

Spis treści

1. Wprowadzenie.....	1
2. System nazewnictwa D_P/L_P	2
3. Stereochemia tworzenia wiązania diestrowego – badania mechanistyczne.....	5
4. Wpływ różnych typów katalizy na chemię i stereochemię kondensacji.....	14
5. Stereochemia tworzenia wiązania diestrowego – badania strukturalne.....	19
6. Optymalizacja warunków kondensacji w kierunku maksymalnej stereoselektywności.....	21
7. Podsumowanie	23
8. Przypisy.....	24

Michał Sobkowski
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

**Chemia i stereochemia reakcji
H-fosfonianów nukleozydów z alkoholami**

Rozprawa habilitacyjna

Poznań 2010

Chemia i stereochemia reakcji *H*-fosfonianów nukleozydów z alkoholami

**Komentarz do monotematycznego cyklu publikacji
będących przedmiotem rozprawy habilitacyjnej**

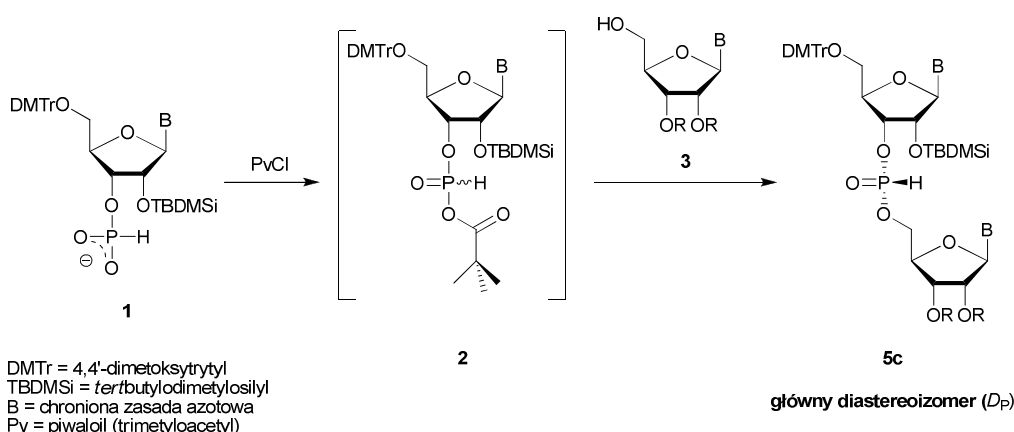
1. Wprowadzenie

Właściwością odróżniającą chemicznie modyfikowane oligonukleotydy syntetyczne od naturalnych fragmentów DNA czy RNA jest ich podwyższona odporność na degradację enzymatyczną przy jednoczesnym zachowaniu specyficzności oddziaływań z komplementarnymi fragmentami kwasów nukleinowych. Modyfikacja grupy fosforanowej nukleotydu skutkuje jednak często powstaniem nowego centrum chiralności, co, jeśli stereochemia generowania centrum chiralnego nie jest kontrolowana, w konsekwencji prowadzi do mieszaniny P-diastereomerów. Problem chiralności centrum fosforowego w oligonukleotydach zarysował się szczególnie wyraźnie, gdy stwierdzono, że tiofosforanowe analogi oligonukleotydów wykazują zróżnicowane właściwości biologiczne w zależności od konfiguracji atomu fosforu, np. różne powinowactwo do komplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych czy podatność substratową dla enzymów^[1]. Z tej przyczyny analogi oligonukleotydów o zdefiniowanej konfiguracji centrów fosforowych są nie tylko interesującymi narzędziami do badań strukturalnych w biochemii i biologii molekularnej, ale mogą znaleźć potencjalne zastosowania medyczne, jako substancje o lepszym działaniu terapeutycznym niż stosowane obecnie mieszaniny diastereoizomeryczne modyfikowanych oligonukleotydów.

Dotychczasowe wysiłki, których celem była stereospecyficzna lub stereoselektywna synteza analogów oligonukleotydów podejmowane były głównie w serii deoksy^[2-4]. W ostatnich latach obserwuje się natomiast dynamiczny wzrost zainteresowania chemiczną syntezą fragmentów RNA^[5-7], związany głównie z odkryciem nowych funkcji oligorybonukleotydów w organizmach żywych, określanych szeroko jako *interferencja RNA*^[8]. Dotąd opublikowane zostały jedynie trzy metody stereokontrolowanej syntezy P-chiralnych analogów oligorybonukleotydów^[9-11], z których jedna jest szczególnie interesująca poznawczo ze względu na silną indukcję asymetryczną zachodzącą podczas tworzenia *H*-fosfonianowego wiązania internukleotydogo z P-achiralnych substratów^[11-14].

Typowa procedura kondensacji 3'-*H*-fosfonianów nukleozydów z nukleozydami polega na rozpuszczeniu odpowiednio zablokowanych substratów w bezwodnej pirydynie i dodaniu ok. 3 ekw. chlorku trimetyloacetylu (chlorku piwaloilu, PvCl) jako czynnika kondensującego (rys. 1). Powoduje to szybkie (poniżej 1 min, czyli minimalnego czasu koniecznego do zarejestrowania pierwszego widma ³¹P NMR) wytworzenie *H*-fosfonianowego wiązania diestrowego (wraz z

towarzyszącymi produktami ubocznymi kondensacji: bezwodnikiem piwalowym oraz piwalanami i chlorowodorkami amin). Reakcja ta przebiega zazwyczaj ilościowo (^{31}P NMR). W przypadku *H*-fosfonianów deoksynukleozydów powstający diester jest w przybliżeniu równomolową mieszaniną diastereoizomerów różniących się konfiguracją ligandów atomu fosforu, natomiast w serii rybo reakcja wykazuje znaczącą diastereoselektywność rzędu 40%–70% *de* (nadmiaru diastereoizomerycznego)^{[11;15]*}.



Rys. 1. Stereoselektywna kondensacja *H*-fosfonianów rybonukleozydów (1) z nukleozydami (3) z użyciem chlorku piwaloilu jako czynnika kondensującego.

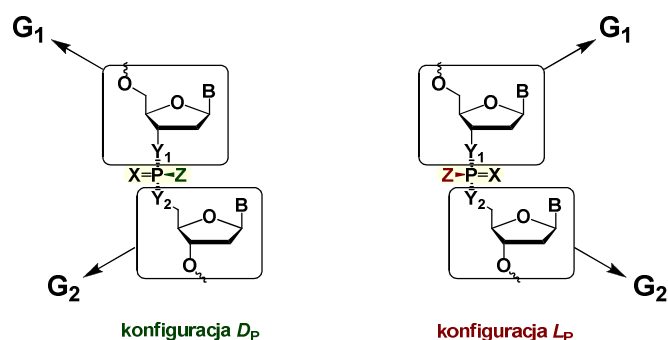
Celem badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy habilitacyjnej było wyjaśnienie mechanizmu indukcji asymetrycznej zachodzącej podczas kondensacji 3'-*H*-fosfonianów rybonukleozydów oraz optymalizacja warunków reakcji w celu uzyskania maksymalnej stereoselektywności. W toku prac podjąłem także dodatkowy wątek badawczy – opracowanie systemu nazewnictwa stereochemicznego, którego celem było powiązanie deskryptorów stereochemicznych z cechami strukturalnymi badanych związków.

2. System nazewnictwa D_P/L_P

Już pierwsze próby opisu konfiguracji i przebiegu reakcji *P*-chiralnych 3'-*H*-fosfonianów nukleozydów oraz powiązania wyników stereochemicznych z rozmieszczeniem ligandów wokół atomu fosforu ujawniły niedogodności nomenklatury systematycznej Cahn-Ingolda-Preloga (CIP). Wiązały się one z różnicami w pierwszeństwie podstawników powodującymi przypisanie

* Odnosiłki do publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej wyróżnione są pogrubionym drukiem.

różnych deskryptorów R_P/S_P dla związków o analogicznej budowie. Ponieważ podobny problem w stereochemii aminokwasów i węglowodanów przyczynił się do zachowania tradycyjnego nazewnictwa D/L dla tych klas związków, wydawało się uzasadnione (a nawet pożądane) zaprojektowanie systemu, w którym deskryptory stereochemiczne związane byłyby z charakterystycznymi cechami podstawników atomu fosforu analogów nukleotydów.

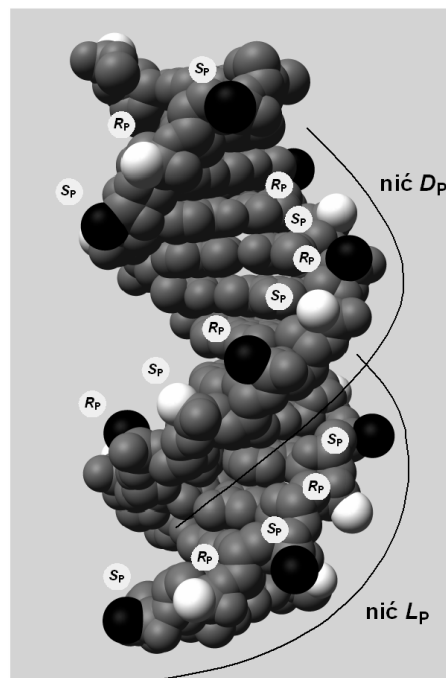


- Z: -H, -SR, -NR₂, -Me, -SiR₃, -BH₃, -I, -Cl, -F, -OR itp.
 Y_1, Y_2 : O, S, NR, CR₂ itp.
 X: O, S, Se, Te, NR, CR₂ itp. lub wolna para elektronowa
 G_1 : nukleozyd-3'-yl, nukleozyd-2'-yl, alkil, aryl, acyl, itp.
 G_2 : nukleozyd-5'-yl, alkil, aryl, acyl, itp.

Rys. 2. Struktury związków o konfiguracji D_P i L_P .

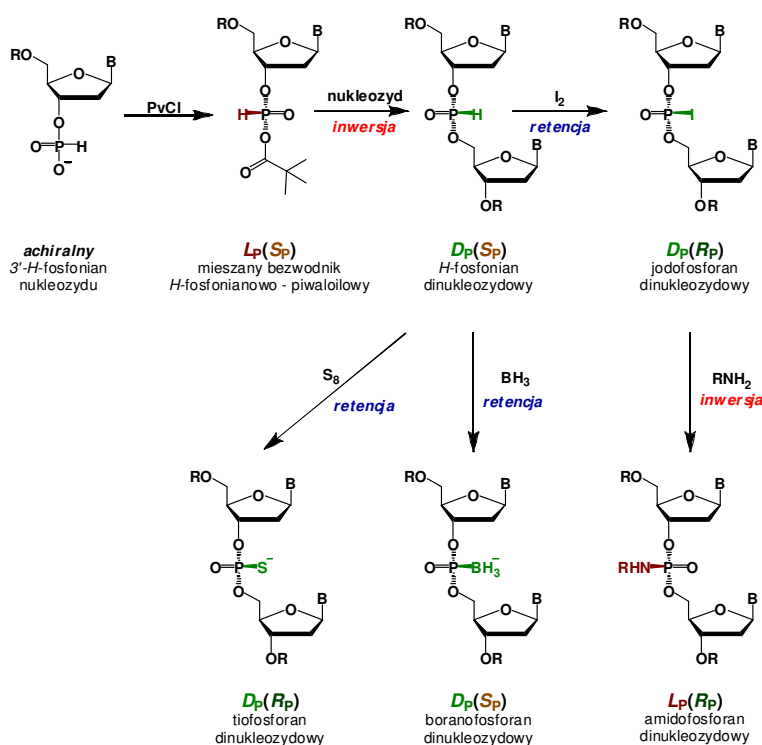
Punktem wyjścia nowego systemu stała się struktura P-chiralnego dinukleotydu przedstawionego w często spotykanym w chemii nukleotydów układzie z resztą nukleozyd-3'-ylową powyżej i resztą nukleozyd-5'-ylową poniżej grupy fosforanowej, w którym rozmieszczenie przestrzenne podstawników jest analogiczne do projekcji Fischera. Wówczas jako konfigurację D_P przyjmuje się układ, w którym poziome wiązanie pojedyncze skierowane jest w prawą stronę ($X=P-Z$), a dla konfiguracji L_P w lewą stronę ($Z=P-X$; rys. 1)^[16;17].

