

Tomasz Kaczyński

Rozprawa doktorska pt.:

**SYNTEZA I BADANIE REAKCJI OTWARCIA PIERŚCIENIA
3-(PIRYDYN-2-YLO)-1,3,2-OKSAZAFOSFOLIDYNY POD
WPLYWEM DIFOSFORANÓW**

Praca przedstawiona Radzie Naukowej Instytutu Chemii
Bioorganicznej PAN w Poznaniu w celu uzyskania stopnia
doktora nauk chemicznych

Promotor: dr hab. Marcin K. Chmielewski, prof. IChB

Poznań 2016

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi, dr hab. Marcinowi K. Chmielewskiemu za wytyczanie ciekawych kierunków badań, niezliczone rozmowy, cierpliwość i wsparcie.

Panu Profesorowi Wojciechowi Markiewiczowi za ogromną życzliwość od początku mojej przygody w IChB.

Dziękuję Pani dr Asi Romanowskiej za nieocenioną pomoc w początkowych fazach prac badawczych.

Pani dr Jolancie Brzezińskiej za uwagi i wskazówki, których potrzebowałam podczas przygotowania niniejszej rozprawy.

Panu dr Tomaszowi Ratajczakowi za przygarnięcie pod swoim dygestorium na samym początku, oraz wszystkie późniejsze godziny, dni i lata wspólnej pracy w laboratorium. Dziękuję za wszystkie merytoryczne i niemerytoryczne rozmowy, z których czasem coś wynikało...

Bardzo dziękuję Agnieszce, Martynie, Sandrze, Dominice i wszystkim koleżankom i kolegom, z którymi miałem przyjemność współpracować. Mam nadzieję, że mimo wszystko była to choć czasami przyjemność obopólna...

Szczególne podziękowania dla mojej żony za niewyczerpujące się pokłady cierpliwości oraz motywację i wsparcie wtedy, kiedy było to potrzebne.

1 Spis treści

1	SPIS TREŚCI	3
2	WYKAZ PRAC NAUKOWYCH ORAZ KOMUNIKATÓW KONFERENCYJNYCH	6
3	CELE PRACY.....	8
4	SKRÓTY UŻYWANE W PRACY	9
5	CZĘŚĆ LITERATUROWA	12
5.1	TRIFOSFORANY NUKLEOZYDÓW	12
5.2	METODY SYNTEZY TRIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW	12
5.2.1	<i>Metody syntezy w fazie ciekłej</i>	<i>14</i>
5.2.1.1	Metody syntezy poprzez chlorofosforany	14
5.2.1.2	Metody syntezy poprzez amidofosforany nukleozydów	18
5.2.1.3	Synteza poprzez mieszane produkty pośrednie P (III) -P (V)	21
5.2.1.4	Metoda fosfortriestrowa	23
5.2.1.5	Syntezy przez fosforan sulfonylu	24
5.2.2	<i>Metody syntezy na podłożu stałym</i>	<i>25</i>
5.2.2.1	Metody wykorzystujące przyłączenie reszty cukrowej do podłoża	25
5.2.2.2	Metody wykorzystujące przyłączenie do podłoża poprzez zasady azotowe	27
5.2.2.3	Metody wykorzystujące łączniki polimerowe	28
5.2.3	<i>Metody enzymatyczne</i>	<i>29</i>
5.3	IDENTYFIKACJA FOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW ZA POMOCĄ ³¹ P NMR	31
5.3.1	<i>Fosfor P(V)</i>	<i>32</i>
5.3.1.1	Fosforano mono-, di-, triestry oraz ich mono- i diamidy	32
5.3.1.2	Nukleozydo 3', 5'- cyklofosforany	33
5.3.1.3	Nukleozydo 2', 3'- cyklofosforany	34
5.3.1.4	Pirofosforanowe pochodne nukleozydów	34
5.3.1.5	Nukleozydo 3', 5'- cyklopirofosforany	35
5.3.1.6	Nukleozydo 5'-O-trimetafosforany	35
5.3.1.7	Trifosforanowe pochodne nukleozydów	36
5.3.1.8	Polifosforanowe pochodne nukleozydów	37
5.3.2	<i>Fosfor P(III).....</i>	<i>37</i>
5.4	GRUPY OCHRONNE STOSOWANE W CHEMII NUKLEOZYDÓW	38
5.4.1	<i>Termolabilne grupy ochronne.....</i>	<i>39</i>
5.4.1.1	2-Pirydynylowe Termolabilne grupy ochronne	40
5.4.1.2	Termolabilne grupy ochronne stosowane w ochronie centrum fosforowego	41
5.4.1.3	Termolabilne grupy ochronne stosowane w ochronie grup hydroksylowych	44
5.4.1.4	Termolabilne grupy ochronne stosowane w ochronie zasad azotowych	44
5.5	OKSAZAFOSFOLIDYNY I ICH ZASTOSOWANIE W SYNTEZIE ANALOGÓW NUKLEOZYDÓW	45

