejsze efekty obserwowano dla jego kombinacji z kamptotecyną, cisplatyną, etopozydem, RG7112 oraz mieszaniną RG7112 z aktynomycyną D, przy stężeniu 7 μ M. Analogiczne kombinacje zoledronianu z tymi samymi związkami nie wywoływały równie silnego efektu cytotoksycznego. Jednocześnie zaobserwowano, że stosowanie kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego w połączeniu z cytostatykami nie powodowało istotnego wzrostu toksyczności względem komórek linii BJ1-hTERT w porównaniu do toksyczności wywoływanej przez same cytostatyki.
3. Kwasy 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowe wykazują właściwości hamujące wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* przy stężeniach 1 oraz 2 mM. Najsilniejszą aktywność przeciwdrobnoustrojową zaobserwowano dla bisfosfonowych analogów norwaliny ($R^1 = Pr$), leucyny ($R^1 = i-Bu$), tyrozyny ($R^1 = CH_2C_6H_4OH$) oraz alaniny ($R^1 = Me$), przy czym ten ostatni całkowicie zahamował rozwój bakterii przy stężeniu 2 mM. Badania cytotoksyczności na liniach komórkowych MG-63 i L-929 wykazały, że większość związków charakteryzuje się niską lub umiarkowaną toksycznością, jednak przy wyższym stężeniu (2 mM) odnotowano wyraźny spadek aktywności metabolicznej, szczególnie w linii L-929. Najbardziej korzystny profil, łączący skuteczne działanie antybakteryjne ze stosunkowo niewielką toksycznością, wykazały bisfosfonowe analogi norwaliny ($R^1 = Pr$) oraz norleucyny ($R^1 = Bu$).
4. Spośród badanych koniugatów 1-aminometylidenobisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny, najwyższą cytotoksyczność wobec linii komórkowych U-2 OS, A549 oraz AGS wykazała pochodna funkcjonalizowana dwoma

ugrupowaniami ABPs, w pozycjach C-3 oraz C-28. Aktywność tego związku była jednak porównywalna z aktywnością samej betuliny, a jego potencjał ogranicza dodatkowo brak selektywności wobec komórek nowotworowych. Koniugacja pochodnych betuliny z 1-aminometylidenobisfosfonianem tetraetylu przyczyniła się natomiast do poprawy rozpuszczalności otrzymanych związków.

5. Żaden z badanych 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu nie wykazywał istotnego działania cytotoksycznego wobec komórek U-2 OS. Może to wskazywać na potencjalne przyczyny braku obserwowanej poprawy właściwości cytotoksycznych betuliny po przeprowadzeniu jej funkcjonalizacji ugrupowaniem 1-aminometylidenobisfosfonowym w postaci estru.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Informacje ogólne

Syntezy opisane w pracy prowadzono w standardowych warunkach laboratoryjnych.

Wszystkie stosowane, dostępne handlowo związki chemiczne wykorzystywano bez wcześniejszego oczyszczania.

Stosowano odczynniki handlowe następujących firm:

- Sigma Aldrich: chlorowodorek benzimidolilu etylu $\geq 97\%$, eter 18-korona-6 99%, *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid $>99\%$, 20% wodorotlenek palladu na węglu 98%, 2,4,6-trimetylopirydyna $\geq 99\%$;
- Acros Organics: chloromrówczan benzylu 97%, 33% kwas bromowodorowy w kwasie octowym; fosforyn trietylu 98%, pirydyna $\geq 99.8\%$, trietyloamina $>99.5\%$; 10% pallad na węglu aktywnym;
- Apollo Scientific: HATU 99%, mezylan deferoksaminy;
- ThermoScientific: *N,N*-diizopropyletyloamina 99%, fosforyn dietylu 98%, bromek (4-karboksybutylo)trifenylfosfoniowy 97%, bromek trimetylosililu 98%, indometacyna 98%;
- Alfa Aesar: fenylofosfonin dietylu 98%, bezwodnik bursztynowy 99%;
- ChemPur: wodorotlenek sodu cz.d.a.;
- Fluka: chlorek acetylu $>98.0\%$, 1-hydroksybenzotriazol $>98\%$;
- AmBeed: bromek (2-karboksyetylo)trifenylfosfoniowy 97%, kwas mykofenolowy 99,8%, 5-karboksyuracyl 98%;
- Chemat: chlorambucyl $>98\%$;
- BLDpharm: difenylofosfinin metylu $>99\%$;
- POCH: węglan potasu cz.d.a., 35-38% kwas solny cz.d.a., chlorowodorek acetimidolilu etylu 97%.

Stosowane rozpuszczalniki (dichlorometan, chloroform, acetonitryl, metanol, etanol, n-heksan, toluen, octan etylu, *N,N*-dimetyloformamid, eter dietylowy) suszono nad sitami molekularnymi 4Å i stosowano bez wcześniejszego oczyszczania.

Reakcje katalitycznego uwodornienia prowadzono w reaktorze ciśnieniowym Parr, model 3916, pod ciśnieniem wodoru 1.5-1.6 bar.

Reakcje wspomagane ultradźwiękami prowadzono w laboratoryjnej myjce ultradźwiękowej Elmasonic S10H o częstotliwości ultradźwięków równej 37 kHz i efektywnej wydajności ultradźwięków wynoszącej 90W.

Reakcje wymagające obniżonych temperatur prowadzono w szklanych, grubościennych probówkach zamykanych korkami polipropylenowymi. Niską temperaturę reakcji utrzymywano korzystając z kriostatu F81-ME firmy Julabo.

Chromatografię kolumnową wykonywano stosując kolumny wypełnione żelem krzemionkowym (silica gel 60, 70-230 mesh, Merck). Analizę TLC wykonywano na plastikowych płytkach firmy Merck pokrytych żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ o grubości warstwy 0.2 mm. Plamki na płytkach obserwowano w świetle lampy UV ($\lambda = 254$ nm) lub wizualizowano poprzez wypalanie płytek po ich spryskaniu 10% roztworem kwasu siarkowego w etanolu lub zanurzeniu w wywoływaczu cerowo-molibdenowym. Ten ostatni otrzymano poprzez rozpuszczenie 5 g siarczanu(VI) ceru(IV), 25 g kwasu molibdenowego w mieszaninie 50 mL stężonego kwasu siarkowego(VI) z 450 mL wody.

Widma ^1H NMR oraz ^{13}C NMR wykonywano na aparatach Varian 600 lub Agilent Magnet 400 MHz, przy częstotliwościach pola magnetycznego odpowiednio 600 lub 400 MHz dla ^1H NMR oraz 150 lub 100 MHz dla ^{13}C NMR. Przesunięcia chemiczne podano względem tetrametylosilanu (TMS) jako wzorca wewnętrznego (^1H NMR, 0 ppm) lub sygnału resztkowego rozpuszczalnika (^{13}C NMR: CDCl_3 77.16 ppm, CD_3OD 49.00 ppm, DMSO 39.52 ppm). Widma ^{31}P NMR rejestrowano na aparacie Agilent Magnet 400 MHz przy częstotliwości pola magnetycznego 162 MHz, w odniesieniu do H_3PO_4 (85%) przy 0 ppm. Wartości przesunięć chemicznych (δ) podano w ppm, a stałe sprzężenia (J) w Hz. Multipletowość oznaczano jako: singlet (s), poszerzony singlet (br s), dublet (d), poszerzony dublet (br d), dublet dubletów (dd), tryplet (t), tryplet dubletów (td), kwartet typu AB (ABq), kwartet (q), kwintet (qi), multiplet (m).

Widma IR otrzymanych związków rejestrowano na spektrometrze FT-IR Nicolet 6700 techniką ATR.

Analizy wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS) prowadzono korzystając z aparatu Waters Xevo G2 Q-TOF wyposażonego w źródło jonizacji elektrosprejem (ESI). Dokładne masy i wzory jonów molekularnych zostały wyznaczone przy użyciu oprogramowania MassLynx.

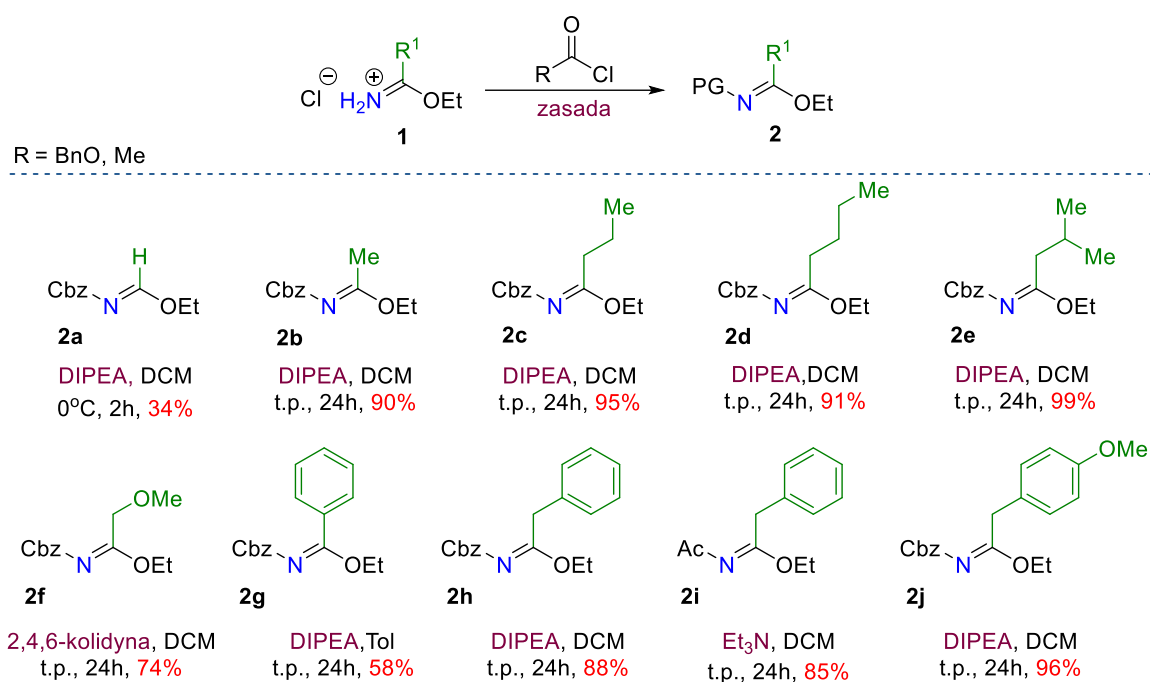
Temperatury topnienia związków krystalicznych oznaczano za pomocą aparatu Bibby Stiriling SMP 3; nie były one korygowane.

2. Procedury syntetyczne

W reakcjach acylowania chlorowodorków imidoilanów etylu **1** korzystano z handlowo dostępnych chlorowodorków acetimidoilanu etylu oraz benzimidoilanu etylu. Chlorowodorek formimidoilanu etylu zsyntetyzowano zgodnie z procedurą opisaną przez Schmitza i Ohme.²⁰⁰ Pozostałe pochodne **1** otrzymano zgodnie z procedurą opisaną przez Yadav i Babu.²⁰¹

2.1 Synteza symetrycznych oraz niesymetrycznych związków 1-amino-1,1-bisfosforowych

2.1.1 Acylowanie chlorowodorków imidoilanów etylu



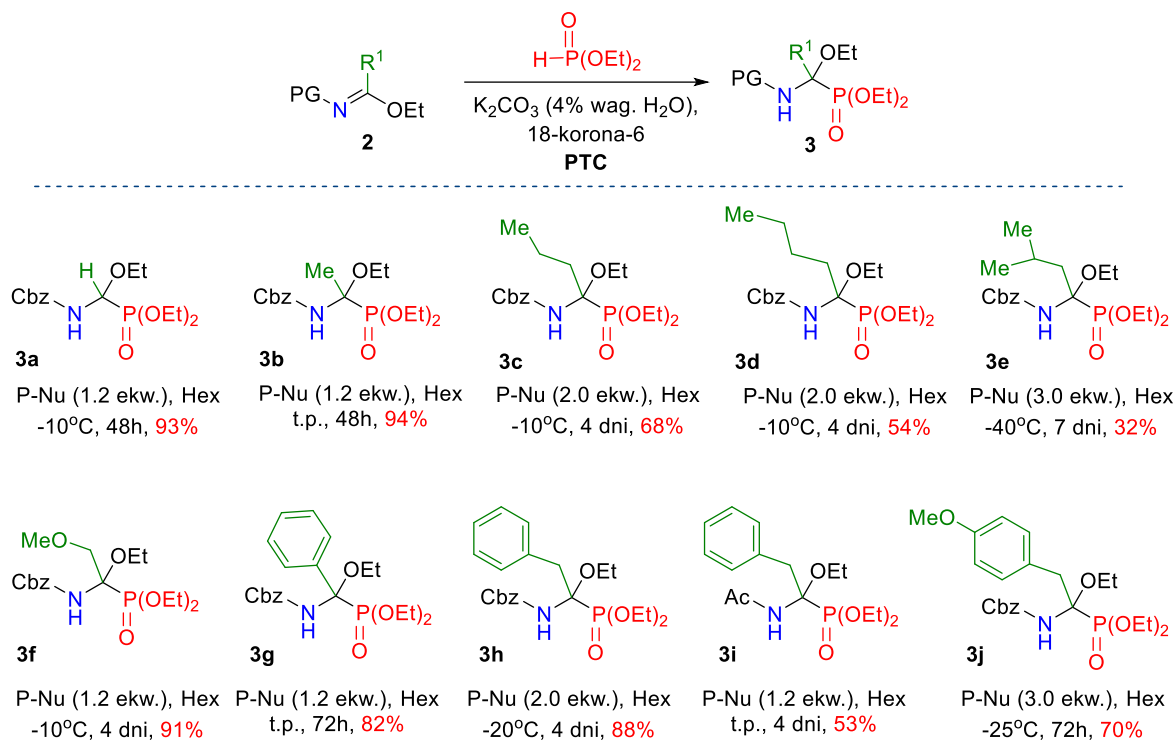
Schemat 47

Reakcje *N*-acylowania chlorowodorków imidoilanów etylu **1** prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Kuźnik i wsp.¹⁷⁵ Do kolby okrągłodennej o objętości 50 mL, umieszczonej w łaźni wodno-lodowej, wprowadzano chlorowodorek imidoilanu etylu **1** (8.0 mmol, 1.0 ekw.). Zawartość kolby przedmuchiwano argonem, a następnie w przepływie gazu obojętnego dodawano kolejno rozpuszczalnik (25 mL, zob. Schemat 47), odpowiednią zasadę (17.6 mmol, 2.2 ekw., zob. Schemat 47) oraz chloromrówczan benzylu (8.0 mmol, 1.36 g, 1.14 mL, 1.0 ekw.) lub chlorek acetylu (8.0 mmol, 0.68 g, 0.57 mL, 1.0 ekw.). Następnie na kolbę nakładano septę oraz balon z argonem i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej lub obniżonej przez 2 lub 24 godziny (zob. Schemat 47). Po upływie tego czasu odparowywano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a do uzyskanej

pozostałości dodawano heksan (15 mL) w celu oddzielenia produktu **2** od chlorowodoru zasady. Powstały osad oddzielano przez sączenie pod obniżonym ciśnieniem przez warstwę celitu, a przesącz zateżano na wyparce rotacyjnej. Tak otrzymane *N*-acyloimidoilany etylu **2** stosowano w kolejnych syntezach bez dodatkowego oczyszczania. Dane spektroskopowe otrzymanych związków były zgodne z danymi literaturowymi.¹⁷⁵

Syntezę *N*-(benzyloksykarbonylo)fenyloacetimidoilanu etylu **2h** przeprowadzono z użyciem zasady *Hüniga* (2.1 ekw.), którą dodawano w dwóch równych porcjach – przed i po wprowadzeniu chloromrówczanu benzylu (1.25 ekw.).

2.1.2 Synteza 1-(*N*-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonianów dietylu w układzie PTC

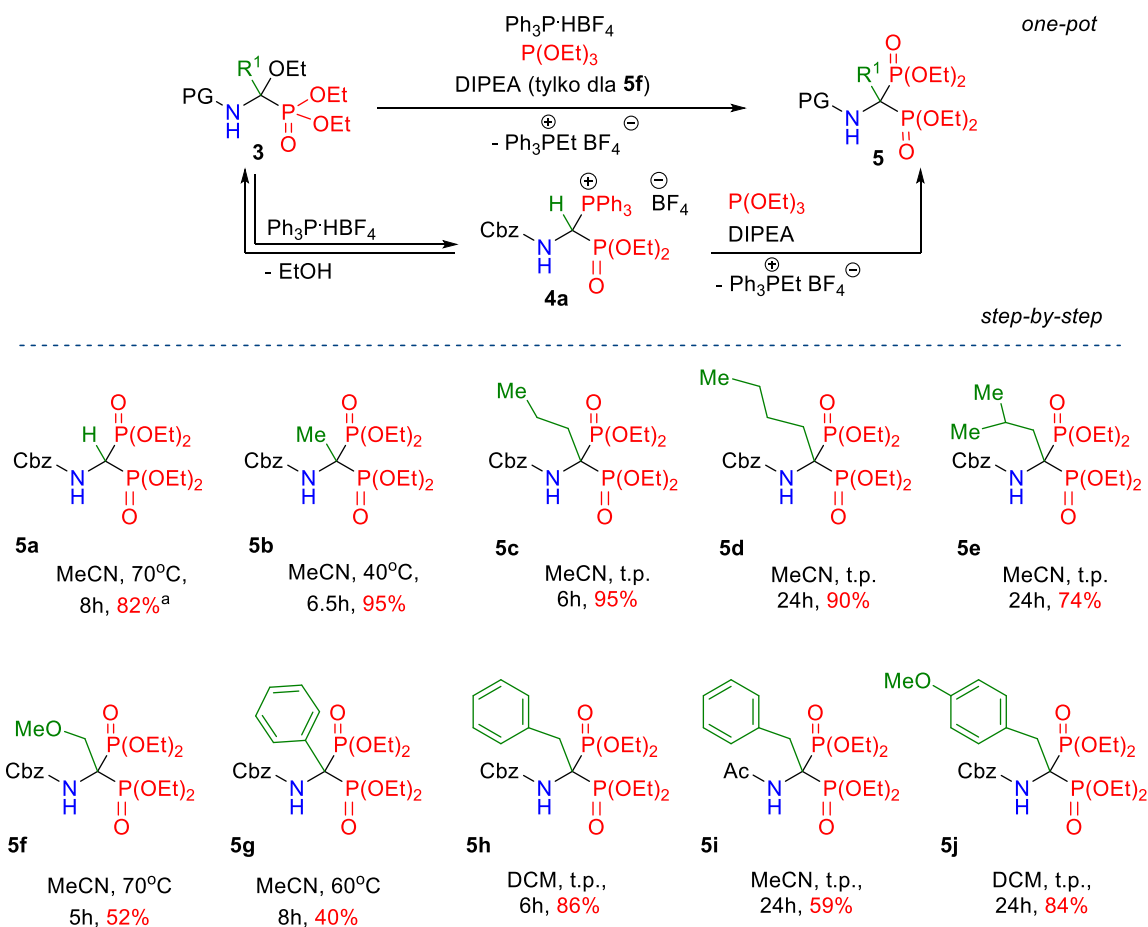


Schemat 48

Reakcję addycji fosforu dietylu do *N*-acyloimidoilanów etylu **2**, w układzie PTC prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Kuźnik i wsp.¹⁷⁵ Do kolby o objętości 25 mL (reakcje prowadzone w temperaturze pokojowej) lub długiej szklanej probówki z teflonowym korkiem (reakcje prowadzone w temperaturze obniżonej) wprowadzano kolejno eter koronowy (0.24 mmol, 63 mg, 0.12 ekw.), uwodniony (4% wag. H₂O) węgiel potasu (2.7 mmol, 373 mg, 1.35 ekw.) oraz roztwór *N*-acyloimidoilanu etylu **2** (2.0 mmol, 1.0 ekw.) w heksanie (6.5 mL). Po rozpoczęciu

mieszania wkraplano fosforyn dietylu (P-Nu, 2.4–6.0 mmol, 1.2–3.0 ekw., zob. Schemat 48) i kontynuowano reakcję w temperaturze pokojowej lub obniżonej w czasie podanym na schemacie 48). Po zakończeniu reakcji węglan potasu oddzielano przez sączenie grawitacyjne, a produkt **3** ekstrahowano z pozostałości w naczyniu reakcyjnym oraz na sączku heksanem lub dichlorometanem. Otrzymany przesącz zatężano, a surowy produkt poddawano oczyszczaniu metodą chromatografii kolumnowej (DCM/MeOH/Et₃N 100:1:1, v/v/v). Dane spektroskopowe uzyskanych związków były zgodne z danymi literaturowymi.¹⁷⁵

2.1.3 Otrzymywanie 1-(N-acyloamino)alkano-1,1-bisfosfonianów tetraetylu



^a Wydajność obliczona względem wyjściowego 1-etoksyfosfonianu **3a**

Schemat 49

Syntezę 1-(N-acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **5** prowadzono zgodnie z procedurami opisanymi przez Kuźnik i wsp.¹⁷⁵

2.1.3.1 Otrzymywanie 1-(N-acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu 5 metodą *one-pot*

Do kolby okrągłodennej o objętości 25 mL wprowadzano odpowiedni 1-(N-acyloamino)-1-etoksyalkanofosfonian dietylu **3** (1.0 mmol), tetrafluoroboran trifenylofosfoniowy (1.1 mmol, 385 mg, 1.1 ekw.) oraz rozpuszczalnik (4 mL, zob. Schemat 49). Zawartość kolby mieszano w temperaturze pokojowej do rozpuszczenia substratów, po czym wkraplano fosforyn trietylu (1.5 mmol, 249 mg, 0.26 mL, 1.5 ekw.). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej lub podwyższonej przez 5–24 godzin (zob. Schemat 49). Po zakończeniu reakcji odparowywano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskaną pozostałość ekstrahowano toluenem (3 x 5 mL) w celu oddzielenia produktu **5** od tetrafluoroboranu etylotrifenylofosfoniowego. Zebrane ekstrakty łączono, odparowywano części lotne, a surowy produkt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej (DCM/MeOH 20:1, v/v).

Syntezę związku **5f** przeprowadzono w sposób analogiczny, lecz z dodatkiem katalitycznej ilości zasady *Hüniga* (0.4 mmol, 52 mg, 70 µL, 0.4 ekw.).

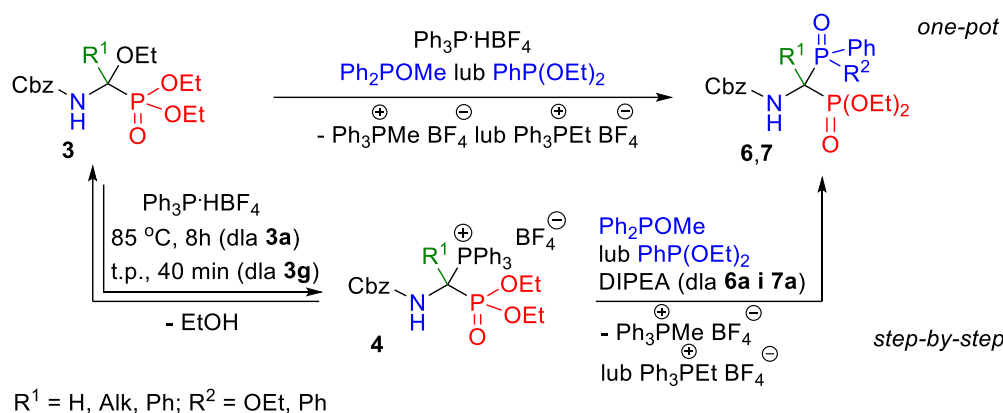
W przypadku syntezy pochodnej **5e**, zastosowano inną kolejność dozowania reagentów: pochodną 1-etoksyfosfonową **3e** rozpuszczono w acetonitrylu (2 mL), a następnie wkroplono kolejno fosforyn trietylu oraz roztwór tetrafluoroboranu trifenylofosfoniowego w acetonitrylu (2 mL).

Dane spektroskopowe otrzymanych związków były zgodne z danymi literaturowymi.¹⁷⁵

2.1.3.2 Otrzymywanie 1-(N-benzyloksykarbonyloamino)metylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu metodą *step-by-step*

1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-etoksymetanofosfonian dietylu **3a** (1.0 mmol, 345 mg, 1.0 ekw.) oraz tetrafluoroboran trifenylofosfoniowy (1.1 mmol, 385 mg, 1.1 ekw.) rozpuszczono w DCM (5 mL) w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość ogrzewano w łaźni olejowej w temperaturze 85°C pod zmniejszonym ciśnieniem przez 5 godzin, uzyskując sól fosfoniową **4** (R¹ = H) w formie żywicy. Następnie, sól **4** (R¹ = H) rozpuszczono w acetonitrylu (4 mL), dodano fosforyn trietylu (1.5 mmol, 249 mg, 258 µL, 1.5 ekw.) oraz zasadę *Hüniga* (0.4 mmol, 52 mg, 70 µL, 0.4 ekw.). Mieszaninę ogrzewano w temperaturze 70°C przez 8 godzin. Produkt **5a** wyizolowano i oczyszczono w analogiczny sposób jak w procedurze opisanej w rozdziale 2.1.3.1.

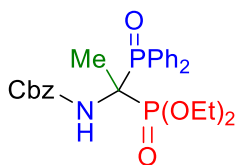
2.1.4 Otrzymywanie fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów 1-(N-benzylksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu



Schemat 50

2.1.4.1 Otrzymywanie fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów 1-(N-benzylksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów metodą *one-pot*

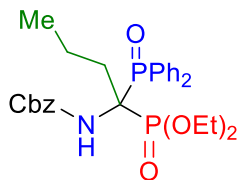
Syntezę fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych analogów 1-(N-benzylksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów **6** oraz **7** prowadzono w sposób analogiczny jak syntezę 1-(N-acyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **5** (szczegółowo opisaną w punkcie 2.1.3.1), stosując difenylofosfinin metylu (1.5 mmol, 324 mg, 300 μL) lub fenylofosfonin dietylu (1.5 mmol, 297 mg, 270 μL) w roli nukleofila. Produkty izolowano wykorzystując ekstrakcję toluenem (3x5 mL) oraz chromatografię kolumnową (DCM/MeOH 20:1, v/v, następnie DCM/MeOH 40:1, v/v dla **6b-e**, **6g** oraz **7b-d**, **7f**, **7g** lub AcOEt/Hex/MeOH 14:4:1, v/v/v, następnie DCM/MeOH 40:1, v/v dla **7e**).



