



Karolina Ciesielska

**Synteza, badania strukturalne
i aktywność przeciwnowotworowa
nowych fluorowanych
 α -aminofosfonianów**

ROZPRAWA DOKTORSKA

przedstawiona Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

celem uzyskania stopnia

Doktora Nauk Chemicznych

Promotor: prof. UAM dr hab. Donata Pluskota-Karwatka

Promotor pomocniczy: dr Dariusz Wawrzyniak

*Serdecznie dziękuję Pani **Profesor Donacie Pluskocie-Karwatce** za wskazanie interesującej tematyki badań, pasję, nieustającą pomoc i wsparcie, a także za ogrom przekazanej wiedzy*

*Dziękuję Panu Doktorowi Dariuszowi
Wawrzyniakowi za wprowadzenie
w świat badań biologicznych, wszelką
pomoc, inspirujące pomysły oraz
zaangażowanie*

*Dziękuję Panu **Profesorowi Maciejowi Kubickiemu**
oraz Panu **Magistrowi Grzegorzowi Dutkiewiczowi**
za przeprowadzenie badań krystalograficznych*

*Dziękuję Panu **Profesorowi Marcinowi Hoffmannowi**
oraz Panu **Doktorowi Wojciechowi Jankowskiemu**
za wykonanie obliczeń kwantowo-chemicznych*

*Dziękuję Pani **Profesor Katarzynie Rolle** za możliwość
stażu w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu
Chemii Bioorganicznej PAN oraz za miłą atmosferę pracy*

*Dziękuję Panu **Doktorowi Karolowi Kamelowi**
za przeprowadzenie badań dokowania molekularnego*

*Dziękuję Pani **Magister Bożenie Wyrzykiewicz** za przemiłą
współpracę i nieustający entuzjazm podczas realizacji
badań spektroskopowych*

*Dziękuję **Adzie, Żanecie, Julii, Julii, Konradowi**
i **Pawłowi** z Zakładu Neuroonkologii Molekularnej IChB
PAN za każdą pomoc, wspólnie spędzony czas
i niezapomnianą atmosferę pracy podczas stażu*

*Dziękuję **Karolinie** za wszystkie wspólne konferencje
i wzajemne wsparcie*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń.....	15
Streszczenie.....	19
Abstract.....	21
Wprowadzenie.....	23
Cel pracy.....	25
I CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	29
1. α -Aminofosfoniany.....	29
1.1. Budowa.....	29
1.2. Właściwości biologiczne.....	30
1.2.1. Właściwości przeciwutleniające.....	32
1.2.2. Aktywność przeciwnowotworowa.....	33
1.2.3. Aktywność przeciwwirusowa.....	37
1.2.4. Aktywność przeciwbakteryjna.....	39
1.2.5. Inhibicja enzymów.....	40
1.2.6. Właściwości chwastobójcze.....	43
1.2.7. Właściwości przeciwgrzybicze.....	44
1.3. Inne zastosowania α -aminofosfonianów.....	45
1.4. Metody otrzymywania α -aminofosfonianów.....	45
1.4.1. Reakcja Kabachnik'a-Fields'a.....	47
1.4.1.1. Stereoselektywna reakcja Kabachnik'a-Fields'a.....	50
1.4.2. Reakcja Pudovik'a.....	54
1.4.2.1. Stereoselektywna reakcja Pudovik'a.....	55
2. Właściwości fluoru i związków fluoroorganicznych.....	64
3. Urokinaza- budowa i mechanizm działania.....	68
3.1. Inhibitory urokinazy.....	72
II WYNIKI I DYSKUSJA.....	79
1. Strategia syntezy tytułowych α -aminofosfonianów.....	79
1.1. Mechanochemiczna metoda syntezy imin.....	79

1.2. Zastosowanie metody mechanochemicznej do syntezy imin w większej skali.....	87
1.3. Struktury krystaliczne imin.....	88
2. Synteza i badania strukturalne α -aminofosfonianów.....	89
2.1. Synteza α -aminofosfonianów.....	89
2.2. Badania strukturalne.....	95
2.3. Obliczenia kwantowo-chemiczne.....	101
3. Badania aktywności biologicznej α -aminofosfonianów.....	104
3.1. Właściwości farmakokinetyczne.....	104
3.2. Badania cytotoksyczności <i>in vitro</i>	107
3.3. Test klonogenny.....	112
3.4. Badania inhibicji urokinazy.....	114
3.5. Dokowanie molekularne.....	119
III WAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA I WNIOSKI.....	131
1. Ważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej.....	131
2. Podsumowanie i wnioski.....	132
IV CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	139
1. Metody ogólne.....	139
2. Preparatyka i dane spektroskopowe imin.....	139
2.1. Ogólna procedura syntezy imin.....	139
2.2. Dane spektroskopowe.....	140
2.2.1. <i>N</i> ,1-bis(2-fluorofenylo)metanoimina (1.1).....	140
2.2.2. 1-(2,4-difluorofenylo)- <i>N</i> -(2-fluorofenylo)metanoimina (1.2).....	140
2.2.3. <i>N</i> -(2-fluorofenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.3).....	141
2.2.4. <i>N</i> -(2-fluorofenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.4).....	141
2.2.5. <i>N</i> -(4-chlorofenylo)-1-(2-fluorofenylo)metanoimina (1.5).....	142
2.2.6. <i>N</i> -(4-chlorofenylo)-1-(2,4-difluorofenylo)metanoimina (1.6).....	142
2.2.7. <i>N</i> -(4-chlorofenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.7).....	143
2.2.8. <i>N</i> -(4-chlorofenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.8).....	143
2.2.9. <i>N</i> -(4-bromofenylo)-1-(2-fluorofenylo)metanoimina (1.9).....	144

2.2.10. <i>N</i> -(4-bromofenylo)-1-(2,4-difluorofenylo)metanoimina (1.10).....	144
2.2.11. <i>N</i> -(4-bromofenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.11).....	145
2.2.12. <i>N</i> -(4-bromofenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.12).....	145
2.2.13. 1-(2-fluorofenylo)- <i>N</i> -(4-metoksyfenylo)metanoimina (1.13).....	146
2.2.14. 1-(2,4-difluorofenylo)- <i>N</i> -(4-metoksyfenylo)metanoimina (1.14).....	146
2.2.15. <i>N</i> -(4-metoksyfenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.15).....	147
2.2.16. <i>N</i> -(4-metoksyfenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.16).....	147
2.2.17. 1-(2-fluorofenylo)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolilo)metanoimina (1.17).....	148
2.2.18. 1-(2,4-difluorofenylo)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolilo)metanoimina (1.18).....	148
2.2.19. <i>N-p</i> -tolilo-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.19).....	149
2.2.20. 1-(perfluorofenylo)- <i>N</i> -(<i>p</i> -tolilo)metanoimina (1.20).....	149
2.2.21. 1-(2-fluorofenylo)- <i>N</i> -(<i>o</i> -tolilo)metanoimina (1.21).....	150
2.2.22. 1-(2,4-difluorofenylo)- <i>N</i> -(<i>o</i> -tolilo)metanoimina (1.22).....	150
2.2.23. <i>N-o</i> -tolilo-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.23).....	151
2.2.24. 1-(perfluorofenylo)- <i>N</i> -(<i>o</i> -tolilo)metanoimina (1.24).....	151
2.2.25. 4-((2-fluorobenzylideno)amino)fenol (1.25).....	152
2.2.26. 4-((2,4-difluorobenzylideno)amino)fenol (1.26).....	152
2.2.27. 4-((2,4,6-trifluorobenzylideno)amino)fenol (1.27).....	153
2.2.28. 4-(((perfluorofenylo)metyleno)amino)fenol (1.28).....	153
2.2.29. 1-(2-fluorofenylo)- <i>N</i> -(1-fenyloetylo)metanoimina (1.29).....	154
2.2.30. 1-(2,4-difluorofenylo)- <i>N</i> -(1-fenyloetylo)metanoimina (1.30).....	154
2.2.31. <i>N</i> -(1-fenyloetylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.31).....	155
2.2.32. 1-(perfluorofenylo)- <i>N</i> -(1-fenyloetylo)metanoimina (1.32).....	155
2.2.33. 1-(2-fluorofenylo)- <i>N</i> -(1-(4-metoksyfenylo)etylo)metanoimina (1.33).....	156
2.2.34. 1-(2,4-difluorofenylo)- <i>N</i> -(1-(4-metoksyfenylo)etylo)metanoimina (1.34).....	156
2.2.35. <i>N</i> -(1-(4-metoksyfenylo)etylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.35).....	157
2.2.36. <i>N</i> -(1-(4-metoksyfenylo)etylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.36).....	157
3. Preparatyka i dane spektroskopowe α -aminofosfonianów.....	158
3.1. Ogólna procedura syntezy α -aminofosfonianów.....	158

3.2. Dane spektroskopowe.....	159
3.2.1. ((2,4-difluorofenylo)((<i>R</i>)-1-fenyl-oetylo)amino)metylo)fosfonian dimetylu (2.1).....	159
3.2.2. ((2,4-difluorofenylo)((<i>R</i>)-1-fenyl-oetylo)amino)metylo)fosfonian dietylu (2.2)...	160
3.2.3. ((perfluorofenylo)((<i>R</i>)-1-fenyl-oetylo)amino)metylo)fosfonian dimetylu (2.3)...	161
3.2.4. ((2-fluorofenylo)((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)metylo)fosfonian dimetylu (2.4).....	162
3.2.5. ((4-fluorofenylo)((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)metylo)fosfonian diizopropylu (2.5).....	163
3.2.6. ((2,4-difluorofenylo)((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)metylo)fosfonian dimetylu (2.6).....	164
3.2.7. ((2,4-difluorofenylo)((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)metylo)fosfonian dietylu (2.7).....	165
3.2.8. ((2,4-difluorofenylo)((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)metylo)fosfonian diizopropylu (2.8).....	166
3.2.9. (((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)(2,4,6-trifluorofenylo)metylo)fosfonian dimetylu (2.9).....	168
3.2.10. (((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)(perfluorofenylo)metylo)fosfonian dimetylu (2.10).....	169
3.2.11. (((<i>R</i>)-1-(4-metoksyfenyl-o)etylo)amino)(perfluorofenylo)metylo)fosfonian dietylu (2.11).....	170
3.2.12. (((<i>S</i>)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(2-fluorofenylo)metylo)fosfonian dimetylu (2.12).....	171
3.2.13. (((<i>S</i>)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(4-fluorofenylo)metylo)fosfonian dimetylu (2.13).....	172
3.2.14. (((<i>S</i>)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(4-fluorofenylo)metylo)fosfonian dietylu (2.14).....	173
3.2.15. ((2,4-difluorofenylo)((<i>S</i>)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)metylo)fosfonian dimetylu (2.15).....	174
3.2.16. ((2,4-difluorofenylo)((<i>S</i>)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)metylo)fosfonian dietylu (2.16).....	175
3.2.17. ((2,4-difluorofenylo)((<i>S</i>)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)metylo)fosfonian diizopropylu (2.17).....	176
3.2.18. (((<i>S</i>)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(2,4,6-trifluorofenylo)metylo)fosfonian dimetylu (2.18).....	177

3.2.19. (((S)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(2,4,6-trifluorofenylo)metylo)fosfonian dietylu (2.19).....	178
4. Obliczenia kwantowo-chemiczne.....	179
5. Krystalografia rentgenowska.....	179
6. Przewidywanie farmakokinetyki <i>in silico</i>	179
7. Linie komórkowe i warunki hodowli.....	180
8. Test żywotności/prolifracji komórek.....	180
9. Test tworzenia kolonii.....	181
10. Fluorometryczny test inhibicji uPA.....	181
11. Analiza ekspresji PLAU w bazie danych TCGA.....	182
12. Dokowanie molekularne.....	182
V LITERATURA.....	185
VI ZAŁĄCZNIKI.....	209

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

- A549** - linia komórkowa gruczolakoraka płuc
- ADME** - *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*, wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie
- BBB** - *Blood-Brain Barrier*, bariera krew-mózg
- BINOL** - 1,1'-bi-2-naftol
- BRCA** - rak inwazyjny piersi
- BSA** - *Bovine Serum Albumin*, albumina surowicy bydłęcej
- Caco-2** - linia komórkowa gruczolakoraka jelita grubego
- CAS** - katalityczne miejsce aktywne
- CDCl₃** - deuterowany chloroform
- CD₃OD** - deuterowany metanol
- CESC** - rak płaskonabłonkowy szyjki macicy i gruczolakorak szyjki macicy
- COAD** - gruczolakorak jelita grubego
- CT-DNA** - *circulating tumor DNA*, krążące DNA nowotworowe
- DMSO** - dimetylosulfotlenek
- DNA** - kwas deoksyrybonukleinowy
- ECM** - macierz zewnątrzkomórkowa
- FdU** - 5-fluoro-2'-deoksyurydina
- GBM** - glejak wielopostaciowy
- GEPIA** - *Gene Expression Profiling Interactive Analysis*, interaktywna analiza profilowania ekspresji genów
- HBA** - liczba akceptorów wiązań wodorowych
- HBD** - liczba donorów wiązań wodorowych
- HeLa** - linia komórkowa gruczolakoraka szyjki macicy
- HepG2** - linia komórkowa raka wątrobowokomórkowego
- HIA** - bierna absorpcja przez przewód pokarmowy
- HIV** - ludzki wirus niedoboru odporności
- HMA** - (heksametyleno)amiloryd
- HRMS** - *High Resolution Mass Spectroscopy*, wysokorozdzielcza spektrometria mas
- HSQC** - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*, heterojądrowa korelacja przez jedno wiązanie
- iBu** - grupa *izo*-butylowa

IC₅₀ - *Inhibitory Concentration*, stężenie hamujące żywotność/proliferaację komórek o 50%

iPr - grupa *izo*-propylowa

LogP - współczynnik rozdziału woda/oktanol

LogS - rozpuszczalność w wodzie

LUAD - gruczolakorak płuc

LUSC - rak płaskonabłonkowy płuc

MCR - *Multi-Component Reactions*, reakcje wieloskładnikowe

MDA-MB-231 - linia komórkowa gruczolakoraka piersi

MMP - metaloproteazy macierzy

MRC-5 - linia komórek nienowotworowych fibroblastów płuc

mRNA - matrycowe RNA

MTT - bromek 3-[4,5dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu

MW - masa cząsteczkowa

NMIBC - nieinwazyjny rak pęcherza moczowego

NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*, magnetyczny rezonans jądrowy (¹H- protonowy, ¹³C- węglowy, ¹⁹F- fluorowy, ³¹P- fosforowy)

NOESY - *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*, wielowymiarowa technika NMR, umożliwiająca określenie wzajemnego położenia protonów w przestrzeni

OV - surowiczy gruczolakorak jajnika

OVCAR-3 - linia komórkowa gruczolakoraka jajnika

PAI-1 - inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1

PAI-2 - inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 2

PAS - obwodowe miejsce aktywne

PDB - *Protein Data Bank*, bank danych o białkach

PET - *Positron Emission Tomography*, pozytonowa tomografia emisyjna

PSA - pole powierzchni polarnej

PTP - *Protein-Tyrosine-Phosphatase*, białkowa fosfataza tyrozynowa

PVY - *Potato virus Y*, wirus Y ziemniaka

RB - liczba wiązań rotujących

READ - gruczolakorak odbytnicy

ROS - *Reactive Oxygen Species*, reaktywne formy tlenu

RT - temperatura pokojowa

SARS-CoV-2 - drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego

SBM - bromelaina macierzysta

SK-OV-3 - linia komórkowa gruczolakoraka jajnika

SWNCT - *Single-Walled Carbon Nanotubes*, jednościenne nanorurki węglowe

tBu - grupa *tert*-butylowa

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*, atlas genomu nowotworu

THF - tetrahydrofuran

TLC - *Thin Layer Chromatography*, chromatografia cienkowarstwowa

TMV - *Tabacco mosaic virus*, wirus mozaiki tytoniu

tPA - aktywator plazminogenu typu tkankowego

U-87 MG - linia komórkowa glejaka wielopostaciowego

U-118 MG - linia komórkowa glejaka wielopostaciowego

U-251 MG - linia komórkowa glejaka wielopostaciowego

uPA - urokinazowy aktywator plazminogenu

uPAR - receptor urokinazy

Streszczenie

α -Aminofosfoniany są ważnymi przedstawicielami związków fosforoorganicznych. Ich strukturalna analogia do naturalnych α -aminokwasów sprawia, że wykazują one szereg aktywności biologicznych, takich jak inhibicja enzymów, działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, czy przeciwnowotworowe. Jednym z enzymów, którego podwyższony poziom prowadzi do poważnych konsekwencji w organizmie, jest urokinaza. Nadekspresja tego białka związana jest z nasileniem przebiegu choroby nowotworowej przejawiającym się, między innymi, powstawaniem przerzutów. Urokinaza stanowi interesujący cel terapeutyczny, gdyż zahamowanie jej działania może skutkować polepszeniem rokowań dla pacjentów. Wprowadzenie fluoru do cząsteczek związków chemicznych jest strategią umożliwiającą modulowanie chemicznych i fizycznych właściwości tych związków. Pozwala między innymi na poprawę lipofilowości, co stanowi bardzo ważny parametr w przypadku substancji o potencjalnym medycznym zastosowaniu. Celem badań prowadzonych w ramach projektu doktorskiego była synteza nowych fluorowanych α -aminofosfonianów, badania strukturalne otrzymanych związków, a także badania aktywności biologicznej pod kątem oceny ich cytotoksyczności przeciwnowotworowej oraz inhibicji enzymu- urokinazy.

Tytułowe związki otrzymano na drodze hydrofosfonylacji imin. Ze względu na duże znaczenie zasad Schiff'a w syntezie, opracowano nową, mechanochemiczną metodę ich otrzymywania, która wpisuje się w zasady zielonej chemii. Metodą tą zsyntezowano szereg imin, wykorzystując do reakcji fluorowane pochodne benzaldehydu oraz pochodne aniliny, zawierające różne podstawniki w różnych pozycjach w pierścieniu aromatycznym. Struktury imin potwierdzono wykonując widma ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR oraz analizy krystalograficzne. Ponadto, dla związków dotąd nieopisanych w literaturze wykonano analizy HRMS. Do syntezy tytułowych α -aminofosfonianów zastosowano chiralne aminy o określonej konfiguracji absolutnej, wobec czego produkty otrzymywane były w postaci mieszanin diastereoizomerycznych. Wszystkie związki zostały szczegółowo scharakteryzowane metodami zarówno spektroskopowymi (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR, ^{31}P NMR), jak i spektrometrycznymi (HRMS). Wykorzystując technikę 2D NMR oraz metodę dyfrakcji promieni rentgenowskich ustalono konfigurację absolutną nowego centrum chiralności, generowanego w głównym diastereoizomerycznym produkcie podczas addycji fosforynu do iminy.

Otrzymane α -aminofosfoniany poddano badaniom aktywności biologicznej. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę farmakokinetyczną *in silico*, której celem była ocena związków jako substancji lekopodobnych. Wszystkie zsyntezowane α -aminofosfoniany spełniały tak zwaną „regułę piątki Lipińskiego”, która jest najpopularniejszym kryterium określania podobieństwa substancji do leków. Otrzymane związki przebadano *in vitro* pod kątem oceny ich cytotoksyczności. Badania przeprowadzono względem dziesięciu linii komórkowych ludzkich nowotworów, pochodzących z różnych narządów oraz względem jednej linii komórek prawidłowych. Celem określenia długoterminowych działań związków, wykonano testy klonogenne. α -Aminofosfoniany zostały również poddane testom inhibicji enzymatycznej, podczas których zbadano ich zdolność hamowania działania urokinazy. Badania inhibicji enzymatycznej wobec urokinazy prowadzono także z wykorzystaniem dokowania molekularnego. Pozwoliło to na poznanie szczegółowych zależności pomiędzy wykazywaną inhibicją a strukturą cząsteczki.

Abstract

α -Aminophosphonates are important representatives of organophosphorus compounds. Their structural analogy to natural α -amino acids makes them exhibit a range of biological activities, such as enzyme inhibition, antimicrobial, antiviral and anticancer effects. One of the enzymes whose elevated levels lead to serious consequences in the body is urokinase. Overexpression of this protein is associated with an increase in the course of cancer manifested, among other things, by the formation of metastases. Urokinase represents an interesting therapeutic target, as inhibition of its activity can result in an improved prognosis for patients. The introduction of a fluorine into the molecules of chemical compounds is a strategy for modulating the chemical and physical properties of these compound. Among other things, it allows improving lipophilicity, which is a very important parameter for substances with potential medical applications. The aim of the research carried out within the framework of the doctoral project was the synthesis of new fluorinated α -aminophosphonates, structural studies of the obtained molecules, as well as biological activity studies to assess their anticancer cytotoxicity and urokinase enzyme inhibition.

The title compounds were obtained by hydrophosphonylation of imines. Due to the great importance of Schiff bases in the synthesis, a new mechanochemical method for their preparation was developed, which fits in with the principles of green chemistry. Using this method, a series of imines were synthesized using fluorinated benzaldehydes derivatives and aniline derivatives containing different substituents at different positions in the aromatic ring for the reaction. The structures of the imines were confirmed by performing ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR spectra and crystallographic analyses. In addition, HRMS analyses were performed for compounds not yet described in the literature. For the synthesis of the title α -aminophosphonates, chiral amines with a specific absolute configuration were used, so that the products were obtained as diastereoisomeric mixtures. All compounds were characterized in detail by both spectroscopic (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR, ^{31}P NMR) and spectrometric (HRMS) methods. Using 2D NMR and X-ray diffraction techniques, the absolute configuration of new chirality center generated in the main diastereoisomeric product during the addition of phosphite to imine was determined.

The obtained α -aminophosphonates were subjected to biological activity studies. First, *in silico* pharmacokinetic analysis was carried out to evaluate the compounds as drug-like substances. All synthesized α -aminophosphonates met the so-called “Lipinski’s Rule of Five”, which is the most popular criterion for determining the similarity of substances to drugs. The obtained compounds were tested *in vitro* to evaluate their cytotoxicity. The tests were performed against ten human cancer cell lines from different organs and against one normal cell line. To determine the long-term effects of the compounds, clonogenic assays were performed. The α -aminophosphonates were also subjected to enzyme inhibition tests, during which their ability to inhibit urokinase was examined. Enzymatic inhibition tests against urokinase were also conducted using molecular docking. This made it possible to find out the detailed relationships between the inhibition shown and the structure of the molecule.

Wprowadzenie

Choroby nowotworowe stanowią jedną z najczęściej występujących przyczyn zgonów na całym świecie. Z roku na rok nieustannie obserwowany jest wzrost zachorowalności na nowotwory. Pomimo dostępności na rynku farmaceutycznym szerokiej gamy substancji przeciwnowotworowych, wciąż poszukiwane są nowe związki wykazujące takie działanie. Istotnym aspektem tych poszukiwań jest opracowanie wysoce selektywnych leków, których zastosowanie w chemioterapii wywoła jak najmniej niepożądanych skutków dla organizmu człowieka. Co więcej, bardzo niepokojącym i coraz częściej obserwowanym w leczeniu wielu chorób zjawiskiem, jest lekooporność. Między innymi także nowotwory stają się coraz bardziej odporne na stosowane leki i terapie. Dlatego projektowanie nowych substancji o działaniu przeciwnowotworowym stanowi niezwykle ważny cel badań prowadzonych przez wiele zespołów naukowych. Jednym z nurtów takich badań jest synteza związków małowcząsteczkowych, jako substancji o potencjalnie dobrej biodostępności.

Nową rozwijającą się formą leczenia nowotworów, dającą obiecujące wyniki, jest terapia celowana. Polega ona na zastosowaniu substancji, które nie działają jak standardowe leki cytostatyczne, ale biorą udział między innymi w blokowaniu mechanizmów procesów specyficznych dla komórek nowotworowych. Chemioterapia celowana wykorzystuje różne cele molekularne, a jednym z nich jest urokinaza- enzym, którego nadekspresję obserwuje się w wielu typach nowotworów, na przykład w nowotworach piersi oraz trzustki. Inhibicja urokinazy może zatem stanowić jedną z metod terapii celowanej.

Wśród wielu związków chemicznych wykazujących aktywność przeciwnowotworową na uwagę zasługują α -aminofosfoniany. Są to związki fosforoorganiczne, będące strukturalnymi analogami α -aminokwasów. Zaskakująco liczna grupa przedstawicieli tych związków charakteryzuje się różnego rodzaju aktywnością biologiczną. Z tego powodu α -aminofosfoniany stanowią atrakcyjne, a także cenne źródło związków znajdujących zastosowanie między innymi w badaniach ukierunkowanych na poszukiwanie nowych leków.

Cel pracy

Celem projektu doktorskiego była synteza nowych α -aminofosfonianów jako związków o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych.

Aktywność biologiczna związków może być i bardzo często jest uzależniona od ich budowy przestrzennej, dlatego do syntezy zaprojektowanych związków wybrano strategię opartą na diastereoselektywnej reakcji Pudovik'a.

Ważnym pierwiastkiem w chemii medycznej jest fluor. Obecność jego atomów w cząsteczkach związków organicznych może znacząco wpłynąć na ich właściwości fizyczne i chemiczne, a także, często korzystnie, na ich bioaktywność i ogólny profil farmakokinetyczny. Z tego względu modulowanie właściwości związków chemicznych poprzez wprowadzenie do ich cząsteczek fluoru staje się coraz bardziej powszechną strategią. Dlatego, celem projektu doktorskiego było zastosowanie w syntezie tytułowych związków substratów zawierających fluor. Takie podejście umożliwiło otrzymanie nowych fluorowanych fosfonianowych analogów kwasów α -aminokarboksylowych.

Celem prowadzonych prac były także badania strukturalne uzyskanych α -aminofosfonianów, uwzględniając nie tylko standardowe potwierdzenie struktury nowych związków, ale służące również ustaleniu konfiguracji absolutnej powstającego na drodze stereoselektywnej reakcji Pudovik'a centrum stereogenicznego. Poznanie struktury przestrzennej otrzymanych związków było szczególnie istotne w odniesieniu do ich ewentualnej aktywności biologicznej.

Istotną część projektu doktorskiego stanowiły badania potencjalnej aktywności biologicznej otrzymanych α -aminofosfonianów. Określenie podobieństwa związków chemicznych do leków jest ważnym etapem w projektowaniu substancji o ewentualnym zastosowaniu w medycynie, dlatego przeprowadzenie takich badań uwzględniono w niniejszym projekcie. Jako kierunek badań biologicznych wybrano ocenę otrzymanych α -aminofosfonianów jako związków przeciwnowotworowych o działaniu cytotoksycznym, jak również nieco mniej konwencjonalne podejście- jako związków mogących znaleźć zastosowanie w chemioterapii celowanej. Jako biomarker wytypowano urokinazę, wobec której zaplanowano wykonanie testów inhibicji enzymatycznej.

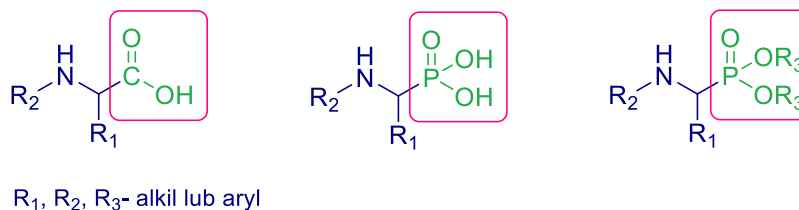
I
CZEŚĆ LITERATUROWA

1. α -Aminofosfoniany

Chemia związków fosforu to niezwykle ciekawa i intensywnie rozwijająca się dziedzina badań. Szczególnie interesujące i coraz bardziej popularne ze względu na swoje biologiczne, fizyczne i chemiczne właściwości są związki fosforoorganiczne, takie jak fosfoniany i α -aminofosfoniany. Fosfoniany charakteryzują się wyjątkową bioaktywnością, dlatego często stosowane są jako leki lub proleki [1][2]. Motyw strukturalny, jakim jest wiązanie węgiel-fosfor stanowi atrakcyjny cel badawczy w różnych obszarach chemii [3]. α -Aminofosfoniany należą do grupy szczególnie ważnych przedstawicieli związków fosforoorganicznych, bowiem słyną z wykazywania szerokiego spektrum aktywności biologicznych i w konsekwencji zainteresowanie nimi wzrasta nieprzerwanie od lat 70. XX wieku [4][5]. α -Aminofosfoniany z powodzeniem znajdują zastosowanie w chemii medycznej, czy bioorganicznej, a także w szeroko rozumianym przemyśle [6][7][8]. Zważywszy na właściwości tej grupy związków oraz ich istotną rolę w projektowaniu leków, α -aminofosfoniany cieszą się dużym zainteresowaniem środowiska naukowego na całym świecie [9].

1.1. Budowa

Kwasy α -aminofosfonowe oraz ich estry, α -aminofosfoniany, stanowią bioizostery naturalnych α -aminokwasów (Rysunek 1). Trygonalna grupa karboksylowa obecna w aminokwasach, została w α -aminofosfonianach zastąpiona tetraedryczną grupą fosfonianową [10]. Obecność wiązania fosfor-węgiel sprawia, że pochodne fosfonianów cechują się znaczną trwałością chemiczną oraz metaboliczną [11]. Grupa fosfonianowa wykazuje podobieństwo do wysokoenergetycznego stanu przejściowego niektórych reakcji enzymatycznych, w szczególności reakcji hydrolizy oraz tworzenia wiązania amidowego lub estrowego [10][12]. Budowa α -aminofosfonianów czyni je interesującymi i bardzo użytecznymi związkami w syntezie chemicznej [11]. Ponadto, α -aminofosfoniany stanowią najważniejsze substytuty odpowiednich α -aminokwasów w układach biologicznych [13]. Podobieństwo strukturalne α -aminofosfonianów do karboksylowych analogów jest dość niezwykle, gdyż sprawia, że w wielu układach i procesach fosfonianowe odpowiedniki mogą zostać rozpoznane i traktowane jako aminokwasy. Jest to interesujące ze względu na istniejące różnice pomiędzy tymi dwiema grupami związków, takie jak na przykład wielkość, kształt czy kwasowość [5].



Rysunek 1. Bioizosteryzm α -aminokwasów, kwasów α -aminofosfonowych i α -aminofosfonianów [14].

W świetle przytoczonych faktów, ugrupowanie N-C-P(O)(OR)₂ stanowi wartościowy farmakofor, którego obecność w cząsteczkach związków może przyczynić się do ich ewentualnej bioaktywności [15].

1.2. Właściwości biologiczne

Wielu przedstawicieli α -aminofosfonianów wykazuje szereg znaczących aktywności biologicznych. Ma to związek nie tylko z ich strukturalnym podobieństwem do α -aminokwasów, ale także z obecnością wiązania węgiel-fosfor. Wiązanie to nie ulega degradacji przez fosfatazę, wobec czego związki zawierające takie wiązanie charakteryzują się wysoką trwałością fizjologiczną [10][16][17]. Ważnym aspektem budowy α -aminofosfonianów, który również wpływa na ich bioaktywność, jest tetraedryczna grupa fosfonianowa. Jej obecność sprawia, że α -aminofosfoniany stanowią trwale mimetyki tetraedrycznych stanów przejściowych hydrolizy peptydów [8][18][19]. Ponadto, α -aminofosfoniany wykazują lipofilowy charakter oraz dobrą przenikalność przez błony komórkowe organizmu [10]. Dowiedziono, że konfiguracja absolutna na atomie węgla bezpośrednio związanym z atomem fosforu, ma istotny wpływ na właściwości biologiczne tej grupy związków [20][21][22]. W wielu przypadkach lepszą bioaktywność pochodnych kwasów α -aminofosfonowych zaobserwowano dla związków z atomem węgla α o konfiguracji absolutnej *R* [23][24]. W bezpośrednim działaniu na organizmy, α -aminofosfoniany charakteryzują się zwykle niską toksycznością [7]. Fakt ten powoduje, że α -aminofosfoniany są atrakcyjnymi związkami znajdującymi zastosowanie nie tylko w medycynie, ale i rolnictwie [4].

Zakres biologicznego wykorzystania fosfonianowych analogów α -aminokwasów w zasadzie jest nieograniczony. Stanowią one obiecującą grupę związków o wysokim potencjale farmakologicznym i biologicznym [11][25][26]. α -Aminofosfoniany wykazują aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwnowotworową, grzybobójczą.

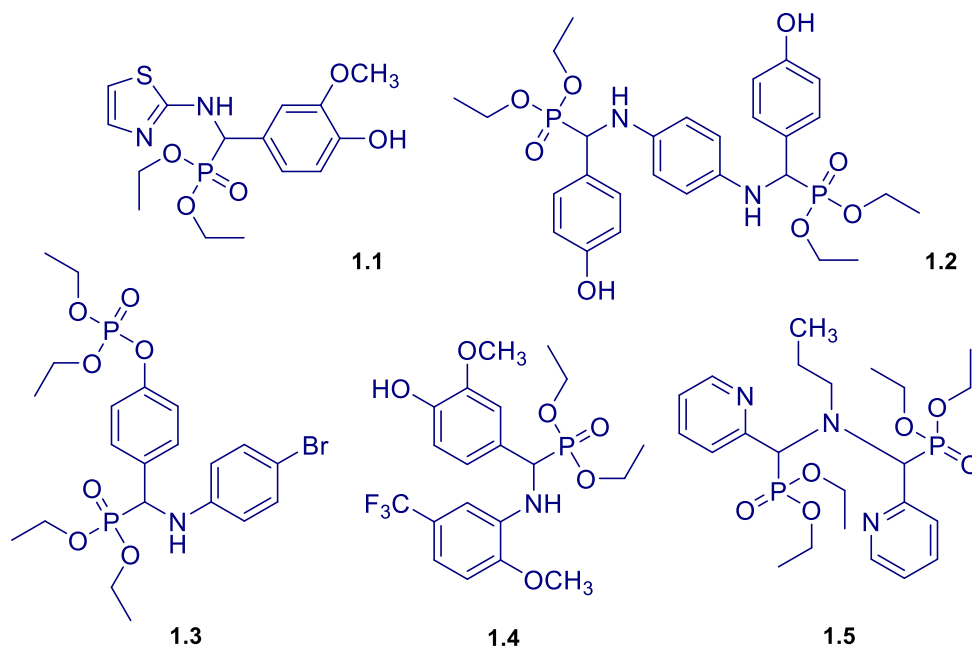
Znane są także α -aminofosfoniany o właściwościach przeciwutleniających, przeciwzakrzepowych, a także hamujących działanie enzymów [4][7][27][28]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa omawianych związków obejmuje między innymi hamowanie rozwoju *Plasmodium falciparum*, pasożyta odpowiedzialnego za wywoływanie malarii [9]. α -Aminofosfoniany cechują się także bardzo dobrą inhibicją względem wielu szczepów grzybów z rodzaju *Candida* [29]. Ponadto znane są również α -aminofosfoniany o działaniu przeciwzapalnym [7]. Fosfonianowe analogi α -aminokwasów odgrywają w medycynie znaczącą rolę jako peptydomimetyki [1]. W rolnictwie znajdują zastosowanie jako środki agrochemiczne: pestycydy oraz wysoce skuteczne środki chwastobójcze [8]. α -Aminofosfoniany mogą posłużyć do funkcjonalizacji jednościennych nanorurek węglowych (SWNCT), materiału o wszechstronnych zastosowaniach w wielu dziedzinach. SWNCT są szeroko wykorzystywane także w naukach biomedycznych, jako biosensory, środki stosowane w terapii genowej, inżynierii tkankowej oraz do dostarczania leków. Połączenie nanorurek węglowych z biologicznie aktywnymi α -aminofosfonianami stanowi materiał o potencjalnym zastosowaniu w farmacji [30]. Wykazano, że α -aminofosfoniany posiadają zdolność oddziaływania z różnymi biocząsteczkami, na przykład z bromelainą macierzystą (SBM). SBM jest enzymem- proteinazą cysteinową, znajdującym zastosowanie w medycynie między innymi jako środek przeciwnowotworowy, przeciwzakrzepowy, przeciwobrzękowy czy przeciwzapalny. α -Aminofosfoniany wykazują kompatybilność wobec SBM i mogą stabilizować oraz chronić ten enzym przed zaburzeniami strukturalnymi czy termicznymi. Można zatem uznać, że fosfonianowe analogi α -aminokwasów są dobrymi kandydatami do stosowania jako środki stabilizujące biocząsteczki [2].

Oczywistym jest, że budowa związku powiązana jest z jego właściwościami fizycznymi, chemicznymi i aktywnością biologiczną. Na bioaktywność α -aminofosfonianów wpływa wspomniane już podobieństwo strukturalne do α -aminokwasów oraz obecność wiązania C-P. Ważną strategią w modulowaniu właściwości biologicznych związków chemicznych jest wprowadzenie do ich cząsteczek podstawników. Zastąpienie atomu wodoru atomem innego pierwiastka lub grupą funkcyjną może znacząco wpłynąć na zmianę tych właściwości. Na przykład wprowadzenie grupy metylowej jako podstawnika do pierścienia fenylowego wpływa na zmianę lipofilowości związku, co wiąże się z jego wchłanianiem i dystrybucją

w organizmie [15]. Szerokim zakresem wykazywanych aktywności biologicznych charakteryzują się także α -aminofosfoniany, które zawierają w swojej strukturze ugrupowanie heterocykliczne, takie jak furan, pirol, tiofen, indol lub chinazolina [28][31][32].

1.2.1. Właściwości przeciwutleniające

Wśród fosfonianowych analogów α -aminokwasów są związki o działaniu antyoksydacyjnym (Rysunek 2). Poznane zostały α -aminofosfoniany o lepszych właściwościach przeciwutleniających niż między innymi kwas askorbinowy (witamina C) [7]. Zwiększony poziom tak zwanych reaktywnych form tlenu (ROS) obserwowany jest w przypadku wielu chorób, takich jak nowotwory, choroby układu krążenia czy choroby neurodegeneracyjne, jak choroba Alzheimera oraz Parkinsona. Estry kwasów α -aminofosfonowych mogą ograniczać działanie wolnych rodników. Hamują enzym acetylocholinoesterazę, którego nadmierna aktywność jest przyczyną powstawania chorób neurodegeneracyjnych [4].



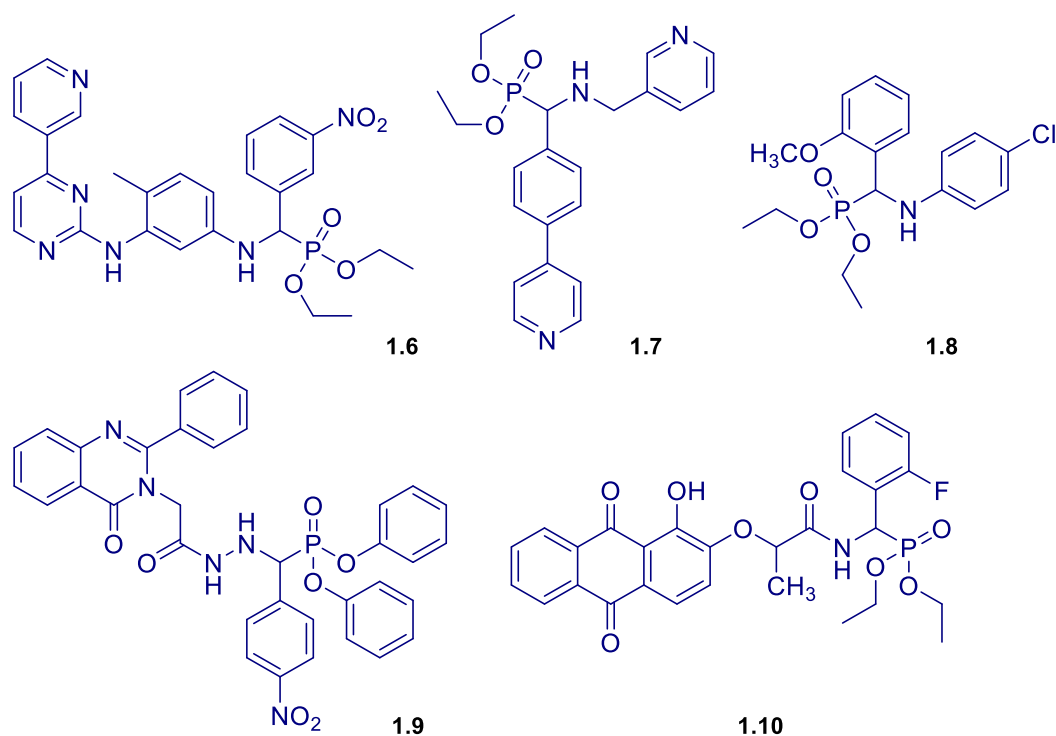
Rysunek 2. Przykłady α -aminofosfonianów wykazujących działanie antyoksydacyjne [7][11][33][34][35].

Badania, zarówno eksperymentalne, jak i teoretyczne, pokazały, że aktywność przeciwutleniająca związku chemicznego jest bezpośrednio związana z obecnością w jego strukturze grupy -OH, a także pierścieni benzenowych. Te elementy strukturalne

odgrywają istotną rolę w wychwytywaniu wolnych rodników, potencjalnie prowadząc do lepszych właściwości antyoksydacyjnych związków [36].

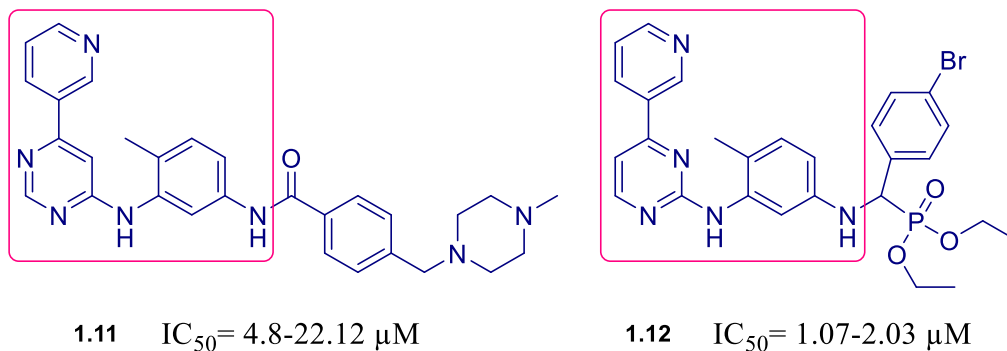
1.2.2. Aktywność przeciwnowotworowa

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia choroby nowotworowe są drugą najczęściej występującą przyczyną zgonów na całym świecie, a niekontrolowany wzrost nieprawidłowych komórek stanowi poważny problem [16][37]. Dane pokazały, że w 2020 roku nowotwory były przyczyną niemal dziesięciu milionów zgonów na świecie [38]. Pomimo ciągłego rozwoju metod leczenia opartych na chemioterapii, wciąż borykają się one z takimi problemami jak wysoka toksyczność wobec organizmu oraz niska specyficzność stosowanych terapeutów. Skłania to do poszukiwań nowych, lepszych leków [39]. Poważnym problemem jest także obserwowana coraz częściej w przypadku niektórych nowotworów wielolekooporność. To wszystko przekonuje do projektowania nowych, bardziej skutecznych środków terapeutycznych [40]. Jedną ze strategii służących temu celowi jest wprowadzenie do struktury cząsteczki ugrupowania fosfonianowego [41]. Znanych jest wiele α -aminofosfonianów o aktywności przeciwnowotworowej. Przykłady przedstawiono na Rysunku 3 [1]. Badania pokazały, że fosfonianowe analogi α -aminokwasów, wykazujące aktywność przeciwnowotworową, mogą indukować apoptozę patogennych komórek poprzez szlaki mitochondrialne i enzymy z nimi związane [42]. Apoptoza w komórkach nowotworowych jest kluczowa dla powodzenia terapii leczniczej w przypadku choroby nowotworowej. Wykazano, że α -aminofosfoniany indukują apoptozę komórek nowotworowych w fazie G1 cyklu komórkowego, podczas której następuje intensywny wzrost komórki przed procesem replikacji DNA. Wynika z tego, że zatrzymanie cyklu następuje już na jego początkowym etapie [41].



Rysunek 3. Przykłady α -aminofosfonianów wykazujących aktywność przeciwnowotworową [28][37][39][41][43].

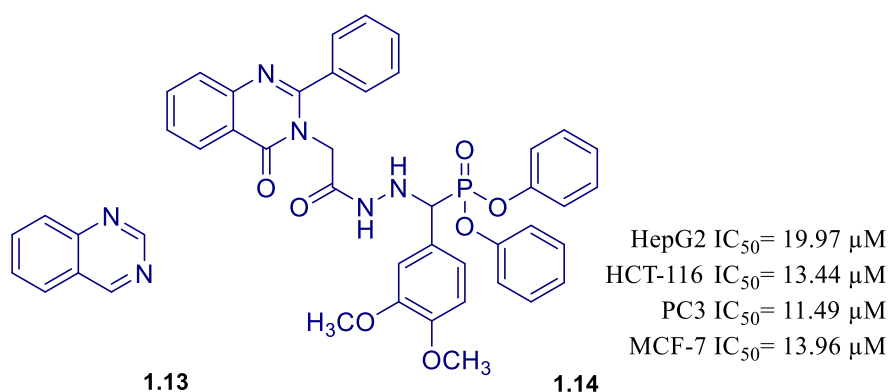
Dowiedziano, że wprowadzenie grupy aminofosfonianowej do cząsteczek związków charakteryzujących się już aktywnością przeciwnowotworową (na przykład reina, chinazolina czy imatynib) może tę aktywność zwiększyć [1][44][45]. Imatynib stosowany jest w leczeniu białaczki. Poprzez wprowadzenie do fragmentu jego struktury ugrupowania fosfonianowego w pozycji α , otrzymano serię nowych związków wykazujących bardzo dobrą aktywność przeciwnowotworową (Rysunek 4). Co więcej, zaobserwowano, że spośród tych związków wyjątkową cytotoksycznością charakteryzują się cząsteczki z podstawnikiem halogenowym lub z grupą nitrową [37].



Rysunek 4. Struktura oraz wykazywana cytotoksyczność imatynibu 1.11, substancji przeciwnowotworowej stosowanej w leczeniu białaczki oraz przykładowej nowej, fosfonianowej pochodnej tego leku 1.12 [37].

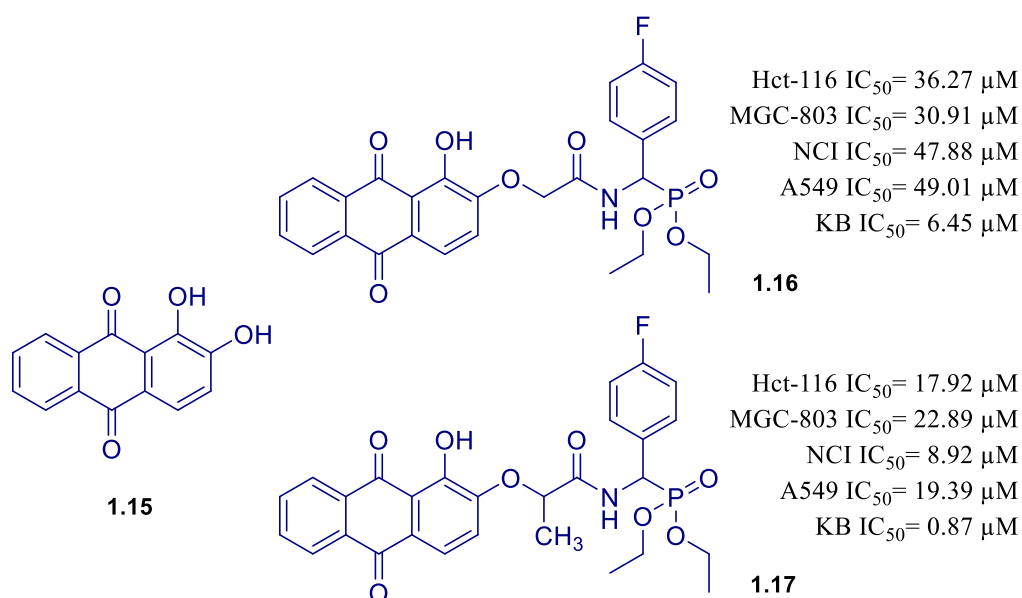
Przeprowadzone dla nowo otrzymanych pochodnych badania aktywności przeciwnowotworowej wykazały ich lepsze działanie niż w przypadku standardowych leków, takich jak dokсорubicyna, czy wspomniany imatynib [37]. Jak zaobserwowano w przeprowadzonych badaniach, wyższą cytotoksyczność wykazały cząsteczki z podstawnikiem w pozycji *para*, niż w pozycji *meta* [46].

Innym przykładem związku chemicznego, którego połączenie z ugrupowaniem α -aminofosfonianowym doprowadziło do zwiększenia jego aktywności przeciwnowotworowej, jest chinazolina (Rysunek 5). Pochodna chinazoliny okazała się nawet kilka razy bardziej aktywna wobec komórek nowotworowych wielu linii, niż dokсорubicyna [28].



Rysunek 5. Struktura chinazoliny 1.13 oraz pochodnej chinazoliny z ugrupowaniem α -aminofosfonianowym 1.14 o znacznej aktywności przeciwnowotworowej [28].

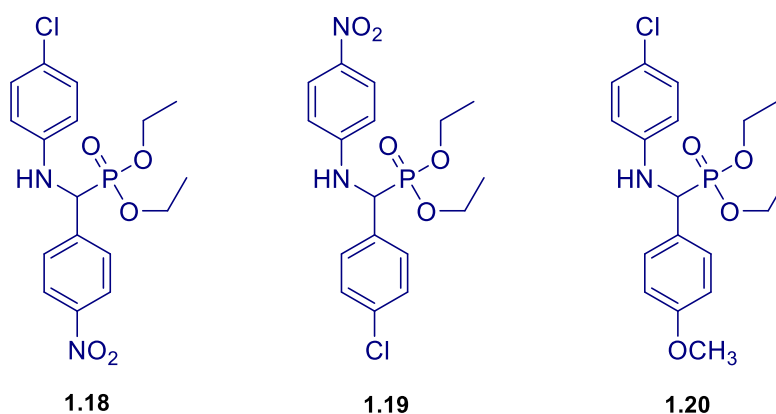
Połączenie grupy α -aminofosfonianowej oraz alizaryny, występującej naturalnie pochodnej antrachinonu, o szerokiej bioaktywności, w tym przeciwnowotworowej, także przyczyniło się do otrzymania nowych związków (Rysunek 6) o bardzo dobrych właściwościach farmakologicznych i o cytotoksyczności lepszej niż ta obserwowana dla niezmodyfikowanej alizaryny, jak również dla 5-fluorouracylu, popularnego związku chemicznego stosowanego w terapii chorób nowotworowych. Zaobserwowano, że obecność podstawnika $-\text{CH}_3$ w strukturze zsyntezowanych pochodnych również wpływa pozytywnie na wykazywaną aktywność przeciwnowotworową. Ważne okazały się także podstawniki w pierścieniu fenylowym obecnym w strukturze α -aminofosfonianów. Podstawienie atomem fluoru, chloru czy bromu powodowało poprawę cytotoksyczności otrzymanych związków, natomiast podstawniki $-\text{CH}_3$ i $-\text{OCH}_3$ wykazywały wpływ negatywny [41].



Rysunek 6. Struktura alizaryny 1.15 oraz przykładowych α -aminofosfonianów 1.16 i 1.17 opartych na strukturze alizaryny wykazujących bardzo dobrą aktywność przeciwnowotworową [41].

Mechanizm antynowotworowego działania wielu leków, szczególnie tych zaliczanych do metaloleków, jak na przykład *cis*-platyna, opiera się na powodowaniu zmian (uszkodzeń) w budowie DNA. Uszkodzenie struktury DNA, często na skutek mutacji, jest przyczyną powstawania nowotworów. Strukturalne zmiany w DNA zaobserwowano między innymi w chorobach nowotworowych nerek, wątroby i układu trawiennego. Wobec tego DNA może stanowić dogodny cel w procesie projektowania

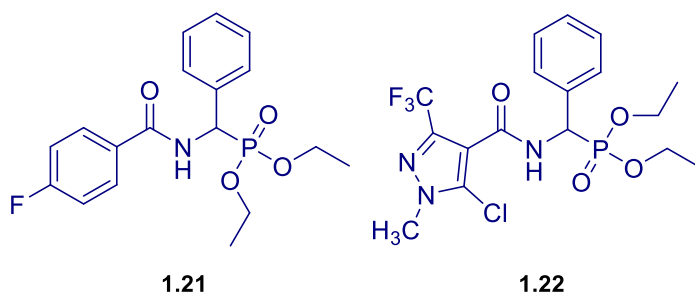
leków. W literaturze opisano α -aminofosfoniany, dla których dowiedziono zdolności oddziaływania z DNA (Rysunek 7). Ponadto, związki te wykazywały również możliwość wiązania z albuminą surowicy bydlęcej (BSA- *bovine serum albumin*) [43]. Jest to białko występujące w osoczu w dużych ilościach. Pełni bardzo ważną funkcję w dystrybucji leków i ich metabolizmie. Co więcej, jest ono często stosowane w badaniach jako modelowe białko ze względu na swoją trwałość, niską toksyczność i biokompatybilność [47].



Rysunek 7. Przykłady α -aminofosfonianów wykazujących zdolność oddziaływania z CT-DNA [43].

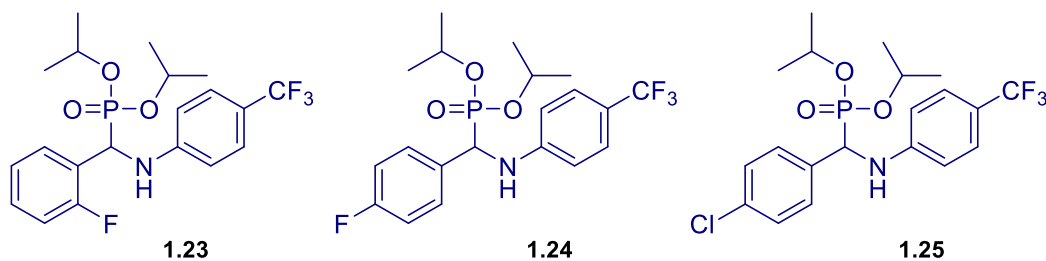
1.2.3. Aktywność przeciwwirusowa

Jedną z wielu wykazywanych przez α -aminofosfoniany aktywności biologicznych jest ich zdolność do działania przeciwwirusowego. Fosfonianowe analogi α -aminokwasów znalazły między innymi zastosowanie w terapii przeciw wirusowi HIV [7]. α -Aminofosfoniany charakteryzują się znaczną toksycznością wobec TMV (*Tabacco mosaic virus*), będącego pierwszym poznany wirusem, mogąym infekować ponad 400 gatunków roślin (Rysunek 8) [48][49]. Wykazano, że α -aminofosfoniany zawierające ugrupowanie amidowe działają przeciwwirusowo oraz ochronnie przed TMV. Aktywność wybranych związków jest porównywalna z referencyjnym środkiem wirusobójczym-Ningnanmyciną [50]. Podobnie, innym roślinnym wirusem, wobec którego została potwierdzona aktywność przeciwwirusowa α -aminofosfonianów jest PVY (*Potato virus Y*). Dodatkowo otrzymane pochodne z fragmentem benzotiazolu zostały przebadane pod kątem działania ochronnego i w tym przypadku również odnotowano zadowalające wyniki. Zaobserwowano, że silniejsze działanie przeciwwirusowe wykazują α -aminofosfoniany zawierające grupę difenylofosforynową niż dialkilofosforynową [51].



Rysunek 8. Przykłady α -aminofosfonianów wykazujących aktywność przeciw *Tabacco mosaic virus* [50][52].

Wprowadzenie atomu lub atomów fluoru do struktury związków organicznych jest istotną strategią otrzymywania cząsteczek o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym, a także metodą zwiększania aktywności biologicznej znanych już leków [53][54][55]. Badania pokazały, że α -aminofosfoniany zawierające grupę $-\text{CF}_3$ (Rysunek 9) wykazują zdolność hamowania aktywności *Tabacco mosaic virus*. Co więcej, związki zawierające w swojej strukturze podstawnik fluorofenyłowy (1.23 oraz 1.24), charakteryzują się znacznie wyższą wartością inhibicji niż związek z podstawnikiem chlorofenyłowym (1.25) (Tabela 1) [48].



Rysunek 9. Struktury fluorowanych α -aminofosfonianów wykazujących aktywność przeciw TMV [48].

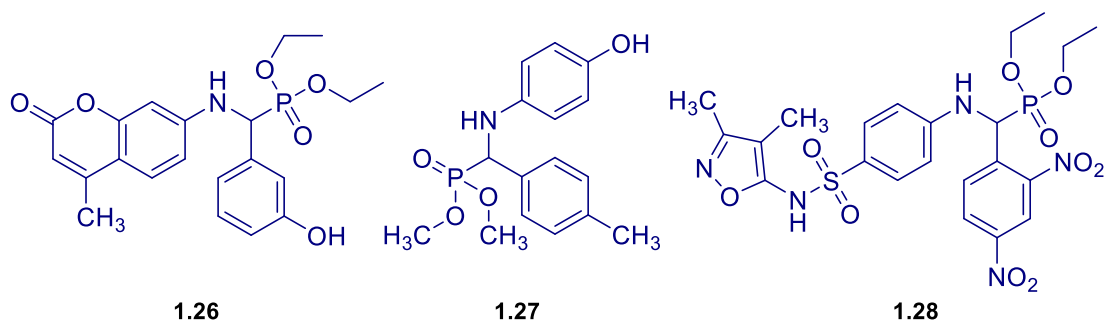
Tabela 1. Aktywność przeciwwirusowa fluorowanych α -aminofosfonianów [48].

Związek	Zahamowania aktywności wirusa TMV [%]	
	7 dni	14 dni
1.23	38.08	64.12
1.24	45.73	52.1
1.25	9.43	39.28

Wyniki badań opartych na dokowaniu molekularnym pozwoliły ocenić aktywność α -aminofosfonianów również wobec wirusa SARS-CoV-2. Wykazano, że badane związki mogą oddziaływać z główną proteazą (Mpro) i polimerazą RNA (RdRp) tego drobnoustroju. Zidentyfikowano potencjalne miejsca ataku nukleofilowego oraz elektrofilowego, a także miejsca aktywne interakcji, co pozwala sądzić, że pochodne α -aminofosfonianów mogłyby być skutecznymi inhibitorami koronawirusa [9].

1.2.4. Aktywność przeciwbakteryjna

Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci odnotowuje się znaczny wzrost lekooporności u patogennych mikroorganizmów. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest niewłaściwe stosowanie antybiotyków. Aby zapobiec rozpowszechnianiu się tego problemu stale poszukiwane są nowe, silne środki przeciwbakteryjne lub modyfikowane są znane już substancje. W trend ten bardzo dobrze wpisują się fosfoniany ze względu na szerokie farmaceutyczne zastosowanie oraz wykazywane działanie antybakteryjne (Rysunek 10) [1]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa α -aminofosfonianów obejmuje działanie przeciw bakteriom Gram-dodatnim oraz Gram-ujemnym. Podobnie jak w przypadku innych biologicznych aktywności, również właściwości przeciwbakteryjne α -aminofosfonianów są zbliżone do tych, które charakteryzują stosowane antybiotyki, na przykład gentamycyna [25]. α -Aminofosfoniany wykazują bardzo dobre właściwości przeciwbakteryjne wobec tak popularnych szczepów bakteryjnych jak *Escherichia coli* (pałeczka okrężnicy), *Salmonella typhimurium* (pałeczka paraduru), *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty), czy *Listeria monocytogenes* (listeria monocytogenes), *Bacillus subtilis* (laseczka sienna), *Klebsiella pneumoniae* (pałeczka zapalenia płuc) [1][15][56]. Fosfonianowe bioizostery α -aminokwasów znalazły również zastosowanie w lekach przeciwgruźliczych [37].



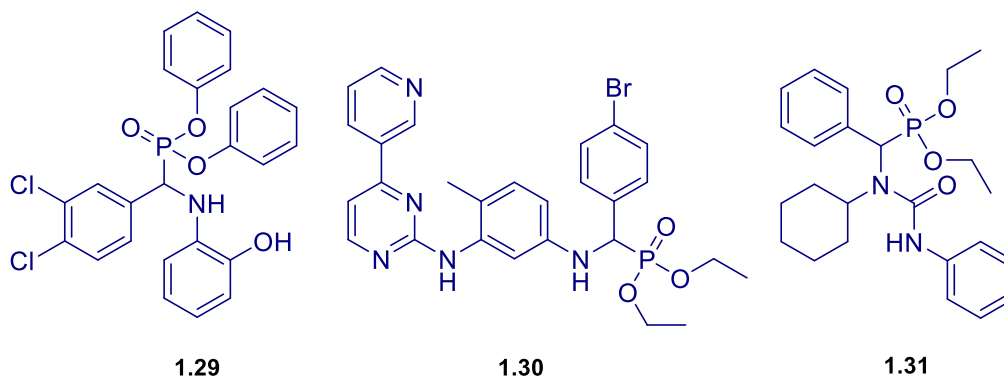
Rysunek 10. Przykłady α -aminofosfonianów o działaniu przeciwbakteryjnym. Związek 1.26 charakteryzuje się aktywnością względem *S. aureus* oraz *E. coli*, związek 1.27 względem *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* oraz *P. aeruginosa*, natomiast związek 1.28 względem *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* oraz *C. albicans* [1][15][56].

1.2.5. Inhibicja enzymów

Strukturalna analogia α -aminofosfonianów i α -aminokwasów sprawia, że dla niektórych enzymów te dwie grupy związków są nierozróżnialne. Przykłady α -aminofosfonianów będących inhibitorami enzymów przedstawia Rysunek 11. Zdolność inhibicji enzymów związana jest z tetraedryczną strukturą grupy fosfonianowej, która stanowi analog stanu przejściowego obserwowanego podczas reakcji enzymatycznych [57]. α -Aminofosfoniany konkurują z α -aminokwasami o receptory komórkowe oraz o miejsca aktywne enzymów, pełniąc rolę antagonistów aminokwasów [1][5].

Inhibicja obejmuje wiele typów enzymów, takich jak proteaza HIV, trombina, chymotrypsyna, kolagenaza, syntaza, hydrolazy serynowe, enzymy proteolityczne oraz reniny [8][9][15][58][59]. Szczególną grupę enzymów proteolitycznych, do inhibicji których wykorzystywane są fosfonianowe analogi α -aminokwasów, stanowią metaloproteazy macierzy [60][61]. α -Aminofosfoniany silnie hamują enzymy PTP (*Protein Tyrosine Phosphatases*, białkowe fosfatazy tyrozynowe), odpowiedzialne między innymi za kontrolę cyklu komórkowego oraz wzrostu i proliferacji komórek. Nieprawidłowa ekspresja PTP obserwowana jest w różnych typach nowotworów i znacząco wpływa na postęp choroby, wobec czego inhibitory tej grupy enzymów są intensywnie poszukiwane jako leki w terapii celowanej [43][62]. Ciekawą grupę związków chemicznych, charakteryzującą się inhibicją wielu typów enzymów stanowią α -aminofosfoniany zawierające w swojej strukturze ugrupowanie cykloheksylowe.

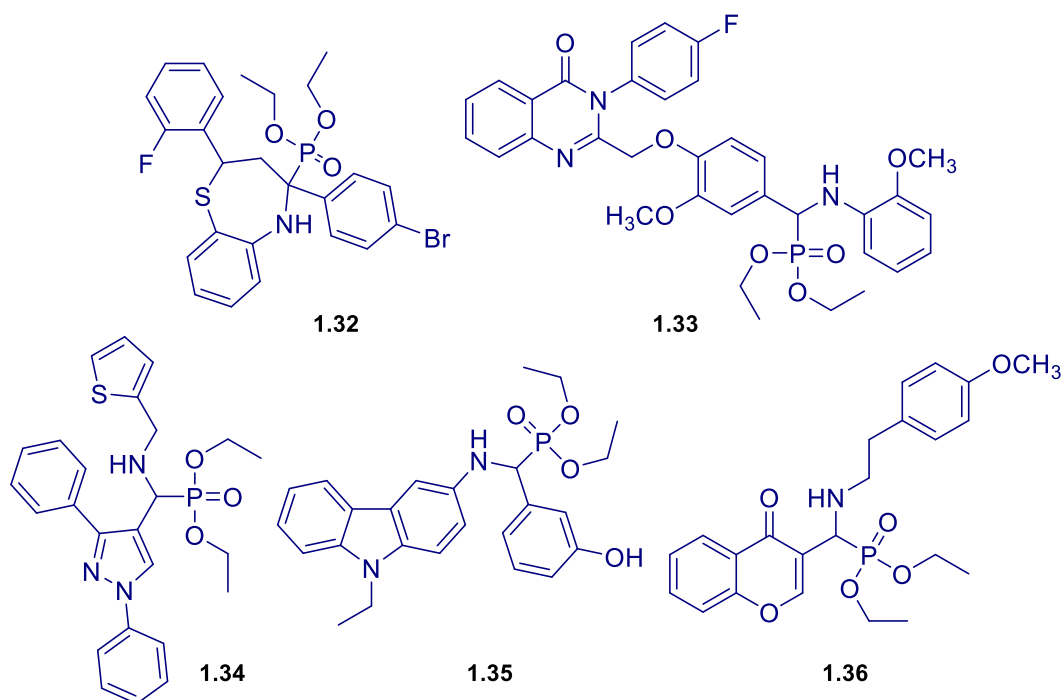
Wykazują one działanie hamujące wobec acetylocholinoesterazy, lizofosfolipazy D, epoksyhydrolazy, aminopeptydazy leucynowej oraz aminopeptydazy alaninowej [63][64].



Rysunek 11. Przykłady α -aminofosfonianów hamujących działanie enzymów. Związek 1.29 stanowi inhibitor PARP1 (polimerazy poli(ADP-rybozy)), związek 1.30 wykazuje działanie hamujące wobec kinazy tyrozynowej Bcr-Abl, natomiast związek 1.31 jest inhibitorem acetylocholinoesterazy [37][63][65].

Acetylocholinoesteraza jest enzymem, który hydrolizuje acetylocholinę (podstawowy neuroprzekaźnik) do choliny, co skutkuje zmniejszeniem neuroprzekaźnictwa. Uważa się, że działanie acetylocholinoesterazy jest jednym z czynników odpowiadających za neurodegeneracyjną chorobę Alzheimer'a. Badania dotyczące terapii stosowanych w przypadku tej choroby w dużej mierze koncentrują się na poszukiwaniu inhibitorów acetylocholinoesterazy. Opracowanych zostało wiele leków, które hamują działanie tego enzymu i w ten sposób łagodzą objawy choroby Alzheimer'a. Powodują one jednak bardzo dużo niepożądanych skutków ubocznych, dlatego też nieustannie poszukiwane są nowe substancje zdolne do hamowania działania acetylocholinoesterazy [66][67]. Obiecujące wyniki zaobserwowano dla pochodnych α -aminofosfonianów, zawierających fragmenty strukturalne różnych związków organicznych, między innymi pirazolu, karbazolu, chromonu, 1,5-benzotiazepiny czy chinazolinonu (Rysunek 12). Te heterocykliczne związki wykazują szeroki zakres aktywności biologicznych, jak na przykład działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe czy przeciwwirusowe, a ponadto znajdują zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimer'a. Ich pochodne są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym do produkcji wielu powszechnie dostępnych na rynku leków, takich jak Pyramidonum (lek przeciwbólowy) czy Polcrom (lek przeciwalergiczny). Biorąc pod uwagę interesujące właściwości α -aminofosfonianów

oraz wspomnianych układów heterocyklicznych, postanowiono otrzymać związki posiadające w cząsteczkach oba farmakofory; ugrupowanie fosfonianowe oraz pierścień heterocykliczny. Uzyskane związki charakteryzowały się wysoką inhibicją acetylocholinoesterazy. Co więcej, α -aminofosfoniany są idealnymi kandydatami jako substancje stosowane w leczeniu choroby Alzheimer'a nie tylko ze względu na zdolności hamowania działania acetylocholinoesterazy, ale także bardzo dobre właściwości przeciwutleniające [66][68][69][70][71].



Rysunek 12. Przykłady α -aminofosfonianów hamujących działanie acetylocholinoesterazy [66][68][69][70][71].

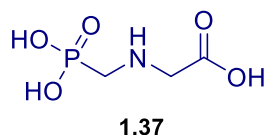
Bardzo dobrą zdolność hamowania działania acetylocholinoesterazy, lepszą w porównaniu do galantaminy wykazały także α -aminofosfoniany zawierające ugrupowanie 1,5-benzotiazepiny (Struktura 1.32). Warto podkreślić, że w strukturze tych związków obecny jest atom fluoru. Dokowanie molekularne tych α -aminofosfonianów pokazało ich doskonałe wiązanie się z enzymem. Stwierdzono, że obecność podstawników halogenowych w strukturze związku wpływa na wzrost jego zdolności do inhibicji acetylocholinoesterazy. Zaobserwowano także istotną różnicę w aktywności α -aminofosfonianów i ich analogów niezawierających grupy fosfonianowej, co jednoznacznie dowodzi kluczowego znaczenia tego ugrupowania dla aktywności biologicznej badanego związku. Najprawdopodobniej obecność tego ugrupowania

zwiększa powinowactwo wiązania w miejscu aktywnym enzymu [66]. Wyjątkowość grupy fosfonianowej potwierdza również synteza pochodnych chinazolinonu zawierających tę grupę (Struktura 1.33). Otrzymane związki charakteryzują się znacznie większą aktywnością hamującą działanie acetylocholinoesterazy niż przed wprowadzeniem do ich struktury grupy α -aminofosfonianowej. Udowodniono także, że związki zawierające podstawniki elektronoakceptorowe wykazują wysoką skuteczność inhibicji enzymu. Uważa się, że ich obecność ma korzystny wpływ na ustawienie inhibitora w miejscu aktywnym acetylocholinoesterazy [71]. α -Aminofosfoniany zawierające w swojej strukturze pirazol (Struktura 1.34) posiadają lepsze właściwości inhibitujące od standardowych leków, takich jak galantamina, rywastygmina, czy takryna, wykazując nawet 50-krotnie silniejsze działanie [68]. Również α -aminofosfoniany z ugrupowaniem karbazolu (Struktura 1.35) są kilkukrotnie lepszymi inhibitorami acetylocholinoesterazy niż znane leki [69]. Rentgenowska analiza krystalograficzna acetylocholinoesterazy umożliwiła poznanie budowy jej miejsca aktywnego. Jest to wąskie wgłębienie o szerokości 5 Å i głębokości około 20 Å, składające się z dwóch głównych miejsc wiązania substratu- katalitycznego miejsca aktywnego (CAS) oraz obwodowego miejsca aktywnego (PAS) [72]. Wyniki przeprowadzonego dokowania molekularnego wykazały, że α -aminofosfoniany wiążą się z enzymem w obu tych miejscach, charakteryzując się tym samym mieszanym typem inhibicji [69]. Równie dobrymi inhibitorami, charakteryzującymi się lepszym działaniem niż na przykład rywastygmina są α -aminofosfoniany zawierające w strukturze układ chromonu (Struktura 1.36). Wykazują one zdolność do wiązania z CAS i PAS acetylocholinoesterazy. Przeprowadzone badania udowodniły także właściwości przeciwutleniające tych związków, co jest równie istotne zważywszy na fakt, że zwiększony poziom wolnych rodników może się przyczyniać do dalszego rozwoju choroby Alzheimer'a [70].

1.2.6. Właściwości chwastobójcze

Stale rosnące zapotrzebowanie na środki chwastobójcze oraz postępująca odporność chwastów na herbicydy jest przyczyną poszukiwania nowych substancji do zwalczania tych niepożądanych roślin. α -Aminofosfoniany oraz kwasy α -aminofosfonowe cieszą się dużym zainteresowaniem jako środki o właściwościach chwastobójczych, między innymi ze względu na niską toksyczność dla ssaków oraz wysoką podatność na degradację przez organizmy glebowe. Bez wątpienia,

najpopularniejszą substancją o działaniu chwastobójczym, zawartą w wielu preparatach do tego przeznaczonych, jest glifosat- (*N*-fosfonometylo)glicyna (Rysunek 13). Związek ten należy do kwasów α -aminofosfonowych i charakteryzuje się niezwykle prostą budową oraz niską masą cząsteczkową. Wysoka rozpuszczalność glifosatu w wodzie sprzyja jego wchłanianiu i translokacji przez tkanki roślinne, gdzie następnie po wchłonięciu nie ulega znacznemu metabolizmowi. W glebie ulega rozkładowi przez mikroorganizmy do nietoksycznych produktów, jakimi są dwutlenek węgla, amoniak i woda [5][10]. Mechanizm chwastobójczego działania glifosatu opiera się głównie na podobieństwie grupy COOH do grupy PO(OH)₂. Zmiana ta nie zostaje rozpoznana przez enzym- syntazę 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanową, który bierze udział w biosyntezie aminokwasów niezbędnych do rozwoju roślin, między innymi fenyloalaniny czy tyrozyny. Blokada enzymu sprawia, że glifosat działa jako specyficzny inhibitor biosyntezy, hamując tym samym ekspansję chwastów [73].

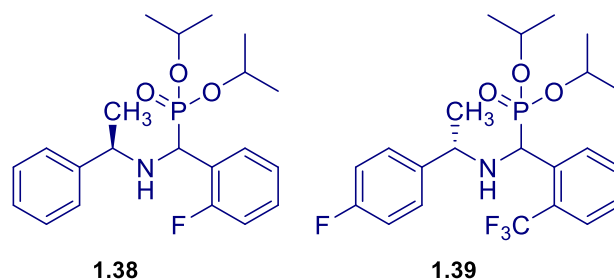


Rysunek 13. Struktura glifosatu- kwasu α -aminofosfonowego o właściwościach chwastobójczych [5].

α -Aminofosfoniany znalazły zastosowanie w rolnictwie nie tylko ze względu na działanie chwastobójcze czy grzybobójcze. Bardzo dobrze sprawdzają się również jako regulatory wzrostu roślin oraz środki owadobójcze [4][20][74][75].

1.2.7. Właściwości przeciwgrzybicze

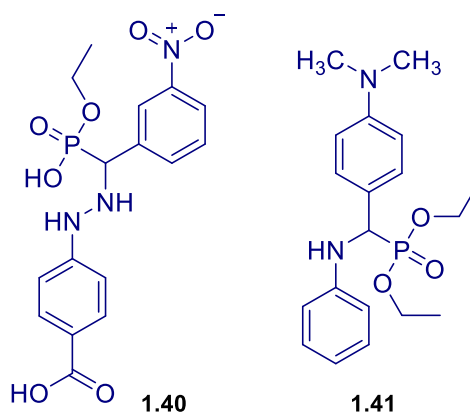
α -Aminofosfoniany charakteryzują się obiecującym działaniem przeciwgrzybiczym. Opisane zostały związki, które hamują wzrost takich fitopatogennych grzybów jak *Phytophthora infestans*, *Piricularia oryzae* oraz *Pellicularia sasakii* (Rysunek 14). Aktywność tych związków jest porównywalna lub lepsza od aktywności himeksazolu, będącego substancją czynną w popularnie stosowanych środkach ochrony roślin [20].



Rysunek 14. Struktury α -aminofosfonianów o właściwościach przeciwgrzybiczych [20].

1.3. Inne zastosowanie α -aminofosfonianów

Poza zastosowaniem związanym z ich aktywnością biologiczną, estry kwasów α -aminofosfonowych zyskują uwagę i zainteresowanie jako związki kompleksujące oraz silne środki antykorozyjne metali i ich stopów (Rysunek 15). Szczególną zdolność hamowania korozji wykazują α -aminofosfoniany aromatyczne zawierające w swojej strukturze atomy azotu, siarki czy tlenu [8][76][77]. α -Aminofosfoniany są także cennymi reagentami w syntezie organicznej. Jako substraty mogą między innymi brać udział w reakcji selektywnego aromatycznego przegrupowania aza-Claisen'a, prowadząc do otrzymania winylofosfonianów [78].



Rysunek 15. Przykłady α -aminofosfonianów o właściwościach antykorozyjnych [76][77].

1.4. Metody otrzymania α -aminofosfonianów

Kluczowym etapem syntezy fosfonianowych analogów α -aminokwasów jest generowanie wiązania fosfor-węgiel [79]. Dwa główne podejścia syntetyczne prowadzące do utworzenia takiego wiązania opierają się na reakcji Kabachnik'a-Fields'a i reakcji

Pudovik'a [4]. Metody bazujące na każdej z tych reakcji zapewniają bezpośrednie otrzymanie docelowych związków [8]. Reakcje te mogą przebiegać z udziałem katalizatorów, a najczęściej stosowanymi są kwasy Lewisa, takie jak SnCl_4 , ZrCl_4 , InCl_3 [6]. W literaturze naukowej opisane są także mniej konwencjonalne podejścia do zagadnień katalizy w reakcjach Kabachnik'a-Fields'a i Pudovik'a, między innymi stosowanie w tym celu cieczy jonowych, jak azotan etyloamoniowy $[\text{EtNH}_3]\text{NO}_3$, który zapewnia wysoką wydajność reakcji i jest przyjazny dla środowiska lub cieczy jonowej utworzonej na bazie chlorku choliny i chlorku cynku $\text{ChCl}\cdot 2\text{ZnCl}_2$, efektywnej w łagodnych warunkach i nadającej się do recyklingu [6][80]. Do syntezy α -aminofosfonianów używano również rozpuszczalnych katalizatorów na nośniku polimerowym, co pozwoliło na zachowanie jednorodnych warunków reakcji, jednak produkty otrzymywano z niezadowalającą wydajnością. Stosowanie katalizatorów związane jest jednak z pewnymi niedogodnościami: z koniecznością użycia skomplikowanej aparatury i złożonej procedury syntezy, jak również z obecnością szkodliwych reagentów w środowisku reakcji [39]. Obecnie popularne staje się wspomaganie reakcji Kabachnik'a-Fields'a i Pudovik'a promieniowaniem mikrofalowym lub falami ultradźwiękowymi [15][80].

W ostatnim czasie w syntezie organicznej istotny nacisk kładzie się na przestrzeganie zasad zielonej chemii. Obejmują one między innymi ograniczenie stosowania rozpuszczalników, minimalizowanie zużycia energii, unikanie toksycznych odczynników czy redukcję odpadów [6][80]. Reakcja Kabachnik'a-Fields'a i reakcja Pudovik'a wpisują się w zasady zielonej chemii. Są to metody wieloskładnikowe, co jest korzystne dla środowiska. Przeprowadzenie syntezy w sposób jednoetapowy pozwala między innymi na mniejsze zużycie energii. Ponadto, metody wieloskładnikowe charakteryzują się wysoką wydajnością procesów i skróconym czasem reakcji [1].

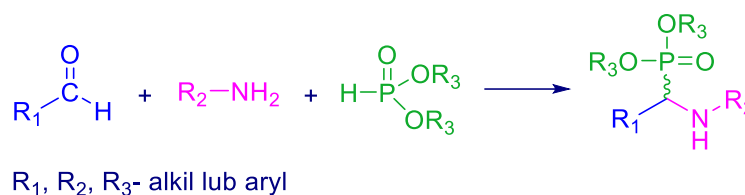
Mniej popularną metodą otrzymywania α -aminofosfonianów jest zastosowanie reakcji Mitsunobu. Jej przebieg zakłada poddanie hydroksyfosfonianu warunkom reakcji Mitsunobu z aminą [29]. Innymi, również mniej często stosowanymi metodami są reakcja Michaelis'a-Arbuzov'a oraz Michaelis'a-Becker'a [81].

Szerokie zastosowanie estrów kwasów α -aminofosfonowych sprawia, że pomimo mnogości metod syntetycznych prowadzących do otrzymania α -aminofosfonianów, nieustannie opracowywane są nowe procedury, które zapewnią wydajne utworzenie

produktów w warunkach przyjaznych środowisku. Większość modyfikacji dotyczy skrócenia czasu trwania reakcji, niestosowania drogich i toksycznych katalizatorów oraz rozpuszczalników, zwiększenia wydajności reakcji oraz złagodzenia jej warunków, a także ułatwienia procesu oczyszczania otrzymanych α -aminofosfonianów [82].

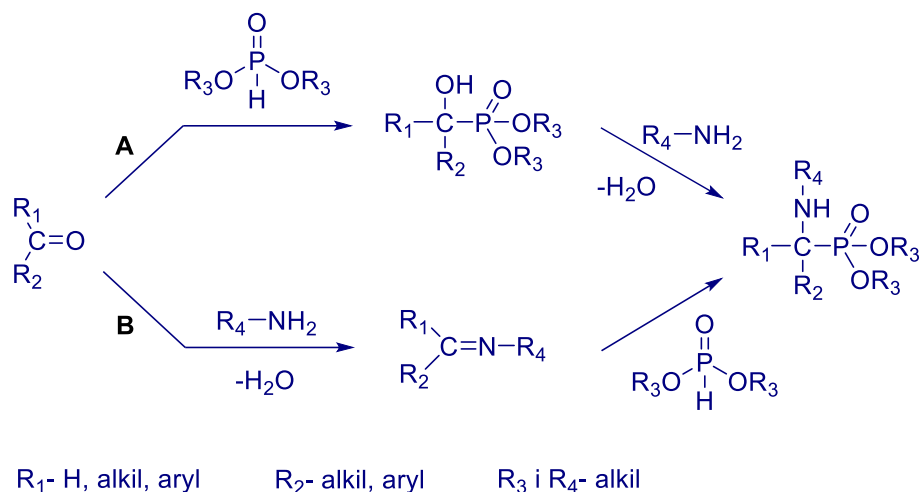
1.4.1. Reakcja Kabachnik'a-Fields'a

Trójskładnikowa reakcja Kabachnik'a-Fields'a jest niewątpliwie jedną z najbardziej popularnych i dogodnych metod syntezy α -aminofosfonianów. Polega na reakcji związku karbonylowego, aminy i fosforynu w układzie jednonaczyniowym (Rysunek 16) [13]. Mogą być w niej stosowane zarówno aminy pierwszorzędowe, jak i drugorzędowe. Substratami zawierającymi grupę karbonylową są najczęściej aldehydy, niemniej jednak w reakcji mogą brać udział również ketony [1]. Jako związek fosforoorganiczny powszechnie w trójskładnikowej metodzie stosuje się fosforyn dialkilu lub diarylu, choć nie wyklucza to zastosowania trialkilowego fosforynu [15]. Reakcja została opracowana w 1952 roku przez Martina I. Kabachnik'a i Ellisa K. Fieldsa [29][83].



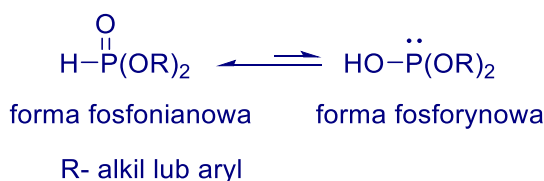
Rysunek 16. Schemat otrzymywania α -aminofosfonianów w reakcji Kabachnik'a-Fields'a.

Przebieg reakcji Kabachnik'a-Fields'a może być przedstawiony dwoma mechanizmami (Rysunek 17). Pierwszy z nich zakłada addycję fosforynu do grupy karbonylowej, prowadząc do utworzenia α -hydroksyfosfonianu, którego dalsza reakcja z aminą umożliwia otrzymanie α -aminofosfonianu (Rysunek 17, reakcja A). Drugi mechanizm opiera się na reakcji Pudovik'a. Utworzona *in situ* w wyniku kondensacji aldehydu i aminy imina, ulega reakcji z fosforynem, poprzez jego bezpośredni nukleofilowy atak (Rysunek 17, reakcja B). Uważa się jednak, że tworzenie α -aminofosfonianu z α -hydroksyfosfonianu jest mniej prawdopodobne ze względu na możliwość rozkładu produktu reakcji aldehydu i fosforynu do wyjściowych substratów [11][83].



Rysunek 17. Schemat przebiegu reakcji Kabachnik'a-Fields'a według reakcji Abramov'a (A) oraz według reakcji Pudovik'a (B) [83].

Reakcja Kabachnik'a-Fields'a jest typem reakcji Mannicha, przez co czasem nazywana jest reakcją fosfa-Mannicha [28]. Hydrofosfonylowanie imin przeprowadzane w temperaturze pokojowej wymaga zastosowania katalizatora, natomiast w przypadku jego braku niezbędne jest dostarczenie dodatkowej energii, na przykład w postaci ciepła lub promieniowania mikrofalowego. Ma to związek z istnieniem tautomerii fosfonianowo-fosforynowej (Rysunek 18). W przewadze występuje forma fosfonianowa, jednak to tautomer fosforynowy jest bardziej nukleofilowy i bierze udział w reakcji addycji [31][84].



Rysunek 18. Tautomeria fosforoorganicznego substratu reakcji Kabachnik'a-Fields'a.

Reakcja Kabachnik'a-Fields'a należy do reakcji wieloskładnikowych (MCR-*multicomponent reactions*). W takich reakcjach produkty otrzymywane są z wysoką wydajnością oraz czystością. Reakcje wieloskładnikowe umożliwiają otrzymanie w jednym etapie złożonych i rozbudowanych struktur chemicznych. MCR cieszą się zainteresowaniem syntetyków także ze względu na ekologiczność procesu. Popularne są podejścia syntetyczne bez zastosowania rozpuszczalnika oraz katalizatora. Przeprowadzenie reakcji metodą wieloskładnikową wpływa na obniżenie kosztów

procesu, wytworzenie mniejszej ilości zanieczyszczeń chemicznych i łatwość oczyszczania otrzymanych produktów. Prostota reakcji wieloskładnikowych, szczególnie w przemyśle, jest ważną zaletą ekonomiczną oraz ekologiczną [82].

Reakcja Kabachnik'a-Fields-a często prowadzona jest w obecności katalizatora, których literatura opisuje całą gamę, na przykład CF_3COOH , kwas winowy, kwas amidosulfonowy, kwas siarkowy, dodecylosiarczan magnezu, LiClO_4 , InCl_3 , SmI_2 , ZnCl_2 , SnCl_4 , MgClO_4 , LnCl_3 lub TiO_2 [4][7][80][85]. Skutecznymi katalizatorami są zarówno kwasy i zasady Lewis'a, jak i Brønsted'a [15]. Wydajnym katalizatorem do jednonacyniowej syntezy bioaktywnych związków fosforoorganicznych, który ponadto można poddać recyklingowi, jest kwas poliglikolosulfonowy PEG- SO_3H [39]. Zastosowanie siarczanowanego poliboranu jako katalizatora w reakcji Kabachnik'a-Fields'a umożliwia wydajną syntezę α -aminofosfonianów w warunkach bezrozpuszczalnikowych i co istotne, możliwe jest jego ponowne użycie. Może być stosowany w reakcjach z wykorzystaniem aromatycznych aldehydów oraz amin, natomiast w przypadku reagentów alifatycznych jest nieodpowiedni. Mechanizm działania tego katalizatora prawdopodobnie polega na aktywacji aldehydu, umożliwiając nukleofilowy atak aminy, a następnie aktywowana siarczanowym poliboranem imina ulega reakcji z fosforynem [85]. Triflaty metali $[\text{M}(\text{OTf})_n]$, takich jak lit, magnez, glin, miedź, cyna oraz metali ziem rzadkich również wykorzystywane są do syntezy α -aminofosfonianów [86]. Podczas reakcji Kabachnik'a-Fields'a tworzy się woda, której obecność może negatywnie wpływać na stosowane katalizatory, prowadząc do ich dezaktywacji lub rozkładu. Triflaty metali wykazują się odpornością na działanie wody [1]. Mają one jednak zastosowanie tylko w reakcji z aldehydami, w przypadku ketonów są nieskuteczne. Charakteryzują się one także bardzo wysoką ceną [87]. Coraz większą popularność jako katalizatory zyskują nanocząstki, na przykład ZnO oraz CeO_2 [29][88]. Wiele zalet wykazują również stałe katalizatory kwasowe. W reakcji Kabachnik'a-Fields'a zastosowano na przykład żywicę Amberyst-15, która pozwoliła na syntezę α -aminofosfonianów z bardzo dobrą wydajnością [13]. Innymi przykładami tego rodzaju katalizatorów są zeolity i glinki, które cieszą się szczególnym zainteresowaniem ze względu na ich przyjazne środowisku właściwości. Użycie glinki KSF umożliwia otrzymanie α -aminofosfonianów z doskonałymi wydajnościami w bardzo krótkim czasie reakcji pod wpływem promieniowania mikrofalowego. Zastosowanie tego katalizatora skutkuje nawet 90%-ową wydajnością procesu, natomiast jego brak w mieszaninie

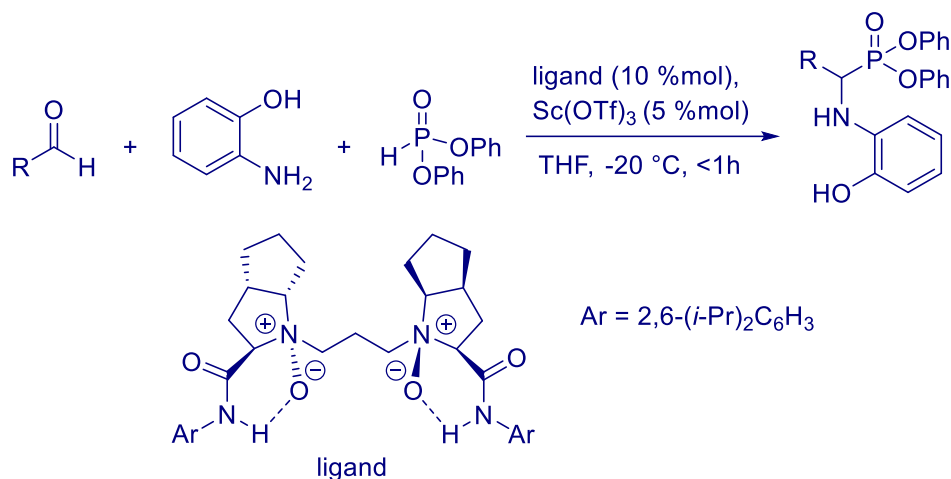
reakcyjnej prowadzi do otrzymania tylko około 10% produktu. Ponadto, glina KSF jest skuteczna wobec różnorodnych związków karbonylowych, zarówno ketonów, jak i rozmaitych aldehydów aromatycznych, alifatycznych, heterocyklicznych, czy α,β -nienasyconych [87]. Przykładem zeolitu, którego zastosowanie prowadzi do efektywnego otrzymania α -aminofosfonianów jest H β zeolit [89]. Heterogeniczne katalizatory kwasowe charakteryzują się prostotą działania, łatwością izolacji i możliwością ponownego użycia, zadowalającą selektywnością, niską toksycznością oraz niewysokim kosztem [13][87]. Z reguły jednak stosowanie katalizatorów wiąże się z ich korozyjnymi właściwościami i negatywnym wpływem na środowisko [85]. Poszukiwane są wobec tego również podejścia syntetyczne nie wymagające użycia katalizatora [90].

Jednym z czynników mających wpływ na wydajność prowadzonych reakcji jest efekt elektronowy podstawników w aldehydach aromatycznych. Zarówno podstawniki elektronoakceptorowe, jak i elektrondonorowe, pozwalają otrzymać produkty w zadowalających ilościach. Jednakże, lepsze wyniki odnotowuje się w przypadku obecności podstawników elektrondonorowych. Zwiększona gęstość elektronowa na iminowym atomie azotu wpływa na intensywność oddziaływania kwasów Lewis'a jako katalizatorów z tym atomem, który pełni funkcję zasady Lewis'a. W konsekwencji, jon iminowy stanowi lepsze centrum elektrofilowe dla nukleofilowego ataku fosforynu [80].

1.4.1.1. Stereoselektywna reakcja Kabachnik'a-Fields'a

α -Aminofosfoniany są cenną grupą związków, z których wiele wykazuje aktywność biologiczną. Wiadomo jednak, że aktywność taka zależy od konfiguracji absolutnej centrum stereogenicznego [58]. Wobec tego niezwykle istotne są stereoselektywne metody syntezy α -aminofosfonianów. Znanych jest jednak niewiele prac dotyczących stereoselektywnej, trójskładnikowej reakcji Kabachnik'a-Fields'a. Poszukiwanie nowych układów katalitycznych umożliwiających stereoselektywne otrzymanie chiralnych α -aminofosfonianów stanowi od wielu lat wyzwanie w syntezie organicznej. Jednym z katalizatorów, zapewniającym bardzo dobre wyniki enancjoselektywności oraz wysoką wydajność reakcji jest tworzony *in situ* chiralny kompleks *N,N'*-ditlenku-Sc(III) (Rysunek 19, Tabela 2). Enancjoselektywność reakcji prowadzonej z udziałem tego katalizatora silnie zależy od jego budowy. Optymalizacja warunków reakcji pozwoliła uzyskać nawet 87% nadmiaru enancjomerycznego tworzonych produktów. Zaletą tego układu katalitycznego jest możliwość otrzymania

α -aminofosfonianów z bardzo dobrą wydajnością już w ciągu godziny. Jak przedstawiono w Tabeli 2, właściwości elektronowe podstawnika w pierścieniu aromatycznym aldehydu, nie wykazywały wpływu na wydajność reakcji, nie determinowały także jej stereoselektywności [91].

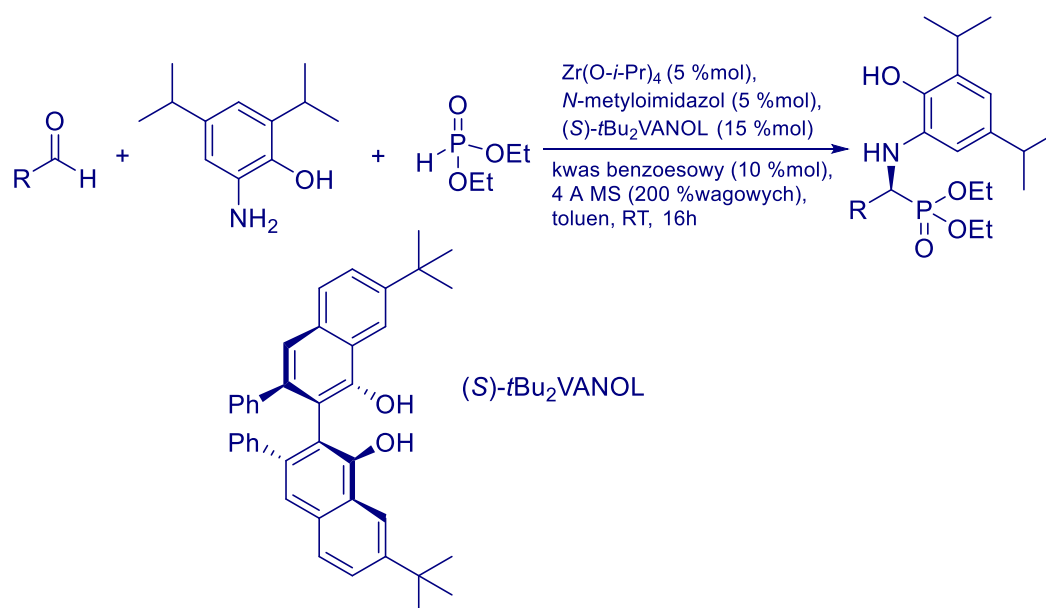


Rysunek 19. Schemat enancjoselektywnej reakcji Kabachnik'a-Fields'a z zastosowaniem układu katalitycznego *N,N'*-ditlenku-Sc(III) [91].

Tabela 2. Wartości wydajności oraz enancjoselektywności asymetrycznej reakcji Kabachnik'a-Fields'a katalizowanej *N,N'*-ditlenkiem-Sc(III), zachodzącej z udziałem aldehydów aromatycznych zawierających różne podstawniki w pierścieniu fenylovym [91].

R	Wydajność [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
C ₆ H ₅	86	84
4-NO ₂ C ₆ H ₄	76	84
3-NO ₂ C ₆ H ₄	79	87
4-FC ₆ H ₄	90	84
4-ClC ₆ H ₄	94	86
4-MeC ₆ H ₄	89	83
3-MeC ₆ H ₄	96	84
4-MeOC ₆ H ₄	75	80
3-MeOC ₆ H ₄	73	83
4-C ₆ H ₅ C ₆ H ₄	88	83
2-naftyl	88	81

Innym układem katalitycznym znajdującym zastosowanie w trójskładnikowej asymetrycznej reakcji Kabachnik'a-Fields'a jest połączenie *in situ* tetraizopropanolanu cyrkonu, *N*-metyloimidazolu i liganda biarylowego, jakim jest (*S*)-*t*Bu₂VANOL (Rysunek 20). Optymalizacja warunków reakcji pokazała istotny wpływ obecności kwasu benzoowego oraz sit molekularnych na wzrost jej wydajności oraz enancjoselektywności (Tabela 3). Reakcje prowadzono zarówno z udziałem aldehydów zawierających podstawniki elektronodonorowe, jak i elektronoakceptorowe. W przypadku stosowania obu rodzajów substratów aldehydowych, odnotowano zadowalające wyniki. Spośród różnych pochodnych benzaldehydu, tylko w przypadku *p*-metylobenzaldehydu zaobserwowano niższą enancjoselektywność (70%). W pozostałych przypadkach otrzymano α -aminofosfoniany z ponad 90%-owym nadmiarem enancjomerycznym. Co więcej, dalsze badania pokazały skuteczność omawianego katalizatora również podczas zastosowania do reakcji aldehydów alifatycznych [92].

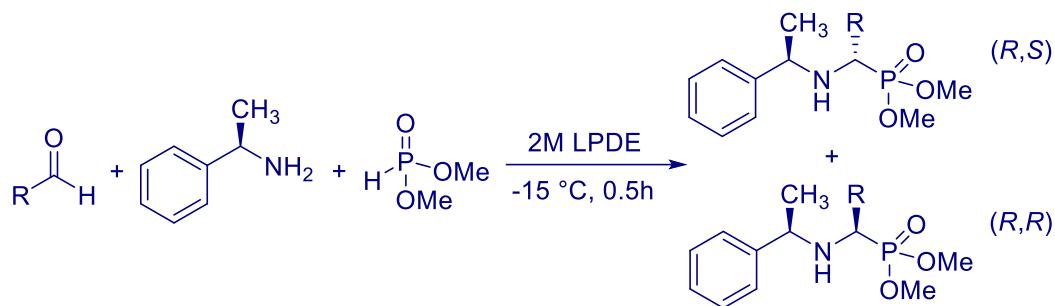


Rysunek 20. Schemat asymetrycznej syntezy α -aminofosfonianów w reakcji Kabachnik'a-Fields'a z zastosowaniem katalizatora na bazie cyrkonu i liganda biarylowego [92].

Tabela 3. Wydajność reakcji oraz nadmiar enancjomeryczny α -aminofosfonianów otrzymanych w reakcji Kabachnik'a-Fields'a katalizowanej układem tetraizopropanolanu cyrkonu, *N*-metyloimidazolu i (*S*)-*t*Bu₂VANOL'u [92].

R	Wydajność [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
C ₆ H ₅	90	93
2-naftyl	81	95
4-MeOC ₆ H ₄	89	90
4- <i>t</i> BuC ₆ H ₄	95	91
4-MeC ₆ H ₄	70	75
4-ClC ₆ H ₄	70	96
4-BrC ₆ H ₄	70	96
4-CF ₃ C ₆ H ₄	72	90

Reakcja Kabachnik'a-Fields'a może być prowadzona również w sposób diastereoselektywny. Otrzymanie α -aminofosfonianów w postaci mieszaniny diastereoizomerów następuje wskutek zastosowania w reakcji chiralnego substratu. Przeprowadzenie jednonaczyniowej trójskładnikowej reakcji w roztworze nadchloranu litu i eteru dietylowego pozwala na utworzenie fosfonianowych analogów α -aminokwasów z wysoką wydajnością oraz stereoselektywnością (Rysunek 21, Tabela 4). Badania wykazały, że wykorzystanie w syntezie aminy zawierającej centrum stereogeniczne o konfiguracji absolutnej *R* prowadzi do otrzymania w przewadze α -aminofosfonianu o konfiguracji *S* na nowym centrum stereogenicznym. Opracowane warunki reakcji charakteryzują się skutecznością wobec aldehydów alifatycznych oraz aromatycznych [93].



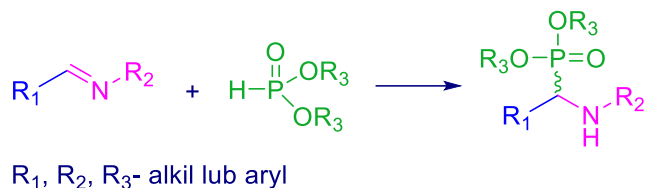
Rysunek 21. Schemat diastereoselektywnej reakcji Kabachnik'a-Fields'a przeprowadzonej w roztworze nadchloranu litu oraz eteru dietylowego [93].

Tabela 4. Wartości wydajności oraz stosunków diastereomerycznych α -aminofosfonianów w reakcji Kabachnik'a-Fields'a w roztworze LPDE (nadchloran litu/eter dietylowy) [93].

R	Wydajność [%]	Stosunek diastereoizomerów (<i>R,S</i>):(<i>R,R</i>)
<i>izo</i> -propyl	95	79:21
<i>tert</i> -butyl	96	82:18
cykloheksyl	92	80:20
benzyl	90	83:17

1.4.2. Reakcja Pudovik'a

Reakcja Pudovik'a jest drugą spośród najczęściej stosowanych metod otrzymywania α -aminofosfonianów. W reakcji tej tworzenie wiązania węgiel-fosfor następuje w wyniku hydrofosfonylacji iminy poprzez zastosowanie związku zawierającego labilne wiązanie fosfor-wodór, jakim jest fosforyn dialkilu lub diarylu (Rysunek 22) [4][94][95][96]. W reakcji Pudovik'a addycja fosforu może następować również do innych układów nienasyconych, na przykład do wiązania $C=O$ [97]. Z tego względu metoda ta znajduje szerokie zastosowanie w syntezie organicznej. Ograniczeniem jest konieczność użycia amin pierwszorzędowych [64].



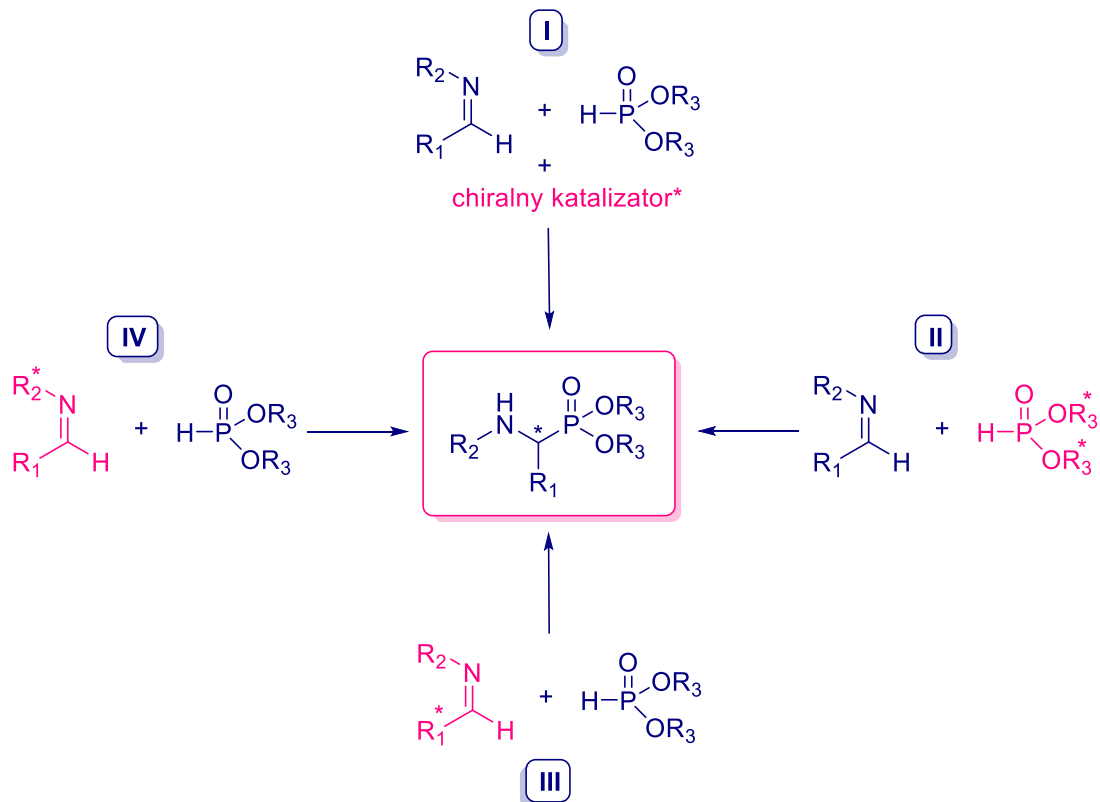
Rysunek 22. Schemat otrzymywania α -aminofosfonianów w reakcji Pudovik'a [98].

Dane literaturowe z okresu 2010-2021 pokazują, że znaczna część wydanych w tym czasie publikacji naukowych, ponieważ aż około 75%, dotyczy reakcji Kabachnik'a-Fields'a, natomiast tylko w 25% opisano badania z wykorzystaniem reakcji Pudovik'a [81]. Przebieg reakcji Pudovik'a może być wspomagany poprzez zastosowanie katalizatorów. Najczęściej addycji fosforynu do iminy towarzyszą kwasy Lewis'a, które charakteryzują się wysoką selektywnością tworzenia produktów. Ponadto, są stabilne w środowisku reakcyjnym i często nadają się do recyklingu [1][39]. Jednakże w przypadku dwuetapowej, jednonaczyniowej syntezy α -aminofosfonianów, woda powstająca podczas generowania w pierwszym etapie iminy, dezaktywuje niektóre kwasy Lewis'a, między innymi ZnCl_2 , SnCl_4 czy MgBr_2 . Niewrażliwy na działanie wody, a także wysoce reaktywny jest $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, dlatego jako kwas Lewis'a znajduje szerokie zastosowanie w syntezie organicznej, także w reakcji hydrofosfonylacji imin. Innym przykładem katalizatora, który charakteryzuje się odpornością na działanie wody, jest pentahydrat azotanu bizmutu. Katalizatory nukleofilowej addycji fosforynów do imin mogą być również nieco mniej typowe, takie jak nanocząstki Fe_3O_4 i CeO_2 , niejonowy środek powierzchniowo czynny Triton X-100, katalizatory heterogeniczne czy alkoholany metali alkalicznych, na przykład NaOEt [16][87][99]. Reakcja Pudovik'a może zachodzić również pod wpływem ogrzewania, promieniowania mikrofalowego lub ultradźwiękowego [81].

1.4.2.1. Stereoselektywna reakcja Pudovik'a

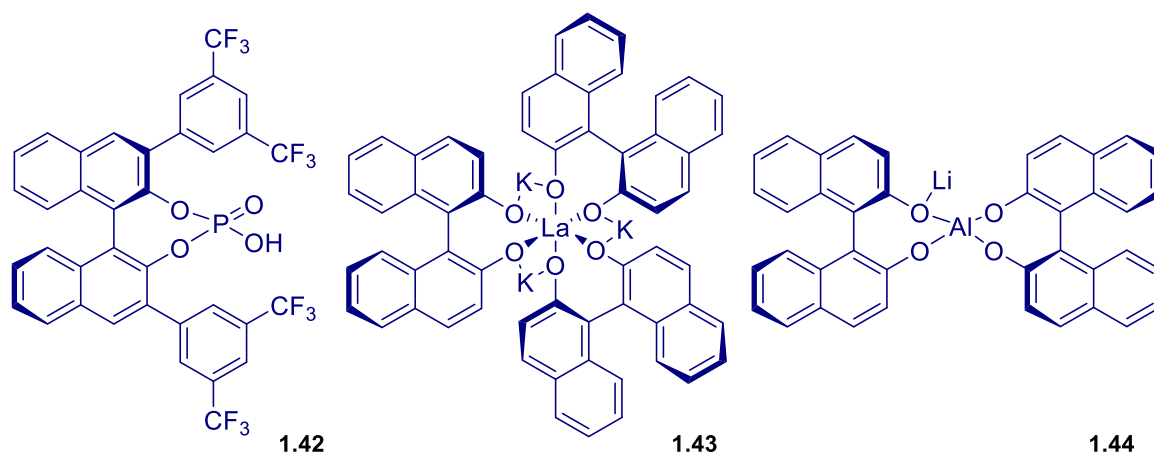
Reakcja Pudovik'a może zachodzić enancjoselektywnie lub diastereoselektywnie [100]. Do najczęściej stosowanych metod syntezy optycznie czynnych α -aminofosfonianów należy enancjoselektywna addycja niechiralnego fosforynu do niechiralnej iminy z udziałem chiralnego katalizatora (I), diastereoselektywna addycja chiralnego fosforynu do niechiralnej iminy (II), addycja niechiralnego fosforynu do iminy otrzymanej z chiralnego aldehydu (III) lub chiralnej aminy (IV) (Rysunek 23) [31][101]. Wysoką diastereoselektywność można uzyskać również poprzez koordynację iminy

z kwasem Lewis'a zastosowanym jako katalizator, prowadzącą do utworzenia sztywnej, cyklicznej struktury, która sprzyja stereoselektywności otrzymywania α -aminofosfonianów [58][101].



Rysunek 23. Metody stereoselektywnej syntezy α -aminofosfonianów w reakcji Pudovik'a [101].

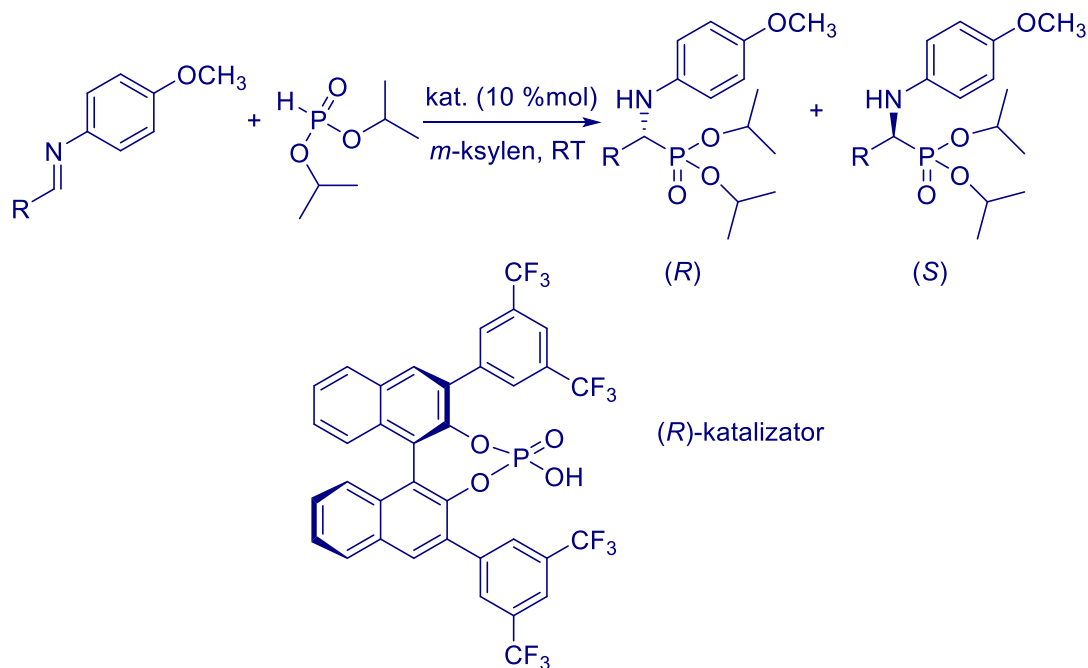
Do skutecznych strategii w syntezie optycznie czynnych związków należy zastosowanie chiralnych katalizatorów [102]. Popularnymi katalizatorami stosowanymi do aktywacji wiązania iminowego C=N są kwasy Lewis'a zawierające atom metalu. Jednak dużo bardziej stabilne i preferowane w syntezie α -aminofosfonianów okazują się niezawierające metali organokatalizatory [31]. Chiralne kwasy Brønsteda bardzo dobrze sprawdzają się jako katalizatory stereoselektywnej hydrofosfonylacji imin [39]. Ich działanie polega na elektrofilowej aktywacji podwójnego wiązania C=N. Jednymi z częściej stosowanych, są katalizatory zawierające (*R*)-BINOL (1,1'-bi-2-naftol) (Rysunek 24) [102]. Wprowadzenie chiralnego liganda, jakim jest (*R*)-BINOL, w strukturę katalizatora, indukuje enancjoselektywność reakcji [97].



Rysunek 24. Przykłady katalizatorów hydrofosfonylacji imin opartych na (*R*)-BINOL'u [97][103].

Istotny wpływ na wydajność procesu hydrofosfonylacji imin oraz stosunek stereoizomeryczny powstających produktów mają podstawniki zawarte w strukturze katalizatora. Zdarza się, że obecność danego podstawnika skutkuje bardzo dobrą wydajnością, ale niską stereoselektywnością lub odwrotnie, dlatego synteza skutecznych organokatalizatorów stanowi duże wyzwanie. Z danych literaturowych wynika, że obecność grupy -CF₃ prowadzi do utworzenia produktów z podobną wydajnością jak w przypadku zastosowania podstawnika -NO₂, jednak pozwala na otrzymanie α -aminofosfonianów z wyższym nadmiarem enancjomerycznym [102].

Badania wykazały, że zastosowanie katalizatora opartego na (*R*)-BINOL'u i ugrupowaniach fenyłowych z podstawnikiem -CF₃ skutkuje uzyskaniem w przewadze α -aminofosfonianów o konfiguracji *R* (Rysunek 25). W zależności od struktury podstawnika obecnego w iminie, można zaobserwować znaczną różnicę pomiędzy otrzymanymi nadmiarami enancjomerycznymi powstałych produktów (Tabela 5) [102].



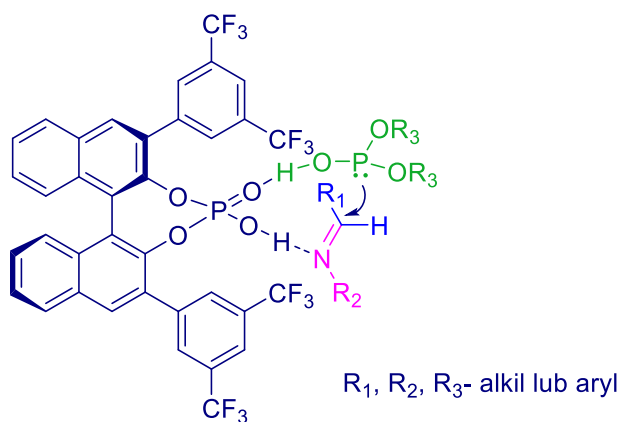
Rysunek 25. Schemat enancjoselektywnej reakcji Pudovik'a z zastosowaniem chiralnego katalizatora opartego na strukturze (R)-BINOL'u [102].

Tabela 5. Wydajności reakcji Pudovik'a przeprowadzonej z zastosowaniem chiralnego katalizatora oraz nadmiar enancjomeryczny powstałych produktów [102].

R	Wydajność [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
C ₆ H ₅	84	52
<i>o</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	76	69
<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	72	77
C ₆ H ₅ CH=CH	92	84
<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ CH=CH	88	86
<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ CH=CH	97	83
<i>o</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ CH=CH	80	82
<i>o</i> -ClC ₆ H ₄ CH=CH	82	87
<i>o</i> -NO ₂ C ₆ H ₄ CH=CH	92	88
<i>o</i> -CF ₃ C ₆ H ₄ CH=CH	86	90

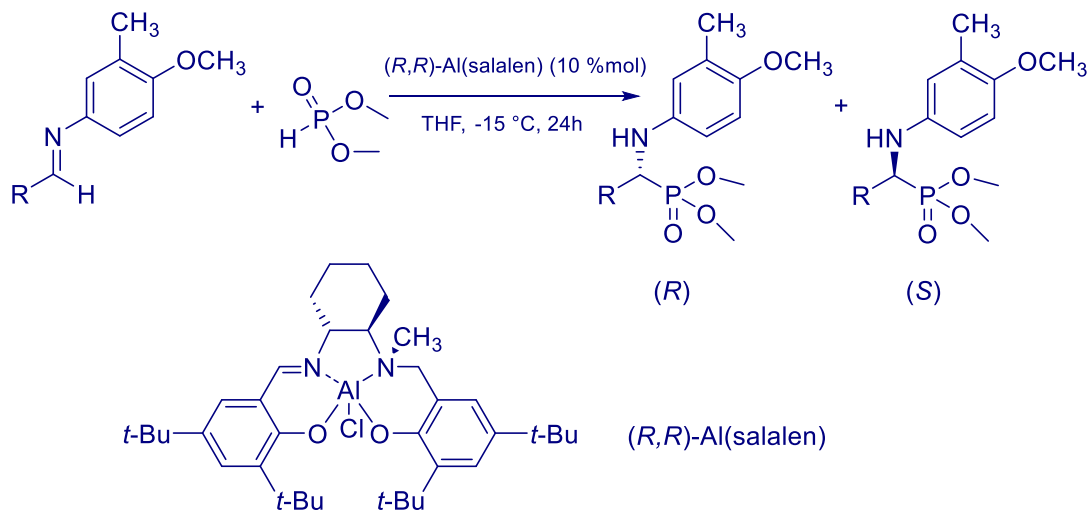
Zaproponowany mechanizm działania katalizatora opartego na strukturze kwasu fosfonowego i (R)-BINOL'u zakłada, iż atom wodoru grupy -OH pełni rolę kwasu Brønsted'a aktywując iminę, natomiast atom tlenu (połączony wiązaniem podwójnym

z atomem fosforu) aktywuje nukleofilowy fosforyn poprzez koordynację z atomem wodoru, działając tym samym jako zasada Brønsted’a (Rysunek 26) [102].



Rysunek 26. Zaproponowany mechanizm działania katalizatora opartego na strukturze kwasu fosfonowego oraz (*R*)-BINOL’u w reakcji hydrofosfonylacji imin [102].

Stereoselektywną hydrofosfonylację imin można przeprowadzić również stosując (*R,R*)-Al(salalen) (Rysunek 27). Użycie tego katalizatora skutkowało otrzymywaniem α -aminofosfonianów ze znacznym nadmiarem enancjomeru o konfiguracji *R* (Tabela 6) oraz z bardzo wysoką wydajnością [97].



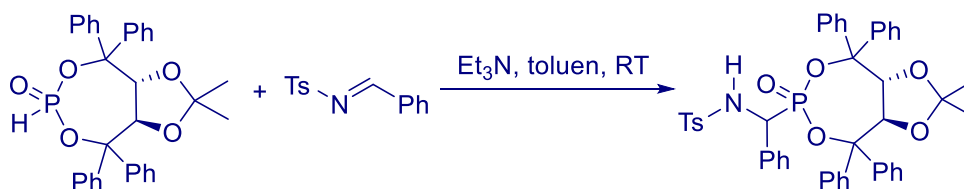
Rysunek 27. Schemat enancjoselektywnej reakcji Pudovik’a z wykorzystaniem (*R,R*)-Al(salalenu) jako katalizatora [97].

Tabela 6. Wydajność oraz nadmiar enancjomeryczny produktów stereoselektywnej reakcji Pudovik’a katalizowanej (*R,R*)-Al(salalenem) [97].

R	Wydajność [%]	Nadmiar enancjomeryczny [%]
C ₆ H ₅	90	87
4-BrC ₆ H ₄	>99	95
4-ClC ₆ H ₄	95	95
4-CH ₃ OC ₆ H ₄	92	85
4-CH ₃ C ₆ H ₄	95	90
2-CH ₃ C ₆ H ₄	93	87
2-furyl	>99	63

Zaobserwowano, że obecność w strukturze iminy podstawnika elektroakceptorowego w pozycji *para*- w pierścieniu fenylowym wpływa korzystnie na stereoselektywność reakcji, podczas gdy obecność podstawnika elektronodonorowego powoduje obniżenie stereoselektywności [101].

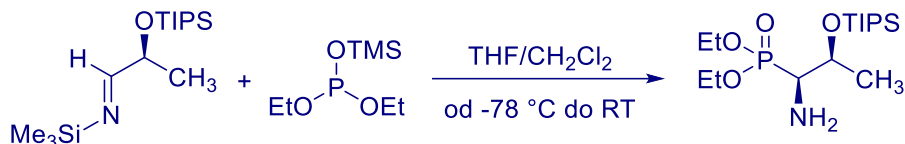
Stereoselektywną reakcję Pudovik’a można przeprowadzić również przy zastosowaniu chiralnych substratów, otrzymując produkty w postaci diastereoizomerów [104]. Jedną z takich reakcji jest hydrofosfonylacja achiralnych imin chiralnymi fosforinami. Przykładem chiralnego fosforowego nukleofila jest cykliczny (*R,R*) fosforin 2,3-*O*-izopropylideno-1,1,4,4-tetrafenylotreitolu (TADDOL). Addycja tego fosforinu do *N*-tosylobenzaldiminy pozwoliła na otrzymanie α -aminofosfonianu z zadowalającym stosunkiem diastereoizomerycznym, wynoszącym 77:23 oraz bardzo dobrą wydajnością, równą 93% (Rysunek 28) [100][105].



Rysunek 28. Schemat syntezy α -aminofosfonianu z wykorzystaniem chiralnego źródła fosforu- (*R,R*) fosforinu 2,3-*O*-izopropylideno-1,1,4,4-tetrafenylotreitolu [105].

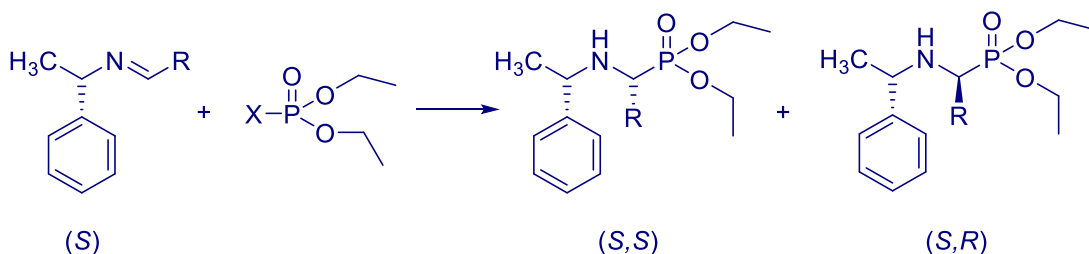
Addycja niechiralnego fosforinu do chiralnej iminy stanowi kolejną strategię diastereoselektywnej syntezy α -aminofosfonianów. Zasadę Schiff’a można otrzymać między innymi na drodze kondensacji chiralnego aldehydu z niechiralną aminą, ale nie

jest to często stosowane podejście [100]. Jednym z nielicznych przykładów takiej strategii jest reakcja (*S*)-2-triizopropylsilyloksylaktaldehydu z *N*-trimetylosililoaminą, prowadząca do powstania chiralnej iminy, którą poddano działaniu fosforynu. β -Sililoksy- α -aminofosfonian otrzymano z wysoką wydajnością (85%) oraz doskonałą diastereoselektywnością (98:2) (Rysunek 29) [106].



Rysunek 29. Schemat reakcji diastereoselektywnej syntezy α -aminofosfonianu z zastosowaniem iminy powstałej z achiralnej aminy oraz chiralnego aldehydu [106].

Inną metodą diastereoselektywnej syntezy α -aminofosfonianów jest zastosowanie do reakcji chiralnej aminy o określonej konfiguracji centrum stereogenicznego. Przeprowadzono między innymi reakcje (*S*)- α -metylobenzyloaminy z różnymi aldehydami i fosforynami, otrzymując produkty ze stosunkiem diastereoizomerycznym od umiarkowanego do bardzo dobrego (Rysunek 30, Tabela 7) [101].



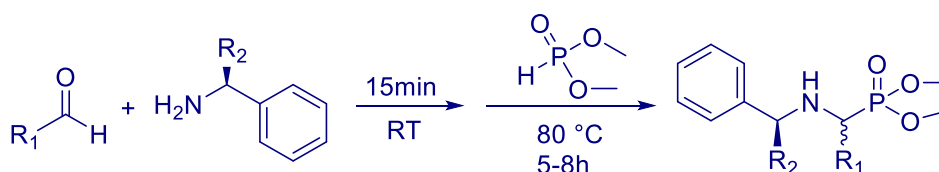
Rysunek 30. Schemat diastereoselektywnej syntezy α -aminofosfonianów z zastosowaniem chiralnej aminy- (*S*)- α -metylobenzyloaminy [101].

Tabela 7. Stosunki diastereoizomeryczne α -aminofosfonianów otrzymanych w reakcji Pudovik'a z użyciem (*S*)- α -metylobenzyloaminy [101].

R	X	Stosunek diastereoizomerów (<i>R,S</i>):(<i>S,S</i>)
C ₆ H ₅	H	66:34
4-HOC ₆ H ₄	Na	97,5:2,5
cykloheksyl	H	83:17

W literaturze naukowej opisana została również jednonaczyniowa dwuetapowa metoda diastereoselektywnej syntezy α -aminofosfonianów z zastosowaniem chiralnej

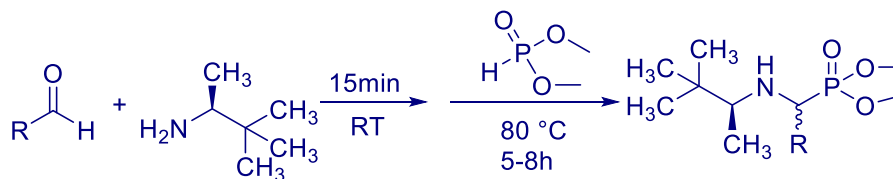
aminy (Rysunek 31, Tabela 8, Rysunek 32, Tabela 9). Zakłada ona wygenerowanie substratu iminowego w pierwszym etapie reakcji, natomiast drugi etap obejmuje wprowadzenie odpowiedniego fosforynu do powstałej iminy. Co istotne, syntezę prowadzono w łagodnych, przyjaznych środowisku warunkach, bez zastosowania rozpuszczalnika oraz bez katalizatora. Mimo to, produkty otrzymano z wysoką wydajnością, a w zależności od zastosowanej aminy, α -aminofosfoniany uzyskano z dobrą i bardzo dobrą diastereoselektywnością [90].



Rysunek 31. Schemat diastereoselektywnej reakcji Pudovik’a prowadzonej bez udziału rozpuszczalnika i bez katalizatora [90].

Tabela 8. Wydajności oraz stosunki diastereoizomeryczne produktów diastereoselektywnej reakcji Pudovik’a przeprowadzonej bez udziału rozpuszczalnika i bez katalizatora [90].

R ₁	R ₂	Wydajność [%]	Stosunek diastereoizomerów
C ₆ H ₅	Me	91	75:25
4-ClC ₆ H ₄	Me	80	72:28
4-MeOC ₆ H ₄	Me	89	76:24
<i>i</i> Bu	Me	87	73:27
<i>i</i> Pr	Me	79	71:29
<i>t</i> Bu	Me	86	75:25
C ₆ H ₅	Et	80	74:26
4-ClC ₆ H ₄	Et	83	76:24
4-MeOC ₆ H ₄	Et	82	78:22
<i>i</i> Bu	Et	86	73:27
<i>i</i> Pr	Et	83	72:28
<i>t</i> Bu	Et	83	77:23

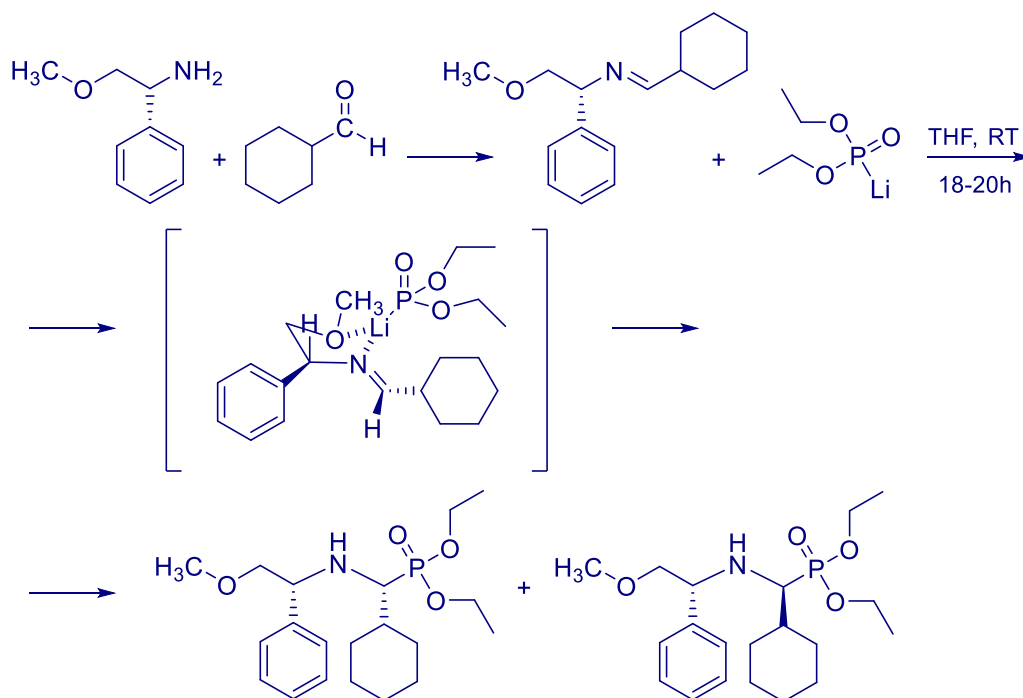


Rysunek 32. Schemat diastereo selektywnej reakcji Pudovik’a prowadzonej bez udziału rozpuszczalnika i bez katalizatora [90].

Tabela 9. Wydajności oraz stosunki diastereoizomeryczne produktów diastereo selektywnej reakcji Pudovik’a przeprowadzonej bez udziału rozpuszczalnika i bez katalizatora [90].

R	Wydajność [%]	Stosunek diastereoizomerów
C ₆ H ₅	91	93:7
4-ClC ₆ H ₄	90	91:9
4-MeOC ₆ H ₄	92	90:10
<i>i</i> Bu	86	82:18
<i>i</i> Pr	91	80:20
<i>t</i> Bu	93	91:9

Diastereo selektywność reakcji Pudovik’a zależy może także od budowy fosforynu. Badania pokazały, że addycja soli litowej fosforynu, na przykład dietylofosforynu litu, do iminy prowadzi do otrzymania α -aminofosfonianów z bardzo wysokim stosunkiem diastereoizomerycznym, wynoszącym 98:2 (Rysunek 33). Stereoselektywność reakcji wyjaśniono proponując model sztywnego 5-członowego stanu przejściowego, w którym chelatacja kationu litu przez atom tlenu grupy OCH₃ i przez iminowy atom azotu wymusza położenie grupy fenyłowej *trans* względem fosforynu (Rysunek 33). W konsekwencji atak nukleofila następuje od strony *re* wiązania iminowego, prowadząc do powstania w znacznej przewadze izomeru o konfiguracji *R* na nowo utworzonym centrum stereogenicznym [58].



Rysunek 33. Schemat diastereo selektywnej reakcji Pudovik'a z zastosowaniem chelatującego jonu metalu [58].

2. Właściwości fluoru i związków fluorooorganicznych

Fluor jest pierwiastkiem mogącym znacząco zmieniać właściwości fizykochemiczne i biologiczne związków chemicznych. Jest najbardziej elektroujemnym spośród wszystkich pierwiastków. W skali Pauling'a jego elektroujemność wynosi 4.0. Fluor tworzy z węglem bardzo silne wiązanie kowalencyjne, którego energia dysocjacji jest równa 105.4 kcal/mol. Wartość energii dysocjacji innych kowalencyjnych wiązań tworzonych przez węgiel jest niższa i wynosi 83.1 kcal/mol w przypadku wiązania węgiel-węgiel, 84.0 kcal/mol dla wiązania węgiel-tlen oraz 98.1 kcal/mol dla wiązania węgiel-wodór. Wiązanie z atomem fluoru jest więc najsilniejszym wiązaniem w chemii organicznej [107]. Z tego względu fluorowane związki organiczne charakteryzują się wysoką trwałością termiczną i oksydacyjną, niską polarnością, małym napięciem powierzchniowym oraz słabym oddziaływaniem międzycząsteczkowym. Cechy te są pożądane dla związków znajdujących zastosowanie jako środki powierzchniowo czynne, barwniki, membrany, agrochemikalia oraz leki [108]. Wiązanie węgiel-fluor jest wysoce spolaryzowane. Gęstość elektronowa atomu fluoru sprawia, że chętniej tworzy on wiązania z atomem węgla o hybrydyzacji sp^3 niż sp^2 [107][109]. Obecność fluoru w strukturze związku istotnie zmienia jego kwasowość lub zasadowość. Podstawienie

atomu wodoru atomem fluoru prowadzi do znacznego obniżenia wartości pK_a cząsteczki (Tabela 10). Powoduje to zmianę powinowactwa wiązania, w konsekwencji wpływając na właściwości farmakokinetyczne związku. Grupy zasadowe mogą działać niekorzystnie na proces wchłaniania leków. Zapobiega temu wprowadzenie w ich pobliżu atomu fluoru, który zmniejsza charakter zasadowy podstawników, skutkiem czego jest lepsza przepuszczalność związku przez błony komórkowe. Obniżenie pK_a poprawia biodostępność potencjalnego leku poprzez jego lepsze wchłanianie w organizmie [110][111].

Tabela 10. Wpływ podstawienia atomem fluoru na wartości pK_a przykładowych związków chemicznych [110].

Związek chemiczny	Wartość pK_a	Związek chemiczny	Wartość pK_a
CH_3-COOH	4.76	CH_3CH_2-OH	15.9
$CH_2F-COOH$	2.59	CF_3CH_2-OH	12.4
CHF_2-COOH	1.34	$(CH_3)_3C-OH$	19.2
CF_3-COOH	0.52	$(CF_3)_3C-OH$	5.1

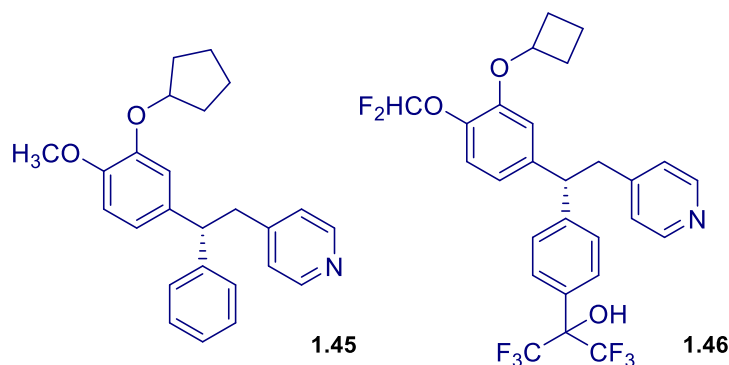
Zastąpienie w strukturze związku atomu wodoru atomem fluoru zwykle nie powoduje zaburzenia konformacji cząsteczki. Fluor oraz wodór posiadają zbliżone parametry fizykochemiczne. Charakteryzują się między innymi podobnymi wartościami promieni van der Waalsa, który dla fluoru równy jest 1.47 Å, natomiast dla wodoru 1.2 Å. Dodatkowo, ze względu na niewielki rozmiar atomu fluoru, włączenie go do cząsteczki związku nie wywołuje zaburzeń sterycznych. W wiązaniu kowalencyjnym atom fluoru zajmuje mniej przestrzeni niż grupa metylowa, aminowa czy też hydroksylowa. Fluor wykazuje indukcyjny efekt wyciągania elektronów, co jest jedną z przyczyn istotnych zmian jakie niesie ze sobą wprowadzenie go do struktury związku. Efekt ten może wpływać na poprawę oddziaływania fluorowanych cząsteczek z enzymami i receptorami. Fluor może uczestniczyć w oddziaływaniach elektrostatycznych, dlatego posiada możliwość zwiększenia powinowactwa wiązań pomiędzy fluorowanym związkiem organicznym a miejscem aktywnym enzymu [53][110][111]. Wprowadzanie atomu fluoru do struktury jest jedną z częściej stosowanych metod modyfikowania właściwości związków chemicznych. Substytucja fluorem odgrywa ważną rolę w projektowaniu środków terapeutycznych. Fluorowane związki chemiczne wykazują wysoki potencjał farmakologiczny, co pozwala spekulować, że ilość leków na rynku z ich udziałem będzie

stale wzrastać [110][112][113]. Za większość wyjątkowych właściwości fluoru odpowiedzialna jest jego wysoka elektroujemność i niewielki rozmiar atomu [108]. Substytucja atomem fluoru pełni kluczową rolę w projektowaniu leków charakteryzujących się wysoką selektywnością oraz aktywnością [114]. Podsumowując, zastąpienie atomu wodoru atomem fluoru w cząsteczce związku chemicznego nie prowadzi do znaczących zmian w jego budowie przestrzennej, natomiast istotnie wpływa na właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne związku [107].

