

Anastasija Balašova

BENZOKSAFOSFEPĪNA ATVASINĀJUMI KĀ SELEKTĪVI OGĻSKĀBES ANHIDRĀZES INHIBITORI

Promocijas darba kopsavilkums

DEVELOPMENT OF BENZOXAPHOSPHEPINE DERIVATIVES AS SELECTIVE CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS

Summary of the Doctoral Thesis



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte
Ķīmijas un ķīmijas tehnoloģijas institūts

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Faculty of Natural Sciences and Technology
Institute of Chemistry and Chemical Technology

Anastasija Balašova

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorante
Doctoral Student of the Study Programme “Chemistry, Materials Science and Engineering”

**BENZOKSAFOSFEPĪNA ATVASINĀJUMI
KĀ SELEKTĪVI OĢĻSKĀBES ANHIDRĀZES
INHIBITORI**

**DEVELOPMENT OF BENZOXAPHOSPHEPINE
DERIVATIVES AS SELECTIVE CARBONIC
ANHYDRASE INHIBITORS**

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

Zinātniskais vadītājs
profesors *Ph. D.*
RAIVIS ŽALUBOVSKIS

Scientific supervisor
Professor PhD
RAIVIS ŽALUBOVSKIS

RTU Izdevniecība
RTU Press
Rīga 2025

Balašova A. Benzoksafosfēpīna atvasinājumi kā
selektīvi ogļskābes anhidrāzes inhibitori.
Promocijas darba kopsavilkums.
Rīga: RTU Izdevniecība, 2025. — 51 lpp.

Balašova, A. Development of Benzoxaphosphepine
Derivatives as Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors.
Summary of the Doctoral Thesis.
Riga: RTU Press, 2025. — 51 p.

Publicēts saskaņā ar RTU promocijas padomes
“RTU P-01” 2025. gada 29. septembra lēmumu.
Protokols Nr. 04030-9.1/72.

Published in accordance with the decision of the RTU
Promotion Council “RTU P-01” of 29 September 2025.
Minutes No. 04030-9.1/72.

Vāka attēls no www.shutterstock.com.
Cover picture from www.shutterstock.com.

<https://doi.org/10.7250/9789934372308>
ISBN 978-9934-37-230-8 (pdf)

PATEICĪBAS / ACKNOWLEDGEMENTS

Galvenokārt vēlos izteikt dziļāko un patiesāko pateicību visiem saviem draugiem un ģimenei, īpaši mātei, mātai un kaķiem, kuri man vienmēr ir bijuši liels atbalsts un spēks.

Esmu ļoti pateicīga maniem kolēģiem no Lietderīgās ķīmijas grupas — Aleksandram Pustenko un Ļenai Golombai — par nenovērtējamo atbalstu, palīdzību un uzmuntrinājumu studiju laikā. Liels paldies grupas vadītājam profesoram Raivim Žalubovskim par promocijas darba vadīšanu.

Sirsnīgs paldies maniem kursabiedriem un kolēģiem no Organiskās sintēzes perspektīvo tehnoloģiju laboratorijas Naurim Narvaišam un Gļebam Jeršovam (kurš ir arī mūzikas grupas *Cellar Cat* dalībnieks) par iedvesmu, padomiem un vērtīgajām diskusijām.

Īpaši pateicos kolēģiem, kuri kļuvuši arī par draugiem, no Organiskās sintēzes metodoloģijas grupas: Annai Ņikitjukai, Elīnai Līdumniecei un Georgijam Stakanovam. Milzīgs paldies par nodēģajiem ieteikumiem, iedrošinājumu un motivāciju, kā arī darba labošanu.

Pateicība Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijas un Hromatogrāfijas laboratorijas kolektīvam par analīžu veikšanu. Paldies arī sadarbības partneriem un *stimati amici* no *Supuran* grupas (Florences Universitāte) par ieguldījumu promocijas darba tapšanā.

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā (LOSI) ar iekšējo studentu grantu (IG-2021-09, IG-2022-07, IG-2023-09, IG-2024-05) un Eiropas Sociālā fonda (projekta Nr. 8.2.2.0/20/I/008) atbalstu.

First and foremost, I am sincerely grateful to all my friends and family, especially my mother, sister and cats, for their unwavering support and enthusiasm.

I also wish to thank my colleagues from the Applied Chemistry Group — Aleksandrs Pustenko and Ļena Golomba — for the guidance and encouragement during my studies. Many thanks to the group leader, Professor Raivis Žalubovskis, for the supervision of the Thesis.

Heartfelt thanks go to my coursemates and colleagues from the Laboratory of Advanced Technologies for Organic Synthesis, Nauris Narvaišs and Gļebs Jeršovs (who is also a member of the *Cellar Cat* music band), for inspiring me, for their advice and valuable discussions.

Moreover, I would like to give special recognition to the colleagues, who have also become friends, from the Organic Synthesis Methodology Group: Anna Ņikitjuka, Elīna Līdumniece and Georgijs Stakanovs. I am thankful for the tremendous support, motivation and thorough proof-reading.

I appreciate and acknowledge the personnel of the Laboratory of Physical Organic Chemistry and the Laboratory of Chromatography, as well as the input of our collaborators *e stimati amici* from the *Supuran* group at the University of Florence.

The present research was conducted at the Latvian Institute of Organic Synthesis (LIOS) and supported by the internal student grants (IG-2021-09, IG-2022-07, IG-2023-09, IG-2024-05), as well as by the European Social Fund (Project No. 8.2.2.0/20/I/008).

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2025. gada 11. decembrī plkst. 13.00 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Rīgā, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

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

Profesors *Ph. D. Jean-Yves Winum*,
Monpeljē Universitāte, Francija

Profesore *Ph. D. Eglė Arbačiauskienė*,
Kauņas Tehnoloģiju universitāte, Lietuva

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi 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.

Anastasija Balašova (paraksts)

Datums

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa. Tas ietver kopsavilkumu latviešu un angļu valodā, četras publikācijas un nepublicētus rezultātus. Publikācijas uzrakstītas angļu valodā, to kopējais apjoms, ieskaitot elektroniski pieejamo informāciju, ir 81 lpp.

SATURS / CONTENTS

SAĪSINĀJUMI / ABBREVIATIONS	6
PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS	7
Tēmas būtība un aktualitāte	7
Pētījuma mērķis un uzdevumi	8
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti	9
Darba struktūra un apjoms	9
Darba aprobācija un publikācijas	9
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI.....	11
Prologs	11
1. Benzoksafosfēna oksīdu sintēze un inhibēšanas potenciāls	12
2. Benzoksafosfēna pamatstruktūras ķīmiskās daudzveidības paplašināšana	14
3. Benzoksafosfēnu optimizēšana līdz nanomolāriem mērķenzīmu inhibitoriem	16
4. Inhibitoru klāsta papildināšana un saistīšanās mehānisma izpēte	20
SECINĀJUMI.....	25
GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS.....	28
Introduction.....	28
Aims and objectives	29
Scientific novelty and main results	30
Structure of the Thesis	30
Publications and approbation of the Thesis	30
MAIN RESULTS OF THE THESIS	32
Prologue	32
1. Synthesis and inhibitory potential of benzoxaphosphepine chemotype	33
2. Exploration of chemical space around benzoxaphosphepine scaffold	35
3. Paving the way to nanomolar inhibition of the target isozymes	37
4. Expanding the library of inhibitors and probing the binding mechanism	41
CONCLUSIONS	46
ATSAUCES / REFERENCES	48

SAĪSINĀJUMI / ABBREVIATIONS

AAZ	acetazolamīds / acetazolamide
Ac	acetil- / acetyl
AEŠH	augstas efektivitātes šķidrums hromatogrāfija
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil- / <i>tert</i> -butyloxycarbonyl
CA	ogļskābes anhidrāze / carbonic anhydrase
CARP	ogļskābes anhidrāzei radniecīgs proteīns / carbonic anhydrase-related protein
Cys	cisteīns / cysteine
CSI	hlorsulfonilizocianāts / chlorosulfonyl isocyanate
DCE	dihloretāns / dichloroethane
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamīds / <i>N,N</i> -dimethylformamide
DNs	2,4-dinitrobenzolsulfonil- / 2,4-dinitrobenzenesulfonyl
dppf	1,1'-bis(difenilfosfīno)ferrocēns / 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
EDC	1-etil-3-(3-(<i>N,N</i> -dimetilamino)propil)karbodiimīds / 1-ethyl-3-(3-(<i>N,N</i> -dimethylamino)propyl)carbodiimide
Et	etil- / ethyl
Gly	glicīns / glycine
h	stunda / hour
HMDS	bis(trimetilsilil)amīns / bis(trimethylsilyl)amine
HPLC	high-performance liquid chromatography
<i>i</i> Pr	izopropil- / isopropyl
i.t.	istabas temperatūra
K_i	inhibēšanas konstante / inhibition constant
LED	gaismu izstarojošā diode / light-emitting diode
Me	metil- / methyl
Naph	naftil- / naphthyl
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimīds / <i>N</i> -bromosuccinimide
ND	nav noteikts / not determined
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirolidons / <i>N</i> -methyl-2-pyrrolidone
PBS	fosfāta fizioloģiskais buferšķīdums / phosphate-buffered saline
Ph	fenil- / phenyl
Py	piridīns / pyridine
r.t.	room temperature
SAR	struktūras–aktivitātes likumsakarība / structure–activity relationship
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butil- / <i>tert</i> -butyl
TFA	trifluoretiķskābe / trifluoroacetic acid
THF	tetrahidrofurāns / tetrahydrofuran
TMS	trimetilsilil- / trimethylsilyl
Tol	tolil- / tolyl
UV	ultravioletā gaisma / ultraviolet

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Tēmas būtība un aktualitāte

Ogļskābes anhidrāzes (CA, EC 4.2.1.1), atklātas 20. gadsimta 30. gadu sākumā, ir ļoti plaša un nozīmīga enzīmu saime, kuras pārstāvji atrodami visos dzīvajos organismos un katalizē apgriezenisku oglekļa dioksīda hidratēšanu, veidojot bikarbonāta anjonu.¹ Tās tiek iedalītas astoņās evolucionāri atšķirīgās ģimenēs: α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ un ι .² Lai arī pēc struktūras šie enzīmi ir daudzveidīgi, visām CA klasēm aktīvajā centrā ir metāla jons kā kofaktors. Piemēram, α -CA satur Zn^{2+} , un tam ir izšķiroša loma CA katalītiskajā ciklā.³ Šī ir visplašāk pētītā CA klase, jo tā ir sastopama mugurkaulniekos; tās aktivitāte ir tieši saistīta ar dažādu fizioloģisko un patoloģisko procesu norisi, padarot α -CA par svarīgu farmakoloģisko mērķi.^{3,4} Cilvēkos līdz šim ir zināmi 15 α -CA izoenzīmi, kas atšķiras pēc to struktūras, lokalizācijas un katalītiskās aktivitātes.⁴

Cilvēka CA izoformas tiek klasificētas atbilstoši to subšūnu lokalizācijai: citosoliskās izoformas (CA I, II, III, VII, XIII), mitohondriju izoformas (CA VA, VB), sekretētā izoforma (CA VI), kā arī ar membrānu saistītās izoformas (CA IV, IX, XII, XIV).⁴ Pastāv arī trīs katalītiski neaktīvi CA radniecīgi proteīni (CARP VIII, X, XI), kuru bioloģiskās funkcijas joprojām ir nepietiekami aprakstītas.^{4,5} CA katalītiski aktīvo formu regulācijas traucējumus un darbību nereti saista ar tādām slimībām kā vēzis, glaukoma, vielmaiņas un neiroloģiskās saslimšanas.⁴ Tiek uzskatīts, ka divas transmembrānās izoformas — CA IX un CA XII —, kas ir paaugstināti ekspresētas cieto vēžu šūnās, nodrošina optimālu šūnas iekšējo un ārējo pH, tādējādi veicinot audzēju attīstību un metastazēšanos.⁶⁻⁹ CA IX un CA XII izoformu ekspresija var kalpot kā diagnostikas un prognozēšanas biomarkieris noteiktiem vēža veidiem, kā arī korelē ar terapijas rezistenci hipoksijas un acidozes dēļ.^{6,10,11} Līdz ar to selektīvu CA IX/XII inhibitoru izveide ir perspektīva stratēģija vēža ārstēšanai ar plašām lietošanas iespējām klīnikā.

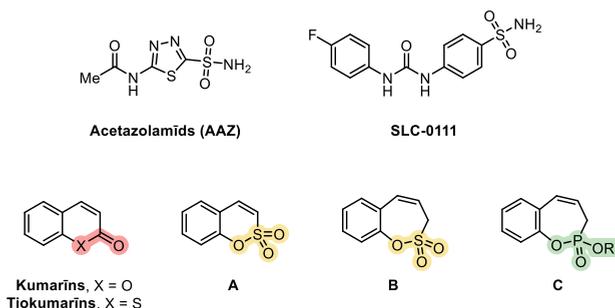
Ar rentgendifraktometrijas palīdzību ir izdevies noteikt trīsdimensionālo struktūru vairumam cilvēka CA izoformu, kas veicināja CA inhibitoru attīstību.²⁻⁴ Katalītiski aktīvo izoformu aktīvais centrs ir novietots koniskā dobumā, ko veido divi atšķirīgi reģioni — hidrofobais un hidrofilais.²⁻⁴ Šīs dažādās aktīvā centra daļas ir būtiskas enzīma darbībai un skaidrojamas ar substrāta un enzīmātiskās reakcijas produkta ķīmisko dabu. Dobuma dziļumā atrodas Zn^{2+} , kas veido tetraedrisku kompleksu ar trim histidīna atlikumiem un ar ūdens molekulu vai hidroksīdjonu.²⁻⁴ CA izoformu strukturālā līdzība un augsta aminoskābju secības identitāte katalītiskajā domēnā apgrūtina selektīvu inhibitoru konstruēšanu. Ņemot vērā CA IX un CA XII izoformu pārmērīgo ekspresiju vēža audos, bet zemu — normālos audos, šī promocijas darba pētījums ir mērķēts uz selektīvu CA IX/XII inhibitoru izstrādi, saglabājot organismā plaši sastopamo CA I un CA II izoformu aktivitāti.

Daudzi pētījumi tika vērsti uz CA un to inhibitoru mijiedarbības izpratni, kas sniegtu vērtīgas norādes racionālam zāļu dizainam. Patlaban ir zināmi četri dažādi inhibēšanas mehānismi: 1) kompleksēšanās ar enzīma aktīvajā centrā esošo cinka jonu (cinku saistošos inhibitorus sauc par klasiskajiem CA inhibitoriem, tostarp pirmējie sulfonamīdi, neorganiskie un organiskie anjoni, karbamāti, tioli, selenoli, benzoksaboroli); 2) koordinēšanās ar ūdens molekulu vai hidroksīda jonu, kas saistīts pie cinka (novērots fenolu, poliamīnu, sulfokumarīnu **A** (1. att.) gadījumā); 3) aktīvā centra ieejas aizsegšana (kumarīni, tiokumarīni); 4) perifēra saistīšanās (šim saistības veidam gan zināms tikai viens piemērs — 2-(benzilsulfinil)-benzoscābe, tā saistās ārpus aktīvā centra,

hidrofobajā kabatā blakus aktīvā centra ieejai),²⁻⁴ kā arī ir vairāki CA inhibējoši savienojumi, kuriem darbības mehānisms nav noteikts.

Daži klasiskie CA inhibitori, piemēram, acetazolamīds (AAZ), metazolamīds, sultiāms un dorzolamīds tiek lietoti klīnikā kā diurētiķi, pretglaukomas vai pretepilepsijas līdzekļi.² Savienojumi, kas satur cinku saistošo $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grupu, ir vieni no visefektīvākajiem CA inhibitoriem, taču to neselektīvā CA izoformu inhibēšana ir saistīta ar nevēlamiem blakusefektiem. Tādēļ tiek konstruēti jauni inhibitori ar uzlabotu selektivitāti, to skaitā zāļu kandidāts SLC-0111, kas tika izstrādāts, lai inhibētu tieši ar vēzi saistītās CA IX un CA XII izoformas (1. att.).^{12,13} SLC-0111 ir sasniedzis klīniskos pētījumus, kuros iesaistīti pacienti ar metastātiskiem cietiem audzējiem.¹⁴ Tas atspoguļo CA inhibitoru terapeitisko potenciālu onkoloģisko slimību ārstēšanā.

Promocijas darba autores un viņas kolēģu pētniecības grupa fokusējās uz neklasisko kumarīna tipa CA inhibitoru izpēti un attīstīšanu. Enzīma aktīvajā centrā notiek kumarīnu hidrolīze, veidojot attiecīgās kanēļskābes, kas bloķē aktīvā centra ieeju.^{15,16} Kumarīnu CA inhibēšanas spēja tika atklāta dabasvielu ekstraktu augstas caurlaidības skrīninga rezultātā, un tie izraisīja lielu interesi, pateicoties bioloģiskajai aktivitātei uz visām aktīvajām α -CA izoformām.^{15,17} Grupas iepriekšējie pētījumi kumarīna tipa inhibitoru pilnveidošanā rezultējās ar sulfokumarīniem **A** (1,2-benzoksatiin-2,2-dioksīdi) un to analogiem — homosulfokumarīniem **B** (3*H*-1,2-benzoksatiēpīn-2,2-dioksīdi), kas uzrādīja augstu selektivitāti attiecībā pret CA IX un XII (1. att.).¹⁸⁻²⁴ Promocijas darba ietvaros tiek pētīta jauna savienojumu klase — 3*H*-1,2-benzoksafosfepīn-2-oksīdi **C** kā nākamās paaudzes CA inhibitori.