DCM, 40 °C, 6h, 57%

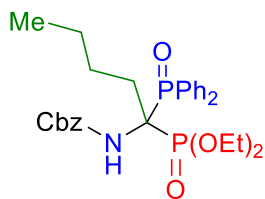
1-(N-Benzylksykarbonyloamino)-1-(difenylofosforylo)etanofosfonian dietylu (6b). Olej; 57% (292 mg). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.08-7.98 (m, 4H), 7.58-7.42 (m, 6H), 7.39-7.31 (m, 5H), 5.77 (br s, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.17-3.88 (m, 4H), 1.98 (t, $J = 16.6$ Hz, 3H), 1.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.16 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 154.5 (br s), 136.5, 132.9 (d, $J = 8.7$ Hz), 132.9 (d, $J = 8.3$ Hz), 132.4 (d, $J = 3.1$ Hz), 129.6 (dd, $J = 97.3, 2.5$ Hz), 129.4 (dd, $J = 96.8, 1.9$ Hz), 128.6, 128.5 (d, $J = 11.8$ Hz), 128.4 (d, $J = 11.8$ Hz), 128.3, 128.2, 66.9, 63.8 (d, $J = 7.6$ Hz), 63.6 (d, $J = 7.2$ Hz), 58.5 (dd, $J = 146.5$,

65.7 Hz), 17.2 (d, $J = 3.8$ Hz), 16.5 (d, $J = 5.3$ Hz), 16.4 (d, $J = 5.3$ Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 32.1 (d, $J = 23.3$ Hz), 20.2 (d, $J = 23.5$ Hz). IR (ATR) 3383, 1735, 1229, 1019, 965, 743 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 516.1705, znalezienie 516.1697.



t.p, 6h, 76%

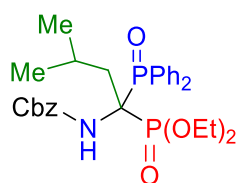
1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)butanofosfonian dietylu (6c). Bezbarwne kryształy; 76% (413 mg); t.t. 135.5-137.0°C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.32-8.27 (m, 2H), 7.97-7.92 (m, 2H), 7.59-7.46 (m, 4H), 7.42-7.31 (m, 7H), 6.19 (dd, $J = 13.0, 6.6$ Hz, 1H), 5.06 i 5.00 (ABq, $J = 12.4$ Hz, 2H), 4.20-4.10 (m, 1H), 4.05-3.97 (m, 1H), 3.93-3.84 (m, 1H), 3.75-3.65 (m, 1H), 2.56-2.41 (m, 1H), 2.13-1.98 (m, 1H), 1.51-1.33 (m, 2H), 1.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 0.62 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 154.7 (br s), 136.6, 133.4 (d, $J = 8.7$ Hz), 133.0 (d, $J = 9.1$ Hz), 132.3 (d, $J = 2.7$ Hz), 132.0 (d, $J = 3.1$ Hz), 131.7 (d, $J = 97.5$ Hz), 129.0 (d, $J = 98.6$ Hz), 128.6, 128.4 (d, $J = 12.0$ Hz), 128.3, 128.2, 128.0 (d, $J = 12.1$ Hz), 66.9, 63.8 (d, $J = 7.5$ Hz), 62.5 (dd, $J = 147.9, 60.7$ Hz), 62.9 (d, $J = 7.6$ Hz), 32.7, 17.4 (dd, $J = 7.8, 5.9$ Hz), 16.6 (d, $J = 5.3$ Hz), 16.2 (d, $J = 6.1$ Hz), 14.3. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 34.7 (d, $J = 16.8$ Hz), 20.9 (d, $J = 16.7$ Hz). IR (ATR) 3182, 1727, 1541, 1442, 1257, 1057, 961, 692 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 544.2018, znalezienie 544.2014.



t.p, 3h, 53%
lub 40 °C, 3h, 76%

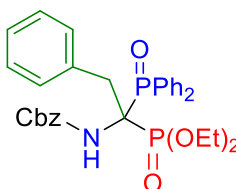
1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)pentanofosfonian dietylu (6d). Bezbarwne kryształy; 76% (423 mg); t.t. 131.5-134°C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.34-8.29 (m, 2H), 7.96-7.91 (m, 2H), 7.58-7.29 (m, 11H), 6.25 (dd, $J = 13.4, 7.0$ Hz, 1H), 5.08 i 5.00 (ABq, $J = 12.4$ Hz, 2H), 4.20-4.10 (m, 1H), 4.05-3.95 (m, 1H), 3.92-3.82 (m, 1H), 3.73-3.63 (m, 1H), 2.59-2.43 (m, 1H), 2.13-1.99 (m, 1H), 1.46-1.36 (m, 1H), 1.35-1.27 (m, 1H), 1.23 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.06 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.96-0.87 (m, 1H), 0.62 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 154.7 (br s), 136.6, 133.4 (d, $J = 8.8$ Hz), 133.1 (d, $J = 9.5$ Hz), 132.4 (d, $J = 3.1$ Hz), 130.0 (d, $J = 3.1$ Hz), 131.8 (d,

$J = 98.6$ Hz), 128.8 (d, $J = 99.2$ Hz), 128.6, 128.4 (d, $J = 12.1$ Hz), 128.2, 128.2, 127.9 (d, $J = 12.2$ Hz), 66.9, 63.7 (d, $J = 7.3$ Hz), 62.9 (d, $J = 7.6$ Hz), 62.3 (dd, $J = 148.3, 60.6$ Hz), 30.3, 25.6 (dd, $J = 7.6, 5.3$ Hz), 22.8, 16.6 (d, $J = 5.4$ Hz), 16.2 (d, $J = 6.1$ Hz), 13.6. **^{31}P NMR** (162 MHz, CDCl_3) δ 34.9 (d, $J = 16.0$ Hz), 20.9 (d, $J = 16.4$ Hz). **IR** (ATR) 3184, 1727, 1542, 1442, 1261, 1026, 1026, 960, 692 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 558.2174, znalezienie 558.2173.



t.p., 3h, 55%

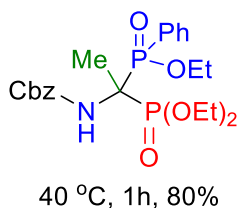
1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylofosforylo)-3-metylobutanofosfonian dietylu (6e). Bezbarwne kryształy; 55% (306 mg). **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3) δ 8.46-8.40 (m, 2H), 7.92-7.86 (m, 2H), 7.69-7.29 (m, 11H), 6.58 (dd, $J = 17.2, 8.8$ Hz, 1H), 5.10 i 5.04 (ABq, $J = 12.2$ Hz, 2H), 4.18-4.09 (m, 1H), 3.99-3.91 (m, 1H), 3.81-3.73 (m, 1H), 3.62-3.52 (m, 1H), 2.45-2.31 (m, 1H), 2.06-1.95 (m, 1H), 1.88-1.81 (m, 1H), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.01 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.36 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3) δ 154.7 (br d, $J = 7.0$ Hz), 136.6, 133.7 (d, $J = 9.1$ Hz), 133.3 (d, $J = 9.7$ Hz), 132.4 (d, $J = 3.0$ Hz), 132.2 (d, $J = 98.8$ Hz), 132.0 (d, $J = 3.0$ Hz), 128.5, 128.3 (d, $J = 12.2$ Hz), 128.3, 128.2 (d, $J = 99.7$ Hz), 128.1, 127.6 (d, $J = 12.5$ Hz), 66.9, 63.6 (d, $J = 7.4$ Hz), 63.1 (dd, $J = 150.4, 60.1$ Hz), 62.6 (d, $J = 7.7$ Hz), 38.4, 24.7 (dd, $J = 10.5, 6.1$ Hz), 24.2, 24.0, 16.5 (d, $J = 5.3$ Hz), 16.1 (d, $J = 6.5$ Hz). **^{31}P NMR** (162 MHz, CDCl_3) δ 37.2 (d, $J = 14.2$ Hz), 20.6 (d, $J = 14.8$ Hz). **IR** (ATR) 2957, 1732, 1438, 1233, 1022, 961, 695 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 558.2174, znalezienie 558.2167.



t.p., 2h, 77%

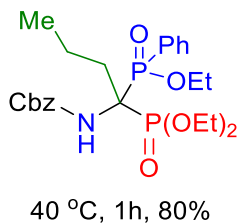
1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylofosforylo)-2-fenyletanofosfonian dietylu (6g). Bezbarwne kryształy; 77% (459 mg); t.t. 132.5-134.5°C. **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15-8.09 (m, 4H), 7.55-7.26 (m, 11H), 7.15-6.99 (m, 5H), 5.94 (dd, $J = 14.4, 8.0$ Hz, 1H), 5.05 i 4.96 (ABq, $J = 12.0$ Hz, 2H), 3.98-3.53 (m, 6H), 1.07 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 0.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H). **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3) δ 154.9 (dd, $J = 11.5, 4.3$

Hz), 136.3, 135.2 (dd, $J = 9.6, 6.2$ Hz), 133.6 (d, $J = 9.1$ Hz), 133.2 (d, $J = 9.1$ Hz), 132.0 (d, $J = 3.0$ Hz), 131.9 (d, $J = 2.9$ Hz), 131.1, 131.1 (dd, $J = 9.6, 1.8$ Hz), 130.7 (d, $J = 90.3$ Hz), 128.6, 128.5, 128.3, 128.1 (d, $J = 12.1$ Hz), 127.9 (d, $J = 12.2$ Hz), 127.7, 126.7, 67.1, 63.9 (dd, $J = 145.7, 60.0$ Hz), 63.2 (d, $J = 7.2$ Hz), 63.0 (d, $J = 7.6$ Hz), 35.8, 16.2 (d, $J = 5.7$ Hz), 16.0 (d, $J = 6.5$ Hz). **^{31}P NMR** (162 MHz, CDCl_3) δ 36.3 (br s), 19.6 (d, $J = 8.6$ Hz). **IR** (ATR) 3193, 1732, 1542, 1239, 1022, 975, 694 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 592.2018, znalezienie 592.2005.



1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenyl)fosforylo]etanofosfonian

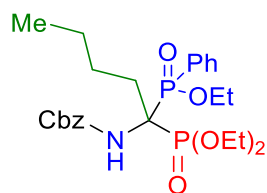
dietylu (7b). Olej; 80% (384 mg), dr 1:1.4. **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3) δ 7.85–7.80 (m, 2H)^a, 7.78–7.29 (m, 8H)^a, 5.58 (br s, 1H)^b, 5.46 (br s, 1H)^b, 4.98 (s, 2H)^b, 4.94 i 4.91 (ABq, $J = 12.2$ Hz, 2H)^b, 4.31–4.05 (m, 6H)^a, 1.90 (t, $J = 17.2$ Hz, 3H)^b, 1.85 (t, $J = 17.2$ Hz, 3H)^b, 1.36 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 1.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)^b. **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3) δ 154.2 (br s)^a, 136.3^a, 133.4 (d, $J = 9.1$ Hz)^b, 133.4 (d, $J = 9.1$ Hz)^b, 132.8 (d, $J = 2.9$ Hz)^b, 132.7 (d, $J = 2.9$ Hz)^b, 128.5^b, 128.4^b, 128.2 (d, $J = 12.4$ Hz)^b, 128.2 (d, $J = 13.2$ Hz)^b, 128.2^a, 128.1^b, 128.1^b, 128.0 (dd, $J = 130.1, 3.1$ Hz)^b, 127.8 (dd, $J = 132.5, 3.1$ Hz)^b, 66.6^b, 66.5^b, 63.9 (d, $J = 7.0$ Hz)^b, 63.6 (d, $J = 7.4$ Hz)^b, 63.5 (d, $J = 7.2$ Hz)^b, 63.4 (d, $J = 7.4$ Hz)^b, 62.7 (d, $J = 7.0$ Hz)^b, 62.5 (d, $J = 6.7$ Hz)^b, 57.3 (dd, $J = 146.8, 97.3$ Hz)^b, 57.4 (dd, $J = 145.1, 98.3$ Hz)^b, 16.5–16.3 (m),^a 16.1 (br s)^b, 16.0 (br s)^b. **^{31}P NMR** (162 MHz, CDCl_3) δ 37.8 (d, $J = 21.5$ Hz), 37.4 (d, $J = 23.4$ Hz), 19.9 (d, $J = 22.2$ Hz), 19.7 (d, $J = 23.3$ Hz). **IR** (ATR) 2983, 1738, 1501, 1228, 1017, 954, 821, 749, 695 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NO}_7\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 484.1654, znalezienie 484.1643. ^aNakładające się sygnały diastereoizomerów. ^bOsobny sygnał diastereoizomeru.



1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenyl)fosforylo]butanofosfonian

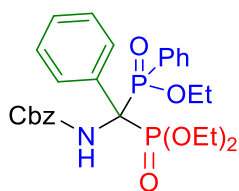
dietylu (7c). Olej; 80% (409 mg), dr 1:1.6. **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87–7.81 (m, 2H)^a, 7.56–7.52 (m, 1H)^a, 7.43–7.32 (m, 7H)^a, 5.54–5.48 (m, 1H)^a, 5.04 i 4.96 (ABq, $J = 13.4$

Hz, 2H)^b, 4.97 (s, 2H)^b, 4.26-4.00 (m, 6H)^a, 2.39-2.12 (m, 2H)^a, 1.68-1.59 (m, 1H)^a, 1.57-1.45 (m, 1H)^a, 1.34-1.28 (m, 6H)^a, 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 0.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 0.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 154.3 (br s)^a, 136.5^a, 133.8 (d, $J = 9.6$ Hz)^b, 133.7 (d, $J = 9.5$ Hz)^b, 132.7 (d, $J = 3.5$ Hz)^b, 132.7 (d, $J = 3.3$ Hz)^b, 129.2 (dd, $J = 128.2, 2.6$ Hz)^b, 129.0 (d, $J = 131.1$ Hz)^b, 128.6^a, 128.3^b, 128.3^b, 128.3^a, 128.2 (d, $J = 12.4$ Hz)^b, 128.1 (d, $J = 12.8$ Hz)^b, 66.9^a, 63.6 (d, $J = 7.2$ Hz)^b, 63.6 (d, $J = 7.3$ Hz)^b, 63.4 (d, $J = 6.8$ Hz)^b, 63.4 (d, $J = 6.4$ Hz)^b, 62.4 (d, $J = 7.0$ Hz)^a, 62.0 (dd, $J = 144.1, 94.4$ Hz)^b, 61.9 (dd, $J = 143.6, 94.1$ Hz)^b, 32.4 (d, $J = 4.0$ Hz)^b, 32.0 (d, $J = 3.5$ Hz)^b, 18.0 (dd, $J = 7.1, 4.3$ Hz)^b, 17.8 (dd, $J = 6.5, 5.1$ Hz)^b, 16.7-16.4 (m),^a 14.7^b, 14.6^b. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 38.8 (d, $J = 18.7$ Hz), 38.1 (d, $J = 20.3$ Hz), 20.0 (d, $J = 20.4$ Hz), 19.7 (d, $J = 18.5$ Hz). IR (ATR) 2976, 1737, 1488, 1247, 1234, 1021, 957, 748, 695 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z : obliczone dla C₂₄H₃₆NO₇P₂ [M+H]⁺ 512.1967, znalezione 512.1964. ^aNakładające się sygnały diastereoizomerów. ^bOsobny sygnał diastereoizomeru.



40 °C, 1h, 82%

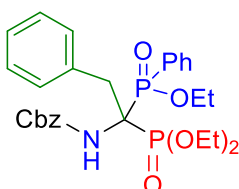
1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenilo)fosforylo]pentanofosfonian dietylu (7d). Bezbarwne kryształy; 82% (430 mg), dr 1:1.5. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.88-7.81 (m, 2H)^a, 7.56-7.52 (m, 1H)^a, 7.43-7.32 (m, 7H)^a, 5.55-5.47 (m, 1H)^a, 5.04 i 4.96 (ABq, $J = 12.2$ Hz, 2H)^b, 4.98 (s, 2H)^b, 4.25-4.00 (m, 6H)^a, 2.43-2.12 (m, 2H)^a, 1.64-1.53 (m, 1H)^a, 1.51-1.42 (m, 1H)^a, 1.34-1.22 (m, 11H)^a, 0.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 0.83 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 154.3 (br s)^a, 136.6^a, 133.8 (d, $J = 9.9$ Hz)^b, 133.7 (d, $J = 10.3$ Hz)^b, 132.7 (d, $J = 3.4$ Hz)^b, 132.7 (d, $J = 3.1$ Hz)^b, 129.1 (dd, $J = 127.1, 2.6$ Hz)^b, 129.0 (d, $J = 130.2$ Hz)^b, 128.6^a, 128.3^a, 128.3^a, 128.2 (d, $J = 13.6$ Hz)^b, 128.1 (d, $J = 12.8$ Hz)^b, 66.9^a, 63.6 (d, $J = 7.2$ Hz)^a, 63.4 (d, $J = 7.6$ Hz)^b, 63.4 (d, $J = 7.3$ Hz)^b, 62.4 (d, $J = 7.0$ Hz)^b, 62.4 (d, $J = 7.0$ Hz)^b, 61.9 (dd, $J = 144.2, 94.5$ Hz)^b, 61.8 (dd, $J = 143.8, 94.1$ Hz)^b, 30.2 (d, $J = 4.2$ Hz)^b, 29.8 (d, $J = 3.4$ Hz)^b, 26.5 (dd, $J = 6.9, 4.2$ Hz)^b, 26.4 (t, $J = 5.5$ Hz)^b, 23.4^b, 23.3^b, 16.7-16.4 (m),^a 14.0^a. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 38.9 (d, $J = 18.4$ Hz), 38.1 (d, $J = 19.9$ Hz), 20.0 (d, $J = 19.8$ Hz), 19.9 (d, $J = 18.6$ Hz). IR (ATR) 2960, 1737, 1498, 1232, 1021, 955, 747, 696 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z : obliczone dla C₂₅H₃₈NO₇P₂ [M+H]⁺ 526.2124, znalezione 526.2126. ^aNakładające się sygnały diastereoizomerów. ^bOsobny sygnał diastereoizomeru.



t.p., 24h, 62%

Główny diastereoizomer 1-(N-benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenilo)-fosforylo]fenylometanofosfonian dietylu (7e'). Olej; 50% (270 mg). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.52-7.17 (m, 15H), 6.04 (br s, 1H), 5.09-4.99 (m, 2H), 4.14-3.98 (m, 6H), 1.27 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.16 (br s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 154.5 (br s), 136.5 (br s), 134.1 (d, $J = 9.2$ Hz), 132.7 (d, $J = 3.1$ Hz), 131.5 (br s), 128.8 (t, $J = 5.0$ Hz), 128.5, 128.3 (br s), 127.7, 127.6, 127.3 (t, $J = 2.3$ Hz), 67.2, 66.6 (dd, $J = 144.3, 86.0$ Hz), 64.0 (d, $J = 7.5$ Hz), 63.7 (d, $J = 7.2$ Hz), 63.0 (d, $J = 7.1$ Hz), 16.5 (d, $J = 6.1$ Hz), 16.4 (d, $J = 6.4$ Hz), 16.4 (d, $J = 5.7$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 36.5 (d, $J = 11.8$ Hz), 17.1 (d, $J = 11.7$ Hz). **IR** (ATR) 2981, 1747, 1495, 1247, 1236, 1018, 953, 727, 694 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{NO}_7\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 546.1811, znalezienie 546.1808.

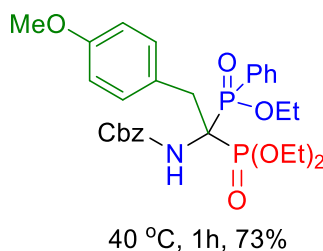
Poboczny diastereoizomer 1-(N-benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenilo)-fosforylo]fenylometanofosfonian dietylu (7e''). Olej; 12% (67 mg). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.49-7.12 (m, 15H), 6.14 (br s), 5.11-5.07 (m, 2H), 4.32-3.82 (m, 6H), 1.32 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.17 (br s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 154.4 (br s), 136.5 (br s), 133.7 (d, $J = 9.2$ Hz), 132.6 (d, $J = 3.1$ Hz), 128.8-128.2 (m), 127.7, 127.6, 127.4 (t, $J = 2.5$ Hz), 67.1, 66.0 (dd, $J = 140.0, 86.0$ Hz), 64.1 (d, $J = 7.2$ Hz), 63.9 (d, $J = 7.2$ Hz), 63.6 (d, $J = 7.2$ Hz), 16.6 (d, $J = 5.7$ Hz), 16.5 (d, $J = 5.3$ Hz), 16.4 (d, $J = 5.7$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 38.6 (d, $J = 6.8$ Hz), 17.3 (d, $J = 6.9$ Hz). **IR** (ATR) 2923, 1744, 1590, 1239, 1023, 971, 877, 744, 696 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{NO}_7\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 546.1810, znalezienie 546.1805.



40 °C, 1h, 91%

1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenilo)fosforylo]-2-fenyletano-fosfonian dietylu (7f). Bezbarwne kryształy; 91% (509 mg), dr 1:1.7. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.97-7.84 (m, 2H)^a, 7.54-7.11 (m, 13H)^a, 5.54 (dd, $J = 16.4, 8.6$ Hz, 1H)^b, 5.39 (dd, $J = 11.6, 8.1$ Hz, 1H)^b, 5.22 i 5.10 (ABq, $J = 12.0$ Hz, 2H)^b, 5.05 (s, 2H)^b, 4.25-

3.57 i 3.45-3.40 (m, 8H)^a, 1.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 1.18 (td, $J = 7.1, 0.7$ Hz, 3H)^b, 1.14 (td, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 3H)^b, 1.11 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.08 (td, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 3H)^b, 1.05 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 154.9 (dd, $J = 8.0, 7.9$ Hz)^b, 154.7 (dd, $J = 14.5, 2.7$ Hz)^b, 136.3^a, 135.6 (dd, $J = 11.7, 4.3$ Hz)^b, 135.4 (dd, $J = 8.7, 7.5$ Hz)^b, 133.8 (d, $J = 10.0$ Hz)^b, 133.7 (d, $J = 9.9$ Hz)^b, 132.4 (d, $J = 2.9$ Hz)^b, 132.3 (d, $J = 2.9$ Hz)^b, 131.3^b, 131.1^b, 129.6 (d, $J = 131.0$ Hz)^b, 129.5 (d, $J = 130.8$ Hz)^b, 128.5^a, 128.4^b, 128.3^b, 128.3^b, 128.1^b, 127.7 (d, $J = 13.3$ Hz)^b, 127.7 (d, $J = 15.2$ Hz)^b, 127.6^a, 126.6^b, 126.5^b, 67.0^b, 66.9^b, 63.4 (d, $J = 7.3$ Hz)^b, 63.2 (d, $J = 7.0$ Hz)^b, 63.1 (d, $J = 7.7$ Hz)^b, 62.9 (dd, $J = 143.7, 93.6$ Hz)^b, 62.9 (dd, $J = 143.2, 94.1$ Hz)^b, 62.8 (d, $J = 7.5$ Hz)^b, 62.3 (d, $J = 7.0$ Hz)^b, 61.6 (d, $J = 6.8$ Hz)^b, 35.2 (t, $J = 3.4$ Hz)^b, 34.8^b, 16.4 (d, $J = 6.1$ Hz)^b, 16.1 (d, $J = 6.2$ Hz)^b, 16.0 (d, $J = 6.2$ Hz)^b, 16.0 (d, $J = 6.4$ Hz)^b, 16.0 (d, $J = 6.1$ Hz)^b. **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 39.3 (d, $J = 6.8$ Hz), 36.7 (d, $J = 6.0$ Hz), 19.1 (d, $J = 7.1$ Hz), 18.4 (d, $J = 8.4$ Hz). **IR** (ATR) 2928, 1737, 1498, 1244, 1019, 954, 751, 698 cm⁻¹. **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla C₂₈H₃₆NO₇P₂ [M+H]⁺ 590.1967, znalezione 590.1965. ^aNakładające się sygnały diastereoizomerów. ^bOsobny sygnał diastereoizomeru.

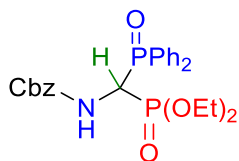


1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenilo)fosforylo]-2-(4-metoks-fenilo)etanofosfonian dietylu (7g). Olej; 73% (418 mg), dr 1:1.7. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95–7.83 (m, 2H)^a, 7.54–7.10 (m, 10H)^a, 6.71–6.66 (m, 2H)^a, 5.54 (dd, $J = 16.3, 8.7$ Hz, 1H)^b, 5.38 (dd, $J = 11.7, 8.1$ Hz, 1H)^b, 5.21 i 5.09 (ABq, $J = 12.2$ Hz, 2H)^b, 5.04 (s, 2H)^b, 4.25–3.38 (m, 8H)^a, 3.75 (s, 3H)^b, 3.74 (s, 3H)^b, 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H)^b, 1.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 1.17 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H)^b, 1.12 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.11 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.08 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 158.5^b, 158.5^b, 155.0 (t, $J = 8.0$ Hz)^b, 154.8 (dd, $J = 13.8, 2.7$ Hz)^b, 136.4^a, 133.9 (d, $J = 10.6$ Hz)^b, 133.8 (d, $J = 10.0$ Hz)^b, 132.5 (d, $J = 2.9$ Hz)^b, 132.4 (d, $J = 3.0$ Hz)^b, 132.4^b, 132.2^b, 129.8 (d, $J = 130.9$ Hz)^b, 129.7 (d, $J = 130.5$ Hz)^b, 128.6^b, 128.6^b, 128.5^b, 128.4^b, 128.4^b, 128.2^b, 127.8 (d, $J = 13.3$ Hz)^b, 127.8 (d, $J = 13.3$ Hz)^b, 127.5 (dd, $J = 9.2, 4.4$ Hz)^b, 127.4 (t, $J = 8.2$ Hz)^b, 113.1^a, 67.1^b, 67.0^b, 63.5 (d, $J = 7.2$ Hz)^b, 63.3 (d, $J = 7.0$ Hz)^b, 63.2 (d, $J = 7.5$ Hz)^b, 63.0 (dd, $J = 143.4, 93.7$ Hz)^b, 63.0 (dd, $J = 143.0, 94.0$ Hz)^b, 63.0 (d, $J = 7.6$ Hz)^b, 62.4 (d, $J = 6.9$ Hz)^b, 61.8 (d, $J = 6.8$ Hz)^b, 55.3^b, 55.2^b, 34.5 (br s)^b, 34.1^b, 16.5 (d, $J = 6.0$ Hz)^b, 16.3 (d, $J = 6.1$ Hz)^b, 16.3 (d, $J = 6.0$ Hz)^b, 16.2 (d, $J = 6.1$ Hz)^b, 16.1 (d, $J = 6.1$ Hz)^b, 16.1 (d, $J = 6.1$ Hz)^b. **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃) δ 39.1 (d, $J = 7.5$ Hz), 36.8 (d, $J = 8.5$ Hz), 19.3

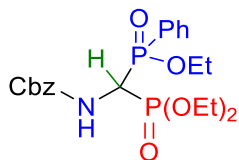
(d, $J = 7.6$ Hz), 18.6 (d, $J = 8.6$ Hz). **IR** (ATR) 2928, 1732, 1511, 1247, 1019, 950, 822, 747, 696 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_8\text{NaP}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 612.1892, znalezione 612.1887. ^aNakładające się sygnały diastereoizomerów. ^bOsobny sygnał diastereoizomeru.

2.1.4.2 Otrzymywanie 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylofosforylo)-metanofosfonianu dietylu i 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenilo)fosforylo]metanofosfonianu dietylu metodą *step-by-step*

Syntezę 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylofosforylo)metanofosfonianu dietylu **6a** i 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenilo)fosforylo]metanofosfonianu dietylu **7a** przeprowadzono w sposób analogiczny jak syntezę ich symetrycznego analogu **5a** (opisaną szczegółowo w punkcie 2.1.3.2), stosując difenylofosfinin metyłu (1.5 mmol, 324 mg, 300 μL) lub fenylfosfonin dietylu (1.5 mmol, 297 mg, 270 μL) w roli nukleofila. Reakcje z nukleofilami fosforowymi prowadzono w temperaturze 60°C przez 6 godzin. Produkty izolowano za pomocą ekstrakcji toluenem oraz chromatografii kolumnowej (DCM/MeOH 20:1, v/v, następnie DCM/MeOH 40:1, v/v).



