

**Davide Ceradini**

# **MĒROGOJAMAS SINTĒZES IZSTRĀDE IZVĒLĒTIEM SERĪNA PROTEĀZES ūPA INHIBITORIEM**

Promocijas darba kopsavilkums

## **DEVELOPMENT OF SCALABLE SYNTHESIS FOR SELECTED PROTEASE ūPA INHIBITORS**

Summary of the Doctoral Thesis



**RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE**

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte  
Organiskās ķīmijas tehnoloģijas institūts

**RIGA TECHNICAL UNIVERSITY**

Faculty of Materials Science and Applied Chemistry  
Institute of Technology of Organic Chemistry

**Davide Ceradini**

Doktora studiju programmas “Ķīmija” doktorants  
Student of the Doctoral Program “Chemistry”

**MĒROGOJAMAS SINTĒZES IZSTRĀDE  
IZVĒLĒTIEM SERĪNA PROTEĀZES  $\alpha$ PA  
INHIBITORIEM**

**DEVELOPMENT OF SCALABLE SYNTHESIS FOR  
SELECTED SERINE PROTEASE  $\alpha$ PA INHIBITORS**

**Promocijas darba kopsavilkums  
Summary of the Doctoral Thesis**

Supervisor / Zinātniskais vadītājs  
Leading Researcher / Vadošais pētnieks *Dr. chem.*  
KIRILS ŠUBINS

Supervisor / Zinātniskais vadītājs  
Professor / Profesors *Dr. chem.*  
AIGARS JIRGENSONS

RTU Izdevniecība  
RTU Press  
Riga 2023

Ceradini D. Mērogojamas sintēzes izstrāde izvēlētiem  
serīna proteāzes uPA inhibitoriem.  
Promocijas darba kopsavilkums. –  
R.: RTU press, 2023. – 77 lpp.

Ceradini, D. Development of Scalable Synthesis for  
Selected Protease uPA Inhibitors.  
Summary of the Doctoral Thesis. –  
Riga: RTU Press, 2023. – 77 p.

Iespiests saskaņā ar RTU promocijas  
padomes “RTU P-01” 2023. gada  
13. janvāra lēmumu, protokols Nr. 04030-9.1/35.

Published in accordance with the decision  
of the Promotion Council “RTU P-01” of  
January 13, 2023, Minutes No. 04030-9.1/35.

<https://doi.org/10.7250/9789934228858>

ISBN 978-9934-22-885-8 (pdf)

**PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI  
RĪGAS TEHNISKĀJĀ UNIVERSITĀTĒ**

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2023. gada 13. aprīlī plkst. 14.00 Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Rīgā, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

*Dr. chem.* Aiva Plotniece, Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija

*Dr. Jurgen Joossens*, Antverpenes Universitāte, Beļģija

*Dr. chem.* Gints Šmits, Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Davide Ceradini ..... (paraksts)

Datums .....

Promocijas darbs rakstīts angļu valodā. Tajā ir ievads, literatūras apskats, rezultāti un diskusija, eksperimentālā daļa, secinājumi, 16 attēlu, 83 shēmas, 45 tabulas un četri pielikumi. Kopējais lappušu skaits ir 181, neskaitot pielikumus. Bibliogrāfijā ir atsauce uz 133 literatūras avotiem.

## SATURS

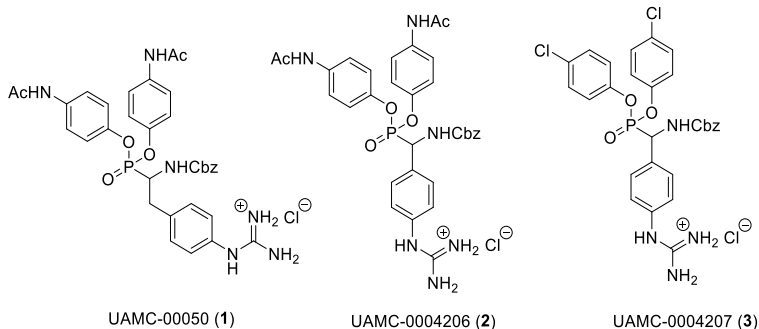
PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS .....	6
Ievads.....	6
Pētījuma mērķis un uzdevumi .....	7
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti.....	7
Darba struktūra un apjoms.....	8
Publikācijas un darba aprobācija .....	8
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI .....	9
Uzlabotas vairāku gramu UAMC-00050 (1) sintēzes izstrāde.....	9
Triarilfosfīta <b>5</b> iegūšana .....	10
Amino grupas Boc aizsardzība savienojumā <b>6</b> .....	11
Aldehīda <b>9</b> iegūšana.....	12
Biruma-Oleksišina reakcija.....	13
<i>N</i> -Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā <b>11</b> .....	14
Starpprodukta <b>21</b> guanilēšana .....	15
Galaprodukta UAMC-00050 (1) attīrīšana .....	18
Procesa metodes izstrāde UAMC-00050 (1) iegūšanai .....	18
Rezerves $\alpha$ -aminofosfonāts UAMC-0004206 (2) un koncepcijas pierādīšanas $\alpha$ - amino fosfonāts UAMC-0004207 (3) .....	19
UAMC-0004206 (2) Iegūšana un procesa optimizācija .....	20
Starpprodukta <b>25</b> iegūšana Biruma-Oleksišina reakcijā .....	20
<i>N</i> -Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā <b>25</b> .....	22
Starpprodukta <b>26</b> guanilēšana .....	22
<i>N</i> -Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā <b>28</b> un sāls pretjona apmaiņa savienojumā <b>31</b> .....	24
Procesa metodes izstrāde UAMC-0004207 (3) iegūšanai.....	25
Biruma-Oleksišina reakcija.....	26
<i>N</i> -Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā <b>34</b> .....	27
Starpprodukta <b>39</b> guanilēšana .....	28
<i>N</i> -Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā <b>37</b> .....	29
UAMC-00050 (1) Divu enantiomēru atdalīšana .....	30

$\alpha$ -aminofosfonātu stereoselektīva iegūšana .....	31
SECINĀJUMI.....	35
PATEICĪBAS .....	38

# PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

## Ievads

Sausās acs slimība (SAS), kas pazīstama arī kā *keratoconjunctivitis sicca*, ir daudzfaktoru acs virsmas slimība,<sup>1</sup> kas skar simtiem miljonu cilvēku visā pasaulē.<sup>2</sup> SAS attīstības riska faktori ir vecums, sieviešu dzimums, hormonālā nelīdzsvarotība, autoimūnas slimības, radzenes patoloģiska inervācija, vitamīnu trūkums, apkārtējās vides izraisīts stress, kontaktlēcu lietošana, infekcijas, medikamentu lietošana un oftalmoloģiskā ķirurģiskā iejaukšanās.<sup>3</sup> Slimību raksturo sausa, smilšaina vai dedzinoša sajūta acī, kā arī pārmērīga asarošana un fotosensitivitāte.<sup>4</sup> SAS ir iekaisuma slimība, kas ietver gan vielmaiņas, gan imūnsistēmas disregulāciju. Pieaugošā osmolaritāte asaru plēvē var izraisīt oksidatīvus apstākļus acs virsmā, kas aktivizē patoloģisku kaskādi. Nesen Antverpenes Universitātē izstrādāts jauns bioloģiski aktīvs  $\alpha$ -aminofosfonāts (UAMC-00050 (1), 1. att.) kā vadošais medikaments SAS ārstēšanā.<sup>5,6</sup> Molekula ir peptīda dabas difenilfosfonāts un neatgriezenisks serīna proteāzes inhibitors, kas enzīma aktīvajā centrā veido kovalentu saiti ar serīna sānu ķēdes hidroksilgrupu. Šāda veida savienojumu selektivitāte parasti tiek nodrošināta, amīnā iekļaujot peptīdu ķēdes. Savukārt *Joossens* u. c. pierādīja, ka spēcīgu un selektīvu inhibīciju var panākt arī ar maziem nepeptīdu difenilfosfonātiem.<sup>5</sup> Diarilfosfonāts UAMC-00050 (1) uzrāda labu inhibējošo aktivitāti pret urokināzes plazminogēna aktivatoru (uPA) un citām tripsīnam līdzīgām serīna proteāzēm, kas ir iesaistītas acu slimībās. Dzīvniekiem, kas ārstēti ar UAMC-00050 (1), pēc novērtēšanas ar nātrija fluoresceīnu novērots ievērojams acu virsmas bojājumu samazinājums, salīdzinot ar dzīvniekiem, kas nebija ārstēti, vai ar tādiem, kas ārstēti ar kontroles savienojumu vai ciklosporīnu. IL1 $\alpha$  un TNF $\alpha$  koncentrācijas asaru šķīdumā ievērojami samazinās arī ar UAMC-00050 (1) ārstētām žurkām. Turklāt ievērojami samazinās iekaisuma šūnu infiltrācija palpebrālajā acs saistenē (CD3 un CD45). Pro-Matricas metaloproteināze (pro-MMP9) uzkrāšanās un aktīvā MMP9 samazināšanās konstatēti asaru šķīdumā dzīvniekiem, kas ārstēti ar UAMC-00050 (1), un tas liecina, ka tripsīnam līdzīgajām serīna proteāzēm ir nozīme MMP9 aktivizēšanā acu iekaisuma gadījumā šajā dzīvnieku modelī. Lai nodrošinātu vairāk materiāla pirmsklīniskajiem pētījumiem, tika izstrādāta jauna vairāku gramu UAMC-00050 (1) sintēzes metode, uzlabojot kopējo iznākumu, procesa izmaksas un tā ietekmi uz vidi. Sekundārais mērķis bija nodrošināt divu  $\alpha$ -aminofosfonātu 3–5 g iegūšanu, kas ir līdzīgi UAMC-00050 (1): UAMC-0004206 (2), ko bija plānots izmantot kā rezerves savienojumu savienojumam UAMC-00050 (1), un UAMC-0004207 (3), kas tika izmantots, lai izpētītu 4-hlorfenilfosfonātu atvasinājumu aktivitāti. (1. att.). Tālāk promocijas darba autora mērķis bija veikt divu UAMC-00050 (1) enantiomēru atdalīšanu, lai noteiktu tīro izomēru bioloģisko aktivitāti. Šī mērķa sasniegšanai izstrādāta jauna enantioselektīvu un diastereoselektīvu metode  $\alpha$ -aminofosfonātu sintēzei.



1. att.  $\alpha$ -aminofosfonātu UAMC-00050 (1), UAMC-0004206 (2) un UAMC-0004207 (3) struktūras.

### Pētījuma mērķis un uzdevumi

Darba mērķis ir izstrādāt praktisku, efektīvu un drošu metodiku  $\alpha$ -aminofosfonātu iegūšanai: UAMC-00050 (1), UAMC-0004206 (2) un UAMC-0004207 (3).

Darba mērķa īstenošanai noteikti vairāki uzdevumi.

- 1) Izstrādāt metodi  $\alpha$ -aminofosfonāta UAMC-00050 (1) iegūšanai, kas var nodrošināt produkta vairāku gramu sintēzi ar reproducējamu kvalitāti. Metodei jābūt efektīvākai, drošākai un lētākai, salīdzinot ar iepriekš izstrādāto medicīniskās ķīmijas metodi.
- 2) Sintezēt 3–5 g rezerves  $\alpha$ -aminofosfonāta UAMC-0004206 (2) un koncepcijas pierādīšanas  $\alpha$ -aminofosfonāta UAMC-0004207 (3).
- 3) Izolēt divus UAMC-00050 (1) enantiomērus *in vitro* pētījumiem un izpētīt metodes UAMC-00050 (1) stereoselektīvai sintēzei.

### Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

- 1) Izstrādāta jauna metode  $\alpha$ -aminofosfonātu iegūšanai izmantojot  $Y(OTf)_3$  kā katalizatoru.
- 2) Izstrādāta uzlabota mērogojama metode  $\alpha$ -aminofosfonāta UAMC-00050 (1) iegūšanai vairāku gramu daudzumā.
- 3) Sintezēti  $\alpha$ -aminofosfonāti UAMC-0004206 (2) un UAMC-0004207 (3).
- 4) Diastereoselektīva metode  $\alpha$ -aminofosfonāta iegūšanai ar hirālu karbamātu pārbaudīta, izmantojot modeļsubstrātu. Metode nodrošināja atbilstoša  $\alpha$ -aminofosfonāta iegūšanu ar 28 % enantiomēro pārkumu.



## Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbā ir četras daļas. Pirmajā aprakstīta sintēzes optimizācija savienojuma UAMC-00050 (**1**) iegūšanai, otrajā aprakstīta optimizācija savienojuma UAMC-0004206 (**2**) iegūšanai, trešajā aprakstīta optimizācija savienojuma UAMC-0004207 (**3**) iegūšanai un ceturtajā aprakstīti savienojuma UAMC-00050 (**1**) stereoselektīvās sintēzes pētījumi.

## Publikācijas un darba aprobācija

Darba galvenie rezultāti apkopoti trīs zinātniskajās publikācijās, pētījuma rezultāti prezentēti trīs konferencēs.

### Zinātniskās publikācijas

- 1) Ceradini, D.; Shubin, K. One-pot synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates by yttrium-catalyzed Birum-Oleksyszyn reaction *RSC Adv.* **2021**, *11*, 39147–39152. doi.org/10.1039/D1RA07718J.
- 2) Ceradini, D.; Shubin, K. New methods for the synthesis of phosphono- $\delta$ -lactones (microreview). *Chem. Heterocycl. Compd.* **2021**, *57*, 1167–1169. doi.org/10.1007/s10593-021-03038-7.
- 3) Ceradini, D.; Cacivkins, P.; Ramos-Llorca, A.; Shubin, K. Improved Synthesis of the Selected Serine Protease uPA Inhibitor UAMC-00050, a Lead Compound for the Treatment of Dry Eye Disease. *OPRD* **2022**, *26*(10), 2937–2946. doi.org/10.1021/acs.oprd.2c00244.

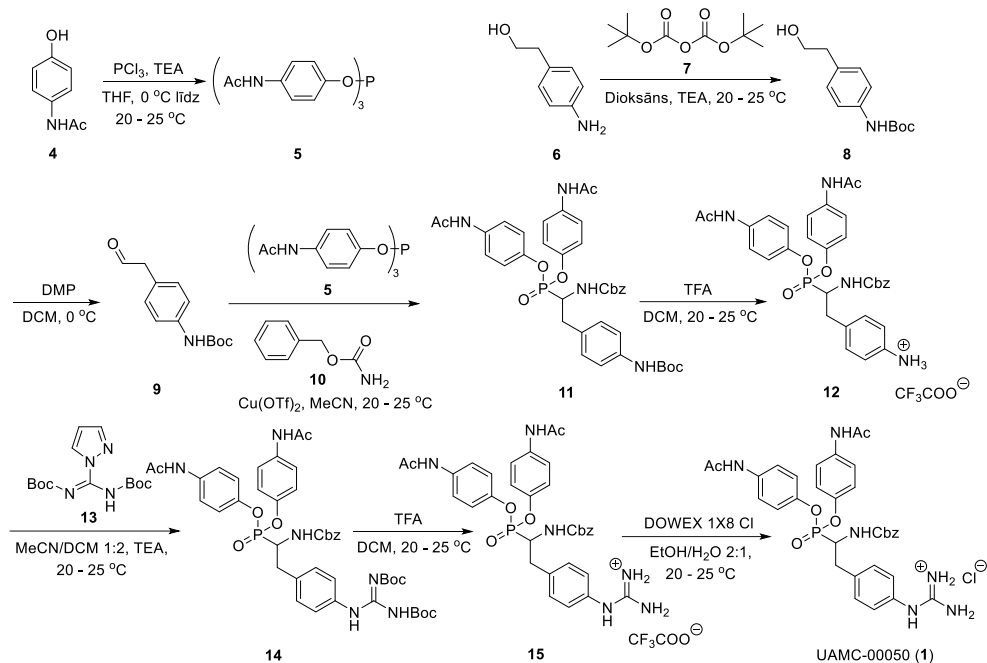
### Konferences

- 1) Process optimization of the synthesis of UAMC-00050, a novel uPA inhibitor, XXVI EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2021), kas notika virtuāli 2021. gada 29. augustā–2. septembrī.
- 2) Process optimization of the synthesis of UAMC-00050, a novel uPA inhibitor, Paul Walden 12<sup>th</sup> Symposium on Organic Chemistry, kas notika virtuāli 2021. gada 28.–29. oktobrī.
- 3) Upscaling of lead compounds from WP1 and enantioselective synthesis of theserine protease inhibitor UAMC-00050, Symposium DRY EYE DISEASE IT-DED<sup>3</sup> Consortium Meeting, kas notika Quinze-Vingts slimnīcas Redzes Institutā, Parīzē, Francijā, 2021. gada 2.–3. decembrī.

## PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

### Uzlabota vairāku gramu UAMC-00050 (1) sintēzes izstrāde

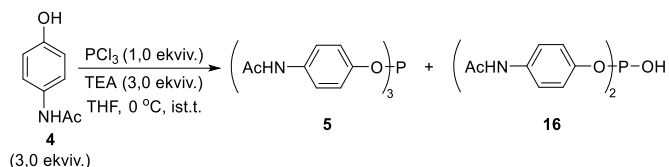
Medicīnas ķīmijas metode UAMC-00050 (1) sintēzei (1. shēma) vispirms atkārtota bez izmaiņām, izpildot sintēzi dažādos mērogos, no 100 mg līdz 17 g. Sintēze sākas ar amīna grupas aizsardzību 4-aminofenētīlspirtā (6) ar Boc<sub>2</sub>O trietilamīna (TEA) klātbūtnē. Tālāk seko spirta 8 oksidēšana par aldehīdu 9 ar Dess-Martin periodinānu (DMP). Molekulas 11 karkass izveidots viena reaktora trīskomponentu (Birum-Oleksyszyn) Biruma-Oleksišina reakcijā starp aldehīdu 9, benzilkarbamātu (10) un fosfītu 5, kā katalizatoru izmantojot vara triflātu.<sup>7-9</sup> Triarilfosfīts 5 iegūts no paracetamola (4) un izmantots nākamajā stadijā bez attīrīšanas. Pēc tam Boc grupa noņemta ar TFA/DCM 1:1, lai iegūtu sāli 12. Guanidīna atlikums ievadīts molekulā izmantojot *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīnu (13), divas Boc grupas noņemtas ar TFA/DCM 1:1, un trifluoracetāta sāls pretjons apmainīts pret hlorīdu pēc savienojuma 15 maisīšanas ar DOWEX 1X8 Cl sveķiem, lai iegūtu savienojumu 1. Pārbaudot medicīnas ķīmijas metodi, novērota virkne kritisko punktu, kas tiks apspriesti promocijas darbā. Veicot Biruma-Oleksišina reakciju, novērota reproducējamības problēma 4,3 mmol mērogā. Zems reakcijas iznākums (11 %) stipri ietekmēja kopējo metodes iznākumu (3 %), un šajā posmā radušos piemaisījumus bija grūti atdalīt no produkta. Savienojuma 5 tīrība ir izšķiroša, lai ierobežotu blakusproduktu veidošanos Biruma-Oleksišina posmā, jo skābie sadalīšanās produkti var nošķelt Boc grupu un izraisīt blakusproduktu veidošanos. DMP kā oksidētāja izmantošana aldehīda 9 iegūšanai nav piemērota liela apjoma sintēzēm zemas atomu ekonomijas un drošības apsvērumu dēļ.<sup>10</sup> Aizsargāta guanidīna 14 iegūšanai kā reaģents izmantots *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīns (13), kas tā cenas dēļ spēcīgi ietekmē procesa izmaksas. Neskatoties uz to, ka savienojuma 1 struktūra ir salīdzinoši vienkārša, ir tikai viens praktisks veids, kā to iegūt. Tāpēc tika nolemts saglabāt Biruma-Oleksišina reakciju neatkarīgi no tās sliktā iznākuma. Tika veikta apstākļu pārbaude, lai palielinātu produkta 11 iznākumu un tīrību. Bija nepieciešama plaša reakcijas apstākļu optimizācija, lai iegūtu un izdalītu fosfītu 5 tā nestabilitātes skābekļa un mitruma klātbūtnē dēļ. Lai iegūtu aldehīdu 9 ar augstāku drošību un uzlabotu atomu ekonomiju, pētītas dažādas DMP katalītiskās alternatīvas. Lai samazinātu izmaksas, pētītas *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīna (13) alternatīvas guanidīna daļas veidošanai savienojumā 14. Procesu masas intensitāte (*process mass intensity, PMI*) samazināta, izmantojot kolonnu hromatogrāfijas alternatīvas metodes starpproduktu attīrīšanā.



1. shēma. Medicīnas ķīmijas metode UAMC-00050 (**1**) sintēzei.

### Triarilfosfīta **5** iegūšana

Savienojums **5** iegūts saskaņā ar oriģinālajiem apstākļiem<sup>5</sup> ar nelielām modifikācijām (2. shēma). Triarilfosfīta **5** atdalīšana no galvenajiem piemaisījumiem (diarilfosfīts **16** un paracetamols (**4**)), izmantojot hromatogrāfisko atdalīšanu, izgulsnēšanu vai kristalizāciju, izrādījās sarežģīta. Tāpēc blakusprodukta daudzums samazināts pēc reakcijas apstākļu optimizācijas (piemēram, samazinot reakcijas laiku no 105 līdz 60 minūtēm). Tika konstatēts, ka izejas savienojumā esošais ūdens ir galvenais iemesls triarilfosfīta **5** samazinātai tīrībai. Izejas savienojuma **4** rūpīga žāvēšana vakuumā (5 mbar) vismaz 24 stundas ievērojami uzlaboja produkta **5** konversiju un tīrību. Atlikušais ūdens paracetamolā (**4**) veidoja 0,030 % (aprēķināts, izmantojot Karla Fišera titrēšanu). Pēc reakcijas optimizācijas 44 mmol iekrājumā fosfīts **5** iegūts ar 98 % iznākumu un 92,3 % tīrību, noteiktu ar augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfiju, izmantojot platības normalizācijas metodi (AIŠH).



2. shēma. Savienojuma **5** iegūšana: paracetamols (**4**) (3,0 ekviv.) reaģē ar  $\text{PCl}_3$  (1,0 ekviv.) tetrahidrofuranā, TEA (3,0 ekviv.) klātbūtnē, 0 °C temperatūrā.

### Aminogrupas Boc aizsardzība savienojumā **6**

Medicīnas ķīmijas metodē aminogrupas aizsardzība savienojumā **6** panākta, izmantojot di-*tert*-butildikarbonātu (1,1 ekviv.) TEA (1,0 ekviv.) klātbūtnē dioksānā (1. tab. 1. piem.).<sup>5</sup> Šī procesa attīstībā veiksmīgi izmantots literatūrā aprakstītais labākais reakcijas protokols<sup>11</sup> (kas neprasa TEA lietošanu). Savienojumu **6** apstrādāts ar 1,1 ekviv. di-*tert*-butildikarbonāta EtOAc 16 stundu laikā (1. tab., 2. piem.). Savienojuma **8** attīrīšana veiksmīgi panākta, izmantojot filtrēšanu caur silikagēlu kolonnu hromatogrāfijas vietā (1. tab., 3. piem.). Palielinot reakcijas mērogu līdz 73,0 mmol iekrājumam, silikagēla daudzums samazināts no 15,0 sv./sv. līdz 8,3 sv./sv. (1. tab., 4. piem.). Vēlāk konstatēts, ka arī kristalizācija ir piemērota metode savienojuma **8** attīrīšanai. Piecos dažādos apstākļos MeCN/MTBE maisījums 1:1 tilp./tilp. (šķīdinātājs/**8** = 1.5:1 tilp./sv.) nodrošināja produktu ar 98 % iznākumu un 99 % tīrību pēc AIŠH (1. tab., 5. piem.).

1. tabula

#### Savienojuma **8** iegūšanas optimizācija

Nr. p. k.	Šķīdinātājs	Iekrājumus (mmol)	Bāze	Attīrīšanas metode	Iznākums (%) <sup>a</sup>	Tīrība (%) <sup>b</sup>
1.	Dioksāns	37,00	TEA	Kolonnu hromatogrāfija	97	99
2.	EtOAc	37,00	–	Kolonnu hromatogrāfija	99	99
3.	EtOAc	37,00	–	Silikagēls ( $\text{SiO}_2/\mathbf{8} = 15:1$ sv./sv.)	95	99
4.	EtOAc	73,00	–	Silikagēls ( $\text{SiO}_2/\mathbf{8} = 8.3:1$ sv./sv.)	99	99
5.	EtOAc	73,00	–	Kristalizācija (MeCN/MTBE 1:1/ <b>8</b> = 1.5:1 tilp./sv.)	98	99

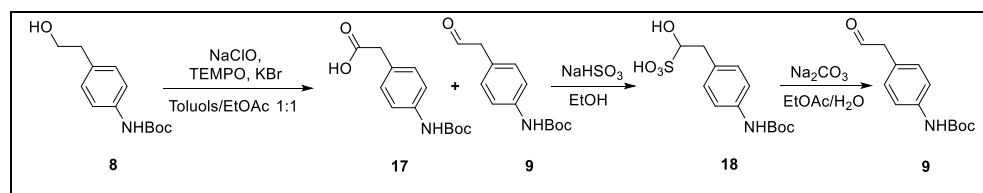
<sup>a</sup> Izdalīts iznākums. <sup>b</sup> Noteikts ar AIŠH.