1. att. CA inhibitoru struktūras.

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir, balstoties uz fosfepīna oksīda **C** struktūru, izstrādāt efektīvus un selektīvus ar audzēju saistīto CA IX un CA XII izoformu inhibitorus ar potenciālu terapeitisku lietojumu. Lai sasniegtu darba mērķi, tika definēti šādi uzdevumi:

1. izstrādāt 3*H*-1,2-benzoksafosfepīn-2-oksīda un tā atvasinājumu iegūšanas metodoloģiju;
2. noteikt sintezēto savienojumu inhibējošo aktivitāti uz izvēlētām cilvēka CA izoformām;
3. izpētīt savienojumu ietekmi uz šūnu dzīvotspēju, kā arī noteikt šķīdību ūdenī;
4. veikt struktūras–aktivitātes likumsakarību analīzi un sniegt ieskatu saistīšanās mehānismā.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Promocijas darba gaitā ir izstrādāti jauni 3*H*-1,2-benzoksafosfepīna 2-oksīda atvasinājumi, kas sniedz ieguldījumu selektīvo ogļskābes anhidrāzes inhibitoru jomā. Sintēzes stratēģija ļāva iegūt plašu benzoksafosfepīna atvasinājumu klāstu. Tika noteikta iegūto savienojumu spēja inhibēt cilvēka CA izoformas. Savienojumi selektīvi inhibēja ar audzēju saistītās izoformas IX un XII. Pētījuma rezultātā iegūta virkne inhibitoru, kam piemīt zema nanomolāra CA IX/XII inhibēšanas aktivitāte. Atsevišķiem pārstāvjiem papildus tika izvērtēta citotoksicitāte un noteikta šķīdība ūdenī. Noskaidrotās struktūras–aktivitātes likumsakarības deva ieskatu par iespējamo saistīšanās veidu ar mērķenzīmu. Kopumā rezultāti liecina, ka šie savienojumi ir potenciāli zāļvielu kandidāti un tos var izmantot turpmākai izpētei.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa par 3*H*-1,2-benzoksafosfepīna 2-oksīda atvasinājumu kā potenciālu pretvēža līdzekļu izstrādi, mērķējot tos uz ogļskābes anhidrāzes IX un XII izoformām.

Katra promocijas darba rezultātu apakšnodaļa ir balstīta vienas publikācijas saturā, ievērojot hronoloģisku secību.

Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba galvenie rezultāti apkopoti trijās zinātniskajās oriģinālpublikācijās un vienā apskatrakstā. Pētījuma rezultāti prezentēti deviņās konferencēs.

Zinātniskās publikācijas

1. **Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Synthetic methods toward phosphacoumarins (microreview). *Chem. Heterocycl. Comp.* **2022**, *58*, 310–312.
2. Pustenko, A.; **Balašova, A.**; Nocentini, A.; Supuran, C. T.; Žalubovskis, R. 3*H*-1,2-Benzoxaphosphepine 2-oxides as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX and XII. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 216–224.
3. **Balašova, A.**; Pustenko, A.; Nocentini, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Žalubovskis, R. Aryl derivatives of 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides as inhibitors of cancer-related carbonic anhydrase isoforms IX and XII. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 2249267.
4. **Balašova, A.**; Pustenko, A.; Angeli, A.; Andreucci, E.; Biagioni, A.; Nocentini, A.; Carta, F.; Supuran, C. T.; Žalubovskis, R. Unraveling the potential of amino-, acylamino-, and ureido-substituted 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides toward nanomolar inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *ACS Med. Chem. Lett.* **2025**, *16* (6), 1031–1037.
5. Manuskripts par pēdējo apakšnodaļu tiek gatavots publicēšanai.

Zinātniskās konferences

1. **Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *56th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2021)*, virtual event, July 7–9, **2021**.

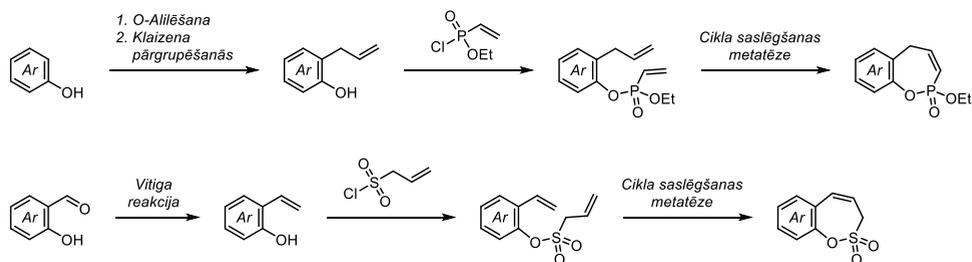
2. **Balašova, A.** Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *12th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry*, virtual event, October 28–29, **2021**.
3. **Balašova, A.; Žalubovskis, R.** Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2022)*, Vilnius, Lithuania, July 3–6, **2022**.
4. **Balašova, A.; Žalubovskis, R.** Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *Drug Discovery Conference 2022*, Riga, Latvia, September 22–24, **2022**.
5. **Balašova, A.; Žalubovskis, R.** Development of benzoxaphosphepine 2-oxides as carbonic anhydrase inhibitors. *81st International Scientific Conference of the University of Latvia*, Riga, Latvia, March 17, **2023**.
6. **Balašova, A.; Žalubovskis, R.** Design and synthesis of benzoxaphosphepine 2-oxides as carbonic anhydrase inhibitors. *12th International conference on Carbonic Anhydrases*, Naples, Italy, July 5–7, **2023**.
7. **Balašova, A.; Pustenko, A.; Žalubovskis, R.** Development of benzoxaphosphepine 2-oxides as carbonic anhydrase inhibitors. *Autoimmune diseases: main problems and solutions*, Riga, Latvia, November 9–10, **2023**.
8. **Balašova, A.; Pustenko, A.; Žalubovskis, R.** Benzoxaphosphepine 2-oxides — a novel class of carbonic anhydrase inhibitors. *Conference “Achievements of the SPRINGBOARD project”*, Riga, Latvia, May 2–3, **2024**.
9. **Balašova, A.; Pustenko, A.; Žalubovskis, R.** Benzoxaphosphepine 2-oxides — a novel class of carbonic anhydrase inhibitors. *Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2024)*, Riga, Latvia, July 7–10, **2024**.

PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

Prologs

Fosforu saturošiem savienojumiem piemīt plaša spektra bioloģiskās aktivitātes, tostarp pretvēža, pretmikrobu un pretiekaisuma īpašības, kā arī inhibējoša iedarbība uz dažādiem enzīmiem.^{25,26} Fosfora grupu ievadišana bieži vien uzlabo zāļu farmakokinētiku un farmakodinamiku, liecinot par augstu izmantošanas potenciālu medicīnas ķīmijā,^{25–28} turklāt šīs grupas var būt vairāku citu funkcionālo grupu bioizostēri, kuru priekšrocība ir paaugstināta biopieejamība.^{25,29} Līdz ar to tika paredzēts, ka benzoksafosfepīna oksīdi **C** ir iespējami sulfokumarīna analoģu bioizostēri (1. att.).

Fosforu saturošu kondensētu heterociklu sintēzes metodoloģija ir salīdzinoši ierobežota. No literatūrā zināmajām pārejas metālu katalizētām pārvērtībām šādu *P*-heterociklu veidošanai cikla saslēgšanas metatēze ir izceļama kā universāla metode benzanelētu septiņlocekļu ciklu konstruēšanai. Šī metode tika veiksmīgi lietota gan sēru, gan fosforu saturošu analoģu sintēzei (2. att.).^{22,30} 3*H*-1,2-Benzoksafosfepīna 2-oksīda **C** atvasinājumus tika plānots iegūt, izmantojot līdzīgu pieeju. Nākamajās apakšnodaļās aprakstīta šo jauno fosfororganisko savienojumu sintēze un izvērtēta to bioloģiskā aktivitāte.

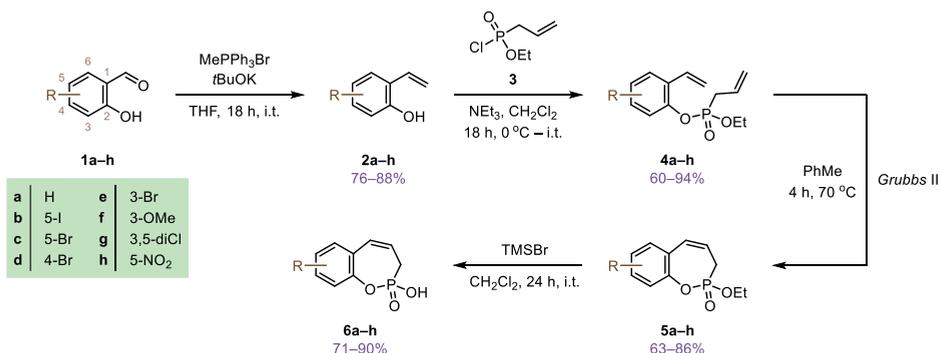


2. att. Benzanelētu *P*- vai *S*-saturošu septiņlocekļu heterociklu iegūšanas iespējas.

Informācija par fosfakumarīnu un to homoloģu sintēzes metodēm ir apkopota apskatītajā *Chem. Heterocycl. Comp.* **2022**, 58, 310–312.

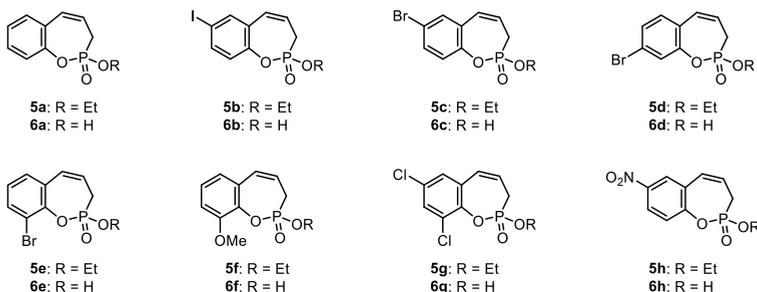
1. Benzoksafosfepīna oksīdu sintēze un inhibēšanas potenciāls

3*H*-1,2-Benzoksafosfepīn-2-oksīdu vispārīgais sintēzes ceļš tika izstrādāts, balstoties uz iepriekš aprakstīto strukturāli līdzīgu savienojumu iegūšanas metodoloģiju, kuras pamatā ir olefinu metatēzes reakcija cikla saslēgšanai.^{22,30} Sākumā komerciāli pieejamie salicilaldehīdi **1a–h** tika pārvērsti par vinilfenoliem **2a–h**, veicot *Wittig* olefinēšanas reakciju (1. shēma). Tālāk fosforilēšana ar hlorīdu **3** deva diolefinus **4a–h**, kas tika ciklizēti par vēlamajiem benzoksafosfepīniem **5a–h**, izmantojot otrās paaudzes *Grubbs* katalizatoru. Apstrādājot etoksiatvasinājumus **5a–h** ar TMSBr, notika etilgrupas nošķelšana, veidojot hidroģēnfonātus **6a–h**. Produktu iznākumi reakcijās bija vidēji augsti līdz augsti.



1. shēma. Benzoksafosfepīna oksīdu **5** un **6** sintēze.

Lai novērtētu sintezēto ciklisko fosfonātu **5** un **6** (3. att.) inhibitoro aktivitāti un selektivitāti, tika noteikta šo savienojumu spēja inhibēt četras farmakoloģiski nozīmīgas cilvēka ogļskābes anhidrāzes izoformas — CA I, II, IX un XII.³¹ Citosoliskās CA izoformas I un II ir sastopamas daudzos veselos audos, tāpēc to inhibēšana ir nevēlama, savukārt transmembrānās izoformas IX un XII paaugstināti ekspresējas audzēju šūnās un tiek uzskatītas par potenciāliem zāļvielu mērķiem. Iegūto inhibitoru aktivitātes uz CA ir izteiktas kā K_i (inhibēšanas konstantes) vērtības.



3. att. Potenciālo CA inhibitoru **5** un **6** struktūras.

In vitro analīzes dati liecina, ka testētie savienojumi **5**, **6** ir selektīvi inhibitori pret ar audzēju saistīto CA IX un CA XII izoformām un nav aktīvi pret CA I un CA II. Visi atvasinājumi uzrādīja K_i vērtības mikromolārā diapazonā, atsevišķos gadījumos sasniedzot pat submikromolāru līmeni

(1. tabula). Benzoksafosfepīna oksīdu **5**, **6** aizvietotāji pie aromātiskā fragmenta vai pie fosfora atoma (OH vs OEt) būtiski neietekmēja inhibitoro aktivitāti. Iegūtie rezultāti liecina arī par to, ka benzoksafosfepīna oksīdi ir sulfokumarīnu **A**, **B** bioizostēri analogi mijiedarbībā ar CA izoformām. Salīdzinot ar acetazolamīdu (AAZ), redzams, ka fosforu saturošie savienojumi **5**, **6** ir vājāki mērķenzīmu inhibitori, tomēr, pateicoties to augstajai selektivitātei un fizikālķīmiskajām īpašībām, benzoksafosfepīna pamatstruktūra ir piemērota tālākai optimizēšanai.

1. tabula

CA inhibēšanas dati savienojumu sērijām **5**, **6** un standarta inhibitoram AAZ

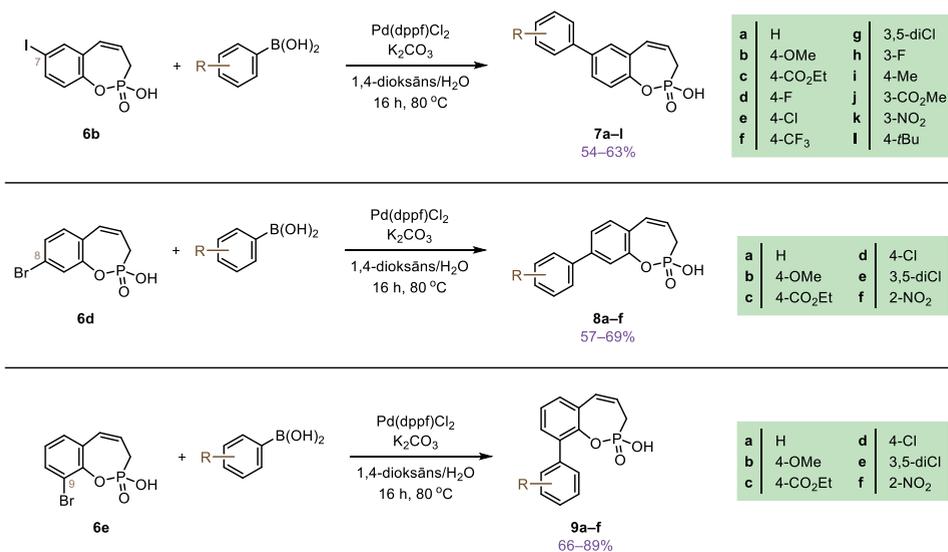
Savienojums	K_i (μM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
5a	>100	>100	0,82	0,82
6a	>100	>100	1,3	0,51
5b	>100	>100	4,7	2,4
6b	>100	>100	0,88	0,68
5c	>100	>100	0,76	1,6
6c	>100	>100	1,0	0,96
5d	ND	ND	ND	ND
6d	>100	>100	3,4	1,5
5e	>100	>100	11,3	3,3
6e	>100	>100	2,5	1,8
5f	>100	>100	9,0	7,4
6f	>100	>100	1,8	1,2
5g	>100	>100	6,1	3,4
6g	>100	>100	0,80	1,7
5h	>100	>100	3,9	0,95
6h	>100	>100	0,67	1,0
AAZ*	0,25	0,012	0,025	0,006

[a] Noteikts sadarbībā ar prof. C. T. Supuran grupu Florences Universitātē. [b] Rezultāti ir aprēķināti kā vidējais no trīs neatkarīgiem mērījumiem (kļūdas ir ± 5 –10% robežās no norādītajām vērtībām). [c] Inhibitoru un enzīmu saturošie šķīdumi tika inkubēti 6 h i.t. * References standarts.

Šīs apakšnodaļas pētījumi ir aprakstīti oriģinālpublikācijā *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, 38 (1), 216–224.

2. Benzoksafosfepīna pamatstruktūras ķīmiskās daudzveidības paplašināšana

Lai iegūtu plašāku informāciju par struktūras-aktivitātes likumsakarībām, tika veikta benzoksafosfepīna oksīda modificēšana, ievadot dažādus aril aizvietotājus 7-, 8- un 9-pozīcijā. Aril atvasinājumi **7–9** tika sintezēti palādijs katalizētā *Suzuki–Miyaura* šķērssametnāšanas reakcijā starp komerciāli pieejamajām arilborskābēm un halogēniem **6b,d,e** (2. shēma). No iepriekšējiem rezultātiem zināms, ka 6-pozīcijā aizvietotus atvasinājumus iegūt nav iespējams, jo attiecīgais diolefin stērisko traucējumu dēļ neciklizējas metatēzes stadijā.²³ Iegūto produktu **7–9** bioloģiskās aktivitātes ļautu noskaidrot piemērotāko aizvietotāju novietojumu jaunu šāda tipa CA inhibitoru dizainā.



2. shēma. Benzoksafosfepīna oksīda 7-, 8-, 9-aril atvasinājumu **7–9** sintēze.