System ten, opracowany pierwotnie dla H -fosfonianów nukleotydów i produktów ich utlenienia, został następnie szczegółowo dopracowany^[18-21], a przypisanie deskryptorów D_P i L_P do danej konfiguracji zostało ujęte w pięć formalnych reguł, umożliwiających zastosowanie nomenklatury D_P/L_P do P-chiralnych analogów dinukleotydowych^[18], mono- i nienukleotydowych^[19] oraz do śledzenia stereochemii wieloetapowych reakcji chemicznych^[20].



Rys. 3. Model fragmentu dupleksu B-DNA zawierającego P-chiralne wiązania internukleotydowe (● = siarka, ○ = azot).

Określenie konfiguracji chiralnego atomu fosforu przez porównanie z elementami strukturalnymi wzorcowych dinukleotydów przedstawionych na powyższym rysunku eliminuje w większości wypadków niepożądane zmiany deskryptora związane ze zmianą pierwszeństwa podstawników, a nie ze zmianą ich położenia przestrzennego. Przewaga nomenklatury D_P/L_P nad systemem CIP uwidacznia się np. przy analizie strukturalnej chimerycznych dupleksów kwasów nukleinowych, w których centra fosforowe stanowią grupy tiofosforanowe i amidofosforanowe. Dla formy B-DNA reszty P-S (R_P) i P-N (S_P) umiejscowione w dużej bruździe mają zawsze konfigurację D_P , podczas gdy dla reszt P-S (S_P) i P-N (R_P) skierowanych poza dupleks przypisana jest konfiguracja L_P (rys. 3).



Rys. 4. Przykładowe wykorzystanie nomenklatury D_P/L_P do śledzenia stereochemii reakcji.

Zastosowanie konwencji D_P/L_P do analizy stereochemii przebiegu reakcji chemicznej przedstawione jest na przykładzie kondensacji 3'-H-fosfonianu nukleozydu z drugą jednostką nukleozydową oraz następczych reakcji prowadzących do tio-, borano- i amidofosforanu dinukleozydowego (rys 4)^[20]. Każdy proces związany z inwersją konfiguracji atomu fosforu odzwierciedlony jest przez zmianę deskryptora D_P/L_P , natomiast dla reakcji zachodzących z retencją kon-

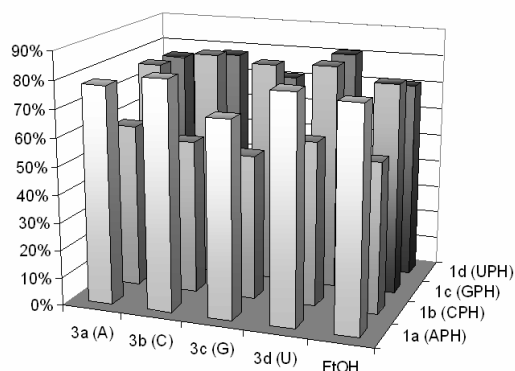
figuracji deskryptor pozostaje niezmienny. W omawianym przykładzie system R_P/S_P nie pozwala na uzyskanie analogicznej korelacji pomiędzy strukturą, a deskryptorem. System D_P/L_P można z powodzeniem wykorzystać także do śledzenia stereochemii przekształceń amidofosforinów^[20;22] i innych pochodnych nukleozydów^[20].

W większości przypadków deskryptory D_P/L_P pozwalają na określenie konfiguracji absolutnej atomu fosforu, jednak ze względu na strukturalny charakter i elastyczność systemu, możliwe są sytuacje niejednoznaczne. Z tej przyczyny zaleca się, aby przy definiowaniu konfiguracji danego związku, deskryptory D_P/L_P były uzupełniane oznaczeniami systematycznymi (R_P/S_P).

3. Stereochemia tworzenia wiązania diestrowego – badania mechanistyczne

Wstępnym etapem badań eksperymentalnych było określenie konfiguracji atomu fosforu w powstających diestrach H -fosfonianowych i analiza korelacyjna z sygnałami na widmach ^{31}P NMR. We wcześniejszych pracach oznaczono konfigurację głównych diastereoizomerów niektórych H -fosfonianów dinukleozydowych o sekwencji $\text{Nu}_{\text{PH}}\text{U}$ jako S_P (D_P), a ich sygnały ^{31}P NMR zlokalizowane były zawsze przy słabszym polu magnetycznym niż sygnały pochodzące od diastereoizomerów R_P (L_P)^[11-13]. Systematyczna analiza wszystkich 16 kombinacji dinukleozydowych oraz wybranych H -fosfonianów alkilowo-nukleozydowych potwierdziła tę tendencję,

jednak w przypadku niektórych diestrów H -fosfonianowych (np. $\text{G}_{\text{PH}}\text{U}$) i dla niektórych rozpuszczalników (np. toluenu) względne położenie sygnałów diastereoizomeru głównego i mniejszościowego ulegało odwróceniu. Podobne zjawisko występowało także w przypadku niektórych tiofosforanów dinukleozydowych. W toku dalszych badań wykluczona została możliwość odwrócenia stereoselektywności kondensacji w kierunku konfiguracji L_P , a nietypowe położenie sygnałów ^{31}P NMR przypisane zostało różnicowanemu wpływowi rozpuszczalnika i sekwencji na przesunięcie chemiczne. Zaobserwowane anomalie wskazały, że postulowana wcześniej przez F. Ecksteina^[23] korelacja pomiędzy konfiguracją atomu fosforu, a jego przesunięciem chemicznym



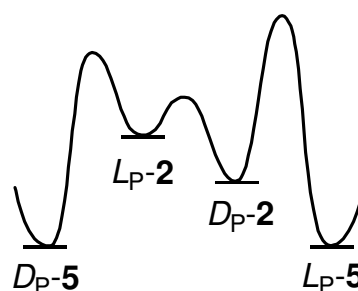
Rys. 5. Stereoselektywność (% izomeru D_P) syntezy diestrów H -fosfonianowych (**5**) w pirydynie. Reakcje czterech H -fosfonianów (**1a-d**) z czterema nukleozydami (**3a-d**) i etanolem.

nym w ^{31}P NMR musi być traktowana z dużą ostrożnością, jedynie jako wskazówka wstępna lub dodatkowa^[15:24]. Nie zaobserwowano natomiast odstępstwa od stereoselektywności kondensacji w kierunku diastereoizomeru D_P .

Ponieważ centrum H -fosfonianowe w wyjściowych monoestrach (**1**; rys. 1) jest achiralne, a w powstających diestrach (**5**) jest chiralne i stabilne konfiguracyjnie^[25], zjawisko indukcji asymetrycznej musi zachodzić pomiędzy tymi strukturami granicznymi. Może być ona rezultatem (i) preferencyjnego tworzenia jednego diastereoizomeru mieszanego bezwodnika H -fosfonianowopiwalowego (**2**) i jego następczej stereospecyficznego estryfikacji, (ii) preferencyjnej estryfikacji jednego z diastereoizomerów mieszanego bezwodnika **2** (pod warunkiem jego niestabilności konfiguracyjnej), (iii) pseudorotacji jednego z diastereoizomerów przejściowego związku pięciowiązalnego utworzonego przez addycję nukleozydu do mieszanego bezwodnika **2**, lub (iv) zróżnicowanej geometrii ataku i odejścia grup podczas estryfikacji diastereoizomerów związku **2**.

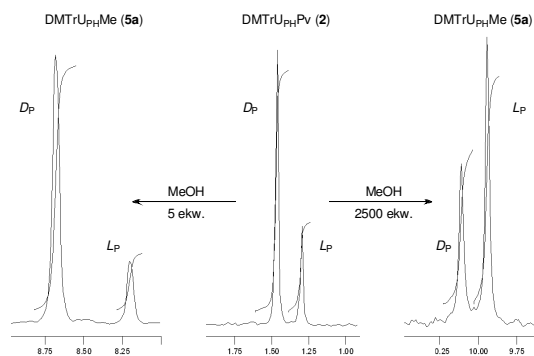
Przebieg reakcji opisany w punkcie (i) odpowiada indukcji asymetrycznej typu *dynamicznego różnicowania termodynamicznego* (DYTR, ang. *dynamic thermodynamic resolution*). W mechanizmie tym mieszany bezwodnik **2** musi cechować trwałość konfiguracji (lub P -epimeryzacja znacznie wolniejsza od estryfikacji), a stosunek jego diastereoizomerów zostaje zachowany w końcowym diestrze **5**. W rzeczywistości stosunek diastereoizomerów dla związku **2** wynosił ok. 2:1, podczas gdy dla produktu **5** ok. 4:1, a w zoptymalizowanych warunkach reakcji osiągał wartość $>9:1$ ^[26]. Tak znaczny brak zgodności stosunków diastereoizomerów wykluczył rozważany mechanizm jako źródło stereoselektywności kondensacji H -fosfonianów rybonukleozydów.

Druga koncepcja, której mechanizm zgodny jest z *dynamiczną kinetyczną transformacją asymetryczną* (DYKAT, ang. *dynamic kinetic asymmetric transformation*), wymaga spełnienia dwóch warunków (zasada Curtina-Hammetta): diastereoizomery mieszanego bezwodnika **2** muszą znajdować się w szybkiej równowadze, a jeden z nich musi być bardziej reaktywny niż drugi (rys. 6). Pierwszy wymóg, tj. równowagowanie $D_{P-2} \rightleftharpoons L_{P-2}$, został potwierdzony eksperymentalnie przez wykazanie szybkiej i odwracalnej wymiany reszty piwalilowej z karboksylanami i fenolami^[27]. Innym dowodem



Rys. 6. Zakładany profil energetyczny estryfikacji mieszanego bezwodnika **2** do diestru H -fosfonianowego **5** wg mechanizmu DYKAT.

potwierdzającym istnienie postulowanej równowagi było wygaszanie kinetyczne (ang. *kinetic quenching*) mieszanego bezwodnika **2** przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej znacznego nadmiaru metanolu. W takich warunkach szybkość estryfikacji zdecydowanie przewyższyła szybkość równowagowania $D_P\text{-}2 \rightleftharpoons L_P\text{-}2$, co skutkowało odwróceniem stereoselektywności reakcji i utworzeniem w przewodzie drugiego (L_P)

