

**Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu**



Rozprawa doktorska

**Nukleozydo Boranofosfoniany – Badania Mechanistyczne
i Syntetyczne**

Mgr Justyna Gołębiewska

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Stawiński

Promotor pomocniczy: Dr Joanna Romanowska

Poznań 2020

Pracę tę dedykuję Rodzicom

Serdecznie dziękuję **prof. dr. hab. Jackowi Stawińskiemu** za zaangażowanie
i nieocenioną pomoc w realizacji niniejszej pracy.
Dziękuję za przekazaną wiedzę i doświadczenie, za ogromne wsparcie i życzliwość,
na którą zawsze mogłam liczyć.

Serdeczne podziękowania składam również:

Dr Joannie Romanowskiej, dzięki której moja przygoda w Instytucie się zaczęła oraz za wszystkie mile spędzone chwile,

Prof. dr. hab. Adamowi Kraszewskiemu oraz **Prof. dr. hab. Michałowi Sobkowskemu**, za cenne rady oraz codzienną życzliwość,

Marcie Rachwałak i **Tomkowi Jakubowskiemu**, za niezliczone chemiczne dyskusje, za uśmiech, pomoc i cały ten czas spędzony razem!

Wszystkim **Pracownikom Biomolekularnego NMR i Pracowni NMR**, za codzienną życzliwość, tworzenie miłej atmosfery, a przede wszystkim za uruchomienie borowego NMR, co niezmiernie ułatwiło moją pracę badawczą,

Wszystkim zaprzyjaźnionym **Doktorantom**, za wspólnie spędzony czas na nauce, rozmowach i wspólnych wyjściach,

Wszystkim **Pracownikom Instytutu Chemii Bioorganicznej**, z którymi miałam przyjemność pracować,

Mojej Rodzinie i Jackowi, za wiarę we mnie i okazane wsparcie!

Streszczenie

Nukleozydo Boranofosfoniany – Badania Mechanistyczne i Syntetyczne

Nukleozydo boranofosfoniany stanowią ważną klasę analogów nukleotydów, w których jeden z niemostrkowych atomów tlenu został zastąpiony grupą boranową. Podobieństwo strukturalne nukleozydo boranofosfonianów do naturalnych nukleotydów oraz ich wyższa trwałość w medium komórkowym czynią je wyjątkowo użytecznymi w badaniach biologicznych. W przeciwieństwie do ich właściwości chemicznych i biologicznych, reaktywność samej grupy boranowej w tych związkach jak dotąd jest bardzo mało poznana. Z punktu widzenia chemii, modyfikowanie i prowadzenie przekształceń w obrębie tej grupy otwiera nowe możliwości wykorzystania pochodnych boranofosfonianów, np. jako grupy maskujące lub markery chemiczne dla post-syntetycznych modyfikacji oligonukleotydów, czy też nowy rodzaj farmakoforów. Z tych między innymi powodów zainteresowałam się tą klasą związków i celem mojej pracy doktorskiej stało się przebadanie reaktywności grupy boranowej nukleozydo boranofosfonianów w warunkach utleniających wobec szerokiego spektrum *N*-nukleofili, do których związki te wykazują szczególnie wysokie powinowactwo.

Przeprowadzone badania pozwoliły mi na ustalenie poprawnej stereochemii reakcji przekształcania nukleozydo boranofosfonianów w amidofosforany z aminami 1° i 2° w obecności jodu oraz zaproponowanie nowego mechanizmu tej reakcji, wyjaśniającego wszystkie fakty eksperymentalne. Badałam również reakcję boranofosfoniano diestrów z aminami 3° i heterocyklicznymi wobec jodu, które prowadziły do modyfikacji na centrum borowym z utworzeniem motywu strukturalnego P-B-N. Pokazałam, że obie reakcje zachodzą prawdopodobnie wg wspólnego mechanizmu, a o tworzeniu się różnych produktów decydowała trwałość wiązania P-B w związku pośrednim, odpowiednim aminoboranofosfonianie. Szczegółowe eksperymenty z użyciem różnych rozpuszczalników dały dodatkowy wgląd w mechanizm badanych reakcji i pokazały, że rodzaj użytego rozpuszczalnika ma kluczowe znaczenie dla reaktywności boranofosfonianów. Udało mi się zidentyfikować i poznać reaktywność nowych, dotąd nieopisanych w literaturze pochodnych boranofosfonianów, np. jodoboranofosfonianów, adduktów z acetonitrylem (ACN- λ^3 -boranofosfonian), z tetrahydrofuranem (THF- λ^3 -boranofosfonian). Wykazałam również, że istnieje możliwość dalszego modyfikowania adduktów amin z boranofosfonianami na centrum boranowym i otrzymałam pierwszą taką pochodną, boranofosfonian diester z dwiema cząsteczkami pirydyny na centrum boranowym.

Podsumowując, badania jakie przeprowadziłam w ramach mojej pracy doktorskiej pozwoliły na odkrycie nowych możliwości syntetycznych boranofosfonianów, zarówno w aspekcie formalnego podstawienia grupy $-BH_3$ inną grupą atomów jak i w funkcjonalizacji samej grupy boranowej. Badania mechanistyczne umożliwiły lepsze poznanie i zrozumienie reaktywności boranofosfonianów względem różnego rodzaju *N*-nukleofili i w konsekwencji, dostarczyły również cennych wskazówek syntetycznych. Uważam, że zdobyta wiedza ma dużą wartość poznawczą i może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań podstawowych nad tą klasą związków oraz projektowaniem analogów boranofosfonianów z nowymi motywami strukturalnymi, o potencjalnym znaczeniu biologicznym, a nawet terapeutycznym.

Summary

Exploring Nucleoside Boranephosphonate Chemistry – Mechanistic and Synthetic Studies

Nucleoside boranephosphonates are an important class of nucleotide analogues in which one of the non-bridging oxygen atom has been replaced by a borane moiety (-BH₃). The significant structural similarity to natural nucleotides and their higher stability in the cell medium make these analogues extremely useful in biological research. In contrast to their chemical and biological properties, reactivity of the borane group itself in these compounds has been poorly explored so far. From the chemistry point of view, modifying and carrying out transformations within this group opens new possibilities for application of boranephosphonate derivatives, *e.g.*, as masking groups, chemical markers in post-synthetic modifications of oligonucleotides, or a new type of pharmacophores. These stimulated my interest in this class of compounds and ultimately, the reactivity of the borane group of nucleoside boranephosphonate under oxidative conditions with diverse *N*-nucleophiles became subject of my PhD thesis.

Using a stereochemical correlation analysis I determined the correct stereochemistry of the transformation of nucleoside boranephosphonates into phosphoramidates with 1° and 2° amines in the presence of iodine, and proposed a new mechanism for this reaction, consistent with all the experimental data. I also studied the reaction of boranephosphonate diesters with 3° and heteroaromatic amines in the presence of iodine, which led to a modification on the boron center in the form of the P-B-N bond system. I have shown that both reactions most probably occur *via* a common mechanism involving the same initial reaction steps and that formation of different products was determined by stability of the P-B bond in the intermediate compound, a corresponding aminoboranephosphonate. An additional insight into the mechanism provided experiments with differing solvents, which showed that the type of solvent used was crucial for the reactivity of boranephosphonates. I was able to identify and study the reactivity of new, so far not reported in the literature, boranephosphonate derivatives *e.g.*, iodoboranephosphonate, adducts with acetonitrile (ACN-λ³-boranophosphonate), and tetrahydrofuran (THF-λ³-boranophosphonate). I have also demonstrated that it is possible to further modify adducts of amines with boranephosphonates at the borane center, and I have synthesized a boranephosphonate diester with two pyridine molecules at the borane center, as the first example of such derivatives.

To sum up, the research that I have carried out as a part of my doctoral thesis allowed me to discover new synthetic possibilities of boranephosphonate, both in the aspect of a formal substitution of the -BH₃ group with another group of atoms and in the functionalization of the borane group itself. The mechanistic studies helped to get deeper understanding of reactivity of boranephosphonate towards various types of *N*-nucleophiles that was also of synthetic importance. I believe that the acquired knowledge has a high cognitive value and can be a starting point for further basic research on this class of compounds and on the design of new boranephosphonate analogues of potential biological or therapeutic significance.

Dorobek naukowy

Lista publikacji:

1. Nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfoniany – metody syntezy i wybrane właściwości biologiczne,
Gołębiewska J.
Wiadomości Chemiczne, **2020**, 74, 9-10, (praca przyjęta do druku).
 2. Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and Mechanistic Studies,
Gołębiewska J., Stawinski J.
J. Org. Chem., **2020**, 85, 4312.
 3. Aryl H-phosphonates 19. New anti-HIV pronucleotide phosphoramidate diesters containing amino- and hydroxypyridine auxiliaries
Romanowska J., Kołodziej K., Sobkowski M., Rachwałak M., Jakubowski T.,
Gołębiewska J., Kraszewski A., Boryski J., Dąbrowska A., Stawiński J.
Eur. J. Med. Chem. **2019**, 164, 47-58.
 4. Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives
Gołębiewska J., Rachwałak M., Jakubowski T., Romanowska J., Stawiński J.
J. Org. Chem., **2018**, 83, 5496-5505.
 5. Nukleozydo 5'-difosforany i ich analogi – synteza i wybrane właściwości biologiczne
Rachwałak M., Roźniewska M., Gołębiewska J., Jakubowski T., Dąbrowska A., Romanowska J.
Na Pograniczu Chemii i Biologii, **2018**, tom XXXVII, 211-220.
 6. Strategie w projektowaniu pronukleotydów anty-HIV
Piosik M., Gołębiewska J., Romanowska J.
Na Pograniczu Chemii i Biologii, **2014**, XXXII, 81-106.
 7. Zgłoszenie patentowe: „Nowy analog nukleozydo difosforanu, kompozycja farmaceutyczna zawierająca analog nukleozydo difosforanu, jego zastosowanie i sposób syntezy”
Romanowska J., Gołębiewska J., Rachwałak M., Jakubowski T.,
P.422 415, 31.07.2017.
-

Udział w projektach badawczych:

1. Preludium 16
„Exploring second generation of nucleotide analogues containing phosphoranesulfen- or phosphoraneselenamides as new structural motives”
nr 2018/31/N/ST5/03589, data rozpoczęcia 30.08.2019
charakter udziału: kierownik i wykonawca
2. Grant MNiSW dla młodych naukowców i doktorantów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN
„Boranofosfoniany diestry - badania nad reaktywnością grupy boranowej z N-nukleofilami w obecności różnych czynników utleniających”,
nr 24/SN/2018, lata realizacji 2018- 2019
charakter udziału: kierownik i wykonawca
3. Grant Lider 4
"Nukleozydo difosforany - nowatorska koncepcja pro-nukleotydów anti-HIV",
nr LIDER/041/711/L-4/12/NCBR/2013, lata realizacji 2014-2018
charakter udziału: wykonawca

Wystąpienie ustne na konferencjach:

1. J. Gołębiewska, J. Stawinski
„Analogi nukleotydów drugiej generacji”
III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów,
7.12.2019r Poznań
 2. J. Gołębiewska, M. Rachwalak, T. Jakubowski, J. Stawinski
„How amines replace a borane moiety in boranephosphonates? Mechanistic studies on the formation of phosphoramidate diesters”;.
International Conference on Phosphorus, Boron and Silicon (PBSi), **10-12.12.2018r Barcelona**
 3. J. Gołębiewska, J. Romanowska
„Chemia H-fosfonianów w syntezie siarkowych i selenowych analogów nukleozydo 5'-difosforanów”
59. PTChem, **19-23.09.2016r Poznań**
-

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z następujących części:

Opis wyników pracy doktorskiej	1
Wprowadzenie	2
Cel pracy	4
Skrótowy opis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej...	5
Podsumowanie	25
Bibliografia	28
Publikacje wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej	30

1. Nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfoniany – metody syntezy i wybrane właściwości biologiczne.
Gołębiewska J.
Wiadomości Chemiczne, **2020**, 74, 9-10, (praca przyjęta do druku).
2. Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives.
Gołębiewska J., Rachwałak M., Jakubowski T., Romanowska J., Stawinski J.
Journal of Organic Chemistry, **2018**, 83, 5496.
3. Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and Mechanistic Studies.
Gołębiewska J., Stawinski J.
Journal of Organic Chemistry, **2020**, 85, 4312.

Oświadczenia współautorów

OPIS WYNIKÓW PRACY DOKTORSKIEJ

Wprowadzenie

Kwasy nukleinowe (DNA, RNA) to nośniki informacji genetycznej, które zawierają zakodowane dane decydujące o przebiegu wszelkich procesów życiowych i funkcjonowaniu każdego organizmu, począwszy od jednokomórkowych bakterii po złożone zespoły komórkowe tworzące funkcjonalną całość jak rośliny czy zwierzęta. Nukleotydy, które stanowią podstawowe elementy strukturalne kwasów nukleinowych, stały się obiektami ogromnego zainteresowania biochemii od chwili rozwiązania przez Watsona i Cricka w 1953 r. struktury podwójnej helisy DNA. Od tego czasu prowadzone są intensywne badania nie tylko nad poznaniem i zrozumieniem procesów związanych z ekspresją informacji genetycznej zawartej w tych biopolimerach ale również nad analogami nukleotydów i wpływem chemicznych modyfikacji na zmiany funkcji fragmentów lub całych cząsteczek DNA lub RNA. Badania te są obecnie ukierunkowane przede wszystkim na potencjalne wykorzystanie różnych analogów nukleotydów do projektowania nowych terapeutyków oraz diagnostyków medycznych. Na przykład, nukleozydo tiofosforany¹ czy nukleozydo metylofosfoniany² są wykorzystywane w terapiach anty-wirusowych, czy w rozwijających się w ostatnich latach strategiach antysensowej i siRNA (*short interfering RNA*)³ polegających na wyciszeniu ekspresji uszkodzonego genu. Zainteresowanie pochodnymi nukleotydów nieustannie rośnie ze względu na ich wysoki potencjał biologiczny. Poszukiwanie nowych, racjonalnie uzasadnionych modyfikacji tych cząsteczek jest przedmiotem badań prowadzonych przez wielu naukowców na świecie i stało się powodem podjęcia badań w tym obszarze również przeze mnie.

Obiektem moich zainteresowań badawczych w ramach wykonywanej pracy doktorskiej stały się nukleozydo boranofosfoniany. Związki te są przykładem modyfikowanych w części fosforanowej nukleotydów, w których jeden z niemoistkowych atomów tlenu został zastąpiony grupą boranową (-BH₃).

Autorami pierwszego doniesienia literaturowego dotyczącego syntezy nukleozydo boranofosfonianów była grupa amerykańskich naukowców (B. R. Shaw, A. Sood, B. F. Spilvogel)⁴, która na początku lat 90. XX wieku, zaproponowała tę klasę związków

jako nowy rodzaj analogów nukleotydów. Badania te w następnych latach były intensywnie rozwijane przez grupy badawcze B. R. Shaw⁵, T. Wady⁶ i M. Caruthersa⁷.

Nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfoniany wykazują niezwykle podobieństwo do naturalnych fragmentów kwasów nukleinowych w zakresie zdolności przepisywania i czytania z dużą precyzją i efektywnością informacji genetycznej⁸. Ponadto związki te charakteryzuje większa lipofilowość, znaczna stabilność hydrolityczna i odporność na działanie nukleaz w porównaniu z ich naturalnymi odpowiednikami. Właściwości te sprawiły, że boranofosfoniany stały się atrakcyjnym celem badawczym w projektowaniu różnych biologicznie aktywnych połączeń, a w szczególności w projektowaniu związków przeciwwirusowych i pro-leków. Na przestrzeni ostatnich lat, ta klasa związków była często używana w pracach biochemicznych i biologicznych, dając wyjątkowo interesujące wyniki i zachęcające do dalszych badań.

Mimo coraz większego zainteresowania nukleozydo boranofosfonianami, badania chemii tej klasy związków ograniczały się przede wszystkim do poszukiwania nowych, bardziej wydajnych metod ich syntezy. Dopiero w ostatnich latach zaczęto prowadzić badania nad reaktywnością samej funkcji boranowej nukleozydo boranofosfonianów. Funkcjonalizowanie tak unikalnego ugrupowania jakim jest grupa boranowa ($O=P-BH_3$), stanowi niezwykle interesujące i ważne zagadnienie, które może prowadzić do nowych zastosowań tak modyfikowanych związków. Co więcej, wprowadzanie różnego rodzaju modyfikacji właśnie przy atomie fosforu łańcucha oligonukleotydowego wydaje się być niezwykle korzystne ze względów sterycznych. Reszty fosforanowe ułożone po zewnętrznej stronie podwójnej helisy DNA umożliwiają kontakt z białkami i różnego rodzaju enzymami. Miejsce to jest również wygodne dla wprowadzania strukturalnych modyfikacji lub różnego rodzaju markerów chemicznych, wykorzystywanych do post-syntetycznej modyfikacji kwasów nukleinowych.

Badania nad reaktywnością grupy boranowej w boranofosfonianach i poznanie możliwości jakie stwarza chemiczna funkcjonalizacja obudziły moje zainteresowanie tą klasą związków i w konsekwencji stały się przedmiotem mojej pracy doktorskiej.

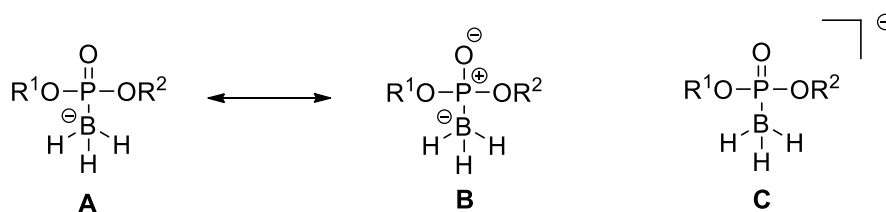
Cel pracy

Głównym celem mojej pracy doktorskiej były badania reaktywności funkcji boranowej nukleozydo boranofosfonianów wobec szerokiego spektrum, zróżnicowanych strukturalnie *N*-nukleofili w warunkach utleniających. Obejmowały one:

- I. Badania mechanistyczne nad formalnym podstawieniem grupy boranowej funkcją aminową w boranofosfonianach w warunkach utleniających, gdy użytym nukleofilem była 1° lub 2° amina.
- II. Badania mechanistyczne tworzenia pochodnych z motywem strukturalnym P-B-N w czasie utleniania boranofosfonianów w obecności heteroaromatycznych i 3° amin.
- III. Badania wpływu rodzaju użytego rozpuszczalnika na przebieg reakcji utleniania boranofosfoniano diestrów w różnych warunkach reakcyjnych.
- IV. Badania trwałości i podatności na dalsze utlenianie powstałych adduktów amina- λ^3 -boranofosfonian.
- V. Badania spektrum substratowego reakcji tworzenia pochodnych P-B-N pod względem rodzaju użytej aminy (czynniki strukturalne i elektronowe).

Skrótowny opis publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej

Zaczynając opis prowadzonych przeze mnie badań, na wstępie chciałabym wyjaśnić kwestię nazewnictwa badanej przeze mnie klasy związków. W literaturze stosowane i akceptowane są dla niej dwie nazwy, mianowicie boranofosfoniany oraz boranofosforany. Ponieważ zgodnie z nomenklaturą związków fosforu, połączenia zawierające atom fosforu związany z atomem o niskiej elektroujemności określa się mianem fosfonianów, dlatego nazwa boranofosfoniany wydaje się być bardziej poprawna i jednocześnie wskazuje na III stopień utlenienia atomu fosforu. Odnośnie graficznej prezentacji boranofosfonianów, połączenie między atomem fosforu a atomem boru w tych związkach ma formalnie charakter wiązania koordynacyjnego, powstałego w wyniku donowania wolnej pary elektronowej zlokalizowanej na atomie fosforu anionu fosfonianowego na pusty orbital p atomu boru grupy BH_3 . Formalny ładunek ujemny jest przypisany do atomu boru (struktura **A**, Schemat 1), mimo że w rzeczywistości zdelokalizowany jest on na atomach wodoru grupy boranowej, nadając im częściowo charakter jonów wodorkowych. Strukturę **A** można również przedstawić w postaci formy mezoemerycznej **B**⁹⁻¹⁰ (struktura **B**, Schemat 1). Schemat 1 przedstawia niektóre formy graficznego przedstawienia struktury boranofosfonianów spotykane w literaturze.



$\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{alkil, aryl, nukleozyd}$

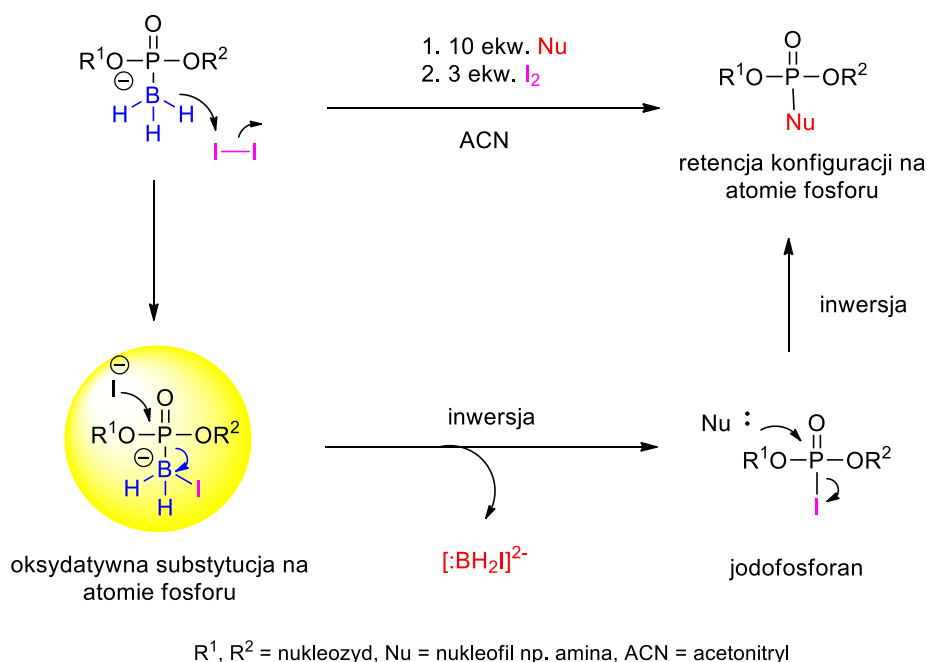
Schemat 1. Możliwości przedstawienia struktury boranofosfonianów.

W ciągu ostatnich dziesięcioleci chemicy próbowali opracować skuteczne metody wprowadzenia funkcji boranowej ($-\text{BH}_3$) do ugrupowania fosforanowego nukleotydów i oligonukleotydów. Pierwsza z publikacji wchodzących w skład mojej rozprawy doktorskiej, „Nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfoniany – metody syntezy i wybrane właściwości biologiczne” (*Wiadomości Chemiczne*, 2020), stanowi krótki przegląd literaturowy różnych metod wprowadzania motywu strukturalnego

boranofosfonianu za pomocą metody amidofosforynowej, strategii H-fosfonianowej lub poprzez zastosowanie dedykowanych odczynników boranofosfonylujących. W pracy tej przedstawiłam również opracowane metody chemicznej i enzymatycznej syntezy analogów oligonukleotydów zawierających stereozdefiniowane boranofosfonianowe wiązania internukleotydowe. Ostatnia część pracy poświęcona jest wybranym właściwościom biologicznym nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfonianów, m.in., ich odporności na działanie enzymów nukleolitycznych, interakcji z różnymi enzymami związanymi z regulacją ekspresji genów, itp., które czynią te związki atrakcyjnym narzędziem do badań molekularnych podstaw procesów biologicznych i są ważne w aspekcie projektowania nowych terapeutyków i diagnostyków medycznych.

Badania nad reaktywnością samej funkcji boranowej nukleozydo boranofosfonianów i możliwościami jej modyfikacji, stanowią nowy rozdział w chemii tej klasy związków. Zapoczątkowane zostały w 2015 roku dwiema publikacjami Caruthersa *et al.*¹¹⁻¹², w których przedstawiono możliwości użycia boranofosfonianów jako chemicznych markerów do post-syntetycznej modyfikacji kwasów nukleinowych. Prace te wzbudziły moje zainteresowania chemią boranofosfonianów i zachęciły do podjęcia badań mających na celu poznanie podatności ugrupowania boranowego w tych analogach nukleotydowych na dalszą funkcjonalizację.

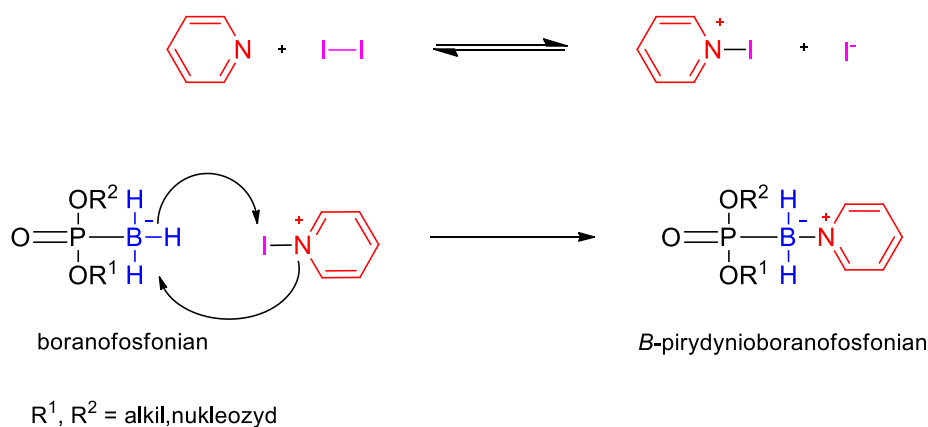
W pierwszej pracy Caruthersa *et al.*¹¹. dotyczącej reaktywności grupy boranowej nukleozydo boranofosfonianów, opublikowanej w renomowanym czasopiśmie naukowym (*Journal of the American Chemical Society*), zostały opisane przekształcenia tych związków w odpowiednie analogi fosforanów, np. amidofosforany, tiofosforany i C-fosfoniany. Reakcje były stereospecyficzne, a produkty tworzyły się, według autorów, z całkowitą retencją konfiguracji na atomie fosforu. Metoda ta została przedstawiona jako wydajna droga wprowadzania post-syntetycznych modyfikacji na centrach fosforowych łańcucha DNA. Zaproponowany mechanizm dla tego przekształcenia (Schemat 2) zakładał jako kluczowy etap rozerwanie wiązania fosfor-bor jako nowy typ reaktywności boranofosfonianów, nazwany przez autorów oksydatywną substytucją nukleofilową na atomie fosforu.



Schemat 2. Zaproponowany przez Caruthersa *et al.*¹¹ mechanizm przekształcania boranofosfonianów w amidofosforany.

Chociaż na pierwszy rzut oka możliwy, główny etap tego mechanizmu (oksydatywna substytucja nukleofilowa) budził nasze wątpliwości z co najmniej trzech powodów. Po pierwsze, grupą opuszczającą w zaproponowanym mechanizmie byłby dianion borylowy $[:BH_2I]^{2-}$, niosący ze sobą dwa ładunki ujemne i posiadający dodatkowo wolną parę elektronową. Wydawało się być mało prawdopodobne aby takie indywiduum chemiczne mogło być dobrą grupą opuszczającą. Po drugie, wątpliwości budził rodzaj atakującego nukleofila, a mianowicie, anion jodkowy. Zgodnie z teorią twardych i miękkich kwasów i zasad (HSAB), jodki nie są dobrymi nukleofilami dla twardego centrum elektrofilowego, jakim jest atom fosforu. Po trzecie, ujemnie naładowane centrum fosforowe boranofosfonianu z pewnością utrudniałoby atak ujemnie naładowanego nukleofila, co przekładałoby się na wysoką energię aktywacji (reakcja nie zachodziłaby łatwo). Powyższe wątpliwości co do poprawności mechanizmu tego etapu syntezy były o tyle ważne, gdyż stawiały pod znakiem zapytania stereochemię całego procesu, w tym konfigurację na atomie fosforu finalnego produktu reakcji, odpowiedniego amidofosforanu (postulowana retencja konfiguracji). Kolejna praca z tego samego laboratorium dotyczyła reakcji boranofosfoniano diestrów z pirydyną¹² w obecności jodu. Autorzy oczekiwali, że pirydyna i różnego rodzaju heteroaromatyczne aminy będą reagować podobnie z boranofosfonianami jak 1° i 2°

aminy, dając jodofosforany, a z nich reaktywne amidofosforanowe pochodne (tzw. addukty pirydyniowe), potencjalnie użyteczne w syntezie oligonukleotydów. Okazało się jednak, że w przypadku pirydyny (i innych amin 3°), nie następowało oczekiwane rozrywanie wiązania P-B, jak to miało miejsce dla 1° i 2° amin, lecz powstawały związki z ugrupowaniem P-B-N (np. *B*-pirydynioboranofosfoniany). Ze względu na tworzenie się różnych produktów, autorzy zaproponowali dla tej reakcji nowy mechanizm, inny niż ten opisany wyżej dla 1° i 2° amin. Zakładał on tworzenie kompleksu pirydyna-jod, który następnie w wyniku jednoetapowej czterocentrowej reakcji z boranofosfoniano diestrem dawał finalny produkt, *B*-pirydynioboranofosfonian jako główny produkt (Schemat 3).



Schemat 3. Zaproponowany przez Caruthersa et al.¹² mechanizm tworzenia pochodnych zawierających wiązanie P-B-N.

Biorąc pod uwagę, że aminy alifatyczne są bardziej zasadowe w porównaniu z pirydyną i również mogą tworzyć kompleksy z jodem, zastanawiające było, dlaczego w przypadku amin alifatycznych reakcja z boranofosfonianami w obecności jodu miałyby zachodzić wg innego mechanizmu. Wyprzedzając nieco dyskusję na ten temat, moje badania pokazały, że reakcje z rozerwaniem wiązania P-B i te, w których to wiązanie zostaje zachowane (tworzenie pochodnych P-B-N), stanowią szczególne przypadki tego samego mechanizmu, jeśli chodzi o utlenianie grupy boranowej boranofosfonianów.

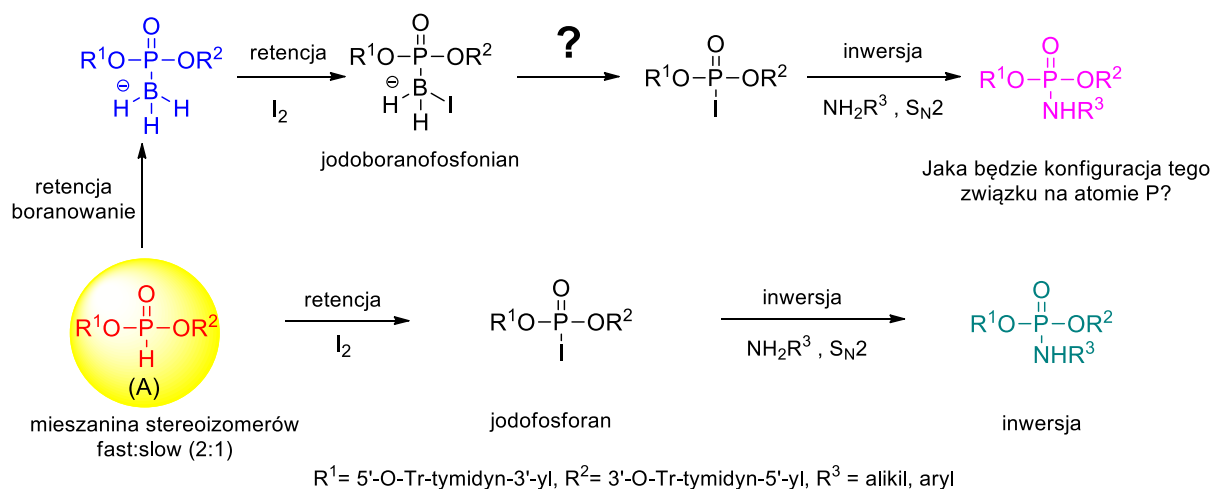
Wątpliwości i dyskusje jakie wzbudziły w naszym laboratorium powyższe prace oraz zainteresowania naszej grupy badawczej boranofosfonianami jako potencjalnymi terapeutykami¹³⁻¹⁴ sprawiły, że właśnie ten obszar chemii boru i fosforu stał się dla mnie niezwykle interesujący, a powyższe zagadnienia mechanistyczne, tematem mojej pracy doktorskiej.

Pierwszym, ważnym etapem prowadzonych przeze mnie badań było sprawdzenie czy wątpliwości, jakie budził w nas zaproponowany w literaturze mechanizm dla reakcji przekształcania boranofosfonianów w amidofosforany (Schemat 1), znajdzie eksperymentalne potwierdzenie. Zanim zaczęłam rozważać różne opcje mechanistyczne dla etapu oksydatywnej nukleofilowej substytucji, postanowiłam sprawdzić, czy postulowana stereochemia całego przekształcenia (retencja konfiguracji) była poprawna. Było to o tyle ważne, gdyż nasze wątpliwości budziło również przypisanie absolutnej konfiguracji finalnego dinukleozydo (3'-5') amidofosforanu (co miałyby wpływ na stereochemię całego procesu) za pomocą spektroskopii jądrowego efektu Overhausera (eksperyment NOESY). Najbardziej wiarygodnym sposobem sprawdzenia stereochemii badanej reakcji wydawała się być analiza stereochemiczna produktu omawianej reakcji, tj. dinukleozydo amidofosforanu, i jego porównanie z analogicznym produktem, ale otrzymanym na innej, stereochemicznie zdefiniowanej ścieżce syntetycznej.

W tym celu zaprojektowałam schemat stereochemicznej analizy korelacyjnej (Schemat 4) w którym związkiem centralnym był modelowy dinukleozydo (3'-5') H-fosfonian A. Związek ten umożliwiał syntezę odpowiedniego dinukleozydo amidofosforanu na dwóch niezależnych drogach: oksydatywnej kondensacji z wybraną aminą lub, po przeprowadzeniu w odpowiedni boranofosfonian, utlenieniu wobec tej samej aminy (badana reakcja). Do reakcji użyłam mieszaninę 1:2 diastereomerów dinukleozydo H-fosfonianu A, którą poddałam oksydatywnej kondensacji z *n*-butyloaminą, w acetonitrylu, w obecności elementarnego jodu. Jest to dobrze znana w chemii H-fosfonianów stereospecyficzna reakcja, w wyniku której otrzymany produkt, w tym wypadku amidofosforan, tworzy się z całkowitą inwersją konfiguracji na atomie fosforu¹⁵⁻¹⁷.

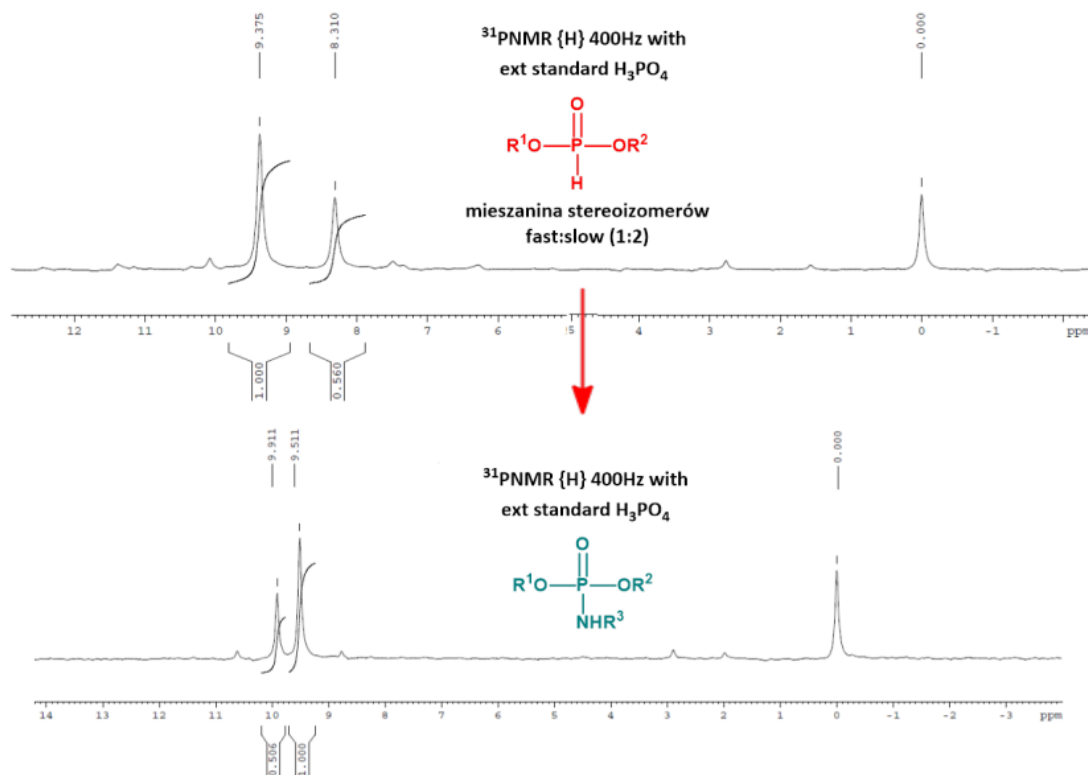
Tę samą mieszaninę P-diastereomerów dinukleozydo H-fosfonianu A poddałam również reakcji boranowania (etap ten zachodzi z retencją konfiguracji na atomie fosforu), otrzymując zdefiniowaną stereochemicznie mieszaninę izomerów dinukleozydo boranofosfonianu. Tak przygotowany substrat w następnym etapie został poddany reakcji z *n*-butyloaminą i jodem według procedury opisanej w literaturze (badana reakcja). Schematy 5a i 5b przedstawiają widma ³¹P NMR substratów i produktów reakcji

oksydatywnej kondensacji A z aminą i badanej reakcji odpowiedniego boranofosfonianu z aminą wobec jodu.

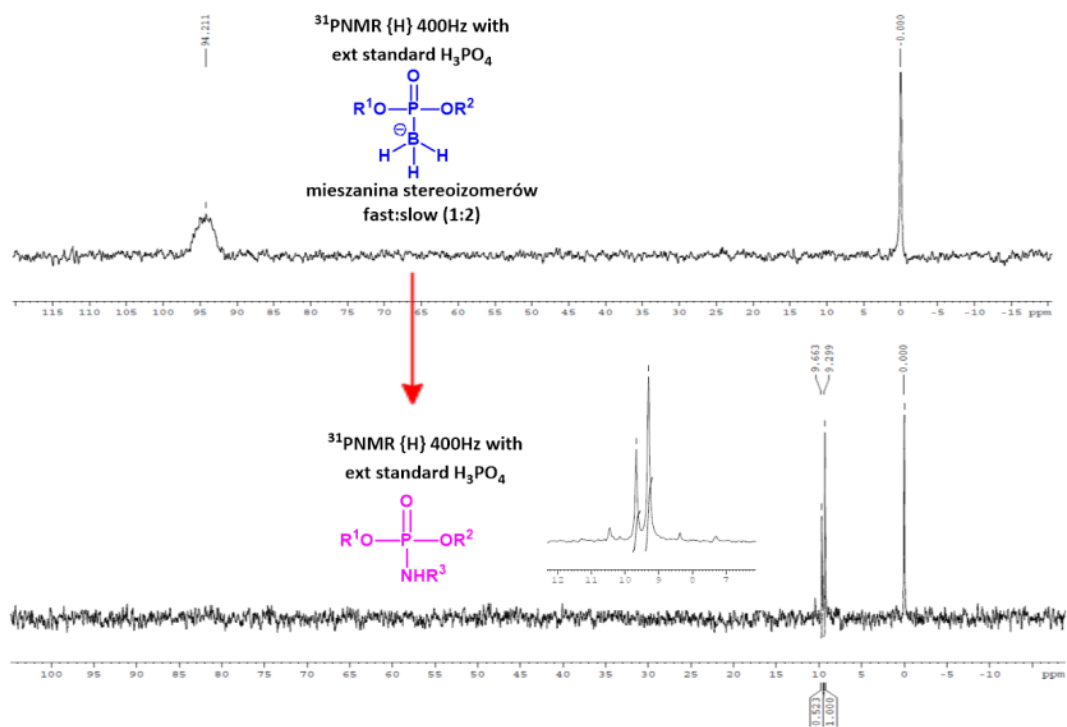


Schemat 4. Plan stereochemicznej analizy korelacyjnej dla amidofosforanu otrzymanego przez boranofosfonian.

Taki sam układ sygnałów w widmach ^{31}P NMR produktów obu reakcji jednoznacznie wskazywał na powstawanie takich samych mieszanin P-diastereomerów amidofosforanu, a więc na taką samą stereochemię obu reakcji (Schemat 5a i 5b). Ponieważ stereochemia oksydatywnej kondensacji H-fosfonianów z aminami jest znana i zachodzi z inwersją konfiguracji na atomie fosforu, więc również reakcja przekształcania boranofosfonianów w amidofosforany musi zachodzić z całkowitą inwersją konfiguracji, a nie z retencją konfiguracji jak to było postulowane w literaturze. To stwierdzenie, poza korektą błędnie przypisanej konfiguracji finalnego produktu, miało również fundamentalne znaczenie dla mechanizmu badanej reakcji. Ponieważ w zaproponowanej analizie korelacyjnej stereochemia tylko jednego etapu (oznaczony znakiem zapytania na Schemacie 4) była nieznana, inwersja konfiguracji na atomie fosforu całego procesu wskazywała, że etap ten musi zachodzić z retencją, a nie z inwersją konfiguracji. Potwierdziło to słuszność naszych wątpliwości przypisywania temu etapowi mechanizmu typu S_N2 , implikującemu inwersję konfiguracji. W tej sytuacji powstało pytanie: według jakiego mechanizmu może zachodzić formalne podstawienie grupy jodoboranowej jodem, aby zgodnie z otrzymanymi danymi eksperymentalnymi zachodził on z retencją konfiguracji na atomie fosforu?

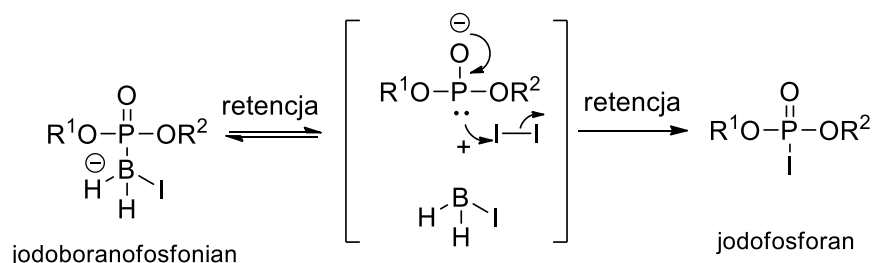


Schemat 5a. Widma ^{31}P NMR substratów i produktów z eksperymentu stereochemicznej analizy korelacyjnej dla dinukleozydowego H-fosfonianu A.



Schemat 5b. Widma ^{31}P NMR substratów i produktów z eksperymentu stereochemicznej analizy korelacyjnej dla dinukleozydowego boranofosfonian, otrzymanego z H-fosfonianu A.

Ponieważ boranofosfoniany można traktować jako kompleksy anionu fosfonianowego z boranem założyłam, że przy labilizacji wiązania P-B (np. poprzez utworzenie jodoboranofosfonianu) może następować spontaniczna dysocjacja takiego kompleksu z odtworzeniem anionu fosfonianowego, który w warunkach reakcyjnych ulegałby natychmiastowemu utlenianiu do jodofosforanu. Ponieważ dysocjacja kompleksu powinna zachodzić z retencją konfiguracji na atomie fosforu (odwrotność procesu tworzenia się boranofosfonianu), a utlenianie anionu fosfonianowego zachodzi również z retencją konfiguracji, całkowita stereochemia tego przekształcenia byłaby zgodna z wymaganą retencją na centrum fosforowym. Taki mechanizm przedstawia Schemat 6.



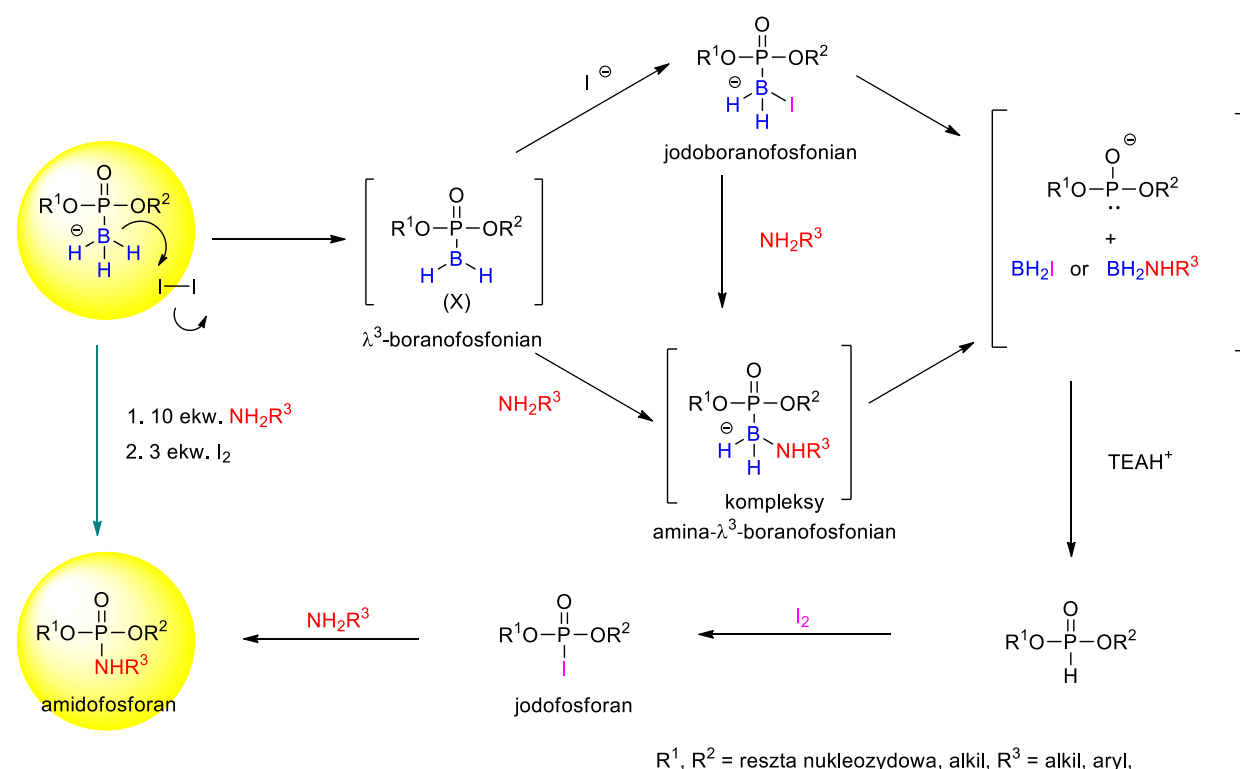
Schemat 6. Zaproponowany mechanizm dla przekształcenia jodoboranofosfonianu w odpowiedni jodofosforan zachodzący z retencją konfiguracji na atomie fosforu.

Ważnym punktem tego mechanizmu było utlenianie jodem utworzonego anionu fosfonianowego, co implikowało zużycie 2 ekw. jodu i tłumaczyło fakt dlaczego ekwimolarne ilości jodu postulowane w oryginalnym mechanizmie, były w naszych rękach niewystarczające do całkowitego przekształcenia boranofosfonianu w odpowiedni amidofosforan.

Dostarczenie dowodów eksperymentalnych potwierdzających zaproponowany mechanizm okazało się dość trudnym zadaniem, gdyż cały proces przekształcenia boranofosfonianu w odpowiedni amidofosforan zachodził bez tworzenia się produktów przejściowych możliwych do zarejestrowania w widmach ^{31}P NMR. Ponieważ zaproponowany mechanizm implikował tworzenie się anionu fosfonianowego, podjęłam próbę uwiarygodnienia tego procesu, ponad uzasadnione wątpliwości, poszukując dowodów na tworzenie się H-fosfonianów jako produktów pośrednich. Badania te, wraz z wspomnianą wyżej stereochemiczną analizą korelacyjną stanowiły treść drugiej publikacji „Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of

Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives” *Journal of Organic Chemistry* (2018)¹⁸.

W trakcie tych badań, wykonując eksperymenty w różnych warunkach, udało mi się zaobserwować tworzenie się diestrów H-fosfonianów i pokazać, że mogą być one produktami pośrednimi w badanej reakcji. Było to kluczowym elementem dla wyjaśnienia prawidłowej stereochemii tworzenia się dinukleozydo amidofosforanu, co finalnie pozwoliło na zaproponowanie nowego mechanizmu dla dyskutowanej reakcji (Schemat 7).

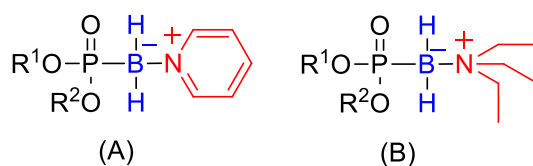


Schemat 7. Nowy mechanizm dla reakcji przekształcania boranofosfonianów w amidofosforany.

Najważniejszymi etapami tego mechanizmu są: (i) tworzenie silnie elektrofilowego λ^3 -boranofosfonianu X, który może koordynować różne nukleofile obecne w medium reakcyjnym, oraz (ii) pęknięcie wiązania P-B z utworzeniem anionu fosfonianowego, lub bardziej prawdopodobnie, H-fosfonianu. Ten ostatni proces wymagał labilizacji wiązania fosfor-bor, w czym instrumentalne wydawało się być dokoordynowanie do grupy boranowej aminy, jako silnego donora elektronów na centrum boranowym. Powinno powodować to osłabienie wiązania P-B i ułatwiać oddysocjowanie części fosfonianowej. Zaproponowany mechanizm jest zgodny

z obserwowaną stereochemią procesu tworzenia się amidofosforanów z odpowiedniego boranofosfonianu, oraz wyjaśnia wyższe niż stechiometryczne zużycie jodu i aminy w tej reakcji.

W następnym etapie moich badań zajmowałam się reakcją boranofosfonianów z 3° i heteroaromatycznych aminami (np. pirydyny) w obecności jodu. Proces ten różnił się fundamentalnie od reakcji z 1° i 2° aminami, gdyż nie prowadził do rozerwania wiązania P-B, lecz do tworzenia produktów zawierających ugrupowanie P-B-N, np. adduktów pirydyna- λ^3 -boranofosfonian czy trietyloamina- λ^3 -boranofosfonian (odpowiednio A i B, Rys. 1), nazywanych również, odpowiednio, B-pirydynio- i B-amonioboranofosfonianami. Są to trwałe związki, które można izolować za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym. Badania nad mechanizmem powyższej reakcji i niektórymi właściwościami związków z wiązaniami P-B-N zostały opisane w 3. publikacji „Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and Mechanistic Studies”, *Journal of Organic Chemistry* (2020)¹⁹.



$\text{R}^1, \text{R}^2 =$ alkil lub reszta nukleozydowa

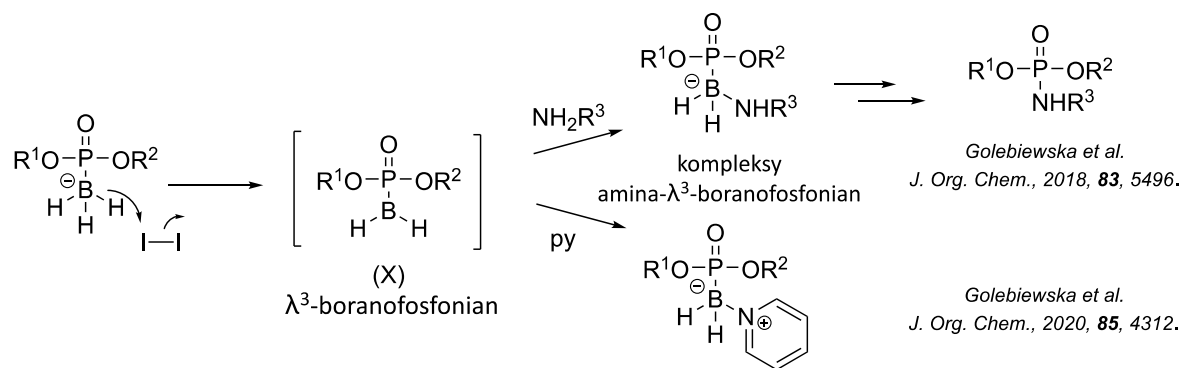
Rys. 1. Przykłady związków zawierających układ wiązań P-B-N.

Spektrum substratowe reakcji boranofosfonianów z 3° aminami jest dość szerokie a eksperymenty z wykorzystaniem spektroskopii ^{31}P NMR pokazywały wydajne tworzenie się ugrupowania P-B-N w reakcjach, np. z cyklicznymi i acyklicznymi 3° aminami, cyklicznymi amidynami (DBU, DBN), a nawet z zawadzonymi sterycznie pirydynami (2,6-lutydyna). Czynnikiem stabilizującym tego rodzaju połączenia jest prawdopodobnie istnienie formy betainowej ze znacznym udziałem *back donation*, dodatkowo stabilizującym wiązanie B-N. Aminy alifatyczne, jako lepsze σ -donory pary elektronowej (hybrydyzacja sp^3) w porównaniu do amin heteroaromatycznych (hybrydyzacja sp^2) tworzyły bardziej stabilne kompleksy amina- λ^3 -boranofosfonian, jednak ich syntezy nie przebiegały tak wydajnie jak w przypadku pirydyny.

Prawdopodobnie, reakcje uboczne amin z jodem i szybsze zużywanie się substratów były czynnikami wpływającymi na niższe wydajności tych pierwszych reakcji.

Jak wspominałam powyżej, ze względu na tworzenie się różnych produktów w reakcjach boranofosfonianów z 1° i 2° aminami vs aminy 3° i heteroaromatyczne w obecności jodu, Caruthers *et al.*¹¹⁻¹² proponowali dwa odrębne mechanizmy dla obu typów reakcji. To mechanistyczne zróżnicowanie wydawało się dość dziwne biorąc pod uwagę rolę, jaką pełnił jod w tej reakcji i moim zdaniem, wynikało raczej z błędnego mechanizmu przypisanemu reakcjom boranofosfonianów z 1° i 2° aminami, niż z konieczności poszukiwania mechanistycznego wyjaśnienia przebiegu reakcji boranofosfonianów z 3° aminami.

Postawiłam więc hipotezę, że początkowe etapy reakcji boranofosfoniano diestrów z aminami wobec jodu są takie same niezależnie od typu użytej aminy i polegają na utworzeniu silnie elektrofilowego λ^3 -boranofosfonianu X (Schemat 7), który koordynował obecną w medium reakcyjnym aminę tworząc kompleksy amina- λ^3 -boranofosfonian (Schemat 8). Dalszy los reakcji zależał natomiast od rodzaju i stabilności utworzonego kompleksu. Dla 1° i 2° amin były to aminoboranofosfoniany, w których obecność wolnej pary elektronowej na atomie azotu może destabilizować wiązanie P-B, prowadząc do rozpadu kompleksu z utworzeniem odpowiedniego H-fosfonianu, i po jego utlenieniu, do amidofosforanu. W przypadku 3° i heterocyklicznych amin, utworzone kompleksy amina- λ^3 -boranofosfonian były natomiast trwałe (struktura betainy, brak wolnej pary elektronowej na atomie azotu) i pozostawały końcowymi produktami reakcji (np. B-pirydynioboranofosfonian).



R^1, R^2 = alkil lub reszta nukleozydowa; R^3 = alkil lub aryl;

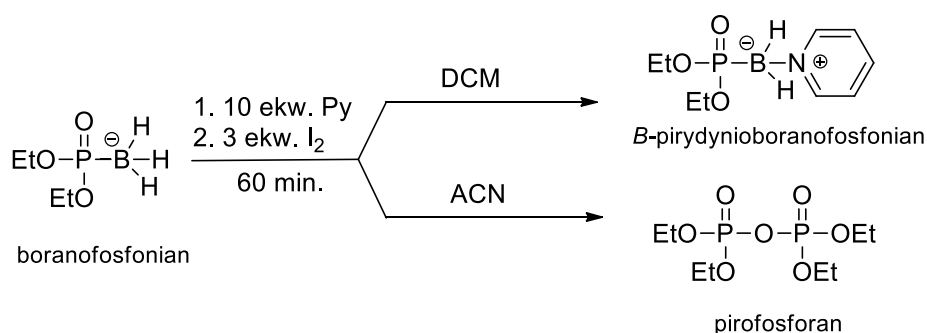
Schemat 8. Zaproponowany mechanizm reakcji boranofosfonianów z 1°, 2° i 3° aminami zachodzący przez λ^3 -boranofosfonian X jako związek przejściowy.

Mimo pozornej prostoty, reakcja ta okazała się być eksperymentalnie trudną. Głównymi problemami były niepowtarzalne czasem wyniki mimo dbałości o zachowanie takich samych warunków eksperymentalnych, uporczywe tworzenie się produktów ubocznych, duża czułość na rodzaj użytego rozpuszczalnika i stechiometrię reagentów. Ze względu na analogiczną reaktywność dietylowego i ditymidynowego boranofosfonianu, wybrałam ten pierwszy jako układ modelowy do moich badań, z uwagi na koszty i łatwość syntezy oraz prostsze do interpretacji widma NMR.

Biorąc pod uwagę zaproponowany na Schemacie 7 mechanizm, w którym kluczowym etapem na drodze syntezy adduktów amin z boranofosfonianami była pochodna X zawierająca triskoordynowany atom boru, pewne możliwe źródła obserwowanej niepowtarzalności badanej reakcji zaczęły być bardziej zrozumiałe. W pierwszej kolejności postanowiłam zbadać wpływ rodzaju użytego rozpuszczalnika na przebieg dyskutowanej reakcji. Ten czynnik wydawał się ważnym z przynajmniej dwóch względów. Po pierwsze, zakładając, że w reakcji zaangażowany jest związek pośredni z deficytem elektronów, λ^3 -boranofosfonian X, zdolność koordynacyjna lub właściwości donowania elektronów przez rozpuszczalnik mogą mieć szczególne znaczenie dla stabilizacji takich układów. Możliwości takie stwarzały np. acetonitryl lub tetrahydrofuran, ale nie dichlorometan. Po drugie, rozpuszczalnik może mieć duży wpływ na reaktywność jodu poprzez tworzenie kompleksów typu *charge transfer*. Przykładem tego ostatniego była ciemnofioletowa barwa roztworu jodu w dichlorometanie, która świadczyła o tym, że jod w tym rozpuszczalniku pozostawał w formie cząsteczkowej, podczas gdy brunatna barwa roztworu w acetonitrylu

wskazywała na tworzenie się kompleksów molekularnych, mogących modulować efektywność utleniania grupy boranowej. W świetle powyższego, oraz biorąc pod uwagę rozpuszczalność substratów, wybrałam dichlorometan (DCM) oraz acetonitryl (ACN) jako dwa różne typy rozpuszczalników w prowadzonych przeze mnie badaniach.

Standardowa procedura otrzymywania adduktów amina- λ^3 -boranofosfonian zakładała stosowanie trzykrotnego nadmiaru jodu oraz dziesięciokrotnego nadmiaru 3° aminy w stosunku do boranofosfonianu. W tych warunkach produktem reakcji w DCM był addukt pirydyna- λ^3 -boranofosfonian (^{31}P NMR, $\delta_{\text{P}} = 60$ ppm), który powstawał z wydajnością około 80% (pozostałe 20% to produkt uboczny, ^{31}P NMR, $\delta_{\text{P}} = 45$ ppm). Krańcowo duży wpływ rozpuszczalnika obserwowałam dla reakcji w ACN, która w odróżnieniu od tej w DCM, prowadziła do zupełnie innego produktu, tetraetylowego pirofosforan (^{31}P NMR, $\delta_{\text{P}} = -13$ ppm) (Schemat 9).

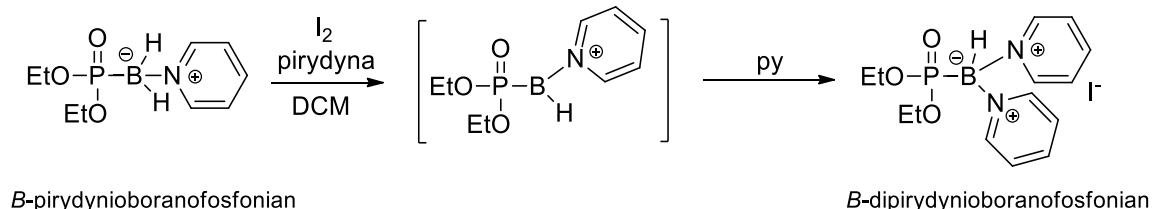


Schemat 9. Reaktywność boranofosfonianów z 3° aminami w zależności od użytego rozpuszczalnika: reakcja w dichlorometanie vs w acetonitrylu.