## Aldehīda 9 iegūšana

Meklējot DMP alternatīvas aldehīda **9** iegūšanai, tika pārbaudīta virkne katalītisko apstākļu, kā primāros oksidētājus izmantojot gaisu/O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un NaClO. Diemžēl gaiss/O<sub>2</sub> ar (bpy)CuI/TEMPO<sup>12</sup> un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ar AlCl<sub>3</sub><sup>13</sup> vai KBr/TEMPO/*p*TsOH<sup>14</sup> nespēja nodrošināt produkta **9** iegūšanu. No otras puses, izmantojot 1,5 ekvivalentus NaClO un TEMPO, KBr un *n*Bu<sub>4</sub>Br katalītisko daudzumu,<sup>15, 16</sup> nodrošināta substrāta **8** 69 % konversija (2. tab., 1. piem.). Patīkami pārsteigti, palielinot NaClO ekvivalentu daudzumu līdz 1,8, tika panākta pilnīga spirta **8** konversija jau pēc 15 minūtēm (2. tab., 2. piem.). 2. piemēra apstākļi mērogoti līdz 4,22 mmol iekrājumam. Diemžēl pēc attīrīšanas produkts **9** iegūts ar zemu 31 % iznākumu ar karbonskābi **17** kā galveno piemaisījumu (2. tab., 3. piem.). Kā ziņo Anelli u. c.,<sup>18</sup> *n*Bu<sub>4</sub>NBr klātbūtne izraisa spirta **8** pāroksidāciju par skābi **17**. Iznākumu izdevās palielināt līdz 59 %, izņemot no reakcijas maisījuma ceturtdējo sāli (2. tab., 4. piem.). Iznākums palielināts līdz 71 %, kad TEMPO daudzums samazināts no 0,05 līdz 0,01 ekvivalentam un reakcijas laiks samazināts no 60 līdz 30 minūtēm (2. tab., 5. piem.). Tomēr pēc reakcijas mērogošanas līdz 37 mmol apjomam tika novērota iznākuma samazināšanās līdz 60 % (2. tab., 6. piem.). Samazinot NaClO daudzumu līdz 1,6 ekvivalentiem un reakcijas laiku līdz 15 minūtēm, tika iegūts savienojums **9** ar 66 % iznākumu (2. tab., 7. piem.). No attīrīšanas ar kolonnu hromatogrāfiju izdevās izvairīties, izmantojot bisulfīta adukta protokolu,<sup>17</sup> un savienojums **9** iegūts ar 99 % tīrību pēc AIŠH. Tomēr, kad šī attīrīšanas metode piemērota, sintezējot savienojumu **9** 73 mmol mēroga iekrājumā, novērota iznākuma samazināšanās (līdz 59 %; 2. tab., 8. piem.). Filtrāta pārbaude liecināja, ka to, visticamāk, izraisīja problēma ar lēnu adukta **18** veidošanos, nevis katalītisko oksidāciju. Neapstrādāta aldehīda reakcijas laika pagarināšana no 2 līdz 16 stundām ar NaHSO<sub>3</sub> ļāva pilnībā pārveidot aldehīdu **9** par starpproduktu **18**. Bisulfīta atvasinājums pārveidots atpakaļ par aldehīdu pēc reakcijas ar Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ūdens šķīdumu, nodrošinot savienojumu **9** ar 71 % iznākumu no savienojuma **8** ar tīrību 99,2 % pēc AIŠH (2. tab., 9. piem.).

2. tabula

### Optimizācija aldehīda **9** sintēzei



Nr. p. k. <sup>a</sup>	Spirts (mmol)	NaClO (ekviv.) <sup>b</sup>	TEMPO (ekviv.)	Laiks (min)	Bisulfīta ekstrakcija <sup>c</sup>	Konversija (%) <sup>d</sup>	Iznākums (%) <sup>e</sup>
1. <sup>f</sup>	0,42	1,5	0,05	120	–	69	N/A
2. <sup>f</sup>	0,42	1,8	0,05	15	–	100	N/A
3. <sup>f</sup>	4,22	1,8	0,05	15	2 st. 20–25 °C	100	31
4.	4,22	1,7	0,05	60	2 st. 20–25 °C	100	59

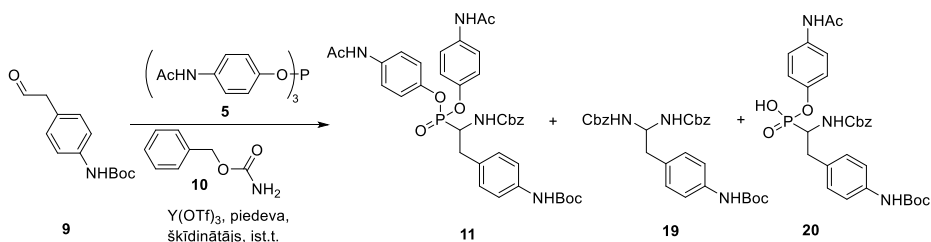
## 2. tabulas turpinājums

5.	4,22	1,7	0,01	30	2 st. 20–25 °C	100	71
6.	37,00	1,7	0,01	30	2 st. 20–25 °C	100	60
7.	37,00	1,6	0,01	15	2 st. 20–25 °C	100	66
8.	73,00	1,6	0,01	15	2 st. 20–25 °C	100	59
9.	73,00	1,6	0,01	15	16 st. 20–25 °C	100	71

<sup>a</sup> KBr (0,1 ekviv.); <sup>b</sup> 11–15 % NaClO ūdens šķīdums; <sup>c</sup> pirms filtrēšanas maisīts 1 stundu 0 °C temperatūrā; <sup>d</sup> noteikta ar <sup>1</sup>H KMR metodi; <sup>e</sup> izdalīts iznākums; <sup>f</sup> nBu<sub>4</sub>NBr (0,05 ekviv.).

## Biruma-Oleksišina reakcija

Viena reaktora trīskomponentu reakcija starp aldehīdu **9**, fosfītu **5** un benzilkarbamātu (**10**) ir galvenais posms savienojuma **1** sintēzē. Diemžēl, atkārtojot reakciju vairāku gramu mērogā, starpprodukts **11** iegūts ar zemu iznākumu (11 %). Turklāt piemaisījumi reakcijas maisījumā radīja attīrīšanas problēmas. Optimizācija sākās ar katalizatoru skrīningu – starp 18 Lūisa un Brensteda skābēm, Y(OTf)<sub>3</sub> spēja nodrošināt savienojuma **11** 42 % iznākumu un uzlabotu piemaisījumu profilu (3. tab., 1. piem.).<sup>18</sup> Tālāk tika veikta šķīdinātāja optimizācija. Veicot reakciju MeCN, tika novērota nogulšņu veidošanās, kas vēlāk identificētas kā amināls **19**. Astoņu reakcijas šķīdinātāju skrīnings atklāja, ka MeCN/THF maisījums 1:1 tilp./tilp. ir vispiemērotākais amināla **19** izšķīdināšanai, kas izraisīja 44 % savienojuma **11** iznākumu (3. tab., 2. piem.). Iznākumu izdevās vēl paaugstināt (līdz 45 %), palielinot koncentrāciju no 0,07 līdz 0,17 M (3. tab., 3. piem.). Pēc tam kā piedevas tika pārbaudīta virkne anhidrīdu, jo ir zināms, ka tie veicina līdzīgas reakcijas starp amināliem un alkilfosfonskābēm.<sup>19–22</sup> Ekvimolāri etiķskābes un trifluoretiķskābes anhidrīdu daudzumi spēja palielināt  $\alpha$ -aminofosfonāta **11** iznākumu attiecīgi līdz 50 % un 52 % (3. tab., 4. un 5. piem.).

3. shēma. Biruma-Oleksišina reakcija  $\alpha$ -aminofosfonāta **11** iegūšanai.

Šķīdinātāju un piedevu skrīnings savienojuma **11** sintēzei

Nr. p. k. <sup>a</sup>	Šķīdinātājs	Piedevas (1,0 ekviv.)	Konc. (M)	Savienojuma 11 iznākums (%) <sup>b</sup>	Savienojumu 11/20 attiecība
1.	MeCN	–	0,07	42	80,3:19,7
2.	MeCN/THF 1:1	–	0,07	44	81,3:18,7
3.	MeCN/THF 1:1	–	0,17	45	75,7:24,3
4.	MeCN/THF 1:1	Ac <sub>2</sub> O	0,17	50	80,4:19,6
5.	MeCN/THF 1:1	TFAA	0,17	52	75,7:24,3

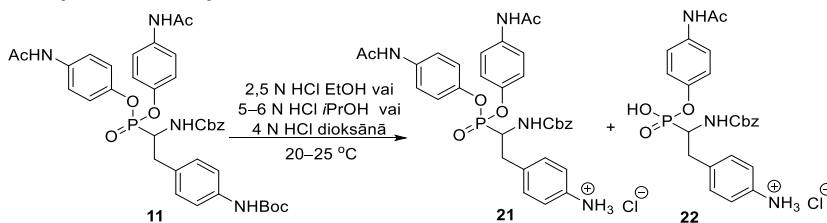
<sup>a</sup>Aldehīds **9** (1,0 ekviv.), benzilkarbamāts (**10**) (1,0 ekviv.), fosfīts **5** (1,0 ekviv.), 4,3 mmol iekrāvums, reakcijas norise četras stundas; <sup>b</sup> izdalīts iznākums.

Reakcijas beigās paracetamols (**4**), diarilfosfīts **16**, monoarilfosfonāts **20** un amināls **19** veidoja galvenos piemaisījumus. Neapstrādāta jēlsavienojuma bāziskā mazgāšana ar 0,5 M NaOH ūdens šķīdumu ļāva gandrīz pilnībā atbrīvoties no skābajiem piemaisījumiem, t. i., paracetamola (**4**) monoarilfosfonāta **20** un diarilfosfīta **16**. Filtrēšana caur silikagēlu ļāva atbrīvoties no amināla **19** un citiem lipofīliem piemaisījumiem. Šādas attīrīšanas rezultātā iegūts  $\alpha$ -aminofosfonāts **11** ar 64,2 % tīrību pēc AIŠH. Pēc bāziskās mazgāšanas jēlsavienojumā joprojām palika aptuveni 8,3 % paracetamola (**4**) pēc AIŠH datiem. Bāziskā ūdens šķīdumā izgulsnēšana ar pretšķīdinātāju ļāva atbrīvoties no atlikušā blakusprodukta **4**. Jēlsavienojuma **11** šķīdumam acetonā pa pilienam pievienoja 0,5 % NaHCO<sub>3</sub> ūdens šķīdumu. Nogulsnes izdalītas ar 82,3 % AIŠH tīrību. Tālāk tika veikta krāsaino piemaisījumu noņemšana. Tika pārbaudīti deviņi dažādu aktivētas ogles veidi, diemžēl neviens no tiem nespēja noņemt krāsainos piemaisījumus. Tad kā attīrīšanas metode tika izmēģināta suspendēšana/mazgāšana. Neapstrādātais savienojums tika suspendēts EtOAc/acetona 19:1 maisījumā. Pēc 16 stundu maisīšanas savienojums **11** izolēts no mātes šķīduma ar 98 % tīrību pēc AIŠH. Reakcija un attīrīšanas protokoli (t. i., bāziskā mazgāšana, filtrēšana caur silikagēlu, izgulsnēšana ar pretšķīdinātāju un suspendēšana/mazgāšana) pārbaudīti ar 10,00 g (43 mmol) aldehīda **9** iekrāvumu, nodrošinot  $\alpha$ -aminofosfonātu **11** ar 44 % iznākumu un 98,2 % tīrību pēc AIŠH.

**N-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā 11**

TFA/DCM 1:1 šķīdums izmantots, lai nošķeltu Boc aizsarggrupu savienojumā **11** medicīnas ķīmijas metodē. HCl izpētīta kā ekonomiskāka alternatīva TFA, turklāt rezultātā veidojās mazāk higroskopiskā HCl sāls (**6**. shēma). Sākotnēji kā šķīdinātājs, kas spēj izšķīdināt savienojumu **11**, tika izmantots 2,5 N HCl etanolā. Tomēr reakcijas beigās reakcijas maisījumā tika konstatēta neliela monoarilsavienojuma **22** klātbūtne. Līdzīga problēma novērota, izmantojot 5–6 N HCl un *i*PrOH. Tāpēc substrāts **11** apstrādāts ar 4 N HCl dioksānā trīs stundas. Anilīna hidrohlorīds **21** izolēts no reakcijas maisījuma ar izgulsnēšanu ar pretšķīdinātāju no EtOH šķīduma, kas maisīts ar 10 reizes lielāku EtOAc tilpumu 20–25 °C temperatūrā. Optimizācijas

rezultātā atrastie apstākļi piemēroti paaugstināta mēroga *N*-Boc aizsarggrupas nošķelšanai un reakcijas maisījuma apstrādei. Anilīna hidrohlorīds **21** iegūts ar 99 % iznākumu un 97,9 % tīrību pēc AIŠH, kā izejvielu izmantojot 14 mmol  $\alpha$ -aminofosfonāta **11**.

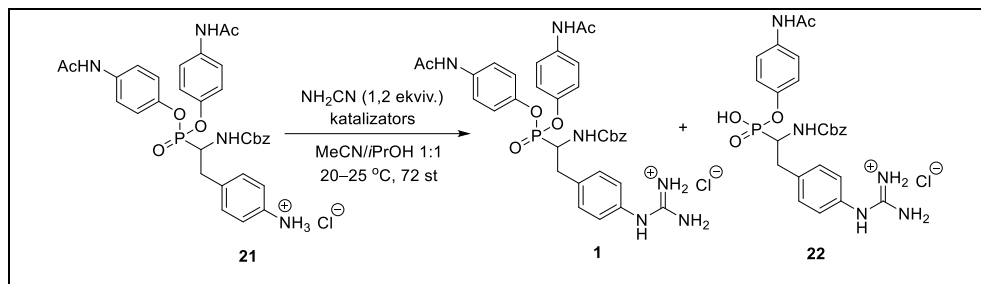


4. shēma. *N*-Boc nošķelšana savienojumā **11** HCl vidē.

### Starpprodukta **21** guanilēšana

Medicīnas ķīmijas metodē galaprodukts **1** iegūts no anilīna TFA sāls **12**, guanilgrupu molekulā ievadot ar *N,N*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīnu (**13**). Šai reakcijai sekoja Boc grupas nošķelšana ar TFA/DCM un sāls pretjona apmaiņa ar DOWEX 1X8 Cl sveķiem, lai starpproduktu **15** pārvērstu par produktu **1**. Lai samazinātu stadiju skaitu, tika pārbaudīts tiešs veids, kā anilīna HCl sāli **21** pārvērst produktā **1**. Literatūrā ir atrodamas anilīna tiešas pārvērtības par arilguanidīnu.<sup>23-28</sup> No tām izvēlējamies guanilēšanu ar NH<sub>2</sub>CN, lai izstrādātu protokolu ar labāko atomu ekonomiju un zemākām izmaksām.<sup>23, 24</sup> Sākotnēji anilīna sāls **21** guanilēšana tika veikta ar 1,2 ekvivalentiem NH<sub>2</sub>CN 0,1 ekvivalenta Sc(OTf)<sub>3</sub> klātbūtnē dažādos šķīdinātājos vai šķīdinātāju maisījumos istabas temperatūrā. Noskaidrots, ka MeCN/*i*PrOH 1:1 ir visoptimālākā reakcijas vide, kas nodrošina 38 % anilīna sāls **21** konversiju 72 stundās (4. tab., 1. piem.). Izmantojot optimizēto šķīdinātāju, tālāk tika pārbaudīta virkne skābju katalītiskā vai ekvimolārā daudzumā. Lūisa skābes, piemēram, Bi(OTf)<sub>3</sub> un Y(OTf)<sub>3</sub> (4. tab., 2. un 3. piem.) un Brensteda skābes, piemēram, HCl, HNO<sub>3</sub> un AcOH (4. tab., 4.-6. piem.), nespēja nodrošināt labāku konversiju, salīdzinot ar Sc(OTf)<sub>3</sub>. Pirms turpināt optimizāciju, tika izstrādāta produkta **1** izdalīšanās un attīrīšanas metode. Produkts **1** izdalīts kā cieta viela pēc jēlsavienojuma EtOH šķīduma pilināšanas 10 reizes lielākam *i*PrOAc tilpumam, maisot 20–25 °C temperatūrā.



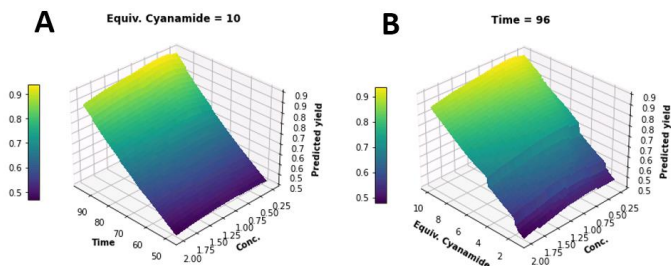
Katalizatora optimizācija tiešai savienojuma **21** guanilēšanai

Nr. p. k. <sup>a</sup>	Katalizators	Katalizatora ekviv.	Konversija (%) <sup>b</sup>
1.	Sc(OTf) <sub>3</sub>	0,1	38
2.	Bi(OTf) <sub>3</sub>	0,1	34
3.	Y(OTf) <sub>3</sub>	0,1	25
4.	HCl	1,0	8
5.	HNO <sub>3</sub>	1,0	40
6.	AcOH	1,0	11

<sup>a</sup>Anilīns **21** (0,08 mmol), NH<sub>2</sub>CN (1,2 ekviv.), 1,0 M koncentrācija, 72 stundas, MeCN/*i*PrOH 1:1;

<sup>b</sup>noteikta ar AIŠH.

Ņemot vērā sākotnējā skrīninga rezultātus, tika pieņemts, ka trīs mainīgajiem apstākļiem (t. i., koncentrācijai, reakcijas laikam un NH<sub>2</sub>CN ekvivalentiem) varētu būt vislielākā ietekme uz reakcijas iznākumu. Izvēlējamies eksperimenta plānošanas pieeju (*Design of Experiment, DoE*), lai vienlaikus izpētītu visus trīs mainīgos lielumus un rezultātā noteiktu jebkādu mijiedarbību starp tiem. Trīs mainīgo lielumu robežas noteiktas šādas: 0,1–2,0 M koncentrācija, 1,2–10,0 ekvivalenti NH<sub>2</sub>CN un reakcijas laiks 48–96 stundas. *DoE* tika veikta ar mākslīgā intelekta tīmekļa programmatūras *xT SAAM* palīdzību.<sup>29</sup> Programma izmanto stohastiskās optimizācijas metodes, lai sagatavotu ieteikumus nākamajiem eksperimentiem, līdz tiek sasniegts mērķis. Šajā gadījumā mērķis bija maksimāli palielināt galaprodukta iznākumu. Kopumā veikti 22 eksperimenti, kas sadalīti četrās secīgās paralēlo eksperimentu iterācijās. Tika apkopotas ienesīguma vērtības, un programmatūra, izmantojot automatizētu mehānismu, ģenerēja galīgo modeli. No atbildes virsmas modeļa (*Response Surface Model, RSM*; 2. att.) tika novērots, ka vislabāko iznākumu var iegūt pie 0,5 M koncentrācijas ar 10,0 ekvivalentiem NH<sub>2</sub>CN un maksimāli palielināta laika.



2. att. Cianamīda guanilēšanas reakcijas produkta **1** iznākums, kas prognozēts *RSM* modelī, reakcijas vide – *i*PrOH/MeCN 1:1; A: cianamīda ekvivalenti – 10,0; B: reakcijas laiks – 96 stundas. Dzeltenie apgabali norāda maksimālo paredzamo iznākumu.

Optimizētos apstākļos (0,5 M koncentrācija, 10,0 ekvivalenti  $\text{NH}_2\text{CN}$ , reakcijas laiks 96 stundas) konversija uzlabota līdz 95 %, nelielā mērogā (0,08 mmol) galaprodukts **1** iegūts ar 86 % iznākumu un 89 % tīrību pēc AIŠH (5. tab., 1. piem.). Tomēr, palielinot reakcijas mērogu līdz 0,77 mmol, tika novērota konversijas samazināšanās un līdz ar to arī iznākuma un tīrības samazināšanās (5. tab., 2. piem.).  $\text{NH}_2\text{CN}$  ekvivalentu palielināšana līdz 15,0 bija nepieciešama, lai saglabātu izejvielas **21** konversiju 95 % līmenī (5. tab., 3. piem.). Otrajā reakcijas šķīdinātāju skrīningā tika konstatēts, ka THF/EtOH 2:1 maisījums, 10,0 ekvivalenti  $\text{NH}_2\text{CN}$  gan 0,77, gan 7,7 mmol mērogā spēja nodrošināt 95 % konversiju (5. tab., 4. un 5. piem.). 7,7 mmol mērogā anilīna **21** tieša guanilēšana THF/EtOH 2:1 maisījumā ar 10,0 ekvivalentiem  $\text{NH}_2\text{CN}$  nodrošināja savienojumu **1** ar 90,0 % iznākumu un 91,0 % tīrību pēc AIŠH. Starp galaprodukta piemaisījumiem tika identificēta neliela monoarilfosfonāta **22** klātbūtne, kas pēc AIŠH sasniedza 0,4–1,1 %.

5. tabula

Šķīdinātāja optimizācija tiešai savienojuma **21** guanilēšanai

Nr. p. k. <sup>a</sup>	Iekrāvums (mmol)	Šķīdinātājs	$\text{NH}_2\text{CN}$ (ekviv.)	Iznākums (%) <sup>b</sup>	Tīrība (%) <sup>c</sup>
1.	0,08	MeCN/ <i>i</i> PrOH 1:1	10	86	89
2.	0,77	MeCN/ <i>i</i> PrOH 1:1	10	77	85
3.	0,77	MeCN/ <i>i</i> PrOH 1:1	15	83	88
4.	0,77	THF/EtOH 2:1	10	89	91
5.	7,7	THF/EtOH 2:1	10	90	91

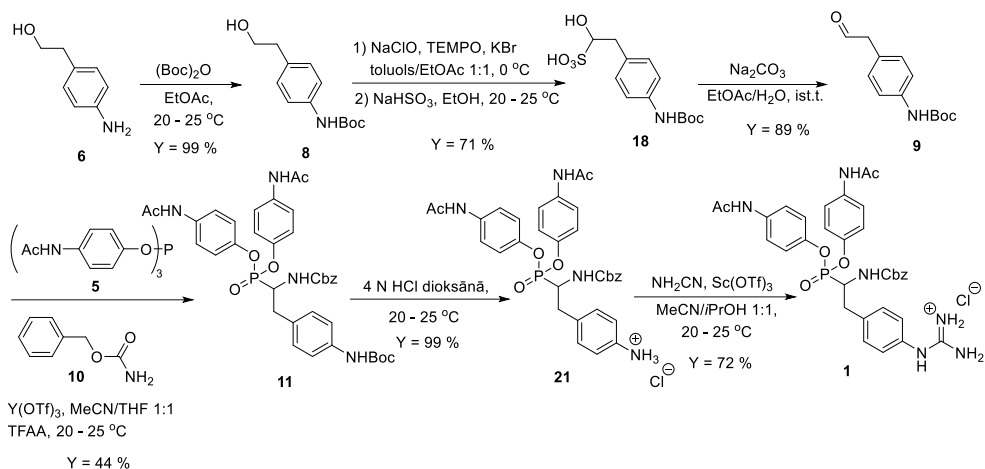
<sup>a</sup> Sc(OTf)<sub>3</sub> (0,1 ekviv.) kā katalizators, 96 st, 0,5 M; <sup>b</sup> izdalīts iznākums; <sup>c</sup> noteikta ar AIŠH.

## Galaprodukta UAMC-00050 (1) attīrīšana

Sākumā tika mēģināts kristalizēt neapstrādātu produktu **1**, tomēr ne ar vienu no 17 pārbaudītajiem šķīdinātājiem nevarēja iegūt tīru savienojumu **1**. Ņemot vērā šos rezultātus, tika izmantotas citas attīrīšanas metodes. Tika nolemts pārbaudīt produkta **1** izgulsnēšanu ar virkni pretšķīdinātāju, lai noskaidrotu, vai ir iespējams palielināt tīrību. Jēlsavienojuma **1** šķīdums absolūtā EtOH pievienots pa pilienam septiņiem dažādiem pretšķīdinātājiem. No pieciem organiskajiem šķīdinātājiem un diviem ūdens šķīdumiem tikai *i*PrOAc un EtOAc spēja nedaudz palielināt tīrību, bet ne pietiekami, lai sasniegtu 98 % tīrības mērķi. Visbeidzot, tika pētīta apgrieztais fāzes hromatogrāfija galaprodukta **1** attīrīšanai. Pēc virknes eluentu skrīninga izvēlēts ūdens/(MeCN/EtOH 9:1) gradients. Savienojums **1** veiksmīgi izolēts, izmantojot C18 RP kolonnu. Attīrīšanas metode pārbaudīta 3,75 g mērogā, iegūstot savienojuma **1** divās frakcijās – S1 ar tīrību 98,1 % pēc AĪŠH un S2 ar tīrību 99,4 % pēc AĪŠH. Tīrs materiāls reģenerēts ar 79 % iznākumu no jēlprodukta, kopējais  $\alpha$ -aminofosfonāta **1** iznākums no anilīna **21** – 72 %.

## Procesa metodes izstrāde UAMC-00050 (1) iegūšanai

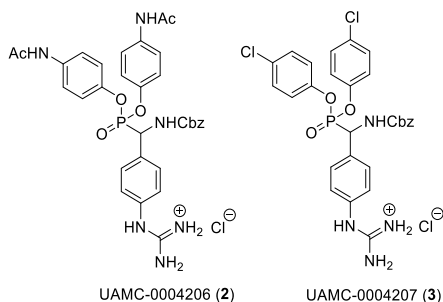
Promocijas darba gaitā ir izstrādāts optimizēts process  $\alpha$ -aminofosfonāta UAMC-00050 (**1**) mērogojamai iegūšanai. Metodes galvenā izejviela – aldehīds **9** iegūts saskaņā ar Anelli-Montanari protokolu, izmantojot NaClO kā primāro oksidētāju un TEMPO/KBr kā katalītisko sistēmu. Iznākums palielināts no 65 % līdz 71 %, un atomu ekonomija uzlabota no 33 % līdz 66 %. Optimizēta Biruma-Oleksišina reakcija galvenā starpprodukta **11** iegūšanai. Y(OTf)<sub>3</sub> kā katalizatora, TFAA kā piedevas un MeCN/THF 1:1 kā reakcijas vides kombinācija palielināja iznākumu no 11 % līdz 44 %. Savienojuma **11** attīrīšana panākta, izmantojot metodes, kas alternatīvas kolonnu hromatogrāfijai, piemēram, bāziskā ekstrakcija, suspendēšana/mazgāšana, izgulsnēšana ar pretšķīdinātāju. Produkta **1** iegūšanai izmantota mākslīgajā intelektā balstīta programmatūra (*xT-SAAM*), lai uzlabotu produkta **1** iegūšanu pēc metodes, kur kā reaģents lietots cianamīds. Optimizētā reakcija izmantota, lai aizstātu dārgo *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamīdīnu, samazinot UAMC-00050 (**1**) iegūšanas izmaksas. Izstrādātajā optimizētajā procesa metodē izdevās atteikties no hlorētu šķīdinātāju izmantošanas un starpproduktu tīrīšanas ar kolonnu hromatogrāfiju. Lai sasniegtu mērķa tīrību > 98 %, kolonnu hromatogrāfija bija nepieciešama tikai gala savienojuma attīrīšanai. Jaunais vairāku gramu process uzlaboja savienojuma **1** kopējo iznākumu no 3 % medicīnas ķīmijas ceļā līdz 22 % kopā sešās stadijās (5. shēma).



5. shēma. Savienojuma UAMC-00050 (**1**) optimizēta sintēzes metode.