Aril atvasinājumi **7–9** uzrādīja samērā līdzīgas K_i vērtības (mikromolārā līmenī) uz CA IX un CA XII izoformām kā sākotnējie inhibitori **6b,d,e**, vienlaikus saglabājot selektivitāti (2. tabula). Būtiski, ka 9-pozīcijā aizvietotu atvasinājumu **9** gadījumā tika novērota aktivitātes samazināšanās, savukārt 7- un 8-aizvietotu analoģu **7, 8** CA IX/XII inhibēšanas spēja bija ievērojami augstāka. Kopumā savienojumu sēriju **7** un **8** pārstāvji uzrādīja līdzīgus rezultātus, tomēr **7a, 7d** un **7h** ir aktīvākie šo sēriju inhibitori. Šī tendence ir novērojama arī sulfokumarīna **A** un homosulfokumarīna **B** analoģu rindās.^{20,23} Līdz ar to tālākā funkcionalizēšana, lai uzlabotu aktivitāti, tika veikta benzoksafosfepīna 7-pozīcijā.

CA inhibēšanas dati savienojumu sērijām 7–9 un standarta inhibitoram AAZ

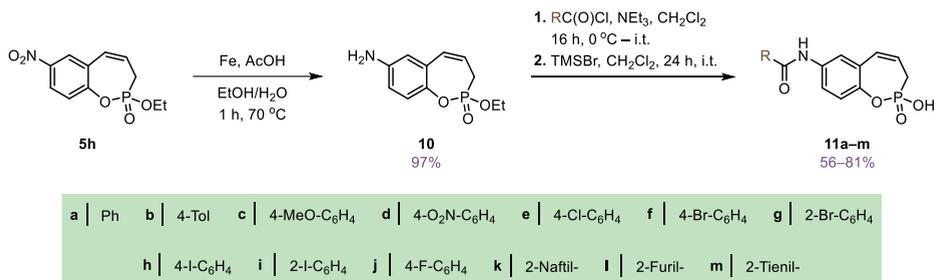
Savienojums	K_i (μM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
7a	>100	>100	0,77	0,95
7b	>100	>100	4,6	1,7
7c	>100	>100	6,0	6,7
7d	>100	>100	0,86	0,25
7e	>100	>100	8,6	1,1
7f	>100	>100	3,7	0,59
7g	>100	>100	7,3	4,2
7h	>100	>100	0,63	0,56
7i	>100	>100	1,5	0,94
7j	>100	>100	9,5	1,5
7k	>100	>100	7,6	0,64
7l	>100	>100	4,9	0,97
8a	>100	>100	1,8	2,7
8b	>100	>100	2,1	5,6
8c	>100	>100	10,2	3,8
8d	>100	>100	5,0	7,1
8e	>100	>100	0,98	0,84
8f	>100	>100	12,9	0,67
9a	>100	>100	16,5	25,5
9b	>100	>100	39,4	52,4
9c	>100	>100	55,3	>100
9d	>100	>100	48,9	65,3
9e	>100	>100	22,4	28,2
9f	>100	>100	38,4	35,1
AAZ*	0,25	0,012	0,025	0,006

[a] Noteikts sadarbībā ar prof. C. T. Supuran grupu Florences Universitātē. [b] Rezultāti ir aprēķināti kā vidējais no trīs neatkarīgiem mērījumiem (kļūdas ir ± 5 –10% robežās no norādītajām vērtībām). [c] Inhibitoru un enzīmu saturošie šķīdumi tika inkubēti 6 h i.t. * References standarts.

Šīs apakšnodaļas pētījumi ir aprakstīti oriģinālpublikācijā *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, 38 (1), 2249267.

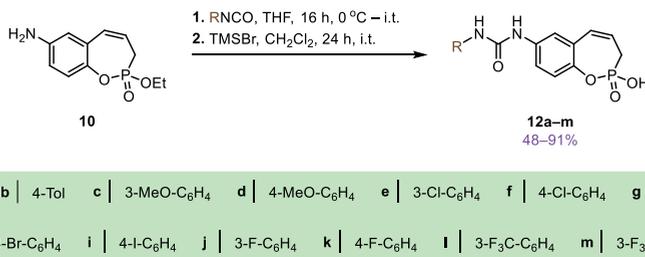
3. Benzoksafosfepīnu optimizēšana līdz nanomolāriem mērķenzīmu inhibitoriem

Iepriekšējos pētījumos par benzoksatiīna un benzoksatiepīna dioksīdiem **A** un **B**, kas ir benzoksafosfepīna oksīdu **C** tuvākie analogi, tika atklāts, ka acilaminofunkcijas ievadīšana pamatstrukturā nozīmīgi ietekmēja savienojumu inhibitoro aktivitāti pret CA IX un CA XII.^{21,24} Tādēļ nākamā darba posmā, lai sasniegtu labāku aktivitāti, tika nolemts sintezēt atvasinājumus ar amīda funkcionālajām grupām. Vispirms iepriekš iegūtais nitrobenzoksafosfepīns **5h** tika reducēts līdz amīnam **10**, kas tālāk tika acilēts ar virkni karbonskābju hlorīdu. Pēc starpproduktu etilgrupas nošķelšanas ar TMSBr tika iegūti attiecīgie amīdi **11a–m** (3. shēma).



3. shēma. Benzoksafosfepīna oksīda amino- un acilaminoatvasinājumu **10** un **11** sintēze.

Šī pētījuma ietvaros jaunu un selektīvu ogļskābes anhidrāzes inhibitoru klāsts tika papildināts arī ar urīnvielas atvasinājumiem **12**. Urīnvielas funkciju saturoši savienojumi tiek plaši izmantoti zāļvielu konstruēšanā un attīstīšanā, lai uzlabotu līdersavienojumu bioloģisko aktivitāti, kā arī fizikālķīmiskos parametrus.³² Turklāt zāļvielas kandidāts SLC-0111, kas uzrādīja spēcīgu CA IX/XII inhibēšanu un kam ir pabeigti I fāzes klīniskie pētījumi (NCT02215850), satur urīnvielas fragmentu. Benzoksafosfepīna oksīda urīnvielas atvasinājumi tika sintezēti, amīnam **10** reaģējot ar dažādiem arilzocianātiem, kam seko *O*-deetilēšana, izmantojot TMSBr (4. shēma). Vēlamās *N,N'*-diarilurīnvielas **12a–m** tika iegūtas ar vidējiem līdz augstiem iznākumiem.



4. shēma. Benzoksafosfepīna oksīda urīnvielas atvasinājumu **12** sintēze.

Jaunsintezēto amino-, acilamino- un urīnvielas atvasinājumu **10–12** enzimatiskie testi uz CA I, II, IX, XII parādīja interesantus rezultātus. Tāpat kā iepriekš pētītie analogi **5–9**, savienojumi **10–12** neinhibē normālos audos plaši sastopamās CA I un CA II izoformas. Zīmīgi, ka amīns **10** un tā atvasinājumi **11**, **12** sasniedza nanomolāru līmeni — daži savienojumi uzrādīja labāku inhibēšanas aktivitāti uz CA IX vai CA XII nekā SLC-0111 un AAZ (3. tabula). Jāuzsver, ka spēja inhibēt abas

izoformas ir novērojama tikai amīna **10** un amīdu **11** gadījumā, savukārt urīnvielas **12** izrādījās selektīvi CA IX inhibitori.

3. tabula

CA inhibēšanas dati savienojumu sērijām **10–12** un inhibitoriem SLC-0111 un AAZ

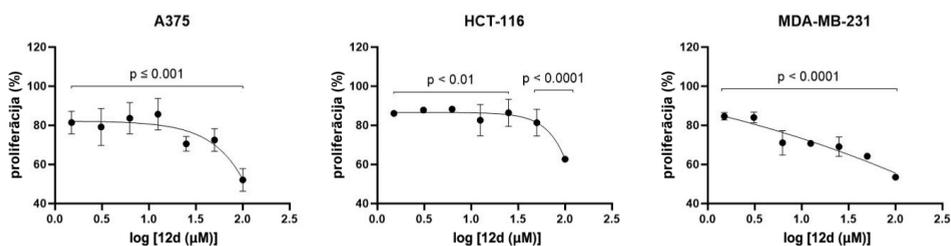
Savienojums	K_i (nM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
10	>10000	>10000	3,5	16,6
11a	>10000	>10000	10,8	7,3
11b	>10000	>10000	20,5	7,8
11c	>10000	>10000	10,1	8,1
11d	>10000	>10000	29,4	6,7
11e	>10000	>10000	158,4	64,1
11f	>10000	>10000	25,8	84,4
11g	>10000	>10000	23,2	8,9
11h	>10000	>10000	18,7	57,5
11i	>10000	>10000	14,6	6,9
11j	>10000	>10000	27,4	4,0
11k	>10000	>10000	20,1	27,2
11l	>10000	>10000	22,3	9,7
11m	>10000	>10000	32,8	74,6
12a	>10000	>10000	34,9	>10000
12b	>10000	>10000	46,9	>10000
12c	>10000	>10000	53,3	>10000
12d	>10000	>10000	5,3	>10000
12e	>10000	>10000	52,9	>10000
12f	>10000	>10000	54,8	>10000
12g	>10000	>10000	46,9	>10000
12h	>10000	>10000	36,8	>10000
12i	>10000	>10000	36,0	>10000
12j	>10000	>10000	51,8	>10000
12k	>10000	>10000	4,4	>10000
12l	>10000	>10000	31,9	>10000
12m	>10000	>10000	42,7	>10000
SLC-0111 ¹²	5080	960	45,1	4,5
AAZ [*]	250	12,1	25,8	5,7

[a] Noteikts sadarbībā ar prof. C. T. Supuran grupu Florences Universitātē. [b] Rezultāti ir aprēķināti kā vidējais no trīs neatkarīgiem mērījumiem (kļūdas ir ±5–10% robežās no norādītajām vērtībām). [c] Inhibitoru un enzīmu saturošie šķīdumi tika inkubēti 6 h i.t. * References standarts.

Jāatzīmē, ka dažos vēža apakštīpos CA XII ekspresijai, salīdzinot ar CA IX izoformu, ir minimāla ietekme uz audzēja šūnu proliferāciju.³³ Turklāt CA XII ir sastopama vairākos normālos audos, kas liecina par nepieciešamību noteiktos gadījumos izstrādāt selektīvākus CA IX inhibitorus attiecībā

pret CA XII.^{33,34} Savienojumi **12**, kam piemīt CA IX inhibēšanas selektivitāte, varētu būt īpaši nozīmīgi farmakoloģijas jomā, pateicoties samazinātām blaknēm, saistītām ar neselektīvu CA izoformu aktivitātes nomākšanu.

No sintezētajiem benzoksafosfepīna oksīda **C** atvasinājumiem amīns **10**, amīdi **11** un urīnvielas **12** uzrādīja visaugstāko mērķenzīmu inhibēšanas spēju (ar K_i vērtībām nanomolārā diapazonā). No tiem **10**, **11c** un **12d** tika izvēlēti turpmākajiem *in vitro* eksperimentiem citotoksicitātes pārbaudei. Analizējamo inhibitoru citotoksicitāte tika pētīta uz A375 melanomas šūnu, HCT-116 kolorektālā vēža šūnu un MDA-MB-231 trīskārši negatīvā krūts vēža šūnu līnijām, kas kultivētas klasiskajos apstākļos. Šūnu dzīvotspējas noteikšanai tika izmantota MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds) kolorimetriskā metode.^{35,36} Rezultāti liecināja, ka amīnam **10** un amīdam **11c** ir zema citotoksiskā aktivitāte visās pētījumā analizētajās šūnu līnijās, savukārt urīnvielas atvasinājums **12d** uzrādīja izteiktāku citotoksisko efektu — inkubācija ar **12d** samazināja HCT-116 šūnu proliferāciju par 40% un A375, MDA-MB-231 šūnu proliferāciju par 50% 100 μM koncentrācijā (4. att.).



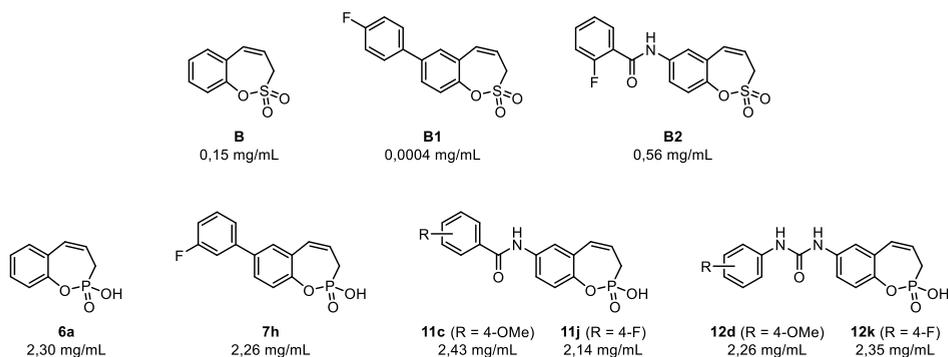
4. att. Savienojuma **12d** citotoksiskā iedarbība uz A375, HCT-116 un MDA-MB-231 šūnu līnijām pēc 72 h inkubācijas ($N = 4$; dati analizēti, izmantojot *GraphPad Prism 10.3.1*; noteikts Florences Universitātē sadarbībā ar *Dr. E. Andreucci* un *Dr. A. Biagioni*).

Dažiem literatūrā zināmajiem CA inhibitoriem piemīt augsta citotoksicitāte,^{37,38} tomēr tiek uzskatīts, ka CA IX/XII inhibitoru pretvēža potenciāls galvenokārt ir saistīts ar to spēju modulēt audzēja mikrovidi, samazinot acidozi, kā arī kavējot ļaundabīgo šūnu augšanu un izplatīšanos.⁹ Turklāt kombinācijā ar citām zālvielām CA IX/XII inhibitori var darboties sinerģiski, sensibilizējot vēža šūnas un tādējādi palielinot ķīmijterapijas efektivitāti.^{39,40} Interesanti, ka preklīniskajos *in vitro* pētījumos zālvielas kandidāts SLC-0111 neietekmēja vēža šūnu dzīvotspēju normoksijas un neitrālā pH (7,4) apstākļu gadījumā, taču uzrādīja citotoksisko aktivitāti vēža šūnu līnijās, kultivētās skābā vidē (pH 6,7) vai hipoksijas apstākļos.⁴¹ Izteiktu antiproliferatīvu un antimetastātisku iedarbību SLC-0111 uzrādīja *in vivo* krūts vēža modeļos.^{12,13}

Citotoksicitātes testi plašākā šūnu līniju panelī, iekļaujot vēža šūnu līnijas ar paaugstinātu CA IX/XII ekspresiju un to inkubāciju hipoksijas apstākļos, sniegtu papildu informāciju par benzoksafosfepīna oksīdu terapeitisko potenciālu. Ņemot vērā novēroto selektivitāti CA izoformu inhibēšanā (3. tabula), pētījumi par šo savienojumu ietekmi uz vēža šūnām, kurām ir raksturīga pozitīva CA IX ekspresija un negatīva/vāja CA XII ekspresija (vai *vice versa*), ļautu izvērtēt saistību starp mērķproteīnu inhibēšanu un vēža šūnu proliferācijas spēju.

Darba turpinājumā 3H-1,2-benzoksafosfepīn-2-oksīdu klases, kā arī 3H-1,2-benzoksatiepīn-2,2-dioksīdu klases pārstāvjiem tika noteikta šķīdība ūdenī. Analīze tika veikta fosfāta fizioloģiskajā

buferšķīdumā (PBS; pH ~ 7,4) pie 25 °C, izmantojot AEŠH-UV metodi. No iegūtajiem rezultātiem redzams, ka pāreja no sultoniem uz cikliskajām fosfonskābēm uzlabo šķīdību ūdenī — fosfonātiem **6a**, **7h**, **11c**, **11j**, **12d**, **12k** tā ir izteikti augstāka nekā sultonu analogiem **B**, **B1**, **B2** (5. att.). Jāpiebilst, ka benzoksafosfepīna oksīdu šķīdības vērtības ir līdzvērtīgas neatkarīgi no aizvietotāja. Turklāt no fosfonskābēm ir iespējams iegūt sāļus, lai papildus paaugstinātu šķīdību ūdenī. Potenciālu zāļvielu šķīdība ir būtisks parametrs, kas ietekmē to absorbciju, biopieejamību un administrēšanu. Neapmierinošas farmakokinētiskās īpašības nereti ir saistītas ar savienojumu zemu šķīdību un šūnu caurlaidību.³²



5. att. Izvēlēto inhibitoru šķīdība PBS buferī (noteikts sadarbībā ar Dr. H. Kažokas grupu LOSI Hromatogrāfijas laboratorijā).

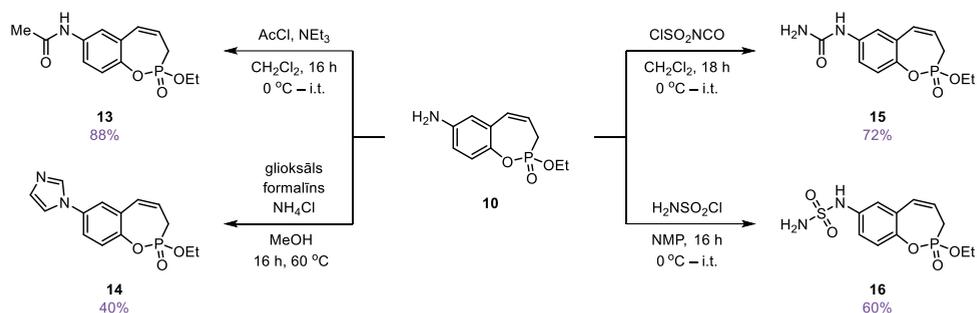
Šīs apakšnodaļas pētījumi ir aprakstīti oriģinālpublikācijā *ACS Med. Chem. Lett.* **2025**, *16* (6), 1031–1037.