6	BADANIA WŁASNE. WYNIKI I Dyskusja	51
6.1	SYNTEZA ALKOHOLI 2-PIRYDYNLOWYCH.....	52
6.2	SYNTEZA OKSAZAFOSOLIDYN	57
6.2.1	<i>2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenilo-[1,3,2]-oksazafosolidyna(32). Stereochemia i badania krystalograficzne.....</i>	<i>60</i>
6.2.1.1	Badanie stereospecyficzności wewnętrzcząsteczkowej P-cyklizacji.....	62
6.2.1.2	Rozdział diastereoizomerów oraz określenie ich konfiguracji absolutnej	64
6.2.1.3	Próby zastosowania 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenilo-[1,3,2]-oksazafosolidyny (32a) w stereoselektywnej syntezie fosforanów i tiofosforanów nukleozydów.....	67
6.3	WYKORZYSTANIE 3-(PIRYDYN-2-YL)-OKSAZAFOSOLIDYN NUKLEOZYDÓW W SYNTEZIE TRIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW ..	70
6.4	PIROFOSFORANY JAKO CZYNNIKI NUKLEOFILOWE	74
6.5	WYBÓR CZYNNIKA UTLENIAJĄCEGO	76
6.6	ZASTOSOWANIE PIRFOSFORANU TRIS(TETRABUTYLOAMINOWEGO) JAKO CZYNNIKA NUKLEOFILOWEGO	78
6.7	ZASTOSOWANIE PIRFOSFORANU BIS(TRIBUTYLOAMINOWEGO) JAKO CZYNNIKA NUKLEOFILOWEGO.....	79
6.8	ZASTOSOWANIE HYDROFOBOWEGO PIRFOSFORANU PPN JAKO CZYNNIKA NUKLEOFILOWEGO.....	80
6.9	SYNTEZA CYKLICZNEGO CZYNNIKA TRIFOSFORYLUJĄCEGO	81
6.10	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I Dyskusja.....	83
6.11	NAJWAŻNIEJSZE UZYSKANE WYNIKI.....	95
7	STRESZCZENIE	96
8	ABSTRACT	97
9	CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	98
9.1	MATERIAŁY I METODY	98
9.1.1	<i>Reaktory mikrofalowe</i>	<i>98</i>
9.1.2	<i>Spektroskopia ¹H, ¹³C, ³¹P NMR i spektrometria mas.....</i>	<i>98</i>
9.1.3	<i>Krystalografia – pomiary rentgenowskie i metody obliczeniowe</i>	<i>99</i>
9.1.4	<i>Chromatografia HPLC</i>	<i>99</i>
9.1.5	<i>Chromatografia cienkowarstwowa</i>	<i>99</i>
9.1.6	<i>Pomiar zawartości wody.....</i>	<i>99</i>
9.2	SYNTEZA ALKOHOLI 2-PIRYDYNLOWYCH.....	100
9.2.1	<i>Synteza N-(2-pirydylo)-2-aminoetanolu (28).....</i>	<i>100</i>
9.2.2	<i>Synteza N-(2-pirydylo)-2-amino-1-feniloetanolu (29).....</i>	<i>100</i>
9.2.3	<i>Synteza N-(2-pirydyn-ylo-5-metylo)-2-aminoetanolu (30).....</i>	<i>101</i>
9.2.4	<i>Synteza 2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosolidyny (31).....</i>	<i>102</i>
9.2.5	<i>Synteza 2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenilo-[1,3,2]-oksazafosolidyny (32).....</i>	<i>103</i>
9.2.6	<i>Synteza 2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo-5-metylo)-[1,3,2]-oksazafosolidyny (33).....</i>	<i>104</i>
9.2.7	<i>Synteza 3'-O-acetylo-5'-O-[2-tio-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenilo-(1,3,2)-oksazafosolidyno] tymidyny (35)</i>	<i>105</i>

9.2.8	Synteza 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3'-O-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (36)	105
9.2.9	Synteza 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3'-O-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-2-tio-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (37)	106
9.2.10	Synteza 2-N-izopropylamino-2-tio-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (38)	106
9.2.11	Synteza 3'-O-acetylo-5'-[3-(pirydyn-2-ylo)-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (43)	107
9.2.12	Synteza 3'-O-acetylo-5'-[3-(pirydyn-2-ylo-5-metylo)-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (44)	108
9.2.13	Synteza 3'-O-acetylo-5'-O-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (45)	109
10	ATLAS WIDM NMR I MASOWYCH	111
11	DANE KRystalograficzne	149
12	BIBLIOGRAFIA	151

2 Wykaz prac naukowych oraz komunikatów konferencyjnych

Publikacje naukowe:

1. Tomasz P. Kaczyński, Marcin K. Chmielewski, *Methods for nucleoside triphosphate preparation: an overview of the most recent synthetic approaches*. Mini Reviews in Organic Chemistry – praca zaakceptowana do publikacji.
2. Brzezinska, J., Witkowska, A., Kaczynski, T.P., Krygier, D., Ratajczak, T. and Chmielewski, M.K. 2017. *2-Pyridinyl thermolabile groups as general protectants for hydroxyl, phosphate, and carboxyl functions*. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry 68:2.20.1-2.20.26. DOI: 10.1002/cpnc.26
3. Tomasz P. Kaczyński, Tomasz Manszewski and Marcin K. Chmielewski *Stereoselective P-Cyclisation and Diastereoisomeric Purification of 5-Phenyl-3-(pyridin-2-yl)-1,3,2-oxazaphospholidine Formed from a Thermolabile Protecting Group*. European Journal of Organic Chemistry 2016, 14, 2522–2527, DOI: 10.1002/ejoc.201501596
4. Tomasz Kaczyński, Joanna Romanowska i Marcin K. Chmielewski *„Application of thermolabile protecting groups on triphosphates synthesis”* Collection of Czechoslovak Chemical Communications 2014, 14, 291-292