### Rezerves $\alpha$ -aminofosfonāts UAMC-0004206 (**2**) un koncepcijas pierādīšanas $\alpha$ -aminofosfonāts UAMC-0004207 (**3**)

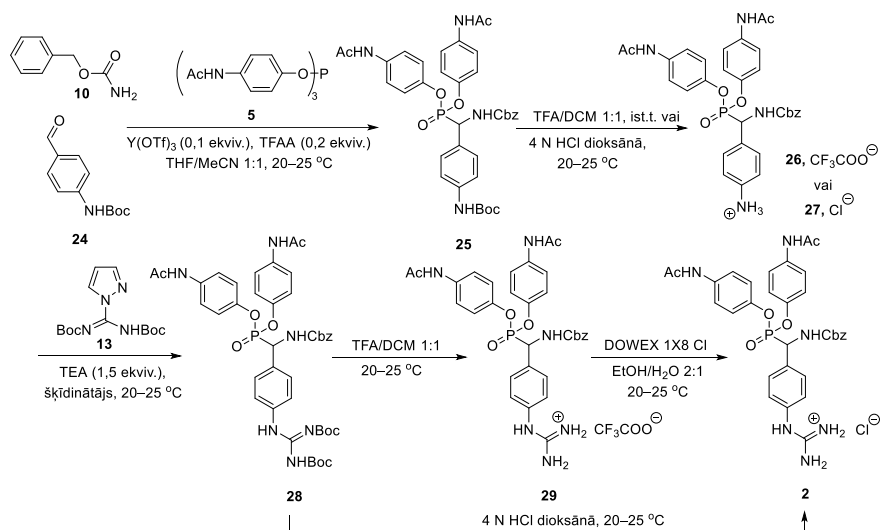
Antverpenes Universitātē pēdējos gados ir pārbaudīta virkne aktivitātē balstītu paraugu (ABP), kas iegūti no  $\alpha$ -aminofosfonātiem. Rezultātā pierādīts, ka ABP, kas iegūti no  $\alpha$ -aminofosfonātiem, kas ģenerēti no aizvietota benzaldehīda, uzrāda augstu aktivitāti pret uPA un zemu aktivitāti pret trombīnu. Rezultāti promocijas darba autoram lika izstrādāt divas molekulas, kas satur aizvietotu benzaldehīdu, nevis aizvietotu fenilacetaldēhīdu, kā tas ir UAMC-00050 (**1**). UAMC-0004206 (**2**), kas ir līdzīgs UAMC-00050 (**1**), satur paracetamola fosfonāta esterī. Savienojums kalpos kā vadošā savienojuma UAMC-00050 (**1**) rezerves atvasinājums. UAMC-0004207 (**3**) satur 4-hlorfenola fosfonāta esterī, tāpēc šis savienojums tiks pārbaudīts koncepcijas pierādīšanai, lai noteiktu aktivitāti, kas atklāta tādiem ABP, kuru struktūrā ir iekļauts 4-hlorfenola fosfonāta esteris.



3. att. Rezerves savienojums UAMC-0004206 (**2**) un koncepcijas pierādīšanas savienojums UAMC-0004207 (**3**).

## UAMC-0004206 (2) iegūšana un procesa optimizācija

UAMC-0004206 (2) sintēzei tika iegādāts *tert*-butil(4-formilfenil)karbamātu (24), izmantojot to kā izejas reaģentu (6. shēma). Biruma-Oleksišina reakcijas apstākļus, kas tika izmantoti starpprodukta 11 iegūšanai UAMC-00050 (1) sintēzes procesā, tika pielāgots savienojuma 25 sintēzei. *N*-Boc Aizsarggrupas nošķelšana savienojumā 25 veikta ar 4 N HCl dioksānā vai TFA/DCM 1:1. UAMC-0004206 (2) sintēzes metodē, kas ir līdzīga UAMC-00050 (1) medicīnas ķīmijas metodei, tika izmantots *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamīdins (13), lai  $\alpha$ -aminofosfonātā ievadītu guanidīna daļu. Tādā veidā iegūtais Boc aizsargātais guanidīns 28 veiksmīgi attīrīts ar kolonnu hromatogrāfiju uz silikagēla. Nepieciešamo tīrību (95–98 %) varēja viegli sasniegt pēc vienas attīrīšanas. Tālāk sekoja pēdējās *N*-Boc aizsarggrupas nošķelšana ar HCl, lai vienā stadijā iegūtu gala savienojumu 2. Alternatīvi *N*-Boc grupu var nošķelt ar TFA, kam seko sāls pretjona apmaiņa ar DOWEX 1X8 Cl sveķiem.



6. shēma. Sintēzes metode UAMC-0004206 (2) iegūšanai.

### Starpprodukta 25 iegūšana Biruma-Oleksišina reakcijā

Pirmais solis UAMC-0004206 (2) iegūšanā ir trīskomponentu Biruma-Oleksišina reakcija starp *tert*-butil(4-formilfenil)karbamātu (24), benzilkarbamātu (10) un triarilfosfītu 5 (6. tab.). Ņemot vērā zināšanas, kas iegūtas no UAMC-00050 (1) sintēzes, tika nolemts izmantot 0,1 ekvivalentu itrija triflāta kā katalizatoru, MeCN/THF 1:1 maisījumu kā reakcijas vidi un TFAA kā piedevu. Tika veikta virkne neliela mēroga eksperimentu (0,22 mmol aldehīda 24), lai atrastu optimālo koncentrāciju, pareizo TFAA un fosfīta 5 ekvivalentu attiecību un optimālo reakcijas norises laiku. Reakcijas iznākums aprēķināts, pamatojoties uz attiecību starp produkta 25

hromatogrāfisko koncentrāciju un iekšējo standartu (IS) naftalīnu. Balstoties skrīninga datus, lielāka mēroga eksperimentam izvēlēti šādi apstākļi: 1,0 vai 1,5 ekvivalenti fosfīta **5**, koncentrācijas 0,17, 1,0, 1,5 vai 2,5 M, un noteikts produkta **25** izdalīts iznākums. Veikti četri eksperimenti ar 2,2 mmol aldehīda **24**. Produkts izdalīts no reakcijas maisījuma ar kolonnas hromatogrāfiju. Standarta apstākļi no UAMC-00050 (**1**) sintēzes nodrošināja savienojumu **25** ar 46 % iznākumu un 89 % tīrību pēc AIŠH (6. tab., 1. piem.). Pie 1,00 M koncentrācijas un ar 1,5 ekvivalentiem fosfīta **5**  $\alpha$ -aminofosfonāts **25** iegūts ar 59 % iznākumu un 84 % tīrību pēc AIŠH. Labākie maza mēroga skrīninga nosacījumi (1,50 M koncentrācija un četru stundu norise) nodrošina produkta 64 % iznākumu un 84 % tīrību pēc AIŠH, savukārt ar augstāku koncentrāciju 2,5 M produkts iegūts pēc attīrīšanas ar 55 % iznākumu un 90 % pēc AIŠH. Eksperimenti 2,2 mmol mērogā apstiprināja pirmā skrīninga rezultātus. 6. tabulas 3. piemēra apstākļi (1,50 M koncentrācija, 1,0 ekvivalents fosfīta **5** un 4 stundu norise) izvēlēti savienojuma **25** vairāku gramu iegūšanai. Pirms pārejas uz 4,4 un 11,0 mmol mērogu tika izpētītas attīrīšanas metodes, kas varētu būt alternatīvas kolonnas hromatogrāfijai. Diemžēl neizdevās atrast piemērotu šķīdinātāju produkta **25** bāziskai mazgāšanai, kas būtu analoga UAMC-00050 (**1**). Tāpēc jēlprodukts izšķīdināts 96 % EtOH un pa pilienam pievienots 10 reizes lielākam EtOAc tilpumam, maisot 0 °C temperatūrā. Šī attīrīšana ļāva sasniegt tīrību 87–94 % diapazonā (pēc AIŠH) tieši no neapstrādāta reakcijas jēlprodukta tikai vienā attīrīšanas stadijā.

6. tabula

Iekrāvumi ar produkta **25** izdalīšanu

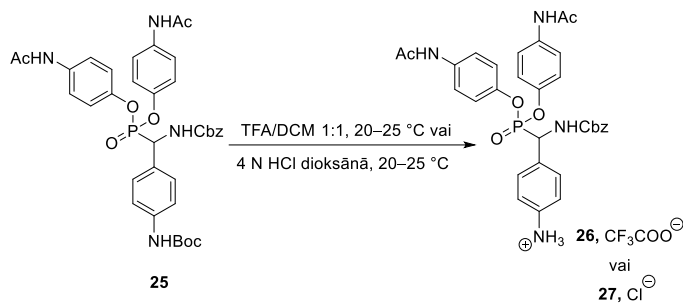
$\text{Y(OTf)}_3$  (0.1 ekviv.),  
TFAA (0.2 ekviv.),  
THF/MeCN 1:1,  
20–25 °C

Nr. p. k.	Mērogs (mmol)	Savienojums <b>5</b> (ekviv.)	Koncentrācija (M)	Laiks (st.)	Iznākums (%) <sup>a</sup>	Tīrība (%) <sup>b</sup>
1.	2,2	1,0	0,17	8	46	89
2.	2,2	1,5	1,00	4	59	84
3.	2,2	1,0	1,50	4	64	84
4.	2,2	1,0	2,50	4	55	90
5.	4,4	1,0	1,50	4	55	94
6.	11,0	1,0	1,50	4	63	87

<sup>a</sup> Izdalīts iznākums; <sup>b</sup> noteikta ar AIŠH.

## N-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā 25

Sākotnēji Boc grupa nošķelta, izmantojot apstākļus, kas izstrādāti UAMC-00050 (**1**) *N*-Boc aizsarggrupas nošķelšanai.  $\alpha$ -aminofosfonātu **25** apstrādāts ar 4 N HCl dioksānā trīs stundas 20–25 °C temperatūrā, produkts izolēts, izgulsnējot ar pretšķīdinātāju, jēlsavienojuma šķīdums EtOH pievienots pa pilienam 10 reizes lielākam MTBE tilpumam, maisot 0 °C temperatūrā. Anilīna **27** hidrogēnhlorīds iegūts kopumā ar labu iznākumu un tīrību dažādos iekrājumos. Tomēr nākamajā solī, guanilējot ar *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīnu (**13**), iegūts slikts guanilētā produkta **28** iznākums, ja par izejvielu izmanto HCl anilīna sāli. Kā alternatīva tika sintezēts anilīna trifluoracetāts **26**, apstrādājot izejas Boc aizsargātu savienojumu **25** ar TFA/DCM 1:1 20–25 °C temperatūrā. Pēc 45 minūtēm sasniegta pilna konversija, un cietais savienojums **26** izolēts tāpat kā produkts **27**. Anilīna TFA sāls **26** izrādījās pārākš par anilīna HCl sāli **27** guanilēšanas posmā, tāpēc anilīna **26** lielāka mēroga iegūšanai Boc grupas nošķelšanai tika nolemts izmantot TFA. Reakcija pārbaudīta ar 2,59 mmol  $\alpha$ -aminofosfonāta **25** iekrāvumu, iegūstot anilīna trifluoracetātu **26** ar 99 % iznākumu un 97 % tīrību pēc AIŠH (7. shēma).



7. shēma. *N*-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā **25**.

## Starpprodukta **26** guanilēšana

Sākotnējā medicīnas ķīmijas metodē anilīna trifluoracetāta **26** guanilēšana veikta, kā reaģentu izmantojot *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīnu (**13**). Iegūto Boc aizsargāto produktu var viegli attīrīt ar hromatogrāfiju uz silikagēla. Sākotnēji 0,78 mmol anilīna hidrohlorīda **27** apstrādāti ar 1,2 ekvivalentiem reaģenta **13** *i*PrOH/MeCN 1:1 vidē, reakcija apturēta, kad anilīna HCl sāls **27** konversija sasniedza 90 %. (7. tab., 1. piem.). Diemžēl 1. piemēra apstākļi bija slikti atkārtojami tajā pašā mērogā un produkta **28** iznākums samazinājās līdz 54 %. (7. tab., 2. piem.). Tāpēc par izejvielu tika izmantots anilīna TFA sāls **26**. Pēc 96 stundām sasniegta savienojuma **26** 90 % konversija, un produkts izdalīts ar 74 % iznākumu (7. tab., 3. piem.). Izolētā materiāla AIŠH analīze uzrādīja piemaisījuma klātbūtni, kura masa atbilst struktūrai **29**, kur viena *tert*-butilgrupa produktā ir apmainīta pret izopropilgrupu pāresterifikācijas rezultātā ar *i*PrOH. Kā reakcijas vidi izmantojot DCM/MeCN 1:1 *i*PrOH/MeCN 1:1 vietā, piemaisījums **29** vairs netika

novērots. Izmantojot produkta un reaģentu polaritātes atšķirību, *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīns un TEA nomazgāti no jēlprodukta, suspendējot un maisot ar heptānu/EtOAc 2:1. Produkts **28** iegūts pēc filtrēšanas ar 85 % tīrību pēc AIŠH un satur 10 % anilīna **26** kā brīvas bāzes. Produkts **28** atdalīts no izejas anilīna ar kolonnu hromatogrāfiju uz silikagēla (gradients heptāns/EtOAc). Pirmo vairāku gramu sintēzi ar 2,68 mmol anilīna trifluoracetāta **26** iekrāvumu sarežģīja daudz ilgāks reakcijas laiks (144 stundas), kas vajadzīgs, lai sasniegtu izejas savienojuma vismaz 90 % konversiju. Pēc suspendēšanas/maisīšanas un hromatogrāfijas produkts izolēts ar 67 % iznākumu (7. tab., 5. piem.). Ilgstošais reakcijas laiks neizraisīja lielu izejas savienojuma vai produkta hidrolīzi, tāpēc tika turpināta mēroga palielināšana, nemainot reakcijas parametrus (piemēram, šķīdinātājus, koncentrāciju). Veicot reakciju līdz pat 7,68 mmol liela iekrāvumā, tika novērota arī lēnāka konversija – šajā gadījumā 90 % konversijas sliekšnis sasniegts pēc 120 stundām, tomēr daļa produkta zaudēta attīrīšanas laikā, un tā rezultātā produkta **28** iznākums bija tikai 43 % (7. tab., 6. piem.). Pēdējā vairāku gramu sintēze veikta ar 10,20 mmol izejas savienojumu, un konversija, lielāka par 90 %, sasniegta tikai pēc 168 stundām, produkts **28** izolēts ar 71 % iznākumu un 97 % tīrību pēc AIŠH.

7. tabula

Guanilēšanas reakcijas optimizācija savienojuma **28** sintēzei

Nr. p. k.	Anilīns (mmol)	Anilīns	Šķīdinātājs	Konc. (M)	Laiks (st.)	Iznākums (%) <sup>a</sup>
1.	0,78	<b>27</b>	<i>i</i> PrOH/MeCN 1:1 tilp./tilp.	1,0	96	88
2.	0,78	<b>27</b>	<i>i</i> PrOH/MeCN 1:1 tilp./tilp.	1,0	96	54
3.	0,70	<b>26</b>	<i>i</i> PrOH/MeCN 1:1 tilp./tilp.	1,0	96	74
4.	0,70	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 tilp./tilp.	1,0	96	75

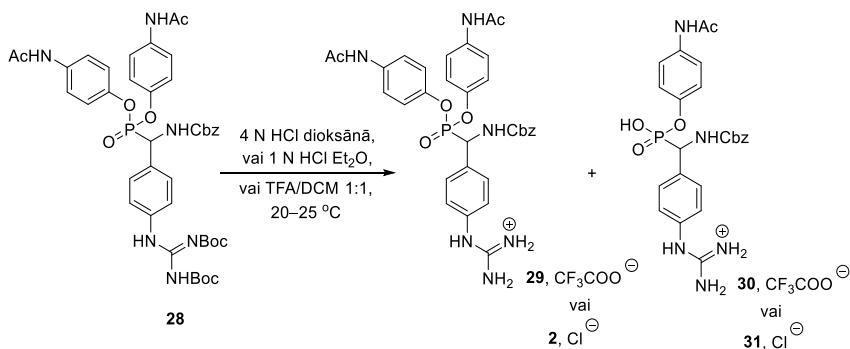


5.	2,68	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 tilp./tilp.	1,0	144	67
6.	7,68	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 tilp./tilp.	1,0	120	43
7.	10,20	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 tilp./tilp.	1,0	168	71

<sup>a</sup> Izdalīts iznākums.

### ***N*-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā **28** un sāls pretjona apmaiņa savienojumā **31****

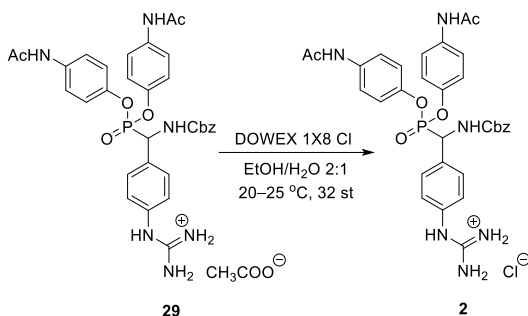
*N*-Boc aizsarggrupas nošķelšana sākotnēji veikta ar 4 N HCl dioksānā pārākumu, lai uzreiz iegūtu vēlamo hidrochlorīdu **2**, kas nepieciešams bioloģiskajiem testiem. Izejas savienojuma **28** pilnīga pārvēršana par produktu **2** notika pēc 20 stundām (8. shēma). Galaprodukta AIŠH analīze uzrādīja 11 % hidrolizēta monoarilblakusprodukta **31** klātbūtni. 4 N HCl dioksānā aizstāšana ar TFA/DCM 1:1 ierobežoja hidrolizētā blakusprodukta **30** veidošanos un nodrošināja pilnīgu savienojuma **28** konversiju produktā **29** trīs stundu laikā ar 84 % iznākumu 0,11 mmol mērogā. Ar atstrādātajiem reakcijas apstākļiem tika veikti lielāka mēroga eksperimenti. Ar 0,51, 1,03 un 2,25 mmol iekrāvējiem vēlamais produkts **29** iegūts ar 99 % iznākumu un blakusprodukta **30** iznākumu diapazonā no 0,5 līdz 1,0 % pēc AIŠH.



8. shēma. *N*-Boc Aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā **28**.

Visbeidzot, trifluoracetāta pretjonu savienojumā **29** tika apmainīts pret hlorīdu, izmantojot DOWEX 1X8 Cl sveķus (sveķi/sāls **29** = 10:1 sv./sv., 8. shēma). Produkts **2** iegūts pēc izgulsnēšanas ar pretšķīdinātāju: jēlsavienojuma **2** šķīdums EtOH piepildināts 10 reizes lielākam MTBE tilpumam maisot 0 °C temperatūrā. Sāls pretjona apmaiņa veikta astoņos dažādos

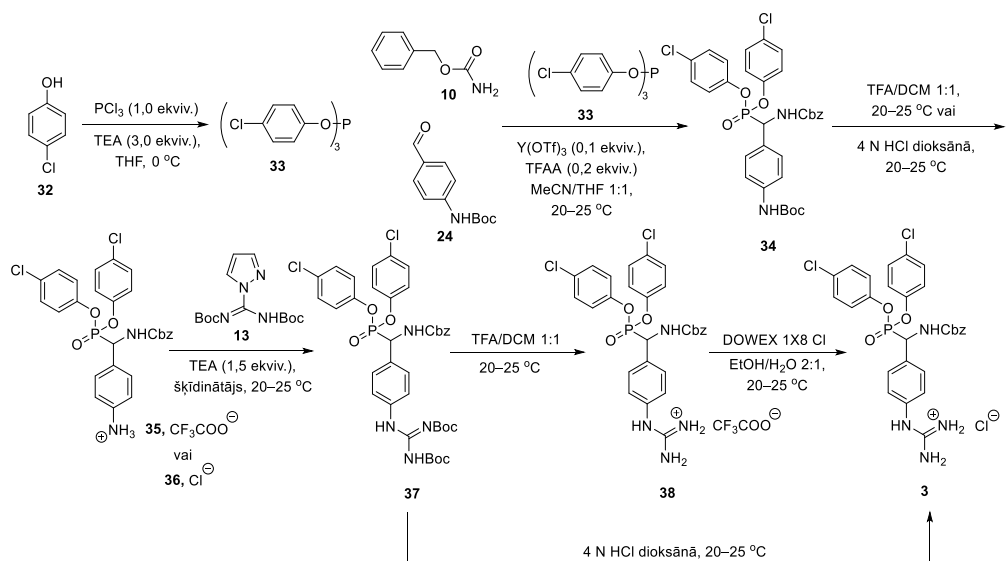
iekrāvumos, saglabājot TFA sāls **29** daudzumu zem 2,0 mmol. Kopumā no dažādiem iekrāvumiem savākti 5,79 g galaprodukta ar AIŠH tīrību, kas pārsniedz 95 %, ko uzskata par pieņemamu tīrību bioloģiskajiem testiem (9. shēma).



9. shēma. Sāls pretjona apmaiņa savienojumā **2**.

### Procesa metodes izstrāde UAMC-0004207 (**3**) iegūšanai

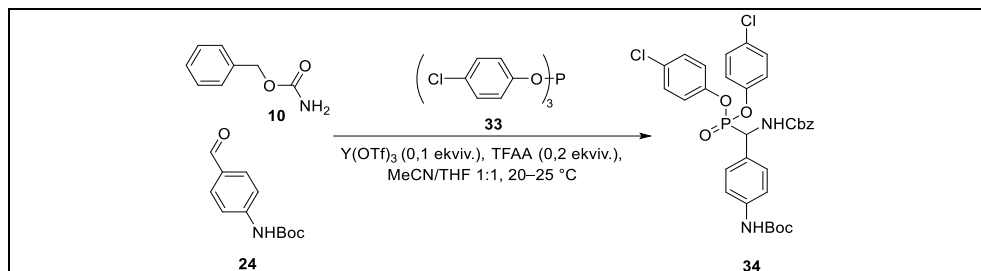
UAMC-0004207 (**3**) struktūra ir ļoti līdzīga UAMC-0004206 (**2**) struktūrai, atšķirība ir tikai fosfonāta estera grupā. Šajā molekulā paracetamola esteris ir aizvietots ar 4-hlorfenola esterī. UAMC-0004207 (**3**) molekulai reaģējot ar serīnu enzīma aktīvajā centrā (piemēram, uPA), izdalās toksisks fenols, tāpēc UAMC-0004207 (**3**) nebija plānots izmantot kā UAMC-00050 (**1**) rezerves savienojumu. Tā vietā šo savienojumu tika plānots izmantot, lai apstiprinātu ABP koncepcijas pierādījumu, pamatojoties uz 4-hlorfenola fosfonāta esteriem. Tika nolemts izmantot to pašu sintēzes metodi, kas tika izmantota UAMC-0004206 (**2**) iegūšanai (6. shēma). Fosfīts **33** iegūts no fenola **32** pēc tādas pašas metodes kā fosfīts **5**. Biruma-Oleksišina reakcija veikta MeCN/THF 1:1 maisījumā un katalizēta ar 10 mol% Y(OTf)<sub>3</sub>. Optimālā reakcijas koncentrācija, norises laiks un TFAA ekvivalentu daudzums atrasti pēc apstākļu skrīninga. Tāpat kā savienojuma UAMC-0004206 (**2**) sintēzē guanidīna daļa ievadīta ar *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamidīnu, iegūto Boc aizsargāto savienojumu **37** varēja viegli izdalīt no reakcijas maisījuma. Visbeidzot, *N*-Boc aizsarggrupas nošķelšanu tika plānots veikt pēc tādas pašas stratēģijas kā citiem  $\alpha$ -aminofosfonātiem. Ja iespējams, izmantot HCl aizsarggrupas nošķelšanai un nepieciešamā sāls **3** iegūšanai vienā stadijā, pretējā gadījumā izmantot TFA aizsarggrupas nošķelšanai, kam sekotu sāls pretjona apmaiņa ar DOWEX 1X8 Cl sveķiem (10. shēma).



10. shēma. Savienojuma UAMC-0004207 (**3**) plānotais sintēzes ceļš.

### Biruma-Oleksišina reakcija

Iesākumā Biruma-Oleksišina reakcijai tika izmantoti standarta apstākļi, kas atrasti, procesa metodes izstrādes laikā sintezējot UAMC-00050 (**1**) (3. tab., 5. piem.). Aldehīds **24** (1,0 ekviv.) reaģēja ar fosfītu **33** (1,0 ekviv.) un benzilkarbamātu (**10**) (1,0 ekviv.)  $Y(OTf)_3$  (0,1 ekviv.) un TFAA (1,0 ekviv.) klātbūtnē, izmantojot MeCN/THF 1:1 maisījumu (koncentrācija 0,17 M) kā šķīdinātāju. Pēc virknes neliela mēroga eksperimentu (0,45 mmol mērogā) visaugstākā produkta **34**/IS attiecība iegūta, veicot eksperimentu ar 1:1:1 attiecību starp reaģentiem, 0,2 ekvivalentiem TFAA, 2,5 M koncentrācijā divas stundas.

Iekrāvumi ar produkta **34** izdalīšanu


Nr. p. k.	Iekrāvums (mmol)	Iznākums (%) <sup>a</sup>	Tīrība (%) <sup>b</sup>
1.	2,3	71	85
2.	4,6	70	81
3.	11,5	43	76
4.	13,3	53	75

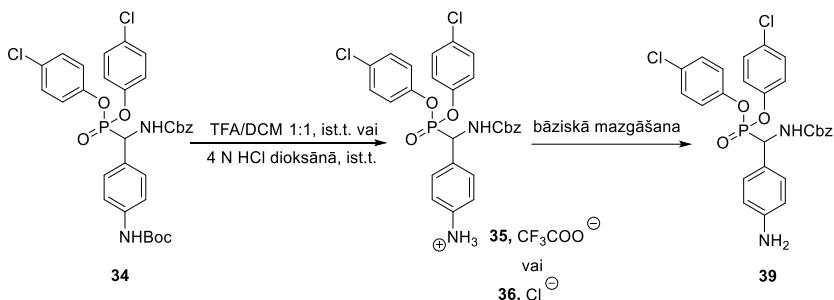
<sup>a</sup> Izdalīts iznākums; <sup>b</sup> noteikta ar AIŠH.

Pēc reakcijas apstākļu optimizācijas tika veikti lielāka mēroga eksperimenti, lai novērtētu produkta **34** izdalītos iznākumus. Produkts attīrīts ar kolonnu hromatogrāfiju. Pie 2,5 M koncentrācijas reakcija apturēta pēc divām stundām, un produkts **34** izdalīts ar 71 % iznākumu un 85 % tīrību pēc AIŠH (8. tab., 1. piem.). Iegūtais iznākums apstiprināja mazāka mēroga eksperimentu novērojumus. Pie 4,6 mmol aldehīda **24** iekrāvuma iegūts līdzīgs produkta iznākums – 70 % (8. tab., 2. piem.), tomēr, veicot sintēzi ar 11,5 un 13,3 mmol aldehīda **24** iekrāvumiem, iznākumi samazinājās attiecīgi līdz 43 % un 53 % (8. tab., 3. un 4. piem.). Zemus iznākumus var izskaidrot ar produktu apgrūtinātu attīrīšanu no piemaisījumiem.