Bardziej szczegółowe badania reakcji w acetonitrylu pokazały, że początkowo tworzył się addukt pirydyna- λ^3 -boranofosfonian, jednak związek ten w mieszaninie reakcyjnej był niestabilny i w czasie około 30-60 min. ulegał przekształceniu do pirofosforanu tetraetylowego. Dla procesu tego zaproponowałam możliwy mechanizm, w którym kluczową rolę odgrywał atak nukleofilowy anionu jodkowego na pierścień aromatyczny kationu pirydyniowego.

Podjęłam również próbę ustalenia struktury produktu ubocznego (^{31}P NMR, $\delta_{\text{P}} = 45$ ppm) tworzącego się w reakcjach prowadzonych w DCM. Było to ważne w aspekcie lepszego poznania reaktywności związków z wiązaniem P-B-N jak i ewentualnej roli rozpuszczalnika w tym procesie. Najbardziej prawdopodobnym scenariuszem tworzenia się produktu ubocznego była następcza reakcja utleniania kolejnego jonu wodorkowego funkcji boranowej. Przeprowadzone badania pozwoliły mi na opracowanie warunków

reakcyjnych, w których związek ten tworzył się jako główny produkt. Pochodną tę wyizolowałam i ustaliłam jej strukturę jako adduktu boranofosfonianu z dwiema cząsteczkami pirydyny (*B*-dipirydynioboranofosfonian, Schemat 10).



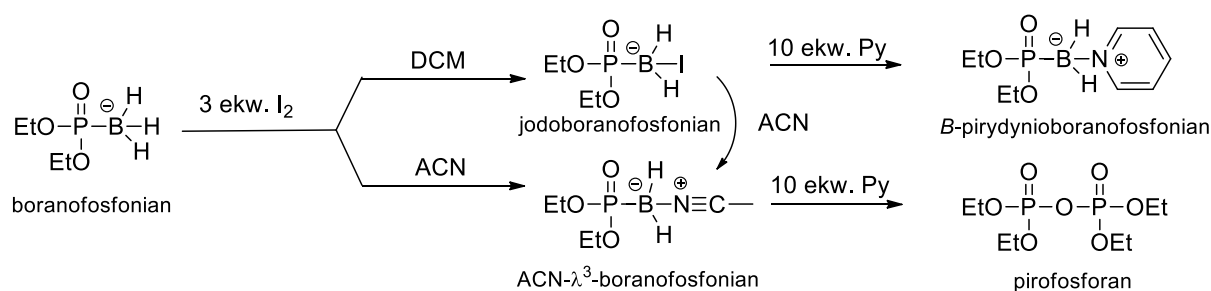
Schemat 10. Synteza produktu ubocznego, dipirydynioboranofosfonianu, poprzez następcze utlenianie *B*-pirydynioboranofosfonianu.

Tworzenia takiego produktu ubocznego nie obserwowałam w reakcji prowadzonej w acetonitrylu. Najprawdopodobniej w tym rozpuszczalniku nie zachodziło utlenianie kolejnego jonu wodorkowego grupy boranowej, co było zgodne z naszymi wcześniejszymi obserwacjami, że reakcje boranofosfonianów z jodem w acetonitrylu były wolniejsze i aby osiągnąć całkowite przereagowanie substratu wymagały stosowania większego nadmiaru jodu w porównaniu do reakcji prowadzonych w DCM.

Z powodu dużych różnic w reaktywności boranofosfonianów w dichlorometanie i acetonitrylu postanowiłam wykonać obie reakcje bez obecności aminy (reakcje preaktywacji), aby zobaczyć, co jest początkowym produktem utleniania boranofosfonianów jodem w każdym z tych rozpuszczalników. Oczekiwany produktem był jodoboranofosfonian (Schemat 4), który mógłby się tworzyć albo bezpośrednio w reakcji czterocentrowej boranofosfonianu i jodu, lub poprzez koordynację anionu jodkowego przez postulowany λ^3 -boranofosfonian X (Schemat 7). Mogło to rzucić pewne światło na początkowe etapy postulowanego przez nas mechanizmu oraz dostarczyć informacji o reaktywności tworzących się związków przejściowych.

W reakcji boranofosfonianu dietylu w dichlorometanie z trzykrotnym nadmiarem jodu tworzył się produkt generujący sygnał w widmie ^{31}P NMR przy około 70 ppm i -39 ppm w ^{11}B NMR, natomiast dla reakcji prowadzonych w acetonitrylu, przesunięcia chemiczne dla powstającego produktu wynosiły odpowiednio 75 ppm (^{31}P NMR) oraz -25 ppm (^{11}B NMR). Początkowo zakładałam, że produktami obu reakcji jest oczekiwany jodoboranofosfonian dietylu, a różnice w przesunięciach chemicznych są spowodowane

różną polarnością rozpuszczalników. Sugerować to mógł również fakt, że po zmieszaniu obu roztworów obserwowałam tylko jeden sygnał w widmie ^{31}P NMR (ok. 75 ppm) i w widmie ^{11}B NMR (ok. -25 ppm). Jednakże dalsze eksperymenty jednoznacznie pokazały, że w obu reakcjach tworzyły się dwa różne związki. Mimo że żadnego z tych produktów preaktywacji nie udało się wyizolować, widma masowe mieszanin reakcyjnych pozwoliły mi zidentyfikować związek powstający w dichlorometanie jako jodoboranofosfonian dietylu, natomiast związek z reakcji prowadzonej w acetonitrylu, jako nowy typ kompleksu acetonitryl- λ^3 -boranofosfonian (Schemat 11).

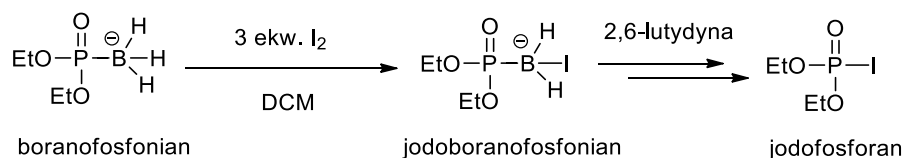


Schemat 11. Struktury produktów preaktywacji boranofosfonianu dietylu jodem w DCM i w ACN.

Biorąc pod uwagę, że każdy z produktów preaktywacji posiadał dobrą grupę odchodzącą, a mianowicie, jodek lub acetonitryl, to dość zaskakująco, każdy z nich dawał inny produkt w reakcji z dodaną 3^o aminą (Schemat 11). W reakcji jodoboranofosfonianu z pirydyną tworzył się addukt pirydyna- λ^3 -boranofosfonian, najprawdopodobniej w reakcji substytucji nukleofilowej jodków przez pirydynę na centrum boranowym. Natomiast sposób powstawania pirofosforanu tetraetylowego w reakcji generowanego *in situ* adduktu acetonitryl- λ^3 -boranofosfonian z pirydyną był mniej oczywisty i zaproponowałam dla niego mechanizm podobny do reakcji Rittera.

Eksperyment z preaktywacją, w którym tworzył się jodoboranofosfonian i który w reakcji z pirydyną dawał oczekiwany produkt (*B*-pirydynioboranofosfonian), początkowo dość mocno wspierał hipotezę jodoboranofosfonianu jako związku przejściowego w reakcji tworzenia adduktów amina- λ^3 -boranofosfonian. Jednakże kolejne reakcje jodoboranofosfonianu z innymi aminami np. z 2,6-lutydyną uczyniły tę hipotezę wątpliwą. Okazało się bowiem, że reakcja wygenerowanego jodoboranofosfonianu z dodaną 2,6-lutydyną nie prowadziła do adduktu tej aminy

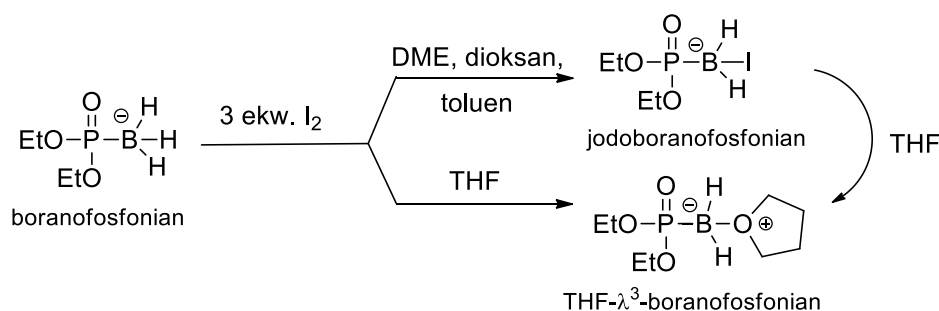
z boranofosfonianem, lecz do odpowiedniego jodofosforanu (Schemat 12), podczas gdy wynikiem reakcji boranofosfonianu z tą samą aminą, ale prowadzonej bez preaktywacji (bez tworzenia *in situ* jodoboranofosfonianu), był addukt 2,6-lutydyna- λ^3 -boranofosfonian. Eksperyment ten pozwolił na wykluczenie ścieżki reakcyjnej generowania jodoboranofosfonianu jako jednego z etapów na drodze syntezy adduktów amina- λ^3 -boranofosfonian.



Schemat 12. Reakcja wygenerowanego jodoboranofosfonianu dietylu z dodaną 2,6-lutydyną.

Jeśli chodzi o przekształcenia jodoboranofosfonianu w jodofosforan pod wpływem 2,6-lutydyny, to najprawdopodobniej w warunkach reakcji mogło zachodzić utlenianie kolejnego jonu wodorkowego funkcji boranowej i utworzenie diodoborano pochodnej, co w konsekwencji mogło prowadzić do osłabienia wiązania P-B i oddysocjowania, a następnie utlenienia, części fosfonianowej. Moje wcześniejsze badania wskazywały, że środowisko zasadowe sprzyjało utlenianiu kolejnych jonów wodorkowych, dlatego taki bieg reakcji w przypadku słabo nukleofilowej lecz bardziej zasadowej niż pirydyna, 2,6-lutydyny, wydaje się być zasadny.

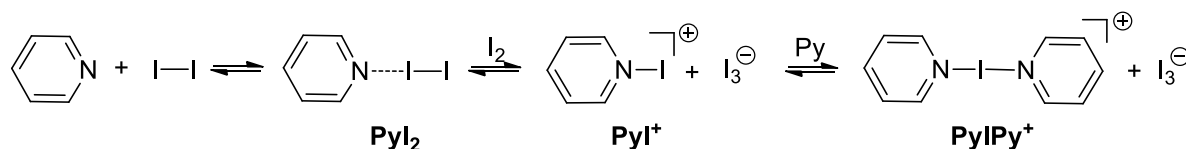
Przebadalam również inne rozpuszczalniki, takie jak monoglim (1,2-dimetoksymetan, DME), dioksan, tetrahydrofuran (THF), *N,N*-dimetyloformamid (DMF) czy toluen, powszechnie stosowane w chemii organicznej. Produktem reakcji preaktywacji boranofosfonianów, które prowadziłam w monoglimie, dioksanie i toluenie był również jodoboranofosfonian, jednakże tworzył się on zawsze jako produkt mniejszościowy (dla DME 25%), natomiast w DMF następowała całkowita deboronacja substratu. Spośród badanych rozpuszczalników jedynie w THF tworzył się trwały produkt preaktywacji (^{31}P NMR $\delta_{\text{P}} = 78$ ppm, ^{11}B NMR $\delta_{\text{P}} = -7$ ppm), który zidentyfikowałam jako nieznaną dotąd addukt tetrahydrofuran- λ^3 -boranofosfonian (Schemat 13).



Schemat 13. Produkty reakcji preaktywacji boranofosfonianu dietylu w DME, dioksanie, toluenie i THF.

Tworzenie się adduktu tetrahydrofuran- λ^3 -boranofosfonian wskazywało, że THF, podobnie jak acetonitryl, jest rozpuszczalnikiem silnie partycypującym. W odróżnieniu jednak od analogicznego adduktu acetonitrylowego, ulegał on łatwo substytucji nukleofilowej na atomie boru w reakcjach z dodanymi 3° aminami dając pochodne z wiązaniem P-B-N. Taka reaktywność mogłaby czynić z adduktu tetrahydrofuran- λ^3 -boranofosfonian potencjalny związek przejściowy w reakcjach syntezy *B*-pirydynioborano- lub *B*-amonioboranofosfonianów.

Jeżeli chodzi o sam proces utleniania boranofosfonianów, to kilku słów komentarza, co jest właściwym czynnikiem utleniającym w badanych przeze mnie reakcjach. Chociaż wiadomo, że jod jest zaangażowany jako utleniacz, to już sama struktura kompleksu utleniającego nie jest tak oczywista. Wynika to z faktu, że aminy tworzą z jodem różnego rodzaju kompleksy, połączone zwykle złożonymi układami równowagowymi, które zależą od stężenia reagentów, polarności medium i dodatkowo ulegają zmianie w czasie. Badania oddziaływania amin z halogenami były przedmiotem licznych badań od prawie 100 lat, a typowy układ równowagowy dla pirydyny i jodu²⁰ przedstawia Schemat 14. Jod cząsteczkowy i wszystkie rodzaje przedstawionych kompleksów, a mianowicie kompleks typu charge transfer (PyI_2) i kompleksy jonowe typu PyI^+ i PyIPy^+ , mogą działać jako utleniacze.

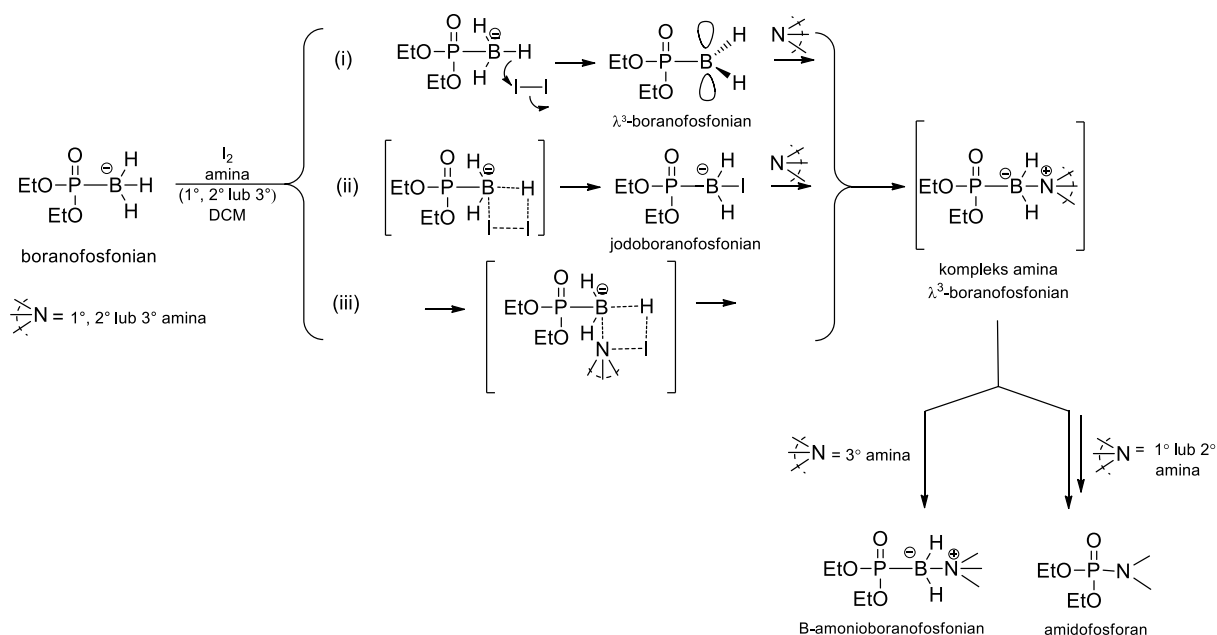


Schemat 14. Postulowane struktury kompleksów jakie mogą tworzyć się między pirydyną a jodem.

Ze względu na złożoność systemu utleniającego w reakcjach wykorzystujących jod jako utleniacz i aminy jako nukleofile oraz jego wrażliwość na różne czynniki reakcyjne (np. rodzaj użytego rozpuszczalnika, stężenie i stosunek reagentów, niestabilność w czasie), nie podjęłam próby ustalenia, który z czynników utleniających, cząsteczkowy jod czy kompleksy PyI_2 , PyI^+ lub PyIPy^+ , są głównymi akceptorami jonu wodorkowego z grupy boranowej podczas syntezy *B*-pirydynioboranofosfonianów. Przeprowadziłam jedynie wstępne badania ^1H NMR mieszanin jodu i pirydyny, których wyniki były zgodne z pracami Schustera i Robertsza.²⁰ Dla równomolowych ilości jodu i pirydyny w DCM obserwowałam tworzenie się kompleksów typu charge transfer (PyI_2), które były w szybkiej równowadze z pirydyną, natomiast w bardziej polarnym rozpuszczalniku, ACN, widoczne były dodatkowe sygnały (ok. 5%) pochodzące prawdopodobnie od kompleksu PyIPy^+ . Przy większym stężeniu jodu, ilość tego kompleksu w ACN wzrastała do 10-15% (mieszanina pirydyna-jod, 1:3) i kompleks ten pojawiał się również w widmach mieszanin w DCM (ok. 5%).

Ponieważ nie było dostrzegalnych różnic w szybkości utleniania boranofosfonianu dietylu w DCM z użyciem samego jodu (proces wstępnej aktywacji) vs jodu w obecności pirydyny (reakcja prowadząca do pochodnych P-B-N), przyjąłam, że reaktywność jodu cząsteczkowego była prawdopodobnie podobna do reaktywności kompleksów jodu z pirydyną (Schemat 14). Z tego powodu w rozważaniach mechanistycznych dotyczących reakcji boranofosfonianów z aminami w obecności jodu zakładałam udział jodu cząsteczkowego lub jego kompleksów z aminami w procesie utleniania grupy boranowej jako równouprawnione.

Zaproponowany ogólny mechanizm reakcji boranofosfonianów diestrów z aminami w obecności jodu przedstawiony na Schematach 7 i 8 jest zgodny z danymi eksperymentalnymi i bardzo prawdopodobny w świetle naszej wiedzy o reaktywności związków boru i fosforu, jednak pierwszy etap dyskutowanego mechanizmu, utlenianie jonu wodorkowego grupy boranowej, pozostawiał możliwości dla kilku scenariuszy (Schemat 15).



Schemat 15. Niektóre ścieżki mechanistyczne, dla pierwszego etapu reakcji boranofosfoniano diestrów z 1°, 2° oraz 3° aminami w obecności jodu.

Biorąc pod uwagę różne możliwe ścieżki mechanistyczne, których *a priori* nie można wykluczyć, zaproponowałam trzy możliwości mechanistyczne dla pierwszego etapu: (i) generowanie silnie elektrofilowego, tri-skoordynowanego λ^3 -boranofosfonianu jako związku przejściowego, (ii) tworzenie się jodoboranofosfonianu jako związku przejściowego w jednoetapowej (prawdopodobnie asynchronicznej) reakcji z czterocentrowym stanem przejściowym, (iii) jednoetapowa, czterocentrowa reakcja boranofosfonianu z utworzonym *in situ* kompleksem amina-jod, prowadząca w przypadku amin 3° bezpośrednio do finalnego produktu lub, dla amin 1° i 2°, do niestabilnego związku przejściowego aminoboranofosfonianu, ulegającemu kaskadzie reakcji prowadzących do odpowiedniego amidofosforanu (Schemat 15).

Przeprowadzone badania pokazały, że najbardziej prawdopodobnym scenariuszem mechanistycznym dla badanych reakcji jest generowanie λ^3 -boranofosfonianu jako związku przejściowego, który prawdopodobnie natychmiast jest wychwytywany przez aminę w klatce rozpuszczalnika [ścieżka (i)]. Przyjmując taki mechanizm byłam w stanie wyjaśnić wyniki wszystkich omawianych wyżej eksperymentów. Jeśli chodzi o ścieżkę reakcyjną (ii), to wszystkie przebadane aminy 1° i 2° reagowały z wygenerowanym jodoboranofosfonianem, dając odpowiednie amidofosforany, a więc nie można wykluczyć jodoboranofosfonianu jako związku

przejściowego w tej reakcji (pękanie wiązania P-B i tworzenie wiązania P-N). Z drugiej strony, nie wszystkie aminy heterocykliczne i 3° (np. 2,6-lutydyna, trietyloamina), w reakcji z jodoboranofosfonianem dawały oczekiwany produkt z wiązaniem P-B-N, co wyklucza go jako związek pośredni w reakcjach z aminami 3° i heterocyklicznymi (zakładając, że wszystkie aminy 3° reagowały według jednego mechanizmu). Ścieżki mechanistycznej (iii), w której czynnikiem utleniającym jest kompleks jodu z aminą i reakcja zachodzi według mechanizmu jednostopniowego, nie można również całkowicie wykluczyć, biorąc pod uwagę fakt tworzenia się takich kompleksów w warunkach reakcyjnych. Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że przedstawione na Schemacie 15 warianty mechanistyczne (i), (ii) i (iii) stanowią przypadki graniczne poszczególnych mechanizmów: generowanie całkowicie wolnego λ^3 -boranofosfonianu [ścieżka (i)], synchroniczna reakcja czterocentrowa dla utleniania boranofosfonianów jodem [ścieżka (ii)] i podobny mechanizm dla utleniania kompleksem jod-amina [ścieżka (iii)]. Ponieważ na grupie boranowej boranofosfonianu nie ma wolnego orbitalu p na który mógłby nastąpić transfer pary elektronowej nukleofila (w tym przypadku, jodku lub aminy), najprawdopodobniej mechanizmy (ii) i (iii) musiałby być asynchroniczne, z bardziej zaawansowanym w stanie przejściowym pękaniem wiązania B-H względem tworzenia wiązania B-N. Przy takim rozumieniu mechanizmu czterocentrowego na Schemacie 15, różnice między ścieżkami reakcyjnymi (i) a (ii) i (iii) są już znacznie mniejsze.

Podsumowanie

W ramach prowadzonych przeze mnie badań zaprojektowałam eksperymenty i przeprowadziłam stereochemiczną analizę korelacyjną dla tworzenia amidofosforanów diestrów z odpowiednich boranofosfonianów. Pokazałam, że w przeciwieństwie do doniesień literaturowych, boranofosfoniany diestry reagują z 1° i 2° aminami w obecności jodu tworząc produkt, amidofosforan, z całkowitą inwersją konfiguracji na atomie fosforu. Na tej podstawie zaproponowałam nowy mechanizm całego przekształcenia, w którym kluczowym etapem była dysocjacja zaktywowanego boranofosfonianu (jodoborano- lub aminoboranofosfonianu) z utworzeniem odpowiedniego H-fosfonianu. Mechanizm ten implikował również podwójną rolę jodu w tej reakcji. W pierwszym etapie jod działał jako aktywator grupy boranowej, utleniając jon wodorkowy grupy boranowej i tworząc jodoboranofosfonian (-PBH₂I) lub λ³-boranofosfonian zawierający triskoordynowany atom boru. Reakcja każdej z tych pochodnych z aminą może prowadzić do aminoboranofosfonianu, który najprawdopodobniej spontanicznie (lub po dalszym utlenieniu) szybko ulegał rozpadowi do H-fosfonianu i części boranowej. Koordynacja aminy jest według nas kluczowym etapem reakcji ułatwiającym dysocjację utworzonego kompleksu. Drugą, równorzędną rolę jodu w tej reakcji, jest utlenianie utworzonego H-fosfonianu diestru do jodofosforanu wg znanego mechanizmu utleniania związków P(III). Ponieważ wszystkie etapy reakcji prowadzące do utworzenia H-fosfonianu zachodzą z retencją konfiguracji na atomie fosforu, stereochemię finalnego produktu determinują dalsze przekształcenia H-fosfonianu (utlenianie - retencja i podstawienie jodu grupą aminową – inwersja konfiguracji).

Badania nad reakcją boranofosfonianów diestrów z 3° i heteroaromatycznymi aminami pokazały, że w odróżnieniu od reakcji z 1° i 2° aminami, powstawały w niej związki zawierające wiązania P-B-N oraz, że struktura aminy i rodzaj użytego rozpuszczalnika miały decydujący wpływ na rodzaj tworzącego się produktu.

W reakcji boranofosfonianu dietylu z pirydyną, w dichlorometanie w obecności jodu powstawał jako główny produkt addukt pirydyny z λ³-boranofosfonianem,

B-pirydynioboranofosfonian (PBP_y). W analogicznych warunkach reakcje w acetonitrylu prowadziły do całkowitej deboronacji (rozrywania wiązania P-B) dając finalnie pirofosforan tetraetylu. Tworzenie się różnych produktów w zależności od użytego rozpuszczalnika (dichlorometan vs acetonitryl) najprawdopodobniej było spowodowane niestabilnością tworzącego się adduktu pirydyniowego w warunkach reakcyjnych lub też możliwością alternatywnej ścieżki reakcyjnej (tworzenie kompleksu λ³-boranofosfonianu z rozpuszczalnikiem) w acetonitrylu. Podobny przebieg reakcji obserwowany był również dla innych pochodnych pirydyny oraz 3° amin. Także preaktywacja boranofosfonianu dietylu jodem, bez udziału aminy, w dichlorometanie vs acetonitrylu, prowadziła do różnych produktów. W dichlorometanie tworzył się jodoboranofosfonian, natomiast w acetonitrylu, dotąd nieznaną kompleks λ³-boranofosfonianu z acetonitrylem. Tak generowane produkty preaktywacji po dodaniu pirydyny tworzyły również różne produkty: z jodoboranofosfonianu tworzył się oczekiwany addukt pirydyny z boranofosfonianem, a z kompleksu z acetonitrylem, tetraetylowy pirofosforan. Spośród innych badanych rozpuszczalników, tetrahydrofuran (THF), podobnie jak acetonitryl (ACN), okazał się być rozpuszczalnikiem silnie partycypującym w reakcjach z boranofosfonianami. THF efektywnie tworzył kompleks z λ³-boranofosfonianem, jednak w przeciwieństwie do kompleksu ACN- λ³-boranofosfonian, w reakcji z dodaną pirydyną generował oczekiwany produkt PBP_y z wiązaniem P-B-N.

Na podstawie spektroskopii ³¹P i ¹¹B NMR oraz obserwowanej reaktywności udało mi się zaproponować jeden, ogólny mechanizm, według którego boranofosfoniany diestry reagują w warunkach utleniających z 1°, 2°, 3° i heteroaromatycznymi aminami. Pierwszym etapem reakcji według tego mechanizmu jest tworzenie się elektronowo deficytowej, triskoordynowanej pochodnej boranofosfonianu (λ³-boranofosfonian), która koordynuje obecną w mieszaninie reakcyjnej aminę. Dalszy los reakcji, zależał od typu użytej aminy. W przypadku amin 1°, 2°, następuje labilizacja wiązania P-B, co prowadzi do deboronacji i finalnie tworzenia amidofosforanów, natomiast koordynacja aminy 3° lub aminy heterocyklicznej, powoduje stabilizację wiązania P-B i kompleks z układem wiązań P-B-N pozostawał finalnym produktem reakcji.

Podsumowując, za najbardziej wartościowe pod względem poznawczym uważam ustalenie poprawnej stereochemii przekształcania nukleozydo boranofosfonianów

w amidofosforany oraz zaproponowanie nowego, zgodnego z danymi eksperymentalnymi, mechanizmu dla całego procesu, a szczególnie dla stereochemicznie krytycznego etapu rozrywania wiązania P-B. Wyniki te wydają się być szczególnie ważne w świetle możliwych zastosowań boranofosfonianów jako chemicznych markerów w post-syntetycznych modyfikacjach oligonukleotydów i generowaniu P-chiralnych wiązań internukleotydowych. Jako wartość dodaną w moich badaniach mechanistycznych uważam również zaproponowanie jednego, ogólnego mechanizmu dla reakcji boranofosfonianów z 1°, 2°, i 3° aminami, który tłumaczy powstawanie pochodnych P-N (w przypadku 1° i 2° amin) jak i P-B-N (3° i heterocykliczne aminy).

Z punktu widzenia chemii boru za cenne uważam poznanie czynników wpływających na labilizację wiązanie P-B oraz czynników wzmacniających to wiązanie. Ma to fundamentalne znaczenie w reakcjach boranofosfonianów zachodzących na centrum borowym i stwarza możliwości sterowania tymi procesami. Przy tej okazji udało mi się zidentyfikować i poznać reaktywność nowych, dotąd nieopisanych w literaturze pochodnych boranofosfonianów, np. jodoboranofosfonianów, adduktów ACN- λ^3 -boranofosfonian, THF- λ^3 -boranofosfonian czy też nowych pochodnych amina- λ^3 -boranofosfonian. W badaniach tych uwidoczniono się kluczowe znaczenie rodzaju użytego rozpuszczalnika dla reaktywności boranofosfonianów. Wartym podkreślenia, w aspekcie możliwości dalszej funkcjonalizacji adduktów amin z boranofosfonianami na centrum boranowym, było otrzymanie pierwszego związku z podwójną modyfikacją na grupie boranowej, diestru dipirydynioboranofosfonianu.

Myślę, że badania wykonane w ramach mojej pracy doktorskiej znacząco poszerzyły naszą wiedzę na temat reaktywności nukleozydo boranofosfonianów, ukazały wachlarz możliwości jakie oferuje ta chemia w modyfikowaniu funkcji fosforanowej, a otrzymane wyniki będą dla mnie inspirującym materiałem zachęcającym do dalszych badań i odkrywania nieznanych jeszcze możliwości syntetycznych tej klasy związków.

Bibliografia

1. Azad, R. F.; Brown-Driver, V.; Buckheit, R. W.; Anderson, K. P., Antiviral activity of a phosphorothioate oligonucleotide complementary to human cytomegalovirus RNA when used in combination with antiviral nucleoside analogs. *Antiviral Res.* **1995**, *28*, 101-111.
2. Kulka, M.; Wachsmann, M.; Miura, S.; Fischelevich, R.; Miller, P. S.; Ts'o, P. O. P.; Aurelian, L., Antiviral effect of oligo(nucleoside methylphosphonates) complementary to the herpes simplex virus type 1 immediate early mRNAs 4 and 5. *Antiviral Res.* **1993**, *20*, 115-130.
3. Duschmale, J.; Hansen, H. F.; Duschmale, M.; Koller, E.; Albaek, N.; Moller, M. R.; Jensen, K.; Koch, T.; Wengel, J.; Bleicher, K., In vitro and in vivo properties of therapeutic oligonucleotides containing non-chiral 3' and 5' thiophosphate linkages. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (1), 63-74.
4. Sood, A.; Shaw, B. R.; Spielvogel, B. F., Boron-containing nucleic acids. 2. Synthesis of oligodeoxynucleoside boranophosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9000-9001.
5. Lin, J.; Shaw, B. R., Synthesis of a novel triphosphate analogue: nucleoside α -P-borano, α -P-thiotriphosphate. *Chem. Commun.* **2000**, (21), 2115-2116.
6. Wada, T.; Maizuru, Y.; Shimizu, M.; Oka, N.; Saigo, K., Stereoselective synthesis of dinucleoside boranophosphates by an oxazaphospholidine method. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (12), 3111-4.
7. Olesiak, M.; Krivenko, A.; Krishna, H.; Caruthers, M. H., Synthesis And Biological Activity of Borane Phosphonate DNA. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Relat. Elem.* **2011**, *186* (4), 921-932.
8. Li, P.; Sergueeva, Z. A.; Dobrikov, M.; Shaw, B. R., Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: Chemistry and properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (11), 4746-4796.
9. Nahum, V.; Fischer, B., Boranophosphate Salts as an Excellent Mimic of Phosphate Salts: Preparation, Characterization, and Properties. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, *2004* (20), 4124-4131.
10. Imamoto, T.; Nagato, E.; Wada, Y.; Masuda, H.; Yamaguchi, K.; Uchamaru, T., New boranophosphorylation reagents, dimethyl boranophosphate monopotassium salt and tetramethyl boranopyrophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (41), 9925-9926.
11. Paul, S.; Roy, S.; Monfregola, L.; Shang, S.; Shoemaker, R.; Caruthers, M. H., Oxidative substitution of boranephosphonate diesters as a route to post-synthetically modified DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (9), 3253-64.
12. Roy, S.; Paul, S.; Roy, M.; Kundu, R.; Monfregola, L.; Caruthers, M. H., Pyridinium Boranephosphonate Modified DNA Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (3), 1420-1427.
13. Rachwalak, M. Poszukiwania nowych pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów o potencjalnej aktywności anty-HIV. Badania chemiczne i biologiczne. Rozprawa Doktorska, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, **2020**.
14. Jakubowski, T. Boranofosfoniany – właściwości i nowe drogi syntezy. Rozprawa Doktorska, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, **2020**.
15. Stawinski, J.; Strömberg, R.; Zain, R., Stereospecific oxidation and oxidative coupling of H-phosphonate and H-phosphonothioate diesters. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33* (22), 3185-3188.
16. Nilsson, J.; Stawinski, J., Controlling stereochemistry during oxidative coupling. Preparation of Rp or Sp phosphoramidates from one P-chiral precursor. *Chem. Commun.* **2004**, 2566-2567.

17. Stec, W.; Mikolajczyk, M., Stereochemistry of organophosphorus cyclic compounds. II. Stereospecific synthesis of cis- and trans-2-halogeno-2-oxo-4-methyl-1,3,2-dioxaphosphorinans and their chemical transformations. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 539-546.
18. Golebiewska, J.; Rachwalak, M.; Jakubowski, T.; Romanowska, J.; Stawinski, J., Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (10), 5496-5505.
19. Golebiewska, J.; Stawinski, J., Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and Mechanistic Studies. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 4312-4323.
20. Schuster, I. I.; Roberts, J. D., Halogen Complexes of Pyridines. A Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *44*, 2658-2662.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Paper 2 (J. Org. Chem., 2018) and paper 3 (J. Org. Chem., 2020) reprinted with permission from the Journal of Organic Chemistry. Copyright 2018 and 2020 American Chemical Society.

1

Nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfoniany – metody syntezy
i wybrane właściwości biologiczne

NUKLEOZYDO I OLIGONUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANY – METODY SYNTEZY I WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE

NUCLEOSIDE AND OLIGONUCLEOSIDE BORANEPHOSPHONATES – SYNTHETIC METHODS AND SELECTED BIOLOGICAL PROPERTIES

Justyna Gołębiewska

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: jgoliebiewska@ibch.poznan.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Metody otrzymywania nukleozydo boranofosfonianów

1.1. Różne podejścia tworzenia wiązania P-BH₃

1.1.1. Synteza z wykorzystaniem podejścia amidofosforynowego

1.1.2. Synteza boranofosfonianów z wykorzystaniem H-fosfonianów

1.1.3. Synteza boranofosfonianów z wykorzystaniem czynników boranofosfonylujących

1.2. Inkorporacja nukleozydo boranofosfonianów do łańcucha oligonukleotydowego (PB-DNA)

1.2.1. Podejście amidofosforynowe

1.2.2. Podejście z wykorzystaniem H-fosfonianów

1.2.3. Metoda boranofosfoniano triestrowa

1.2.4. Podejście z wykorzystaniem H-boranofosfinianów

1.2.5. Stereospecyficzna synteza boranofosfoniano diestrowa

2. Wybrane właściwości biologiczne pochodnych nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfonianów

2.1. Pochodne nukleozydo boranofosfonianów w projektowaniu proleków anty-HIV

2.2. Oligonukleozydo boranofosfoniany w wyciszaniu ekspresji genów

2.3. Oddziaływanie nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfonianów z enzymami

2.3.1. Oddziaływanie nukleozydo boranofosfonianów z nukleazami

2.3.2. Oddziaływanie nukleozydo boranofosfonianów z polimerazą DNA i RNA

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Justyna Gołębiewska w 2015 roku ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu A. Mickiewicza w Poznaniu. Obecnie jest uczestniczką Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, gdzie w Zakładzie Chemii Komponentów Kwasów Nukleinowych prowadzi badania dotyczące reaktywności funkcji boranowej w pochodnych nukleozydo boranofosfonianach, pod opieką prof. dr. hab. Jacka Stawińskiego.



<https://orcid.org/0000-0001-5409-0134>

ABSTRACT

Interest in boron-containing compounds has grown in recent years due to their potential medicinal and biochemical applications. Nucleoside boranephosphonates are analogues of naturally occurring nucleoside phosphates in which one of the non-bridging oxygen atom has been replaced by a BH_3 group [1]. This modification imparts unique biological properties to nucleotides and nucleic acids. DNA and RNA fragments containing boranephosphonate internucleotide linkages are resistant to various nucleases, stimulate the RNase H activity, and reveal high lipophilicity, which significantly enhances their cellular uptake [2]. The hydrolytic stability and nuclease resistance make these compounds attractive candidates in designing new therapeutics and medicinal diagnostics. Considering these characteristics nucleoside boranephosphonates constitute a promising class of nucleotide analogues worth exploring for biological purposes.

For this reason over the past decades chemists strived to develop efficient synthetic strategies for incorporation of the borane group ($-\text{BH}_3$) into the phosphate moiety of nucleotides and oligonucleotides. This review presents in the first part different approaches for the introduction of the boranephosphonate structural motif into nucleotides by using phosphoramidite method, H-phosphonate strategy, and by employing dedicated boranephosphonylating reagents. Next, recent chemical approaches for the preparation of oligonucleoside boranephosphonates are presented together with enzymatic methods for the incorporation of the BH_3 group into DNA and RNA fragments. The last part of this review is dedicated to the selected biological properties of nucleoside and oligonucleoside boranephosphonate, their interaction with enzymes, potency of these compounds for gene suppression, and their possible use as new class of active pharmaceutical ingredients (API).

Keywords: nucleoside boranephosphonate, synthetic strategies, nuclease resistance, biological activity

Słowa kluczowe: nukleozydo boranofosfoniany, strategie syntetyczne, odporność na nukleazy, aktywność biologiczna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

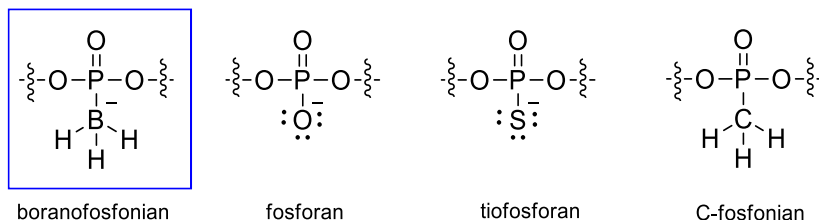
AZT	– 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
B	– heterocykliczna zasada azotowa
BIBS	– grupa di- <i>tert</i> -butyloizobutylosililowa
BOMP	– 2-(benzotriazol-1-yloxy)-1,1-dimetylo-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diaza fosfolidynio hexa-fluorofosforan [ang. 2-(benzotriazol-1-yloxy)-1,1-dimethyl-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diaza phospholidinium hexa-fluorophosphate]
BSA	– <i>N,O</i> -bis(trimetylosililo)acetamid
BSPDE	– fosfodiesteraza ze śledziony wołowej (ang. bovine spleen phosphodiesteraze)
CMPT	– N-(cyjanometylo)pirolidyno triflat
CN	– grupa 2-cyjanoetylowa
d4T	– 2',3'-didehydro-2',3'-dideoksytymidyna
DBU	– 1,4-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCA	– kwas dichlorooctowy
ddA	– 2',3'-dideoksyadenozyna
ddNTP	– 2',3'-dideoksynukleozydo 5'-trifosforan
DIPEA	– diizopropylowyloamina
DMTr	– grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
dNDP	– 2'-deoksynukleozydo 5'-difosforan
dNMP	– 2'-deoksynukleozydo 5'-fosforan
dNTP	– 2'-deoksynukleozydo 5'-trifosforan
iPr	– izopropylowyloamina
MNTP	– 1,3-dimetylo-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidino-1-yl-1,3,2-diazafosfolidynio hexafluorofosforan [ang. 1,3-dimethyl-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate]
NDP	– nukleozydo 5'-difosforan
NMP	– nukleozydo 5'-monofosforan
NTP	– nukleozydo 5'-trifosforan
PB	– boranofosfonian
PB-DNA (RNA, siRNA)	– fragmenty DNA, RNA i siRNA zawierające boranofosfonianowe (3'-5') wiązanie internukleotydomowe
PRO	– grupy blokujące zasady azotowe
RNA	– kwas rybonukleinowy
SVPDE	– fosfodiesteraza z jadu węża (ang. snake venom phosphodiesteraze)
TFA	– kwas trifluorooctowy
TMSCI	– chlorek trimetylosililu

WPROWADZENIE

Cząsteczki zawierające w swojej strukturze atom lub atomy boru cieszą się ogromnym zainteresowaniem chemików ze względu na ciekawe właściwości chemiczne tych związków oraz ich potencjalne zastosowania w biochemii i medycynie [3-5]. Obecnie terapia borowo-neutronowa (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) jest jedną z najbardziej rozwiniętych i zaawansowanych technik radiacyjnych, wykorzystujących związki boru w walce z niektórymi typami nowotworów [6, 7]. Pochodne boru charakteryzują się generalnie niską toksycznością [1, 8], a szereg korzystnych właściwości jakie aktywna biologicznie cząsteczka nabywa poprzez wprowadzenie atomu boru do jej struktury, jest siłą napędową badań nad chemią tego pierwiastka.

Pochodne nukleozydo boranofosfonianów stanowią nowy typ analogów nukleotydów, w których jeden z niemostrkowych atomów tlenu grupy fosforanowej został zamieniony funkcją $-BH_3$ [1, 2]. Po raz pierwszy nukleozydo boranofosfoniany zostały otrzymane przez A. Sood'a, B. R. Shaw i B.F. Spielvogel'a w latach 90. XX wieku [9]. Analogi te, na przestrzeni lat, wzbudzały coraz większe zainteresowanie badawcze, przede wszystkim ze względu na ich atrakcyjny biologicznie potencjał.

Nukleozydo boranofosfoniany wykazują znaczne podobieństwo pod względem struktury do naturalnych fosforanów. Grupa boranowa ($-BH_3$), podobnie jak zastąpiony przez nią atom tlenu, posiada sześć elektronów walencyjnych, co czyni je izoelektronowymi względem siebie. Obecność ujemnego ładunku formalnie zlokalizowanego na atomie boru, upodabnia te związki do naturalnych fosforanów oraz tiofosforanów [10], a struktura przestrzenna tej grupy czyni ją podobną do funkcji metylowej w metylofosfonianach [11] (*Schemat 1*). Podobieństwa te sprawiły, że pochodne tej klasy związków można uznać za cząsteczki mające analogiczną strukturę do fosfordiestrów, tiofosforanów czy metylofosfonianów, co jest kluczowe ze względu na ich potencjalne zastosowania biologiczne.



Schemat 1. Struktury boranofosfonianów, fosforanów, tiofosforanów i metylofosfonianów

Scheme 1. Structures of boranephosphonates, phosphates, phosphorothioates and methylphosphonates

Mimo że nukleozydo boranofosfoniany są zwykle dobrze rozpuszczalne w wodzie, charakteryzują się znacznie korzystniejszą lipofilowością w porównaniu do naturalnych nukleozydo fosforanów [12]. Co więcej, związki te wykazują również wysoką odporność na działanie różnych enzymów, np. egzo- i endonukleaz komórkowych [9, 13]. Zarówno deoksy- jak i rybonukleozydo 5'-(α -*P*-borano)trifosforany są dobrymi substratami dla polimerazy DNA i RNA [13, 14, 15], co umożliwia łatwą inkorporację grupy boranofosfonianowej do łańcucha oligonukleotydogo. Pokazano też, że obecność grupy α -*P*-BH₃ w antywirusowych analogach boranomono- oraz boranodifosforanów (np. w pochodnych AZT, d4T) polepsza oddziaływanie tych związków z kinazami komórkowymi ułatwiając proces ich dalszej fosforylacji i następnie hamowania procesu odwrotnej transkrypcji w komórkach zaatakowanych przez np. HIV [16, 17]. Atrakcyjne właściwości biologiczne tych związków dają wiele możliwości ich wykorzystania do różnych celów farmakologicznych. W ostatnich dekadach opisane wyżej właściwości były podstawą zastosowania nukleozydo boranofosfonianów m.in. jako potencjalnych czynników w terapii antysensowej i antygenowej, wyciszania genów z wykorzystaniem strategii siRNA (*short interfering*) [1, 2, 18] jak i przy projektowaniu związków mogących hamować proces namnażania wirusów w zainfekowanych komórkach w strategii pronukleotydogej.

1. METODY OTRZYMYWANIA NUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANÓW

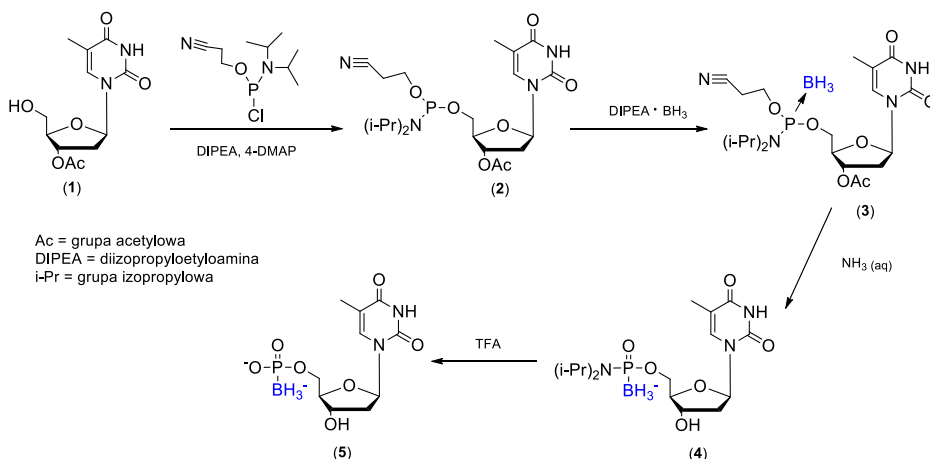
1.1. RÓŻNE PODEJŚCIA TWORZENIA WIĄZANIA P-BH₃

W literaturze naukowej opisane się trzy główne podejścia syntetyczne pozwalające wprowadzać funkcję boranową do części fosforanowej nukleotydu. Wykorzystują one powszechnie stosowaną w syntezie oligonukleotydów (i) metodę amidofosforynową, (ii) chemię H-fosfonianów, oraz (iii) syntezę z zastosowaniem dedykowanych czynników boranofosfonylujących.

1.1.1. Synteza z wykorzystaniem podejścia amidofosforynowego

Metoda amidofosforynowa została użyta w historycznie pierwszej syntezie nukleozydo 5'-boranofosfonianu tymidyny [9, 19] (*Schemat 2*). Wykorzystano w niej w pierwszym etapie kondensację odpowiednio zablokowanej tymidyny (**1**) z chloroamidofosforynem, aby tak powstała pochodna amidofosforynu (**2**) mogła ulegać dalszej reakcji z czynnikiem boranującym, np. kompleksem boranu z diizopropylloaminą (BH₃ • DIPEA) tworząc boranoamidofosfonian (**3**). Kolejnym etapem była reakcja β -eliminacji, w której usuwano grupę 2-cyanoetylową otrzymując boranoamidofosfonian (**4**), a następnie katalizowane kwasem trifluorooctowym (TFA) hydrolityczne odłączenie reszty aminowej. Powstały na tej

ścieżce 5'-boranofosfonian tymidyny (**5**) został wyizolowany chromatograficznie na kolumnie jonowymiennej z 52% wydajnością.

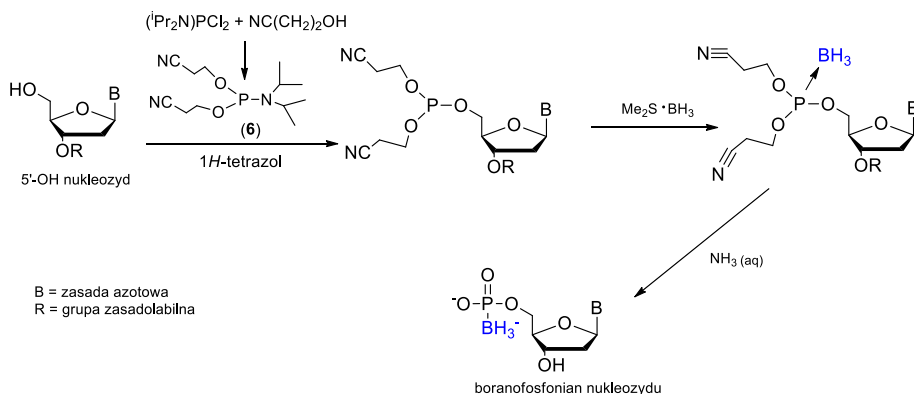


Schemat 2. Podejście amidofosforynowe w syntezie nukleozydo boranofosfonianów

Scheme 2. The phosphoramidite approach to the synthesis of nucleoside boranephosphonates

Główną wadą tego podejścia było powstawanie w opisanych warunkach reakcyjnych produktu ubocznego – monofosforanu tymidyny, którego usunięcie na drodze jonowymiennej chromatografii przysparzało wiele trudności. Według autorów produkt uboczny tworzył się w wyniku reakcji utleniania amidofosforynu **2** (Schemat 2) przez obecny w medium reakcyjnym tlen. Odpowiednie przygotowanie rozpuszczalników przed reakcją, czyli ich deoksygenacja, podwyższały wydajność reakcji nawet o 20% [18].

Pewną modyfikacją tej metody było podejście, w którym czynnik fosfitylujący (**6**), amidofosforyn z dwiema grupami 2-cyanoetylowymi był wygenerowany *in situ* [20] (Schemat 3). Zmiana ta pozwoliła na ominięcie końcowego etapu katalizowanej kwasem hydrolizy funkcji amidowej, co zapewniało wyższą całkowitą wydajność reakcji i zmniejszało ryzyko powstawania trudnego do oddzielenia nukleozydo monofosforanu [20].



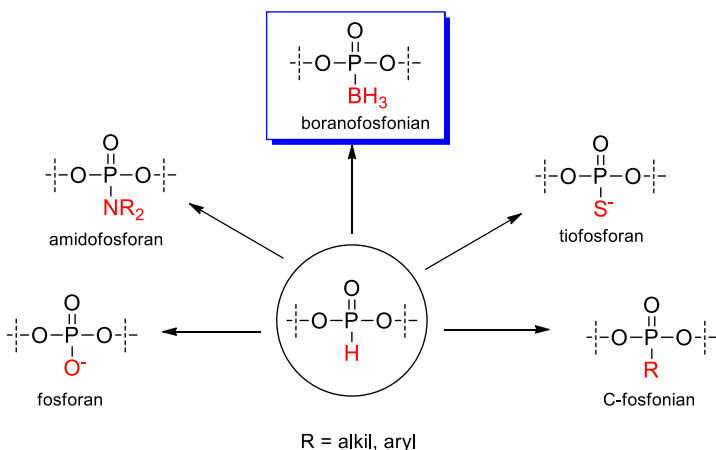
Schemat 3. Zmodyfikowane podejście amidofosforynowe w syntezie nukleozydo boranofosfonianów

Scheme 3. The modified phosphoramidite approach to the synthesis of nucleoside boranophosphonates

1.1.2. Synteza boranofosfonianów z wykorzystaniem H-fosfonianów

H-Fosfoniany są związkami zawierającymi atom fosforu na III stopniu utlenienia, w których jeden z niemostkowych atomów tlenu jest zastąpiony atomem wodoru. Chemia H-fosfonianów jest szeroko stosowana w syntezie różnego rodzaju pochodnych nukleotydów oraz otwiera wiele możliwości wprowadzania post-syntetycznych modyfikacji w obrębie grupy fosforanowej łańcucha oligonukleotydowego [21, 22]. Bogaty wachlarz możliwości, jaki oferuje ta chemia w syntezie pochodnych fosforanów [23], amidofosforanów [24], tiofosforanów [25] czy też analogów zawierających wiązanie P-C [26], został wzbogacony o kolejną metodę umożliwiającą tworzenie pochodnych boranofosfonianów, czyli związków zawierających trwałe wiązanie P-B [27] (Schemat 4).

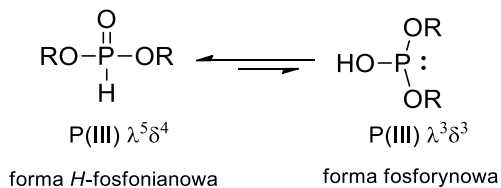
Unikalne właściwości H-fosfonianów pozwalające na łatwe modulowanie ich reaktywności, wynikają z faktu ich występowania w roztworze w postaci dwóch form tautomerycznych (Schemat 5).



Schemat 4. Niektóre możliwości wprowadzania modyfikacji na atomie fosforu jakie oferuje chemia H-fosfonianów

Scheme 4. Some possibilities of introducing modifications at the phosphorus center offered by the H-phosphonate chemistry

Unikalne właściwości H-fosfonianów pozwalające na łatwe modulowanie ich reaktywności, wynikają z faktu ich występowania w roztworze w postaci dwóch form tautomerycznych (Schemat 5).

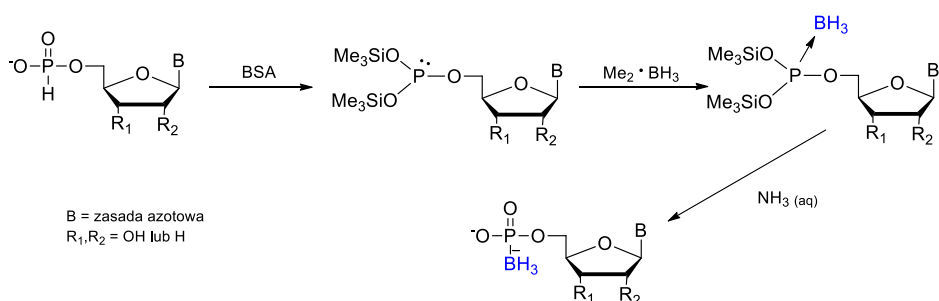


Schemat 5. Równowaga tautomeryczna H-fosfonianów

Scheme 5. A tautomeric equilibrium of H-phosphonates

Pięciowiązalna forma H-fosfonianu $\text{P}(\lambda^5\delta^4)$, w której centrum fosforowe wykazuje charakter elektrofilowy jest w równowadze z jej triskoordynowaną formą fosforynową $\text{P}(\lambda^3\delta^3)$, w której wolna para elektronowa zlokalizowana na atomie fosforu nadaje jej nukleofilowy charakter [21]. Te właściwości H-fosfonianów zostały wykorzystane przy otrzymywaniu nukleozydo baranofosfonianów, poprzez przesunięcie równowagi tautomerycznej w stronę triskoordynowanej formy, umożliwiającej wydajną reakcję z czynnikami boranującymi, prowadząc do oczekiwanego produktu, boranofosfonianu mono- lub diestru.

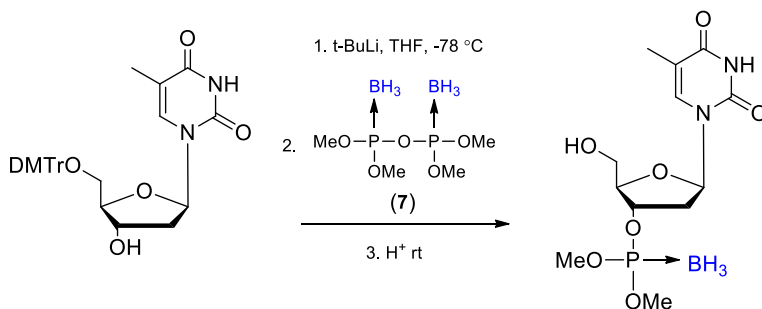
Powszechnie stosowane reagenty umożliwiające przekształcenie H-fosfonianów w formę triskoordynowaną to chlorek trimetylosililu (TMSCl) lub *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamid (BSA). Ścieżkę syntetyczną tworzenia nukleozydo boranofosfonianów z odpowiednich H-fosfonianów przedstawia *Schemat 6*. W pierwszym etapie tej reakcji wygenerowana w obecności BSA pochodna fosforynowa reaguje z kompleksem boranowym ($\text{Me}_2\text{S}\cdot\text{BH}_3$) tworząc disililowy nukleozydo boranofosfonian. Grupy sililowe są następnie usuwane pod działaniem stężonego roztworu amoniaku. To podejście okazało się być wydajną metodą syntezy 2'-, 3'- oraz 5'-nukleozydo boranofosfonianów, które otrzymywano z wydajnościami od 65 do 80% [18].



Schemat 6. Metoda syntezy nukleozydo boranofosfonianów z wykorzystaniem chemii H-fosfonianów
 Scheme 6. A method for the synthesis of nucleoside boranophosphonates using the H-phosphonate chemistry

1.1.3. Synteza boranofosfonianów z wykorzystaniem czynników boranofosfonylujących

Kolejne podejście syntetyczne polegało na użyciu specjalnego czynnika boranofosfonylującego, który w reakcji z odpowiednią pochodną nukleozydu tworzył nukleozydo boranofosfonian triester. Taka strategia została po raz pierwszy zaproponowana w 1997 roku przez T. Imamoto *et al.* [28], który użył tetrametylowy boranopirofosfonian (7) jako czynnik wprowadzający funkcję boranofosfonową na wolną grupę 3'-hydroksylową odpowiednio zablokowanej tymidyny (*Schemat 7*).

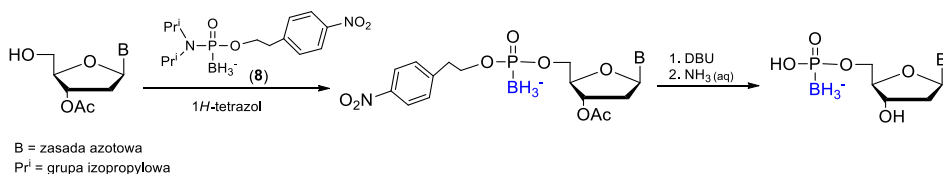


Schemat 7. Metoda syntezy nukleozydo boranofosfoniano triestrów z wykorzystaniem czynnika boranofosfonylującego

Scheme 7. Synthesis of nucleoside boranephosphonates using a boranephosphonylating reagent

Podejście to pozwalało na syntezę nie tylko pochodnych boranofosfonianów zawierających grupę BH_3 , ale również na wprowadzanie modyfikowanej funkcji boranowej, np. połączonej z resztą cyjanową, karboksylową czy karbamylową [29]. Niestety finalne przeprowadzenie powstałego boranofosfonianu triestru w odpowiedni diester lub monoester poprzez usunięcie jednej lub obu grup metylowych zachodziło trudno i było czynnikiem limitującym stosowania tej ścieżki syntetycznej [18, 28].

Innym reagentem wprowadzającym funkcję boranofosfonylową do nukleozydu był zaproponowany przez B. R. Shaw *et al.*, 2-(4-nitrofenyl)etylo diizopropylamidoboranofosforyn (**8**) [18]. Związek ten szybko reagował z wolną funkcją hydroksylową odpowiednio zablokowanego nukleozydu w obecności 1*H*-tetrazolu dając boranofosfonian diester, z którego grupa 2-(4-nitrofenyl)etylowa była usuwana na drodze β -eliminacji z użyciem DBU (1,4-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en) (*Schemat 8*). Czynniki te okazały się być bardziej efektywne w syntezie nukleozydo boranofosfonianów pozwalając na wydajną syntezę tych związków.