4. Inhibitoru klāsta papildināšana un saistīšanās mehānisma izpēte

(Nepublicēti rezultāti)

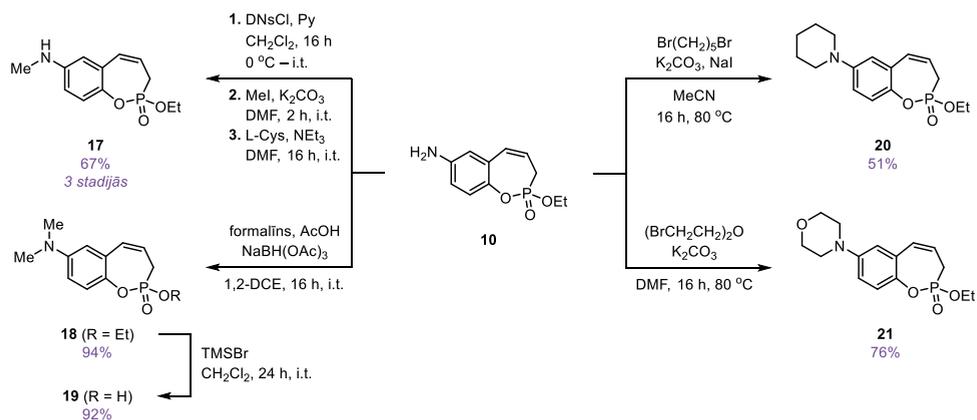
Izvērtējot slāpekli saturošu benzoksafosfepīna oksīdu **10–12** CA IX/XII inhibēšanas potenciālu, tika nolemts paplašināt šo atvasinājumu klāstu ar dažādiem aminofunkcijas aizvietotājiem. Amīns **10**, kas uzrādīja augstu inhibitoro aktivitāti un ligandu efektivitāti, kalpoja par atbilstošu references savienojumu, veicot tālāku struktūras modificēšanu.

Jauni mazmolekulāri CA inhibitori tika sintezēti, izmantojot benzoksafosfepīna oksīda aminoatvasinājumu **10** kā galveno būvbloku. Savienojuma **10** acetilēšana ļāva iegūt acetamīdu **13**. Reakcijā ar CSI amīns **10** tika pārvērstš par *N*'-neaizvietotu urīnvielu **15**, savukārt, amīnam **10** reaģējot ar sulfamoilhlorīdu, veidojās sulfamīds **16**. Veicot *Debus–Radziszewski* reakciju, no būvbloka **10** tika iegūts arī imidazols **14**, lai pārbaudītu, vai imidazolilgrupa varētu darboties kā arilgrupas bioizostērs (5. shēma).



5. shēma. *N*-Saturošu benzoksafosfepīna oksīda atvasinājumu **13–16** sintēze.

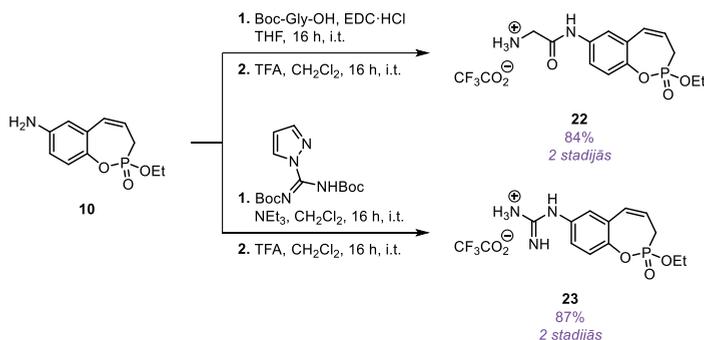
N-Metilatvasinājuma **17** iegūšanai tika izmantota *Fukuyama* metode,⁴² kuras pamatā ir aminogrupas aizsargāšana ar 2,4-dinitrobenzolsulfonilgrupu. *N*-Aizsargāta amīna alkilēšana ar MeI un tai sekojoša DNS grupas nošķelšana ar L-cisteīnu NEt_3 klātienē deva vajadzīgo otrējo amīnu **17** (6. shēma).



6. shēma. *N*-Saturošu benzoksafosfepīna oksīda atvasinājumu **17–21** sintēze.

Būvbloka **10** pārvēršana par *N,N*-dimetilatvasinājumu **18** tika veikta ar formaldehīdu reducējošās aminēšanas ceļā. Pakļaujot savienojumu **18** iepriekš aprakstītajiem *McKenna* reakcijas apstākļiem, ar augstu iznākumu tika iegūts arī analogs **19**. Savukārt piperidīna un morfolīna atvasinājumi **20** un **21** tika sintezēti, attiecīgi alkilējot amīnu **10** ar 1,5-dibrompentānu vai bis(2-brometil)ēteri (6. shēma).

Slāpekli saturošu atvasinājumu rindas paplašināšanai amīns **10** tika transformēts par glicīnamīda **22** un guanidīna **23** analogiem, izmantojot reakciju ar *N*-Boc-aizsargātu glicīnu vai 1*H*-pirazol-1-karboksamidīnu. Pēc aizsarggrupu nošķelšanas skābā vidē mērķsavienojumi tika iegūti trifluoracetātu sāļu veidā (7. shēma).



7. shēma. *N*-Saturōšu benzoksafosfepīna oksīda atvasinājumu **22** un **23** sintēze.

Jauno CA inhibitoru **13–23** *K_i* vērtības bija robežās no 23 nM līdz 3,44 μM (4. tabula).

4. tabula

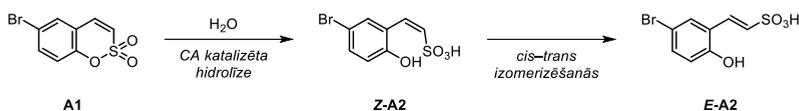
CA inhibēšanas dati savienojumiem **13–23** un standartā inhibitoram AAZ

Savienojums	<i>K_i</i> (nM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
13	>10000	>10000	620	870
14	ND	ND	ND	ND
15	>10000	>10000	51	3440
16	370	94	37	23
17	>10000	>10000	840	710
18	>10000	>10000	950	760
19	>10000	>10000	920	810
20	>10000	>10000	1130	1070
21	>10000	>10000	990	1280
22	>10000	>10000	920	650
23	>10000	>10000	1230	1150
AAZ [*]	250	12,1	25,8	5,7

[a] Noteikts sadarbībā ar prof. C. T. Supuran grupu Florences Universitātē. [b] Rezultāti ir aprēķināti kā vidējais no trīs neatkarīgiem mērījumiem (kļūdas ir ±5–10% robežās no norādītajām vērtībām). [c] Inhibitoru un enzīmu saturošie šķīdumi tika inkubēti 6 h i.t. * References standarts.

Veicot benzoksafosfepīna oksīda atvasinājuma **10** aminogrupas modifikācijas, SAR pētījumos noskaidrots, ka alifātisko fragmentu ievadīšana kopumā samazināja inhibitoru aktivitāti (salīdzinot **13** ar **10** un **11a–m**; kā arī **17–22** ar **10**). Sintezētie acikliskie un cikliskie amīni **17–21**, kā arī amīdi **13**, **22** ir vājāki CA IX/XII inhibitori nekā attiecīgie aromātiskie atvasinājumi **11**, **12** un neaizvietots amīns **10** (3. un 4. tabula). Rezultāti liecina par nepieciešamību precīzi regulēt stēriskos un elektroniskos efektus konstruējamo ligandu aizvietotajiem *N*-saturošajā sānu ķēdē. Interesanti, ka *N'*-neaizvietotai urīnvielai **15** tika novērota līdzīga CA IX selektivitāte attiecībā pret CA XII inhibēšanu kā *N'*-arilurīnvielām **12a–m**. No visiem testētajiem savienojumiem tikai sulfamīds **16** inhibēja CA I un II izoformas, kas bija sagaidāms, ņemot vērā $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grupas koordinēšanos ar cinka jonu.⁴ Toties savienojums **16** uzrādīja augstāku inhibēšanas aktivitāti uz mērķenzīmiem CA IX/XII nekā uz CA I/II, parādot benzoksafosfepīna struktūras ietekmi uz vēlamās selektivitātes nodrošināšanu.

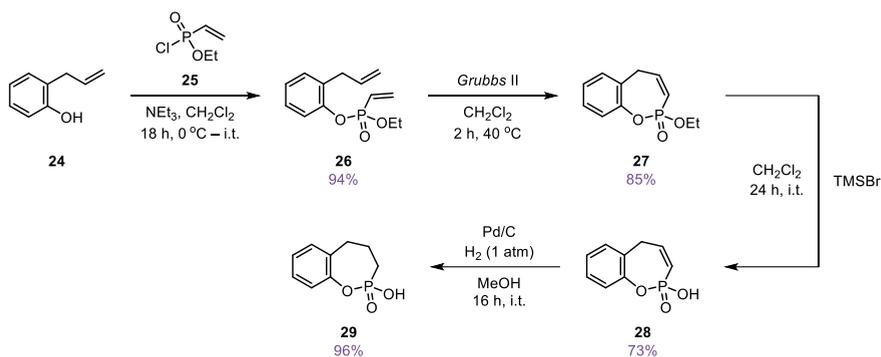
CA enzīma kristalizācijas mēģinājumi kompleksā ar dažādiem 3*H*-1,2-benzoksafosfepīna 2-oksīda atvasinājumiem nebija veiksmīgi, tāpēc joprojām paliek aktuāls jautājums par šo savienojumu konkrētu inhibēšanas mehānismu. Pētījuma gaitā tika izvirzītas divas galvenās hipotēzes: 1) 3*H*-1,2-benzoksafosfepīna 2-oksīdi iedarbojas uz CA neizmainītā veidā; vai 2) 3*H*-1,2-benzoksafosfepīna 2-oksīdi ir zāļvielu priekšteči, kas tiek pārveidoti par aktīvajiem savienojumiem hidrolīzes ceļā. Jāpiebilst, ka enzīmātikajos testos šo inhibitoru aktivitāte ir atkarīga no inkubācijas perioda, kas varētu liecināt par to, ka tie darbojas kā zāļvielu priekšteči. Piemēram, klasisko CA inhibitoru gadījumā enzīmu un inhibitoru šķīdumiem inkubācijas periods ir 15 minūtes, taču benzoksafosfepīna oksīdu aktivitātes noteikšanai bija nepieciešama sešu stundu inkubācija. Analogisks efekts ir raksturīgs kumarīniem un sulfokumarīniem, kuru darbības mehānisms tika noskaidrots kokristalizācijas pētījumos un ietver heterocikliskā fragmenta hidrolītisko šķelšanos; rezultātā izveidojušies skābes atvasinājumi saistās ar enzīma aktīvo centru (6. att.).^{16,19}



6. att. Sulfokumarīna **A1** CA katalizēta hidrolīze.¹⁹

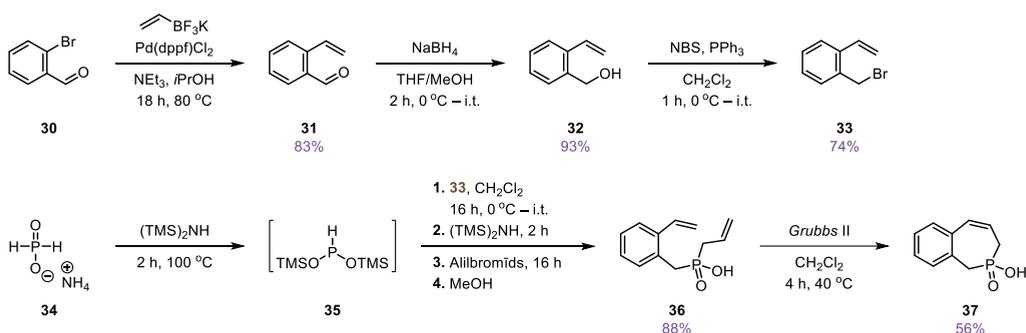
Lai izprastu benzoksafosfepīna oksīdu mijiedarbību ar CA, nepieciešama kompleksas pieejas lietošana, kas paredz tradicionālo SAR pētījumu un datormodelēšanas apvienošanu. Tādēļ tika nolemts iegūt vairākus papildu modeļsubstrātus, kas atklātu oksafosfepīna fragmentā esošās dubultsaites un skābekļa tiltiņa lomu CA inhibēšanā.

5*H*-1,2-Benzoksafosfepīn- un 3,4,5-trihidrobenzoksafosfepīn-2-oksīdi (**28** un **29**) tika sintezēti līdzīgā veidā kā iepriekšējās sērijas inhibitori **6**, sākot no 2-alilfenola (**24**). Fosforilēšanas reakcijā ar hlorīdu **25** no savienojuma **24** tika iegūts diolefīns **26**, kas veidoja ciklizēto produktu **27**, lietojot cikla saslēgšanas metatēzi (8. shēma). Jāmin, ka reakciju veicām sausā CH_2Cl_2 istabas temperatūrā, kas palīdzēja novērst olefīna **27** dubultsaites migrēšanu. Tālāka TMSBr veicināta etilgrupas nošķelšana deva mērķsavienojumu **28**, no kura tika iegūts trihidroanalogi **29**, hydrogenējot heterocikliskajā fragmentā esošo dubultsaiti.



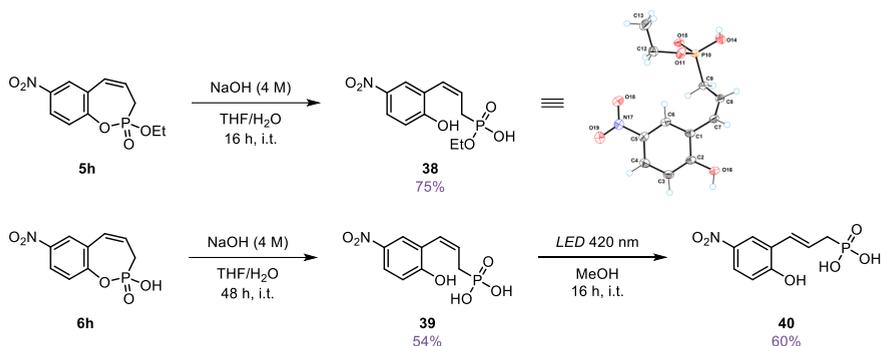
8. shēma. Benzoksafosfēna oksīdu analogu **28** un **29** sintēze.

Lai pagatavotu ciklisko fosfīnskābi **37**, sākotnēji bija nepieciešams iegūt 2-vinilbenzilbromīdu (**33**). Savienojums **33** tika sintezēts no 2-brombenzalhēda (**30**) saskaņā ar literatūras metodi,⁴³ kas paredzēja trīs soļu secenci — *Suzuki–Miyaura* sametināšanu starp **30** un kālija viniltrifluorborātu, aldehīda **21** reducēšanu un iegūtā spirta **32** Appel tipa bromēšanu (9. shēma). Fosforu saturoša fragmenta ievadīšana tika iesākta ar amonija hipofosfīta (**34**) pārvēršanu par bis(trimetilsilil)-fosfonītu (**35**), kas tika izmantots reakcijā ar bromīdu **33**.⁴⁴ Pēc HMDS pievienošanas un alilēšanas sekoja apstrāde ar MeOH, iegūstot dialkilfosfīnskābi **36**.⁴⁴ Pēdējā stadijā, veicot cikla saslēgšanas metatēzi, tika iegūts mērķsavienojums **37**.



9. shēma. 1,3-Dihidrobenzfosfēna 2-oksīda **37** sintēze.

Ņemot vērā iespējamo inhibēšanas mehānismu, kas ietver oksafosfēna hidrolīzi, iepriekš sintezētie benzoksafosfēna oksīdi **5h** un **6h** tika pakļauti hidrolīzes reakcijai ar NaOH ūdens šķīdumu. Reakcijas rezultātā veidojās fosfonāts **38** un fosfonskābe **39** ar *Z*-konfigurācijas dubultsaiti. Savienojuma **38** struktūra tika pierādīta ar monokristāla rentgendifraktometriju. Salīdzināšanās nolūkā hidrolizētais analogs **39** tika pārvērsts par *E*-izomēru **40**, apstarojot to ar violetās gaismas LED (10. shēma).



10. shēma. Fosfonāta **38** un fosfonskābju **39**, **40** sintēze (rentgendifraktometrijas pētījumi tika veikti sadarbībā ar *Dr. S. Beļakovu* LOSI Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijā).

Modeļsavienojumu CA izoformu inhibēšanas testu dati daļēji apstiprināja izvirzīto hipotēzi par 3*H*-1,2-benzoksafosfepīna 2-oksīdu hidrolīzi enzīma vidē. Atbilstoši šai hipotēzei cikla atvēršanas produkti **38** un **39** saglabāja selektivitāti un uzrādīja inhibitoro aktivitāti pret CA IX/XII, kas bija salīdzināma ar ciklisko analogu **5h** un **6h** aktivitāti. Savienojuma **6a** dubultsaites reģioizomēra **28** un hidrogenētā atvasinājuma **29** rezultāti liecina, ka dubultsaitei benzoksafosfepīna bāzes struktūrā ir liela nozīme CA izoformu inhibēšanā, jo tās reducēšana izraisa aktivitātes zudumu. Iespējams, dubultsaite ierobežo struktūru kustīgumu hidrolīzes gadījumā un/vai veido nozīmīgas hidrofobās mijiedarbības ar enzīma aktīvajā centrā esošajām aminoskābēm. Savukārt benzofosfepīna **37** aktivitāti varētu skaidrot ar šī mazmolekulāra liganda spēju ieiet CA IX un CA XII izoformu katalītiskajā kabatā (5. tabula).