**N-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā 34**

Tāpat kā UAMC-0004206 (**2**) sintēzē anilīns **36** iegūts, apstrādājot produktu **34** ar 4 N HCl dioksānā. Produkts iegūts kā cieta viela ar 96 % iznākumu un 99 % tīrību pēc AIŠH pēc jēlprodukta šķīduma EtOH pilināšanās 10 reizes lielākam MTBE tilpumam 0 °C temperatūrā. Diemžēl, pārbaudot guanilēšanas reakciju ar *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamīdīnu, anilīna HCl sāļi **36** bija zema konversija 0,6 mmol mērogā. Savukārt anilīna TFA sāļi **35** bija labāka guanilēšanas konversija 0,3 un 0,6 mmol mērogā. Lai pagatavotu TFA sāli, starpprodukts **34** tika izšķīdināts TFA/DCM 1:1 šķīdumā un maisīts 20–25 °C temperatūrā trīs stundas līdz pilnai konversijai. Tomēr, pievienojot savienojuma **35** EtOH šķīdumu vairākiem pretšķīdinātājiem (t. i., Et<sub>2</sub>O, heptānam, aukstam MTBE, izdalīt savienojumu **35** kā cietu vielu neizdevās. Attiecīgi pēc pilnas **34** konversijas reakcijas maisījums tika koncentrēts, neapstrādāta TFA sāls eļļas veidā izmantota nākamajā stadijā. Tomēr vēlāk tika atklāts, ka neapstrādātajā sālī **35** palika TFA pēdas,

un tika pieņemts, ka tas ir iemesls sliktam iznākumam guanilēšanas posmā 3,0 mmol iekrāvumā. Neapstrādātā anilīna TFA sāls **35** tika izšķīdināts EtOAc un mazgāts ar 0,5 %  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ūdens šķīdumu. Bāziskā mazgāšana nodrošināja anilīnu nesaturošu bāzi **39** un ļāva pilnībā atbrīvoties no TFA, kas uzlaboja iznākumu nākamajā stadijā. TFA/DCM protokols tika palielināts līdz 3,4 mmol starpprodukta **34**, iegūstot anilīnu nesaturošu bāzi **39** ar 97 % iznākumu un 75 % tīrību pēc AIŠH (11. shēma).



11. shēma. *N*-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā **34**.

### Starpprodukta **39** guanilēšana

Pētījums tika sākts ar trifluoracetāta sāli **35**. Pēc virknes neliela mēroga eksperimentu (0,3–0,6 mmol) konstatēts, ka visaugstāko produkta konversiju nodrošina šādi apstākļi: anilīna TFA sāls **35** kā izejviela, 1,2 ekvivalenti *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamīdīna, 1,5 ekvivalenti DIPEA kā bāzes, 1,0 M koncentrācijā. Ar optimizētajiem apstākļiem eksperimenta mērogs tika paaugstināts līdz 2,1 mmol, produktu **37** tika attīrīts ar kolonnu hromatogrāfiju. 90 % konversija sasniegta pēc 96 stundām, un produkts izdalīts ar 37 % iznākumu (9. tab., 1. piem.). Zemais iznākums var būt saistīts ar produkta sadalīšanos reakcijas laikā vai attīrīšanas laikā reakcijas maisījumā esošā DIPEA dēļ. Savienojuma **37** sintēze tika atkārtota 3,0 mmol mērogā, diemžēl reakcija noritēja lēni un bija nepieciešamas 144 stundas, lai sasniegtu 72 % konversiju (9. tab., 2. piem.). Pirms kolonnu hromatogrāfijas jēlprodukta šķīdums EtOAc tika mazgāts ar 0,5 %  $\text{KHSO}_4$  ūdens šķīdumu, lai pilnībā atmazgātu DIPEA. Tomēr pēc hromatogrāfijas produkts tika izdalīts ar zemu iznākumu – 10 %. Zemo iznākumu noteica ilgāks reakcijas laiks, ko izraisīja atlikušā TFA klātbūtnē izejas savienojumā **35**. Lielāka mērogā eksperimentos gaistošo vielu ietvaicēšana vakuumā nebija pietiekami efektīva, lai atbrīvotos no liekā TFA, tāpēc ar bāziskās mazgāšanas ar 0,5 %  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ūdens šķīdumu posmu tika papildināta TFA anilīna sāls **35** apstrāde. Izmantojot citu izejas savienojumu **39**, DIPEA daudzums, kas nepieciešams bāziskā pH (8–10) sasniegšanai, tika samazināts līdz 0,8 ekvivalentiem, un pēc 96 stundām tika sasniegta 83 % konversija (9. tab., 3. piem.). Pēc apstrādes un attīrīšanas produkts **37** izdalīts ar uzlabotu iznākumu – 45 %. Otrajā iekrāvumā 0,8 mmol mērogā DIPEA daudzums samazināts līdz 0,3 ekvivalentiem, 91 % konversija sasniegta pēc 96 stundām, produkts **37** izdalīts ar 43 %

iznākumu (9. tab., 4. piem.). Apmierināts ar uzlabotajiem reakcijas un apstrādes apstākļiem, autors palielināja mērogu līdz 1,8 mmol, un produkts **37** tika izdalīts ar 63 % iznākumu un 95 % tīrību pēc AIŠH (9. tab., 5. piem.).

9. tabula

Guanilēšanas reakcijas optimizācija produkta **37** iegūšanai

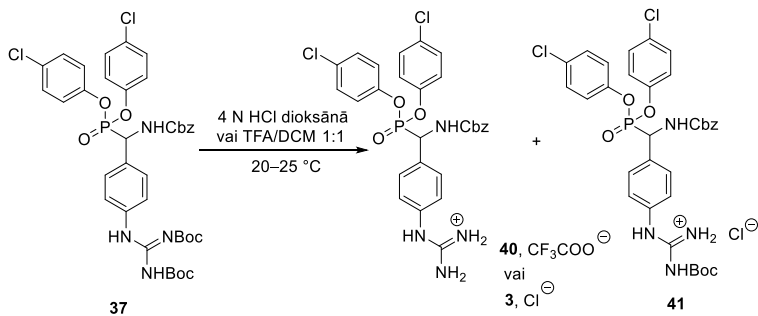
Nr. p. k.	Mērogs (mmol)	Izejas savienojuma apstrāde	DIPEA (ekviv.)	Konversija (%)	Apstrāde	Iznākums (%) <sup>c</sup>
1.	2,1	Nav	1,5	90 <sup>a</sup>	Nav	37
2.	3,0	Nav	1,5	72 <sup>b</sup>	Mazgāšana ar 0,5 % KHSO <sub>4</sub> ūdens šķīdumu	10
3.	0,8	Mazgāšana ar 0,5 % NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ūdens šķīdumu	0,8	83 <sup>a</sup>	Mazgāšana ar 0,5 % KHSO <sub>4</sub> ūdens šķīdumu	45
4.	0,8	Mazgāšana ar 0,5 % NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ūdens šķīdumu	0,3	91 <sup>a</sup>	Mazgāšana ar 0,5 % KHSO <sub>4</sub> ūdens šķīdumu	43
5.	1,9	Mazgāšana ar 0,5 % NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ūdens šķīdumu	0,3	94 <sup>a</sup>	Mazgāšana ar 0,5 % KHSO <sub>4</sub> ūdens šķīdumu	63

<sup>a</sup> Konversija pēc 96 st; <sup>b</sup> konversija pēc 144 st; <sup>c</sup> izdalīts iznākums.

**N-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā **37****

N-Boc aizsarggrupas nošķelšana produktā **37** panākta, izmantojot 4 N HCl dioksānā pa tiešo iegūstot HCl sāli **3**. Sākumā reakcija veikta 16 stundas, gaistošās vielas ietvaicētas vakuumā, atlikums izšķīdināts absolūtā EtOH un pa pilienam pievienots 10 reizes lielākam MTBE tilpumam, maisot 0 °C temperatūrā. Galaprodukts **3** iegūts pēc filtrēšanas kā balta cieta viela ar 90 % tīrību pēc AIŠH. Galaprodukta AIŠH tīrība neizmainījās, kad iegūtais savienojums **3** atkal izšķīdināts absolūtajā EtOH un pa pilienam pievienots 10 reizes lielākam MTBE tilpumam, maisot 0 °C temperatūrā. Piemaisījuma **41** klātbūtne nozīmēja, ka pilnīgai aizsarggrupas nošķelšanai bija

nepieciešams ilgāks reakcijas laiks. Galaprodukts iegūts ar 95 % tīrību pēc AIŠH, veicot reakciju 24 stundas, un 97 %, tīrību veicot 30 stundas. Pēc apstākļu optimizēšanas tika palielināts reakcijas iekrāvums līdz 500 mg mērogam, un no piecām dažādām partijām iegūts HCl sāls UAMC-0004207 (**3**) ar iznākumu no 73 % līdz 89 % un tīrību no 96 % līdz 99 % pēc AIŠH (12. shēma).



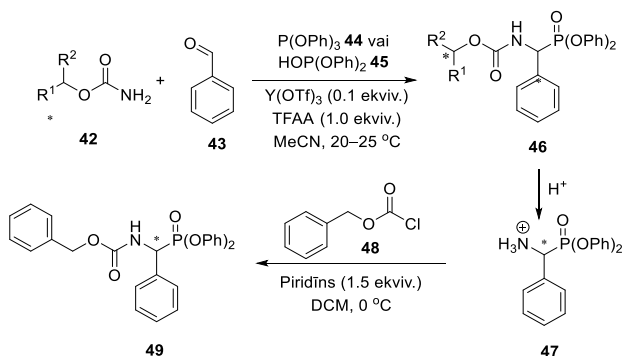
12. shēma. *N*-Boc aizsarggrupas nošķelšana starpproduktā **37**.

### UAMC-00050 (**1**) divu enantiomēru atdalīšana

Zāļu izstrādes laikā ļoti svarīgi ir izpētīt, kā stereoķīmija var ietekmēt enzīmu inhibitoru aktivitāti. UAMC-00050 (**1**) sastāv no diviem enantiomēriem, bet līdz šim tā saistīšanās aktivitāte ar uPA pārbaudīta tikai racēmiskajam maisījumam. Dati par katra enantiomēra saistīšanos ir ļoti svarīgi, lai izprastu mijiedarbību ar enzīmu un jaunu aktīvāku savienojumu attīstību. Diemžēl  $\alpha$ -aminofosfonātu stereoselektīvas iegūšanas metodes ir ļoti ierobežotas gan pēc skaita, gan pēc enantioselektivitātes pakāpes. Attiecīgi promocijas darba galvenais mērķis bija atsevišķu UAMC-00050 (**1**) enantiomēru iegūšana, sadalot racēmisko maisījumu un pārbaudot katra enantiomēra saistīšanos ar uPA. Ir vairākas komerciāli pieejamas hirālās hromatogrāfijas kolonnas enantiomēru atdalīšanai. Kolonnu izmēri svārstās no analītiskā mēroga, kurā var ievadīt līdz pat dažiem miligramiem, līdz simulēto kustīgo daļiņu hromatogrāfijas kolonnām,<sup>30</sup> kur dienā var atdalīt kilogramus enantiomēru. Izpētot dažādas kolonnas, bija iespējams atdalīt divus starpprodukta **14** enantiomērus, izmantojot chiralpak® IG kolonnu (4,6 × 250 mm) ar izokrātisku eluentu, kas sastāvēja no 50 % heptāna, 40 % DCM, 10 % *i*PrOH. Savienojuma **14** racēmiskais maisījums (250 mg) uzņests uz kolonnas kā MeCN šķīdums. Atdalot iegūti aptuveni 50 mg katra enantiomēra ar 95 % AIŠH tīrību. Pēc tam tīrus enantiomēri tika apstrādāti ar TFA/DCM 1:1, lai nošķeltu Boc grupu, rezultātā galaprodukts **1** iegūts ar 99,7 % *ee* pirmajam enantiomēram un 98,4 % *ee* otrajam enantiomēram. Abu enantiomēru *in vitro* pētījumos atklāts, ka enantiomēram **1** ir 10 reizes lielāka afinitāte pret enzīmu nekā enantiomēram **2**. Tomēr enantiomēra **1** IC<sub>50</sub> ir tikai divas reizes zemāka nekā racēmiskajam maisījumam. Tas nozīmē, ka UAMC-00050 (**1**) kā tīra enantiomēra **2** izmantošana racēmiskā maisījuma vietā neradīs lielas izmaiņas zāļu terapeitiskajā darbībā. Tomēr abi enantiomēri ir jāatdala, un to toksicitāte jānovērtē *in vivo* pirms klīnisko pētījumu veikšanas ar UAMC-00050 (**1**).

### $\alpha$ -aminofosfonātu stereoselektīva iegūšana

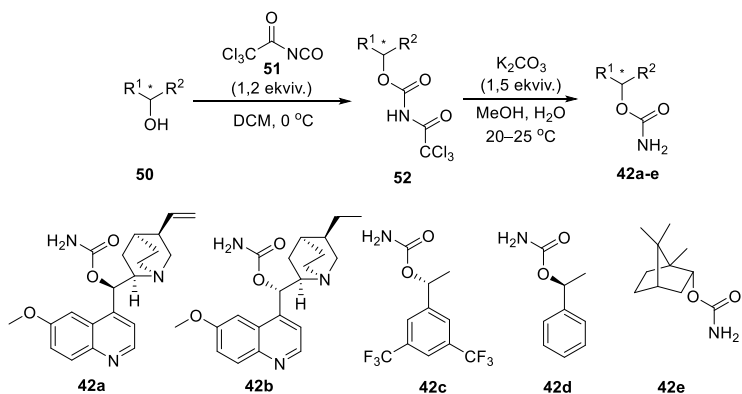
Hirālus karbamātus  $\alpha$ -aminofosfonātu diastereoselektīvai sintēzei iepriekš izmantoja *Oshikawa* u. c.<sup>31</sup> un *Chung* u. c.<sup>32</sup> Abi autori izmantoja karbamātus, kas iegūti no mentola un kampara atvasinājumiem. Tālāk iegūtos  $\alpha$ -aminofosfonātus hidrolizēja, lai iegūtu  $\alpha$ -aminofosfonskābes, un analizēja optisko iznākumu, kas bija robežās no 3,3 % līdz 42,2 %. Iedvesmojoties no šiem darbiem, tika nolemts izpētīt virkni hirālu karbamātu **42** un ievadīt tos reakcijās ar benzaldehīdu (**43**) un trifenilfosfītu (**44**) vai difenilfosfītu (**45**), izmantojot 0,1 ekvivalentus  $Y(OTf)_3$  kā katalizatoru, 1,0 ekvivalentu TFAA kā piedevu bezūdens MeCN vidē 20–25 °C temperatūrā. Laba stereoindukcija un augsts *dr* savienojuma **46** gadījumā ļāva atdalīt diastereomērus, pēc tam nošķelt karbamātu skābos apstākļos un amīnu **47** funkcionalizēt ar benzilchlorformiātu (**48**), lai iegūtu vēlamo enantiobagātinātu  $\alpha$ -aminofosfonātu **49** (13. shēma).



13. shēma. Plānotais ceļš  $\alpha$ -aminofosfonāta **49** stereoselektīvai sintēzei.

Pieci dažādi hirāli spirti **50** atlasīti pārvēršanai attiecīgajos karbamātos reakcijā ar 2,2,2-trihloracetilizociānātu (**51**) un kālija karbonātu. Karbamātu izlasē ietilpst hinīna karbamāts (**42a**), hidrohinidīna karbamāts (**42b**), (*R*)-1-(3,5-bistrifluorometilfenil)etanola karbamāts (**42c**), (*S*)-1-feniletanola karbamāts (**42d**) un borneola karbamāts (**42e**) (14. shēma).





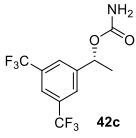
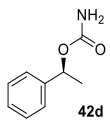
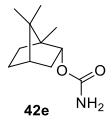
#### 14. shēma. Izvēlētie hirālie karbamāti **42a–e** un to iegūšana.

Pirmie testējamie karbamāti bija stēriski apjomīgi cinhona alkaloidi (hinīns **42a** un hidrohinidīns **42b**). Diemžēl, apstrādājot abus karbamātus ar difenil-, trimetil- vai trifenilfosfītu 1,0 ekvivalenta TFAA vai HCl klātbūtnē un ar 0,1 vai 3,0 ekvivalentiem  $Y(OTf)_3$ , nevienā no eksperimentiem produkts netika atklāts. Tika pieņemts, ka cinhona karbamāti varētu būt pārāk stēriski apjomīgi, lai radītu vēlamu  $\alpha$ -aminofosfonātu. Nākamajā eksperimentu sērijā tika izmantoti trīs mazāk apjomīgi karbamāti. Sākotnēji (*R*)-1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)etilkarbamāts (**42c**) iesaistīts reakcijā ar difenilfosfītu (**45**) un benzaldehīdu (**43**) 0,1 ekvivalenta  $Y(OTf)_3$  un 1,0 ekvivalenta TFAA klātbūtnē (10. tab.). Produkts **53a** iegūts ar **53a/IS** attiecību 0,30 pēc četrām stundām un 0,33 pēc 24 stundām ar vienādu *dr* 57:43 abos eksperimentos (10. tab., 1. un 2. piem.). Izmantojot apjomīgāku trifenilfosfītu **44**, diastereoselektivitāte palielināta līdz 69:31 pēc četrām stundām un līdz 60:40 pēc 24 stundām. Arī **53a/IS** attiecība ir pieaugusi attiecīgi līdz 0,67 pēc četrām stundām un 0,51 pēc 24 stundām (10. tab., 3. un 4. piem.). Reakcija starp karbamātu **42c**, benzaldehīdu (**43**) un trifenilfosfītu (**44**) atkārtota 1,35 mmol mērogā. Reakcija apturēta pēc četrām stundām, un produkts izdalīts. Gan AIŠH gan <sup>1</sup>H KMR eksperimenti apstiprināja *dr* 75:25. Pēc tam tādos pašos reakcijas apstākļos kā karbamāta **42c** gadījumā tika pārbaudīts (*S*)-1-feniletīlkarbamāts (**42d**). Karbamāts **42d** iesaistīts reakcijā ar difenilfosfītu (**45**) un trifenilfosfītu (**44**) (10. tab., 5.–8. piem.). Pretēji karbamātam **42c**, karbamāta **42d** gadījumā attiecība **53b/IS** bija trīs reizes lielāka, ja trifenilfosfīta (**44**) vietā tika izmantots difenilfosfīts (**45**). Diemžēl nebija iespējams noteikt diastereoizomēru attiecību ar AIŠH, jo signāli pilnībā pārklājās. Tāpēc tā vietā izmantots <sup>1</sup>H KMR eksperiments, un galaprodukta *dr* attiecība noteikta kā 51:49. Visbeidzot tika izpēfītas reakcijas ar borneola karbamātu **42e** tādos pašos apstākļos kā ar diviem iepriekšējiem karbamātiem: reakcija ar benzaldehīdu (**43**), trifenilfosfītu (**44**) vai difenilfosfītu (**45**) 0,1 ekvivalenta  $Y(OTf)_3$  un 1,0 ekvivalenta TFAA klātbūtnē. **53c/IS** attiecība bija salīdzināma, lietojot trifenilfosfītu (**44**) vai difenilfosfītu (**45**), savukārt, tāpat kā  $\alpha$ -aminofosfonātam **53b**, arī  $\alpha$ -aminofosfonātam **53c** AIŠH

analīzē bija viens signāls. Diastereomēru attiecības novērtējums reakcijas produktam bija iespējams tikai ar  $^1\text{H}$  KMR eksperimentu. Jaunizveidotā hirālā centra CH protona signāls spektrā tika novērots ar ddd multiplicitāti, kas raksturīga 1:1 diastereoizomēru maisījumiem. Tomēr pēc maisījuma attīrīšanas tā paša protona signāls izskatījās kā dd, kas liecina, ka produktu **53c** izdevās izdalīt kā tīru diastereoizomēru.

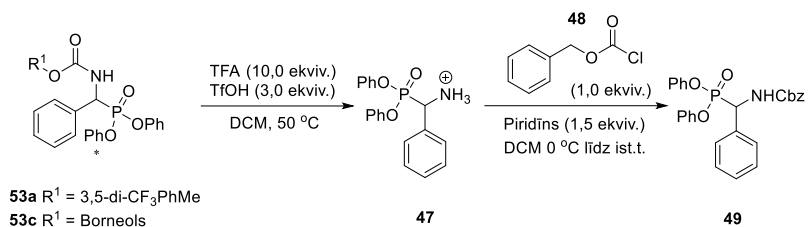
10. tabula

Biruma-Oleksišina reakcija ar hirāliem karbamātiem

Nr. p. k. <sup>a</sup>	Karbamāts	Fosfīts	Laiks (st.)	Produkts/IS	dr
1.	 <b>42c</b> R <sup>1</sup> = 3,5-di-CF <sub>3</sub> PhMe	HOP(OPh) <sub>2</sub>	4	0,30	57:43 <sup>b</sup>
2.			24	0,33	57:43 <sup>b</sup>
3.		P(OPh) <sub>3</sub>	4	0,67	69:31 <sup>b</sup>
4.			24	0,51	60:40 <sup>b</sup>
5.	 <b>42d</b> R <sup>1</sup> = PhEt	HOP(OPh) <sub>2</sub>	4	0,37	51:41 <sup>c</sup>
6.			24	0,24	51:41 <sup>c</sup>
7.		P(OPh) <sub>3</sub>	4	0,12	51:41 <sup>c</sup>
8.			24	0,10	51:41 <sup>c</sup>
9.	 <b>42e</b> R <sup>1</sup> = Borneols	HOP(OPh) <sub>2</sub>	4	0,43	100:0 <sup>c</sup>
10.			24	0,30	100:0 <sup>c</sup>
11.		P(OPh) <sub>3</sub>	4	0,40	100:0 <sup>c</sup>
12.			24	0,39	100:0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Y(OTf)<sub>3</sub> (0,1 ekv.), TFAA (1,0 ekv.), bezūdens MeCN; <sup>b</sup> dr noteikts ar AĪŠ; <sup>c</sup> dr noteikts ar  $^1\text{H}$  NMR pēc produkta attīrīšanās ar kolonnu hromatogrāfiju.

Lai apstiprinātu datus, kas iegūti no AĪŠ un  $^1\text{H}$  KMR analīzēm, bija plānots nošķelt karbamāta grupu  $\alpha$ -aminofosfonātos **53a** un **53c**, atbilstošais amīns būtu pārveidots  $\alpha$ -aminofosfonātā **49** pēc funkcionalizācijas ar benzilchlorformātu (**48**) (15. shēma). Iegūto produktu **49** varētu analizēt uz hirālās kolonnas, lai apstiprinātu reakcijas iespējamo stereoselektivitāti.

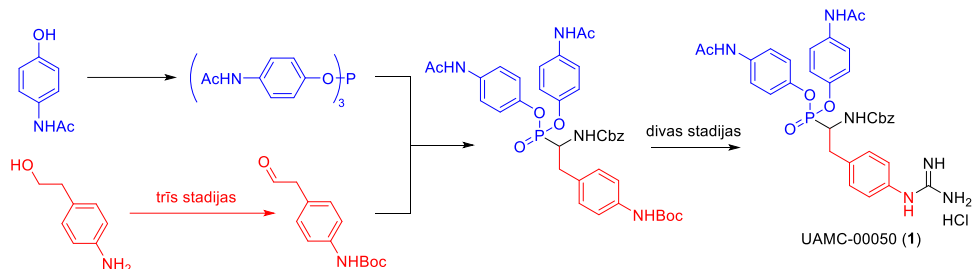


15. shēma. Karbamāta nošķelšana ar TFA/TfOH un amīna funkcionalizēšana ar benzilhlorformiātu.

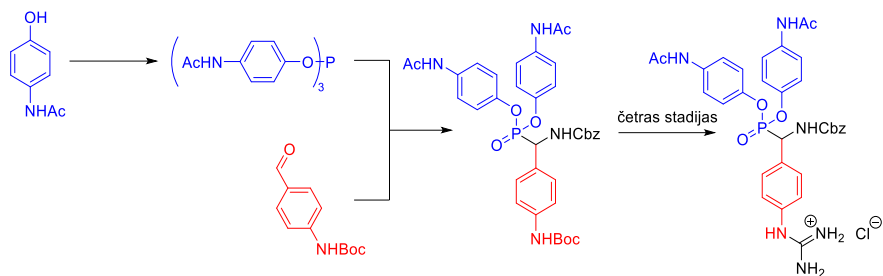
Pēc karbamāta funkcijas nošķelšanas un amīna **47** funkcionalizēšanas ar benzilhlorformiātu (**48**)  $\alpha$ -aminofosfonāts **49** bija izdalīts un analizēts ar hirālu AIŠH.  $\alpha$ -aminofosfonāta **53c** gadījumā, kas iegūts no borneola karbamāta, hirālās kolonnas hromatogrammā bija divi signāli ar gandrīz vienādu laukumu (51:49), kas liecina par racēmisku maisījumu. Kad  $\alpha$ -aminofosfonāts **53a** pārveidots par  $\alpha$ -aminofosfonātu **49**, hirālās kolonnas hromatogramma parādīja divus signālus ar dažādiem laukumiem (64:36), kas liecina par enantiomēro pārkumu 8 %. Galaprodukta **49** *er* bija zemāks nekā  $\alpha$ -aminofosfonāta **53a** *dr*, iespējams, nelielas racemizācijas dēļ, kas notiek, nošķeļot karbamātu un funkcionalizējot ar benzilhlorformiātu.