Udział w konferencjach naukowych:

1. Konferencja naukowa 58. Zjazd PTChem i SITPChem, 21-25.09.2015, Gdańsk - prezentacja wyników badań w formie posteru: „*Stereospecyficzna oksazafosfolidyna - prekursor w nukleofilowym podstawieniu amidofosforynów*”, Tomasz Kaczyński, Tomasz Manszewski, Marcin K. Chmielewski.
2. Konferencja naukowa 57. Zjazd PTChem i SITPChem, 14-18.09.2014, Częstochowa - komunikat ustny: „*Nowa metoda syntezy trifosforanów z wykorzystaniem 2-pirydynylo oksazafosfolidyny*”
3. Konferencja naukowa XXI Round Table On Nucleosides, Nucleotides And Nucleic Acids Chemical Biology Of Nucleic Acids, 24-28.07.2014, Poznań - prezentacja wyników badań w formie posteru: “*Application of Thermolabile Protecting Groups on Triphosphates Synthesis*”, Tomasz Kaczyński, Joanna Romanowska, Martyna Trojanowicz, Marcin K. Chmielewski
4. Konferencja naukowa 16th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, 8-13.06.2014, Český Krumlov – Czechy - prezentacja wyników badań w formie posteru: “*Application of Thermolabile Protecting Groups on Triphosphates Synthesis*”, Tomasz Kaczyński, Joanna Romanowska, Martyna Trojanowicz, Marcin K. Chmielewski
5. Konferencja naukowa 55. Zjazd PTChem i SITPChem - Białystok 16-20.09.2012 – prezentacja wyników badań w formie posteru: „*Wpływ modyfikacji pierścienia oksazafosfolidynowego w koncepcji „CLICK-CLACK*”, Tomasz Kaczyński, Marcin K. Chmielewski
6. Pomoc w organizacji, oraz uczestnictwo w międzynarodowej konferencji „Joint Conference of Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society” – Poznań 4-7.03.2012r.

3 Cele pracy

Celem pracy doktorskiej jest badanie mechanizmu cyklizacji oraz nukleofilowego otwarcia pierścienia 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny. Jest to nowa klasa związków, które dzięki obecności podstawnika pirydynowego wykazują zwiększoną podatność na działanie nukleofili. Z prowadzonych badań wynika, że niektóre aminoalkohole 2-pirydynylowe ulegają cyklizacji po przyłączeniu do centrum fosforynowego tworząc pięcioczłonowy pierścień oksazafosfolidyny. Realizacja celu została poprzedzona opracowaniem chemicznej metody syntezy aminoalkoholi 2-pirydynylowych, które są prekursorami termolabilnych grup ochronnych stosowanych między innymi w ochronie centrum fosforanowego. Badanie podatności na otwarcie pod wpływem czynnika nukleofilowego prowadziłem z wykorzystaniem różnych anionów difosforanowych. Aby osiągnąć zamierzony cel pracy, przeprowadziłem następujące etapy prac badawczych, nakierowane na uzyskanie celów szczegółowych, do których należą:

- Wybór i synteza aminoalkoholi 2-pirydynylowych jako prekursorów 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyn;
- Określenie miejsc modyfikacji 2-pirydynylowych alkoholi oraz ich wpływu na reakcję cyklizacji i otwierania pierścienia oksazafosfolidynowego;
- Opracowanie metody syntezy 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyn poprzez cyklizację 2-Pirydynylowych Termolabilnych Grup Ochronnych;
- Badania strukturalne i mechanistyczne nad stereoizomerami 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyn;
- Badanie reakcji otwarcia pierścienia 3-pirydynylooksazafosfolidynowego pod wpływem difosforanów w celu opracowania założeń pod przyszłą syntezę trifosforanów nukleozydów;
- Badania zależności pomiędzy modyfikacją oksazafosfolidyny, a jej właściwościami podczas reakcji z pirofosforanami jako czynnikami nukleofilowym.

4 Skróty używane w pracy

2-Py – grupa 2-pirydynylowa

Ac- grupa acetylowa

Ade – adenozyzna

ATP - adenozyjno-5'-trifosforan

Bu – grupa butylowa

CDI- karbonyldiimidazol

CPG- (ang. *Controlled Pore Glass*) – szkło o kontrolowanej porowatości

CTP - cytydino-5'-trifosforan

Cyt – cytozyzna

dATP – deoksyadenozyjno-5'-trifosforan

DBU - 1,8-Diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en

dCTP - deoksytydino-5'-trifosforan

dGTP- deoksyguanozyjno-5'-trifosforan

DIPA - diizopropylamina

DIPEA - diizopropyletylamina

DMF - dimetyloformamid

dNTP – deoksynukleozydo-5'-trifosforan

dTTP – deoksytymidino-5'-trifosforan

dUTP - deoksyurydino-5'-trifosforan

eq – ang. *equivalent* – ekwiwalent

Et – grupa etylowa

EtOH - etanol

GTP – guanozyjno-5'-trifosforan

Gua - guanozyna

HPLC – (*ang. High Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

*i*Pr – grupa izopropylowa

MeCN -acetonitryl

MetOH - metanol

M_p - (*ang. melting point*) – temperatura topnienia

NMP – nukleozydo monofosforan

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy

NTP – nukleozydo trifosforan

ODNs – oligo dezoksynukleozydy

ORN – oligo rybonukleotydy

OTf – grupa triflatowa

PBS – (*ang. Phosphate-buffered saline*) - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PEG - poli(glikol etylenowy)