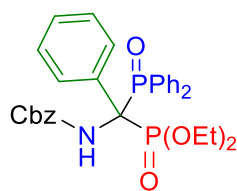
1-(*N*-Benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylofosforylo)metanofosfonian dietylu (6a**)**. Bezbarwne kryształy; 65% (325 mg); t.t. 206-207.5°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93-7.80 (m, 4H), 7.56-7.15 (m, 11H), 5.54 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 5.17 (ddd, $J = 21.2, 10.6, 10.0$ Hz, 1H), 4.99 i 4.97 (ABq, $J = 12.4$ Hz, 2H), 4.13-3.95 (m, 4H), 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.15 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 155.8 (br s), 136.0, 132.5 (d, $J = 2.9$ Hz), 132.4 (d, $J = 2.9$ Hz), 131.6 (d, $J = 9.8$ Hz), 131.4 (d, $J = 9.5$ Hz), 130.7 (d, $J = 100.7$ Hz), 128.7 (d, $J = 12.2$ Hz), 128.6 (d, $J = 12.4$ Hz), 128.6, 128.3, 128.1, 67.6, 63.8 (d, $J = 7.1$ Hz), 63.3 (d, $J = 6.8$ Hz), 48.9 (dd, $J = 146.0, 66.7$ Hz), 16.4 (d, $J = 6.0$ Hz), 16.2 (d, $J = 5.7$ Hz). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 29.4 (d, $J = 19.3$ Hz), 16.6 (d, $J = 19.1$ Hz). **IR** (ATR) 3193, 1705, 1540, 1254, 1019, 978, 750 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 502.1548, znalezione 502.1542.



1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-[etoksy(fenyl)fosforylo]metanofosfonian dietylu (7a). Olej; 77% (363 mg), dr 1:1. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.86-7.80 (m, 2H)^a, 7.58-7.52 (m, 1H)^a, 7.47-7.41 (m, 2H)^a, 7.37-7.28 (m, 4H)^a, 7.19-7.17 (m, 1H)^a, 5.43 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H)^b, 5.25 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H)^b, 5.07 i 5.05 (ABq, $J = 12.2$ Hz, 2H)^b, 4.95 (s, 2H)^b, 4.71 (ddd, $J = 23.2, 21.6, 10.8$ Hz, 1H)^b, 4.67 (td, $J = 21.6, 10.8$ Hz, 1H)^b, 4.29-4.01 (m, 6H)^a, 1.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 1.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H)^b, 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b, 1.21 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H)^b. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 155.6 (dd, $J = 5.0, 4.0$ Hz)^b, 155.4 (t, $J = 4.6$ Hz)^b, 136.1^b, 136.1^b, 133.1 (d, $J = 3.0$ Hz)^b, 133.0 (d, $J = 2.9$ Hz)^b, 132.3 (d, $J = 10.1$ Hz)^b, 132.3 (d, $J = 9.9$ Hz)^b, 129.0 (dd, $J = 133.6, 3.1$ Hz)^b, 128.9 (dd, $J = 134.7, 4.6$ Hz)^b, 128.6^b, 128.6^b, 128.6 (d, $J = 12.9$ Hz)^b, 128.5 (d, $J = 13.3$ Hz)^b, 128.4^b, 128.3^b, 128.0^a, 67.7^b, 67.5^b, 63.6 (d, $J = 6.6$ Hz)^b, 63.5 (d, $J = 6.9$ Hz)^b, 63.5 (d, $J = 6.3$ Hz)^b, 63.4 (d, $J = 5.9$ Hz)^b, 62.6 (d, $J = 6.6$ Hz)^b, 62.3 (d, $J = 6.5$ Hz)^b, 49.3 (dd, $J = 146.6, 96.8$ Hz)^b, 48.5 (dd, $J = 143.7, 100.3$ Hz)^b, 16.6 (d, $J = 5.9$ Hz)^b, 16.6 (d, $J = 6.0$ Hz)^b, 16.5 (d, $J = 5.9$ Hz)^b, 16.4 (d, $J = 5.9$ Hz)^b, 16.4 (d, $J = 6.2$ Hz)^b, 16.4 (d, $J = 6.1$ Hz)^b. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 33.6 (d, $J = 21.3$ Hz), 32.6 (d, $J = 27.2$ Hz), 16.6 (d, $J = 21.3$ Hz), 16.3 (d, $J = 27.6$ Hz). **IR** (ATR) 2926, 1705, 1585, 1266, 1024, 972, 877, 744, 696 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NO}_7\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 470.1498, znalezione 470.1494. ^aNakładające się sygnały diastereoizomerów. ^bOsobny sygnał diastereoizomeru.

2.1.4.3 Otrzymywanie 1-(N-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylofosforylo)fenylometanofosfonianu dietylu metodą *step-by-step*

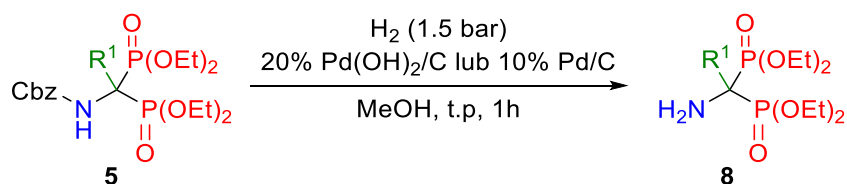
1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-etoksyfenylometanofosfonian dietylu **3g** (1.0 mmol, 421 mg, 1.0 ekw.) oraz tetrafluoroboran trifenylofosfoniowy (1.1 mmol, 385 mg, 1.1 ekw.) rozpuszczono w dichlorometanie (5 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 40 minut. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik, a otrzymaną pozostałość suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 40 minut. Uzyskaną w ten sposób sól fosfoniową **4** (Schemat 50, $\text{R}^1 = \text{Ph}$) rozpuszczono w dichlorometanie (4 mL), po czym wkroplono difenylofosfinin metylu (1.5 mmol, 324 mg, 300 μL). Reakcję prowadzono w temperaturze 40°C przez 6 godzin. Produkt **6f** wyizolowano i oczyszczono analogicznie jak związki **6b-e**, **6g** oraz **7b-d**, **7f**, **7g**.



1-(N-Benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)fenylometanofosfonian dietylu (6f). Olej; 52% (289 mg). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.99-7.95 (m, 2H), 7.79-7.75 (m, 2H), 7.51-7.10 (m, 16H), 6.54 (dd, $J = 9.8, 7.0$ Hz, 1H), 5.03 i 4.91 (ABq, $J = 12.4$ Hz, 2H), 4.13-3.86 (m, 4H), 1.11 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 154.6 (br s), 136.3, 133.6 (d, $J = 9.0$ Hz), 133.4 (d, $J = 8.8$ Hz), 132.2 (d, $J = 2.9$ Hz), 132.1 (d, $J = 3.0$ Hz), 131.9 (d, $J = 10.2$ Hz), 130.2 (d, $J = 97.2$ Hz), 128.7 (t, $J = 5.0$ Hz), 128.5, 128.2, 127.9 (d, $J = 12.1$ Hz), 127.8 (d, $J = 12.1$ Hz), 127.7 (t, $J = 2.7$ Hz), 127.2 (t, $J = 2.3$ Hz), 67.5 (dd, $J = 146.7, 56.4$ Hz), 67.2, 64.4 (d, $J = 5.0$ Hz), 63.6 (d, $J = 7.6$ Hz), 16.4 (d, $J = 5.7$ Hz), 16.3 (d, $J = 6.1$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 38.3 (br s), 17.3 (d, $J = 9.2$ Hz). **IR** (ATR) 2927, 1741, 1438, 1236, 1026, 969, 697 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 578.1861, znalezione 578.1847.

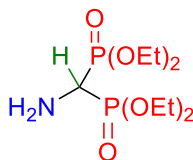
2.1.5 Katalityczne uwodornienie N-Cbz zabezpieczonych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych

2.1.5.1 Katalityczna redukcja 1-(N-benzyloksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu

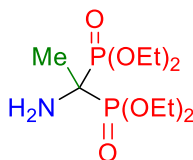


Schemat 51

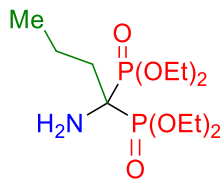
Do szklanego naczynia reakcyjnego, dedykowanego do reaktora firmy Parr, wprowadzano roztwór 1-(N-benzyloksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **5** (1.0 mmol) w metanolu (10 mL) oraz katalizator: 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.1 g) lub 10% Pd/C (0.2 g). Mieszaninę reakcyjną wytrząsano w reaktorze firmy Parr pod ciśnieniem wodoru 1.5 bar przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji katalizator oddzielano przez sączenie pod obniżonym ciśnieniem przez warstwę celitu, a przesącz zatężano na wyparce rotacyjnej. Otrzymane produkty stosowano w kolejnych etapach syntezy bez dodatkowego oczyszczania.



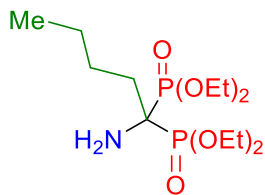
1-Aminometylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu (8a).¹⁵⁶ Olej; 99% (300 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.27-4.20 (m, 8H), 3.42 (t, J = 20.6 Hz, 1H), 1.67 (br s, 2H), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 12H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 63.3 (d, J = 3.2 Hz), 63.3 (d, J = 2.5 Hz), 63.3 (d, J = 2.8 Hz), 63.3 (d, J = 3.3 Hz), 47.9 (t, J = 144.6 Hz), 16.6 (d, J = 3.0 Hz), 16.6 (d, J = 2.9 Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 20.2. IR (ATR) 3478, 2983, 1239, 1017, 970 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 304.1079, znalezienie 304.1077.



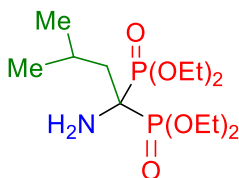
1-Aminoetylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu (8b).²⁰² Olej; 99% (314 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.27-4.19 (m, 8H), 1.74 (br s, 2H), 1.55 (t, J = 16.3 Hz, 3H), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 12H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 63.5 (d, J = 3.4 Hz), 63.4 (d, J = 3.4 Hz), 63.4 (d, J = 3.6 Hz), 63.3 (d, J = 3.5 Hz), 53.0 (t, J = 146.3 Hz), 20.1 (t, J = 3.8 Hz), 16.6 (d, J = 3.0 Hz), 16.6 (d, J = 3.0 Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 23.5. IR (ATR) 3488, 2982, 1235, 1016, 962 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.1235, znalezienie 318.1237.



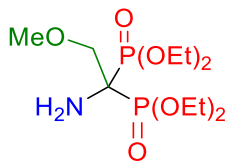
1-Aminobutyldenno-1,1-bisfosfonian tetraetylu (8c). Olej; 95% (328 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.26-4.18 (m, 8H), 1.96-1.83 (m, 2H), 1.76 (br s, 2H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.35 (t, J = 7.1, 12H), 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 63.0 (d, J = 3.5 Hz), 63.0 (d, J = 3.4 Hz), 63.0 (d, J = 3.8 Hz), 63.0 (d, J = 3.3 Hz), 56.7 (t, J = 143.1 Hz), 36.4 (t, J = 2.6 Hz), 17.0 (t, J = 5.9 Hz), 16.4 (d, J = 3.0 Hz), 16.4 (d, J = 3.0 Hz), 14.6. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 23.4. IR (ATR) 3474, 2975, 1231, 1018, 962 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 346.1548, znalezienie 346.1547.



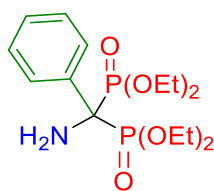
1-Aminopentylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu. (8d). Olej; 97% (348 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.26-4.17 (m, 8H), 1.98-1.85 (m, 2H), 1.76 (br s, 2H), 1.60-1.52 (m, 2H), 1.38-1.28 (m, 2H), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 63.1 (d, $J = 3.1$ Hz), 63.1 (d, $J = 3.6$ Hz), 56.7 (t, $J = 142.5$ Hz), 33.9 (t, $J = 2.7$ Hz), 25.7 (t, $J = 5.6$ Hz), 23.3, 16.5 (d, $J = 3.0$ Hz), 16.5 (d, $J = 3.0$ Hz), 13.8. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 23.5. IR (ATR) 3428, 2960, 1231, 1017, 966 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 360.1705, znalezione 360.1700.



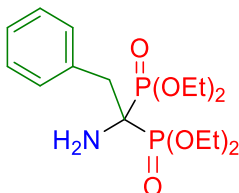
1-Amino-3-metylobutylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu (8e). Olej; 98% (351 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.28-4.21 (m, 8H), 2.22-1.19 (m, 1H), 1.90 (td, $J = 15.3, 5.5$ Hz, 2H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 12H), 1.02 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 63.6 (d, $J = 3.6$ Hz), 63.6 (d, $J = 4.0$ Hz), 57.8 (t, $J = 142.5$ Hz), 41.8 (t, $J = 2.9$ Hz), 25.2, 24.6 (t, $J = 6.9$ Hz), 16.6 (d, $J = 3.0$ Hz), 16.6 (d, $J = 2.8$ Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 22.8. IR (ATR) 2980, 1236, 1018, 961 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 360.1705, znalezione 360.1699.



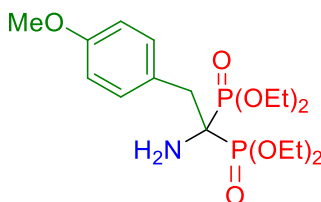
1-Amino-2-metoksyetylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu (8f). Olej; 97% (336 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.26-4.17 (m, 8H), 3.79 (dd, $J = 12.6, 11.4$ Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 1.98 (br s, 2H), 1.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 74.1 (t, $J = 1.9$ Hz), 63.4 (d, $J = 3.4$ Hz), 63.4 (d, $J = 3.4$ Hz), 63.4 (d, $J = 3.4$ Hz), 63.3 (d, $J = 3.5$ Hz), 58.6 (t, $J = 141.2$ Hz), 59.5, 16.6 (d, $J = 2.7$ Hz), 16.6 (d, $J = 3.1$ Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 21.2. IR (ATR) 2982, 2931, 1240, 1016, 962 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{11}\text{H}_{28}\text{NO}_7\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.1341, znalezione 348.1336.



1-Aminofenylometylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu. (8g).²⁰² Olej; 99% (375 mg). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.91-7.87 (m, 2H), 7.39-7.35 (m, 2H), 7.32-7.28 (m, 1H), 4.19-4.12 (m, 4H), 4.07-3.99 (m, 2H), 3.91-3.81 (m, 2H), 2.07 (br s, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 1.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 134.1 (t, *J* = 5.2 Hz), 128.1 (t, *J* = 2.5 Hz), 127.9 (t, *J* = 2.8 Hz), 127.4 (t, *J* = 5.0 Hz), 64.1 (d, *J* = 3.5 Hz), 64.1 (d, *J* = 3.5 Hz), 63.7 (d, *J* = 3.6 Hz), 63.7 (d, *J* = 3.7 Hz), 60.4 (t, *J* = 140.5 Hz), 16.5 (d, *J* = 3.0 Hz), 16.5 (d, *J* = 3.1 Hz), 16.4 (d, *J* = 3.0 Hz), 16.3 (d, *J* = 3.1 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 19.2. IR (ATR) 2980, 2933, 1239, 1015, 958 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₁₅H₂₈NO₆P₂ [M+H]⁺ 380.1392, znalezienie 380.1389.



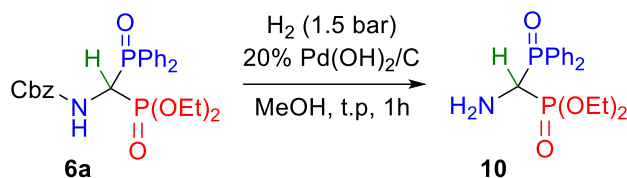
1-Amino-2-fenyletylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu (8h). Olej; 100% (413 mg). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.22 (m, 5H), 4.23-4.07 (m, 8H), 3.32 (t, *J* = 14.2 Hz, 2H), 1.91 (br s, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 135.2 (t, *J* = 8.5 Hz), 131.4, 127.9, 127.0, 63.4 (d, *J* = 3.5 Hz), 63.3 (d, *J* = 3.5 Hz), 63.2 (d, *J* = 3.5 Hz), 63.1 (d, *J* = 3.5 Hz), 57.6 (t, *J* = 143.3 Hz), 38.8, 16.5 (d, *J* = 3.0 Hz), 16.4 (d, *J* = 3.1 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 22.1. IR (ATR) 2981, 1244, 1023, 968 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₁₆H₂₉NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 416.1368, znalezienie 416.1382.



1-Amino-2-(4-metoksyfenylo)etylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu (8i).¹⁰⁷ Olej; 98% (413 mg). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28-7.26 (m, 2H), 6.84-6.80 (m, 2H), 4.21-4.11 (m, 8H), 3.79 (s, 3H), 3.27 (t, *J* = 14.7 Hz, 2H), 1.78 (br s, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 158.9, 132.5, 127.1 (t, *J* = 8.4 Hz), 113.4, 63.4 (d, *J* = 3.5 Hz), 63.3 (d, *J* = 3.4 Hz), 63.2 (d, *J* = 3.5 Hz), 63.2 (d, *J* = 3.8 Hz), 57.6 (t,

$J = 143.1$ Hz), 55.4, 38.0 (t, $J = 2.1$ Hz), 16.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 16.5 (d, $J = 3.0$ Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 22.4. IR (ATR) 3462, 2984, 1512, 1236, 1017, 969 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{NO}_7\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 424.1654, znalezione 424.1650.

2.1.5.2 Katalityczne uwodornienie 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)metanofosfonianu dietylu



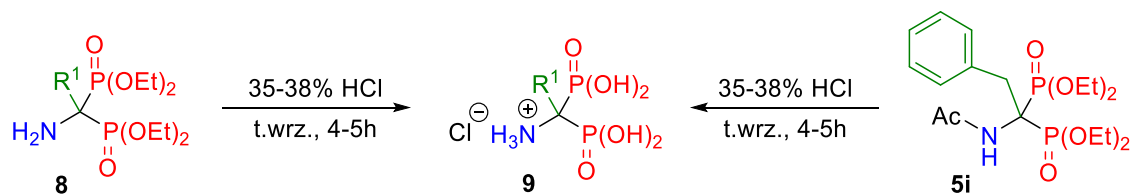
Schemat 52

Redukcję 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)-1-(difenylfosforylo)metanofosfonianu dietylu **6a** (0.1 mmol, 50.1 mg) prowadzono w sposób analogiczny jak redukcję 1-(*N*-benzyloksykarbonyloamino)alkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **5**, stosując 5-krotnie większą ilość katalizatora $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (50 mg). Produkt wyizolowano jak opisano w punkcie 2.1.5.1 i dodatkowo oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej ($\text{AcOEt}/\text{Hex}/\text{MeOH}$ 14:4:1, v/v/v).

1-Amino-1-(difenylfosforylo)metanofosfonian dietylu (10). Olej; 87% (32.1 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.99-7.90 (m, 4H), 7.57-7.46 (m, 6H), 4.19-3.94 (m, 5H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 132.2 (d, $J = 2.7$ Hz), 132.2 (d, $J = 2.7$ Hz), 132.0 (d, $J = 9.0$ Hz), 131.9 (d, $J = 9.2$ Hz), 131.4 (dd, $J = 98.7, 2.0$ Hz), 131.1 (dd, $J = 99.8, 3.7$ Hz), 128.7 (d, $J = 11.9$ Hz), 128.5 (d, $J = 11.9$ Hz), 63.3 (d, $J = 6.9$ Hz), 62.9 (d, $J = 7.1$ Hz), 50.6 (dd, $J = 142.9, 66.1$ Hz), 16.4 (d, $J = 5.9$ Hz), 16.4 (d, $J = 6.1$ Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 28.5 (d, $J = 13.6$ Hz), 20.8 (d, $J = 13.4$ Hz). IR (ATR) 3383, 1639, 1438, 1229, 1182, 1015, 974 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{NO}_4\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 368.1181, znalezione 368.1176.

2.1.6 Otrzymywanie kwasów 1-amino-1,1-bisfosforowych

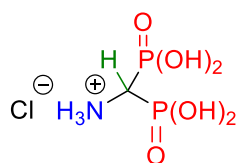
2.1.6.1 Hydroliza 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu



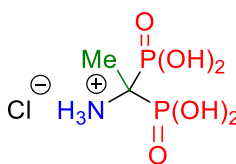
Schemat 53

Do kolby okrągłodennej o objętości 5 mL wprowadzano 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu **8** (0.5 mmol) lub 1-(*N*-acetyloamino)-2-fenyletylideno-1,1-

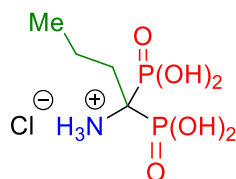
bisfosfonian tetraetylu **5i** (0.5 mmol) oraz roztwór stężonego kwasu solnego (1.2 mL). Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia przez 4-5 godzin. Po zakończeniu reakcji z kolby odparowywano lotne składniki na wyparce rotacyjnej, a pozostałość kilkakrotnie rozpuszczano w wodzie (1.5 mL) i ponownie odparowywano, celem całkowitego usunięcia pozostałości lotnych zanieczyszczeń. Produkt krystalizowano z wody.



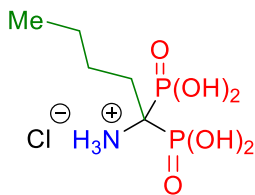
Chlorowodorek kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego (9a).²⁰³ Białe kryształy; 91% (103 mg), t.t. 292-294°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O+NaOD) δ 2.76 (t, *J* = 17.6 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O+NaOD) δ 54.2 (t, *J* = 127.5 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, D₂O+NaOD) δ 17.6. IR (ATR) 2967, 1601, 1522, 910, 756 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla CH₇NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 213.9646, znalezione 213.9699.



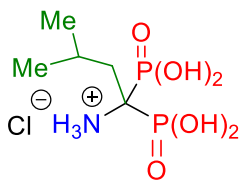
Chlorowodorek kwasu 1-aminoetylideno-1,1-bisfosfonowego (9b).¹⁰⁶ Białe kryształy; 81% (97.3 mg), t.t. 263-265°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 1.35 (br t, *J* = 13.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 56.7 (t, *J* = 130.4 Hz), 20.5 (t, *J* = 3.0 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ 13.2. IR (ATR) 2899, 1593, 1507, 1105, 912, 772 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₂H₉NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 227.9803, znalezione 227.9796.



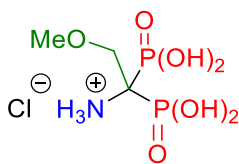
Chlorowodorek kwasu 1-aminobutylideno-1,1-bisfosfonowego (9c).¹⁰⁶ Białe kryształy; 88% (118.5 mg), t.t. 245-247°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 2.08-1.97 (m, 2H), 1.61-1.55 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 60.2 (t, *J* = 125.8 Hz), 36.9 (t, *J* = 2.4 Hz), 20.3 (t, *J* = 5.7 Hz), 16.8. ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ 12.7. IR (ATR) 2972, 2185, 1532, 1125, 1051, 913 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₄H₁₃NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 256.0116, znalezione 256.0115.

**Chlorowodorek kwasu 1-aminopentylideno-1,1-bisfosfonowego (9d).**¹⁰⁶

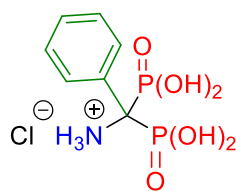
Jasnobeżowe kryształy; 92% (129.7 mg), t.t. 242-243°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 2.11-2.00 (m, 2H), 1.59-1.51 (m, 2H), 1.40-1.31 (m, 2H), 0.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 60.1 (t, *J* = 126.1 Hz), 34.4, 28.8 (t, *J* = 5.5 Hz), 25.6, 16.0. ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ 12.8. IR (ATR) 2968, 1549, 1156, 1051, 1003, 914, 831 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₅H₁₅NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 270.0272, znalezione 270.0273.

**Chlorowodorek kwasu 1-amino-3-metylobutylideno-1,1-bisfosfonowego (9e).**

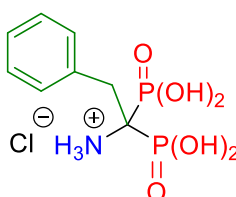
Jasnobeżowe kryształy; 83% (117.7 mg), t.t. 230-231°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 2.19-2.13 (m, 1H), 2.05-1.97 (m, 2H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 61.0 (t, *J* = 125.3 Hz), 42.8 (t, *J* = 2.3 Hz), 27.0, 27.0 (t, *J* = 6.7 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ 12.8. IR (ATR) 2967, 1599, 1522, 1143, 908, 775 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₅H₁₅NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 270.0272, znalezione 270.0274.

**Chlorowodorek kwasu 1-amino-2-metoksyetylideno-1,1-bisfosfonowego (9f).**²⁰⁴

Białe kryształy; 64% (86.5 mg), t.t. 228°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.92 (dd, *J* = 11.5, 8.5 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 74.2, 62.0, 60.8 (t, *J* = 123.0 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ 10.0. IR (ATR) 2938, 2189, 1610, 1522, 1151, 1070, 981, 908 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₃H₁₁NO₇NaP₂ [M+Na]⁺ 257.9908, znalezione 257.9900.

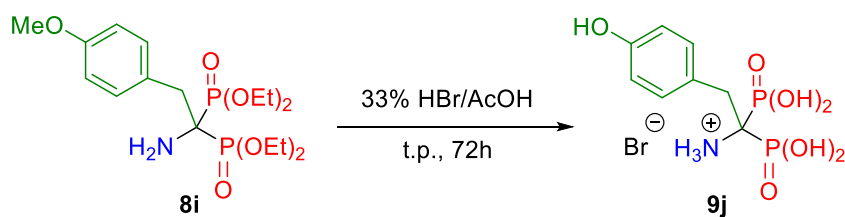


Chlorowodorek kwasu 1-amino-1-fenylometylideno-1,1-bisfosfonowego (9g).²⁰² Jasnobieżowe kryształy; 92% (139.8 mg), t.t. 227-228°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.66-7.63 (m, 2H), 7.48-7.41 (m, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 136.1, 131.5, 130.8, 128.8 (t, *J* = 4.4 Hz), 65.0 (t, *J* = 124.0 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, D₂O) δ 10.2. IR (ATR) 2954, 1611, 1513, 1132, 1034, 902 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₇H₁₁NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 289.9959, znalezione 289.9963.



Chlorowodorek kwasu 1-amino-2-fenyletylideno-1,1-bisfosfonowego (9h).¹⁴ Jasnobieżowe kryształy; 85% (134.5 mg), t.t. 228-231°C (rozkład). ¹H NMR (400 MHz, D₂O+NaOD) δ 7.51-7.49 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 1H), 3.28 (t, *J* = 12.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O+NaOD) δ 139.9 (t, *J* = 6.9 Hz), 132.0, 127.4, 125.5, 57.3 (t, *J* = 130.7 Hz), 40.2. ³¹P NMR (162 MHz, D₂O+NaOD) δ 20.5. IR (ATR) 2965, 1601, 1517, 1162, 1004, 912, 745 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₈H₁₃NO₆NaP₂ [M+Na]⁺ 304.0116, znalezione 304.0114.

2.1.6.2 Otrzymywanie bromowodoru kwasu 1-amino-2-(4-hydroksyfenylo)-etylideno-1,1-bisfosfonowego



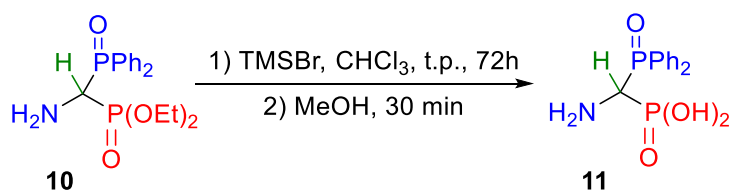
Schemat 54

Do kolby okrągłodennej o objętości 5 mL wprowadzono 1-amino-2-(4-metoksyfenylo)etylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu **8i** (0.35 mmol, 148.2 mg) oraz 33% roztwór HBr w kwasie octowym (2.0 mL). Zawartość kolby mieszano w temperaturze pokojowej przez 72 godziny. Po zadany czasie z mieszaniny reakcyjnej odparowano części lotne na wyparce rotacyjnej, a pozostałość kilkakrotnie rozpuszczano w wodzie (1.5 mL) i ponownie odparowywano, celem całkowitego

usunięcia pozostałości lotnych zanieczyszczeń. Produkt krystalizowano z wody i przemywano metanolem.