## SECINĀJUMI

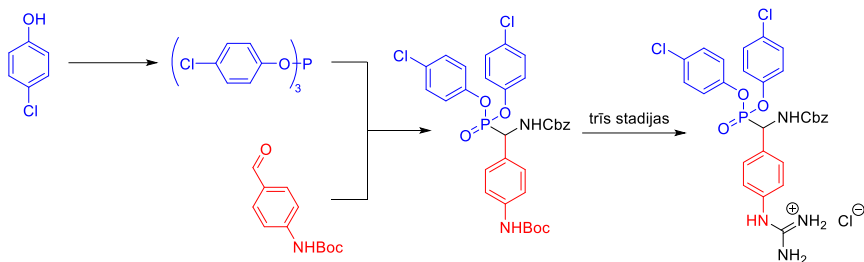
1. Kopējais iznākums UAMC-00050 (**1**) sintēzē palielināts no 3 % medicīnas ķīmijas metodes ceļā līdz 22 % procesu ķīmijas ceļā. Liels darbs veltīts aldehīda **9**, fosfonāta **11**, kā arī galaprodukta **1** iegūšanai un attīrīšanai. Oksidēšana ar DMP, sintēzējot aldehīdu **9**, aizstāta ar zaļāku un lētāku oksidēšanu ar NaClO/TEMPO/KBr. Metodes galvenā reakcija (Biruma-Oleksišina reakcija) plaši izpētīta UAMC-00050 (**1**) sintēzei. Katalizatoru izpēte parādīja, ka  $Y(OTf)_3$  ir visefektīvākais katalizators UAMC-00050 (**1**) sintēzei. Turpmāka reakcijas apstākļu optimizācija, izmantojot izvēlēto katalizatoru kombinācijā ar TFAA kā piedevu un THF/MeCN 1:1 kā šķīdinātāju, ļāva palielināt savienojuma **9** iznākumu no 11 % līdz 44 %. Guanidīns **1** iegūts no anilīna **21** vienā stadijā. Par reaģentu izvēlēts cianamīds, un guanilēšanas reakcijas optimizēšanai izmantota eksperimenta plānošanas pieeja (*DoE*). Jaunizstrādātais protokols ļāva ievērojami samazināt izmaksas UAMC-00050 (**1**) iegūšanai. Visos starpproduktu sintēzes posmos, iegūstot savienojumus **8**, **9** un **11**, izdevās atteikties no kolonnu hromatogrāfijas, un starpprodukti attīrīti, izmantojot alternatīvas metodes, kas piemērotas lielāka mēroga sintēzēm, piemēram, kristalizācija, suspendēšana/mazgāšana vai izgulsnēšana ar pretšķīdinātāju. Lai iegūtu galaproduktu ar mērķa tīrību > 98 %, bija nepieciešama tikai viena kolonnu hromatogrāfija. Uzlabotā sintēzes metode pārbaudīta, veicot sintēzi vairāku gramu mērogā, un ir piemērota UAMC-00050 (**1**) nepieciešamā daudzuma iegūšanai preklīniskajiem pētījumiem.



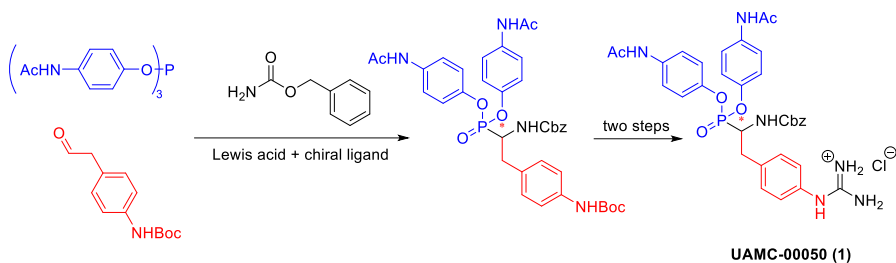
2. Izstrādāta piecu stadiju sintēzes metode, iegūstot 5,79 g UAMC-0004206 (**2**). Galaprodukts iegūts no aldehīda **24** ar kopējo iznākumu 30 %. Veicot Biruma-Oleksišina reakciju, koncentrācija atzīta par svarīgu parametru, kas ietekmē reakcijas iznākumu. Guanilēšanas ar *N,N*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karboksamīdīnu (**13**) posmā tika pieņemts, ka *i*PrOH izmantošana kombinācijā ar MeCN ir piemaisījumu avots galaproduktā. DCM izmantošana *i*PrOH vietā ļāva izdalīt tīru galaproduktu.



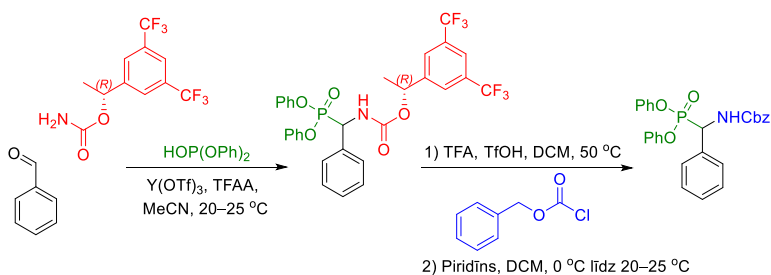
3. Izstrādāta četru stadiju sintēzes metode, iegūstot 1,9 g UAMC-0004207 (3). Galaprodukts iegūts no aldehīda **24** ar kopējo iznākumu 26 %. Līdzīgi kā UAMC-0004206 (2) sintēzē, veicot Biruma-Oleksišina reakciju, koncentrācija atzīta par svarīgu parametru, kas ietekmē reakcijas iznākumu. Papildu pētījumi bija nepieciešami, jo TFA atlikumam anilīnā bija negatīva ietekme uz guanilēšanas reakciju ar *N,N'*-di-Boc-1*H*-pirazol-1-karbonsamīdīnu (**13**). Bāziskā izejas savienojuma mazgāšana ar 0,5 %  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ūdens šķīdumu un jēlsavienojuma skābā mazgāšana ar 0,5 %  $\text{KHSO}_4$  ūdens šķīdumu pirms hromatogrāfiskās attīršanas ļāva palielināt aizsargātā guanidīna iznākumu.



4. Divi UAMC-00050 enantiomēri tika izolēti un testēti *in vitro*. Enzīmu tests iezīmēja 10 reizes lielāku atšķirību starp diviem stereozomēriem, kuros enantiomēram 1 ir labāka afinitāte ar uPA nekā enantiomēram 2. Enantiomēra 1 IC<sub>50</sub> rezultātā bija tikai divas reizes zemāks par racēmiskā maisījuma IC<sub>50</sub>. Tika pētīts stereoselektīvs sintētisks preparāts UAMC-00050, lai nodrošinātu materiālu toksikoloģiskiem pētījumiem vēlākā zāļu izstrādes posmā.



5. Iegūts hirāls  $\alpha$ -aminofosfonāta karbamāta atvasinājums ar 75:25 diastereomēro attiecību, izmantojot (*R*)-1-(3,5-bis(trifluormetil)fenil)etilkarbamātu kā hirālo palīgvielu Biruma-Oleksišina reakcijā. Pēc hirālās palīggrupas nošķelšanas ar skābi un aminogrupas funkcionalizācijas ar benzilchlorformiātu diastereoizomēru maisījums pārveidots par vēlamo ar Cbz aizsargāto  $\alpha$ -aminofosfonātu. Pārvērtību rezultātā iegūts enantiomēru maisījums ar 64:36 attiecību. Neskatoties uz zemo enantioselektivitāti šī metode ir nozīmīgs papildinājums stereoselektīvās Biruma-Oleksišina reakcijas attīstībai, kas atstāta novārtā vairāk nekā divas desmitgades.



## PATEICĪBAS

Pēdējie četri gadi nebija gluži kā pelde pa straumi, tāpēc īpašs paldies manam darba vadītājam *Dr. chem.* Kirilam Šubinam par to, ka viņš man iemācīja būt procesu ķīmiķim un vadīja promocijas darbu; profesoram *Dr. chem.* Aigaram Jirgenšonam par promocijas darba vadīšanu, recenzēšanu un sagatavošanu aizstāvēšanai; Pazam par neticamo projektu vadītāja darbu *IT-DED*<sup>3</sup> projektā; Marko un Alisei par darba pārskatīšanu, skaitļošanas aprēķiniem un pastāvīgo morālo atbalstu, jo dzīvē ir brīži, kad “*non posso ne scendere ne salire, ne scendere ne salire*”; manai ģimenei par mīlestību un pastāvīgo atbalstu; Sabīnei par laipnību un nemitīgo smaidu, kas padarīja šo ceļu mazāk grūtu!

Projekts ir saņēmis Eiropas Savienības pētniecības un inovācijas programmas “Apvārsnis 2020” Marijas Sklodovskas-Kirī sākotnējās apmācības tīkla (*ITN*) (*ITDED*<sup>3</sup>) (*H2020-MSCA-ITN-2017*), granta līguma Nr. 765608, finansējumu.

**DOCTORAL THESIS PROPOSED TO  
RIGA TECHNICAL UNIVERSITY FOR THE PROMOTION  
TO THE SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE**

To be granted the scientific degree of Doctor of Science (Ph. D.), the present Doctoral Thesis has been submitted for the defence at the open meeting of RTU Promotion Council on April 13, 2023 at 14.00 at the Faculty of Materials Science and Applied Chemistry of Riga Technical University, 3 Paula Valdena Street, Room 272.

**OFFICIAL REVIEWERS**

Dr. chem. Aiva Plotniece, Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia

Dr. Jurgen Joossens, University of Antwerp, Belgium

Dr. chem. Gints Šmits, Latvian Institute of Organic Synthesis, Latvia

**DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY**

I hereby declare that the Doctoral Thesis submitted for the review to Riga Technical University for the promotion to the scientific degree of Doctor of Sciences (Ph. D.) is my own. I confirm that this Doctoral Thesis has not been submitted to any other university for the promotion to a scientific degree.

Davide Ceradini ..... (signature)

Date.....

The Doctoral Thesis has been written in English. It consists of an introduction, literature review, results and discussion, experimental part, conclusion, 16 figures, 83 schemes, 45 tables, and 4 appendices. The total number of pages is 181 excluding appendices. The bibliography contains 133 titles.



## CONTENTS

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS .....	42
Introduction.....	42
Aims and objectives .....	43
Scientific novelty and main results.....	43
Structure of the thesis .....	44
Publications and approbation of the thesis .....	44
MAIN RESULTS OF THE THESIS .....	45
Development of an improved multigram synthesis of UAMC-00050 .....	45
Preparation of triaryl phosphite <b>5</b> .....	46
Boc-Protection of the amine group in compound <b>6</b> .....	47
Preparation of aldehyde <b>9</b> .....	47
Birum-Oleksyszyn reaction .....	49
<i>N</i> -Boc Deprotection of intermediate <b>11</b> .....	50
Guanylation of intermediate <b>21</b> .....	51
Purification of the final compound <b>1</b> .....	53
Process development route to UAMC-00050 .....	53
Backup $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-0004206 and a proof-of-concept $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-0004207 .....	54
Process optimization and preparation of UAMC-0004206 .....	55
Birum-Oleksyszyn synthesis of intermediate <b>25</b> .....	56
<i>N</i> -Boc Deprotection of intermediate <b>25</b> .....	57
Guanylation of intermediate <b>26</b> .....	58
<i>N</i> -Boc Deprotection of intermediate <b>28</b> and salt exchange of product <b>31</b> .....	59
Process development of UAMC-0004207.....	60
Birum-Oleksyszyn reaction .....	61
<i>N</i> -Boc deprotection of intermediate <b>34</b> .....	62
Guanylation of intermediate <b>39</b> .....	63
<i>N</i> -Boc Deprotection of intermediate <b>37</b> .....	64
Separation of two enantiomers of UAMC-00050.....	65

Stereoselective preparation of $\alpha$ -aminophosphonates.....	66
CONCLUSIONS.....	70
ACKNOWLEDGMENTS.....	75

# GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

## Introduction

Dry eye disease (DED) also known as *keratoconjunctivitis sicca* is a multifactorial disease of the ocular surface<sup>1</sup> that affects hundreds of millions of people around the world.<sup>2</sup> Risk factors for the development of DED include advanced age, female sex, hormonal imbalance, autoimmune disease, abnormal corneal innervation, vitamin deficiency, environmental stress, contact lens use, infection, medication use, and ophthalmic surgery.<sup>3</sup> The disease is characterized by a dry, gritty, or burning feeling in the eye, as well as excessive tearing and photosensitivity.<sup>4</sup> DED is an inflammatory disease that involves both metabolic and immune dysregulation. An increasing osmolarity in the tear film can induce oxidative conditions at the ocular surface which activates a pathological cascade. Recently, a new biologically active  $\alpha$ -aminophosphonate (UAMC-00050 (**1**); Figure 1) was developed at the University of Antwerp as a drug lead for the treatment of DED.<sup>5,6</sup> The molecule is a peptidic diphenyl phosphonate irreversible serine protease inhibitor which forms a covalent bond with a serine side chain hydroxyl group in the active site. The selectivity profile of this type of compounds is usually enforced by incorporating peptidic tails to the amine. In contrast, Joossens *et al.* demonstrated that a potent and selective inhibition can also be achieved with small, non-peptidic diphenyl phosphonates.<sup>5</sup> The diaryl phosphonate UAMC-00050 (**1**) shows good inhibitory activity against urokinase plasminogen activator (uPA) and other trypsin-like serine proteases, which are involved in eye diseases. Animals treated with UAMC-00050 displayed a significant reduction in ocular surface damage after evaluation with sodium fluorescein, compared to untreated, vehicle-treated and cyclosporine-treated animals. Concentrations of IL1 $\alpha$  and TNF $\alpha$  were also significantly reduced in tear fluid in UAMC-00050 treated rats. Additionally, inflammatory cell infiltration in the palpebral conjunctiva (CD3 and CD45), was substantially reduced. An accumulation of pro-MMP9 and a decrease in active MMP9 were found in tear fluid from animals treated with UAMC-00050, suggesting that trypsin-like serine proteases play a role in activating MMP9 in ocular inflammation in this animal model. To provide more material for pre-clinical studies we developed a new multigram synthesis, improving the overall yield, the cost of the process and its environmental impact. As a secondary goal, we aimed to provide 3-5 g of two  $\alpha$ -aminophosphonates similar to UAMC-00050: UAMC-0004206 (**2**), which was planned to be used as a backup for compound UAMC-00050, and UAMC-0004207 (**3**), which was used to investigate the activity of 4-chlorophenyl phosphonate derivatives (Figure 1). Furthermore, we aimed to perform a separation of two enantiomers of UAMC-00050 (**1**) to determine biological activity of pure isomers. As a part of this endeavor we attempted to develop a new enantioselective and diastereoselective method for the synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates.

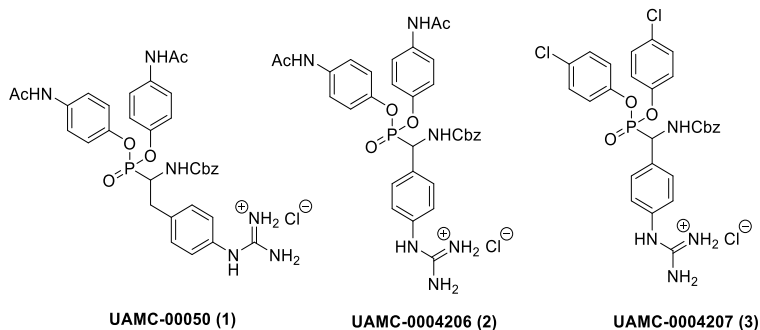


Fig. 1. Structures of UAMC-00050, UAMC-0004206 and UAMC-0004207.

### Aims and objectives

The thesis aims to develop a practical, efficient and safe methodology for the preparation of  $\alpha$ -aminophosphonates: UAMC-00050 (1), UAMC-0004206 (2), and UAMC-0004207 (3).

The following tasks were set:

1. Develop a procedure for the preparation of  $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-00050 (1) which can deliver multigram quantities of the product with reproducible quality. The route must be more efficient, safer and less expensive than the medicinal chemistry route.
2. Provide 3–5 g of the backup  $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-0004206 (2) and the proof-of-concept  $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-0004207 (3).
3. Isolate two enantiomers of UAMC-00050 (1) for *in vitro* studies and explore routes for the stereoselective preparation of UAMC-00050 (1).

### Scientific novelty and main results

1. A new method for the preparation of  $\alpha$ -aminophosphonates was developed using  $Y(OTf)_3$  as a catalyst.
2. An improved procedure for the preparation of multigram quantities of UAMC-00050 was developed.
3.  $\alpha$ -aminophosphonates UAMC-0004206 and UAMC-0004207 were prepared.
4. A diastereoselective route for the preparation of  $\alpha$ -aminophosphonate through a chiral carbamate was tested on a model substrate, that provides the corresponding  $\alpha$ -aminophosphonate with an enantiomeric excess of 28 %.

## Structure of the Thesis

The thesis is divided into 4 sections: in Section 1, the optimization efforts for the preparation of UAMC-00050 (**1**) are reported, in Section 2, the optimization efforts for the preparation of UAMC-0004206 (**2**) are reported, in Section 3, optimization efforts for the preparation of UAMC-0004207 (**3**) are reported, and in Section 4,d the studies of the stereoselective preparation of UAMC-00050 (**1**) are reported.

## Publications and approbation of the Thesis

The main results of the Thesis were summarized in 3 scientific publications, results of the research were presented at 3 conferences.

Scientific publications:

1. Ceradini, D., Shubin, K. One-pot synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates by yttrium-catalyzed Birum-Oleksyszyn reaction *RSC Adv.*, **2021**,11, 39147–39152. doi.org/10.1039/D1RA07718J
2. Ceradini, D., Shubin, K. New methods for the synthesis of phosphono- $\delta$ -lactones (microreview). *Chem Heterocycl Comp*, **2021**, 57, 1167–1169. doi.org/10.1007/s10593-021-03038-7
3. Ceradini, D., Cacivkins, P., Ramos-Llorca, A., Shubin, K. Improved Synthesis of the Selected Serine Protease uPA Inhibitor UAMC-00050, a Lead Compound for the Treatment of Dry Eye Disease. *OPRD* **2022**, 26, 10, 2937–2946. doi.org/10.1021/acs.oprd.2c00244
4. Ramos-Llorca, A., Decraecker, L., Cacheux, V. M. Y., Zeiburlina, I., De bruyn, M., Battut, L., Moreno-Cinos, C., Ceradini, D., Espinosa, E., Dietrich, G., Berg, M., De Meester, I., Van Der Veken, P., Boeckxstaens, G., Lambeir, A.-M., Denadai-Souza, A., Augustyns, K. Chemically Diverse Activity-Based Probes with Unexpected Inhibitory Mechanisms Targeting Trypsin-like Serine Proteases. *Frontiers in Chemistry*, **2023**, 10. doi.org/10.3389/fchem.2022.1089959 (*in press*).

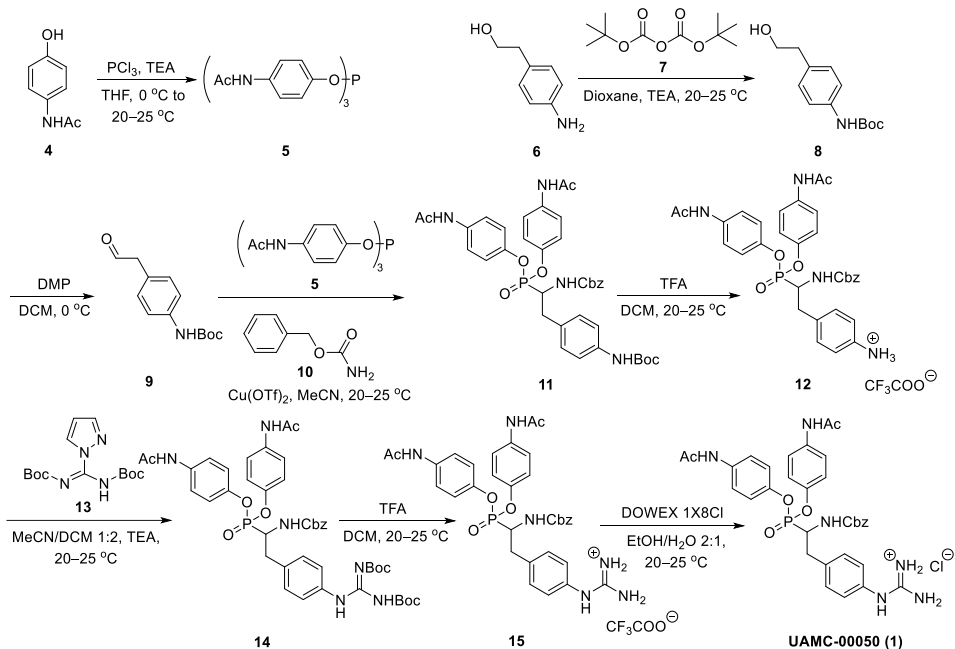
Presentations at conferences:

1. Process optimization of the synthesis of UAMC-00050, a novel uPA inhibitor, XXVI EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMC 2021), which took place virtually on August 29–<sup>1</sup> September 2, 2021.
2. Process optimization of the synthesis of UAMC-00050, a novel uPA inhibitor, Paul Walden 12<sup>th</sup> Symposium on Organic Chemistry, which took place virtually on 28–29 October 2021.
3. Upscaling of lead compounds from WP1 and enantioselective synthesis of theserine protease inhibitor UAMC-00050, Symposium DRY EYE DISEASE IT-DED<sup>3</sup> Consortium Meeting, which took at the Quinze-Vingts National Ophthalmology Hospital and the Vision Institute, Paris (France), 2–3 December 2021.

## MAIN RESULTS OF THE THESIS

### Development of an improved multigram synthesis of UAMC-00050

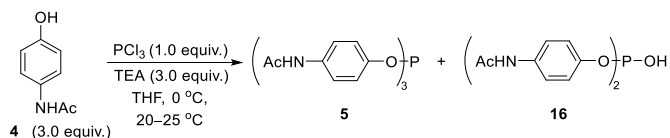
A medicinal chemistry route of the preparation of UAMC-00050 (Scheme ) was first repeated without any change, reproducing the methodology at various scales, from 100 mg to 17 g. The route starts with protection of the amine in 4-aminophenethyl alcohol (**6**) with Boc<sub>2</sub>O in the presence of triethylamine (TEA), followed by oxidation of alcohol **8** to aldehyde **9** with Dess-Martin periodinane (DMP). The molecule's core **11** is built with the one-pot three-component Birum-Oleksyszyn reaction between aldehyde **9**, benzyl carbamate (**10**) and phosphite **5**, using copper triflate as a catalyst.<sup>7-9</sup> Triaryl phosphite **5** was prepared from paracetamol (**4**) and used in the next step without any purification. Then, the Boc group was removed in TFA/DCM 1:1 v/v to generate salt **12**. The guanidine moiety was inserted using *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine (**13**), the two Boc groups were removed with TFA/DCM 1:1 v/v, and the trifluoroacetate counterion was ion-exchanged with chloride after stirring compound **15** with a DOWEX 1X8 Cl resin to get **1**. Once the medicinal chemistry route was tested, we noted a series of critical points, which are discussed here. A reproducibility issue was noticed, at a 4.3 mmol scale, with the Birum-Oleksyszyn reaction. The poor yield of the reaction (11 %) heavily affected the overall yield of the route (3 %), and the impurities generated in this step proved to be difficult to separate from the product. The purity of **5** is pivotal to curb the generation of side products in the Birum-Oleksyszyn step, since the acidic degradation products can cleave the Boc group and lead to the formation of side products. The use of the Dess-Martin periodinane (DMP) as an oxidizing agent for the preparation of aldehyde **9** is not suitable for a large-scale preparation due to its low atom economy and its safety concerns.<sup>10</sup> The preparation of a protected guanidine **14** employed *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine (**13**) as a reagent, which, due to its price, strongly affects the cost of the process. Despite being structurally simple, there is only one practical way to prepare **1**. Therefore, we decided to keep the Birum-Oleksyszyn reaction regardless of its poor yield. A screening of conditions was performed to increase the yield and the purity of the product **11**. A series of optimizations of reaction conditions were necessary to prepare and isolate phosphite **5** due to its instability in the presence of oxygen and moisture. Catalytic alternatives to DMP were explored to generate aldehyde **9** with higher safety and an improved atom economy. To reduce the costs, alternatives to *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine (**13**), were explored for the formation of guanidine moiety in compound **14**. The process mass intensity (PMI) was lowered, using alternatives to flash chromatography in the purification of the intermediates.



Scheme 1. Medicinal chemistry route to UAMC-00050.

### Preparation of triaryl phosphite **5**

Compound **5** was prepared according to the original conditions<sup>5</sup> after minor modifications (Scheme 2). The separation of the triaryl phosphite **5** from the main impurities (diaryl phosphite **16** and paracetamol (**4**)) via chromatographic separation, precipitation, or crystallization proved to be difficult. Therefore, the amount of side product was lowered after optimization of the reaction conditions (*e.g.* reducing the reaction time from 105 to 60 minutes). Water, present in the starting material, was found to be the main reason for the reduced purity of triaryl phosphite **5**. Careful drying of the starting material **4** in vacuo (5 mbar) for at least 24 h significantly improved the conversion and purity of product **5**. Residual water in paracetamol (**4**) was assessed to be 0.030 % (Karl Fisher titration). After the optimization of the reaction, phosphite **5** was obtained with a yield of 98 % and purity of 92.3 % area normalized (AN) by HPLC on a 44 mmol scale.



Scheme 2. Preparation of **5**, paracetamol (**4**) (3.0 equiv.) are reacted with  $\text{PCl}_3$  (1.0 equiv.) in THF in the presence of TEA (3.0 equiv.) at 0 °C.



## Boc-Protection of the amine group in compound **6**

In the medicinal chemistry procedure, protection of the amino group in **6** was achieved using 1.1 equiv. of di-*tert*-butyl dicarbonate in the presence of TEA (1.0 equiv.) in dioxane (Table 1, entry 1).<sup>5</sup> A better reaction protocol reported in the literature<sup>11</sup> (which does not require TEA) was successfully used in our process development. Compound **6** was treated with 1.1 equivalents of di-*tert*-butyl dicarbonate in EtOAc for 16 h (Table 1, entry 2). Purification of **8** was successfully achieved using a silica pad filtration instead of flash chromatography (Table 1, entry 3). The amount of silica was then reduced from 15.0 w/w to 8.3 w/w when the reaction was upscaled to 73 mmol (Table 1, entry 4). In a later improvement, crystallization was found to be a suitable tool for the purification of **8**. Among 7 different conditions, the mixture of MeCN/MTBE 1:1 v/v (solvent/**8** = 1.5:1 v/w) provided the product with 98 % yield and purity 99 % AN by HPLC (Table 1, entry 5).

Table 1

### Optimization of Preparation of Product **8**

Entry	Solvent	Scale (mmol)	Base	Method of purification	Yield (%) <sup>a</sup>	Purity (%) <sup>b</sup>
1	Dioxane	37.00	TEA	Flash chromatography	97	99
2	EtOAc	37.00	-	Flash chromatography	99	99
3	EtOAc	37.00	-	Pad of Silica (SiO <sub>2</sub> / <b>8</b> = 15:1 w/w)	95	99
4	EtOAc	73.00	-	Pad of Silica (SiO <sub>2</sub> / <b>8</b> = 8.3:1 w/w)	99	99
5	EtOAc	73.00	-	Crystallization (MeCN/MTBE 1:1/ <b>8</b> = 1.5:1 v/w)	98	99

<sup>a</sup> Isolated yield; <sup>b</sup> AN by HPLC.