Moc wiązania pomiędzy atomem fluoru i atomem węgla sprawia, że jest to wiązanie o niskiej reaktywności. Jon fluorkowy jest bardzo słabą grupą opuszczającą w reakcji substytucji nukleofilowej S_N2 . Fluor tworzy również słabe wiązania wodorowe, chociaż obecność trzech wolnych par elektronowych i wysoka polaryzacja sugerowałyby, że pierwiastek ten będzie dobrym akceptorem w wiązaniu wodorowym. Wiązanie węgiel-fluor może jednak skutecznie koordynować kationy metali [107]. Fluor posiada zdolność działania zarówno jako elektrofil, a także jako nukleofil. Fluorowce, zważywszy na dużą gęstość elektronową zazwyczaj pełnią rolę nukleofili [108].

Związki chemiczne zawierające fluor mogą być stosowane jako inhibitory wielu enzymów [108][114]. Dowiedziono, że inhibitory trombiny zawierające atom fluoru wiążą się nawet pięć razy silniej z trombiną niż niefluorowane inhibitory [111]. Związki posiadające w swojej strukturze perfluorowany pierścień aromatyczny, ze względu na odwrócony rozkład gęstości elektronowej w porównaniu do pierścieni niefluorowanych, mogą wykazywać interakcje w układach biologicznych. Wpływają one między innymi na oddziaływanie z aromatycznymi aminokwasami w centrach aktywnych enzymów [12][115]. Obecność fluoru w cząsteczce korzystnie wpływa także na jej metabolizm. W poszukiwaniu nowych, potencjalnych substancji leczniczych powszechnym problemem jest ich niska stabilność metaboliczna, między innymi podczas procesu utleniania z udziałem enzymu P450. Trwałość metaboliczna jest istotnym parametrem określającym biodostępność leku. Modyfikacja związku poprzez wprowadzenie atomu fluoru pomaga w zablokowaniu metabolizmu potencjalnego leku. Na przykład substancje lecznicze zawierające w strukturze pierścień fenyłowy z atomem fluoru w pozycji *para*, minimalizują utlenianie enzymatyczne związku. Innym przykładem wpływu fluoru na metabolizm jest modyfikacja związku przeznaczonego do leczenia astmy (Rysunek 34), który charakteryzował się szybkim rozpadem oraz toksycznymi dla organizmu

powstającymi metabolitami. Opracowany w pierwszej generacji nietrwały związek (struktura 1.45) został zmodyfikowany między innymi poprzez substytucję fluoru w grupie metoksylowej. Otrzymany w drugiej generacji lek (struktura 1.46), zawierający grupę difluorometoksylową, charakteryzował się znacznie wyższą trwałością. Modyfikacja związku pozwoliła także na uniknięcie tworzenia się szkodliwych metabolitów [109][110][111].



Rysunek 34. Struktury związków opracowanych w celu leczenia astmy. Struktura 1.45 przedstawia związek nietrwały metabolicznie, który zmodyfikowano między innymi poprzez wprowadzenie fluoru, otrzymując stabilny związek 1.46 [110].

W zależności od rozmieszczenia atomów fluoru w strukturze związku, może on zwiększać lub zmniejszać jego lipofilowość oraz rozpuszczalność. Lipofilowość stanowi istotny parametr w farmakologii oraz toksykologii. Wpływa bowiem na przenikalność substancji przez błony komórkowe organizmu, a także na metabolizm cząsteczki [116][117]. Monofluorowanie lub wprowadzenie grup trifluorometylowych zwykle prowadzi do zmniejszenia lipofilowości. Zwiększenie lipofilowości można zaobserwować w przypadku wprowadzenia fluoru w ugrupowania aromatyczne lub umieszczenie ich w sąsiedztwie atomów węgla tworzących wiązania π . Ze względu na fakt, iż dystrybucja leku w organizmie najczęściej zachodzi poprzez transport bierny, lipofilowość cząsteczki musi pozwolić jej na swobodne przejście przez błonę komórkową [110][118]. Nie może być ona również zbyt wysoka, gdyż w konsekwencji prowadzi to do zmniejszenia rozpuszczalności związku. Zatem zaprojektowanie substancji o odpowiednich parametrach wpływających na biodystrybucję stanowi pewnego rodzaju wyzwanie [111]. Zmiana lipofilowości, ale także wartości pK_a pod wpływem wprowadzenia fluoru do struktury związku, zwiększa przepuszczalność przez barierę krew-mózg (BBB), co

stanowi istotny parametr przede wszystkim dla leków działających na ośrodkowy układ nerwowy [114].

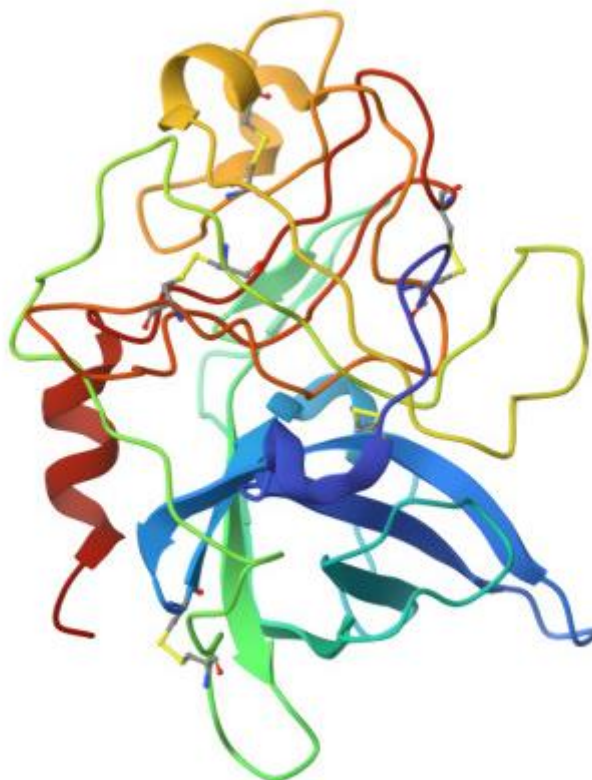
Fluorowane związki nieustannie zyskują na znaczeniu w wielu dziedzinach nauki, gdyż wykazują szeroką gamę zastosowań, między innymi jako ciekłe kryształy, nanocząstki, czy środki powierzchniowo czynne [108]. Ponadto, związki zawierające atom lub atomy fluoru są cennymi substratami do syntezy nowych, bioaktywnych substancji. Wykorzystywane są również w badaniach supramolekularnych oraz w projektowaniu nowych materiałów [53]. Właściwości fluoru sprawiają, że posiada on szerokie możliwości zastosowań w chemii medycznej, choć zainteresowanie wykorzystaniem go w tej dziedzinie nastąpiło dopiero w latach 70. XX wieku. Obecnie związki fluorowane w branży farmaceutycznej są niezwykle pożądane i powszechne. Szacuje się, że stanowią około 25% leków małowcząsteczkowych [111][119]. Sygnał ^{19}F NMR jest wykorzystywany między innymi do znakowania sond biochemicznych, co stosowane jest podczas badań konformacji białek oraz interakcji pomiędzy lekiem a celem terapeutycznym. Sygnał izotopu ^{18}F NMR znajduje zastosowanie w przygotowaniu znaczników w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET), służącej do diagnostyki onkologicznej, pozwalając ocenić stopień zaawansowania choroby oraz jej nawrotów [12][109][120]. Znaczniki ^{18}F charakteryzują się dłuższym okresem półtrwania niż inne powszechnie stosowane radionuklidy. Poza zastosowaniem jako narzędzie diagnostyczne, PET służy do oceniania dystrybucji leku w organizmie. Pozwala również na sprawdzenie, czy potencjalna substancja lecznicza wykazuje zdolność przekraczania bariery krew-mózg, co jest bardzo trudne do oceny bez użycia tego narzędzia. Ze względu na szerokie rozpowszechnienie fluoru w substancjach farmaceutycznych, wykorzystanie znacznika ^{18}F w badaniach biodystrybucji jest niezwykle cenne [110]. Wyjątkowe właściwości fluoru czynią go także ważnym pierwiastkiem w naukach o materiałach oraz w agrochemii. Szacuje się, że nawet 40% dostępnych na rynku środków agrochemicznych zawiera fluor [120]. Zaobserwowano, że wprowadzenie atomu fluoru do struktury substancji fitotoksycznej znacznie poprawia jej właściwości chwastobójcze oraz selektywność działania [108].

3. Urokinaza- budowa i mechanizm działania

Urokinazowy aktywator plazminogenu (*urokinase-plasminogen activator*, uPA), popularnie nazywany urokinazą, jest enzymem należącym do proteaz serynowych.

Enzym ten odgrywa istotną rolę w organizmie katalizując przemianę plazminogenu w plazminę [121][122]. Aktywowana plazmina bierze udział w rozpuszczaniu zakrzepów poprzez degradację fibryny do formy rozpuszczalnej, dlatego urokinaza znajduje zastosowanie w medycynie, między innymi w leczeniu zakrzepicy [123][124]. uPA reguluje nie tylko procesy fizjologiczne, ale również patologiczne [125]. Razem z plazminogenem, plazminą, aktywatorem plazminogenu typu tkankowego (tPA), receptorem (uPAR) oraz dwoma głównymi inhibitorami aktywatorów plazminogenu (PAI-I i PAI-II), uPA stanowi część układu enzymatycznego ulegającego nadekspresji w chorobach nowotworowych. Z tego powodu, urokinaza jest biomarkerem i coraz bardziej popularnym celem terapeutycznym w wielu typach nowotworów, na przykład w nowotworach głowy i szyi, piersi, płuc, trzustki i jajnika [121][126]. Wyniki badań pokazują, że zahamowanie aktywności urokinazy lub zablokowanie możliwości wiązania jej z uPAR skutkuje zmniejszeniem progresji nowotworu i jego dalszej inwazji przejawiającej się w powstawaniu przerzutów [125].

Aktywator plazminogenu typu urokinazy jest białkiem zbudowanym z 411 reszt aminokwasowych. Wytwarzana jako jednołańcuchowa, nieaktywna cząsteczka, urokinaza zostaje aktywowana po związaniu ze swoim receptorem przez rozcięcie wiązania peptydowego Lys158-Ile159 [127]. W rezultacie urokinaza składa się z dwóch łańcuchów połączonych ze sobą mostkiem disiarczkowym. Sekwencja N-końcowego fragmentu, pochodząca od łańcucha zakończonego Lys158 zawiera dwie domeny, które odpowiedzialne są za wiązanie z uPAR. Sekwencja C-końcowa drugiego łańcucha zawiera natomiast domenę proteazy serynowej, odpowiadającą za aktywność katalityczną i wiązanie z inhibitorem [121][127]. Ludzki gen urokinazy ulega ekspresji między innymi w komórkach śródbłonna, komórkach nabłonka nerek i w niektórych komórkach nowotworowych [128]. Ponadto, nawet 5-krotnie wyższą ekspresję uPA zaobserwowano w tętnicach osób chorujących na miażdżycę, przy czym poziom nadekspresji związany jest bezpośrednio ze stadium zaawansowania choroby [129]. Aktywność urokinazy regulują inhibitory aktywatora plazminogenu oraz uPAR [130]. Otrzymanie struktury krystalicznej urokinazy umożliwiło poznanie budowy jej miejsca aktywnego i dostarczyło informacji bardzo cennych w odniesieniu do procesu projektowania potencjalnych inhibitorów (Rysunek 35).

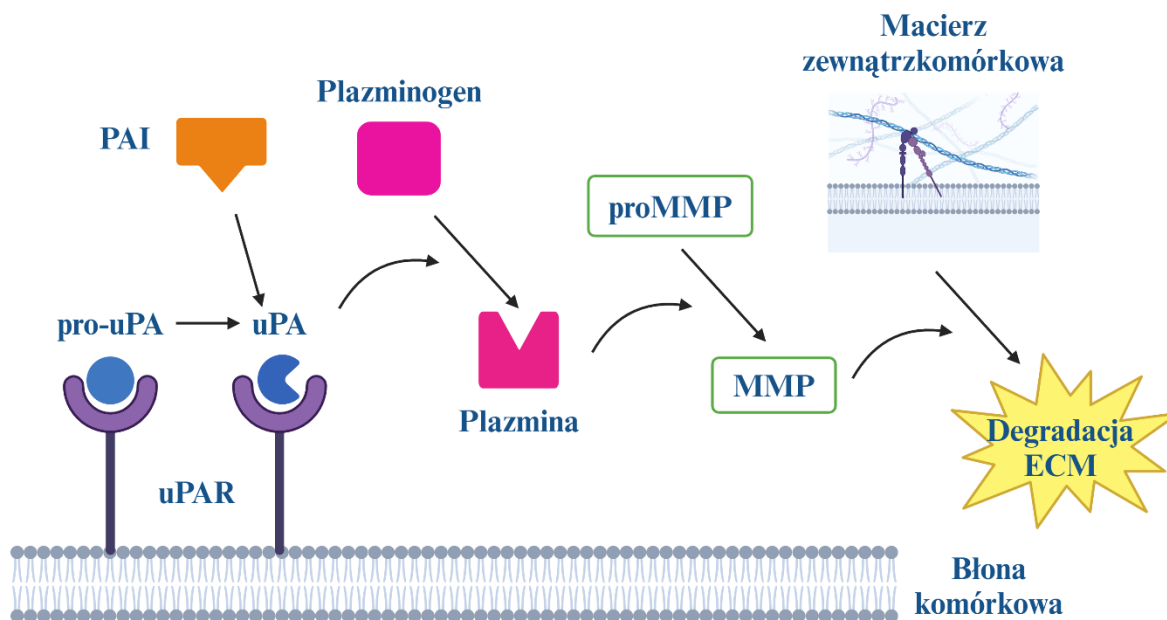


Rysunek 35 . Struktura urokinazy (PDB kod 1C5W_2).

uPA jest trypsynopodobną proteazą serynową, posiadającą w swojej budowie, podobnie jak inne proteazy, specyficzną kieszeń S1, która różni się nieznacznie wielkością oraz kształtem pomiędzy enzymami [131][132]. S1 jest głęboką kieszenią zawierającą resztę Asp189. Oddziaływania, które zachodzą w tym miejscu są istotne dla określenia selektywności inhibitorów urokinazy [125]. Jedną z istotniejszych, specyficznych cech budowy uPA jest obecność w kieszeni S1 Ser190. W tPA w miejscu Ser190 znajduje się Ala190 [132]. Hydrofilowa reszta Ser190 uniemożliwia wiązanie hydrofobowych fragmentów, charakterystycznych między innymi dla inhibitorów trombiny, wykazujących powinowactwo do hydrofobowej reszty Ala190 [133].

System aktywacji plazminogenu odgrywa kluczową rolę w procesie przerzutowania i wzrostu guzów nowotworowych. Zwiększona ekspresja urokinazy nasila chorobę, co skutkuje niekorzystnym rokowaniem dla pacjenta [134]. Uznaje się, że uPA jest istotnym mediatorem inwazji komórek oraz przebudowy tkanek. Wysoki poziom urokinazy może także wpływać na zahamowanie procesu gojenia się ran [135][136]. Połączenie nieaktywnego białka pro-uPA z receptorem uPAR prowadzi do aktywacji urokinazy. Rozpoczyna to kaskadę proteolityczną, podczas której plazminogen zostaje

przekształcony do plazminy, co w następstwie aktywuje prometaloproteazy (proMMP) do metaloproteaz macierzy (MMP). Powoduje to degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (Rysunek 36). W wyniku tych przemian komórki nowotworowe mogą niszczyć otaczające je tkanki i wnikać do tych zdrowych. Migrując z krwią mają możliwość atakowania również odległych narządów [121][127][137]. Jest to wieloetapowy proces, podczas którego komórki nowotworowe oddzielają się od swojego pierwotnego miejsca, by przedostać się do pobliskich tkanek, a następnie doprowadzić do inwazji dalszych narządów [138][139]. W ten sposób połączenie cząsteczki urokinazy z jej receptorem pośredniczy w proliferacji patogennych komórek, co jest krytycznym etapem postępu choroby i powstawania przerzutów [140].



Rysunek 36. Schemat działania systemu aktywacji plazminogenu [141].

W świetle powyższych faktów urokinaza postrzegana jest jako kluczowy enzym związany z degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej, inicjujący inwazję nowotworów [142]. Obecność systemu uPA w środowisku komórek nowotworowych sprawiła, że stał on się źródłem markerów nowotworowych [143]. Biomarkery są cennym narzędziem pozwalającym ocenić potencjał biologiczny i kliniczny nowotworów. Umożliwiają prognozowanie ryzyka przerzutów lub nawrotu choroby. Badania dowodzą, że podwyższony poziom urokinazy w osoczu zwiększa ryzyko nawrotu choroby, a nawet śmierci pacjenta, natomiast zwiększony poziom uPAR ma związek z narażeniem na

przerzuty do odległych węzłów chłonnych [144]. Aktualnie stosowane modele predykcyjne nie są wystarczająco precyzyjne, a wykorzystanie biomarkerów molekularnych może pomóc w zwiększeniu dokładności prognozowania oraz w podejmowaniu odpowiednich decyzji klinicznych [145]. Prognostyczne zastosowanie urokinazy okazuje się bardziej skuteczne niż użycie innych markerów biologicznych, takich jak receptory estrogenowe, HER-2, białko p53 czy katepsyna D [141].

Korelację stężenia uPA i powstawania przerzutów zaobserwowano szczególnie w przypadku raka piersi [141]. Nawet u 40% pacjentek zmagających się z nowotworem piersi diagnozowane są przerzuty w odległych narządach [121]. Zarówno urokinaza, jej receptor, jak i inhibitor PAI-1 są niezależnymi markerami, których wykorzystanie kliniczne we wczesnym stadium raka piersi najprawdopodobniej może pomóc w chemioterapii uzupełniającej [141][145][146]. Wykrywanie kompleksu uPA/PAI-1 zostało włączone do międzynarodowych wytycznych dotyczących diagnostyki raka piersi [147]. Znaczenie urokinazy jako biomarkera dostrzeżono również w przypadku nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego (NMIBC), wykazującego złożone zachowania biologiczne i kliniczne. Nawet około 50% pacjentów zmagających się z tym nowotworem doświadcza nawrotu choroby. Nadekspresję co najmniej jednego z składników systemu uPA stwierdzono aż u ponad 80% badanych pacjentów. Większość z nich wykazywała zwiększoną aktywność jednego z trzech markerów (uPA, uPAR lub PAI-1), natomiast u niektórych zaobserwowano nadekspresję wszystkich trzech składowych, co było jednoznacznie powiązane z postępem choroby [145]. Korelacja podwyższonego poziomu uPA oraz PAI-1 z agresywnością nowotworu odnotowana została również u pacjentek zmagających się z rakiem jajnika [141]. U osób chorujących na raka trzustki, szczególnie w złośliwej postaci, wykazano wzrost ekspresji uPA i uPAR [140]. Nadekspresję urokinazy i jej znaczenie w powstawaniu przerzutów potwierdzono także w przypadku płaskonabłonkowego nowotworu głowy i szyi. Mnogość i zróżnicowanie chorób nowotworowych związanych z uPA i pozostałymi elementami systemu aktywacji plazminogenu dowodzą tego, jak cennym biomarkerem w diagnostyce i terapii przeciwnowotworowej jest urokinaza [142].

3.1. Inhibitory urokinazy

Inhibicja urokinazy jest ważnym procesem terapeutycznym w przebiegu wielu chorób. Zahamowanie reaktywności uPA może być przeprowadzone różnymi metodami,

zarówno na poziomie białka, jak i na poziomie genu. Do najczęściej spotykanych strategii należy między innymi zastosowanie inhibitora o niskiej masie cząsteczkowej skierowanego do miejsca aktywnego enzymu, zastosowanie przeciwciał blokujących oddziaływanie urokinazy z jej receptorem lub obniżających aktywność enzymatyczną urokinazy, zastosowanie oligonukleotydów antysensowych blokujących ekspresję urokinazy czy zastosowanie wektorów wirusowych dostarczających geny dla składników układu aktywacji plazminogenu [148][149].

Powszechnie stosowane, małowczątkowe inhibitory urokinazy mają w swojej strukturze zasadową resztę aromatyczną podstawioną grupą amidynową lub guanidynową, które stanowią element wiążący kieszeń S1 poprzez silne oddziaływanie z resztą Asp189. Wobec tego inhibitory drobnocząsteczkowe dzielą się na dwa ogólne typy: amidyny aromatyczne oraz pochodne guanidyn [125][132][150]. Amidyny są jednak uznawane za związki o słabej biodostępności [151]. Znanych jest niewiele związków, które selektywnie blokują urokinazę, ponieważ trypsynopodobne proteiny serynowe, takie jak tPA, trypsyna, czy trombina, charakteryzują się podobną strukturą i sekwencją aminokwasów. Zablockowanie działania aktywatora plazminogenu typu tkankowego, odpowiedzialnego za proces fibrynolizy, prowadzący do rozpuszczania zakrzepów, może prowadzić do poważnych konsekwencji kardiologicznych. Wobec tego selektywność inhibitora odgrywa tutaj bardzo ważną rolę [125][132][135][143][148]. Niemniej jednak specyficzne inhibitory nie są dostępne, a ponadto uważa się, że ich długotrwałe stosowanie mogłoby powodować poważne powikłania w postaci zakrzepów [146].

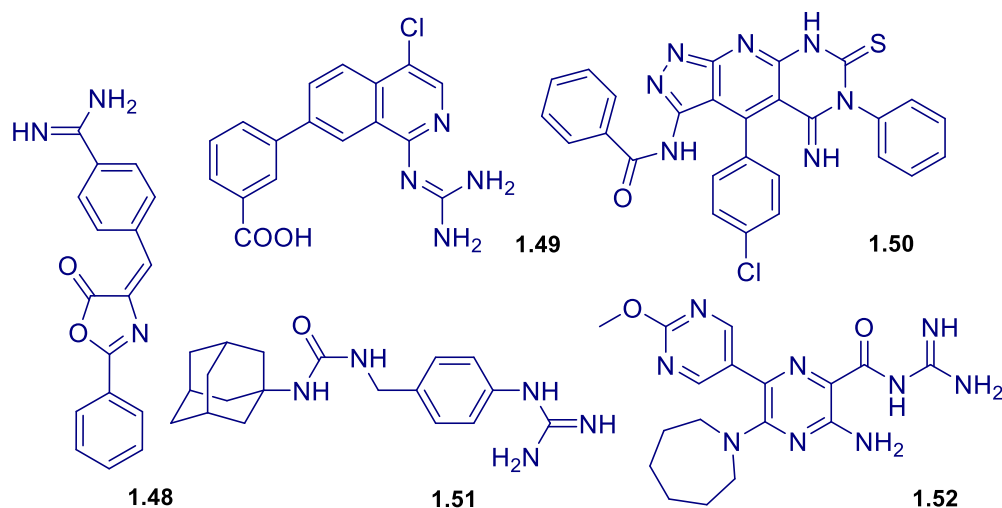
Popularną pochodną guanidynową, wykazującą zdolność inhibicji urokinazy, stosowaną również w medycynie jako lek o właściwościach moczopędnych, jest amiloryd (Rysunek 37). Charakteryzuje się on selektywnością wobec proteaz serynowych, a także możliwym działaniem przeciwnowotworowym [125][139]. Amiloryd oddziałuje z resztami aminokwasów znajdujących się w kieszeni S1 poprzez tworzenie licznych wiązań wodorowych [125]. Uznaje się także, że jest on inhibitorem wymiany Na^+/H^+ , co wpływa na zahamowanie inwazji i ruchliwości komórek nowotworowych [138]. Oszacowano, że energia wiązania amilorydu z urokinazą wynosi -12.99 kcal/mol [152].



Rysunek 37. Struktura amilorydu, związku chemicznego stosowanego do inhibicji urokinazy [125].

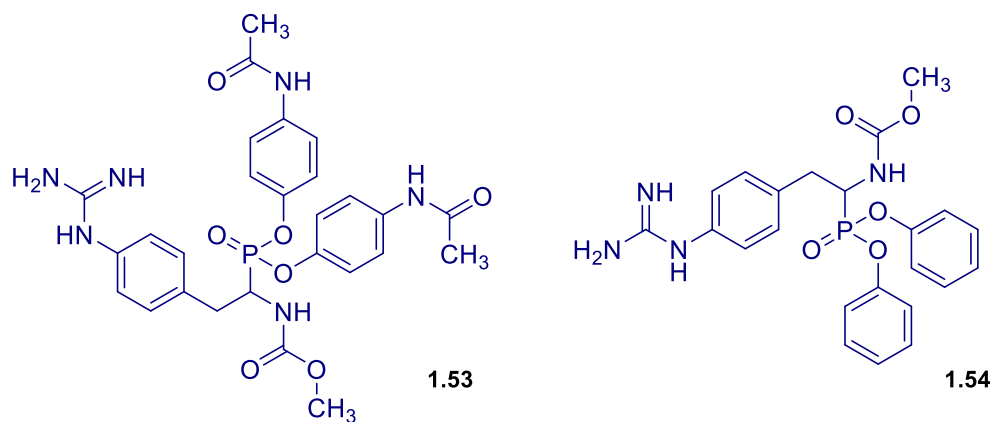
Ze względu na strukturę uPA, a w szczególności jej miejsca aktywnego, najbardziej obiecującą strategią zahamowania aktywności enzymu jest synteza niepeptydowych, małowczątkowych inhibitorów o odwracalnym profilu hamowania (Rysunek 38) [126][153]. Wiele spośród nowo opracowanych inhibitorów wykazuje niższą wartość IC_{50} niż amiloryd. Związek 1.48 posiada w swojej budowie farmakofor, jakim jest pierścień oksazolidynonu, który oddziałuje z resztami aminokwasów w miejscu aktywnym enzymu poprzez tworzenie wiązań wodorowych. Obecność podstawnika fenyloamidynowego znacząco wpływa na wzrost interakcji inhibitora w kieszeni S1 urokinazy, może także zwiększyć jego selektywność ze względu na zdolność oddziaływania między innymi z resztą Ser190 [125]. Związek 1.49 stanowi pochodną izochinolinologuanidyny i charakteryzuje się bardzo dobrą selektywnością względem urokinazy. Kluczową rolę w działaniu tego inhibitora odgrywa obecność podstawnika halogenowego oraz fenyloowego z grupą karboksylową, który wpływa na lipofilowość związku, w konsekwencji czyniąc go biodostępnym [135]. Skutecznym inhibitorem urokinazy jest także związek 1.50, pochodna pirazolu. Wyniki przeprowadzonego dokowania molekularnego pokazały, że jego aktywność związana jest z obecnością skondensowanych układów pierścieniowych w strukturze i wykazywanych przez nie oddziaływań w kieszeni S1. Podstawnik chlorofenyloowy zapewnia lipofilowy charakter cząsteczki [154]. Innym niepeptydowym związkiem silnie hamującym działanie urokinazy jest związek 1.51, zawierający grupę ureidową. Współczynnik selektywności tego inhibitora w stosunku do tPA wynosi co najmniej 400. Grupa guanidynowa zajmuje kieszeń S1 urokinazy, natomiast grupa ureidowa tworzy cztery wiązania wodorowe w pobliżu miejsca aktywnego tego enzymu [131]. Jedną ze strategii poszukiwania nowych związków wykazujących zdolność hamowania działania urokinazy, jest modyfikacja strukturalna amilorydu. Przykładem zastosowania takiego podejścia jest związek 1.52. Otrzymane 6-podstawione pochodne (heksametyleno)amilorydu (HMA) charakteryzują się wysoką selektywnością wobec innych proteaz serynowych oraz

kilkukrotnie wyższą inhibicją uPA niż HMA. Co ważne, w przeciwieństwie do amiloridu, wykazują one minimalne działanie hamujące na nabłonkowe kanały sodowe. Zahamowanie tych kanałów wiąże się ze zmniejszeniem wydalania jonów K^+ , których nadmiar może prowadzić między innymi do arytmii serca [139].



Rysunek 38. Przykłady małowzrostkowych inhibitorów urokinazy [125][131][135][139][154].

Ciekawym podejściem do poszukiwania inhibitorów uPA jest synteza cząsteczek opartych na aminokwasach i ich strukturalnych analogach. W literaturze opisane zostały α -aminofosfoniany, które stanowią bardzo silne, selektywne i nieodwracalne inhibitory urokinazy wykazujące znaczną aktywność przeciwpłazmową (Rysunek 39) [126][155]. Inhibitory łączące się z enzymem w sposób nieodwracalny mogą wykazywać silniejszy efekt, a także mniejszą toksyczność wobec organizmu [155].



Rysunek 39. Przykłady α -aminofosfonianów działających jako inhibitory uPA [126][155].

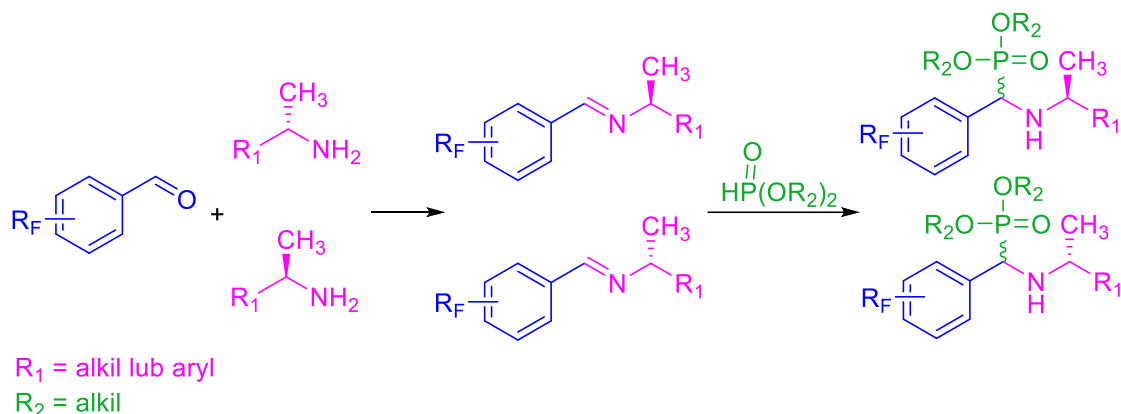
Uważa się, że obecna w strukturze związku 1.53 oraz 1.54 grupa difenylofosfonianowa oddziałuje z seryną znajdującą się w miejscu aktywnym proteaz serynowych, co prowadzi do nieodwracalnego zahamowania aktywności enzymu. Związki te charakteryzują się bardzo wysoką zdolnością hamowania działania urokinazy oraz znaczną selektywnością w stosunku do enzymów biorących udział w procesie krzepnięcia krwi oraz fibrynolizie. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że najlepsze wartości, zarówno aktywności względem urokinazy, jak i selektywności, wykazywały związki zawierające niewielkie podstawniki przy atomie węgla α , na przykład metylokarbaminiany. Co więcej, otrzymane α -aminofosfoniany 1.53 i 1.54 są wysoce stabilne w różnych środowiskach pH. 3-godzinna inkubacja tych związków w warunkach fizjologicznych (pH 7.4, temperatura 37°C) wykazała, że 60% dostarczonego związku zachowało nienaruszoną strukturę [155]. W oparciu o powyższe fakty można wysunąć hipotezę, że α -aminofosfoniany wydają się stanowić bardzo cenne, warte naukowego zainteresowania, źródło potencjalnych inhibitorów urokinazy.

II

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Strategia syntezy tytułowych α -aminofosfonianów

Ogólną strategię syntezy nowych zawierających fluor α -aminofosfonianów przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Schemat syntezy fluorowanych α -aminofosfonianów opartej na diastereoselektywną hydrofosfonylacją imin otrzymanych w reakcjach fluorowanych pochodnych benzaldehydu z chiralnymi aminami.

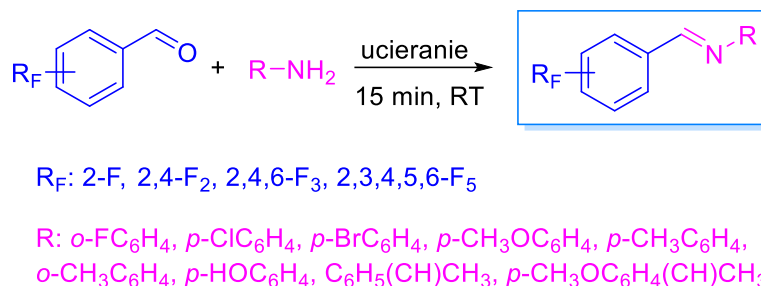
Do syntezy tytułowych związków zaadaptowano metodę literaturową [90]. Polegała ona na otrzymaniu chiralnych imin, które następnie poddawano addycji nukleofilowych fosforinów, uzyskując oczekiwane α -aminofosfoniany w postaci diastereoizomerów (Rysunek 1).

W przyjętej strategii, iminy jako prekursorzy zaprojektowanych α -aminofosfonianów odgrywały bardzo ważną rolę. Z tego powodu, mimo iż literatura naukowa oferuje wiele metod syntezy tych związków, postanowiono opracować bardziej dogodną i przyjazną środowisku, a jednocześnie efektywną, nową metodą otrzymywania imin.

1.1. Mechanochemiczna metoda syntezy imin

Biorąc pod uwagę zasady zielonej chemii i troskę o środowisko naturalne, opracowano mechanochemiczną metodę syntezy fluorowanych imin (Rysunek 2). Metoda polega na ręcznym ucieraniu przy zastosowaniu szklanej bagietki równomolowych ilości aldehydów i amin. Reakcje prowadzone są w warunkach bezrozpuszczalnikowych, w temperaturze pokojowej i nie wymagają zastosowania katalizatorów. Co więcej, produkty otrzymywane są w krótkim czasie, wynoszącym 15 minut. Z uwagi na szczególne znaczenie imin zawierających w cząsteczkach fluor, które wynika z potrzeby

zastosowania ich w drugim etapie syntezy tytułowych α -aminofosfonianów, metodę tę przetestowano z powodzeniem dla fluorowanych pochodnych benzaldehydu.

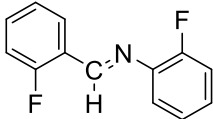
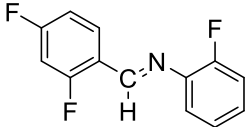
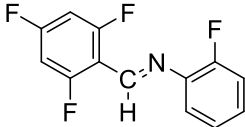
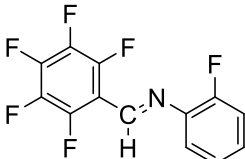
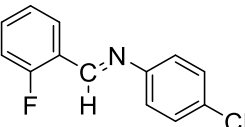
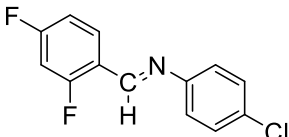
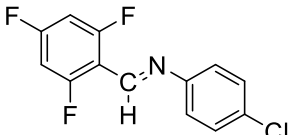
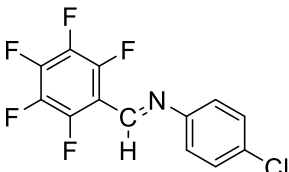
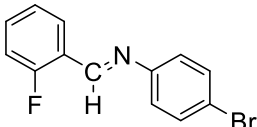


Rysunek 2. Schemat mechanochemicznej metody syntezy fluorowanych imin.

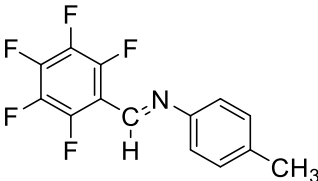
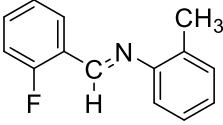
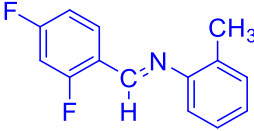
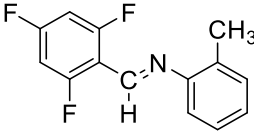
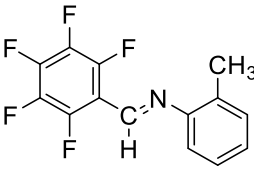
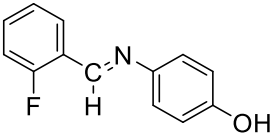
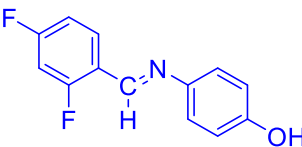
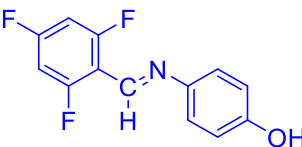
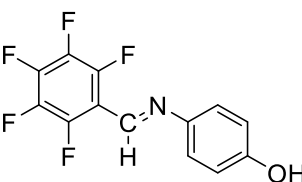
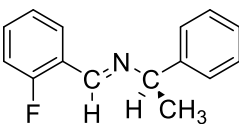
2-fluorobenzaldehyd, 2,4-difluorobenzaldehyd, 2,4,6-trifluorobenzaldehyd oraz 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyd poddano reakcji z szeregiem pochodnych aniliny zawierających podstawniki, zarówno elektronodonorowe jak i elektronoakceptorowe, a także z aminami chiralnymi: (*R*)- α -metylobenzyloaminą i (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminą. Zastosowano substraty będące w temperaturze pokojowej cieczami (2-fluorobenzaldehyd, 2,4-difluorobenzaldehyd, 2-fluoroanilina, 2-toluidyna, (*R*)- α -metylobenzyloamina oraz (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloamina), jak i ciałami stałymi (2,4,6-trifluorobenzaldehyd, 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyd, 4-chloroanilina, 4-bromoanilina, 4-anizydyna, 4-toluidyna oraz 4-aminofenol).

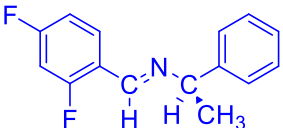
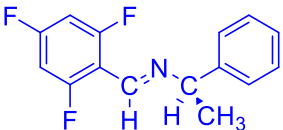
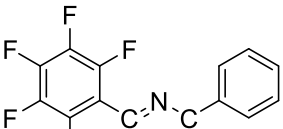


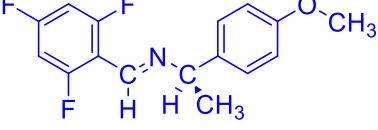
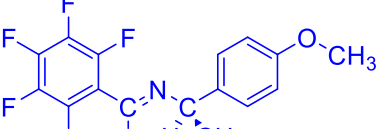
Badania wykazały, że 15 minut jest optymalnym czasem prowadzenia reakcji. Po 10 minutach w mieszaninie reakcyjnej obserwowano obecność niewielkich ilości substratów, natomiast wydłużenie czasu reakcji do 20 minut nie miało wpływu na jej wydajność. Monitorowanie postępu reakcji za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej (TLC), a także wykonane widma NMR produktów, w zdecydowanej większości nie wykazały obecności nieprzereagowanych substratów i otrzymane produkty nie wymagały oczyszczania. Zaobserwowano niewielkie ilości nieprzereagowanej aminy w przypadku 10 związków, dla których w celu określenia wydajności wykonano widma ¹H NMR z zastosowaniem wzorca wewnętrznego, za który posłużył dichlorometan. Poniższa tabela prezentuje struktury imin zsyntezowanych metodą mechanochemiczną oraz wydajności reakcji (Tabela 1). Spośród 36 otrzymanych imin, 12, przedstawionych w Tabeli 1 kolorem niebieskim, stanowią nowe, nieopisane dotąd w literaturze naukowej związki.

Tabela 1. Wydajności reakcji i struktury fluorowanych imin otrzymanych metodą mechanochemiczną.

Produkt	Struktura produktu	Wydajność	Wydajność odnotowana w literaturze
1.1		86%	-
1.2		58% *	-
1.3		56% *	-
1.4		95%	-
1.5		86%	-
1.6		96%	-
1.7		91%	99% [156] 100% [157]
1.8		78%	92% [158]
1.9		90%	-

1.10		85%	-
1.11		80%	-
1.12		84% *	83% [158]
1.13		97%	78% [159]
1.14		95%	66% [160]
1.15		99%	99% [156]
1.16		98%	80% [161] 92% [162] 97% [163][164] 98% [165]
1.17		97%	-
1.18		95%	81% [166]
1.19		88%	-

1.20		92%	93% [167] 95% [158]
1.21		87% *	-
1.22		74% *	-
1.23		98%	-
1.24		96%	-
1.25		79% *	-
1.26		90% *	-
1.27		45% *	-
1.28		68% *	54% [158]
1.29		98%	-

1.30		93%	-
1.31		93%	-
1.32		72% *	-
1.33		86%	-
1.34		91%	-
1.35		96%	-
1.36		77%	-

*Obliczono z widm ^1H NMR metodą wzorca wewnętrznego, stosując dichlorometan jako wzorzec wewnętrzny.

Budowę wszystkich uzyskanych imin potwierdzono metodami spektroskopowymi (^1H NMR, ^{13}C NMR oraz ^{19}F NMR). Dla związków nieopisanych dotąd w literaturze wykonano także analizy spektrometryczne (HRMS). Wszystkie iminy otrzymano z wydajnościami od dobrych do bardzo dobrych. W przypadku 18 z 36 produktów odnotowano wydajność reakcji wynoszącą 90% lub więcej. Nie zaobserwowano wpływu ilości atomów fluoru w pierścieniu aromatycznym na wydajność prowadzonych reakcji. W przypadku imin monofluorowanych odnotowano wydajności zawierające się w przedziale 79-98%, natomiast w przypadku produktów pentafluorowanych, 68-98%. Bardzo dobre wyniki uzyskano zarówno dla imin otrzymanych z wykorzystaniem pochodnych aniliny, jak również amin chiralnych. Co istotne, bariery nie stanowił także

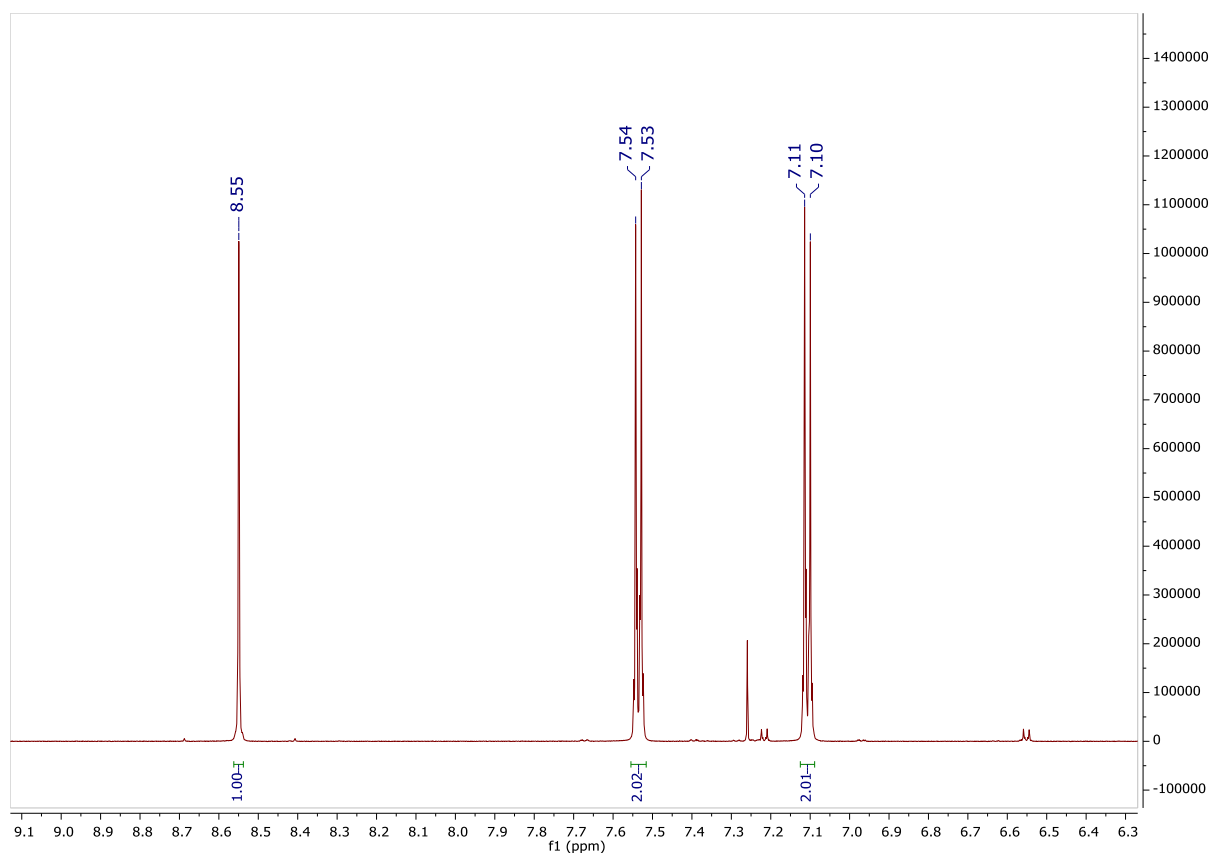
stan skupienia zastosowanych substratów. Między innymi produkt 1.21, powstały w reakcji aldehydu i aminy, które w temperaturze pokojowej są cieczeniami, został otrzymany z wydajnością 87%. Produkt 1.16, utworzony z substratów w formie stałej uzyskano z wydajnością 98%. W przypadku połączenia aldehydu w postaci cieczy oraz aminy w formie stałej, na przykład imina 1.6, można otrzymać produkt z wydajnością równą 96%. W sytuacji przeciwnej (aldehyd w formie ciała stałego oraz amina w formie cieczy), jak ma to miejsce między innymi w przypadku iminy 1.35, odnotowano identyczną wydajność. Co więcej, niejednokrotnie wydajności reakcji osiągały lepsze wartości niż w przypadku metod opisanych w literaturze. Metody te obejmowały między innymi syntezy we wrzącym toluenie z zastosowaniem aparatu Dean'a-Stark'a (produkt 1.7 i 1.15) lub oparte były na reakcjach prowadzonych z użyciem dowex'u i chlorobenzenu jako rozpuszczalnika (produkt 1.14). Iminy 1.13, 1.16 1.18 oraz 1.20 otrzymywano w łagodniejszych warunkach, stosując heksan i siarczan magnezu, etanol lub dichlorometan w temperaturze pokojowej. Opracowana w ramach niniejszej pracy metoda mechanochemiczna pozwoliła uzyskać wydajności reakcji porównywalne z literaturowymi, a w wielu przypadkach lepsze, i co warto podkreślić, w warunkach znacznie bardziej przyjaznych środowisku.

Produkty, w przypadku których zaobserwowano obecność nieprzereagowanych substratów, zostały oczyszczone poprzez przefiltrowanie roztworu iminy przez cienką warstwę silikażelu umieszczoną na lejku piankowym. Metoda ta pozwoliła na skuteczną i szybką izolację iminy z mieszaniny poreakcyjnej. Otrzymane wartości wydajności oczyszczonych produktów były identyczne lub porównywalne do wartości obliczonych z widm ^1H NMR wykonanych z zastosowaniem wzorca wewnętrznego (Tabela 2). W przypadku zaledwie kilku produktów (1.26, 1.27, 1.28) zaobserwowano niższą wydajność o około 10%. Potwierdzeniem skuteczności zastosowanej metody izolacji jest porównanie przykładowych wykonanych widm ^1H NMR przed (Rysunek 3) i po oczyszczeniu (Rysunek 4) jednej z imin.

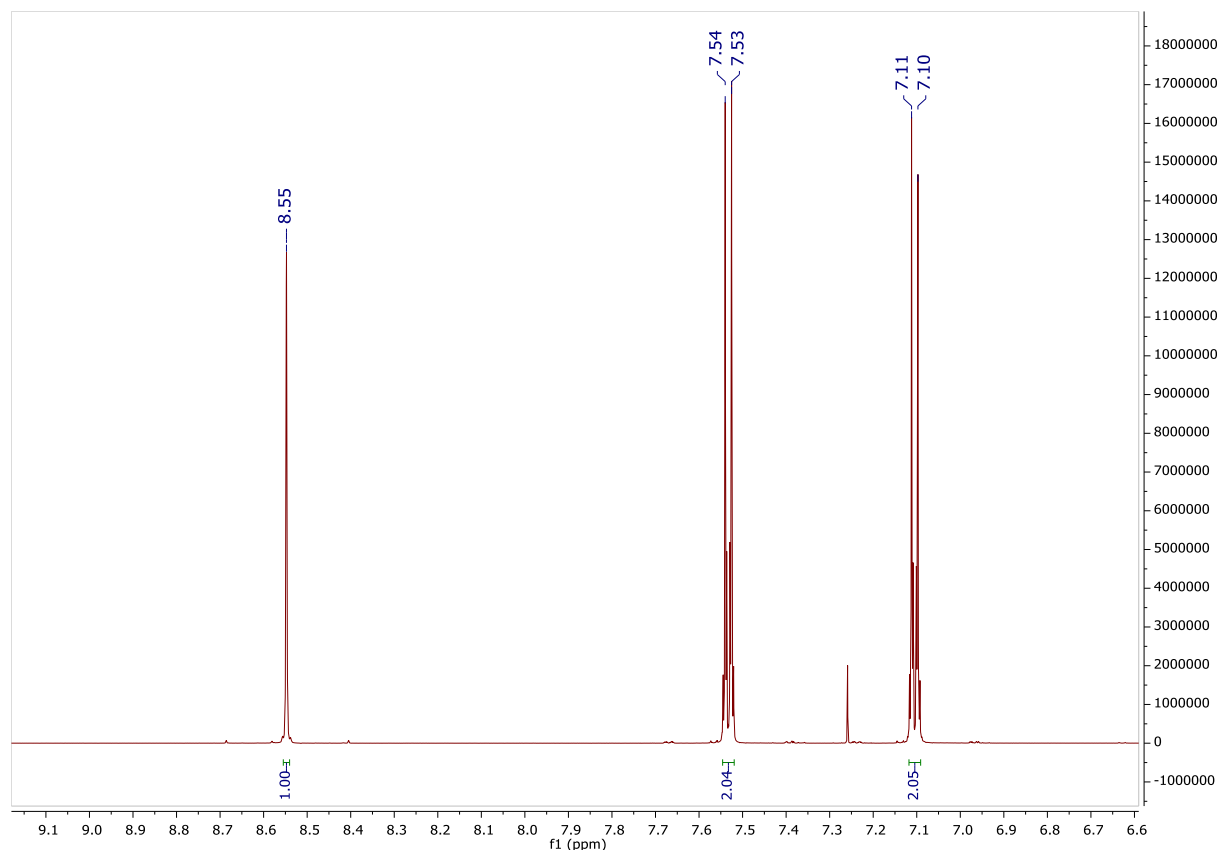
WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 2. Porównanie wydajności obliczonych z widm ^1H NMR wykonanych z zastosowaniem wzorca wewnętrznego z wydajnościami reakcji obliczonymi dla imin oczyszczonych poprzez przefiltrowanie przez warstwę silikażelu na leжку piankowym.

Produkt	Wydajność obliczona z NMR	Wydajność po oczyszczeniu iminy
1.2	58%	57%
1.3	56%	56%
1.12	84%	76%
1.21	87%	87%
1.22	74%	68%
1.25	79%	75%
1.26	90%	77%
1.27	45%	35%
1.28	68%	58%
1.32	72%	69%



Rysunek 3. Widmo ^1H NMR produktu 1.12 przed oczyszczeniem.



Rysunek 4. Widmo ^1H NMR produktu 1.12 po oczyszczeniu.

Widoczne w widmie ^1H NMR wykonanym przed jego oczyszczeniem dwa małe dublety przy wartości przesunięcia chemicznego wynoszącej 7.22 oraz 6.55 ppm przypisano odpowiednio dwóm parom równocennych protonów obecnych w pierścieniu fenyłowym 4-bromoaniliny, stanowiącej substrat w reakcji syntezy iminy 1.12. Sygnałów tych nie zaobserwowano w widmie wykonanym po przesączeniu iminy przez warstwę silikażelu, co potwierdza skuteczność zastosowanej metody oczyszczania.

1.2. Zastosowanie metody mechanochemicznej do syntezy imin w większej skali

W celu oceny możliwości wykorzystania opracowanej mechanochemicznej metody do syntezy większych ilości produktów, dla kilku przykładowych imin przeprowadzono reakcje ich otrzymywania w większej skali. Reakcję 2,4-difluorobenzaldehydu z 4-anizydyną wykonano w skali 2-krotnie, 4-krotnie, 6-krotnie, 8-krotnie oraz 10-krotnie większej w stosunku do początkowej (0.26 mmol) (Tabela 3). Wszystkie przeprowadzone syntezy skutkowały otrzymaniem produktów z bardzo wysokimi wydajnościami, które wynosiły 95-97%, podczas gdy wydajność reakcji oryginalnej była równa 95%.

Tabela 3. Wydajności reakcji 2,4-difluorobenzaldehydu z 4-anizydyną przeprowadzonych w większej skali.

Produkt	Ilość substratów (mmol)	Skala	Wydajność
1.14	0.52	2-krotność	96%
1.14	1.04	4-krotność	97%
1.14	1.56	6-krotność	97%
1.14	2.08	8-krotność	97%
1.14	2.6	10-krotność	95%

Ocenę wpływu ilości substratów na przebieg reakcji i jej wydajność określono również w przypadku innych imin (Tabela 4). W skali 2-krotnie większej wykonano syntezę produktu 1.24 jako przykład iminy pentafluorowanej, w skali 4-krotnie większej przeprowadzono syntezę produktu 1.35 jako przykład iminy trifluorowanej oraz w skali 8-krotnie większej syntezę produktu 1.17 jako przykładowej iminy monofluorowanej. Reakcje 2-fluorobenzaldehydu z 4-toluidyną (produkt 1.17), 2,4,6-trifluorobenzaldehydu z (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminą (produkt 1.35), a także 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehydu z 2-toluidyną (produkt 1.24), przeprowadzone z zastosowaniem większej ilości substratów, również charakteryzowały się wysokimi wydajnościami zawierającymi się w przedziale 95-98%. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że metoda mechanochemicznej syntezy fluorowanych imin wykazuje wysoki potencjał zastosowania, także w celu otrzymania większych ilości produktów.

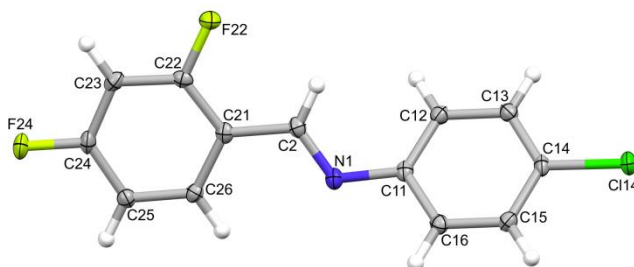
Tabela 4. Wydajności reakcji syntezy imin przeprowadzonych w większej skali.

Produkt	Ilość substratów (mmol)	Skala	Wydajność
1.24	0.52	2-krotność	95%
1.35	1.04	4-krotność	98%
1.17	2.08	8-krotność	96%

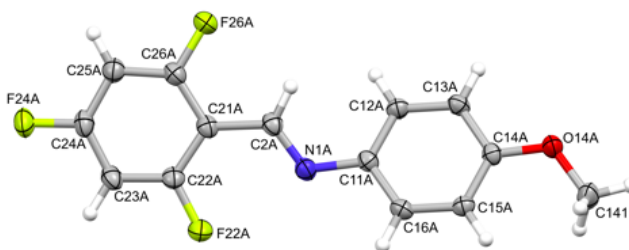
1.3. Struktury krystaliczne imin

Produkty mechanochemicznej syntezy otrzymano zarówno w postaci oleistej, jak i ciał stałych. Substancje stałe poddane zostały procesowi krystalizacji poprzez powolne odparowywanie rozpuszczalnika. Kryształy odpowiednie do badań rentgenograficznych uzyskano dla trzech imin: 1.6, 1.15 oraz 1.16. Iminy te krystalizowano w temperaturze

4 °C stosując jako rozpuszczalnik chloroform dla związku 1.6 i 1.15 oraz dichlorometan dla 1.16. Struktury krystaliczne imin 1.6, 1.15 oraz 1.16 przedstawione zostały odpowiednio na Rysunkach 5-7. Pomimo iż związki te zostały wcześniej opisane w literaturze, nie zostały jednak wykonane ich analizy krystalograficzne.



Rysunek 5. Struktura krystaliczna produktu 1.6.



Rysunek 6. Struktura krystaliczna produktu 1.15.



Rysunek 7. Struktura krystaliczna produktu 1.16.

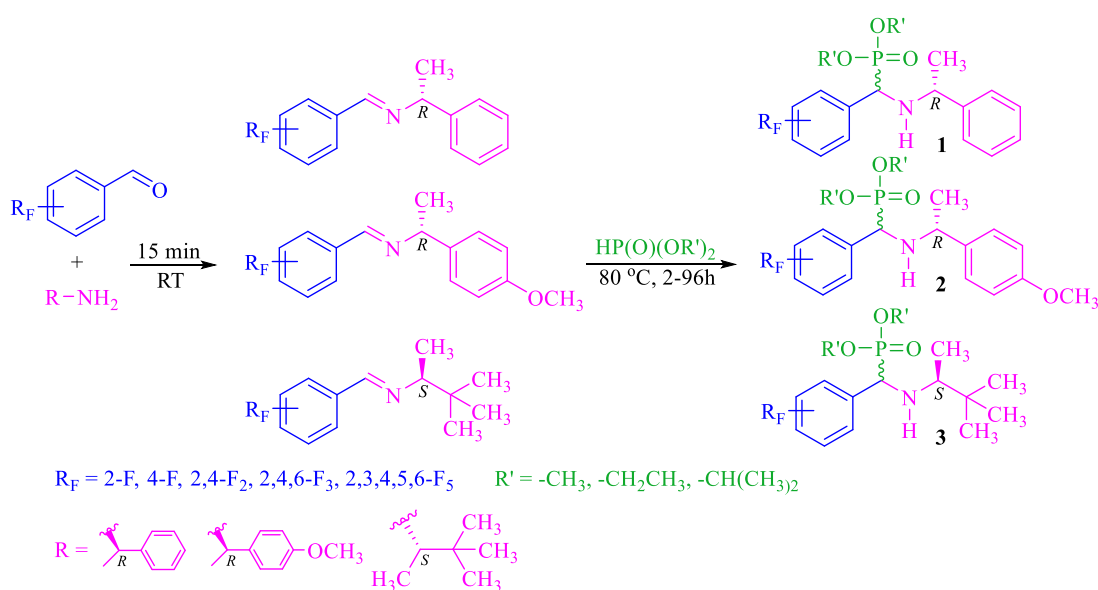
Wyniki analiz krystalograficznych jednoznacznie potwierdziły budowę otrzymanych imin.

2. Synteza i badania strukturalne α -aminofosfonianów

2.1. Synteza α -aminofosfonianów

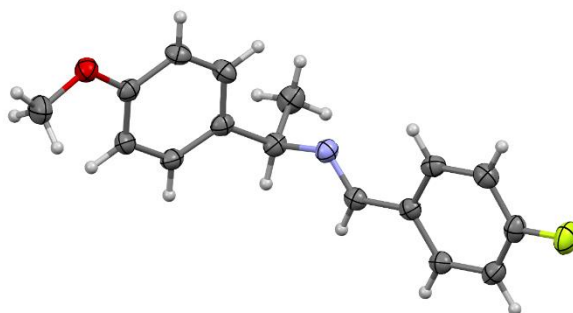
Opracowaną mechanochemiczną metodę otrzymywania imin zastosowano w pierwszym etapie syntezy α -aminofosfonianów prowadzącym do powstania chiralnych imin, które w drugim etapie poddane były hydrofosfonylacji. W reakcjach tworzenia imin wykorzystywano aldehydy: 2-fluorobenzaldehyd, 4-fluorobenzaldehyd,

2,4-difluorobenzaldehyd, 2,4,6-trifluorobenzaldehyd i 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyd oraz chiralne aminy: (*R*)- α -metylobenzyloaminę, (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminę i (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminę. Równomolowe ilości substratów (1.005 mmol) ucierano szklaną bagietką w okrągłodennej kolbie. Otrzymane iminy poddawano następnie reakcji hydrofosfonylacji z zastosowaniem fosforynów (1.055 mmol): fosforynu dimetylu, fosforynu dietylu lub fosforynu diizopropylu (Rysunek 8). Reakcje addycji fosforynów prowadzono w atmosferze argonu, w temperaturze 80°C, bez użycia rozpuszczalnika. Czas prowadzenia drugiego etapu syntezy α -aminofosfonianów był zróżnicowany i w zależności od budowy zastosowanych substratów wynosił od dwóch do 96 godzin. W większości przypadków produkty otrzymano w postaci oleistej. α -Aminofosfoniany zostały szczegółowo scharakteryzowane spektroskopowo (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR, ^{31}P NMR) oraz spektrometrycznie (HRMS). W celu potwierdzenia czystości związków, wykonano także analizę elementarną.



Rysunek 8. Schemat syntezy α -aminofosfonianów.

Jedną z chiralnych imin, będących substratem w reakcjach hydrofosfonylacji, otrzymano w postaci ciała stałego. Iminę tę poddano krystalizacji z heksanu w temperaturze 4°C uzyskując kryształy odpowiednie do badań rentgenograficznych. Strukturę krystaliczną tej iminy powstałej w reakcji 4-fluorobenzaldehydu i (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminy przedstawiono na Rysunku 9. Otrzymana struktura stanowi potwierdzenie budowy związku i jednocześnie skuteczności metody mechanochemicznej także w syntezie imin chiralnych.



Rysunek 9. Struktura krystaliczna chiralnej iminy otrzymanej w reakcji (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminy z 4-fluorobenzaldehydem.

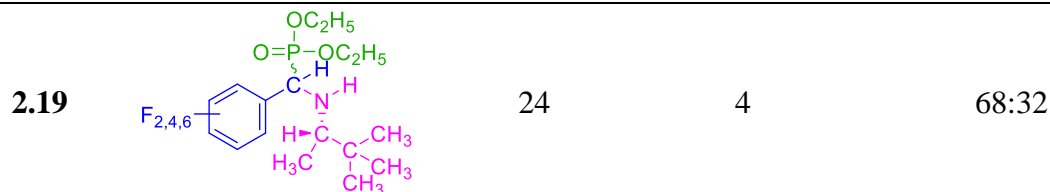
α -Aminofosfoniany otrzymano w postaci par diastereoizomerów z wydajnością od umiarkowanej do bardzo dobrej (Tabela 5). Diastereoizomery charakteryzowały się niemal identycznymi wartościami współczynnika retencji, co uniemożliwiło ich rozdzielanie. Stosunki diastereoizomeryczne obliczono na podstawie widm ^{31}P NMR wykonanych dla oczyszczonych produktów.

Tabela 5. Struktury, wydajność, czas reakcji hydrofosfonylacji oraz stosunki diastereoizomeryczne otrzymanych α -aminofosfonianów.

Produkt	Struktura	Wydajność [%]	Czas [h]	Stosunek diastereoizomeryczny
2.1		66	24	79:21
2.2		66	24	82:18
2.3		56	5	61:39

2.4		68	24	81:19
2.5		71	96	81:19
2.6		52	8	88:12
2.7		54	96	87:13
2.8		88	24	81:19
2.9		40	24	71:29
2.10		32	48	63:37

2.11		35	96	74:26
2.12		67	2	86:14
2.13		39	24	87:13
2.14		39	24	88:12
2.15		52	6	89:11
2.16		65	4	89:11
2.17		54	72	83:17
2.18		42	6	74:26

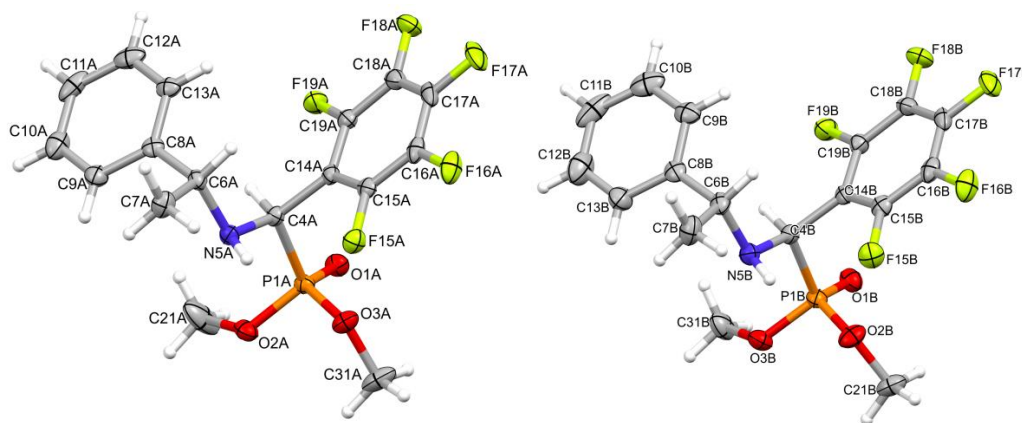


Otrzymane α -aminofosfoniany charakteryzowały się bardzo dobrymi stosunkami diastereoizomerycznymi. W przypadku związków zawierających większą liczbę atomów fluoru (trifluorowanych oraz pentafluorowanych) zaobserwowano mniejszą różnicę pomiędzy ilością powstających diastereoizomerów, a także odnotowano niższe wydajności reakcji ich powstawania w porównaniu do ich monofluorowanych oraz difluorowanych odpowiedników (Tabela 5). Analiza porównawcza wydajności reakcji oraz stosunków diastereoizomerycznych produktów otrzymanych z zastosowaniem (*R*)- α -metylobenzyloaminy (Tabela 5, związki 2.1-2.3) z wydajnością i diastereoselektywnością reakcji opisanych w literaturze odnoszących się do α -aminofosfonianów uzyskanych z zastosowaniem (*S*)- α -metylobenzyloaminy (Rozdział I, Tabela 8), pozwala zaobserwować różnice dotyczące zarówno wydajności, jak i stereoselektywności. Difluorowane α -aminofosfoniany utworzone w reakcji z (*R*)- α -metylobenzyloaminą (Tabela 5, związek 2.1 i 2.2) charakteryzowały się lepszym stosunkiem diastereoizomerycznym niż związki literaturowe. α -Aminofosfonian zawierający w swojej strukturze pięć atomów fluoru (Tabela 5, związek 2.3) otrzymano natomiast z niższą diastereoselektywnością (61:39), mimo, że w przypadku difluorowanego odpowiednika tego związku (Tabela 5, związek 2.1) stosunek diastereoizomeryczny wynosił 79:21. W przypadku reakcji przeprowadzonej z zastosowaniem (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy (Tabela 5, związki 2.12-2.19) odnotowano, podobnie jak w literaturze (Rozdział I, Tabela 9), wysoką diastereoselektywność. α -Aminofosfoniany monofluorowane oraz difluorowane (związki 2.12-2.17) otrzymano ze znacznie lepszą diastereoselektywnością niż α -aminofosfoniany trifluorowane (związki 2.18 i 2.19). Związki różniące się między sobą wyłącznie liczbą atomów fluoru w pierścieniu aromatycznym- związek 2.12 i 2.13 (monofluorowane), 2.15 (difluorowany) oraz 2.18 (trifluorowany) uzyskano odpowiednio z diastereoselektywnością równą 86:14, 87:13, 89:11 oraz 74:26. Wyniki te pozwalają na zaobserwowanie lepszej diastereoselektywności w przypadku α -aminofosfonianów zawierających mniejszą liczbę atomów fluoru. Podobnej obserwacji można dokonać

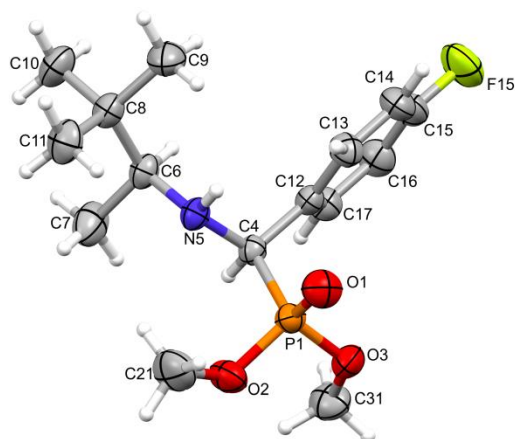
w grupie związków 2.14 (monofluorowany), 2.16 (difluorowany) i 2.19 (trifluorowany), dla których stosunki diastereoizomeryczne wynoszą odpowiednio 88:12, 89:11 i 68:32. Analiza porównawcza wyników odnotowanych dla przeprowadzonych reakcji oraz wyników opisanych w literaturze pozwala wnioskować, że związki zawierające większą liczbę atomów fluoru otrzymywane są z niższą wydajnością oraz diastereoselektywnością.

2.2. Badania strukturalne

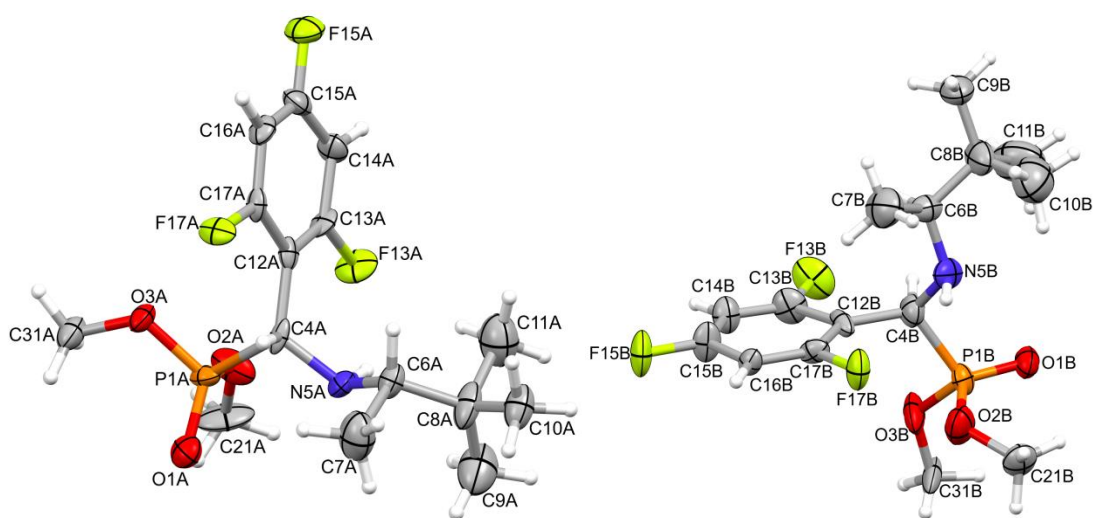
Otrzymane na drodze stereoselektywnej syntezy α -aminofosfoniany zawierały w swojej strukturze dwa centra stereogeniczne- jedno o znanej konfiguracji absolutnej pochodzące od zastosowanej do pierwszego etapu syntezy aminy oraz drugie, utworzone w drugim etapie procesu w wyniku nukleofilowej addycji fosforynu. W celu określenia, który z pary diastereoizomerów powstaje w przewadze, wykonano szereg analiz, posługując się różnymi metodami. α -Aminofosfoniany będące ciałami stałymi poddano procesowi krystalizacji, poprzez powolne odparowanie rozpuszczalnika. Kryształy odpowiednie do badań krystalograficznych otrzymano w przypadku trzech związków, które poddano analizie dyfrakcji rentgenowskiej. Umożliwiło to poznanie struktur krystalicznych produktów 2.3 (Rysunek 10), 2.13 (Rysunek 11) oraz 2.18 (Rysunek 12).



Rysunek 10. Struktura krystaliczna produktu 2.3.



Rysunek 11. Struktura krystaliczna produktu 2.13.

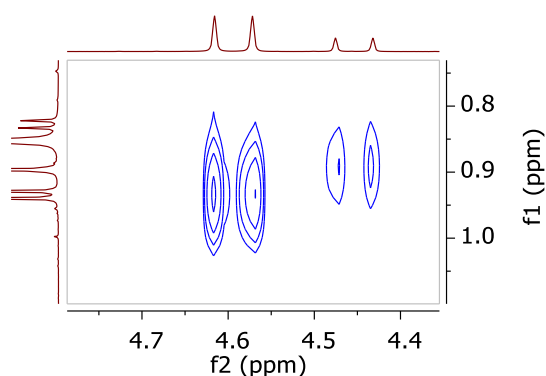


Rysunek 12. Struktura krystaliczna produktu 2.18.

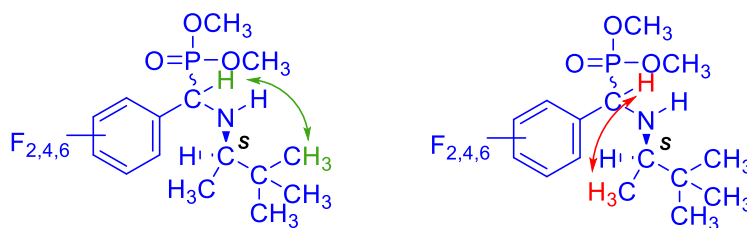
W komórce elementarnej związku 2.3 (Rysunek 10) można zaobserwować obecność dwóch cząsteczek o tej samej konfiguracji absolutnej nowo wygenerowanego centrum stereogenicznego. Struktura krystaliczna tego związku przedstawia izomer (*R,R*).

Obecność dwóch cząsteczek w komórce elementarnej wykazała także analiza krystalograficzna produktu 2.18 (Rysunek 12). W tym przypadku jednak cząsteczki reprezentują oba powstające diastereoizomery, zarówno izomer (*R,S*), jak i (*S,S*). Dane uzyskane z badań rentgenograficznych w połączeniu ze szczegółową analizą widm 2D NMR (NOESY) badanych związków umożliwiły określenie konfiguracji absolutnej generowanego w procesie hydrofosfonylacji centrum stereogenicznego diastereoizomeru powstającego w przewodzie. W widmie NOESY produktu 2.18 odnotowano obecność korelacji pomiędzy protonem połączonym z nowym centrum stereogenicznym ($\underline{\text{H}}\text{C-P}$), charakteryzującym się wartością przesunięcia chemicznego $\delta = 4.62$ ppm, a protonami

grupy metylowej połączonej z chiralnym atomem węgla pochodzącym od aminy ($C(H)CH_3$), charakteryzującymi się wartością $\delta = 0.93$ ppm (Rysunek 13, Rysunek 14). Korelację tę zaobserwowano tylko w przypadku głównego diastereoizomeru. Natomiast dla drugiego diastereoizomeru zaobserwowano korelację pomiędzy protonem $HC-P$ a protonami jednej z trzech grup metylowych należących do grupy *tert*-butylowej $C(CH_3)_3$ (Rysunek 13, Rysunek 14). Sygnał protonu $HC-P$ obecny jest w widmie NOESY przy wartości przesunięcia chemicznego $\delta = 4.48$ ppm, podczas gdy sygnał protonów $C(CH_3)_3$ widoczny jest przy $\delta = 0.90$ ppm (Rysunek 13). Dane dotyczące struktury krystalicznej α -aminofosfonianu 2.18 pozwoliły przeprowadzić analizę odległości pomiędzy odpowiednimi protonami w obu diastereoizomerach rozważanego związku (Tabela 6). Analiza pokazała, że jedynie dla diastereoizomeru (*S,S*) odległości pomiędzy protonami $HC-P$ a $C(CH_3)_3$ są wystarczająco bliskie (4.205, 3.162, 2.769 Å), aby uzyskać sygnał korelacji obserwowany w widmie NOESY. Analiza wykazała także, że tylko w diastereoizomerze (*R,S*) odległości pomiędzy protonami $HC-P$ a $C(H)CH_3$ są na tyle bliskie (3.525, 2.958, 2.166 Å), by móc zaobserwować sygnał korelacji w widmie NOESY. W oparciu o dane uzyskane z badań NMR (widmo NOESY związku 2.18) i krystalograficznych (struktura krystaliczna produktu 2.18) stwierdzono, że powstający w przewodzie diastereoizomer α -aminofosfonianu 2.18 charakteryzuje się konfiguracją absolutną *R* nowo utworzonego centrum stereogenicznego.



Rysunek 13. Fragment widma NOESY produktu 2.18.



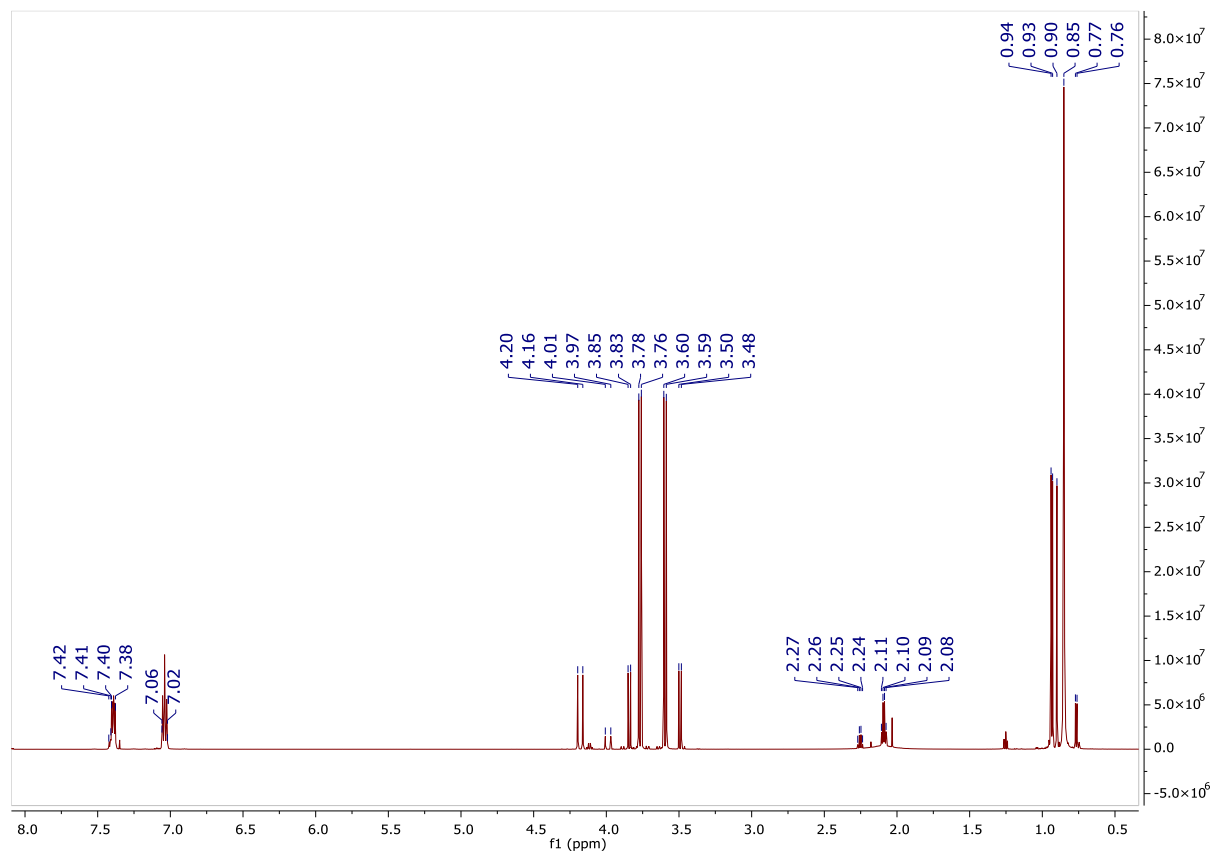
Rysunek 14. Korelacje kluczowe dla ustalenia budowy stereochemicznej diastereoizomerów związku 2.18 zaobserwowane w widmie NOESY (Rysunek 13).

Tabela 6. Odległości między atomami wodoru w strukturze krystalicznej związku 2.18.

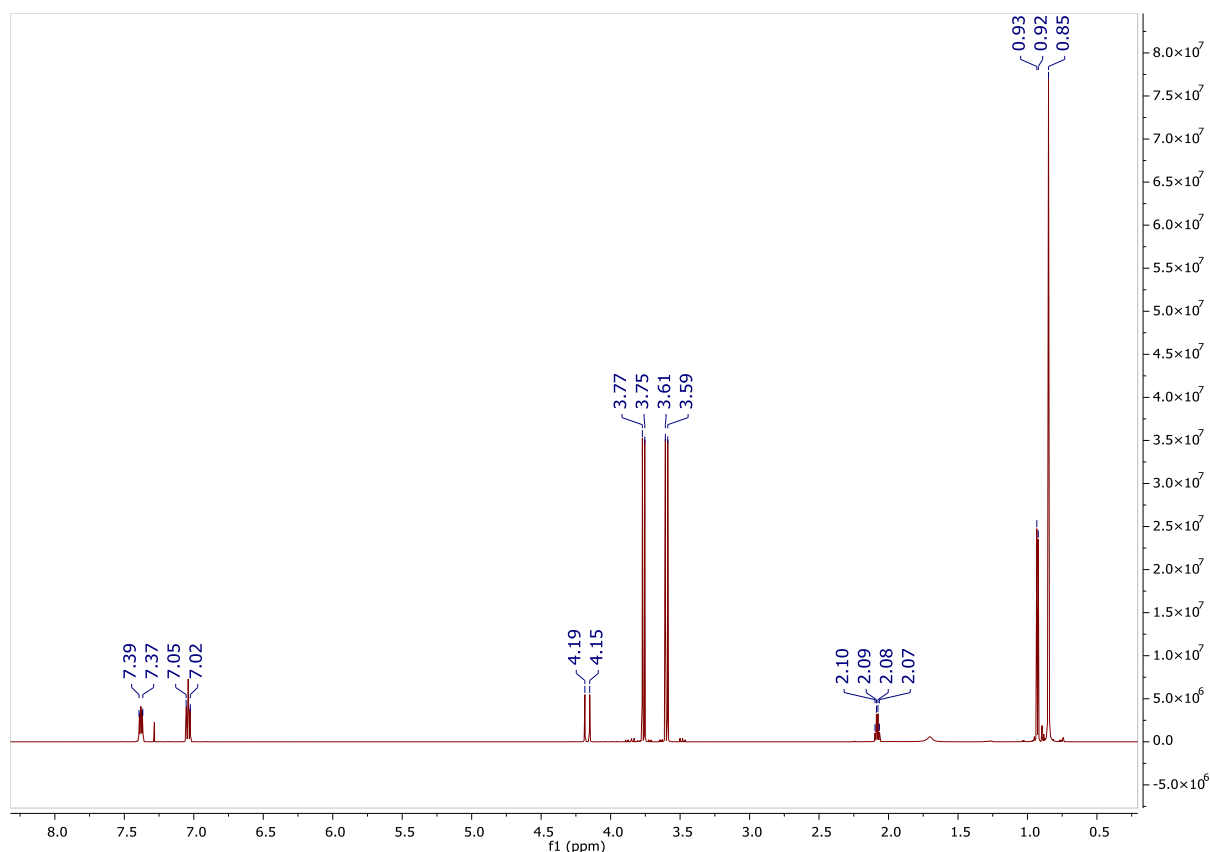
Atomy wodoru	Odległości między atomami wodoru [Å]	
	Stereoizomer <i>S,S</i>	Stereoizomer <i>R,S</i>
HC-P, C(H)CH ₃	4.47, 4.40, 3.76	3.53, 2.96, 2.17
HC-P, C(CH ₃) ₃	5.22, 5.19, 4.40	5.47, 4.46, 4.33
	4.21, 3.16, 2.77	5.78, 5.07, 4.82
	5.26, 5.01, 4.26	5.60, 4.79, 4.51

Struktura krystaliczna związku 2.13 (Rysunek 11) wykazała obecność tylko jednego diastereoizomeru w komórce elementarnej. Jest to izomer o konfiguracji *R* centrum chiralności utworzonym w wyniku hydrofosfonylacji iminy. Do syntezy tego związku, podobnie jak w przypadku α -aminofosfonianu 2.18, została zastosowana amina zawierająca centrum stereogeniczne o konfiguracji absolutnej *S*. Z tego względu oczekiwano, że również w przypadku związku 2.13 stereoizomer o konfiguracji *R* centrum stereogenicznego utworzonego na skutek addycji fosforynu będzie produktem głównym. Wyniki uzyskane z badań spektroskopowych w połączeniu z danymi krystalograficznymi potwierdziły tę hipotezę. Rysunek 15 przedstawia widmo ¹H NMR α -aminofosfonianu 2.13 otrzymane bezpośrednio po oczyszczeniu związku na kolumnie chromatograficznej. Jak można zauważyć, w widmie obecne są pary sygnałów różniących się intensywnością pochodzące od obu diastereoizomerów. Porównanie tego widma z otrzymanym dla formy krystalicznej rozważanego związku jasno pokazuje, że zawiera ono sygnały wyłącznie od jednego (głównego: sygnały o większej intensywności) diastereoizomeru (Rysunek 16). Fakt ten, w połączeniu ze stereochemiczną budową izomeru obecnego w formie krystalicznej (Rysunek 11) prowadzi do wniosku, że utworzone na skutek reakcji hydrofosfonylacji centrum stereochemiczne głównego

diastereoizomeru α -aminofosfonianu 2.13, podobnie jak związku 2.18, charakteryzuje się konfiguracją absolutną *R*.



Rysunek 15. Widmo ^1H NMR pary powstających diastereoizomerów związku 2.13.

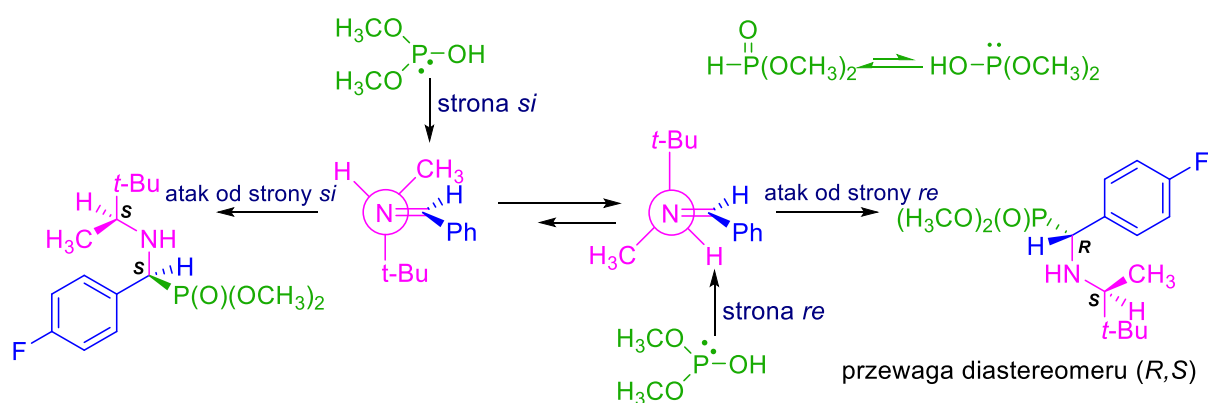


Rysunek 16. Widmo ¹H NMR wykrystalizowanego głównego diastereoizomeru związku 2.13.

Ustalenia dotyczące stereochemicznej budowy głównych diastereoizomerów α -aminofosfonianów zsyntezowanych w ramach niniejszej pracy przy użyciu pomocnika chiralnego (iminy zawierającej centrum stereogeniczne o konfiguracji absolutnej *S*) są zgodne z danymi literaturowymi odnoszącymi się do podobnej reakcji, która także została przeprowadzona z wykorzystaniem (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy i w przypadku której również zaobserwowano powstawanie w przewadze diastereoizomeru (*R,S*) [90].

Diastereoselektywność hydrofosfonylacji chiralnych imin może być wyjaśniona za pomocą modelu Ahn'a-Eisenstein'a zaproponowanego dla reakcji addycji nukleofilowej do imin zawierających centrum stereogeniczne [168]. Model ten zakłada antyperiplanarność największej grupy w pozycji α iminy oraz atak nukleofila od strony mniejszej zawady przestrzennej. Model Ahn'a-Eisenstein'a został już wcześniej zastosowany do wyjaśnienia diastereoselektywności powstawania α -aminofosfonianów w reakcjach z udziałem aldehydów, chiralnych amin i fosforynu dimetylu w roztworze nadchloranu litu w eterze dietylowym [93]. Podejście Ahn'a-Eisenstein'a do diastereoselektywnego tworzenia izomerów związku 2.13 przedstawiono na Rysunku 17. Wynika z niego, iż istnieją dwa możliwe konformery iminowe, w których grupa *t*-Bu jest

prostopadła do płaszczyzny wiązania C=N. Ze względu na zawadę przestrzenną, korzystniejszy jest atak nukleofila od strony *re*, który prowadzi do utworzenia diastereoizomeru (*R,S*). Wobec tego, zastosowanie (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy jako substratu skutkuje otrzymaniem izomeru (*R,S*) o konfiguracji *R* na nowo wygenerowanym centrum stereogenicznym jako głównego produktu reakcji. Hydrofosfonylowanie imin pochodzących od (*R*)- α -metylobenzyloaminy oraz (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminy prowadzi, zgodnie z omówionym wyżej modelem, do powstania w przewadze diastereoizomeru (*S,R*), w którym atom węgla będący nowym centrum chiralności posiada konfigurację absolutną *S*.



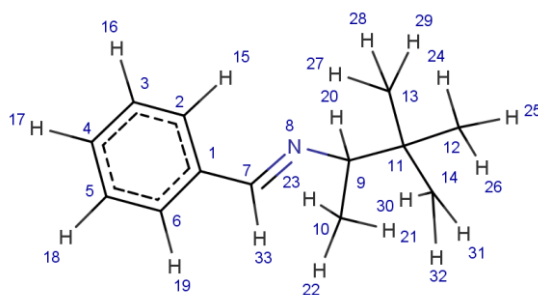
Rysunek 17. Diastereoselektywność reakcji hydrofosfonylacji iminy na przykładzie tworzenia produktu 2.13 w oparciu o model Ahn'a-Eisenstein'a.

Poznanie struktury chemicznej nowo zsyntezowanych α -aminofosfonianów, a w szczególności ustalenie ich stereochemicznej budowy, stanowiło bardzo ważny zakres prac badawczych zwłaszcza w kontekście badań aktywności biologicznych otrzymanych związków.

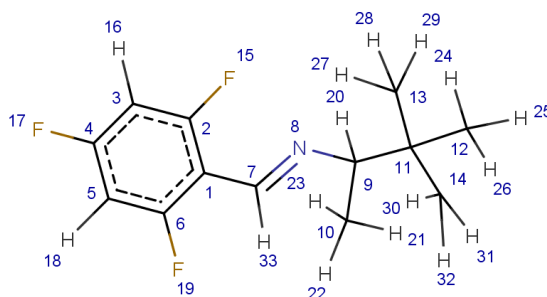
2.3. Obliczenia kwantowo-chemiczne

Analiza otrzymanych stosunków diastereoizomerycznych zsyntezowanych α -aminofosfonianów pozwoliła na zaobserwowanie znacznie lepszej diastereoselektywności reakcji prowadzących do powstania α -aminofosfonianów monofluorowanych oraz difluorowanych niż w przypadku związków zawierających większą liczbę atomów fluoru w strukturze (Tabela 5). Spostrzeżenia te sugerują wpływ liczby atomów fluoru w chiralnej cząsteczce iminy na stereoselektywność reakcji

hydrofosfonylacji. W celu wyjaśnienia tej obserwacji przeprowadzono badania kwantowo-chemiczne, których istotą było znalezienie możliwych rotamerów dla modelowej niefluorowanej iminy pochodzącej od benzaldehydu i (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy (NF, Rysunek 18) oraz dla jej fluorowanego analogu, zawierającego atomy fluoru w pozycjach *ortho* i w pozycji *para* pierścienia fenylowego (3F, Rysunek 19). Optymalizację struktur przeprowadzono dla NF i 3F różniących się kątem dwuściennym C7-N8-C9-C11 (Rysunek 18, Rysunek 19).



Rysunek 18. Numeracja atomów w iminie NF.



Rysunek 19. Numeracja atomów w iminie 3F.

Optymalizacja struktur iminy niefluorowanej (NF) doprowadziła do uzyskania tylko dwóch konformerów: pierwszego z kątem dwuściennym C7-N8-C9-C11 wynoszącym 123.4° i drugiego z kątem dwuściennym C7-N8-C9-C11 wynoszącym -121.7° . Podobnie optymalizacja przeprowadzona dla struktur trifluorowanej iminy (3F) doprowadziła do uzyskania dwóch konformerów: pierwszego o kącie dwuściennym C7-N8-C9-C11 wynoszącym 124.0° i drugiego o kącie dwuściennym C7-N8-C9-C11 wynoszącym -122.2° (Tabela 7, NF_konformer1, NF_konformer2, 3F_konformer1, 3F_konformer2, odpowiednio). W Tabeli 7 przedstawiono wartości energii względnej uzyskane dla konformerów iminy niefluorowanej oraz dla iminy trifluorowanej.

Tabela 7. Porównanie względnych energii dwóch możliwych konformerów iminy NF i 3F.

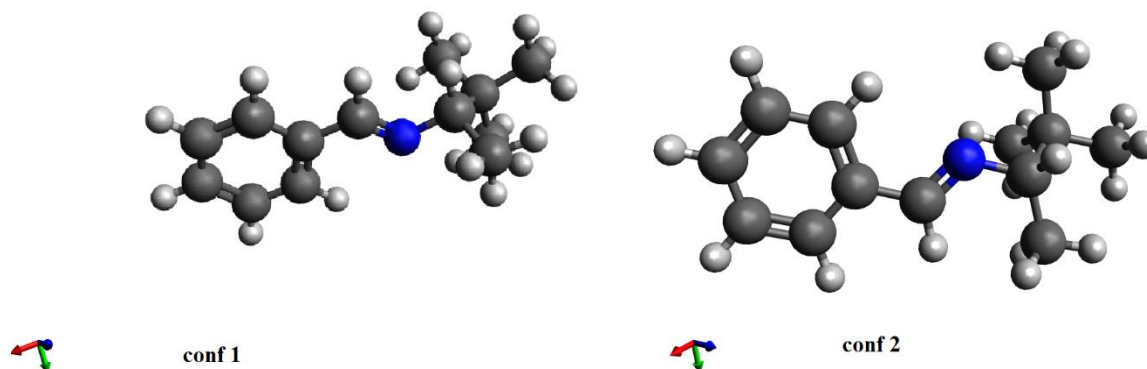
Konformer	Energia względna [kcal/mol]
NF_konformer1	0.0 ^a
NF_konformer2	6.5
3F_konformer1	0.0 ^b
3F_konformer2	2.1

Minimum energetyczne [Hartree]

^a-561.326424

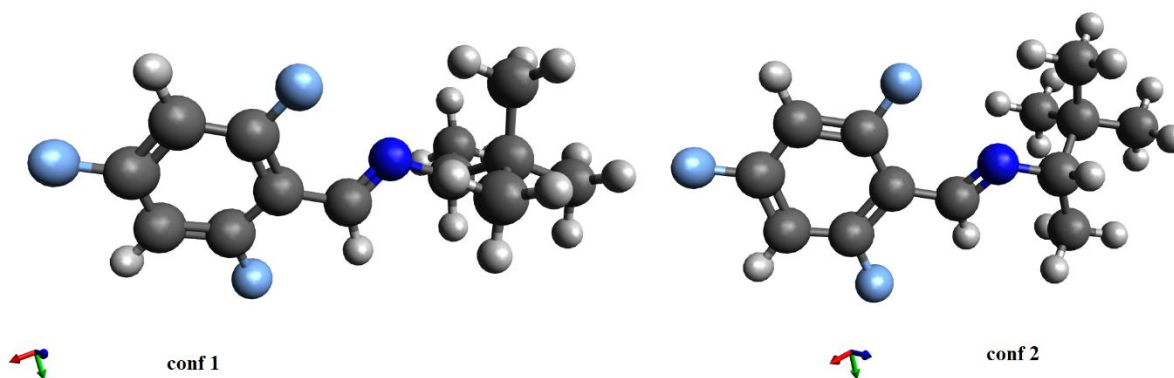
^b-858.955057

Jak przedstawiono w Tabeli 7, korzystniejszą energetycznie strukturę dla niefluorowanej iminy posiadał rotamer NF_konformer1 z kątem dwuściennym C7-N8-C9-C11 wynoszącym 123.4°. Obie otrzymane struktury prezentuje Rysunek 20.



Rysunek 20. Struktury rotamerów iminy NF.

Zgodnie z danymi przedstawionymi w Tabeli 7, rotamer o kącie dwuściennym C7-N8-C9-C11 wynoszącym 124.0° (3F_konformer1) jest trwalszym konformerem fluorowanej iminy. Struktury otrzymane dla 3F przedstawiono na Rysunku 21.



Rysunek 21. Struktury rotamerów iminy 3F.

Różnica energii pomiędzy rotamerami iminy z pierścieniem aromatycznym zawierającym atomy fluoru jest znacznie mniejsza w porównaniu do niefluorowanego, macierzystego związku. Wynika z tego, że nadmiar diastereomeryczny jest bardziej wyraźny w cząsteczkach pozbawionych atomów fluoru.

3. Badania aktywności biologicznej α -aminofosfonianów

3.1. Właściwości farmakokinetyczne

Otrzymane fosfonianowe analogi α -aminokwasów zostały poddane ocenie farmakokinetycznej oraz badaniom aktywności biologicznej.

W celu poznania właściwości farmakokinetycznych otrzymanych α -aminofosfonianów posłużono się oprogramowaniem SwissADME. Zastosowanie parametrów ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*), odnoszących się do wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania związku, pozwala na wstępną ocenę właściwości farmakokinetycznych substancji i stanowi ważny etap badań podczas projektowania leków i określania ich celu terapeutycznego. Umożliwia to identyfikację potencjalnych substancji lekopodobnych lub optymalizację struktur znanych już cząsteczek [29]. Wykazano, że wstępna analiza parametrów ADME prowadzi do zmniejszenia występowania niepowodzeń w fazie badań klinicznych projektowanych leków. Ocena podobieństwa danej substancji do leku pozwala między innymi na określenie biodostępności cząsteczki po podaniu doustnym [169]. Przewidywanie farmakokinetyki badanego związku opiera się na jego strukturze molekularnej oraz właściwościach fizykochemicznych. Dane uzyskane w wyniku przeprowadzonych *in silico* badań farmakokinetycznych α -aminofosfonianów otrzymanych w ramach niniejszej pracy przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Dane uzyskane z badań farmakokinetycznych α -aminofosfonianów.

Lp.	MW	PSA [Å ²]	LogP	LogS	HBD	HBA	RB	HIA	BBB	Lipiński
2.1	355.32	57.37	3.51	-3.70	1	6	7	Wysoka	Tak	Tak
2.2	383.37	57.37	4.13	-4.17	1	6	9	Wysoka	Nie	Tak
2.3	409.29	57.37	4.45	-4.18	1	9	7	Wysoka	Nie	Tak
2.4	367.35	66.60	3.15	-3.61	1	6	8	Wysoka	Tak	Tak
2.5	423.46	66.60	4.37	-4.78	1	6	10	Wysoka	Nie	Tak
2.6	385.34	66.60	3.52	-3.77	1	7	8	Wysoka	Tak	Tak
2.7	413.40	66.60	4.14	-4.25	1	7	10	Wysoka	Nie	Tak
2.8	441.45	66.60	4.76	-4.95	1	7	10	Wysoka	Nie	Tak
2.9	403.33	66.60	3.86	-3.93	1	8	8	Wysoka	Nie	Tak
2.10	439.31	66.60	4.40	-4.26	1	10	8	Wysoka	Nie	Tak
2.11	467.37	66.60	5.02	-4.74	1	10	10	Wysoka	Nie	Tak
2.12	317.34	57.37	3.19	-3.40	1	5	7	Wysoka	Tak	Tak
2.13	317.34	57.37	3.19	-3.40	1	5	7	Wysoka	Tak	Tak
2.14	345.39	57.37	3.86	-3.89	1	5	9	Wysoka	Tak	Tak
2.15	335.33	57.37	3.56	-3.57	1	6	7	Wysoka	Tak	Tak
2.16	363.38	57.37	4.17	-4.05	1	6	9	Wysoka	Tak	Tak
2.17	391.43	57.37	4.76	-4.76	1	6	9	Wysoka	Nie	Tak
2.18	353.32	57.37	3.86	-3.73	1	7	7	Wysoka	Tak	Tak
2.19	381.37	57.37	4.48	-4.22	1	7	9	Wysoka	Nie	Tak

MW – masa cząsteczkowa, PSA – pole powierzchni polarnej, LogP – współczynnik rozdziału oktanol/woda, LogS – rozpuszczalność w wodzie, HBD – liczba donorów wiązań wodorowych, HBA – liczba akceptorów wiązań wodorowych, RB – liczba wiązań rotujących, HIA – bierna absorpcja przez przewód pokarmowy, BBB – penetracja bariery krew-mózg, Lipiński – spełnienie reguły Lipińskiego.

Związki o potencjalnym medycznym zastosowaniu powinny spełniać tak zwaną „regułę piątki Lipińskiego”, która jest najpopularniejszym kryterium oceny substancji lekopodobnej. Reguła ta określa związek pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi i fizykochemicznymi, uwzględniając cztery wstępne warunki uznania cząsteczki za dobrego kandydata na lek doustny: liczbę donorów wiązań wodorowych (HBD) ≤ 5 , liczbę akceptorów wiązań wodorowych (HBA) ≤ 10 , masę cząsteczkową (MW) ≤ 500 Da, a także współczynnik rozdziału oktanol/woda (LogP) ≤ 5 [37][169]. Masa cząsteczkowa potencjalnej substancji leczniczej powinna znajdować się w przedziale 150 a 500 g/mol. Pole powierzchni polarnej (PSA) stanowi ważny parametr fizykochemiczny, który wpływa na zdolność przekraczania barier biologicznych, zarówno bariery prowadzącej do

przewodu pokarmowego, jak i bariery krew-mózg. Optymalny zakres wartości PSA powinien wynosić pomiędzy 20 a 130 Å². Zbyt wysoka polarność może sprawić, że lek nie będzie biodostępny dla organizmu po podaniu doustnym [169].

Współczynnik podziału oktanol/woda (LogP) jest parametrem, który ma częste zastosowanie w projektowaniu leków i przewidywaniu właściwości farmakokinetycznych substancji, pozwalającym na określenie jej lipofilowości [116][170]. Lipofilowość stanowi bardzo istotny parametr umożliwiający wstępną ocenę zdolności badanych substancji do przenikania przez błony biologiczne, a to z kolei wiąże się z zachowaniem potencjalnych leków w organizmie [117]. Związki chemiczne, które charakteryzują się wysoką wartością LogP, preferują hydrofobowe części komórek, takie jak dwuwarstwy lipidowe, natomiast substancje wykazujące niskie wartości cechuje powinowactwo do hydrofilowych miejsc, jakim jest na przykład surowica krwi [116][170]. Nadmierna lipofilowość nie jest jednak wskazana, ponieważ przyczynia się do słabej rozpuszczalności leków w wodzie i zaburzenia ich wchłaniania po doustnym podaniu [110]. Jej optymalna wartość powinna znajdować się w zakresie $-0.7 < \text{LogP} < 5$ [169]. Istotnym parametrem przy projektowaniu leków jest również współczynnik rozpuszczalności w wodzie (LogS), który powinien zawierać się w przedziale $-6.5 < \text{LogS} < 0.5$ [29]. Co więcej, wyznaczone zostały klasy rozpuszczalności, które przedstawiają się w następującej skali LogS: substancja nierozpuszczalna $< -10 < \text{słabo rozpuszczalna} < -6 < \text{umiarkowanie rozpuszczalna} < -4 < \text{rozpuszczalna} < -2 < \text{dobrze rozpuszczalna} < 0 < \text{wysoce rozpuszczalna}$. Podczas opracowywania leków doustnych, rozpuszczalność w wodzie stanowi bardzo ważny czynnik, decydujący o wchłanianiu substancji [169].

Liczba donorów wiązań wodorowych (HBD) i liczba akceptorów wiązań wodorowych (HBA) wpływa na polarność substancji oraz na jej lipofilowość. Większa liczba HBA powoduje wzrost hydrofilowości cząsteczki [171]. Liczba wiązań rotujących (RB) zapewnia elastyczność substancji. Cząsteczka będąca kandydatem na lek nie powinna zawierać więcej niż 9 takich wiązań [169].

Bardzo ważnym parametrem w ocenie substancji jako lekopodobnej jest jej zdolność przenikania przez bariery biologiczne. Bierne wchłanianie z przewodu pokarmowego (HIA) oraz przenikanie bariery krew-mózg (BBB) uwzględnia między innymi lipofilowość i polarność cząsteczki [169]. Zdolność przekraczania bariery krew-mózg

stanowi szczególny parametr dla potencjalnych leków neuroterapeutycznych [172]. Zarówno optymalny zakres wartości LogP, jak i niska masa molowa i mała powierzchnia polarna substancji zapewniają dobre wchłanianie leku w układzie pokarmowym poprzez bierną dyfuzję [170]. Leki podawane dożylnie wykazują 100% biodostępności, natomiast leki przyjmowane doustnie charakteryzują się gorszą biodostępnością, dlatego tak istotne jest modyfikowanie właściwości substancji, które może przyczynić się do poprawy absorpcji związku przez układ pokarmowy [110].

Analiza wartości parametrów farmakokinetycznych przedstawionych w Tabeli 8 pokazuje, że wszystkie zaprojektowane α -aminofosfoniany spełniają „regułę pięciu Lipińskiego”. Związki te posiadają 10 lub mniej wiązań rotujących i pole powierzchni polarnej znacznie poniżej 130 Å². Właściwości te sugerują duże prawdopodobieństwo dobrej biodostępności po podaniu doustnym. Wszystkie związki charakteryzują się wysoką absorpcją przez przewód pokarmowy (HIA), co również wpływa korzystnie na ich biodostępność. Co więcej, 8 spośród otrzymanych α -aminofosfonianów może wykazywać zdolność przenikania bariery krew-mózg (BBB). Jest to szczególnie istotne w świetle potencjalnego działania tych związków przeciw nowotworom mózgu.

3.2. Badania cytotoksyczności *in vitro*

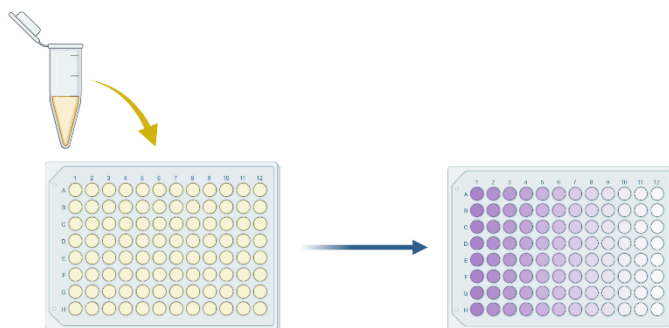
Zsyntezowane α -aminofosfoniany zostały ocenione pod kątem ich cytotoksyczności *in vitro* w stosunku do dziesięciu ludzkich linii komórek nowotworowych pochodzących z różnych tkanek organizmu (Tabela 9). Związki przebadano także względem referencyjnej linii komórek zdrowych- MRC-5, pochodzących z fibroblastów płuc.

Tabela 9. Linie komórkowe ludzkich nowotworów zastosowane w badaniach cytotoksyczności *in vitro*.

Organ	Typ nowotworu	Testowane linie komórkowe
		U-87 MG
Mózg	Glejak wielopostaciowy	U-251 MG U-118 MG
Płuca	Gruzołakorak płuc	A549
Piersi	Gruzołakorak piersi (potrójnie ujemny)	MDA-MB-231

Wątroba	Rak wątrobowokomórkowy	HepG2
Jelito grube	Gruczolakorak jelita grubego	Caco-2
Jajniki	Gruczolakorak jajnika	OVCAR-3 SK-OV-3
Szyjka macicy	Gruczolakorak szyjki macicy	HeLa

W celu określenia aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych α -aminofosfonianów, wykonano test MTT, który stanowi jedną z popularnych metod oceny cytotoksyczności potencjalnych leków [28]. Jest testem kolorymetrycznym, w którym aktywne metabolicznie komórki prowadzą do konwersji żółtego MTT (bromku 3-[4,5-dimetylotiazolo-2-yl]-2,5-difenyłu) w fioletowe kryształy formazonu (Rysunek 22) [43]. Rozpuszczenie powstałych kryształów w DMSO umożliwia pomiar absorbancji. Porównanie wartości otrzymanych dla komórek kontrolnych (nieotraktowanych badanym związkiem) z wartościami odczytanymi dla komórek poddanych działaniu substancji, pozwala na określenie cytotoksyczności badanego związku o możliwym zastosowaniu farmaceutycznym [28].



Rysunek 22. Wizualny efekt redukcji MTT do formazonu pod wpływem różnych stężeń badanego, cytotoksycznego związku.

Wartości IC_{50} uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań cytotoksyczności α -aminofosfonianów przedstawiono w Tabelach: 10 oraz 11. Test MTT wykonano dla wszystkich związków otrzymanych w postaci par diastereoizomerów jak również dla wyizolowanego na drodze krystalizacji diastereoizomeru (*R,S*) związku 2.13. Jako związek referencyjny, będący popularnym lekiem przeciwnowotworowym, zastosowano 5-fluoro-2'-deoksyurydynę (FdU).

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabela 10. Wartości IC₅₀ [μM] zsyntezowanych α-aminofosfonianów otrzymane w badaniach cytotoksyczności przeciwko liniom komórkowym ludzkich nowotworów.

Produkt	U-87 MG	U-251 MG	U-118 MG	OVCAR-3	SK-OV-3
2.1	57.04 ± 6.60	110.10 ± 3.15	67.67 ± 3.24	2.47 ± 1.15	17.39 ± 1.47
2.2	7.68 ± 3.11	5.59 ± 1.19	34.59 ± 7.21	5.56 ± 1.00	3.24 ± 1.17
2.3	5.45 ± 0.52	34.08 ± 14.21	51.23 ± 19.93	13.04 ± 2.50	28.18 ± 3.41
2.4	9.24 ± 1.39	8.70 ± 2.64	>500	15.68 ± 6.44	338.30 ± 68.66
2.5	21.71 ± 3.21	26.99 ± 5.26	18.18 ± 1.03	44.32 ± 10.29	8.41 ± 1.98
2.6	9.92 ± 1.26	18.96 ± 1.59	182.60 ± 6.98	100.10 ± 26.48	3.71 ± 0.62
2.7	59.19 ± 4.09	53.24 ± 8.88	43.62 ± 2.70	0.64 ± 0.56	1.63 ± 1.20
2.8	3.72 ± 0.46	3.51 ± 0.59	67.56 ± 9.91	3.57 ± 2.78	9.35 ± 2.22
2.9	22.62 ± 0.60	47.76 ± 6.34	69.98 ± 1.57	78.62 ± 7.25	4.20 ± 1.81
2.10	45.11 ± 4.77	53.07 ± 14.44	31.36 ± 3.64	13.73 ± 7.06	4.36 ± 0.30
2.11	9.34 ± 1.24	78.94 ± 19.89	14.43 ± 6.00	>500	5.37 ± 0.81
2.12	3.27 ± 0.32	8.95 ± 1.16	81.16 ± 28.17	51.73 ± 5.36	21.95 ± 1.96
2.13	42.70 ± 10.28	18.63 ± 6.44	40.74 ± 7.35	94.02 ± 24.03	4.87 ± 1.61
2.13*	180.60 ± 11.56	8.27 ± 1.25	>500	>500	65.73 ± 10.65
2.14	10.95 ± 1.11	24.35 ± 0.58	64.20 ± 4.73	71.60 ± 4.04	15.28 ± 1.50
2.15	40.66 ± 5.12	118.80 ± 13.94	87.69 ± 8.56	66.30 ± 11.61	131.00 ± 24.04
2.16	10.50 ± 0.98	48.59 ± 1.81	35.48 ± 8.03	48.26 ± 5.02	110.10 ± 27.06
2.17	7.78 ± 0.56	3.97 ± 0.67	149.50 ± 0.60	193.60 ± 2.26	8.63 ± 0.73
2.18	61.09 ± 4.33	144.50 ± 35.23	121.90 ± 28.68	13.72 ± 1.77	7.08 ± 3.36
2.19	11.53 ± 2.17	7.57 ± 0.34	40.71 ± 8.79	55.06 ± 18.24	16.58 ± 3.62
FdU	18.46 ± 9.62	17.81 ± 7.03	23.40 ± 4.31	24.51 ± 8.37	12.83 ± 6.92

*Wyizolowany (*R,S*) diastereoizomer

Tabela 11. Wartości IC₅₀ [μM] zsyntezowanych α-aminofosfonianów otrzymane w badaniach cytotoksyczności przeciwko liniom komórkowym ludzkich nowotworów oraz względem linii MRC-5.

Produkt	HepG2	Caco-2	HeLa	MDA-MB-231	A549	MRC-5
2.1	47.89 ± 10.28	8.63 ± 3.51	5.35 ± 1.05	169.70 ± 11.31	5.45 ± 1.70	5.24 ± 0.25
2.2	116.70 ± 9.93	2.24 ± 1.01	4.11 ± 0.88	11.64 ± 3.28	35.37 ± 5.13	16.58 ± 0.61
2.3	55.09 ± 1.78	6.02 ± 0.80	4.09 ± 1.83	94.30 ± 18.40	49.58 ± 1.87	84.10 ± 9.30
2.4	72.61 ± 12.90	1.30 ± 0.32	5.18 ± 1.77	166.60 ± 24.23	43.33 ± 4.40	29.09 ± 2.61
2.5	7.74 ± 0.84	6.47 ± 1.63	3.18 ± 1.38	33.83 ± 2.43	37.74 ± 9.15	5.90 ± 0.27
2.6	58.52 ± 19.52	28.47 ± 1.86	2.54 ± 1.65	10.99 ± 1.05	53.12 ± 4.38	10.56 ± 1.88
2.7	7.79 ± 0.41	47.36 ± 2.22	32.37 ± 12.87	156.0 ± 4.76	21.59 ± 3.59	4.71 ± 0.75
2.8	46.23 ± 8.14	0.72 ± 0.17	5.07 ± 0.35	180.90 ± 15.20	2.87 ± 1.07	1.82 ± 0.33

WYNIKI I DYSKUSJA

2.9	13.24 ± 4.71	14.64 ± 1.63	17.50 ± 4.27	27.01 ± 3.95	33.20 ± 5.75	5.86 ± 1.63
2.10	35.46 ± 10.64	6.93 ± 1.21	52.43 ± 17.98	79.25 ± 3.58	75.06 ± 11.24	2.17 ± 0.02
2.11	45.28 ± 7.17	1.74 ± 0.36	3.92 ± 1.84	19.05 ± 3.43	44.56 ± 0.77	27.18 ± 1.27
2.12	59.59 ± 10.53	1.30 ± 0.74	21.44 ± 5.35	159.70 ± 9.08	55.08 ± 10.20	34.36 ± 4.71
2.13	5.08 ± 1.66	15.32 ± 7.13	7.44 ± 1.60	230.30 ± 23.36	7.94 ± 3.24	114.80 ± 36.80
2.13*	91.94 ± 16.45	3.81 ± 1.79	5.87 ± 1.63	311.10 ± 55.05	2.66 ± 0.64	6.08 ± 1.00
2.14	34.51 ± 8.02	51.38 ± 5.30	13.00 ± 4.10	59.28 ± 7.60	49.19 ± 1.35	13.83 ± 1.20
2.15	59.49 ± 4.56	6.44 ± 0.93	9.85 ± 2.22	165.0 ± 13.76	1.82 ± 0.75	82.20 ± 10.39
2.16	18.38 ± 0.85	27.36 ± 5.75	4.46 ± 1.15	5.58 ± 0.42	18.03 ± 2.72	106.90 ± 8.10
2.17	23.57 ± 2.88	10.52 ± 1.46	5.37 ± 1.44	9.89 ± 1.02	72.03 ± 13.76	47.80 ± 1.07
2.18	92.07 ± 12.66	72.31 ± 5.71	4.14 ± 0.59	82.95 ± 17.34	48.63 ± 13.20	15.02 ± 3.11
2.19	46.70 ± 5.63	0.39 ± 0.08	10.61 ± 1.42	39.33 ± 2.80	33.30 ± 5.35	36.46 ± 6.17
FdU	37.86 ± 6.69	12.85 ± 2.92	5.31 ± 0.78	5.65 ± 1.31	22.80 ± 5.33	22.46 ± 6.34

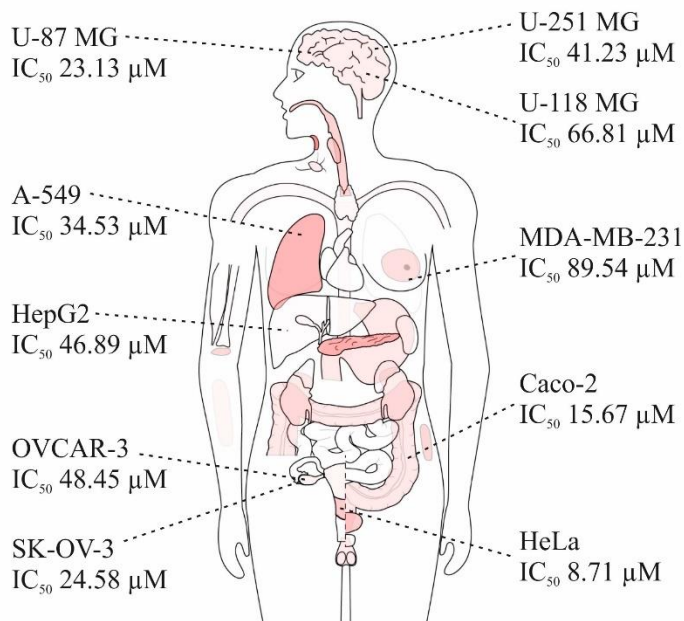
*Wyizolowany (*R,S*) diastereoizomer

Jak wynika z danych zawartych w Tabelach: 10 i 11, zdecydowana większość otrzymanych α -aminofosfonianów wykazała aktywność przeciwko wszystkim testowanym liniom komórek nowotworowych. Dokładna analiza wartości IC₅₀ pozwoliła stwierdzić, że dziesięć spośród dwudziestu testowanych związków (2.2, 2.3, 2.4, 2.6, 2.11, 2.13, 2.15, 2.16, 2.17, 2.18) wykazało bardzo dobrą aktywność wobec linii komórkowej HeLa. Związki te, z wyjątkiem 2.13, 2.15 i 2.17, charakteryzowały się wyższą cytotoksycznością niż 5-fluoro-2'-deoksyurydyną wobec komórek raka szyjki macicy. Spośród tych dziesięciu związków, pięć zawiera w swoich cząsteczkach fragment strukturalny pochodzący od (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy, co wskazuje, że obecność tego fragmentu może wpływać na wzrost aktywności hamującej badanych związków. Tendencja ta jest także obserwowana w przypadku związków: 2.2, 2.3, 2.4, 2.11, 2.12, 2.16, 2.17 i 2.19 wykazujących najlepszą aktywność cytotoksyczną względem linii komórek glejaka wielopostaciowego U-87 MG. Trzy z tych związków: 2.12, 2.17 i 2.19 wykazały również bardzo dobrą aktywność wobec linii komórkowej U-251 MG, natomiast α -aminofosfoniany 2.12 oraz 2.15 charakteryzowały się wysoką aktywnością w stosunku do linii komórkowych odpowiednio Caco-2 i A549, przy niskiej cytotoksyczności wobec zdrowych komórek MRC-5. Biorąc pod uwagę wartości IC₅₀ otrzymane dla wszystkich badanych linii komórek nowotworowych, można stwierdzić, że związek 2.2 jest najbardziej aktywnym spośród zsyntezowanych α -aminofosfonianów zawierających fragment struktury (*R*)- α -metylobenzyloaminy, produkty 2.4 oraz 2.11 wykazują najwyższą cytotoksyczność spośród α -aminofosfonianów otrzymanych

z (*R*)-4-metyoksy- α -metylobenzyloaminy, natomiast związki 2.12 i 2.15 charakteryzują się najwyższą aktywnością spośród tych zawierających fragment (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy. Obserwacje te pozwalają także wysunąć wniosek, że mniejsza liczba atomów fluoru w cząsteczkach badanych związków korzystnie wpływa na ich aktywność cytotoksyczną.

W przypadku kwasów α -aminofosfonowych i ich estrów zawierających centrum stereogeniczne na atomie węgla α , jego konfiguracja absolutna jest istotnie związana z aktywnością biologiczną tych związków [173][174]. Z danych literaturowych wynika, że często stereoizomery *R* charakteryzują się wyższą bioaktywnością [175]. Porównanie wartości IC_{50} otrzymanych dla pary diastereoizomerów związku 2.13 i czystego diastereoizomeru charakteryzującego się konfiguracją absolutną *R* na atomie węgla α (związek oznaczony jako 2.13*) wyraźnie pokazuje, że mieszanina diastereoizomerów posiada lepszą aktywność hamującą wobec większości testowanych linii komórek nowotworowych. Ta obserwacja prowadzi do wniosku, że w przeciwieństwie do danych literaturowych w przypadku α -aminofosfonianu 2.13, powstający w mniejszości diastereoizomer o konfiguracji absolutnej *S* na atomie węgla α , wykazuje wyższą aktywność biologiczną niż stereoizomer główny.

Podsumowując, przeprowadzone badania cytotoksyczności otrzymanych α -aminofosfonianów wykazały, że związki te charakteryzują się bardzo dobrą aktywnością przeciwko liniom komórkowym nowotworów pochodzących z różnych ludzkich narządów (Rysunek 23). Najniższe średnie wartości IC_{50} uzyskano względem linii komórkowej HeLa oraz Caco-2. Obiecujące wyniki odnotowano także w przypadku linii U-87 MG, a także SK-OV-3.



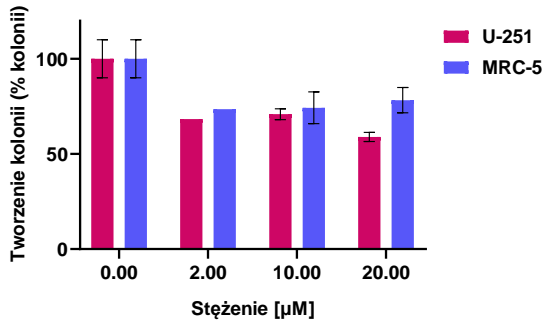
Rysunek 23. Średnie wartości IC₅₀ otrzymanych α -aminofosfonianów przeciwko liniom komórkowym ludzkich nowotworów.

3.3. Test klonogeny

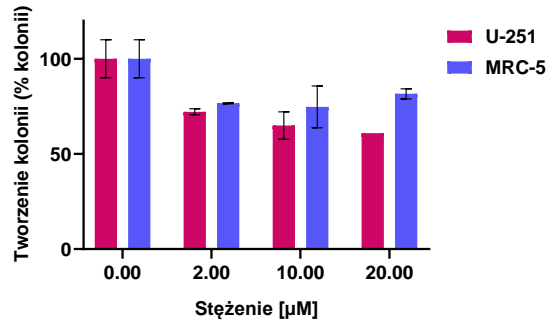
W celu uzyskania informacji na temat zdolności pojedynczej komórki do tworzenia kolonii oraz zbadania wpływu α -aminofosfonianów na wzrost i proliferację komórek *in vitro*, przeprowadzono test klonogeny. Testy klonogenne stanowią przydatne narzędzie do monitorowania zdolności badanej substancji do zmniejszenia przeżywalności klonogennej komórek nowotworowych [176].

Test klonogeny przeprowadzono dla dziesięciu losowo wybranych α -aminofosfonianów, stosując w badaniach stężenia 2 μ M, 10 μ M i 20 μ M. Długoterminowe działanie hamujące badano na linii komórek nowotworowych U-251 MG i linii komórek zdrowych MRC-5 (Rysunek 24). Traktowanie komórek α -aminofosfonianami porównano z nietraktowanymi inhibitorom komórkami stanowiącymi próbę kontrolną, która wynosiła 100% tworzenia kolonii.

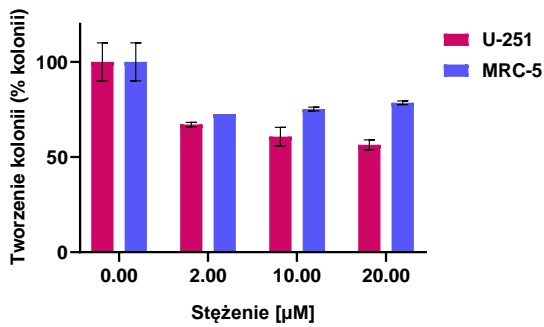
WYNIKI I DYSKUSJA



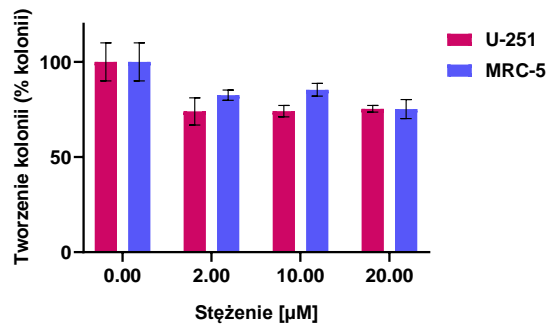
Produkt 2.2



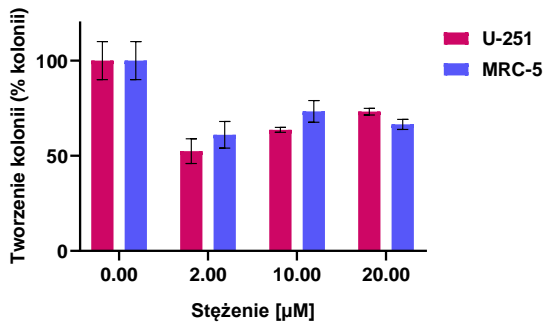
Produkt 2.5



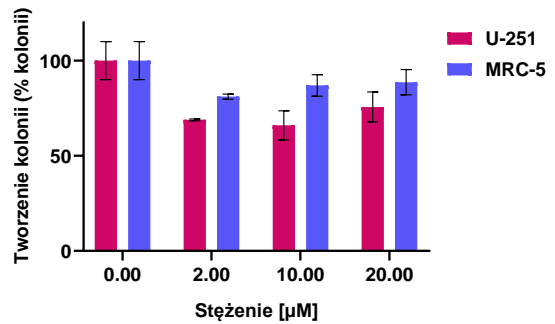
Produkt 2.7



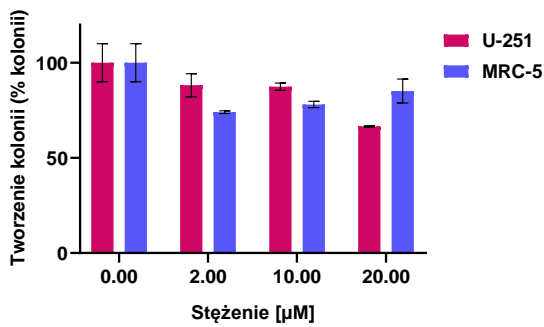
Produkt 2.9



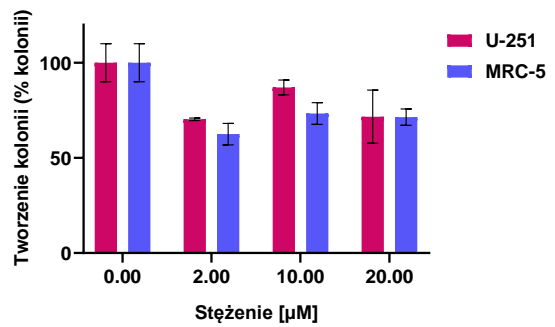
Produkt 2.12



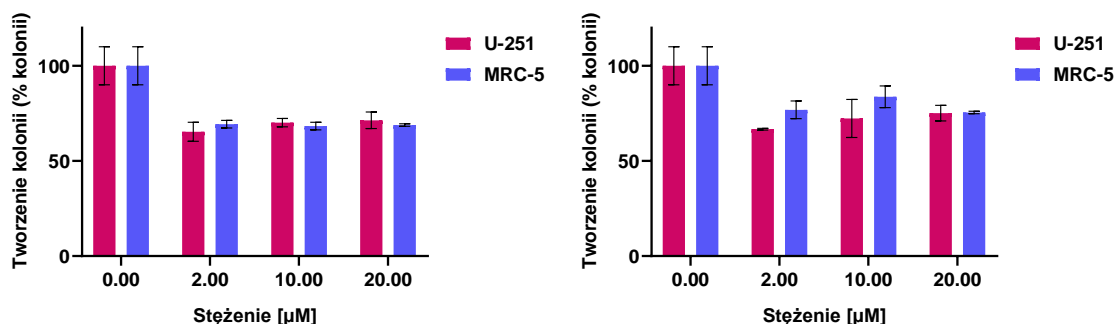
Produkt 2.14



Produkt 2.16



Produkt 2.17



Produkt 2.18

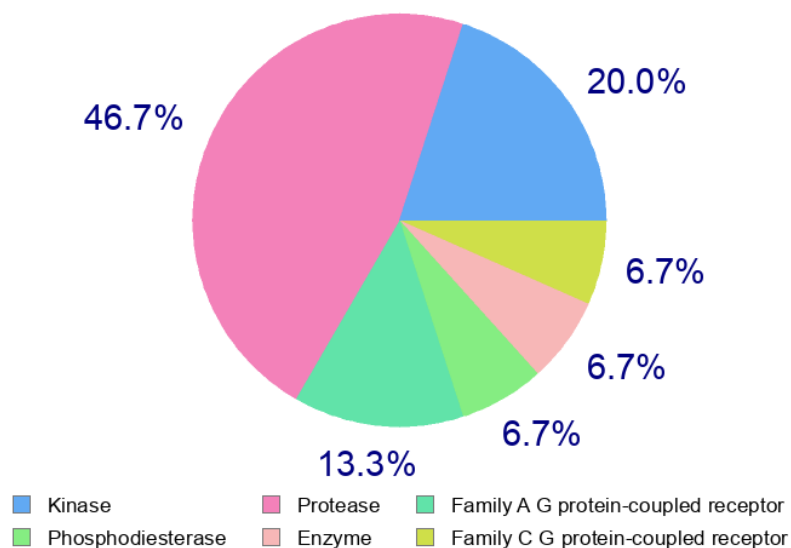
Produkt 2.19

Rysunek 24. Wpływ badanych związków na proces formowania kolonii przez komórki linii U-251 MG oraz MRC-5. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe z czterech niezależnych prób.

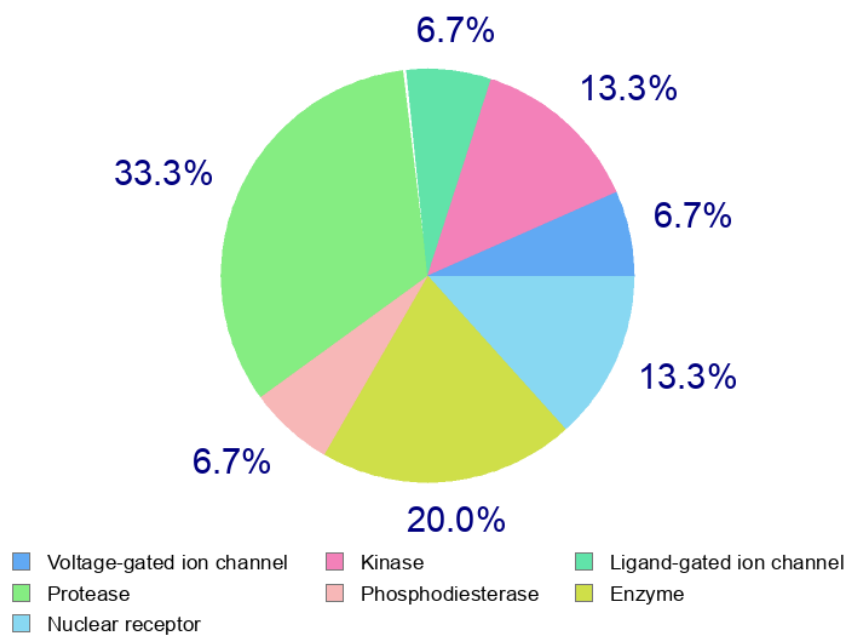
W obu badanych liniach komórkowych zaobserwowano zmniejszoną zdolność komórek do tworzenia kolonii. Warto jednak podkreślić, że w przypadku zdecydowanej większości zastosowanych α -aminofosfonianów większy spadek klonogenności odnotowano dla linii komórek nowotworowych. Nie zaobserwowano natomiast znaczących różnic w klonogenności komórek w zależności od zastosowanego stężenia α -aminofosfonianów. Spośród badanych związków największe działanie hamujące wykazał 2.12.

3.4. Badania inhibicji urokinazy

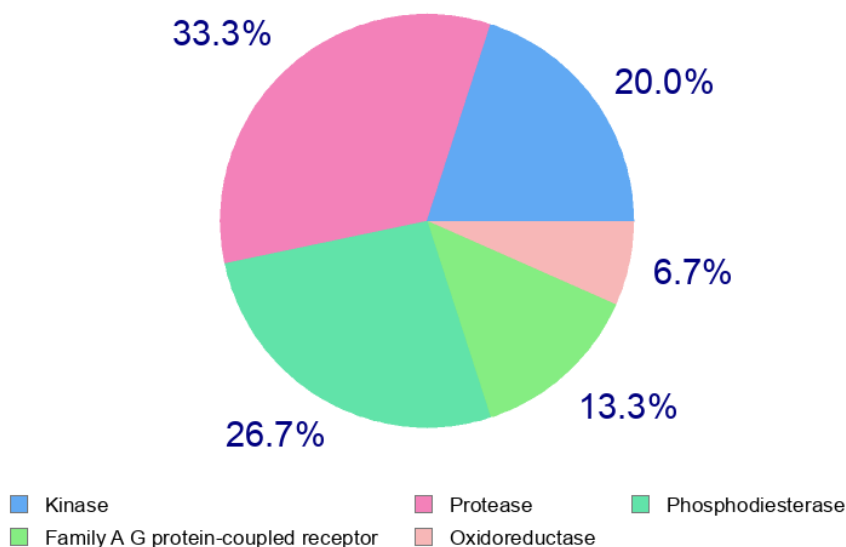
Przeprowadzenie badań *in silico* przy wykorzystaniu programu SwissADME, uwzględniającego opisane w literaturze różnorodne związki zdolne do inhibicji enzymów, pozwoliło na określenie najbardziej prawdopodobnych celów makromolekularnych dla α -aminofosfonianów zsyntezowanych w ramach niniejszej pracy. Wyznaczone przewidywane cele makromolekularne dla przykładowych α -aminofosfonianów zaprezentowano na Rysunkach 25-27. W przypadku wielu otrzymanych α -aminofosfonianów, taki cel mogą stanowić enzymy z grupy proteaz. Do tej grupy enzymów należy między innymi urokinaza. Z tego powodu, jak również ze względu na swoją rolę w procesie przerzutowania komórek nowotworowych (Część literaturowa, rozdział 3), enzym ten został wytypowany jako cel dalszych badań z udziałem α -aminofosfonianów.



Rysunek 25. Najbardziej prawdopodobne cele makromolekularne dla związku 2.1.



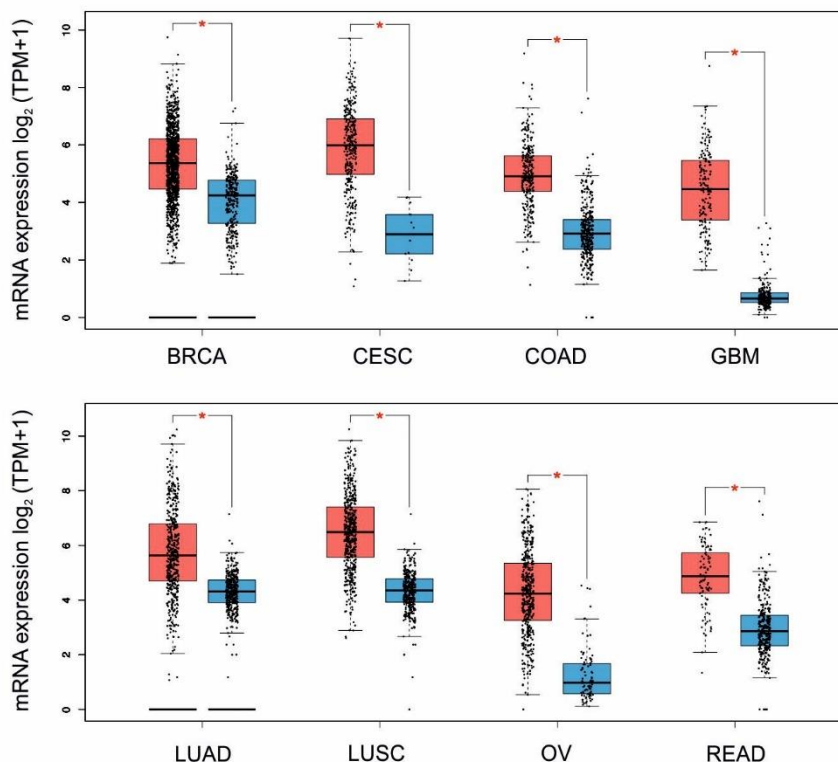
Rysunek 26. Najbardziej prawdopodobne cele makromolekularne dla związku 2.10.



Rysunek 27. Najbardziej prawdopodobne cele makromolekularne dla związku 2.18.

Oceny ekspresji genu urokinazy w różnych tkankach nowotworowych oraz ich odpowiednich tkankach normalnych, dokonano za pomocą bazy danych interaktywnej analizy profilowania ekspresji genów (GEPIA) i bazy danych atlasu genomu nowotworów (TCGA). Przeprowadzona ocena pozwoliła na szczegółowe poznanie ekspresji tego genu w różnych narządach. Zróżnicowana ekspresja wskazuje, że mRNA urokinazy ulega nadekspresji w większości typów nowotworów, co czyni ten enzym obiecującym celem terapeutycznym w przypadku ludzkich nowotworów charakteryzujących się powstawaniem przerzutów.