Schemat 8. Metoda syntezy nukleozydo boranofosfonianów z wykorzystaniem 2-(4-nitrofenyl)etylo diizopropylamidoboranofosforynu jako czynnika boranofosfonylującego

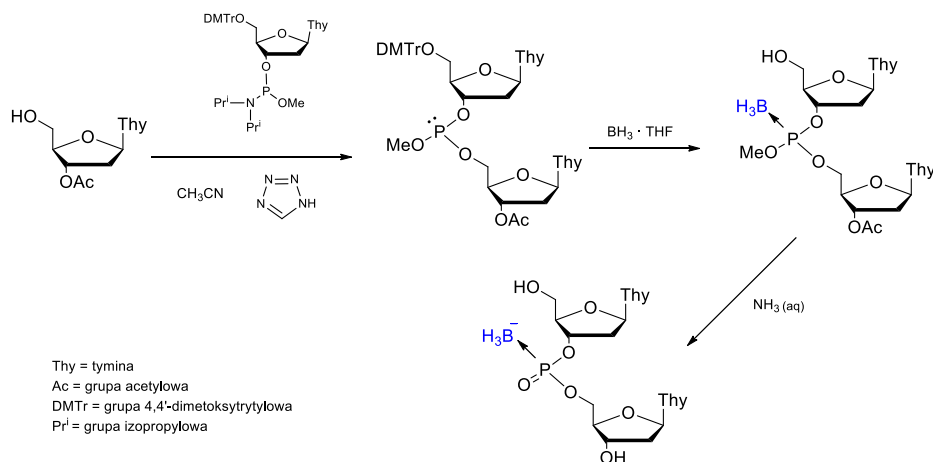
Scheme 8. Synthesis of nucleoside boranephosphonates using 2-(4-nitrophenyl)ethyl diisopropylamidoboranephosphite as a boranephosphonylating agent

1.2. INKORPORACJA NUKLEOZYDO BORANOFOSFORANÓW DO ŁAŃCUCHA OLIGONUKLEOTYDOWEGO (PB-DNA)

Na przestrzeni ostatnich lat naukowcy prowadzili intensywne prace mające na celu opracowanie wydajnej i uniwersalnej metody wprowadzania nukleozydo boranofosfonianów do łańcucha oligonukleotydowego (PB-DNA). W tym rozdziale krótko przedstawię strategie syntetyczne wprowadzania tego typu modyfikacji. Do tej pory zostały zaproponowane metody (i) z użyciem podejścia amidofosforynowego, (ii) z wykorzystaniem chemii H-fosfonianów oraz (iii) poprzez boranofosfonianotriestry. Oprócz tych metod opisana została również ścieżka (iv) wykorzystująca H-boranofosfoniany i niezwykle ważna, z biologicznego punktu widzenia, (v) metoda pozwalająca na chemiczną syntezę P-stereozeźdźdźkowanych pochodnych nukleozydo boranofosfonianów z użyciem oksazafosfolidynowych pochodnych, jako stereochemiczna alternatywa dla metody enzymatycznej [30].

1.2.1. Podejście amidofosforynowe

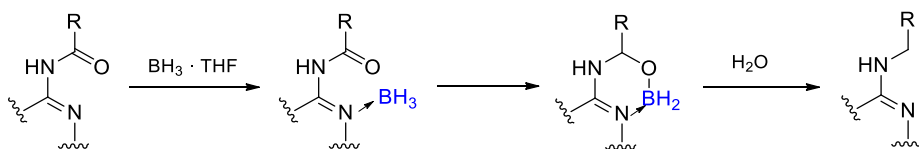
Jak wspomniano wyżej, pochodne nukleozydo boranofosfonianów zostały po raz pierwszy zsyntezowane na początku lat 90. XX wieku [9]. Zastosowana wówczas metoda amidofosforynowa została zmodyfikowana tak, aby umożliwić wprowadzanie nukleozydo boranofosfonianów w strukturę łańcucha oligonukleotydowego. Opracowany protokół syntetyczny składał się z etapu kondensacji tymidyny z wolną grupą 5'-OH z 5'-O-DMTr-3'-amidofosforynem tymidyny w obecności 1*H*-tetrazolu. Otrzymany w ten sposób triester fosforynowy, poddawany był reakcji boranowania kompleksem $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$. Na tym etapie odblokowaniu ulegała również grupa 5'-O-DMTr. Cykl reakcji kończyło rozłożenie nadmiaru kompleksu boranowego i usunięcia blokady metylowej z reszty fosfonianowej przez traktowanie całości stężonym, wodnym roztworem amoniaku [31] (*Schemat 9*).



Schemat 9. Włączanie nukleozydo boranofosfonianów do łańcucha oligonukleotydowego wg metody amidofosforynowej

Scheme 9. The incorporation of nucleoside boranephosphonates into an oligonucleotide chain according to the phosphoramidite method

Niestety powyższa metoda pozwalała jedynie na syntezę oligonukleozydo boranofosfonianów zawierających tyminę, gdyż pozostałe zasady azotowe (adenina, guanina, cytozyna), zawierające acylowe grupy ochronne na atomach azotu, ulegały redukcji w obecności czynnika boranującego powodując trwale modyfikacje zasady heterocyklicznej (Schemat 10). Metoda ta nie była więc uniwersalna i nie pozwalała na syntezę mieszanych sekwencji nukleotydów w łańcuchu oligonukleotydowym (PB-DNA) [31].



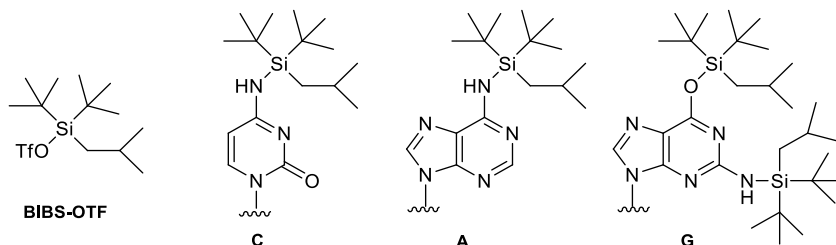
R = grupa alkilowa

Schemat 10. Proponowany mechanizm redukcji blokady acylowej na zasadach azotowych

Scheme 10. The proposed mechanism for the reduction of *N*-acyl protecting groups in nucleic acid bases

Nowa strategia udoskonalająca amidofosforynowe podejście otrzymywania nukleozydo boranofosfonianów została zaproponowana nieco później przez M. Caruthersa *et al.* [32]. Pozwalała ona na syntezę oligonukleotydów o mieszanych sekwencjach boranofosfonianowych (PB-DNA) dzięki użyciu blokad silylowych [di-*tert*-butylizobutylsilyl (BIBS)] dla grup aminowych adenozy, cytydyny i guanozy (Schemat 11). Blokadą grupy 5'-OH nukleozydu w tym po-

dejęciu był dimetoksytrytyl (DMTr). Taki układ blokad zapobiegał reakcji redukcji grup ochronnych na zasadach azotowych, a usuwanie grup DMTr i BIBS przy użyciu kwasu trifluorooctowego (TFA) pozwalało na syntezę oligonukleozydów boranofosfonianowych z dobrymi wydajnościami [32].



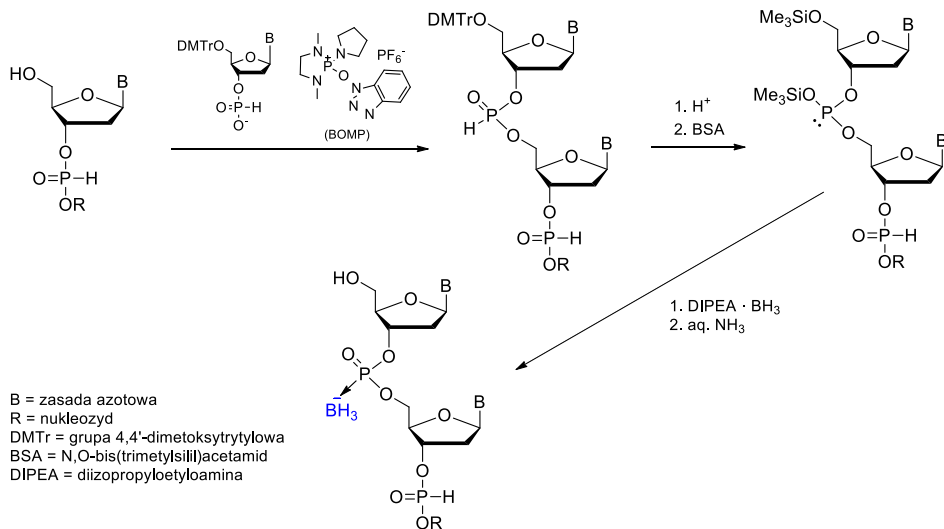
Schemat 11. Grupa di-*tert*-butyloizobutylosililowa (BIBS) jako ochrona funkcji aminowych na heterocyklicznych zasadach azotowych

Scheme 11. The di-*tert*-butylisobutylsilyl group (BIBS) as a protection of the amine functions in heterocyclic nitrogen bases

1.2.2. Podejście z wykorzystaniem H-fosfonianów

Pierwszy raz chemia H-fosfonianów została użyta do syntezy oligonukleozydo boranofosfonianów w 1997 roku przez Matteucciego *et al.* [24]. Niedługo po tym ukazały się publikacje B. R. Shaw [33] oraz M. Caruthersa [34] opisujące również wykorzystanie tego podejścia.

Synteza ta polegała na kondensacji 3'-H-fosfonianu 5'-*O*-DMTr tymidyny z komponentem nukleozydowym w obecności czynnika kondensującego BOMP [2-(benzotriazol-1-yloxy)-1,1-dimetylo-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diaza fosfolidynio hexafluorofosforan]. Po usunięciu grupy 5'-*O*-DMTr z dinukleozydowego H-fosfonianu, powstały związek był traktowany czynnikiem silylującym. Etap ten pozwalał na przeprowadzenie H-fosfonianu w formę triwalentną z wolną parą elektronową na atomie fosforu oraz jednocześnie zablokowanie grupy 5'-OH tymidyny (Schemat 12). Tak wygenerowana triwalentna forma fosforynowa bardzo szybko reagowała z wprowadzonym do mieszaniny reakcyjnej kompleksem boranującym tworząc boranofosfonian diester. W ostatnim etapie syntezy amoniak usuwał blokady silylowe, co prowadziło do 3'-5'-boranofosfonianu ditymidyny, końcowego produktu syntezy.



Schemat 12. Metoda syntezy oligonukleozydo boranofosfonianów z wykorzystaniem nukleozydo H-fosfonianów z nieblokowaną funkcją aminową

Scheme 12. Synthesis of oligonucleoside boranophosphonates using nucleoside H-phosphonates with unprotected amino functions

Metoda ta nie pozwalała jednak na synteze mieszanych sekwencji oligonukleotydocy również z powodu redukcji *N*-acylowych funkcji używanych do blokowania grup aminowych adenozydu, cytydyny i guanozydu.

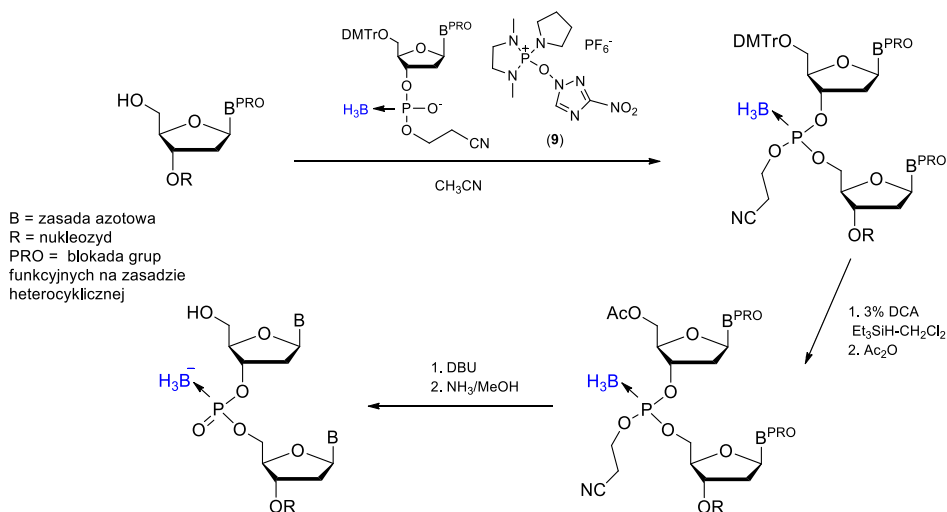
Aby przezwyciężyć te niedogodności została zaproponowana strategia syntezy boranofosfonianów bez blokad na heteroaromatycznych zasadach azotowych nukleozydo H-fosfonianów. Jako pierwszy tę strategię użył T. Wada *et al.* w syntezie pochodnych dinukleotydocy boranofosfonianów [35], natomiast w syntezie boranowych oligonukleotydocy, tę wersję zaprezentowała B. R. Shaw [36] (*Schemat 12*).

Metoda ta okazała się być prostym sposobem syntezy oligonukleotydocy boranofosfonianowych o mieszanych sekwencjach, jednak jej efektywność ograniczała się do otrzymywania dość krótkich oligonukleotydocy, zawierających do 10 jednostek nukleotydocy. Przyczyną tego była najprawdopodobniej częściowa niestabilność internukleotydocy wiązania H-fosfonianowego podczas kolejnych etapów wydłużania łańcucha oligonukleotydocy [36].

1.2.3. Metoda boranofosfonianotriestrowa

Kolejne podejście syntetyczne otrzymywania oligonukleotydocy boranofosfonianów polegało na użyciu nukleozydo boranofosfoniano diestrów jako

jednostek nukleotydowych. Strategia ta miała na celu wyeliminowanie reakcji ubocznych jakie generował etap boranowania po każdym cyklu przyłączania jednostki nukleotydowej w wydłużającym się łańcuchu DNA. W tym celu T. Wada *et al.* [37, 38] użył do syntezy zablokowane na zasadach azotowych (2-*N*-fenylacetyl) jednostki nukleozydo 3'-boranofosfonianów. W tej metodzie cząsteczka 5'-*O*-DMTr-nukleozydo boranofosfoniano diestru była przyłączana do nukleotydu z wolną grupą 5'-OH za pomocą MNTP (9) [1,3-dimetylo-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazafoolidynio hexafluorofosforanu] jako czynnika kondensującego. Po każdym etapie przyłączania jednostki nukleotydowej, usuwano blokady dimetoksytrytylowe (DMTr) za pomocą kwasu dichlorooctowego z dodatkiem Et_3SiH służącego do wyłapywania kationu trytylowego. W ostatnim etapie usuwano grupę 2-cyanoetylową z funkcji boranofosfonianowej stosując silną zasadę (Schemat 13).



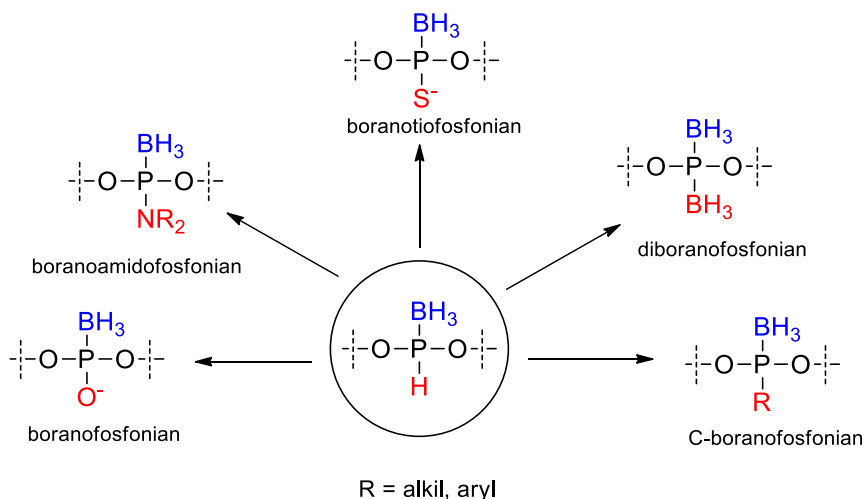
Schemat 13. Synteza oligonukleozydów boranofosfonianowych z wykorzystaniem metody boranofosfonianotriestrowej

Scheme 13. Synthesis of boranephosphonate oligonucleosides by the using boranephosphotriester approach

1.2.4. Podejście z wykorzystaniem H-boranofosfinianów

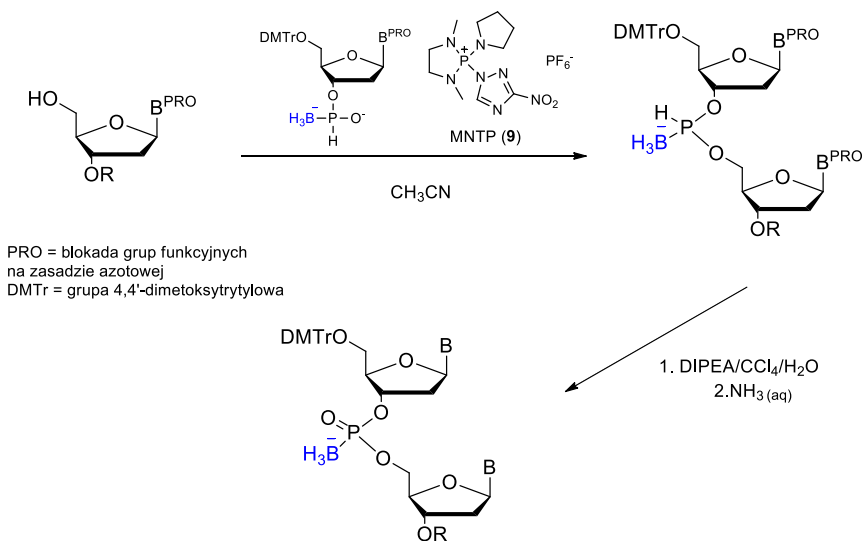
Grupa T. Wady zaproponowała podejście syntetyczne wykorzystujące H-boranofosfiniany, czyli cząsteczki zawierające zarówno wiązanie P-BH₃ jak i P-H, w syntezie oligonukleozydo boranofosfonianów [39, 40]. H-Boranofosfiniany, dzięki obecności wiązania P-H, stanowią wyjątkowo użyteczny materiał wyjściowy w syntezie szerokiego spektrum P-modyfikowanych pochodnych, np. boranofosfo-

nianów, boranoamidofosfoniaów, boranotiofosfonianów czy pochodnych diboranofosfonianów (Schemat 14).



Schemat 14. Możliwości wprowadzania modyfikacji z wykorzystaniem H-boranofosfinań
Scheme 14. Possibilities of introducing modifications using H-boranephosphinates

Boranofosfiniany zostały również użyte w syntezie oligonukleotydów modyfikowanych funkcją $-BH_3$. Synteza ta polegała na kondensowaniu nukleozydo H-boranofosfinianu z nukleozydem z wolną grupą 5'-OH w obecności MNTP (9) jako aktywatora. Powstały w tych warunkach diester H-boranofosfinianu poddawany był *in situ* reakcji utleniania mieszaniną CCl_4/H_2O w obecności diizopropylloaminy (DIPEA), a powstały boranochlorofosfonian, hydrolizowano do finalnego dinukleozydo boranofosfonianu za pomocą stężonego, wodnego roztworu amoniaku (Schemat 15). Wydajność tej metody sięgała 44% przy syntezie łańcuchów składających się do 12 jednostek nukleotydowych.



Schemat 15. Ścieżka syntetyczna otrzymywania oligonukleozydo boranofosfonianów z wykorzystaniem pochodnych H-boranofosfinianów

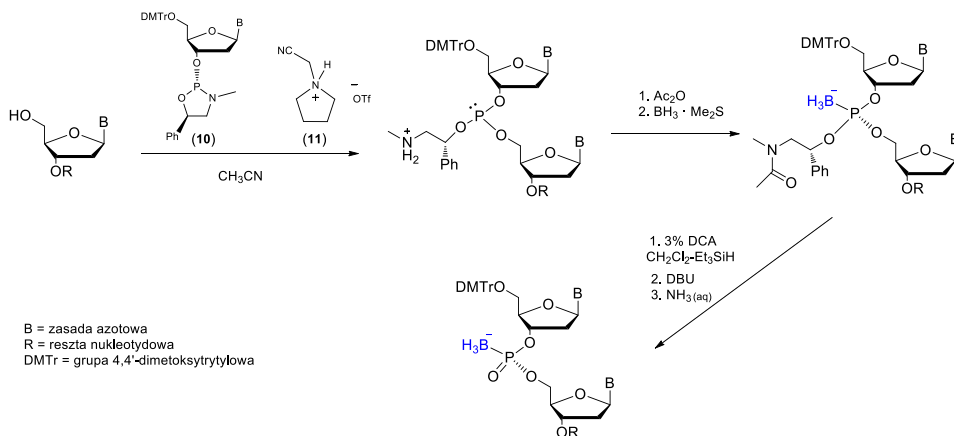
Scheme 15. A synthetic approach for the preparation of oligonucleoside boranephosphonates using H-boranephosphinate derivatives

1.2.5. Stereospecyficzna synteza boranofosfoniano diestrów

Mimo iż metody syntezy pochodnych nukleozydo boranofosfonianów ewoluowały na przestrzeni ostatnich lat, to żadna z zaproponowanych metod nie oferowała kontroli stereochemicznej na centrum fosforowym. Ten aspekt jest niezwykle ważnym zagadnieniem ze względu na potencjał biologiczny zarówno mononukleotydów jak i oligonukleotydów zawierających grupę BH_3 przy atomie fosforu. Poniżej zostały przedstawione chemiczne oraz enzymatyczne strategie stereospecyficznej syntezy tych analogów oligonukleotydów.

Pierwsze podejście zaproponowane przez T. Wadę zapewniające kontrolę stereochemiczną na atomie fosforu boranofosfonianów, polegało na użyciu nieblokowanych na zasadach azotowych pochodnych nukleozydo oksazafosfolidynowych (**10**), które były otrzymywane stereoselektywnie z wykorzystaniem enancjomerycznie czystego 1,2-aminoalkoholu [41]. Taki monomer był kondensowany z nukleozydem z wolną grupą 5'-OH w obecności CMPT [N-(cyjanometylo)pirolidynowego triflattu (**11**)] jako kwasowego aktywatora. Powstały na tej drodze triester fosforynowy o zdefiniowanej stereochemii przy atomie fosforu był poddawany reakcji boranowania kompleksem $BH_3 \cdot Me_2S$ tworząc boranofosfonian triester. Po usunięciu grupy DMTr (3% DCA, Et_3SiH), powstały dimer był traktowany DBU w celu usunięcia reszty aminoalko-

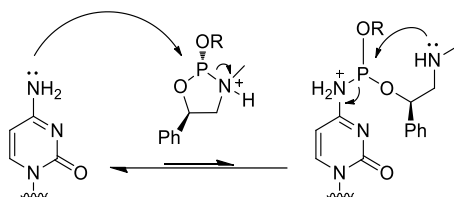
holu, a następnie odłączony od podłoża pod działaniem stężonego roztworu amoniaku (*Schemat 16*).



Schemat 16. Stereoselektywna metoda syntezy łańcucha oligonukleozydowego boranofosfonianów przy użyciu pochodnych oksazafosfolidynowych

Scheme 16. Stereoselective synthesis of boranephosphonate oligonucleosides via oxazaphospholidine intermediates

Niestety metoda ta okazała się efektywna tylko przy syntezie dimerów. Próby wydłużania łańcucha oligonukleotydomowego kończyły się utratą stereoselektywności, co autorzy tłumaczyli epimeryzacją pierścienia oksazafosfolidynowego substratu **10**, katalizowaną grupami aminowymi zasad azotowych [30] (*Schemat 17*).

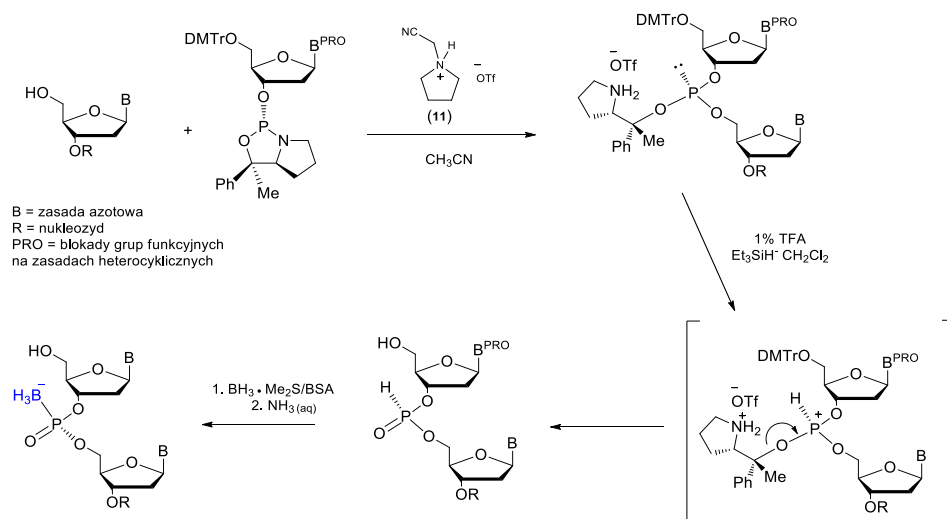


Schemat 17. Proponowany mechanizm epimeryzacji pochodnych oksazafosfolidynowych katalizowany grupą aminową heterocyklicznych zasad azotowych

Scheme 17. A proposed mechanism of the epimerization of oxazaphospholidine derivatives catalyzed by the amino group of heterocyclic nucleic bases

Kolejnym podejściem syntetycznym otrzymywania stereozdefiniowanego łańcucha PB-DNA, zaproponowanym przez tę samą grupę badawczą, było wykorzystanie pochodnych nukleozydo H-fosfonianów jako związków przejściowych

wych. Odpowiednią stereochemię na atomie fosforu tych związków zapewniało przyłączenie w pierwszym etapie bicyklicznej pochodnej oksazafosolidyny. Czysty stereoizomer nukleozydo 3'-oksazafosolidyny był kondensowany z nukleozydem posiadającym wolną grupą 5'-OH (lub 5'-OH oligonukleotydem) w obecności CMPT (11) jako aktywatora. Otrzymana w tym etapie triestrowa pochodna fosforynowa ulegała następnie przekształceniu w H-fosfonian diester w reakcji eliminacji typu E1 fragmentu pirolidyniowego, która zachodziła z retencją konfiguracji na centrum fosforowym [42, 43]. Po tym etapie utworzony H-fosfonian, ulegał boranowaniu kompleksem $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ w obecności czynnika sililującego [43, 44] (Schemat 18).



Schemat 18. Stereoselektywna metoda syntezy łańcucha oligonukleozydo boranofosfonianowego z wykorzystaniem chemii H-fosfonianów

Scheme 18. A stereoselective synthesis of oligonucleoside boranophosphonate chains using the H-phosphonate chemistry

Metoda ta pozwalała na otrzymywanie oligonukleotydów o długości do 12 jednostek nukleotydu o zdefiniowanej stereochemii na centrum fosforowym (dla tymidyny) lub tetra-nukleotydu o mieszanej sekwencji zasad.

Przedstawione wyżej drogi syntezy stereozdefiniowanych łańcuchów PB-DNA były opracowane jako alternatywa dla enzymatycznej syntezy tych związków. Przeprowadzone badania pokazały, że nukleozydo 5'- α -P boranotrifosforany są substratami dla polimerazy DNA i RNA. Enzymy te działają w sposób stereospecyficzny, rozpoznając jedynie izomer Rp jako substrat. Enzymatyczna reakcja włączania nukleozydo boranofosfonianu do oligonukleotydu zachodzi z całkowitą inwersją konfiguracji na atomie fosforu, prowadząc do związku

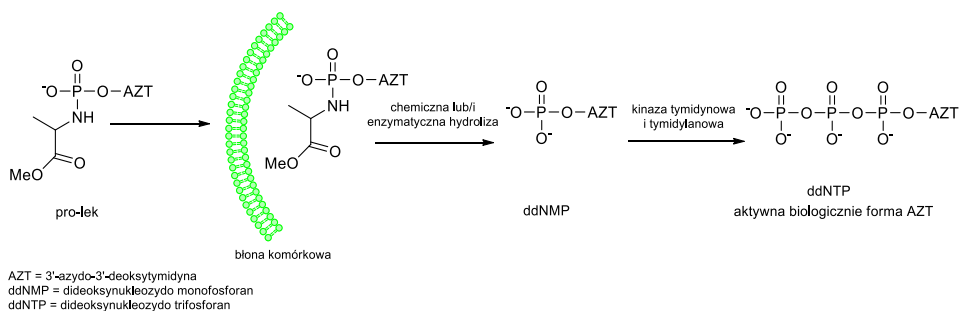
o konfiguracji *Sp*. Metoda enzymatyczna jest szybkim i wygodnym podejściem syntezy oligonukleotydów zawierających funkcję boranową w części fosforanowej o zdefiniowanej konfiguracji na atomie fosforu. Niestety metoda ta nie jest uniwersalna, ponieważ ogranicza się jedynie do syntezy oligonukleozydo boranofosfonianów o konfiguracji *Sp* wiązania internukleotydu [45] (*vide infra*).

2. WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE POCHODNYCH NUKLEOZYDO I OLIGONUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANÓW

2.1. POCHODNE NUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANÓW W PROJEKTOWANIU PROLEKÓW ANTY-HIV

Proleki są związkami, które wykazują działanie terapeutyczne dopiero po chemicznych lub/i enzymatycznych przekształceniach wewnątrz komórki. Pronukleotydy to jeden z przykładów proleków, których zadaniem jest hamowanie procesu namnażania wirusa na etapie odwrotnej transkrypcji [46]. Inhibicja tego procesu polegała do tej pory na stosowaniu 2',3'-dideoksynukleotydów (ddN), które pod wpływem kinaz komórkowych były fosforylowane kolejno do odpowiednio mono-, di- i finalnie do nukleozydo trifosforanu, biorącego bezpośredni udział w reakcji syntezy wirusowego DNA. Włączony w łańcuch tworzącego się wirusowego DNA 2',3'-dideoksynukleotyd blokuje jego elongację hamując ostatecznie namnażanie wirusa [46].

Problemy w enzymatycznej fosforylacji antywirusowego nukleozydu do odpowiedniego mono-, di- i trifosforanu to czynniki ograniczające często jego efektywność jako czynnika antywirusowego. Aby je ominąć zaczęto projektować pochodne antywirusowych 2',3'-dideoksynukleotydów w formie odpowiednich mono-, di-, oraz trifosforanów. Jednakże wysoka polarność tych związków obniżała ich efektywny transport do komórki. W celu przewyciężenia tej niedogodności zaczęto częściowo maskować ładunki ujemne syntezowanych fosforanów poprzez przyłączanie odpowiednich lipofilowych grup maskujących, mających ułatwić przejście takich związków przez błony komórkowe. Projektowane według tej koncepcji nukleozydo 5'-fosforany są nazwane pronukleotydami [46] (*Schemat 19*).

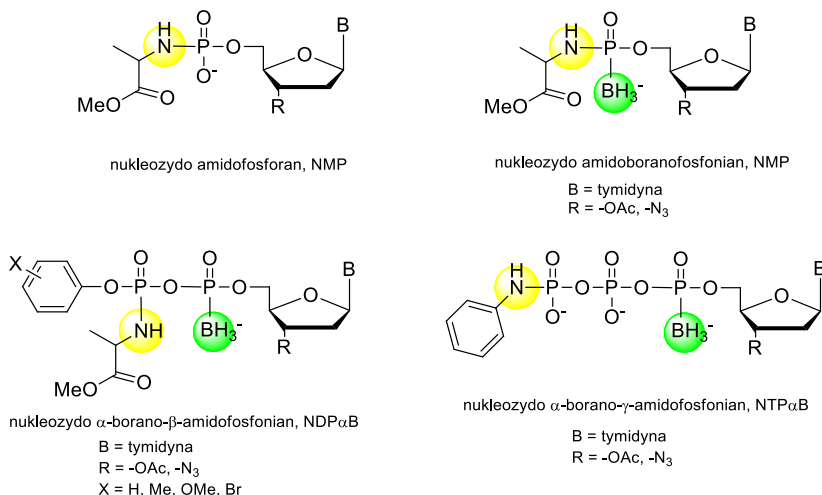


Schemat 19. Idea działania pronukleotydów. Aktywacja antywirusowej pochodnej AZTMP w zainfekowanej komórce

Scheme 19. The operating principle of pronucleotides. Activation of an antiviral AZTMP derivative in the infected cell

Grupa badawcza C. R. Wagnera zaproponowała syntezę nukleozydo monofosforanów, pochodnych AZT (3'-azydo-3'-deoksytymidyny), w których połączony z atomem fosforu aminokwas pełnił rolę grupy maskującej (Schemat 20). Analogiczne badania były prowadzone również w grupie A. Kraszewskiego, gdzie stosowaną grupą maskującą były aryloaminy [47]. Badania biologiczne pokazały, że związki takie miały wyższą aktywnością antywirusową i obniżoną toksycznością w porównaniu do samego AZT [48]. Obiecujące parametry biologiczne zachęciły do dalszych prac nad tą klasą pochodnych i jej poszerzeniem o analogi zawierające dodatkową funkcję maskującą w formie grupy boranowej ($-\text{BH}_3$), z nadzieją, że zwiększy to biodostępność modyfikowanych cząsteczek i polepszy ich właściwości biologiczne [49, 50].

Do tej pory zostały opracowane różne strategie syntetyczne otrzymywania nukleozydo amidofosforanów zawierających dodatkowo funkcję boranową ($-\text{BH}_3$). Badania te były głównym obiektem zainteresowań grupy badawczej B. R. Shaw, która zaproponowała różne podejścia syntetyczne (nie opisane tutaj) dla pochodnych nukleozydo 5'- α -P-boranomono-, di- i tri-fosforoamidów [18] (Schemat 20).



Schemat 20. Wybrane struktury otrzymanych nukleozydo amidofosforanów i ich α-P boranowych pochodnych nukleozydo mono-, di- i tri-amidofosforanów

Scheme 20. Selected structures of the synthesized nucleoside phosphoramidates and their α-P borane nucleoside mono-, di- and tri-phosphoramidate derivatives

Przeprowadzone badania pokazały, że obecność grupy BH₃ przy α-atomie fosforu w analogach AZTDP [17], d4TDP [51] oraz ddADP [52] ułatwia ich dalszą fosforylację katalizowaną przez odpowiednie kinazy komórkowe. Utworzone w tym procesie odpowiednie α-P-boranotrifosforany (AZTTTP, d4TTTP, ddATP) w dalszym etapie ulegały inkorporacji do syntezowanego wirusowego DNA przez odwrotną transkryptazę HIV-1 [51, 52]. Wyniki te są bardzo zachęcające w świetle możliwości zastosowań nukleozydo boranofosfonianów w badaniach nad nowymi analogami pronukleotydomy.

2.2. OLIGONUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANY W WYCISZANIU EKSPRESJI GENÓW

siRNA (*short interfering RNA*) są to krótkie fragmenty dwuniciowego RNA, które w ostatnich latach były wykorzystywane w badaniach nad nową strategią wyciszania ekspresji uszkodzonych genów. Strategia siRNA polega na wprowadzeniu do komórek syntetycznego fragmentu RNA, którego zadaniem jest wyciszenie ekspresji uszkodzonego genu na poziomie mRNA. Sam proces modulowania ekspresji genów, w którego udział zaangażowane są różne enzymy, jest dość złożony. Prowadzone badania nad wpływem modyfikacji w strukturze siRNA na efektywność wyciszania genów miały na celu przede wszystkim poznanie stabilności takich konstruktów w medium komórkowym oraz zbadaniu ich

oddziaływania z kompleksem białkowym RISC (*RNA-induced silencing complex*). Kompleks ten, o aktywności nukleazy, odgrywa kluczową rolę w procesie wyciszania genów w strategii siRNA. Katalizuje on rozplatanie podwójnej helisy siRNA, a powstała pojedyncza nić wraz z kompleksem RISC przyłącza się do komplementarnego fragmentu komórkowego mRNA. Tak powstała hybryda siRNA:mRNA jest rozcinana przez RISC uniemożliwiając translację mRNA, a w konsekwencji ekspresję informacji genetycznej [53]. Jedną z badanych modyfikacji wiązania internuklotydowego w siRNA były boranofosfoniano diestry (P-BH₃). Przeprowadzone badania pokazały, że wiązanie boranofosfonianowe jest odporne na działanie różnych komórkowych nukleaz. Modyfikowane grupą boranową jednoniciowe fragmenty siRNA w kompleksie z RISC efektywnie rozpoznawały i wiązały się z komplementarną nicią mRNA prowadząc w efekcie do jej degradacji [2, 54].

Pierwsze eksperymenty jakie zostały przeprowadzone tą techniką dotyczyły m.in. badania wpływu oligonukleozydo boranofosfonianów tworzących fragment siRNA (PB-siRNA) na ekspresję genu EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) w komórkach HeLa [14, 15]. Zsyntezowane za pomocą polimerazy T7 RNA podwójne oraz pojedyncze nici PB-siRNA wykazywały wyższą efektywność wyciszania ekspresji wybranego genu niż dotychczas stosowane analogi tiofosforanowe, oraz często nawet wyższą w porównaniu do natywnych siRNA. Postulowaną przyczyną podwyższonej wydajności procesu wyciszania ekspresji genu jest prawdopodobnie odporność nukleozydo boranofosfonianów na działanie nukleaz i przez to zwiększenie trwałości białkowego kompleksu RISC [15], niezbędnego w procesie interferencji. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują również, że skuteczna degradacja wyciszanego fragmentu mRNA wymaga odpowiedniego ułożenia tej nici wraz z komplementarnym fragmentem siRNA w helisę typu A [55]. Tworzenie się właśnie tego typu helisy jest preferowane przez oligonukleozydo boranofosfoniany, co w konsekwencji również może wpływać na efektywność procesu wyciszania genu.

Pochodne nukleozydo boranofosfonianów były również badane w kontekście ich wykorzystania w antysensowej strategii wyciszania ekspresji uszkodzonego genu. Technika ta polega na tworzeniu się kompleksu między wprowadzonym do komórki, modyfikowanym fragmentem DNA (np. PS-DNA, PB-DNA), a komplementarnym mRNA, którego translację chcemy wyciszyć. Powstały heterodupleks mRNA:DNA jest rozpoznawana przez RNaze H, która katalizuje rozpad nici mRNA w tej hybrydzie, hamując na tym etapie ekspresję informacji genetycznej [2, 56]. Przeprowadzone badania pokazały, że oligonukleozydo boranofosfoniany (PB-DNA) tworzą kompleksy z komplementarnym fragmentem mRNA w medium komórkowym. Powstałe na tej drodze heterodupleksy

DNA:mRNA są rozpoznawane przez RNazę H, a cały proces zachodzi według założonej strategii. Zwiększenie odporności antysensowych oligonukleotydów na degradację enzymatyczną (co ma miejsce w przypadku boranofosfonianów) podwyższa efektywność terapii antysensowej [2].

Opisane powyżej eksperymenty, stały się podstawą do prowadzenia dalszych badań nad pochodnymi nukleozydo boranofosfonianów jako potencjalnymi czynnikami mogącymi znaleźć zastosowanie w terapii antysensowej i antygenowej oraz dla wyciszenia ekspresji genów z wykorzystaniem strategii siRNA.

2.3. ODDZIAŁYWANIE NUKLEOZYDO I OLIGONUKLEOZYDO BORANOFOSFONIANÓW Z ENZYMAMI

Stabilność analogów nukleozydo boranofosfonianów wobec enzymów komórkowych była głównym czynnikiem decydującym o ich biologicznej atrakcyjności. Przeprowadzone badania pokazały, że oligonukleozdo boranofosfoniany wykazują wysoką stabilność wiązania internukleotydowego wobec różnego typu egzo- i endonukleaz oraz są substratami dla polimeraz DNA i RNA, katalizujących proces przyłączania kolejnych jednostek nukleotydowych podczas syntezy kwasów nukleinowych [45].

2.3.1. Oddziaływanie nukleozydo boranofosfonianów z nukleazami

Mimo że wiązanie internukleotydowe pochodnych nukleozydo boranofosfonianów jest powszechnie uznawane za odporne na hydrolizę katalizowaną nukleazami, to w niektórych przypadkach ta odporność nie jest całkowita [13, 45].

I tak badania, w których używano boranofosfonian ditymidynowy d[Tp(B)T] jako układ modelowy w reakcji z fosfodiesterazą z jadu węża (SVPDE – *snake venom phosphodiesterase, 3'-egzonukleaza*) pokazały, że jedynie stereoizomer *Sp*-d[Tp(B)T] jest rozpoznawany przez ten enzym. Sam proces hydrolizy wiązania internukleotydowego dla tego związku był około 330 razy wolniejszy w porównaniu do niemodyfikowanego dinukleozydowego fosforanu d(TpT). Stąd pochodne boranofosfonianów można uznać za względnie odporne na działanie tego typu nukleaz. Obydwa stereoizomery, *Sp* oraz *Rp* d[Tp(B)T], okazały się być kompetycyjnymi inhibitorami SVPDE, blokującymi jego naturalną aktywność.

W obecności fosfodiesterazy ze śledziona wołowej (BSPDE – *bovine spleen phosphodiesterase, 5'-egzonukleaza*), zachodziła hydroliza obu diastereoizomerów d[Tp(B)T]. W przypadku stereoizomeru *Sp* proces ten był 30, a dla *Rp* 80 razy wolniejszy w porównaniu do niemodyfikowanego dinukleozydo (3'-5')-fosforanu. Żaden z izomerów d[Tp(B)T] nie był substratem dla niespecyficznej endonukleazy

typu S_1 , ani dla specyficznej endonukleazy P_1 [45], które dokonują cięcia jednoniciowego DNA i RNA.

Analogi rybonukleozydo boranofosfonianów również wykazywały wysoką stabilność wobec enzymów nukleolitycznych [57]. Podobnie jak dla 2'-deoksynukleozydo boranofosfonianów, oddziaływanie odpowiedników rybonukleozydowych z tymi enzymami miało charakter stereospecyficzny. Przeprowadzone badania pokazały, że również stereoizomer Sp boranofosfonianu diurydyny Sp -[Up(B)U] był lepszym substratem dla fosfodiesterazy typu SVPDE niż izomer Rp (Sp -izomer $t_{1/2}$ = 80 h vs Rp -izomer $t_{5\%}$ = 90 h) [18, 57].

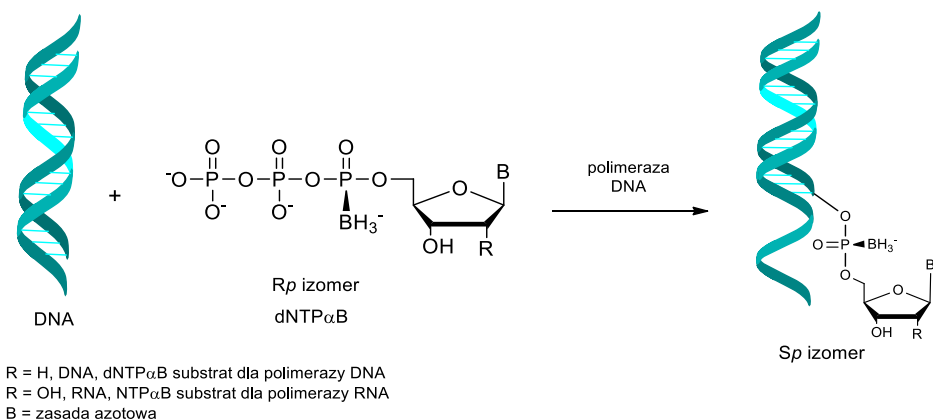
Większość badań nad stabilnością wiązania internukleotydoowego rybonukleozydo boranofosfonianów wobec SVPDE, BSPDE i RNazy A była prowadzona na dimerze r[Up(B)A]. Hydroliza wiązania internukleotydoowego dla tego analogu, katalizowana przez SVPDE, była ponad 2000 razy wolniejsza w porównaniu do niemodyfikowanej formy r[UpA]. Dlatego można uznać, że praktycznie żaden ze stereoizomerów tego związku nie jest substratem dla SVPDE. Stabilność diastereoizomerów r[Up(B)A] wobec fosfodiesterazy BSPDE była niższa w porównaniu z fosfodiesterazą SVPDE. Enzym ten hydrolizował wiązanie fosfodiesterowe w r[Up(B)A] tylko 4 razy wolniej niż w naturalnym dinukleozydowym fosforanie r[UpA]. Natomiast obydwa izomery, Sp jak i Rp -r[Up(B)A], okazały się być substratami dla RNazy A [18].

2.3.2. Oddziaływanie nukleozydo boranofosfonianów z polimerazą DNA i RNA

Polimeraza to enzym, którego zadaniem jest włączanie jednostek nukleotydoowych do tworzącego się łańcucha DNA lub RNA. Termostabilne odmiany polimerazy DNA są powszechnie wykorzystywane w laboratoriach biologicznych w reakcjach PCR (*polimerase chain reaction*), pozwalających na powielanie wybranej sekwencji DNA. Przeprowadzone badania na różnych analogach nukleotydoowych pokazały, że pochodne α -P-BH₃ nukleozydo trisfosforanów (dNTP α B [58], NTP α B [59]) są rozpoznawane przez polimerazę DNA [13, 45], większość termostabilnych odmian tego enzymu (Taq, Vent, Taq FS) oraz polimerazę RNA [13]. Wysoka stabilność termiczna boranotrisfosforanów dNTP α B oraz boranowanych oligonukleotydoów pozwala na ich wykorzystywanie w reakcji PCR. Dzięki temu możliwa jest łatwa i wydajna synteza łańcucha oligonukleotydoowego całkowicie modyfikowanego grupą boranową (P-BH₃) (BP DNA oraz BP RNA).

Oddziaływania dNTP α B i NTP α B z polimerazami DNA i RNA mają charakter stereospecyficzny. W obu przypadkach (dNTP α B, NTP α B), jedynie izomer o konfiguracji Rp umożliwia syntezę stereoregularnej nici BP DNA i BP RNA.

Reakcja ta zachodzi z inwersją konfiguracji na atomie fosforu prowadząc do oligonukleotydu o konfiguracji *Sp*-NTP α B internukleotydowego wiązania boranofosfonianowego [2] (Schemat 21).



Schemat 21. Stereospecyficzna synteza oligonukleozydu boranofosfonianów katalizowana przez polimerazę DNA

Scheme 21. Stereospecific synthesis of oligonucleoside boranephosphonates catalyzed by a DNA polymerase

Stereoizomery *Rp*-dNTP α B i *Rp*-NTP α B mogą w pełni zastąpić naturalny dNTP w reakcji wydłużania startera i reakcji PCR oraz NTP w procesie transkrypcji, katalizowanych przez polimerazy DNA i RNA [13]. Polimeraza bakteryjna typu T7 RNA umożliwia włączanie boranofosfonianów NTP α B zawierających wszystkie podstawowe zasady występujące w kwasach nukleinowych i syntezę całkowicie boranowanych fragmentów DNA i RNA [60].

UWAGI KOŃCOWE

Nukleozydo i oligonukleozydo boranofosfoniany stanowią nowy typ analogów kwasów nukleinowych. Ich znaczne podobieństwo pod względem struktury do naturalnych kwasów nukleinowych otworzyło szereg możliwości wykorzystania tych związków do badań nad nowymi terapeutykami i w diagnostyce medycznej. Zwiększona lipofilowość, wyższa odporność hydrolityczna na działania nukleaz, aktywowanie RNazy H to właściwości, które stwarzają unikalne możliwości wykorzystywania tych związków w badaniach biologicznych. Potencjał nukleozydo boranofosfonianów jest szeroko wykorzystywany nie tylko w badaniach biologicznych i projektowaniu nowych terapeutyków ale również jako precyzyjnych narzędzi w badaniach mechanizmów reakcji enzymatycznych. Ponadto same boranofosfoniany jako indywidualne chemiczne są ciekawymi obiektami chemicznymi. Do tej pory badania

nad tą klasą związków koncentrowały się przede wszystkim na opracowaniu efektywnych metod ich syntezy. W ostatnich latach interesującym zagadnieniem stały się badania reaktywności samej grupy boranowej nukleozydo boranofosfonianów [61-63]. Badania nad możliwościami modyfikowania funkcji boranowej mogą otworzyć nowe możliwości wykorzystania tych związków dla projektowania grup maskujących funkcję fosforanową lub markerów chemicznych w syntezie analogów oligonukleotydów, czy też opracowywaniu nowych farmakoforów i terapeutyków bazujących na kwasach nukleinowych.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję prof. dr. hab. Jackowi Stawińskiemu za nieocenioną pomoc w realizacji wszystkich prac badawczych związanych z moim doktoratem. Publikacja powstała w ramach realizacji projektu badawczego Preludium 16, 2018/31/N/STO/03589, finansowanego ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.S. Summers, B.R. Shaw, *Curr. Med. Chem.*, 2001, **8**, 1147.
- [2] B.R. Shaw, M. Dobrikov, X.I.N. Wang, J. Wan, K. He, J.-L. Lin, P. Li, V. Rait, Z.A. Sergueeva, D. Sergueev, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, **1002**, 12.
- [3] Y. Endo, T. Yoshimi, C. Miyaura, *Pure Appl. Chem.*, 2003, **75**, 1197.
- [4] W. Yang, X. Gao, B. Wang, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 346.
- [5] A. Adamczyk-Woźniak, K. Czerwińska, I.D. Madura, A. Matuszewska, A. Sporzyński, A. Żubrowska-Zembrzuska, *New J. Chem.*, 2015, **39**, 4308.
- [6] R.F. Barth, Z. Zhang, T. Liu, *Cancer Commun.*, 2018, **38**, 36.
- [7] S.C. Quah, *J. Xiangya Med.*, 2018, **3**, 29.
- [8] T.H. Hall, B.S. Burnham, K.G. Rajendran, S.Y. Chen, A. Sood, B.F. Spielvogel, B.R. Shaw, *Biomed. Pharmacother.*, 1993, **47**, 79.
- [9] A. Sood, B.R. Shaw, B.F. Spielvogel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 9000.
- [10] L. Wang, S. Jiang, Z. Deng, P.C. Dedon, S. Chen, *Microbiol. Rev.*, 2019, **43**, 109.
- [11] P.S. Miller, Non-ionic antisense oligonucleotides, in: J.S. Cohen (Ed.) *Oligonucleotides-Antisense Inhibitors of Gene Expression*, The Macmillan Press Ltd, New York, 1989.
- [12] P. Li, B.R. Shaw, *Chem. Commun.*, 2002, 2890.
- [13] K.W. Porter, J.D. Briley, B.R. Shaw, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 1611.
- [14] A.H. Hall, J. Wan, E.E. Shaughnessy, B. Ramsay Shaw, K.A. Alexander, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 5991.
- [15] A.H. Hall, J. Wan, A. Spesock, Z. Sergueeva, B.R. Shaw, K.A. Alexander, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 2773.
- [16] B. Schneider, P. Meyer, S. Sarfati, L. Mulard, C. Guerreiro, J. Boretto, J. Janin, M. Veron, D. Deville-Bonne, B. Canard, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2001, **20**, 297.
- [17] P. Meyer, B. Schneider, S. Safati, D. Deville-Bonne, C. Guerreiro, J. Boretto, J. Janin, M. Veron, B. Canard, *EMBO J.*, 2000, **19**, 3520.
- [18] P. Li, Z.A. Sergueeva, M. Dobrikov, B.R. Shaw, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4746.

- [19] J. Tomasz, B.R. Shaw, K. Porter, B.F. Spielvogel, A. Sood, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1992, **31**, 1373.
- [20] S.I. Khan, M.I. Dobrikov, B.R. Shaw, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2005, **24**, 1047.
- [21] J. Stawinski, A. Kraszewski, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 952.
- [22] J. Nilsson, M. Bollmark, J. Jankowska, M. Wenska, J. Cieslak, A. Kraszewski, J. Stawinski, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 2002, **177**, 1513.
- [23] P.J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1987, 1269.
- [24] M.A. Maier, A.P. Guzaev, M. Manoharan, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 1819.
- [25] J. Stawinski, M. Thelin, *J. Org. Chem.*, 1991.
- [26] T. Szabo, A. Kers, J. Stawinski, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 893.
- [27] J. Zhang, T. Terhorst, M.D. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 4957.
- [28] T. Imamoto, E. Nagato, Y. Wada, H. Masuda, K. Yamaguchi, T. Uchimaru, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 9925.
- [29] K. Vyakaranam, G. Rana, B.F. Spielvogel, J.A. Maguire, N.S. Hosmane, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2002, **21**, 581.
- [30] Y. Nukaga, T. Wada, *Chemical Synthesis of Boranophosphate Deoxy-ribonucleotides*, in: *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides*, 2018.
- [31] Z.A. Sergueeva, D.S. Sergueev, B.R. Shaw, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2001, **20**, 941.
- [32] H.B. McCuen, M.S. Noe, A.B. Sierzchala, A.P. Higson, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 8138.
- [33] D.S. Sergueev, B.R. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 9417.
- [34] A.P. Higson, A.B. Sierzchala, H. Brummel, Z. Zhao, M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 3899.
- [35] T. Wada, Y. Sato, F. Honda, S. Kawahara, M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 12710.
- [36] D.S. Sergueev, Z.A. Sergueeva, B.R. Shaw, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2001, **20**, 789.
- [37] T. Kawanaka, M. Shimizu, N. Shintani, T. Wada, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 3783.
- [38] M. Shimizu, K. Saigo, T. Wada, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 4262.
- [39] R. Higashida, N. Oka, T. Kawanaka, T. Wada, *Chem. Commun.*, 2009, 2466.
- [40] S. Uehara, S. Hiura, R. Higashida, N. Oka, T. Wada, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 3465.
- [41] T. Wada, Y. Maizuru, M. Shimizu, N. Oka, K. Saigo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 3111.
- [42] N. Iwamoto, N. Oka, T. Sato, T. Wada, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009, **48**, 496.
- [43] N. Iwamoto, N. Oka, T. Wada, *Tetrahedron Lett.*, 2012, **53**, 4361.
- [44] R.I. Hara, T. Saito, T. Kogure, Y. Hamamura, N. Uchiyama, Y. Nukaga, N. Iwamoto, T. Wada, *J. Org. Chem.*, 2019, **84**, 7971.
- [45] H. Li, K. Porter, F. Huang, B.R. Shaw, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 4495.
- [46] E. De Clercq, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2002, **1**, 13.
- [47] J. Romanowska, M. Sobkowski, A. Szymanska-Michalak, K. Kolodziej, A. Dabrowska, A. Lipniacki, A. Piasek, Z.M. Pietrusiewicz, M. Figlerowicz, A. Guranowski, J. Boryski, J. Stawinski, A. Kraszewski, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 6482.
- [48] G.W.G. Shu-ling Chang, Peter J. Southern, Carston R. Wagner, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 223.
- [49] P. Li, B.R. Shaw, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2005, **24**, 675.
- [50] P. Li, B.R. Shaw, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 2171.

- [51] B. Selmi, J. Boretto, S.R. Sarfati, C. Guerreiro, B. Canard, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 48466.
- [52] J. Deval, B. Selmi, J. Boretto, M.P. Egloff, C. Guerreiro, S. Sarfati, B. Canard, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 42097.
- [53] G. Meister, T. Tuschl, *Nature*, 2004, **431**, 343.
- [54] A.H.S. Hall, J. Wan, A. Spesock, Z. Sergueeva, B.R. Shaw, K.A. Alexander, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 2773.
- [55] Y. Chiu, T.M. Rana, *Mol. Cell*, 2002, **10**, 549.
- [56] A.M. Rossor, M.M. Reilly, J.N. Sleight, *Pract. Neurol.*, 2018, **18**, 126.
- [57] F.-C.Q. Yao-Quan Chen, Yi-Bing Zhang, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 745.
- [58] B. Krzyzanowska, H. Kaizhang, A. Hasan, S. B.R., *Tetrahedron* 1998, **54**, 5119.
- [59] K. He, A. Hasan, B. Krzyzanowska, B.R. Shaw, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 5769.
- [60] J. Wan, B.R. Shaw, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, 2005, **24**, 943.
- [61] J. Golebiewska, J. Stawinski, *J. Org. Chem.*, 2020, **85**, 4312.
- [62] S. Paul, S. Roy, L. Monfregola, S. Shang, R. Shoemaker, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 3253.
- [63] J. Golebiewska, M. Rachwalak, T. Jakubowski, J. Romanowska, J. Stawinski, *J. Org. Chem.*, 2018, **83**, 5496.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 marca 2020 r.

2

Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the
Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of
H-Phosphonate Derivatives

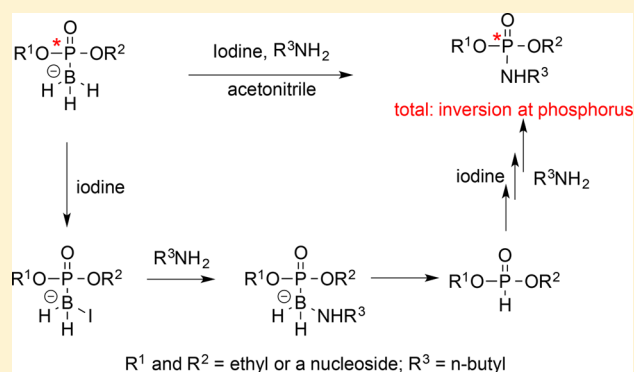
Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives

Justyna Gołębiewska, Marta Rachwalak, Tomasz Jakubowski, Joanna Romanowska,* and Jacek Stawinski*[✉]

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Poland

Supporting Information

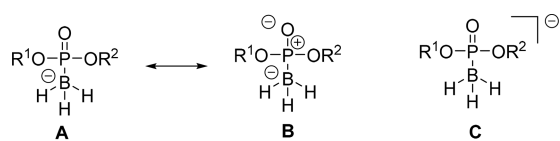
ABSTRACT: Mechanistic and stereochemical aspects of the reaction of boranephosphonate diesters with amines promoted by iodine were investigated. This is a complex, multistep reaction that ultimately produces the corresponding phosphoramidate diesters via a formal replacement of the borane group by an amine moiety. We found by a stereochemical correlation analysis that, contrary to a literature report, the whole transformation proceeded with total inversion of the configuration at the phosphorus center. Our study also showed that instead of the postulated nucleophilic substitution by iodide at the phosphorus center of the initially formed intermediate, the corresponding iodoboranephosphonate, the crucial step of the reaction involved intermediacy of H-phosphonate derivatives that reacted with iodine to afford ultimately phosphoramidate diesters. The reaction of the iodoboranephosphonate with the amine to produce an aminoboranephosphonate diester that rapidly dissociated into the corresponding H-phosphonate and the borane parts was apparently instrumental to the formation of an H-phosphonate diester intermediate.



The reaction of the iodoboranephosphonate with the amine to produce an aminoboranephosphonate diester that rapidly dissociated into the corresponding H-phosphonate and the borane parts was apparently instrumental to the formation of an H-phosphonate diester intermediate.

INTRODUCTION

Boranephosphonates¹ are analogues of natural phosphate esters in which the -BH_3 group replaces one of the nonbridging oxygen atoms.² The borane group (-BH_3) is isoelectronic with oxygen in phosphate esters and also with sulfur and the methyl group present in other phosphate analogues, e.g., phosphorothioates and methylphosphonates, respectively.³ Despite many similarities (e.g., a tetrahedral structure, the presence of a negative charge), there are significant differences between boranephosphonates compared to phosphate diesters.⁴ The phosphorus–boron bond in boranephosphonate diesters is a dative bond⁵ formed via transfer of a lone electron pair from a phosphite diester to an electron deficient borane. This is reflected in formula A in Figure 1 with a formal negative charge placed on the boron atom. However, since boron is less electronegative than oxygen, the negative charge resides mainly



R¹ and R² = alkyl, aryl, nucleoside, etc.

Figure 1. Various structural formulas for boranephosphonate diesters.

on the phosphoryl oxygen atom, as shown in a mesomeric form B. Moreover, in A and B the formal negative charge on the boron atom is assumed to be spread on the hydrogens as partial charges. Such charge distribution was supported by X-ray analysis, and this bonding pattern is somewhat similar to that of phosphonium salts.^{4,6} Alternatively, boranephosphonates can be presented as complex anions, analogous to $[\text{BH}_4]^-$, without assignment of a negative charge to the specific ligands (formula C).