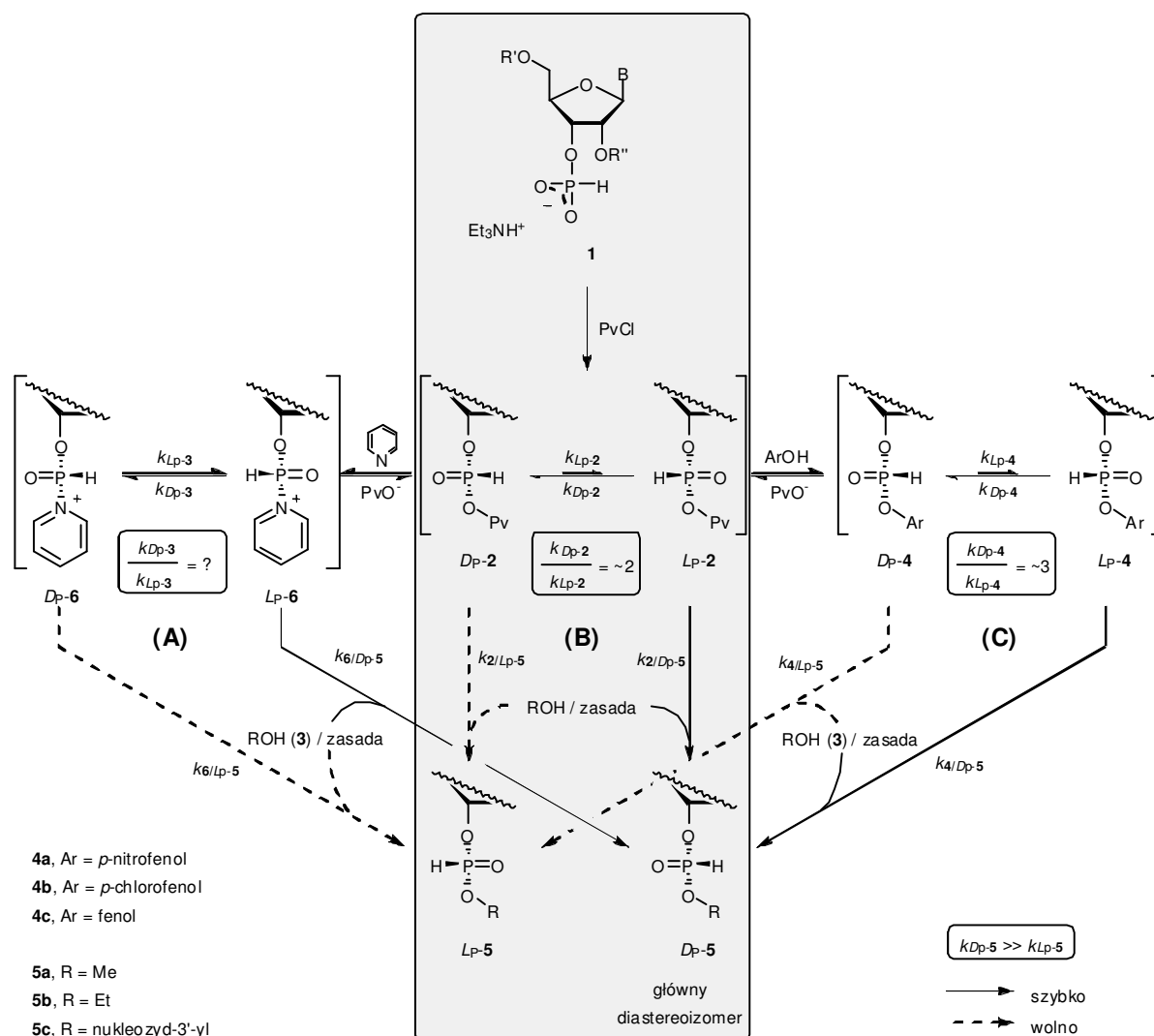


Rys. 7. Stereoselektywność reakcji mieszanego bezwodnika **2** z metanolem.

diastereoizomeru diestru *H*-fosfonianowego (rys. 7). Zakładając przebieg estryfikacji zgodny z mechanizmem $S_N2(P)$, można przyjąć, że główny diastereoizomer mieszanego bezwodnika (**2**) ma konfigurację D_P , a mniejszościowy – konfigurację L_P . Co więcej, wynika z tego, że mniejszościowy diastereoizomer $L_P\text{-}2$ jest zdecydowanie bardziej reaktywny niż jego epimer D_P (rys. 8, obszar zacieniony).

Wyciągnięcie dalszych wniosków z przebiegu reakcji z udziałem mieszanego bezwodnika **2** monitorowanej za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR było znacznie utrudnione ze względu na wysoką reaktywność tego związku, przez co zarejestrowane widma ^{31}P NMR pochodziły jedynie z końcowych faz reakcji. Ponieważ próby modulacji reaktywności poprzez zmiany środowiska reakcji nie przyniosły pożądanych rezultatów, grupa piwaloilowa w związku **2** zastąpiona została grupą arylową (rys. 8, reakcja C)^[27-29]. Uzyskane *H*-fosfoniany arylowo-nukleozydowe (**4**) są reaktywnymi estrami ulegającymi transestryfikacji w sposób analogiczny do estryfikacji mieszanego bezwodnika **2**, a ich reaktywność można regulować poprzez odpowiedni dobór podstawników w pierścieniu aromatycznym^[30;31].

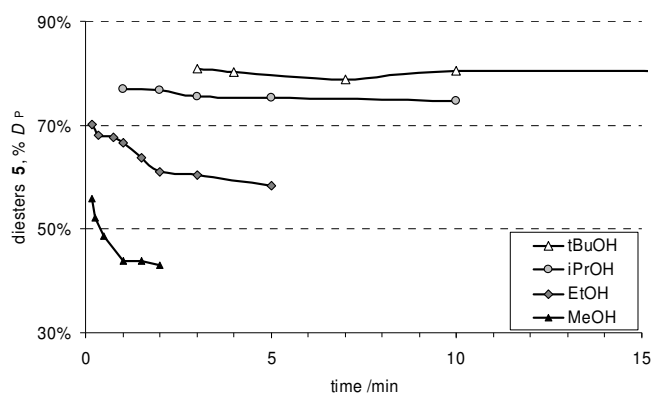
W przeprowadzonych badaniach 3'-*H*-fosfoniany arylowo-urydynowe typu **4** były otrzymywane *in situ* i poddawane transestryfikacji alkoholami i nukleozydami. W doświadczeniach wstępnych ustalone zostały kombinacje reszt arylowych diestrow **4** i alkoholi, których czasy reakcji były najlepiej dopasowane do skali czasowej eksperymentów ^{31}P NMR. W ten sposób wytypowane zostały estry *p*-nitrofenylowe **4a** ($\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{PhNO}_2$) i *p*-chlorofenylowe **4b** ($\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{PhCl}$) oraz MeOH i EtOH jako hydroksylowe komponenty reakcji.



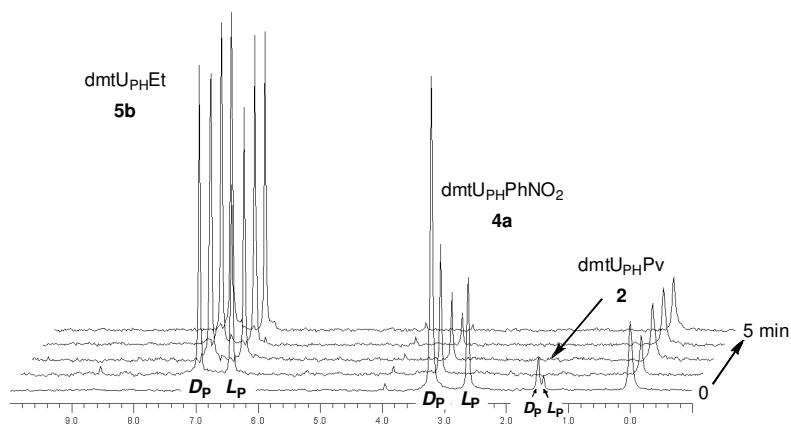
Rys. 8. Mechanizm indukcji asymetrycznej typu DYKAT podczas kondensacji 3'-*H*-fosfonianów rybonukleozydów z alkoholami i nukleozydami. (A) Reakcja w obecności katalizatora nukleofilowego; (B – obszar wyróżniony) bezpośrednia estyfikacja mieszanego bezwodnika **2**; (C) transestryfikacja *H*-fosfonianu arylowo-nukleozydowego typu **4**.

Stereoselektywność transestryfikacji badanych diestrów *H*-fosfonianowych typu **4** zależała od użytego alkoholu oraz zmieniała się w czasie reakcji (rys. 9). Dla najbardziej reaktywnego diestru $\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{PhNO}_2$ (**4a**) zmiany te widoczne były jedynie dla szybko reagujących alkoholi pierwszorzędowych i polegały na stopniowym spadku udziału izomeru *D*_p-**5** w całej puli produktu w wyniku zwiększającej się w miarę postępu reakcji ilości powstającego izomeru *L*_p-**5**. Zmianom tym towarzyszył szybki ubytek mniejszościowego diastereoizomeru $\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{PhNO}_2$ w

mieszaniu reakcyjnej (rys. 10). Sugeruje to, że izomer D_P diestru $\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{Et}$ (D_P -**5b**) tworzył się z mniejszościowego izomeru wyjściowego diestru $\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{PhNO}_2$, co wskazuje na jego konfigurację L_P (L_P -**4a**). Po zużyciu izomeru L_P -**4a** dominującą ścieżką reakcji stało się tworzenie produktu L_P -**5b** z pozostałego diastereoizomeru D_P -**4a**. Obserwacja tych zmian możliwa była dzięki znacząco szybszej transestryfikacji izomeru L_P -**4a** niż jego odtwarzania z D_P -**4a** w procesie równowagowania D_P -**4** \rightleftharpoons L_P -**4**.



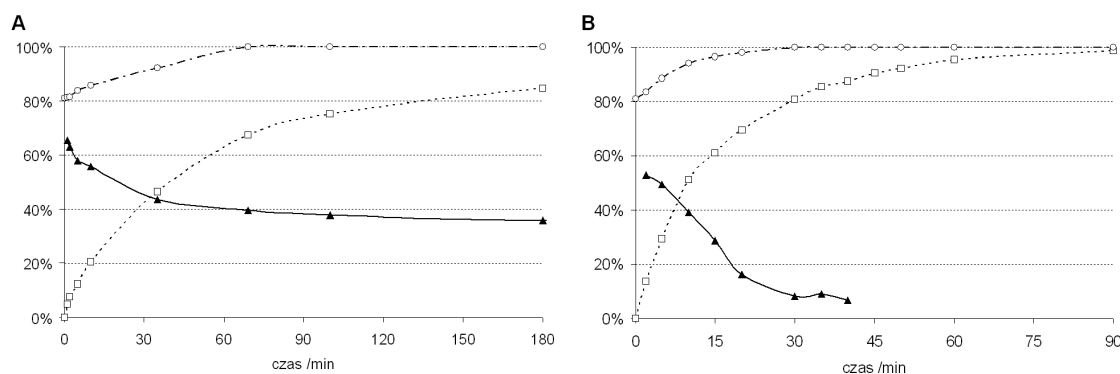
Rys. 9. Zmiany udziału diastereoizomerów D_P w całkowitej ilości H -fosfonianów alkilowo-urydynowych typu **5** w trakcie transestryfikacji H -fosfonianu $\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{PhNO}_2$ **4a** różnymi alkoholami. Punkt wyjściowy: ok. 50% przereagowania, przybliżone czasy końcowe reakcji: MeOH, 1,5 min; EtOH, 5 min; i PrOH, 10 min; t BuOH, 30 min.



Rys. 10. Widma ^{31}P NMR reakcji transestryfikacji H -fosfonianu $\text{dmtU}_{\text{PH}}\text{PhNO}_2$ **4a** z etanolem (5 ekw.) w czasie 5 min. W mieszaninie wyjściowej widoczne są sygnały mieszanego bezwodnika **2** istniejącego w równowadze z H -fosfonianem **4a**.