Bromowodorek kwasu 1-amino-2-(4-hydroksyfenylo)etylideno-1,1-bisfosfonowego (9j). Jasnobieżowe kryształy; 89% (117.6 mg), t.t. 227-229°C (rozkład). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$) δ 7.20-7.18 (m, 2H), 6.56-6.54 (m, 2H), 3.13 (t, $J = 12.6$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$) δ 166.6, 136.2, 128.1 (t, $J = 6.7$ Hz), 120.5, 60.3 (t, $J = 130.5$ Hz), 42.1. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, $\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$) δ 20.8. **IR** (ATR) 2950, 1604, 1518, 1145, 1029, 906, 752 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_7\text{NaP}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 320.0066, znalezione 320.0065.

2.1.6.3 Otrzymywanie kwasu 1-amino-1-(difenylfosforylo)metanofosfonowego



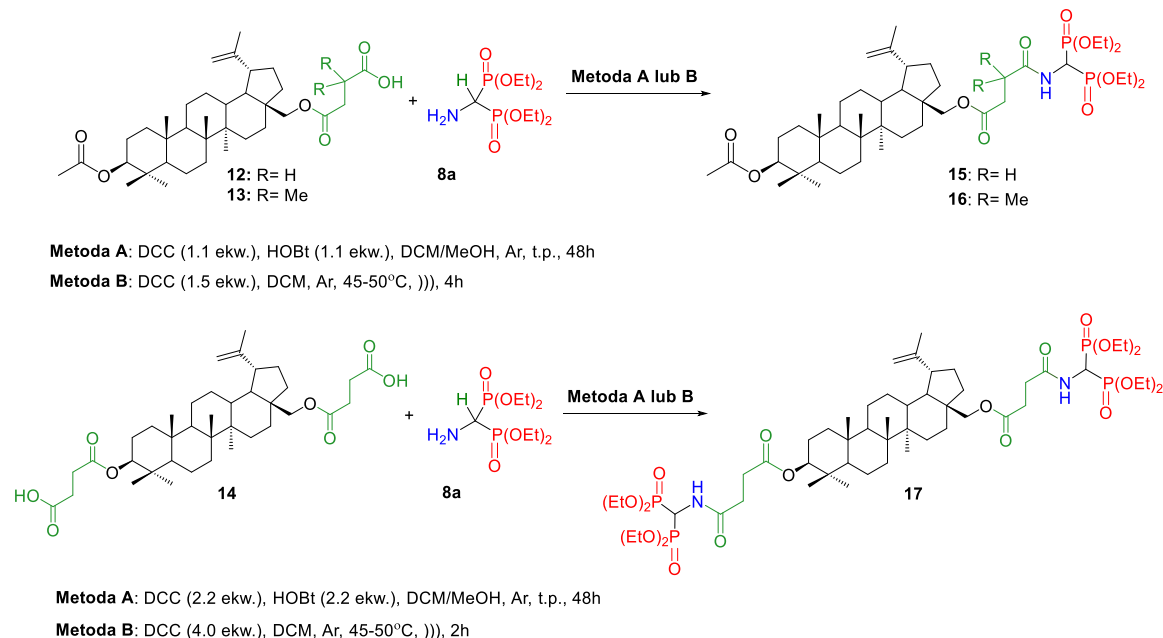
Schemat 55

Do roztworu 1-amino-1-(difenylfosforylo)metanofosfonianu dietylu **10** (0.04 mmol, 14.4 mg, 1.0 ekw.) w chloroformie (0.7 mL) wprowadzono bromek trimetylosililu (0.4 mmol, 61 mg, 53 μL , 10.0 ekw.). Zawartość kolby mieszano w temperaturze pokojowej przez 72 godziny. Po tym czasie odparowano części lotne na wyparce rotacyjnej, a uzyskaną pozostałość rozpuszczono w metanolu (0.7 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie ponownie odparowano części lotne na wyparce rotacyjnej, a produkt wysuszone pod obniżonym ciśnieniem.

Kwas 1-amino-1-(difenylfosforylo)metanofosfonowy (11). Beżowe kryształy; 99% (12.1 mg), t.t. 217°C (rozkład). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 8.04–7.94 oraz 7.72–7.53 (m, 10H), 4.81 (dd, $J = 19.2, 9.8$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) δ 134.5 (d, $J = 2.9$ Hz), 134.3 (d, $J = 2.9$ Hz), 133.4 (d, $J = 10.3$ Hz), 132.6 (d, $J = 10.1$ Hz), 130.6 (dd, $J = 104.1, 3.8$ Hz), 130.4 (d, $J = 12.5$ Hz), 129.8 (d, $J = 104.3$ Hz), 129.7 (d, $J = 13.0$ Hz).^a $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CD_3OD) δ 28.6, 8.5. **IR** (ATR) 2850, 1589, 1521, 1437, 1174, 1117, 930 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_4\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.0555, znalezione 312.0558. ^aSygnał atomu węgla w pozycji α ukryty pod sygnałem resztkowym rozpuszczalnika w zakresie 48.4-49.6 ppm.

2.2 Otrzymywanie koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu

2.2.1 Otrzymywanie koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z pochodnymi betuliny



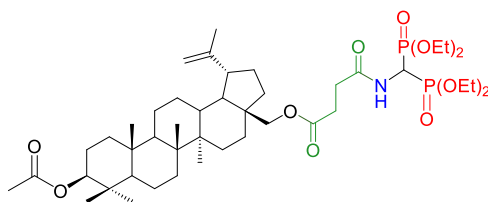
Schemat 56

Metoda A

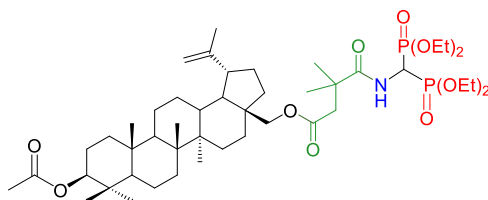
Do kolby okrągłodennej wprowadzano pochodną betuliny **12**, **13** lub **14** (0.10 mmol, 1.0 ekw.), 1-hydroksybenzotriazol (0.11 mmol, 14.9 mg, 1.1 ekw. dla **12** oraz **13** lub 29.8 mg, 0.22 mmol, 2.2 ekw. dla **14**) oraz *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC, 0.11 mmol, 22.7 mg, 1.1 ekw. dla **12** oraz **13** lub 0.22 mmol, 45.4 mg, 2.2 ekw. dla **14**). Kolbę zamykano septą, przedmuchiwano argonem z balonika, po czym wprowadzano dichlorometan (4.5 mL). Całość mieszano w temperaturze 0–5°C przez 15 minut, a następnie w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po tym czasie, przez septę, do kolby wprowadzano roztwór 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** (0.2 mmol, 60.6 mg, 2.0 ekw. dla **12** oraz **13** lub 0.4 mmol, 121.2 mg, 4.0 ekw. dla **14**) w dichlorometanie (2.4 mL) oraz metanol (0.25 mL). Reakcję kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Po jej zakończeniu, z kolby odparowywano części lotne na wyparce rotacyjnej, a surowy produkt izolowano z uzyskanej pozostałości przez ekstrakcję z fazy stałej przy użyciu octanu etylu (3 x 5 mL). Po połączeniu ekstraktów i odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt oczyszczano dwukrotnie za pomocą chromatografii kolumnowej (AcOEt/MeOH, gradient 20:1 do 5:1, v/v).

Metoda B

Do szklanej fiolki zakręcaną gwintowaną nakrętką wprowadzano 1-amino-1,1-metylidenobisfosfonian tetraetylu **8a** (0.2 mmol, 60.6 mg, 2.0 ekw. dla reakcji z udziałem substratu **12** oraz **13** lub 0.4 mmol, 121.2 mg, 4.0 ekw. dla **14**), pochodną betuliny **12**, **13** lub **14** (0.10 mmol, 1.0 ekw.), DCC (0.15 mmol, 30.9 mg, 1.5 ekw. dla **12** oraz **13** lub 0.4 mmol, 82.5 mg, 4.0 ekw. dla **14**) oraz dichlorometan (5 mL). Mieszaninę przedmuchiwano argonem, probówkę umieszczano w laboratoryjnej myjce ultradźwiękowej i prowadzono reakcję w temperaturze 45-50°C przez 2-4 godziny. Produkty izolowano i oczyszczano jak w metodzie A.

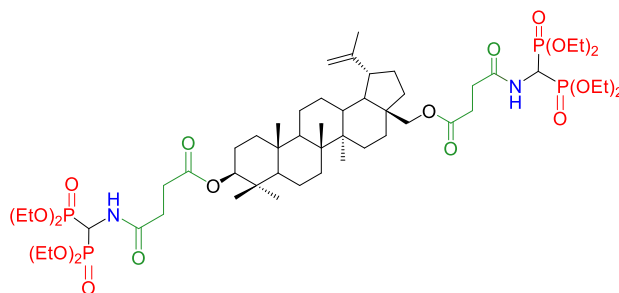


3-OAc-28-SANHCH(PO(OEt)₂)₂BN (15). Żywica; 61% (metoda A), 91% (metoda B). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.19 (br d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 5.01 (td, *J* = 21.7, 10.1 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 2.6, 1H), 4.59-4.58 (m, 1H), 4.46 (dd, *J* = 11.1, 5.3 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.24-4.15 (m, 8H), 3.87 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 2.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.42 (td, *J* = 11.0, 5.7 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.92-0.77 (m, 24H), 1.68 (s, 3H), 1.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.34 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.02 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.84 (s, 6H), 0.83 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.0, 171.1, 170.6 (t, *J* = 4.1 Hz), 150.2, 110.0, 81.0, 63.8 (d, *J* = 3.1 Hz), 63.8 (d, *J* = 3.1 Hz), 63.7 (d, *J* = 3.2 Hz), 63.7 (d, *J* = 3.2 Hz), 63.2, 55.5, 50.4, 48.9, 47.9, 46.6, 43.8 (t, *J* = 146.1 Hz), 42.8, 41.0, 38.5, 37.9, 37.7, 37.2, 34.7, 34.2, 30.9, 29.9, 29.7, 29.5, 28.1, 27.2, 25.3, 23.8, 21.4, 20.9, 19.2, 18.3, 16.6, 16.6 (d, *J* = 2.9 Hz), 16.5 (d, *J* = 3.0 Hz), 16.5 (d, *J* = 3.1 Hz), 16.4 (d, *J* = 3.1 Hz), 16.3, 16.1, 14.9. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ 16.2. IR (ATR) 2923, 1732, 1247, 1035 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₄₅H₇₈NO₁₁P₂ [M+H]⁺ 870.5050, znalezione 870.5054.



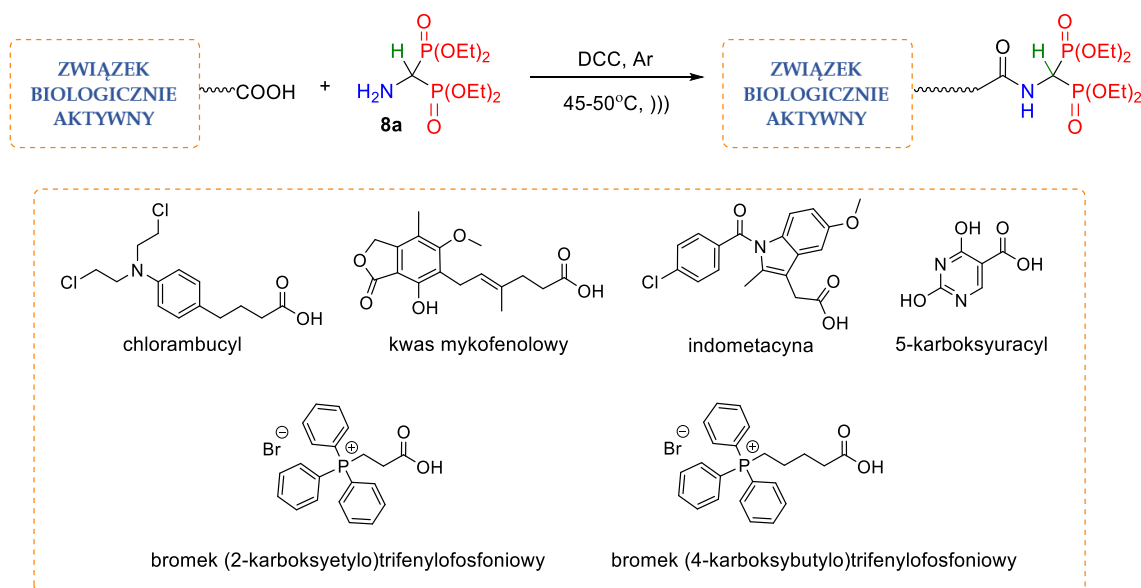
3-OAc-28-DMSANHCH(PO(OEt)₂)₂BN (16). Żywica; 77% (metoda A), 92% (metoda B). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.53 (br d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 5.05 (td, *J* = 21.6, 9.9 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.58-4.59 (m, 1H), 4.47 (dd, *J* = 10.9, 5.4 Hz, 1H), 4.26-4.17 (m, 9H), 3.83 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 2.63 (s, 2H), 2.41 (td, *J* = 10.9, 5.7 Hz, 1H), 2.04 (s, 3H),

1.94-0.78 (m, 24H), 1.68 (s, 3H), 1.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.32 (br s, 6H), 1.01 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.84 (s, 6H), 0.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 175.9 (t, $J = 3.9$ Hz), 171.8, 171.1, 150.2, 110.0, 81.0, 63.7 (d, $J = 3.1$ Hz), 63.7 (d, $J = 3.1$ Hz), 63.6 (d, $J = 3.1$ Hz), 63.6 (d, $J = 3.2$ Hz), 62.7, 55.5, 50.4, 48.9, 47.9, 46.5, 43.7, 43.7 (t, $J = 145.6$ Hz), 42.8, 41.0, 40.9, 38.5, 37.9, 37.7, 37.2, 34.7, 34.2, 29.9, 29.7, 28.1, 27.1, 25.6, 25.6, 25.3, 23.8, 21.4, 20.9, 19.2, 18.3, 16.6, 16.6 (d, $J = 2.9$ Hz), 16.5 (d, $J = 3.0$ Hz), 16.5 (d, $J = 3.2$ Hz), 16.4 (d, $J = 3.1$ Hz), 16.3, 16.1, 14.8. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 16.5. IR (ATR) 2941, 1733, 1245, 1028 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{47}\text{H}_{82}\text{NO}_{11}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 898.5363, znalezienie 898.5369.



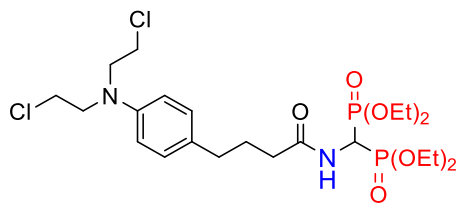
3,28-bis(SANHCH(PO(OEt) $_2$) $_2$)BN (17). Żywica; 34% (metoda A), 69% (metoda B). ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.51 (br d, $J = 10.1$ Hz, 2H), 5.03 (td, $J = 21.7, 10.1$ Hz, 2H), 4.68 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.59-4.58 (m, 1H), 4.47 (dd, $J = 9.5, 6.8$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.22-4.15 (m, 16H), 3.86 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 2.70-2.58 (m, 8H), 2.42 (td, $J = 11.2, 5.6$ Hz, 1H), 1.98-0.76 (m, 24H), 1.68 (s, 3H), 1.35-1.32 (m, 24H), 1.02 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.83 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 172.9, 172.3, 170.8 (t, $J = 8.0$ Hz), 170.7 (t, $J = 7.9$ Hz), 150.2, 110.0, 81.5, 63.8-63.6 (m), 63.1, 55.5, 50.4, 48.9, 47.8, 46.5, 43.7 (t, $J = 146.2$ Hz), 43.7 (t, $J = 146.2$ Hz), 42.8, 41.0, 38.5, 37.9, 37.7, 37.2, 34.6, 34.2, 30.9, 30.8, 29.8, 29.8, 29.7, 29.4, 28.1, 27.1, 25.3, 23.8, 20.9, 19.2, 18.2, 16.6, 16.4-16.5 (m), 16.2, 16.1, 14.8. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 16.3, 16.3. IR (ATR) 2984, 1737, 1236, 1044 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{56}\text{H}_{101}\text{NO}_{18}\text{P}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1213.6000, znalezienie 1213.6082.

2.2.2 Otrzymywanie koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu z chlorambucylem, kwasem mykofenolowym, indometacyną oraz bromkami karboksyalkylotrifenylfosfoniowymi

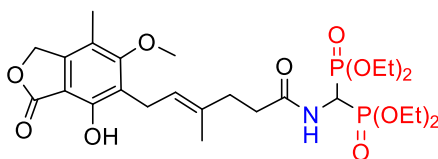


Schemat 57

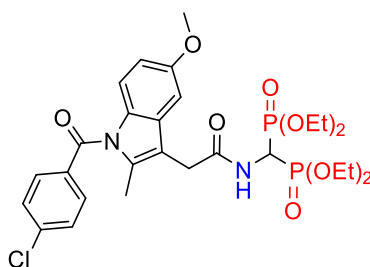
Do szklanej fiolki zakręcaną gwintowaną nakrętką wprowadzano 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu **8a** (0.5 mmol, 151.6 mg, 1.0 ekw.) i odpowiednio chlorambucyl, kwas mykofenolowy, indometacynę, bromek (2-karboksyetylo)trifenylfosfoniowy lub bromek (4-karboksybutylo)trifenylfosfoniowy (0.5 mmol, 1.0 ekw.) oraz DCC (0.6 mmol, 123.8 mg, 1.2 ekw.). Fiolkę przedmuchiwano argonem, po czym dodawano chloroform (3 mL). Probówkę umieszczano w laboratoryjnej myjce ultradźwiękowej i prowadzono reakcję w temperaturze 40-45°C w czasie od 30 minut do 2 godzin. Po zadany czasie mieszaninę reakcyjną chłodzono w łaźni wodno-łodowej. Roztwór oddzielano od wytrącającego się osadu *N,N'*-dicykloheksylomocznika (DCU), a następnie przenoszono do kolby okrągłodennej, odparowywano z niego części lotne, a pozostałość suszono pod obniżonym ciśnieniem. Z osadu DCU można przeprowadzić dodatkową ekstrakcję produktu (z fazy stałej) przy użyciu octanu etylu (3x5 mL). Produkty oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej (DCM/MeOH 20:1, v/v, dla **18-20** lub DCM/MeOH 10:1, v/v, dla **22** i **23**).



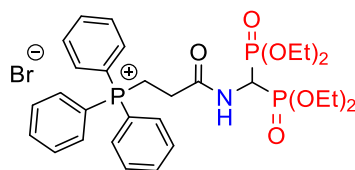
Koniugat 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z chlorambucylem (1-(N-(4-(4-(bis(2-chloroetylo))amino)fenylo)butanoiloamino)metylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu, **18**). Żywica; 90% (255.1 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.10-7.07 (m, 2H), 6.68-6.66 (m, 2H), 5.96 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.06 (td, J = 21.6, 10.1 Hz, 1H), 4.27-4.15 (m, 8H), 3.73-3.69 (m, 4H), 3.65-3.61 (m, 4H), 2.57 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.24 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.93 (qi, J = 7.3 Hz, 2H), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.33 (t, J = 7.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 171.8 (t, J = 4.0 Hz), 144.4, 130.4, 129.7, 112.2, 63.7 (d, J = 3.1 Hz), 63.7 (d, J = 3.2 Hz), 63.4 (d, J = 3.3 Hz), 63.4 (d, J = 3.2 Hz), 53.6, 43.3 (t, J = 147.0 Hz), 40.5, 35.4, 33.7, 27.3, 16.4 (d, J = 3.0 Hz), 16.4 (d, J = 2.8 Hz), 16.3 (d, J = 3.0 Hz), 16.3 (d, J = 3.1 Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 16.4. IR (ATR) 3248, 2981, 1672, 1519, 1255, 1023, 976 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}_2\text{Cl}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 589.1766, znalezienie 589.1761.



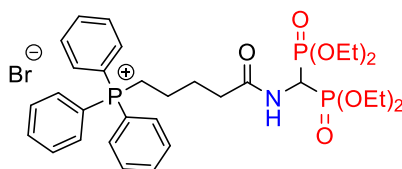
Koniugat 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z kwasem mykofenolowym (**19**). Żywica; 90% (273.2 mg). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (br s, 1H), 6.36 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.27 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 5.20 (s, 2H), 5.04 (td, J = 21.7, 10.1 Hz, 1H), 4.27-4.13 (m, 8H), 3.78 (s, 3H), 3.39 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.40-2.35 (m, 2H), 2.33-2.29 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 172.8, 171.8 (t, J = 4.0 Hz), 163.7, 153.7, 144.2, 134.3, 122.9, 122.1, 116.7, 106.5, 70.0, 63.7 (d, J = 3.1 Hz), 63.7 (d, J = 3.2 Hz), 63.5 (d, J = 3.1 Hz), 63.5 (d, J = 3.2 Hz), 61.0, 43.4 (t, J = 147.1 Hz), 35.1, 35.0, 22.6, 16.4 (d, J = 2.9 Hz), 16.4 (d, J = 3.4 Hz), 16.4 (d, J = 3.8 Hz), 16.3 (d, J = 3.1 Hz), 16.2, 11.6. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 16.4. IR (ATR) 3246, 2982, 1732, 1671, 1254, 1015, 967 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_{11}\text{NaP}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 628.2053, znalezienie 628.2053.



Koniugat 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z indometacyną (20). Żółte kryształy; 93% (297.8 mg), t.t. 146-148°C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.70-7.66 (m, 2H), 7.50-7.47 (m, 2H), 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.70 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.23 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.98 (td, $J = 21.4, 10.0$ Hz, 1H), 4.21-4.01 (m, 8H), 3.83 (s, 3H), 3.70 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 169.1 (t, $J = 4.0$ Hz), 168.3, 156.4, 139.6, 136.4, 133.8, 131.3, 131.0, 130.2, 129.3, 115.2, 112.3, 112.2, 101.1, 63.7 (d, $J = 3.1$ Hz), 63.7 (d, $J = 3.1$ Hz), 63.5 (d, $J = 3.2$ Hz), 63.5 (d, $J = 3.2$ Hz), 55.7, 43.9 (t, $J = 146.6$ Hz), 32.0, 16.4 (d, $J = 3.1$ Hz), 16.4 (d, $J = 3.4$ Hz), 16.3 (d, $J = 3.4$ Hz), 16.3 (d, $J = 3.0$ Hz), 13.4. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 15.9. **IR** (ATR) 3255, 2980, 1672, 1588, 1529, 1475, 1441, 1320, 1231, 1141, 1090, 1024, 983, 948. **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}_2\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 643.1741, znalezione 643.1724.

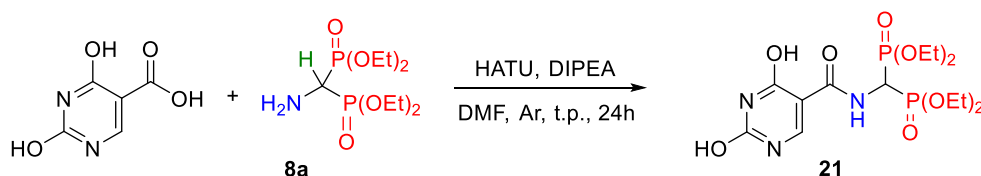


Koniugat 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z bromkiem (2-karboksyetylo)trifenylfosfoniowym (bromek 3-(bis(dietoksyfosforylo)-metylidenoamino)-3-oksopropylotrifenylfosfoniowy, 22). Żywica; 94% (328.7 mg). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.78 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 7.84-7.69 (m, 15H), 5.01 (td, $J = 22.7, 10.0$ Hz, 1H), 4.31-4.17 (m, 8H), 3.85-3.78 (m, 2H), 3.20-3.13 (m, 2H), 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.31 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.1 (dt, $J = 15.9, 4.5$ Hz), 135.4 (d, $J = 3.0$ Hz), 133.9 (d, $J = 10.1$ Hz), 130.8 (d, $J = 12.7$ Hz), 118.0 (d, $J = 86.6$ Hz), 63.9-63.8 (m), 44.9 (t, $J = 147.3$ Hz), 29.2 (d, $J = 3.1$ Hz), 20.2 (d, $J = 54.5$ Hz), 16.7 (d, $J = 2.9$ Hz), 16.6 (d, $J = 2.8$ Hz), 16.6 (d, $J = 3.1$ Hz), 16.6 (d, $J = 3.0$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 25.1, 16.2. **IR** (ATR) 3412, 2983, 1671, 1438, 1241, 1015, 977 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{P}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 620.2096, znalezione 620.2108.



Koniugat 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z bromkiem (4-karboksybutylo)trifenylfosfoniowym (bromek 5-(bis(dietoksyfosforylo)-metylidenoamino)-5-okso-pentylotrifenylfosfoniowy, **23**). Żywica; 92% (334.0 mg). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.85-7.69 (m, 16H), 5.09 (td, $J = 22.5, 10.0$ Hz, 1H), 4.26-4.14 (m, 8H), 3.85-3.77 (m, 2H), 2.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.98 (qi, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.81-1.71 (m, 2H), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ δ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.4 (t, $J = 4.2$ Hz), 135.0 (d, $J = 3.0$ Hz), 133.7 (d, $J = 10.0$ Hz), 130.5 (d, $J = 12.5$ Hz), 118.3 (d, $J = 85.9$ Hz), 63.6 (d, $J = 3.3$ Hz), 63.6 (d, $J = 3.2$ Hz), 63.5 (d, $J = 3.2$ Hz), 63.5 (d, $J = 3.1$ Hz), 43.7 (t, $J = 147.2$ Hz), 34.4, 26.0 (d, $J = 16.8$ Hz), 22.2 (d, $J = 50.7$ Hz), 21.6 (d, $J = 4.2$ Hz), 16.5 (d, $J = 2.9$ Hz), 16.4 (d, $J = 2.8$ Hz), 16.3 (d, $J = 3.1$ Hz), 16.3 (d, $J = 3.1$ Hz). $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ 24.6, 16.6. **IR** (ATR) 3417, 2983, 1663, 1438, 1251, 1016, 976 cm^{-1} . **HRMS** (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_7\text{P}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 648.2409, znalezione 648.2429.

2.2.3 Otrzymywanie koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z 5-karboksyuracylem

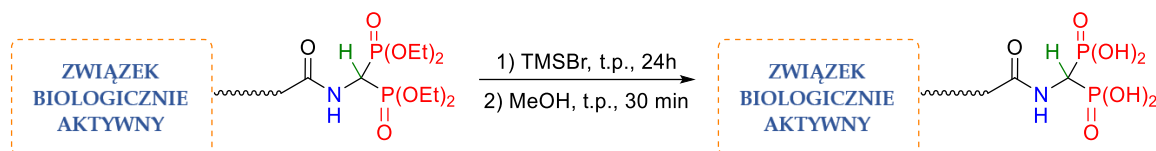


Schemat 58

Do kolby okrągłodennej o pojemności 100 cm^3 wprowadzono kwas 2,4-dihydroksypirymidyno-5-karboksylowy (0.5 mmol, 78.1 mg, 1.0 ekw.). Kolbę przedmuchano argonem, dodano *N,N*-dimetyloformamid (10 mL), a następnie zabezpieczono septą, w którą wbito balon wypełniony argonem. Następnie, przez septę, dodano roztwór HATU (0.52 mmol, 200 mg, 1.05 ekw.) oraz zasady *Hüniga* (0.52 mmol, 68 mg, 1.05 ekw.) w *N,N*-dimetyloformamidzie (10 mL), a po 5 minutach roztwór 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** (0.5 mmol, 151.5 mg, 1.0 ekw.) w *N,N*-dimetyloformamidzie (5 mL). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po zakończeniu reakcji odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Surowy produkt krystalizowano najpierw z układu metanol/eter dietylowy, a następnie z metanolu.