5. tabula

CA inhibēšanas dati savienojumiem **28**, **29**, **36–40** un standarta inhibitoram AAZ

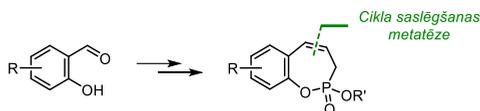
Savienojums	<i>K_i</i> (μM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
28	>100	>100	1,6	3,5
29	>100	>100	>100	>100
36	ND	ND	ND	ND
37	>100	>100	0,86	0,78
38	>100	>100	2,14	1,98
39	>100	>100	1,80	1,67
40	ND	ND	ND	ND
AAZ ^d	0,25	0,012	0,025	0,006

[a] Noteikts sadarbībā ar prof. *C. T. Supuran* grupu Florences Universitātē. [b] Rezultāti ir aprēķināti kā vidējais no trīs neatkarīgiem mērījumiem (kļūdas ir ±5–10% robežās no norādītajām vērtībām). [c] Inhibitoru un enzīmu saturošie šķīdumi tika inkubēti 6 h i.t. * References standarts.

Savienojumu molekulārā modelēšana CA struktūrā ļautu noskaidrot izdevīgāko saistības veidu un sniegtu noderīgu informāciju par attīstīšanas iespējām turpmākajos pētījumos.

SECINĀJUMI

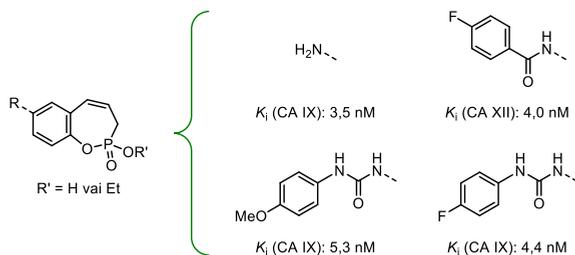
1. Izstrādātā sintēzes pieeja, kas ietver olefīnu veidošanos no 2-hidroksibenzaldehīdiem un cikla saslēgšanas metatēzi kā galveno stadiju, ļauj iegūt jaunus fosforu saturošus heterocikliskos savienojumus — 3H-1,2-benzoksafosfepīna 2-oksīdus. Šos savienojumus ir iespējams tālāk funkcionalizēt, iegūstot plašu atvasinājumu klāstu.



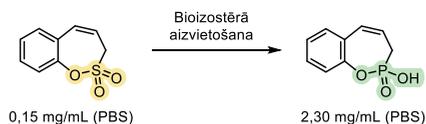
2. 3H-1,2-Benzoksafosfepīna 2-oksīdi ir jauna cilvēka CA inhibitoru klase, kuras pārstāvji uzrādīja augstu inhibēšanas spēju un selektivitāti uz vēža šūnās ekspresētajām CA IX un XII izoformām, salīdzinot ar organismā plaši sastopamajām CA I un II.



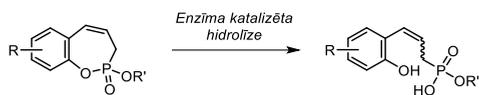
3. 7-Aminoatvasinājums, kā arī 7-acilamino- un 7-urīnvielas atvasinājumi ar dažām arilgrupām uzrādīja visaugstāko inhibitoro aktivitāti pret CA IX un/vai CA XII. Tie ir efektīvāki ar audzēju saistīto izoformu inhibitori nekā AAZ vai zāļvielas kandidāts SLC-0111. Iegūtie rezultāti liecina, ka savienojumi ir piemēroti turpmākai izpētei un attīstīšanai kā potenciāli pretvēža līdzekļi.



4. Benzoksafosfepīna oksīdi ir izmantojami kā kumarīna un tā sēru saturošu analogu bioizostēri attiecībā uz CA izoformu inhibēšanu. Sintezēto fosfororganisko mērķsavienojumu šķīdība ūdenī ir ievērojami augstāka nekā iepriekšējās paaudzes inhibitoriem, kas liecina par potenciāli uzlabotu biopieejamību.



5. CA inhibitoriem ar benzoksafosfēna pamatstruktūru var būt līdzīgs darbības mehānisms kā radniecīgajiem kumarīniem un sulfokumarīniem. Piedāvātais savienojumu saistības veids CA IX vai CA XII aktīvajā centrā ietver oksafosfēna hidrolīzi, kam seko saistīšanās pie aktīvā centra ieejas vai ar cinka neproteīna ligandu. Strukturālās atšķirības CA izoformu I, II, IX un XII aktīvā centra apkārtnē, kā arī 1,2-benzoksafosfēn-2-oksīda aizvietotāju daba nosaka inhibēšanas selektivitāti.



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

To be granted the scientific degree of Doctor of Science (PhD), the present Doctoral Thesis has been submitted for defence at the open meeting of RTU Promotion Council on 11 December 2025 at 13.00 at the Faculty of Natural Sciences and Technology of Riga Technical University, Paula Valdena iela 3, Room 272.

OFFICIAL REVIEWERS

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

Professor PhD Jean-Yves Winum
University of Montpellier, France

Professor PhD Eglė Arbačiauskienė
Kaunas University of Technology, Lithuania

DECLARATION OF ACADEMIC INTEGRITY

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

Anastasija Balašova (signature)

Date

The Doctoral Thesis has been prepared as a collection of thematically related scientific publications complemented by summaries in both Latvian and English. The Doctoral Thesis unites four scientific publications and unpublished results. The scientific publications have been written in English, with a total volume of 81 pages, including electronic supplementary data.

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

Introduction

Discovered in the early 1930s, carbonic anhydrases (CA, EC 4.2.1.1) are a well-known enzyme superfamily recognised for catalysing the reversible hydration of carbon dioxide to bicarbonate anion in all living organisms.¹ They are divided into eight evolutionarily distinct gene families, namely α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ and ι .² While being structurally diverse, all CA enzymes possess a metal ion as a cofactor at their active site. The α -CA gene family contains Zn^{2+} , which plays a crucial role in the catalytic mechanism.³ This is the most widely studied class of CAs, as it is present in vertebrates; its activity is involved in manifold physiological and pathological processes, making α -CA a target of therapeutic interest.^{3,4} In humans, 15 different α -CA isozymes have been identified to date, according to their structure, cellular localisation and catalytic activity.⁴

Generally, human CA isoforms are grouped based on subcellular localisation: cytosolic (CA I, II, III, VII, XIII) isoforms, mitochondrial (CA VA, VB), secreted (CA VI), as well as membrane-bound (CA IV, IX, XII, XIV) isoforms.⁴ Moreover, there are three catalytically inactive CA-related proteins (CARP VIII, X, XI), whose biological functions remain poorly defined.^{4,5} The dysregulated expression and activity of catalytic forms of CA are often associated with a variety of medical conditions, including cancer, glaucoma, metabolic and neurological disorders.⁴ In particular, two transmembrane isoforms, CA IX and CA XII, were shown to be overexpressed in many types of solid tumours, contributing to tumour progression and metastasis through the regulation of intra- and extracellular pH.⁶⁻⁹ Their expression can also serve as a diagnostic and prognostic biomarker in certain cancer histotypes, and is correlated with therapeutic resistance due to involvement in hypoxia and acidosis.^{6,10,11} Therefore, designing and developing selective CA IX/XII inhibitors represents a potential anticancer strategy with promising clinical applications in both conventional and combination therapies.

To date, the three-dimensional structures of the majority of the human CA isoforms have been elucidated by X-ray crystallography, facilitating the development of CA inhibitors.²⁻⁴ The active site of catalytically active isoforms is located in a conical cavity comprising hydrophobic and hydrophilic regions, which are essential for enzymatic reactions.²⁻⁴ At the deepest part of this cavity, Zn^{2+} is embedded and tetrahedrally coordinated by three histidine residues and a water molecule or hydroxide ion.²⁻⁴ High amino acid sequence identity within the catalytic domain and overall structural similarity between human CAs pose a challenge for isoform-specific inhibition. In the framework of the Doctoral Thesis, the author decided to specifically target the inhibition of CA IX and CA XII, given their overexpression in cancerous tissues and limited expression in normal tissues, while preserving the activity of the housekeeping isoforms CA I and CA II.

Over the past few decades, numerous studies have focused on the interactions between CAs and their inhibitors, which can provide valuable clues for rational drug design. So far, four different inhibition mechanisms have been identified: 1) direct coordination to the catalytic zinc ion (zinc-binders are classical CA inhibitors, which include primary sulphonamides, (in)organic anions, carbamates, thiols, selenols, benzoxaboroles); 2) anchoring to the zinc-coordinated water/hydroxide ion (observed with phenols, polyamines and sulphocoumarins **A** (Fig. 1)); 3) occlusion of the active site entrance (coumarins, thiocoumarins); and 4) peripheral site binding (one carboxylic acid

derivative, 2-(benzylsulphonyl)benzoic acid, was found bound outside the active site — in a hydrophobic pocket adjacent to the entrance of the active site cavity).²⁻⁴ Additionally, there are many CA-inhibiting compounds with unknown mechanisms of action.

Several classical CA inhibitors, such as acetazolamide (AAZ), methazolamide, sulthiame and dorzolamide, are clinically used as diuretics, antiglaucoma agents or antiepileptic drugs.² Compounds containing the $-SO_2NH_2$ group, which binds to Zn^{2+} , are among the most effective CA inhibitors; however, their non-selective inhibition profile is linked to severe side effects. For this reason, various novel CA inhibitors with improved selectivity have been introduced, one of which is the drug candidate SLC-0111, designed to inhibit the tumour-associated isoforms (Fig. 1).^{12,13} SLC-0111 has advanced to clinical trials in patients with metastatic solid tumours.¹⁴ This reflects the promising therapeutic niche that CA inhibitors may occupy in the treatment of oncological maladies.

Our research group's main priority is the exploration of non-classical coumarin-type CA inhibitors, whose binding mechanism does not involve coordination to Zn^{2+} .¹⁵ Instead, coumarins bind within the active site of the enzyme in their hydrolysed form, thereby occluding substrate entry.^{15,16} They were initially detected as CA inhibitors during high-throughput screening of natural products and attracted broad interest owing to their ability to inhibit multiple α -CA isoforms.^{15,17} Efforts in advancing the potential of coumarin-based inhibitors have led to the development of sulphocoumarins **A** (1,2-benzoxathiine 2,2-dioxides) and their congeners — homosulphocoumarins **B** (3*H*-1,2-benzoxathiepine 2,2-dioxides) as selective CA IX and XII inhibitors (Fig. 1).¹⁸⁻²⁴ In this Doctoral Thesis, a novel chemotype — 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxide **C** — is studied as a platform for next-generation CA inhibitors.

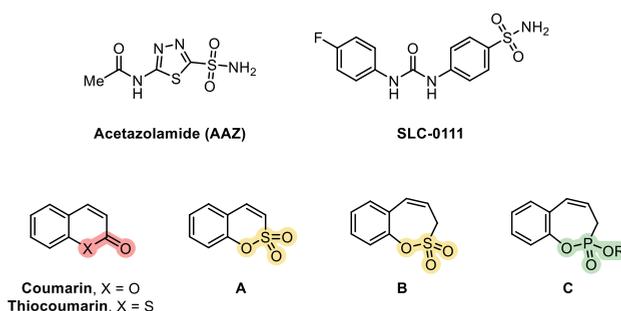


Fig. 1. Structures of CA inhibitors.

Aims and objectives

The Doctoral Thesis aims to develop effective and selective CA inhibitors on the basis of the phosphepine oxide **C** scaffold, targeting the tumour-associated isoforms IX and XII, with potential therapeutic applications. The following tasks were set to achieve this aim:

1. develop a methodology for the synthesis and derivatisation of 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxide;
2. determine the inhibitory activity of the synthesised analogues against a set of human CA isoforms;
3. explore the effects of the compounds on cell viability and evaluate their aqueous solubility;

- investigate the structure–activity relationship (SAR) and provide insights into the binding mechanism.

Scientific novelty and main results

The research presented in the Thesis contributes to the field of selective carbonic anhydrase inhibitors by developing novel benzoxaphosphepine-based compounds. The established general synthetic pathway enabled access to a diverse array of substituted 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides. The obtained compounds were investigated for their ability to inhibit various CA isoforms, showing the preferential activity towards the tumour-associated isoforms IX and XII. A series of inhibitors with low nanomolar potency against CA IX/XII, without off-target effects, was discovered. In addition, several representatives of the benzoxaphosphepine oxide class were evaluated for cytotoxicity and aqueous solubility. The core inferences from SAR studies, as well as mechanistic insights into the binding mode, were drawn. The results highlight the potential of these inhibitors as drug candidates that deserve further exploration.

Structure of the Thesis

The Thesis is a collection of thematically related scientific publications focused on the design and development of 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxide derivatives as potential anticancer agents targeting carbonic anhydrase IX and XII isoforms.

Each section of the results chapter of the Thesis presents a summary of a single publication in chronological order.

Publications and approbation of the Thesis

The main results of the Thesis were summarised in three scientific publications and one review article. Additionally, the research findings were presented at nine conferences.

Scientific publications

- Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Synthetic methods toward phosphacoumarins (microreview). *Chem. Heterocycl. Comp.* **2022**, *58*, 310–312.
- Pustenko, A.; **Balašova, A.**; Nocentini, A.; Supuran, C. T.; Žalubovskis, R. 3*H*-1,2-Benzoxaphosphepine 2-oxides as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX and XII. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 216–224.
- Balašova, A.**; Pustenko, A.; Nocentini, A.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Žalubovskis, R. Aryl derivatives of 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides as inhibitors of cancer-related carbonic anhydrase isoforms IX and XII. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 2249267.
- Balašova, A.**; Pustenko, A.; Angeli, A.; Andreucci, E.; Biagioni, A.; Nocentini, A.; Carta, F.; Supuran, C. T.; Žalubovskis, R. Unraveling the potential of amino-, acylamino-, and ureido-substituted 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides toward nanomolar inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *ACS Med. Chem. Lett.* **2025**, *16* (6), 1031–1037.
- Manuscript regarding the last chapter of the Thesis is in preparation.

Conference participation

1. **Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *56th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2021)*, virtual event, July 7–9, **2021**.
2. **Balašova, A.** Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *12th Paul Walden Symposium on Organic Chemistry*, virtual event, October 28–29, **2021**.
3. **Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2022)*, Vilnius, Lithuania, July 3–6, **2022**.
4. **Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Benzoxaphosphepine 2-oxides as potential carbonic anhydrase inhibitors. *Drug Discovery Conference 2022*, Riga, Latvia, September 22–24, **2022**.
5. **Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Development of benzoxaphosphepine 2-oxides as carbonic anhydrase inhibitors. *81st International Scientific Conference of the University of Latvia*, Riga, Latvia, March 17, **2023**.
6. **Balašova, A.**; Žalubovskis, R. Design and synthesis of benzoxaphosphepine 2-oxides as carbonic anhydrase inhibitors. *12th International conference on Carbonic Anhydrases*, Naples, Italy, July 5–7, **2023**.
7. **Balašova, A.**; Pustenko, A.; Žalubovskis, R. Development of benzoxaphosphepine 2-oxides as carbonic anhydrase inhibitors. *Autoimmune diseases: main problems and solutions*, Riga, Latvia, November 9–10, **2023**.
8. **Balašova, A.**; Pustenko, A.; Žalubovskis, R. Benzoxaphosphepine 2-oxides — a novel class of carbonic anhydrase inhibitors. *Conference “Achievements of the SPRINGBOARD project”*, Riga, Latvia, May 2–3, **2024**.
9. **Balašova, A.**; Pustenko, A.; Žalubovskis, R. Benzoxaphosphepine 2-oxides — a novel class of carbonic anhydrase inhibitors. *Balticum Organicum Syntheticum (BOS 2024)*, Riga, Latvia, July 7–10, **2024**.

MAIN RESULTS OF THE THESIS

Prologue

Phosphorus-containing compounds have demonstrated a wide spectrum of biological activities, including antitumour, antimicrobial and anti-inflammatory properties as well as inhibitory effects against various enzymes.^{25,26} The introduction of phosphorus moieties influences both the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of drugs, which renders them attractive for application in medicinal chemistry.^{25–28} Moreover, phosphorus functionalities can serve as bioisosteres of different functional groups, frequently providing enhanced bioavailability characteristics.^{25,29} In this regard, we envisaged that benzoxaphosphine oxides **C** might have potential as bioisosteres for (sulpho)coumarin analogues (Fig. 1).

The methodology for the synthesis of fused phosphorus-containing heterocycles is relatively limited. Among several transition-metal-catalysed approaches to form benzofused *P*-heterocycles, the use of ring-closing metathesis proved to be a versatile tool for the preparation of 7-membered benzannulated compounds. This method has been successfully applied to the synthesis of both sulphur- and phosphorus-containing analogues (Fig. 2).^{22,30} Consequently, a similar strategy would allow to access 3*H*-1,2-benzoxaphosphine 2-oxides **C**. The following sections outline the synthesis and biological evaluation of these novel organophosphorus derivatives.