## Preparation of aldehyde **9**

Looking for alternatives to DMP for the preparation of aldehyde **9** we began testing a series of catalytic conditions using air/O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and NaClO as primary oxidants. Unfortunately, air/O<sub>2</sub> with (bpy)CuI/TEMPO,<sup>12</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with AlCl<sub>3</sub><sup>13</sup> or KBr/TEMPO/pTsOH<sup>14</sup> failed to provide product **9**. On the other hand, using 1.5 equivalents of NaClO in the presence of a catalytic amount of TEMPO, KBr, and *n*Bu<sub>4</sub>Br,<sup>15, 16</sup> provided a 69 % conversion of substrate **8** (Table 2, entry 1). Gratifyingly, raising the equivalents of NaClO to 1.8, we obtained a complete conversion of alcohol **8** after 15 minutes (Table 2, entry 2). Conditions in entry 2 were upscaled to 4.22 mmol. Unfortunately, after purification, product **9** was obtained with a poor yield of 31 % with carboxylic acid **17** as the main impurity (Table 2, entry 3). As reported by Anelli *et al.*,<sup>17</sup> the presence of

*n*Bu<sub>4</sub>NBr led to an overoxidation of alcohol **8** to acid **17**. The yield was then increased to 59 % when the quaternary salt was removed from the reaction (Table 2, entry 4). The yield was further increased to 71 % when the amount of TEMPO was reduced from 0.05 to 0.01 equivalents and the reaction time was reduced from 60 minutes to 30 minutes (Table 2, entry 5). However, after upscaling the reaction to 37 mmol we noted a decrease in yield to 60 % (Table 2, entry 6). Reducing the amount of NaClO to 1.6 equivalents and the reaction time to 15 minutes allowed us to obtain **9** with yield 66 % (Table 2, entry 7). The flash chromatography purification was avoided by using the bisulfite adduct protocol<sup>18</sup> to isolate **9** with purity 99 % AN by HPLC. However, when this method of purification was applied to a 73 mmol scale preparation of **9**, a decrease in yield (59 %) was observed (Table 2, entry 8). Examination of the mother liquid indicated that it was caused by a slow formation of adduct **18** rather than by the catalytic oxidation. Extending the reaction time of the crude aldehyde with NaHSO<sub>3</sub> from 2 h to 16 h allowed the complete conversion of aldehyde **9** to intermediate **18**. The bisulfite derivative was then converted back to the aldehyde, after a reaction with aq. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, providing **9** in 71 % yield from **8** with purity 99.2 % AN by HPLC (Table 2, entry 9).

Table 2

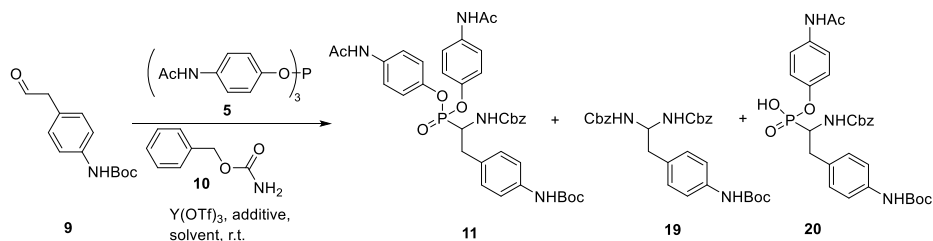
Optimization for the Aldehyde **9** Synthesis

Entry <sup>a</sup>	Alcohol (mmol)	NaClO (equiv.) <sup>b</sup>	TEMPO (equiv.)	Time (min)	Bisulfite extraction <sup>c</sup>	Conversion (%) <sup>d</sup>	Yield (%) <sup>e</sup>
1 <sup>f</sup>	0.42	1.5	0.05	120	–	69	N/A
2 <sup>f</sup>	0.42	1.8	0.05	15	–	100	N/A
3 <sup>f</sup>	4.22	1.8	0.05	15	2 h 20–25 °C	100	31
4	4.22	1.7	0.05	60	2 h 20–25 °C	100	59
5	4.22	1.7	0.01	30	2 h 20–25 °C	100	71
6	37.00	1.7	0.01	30	2 h 20–25 °C	100	60
7	37.00	1.6	0.01	15	2 h 20–25 °C	100	66
8	73.00	1.6	0.01	15	2 h 20–25 °C	100	59
9	73.00	1.6	0.01	15	16 h 20–25 °C	100	71

<sup>a</sup> 0.1 equiv. KBr; <sup>b</sup> NaClO concentration 11–15%; <sup>c</sup> stirred for 1 h at 0 °C before filtration; <sup>d</sup> <sup>1</sup>H NMR assay; <sup>e</sup> isolated yield; <sup>f</sup> 0.05 equiv. *n*Bu<sub>4</sub>NBr.

## Birum-Oleksyszyn reaction

The one-pot three-component reaction between aldehyde **9**, phosphite **5** and benzyl carbamate (**10**) is a key step in the synthesis of compound **1** (Scheme 3). Unfortunately, when the reaction was repeated on a gram scale, intermediate **11** was obtained in a poor yield (11 %). Moreover, impurities in the crude material made purification challenges. The optimization began with a screening of catalysts, among 18 Lewis and Brønsted acids, and Y(OTf)<sub>3</sub> was able to provide **11** with a yield of 42 % and an improved impurity profile (Table 3, entry 1).<sup>19</sup> Next, we focused on solvent optimization. While running the reaction in MeCN, we noted the formation of a precipitate, later identified as aminoral **19**. The screening of eight reaction mediums revealed the mixture THF/MeCN 1:1 v/v as the most appropriate to dissolve aminoral **19**, which led to a 44 % yield of **11** (Table 3, entry 2). In addition, the yield was further raised to 45 % when the concentration was increased from 0.07 M to 0.17 M (Table 3, entry 3). A range of anhydrides was then screened, as additives as these are known to promote a similar reaction between aminorals and alkylphosphonous acids.<sup>20–23</sup> Equimolar amounts of both acetic and trifluoroacetic anhydride were able to increase the yield of  $\alpha$ -aminophosphonate **11** to 50 % and 52 %, respectively (Table 3, entries 4 and 5).



Scheme 3. Birum-Oleksyszyn reaction for the preparation of  $\alpha$ -aminophosphonate **11**.

Table 3

### Solvent and Additive Screening for the Synthesis of **11**

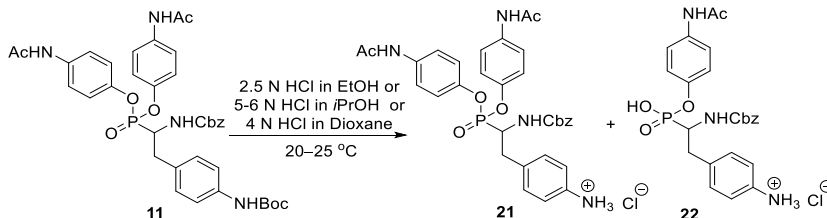
Entry <sup>a</sup>	Solvent	Additive (1.0 equiv.)	Conc. (M)	Yield of <b>11</b> (%) <sup>b</sup>	Ratio <b>11/20</b>
1	MeCN	–	0.07	42	80.3:19.7
2	MeCN/THF 1:1	–	0.07	44	81.3:18.7
3	MeCN/THF 1:1	–	0.17	45	75.7:24.3
4	MeCN/THF 1:1	Ac <sub>2</sub> O	0.17	50	80.4:19.6
5	MeCN/THF 1:1	TFAA	0.17	52	75.7:24.3

<sup>a</sup> 1.0 equiv. of aldehyde **9**, 1.0 equiv. of benzyl carbamate (**10**), 1.0 equiv. of phosphite **5**, 4.3 mmol scale, quench after 4 h; <sup>b</sup> isolated yield.

At the end of the reaction, paracetamol (**4**), diarylphosphite **16**, monoaryl phosphonate **20**, and aminal **19** constituted major impurities. A basic wash of the crude material with a 0.5 M aqueous solution of NaOH allowed an almost complete removal of acidic impurities (*i.e.* paracetamol (**4**) monoaryl phosphonate **20** and diarylphosphite **16**), while a silica pad filtration was used to remove aminal **19** and other lipophilic impurities from the product. At the end of these procedures,  $\alpha$ -aminophosphonate **11** was obtained with a purity of 64.2 % AN by HPLC. After the basic wash, around 8.3 % AN by HPLC of paracetamol (**4**) was still present in the crude material. Antisolvent precipitation in a basic aqueous solution allowed the removal of the remaining byproduct **4**. A 0.5 % aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> was added dropwise to a solution of crude **11** in acetone. The precipitate was isolated with a purity of 82.3 % AN by HPLC. Next, we focused on the removal of the colored impurities. Nine different charcoals were tested; unfortunately, none of them was able to remove the colored impurities. Slurry conditions were then tested as a purification method. The crude material was stirred in a solution of EtOAc/acetone 19:1 v/v. After 16 h of stirring, compound **11** was isolated from the mother liquor with a purity of 98 % AN by HPLC. The reaction and the purification protocols (*i.e.* basic wash, silica pad, antisolvent precipitation, and slurry) were then tested with 10.00 g (43 mmol) of aldehyde **9** as a starting material providing the  $\alpha$ -aminophosphonate **11** in 44 % yield with a purity of 98.2 % AN by HPLC.

#### N-Boc Deprotection of intermediate **11**

TFA in DCM 1:1 v/v at room temperature was used to remove the Boc-protecting group from **11** in the medicinal chemistry route. HCl was investigated as a more economical alternative to TFA and led to less hygroscopic HCl salt (Scheme 4). Initially, we used 2.5 N HCl in ethanol, a solvent capable of dissolving **11**. However, at the end of the reaction, there was noted a modest presence of monoaryl **22**. A similar problem was noted with the use of 5–6 N HCl in *i*PrOH. Substrate **11** was treated with 4 N HCl in dioxane for 3 h. Aniline hydrochloride **21** was then isolated from the reaction mixture after antisolvent precipitation of an EtOH solution of the crude material in 10 volumes of stirred EtOAc at 20–25 °C. After optimization conditions of *N*-Boc, deprotection and work-up were applied for the upscale. Aniline hydrochloride **21** was obtained with a yield of 99 % and purity of 97.9 % AN by HPLC when using 14 mmol of  $\alpha$ -aminophosphonate **11** as a starting material.



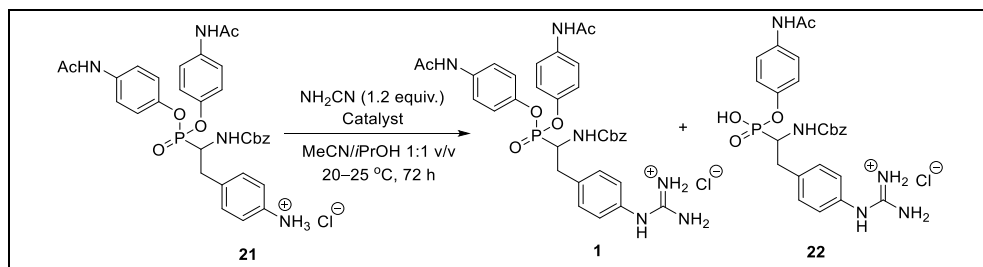
Scheme 4. HCl-mediated *N*-Boc deprotection of **11**.

## Guanylation of intermediate **21**

In the medicinal chemistry route, the final product **1** was prepared from aniline TFA salt **12** by inserting the guanyl group using *N,N*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide (**13**). This reaction was followed by the removal of Boc groups with TFA in DCM and salt exchange with DOWEX 1X8 Cl resin to convert intermediate **15** to product **1**. In order to reduce the step count, we tested a direct way to convert aniline HCl salt **21** to product **1**. Direct transformations of aniline to aryl guanidine are present in literature.<sup>24–29</sup> From these, guanylation with NH<sub>2</sub>CN was selected for the development of the protocol with the best atom economy and costs.<sup>24, 25</sup> Initially, the guanylation of aniline salt **21** was performed with 1.2 equivalents of NH<sub>2</sub>CN in the presence of 0.1 equivalents of Sc(OTf)<sub>3</sub> in a panel of solvents and solvent mixtures at room temperature. These studies revealed MeCN/*i*PrOH 1:1 v/v as the most optimal reaction media to give 38 % conversion of aniline salt **21** in 72 h (Table 4, entry 1). With the optimized medium, we tested a series of acids in catalytic or equimolar amounts. Lewis acids like Bi(OTf)<sub>3</sub> and Y(OTf)<sub>3</sub> (Table 4, entries 2 and 3) and Brønsted acids like HCl, HNO<sub>3</sub> and AcOH (Table 4, entries 4–6) failed to provide improved conversion compared to Sc(OTf)<sub>3</sub>. Before further optimization efforts, an isolation/purification method for product **1** was developed. The product was isolated as a solid after a dropwise addition of an EtOH solution of crude **1** to 10 volumes of stirred *i*PrOAc at 20–25 °C.

Table 4

Catalyst Optimization for the Direct Guanylation of **21**



Entry <sup>a</sup>	Catalyst	Equiv. catalyst	Conversion (%) <sup>b</sup>
1	Sc(OTf) <sub>3</sub>	0.1	38
2	Bi(OTf) <sub>3</sub>	0.1	34
3	Y(OTf) <sub>3</sub>	0.1	25
4	HCl	1.0	8
5	HNO <sub>3</sub>	1.0	40
6	AcOH	1.0	11

<sup>a</sup> 0.08 mmol of aniline **21**, 1.2 equiv. of NH<sub>2</sub>CN, 1.0 M, 72 h, MeCN/*i*PrOH 1:1 v/v; <sup>b</sup> HPLC assay.

After the first screening, we speculated that three variables (*i.e.* concentration, reaction time, and equivalents of  $\text{NH}_2\text{CN}$ ) might have an important role in the reaction outcome. A Design of Experiment (DoE) approach was selected to explore all three variables at the same time and eventually identify any interaction between them. The limits of the three variables were set as follows: 0.1–2.0 M for the concentration, 1.2–10.0 for the equivalents of  $\text{NH}_2\text{CN}$  and 48–96 h for the reaction time. The DoE was performed with the support of the artificial intelligence web-based software xT SAAM.<sup>30</sup> The program uses stochastic optimization techniques to produce suggestions for the next experiments until an objective is satisfied. In our case, the objective was to maximize the yield of the final product. A total of 22 experiments, divided into 4 consecutive iterations of parallel experiments, were carried out. The values of yield were collected and the software, through an automated mechanism, generated the final model. From the response surface model (RSM) (Fig. 2), it was observed that the best yield could be obtained when the concentration was set to 0.5 M with  $\text{NH}_2\text{CN}$  equivalents and time maximized.

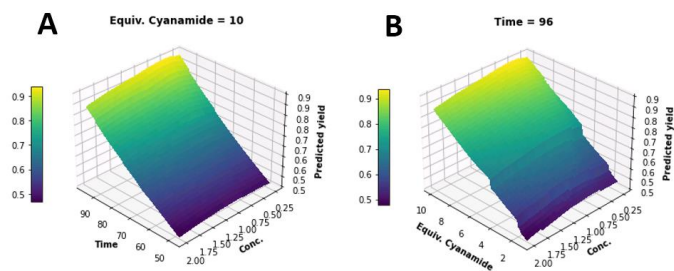


Fig. 2. Predicted yield RSM for the cyanamide guanylation of **1** in *i*PrOH/MeCN 1:1: A – when cyanamide equivalents are fixed at 10; B – when time is fixed at 96 h. Yellow regions indicate the maximum predicted yield.

With the optimized conditions (*i.e.* 0.5 M concentration, 10.0 equiv. of  $\text{NH}_2\text{CN}$ , and 96 h reaction time) the conversion was improved to 95 % and the final product **1** was obtained on a small scale (0.08 mmol) with 86 % yield and purity 89 % AN by HPLC (Table 5, entry 1). However, after an upscale of the reaction to 0.77 mmol, we noted a drop in conversion and, therefore, in yield and purity (Table 5, entry 2). An increase of the equivalents of  $\text{NH}_2\text{CN}$  to 15.0 was necessary to maintain a 95 % conversion of starting material **21** (Table 5, entry 3). A second screening of the reaction medium identified that the mixture of THF/EtOH 2:1 v/v was able to maintain a 95 % conversion when using 10 equivalents of  $\text{NH}_2\text{CN}$  both at 0.77 and 7.7 mmol (Table 5, entries 4 and 5). On the 7.7 mmol scale, a direct guanylation of aniline **21** in THF/EtOH 2:1 v/v with 10 equivalents of  $\text{NH}_2\text{CN}$  provided **1** in 90.0 % yield with purity 91.0 % AN by HPLC. Among the impurities in the final material we noticed a small presence of monoarylphosphonate **22** amounting to 0.4–1.1 % AN by HPLC.

Table 5

Medium Optimization for the Direct Guanylation of **21**

Entry <sup>a</sup>	Scale (mmol)	Solvent	Equiv. NH <sub>2</sub> CN	Yield (%) <sup>b</sup>	Purity (%) <sup>c</sup>
1	0.08	MeCN/ <i>i</i> PrOH 1:1	10	86	89
2	0.77	MeCN/ <i>i</i> PrOH 1:1	10	77	85
3	0.77	MeCN/ <i>i</i> PrOH 1:1	15	83	88
4	0.77	THF/EtOH 2:1	10	89	91
5	7.7	THF/EtOH 2:1	10	90	91

<sup>a</sup>0.1 equiv of Sc(OTf)<sub>3</sub> as catalyst, 96 h, 0.5 M; <sup>b</sup>isolated yield; <sup>c</sup>AN by HPLC.

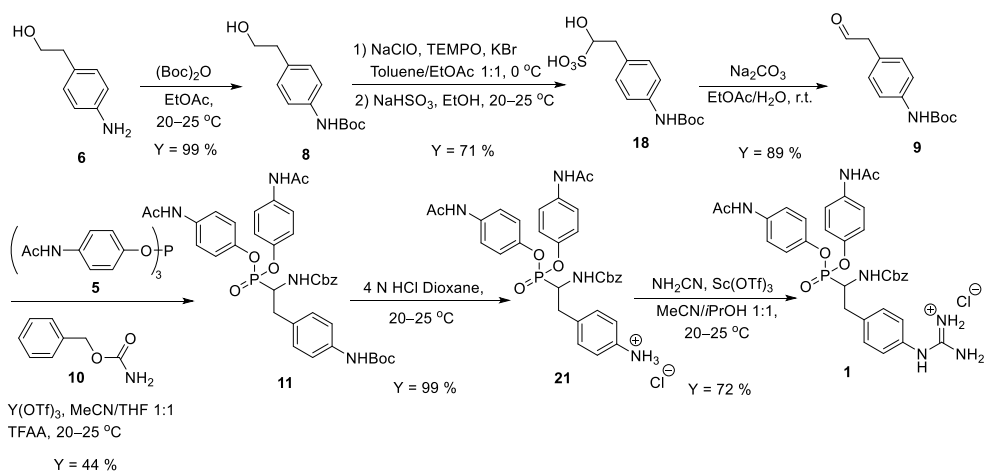
Purification of the final compound **1**

At first, crystallization of crude product **1** was attempted; however, none of the 17 solvents screened was able to yield pure **1**. With these results in hand, we focused on different methods of purification. We decided to test the precipitation of product **1** with a series of antisolvents to see if it was possible to increase the purity. A solution of crude **1** in absolute EtOH was added dropwise to 7 different antisolvents. Among 5 organic solvents and 2 aqueous solutions, only *i*PrOAc and EtOAc were able to slightly increase the purity but not in a sufficient way to reach the 98 % purity target. Last, we investigated reverse phase chromatography (RP) for the purification of final product **1**. After a range of eluents screening, a gradient of water/(MeCN/EtOH 9:1 v/v) was selected. Compound **1** was successfully isolated using a C<sub>18</sub> RP column. The purification was tested on a 3.75 g scale obtaining **1** in two fractions, S1 with a purity of 98.1 % AN by HPLC and S2 with a purity of 99.4 % AN by HPLC. The pure material was recovered with a 79 % yield from the crude product, with a total yield of  $\alpha$ -aminophosphonate **1** from aniline **21** of 72 %.

## Process development route to UAMC-00050

In summary, an optimized process for the scalable preparation of the  $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-00050 has been developed. Key aldehyde **9** was prepared according to the Anelli-Montanari protocol using bleach as the primary oxidant and TEMPO/KBr as the catalytic system. The yield was increased from 65 to 71 % and the atom economy was improved from 33 to 66 %. The Birum-Oleksyszyn reaction for the preparation of pivotal intermediate **11** was optimized. The combination of Y(OTf)<sub>3</sub> as the catalyst, TFAA as the additive and THF/MeCN (1:1 v/v) as the reaction medium increased the yield from 11 to 44 %. Purification of **11** was achieved using alternative methods to flash chromatography (*e.g.* basic extraction, slurry purification, antisolvent precipitation). For the preparation of product **1**, an AI-based software (xT-SAAM) was used to improve the preparation of **1** using cyanamide as a reagent. The optimized reaction was used to replace the expensive *N,N*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine, cutting the cost for the

preparation of UAMC-00050. The use of chlorinated solvents and flash chromatography purification of intermediates were removed from the process. Only the final material required flash chromatography purification in order to reach the target purity >98 %. The new multi-gram process improved the overall yield of compound **1** from 3 % for the medicinal chemistry route to 22 % with a total of 6 steps (Scheme 5).



Scheme 5. Optimized synthetic route to UAMC-00050.

### Backup $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-0004206 and a proof-of-concept $\alpha$ -aminophosphonate UAMC-0004207

The University of Antwerp, in the past years, has tested a series of activity-based probes (ABPs) derived from  $\alpha$ -aminophosphonates. From the results, it was found that ABPs derived from  $\alpha$ -aminophosphonates generated from a substituted benzaldehyde showed high activity toward the uPA and low activity toward the thrombin. The results prompted us to develop two molecules incorporating a substituted benzaldehyde instead of a substituted phenylacetaldehyde as for UAMC-00050 (**1**). UAMC-0004206 (**2**) similar to UAMC-00050 possesses paracetamol phosphonate ester. The compound would serve as a follow-up of the lead compound UAMC-00050, while UAMC-0004207 (**3**) possess a 4-chlorophenol phosphonate ester. This compound will be tested as proof of concept for the activity, discovered in ABPs that incorporate the 4-chlorophenol phosphonate ester in their structure.



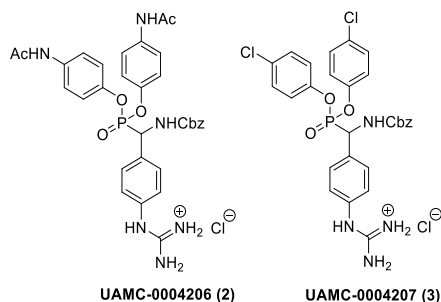
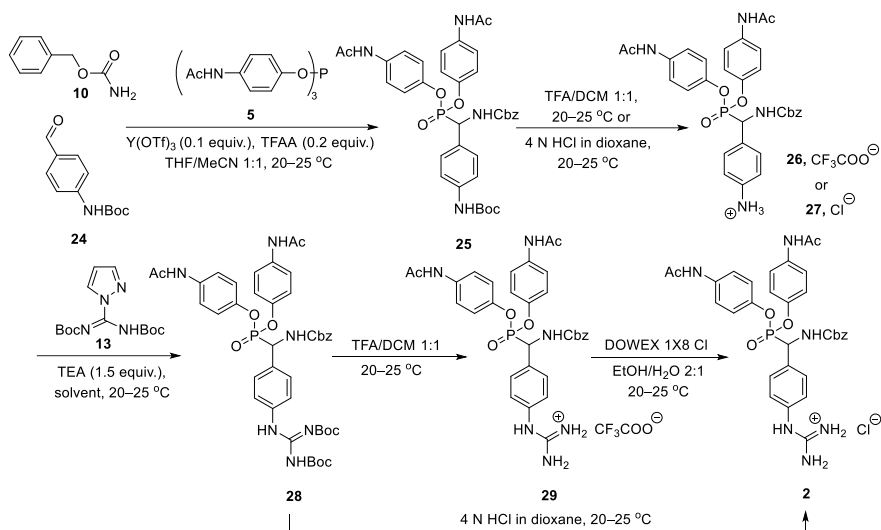


Fig. 3. Backup compound UAMC-0004206 and a proof-of-concept compound UAMC-0004207.

### Process optimization and preparation of UAMC-0004206

For the preparation of UAMC-0004206 (**2**), *tert*-butyl(4-formylphenyl)carbamate (**24**) was purchased and used as starting reagent for the synthesis of **2** (Scheme 6). The Birum-Oleksyszyn reaction conditions used for intermediate **11** in UAMC-00050 synthesis were adapted for compound **25**. *N*-Boc deprotection in compound **25** was performed with 4 N HCl in dioxane or TFA/DCM 1:1 v/v. For the synthesis of UAMC-0004206, analogous to the medicinal chemistry synthesis of UAMC-00050, we used *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboximidine (**13**) to insert the guanidine moiety in the  $\alpha$ -aminophosphonate. In this way, the resulting Boc-protected guanidine **28** was successfully purified by flash chromatography on silica and the required purity (95–98 %) was easily achieved after one purification. Next, the last *N*-Boc deprotection was performed with HCl to access directly the final compound **2** or with TFA followed by a salt exchange with the resin DOWEX 1X8.



Scheme 6. Synthetic route for the preparation of UAMC-0004206.

### Birum-Oleksyszyn synthesis of intermediate 25

The first step for the preparation of UAMC-0004206 (**2**) is a three-component Birum-Oleksyszyn reaction between *tert*-butyl(4-formylphenyl)carbamate (**24**), benzyl carbamate (**10**) and the triaryl phosphite **5** (Table 6). With our knowledge derived from UAMC-00050 synthesis, we decided to use 0.1 equivalents of yttrium triflate as a catalyst, a mixture of MeCN/THF 1:1 v/v as a reaction medium, and TFAA as an additive. A series of small-scale experiments (0.22 mmol of aldehyde **24**) was run in order to find the optimum concentration, the right ratio of equivalents of TFAA and phosphite **5**, and the optimal quenching time of the reaction. The outcome of the reaction was calculated based on the ratio between the chromatographic concentration of product **25** and the internal standard (naphthalene). From the screening, the following conditions (1.0 and 1.5 equivalents of phosphite **5**, and concentrations 0.17, 1.0, 1.5, and 2.5 M) were selected for a larger scale experiment with an isolated yield of product **25**. Four experiments were run with 2.2 mmol of aldehyde **24**. The product was isolated from the reaction mixture after flash chromatography. The standard conditions from UAMC-00050 provided **25** with a yield of 46 % and a purity of 89 % AN by HPLC (Table 6, entry 1). At 1.00 M and with 1.5 equivalents of phosphite **5**,  $\alpha$ -aminophosphonate **25** was obtained with a yield of 59 % and a purity of 84 % AN by HPLC. The best condition of the small-scale screening (1.50 M and 4 h quench) provide the product with a yield of 64 % and a purity of 84 % AN by HPLC, while with a higher concentration of 2.5 M product **25** was obtained after purification with 55 % yield and purity 90 % AN by HPLC. The 2.2 mmol scale experiments confirmed the results of the first screening. Condition in Table 6, entry 3, (1.50 M, 1.0 equivalents of phosphite **5** and quench after 4 h) was selected for multigram preparation of **25**. Before moving to 4.4 and 11.0 mmol scale, we investigated purification methods

alternative to flash chromatography. Unfortunately, we were not able to find a suitable solvent for product **25** to perform a basic wash analogous to UAMC-00050. The crude product was then dissolved in 96 % EtOH and added dropwise to 10 volumes of stirred EtOAc at 0 °C. This purification allowed us to reach a purity ranging from 87 to 94 % AN by HPLC directly from a crude reaction product with just one purification step.