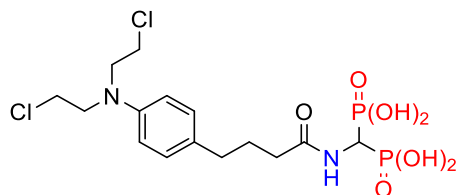
Koniugat 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z 5-karboksyuracylem 1-(N-2,4-dihydroksypirymidyno-5-karbonyloamino)metylideno-1,1-bisfosfonian tetraetylu, **21**). Białe kryształy; 61% (134.5 mg), t.t. 251-252°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.76 (br s, 2H), 9.35 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 4.99 (td, J = 21.6, 10.1 Hz, 1H), 4.13–4.02 (m, 8H), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 6H), 1.21 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 164.3, 161.6, 150.3, 148.8, 102.9, 63.0 (d, J = 3.1 Hz), 63.0 (d, J = 3.2 Hz), 62.9 (d, J = 3.0 Hz), 62.8 (d, J = 3.4 Hz), 43.1 (t, J = 146.2 Hz), 16.2 (d, J = 2.8 Hz), 16.1 (d, J = 3.0 Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO) δ 16.1. IR (ATR) 3095, 2986, 1678, 1538, 1225, 1018, 978 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 442.1144, znalezione 442.1148.

2.2.4 Deestryfikacja grup fosfonowych koniugatów 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu



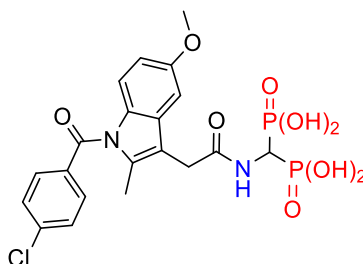
Schemat 59

Do roztworu odpowiedniego koniugatu (0.1 mmol, 1.0 ekw.) w chloroformie (0.7 mL) wprowadzano bromek trimetylosililu (1.0 mmol, 153 mg, 132 μL , 10.0 ekw.) i zawartość kolby mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po zakończeniu reakcji z kolby odparowywano części lotne na wyparce rotacyjnej, a uzyskaną pozostałość rozpuszczano w metanolu (1.0 mL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie ponownie odparowywano części lotne na wyparce rotacyjnej, po czym kilkukrotnie powtarzano proces rozpuszczania produktu w metanolu (1.0 mL) i zateżania uzyskanej mieszaniny, w celu całkowitego usunięcia lotnych zanieczyszczeń. Tak otrzymane koniugaty **24–28** wysuszono pod obniżonym ciśnieniem, a w przypadku produktu **26** dodatkowo przeprowadzono krystalizację z układu metanol/eter dietylowy.

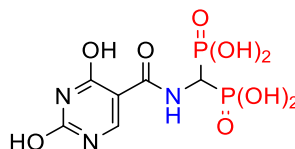


Koniugat kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego z chlorambucylem (kwas N-(4-(4-(bis(2-chloroetylo)amino)fenylo)butanoilo-1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowy, **24**). Beżowe kryształy; 99% (47.1 mg), t.t. 196°C (rozkład). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) 7.31–7.27 (m, 2H), 7.13–7.09 (m, 2H), 3.90 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 3.63 (t,

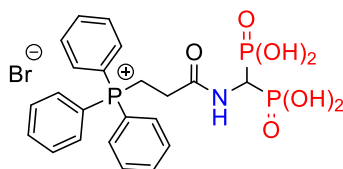
$J = 6.6$ Hz, 4H), 2.66 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.33 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.94 (qi, $J = 7.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 175.0 (t, $J = 4.4$ Hz), 143.9, 137.1, 131.8, 121.3, 59.1, 46.1 (t, $J = 144.7$ Hz), 38.8, 36.0, 35.3, 28.4. ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ 14.9. IR (ATR) 2548, 1636, 1510, 1456, 1146, 915 cm^{-1} . Oddano próbkę związku celem wykonania analizy HRMS.



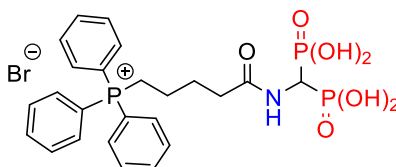
Koniugat kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego z indometacyną (25). Białe kryształy; 99% (52.6 mg), t.t. 158°C (rozkład). ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.23 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H), 7.71–7.59 (m, 4H), 7.13 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 4.54 (td, $J = 21.5, 9.9$ Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.19 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 168.9 (t, $J = 4.3$ Hz), 167.8, 155.6, 137.5, 135.0, 134.3, 131.1, 131.0, 130.1, 129.0, 114.6, 114.3, 111.6, 102.0, 55.4, 46.4 (t, $J = 139.8$ Hz), 30.4, 13.5. ^{31}P NMR (162 MHz, DMSO) δ 16.7. IR (ATR) 3263, 1676, 1606, 1530, 1477, 1456, 1355, 1323, 1233, 1194, 1148, 1059, 993 cm^{-1} . Oddano próbkę związku celem wykonania analizy HRMS.



Koniugat kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego z 5-karboksyuracylem (kwas 1-*N*-(2,4-dihydroksypirymidyno-5-karbonyloamino)metylideno-1,1-bisfosfonowy, **26**). Białe kryształy; 88% (28.7 mg), t.t. 269°C (rozkład). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.28 (s, 1H), 4.95 (t, $J = 21.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 165.4, 164.2 (t, $J = 4.8$ Hz), 152.3, 149.2, 105.8, 47.2 (t, $J = 142.7$ Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ 14.6. IR (ATR) 3002, 1679, 1609, 1520, 1448, 1197, 1011, 931 cm^{-1} . Oddano próbkę związku celem wykonania analizy HRMS.



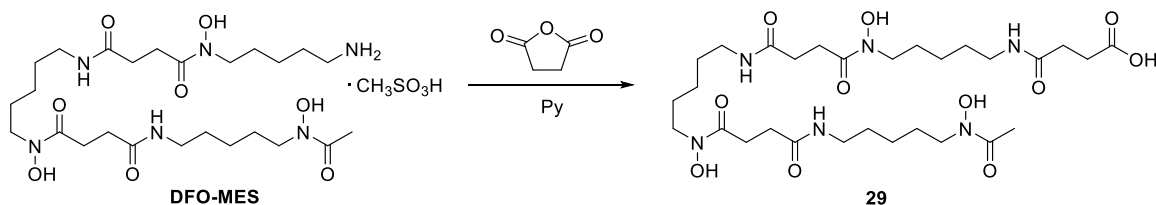
Koniugat kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego z bromkiem (2-karboksyetylo)trifenylfosfoniowym (bromek 3-(bisfosfonometylidenoamino)-3-oksopropylotrifenylfosfoniowy, **27**). Żywica; 99% (58.0 mg). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.93-7.75 (m, 15H), 4.78 (t, J = 21.9 Hz, 1H), 3.74-3.67 (m, 2H), 2.79-2.72 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 171.0 (dt, J = 16.4, 4.5 Hz), 136.4 (d, J = 3.1 Hz), 134.9 (d, J = 10.0 Hz), 131.7 (d, J = 12.7 Hz), 119.5 (d, J = 87.5 Hz), 47.7 (t, J = 143.4 Hz), 28.9 (d, J = 2.5 Hz), 19.2 (d, J = 55.5 Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ 24.6, 14.6. IR (ATR) 2897, 1655, 1436, 1150, 1110, 995, 915, 740, 723 cm^{-1} . Oddano próbkę związku celem wykonania analizy HRMS.



Koniugat kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego z bromkiem (4-karboksybutylo)trifenylfosfoniowym (bromek 5-(bisfosfonometylidenoamino)-5-oksopentylotrifenylfosfoniowy, **28**). Żywica; 97% (59.6 mg). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.91-7.73 (m, 15H), 4.81 (t, J = 22.0 Hz, 1H), 3.48-3.40 (m, 2H), 2.38 (br t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.92-1.85 (m, 2H), 1.81-1.72 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 174.6 (t, J = 4.4 Hz), 136.2 (d, J = 3.0 Hz), 134.8 (d, J = 9.9 Hz), 131.5 (d, J = 12.6 Hz), 119.8 (d, J = 86.2 Hz), 47.3 (t, J = 143.7 Hz), 35.6, 27.5 (d, J = 17.3 Hz), 22.9 (d, J = 3.8 Hz), 22.7 (d, J = 51.2 Hz). ^{31}P NMR (162 MHz, CD_3OD) δ 23.7, 14.9. IR (ATR) 3254, 1643, 1529, 1437, 1150, 1111, 995, 920, 722 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : obliczone dla $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_7\text{P}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 536.1157, znalezione 536.1149.

2.3 Sprzęganie 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z deferoksamina

2.3.1 Otrzymywanie *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy



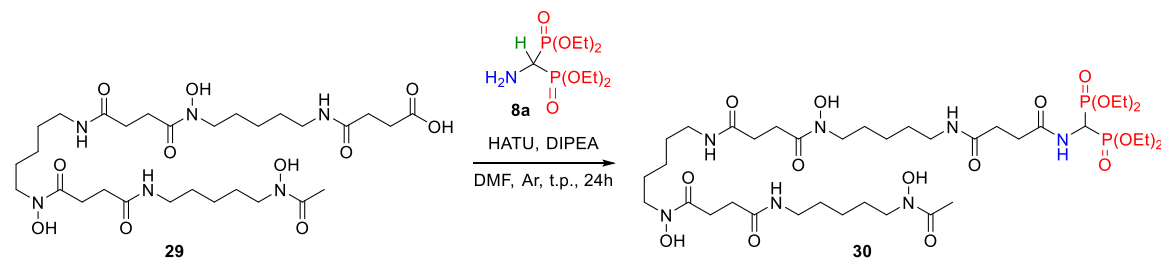
Schemat 60

Syntezę *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy prowadzono zgodnie z opisaną procedurą.¹⁹⁰

Do roztworu bezwodnika bursztynowego (4.28 mmol, 429 mg, 22.5 ekw.) w pirydynie (2 mL) wprowadzono mezylan deferoksaminy (0.19 mmol, 125 mg, 1.0 ekw.). Zawartość kolby mieszano w temperaturze pokojowej przez 20 godzin. Po tym czasie, do kolby dodano 0.16 M roztwór wodorotlenku sodu (22.5 mL) i kontynuowano mieszanie w temperaturze pokojowej przez kolejne 5 godzin, aż do uzyskania klarownego roztworu. Następnie, do mieszaniny wkraplano 35-38% roztwór kwasu solnego do momentu osiągnięcia pH równego 2. Wytrącony osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem na lejku *Büchnera*, przemyto 0.01 M roztworem HCl, a następnie poddano liofilizacji.

***N*-(3-Karboksypropanoilo)deferoksamina (29).**¹⁹⁰ Białe kryształy; 83% (104.2 mg), t.t. 162-164°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.03 (br s, 1H), 9.64 (br s, 1H), 9.59 (br s, 2H), 7.80-7.75 (m, 3H), 3.45 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 3.00 (q, *J* = 6.6 Hz, 6H), 2.57 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.45 – 2.37 (m, 2H), 2.30-2.25 (m, 6H), 1.96 (s, 3H), 1.51-1.46 (m, 6H), 1.40-1.34 (m, 6H), 1.25-1.19 (m, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 173.8, 172.0, 171.3, 170.7, 170.1, 47.1, 46.8, 38.4, 30.0, 29.9, 29.2, 28.8, 27.6, 26.0, 23.5, 20.3. IR (ATR) 3295, 3103, 2928, 2856, 1723, 1616, 1566, 1460, 1396, 1251, 1223, 1197, 1163 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₂₉H₅₂N₆O₁₁Na [M+Na]⁺ 683.3592, znalezione 683.3558.

2.3.2 Otrzymywanie koniugatu *N*-SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO



Schemat 61

Syntezę koniugatu *N*-SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO prowadzono modyfikując opisaną procedurę.¹⁹⁰

Do kolby okrągłodennej o pojemności 50 cm³ wprowadzono *N*-(3-karboksypropanoilo)deferoksaminy **29** (0.176 mmol, 116 mg, 1.0 ekw.). Kolbę przedmuchano argonem, zabezpieczono septą i dodano *N,N*-dimetyloformamid (2.5 mL). Mieszaninę ogrzewano w 80°C do całkowitego rozpuszczenia substratu. Następnie, przez septę, dodano roztwór HATU (0.184 mmol, 70 mg, 1.05 ekw.) oraz zasady *Hüniga* (0.184 mmol, 24 mg, 32 µL, 1.05 ekw.) w *N,N*-dimetyloformamidzie (2.5 mL), a po

5 minutach roztwór 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu **8a** (0.176 mmol, 53 mg, 1.0 ekw.) w *N,N*-dimetyloformamidzie (2.5 mL). Reakcję kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po upływie wyznaczonego czasu, mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce rotacyjnej do objętości ok. 1/6 w stosunku do objętości wyjściowej. Następnie do kolby dodano 10 mL wody destylowanej. Wytrącony osad oddzielono poprzez odwirowanie (5 min, 5500 obr./min, 5°C), po czym dwukrotnie przemyto go schłodzoną wodą dejonizowaną, każdorazowo odwirowując (2 × 5 min, 5500 obr./min, 5°C). Ostatecznie osad poddano liofilizacji.

***N*-SANHCH(PO(OEt)₂)₂DFO (30).** Białe kryształy; 42%; czystość 85% (82.0 mg). ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.65 (br s, 1H), 9.61 (br s, 2H), 8.68 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 7.81-7.75 (m, 3H), 4.87 (td, *J* = 22.7, 10.0 Hz, 1H), 4.10-4.00 (m, 8H), 3.45 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 3.00 (q, *J* = 5.9 Hz, 6H), 2.63-2.53 (m, 4H), 2.50-2.37 (m, 2H), 2.33-2.23 (m, 6H), 1.96 (s, 3H), 1.52-1.46 (m, 6H), 1.40-1.34 (m, 6H), 1.25-1.18 (m, 6H), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 172.0, 171.5 (t, *J* = 4.4 Hz), 171.3, 170.8, 170.1, 62.9 (d, *J* = 3.1 Hz), 62.9 (d, *J* = 3.2 Hz), 62.6 (d, *J* = 3.1 Hz), 62.6 (d, *J* = 3.1 Hz), 47.1, 46.8, 43.1 (t, *J* = 146.7 Hz), 38.4, 30.7, 30.6, 30.6, 30.2, 29.9, 28.8, 27.6, 26.0, 23.5, 20.3, 16.2 (d, *J* = 2.9 Hz), 16.2 (d, *J* = 2.9 Hz), 16.1 (d, *J* = 2.9 Hz), 16.1 (d, *J* = 3.0 Hz). ³¹P NMR (162 MHz, DMSO) δ 16.7. IR (ATR) 3298, 2928, 2855, 1615, 1564, 1460, 1395, 1251, 1196, 1162, 1019, 961 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: obliczone dla C₃₈H₇₄N₇O₁₆P₂ [M+H]⁺ 946.4667, znalezione 946.4745.

3. Metodyka badań biologicznych

3.1 Hodowla komórkowa w warunkach *in vitro*

Hodowle komórkowe prowadzono w warunkach *in vitro*, utrzymując standardowe warunki hodowlane: temperaturę 37°C, atmosferę zawierającą 5% CO₂ oraz wilgotność na poziomie 95%.

Komórki A549 (RRID: CVCL_0023, niedrobnokomórkowy rak płuca, American Type Culture Collection [ATCC]) oraz komórki U-2 OS (RRID: CVCL_0042, kostniakomięsak, ATCC) hodowano w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) o niskiej zawartości glukozy (1 g/L) wzbogaconej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS; nr kat. 10270106, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Komórki AGS (RRID: CVCL_0139, rak gruczolowy żołądka, ATCC) hodowano w pożywce McCoy's 5A uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą. Komórki BJ1-hTERT (RRID: CVCL_6573, prawidłowe ludzkie fibroblasty immortalizowane hTERT, ATCC) hodowano w pożywce o następującym składzie: 2/3 DMEM o wysokiej zawartości glukozy (4.5 g/L) i 1/3 Medium 199 (nr kat. M4530, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej i 0.01 mg/ml higromycyny B-Losung (nr kat. CP12.2, Roth, Karlsruhe, Niemcy). Wszystkie w.w. pożywki dodatkowo zawierały 1% mieszaniny antybiotyków penicyliny-streptomycyny (Pen-Strep).

Komórki L-929 (CCL-1, ATCC, mysie fibroblasty) hodowano w pożywce DMEM o wysokiej zawartości glukozy (4.5 g/L) zawierającej L-glutaminę (PAN Biotech, Niemcy), wzbogaconej dodatkowo 10% płodową surowicą bydlęcą (Eurx, Polska) oraz 1% mieszaniną antybiotyków penicyliny-streptomycyny (Pen-Strep, PAN Biotech, Niemcy). Komórki MG-63 (CRL-1427, ATCC, kostniakomięsak) hodowano w pożywce EMEM (ang. *Eagle's Minimal Essential Medium*) zawierającej L-glutaminę (PAN Biotech, Niemcy), wzbogaconej dodatkowo 10% płodową surowicą bydlęcą (Eurx, Polska), 1% mieszaniną antybiotyków penicyliny-streptomycyny (Pen-Strep), pirogronianem sodu (100 μ M, PAN Biotech, Niemcy) oraz 0.1% MEM NEAA (ang. *Minimum Essential Medium Non-essential Amino Acids*, PAN Biotech, Niemcy)

Komórki hodowano w postaci monowarstwy w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 lub 75 cm². Po osiągnięciu około 80-90% konfluencji, komórki odłączano od podłoża przy użyciu 0.05% roztworu trypsyny/EDTA (Merck). Po usunięciu pożywki komórki płukano buforem PBS w warunkach sterylnych, a następnie inkubowano z trypsyną w temperaturze 37°C przez 4 min. Trypsynę inaktywowano przez dodatek trzykrotnej objętość pożywki zawierającej 10% FBS. W celu całkowitego usunięcia enzymu, uzyskaną zawiesinę komórkową wirowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej, przy 1200 rpm, oddzielano supernatant, po czym komórki zawieszano w świeżej pożywce.

3.2 Badania cytotoksyczności

Cytotoksyczność badanych związków określano na podstawie pomiaru aktywności metabolicznej komórek, z wykorzystaniem testu MTS (linie komórkowe: U-2 OS, A549, AGS, BJ1-hTERT) lub testu Alamar Blue (linie komórkowe: MG-63 oraz L-929).

3.2.1 Test MTS

Cytotoksyczność badanych związków określano na podstawie pomiaru aktywności metabolicznej komórek, z wykorzystaniem testu MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; nr kat. G3581, Promega, Madison, WI, USA). Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w następującej liczbie: U-2 OS – 6 500 komórek/dołek, A549 i AGS – 5 000 komórek/dołek, BJ1-hTERT – 4 000 komórek/dołek, a następnie inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie usuwano

pożywkę, a do odpowiednich dołków dodawano roztwory badanych związków w medium hodowlanym w odpowiednich stężeniach. Komórki inkubowano przez kolejne 48 godzin, po czym ponownie usuwano medium hodowlane, a do każdego dołka dodawano roztwór soli tetrazolowej MTS (3-(4,5-dimetylotioazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2(4-sulfofenylo)-2*H*-tetrazolu) rozcieńczony w bezbarwnej pożywce DMEM F-12 (nr kat. D2906, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po 1.5-godzinnej inkubacji dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali 490 nm, z wykorzystaniem czytnika mikropłytek BioTek Synergy 2. Dane znormalizowano względem kontroli, tj. komórek traktowanych pożywką zawierającą odpowiedni rozpuszczalnik (DMSO, H₂O lub H₂O/EtOH 1:1), w którym przygotowano roztwory wyjściowe badanych substancji. Zawartość rozpuszczalnika w kontroli odpowiadała najwyższemu stężeniu zastosowanemu dla danego związku w danej linii komórkowej. W przypadku, gdy rozpuszczalnikiem była woda i jej najwyższe stężenie nie przekraczało 0.5%, kontrolę stanowiły komórki traktowane wyłącznie pożywką hodowlaną. Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach technicznych oraz co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych. Aktywność metaboliczną obliczono według wzoru:

$$\text{Aktywność metaboliczna [\%]} = \frac{A_1 - A_{\text{ślepa}}}{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{ślepa}}} * 100\%$$

A_1 – wartość absorbancji przy danym stężeniu badanego związku

$A_{\text{ślepa}}$ – wartość absorbancji dla próby ślepej

A_{kontrola} – wartość absorbancji dla próby kontrolnej

Cytotoksyczność badanych związków oceniano na podstawie ich wartości IC₅₀, czyli stężenia, które powoduje 50% zmniejszenie populacji komórek w porównaniu z komórkami w próbie kontrolnej (nietraktowanymi). Do obliczenia wartości IC₅₀ i wykreślenia krzywych wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism 10.2.2 (397) (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA, www.graphpad.com). Wartości IC₅₀ obliczono przy użyciu metody „Inhibitor vs. normalized response - Variable slope”. W przypadku badań nad oceną potencjalnego działania synergistycznego badanych związków analizę statystyczną różnic między badanymi grupami przeprowadzono za pomocą analizy wariancji (ANOVA) z zastosowaniem testu Tukeya. Statystycznie istotne różnice (p) zaznaczono gwiazdkami (*), gdzie *p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001, ns p > 0.05.

Badania nad aktywnością cytotoksyczną 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonianów tetraetylu **8**, kwasów 1-amino-1,1-bisfosfonowych **9**, oraz badania

interakcji pochodnej **9a** z wybranymi cytostatykami zrealizowałam w trakcie rocznego stażu badawczego w Pracowni Molekularnych Mechanizmów Terapii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach.

Cytotoksyczność koniugatów **15**, **16**, **17** oraz betuliny została natomiast zbadana przez dr Małgorzatę Krześniak i dr Barbarę Łasut-Szyszkę w tej samej jednostce.

3.2.2 Test Alamar Blue

Cytotoksyczność badanych związków określano na podstawie pomiaru aktywności metabolicznej komórek, z wykorzystaniem testu Alamar Blue (Alamar Blue Cell Viability Assay; nr kat. 786-921, G-Biosciences). Do 96-dołkowych płytek dodawano po 50 µL zawiesiny komórek MG-63 lub L-929 w odpowiednim medium hodowlanym (EMEM dla komórek MG-63, DMEM dla komórek L-929), w liczbie 5 000 komórek/dołek. Następnie do każdego dołka dodawano 50 µL wodnego roztworu badanego związku o stężeniu 1 mM lub 2 mM, uprzednio przefiltrowanego przez sterylny filtr strzykawkowy o średnicy porów 0.22 µm. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po zakończeniu inkubacji do każdego dołka dodawano 10 µL odczynnika Alamar Blue. Próbkę inkubowano przez kolejne 4 godziny w temperaturze 37°C, a następnie zmierzono absorbancję przy długościach fali 570 nm i 600 nm za pomocą czytnika mikropłytek Varioskan LUX Multimode Reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Każde oznaczenie wykonano w co najmniej trzech powtórzeniach technicznych oraz co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych. Otrzymane dane znormalizowano względem kontroli (komórki traktowane wyłącznie pożywką hodowlaną). Aktywność metaboliczną komórek obliczono według wzoru:

$$\text{Aktywność metaboliczna [\%]} = \frac{(O_2 * A_1) - (O_1 * A_2)}{(O_2 * P_1) - (O_1 * P_2)} * 100\%$$

O_1 – molowy współczynnik ekstynkcji utlenionego Alamar Blue przy 570 nm (równy 80586)

O_2 – molowy współczynnik ekstynkcji utlenionego Alamar Blue przy 600 nm (równy 117216)

A_1 – wartość absorbancji dla badanego związku przy 570 nm

A_2 – wartość absorbancji dla badanego związku przy 600 nm

P_1 – wartość absorbancji dla próby kontrolnej przy 570 nm (komórki traktowane pożywką hodowlaną)

P_2 – wartość absorbancji dla próby kontrolnej przy 600 nm (komórki traktowane pożywką hodowlaną)

Analizę statystyczną różnic między badanymi grupami a kontrolą przeprowadzono za pomocą analizy wariancji (ANOVA) z zastosowaniem testu Dunnetta. Statystycznie istotne różnice (p) z próbą kontrolną zaznaczono gwiazdkami (*), gdzie *p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001, ns p > 0.05.

Badania cytotoksyczności (ocenę biokompatybilności) kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych **9** na liniach MG-63 oraz L-929 zrealizowałam w Centrum Biotechnologii Politechniki Śląskiej pod opieką Pani dr Izabelli Ślęzak-Prochazki z Katedry Inżynierii i Biologii Systemów Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

3.3 Badania mikrobiologiczne

Ocenę aktywności przeciwbakteryjnej kwasów 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych **9a-h** i **9j** przeprowadzono z wykorzystaniem wzorcowych szczepów bakterii *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

W celu wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC), do sterylnych probówek wprowadzono 1 ml pożywki do hodowli bakterii (TSB, Biomaxima) oraz 1 ml roztworu badanego związku w wodzie o stężeniu 1 mM lub 2 mM, przefiltrowanego uprzednio przez sterylny, strzykawkowy filtr nylonowy o średnicy porów 0.22 µm. Następnie do probówek dodano zawiesinę bakterii, w takiej ilości, aby ich końcowe stężenie wynosiło ~ 5 × 10⁶ CFU/ml. Zmierzono gęstość optyczną (O.D.) roztworów za pomocą densytometru, a następnie inkubowano probówki przez 18 godzin w temperaturze 37°C. Po tym czasie, ponownie zmierzono O.D roztworów. Wynik podano jako średnią i odchylenie standardowe z trzech powtórzeń.

Badania strefy zahamowania wzrostu bakterii przeprowadzono z wykorzystaniem wodnych roztworów związków **9a-h** i **9j** o stężeniu 1 mM. Na powierzchnię płytek Mueller-Hinton (agar, DIAG-Med) naniesiono wymazówkę bakterie w ilości ~5×10⁸ CFU/ml. Bakterie zostały rozprowadzone po całej powierzchni. Następnie zrobiono w agarze dołek o średnicy 5 mm i umieszczono w nim 100 µl badanego roztworu. Tak przygotowane płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin. Po tym czasie zmierzono średnicę stref zahamowania wzrostu bakterii wokół dołków. W prowadzonych badaniach jako odniesienie (próba kontrolna) zastosowano sterylny roztwór PBS. Wynik podano jako średnią i odchylenie standardowe z trzech powtórzeń.

Badania mikrobiologiczne zostały przeprowadzone przez Panią dr hab. inż. Alicję Kazek-Kęsik, prof. Pol. Śl. z Katedry Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

3.4 Badania stabilności chelatów z ^{89}Zr

Badania z radioaktywnym cyrkonem-89 były prowadzone wyłącznie w Zakładzie Radiofarmacji i Obrazowania Laboratoryjnego PET Narodowego Instytutu Onkologii w Gliwicach, który posiada laboratoria klasy III wg Prawa atomowego zapewniające bezpieczną pracę z materiałami promieniotwórczymi. Badania stabilności chelatów z ^{89}Zr zostały przeprowadzone przez Panią mgr. inż. Annę Kastelik-Hryniewiecką z Zakładu Radiofarmacji i Obrazowania Laboratoryjnego PET NIO.

Roztwór radioaktywny ^{89}Zr otrzymano w postaci szczawianu cyrkonu-89 w 1 M roztworze kwasu szczawiowego. Izotop ^{89}Zr pochodził z zakupu od zewnętrznych dostawców (Revvity, Holandia; Voxel, Polska) lub był wytwarzany na miejscu w Zakładzie Radiofarmacji i Obrazowania Laboratoryjnego PET, za pomocą cyklotronu IBA Cyclone 18/9.