Poziomy ekspresji urokinazy w nowotworach złośliwych przedstawiono na Rysunku 28. Kolorem czerwonym zaznaczono próbki pochodzące z nowotworów (T), natomiast kolorem niebieskim oznaczono próbki normalne (N).



Rysunek 28. Ekspresja urokinazy w ludzkich nowotworach oraz w odpowiednich zdrowych tkankach.

BRCA to próbki pochodzące z inwazyjnego raka piersi, dla których zostało zidentyfikowanych 1085 próbek nowotworowych, wykazujących nadekspresję urokinazy (T). W przypadku tkanek normalnych (N) takich próbek odnotowano 291. Do analizy ekspresji urokinazy w raku płaskonabłonkowym szyjki macicy i gruczolakoraku szyjki macicy (CESC) dostępnych było 306 próbek pochodzących z nowotworów oraz 13 próbek pochodzących ze zdrowych tkanek. COAD- gruczolakorak jelita grubego, T = 275, N = 349. GBM- glejak wielopostaciowy, T = 163, N = 207. LUAD- gruczolakorak płuc, T = 483, N = 347. LUSC- rak płaskonabłonkowy płuc, T = 486, N = 338. OV- surowiczy gruczolakorak jajnika, T = 426, N = 88. READ- gruczolakorak odbytnicy, T = 92, N = 318.

Zdolność hamowania aktywności ludzkiego uPA o niskiej masie cząsteczkowej przez α -aminofosfoniany określono poprzez wykonanie zmodyfikowanego fluorometrycznego testu aktywności enzymatycznej [139]. Przeprowadzenie tego badania pozwoliło na wyznaczenie wartości IC₅₀ dla każdego otrzymanego związku oraz dla amilorydu, jako substancji referencyjnej, stosowanej w medycynie (Tabela 12).

Tabela 12. Wartości IC₅₀ α -aminofosfonianów oraz amilorydu wobec urokinazy.

Produkt	Wartość IC ₅₀
2.1	>1000 μ M
2.2	>1000 μ M
2.3	>1000 μ M
2.4	114 μ M
2.5	493 μ M
2.6	147 μ M
2.7	280 μ M
2.8	620 μ M
2.9	>1000 μ M
2.10	357 μ M
2.11	416 μ M
2.12	>1000 μ M
2.13	>1000 μ M
2.13*	516 μ M
2.14	>1000 μ M
2.15	>1000 μ M
2.16	>1000 μ M
2.17	>1000 μ M
2.18	720 μ M
2.19	671 μ M
amiloryd	47 μ M

Dziesięć z dwudziestu badanych α -aminofosfonianów wykazało wartości IC₅₀ poniżej 1 mM. Wartości te uzyskano dla związków zawierających w strukturze fragment pochodzący od (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminy (związki: 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.10, 2.11) oraz od (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy (związki: 2.13*, 2.18, 2.19), co może sugerować, że obecność grupy *p*-metoksyfenylowej lub *tert*-butylowej w strukturach badanych α -aminofosfonianów zwiększa ich działanie hamujące w porównaniu do związków zawierających grupę fenylową (związki: 2.1, 2.2, 2.3). Spośród tych dziesięciu związków, 2.4 wykazywał najniższą wartość IC₅₀ (114 μ M), a zatem okazał się najlepszym inhibitorem urokinazy. α -Aminofosfoniany zawierające grupę

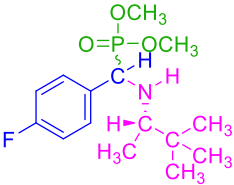
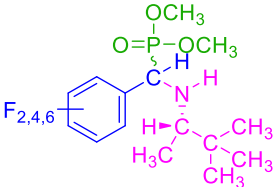
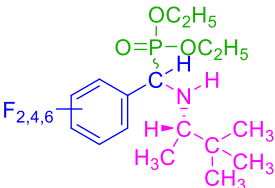
p-metoksyfenylową charakteryzowały się lepszym potencjałem hamującym niż związki 2.18 i 2.19 posiadające grupę *tert*-butylową. Obecność w strukturze związku 2.13* pierścienia fenylowego, zawierającego w pozycji *para* podstawnik fluorowy, prawdopodobnie wpływa korzystnie na aktywność hamującą działanie urokinazy przez ten α -aminofosfonian. Analiza otrzymanych wartości IC_{50} pozwoliła ocenić także wpływ liczby atomów fluoru obecnych w strukturach α -aminofosfonianów na ich zdolność inhibicji badanego enzymu. Wzrost ilości tychże atomów w strukturze związku skutkował mniejszą zdolnością do hamowania działania urokinazy.

3.5. Dokowanie molekularne

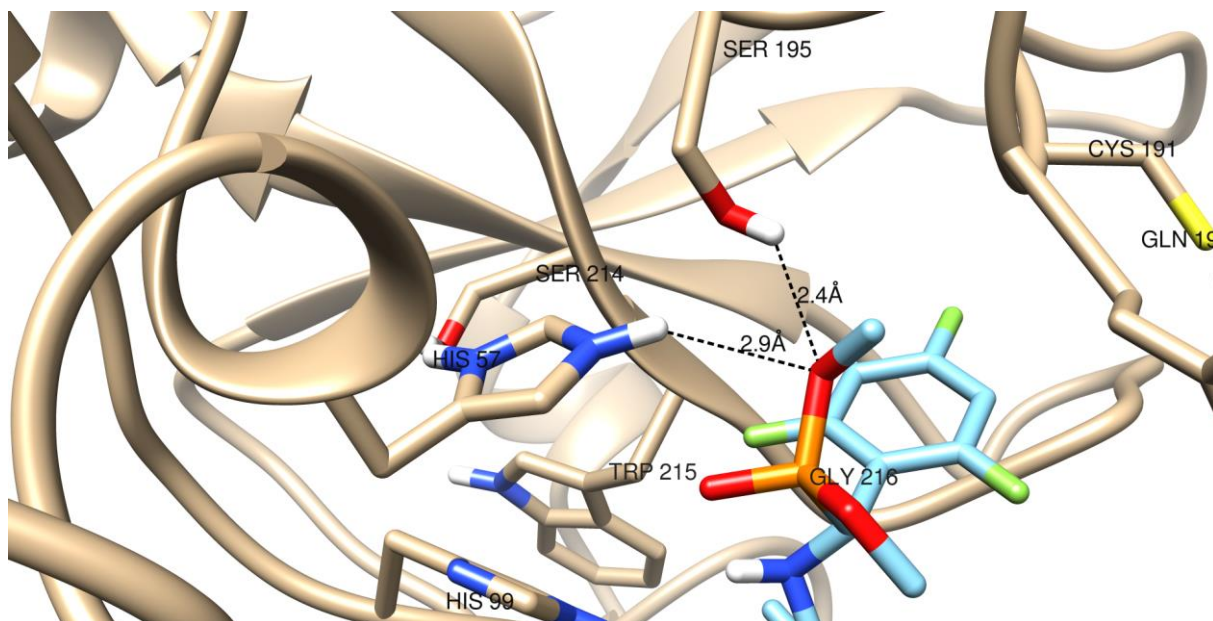
Dokowanie molekularne stanowi popularne narzędzie, między innymi w projektowaniu leków, pomagające zrozumieć oddziaływania pomiędzy małymi cząsteczkami i białkami, a także dostarczające szczegółowych informacji na temat mechanizmu ich wiązania. Wiązanie ligandu z białkiem jest najważniejszym etapem reakcji enzymatycznych, który wpływa na hamowanie działania enzymu [177]. Przeprowadzenie badań dokowania molekularnego jest procesem złożonym, rozpoczynającym się od przygotowania struktury białka poprzez usunięcie wszelkich cząsteczek, takich jak rozpuszczalniki, czy ligandy. Celem tego etapu jest uzyskanie pustej kieszeni wiążącej, niezbędnej do dalszych badań. Istotą dokowania molekularnego jest ocena powinowactwa wiązania potencjalnego inhibitora z enzymem. Wzrost powinowactwa może oznaczać lepszy efekt terapeutyczny badanego związku. Powinowactwo wiązania określane jest poprzez obliczenie energii swobodnej Gibbsa (ΔG), która stanowi sumę entalpii wiązania (ΔH) oraz zmiany entropii (ΔS) [178]. W celu szczegółowego poznania zależności struktury otrzymanych α -aminofosfonianów, wpływających na wykazywaną inhibicję urokinazy, przeprowadzono badania *in silico* dokowania molekularnego dla wybranych dziesięciu związków o najniższych wartościach IC_{50} (Tabela 13). Dokowanie wykonano przy użyciu programu AutoDock Vina. W analizie pozycji uzwojeń wzięto pod uwagę reszty aminokwasowe znajdujące się w odległości 3.5 Å od siebie. Odległość tę wybrano, ponieważ stanowi ona granicę prawidłowych wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych. Są to dwa ważne czynniki wpływające na wiązanie ligand-białko.

Tabela 13. Energia wiązania wybranych α -aminofosfonianów z urokinazą.

Produkt	Struktura	Energia wiązania [kcal/mol]
2.4		-6.411
2.5		-6.281
2.6		-6.366
2.7		-6.208
2.8		-6.319
2.10		-6.691
2.11		-6.526

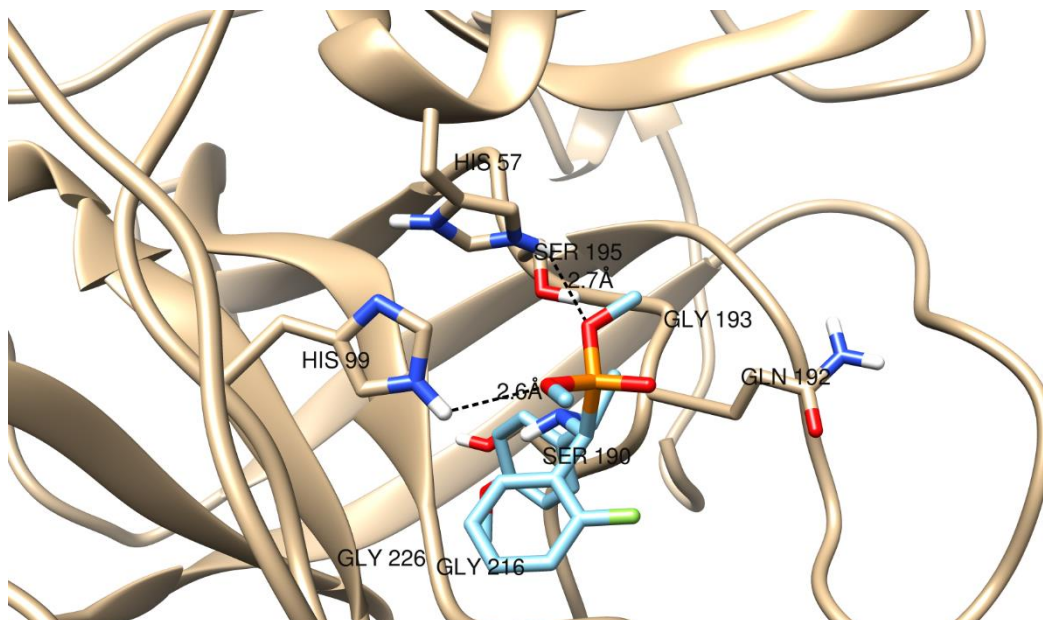
2.13*		-5.728
2.18		-5.494
2.19		-5.651

W siedmiu z dziesięciu związanych ligandów, grupa *p*-metoksyfenylowa była skierowana do wnętrza miejsca wiązania, oddziałując z resztami takimi jak Leu97, Ser190, Gln192, Ser195, Ser214, Gly216 i Gly219, które tworzą wnękę kieszeni wiążącej w strukturze urokinazy. Kontakt polarny z Ser195 jest obecny w przypadku wszystkich α -aminofosfonianów wytypowanych do dokowania molekularnego. Najlepiej można zaobserwować to w przypadku produktu 2.18, gdzie jedna z grup -OCH₃ pochodząca od fosfonianu dimetylu tworzy rozwidłone wiązanie wodorowe z Ser195 i His57 (Rysunek 29). Taka orientacja jest prawdopodobnie spowodowana płytkim zanurzeniem ugrupowania trifluorofenyłowego we wnękę wiążącej (ze względu na jego objętość) i brakiem grupy *p*-metoksyfenylowej.



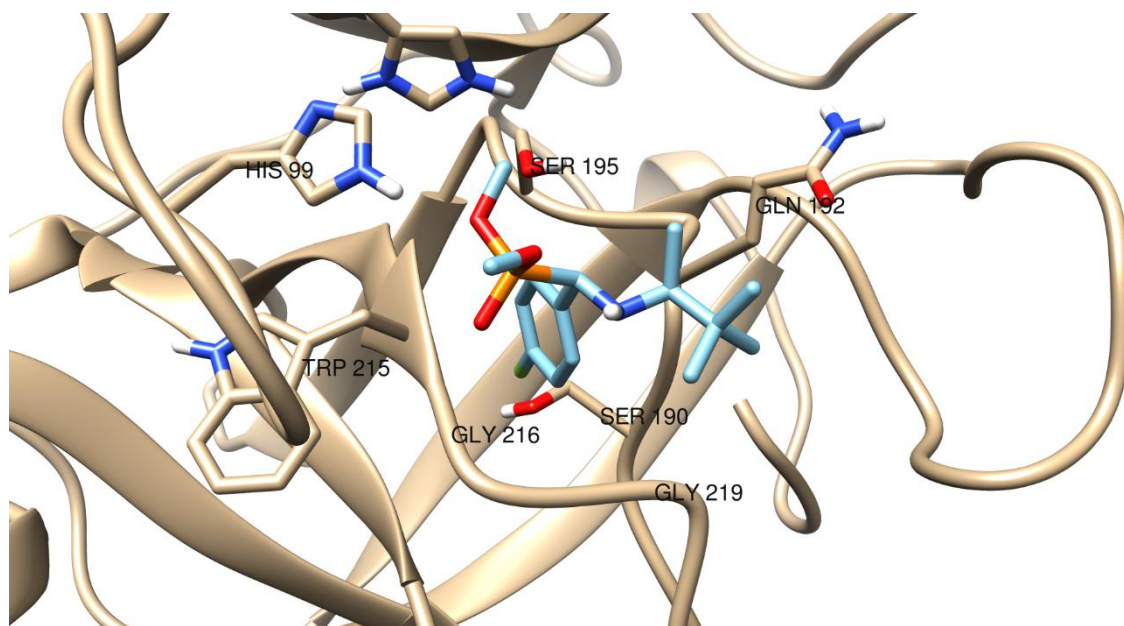
Rysunek 29. Oddziaływanie produktu 2.18 z urokinazą. Czarna przerywana linia wskazuje wiązanie wodorowe pomiędzy ligandem i enzymem.

Innym przykładem takiego oddziaływania jest związek 2.4 (Rysunek 30). W tej cząsteczce grupa *p*-metoksyfenylowa jest zorientowana do wewnątrz kieszeni wiążącej, umożliwiając Ser195 oddziaływanie z jedną z grup dimetylofosfonianowych, a His57 z drugą grupą -OCH₃ pochodzącą od fragmentu fosfonianowego.



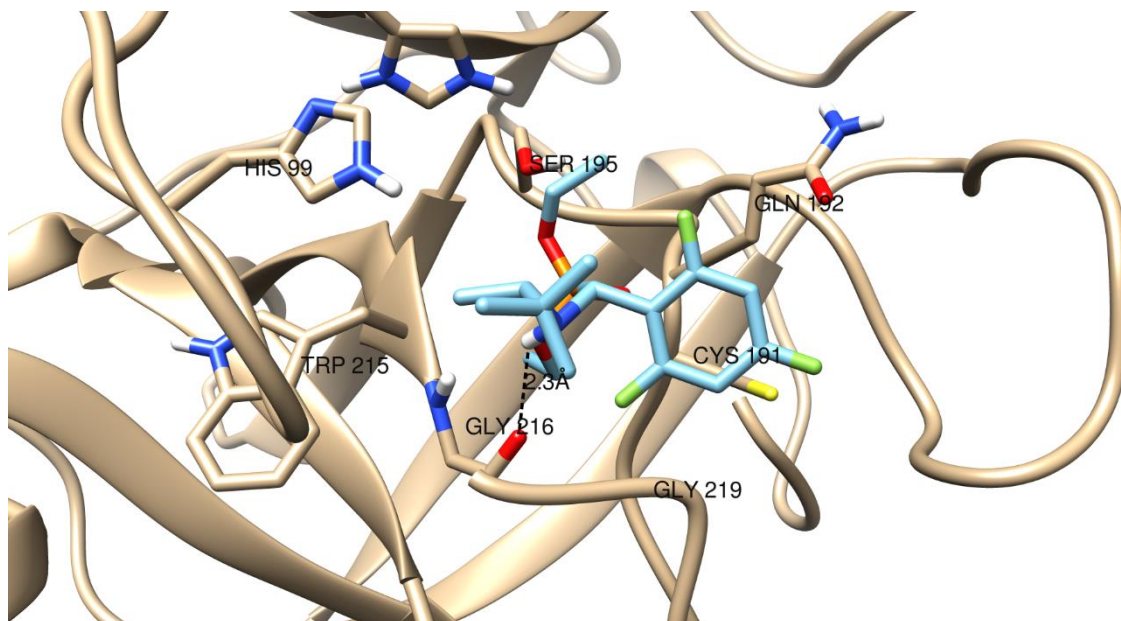
Rysunek 30. Oddziaływanie produktu 2.4 z urokinazą. Czarna przerywana linia wskazuje wiązanie wodorowe pomiędzy ligandem i enzymem.

Oprócz produktu 2.18 tylko dwa inne związki wykazały wyraźną orientację w kieszeni wiążącej. W obu przypadkach główny powód jest taki sam jak dla związku 2.18, a mianowicie brak ugrupowania *p*-metoksyfenylowego, które „kotwicz” cząsteczkę we wnęce wiążącej. Jednym z tych związków jest 2.13*. W tym przypadku fragment *p*-fluorofenylowy łatwo wpasowuje się we wnękę wiążącą, naśladując grupę *p*-metoksyfenylową (Rysunek 31).



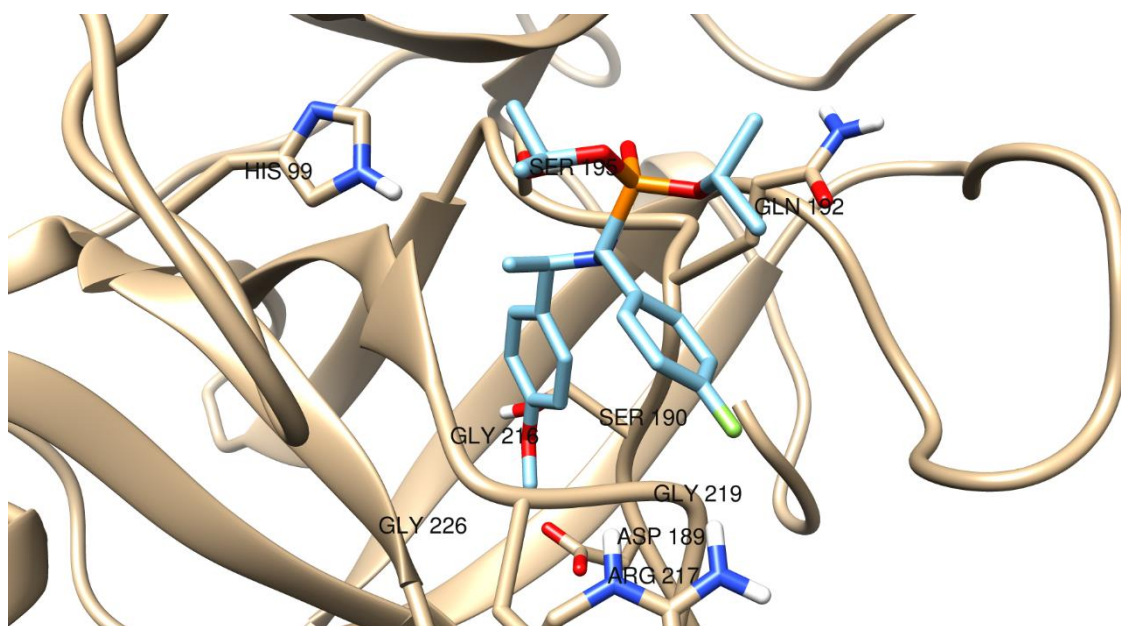
Rysunek 31. Oddziaływanie związku 2.13* z urokinazą.

W przypadku α -aminofosfonianu 2.19 model liganda znajduje się bardziej na powierzchni wnęki (Rysunek 32). Powodem takiego wiązania jest fakt, iż grupa 2,4,6-trifluorofenylowa jest zbyt duża, aby zmieścić się głęboko we wnęce, a ligand ten również nie zawiera grupy *p*-metoksyfenylowej, która dobrze działa jako fragment kotwiczący. Z tego powodu główną interakcją wartą zauważenia jest kontakt polarny Ser195 z jednym z fragmentów fosfonianu dietylu.

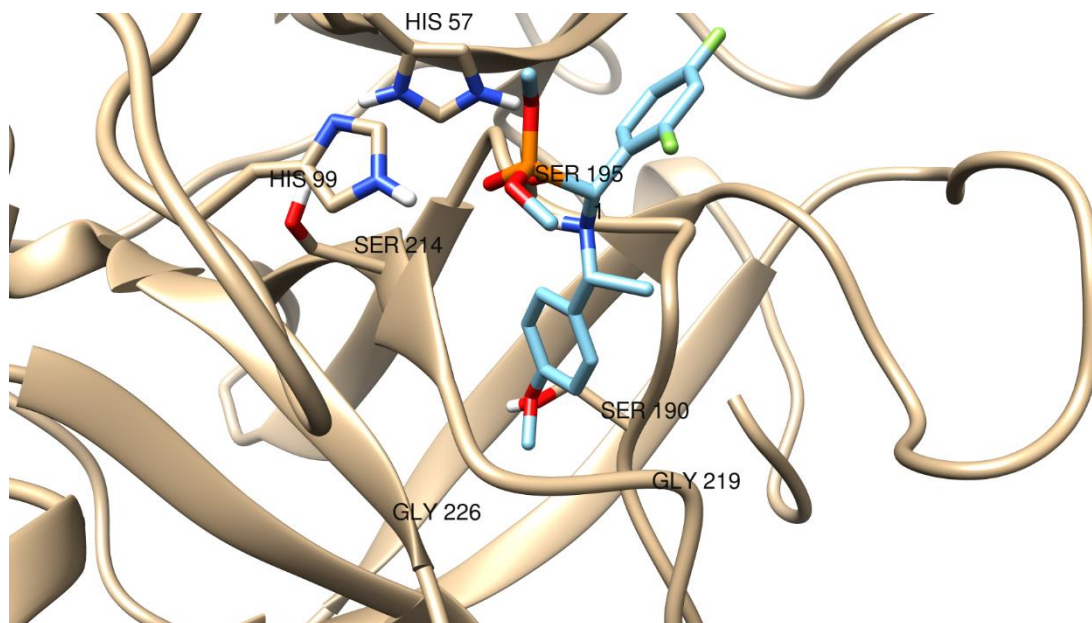


Rysunek 32. Oddziaływanie produktu 2.19 z urokinazą. Czarna przerywana linia wskazuje wiązanie wodorowe pomiędzy ligandem i enzymem.

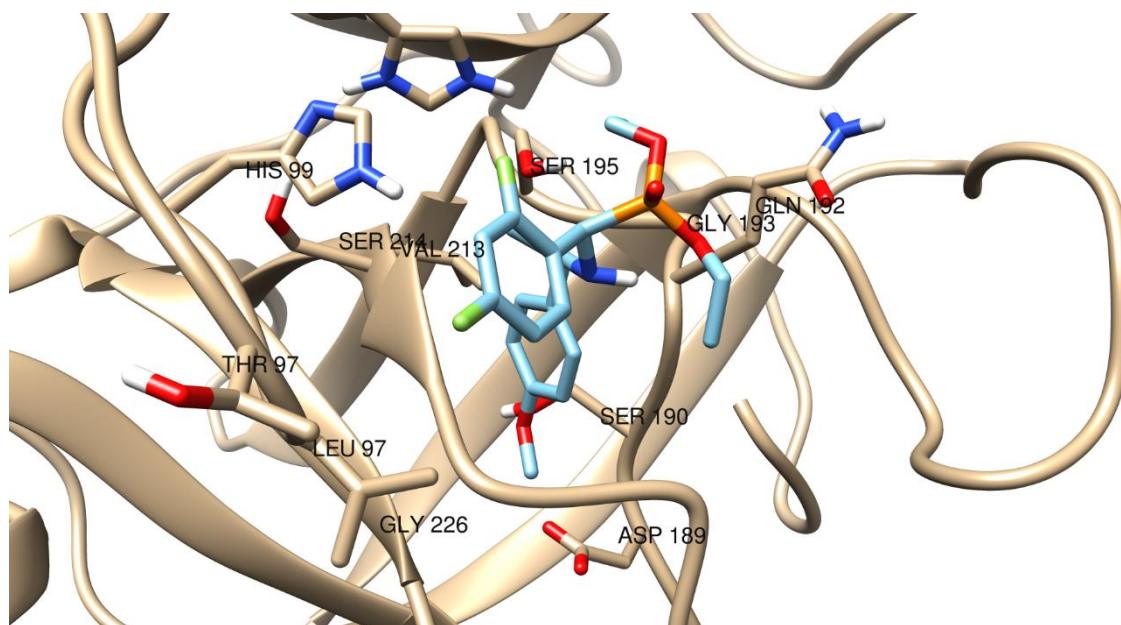
Poniżej przedstawiono sposób wiązania z urokinazą pozostałych badanych α -aminofosfonianów, które zostały wybrane do badań dokowania molekularnego. Wszystkie te związki: 2.5 (Rysunek 33), 2.6 (Rysunek 34), 2.7 (Rysunek 35), 2.8 (Rysunek 36), 2.10 (Rysunek 37) i 2.11 (Rysunek 38) zawierają grupę *p*-metoksyfenylową skierowaną do wnętrza miejsca wiązania enzymu z ligandem.



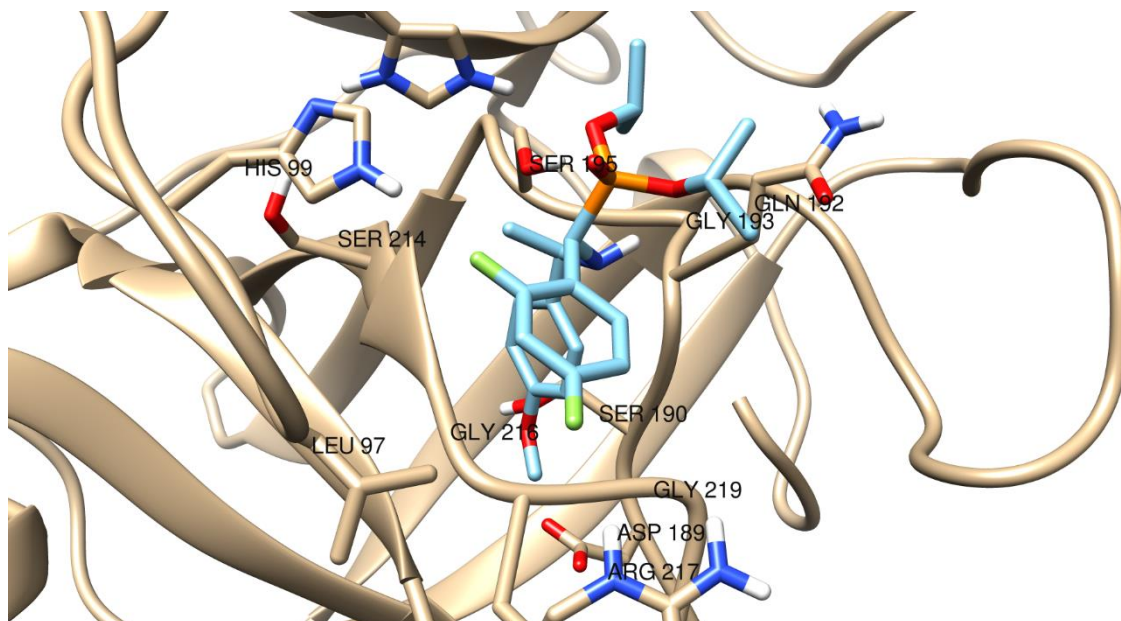
Rysunek 33. Oddziaływanie produktu 2.5 z urokinazą.



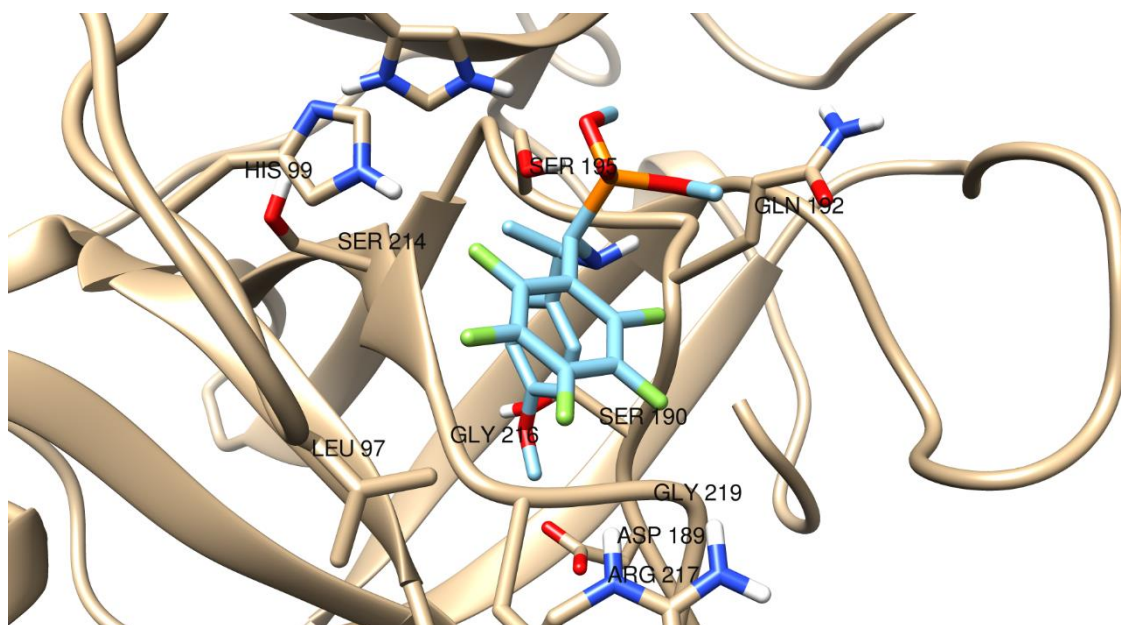
Rysunek 34. Oddziaływanie produktu 2.6 z urokinazą.



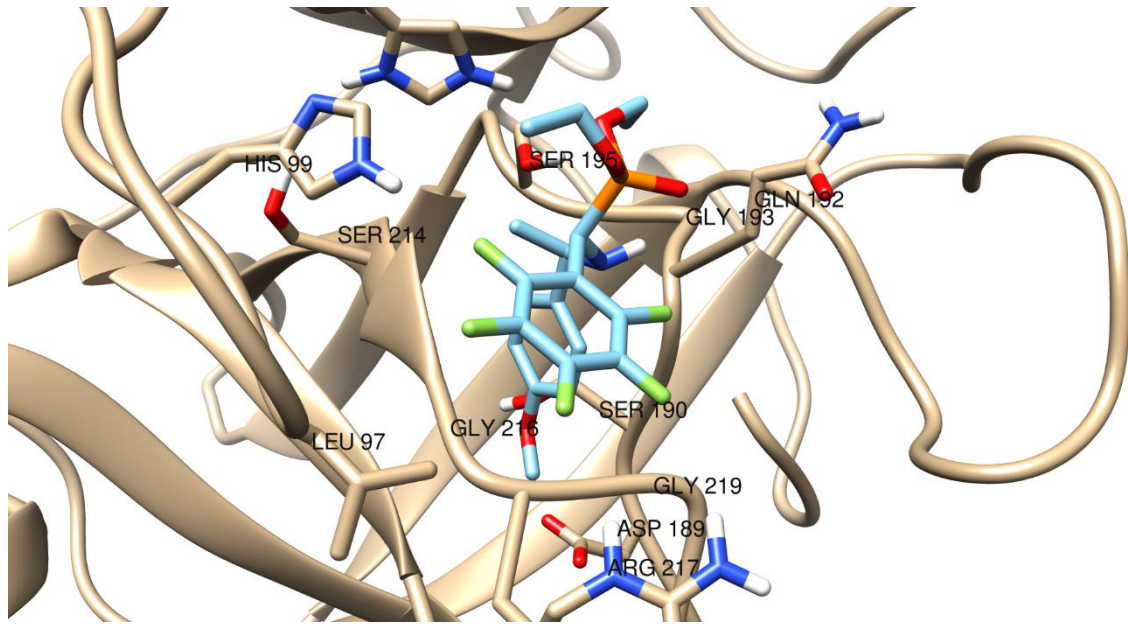
Rysunek 35. Oddziaływanie produktu 2.7 z urokinazą.



Rysunek 36. Oddziaływanie produktu 2.8 z urokinazą.



Rysunek 37. Oddziaływanie produktu 2.10 z urokinazą.



Rysunek 38. Oddziaływanie produktu 2.11 z urokinazą.

III
WAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA
I WNIOSKI

1. Ważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej

- Opracowano nową, mechanochemiczną metodę syntezy imin opartą na reakcji aldehydów z aminami pierwszorzędowymi, pozwalającą na wydajne otrzymanie produktów. Metoda ta nie wymaga zastosowania rozpuszczalnika, katalizatora czy też podwyższonej temperatury. Prowadzi do otrzymania imin w krótkim czasie, wynoszącym 15 minut. Jest to metoda wykazująca wiele zalet pod względem ekologicznym oraz ekonomicznym.
- Wykorzystując nowo opracowaną metodę, otrzymano serię 36 fluorowanych imin, które kompleksowo scharakteryzowano spektroskopowo. Wśród zsyntezowanych produktów, 12 stanowiło związki nieopisane dotąd w literaturze, dla których wykonano również analizy spektrometryczne (HRMS). Co więcej, dla związków, dla których otrzymano kryształy odpowiednie do badań rentgenograficznych, wykonano analizy krystalograficzne, jednoznacznie potwierdzające struktury badanych związków.
- Wykazano, że metoda mechanochemiczna może mieć zastosowanie do syntezy szerokiej gamy produktów. Bardzo dobre wydajności reakcji otrzymano zarówno w przypadku użycia pochodnych aniliny, jak i amin benzyłowych posiadających centrum stereogeniczne na atomie węgla. Na uwagę zasługuje fakt, że zwiększenie skali syntezy nie powodowało zmniejszenia wydajności reakcji.
- Z bardzo dobrą i dobrą diastereoselektywnością zsyntezowano serię nowych fluorowanych α -aminofosfonianów. Strukturę otrzymanych związków potwierdzono badaniami spektroskopowymi i spektrometrycznymi, a ich czystość udokumentowano wykonując analizę elementarną. α -Aminofosfoniany otrzymane w postaci odpowiednich kryształów poddano analizie krystalograficznej, uzyskując struktury krystaliczne badanych związków.
- Na podstawie analizy danych otrzymanych z badań spektroskopowych (2D NMR) i danych uzyskanych w wyniku zastosowania metody dyfrakcji promieni rentgenowskich, w związkach 2.13 i 2.18 ustalono konfigurację absolutną centrum stereogenicznego utworzonego na skutek diastereoselektywnej hydrofosfonylacji imin. Diastereoselektywność tworzenia α -aminofosfonianów wyjaśniono w oparciu o model Ahn'a-Eisenstein'a.

- Wykazano, że zsyntezowane α -aminofosfoniany charakteryzują się właściwościami lekopodobnymi i mogą być dobrymi kandydatami do badań ukierunkowanych na poszukiwanie związków o potencjale medycznym.
- Określono cytotoksyczność zsyntezowanych α -aminofosfonianów wobec dziesięciu linii komórkowych ludzkich nowotworów oraz wobec jednej linii komórek prawidłowych. Wykazano wysoką aktywność przeciwnowotworową otrzymanych związków. Wszystkie α -aminofosfoniany charakteryzują się bardzo dobrą cytotoksycznością względem linii komórkowej HeLa i Caco-2, wykazując średnie wartości IC_{50} równe odpowiednio 8.71 μ M oraz 15.67 μ M. Zadowalające wyniki odnotowano także w przypadku linii U-87 MG i SK-OV-3, dla których średnie wartości IC_{50} wynoszą 23.13 μ M oraz 24.58 μ M, odpowiednio. W przeprowadzonych badaniach jako referencyjny lek wykorzystano 5-fluoro-2'-deoksyurydynę (FdU), stosowany w leczeniu różnych typów nowotworów. W wielu przypadkach wartości IC_{50} zsyntezowanych α -aminofosfonianów są niższe niż w przypadku FdU.
- Wykazano zdolność hamowania działania urokinazy przez zsyntezowane α -aminofosfoniany. Przeprowadzone badania dokowania molekularnego pozwoliły zaobserwować, że obecne w niektórych spośród otrzymanych α -aminofosfonianów grupy: *p*-metoksyfenylowa oraz *p*-fluorofenylowa bardzo dobrze wpasowuje się w miejsce aktywne urokinazy, wpływając na inhibicję aktywności tego enzymu.

2. Podsumowanie i wnioski

Celem niniejszej rozprawy była synteza nowych, zawierających fluor fosfonianowych analogów α -aminokwasów, badania strukturalne otrzymanych związków, a także określenie ich aktywności przeciwnowotworowej. W toku prac badawczych opracowano nową mechanochemiczną metodę syntezy imin. Metoda ta jest nie tylko przyjazna środowisku, ale także nie wymaga zastosowania skomplikowanej aparatury. W krótkim czasie w prosty sposób pozwala na efektywne utworzenie zaplanowanych produktów. W ramach prowadzonych badań otrzymano fluorowane iminy z bardzo dobrymi wydajnościami, w wielu przypadkach wynoszącymi ponad 90%. Przeprowadzona analiza porównawcza z danymi literaturowymi wykazała, że niejednokrotnie uzyskano wyższe wydajności niż w przypadku zastosowania metod, które

zakładają między innymi użycie katalizatorów czy toksycznych rozpuszczalników. Mechanochemiczna metoda charakteryzuje się także szerokim zakresem możliwych do zastosowania substratów. W reakcjach mogą być wykorzystywane zarówno aminy aromatyczne, jak i alifatyczne. Ograniczeniem metody jest jednak zastosowanie amin charakteryzujących się dużą lotnością. Co istotne i warte podkreślenia, syntezę imin metodą mechanochemiczną można przeprowadzić także na większą skalę, przy czym nie powoduje to obniżenia wydajności reakcji. W ramach badań wykonano syntezę nawet w skali 10-krotnie większej w porównaniu ze stosowaną standardowo, odnotowując tak samo wysokie wartości wydajności. Podsumowując, nowo opracowana metoda mechanochemicznego otrzymywania imin może stanowić dogodną i bardzo dobrą alternatywę dla innych procedur, zwłaszcza takich, które także bazują na reakcji aldehydów i pierwszorzędowych amin.

Tytułowe związki otrzymano na drodze diastereoselektywnej hydrofosfonylacji imin. α -Aminofosfoniany uzyskano z bardzo dobrym i dobrym stosunkiem diastereoizomerycznym oraz bardzo dobrą i dobrą wydajnością. W przypadku związków zawierających w strukturze ugrupowanie 2,4,6-trifluorofenyłowe lub 2,3,4,5,6-pentafluorofenyłowe odnotowano niższe wartości wydajności reakcji, jak również niższą diastereoselektywność niż w przypadku związków monofluorowanych oraz difluorowanych. W celu wyjaśnienia niekorzystnego wpływu wspomnianych grup w reagentach aldehydowych, zarówno na otrzymaną wydajność, jak i stosunki diastereoizomeryczne α -aminofosfonianów, wykonano badania z wykorzystaniem metody DFT. Przeprowadzone obliczenia kwantowo-chemiczne wykazały, że różnica energii między dwoma możliwymi konformerami iminy ulegającej hydrofosfonylacji jest mniejsza w substracie niefluorowanym niż w jego analogu z ugrupowaniem 2,4,6-trifluorofenyłowym. Przyjęto więc, że z tego powodu nadmiar diastereomeryczny jest bardziej wyraźny w cząsteczkach pozbawionych atomów fluoru. Niezbędne są jednak dalsze badania w tym zakresie. Badania strukturalne zsyntezowanych α -aminofosfonianów pozwoliły na określenie konfiguracji absolutnej nowo wygenerowanego centrum stereogenicznego, utworzonego w wyniku addycji nukleofilowej fosforynu do iminy. Stereoselektywność reakcji syntezy fosfonianowych analogów α -aminokwasów wyjaśniono w oparciu o model Ahn'a-Eisenstein'a, determinujący stereochemię produktów powstałych na drodze addycji reagentów

nukleofilowych do chiralnych imin. Zgodnie z tym modelem, konfiguracja absolutna atomu węgla α w α -aminofosfonianach zależy wyłącznie od budowy iminy.

α -Aminofosfoniany znane są w literaturze z wykazywania szerokiego spektrum bioaktywności. Otrzymane związki poddano zatem badaniom aktywności biologicznej, koncentrując się na działaniu przeciwnowotworowym oraz inhibicji urokinazy. Analiza *in silico* właściwości farmakokinetycznych zsyntezowanych α -aminofosfonianów wykazała, że związki te spełniają regułę Lipińskiego, która jest popularnie stosowanym kryterium do oceny substancji lekopodobnych. Wszystkie α -aminofosfoniany charakteryzowały się wysoką absorpcją przez przewód pokarmowy, a niektóre z nich wykazywały także zdolność przenikania bariery krew-mózg, dowodząc tym samym bardzo dobrej biodostępności. Wykonano *in vitro* badania cytotoksyczności α -aminofosfonianów względem dziesięciu linii komórkowych ludzkich nowotworów: glejaka (U-87 MG, U-118 MG, U-251 MG), raka płuc (A549), raka piersi (MDA-MB-231), raka wątroby (HepG2), raka jelita grubego (Caco-2), raka jajników (OVCAR-3, SK-OV-3) oraz raka szyjki macicy (HeLa), względem linii komórek prawidłowych (MRC-5) oraz FdU. Z analizy otrzymanych wyników można wnioskować, że lepszą cytotoksycznością charakteryzują się α -aminofosfoniany zawierające mniejszą liczbę atomów fluoru w strukturze. W celu określenia działania długoterminowego α -aminofosfonianów wykonano test klonogeny względem jednej losowo wybranej linii komórek nowotworowych oraz względem linii komórek prawidłowych. Zaobserwowano obniżenie klonogenności w przypadku obu badanych linii, jednak większy spadek zdolności tworzenia kolonii przez komórki wykazano dla komórek nowotworowych. α -Aminofosfoniany poddano także testom inhibicji enzymatycznej, stosując jako enzym urokinazę- białko biorące udział w degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej, co wiąże się z postępowaniem choroby nowotworowej oraz powstawaniem przerzutów. Zaobserwowano zależność strukturalną α -aminofosfonianów od wykazywanej inhibicji. W większości przypadków, najniższe wartości IC_{50} odnotowano dla związków zawierających w swojej strukturze fragment pochodzący od (*R*)-4-metoksy- α -metylobenzyloaminy. Badania dokowania molekularnego wykazały, że grupa metoksylova w pozycji *para* pierścienia aromatycznego α -aminofosfonianów jest fragmentem strukturalnym, który wpasowuje się w kieszeń wiążącą enzymu, prowadząc do zahamowania jego działania.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach projektu doktorskiego są obiecujące i warte kontynuacji. Rozwój badań w zakresie podjętej tematyki może skutkować nie tylko poszerzeniem biblioteki fluorowanych α -aminofosfonianów, ale może również zaowocować nowymi, potencjalnymi terapeutykami. Szczególnie ważne znaczenie wydaje się mieć aktywność cytotoksyczna otrzymanych związków względem linii komórkowych nowotworów mózgu, które zwykle związane są ze słabym rokowaniem dla zdrowia i życia pacjentów. Istotnym aspektem, także wartym dalszego zainteresowania jest synteza nowych fosfonianowych analogów α -aminokwasów z ugrupowaniem *p*-metoksyfenylowym, jako związków potencjalnie silnie oddziałujących z miejscem aktywnym urokinazy, której inhibicja może skutkować zmniejszeniem progresji nowotworów.

IV
CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Metody ogólne

Wszystkie stosowane odczynniki chemiczne pochodziły z Sigma Aldrich (Merck) lub Apollo Scientific.

Do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) stosowano płytki aluminiowe pokryte żelazem krzemionkowym (Merck, 60-F254) oraz mieszaninę rozpuszczalników octan etylu/heksan jako eluent. Płytki wywoływano wykorzystując światło UV ($\lambda = 254$ nm).

Wykonane widma NMR zostały zarejestrowane przy użyciu instrumentów pracujących przy 600 MHz (^1H NMR), 150 MHz (^{13}C NMR) oraz 300 MHz (^{19}F NMR i ^{31}P NMR). Do przeprowadzenia analiz spektroskopowych zastosowano deuterowane rozpuszczalniki- CDCl_3 oraz CD_3OD . Przesunięcia chemiczne (δ) przedstawiono w ppm i skalibrowano na podstawie sygnałów resztkowych CDCl_3 (7.25 ppm dla ^1H NMR i 77.16 ppm dla ^{13}C NMR) oraz CD_3OD (3.30 ppm dla ^1H NMR i 49.05 ppm dla ^{13}C NMR). Pomiary wykonywano w temperaturze 25°C. Widma ^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC oraz NOESY zarejestrowano na spektrometrze Bruker AvanceNEO (600 MHz), natomiast widma ^{19}F NMR i ^{31}P NMR wykonano na spektrometrze Mercury (300 MHz).

Widma mas o wysokiej rozdzielczości (HRMS) zmierzono za pomocą spektrometru mas QTOF (Impact HD, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), w trybie jonów dodatnich stosując elektrozpylanie (ESI) jako metodę jonizacji.

Analizę elementarną wykonano przy użyciu aparatu Vario EL Cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Niemcy).

2. Preparatyka i dane spektroskopowe imin

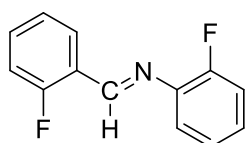
2.1. Ogólna procedura syntezy imin

Syntezy imin przeprowadzano pod wyciągiem. Równomolowe ilości aldehydu (0.26 mmol) i aminy (0.26 mmol) umieszczono w kolbie okrągłodennej i ucierano ręcznie szklaną bagietką bez rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Otrzymany produkt w postaci oleistej lub ciała stałego rozpuszczano w dichlorometanie i bez oczyszczania poddawano analizie TLC. Stosowano fazę octan etylu/heksan w stosunku objętościowym 1:4. W przypadku gdy oprócz oczekiwanego produktu obserwowano również obecność nieprzereagowanego substratu, wykonano widmo ^1H NMR z użyciem dichlorometanu jako wzorca wewnętrznego, którego zastosowanie umożliwiło obliczenie wydajności reakcji. Wydajności otrzymanych imin obliczone na

podstawie widm ^1H NMR metodą wzorca wewnętrznego oznaczono „*”. W większości przypadków analiza TLC wykazała obecność czystych produktów. Wówczas wydajność reakcji obliczono z masy surowego produktu, a czystość związku potwierdzono widmami NMR bez zastosowania wzorca wewnętrznego. Dla wszystkich imin wykonano komplet widm (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR), a dla związków nieopisanych dotąd w literaturze naukowej zmierzono także widma HRMS.

2.2. Dane spektroskopowe

2.2.1. *N*,1-bis(2-fluorofenylo)metanoimina (1.1)



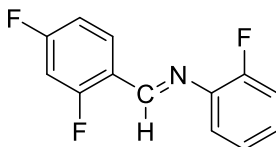
Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 49 mg, 86%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.84 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 8.22 (m, 1H, CHar), 7.49-7.45 (m, 1H, CHar), 7.25 (m, 1H, CHar), 7.20-7.11 (m, 5H, 5 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = -121.55 (m, 1F), -127.02 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ = 162.95 (d, J = 254.1 Hz, Car), 155.98 (m, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 155.28 (d, J = 249.3 Hz, Car), 139.92 (d, J = 10.4 Hz, Car), 133.36 (d, J = 8.8 Hz, CHar), 128.01 (d, J = 2.3 Hz, CHar), 127.05 (d, J = 7.6 Hz, CHar), 124.51 (m 2 CHar), 123.78 (d, J = 8.9 Hz, Car), 121.86 (d, J = 1.5 Hz, CHar), 116.27 (d, J = 20.1 Hz, CHar), 115.86 (d, J = 21.0 Hz, CHar) ppm.

2.2.2. 1-(2,4-difluorofenylo)-*N*-(2-fluorofenylo)metanoimina (1.2)



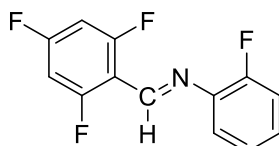
Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju, 36 mg, 58%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.76 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 8.24 (m, 1H, CHar), 7.21-7.13 (m, 4H, 4 CHar), 6.99 (m, 1H, CHar), 6.88 (m, 1H, CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = -104.09 (m, 1F), -117.43 (m, 1F), -127.03 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 166.22$ (dd, $J = 255.2$; 12.3 Hz, Car), 163.20 (dd, $J = 256.7$; 12.3 Hz, Car), 156.09 (s, Car), 154.73 (m, N=C-H), 154.43 (s, Car), 139.66 (d, $J = 10.3$ Hz, Car), 129.58 (dd, $J = 10.2$; 3.9 Hz, CHar), 127.15 (d, $J = 7.7$ Hz, CHar), 124.53 (d, $J = 3.9$ Hz, CHar), 121.85 (m, CHar), 116.30 (d, $J = 20.1$ Hz, CHar), 112.36 (dd, $J = 21.7$; 3.4 Hz, CHar), 104.1 (t, $J = 25.2$ Hz, CHar) ppm.

2.2.3. *N*-(2-fluorofenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.3)



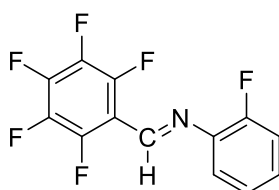
Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 37 mg, 56%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.64$ (s, 1H, -CH=N), 7.21-7.17 (m, 1H, CHar), 7.17-7.12 (m, 3H, 3 CHar), 6.79-6.74 (m, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -102.11$ (m, 1F), -108.80 (m, 2F), -127.20 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.16$ (dt, $J = 255.5$; 15.8 Hz, Car), 162.72 (ddd, $J = 260.4$; 15.0; 8.9 Hz, 2 Car), 155.63 (s, Car), 153.98 (s, Car), 152.94 (m, N=C-H), 140.04 (d, $J = 10.3$ Hz, Car), 127.35 (d, $J = 7.6$ Hz, CHar), 124.50 (d, $J = 3.8$ Hz, CHar), 121.77 (d, $J = 1.0$ Hz, CHar), 116.28 (d, $J = 20.1$ Hz, CHar), 101.17 (m, 2 CHar) ppm.

2.2.4. *N*-(2-fluorofenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.4)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 72 mg, 95%

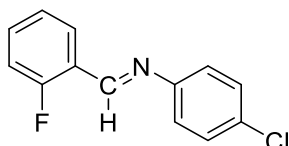
Temperatura topnienia = 78-80°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.67$ (s, 1H, -CH=N), 7.26-7.23 (m, 1H, CHar), 7.20-7.16 (m, 3H, 3 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -126.77$ (m, 1F), -141.89 (m, 2F), -149.45 (m, 1F), -161.87 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 154.82$ (d, $J = 250.7$ Hz, Car), 151.27 (t, $J = 2.8$ Hz, N=C-H), 147.11 (m, Car), 145.39 (m, Car), 143.64 (m, Car), 141.92 (m, Car), 139.10 (d, $J = 10.0$ Hz, Car), 138.66 (m, Car), 136.97 (m, Car), 128.19 (d, $J = 7.7$ Hz, CHar), 124.65 (d, $J = 4.0$ Hz, CHar), 122.05 (d, $J = 0.7$ Hz, CHar), 116.53 (d, $J = 20.0$ Hz, CHar) ppm.

2.2.5. *N*-(4-chlorofenylo)-1-(2-fluorofenylo)metanoimina (1.5)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 52 mg, 86%

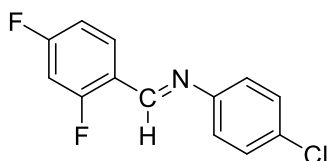
Temperatura topnienia = 47-48°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.75$ (s, 1H, -CH=N), 8.17 - 8.15 (m, 1H, CHar), 7.49 - 7.45 (dm, 1H, CHar), 7.37 - 7.35 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.26 - 7.23 (m, 1H, CHar), 7.18 - 7.16 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.15 - 7.12 (ddd, $J = 10.5$; 8.4 Hz, 1H, CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -121.50$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.89$ (d, $J = 253.8$ Hz, Car), 153.79 (d, $J = 5.0$ Hz, N=C-H), 150.36 (s, Car), 133.20 (d, $J = 8.8$ Hz, CHar), 131.86 (s, Car), 129.26 (s, 2 CHar), 127.86 (d, $J = 2.3$ Hz, CHar), 124.53 (d, $J = 3.5$ Hz, CHar), 123.73 (d, $J = 8.9$ Hz, Car), 122.31 (s, 2 CHar), 115.92 (d, $J = 21.1$ Hz, CHar) ppm.

2.2.6. *N*-(4-chlorofenylo)-1-(2,4-difluorofenylo)metanoimina (1.6)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 63 mg, 96%

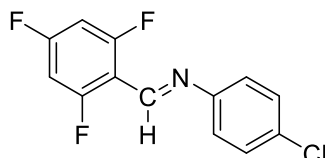
Temperatura topnienia = 95-97°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.67$ (s, 1H, -CH=N), 8.18 (m, 1H, CHar), 7.36 (dm, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.16 (dm, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.98 (m, 1H, CHar), 6.88 (m, 1H, CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -104.24$ (m, 1F), -117.41 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 165.11$ (dd, $J = 255.1$; 12.3 Hz, Car), 163.17 (dd, $J = 256.4$; 12.3 Hz, Car), 152.53 (m, N=C-H), 150.12 (s, Car), 131.96 (s, Car), 129.41 (dd, $J = 10.2$; 4.1 Hz, CHar), 129.29 (s, 2 CHar), 122.27 (s, 2 CHar), 120.36 (dd, $J = 9.2$; 3.7 Hz, Car), 112.37 (dd, $J = 21.8$; 3.6 Hz, CHar), 104.16 (t, $J = 25.3$ Hz, CHar) ppm.

2.2.7. *N*-(4-chlorofenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.7)



Związek otrzymano w postaci żółtego ciała stałego, 64 mg, 91%

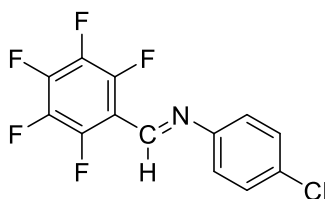
Temperatura topnienia = 71-75°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.55$ (s, 1H, -CH=N), 7.36 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.15 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.78 (tm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -104.46$ (m, 1F), -110.78 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.93$ (m, Car), 163.53 (m, Car), 163.26 (m, Car), 161.81 (m, Car), 150.66 (m, N=C-H, Car), 132.23 (s, Car), 129.32 (s, 2 CHar), 122.13 (s, 2 CHar), 110.63 (m, Car), 101.26 (m, 2 CHar) ppm.

2.2.8. *N*-(4-chlorofenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.8)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 62 mg, 78%

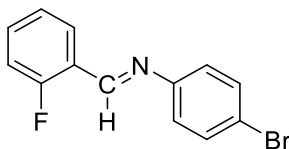
Temperatura topnienia = 105-106°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.55$ (s, 1H, -CH=N), 7.39 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.18 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -142.03$ (m, 2F), -149.56 (tt, $J = 20.8$; 3.9 Hz, 1F), -161.79 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 149.70$ (s, Car), 148.74 (m, N=C-H), 147.10 (m, Car), 145.36 (m, Car), 143.57 (m, Car), 141.81 (m, Car), 138.64 (m, Car), 137.02 (m, Car), 133.08 (s, Car), 129.48 (s, 2 CHar), 122.18 (s, 2 CHar) ppm.

2.2.9. *N*-(4-bromofenylo)-1-(2-fluorofenylo)metanoimina (1.9)



Związek otrzymano w postaci pomarańczowego ciała stałego, 65 mg, 90%

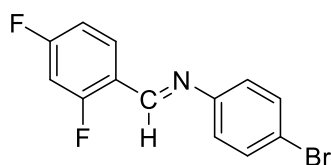
Temperatura topnienia = 53-54°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.75$ (s, 1H, -CH=N), 8.17-8.14 (m, 1H, CHar), 7.52-7.50 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.49-7.45 (m, 1H, CHar), 7.26-7.23 (m, 1H, CHar), 7.15-7.13 (m, 1H, CHar), 7.12-7.10 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -121.47$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.89$ (d, $J = 254.0$ Hz, Car), 153.85 (d, $J = 5.0$ Hz, N=C-H), 150.85 (s, Car), 133.24 (d, $J = 8.7$ Hz, CHar), 132.22 (s, 2 CHar), 127.87 (d, $J = 2.3$ Hz, CHar), 124.54 (d, $J = 3.6$ Hz, CHar), 123.72 (d, $J = 9$ Hz, Car), 122.69 (s, 2 CHar), 119.72 (s, Car), 115.93 (d, $J = 21.0$ Hz, CHar) ppm.

2.2.10. *N*-(4-bromofenylo)-1-(2,4-difluorofenylo)metanoimina (1.10)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 66 mg, 85%

Temperatura topnienia = 93-95°C

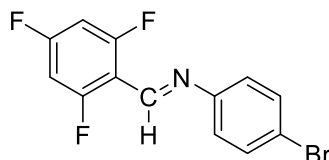
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.67$ (s, 1H, -CH=N), 8.18 (m, 1H, CHar), 7.51 (dt, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.10 (dt, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.98 (m, 1H, CHar), 6.88 (m, 1H, CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -104.17$ (m, 1F), -117.38 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 165.12$ (dd, $J = 255.3$; 12.4 Hz, Car), 163.18 (dd, $J = 256.6$; 12.3 Hz, Car), 152.59 (m, N=C-H), 150.61 (s, Car), 132.26 (s, 2 CHar), 129.43 (dd, $J = 10.2$; 4.1 Hz, CHar), 122.64 (s, 2 CHar), 120.35 (dd, $J = 9.2$; 3.7 Hz, Car), 119.81 (s, Car), 112.39 (dd, $J = 21.8$; 3.6 Hz, CHar), 104.18 (t, $J = 25.3$ Hz, CHar) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{BrF}_2\text{N}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 295.9886, zmierzone: 295.9891.

2.2.11. *N*-(4-bromofenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.11)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 66 mg, 80%

Temperatura topnienia = 74-76°C

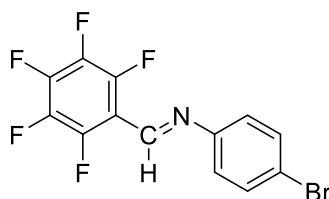
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.54$ (s, 1H, -CH=N), 7.80 (dm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.08 (dm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.77 (tm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -102.15$ (m, 1F), -108.91 (t, $J = 8.9$ Hz, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.05$ (dt, $J = 255.5$; 15.7 Hz, Car), 162.6 (ddd, $J = 260.2$; 15.0; 9.0 Hz, 2 Car), 151.06 (s, Car), 150.60 (d, $J = 1.3$ Hz, N=C-H), 132.21 (s, 2 CHar), 122.43 (s, 2 CHar), 120.04 (s, Car), 110.60 (m, Car), 101.19 (m, 2 CHar) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{BrF}_3\text{N}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 313.9792, zmierzone: 313.9791.

2.2.12. *N*-(4-bromofenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.12)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 77 mg, 84%

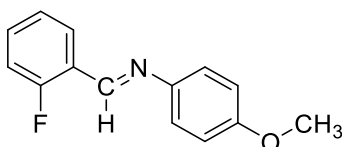
Temperatura topnienia = 106°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.55$ (s, 1H, -CH=N), 7.54 (dt, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.11 (dt, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -141.99$ (m, 2F), -149.48 (m, 1F), -161.78 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 150.17$ (s, Car), 148.77 (m, N=C-H), 147.07 (m, Car), 145.36 (m, Car), 143.57 (m, Car), 141.83 (m, Car), 138.66 (m, Car), 136.98 (m, Car), 132.43 (s, 2 CHar), 122.48 (s, 2 CHar), 120.96 (s, Car) ppm.

2.2.13. 1-(2-fluorofenylo)-*N*-(4-metoksyfenylo)metanoimina (1.13)



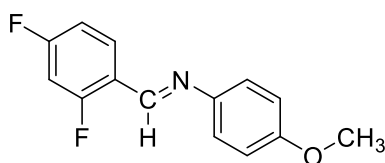
Związek otrzymano w postaci brązowego oleju, 58 mg, 97%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.80$ (s, 1H, -CH=N), 8.17 (m, 1H, CHar), 7.45 - 7.42 (m, 1H, CHar), 7.27 (m, 2H, 2 CHar), 7.23 (m, 1H, CHar), 7.12 (m, 1H, CHar), 6.94 (m, 2H, 2 CHar), 3.84 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -122.01$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.72$ (d, $J = 253.0$ Hz, Car), 158.57 (s, Car), 151.29 (d, $J = 4.8$ Hz, N=C-H), 144.79 (s, Car), 132.52 (d, $J = 8.7$ Hz, CHar), 127.67 (d, $J = 2.6$ Hz, CHar), 124.44 (d, $J = 3.4$ Hz, CHar), 124.22 (d, $J = 9.0$ Hz, Car), 122.39 (s, 2 CHar), 115.81 (d, $J = 21.1$ Hz, CHar), 114.40 (s, 2 CHar), 55.50 (s, O-CH₃) ppm.

2.2.14. 1-(2,4-difluorofenylo)-*N*-(4-metoksyfenylo)metanoimina (1.14)



Związek otrzymano w postaci żółtego ciała stałego, 61 mg, 95%

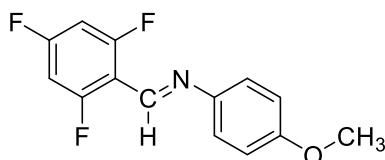
Temperatura topnienia = 85 - 88°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.72$ (s, 1H, -CH=N), 8.21 - 8.17 (m, 1H, CHar), 7.26 - 7.24 (dm, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.99 - 6.95 (m, 1H, CHar), 6.95 - 6.92 (dm, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.88 - 6.85 (m, 1H, CHar), 3.84 (s, 3H, O-CH₃) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -105.57$ (m, 1F), -117.98 (dd, $J = 18.6$; 8.7 Hz, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.69$ (dd, $J = 254.0$; 12.3 Hz, Car), 162.91 (dd, $J = 255.5$; 12.3 Hz, Car), 158.61 (s, Car), 150.03 (m, N=C-H), 144.54 (s, Car), 129.14 (dd, $J = 10.0$; 4.3 Hz, CHar), 122.34 (s, 2 CHar), 120.82 (m, Car), 114.42 (s, 2 CHar), 112.21 (dd, $J = 21.8$; 3.6 Hz, CHar), 104.03 (t, $J = 25.3$ Hz, CHar), 55.49 (s, O- CH_3) ppm.

2.2.15. *N*-(4-metoksyfenylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.15)



Związek otrzymano w postaci jasnobrązowego ciała stałego, 69 mg, 99%

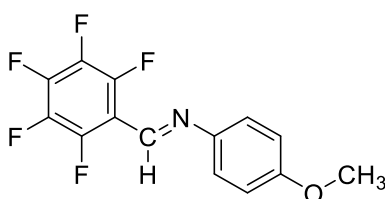
Temperatura topnienia = 90-91°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.59$ (s, 1H, -CH=N), 7.24 (dt, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.94 (dt, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.75 (tm, $J = 8.6$ Hz, 3H, 3 CHar), 3.83 (s, 3H, O- CH_3) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -103.62$ (m, 1F), -109.49 (t, $J = 8.6$ Hz, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.59$ (dt, $J = 254.4$; 15.8 Hz, Car), 162.46 (ddd, $J = 259.0$; 14.9; 9.1 Hz, 2 Car), 158.80 (s, N=C-H), 148.08 (s, Car), 145.04 (s, Car), 122.23 (s, 2 CHar), 114.39 (s, 2 CHar), 111.09 (m, Car), 101.08 (m, 2 CHar), 55.47 (s, O- CH_3) ppm.

2.2.16. *N*-(4-metoksyfenylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.16)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 77 mg, 98%

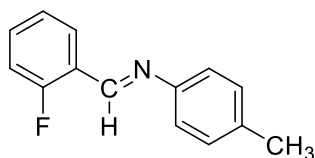
Temperatura topnienia = 121-125°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.58$ (s, 1H, -CH=N), 7.27 (dt, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.94 (dt, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2 CHar), 3.84 (s, 3H, O- CH_3) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -142.67$ (m, 2F), -151.10 (m, 1F), -162.30 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 159.42$ (s, Car), 146.89 (m, Car), 145.75 (d, $J = 2.7$ Hz, N=C-H), 145.18 (m, Car), 144.05 (s, Car), 143.00 (m, Car), 141.30 (m, Car), 138.60 (m, Car), 136.92 (m, Car), 122.45 (s, 2 CHar), 114.49 (s, 2 CHar), 55.49 (s, O- CH_3) ppm.

2.2.17. 1-(2-fluorofenylo)-*N*-(*p*-tolilo)metanoimina (1.17)



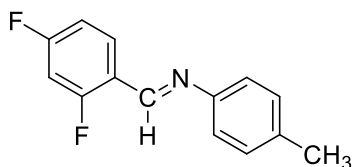
Związek otrzymano w postaci pomarańczowego oleju, 54 mg, 97%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.79$ (s, 1H, -CH=N), 8.18 (td, $J = 7.4; 1.8$ Hz, 1H, CHar), 7.45-7.42 (m, 1H, CHar), 7.25-7.19 (m, 3H, 3 CHar), 7.16 (m, 2H, 2 CHar), 7.13-7.10 (m, 1H, CHar), 2.37 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -121.85$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.78$ (d, $J = 253.0$ Hz, Car), 152.57 (d, $J = 4.9$ Hz, N=C-H), 149.31 (s, Car), 136.21 (s, Car), 132.70 (d, $J = 8.6$ Hz, CHar), 129.77 (s, 2 CHar), 127.79 (d, $J = 2.6$ Hz, CHar), 124.43 (d, $J = 3.4$ Hz, CHar), 124.10 (d, $J = 9.0$ Hz, Car), 120.93 (s, 2 CHar), 115.81 (d, $J = 21.1$ Hz, CHar), 21.0 (s, CH_3) ppm.

2.2.18. 1-(2,4-difluorofenylo)-*N*-(*p*-tolilo)metanoimina (1.18)



Związek otrzymano w postaci brązowego ciała stałego, 57 mg, 95%

Temperatura topnienia = 57-58°C

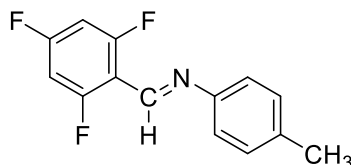
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.71$ (s, 1H, -CH=N), 8.20 (m, 1H, CHar), 7.20 (dm, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.15 (dt, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.97 (m, 1H, CHar), 6.87 (m, 1H, CHar), 2.37 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -105.22$ (m, 1F), -117.81 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.82$ (dd, $J = 254.3; 12.3$ Hz, Car), 163.02 (dd, $J = 255.9; 12.3$ Hz, Car), 151.34 (m, N=C-H), 149.09 (s, Car), 136.31 (s, Car), 129.81 (s, 2

CHar), 129.30 (dd, $J = 10.0$; 4.2 Hz, CHar), 120.89 (s, 2 CHar), 120.72 (dd, $J = 9.4$; 3.7 Hz, Car), 112.22 (dd, $J = 21.7$; 3.5 Hz, CHar), 104.04 (t, $J = 25.3$ Hz, CHar), 21.00 (s, CH₃) ppm.

2.2.19. *N-p-tolilo-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.19)*



Związek otrzymano w postaci żółtego ciała stałego, 57 mg, 88%

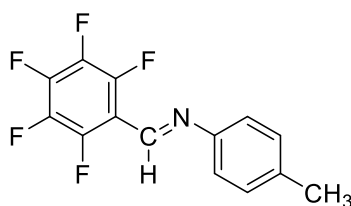
Temperatura topnienia = 59-61°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.59$ (s, 1H, -CH=N), 7.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.14 (dt, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.77 (m, 2H, 2 CHar), 2.38 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = -103.29$ (m, 1F), -109.34 (m, 2F) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 163.75$ (dt, $J = 254.6$; 15.8 Hz, Car), 162.55 (ddd, $J = 259.4$; 15.1; 9.1 Hz, 2 Car), 149.62 (s, Car), 149.42 (s, N=C-H), 136.55 (s, Car), 129.79 (s, 2 CHar), 120.74 (s, 2 CHar), 110.99 (m, Car), 101.11 (m, 2 CHar), 21.01 (s, CH₃) ppm.

2.2.20. 1-(perfluorofenylo)-*N*-(*p*-tolilo)metanoimina (1.20)



Związek otrzymano w postaci jasnopomarańczowego ciała stałego, 69 mg, 92%

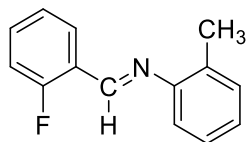
Temperatura topnienia = 131-135°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.57$ (s, 1H, -CH=N), 7.22 (m, 2H, 2 CHar), 7.16 (dm, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2 CHar), 2.38 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = -142.43$ (m, 2F), -150.55 (tt, $J = 20.7$; 3.5 Hz, 1F), -162.18 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 148.69$ (s, Car), 147.35 (d, $J = 2.7$ Hz, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 146.98 (m, Car), 145.27 (m, Car), 143.20 (m, Car), 141.48 (m, Car), 138.61 (m, Car), 137.51 (s, Car), 136.96 (m, Car), 129.92 (s, 2 CHar), 120.81 (s, 2 CHar), 21.04 (s, CH_3) ppm.

2.2.21. 1-(2-fluorofenylo)-*N*-(*o*-tolilo)metanoimina (1.21)



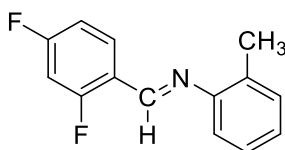
Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 49 mg, 87%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.68$ (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 8.22 (m, 1H, CHar), 7.45-7.42 (m, 1H, CHar), 7.25-7.19 (m, 3H, 3 CHar), 7.15-7.10 (m, 2H, 2 CHar), 6.95-6.94 (m, 1H, CHar), 2.37 (s, 3H, CH_3) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -121.93$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.78$ (d, $J = 253.5$ Hz, Car), 152.50 (d, $J = 4.8$ Hz, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 151.00 (s, Car), 132.72 (d, $J = 8.7$ Hz, CHar), 132.04 (s, Car), 130.27 (s, CHar), 127.91 (d, $J = 2.5$ Hz, CHar), 126.73 (s, CHar), 125.96 (s, CHar), 124.41 (d, $J = 3.5$ Hz, CHar), 124.17 (d, $J = 9.0$ Hz, Car), 117.62 (s, CHar), 115.84 (d, $J = 21.0$ Hz, CHar), 17.80 (s, CH_3) ppm.

2.2.22. 1-(2,4-difluorofenylo)-*N*-(*o*-tolilo)metanoimina (1.22)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 45 mg, 74%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.60$ (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 8.23 (m, 1H, CHar), 7.21 (m, 2H, 2 CHar), 7.13 (m, 1H, CHar), 6.96 (m, 1H, CHar), 6.93 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CHar), 6.85 (m, 1H, CHar), 2.35 (s, 3H, CH_3) ppm.

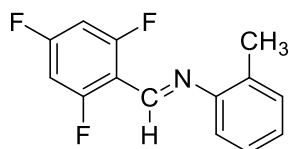
^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -105.18$ (m, 1F), -117.94 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.83$ (dd, $J = 254.3; 12.2$ Hz, Car), 163.00 (dd, $J = 256.0; 12.3$ Hz, Car), 151.26 (m, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 150.75 (s, Car), 132.09 (s, Car), 130.31 (s, CHar), 129.40 (dd, $J = 10.1; 4.3$ Hz, CHar), 126.75 (s, CHar), 126.05 (s, CHar), 120.78

(dd, $J = 9.1; 3.6$ Hz, CHar), 117.54 (s, CHar), 112.20 (dd, $J = 21.7; 3.5$ Hz, CHar), 104.03 (t, $J = 25.3$ Hz, CHar), 17.78 (s, CH₃) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla C₁₄H₁₂F₂N [M + H]⁺ : 232.0937, zmierzone: 232.0944.

2.2.23. *N*-*o*-tolilo-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.23)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 64 mg, 98%

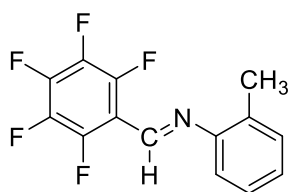
Temperatura topnienia = 52-54°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.50 (s, 1H, -CH=N), 7.24-7.20 (m, 2H, 2 CHar), 7.16-7.14 (m, 1H, 1 CHar), 6.92 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, CHar), 6.78-6.74 (m, 2H, 2 CHar), 2.36 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -103.38 (m, 1F), -109.45 (t, $J = 8.6$ Hz, 2F) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 163.75 (dt, $J = 254.3; 15.7$ Hz, Car), 162.62 (ddd, $J = 259.7; 15.0; 9.1$ Hz, 2 Car), 151.29 (s, Car), 149.31 (m, N=C-H), 131.93 (s, Car), 130.31 (s, CHar), 126.74 (s, CHar), 126.29 (s, CHar), 117.27 (s, CHar), 111.03 (m, Car), 101.09 (m, 2 CHar), 17.72 (s, CH₃) ppm.

2.2.24. 1-(perfluorofenylo)-*N*-(*o*-tolilo)metanoimina (1.24)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 71 mg, 96%

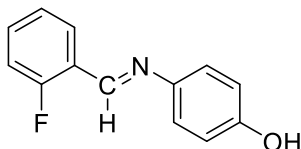
Temperatura topnienia = 132°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8.50 (s, 1H, -CH=N), 7.26-7.22 (m, 2H, 2 CHar), 7.21-7.18 (m, 1H, CHar), 6.95 (dd, $J = 7.7; 1.4$ Hz, 1H, CHar), 2.37 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -142.56 (m, 2F), -150.71 (m, 1F), -162.21 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 150.33$ (s, Car), 147.32 (m, N=C-H), 147.04 (m, Car), 145.35 (m, Car), 143.26 (m, Car), 141.53 (m, Car), 138.64 (m, Car), 136.97 (m, Car), 132.59 (s, Car), 130.54 (s, CHar), 127.10 (s, CHar), 126.80 (s, CHar), 116.87 (s, CHar), 17.68 (s, CH_3) ppm.

2.2.25. 4-((2-fluorobenzylideno)amino)fenol (1.25)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 44 mg, 79%

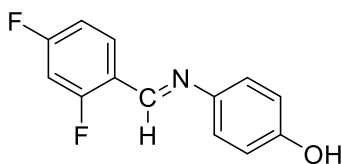
Temperatura topnienia = 164-170°C

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.78$ (s, 1H, -CH=N), 8.07 (m, 1H, CHar), 7.50-7.46 (m, 1H, CHar), 7.26 (m, 1H, CHar), 7.18 (m, 3H, 2 CHar), 6.83 (dt, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.61 (m, 1H, CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = -121.31$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 164.09$ (d, $J = 252.2$ Hz, Car), 158.10 (s, Car), 152.26 (d, $J = 4.9$ Hz, N=C-H), 144.62 (s, Car), 134.06 (d, $J = 8.7$ Hz, CHar), 128.66 (d, $J = 2.5$ Hz, CHar), 125.73 (d, $J = 3.5$ Hz, CHar), 125.31 (d, $J = 9.2$ Hz, Car), 123.56 (s, 2 CHar), 116.95 (d, $J = 21.2$, CHar), 116.92 (s, 2 CHar) ppm.

2.2.26. 4-((2,4-difluorobenzylideno)amino)fenol (1.26)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 55 mg, 90%

Temperatura topnienia = 141-143°C

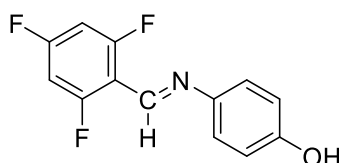
^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.70$ (s, 1H, -CH=N), 8.11 (m, 1H, CHar), 7.17 (dt, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.04 (m, 1H, CHar), 6.81 (dt, $J = 9.0$ Hz, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = -105.51$ (m, 1F), -117.03 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 166.21$ (dd, $J = 252.8$; 12.5 Hz, Car), 164.35 (dd, $J = 251.6$; 12.4 Hz, Car), 158.11 (s, Car), 150.96 (dd, $J = 4.2$; 1.5 Hz, N=C-H), 144.48 (s, Car), 130.35 (dd, $J = 10.2$; 4.2 Hz, CHar), 123.56 (s, 2 CHar), 122.15 (dd, $J = 9.3$; 3.8 Hz, Car), 116.91 (s, 2 CHar), 113.28 (dd, $J = 22.0$; 3.5 Hz, CHar), 105.10 (t, $J = 25.8$ Hz, CHar) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 234.0730, zmierzone: 234.0727.

2.2.27. 4-((2,4,6-trifluorobenzylideno)amino)fenol (1.27)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego, 29 mg, 45%

Temperatura topnienia = 124-126°C

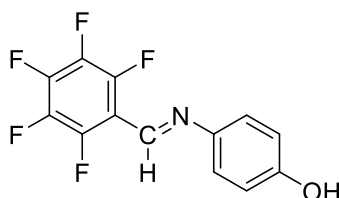
^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.60$ (s, 1H, -CH=N), 7.17 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2 CHar), 6.98 (t, $J = 8.9$ Hz, 2 CHar), 6.82 (dm, $J = 8.9$ Hz, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = -103.49$ (m, 1F), -109.40 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 164.54$ (m, 3 Car), 158.39 (s, Car), 148.99 (m, N=C-H), 144.84 (s, Car), 123.45 (s, 2 CHar), 118.58 (s, Car), 116.94 (s, 2 CHar), 102.15 (m, 2 CHar) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 252.0636, zmierzone: 252.0629.

2.2.28. 4-(((perfluorofenylo)metyleno)amino)fenol (1.28)



Związek otrzymano w postaci żółtego ciała stałego, 48 mg, 68%

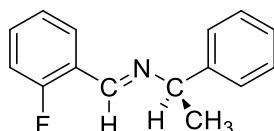
Temperatura topnienia = 159-162°C

^1H NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.61$ (s, 1H, -CH=N), 7.22 (dt, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.83 (dt, $J = 8.9$ Hz, 2H, 2 CHar) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = -143.01$ (m, 2F), -152.98 (m, 1F), -163.66 to (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): $\delta = 158.96$ (s, Car), 148.21 (m, Car), 146.57 (m, N=C-H), 146.46 (m, Car), 144.13 (s, Car), 142.58 (m, Car), 139.99 (m, Car), 138.35 (m, Car), 123.75 (s, 2 CHar), 116.93 (s, 2 CHar), 113.15 (m, Car) ppm.

2.2.29. 1-(2-fluorofenyl)-N-(1-fenylethyl)metanoimina (1.29)



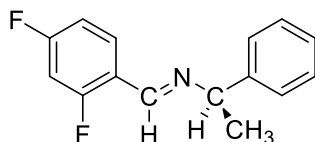
Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju, 58 mg, 98%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.69$ (s, 1H, -CH=N), 8.08 (m, 1H, CHar), 7.43 (m, 2H, 2 CHar), 7.39 – 7.35 (m, 1H, CHar), 7.34 (m, 2H, 2 CHar), 7.24 (m, 1H, CHar), 7.16 (m, 1H, CHar), 7.07 – 7.04 (m, 1H, CHar), 4.58 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 1.60 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{H}(\text{C})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -122.66$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.20$ (d, $J = 252.0$ Hz, Car), 152.70 (d, $J = 4.8$ Hz, N=C-H), 144.97 (s, Car), 132.08 (d, $J = 8.6$ Hz, CHar), 128.43 (s, 2 CHar), 127.95 (d, $J = 2.9$ Hz, CHar), 126.88 (s, CHar), 126.59 (s, 2 CHar), 124.24 (d, $J = 3.5$ Hz, CHar), 123.98 (d, $J = 9.4$ Hz, Car), 115.56 (d, $J = 19.1$ Hz, CHar), 70.15 (s, N- $\underline{\text{C}}(\text{H})\text{CH}_3$), 24.83 (s, N-C(H) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

2.2.30. 1-(2,4-difluorofenyl)-N-(1-fenylethyl)metanoimina (1.30)



Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju, 59 mg, 93%

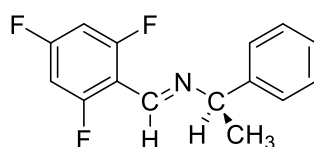
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.60$ (s, -CH=N), 8.09 (td, $J = 8.6$; 6.7 Hz, 1H, CHar), 7.41 (m, 2H, 2 CHar), 7.35 – 7.32 (m, 2H, 2 CHar), 7.25 – 7.22 (m, 1H, CHar), 6.91 – 6.87 (m, 1H, CHar), 6.81 – 6.78 (m, 1H, CHar), 4.55 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 1.58 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, $\text{H}(\text{C})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -106.50$ (m, 1F), -118.66 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.47$ (dd, $J = 253.0$; 12.3 Hz, Car), 162.40 (dd, $J = 254.6$; 12.1 Hz, Car), 151.54 (d, $J = 2.8$ Hz, N=C-H), 144.87 (s, Car), 129.34 (dd, $J = 10.0$; 4.6 Hz, CHar), 128.45 (s, 2 CHar), 126.93 (s, CHar), 126.55 (s, 2 CHar), 120.51 (dd, $J = 9.7$; 3.8 Hz, Car), 111.89 (dd, $J = 21.5$, 3.5 Hz, CHar), 103.78 (t, $J = 25.4$ Hz, CHar), 70.11 (s, N-C(H)CH₃), 24.83 (s, N-C(H)CH₃) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 246.1094, zmierzone: 246.1103.

2.2.31. *N*-(1-fenylotylo)-1-(2,4,6-trifluorofenyl)metanoimina (1.31)



Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju, 64 mg, 93%

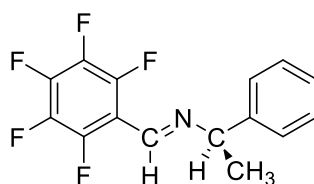
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.48$ (s, 1H, -CH=N), 7.42 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.34 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.24 (m, 1H, CHar), 6.69 (m, 2H, 2 CHar), 4.52 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H(C)CH₃), 1.61 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -104.74$ (m, 1F), -110.08 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.28$ (dt, $J = 253.2$; 15.7 Hz, Car), 162.22 (ddd, $J = 257.9$; 14.9; 9.3 Hz, 2 Car), 149.19 (s, N=C-H), 144.64 (s, Car), 128.47 (s, 2 CHar), 126.94 (s, CHar), 126.51 (s, 2 CHar), 110.83 (m, Car), 101.00 - 100.63 (m, 2 CHar), 71.48 (s, N-C(H)CH₃), 25.00 (s, N-C(H)CH₃) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 264.1000, zmierzone: 264.0999.

2.2.32. 1-(perfluorofenyl)-*N*-(1-fenylotylo)metanoimina (1.32)



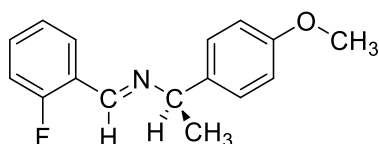
Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 56 mg, 72%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.46$ (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 7.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.35 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.25 (m, 1H, CHar), 4.56 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 1.61 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, $\text{H}(\text{C})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -143.02$ (m, 2F), -151.84 (m, 1F), -162.54 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 147.66$ (m, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 146.70 (m, Car), 145.00 (m, Car), 144.11 (s, Car), 142.84 (m, Car), 141.09 (m, Car), 138.48 (m, Car), 136.82 (m, Car), 128.57 (s, 2 CHar), 127.16 (s, CHar), 126.46 (s, 2 CHar), 71.65 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}(\text{H})\text{CH}_3$), 25.02 (s, $\text{N}-\text{C}(\text{H})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

2.2.33. 1-(2-fluorofenylo)-*N*-(1-(4-metoksyfenylo)etylo)metanoimina (1.33)



Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju, 58 mg, 86%

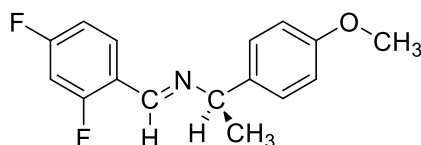
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.67$ (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 8.07–8.04 (m, 1H, CHar), 7.39–7.33 (m, 3H, 3 CHar), 7.17–7.14 (m, 1H, CHar), 7.07–7.04 (m, 1H, CHar), 6.89 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 4.55 (q, $J = 6.6$ Hz, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 3.80 (s, 3H, O- CH_3), 1.57 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{H}(\text{C})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -122.71$ (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.20$ (d, $J = 252.0$ Hz, Car), 158.53 (s, Car), 152.45 (d, $J = 4.7$ Hz, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 137.09 (s, Car), 132.04 (d, $J = 8.5$ Hz, CHar), 127.96 (s, CHar), 127.64 (s, 2 CHar), 124.23 (d, $J = 3.5$ Hz, CHar), 124.01 (d, $J = 9.2$ Hz, Car), 115.60 (d, $J = 15.2$ Hz, CHar), 113.83 (s, 2 CHar), 69.52 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}(\text{H})\text{CH}_3$), 55.28 (s, O- CH_3), 24.68 (s, $\text{N}-\text{C}(\text{H})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{FNO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 258.1294, zmierzone: 258.1283.

2.2.34. 1-(2,4-difluorofenylo)-*N*-(1-(4-metoksyfenylo)etylo)metanoimina (1.34)



Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju, 65 mg, 91%

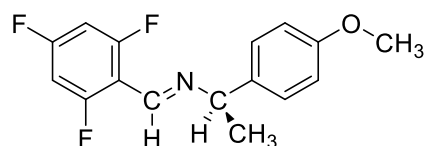
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.58$ (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 8.09-8.05 (m, 1H, CHar), 7.32 (dd, $J = 8.8; 0.5$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.90 (m, 1H, CHar), 6.88 (dd, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.81-6.78 (m, 1H, CHar), 4.52 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 3.09 (s, 3H, O- CH_3), 1.56 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, $\text{H}(\text{C})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -106.63$ (m, 1F), -118.70 (m, 1F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 164.39$ (dd, $J = 252.9; 12.6$ Hz, Car), 162.38 (dd, $J = 254.5; 12.1$ Hz, Car), 158.5 (s, Car), 151.2 (m, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 136.9 (s, Car), 129.3 (dd, $J = 10.0; 4.5$ Hz, CHar), 127.6 (s, 2 CHar), 120.54 (dd, $J = 9.7; 3.7$ Hz, Car), 113.84 (s, 2 CHar), 111.98-111.81 (dd, $J = 21.5; 3.5$ Hz, CHar), 103.77 (t, $J = 25.4$ Hz, CHar), 69.47 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}(\text{H})\text{CH}_3$), 55.23 (s, O- CH_3), 24.66 (s, $\text{N}-\text{C}(\text{H})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 276.1199, zmierzone: 276.1201.

2.2.35. *N*-(1-(4-metoksyfenylo)etylo)-1-(2,4,6-trifluorofenylo)metanoimina (1.35)



Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju, 73 mg, 96%

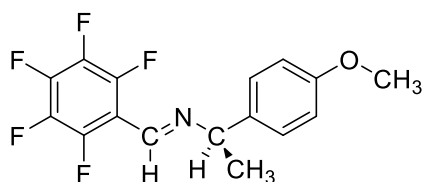
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.46$ (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 7.33 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.88 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.71-6.66 (m, 2 CHar), 4.49 (q, $J = 6.6$, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 3.79 (s, 3H, O- CH_3), 1.59 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, $\text{H}(\text{C})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -104.87$ (m, 1F), -110.13 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 163.44$ (dt, $J = 253.1; 15.7$ Hz, Car), 162.18 (ddd, $J = 257.9; 15.0; 9.4$ Hz, 2 Car), 158.56 (s, Car), 148.89 (s, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 136.73 (s, Car), 127.56 (s, 2 CHar), 113.84 (s, 2 CHar), 110.86 (m, Car), 100.97-100.60 (m, 2 CHar), 70.82 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}(\text{H})\text{CH}_3$), 55.21 (s, O- CH_3), 24.85 (s, $\text{N}-\text{C}(\text{H})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 294.1105, zmierzone: 294.1105

2.2.36. *N*-(1-(4-metoksyfenylo)etylo)-1-(perfluorofenylo)metanoimina (1.36)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 66 mg, 77%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 8.44 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 7.32 (dm, J = 8.8 Hz, 2H, 2 CHar), 6.90 (dm, J = 8.8 Hz, 2H, 2 CHar), 4.53 (q, J = 6.6 Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 3.80 (s, 3H, O- CH_3), 1.59 (d, J = 6.6 Hz, 3H, $\text{H}(\text{C})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = -143.03 (m, 2F), -151.91 (m, 1F), -162.54 (m, 2F) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ = 158.75 (s, Car), 147.42 (d, J = 2.3 Hz, $\text{N}=\text{C}-\text{H}$), 146.70 (m, Car), 144.97 (m, Car), 142.82 (m, Car), 141.11 (m, Car), 138.50 (m, Car), 136.87 (m, Car), 136.18 (s, Car), 127.59 (s, 2 CHar), 113.99 (s, 2 CHar), 71.03 (s, $\text{N}-\underline{\text{C}}(\text{H})\text{CH}_3$), 55.30 (s, O- CH_3), 24.89 (s, $\text{N}-\text{C}(\text{H})\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

HRMS (ESI, m/z) obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{F}_5\text{NO}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$: 330.0917, zmierzone: 330.0908.

3. Preparatyka i dane spektroskopowe α -aminofosfonianów

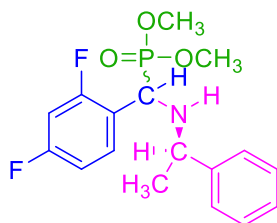
3.1. Ogólne procedura syntezy α -aminofosfonianów

Wszystkie reakcje wykonywano pod wyciągiem. Równomolowe ilości aldehydu (1.005 mmol) oraz aminy (1.005 mmol) umieszczono w okrągłodennej szklanej kolbie i ucierano ręcznie przy użyciu szklanej bagietki w warunkach bezrozpuszczalnikowych i w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą TLC, stosując jako eluent mieszaninę octan etylu/heksan w stosunku objętościowym 1:4. Następnie do utworzonej iminy dodawano fosforyn (1.055 mmol). Reakcje prowadzono w temperaturze 80°C, w atmosferze argonu. Czas reakcji był zależny od zastosowanych substratów. Postęp syntezy monitorowano za pomocą TLC, wykorzystując jako eluent mieszaninę octan etylu/heksan w stosunku objętościowym 1:1. Po zakończeniu reakcji, produkty oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent mieszaninę octan etylu/heksan w stosunku 1:1. Związki otrzymane w postaci ciała stałego poddawano procesowi krystalizacji. Kryształy odpowiednie do analizy rentgenograficznej uzyskano poprzez krystalizację z heksanu (produkt 2.13 oraz 2.18) w 4°C oraz chloroformu (związek 2.3) w 4°C. Dla wszystkich zsyntezowanych

produktów wykonano widma NMR (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) oraz analizę elementarną, a także zmierzono widma HRMS.

3.2. Dane spektroskopowe

3.2.1. ((2,4-difluorofenilo)((*R*)-1-feniloetylo)amino)metylofosfonian dimetylu (2.1)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 235 mg, 66%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.57-7.53 (m, 1H, CHar), 7.49-7.44 (m, 1H, CHar)*, 7.34-7.31 (m, 2H, 2 CHar), 7.28-7.18 (m, 5H, 5 CHar)*, 7.28-7.18 (m, 3H, 3 CHar), 6.97-6.94 (m, 1H, CHar), 6.89-6.86 (m, 1H, CHar)*, 6.81-6.77 (m, 1H, CHar), 6.77-6.73 (m, 1H, CHar)*, 4.51 (d, J = 22.0 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.13 (d, J = 23.0 Hz, 1H, H-C-P), 3.88 (d, J = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.82 (d, J = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 3.76 (q, J = 6.5 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.57 (d, J = 10.5 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.52 (d, J = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 1.35 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 1.32 (d, J = 6.6 Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = -110.89 (m, 1F), -111.03 (m, 1F)*, -114.34 (m, 1F), -114.68 (m, 1F)* ppm.

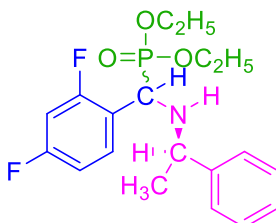
^{31}P NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 25.98 (m, 1P)*, 25.65 (m, 1P) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ = 162.31 (ddd, J = 249.1; 11.8; 2.7 Hz, Car)*, 160.58 (ddd, J = 248.9; 11.8; 7.5 Hz, Car)*, 144.65 (s, Car)*, 143.57 (s, Car), 130.38-130.25 (m, Car)*, 128.54 (s, 2 CHar), 128.37 (s, 2 CHar)*, 127.39 (s, CHar), 127.22 (s, CHar)*, 126.92 (s, 2 CHar), 126.62 (s, 2 CHar)*, 119.87 (dd, J = 14.9; 3.8 Hz, CHar)*, 111.85-111.67 (m, CHar)*, 103.57 (t, J = 26.9 Hz, CHar)*, 55.98 (d, J = 13.4 Hz, H(C)CH₃)*, 55.32 (d, J = 17.4 Hz, H(C)CH₃), 54.16 (d, J = 6.8 Hz, O-CH₃)*, 54.12 (d, J = 5.4 Hz, O-CH₃), 53.28 (d, J = 7.2 Hz, O-CH₃)*, 53.11 (d, J = 7.0 Hz, O-CH₃), 49.53 (dd, J = 157.5; 1.8 Hz, H-C-P)*, 49.40 (d, J = 158.7 Hz, H-C-P), 24.69 (s, H(C)CH₃), 22.44 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{NO}_3\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 356.1227, zmierzone: 356.1219.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₇H₂₀F₂NO₃P: 57.47 C, 5.67 H, 3.94 N, zmierzone: 57.63 C, 5.90 H, 3.97 N.

3.2.2. ((2,4-difluorofenylo)(((R)-1-fenyletylo)amino)metylo)fosfonian dietylu (2.2)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 262 mg, 66%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.60-7.56 (m, 1H, CHar), 7.50-7.46 (m, 1H, CHar)*, 7.32-7.29 (m, 2H, 2 CHar), 7.25-7.20 (m, 4H, 4 CHar)*, 7.25-7.20 (m, 3H, 3 CHar), 7.18-7.15 (m, 1H CHar)*, 6.95-6.92 (m, 1H, CHar), 6.87-6.84 (m, 1H, CHar)*, 6.70-6.75 (m, 1H CHar), 6.75-6.71 (m, 1H, CHar)*, 4.48 (d, *J* = 22 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.30-4.23 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 4.23-4.17 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 4.23-4.17 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 4.16-4.11 (m, 2H, O-CH₂CH₃), 4.00-3.94 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 3.92-3.88 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 3.87-3.83 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 3.79 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.53 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H(C)CH₃), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂CH₃)*, 1.34 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂CH₃), 1.31 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H(C)CH₃), 1.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂CH₃)*, 1.08 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -111.15 (m, 1F), -111.31 (m, 1F)*, -114.28 (m, 1F), -114.61 (m, 1F)* ppm.

³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 23.69 (m, 1P)*, 23.17 (m, 1P) ppm.

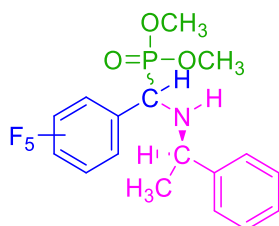
¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 161.99 (ddd, *J* = 251.8; 12.0; 2.9 Hz, Car)*, 160.41 (ddd, *J* = 248.6; 11.8; 7.4 Hz, Car)*, 144.54 (s, Car)*, 143.49 (s, Car), 130.22-130.10 (m, Car)*, 128.23 (s, 2 CHar), 128.08 (s, 2 CHar)*, 127.08 (s, CHar), 126.91 (s, CHar)*, 126.69 (s, 2 CHar), 126.38 (s, 2 CHar)*, 120.06 (dd, *J* = 14.9; 3.6 Hz, CHar)*, 119.49-119.40 (m, CHar), 111.55-111.54 (m, CHar), 111.33 (d, *J* = 21.3 Hz, CHar)*, 103.24 (t, *J* = 25.5 Hz, CHar), 103.12 (t, *J* = 25.5 Hz, CHar)*, 63.06 (d, *J* = 6.0 Hz, O-CH₂CH₃)*, 63.02 (d, *J* = 6.9 Hz, O-CH₂CH₃), 62.43 (d, *J* = 7.2 Hz, O-CH₂CH₃)*, 62.30 (d, *J* = 7.0 Hz, O-CH₂CH₃), 55.84 (d, *J* = 13.0 Hz, H(C)CH₃)*, 55.13 (d, *J* = 17.3 Hz, H(C)CH₃), 49.69 (d, *J* = 156.7 Hz, H-C-P)*, 49.59 (d, *J* = 160.5 Hz, H-C-P), 24.40 (s, H(C)CH₃),

22.27 (s, H(C)CH₃)*, 16.21 (d, $J = 5.8$ Hz, O-CH₂CH₃)*, 16.11 (d, $J = 6.1$ Hz, O-CH₂CH₃), 15.90 (d, $J = 5.7$ Hz, O-CH₂CH₃)*, 15.82 (d, $J = 5.9$ Hz, O-CH₂CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₉H₂₅F₂NO₃P ([M+H]⁺): 384.1540, zmierzone: 384.1539.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₉H₂₄F₂NO₃P: 59.53 C, 6.31 H, 3.65 N, zmierzone: 59.90 C, 6.52 H, 3.69 N.

3.2.3. ((perfluorofenylo)((*R*)-1-fenyletylo)amino)metylofosfonian dimetylu (2.3)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 228 mg, 56%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.35$ -7.14 (m, 5H, 5 CHar)*, 7.35-7.14 (m, 5H, 5 CHar), 4.51 (d, $J = 24.0$ Hz, 1H, H-C-P)*, 4.27 (d, $J = 26.0$ Hz, 1H, H-C-P), 3.88 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H, O-CH₃), 3.88 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.86 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.73 (d, $J = 10.8$ Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.65 (d, $J = 10.8$ Hz, 3H, O-CH₃), 3.61 (qd, $J = 6.5; 1.4$ Hz, 1H, H(C)CH₃), 1.39 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 1.37 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = -142.34$ (s, 2F)*, -141.84 (s, 1F), -144.77 (s, 1F), -155.51 (tm, $J = 20.9$ Hz, 1F)*, -154.58 (tm, $J = 20.8$ Hz, 1F), -162.71 (m, 2F)*, -161.95 (td, $J = 22.0, 8.0$ Hz, 2F) ppm.

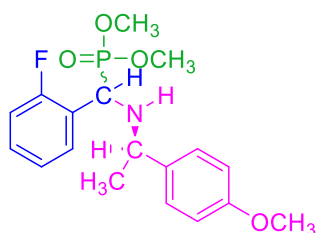
³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 23.04$ (m, 1P)*, 22.75 (m, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 143.88$ (s, Car)*, 142.71 (s, Car), 141.58-141.34 (m, Car), 141.24-141.01 (m, Car)*, 139.87-139.67 (m, Car), 139.57-139.29 (m, Car)*, 138.35-138.14 (m, Car), 138.11-137.78 (m, Car)*, 136.66-136.52 (m, Car), 136.48-136.13 (m, Car)*, 128.54 (s, 2 CHar), 128.19 (s, 2 CHar)*, 127.58 (s, CHar), 127.33 (s, CHar)*, 126.73 (s, 2 CHar), 126.28 (s, 2 CHar)*, 111.18 (t, $J = 15.8$ Hz, Car)*, 111.10 (t, $J = 15.4$ Hz, Car), 57.98 (d, $J = 12.6$ Hz, H(C)CH₃)*, 56.28 (d, $J = 16.9$ Hz, H(C)CH₃), 54.29 (d, $J = 6.8$ Hz, O-CH₃), 54.15 (d, $J = 6.8$ Hz, O-CH₃)*, 53.18 (d, $J = 7.4$ Hz, O-CH₃)*, 52.95 (d, $J = 7.0$ Hz, O-CH₃), 49.48 (d, $J = 161.8$ Hz, H-C-P)*, 48.68 (d, $J = 166.2$ Hz, H-C-P), 24.43 (s, H(C)CH₃), 22.85 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₇H₁₈F₅NO₃P ([M+H]⁺): 410.0944, zmierzone: 410.0941.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₇H₁₇F₅NO₃P: 49.89 C, 4.19 H, 3.42 N, zmierzone: 50.17 C, 4.44 H, 3.48 N.

3.2.4. ((2-fluorofenylo)((*R*)-1-(4-metoksyfenylo)etylo)amino)metylofosfonian dimetylu (2.4)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 249 mg, 68%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.58 (tt, *J* = 7.5; 1.9 Hz, 1H, CHar), 7.50 (tt, *J* = 7.50; 1.9 Hz, 1H, CHar)*, 7.30-7.27 (m, 1H, CHar), 7.26-7.22 (m, 1H, CHar)*, 7.22-7.19 (m, 1H, CHar), 7.16-7.15 (m, 1H, CHar)*, 7.15-7.14 (m, 2H, 2 CHar), 7.14 (dm, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2 CHar)*, 7.04-7.01 (m, 1H, CHar), 7.02-6.99 (m, 1H, CHar)*, 6.86 (dm, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2 CHar), 6.78 (dm, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2 CHar)*, 4.58 (d, *J* = 22.2 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.21 (d, *J* = 23.5 Hz, 1H, H-C-P), 3.87 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.82 (d, *J* = 10.7 Hz, 3H, O-CH₃), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.75 (s, 3H, Ar-OCH₃)*, 3.74 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.53 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.47 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 1.32 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 1.30 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -118.56 (m, 1F), -118.81 (m, 1F)* ppm.

³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 26.42 (d, *J* = 5.9 Hz, 1P)*, 26.07 (d, *J* = 5.8 Hz, 1P) ppm.

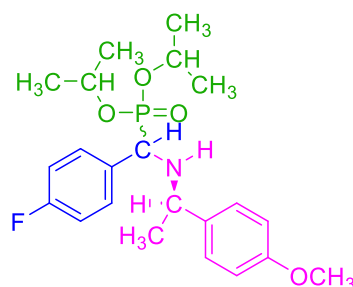
¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 160.99 (dd, *J* = 246.8; 7.1 Hz, Car), 160.46 (dd, *J* = 246.1; 7.5 Hz, Car)*, 158.70 (s, Car), 158.55 (s, Car)*, 136.78 (s, Car)*, 135.57 (s, Car), 129.33 (dd, *J* = 8.1; 2.7 Hz, Car), 129.26-129.16 (m, Car)*, 129.20 (s, CHar), 129.18 (s, CHar)*, 127.93 (s, 2 CHar), 127.56 (s, 2 CHar)*, 124.43 (t, *J* = 2.9 Hz, CHar), 124.32 (t, *J* = 2.8 Hz, CHar)*, 123.49 (d, *J* = 14.6 Hz, CHar)*, 122.98 (d, *J* = 14.3 Hz, CHar), 115.30-115.28 (m, CHar), 115.07 (dd, *J* = 22.5; 1.6 Hz, CHar)*, 113.71 (s, 2 CHar), 113.57 (s, CHar)*, 55.03 (s, Ar-OCH₃)*, 54.96 (d, *J* = 14.2 Hz, H(C)CH₃)*, 54.54 (d, *J* = 17.9 Hz, H(C)CH₃), 54.14 (d, *J* = 6.9 Hz, O-CH₃), 54.05 (d, *J* = 7.0 Hz, O-CH₃)*, 53.29

(d, $J = 7.3$ Hz, O-CH₃)*, 53.09 (d, $J = 7.1$ Hz, O-CH₃), 49.61 (dd, $J = 156.9; 1.9$ Hz, H-C-P)*, 49.45 (d, $J = 161.0$ Hz, H-C-P), 24.50 (s, H(C)CH₃), 22.15 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₈H₂₄FNO₄P ([M+H]⁺): 368.1427, zmierzone: 368.1429.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₈H₂₃FNO₄P: 58.85 C, 6.31 H, 3.81 N, zmierzone: 58.49 C, 6.14 H, 3.74 N.

3.2.5. ((4-fluorofenilo)(((R)-1-(4-metoksyfenylo)etylo)amino)metylo)fosfonian diizopropylu (2.5)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 298 mg, 71%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.31-7.28$ (m, 2H, 2 CHar)*, 7.27-7.26 (m, 2H, 2 CHar), 7.14 (dm, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 7.10 (dm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.03 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.99 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.85 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.79 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 4.79-4.74 (m, 1H, O-C-H)*, 4.74-4.71 (m, 1H, O-C-H), 4.51-4.45 (m, 1H, O-C-H)*, 4.44-4.40 (m, 1H, O-C-H), 4.12 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, H(C)CH₃), 4.00 (d, $J = 21.3$ Hz, 1H, H-C-P)*, 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.79 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.77 (s, Ar-OCH₃)*, 3.66 (d, $J = 22.4$ Hz, 1H, H-C-P), 1.36 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 1.32 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂), 1.32 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 1.30 (d, $J = 6.1$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂), 1.29 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂), 1.29 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 1.24 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 1.19 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂), 0.94 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 0.90 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = -115.31$ (m, 1F), -115.48 (m, 1F)* ppm.

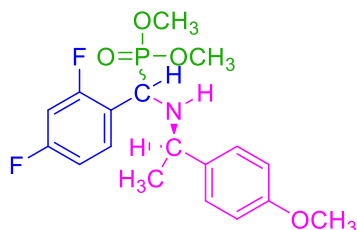
³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 23.06$ (d, $J = 4.7$ Hz, 1P)*, 22.64 (d, $J = 4.9$ Hz, 1P) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.28$ (dd, $J = 245.9$; 3.4 Hz, Car), 162.17 (dd, $J = 245.9$; 3.1 Hz, Car)*, 158.66 (s, Car), 158.55 (s, Car)*, 137.26 (s, Car)*, 135.86 (s, Car), 132.66-132.64 (m, Car)*, 132.07-132.03 (m, Car), 130.32 (t, $J = 7.2$ Hz, CHar), 130.05 (t, $J = 7.4$ Hz, CHar)*, 128.02 (s, 2 CHar), 127.69 (s, 2 CHar)*, 115.07 (dd, $J = 21.2$; 1.9 Hz, CHar), 115.00 (dd, $J = 21.3$; 1.7 Hz, CHar)*, 113.74 (s, 2 CHar), 113.62 (s, 2 CHar)*, 71.63 (d, $J = 7.5$ Hz, O-C-H)*, 71.46 (d, $J = 7.5$ Hz, O-C-H)*, 57.70 (d, $J = 154.8$ Hz, H-C-P)*, 57.49 (d, $J = 158.7$ Hz, H-C-P), 55.14 (s, Ar-OCH₃)*, 54.81 (d, $J = 12.8$ Hz, H(C)CH₃)*, 54.16 (d, $J = 18.0$ Hz, H(C)CH₃), 24.59 (s, H(C)CH₃), 24.12 (d, $J = 3.2$ Hz, O-C(H)(CH₃)₂)*, 24.06 (d, $J = 3.0$ Hz, O-C(H)(CH₃)₂)*, 24.01 (d, $J = 3.2$ Hz, O-C(H)(CH₃)₂), 23.83 (d, $J = 5.3$ Hz, O-C(H)(CH₃)₂)*, 23.24 (d, $J = 5.7$ Hz, O-C(H)(CH₃)₂)*, 23.17 (d, $J = 5.7$ Hz, O-C(H)(CH₃)₂), 22.31 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{FNO}_4\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 424.2053, zmierzone: 424.2060.

Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{FNO}_4\text{P}$: 62.40 C, 7.38 H, 3.31 N, zmierzone: 62.65 C, 7.49 H, 3.23 N.

3.2.6. ((2,4-difluorofenylo)(((R)-1-(4-metoksyfenylo)etylo)amino)metylo)fosfonian dimetylu (2.6)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 199 mg, 51%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.59$ -7.55 (m, 1H, CHar), 7.50-7.46 (m, 1H, CHar)*, 7.13 (dm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.97-6.93 (m, 1H, CHar), 6.90-6.86 (m, 1H, CHar)*, 6.78 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.76-6.74 (m, 1H, CHar)*, 4.50 (d, $J = 22$ Hz, 1H, P-C-H)*, 4.15 (d, $J = 23.1$ Hz, 1H, P-C-H), 3.87 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.82 (d, $J = 10.5$ Hz, 3H, O-CH₃), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.75 (s, 3H, Ar-OCH₃)*, 3.74 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.57 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.51 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H, O-CH₃), 1.32 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 1.30 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -110.39$ (m, 1F), -110.56 (m, 1F)*, -113.80 (m, 1F), -114.09 (m, 1F)* ppm.

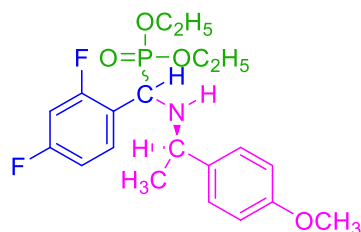
^{31}P NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 26.08$ (m, 1P)*, 25.77 (m, 1P) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.11$ (ddd, $J = 249.3$; 12.2; 2.9 Hz, Car)*, 160.00 (ddd, $J = 248.6$; 12.6; 7.5 Hz, Car)*, 158.73 (s, Car), 158.58 (s, Car)*, 136.60 (s, Car)*, 135.35 (s, Car), 130.26-130.13 (m, Car)*, 127.83 (s, 2 CHar), 127.52 (s, 2 CHar)*, 119.79 (dd, $J = 15.0$; 3.6 Hz, CHar)*, 113.74 (s, 2 CHar), 113.55 (s, 2 CHar)*, 111.59 (d, $J = 21.4$ Hz, CHar)*, 103.59 (t, $J = 26.1$ Hz, CHar)*, 55.18 (d, $J = 13.2$ Hz, H(C)CH₃)*, 55.01 (s, Ar-OCH₃)*, 54.49 (d, $J = 17.5$ Hz, H(C)CH₃), 54.00 (d, $J = 6.9$ Hz, O-CH₃)*, 53.13 (d, $J = 7.2$ Hz, O-CH₃)*, 52.95 (d, $J = 7.1$ Hz, O-CH₃), 49.31 (d, $J = 157.1$ Hz, H-C-P)*, 49.08 (d, $J = 161.4$ Hz, H-C-P), 24.51 (s, H(C)CH₃), 22.28 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{NO}_4\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 386.1333, zmierzone: 386.1334.

Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{NO}_4\text{P}$: 56.10 C, 5.75 H, 3.63 N, zmierzone: 56.14 C, 5.44 H, 3.67 N.

3.2.7. ((2,4-difluorofenilo)(((R)-1-(4-metoksyfenilo)etylo)amino)metylo)fosfonian dietylu (2.7)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 177 mg, 54%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.59$ -7.54 (m, 1H, CHar), 7.50-7.45 (m, 1H, CHar)*, 7.13 (dm, $J = 8.4$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 7.14-7.11 (m, 2H, 2 CHar), 6.95 (td, $J = 8.3$; 2.4 Hz, 1H, CHar), 6.87 (td, $J = 8.4$; 2.4 Hz, 1H, CHar)*, 6.86 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.80-6.78 (m, 1H, CHar), 6.78 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.76-6.72 (m, 1H, CHar)*, 4.47 (d, $J = 22.1$ Hz, 1H, H-C-P)*, 4.30-4.23 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 4.23-4.18 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 4.21-4.17 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 4.17-4.12 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 4.12 (d, $J = 22.8$ Hz, 1H, H-C-P), 4.00-3.94 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 3.94-3.90 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 3.89-3.83 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 3.82-3.79 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.76 (s, Ar-OCH₃)*, 3.75 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.48 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H(C)CH₃), 1.36 (td, $J = 7.1$; 0.4 Hz, 3H, O-CH₂CH₃)*, 1.33-1.29 (m, 3H, O-CH₂CH₃),

1.32 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 1.30 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H(C)CH₃), 1.13 (td, $J = 7.1$; 0.3 Hz, 3H, O-CH₂CH₃)*, 1.09 (td, $J = 7.1$; 0.4 Hz, 3H, O-CH₂CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = -111.22$ (m, 1F), -111.40 (m, 1F)*, -114.22 (m, 1F), -114.53 (m, 1F)* ppm.

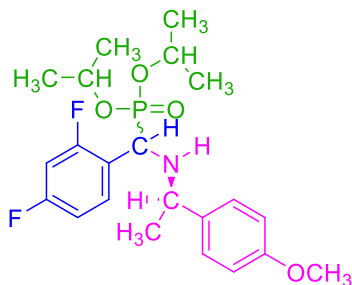
³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 23.76$ (m, 1P)*, 23.29 (m, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 162.09$ (ddd, $J = 248.9$; 12.0; 3.0 Hz, Car)*, 161.51 (ddd, $J = 248.6$; 11.9; 7.4 Hz, Car)*, 158.74 (s, Car), 158.59 (s, Car)*, 136.80 (s, Car)*, 135.57 (s, Car), 130.32 - 130.19 (m, Car)*, 127.88 (s, 2 CHar), 127.56 (s, 2 CHar)*, 120.19 (dd, $J = 15.0$; 3.7 Hz, CHar)*, 119.61 - 119.49 (m, CHar), 113.72 (s, 2 CHar), 113.58 (s, 2 CHar)*, 111.73 - 111.67 (m, CHar), 111.46 (dm, $J = 21.2$ Hz, CHar)*, 103.26 (t, $J = 26.0$ Hz, CHar)*, 63.26 (d, $J = 6.9$ Hz, O-CH₂CH₃)*, 62.62 (d, $J = 7.2$ Hz, O-CH₂CH₃)*, 62.49 (d, $J = 7.2$ Hz, O-CH₂CH₃), 55.25 (d, $J = 13.2$ Hz, H(C)CH₃)*, 55.05 (s, Ar-OCH₃)*, 54.56 (d, $J = 17.3$ Hz, H(C)CH₃), 49.74 (d, $J = 156.8$ Hz, H-C-P)*, 49.56 (d, $J = 161.5$ Hz, H-C-P), 24.54 (s, H(C)CH₃), 22.37 (s, H(C)CH₃)*, 16.33 (d, $J = 5.8$ Hz, O-CH₂CH₃)*, 16.24 (d, $J = 5.9$ Hz, O-CH₂CH₃), 16.02 (d, $J = 5.7$ Hz, O-CH₂CH₃)*, 15.94 (d, $J = 5.9$ Hz, O-CH₂CH₃) ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₂₀H₂₇F₂NO₄P ([M+H]⁺): 414.1646, zmierzone: 414.1648.

Analiza elementarna obliczona dla C₂₀H₂₆F₂NO₄P: 58.11 C, 6.34 H, 3.39 N, zmierzone: 57.85 C, 6.22 H, 3.40 N.

3.2.8. ((2,4-difluorofenylo)(((R)-1-(4-metoksyfenylo)etylo)amino)metylo)fosfonian diizopropylu (2.8)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 387 mg, 88%

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.63$ - 7.59 (m, 1H, CHar), 7.48 (dm, $J = 8.5$ Hz, 1H, CHar)*, 7.11 (dm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 7.03 (td, $J = 8.5$; 2.5 Hz, 1H, CHar), 6.93

(td, $J = 8.3$; 2.5 Hz, 1H, CHar)*, 6.86 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.86-6.81 (m, 1H, CHar)*, 6.75 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 4.81-4.75 (m, 1H, O-C-H)*, 4.73-4.68 (m, 1H, O-C-H), 4.52-4.47 (m, 1H, O-C-H)*, 4.45-4.41 (m, 1H, O-C-H), 4.35 (d, $J = 22.3$ Hz, 1H, H-C-P)*, 4.04 (d, $J = 23.6$ Hz, 1H, H-C-P), 3.77 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$)*, 3.77 (s, 3H, Ar-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 3.72 (s, 3H, Ar-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)*, 3.44 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 1.39 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 1.33 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 1.31 (m, 3H, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂), 1.30 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 1.30-1.28 (m, 6H, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂), 1.24 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 1.19 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂), 1.02 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)*, 0.98 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CD₃OD): $\delta = -111.47$ (m, 1F), -111.62 (m, 1F)*, -113.94 (m, 1F), -114.44 (m, 1F)* ppm.

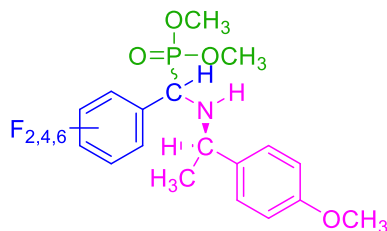
³¹P NMR (300 MHz, CD₃OD): $\delta = 22.07$ (t, $J = 5.3$ Hz, 1P)*, 21.69 (t, $J = 5.3$ Hz, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): $\delta = 162.39$ (ddd, $J = 259.8$; 12.3; 3.2 Hz, Car)*, 160.63 (ddd, $J = 247.8$; 12.2; 7.5 Hz, Car)*, 159.14 (s, Car), 158.92 (s, Car)*, 136.71 (s, Car)*, 135.36 (s, Car), 130.61 - 130.48 (m, Car)*, 130.44 - 130.33 (m, Car), 127.88 (s, 2 CHar), 127.45 (s, 2 CHar)*, 120.55 (dd, $J = 15.0$; 3.7 Hz, CHar)*, 113.55 (s, 2 CHar), 113.38 (s, 2 CHar)*, 111.23 (dt, $J = 20.9$; 2.3 Hz, CHar), 111.04 (dt, $J = 21.5$; 3.0 Hz, CHar)*, 103.25 - 102.89 (m, CHar), 103.00 - 102.64 (m, CHar)*, 72.26 (d, $J = 7.5$ Hz, O-C-H)*, 72.15 (d, $J = 7.4$ Hz, O-C-H), 71.87 (d, $J = 7.8$ Hz, O-C-H)*, 71.79 (d, $J = 7.6$ Hz, O-C-H), 55.96 (d, $J = 13.0$ Hz, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)*, 54.63 (d, $J = 17.7$ Hz, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 54.34 (s, Ar-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 54.31 (s, Ar-O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)*, 50.39 (d, $J = 160.6$ Hz, H-C-P)*, 50.04 (d, $J = 161.3$ Hz, H-C-P), 23.37 (s, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 23.12 (d, $J = 3.3$ Hz, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 23.06 (d, $J = 3.4$ Hz, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂), 22.98 (d, $J = 3.6$ Hz, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 22.94 (d, $J = 3.8$ Hz, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂), 22.88 (d, $J = 5.2$ Hz, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 22.38 (d, $J = 5.3$ Hz, O-C(H)($\underline{\text{C}}\text{H}_3$)₂)*, 21.68 (s, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₂₂H₃₁F₂NO₄P ([M+H]⁺): 442.1959, zmierzone: 442.1964.

Analiza elementarna obliczona dla C₂₂H₃₀F₂NO₄P: 59.86 C, 6.85 H, 3.17 N, zmierzone: 60.05 C, 6.79 H, 3.24 N.

3.2.9. (((R)-1-(4-metoksyfenylo)etylo)amino)(2,4,6-trifluorofenylo)metylofosfonian dimetylu (2.9)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 127 mg, 40%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.15 (d, J = 8.8 Hz, 2H, 2 CHar), 7.14 (dm, J = 8.7 Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.86 (dm, J = 8.8 Hz, 2H, 2 CHar), 6.76 (dm, J = 8.7 Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.60 (t, J = 8.8 Hz, 2H, 2 CHar)*, 4.51 (d, J = 24.5 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.23 (d, J = 26.2 Hz, 1H, H-C-P), 3.86 (d, J = 10.5 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.85 (d, J = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 3.81 (q, J = 6.4 Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$)*, 3.80 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.75 (s, 3H, Ar-OCH₃)*, 3.68 (d, J = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.60 (d, J = 10.7 Hz, 3H, O-CH₃), 3.56 (q, J = 6.3 Hz, 1H, $\underline{\text{H}}(\text{C})\text{CH}_3$), 1.33 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)*, 1.33 (d, J = 6.6 Hz, 3H, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = -108.36 (m, 1F), -108.82 (m, 1F)*, -109.53 – -111.99 (m, 2F and 2F*) ppm.

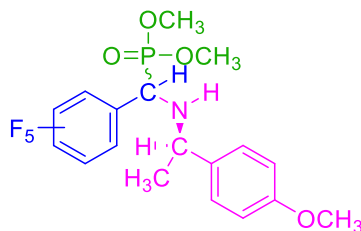
^{31}P NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 24.73 (m, 1P)*, 24.34 (m, 1P) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ = 162.98-162.57 (m, Car)*, 161.39-160.80 (m, 2 Car)*, 158.88 (s, Car), 158.70 (s, Car)*, 136.45 (s, Car)*, 135.19 (s, Car), 127.97 (s, 2 CHar), 127.53 (s, 2 CHar)*, 113.81 (s, 2 CHar), 113.64 (s, 2 CHar)*, 109.54-109.27 (m, Car)*, 108.37-108.21 (m, Car), 100.68-100.54 (m, 2 CHar), 100.50-100.11 (m, 2 CHar)*, 56.27 (d, J = 12.7 Hz, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)*, 55.35 (d, J = 17.5 Hz, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 55.08 (s, Ar-OCH₃)*, 55.06 (s, Ar-OCH₃), 54.21 (d, J = 6.8 Hz, O-CH₃), 54.03 (d, J = 6.9 Hz, O-CH₃)*, 53.19 (d, J = 7.4 Hz, O-CH₃)*, 52.94 (d, J = 7.0 Hz, O-CH₃), 48.53 (d, J = 160.8 Hz, H-C-P)*, 48.02 (d, J = 166.5 Hz, H-C-P), 24.62 (s, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22.63 (s, H(C) $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{NO}_4\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 404.1238, zmierzone: 404.1236.

Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{NO}_4\text{P}$: 53.60 C, 5.25 H, 3.47 N, zmierzone: 53.84 C, 5.56 H, 3.80 N.

3.2.10. (((*R*)-1-(4-metoksyfenylo)etylo)amino)(perfluorofenylo)metylofosfonian dimetylu (2.10)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 109 mg, 32%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.14$ (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 4.49 (d, $J = 24.5$ Hz, 1H, H-C-P)*, 4.25 (d, $J = 25.9$ Hz, 1H, H-C-P), 3.88 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H, O-CH₃), 3.87 (d, $J = 10.6$ Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.82 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 3.81 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH₃)*, 3.73 (d, $J = 10.7$ Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.65 (d, $J = 10.8$ Hz, 3H, O-CH₃), 3.55 (qd, $J = 6.4$; 1.0 Hz, 1H, H(C)CH₃), 1.37 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 1.35 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -141.62$ (s, 1F), -144.67 (s, 1F), -142.13 (d, $J = 18.7$ Hz, 2F)*, -154.40 (td, $J = 20.9$; 4.8 Hz, 1F), -155.43 (td, $J = 20.9$; 4.6 Hz, 1F)*, -161.80 (td, $J = 21.9$; 8.0 Hz, 2F), -162.57 (m, 2F)* ppm.

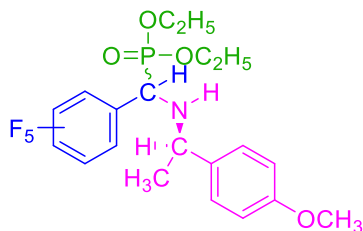
^{31}P NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.24$ (m, 1P)*, 22.97 (m, 1P) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 159.10$ (s, Car), 158.91 (s, Car)*, 141.40-141.07 (m, Car)*, 139.67-139.39 (m, Car)*, 138.22-137.92 (m, Car)*, 136.75-136.25 (m, Car)*, 136.13-135.94 (m, Car)*, 134.82-134.62 (m, Car), 127.92 (s, 2 CHar), 127.52 (s, 2 CHar)*, 114.02 (s, 2 CHar), 113.66 (s, 2 CHar)*, 111.30 (t, $J = 17.6$ Hz, Car)*, 110.15 (t, $J = 17.2$ Hz, Car), 57.32 (d, $J = 12.7$ Hz, H(C)CH₃)*, 55.71 (d, $J = 17.1$ Hz, H(C)CH₃), 55.17 (s, Ar-OCH₃)*, 55.16 (s, Ar-OCH₃), 54.54 (d, $J = 6.8$ Hz, O-CH₃), 54.37 (d, $J = 6.9$ Hz, O-CH₃)*, 53.39 (d, $J = 7.4$ Hz, O-CH₃)*, 53.15 (d, $J = 7.1$ Hz, O-CH₃), 49.42 (d, $J = 161.9$ Hz, H-C-P)*, 48.62 (d, $J = 166.8$ Hz, H-C-P), 24.59 (s, H(C)CH₃), 22.93 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_5\text{NO}_4\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 440.1050, zmierzone: 440.1049.

Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{F}_5\text{NO}_4\text{P}$: 49.21 C, 4.36 H, 3.19 N, zmierzone: 49.17 C, 4.40 H, 3.34 N.

3.2.11. (((*R*)-1-(4-metoksyfenylo)etylo)amino)(perfluorofenylo)metylo)fosfonian dietylu (2.11)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 129 mg, 35%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.15$ (dm, $J = 8.6$ Hz, 2H, 2 CHar), 7.12 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 6.87 (dm, $J = 8.7$ Hz, 2H, 2 CHar), 6.75 (dm, $J = 8.8$ Hz, 2H, 2 CHar)*, 4.45 (d, $J = 24.4$ Hz, 1H, H-C-P)*, 4.27-4.17 (m, 2H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 4.27-4.17 (m, 2H, O-CH $_2$ CH $_3$), 4.22 (d, $J = 21.2$ Hz, H-C-P), 4.13-4.02 (m, 2H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 4.13-4.02 (m, 1H, O-CH $_2$ CH $_3$), 4.01-3.96 (m, 1H, O-CH $_2$ CH $_3$), 3.84 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, H(C)CH $_3$)*, 3.81 (s, 3H, Ar-OCH $_3$), 3.76 (s, 3H, Ar-OCH $_3$)*, 3.56 (qd, $J = 6.4$; 1.2 Hz, 1H, H(C)CH $_3$), 1.36-1.33 (m, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 1.36-1.33 (m, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$), 1.36-1.33 (m, 3H, H(C)CH $_3$)*, 1.36-1.33 (m, 3H, H(C)CH $_3$), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -141.49$ (s, 1F), -144.72 (s, 1F), -141.99 (s, 2F)*, -154.76 (td, $J = 20.8$; 4.9 Hz, 1F), -155.77 (td, $J = 21.0$; 4.7 Hz, 1F)*, -162.13 (s, 2F), -162.87 (s, 2F)* ppm.

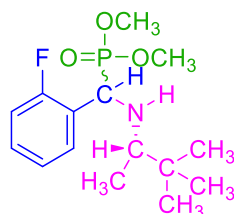
^{31}P NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.81$ (m, 1P)*, 20.39 (m, 1P) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 159.11$ (s, Car), 158.93 (s, Car)*, 141.22-141.00 (m, Car)*, 139.53-139.35 (m, Car)*, 138.30-137.99 (m, Car)*, 136.53-136.28 (m, Car)*, 136.22 (s, Car)*, 134.90 (s, Car), 128.02 (s, 2 CHar), 127.61 (s, 2 CHar)*, 114.00 (s, 2 CHar), 113.69 (s, 2 CHar)*, 111.81 (t, $J = 14.5$ Hz, Car)*, 110.80-110.54 (m, Car), 63.75 (d, $J = 6.8$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$), 63.62 (d, $J = 6.9$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 62.86 (d, $J = 7.4$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 62.70 (d, $J = 6.9$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$), 57.26 (d, $J = 12.2$ Hz, H(C)CH $_3$)*, 55.77 (d, $J = 16.9$ Hz, H(C)CH $_3$), 55.23 (s, Ar-OCH $_3$)*, 50.05 (d, $J = 160.6$ Hz, H-C-P)*, 49.40 (d, $J = 165.8$ Hz, H-C-P), 24.71 (s, H(C)CH $_3$), 23.03 (s, H(C)CH $_3$)*, 16.42 (d, $J = 5.7$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 16.40 (d, $J = 6.0$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$), 16.25 (d, $J = 5.8$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 16.14 (d, $J = 6.1$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$) ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₂₀H₂₄F₅NO₄P ([M+H]⁺): 468.1363, zmierzone: 468.1362.

Analiza elementarna obliczona dla C₂₀H₂₃F₅NO₄P: 51.40 C, 4.96 H, 3.00 N, zmierzone: 51.69 C, 5.33 H, 3.34 N.

3.2.12. (((S)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(2-fluorofenylo)metylofosfonian dimetylu (2.12)



Związek otrzymano w postaci żółtego oleju, 212 mg, 67%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.61-7.59 (m, 1H, CHar), 7.57 (tt, *J* = 7.5; 2.0 Hz, 1H, CHar)*, 7.29-7.24 (m, 1H, CHar)*, 7.29-7.24 (m, 1H, CHar), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, CHar)*, 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, CHar), 7.06-7.03 (m, 1H, CHar)*, 7.06-7.03 (m, 1H, CHar), 4.63 (d, *J* = 22.7 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.48 (d, *J* = 23.6 Hz, 1H, H-C-P), 3.90 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 3.86 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.59 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.51 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 2.24 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, H(C)CH₃), 2.09 (qd, *J* = 6.3; 0.9 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, C(CH₃)₃)*, 0.78 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -119.42 (m, 1F), -119.55 (m, 1F)* ppm.

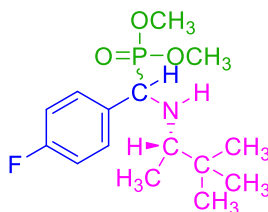
³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 26.39 (d, *J* = 6.3 Hz, 1P)*, 26.04 (d, *J* = 6 Hz, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 160.98 (dd, *J* = 245.9; 7.6 Hz, Car)*, 160.42 (dd, *J* = 245.5; 7.7 Hz, Car), 129.55 (t, *J* = 3.9 Hz, Car)*, 129.41 (t, *J* = 3.9 Hz, Car), 129.13-129.05 (m, CHar)*, 124.21 (t, *J* = 3.0 Hz, CHar), 124.13 (t, *J* = 3.0 Hz, CHar)*, 123.09 (dd, *J* = 14.2; 2.1 Hz, CHar)*, 115.03 (dd, *J* = 22.7; 1.9 Hz, CHar)*, 61.92 (d, *J* = 15.4 Hz, H(C)CH₃), 58.24 (d, *J* = 15.7 Hz, H(C)CH₃)*, 54.16 (d, *J* = 6.8 Hz, O-CH₃)*, 53.14 (d, *J* = 7.0 Hz, O-CH₃)*, 53.10 (dd, *J* = 159.3; 2.2 Hz, H-C-P), 52.81 (d, *J* = 7.3 Hz, O-CH₃), 49.20 (d, *J* = 158.5 Hz, H-C-P)*, 35.26 (s, C(CH₃)₃), 33.78 (s, C(CH₃)₃)*, 26.14 (s, C(CH₃)₃)*, 26.14 (s, C(CH₃)₃), 17.04 (s, H(C)CH₃), 13.32 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₅H₂₆FNO₃P ([M+H]⁺): 318.1634, zmierzone: 318.1625.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₅H₂₅FNO₃P: 56.77 C, 7.94 H, 4.41 N, zmierzone: 57.14 C, 8.05 H, 4.32 N.

3.2.13. (((S)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(4-fluorofenylo)metylofosfonian dimetylu (2.13)



Związek otrzymano w postaci białego ciała stałego, 246 mg, 39%

Temperatura topnienia = 79-81°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.42-7.41 (m, 2H, 2 CHar), 7.40-7.37 (m, 2H, 2 CHar)*, 7.06-7.02 (m, 2H, 2 CHar)*, 7.06-7.02 (m, 2H, 2 CHar), 4.17 (d, *J* = 21.0 Hz, 1H, H-C-P)*, 3.98 (d, *J* = 22.6 Hz, 1H, H-C-P), 3.84 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, O-CH₃), 3.77 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.60 (d, *J* = 10.4 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.49 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, O-CH₃), 2.25 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, H(C)CH₃), 2.09 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, C(CH₃)₃)*, 0.77 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -114.97 (m, 1F)*, -115.03 (m, 1F) ppm.

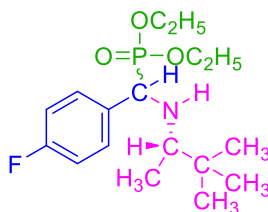
³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 26.74 (d, *J* = 5.2 Hz, 1P)*, 26.46 (d, *J* = 4.8 Hz, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 162.36 (dd, *J* = 246.3; 3.5 Hz, Car)*, 133.61 (d, *J* = 2.7 Hz, Car), 131.59 (t, *J* = 3.6 Hz, Car)*, 130.32 (dd, *J* = 8.0; 6.6 Hz, 2 CHar)*, 130.01 (dd, *J* = 8.0; 6.8 Hz, 2 CHar), 115.26 (dd, *J* = 21.4; 2.0 Hz, 2 CHar), 115.21 (dd, *J* = 21.5; 2.4 Hz, 2 CHar)*, 61.77 (d, *J* = 14.8 Hz, H(C)CH₃), 60.97 (d, *J* = 154.8 Hz, H-C-P), 57.82 (d, *J* = 15.7 Hz, H(C)CH₃)*, 57.28 (d, *J* = 154.7 Hz, H-C-P)*, 53.97 (d, *J* = 7.0 Hz, O-CH₃), 53.88 (d, *J* = 7.0 Hz, O-CH₃)*, 53.34 (d, *J* = 6.9 Hz, O-CH₃)*, 52.95 (d, *J* = 7.1 Hz, O-CH₃), 35.42 (s, C(CH₃)₃), 33.99 (s, C(CH₃)₃)*, 26.32 (s, C(CH₃)₃)*, 26.30 (s, C(CH₃)₃), 17.25 (s, H(C)CH₃), 13.15 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₅H₂₆FNO₃P ([M+H]⁺): 318.1634, zmierzone: 318.1629.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₅H₂₅FNO₃P: 56.77 C, 7.94 H, 4.41 N, zmierzone: 56.71 C, 8.31 H, 4.38 N.

3.2.14. (((S)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(4-fluorofenylo)metylofosfonian dietylu (2.14)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 134 mg, 39%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.42-7.40 (m, 2H, 2 CHar), 7.40-7.37 (m, 2H, 2 CHar)*, 7.05-7.01 (m, 2H, 2 CHar)*, 4.21-4.08 (m, 2H, O-CH₂CH₃)*, 4.21-4.08 (m, 2H, O-CH₂CH₃), 4.21-4.08 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 4-21-4.08 (m, 1H, H-C-P), 4.15 (d, J = 21.1 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.03-3.98 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 3.93-3.88 (m, 1H, O-CH₂CH₃)*, 3.76-3.72 (m, 1H, O-CH₂CH₃), 2.26 (q, J = 6.6 Hz, 1H, H(C)CH₃), 2.09 (qd, J = 6.4; 0.9 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 1.32 (td, J = 7.1; 0.4 Hz, 3H, O-CH₂CH₃), 1.29 (td, J = 7.1; 0.5 Hz, 3H, O-CH₂CH₃)*, 1.17 (td, J = 7.1; 0.4 Hz, 3H, O-CH₂CH₃)*, 1.09 (td, J = 7.1; 0.4 Hz, 3H, O-CH₂CH₃), 0.93 (d, J = 6.4 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, C(CH₃)₃)*, 0.77 (d, J = 6.7 Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -115.21 (m, 1F)*, -115.31 (m, 1F) ppm.

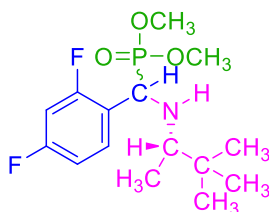
³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 24.55 (d, J = 5.3 Hz, 1P)*, 24.26 (d, J = 4.8 Hz, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 162.30 (dd, J = 246.0; 3.5 Hz, Car)*, 133.70 (d, J = 3.2 Hz, Car), 131.70 (d, J = 3.8 Hz, Car)*, 130.35 (dd, J = 7.9; 6.6 Hz, 2 CHar)*, 130.05 (dd, J = 7.8; 6.7 Hz, 2 CHar), 115.09 (dd, J = 21.4; 2.0 Hz, 2 CHar), 115.03 (dd, J = 21.4; 2.5 Hz, 2 CHar)*, 63.25 (d, J = 7.0 Hz, O-CH₂CH₃)*, 62.85 (d, J = 7.0 Hz, O-CH₂CH₃)*, 62.52 (d, J = 7.2 Hz, O-CH₂CH₃), 62.86 (d, J = 14.8 Hz, H(C)CH₃), 61.11 (d, J = 154.7 Hz, H-C-P), 57.82 (d, J = 15.7 Hz, H(C)CH₃)*, 57.47 (d, J = 154.8 Hz, H-C-P)*, 35.41 (s, C(CH₃)₃), 34.00 (s, C(CH₃)₃)*, 26.30 (s, C(CH₃)₃)*, 20.74 (s, C(CH₃)₃), 17.15 (s, H(C)CH₃), 16.41 (d, J = 6.0 Hz, O-CH₂CH₃), 16.30 (d, J = 5.8 Hz, O-CH₂CH₃)*, 16.16 (d, J = 5.7 Hz, O-CH₂CH₃)*, 16.09 (d, J = 5.9 Hz, O-CH₂CH₃), 13.13 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₇H₃₀FNO₃P ([M+H]⁺): 346.1947, zmierzone: 346.1941.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₇H₂₉FNO₃P: 59.12 C, 8.46 H, 4.06 N, zmierzone: 59.23 C, 8.71 H, 4.09 N.