PEP - fosfoenolopirogronian

Ph – grupa fenylowa

ppm – (*ang. parts per milion*) – liczba części na milion

PS-ODNs – tiofosforany oligonukleotydów

RP- (*ang. reversed-phase*) - odwrócona faza

R_t – (*ang. room temperature*) – temperatura pokojowa

siRNA – (*ang. small interfering RNA*) - krótkie interferujące RNA

TBDMS – grupa *tert*-butylodimetylosililowa

t-Bu - grupa *tert*butylowa

TEA - trietyloamina

TGO – Termolabilna Grupa Ochronna

THF - tetrahydrofuran

Thy - tymidyna

TLC – (*ang. Thin Layer Chromatography*) – chromatografia cienkowarstwowa

TPP – tryfenylofosfina

Ts – grupa tosylowa

TTP – tymidyno-5'-trifosforan

Ura -Uracyl

UTP - urydyno-5'-trifosforan

5 Część Literaturowa

5.1 Trifosforany nukleozydów

Trifosforany nukleozydów (NTP) są kluczowymi mediatorami niezliczonych procesów biologicznych, w tym replikacji DNA, transkrypcji i translacji. Naturalnie występujące trifosforany deoksyrybo- i rybonukleozydów są podstawowymi blokami strukturalnymi w enzymatycznej syntezie DNA i RNA w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Odpowiednie syntetyczne analogi NTP były szeroko stosowane jako inhibitory^{1,2,3} i substraty enzymów^{4,5}, agonisty i antagonisty receptorów nukleotydocowych^{6,7}, znakowane sondy molekularne, czy składniki testów biologicznych.⁸ Dodatkowo stanowią czynne metabolity niektórych leków, takich jak np. rybawiryna- związek o właściwościach przeciwwirusowych. 5'-trifosforany DNA lub RNA służą również jako ważne substraty w wielu zastosowaniach biochemicznych.⁹ Trifosforany DNA są stosowane w przemyśle biotechnologicznym jako substraty do wytwarzania syntetycznych genów.¹⁰ Z kolei trifosforany RNA są używane do ligacji cząsteczek RNA¹¹, wykrywania odpowiedzi wirusowych poprzez aktywację białka RIG-I¹², indukcji odporności przeciwwirusowej¹³ oraz w syntezie enzymatycznej m7G-5'-kapowanych RNA.¹⁴ Wykazano, że odpowiedź immunologiczna wywołana przez wiązanie trifosforanów RNA z TP RIG-I łączy się z wyciszaniem genów przez małe interferujące RNA (siRNA).¹⁵ Dane te wskazują na potencjał terapeutyczny immunostymulujących kwasów nukleinowych, w tym trifosforanów siRNA. Ostatnie badania właściwości RIG-I były możliwe przy stosowaniu syntetycznych trifosforanów, zamiast 5'-trifosforanów generowanych przez transkrypcję RNA *in vitro*. Istnieje kilka zalet syntetycznych NTP nad uzyskiwanymi *in vitro*, takich jak czystość reakcji, powtarzalna wydajność, potencjalne zastosowanie w syntezie wielkoskalowej, a także możliwość wprowadzenia wielu modyfikacji chemicznych.

5.2 Metody syntezy trifosforanów nukleozydów

Obserwując rozwój metod syntezy trifosforanów nukleozydów można dojść do wniosku, że potrzeba uniwersalnej i wysoce wydajnej metody jest nierozwiązanym, palącym problemem syntetycznym. Istnieją wprawdzie metody, które działają bardzo dobrze na niektórych substratach (np. metody enzymatyczne dla naturalnych trifosforanów nukleozydów) i istnieje kilka metod, które działają umiarkowanie dobrze dla większości substratów – np. powszechnie stosowana metoda Ludwig'a – Eckstein'a wykorzystująca chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxafosforyn-4-on.¹⁶ Jednak żadna z nich nie ma znamion metody uniwersalnej.

Trifosforany nukleozydów są trudne do otrzymania, izolacji, charakterystyki i przechowywania ze względu na kilka czynników. Po pierwsze, wiele z metod ich syntezy obejmuje połączenia związków jonowych z substratami o charakterze hydrofobowym lub niepolarnym (na przykład reakcja pirofosforanów z zabezpieczonymi nukleozydami). W związku z tym trudno jest znaleźć odpowiednie środowisko reakcji, a oczyszczanie musi obejmować izolowanie naładowanych produktów rozpuszczalnych w wodzie z mieszaniny zanieczyszczeń hydrofilowych i hydrofobowych. Po drugie, związki te należą do związków nietrwałych, szczególnie w roztworze. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że hydroliza funkcji trifosforanowej zachodzi zarówno w warunkach zasadowych, jak i kwasowych.¹⁷ Dodatkowo zauważono, że stałe próbki trifosforanów nukleozydów rozkładają się w ciągu kilku dni, nawet w niskiej temperaturze. Stabilność trifosforanów nukleozydów lub jej brak, jest prawdopodobnie związana z przeciwjonami obecnymi w środowisku. Trifosforany w formie sprotonowanej, są uważane za stosunkowo niestabilne, prawdopodobnie dlatego, że obniżają pH niezbuforowanego środowiska w którym są rozpuszczone, co przyspiesza ich rozkład. W warunkach obojętnych mogą one być stabilne w obniżonych temperaturach przez lata, zwłaszcza gdy do stabilizacji użyje się kationów trialkiloamoniumowych.