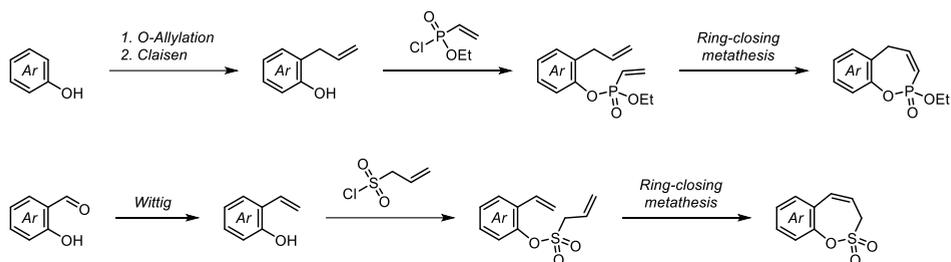
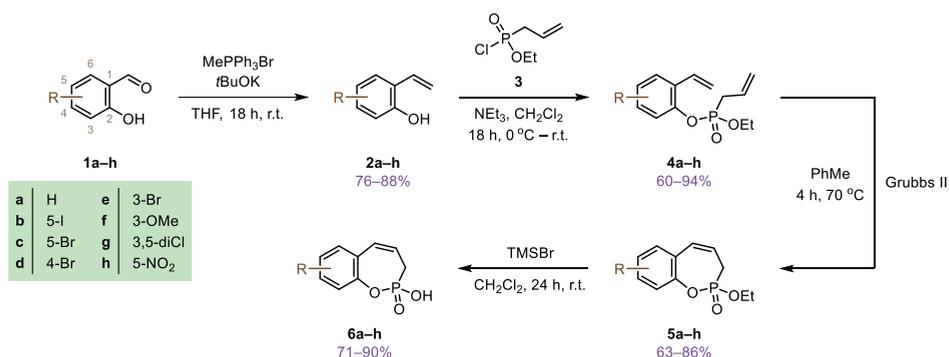


Fig. 2. Routes towards benzofused *P*- or *S*-containing 7-membered heterocycles.

The synthetic methods of phosphacoumarins and their homologues are summarised in the review article in *Chem. Heterocycl. Comp.* **2022**, *58*, 310–312.

1. Synthesis and inhibitory potential of benzoxaphosphepine chemotype

The general synthetic route leading to 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides was established based on previously described methodology involving ring-closing metathesis reaction for the synthesis of structurally related compounds.^{22,30} At first, commercially available salicylaldehydes **1a–h** were converted to vinylphenols **2a–h** using Wittig olefination (Scheme 1). Subsequent phosphorylation with chloride **3** afforded diolefin **4a–h**, which underwent ring-closing metathesis in the presence of Ru-based catalyst to generate benzoxaphosphepine scaffold. The final cleavage of the ethyl group in **5a–h** was achieved with TMSBr. This robust protocol provided compounds **6a–h** in overall good to excellent yields.



Scheme 1. Synthetic procedure towards benzoxaphosphepine oxides **5** and **6**.

In order to evaluate the inhibitory activity and selectivity of the synthesised cyclic phosphonates **5** and **6** (Fig. 3), compounds were screened against four pharmacologically relevant CA isoforms by means of the stopped-flow CO₂ hydration assay.³¹ In this study, the ubiquitous CA I and II are regarded as off-target isoforms, whose inhibition is undesirable in contrast to the inhibition of the cancer-associated isoforms CA IX and XII. The activities of inhibitors, calculated as *K*_i (inhibition constants) values, were compared to the standard drug AAZ.

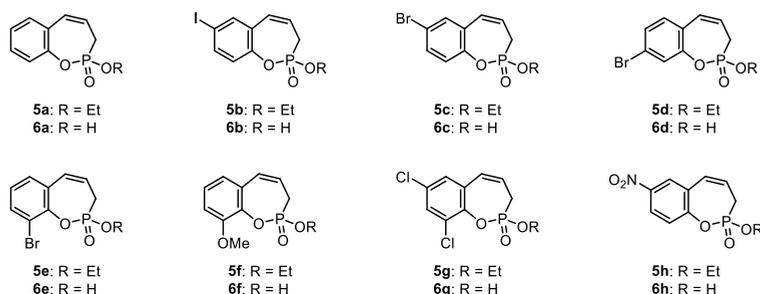


Fig. 3. The scope of potential CA inhibitors **5** and **6**.

The *in vitro* assay results revealed that all the tested compounds **5** and **6** possess the desired activity and isoform selectivity by inhibiting only CA IX and CA XII isoforms. Regardless of the substitution pattern on the aromatic fragment or phosphorus atom (OH vs OEt), the activity of these

derivatives lies in the micromolar range, reaching even the submicromolar level, as in compound **6b** (Table 1). These findings also indicate the bioisosteric relationship between sulphocoumarins **A**, **B** and benzoxaphosphepine oxides acting as CA IX/XII inhibitors. Although the inhibitory potential of cyclic phosphonates **5** and **6** was determined to be weaker than that of AAZ, this novel phosphorus-containing chemotype laid the groundwork for further structural optimisation in developing more potent inhibitors.

Table 1

Inhibition data of compound series **5**, **6** and the standard inhibitor AAZ against CA I, II, IX and XII

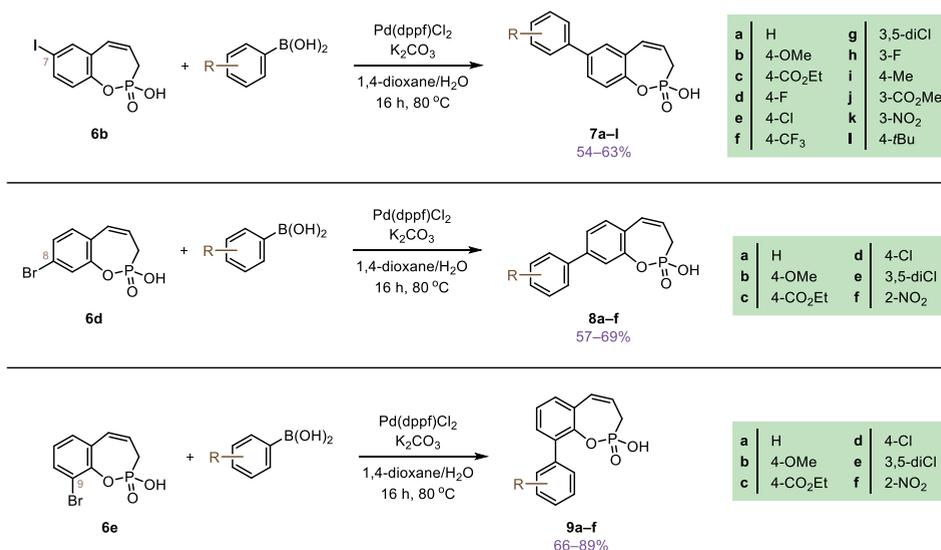
Compound	K_i (μM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
5a	>100	>100	0.82	0.82
6a	>100	>100	1.3	0.51
5b	>100	>100	4.7	2.4
6b	>100	>100	0.88	0.68
5c	>100	>100	0.76	1.6
6c	>100	>100	1.0	0.96
5d	ND	ND	ND	ND
6d	>100	>100	3.4	1.5
5e	>100	>100	11.3	3.3
6e	>100	>100	2.5	1.8
5f	>100	>100	9.0	7.4
6f	>100	>100	1.8	1.2
5g	>100	>100	6.1	3.4
6g	>100	>100	0.80	1.7
5h	>100	>100	3.9	0.95
6h	>100	>100	0.67	1.0
AAZ*	0.25	0.012	0.025	0.006

[a] Determined in collaboration with Prof. C. T. Supuran's group from the University of Florence. [b] Values are the mean from three different assays using the stopped-flow technique (errors were in the range of ± 5 –10% of the reported values). [c] Inhibitor and enzyme solutions were preincubated together for 6 h at r.t. * Reference standard.

The results presented in this section are described in the scientific publication in *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 216–224.

2. Exploration of chemical space around benzoxaphosphepine scaffold

Going forward, the research was directed towards the detailed examination of the substitution effect on carbonic anhydrase inhibition by introducing various aryl groups in the benzene fragment of the benzoxaphosphepine core. A series of aryl derivatives **7–9** was conveniently obtained in the Suzuki–Miyaura cross-coupling reaction between halides **6b,d,e** and commercial arylboronic acids (Scheme 2). The resultant 7-, 8- and 9-aryl-substituted products would allow us to gain additional insight into the positional preference of different tails in inhibitors of such type for enhanced suppression of CA IX/XII activity. Alas, 6-aryl counterparts were not obtained due to increased steric hindrance during the ring-closing metathesis step in the synthesis of the corresponding halide.²³



Scheme 2. Synthesis of benzoxaphosphepine oxide 7-, 8-, 9-aryl derivatives **7–9**.

The aryl analogues **7–9** were subjected to the same inhibition assay against CA I, II, IX and XII with AAZ serving as the reference inhibitor. The data indicated that these compounds exhibited similar activity (μM range) as their precursors **6b,d,e**, as well as retained selectivity for the target CA isoforms. Among the synthesised biaryls **7–9**, 9-substituted derivatives **9** showed the poorest inhibition of CA IX/XII, whereas the potencies of 7- and 8-substituted derivatives **7** and **8** were substantially higher (Table 2). Generally, representatives of compound series **7** and **8** displayed comparable inhibitory activity; however, a slightly better inhibition profile was observed in the case of **7**. This trend was also evident in aryl-substituted sulphocoumarins **A** and their congeners **B**.^{20,23} Therefore, further functionalisation was performed at position 7 of the benzoxaphosphepine scaffold.

Table 2

Inhibition data of compound series 7–9 and the standard inhibitor AAZ against CA I, II, IX and XII

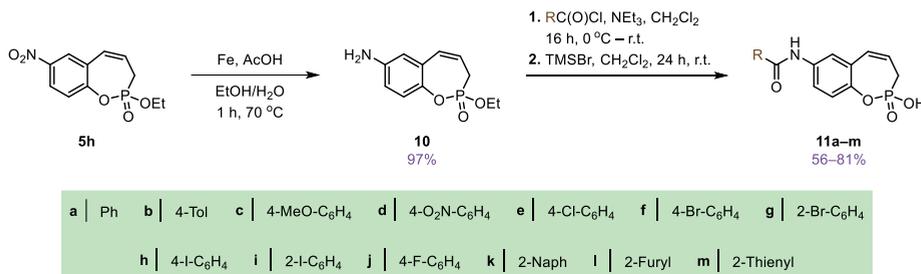
Compound	K_i (μM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
7a	>100	>100	0.77	0.95
7b	>100	>100	4.6	1.7
7c	>100	>100	6.0	6.7
7d	>100	>100	0.86	0.25
7e	>100	>100	8.6	1.1
7f	>100	>100	3.7	0.59
7g	>100	>100	7.3	4.2
7h	>100	>100	0.63	0.56
7i	>100	>100	1.5	0.94
7j	>100	>100	9.5	1.5
7k	>100	>100	7.6	0.64
7l	>100	>100	4.9	0.97
<hr/>				
8a	>100	>100	1.8	2.7
8b	>100	>100	2.1	5.6
8c	>100	>100	10.2	3.8
8d	>100	>100	5.0	7.1
8e	>100	>100	0.98	0.84
8f	>100	>100	12.9	0.67
<hr/>				
9a	>100	>100	16.5	25.5
9b	>100	>100	39.4	52.4
9c	>100	>100	55.3	>100
9d	>100	>100	48.9	65.3
9e	>100	>100	22.4	28.2
9f	>100	>100	38.4	35.1
<hr/>				
AAZ*	0.25	0.012	0.025	0.006

[a] Determined in collaboration with Prof. C. T. Supuran's group from the University of Florence. [b] Values are the mean from three different assays using the stopped-flow technique (errors were in the range of ± 5 –10% of the reported values). [c] Inhibitor and enzyme solutions were preincubated together for 6 h at r.t. * Reference standard.

The results presented in this section are described in the scientific publication in *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38* (1), 2249267.

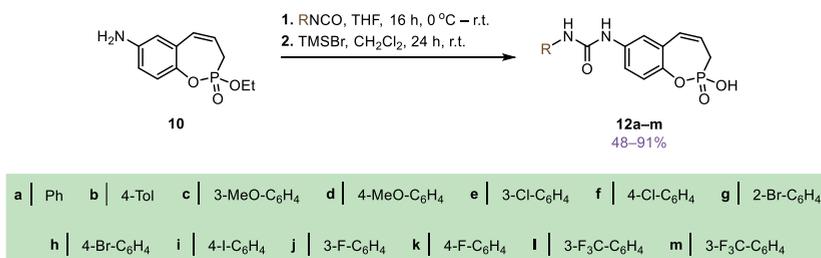
3. Paving the way to nanomolar inhibition of the target isozymes

In the following investigation, the incorporation of an amide functional group into the scaffold of benzoxaphosphepine oxide was considered. Previous findings on benzoxathiine and benzoxathiepine dioxides **A** and **B** uncovered that the presence of the acylamino functionality contributes to enhanced inhibitory activity towards CA IX and CA XII isoforms.^{21,24} In the first step, nitro derivative **5h**, prepared in the earlier part of this research, was reduced to aniline **10**, which was then acylated by aroyl or heteroaroyl chlorides. The intermediate phosphonates underwent the ethyl group cleavage, furnishing the corresponding amides **11a–m** (Scheme 3).



Scheme 3. Synthesis of benzoxaphosphepine oxide (acyl)amino derivatives **10** and **11**.

Aside from acylamino derivatives **11**, ureido analogues **12** were also synthesised, as this structural motif is present in SLC-0111 — a potent CA IX/XII inhibitor that completed Phase I clinical trials (NCT02215850). Moreover, urea-containing compounds are increasingly utilised in drug design and development in order to improve pharmacological properties.³² The preparation of benzoxaphosphepine oxide ureido derivatives was achieved by reaction of aniline **10** with various commercial isocyanates (Scheme 4). Successive TMSBr-mediated *O*-deethylation provided the corresponding *N,N'*-diarylureas **12a–m** in moderate to excellent yields.



Scheme 4. Synthesis of benzoxaphosphepine oxide ureido derivatives **12**.

The inhibition profiles of amino-, acylamino- and ureido-substituted benzoxaphosphepine oxides **10–12** against CA isoforms I, II, IX and XII showed intriguing results (Table 3). Consistent with previously studied analogues **5–9**, no inhibitory activity against off-target isoforms CA I and II was detected. Remarkably, all the newly synthesised compounds displayed inhibition of the tumour-associated CA IX in the nanomolar range. However, the activity of CA XII isoform was suppressed only by aniline **10** and acylamino derivatives **11**, while ureas **12** exclusively inhibited CA IX.

Table 3

Inhibition data of compound series **10–12** and the reference compounds SLC-0111, AAZ against CA I, II, IX and XII

Compound	K_i (nM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
10	>10000	>10000	3.5	16.6
11a	>10000	>10000	10.8	7.3
11b	>10000	>10000	20.5	7.8
11c	>10000	>10000	10.1	8.1
11d	>10000	>10000	29.4	6.7
11e	>10000	>10000	158.4	64.1
11f	>10000	>10000	25.8	84.4
11g	>10000	>10000	23.2	8.9
11h	>10000	>10000	18.7	57.5
11i	>10000	>10000	14.6	6.9
11j	>10000	>10000	27.4	4.0
11k	>10000	>10000	20.1	27.2
11l	>10000	>10000	22.3	9.7
11m	>10000	>10000	32.8	74.6
12a	>10000	>10000	34.9	>10000
12b	>10000	>10000	46.9	>10000
12c	>10000	>10000	53.3	>10000
12d	>10000	>10000	5.3	>10000
12e	>10000	>10000	52.9	>10000
12f	>10000	>10000	54.8	>10000
12g	>10000	>10000	46.9	>10000
12h	>10000	>10000	36.8	>10000
12i	>10000	>10000	36.0	>10000
12j	>10000	>10000	51.8	>10000
12k	>10000	>10000	4.4	>10000
12l	>10000	>10000	31.9	>10000
12m	>10000	>10000	42.7	>10000
SLC-0111 ¹²	5080	960	45.1	4.5
AAZ [*]	250	12.1	25.8	5.7

[a] Determined in collaboration with Prof. C. T. Supuran's group from the University of Florence. [b] Values are the mean from three different assays using the stopped-flow technique (errors were in the range of ± 5 –10% of the reported values). [c] Inhibitor and enzyme solutions were preincubated together for 6 h at r.t. * Reference standard.

Of note, it has been reported that the expression of CA XII has minimal impact on tumour cell proliferation in some cancer subtypes, compared to CA IX.³³ Furthermore, the presence of CA XII in multiple normal tissues highlights the necessity of selective CA IX inhibitors over CA XII in certain cases.^{33,34} From this perspective, urea-containing derivatives **12** hold particular importance in the

pharmacological field and may offer potential benefits due to reduced side effects arising from non-specific inhibition.

Aniline **10**, amides **11a,c** and ureas **12d,k** emerged as the most effective inhibitors of CA IX and/or CA XII, with K_i values equivalent to, or even exceeding, those of SLC-0111 and AAZ. These promising compounds warranted further investigation. Thus, the cytotoxicity of **10**, **11c**, **12d** was assessed *in vitro* on A375 melanoma cells, HCT-116 colorectal cancer cells and MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells cultivated under standard conditions. Cell viability was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay.^{35,36} The results showed that compounds **10** and **11c** exhibited low cytotoxic activities across the tested cell lines. Conversely, compound **12d** exerted more pronounced cancer cell cytotoxicity — treatment with a 100 μ M solution of **12d** reduced proliferation by 40% in HCT-116 cells and by 50% in A375 and MDA-MB-231 cells (Fig. 4).

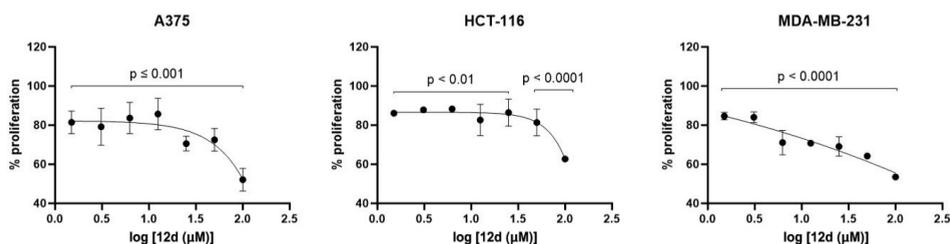


Fig. 4. Cytotoxic effect of **12d** on A375, HCT-116 and MDA-MB-231 cancer cell lines after 72 hours of incubation ($N = 4$; data was analysed using GraphPad Prism 10.3.1; determined in collaboration with Dr. E. Andreucci and Dr. A. Biagioni from the University of Florence).