Radioznakowanie ligandów $N\text{-SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$ oraz $p\text{-NCS-Bn-DFO}$

Przygotowano 4.2 mM roztwory chelatorów $N\text{-SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$ oraz $p\text{-NCS-Bn-DFO}$ (Diverchim, Francja) w DMSO. Roztwór szczawianu cyrkonu-89 (38 μL , 17.76 MBq) w 1 M kwasie szczawiowym zobojętniono przez dodanie 8 μL 2 M roztworu Na_2CO_3 . Następnie ustabilizowano pH roztworu poprzez wprowadzenie 50 μL buforu HEPES. Końcowa objętość roztworu wynosiła 96 μL . Następnie, do probówek typu Eppendorf (1.5 mL) odmierzone po 15 μL roztworu chelatora, po czym dodano po 45 μL roztworu radioaktywnego. Całość dokładnie wymieszano za pomocą końcówek pipet.

Bezpośrednio po znakowaniu ($t = 0$ h) wykonywano analizę radio-TLC oraz pobierano odpowiednie objętości roztworów do badań stabilności chelatów $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-SANHCH}(\text{PO}(\text{OEt})_2)_2\text{DFO}$ oraz $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-}p\text{-NCS-Bn-DFO}$ w różnych warunkach (bufor HEPES, surowica ludzka, nadmiar EDTA).

Radio-TLC

Wszystkie analizy radio-TLC przeprowadzano z użyciem chromatografu cienkowarstwowego Raytest (skaner TLC), z oprogramowaniem Gina Star.

- Płytką: podłoże z mikrowłókna szklanego pokryte żelem krzemionkowym (iTLC - instant TLC)
- Faza rozwijająca: 0.1 M octan amonu + 25 mM EDTA w stosunku 1:1 (v/v)
- Wartości R_f : $R_f(^{89}\text{Zr}) \approx 1.0$, $R_f(\text{chelatów z } ^{89}\text{Zr}) \approx 0.0$

Badania stabilności chelatów z ^{89}Zr w HEPES

Do probówki typu Eppendorf przenoszono 30 μL roztworu odpowiedniego chelatu. Następnie dodawano 285 μL buforu HEPES, tak aby jego końcowe stężenie wynosiło 100 μM i mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej. Analizy radio-TLC wykonywano w ustalonych odstępach czasu (po 2, 18, 24, 48, 72 oraz 96 godzinach).

Badania stabilności chelatów z ^{89}Zr w surowicy

Do probówki typu Eppendorf, zawierającej 200 μL surowicy ludzkiej (Sigma Aldrich), przenoszono 17 μL roztworu odpowiedniego chelatu (2 MBq). Probówkę szczelnie zamykano i inkubowano w 37°C przy jednoczesnym wytrząsaniu. Analizy radio-TLC wykonywano w ustalonych odstępach czasu (po 2, 18, 24, 48, 72 oraz 96 godzinach).

Badania stabilności chelatów z ^{89}Zr wobec nadmiaru EDTA

Do probówki typu Eppendorf przenoszono 8.5 μL roztworu odpowiedniego chelatu (1 MBq, 8.93 nmol). Następnie, dodawano 100 μL buforu HEPES oraz 89.3 μL roztworu 0.01 M EDTA w buforze HEPES (0.893 μmol , 100-krotny nadmiar molowy). Probówkę szczelnie zamykano i inkubowano w temperaturze pokojowej. Analizy radio-TLC wykonywano w ustalonych odstępach czasu (po 2, 18, 24, 42, 48, 72 oraz 96 godzinach).

Streszczenie

Związki fosforoorganiczne od wielu lat stanowią przedmiot intensywnych badań ze względu na ich wszechstronne zastosowania w syntezie organicznej oraz chemii medycznej. Ważną grupę tych związków stanowią 1-amino-1,1-bisfosfoniany (ABPs). Ich wyjątkowe właściwości, takie jak silne powinowactwo do tkanki kostnej oraz zróżnicowana aktywność biologiczna, budzą ogromne zainteresowanie ukierunkowane zarówno na odkrywanie biologicznych właściwości tych związków, jak również poszukiwanie efektywnych metod ich syntezy. Ważnym kierunkiem badań pozostają także modyfikacje strukturalne ABPs, podobnie jak synteza ich koniugatów z innymi związkami biologicznie czynnymi, co może w znaczący sposób przyczynić się do zwiększenia potencjału terapeutycznego wyjściowych struktur.

Tematyka niniejszej pracy koncentrowała się na opracowaniu uniwersalnych metod syntezy związków 1-amino-1,1-bisfosforowych oraz ich koniugatów z cząsteczkami o znaczeniu biologicznym. Badania właściwości otrzymanych struktur umożliwiły weryfikację ich potencjału terapeutycznego i diagnostycznego.

Badania rozpoczęto od syntezy szerokiej gamy zróżnicowanych strukturalnie *N*-zabezpieczonych pochodnych 1-aminoalkilideno-1,1-bisfosfonowych, na drodze kilkietapowej procedury z chlorowodorków imidoilanów etylu, poprzez odpowiednie 1-etoksyalkanofosfoniany dietylu. Następnie metodę tę rozszerzono na syntezę pochodnych fosfonowo-fosfinoilowych oraz fosfonowo-fosfinowych, dzięki czemu stała się jedną z niewielu znanych, uniwersalnych metod sekwencyjnego otrzymywania związków 1-amino-1,1-bisfosforowych. W pracy opisano także skuteczne warunki deprotekcji i hydrolizy symetrycznych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych oraz wskazano na możliwość przeprowadzenia analogicznych transformacji dla fosfonowo-fosfinoilowych pochodnych ABPs.

W dalszej części skupiono się na modyfikacji struktury wybranej pochodnej ABP. Opracowano prostą i efektywną metodę sprzęgania 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu ze związkami takimi jak: kwas mykofenolowy, indometacyna, bromki karboksyalkilotrifenylofosfoniowe oraz pochodne betuliny, opartą na tworzeniu wiązania amidowego z wykorzystaniem ultradźwięków. Metodę tę można zastosować zarówno do przeprowadzenia drobnych modyfikacji struktury ABP, jak również do otrzymania jego koniugatów ze związkami biologicznie czynnymi o bardziej złożonej strukturze.

W ramach pracy podjęto również próby przeprowadzenia modyfikacji struktury deferoksaminy z udziałem wybranej pochodnej ABP, celem otrzymania

liganda o strukturze pozwalającej na wykorzystanie go jako znacznika diagnostycznego.

Ostatnim etapem realizowanych badań była ocena aktywności biologicznej wybranych pochodnych 1-amino-1,1-bisfosfonowych i ich koniugatów, obejmująca analizę cytotoksyczności oraz właściwości przeciwbakteryjnych. Uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie związków o największym potencjale aplikacyjnym.

Abstract

Organophosphorus compounds have been the subject of intensive research for many years due to their versatile applications in organic synthesis and medicinal chemistry. An important subgroup of these compounds is 1-amino-1,1-bisphosphonates (ABPs). Their unique features, such as strong affinity for bone tissue and multidirectional biological activity have attracted great interest aimed at exploring their biological effects as well as developing efficient methods for their synthesis. Structural modifications of ABPs, as well as the synthesis of their conjugates with other biologically active molecules, also remain key areas of research, as these approaches can significantly enhance the therapeutic potential of the parent compounds.

The subject of this work focused on developing versatile synthetic strategies for 1-amino-1,1-bisphosphonate derivatives and their conjugates with biologically relevant molecules. Characterization of the synthesized compounds enabled the assessment of their therapeutic and diagnostic potential.

The study began with the synthesis of a wide range of structurally diverse *N*-protected derivatives of 1-aminoalkylidene-1,1-bisphosphonates *via* a multi-step procedure starting from ethyl imidoyl chlorides and proceeding through diethyl 1-ethoxyalkylphosphonates. This method was subsequently extended to obtain phosphonyl-phosphinoyl and phosphonyl-phosphinyl derivatives, establishing one of the few known universal sequential synthetic approaches for 1-amino-1,1-bisphosphonates. Effective conditions for deprotection and hydrolysis of symmetrical 1-amino-1,1-bisphosphonate derivatives were also described, along with the possibility of analogous transformations for phosphonyl-phosphinoyl ABPs derivatives.

Further efforts focused on structural modification of a selected ABP derivative. A simple and efficient method for coupling of tetraethyl 1-aminomethylidene-1,1-bisphosphonate with compounds such as mycophenolic acid, indomethacin, carboxyalkyltriphenylphosphonium bromides, and betulin derivatives was developed, based on amide bond formation assisted by ultrasound. This approach was successfully applied both for minor structural modifications of ABP and for synthesizing conjugates with more complex biologically active molecules.

Furthermore, attempts were made to modify the structure of deferoxamine using a selected ABP derivative to obtain a ligand suitable for use as a diagnostic marker.

The final stage of the study involved the evaluation of the biological activity of selected 1-amino-1,1-bisphosphonate derivatives and their conjugates, including cytotoxicity and antibacterial properties. The research findings enabled identification of compounds with the most promising therapeutic applications.

LITERATURA

1. A. Kuźnik, R. Mazurkiewicz, M. Zięba, K. Erfurt, *Tetrahedron Lett.*, **2018**, 59, 3307–3310.
2. N. Menshutkin, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1865**, 133, 317–320.
3. R. G. G. Russell, *Bone*, **2011**, 49, 2–19.
4. H. Fleisch, R. G. G. Russell, F. Straumann, *Nature*, **1966**, 212, 901–903.
5. H. Fleisch, R. G. G. Russell, S. Bisaz, R. C. Mühlbauer, D. A. Williams, *Eur. J. Clin. Invest.*, **1970**, 1, 12–18.
6. F. H. Ebetino, A. M. L. Hogan, S. Sun, M. K. Tsoumpra, X. Duan, J. T. Triffitt, A. A. Kwaasi, J. E. Dunford, B. L. Barnett, U. Oppermann, M. W. Lundy, A. Boyde, B. A. Kashemirov, C. E. McKenna, R. G. G. Russell, *Bone*, **2011**, 49, 20–33.
7. M. T. Drake, B. L. Clarke, S. Khosla, *Mayo Clin. Proc.*, **2008**, 83, 1032–1045.
8. E. Chmielewska, P. Kafarski, *Open Pharm. Sci. J.*, **2016**, 3, 56–78.
9. S. Siva Prasad, S. H. Jayaprakash, Ch. Syamasundar, P. Sreelakshmi, C. Bhuvaneswar, B. Vijaya Bhaskar, W. Rajendra, S. K. Nayak, C. Suresh Reddy, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2015**, 190, 2040–2050.
10. N. B. Reddy, C. S. Sundar, B. S. Krishna, K. M. K. Reddy, C. S. Reddy, *Iran. J. Org. Chem.*, **2014**, 6, 1227–1234.
11. M. A. Ermer, S. C. Kottmann, J. E. Otten, A. Wittmer, P. Poxleitner, K. Pelz, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **2018**, 76, 553–560.
12. G. Forlani, D. Petrollino, M. Fusetti, L. Romanini, B. Nocek, A. Joachimiak, Ł. Berlicki, P. Kafarski, *Amino Acids*, **2012**, 42, 2283–2291.
13. C. M. Lacbay, J. Mancuso, Y. S. Lin, N. Bennett, M. Götte, Y. S. Tsantrizos, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 7435–7449.
14. J. Agapkina, D. Yanvarev, A. Anisenko, S. Korolev, J. Vepsäläinen, S. Kochetkov, M. Gottikh, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 73, 73–82.
15. M. Gnant, P. Clézardin, *Cancer Treat. Rev.*, **2012**, 38, 407–415.
16. V. Stresing, F. Daubiné, I. Benzaid, H. Mönkkönen, P. Clézardin, *Cancer Lett.*, **2007**, 257, 16–35.
17. Z. Ouyang, H. Li, Z. Zhai, J. Xu, C. R. Dass, A. Qin, K. Dai, *Curr. Drug Targets*, **2018**, 19, 409–421.
18. S. Sun, J. Tao, P. P. Sedghizadeh, P. Cherian, A. F. Junka, E. Sodagar, L. Xing, R. K. Boeckman, V. Srinivasan, Z. Yao, B. F. Boyce, B. Lipe, J. D. Neighbors, R. G. G. Russell, C. E. McKenna, F. H. Ebetino, *Br. J. Pharmacol.*, **2021**, 178, 2008–2025.
19. R. G. G. Russell, N. B. Watts, F. H. Ebetino, M. J. Rogers, *Osteoporos. Int.*, **2008**, 19, 733–759.
20. N. H. Bell, R. H. Johnson, *Endocrine*, **1997**, 6, 203–206.
21. H. Fleisch, *Endocr. Rev.*, **1998**, 19, 80–100.
22. H. Fleisch, *Bisphosphonates in Bone Disease: From the Laboratory to the Patient*, Academic Press, San Diego, **2000**.
23. S. P. Luckman, D. E. Hughes, F. P. Coxon, R. G. G. Russell, M. J. Rogers, *J. BONE Miner. Res.*, **1998**, 13, 581–589.
24. J. C. Frith, J. Mönkkönen, S. Auriola, H. Mönkkönen, M. J. Rogers, *Arthritis Rheum.*, **2001**, 44, 2201–2210.
25. P. P. Lehenkari, M. Kellinsalmi, M. J. Rogers, A. Azhayev, *Mol. Pharmacol.*, **2002**, 62, 1255–1262.
26. D. Amin, S. Cornell, S. Gustafson, S. Needle, J. Ullrich, G. Bilder, M. Perrone, *J. Lipid Res.*, **1992**, 33, 1657–1663.
27. S. P. Luckman, D. E. Hughes, F. P. Coxon, R. G. G. Russell, M. J. Dr. Rogers, *J. Bone Miner. Res.*, **1998**, 13, 581–589.

28. S. P. Luckman, F. P. Coxon, F. H. Ebetino, R. G. G. Russell, M. J. Rogers, *J. Bone Miner. Res.*, **1998**, 13, 1668–1678.
29. S. Sousa, P. Clézardin, *Calcif. Tissue Int.*, **2018**, 102, 227–250.
30. R. Czyżykowski, *Oncol. Clin. Pract.*, **2017**, 13, 268–274.
31. E. Terpos, E. Zamagni, S. Lentzsch, M. T. Drake, R. García-Sanz, N. Abildgaard, I. Ntanasis-Stathopoulos, F. Schjesvold, J. De La Rubia, C. Kyriakou, J. Hillengass, S. Zweegman, M. Cavo, P. Moreau, J. San-Miguel, M. A. Dimopoulos, N. Munshi, B. G. M. Durie, N. Raje, *Lancet Oncol.*, **2021**, 22, 119–130.
32. H. H. Van Acker, S. Anguille, Y. Willemen, E. L. Smits, V. F. Van Tendeloo, *Pharmacol. Ther.*, **2016**, 158, 24–40.
33. D. T. Wen, Z. Xu, M. L. Xuan, G. R. Liang, W. L. Zheng, X. F. Liang, J. Xiao, X. Y. Wang, *Front. Oncol.*, **2018**, 8, 495.
34. Z. Sanaat, O. Nouri, M. Khanzadeh, H. Mostafaei, N. Vahed, N. Kabiri, R. A. A. Khoei, H. Salehi-Pourmehr, *J. Breast Cancer*, **2022**, 25, 454.
35. I. J. Diel, E. F. Solomayer, G. Bastert, *Cancer*, **2000**, 88, 3080–3088.
36. M. C. Winter, I. Holen, R. E. Coleman, *Cancer Treat. Rev.*, **2008**, 34, 453–475.
37. J. Mani, S. Vallo, K. Barth, J. Makarević, E. Juengel, G. Bartsch, C. Wiesner, A. Haferkamp, R. A. Blaheta, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **2012**, 15, 250–255.
38. F. Xie, P. Li, J. Gong, J. Zhang, J. Ma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, 467, 664–669.
39. P. I. Croucher, H. De Raeve, M. J. Perry, A. Hijzen, C. M. Shipman, J. Lippitt, J. Green, E. Van Marck, B. Van Camp, K. Vanderkerken, *J. Bone Miner. Res.*, **2003**, 18, 482–492.
40. T. Kubo, S. Shimose, T. Matsuo, K. Tanaka, Y. Yasunaga, A. Sakai, M. Ochi, *J. Orthop. Res.*, **2006**, 24, 1138–1144.
41. Z. Zhou, H. Guan, X. Duan, E. S. Kleinerman, *Cancer*, **2005**, 104, 1713–1720.
42. A. Streitbuenger, M. Henrichs, H. Ahrens, C. Lanvers-Kaminzky, F. Gouin, G. Gosheger, J. Hardes, *Int. Orthop.*, **2011**, 35, 1369–1373.
43. P. Clézardin, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2012**, 12, 102–113.
44. D. Santini, U. Vespasiani Gentilucci, B. Vincenzi, A. Picardi, F. Vasaturo, A. La Cesa, N. Onori, S. Scarpa, G. Tonini, *Ann. Oncol.*, **2003**, 14, 1468–1476.
45. M. F. Heymann, F. Lezot, D. Heymann, *Bone*, **2020**, 139, 115523.
46. H. Asahi, A. Mizokami, S. Miwa, E. T. Keller, K. Koshida, M. Namiki, *Int. J. Urol.*, **2006**, 13, 593–600.
47. G. Odri, P. P. Kim, F. Lamoureux, C. Charrier, S. Battaglia, J. Amiaud, D. Heymann, F. Gouin, F. Redini, *BMC Cancer*, **2014**, 14, 169.
48. P. Clézardin, *Bone*, **2011**, 48, 71–79.
49. J. Rääkkönen, H. Mönkkönen, S. Auriola, J. Mönkkönen, *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, 79, 777–783.
50. M. Marra, D. Santini, G. Meo, B. Vincenzi, S. Zappavigna, A. Baldi, M. Rosolowski, G. Tonini, M. Loeffler, R. Lupu, S. R. Addeo, A. Abbruzzese, A. Budillon, M. Caraglia, *Int. J. Cancer*, **2009**, 125, 2004–2013.
51. S. Wakchoure, M. A. Merrell, W. Aldrich, T. Millender-Swain, K. W. Harris, P. Triozzi, K. S. Selander, *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12, 2862–2868.
52. H. K. Brown, P. D. Ottewell, R. E. Coleman, I. Holen, *J. Cell. Mol. Med.*, **2011**, 15, 501–513.
53. J. Sonnemann, B. Bumbul, J. F. Beck, *Mol. Cancer Ther.*, **2007**, 6, 2976–2984.
54. D. Santini, M. Caraglia, B. Vincenzi, I. Holen, S. Scarpa, A. Budillon, G. Tonini, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2006**, 3, 325–338.
55. H. L. Neville-Webbe, A. Rostami-Hodjegan, C. A. Evans, R. E. Coleman, I. Holen, *Int. J. Cancer*, **2005**, 113, 364–371.

56. T. Hiraga, A. Ueda, D. Tamura, K. Hata, F. Ikeda, P. J. Williams, T. Yoneda, *Int. J. Cancer*, **2003**, *106*, 973–979.
57. D. R. Budman, A. Calabro, *Oncology*, **2006**, *70*, 147–153.
58. S. Matsumoto, S. Kimura, H. Segawa, J. Kuroda, T. Yuasa, K. Sato, M. Nogawa, F. Tanaka, T. Maekawa, H. Wada, *Lung Cancer*, **2005**, *47*, 31–39.
59. J. Trojan, S. Z. Kim, K. Engels, S. Kriener, P. S. Mitrou, K. U. Chow, *Anticancer. Drugs*, **2005**, *16*, 87–91.
60. M. S. Benassi, A. Chiechi, F. Ponticelli, L. Pazzaglia, G. Gamberi, L. Zanella, M. C. Manara, P. Perego, S. Ferrari, P. Picci, *Cancer Lett.*, **2007**, *250*, 194–205.
61. S. Kimura, J. Kuroda, H. Segawa, K. Sato, M. Nogawa, T. Yuasa, O. G. Ottmann, T. Maekawa, *Int. J. Hematol.*, **2004**, *79*, 37–43.
62. S. Okamoto, Y. Jiang, K. Kawamura, M. Shingyoji, T. Fukamachi, Y. Tada, Y. Takiguchi, K. Tatsumi, H. Shimada, K. Hiroshima, H. Kobayashi, M. Tagawa, *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e60297.
63. R. Schmidmaier, M. Simsek, P. Baumann, B. Emmerich, G. Meinhardt, *Anticancer. Drugs*, **2006**, *17*, 621–629.
64. D. Heymann, B. Ory, F. Blanchard, M. F. Heymann, P. Coipeau, C. Charrier, S. Couillaud, J. P. Thiery, F. Gouin, F. Redini, *Bone*, **2005**, *37*, 74–86.
65. N. Horie, H. Murata, S. Kimura, H. Takeshita, T. Sakabe, T. Matsui, T. Maekawa, T. Kubo, S. Fushiki, *Br. J. Cancer*, **2007**, *96*, 255–261.
66. S. Magnetto, S. Boissier, P. D. Delmas, P. Clézardin, *Int. J. Cancer*, **1999**, *83*, 263–269.
67. S. Lu, J. Zhang, Z. Zhou, M. L. Liao, W. Z. He, X. Y. Zhou, Z. M. Li, J. Q. Xiang, J. J. Wang, H. Q. Chen, *Oncol. Rep.*, **2008**, *20*, 581–587.
68. P. D. Ottewell, H. Monkkonen, M. Jones, D. V. Lefley, R. E. Coleman, I. Holen, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **2008**, *100*, 1167–1178.
69. L. Liu, H. Geng, C. Mei, L. Chen, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2021**, *2021*, 6661534.
70. B. O’Carrigan, M. H. Wong, M. L. Willson, M. R. Stockler, N. Pavlakis, A. Goodwin, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2017**, *10*, CD003474.
71. Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group, *The Lancet*, **2015**, *386*, 1353–1361.
72. R. Mhaskar, A. Kumar, B. Miladinovic, B. Djulbegovic, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2017**, *12*, CD00318.
73. C. L. Vale, S. Burdett, L. H. M. Rydzewska, L. Albiges, N. W. Clarke, D. Fisher, K. Fizazi, G. Gravis, N. D. James, M. D. Mason, M. K. B. Parmar, C. J. Sweeney, M. R. Sydes, B. Tombal, J. F. Tierney, *Lancet Oncol.*, **2016**, *17*, 243–256.
74. F. Orsini, G. Sello, M. Sisti, *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 264–289.
75. S. Takiguchi, Y. Nishino, K. Inoue, M. Ikeda, Kataoka, K. Matsusue, K. Nishiyama, H. Iguchi, *Oncol. Rep.*, **2012**, *28*, 111–116.
76. S. Matsunaga, K. Iguchi, S. Usui, K. Hirano, *Anticancer Res.*, **2007**, *27*, 927–932.
77. P. Petruczynik, P. Kafarski, M. Psurski, J. Wietrzyk, Z. Kielbowicz, J. Kuryszek, E. Chmielewska, *Molecules*, **2020**, *25*, 1424.
78. P. Kosikowska, M. Bochno, K. Macegoniuk, G. Forlani, P. Kafarski, Ł. Berlicki, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2016**, *31*, 931–938.
79. S. Ghosh, J. M. W. Chan, C. R. Lea, G. A. Meints, J. C. Lewis, Z. S. Tovian, R. M. Flessner, T. C. Loftus, I. Bruchhaus, H. Kendrick, S. L. Croft, R. G. Kemp, S. Kobayashi, T. Nozaki, E. Oldfield, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 175–187.
80. E. Puljula, P. Turhanen, J. Vepsäläinen, M. Monteil, M. Lecouvey, J. Weisell, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2015**, *6*, 397–401.
81. E. S. Rudge, A. H. Y. Chan, F. J. Leeper, *RSC Med. Chem.*, **2022**, *13*, 375–391.
82. M. Monteil, E. Migianu-Griffoni, O. Sainte-Catherine, M. Di Benedetto, M. Lecouvey, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *77*, 56–64.

83. M. Abdelkarim, E. Guenin, O. Sainte-Catherine, N. Vintonenko, N. Peyri, G. Y. Perret, M. Crepin, A. M. Khatib, M. Lecouvey, M. Di Benedetto, *PLoS ONE*, **2009**, *4*, e4685.
84. V. A. Pavlov, F. H. Ebetino, M. W. Lundy, J. Joly, R. L. Dobson, R. G. G. Russell, A. W. Mazur, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2016**, *191*, 1504–1508.
85. K. Matsumoto, K. Hayashi, K. Murata-Hirai, M. Iwasaki, H. Okamura, N. Minato, C. T. Morita, Y. Tanaka, *ChemMedChem*, **2016**, *11*, 2656–2663.
86. Y. Zhang, A. Leon, Y. Song, D. Studer, C. Haase, L. A. Koscielski, E. Oldfield, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 5804–5814.
87. A. J. Wiemer, J. S. Yu, L. W. Shull, R. J. Barney, B. M. Wasko, K. M. Lamb, R. J. Hohl, D. F. Wiemer, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 3652–3660.
88. F. H. Ebetino, L. A. Jamieson, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **1990**, *51*, 23–26.
89. J. Dussart-Gautheret, J. Deschamp, T. Legigan, M. Monteil, E. Migianu-Griffoni, M. Lecouvey, *Molecules*, **2021**, *26*, 7609.
90. E. Chmielewska, P. Kafarski, *Molecules*, **2016**, *21*, 1474.
91. V. D. Romanenko, V. P. Kukhar, *Arkivoc*, **2012**, 2012, 127–166.
92. F. Suzuki, Y. Fujikawa, S. Yamamoto, H. Mizutani, C. Funabashi, T. Ohya, T. Ikai, T. Oguchi, *US Patent 5583122 A*, **1979**.
93. P. Kafarski, B. Lejczak, G. Forlani, R. Gancarz, C. Torreilles, J. Grembecka, A. Ryczek, P. Wieczorek, *J. Plant Growth Regul.*, **1997**, *16*, 153–158.
94. E. Bálint, Á. Tajti, A. Dzielak, G. Hägele, G. Keglevich, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2016**, *12*, 1493–1502.
95. M. Bochno, Ł. Berlicki, *Tetrahedron Lett.*, **2014**, *55*, 219–223.
96. L. I. Minaeva, L. S. Patrikeeva, M. M. Kabachnik, I. P. Beletskaya, B. S. Orlinson, I. A. Novakov, *Heteroat. Chem.*, **2011**, *22*, 55–58.
97. V. I. Krutikov, A. V. Erkin, P. A. Pautov, M. M. Zolotukhina, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2003**, *73*, 187–197.
98. M. S. Shaik, M. R. Nadiveedhi, M. Gundluru, U. Katike, V. S. R. Obulam, S. R. Cirandur, *Synth. Commun.*, **2021**, *51*, 747–764.
99. W. Plöger, N. Schindler, K. Wollmann, K. H. Worms, *Z. Für Anorg. Allg. Chem.*, **1972**, *389*, 119–128.
100. M. Fukuda, Y. Okamoto, H. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1975**, *48*, 1030–1030.
101. A. Wang, Z. Chang, W. T. Sun, P. Huang, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 732–735.
102. G. Olive, A. Jacques, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2003**, *178*, 33–46.
103. C. Yu, B. Wang, Z. Chen, *Chin. J. Chem.*, **2008**, *26*, 1899–1901.
104. A. A. Prishchenko, M. V. Livantsov, O. P. Novikova, L. I. Livantsova, V. S. Petrosyan, *Heteroat. Chem.*, **2009**, *20*, 319–324.
105. A. A. Prishchenko, M. V. Livantsov, O. P. Novikova, L. I. Livantsova, I. S. Ershov, V. S. Petrosyan, *Heteroat. Chem.*, **2013**, *24*, 355–360.
106. S. H. Szajnman, E. L. Ravaschino, R. Docampo, J. B. Rodriguez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 4685–4690.
107. B. Kaboudin, H. Esfandiari, A. Moradi, F. Kazemi, H. Aoyama, *J. Org. Chem.*, **2019**, *84*, 14943–14948.
108. R. E. Islas, J. J. García, *ChemCatChem*, **2019**, *11*, 1337–1345.
109. Y. C. Hong, J. L. Ye, P. Q. Huang, *J. Org. Chem.*, **2022**, *87*, 9044–9055.
110. T. Cheviet, S. Peyrottes, *J. Org. Chem.*, **2021**, *86*, 3107–3119.
111. T. Schrader, R. Kober, W. Steglich, *Synthesis*, **1986**, 1986, 372–375.
112. F. H. Ebetino, J. D. Berk, *J. Organomet. Chem.*, **1997**, *529*, 135–142.
113. C. A. Metcalf, W. C. Shakespeare, T. K. Sawyer, Y. Wang, R. Bohacek, *U.S. Patent WO03000270*, **2003**.