Metody otrzymywania i izolacji trifosforanów zostały ulepszone znacząco od czasu ich pierwszej syntezy chemicznej. W 1949 roku Michelson i Todd jako pierwsi zaproponowali syntezę, izolację i charakterystykę ATP.¹⁸ Procedura izolacji zawierała kilka pracochłonnych etapów strącania soli baru w kontrolowanych warunkach pH, niechromatograficzne metody jonowymienne oraz rekrytalizację odpowiedniej soli akrydyniowej. Charakterystyka polegała na określeniu temperatury topnienia, rentgenowskiej fotografii proszkowej, widmach IR, widmach absorpcyjnych oraz przebadaniu aktywności biologicznej zregenerowanego wolnego kwasu nukleinowego. W późniejszych latach dostępna stała się szeroko stosowana do oceny czystości trifosforanów chromatografia bibułowa, obecnie w dużej mierze zastąpiona przez HPLC.¹⁹

Ogromnym ułatwieniem w identyfikacji związków zawierających atom fosforu jest analiza ³¹P NMR. Ugrupowanie trifosforanowe posiada w widmie ³¹P NMR charakterystycznie rozszczepione sygnały przy przesunięciu chemicznym wynoszącym -6, -11 i -22 ppm, które można przypisać dla poszczególnych atomów fosforu (α , γ , β). Wartości przesunięć chemicznych dla trifosforanów nukleozydów są silnie zależne od użytego rozpuszczalnika, pH i użytych przeciwjonów. Łatwość, z jaką obserwuje się te sygnały jest odwrotnie proporcjonalna do szybkości wymiany przeciwjonów, która może być ograniczana przez użycie

buforu. Zjawisko wymiany przeciwjonów wpływa również na obraz widm protonowych. Co więcej, niewystarczająca liofilizacja może prowadzić do pozostałości soli trialkiloamonio wych, które będą przesłaniać lub całkowicie zasłaniać odpowiednie sygnały w widmie fosforowym. Dlatego często nawet pośrednie etapy syntezy wymagają stosowania technik spektrometrii mas w miejsce prostszych i szybszych metod analizy postępów reakcji.

Duże zapotrzebowanie na syntetyczne trifosforany nukleozydów oraz wiele problemów z ich syntezą i obróbką powoduje, że od lat są one przedmiotem zainteresowania chemików. Mimo wielu podejmowanych prób nowe metody ich syntezy okazują się najczęściej efektywne tylko w określonym, wąskim zakresie zastosowań.

5.2.1 Metody syntezy w fazie ciekłej

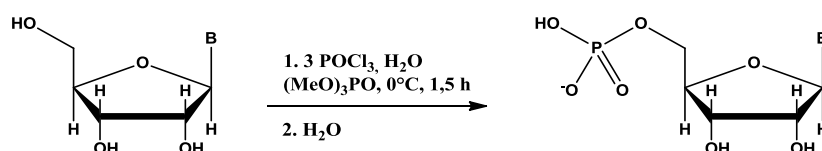
5.2.1.1 Metody syntezy poprzez chlorofosforany

Wczesne prace dotyczące fosforylacji nukleozydów z wykorzystaniem trichlorku fosforu były utrudnione przez brak stereoselektywności podczas reakcji. Odpowiednie innowacje zostały zaproponowane przez Yoshikawę i jego współpracowników, którzy odkryli, że szybkość fosforylacji można zwiększyć używając jako rozpuszczalników trimetylo- lub trietylofosforanów.²⁰ Zastosowanie takich rozpuszczalników pozwoliło uzyskać dwa zasadnicze rezultaty. Po pierwsze, w przeciwieństwie do wcześniejszych prac stało się możliwe jednoczesne rozpuszczanie nukleozydów i innych reagentów w celu otrzymania homogenicznych roztworów. Po drugie, uważa się że oddziaływanie pomiędzy trialkilofosforanami a POCl_3 prowadzi do powstawania aktywnego produktu pośredniego podobnie jak w przypadku kompleksu pomiędzy POCl_3 a DMF.²¹

Pierwsze prace Yoshikawy były prowadzone na 2', 3'-*O*-izopropylideno blokowanych nukleozydach, ale z czasem udało się znaleźć optymalne warunki dla selektywnej reakcji na grupie 5'-hydroksylowej w nieblokowanych rybo- i dezoksyrybonukleozydach.²² Zauważono, że kluczowe znaczenie w hamowaniu powstawania mieszaniny 2' i 3' fosforanów ma środowisko kwasowe, stąd w metodzie Yoshikawy dodaje się określonych ilości wody w celu wytworzenia HCl *in situ*. Należy tutaj zaznaczyć, że kolejne prace wykazały, że dobrą regioselektywność można również uzyskać w warunkach lekko zasadowych, stąd zależność pomiędzy regioselektywnością fosforylacji, a pH jest niejasna.