The above clarifies that due to significant bonding differences compared to phosphodiester, incorporation of boranephosphonates into DNA or RNA can impart new properties to these biomolecules, e.g., chirality at the phosphorus centers, different bonds length, and disparate charge distribution in internucleotidic bonds. Indeed, it was found that the presence of the P-BH₃ group in oligonucleotides modulates their nuclease resistance, interaction with proteins, lipophilicity, hydrolytic stability, and secures generally low toxicity of the boron analogues.^{3,7} These features constituted the basis for the development in the last two decades of boranephosphonate-modified nucleic acids as potential antisense/antigene and siRNA gene silencing agents.^{2,3,8} Nucleoside boranephospho-

Received: February 13, 2018

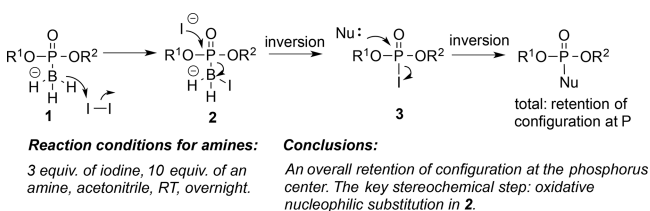
Published: April 23, 2018

nates as phosphate analogues were introduced by Shaw, Spielvogel, and Sood in the early 1990s,⁹ and then they were further developed by Shaw,¹⁰ Wada,^{6a,11} Caruthers,¹² and others.^{4,7,13}

Recently, Caruthers et al.¹⁴ expanded the scope of possible applications of boranephosphonates by developing the P-BH₃ group as a potential post-synthetic modification for nucleic acids. In this concept, the borane group serves as a stable chemical marker that can be targeted and labilized by a selective reagent to replace the -BH₃ group with another functionality,^{14a} or to introduce a modification at the boron atom itself.^{14b} The added value of such an approach is that due to chirality at the phosphorus center of boranephosphonates, one can, in principle, obtain nucleic acid mimics with stereochemically defined chiral internucleotide linkages.

The underlying chemistry for the targeting and the replacement of the borane group by nucleophiles developed by Caruthers et al.¹⁴ is shown in Scheme 1 and consists of an

Scheme 1. Mechanism for the Formal Replacement of the -BH₃ Group by a Nucleophile in Boranephosphonate Diesters Promoted by Iodine Postulated by Caruthers et al.^{14a}



R¹ and R² = nucleoside moieties; Nu = nucleophile, e.g. amine, alkoxide, carbanion, etc.

oxidative conversion of boranephosphonates to stereochemically defined phosphate diester derivatives, e.g., phosphoramidates, phosphotriesters, phosphorothiolates, and C-phosphonates. This transformation, which bears a high potential for the post-synthetic modification of oligonucleotides, was claimed to proceed with an overall retention of configuration at the phosphorus center and to involve, as a crucial step, a nucleophilic attack of iodide on the activated boranephosphonate intermediate 2 (Scheme 1).

Our interest in the development of synthetic methods based on H-phosphonate chemistry for the preparation of biologically important phosphorus compounds and their analogues¹⁵ and some unusual features of the above reaction prompted us to take a closer look at the proposed mechanism. By analyzing the reaction steps, we found a possible fundamental flaw in the mechanism that might affect the predicted stereochemistry of the reaction and also has a bearing for a general type of reactivity postulated for boranephosphonate derivatives. Taking into account the potential importance of this type of reaction in oligonucleotide chemistry and the claimed significance of the proposed oxidative nucleophilic substitution step at the boranephosphorus center in boron chemistry, we undertook these studies to clarify some chemical and stereochemical aspects of the above reaction. As model compounds for our studies, we chose boranephosphonate diesters **1a** and **1b**, and *n*-butylamine was chosen as a nucleophile.

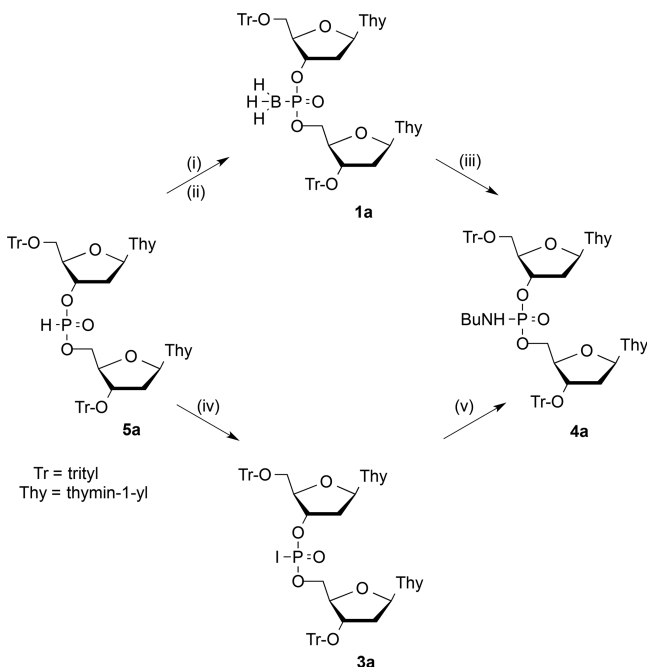
RESULTS AND DISCUSSION

Oxidation of a hydride in boranephosphonates **1** by iodine to produce monoiodoboranephosphonates **2** (and possibly di- or triiodo derivatives), that subsequently may undergo nucleophilic substitution at the phosphorus center by iodide, is the initial step in the mechanism postulated by Caruthers et al.^{14a} (Scheme 1). While the first step, the oxidation of a borane hydride by iodine, is quite likely,¹⁶ the second step, a nucleophilic substitution of the iodoborane group by iodide, seemed very implausible on at least three counts. First, iodide is not a particularly good nucleophile for the phosphorus.¹⁷ As a soft base, it is unlikely that iodide would efficiently attack hard phosphonate diesters in accordance with the principle of hard and soft acids and bases.¹⁸ Second, the boranephosphonate group in boranephosphonate diesters, similar to phosphate diesters, is negatively charged and thus can hinder the approaching nucleophile. Third, assuming a nucleophilic attack by iodide on the phosphorus center in **2** would necessitate the departure of the iodoborane group with an electron pair in the form of boryl dianion [:BH₂I]²⁻ with two formal negative charges. This would be thermodynamically unfavorable given the high basicity and nucleophilicity of boryl dianions.¹⁹ These are rather elusive species that are formed under highly reducing conditions, as evidenced by ¹¹B NMR spectroscopy (for generic [:BH₃]²⁻),²⁰ and their stability becomes manageable only upon extensive delocalization of the lone electron pair (casus [B(CN)₃]²⁻).²¹

The authors predicted retention of the configuration at the phosphorus center for the whole process, and this claim was substantiated by the NOESY-experiments. In the latter, the authors compared the NOE effects between protons of the BH₃ group and the ribose protons in the starting boranephosphonates of type **1** vs methyl and the ribose protons in the corresponding methyl phosphotriesters.^{14a} However, since spatial arrangements of the BH₃ vs OCH₃ protons in these compounds may differ significantly, we considered that this NMR spectroscopy evidence warrants additional studies to firmly establish a stereochemical relationship between the substrates and the products in this reaction.

Stereochemical Correlation Analysis. To establish a stereochemical outcome of the investigated reaction, we carried out a stereochemical correlation analysis. To this end, dinucleoside H-phosphonate **5a**, enriched in one of the diastereomers (³¹P NMR analysis; 2:1 mixture of the low field:the high field diastereomers; δ_p = 9.38 and 8.31 ppm), was synthesized and subjected to oxidative coupling with *n*-butylamine (Scheme 2, lower reaction path).²² This reference reaction, that is known to be stereospecific and to occur with inversion of the configuration at the phosphorus center,^{22,23} produced two diastereomers of dinucleoside phosphoramidate **4a** in the expected ratio of 1:2 (the high field:the low field diastereomers, ³¹P NMR analysis). In the second experiment, we converted the same diastereomeric mixture of H-phosphonate diesters **5a** into boranephosphonate diesters **1a** (see the Experimental Section) and subjected these to a reaction with iodine in the presence of *n*-butylamine, as described by Caruthers et al.^{14a} We found that patterns of the signals in the ³¹P NMR spectra of diastereomeric phosphoramidates **4a** obtained from H-phosphonate **5a** via boranephosphonate **1a** as an intermediate and that form a direct oxidative coupling of H-phosphonate **5a** with *n*-butylamine (the reference reaction) were identical (two signals between δ_p = 9–

Scheme 2. Conversion of H-Phosphonate Diester 5a into Phosphoramidate 4a via Oxidative Coupling with an Amine (Lower Path) and via Boranephosphonate Intermediate 1a (Upper Path), Both Promoted by Iodine^{4a}



^{4a}Reaction conditions: (i) 5 equiv of TMS-Cl and 5 equiv of TEA in CH₂Cl₂; (ii) 10 equiv of BH₃·SMe₂ in THF, followed by 25% aq ammonia treatment; (iii) 3 equiv of I₂ and 10 equiv of *n*-BuNH₂ in acetonitrile;^{14a} (iv) 2 equiv of I₂ and 4 equiv of TEA in acetonitrile;^{22a} and (v) 5 equiv of *n*-BuNH₂ in acetonitrile.^{22b} Abbreviations: TMS-Cl, trimethylsilyl chloride; TEA, triethylamine; and THF, tetrahydrofuran.

10 ppm, ratio 1:2; see Figure 2), and thus both reactions had to proceed with the same overall stereochemistry, namely, with total inversion of the configuration at the phosphorus center.

Since the transformation of H-phosphonate diesters into the corresponding boranephosphonates is known to occur with the retention of the configuration,^{13d,24} it is implied that a reaction of boranephosphonate 1a with iodine to produce iodophosphate 3a also has to occur with the retention of the

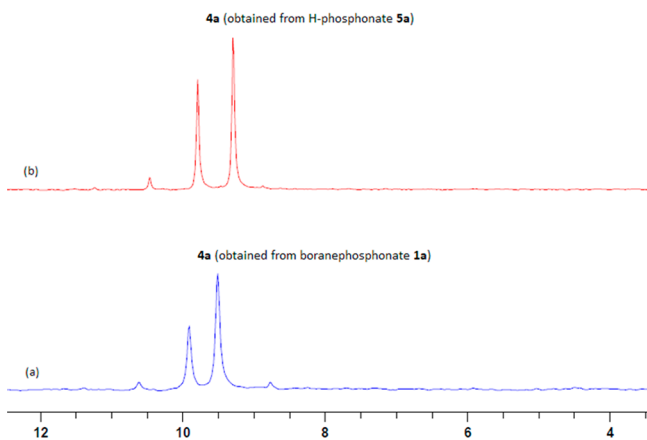
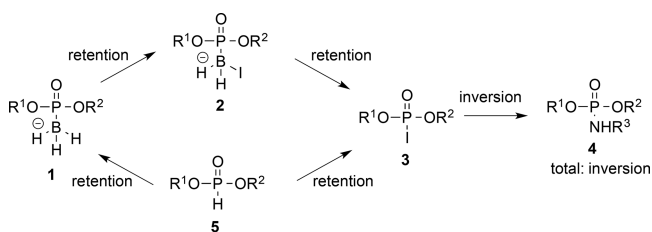


Figure 2. Excerpts of ³¹P NMR spectra of crude reaction mixtures of (a) boranephosphonate 1a + *n*-butylamine + iodine and (b) H-phosphonate 5a + *n*-butylamine + iodine (the reference reaction). For experimental details, see in the text.

configuration at the phosphorus center. This contradicted the finding by Caruthers et al.,^{14a} who claimed, for the latter step, inversion of the configuration for this process.

To clarify this point, all steps important for the stereochemical correlation analysis from Schemes 2 and 1 are summarized in Scheme 3. The correlation hinges on the

Scheme 3. Stereochemical Correlation Scheme for the Conversion of H-Phosphonate Diester 5 into Phosphoramidate 4 via a Direct Oxidative Coupling (the Lower Path) and via Intermediacy of Boranephosphonate 1 (the Upper Path)



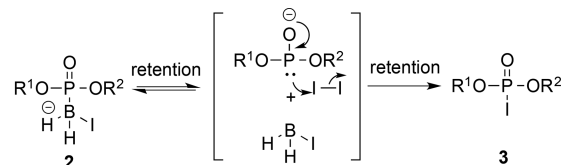
1a - 5a, R¹ and R² = nucleoside moieties as in Scheme 2; R³ = *n*-butyl
1b - 5b, R¹ = R² = ethyl; R³ = *n*-butyl

common intermediacy of phosphoriodate 3. This, on one hand, can be stereospecifically converted in the presence of an amine to the corresponding phosphoramidate 4 through inversion of configuration at the phosphorus,^{22b} and on the other one, can be generated on two independent routes, bifurcated from H-phosphonate 5. In the reference reaction, a tricoordinated form of H-phosphonate 5 reacted directly with iodine to afford the retention of the configuration of iodophosphate 3,^{22a} while for the investigated reaction, the same starting material 5 (after silylation) was used for the preparation of boranephosphonate 1. Since the transformation of H-phosphonate diesters into the corresponding boranephosphonates (5 into 1) proceeds with the retention of the configuration,^{13d,24} and the subsequent reaction with iodine (1 into 2) does not involve the phosphorus center (borane hydride oxidation), the sense of chirality of iodoboranephosphonate 2 must be the same as that of H-phosphonate 5. Thus, in Scheme 3, the stereochemistry of all of the reaction steps but one, namely, that from 2 to 3, is known. To obtain agreement with the experimental data, we had to assume that the conversion of iodoboranephosphonate 2 into the corresponding iodophosphate 3 occurred with the retention of the configuration, as indicated in Scheme 3. This, on stereochemical ground, in principle, ruled out a nucleophilic substitution by iodide at the phosphorus center suggested by Caruthers et al.^{14a} Having said that, there could be a remote possibility for this step to be nevertheless a nucleophilic substitution, provided it would involve a pseudorotation of the initially formed trigonal bipyramid intermediate (*tbp*). However, in acyclic phosphorus compounds, nucleophilic substitution occurs with inversion of the configuration without intermediacy of *tbp*, and a pseudorotation step is usually invoked to explain the stereochemical outcome of reactions when phosphorus is part of a ring system.²⁵ This adds another argument to those in the text above against an S_N2(P) process and thus called for another mechanism for this step for this reaction.

To provide a mechanistic explanation for this crucial step of the transformation (step 2 to 3), we propose that iodoboranephosphonate 2, formed by a borane hydride

oxidation of the boranephosphonate **1**, could undergo dissociation to a phosphite anion and iodoborane, followed by oxidation of the former by iodine to afford phosphoriodidate **3** (Scheme 4).

Scheme 4. Possible Mechanism for Transformation of Iodoboranephosphonate **2** into Phosphoriodidate **3** with Retention of Configuration



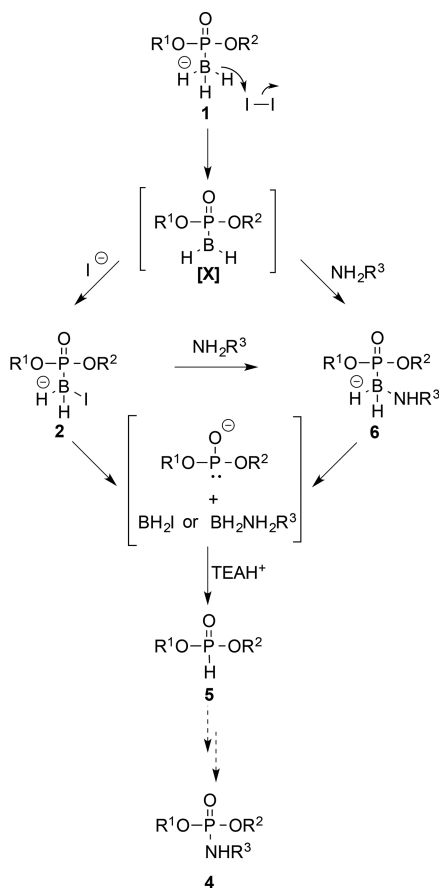
2a, 3a, R¹ and R² = nucleoside moieties as in Scheme 2.

2b, 3b, R¹ = R² = ethyl

Since both reactions in Scheme 4, i.e., the dissociation of iodoboranephosphonate **2**^{13d,24} and the oxidation of the phosphite anion,²² do not involve any change in the stereochemistry at the phosphorus atom, a total retention of the configuration is expected for this step, as depicted in the stereochemical correlation diagram (Schemes 4 and 5).

One should note that in contradistinction to a mechanism proposed by Caruthers et al.,^{14a} where iodine acted only as an

Scheme 5. Various Possible Pathways for the Formation of H-Phosphonate Diester **5** Intermediates



2a, 5a, 6a, R¹ and R² = nucleoside moieties as in Scheme 2; R³ = *n*-butyl
2b, 5b, 6b, R¹ = R² = ethyl; R³ = *n*-butyl

activator for the borane group of boranephosphonates of type **1** (via oxidation of a borane hydride), in our mechanism, iodine plays a dual role, being also a stoichiometric oxidant for the in situ generated P(III) species (phosphite anion of an H-phosphonate diester; Scheme 4). Thus, the two mechanisms could, in principle, be also distinguished by the amount of iodine consumed during the reaction. For the oxidative nucleophilic substitution mechanism, only 1 mol equiv of iodine was claimed to be necessary;^{14a} however, to get reproducible results, the authors routinely used 3 equiv of iodine (see Scheme 1). In our hands, the reaction consistently required at least 2–3 equiv of iodine to go to completion. Apparently, due to some subsequent reactions of iodine with an amine present and with borane derivatives formed, its consumption varied, depending on the reaction conditions.

Formation of an H-Phosphonate Diester as a Key Intermediate. The dissociation step that generates an H-phosphonate species (as a phosphite anion or its protonated form; Scheme 4) is critical for the discussed mechanism to be operative during the reaction of boranephosphonates with amines. Boranephosphonate diesters are stable compounds that can be stored and handled at ambient temperature without any particular precautions. In chemical terms, this means that the P–B bond in these compounds is rather strong and does not undergo a spontaneous scission. Since boranephosphonates are Lewis acid–base complexes, their stability is controlled by the acidity and basicity of the parent borane and the phosphonate parts.

Both our model compounds, dinucleoside boranephosphonate **1a** and diethyl boranephosphonate **1b**, afforded the corresponding phosphoramidates **4a** and **4b** when treated separately in dichloromethane or acetonitrile with *n*-butylamine (10 equiv) and iodine (3 equiv).^{14a} The ³¹P NMR experiments showed that the starting materials, boranephosphonates **1a** and **1b**, were stable in pyridine, acetonitrile, and dichloromethane in the presence of *n*-butylamine (50 equiv, 24 h, room temperature). Since upon addition of elemental sulfur (10 equiv) or sulfur and trimethylsilyl chloride (10 equiv of each) to such solutions, no sulfurization products (formation of the corresponding phosphorothioate diesters) could be detected, we inferred that under these experimental conditions, boranephosphonates **1** did not dissociate spontaneously to afford detectable equilibrium mixtures of the parent H-phosphonate derivatives and borane. Thus, it seemed that the generation of appreciable amounts of H-phosphonate diesters from boranephosphonates must apparently involve an initial activation of **1** by iodine²⁶ as was suggested by Caruthers et al.^{14a} To unravel this point, first we wanted to know if we could observe, by ³¹P or ¹¹B NMR spectroscopy, the formation of the postulated initial intermediates of the reaction, namely, the corresponding iodoboranephosphonate derivatives **2**. This would permit further studies on the susceptibility of intermediates **2** to dissociate into the Lewis acid–Lewis base components, a critical step in our mechanistic proposition. We considered two scenarios: (i) a direct fragmentation of iodoboranephosphonates **2** into the corresponding H-phosphonate diesters **5**, and (ii) a possible formation of H-phosphonates **5** from **2** via other, unidentified yet boranephosphonate intermediates.

Scheme 5 depicts some possible pathways for the generation of H-phosphonate diesters **5** during the course of the reaction of boranephosphonates **1** with amines promoted by iodine. Oxidation of a borane hydride in **1** by iodine might initially

form a trigonal, electron-deficient borane intermediate [X] that coordinates iodide to afford iodoboranephosphonate **2**. In the presence of amine nucleophile during the hydride oxidation by iodine, it could intercept the incipient intermediate [X] to form aminoboranephosphonate **6**. Alternatively, both species **2** and **6** could also be formed directly from boranephosphonate **1** without the intermediacy of [X] via four-center transition states involving iodine (for iodoboranephosphonate **2**) or amine–iodine complexes²⁷ (for aminoboranephosphonate **6**). Irrespective how they were formed, **2** and **6** might afford H-phosphonate **5**, but their propensity to spontaneous dissociation should depend on the Lewis acid strength of the borane moieties in these compounds. By comparing the inductive vs the π -electron donating effects of iodo and amino substituents in trigonal borane derivatives,²⁸ we expected that the latter should significantly prevail in aminoboranes, making them weaker Lewis acids.

By this token, we anticipated that aminoboranephosphonates **6** would be more susceptible to dissociate into the parent Lewis acid–Lewis base components than iodoborane **2** derivatives, and thus a pathway to H-phosphonate **5** via aminoborane **6** intermediates (Scheme 5) should be thermodynamically favored.

To find support for this hypothesis, we carried out a reaction of boranephosphonates **1** with iodine under various experimental conditions by varying solvents, ratio, and kinds of reactants. When iodine (3 equiv) was added to a solution of boranephosphonates **1** and *n*-butylamine (5–10 equiv) in dichloromethane or acetonitrile, the reaction proceeded to completion within a few minutes to afford the expected phosphoramidates **4** without the formation of any detectable intermediates. This indicated that the first step of the reaction in Scheme 5, i.e., the oxidation of a borane hydride in **1** by iodine, appeared to be the rate limiting step of the whole transformation.

To get some insight into the possible intermediates involved in this reaction, we first attempted to react diethyl boranephosphonate **1b** in dichloromethane with iodine alone (an activation process). Since amine is apparently involved in the very last step of the reaction, its absence should possibly cause accumulation, and thus detection by ³¹P NMR spectroscopy, of some of the postulated upstream intermediates. Indeed, after the addition of 1 equiv of iodine to a dichloromethane solution of **1b**, the first ³¹P NMR spectrum recorded revealed, besides the starting material **1b** (ca. 29%, $\delta_p = 99.80$ ppm) and diethyl phosphoriodidate **3b** (ca. 7%, $\delta_p = -41.88$ ppm), also the presence of an intermediate we searched for, namely, diethyl H-phosphonate **5b** (ca. 22%, $\delta_p = 8.21$ ppm), and a signal from an unknown species, resonating at $\delta_p = 67.42$ ppm (ca. 35%). Significant broadening of this resonance indicated the presence of a boron atom, and thus the signal was tentatively assigned to the postulated, initial intermediate of the reaction, diethyl iodoboranephosphonate **2b** (Scheme 5). The reaction with 2 equiv of iodine proceeded analogously, except the starting material **1b** completely disappeared, and the intermediate **2b** amounted to 68%. In both instances, the addition of *n*-butylamine (10 equiv) and more iodine (another 1–2 equiv) resulted in the immediate, complete disappearance of all of the intermediates and the formation of diethyl *n*-butylphosphoramidate **4b** ($\delta_p = 8.45$ ppm) as the sole phosphorus-containing product (³¹P NMR analysis). A similar course of the reaction was also observed in acetonitrile,²⁹ but since the activation of boranephosphonates **1** was more

efficient in dichloromethane than in acetonitrile, the former solvent was used in further studies.

These results were consistent with the proposed reaction pathway of boranephosphonate diesters with amines promoted by iodine, depicted in Scheme 5. First, they indicated that iodoboranephosphonate intermediate **2b** can, to some extent, spontaneously dissociate to afford some amounts of H-phosphonate **5b**, a stereochemically important type of intermediate for this reaction, and second, that all the intermediates observed, i.e., iodoboranephosphonate **2b**, H-phosphonate diester **5b**, and phosphoriodidate **3b**, are possible or factual intermediates in the above reaction.

As mentioned above, the addition of iodine as the last reagent (i.e., when boranephosphonate diester and amine were both present in the reaction mixture) could trigger a new reaction pathway. This concerns a putative aminoboranephosphonate **6** intermediate, which could be formed both via a direct coordination of an amine to an electron-deficient borane intermediate [X] (or directly from **1** via a four-center transition state) and a nucleophilic attack of an amine at the boron center of iodoboranephosphonate **2b** (Scheme 5) under these conditions.

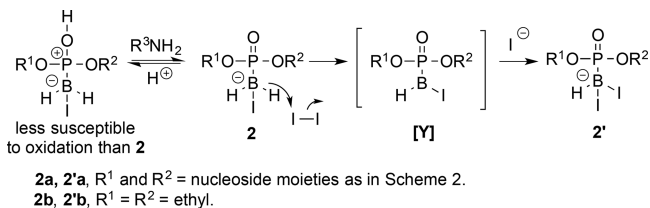
Since these pathways are cryptic during the course of a regular reaction (i.e., when all reactants are present in sufficient amounts), we addressed this issue by (i) reacting **1a** with a limited amount of iodine in the presence of *n*-butylamine and (ii) treating a generated iodoboranephosphonate **2b** with *n*-butylamine. To this end, to a solution of boranephosphonate **1b** in dichloromethane containing *n*-butylamine (1 equiv) we added 1 equiv of iodine. In the ³¹P NMR spectrum obtained, the pattern of the signals was qualitatively similar to that of the reaction of **1b** with iodine alone (presence of signals from the starting material **1b**, the putative iodoboranephosphonate intermediate **2b**, H-phosphonate **5b**, and iodophosphate **3b**; vide supra), except for a new resonance from an unknown intermediate at $\delta_p = 42.63$ ppm (ca. 10%).³⁰ Quenching this reaction mixture with *n*-butylamine (10 equiv) caused the signals from iodoboranephosphonate **2b** (at ca. 69 ppm) and the unknown intermediate (at ca. 42 ppm) to immediately disappear, and only the unreacted starting material **1b**, H-phosphonate **5b**, and a small amount of phosphoramidate **4b** (from iodophosphate **3b**) remained (³¹P NMR analysis).

These experiments indicated that the signal at ca. 42 ppm was not due to a side product formation but corresponded to a legitimate intermediate of the reaction, and thus it was tempting to assign it to the postulated aminoboranephosphonate **6b**. Although the signal at ca. 42 ppm was clearly observed when the activation of boranephosphonate **1b** was carried out in the presence of *n*-butylamine, we exercised some caution as it was rather broad and could be overlooked in noisy ³¹P NMR spectra, especially at a low concentration of the intermediate. Indeed, scrutiny of all of our previous ³¹P NMR spectra from the reaction of **1b** with iodine in the absence of *n*-butylamine showed that in a few instances, we could discern a slight bump in the spectra at ca. 42 ppm that might correspond to the sought intermediate. This was a compelling argument that an intermediate resonating at ca. 42 ppm did not contain a *n*-butylamine moiety as a structural fragment and, thus, could not be assigned to aminoboranephosphonate **6b**.

In light of the above, we hypothesized that when the activation of boranephosphonate **1b** with iodine is carried out in the presence of a base (*n*-butylamine), the initially formed activation product, iodoboranephosphonate **2b**, can be prone to

further borane hydride oxidize and form diiodoboranephosphonate **2'** (Scheme 6). We assigned this structure to an intermediate that resonated at ca. 42 ppm in the ^{31}P NMR spectra.

Scheme 6. Formation of a Putative Diiodoboranephosphonate Intermediate under Basic Conditions



To substantiate this hypothesis, we reacted boranephosphonate **1b** in dichloromethane with iodine (2 equiv) in the presence of 2,6-lutidine (5 equiv). The ^{31}P NMR spectrum (after 5 min) revealed, apart from a resonance due to iodophosphate **3b** ($\delta_{\text{p}} = -41.32$ ppm, ca. 13%), two broad signals at 62.56 ppm (ca. 60%) and 40.75 ppm (ca. 27%). These were assigned to the two putative intermediates, namely, iodoboranephosphonate **2b** and diiodoboranephosphonate **2'**. Since both of them were converted into phosphoramidate **4a** upon the addition of *n*-butylamine, they were assumed to be potential intermediates involved in the investigated reaction.

We also probed the reactivity of iodoboranephosphonate **2b** toward *n*-butylamine as a possible step in the investigated reaction (step 2 to **6**, Scheme 5). The most revealing experiment consisted of an incremental addition of *n*-butylamine to a reaction mixture that was formed from the activation of boranephosphonate **1b** with a limited amount of iodine (Figure 3). We tried to minimize the amount of iodine used so that in the reaction mixture, after the generation of iodoboranephosphonate intermediate **2b**, no iodine was left.³¹

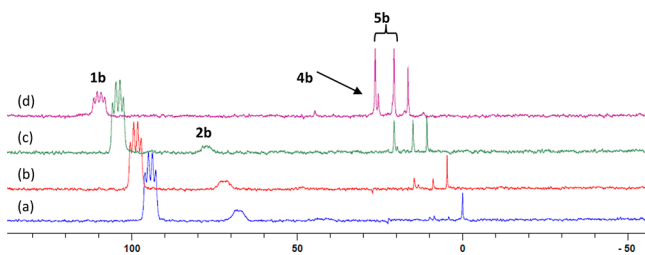


Figure 3. ^{31}P NMR spectra of the reaction of iodoboranephosphonate **2b** with *n*-butylamine in dichloromethane. (a) The reaction of **1a** with *n*-butylamine (1 equiv) and iodine (0.8 equiv), (b) after the addition of 1 equiv of *n*-butylamine, (c) after the addition of another equiv of *n*-butylamine (total 2 equiv), and (d) after the addition of a total 10 equiv of *n*-butylamine.

This would permit us to observe what species are formed upon reaction of **2b** with the added *n*-butylamine. Under such conditions (Figure 3), no new intermediates could be detected, and only a gradual disappearance of **2b** and an accumulation of H-phosphonate **5b** were observed (Figure 3). This strongly suggested that in the presence of *n*-butylamine, iodoboranephosphonate **2b** underwent a rapid nucleophilic substitution at the boron center to form aminoboranephosphonate **6b**, that immediately collapsed to the corresponding H-phosphonate **5b**

and the aminoborane. Apparently, due to inherent instability of aminoboranephosphonates **6**, the postulated intermediate **6b** did not accumulate and, thus, could not be detected under the reaction conditions.

The above experiment was also pertinent to the mechanism proposed by Caruthers et al.^{14a} If iodoboranephosphonates **2** would be susceptible to nucleophilic substitution by iodide,^{14a} they should even more readily react with *n*-butylamine to afford phosphoramidates **4**. Since this was not the case, the reaction of **2b** with *n*-butylamine lent support for the mechanism depicted in Scheme 5 that involves the intermediacy of H-phosphonate diester **5**. Additionally, in a separate experiment, iodoboranephosphonate **2b**, generated from **1b** and iodine (1 equiv) in dichloromethane, was subjected to a reaction with 10 equiv of the added tetrabutylammonium iodide to probe its susceptibility to nucleophilic substitution. Since no measurable increase in the amount of phosphoriodidate **3b** could be detected, this, again, argued against a mechanism involving a nucleophilic attack of iodide on the phosphorus center. It seems that a mechanism in Scheme 5 is rather general for amine nucleophiles, as analogous types of intermediates were observed in the reactions with aromatic amines (e.g., aniline) and 2° amines (e.g., diethylamine).

To sum up this part, all of the above experiments indicate that various pathways are possible for the investigated reaction (Scheme 5 and 6). The reaction of boranephosphonate diesters **1** with *n*-butylamine promoted by iodine most likely commences with a borane hydride oxidation to produce a putative trivalent borane intermediate [X]. Under the reaction conditions, this may coordinate iodide and *n*-butylamine to produce two putative intermediates, iodoboranephosphonate **2** and aminoboranephosphonate **6**. The latter, due to its inherent instability, immediately collapsed to afford the corresponding H-phosphonate diester **5**, while the former most likely reacted with the amine present to be converted into **5**, with the intermediacy of the corresponding aminoboranephosphonate **6**. Alternatively, **2** and **6** could be formed from boranephosphonate **1** directly via reactions involving four-center transition states. Under basic conditions, monoiodoborane intermediate **2** can partially be converted into diiodoboranephosphonate **2'**, that is apparently also susceptible to the reaction with amine. H-Phosphonate **5** can also probably be formed directly from iodoboranephosphonate **2**, but this process is expected to be much slower than the reaction with the amine. All of the above reaction steps occur with a retention of configuration, and thus, the sense of chirality of boranephosphonate **1** is preserved in the H-phosphonate diester **5** formed. There are two more reaction steps that follow this key intermediate formation, namely, the oxidation of **5** by iodine to the corresponding phosphoriodidate **3** (with retention of the configuration) and its reaction with *n*-butylamine (with inversion of the configuration). These furnished the final product, the corresponding phosphoramidate **4**, with a total inversion of the configuration at the phosphorus center.

Finally, due to probably similar kinetics of the formation of **2** and **6** (directly from **1** or via intermediate [X]) and the formation of **2'** from **2**, as well as conversion of **2** and **2'** into **6**, all of these pathways can most likely be operative during the course of the reaction. Although changes in the reaction conditions can modulate their contributions, this should not affect the final stereochemical outcome of the whole transformation that is governed by the stereochemistry of the key

intermediate formed, namely the corresponding H-phosphonate diester.

CONCLUSIONS

We designed and carried out a stereochemical correlation analysis for the formation of phosphoramidate diesters from the corresponding boranephosphonate derivatives. Contrary to previous studies,^{14a} we found that the reaction of boranephosphonate diesters **1** with amines promoted by iodine proceeded with total inversion of configuration at the phosphorus center and involved the formation of the corresponding H-phosphonate as a stereochemically important intermediate. On this basis, we could dismiss an oxidative nucleophilic attack on the phosphorus as a crucial step in this reaction. The role of iodine in the whole transformation was found to be 2-fold: (i) activation of the borane group via oxidation of the hydride anion to produce an iodoborane function ($-\text{BH}_2\text{I}$; intermediate **2** and possibly **2'**) and (ii) oxidation of the key intermediate, H-phosphonate diester **5**, to the corresponding phosphoriodidate diester. The reaction of iodoboranephosphonates **2** with an amine to produce a putative aminoboranephosphonate **6**, that apparently rapidly dissociated into the H-phosphonate **5** and the borane parts, is most likely instrumental to the formation of the H-phosphonate intermediate. Since all the reaction steps leading to H-phosphonate diesters **5** occur with retention of the configuration, the sense of chirality of boranephosphonates **1** is preserved in this intermediate. The two final steps, oxidation of H-phosphonate **5** by iodine followed by the reaction with the amine present, furnished the final phosphoramidates **4** with total inversion of the configuration.

EXPERIMENTAL SECTION

All reagents were of analytical grade, obtained from commercial suppliers, and used without further purification. The anhydrous solvents used for the reactions were stored over molecular sieves 4 Å. TLC analyses were carried out on Merck silica gel 60 F 254 precoated plates using a CH_2Cl_2 –MeOH 9:1 (v/v) solvent system. All evaporations were carried out on rotatory evaporators under reduced pressure at 40 °C.

H-Phosphonate diester **5a** was synthesized from the appropriate H-phosphonate monoesters³² and alcohols according to standard coupling procedures.³³ The P-diastereomers of **5a** were separated using silica gel chromatography with ethyl acetate:toluene 99:1 (v/v) as a solvent system. These diastereomers are referred to as “slow” and “fast” (chromatographic mobility) or “low-field” and “high-field” (signals in the ³¹P NMR spectra). For these studies, **5a** was used as a 2:1 or 1:2 mixture of the diastereomers.

The NMR spectra were recorded using a Bruker Avance II 400 MHz instrument. The chemical shifts are reported in ppm, relative to solvent peaks (¹H, ¹³C NMR), 2% H_3PO_4 solution in D_2O (³¹P NMR), and BF_3 diethyl etherate (¹¹B NMR). Assignment of the NMR signals was accomplished on the basis of the expected chemical shift values, splitting pattern of the signals, and 2D correlation experiments. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on Thermo Fisher Scientific Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer. Identification of intermediates observed in the ³¹P and ¹¹B NMR spectra of the reaction mixtures was done on the basis of the expected chemical shifts, coupling constants, shapes of the multiples, and spiking of the reaction samples with compounds of known structures.

For compounds **1a** and **4a**, due to the presence of two P-diastereomers and similar chemical shifts of the protons in the 3'- and 5'-nucleoside units, multiplicity and overlapping of the resonances were observed in the ¹H NMR spectra. For this reason, only selected diagnostic signals are listed. Purity of the isolated compounds was >97% (¹H NMR spectroscopy).

Synthesis of 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-Tritylthymidin-3'-yl Boranephosphonate 1a, Triethylammonium Salt. 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-tritylthymidin-3'-yl H-phosphonate **5a** (0.1 mmol) was placed in a 100 mL pear-shaped flask and evaporated twice then added anhydrous dichloromethane (2×20 mL). The residue was dissolved in anhydrous dichloromethane (20 mL), and then triethylamine (0.5 mmol) and trimethylsilyl chloride (0.5 mmol) were added. After being stirred for 10 min, borane dimethyl sulfide complex in THF (1 mmol) was added to the generated silyl phosphite derivative. The reaction mixture was stirred for another 10 min, and progress of the reaction was monitored by ³¹P NMR spectroscopy. After the reaction mixture was quenched by the addition of an aqueous ammonia (25%, 2 mL) and the removal of the solvents, the product was purified by silica gel column chromatography using a gradient of methanol in dichloromethane (0–5%, v/v) containing triethylamine (1%). Fractions containing the desired product were collected and evaporated to yield **1a** as a white solid (96 mg). Yield 85%. $R_f = 0.13$ and 0.28. HRMS m/z : $[\text{M}-\text{Et}_3\text{NH}^+]^-$ Calcd for $\text{C}_{58}\text{H}_{57}\text{BN}_4\text{O}_{11}\text{P}$, 1027.3860; found, 1027.3878. ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, (diagnostic signals) δ): –0.20–0.80 (br m, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 6.30–6.70 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 8.6, 11.6, 12.5, 39.1, 39.5, 45.6, 64.2, 74.9, 76.0, 84.9, 85.5, 85.9, 87.6, 87.8, 111.4, 127.4, 128.1, 128.7, 128.9, 135.79, 136.5, 143.3, 144.1, 144.3, 150.8, 164.2. ³¹P NMR (CDCl_3 , 162 Hz, δ): 94.15 (br m). ¹¹B NMR (CDCl_3 , 128.4 Hz, δ): –38.47 (br).

Synthesis of Diethyl Boranephosphonate 1b, Triethylammonium Salt. **1b** was obtained analogously to **1a** using diethyl H-phosphonate (0.1 mmol) as a starting material. The product was purified by silica gel column chromatography using a 0–10% gradient of methanol in dichloromethane containing triethylamine (1%). The separation was controlled by TLC chromatography by evocating spots in a chamber with iodine vapor. Compound **1b** was obtained as a colorless oil (23 mg). Yield 90%. HRMS m/z : $[\text{M}-\text{Et}_3\text{NH}^+]^-$ Calcd for $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{BO}_3\text{P}$, 151.0701; found, 151.0689. ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ): –0.40–0.60 (br m, 3H), 0.15 (m, 3H), 1.06 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.1 Hz), 1.13 (t, 6H, ³J_{HH} = 7.3 Hz), 2.9 (q, 4H, 7.3 Hz), 3.73 (m, 4H, ³J_{HH} = 7.3 Hz). ¹³C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 8.1, 16.4 (d, ³J_{PC} = 5.8 Hz), 45.4, 59.1 (d, ²J_{PC} = 4.1 Hz). ³¹P NMR (CDCl_3 , 162 Hz, δ): 95.31 (br q, ¹J_{PB} = 131.0 Hz). ¹¹B NMR (CDCl_3 , 128.4 Hz, δ): –41.25 (d, ¹J_{PB} = 134.7 Hz).

Transformation of 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-Tritylthymidin-3'-yl H-Phosphonate 5a into 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-Tritylthymidin-3'-yl n-Butylphosphoramidate 4a (the Reference Reaction). 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-tritylthymidin-3'-yl H-phosphonate **5a** (0.1 mmol; a ca. 2:1 mixture of the low and high field diastereomers; $\delta_p = 9.38$ and 8.31 ppm) was made anhydrous by the evaporation of the added pyridine (2×20 mL) and acetonitrile (2×20 mL), and then it was left overnight on the vacuum line. The residue was dissolved in anhydrous acetonitrile (20 mL), and then *n*-butylamine (0.5 mmol) and iodine (0.3 mmol) dissolved in acetonitrile (0.5 mL) were added. After being stirred for 5 min, the ³¹P NMR spectrum was recorded. It showed two signals of intensities ca. 1:2 at $\delta_p = 9.91$ and 9.51 ppm, corresponding to the expected phosphoramidate **4a**. The product was isolated by silica gel column chromatography using a gradient of methanol in dichloromethane (0–5%). Compound **4a** was obtained as a white solid (80 mg). Yield 74%. $R_f = 0.66$. HRMS m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$, 1084.4267; found, 1084.4277. ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, (diagnostic signals) δ): 1.42 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 6.27–6.45 (br m, 2H). ¹³C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 14.1, 14.8, 16.1, 22.1, 36.0, 41.5, 43.4, 65.9, 68.5, 86.8, 87.3, 87.7, 90.1, 90.5, 113.5, 114.0, 130.0, 130.5, 131.1, 131.2, 137.7, 138.2, 145.4, 146.3, 152.9, 166.4. ³¹P NMR (CDCl_3 , 162 Hz, δ): 9.51, 9.91 (integration ca. 2:1).

Transformation of 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-Tritylthymidin-3'-yl Boranephosphonate 1a into 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-Tritylthymidin-3'-yl n-Butylphosphoramidate 4a. 3'-O-Tritylthymidin-5'-yl 5'-O-tritylthymidin-3'-yl boranephosphonate **1a** (0.1 mmol; obtained from ca. 1:2 diastereomeric mixture of **5a** as described above) was dried by the evaporation of the added anhydrous acetonitrile (2×20 mL) and was dissolved in the same

solvent (20 mL). To this, *n*-butylamine (1 mmol) and iodine (0.3 mmol, dissolved in 0.5 mL of acetonitrile) were added. After being stirred for 5 min, the ^{31}P NMR spectrum was recorded. It showed two signals of intensities 1:2 at $\delta_{\text{p}} = 9.66$ and 9.30 ppm, corresponding to the expected phosphoramidate **4a**. The pattern of the signals was the same as in the reference reaction, and after isolation of the product (74 mg), it was found to be identical to that from the direct oxidative coupling above. Yield 68%. $R_{\text{f}} = 0.68$. HRMS m/z : $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ Calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$, 1084.4267; found, 1084.4276. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, (diagnostic signals) δ): 1.43 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 6.30–6.45 (br m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 11.7, 12.4, 13.6, 14.1, 19.6, 19.7, 22.7, 29.7, 30.0, 31.9, 33.7, 39.1, 41.0, 63.6, 66.01, 74.4, 84.3, 85.4, 87.7, 88.1, 111.1, 111.7, 127.6, 128.09, 128.14, 128.7, 128.8, 135.2, 135.5, 143.0, 144.0, 150.3, 163.7. ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 Hz, δ): 9.30, 9.66 (integration ca. 2:1).

Synthesis of Diethyl *n*-Butylphosphoramidate **4b.** **4b** was obtained analogously to **4a** using diethyl H-phosphonate (0.1 mmol) as a starting material. The product was purified by silica gel column chromatography using a 0–10% gradient of methanol in dichloromethane containing triethylamine (1%). The separation was controlled by TLC chromatography by evocating spots in a chamber with iodine vapor. Compound **4b** was obtained as a colorless oil (17.5 mg). Yield 85%. HRMS m/z : $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ Calcd for $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{P}$, 208.1108; found, 208.1100. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ): 0.84 (t, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz), 1.25 (m, 8H), 1.41 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 3.98 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 13.6, 16.1 (d, $^2J_{\text{PC}} = 7.1$ Hz), 19.6, 33.7 (d, $^2J_{\text{PC}} = 6.1$ Hz), 41.0, 62.0 (d, $^2J_{\text{PC}} = 5.3$ Hz). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 Hz, δ): 9.33.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.joc.8b00419.

^1H , ^{13}C , ^{31}P , and ^{11}B NMR spectra (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Tel.: (+) 48 61 852 85 02 ext. 181; Fax: (+) 48 61 852 05 32; E-mail: js@organ.su.se and jstaw@ibch.poznan.pl

*Tel.: (+) 48 61 852 85 02 ext. 191; Fax: (+) 48 61 852 05 32; E-mail: joarom@ibch.poznan.pl

ORCID

Jacek Stawinski: 0000-0001-9350-3018

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Prof. Zofia Gdaniec and Dr. Witold Andrałojć for their help with ^{11}B NMR measurements and Jakub Idkowiak for MS analysis. Financial support from the National Centre for Research and Development (Grant LIDER/041/711/L-4/NCBR/2013 to J.R.) and the Polish Ministry of Science and Higher Education (the KNOW program) is greatly acknowledged.

■ REFERENCES

(1) Since boron is less electronegative than carbon or hydrogen, for this class of compounds, we prefer a generic name “phosphonate” over “phosphate”, analogously to C-phosphonate and H-phosphonate derivatives.

(2) Li, P.; Sergueeva, Z. A.; Dobrikov, M.; Shaw, B. R. Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: Chemistry and properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4746–4796.

(3) Summers, J. S.; Shaw, B. R. Boranophosphates as Mimics of Natural Phosphodiesterases in DNA. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1147–1155.

(4) Nahum, V.; Fischer, B. Boranophosphate salts as an excellent mimic of phosphate salts: Preparation, characterization, and properties. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, *2004*, 4124–4131.

(5) (a) Haaland, A. Covalent versus Dative Bonds to Main Group Metals, a Useful Distinction. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 992–1007. (b) Cowley, A. H.; Damasco, M. C. A Study of the Donor-Acceptor Bond in Phosphine-Borane Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6815–6821.

(6) (a) Imamoto, T.; Nagato, E.; Wada, Y.; Masuda, H.; Yamaguchi, K.; Uchamaru, T. New boranophosphorylation reagents, dimethyl boranophosphate monopotassium salt and tetramethyl boranophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9925–9926. (b) Summers, J. S.; Roe, D.; Boyle, P. D.; Colvin, M.; Shaw, B. R. Structural studies of a borane-modified phosphate diester linkage: Ab initio calculations on the dimethylboranophosphate anion and the single-crystal X-ray structure of its diisopropylammonium salt. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4158–4159.

(7) (a) Spielvogel, B. F. Boron analogues of biomolecules: biomedical prospects. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1994**, *87*, 267–276.

(b) Lin, J.; Shaw, B. R. Synthesis of new classes of boron-containing nucleotides. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 587–596.

(c) Dobrikov, M. I.; Grady, K. M.; Shaw, B. R. Introduction of the alpha-P-borano-group into deoxynucleoside triphosphates increases their selectivity to HIV-1 reverse transcriptase relative to DNA Polymerases. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 275–282. (d) Wang, X.; Dobrikov, M.; Sergueev, D.; Shaw, B. R. RNase H activation by stereoregular boranophosphate oligonucleotide. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1151–1153. (e) Rait, V. K.; Shaw, B. R. Boranophosphates Support the RNase H Cleavage of Polyribonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1999**, *9*, 53–60.

(f) Meyer, P.; Schneider, B.; Sarfati, S.; Deville-Bonne, D.; Guerreiro, C.; Boretto, J.; Janin, J.; Veron, M.; Canard, B. Structural basis for activation of alpha-boranophosphate nucleotide analogues targeting drug-resistant reverse transcriptase. *EMBO J.* **2000**, *19*, 3520–3529.

(8) (a) Shaw, B. R.; Dobrikov, M.; Wang, X. I. N.; Wan, J.; He, K.; Lin, J.-L.; Li, P.; Rait, V.; Sergueeva, Z. A.; Sergueev, D. Reading, Writing, and Modulating Genetic Information with Boranophosphate Mimics of Nucleotides, DNA, and RNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *1002*, 12–29. (b) Martin, A. R.; Vasseur, J. J.; Smietana, M. Boron and nucleic acid chemistries: merging the best of both worlds. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5684–713. (c) Hall, A. H. S.; Wan, J.; Spesock, A.; Sergueeva, Z.; Shaw, B. R.; Alexander, K. A. High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2773–2781. (d) Schneider, B.; Meyer, P.; Sarfati, S.; Mulard, L.; Guerreiro, C.; Boretto, J.; Janin, J.; Veron, M.; Deville-Bonne, D.; Canard, B. Activation of anti-reverse transcriptase nucleotide analogues by nucleoside diphosphate kinase: improvement by alpha-boranophosphate substitution. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 297–306.

(9) (a) Sood, A.; Shaw, B. R.; Spielvogel, B. F. Boron-containing nucleic acids. 2. Synthesis of oligodeoxynucleoside boranophosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9000–9001. (b) Tomasz, J.; Shaw, B. R.; Porter, K.; Spielvogel, B. F.; Sood, A. Boron-Containing Nucleic Acids. 3. 5'-P-Borane-Substituted Thymidine Monophosphate and Triphosphate. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1373–1375.

(10) (a) Li, H.; Hardin, C.; Shaw, B. R. Hydrolysis of thymidine boranomonomophosphate and stepwise deuterium substitution of the borane hydrogens. P-31 and B-11 NMR studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6606–6614. (b) Sergueev, D. S.; Shaw, B. R. H-Phosphonate approach for solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates and their characterization. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9417–9427. (c) Lin, J. L.; He, K. Z.; Shaw, B. R. Novel 3',5'-cyclic nucleotide analogue: Adenosine 3',5'-cyclic boranomonomophosphate. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 795–797. (d) Li, P.; Shaw, B. R. Synthesis of prodrug candidates: Conjugates of amino acid with nucleoside boranophosphate. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2009–2012. (e) Li, P.;

Shaw, B. R. Convenient synthesis of nucleoside borane diphosphate analogues: deoxy- and ribonucleoside 5'-P-alpha-boranodiphosphates. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7051–7057. (f) Li, P.; Shaw, B. R. Synthesis of nucleoside boranophosphoramidate prodrugs conjugated with amino acids. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2171–2183. (g) Li, P.; Xu, Z. H.; Liu, H. Y.; Wennefors, C. K.; Dobrikov, M. I.; Ludwig, J.; Shaw, B. R. Synthesis of alpha-P-modified nucleoside diphosphates with ethylenediamine. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16782–16783.

(11) (a) Oka, N.; Wada, T.; Saigo, K. An oxazaphospholidine approach for the stereocontrolled synthesis of oligonucleoside phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8307–8317. (b) Shimizu, M.; Tamura, K.; Wada, T.; Saigo, K. BH₃ as a protecting group for phosphonic acid: novel method for the synthesis of dinucleoside H-phosphonate. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 371–374. (c) Higashida, R.; Oka, N.; Kawanaka, T.; Wada, T. Nucleoside H-boranophosphonates: a new class of boron-containing nucleotide analogues. *Chem. Commun.* **2009**, 2466–2468. (d) Uehara, S.; Hiura, S.; Higashida, R.; Oka, N.; Wada, T. Solid-phase synthesis of P-boronated oligonucleotides by the H-boranophosphonate method. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3465–3472. (e) Sato, K.; Wada, T. One-pot conversion reactions of glycosyl boranophosphates into glycosyl phosphate derivatives via acyl phosphite intermediates. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 11092–11095.

(12) (a) Jenkins, K. E.; Higson, A. P.; Seeberger, P. H.; Caruthers, M. H. Solid-phase synthesis and biochemical studies of O-boranophosphopeptides and O-dithiophosphopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6584–6593. (b) McCuen, H. B.; Noe, M. S.; Sierzchala, A. B.; Higson, A. P.; Caruthers, M. H. Synthesis of Mixed Sequence Borane Phosphonate DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8138–8139. (c) Roy, S.; Olesiak, M.; Padar, P.; McCuen, H.; Caruthers, M. H. Reduction of metal ions by boranephosphonate DNA. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9130–9133. (d) Roy, S.; Caruthers, M. Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries. *Molecules* **2013**, *18*, 14268–84. (e) Russell, C.; Roy, S.; Ganguly, S.; Qian, X.; Caruthers, M. H.; Nilsson, M. Formation of Silver Nanostructures by Rolling Circle Amplification Using Boranephosphonate-Modified Nucleotides. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6660–6.

(13) (a) Huang, J. Y.; Lu, W.; Xi, Z. A BH₃ masked H-phosphonate for coupling in oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2183–2186. (b) Oka, N.; Takayama, Y.; Ando, K.; Wada, T. Synthesis of nucleoside 5'-boranophosphorothioate derivatives using an H-boranophosphonate monoester as a precursor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4571–4574. (c) Belabassi, Y.; Antczak, M. I.; Tellez, J.; Montchamp, J. L. Borane complexes of the H₃PO₂ P(III) tautomer: useful phosphinate equivalents. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9181–9190. (d) Jin, Y.; Just, G. The synthesis of the Sp and Rp diastereomers of dithymidine boranophosphate. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6429–6432. (e) Jin, Y.; Just, G. A stereoselective synthesis of dinucleotide boranophosphate, using chiral indole-oxazaphosphorine intermediates. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6433–6436. (f) Stasi, L.; Just, G. Reactions of phosphite triesters with alkyl boranes. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2283–2286.

(14) (a) Paul, S.; Roy, S.; Monfregola, L.; Shang, S.; Shoemaker, R.; Caruthers, M. H. Oxidative substitution of boranephosphonate diesters as a route to post-synthetically modified DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3253–64. (b) Roy, S.; Paul, S.; Roy, M.; Kundu, R.; Monfregola, L.; Caruthers, M. H. Pyridinium Boranephosphonate Modified DNA Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 1420–1427.

(15) (a) Stawinski, J.; Kraszewski, A. How to get the most out of two phosphorus chemistries. Studies on H-phosphonates. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 952–960. (b) Stawinski, J.; Thelin, M. Nucleoside H-Phosphonates. 14. Synthesis of Nucleoside Phosphoroselenoates and Phosphorothioselenoates via Stereospecific Selenization of the Corresponding H-Phosphonate and H-Phosphonothioate Diesters with the Aid of New Selenium-Transfer Reagent 3H-1,2-Benzothiaselenol-3-one. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 130–136. (c) Szabó, T.; Kers, A.; Stawinski, J. A new approach to the synthesis of the 5'-deoxy-5'-methylphosphonate linked thymidine oligonucleotide analogues. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 893–900.

(16) (a) Denniston, M. L.; Chiusano, M.; Brown, J. M.; Martin, D. R. An Investigation of Lewis Base-Monoiodoboranes and their Reactions with Group V Donors In Solution. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1976**, *38*, 379–382. (b) Ryschkewitsch, G. E. Bis (pyridine) boronium Salts. Syntheses and Formation Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 3145–3148.

(17) Horner, L. Selektivitätsstudien: OH-, NH- und SH-gruppenspezifische Reagentien - ihre Anwendung in der organischen Analytik und als Schutzgruppen in der Synthese. *J. Prakt. Chem./Chem.-Ztg.* **1992**, *334*, 645–655.

(18) (a) Pearson, R. G.; Songstad, J. Application of the principle of hard and soft acids and bases to organic chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 1827–1836. (b) Ho, T.-L. The Hard Soft Acids Bases (HSAB) principle and organic chemistry. *Chem. Rev.* **1975**, *75*, 1–20.

(19) Yamashita, M.; Nozaki, K. In *Synthesis and Application of Organoboron Compounds*; Fernandez, E., Whiting, A., Eds.; Springer International Publishing: Heidelberg, 2015; Vol. 49, p 1–37.

(20) Godfroid, R. A.; Hill, T. G.; Onak, T. P.; Shore, S. G. Formation of [BH₃]²⁻ and [B₂H₆]²⁻ from the Homogeneous Reduction of B₂H₆. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12107–12108.

(21) Bernhardt, E.; Bernhardt-Pitchougina, V.; Willner, H.; Ignatiev, N. "Umpolung" at boron by reduction of [B(CN)₄]⁻ and formation of the dianion [B(CN)₃]²⁻. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 12085–8.

(22) (a) Stawinski, J.; Strömberg, R.; Zain, R. Stereospecific oxidation and oxidative coupling of H-phosphonate and H-phosphonothioate diesters. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3185–3188. (b) Nilsson, J.; Stawinski, J. Controlling stereochemistry during oxidative coupling. Preparation of Rp or Sp phosphoramidates from one P-chiral precursor. *Chem. Commun.* **2004**, 2566–2567.

(23) (a) Stec, W.; Mikolajczyk, M. Stereochemistry of organophosphorus cyclic compounds. II. Stereospecific synthesis of *cis*- and *trans*-2-halogeno-2-oxo-4-methyl-1,3,2-dioxaphosphorinans and their chemical transformations. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 539–546. (b) Seela, F.; Kretschmer, U. Stereochemistry of oxidation of diastereomeric d(TpA) phosphonates with sulfur and iodine-[18-O]water. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, *0*, 1154–1159.

(24) Sergueeva, Z. A.; Sergueev, D. S.; Shaw, B. R. Synthesis of dithymidine boranophosphates via stereospecific boronation of H-phosphonate diesters and assignment of their configuration. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2041–2044.

(25) Thatcher, G. R. J.; Kluger, R. Mechanism and catalysis of nucleophilic substitution in phosphate esters. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1989**, *25*, 99–265.

(26) One can envisage also the possibility of a direct formation of phosphoriodidate **3** from boranephosphonate **1** by shifting the bonding P-B electron pair to iodine. This would not affect stereochemistry of the formed phosphoriodidate **3** (retention of configuration). However, due to the found stability of the P-B bond in boranephosphonate diesters, we deemed this reaction pathway as less likely.

(27) (a) Schug, J. C.; Chang, W. M.; Dyson, M. C. Amine-iodine interaction. *Spectrochim. Acta Part A* **1972**, *28*, 1157–1165. (b) Sambhi, M. S.; Khoo, S. K. The Nature of Bonding in Amine-Iodine Complexes. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 666. (c) Tornieport-Oetting, I.; Klapotke, T. M. Novel iodoammonium cations: Synthesis and characterization of *o*-C₆H₄(NH₂)₂I⁺X⁻ (X⁻ = I⁻, AsF₆⁻, AlI₄⁻). *Polyhedron* **1989**, *8*, 2911–2914.

(28) (a) Jonas, V.; Frenking, G.; Reetz, M. T. Comparative Theoretical Study of Lewis Acid-Base Complexes of BH₃, BF₃, BCl₃, AlCl₃, and SO₂. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8141–8753. (b) Niedenzu, K. Recent Developments in the Chemistry of Aminoboranes. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 86–92. (c) Ishihara, K. In *Lewis Acids in Organic Synthesis*; Yamamoto, H., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2000; p 89–190.

(29) In acetonitrile, the analogous reactions were less efficient. With 1 equiv of iodine, only the formation of diethyl phosphoriodidate (ca. 14%) was observed. When the amount of iodine was increased to 2 equiv, the formation of diethyl iodoboranephosphonate **2b** intermediate could also be detected (ca. 22%).

(30) In this reaction, the formation of a minute amount (ca. 1%) of the corresponding phosphoramidate **4b** was also observed. When the reaction was carried out with 2 equiv of iodine and 4 equiv of the amine, the resonance from the phosphoramidate became the major signal. In this instance, no signals from the starting material **1b** and H-phosphonate **5b** could be detected.

(31) The reaction of boranephosphonate **1b** with amines in the presence of iodine was very sensitive to the ratio of the reagents used. With 0.5–0.8 equiv of iodine in the presence of 1 equiv of *n*-butylamine, only iodoboranephosphonate **2b** and the unreacted starting material **1b** could be observed in the ³¹P NMR spectra, while with 1 equiv of iodine, additional signals, due to diiodoboranephosphonate **2b'** and iodophosphate **3b**, appeared. When the amount of *n*-butylamine was increased to 3 equiv, the pattern of the signals was similar to that of the reaction with 1 equiv of the amine, but the signal from **3b** was replaced by that of the corresponding phosphoramidate **4b**.

(32) Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. Studies on aryl H-phosphonates. I. Efficient method for the preparation of deoxyribo- and ribonucleoside 3'-H-phosphonate monoesters by transesterification of diphenyl H-phosphonate. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3355–3358.

(33) (a) Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. Nucleosides H-Phosphonates. V. The Mechanism of Hydrogenphosphonate Diester Formation Using Acyl Chlorides as Coupling Agents in Oligonucleotide Synthesis by the Hydrogenphosphonate Approach. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **1987**, *6*, 655–662. (b) 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.* **2001**, *9*, 2315–2322. (c) Stawinski, J.; Strömberg, R. In *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*; Herdewijn, P., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2004; Vol. 288, p 81–100.