While some known CA inhibitors possess high cytotoxic potential,^{37,38} their primary anticancer value often lies in the ability to modulate the tumour microenvironment, reducing acidosis as well as impairing tumour growth and metastasis.⁹ Moreover, CA IX/XII inhibitors can be synergistic with other drugs by chemosensitising tumour cells.^{39,40} In preclinical *in vitro* studies, SLC-0111 did not affect cancer cell viability under normoxic and standard pH (7.4) conditions; however, a notable cytotoxic effect was observed under acidic pH (6.7) or hypoxic conditions.⁴¹ Importantly, SLC-0111 featured antiproliferative and antimetastatic properties in *in vivo* breast cancer models.^{12,13}

Additional information regarding the therapeutic potential of benzoxaphosphepine oxides can be gained by examining the toxicity and antiproliferative efficacy across a broader panel of cell lines, especially cancer cell lines with higher expression of CA IX/XII and under hypoxic conditions. Given the observed isozyme selectivity and potent activity in the inhibition of CA, the study on cancer cell lines that exhibit high expression of CA IX and do not express CA XII (or *vice versa* — CA IX-negative and CA XII-positive) would allow us to draw the correlation between the inhibition of these proteins and the antiproliferation of cancer cells.

Complementing the aforementioned findings, the aqueous solubility of members of the 3H-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxide class was determined and compared with representatives of the 3H-1,2-benzoxathiepine 2,2-dioxide class. The analysis was performed in phosphate-buffered saline solution (PBS; pH \sim 7.4) at 25 $^{\circ}$ C using the HPLC-UV method. From the collected data, it is discernible that the transition from sultones to cyclic phosphonic acids has a significant effect on aqueous solubility.

The phosphono derivatives **6a**, **7h**, **11c**, **11j**, **12d**, **12k** have markedly higher solubility than the corresponding sultone derivatives **B**, **B1**, **B2** (Fig. 5). Interestingly, no influence on the solubility of benzoxaphosphepine oxides was observed upon varying the side chain. In addition, the presence of a free phosphonic acid group allows the formation of salts, which are expected to increase water solubility. In drug development, solubility in water is a critical factor for drug absorption, bioavailability and administration. Poor pharmacokinetic properties are often linked to low solubility and limited permeability.³²

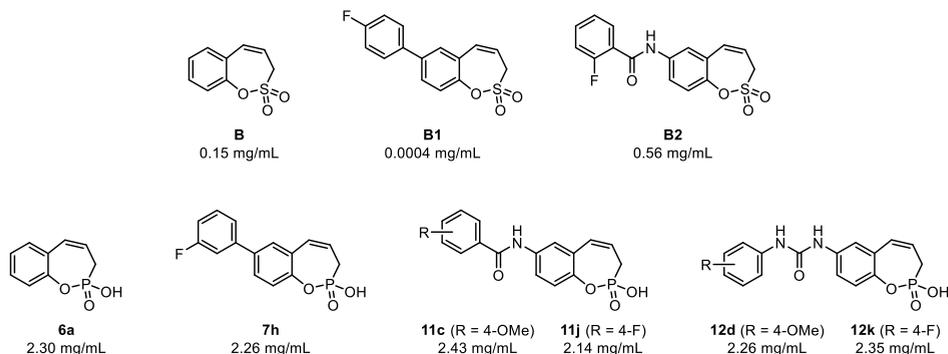


Fig. 5. Solubility of the selected inhibitors in PBS buffer (measurements were done in collaboration with Dr. H. Każoka's group at the LIOS Laboratory of Chromatography).

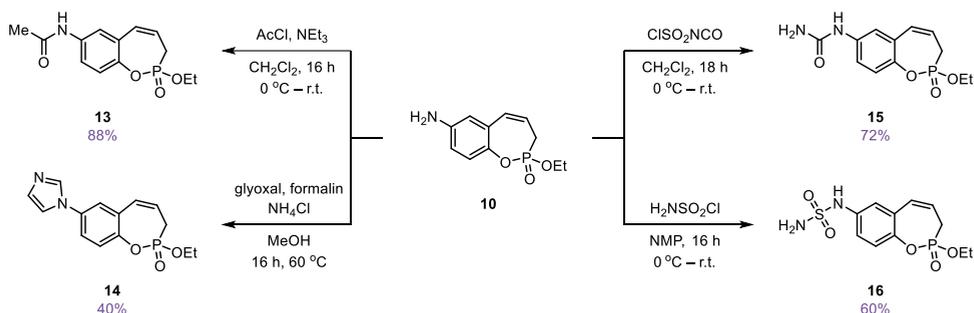
The results presented in this section are described in the scientific publication in *ACS Med. Chem. Lett.* **2025**, *16* (6), 1031–1037.

4. Expanding the library of inhibitors and probing the binding mechanism

(Unpublished results)

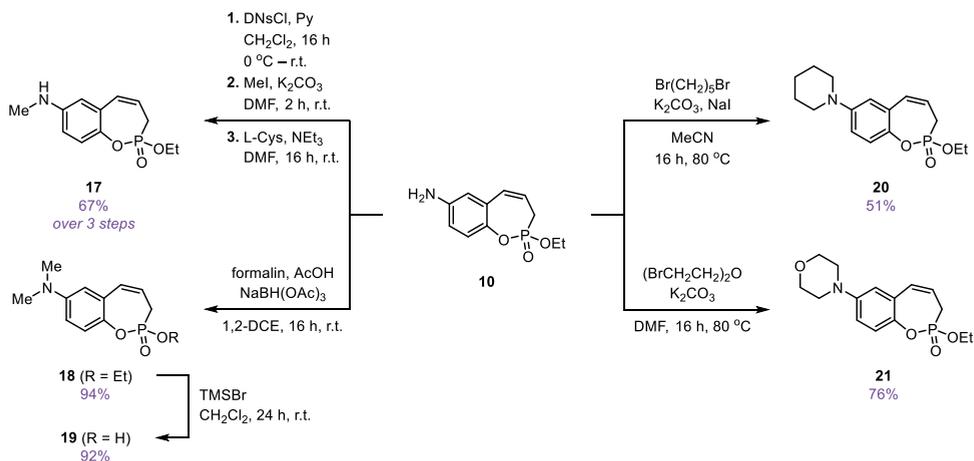
Building on the potential of nitrogen-containing benzoxaphosphepine oxides **10–12**, the synthesis of amino derivative **10** analogues as CA inhibitors was carried out. Aniline **10** showcased exceptional inhibitory activity against CA IX/XII, exhibiting high ligand efficiency, and thus served as the benchmark for further structural diversification of the benzoxaphosphepine scaffold.

A wide array of novel benzoxaphosphepine oxide derivatives were synthesised from aniline **10** as a starting material. Acetylation of **10** furnished acetamide **13**, whereas reaction with CSI provided *N*'-unsubstituted urea **15**. In turn, sulphamide **16** was prepared using sulphamoyl chloride. The Debus–Radziszewski reaction yielded imidazole **14** to verify the possible bioisosterism between imidazolyl and aryl groups (Scheme 5).



Scheme 5. Synthesis of *N*-containing benzoxaphosphepine oxide derivatives **13–16**.

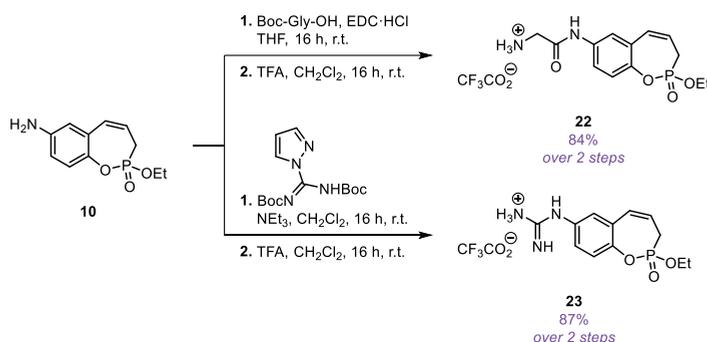
The preparation of *N*-methyl derivative **17** was accomplished by using the Fukuyama method,⁴² in which the starting aniline **10** was converted to 2,4-dinitrobenzenesulphonamide. Alkylation with MeI followed by deprotection of the DN_s group in the presence of L-cysteine and NEt₃ afforded the desired secondary amine **17** (Scheme 6).



Scheme 6. Synthesis of *N*-containing benzoxaphosphepine oxide derivatives **17–21**.

The employment of reductive amination of formaldehyde produced *N,N*-dimethyl derivative **18**, which was also *O*-deethylated under standard McKenna conditions to give **19** in excellent yield. The construction of piperidine and morpholine cycles in **20** and **21** was readily done utilising alkylation of **10** with 1,5-dibromopentane or bis(2-bromoethyl) ether, respectively (Scheme 6).

Adding to the structural diversity, aniline **10** was transformed into glycnamide derivative **22** and guanidine derivative **23** by treatment with *N*-Boc-protected glycine or 1*H*-pyrazole-1-carboxamide. Removal of protecting groups under acidic conditions facilitated the isolation of the target compounds as trifluoroacetate salts (Scheme 7).



Scheme 7. Synthesis of *N*-containing benzoxaphosphepine oxide derivatives **22** and **23**.

These *N*-containing analogues **13–23** were tested for their inhibitory activity against CA I, II, IX and XII. Compounds showed varied activity, ranging from 23 nM to 3.44 μM (Table 4).

Table 4

Inhibition data of compounds **13–23** and the standard inhibitor AAZ against CA I, II, IX and XII

Compound	<i>K_i</i> (nM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
13	>10000	>10000	620	870
14	ND	ND	ND	ND
15	>10000	>10000	51	3440
16	370	94	37	23
17	>10000	>10000	840	710
18	>10000	>10000	950	760
19	>10000	>10000	920	810
20	>10000	>10000	1130	1070
21	>10000	>10000	990	1280
22	>10000	>10000	920	650
23	>10000	>10000	1230	1150
AAZ *	250	12.1	25.8	5.7

[a] Determined in collaboration with Prof. C. T. Supuran's group from the University of Florence. [b] Values are the mean from three different assays using the stopped-flow technique (errors were in the range of ±5–10% of the reported values). [c] Inhibitor and enzyme solutions were preincubated together for 6 h at r.t. * Reference standard.

The salient SAR findings indicated that tailored nitrogen-atom modifications to aniline **10**, particularly the introduction of aliphatic motifs, led to diminished inhibitory potency (as evidenced in **13** vs **10**, **11a–m**; and **17–22** vs **10**). All acyclic and cyclic aliphatic amines **17–21**, as well as amides **13** and **22**, were less potent against CA IX/XII when compared to the corresponding aromatic derivatives **11** and **12** and the unsubstituted amine **10** (Tables 3 and 4). These aliphatic substitutions in the *N*-containing side chain of the benzoxaphosphepine oxide scaffold had detrimental effects on the inhibitory activity, emphasising the importance of the delicate balance of electronic and steric effects required for optimal interactions with the target isozymes. Interestingly, the *N'*-unsubstituted urea derivative **15** demonstrated a similar selectivity trend, exhibiting high selectivity towards the CA IX isoform over CA XII, as observed in the previously analysed *N'*-aryl-substituted ureido derivatives **12a–m**. Furthermore, among the assessed compounds, only sulphamide **16** inhibited the off-target CA I and II, which was anticipated, given the pivotal role that the $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ group has in the inhibition of active CA isoforms by coordinating with the catalytic zinc ion.⁴ Compound **16**, in fact, was a more effective inhibitor of the target isoforms CA IX/XII than the off-target CA I/II, thereby showing the efficacy of the benzoxaphosphepine oxide moiety to induce the desired selectivity (Table 4).

Since cocrystallisation trials between CA and different 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides were unsuccessful, the respective binding mechanism of benzoxaphosphepine-based CA inhibitors remains unclear and is a matter of ongoing discussion. Currently, two main hypotheses are under consideration: 1) 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides are genuine inhibitors that directly interact with the active site in their intact form; 2) 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides are prodrugs that undergo hydrolysis, with the resulting products then acting as active compounds. The observation that the inhibition of CAs was time-dependent, requiring a 6-hour incubation to detect the optimal effect, led us to assume that benzoxaphosphepine oxides can be considered as prodrugs. Moreover, structurally related coumarins and sulphocoumarins were shown to be hydrolysed by the esterase activity of CA to yield the corresponding acid derivatives prior to binding (Fig. 6); the mechanism of action of such compounds was corroborated by crystallographic studies.^{16,19}

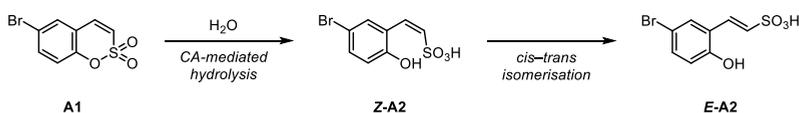
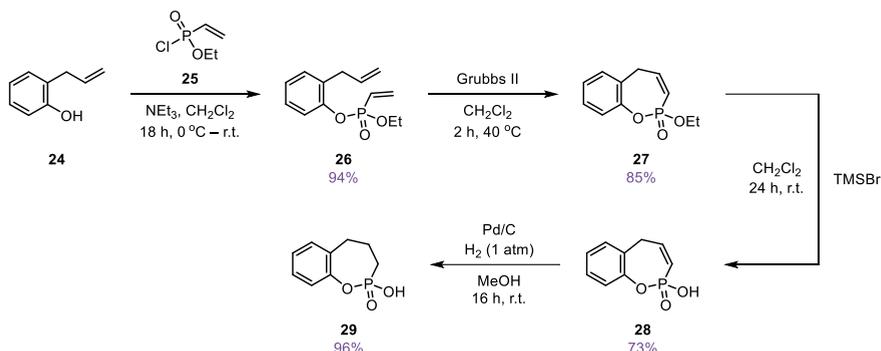


Fig. 6. CA-mediated hydrolysis of sulphocoumarin **A1** to **E-A2**.¹⁹

The combination of *in silico* analysis with *in vitro* studies of various model substrates would provide a tool for understanding the binding mode in lieu of an X-ray cocrystal structure. To determine the contributions of the double bond and the *O*-tether in the oxaphosphepine moiety, several additional compounds were synthesised.

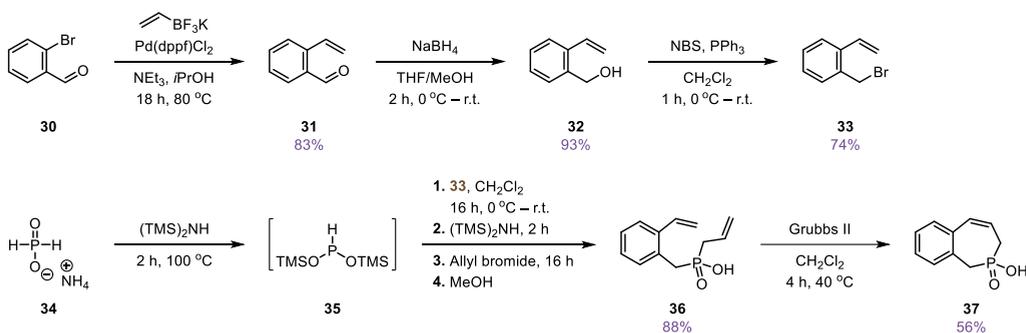
The synthesis of 5*H*-1,2-benzoxaphosphepine and 3,4,5-trihydrobenzoxaphosphepine 2-oxides (**28** and **29**) was completed in a similar manner to **6**, starting from 2-allylphenol (**24**) (Scheme 8). The resultant diolefin **26**, which was formed by phosphorylation of **24** with chloride **25**, gave the cyclisation product **27** *via* ring-closing metathesis. Notably, changing the solvent from PhMe to CH_2Cl_2 , as well as decreasing the reaction temperature, prevented migration of the double bond in

27. The further removal of the ethyl group by means of TMSBr afforded product **28**, which was subjected to hydrogenation to yield trihydro analogue **29**.



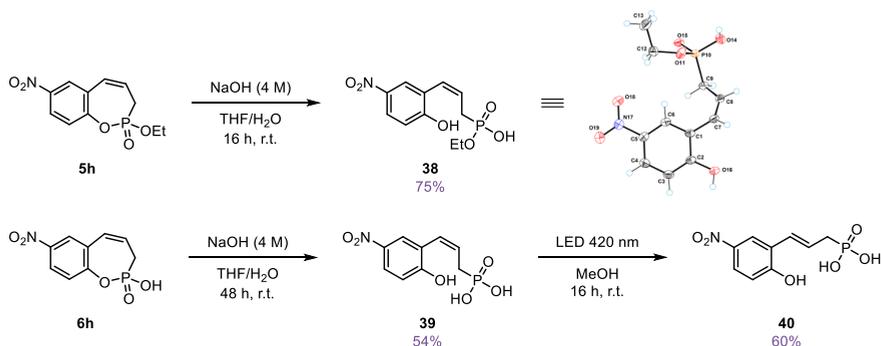
Scheme 8. Synthesis of benzoxaphosphepine oxide analogues **28** and **29**.