Schemat 1 przedstawia typowe warunki i rezultaty otrzymane przez zespół Yoshikawy. Wcześniejsze doniesienia²³ opisują selektywność fosforylacji metodą Yoshikawy jako bardzo

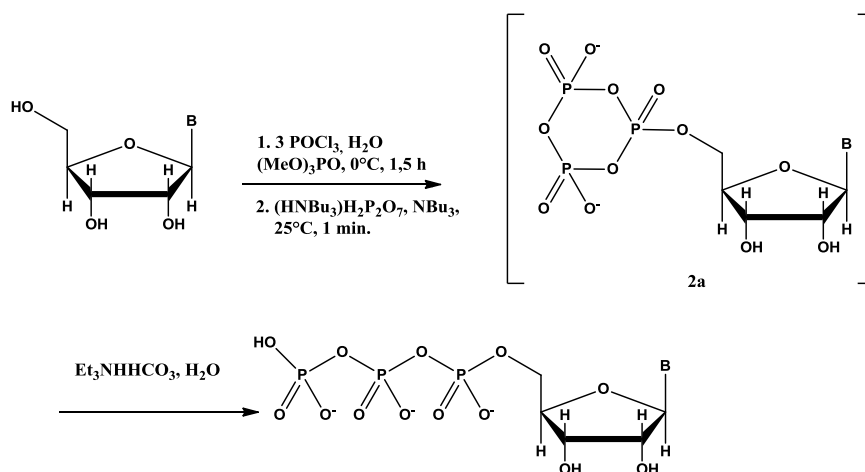
wysoką, jednak okazuje się, że rzadko jest ona całkowita, a nowoczesne metody analityczne pokazują to lepiej niż było to dawniej możliwe. Zespół Yoshikawy próbował również zamiast POCl_3 używać chlorku pirofosforu $[\text{Cl}_2\text{P}(\text{O})\text{OP}(\text{O})\text{Cl}_2]$, jednak nie odnotowano przewagi tego rozwiązania.



Schemat 1: Monofosforylacja metodą Yoshikawy – warunki ogólne.

Niemalże w tym samym czasie konkurencyjne zespoły do reakcji fosforylacji nukleozydów w rozpuszczalnikach innych niż trialkilofosforany (np. 2-chlorofenol), stosowały bezwodnik kwasu dichlorofosforowego. Zaobserwowano pewne wysoce selektywne reakcje^{24,25}, jednak w niektórych przypadkach nie udało się uzyskać żadnej lub jedynie niewielką regioselektywność, stąd metody te nie uzyskały dużej popularności.

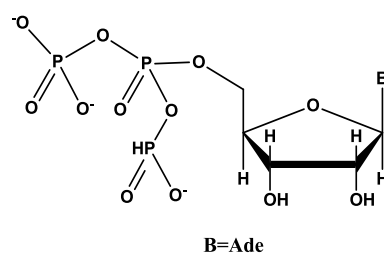
Ciekawym osiągnięciem monofosforylacji metodą Yoshikawy jest otrzymanie chlorofosforanowego produktu pośredniego, który przed etapem hydrolizy może być wykorzystany w bezpośredniej reakcji z jonem pirofosforanowym. Pracujące niezależnie zespoły Ludwiga²⁶ i Cheng²⁷ generowały dichlorofosforany nukleozydów za pomocą metody Yoshikawy by następnie prowadzić reakcję w obecności tributyloaminy i 5-krotnego nadmiaru pirofosforanu *bis*(tri-*n*-butyloamoniowego) w bezwodnym DMF. Po 1 minucie obserwowano powstawanie cyklicznego produktu pośredniego (trimetafosforanu **2a**), który w wyniku hydrolizy w TEAB (pH=7,5) prowadził do powstania trifosforanu nukleozydu z 78-86% wydajnością (Schemat 2). Ludwig zauważył, że uzyskiwane wydajności są mniejsze kiedy nie dodawano do reakcji amin zwiększających zasadowość. Dlatego w swojej procedurze po 1 minucie zaczął dodawać buforu wodorowęglanu amonu. Należy tutaj zwrócić uwagę na to, że podczas fosforylacji za pomocą POCl_3 nie została dodana woda, pomimo że Yoshikawa i inni wskazywali, iż powstający w takim przypadku HCl zwiększa selektywność reakcji w kierunku pozycji 5'. Poza tym Ludwig wykazał, że niecałkowita selektywność w pierwszym etapie jest punktem wyjścia do powstawania dużej ilości produktów ubocznych. W związku z tym zaproponowano, by cykliczny produkt pośredni powstawał bezpośrednio przed hydrolizą. Trimetafosforany są zatem wytwarzane przez aktywowane pochodne trifosforanów w warunkach bezwodnych i są z łatwością hydrolizowane, w efekcie czego otrzymuje się trifosforany nukleozydów.^{28,29,30} Pomysł ten znalazł szerokie zastosowanie w opracowaniu wielu procedur pozwalających na wykorzystanie tej metody w syntezie NTP.³¹



Schemat 2: Metoda Ludwig’a z wykorzystaniem cyklicznego produktu pośredniego **2a**.