3.2.15. ((2,4-difluorofenylo)(((S)-3,3-dimetylobutan-2-yl)amino)metylo)fosfonian dimetylu (2.15)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 174 mg, 52%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.59-7.55 (m, 1H, CHar)*, 6.93 (td, *J* = 8.5; 2.3 Hz, 1H, CHar)*, 6.83-6.79 (m, 1H, CHar)*, 4.57 (d, *J* = 22.5 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.42 (d, *J* = 23.7 Hz, 1H, H-C-P), 3.91 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 3.86 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.63 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.55 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 2.22 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, H(C)CH₃), 2.06 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.84 (s, 9H, C(CH₃)₃)*, 0.78 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -111.11 (m, 1F)*, -111.11 (m, 1F), -115.18 (m, 1F), -115.34 (m, 1F)* ppm.

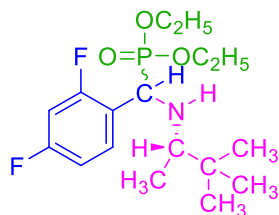
³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 26.15 (m, 1P)*, 25.81 (m, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 162.23 (ddd, *J* = 249.2; 12.2; 3.1 Hz, Car)*, 161.00 (ddd, *J* = 248.5; 11.9; 7.6 Hz, Car)*, 130.74-130.61 (m, Car)*, 130.57-130.44 (m, Car), 119.11 (dt, *J* = 14.5; 2.6 Hz, CHar)*, 111.62 (dt, *J* = 21.4; 3.2 Hz, CHar)*, 103.61-103.25 (m, CHar)*, 62.10 (d, *J* = 15.3 Hz, H(C)CH₃), 58.44 (d, *J* = 15.6 Hz, H(C)CH₃)*, 54.32 (d, *J* = 6.8 Hz, O-CH₃)*, 53.27 (d, *J* = 7.2 Hz, O-CH₃)*, 52.92 (d, *J* = 7.4 Hz, O-CH₃), 48.92 (d, *J* = 159.8 Hz, H-C-P)*, 35.29 (s, C(CH₃)₃), 33.85 (s, C(CH₃)₃)*, 26.17 (s, C(CH₃)₃)*, 17.05 (s, H(C)CH₃), 13.38 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₅H₂₅F₂NO₃P ([M+H]⁺): 336.1540, zmierzone: 336.1534.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₅H₂₄F₂NO₃P: 53.73 C, 7.21 H, 4.18 N, zmierzone: 53.44 C, 7.53 H, 4.09 N.

3.2.16. ((2,4-difluorofenylo)((*S*)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)metylofosfonian dietylu (2.16)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 187 mg, 65%

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.62\text{--}7.59$ (m, 1H, CHar), $7.59\text{--}7.55$ (m, 1H, CHar)*, 6.92 (td, $J = 8.4; 2.4$ Hz, 1H, CHar)*, 6.92 (td, $J = 8.4; 2.4$ Hz, 1H, CHar), $6.81\text{--}6.78$ (m, 1H, CHar)*, $6.81\text{--}6.78$ (m, 1H, CHar), 4.54 (d, $J = 22.3$ Hz, 1H, H-C-P)*, 4.40 (d, $J = 23.7$ Hz, 1H, H-C-P), $4.28\text{--}4.16$ (m, 2H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, $4.28\text{--}4.16$ (m, 2H, O-CH $_2$ CH $_3$), $4.05\text{--}3.98$ (m, 1H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, $3.97\text{--}3.90$ (m, 1H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, $3.97\text{--}3.90$ (m, 1H, O-CH $_2$ CH $_3$), $3.84\text{--}3.80$ (m, 1H, O-CH $_2$ CH $_3$), 2.23 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H(C)CH $_3$), 2.06 (qd, $J = 6.3; 0.9$ Hz, 1H, H(C)CH $_3$)*, 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$), 1.33 (td, $J = 7.1; 0.5$ Hz, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 1.16 (td, $J = 7.1; 0.4$ Hz, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 1.11 (td, $J = 7.1; 0.3$ Hz, 3H, O-CH $_2$ CH $_3$), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H(C)CH $_3$)*, 0.90 (s, 9H, C(CH $_3$) $_3$), 0.84 (s, 9H, C(CH $_3$) $_3$)*, 0.78 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H(C)CH $_3$) ppm.

^{19}F NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = -111.48$ (m, 1F)*, -111.48 (m, 1F), -115.15 (m, 1F), -115.33 (m, 1F)* ppm.

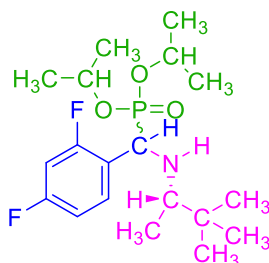
^{31}P NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.77$ (m, 1P)*, 23.45 (m, 1P) ppm.

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 162.15$ (ddd, $J = 248.8; 12.2; 3.2$ Hz, Car)*, 161.10 (ddd, $J = 248.4; 11.9; 7.5$ Hz, Car)*, $130.82\text{--}130.69$ (s, Car)*, $130.62\text{--}130.50$ (m, Car), 119.52 (dt, $J = 14.4; 3.0$ Hz, CHar)*, 111.45 (dt, $J = 21.3; 3.2$ Hz, CHar)*, $103.45\text{--}103.09$ (m, CHar)*, 63.50 (d, $J = 6.7$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 63.42 (d, $J = 7.1$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$), 62.72 (d, $J = 7.1$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 62.44 (d, $J = 7.4$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$), 62.06 (d, $J = 15.0$ Hz, H(C)CH $_3$), 58.41 (d, $J = 15.5$ Hz, H(C)CH $_3$)*, 52.92 (d, $J = 158.8$ Hz, H-C-P), 49.25 (d, $J = 159.0$ Hz, H-C-P)*, 35.50 (s, C(CH $_3$) $_3$), 33.91 (s, C(CH $_3$) $_3$)*, 26.21 (s, C(CH $_3$) $_3$)*, 17.02 (s, H(C)CH $_3$), 16.40 (d, $J = 5.9$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$), 16.28 (d, $J = 5.9$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 16.08 (d, $J = 5.8$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$)*, 16.01 (d, $J = 5.9$ Hz, O-CH $_2$ CH $_3$), 13.40 (s, H(C)CH $_3$)* ppm.

HRMS (ESI $^+$) obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{F}_2\text{NO}_3\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 364.1853, zmierzone: 364.1849.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₇H₂₈F₂NO₃P: 56.19 C, 7.77 H, 3.85 N, zmierzone: 56.33 C, 7.73 H, 3.94 N.

3.2.17. ((2,4-difluorofenylo)(((S)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)metylo)fosfonian diizopropylu (2.17)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 213 mg, 54%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.63-7.60 (m, 1H, CHar), 7.59-7.55 (m, 1H, CHar)*, 6.90 (td, *J* = 8.4; 2.5 Hz, 1H, CHar)*, 6.80-6.76 (m, 1H, CHar)*, 4.84-4.77 (m, 1H, O-C-H), 4.57-4.52 (m, 1H, O-C-H)*, 4.47 (d, *J* = 22.7 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.48-4.43 (m, 1H, O-C-H), 4.35 (d, *J* = 23.6 Hz, 1H, H-C-P), 2.24 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, H(C)CH₃), 2.04 (qd, *J* = 6.4; 1.0 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 1.35 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 1.34 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂), 1.32 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 1.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 1.22 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂), 1.04 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, O-C(H)(CH₃)₂)*, 0.95 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.84 (s, 9H, C(CH₃)₃)*, 0.77 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -111.84 (m, 1F)*, -111.84 (m, 1F), -115.01 (m, 1F), -115.26 (m, 1F)* ppm.

³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 22.16 (m, 1P)*, 22.00 (m, 1P) ppm.

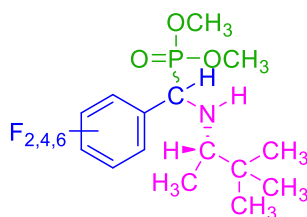
¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 161.97 (ddd, *J* = 248.5; 12.0; 3.0 Hz, Car)*, 161.41 (ddd, *J* = 248.3; 11.8; 7.5 Hz, Car)*, 130.75-130.63 (m, Car)*, 130.59-130.53 (m, Car), 121.99 (dd, *J* = 15.2; 3.8 Hz, CHar), 119.91 (dm, *J* = 14.5 Hz, CHar)*, 111.21 (dt, *J* = 21.2; 2.9 Hz, CHar)*, 103.22-102.86 (m, CHar)*, 71.63 (d, *J* = 7.0 Hz, O-C-H)*, 71.36 (d, *J* = 7.3 Hz, O-C-H), 71.02 (d, *J* = 7.3, O-C-H)*, 70.93 (d, *J* = 7.6 Hz, O-C-H), 61.74 (d, *J* = 14.5 Hz, H(C)CH₃), 58.19 (d, *J* = 15.7 Hz, H(C)CH₃)*, 53.04 (d, *J* = 159.3 Hz, H-C-P), 49.40 (d, *J* = 161.0 Hz, H-C-P)*, 35.22 (s, C(CH₃)₃), 33.82 (s, C(CH₃)₃)*, 26.19 (s, C(CH₃)₃), 26.16 (s, C(CH₃)₃)*, 24.14 (d, *J* = 3.8 Hz, O-C(H)(CH₃)₂), 24.08 (d, *J* = 3.0 Hz, O-C(H)(CH₃)₂)*, 23.96 (d, *J* = 3.2 Hz, O-C(H)(CH₃)₂), 23.87 (d, *J* = 3.4 Hz,

O-C(H)(CH₃)₂)*, 23.59 (d, *J* = 5.6 Hz, O-C(H)(CH₃)₂)*, 23.23 (d, *J* = 5.4 Hz, O-C(H)(CH₃)₂)*, 23.07 (d, *J* = 5.6 Hz, O-C(H)(CH₃)₂), 16.89 (s, H(C)CH₃), 13.27 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₉H₃₃F₂NO₃P ([M+H]⁺): 392.2166, zmierzone: 392.2167.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₉H₃₂F₂NO₃P: 58.30 C, 8.24 H, 3.58 N, zmierzone: 58.44 C, 8.55 H, 3.64 N.

3.2.18. (((*S*)-3,3-dimetylobutan-2-ylo)amino)(2,4,6-trifluorofenylo)metylofosfonian dimetylu (2.18)



Związek otrzymano w postaci białego ciała stałego, 118 mg, 42%

Temperatura topnienia = 61-64°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.70-6.66 (m, 2H, 2 CHar)*, 4.59 (d, *J* = 26.4 Hz, 1H, H-C-P)*, 4.45 (d, *J* = 26.1 Hz, 1H, H-C-P), 3.90 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃), 3.89 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.69 (d, *J* = 10.6 Hz, 3H, O-CH₃)*, 3.66 (d, *J* = 10.7 Hz, 3H, O-CH₃), 2.22 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, H(C)CH₃), 2.14 (qd, *J* = 6.3; 1.2 Hz, 1H, H(C)CH₃)*, 0,94 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, H(C)CH₃)*, 0.89 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, C(CH₃)₃)*, 0.83 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H(C)CH₃) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = -108.12 (m, 1F)*, -108.20 (m, 1F), -111.38 (bs, 2F)*, -109.59 (bs, 2F) ppm.

³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 24.40 (m, 1P)*, 24.06 (m, 1P) ppm.

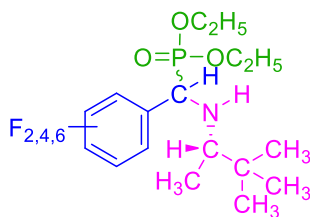
¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 162.08 (ddd, *J* = 249.8; 15.9; 2.0 Hz, 2 Car)*, 161.97 (dd, *J* = 250.6; 2.4 Hz, Car)*, 110.74-110.54 (m, Car), 108.70 (td, *J* = 35.7; 18.0; 4.9 Hz, Car)*, 101.61-99.89 (m, 2 CHar)*, 62.51 (d, *J* = 15.4 Hz, H(C)CH₃), 59.36 (d, *J* = 15.3 Hz, H(C)CH₃)*, 54.59 (d, *J* = 6.7 Hz, O-CH₃)*, 54.38 (d, *J* = 6.8 Hz, O-CH₃), 53.14 (d, *J* = 7.2 Hz, O-CH₃)*, 52.88 (d, *J* = 7.3 Hz, O-CH₃), 52.08 (d, *J* = 165 Hz, H-C-P), 48.48 (d,

$J = 165,2$ Hz, H-C-P)*, 35.50 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$), 33.89 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$)*, 26.23 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.14 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$)*, 16.51 (s, H(C) $\underline{C}H_3$), 13.69 (s, H(C) $\underline{C}H_3$)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{NO}_3\text{P}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 354.1445, zmierzone: 354.1436.

Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}_3\text{P}$: 50.99 C, 6.56 H, 3.96 N, zmierzone: 50.93 C, 6.64 H, 3.88 N.

3.2.19. (((S)-3,3-dimetylobutan-2-yl)amino)(2,4,6-trifluorofenylo)metylofosfonian dietylu (2.19)



Związek otrzymano w postaci jasnożółtego oleju, 91 mg, 24%

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.70$ -6.66 (m, 2H, 2 CHar)*, 6.70-6.66 (m, 2H, 2 CHar), 4.57 (d, $J = 26.4$ Hz, 1H, H-C-P)*, 4.45 (d, $J = 26.0$ Hz, H-C-P), 4.32-4.21 (m, 2H, O- $\underline{C}H_2CH_3$)*, 4.32-4.21 (m, 2H, O- $\underline{C}H_2CH_3$), 4.12-3.95 (m, 2H, O- $\underline{C}H_2CH_3$)*, 4.12-3.95 (m, 2H, O- $\underline{C}H_2CH_3$), 2.25 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, $\underline{H}(\text{C})\text{CH}_3$), 2.15 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H, $\underline{H}(\text{C})\text{CH}_3$)*, 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O- $\underline{C}H_2CH_3$)*, 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O- $\underline{C}H_2CH_3$), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O- $\underline{C}H_2CH_3$)*, 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O- $\underline{C}H_2CH_3$), 0.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H(C) $\underline{C}H_3$)*, 0.90 (s, 9H, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.85 (s, 9H, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$)*, 0.84 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, H(C) $\underline{C}H_3$) ppm.

¹⁹F NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = -108.92$ (m, 1F)*, -109.01 (m, 1F), -111.82 (bs, 2F)*, -109.99 (bs, 2F) ppm.

³¹P NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 22.04$ (m, 1P)*, 21.67 (m, 1P) ppm.

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta = 161.98$ (ddd, $J = 249.8$; 31.8; 2.8 Hz, Car)*, 161.98 (dd, $J = 249.7$; 2.7 Hz, 2 Car)*, 110.90 (td, $J = 16.5$; 4.5 Hz, Car), 108.94 (td, $J = 17.7$; 4.6 Hz, Car)*, 101.39-99.61 (m, 2 CHar)*, 63.78 (d, $J = 6.7$ Hz, O- $\underline{C}H_2CH_3$)*, 63.52 (d, $J = 7.0$ Hz, O- $\underline{C}H_2CH_3$), 62.61 (d, $J = 7.2$ Hz, O- $\underline{C}H_2CH_3$)*, 62.35 (d, $J = 6.8$ Hz, O- $\underline{C}H_2CH_3$), 59.31 (d, $J = 15.2$ Hz, H(C) $\underline{C}H_3$)*, 52.29 (d, $J = 134.5$ Hz, H-C-P), 48.85 (d, $J = 165.1$ Hz, H-C-P)*, 35.45 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$), 33.88 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$)*, 26.20 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.10 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_3$)*, 16.42 (d, $J = 5.9$ Hz, O- $\underline{C}H_2CH_3$), 16.35 (d, $J = 5.8$ Hz,

O-CH₂CH₃)*, 16.34 (s, H(C)CH₃), 16.12 (d, $J = 6.0$ Hz, O-CH₂CH₃)*, 13.65 (s, H(C)CH₃)* ppm.

HRMS (ESI⁺) obliczone dla C₁₇H₂₈F₃NO₃P ([M+H]⁺): 382.1758, zmierzone: 382.1756.

Analiza elementarna obliczona dla C₁₇H₂₇F₃NO₃P: 53.54 C, 7.14 H, 3.67 N, zmierzone: 53.26 C, 7.21 H, 3.99 N.

4. Obliczenia kwantowo-chemiczne

Celem wykonanych obliczeń było znalezienie możliwych rotamerów niefluorowanej i fluorowanej iminy. Obliczenia energii przeprowadzono w próżni stosując metodę DFT na poziomie teorii M062X/6-31+G(d) przy użyciu programu GAUSSIAN 09 [179][180][181].

5. Krystalografia rentgenowska

Dane dyfrakcyjne zebrano techniką skanowania ω dla produktów 1.6, 1.16, 2.3 i 2.18 w temperaturze 100(1)K na czterokołowym dyfraktometrze Rigaku XCalibur z detektorem Eos CCD wyposażonym w monochromatyzowane grafitem źródło promieniowania MoK α ($\lambda = 0.71073$ Å), natomiast dla produktów 1.15 oraz 2.13 w temperaturze 130(1)K na czterokołowym dyfraktometrze Rigaku SuperNova z detektorem Atlas CCD wyposażonym w mikroogniskowe źródło promieniowania CuK α Nova ($\lambda = 1.54178$ Å). Dane skorygowano ze względu na czynnik Lorentza- polaryzacyjny oraz absorpcję. Dokładne parametry komórek elementarnych wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów, używając wybranych z całego eksperymentu najsilniejszych refleksów. Struktury rozwiązano za pomocą programu SHELXT i udoskonalono za pomocą pełnomacierzowej procedury najmniejszych kwadratów na F² używając programu SHELXL-2013 [182][183]. Wszystkie atomy inne niż wodór były udokładniane anizotropowo. Atomy wodoru umieszczono w wyidealizowanych (geometrycznie) pozycjach i udokładniono z więzami utrzymującymi zadaną geometrię i definiującymi izotropowe parametry drgań termicznych jako 1.2 (1.5 dla grup metylowych) razy U_{eq} atomów nie wodorowych, z którymi dane atomy wodoru były połączone wiązaniem.

6. Przewidywanie farmakokinetyki *in silico*

Obliczenia deskryptorów profilu farmakokinetycznego oraz najbardziej prawdopodobnych celów makromolekularnych dla otrzymanych produktów przeprowadzono na serwerze SwissADME [169].

7. Linie komórkowe i warunki hodowli

Ludzkie linie komórkowe glejaka wielopostaciowego (U-87 MG, U-118 MG, U-251 MG), raka jajnika (OVCAR-3, SK-OV-3), raka ryjki macicy (HeLa), raka piersi (MDA-MB-231), raka okrężnicy (Caco-2), raka wątroby (HepG2), raka płuc (A549) oraz linię komórek nienowotworowych fibroblastów płuc (MRC-5) zakupiono w ATCC (Manassas, USA).

Komórki linii HeLa i OVCAR-3 hodowano w pożywce RPMI 1640. Komórki linii Caco-2 oraz U-118 MG hodowano w pożywce DMEM. Komórki linii U-87 MG, U-251 MG, HepG2, MDA-MB-231, A549 i MRC-5 hodowano w pożywce EMEM. Komórki linii SK-OV-3 hodowane były w pożywce McCoy's 5A. Do każdej pożywki dodano 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) oraz 10 mg/ml antybiotyków (penicyliny i streptomycyny). Komórki hodowano w temperaturze 37°C z 5% CO₂ w nawilżonym powietrzu. Pożywki komórkowe pochodziły z firmy Sigma Aldrich oraz ATCC. Stężenia komórek w hodowli dostosowano tak, aby umożliwić wykładniczy wzrost. Dokonywano mikroskopowej kontroli wzrostu komórek.

8. Test żywotności/prolifracji komórek

Żywotność/prolifrację komórek oceniono metodą barwienia barwnikiem, stosując bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazolium (MTT). Zastosowano protokół metody znanej z literatury [184]. Jednowarstwową hodowlę komórek poddano trypsynizacji i zliczono. Do każdego dołka 96-dołkowej płytki dodano 100 µl rozcieńczonej zawiesiny komórek (10 000 komórek). Po 24 godzinach, gdy utworzyła się częściowa monowarstwa, do komórek dodano po 10 µl badanego związku o różnych stężeniach oraz po 90 µl świeżej pożywki. Jako kontrolę pozostawiono dla każdego powtórzenia po jednym dołku z komórkami, których nie traktowano inhibitorem. Związek testowano w dziewięciu różnych stężeniach: 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 i 2000 µg/ml. Po 48 godzinach supernatant wypłukano i do każdego dołka dodano po 100 µl roztworu MTT w pożywce (końcowe stężenie 0.5 mg/ml). Po 1.5 godzinie inkubacji, usunięto nieprzereagowany barwnik i do każdego dołka dodano po 100 µl DMSO rozpuszczającego kryształy formazanu, a następnie dokonano pomiaru

absorbancji w wielodołkowym czytniku płytek Synergy2 (BioTek Instruments, USA) przy testowej długości fali 492 nm i referencyjnej długości fali 690 nm. Dla każdego stężenia związku wykonano 3 niezależne powtórzenia. Wyniki obliczono jako IC₅₀ (*Inhibitory Concentration 50*- stężenie hamujące 50). IC₅₀ odpowiada stężeniu badanego związku, które hamuje żywotność/proliferaację komórek o 50%. Wyniki przedstawiono jako średnią wszystkich powtórzeń.

9. Test tworzenia kolonii

Test klonogenny jest to test przeżycia komórek *in vitro*, oparty na zdolności pojedynczej komórki do utworzenia kolonii. Kolonię definiuje się jako składającą się z co najmniej 50 komórek. Test klonogenny przeprowadzono według metody zaadaptowanej z literatury [185]. Komórki linii U-251 MG oraz MRC-5 wysiano na 6-dołkowe płytki w ilości 500 komórek na każdy dołek i pozostawiono do przyłgnięcia na 24 godziny. Następnie komórki potraktowano różnymi stężeniami związków (2 μ M, 10 μ M, 20 μ M) i inkubowano je przez 7 dni. Po upływie tygodnia usunięto pożywkę, płytki przepłukano roztworem PBS, a powstałe kolonie wybarwiono 1%-owym etanolowym roztworem fioletu genecjanowego, po czym zliczono utworzone kolonie. Dla każdego stężenia związku wykonano 4 niezależne powtórzenia.

10. Fluorometryczny test inhibicji uPA

Urokinazę pochodzącą z ludzkich komórek nerek (numer katalogowy U4010, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), rozcieńczono do 10 IU/ μ l, podzielono na porcje i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu zastosowania w badaniach. 5mM roztwór podstawowy fluorescencyjnego substratu III urokinazy (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, numer katalogowy 672159, Merck Millipore, MA, USA, ludzka uPA Km = 400 μ M) przygotowano poprzez rozpuszczenie 25 mg substratu w 8.1 ml 10%-owego roztworu DMSO w wodzie Milli-Q i podzielono na porcje, które przechowywano w temperaturze -20°C. Przygotowano bufor (50 mM Tris-HCl pH = 7.4, 100 mM NaCl, 0.01% v/v Tween-20), który przechowywano w temperaturze 4°C, maksymalnie przez 7 dni. W dniu testu badane związki rozcieńczono seryjnie w buforze w czarnej 96-dołkowej płytce z przezroczystym dnem (Corning, USA) umieszczonej na lodzie. Do 100 μ l przygotowanych roztworów testowanych związków dodano po 90 μ l roztworu substratu fluorescencyjnego o stężeniu 250 μ M oraz po 10 μ l roztworu urokinazy (5 IU), rozpoczynając reakcję. Na osobnej płytce przygotowano roztwór kontrolny zawierający

bufor, substrat fluorescencyjny i enzym oraz roztwór kontrolny zawierający bufor i substrat fluorescencyjny. Wykonano po 2 powtórzenia dla każdej reakcji. Postęp reakcji monitorowano za pomocą fluorescencyjnego czytnika płytek Synergy2 (tryb intensywności fluorescencji, odczyt wykonywany z dołu płytki, ex 360 nm, em 460 nm, 5 błysków na dołek, podwójne wytrząsanie orbitalne przez 2 sekundy przed każdym odczytem, czas cyklu 60 sekund, 45-60 cykli, inkubacja w 37°C, BioTek Instruments, USA). Zmiany fluorescencji w okresie 15 minut w stosunku do liniowej części krzywej postępu reakcji wykorzystano do określenia wartości IC₅₀ poprzez dopasowanie danych przekształconych logarytmicznie do sigmoidalnej krzywej dawka-odpowieź w programie GraphPad v8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

11. Analiza ekspresji PLAU w bazie danych TCGA

Dane dotyczące ekspresji genu PLAU (aktywator plazminogenu typu urokinazy, urokinaza) różnych nowotworów uzyskano z *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) i bazy danych GEPIA (*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*). Dane dotyczące ekspresji genu urokinazy z TCGA uzyskano przy użyciu programu GEPIA.

12. Dokowanie molekularne

Model receptora białkowego do procedury dokowania przygotowano na podstawie struktury 1F5L z Protein Data Bank (PDB). Zarówno model receptora, jak i modele ligandów sparametryzowano przy użyciu oprogramowania UCSF Chimera. Dokowanie molekularne przeprowadzono przy użyciu programu AutoDock Vina. Przestrzenią dokującą był prostopadłościan o wymiarach 15 x 20 x 10 Å, który był wyśrodkowany w miejscu pierwotnego liganda ze struktury 1F5L, z odstępem wynoszącym 0.375 Å. Kompletność poszukiwań została ustalona na 20. Procedura dokowania była podejściem półelastycznym, z elastycznymi cząsteczkami liganda i sztywnym modelem receptora, przy użyciu funkcji punktacji Vina. Pięć najwyższej ocenionych konstrukcji z każdego dokowania zostało poddanych inspekcji wzrokowej i zaprezentowanych w pozycjach dokowania.

V
LITERATURA

- [1] Sabry E., Mohamed H. A., Ewies E. F., Kariuki B. M., Darwesh O. M., Bekheit M. S. Microwave-assisted synthesis of novel sulfonamide-based compounds bearing α -aminophosphonate and their antimicrobial properties. *J. Mol. Struct.* **2022**, 1266, 133553.
- [2] Mohan G., Kuma S., Sudileti M., Sridevi C., Venkatesu P., Reddy C. S. Excellency of pyrimidinyl moieties containing α -aminophosphonates over benzthiazolyl moieties for thermal and structural stability of stem bromelain. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 165, 2010-2021.
- [3] Turhanen P. A., Demadis K. D., Kafarski P. Editorial: Phosphonate Chemistry in Drug Design and Development. *Front. Chem.* **2021**, 9, 695128.
- [4] Zaout S., Chafaa S., Hellal A., Boukhemis O., Khattabi L., Merazig H., Chafai N., Bensouici C., Bendjeddou L. Hydroxyphenylamine phosphonate derivatives: Synthesis, X-ray crystallographic analysis, and evaluation of their anti-Alzheimer effects and antioxidant activities. *J. Mol. Struct.* **2021**, 1225, 129121.
- [5] Kafarski P., Lejczak B. Biological activity of aminophosphonic acids. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **1991**, 63 (1-2), 193-215.
- [6] Dake S. A., Raut D. S., Kharat K. R., Mhaske R. S., Deshmukh S. U., Pawar R. P. Ionic liquid promoted synthesis, antibacterial and in vitro antiproliferative activity of novel α -aminophosphonate derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2527-2532.
- [7] Damiche R., Chafaa S. Synthesis of new bioactive aminophosphonates and study of their antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities as well the assessment of their toxicological activity. *J. Mol. Struct.* **2017**, 1130, 1009-1017.
- [8] Abdelkader H., Farouk Z., Mohamed M., Abdelghani M., Houdheifa L., Imene K., Ines H., Anis B., Nadjib C., Merim H., Souad R., Lasnouni T., Omar L. B. Efficient one-pot synthesis, characterization and \hat{A} DFT study of solvents polarity effects on the structural, energetic and thermodynamic proprieties of (a-methylamino-ethyl)-phosphonic acid dimethyl ester. *J. Mol. Struct.* **2023**, 1272, 134165.
- [9] Kerkour R., Chafai N., Moumeni O., Chafaa S. Novel α -aminophosphonate

- derivates synthesis, theoretical calculation, Molecular docking, and in silico prediction of potential inhibition of SARS-CoV-2. *J. Mol. Struct.* **2023**, 1272, 134196.
- [10] Che J. Y., Xu X. Y., Tang Z. L., Gu Y. C., Shi D. Q. Synthesis and herbicidal activity evaluation of novel α -amino phosphonate derivatives containing a uracil moiety. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 1310-1313.
- [11] Aissa R., Guezane-Lakoud S., Gali L., Toffano M., Ignaczak A., Adamiak M., Merabet-Khelassi M., Guillot R., Aribi-Zouiouèche L. New promising generation of phosphates α -aminophosphonates: Design, synthesis, in-vitro biological evaluation and computational study. *J. Mol. Struct.* **2022**, 1247, 131336.
- [12] Pawłowska A., Volle J. N., Virieux D., Pirat J. L., Janiak A., Nowicki M., Hoffmann M., Pluskota-Karwatka D. Perfluorophenyl phosphonate analogues of aromatic amino acids: Synthesis, X-ray and DFT studies. *Tetrahedron* **2018**, 74, 975-986.
- [13] Subba Reddy G., Rao K. U. M., Syama Sundar Ch., Sudha S. S., Haritha B., Swapna S., Suresh Reddy C. Neat synthesis and antioxidant activity of α -aminophosphonates. *Arab. J. Chem.* **2014**, 7, 833-838.
- [14] Fiore C., Sovic I., Lukin S., Halasz I., Martina K., Delogu F., Ricci P. C., Porcheddu A., Shemchuk O., Braga D., Pirat J. L., Virieux D., Colacino E. Kabachnik-Fields Reaction by Mechanochemistry: New Horizons from Old Methods. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, 8 (51), 18889-18902.
- [15] Kirouani I., Hellal A., Madani A., Layaida H., Haddadi I., Bouchama A., Chafai N. Phosphonylated p-aminophenol derivatives: Microwave Assisted Synthesis, Density Functional Theory study and biological activities evaluation, *J. Mol. Struct.* **2023**, 1290, 135916.
- [16] Bhattacharya A. K., Raut D. S., Rana K. C., Polanki I. K., Khan M. S., Iram S. Diversity-oriented synthesis of α -aminophosphonates: A new class of potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 66, 146-152.
- [17] Raheem S., Jan T., Qayum A., Yadav O., Mustafa M., Ansari A., Peerzada G. M., Singh S. K., Ahmad Rizvi M. Crystal Structure, quantum chemical analysis and

- apoptotic propensity of diaryl substituted α -aminophosphonates as selected C-P bonded systems. *Polyhedron* **2023**, 244, 116597.
- [18] Jacobsen N. E., Bartlett P. A., A Phosphoramidate Dipeptide Analogue as an Inhibitor of Carboxypeptidase A. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 654-657.
- [19] Turcheniuk K. V., Kukhar V. P., Röschenthaler G. V., Aceña J. L., Soloshonok V. A., Sorochinsky A. E. Recent advances in the synthesis of fluorinated aminophosphonates and aminophosphonic acids. *RSC Adv.* **2013**, 3 (19), 6693-6716.
- [20] Yang S., Gao X. W., Diao C. L., Song B. A., Jin L. H., Xu G. F., Zhang G. P., Wang W., Hu D. Y., Xue W., Zhou X., Lu P. Synthesis and Antifungal Activity of Novel Chiral α -Aminophosphonates Containing Fluorine Moiety. *Chinese J. Chem.* **2006**, 24, 1581-1588.
- [21] Jászay Z. M., Németh G., Pham T. S., Petneházy I., Grün A., Toke L. Catalytic enantioselective Michael addition in the synthesis of α -aminophosphonates. *Tetrahedron Asymmetry* **2005**, 16, 3837-3840.
- [22] Nagrik D. M., Wavhal K. K. An efficient synthesis of α -aminophosphonates through Kabachnik-Fields reaction protocol by using cobalt chloride doped polyaniline as the nano catalyst. *J. Phys. Conf. Ser.* **2020**, 1644, 012038.
- [23] Yang X., Song B. A., Jin L. H., Wei X., Bhadury S. P., Li X. Y., Yang S., Hu D. Y. Synthesis and antiviral bioactivities of novel chiral bis-thiourea-type derivatives containing α -aminophosphonate moiety. *Sci. China Chem.* **2011**, 54, 103-109.
- [24] Maestro A., del Corte X., López-Francés A., Martínez de Marigorta E., Palacios F., Vicario J. Asymmetric Synthesis of Tetrasubstituted α -Aminophosphonic Acid Derivatives. *Molecules* **2021**, 26, 3202.
- [25] K'tir H., Amira A., Benzaid C., Aouf Z., Benharoun S., Chemam Y., Zerrouki R., Aouf N. E. Synthesis, bioinformatics and biological evaluation of novel α -aminophosphonates as antibacterial agents: DFT, molecular docking and ADME/T studies. *J. Mol. Struct.* **2022**, 1250 (2), 131635.
- [26] Rezaei Z., Firouzabadi H., Iranpoor N., Ghaderi A., Jafari M. R., Jafari A. A., Zare H. R. Design and one-pot synthesis of α -aminophosphonates and bis(α -

- aminophosphonates) by iron(III) chloride and cytotoxic activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44 (11), 4266-4275.
- [27] Olszewski T. K., Majewski M. Highly diastereoselective addition of chiral H-phosphonate to tert-butylsulfinyl aldimines: a convenient approach to (R)- α -aminophosphonic acids. *Tetrahedron Asymmetry* **2015**, 26, 846-852.
- [28] Awad M. K., Abdel-aal M. F., Atlam F. M., Hekal H. A. Design, synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel α -aminophosphonates based quinazolinone moiety as potential anticancer agents: DFT, NBO and vibrational studies. *J. Mol. Struct.* **2018**, 1173, 128-141.
- [29] Bahadi R., Berredjem M., Benzaid C., Bouchareb F., Dekir A., Djendi M. L., Ibrahim-Ouali M., Boussaker M., Bouacida S., Bhat A. R., Ahmed S., Bachari K., Redjemia R. Efficient synthesis, crystallography study, antibacterial/antifungal activities, DFT/ADMET studies and molecular docking of novel α -aminophosphonates. *J. Mol. Struct.* **2023**, 1289, 135849.
- [30] Gajewska A., Pawłowska A., Szwajca A., Da Ros T., Pluskota-Karwatka D. Synthesis and structural characterization of single-walled carbon nanotubes functionalized with fluorinated phosphonate analogues of phenylglycine, as promising materials for synthetic and biomedical applications. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1210, 128027.
- [31] Shi F., Song B. Origins of enantioselectivity in the chiral Brønsted acid catalyzed hydrophosphonylation of imines. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 1292-1298.
- [32] Ali N. A. S., Zakir S., Patel M., Farooqui M. Synthesis of new α aminophosphonate system bearing Indazole moiety and their biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 50, 39-43.
- [33] Sudileti M., Chintha V., Nagaripati S., Gundluru M., Yasmin S. H., Wudayagiri R., Cirandur S. R. Green synthesis, molecular docking, anti-oxidant and anti-inflammatory activities of α -aminophosphonates. *Med. Chem. Res.* **2019**, 28 (10), 1740-1754.
- [34] Reddy N. B., Chereddy S. S., Krishna B. S., Santhisudha S., Sreelakshmi P., Nayak S. K., Reddy C. S. Cellulose-SO₃H catalyzed synthesis of bis(α -

- aminophosphonates) and their antioxidant activity. *Org. Commun.* **2017**, 10 (1), 46-55.
- [35] Tellamekala S., Gundluru M., Sarva S., Nadiveedhi M. R., Sudileti M., Allagadda R., Chippada A. R., Cirandur S. R. Meglumine sulfate-catalyzed one-pot green synthesis and antioxidant activity of α -aminophosphonates. *Synth. Commun.* **2019**, 49 (4), 563-575.
- [36] Kitouni S., Chafai N., Chafaa S., Houas N., Ghedjati S., Djenane M. Antioxidant activity of new synthesized imine and its corresponding α -aminophosphonic acid: Experimental and theoretical evaluation. *J. Mol. Struct.* **2023**, 1281, 135083.
- [37] Aita S., Badavath V. N., Gundluru M., Sudileti M., Nemallapudi B. R., Gundala S., Zyryanov G. V., Chamarti N. R., Cirandur S. R. Novel α -Aminophosphonates of imatinib Intermediate: Synthesis, anticancer Activity, human Abl tyrosine kinase Inhibition, ADME and toxicity prediction. *Bioorg. Chem.* **2021**, 109, 104718.
- [38] Ma J., Li J., Guo P., Liao X., Cheng H. Synthesis and antitumor activity of novel indole derivatives containing α -aminophosphonate moieties. *Arab. J. Chem.* **2021**, 14,103256.
- [39] Reddy C. B., Kumar K. S., Kumar M. A., Reddy M. V. N., Krishna B. S., Naveen M., Arunasree M. K., Reddy C. S., Raju C. N., Reddy C. D. PEG-SO₃H catalyzed synthesis and cytotoxicity of α -aminophosphonates. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 47, 553-559.
- [40] Shang F. F., Wang J. Y., Xu Q., Deng H., Guo H. Y., Jin X., Li X., Shen Q. K., Quan Z. S. Design, synthesis of novel celastrol derivatives and study on their antitumor growth through HIF-1 α pathway. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 220, 113474.
- [41] Ye M. Y., Yao G. Y., Pan Y. M., Liao Z. X., Zhang Y., Wang H. S. Synthesis and antitumor activities of novel α -aminophosphonate derivatives containing an alizarin moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 116-128.
- [42] Iwanejko J., Samadaei M., Pinter M., Senfter D., Madlener S., Kochel A., Rohr-Udilova N., Wojaczyńska E. Cytotoxic Activity of Piperazin-2-One-Based

- Structures : Cyclic Imines, Lactams, Aminophosphonates, and Their Derivatives. *Materials* **2021**, 14 (9), 2138.
- [43] Wang Q., Yang L., Ding H., Chen X., Wang H., Tang X. Synthesis, X-ray crystal structure, DNA/protein binding and cytotoxicity studies of five α -aminophosphonate N-derivatives. *Bioorg. Chem.* **2016**, 69, 132-139.
- [44] Yao G., Ye M., Huang R., Li Y., Pan Y., Xu Q., Liao Z. X., Wang H. Synthesis and antitumor activities of novel rhein α -aminophosphonates conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (2), 501-507.
- [45] Ali T. E., El-Edfawy S. M. A convenient synthesis and biological evaluation of some novel linear and cyclic α -aminophosphonic acid derivatives containing a quinazolinone ring. *Res. Chem. Intermed.* **2015**, 42 (2), 1329-1347.
- [46] Huang X., Wang M., Wang C., Hu W., You Q., Ma T., Jia Q., Yu C., Liao Z., Wang H. Synthesis and biological evaluation of novel millepachine derivative containing aminophosphonate ester species as novel anti-tubulin agents. *Bioorg. Chem.* **2020**, 94, 103486.
- [47] Varga N., Benko M., Sebok D., Dékány I. BSA/polyelectrolyte core-shell nanoparticles for controlled release of encapsulated ibuprofen. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**, 123, 616-622.
- [48] Song B. A., Wu Y. L., Yang S., Hu D. Y., He X. Q., Jin L. H. Synthesis and bioactivity of α -aminophosphonates containing fluorine. *Molecules* **2003**, 8, 186-192.
- [49] Zhou X., Ye Y., Liu S., Shao W., Liu L., Yang S., Wu Z. Design, synthesis and anti-TMV activity of novel α -aminophosphonate derivatives containing a chalcone moiety that induce resistance against plant disease and target the TMV coat protein. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2021**, 172, 104749.
- [50] Hu D. Y., Wan Q. Q., Yang S., Song B. A., Bhadury P. S., Jin L. H., Yan K., Liu F., Chen Z., Xue W. Synthesis and antiviral activities of amide derivatives containing the α -aminophosphonate moiety. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 (3), 998-1001.
- [51] Xie D., Zhang A., Liu D., Yin L., Wan J., Zeng S., Hu D. Synthesis and antiviral

- activity of novel α -aminophosphonates containing 6-fluorobenzothiazole moiety. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2017**, 192 (9), 1061-1067.
- [52] Wu L., Song B., Bhadury P. S., Yang S., Hu D. Synthesis and Antiviral Activity of Novel Pyrazole Amides Containing α -Aminophosphonate Moiety. *J. Heterocyclic Chem.* **2011**, 48 (2), 389-396.
- [53] Avila-Sorrosa A., Hernández-González J. I., Reyes-Arellano A., Toscano R. A., Reyes-Martínez R., Pioquinto-Mendoza J. R., Morales-Morales D. Synthesis, structural characterization and biological activity of fluorinated Schiff-bases of the type [C₆H₄-1-(OH)-3-(CH=NR_F)]. *J. Mol. Struct.* **2015**, 1085, 249-257.
- [54] Mei H., Remete A. M., Zou Y., Moriwaki H., Fustero S., Kiss L., Soloshonok V. A., Han J. Fluorine-containing drugs approved by the FDA in 2019. *Chinese Chem. Lett.* **2020**, 31 (9), 2401-2413.
- [55] Meanwell N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (14), 5822-5880.
- [56] Yang X. C., Zeng C. M., Avula S. R., Peng X. M., Geng R. X., Zhou C. H. Novel coumarin aminophosphonates as potential multitargeting antibacterial agents against *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 245, 114891.
- [57] Amedjkouh M., Westerlund K. Self-reproduction of chirality on α -aminophosphonates: Asymmetric synthesis of α -alkylated diethyl pyrrolidin-2-yl-phosphonate. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 5175-5177.
- [58] Yager K. M., Taylor C. M., Smith A. B. Asymmetric Synthesis of α -Aminophosphonates via Diastereoselective Addition of Lithium Diethyl Phosphite to Chelating Imines. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9377-9378.
- [59] Skoreński M., Oleksyszyn J., Sieńczyk M. Efficient methods for the synthesis of α -aminophosphonate fluoroalkyl esters. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 1566-1568.
- [60] Kaboudin B., Karami L., Kato J. Y., Aoyama H., Yokomatsu T. A catalyst-free, three-component decarboxylative coupling of amino acids with aldehydes and H-dialkylphosphites for the synthesis of α -aminophosphonates. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 4872-4875.

- [61] Huang X., Wang M., You Q., Kong J., Zhang H., Yu C., Wang Y., Wang H., Huang R. Synthesis, mechanisms of action, and toxicity of novel aminophosphonates derivatives conjugated irinotecan in vitro and in vivo as potent antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 189, 112067.
- [62] Wang Q., Zhu M., Zhu R., Lu L., Yuan C., Xing S., Fu X., Mei Y., Hang Q. Exploration of α -aminophosphonate N-derivatives as novel, potent and selective inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 49, 354-364.
- [63] Kaboudin B., Arefi M., Emadi S., Sheikh-hasani V. Synthesis and inhibitory activity of ureidophosphonates, against acetylcholinesterase: Pharmacological assay and molecular modeling. *Bioorg. Chem.* **2012**, 41-42, 22-27.
- [64] Smolobochkin A. V., Gazizov A. S., Doszhanova K. A., Kuandykova A. B., Jiyembayev B Z., Burilov A. R., Pudovik A. M., Cherkasov R. A. Synthesis of New α -Aminophosphonates Based on Cyclohexylamine. *Russ. J. Gen. Chem.* **2020**, 90 (6), 1100-1103.
- [65] Schweiker S. S., Tauber A. L., Kam C. M., Eyckens D. J., Henderson L. C., Levonis S. M. α -Aminophosphonates as Potential PARP1 Inhibitors. *ChemistrySelect* **2020**, 5 (14), 42054209.
- [66] Shaikh S., Dhavan P., Uparkar J., Singh P., Vaidya S. P., Jadhav B. L., Ramana M. M. V. Synthesis, characterization, in vitro cholinesterase and hRBCs hemolysis assay and computational evaluation of novel 2,3,4,5-tetrahydrobenzothiazepine appended α -aminophosphonates. *Bioorg. Chem.* **2021**, 116, 105397.
- [67] Peitzika S. C., Pontiki E. A Review on Recent Approaches on Molecular Docking Studies of Novel Compounds Targeting Acetylcholinesterase in Alzheimer Disease. *Molecules* **2023**, 28, 1084.
- [68] Shaikh S., Dhavan P., Pavale G., Ramana M. M. V, Jadhav B. L. Design, synthesis and evaluation of pyrazole bearing α -aminophosphonate derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease, *Bioorg. Chem.* **2020**, 96, 103589.
- [69] Shaikh S., Dhavan P., Singh P., Uparkar J., Vaidya S. P., Jadhav B. L., Ramana M. M. V. Synthesis of carbazole based α -aminophosphonate derivatives: design,

- molecular docking and in vitro cholinesterase activity. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, 40 (11), 4801-4814.
- [70] Shaikh S., Dhavan P., Ramana M. M. V., Jadhav B. L. Design, synthesis and evaluation of new chromone - derived aminophosphonates as potential acetylcholinesterase inhibitor. *Mol. Divers.* **2021**, 25, 811-825.
- [71] Rao K. Y., Basha S. J., Monika K., Sreelakshmi M., Sivakumar I., Mallikarjuna G., Yadav R. M., Kumar S., Subramanyam R., Damu A. G. Synthesis and anti-Alzheimer potential of novel α -amino phosphonate derivatives and probing their molecular interaction mechanism with acetylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, 253, 115288.
- [72] Ochoa R., Rodriguez C. A., Zuluaga A. F. Perspectives for the structure-based design of acetylcholinesterase reactivator. *J. Mol. Graph. Model.* **2016**, 68,176-183.
- [73] Kafarski P., Lejczak B., Slesakb E., Przetocki J. Plant Growth Regulating Activity of Aromatic Aminophosphonates and Their Short Peptides. *Pestic. Sci* **1989**, 25, 137-143.
- [74] Milen M., Ábrányi-Balogh P., Dancsó A., Frigyes D., Pongó L., Keglevich G. T3P®-promoted Kabachnik-Fields reaction: An efficient synthesis of α -aminophosphonates, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54 (40), 5430–5433.
- [75] Bhadury P. S., Zhang Y., Zhang S., Song B., Yang S., Hu D., Chen Z., Xue W., Jin L. An Effective Route to Fluorine Containing Asymmetric α -Aminophosphonates Using Chiral Bronsted Acid Catalyst. *Chirality* **2009**, 21, 547-557.
- [76] Benbouguerra K., Chafaa S., Chafai N., Mehri M., Moumeni O., Hellal A. Synthesis, spectroscopic characterization and a comparative study of the corrosion inhibitive efficiency of an α -aminophosphonate and Schiff base derivatives: Experimental and theoretical investigations. *J. Mol. Struct.* **2018**,1157, 165-176.
- [77] Chafai N., Chafaa S., Benbouguerra K., Daoud D., Hellal A., Mehri M. Synthesis, characterization and the inhibition activity of a new α -aminophosphonic derivative on the corrosion of XC48 carbon steel in 0.5 M H₂SO₄: Experimental and theoretical studies. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2017**, 70, 331-344.

- [78] Kaboudin B., Ghashghaee M., Fukaya H., Yanai H. Stereoselective synthesis of vinylphosphonates through aromatic aza-Claisen rearrangement of α -aminophosphonates. *Chem. Commun.* **2023**, 59, 7076-7079.
- [79] Iwanejko J., Brol A., Szyja B., Daszkiewicz M., Wojaczyńska E., Olszewski T. K. Hydrophosponylation of chiral hexahydroquinoxalin-2(1H)-one derivatives as an effective route to new bicyclic compounds: Aminophosphonates, enamines and imines. *Tetrahedron* **2019**, 75, 1431-1439.
- [80] Disale S. T., Kale S. R., Kahandal S. S., Srinivasan T. G., Jayaram R. V. Choline chloride·2ZnCl₂ ionic liquid: An efficient and reusable catalyst for the solvent free Kabachnik-Fields reaction. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 2277–2279.
- [81] Amira A., Aouf Z., K'tir H., Chemam Y., Ghodbane R., Zerrouki R., Aouf N. E. Recent Advances in the Synthesis of α -Aminophosphonates: A Review. *ChemistrySelect* **2021**, 6, 6137-6149.
- [82] Rashid Z., Naeimi H., Ghahremanzadeh R. Highly efficient one-pot four-component Kabachnik–Fields synthesis of novel α -amino phosphonates under solvent-free and catalyst-free conditions. *RSC Adv.* **2015**, 5 (120), 99148-99152.
- [83] Keglevich G., Rádai Z. α -Hydroxyphosphonates as intermediates in the Kabachnik–Fields reaction: New proof of their reversible formation. *Tetrahedron Lett.* **2020**, 61, 151961.
- [84] Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S. Enantioselective synthesis of α -hydroxyphosphonates through asymmetric Pudovik reactions with chiral lanthanoid and titanium alkoxides. *J. Chem. Soc. - Perkin Trans.* **1997**, 1, 1527-1533.
- [85] Khatri C. K., Satakar V. B., Chaturbhuj G. U. Sulfated polyborate catalyzed Kabachnik-Fields reaction: An efficient and eco-friendly protocol for synthesis of α -amino phosphonates. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 694-698.
- [86] Mu X. J., Lei M. Y., Zou J. P., Zhang W. Microwave-assisted solvent-free and catalyst-free Kabachnik-Fields reactions for α -amino phosphonates. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1125-1127.
- [87] Yadav J. S., Reddy B. V. S. Montmorillonite Clay-Catalyzed One-Pot Synthesis of

- α -Amino Phosphonates, *Synlett* **2001**, 7, 1131-1133.
- [88] Agawane S. M., Nagarkar J. M. Nano ceria catalyzed synthesis of α -aminophosphonates under ultrasonication. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 3499-3504.
- [89] Tillu V. H., Dumbre D. K., Wakharkar R. D., Choudhary V. R. One-pot three-component Kabachnik-Fields synthesis of α -aminophosphonates using H-beta zeolite catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 863-866.
- [90] Tibhe G. D., Lagunas-Rivera S., Vargas-Díaz E., García-Barradas O., Ordoñez M. Uncatalyzed One-pot diastereoselective synthesis of α -amino phosphonates under solvent-free conditions. *European J. Org. Chem.* **2010**, 2010 (34), 6573-6581.
- [91] Zhou X., Shang D., Zhang Q., Lin L., Liu X., Feng X. Enantioselective three-component Kabachnik-Fields reaction catalyzed by chiral scandium(III) N,N'-dioxide complexes. *Org. Lett.* **2009**, 11 (6), 1401-1404.
- [92] Dai Y., Zheng L., Chakraborty D., Borhan B., Wulff W. D. Zirconium-catalyzed asymmetric Kabachnik-Fields reactions of aromatic and aliphatic aldehydes. *Chem. Sci.* **2021**, 12, 12333-12345.
- [93] Heydari A., Karimian A., Ipaktschi J. Lithium Perchlorate/Diethylether Catalyzed Aminophosphonation of Aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6729-6732.
- [94] Ordóñez M., Sayago F. J., Cativiela C. Synthesis of quaternary α -aminophosphonic acids. *Tetrahedron* **2012**, 68, 6369-6412.
- [95] Rao K. U. M., Swapna S., Manidhar D. M., Reddy K. M. K., Reddy C. S. Efficient synthesis of α -aminophosphonates and evaluation of significance of P=O group towards antioxidant activity. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2015**, 190, 232-239.
- [96] Semenzin D., Etemad-Moghadam G., Albouy D., Diallo O., Koenig M. Dual Radical/Polar Pudovik Reaction: Application Field of New Activation Methods. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2414-2422.
- [97] Merino P., Marqués-López E., Herrera R. P. Catalytic enantioselective hydrophosphonylation of aldehydes and imines. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1195-1208.

- [98] Tsacheva I., Todorova Z., Momekova D., Momekov G., Koseva N. Pharmacological Activities of Schiff Bases and Their Derivatives with Low and High Molecular Phosphonates. *Pharmaceuticals* **2023**, 16, 938.
- [99] Heo Y., Cho D. H., Mishra M. K., Jang D. O. Efficient one-pot synthesis of α -aminophosphonates from aldehydes and ketones catalyzed by ytterbium(III) triflate. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 3897-3899.
- [100] Ordóñez M., Viveros-Ceballos J. L., Estudillo I. R. Stereoselective Synthesis of α -Aminophosphonic Acids through Pudovik and Kabachnik-Fields Reaction. *Amin. Acid - New Insights Roles Plant Anim.* **2017**, 6, 127-151.
- [101] Ordóñez M., Rojas-Cabrera H., Cativiela C. An overview of stereoselective synthesis of α -aminophosphonic acids and derivatives. *Tetrahedron* **2009**, 65, 17-49.
- [102] Akiyama T., Morita H., Itoh J., Fuchibe K. Chiral Brønsted acid catalyzed enantioselective hydrophosphonylation of imines: Asymmetric synthesis of α -amino phosphonates. *Org. Lett.* **2005**, 7 (13), 2583-2585.
- [103] Sasai H., Arai S., Tahara Y., Shibasaki M. Catalytic Asymmetric Synthesis of α -Amino Phosphonates Using Lanthanoid-Potassium-BINOL Complexes, *J.Org.Chem.* **1995**, 60, 6656-6657.
- [104] Dimukhametov M. N., Bylinkin R. A., Alfonsov V. A. Stereochemistry of Asymmetric Kabachnik-Fields and Pudovik Reactions. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **1999**, 147, 39.
- [105] Vicario J., Ortiz P., Palacios F. Synthesis of tetrasubstituted α -aminophosphonic acid derivatives from trisubstituted α -aminophosphonates. *European J. Org. Chem.* **2013**, 2013 (31), 7095-7100.
- [106] Bongini A., Camerini R., Panunzio M. Efficient Synthesis of the four Diastereomers of Phosphothreonine from Lactaldehyde. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7 (5), 1467-1476.
- [107] O'hagan D. Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 308-319.

- [108] Berger R., Resnati G., Metrangolo P., Weber E., Hulliger J. Organic fluorine compounds: A great opportunity for enhanced materials properties. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3496-3508.
- [109] Mei H., Han J., Klika K. D., Izawa K., Sato T., Meanwell N. A., Soloshonok V. A. Applications of fluorine-containing amino acids for drug design. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 186, 111826.
- [110] Purser S., Moore P. R., Swallow S., Gouverneur V. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37 (2), 320-330.
- [111] Böhm H. J., Banner D., Bendels S., Kansy M., Kuhn B., Müller K., Obst-Sander U., Stahl M. Fluorine in medicinal chemistry. *ChemBioChem* **2004**, 5, 637-643.
- [112] Ciesielska K., Hoffmann M., Kubicki M., Pluskota-Karwatka D. Mechanochemical Synthesis of Fluorinated Imines. *Molecules* **2022**, 27, 4557.
- [113] Wang J., Sánchez-Roselló M., Aceña J. L., Del Pozo C., Sorochinsky A. E., Fustero S. Soloshonok V. A., Liu H. Fluorine in pharmaceutical industry: Fluorine-containing drugs introduced to the market in the last decade (2001-2011). *Chem. Rev.* **2014**, 114, 2432-2506.
- [114] Kirk K. L. Fluorine in medicinal chemistry: Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules. *J. Fluor. Chem.* **2006**, 27, 1013-1029.
- [115] Kwiczak-Yiğitbaşı J., Pirat J. L., Virieux D., Volle J. N., Janiak A, Hoffmann M., Mrzygłód J., Wawrzyniak D., Barciszewski J., Pluskota-Karwatka D. Synthesis, structural studies and biological properties of some phosphono-perfluorophenylalanine derivatives formed by S_NAr reactions. *RSC Adv.* **2019**, 9, 24117-24133.
- [116] Mokhnache K., Karbab A., Soltani E. K. Bououden W., Ouhida S., Arrar L., Esteban M. A., Charef N., Mubarak M. S. Synthesis, characterization, toxic substructure prediction, hepatotoxicity evaluation, marine pathogenic bacteria inhibition, and DFT calculations of a new hydrazone derived from isoniazid. *J. Mol. Struct.* **2020**, 1221, 128817.
- [117] Pallicer J. M., Sales J., Rosés M., Ràfols C., Bosch E. Lipophilicity assessment of basic drugs (logP_{o/w} determination) by a chromatographic method. *J. Chromatogr.*

- A **2011**, 1218, 6356-6368.
- [118] Smart B. E. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluor. Chem.* **2001**, 109, 3-11.
- [119] Han J., Kiss L., Mei H., Remete A. M., Ponikvar-Sver M., Sedgwick D. M., Roman R., Fustero S., Moriwaki H. Chemical Aspects of Human and Environmental Overload with Fluorine. *Chem. Rev.* **2021**, 121, 4678-4742.
- [120] Champagne P. A., Desroches J., Hamel J. D., Vandamme M., Paquin J. F. Monofluorination of Organic Compounds: 10 Years of Innovation. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 9073-9174.
- [121] Tang L., Han X. The urokinase plasminogen activator system in breast cancer invasion and metastasis. *Biomed. Pharmacother.* **2013**, 67, 179–182.
- [122] Xu X., Cai Y., Wei Y., Donate F., Juarez J., Parry G., Chen L., Meehan E. J., Ahn R. W., Ugolkov A., Dubrovskiy O., O'Halloran T. V., Huang M., Mazar A. P. Identification of a new epitope in uPAR as a target for the cancer therapeutic monoclonal antibody ATN-658, a structural homolog of the uPAR binding integrin CD11b (α M). *PLoS One* **2014**, 9 (1), 85349.
- [123] Du X. L., Kong L. S., Meng Q. Y., Qian A., Li W. D., Chen H., Li X. Q., Li C. L. Safety and efficacy of low dosage of urokinase for catheter-directed thrombolysis of deep venous thrombosis. *Chin. Med. J.* **2015**, 128 (13), 1787-1792.
- [124] Suenson E., Lutzen O., Thorsen S. Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur. J. Biochem.* **1984**, 140, 513-522.
- [125] Zhu M., Gokhale V. M., Szabo L., Munoz R. M., Baek H., Bashyam S., Hurley L. H., Von Hoff D. D., Han H. Identification of a novel inhibitor of urokinase-type plasminogen activator. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6 (4), 1348-1356.
- [126] Gladysz R., Adriaenssens Y., De Winter H., Joossens J., Lambeir A. M., Augustyns K., Van der Veken P. Discovery and SAR of novel and selective inhibitors of urokinase plasminogen activator (uPA) with an imidazo[1,2-a]pyridine scaffold. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (23), 9238-9257.

- [127] Dass K., Ahmad A., Azmi A. S., Sarkar S. H., Sarkar F. H. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat. Rev.* **2008**, 34, 122-136.
- [128] Cesarman-Maus G., Hajjar K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* **2005**, 129, 307-321.
- [129] Cozen A. E., Moriwaki H., Kremen M., DeYoung M. B., Dichek H. L., Slezicki K. I., Young S. G., Véniant M., Dichek D. A. Macrophage-Targeted Overexpression of Urokinase Causes Accelerated Atherosclerosis, Coronary Artery Occlusions, and Premature Death. *Circulation* **2004**, 109, 2129-2135.
- [130] Li Y., Cozzi P. J. Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2007**, 33, 521-527.
- [131] Sperl S., Jacob U., Arroyo de Prada N., Stürzebecher J., Wilhelm O. G., Bode W., Magdolen V., Huber R., Moroder L. (4-Aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase. *PNAS* **2000**, 97 (10), 5113-5118.
- [132] Mackman R. L., Katz B. A., Breitenbucher J. G., Hui H. C., Verner E., Luong C., Liu L., Sprengeler P. A. Exploiting subsite S1 of trypsin-like serine proteases for selectivity: Potent and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator. *J. Med. Chem.* **2001**, 44 (23), 3856-3871.
- [133] Frederickson M., Callaghan O., Chessari G., Congreve M., Cowan S. R., Matthews J. E., McMenemy R., Smith D. M., Vinković M., Wallis N. G. Fragment-based discovery of mexiletine derivatives as orally bioavailable inhibitors of urokinase-type plasminogen activator. *J. Med. Chem.* **2008**, 51 (2), 183-186.
- [134] Jaiswal R. K., Varshney A. K., Yadava P. K. Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 98, 886-898.
- [135] Barber C. G., Dickinson R. P., Fish P. V. Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. Part 3: 1-Isoquinolinylguanidines. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3227-3230.
- [136] Bayliss M. A. J., Venn R. F., Edgington A. M., Webster R., Walker D. K. Determination of a potent urokinase-type plasminogen activator, UK-356,202, in plasma at pg/mL levels using column-switching HPLC and fluorescence detection.

- J. Chromatogr. B* **2009**, 877, 121-126.
- [137] Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis, *Atherosclerosis* **2012**, 222, 8–14.
- [138] Ding Y., Zhang H., Zhou Z., Zhong M., Chen Q., Wang X., Zhu Z. u-PA inhibitor amiloride suppresses peritoneal metastasis in gastric cancer. *World J. Surg. Oncol.* **2012**, 10 (270), 1–7.
- [139] Buckley B. J., Aboelela A., Minaei E., Jiang L. X., Xu Z., Ali U., Fildes K., Cheung C. Y., Cook S. M., Johnson D. C., Bachovchin D. A., Cook G. M., Apte M., Huang M., Ranson M., Kelso M. J. 6-Substituted Hexamethylene Amiloride (HMA) Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of the Human Urokinase Plasminogen Activator for Use in Cancer *J. Med. Chem.* **2018**, 61 (18), 8299-8320.
- [140] Bauer T. W., Liu W., Fan F., Camp E. R., Yang A., Somcio R. J., Bucana C. D., Callahan J., Parry G. C., Evans D. B., Boyd D. D., Mazar A. P., Ellis L. M. Targeting of urokinase plasminogen activator receptor in human pancreatic carcinoma cells inhibits c-Met- and insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion and orthotopic tumor growth in mice. *Cancer Res.* **2005**, 65 (17), 7775-7781.
- [141] Duffy M. J., Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: A rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin. Biochem.* **2004**, 37, 541-548.
- [142] Meyer J. E., Brocks C., Graefe H., Mala C., Thäns N., Bürgle M., Rempel A., Rotter N., Wollenberg B., Lang S. The oral serine protease inhibitor WX-671 - First experience in patients with advanced head and neck carcinoma. *Breast Care* **2008**, 3 (2), 20-24.
- [143] Zesławska E., Stürzebecher J., Oleksyn B. J. Geometry of GPPE binding to picrate and to the urokinase type plasminogen activator. *Bioorganic Med. Chem. Lett* **2007**, 17, 6212-6215.
- [144] Janisch F., D'Andrea D., Iwata T., Kimura S., Abufaraj M., Enikeev D., Glybochko P. V., Karakiewicz P. I., Nyirady P., Fajkovic H., Haitel A., Seebacher V., Rink M., Shariat S. F. The prognostic value of the urokinase-plasminogen activator

- system (uPA) in bladder cancer patients treated with radical cystectomy (RC). *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2020**, 38, 423-432.
- [145] Iwata T., Kimura S., Abufaraj M., Janish F., Kardoust Parizi M., Haitel A., Rink M., Rouprêt M., Fajkovic H., Seebacher V., Nyirady P., Karakiewicz P. I., Enikeev D., Rapoport L. M., Nasu Y., Shariat S. F. Prognostic role of the urokinase plasminogen activator (uPA) system in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2019**, 37, 774-783.
- [146] Judex M. O., Mueller B. M. Plasminogen activation/plasmin in rheumatoid arthritis: Matrix degradation and more. *Am. J. Pathol.* **2005**, 166 (3), 645-647.
- [147] Banys-Paluchowski M., Witzel I., Aktas B., Fasching P. A., Hartkopf A., Janni W., Kasimir-Bauer S., Pantel K., Schön G., Rack B., Riethdorf E., Solomayer E. F., Fehm T., Müller V. The prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the blood of patients with metastatic breast cancer. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (2318), 1-10.
- [148] Schmitt M., Wilhelm O. G., Reuning U., Krüger A., Harbeck N., Lengyel E., Graeff H., Gänsbacher B., Kessler H., Bürgle M., Stürzebecher J., Sperl S., Magdolen V. The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumor therapy. *Fibrinolysis and Proteolysis* **2000**, 14 (2), 114-132.
- [149] Schweinitz A., Steinmetzer T., Banke I. J., Arlt M. J. E., Stürzebecher A., Schuster O., Geissler A., Giersiefen H., Zeslawska E., Jacob U., Krüger A., Stürzebecher J. Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (32), 33613-33622.
- [150] Fish P. V., Barber G. C., Brown D. G., Butt R., Collis M. G., Dickinson R. P., Henry B. T., Home V. A., Huggins J. P., King E., O'Gara M., McCleverty D., McIntosh F., Phillips C., Webster R. Selective Urokinase-Type Plasminogen Activator Inhibitors. 4. 1-(7-Sulfonamidoisoquinoliny)guanidines. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (10), 2341-2351.
- [151] Bruncko M., McClellan W. J., Wendt M. D., Sauer D. R., Geyer A., Dalton C. R., Kaminski M. A., Weitzberg M., Gong J., Dellaria J. F., Mantei R., Zhao X., Nienaber V. L., Stewart K., Klinghofer V., Bouska J., Rockway T. W., Giranda V.

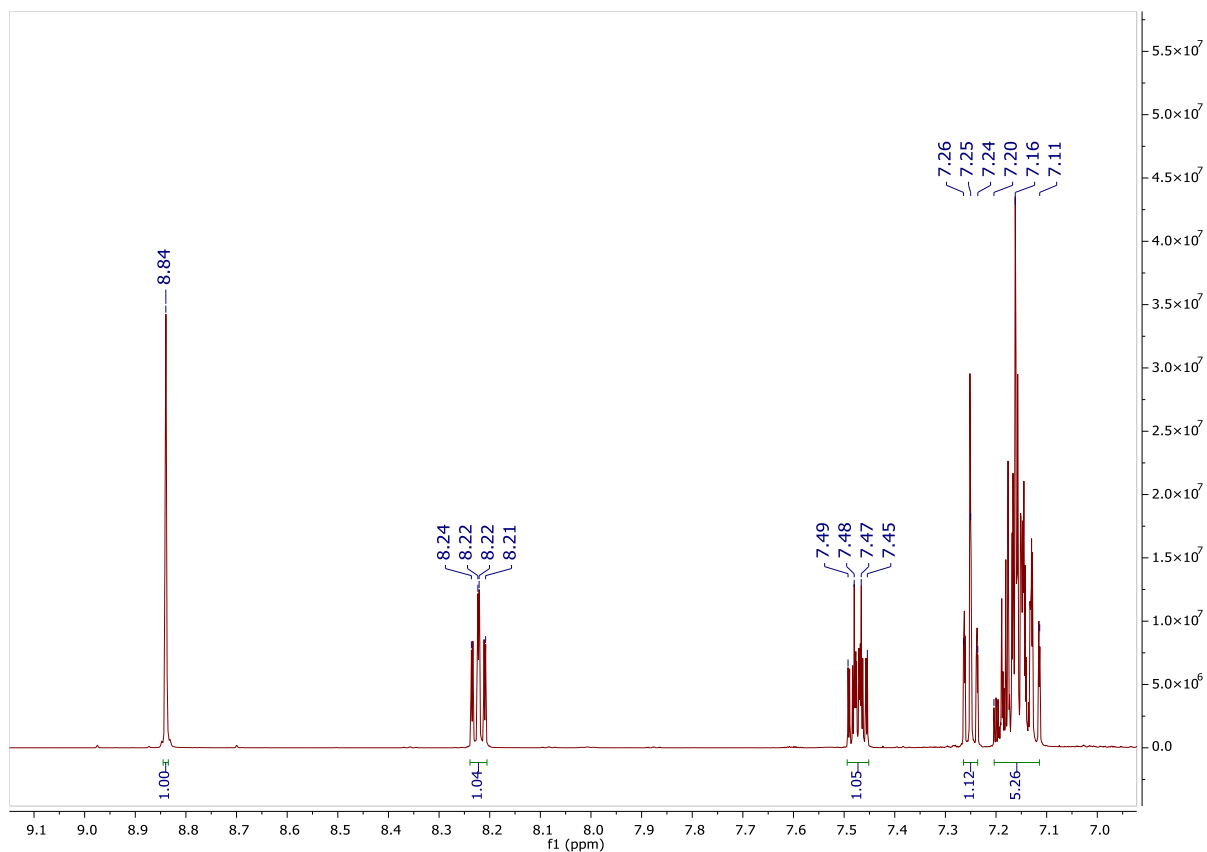
- L. Naphthamidine urokinase plasminogen activator inhibitors with improved pharmacokinetic properties. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 93-98.
- [152] Ahmed E. M., Sarhan A. E., El-Naggar D. H., Khattab R. R., El-Naggar M., El-Messery S. M., Hassan G. S., Mounier M. M., Mahmoud K., Ali N. I., Mahrous K. F., Ali M. M., El Sayed M. T. Towards breast cancer targeting: Synthesis of tetrahydroindolocarbazoles, antibreast cancer evaluation, uPA inhibition, molecular genetic and molecular modelling studies. *Bioorg. Chem.* **2019**, 93, 103332.
- [153] Duffy M. J., McGowan P. M., Harbeck N., Thomssen C., Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: Validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res.* **2014**, 16 (428), 1-10.
- [154] Farag P. S., AboulMagd A. M., Hemdan M. M., Hassaballah A. I. Annulated pyrazole derivatives as a novel class of urokinase (uPA) inhibitors: Green synthesis, anticancer activity, DNA-damage evaluation, and molecular modelling study. *Bioorg. Chem.* **2023**, 130, 106231.
- [155] Joossens J., Ali O. M., El-Sayed I., Surpateanu G., Van der Veken P., Lambeir A. M., Setyono-Han B., Foekens J. A., Schneider A., Schmalix W., Haemers A., Augustyns K. Small, potent, and selective diaryl phosphonate inhibitors for urokinase-type plasminogen activator with in vivo antimetastatic properties. *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (26), 6638-6646.
- [156] Cornec A., Monti L., Kovalevich J., Makani V., James M. J., Vijayendran K. G., Oukoloff K., Yao Y., Lee V. M. Y., Trojanowski J. Q., Smith A. B., Brunden K. R., Ballatore C. Multitargeted Imidazoles: Potential Therapeutic Leads for Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (12), 5120-5145.
- [157] Lamberth C., Dumeunier R., Trah S., Wendeborn S., Godwin J., Schneiter P. Corran A. Bioorganic & Medicinal Chemistry Synthesis and fungicidal activity of tubulin polymerisation promoters. Part 3: Imidazoles. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21,127-134.
- [158] Korobeinicheva I. K., Furin G. G., Anstey A. V. Vibrational Spectra of Polyfluoroaromatic Compounds Containing the Azomethine Group. *Bull. Acad.*

- Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **1984**, 33, 522-528.
- [159] Liu X., Ren Y., Xia H., Fan X., Mu Y. Inorganica Chimica Acta Synthesis, structures, photoluminescent and electroluminescent properties of boron complexes with anilido-imine ligands. *Inorganica Chim. Acta* **2010**, 363, 1441-1447.
- [160] Elriati A., Loose J., Mayrhofer R., Bergmann H., Otto H. β -Lactam derivatives as enzyme inhibitors: halogenated β -lactams and related compounds. *Monatsh Chem* **2008**, 139, 835-846.
- [161] Yu D., Lu L., Shen Q. Palladium-Catalyzed Coupling of Polyfluorinated Arenes with Heteroarenes via C-F/C-H Activation. *Org. Lett.* **2013**, 15 (4), 940-943.
- [162] Divse J. M., Mhaske S. B., Charolkar C. R., Sant D. G., Tupe S. G., Deshpande M. V., Khedkar V. M., Nawale L. U., Sarkar D., Pore V. S. Synthesis and Biological Evaluation of New Fluconazole β -Lactam Conjugates Linked via 1,2,3-Triazole. *New J. Chem.* **2017**, 41, 470-479.
- [163] Adamson A. J., Banks R. E., Fields R., Tipping A. E. One-Pot Synthesis of 1,2,3,4-Tetrafluoroacridines From pentafluorobenzaldehyde. *J. Chem. Res. Synop.* **1997**, 76-77.
- [164] Bravo P., Capelli S., Crucianelli M., Guidetti M., Andrey L., Zanda M. Asymmetric Synthesis of α -Arylglycinols via Additions of Lithium Methyl p-Tolyl Sulfoxide to N- (PMP) arylaldehydes Followed by "Non Oxidative" Pummerer Reaction. *Tetrahedron* **1999**, 55, 3025-3040.
- [165] Sakai T., Korenaga T., Washio N., Nishio Y., Minami S., Ema T. Synthesis of Enantiomerically Pure (R,R)- and (S,S)-1,2-Bis(pentafluorophenyl)ethane-1,2-diamine and Evaluation of the pKa Value by Ab Initio Calculations. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, 77, 1001-1008.
- [166] Shawcross A. P., Stanforth S. P. Observations on the Vilsmeier Reaction Part 2. The Anomalous Reaction of N-Benzyl N-Cyanoethyl-4-Methylaniline Derivatives. *Tetrahedron* **1989**, 45 (22), 7063-7076.
- [167] Adamson A. J., Archambeau Y., Banks R. E., Beagley B., Helliwell M., Pritchard R. G., Tipping A. E. p-Methyl-N-(pentafluorobenzylidene)aniline (1), 1,2,3,4-tetrafluoro-7-methoxyacridine (2), 1,2,3,4,7-pentafluoroacridine (3) and 3-(p-

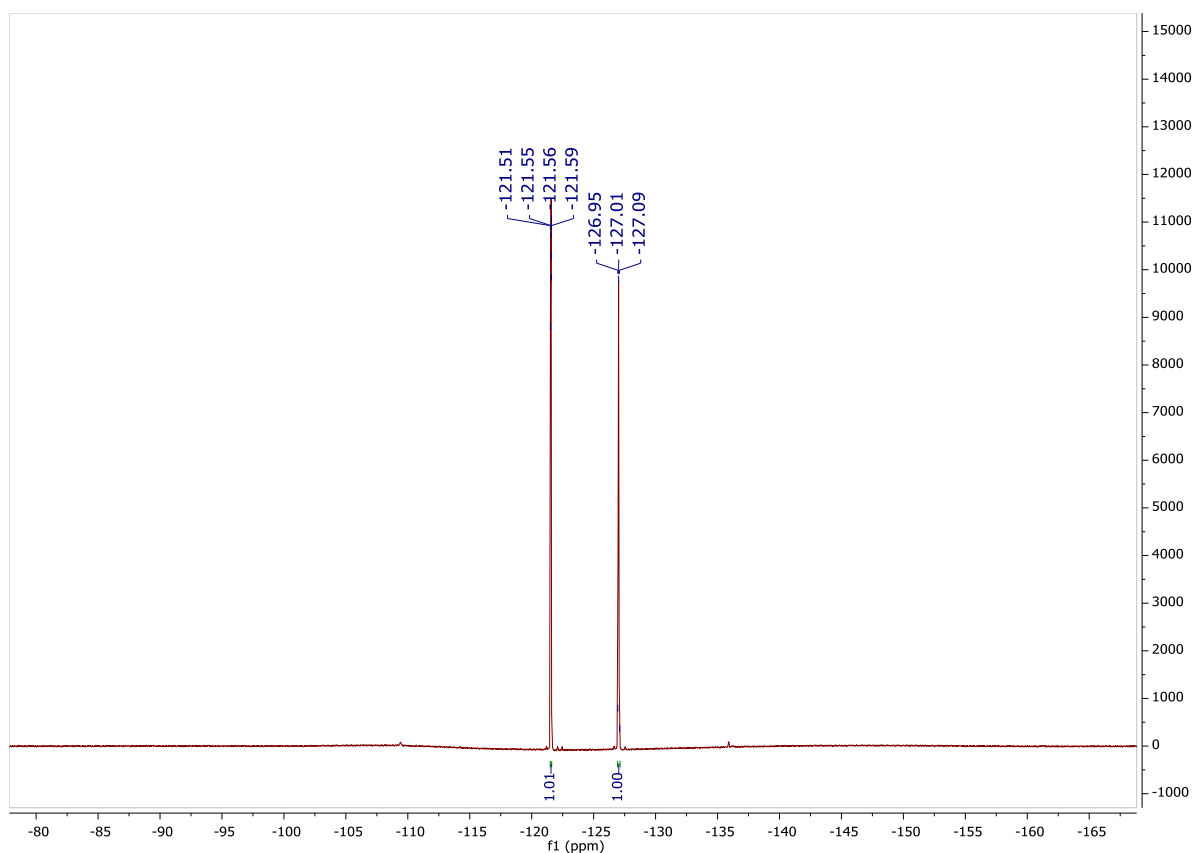
- methylanilino)-1,2,4-trifluoro-7-methylacridine (4): four molecules representing key stages in the one-pot synthesis of 1. *Acta Crystallogr. C* **1994**, 50, 967-971.
- [168] Ahn N. T., Eisenstein O. Theoretical interpretation of 1-2 asymmetric induction. The importance of antiperiplanarity. *Nouv J Chim* **1977**, 1, 61-70.
- [169] Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 42717.
- [170] Kujawski J., Bernard M. K., Janusz A., Kuźma W. Prediction of log P: ALOGPS application in medicinal chemistry education. *J. Chem. Educ.* **2012**, 89, 64-67.
- [171] Abraham M. H., Ibrahim A., Zissimos A. M., Zhao Y. H., Comer J., Reynolds D. P. Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design. *Drug Discov. Today* **2002**, 7 (20), 1056-1063.
- [172] Marchán-García J., Buxaderas E., Stratico D. N., Richmond V., Cavallaro V., Murray A. P., Radivoy G., Moglie Y. Green approach to the synthesis of α -aminophosphonate-tetrahydroisoquinoline hybrids and their anti-cholinesterase activity. *Bioorg. Chem.* **2024**, 143, 107008.
- [173] Mucha A., Kafarski P., Berlicki Ł. Remarkable potential of the α -aminophosphonate/phosphinate structural motif in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2011**, 54 (17), 5955-5980.
- [174] Orsini F., Sello G., Sisti M., Aminophosphonic Acids and Derivatives. Synthesis and Biological Applications. *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, (3), 64-289.
- [175] Palacios F., Olszewski T. K., Vicario J. Diastereoselective hydrophosphonylation of imines using (R,R)-TADDOL phosphite. Asymmetric synthesis of α -aminophosphonic acid derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (19), 4255-4258.
- [176] Franken N. A. P., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 2315-2319.
- [177] de Ruyck J., Brysbaert G., Blossey R., Lensink M. F. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* **2016**, 9, 1-11.

- [178] Wang G., Zhu W. Molecular docking for drug discovery and development: a widely used approach but far from perfect. *Future Med. Chem.* **2016**, 8, (14), 1707-1710.
- [179] Zhao Y., Truhlar D. G. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, 120, 215-241.
- [180] Petersson G. A., Bennett A., Tensfeldt T. G., Al-Laham M. A., Shirley W. A., Mantzaris J. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. *J. Chem. Phys.* **1988**, 89, 2193-2218.
- [181] Petersson G. A., Al-Laham M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **1991**, 94, 6081-6090.
- [182] Sheldrick G. M. SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.* **2015**, 71, 3-8.
- [183] Sheldrick G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.* **2015**, 71, 3-8.
- [184] Xavier C. P. R., Lima C. F., Rohde M., Pereira-Wilson C. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, 68, 1449-1457.
- [185] Crowley L. C., Christensen M. E., Waterhouse N. J. Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**.

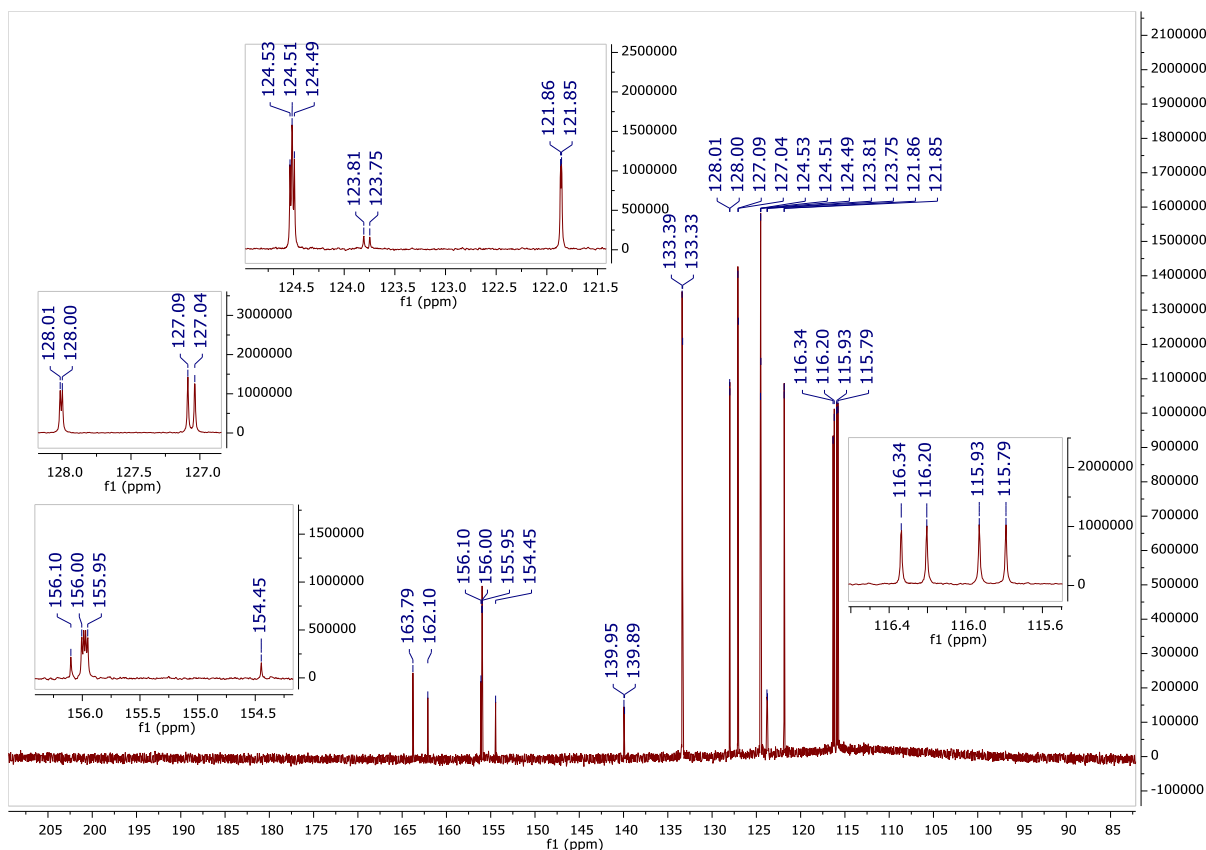
VI
ZAŁĄCZNIKI



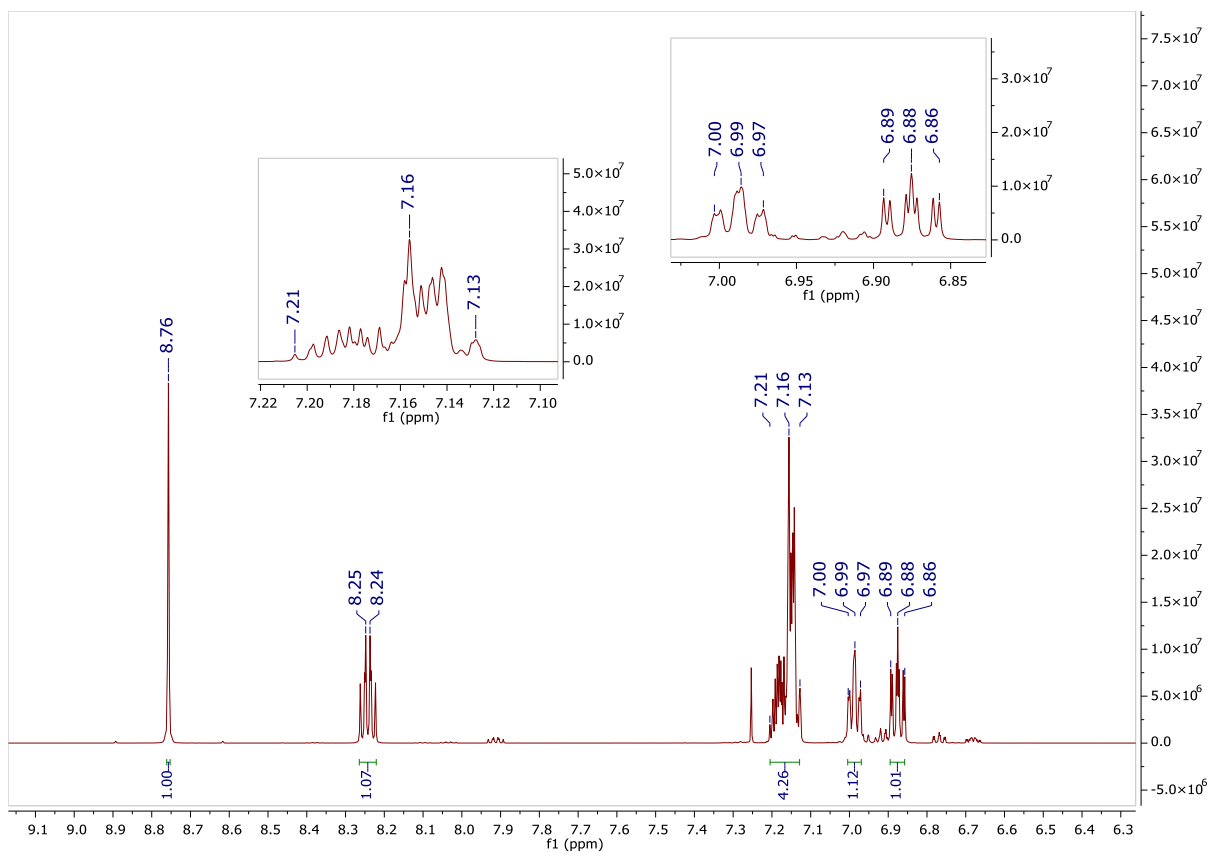
Rysunek 1. Widmo ¹H NMR związku 1.1 (CDCl₃).



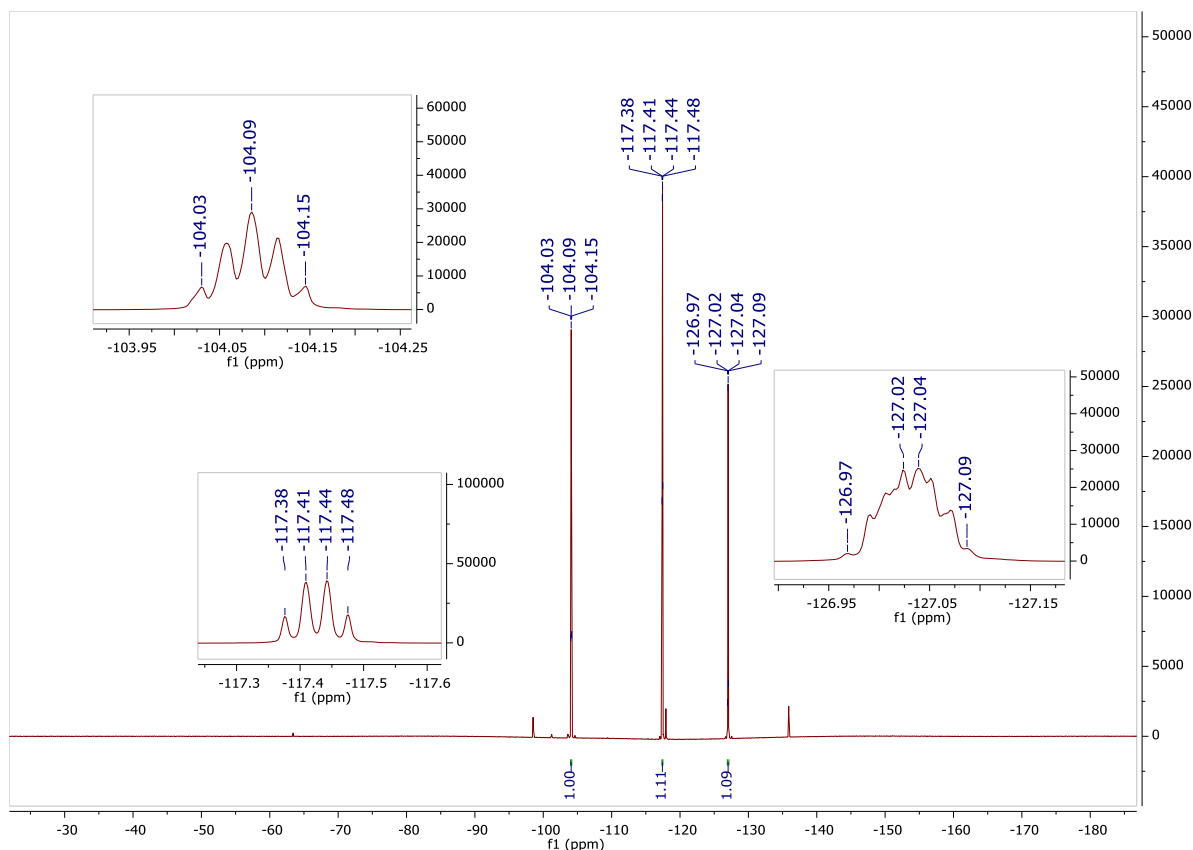
Rysunek 2. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.1 (CDCl₃).



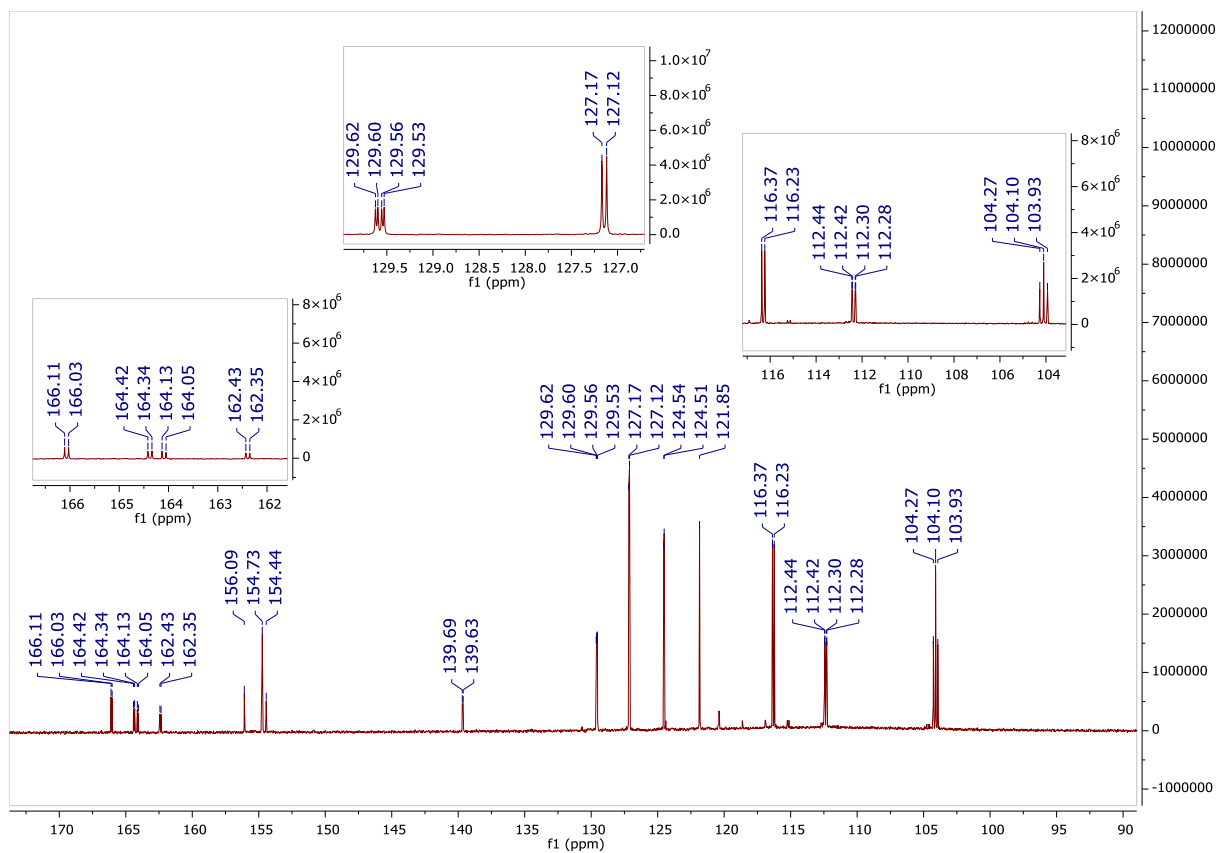
Rysunek 3. Widmo ^{13}C NMR związku 1.1 (CDCl_3).



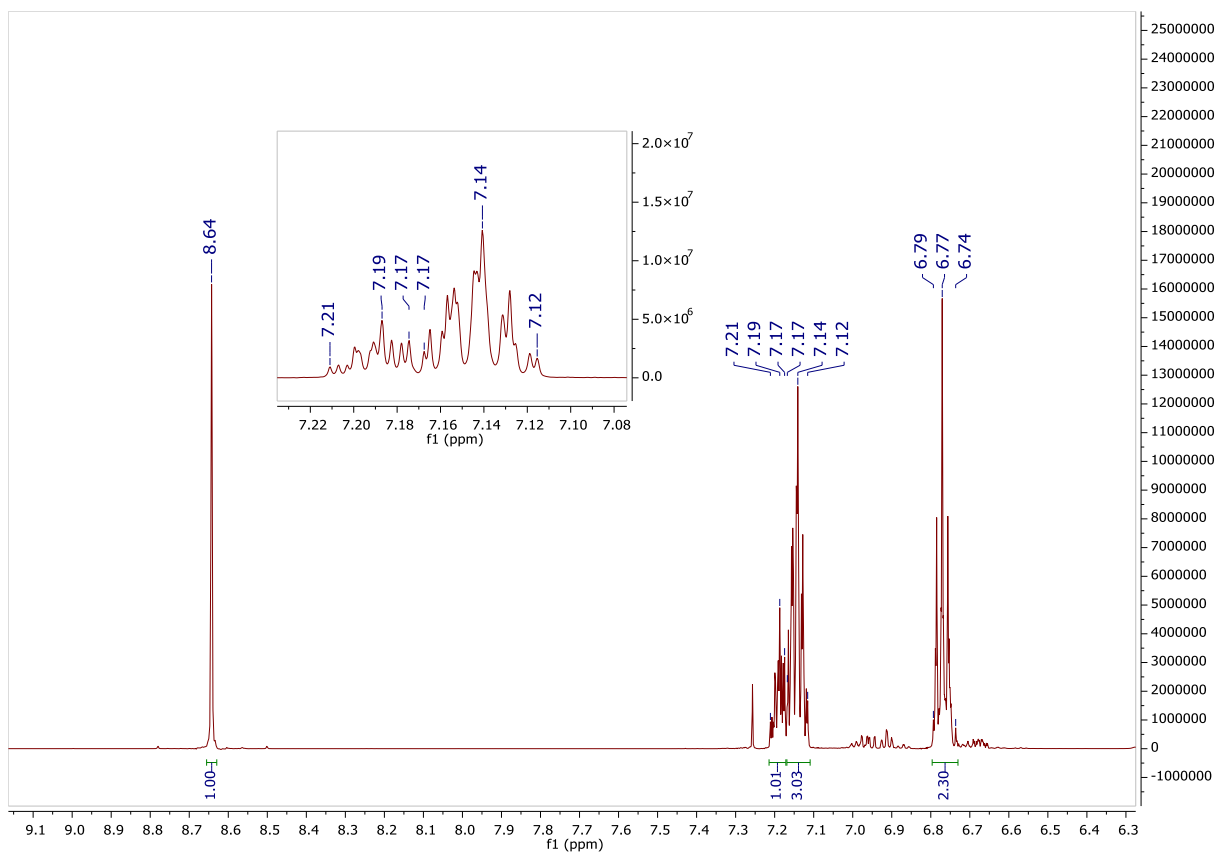
Rysunek 4. Widmo ^1H NMR związku 1.2 (CDCl_3).



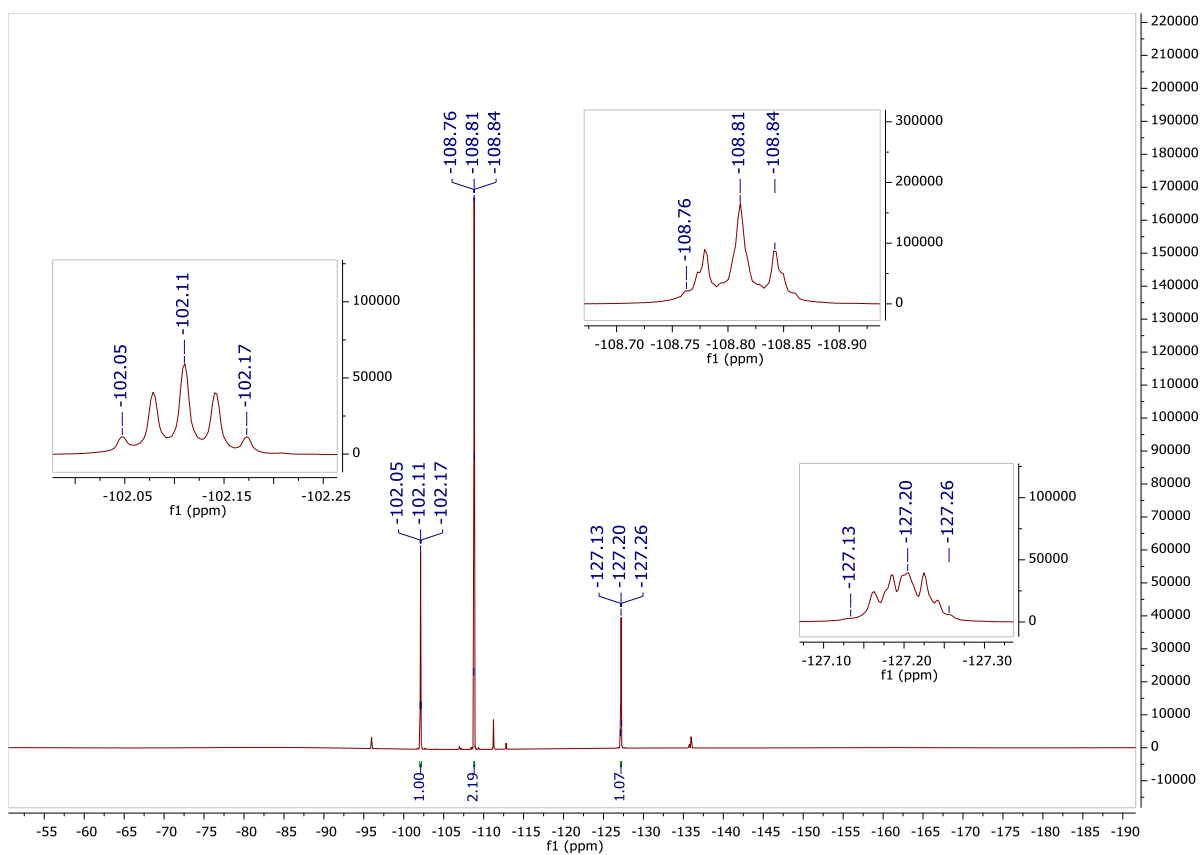
Rysunek 5. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.2 (CDCl₃).



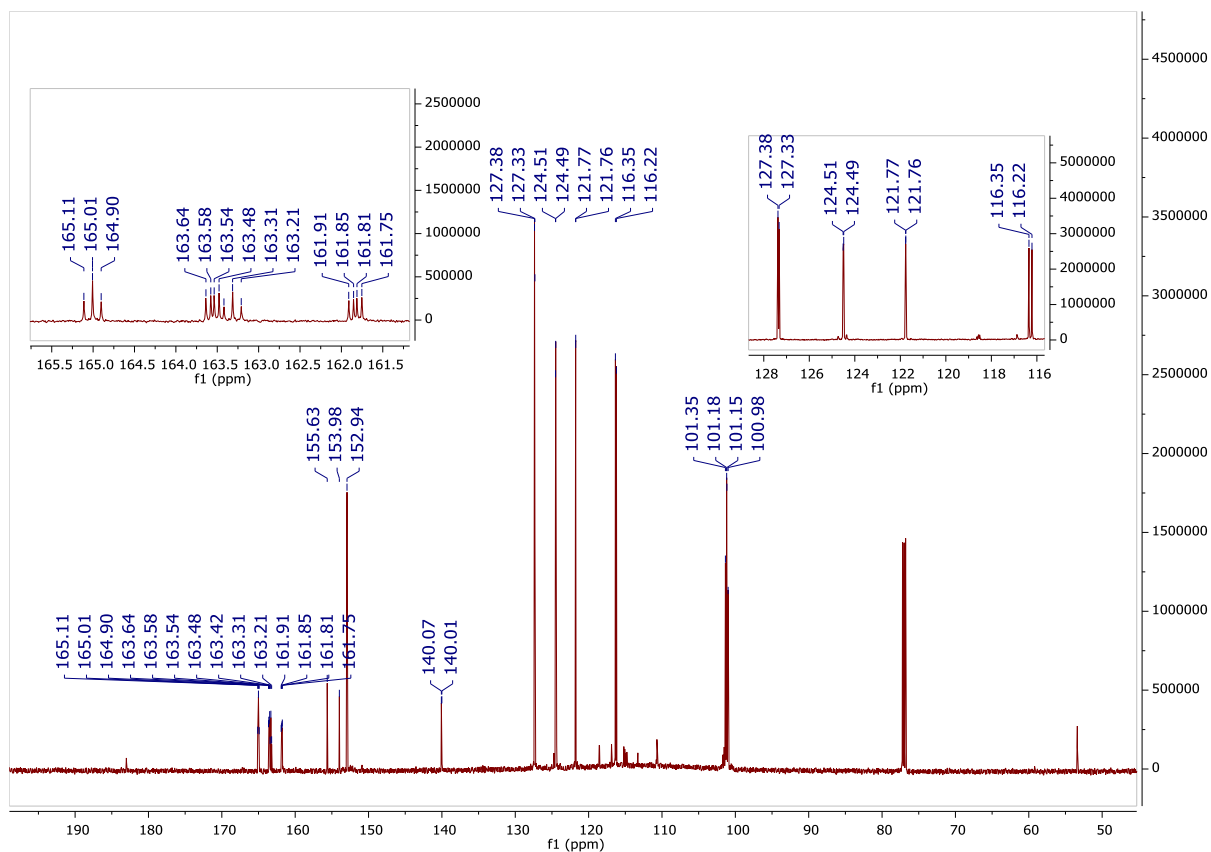
Rysunek 6. Widmo ¹³C NMR związku 1.2 (CDCl₃).



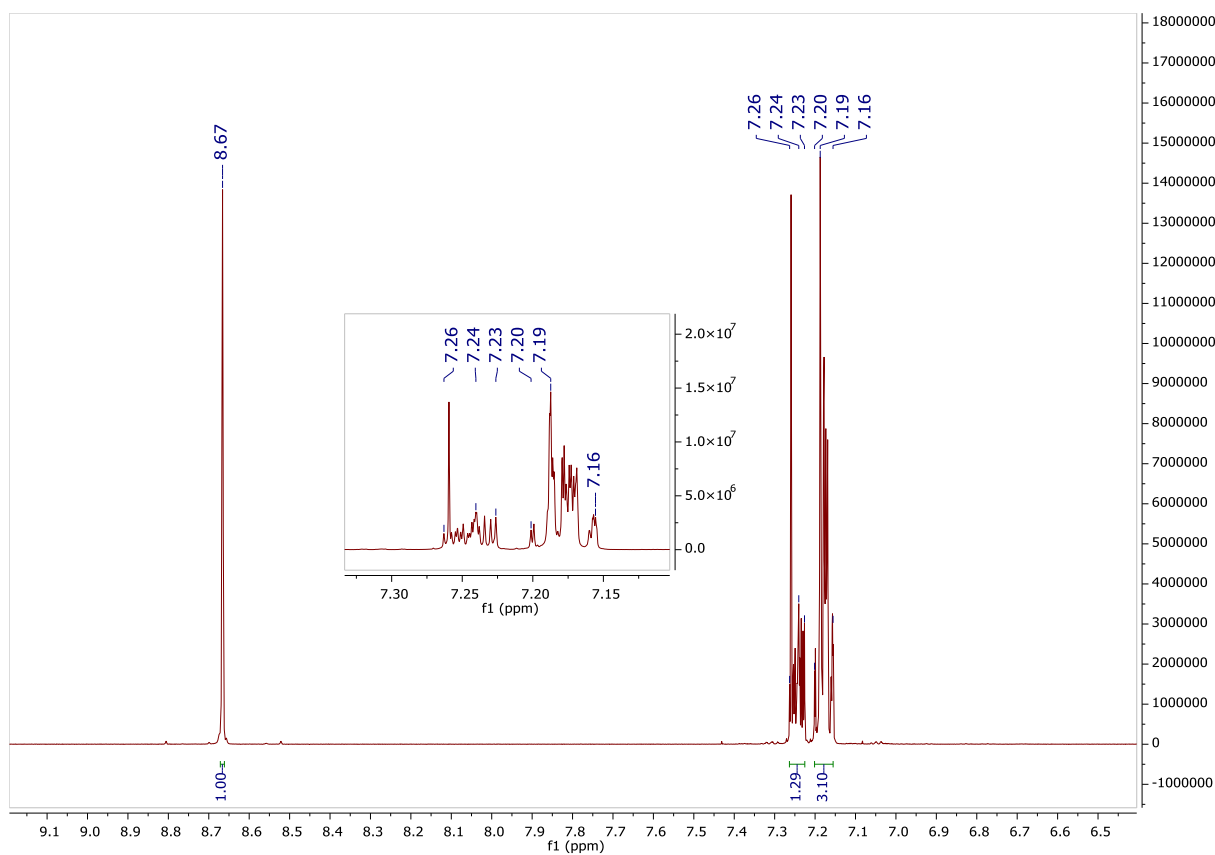
Rysunek 7. Widmo ^1H NMR związku 1.3 (CDCl_3).



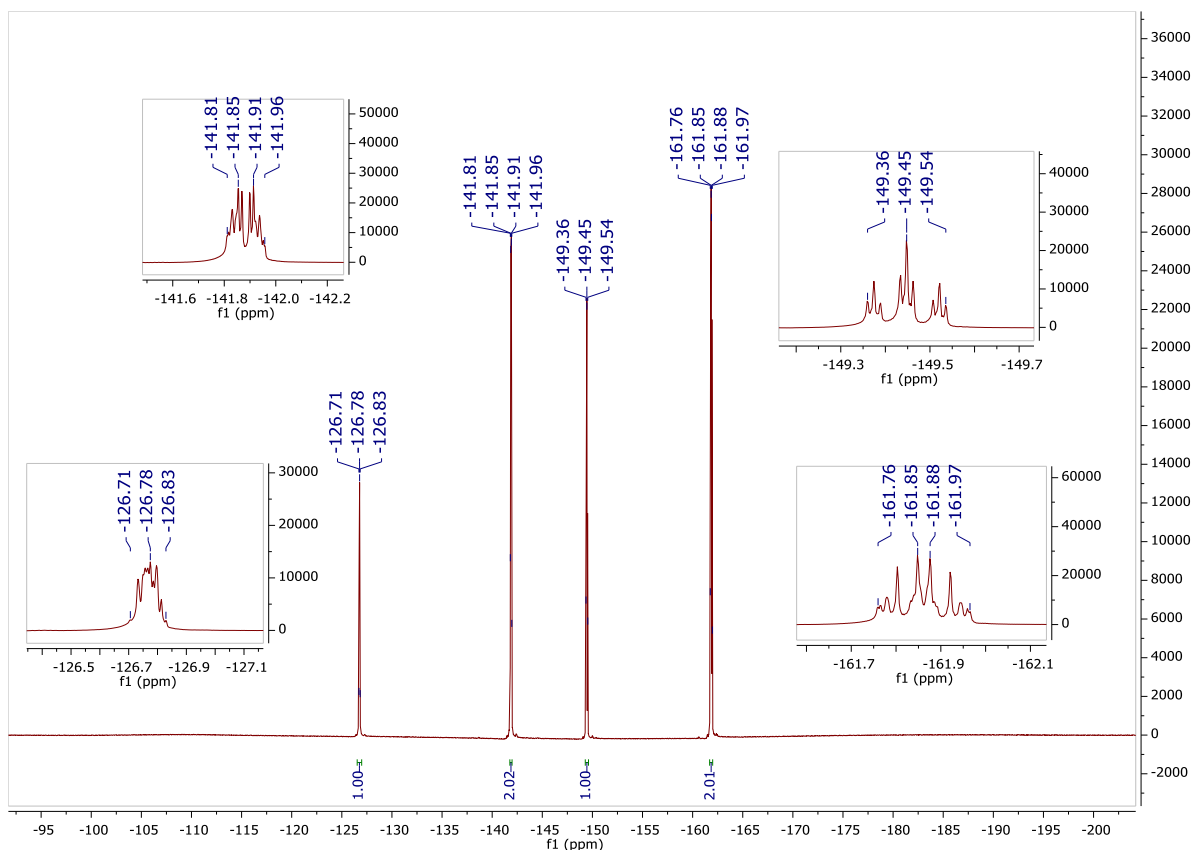
Rysunek 8. Widmo ^{19}F NMR związku 1.3 (CDCl_3).



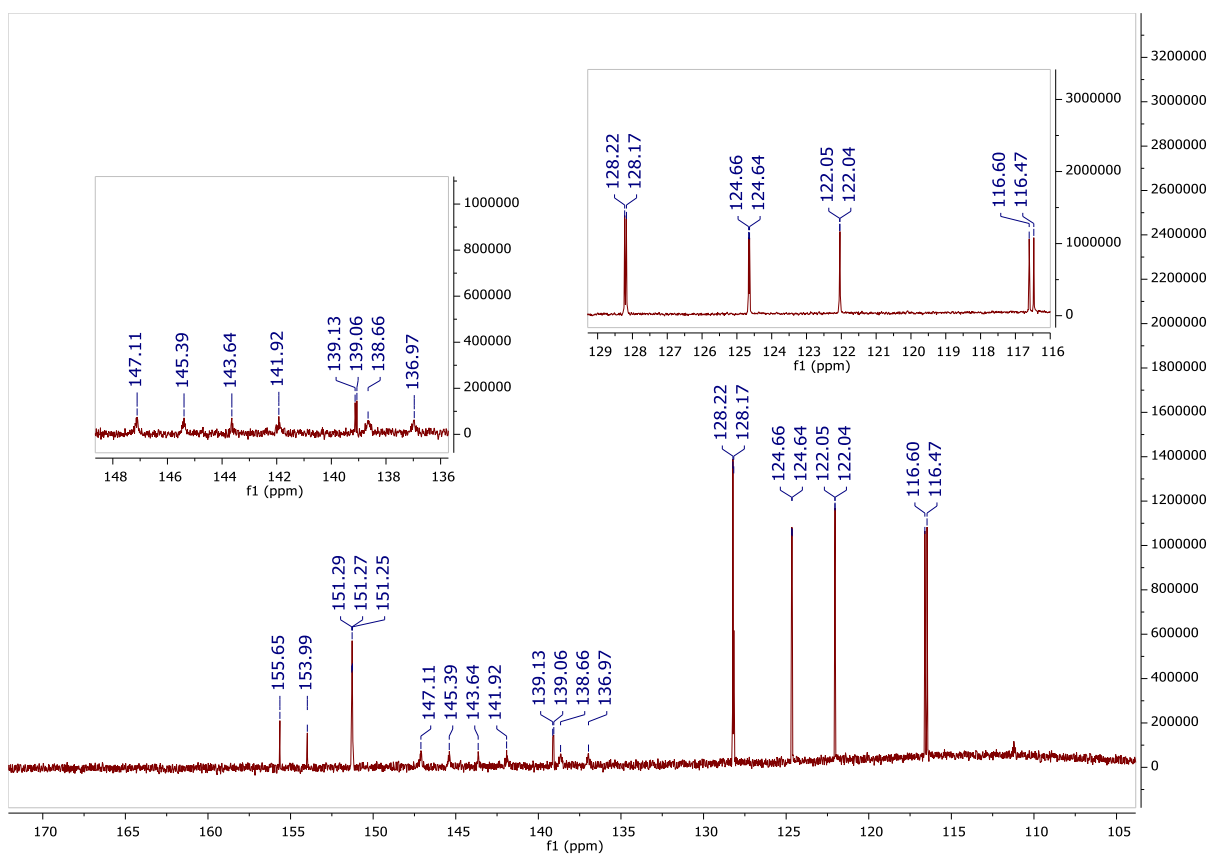
Rysunek 9. Widmo ¹³C NMR związku 1.3 (CDCl₃).



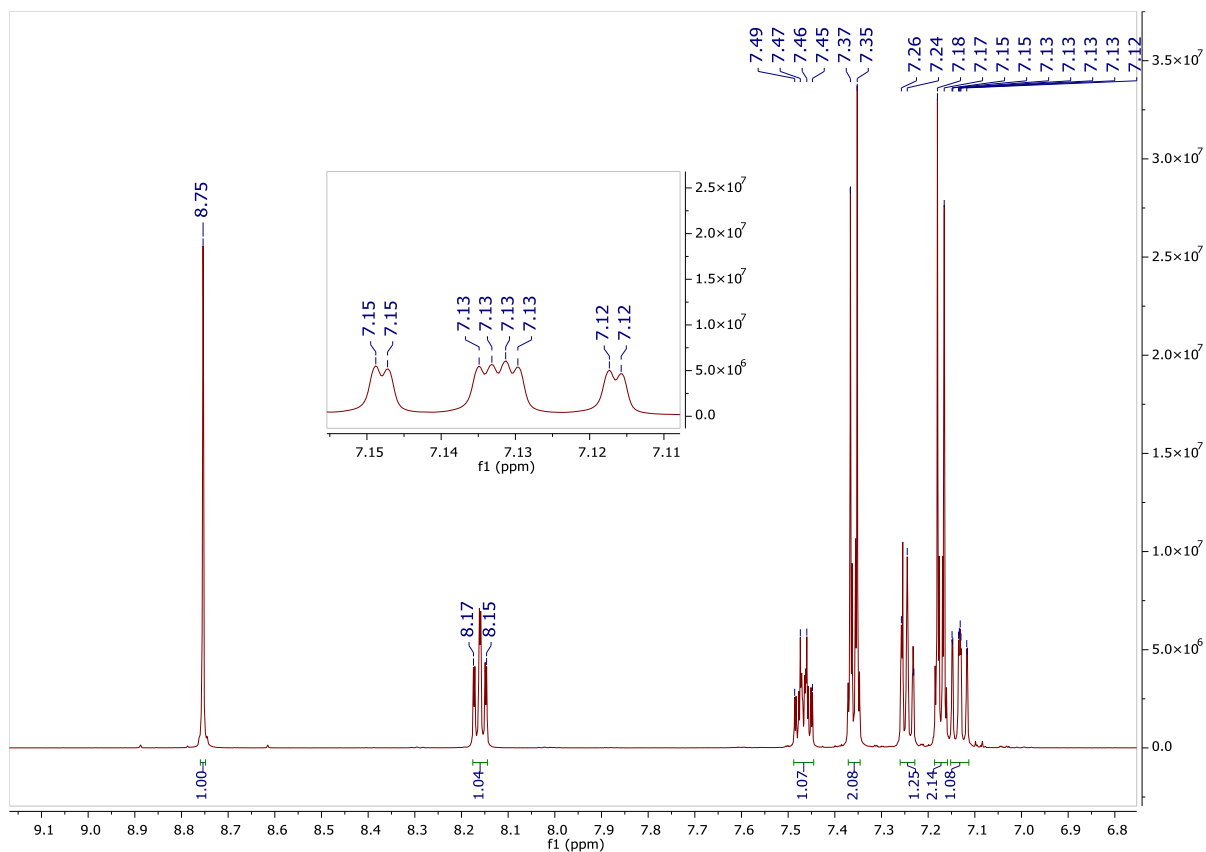
Rysunek 10. Widmo ¹H NMR związku 1.4 (CDCl₃).



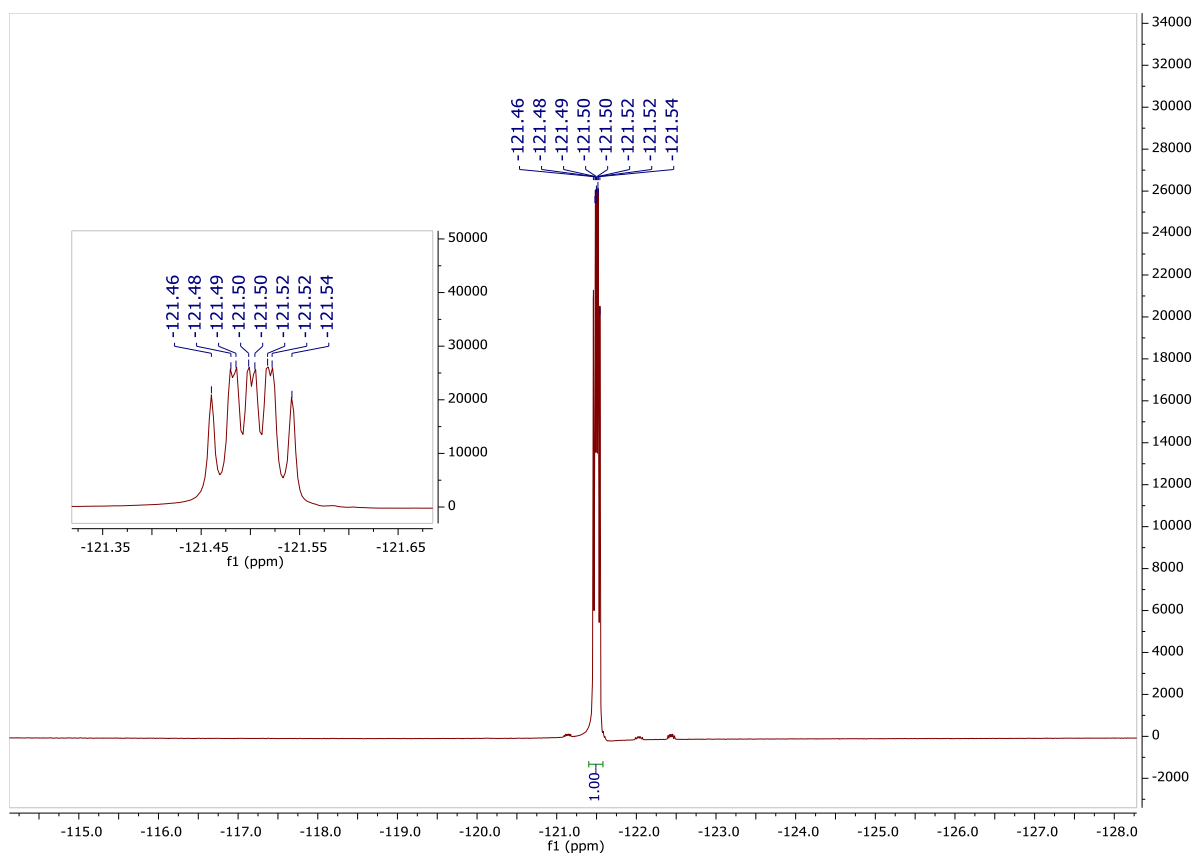
Rysunek 11. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.4 (CDCl₃).



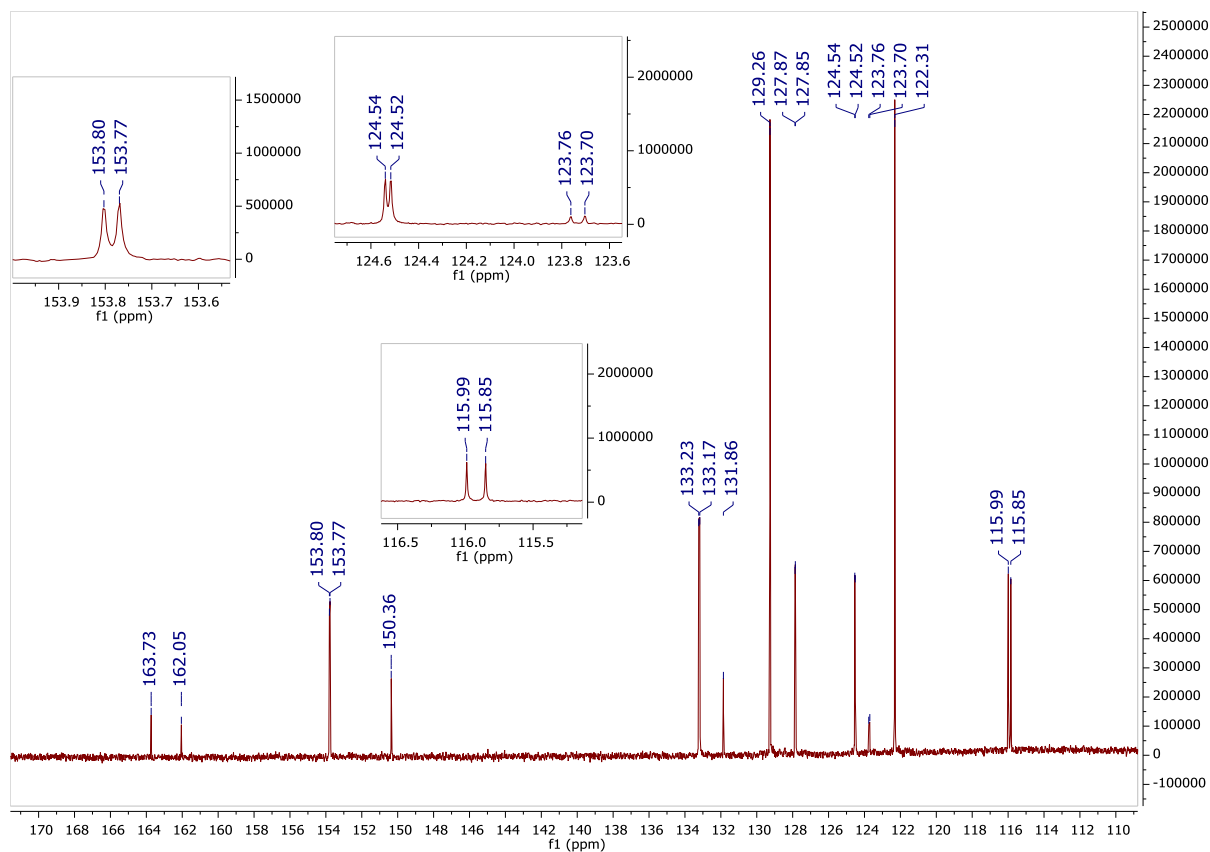
Rysunek 12. Widmo ¹³C NMR związku 1.4 (CDCl₃).



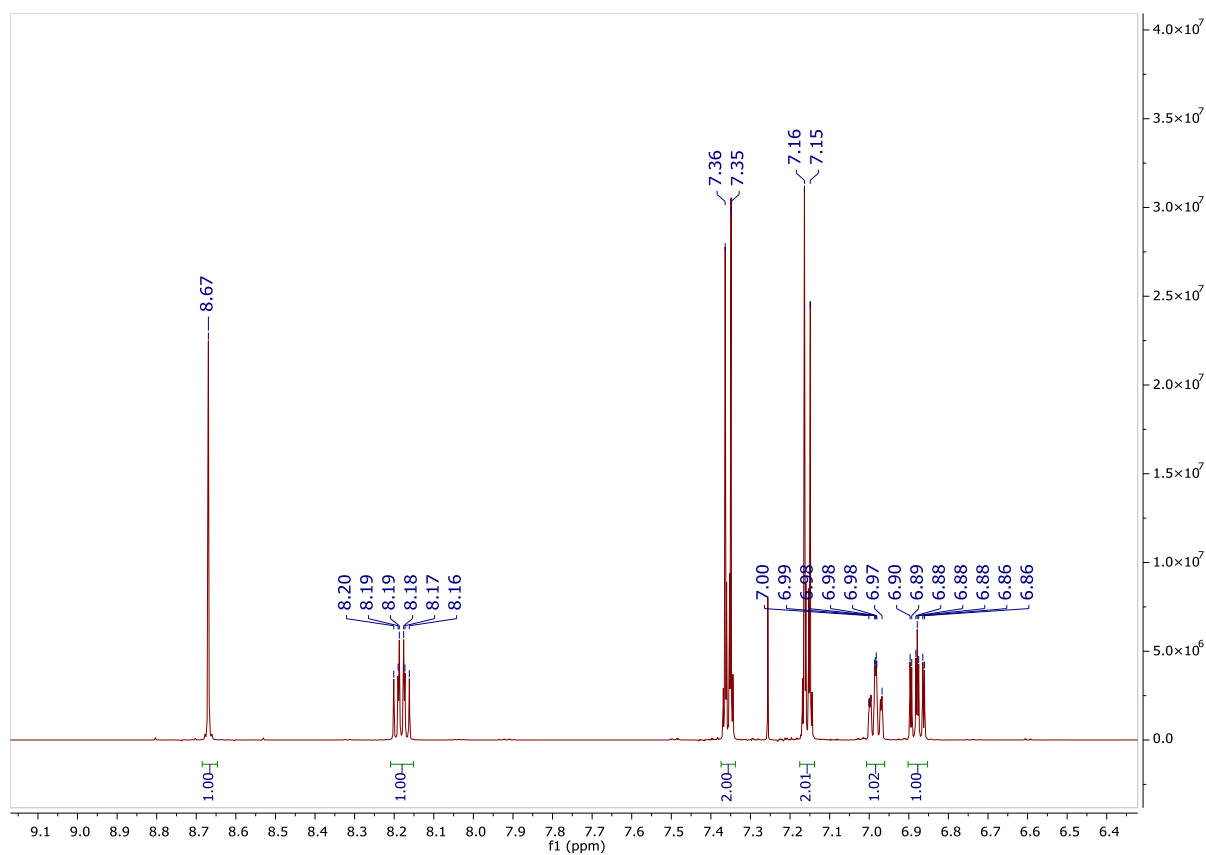
Rysunek 13. Widmo ^1H NMR związku 1.5 (CDCl_3).



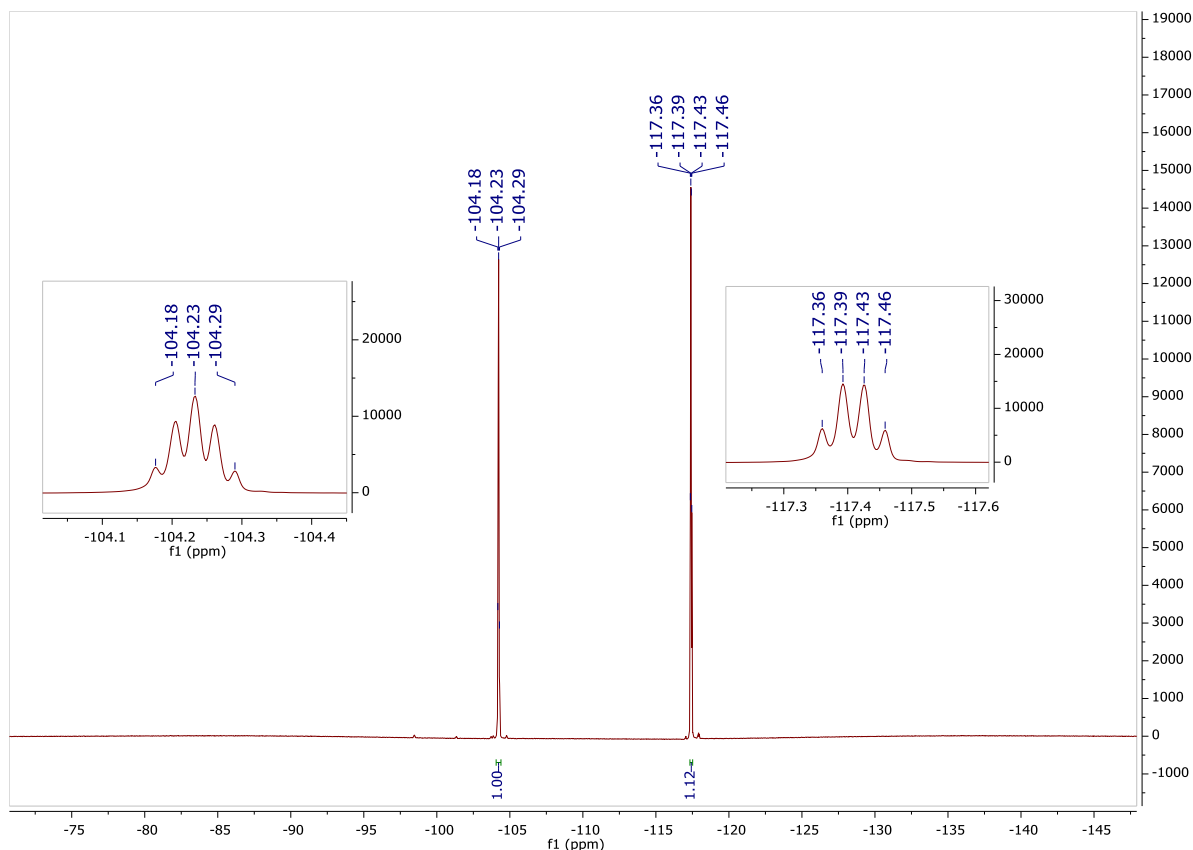
Rysunek 14. Widmo ^{19}F NMR związku 1.5 (CDCl_3).



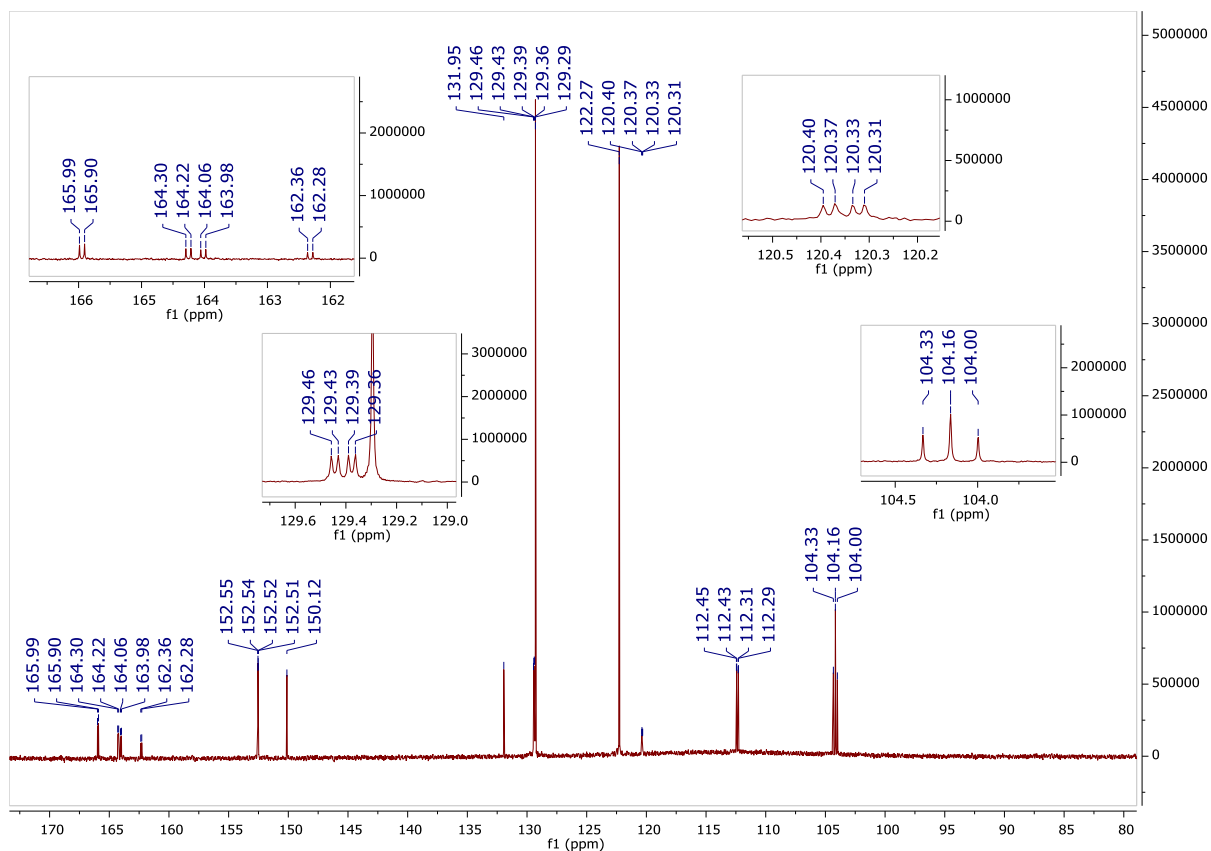
Rysunek 15. Widmo ^{13}C NMR związku 1.5 (CDCl_3).



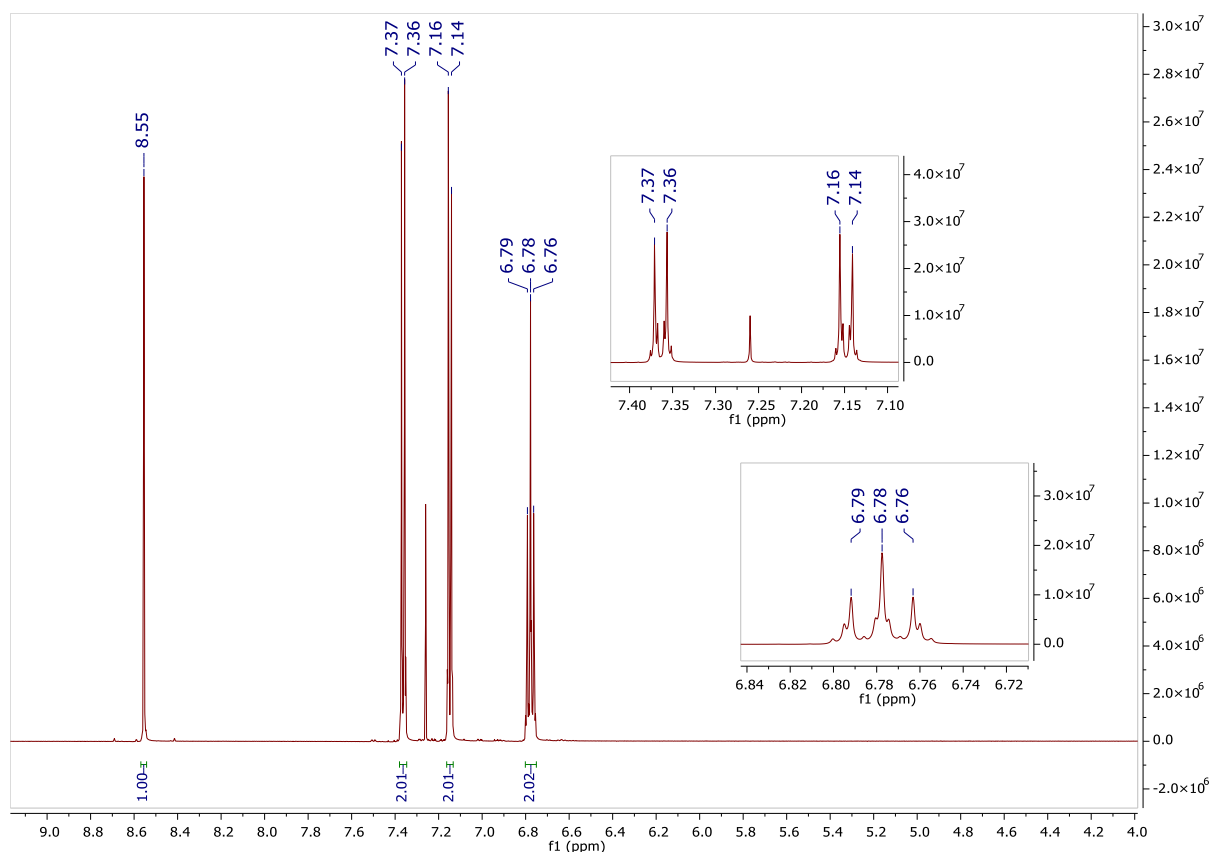
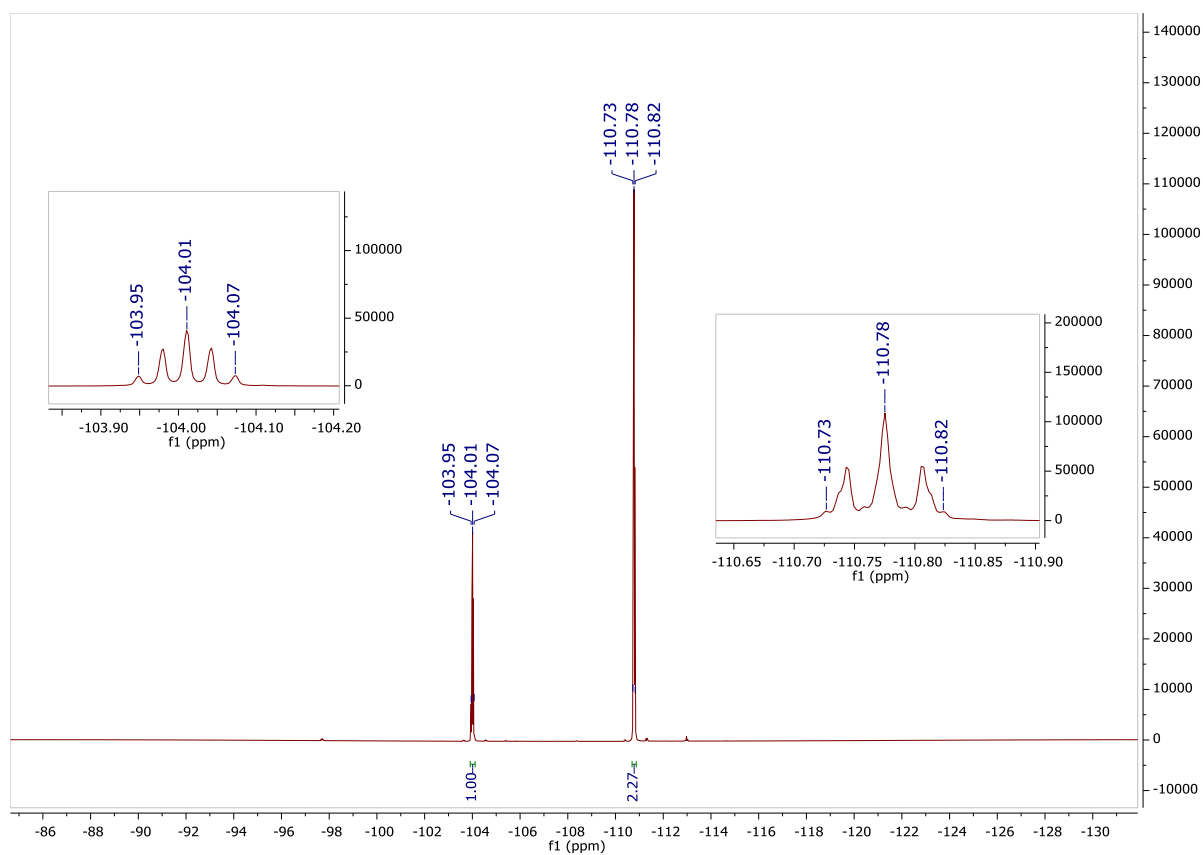
Rysunek 16. Widmo ^1H NMR związku 1.6 (CDCl_3).