SUPPORTING INFORMATION

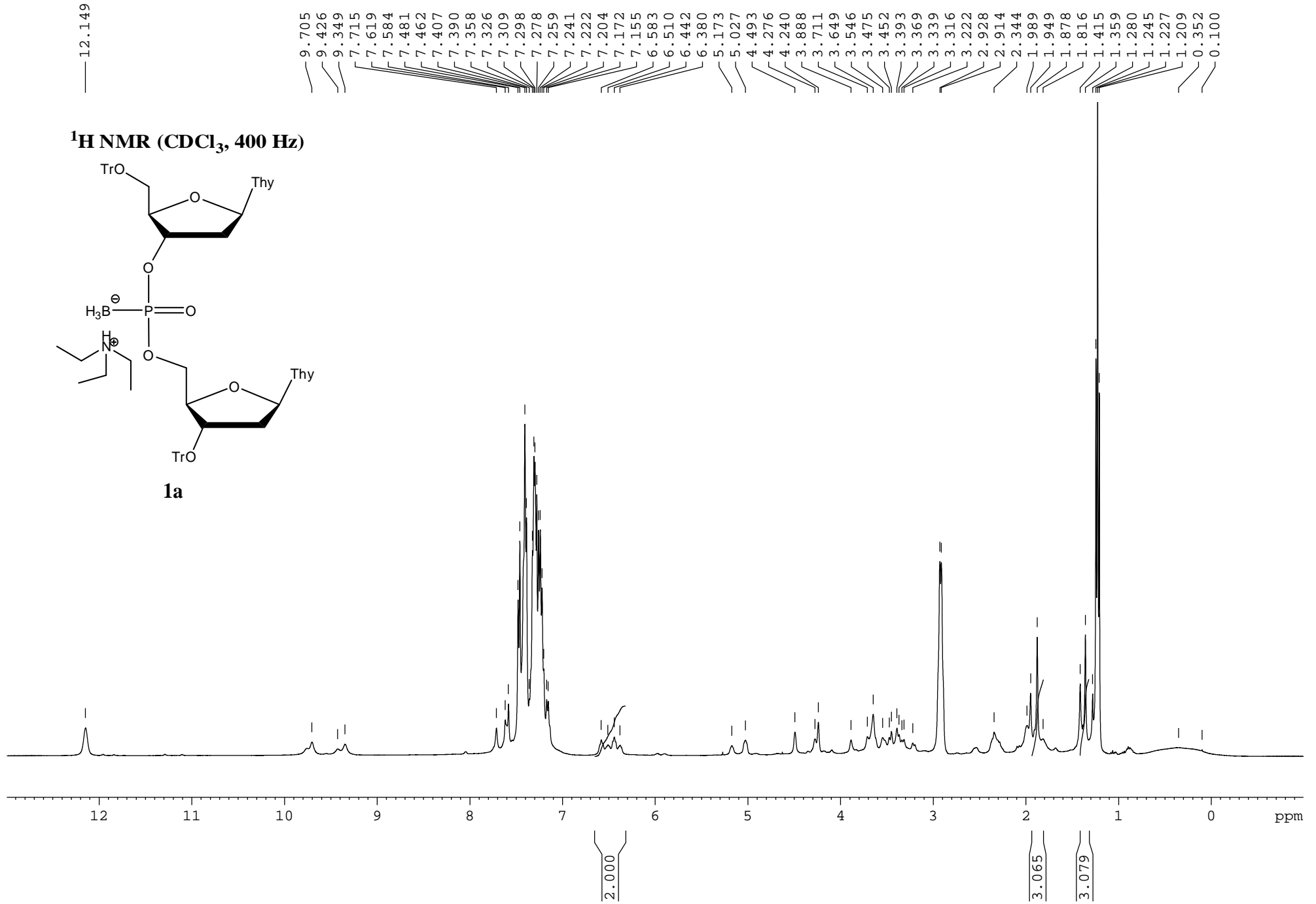
Reaction of boranephosphonate diesters with amines in the presence of iodine: the case for the intermediacy of H-phosphonate derivatives

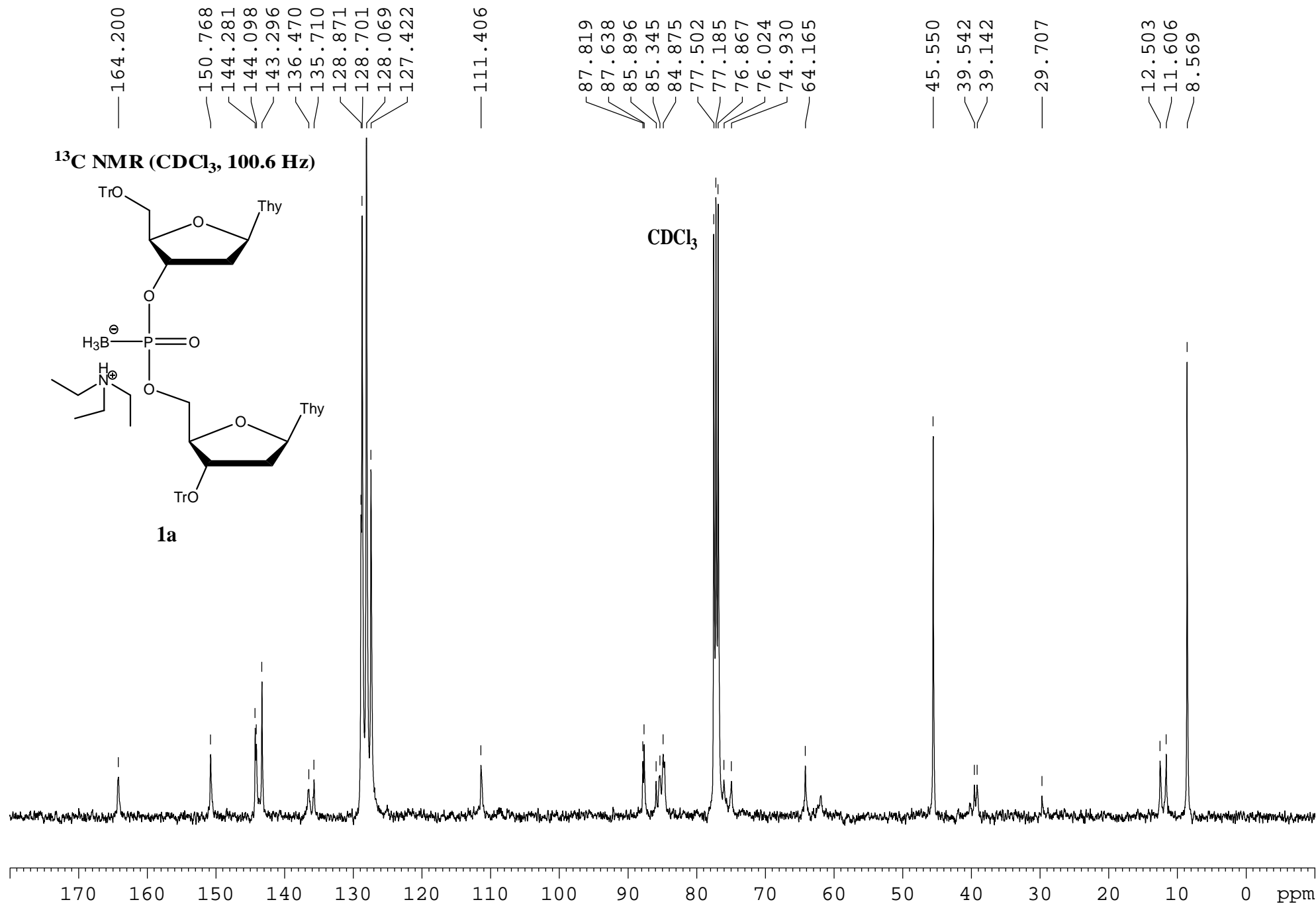
Justyna Gołębiewska, Marta Rachwałak, Tomasz Jakubowski,
Joanna Romanowska,* and Jacek Stawinski*

Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Noskowskiego 12/14, 61-704
Poznań, Poland

TABLE OF CONTENTS FOR THE SUPPORTING INFORMATION

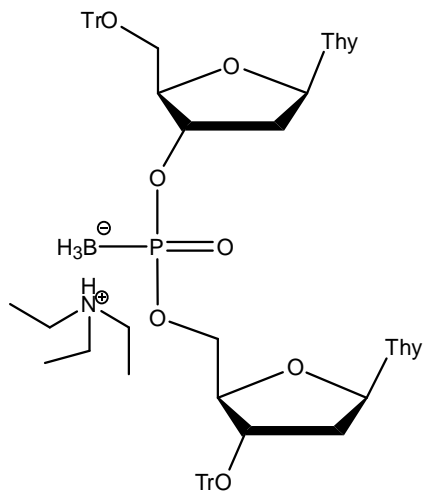
S-2	^1H , ^{13}C , ^{31}P , and ^{11}B NMR spectra of substrates and products
S-19	^{31}P NMR spectra of some reaction mixtures



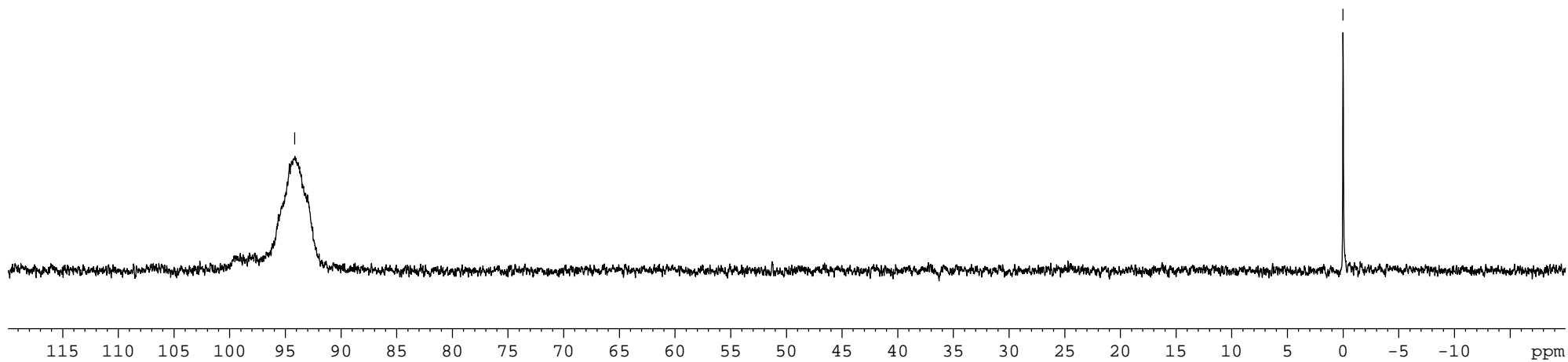


^{31}P NMR{ ^1H } (CDCl₃, 162 Hz)

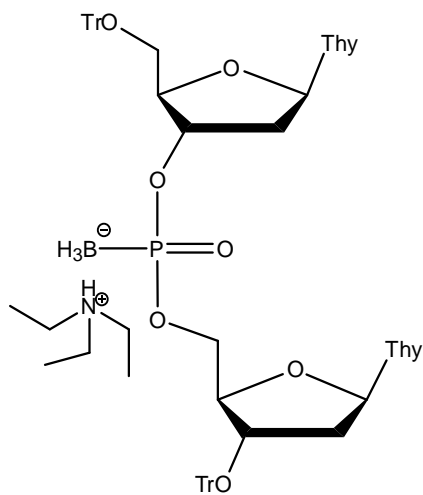
H₃PO₄ ext. standard



1a

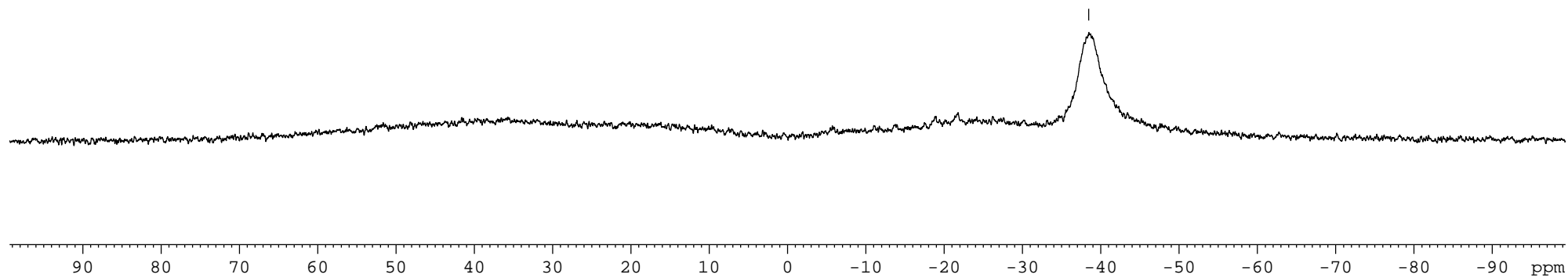


^{11}B NMR{ ^1H } (CDCl₃, 128.4 Hz)

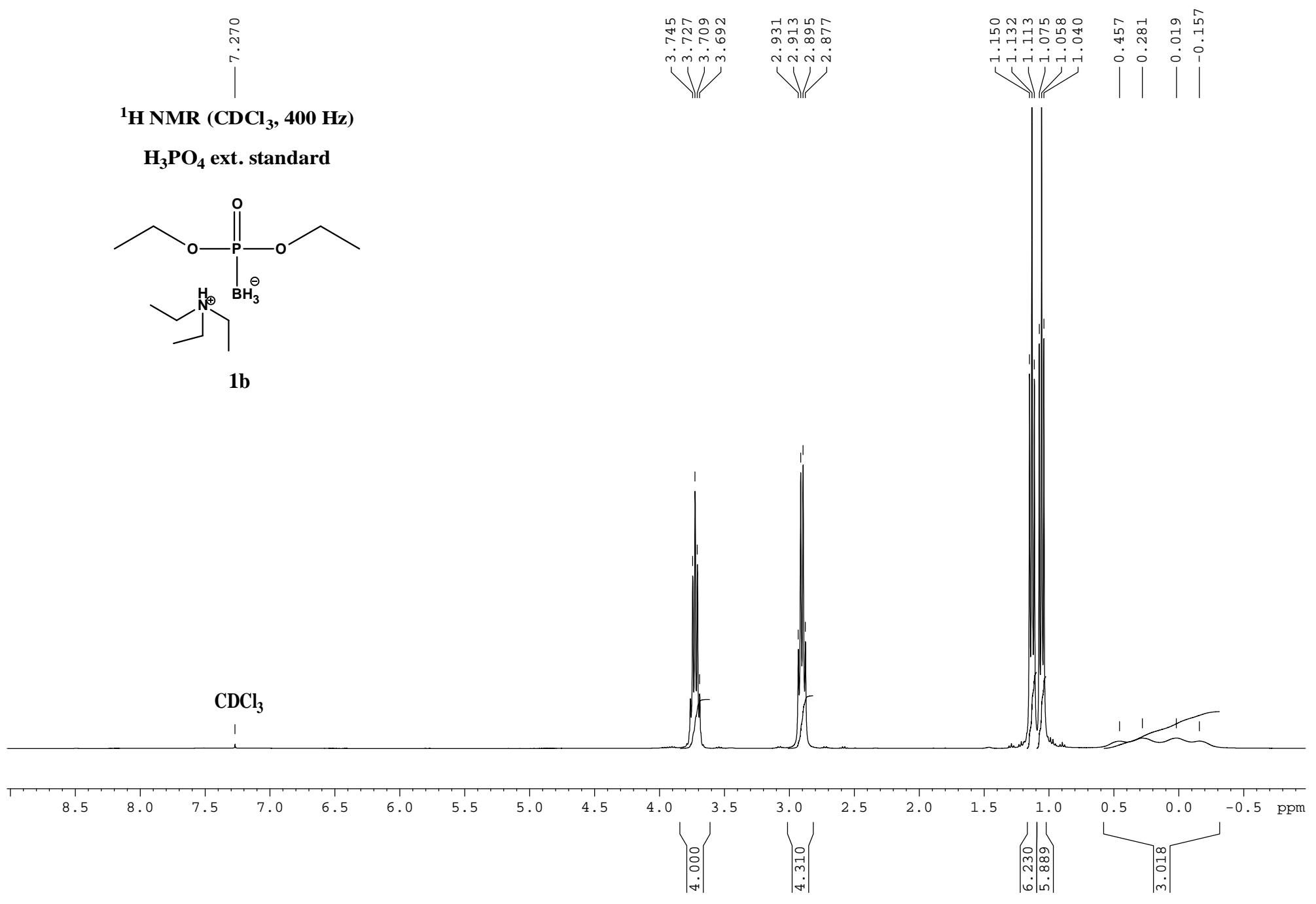
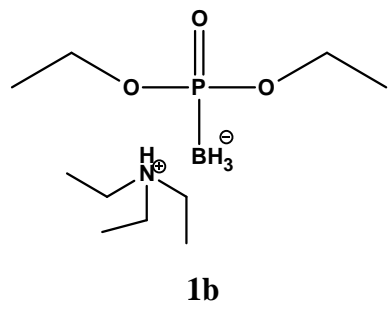


1a

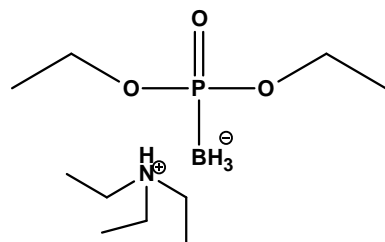
— -38.470



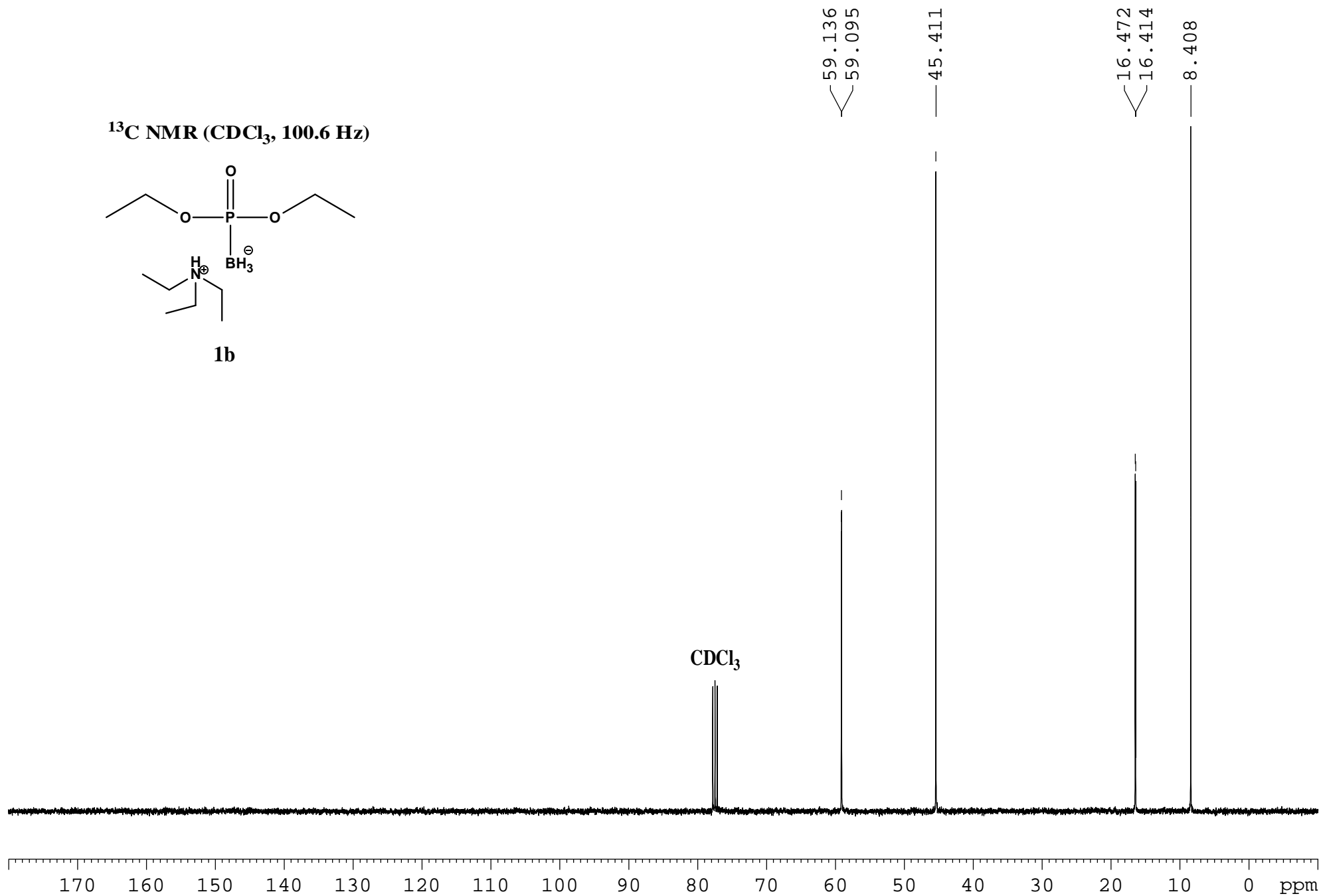
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 Hz)
 H_3PO_4 ext. standard



^{13}C NMR (CDCl_3 , 100.6 Hz)



1b

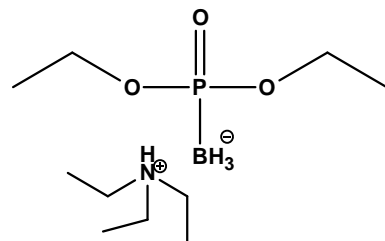


96.533
95.739
94.878
94.107

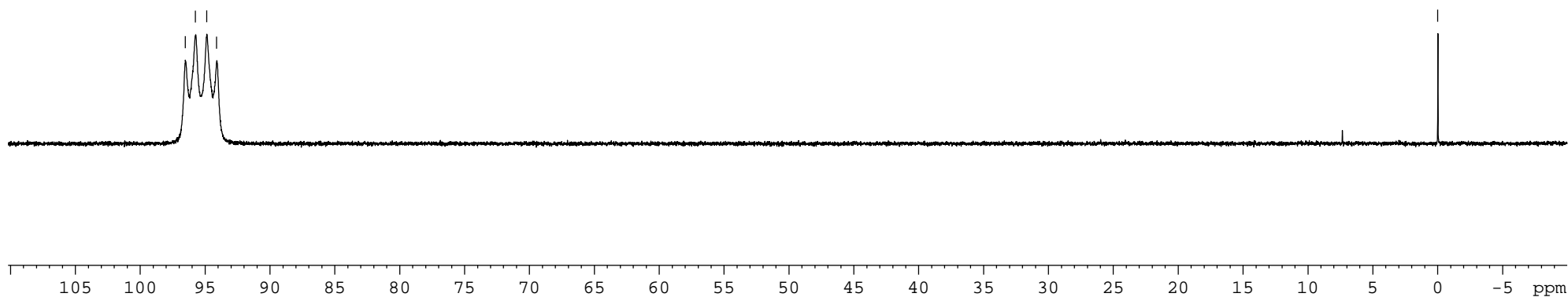
0.000

^{31}P NMR{ ^1H } (CDCl₃, 162 Hz)

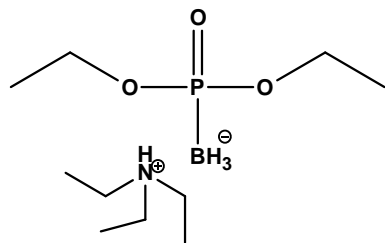
H₃PO₄ ext. standard



1b

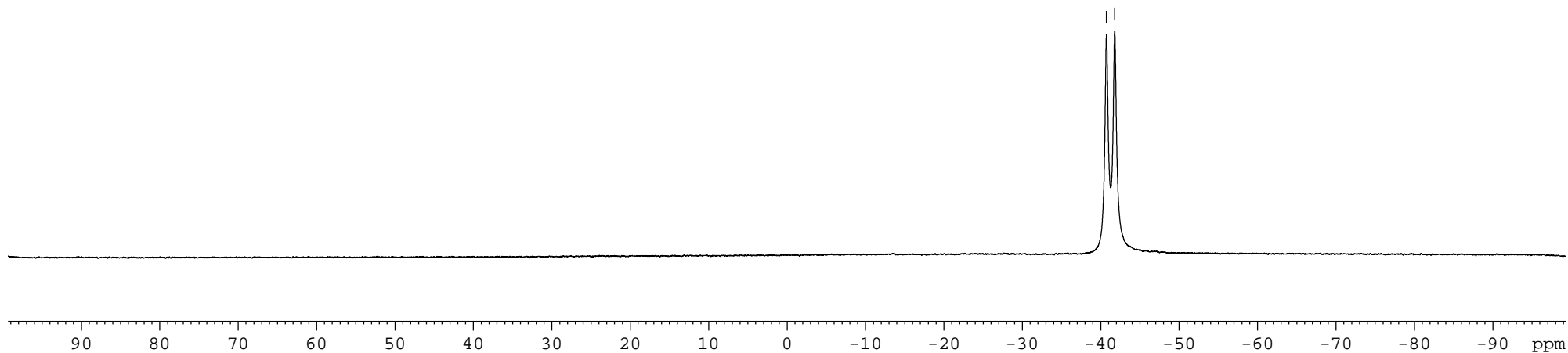


^{11}B NMR{ ^1H } (CDCl₃, 128.4 Hz)



1b

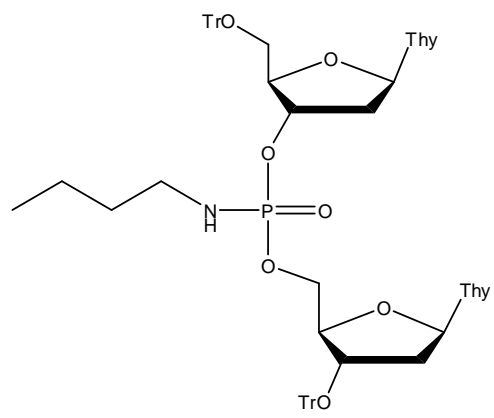
-40.719
-41.771



S9

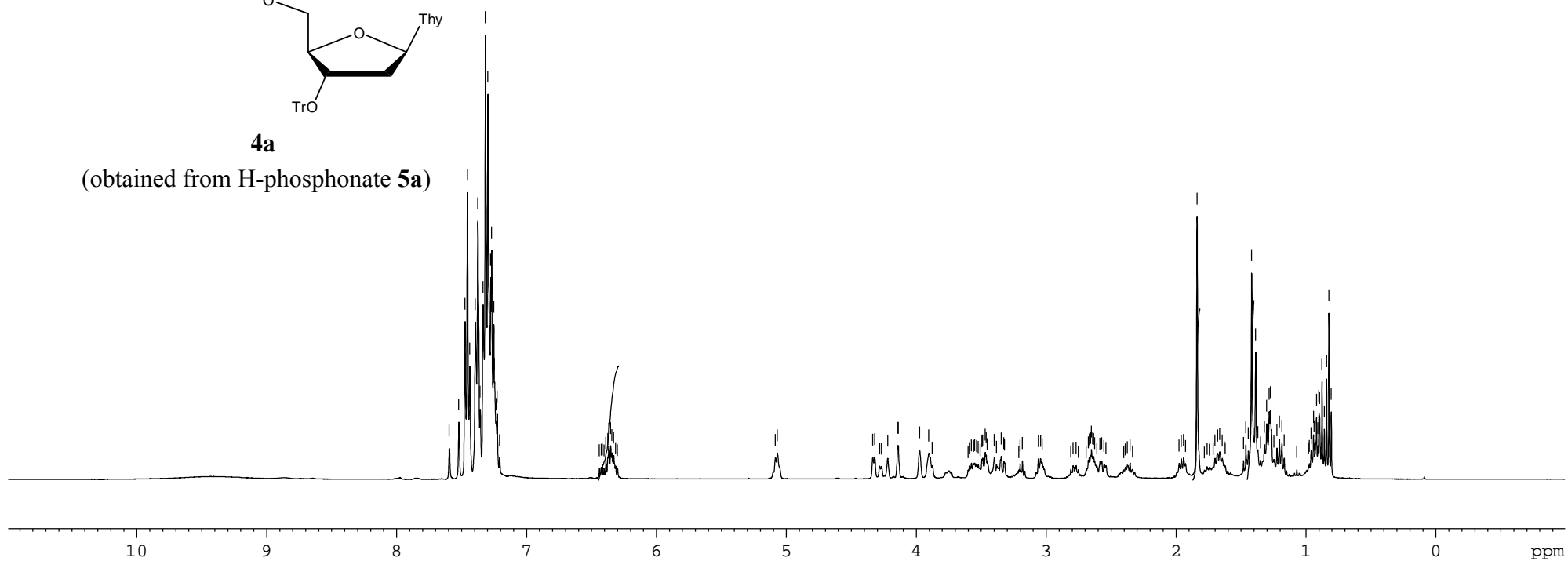
7.596
7.522
7.475
7.456
7.437
7.394
7.375
7.357
7.335
7.318
7.299
7.287
7.277
7.269
7.253
7.247
7.235
7.226
7.208
6.375
6.368
6.354
6.344
6.329
5.085
5.069
4.336
4.321
4.220
4.144
4.139
3.975
3.905
3.489
3.469
3.462
3.400
3.347
3.061
3.043
2.668
2.659
2.652
2.643
2.635
1.960
1.942
1.839
1.700
1.680
1.664
1.645
1.463
1.445
1.419
1.388
1.371
1.321
1.303
1.283
1.274
1.224
1.205
1.186
1.168
0.961
0.956
0.943
0.938
0.919
0.908
0.901
0.895
0.877
0.859
0.842
0.824
0.806

¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz)



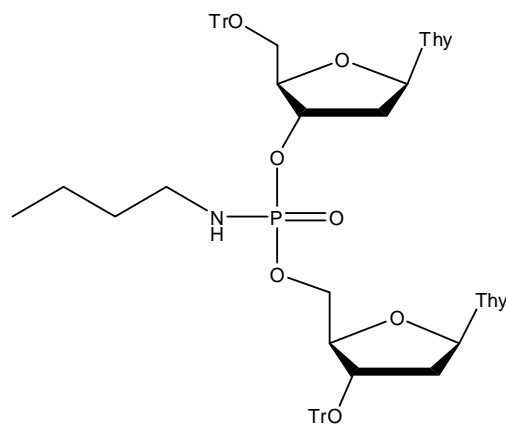
4a

(obtained from H-phosphonate **5a**)



^{31}P NMR{ ^1H } (CDCl₃, 162 Hz)

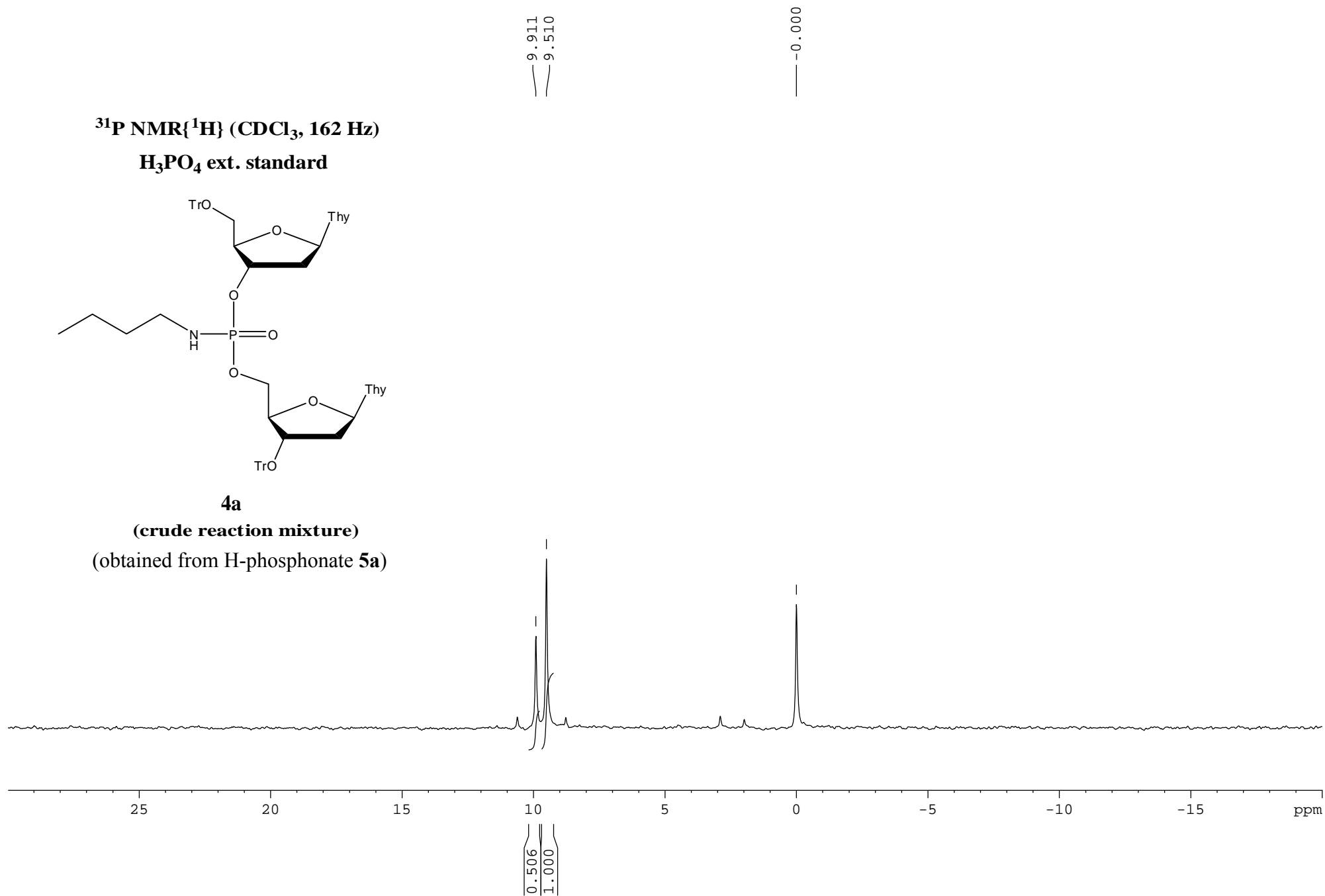
H₃PO₄ ext. standard



4a

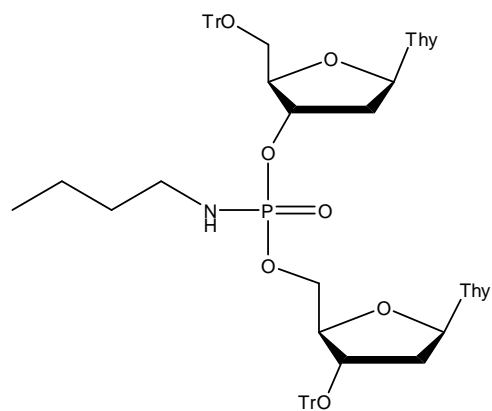
(crude reaction mixture)

(obtained from H-phosphonate 5a)



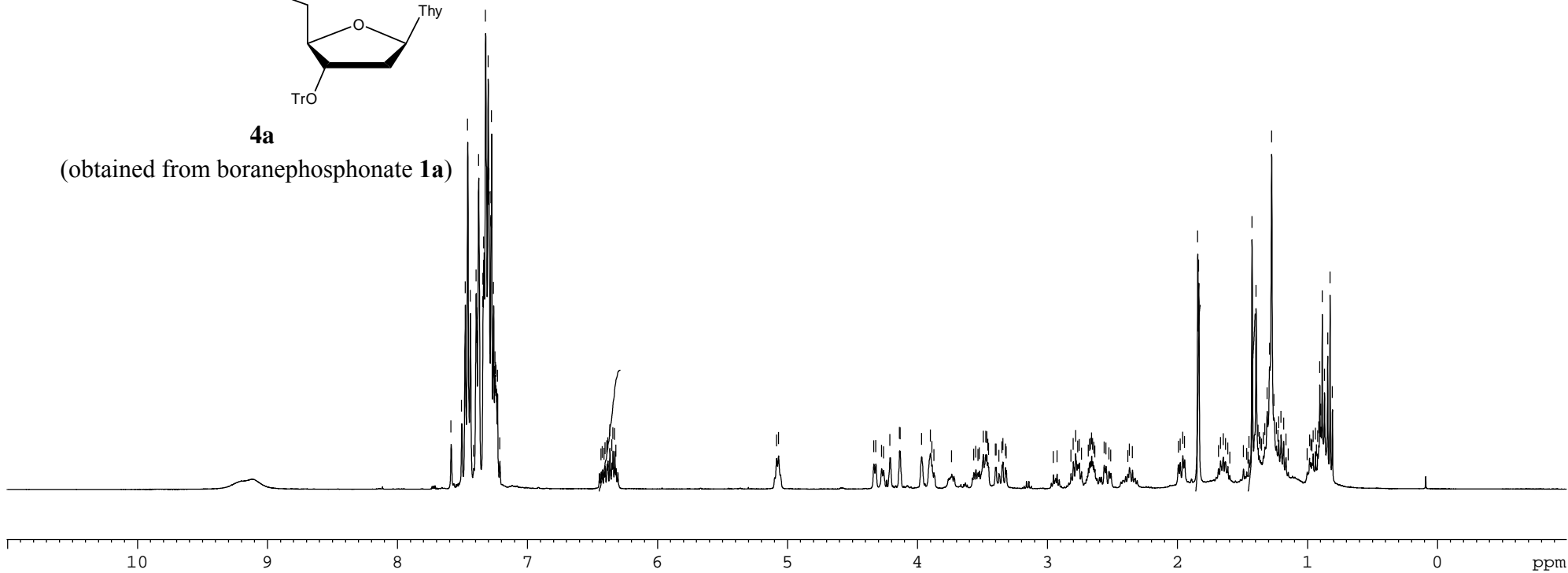
7.589
7.507
7.480
7.461
7.440
7.396
7.391
7.377
7.343
7.338
7.334
7.324
7.303
7.297
7.281
7.276
7.261
7.253
7.249
7.246
7.242
7.232
7.213
6.382
6.367
6.343
6.329
6.329
5.085
5.070
4.212
4.139
4.133
4.133
3.969
3.901
3.495
3.474
3.467
2.784
2.669
2.661
2.652
1.959
1.946
1.845
1.837
1.669
1.648
1.631
1.450
1.427
1.396
1.380
1.371
1.362
1.339
1.328
1.311
1.292
1.276
1.258
1.239
1.228
1.221
1.203
1.184
1.166
0.984
0.956
0.939
0.921
0.913
0.905
0.897
0.887
0.869
0.845
0.826
0.808

¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz)



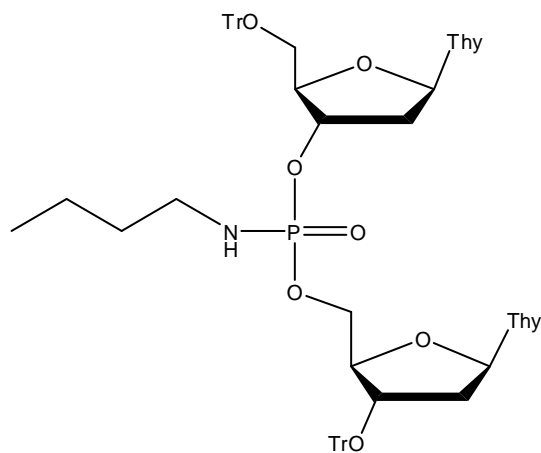
4a

(obtained from boranephosphonate **1a**)



— 163.736
 — 150.330
 — 143.946
 — 143.007
 — 135.451
 — 135.208
 — 128.789
 — 128.665
 — 128.139
 — 128.090
 — 127.562
 — 111.645
 — 111.138
 — 88.055
 — 87.730
 — 85.361
 — 84.310
 — 74.364
 — 66.015
 — 63.572
 — 40.995
 — 39.141
 — 33.667
 — 31.930
 — 30.037
 — 29.704
 — 22.701
 — 19.725
 — 19.627
 — 14.132
 — 13.639
 — 12.353
 — 11.716

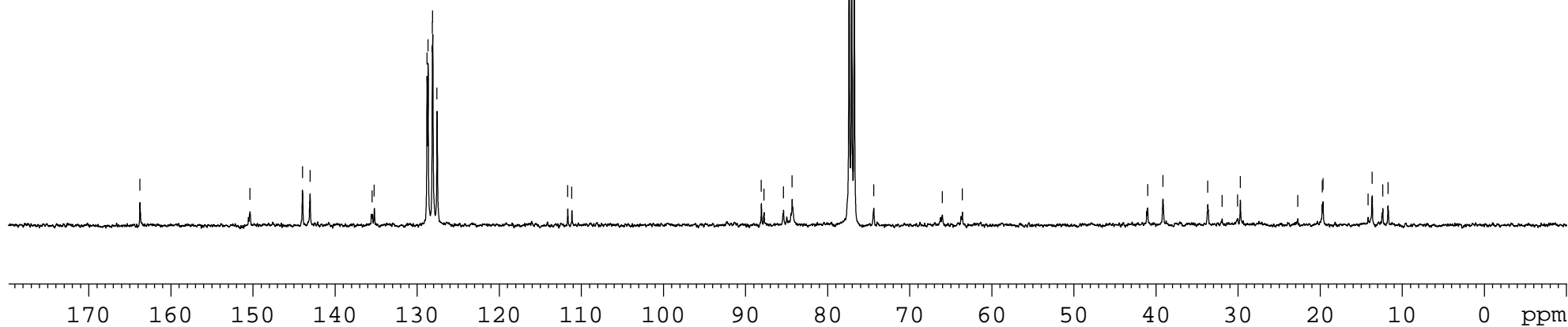
^{13}C NMR (CDCl₃, 100.6 Hz)



4a

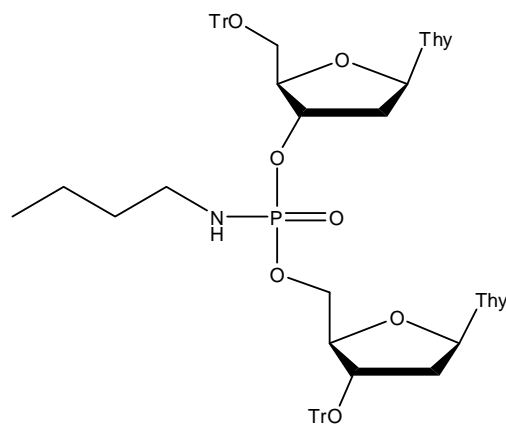
(obtained from boranephosphonate **1a**)

CDCl₃



^{31}P NMR{ ^1H } (CDCl₃, 162 Hz)

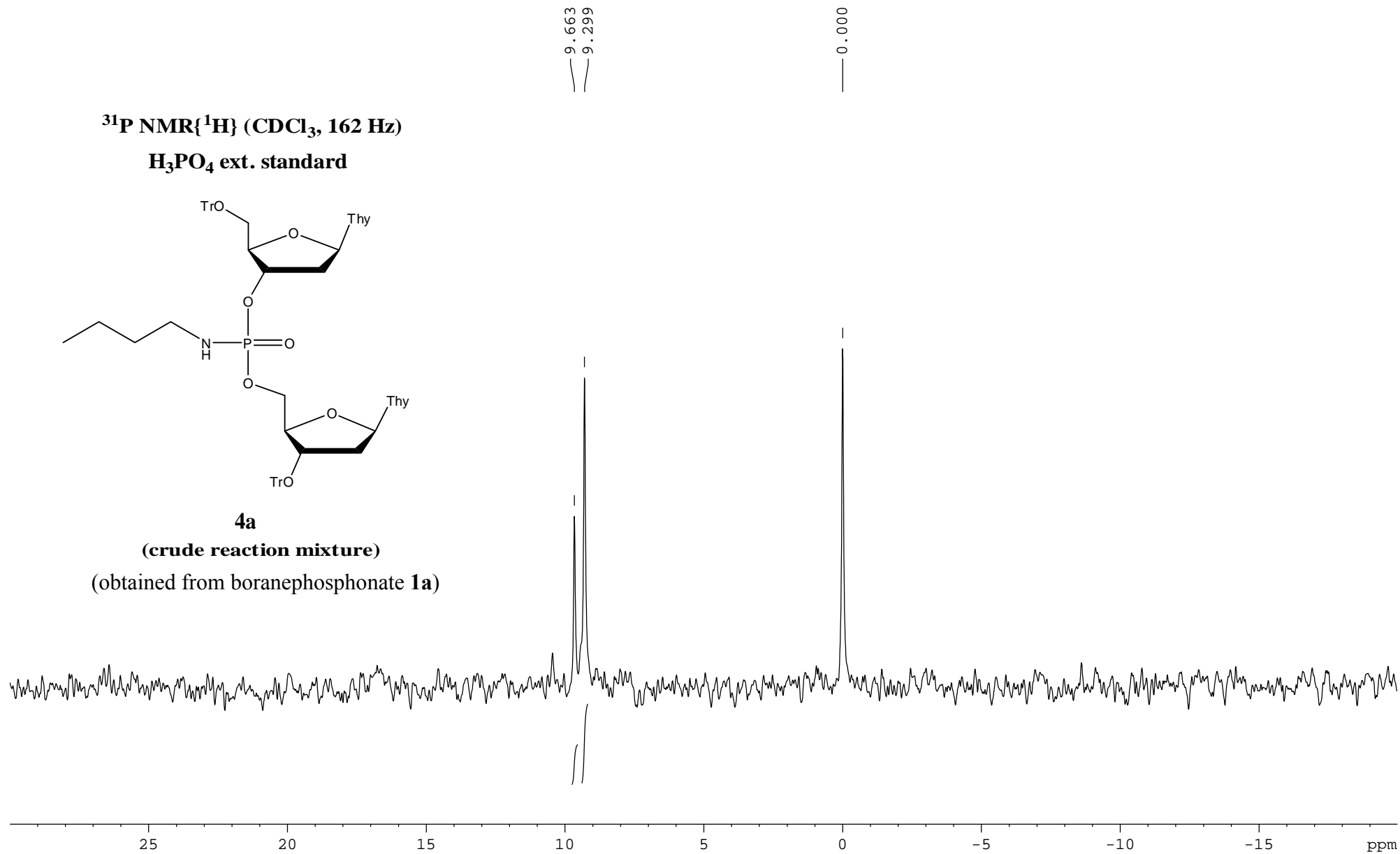
H₃PO₄ ext. standard



4a

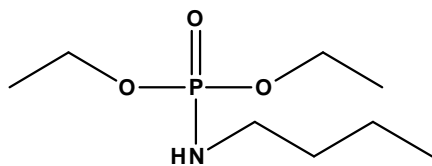
(crude reaction mixture)

(obtained from boranephosphonate 1a)

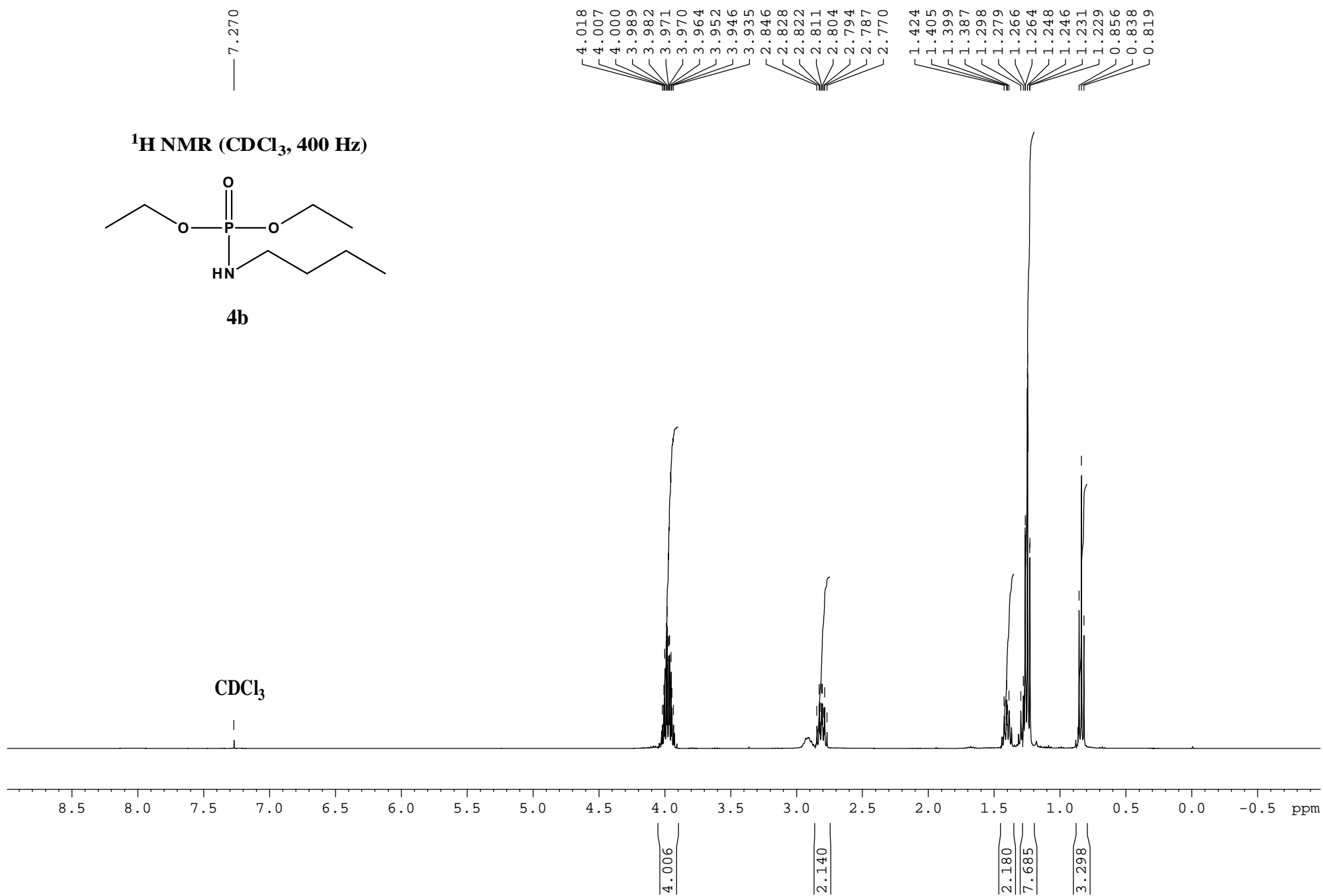


0.501
1.000

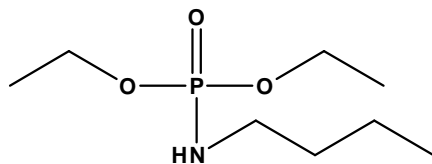
¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz)



4b

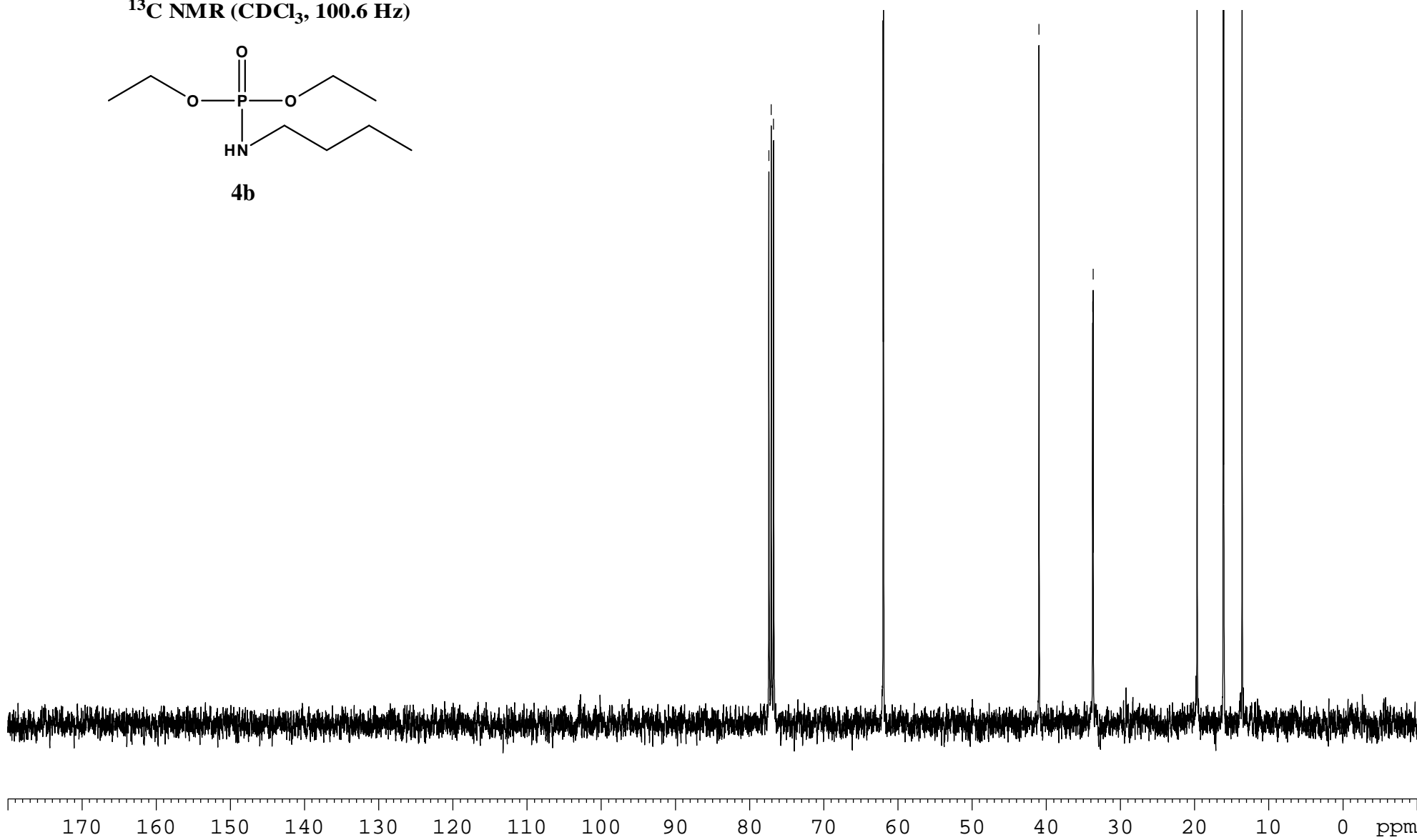


¹³C NMR (CDCl₃, 100.6 Hz)



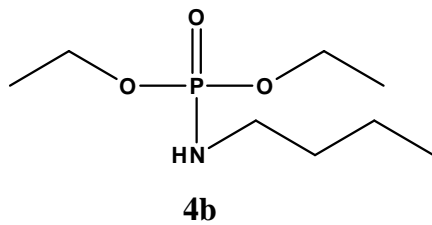
4b

77.384
77.066
76.747
61.978
61.925
40.960
33.723
33.663
19.641
16.118
16.047
13.575



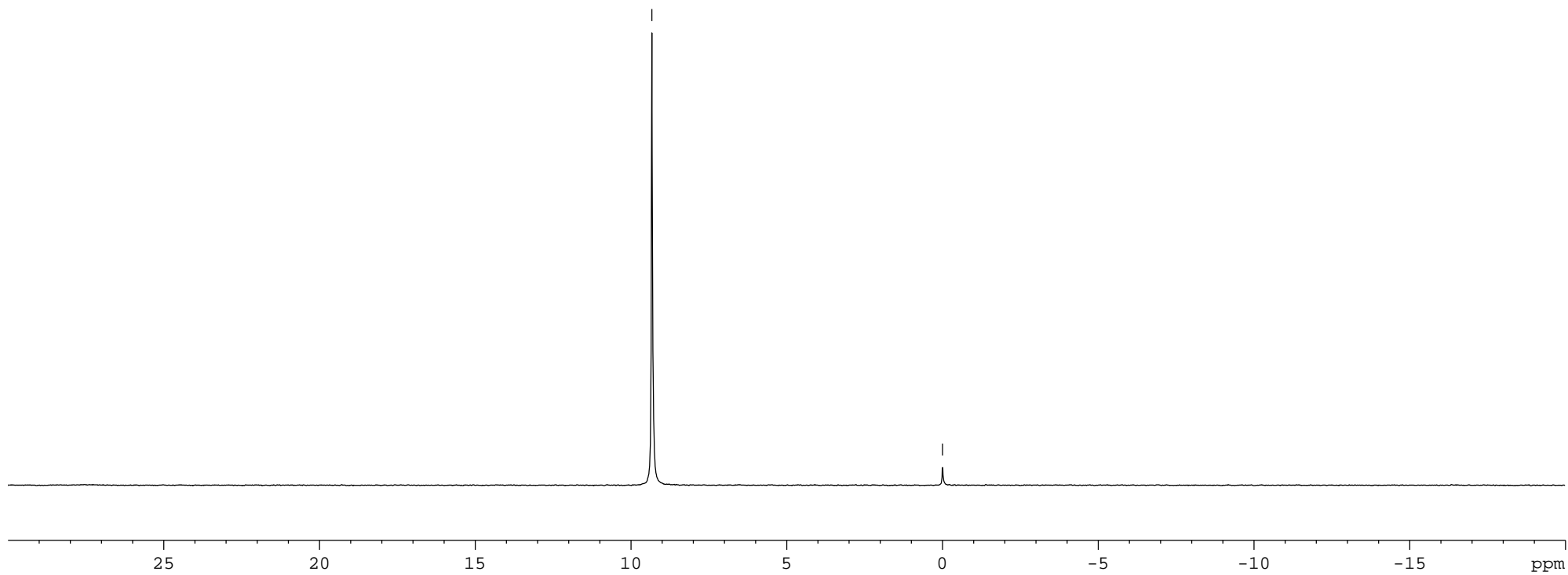
^{31}P NMR{ ^1H } (CDCl₃, 162 Hz)

H₃PO₄ ext. standard



— 9.328

— 0.000



— 99.824

— 67.419

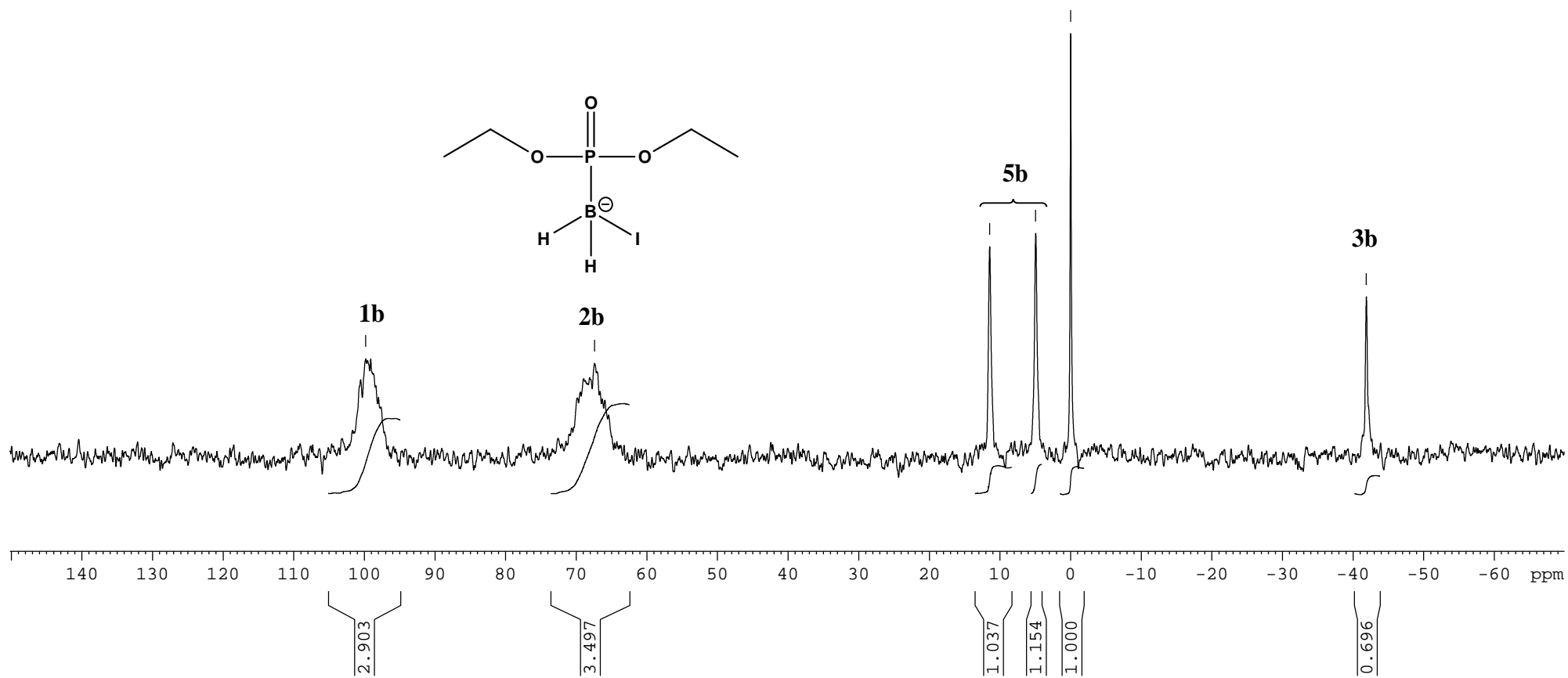
— 11.470

— 4.944

— 0.001

— -41.876

Reaction of **1b** + 1 equiv. I₂ (for details, see in the text)