Dla mniej reaktywnych alkoholi wyższego rzędu szybkość reakcji była niższa i zmiany w stosunku diastereoizomerów w czasie reakcji były mniej widoczne, co wskazywało na znacząco

większą szybkość równowagowania $D_P\text{-4} \rightleftharpoons L_P\text{-4}$ w porównaniu z szybkością transestryfikacji, dzięki czemu stężenie izomeru $L_P\text{-4}$ pozostawało cały czas na poziomie zapewniającym dominującą tworzenie diastereoizomerów $L_P\text{-H}$ -fosfonianów alkilowo-urydynowych typu **5** (rys. 9).



Rys 11. Przebieg reakcji $dmtU_{PH}PhCl$ (**4b**) z (A) 5 ekw. i (B) 20 ekw. metanolu. Legenda: ---○--- udział $D_P\text{-4b}$ w całkowitym **4b**; ---□--- % produktu $dmtU_{PH}Me$ (**5a**); —▲— udział $D_P\text{-5a}$ w **5a** utworzonym w przedziale czasowym pomiędzy aktualnym i poprzednim widmem ^{31}P NMR.

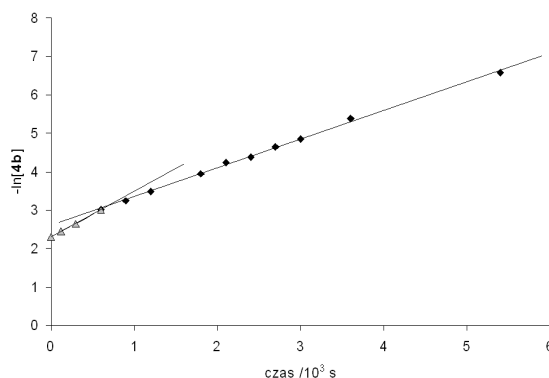
Tabela 1. Reakcja H -fosfonianów $dmtU_{PH}Pv$ (**2**) i $dmtU_{PH}Ar$ (**4a**, **4b**) z metanolem w warunkach kondensacji standardowej i wygaszania kinetycznego.

Substrat	Substrat, % L_P	Produkt 5a ($dmtU_{PH}Me$), % D_P	
		substrat + 5 ekw. MeOH	substrat + 2 500 ekw. MeOH
2 ($dmtU_{PH}Pv$)	30	81	36
4a ($dmtU_{PH}PhNO_2$)	25	42	30
4b ($dmtU_{PH}PhCl$)	19	41	23

Powyższe ustalenia potwierdzone zostały w reakcji $dmtU_{PH}PhCl$ (**4b**) z metanolem, w której zaobserwowana została wyraźna korelacja pomiędzy zubożeniem substratu w reaktywniejszy izomer $L_P\text{-4b}$ w trakcie trwania procesu, a odwróceniem stereoselektywności w kierunku produktu $L_P\text{-5a}$ (rys. 11). Warty odnotowania jest fakt, że w późnym stadium reakcji z małym nadmiarem metanolu (5 ekw.), pomimo bardzo niskiej zawartości diastereoizomeru $L_P\text{-4b}$ (poniżej poziomu detekcji ^{31}P NMR), ok. 40% nowo utworzonego $dmtU_{PH}Me$ (**5a**) miało konfigurację D_P , czyli pochodziło z transestryfikacji $L_P\text{-4b}$, najwyraźniej szybko reagującego z alkoholem zaraz po utworzeniu się z $D_P\text{-4b}$ (rys. 11A). Kiedy natomiast szybkość transestryfikacji została zwiększona przez użycie 20 ekw. metanolu, po upływie ok. 30 min. tworzenie $D_P\text{-5a}$ praktycznie

ustało, najprawdopodobniej z powodu braku jego stereochemicznego substratu, diestru L_P -**4b** (rys. 11B). Dalsze zwiększenie szybkości transestryfikacji (duży nadmiar metanolu) pozwoliło na uzyskanie produktu **5a** w stosunku diastereoizomerycznym odzwierciedlającym stosunek diastereoizomerów w wyjściowym $dmtU_{PH}PhCl$ (Tabela 1), jako wynik zmiany mechanizmu indukcji asymetrycznej z typu DYKAT (*dynamic kinetic asymmetric transformation*; przy małej ilości alkoholu) na DYTR (*dynamic thermodynamic resolution*), tj. stereospecyficzną transestryfikację poszczególnych diastereoizomerów diestru $dmtU_{PH}PhCl$ **4b**^[27].

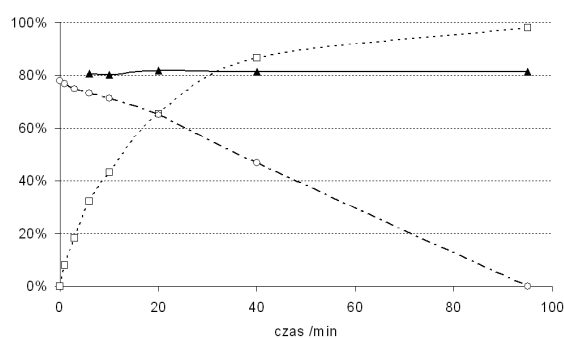
Próby ustalenia parametrów kinetycznych transestryfikacji *H*-fosfonianów aryłowych typu **4** zakończyły się jedynie częściowym sukcesem. W warunkach reakcji pseudo pierwszego rzędu (20 ekw. metanolu, rys. 11B) stała szybkości reakcji pseudo pierwszego rzędu k'_{obs} wynosiła $1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ w pierwszych minutach reakcji, po czym po ok. 10 min obniżała się do $7,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (rys. 12). Spowodowane to było najprawdopodobniej przereagowaniem reaktywniejszego izomeru L_P -**4b**, którego udział w całkowitej ilości substratu **4b** spadł w tym okresie czasu do <5%. Analogiczne stałe szybkości dla reakcji prowadzonych w obecności 5 ekw. metanolu (odpowiednio $8,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ i $2,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) były wyższe niż można było oczekiwać wobec czterokrotnie obniżonego nadmiaru metanolu. Wskazuje to na znaczący udział równowagowania D_P -**4b** \rightleftharpoons L_P -**4b** na kinetykę reakcji. Niestety nie udało się wyznaczyć stałych szybkości powyższej równowagi, przede wszystkim z powodu małych różnic pomiędzy stosunkami D_P/L_P diestru $dmtU_{PH}PhCl$ (**4b**) zaraz po wygenerowaniu (81:19) i tego samego diestru po ustaleniu się równowagi (72:28) oraz częściowego nakładania się sygnałów ^{31}P NMR obu diastereoizomerów. W konsekwencji niemożliwe było wyznaczenie pozostałych stałych szybkości reakcji procesu DYKAT.



Rys. 12. Kinetyka reakcji $dmtU_{PH}PhCl$ (**4b**) z 20 ekw. MeOH.

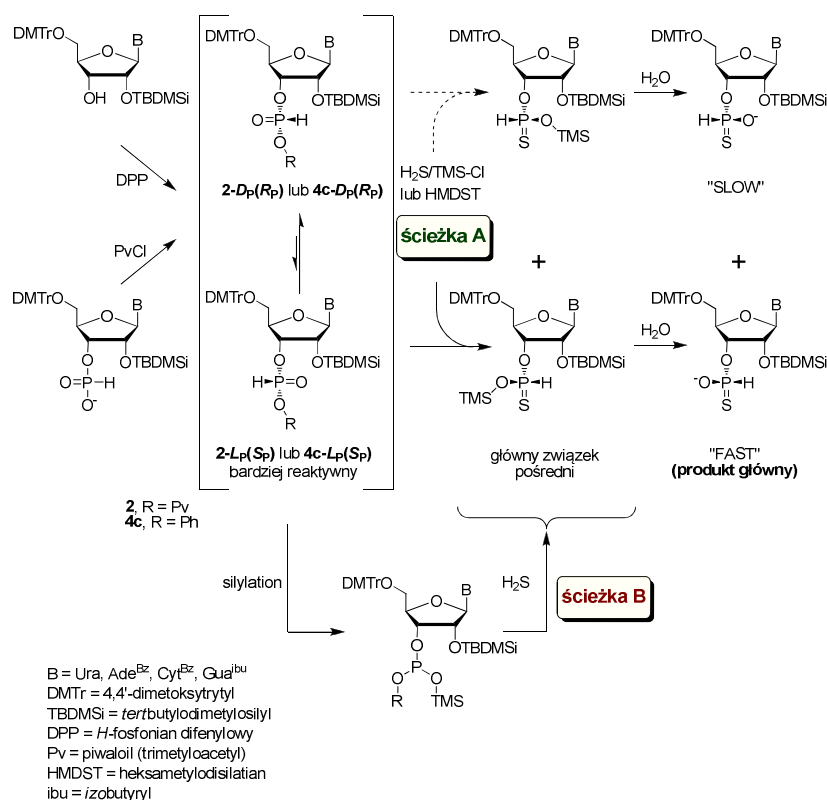
Podsumowując powyższe rozważania można stwierdzić, że stereoselektywność badanych reakcji jest kontrolowana przez proces typu DYKAT (dynamiczne kinetyczne przekształcenie asymetryczne), w którym diastereoizomery reaktywnych związków pośrednich (**2** i **4**) występują w dynamicznej równowadze, a jeden z nich, będący znacząco bardziej reaktywny od drugiego, jest przekształcany w kinetyczny produkt końcowy. Poprzez zmniejszenie szybkości równowagowania i zwiększenie szybkości estryfikacji można osiągnąć odwrócenie stereoselektywności reakcji, która w takich warunkach przebiega zgodnie z mechanizmem typu DYTR (dynamiczne różnicowanie termodynamiczne). Eksperymenty modelowe, wykorzystujące *H*-fosfoniany arylowo-nukleozydowe (**4**) i wygaszanie kinetyczne mieszanin reakcyjnych, wskazują, że bardziej reaktywny izomer związków pośrednich (**2** i **4**) ma konfigurację L_P ^[27].

Ogólnym wymogiem dwóch pozostałych zaproponowanych mechanizmów indukcji asymetrycznej, tj. pseudorotacji pięciowiązalnego związku pośredniego lub odmiennej geometrii tworzenia i rozpadu bipiramidy trygonalnej (np. atak apikalny – odejście ekwatorialne lub *vice versa*) jest dominująca retencja konfiguracji jednego diastereoizomeru mieszanego bezwodnika **2** i inwersja konfiguracji dla drugiego diastereoizomeru. Weryfikacja eksperymentalna tych koncepcji jest niestety trudna do wykonania. Wydaje się jednak, że w obu przypadkach konieczny byłby udział struktur wysokoenergetycznych typu bipiramidy trygonalnej z atomem wodoru lub fosforylowym atomem tlenu w pozycji apikalnej^[27], co czyni te mechanizmy mało prawdopodobnymi, choć ich udział nie może być wykluczony.



Rys. 13. Przebieg reakcji *H*-tiofosfonianu $dmtU_{PHS}PhCl$ z 5 ekw. metanolu. Legenda: ---o--- udział początkowo głównego (prawdopodobnie D_P) diastereoizomeru substratu $dmtU_{PHS}PhCl$ w mieszaninie diastereoizomerycznej ($D_P + L_P$); ---□--- % produktu $dmtU_{PHS}Me$; —▲— udział głównego (prawdopodobnie D_P) diastereoizomeru *H*-tiofosfonianu $dmtU_{PHS}Me$ w mieszaninie diastereoizomerycznej ($D_P + L_P$).