In order to prepare the cyclic phosphinic acid **37**, 2-vinylbenzyl bromide (**33**) was obtained from 2-bromobenzaldehyde (**30**) according to the literature procedure (Scheme 9).⁴³ The synthetic sequence included the Suzuki–Miyaura coupling between **30** and potassium vinyltrifluoroborate, reduction of aldehyde **31** and Appel-type bromination of alcohol **32**. The inclusion of phosphorus-containing moiety began with the conversion of ammonium hypophosphite (**34**) to bis(trimethylsilyl) phosphonite (**35**), which was then treated with bromide **33**.⁴⁴ Subsequent addition of HMDS followed by allylation and methanolic work-up formed dialkylphosphinic acid **36**.⁴⁴ The final ring-closing metathesis step furnished the target compound **37**.



Scheme 9. Synthesis of 1,3-dihydrobenzophosphepine 2-oxide **37**.

Considering the plausible inhibition mechanism through hydrolysis of the oxaphosphepine moiety, hydrolysed forms of benzoxaphosphepine oxides **5h** and **6h** were generated upon treatment with aqueous alkali. The obtained phosphonate **38** and phosphonic acid **39** possess the *Z*-configuration of the double bond, which was unambiguously confirmed by single-crystal X-ray diffraction for **38**. To ensure proper SAR comparison, compound **39** was irradiated with a violet light LED, affording phosphonic acid **40** with the *E*-configuration of the double bond (Scheme 10).



Scheme 10. Synthesis of phosphonate **38** and phosphonic acids **39** and **40** (X-ray diffraction studies were performed by Dr. S. Belyakov at the LIOS Laboratory of Physical Organic Chemistry).

Inhibition assays of the model substrates against CA isoforms I, II, IX and XII partially supported the presumption of 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides' hydrolysis in enzymatic media. In particular, the open *Z*-forms **38** and **39** preserved the selectivity and exhibited inhibitory activity against CA IX/XII similar to that of the cyclic forms **5h** and **6h**. Moreover, the results of the double bond positional isomer of **6a**, namely **28**, and hydrogenated derivative **29** imply that the double bond in benzoxaphosphepine-based CA inhibitors has to be retained for maintaining their potency. It is possible that the double bond restricts conformational mobility in the case of hydrolysis and/or contributes to the formation of key hydrophobic interactions. The activity of benzoxaphosphepine **37** could be explained by this small-molecule ligand's ability to enter the binding pockets of CA IX and CA XII isoforms (Table 5).

Table 5

Inhibition data of compounds **28**, **29**, **36–40** and the standard inhibitor AAZ against CA I, II, IX and XII

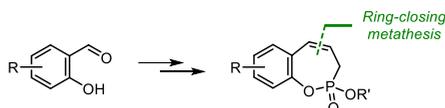
Compound	K_i (μM) ^[a,b,c]			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
28	>100	>100	1.6	3.5
29	>100	>100	>100	>100
36	ND	ND	ND	ND
37	>100	>100	0.86	0.78
38	>100	>100	2.14	1.98
39	>100	>100	1.80	1.67
40	ND	ND	ND	ND
AAZ*	0.25	0.012	0.025	0.006

[a] Determined in collaboration with Prof. C. T. Supuran's group from the University of Florence. [b] Values are the mean from three different assays using the stopped-flow technique (errors were in the range of ± 5 –10% of the reported values). [c] Inhibitor and enzyme solutions were preincubated together for 6 h at r.t. * Reference standard.

The utilisation of *in silico* docking could be beneficial for elucidating the binding mechanism of 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides and will be applied in future studies.

CONCLUSIONS

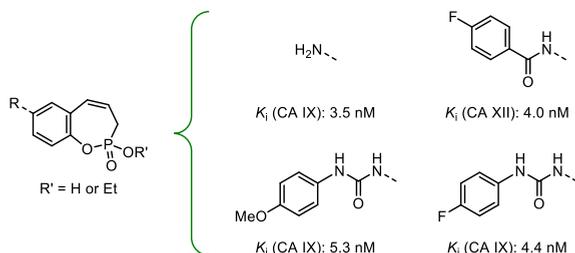
- The developed synthesis strategy employing ring-closing metathesis has enabled access to novel phosphorus-containing heterocyclic compounds — 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides. Their structural features, in combination with the established synthetic approach, allow further derivatisation of the scaffold and the preparation of diverse analogues.



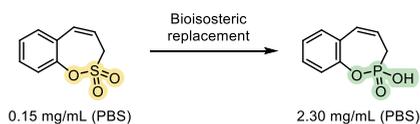
- The structural framework of 3*H*-1,2-benzoxaphosphepine 2-oxides represents a promising new class of human CA inhibitors, exhibiting high affinity and exceptional isoform selectivity for the tumour-associated CA IX and XII over the ubiquitous CA I and II.



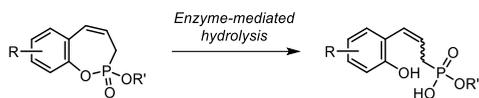
- Among the synthesised series, 7-amino-substituted, as well as acylamino- and ureido-substituted derivatives bearing specific aryl groups, emerged as the superior inhibitors of CA IX and/or CA XII, outperforming the reference compounds such as AAZ and SLC-0111. The preliminary bioactivity profiles suggest that the compounds are suitable for future development and evaluation as anticancer agents.



- The bioisosteric relationship between the benzoxaphosphepine and (sulpho)coumarin scaffolds was highlighted with respect to CA inhibition. The aqueous solubility of the phosphorus-containing compounds surpasses that of the previous-generation analogues, indicating a potentially improved bioavailability profile.



5. Benzoxaphosphepine-based CA inhibitors are expected to share a similar mechanism of action with coumarins and sulphocoumarins. The proposed binding mode within the active site of CA IX or CA XII involves putative hydrolysis of the oxaphosphepine motif, followed by binding at the entrance of the catalytic site or anchoring to the zinc-bound water molecule. The spatial differences in the vicinity of the active sites of CA isoforms I, II, IX and XII are a possible reason for the observed selectivity in inhibition.



ATSAUCES / REFERENCES

- (1) Meldrum, N. U.; Roughton, F. J. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol.* **1933**, *80* (2), 113–142.
- (2) Nocentini, A.; Supuran, C. T. Advances in the structural annotation of human carbonic anhydrases and impact on future drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2019**, *14* (11), 1175–1197.
- (3) Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem. Rev.* **2012**, *112* (8), 4421–4468.
- (4) D'Ambrosio, K.; Di Fiore, A.; Alterio, V.; Langella, E.; Monti, S. M.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple binding modes of inhibitors to human carbonic anhydrases: An update on the design of isoform-specific modulators of activity. *Chem. Rev.* **2025**, *125* (1), 150–222.
- (5) Aspatwar, A.; Tolvanen, M. E. E.; Parkkila, S. An update on carbonic anhydrase-related proteins VIII, X and XI. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28* (6), 1129–1142.
- (6) Mishra, C. B.; Tiwari, M.; Supuran, C. T. Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: Where are we today? *Med. Res. Rev.* **2020**, *40* (6), 2485–2565.
- (7) Pastorekova, S.; Gillies, R. J. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: Links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 65–77.
- (8) Becker, H. M. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 157–167.
- (9) Chiche, J.; Ilc, K.; Laferrière, J.; Trottier, E.; Dayan, F.; Mazure, N. M.; Brahimi-Horn, M. C.; Pouysségur, J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* **2009**, *69* (1), 358–368.
- (10) Chia, S. K.; Wykoff, C. C.; Watson, P. H.; Han, C.; Leek, R. D.; Pastorek, J.; Gatter, K. C.; Ratcliffe, P.; Harris, A. L. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2001**, *19* (16), 3660–3668.
- (11) Watson, P. H.; Chia, S. K.; Wykoff, C. C.; Han, C.; Leek, R. D.; Sly, W. S.; Gatter, K. C.; Ratcliffe, P.; Harris, A. L. Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 1065–1070.
- (12) Pacchiano, F.; Carta, F.; McDonald, P. C.; Lou, Y.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Dedhar, S.; Supuran, C. T. Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (6), 1896–1902.
- (13) Lou, Y.; McDonald, P. C.; Oloumi, A.; Chia, S.; Ostlund, C.; Ahmadi, A.; Kyle, A.; auf dem Keller, U.; Leung, S.; Huntsman, D.; Clarke, B.; Sutherland, B. W.; Waterhouse, D.; Bally, M.; Roskelley, C.; Overall, C. M.; Minchinton, A.; Pacchiano, F.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Touisni, N.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. Targeting tumor hypoxia: Suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res.* **2011**, *71* (9), 3364–3376.

- (14) McDonald, P. C.; Chia, S.; Bedard, P. L.; Chu, Q.; Lyle, M.; Tang, L.; Singh, M.; Zhang, Z.; Supuran, C. T.; Renouf, D. J.; Dedhar, S. A Phase 1 study of SLC-0111, a novel inhibitor of carbonic anhydrase IX, in patients with advanced solid tumors. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* **2020**, *43* (7), 484–490.
- (15) Lomelino, C. L.; Supuran, C. T.; McKenna, R. Non-classical inhibition of carbonic anhydrase. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17* (7), 1150.
- (16) Maresca, A.; Temperini, C.; Pochet, L.; Masereel, B.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (1), 335–344.
- (17) Davis, R. A.; Vullo, D.; Maresca, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (6), 1539–1543.
- (18) Žalubovskis, R. In a search for selective inhibitors of carbonic anhydrases: Coumarin and its bioisosteres – synthesis and derivatization. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, *51*, 607–612.
- (19) Tars, K.; Vullo, D.; Kazaks, A.; Leitans, J.; Lends, A.; Grandane, A.; Zalubovskis, R.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Sulfocoumarins (1,2-benzoxathiine-2,2-dioxides): A class of potent and isoform-selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (1), 293–300.
- (20) Grandane, A.; Tanc, M.; Žalubovskis, R.; Supuran, C. T. Synthesis of 6-aryl substituted sulfocoumarins and investigation of their carbonic anhydrase inhibitory Action. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (7), 1430–1436.
- (21) Grandane, A.; Tanc, M.; Di Cesare Manelli, L.; Carta, F.; Ghelardini, C.; Žalubovskis, R.; Supuran, C. T. 6-Substituted sulfocoumarins are selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors with significant cytotoxicity against colorectal cancer cells. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (9), 3975–3983.
- (22) Pustenko, A.; Stepanovs, D.; Žalubovskis, R.; Vullo, D.; Kazaks, A.; Leitans, J.; Tars, K.; Supuran, C. T. 3H-1,2-Benzoxathiepine 2,2-dioxides: A new class of isoform-selective carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32* (1), 767–775.
- (23) Pustenko, A.; Nocentini, A.; Balašova, A.; Alafeefy, A.; Krasavin, M.; Žalubovskis, R.; Supuran, C. T. Aryl derivatives of 3H-1,2-benzoxathiepine 2,2-dioxide as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35* (1), 245–254.
- (24) Pustenko, A.; Nocentini, A.; Balašova, A.; Krasavin, M.; Žalubovskis, R.; Supuran, C. T. 7-Acylamino-3H-1,2-benzoxathiepine 2,2-dioxides as new isoform-selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35* (1), 650–656.
- (25) Voráčová, M.; Yli-Kauhaluoma, J.; Kiuru, P. The key phosphorus moieties in drug design: Antimicrobials and beyond. *Future Med. Chem.* **2024**, *16* (23), 2455–2458.
- (26) Rodriguez, J. B.; Gallo-Rodriguez, C. The role of the phosphorus atom in drug design. *ChemMedChem* **2018**, *14* (2), 190–216.
- (27) Yu, H.; Yang, H.; Shi, E.; Tang, W. Development and clinical application of phosphorus-containing drugs. *Med. Drug Discov.* **2020**, *8*, 100063.
- (28) Columbus, I.; Ghindes-Azaria, L.; Chen, R.; Yehezkel, L.; Redy-Keisar, O.; Fridkin, G.; Amir, D.; Marciano, D.; Drug, E.; Gershonov, E.; Klausner, Z.; Saphier, S.; Elias, S.; Pevzner, A.; Eichen, Y.; Parvari, G.; Smolkin, B.; Zafrani, Y. Studying lipophilicity trends of phosphorus

- compounds by ^{31}P -NMR spectroscopy: A powerful tool for the design of P-containing drugs. *J. Med. Chem.* **2022**, *65* (12), 8511–8524.
- (29) Li, X.; Zhang, D.; Pang, H.; Shen, F.; Fu, H.; Jiang, Y.; Zhao, Y. Synthesis of a diverse series of phosphacoumarins with biological activity. *Org. Lett.* **2005**, *7* (22), 4919–4922.
- (30) Majumdar, K. C.; Nandi, R. K.; Ganai, S. Synthesis of phosphorus containing medium ring heterocycles by sequential Claisen rearrangement and ring closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (6), 1247–1250.
- (31) Khalifah, R. G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246* (8), 2561–2573.
- (32) Ghosh, A. K.; Brindisi, M. Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (6), 2751–2788.
- (33) Chen, Z.; Ai, L.; Mboge, M. Y.; Tu, C.; McKenna, R.; D. Brown, K.; Heldermon, C. D.; Frost, S. C. Differential expression and function of CAIX and CAXII in breast cancer: A comparison between tumorgraft models and cells. *PLoS One* **2018**, *13* (7), e0199476.
- (34) Ivanov, S.; Liao, S.-Y.; Ivanova, A.; Danilkovitch-Miagkova, A.; Tarasova, N.; Weirich, G.; Merrill, M. J.; Proescholdt, M. A.; Oldfield, E. H.; Lee, J.; Zavada, J.; Waheed, A.; Sly, W.; Lerman, M. I.; Stanbridge, E. J. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158* (3), 905–919.
- (35) Andreucci, E.; Biagioni, A.; Peri, S.; Versienti, G.; Cianchi, F.; Staderini, F.; Antonuzzo, L.; Supuran, C. T.; Olivo, E.; Pasqualini, E.; Messerini, L.; Massi, D.; Lulli, M.; Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Schiavone, N.; Calorini, L.; Magnelli, L.; Papucci, L. The CAIX inhibitor SLC-0111 exerts anti-cancer activity on gastric cancer cell lines and resensitizes resistant cells to 5-Fluorouracil, taxane-derived, and platinum-based drugs. *Cancer Lett.* **2023**, *571*, 216338.
- (36) Andreucci, E.; Fioretto, B. S.; Rosa, I.; Matucci-Cerinic, M.; Biagioni, A.; Romano, E.; Calorini, L.; Manetti, M. Extracellular lactic acidosis of the tumor microenvironment drives adipocyte-to-myofibroblast transition fueling the generation of cancer-associated fibroblasts. *Cells* **2023**, *12* (6), 939.
- (37) Supuran, C. T. Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12* (2), 283–287.
- (38) Awadallah, F. M.; El-Waei, T. A.; Hanna, M. M.; Abbas, S. E.; Ceruso, M.; Oz, B. E.; Guler, O. O.; Supuran, C. T. Synthesis, carbonic anhydrase inhibition and cytotoxic activity of novel chromone-based sulfonamide derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 425–435.
- (39) Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors as emerging agents for the treatment and imaging of hypoxic tumors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27* (12), 963–970.
- (40) Andreucci, E.; Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Laurenzana, A.; Carta, F.; Supuran, C. T.; Calorini, L. The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 sensitises cancer cells to conventional chemotherapy. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, *34* (1), 117–123.
- (41) Andreucci, E.; Peppicelli, S.; Carta, F.; Brisotto, G.; Biscontin, E.; Ruzzolini, J.; Bianchini, F.; Biagioni, A.; Supuran, C. T.; Calorini, L. Carbonic anhydrase IX inhibition affects viability of cancer cells adapted to extracellular acidosis. *J. Mol. Med.* **2017**, *95*, 1341–1353.

- (42) Fukuyama, T.; Kan, T. Ns strategies: A highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Commun.* **2004**, 353–359.
- (43) Roth, H. G.; Nicewicz, D. A. Diastereoselective synthesis of the ABCD ring system of rubriflorldilactone B. *Synlett* **2022**, 33 (1), 48–51.
- (44) Boyd, E. A.; Regan, A. C. Synthesis of alkyl phosphinic acids from silyl phosphonites and alkyl halides. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35 (24), 4223–4226.



Anastasija Balašova dzimusi 1998. gadā Rīgā. Latvijas Universitātē ieguvusi dabaszinātņu bakalaura (2019) un maģistra (2021, ar izcilību) grādu ķīmijā. Kopš 2018. gada strādā Latvijas Organiskās sintēzes institūtā. Patlaban ir profesora Raivja Žalubovska vadītās Lietderīgās ķīmijas grupas zinātniskā asistente. Pētījuma "Jauns virziens pretvēža preparātu izveidē", ko Latvijas Zinātņu akadēmija nosaukusi par vienu no 2020. gada Latvijas nozīmīgākajiem sasniegumiem zinātnē, līdzautore. Zinātniskās intereses saistītas ar medicīnas ķīmiju un bioloģiski aktīvu heterociklisku savienojumu sintēzi. Ir piecu oriģinālpublikāciju un viena apskatraksta līdzautore.

Anastasija Balašova was born in 1998 in Riga. She obtained a Bachelor's degree (2019) and a Master's degree with distinction (2021) in Natural Sciences in Chemistry from the University of Latvia. Since 2018, she has been working at the Latvian Institute of Organic Synthesis. Currently, she is a research assistant in the Applied Chemistry Group under the supervision of Prof. Raivis Žalubovskis. She is a co-author of the study "A new direction in the development of anticancer drugs", recognised by the Latvian Academy of Sciences as one of Latvia's most significant scientific achievements of 2020. Her research interests are related to medicinal chemistry and the synthesis of biologically active heterocyclic compounds. She is a co-author of five original publications and one review article.