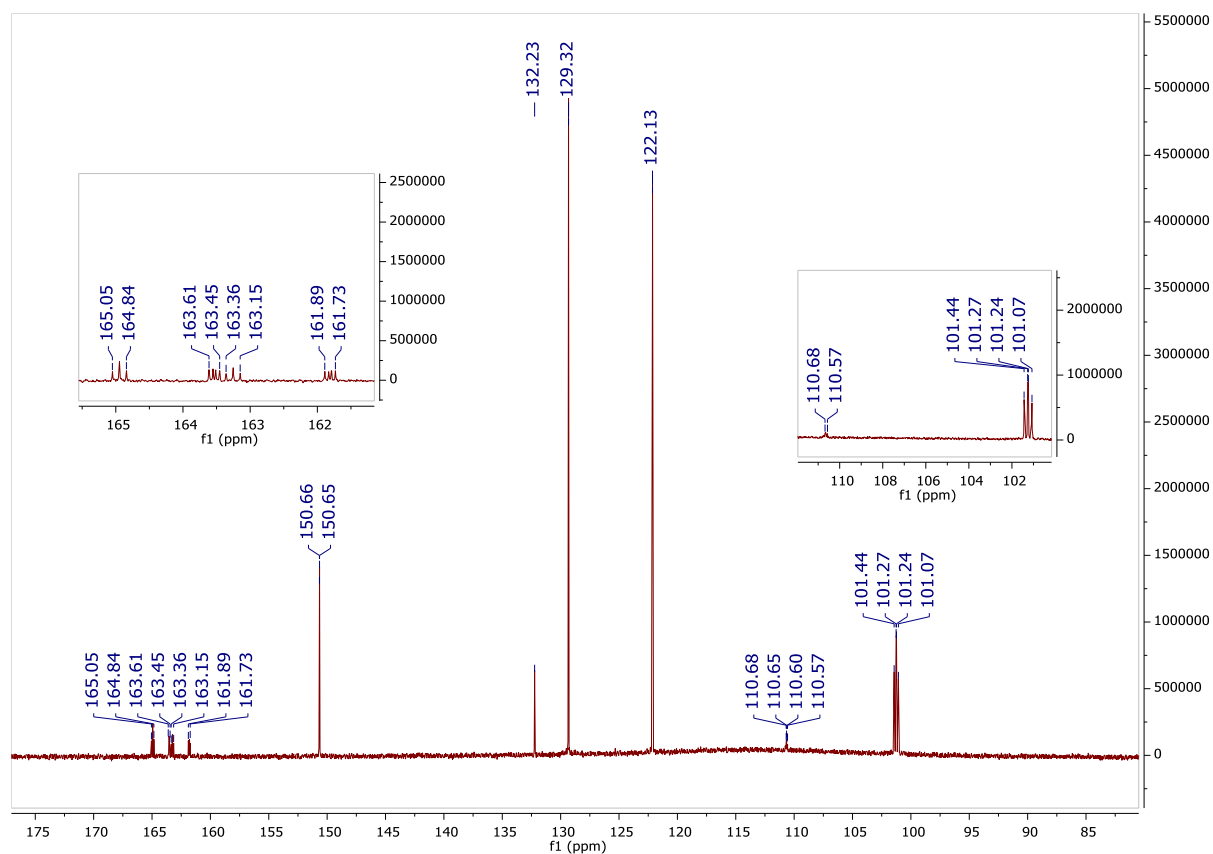


Rysunek 17. Widmo ^{19}F NMR związku 1.6 (CDCl_3).

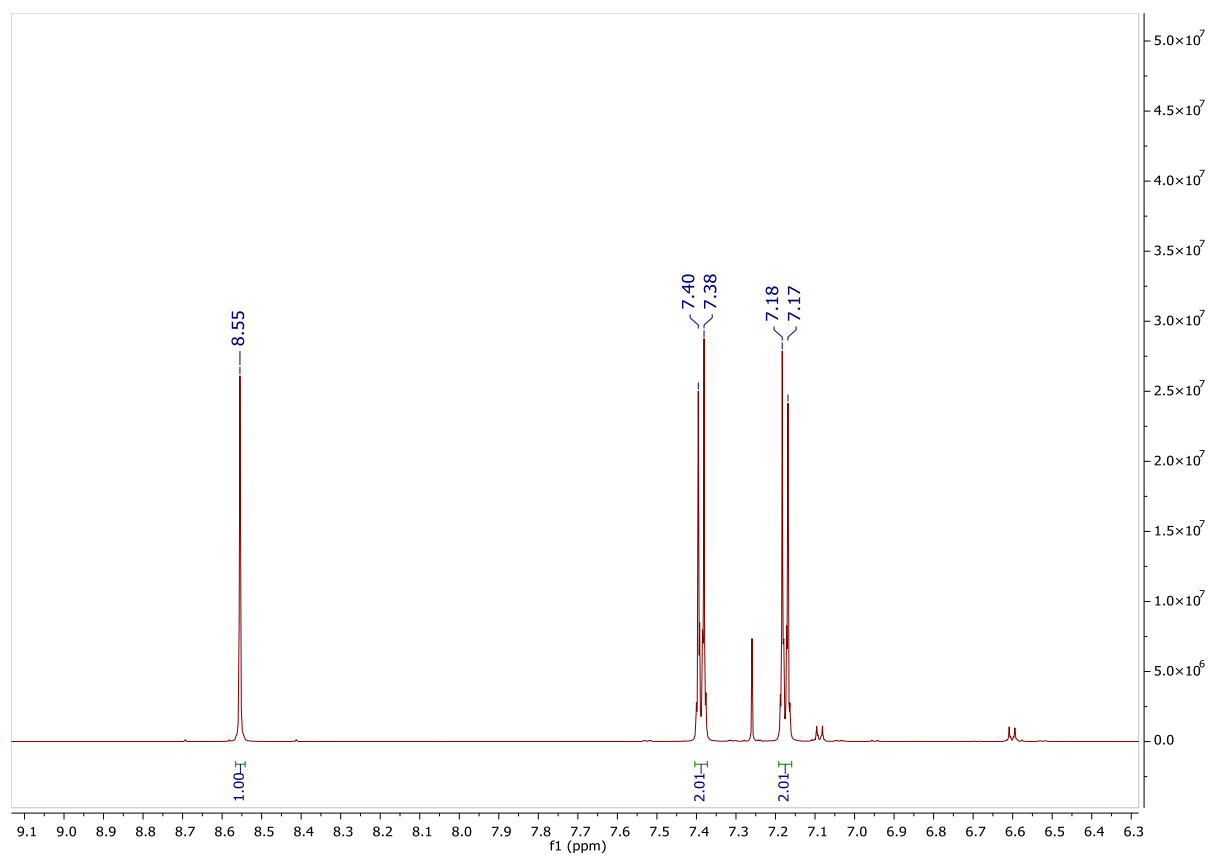


Rysunek 18. Widmo ^{13}C NMR związku 1.6 (CDCl_3).

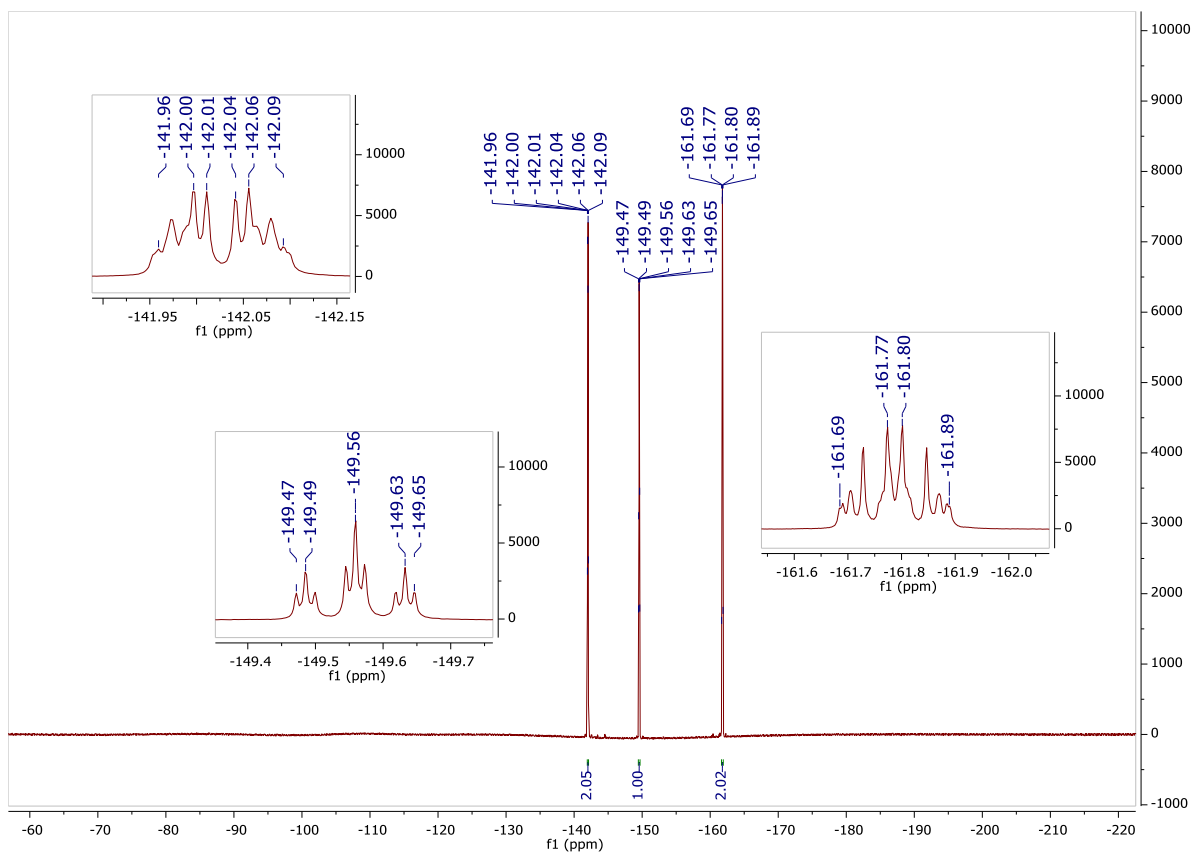
Rysunek 19. Widmo ^1H NMR związku 1.7 (CDCl_3).Rysunek 20. Widmo ^{19}F NMR związku 1.7 (CDCl_3).



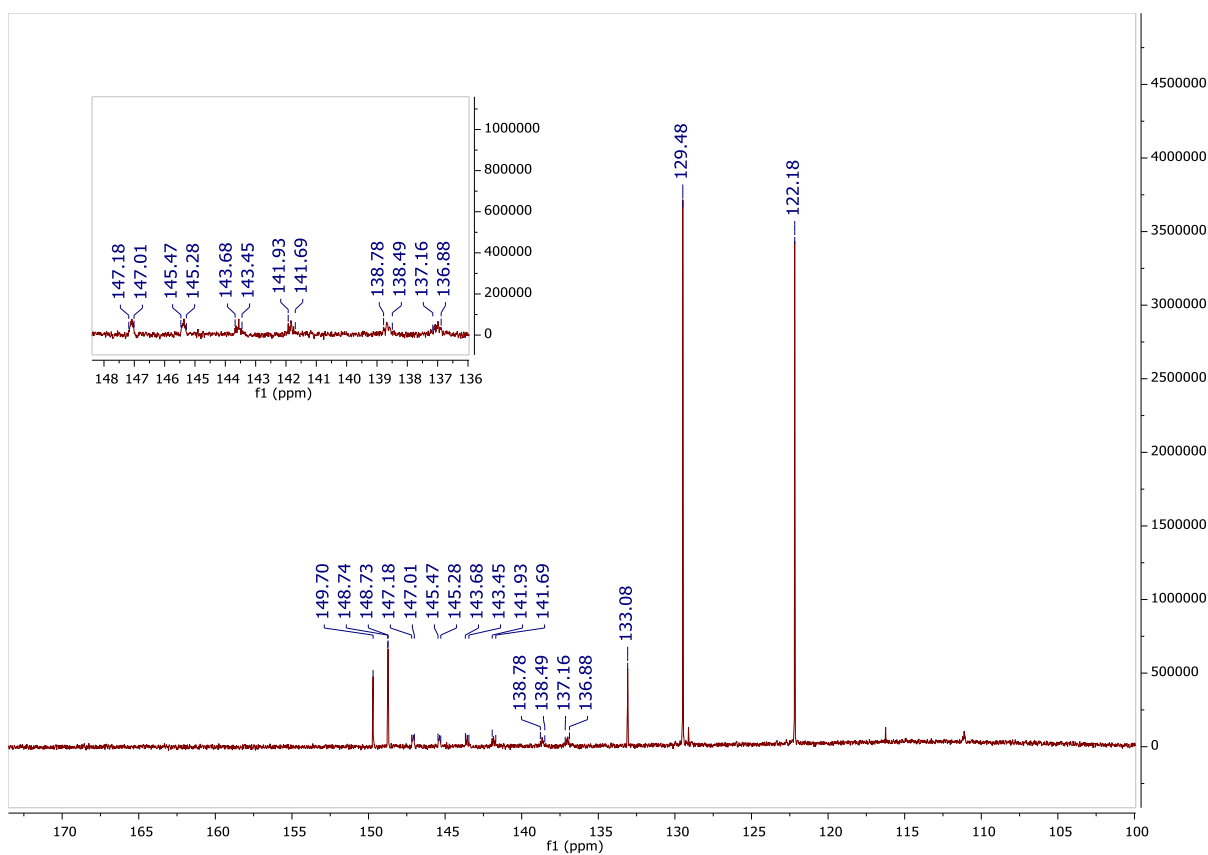
Rysunek 21. Widmo ^{13}C NMR związku 1.7 (CDCl_3).



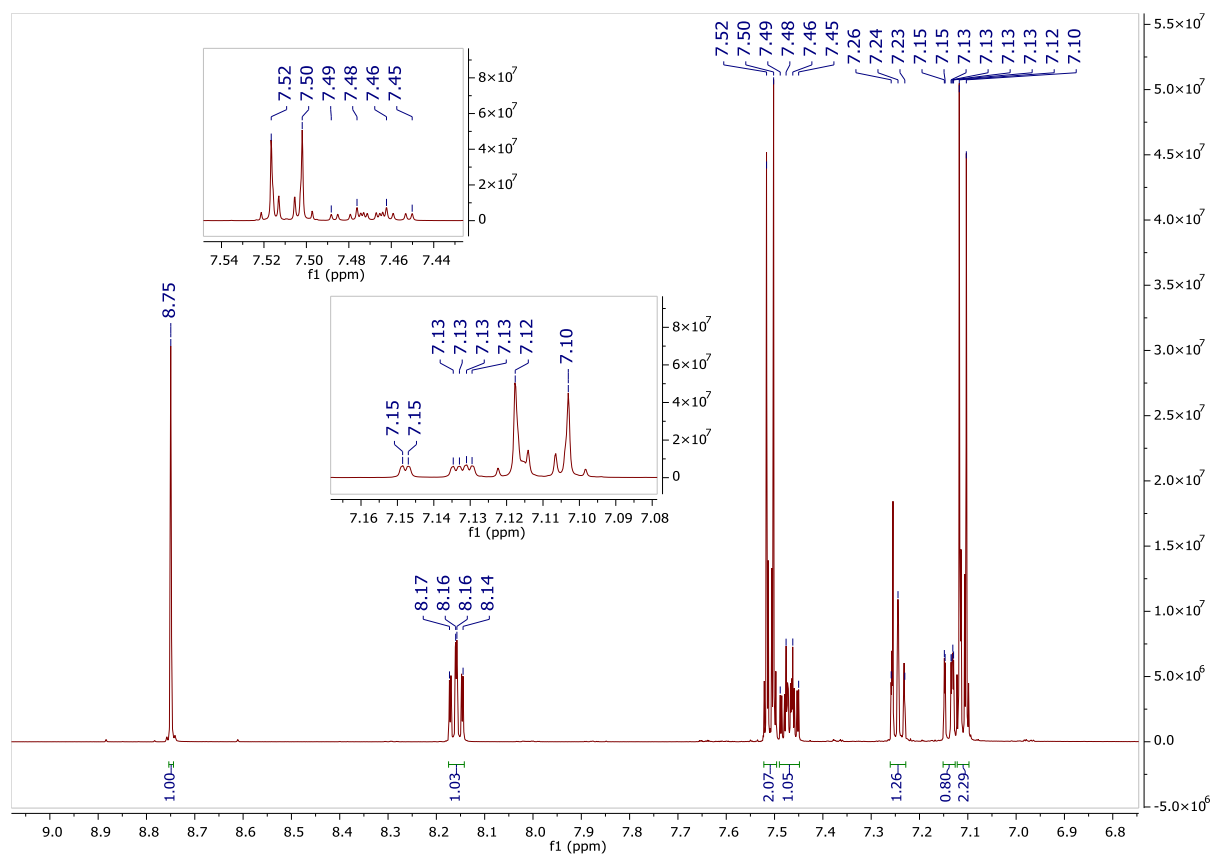
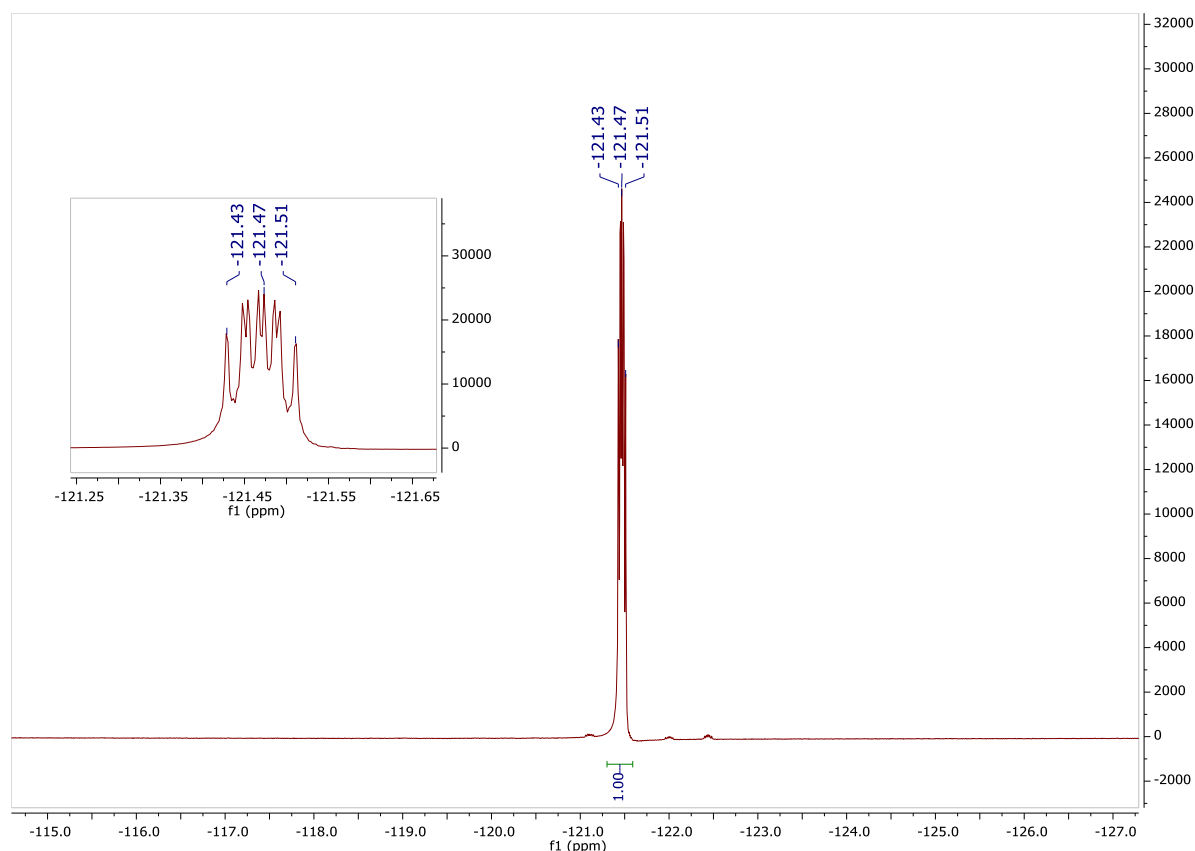
Rysunek 22. Widmo ^1H NMR związku 1.8 (CDCl_3).

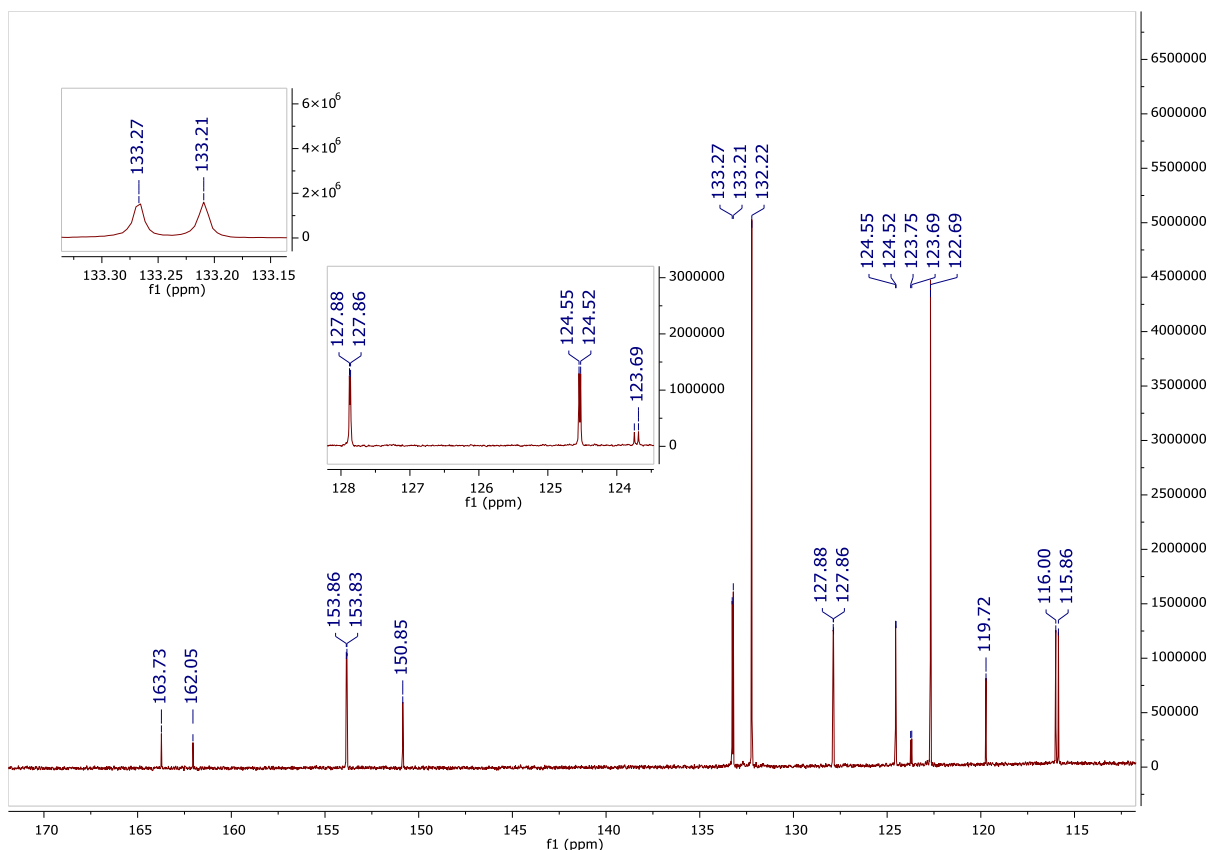


Rysunek 23. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.8 (CDCl₃).

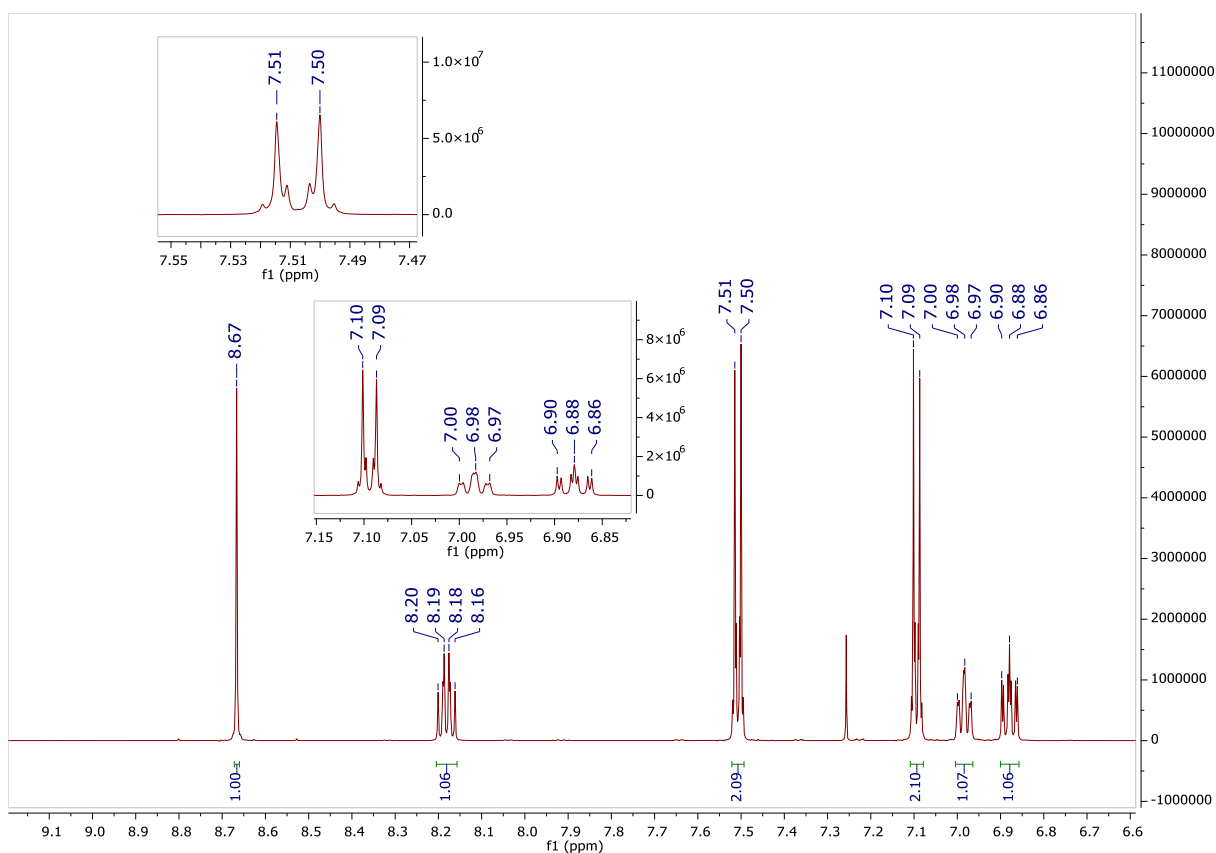


Rysunek 24. Widmo ¹³C NMR związku 1.8 (CDCl₃).

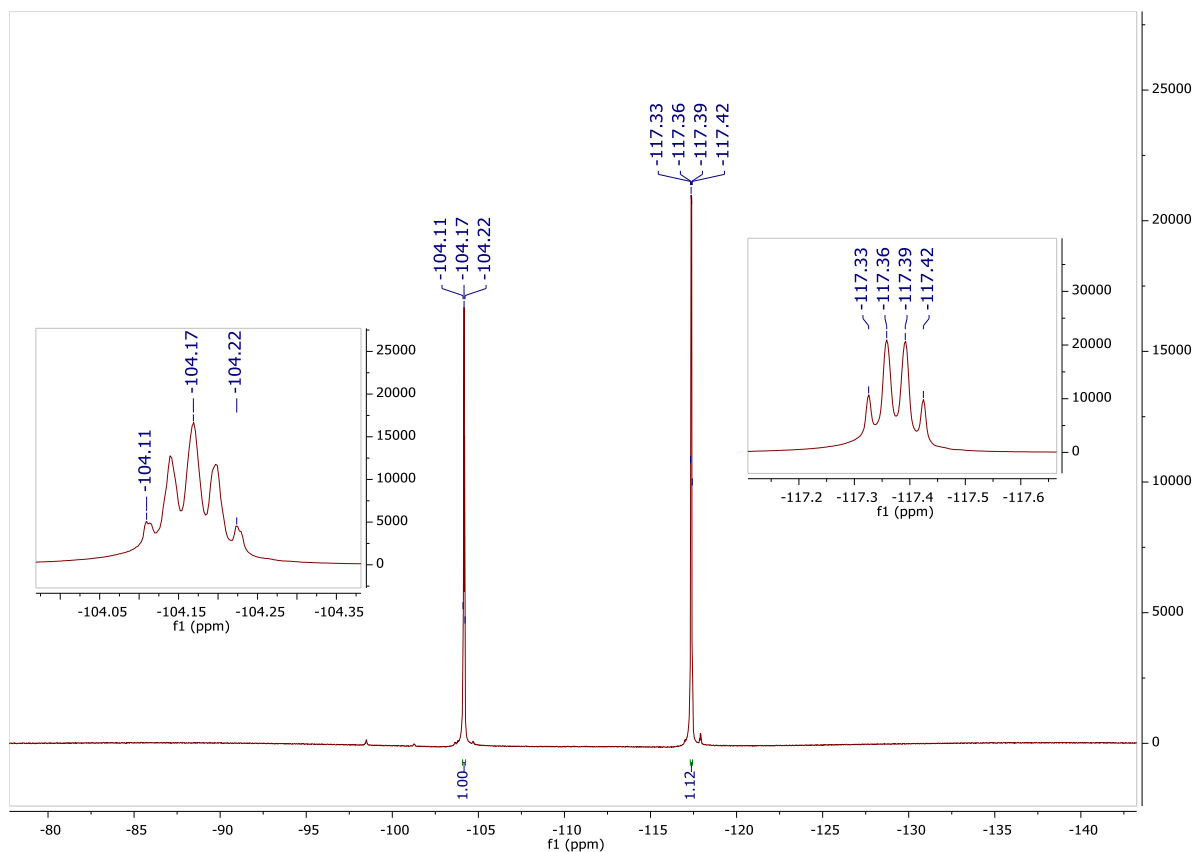
Rysunek 25. Widmo ^1H NMR związku 1.9 (CDCl_3).Rysunek 26. Widmo ^{19}F NMR związku 1.9 (CDCl_3).



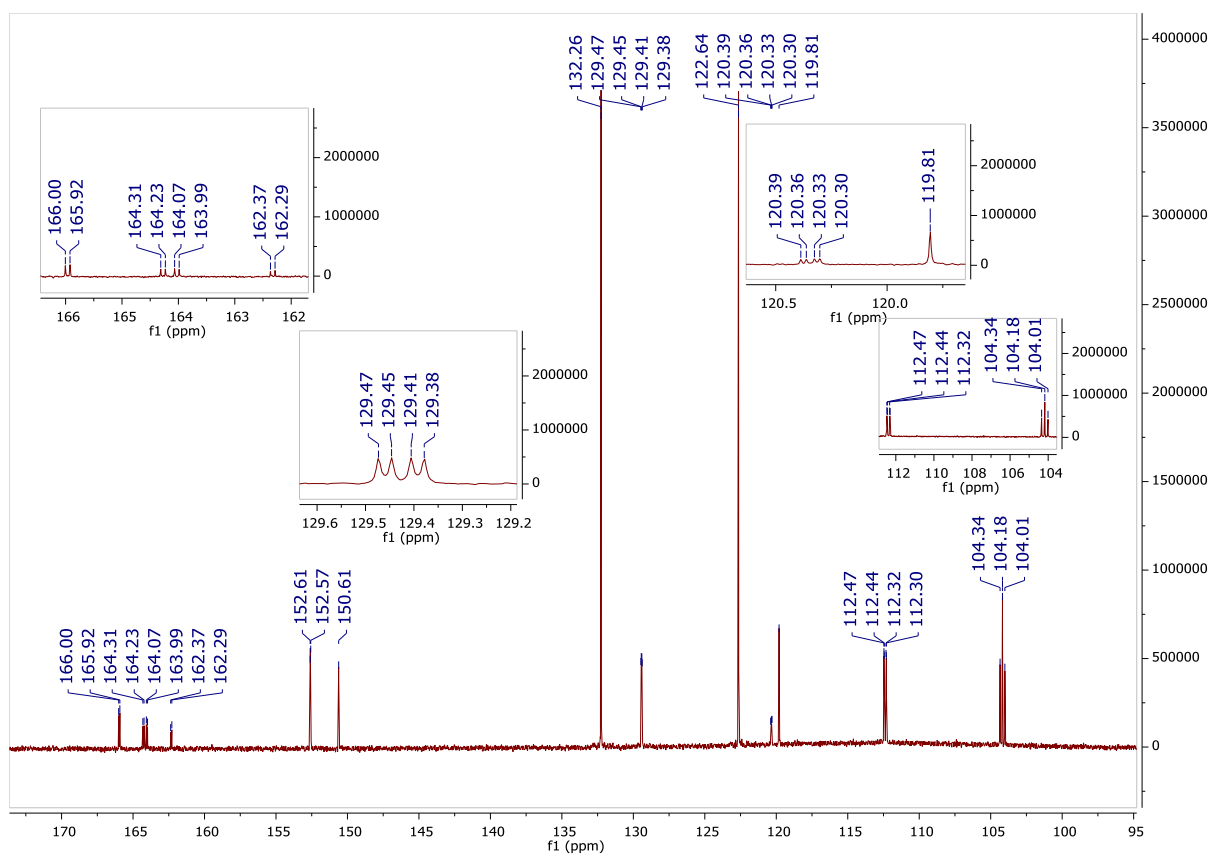
Rysunek 27. Widmo ¹³C NMR związku 1.9 (CDCl₃).



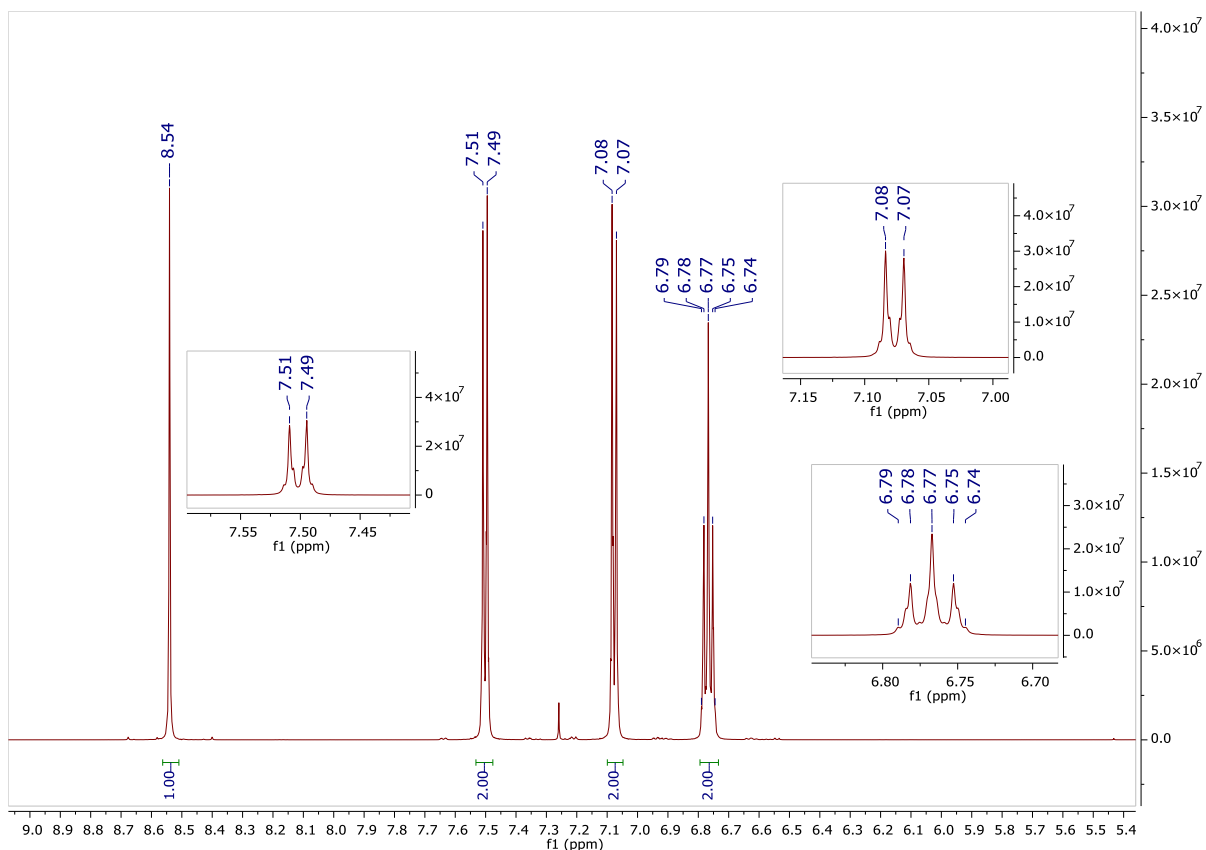
Rysunek 28. Widmo ¹H NMR związku 1.10 (CDCl₃).



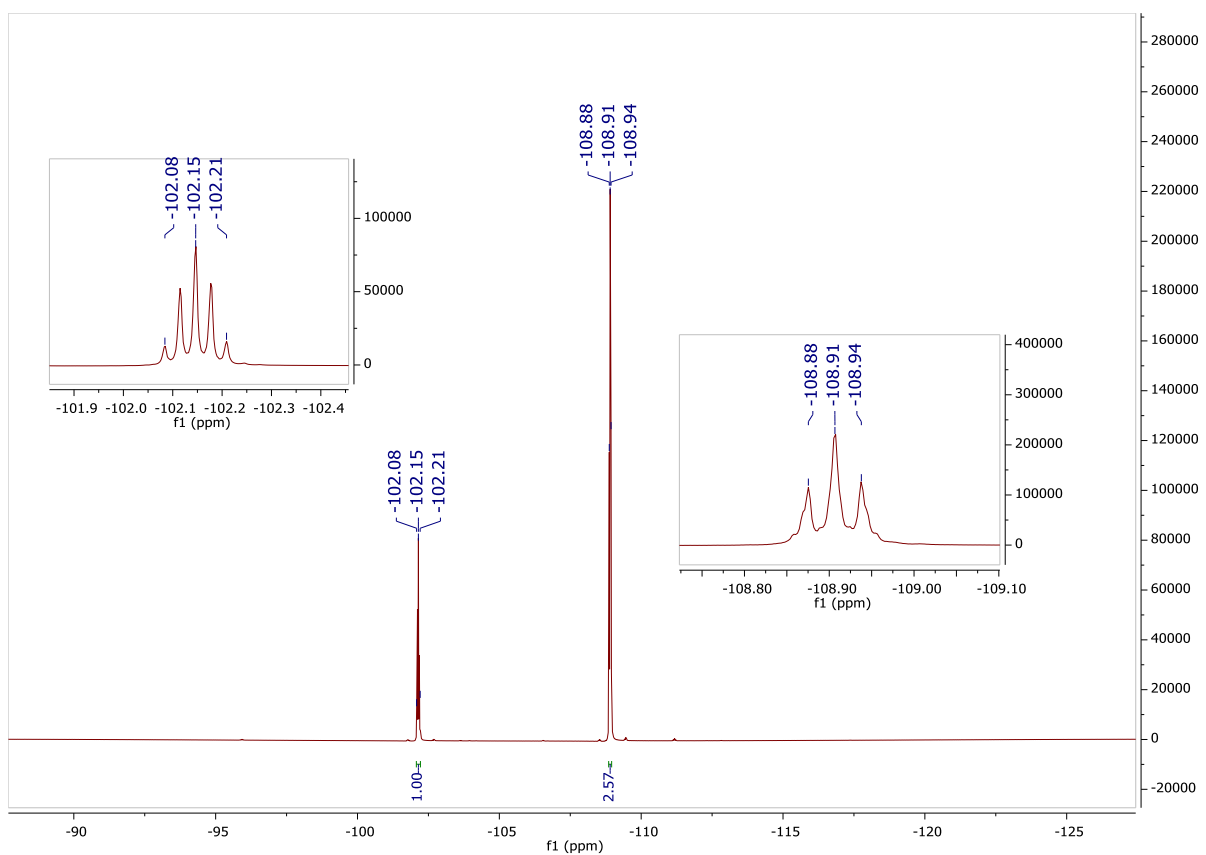
Rysunek 29. Widmo ^{19}F NMR związku 1.10 (CDCl_3).



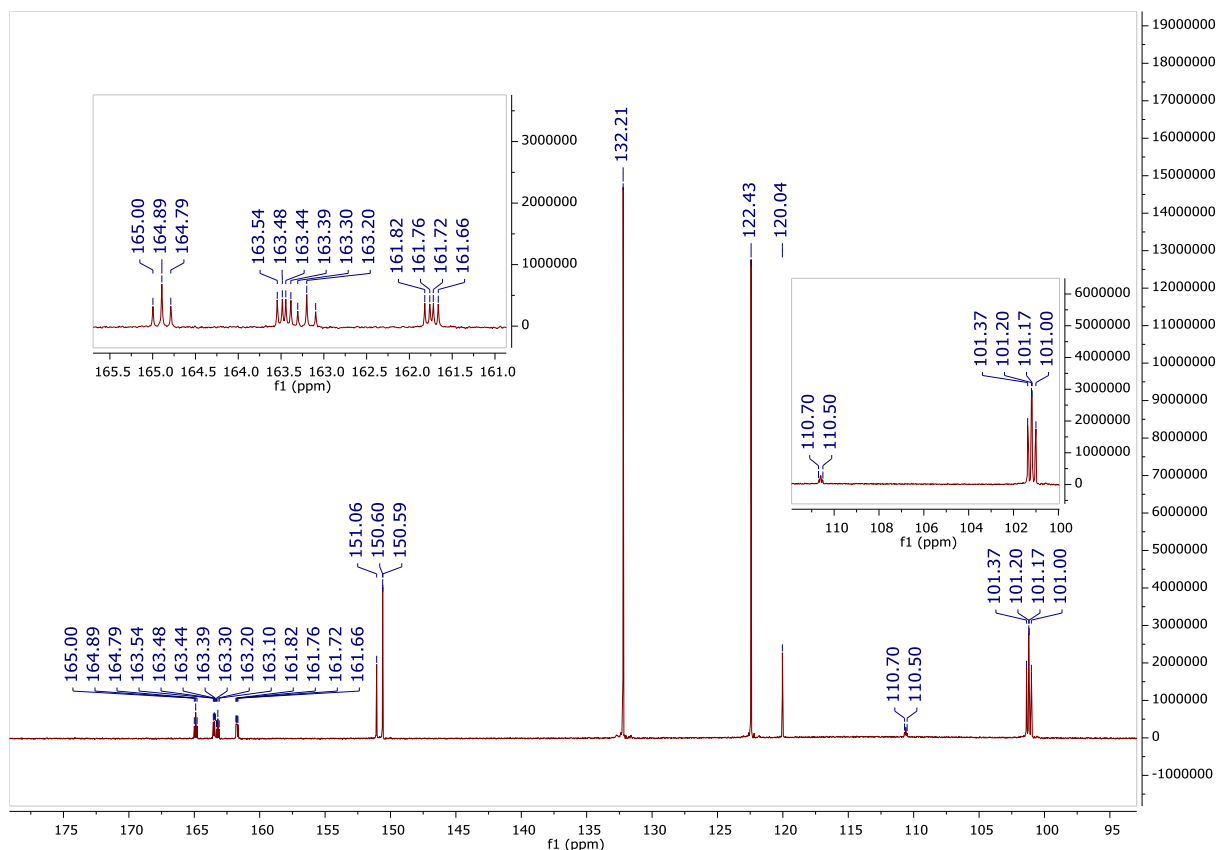
Rysunek 30. Widmo ^{13}C NMR związku 1.10 (CDCl_3).



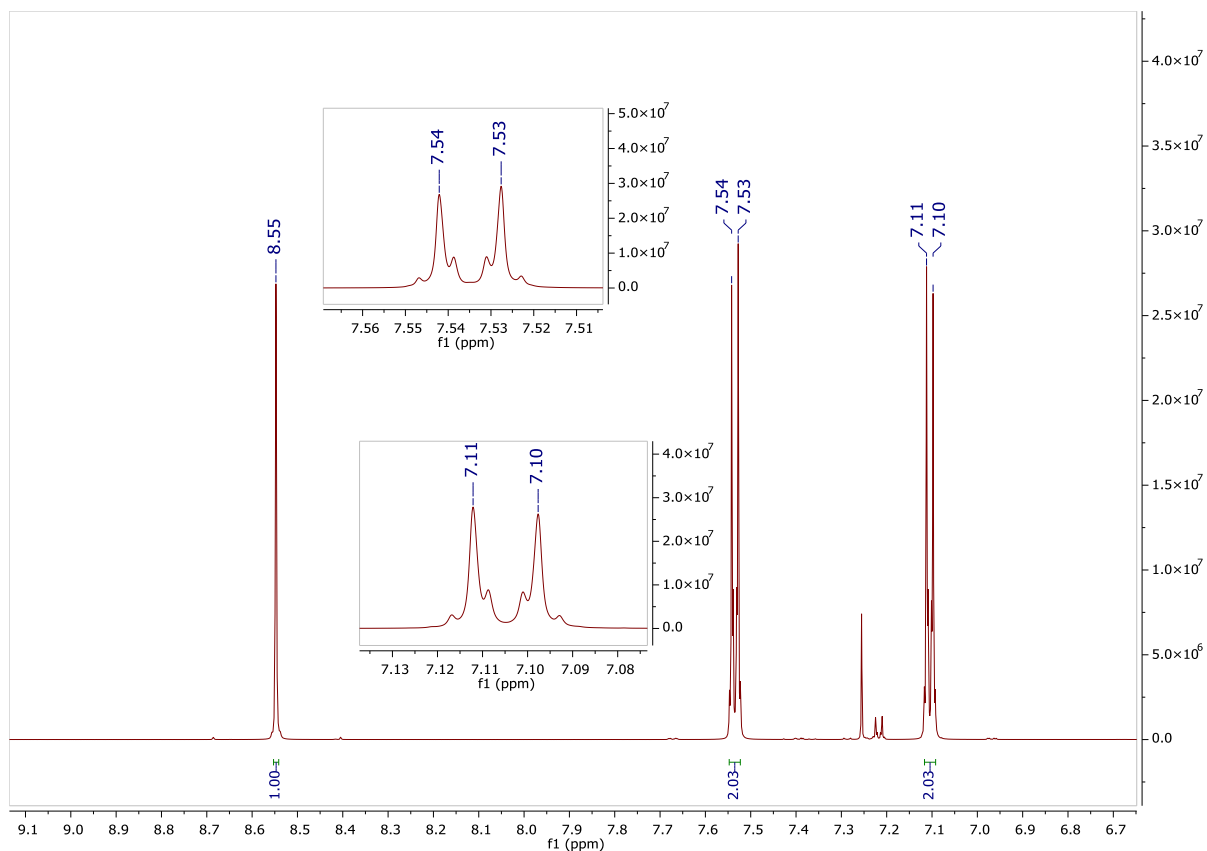
Rysunek 31. Widmo ¹H NMR związku 1.11 (CDCl₃).



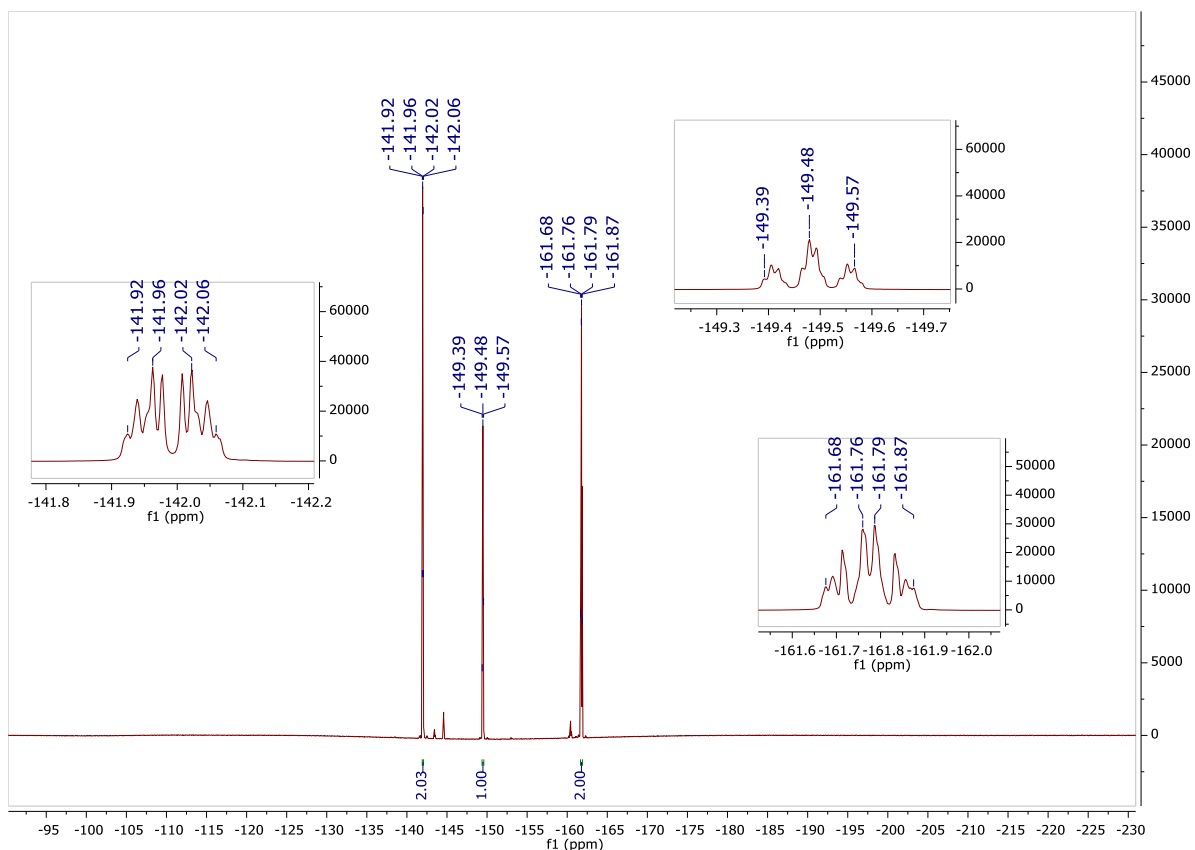
Rysunek 32. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.11 (CDCl₃).



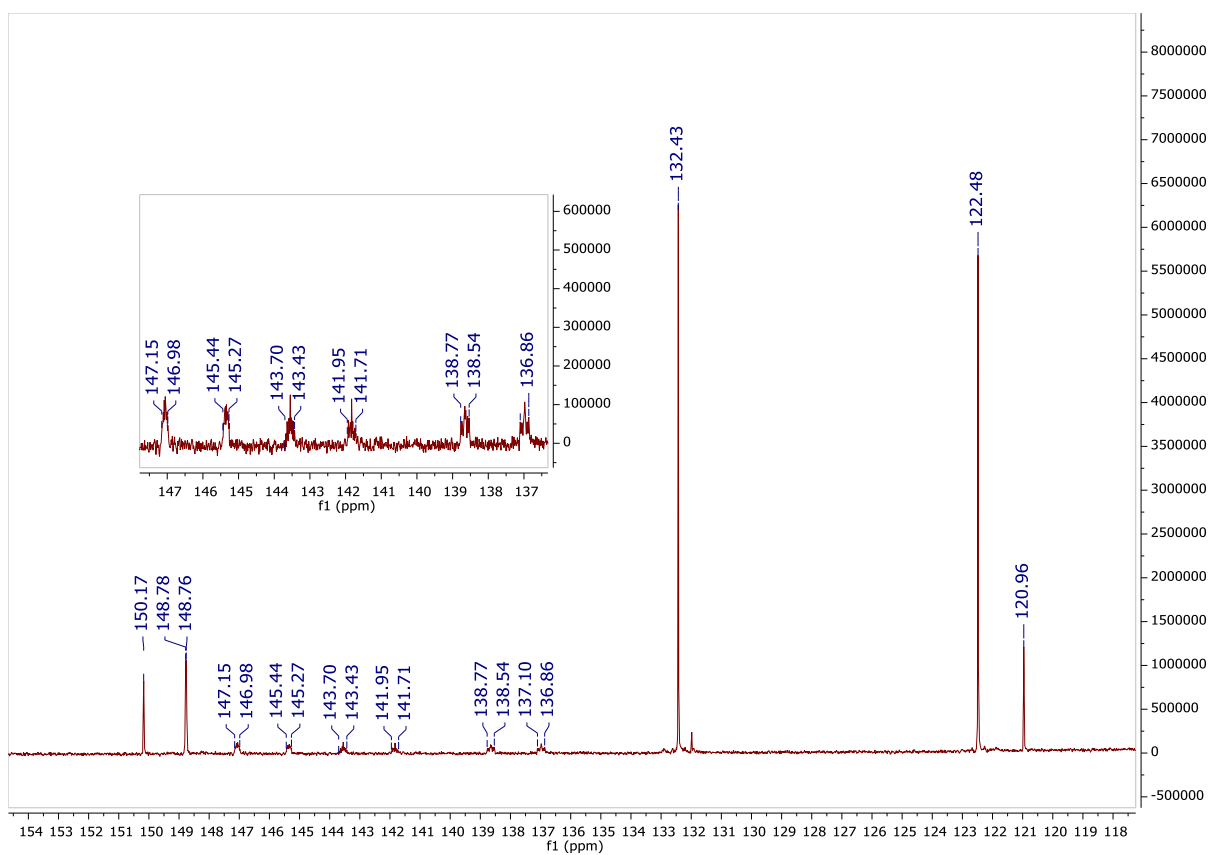
Rysunek 33. Widmo ^{13}C NMR związku 1.11 (CDCl_3).



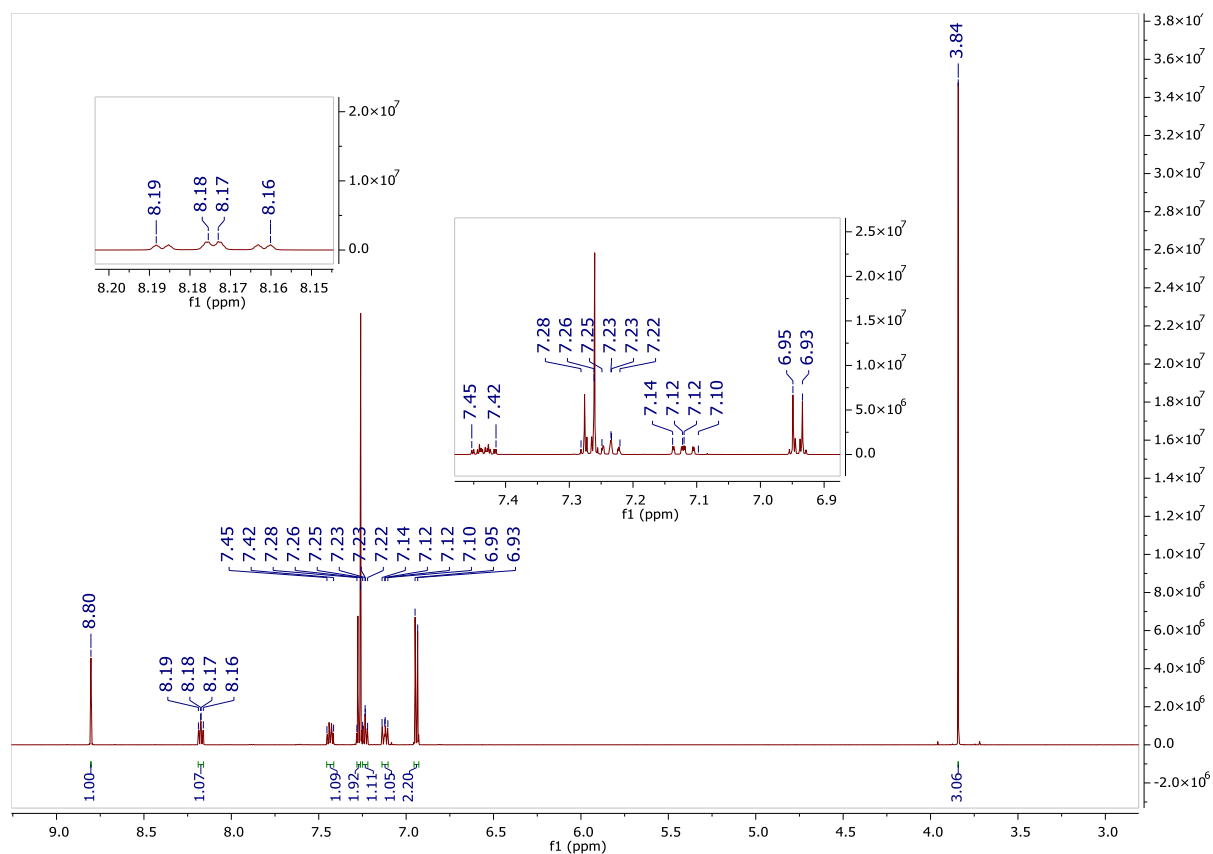
Rysunek 34. Widmo ^1H NMR związku 1.12 (CDCl_3).



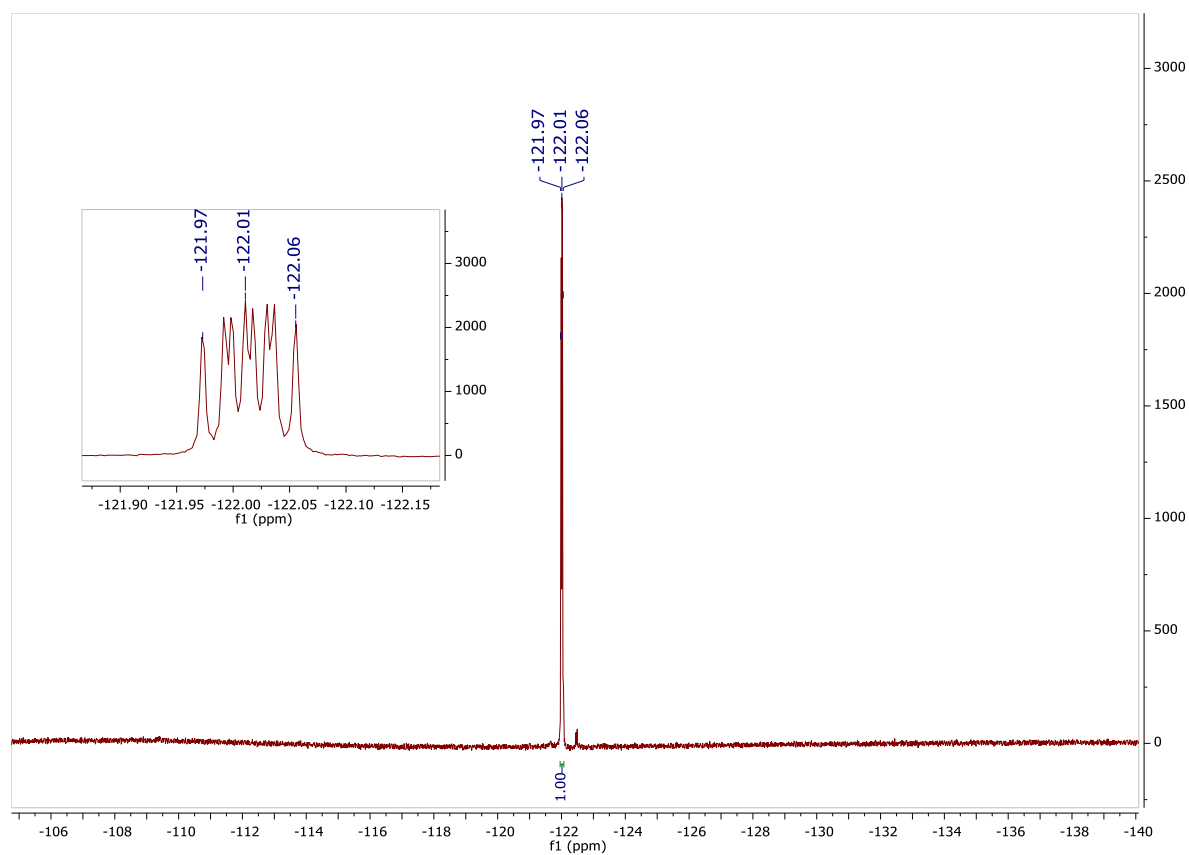
Rysunek 35. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.12 (CDCl₃).



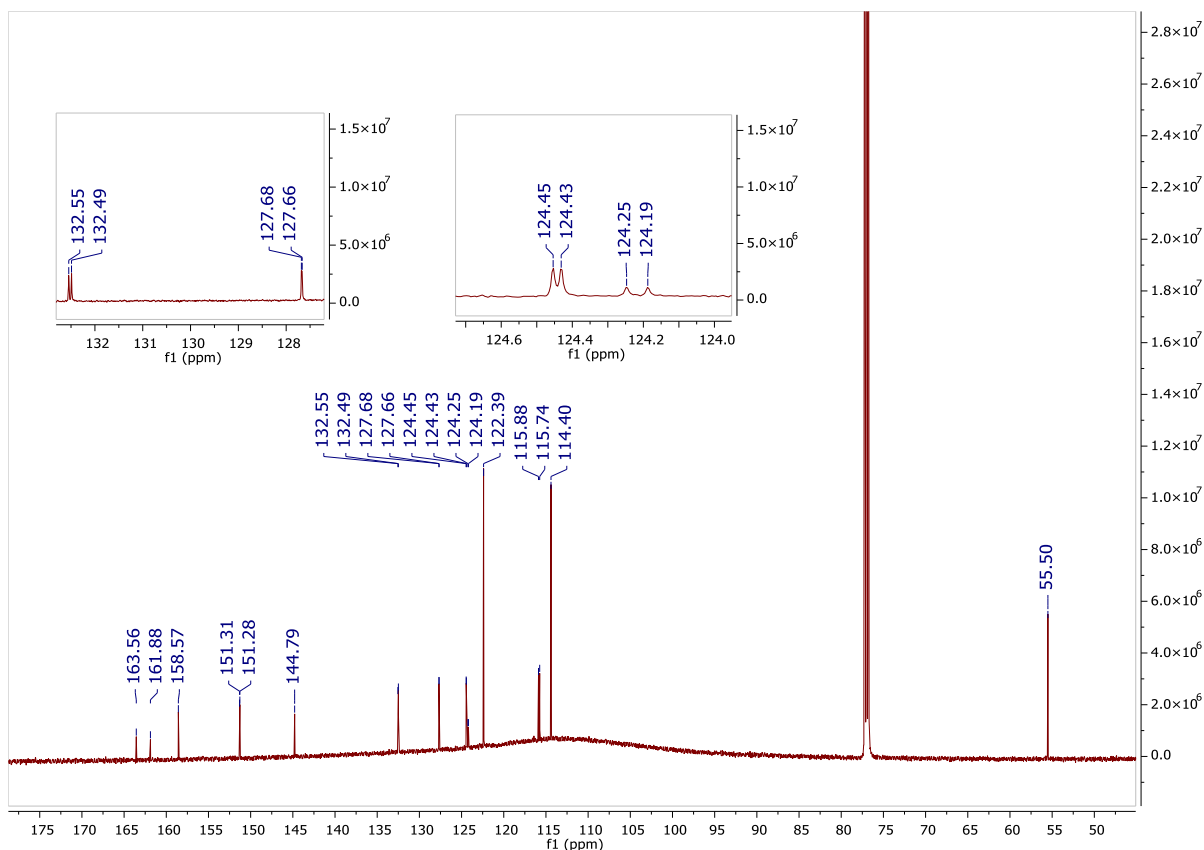
Rysunek 36. Widmo ¹³C NMR związku 1.12 (CDCl₃).



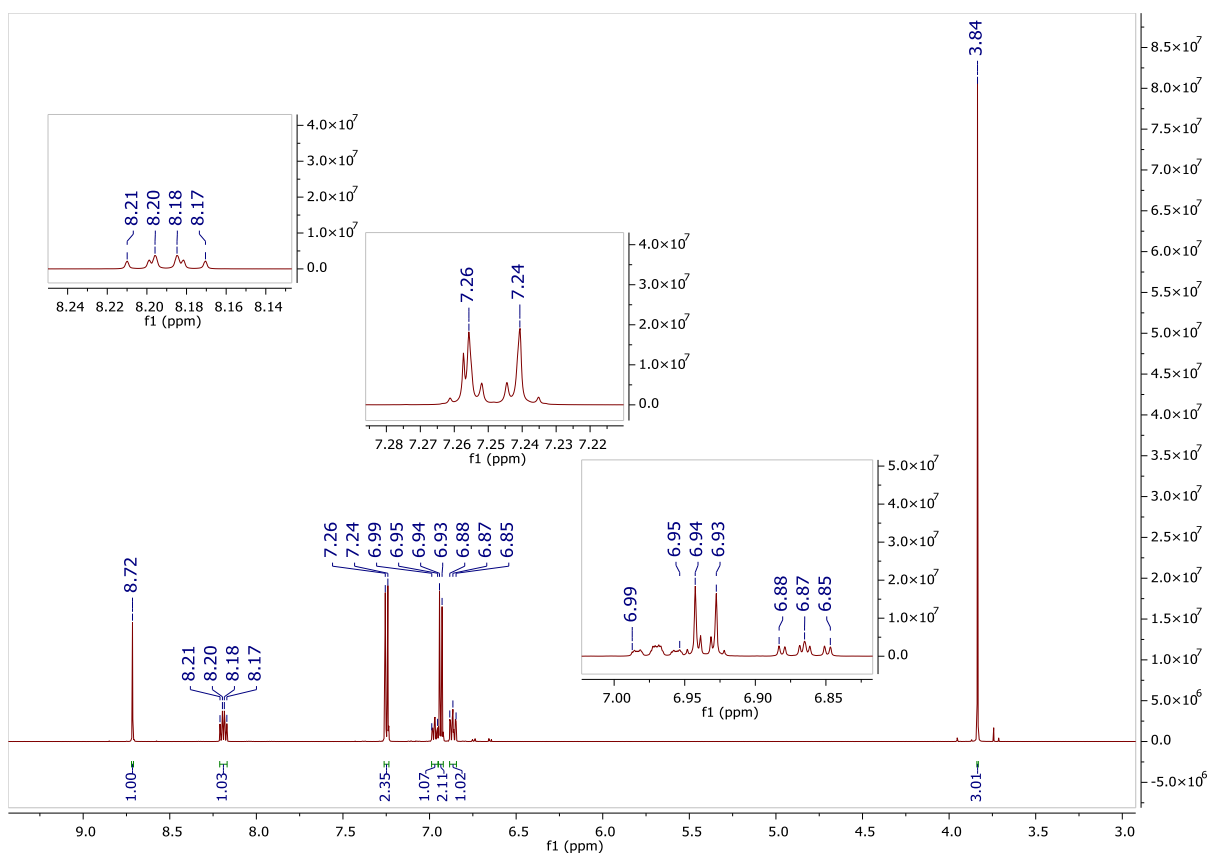
Rysunek 37. Widmo ^1H NMR związku 1.13 (CDCl_3).



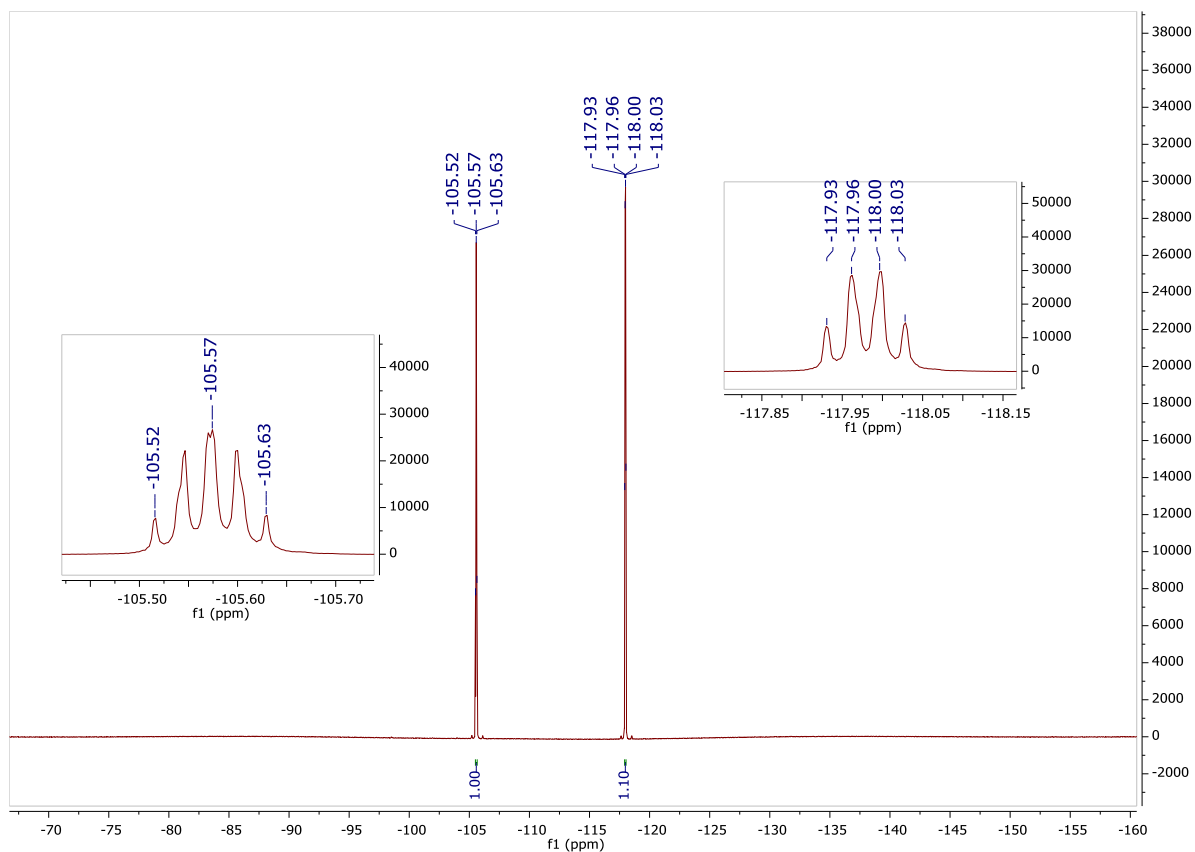
Rysunek 38. Widmo ^{19}F NMR związku 1.13 (CDCl_3).



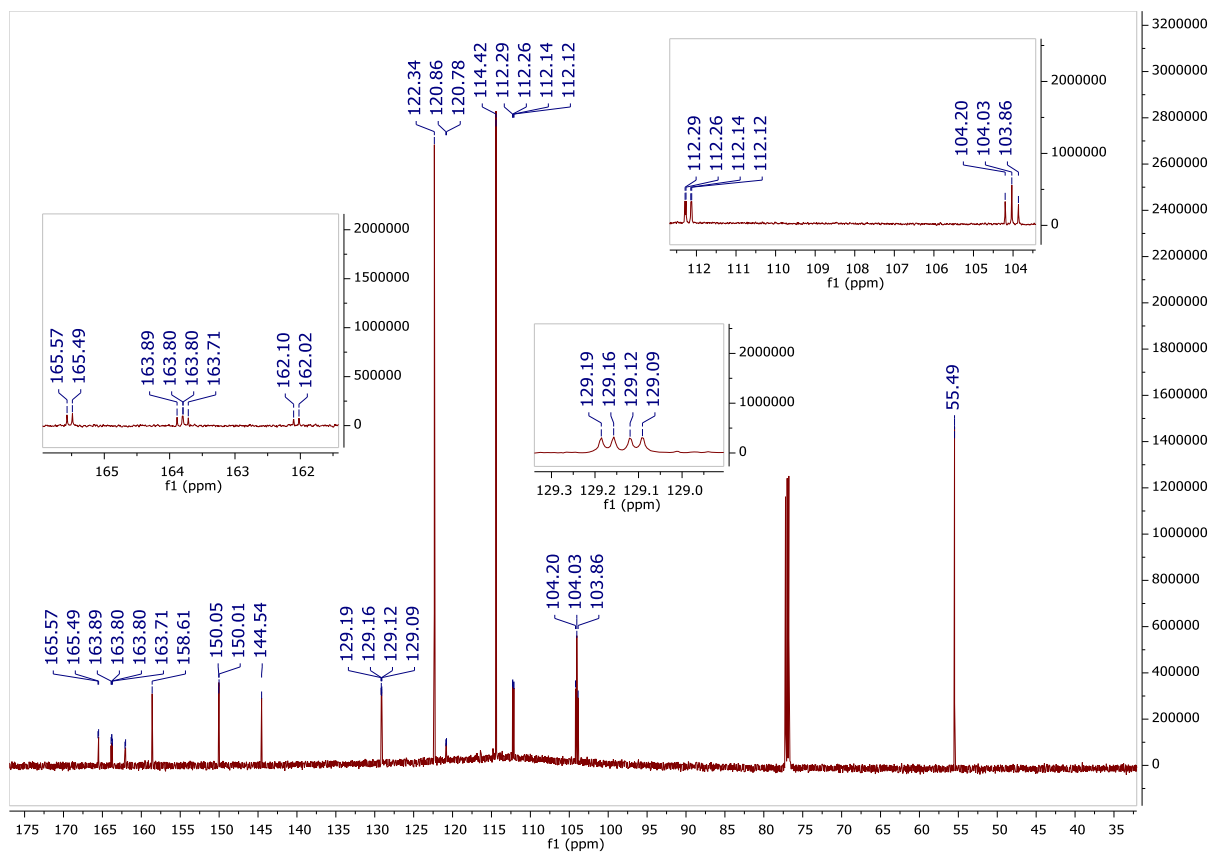
Rysunek 39. Widmo ¹³C NMR związku 1.13 (CDCl₃).



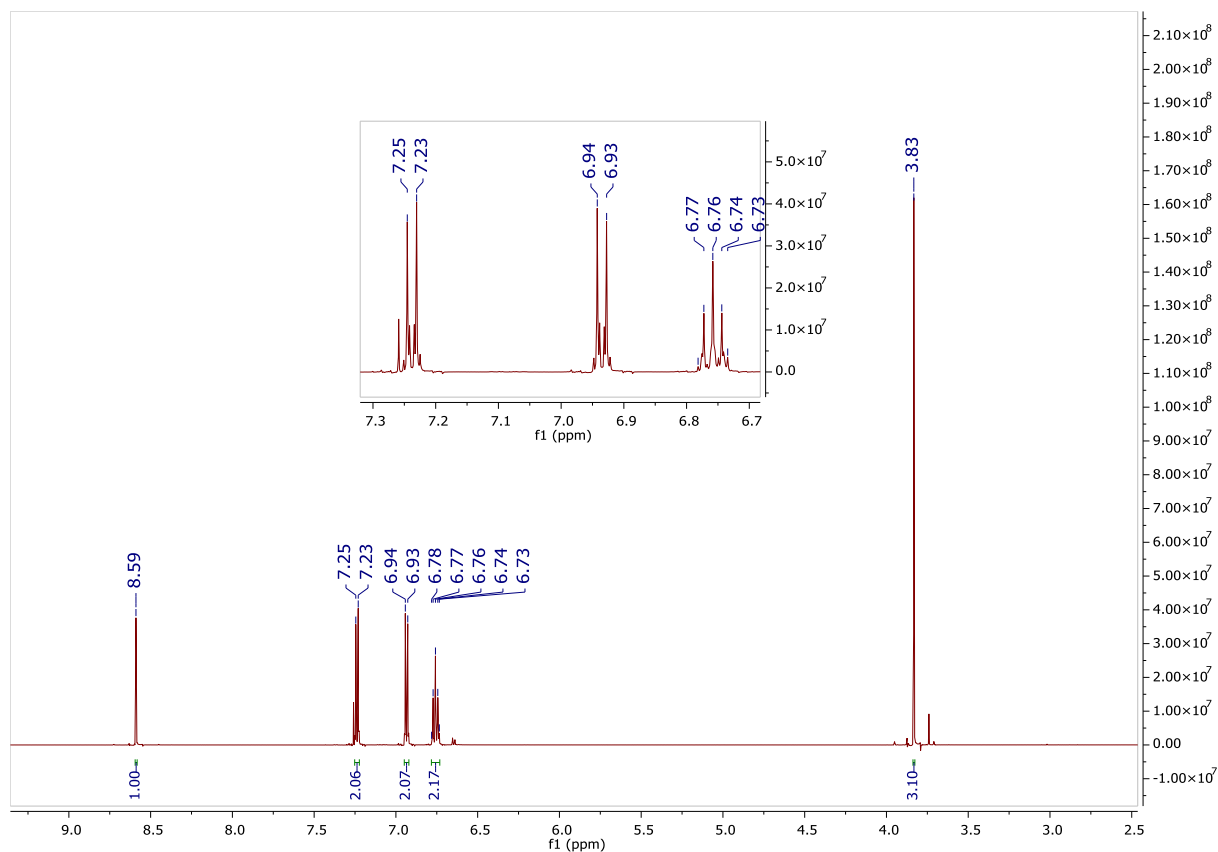
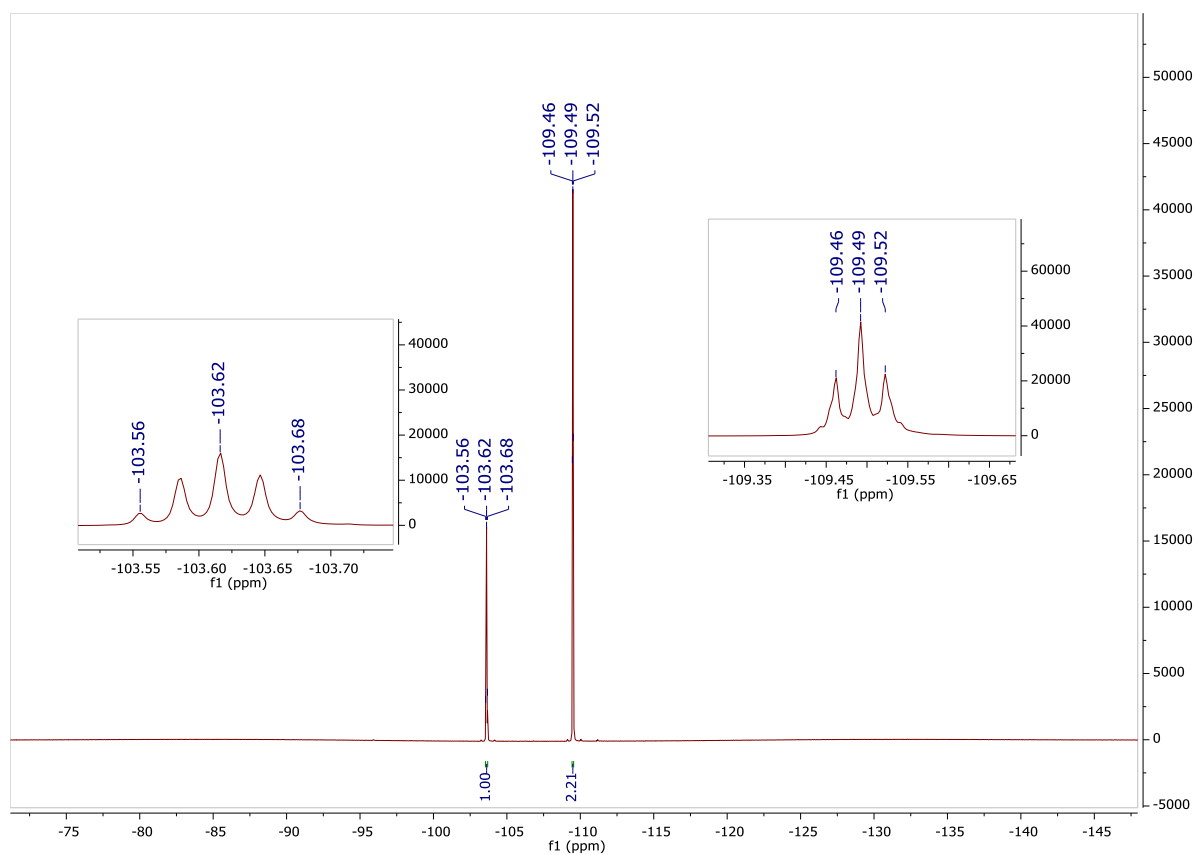
Rysunek 40. Widmo ¹H NMR związku 1.14 (CDCl₃).

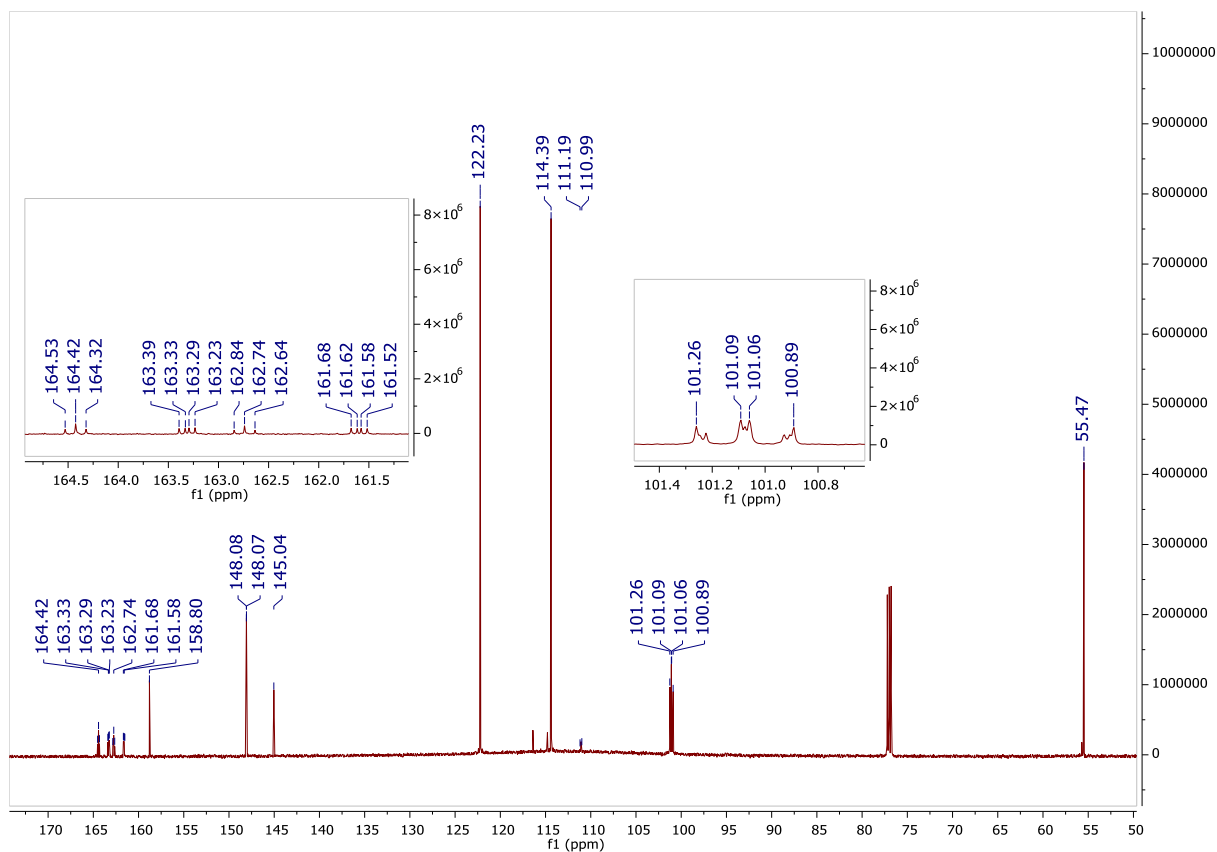


Rysunek 41. Widmo ^{19}F NMR związku 1.14 (CDCl_3).

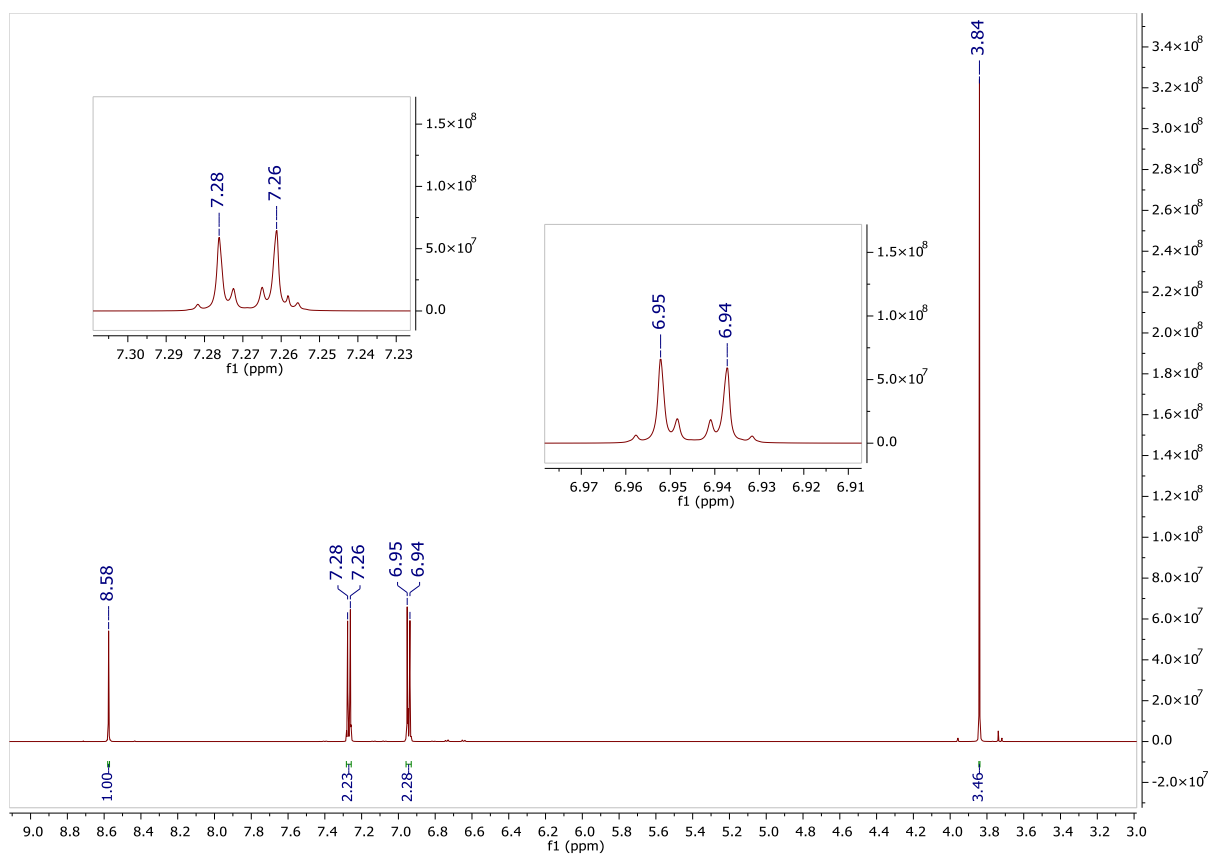


Rysunek 42. Widmo ^{13}C NMR związku 1.14 (CDCl_3).

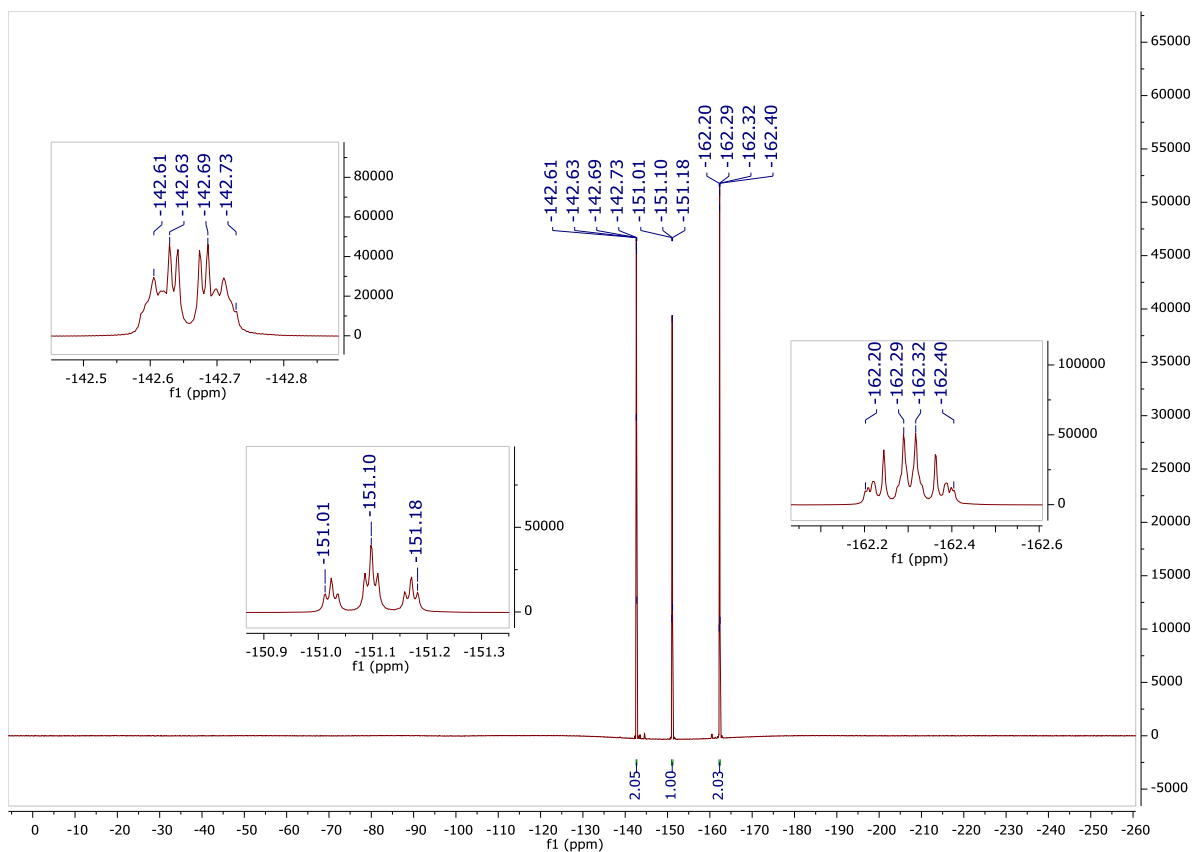
Rysunek 43. Widmo ^1H NMR związku 1.15 (CDCl_3).Rysunek 44. Widmo ^{19}F NMR związku 1.15 (CDCl_3).



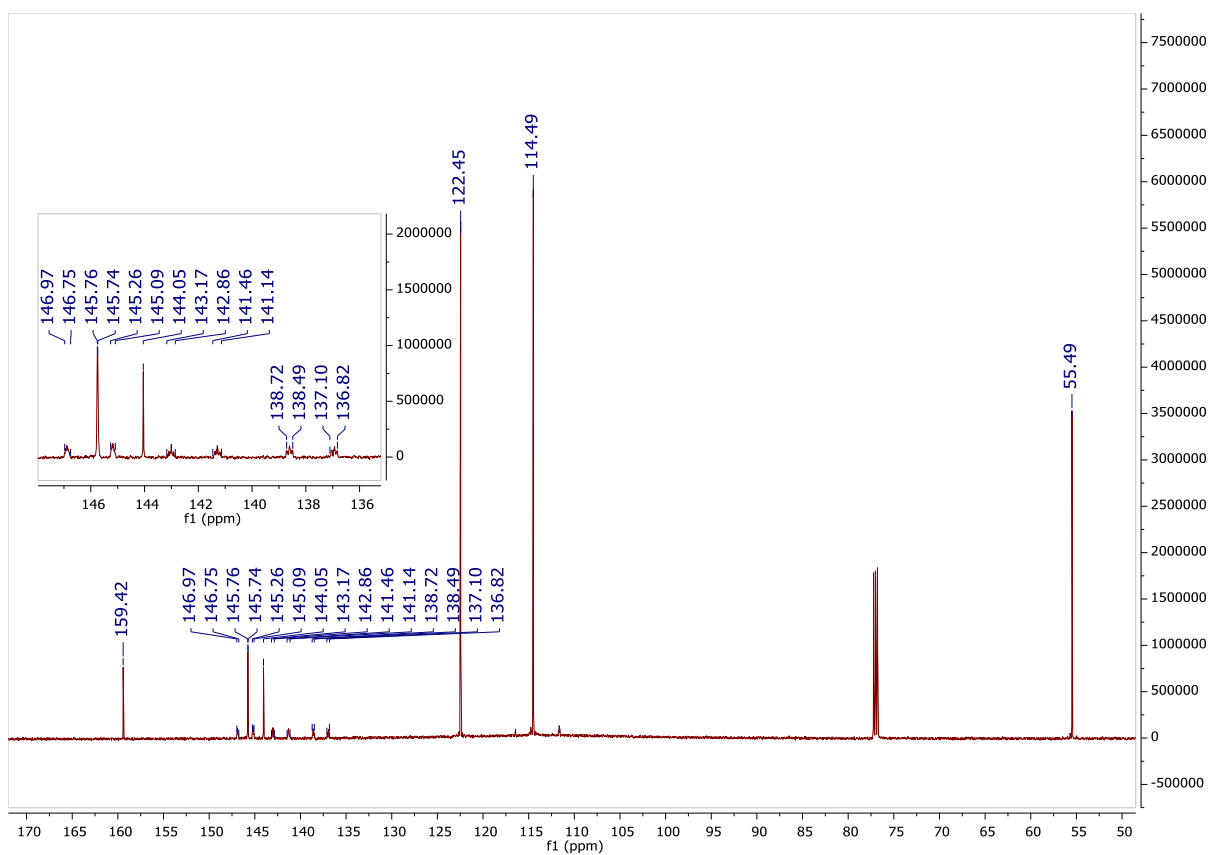
Rysunek 45. Widmo ^{13}C NMR związku 1.15 (CDCl_3).



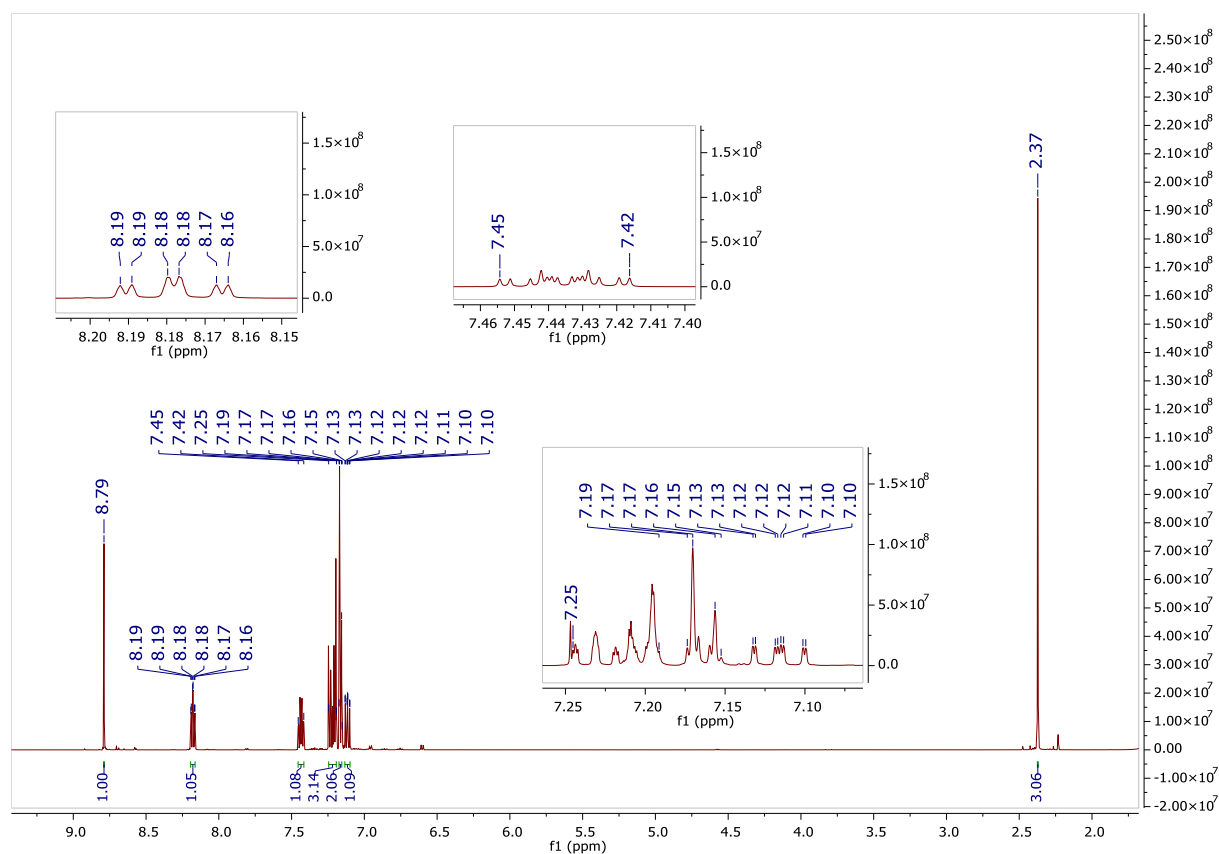
Rysunek 46. Widmo ^1H NMR związku 1.16 (CDCl_3).



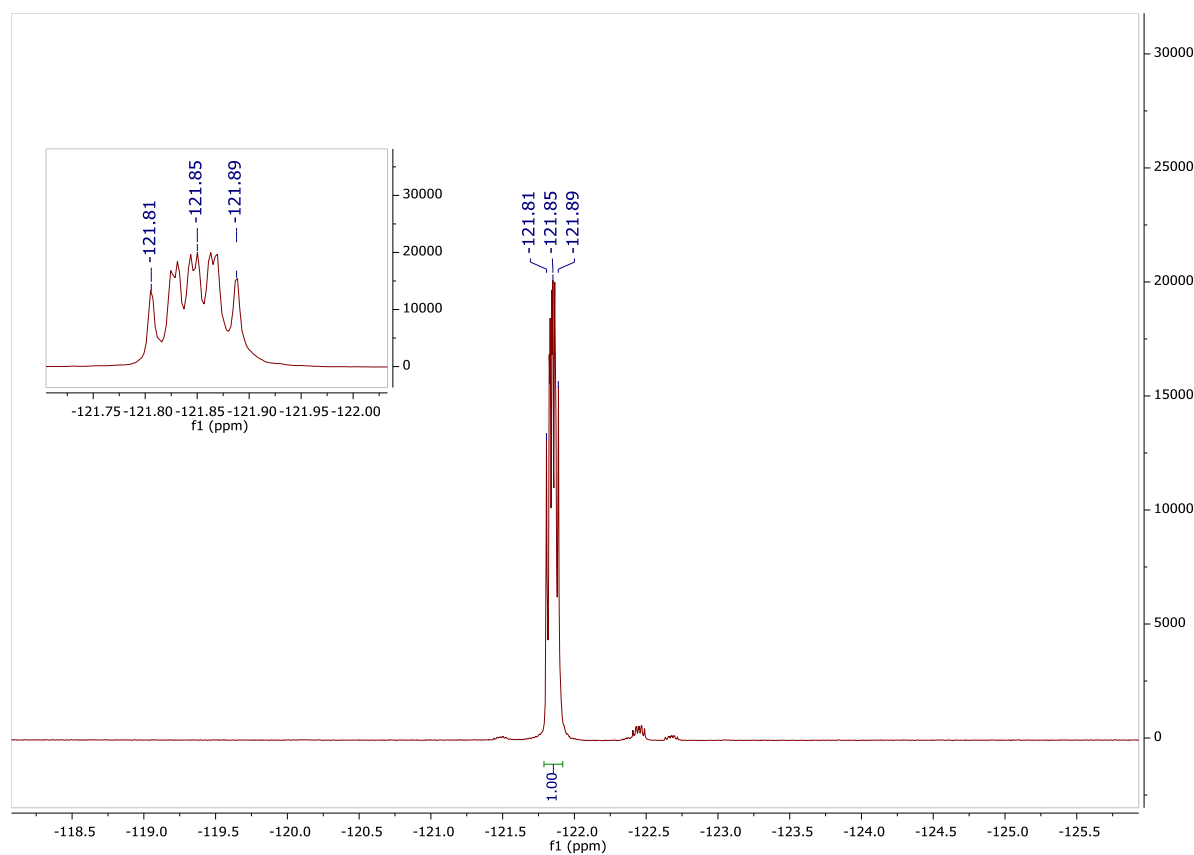
Rysunek 47. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.16 (CDCl₃).



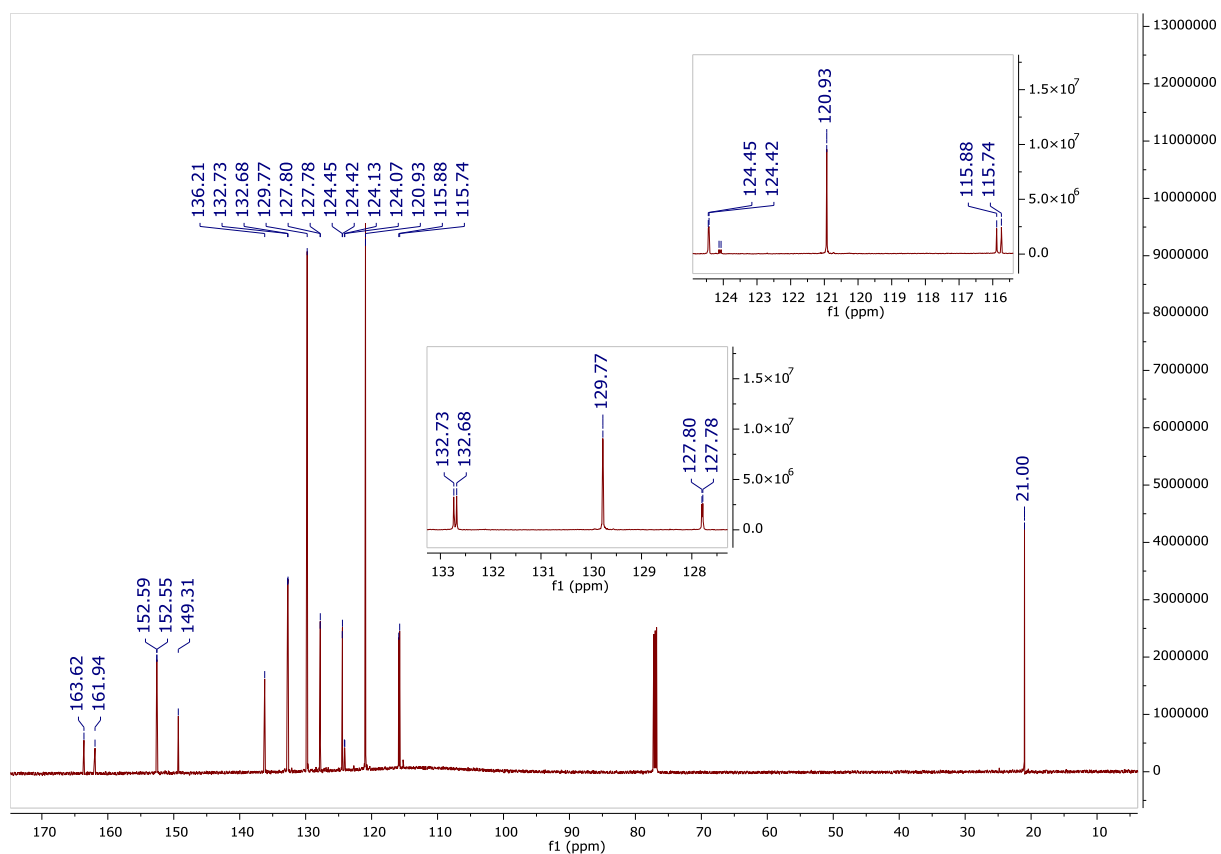
Rysunek 48. Widmo ¹³C NMR związku 1.16 (CDCl₃).



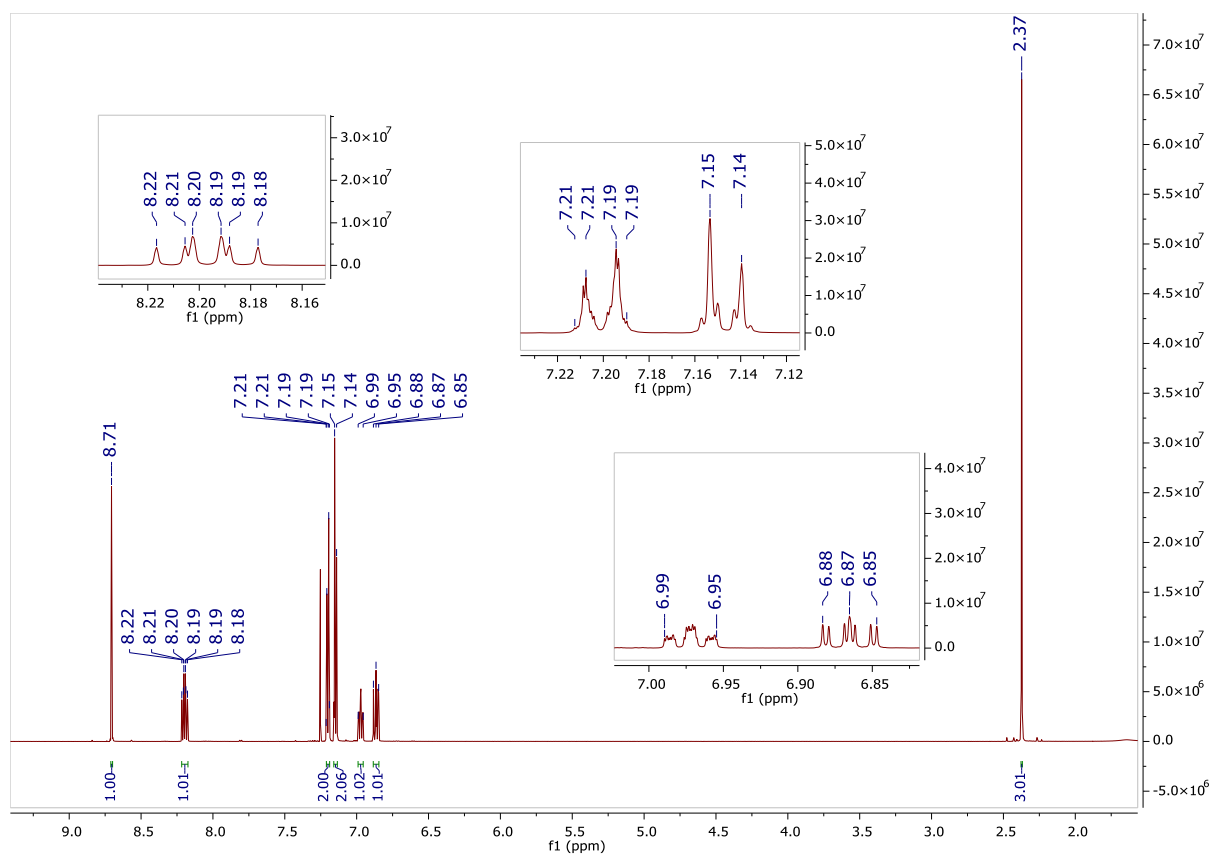
Rysunek 49. Widmo ^1H NMR związku 1.17 (CDCl_3).



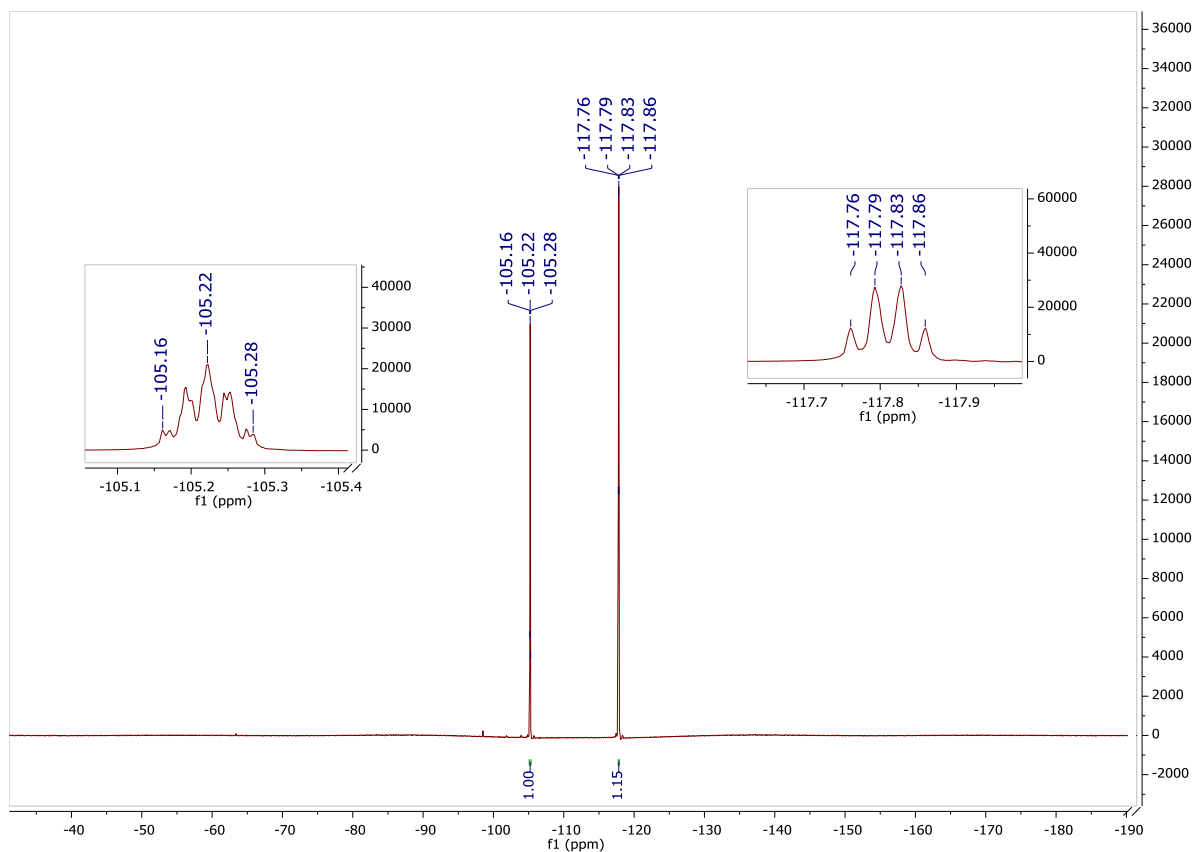
Rysunek 50. Widmo ^{19}F NMR związku 1.17 (CDCl_3).



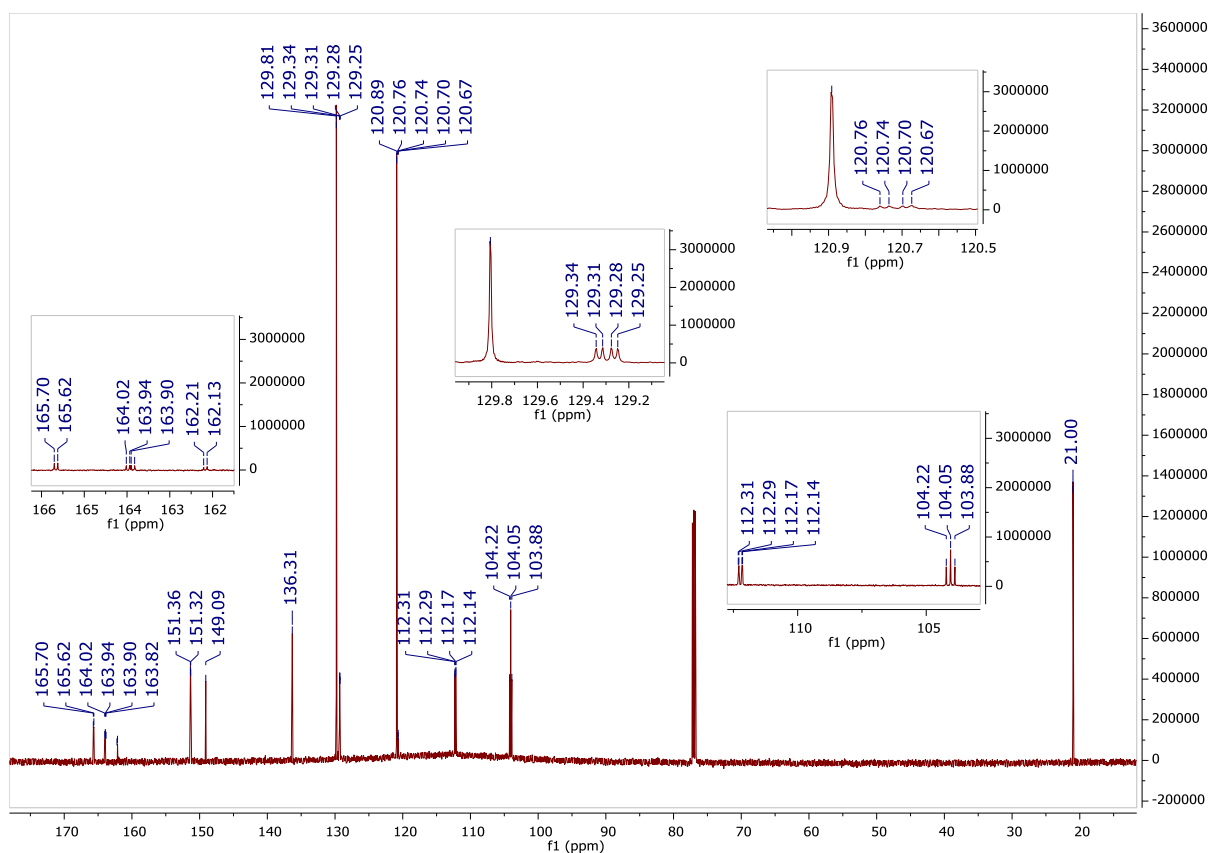
Rysunek 51. Widmo ^{13}C NMR związku 1.17 (CDCl_3).



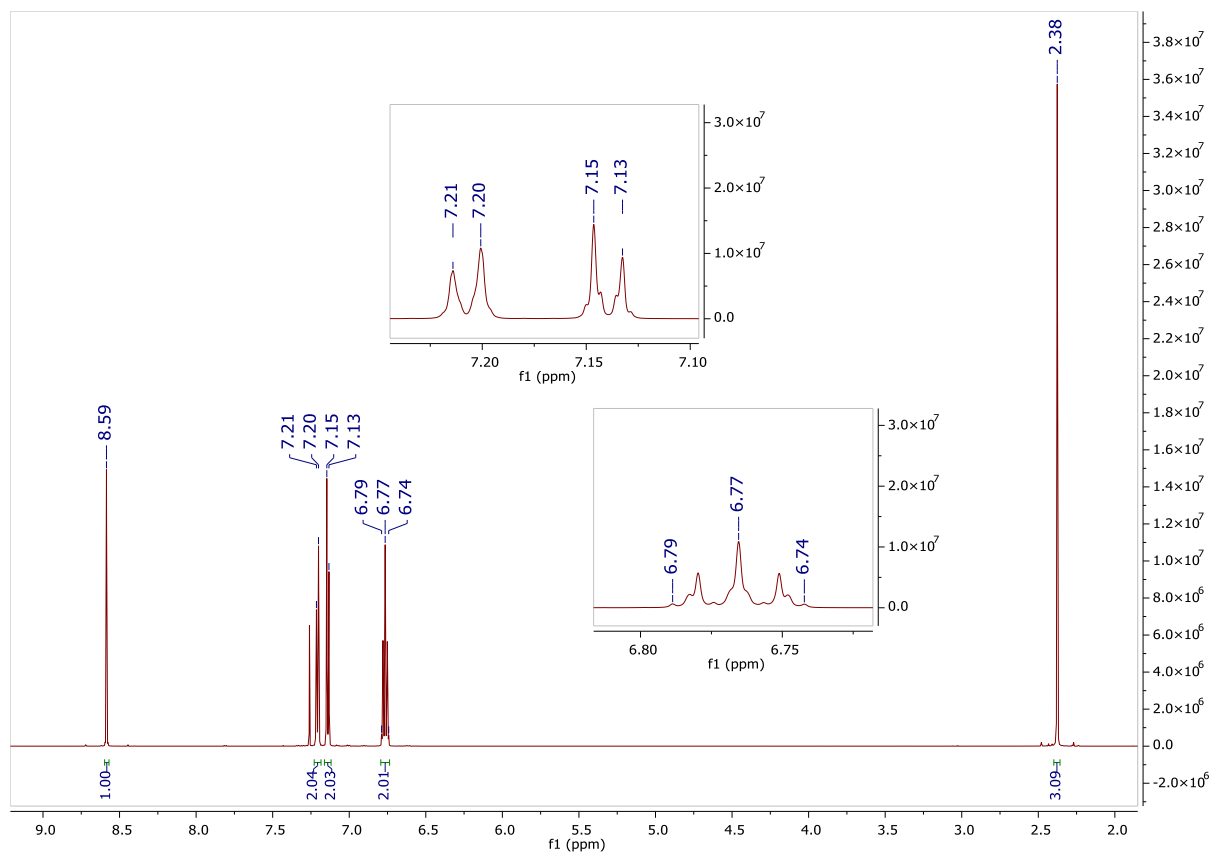
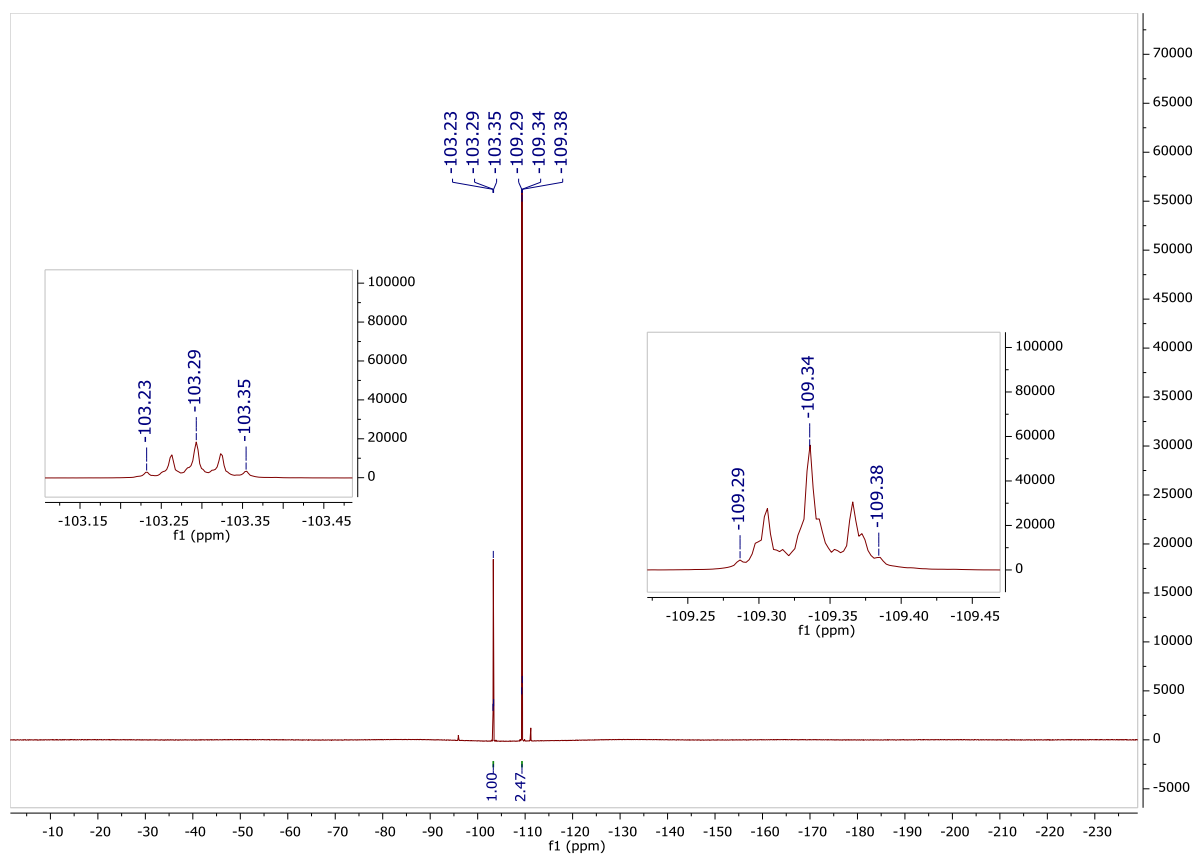
Rysunek 52. Widmo ^1H NMR związku 1.18 (CDCl_3).

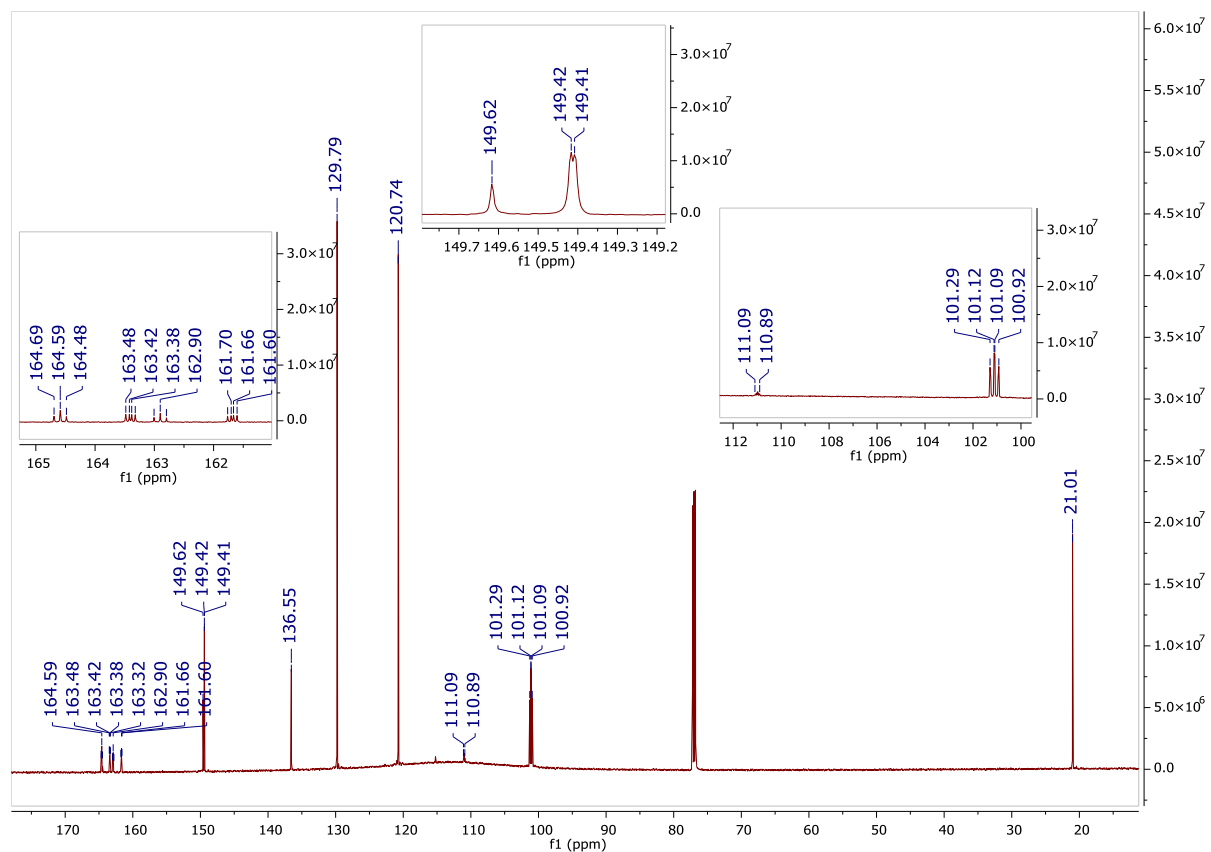


Rysunek 53. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.18 (CDCl₃).

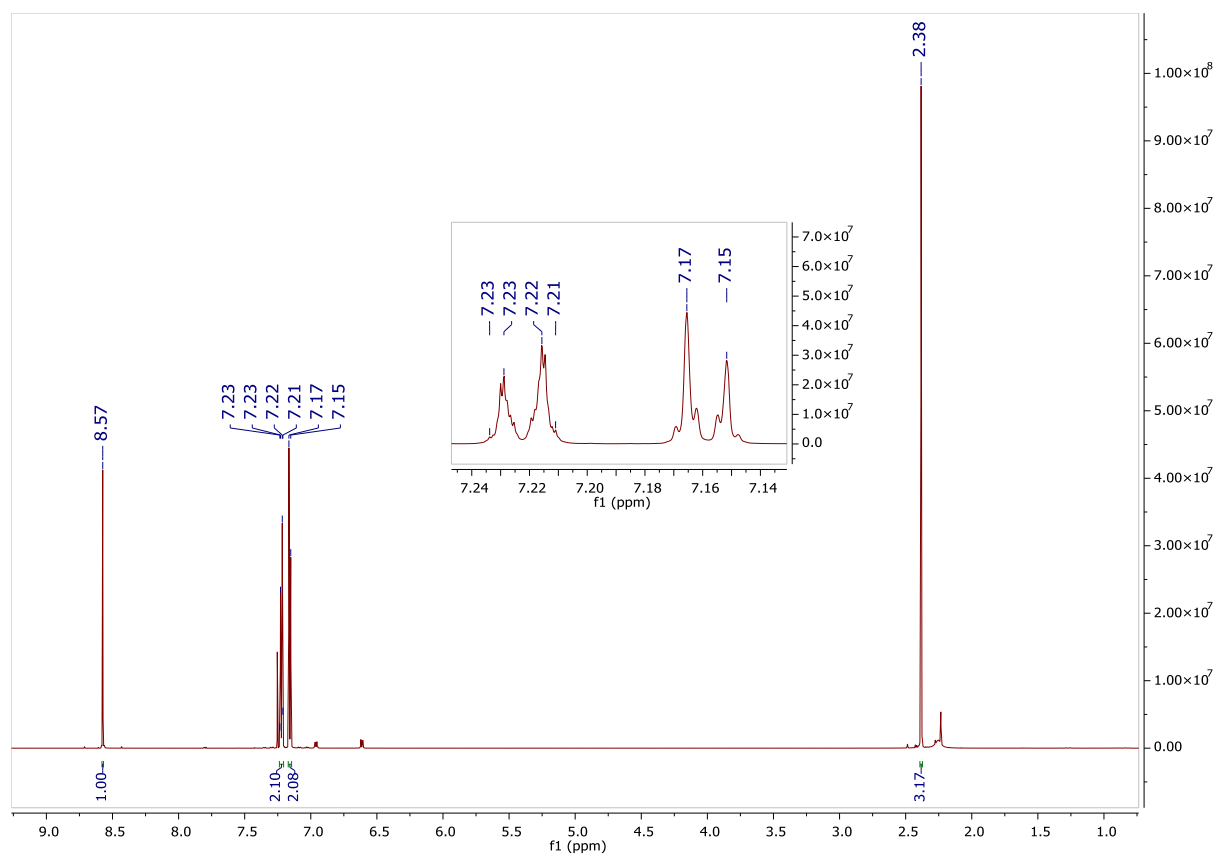


Rysunek 54. Widmo ¹³C NMR związku 1.18 (CDCl₃).

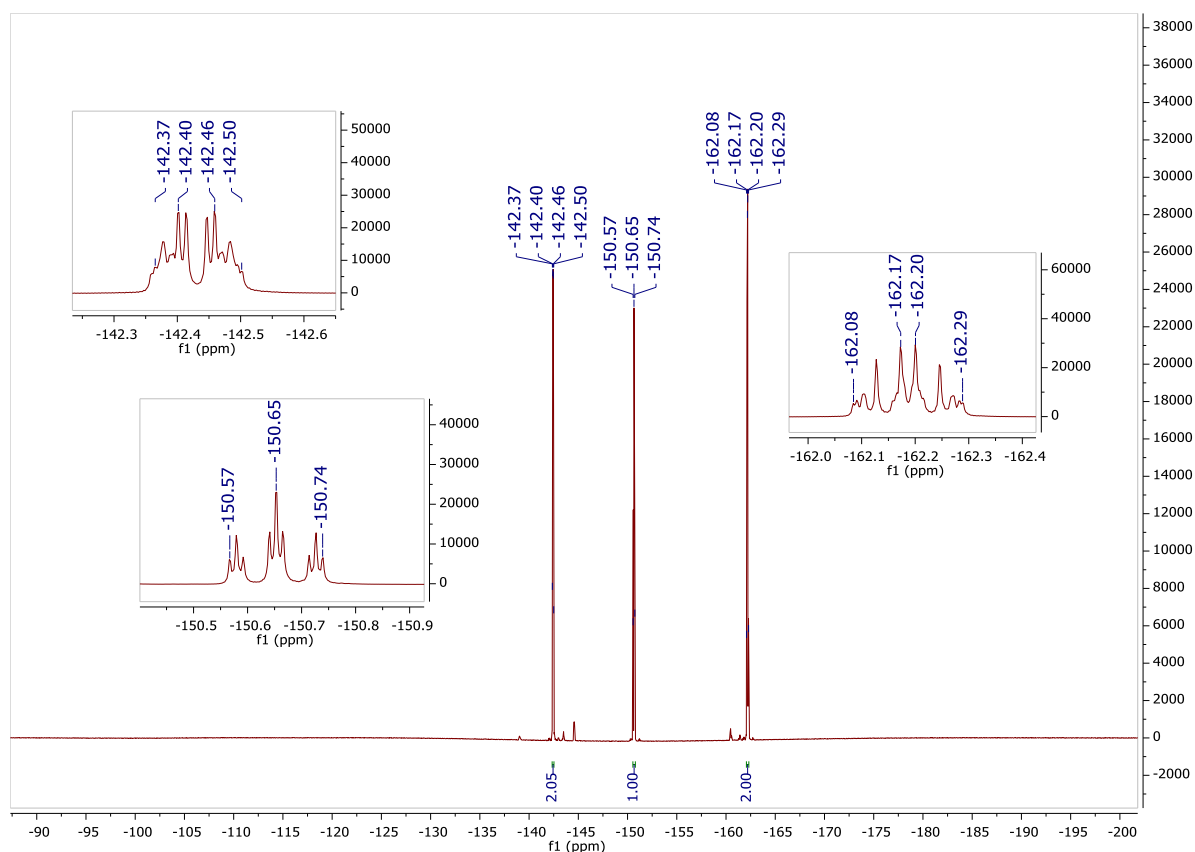
Rysunek 55. Widmo ^1H NMR związku 1.19 (CDCl_3).Rysunek 56. Widmo ^{19}F NMR związku 1.19 (CDCl_3).



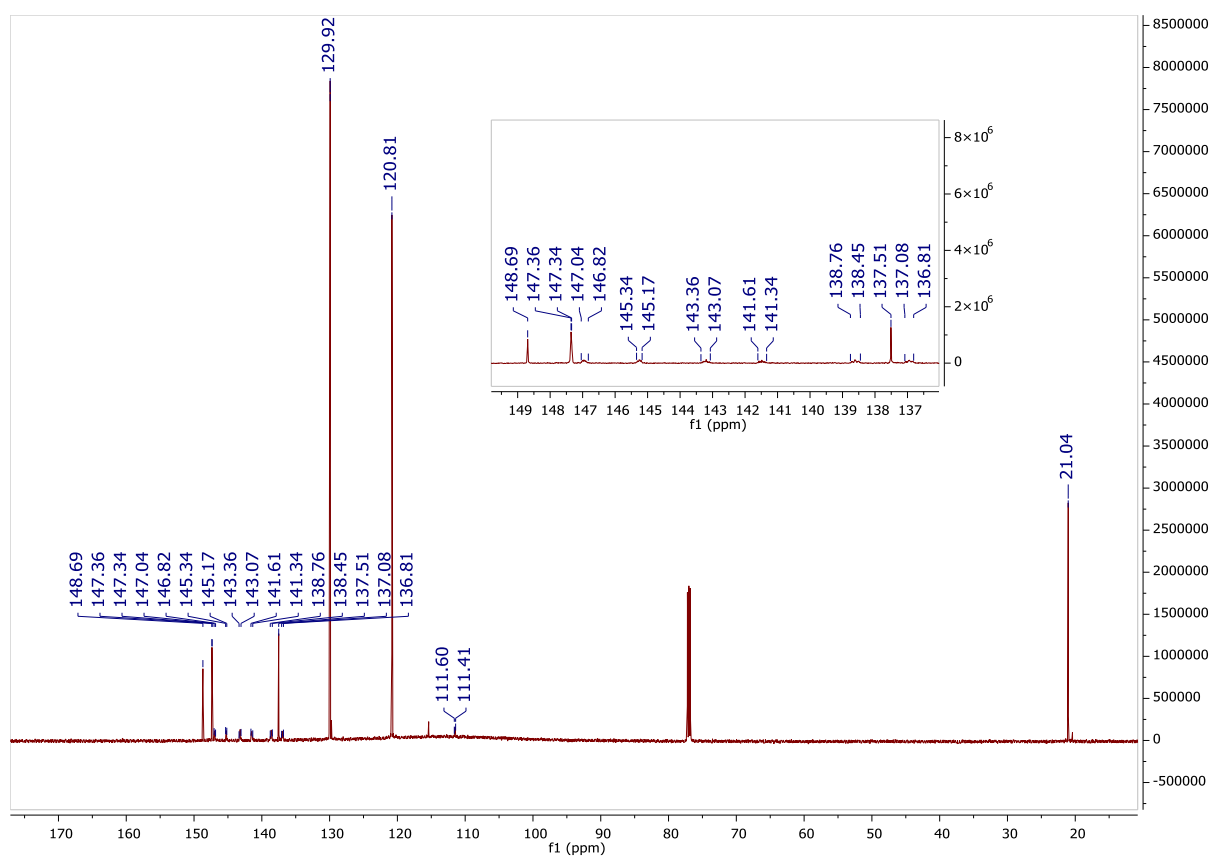
Rysunek 57. Widmo ^{13}C NMR związku 1.19 (CDCl_3).