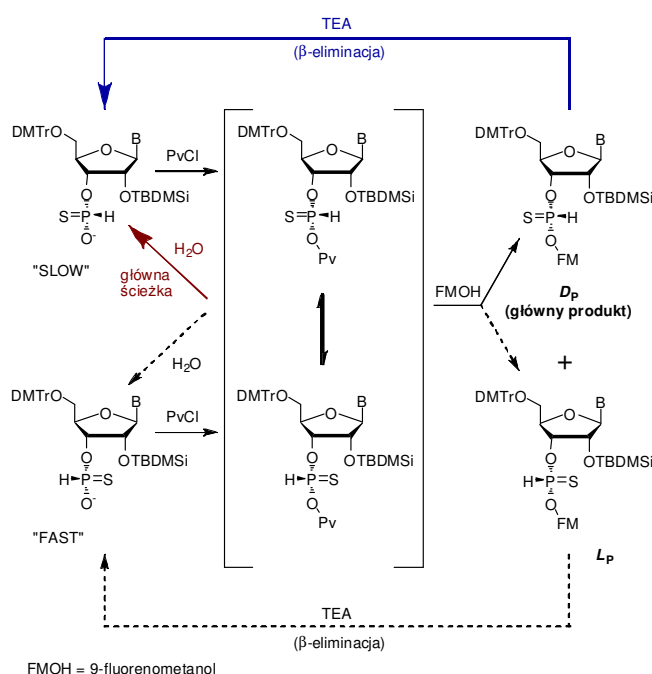
Interesujące wyniki stereochemiczne uzyskano we wstępnych badaniach analogicznych reakcji pochodnych siarkowych *H*-fosfonianów rybonukleotydów^[32]. Wskazują one, że indukcja asymetryczna podczas kondensacji *H*-tiofosfonianów przebiegać może według innego mechanizmu niż w serii okso. Na przykład w reakcji 3'-*H*-tiofosfonianu *p*-chlorofenylo-urydynowego (dmtU_{PHS}PhCl) z metanolem (rys. 13), bardziej reaktywny był główny diastereoizomer substratu (a nie mniejszościowy, jak w serii okso, por. rys. 11A). Mogłoby to wskazywać na stereospecyficzny mechanizm typu DYTR, jednak niektóre dane eksperymentalne sugerują możliwość przebiegu reakcji z retencją konfiguracji wokół atomu fosforu.



Rys. 14. Otrzymywanie diastereoizomerów "FAST" (*R_p*) *H*-tiofosfonianów rybonukleozydów. Ścieżka A, główny kierunek reakcji (85–90%; *de* ~50%); ścieżka B, alternatywna droga reakcji (10–15%) o obniżonej szybkości (ok. 2 rzędy wielkości) i stereoselektywności (*de* 20–30%)^[33].

Ponieważ dalsze badania mechanistyczne tej klasy związków wymagały łatwego dostępu do czystych diastereoizomerów monoestrów 3'-*H*-tiofosfonianowych rybonukleozydów, opracowane zostały metody ich stereoselektywnej syntezy^[33]. Diastereoizomer "FAST", wykazujący

większą mobilność podczas chromatografii na żelu krzemionkowym, otrzymany został z *de* 50% w reakcji sulfhydrolizy aktywowanego *H*-fosfonianu nukleozydu (rys. 14), a jego konfiguracja absolutna została określona wstępnie na podstawie analizy korelacyjnej ^{31}P NMR jako R_P . Diastereomer "SLOW" (S_P) otrzymany może być przez transformację asymetryczną *H*-tiofosfonianu nukleozydowego o dowolnym składzie diastereoizomerycznym w procedurze aktywacji – hydrolizy (*de* 50%) lub estryfikacji 9-fluorenometanolem z następczą β -eliminacją (*de* 80%; rys. 15). Wyjaśnienie mechanizmu indukcji asymetrycznej zachodzącej w trakcie kondensacji 3'-*H*-tiofosfonianów rybonukleozydów jest przedmiotem trwających obecnie badań.



Rys. 15. Otrzymywanie diastereoizomerów "SLOW" (S_P) *H*-tiofosfonianów rybonukleozydów.

4. Wpływ różnych typów katalizy na chemię i stereochemię kondensacji

W dotychczasowych rozważaniach, w celu uproszczenia dyskusji pominięty został wpływ katalizy na przebieg badanych reakcji. Aminy stosowane podczas kondensacji *H*-fosfonianów służą jednak nie tylko do neutralizacji powstających kwasów, ale mogą pełnić rolę katalizatorów zasadowych aktywujących komponenty hydroksylowe (ogólna kataliza zasadowa) i katalizatorów nukleofilowych oddziałujących na czynnik kondensujący lub mieszany bezwodnik typu **2**.

Ponadto sole amin powstające jako produkty uboczne kondensacji mogą działać jako katalizatory kwasowe zwiększające szybkość reakcji mieszanego bezwodnika typu **2** (ogólna kataliza kwasowa). Ponieważ każdy z tych typów katalizy może wpływać zarówno na wydajność, jaki i stereoselektywność kondensacji, ich udział w badanych reakcjach wymaga osobnego omówienia.

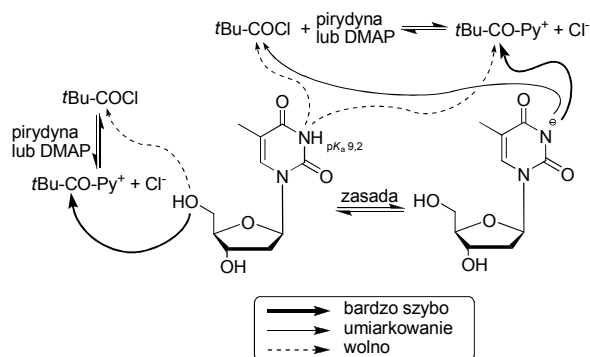
Silne katalizatory nukleofilowe, np. 4-(dimetyloamino)pirydyna (DMAP), 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO) lub *N*-metyloimidazol (NMI), stosowane w reakcjach przebiegających na atomach węgla^[34] i fosforu(V)^[35], okazały się mało efektywne w kondensacjach *H*-fosfonianów^[36;37]. W łagodnych warunkach stosowanych w niniejszych badaniach (3 ekw. aminy w neutralnym rozpuszczalniku, temperatura pokojowa) wyeliminowane zostało *P*-acylowanie, uważane za główną przyczynę niskich wydajności reakcji prowadzonych w obecności powyższych amin. Tworzenie diestru *H*-fosfonianowego (**5**) przebiegało w takich warunkach zadowalająco wtedy, gdy zastosowano co najmniej 3 ekw. chlorku piwaloilu jako czynnika kondensującego^[32;38;39], podczas gdy dla reakcji wobec pirydyny wystarczające było użycie jedynie 1,2 ekw. $PvCl$. Możliwych jest kilka przyczyn takiego wielokrotnionego zapotrzebowania na czynnik kondensujący. Przede wszystkim, silne katalizatory nukleofilowe mogą znacząco zwiększać reaktywność chlorków acylowych wykorzystywanych jako czynniki kondensujące poprzez tworzenie bardzo reaktywnych *N*-acylowych soli oniowych typu **6** (rys. 8). W przeciwieństwie do wyjściowych chlorków kwasowych, związki takie obok reakcji z resztami *H*-fosfonianowymi mogą także reagować z innymi związkami nukleofilowymi obecnymi w mieszaninach reakcyjnych^[40;41], a także z anionami piwalowymi będącymi produktami towarzyszącymi reakcjom kondensacji. W efekcie następuje niepożądane zużycie czynnika kondensującego. Estryfikacja utworzonego *in situ* mieszanego bezwodnika (**2**) przebiegała w obecności tego typu amin z niskimi wydajnościami, co mogło być spowodowane brakiem chemoselektywności ataku katalizatora nukleofilowego na atom *P* vs. *C=O* w związku **2**, a w efekcie prowadząc częściowo do powstawania wspomnianych powyżej *N*-acylowych soli oniowych i odtworzenia substratu **1**^[32;39].

Poza problemami związanymi z wydajnością, kondensacje prowadzone w obecności silnych katalizatorów nukleofilowych charakteryzują się obniżoną stereoselektywnością (np. *de* 53% dla DMAP w porównaniu do 62% dla pirydyny i 70% dla 2,6-lutydyny^[38]). Wynik ten może być efektem obniżenia stosunku $k_{\text{równowagowania}} / k_{\text{estryfikacji}}$ dla soli oniowych typu **6**.

Reaktywność chlorku piwaloilu wobec grup hydroksylowych i pozycji N3H tymidyny i uracylu w obecności silnych katalizatorów nukleofilowych lub mieszaniny pirydyny i trietyloaminy była bardzo wysoka. Obserwowany czas połowicznego przereagowania wynosił w niektórych przypadkach poniżej 1 s, reakcje takie mogły więc skutecznie konkurować z kondensacją *H*-fosfonianów rybonukleozydów. Prawdopodobną przyczyną tak dużej szybkości reakcji N- i O-acylowania jest synergistyczny efekt katalizy nukleofilowej i zasadowej (rys. 16)^[40;41]. Korzystnym wynikiem tych obserwacji było opracowanie szybkich i selektywnych metod syntezy piwaloilowych pochodnych tymidyny i uracylu^[41].

W przeciwieństwie do niesatysfakcjonujących rezultatów kondensacji przeprowadzanych wobec silnych katalizatorów nukleofilowych, reakcje prowadzone w obecności pirydyny i większości jej pochodnych alkilowych przebiegają ilościowo i z wysoką stereoselektywnością. Udział katalizy nukleofilowej podczas kondensacji *H*-fosfonianów (**1**) wobec pirydyny jest zjawiskiem potwierdzonym w szeregu prac^[37;42-46] i potencjalnie może wpływać na mechanizm indukcji asymetrycznej (rys. 8, reakcja A). Wpływ ten nie znajduje jednak wyraźnego odzwierciedlenia eksperymentalnego, gdyż kondensacje prowadzone w obecności pochodnych pirydyny wykazują ten sam kierunek stereoselektywności (dominujące tworzenie diestrów o konfiguracji *D_p*), co reakcje zachodzące pod ich nieobecność^[38]. Sugeruje to, że dla katalizatorów nukleofilowych proces DYKAT realizowany jest na etapie soli fosfonopirydyniowych typu **6**, dla których stosunek $k_{\text{równowagowania}} / k_{\text{estryfikacji}}$ jest zbliżony do stosunku analogicznych stałych szybkości reakcji bez udziału katalizy nukleofilowej (rys. 8, reakcja B).

Wyraźne różnice pomiędzy aminami nukleofilowymi i nienukleofilowymi zostały zaobserwowane w doświadczeniach wygaszania kinetycznego, w których dla łagodnych katalizatorów nukleofilowych (np. pirydyny) następował gwałtowny spadek stereoselektywności, natomiast dla amin słabo nukleofilowych zmiany stereoselektywności były nieznaczne. Wskazuje to na zmniejszenie efektywności procesu DYKAT w przypadku występowania katalizy nukleofilowej, co może wynikać z względnego zmniejszenia szybkości równowagowania adduktu **6** w porównaniu do jego estryfikacji ($k_{LP-6} / k_{6/DP-5} < k_{LP-2} / k_{2/DP-5}$;



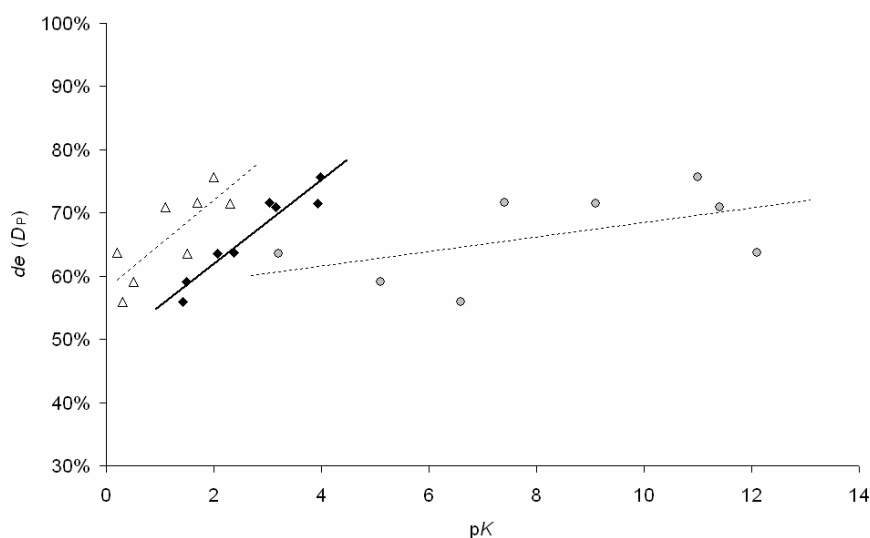
Rys. 16. Wpływ katalizy nukleofilowej i zasadowej na kierunki reakcji chlorku piwaloilu z tymidyną.

rys 8)^[38]. Taka interpretacja wyników jest zgodna z wcześniej zakładanymi przyczynami niższej stereoselektywności obserwowanej dla silnych katalizatorów nukleofilowych.