Table 6

Batches with Isolation of Product **25**

Reaction scheme showing the conversion of **24** to **25** using reagent **5** and **10**. Conditions:  $Y(OTf)_3$  (0.1 equiv.), TFAA (0.2 equiv.), THF/MeCN 1:1 v/v, 20–25 °C.

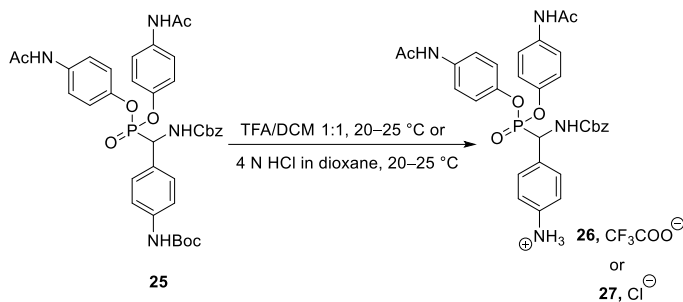
Entry	Scale (mmol)	Equiv. of <b>5</b>	Conc. (M)	Time (h)	Yield (%) <sup>a</sup>	Purity (%) <sup>b</sup>
1	2.2	1.0	0.17	8	46	89
2	2.2	1.5	1.00	4	59	84
3	2.2	1.0	1.50	4	64	84
4	2.2	1.0	2.50	4	55	90
5	4.4	1.0	1.50	4	55	94
6	11.0	1.0	1.50	4	63	87

<sup>a</sup> Isolated yield; <sup>b</sup> AN by HPLC.

### N-Boc Deprotection of intermediate **25**

Initially the Boc group was removed using conditions developed for the N-Boc deprotection of UAMC-00050.  $\alpha$ -Aminophosphonate **25** was treated with 4 N HCl in dioxane for 3 h at 20–25 °C, then, the product was isolated by antisolvent precipitation of the crude material solution in EtOH added dropwise in 10 volumes of stirred MTBE at 0 °C. The HCl salt of aniline **27** was obtained in general with good yields and purity among different batches. However, it was noted that in the next step, the guanylation with *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide (**13**), poor yields of guanylated product **28** were obtained when HCl aniline salt was used as starting material. As an alternative, TFA aniline salt **26** was prepared instead, treating the starting Boc-protected material **25** with TFA/DCM 1:1 v/v at 20–25 °C. After 45 minutes the conversion was complete and solid product **26** was isolated as for product **27**. The TFA aniline salt **26** proved to be superior to the HCl salt of aniline **27** in the guanylation step, therefore, we decided to use TFA

to remove the Boc group in a larger scale preparation of aniline **26**. The reaction was tested with 2.59 mmol of  $\alpha$ -aminophosphonate **25**, and aniline trifluoroacetate **26** was obtained with a yield of 99 % and a purity of 97 % AN by HPLC (Scheme 7).



Scheme 7. *N*-Boc Deprotection of intermediate **25**.

### Guanylation of intermediate **26**

In the original medicinal chemistry route, guanylation of aniline trifluoroacetate **26** was performed using *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide (**13**) as a reagent. The resulting Boc-protected product can be easily purified by chromatography on silica. Initially, 0.78 mmol of aniline hydrochloride **27** were treated with 1.2 equivalents of reagent **13** in *i*PrOH/MeCN 1:1 v/v, the reaction was quenched when the conversion of aniline **27** HCl salt was higher than 90 % (Table , entry 1). Unfortunately, the conditions in entry 1 were poorly reproducible on the same scale and the yield of product **28** dropped to 54 % (Table , entry 2). TFA salt of aniline **26** was then used as a starting material. After 96 h a conversion of **26** higher than 90 % was reached and the product was isolated with a yield of 74 % (Table , entry 3). HPLC analysis of the isolated material showed the presence of an impurity whose mass corresponds to the structure of **29**, where one *tert*-butyl group in the product is exchanged with an *iso*-propyl group due to transesterification with isopropanol. After using DCM/MeCN 1:1 v/v as the reaction medium instead of *i*PrOH/MeCN 1:1 v/v, impurity **29** was not observed anymore in the reaction mixture. Using the difference in polarity between the product and the reagents, *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide and TEA were removed with a slurry purification in heptane/EtOAc 2:1 v/v. Product **28** was obtained, after filtration, with a purity of 85 % AN by HPLC, containing 10 % AN by HPLC of aniline **26** as a free base. Product **28** was separated from the starting aniline by flash chromatography on silica (gradient heptane/EtOAc). The first multigram synthesis with 2.68 mmol of aniline trifluoroacetate **26** was complicated by a much longer reaction time (144 h) required to reach conversion of starting material higher than 90 %. After slurry purification and flash chromatography, the product was isolated with a yield of 67 % (Table , entry 5). As the long reaction time did not lead to major hydrolysis of the starting material or the product, we proceed with further upscale without any modification to the reaction parameters (*e.g.* solvents, concentration). Running the reaction to 7.68 mmol we noted the same slower conversion, which in this case the 90 % conversion threshold

was reached after 120 h, however, some product was lost during the purification, which led to a 43 % yield of product **28** (Table , entry 6). The last multigram synthesis was performed with 10.20 mmol of starting material, a conversion higher than 90 % was reached only after 168 h, the product **28** was isolated with a yield of 71 % and a purity of 97 % AN by HPLC.

Table 7

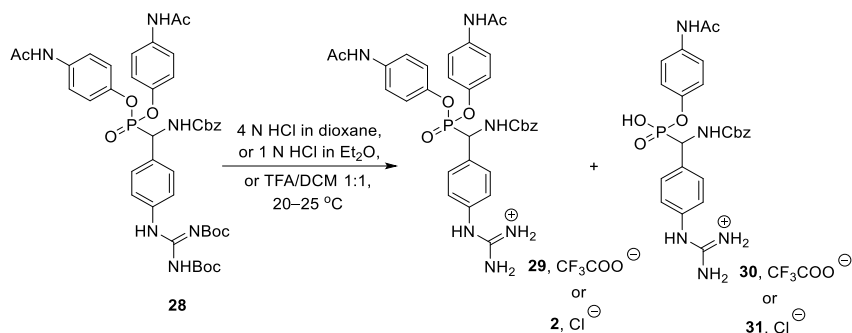
Optimization of Guanylation Reaction for the Preparation of **28**

Entry	Aniline (mmol)	Aniline	Solvent	Conc. (M)	Time (h)	Yield (%) <sup>a</sup>
1	0.78	<b>27</b>	<i>i</i> PrOH/MeCN 1:1 v/v	1.0	96	88
2	0.78	<b>27</b>	<i>i</i> PrOH/MeCN 1:1 v/v	1.0	96	54
3	0.70	<b>26</b>	<i>i</i> PrOH/MeCN 1:1 v/v	1.0	96	74
4	0.70	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 v/v	1.0	96	75
5	2.68	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 v/v	1.0	144	67
6	7.68	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 v/v	1.0	120	43
7	10.20	<b>26</b>	DCM/MeCN 1:1 v/v	1.0	168	71

<sup>a</sup> Isolated yield.

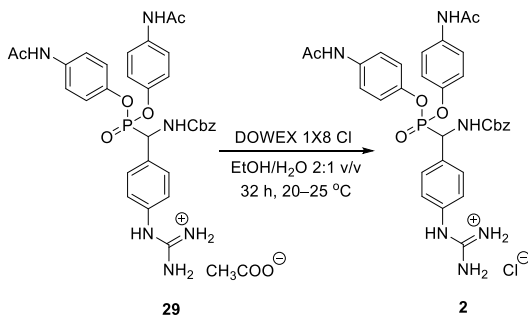
***N*-Boc Deprotection of intermediate **28** and salt exchange of product **31****

The *N*-Boc deprotection was initially carried out with an excess of 4 N HCl in dioxane in order to obtain directly the desired chloride salt **2** required for the biological tests. A complete conversion of the starting material **28** to product **2** was achieved after 20 h (Scheme 8). HPLC assay of the final material showed the presence of the hydrolyzed monoaryl side product **31**, which counted as 11 % AN by HPLC. Substitution of 4 N HCl in dioxane with TFA/DCM 1:1 v/v curbed the formation of the hydrolyzed side product **30** and provided a full conversion of **28** after 3 h with an 84 % yield of **29** at a 0.11 mmol scale. With the working conditions in hand, larger scale experiments were performed. At 0.51, 1.03 and 2.25 mmol scale the desired product **29** was obtained with a yield of 99 % and with the side product **30** ranging from 0.5 to 1.0 % AN by HPLC in the final material.



Scheme 8. *N*-Boc Deprotection of intermediate **28**.

Finally, trifluoroacetate in **29** was exchanged with chloride using DOWEX 1X8 Cl resin (Resin/Salt **29** = 10:1 w/w; Scheme 8), the product **2** was collected after antisolvent precipitation: a solution of crude **2** in EtOH added dropwise in 10 volumes of stirred MTBE at 0 °C. The salt exchange was performed on eight different batches and the scale was kept below 2.0 mmol of TFA salt **29**. Overall, 5.79 g of final material was collected from different batches with an HPLC purity higher than 95 % AN, which is acceptable for biological tests (Scheme 9).

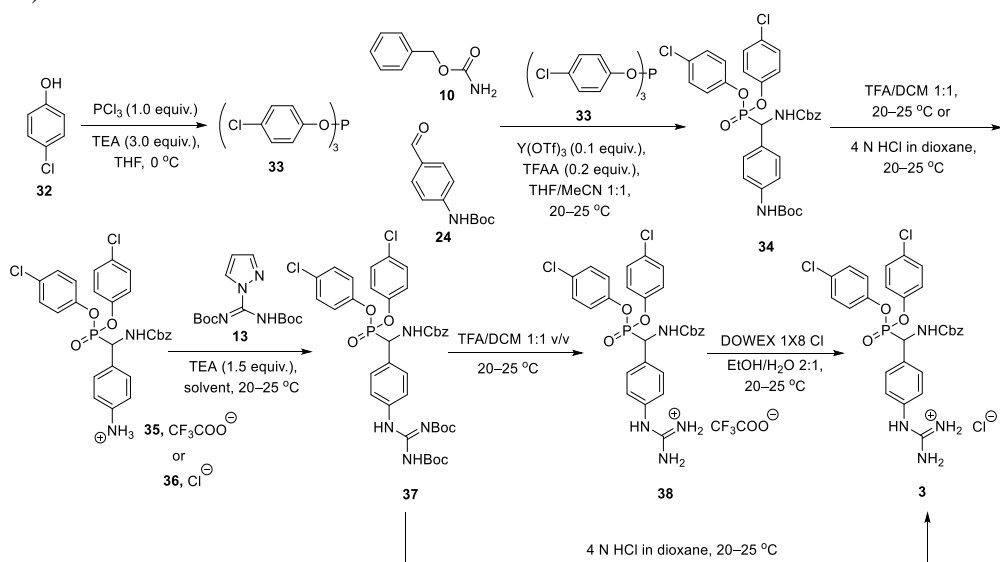


Scheme 9. Salt exchange to product **2**.

### Process development of UAMC-0004207

UAMC-0004207 (**3**) possesses a similar structure to UAMC-0004206 (**2**), where the only difference is in the phosphonate ester. In this molecule, the paracetamol ester is substituted with a 4-chlorophenol ester. Due to the toxicity of the phenol, which is released once the molecule reacts with serine in the active site of the enzyme (*e.g.* uPA), UAMC-0004207 was not planned to be used as a follow-up compound of UAMC-00050. This compound, instead, will be used to validate

the proof of concept of ABPs based on 4-chlorophenol phosphonate esters. We decided to use the same route, as used for the preparation of UAMC-0004206 (Scheme 6). Phosphite **33** was prepared from phenol **32** with the same procedure as phosphite **5**. Birum-Oleksyszyn reaction was run in MeCN/THF 1:1 v/v mixture and promoted by 10 mol% of Y(OTf)<sub>3</sub>. The optimal concentration, quench time and equivalents of TFAA were found after a conditions screening. As for UAMC-0004206, the guanidine moiety was inserted with *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide, and the resulting Boc-protected compound **37** could be easily isolated from the reaction mixture. Finally, for the *N*-Boc deprotection, we planned the same strategy as for the previous  $\alpha$ -amino-phosphonate, if possible to use HCl for deprotection and obtaining the desired salt **3** in one step, otherwise to use TFA for deprotection, followed by a salt exchange with DOWEX 1X8 Cl (Scheme 10).



Scheme 10. A planned route for the preparation of UAMC-0004207.

### Birum-Oleksyszyn reaction

As a starting point, we used the standard conditions for the Birum-Oleksyszyn reaction found during the process development for UAMC-00050 (Table 3, entry 5). Aldehyde **24** (1.0 equivalents) was reacted with phosphite **33** (1.0 equivalents) and benzyl carbamate (**10**) (1.0 equiv.) in the presence of Y(OTf)<sub>3</sub> (0.1 equivalents) and TFAA (1.0 equivalents) using MeCN/THF 1:1 v/v (0.17 M concentration) as a medium. After a series of small-scale experiments (0.45 mmol) the highest ratio product (**34**)/IS was obtained when the transformation was performed with a 1:1:1 ratio between the reactants, 0.2 equivalents of TFAA, 2.5 M as concentration and a quenching time of 2 h.

Batches with Isolation of Product **34**

Entry	Scale (mmol)	Yield (%) <sup>a</sup>	Purity (%) <sup>b</sup>
1	2.3	71	85
2	4.6	70	81
3	11.5	43	76
4	13.3	53	75

<sup>a</sup> Isolated yield; <sup>b</sup> AN by HPLC.

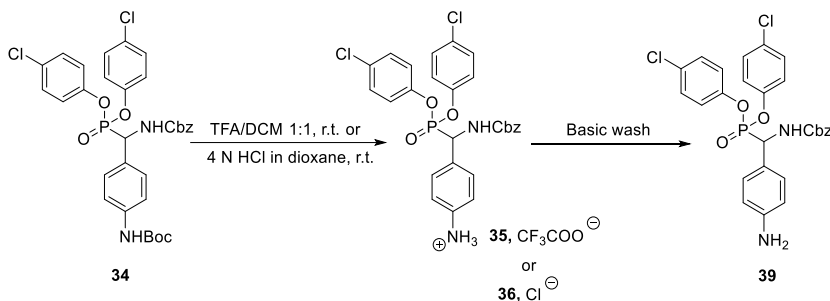
With the best conditions in hand, upscale experiments were carried out in order to assess isolated yields of product **34**. The product was purified by flash chromatography. At 2.5 M the reaction was stopped after 2 h and product **34** was isolated with a yield of 71 % and a purity of 85 % AN by HPLC (Table 8, entry 1). The yield obtained confirmed observations from the small-scale screening. At 4.6 mmol scale of aldehyde **24** a similar 70 % yield was obtained (Table 8, entry 2); however, when the synthesis was performed at 11.5 and 13.3 mmol scale of **24**, the yield dropped respectively to 43 and 53 % (Table 8, entries 3 and 4). These poor results might be attributed to problems in the purification of the product from impurities.

**N-Boc deprotection of intermediate 34**

As for UAMC-0004206, the aniline **36** was obtained after treatment of product **34** with 4 N HCl in dioxane. The product was obtained as solid with 96 % yield and purity 99 % AN by HPLC after dropwise addition of a solution of crude product in EtOH in 10 volumes of stirring MTBE at 0 °C. Unfortunately, when tested on the guanylation reaction with *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine, the HCl aniline **36** salt provided poor conversion at 0.6 mmol scale. On the other hand, the TFA aniline salt **35** showed a better conversion of guanylation at 0.3 and 0.6 mmol scale. For the preparation of TFA salt, intermediate **34** was dissolved in TFA/DCM 1:1 v/v and stirred at 20–25 °C for 3 h until complete conversion. However, when the EtOH solution of crude **35** was added to several antisolvents (*i.e.* Et<sub>2</sub>O, heptane, cold MTBE), it was not possible to isolate solid **35**. Accordingly, after a complete conversion of **34**, the reaction mixture was concentrated and the crude oily TFA salt was used in the next step. However, later it was discovered that traces of TFA remained in the crude salt **35**, and we speculated that they were responsible for the poor yield



during the upscale of guanylation to 3.0 mmol. Crude aniline TFA salt **35** was then dissolved in EtOAc and washed with a solution of 0.5 % aq.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . The basic wash provided an aniline-free base **39** and allowed a complete removal of TFA, which improved the yield on the next step. The TFA/DCM protocol was upscaled to 3.4 mmol of intermediate **34** and aniline free base **39** was obtained with a yield of 97 % and a purity of 75 % AN by HPLC (Scheme 11).



Scheme 11. *N*-Boc Deprotection of intermediate **34**.

### Guanylation of intermediate **39**

The research started with trifluoroacetate salt **35**. After a series of small-scale experiments (0.3–0.6 mmol), the following conditions were found to provide the highest conversion of product: aniline TFA salt **35** as starting material, 1.2 equivalents of *N,N'*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamidine, 1.5 equiv. of DIPEA as the base, and 1.0 M as the concentration. With the optimized conditions in hand, the scale of the experiment was raised to 2.1 mmol and product **37** was isolated with flash chromatography. After 96 h a conversion of 90 % was reached and the product was isolated in 37 % yield (Table 1, entry 1). The low yield might be connected to a decomposition of the product during the reaction or purification due to the DIPEA present in the reaction mixture. The synthesis of **37** was then repeated at a 3.0 mmol scale, unfortunately, the reaction proceeded slowly and 144 h were necessary to reach a conversion of 72 % (Table 9, entry 2). Before the flash chromatography purifications, the crude material dissolved in EtOAc was washed with 0.5 % aq.  $\text{KHSO}_4$  to completely remove the DIPEA. However, the product was isolated after flash chromatography with a poor 10 % yield. The low yield was due to the longer reaction time, which was caused by the presence of residual TFA in the starting material **35**. At a larger scale the vacuum removal of volatiles was not good enough to remove all the excess TFA, therefore, a basic wash with 0.5 % aq.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  was added as a treatment for the TFA aniline salt **35**. With the new starting material **39**, the equivalents of DIPEA, necessary to achieve basic pH (8–10), were reduced to 0.8, and after 96 h, a conversion of 83 % was reached (Table 9, entry 3). After work-up and purification, product **37** was isolated with an improved yield of 45 %. In a second batch at 0.8 mmol scale, the equivalents of DIPEA were further reduced to 0.3 and a 91 % conversion was reached after 96 h, product **37** isolated with a yield of 43 % (Table 9, entry 4). Satisfied with the new reaction and work-up conditions we increase the scale to 1.9 mmol where

product **37** was isolated with a yield of 63 % and a purity of 95 % AN by HPLC (Table 9, entry 5).

Table 9

Optimization of the Guanylation Reaction for the Preparation of Product **37**

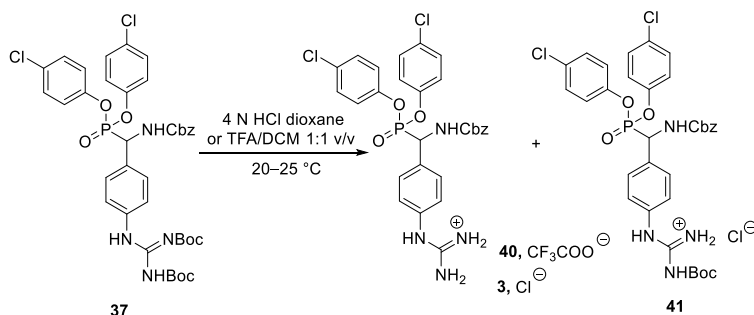
Entry	Scale (mmol)	Treatment of starting material	Equiv. DIPEA	Conversion (%)	Work-Up	Yield (%) <sup>c</sup>
1	2.1	None	1.5	90 <sup>a</sup>	None	37
2	3.0	None	1.5	72 <sup>b</sup>	Wash with 0.5 % aq. KHSO <sub>4</sub>	10
3	0.8	Wash with 0.5 % aq. NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0.8	83 <sup>a</sup>	Wash with 0.5 % aq. KHSO <sub>4</sub>	45
4	0.8	Wash with 0.5 % aq. NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0.3	91 <sup>a</sup>	Wash with 0.5 % aq. KHSO <sub>4</sub>	43
5	1.9	Wash with 0.5 % aq. NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0.3	94 <sup>a</sup>	Wash with 0.5 % aq. KHSO <sub>4</sub>	63

<sup>a</sup> Conversion after 96 h; <sup>b</sup> conversion after 144 h; <sup>c</sup> isolated yield.

**N-Boc Deprotection of intermediate 37**

N-Boc Deprotection of product **37** was performed using 4 N HCl in dioxane, directly generating the HCl salt **3**. At first, the reaction was run for 16 h, the volatiles were removed in vacuo, and the residue was dissolved in absolute EtOH and added dropwise to 10 volumes of stirred MTBE at 0 °C. The final product **3** was obtained by filtration as an off-white solid, with a purity of 90 % AN by HPLC. The HPLC purity of the final material did not change when product **3** was dissolved again in absolute EtOH and added dropwise in 10 volumes of stirred MTBE at 0 °C. The presence of impurity **41** implied that a longer reaction time was necessary for the complete deprotection. The final material was obtained with a purity of 95 % AN by HPLC when the reaction was run for 24 h, and a purity of 97 % AN by HPLC when the reaction was run for 30 h. With the optimized conditions in hand we upscaled the reaction to a 500 mg scale, and among

the five different batches, the HCl salt UAMC-0004207 was obtained with yields between 73 % and 89 % and purity between 96 % and purity 99 % AN by HPLC (Scheme 12).



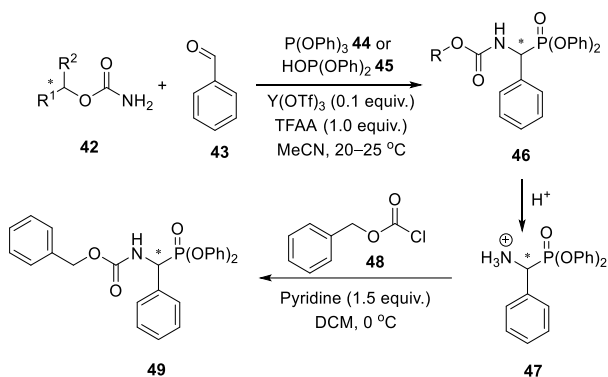
Scheme 12. *N*-Boc Deprotection of intermediate **37**.

### Separation of two enantiomers of UAMC-00050

Investigation of how stereochemistry can affect the activity of enzyme inhibitors is pivotal during drug development. UAMC-00050 consists of two enantiomers, but so far, its binding activity on uPA was tested only for the racemic mixture. Data on the binding of each enantiomer is crucial for the understanding of interactions with the enzyme and the development of more active molecules. Unfortunately, methods for the stereoselective preparation of  $\alpha$ -aminophosphonates are very limited both in scope and in a degree of enantioselectivity. Accordingly, our primary target was the preparation of individual enantiomers of UAMC-00050 by separating the racemic mixture and testing their binding with uPA. There are several commercially available chiral chromatographic columns for the separation of enantiomers. The size of the columns ranges from an analytical scale, where one can inject up to a few milligrams, to a simulated moving bed,<sup>31</sup> where kilograms of enantiomers can be isolated in a day. In a screening of columns, we were able to separate the two enantiomers of intermediate **14**, using a chiralpak® IG column (4.6 × 250 mm) with an isocratic eluent composed of heptane 50 %, DCM 40 %, *i*PrOH 10 %. The racemic mixture of **14** (250 mg) was applied to the column as a solution in MeCN. The separation yielded approximately 50 mg of each enantiomer with 95 % HPLC purity. Pure enantiomers were then treated with TFA/DCM 1:1 v/v to cleave the Boc group, and the final product **1** was obtained with 99.7 % ee for the first enantiomer and 98.4 % ee for the second enantiomer. *In vitro* studies of the two enantiomers highlighted that enantiomer 1 has a 10-fold higher affinity with the enzyme than enantiomer 2. However, the IC<sub>50</sub> of enantiomer 1 is just twice lower as the racemic mixture. This means that using UAMC-00050 as pure enantiomer 2 instead of the racemic mixture will not bring a big change in the therapeutic effect of the drug. Nevertheless, the two enantiomers need to be isolated and their toxicity must be evaluated *in vivo* before proceeding to clinical experimentation with UAMC-00050.

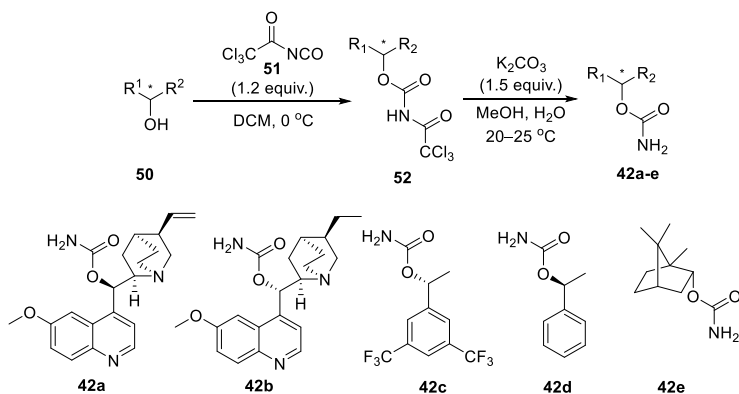
## Stereoselective preparation of $\alpha$ -aminophosphonates

Chiral carbamates have been previously employed for the diastereoselective synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates by Oshikawa *et al.*<sup>32</sup> and Chung *et al.*<sup>33</sup> Both authors used carbamates generated from menthol and camphor derivatives. Obtained  $\alpha$ -aminophosphonates were then hydrolyzed to yield  $\alpha$ -aminophosphonic acids and analyzed for optical yield ranging from 3.3 to 42.2 %. Inspired by these works we decided to prepare a series of chiral carbamates **42** and couple them with benzaldehyde (**43**) and triphenyl phosphite (**44**) or diphenyl phosphite (**45**) using 0.1 equivalents of  $Y(OTf)_3$  as a catalyst, 1.0 equivalents of TFAA as an additive in anhydrous MeCN at 20–25 °C. In the case of a good stereoselection and high dr of **46**, we could separate diastereomers, then cleave carbamate under acidic conditions and functionalize the amine **47** with benzyl chloroformate (**48**) to yield the desired enantioenriched  $\alpha$ -aminophosphonate (**49**) (Scheme 13).



Scheme 13. A planned route for the stereoselective synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonate **49**.