— 98.218

— 70.327

— 42.629

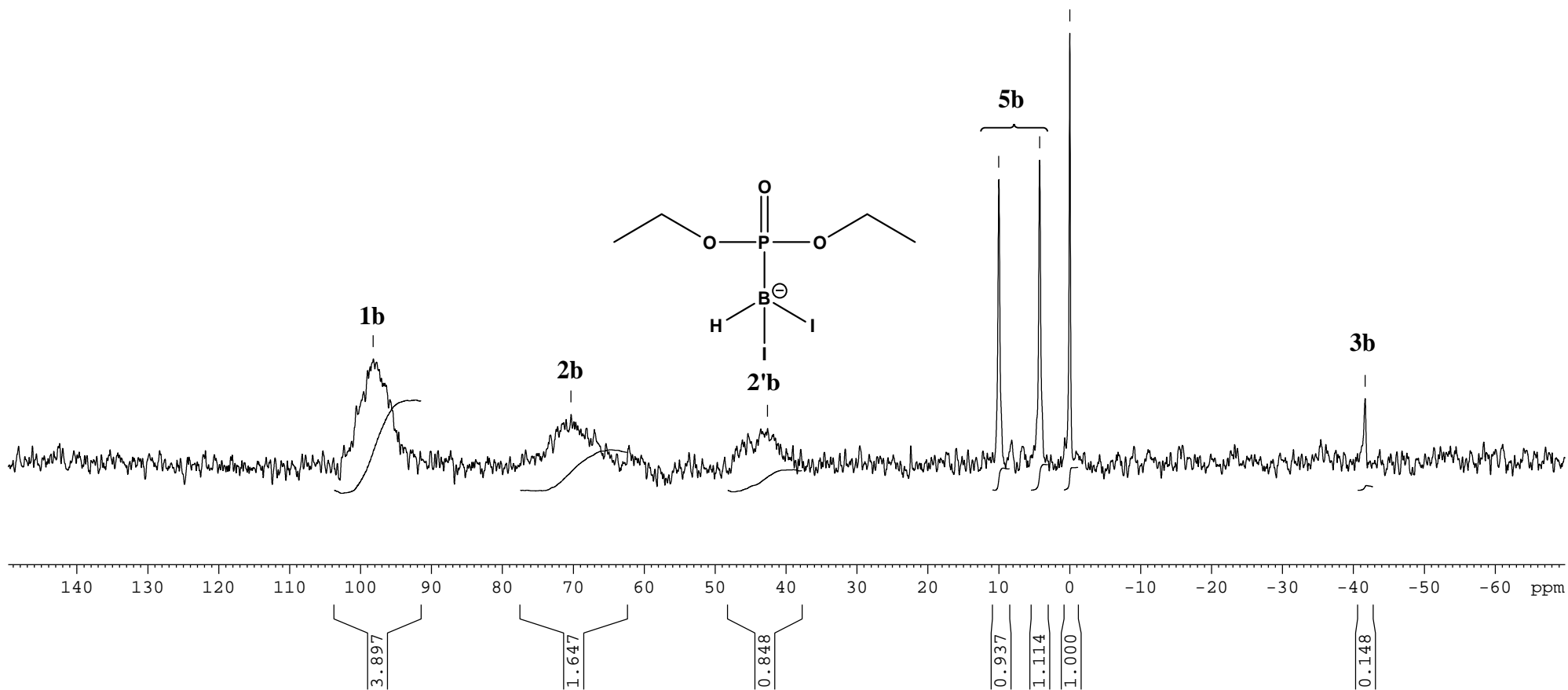
— 10.004

— 4.254

— 0.001

— -41.647

Reaction of **1b** + 1 equiv. *n*-butylamine + 1 equiv. I₂ (for details, see in the text)



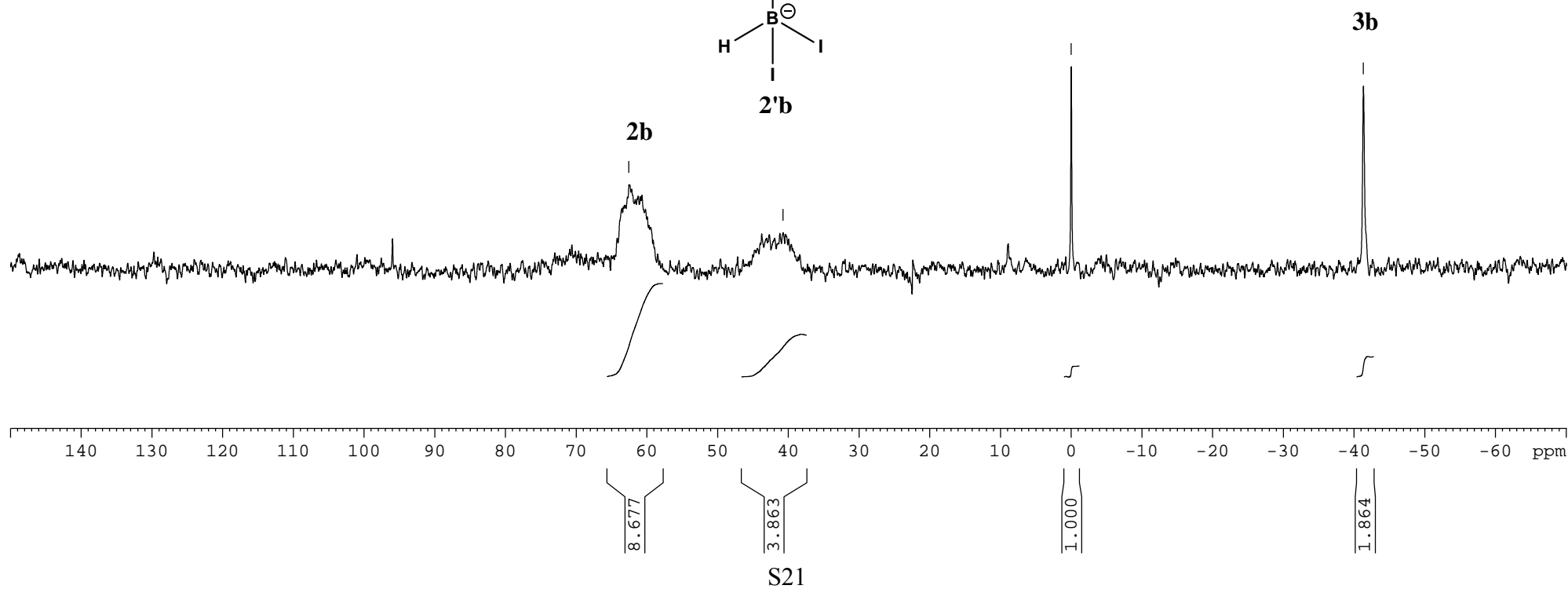
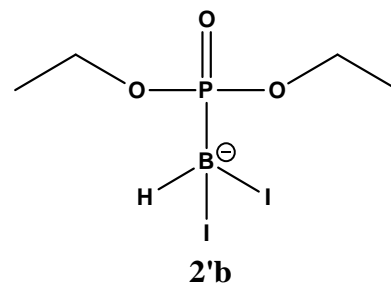
62.556

40.749

0.001

-41.322

Reaction of **1b** + 5 equiv. 2,6-lutidine + 2 equiv. I₂ (for details, see in the text)



3

Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or
Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and
Mechanistic Studies

Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and Mechanistic Studies

Justyna Gołębiewska and Jacek Stawinski*



Cite This: *J. Org. Chem.* 2020, 85, 4312–4323



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

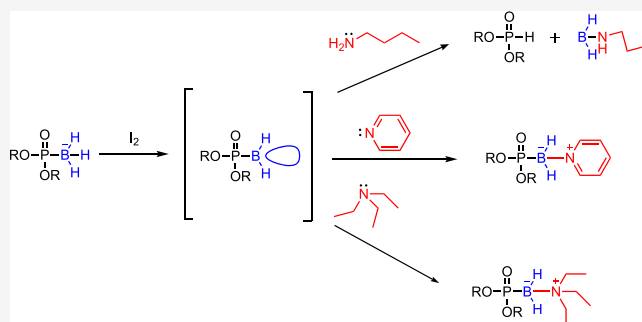


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Boranephosphonate diesters react with heteroaromatic and certain tertiary amines in the presence of an oxidant (I_2) to afford the boron-modified phosphodiester analogues containing a P–B–N structural motif. Our multinuclear ^{31}P and ^{11}B NMR spectroscopy studies lend support for a two-step mechanism involving generation of a λ^3 -boranephosphonate intermediate that immediately coordinates an amine in the solvent cage, leading to *B*-pyridinium or *B*-ammonium boranephosphonate betaine derivatives. We found that the type of the solvent used (e.g., dichloromethane vs acetonitrile) significantly affected the course of the reaction, resulting in either formation of boron-modified derivatives or loss of the boron group with a subsequent oxidation of the phosphorus atom. In aprotic, electron-donating, polar solvents, e.g., acetonitrile (ACN) and tetrahydrofuran (THF), a λ^3 -boranephosphonate intermediate can also coordinate solvent molecules forming P–B–ACN or P–B–THF complexes that may influence the type of the products formed.



INTRODUCTION

During recent decades, boranephosphonate analogues have emerged as important bioisosters of nucleic acids and their components.¹ New properties imparted by the presence of the BH_3 group, located in a nonbridging position of the phosphate function, e.g., chirality at the phosphorus center, resistance to nucleases, high lipophilicity, low toxicity, etc.,² constituted the basis for potential applications of these analogues as antisense/antigene agents, siRNA gene modulators,^{1a,2a,3} alternative substrates for polymerase chain reaction (PCR),⁴ or new structural motifs for nucleic acids-based diagnostics.⁵

Apart from these biology-related applications, there has been increasing interest in exploring boranephosphonates/boranephosphinates as new, potentially important synthetic equivalents for P(III) phosphorus synthons with the hidden P–H functionality (e.g., H-phosphonate or H-phosphinate esters). Temporary conversion of the P–H function into the P– BH_3 one freezes these compounds in a $\lambda^5\sigma^4$ phosphonate form that, in contrast to that of the parent P–H compounds, cannot isomerize to a nucleophilic $\lambda^3\sigma^3$ trivalent form with a lone electron pair on the phosphorus. Thus, boranephosphonates are generally more resistant to various chemical transformations than H-phosphonate derivatives, but the P–H function and its reactivity can be retrieved at the end of synthesis and subject, if so desired, to additional synthetic tasks. The feasibility and usefulness of such an approach has been successfully demonstrated in the synthesis of biologically important phosphorus compounds.⁶

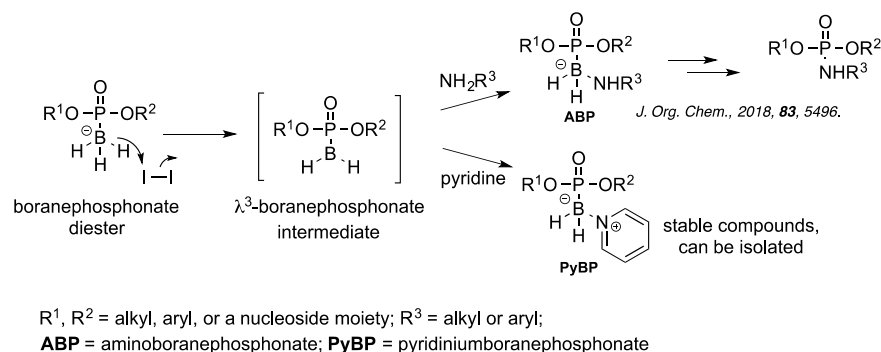
Recently, Caruthers et al.,⁷ exploring further chemistry of boranephosphonates, proposed the P–B bond as a new chemical marker for a postsynthetic modification of oligonucleotides and showed that the BH_3 group under mild, oxidative conditions (e.g., in the presence of iodine) can be stereospecifically replaced by various nucleophiles, e.g., amines, alcohols, thiols, etc., forming the corresponding P(V) derivatives. When such oxidative transformation is carried out in the presence of pyridine (or other heteroaromatic or certain 3° amines), boranephosphonate diester derivatives bearing a pyridine or a 3° amine moiety attached to the borane group are formed.⁸ The authors showed that a pyridiniumboranephosphonate modification, when present in oligonucleotides, facilitated cellular uptake of such molecules⁸ and modulated the reducing properties of borane-modified nucleic acids during formation of DNA-templated metal nanostructures.^{8,9}

With a focus on the chemistry of boranephosphonates as important nucleotide analogs and potentially valuable synthetic intermediates, we recently investigated the mechanistic aspects of a formal replacement of the BH_3 group by amines,

Received: December 29, 2019

Published: February 19, 2020

Scheme 1. Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines, Promoted by Iodine



promoted by iodine.¹⁰ In contradistinction to the literature report,⁷ we found that this transformation occurred with total inversion of the configuration at the phosphorus center and involved the intermediacy of the corresponding H-phosphonate diesters.¹⁰ These findings are of importance in the context of a possible use of boranephosphonate analogues in postsynthetic modifications of nucleic acids.

In this paper, we investigated the reaction of boranephosphonate diesters with heteroaromatic and 3° amines, promoted by iodine.⁸ This reaction, in contrast to that involving 1° or 2° amines,⁷ preserves the P–B bond in boranephosphonates and leads to formation of a new structural motif, P–B–N, where N is part of a heteroaromatic or 3° amine.⁸ Taking into account the potential importance of B-modified boranephosphonate nucleotide analogues in nucleic acid chemistry, medicinal chemistry, or metal nanotechnology, we undertook these studies to gain better understanding of the underlying chemistry, to evaluate the substrate scope of this reaction in terms of the kind of amine used, and to clarify some mechanistic aspects that can be of synthetic relevance. We used in our studies multinuclear NMR spectroscopy to detect putative intermediates and define a mechanistic framework of the whole transformation. As a model system for our studies we chose a reaction of diethyl boranephosphonate diester **1** with pyridine (or its derivatives) or certain 3° amines promoted by iodine under various experimental conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

For the reaction of boranephosphonate diesters with 1° and 2° amines in the presence of iodine and that with heteroaromatic and certain 3° amines, two distinct mechanisms have been advocated. For that involving 1° and 2° amines, a nucleophilic substitution of the activated borane group by iodide to form the corresponding iodophosphate with inversion of the configuration at phosphorus was proposed as a key reaction step.⁷ For the second reaction, which makes use of heteroaromatic or 3° amines as substrates and preserves the borane group in the molecule, a different mechanism, involving a four-center addition of an *N*-iodoammonium species to the borane moiety with a simultaneous oxidation of the boron-bound hydride, was suggested.⁸

Studies from our laboratory showed that the mechanism suggested for the reaction of boranephosphonates with 1° and 2° amines was incorrect.¹⁰ We proposed that the most likely reaction pathway for this process involved the intermediacy of an electron-deficient λ^3 -boranephosphonate species that coordinated the amine present in the reaction mixture to form an aminoborane intermediate, followed by its dissociation

to the corresponding H-phosphonate, and finally after oxidation, to a phosphoramidate diester (Scheme 1).

As for the reaction of boranephosphonate diesters with heteroaromatic and 3° amines promoted by iodine, our working hypothesis was that the initial, key mechanistic steps were the same as those proposed for 1° and 2° amines, i.e., involved formation of an electron-deficient λ^3 -boranephosphonate species, followed by coordination of the amine used (Scheme 1). The fate of the reaction is probably determined by the stability of the formed intermediates, i.e., complexes of λ^3 -boranephosphonate with amines (**ABP** vs **PyBP**, Scheme 1). In the case of the instability of an aminoboranephosphonate complex (e.g., **ABP**), the reaction proceeds further to the corresponding P(V) derivative, but if the complex is stable enough (e.g., pyridiniumborane complex **PyBP**), it may remain the final product of the reaction. This hypothesis was based on the expected reactivity of boranephosphonate diesters toward oxidants, the known affinity of electron-deficient boron species toward amines, and some preliminary ³¹P NMR spectroscopy experiments on this reaction.

Although the conversion of boranephosphonate diesters into the corresponding pyridiniumborane- or ammoniumboranephosphonate derivatives formally looks like a simple two-step reaction, careful scrutiny of the reaction conditions revealed that it might be a complex process with various competing reaction pathways and multiple equilibria systems involved. In agreement, Caruthers et al.⁸ reported on the formation on variable amounts of phosphates in this reaction (loss of the borane group and oxidation at the phosphorus center) and a complex dependency on the amount of pyridine and the oxidant used. For our part, we observed also the irreproducibility of certain experiments that can point to the sensitivity of the reaction to factors that have not been fully appreciated.

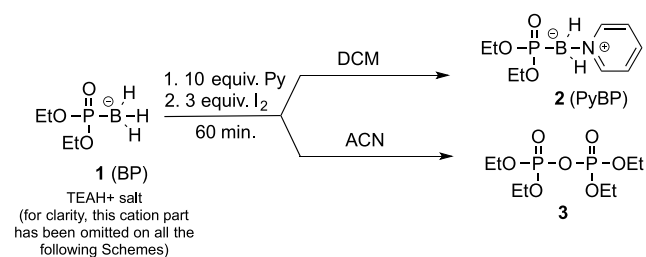
To get a deeper insight into the mechanistic features of the investigated reaction and to pinpoint synthetically important factors, we carried out series of experiments to identify the intermediates involved, clarify the role of the solvents used, and elucidate the possible involvement of amine–oxidant complexes in the oxidation step.

Reaction of Boranephosphonate **1 with Pyridine Promoted by Iodine in Different Solvents.** Preliminary experiments showed that simple diethyl boranephosphonate **1** reacted with pyridine in the presence of iodine analogously to the derivatives containing more complex esters residues (e.g., nucleoside moieties), and for this reason we selected it as a model boranephosphonate diester for our studies. We expected that the type of solvent used for this reaction can be important on at least two counts. First, iodine is known to form brown- or

violet-colored solutions depending upon the solvent. Brown solutions, which contain iodine coordinated to the solvent molecules, appear to be more reactive than those with presumably free iodine molecules, the violet ones.¹¹ Second, assuming an electron-deficient borane intermediate to be involved in the investigated reaction (Scheme 1), the coordination ability or electron-donating properties of the solvent may be of particular importance for stabilization of such species. Thus, taking into account the solubility requirements for the substrates and the theoretical premises mentioned above, we chose dichloromethane (DCM) and acetonitrile (ACN) as two differing solvents for the studied reaction.

Reaction of Diethyl Boranephosphonate 1 with Pyridine and Iodine in Dichloromethane vs Acetonitrile. A standard protocol for the investigated reaction consisted of adding iodine (3 equiv) to a ca. 0.1 M solution of boranephosphonate 1 (TEAH⁺ salt) in a selected solvent containing a heterocyclic or 3° amine (10 equiv). First, we ran the reaction in DCM with pyridine as a heterocyclic amine. Inspection of the ³¹P NMR spectrum after 1 h since the addition of iodine showed a complete disappearance of the starting material 1 ($\delta_p = 94.2$ ppm) and the presence of two signals at $\delta_p = 59.8$ ppm (m, ca. 80%) and $\delta_p = 45.0$ ppm (m, ca. 20%). The compound resonating at ca. 60 ppm was isolated from the reaction mixture and identified (¹H, ¹³C, ¹¹B NMR, and HRMS) as the expected product, diethyl pyridiniumboranephosphonate 2 (Scheme 2, PyBP). For identification of the side product at $\delta_p = 45.0$ ppm, see later in the text.¹²

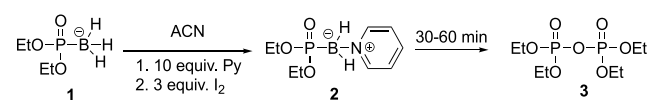
Scheme 2. Different Courses of the Reaction 1 + Pyridine + Iodine in Dichloromethane (DCM) vs Acetonitrile (ACN)^a



^aFor the relevant ³¹P and ¹¹B NMR spectra, see Figures S1 and S2 in the Supporting Information.

The analogous reaction of BP 1 with pyridine and iodine in ACN took a completely different course and afforded tetraethyl pyrophosphate 3 ($\delta_p = -13.0$ ppm) as the sole phosphorus-containing product (Scheme 2). This indicated that deboronation occurs during the course of the reaction, but its mechanistic pathway was far from clear. To get some insight into a possible mechanism, we followed the progress of the reaction in acetonitrile by ³¹P NMR spectroscopy. In the first ³¹P NMR spectrum recorded (after ca. 5 min.), a compound resonating at ca. $\delta_p = 60$ ppm (m, ca. 80%) appeared in the reaction mixture and during 30–60 min it gradually faded away to be converted into the final product of this reaction, pyrophosphate 3. The shape of the signal and its chemical shift values ($\delta_p = 59.8$ ppm and $\delta_b = -13.4$ ppm) strongly suggested formation of PyBP 2, but in contradistinction to the reaction in DCM, this species was unstable under the reaction conditions and ultimately (within 60 min) produced pyrophosphate 3 (Scheme 3).

Scheme 3. Transient Formation of PyBP 2 in the Reaction of 1 with Pyridine and Iodine in Acetonitrile^a



^aFor the relevant ³¹P and ¹¹B NMR spectra, see Figure S1 in the Supporting Information.

Since the isolated PyBP 2 was found to be completely stable in an acetonitrile solution, to prove its intermediacy in the investigated reaction, we reacted BP 1 with pyridine (10 equiv) and iodine (3 equiv) in ACN in the presence of the added putative intermediate, PyBP 2 (1 equiv). Somewhat surprisingly, in this experiment BP 1 was converted into PyBP 2, which did not undergo further transformation (a few hours) to the expected final product under these conditions, pyrophosphate 3. However, when we doubled the amount of iodine and pyridine in the above reaction, both substrates (BP 1 and PyBP 2) were converted into tetraethyl pyrophosphate 3 (Figure 1). Thus, in this context, two questions should be addressed: (i) why sometimes the produced PyBP 2 was stable even when the investigated reaction was run in acetonitrile and, related to it, (ii) what is a possible mechanism of transformation of PyBP 2 into pyrophosphate 3 during the course of the reaction in acetonitrile?

The transformation of PyBP 2 into pyrophosphate 3 during the course of the reaction in ACN (Scheme 3) occurred without any detectable intermediates by ³¹P NMR spectroscopy, and thus, no mechanistic clue existed for this process. However, on a chemical basis one can assume as plausible an initial nucleophilic attack of iodide (present in the reaction mixture) on carbon C2 of the pyridinium cation moiety¹³ in 2 to form aminoboranephosphonate intermediate 4 (Scheme 4). Such a species, or its protonated form, was expected to be unstable and should dissociate to generate first phosphonate anion 5 (or the corresponding H-phosphonate,¹⁰ and after its oxidation by iodine in the presence of spurious water pyrophosphate 3. This reaction pathway was partly supported by the findings that under strictly anhydrous conditions also the pyridinium adduct of metaphosphate 6 was formed.¹⁴

As for the variable persistence of PyBP 2 during the reaction in acetonitrile, we carried out a series of experiments in which we reacted BP 1 with pyridine (10 equiv) by varying the amount of iodine (0.5, 1, 1.5, 2, and 3 equiv). We observed that with less iodine (0.5–1.5 equiv) the produced PyBP 2 was stable under the reaction conditions (24 h), while a larger excess of iodine (2–3 equiv) favored decomposition of 2 into tetrasubstituted pyrophosphate 3 (ca. 1 h). These can be rationalized in light of the mechanism in Scheme 4 by assuming the possible formation of polyiodides¹⁵ with an excess of iodine, which could be a more effective nucleophile than iodides.

Another important aspect of the reaction in acetonitrile, in contrast to that run in DCM, was the absence of the side product resonating at ca. $\delta_p = 45$ ppm. This could be of synthetic importance and possibly might provide additional mechanistic insight into the investigated reaction. Since the most likely scenario for the formation of side products in this reaction was a subsequent oxidation of the initially formed PyBP 2 by iodine, first we doubled the amount of iodine and pyridine (6 and 20 equiv, respectively) in the reaction in

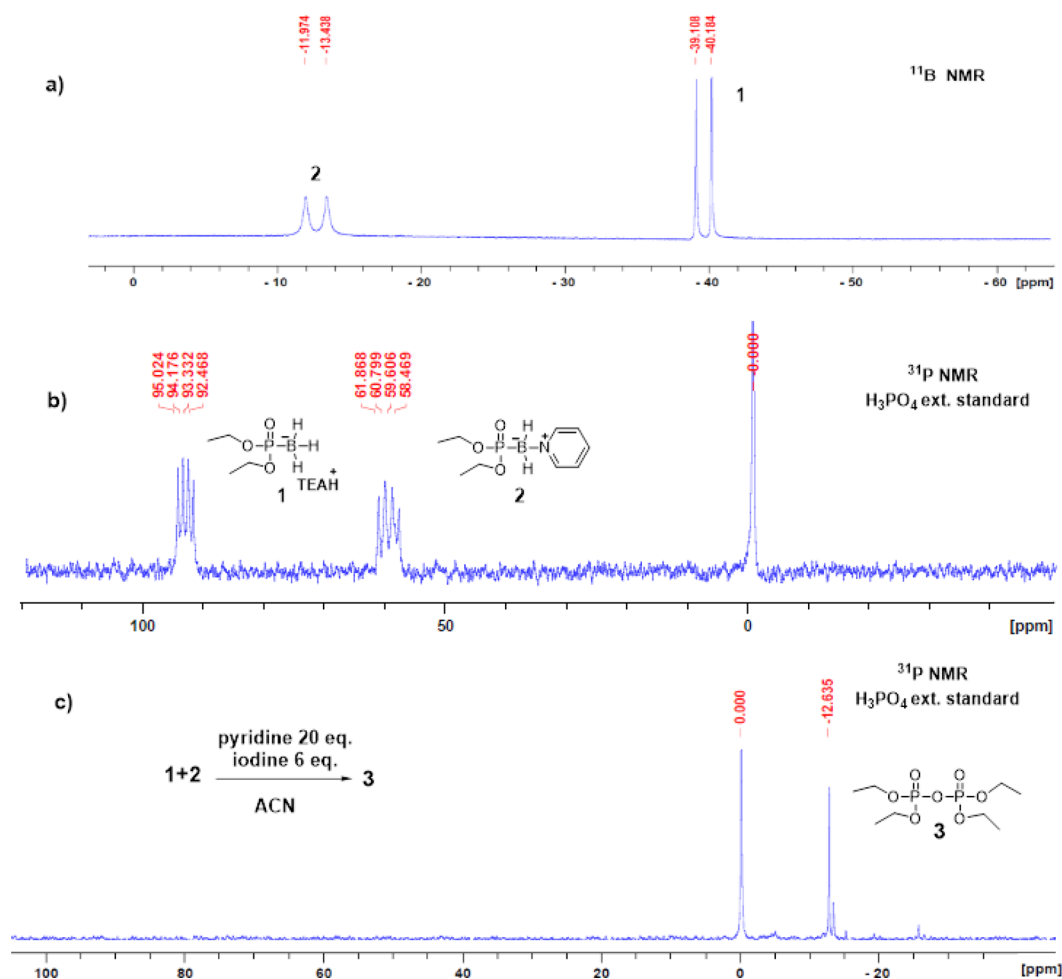
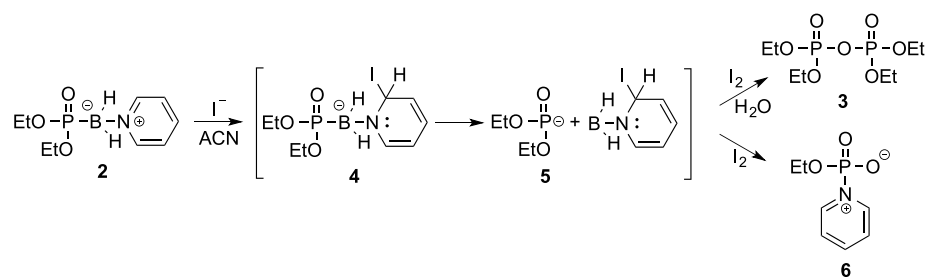


Figure 1. Reaction of boranephosphonate **1** with pyridine (20 equiv) in acetonitrile mediated by iodine (6 equiv) in the presence of the added postulated intermediate, pyridiniumboranephosphonate **2** (1 equiv). (a) ^{11}B NMR spectrum of **1** + **2** before addition of iodine; (b) ^{31}P NMR spectrum of the same reaction mixture as in a; (c) ^{31}P NMR spectrum of the reaction mixture as in b but a few minutes after adding iodine.

Scheme 4. Putative Mechanism for the Conversion of PyBP **2** during the Reaction of BP **1** with Pyridine and Iodine in Acetonitrile

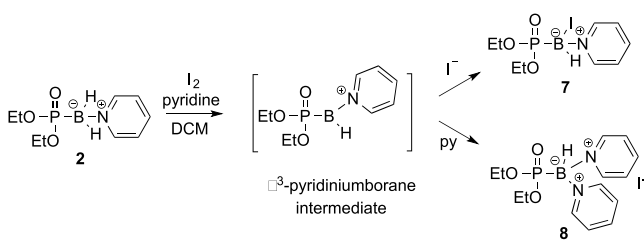


DCM. Unfortunately, this did not result in an increase in side product formation. However, repeated addition of new portions of iodine and pyridine to the reaction mixture (three times 3 and 10 equiv, respectively) each time generated more byproduct resonating at ca. $\delta_p = 45$ ppm (increase of ca. 20% upon each addition).¹⁶ A similar phenomenon was also observed when isolated PyBP **2** was subjected to the incremental addition of iodine and pyridine in DCM. We speculated that a plausible explanation for why the reaction demanded repeated addition of several portions of fresh iodine and pyridine could be that oxidation of PyBP **2** apparently required more reactive oxidizing species than that involved in

the oxidation of BP **1**. Such species could be a short lived and transiently generated upon mixing of iodine with pyridine (more on iodine–pyridine complexes, see later in the text). At this point we opted for two possible structures for this side product, namely, iodopyridiniumboranephosphonate **7** (compound with a betaine structure) and dipyridiniumboranephosphonate **8** (a cationic species), shown in Scheme 5.

Propitiously enough, we succeeded in isolation from the reaction mixture of the side product resonating at $\delta_p = 45.0$ ppm and found that it contained two pyridine moieties (^1H NMR). This and other spectral analysis data (^{13}C , ^{31}P , and ^{11}B NMR, and HRMS) allowed us to determine the structure of

Scheme 5. Possible Outcome of Oxidation of PyBP 2 with the Iodine–Pyridine Reagent System



this side product as a derivative of dipyridiniumboranephosphonate 8.

Since formation of the side product 8 was not observed when the investigated reaction was run in acetonitrile, it seemed that further oxidation of PyBP 2 by iodine did not occur in this solvent. This paralleled our previous observation that oxidation of BP 1 in acetonitrile was slower than that in dichloromethane and usually required more iodine.¹⁰

Preactivation of Boranephosphonate 1 with Iodine in Dichloromethane vs Acetonitrile. The widely differing reactivity of BP 1 in dichloromethane compared to acetonitrile (Scheme 2) prompted us to investigate what were the initial products of the activation of boranephosphonate diesters with iodine in these solvents. To this end, we reacted BP 1 with 3 equiv of iodine separately in DCM and in ACN and followed the progress of these reactions by ³¹P and ¹¹B NMR spectroscopy. We found that in DCM the major reaction product (>70%) resonated at ca. $\delta_p = 69$ ppm and $\delta_B = -39$ ppm and in ACN at $\delta_p = 75$ ppm and $\delta_B = -25$ ppm (also the major product, >70%). Upon mixing these two reaction mixtures only one signal in the ³¹P NMR (at ca. 75 ppm) and one in the ¹¹B NMR (at ca. -25 ppm) spectra were observed. This might have indicated that the same product was formed in both reactions, and the observed differences in chemical shifts values were due to differences in the solvents' polarity. However, additional experiments testified to something to the contrary. When to the reaction mixture in ACN dichloromethane was added (1:1, v/v), this did not affect the chemical shift values of the signals in ³¹P (ca. 75 ppm) and ¹¹B NMR (-25 ppm) spectra. However, addition of acetonitrile to the reaction mixture in DCM (1:1, v/v) resulted in an immediate change in the positions of the NMR signals from $\delta_p = 69$ and $\delta_B = -39$ ppm to those observed in the reaction mixture in ACN ($\delta_p = 75$ and $\delta_B = -25$ ppm). By adding only limited amounts of acetonitrile to the reaction mixture in DCM, two resonances in the ³¹P NMR (at ca. 67 and 75 ppm) and ¹¹B NMR spectra (at ca. -39 and -25 ppm) could be observed. These experiments strongly suggested the following: (i) in the preactivation reaction of BP 1 with iodine in DCM and in the reaction in ACN different products were formed, and (ii) the

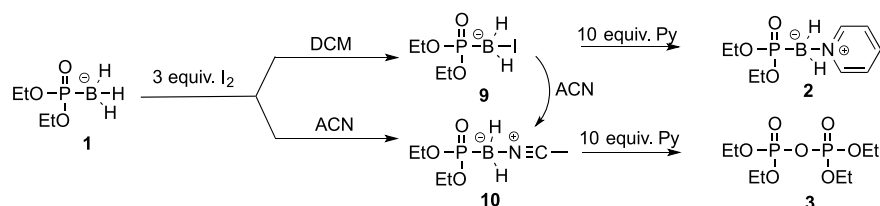
product formed in DCM was apparently converted to that formed in acetonitrile upon addition of the later solvent.

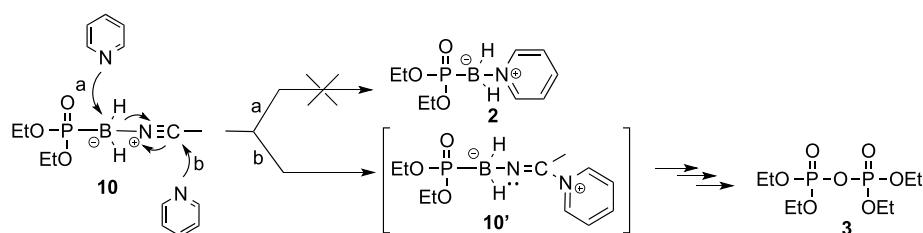
Although none of these preactivation products could be isolated, the MS spectra of the crude reaction mixtures and the observed reactivity of the intermediates formed, pointing to iodoboranephosphonate 9 (preactivation in DCM, $\delta_p = 69$ and $\delta_B = -39$ ppm) and to a new type of complex of acetonitrile- λ^3 -boranephosphonate 10 (preactivation in ACN, $\delta_p = 75$ ppm and $\delta_B = -25$ ppm) as the most likely structures (Scheme 6). Mechanistic aspects of how these intermediates could be formed will be discussed later in this work.

As a next step we studied the reactivity of the generated intermediates 9 and 10 toward pyridine. We found that addition of pyridine (10 equiv) to the reaction mixture containing the putative iodoborane intermediate 9 in DCM afforded immediately the expected product, pyridiniumboranephosphonate 2, presumably via a nucleophilic substitution at the boron center (Scheme 6). This might have supported the view that 9 could be an intermediate involved in the reaction of boranephosphonate diesters with pyridine promoted by iodine. However, the analogous reactions with the added 2,6-lutidine or triethylamine did not produce the anticipated products,¹⁷ i.e., the corresponding 2,6-lutidiniumborane- or triethylammoniumboranephosphonate, although these were formed in the reactions without the preactivation step (compounds 12b and 12l, vide infra). On this basis and assuming that the same mechanism operated for all of the investigated amines, we could dismiss iodoboranephosphonate 9 as a common reaction intermediate and considered instead a path via a four-center transition state addition or a mechanism involving the intermediacy of an electron-deficient λ^3 -boranephosphonate species (vide infra and Scheme 1) for the formation of products 2 and 12a-l.

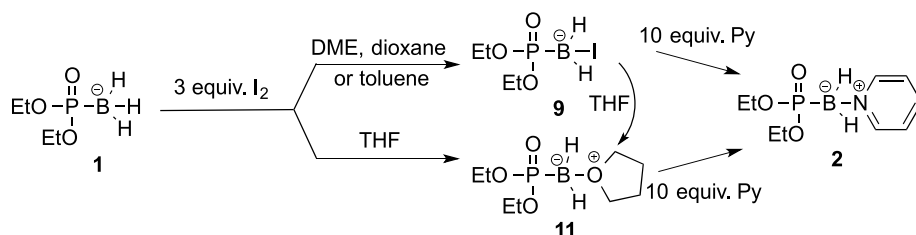
The reactivity of intermediate 10 generated in acetonitrile turned out to be somewhat unexpected since the addition of pyridine (10 equiv) resulted in the immediate formation of pyrophosphate 3 (Scheme 6). This reaction, in contrast to that in Scheme 3, was fast, proceeded without pyridiniumboranephosphonate 2 as an intermediate, and thus could be an alternative reaction pathway leading to pyrophosphate 3. A possible explanation for the observed reactivity of 10 could be that a betaine-type of structure of this complex should make the B–N bond stronger and effectively prevent a nucleophilic substitution of the acetonitrile moiety by pyridine at the boron center (path a in Scheme 7). On the other hand, the presence of a positive charge on the nitrile nitrogen in 10 might invite a nucleophilic attack of pyridine on the nitrile carbon (path b in Scheme 7), possibly generating an aminoborane intermediate 10'. This step, which can be considered analogous to that in the Pinner¹⁸ or the Ritter¹⁹

Scheme 6. Products of the Preactivation of BP 1 with Iodine in DCM and in ACN and Their Subsequent Reactions with the Added Pyridine



Scheme 7. Possible Mechanism for the Reaction of Acetonitrile- λ^3 -Boranephosphonate Complex 10 with Pyridine in the Presence of Iodine

Scheme 8. Preactivation of BP 1 with Iodine in Monoglyme (DME), Dioxane, Toluene, and THF



reaction, should lead to labilization of the P–B bond and dissociation of the aminoborane intermediate **10'** into phosphonate anion **5** and the borane part and then, in the presence of iodine, to subsequent P-oxidation reactions, as discussed above for the transformation shown in Scheme 4.

In line with the mechanism suggested in Scheme 7, the added 2,6-lutidine (10 equiv) or triethylamine (10 equiv) reacted similarly as pyridine with acetonitrile–borane complex **10**²⁰ to afford pyrophosphate **3** (see also later in the text).

Reactivity of Boranephosphonate 1 in Other Solvents. The high sensitivity of boranephosphonate diesters to the nature of the solvent used for the reaction prompted us to investigate the activation process of BP **1** and its reaction with amines mediated by iodine in different organic solvents, namely, monoglyme (1,2-dimethoxyethane, DME), dioxane, tetrahydrofuran (THF), *N,N*-dimethylformamide (DMF), and toluene. The reactions of **1** with iodine alone (3 equiv; the preactivation process) in monoglyme, dioxane, and toluene occurred similarly but less efficiently than that in DCM, producing iodoboranephosphonate **9** (Schemes 6 and 8) as a minor product (e.g., in DME, 50% of unreacted **1**, 25% of **9**, and 25% of diethyl phosphoriodidate). In DMF the reaction of BP **1** with iodine afforded immediately only deboronated products without any detectable by the ³¹P NMR spectroscopy intermediates.

We observed that the produced iodoboranephosphonate **9** was much less stable in monoglyme or dioxane than in DCM (>24 h) and decomposed (deboronation and oxidation) to phosphate derivatives within 1 h.

The preactivation of BP **1** with iodine in THF did not afford iodoboranephosphonate **9** but a new compound resonating in the ³¹P NMR spectrum at 78.2 ppm and in the ¹¹B NMR at –7.3 ppm. This later chemical shift value indicated the presence of a boron–oxygen bond, and thus, we tentatively identified this compound as a THF- λ^3 -boranephosphonate complex **11** (Scheme 8), analogously to that containing the acetonitrile instead of the THF moiety (compound **10** in Scheme 6). This assignment was substantiated by the experiment in which iodoboranephosphonate **9**, generated in DCM ($\delta_p = 69.4$ ppm and $\delta_B = -38.7$ ppm), was converted into the putative THF- λ^3 -boranephosphonate complex **11** (δ_p

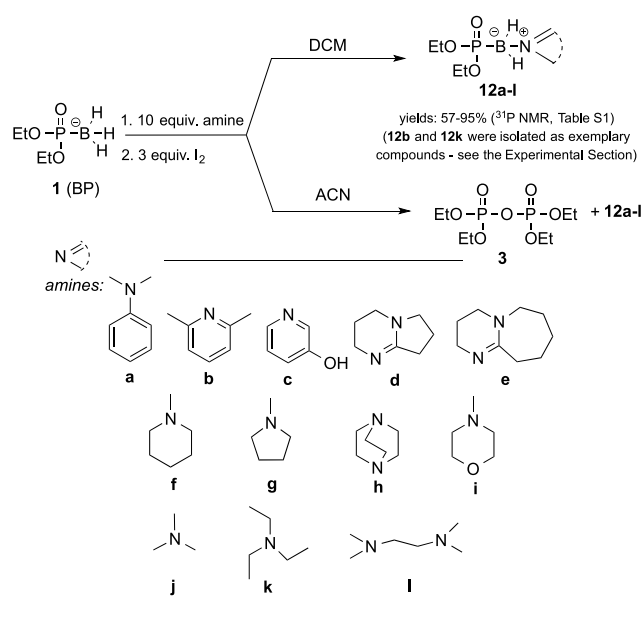
= 78.2 and $\delta_B = -7.3$ ppm) upon addition of THF (20 equiv). In light of these it seems that THF, in contradistinction to monoglyme or dioxane, is a strongly participating solvent, resembling in this respect ACN. One should note, however, that the bonding pattern in THF- λ^3 -boranephosphonate **11** is quite different from that in the acetonitrile complex **10**. This probably made complex **11** susceptible to a nucleophilic substitution by pyridine at the boron center²¹ to form pyridiniumboranephosphonate **2** (Scheme 8), in contradistinction to the acetonitrile complex **10**, where this reaction pathway was disfavored (Scheme 6).

In all of the investigated solvents the reaction of BP **1** with pyridine (10 equiv) and iodine (3 equiv) without the preactivation proceeded similarly as in DCM and afforded the expected product Py-BP **2** together with small amounts of dipyridiniumboranephosphonate **8** (10–20%) as a side product.

Substrate Scope of the Investigated Reaction. To explore the substrate scope of the investigated reaction we appended the series of *N*-nucleophiles used by Caruthers et al.⁸ by additional heteroaromatic and 3° amines **a–l** with diverse structural features (aromatic amines, pyridine derivatives, bicyclic amidines, aliphatic acyclic, cyclic and bicyclic amines, etc.; Scheme 9).

For comparison with the reactivity of pyridine, we reacted amines **a–l** with BP **1** in DCM, ACN, and THF in the presence of iodine and also separately with the products of activation of BP **1** with iodine, i.e., iodoboranephosphonate **9** (reactions in DCM), acetonitrile- λ^3 -boranephosphonate **10** (reactions in ACN), and tetrahydrofuran- λ^3 -boranephosphonate **11** (reactions in THF). Analysis of the data from Table S1 (see the Supporting Information) revealed some general trends regarding the reactivity of the tested amines. In dichloromethane, amines **a–l** reacted promptly with BP **1** but less cleanly than pyridine to afford the corresponding *B*-modified boranephosphonate derivatives **12** (³¹P NMR experiments, $\delta_p = 58$ –65 ppm, broad signals) and some deboronated products (ca. 5–20%). In all instances, the presence of additional boron-containing products (up to 20%), resonating at ca. 40 ppm in the ³¹P NMR spectra, could be detected.²² A similar reactivity was observed for the reactions in ACN and THF (participating

Scheme 9. Substrate Scope of the Reaction of Diethyl Boranephosphonate **1** with Tertiary Amines



solvents), and the yields of the P–B–N products of type **12** were usually noticeably higher in THF than those in ACN or DCM. For certain amines, however, e.g., **b** and **d** in ACN and **a** and **b** in THF, only the deboronated products were formed. For the reaction of amines **a–l** (10 equiv) with the generated iodoboranephosphonate intermediate **9** (reactions in DCM), formation of **12** with variable proportions of tetraethyl pyrophosphate **3** (20–60%) were observed. Certain sterically hindered amines (e.g., **b**, **e**, **i**, **j**, and **k**) apparently could not substitute for the iodide at the boron center in **9** and produced only the deboronated products (phosphate derivatives). This may have a mechanistic bearing concerning a possible intermediate involved in the investigated reaction.

In the instance of acetonitrile– λ^3 -boranephosphonate complex **10**, no formation of the P–B–N derivatives of type **12** was observed for all of the tested amines, analogously to the reaction with pyridine (Scheme 7). In sharp contrast to the reactivity of **10**, tetrahydrofuran– λ^3 -boranephosphonate complex **11** reacted smoothly with amines **c–l** giving the P–B–N derivatives **12** usually in higher yields than in the reaction of BP **1** in DCM. This was most apparent for amidine bases **d** and **e**. Sterically hindered amines of low basicity, e.g., *N,N*-dimethylaniline (**a**) and 2,6-lutidine (**b**), were not able to substitute the THF moiety in complex **11**, but instead, they probably facilitated further oxidation of the borane group, eventually producing deboronated products (phosphate derivatives).

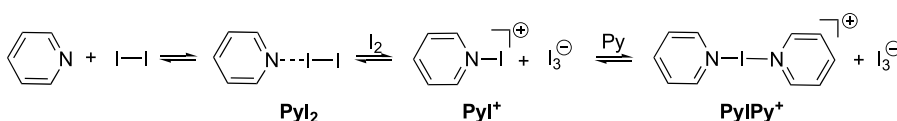
The broad substrate scope of this reaction is consistent with studies by Caruthers et al.⁸ but with a notable exception of 2,6-lutidine and triethylamine for which no formation of

complexes of type **12** was reported due to the claimed extensive steric hindrance. On the contrary, we found that in DCM compounds **12b** (2,6-lutidine derivative) and **12k** (triethylamine derivative) could be formed and their structures were confirmed by spectroscopic methods (¹H, ¹³C, ³¹P, and ¹¹B NMR, and HRMS) after silica gel chromatographic isolation. This highlighted the importance of the solvent used and might point to the intermediacy of an electron-deficient borane species in this reaction (see Scheme 1). In agreement, in the reaction of boranephosphonate diesters with sterically hindered amines, participating solvents (e.g., dioxane in the Caruthers' studies,⁸ and acetonitrile or THF in the present work) may efficiently prevent capturing of the borane intermediate by the amines, in contrast to nonparticipating solvents (e.g., dichloromethane), where the transient λ^3 -borane intermediate can be intercepted even by sterically hindered amines to form *B*-modified boranephosphonate diesters of type **12**.

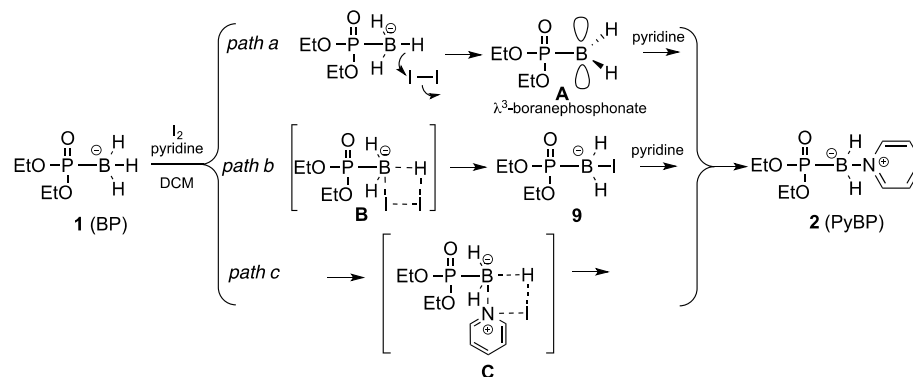
Mechanistic Aspects of the Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines Promoted by Iodine. *Issue of the Oxidizing Species: Iodine–Amine Complexes.* Although iodine is implicated as an oxidant in the investigated reaction, the chemical nature of the oxidizing entity involved is far from clear. The problem can be particularly difficult to resolve for oxidative transformations involving amines^{7,8} since these are known to form with iodine various type of complexes, connected via complex equilibria systems,²³ that ultimately undergo time- and concentration-dependent decomposition processes.^{23d,24} The interaction of amines with halogens has been the subject of numerous investigations for almost a century,^{11b,23c,25} and in recent years, these studies have received new stimuli due to revival of the concept of N–X–N halogen bonding²⁶ as a new molecular motif in rational drug design and in material sciences.²⁷ For a pyridine/iodine mixture, a typical equilibria system that is established in organic solvents is shown in Scheme 10.^{23c,28}

An increase in the iodine concentration is shifting the equilibrium in Scheme 10 toward *N*-iodopyridinium cationic species PyI⁺, while an increase in base concentration (pyridine) favors formation of a charge transfer complex PyI₂ (*K*_a ca. 100–200 M^{−1}) and another cationic species, *N*-iododipyridinium PyIPy⁺.^{28a,29} In nonpolar solvents, the charge transfer complexes of type PyI₂ are relatively stable, but in polar systems, they tend to dissociate to form ionic species PyI⁺ and PyIPy⁺ that undergo slow decomposition.^{28a} According to Schuster's and Roberts' ¹H and ¹³C NMR studies,³⁰ in nonpolar solvents iodine and pyridine are in fast equilibrium with PyI₂, while the equilibrium between PyI₂ and PyIPy⁺ is slow on the NMR time scale. In line with these, our ¹H NMR experiments on the 2:1 mixture of pyridine and iodine in DCM revealed only one set of signals from the pyridine moiety, indicating a rapid equilibrium of iodine and pyridine with the charge transfer complex PyI₂. For the ACN solutions, an additional set of signals, attributed to the formation of cationic species PyIPy⁺ (ca. 15%), was observed

Scheme 10. Putative (simplified) Equilibria System for Iodine and Pyridine in Organic Solvents



Scheme 11. Some Possible Reaction Pathways for the Formation of Pyridiniumboranephosphonate 2



in the ¹H NMR spectra (data not shown). We could also confirm that solutions of iodine with pyridine were not completely stable (even in DCM), judging from the inferior results of the formation of pyridiniumboranephosphonates 2, when pyridine and iodine were mixed 15–60 min prior to the reaction with BP 1.³¹ Due to the complexity of the system and its sensitivity to various factors (e.g., kind of the solvent used, concentration and ratio of the reactants, instability in time), no attempt was made to identify which of the species, elemental iodine, charge transfer complex PyI₂, PyI⁺, or PyIPy⁺, was the reactive entity accepting a hydride ion from the borane group during synthesis of 2. However, selected experiments shed some light on this problem. Since there was no discernible difference in the rate of oxidation of boranephosphonate 1 in DCM with iodine alone (the preactivation process) and with iodine in the presence of pyridine (the reaction to produce 2, vide supra), we assumed for the purpose of our studies that the reactivity of elemental iodine was probably similar to that of the other complexes formed by iodine with pyridine (Scheme 10). For this reason, in our mechanistic discussion we found it was justified to invoke participation of elemental iodine or its complexes with pyridine as possible oxidants.

Reaction Pathways for Oxidative Transformation of Boranephosphonate 1 into Pyridiniumboranephosphonate Derivative 2. All of the experiments discussed above cumulatively pointed to three possible reaction pathways for the conversion of BP 1 into pyridiniumboranephosphonates of type 2 that are summarized in an abbreviated form in Scheme 11.

At the present stage of this study path a in Scheme 11 seems most likely because all of the synthetic results discussed above can be simply accounted for by assuming the intermediacy of λ³-boranephosphonate A with a vacant p orbital on the boron atom. In line with this, in nonparticipating solvents such as DCM formation compounds of type 12 with the P–B–N functionality bearing even highly sterically hindered amines were observed. While being generated in the preactivation process in DCM iodoboranephosphonate 9 also reacted smoothly with pyridine and other 3° amines (Table 1S), it failed to provide the corresponding P–B–N derivatives in the reaction with certain sterically hindered amines, e.g., 2,6-lutidine (b), DBU (e), *N*-methylmorpholine (i), trimethylamine (j), and triethylamine (k) (Table 1S). By this token, path b, which assumed iodoboranephosphonate 9 as an alternative common intermediate in this reaction, must be rejected. Thus, in light of our previous studies,¹⁰ path a may constitute a uniform mechanism for the iodine-mediated reactions of

boranephosphonate diesters with amines regardless of the type of final products formed, i.e., the corresponding phosphoramidates (for 1° and 2° amines)¹⁰ or *B*-modified boranephosphonate derivatives (for 3° and heteroaromatic amines, this study).

Another possible way for the formation of pyridiniumboranephosphonate 2 can be path c, which involves a 4-center transition state C (Scheme 11) in which oxidation of the borane hydride and coordination of the pyridine moiety occurs simultaneously. Such a mechanism was previously proposed by Caruthers et al.⁸ to explain a different course of the mediated by iodine reaction of boranephosphonate diesters with pyridine vs 1° or 2° amines. This seems reasonable in light of the oxidizing species present in the reaction mixture, but on the geometrical ground, a transition state of type C would call for a square pyramidal arrangement of the substituents around the boron center and require a frontside attack of the amine moiety. While probably possible for pyridine, this scenario can be somewhat problematic for sterically hindered bases. Thus, we suggest that if PyI⁺ would be involved as a reactive oxidizing species, the B–H bond breaking (oxidation of the borane hydride) might run significantly ahead of the B–N bond formation and the transition state could adopt all of the characteristics of λ³-boranephosphonate A intermediate with the pyridine molecule nearby the boron center available for coordination. We refer to such a mechanism as occurring via λ³-boranephosphonate A intermediate in a solvent cage. A similar scenario can be envisaged for iodine or its charge transfer complex with pyridine (PyI₂) acting as an oxidizing species (path a), where the incipient λ³-boranephosphonate A intermediate could be intercepted by pyridine present in the solvent cage. Assuming the above mechanism, it can be expected that in participating solvents (ACN and THF, see Table 1S) competitive capture of intermediate A by the solvent molecules may occur. This would lead to formation of acetonitrile–λ³-boranephosphonate complex 10 (reactions in ACN) or tetrahydrofuran–λ³-boranephosphonate complex 11 (reactions in THF). Since compound 10 cannot be converted into P–B–N products (see Scheme 6 and Table 1S), lower yields of the desired products 12 would be expected for the reaction in acetonitrile. This is indeed apparent from the data in Table 1S. In addition, for certain amines, e.g., 2,6-lutidine (b) and DBN (d), only deboronated products were formed in ACN, probably due to complete capture of A by the solvent molecules. This interpretation is congruous with the data for the reactions in THF (Table 1S). In this instance, interception of the putative intermediate A by the solvent molecules to

form tetrahydrofuran- λ^3 -boranephosphonate complex **11** should not have a detrimental effect on the efficiency of the P–B–N compounds formations, because unlike the complex with acetonitrile **10**, complex **11** would return the desired products **12** upon reaction with amines. Indeed, for the most part, the yields of products **12** in the reactions in THF were higher than those in acetonitrile and comparable with those in DCM. The exceptions here were *N,N*-dimethylaniline (**a**) and 2,6-lutidine (**b**), which, as mentioned before, could not substitute the tetrahydrofuran moiety in **11** but instead, promoted its degradation to deboronated products. Considering this reactivity and the assumption that during the course of the reaction of BP **1** with amines intermediate **A** can be captured by the solvent molecules to form **11**, formation of P–B–N products for amines **a** and **b** was not observed in THF.

Finally, a possible mechanism for formation of the preactivation products from BP **1** with iodine in DCM (compound **9**), ACN (compound **10**), and THF (compound **11**) deserves comment. Iodoboranephosphonate **9** can be formed, in principle, via (i) the initial generation of intermediate **A**, followed by coordination of iodide present in the reaction mixture, (ii) in a one-step reaction via a 4-center transition state **B**, analogous to **C**, or (iii) coordination of the iodide anion by the incipient λ^3 -boranephosphonate **A** in a solvent cage, as suggested above for the reactions with amines. Since the reactivity of iodine alone and iodine in the presence of amines toward boranephosphonate diesters seems to be comparable, at this stage of our investigations we tend to favor the last option. As for the formation of acetonitrile- λ^3 -boranephosphonate **10** and tetrahydrofuran- λ^3 -boranephosphonate **11**, direct coordination of the solvent molecules (acetonitrile and tetrahydrofuran, respectively) by λ^3 -boranephosphonate **A** most likely prevailed due to a significantly higher concentration of the solvent molecules compared to iodide, but some participation of **9** cannot be completely excluded.

In summary, it should be remembered that reactions of boranephosphonate diesters with amines mediated by iodine are also very sensitive to the ratio of the reagents used, as shown above for the model amine pyridine. This can have a quantitative and qualitative impact on the outcome of these reactions.

CONCLUSIONS

We found that the reaction of diethyl boranephosphonate **1** with pyridine promoted by iodine in dichloromethane afforded the corresponding pyridiniumboranephosphonate **2** and ca. 20% of dipyridiniumboranephosphonate derivative **8**. In an analogous reaction in acetonitrile, complete deboronation occurred, with tetraethyl pyrophosphate **3** as a final product. It seems that formation of different products in dichloromethane vs acetonitrile was most likely due to the instability of the formed pyridiniumboranephosphonate derivative under the reaction conditions or an alternative reaction pathway (formation of acetonitrile adduct **10**) in the latter solvent. A similar course of the reaction was observed for other pyridine derivatives and 3° amines investigated. Preactivation of BP **1** with iodine in dichloromethane vs acetonitrile without amine also produced distinct intermediates, namely, the corresponding iodoboranephosphonate **9** (in DCM) and the hitherto unknown complex of λ^3 -boranephosphonate with acetonitrile **10** (in ACN). Upon addition of pyridine these afforded the desired diethyl pyridiniumboranephosphonate **2** and tetraethyl

pyrophosphate **3**, respectively. We also found that THF in this reaction acted as a strongly participating solvent, forming BP–THF complex **11** that, in contradistinction to the analogous complex with acetonitrile **10**, reacted with the added pyridine yielding PyBP **2**.

On the basis of ^{31}P and ^{11}B NMR spectroscopy we formulated a general mechanism for the reaction of boranephosphonate diesters with 1°, 2°, 3°, and heteroaromatic amines mediated by iodine. It features, as key mechanistic steps, generation of an electron-deficient intermediate λ^3 -boranephosphonate **A** (Scheme 11) followed by its coordination by the amine present to form compounds with a P–B–N structural motif. Given the overall complexity of this reaction, two distinct mechanisms can also be envisaged: one via a 4-center transition state of type **C** for less sterically hindered amines (e.g., 1° and 2° amines, pyridine) and the other via a λ^3 -boranephosphonate intermediate **A** for sterically hindered amines (e.g., 2,6-lutidine).

EXPERIMENTAL SECTION

All reagents were of analytical grade, obtained from commercial suppliers, and used without further purification. Diethyl boranephosphonate **1** was prepared as previously described.¹⁰ Anhydrous solvents used for the reactions were stored over molecular sieves, 4 Å. TLC analyses were carried out on Merck silica gel 60 F 254 precoated plates using a CH_2Cl_2 –MeOH 9:1 (v/v) solvent system. All evaporations were carried out on rotatory evaporators under reduced pressure at 40 °C.

The NMR spectra were recorded using a Bruker Avance II 400 MHz instrument. The chemical shifts are reported in ppm relative to solvent peaks (^1H , ^{13}C NMR), 2% H_3PO_4 solution in D_2O (^{31}P NMR), and BF_3 diethyl etherate (^{11}B NMR). Assignment of the NMR signals was accomplished on the basis of the expected chemical shift values, splitting pattern of the signals, and 2D correlation experiments. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Thermo Fisher Scientific Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer. Identification of intermediates observed in the ^{31}P and ^{11}B NMR spectra of the reaction mixtures was done on the basis of the expected chemical shifts, coupling constants, shapes of the multiples, and spiking of the reaction samples with compounds of known structures.

The purity of the isolated compounds was >97% (^1H NMR spectroscopy) unless stated otherwise.