Do dziś, metoda została zastosowana w syntezie z wieloma blokowanymi i nieblokowanymi nukleozydami oraz ich analogami. Jednak ze względu na dużą zależność efektywności reakcji od rodzaju zastosowanego substratu otrzymywano różne wydajności docelowych trifosforanów (od niskich do bardzo wysokich). Metodę zaadaptowano też do syntezy analogów trifosforanów nukleozydów, włączając w to modyfikacje w obrębie centrum fosforowego. Przykładowo, przez zastąpienie POCl_3 chlorkiem tiofosforu (PSCl_3).^{32,33}

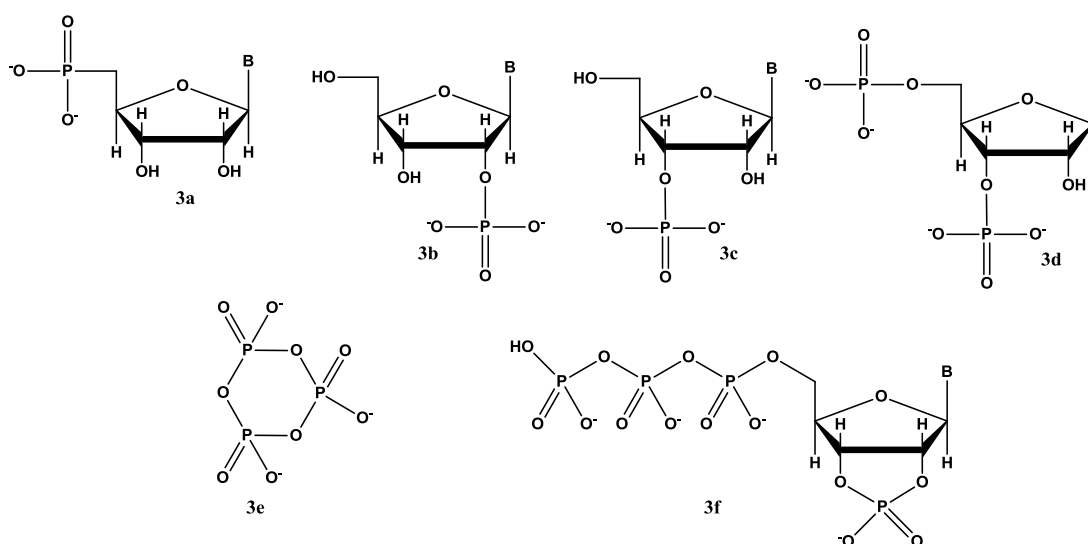
Z kolei użycie dużego nadmiaru POCl_3 i pirofosforanu tri-*n*-butyloamoniowego skutkuje powstawaniem jako głównego produktu ATP^{34} , proponowany mechanizm obejmuje tworzenie pośredniego pseudo-ATP (Rysunek 1), który ulega samoistnemu przegrupowaniu z wytworzeniem cyklicznego trifosforanu **2a**.



Rys. 1: Pseudo-ATP produkt pośredni.

W 2006 roku El-Tayeb i współpracownicy skoncentrowali się na produktach ubocznych powstających podczas syntezy podstawowych modyfikowanych pochodnych urydyno trifosforanu (UTP). Wyizolowali i zidentyfikowali NMP i NDP, a także 2', 3'-cykliczny fosforan oraz 2'-fosforan 5'-trifosforanu nukleozydu.³⁵

Później, szczegółowa analiza podobnych produktów ubocznych została przeprowadzona przez Gillerman i Fischer na przykładzie syntezy ATP.³⁶ Produkty uboczne, zidentyfikowane za pomocą spektroskopii ¹H oraz ³¹P NMR są pokazane na Schemacie 3. W widmach ³¹P NMR nukleozydo-monofosforanu **3a** i nukleotydów **3b-3d** zaobserwowano pojedynczy sygnał między 3, a -5 ppm, natomiast w widmach cyklicznego trimetafosforanu **3e** singlet przy -20 ppm. W widmie ³¹P, polifosforylowany związek **3f** posiada trzy sygnały, które są charakterystyczne dla 5'-trifosforanu (-10 ppm dla *P*_γ, -11 ppm dla *P*_α oraz -23 ppm dla *P*_β) i czwarty sygnał przy 20 ppm, odpowiadający 2', 3'-cyklicznemu fosforanowi. Główny produkt uboczny (około 60% wydajności) został zidentyfikowany jako AMP (**3a**) powstający w wyniku hydrolizy produktu pośredniego- nukleozydo 5'-dichloroku fosforu z wodą.



Schemat 3: Produkty uboczne powstające podczas syntezy NTP metodą Ludwig'a.

Ponadto reakcja DMF z POCl_3 jest znana z produkcji odczynnika Vilsmeier'a $[(\text{CH}_3)_2\text{NCHClPO}_2\text{Cl}_2]$, który może dalej reagować z pirofosforanem lub grupą 2'- i 3'-OH związku **2a** powodując tworzenie produktów ubocznych, odpowiednio **3e** i **3f**. Pomimo słabych lub umiarkowanych wydajności, procedura Ludwig'a jest jedną z najczęściej stosowanych metod syntezy NTP z uwagi na swoją prostotę (wykorzystanie niezabezpieczonych nukleozydów, *one-pot*, krótkie czasy reakcji) i możliwość jej zastosowania do szerokiego zakresu analogów nukleozydów modyfikowanych ugrupowaniami zasadowymi^{16,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48} i/lub cukrowymi.^{49,50} Karbocykliczne⁵¹ i acykliczne pochodne⁵² zostały otrzymane według tej procedury z 25-35% wydajnością.