Five different chiral alcohols **50** were selected for conversion to the corresponding carbamate by a reaction with 2,2,2-trichloroacetyl isocyanate (**51**) and potassium carbonate. The set of carbamates includes quinine carbamate (**42a**), hydroquinidine carbamate (**42b**), (*R*)-1-(3,5-bistrifluoromethylphenyl)ethanol carbamate (**42c**), (*S*)-1-phenylethanol carbamate (**42d**), and borneol carbamate (**42e**) (Scheme 14).



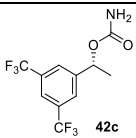
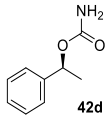
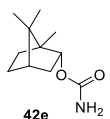
Scheme 14. Selected chiral carbamates **42a-e** and their preparation.

The first carbamates to be tested were bulky cinchona alkaloids (quinine **42a** and hydroquinidine **42b**). Unfortunately, when both carbamates were treated with diphenyl-, trimethyl-, or triphenyl phosphite in the presence of 1.0 equivalent of TFAA, or HCl, and with 0.1, or 3.0 equivalents of  $Y(OTf)_3$ , no product was detected in any of the experiments. We speculated that the cinchonine-carbamates might be too bulky to lead to the formation of the desired  $\alpha$ -amino-phosphonate. The next set of experiments employed three less bulky carbamates. Initially (*R*)-1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)ethyl carbamate (**42c**) was reacted with diphenyl phosphite (**45**) and benzaldehyde (**43**) in the presence of 0.1 equivalents of  $Y(OTf)_3$  and 1.0 equivalents of TFAA (Table 10). The product **53a** was obtained with a **53a**/IS ratio of 0.30 after 4 h and 0.33 after 24 h, and with dr of 57:43 both times (Table 10, entries 1 and 2). The bulkier triphenyl phosphite **44** was used as a reactant in order to increase the diastereoselectivity, which was improved to 69:31 after 4 h and 60:40 after 24 h. Also, for **53a**/IS ratio registered an increase, respectively to 0.67 after 4 h and 0.51 after 24 h (Table 10, entries 3 and 4). The reaction between carbamate **42c**, benzaldehyde (**43**), and triphenyl phosphite (**44**) was repeated on a 1.35 mmol scale. The reaction was quenched after 4 h and the product was isolated. Both HPLC and  $^1H$  NMR assays confirmed the value of 75:25 dr. Next, we tested (*S*)-1-phenylethyl carbamate (**42d**) under the same reaction conditions as for carbamate **42c**, also carbamate **42d** was reacted with diphenyl phosphite (**45**) and triphenyl phosphite (**44**) under the same conditions (Table 10, entries 5–8). Opposite to carbamate **42c**, in the case of carbamate **42d**, the **53b**/IS ratio was 3 times higher when diphenyl phosphite (**45**) was used instead of triphenyl phosphite (**44**). Unfortunately, we were not able to distinguish the diastereoisomeric ratio with HPLC due to a complete overlapping of peaks. Therefore,  $^1H$  NMR assay was used instead, and the analysis of the final material highlighted a dr of 51:49. Last, reactions with borneol carbamate **42e** were investigated under the same conditions as the two previous carbamates: reaction with benzaldehyde (**43**), triphenyl phosphite (**44**) or diphenyl phosphite (**45**), in the presence of 0.1 equivalents of  $Y(OTf)_3$  and 1.0 equivalent of TFAA. The

**53c**/IS ratio was comparable when using triphenyl phosphite (**44**) or diphenyl phosphite (**45**), while like for  $\alpha$ -aminophosphonate **53b**, also for the  $\alpha$ -aminophosphonate **53c**, HPLC assay showed one clear peak. Assessment of diastereomeric ratio for the reaction product was possible only with  $^1\text{H}$  NMR assay. The peak of the CH proton of the newly formed chiral center showed a ddd multiplicity typical of 1:1 diastereoisomers mixtures. However, after purification of the crude mixture, the peak of the same proton showed a dd multiplicity as an indication of the isolation of product **53c** as a pure diastereoisomer.

Table 10

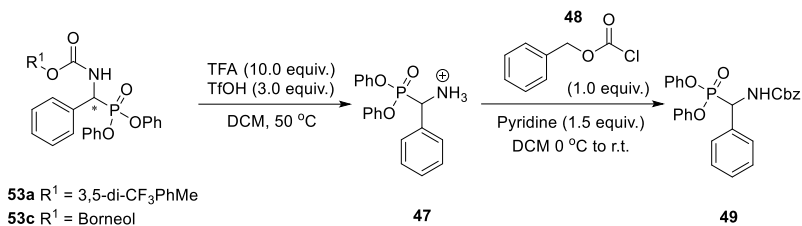
Birum-Oleksyszyn Reaction with Chiral Carbamates

Entry <sup>a</sup>	Carbamate	Phosphite	Time (h)	Product/ IS	dr
1	 <b>42c</b>	HOP(OPh) <sub>2</sub>	4	0.30	57:43 <sup>b</sup>
2			24	0.33	57:43 <sup>b</sup>
3		P(OPh) <sub>3</sub>	4	0.67	69:31 <sup>b</sup>
4			24	0.51	60:40 <sup>b</sup>
5	 <b>42d</b>	HOP(OPh) <sub>2</sub>	4	0.37	51:41 <sup>c</sup>
6			24	0.24	51:41 <sup>c</sup>
7		P(OPh) <sub>3</sub>	4	0.12	51:41 <sup>c</sup>
8			24	0.10	51:41 <sup>c</sup>
9	 <b>42e</b>	HOP(OPh) <sub>2</sub>	4	0.43	100:0 <sup>c</sup>
10			24	0.30	100:0 <sup>c</sup>
11		P(OPh) <sub>3</sub>	4	0.40	100:0 <sup>c</sup>
12			24	0.39	100:0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>0.1 equiv. of Y(OTf)<sub>3</sub> and 1.0 equiv. of TFAA in anhydrous MeCN; <sup>b</sup> dr measured with HPLC assay; <sup>c</sup> dr measured with  $^1\text{H}$  NMR assay after purification of the product by flash chromatography.

In order to confirm our data registered from the HPLC and the  $^1\text{H}$  NMR assay, we planned to remove the carbamate moiety from  $\alpha$ -aminophosphonates **53a** and **53c**, the corresponding amine

would have been converted in  $\alpha$ -aminophosphonates **49** after functionalization with benzyl chloroformate (**48**) (Scheme 15). The resulting product **49** would have been analyzed with a chiral column to confirm the presence of an eventual stereoselectivity of the reaction.

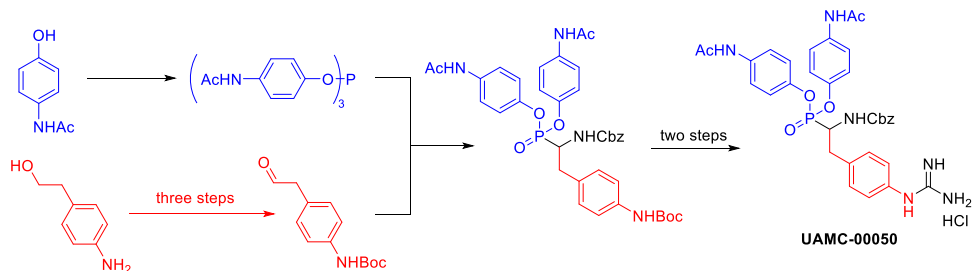


Scheme 15. Removal of carbamate with TFA/TfOH and functionalization of the amine with benzyl chloroformate.

After the removal of the carbamate moiety and functionalization of the amine **47** with benzyl chloroformate **48**, the  $\alpha$ -aminophosphonate **49** was isolated and analyzed by chiral HPLC. In the case of  $\alpha$ -aminophosphonate **53c**, derived from the borneol carbamate, the chiral column chromatogram showed two peaks with almost the same area (51:49), indicating a racemic mixture. On the other hand, when  $\alpha$ -aminophosphonate **53a** was converted to  $\alpha$ -aminophosphonate **49**, the chiral column chromatogram showed two peaks with different areas (64:36), indicating an enantiomeric excess of 28 %. The er of the final product **49** was lower than the dr recorded for  $\alpha$ -aminophosphonate **53a**, probably due to slight racemization during the removal of carbamate and functionalization with benzyl chloroformate.

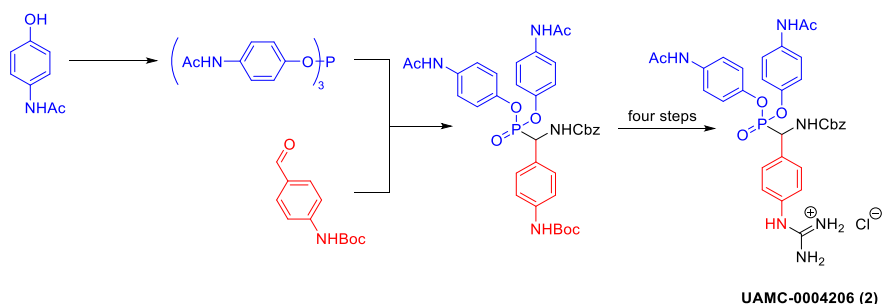
## CONCLUSIONS

1. The overall yield for the preparation of UAMC-00050 (**1**) was increased from 3 % for the medicinal chemistry route to 22 % for the process chemistry route. Major efforts were applied for the preparation of aldehyde **9**, phosphonate **11**, and for the preparation and purification of product **1**. DMP oxidation for the synthesis of aldehyde **9** was substituted with a green and cheap NaClO/TEMPO/KBr oxidation. The key reaction (Birum-Oleksyszyn) was extensively studied for the construction of UAMC-00050. The screening of the catalyst revealed Y(OTf)<sub>3</sub> as the most efficient catalyst for the construction of UAMC-00050. Further optimization of the reaction conditions, using the catalyst in combination with TFAA as an additive and THF/MeCN 1:1 v/v as a solvent allowed to increase the yield of **9** from 11 % to 44 %. Guanidine **1** was prepared from aniline **21** in a single step. Cyanamide was selected as the reactant, and smart DoE was applied to optimize the guanylation reaction. The newly developed protocol allowed us to cut costs for the preparation of UAMC-00050. In all intermediate steps, for the synthesis of **8**, **9**, and **11** flash chromatography was removed and intermediates were purified using alternative methods suitable for a larger scale like crystallization, slurry or antisolvent precipitation. The only flash chromatography was required for the final product in order to reach the target purity >98 %. The improved route was executed on a multi-gram scale and is suitable for preclinical batch preparation of UAMC-00050.

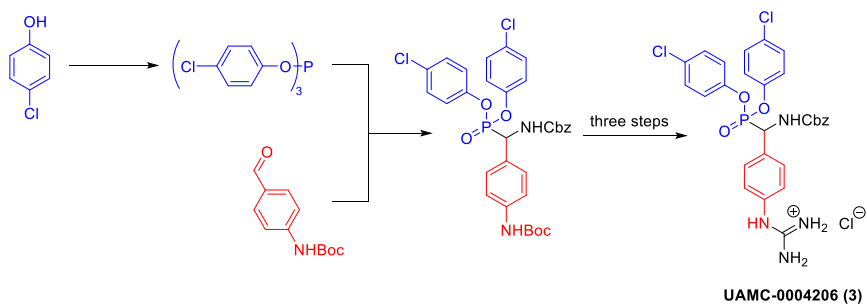




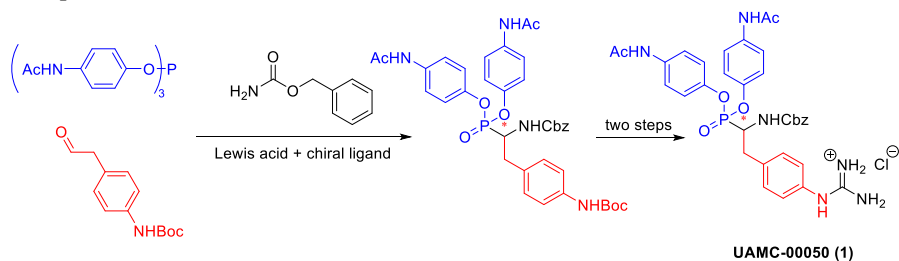
2. A five-step scheme was developed for the preparation of 5.79 g of UAMC-0004206. The target compound was obtained from aldehyde **24** with an overall yield of 30 %. In the Birum-Oleksyszyn step, the concentration was found to be an important parameter for the reaction outcome. For the guanylation step with *N,N*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide (**13**), the use of the *i*PrOH in combination with MeCN was assumed to be the source of impurity in the final material. Using DCM instead of *i*PrOH allowed us to isolate a pure material.



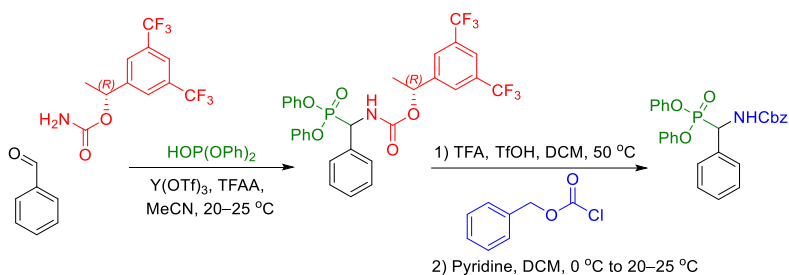
3. A four-step scheme was developed for the preparation of 1.9 g of UAMC-0004207. The final compound was obtained from aldehyde **24** with an overall yield of 26 %. Similar to UAMC-0004206, in the Birum-Oleksyszyn reaction, the concentration was found to be an important parameter for the reaction outcome. The additional development effort was necessary due to residual TFA in the aniline, which had a negative impact on the guanylation reaction with *N,N*-di-Boc-1*H*-pyrazole-1-carboxamide (**13**). A basic wash with 0.5 % aq.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  of the starting material and an acid wash of the crude product with 0.5 % aq.  $\text{KHSO}_4$  before the chromatographic purification allowed to increase in the yield of the protected guanidine.



4. The two enantiomers of UAMC-00050 were isolated and tested *in vitro*. The enzymatic test highlighted a 10-fold difference between the two stereoisomers in which enantiomer 1 has a better affinity with uPA than enantiomer 2. The  $IC_{50}$  of enantiomer 1 resulted to be only twice lower than the racemic mixture. A stereoselective synthetic preparation of UAMC-00050 was investigated to provide material for toxicological studies in a later stage of the drug development.



5. A chiral carbamate derivative of  $\alpha$ -aminophosphonate was prepared in a diastereomeric ratio 75:25 using (*R*)-1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)ethyl carbamate as a chiral auxiliary for Birum-Oleksyszyn reaction. The mixture of diastereoisomers was then converted to the desired Cbz-protected  $\alpha$ -aminophosphonate after acid cleavage of chiral auxiliary and functionalization of the amino group with benzyl chloroformate. The conversion resulted in a mixture of enantiomer with 64:36 er. Despite modest enantioselectivity, the method is an important addition to the development of the stereoselective Birum-Oleksyszyn reaction, which was neglected for more than two decades.



## ACKNOWLEDGMENTS

The last four years were not exactly a stroll down the river, hence my special thanks to: My supervisors Dr. Chem. Kirill Shubin for teaching me how to be a process chemist and for supervising the doctoral work. Professor Dr. chem. Aigars Jirgensons for supervising the doctoral research and reviewing the last dissemination work. Paz for the incredible work as project manager in the IT-DED<sup>3</sup> network. Marco and Alice for reviewing the Thesis, for the computational calculations and for the constant moral support because in life there are moments in which “*non posso ne scendere ne salire, ne scendere ne salire*”. My family, for their love and constant support. Sabīne, for her kindness and her constant smile, which made this path less hard.

This project has received funding from the European Union’s Horizon 2020 Research and Innovation Program under the Marie Skłodowska-Curie Initial Training Network (ITN) “ITDED3” (H2020-MSCA-ITN-2017) grant agreement No. 765608.

## ATSAUCES / REFERENCES

- (1) Craig, J. P.; Nichols, K. K.; Akpek, E. K.; Caffery, B.; Dua, H. S.; Joo, C.-K.; Liu, Z.; Nelson, J. D.; Nichols, J. J.; Tsubota, K.; Stapleton, F. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The Ocular Surface* **2017**, *15* (3), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.008>.
- (2) Stapleton, F.; Alves, M.; Bunya, V. Y.; Jalbert, I.; Lekhanont, K.; Malet, F.; Na, K.-S.; Schaumberg, D.; Uchino, M.; Vehof, J.; Viso, E.; Vitale, S.; Jones, L. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *The Ocular Surface* **2017**, *15* (3), 334–365. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.003>.
- (3) Stevenson, W.; Chauhan, S. K.; Dana, R. Dry Eye Disease: An Immune-Mediated Ocular Surface Disorder. *Arch Ophthalmol* **2012**, *130* (1), 90–100. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2011.364>.
- (4) Paulsen, A. J.; Cruickshanks, K. J.; Fischer, M. E.; Huang, G.-H.; Klein, B. E. K.; Klein, R.; Dalton, D. S. Dry Eye in the Beaver Dam Offspring Study: Prevalence, Risk Factors, and Health-Related Quality of Life. *American Journal of Ophthalmology* **2014**, *157* (4), 799–806. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.12.023>.
- (5) 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (26), 6638–6646. <https://doi.org/10.1021/jm700962j>.
- (6) Joossen, C.; Baán, A.; Moreno-Cinos, C.; Joossens, J.; Cools, N.; Lanckacker, E.; Moons, L.; Lemmens, K.; Lambeir, A.-M.; Fransen, E.; Delputte, P.; Caljon, G.; Van Der Veken, P.; Maes, L.; De Meester, I.; Kiekens, F.; Augustyns, K.; Cos, P. A Novel Serine Protease Inhibitor as Potential Treatment for Dry Eye Syndrome and Ocular Inflammation. *Scientific Reports* **2020**, *10* (1), 17268. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74159-w>.
- (7) Oleksyszyn, J.; Subotkowska, L.; Mastalerz, P. Diphenyl 1-Aminoalkanephosphonates. *Synthesis* **1979**, *1979* (12), 985–986. <https://doi.org/10.1055/s-1979-28903>.
- (8) Birum, G. H. Urylenediphosphonates. General Method for the Synthesis of .Alpha.-Ureidophosphonates and Related Structures. *The Journal of Organic Chemistry* **1974**, *39* (2), 209–213. <https://doi.org/10.1021/jo00916a019>.
- (9) Veken, P. V. der; Sayed, I. E.; Joossens, J.; Stevens, C. V.; Augustyns, K.; Haemers, A. Lewis Acid Catalyzed Synthesis of N-Protected Diphenyl 1-Aminoalkyl-phosphonates. *Synthesis* **2005**, *2005* (4), 634–638. <https://doi.org/10.1055/s-2004-837307>.
- (10) Dallaston, M. A.; Bettencourt, C. J.; Chow, S.; Gebhardt, J.; Spangler, J.; Johnston, M. R.; Wall, C.; Brusnahan, J. S.; Williams, C. M. Ranking Oxidant Sensitiveness: A Guide for Synthetic Utility. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25* (41), 9614–9618. <https://doi.org/10.1002/chem.201902036>.
- (11) Pulido, D.; Casadó-Anguera, V.; Pérez-Benito, L.; Moreno, E.; Cordoní, A.; López, L.; Cortés, A.; Ferré, S.; Pardo, L.; Casadó, V.; Royo, M. Design of a True Bivalent Ligand with Picomolar Binding Affinity for a G Protein-Coupled Receptor Homodimer. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (20), 9335–9346. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01249>.
- (12) Hoover, J. M.; Stahl, S. S. Highly Practical Copper(I)/TEMPO Catalyst System for Chemoselective Aerobic Oxidation of Primary Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (42), 16901–16910. <https://doi.org/10.1021/ja206230h>.

- (13) Lei, Z.; Wang, R. Oxidation of Alcohols Using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as Oxidant Catalyzed by AlCl<sub>3</sub>. *Catalysis Communications* **2008**, *9* (5), 740–742. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2007.08.012>.
- (14) Moriyama, K.; Takemura, M.; Togo, H. Selective Oxidation of Alcohols with Alkali Metal Bromides as Bromide Catalysts: Experimental Study of the Reaction Mechanism. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (13), 6094–6104. <https://doi.org/10.1021/jo5008064>.
- (15) Hampton, P. D.; Whealon, M. D.; Roberts, L. M.; Yaeger, A. A.; Boydson, R. Continuous Organic Synthesis in a Spinning Tube-in-Tube Reactor: TEMPO-Catalyzed Oxidation of Alcohols by Hypochlorite. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12* (5), 946–949. <https://doi.org/10.1021/op800051t>.
- (16) Dong, Z.; Gao, P.; Xiao, Y. Efficient Selective Oxidation of Alcohols to Aldehydes Catalyzed by a Morpholinone Nitroxide. *Synthetic Communications* **2019**, *49* (23), 3380–3388. <https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1666284>.
- (17) Lucio Anelli, P.; Biffi, C.; Montanari, F.; Quici, S. Fast and Selective Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes or to Carboxylic Acids and of Secondary Alcohols to Ketones Mediated by Oxoammonium Salts under Two-Phase Conditions. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (12), 2559–2562. <https://doi.org/10.1021/jo00388a038>.
- (18) Furigay, M. H.; Boucher, M. M.; Mizgier, N. A.; Brindle, C. S. Separation of Aldehydes and Reactive Ketones from Mixtures Using a Bisulfite Extraction Protocol. *J. Vis Exp* **2018**, No. 134. <https://doi.org/10.3791/57639>.
- (19) Ceradini, D.; Shubin, K. One-Pot Synthesis of  $\alpha$ -Aminophosphonates by Yttrium-Catalyzed Birum–Oleksyszyn Reaction. *RSC Adv.* **2021**, *11* (62), 39147–39152. <https://doi.org/10.1039/D1RA07718J>.
- (20) Dmitriev, M. E.; Ragulin, V. V. New Opinions on the Amidoalkylation of Hydrophosphorylic Compounds. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51* (19), 2613–2616. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.03.020>.
- (21) Dmitriev, M. E.; Rossinets, E. A.; Ragulin, V. V. Amidoalkylation of Hydrophosphoryl Compounds. *Russ J Gen Chem* **2011**, *81* (6), 1092–1104. <https://doi.org/10.1134/S1070363211060041>.
- (22) Dmitriev, M. E.; Ragulin, V. V. Arbuzov-Type Reaction of Acylphosphonites and N-Alkoxy-carbonylimine Cations Generated in Situ with Trifluoroacetic Anhydride. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (13), 1634–1636. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.01.094>.
- (23) Vinyukov, A. V.; Dmitriev, M. E.; Ragulin, V. V. One-Pot Synthesis of N-Cbz- $\alpha$ -Aminophosphonic Acids. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2017**, *192* (4), 437–441. <https://doi.org/10.1080/10426507.2016.1248289>.
- (24) Tsubokura, K.; Iwata, T. Direct Guanylation of Amino Groups by Cyanamide in Water: Catalytic Generation and Activation of Unsubstituted Carbodiimide by Scandium(III) Triflate. *Synlett* **2014**, *25*, 1302–1306.
- (25) Diab, S.; Teo, T.; Kumarasiri, M.; Li, P.; Yu, M.; Lam, F.; Basnet, S. K. C.; Sykes, M. J.; Albrecht, H.; Milne, R.; Wang, S. Discovery of 5-(2-(Phenylamino)Pyrimidin-4-Yl)Thiazol-2(3H)-One Derivatives as Potent Mnk2 Inhibitors: Synthesis, SAR Analysis and Biological Evaluation. *ChemMedChem* **2014**, *9* (5), 962–972. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300552>.
- (26) Kondraganti, L.; Manabolu, S. babu; Dittakavi, R. Synthesis of Benzimidazoles via Domino Intra and Intermolecular C-N Cross-Coupling Reaction. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (42), 11744–11748. <https://doi.org/10.1002/slct.201802754>.

- (27) An, T.; Kang, B.; Kang, S.; Pac, J.; Youk, J.; Lin, D.; Lee, Y. Guanidine Cyclic Diimides and Their Polymers. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (69), 10222–10225. <https://doi.org/10.1039/C9CC04522H>.
- (28) Kim, K.; Lin, Y.-T.; Mosher, H. S. Monosubstituted Guanidines from Primary Amines and Aminoiminomethanesulfonic Acid. *Tetrahedron Letters* **1988**, 29 (26), 3183–3186. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(88\)85116-5](https://doi.org/10.1016/0040-4039(88)85116-5).
- (29) Goswami, S.; Hazra, A.; Jana, S. One-Pot Two-Step Solvent-Free Rapid and Clean Synthesis of 2-(Substituted Amino)Pyrimidines by Microwave Irradiation. *BCSJ* **2009**, 82 (9), 1175–1181. <https://doi.org/10.1246/bcsj.82.1175>.
- (30) XT SAAM | Exponential Technologies Ltd. <https://www.x-t.ai/xt-saam/> (accessed 2022-01-11).
- (31) Juza, M.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M. Simulated Moving-Bed Chromatography and Its Application to Chirotechnology. *Trends in Biotechnology* **2000**, 18 (3), 108–118. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01419-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01419-5).
- (32) Oshikawa, T.; Yamashita, M. Preparation of Optically Active 1-Aminoalkylphosphonic Acids from Chiral Carbamates and Chiral Ureas. *BCSJ* **1989**, 62 (10), 3177–3181. <https://doi.org/10.1246/bcsj.62.3177>.
- (33) Chung, S.-K.; Kang, D.-H. Asymmetric Synthesis of  $\alpha$ -Aminophosphonates via Diastereoselective Addition of Phosphite to Chiral Imine Derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7 (1), 21–24. [https://doi.org/10.1016/0957-4166\(95\)00411-4](https://doi.org/10.1016/0957-4166(95)00411-4).



**Davide Ceradini** dzimis 1993. gadā Arzignāno, Itālijā. Padujas Universitātē, Itālijā, ieguvis bakalaura grādu ķīmijā (2015) un maģistra grādu rūpnieciskajā ķīmijā (2018).

No 2018. līdz 2022. gadam bija Latvijas Organiskās sintēzes institūta zinātniskais asistents. Uzturēšanās laikā Rīgā strādājis Eiropas projektā "*The European network for Integrated Training in Dry Eye Disease Drug Development (IT-DED3)*", izstrādājot jaunas zāles sausās acs slimības terapijai. Pētniecības intereses galvenokārt saistītas ar "zaļo" ķīmiju un dizaina kvalitāti.

**Davide Ceradini** was born in 1993 in Arzignano, Italy. He obtained his Bachelor's degree in chemistry from the University of Padua in 2015 and a Master's degree in industrial chemistry in 2018. Since 2018, he has been a research assistant at the Latvian Institute of Organic Synthesis. During his stay in Riga, he was working with the IT-DED3 network – a European project for the development of new therapies for Dry Eye Disease. His research interests are mainly green chemistry and quality by design.