114. Y. V. Rassukana, A. A. Sinitsa, P. P. Onysko, *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.*, **2005**, 54, 2652–2655.
115. Y. Rassukana, M. Kolotylo, O. Sinitsa, V. Pirozhenko, P. Onys'ko, *Synthesis*, **2007**, 2007, 2627–2630.
116. Y. V. Rassukana, I. P. Yelenich, P. P. Onys'ko, *Ukr Bioorg Acta*, **2022**, 17, 101–104.
117. V. P. Morgalyuk, T. V. Strelkova, E. E. Nifant'ev, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2012**, 85, 93–100.
118. A. Kuźnik, R. Mazurkiewicz, M. Grymel, K. Zielińska, J. Adamek, E. Chmielewska, M. Bochno, S. Kubica, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2015**, 11, 1418–1424.
119. K. B. Farrell, A. Karpeisky, D. H. Thamm, S. Zinnen, *Bone Rep.*, **2018**, 9, 47–60.
120. S. Shi, H. Duan, X. Ou, *Biomed. Pharmacother.*, **2024**, 175, 116699.
121. R. N. Young, M. D. Grynepas, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2018**, 40, 87–94.
122. L. Xing, F. H. Ebetino, R. K. Boeckman, V. Srinivasan, J. Tao, T. K. Sawyer, J. Li, Z. Yao, B. F. Boyce, *Bone*, **2020**, 138, 115492.
123. H. Xie, G. Chen, R. N. Young, *J. Med. Chem.*, **2017**, 60, 7012–7028.
124. K. Hochdörffer, K. Abu Ajaj, C. Schäfer-Obodozie, F. Kratz, *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 7502–7515.
125. S. Zhang, J. E. I. Wright, G. Bansal, P. Cho, H. Uludag, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2800–2808.
126. F. Hosain, R. P. Spencer, H. M. Couthon, G. L. Sturtz, *J. Nucl. Med.*, **1995**, 37, 105–107.
127. G. Sturtz, G. Appéré, K. Breistol, O. Fodstad, G. Schwartsmann, H. Hendriks, *Eur. J. Med. Chem.*, **1992**, 27, 825–833.
128. A. A. El-Mabhouh, P. N. Nation, J. T. Abele, T. Riauka, E. Postema, A. J. B. McEwan, J. R. Mercer, *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.*, **2011**, 19, 287–295.
129. A. A. El-Mabhouh, C. A. Angelov, R. Cavell, J. R. Mercer, *Nucl. Med. Biol.*, **2006**, 33, 715–722.
130. S. Schott, M. Wallwiener, B. Kootz, H. Seeger, T. Fehm, H. Neubauer, *Invest. New Drugs*, **2012**, 30, 1750–1755.
131. J. Weinreich, T. C. Schott, I. Königsrainer, M. Küper, A. Königsrainer, H. Schott, *Anticancer Res.*, **2012**, 32, 4299–4306.
132. C. Schem, R. J. Tower, P. Kneissl, A. C. Rambow, G. M. Campbell, C. Desel, T. Damm, T. Heilmann, S. Fuchs, M. Zuhayra, A. Trauzold, C. C. Glüer, S. Schott, S. Tiwari, *J. Bone Miner. Res.*, **2017**, 32, 536–548.
133. S. P. Zinnen, A. Karpeisky, D. D. Von Hoff, L. Plekhova, A. Alexandrov, *The Oncologist*, **2019**, 24, 303–e102.
134. J. K. Agyin, B. Santhamma, S. S. Roy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 6455–6458.
135. H. Wang, H. Zhang, V. Srinivasan, J. Tao, W. Sun, X. Lin, T. Wu, B. F. Boyce, F. H. Ebetino, R. K. Boeckman, L. Xing, *J. Bone Miner. Res.*, **2020**, 35, 343–356.
136. J. Tao, V. Srinivasan, X. Yi, Y. Zhao, H. Zhang, X. Lin, X. Zhou, B. F. Boyce, P. W. Villalta, F. H. Ebetino, K. K. Ho, R. K. Boeckman, L. Xing, *J. Bone Miner. Res.*, **2020**, 37, 629–642.
137. A. El-Mabhouh, C. Angelov, A. McEwan, G. Jia, J. Mercer, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2004**, 19, 627–640.
138. R. Erez, S. Ebner, B. Attali, D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 816–820.
139. P. Herczegh, T. B. Buxton, J. C. McPherson, Á. Kovács-Kulyassa, P. D. Brewer, F. Sztaricskai, G. G. Stroebel, K. M. Plowman, D. Farcasiu, J. F. Hartmann, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2338–2341.
140. T. J. Houghton, K. S. E. Tanaka, T. Kang, E. Dietrich, Y. Lafontaine, D. Delorme, S. S. Ferreira, F. Viens, F. F. Arhin, I. Sarmiento, D. Lehoux, I. Fadhil, K. Laquerre, J.

- Liu, V. Ostiguy, H. Poirier, G. Moeck, T. R. Parr, A. R. Far, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 6955–6969.
141. P. P. Sedghizadeh, S. Sun, A. F. Junka, E. Richard, K. Sadrerafi, S. Mahabady, N. Bakhshalian, N. Tjokro, M. Bartoszewicz, M. Oleksy, P. Szymczyk, M. W. Lundy, J. D. Neighbors, R. G. G. Russell, C. E. McKenna, F. H. Ebetino, *J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 2326–2343.
142. Y. Ren, J. Weeks, T. Xue, J. Rainbolt, K. L. De Mesy Bentley, Y. Shu, Y. Liu, E. Masters, P. Cherian, C. E. McKenna, J. Neighbors, F. H. Ebetino, E. M. Schwarz, S. Sun, C. Xie, *Bone Res.*, **2023**, *11*, 51.
143. R. Reddy, E. Dietrich, Y. Lafontaine, T. J. Houghton, O. Belanger, A. Dubois, F. F. Arhin, I. Sarmiento, I. Fadhil, K. Laquerre, V. Ostiguy, D. Lehoux, G. Moeck, T. R. Parr, A. Rafai Far, *ChemMedChem*, **2008**, *3*, 1863–1868.
144. M. Morioka, A. Kamizono, H. Takikawa, A. Mori, H. Ueno, S. Kadowaki, Y. Nakao, K. Kato, K. Umezawa, *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*, 1143–1148.
145. L. Gil, Y. Han, E. E. Opas, G. A. Rodan, R. Ruel, J. G. Seedor, P. C. Tyler, R. N. Young, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 901–919.
146. M. Thévenin, G. Chen, S. Kantham, C. Sun, M. Glogauer, R. N. Young, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **2021**, *4*, 908–925.
147. S. Hu, C. C. Liu, G. Chen, T. Willett, R. N. Young, M. D. Gryn timer, *Osteoporos. Int.*, **2016**, *27*, 797–808.
148. C. S. Becker, N. V. Chukanov, I. A. Grigor'ev, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2015**, *190*, 1201–1212.
149. S. Arns, R. Gibe, A. Moreau, M. Monzur Morshed, R. N. Young, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 2131–2140.
150. A. B. Shenvi, C. A. Kettner, *U.S. Patent*, 4,499,082, **1985**.
151. J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 333–338.
152. Z. Ashhar, M. F. Ahmad Fadzil, H. Hassan, M. F. Othman, M. B. Md Hassan, V. Y. Chun Vui, C. Guat Choo, N. A. Yusof, *Curr. Med. Imaging Rev.*, **2024**, *20*, e15734056270935.
153. G. P. Keeling, F. Baark, O. L. Katsamenis, J. Xue, P. J. Blower, S. Bertazzo, R. T. M. De Rosales, *Sci. Rep.*, **2023**, *13*, 14611.
154. Z. Zha, Z. Wu, S. R. Choi, K. Ploessl, M. Smith, D. Alexoff, L. Zhu, H. F. Kung, *Mol. Pharm.*, **2020**, *17*, 1674–1684.
155. L. E. Cole, T. Vargo-Gogola, R. K. Roeder, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2016**, *99*, 12–27.
156. V. Kubíček, J. Rudovský, J. Kotek, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, Z. I. Kolar, H. Th. Wolterbeek, J. A. Peters, I. Lukeš, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 16477–16485.
157. V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**, *2007*, 333–344.
158. T. Vitha, V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, I. Lukeš, J. A. Peters, *Dalton Trans.*, **2009**, 3204.
159. P. Ge, F. Sheng, Y. Jin, L. Tong, L. Du, L. Zhang, N. Tian, G. Li, *Biomed. Pharmacother.*, **2016**, *84*, 423–429.
160. M. Fellner, R. P. Baum, V. Kubíček, P. Hermann, I. Lukeš, V. Prasad, F. Rösch, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2010**, *37*, 834–834.
161. M. Guleria, T. Das, J. Amirdhanayagam, A. S. Shinto, K. K. Kamaleshwaran, A. Pandian, H. D. Sarma, A. Dash, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2019**, *34*, 67–75.
162. M. Meckel, M. Fellner, N. Thieme, R. Bergmann, V. Kubicek, F. Rösch, *Nucl. Med. Biol.*, **2013**, *40*, 823–830.

163. A. Khawar, E. Eppard, F. Roesch, H. Ahmadzadehfar, S. Kürpig, M. Meisenheimer, Florian. C. Gaertner, M. Essler, Ralph. A. Bundschuh, *Ann. Nucl. Med.*, **2019**, 33, 404–413.
164. A. Fakhari, A. R. Jalilian, F. Johari-Daha, M. Shafiee-Ardestani, A. Khalaj, *Asia Ocean. J. Nucl. Med. Biol.*, **2016**, 4, 98–105.
165. J. Holub, M. Meckel, V. Kubíček, F. Rösch, P. Hermann, *Contrast Media Mol. Imaging*, **2015**, 10, 122–134.
166. A. Passah, M. Tripathi, S. Ballal, M. P. Yadav, R. Kumar, F. Roesch, M. Meckel, P. Sarathi Chakraborty, C. Bal, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2017**, 44, 41–49.
167. J. Notni, J. Plutnar, H. J. Wester, *EJNMMI Res.*, **2012**, 2, 13.
168. R. K. Doot, A. J. Young, M. E. Daube-Witherspoon, D. Alexoff, K. J. Labban, H. Lee, Z. Wu, Z. Zha, S. R. Choi, K. H. Ploessl, E. K. Schubert, H. Lee, L. Zhu, J. S. Reddin, J. S. Karp, H. Kung, D. A. Pryma, *Nucl. Med. Biol.*, **2020**, 86–87, 1–8.
169. Z. Wu, Z. Zha, S. R. Choi, K. Plössl, L. Zhu, H. F. Kung, *Nucl. Med. Biol.*, **2016**, 43, 360–371.
170. G. P. Keeling, B. Sherin, J. Kim, B. San Juan, T. Grus, T. R. Eykyn, F. Rösch, G. E. Smith, P. J. Blower, S. Y. A. Terry, R. T. M. De Rosales, *Bioconjug. Chem.*, **2021**, 32, 1276–1289.
171. H. Hong, K. Ploessl, Z. Zha, H. Wang, R. Guo, Q. Xie, H. Zhu, Z. Yang, L. Zhu, H. F. Kung, *Appl. Radiat. Isot.*, **2021**, 169, 109485.
172. E. W. Price, C. Orvig, *Chem Soc Rev*, **2014**, 43, 260–290.
173. Y. Lalatonne, M. Monteil, H. Jouni, J. M. Serfaty, O. Sainte-Catherine, N. Lièvre, S. Kusmia, P. Weinmann, M. Lecouvey, L. Motte, *J. Osteoporos.*, **2010**, 2010, 1–7.
174. L. Sandiford, A. Phinikaridou, A. Protti, L. K. Meszaros, X. Cui, Y. Yan, G. Frodsham, P. A. Williamson, N. Gaddum, R. M. Botnar, P. J. Blower, M. A. Green, R. T. M. De Rosales, *ACS Nano*, **2013**, 7, 500–512.
175. A. Kuźnik, D. Kozicka, W. Hawranek, K. Socha, K. Erfurt, *Molecules*, **2022**, 27, 3571.
176. N. Harsági, G. Keglevich, *Molecules*, **2021**, 26, 2840.
177. S. K. Król, M. Kielbus, A. Rivero-Müller, A. Stepulak, *BioMed Res. Int.*, **2015**, 2015, 1–11.
178. Y. H. Wu, F. D. M. Ramírez, Y. Y. Lin, T. M. Shieh, T. C. Chang, C. H. Tang, *Int. Immunopharmacol.*, **2025**, 147, 114018.
179. Y. Kashiwada, J. Chiyo, Y. Ikeshiro, T. Nagao, H. Okabe, L. M. Cosentino, K. Fowke, K. H. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 183–185.
180. S. C. Jonnalagadda, P. Suman, D. C. Morgan, J. N. Seay, in *Stud. Nat. Prod. Chem.*, Elsevier, **2017**, pp. 45–84.
181. I. C. Sun, J. K. Shen, H. K. Wang, L. M. Cosentino, K. H. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 1267–1272.
182. M. Grymel, A. Lalik, A. Kazek-Kęsik, M. Szewczyk, P. Grabiec, K. Erfurt, *Molecules*, **2022**, 27, 5156.
183. F. Wingen, H. Sterz, H. Blum, H. Möller, W. Pittermann, B. L. Pool, H. J. Sinn, H. Spring, D. Schmahl, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1986**, 111, 209–219.
184. F. Wingen, B. L. Pool, P. Klein, T. Klenner, D. Schmähl, *Invest. New Drugs*, **1988**, 6, 155–167.
185. A. Siebert, M. Wysocka, B. Krawczyk, G. Cholewiński, J. Rachoń, *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 143, 646–655.
186. A. Siebert, G. Cholewiński, P. Trzonkowski, J. Rachon, *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, 189, 112091.
187. F. F. Shang, M. Y. Wang, J. P. Ai, Q. K. Shen, H. Y. Guo, C. M. Jin, F. E. Chen, Z. S. Quan, L. Jin, C. Zhang, *Med. Chem. Res.*, **2021**, 30, 2228–2239.

188. A. Siebert, M. Prejs, G. Cholewinski, K. Dzierzbicka, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2017**, 17, 734–745.
189. N. Kuźnik, M. Wyskocka, *Wiad. Chem.*, **2013**, 67, 665–694.
190. E. K. Sarbisheh, A. K. Salih, S. J. Raheem, J. S. Lewis, E. W. Price, *Inorg. Chem.*, **2020**, 59, 11715–11727.
191. S. Heskamp, R. Raavé, O. Boerman, M. Rijpkema, V. Goncalves, F. Denat, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, 28, 2211–2223.
192. R. Raavé, G. Sandker, P. Adumeau, C. B. Jacobsen, F. Mangin, M. Meyer, M. Moreau, C. Bernhard, L. Da Costa, A. Dubois, V. Goncalves, M. Gustafsson, M. Rijpkema, O. Boerman, J. C. Chambron, S. Heskamp, F. Denat, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2019**, 46, 1966–1977.
193. J. P. Holland, V. Divilov, N. H. Bander, P. M. Smith-Jones, S. M. Larson, J. S. Lewis, *J. Nucl. Med.*, **2010**, 51, 1293–1300.
194. G. Sturtz, H. Couthon, O. Fabulet, M. Mian, S. Rosini, *Eur. J. Med. Chem.*, **1993**, 28, 899–903.
195. A. Zajkowicz, A. Gdowicz-Kłosok, M. Krześniak, D. Ściegłńska, M. Rusin, *Cell. Signal.*, **2015**, 27, 1677–1687.
196. B. Łasut-Szyszk, A. Gdowicz-Kłosok, M. Krześniak, M. Głowala-Kosińska, A. Będzińska, M. Rusin, *Apoptosis*, **2024**, 29, 1515–1528.
197. J. Josse, F. Valour, Y. Maali, A. Diot, C. Batailler, T. Ferry, F. Laurent, *Front. Microbiol.*, **2019**, 10, 1602.
198. Y. Li, X. Liu, D. Jiang, Y. Lin, Y. Wang, Q. Li, L. Liu, Y. H. Jin, *Arch. Pharm. Res.*, **2016**, 39, 1257–1265.
199. S. Amiri, S. Dastghaib, M. Ahmadi, P. Mehrbod, F. Khadem, H. Behrouj, M. R. Aghanoori, F. Machaj, M. Ghamsari, J. Rosik, A. Hudecki, A. Afkhami, M. Hashemi, M. J. Los, P. Mokarram, T. Madrakian, S. Ghavami, *Biotechnol. Adv.*, **2020**, 38, 107409.
200. R. Ohme, E. Schmitz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1967**, 6, 566.
201. V. K. Yadav, K. G. Babu, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2005, 452–456.
202. A. A. Prishchenko, M. V. Livantsov, O. P. Novikova, L. I. Livantsova, G. M. Averochkin, V. S. Petrosyan, *Heteroat. Chem.*, **2015**, 26, 405–410.
203. D. Kantoci, J. K. Denike, W. J. Wechter, *Synth. Commun.*, **1996**, 26, 2037–2043.
204. M. Fukuda, Y. Okamoto, H. Sakurai, *Chem. Lett.*, **1977**, 6, 529–532.

DOROBK NAUKOWY I INNE OSIĄGNIĘCIA

Prace oryginalne i zgłoszenia patentowe związane z tematyką pracy doktorskiej:

1. Ultrasound-assisted synthesis of new bisphosphonate–betulin conjugates and preliminary evaluation of their cytotoxic activity.
D. Kozicka, M. Krześniak, M. Grymel, J. Adamek, B. Łasut-Szyska, T. Cichoń, A. Kuźnik; *RSC Advances*, **2025**, 15, 4086-4094.
2. Koniugaty 1-amino-1,1-bisfosfonianów z betulina, sposób wytwarzania i zastosowanie.
M. Grymel, A. Kuźnik, D. Kozicka, M. Krześniak, B. Łasut-Szyska; Zgłoszenie patentowe nr 448906 z dnia 20.06.2024.
3. Sposób wytwarzania koniugatów 1-amino-1,1-bisfosfonianów z betulina.
A. Kuźnik, M. Grymel, D. Kozicka, J. Adamek; Zgłoszenie patentowe nr 448908 z dnia 20.06.2024.
4. A method for the synthesis of unsymmetric bisphosphoric analogs of α -amino acids.
A. Kuźnik, D. Kozicka, A. Październiok-Holewa, A. Dąbek, K. Juszcak, G. Sokołowska, K. Erfurt; *RSC Advances*, **2023**, 13, 18908-18915.
5. Wielka moc w małej cząsteczce – właściwości i zastosowania bisfosfonianów.
D. Kozicka, K. Socha, J. Szarek, A. Kuźnik; *Wiadomości Chemiczne*, **2023**, 77, 59-71.
6. Niesymetryczne fosfonowo-fosfinowe oraz fosfonowo-fosfinoilowe pochodne 1-amino-1,1-bisfosforowe i metody ich syntezy.
D. Kozicka, A. Kuźnik; Interdyscyplinarne badania młodych naukowców, red. B. Balon, Politechnika Śląska, Gliwice, **2023**, nr 987.
7. One-pot and catalyst-free transformation of *N*-protected 1-amino-1-ethoxyalkylphosphonates into bisphosphonic analogs of protein and non-protein α -amino acids.
A. Kuźnik, D. Kozicka, W. Hawranek, K. Socha, i K. Erfurt; *Molecules*, **2022**, 27, 3571.
8. Diethyl 1-(*N*-acetylamino)-1-(diphenylphosphinoyl)-1-phenylmethylphosphonate.
A. Kuźnik, D. Kozicka, J. Adamek; *MolBank*, **2022**, 2022, M1470.

9. Bieżące i perspektywiczne zastosowania 1-amino-1,1-bisfosfonianów.
D. Kozicka, K. Socha, A. Kuźnik; Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców 21, red. K. Piech, Creativetime, **2022**.

Inne prace:

- 1-Hydroxyalkylphosphonium Salts – Synthesis and Properties.
J. Adamek, A. Kuźnik, A. Październiok-Holewa, M. Grymel, D. Kozicka, D. Mierzwa, K. Erfurt; *Molecules*, **2024**, 29, 18.
- Amide-type substrates in the synthesis of N-protected 1-amino-methylphosphonium salts.
D. Kozicka, P. Zieleźny, K. Erfurt, J. Adamek; *Catalysts*, **2021**, 11, 552.
- Synthesis of N-protected 1-aminoalkylphosphonium salts - a new perspective.
J. Adamek, D. Kozicka; *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, **2021**, 197, 508-510.

Konferencje

- Synthesis of conjugates of tetraethyl α -aminomethylenebisphosphonate with biologically active compounds.
D. Kozicka, J. Ciomperlik, J. Adamek, A. Kuźnik; VI Seminarium Ogólnoakademickie „Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych, Sosnowiec, 16.04.2025; poster.
- Synthesis of new bisphosphonate-betulin conjugates.
D. Kozicka, M. Grymel, J. Adamek, A. Kuźnik; Advanced XXV International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 22.11.2024; poster.
- Synthesis and preliminary evaluation of cytotoxic activity of novel bisphosphonate-betulin conjugates.
D. Kozicka, M. Krześniak, M. Grymel, J. Adamek, B. Łasut-Szyska, T. Cichoń, A. Kuźnik; XXVIII Gliwice Scientific Meetings, 21.11.2024; poster.
- Betulina – białe złoto natury.
D. Kozicka, M. Pielok, M. Grymel; I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Kosmotrend – Naturalne surowce kosmetyczne, Gliwice, 06.06.2024; poster.
- Synthesis and spectroscopic properties of phosphonyl-phosphinoyl analogs of 1-amino-1,1 bisphosphonates.

- J. Korczak, D. Kozicka, A. Kuźnik; V Seminarium Ogólnoakademickie „Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych”, Sosnowiec, 27.03.2024; poster.
6. Phosphonium salt-based strategy for the synthesis of bio-active scaffolds.
D. Sapia, W. Kaczmarczyk, J. Adamek, A. Kuźnik, D. Kozicka; V Seminarium Ogólnoakademickie „Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych”, Sosnowiec, 27.03.2024; poster
7. Synthesis of unsymmetric α -aminobisphosphoric analogs.
D. Kozicka, A. Kuźnik, A. Październiak-Holewa, G. Sokołowska; Advanced XXIV International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 24.11.2023; poster.
8. O,P-acetals – an effective building blocks.
W. Kaczmarczyk, D. Kozicka, A. Kuźnik, A. Październiak-Holewa, M. Grymel, J. Adamek; Advanced XXIV International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 24.11.2023; poster.
9. Synteza pochodnych α -aminobisfosforowych z wykorzystaniem fosfoniowych bloków budulcowych.
D. Kozicka, A. Kuźnik, J. Adamek; 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Toruń, 18-22.09.2023; poster.
10. Synteza i właściwości soli 1-hydroksyalkilofosfoniowych.
D. Kozicka, J. Adamek, M. Grymel, A. Kuźnik, A. Październiak-Holewa, D. Mierzwa; XIX Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów i Studentów „Na pograniczu chemii i biologii”, Trzebieszowice, 4-7.06.2023; komunikat ustny.
11. Synteza pochodnych 1-amino-1,1-bisfosforowych.
D. Kozicka, A. Kuźnik; VIII Międzynarodowa Interdyscyplinarna Konferencja Uczelni Technicznych InterTechDOC'23, Ustroń, 19-20.04.2023; komunikat ustny.
12. A novel method of α -aminobisphosphonates synthesis and their potential application.
D. Kozicka, A. Kuźnik; XXVI Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 18-19.11.2022; poster.
13. One-pot synthesis of *N*-protected tetraethyl 1-amino-1,1-bisphosphonates from α -ethoxy derivatives of phosphorus analogs of α -amino acids.

D. Kozicka, K. Socha, A. Kuźnik; Advanced XXIII International Symposium „Advances in the Chemistry of Heteroorganic Compounds”, Łódź, 28.10.2022; poster.

14. Sole 1-hydroksyalkilofosfoniowe – synteza, właściwości i zastosowanie.
J. Adamek, A. Kuźnik, A. Październiak-Holewa, M. Grymel, D. Kozicka; 64. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin, 11-16.09.2022; poster.
15. Bieżące i perspektywiczne zastosowania 1-amino-1,1-bisfosfonianów.
D. Kozicka, K. Socha, A. Kuźnik; Konferencja Młodych Naukowców nt. Analiza zagadnienia, analiza wyników, wystąpienie młodego naukowca, edycja IV, 5-6.03.2022 (online); poster.
16. Perspektywy medycznych zastosowań α -aminobisfosfonianów.
K. Socha, D. Kozicka, A. Kuźnik; III Konferencja Naukowa Studentów Młodzi Zdolni, Łódź, 6.05.2022; poster.
17. Bisfosfoniany – złoty standard dla chorób kości.
K. Socha, D. Kozicka, A. Kuźnik; III Konferencja Naukowa Studentów Młodzi Zdolni, Łódź, 6.05.2022; poster.

Projekty badawcze

1. Realizacja projektu "Strategia syntezy układów aktywnych biologicznie oparta na właściwościach związków fosforoorganicznych" finansowanego w ramach programu IDUB (konkurs jakościowy na dofinansowanie badań o charakterze przełomowym) w roli wykonawcy projektu. Numer projektu: 04/020/SDU/10-21-02. Okres realizacji: 24.06.2024 - 23.06.2026.; kierownik - dr hab. inż. Jakub Adamek, prof. Pol. Śl.
2. **BKM-609/RCH-2/2025 (04/020/BKM25/1119)**; 01.01.2025 - 30.06.2025; Kwas α -aminometylenobisfosfonowy (ABP) jego pochodne i koniugaty - synteza oraz ocena aktywności biologicznej.
3. **BKM-692/RCH2/2024 (04/020/BKM24/1101)**; 01.01.2024 - 31.12.2024; Synteza oraz ocena aktywności biologicznej związków bisfosforowych i ich koniugatów.
4. **BKM-538/RCH2/2023 (04/020/BKM23/1080)**; 01.01.2023 - 31.12.2023; Synteza i reaktywność fosfoniowych bloków budulcowych.

5. **BKM-633/RCH-2/2022 (04/020/BKM22/1056)**; 01.01.2022 – 31.12.2022; Synteza pochodnych 1-aminobisfosforowych i ich wykorzystanie w tworzeniu koniugatów o potencjalnym znaczeniu biologicznym.