Powyższe wyniki wskazywały, że kondensacje 3'-*H*-fosfonianów rybonukleozydów (**1**) wobec amin nienukleofilowych powinny przebiegać ze szczególnie wysoką stereoselektywnością. W celu weryfikacji tego postulatu, modelowe kondensacje *H*-fosfonianu urydyny (**1d**) z etanolem przeprowadzono wobec szeregu amin trzeciorzędowych różniących się budową i zasadowością, i oceniono ich wpływ na chemię i stereochemię reakcji^[32;39]. Pomimo braku katalizy nukleofilowej, badane reakcje przebiegały szybko i – w większości wypadków – bez tworzenia produktów ubocznych zawierających fosfor (³¹P NMR). Jeśli jednak czynnik kondensujący (PvCl) użyty był w ilościach zbliżonych do stechiometrycznych (1,2 ekw.), zazwyczaj wystarczających do ilościowej kondensacji wobec pochodnych pirydyny, dla wielu amin trzeciorzędowych reakcje nie zachodziły do końca. Zjawisko to było szczególnie silne dla amin o $pK_a > 7$, gdzie konieczne było użycie ponad 2,5 ekw. PvCl. Ponieważ piwaloilowanie grup hydroksylowych i reszt nukleozydowych pod nieobecność katalizatorów nukleofilowych przebiega stosunkowo wolno^[40;41], wytypowane zostały dwa procesy, które mogły być odpowiedzialne za zwiększone zapotrzebowanie na czynnik kondensujący: (i) tworzenie bezwodnika piwalowego (Pv₂O) w reakcji PvCl z PvO⁻ oraz (ii) tworzenie Pv₂O w reakcji PvO⁻ z mieszanym bezwodnikiem **2**. Obydwie reakcje są zgodne z obserwowanym wzrastającym zapotrzebowaniem na czynnik kondensujący dla amin o wyższym pK_a (większy stopień jonizacji PvOH wraz ze wzrostem zasadowości środowiska) i w rozpuszczalnikach o niższej polarności. Ponieważ jednak mieszany bezwodnik **2** ulegał prawie ilościowej estryfikacji w obecności różnych amin trzeciorzędowych, jego deacylowanie przez jony piwalanowe nie mogło być głównym źródłem tworzenia Pv₂O podczas standardowych kondensacji (choć było znaczące podczas reakcji, dla których szybkość estryfikacji była obniżona)^[32;39].

Dla stereoselektywności kondensacji nie występowała podobna prosta zależność od zasadowości Brønsteda (rys. 17). Kiedy jednak wartości *de* zostały wykreślone w funkcji zasadowości wiązania wodorowego amin (pK_{HB}), dał się zaobserwować trend wzrostowy $de \sim pK_{HB}$. Zależność ta stała się jeszcze wyraźniejsza, gdy oba rodzaje zasadowości połączone zostały w jeden parametr (któremu została nadana wstępna nazwa „zasadowość DYKAT” i symbol „ pK_{DK} ”), zgodnie z równaniem empirycznym:

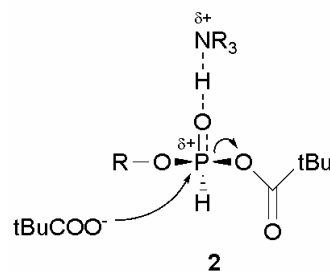
$$(1) \quad pK_{DK} = 0,18 pK_a + pK_{HB}$$



Rys. 17. Wartości de kondensacji $dmtU_{PH}$ (**1**) z etanolem w obecności różnych amin trzeciorzędowych w zależności od ich zasadowości. Trójkąty: zasadowość wiązania wodorowego (pK_{HB} ; $R^2 = 0,657$); kółka: zasadowość Brønsteda (pK_a ; $R^2 = 0,286$); czarne romby: "zasadowość DYKAT" ($pK_{DK} = 0,18 pK_a + pK_{HB}$; $R^2 = 0,916$). Aminy (pK_a): zasada Trögera (3,2); dimetyloanilina (5,1); dietyloanilina (6,6); *N*-metylomorfolina (7,4); *N*¹,*N*¹,*N*²,*N*²-tetrametyloetylenodiamina (9,1); trietyloamina (11,0); diizopropyletyloamina (11,4); "Proton Sponge" (12,1).

Udział zasadowości Brønsteda w równaniu (1) można wytłumaczyć wzrostem szybkości równowagowania $PvO^- + D_P-2b \rightleftharpoons L_P-2b + PvO^-$ w wyniku silniejszej jonizacji kwasu piwalowego. Kluczowa rola zasadowości wiązania wodorowego jest mniej oczywista. Ponieważ parametr ten może odzwierciedlać zdolność sprzężonego kwasu danej aminy do działania jako ogólny katalizator kwasowy, aminy o wysokiej zasadowości wiązania wodorowego mogą przyspieszać równowagowanie mieszanego bezwodnika **2** poprzez zwiększenie elektrofilowości reszty *H*-fosfonianowej w tym związku (rys. 18). Alternatywnie, katalizator kwasowy może ułatwiać oderwanie grupy opuszczającej.

Podsumowując tę część badań można stwierdzić, że dla uzyskania maksymalnej stereoselektywności przy zachowaniu ilościowej wydajności kondensacji, korzystne jest zastosowanie aminy o stosunkowo niskiej aktywności katalizatora nukleofilowego i wysokiej wartości „zasadowości DYKAT”.



Rys. 18. Możliwy wpływ ogólnej katalizy kwasowej na wzrost szybkości *P*-epimeryzacji mieszanego bezwodnika **2**.

5. Stereochemia tworzenia wiązania diestrowego – badania strukturalne

Przedstawione dotąd wyniki wskazują na krytyczną rolę szybkości izomeryzacji reaktywnych *H*-fosfonianowych związków pośrednich (**2**, **4** i **6**) w każdym wariantcie procesu (rys. 8, reakcje A, B i C). We wszystkich przypadkach diastereoizomer L_P związku pośredniego był zdecydowanie bardziej reaktywny od izomeru D_P (także w przypadku innych czynników kondensujących^[26]). Budowa składnika hydroksylowego kondensacji miała mały wpływ na stereoselektywność^[15;27], a obserwowane niewielkie różnice wynikały prawdopodobnie ze zróżnicowanych szybkości estryfikacji, np. jako efekt dostępności grupy hydroksylowej, stężenia związku lub jego szybkości dyfuzji. Wynika z tego, że przestrzenne właściwości atakującego nukleofila i grupy odchodzącej nie mają dużego znaczenia w kontekście mechanizmu indukcji asymetrii. Pojawiło się więc pytanie o strukturalne uwarunkowania leżące u podstaw zróżnicowanej reaktywności diastereoizomerów D_P i L_P *H*-fosfonianów rybonukleozydów^[32].

Nasuającym się wyjaśnieniem jest wpływ zawady przestrzennej wprowadzanej przez objętościową grupę ochronną pozycji 2'-hydroksylowej^[47;48], jednak nie można wykluczyć też innych czynników, takich jak odpychanie elektrostatyczne lub oddziaływanie typu wiązania wodorowego pomiędzy grupą *H*-fosfonianową, a atomem tlenu 2'-O. Wprawdzie można oczekiwać, że wiązanie wodorowe $P-H \cdots O^{2'}$ powinno być słabe, jednak jego tworzenie może być znacząco ułatwione w zatłoczonym środowisku hydrofobowych grup ochronnych. Wiązanie takie mogłoby ograniczyć swobodę konformacyjną grupy *H*-fosfonianowej poprzez wytworzenie sześciocząłowego quasi-pierścienia, w którym dostępność atomu fosforu dla atakującego nukleofila powinna być zróżnicowana dla poszczególnych *P*-diastereoizomerów.

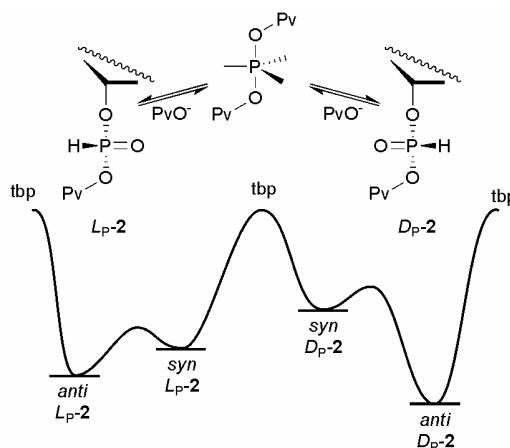
Wstępne badania tego problemu wykazały, że dla szeregu pochodnych *H*-fosfonianu 5'-(dimetoksytrytylo)urydyny niosących rozmaite modyfikacje w pozycji 2' można było zaobserwować wyraźną korelację pomiędzy rozmiarem grupy w pozycji 2', a stereoselektywnością kondensacji z etanolem. Natomiast pomiędzy reakcjami pochodnych z grupami o zbliżonych rozmiarach, lecz różniących się właściwościami elektronowymi (np. grupa 2'-*O*-etylowa i 2'-*O*-acetylowa), nie występowały znaczące różnice, których można by oczekiwać w przypadku występowania wiązania wodorowego $P-H \cdots O^{2'}$. Z drugiej jednak strony, na widmie ¹H NMR pochodnej 2'-fluorowej występuje rozszczepienie sygnału protonu P-H (J 1,5 Hz), które może być spowodowane tworzeniem wiązania $P-H \cdots F$. Obserwowany brak stereoselektywności podczas kondensacji tego związku wskazywałby więc na jedynie pomocniczą rolę wiązania wodorowego, pod-

czas gdy głównym czynnikiem pozostawałyby efekty steryczne^[32]. Z kolei dla pochodnej 2'-NH-TFA, przyczyną praktycznego braku stereoselektywności mogło być wiązanie wodorowe o odwróconej polarności (P=O...H-N) jako efekt o przeciwnym kierunku działania do efektu sterycznego^[32].

Tak więc poza kilkoma specyficznymi wyjątkami, obserwowana zmienność stereoselektywności kondensacji może być przypisana przede wszystkim przestrzennym oddziaływaniom podstawnika w pozycji 2'. Modyfikacje pozycji 5' nie miały natomiast praktycznie znaczenia i nawet pochodna 5'-deoksy reagowała z taką samą stereoselektywnością (*de* 70% ±1,5%), jak *H*-fosfoniany niosące grupy 5'-O-DMTr, 5'-O-Pv i 5'-O-Ac^[32].