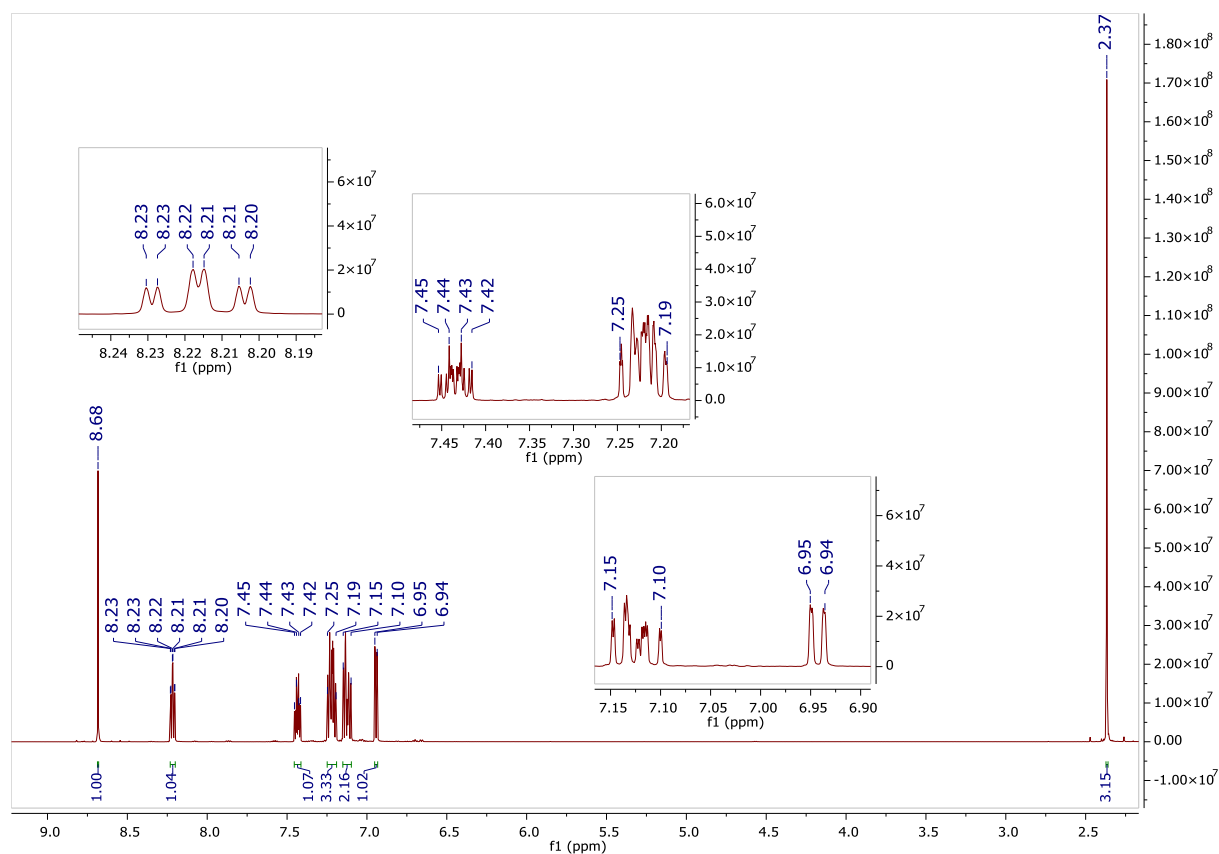
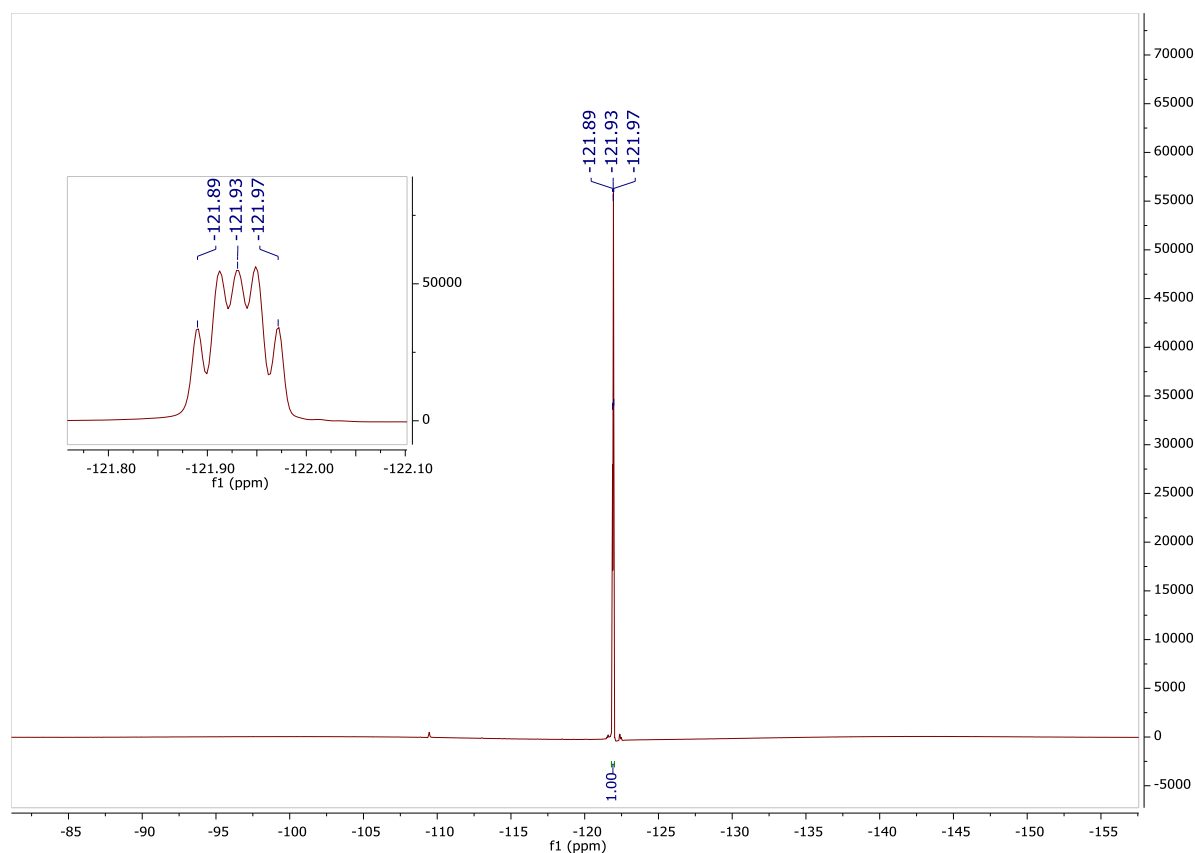
Rysunek 58. Widmo ^1H NMR związku 1.20 (CDCl_3).

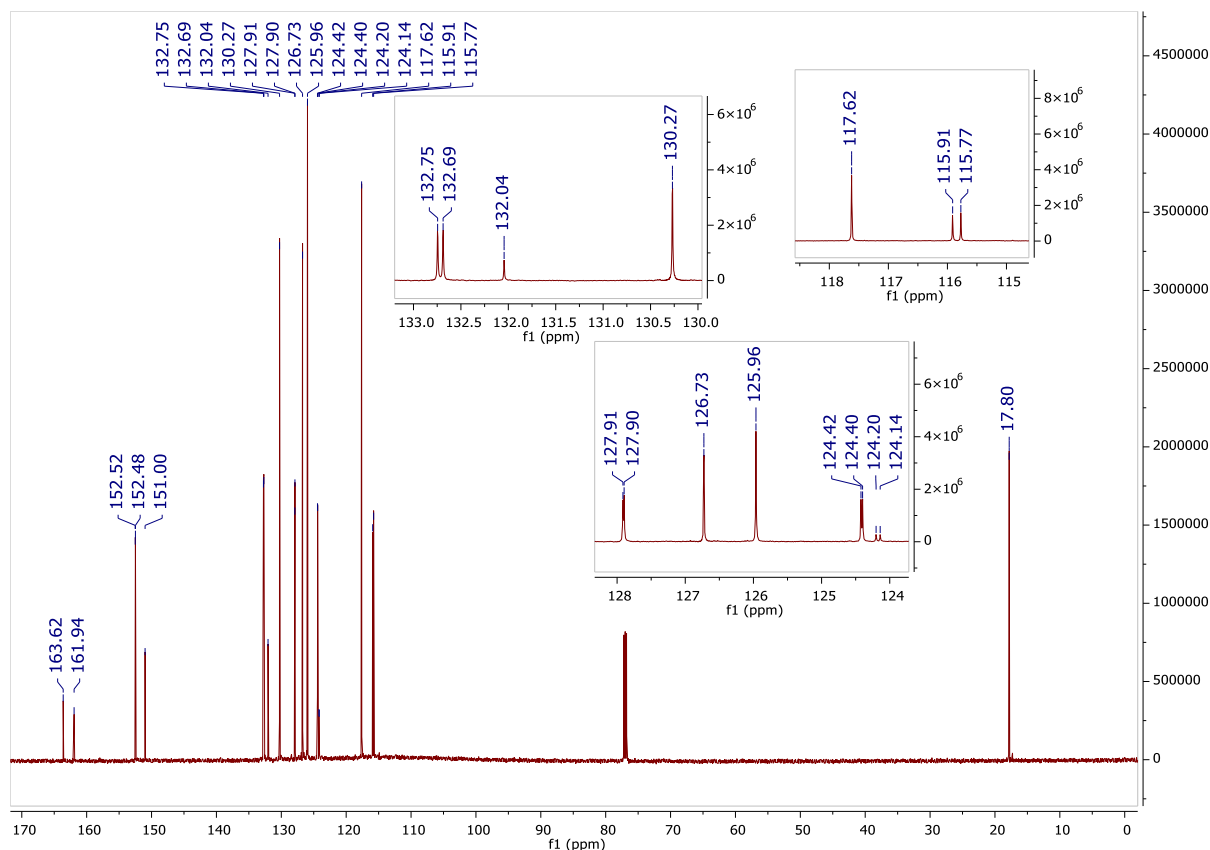


Rysunek 59. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.20 (CDCl₃).

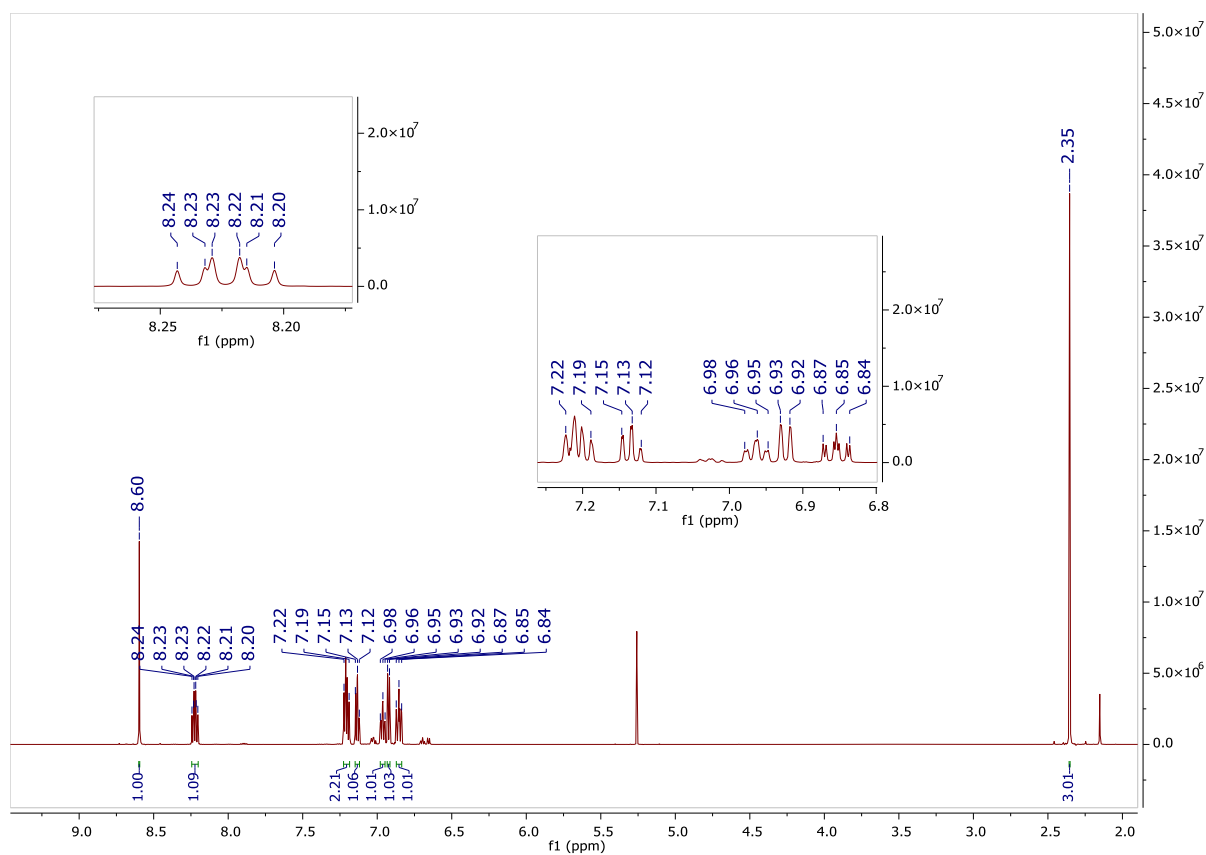


Rysunek 60. Widmo ¹³C NMR związku 1.20 (CDCl₃).

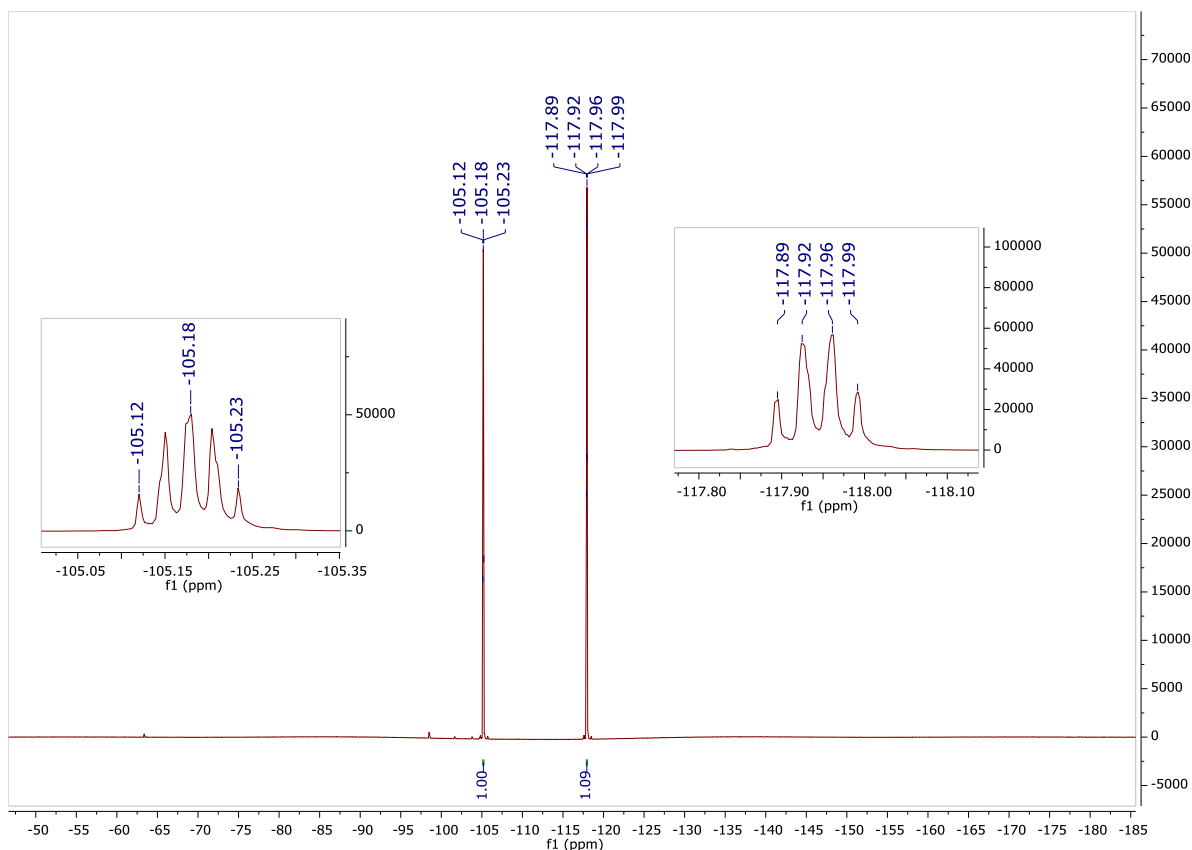
Rysunek 61. Widmo ¹H NMR związku 1.21 (CDCl₃).Rysunek 62. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.21 (CDCl₃).



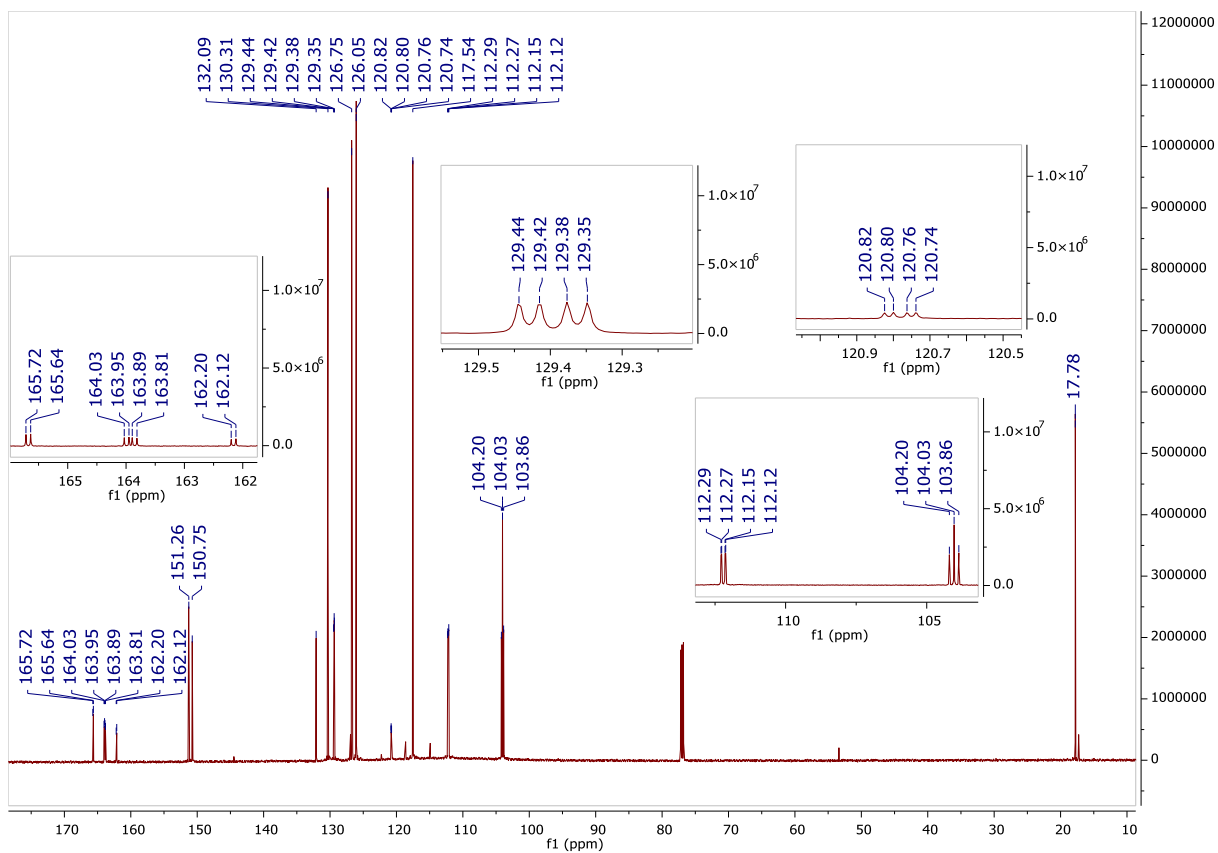
Rysunek 63. Widmo ^{13}C NMR związku 1.21 (CDCl_3).



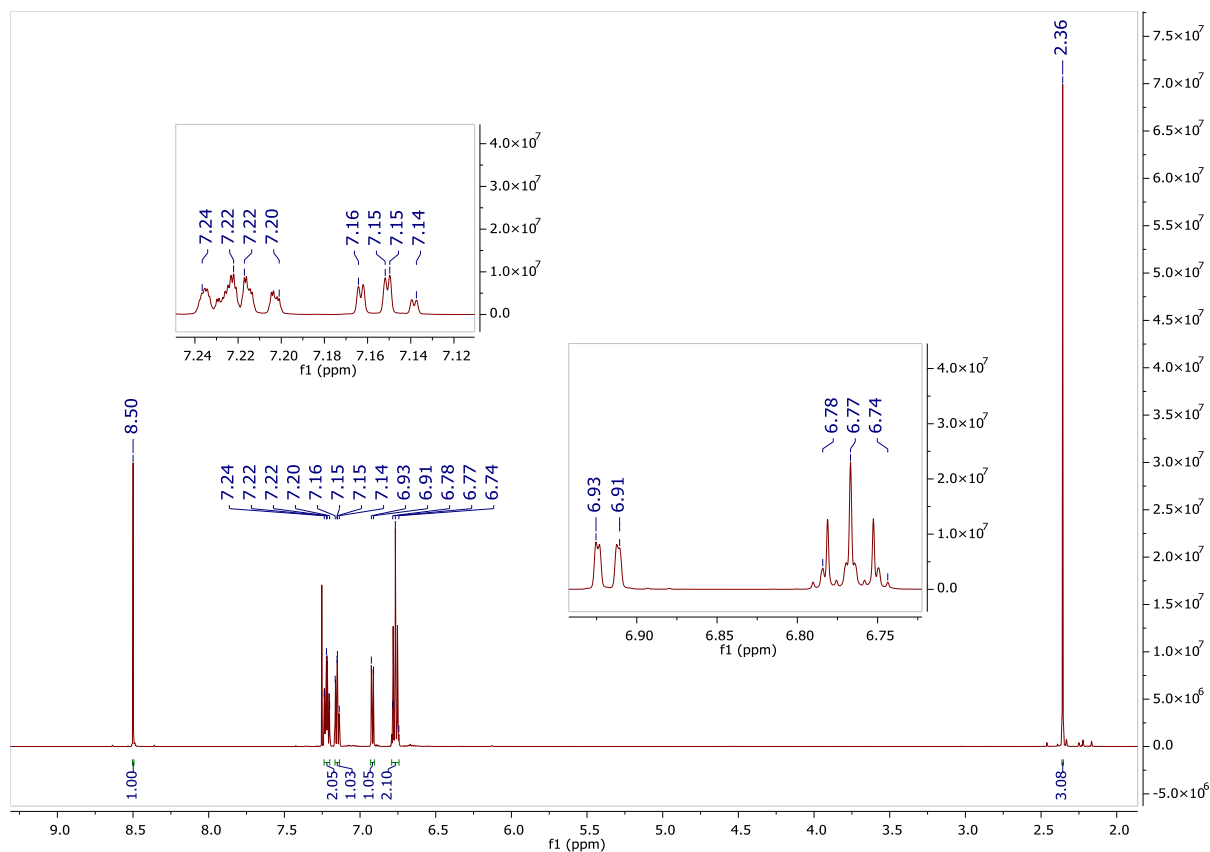
Rysunek 64. Widmo ^1H NMR związku 1.22 (CDCl_3).



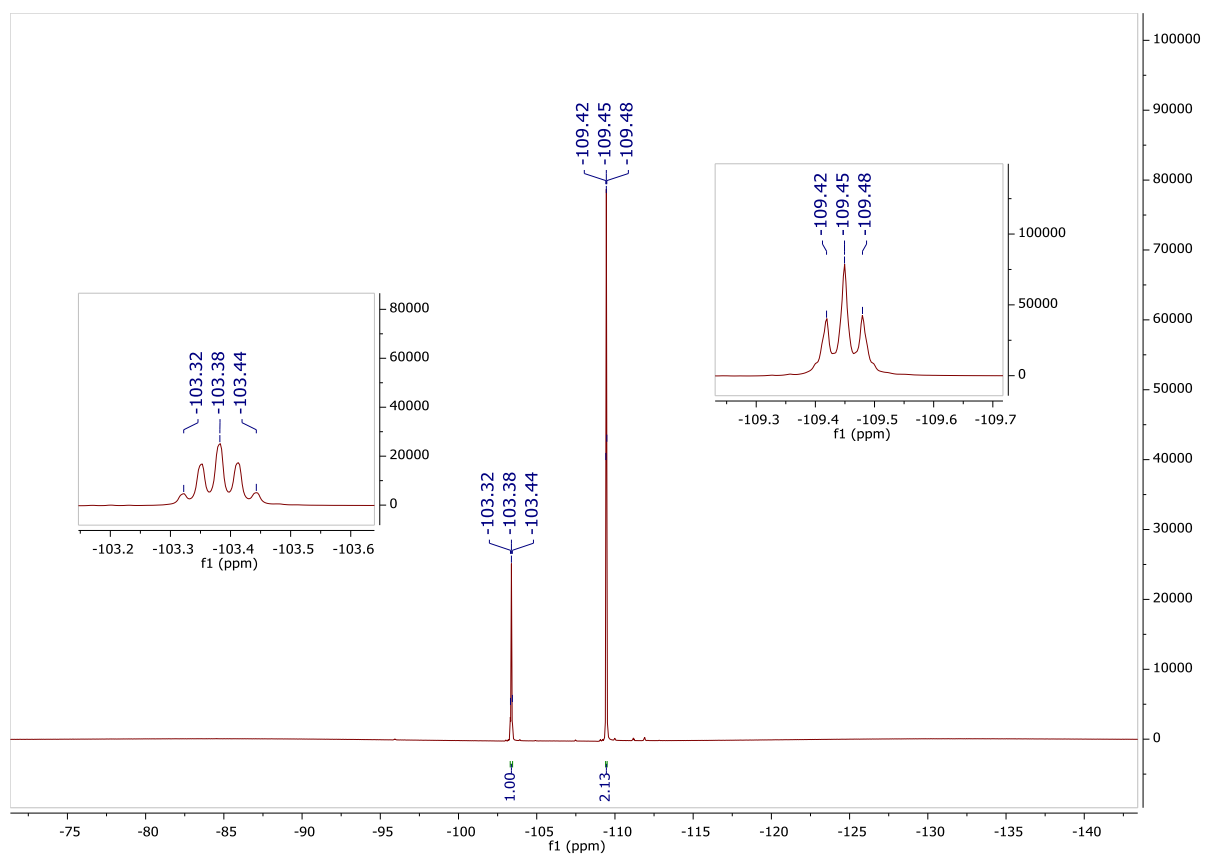
Rysunek 65. Widmo ^{19}F NMR związku 1.22 (CDCl_3).



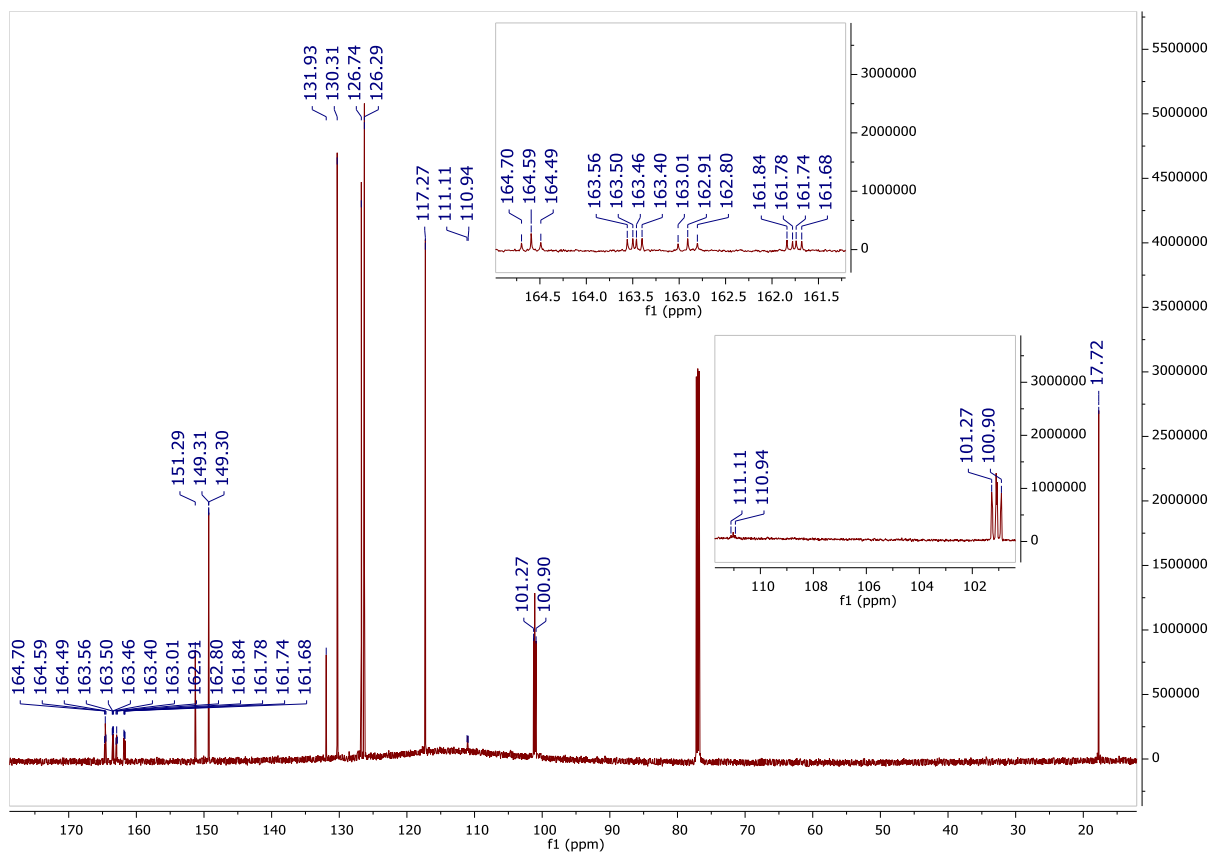
Rysunek 66. Widmo ^{13}C NMR związku 1.22 (CDCl_3).



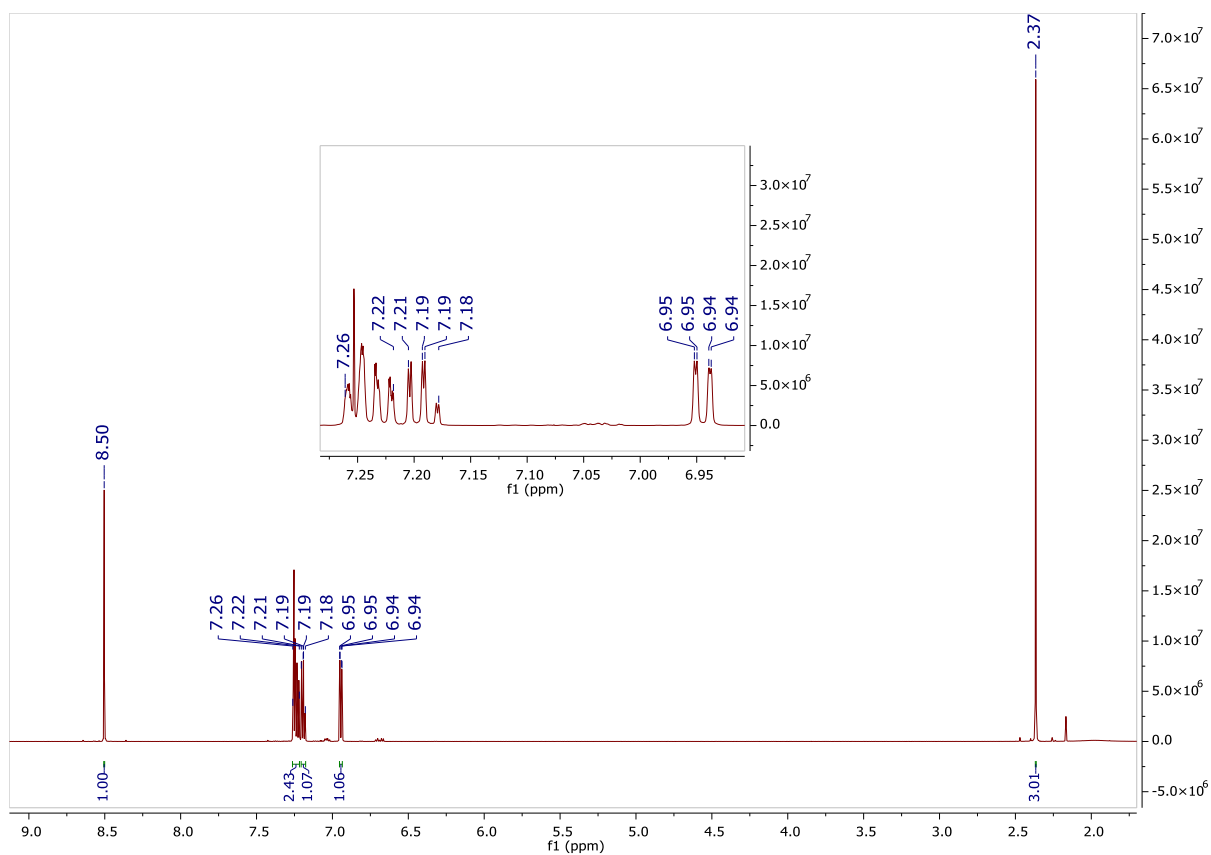
Rysunek 67. Widmo ^1H NMR związku 1.23 (CDCl_3).



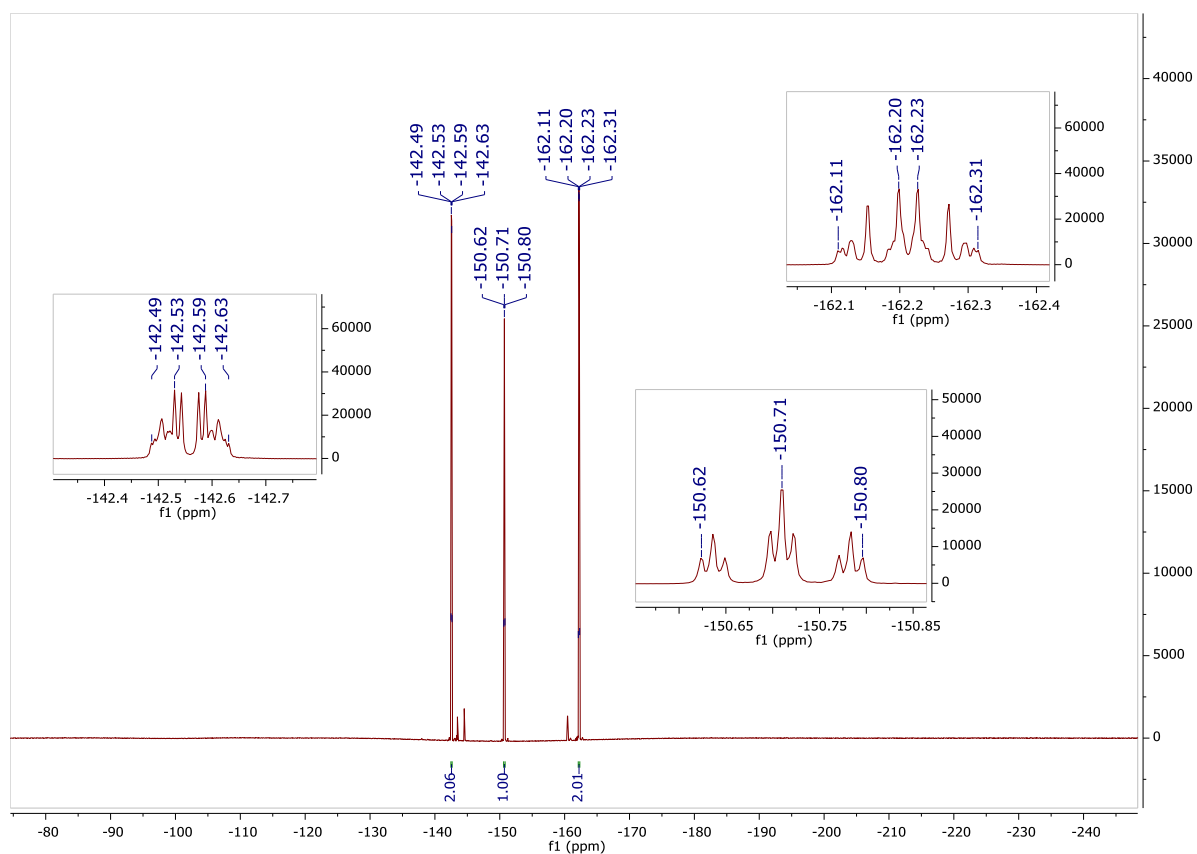
Rysunek 68. Widmo ^{19}F NMR związku 1.23 (CDCl_3).



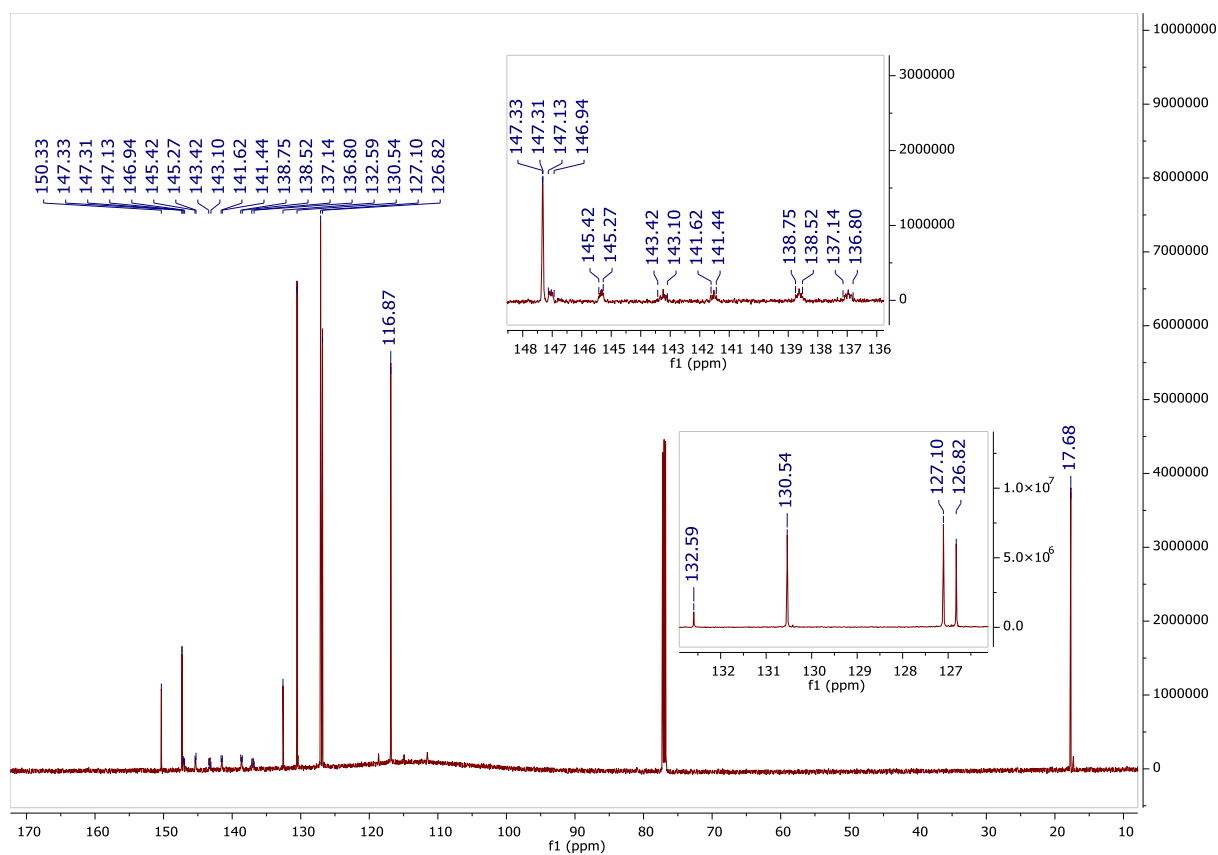
Rysunek 69. Widmo ^{13}C NMR związku 1.23 (CDCl_3).



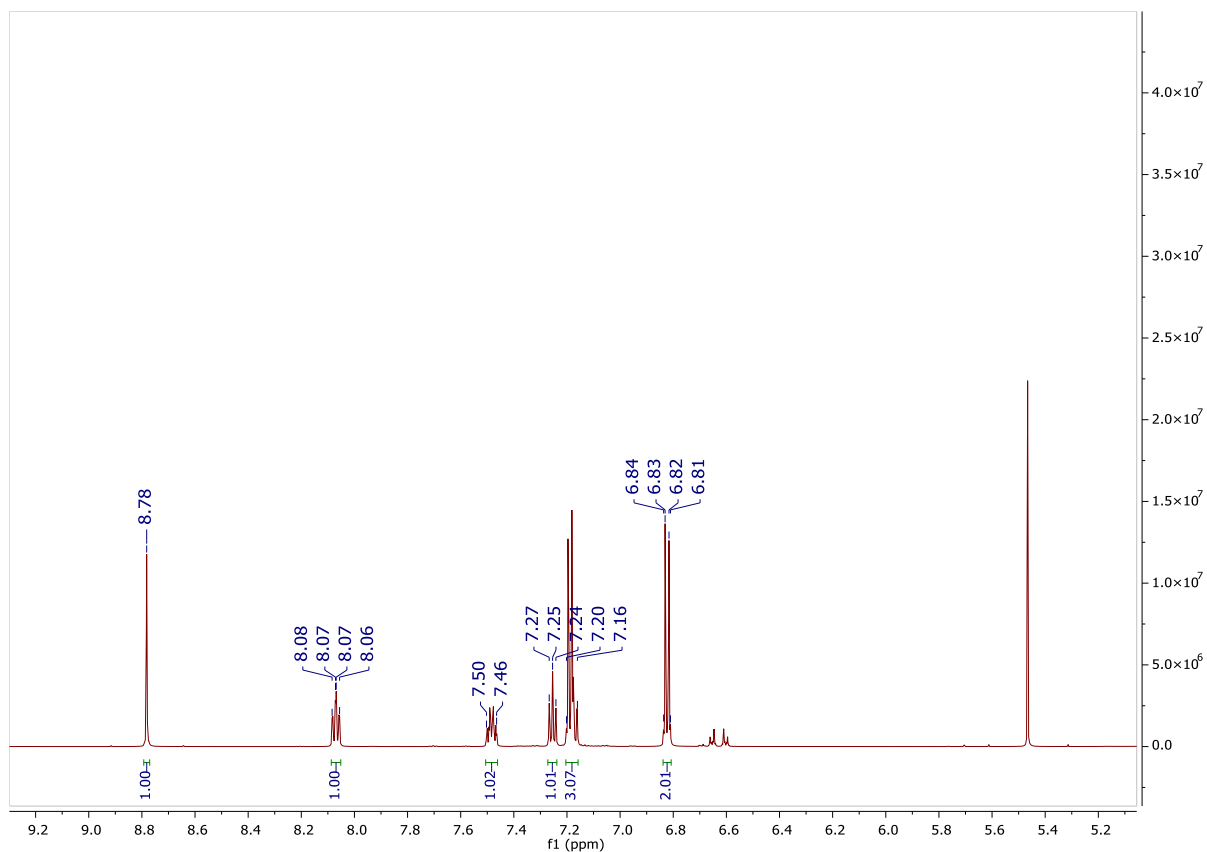
Rysunek 70. Widmo ^1H NMR związku 1.24 (CDCl_3).



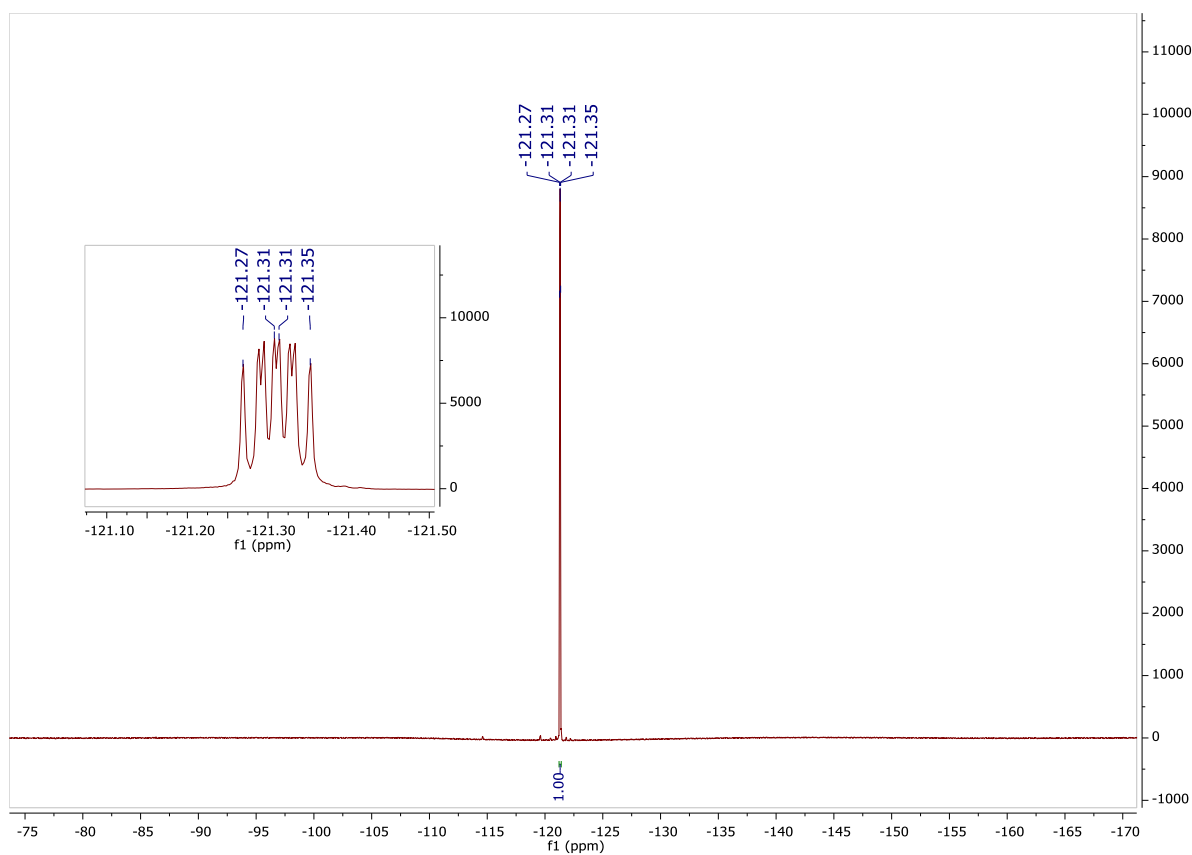
Rysunek 71. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.24 (CDCl₃).



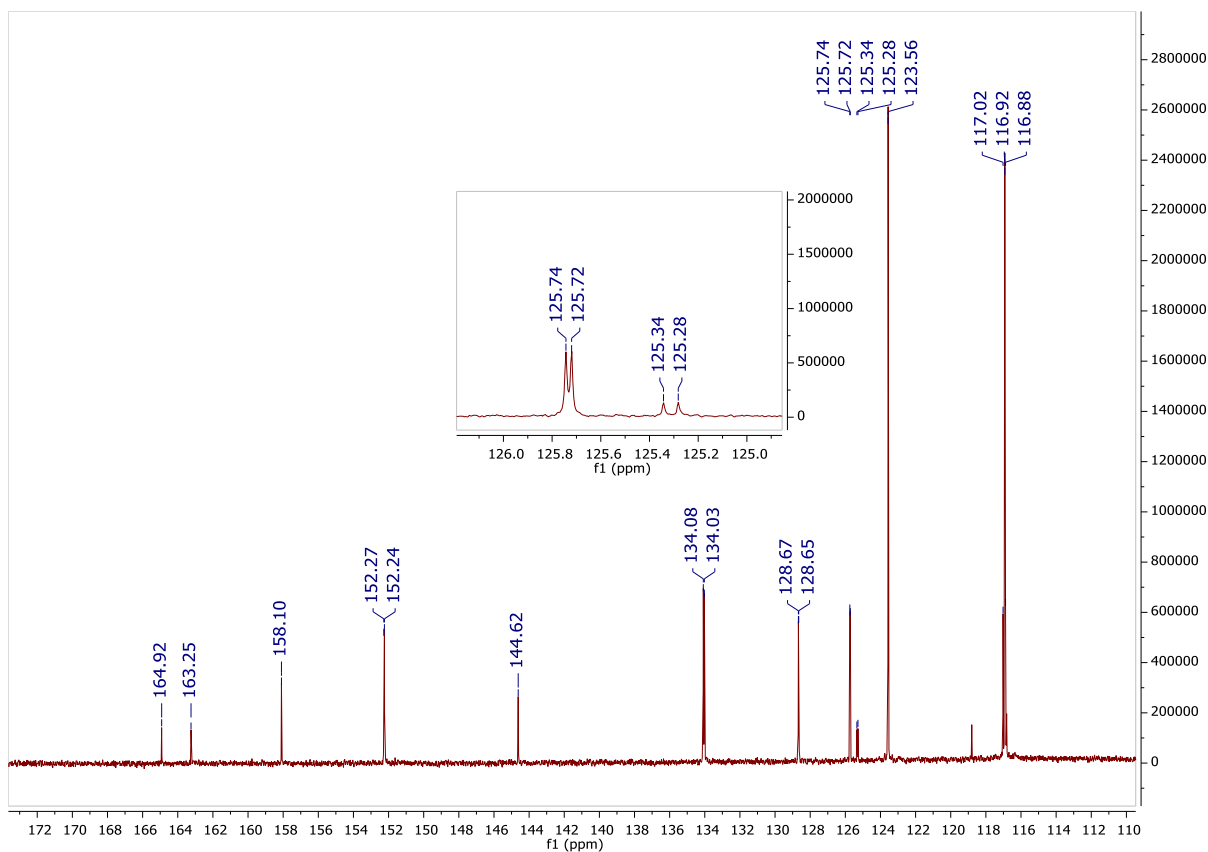
Rysunek 72. Widmo ¹³C NMR związku 1.24 (CDCl₃).



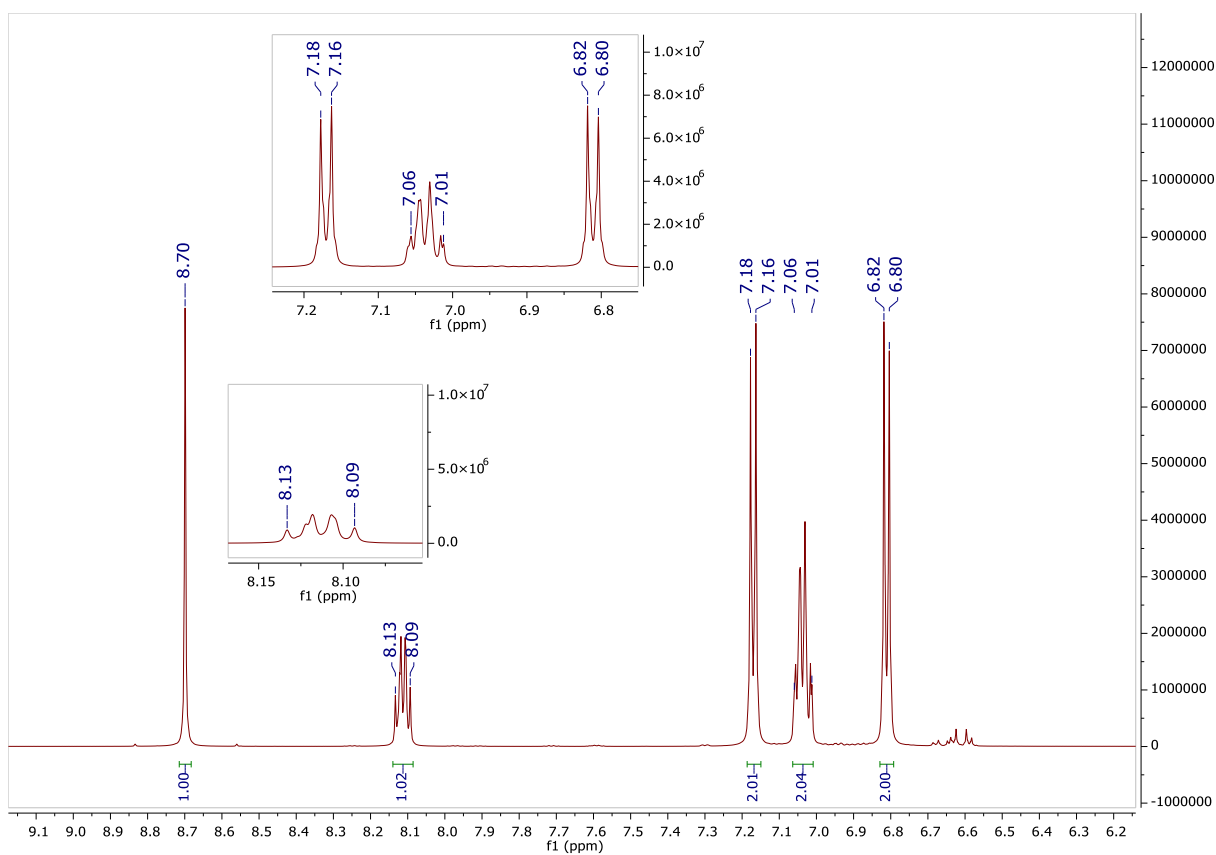
Rysunek 73. Widmo ^1H NMR związku 1.25 (CD_3OD).



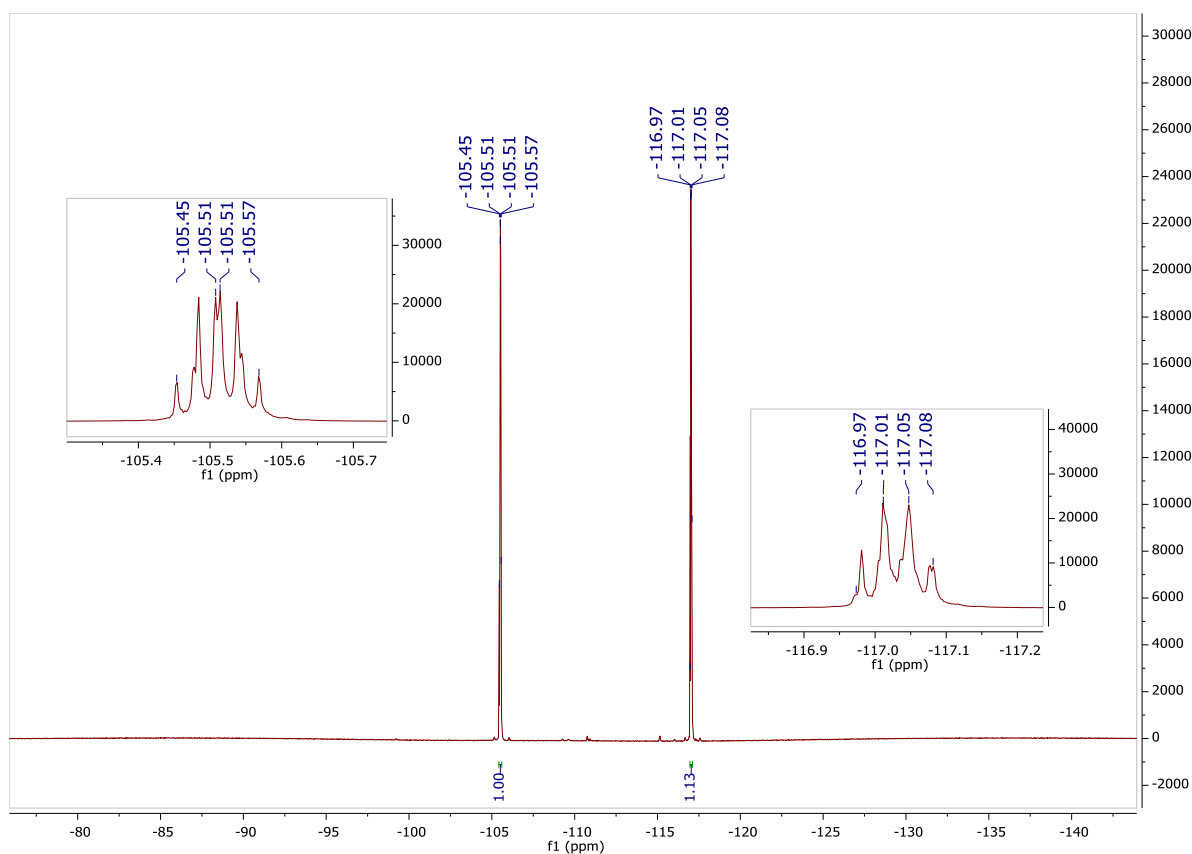
Rysunek 74. Widmo ^{19}F NMR związku 1.25 (CD_3OD).



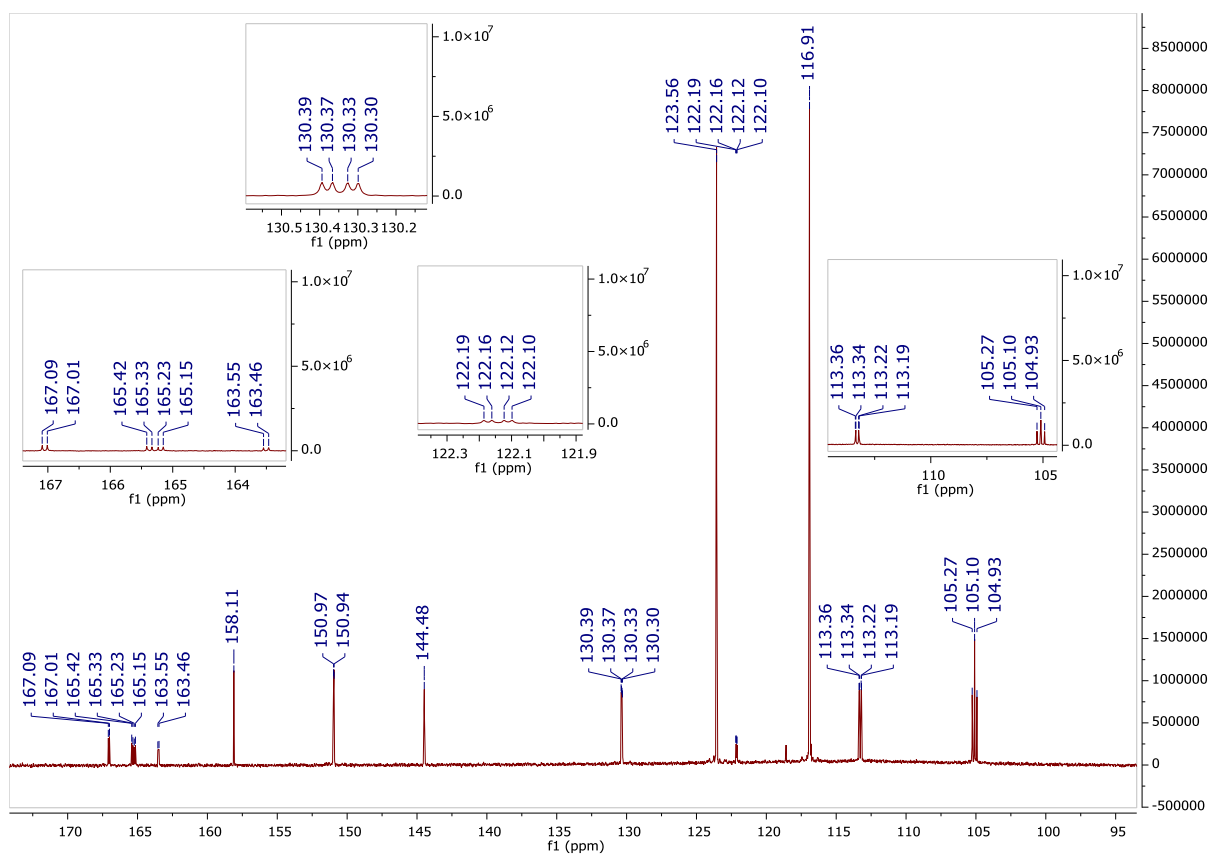
Rysunek 75. Widmo ^{13}C NMR związku 1.25 (CD_3OD).



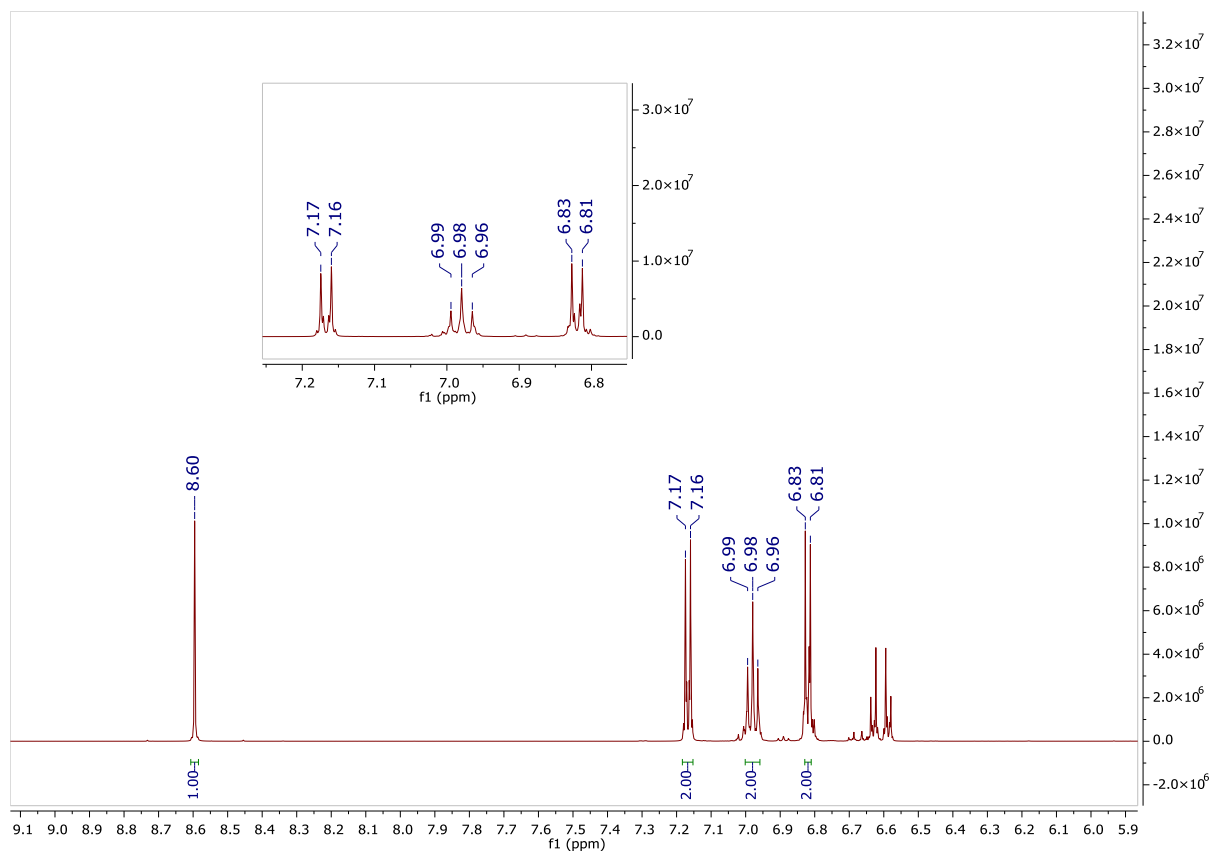
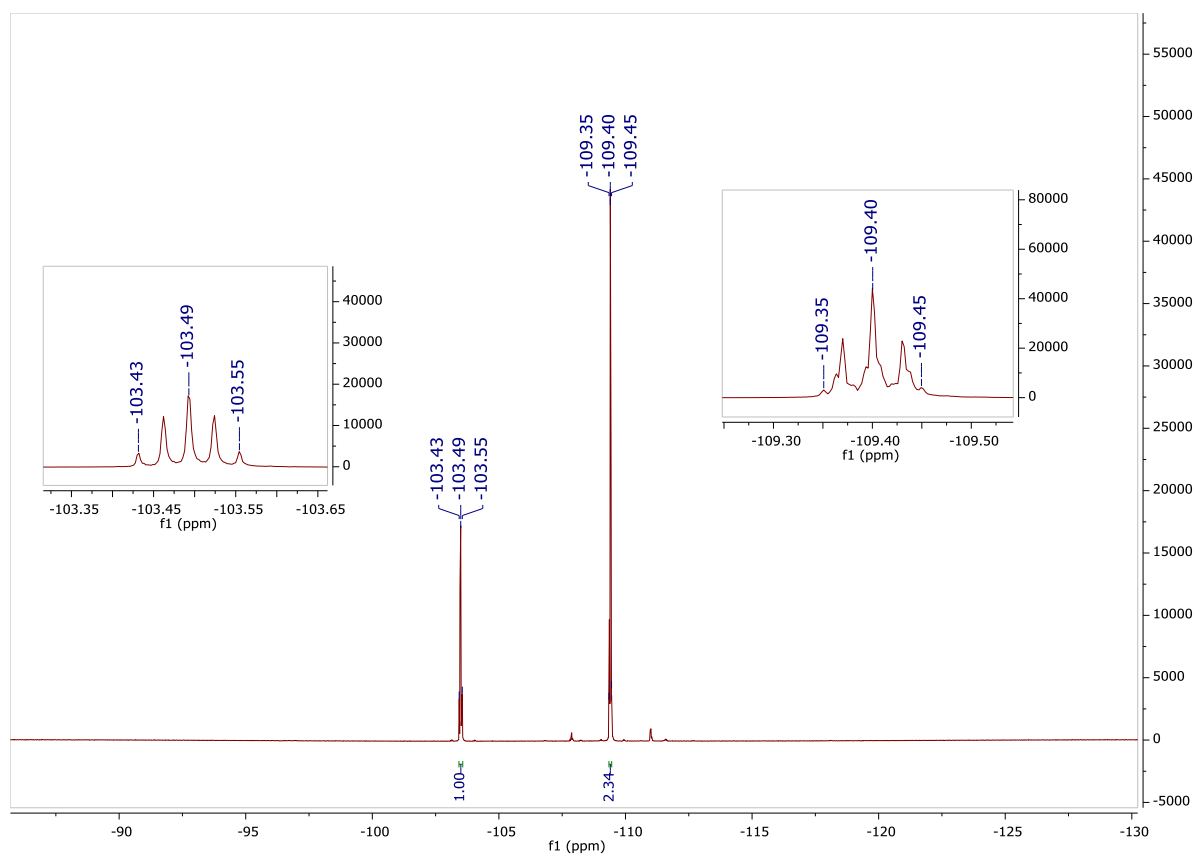
Rysunek 76. Widmo ^1H NMR związku 1.26 (CD_3OD).

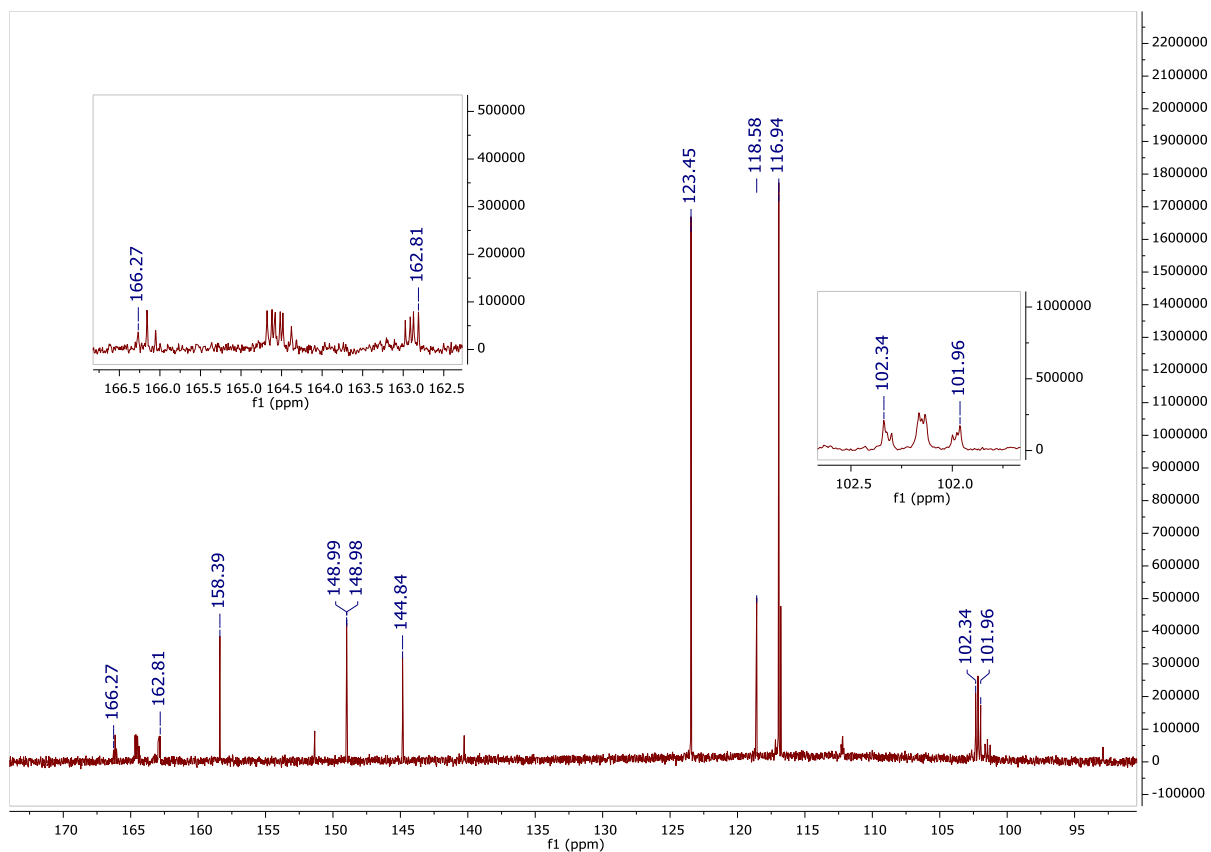


Rysunek 77. Widmo ^{19}F NMR związku 1.26 (CD_3OD).

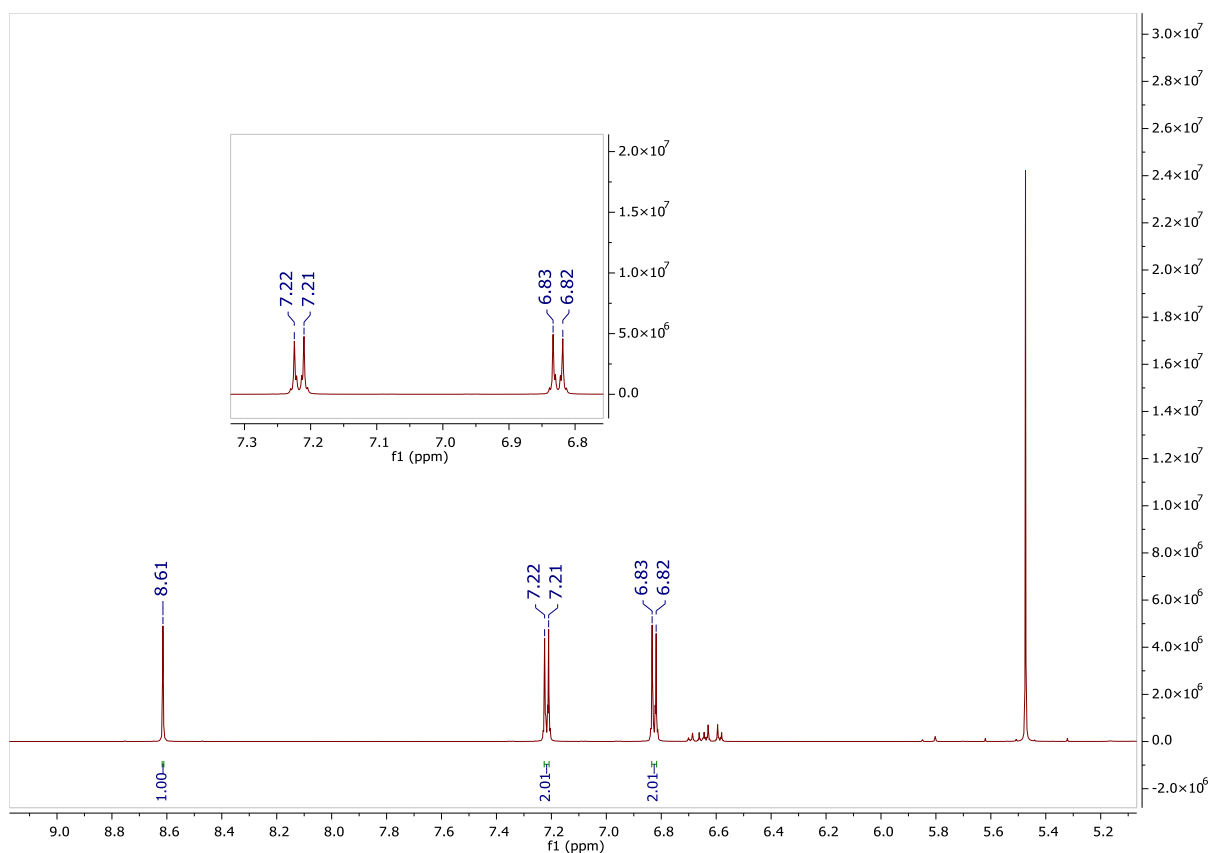


Rysunek 78. Widmo ^{13}C NMR związku 1.26 (CD_3OD).

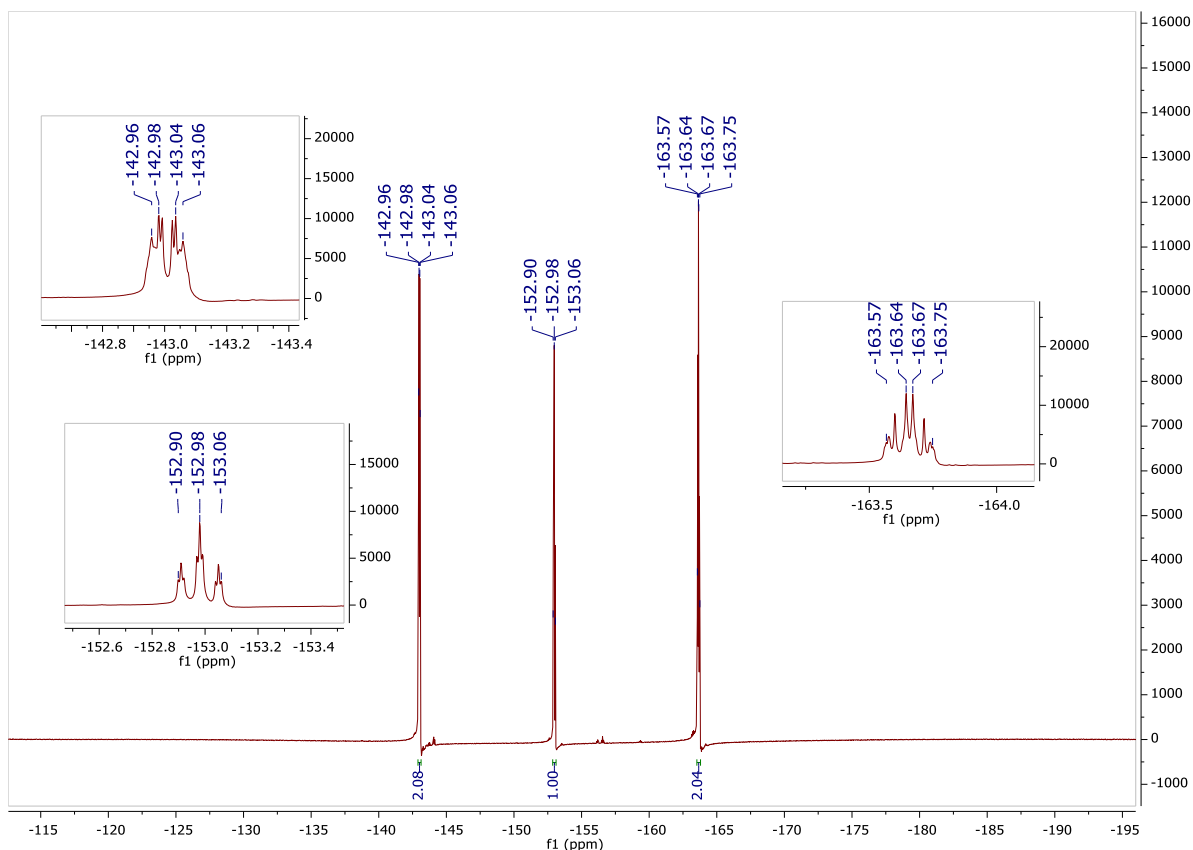
Rysunek 79. Widmo ^1H NMR związku 1.27 (CD_3OD).Rysunek 80. Widmo ^{19}F NMR związku 1.27 (CD_3OD).



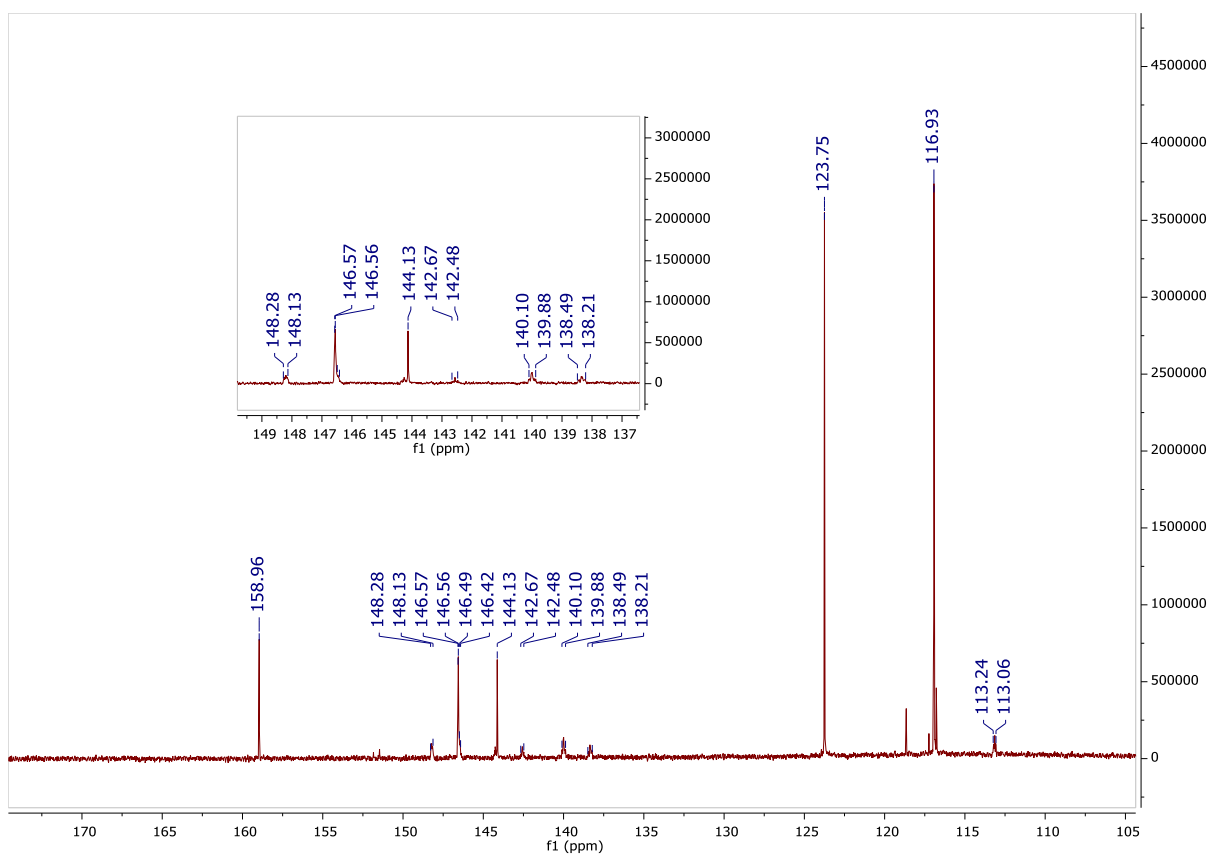
Rysunek 81. Widmo ¹³C NMR związku 1.27 (CD₃OD).



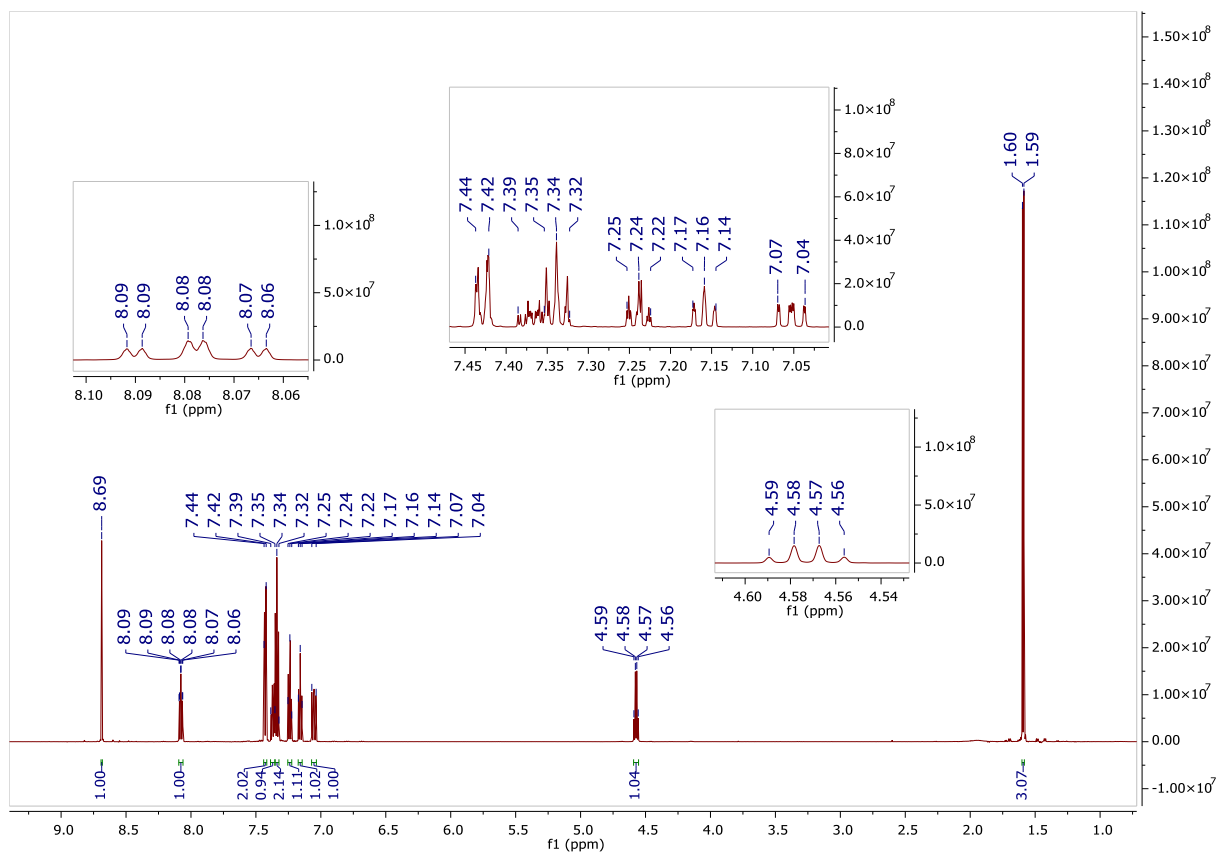
Rysunek 82. Widmo ¹H NMR związku 1.28 (CD₃OD).



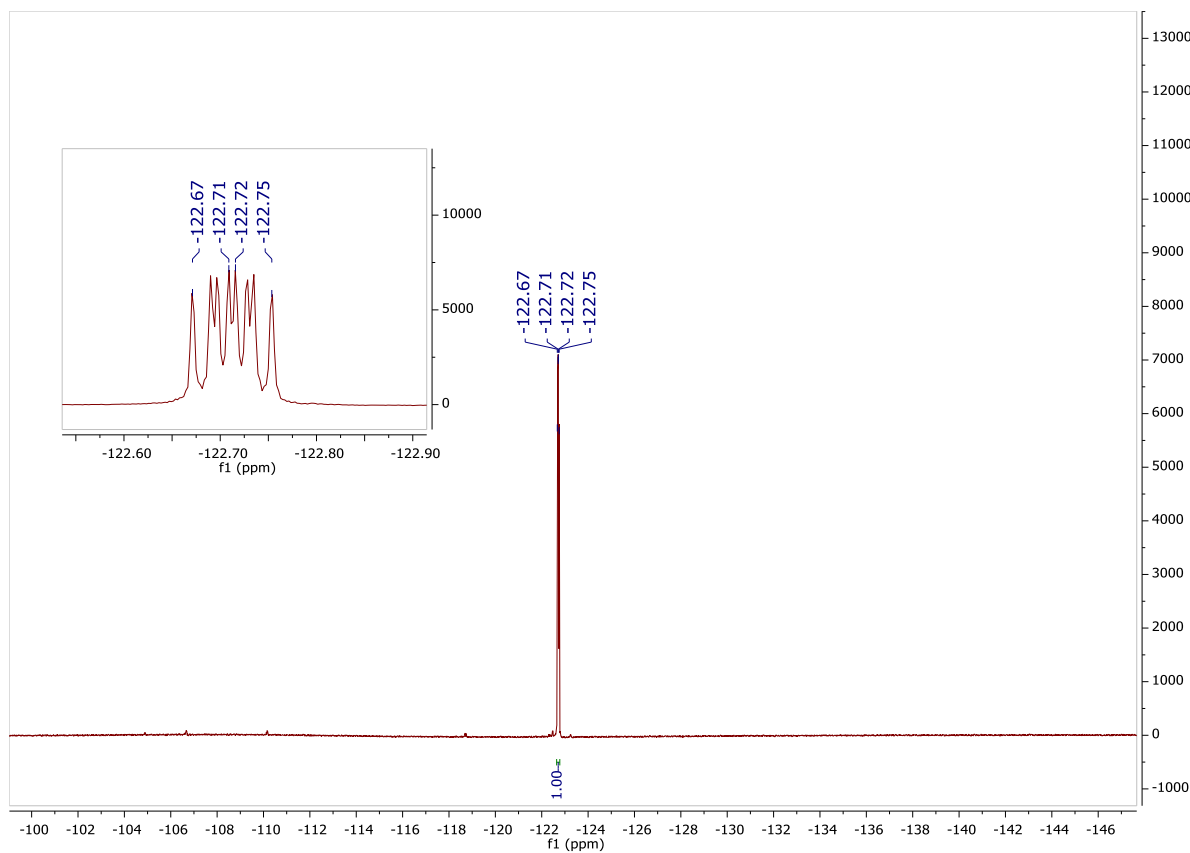
Rysunek 83. Widmo ^{19}F NMR związku 1.28 (CD_3OD).



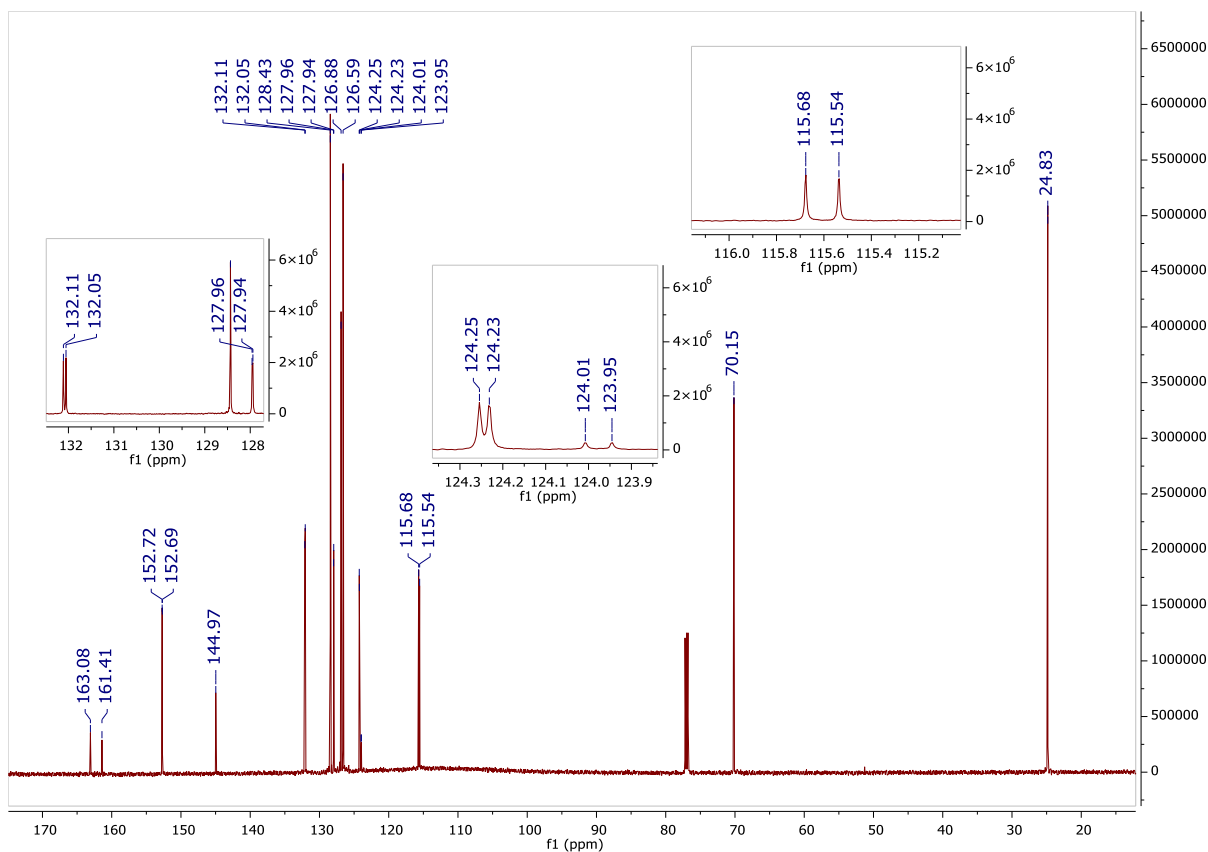
Rysunek 84. Widmo ^{13}C NMR związku 1.28 (CD_3OD).



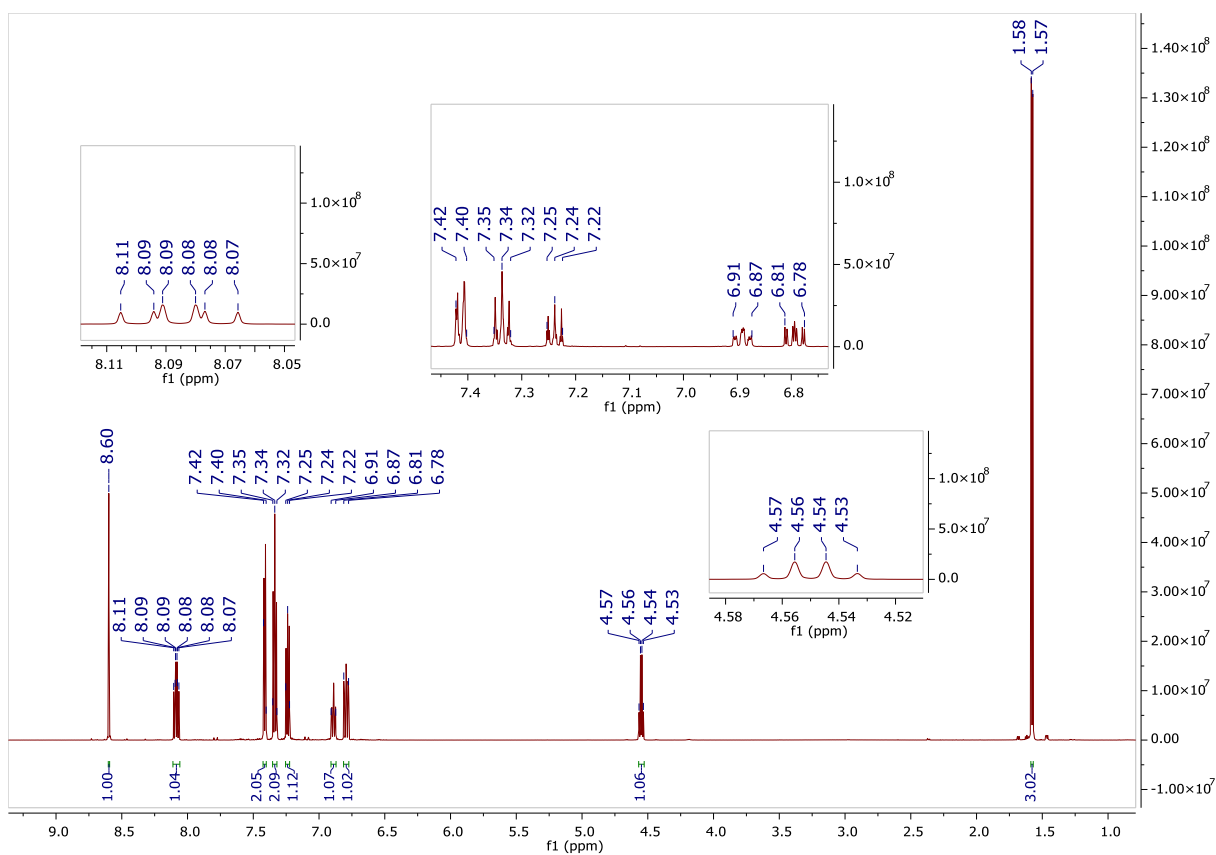
Rysunek 85. Widmo ^1H NMR związku 1.29 (CDCl_3).



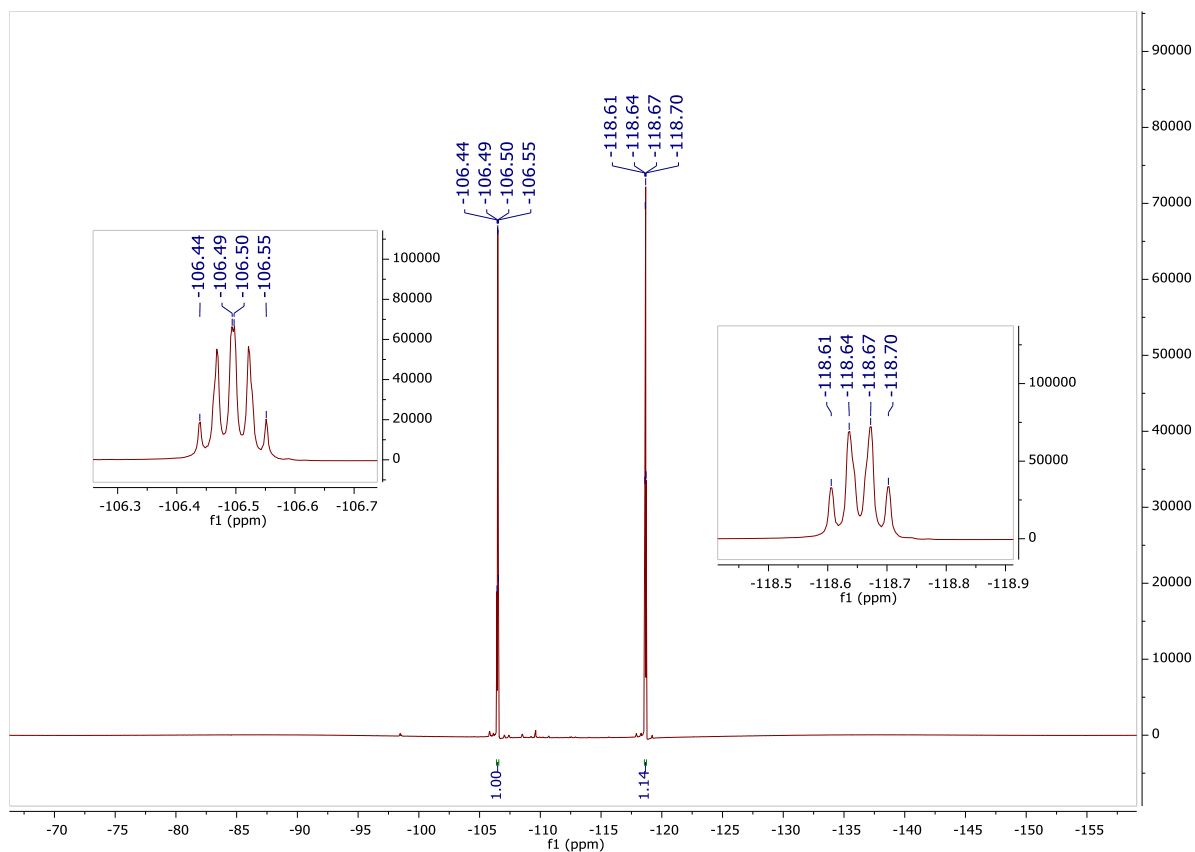
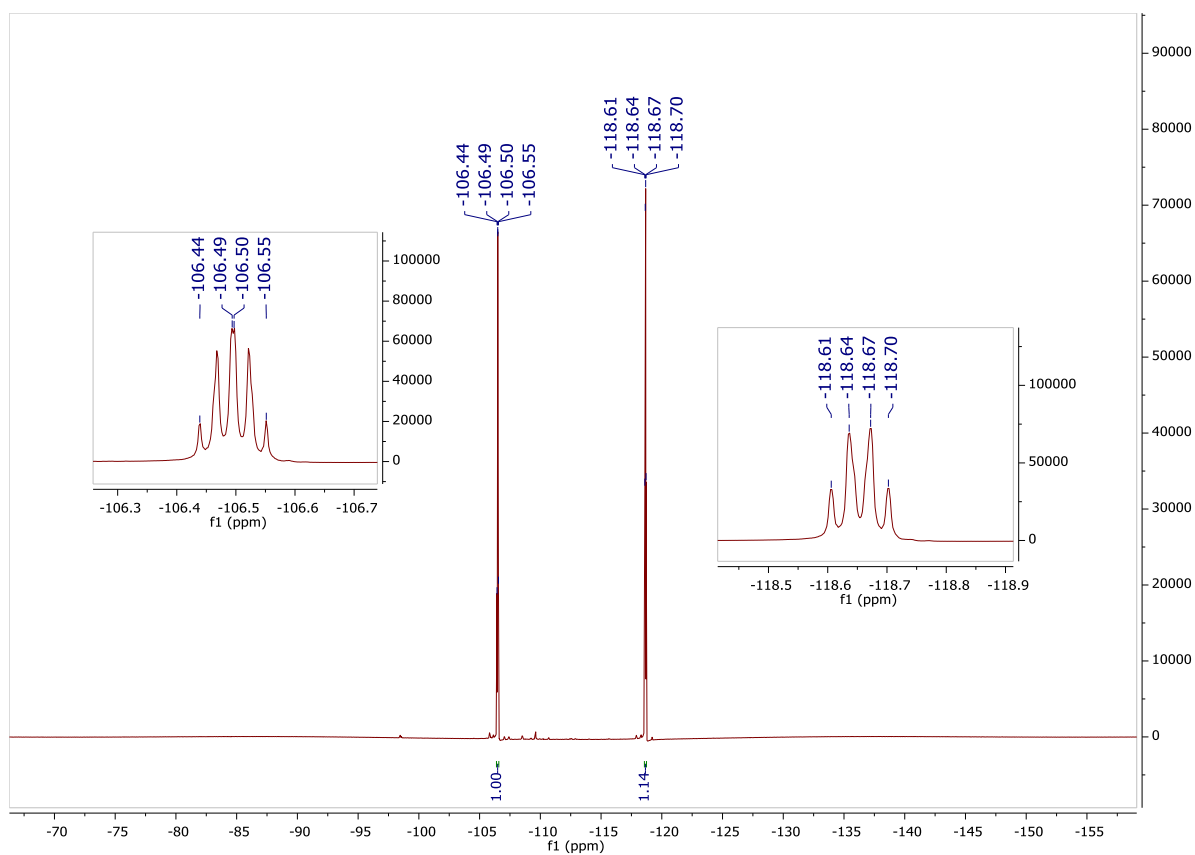
Rysunek 86. Widmo ^{19}F NMR związku 1.29 (CDCl_3).

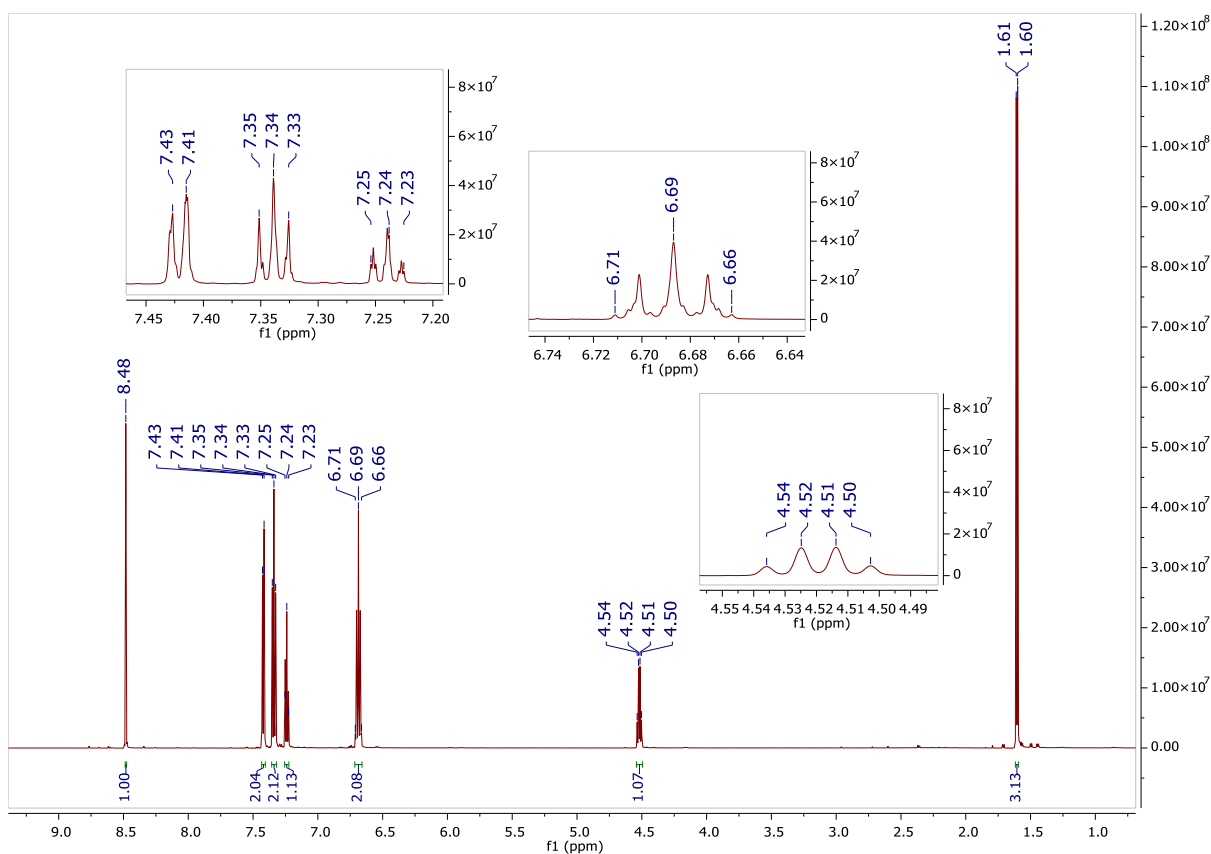


Rysunek 87. Widmo ^{13}C NMR związku 1.29 (CDCl_3).

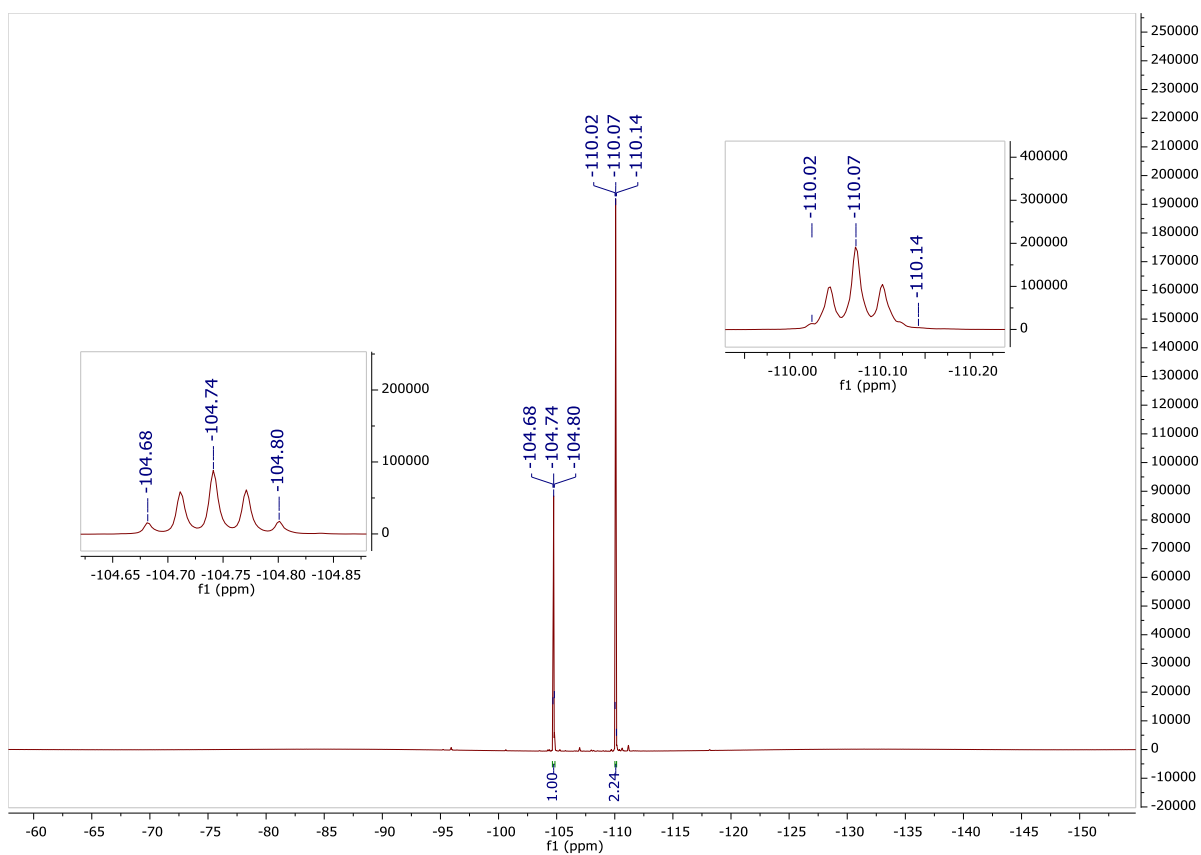


Rysunek 88. Widmo ^1H NMR związku 1.30 (CDCl_3).

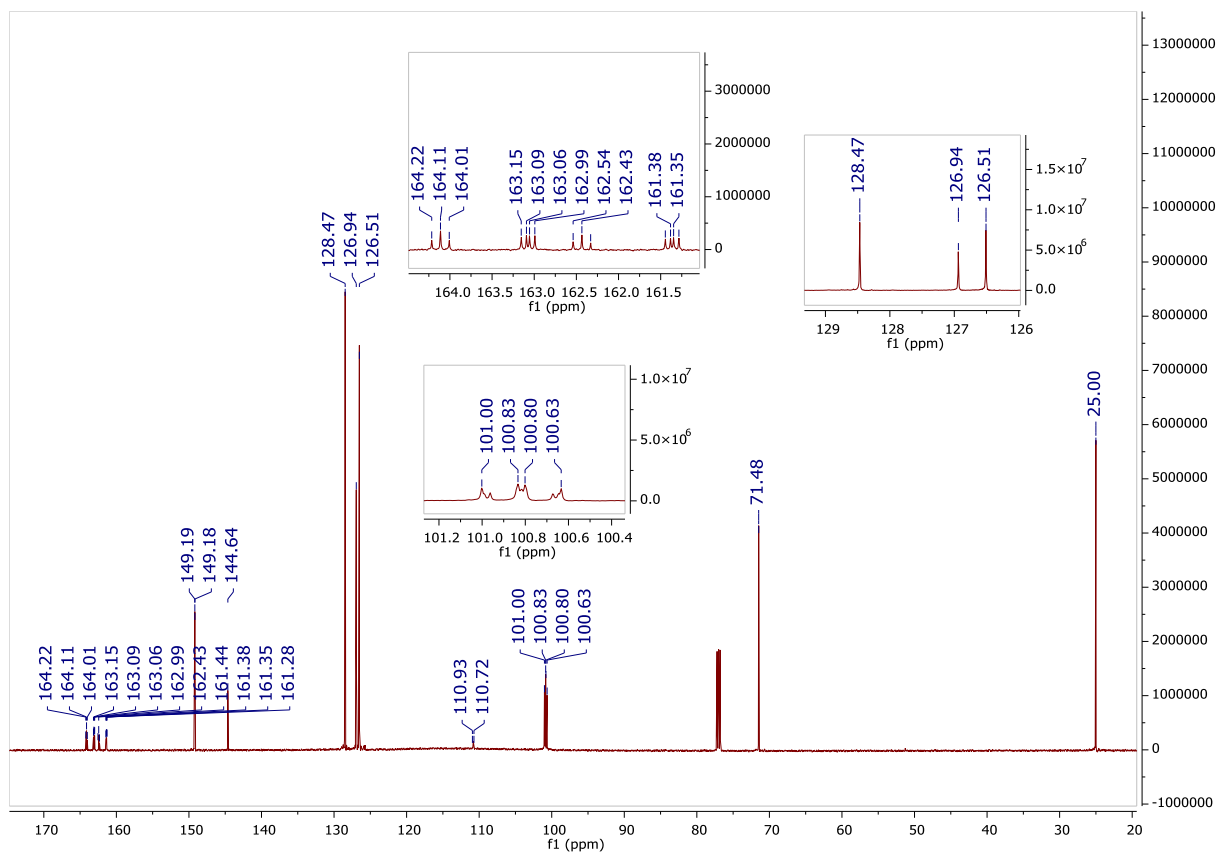
Rysunek 89. Widmo ^{19}F NMR związku 1.30 (CDCl_3).Rysunek 90. Widmo ^{13}C NMR związku 1.30 (CDCl_3).



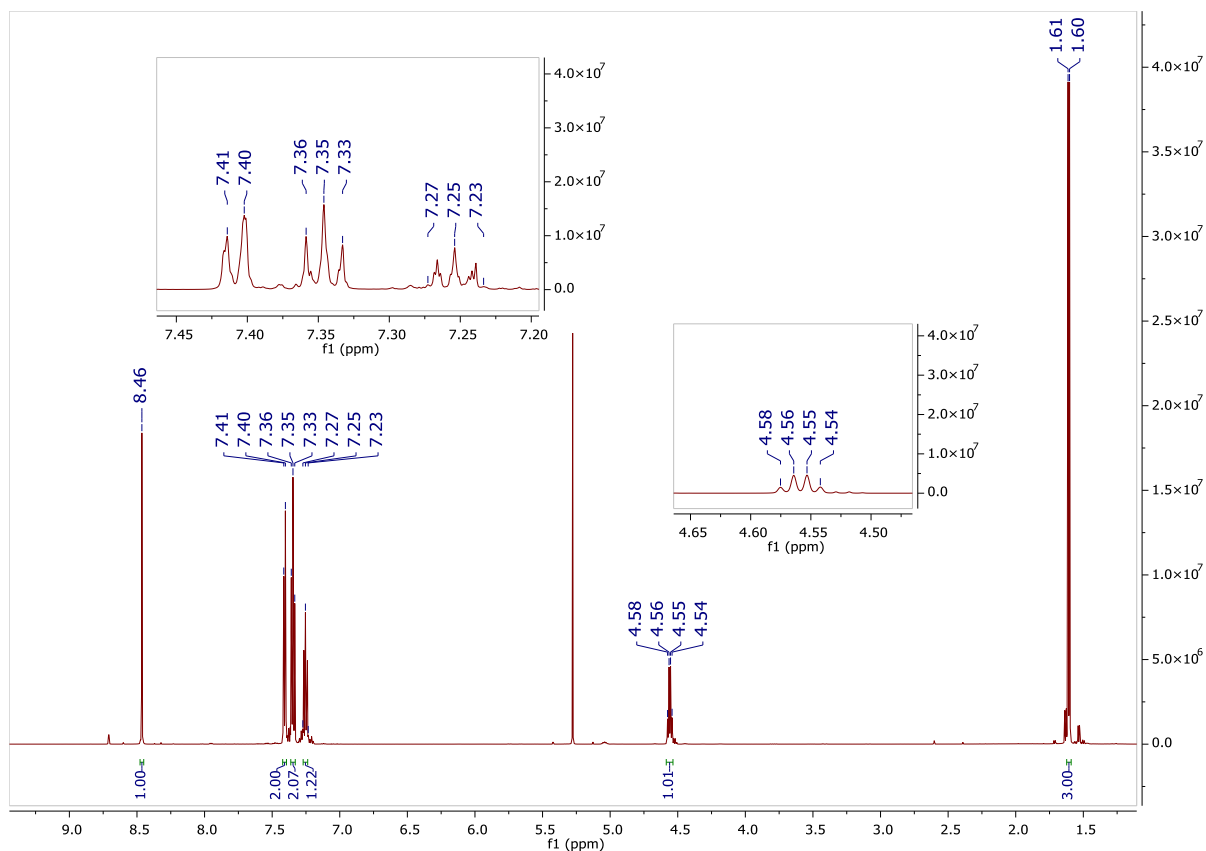
Rysunek 91. Widmo ¹H NMR związku 1.31 (CDCl₃).



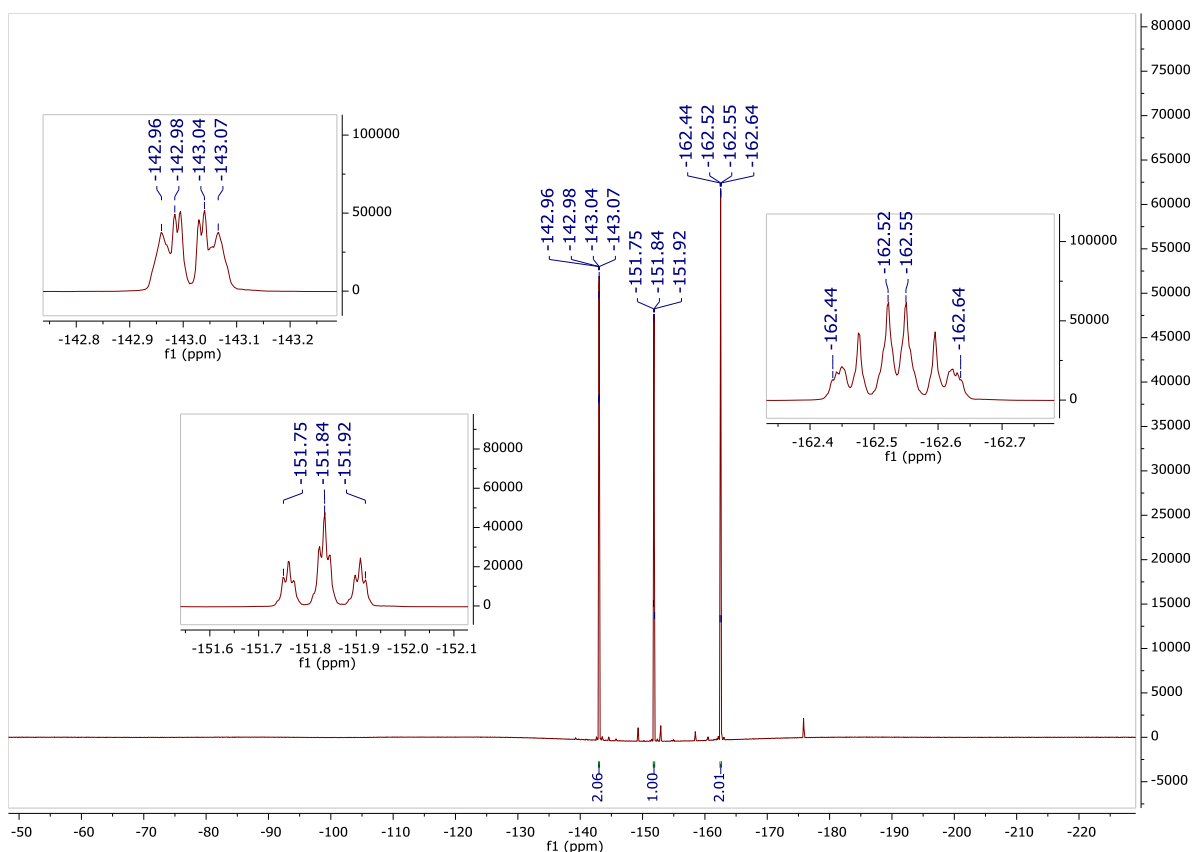
Rysunek 92. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.31 (CDCl₃).



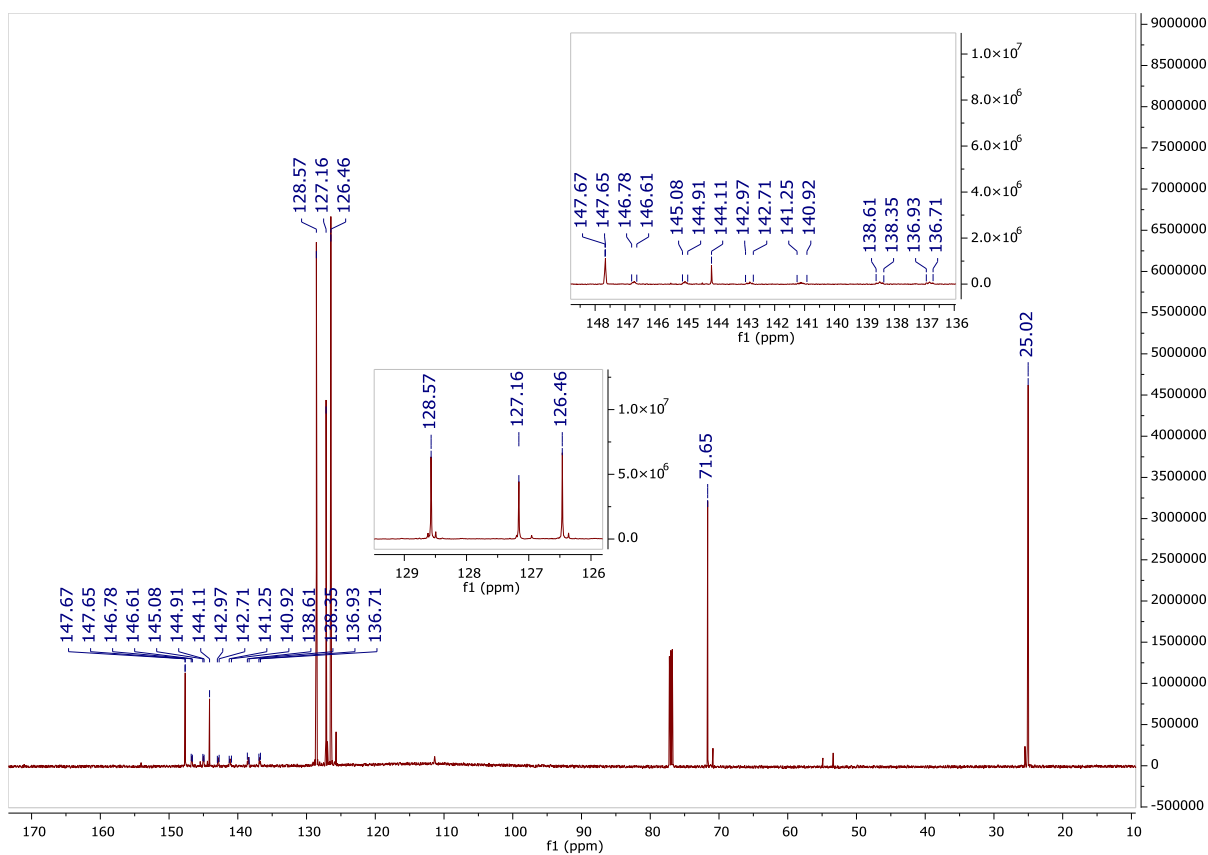
Rysunek 93. Widmo ¹³C NMR związku 1.31 (CDCl₃).



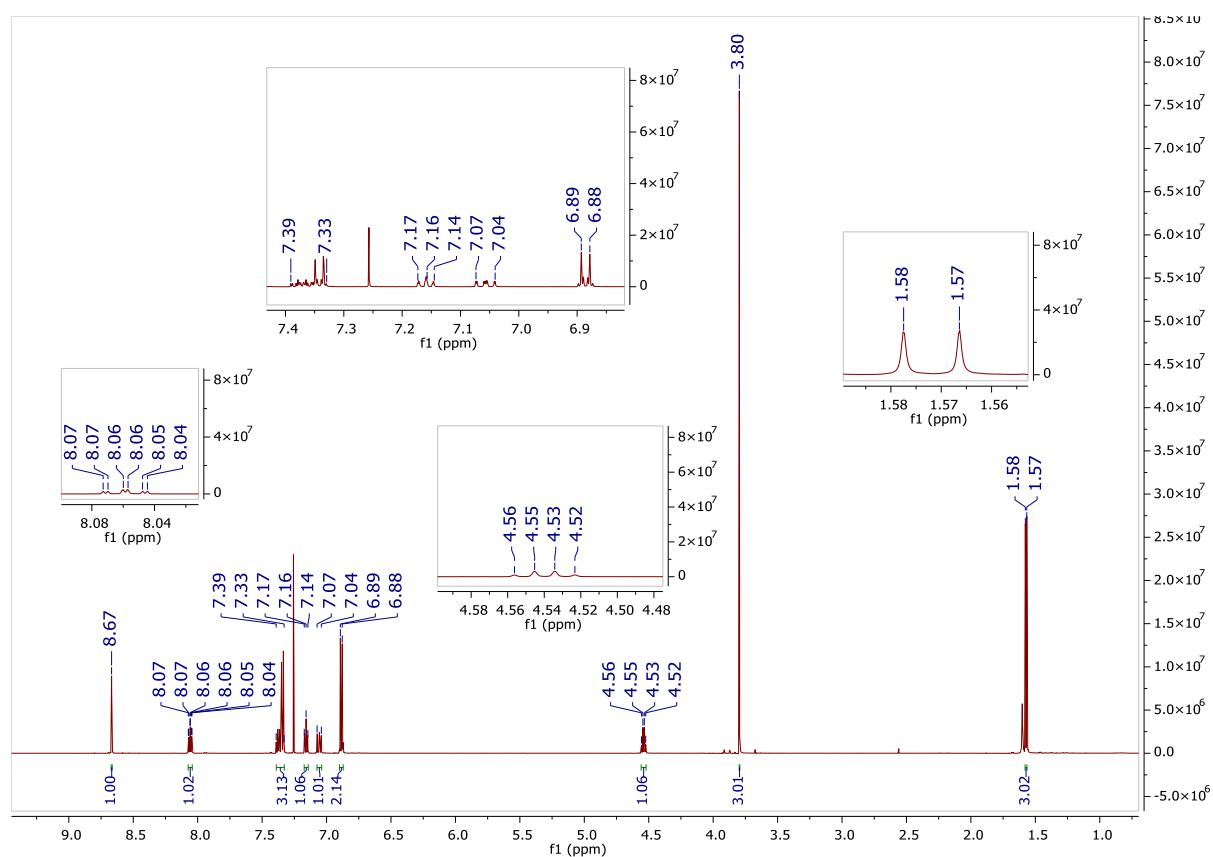
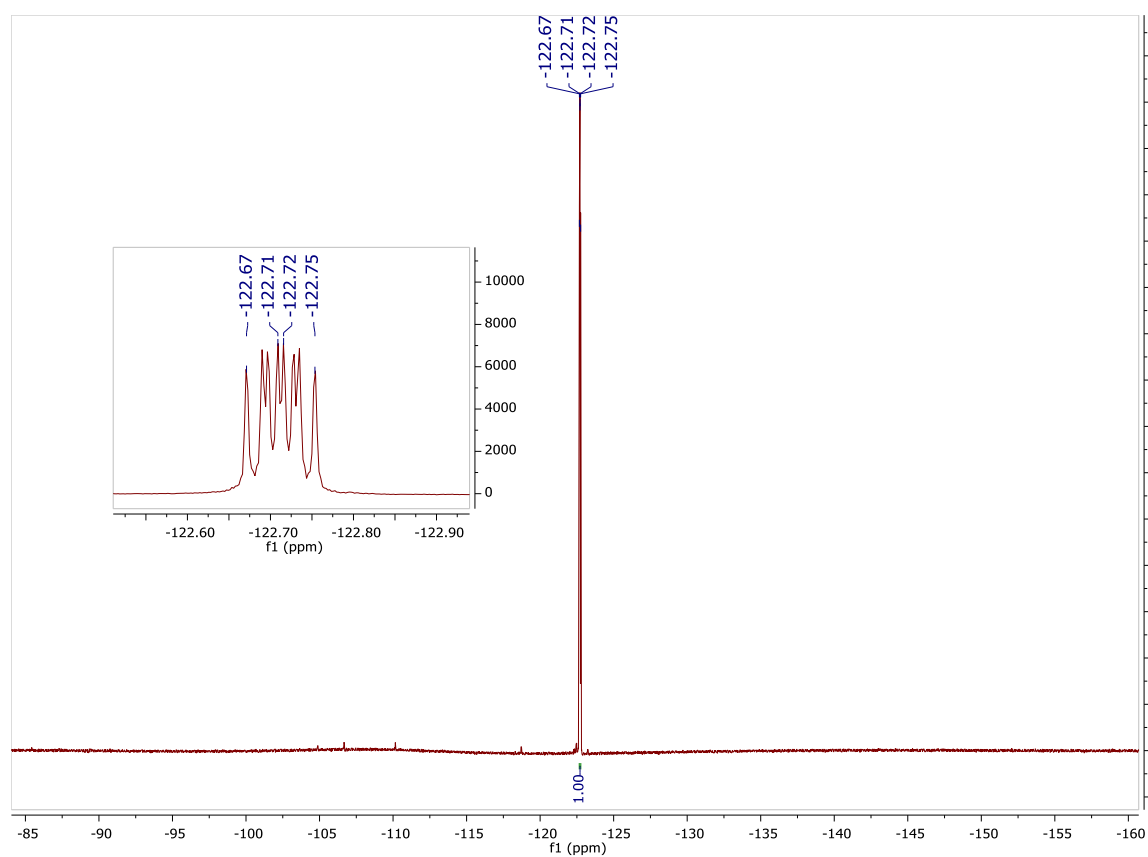
Rysunek 94. Widmo ¹H NMR związku 1.32 (CDCl₃).

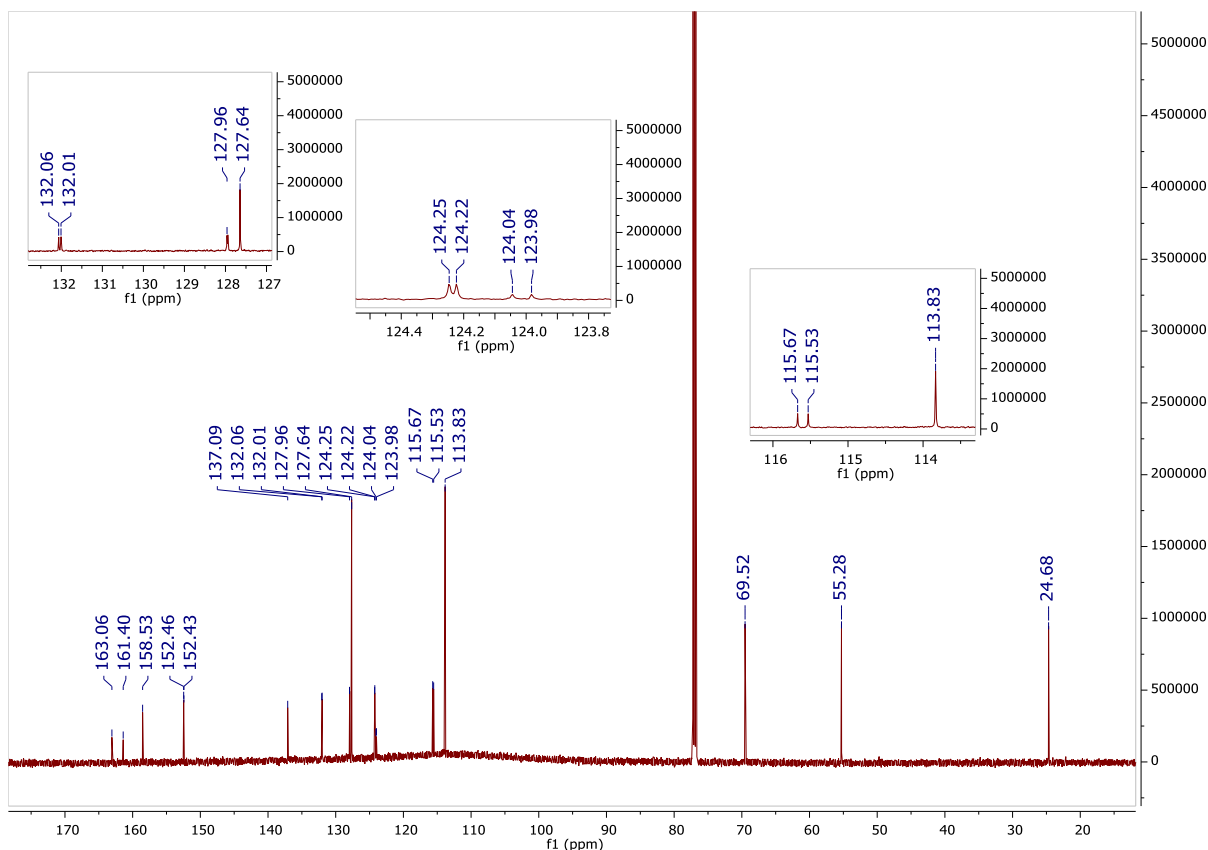


Rysunek 95. Widmo ¹⁹F NMR związku 1.32 (CDCl₃).

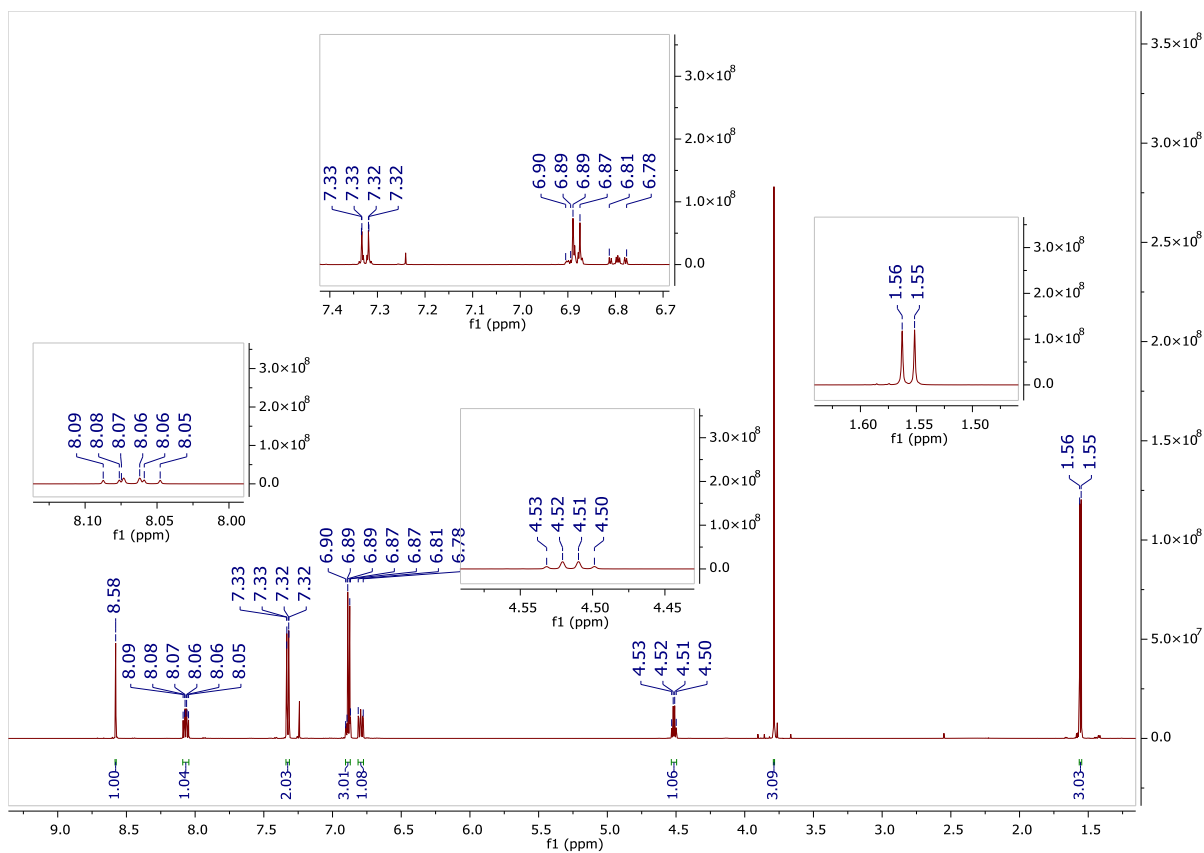


Rysunek 96. Widmo ¹³C NMR związku 1.32 (CDCl₃).

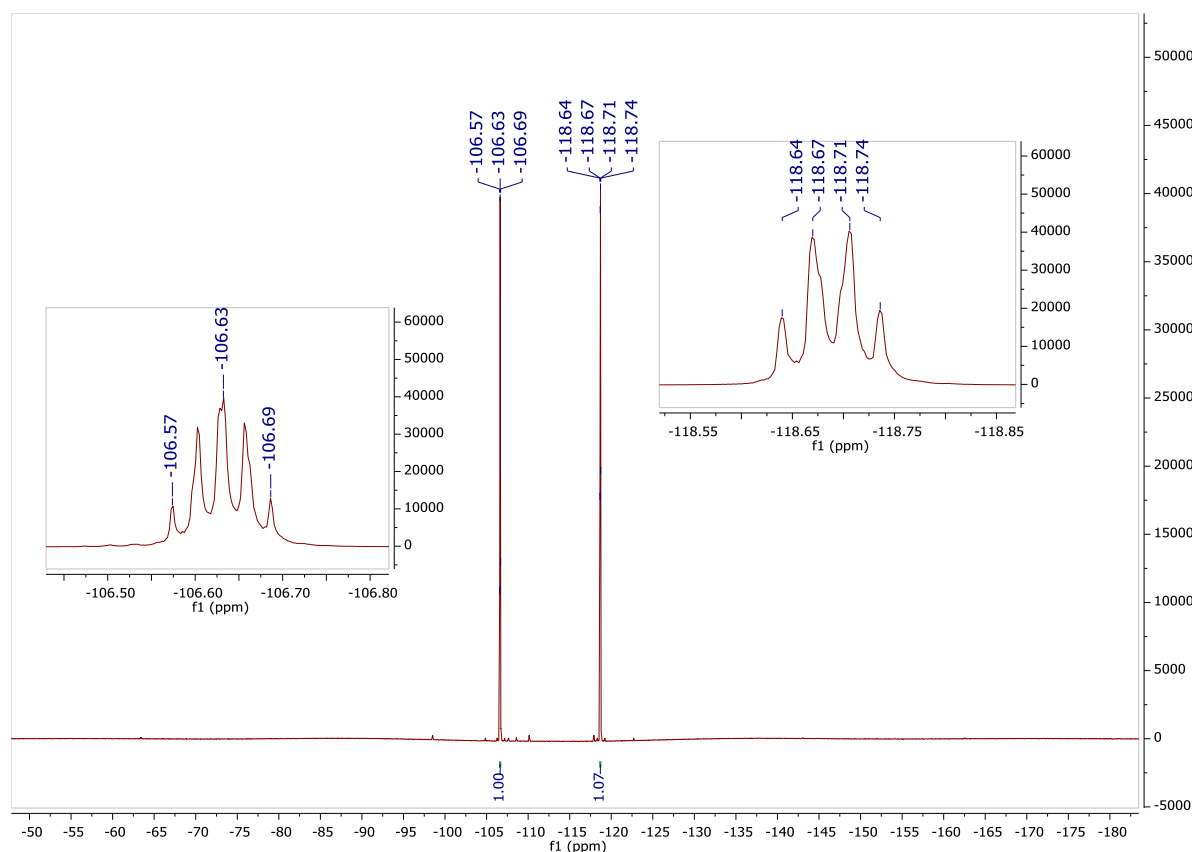
Rysunek 97. Widmo ^1H NMR związku 1.33 (CDCl_3).Rysunek 98. Widmo ^{19}F NMR związku 1.33 (CDCl_3).