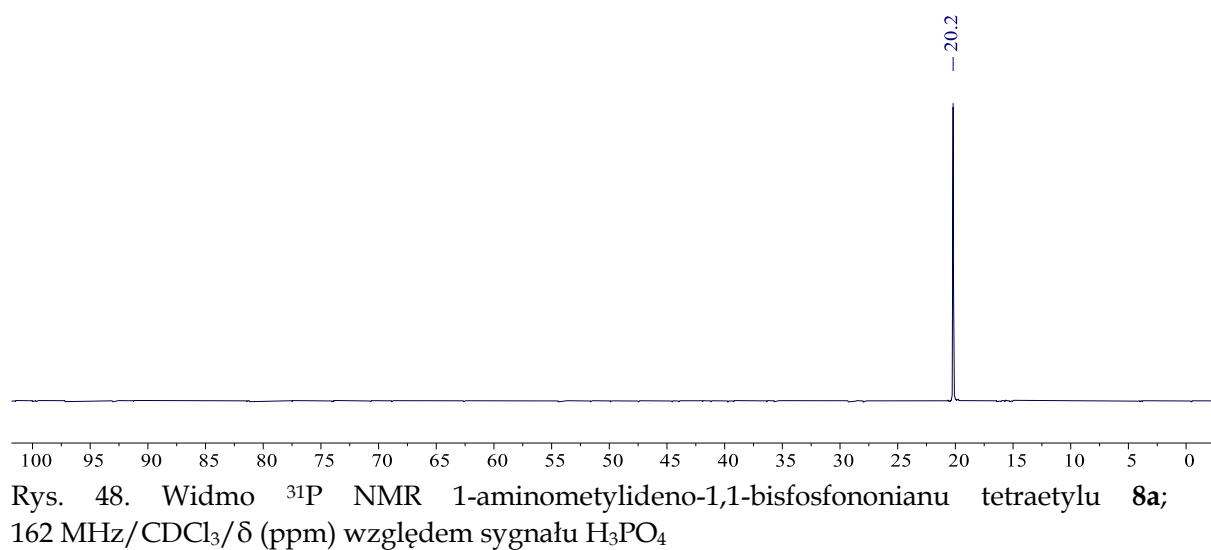
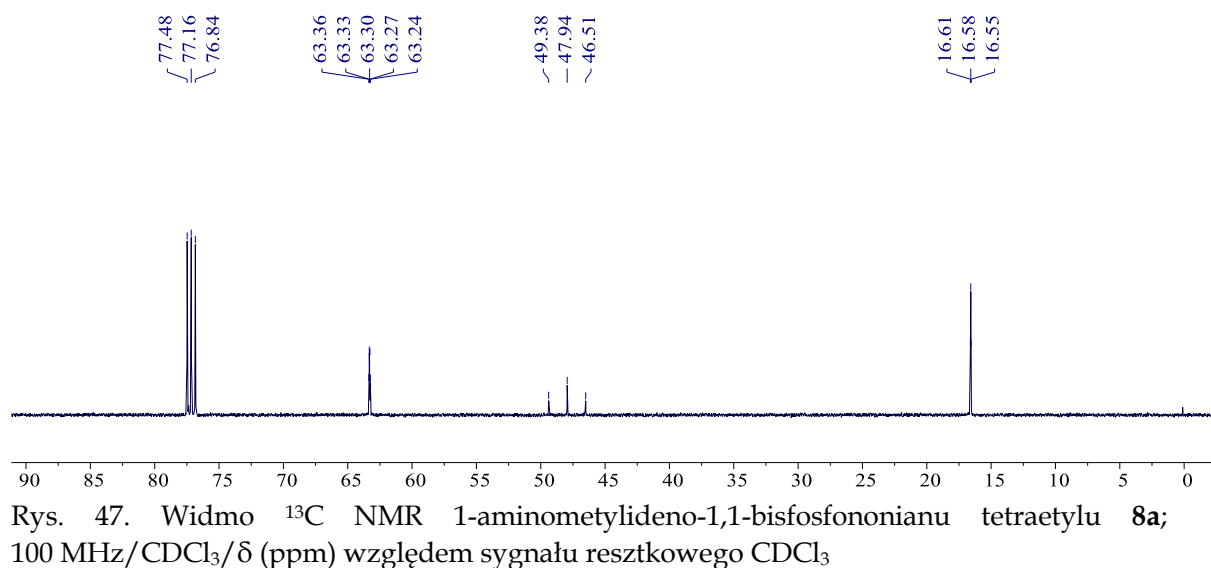
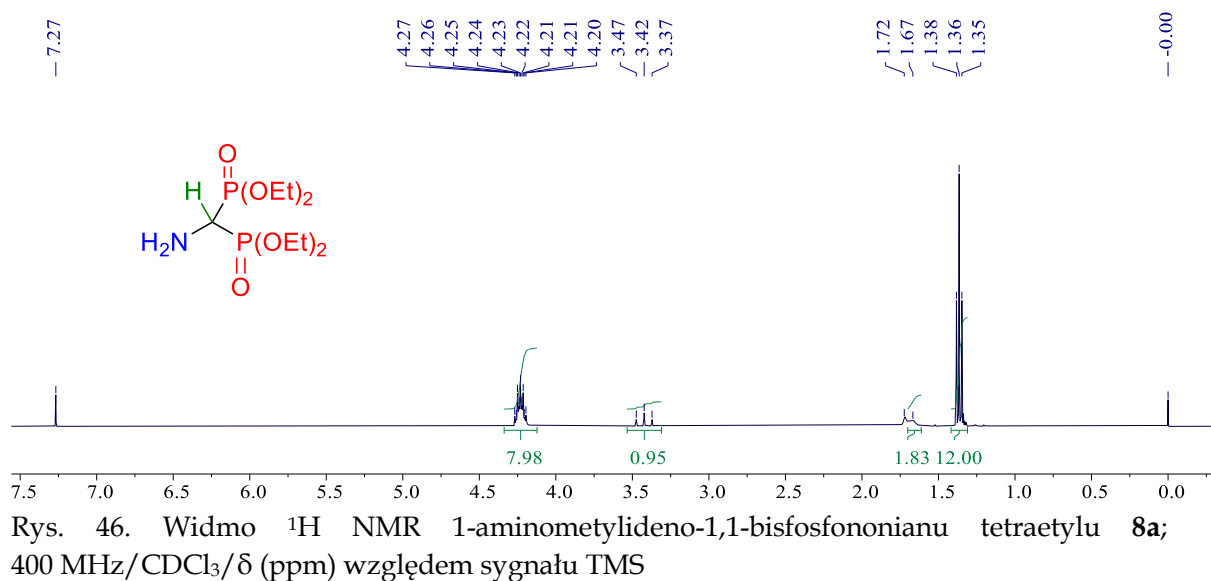
Stáže naukowe

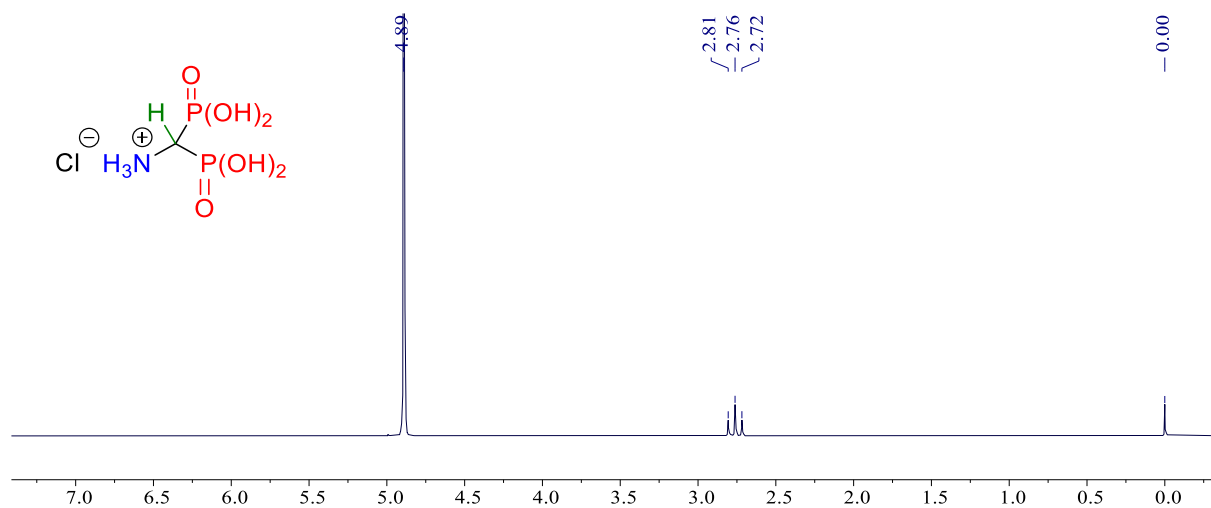
1. Narodowy Instytut Onkologii (o. Gliwice), Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Pracownia Molekularnych Mechanizmów Terapii Nowotworów; 06.2024 - 09.2025.
2. Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, Zespół XB; 01.2024 - 03.2024.

Nagrody i wyróżnienia

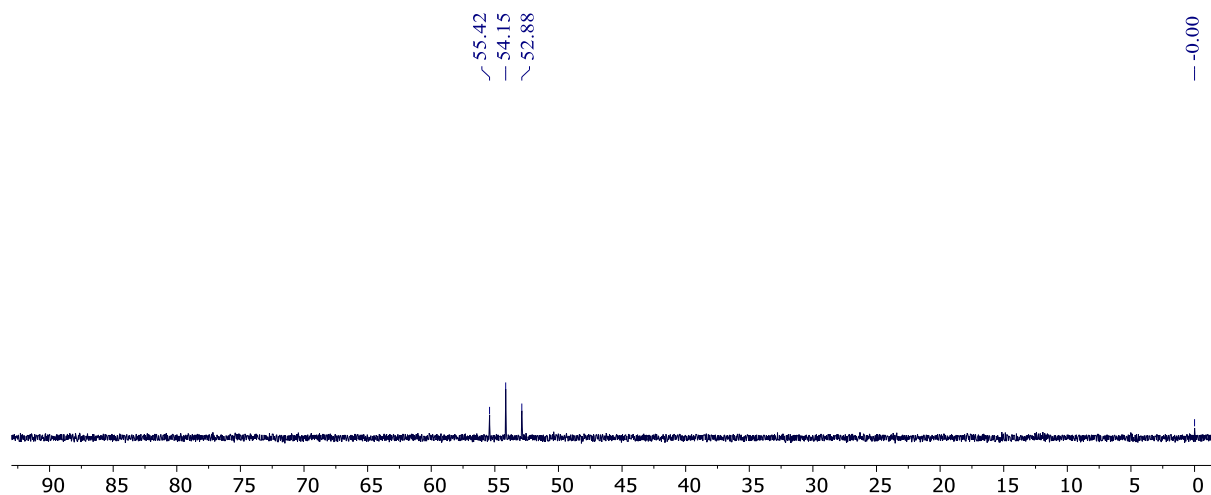
1. Stypendium dla najlepszych doktoratów finansowane w ramach programu IDUB, przyznane w latach akademickich 2021/2022 i 2024/2025.
2. Zespołowa Nagroda Rektora za osiągnięcia organizacyjne w roku 2024.
3. Zespołowa Nagroda Rektora II stopnia za osiągnięcia naukowe w roku 2023.
4. I miejsce w I edycji konkursu 360RG-CHEM Challenge, Łódź, 15.12.2023.
5. Wyróżnienie w konkursie na najlepszy poster na I Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej Kosmotred – Naturalne surowce kosmetyczne, Gliwice, 06.09.2024.

ZAAŁĄCZNIKI

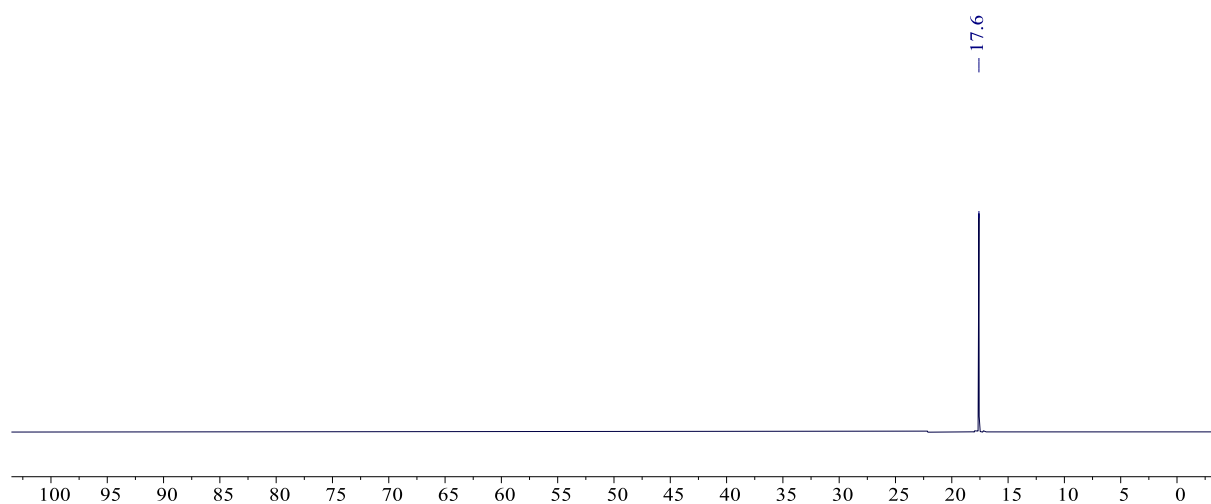




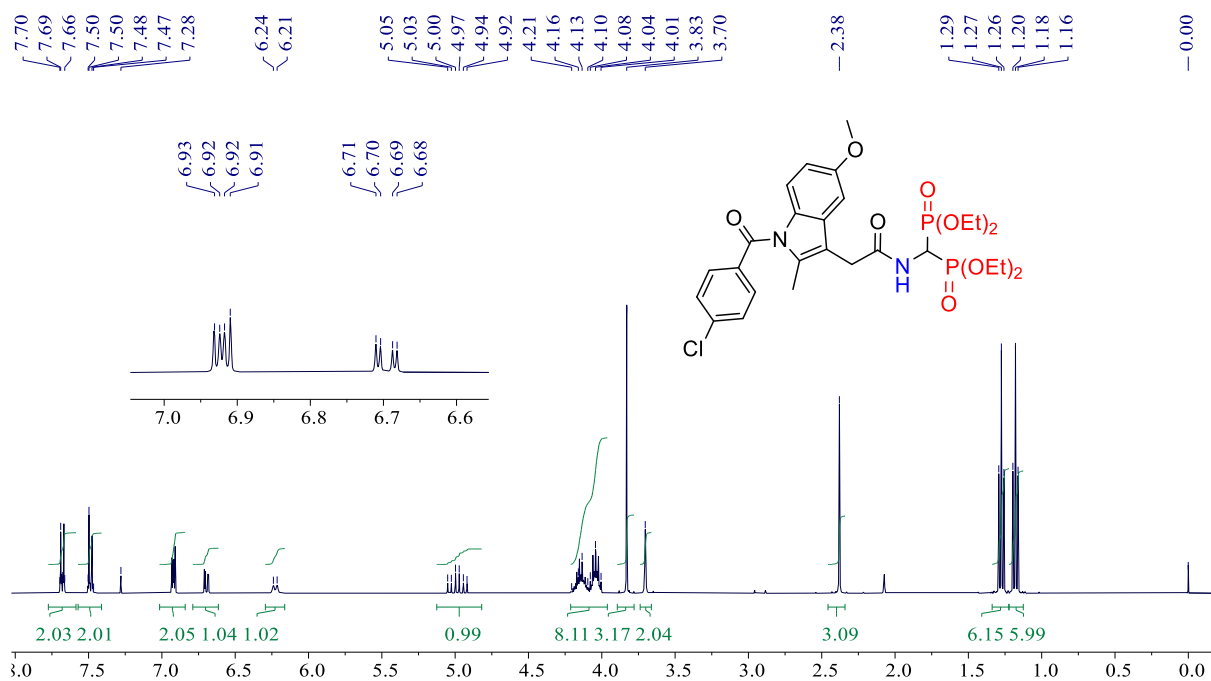
Rys. 49. Widmo ¹H NMR chlorowodorku kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego **9a**; 400 MHz/D₂O+NaOD/ δ (ppm) względem sygnału TMS



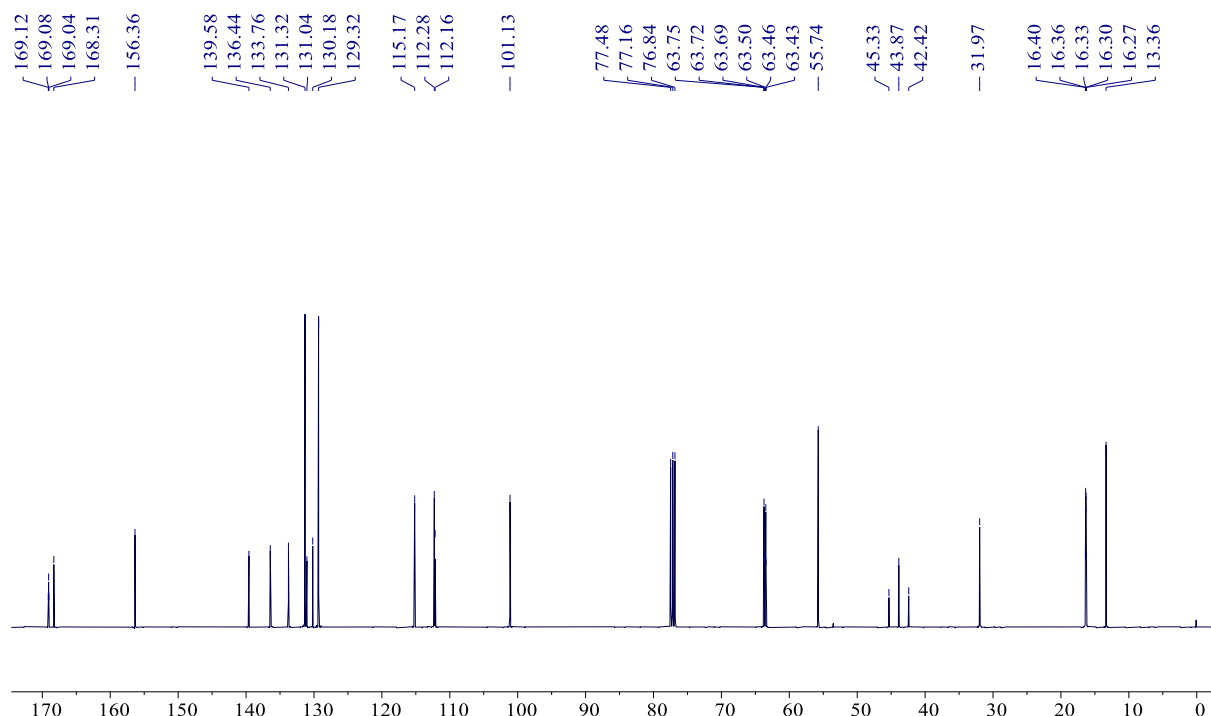
Rys. 50. Widmo ¹³C NMR chlorowodorku kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego **9a**; 100 MHz/D₂O+NaOD/ δ (ppm) względem sygnału TMS



Rys. 51. Widmo ³¹P NMR chlorowodorku kwasu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonowego **9a**; 162 MHz/D₂O+NaOD/ δ (ppm) względem sygnału H₃PO₄



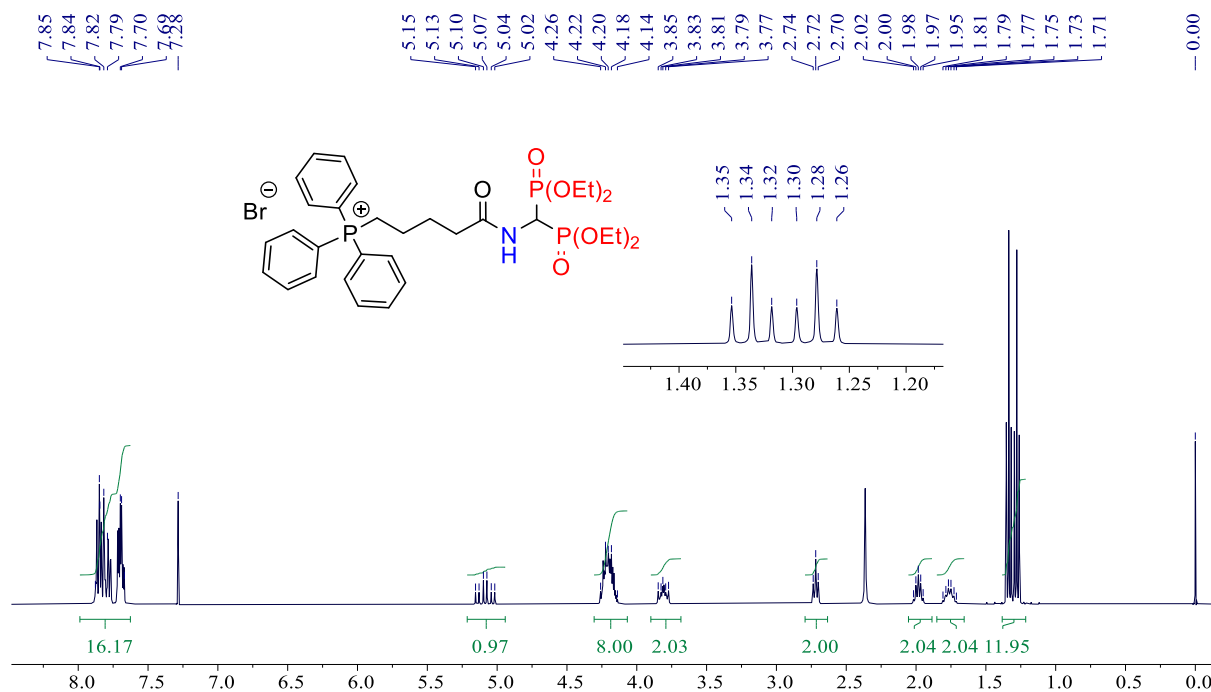
Rys. 52. Widmo ¹H NMR koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z indometacyną **20**; 400 MHz/CDCl₃/δ (ppm) względem sygnału TMS



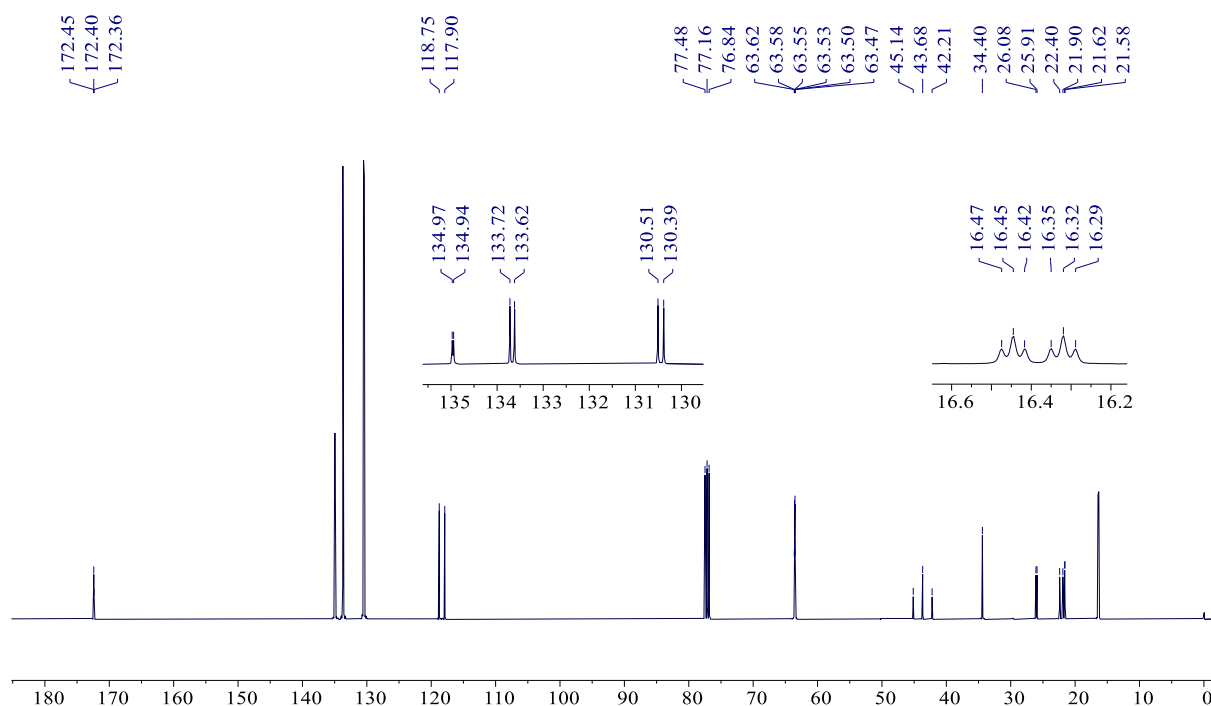
Rys. 53. Widmo ¹³C NMR koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z indometacyną **20**; 100 MHz/CDCl₃/δ (ppm) względem sygnału resztkowego CDCl₃



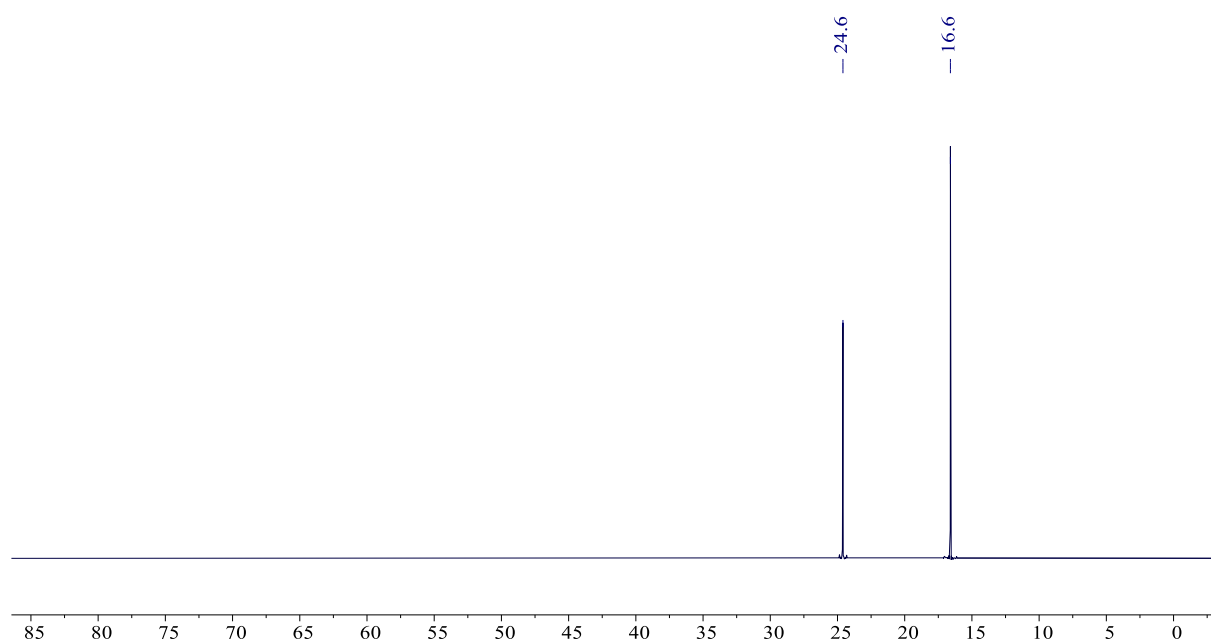
Rys. 54. Widmo ^{31}P NMR koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z indometacyną **20**; 162 MHz/ CDCl_3/δ (ppm) względem sygnału H_3PO_4



Rys. 55. Widmo ^1H NMR koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z bromkiem (4-karboksybutylo)trifenylfosfoniowym **23**; 400 MHz/ CDCl_3/δ (ppm) względem sygnału TMS



Rys. 56. Widmo ^{13}C NMR koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z bromkiem (4-karboksybutylo)trifenylofosfoniowym **23**; 100 MHz/ CDCl_3/δ (ppm) względem sygnału reszkowego CDCl_3



Rys. 57. Widmo ^{31}P NMR koniugatu 1-aminometylideno-1,1-bisfosfonianu tetraetylu z bromkiem (4-karboksybutylo)trifenylofosfoniowym **23**; 162 MHz/ CDCl_3/δ (ppm) względem sygnału H_3PO_4