General Protocol for ^{31}P and ^{11}B NMR Experiments. To a solution of diethyl boranephosphonate **1** (0.5 mmol) and pyridine (5 mmol, 10 equiv) in CH_2Cl_2 (3 mL), iodine (1.5 mmol, 3 equiv) was added, and the reaction mixture was kept at room temperature with continuous stirring. Progress of the reaction was checked by ^{31}P and ^{11}B NMR spectroscopy by taking samples in time intervals and recording the spectra. Analogous reactions were run also in other solvents (e.g. acetonitrile, THF) and with other heteroaromatic and 3° amines (for details, see in the text). To detect possible intermediates involved, **1** in a suitable solvent was reacted with variable amounts of iodine in the absence of an amine (see the preactivation experiments). The reactivity of the intermediates formed was studied by adding to the reaction mixture suitable reactants as indicated in the text.

To prove the chemical identity of the formed compounds, selected reactions were run on a preparative scale, and the products were isolated by silica gel chromatography. The isolated compounds were characterized by spectroscopic methods and, if so desired, subjected to additional reactions as specified in the text.

Preactivation of Diethyl Boranephosphonate **1 with Iodine in Dichloromethane.** Diethyl boranephosphonate **1** (TEAH⁺ salt, 127 mg, 0.5 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL), and the added solvent (3 × 10 mL of CH_2Cl_2) was evaporated repeatedly (3×). The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (3 mL), and iodine (380 mg, 1.5 mmol, 3 equiv) was added. The progress of the reaction was checked

by ^{31}P and ^{11}B NMR spectroscopy by taking samples in time intervals and recording the spectra. After ca. 10 min upon mixing the reagents, the major signal (>70%) at ca. 69 ppm in the ^{31}P NMR or at ca. -39 ppm in ^{11}B NMR spectrum appeared. This was tentatively identified as iodoboranephosphonate **9** on the basis of its reactivity toward pyridine and acetonitrile and by MS spectra of the crude reaction mixture. For more details, see also Scheme 6 and the discussion in the text.

Preactivation of Diethyl Boranephosphonate 1 with Iodine in Acetonitrile. Diethyl boranephosphonate **1** (TEAH⁺ salt, 127 mg, 0.5 mmol) was dissolved in acetonitrile (10 mL), and the added solvent (3 × 10 mL acetonitrile) was evaporated repeatedly (3×). The residue was dissolved in acetonitrile (3 mL), and iodine (380 mg, 1.5 mmol, 3 equiv) was added. The progress of the reaction was checked by ^{31}P and ^{11}B NMR spectroscopy by taking samples in time intervals and recording the spectra. After ca. 15 min upon mixing the reagents, the major signal (>75%) at ca. 75 ppm in the ^{31}P NMR or at ca. -25 ppm in ^{11}B NMR spectrum appeared. This was tentatively identified as λ^3 -boranephosphonate-acetonitrile complex **10** on the basis of its reactivity toward pyridine and by MS spectra of the crude reaction mixture. For more details, see also Scheme 6 and the discussion in the text.

Synthesis of Diethyl Pyridiniumboranephosphonate 2. Diethyl boranephosphonate **1** (TEAH⁺ salt, 254 mg, 1 mmol) was placed in a 100 mL pear-shaped flask, and the added anhydrous dichloromethane (2 × 20 mL) was evaporated. The residue was dissolved in the same solvent (5 mL), and then pyridine (10 mmol) and elemental iodine (3 mmol) were added. The mixture was stirred, and the progress of the reaction was monitored by ^{31}P NMR spectroscopy. After 10 min excess iodine was decomposed by the addition of an aqueous ethanethiol (25%, 0.2 mL), the solvents were evaporated under reduced pressure, and the product was purified by silica gel column chromatography using a gradient of water in acetonitrile (0–5%, v/v). Fractions containing the desired product were collected and evaporated to yield pyridiniumboranephosphonate **2** as a colorless oil (167 mg). Yield 73%. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{H}^+]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{BNO}_3\text{P}$, 230.1117; found, 230.1103. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ): 1.15 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 3.90 (q, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 7.60 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 13.8$ Hz), 8.03 (t, 1H), 8.61 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 16.6 ($^3J_{\text{PC}} = 5.6$ Hz), 58.6 ($^2J_{\text{PC}} = 6.6$ Hz), 126.0 ($^2J_{\text{PC}} = 1.9$ Hz), 140.8 ($^4J_{\text{PC}} = 3.2$ Hz), 148.0 ($^3J_{\text{PC}} = 6.8$ Hz). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz, δ): 60.16 (br m). ^{11}B NMR (CDCl_3 , 128.4 MHz, δ): -13.27 ($^1J_{\text{PB}} = 175.7$ Hz, $^1J_{\text{BH}} = 105.6$ Hz, dt).

Synthesis of Diethyl Dipyridiniumboranephosphonate 8. Diethyl dipyridiniumboranephosphonate **8** was isolated as a side product during the synthesis of pyridiniumboranephosphonate **2** (see above). To this end, a reaction mixture from a separate run was quenched by the addition of aqueous ethanethiol (25%, 0.2 mL), evaporated to dryness, and dissolved in dichloromethane (100 mL). The organic layer was extracted with water (3 × 75 mL), the aqueous phase containing the product was evaporated to dryness, and the residue was purified by reverse silica gel column chromatography using acetone/water (a linear gradient 0–15%, v/v of water) as an eluent. Fractions containing the desired product were collected and evaporated to yield dipyridiniumboranephosphonate **8** as a colorless oil (34 mg). Yield 12%. HRMS m/z , $[\text{M}^+]$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{BN}_2\text{O}_3\text{P}^+$, 307.1377; found, 307.1366. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.27 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 4.14 (m, 4H), 8.07 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 8.57 (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz), 8.97 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ 15.7 ($^3J_{\text{PC}} = 5.0$ Hz), 62.1 ($^3J_{\text{PC}} = 7.5$ Hz), 128.1, 145.9, 147.5 ($^3J_{\text{PC}} = 7.8$ Hz). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz): δ 44.28 (br m). ^{11}B NMR (CDCl_3 , 128.4 MHz, δ): -1.29 ($^1J_{\text{PB}} = 212.2$ Hz, d).

Synthesis of Diethyl 2,6-Dimethylpyridiniumboranephosphonate 12b. Diethyl 2,6-dimethylpyridiniumboranephosphonate **12b** was obtained analogously to diethyl pyridiniumboranephosphonate **2** but using 2,6-dimethylpyridine (10 mmol) as a nucleophile instead of pyridine. The desired product was isolated as a yellowish oil (164 mg). Yield 64%. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{H}^+]^+$ calcd for

$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{BNO}_3\text{P}$, 258.1430; found, 258.1416. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ): 1.28 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 2.97 (s, 6H), 4.02 (m, 4H), 7.36 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz), 7.77 (m, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 16.66 ($^3J_{\text{PC}} = 5.5$ Hz), 25.4, 58.6 ($^2J_{\text{PC}} = 6.9$ Hz), 125.6, 139.8, 159.6. ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz, δ): 62.93 (br m). ^{11}B NMR (CDCl_3 , 128.4 MHz, δ): -18.50 ($^1J_{\text{PB}} = 187.5$ Hz, $^1J_{\text{BH}} = 175.71013$ Hz, dt).

Synthesis of Diethyl Triethylammoniumboranephosphonate 12k. Diethyl triethylammoniumboranephosphonate **12k** was obtained analogously to diethyl pyridiniumboranephosphonate but using as a nucleophile triethylamine (10 mmol) instead of pyridine. The desired product was isolated as a yellowish oil (155 mg). Yield 62%. HRMS m/z : $[\text{M} + \text{H}^+]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{BNO}_3\text{P}$, 252.1899; found, 252.1885. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, δ): 1.16 (m, 15H), 2.99 (q, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz), 3.84 (4H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz, δ): 8.2, 16.6 ($^2J_{\text{PC}} = 5.7$ Hz), 51.7 ($^2J_{\text{PC}} = 8.2$ Hz), 58.2 ($^2J_{\text{PC}} = 6.7$ Hz). ^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz, δ): 60.39 (br m). ^{11}B NMR (CDCl_3 , 128.4 MHz, δ): -16.36 ($^1J_{\text{PB}} = 185.7$ Hz, $^1J_{\text{BH}} = 95.9$ Hz, dt).

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.joc.9b03506>.

^1H , ^{13}C , ^{31}P , and ^{11}B NMR spectra of the synthesized compounds and selected reaction mixtures (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Jacek Stawinski – Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences 61-704 Poznań, Poland; orcid.org/0000-0001-9350-3018; Phone: (+) 48 61 852 85 02; Email: jstaw@ibch.poznan.pl; Fax: (+) 48 61 852 05 32

Author

Justyna Gołębiewska – Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences 61-704 Poznań, Poland

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.joc.9b03506>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Zofia Gdaniec and Dr. Witold Andrałojć from our Institute for their help with ^{11}B NMR measurements. Financial support from the National Science Centre, Poland, the Preludium grant (to J.G.) Nr 2018/31/N/STP/03589 and from the Ministry of Science and Higher Education, Poland, a grant to young investigators and participants of the doctoral studies at the Institute of Bioorganic Chemistry, PAS (to J.G.), is greatly acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) (a) Li, P.; Sergueeva, Z. A.; Dobrikov, M.; Shaw, B. R. Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: Chemistry and properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4746–4796. (b) Kundu, R. Borane phosphonate DNA: a versatile unnatural internucleotide linkage. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 4323–4328.
- (2) (a) Summers, J. S.; Shaw, B. R. Boranophosphates as Mimics of Natural Phosphodiester in DNA. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1147–1155. (b) Spielvogel, B. F. Boron analogues of biomolecules: biomedical prospects. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1994**, *87*, 267–276. (c) Lin, J.; Shaw, B. R. Synthesis of new classes of boron-containing nucleotides. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*

2001, 20, 587–596. (d) Dobrikov, M. I.; Grady, K. M.; Shaw, B. R. Introduction of the α -P-borano-group into deoxynucleoside triphosphates increases their selectivity to HIV-1 reverse transcriptase relative to DNA Polymerases. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* 2003, 22, 275–282. (e) Wang, X.; Dobrikov, M.; Sergueev, D.; Ramsay Shaw, B. RNase H activation by stereoregular boranophosphate oligonucleotide. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* 2003, 22, 1151–1153. (f) Rait, V. K.; Shaw, B. R. Boranophosphates Support the RNase H Cleavage of Polyribonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1999, 9, 53–60. (g) Meyer, P.; Schneider, B.; Sarfati, S.; Deville-Bonne, D.; Guerreiro, C.; Boretto, J.; Janin, J.; Veron, M.; Canard, B. Structural basis for activation of alpha-boranophosphate nucleotide analogues targeting drug-resistant reverse transcriptase. *EMBO J.* 2000, 19, 3520–3529.

(3) (a) Shaw, B. R.; Dobrikov, M.; Wang, X. I. N.; Wan, J.; He, K.; Lin, J.-L.; Li, P.; Rait, V.; Sergueeva, Z. A.; Sergueev, D. Reading, Writing, and Modulating Genetic Information with Boranophosphate Mimics of Nucleotides, DNA, and RNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003, 1002, 12–29. (b) Martin, A. R.; Vasseur, J. J.; Smietana, M. Boron and nucleic acid chemistries: merging the best of both worlds. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 5684–5713. (c) Hall, A. H. S.; Wan, J.; Spesock, A.; Sergueeva, Z.; Shaw, B. R.; Alexander, K. A. High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 2773–2781. (d) Schneider, B.; Meyer, P.; Sarfati, S.; Mulard, L.; Guerreiro, C.; Boretto, J.; Janin, J.; Veron, M.; Deville-Bonne, D.; Canard, B. Activation of anti-reverse transcriptase nucleotide analogs by nucleoside diphosphate kinase: improvement by alpha-boranophosphate substitution. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* 2001, 20, 297–306. (e) Iwamoto, N.; Oka, N.; Sato, T.; Wada, T. Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Oligonucleoside H-Phosphonates by an Oxazaphospholidine Approach. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2009, 48, 496–499.

(4) Porter, K. W.; Briley, J. D.; Shaw, B. R. Direct PCR sequencing with boronated nucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 1611–1617.

(5) He, K.; Porter, K. W.; Hasan, A.; Briley, J. D.; Shaw, B. R. Synthesis of 5-substituted 2'-deoxycytidine 5'-(α -P-borano)-triphosphates, their incorporation into DNA and effects on endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 1788–1794.

(6) (a) Shimizu, M.; Tamura, K.; Wada, T.; Saigo, K. BH₃ as a protecting group for phosphonic acid: novel method for the synthesis of dinucleoside H-phosphonate. *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 371–374.

(b) Nukaga, Y.; Wada, T. *Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides* 2018, 271–284. (c) Ferry, A.; Malik, G.; Retailleau, P.; Guinchard, X.; Crich, D. Alternative synthesis of P-chiral phosphonite-borane complexes: application to the synthesis of phosphone-phostone dimers. *J. Org. Chem.* 2013, 78, 6858–67. (d) Matsumura, F.; Oka, N.; Wada, T. Synthesis of glycosyl boranophosphates and their applications as precursors of glycosyl phosphate analogues. *Org. Lett.* 2008, 10, 1557–1560.

(7) Paul, S.; Roy, S.; Monfregola, L.; Shang, S.; Shoemaker, R.; Caruthers, M. H. Oxidative substitution of boranephosphonate diesters as a route to post-synthetically modified DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 3253–3264.

(8) Roy, S.; Paul, S.; Roy, M.; Kundu, R.; Monfregola, L.; Caruthers, M. H. Pyridinium Boranephosphonate Modified DNA Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* 2017, 82, 1420–1427.

(9) Roy, S.; Olesiak, M.; Padar, P.; McCuen, H.; Caruthers, M. H. Reduction of metal ions by boranephosphonate DNA. *Org. Biomol. Chem.* 2012, 10, 9130–9133.

(10) Golebiewska, J.; Rachwalak, M.; Jakubowski, T.; Romanowska, J.; Stawinski, J. Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives. *J. Org. Chem.* 2018, 83, 5496–5505.

(11) (a) Walker, O. J. Absorption spectra of iodine solutions and the influence of the solvent. *Trans. Faraday Soc.* 1935, 31, 1432–1438.

(b) Kleinberg, J.; Davidson, A. W. The nature of iodine solutions. *Chem. Rev.* 1948, 42, 601–609.

(12) Side products, analogous to that resonating at ca. 45 ppm in ³¹P NMR spectroscopy, were also formed when other boranephosphonate

diesters and different heterocyclic and tertiary amines were used as substrates for the reaction in DCM.

(13) Katritzky, A. R.; Lunt, E. N-Oxides and related compounds - XXXV. Reactions of N-alkoxy-pyridinium and -quinolinium cations with nucleophiles. *Tetrahedron* 1969, 25, 4291–4305.

(14) (a) Tetrasubstituted pyrophosphate 3 was formed apparently due to the reaction of the generated diethyl iodophosphate with spurious water, catalyzed by pyridine. Under more anhydrous conditions, the presence of the pyridinium adduct of metaphosphate 6 was detected also, most likely due to dealkylation of diethyl pyridiniumphosphate (formed from the corresponding iodophosphate) by pyridine; (b) Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. Nucleoside H-Phosphonates. VII. Studies on the Oxidation of Nucleoside Hydrogenphosphonate Esters. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1987, 1269–1273. (c) Bollmark, M.; Stawinski, J. A facile access to nucleoside phosphorofluoridate, nucleoside phosphorofluoridothioate, and nucleoside phosphorofluoridodithioate monoesters. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 5739–5742.

(15) Awtrey, A. D.; Connick, R. E. The absorption spectra of I₂, I₃⁻, I⁻, IO₃⁻, S₄O₆⁼ and S₂O₃⁼. Heat of the reaction I₃⁻ = I₂ + I⁻. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 1842–1843.

(16) Addition of more iodine or pyridine alone to the reaction mixture did not increase formation of the side product.

(17) Reaction of the generated iodoboranephosphonate 9 with 2,6-lutidine (10 equiv) afforded diethyl phosphoriodidate as a sole phosphorus-containing product (δ p ca. -40 ppm). Apparently, due to steric hindrance, 2,6-lutidine acted as a base, facilitating further oxidation of 9 into di- or triodo derivatives and ultimately into the iodophosphate. The reaction of 9 with triethylamine gave a complex mixture of the deboronated products together with unreacted starting material. In this instance, the incomplete reaction was probably due to competing decomposition of iodine by rather strongly basic triethylamine.

(18) Watanabe, K.; Kogoshi, N.; Miki, H.; Torisawa, Y. Improved Pinner Reaction with CPME as a Solvent. *Synth. Commun.* 2009, 39, 2008–2013.

(19) Guérinot, A.; Reymond, S.; Cossy, J. Ritter Reaction: Recent Catalytic Developments. *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 2012, 19–28.

(20) Reaction with triethylamine was practically instantaneous, while for 2,6-lutidine it took ca. 1 h for completion.

(21) Walmsley, D. E.; Budde, W. L.; Hawthorne, M. F. Nucleophilic Substitution at Tetrahedral Boron. Trimethylamine-Alkyl- and -Arylborene Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 3150–3155.

(22) The side products resonating at ca. 40 ppm in the ³¹P NMR spectrum could not be isolated, and their structures remain cryptic. It seems, however, that in contradistinction to the analogous product from the reaction with pyridine (compound 8, Scheme 5), they most likely did not contain an additional amine residue but instead an iodine atom (structures analogous to that of 7 in Scheme 5). This was suggested by the chemical shifts values in the ¹¹B NMR spectra of these side products (signals at ca. -39 vs -1 ppm for 8).

(23) (a) Schug, J. C.; Chang, W. M.; Dyson, M. C. Amine-iodine interaction. *Spectrochim. Acta Part A* 1972, 28A, 1157–1165.

(b) Larsen, D. W.; Allred, A. L. Halogen Complexes. II. The Types and Mean Lifetimes of Complexes Formed by Iodine and 2,4,6-Trimethylpyridine. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, 87, 1219–1226. (c) Reid, C.; Mulliken, R. S. Molecular compounds and their spectra. IV. The pyridine-iodine system. *J. Am. Chem. Soc.* 1954, 76, 3869–3874.

(d) Nagakura, S. Molecular complexes and their spectra. VIII. The molecular complex between iodine and triethylamine. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 520–524.

(24) (a) Schug, J. C.; Kogan, M. J. The nature of iodine-amine solutions. *J. Magn. Reson.* 1973, 11, 406–415. (b) Bist, H. D.; Person, W. B. Spectroscopic studies of triethylamine-I₂ system in n-heptane and in p-dioxane. *J. Phys. Chem.* 1969, 73, 482–489. (c) Zingaro, R. A.; Werf, C. A. V.; Kleinberg, J. Evidence for the existence of unipositive iodine ion in solution of iodine in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73, 88–90.

(25) (a) Downs, A. J.; Adams, C. J. *The chemistry of chlorine, bromine, iodine and astatine*; Pergamon Press: Oxford, 1973. (b) Audrieth, L. F.; Birr, E. J. Anomalous electrolytes. I. The electrical conductivity of solutions of iodine and cyanogen iodide in pyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 668–673. (c) Carlsohn, H. Beitrage zur Chemie des Broms, I. Mitteil.: Darstellung von Brom (I)-dipyridin-perchlorat und Brom (1)-dipyridin-nitrat. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1935**, *68*, 2209–2211. (d) Kleinberg, J.; Colton, E.; Sattizahn, J.; Werf, C. A. V. The Behavior of Iodine Species in Pyridine and Quinoline. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 442–445. (e) Ananthavel, S.P.; Manoharan, M. A theoretical study on electron donor-acceptor complexes of Et₂O, Et₂S and Me₃N with interhalogens, I-X (X = Clor Br). *Chem. Phys.* **2001**, *269*, 49–57.

(26) Desiraju, G. R.; Ho, P. S.; Kloo, L.; Legon, A. C.; Marquardt, R.; Metrangolo, P.; Politzer, P.; Resnati, G.; Rissanen, K. Definition of the halogen bond (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1711–1713.

(27) (a) Metrangolo, P.; Neukirch, H.; Pilati, T.; Resnati, G. Halogen Bonding Based Recognition Processes: A World Parallel to Hydrogen Bonding. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 386–395. (b) Carlsson, A. C.; Veiga, A. X.; Erdelyi, M. Halogen bonding in solution. *Top. Curr. Chem.* **2014**, *359*, 49–76. (c) In *Halogen Bonding I*; Metrangolo, P., Resnati, G., Eds.; Springer: London, 2015; Vol. 358.

(28) (a) Tassaing, T.; Besnard, M. Ionization Reaction in Iodine/Pyridine Solutions: What Can We Learn from Conductivity Measurements, Far-Infrared Spectroscopy, and Raman Scattering? *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 2803–2808. (b) Haque, I.; Wood, J. L. The vibrational spectra and structure of the bis(pyridine)iodine(I), bis(pyridine)bromine(I), bis(g-picoline)iodine(I), and bis(g-picoline)bromine(I) cations. *J. Mol. Struct.* **1968**, *2*, 217–238.

(29) Popov, A. I.; Rygg, R. H. Studies on the chemistry of halogens and of polyhalides. XI. Molecular complexes of pyridine, 2-picoline and 2,6-lutidine with iodine and iodine halides. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4622–4625.

(30) Schuster, I. I.; Roberts, J. D. Halogen complexes of pyridine. A proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance study. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2658–2662.

(31) For triethylamine or other 3° amines, solutions with iodine in DCM or ACN lose their oxidation capacity much faster (within a few to several minutes; decoloration or development of deep dark coloration together with precipitate formation).

SUPPORTING INFORMATION

Reaction of boranephosphonate diesters with pyridines or tertiary amines in the presence of iodine. Synthetic and mechanistic studies.

Justyna Gołębiewska and Jacek Stawinski*

¹Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Poland

TABLE OF CONTENTS FOR THE SUPPORTING INFORMATION

S2-S21	¹ H, ¹³ C, ³¹ P, and ¹¹ B NMR spectra of products
S22-S27	³¹ P and ¹¹ B NMR spectra of intermediates
S28-S29	Table S1
S30	Figure S1, ³¹ P and ¹¹ B NMR spectra of the reaction mixtures in Scheme 2 and 3
S31	Figure S2, ³¹ P and ¹¹ B NMR spectra of the reaction mixtures in Scheme 3
S32	³¹ P NMR spectrum of the reaction mixture in Scheme 4

8.621
8.606

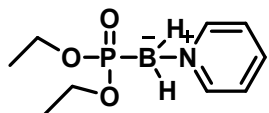
8.035
8.030

7.616
7.599
7.581

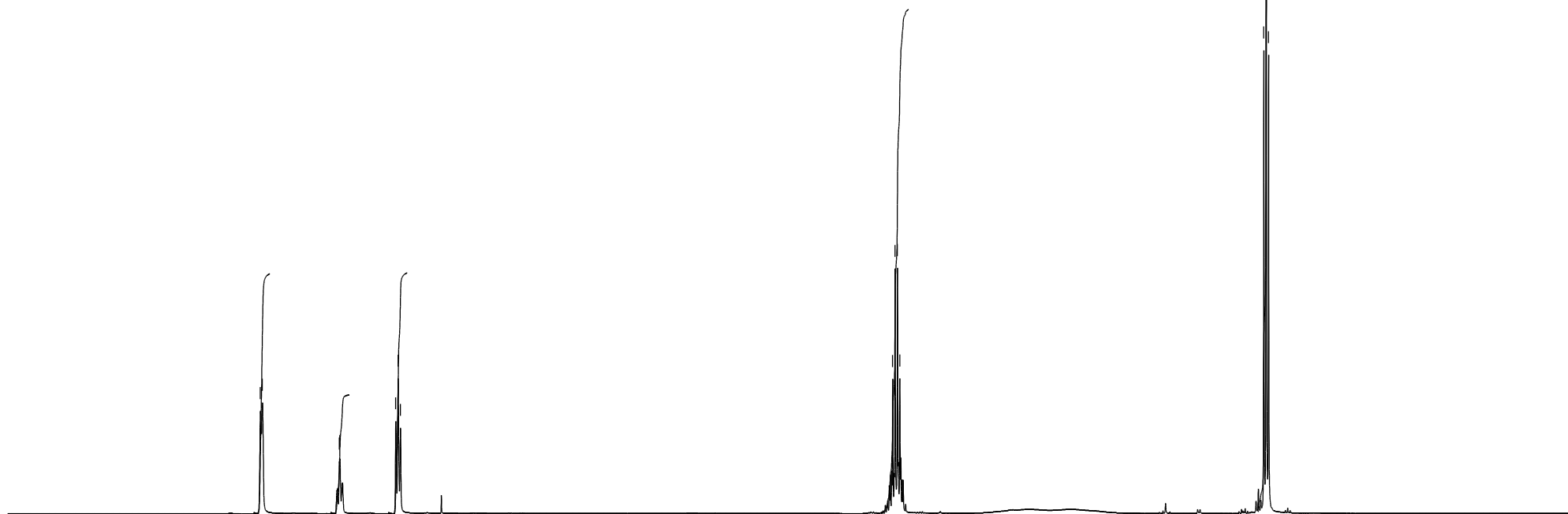
3.927
3.909
3.891
3.874

1.171
1.154
1.136

¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz)



2



10

9

8

7

6

5

4

3

2

1

0

ppm

2.031

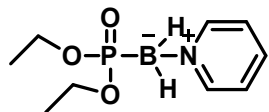
1.000

2.039

4.278

6.372

^{13}C NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 100.6 Hz)



2

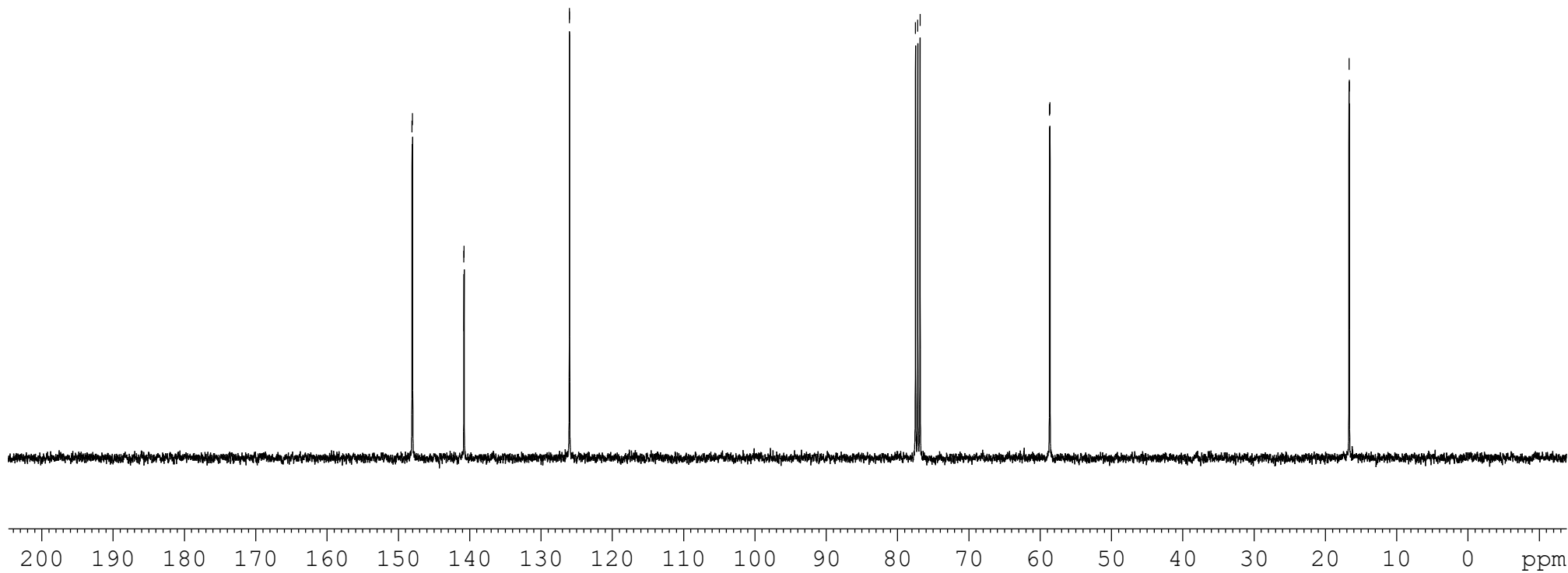
148.078
148.011
140.810
140.778

126.011
125.991

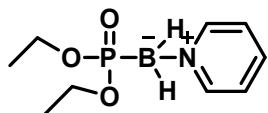
77.470
77.151
76.833

58.669
58.604

16.674
16.618



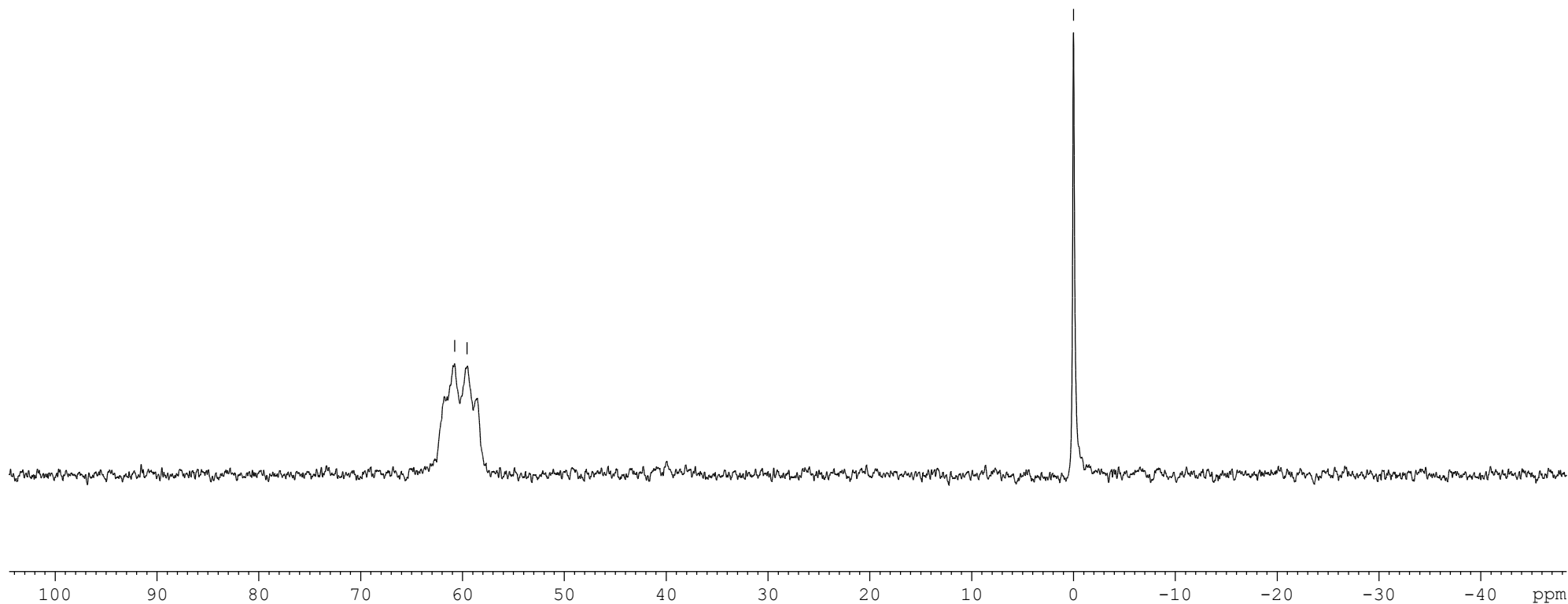
³¹P NMR {¹H} (CDCl₃, 162 Hz)
H₃PO₄ ext.standard



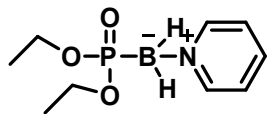
2

60.771
59.551

0.003

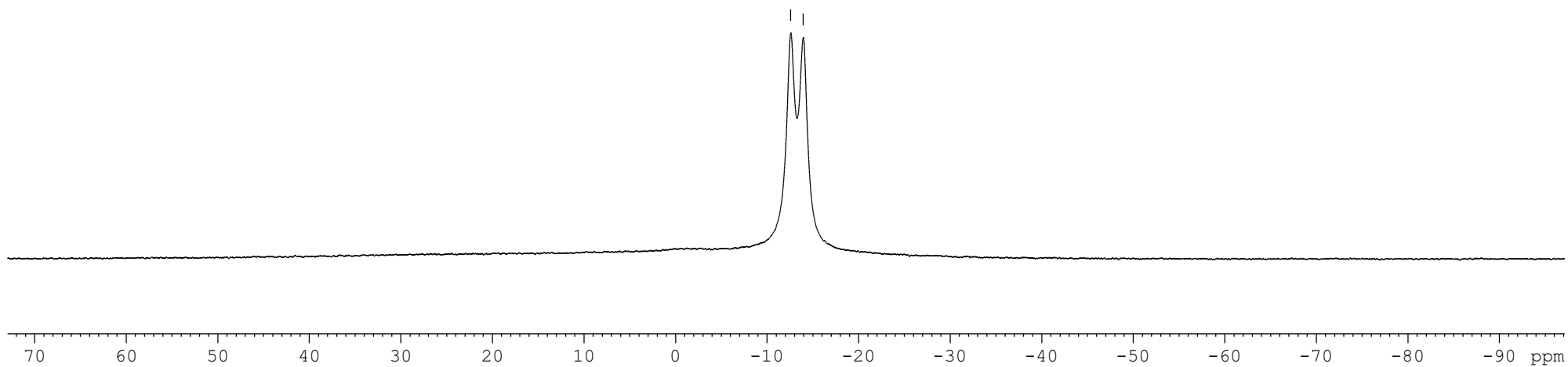


^{11}B NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 128.4 Hz)



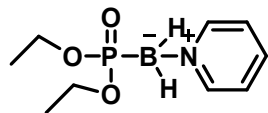
2

-12.587
-13.957



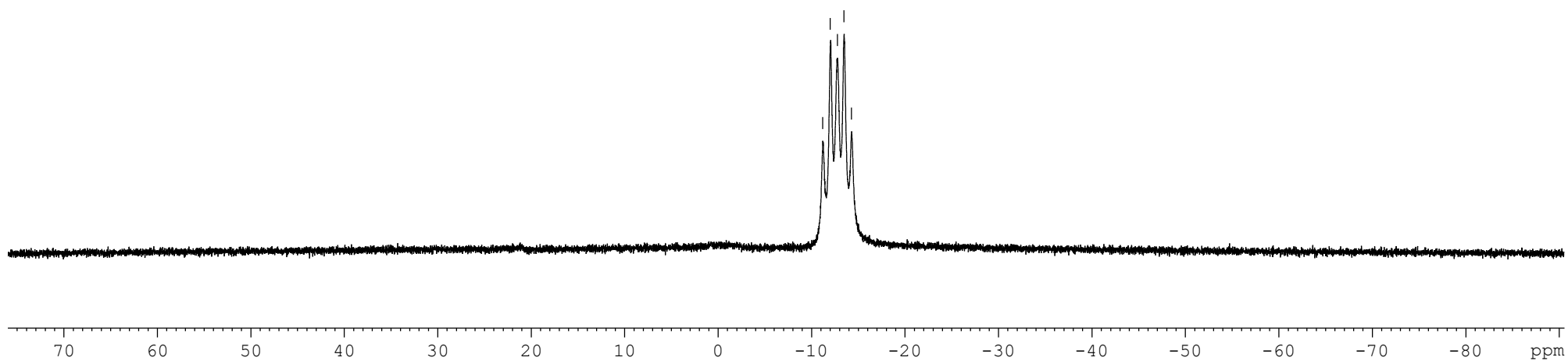
S5

¹¹B NMR (CDCl₃, 128.4 Hz)



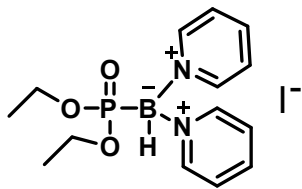
2

-11.183
-12.006
-12.763
-13.470
-14.276

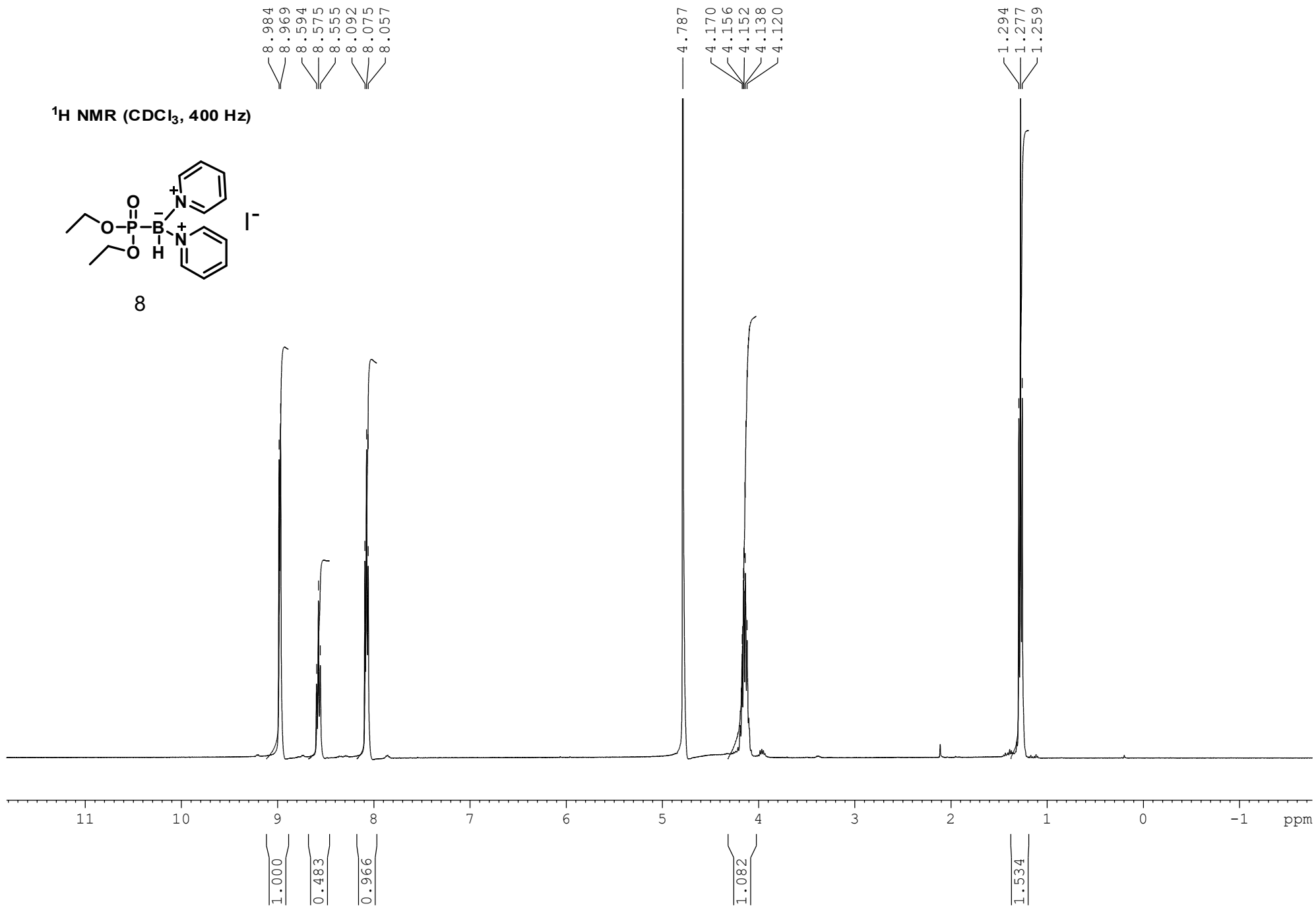


S6

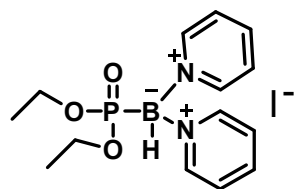
¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz)



8



^{13}C NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 100.6 Hz)



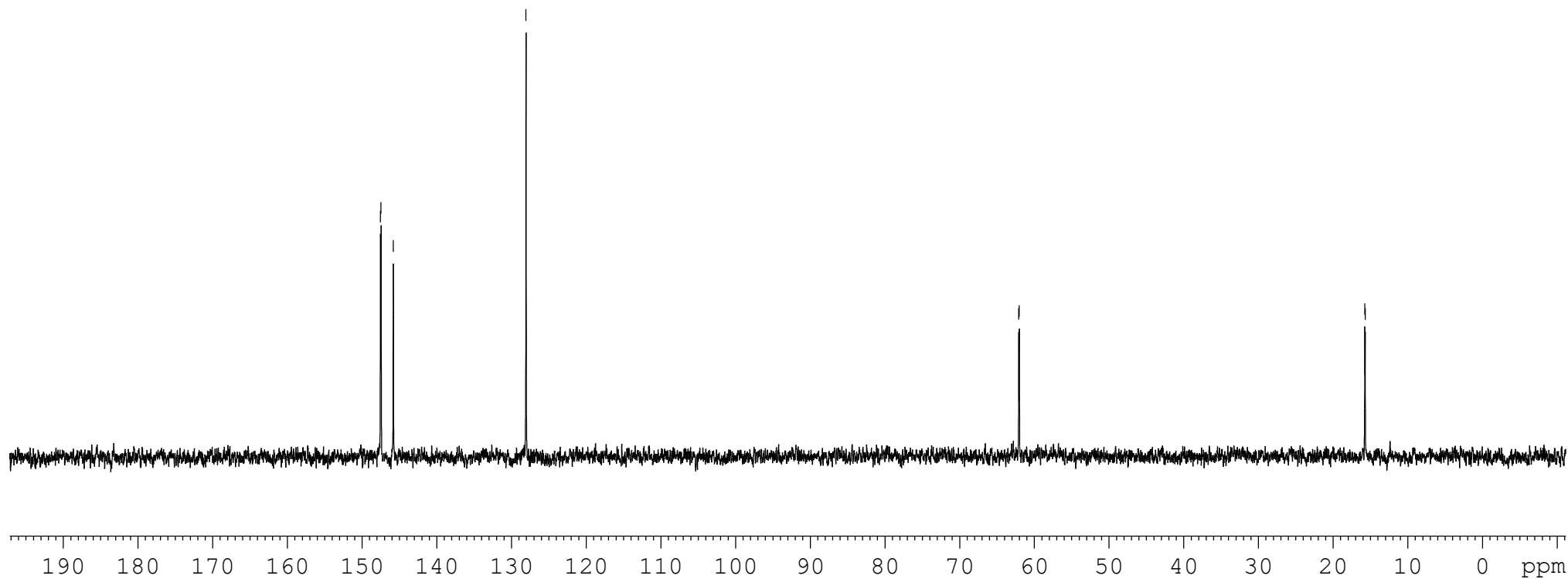
8

147.556
147.478
145.845

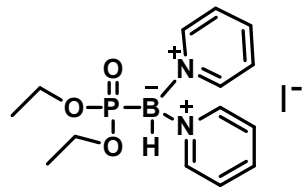
128.072

62.100
62.026

15.769
15.720



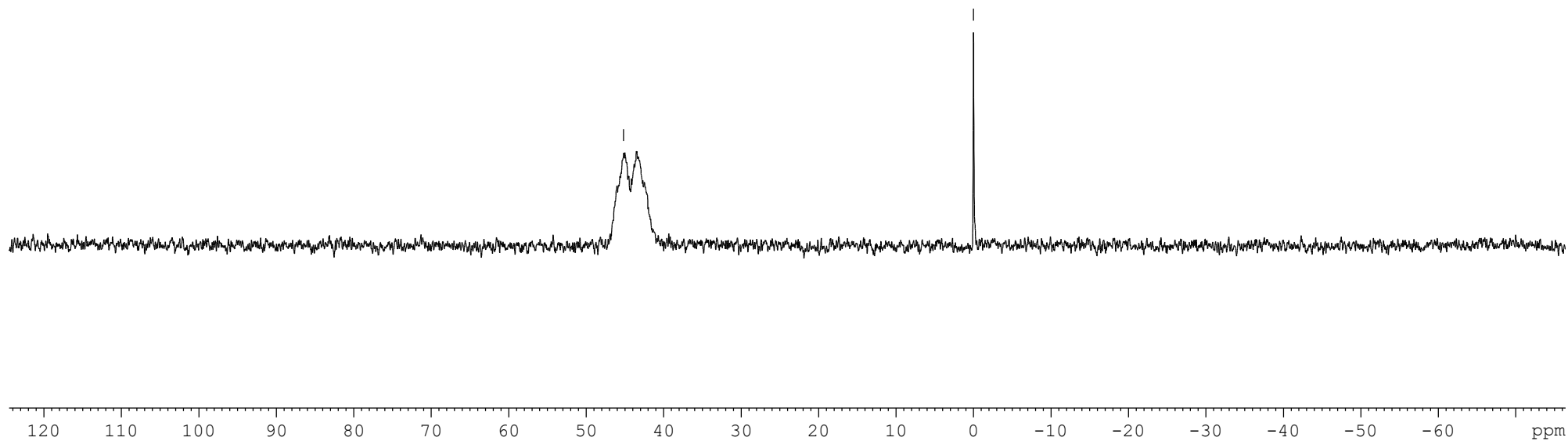
³¹P NMR {¹H} (CDCl₃, 162 Hz)
H₃PO₄ ext.standard



8

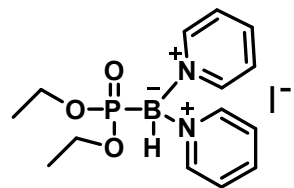
— 45.186

— 0.004



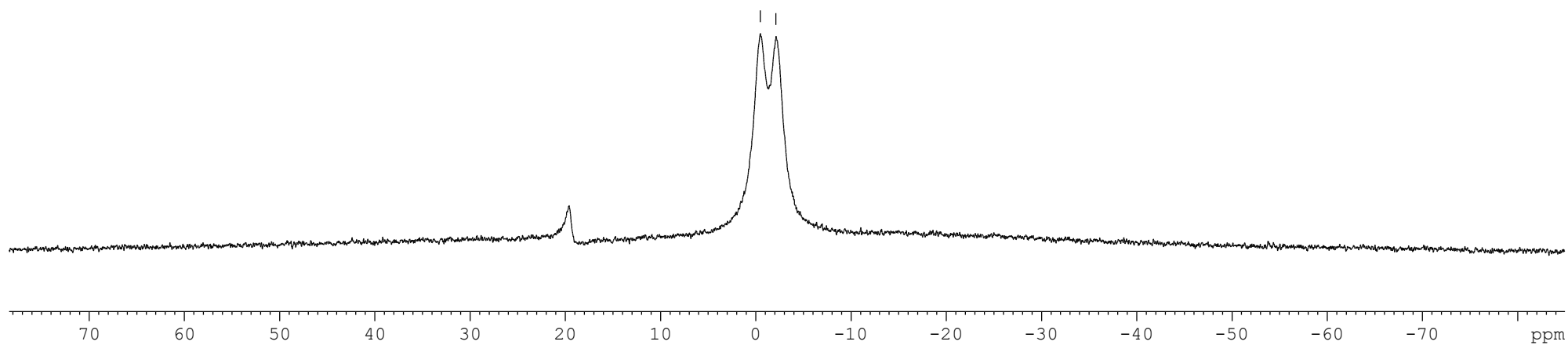
S9

^{11}B NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 128.4 Hz)



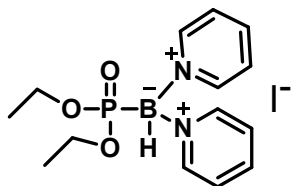
8

-0.468
-2.121



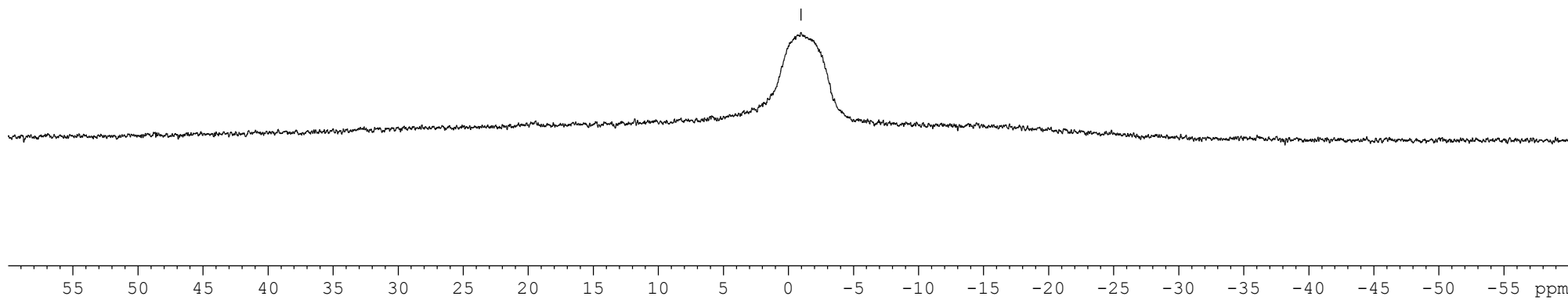
S10

^{11}B NMR (CDCl_3 , 128.4 Hz)



8

— -0.967



S11

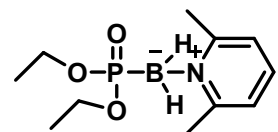
7.776
7.770
7.756
7.367
7.347
7.328

4.053
4.042
4.035
4.025
4.018
4.008
4.000
3.990

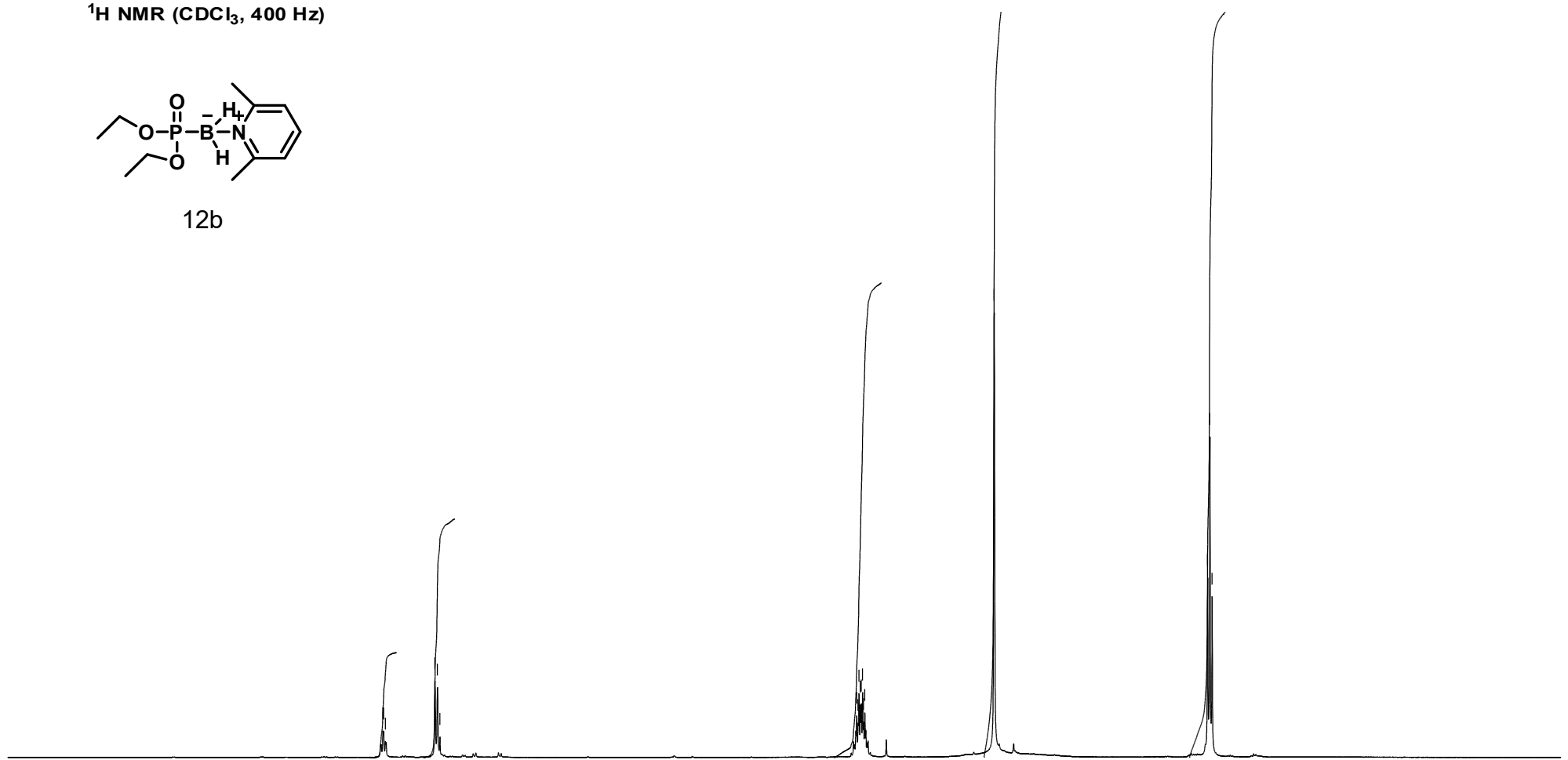
2.973

1.297
1.279
1.261

¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz)



12b



10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0 -1 ppm

0.841

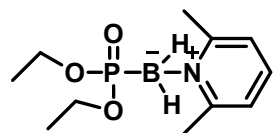
1.917

3.813

6.000

5.990

^{13}C NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 100.6 Hz)



12b

— 159.626

— 139.792

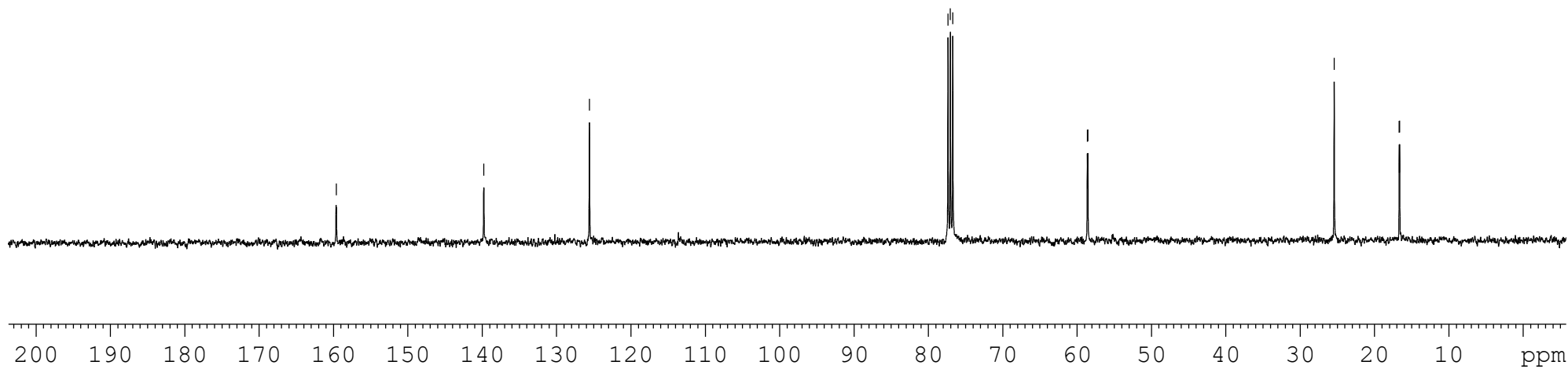
— 125.586

77.372
77.054
76.736

58.634
58.564

— 25.438

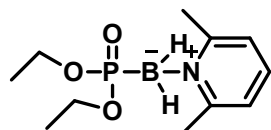
16.685
16.631



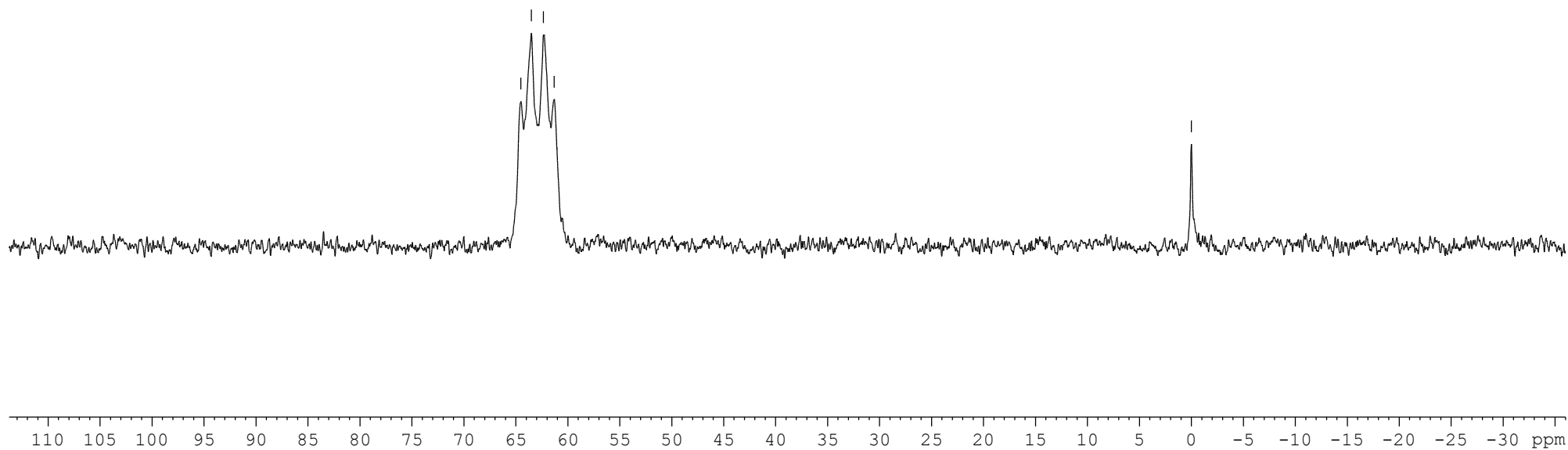
^{31}P NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 162 Hz)
 H_3PO_4 ext.standard

64.514
63.512
62.346
61.315

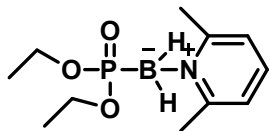
0.007



12b

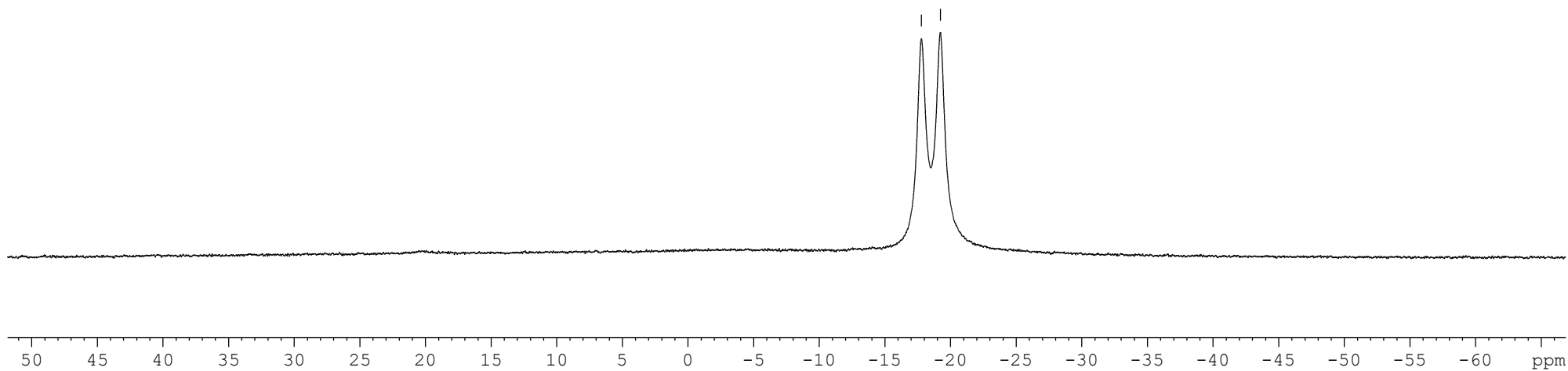


^{11}B NMR { ^1H } (CDCl_3 , 128.4 Hz)