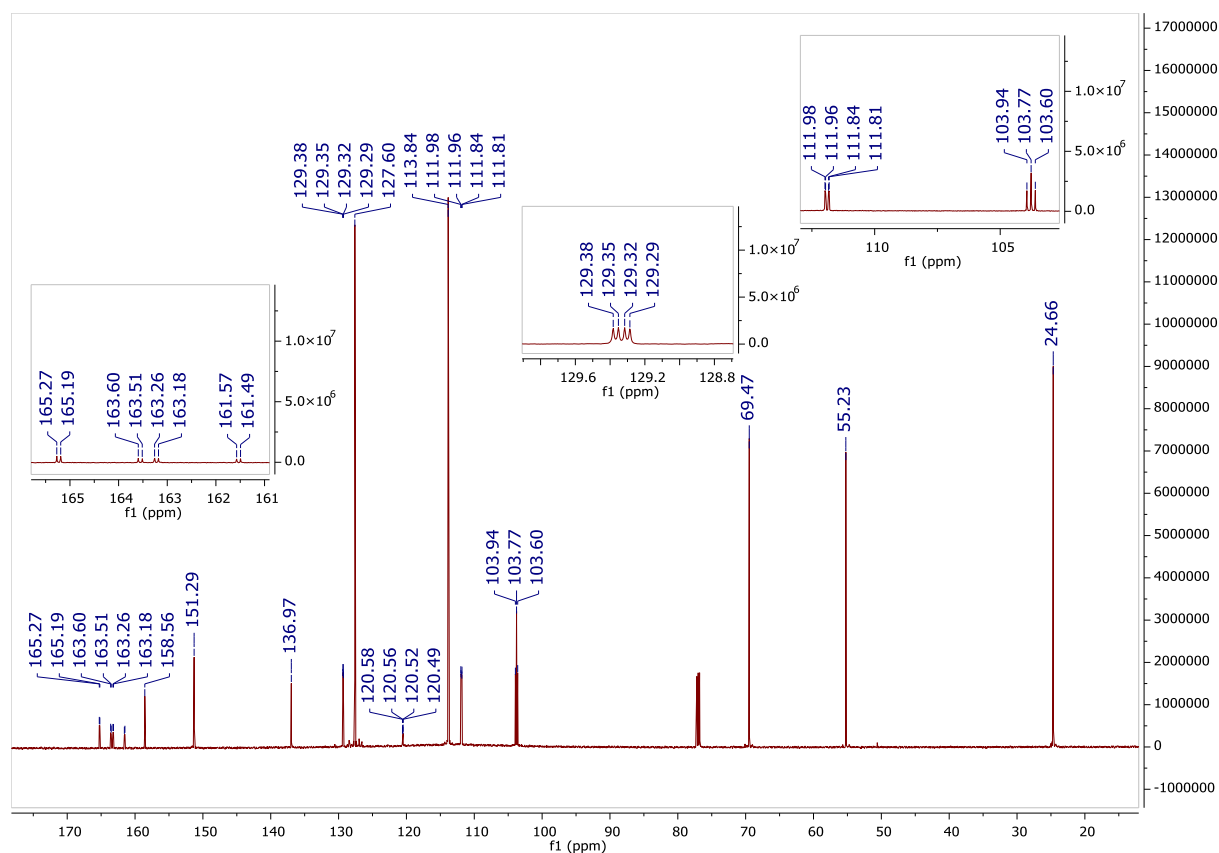
Rysunek 99. Widmo ¹³C NMR związku 1.33 (CDCl₃).



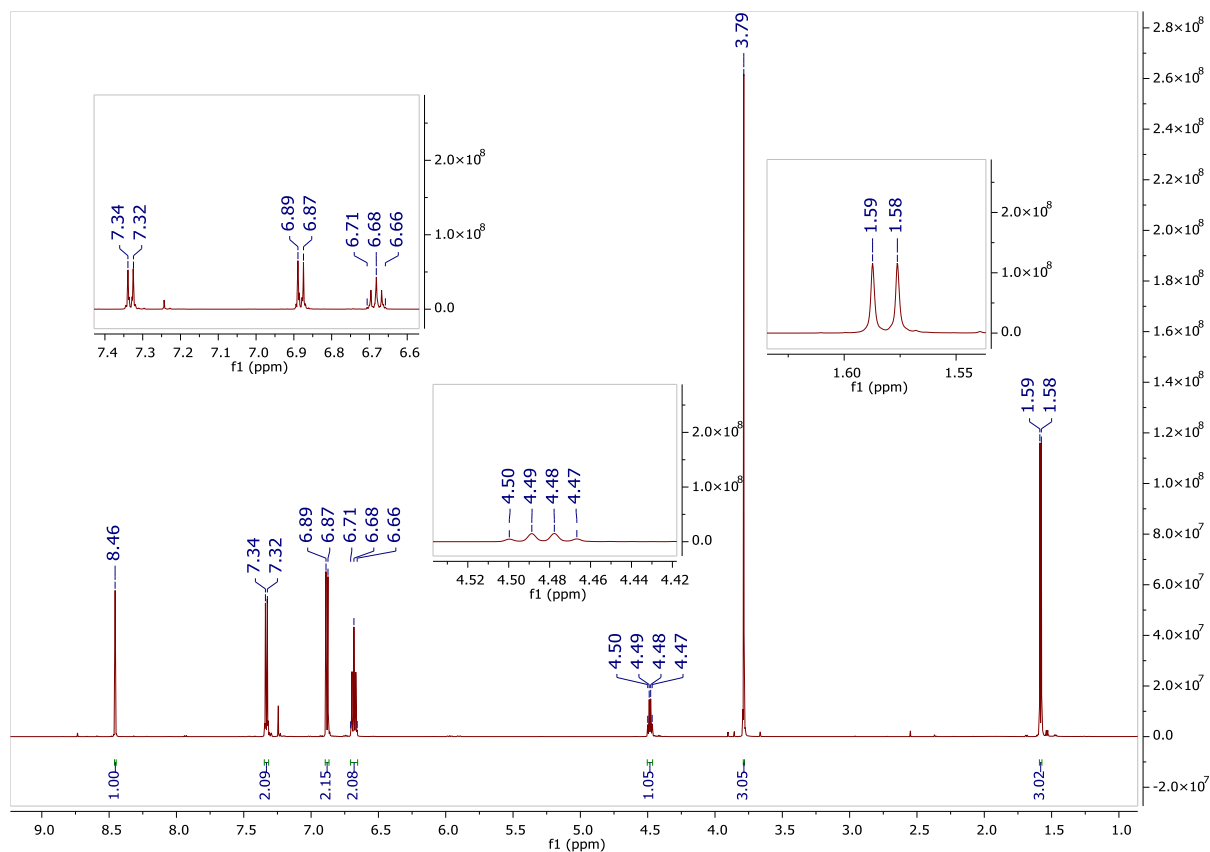
Rysunek 100. Widmo ¹H NMR związku 1.34 (CDCl₃).



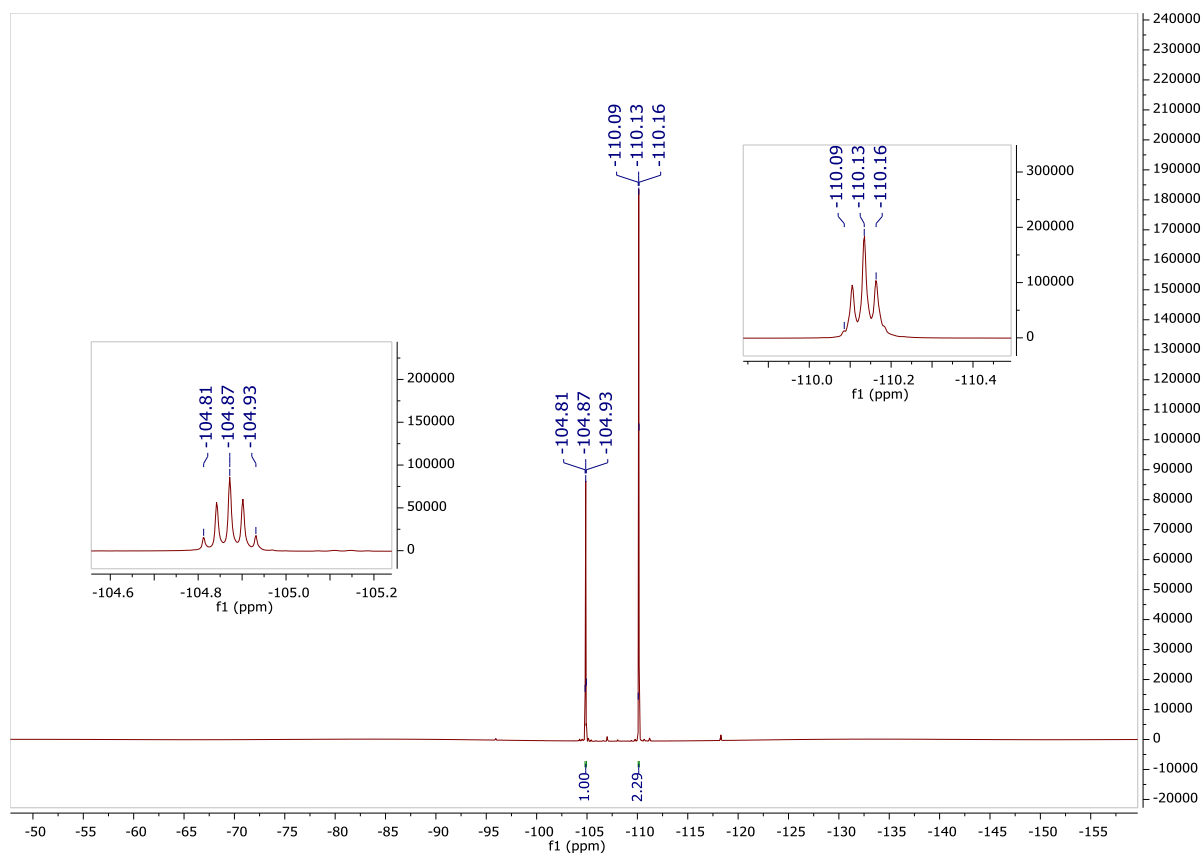
Rysunek 101. Widmo ^{19}F NMR związku 1.34 (CDCl_3).



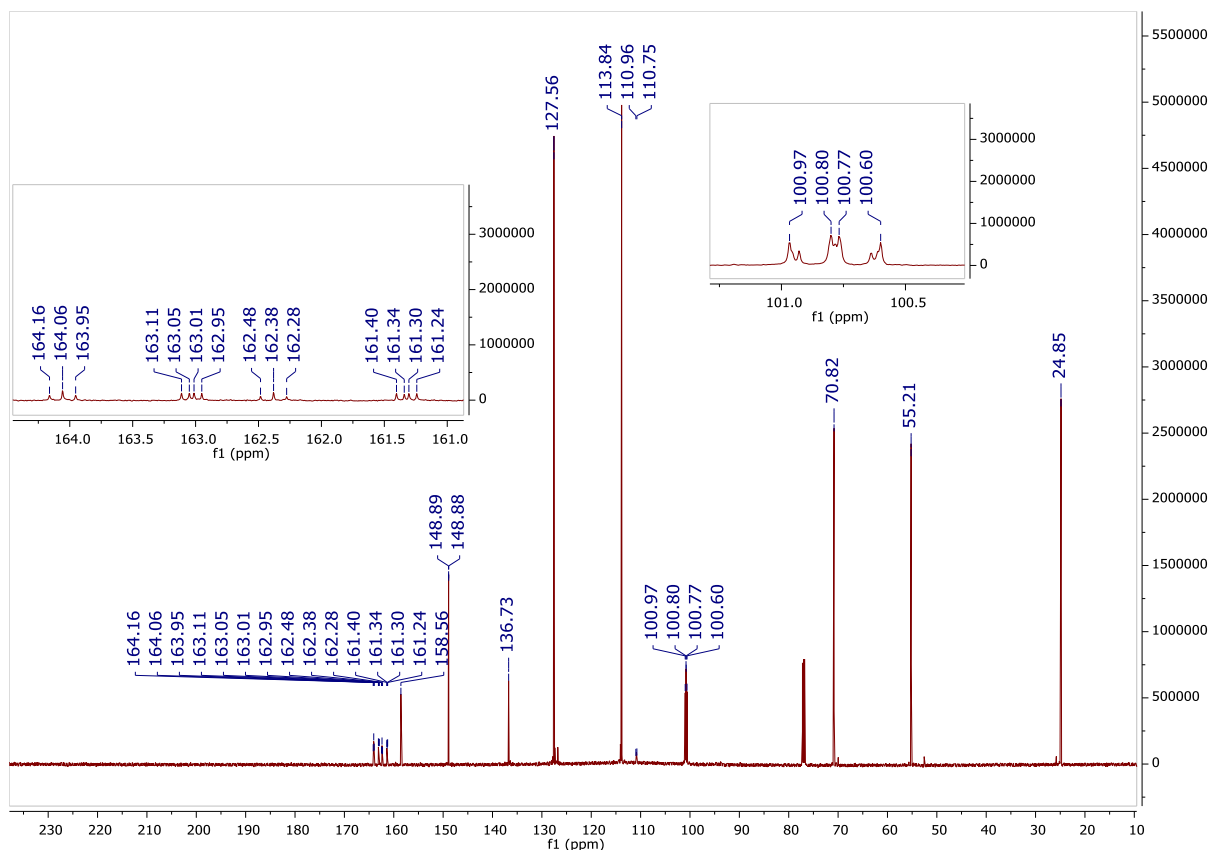
Rysunek 102. Widmo ^{13}C NMR związku 1.34 (CDCl_3).



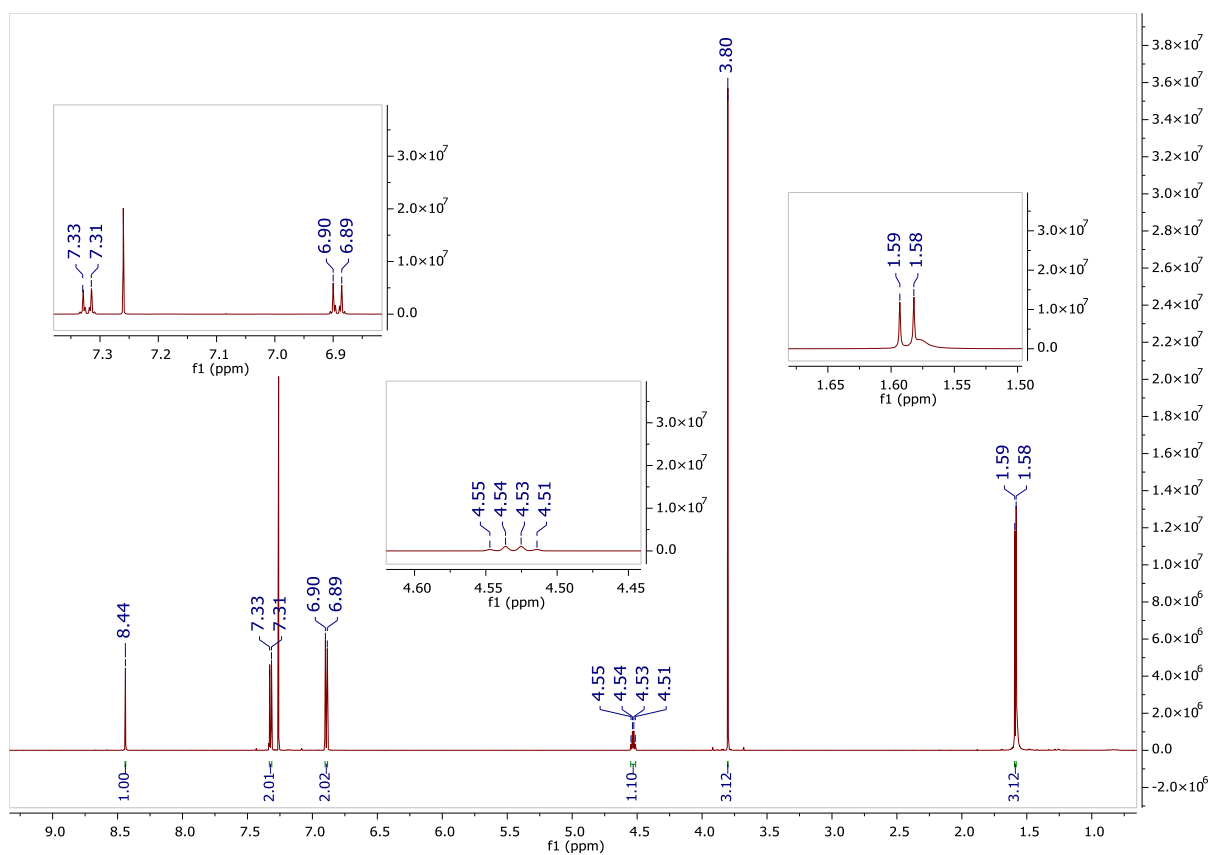
Rysunek 103. Widmo ^1H NMR związku 1.35 (CDCl_3).



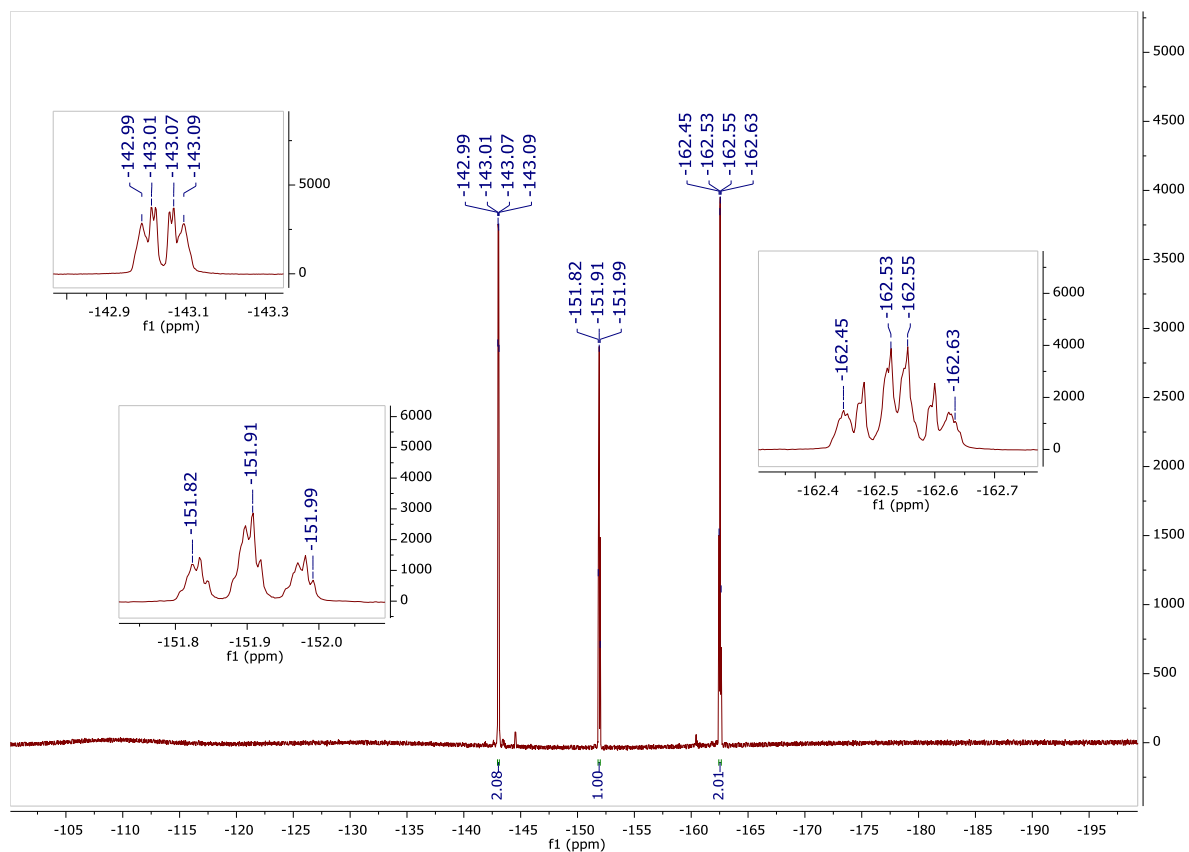
Rysunek 104. Widmo ^{19}F NMR związku 1.35 (CDCl_3).



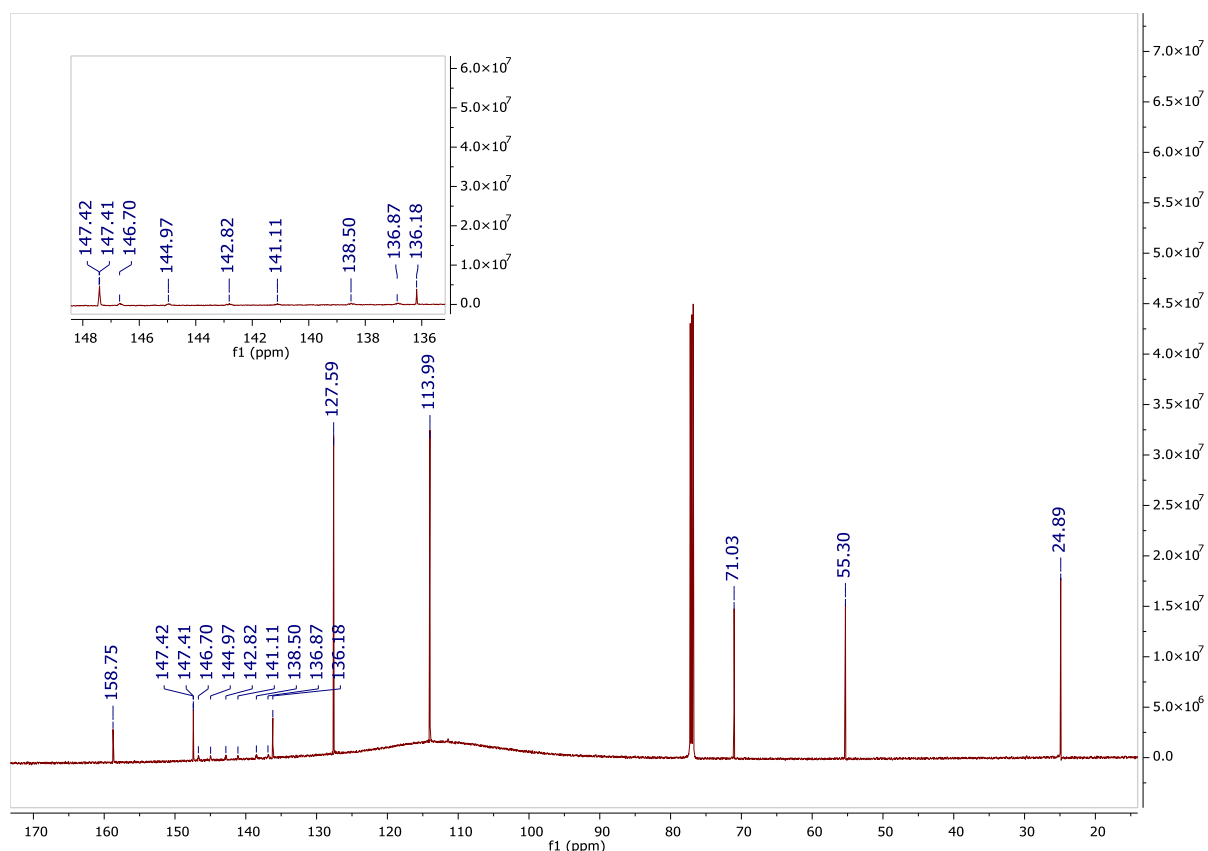
Rysunek 105. Widmo ¹³C NMR związku 1.35 (CDCl₃).



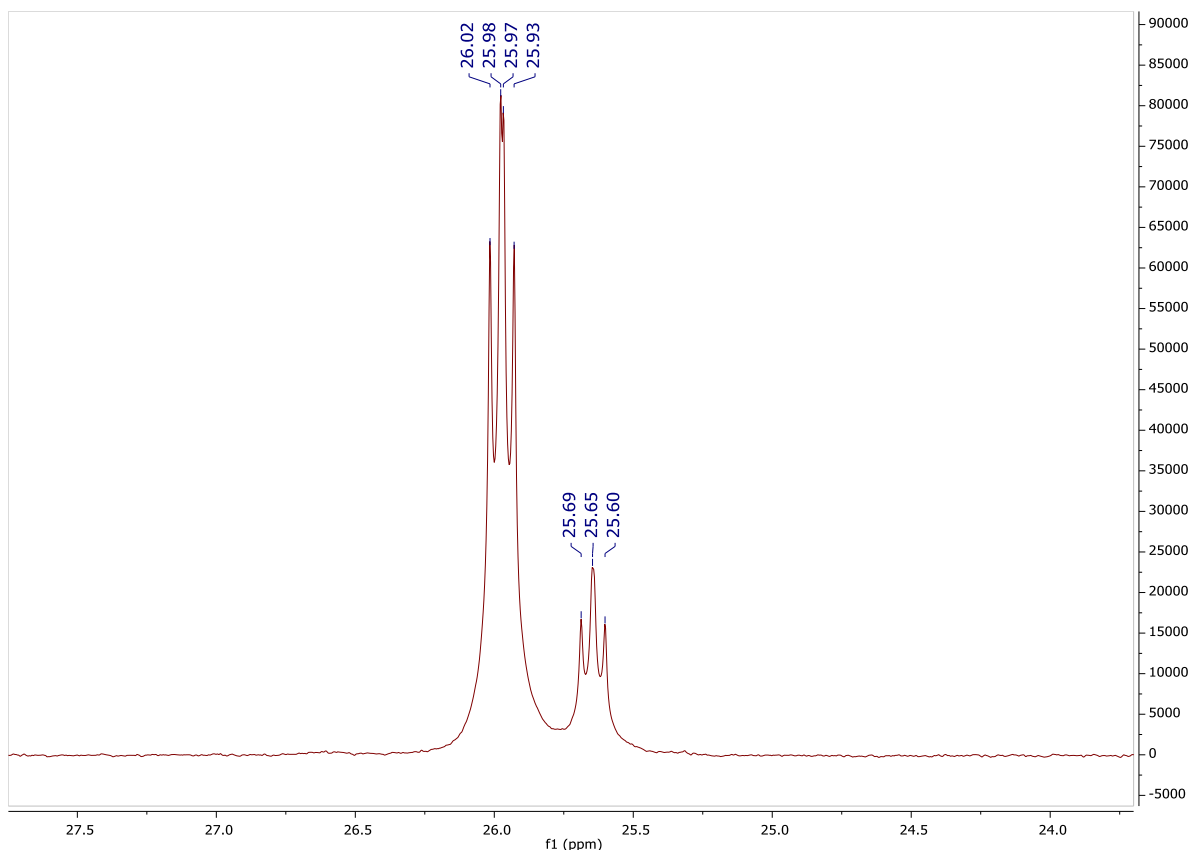
Rysunek 106. Widmo ¹H NMR związku 1.36 (CDCl₃).



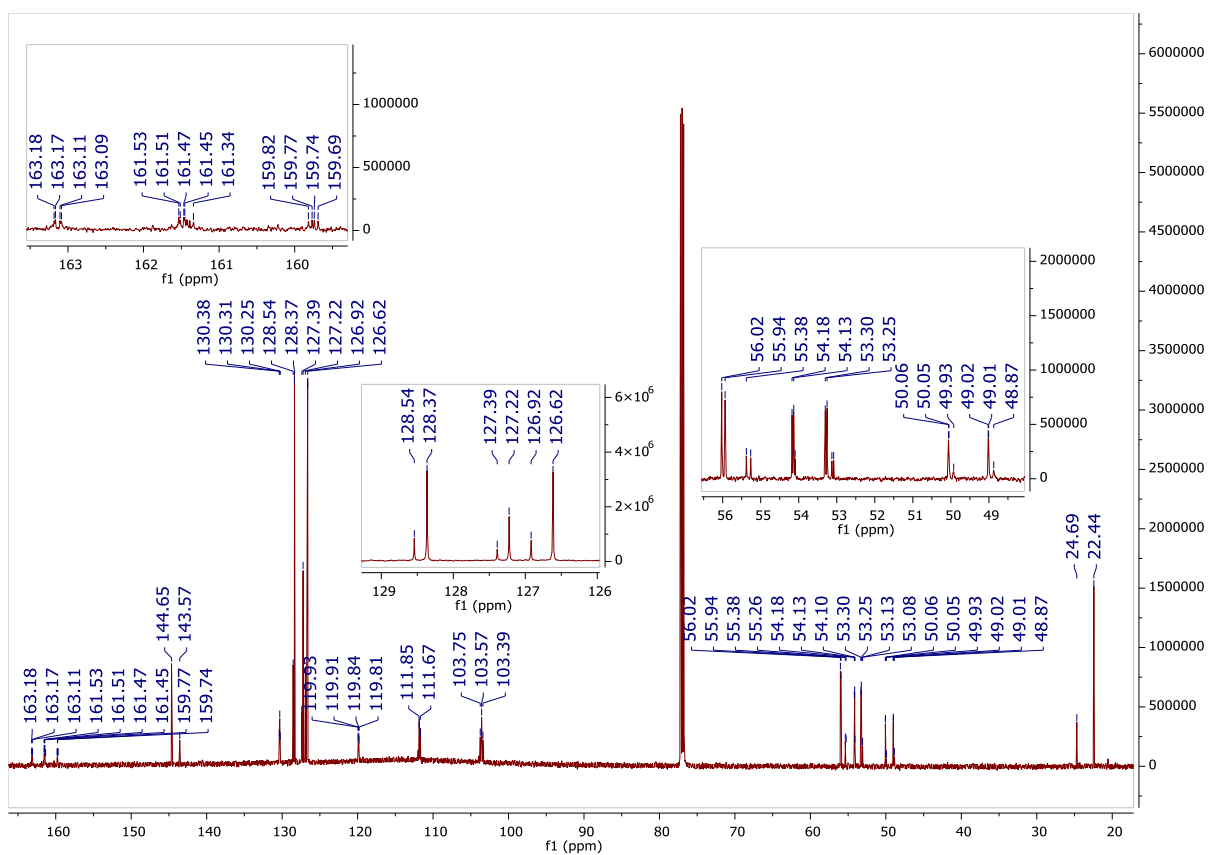
Rysunek 107. Widmo ^{19}F NMR związku 1.36 (CDCl_3).



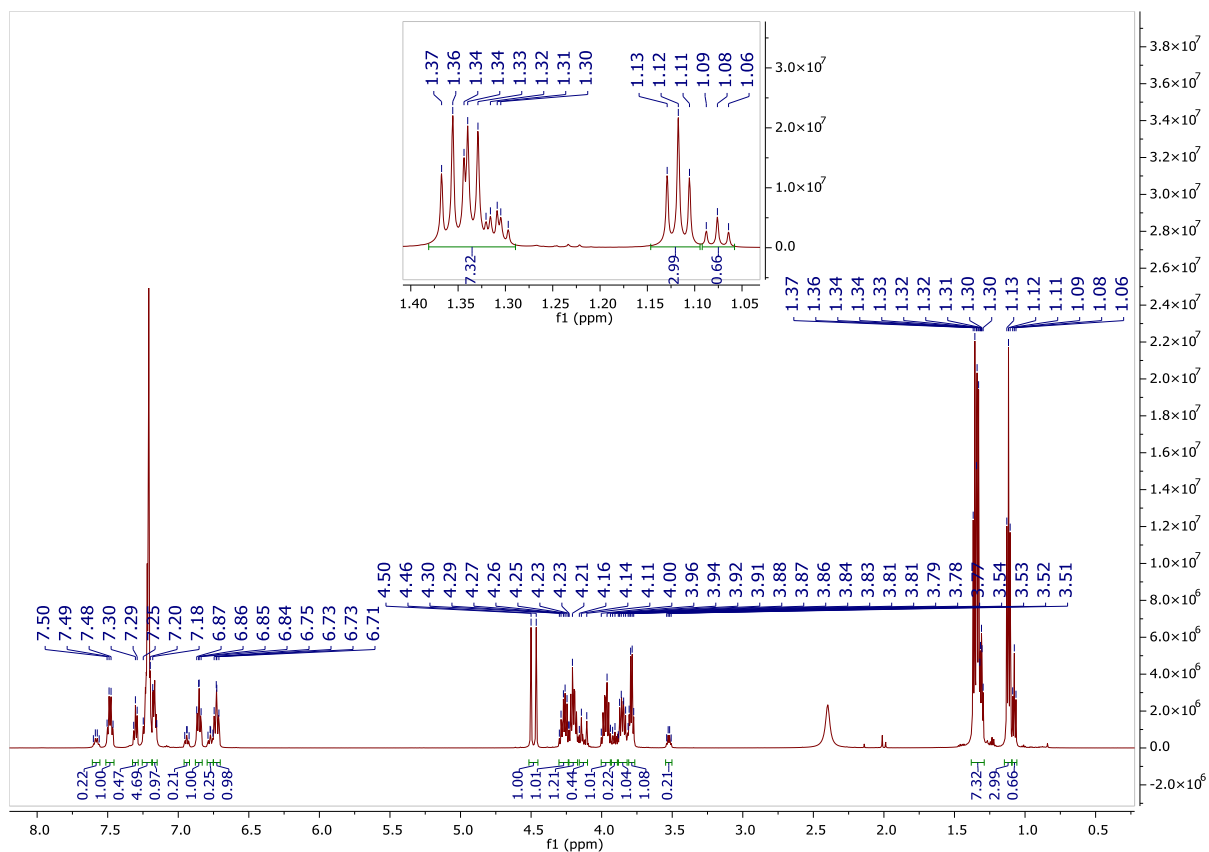
Rysunek 108. Widmo ^{13}C NMR związku 1.36 (CDCl_3).



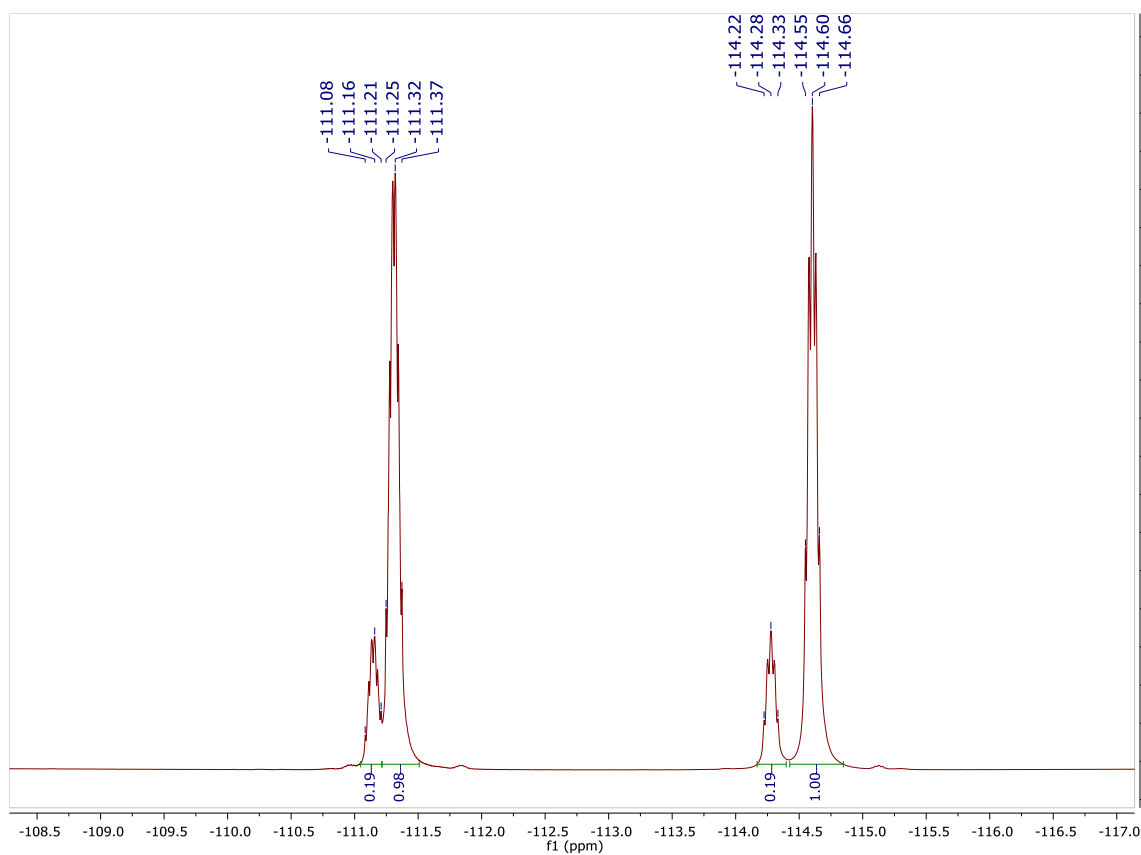
Rysunek 111. Widmo ³¹P NMR związku 2.1 (CDCl₃).



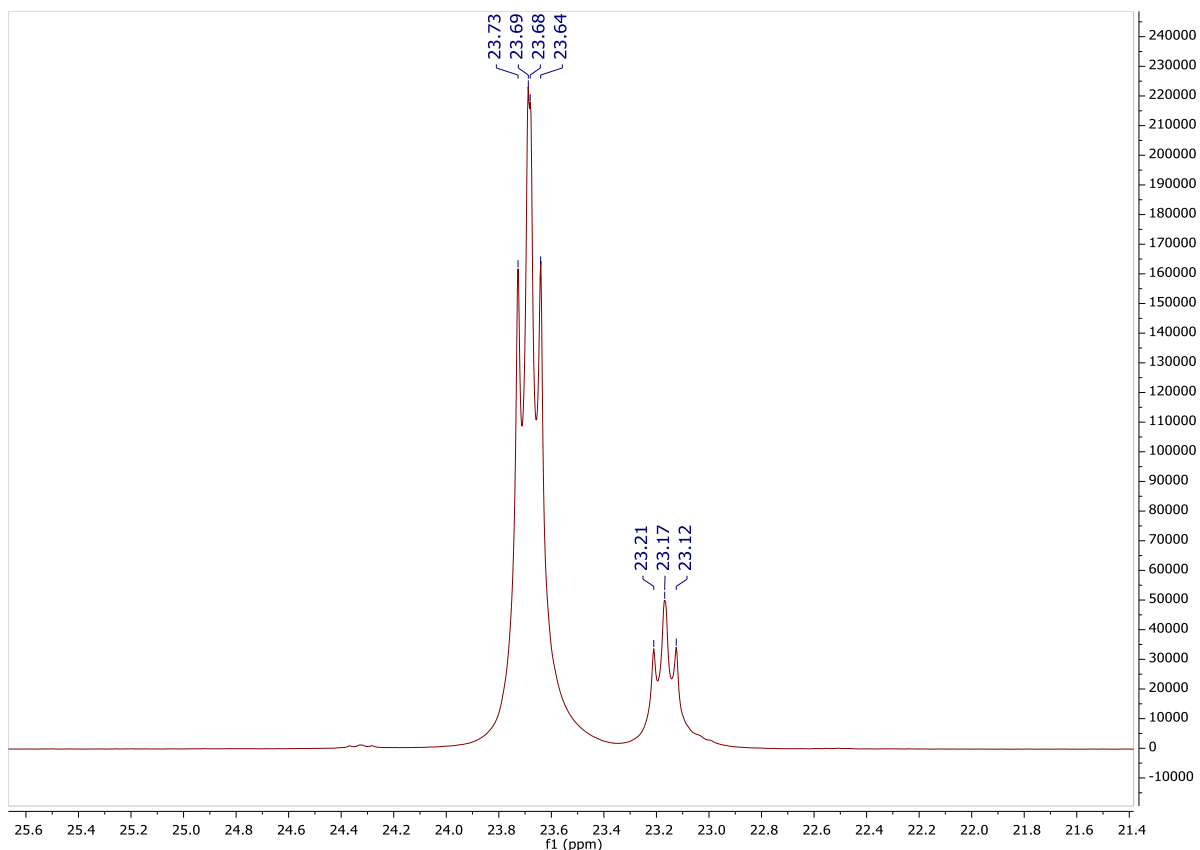
Rysunek 112. Widmo ¹³C NMR związku 2.1 (CDCl₃).



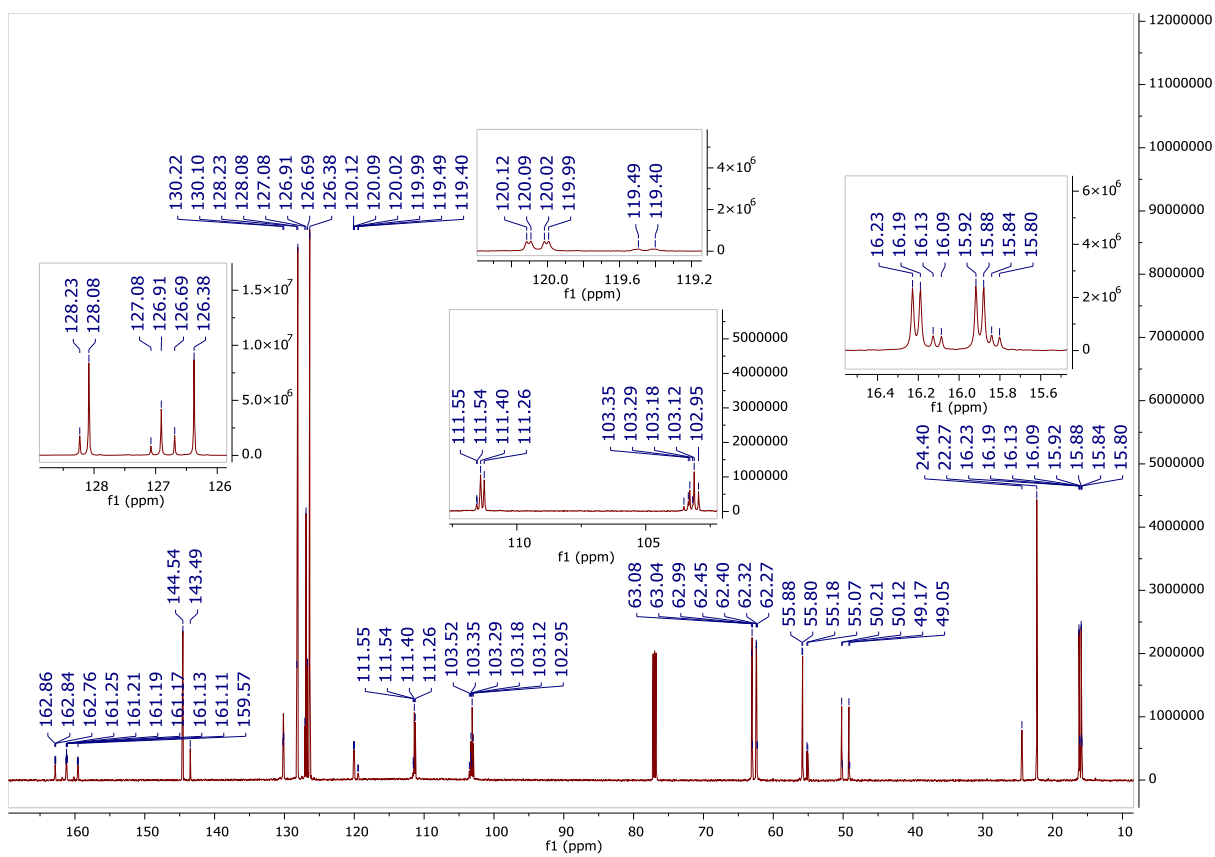
Rysunek 113. Widmo ^1H NMR związku 2.2 (CDCl_3).



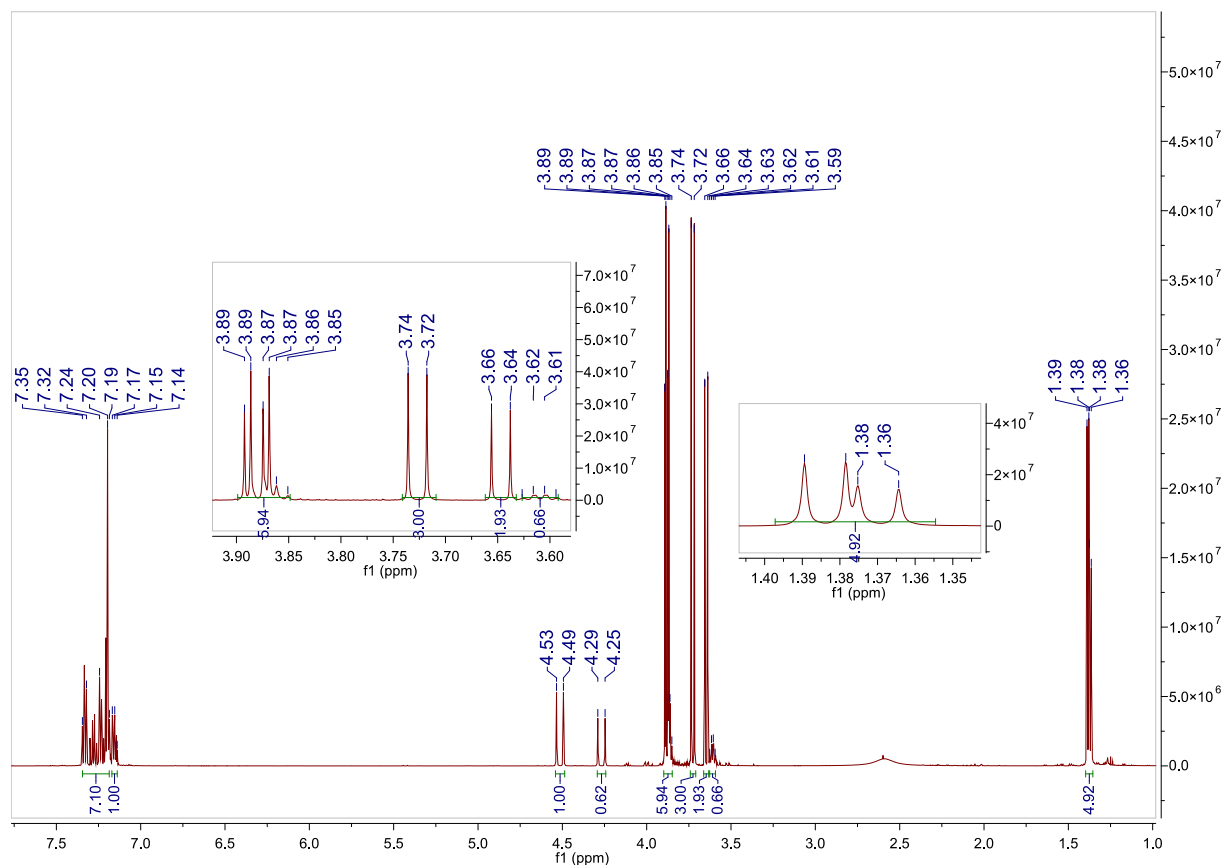
Rysunek 114. Widmo ^{19}F NMR związku 2.2 (CDCl_3).



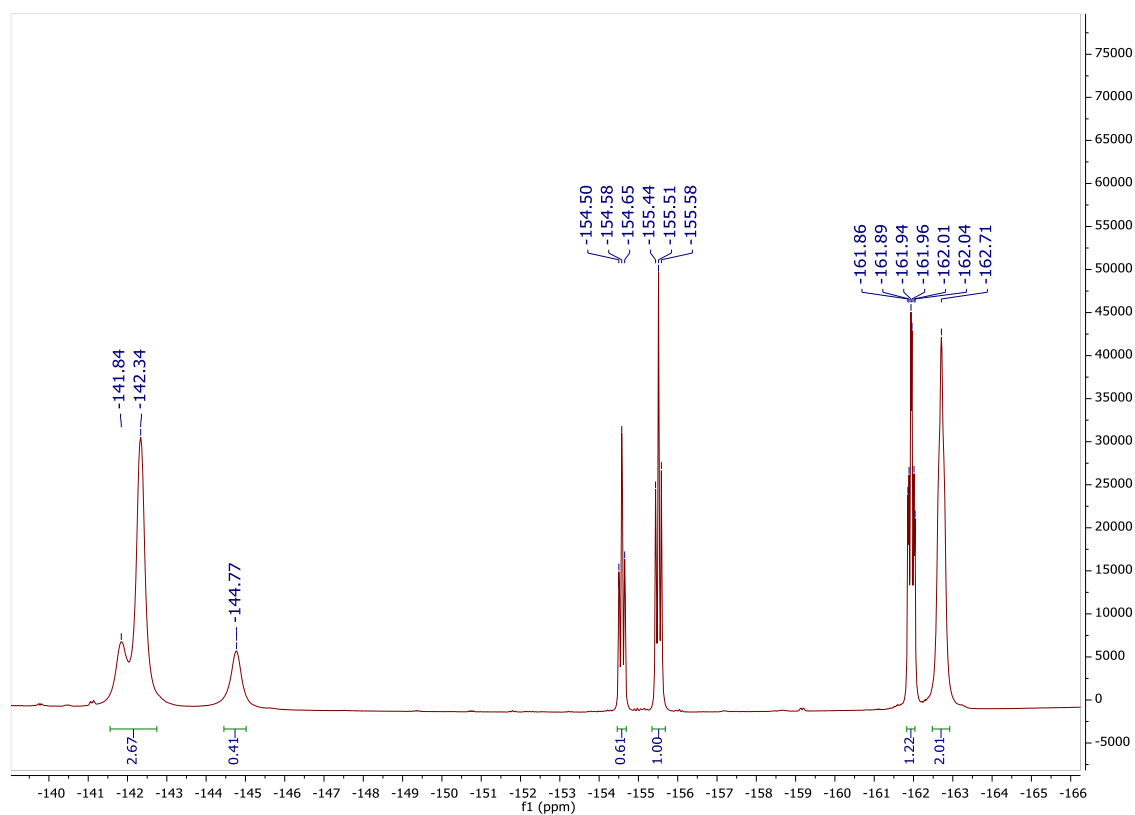
Rysunek 115. Widmo ³¹P NMR związku 2.2 (CDCl₃).



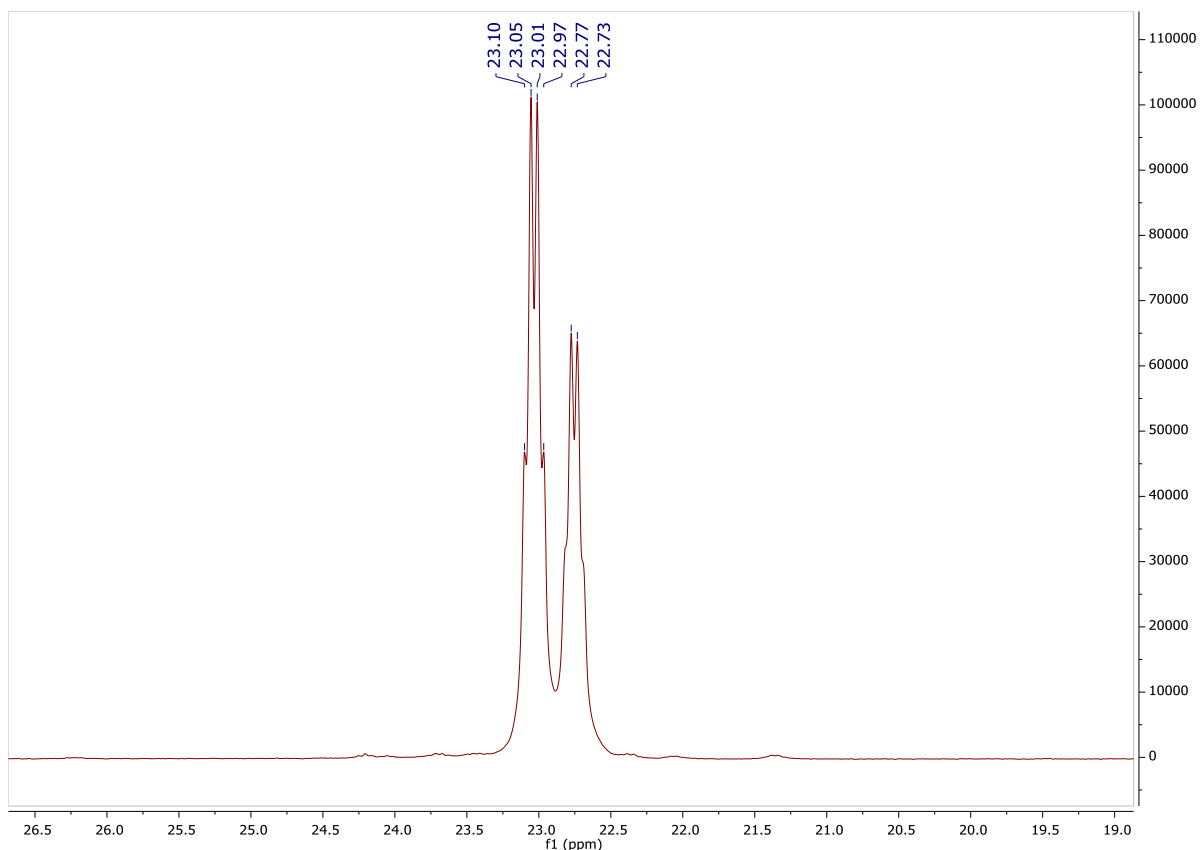
Rysunek 116. Widmo ¹³C NMR związku 2.2 (CDCl₃).



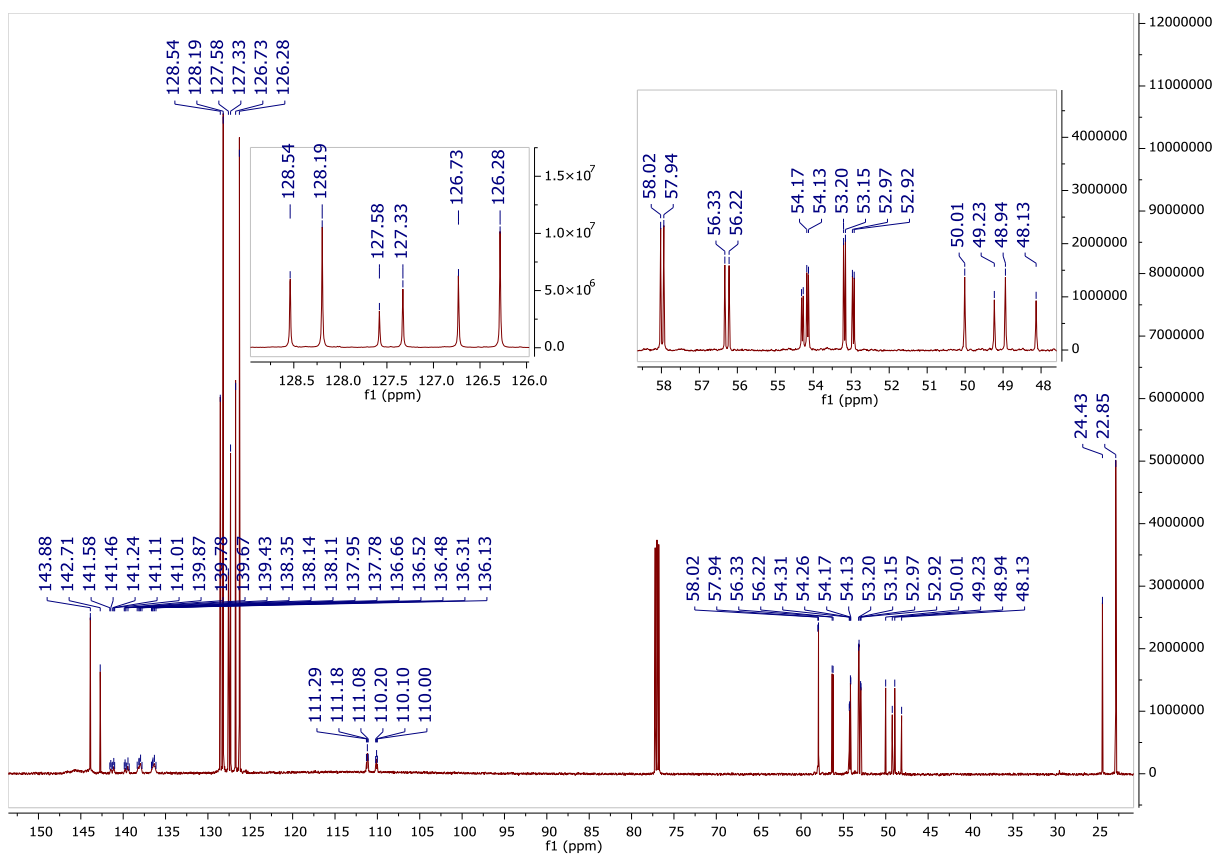
Rysunek 117. Widmo ^1H NMR związku 2.3 (CDCl_3).



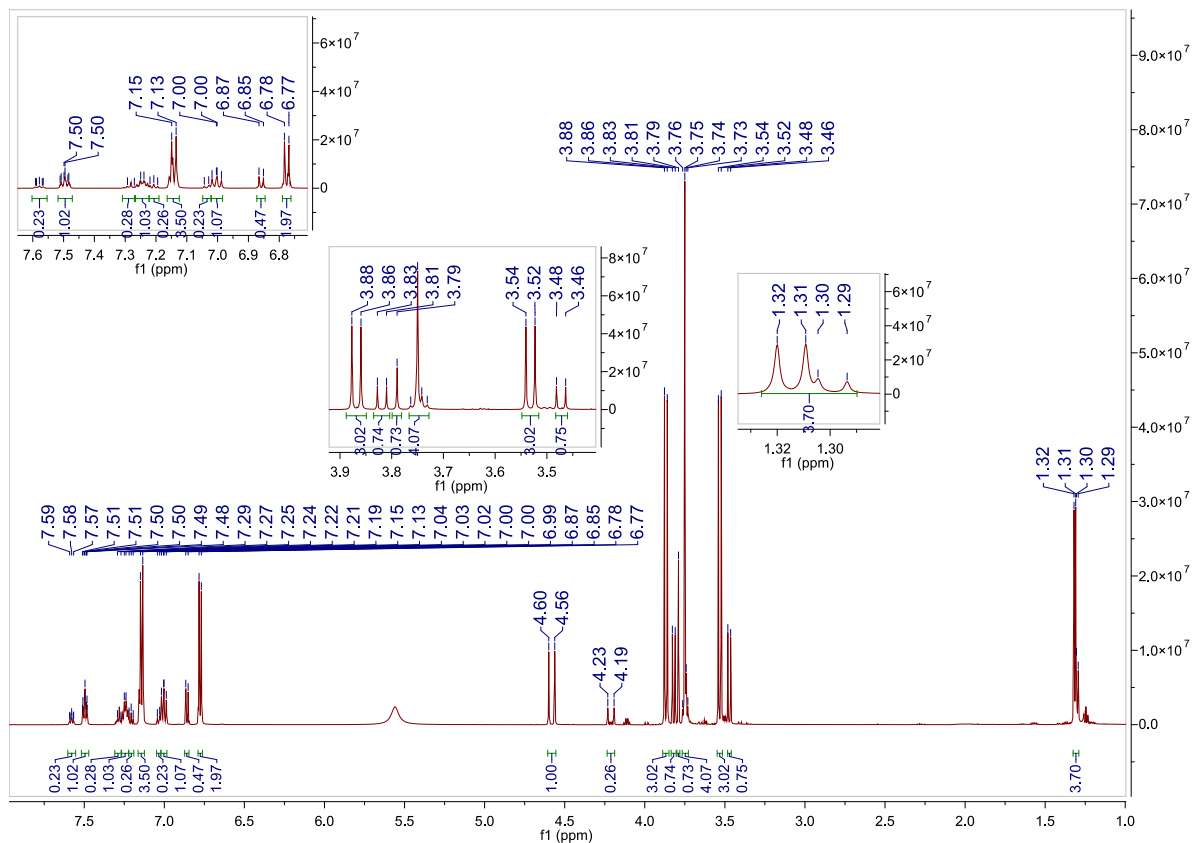
Rysunek 118. Widmo ^{19}F NMR związku 2.3 (CDCl_3).



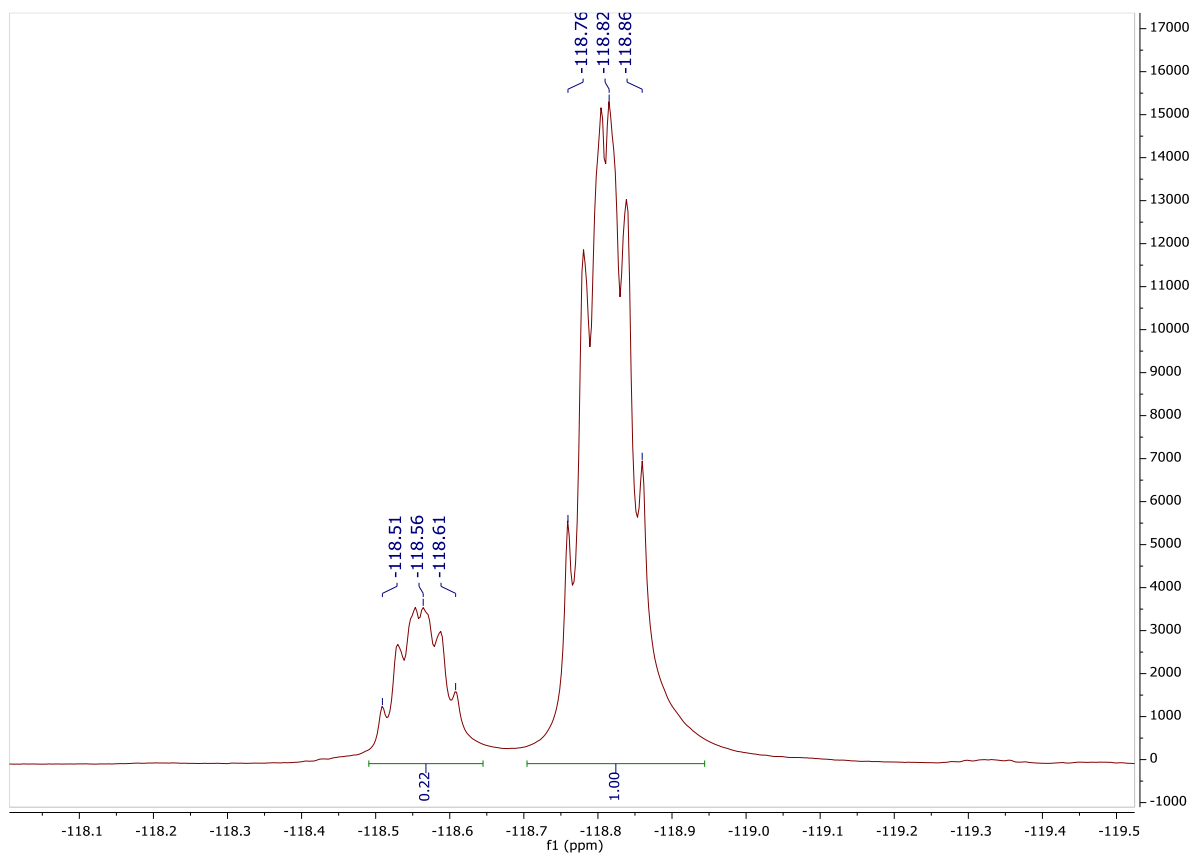
Rysunek 119. Widmo ³¹P NMR związku 2.3 (CDCl₃).



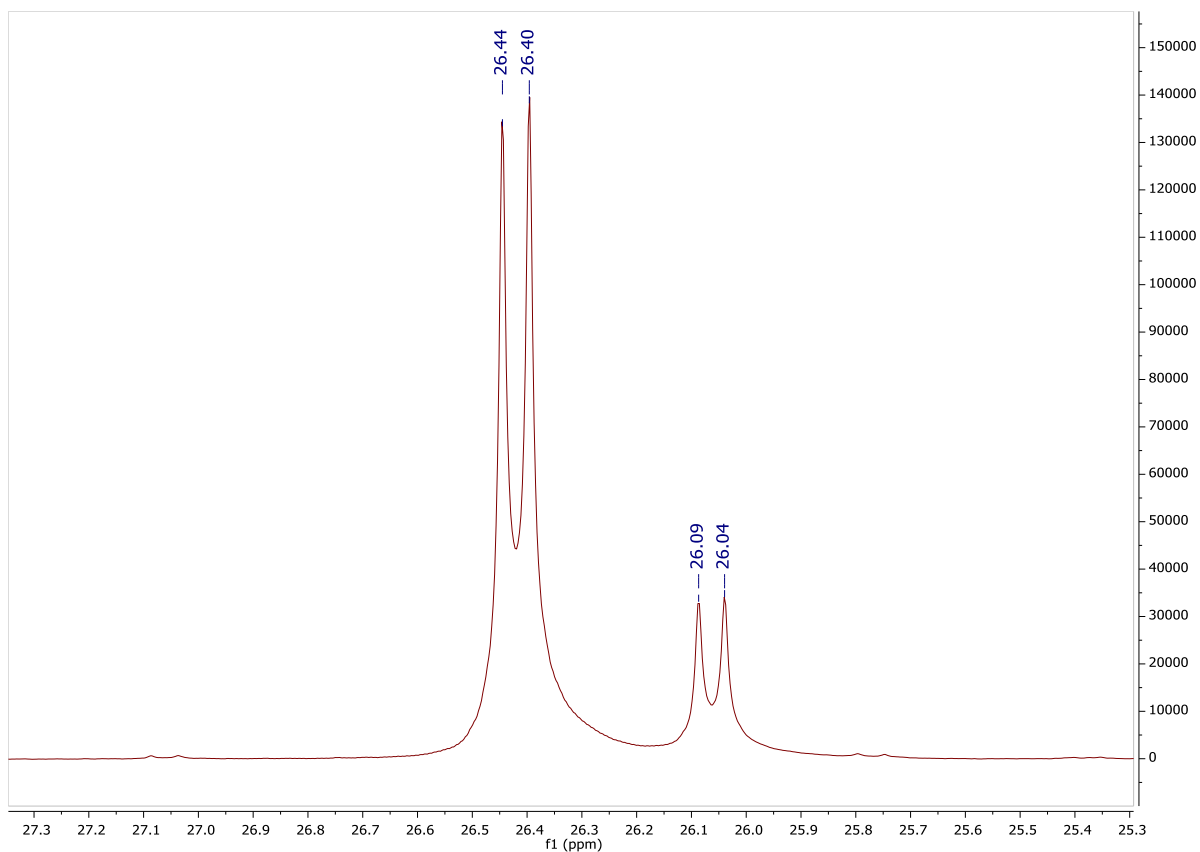
Rysunek 120. Widmo ¹³C NMR związku 2.3 (CDCl₃).



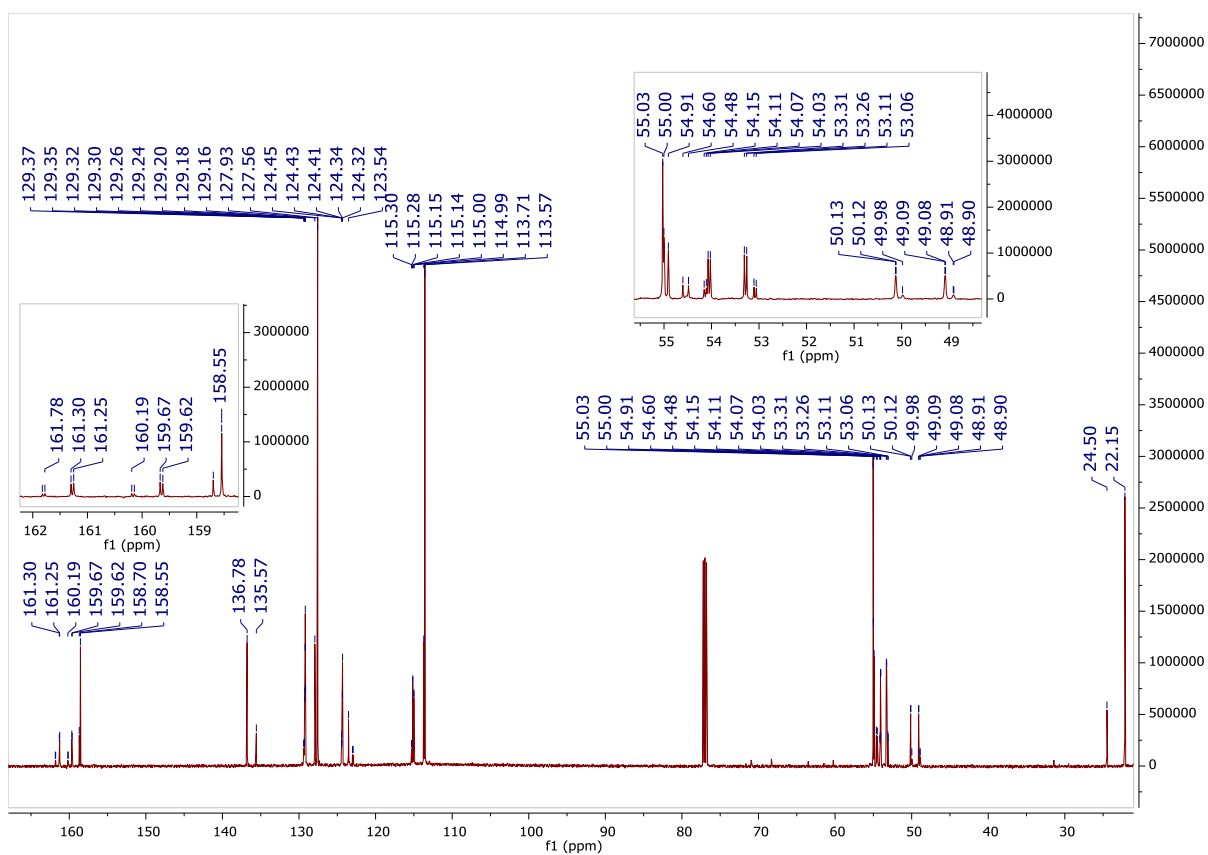
Rysunek 121. Widmo ^1H NMR związku 2.4 (CDCl_3).



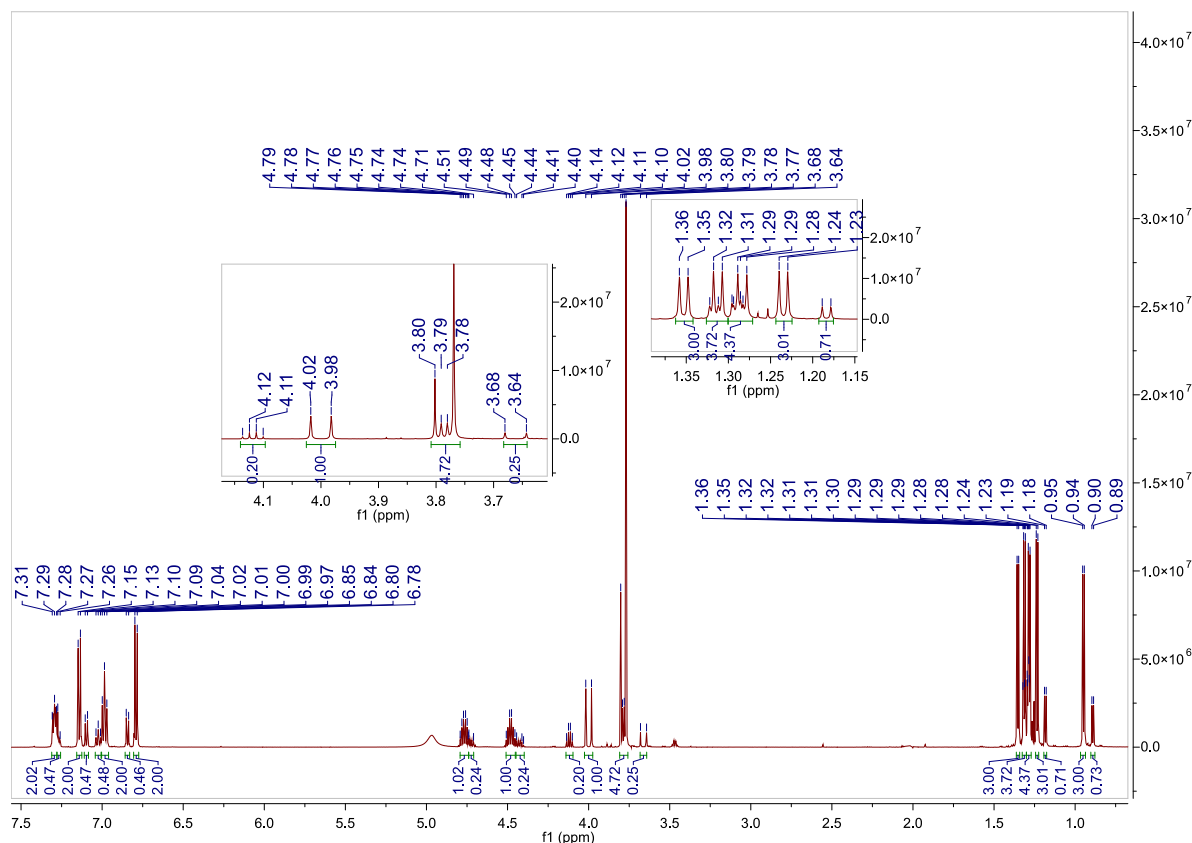
Rysunek 122. Widmo ^{19}F NMR związku 2.4 (CDCl_3).



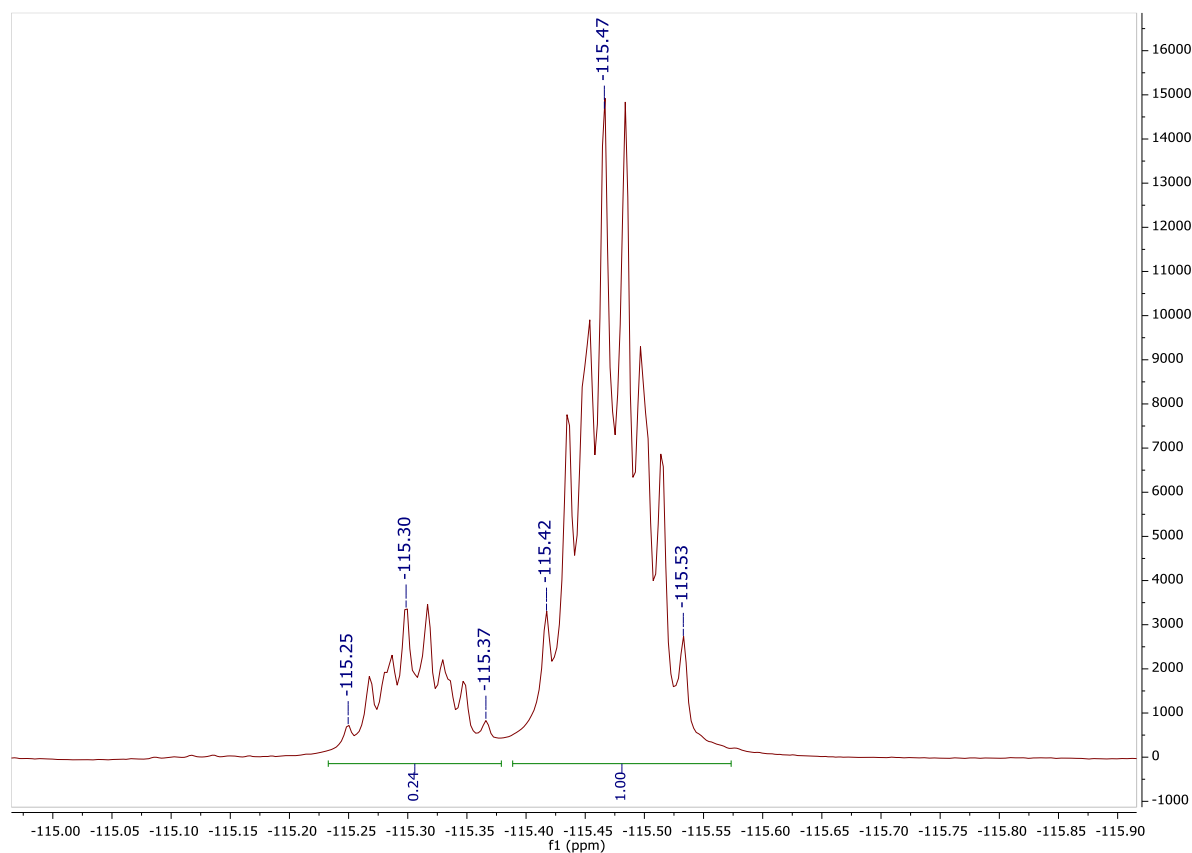
Rysunek 123. Widmo ³¹P NMR związku 2.4 (CDCl₃).



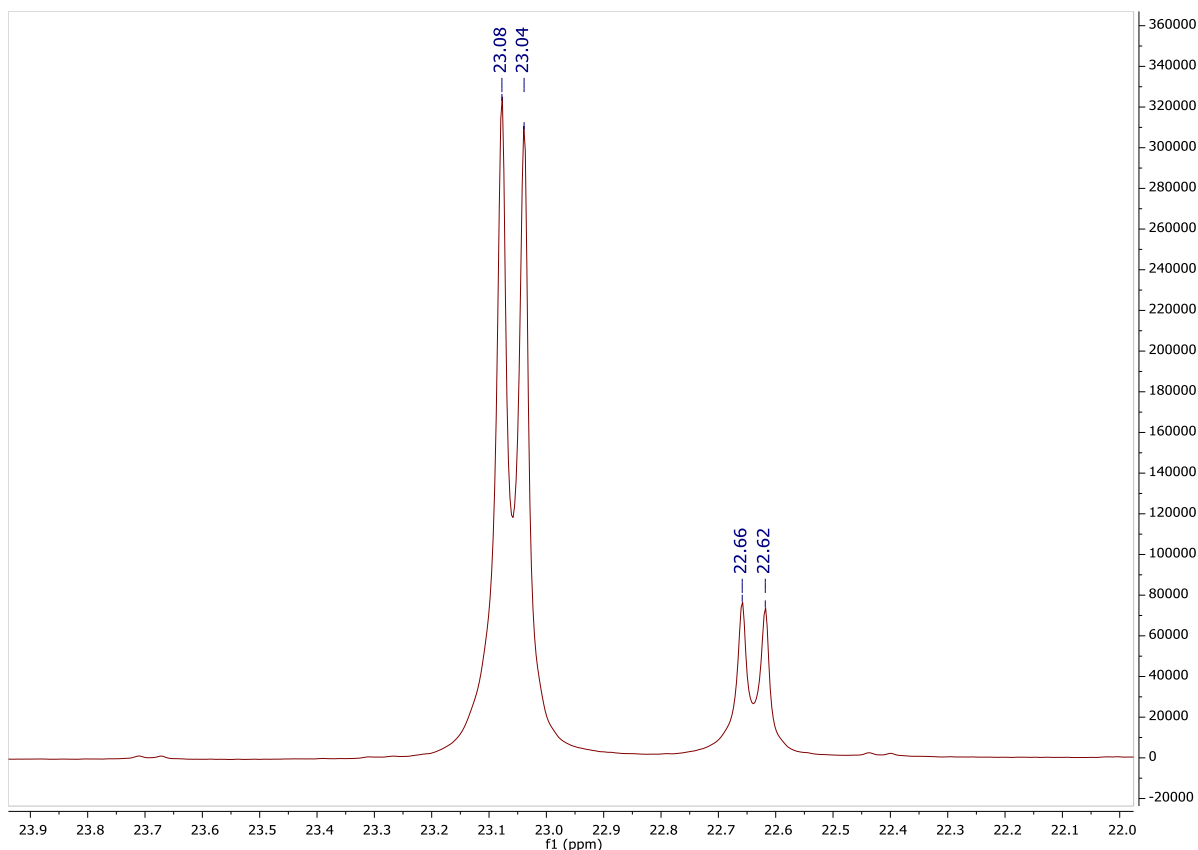
Rysunek 124. Widmo ¹³C NMR związku 2.4 (CDCl₃).



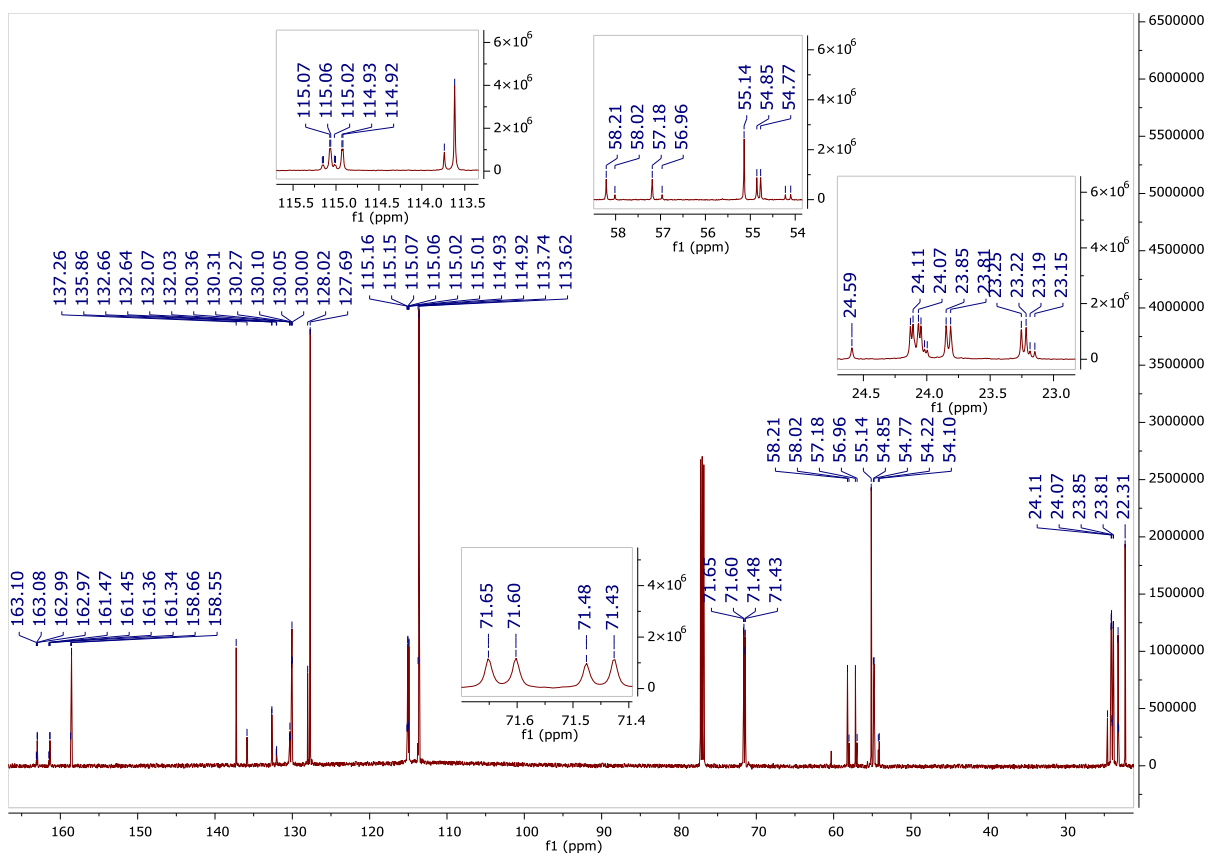
Rysunek 125. Widmo ^1H NMR związku 2.5 (CDCl_3).



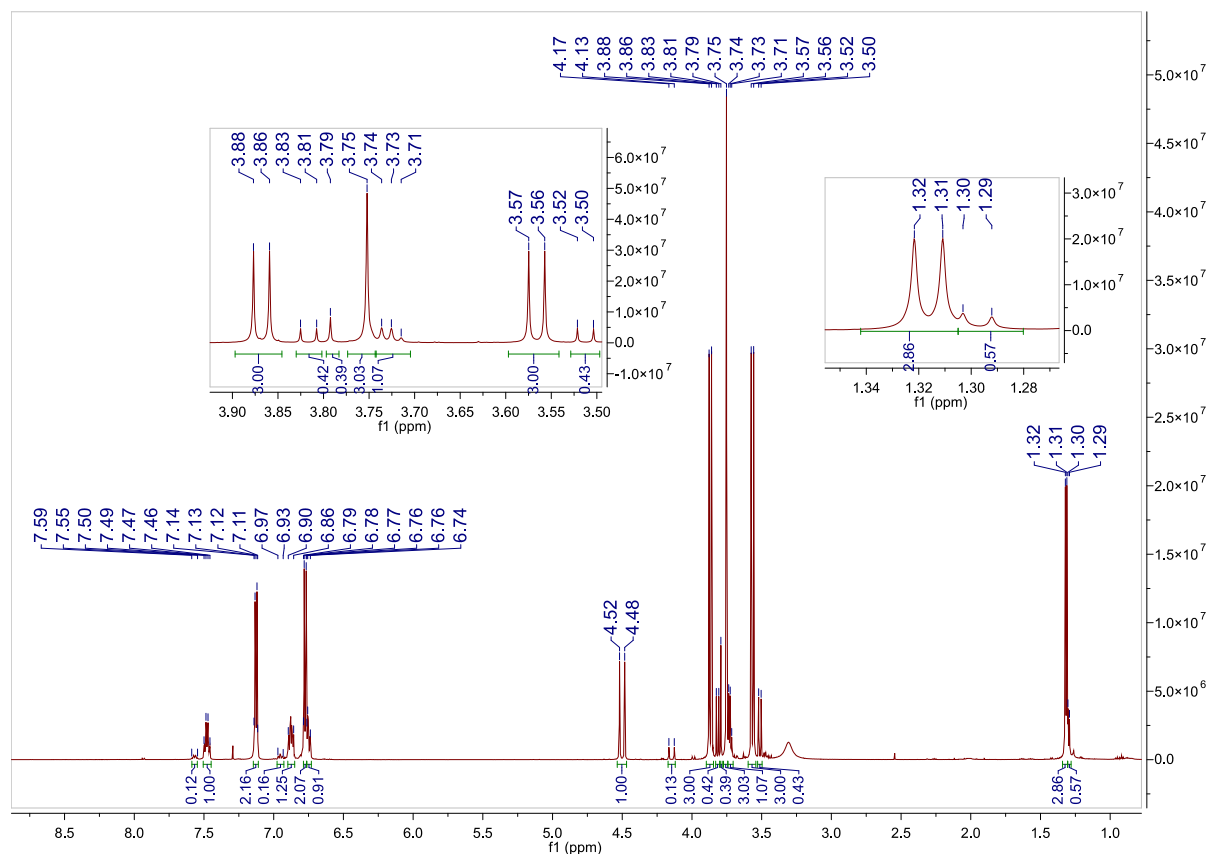
Rysunek 126. Widmo ^{19}F NMR związku 2.5 (CDCl_3).



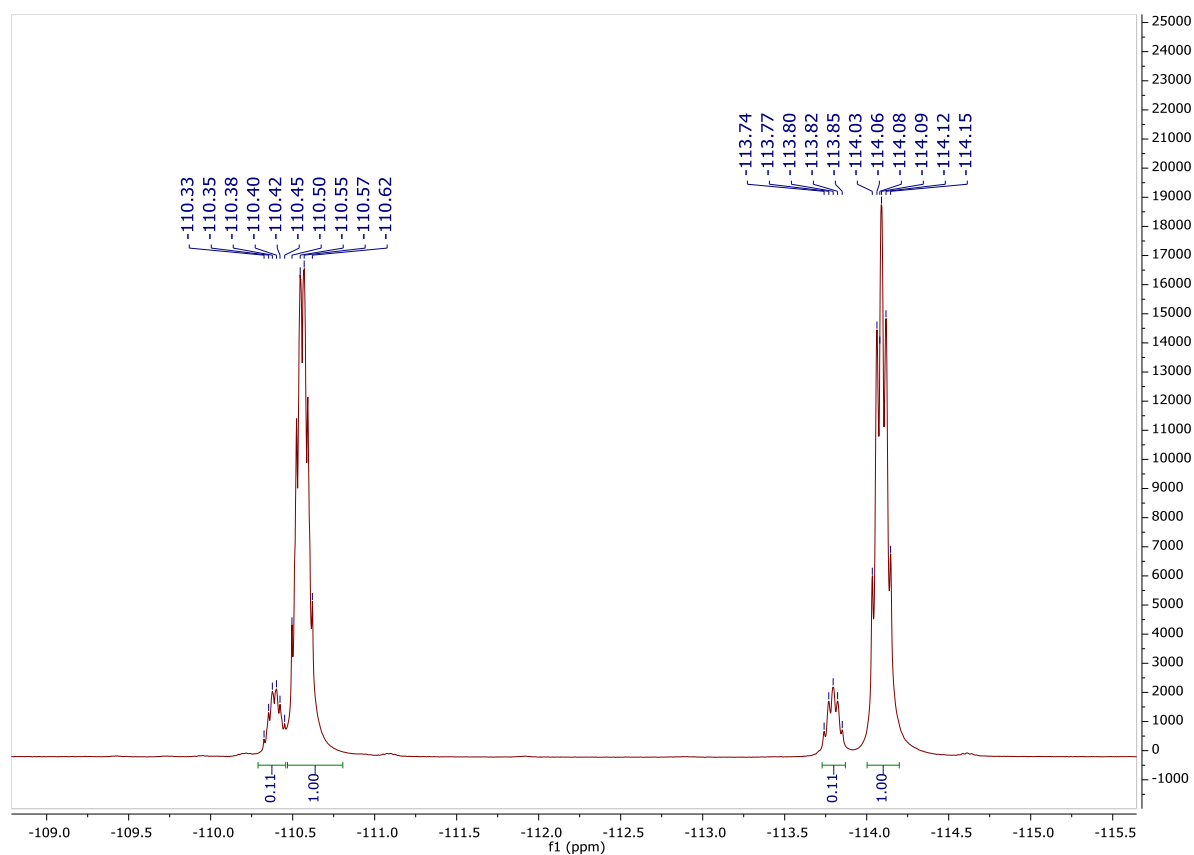
Rysunek 127. Widmo ^{31}P NMR związku 2.5 (CDCl_3).



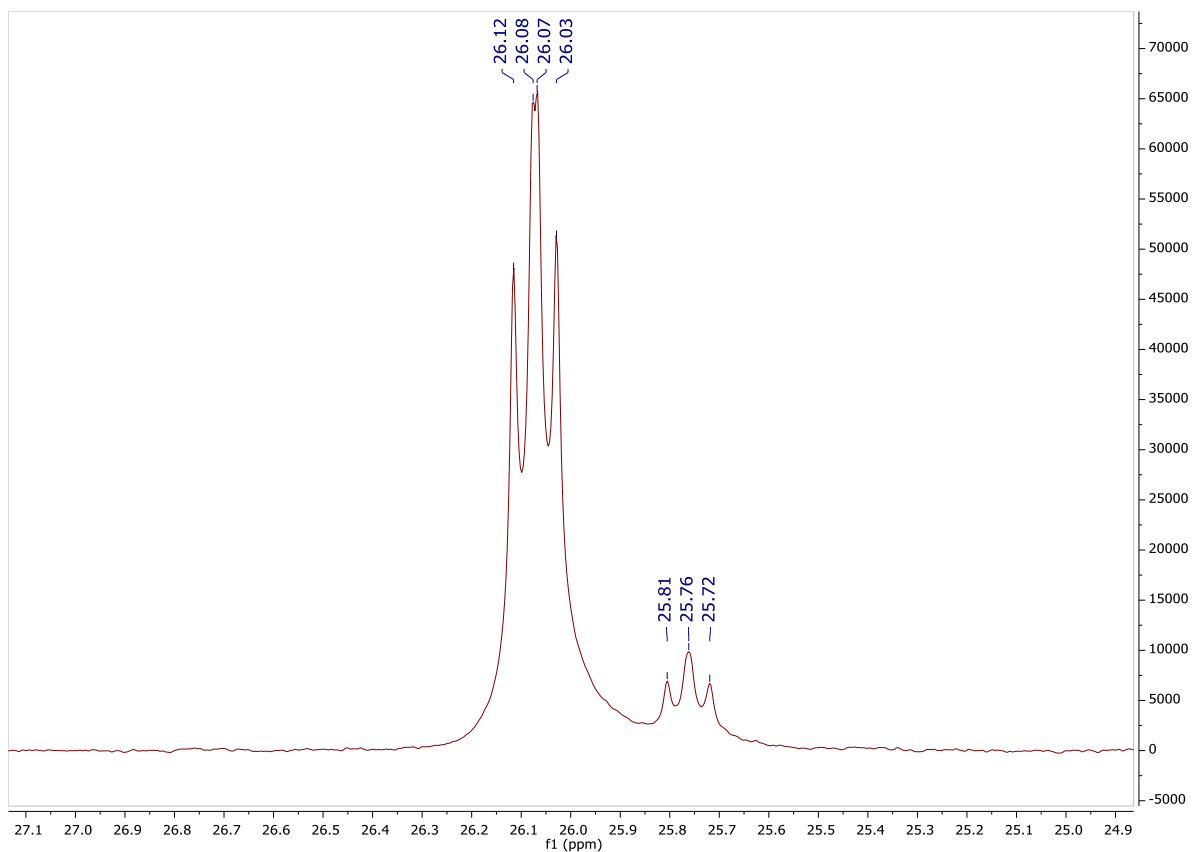
Rysunek 128. Widmo ^{13}C NMR związku 2.5 (CDCl_3).



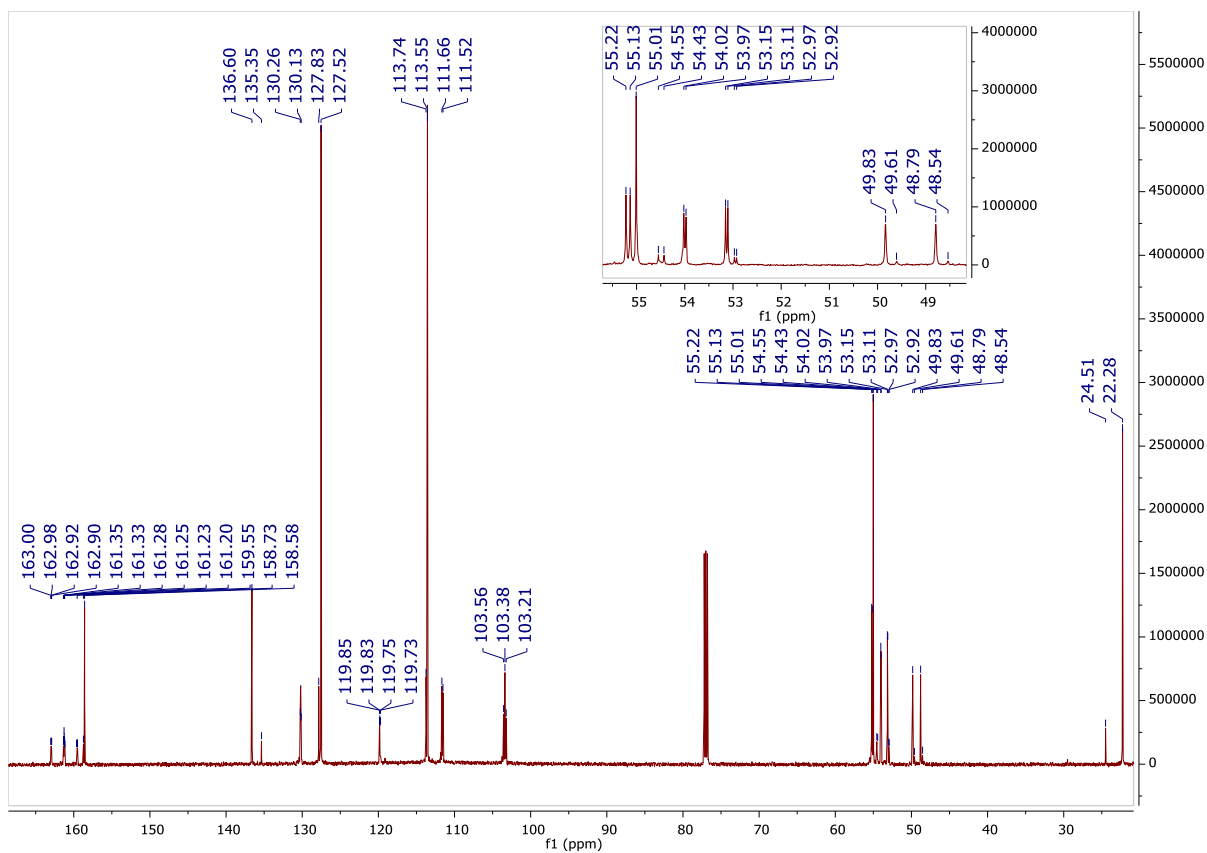
Rysunek 129. Widmo ^1H NMR związku 2.6 (CDCl_3).



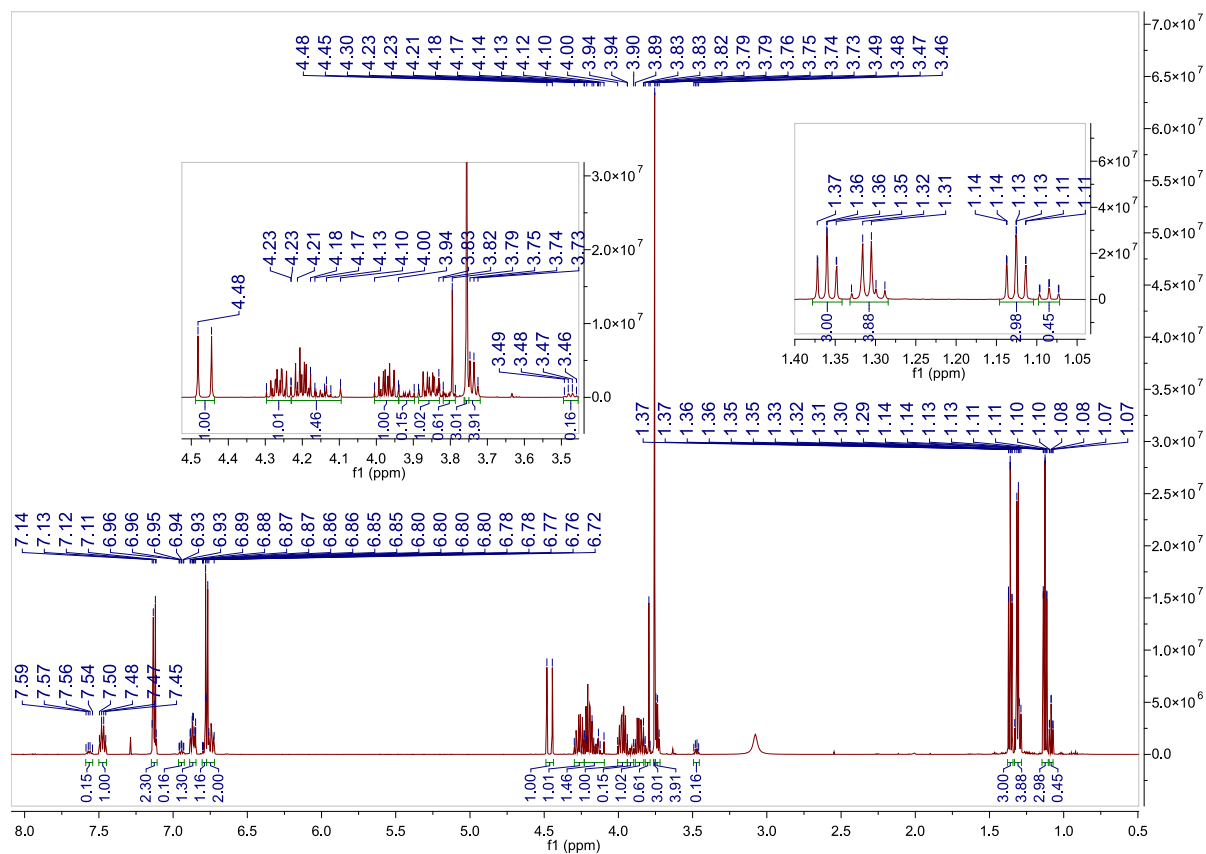
Rysunek 130. Widmo ^{19}F NMR związku 2.6 (CDCl_3).



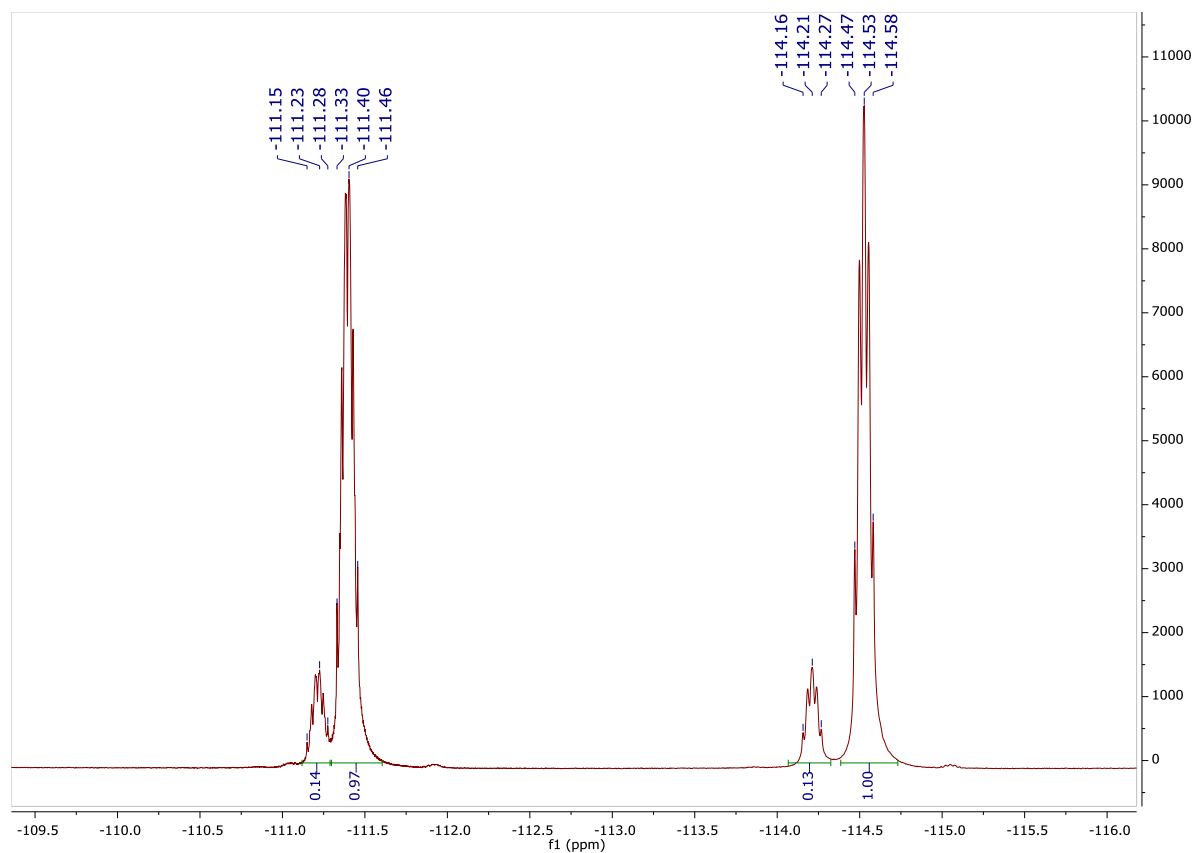
Rysunek 131. Widmo ³¹P NMR związku 2.6 (CDCl₃).



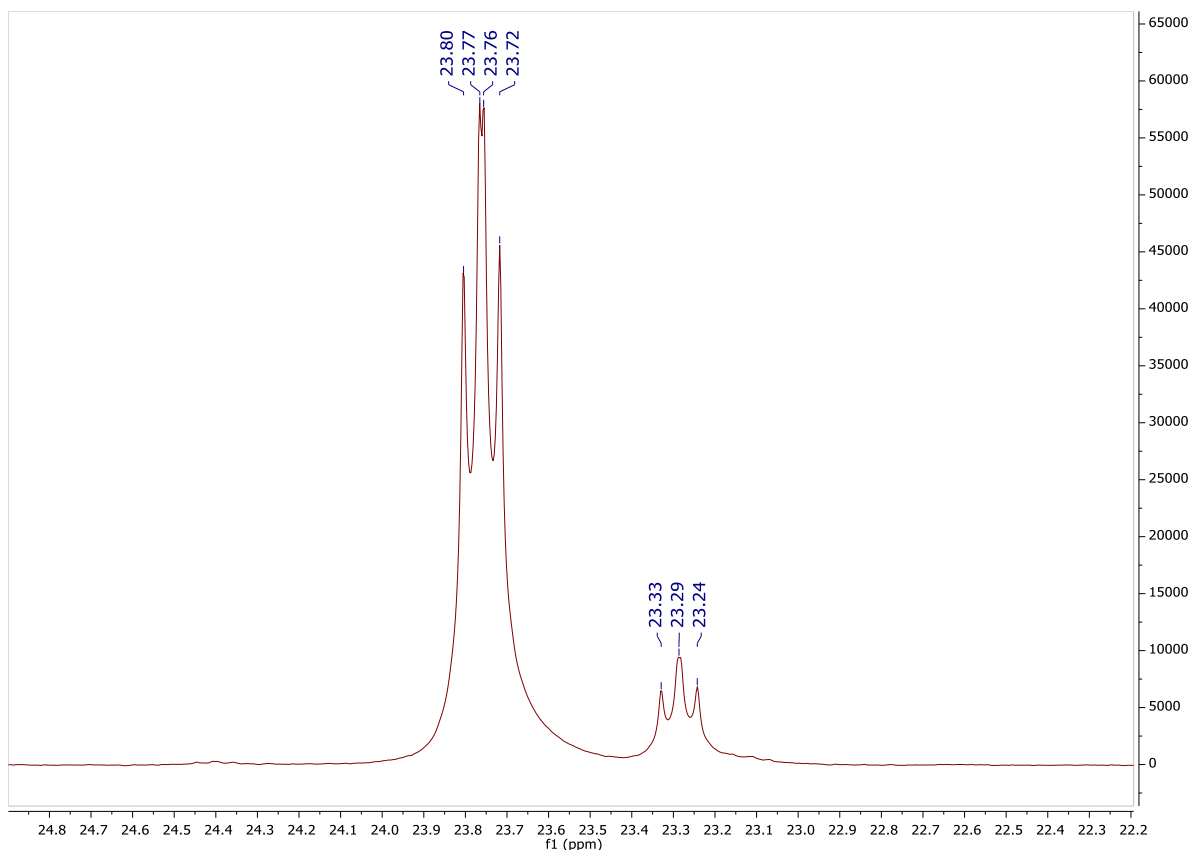
Rysunek 132. Widmo ¹³C NMR związku 2.6 (CDCl₃).



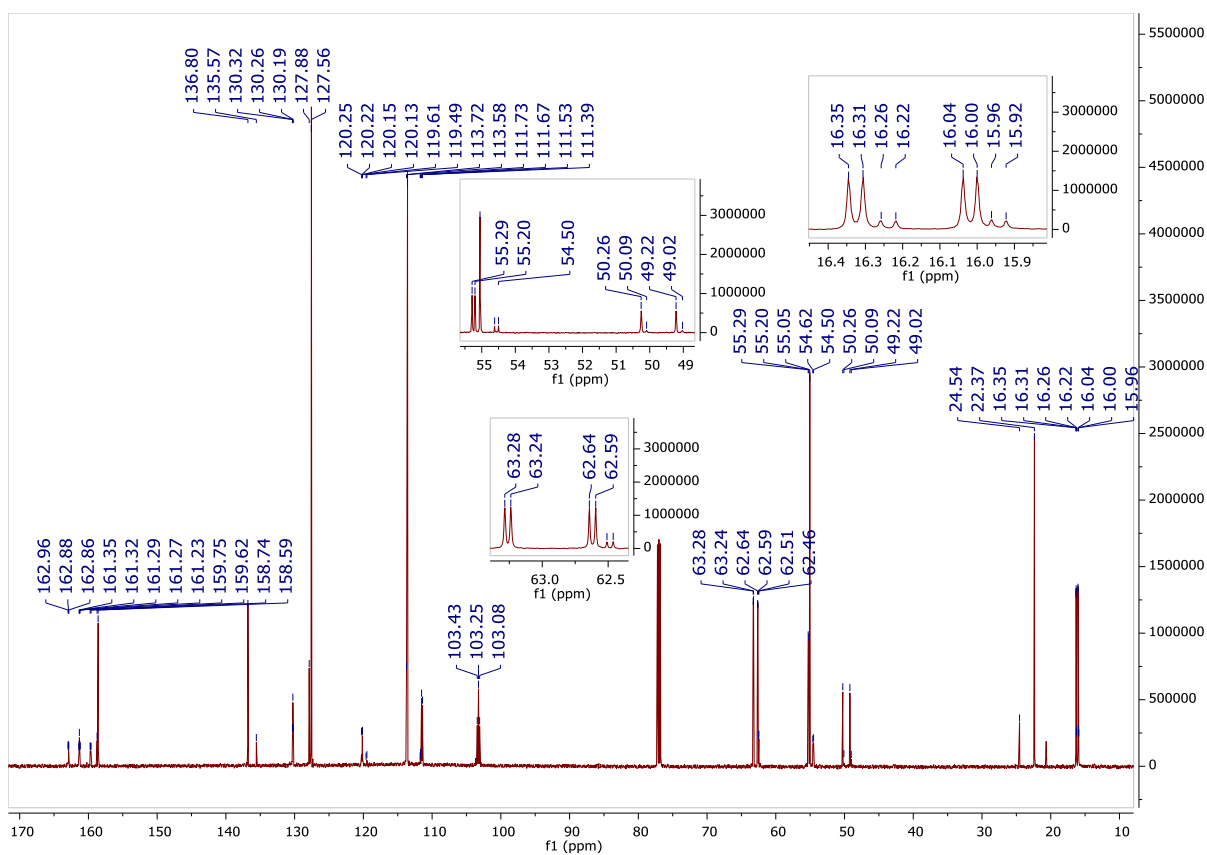
Rysunek 133. Widmo ^1H NMR związku 2.7 (CDCl_3).



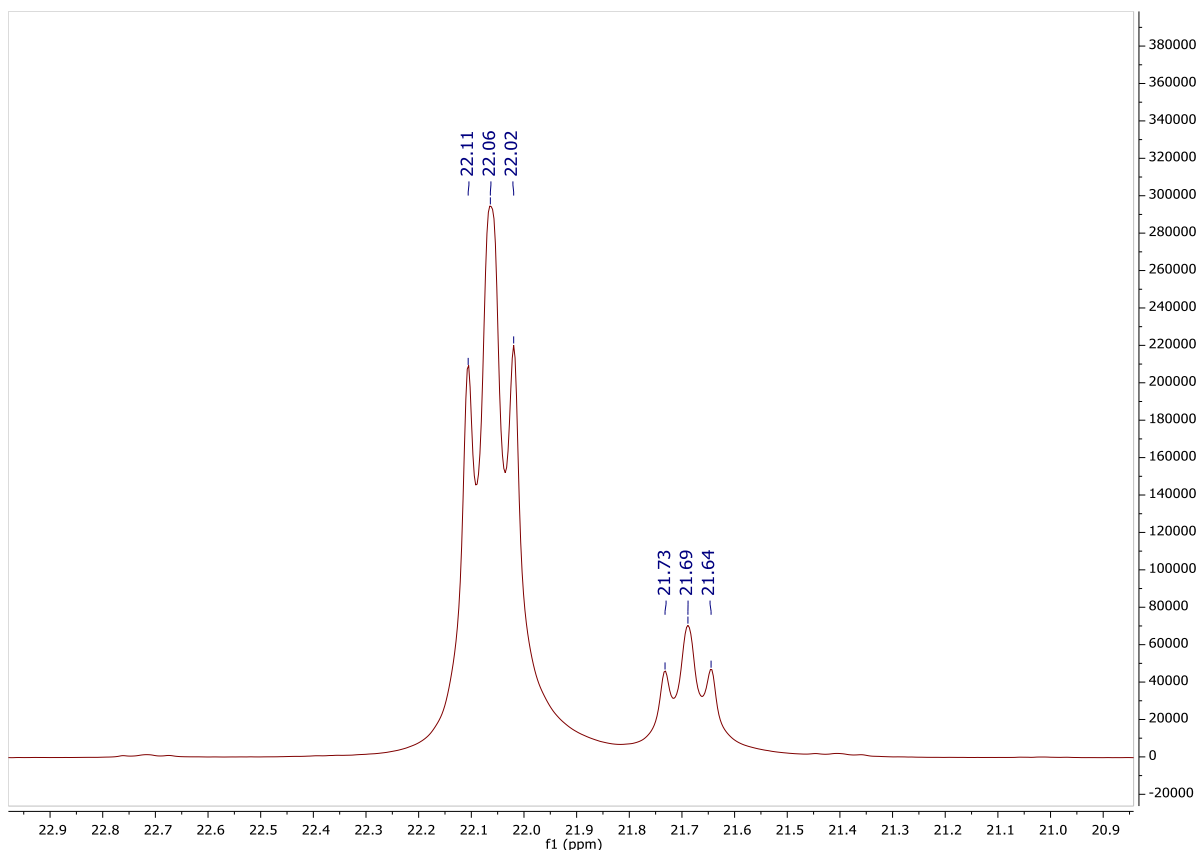
Rysunek 134. Widmo ^{19}F NMR związku 2.7 (CDCl_3).



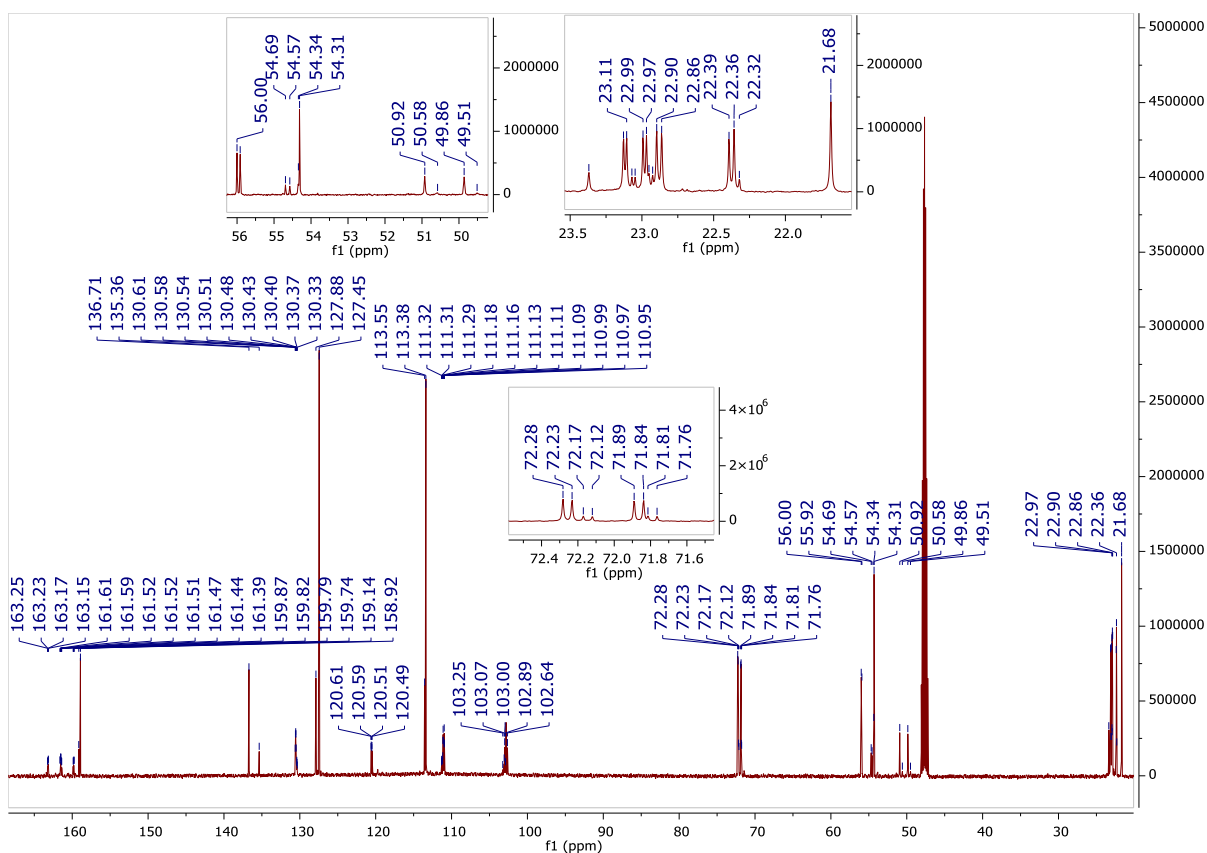
Rysunek 135. Widmo ^{31}P NMR związku 2.7 (CDCl_3).



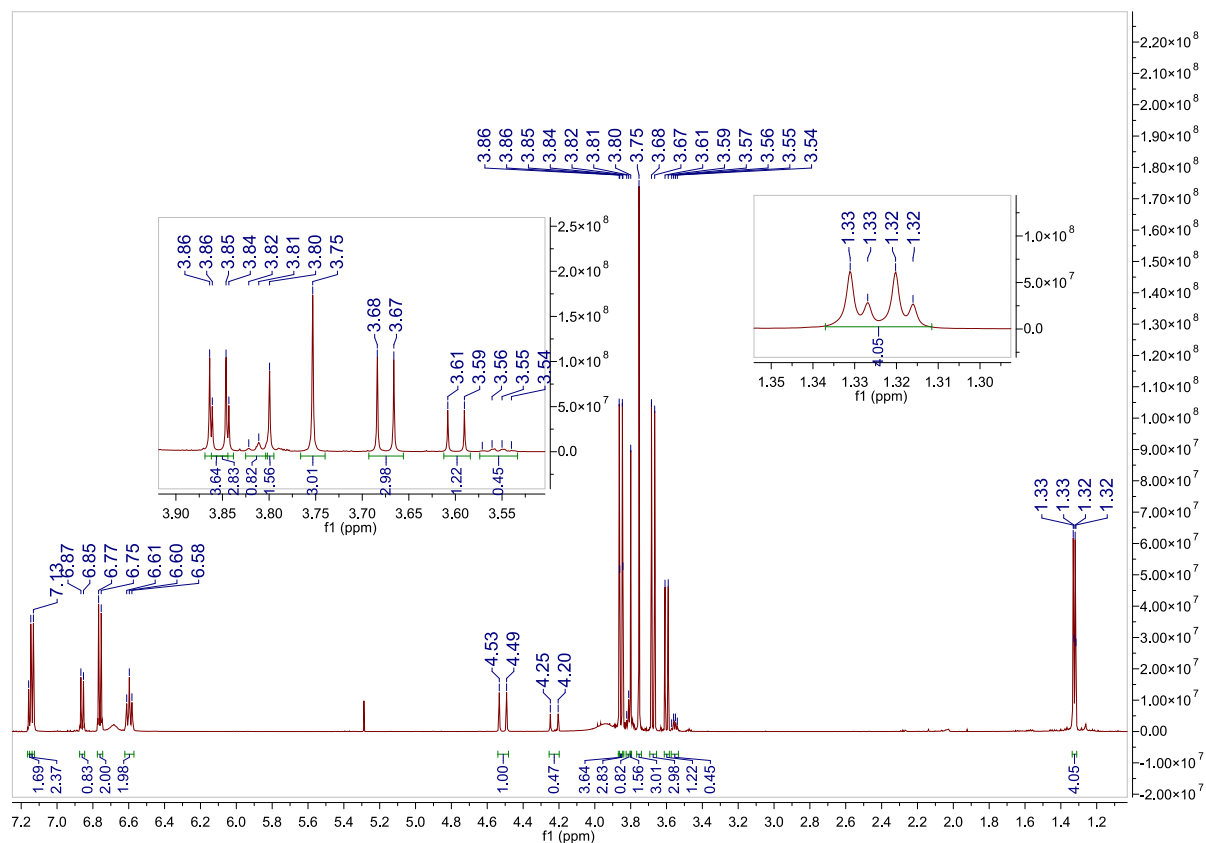
Rysunek 136. Widmo ^{13}C NMR związku 2.7 (CDCl_3).



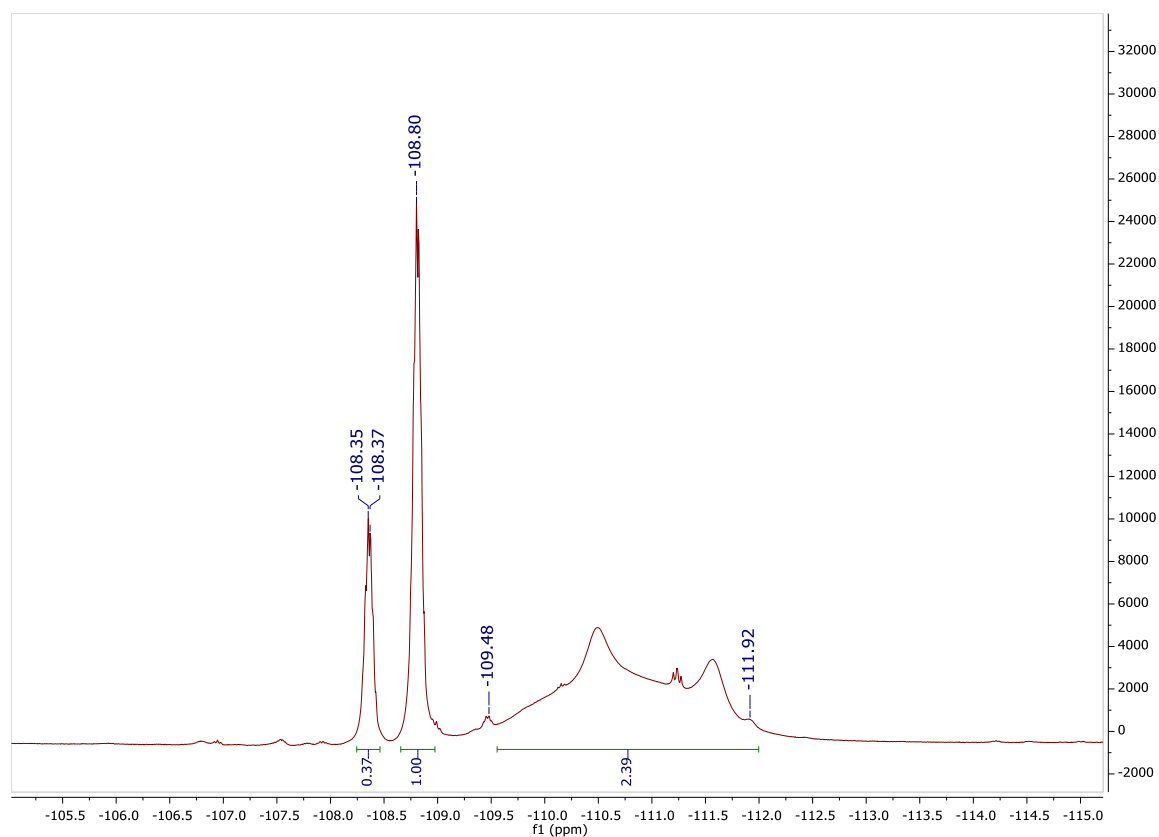
Rysunek 139. Widmo ³¹P NMR związku 2.8 (CD₃OD).



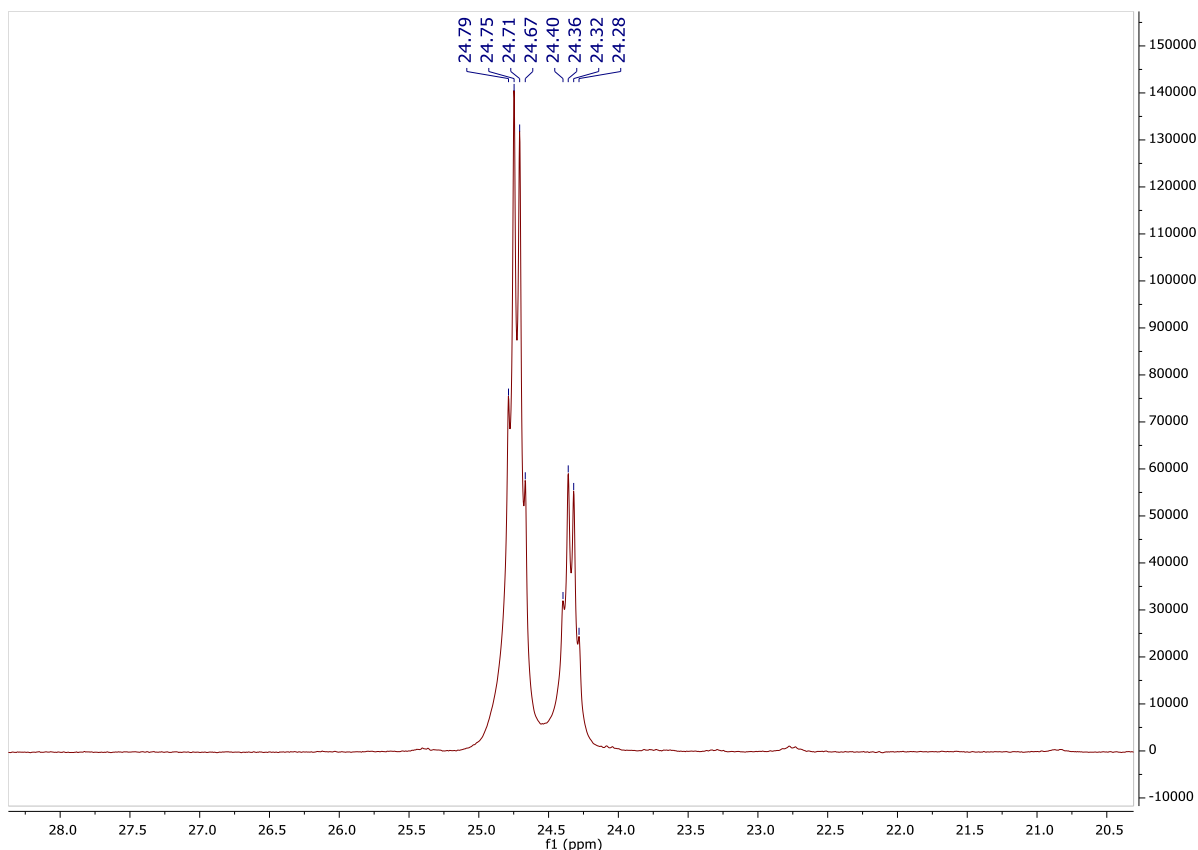
Rysunek 140. Widmo ¹³C NMR związku 2.8 (CD₃OD).



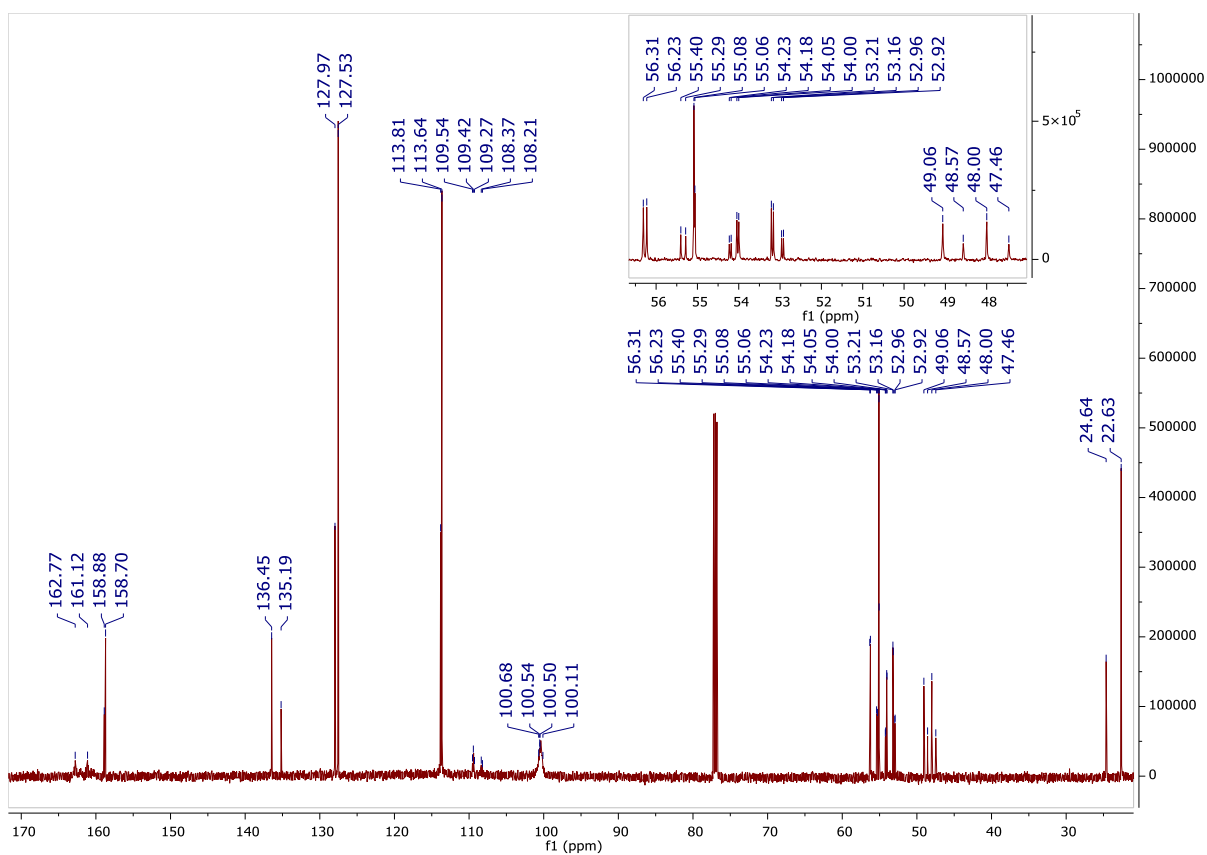
Rysunek 141. Widmo ^1H NMR związku 2.9 (CDCl_3).



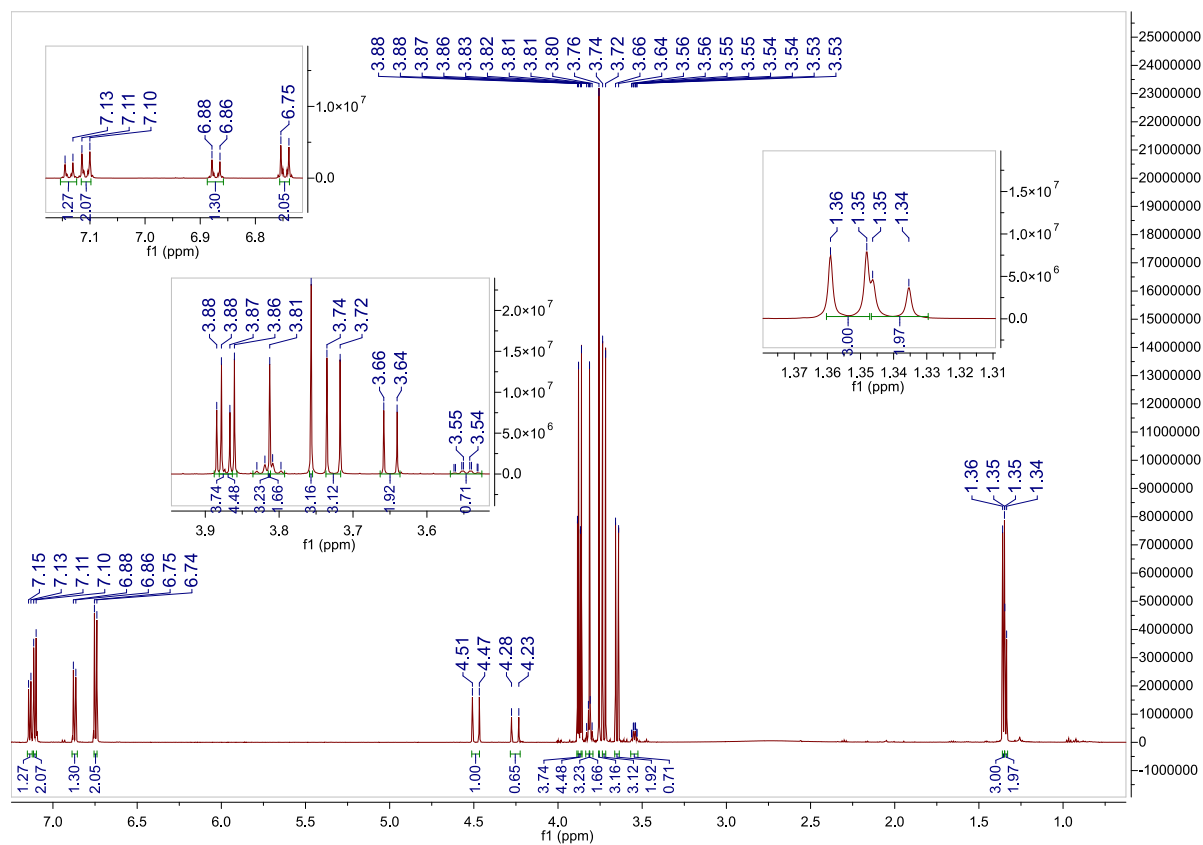
Rysunek 142. Widmo ^{19}F NMR związku 2.9 (CDCl_3).



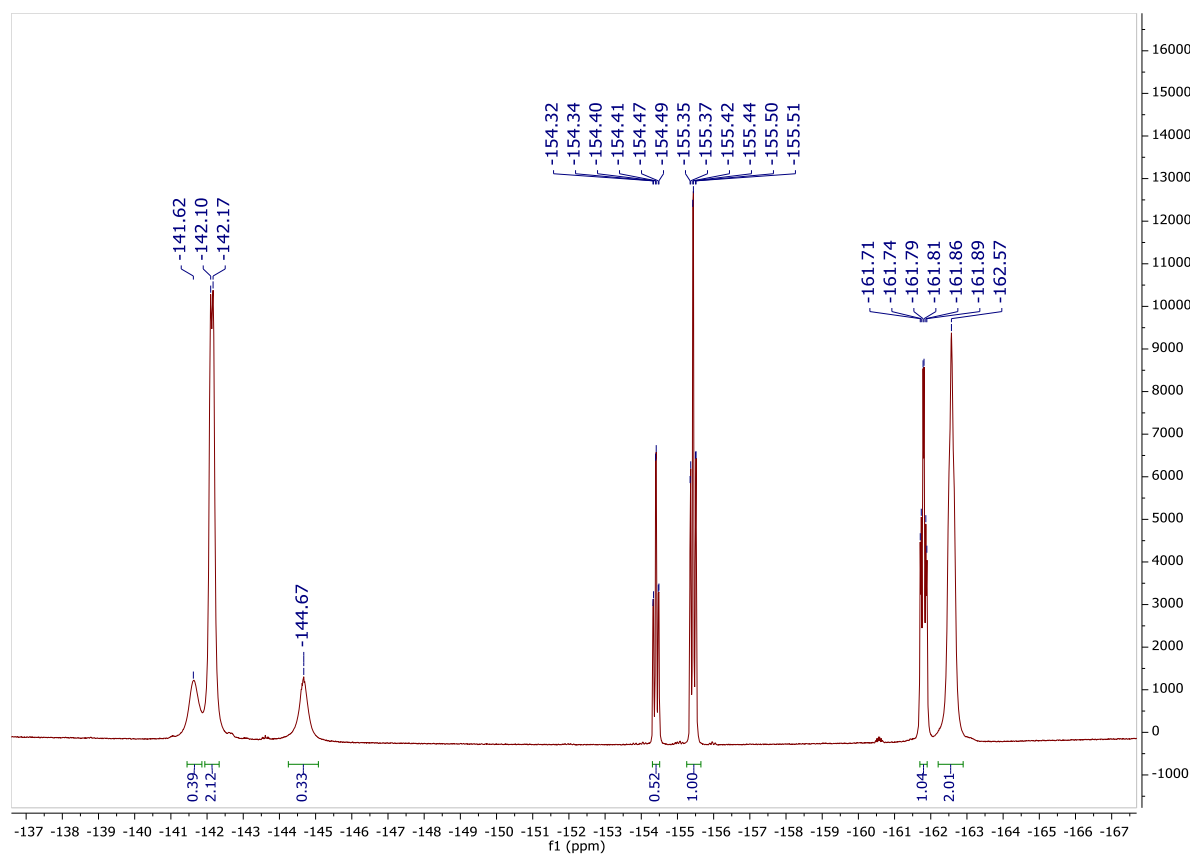
Rysunek 143. Widmo ³¹P NMR związku 2.9 (CDCl₃).