Powyzsze konkluzje jakościowe są zgodne z wnioskami płynącymi z analizy modeli trójwymiarowych. W diastereoizomerach D_P aktywnych pochodnych *H*-fosfonianowych (np. **2**), których grupa *H*-fosfonianowa znajduje się w niskoenergetycznej konformacji antyperiplanarnej, atom wodoru grupy P-H skierowany jest w stronę objętościowej grupy 2', natomiast atom tlenu grupy P=O w relatywnie wolną przestrzeń po stronie 4' rybozy. W diastereoizomerach L_P sytuacja jest odwrotna i w zatłoczonym sąsiedztwie pozycji 2' znajduje się duży, elektroujemny atom tlenu ugrupowania fosforylowego, przez co izomery te stają się mniej korzystne energetycznie. Jednocześnie w konformacji *anti* utrudniony jest atak na atom fosforu ze strony przeciwnej do odchodzącej grupy piwaloilowej. Wysokoenergetyczny diastereoizomer L_P stosunkowo łatwo przyjmuje konformację *syn*, w której układ H-P=O jest zorientowany przeciwnie niż w konformacji *anti*, a grupa atakująca i odchodząca znajdują się w wolnej przestrzeni, dzięki czemu izomer ten łatwo ulega reakcjom typu $S_N2(P)$. Diagram energetyczny odpowiadający tej hipotezie przedstawiony jest na rys. 19^[32].

Dotychczasowa analiza nie wyjaśnia wyraźnie niższej stereoselektywności kondensacji *H*-fosfonianu N^4 -benzoilocytydyny w porównaniu z A, G i U (rys. 5). Z analizy stereochemii kondensacji szeregu *H*-fosfonianów pirymidynowych modyfi-



Rys. 19. Hipotetyczny diagram energetyczny dla izomeryzacji $PvO^- + 2-D_P \rightleftharpoons 2-L_P + PvO^-$ (tbp – bipyramida trygonalna).

kowanych w pozycjach 4, 5 i 6 można było jednak zauważyć, że *H*-fosfoniany o wyższej populacji konformerów N pierścienia rybozy (niska wartość $J_{1'-2'}$ i wysoka $J_{3'-4'}$) wykazywały zazwyczaj niższą stereoselektywność podczas kondensacji. Można z tego wnioskować, że jeśli struktura zasady heterocyklicznej umożliwia łatwe przyjmowanie konformacji N przez rybozę, grupa *H*-fosfonianowa jest lepiej dostępna, co powoduje spadek stereoselektywności^[32].

6. Optymalizacja warunków kondensacji w kierunku maksymalnej stereoselektywności

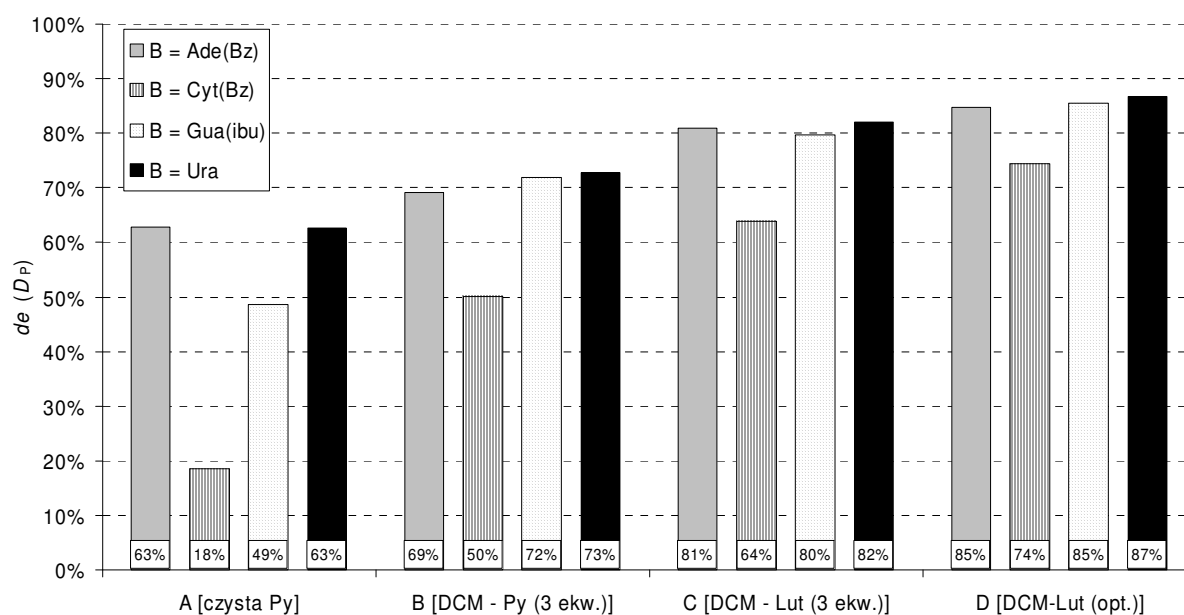
Poza zagadnieniami mechanistycznymi podjęte zostały badania w celu ustalenia warunków reakcji, w których kondensacja 3'-*H*-fosfonianów rybonukleozydów zachodzić będzie ilościowo i z jak największą stereoselektywnością^[26]. Przeanalizowany został wpływ:

- rodzaju aminy użytej jako zasady
- stężenia zasady
- rozpuszczalnika
- rodzaju czynnika kondensującego
- stężenia reagentów
- stosunku reagentów
- temperatury
- chiralności zasady i czynnika kondensującego

Spośród przebadanych amin optymalne okazało się użycie pochodnych pirydyny, w których podstawniki metylowe ograniczały (lecz nie całkowicie) ich właściwości nukleofilowe, a jednocześnie podwyższały zasadowość Brønsteda. Stężenie aminy zostało zoptymalizowane dla 2,6-lutydyny jako ok. 7% (v/v). Dla wszystkich spośród kilkudziesięciu zbadanych czynników kondensujących reakcje zachodziły stereoselektywnie, przy czym najlepsze wyniki uzyskiwane były dla chlorków acylowych, ze wskazaniem na chlorek piwaloilu. Rozpuszczalniki gwarantujące najwyższą stereoselektywność kondensacji charakteryzowały się umiarkowaną polarnością. Korzystne było stosowanie obniżonego stężenia reagentów i małego nadmiaru komponentu hydroksylowego (co obniżało szybkość estryfikacji i umożliwiało efektywniejsze równowagowanie mieszanego bezwodnika **2**). Zależność stereoselektywności od temperatury była zazwyczaj skomplikowana i odzwierciedlała przypuszczalnie zmieniające się w różnym stopniu szybkości

poszczególnych reakcji procesu DYKAT. Najwyższa stereoselektywność występowała w temperaturze pokojowej. Obecność chiralnych komponentów reakcji nie miała znaczącego wpływu na stereoselektywność, co jest zgodne z zakładanym mechanizmem reakcji^[26].

Opracowane w toku powyższych badań optymalne warunki stereoselektywnej kondensacji 3'-*H*-fosfonianów rybonukleozydu to: 25 mM stężenie *H*-fosfonianu **1** w DCM, 1,2 ekw. alkoholu/nukleozydu, 2,6-lutydyna (ok. 7% v/v) jako zasada, PvCl jako czynnik kondensujący (2–3 ekw.), temperatura pokojowa. W takim układzie, w reakcji *H*-fosfonianów **1** z 2',3'-*O*-dibenzoilourydyną (**3d**) stereoselektywność wynosiła 82–87% *de* dla B = Ade^{Bz}, Cyt^{pya}, Gua^{ibu} i Ura oraz ok. 75% *de* dla B = Cyt^{Bz} (rys. 20). Oznaczało to znaczącą poprawę w stosunku do wartości *de* ok. 50–60% (B = Ade^{Bz}, Gua^{ibu}, Ura) i 20% (B = Cyt^{Bz}) dla reakcji prowadzonych w pirydynie w standardowych warunkach^[26].



Rys. 20. Nadmiar diastereoizomeryczny diastereoizomeru D_p *H*-fosfonianu dinukleozydowego **5c** (dmtNu_{PH}U_{Bz2}) w różnych warunkach reakcji: 50 μmol *H*-fosfonianu **1** (B = Ade^{Bz}, Cyt^{Bz}, Gua^{ibu}, Ura) + 2',3'-*O*-dibenzoilourydyna (1,2 ekw.) + PvCl (2,5 ekw.) w (A) pirydynie (0,5 ml); (B) DCM (0,5 ml) zawierającym pirydynę (3 ekw.); (C) DCM (0,5 ml) zawierającym 2,6-lutydynę (3 ekw.); (D) DCM (2,0 ml) zawierającym 2,6-lutydynę (7% v/v = 24 ekw.).

Wstępne próby zastosowania amin trzeciorzędowych w syntezie *H*-fosfonianów dinukleozydowych zakończyły się częściowym powodzeniem. Znacząco mniejsza szybkość estryfikacji mieszanego bezwodnika **2** umożliwiła zachodzenie konkurencyjnego P-acylowania na poziomie

$\geq 10\%$. Z drugiej jednak strony, stereoselektywność reakcji wynosiła $> 90\%$ *de* (D_P -5c), co zachęca do kontynuowania badań w tym kierunku^[32:39].

7. Podsumowanie

W przedstawionym komentarzu omówione zostały najważniejsze wyniki dotyczące badań stereoselektywnej kondensacji 3'-*H*-fosfonianów rybonukleozydów z alkoholami i nukleozydami, które zainicjowane zostały w roku 2002 wraz z rozpoczęciem realizacji własnego projektu badawczego KBN dotyczącego tej tematyki.

Podczas realizacji badań opracowałem nowy system nazewnictwa stereochemicznego „ D_P/L_P ” ułatwiającego analizę przebiegu reakcji z udziałem chiralnego atomu fosforu pochodnych nukleozydowych. Nomenklatura ta stosowana była zarówno w niniejszym komentarzu, jak i w publikacjach wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej.

Zastosowanie *H*-fosfonianów arylowo-nukleozydowych jako analogów mieszanego bezwodnika *H*-fosfonianowo-piwalowego o kontrolowanej reaktywności pozwoliło na odkrycie mechanizmu odpowiedzialnego za indukcję asymetrii podczas tworzenia diastereowego wiązania *H*-fosfonianowego. Przedstawiłem także w moim przekonaniu wysoce prawdopodobne wyjaśnienie wpływu czynników strukturalnych na zróżnicowanie reaktywności diastereoizomerów D_P i L_P mieszanego bezwodnika *H*-fosfonianowo-piwalowego. Ponadto dokonałem analizy wpływu organicznych katalizatorów zasadowych, nukleofilowych i kwasowych na chemię i stereochemię kondensacji *H*-fosfonianów i tworzenie produktów ubocznych.

Oprócz badań mechanistycznych przeprowadziłem badania dotyczące wpływu czynników fizykochemicznych na kondensację *H*-fosfonianów rybonukleozydów pod kątem maksymalizacji stereoselektywności procesu. Optymalizacja warunków reakcji umożliwiła uzyskanie znaczącego wzrostu zawartości głównego diastereoizomeru produktu (o konfiguracji D_P).