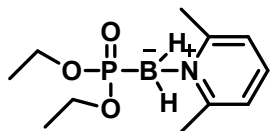


12b

— -17.771
— -19.232

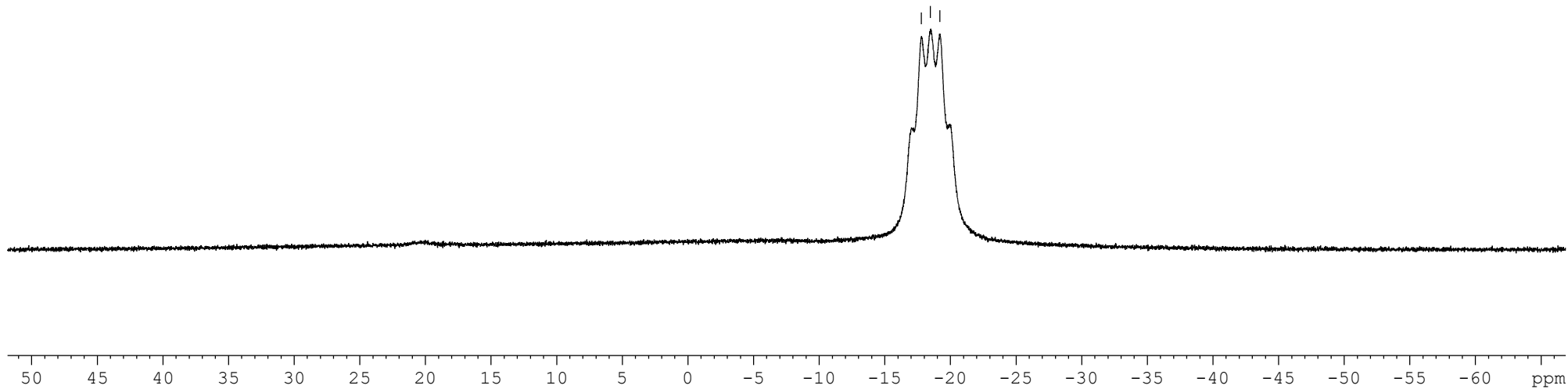


^{11}B NMR (CDCl_3 , 128.4 Hz)

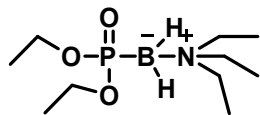


12b

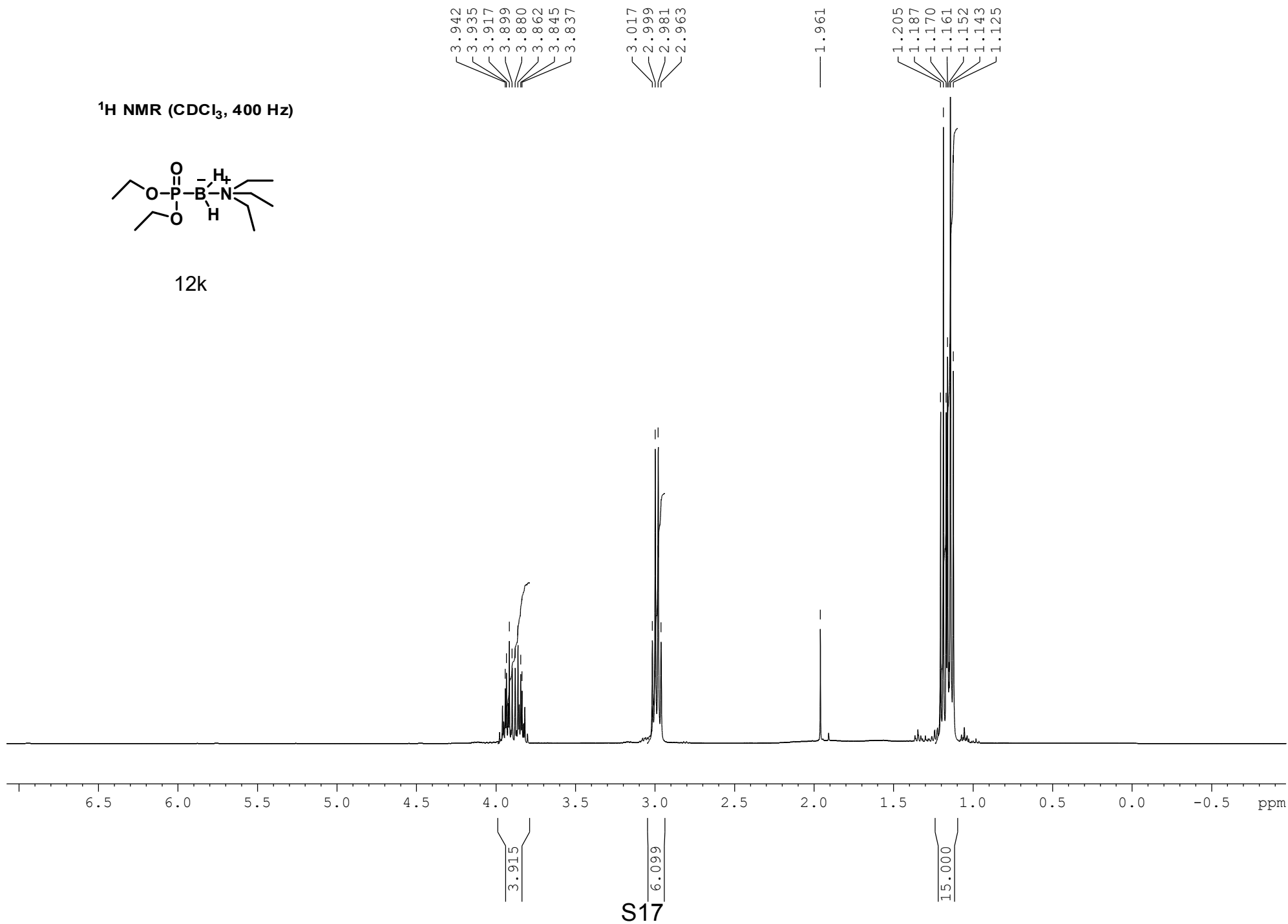
-17.792
-18.462
-19.201



¹H NMR (CDCl₃, 400 Hz)

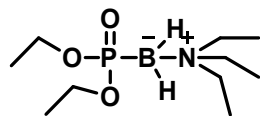


12k



S17

^{13}C NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 100.6 Hz)



12k

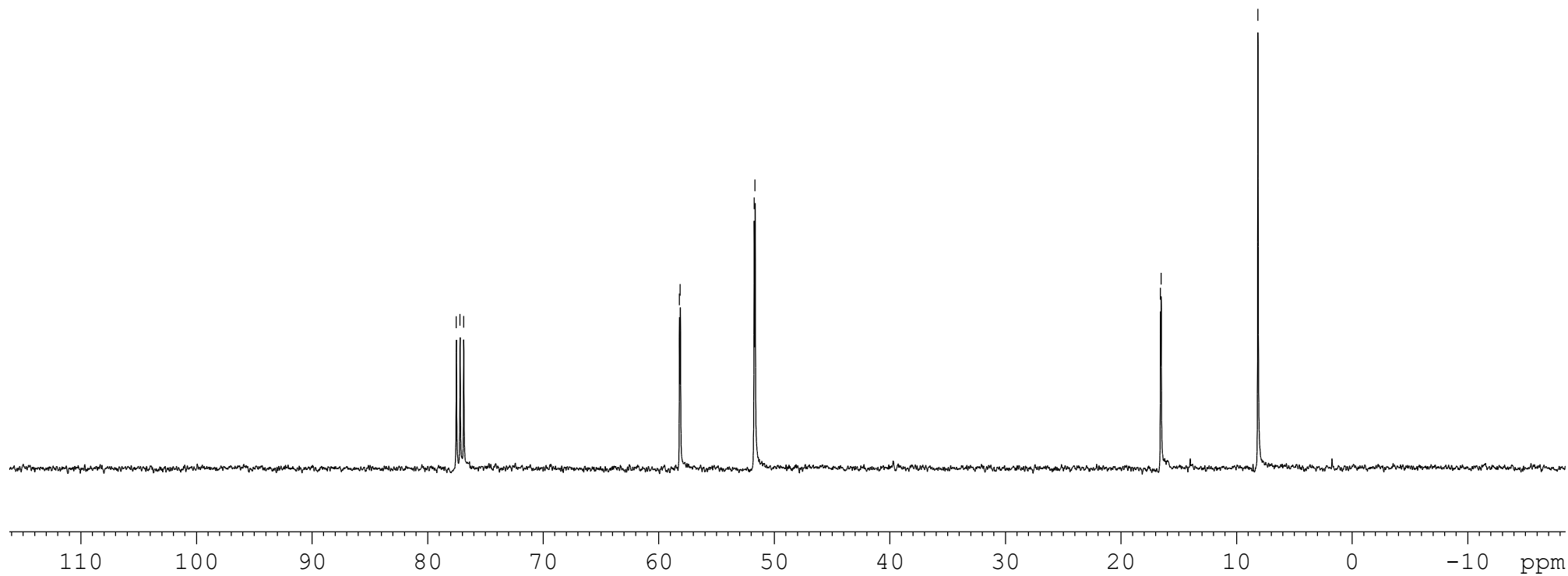
77.519
77.199
76.880

58.204
58.136

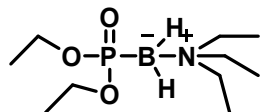
51.746
51.664

16.585
16.528

8.156

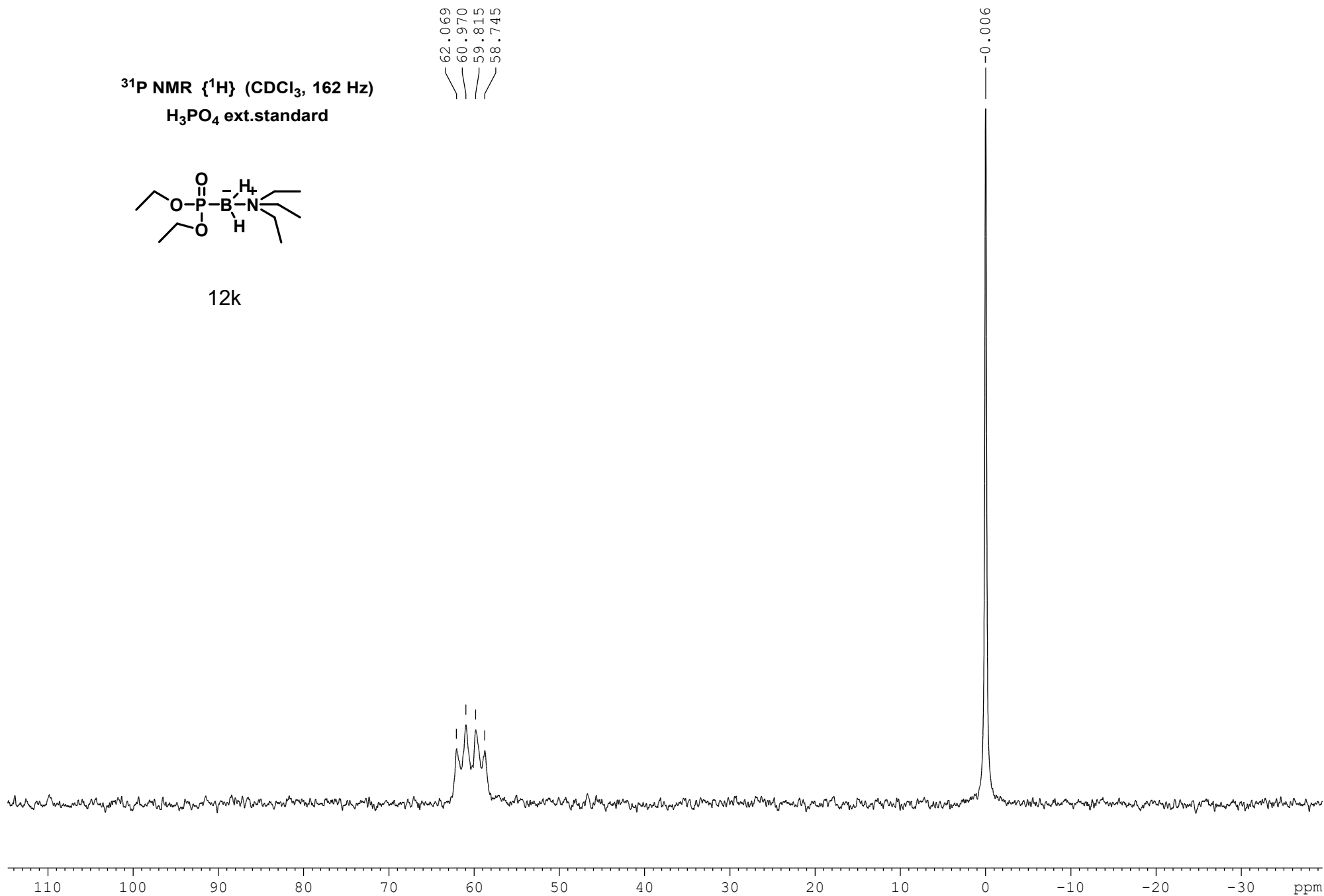


³¹P NMR {¹H} (CDCl₃, 162 Hz)
H₃PO₄ ext.standard

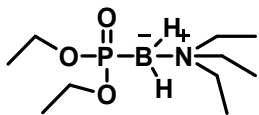


12k

62.069
60.970
59.815
58.745

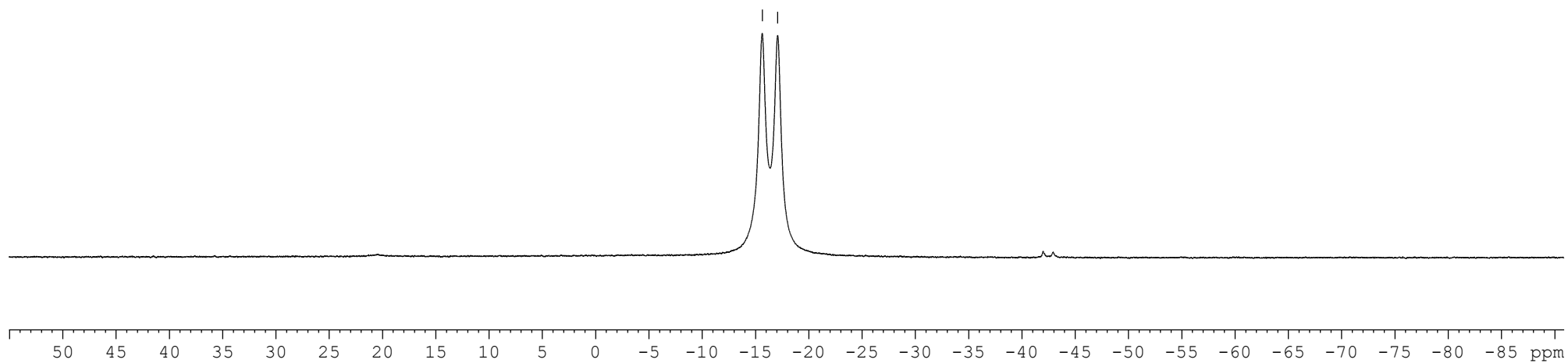


^{11}B NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 128.4 Hz)



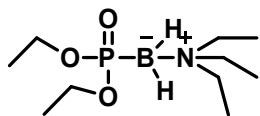
12k

-15.642
-17.088



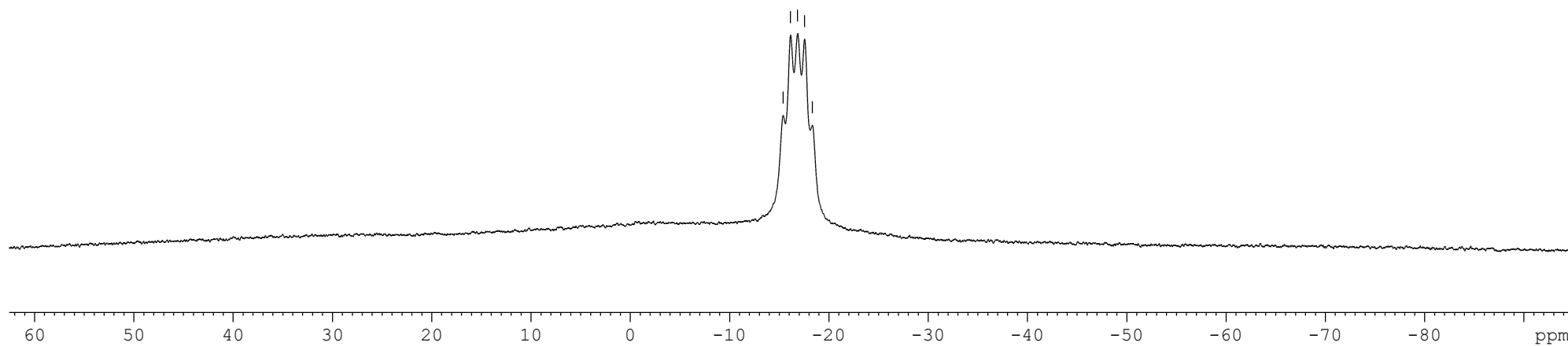
S20

^{11}B NMR (CDCl_3 , 128.4 Hz)



12k

-15.396
-16.137
-16.849
-17.553
-18.339



S21

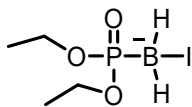
69.044

8.254

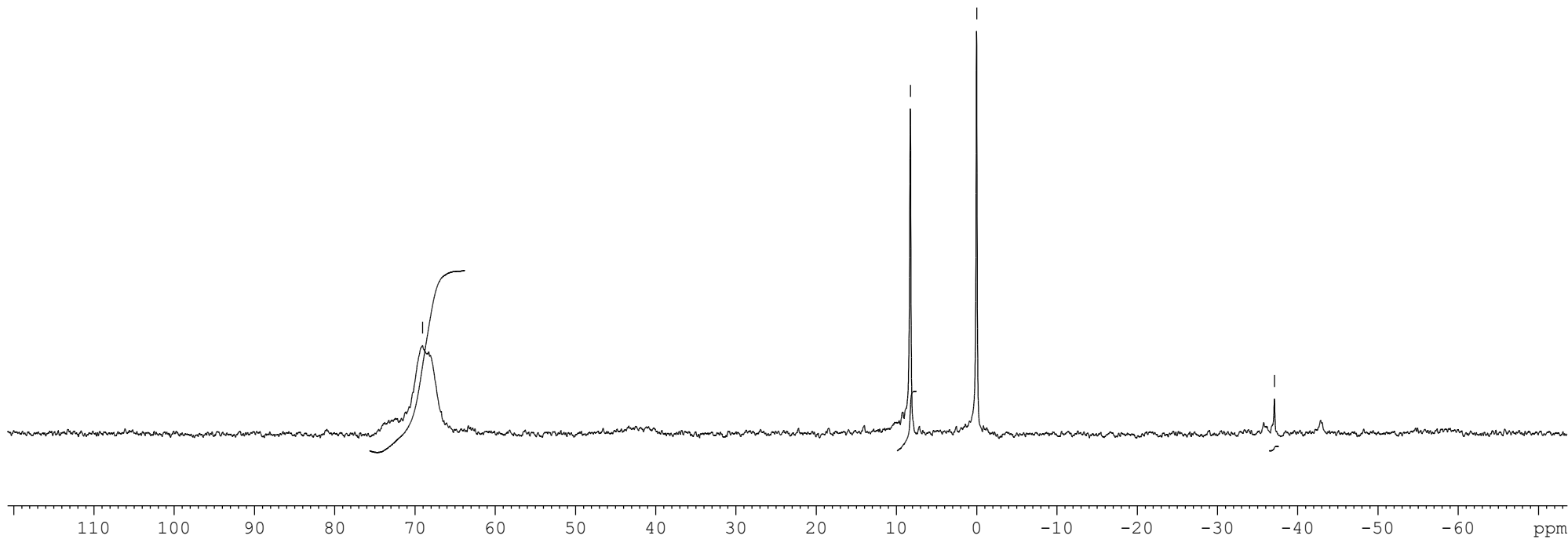
-0.002

-37.114

**^{31}P NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 162 Hz)
 H_3PO_4 ext. standard**



9

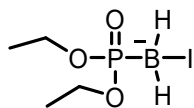


1.000

0.329

0.023

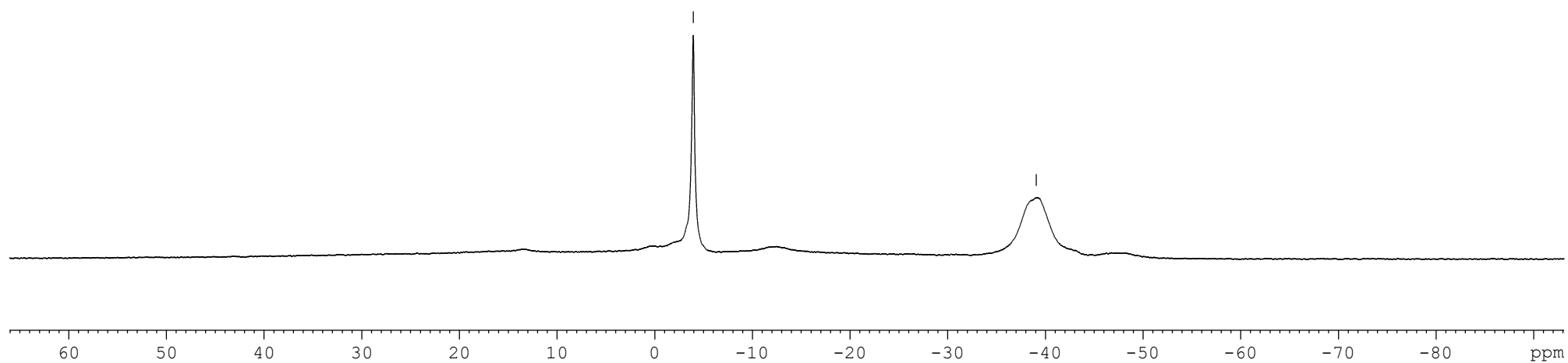
^{11}B NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 128.4 Hz)



9

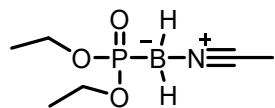
— -3.944

— -39.082

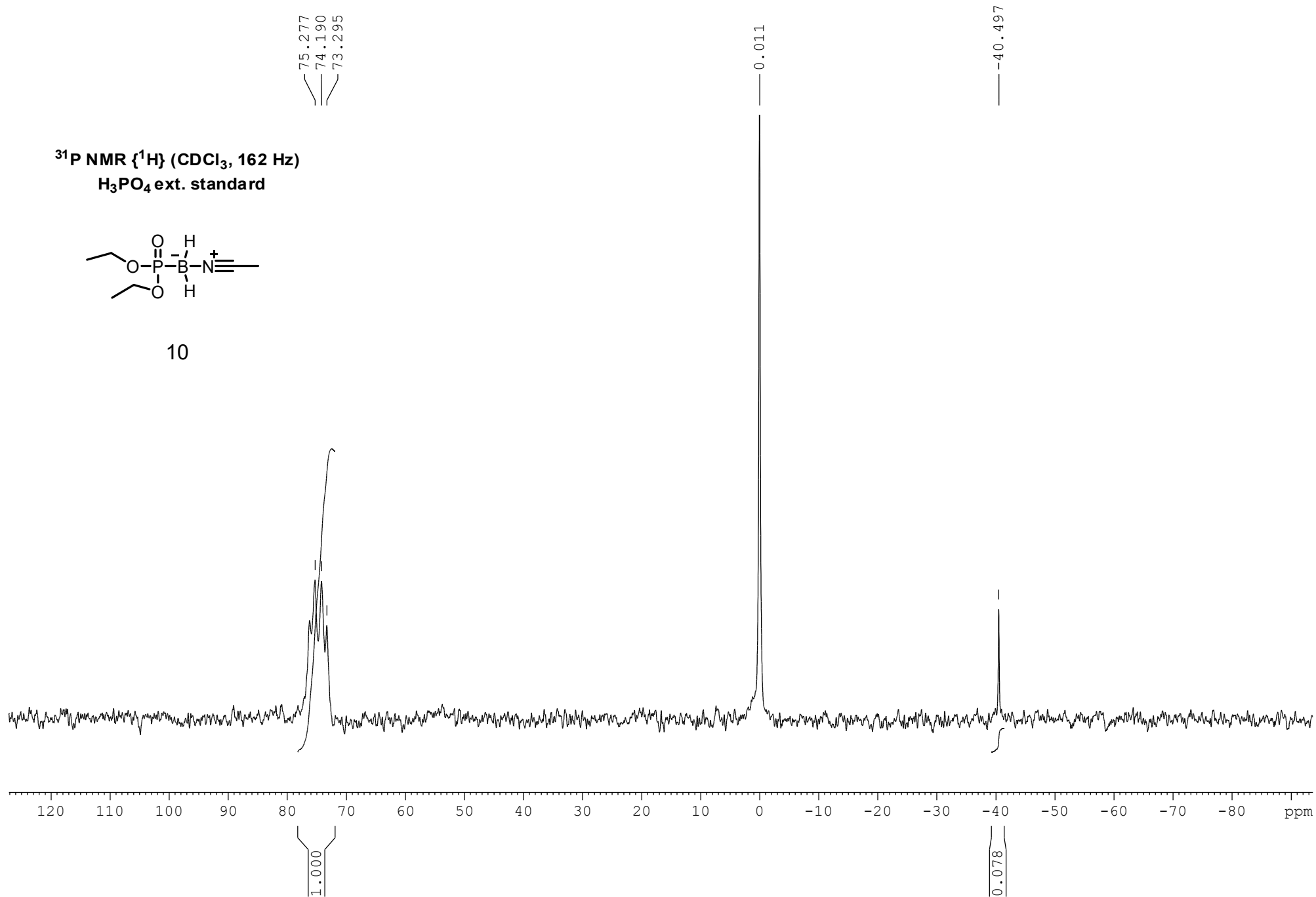


S23

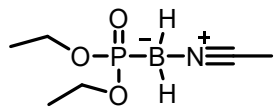
³¹P NMR {¹H} (CDCl₃, 162 Hz)
H₃PO₄ ext. standard



10

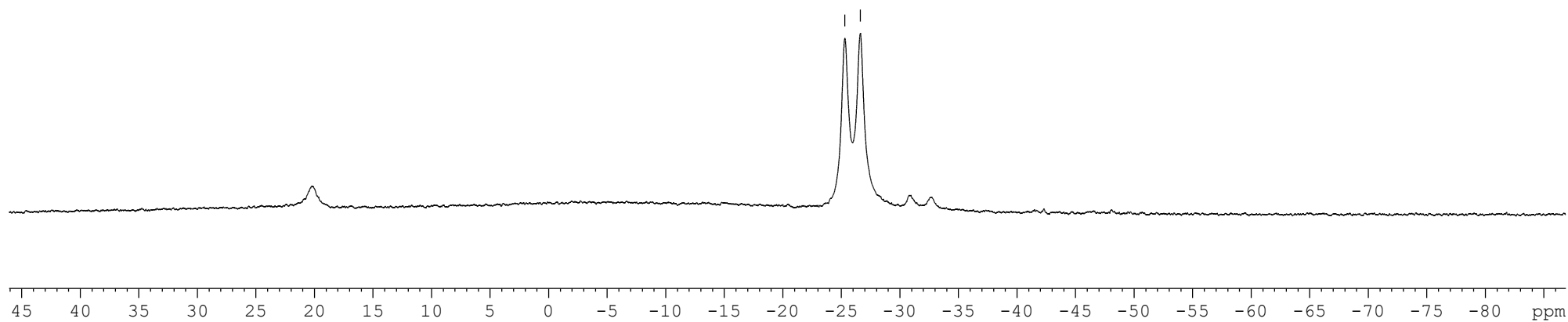


^{11}B NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 128.4 Hz)



10

-25.293
-26.615



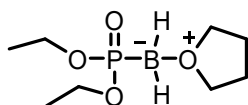
S25

111.37
110.74
110.09
109.44

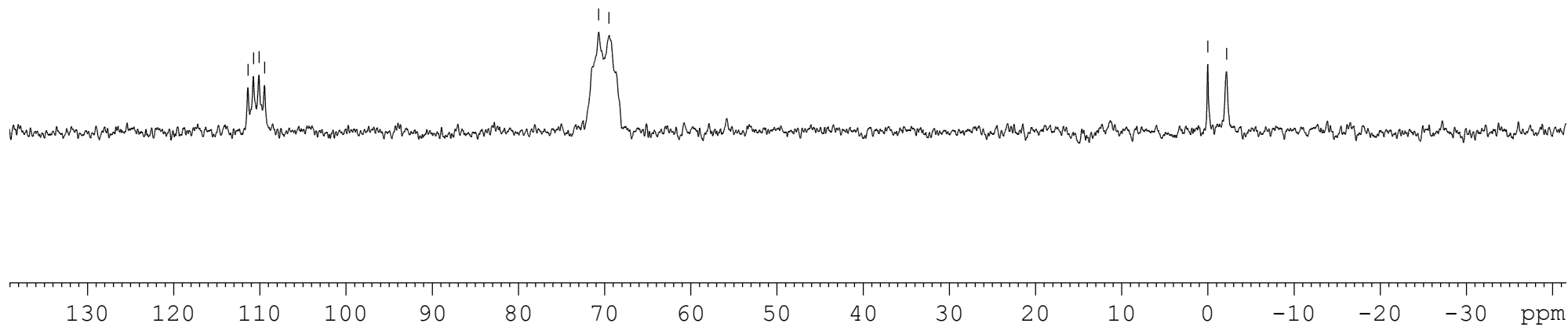
70.69
69.48

0.01
-2.17

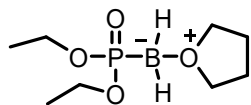
^{31}P NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 162 Hz)
 H_3PO_4 ext. standard



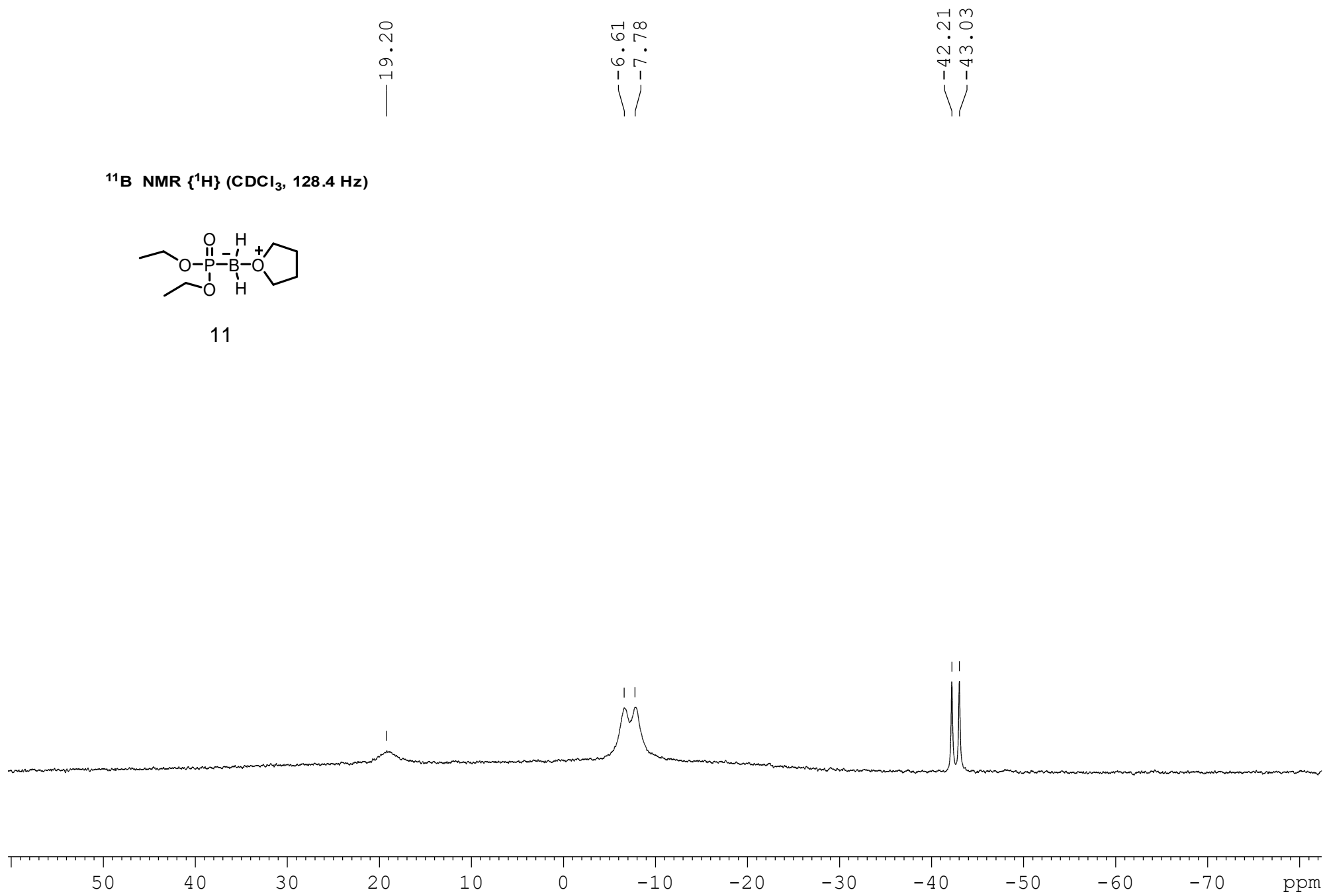
11



^{11}B NMR $\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 128.4 Hz)

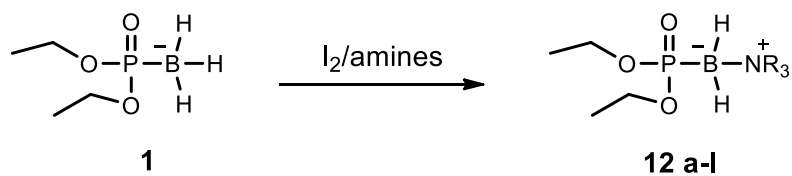


11

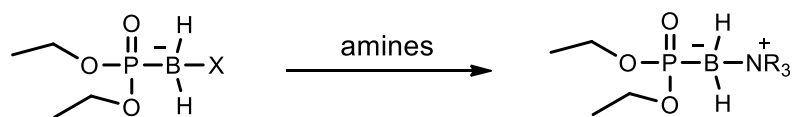


Reaction schemes concerning Table 1S.

The reaction of **1** with **Py** or amines **a-l** in different solvents.


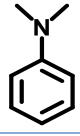
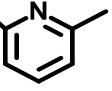
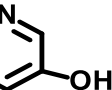
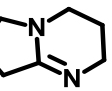
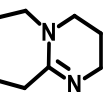









The reaction of intermediates **9**, **10**, **11** with **Py** or amines **a-l** in different solvents.



- 9** X= I, in DCM
- 10** X= ACN, in ACN
- 11** X= THF, in THF

Table S1. ³¹P NMR, ¹¹B NMR data for the reaction of **1** or its derivatives **9**, **10** and **11** with various amines in dichloromethane (DCM), acetonitrile (ACN), and tetrahydrofuran (THF) to produce **2** or **12a-l**.

Comp.	solvent amine	DCM δ_{31P} and δ_{11B} in ppm; ^a Yield [%]		ACN δ_{31P} and δ_{11B} in ppm; ^a Yield [%]		THF δ_{31P} and δ_{11B} in ppm; ^a Yield [%]	
		^b 1	^c 9	^b 1	^d 10	^b 1	^e 11
Py		$\delta_P = 61.9, \delta_B = -14.0$		- ^f		$\delta_P = 61.9, \delta_B = -13.7$	
		79%	49%	0%	0%	93%	67%
a		$\delta_P = 59.9, \delta_B = -10.4$		$\delta_P = 59.9, \delta_B = -10.4$		- ^f	
		57%	51%	64%	35%	0%	0%
b		$\delta_P = 61.8, \delta_B = -19.1$		- ^f		- ^f	
		66%	0%	0%	0%	0%	0%
c		$\delta_P = 63.5, \delta_B = -14.0$		$\delta_P = 64.0, \delta_B = -13.4$		$\delta_P = 62.7, \delta_B = -13.64$	
		94%	45%	88%	0%	92%	56%
d		$\delta_P = 67.2, \delta_B = -18.7$		- ^f		$\delta_P = 66.4, \delta_B = -17.9$	
		37%	14%	0%	0%	28%	87%
e		$\delta_P = 66.3, \delta_B = -18.0$		$\delta_P = 65.4, \delta_B = -17.3$		$\delta_P = 65.3, \delta_B = -17.3$	
		49%	0%	46%	0%	62%	81%
f		$\delta_P = 61.9, \delta_B = -13.9$		$\delta_P = 62.2, \delta_B = -13.2$		$\delta_P = 62.6, \delta_B = -13.6$	
		65%	36%	61%	0%	78%	68%
g		$\delta_P = 61.6, \delta_B = -14.4$		$\delta_P = 63.7, \delta_B = -12.9$		$\delta_P = 61.9, \delta_B = -13.5$	
		75%	67%	23%	0%	93%	94%
h		$\delta_P = 59.8, \delta_B = -13.6$		$\delta_P = 60.9, \delta_B = -13.0$		$\delta_P = 60.1, \delta_B = -13.0$	
		74%	73%	36%	0%	80%	68%
i		$\delta_P = 61.0, \delta_B = -14.5$		$\delta_P = 60.9, \delta_B = -13.5$		$\delta_P = 60.4, \delta_B = -14.2$	
		76%	0%	46%	0%	76%	72%
j		$\delta_P = 61.4, \delta_B = -12.2$		$\delta_P = 61.3, \delta_B = -11.4$		$\delta_P = 61.0, \delta_B = -11.6$	
		81%	0%	56%	0%	95%	64%
k		$\delta_P = 61.1, \delta_B = -16.9$		$\delta_P = 60.5, \delta_B = -16.4$		$\delta_P = 60.6, \delta_B = -17.3$	
		56%	0%	20%	0%	45%	51%
l		$\delta_P = 60.1, \delta_B = -12.9$		$\delta_P = 60.3, \delta_B = -12.3$		$\delta_P = 61.4, \delta_B = -12.7$	
		95%	15%	61%	0%	91%	87%

^a Yields (in %) of the compounds **2** or **12a-l** calculated from the ³¹P spectra;

^b reaction of **1**+ Py or amine a-l (10eq) + iodine (3eq) in selected solvent;

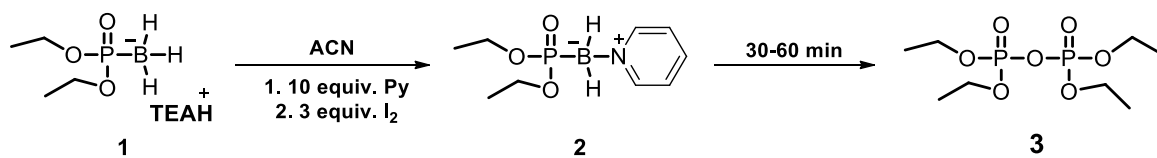
^c reaction of the generated **9** with Py or amine a-l (10eq) in dichloromethane;

^d reaction of the generated **10** with Py or amine a-l (10eq) in acetonitrile;

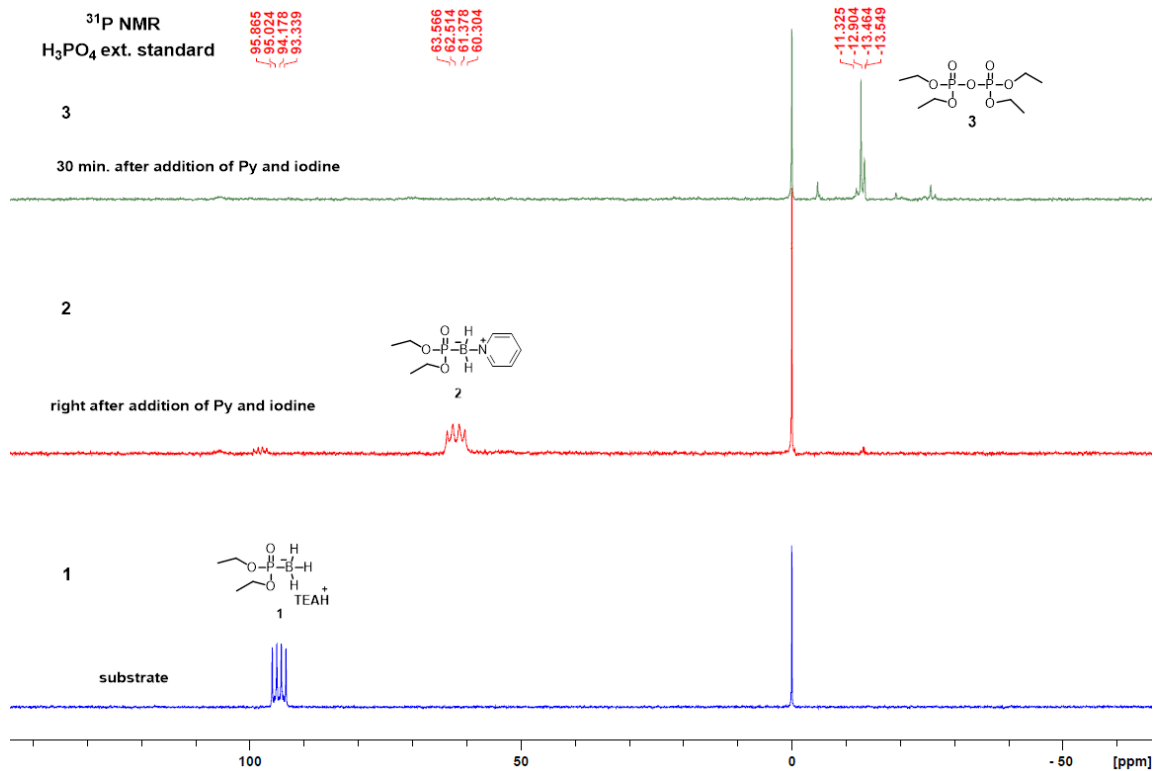
^e reaction of the generated **11** with Py or amine a-l (10eq) in tetrahydrofuran;

^f only deboronated products were formed under the reaction conditions.

Figure S1



^{31}P NMR spectra of the reaction mixture recorded in time



The corresponding ^{11}B NMR spectra recorded during the course of the reaction

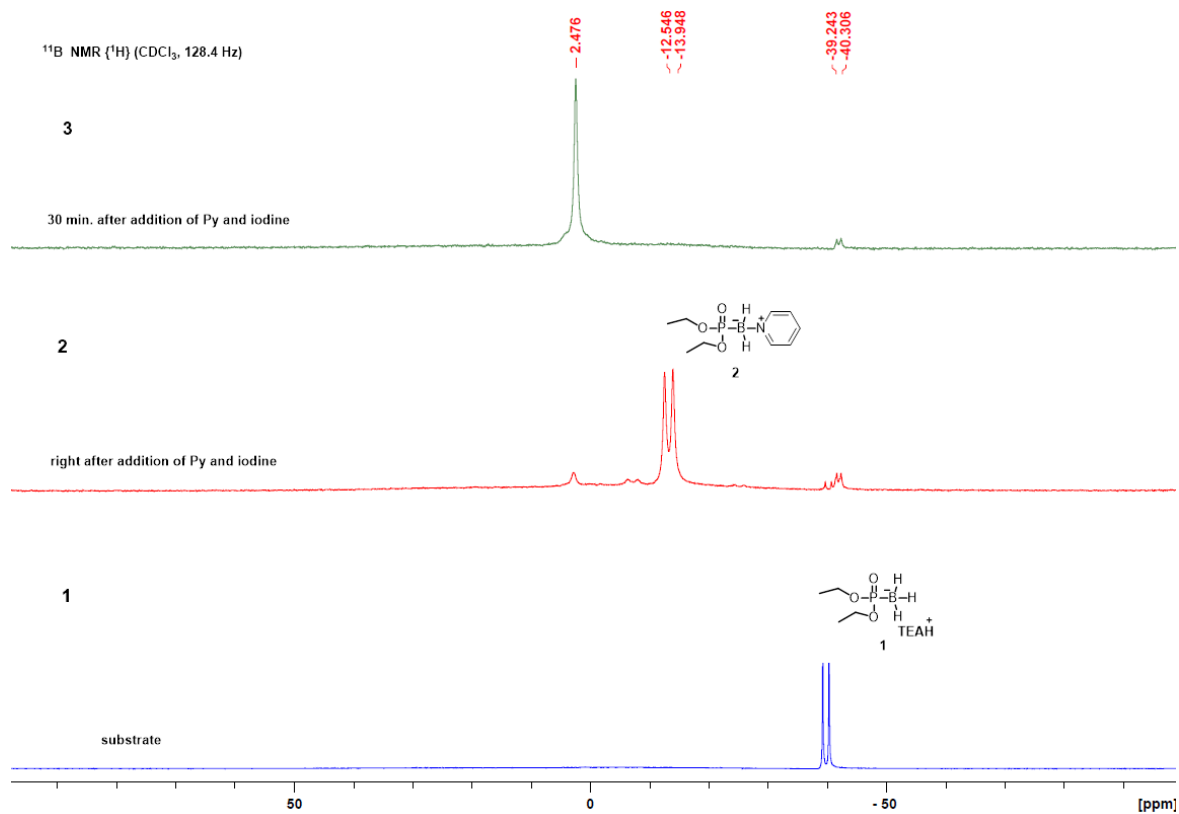
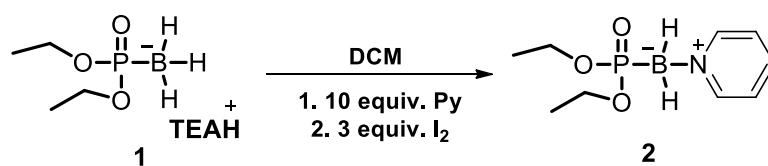
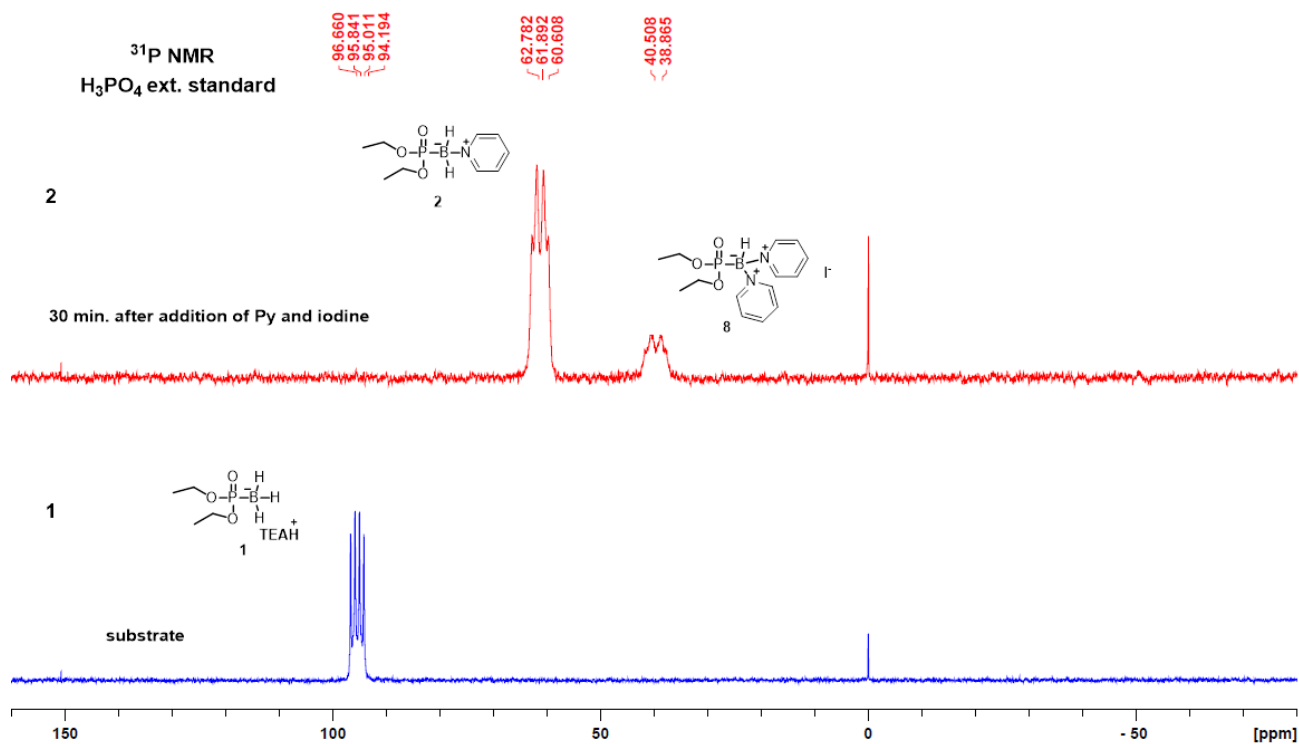


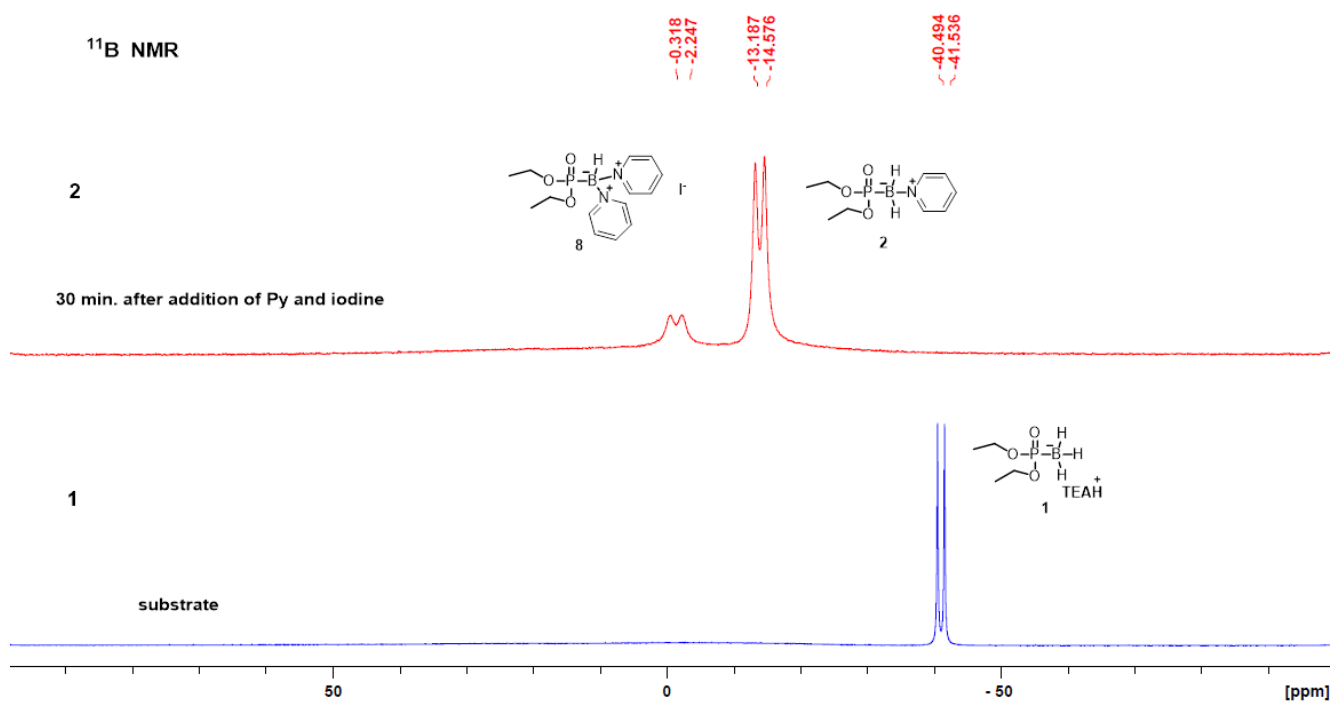
Figure S2



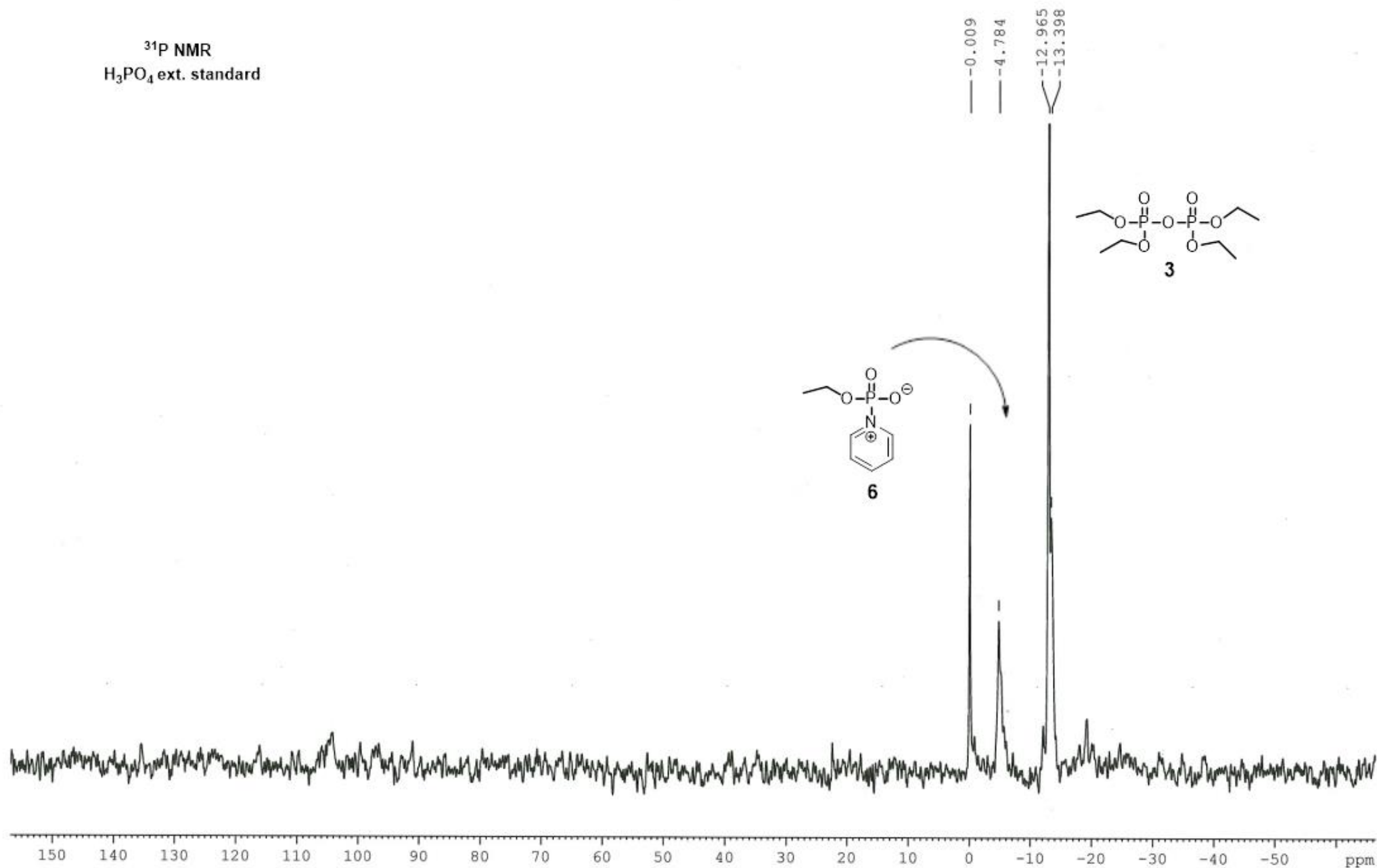
^{31}P NMR spectra of the reaction mixture recorded in time



The corresponding ^{11}B NMR spectra recorded during the course of the reaction



³¹P NMR spectrum of the reaction mixture in Scheme 4



OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Prof. dr hab. Jacek Stawiński

Poznań, 10 maja 2020

OŚWIADCZENIE

Re: rozprawa doktorska mgr Justyny Gołębiewskiej

Jako autor korespondujący poniższych 2. prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Gołębiewskiej:

- (1) Golebiewska, J.; Rachwalak, M.; Jakubowski, T.; Romanowska, J.; Stawinski, J., Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives; *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5496-5505.
- (2) Golebiewska, J.; Stawinski, J., Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and Mechanistic Studies; *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 4312-4323.

oraz promotor Jej pracy doktorskiej oświadczam, że materiał przedstawiony w ww. publikacjach był projektem badawczym mgr Justyny Gołębiewskiej, realizowanym w ramach prowadzonych badań doktorskich.

Doktorantka była główną wykonawczynią w pracy (1) i jedyną wykonawczynią eksperymentów w pracy (2). W obu pracach przygotowała także opisy części eksperymentalnych wraz z materiałami dodatkowymi (supporting information). Mgr Justyna Gołębiewska wniosła znaczący wkład intelektualny w opracowaniu koncepcji badań, w planowaniu odpowiednich eksperymentów oraz ich interpretacji i wyciąganiu finalnych konkluzji. Doktorantka partycypowała również we wszystkich etapach opracowywania wyników do publikacji, tj. w przygotowywaniu manuskryptów, odpowiedzi dla recenzentów i w finalnej korekcie prac.

W moim odczuciu nie ma żadnych wątpliwości, że materiał przedstawiony w publikacjach (1) i (2) stanowi intelektualne i eksperymentalne osiągnięcie mgr Justyny Gołębiewskiej.



Dr Joanna Romanowska
Zakład Chemii Komponentów Kwasów Nukleinowych

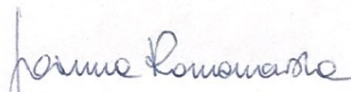
Luboń, dn. 6 maja 2020 r.

OŚWIADCZENIE
Dotyczące rozprawy doktorskiej mgr Justyny Gołębiewskiej

Niniejszym informuję, że mój udział w publikacji:

Gołębiewska, J., Rachwalak, M., Jakubowski, T., Romanowska, J. and Stawinski, J. **“Reaction of boranephosphonate diesters with amines in the presence of iodine: the case for the intermediacy of *H*-phosphonate derivatives”**, *The Journal of Organic Chemistry* **2018**, 83, 5496-5505,

polegał na uzgodnieniu organizacji badań, ich finansowaniu oraz korekcie manuskryptu do publikacji.


/Joanna Romanowska/

Poznań, 5 maja 2020r.

Dr Marta Rachwałak
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

OŚWIADCZENIE

Dotyczy rozprawy doktorskiej mgr Justyny Gołębowskiej

Justyna Gołębowska, Marta Rachwałak, Tomasz Jakubowski, Joanna Romanowska, Jacek Stawinski
*Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the
Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives*
Journal of Organic Chemistry, 83, 5496-5505 (2018)

Oświadczam, że mój udział w niniejszej publikacji polegał na wykonaniu części prac eksperymentalnych oraz przygotowaniu informacji uzupełniających do manuskryptu, tzw. supporting information.

Marta Rachwałak

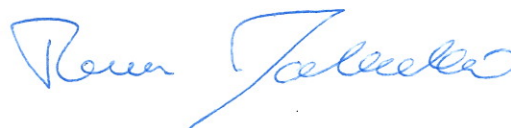
Poznań, 05.05.2020 r.

Mgr Tomasz Jakubowski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Oświadczenie o współautorstwie w publikacjach

- Gołębiewska J., Rachwałak M., Jakubowski T., Romanowska J., Stawiński J.
Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine:
The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives, *J. Org. Chem.* 2018, 83, 5496-5505

Oświadczam, że moja rola, jako współautora powyższej publikacji, polegała na wykonaniu części prac eksperymentalnych, tj. syntezie substratów, jak również na wykonaniu analizy IR.



28.05.2020 r.

Mgr Justyna Gołębiowska
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

OŚWIADCZENIE

Oświadczenie dotyczące współautorstwa w publikacjach:

(1) Golebiowska, J.; Rachwałak, M.; Jakubowski, T.; Romanowska, J.; Stawinski, J., Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives; *J. Org. Chem.* 2018, 83, 5496-5505.

(2) Golebiowska, J.; Stawinski, J., Reaction of Boranephosphonate Diesters with Pyridines or Tertiary Amines in the Presence of Iodine: Synthetic and Mechanistic Studies; *J. Org. Chem.* 2020, 85, 4312-4323.

Oświadczam, że jako pierwszy autor w wymienionych powyżej pracach byłam główną wykonawczynią pracy eksperymentalnej w publikacji (1) oraz jedyną w publikacji (2). Dla obu prac przygotowałam opisy części eksperymentalnych oraz załączonych do publikacji materiałów dodatkowych (supporting information). Brałam udział w opracowaniu koncepcji badań, planowaniu eksperymentów oraz ich interpretacji. Uczestniczyłam również w opracowaniu wyników do publikacji tj. w przygotowaniu manuskryptów, korekcie prac i odpowiedzi dla recenzentów.

Justyna Gołębiowska