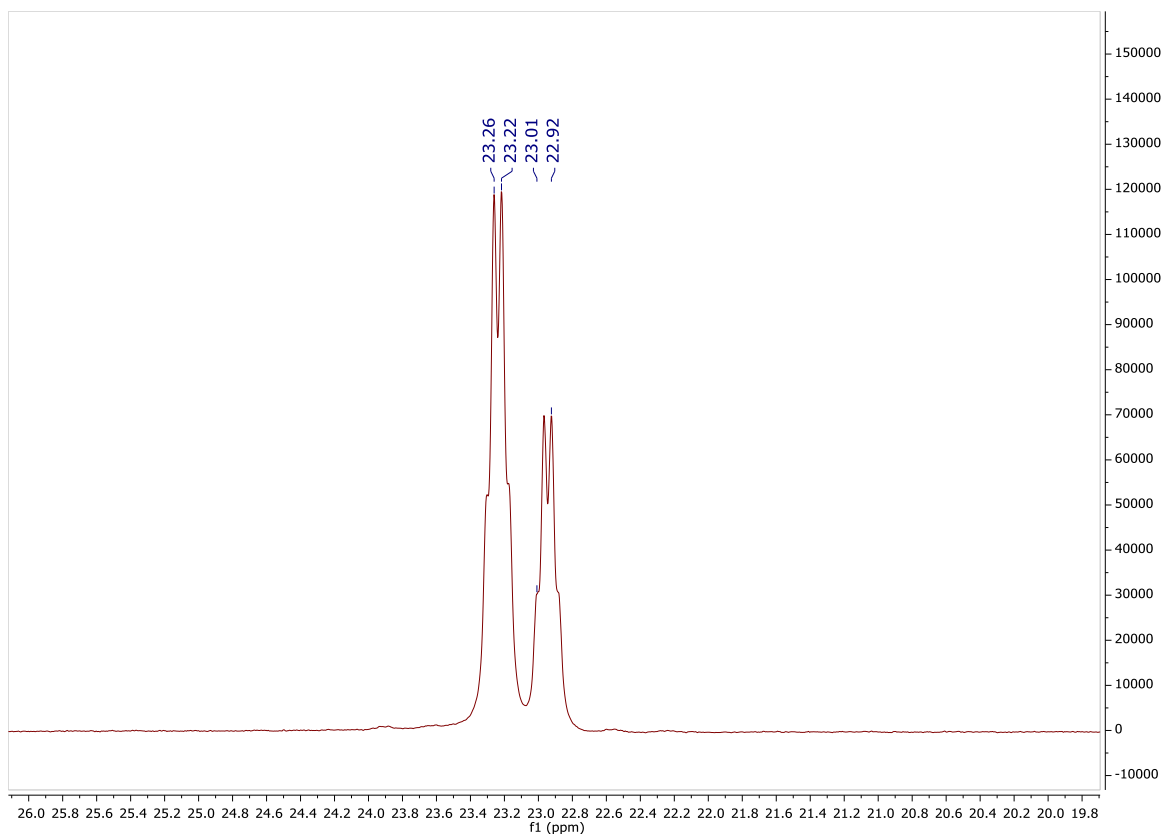
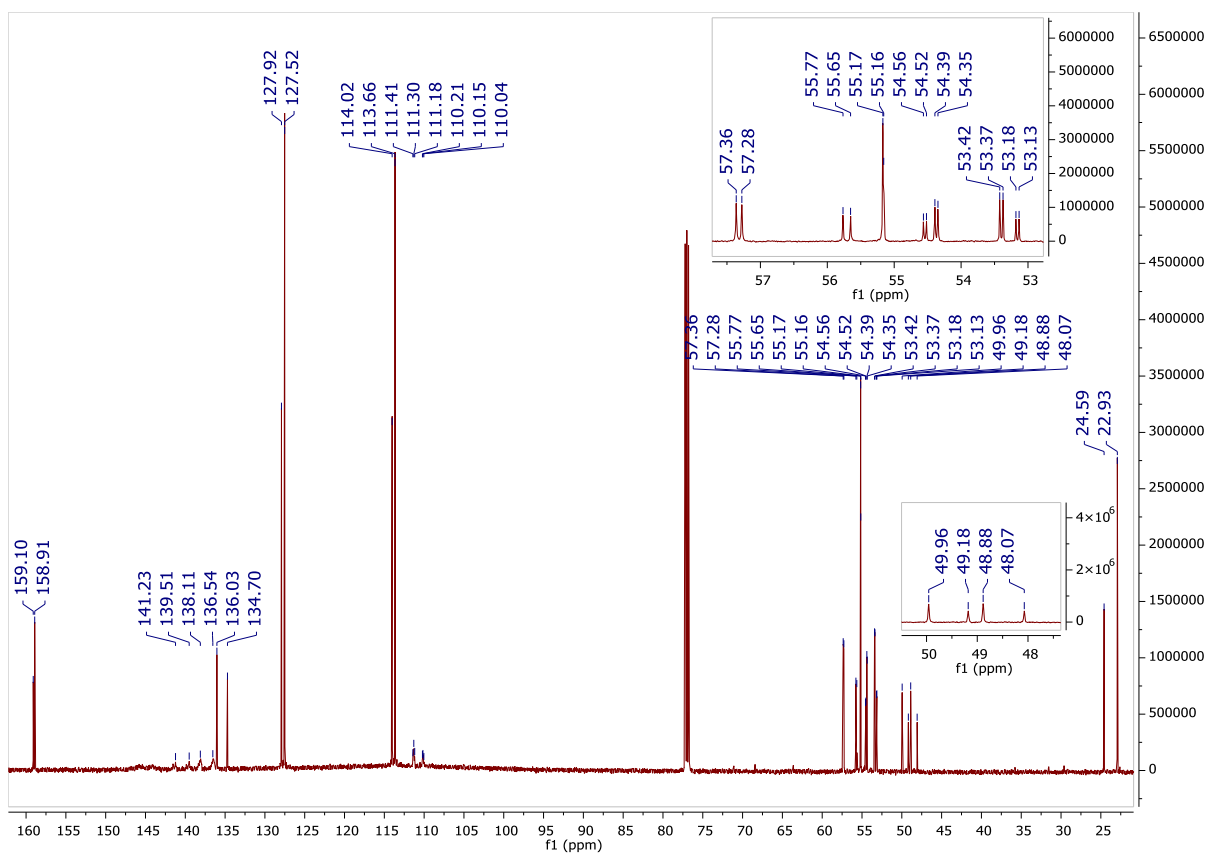
Rysunek 144. Widmo ¹³C NMR związku 2.9 (CDCl₃).

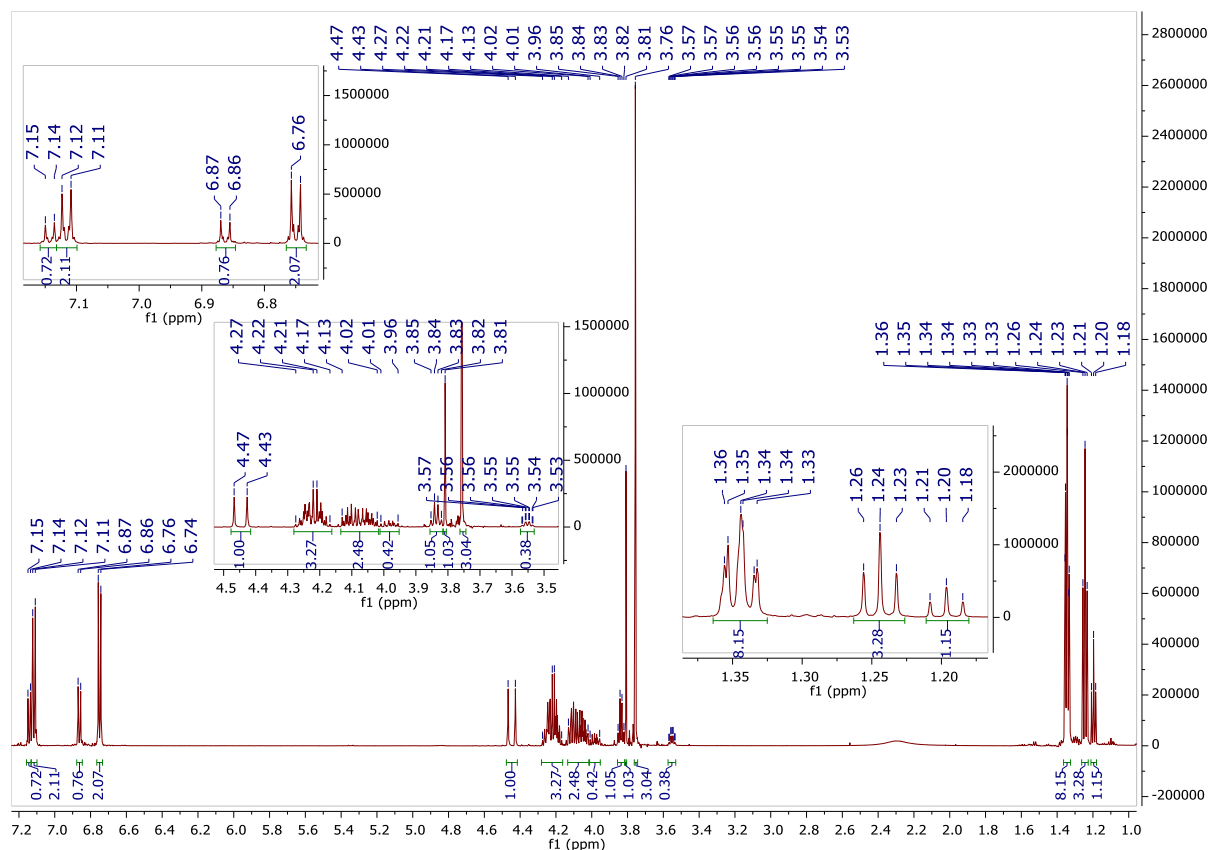


Rysunek 145. Widmo ^1H NMR związku 2.10 (CDCl_3).

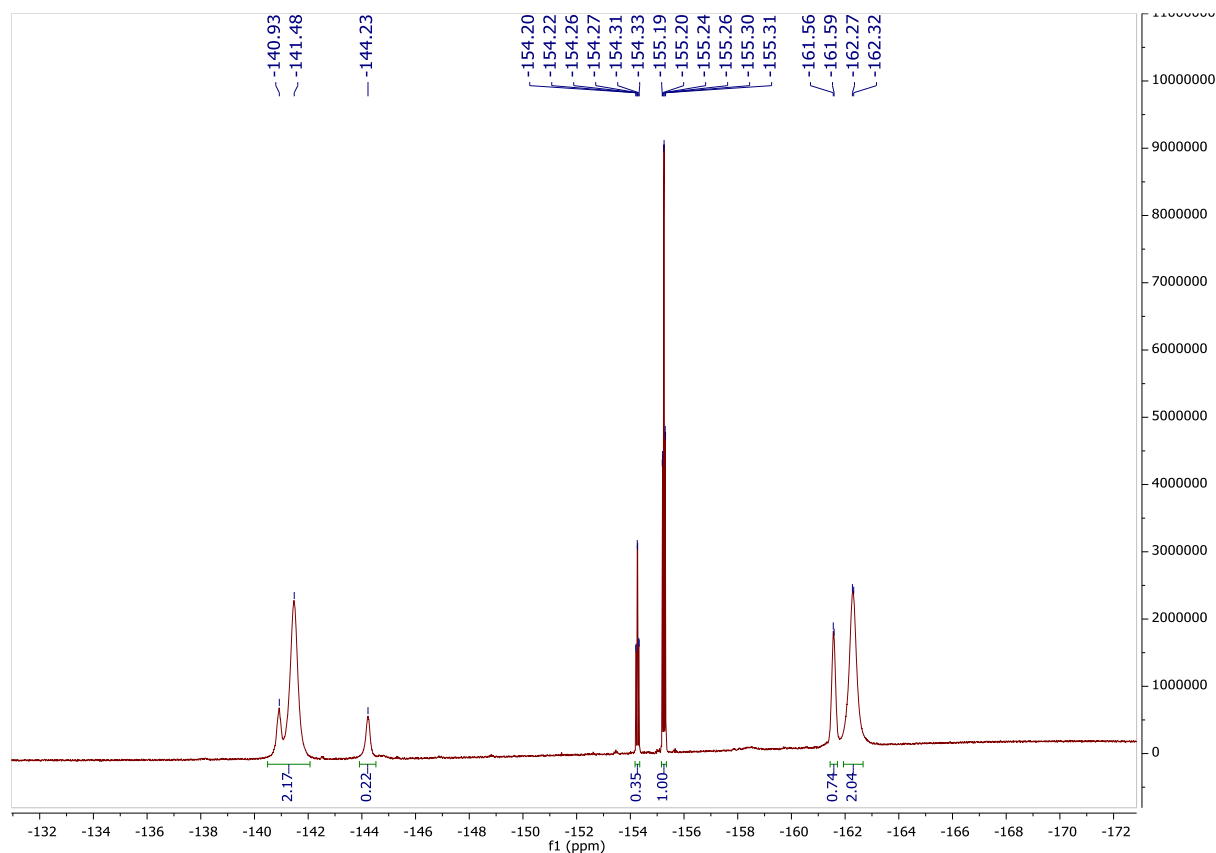


Rysunek 146. Widmo ^{19}F NMR związku 2.10 (CDCl_3).

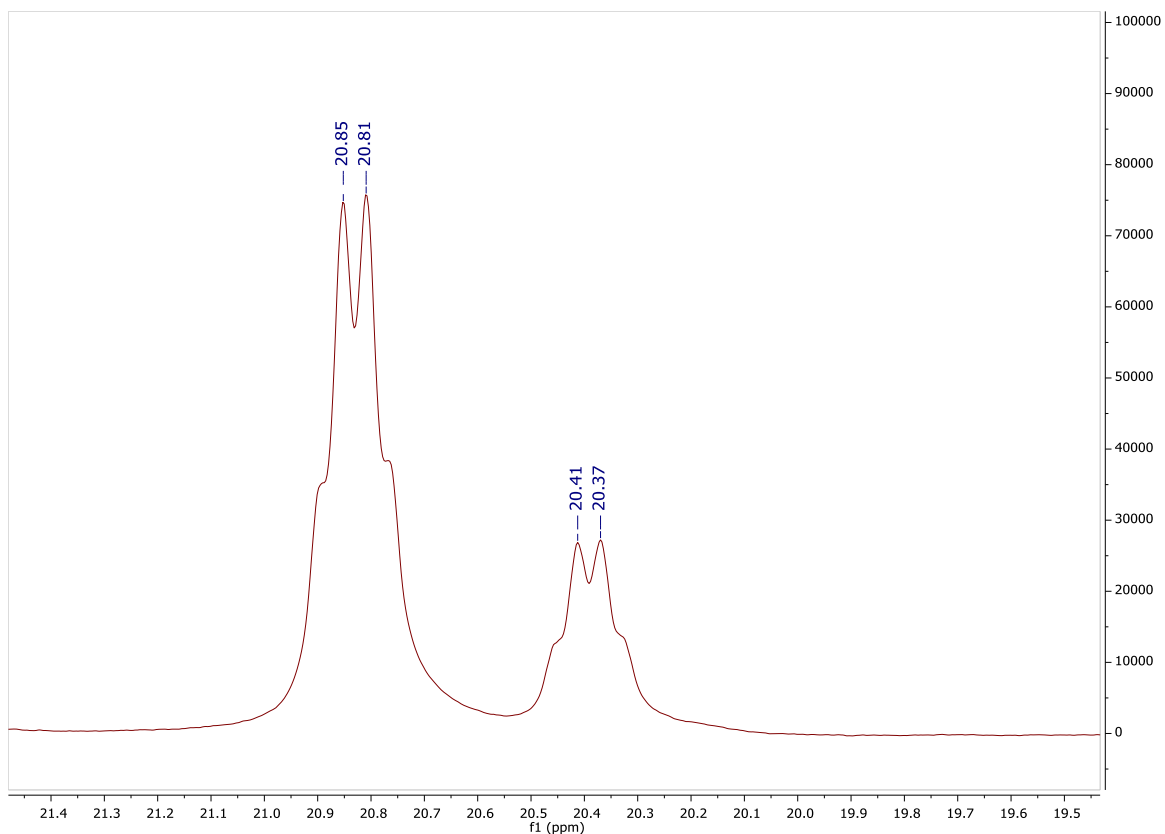
Rysunek 147. Widmo ³¹P NMR związku 2.10 (CDCl₃).Rysunek 148. Widmo ¹³C NMR związku 2.10 (CDCl₃).



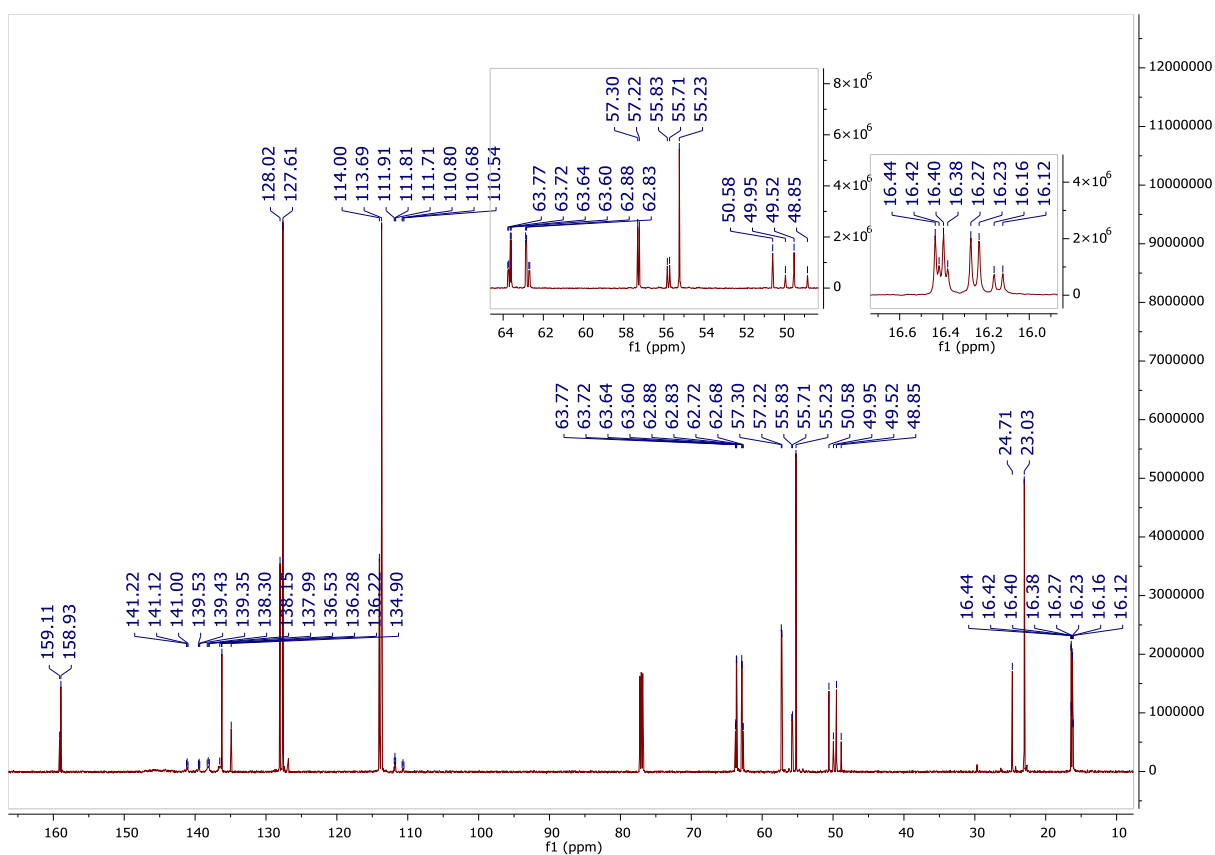
Rysunek 149. Widmo ¹H NMR związku 2.11 (CDCl₃).



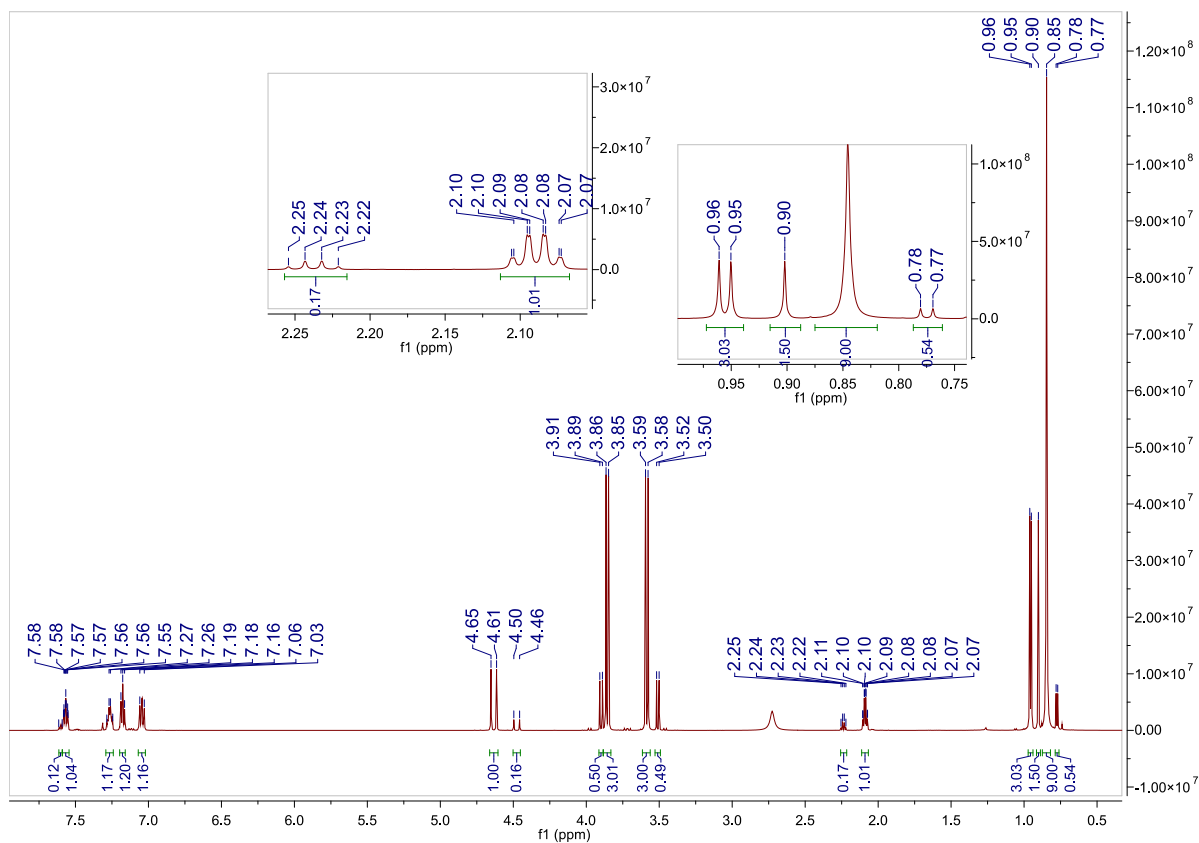
Rysunek 150. Widmo ¹⁹F NMR związku 2.11 (CDCl₃).



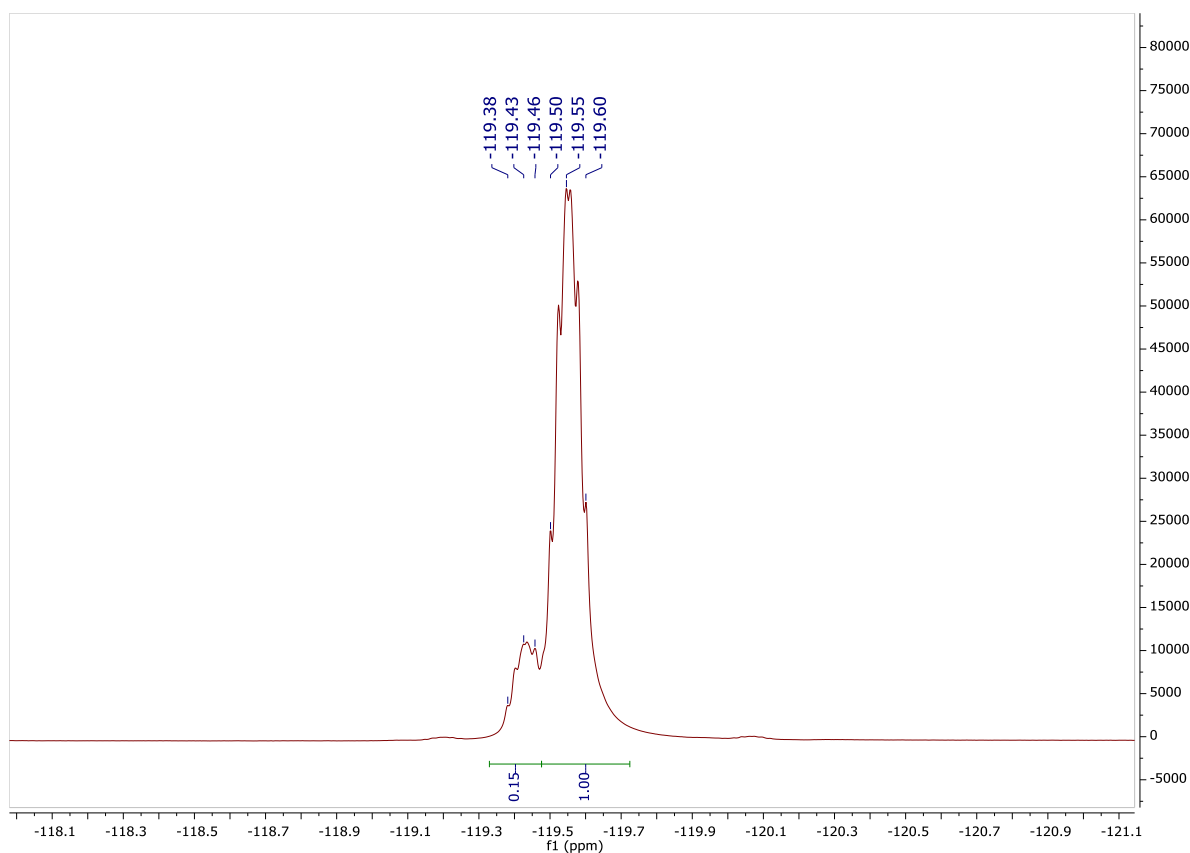
Rysunek 151. Widmo ³¹P NMR związku 2.11 (CDCl₃).



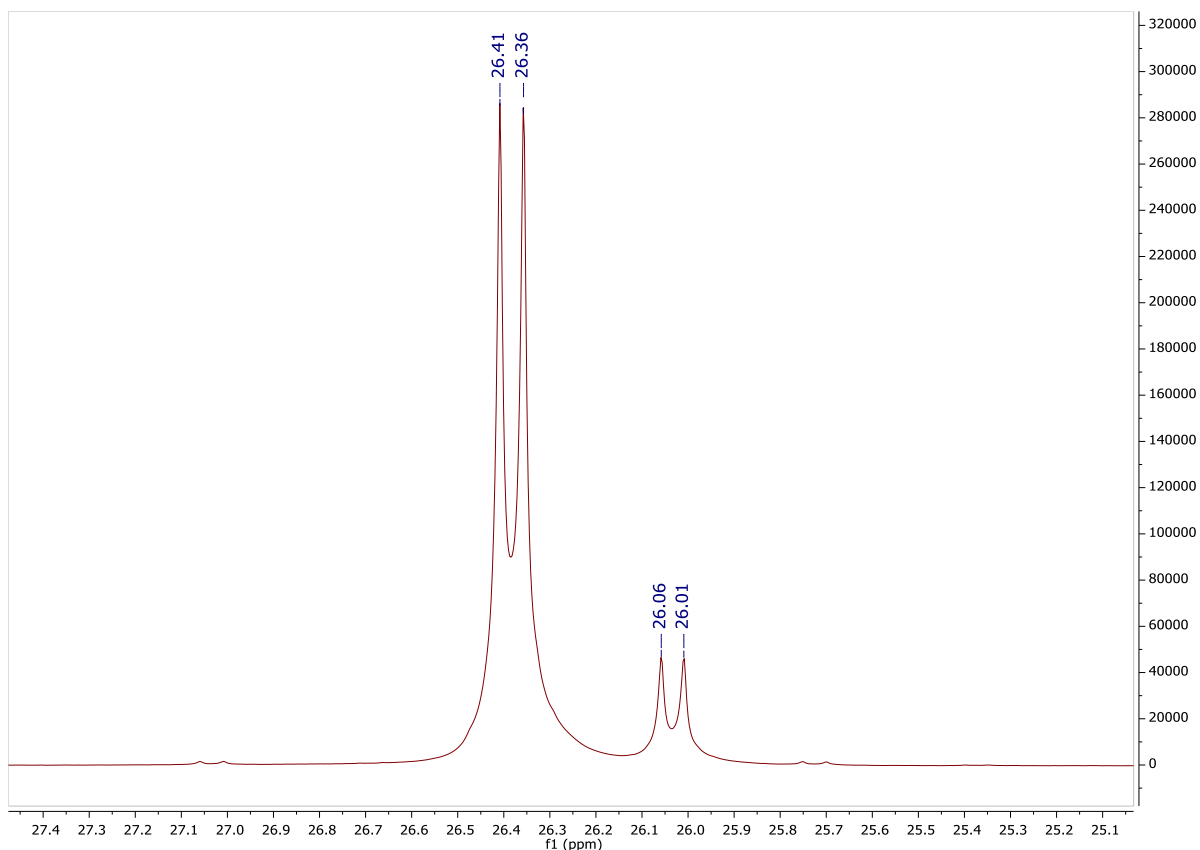
Rysunek 152. Widmo ¹³C NMR związku 2.11 (CDCl₃).



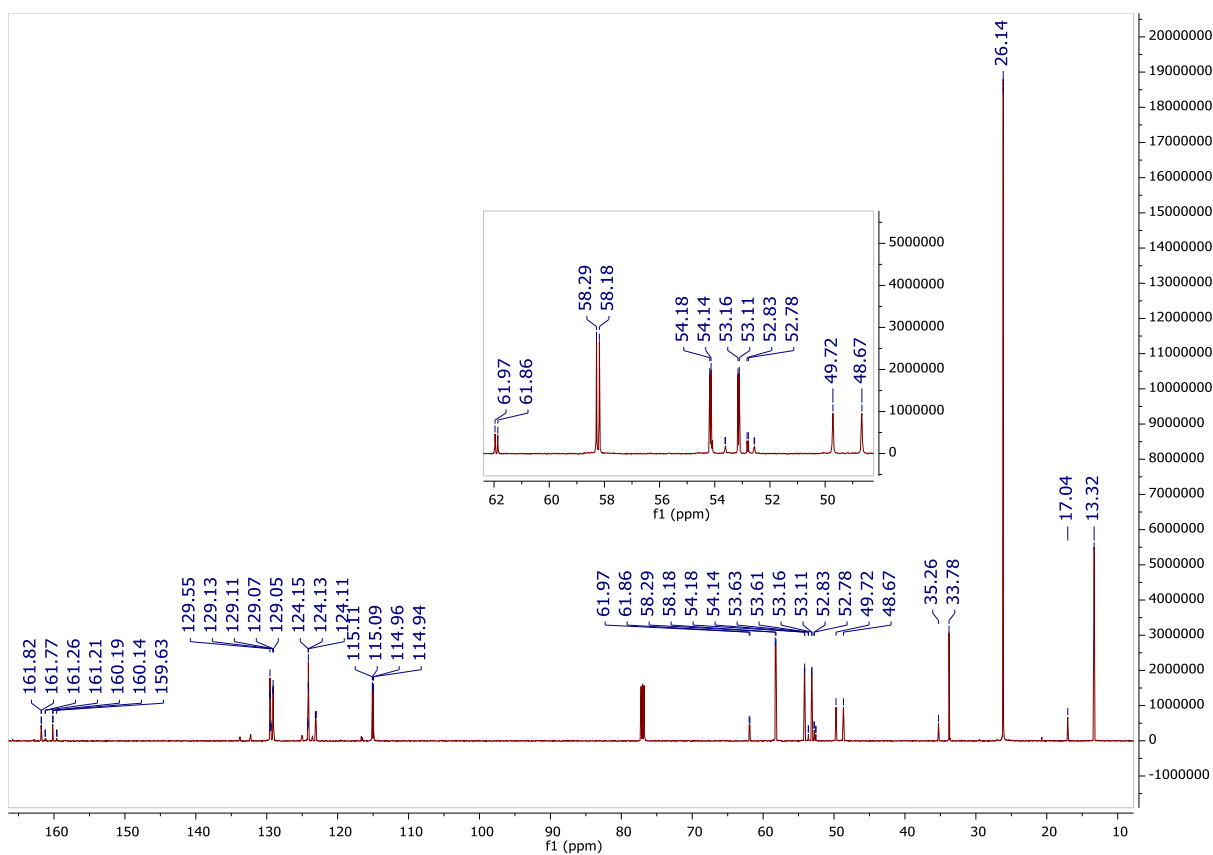
Rysunek 153. Widmo ^1H NMR związku 2.12 (CDCl_3).



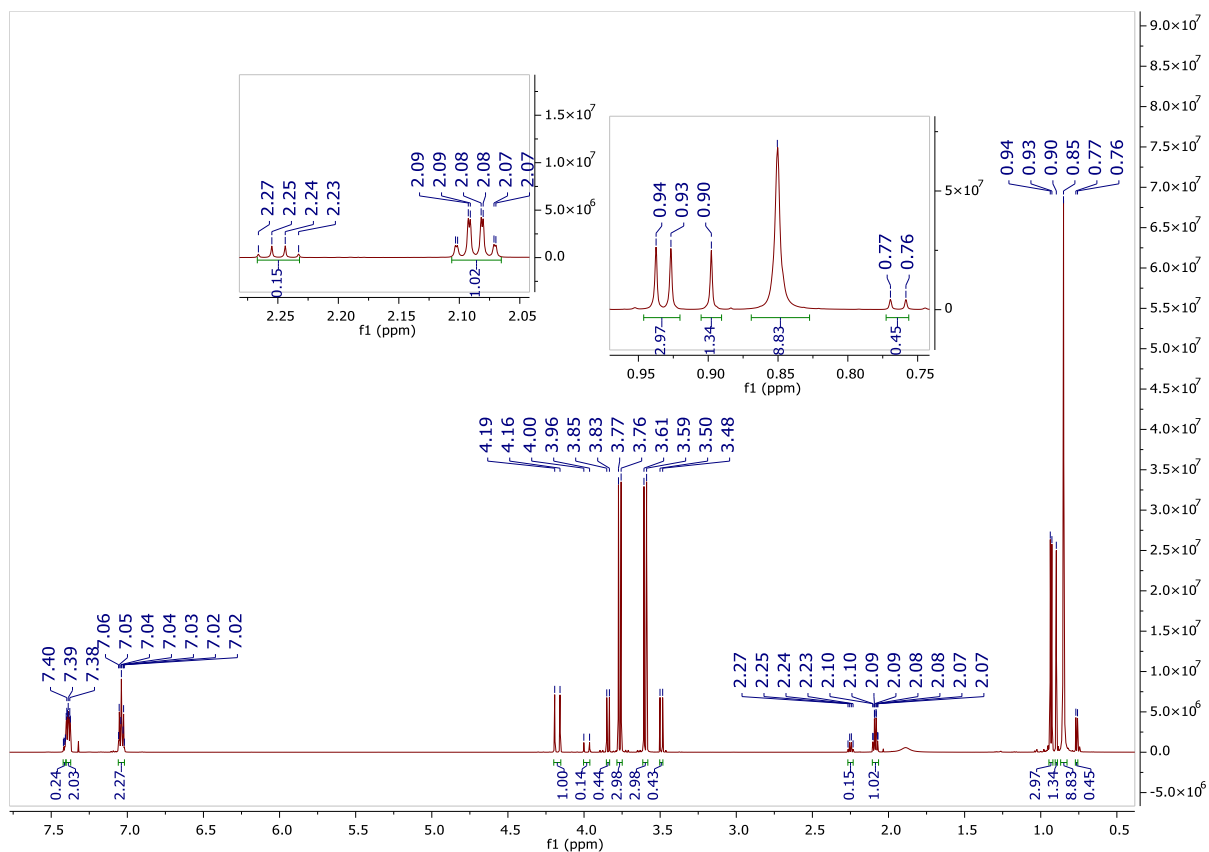
Rysunek 154. Widmo ^{19}F NMR związku 2.12 (CDCl_3).



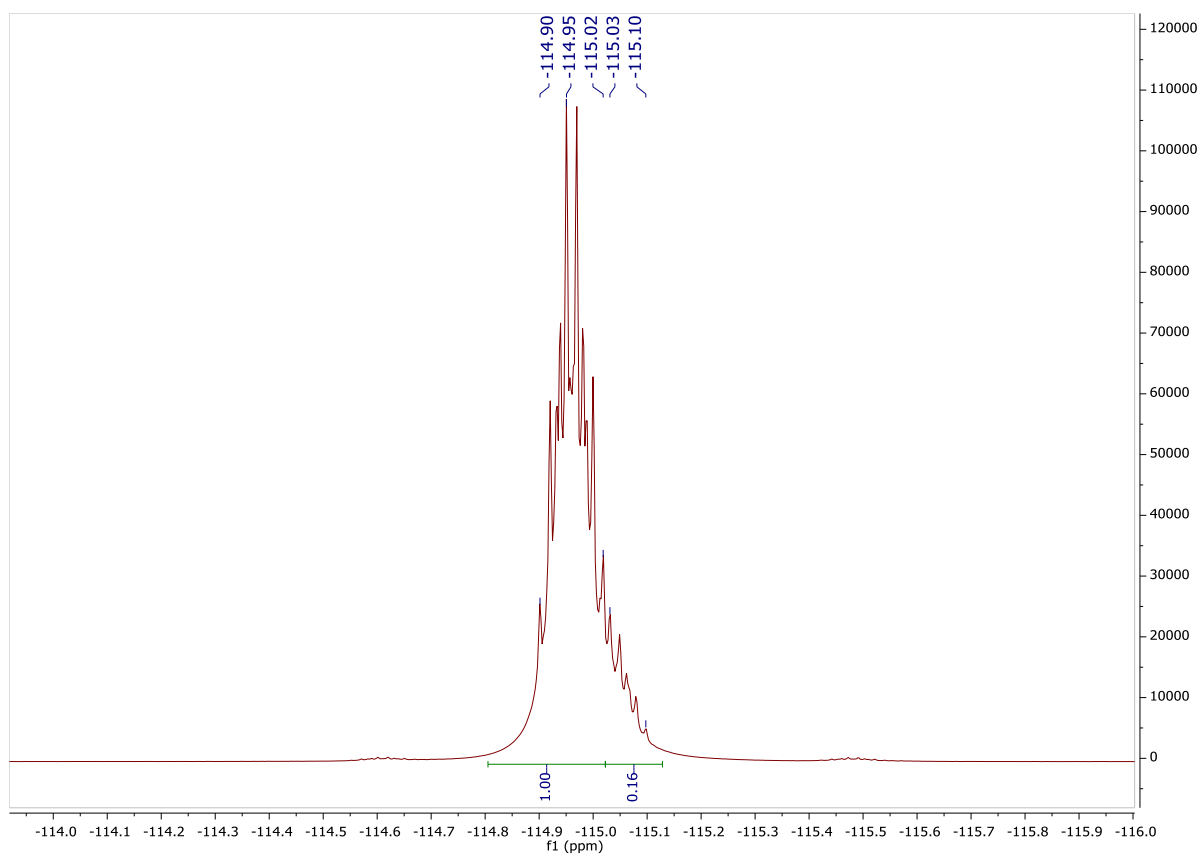
Rysunek 155. Widmo ³¹P NMR związku 2.12 (CDCl₃).



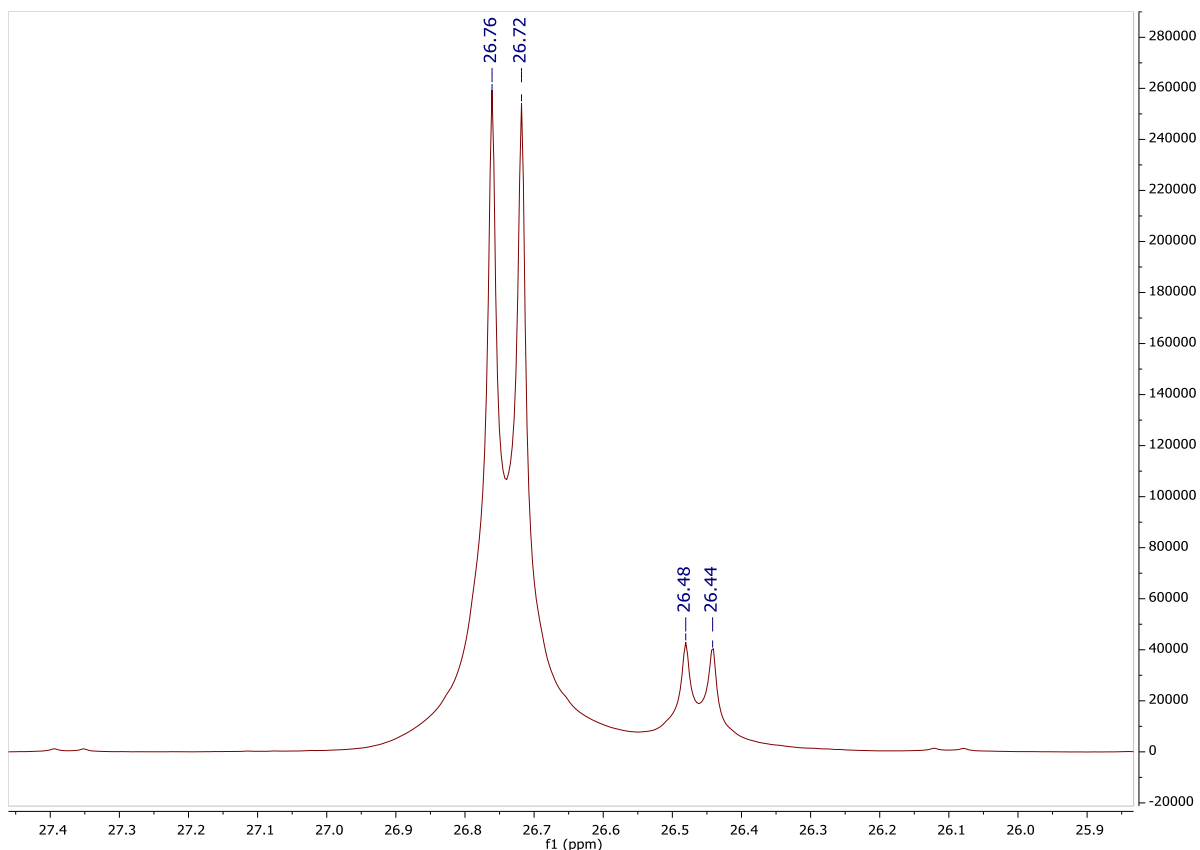
Rysunek 156. Widmo ¹³C NMR związku 2.12 (CDCl₃).



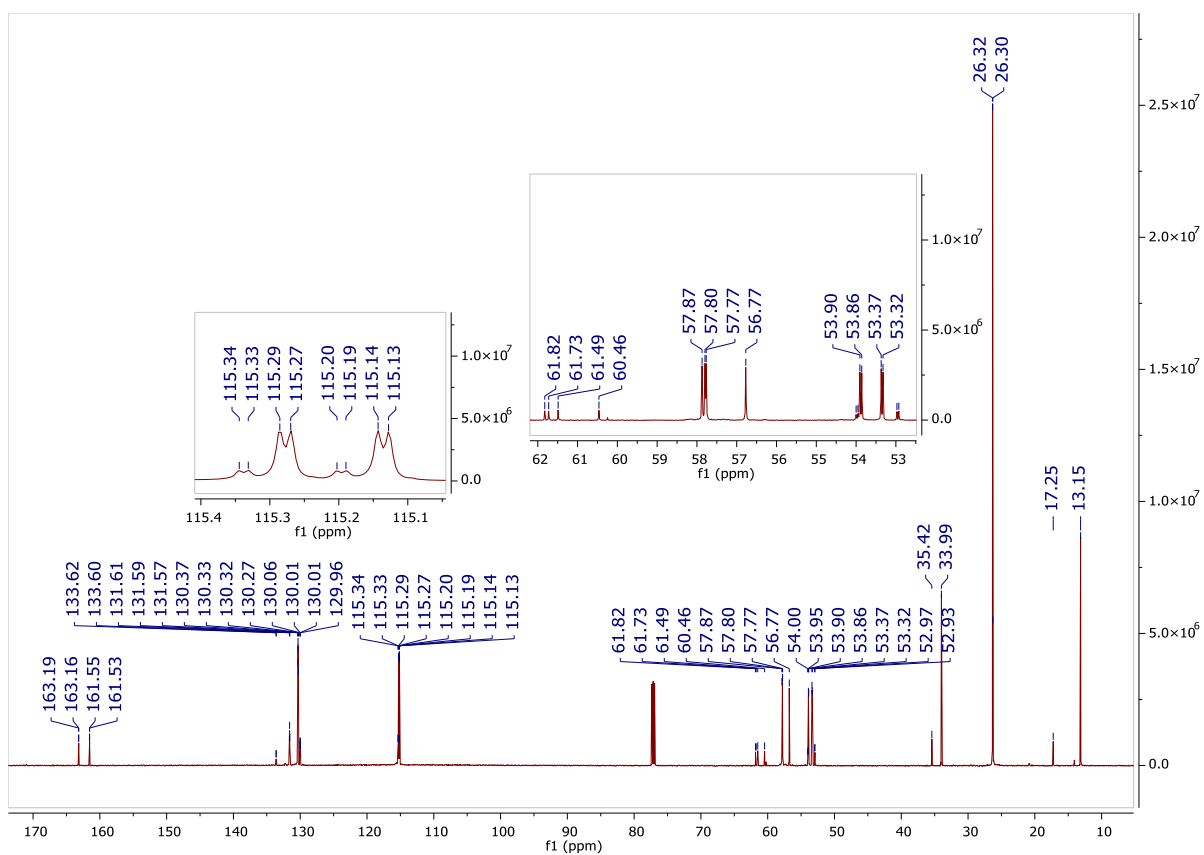
Rysunek 157. Widmo ^1H NMR związku 2.13 (CDCl_3).



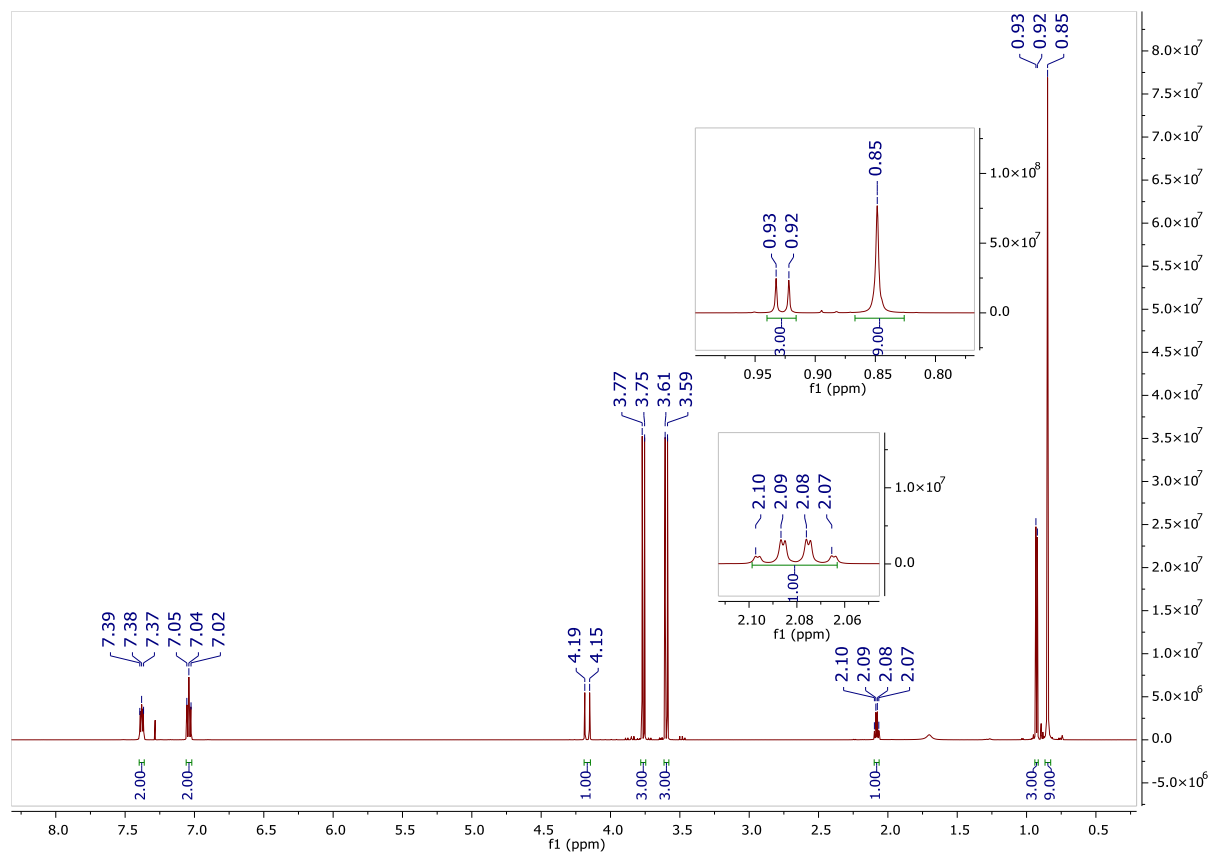
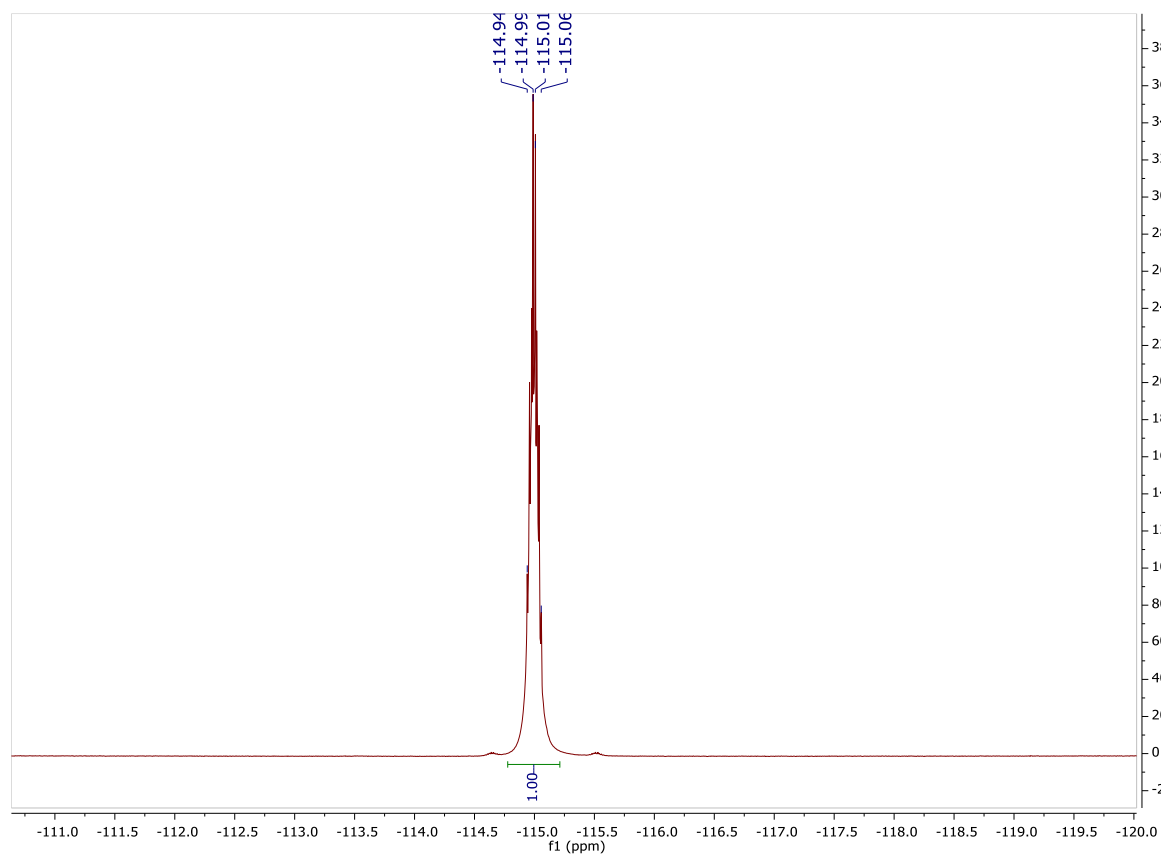
Rysunek 158. Widmo ^{19}F NMR związku 2.13 (CDCl_3).

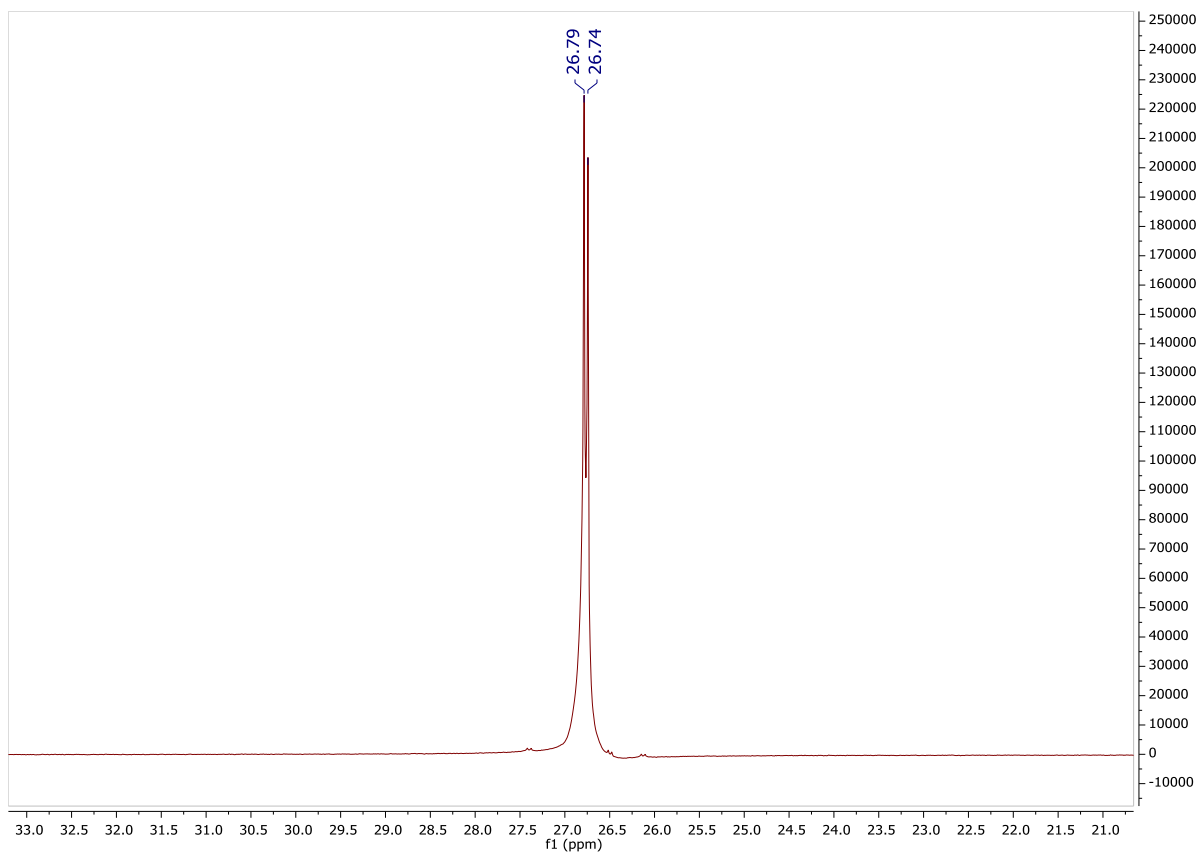


Rysunek 159. Widmo ³¹P NMR związku 2.13 (CDCl₃).

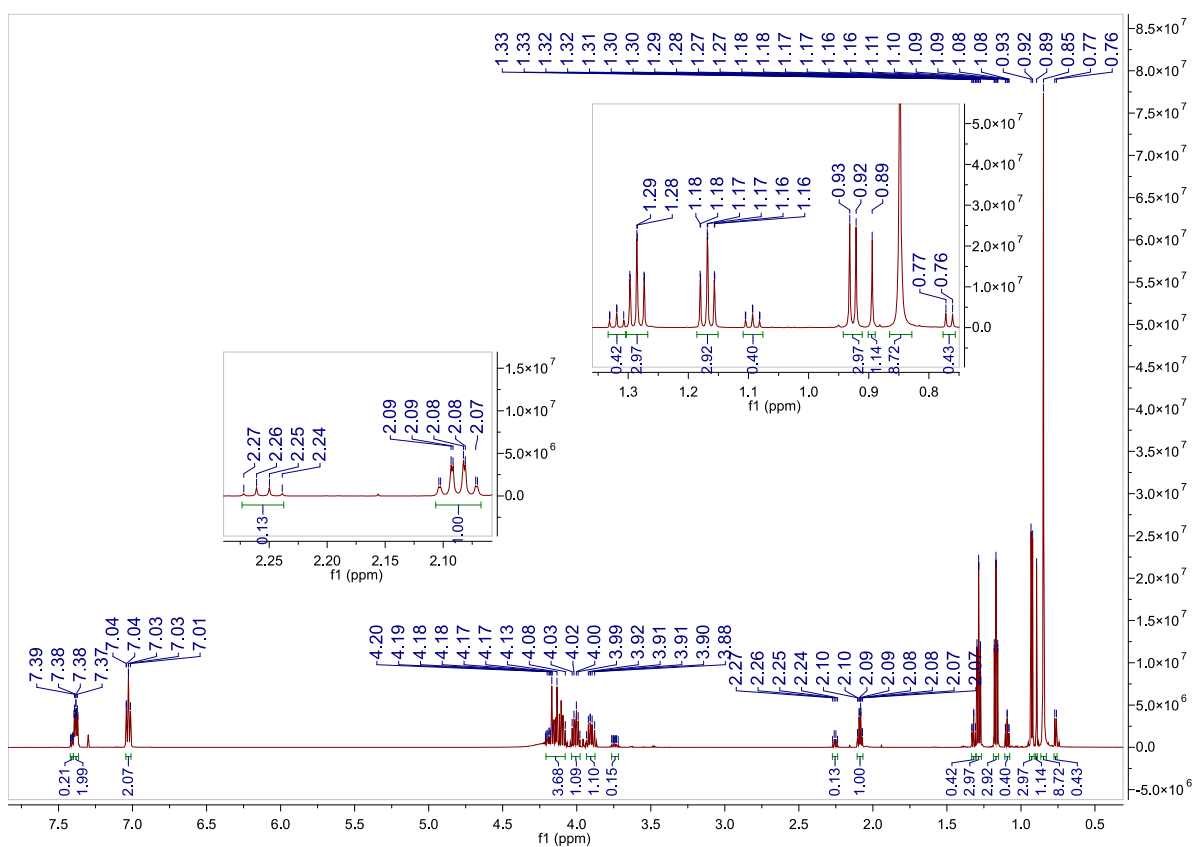


Rysunek 160. Widmo ¹³C NMR związku 2.13 (CDCl₃).

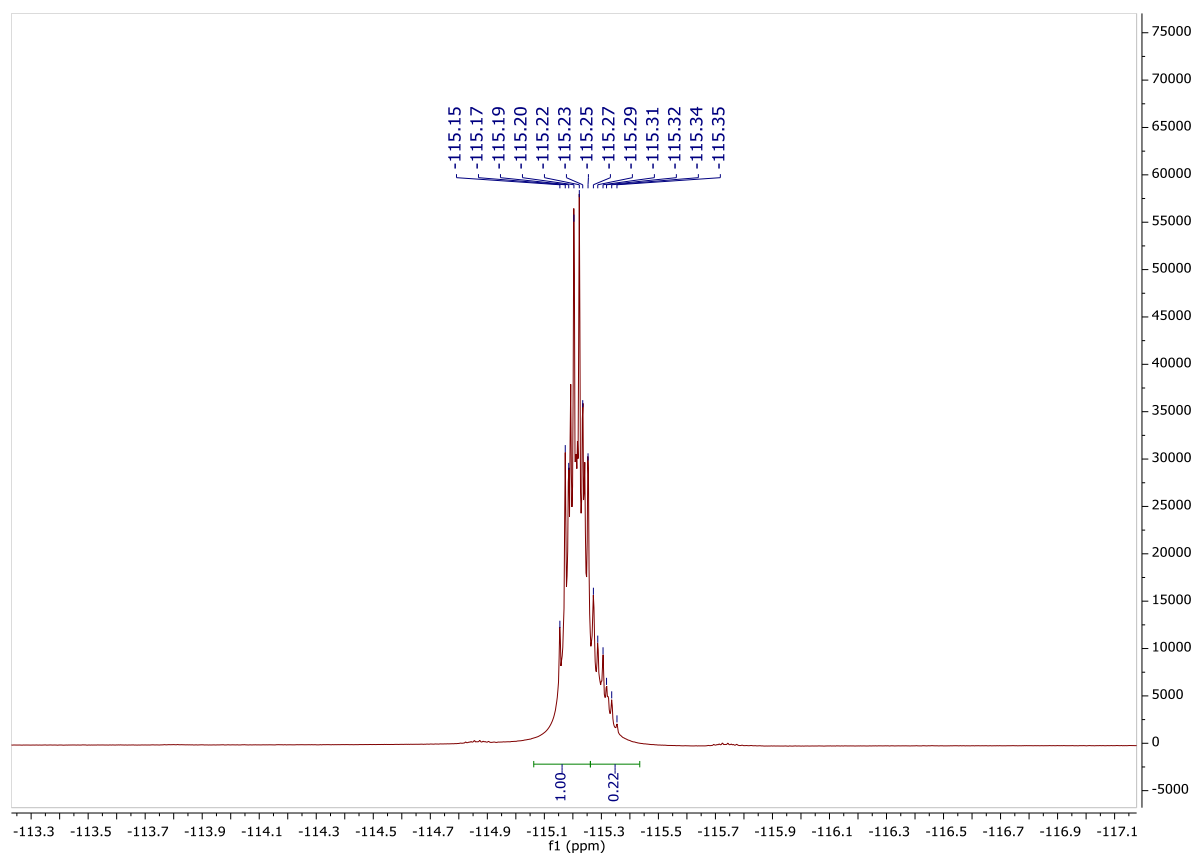
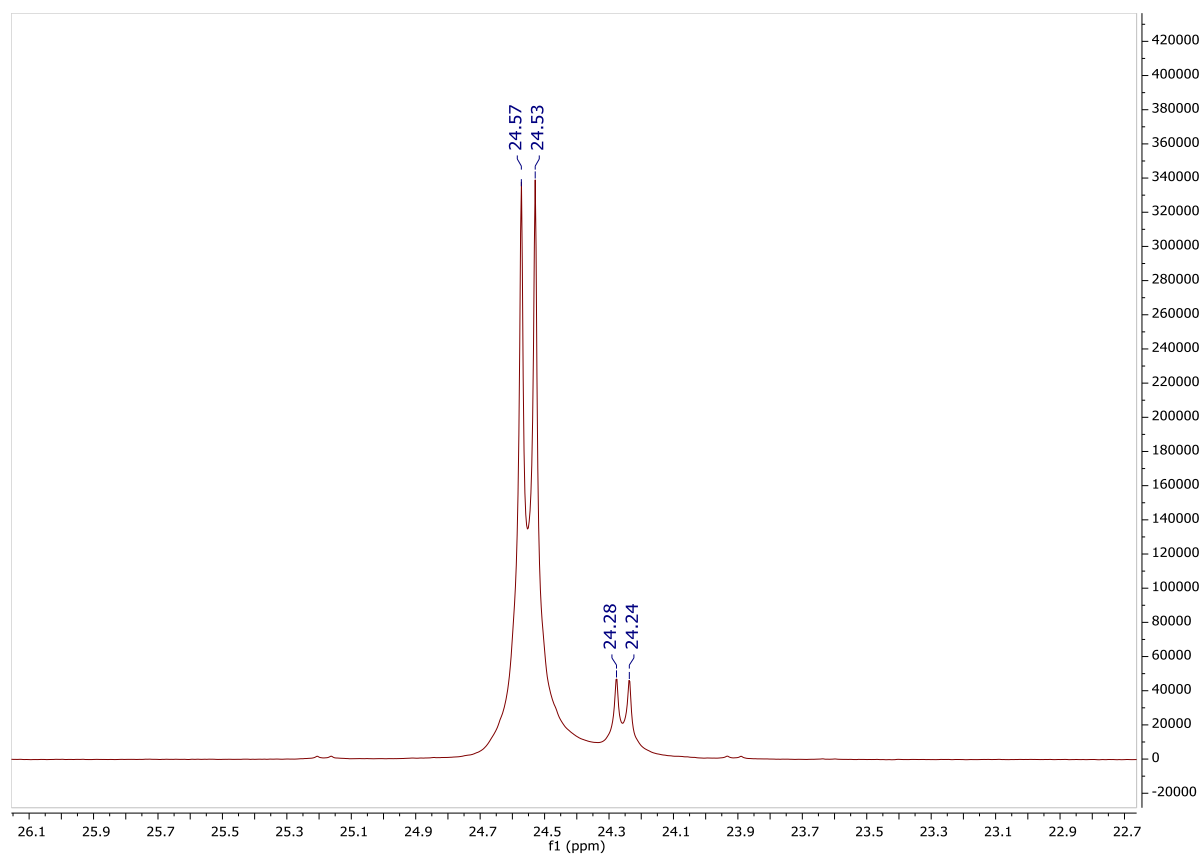
Rysunek 161. Widmo ^1H NMR wyizolowanego (*R,S*)-diastereoizomeru związku 2.13 (CDCl_3).Rysunek 162. Widmo ^{19}F NMR wyizolowanego (*R,S*)-diastereoizomeru związku 2.13 (CDCl_3).

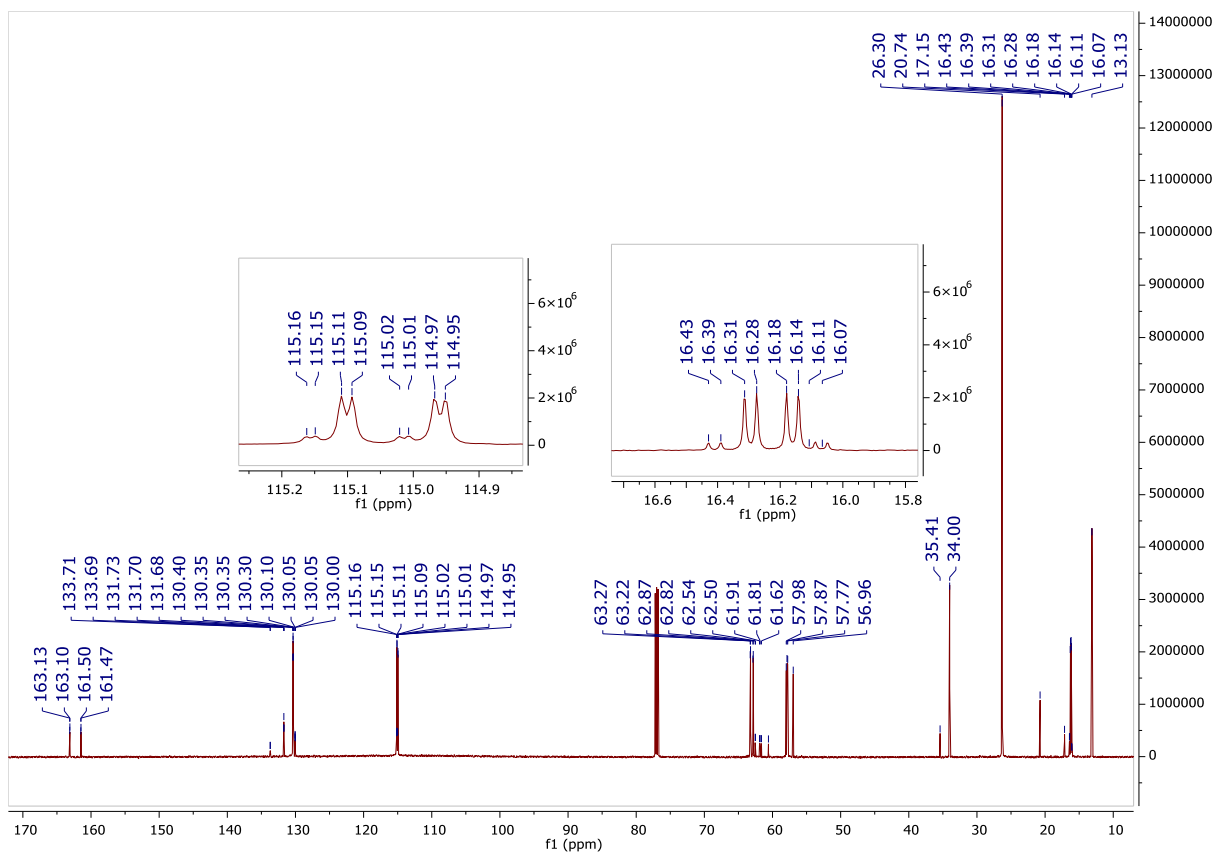


Rysunek 163. Widmo ^{31}P NMR wyizolowanego (*R,S*)-diastereoizomeru związku 2.13 (CDCl_3).

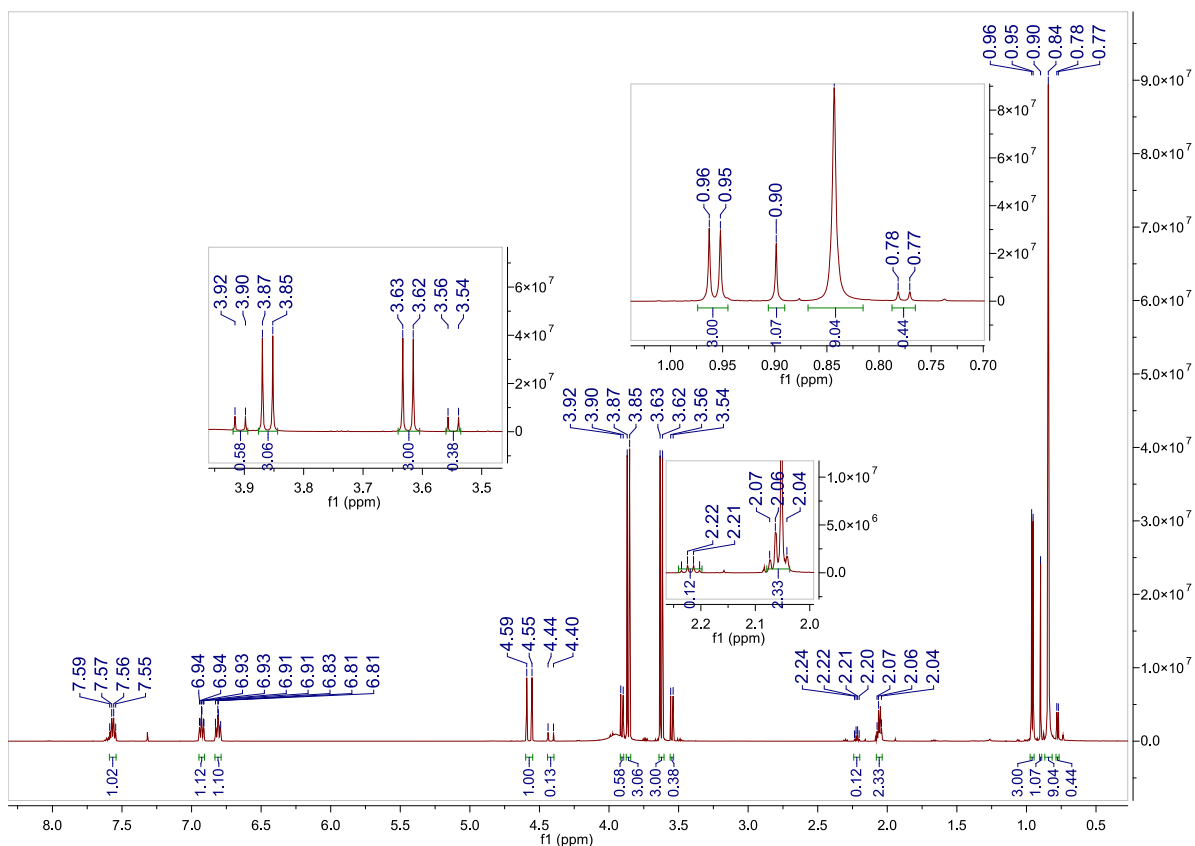


Rysunek 164. Widmo ^1H NMR związku 2.14 (CDCl_3).

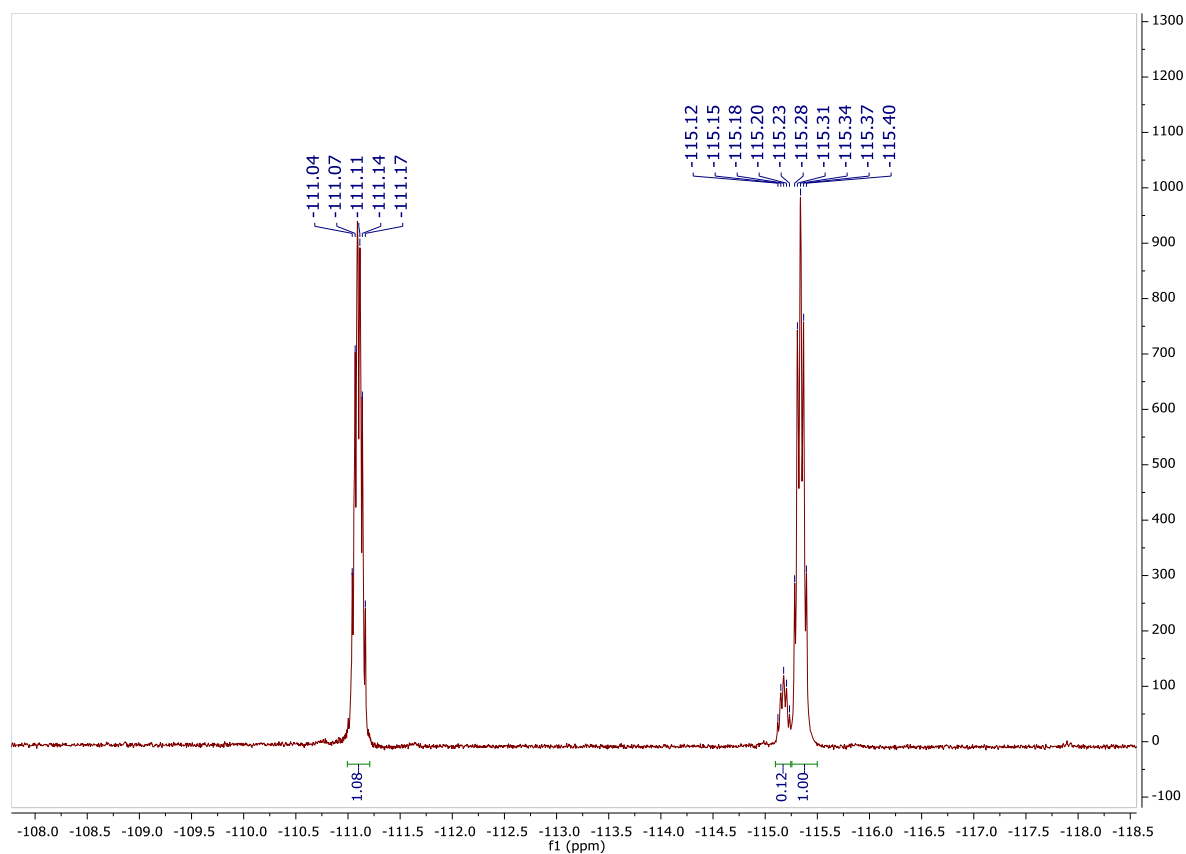
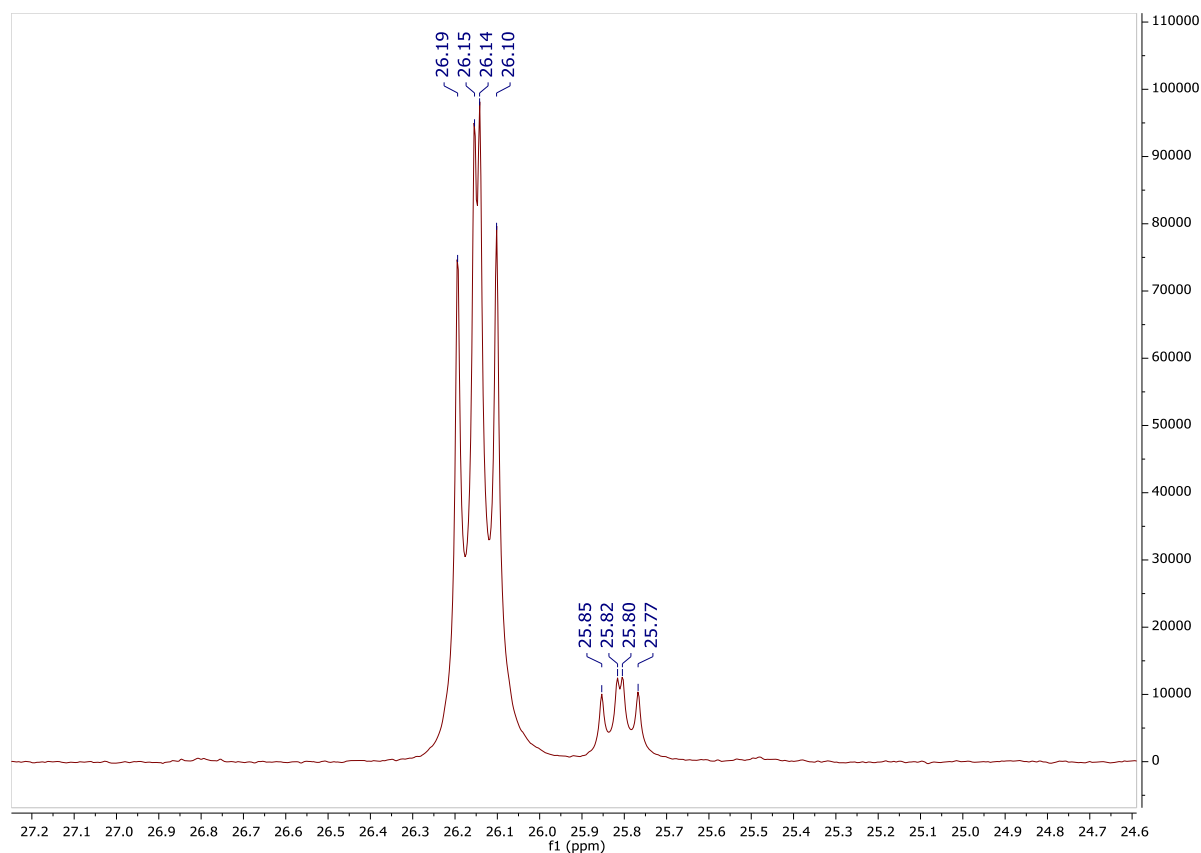
Rysunek 165. Widmo ^{19}F NMR związku 2.14 (CDCl_3).Rysunek 166. Widmo ^{31}P NMR związku 2.14 (CDCl_3).

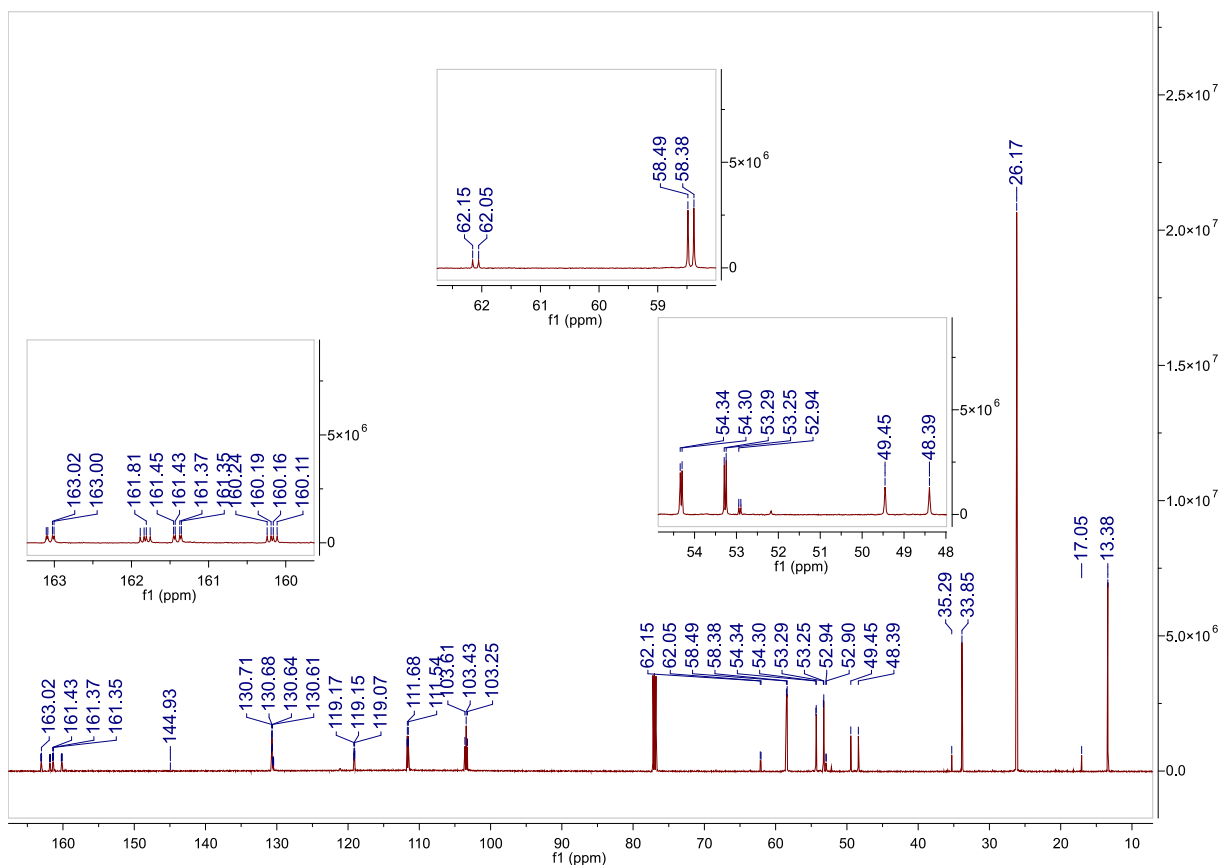


Rysunek 167. Widmo ^{13}C NMR związku 2.14 (CDCl_3).

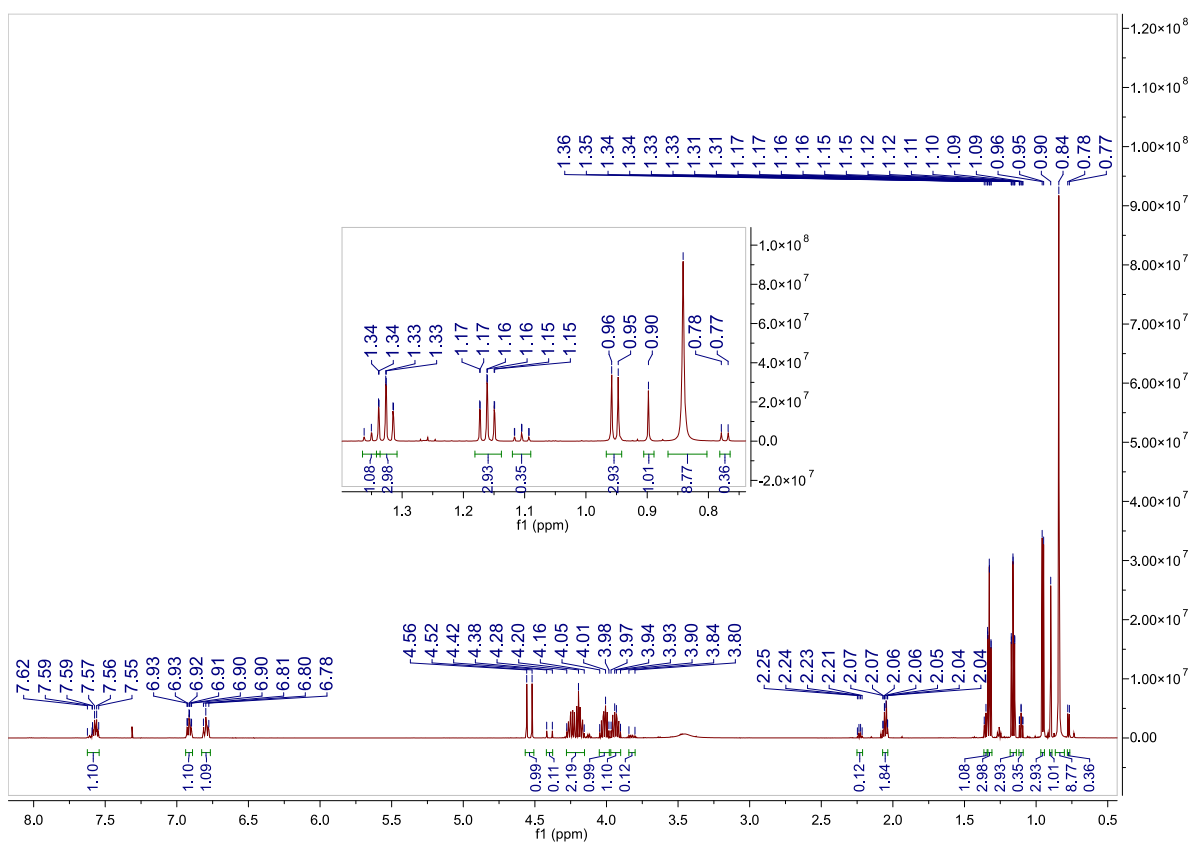


Rysunek 168. Widmo ^1H NMR związku 2.15 (CDCl_3).

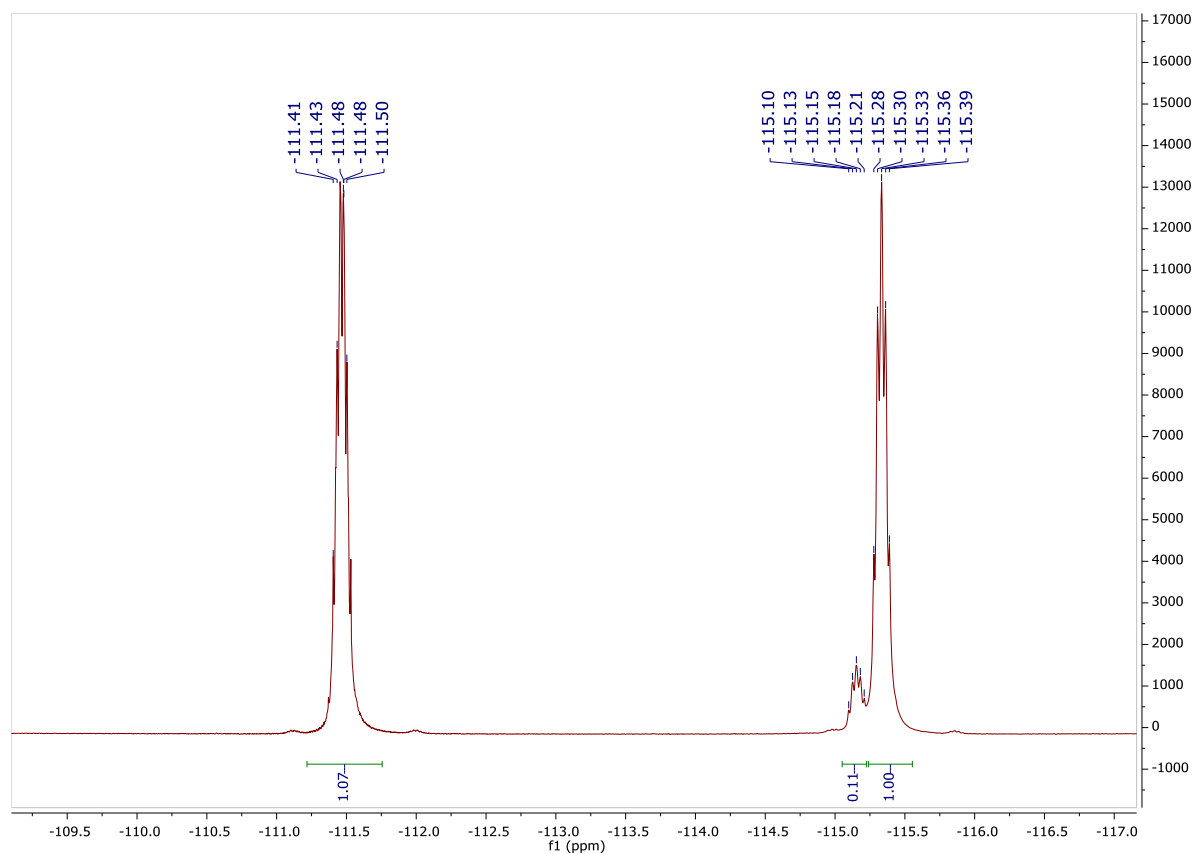
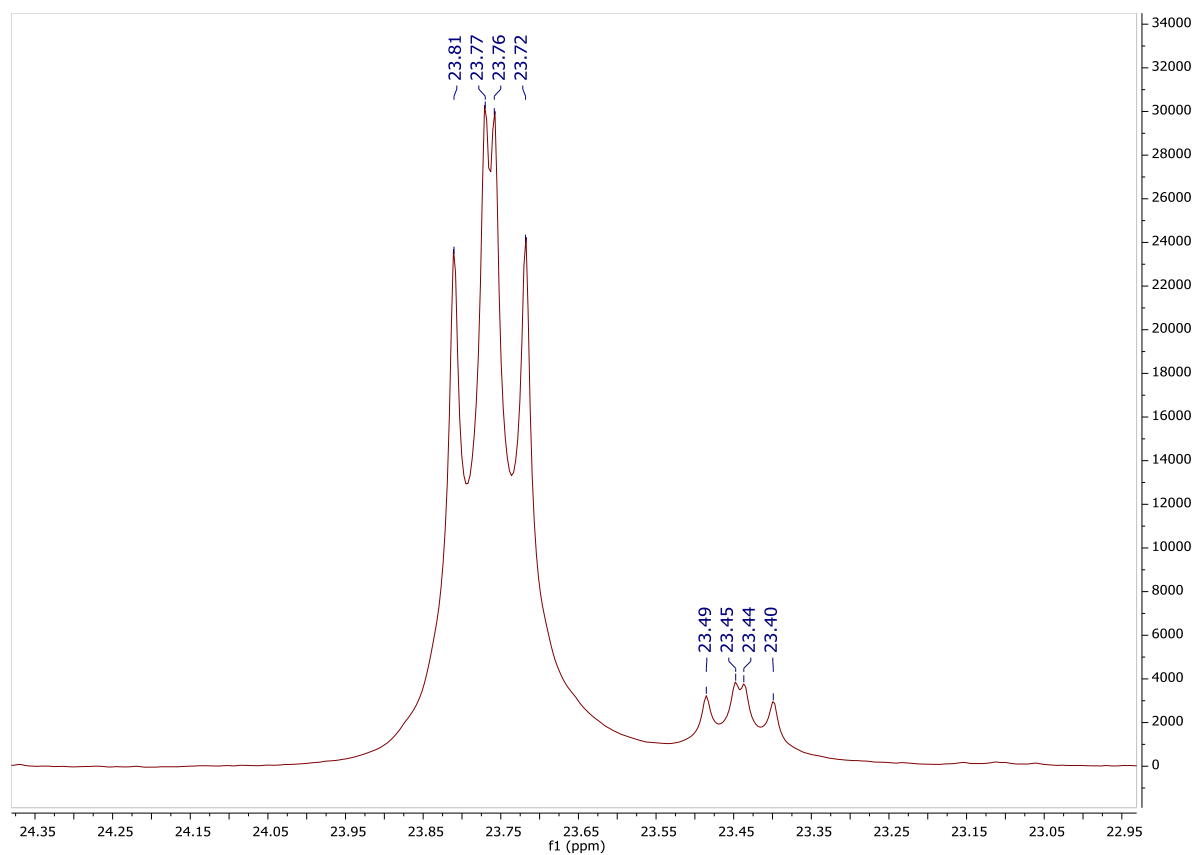
Rysunek 169. Widmo ^{19}F NMR związku 2.15 (CDCl_3).Rysunek 170. Widmo ^{31}P NMR związku 2.15 (CDCl_3).

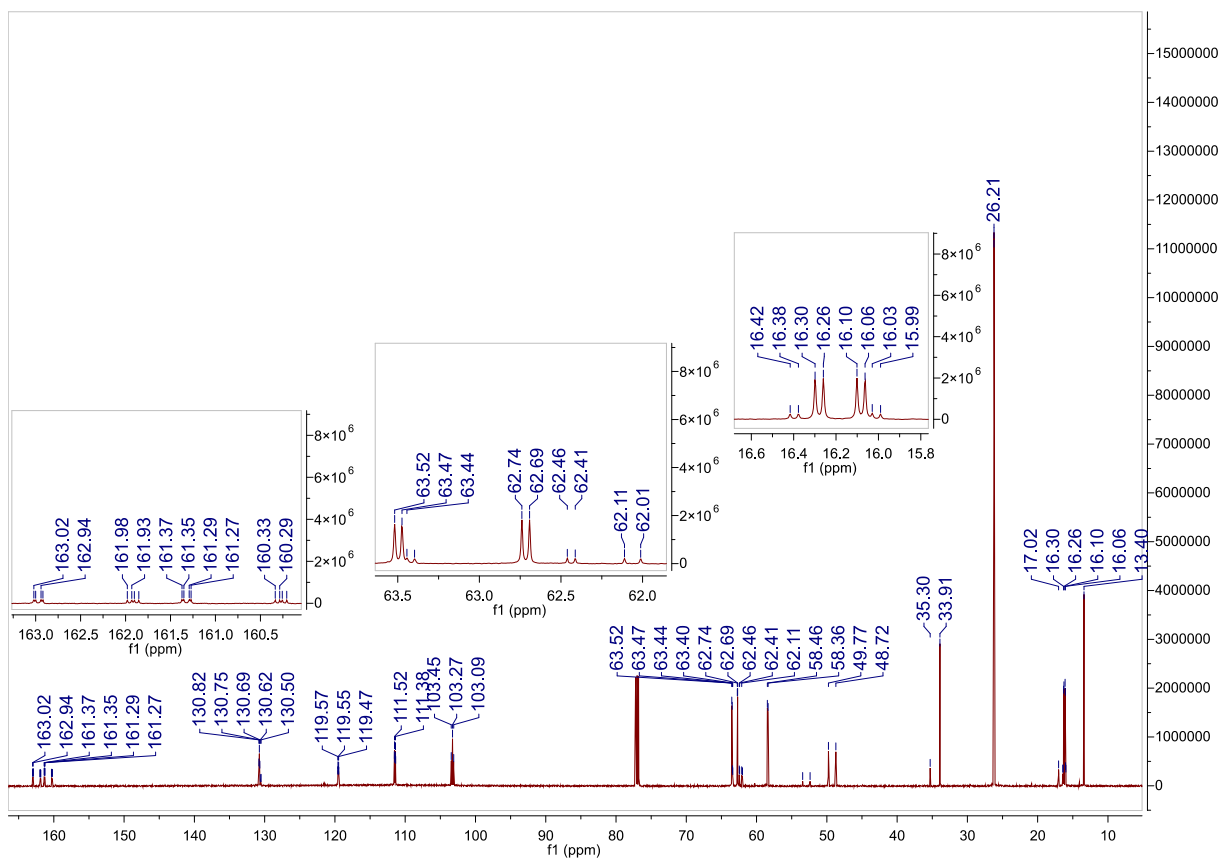


Rysunek 171. Widmo ^{13}C NMR związku 2.15 (CDCl_3).

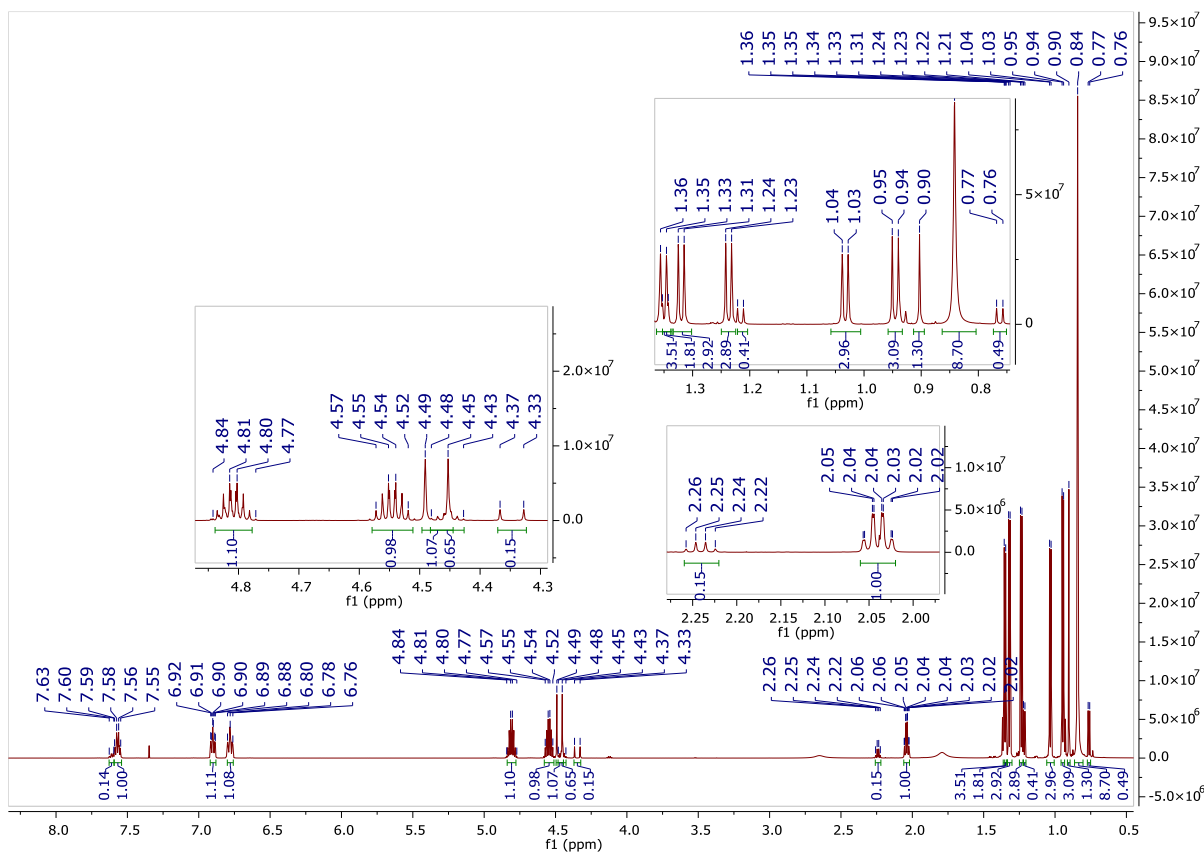


Rysunek 172. Widmo ^1H NMR związku 2.16 (CDCl_3).

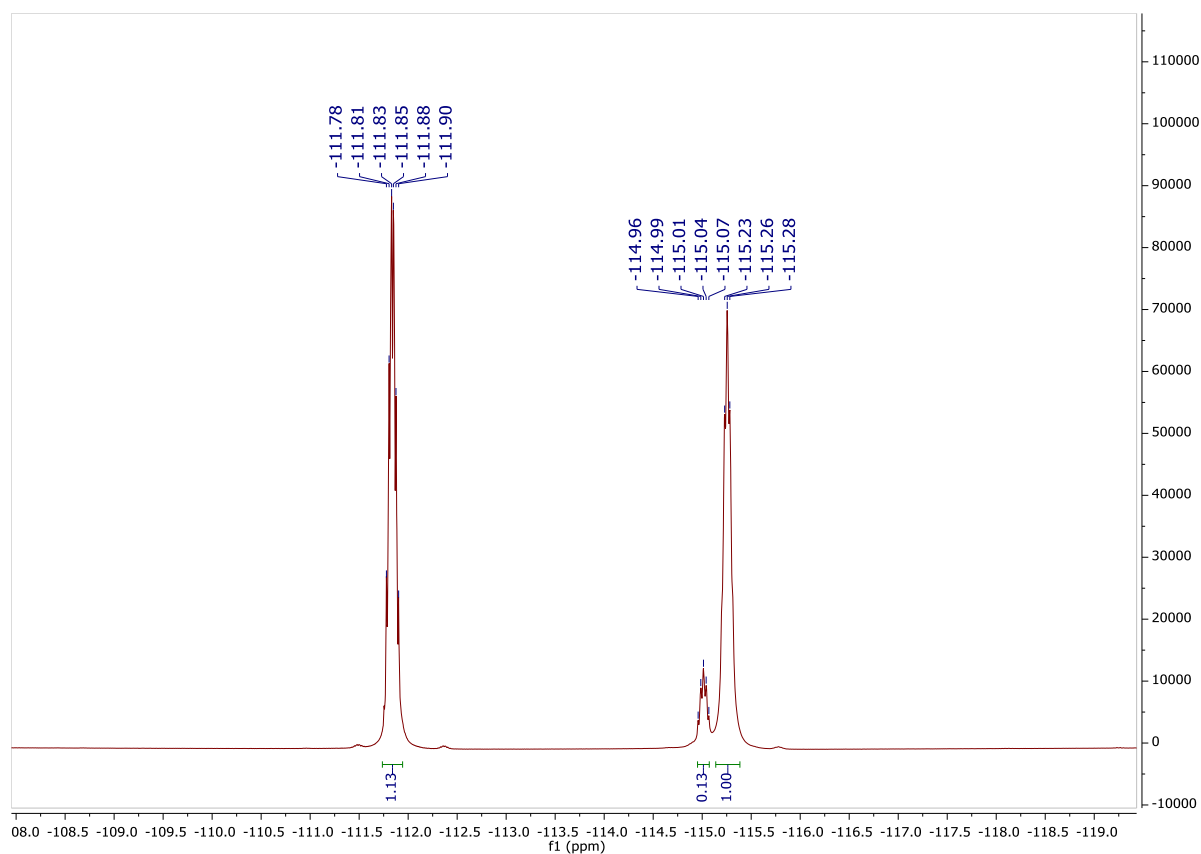
Rysunek 173. Widmo ^{19}F NMR związku 2.16 (CDCl_3).Rysunek 174. Widmo ^{31}P NMR związku 2.16 (CDCl_3).



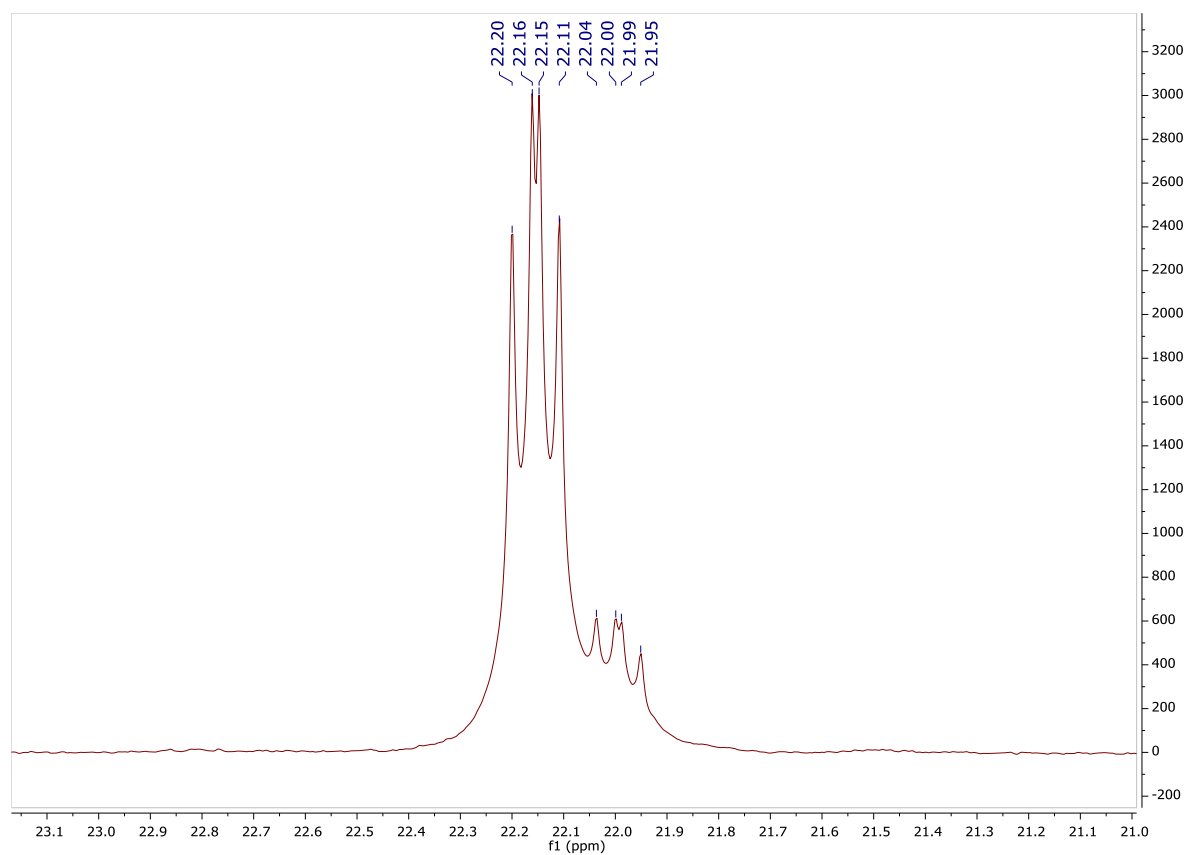
Rysunek 175. Widmo ^{13}C NMR związku 2.16 (CDCl_3).



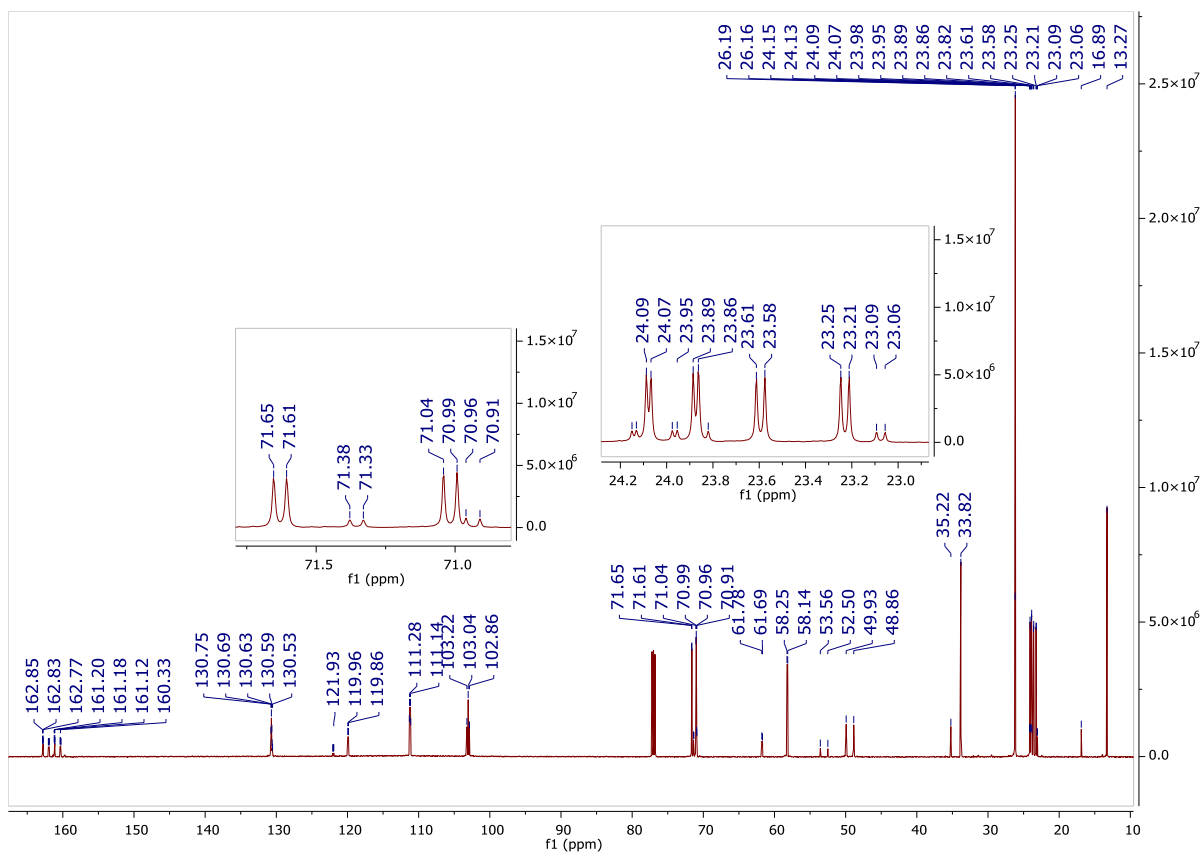
Rysunek 176. Widmo ^1H NMR związku 2.17 (CDCl_3).



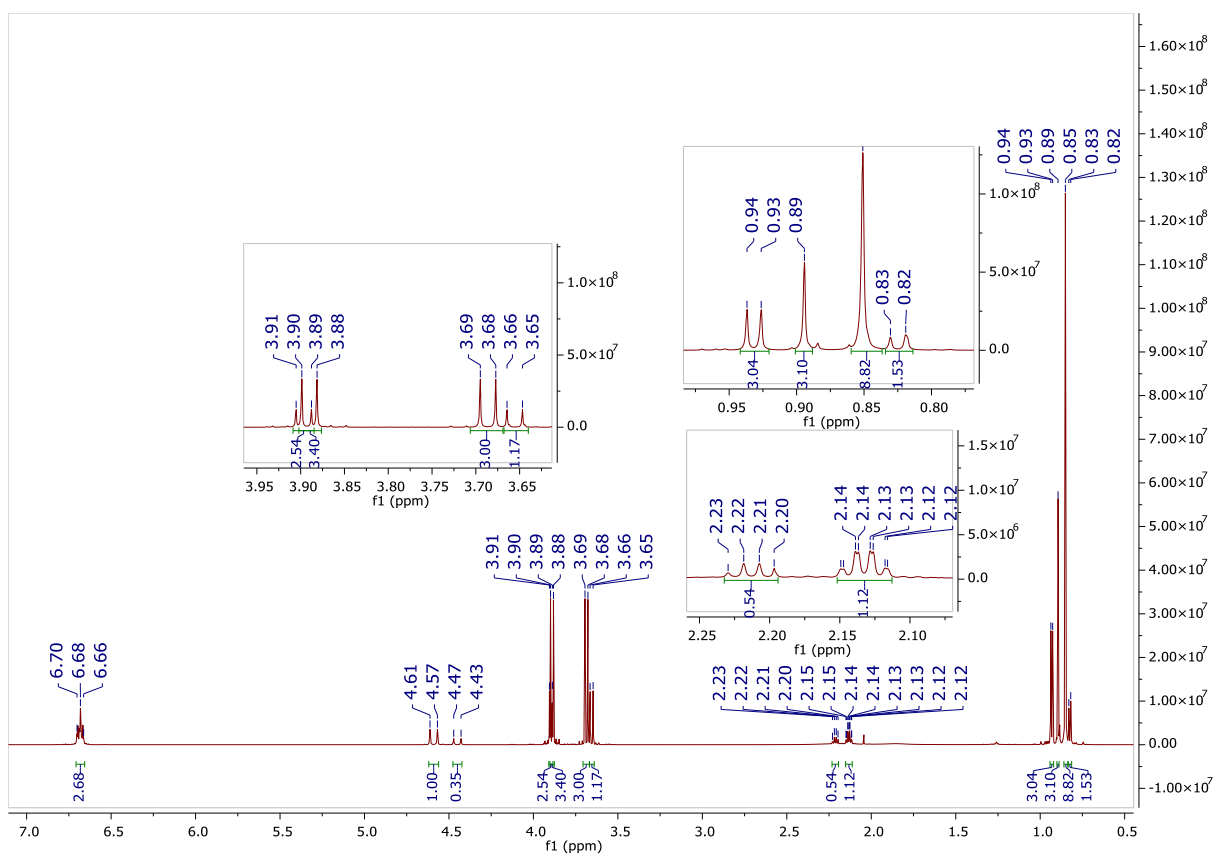
Rysunek 177. Widmo ^{19}F NMR związku 2.17 (CDCl_3).



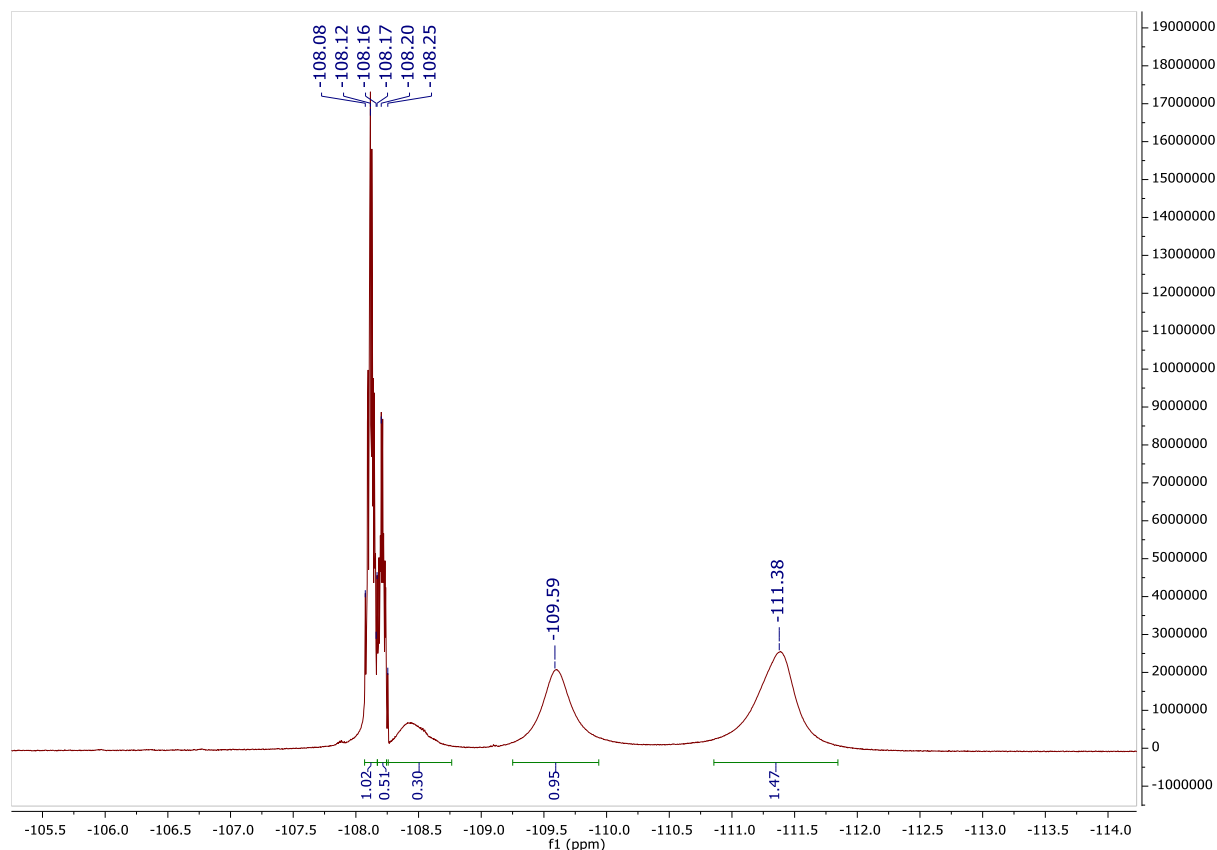
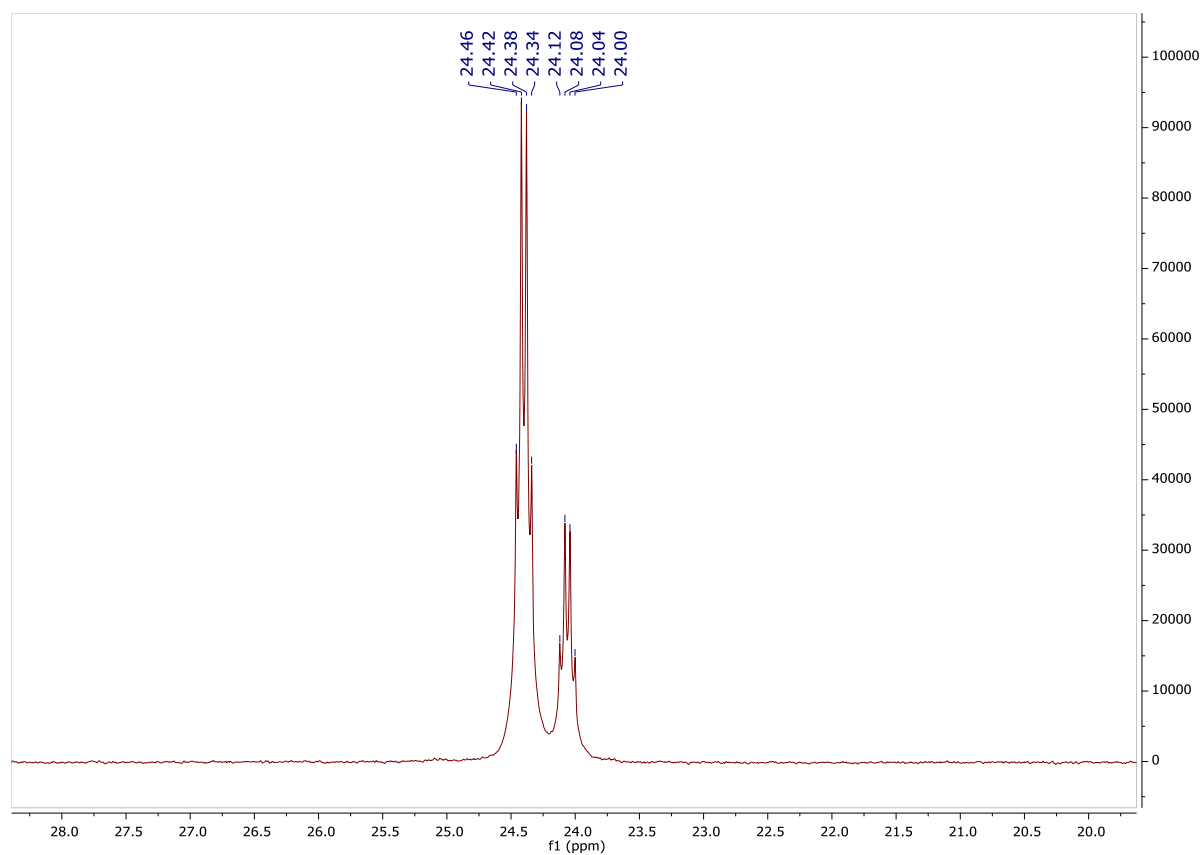
Rysunek 178. Widmo ^{31}P NMR związku 2.17 (CDCl_3).

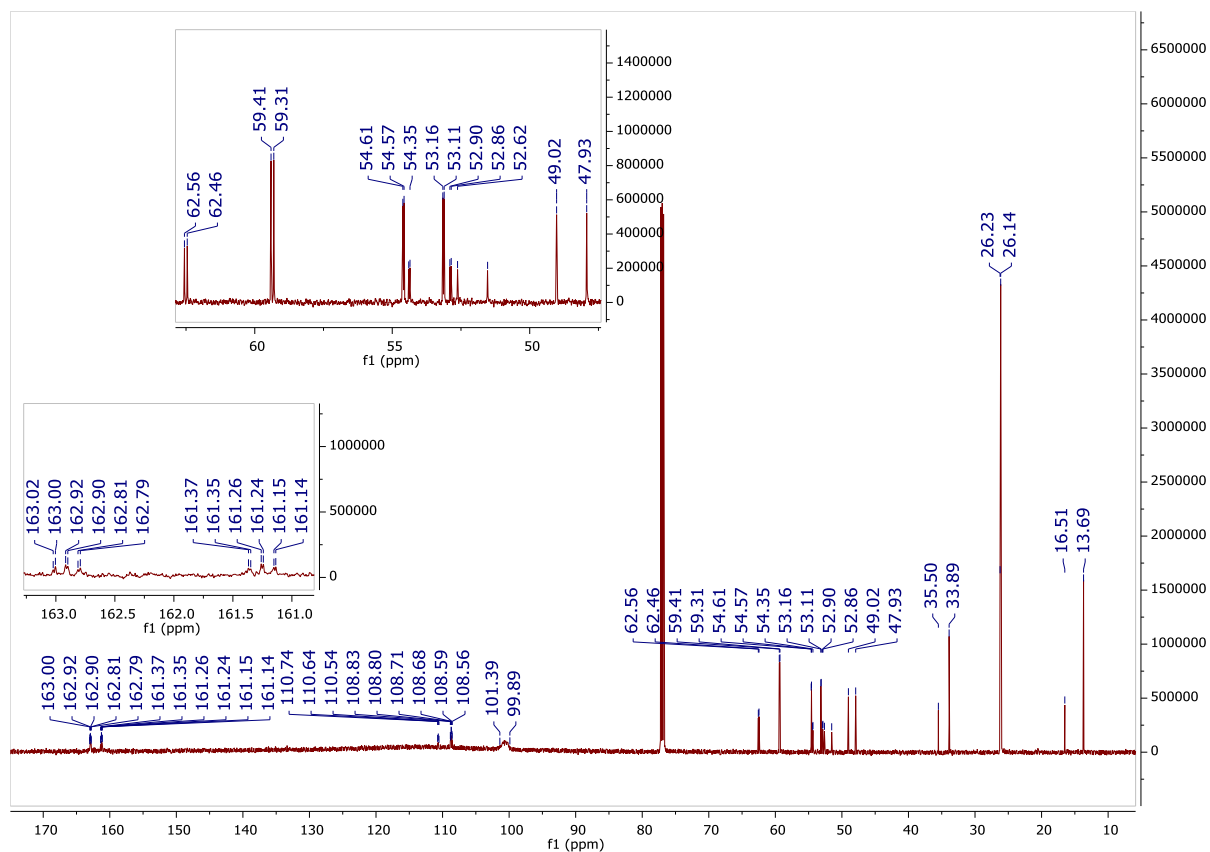


Rysunek 179. Widmo ^{13}C NMR związku 2.17 (CDCl_3).

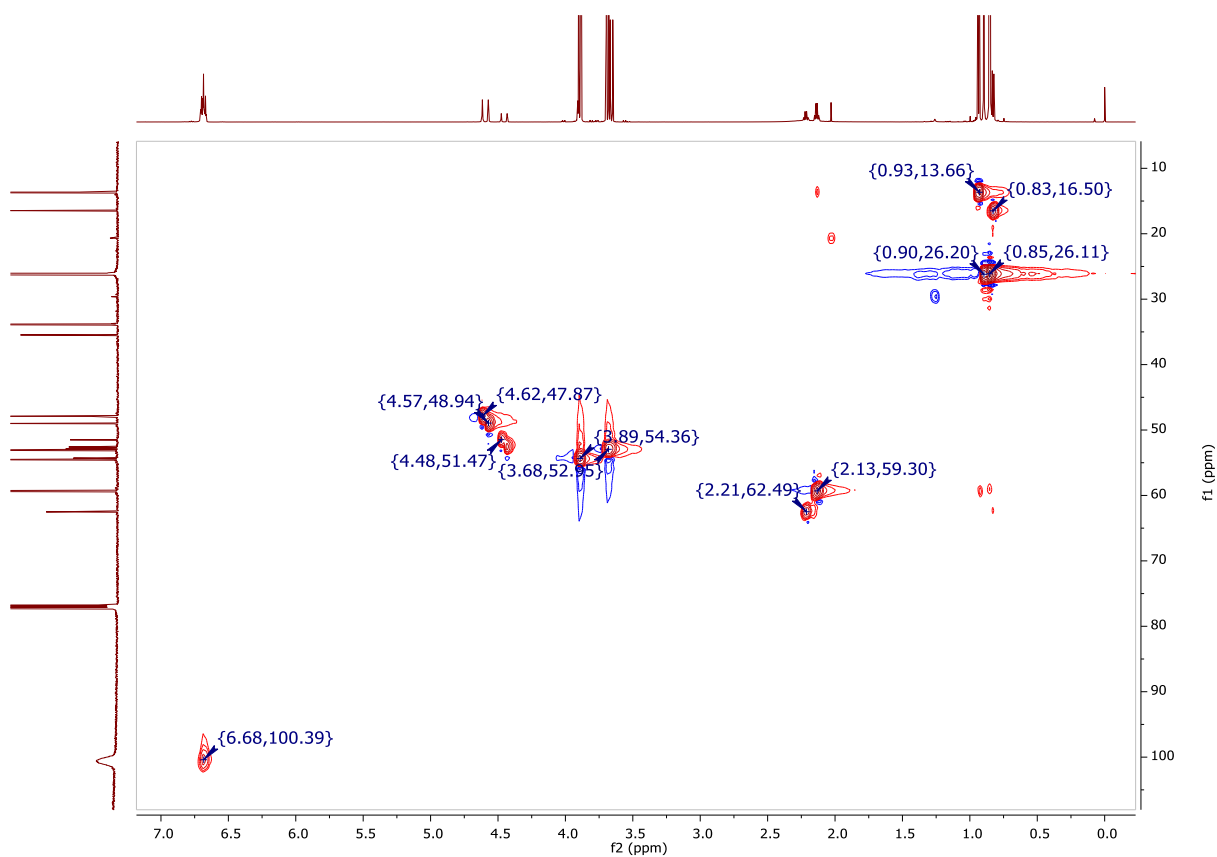


Rysunek 180. Widmo ^1H NMR związku 2.18 (CDCl_3).

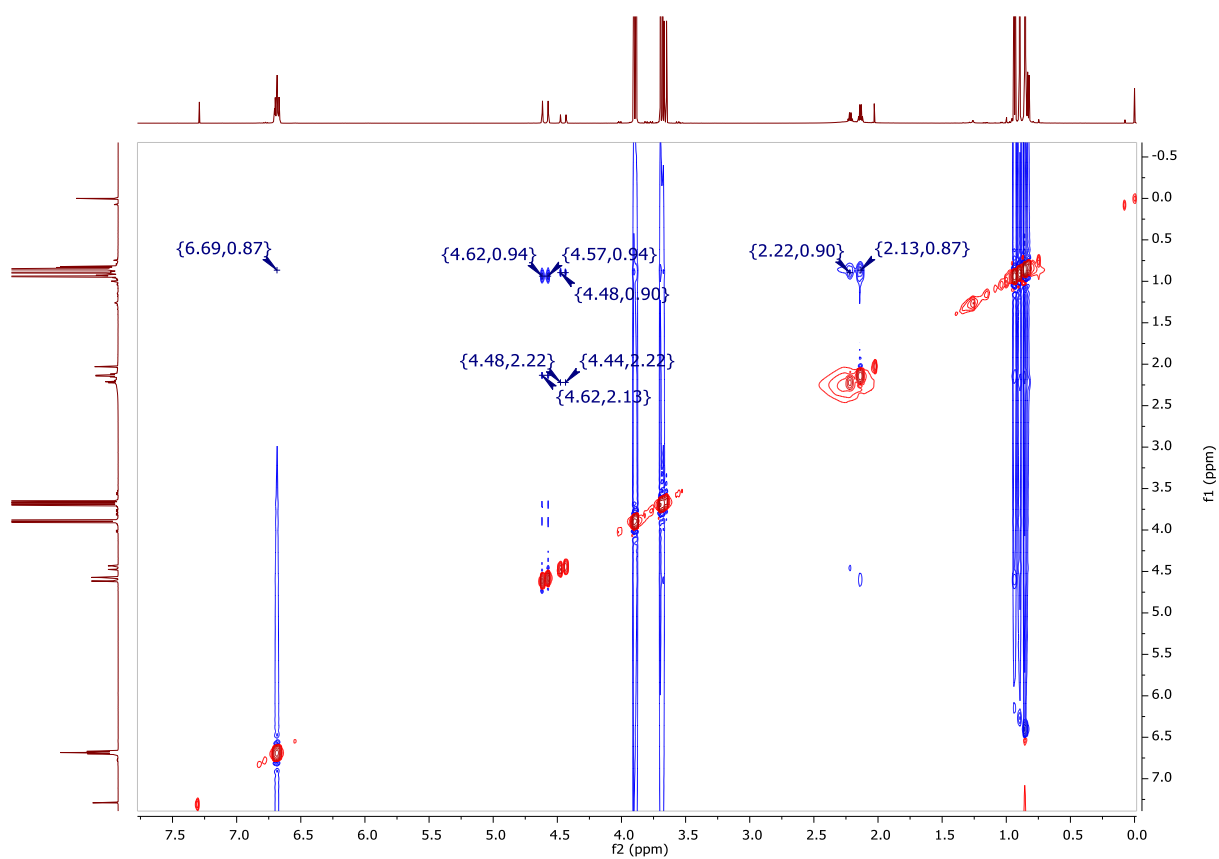
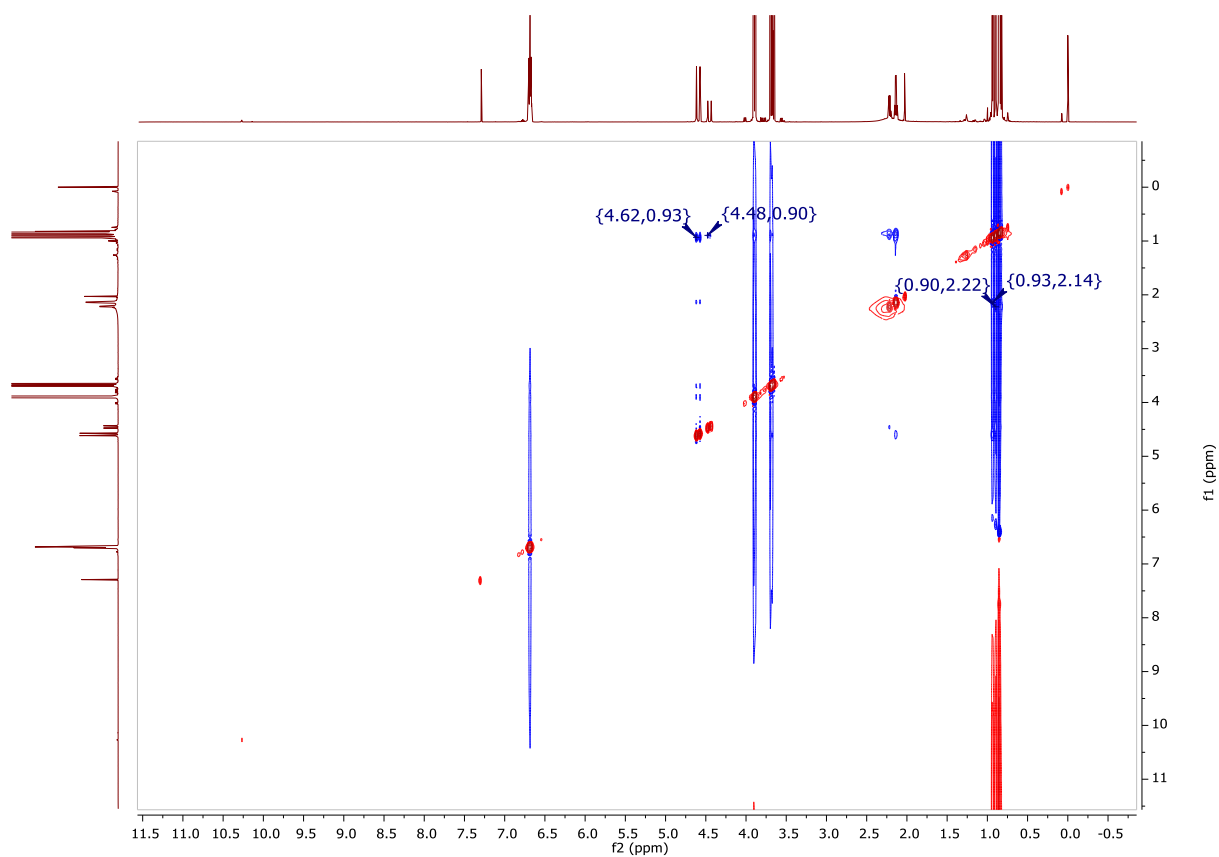
Rysunek 181. Widmo ^{19}F NMR związku 2.18 (CDCl_3).Rysunek 182. Widmo ^{31}P NMR związku 2.18 (CDCl_3).

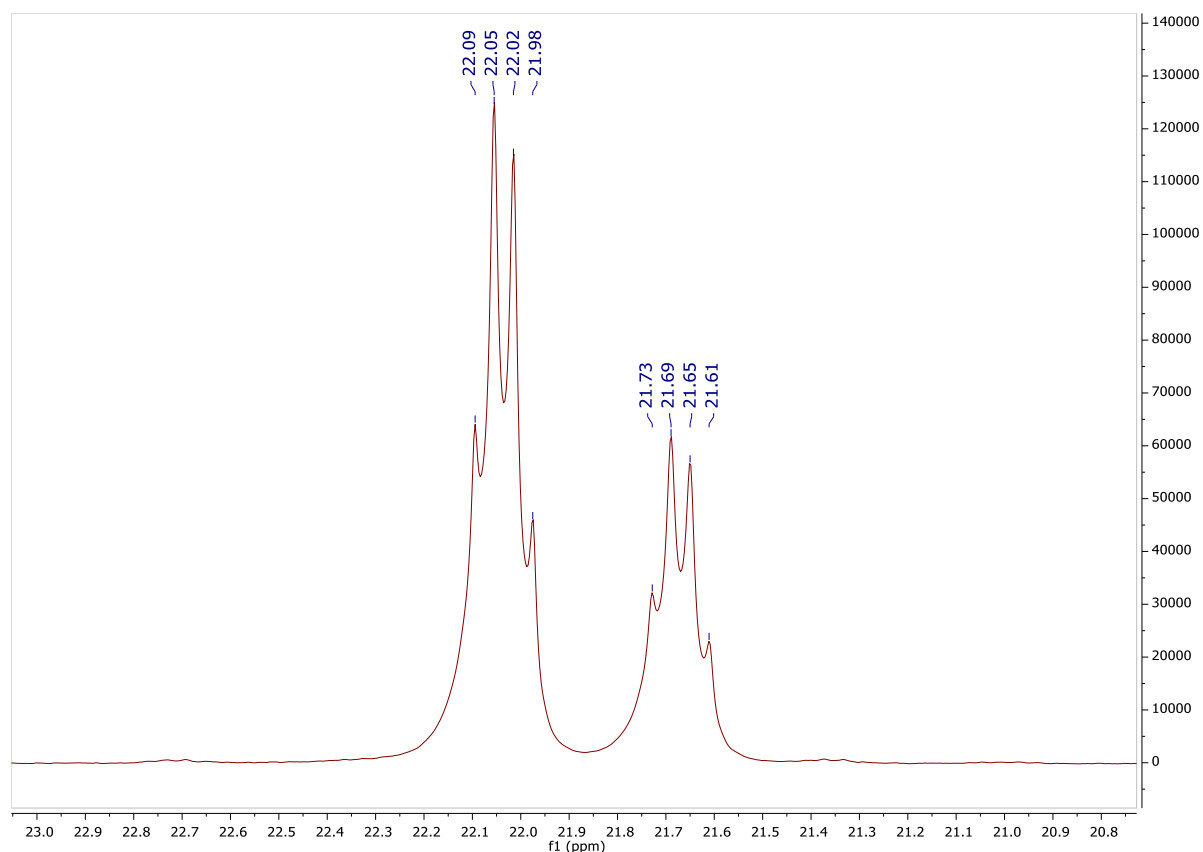


Rysunek 183. Widmo ¹³C NMR związku 2.18 (CDCl₃).

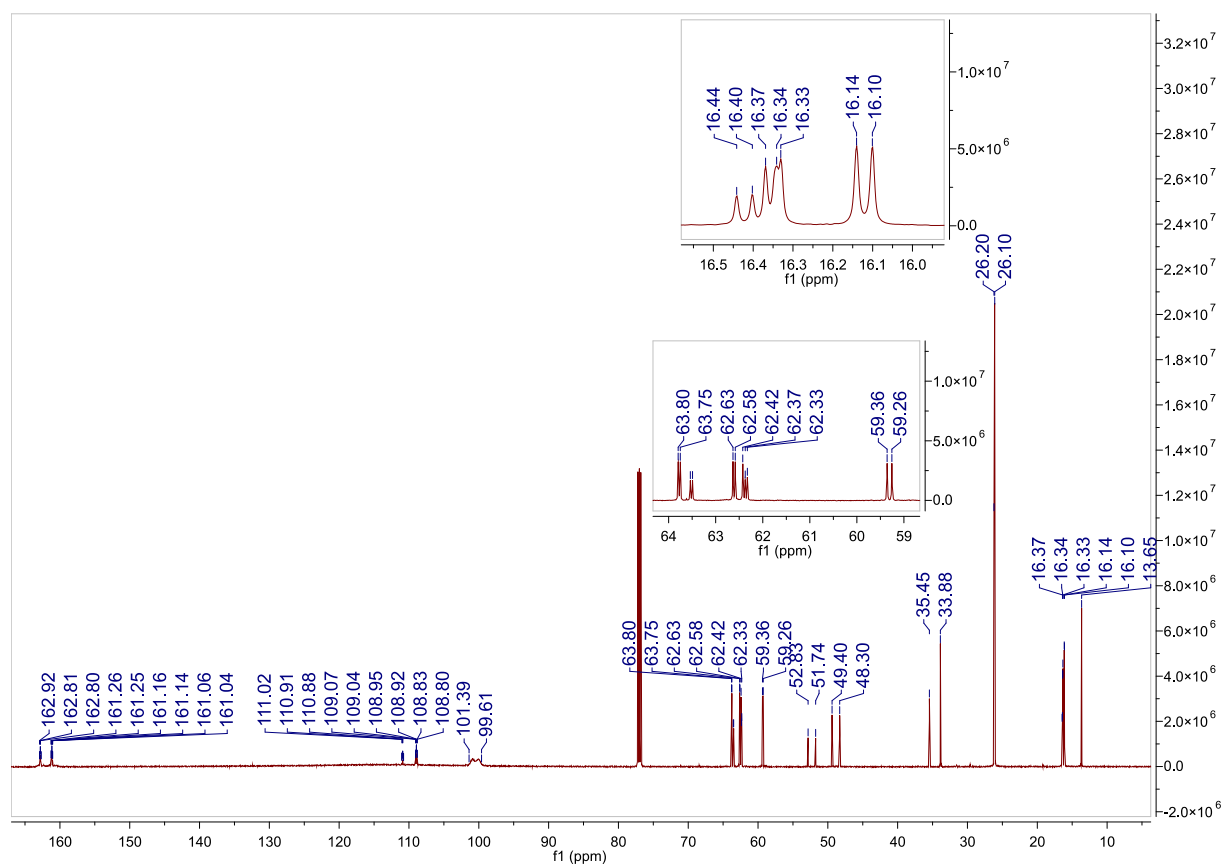


Rysunek 184. Widmo HSQC związku 2.18 (CDCl₃).

Rysunek 185. Widmo NOESY związku 2.18 (CDCl₃).Rysunek 186. Widmo NOESY związku 2.18 (CDCl₃).



Rysunek 189. Widmo ³¹P NMR związku 2.19 (CDCl₃).



Rysunek 190. Widmo ¹³C NMR związku 2.19 (CDCl₃).