Interesującym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest fakt, że szybka wymiana ligandów w aktywnych związkach pośrednich, szczególnie niepożądana podczas syntezy stereospecyficznej z powodu następującej P-epimeryzacji, okazała się być kluczowa dla uzyskania wysokiej stereoselektywności kondensacji *H*-fosfonianów rybonukleozydów z alkoholami i nukleozydami. Warto podkreślić, że dopiero szczegółowa analiza kinetyki i stereochemii szeregu reakcji uwiarydlała dużą złożoność pozornie prostego procesu i ujawniła decydującą rolę trudnych do bezpośredniego zaobserwowania oddziaływań fizycznych i chemicznych, przy znaczącym

wpływie subtelnych zmian strukturalnych w dużej odległości od właściwego centrum reakcyjnego. Badania składające się na niniejszą rozprawę habilitacyjną stanowią więc dobitny dowód, jak istotny wpływ na przebieg procesu chemicznego mogą mieć czynniki i reakcje pozostające poza zasięgiem rutynowo stosowanych narzędzi analitycznych.

8. Przypisy

1. Koziolkiewicz, M., Krakowiak, A., Kwinkowski, M., Boczkowska, M., Stec, W.J., Stereodifferentiation - the effect of P chirality of oligo(nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 5000-5005 (1995).
2. Stec, W.J., Wilk, A., Stereocontrolled Synthesis of Oligo(Nucleoside Phosphorothioate)s, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **33**, 709-722 (1994).
3. Lesnikowski, Z.J., Stereocontrolled Synthesis of P-Chiral Analogs of Oligonucleotides, *Bioorg. Chem.*, **21**, 127-155 (1993).
4. Guga, P., Okruszek, A., Stec, W.J., Recent advances in stereocontrolled synthesis of P-chiral analogues of biophosphates, *Topics in Current Chemistry*, **220**, 169-200 (2002).
5. Beaucage, S.L., Solid-phase synthesis of siRNA oligonucleotides, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **11**, 203-216 (2008).
6. Somoza, A., Protecting groups for RNA synthesis: an increasing need for selective preparative methods, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 2668-2675 (2008).
7. Beaucage S. L., Reese C. B., Recent Advances in the Chemical Synthesis of RNA. W: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2.16.1-2.16.31. Beaucage S. L., Herdewijn P., Matsuda A. (red.), John Wiley & Sons, Inc., New York, 2009.
8. Shrey, K., Suchit, A., Nishant, M., Vibha, R., RNA interference: Emerging diagnostics and therapeutics tool, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **386**, 273-277 (2009).
9. Oka, N., Kondo, T., Fujiwara, S., Maizuru, Y., Wada, T., Stereocontrolled Synthesis of Oligoribonucleoside Phosphorothioates by an Oxazaphospholidine Approach, *Org. Lett.*, **11**, 967-970 (2009).
10. Efimov, V.A., Molchanova, N.S., Chakhmakheva, O.G., Approach to the synthesis of natural and modified oligonucleotides by the phosphotriester method using O-nucleophilic intramolecular catalysis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **26**, 1087-1093 (2007).
11. Almer, H., Stawinski, J., Stromberg, R., Solid support synthesis of all-Rp-oligo(ribonucleoside phosphorothioate)s, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3811-3820 (1996).
12. Almer, H., Stawinski, J., Stromberg, R., Thelin, M., Synthesis of diribonucleoside phosphorothioates via stereospecific sulfurization of H-phosphonate diesters, *J. Org. Chem.*, **57**, 6163-6169 (1992).
13. Almer, H., Stawinski, J., Stromberg, R., Synthesis of Stereochemically Homogeneous Oligoribonucleoside All-R_P-Phosphorothioates by Combining H-Phosphonate Chemistry and Enzymatic Digestion, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1459-1460 (1994).
14. Almer, H., Stawinski, J., Stromberg, R., Chemical Synthesis of RNA-Fragment Analogues That Have Phosphorothioate Linkages of Identical Configuration, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **14**, 879-881 (1995).
15. *Sobkowski, M., Jankowska, J., Stawinski, J., Kraszewski, A., Stereochemistry of internucleotide bond formation by the H-phosphonate method. 1. Synthesis and ³¹P NMR analysis of 16 diribonucleoside (3'-5')-H-phosphonates and the corresponding phosphorothioates, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 1469-1484 (2005).
16. *Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., A proposal for a new stereochemical notation for P-chiral nucleotide analogues and related compounds, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 1301-1307 (2005).
17. *Sobkowski M., Stawinski J., Kraszewski A., A proposal of D_P/L_P notation for nucleotide analogues with a chiral phosphorus centre. W: *Collection Symposium Series*, **7**, 467-469. Hocek M. (red.), Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, 2005.
18. *Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., A proposal for a convenient notation for P-chiral nucleotide analogues. Part 2. Dinucleoside monophosphate analogues, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 1363-1375 (2006).

19. *Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., A proposal for a convenient notation for *P*-chiral nucleotide analogues. Part 3. Compounds with one nucleoside residue and non-nucleosidic derivatives, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 1377-1389 (2006).
20. *Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., A proposal for a convenient notation for *P*-chiral nucleotide analogues. Part 4. A relationship between the D_P/L_P notation and stereochemistry of reactions., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **28**, 29-42 (2009).
21. *Sobkowski M., Stawinski J., Kraszewski A., A Convenient Stereochemical Notation for P-Chiral Nucleotide Analogs. W: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, A.1E.1-A.1E.16. Beaucage S. L., Bergstrom D. E., Glick G. D., Jones R. A. (red.), John Wiley & Sons, New York, 2007.
22. Gacs-Baitz, E., Ferenc, S., Egyed, O., Gyula, S., Synthesis and Structural Study of Various Oxidized Diastereomeric 5'-Dimethoxytrityl-thymidine-3'-O-[O-(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropyl]-phosphoramidite Derivatives. Comparison of the Effects of the P=O, P=S, and P=Se Functions on the NMR Spectral and Chromatographic Properties, *Chirality*, **21**, 663-673 (2009).
23. Eckstein, F., Phosphorothioate analogues of nucleotides: Tools for the investigation of biochemical processes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **22**, 423-439 (1983).
24. *Sobkowski, M., Jankowska, J., Stawinski, J., Kraszewski, A., A cautionary note on the use of the ^{31}P NMR spectroscopy in stereochemical correlation analysis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 1033-1036 (2005).
25. Johansson, T., Stawinski, J., The case for configurational stability of *H*-phosphonate diesters in the presence of diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 2315-2322 (2001).
26. *Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., Stereochemistry of internucleotide bond formation by the *H*-phosphonate method. 6. Optimization of the reaction conditions towards highest stereoselectivity, *Tetrahedron: Asymmetry*, **19**, 2508-2518 (2008).
27. *Sobkowski, M., Kraszewski, A., Stawinski, J., Stereochemistry of internucleotide bond formation by the *H*-phosphonate method. 3. Investigations on a mechanism of stereoselectivity induction, *Tetrahedron: Asymmetry*, **18**, 2336-2348 (2007).
28. *Sobkowski, M., Jankowska, J., Stawinski, J., Kraszewski, A., Aryl nucleoside *H*-phosphonates as a tool for investigation of stereospecificity during coupling, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 887-890 (2005).
29. *Sobkowski M., Jankowska J., Stawinski J., Kraszewski A., Stereochemistry of internucleotide bond formation by the *H*-phosphonate method. 2. Transesterification of aryl ribonucleoside *H*-phosphonate diesters with alcohols. W: *Collection Symposium Series*, **7**, 183-187. Hocek M. (red.), Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, 2005.
30. Cieslak, J., Szymczak, M., Wenska, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., Aryl H-phosphonates. Part 11. Synthetic and ^{31}P NMR studies on the formation of aryl nucleoside H-phosphonates, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3327-3331 (1999).
31. Stawinski, J., Kraszewski, A., How to get the most out of two phosphorus chemistries. Studies on H-phosphonates, *Acc. Chem. Res.*, **35**, 952-960 (2002).
32. *Sobkowski, M., Chemistry and stereochemistry of internucleotide bond formation by the *H*-phosphonate method, *New. J. Chem.*, **34** (w druku, DOI: 10.1039/B9NJ00679F, 2010).
33. *Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., Stereochemistry of internucleotide bond formation by the *H*-phosphonate method. 7. Stereoselective formation of ribonucleoside (R_P)- and (S_P)-3'-*H*-phosphonothioate monoesters, *Tetrahedron: Asymmetry*, (w druku, DOI: 10.1016/j.tetasy.2010.01.022, 2010).
34. Baidya, M., Kobayashi, S., Brotzel, F., Schmidhammer, U., Riedle, E., Mayr, H., DABCO and DMAP - Why are they different in organocatalysis?, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 6176-6179 (2007).
35. Reese, C.B., Zhang, P.Z., Phosphotriester Approach to the Synthesis of Oligonucleotides - A Reappraisal, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2291-2301 (1993).
36. Efimov, V.A., Dubey, I.Y., Chakhmakhcheva, O.G., NMR study and improvement of H-phosphonate oligonucleotide synthesis, *Nucleosides Nucleotides*, **9**, 473-477 (1990).
37. Dubey, I.Y., Efimov, V.A., Lyapina, T.V., Fedoryak, D.M., Nucleophilic catalysts in H-phosphonate internucleotide condensation reaction, *Bioorg. Khim.*, **18**, 911-919 (1992).
38. *Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., Stereochemistry of internucleotide bond formation by the *H*-phosphonate method. 4. The role of nucleophilic catalysis in chemistry and stereochemistry of ribonucleoside *H*-phosphonate condensation, *New. J. Chem.*, **33**, 164-170 (2009).

39. Sobkowski, M., Stawinski, J., Kraszewski, A., Stereochemistry of internucleotide bond formation by the *H*-phosphonate method. 5. The role of Bronsted and H-bonding base catalysis in ribonucleoside *H*-phosphonate condensation – chemical and stereochemical consequences, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, (wysłane do redakcji).
40. *Sobkowski M., Diverse chemoselectivity during acylation of nucleosides. W: *Collection Symposium Series*, **10**, 277-281. Hocek M. (red.), Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, 2008.
41. *Sobkowski, M., A convenient protection of 4-oxypyrimidine moieties in nucleosides by the pivaloyl group , *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **75**, 33 - 57 (2010).
42. Efimov, V.A., Dubey, I.Y., Modification of the H-phosphonate oligonucleotide synthesis on polymer support, *Bioorg. Khim.*, **16**, 211-218 (1990).
43. Garegg, P.J., Stawinski, J., Stromberg, R., Nucleoside Hydrogenphosphonates. Part 6. Reaction of Nucleoside Hydrogenphosphonates with Arenesulphonyl Chlorides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1209-1214 (1987).
44. Sigurdsson, S., Stromberg, R., Side reactions in the H-phosphonate approach to oligonucleotide synthesis: A kinetic investigation on bisacylphosphite formation and 5'-O-acylation, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **22**, 1-12 (2003).
45. Kraszewski, A., Stawinski, J., Aryl nucleoside H-phosphonates. Versatile intermediates in the synthesis of nucleotides and their analogues, *Trends in Org. Chem.*, **10**, 1-19 (2003).
46. Cieslak, J., Sobkowski, M., Jankowska, J., Wenska, M., Szymczak, M., Imiolczyk, B., Zagorowska, I., Shugar, D., Stawinski, J., Kraszewski, A., Nucleoside phosphate analogues of biological interest, and their synthesis via aryl nucleoside H-phosphonates as intermediates, *Acta Biochimica Pol.*, **48**, 429-442 (2001).
47. Stawinski, J., Stromberg, R., Thelin, M., Some Chemical and Stereochemical Aspects of Ribonucleoside H-Phosphonate and H-Phosphonothioate Diester Synthesis, *Nucleosides Nucleotides*, **10**, 511-514 (1991).
48. Battistini, C., Brasca, M.G., Fustinoni, S., High stereoselectivity in the formation of the inter-ribonucleotidic phosphorothioate bond, *Nucleosides Nucleotides*, **10**, 723-725 (1991).