Od czasu opisanie metody, po raz pierwszy w 1987 roku, wprowadzono do niej sporo ulepszeń. W celu zwiększenia szybkości fosforylacji⁵³, w pierwszym etapie reakcji, stosuje się tzw. gąbki protonowe (nawet dla wrażliwych na kwas nukleozydów), obniżono również temperaturę jednocześnie wydłużając czas reakcji.³⁶ Dodatkowo wykazano, że finalny stosunek ATP do AMP jest wyższy, gdy temperaturę reakcji obniżono z 0 do -15°C, a w drugim etapie, czas reakcji wydłużono o 2 godziny. W wyniku wprowadzonych zmian nie zaobserwowano nukleotydów **3f**, ani cyklicznego trimetafosforanu **3e**. Podobne wyniki uzyskano również w syntezie UTP i GTP, podczas gdy synteza CTP wymagała uprzedniej ochrony egzocyklicznej grupy aminowej. Ostatecznie wszystkie naturalnie występujące NTP zostały otrzymane/zsyntetyzowane z 54-74% wydajnością.

Kore i in.^{54,55} zaproponowali modyfikację podstawowej procedury w celu uzyskania deoksy nukleozydo trifosforanów w dużej skali bez konieczności stosowania grup ochronnych. Polega ona na użyciu różnych rozpuszczalników na każdym etapie reakcji: trimetylofosforanu podczas formowania dwuchlorku fosforu i acetonitrylu zamiast DMF w drugim etapie, w celu uniknięcia powstawania kompleksu Vilsmeier'a-Haack'a. Zastosowano również niedomiarowe ilości pirofosforanu *bis*(tri-*n*-butyloamoniowego). Oba etapy przeprowadzano w temperaturze -5°C. Zgodnie z zoptymalizowanymi warunkami, uzyskano syntetyczne odpowiedniki naturalnie występujących dNTP z wydajnością na poziomie 65-70%. Procedura ta została z powodzeniem zastosowana również do otrzymywania modyfikowanych dNTP.^{56,57,58,59} Należy zauważyć, że monofosforylowanie rybonukleozydów nie wymaga obecności zasady w środowisku reakcji, w przeciwieństwie do monofosforylacji deoksyrybonukleozydów, która wymaga starannego doboru zasad.⁶⁰

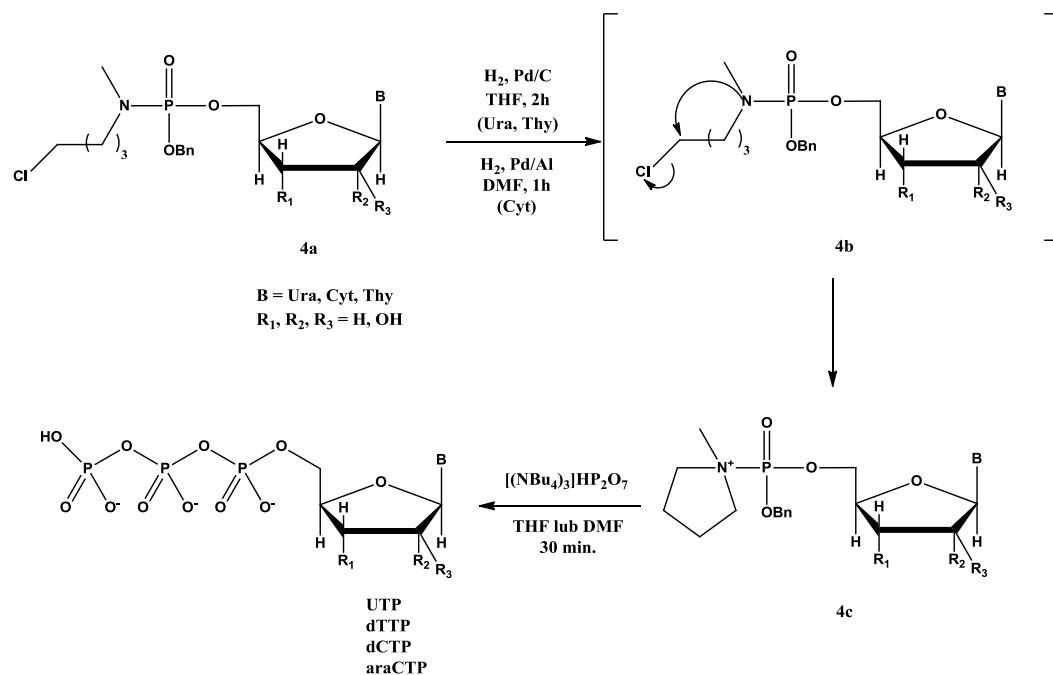
5.2.1.2 Metody syntezy poprzez amidofosforany nukleozydów

Trifosforany nukleozydów mogą być syntetyzowane w wyniku nukleofilowego podstawienia 5'-nukleozydo amidofosforanów przez nieorganiczny pirofosforan. Przykładem może być podejście wykorzystujące fosforan morfoliny, przy czym istnieją dwie drogi do otrzymania finalnego NTP tą metodą. Pierwsza z nich polega na otrzymaniu produktu pośredniego- nukleozydo fosforanu morfoliny w reakcji NMP z morfoliną w obecności DCC, a następnie substytucji nukleofilowej pirofosforanem tributyloaminy.^{61,62} Druga droga polega na użyciu 2,2,2-tribromoetylo chlorofosforanu morfoliny, usunięciu 2,2,2-tribromoetylowej grupy zabezpieczającej, a następnie reakcję z pirofosforanem tributyloamoniowym w DMF (81-85% wydajności).⁶³ Inna metoda, zaproponowana przez Hoard'a i Ott'a, wykorzystuje

fosforoimidazolowy produkt pośredni, który powstaje w wyniku reakcji NMP z 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI).⁶⁴ Fosforoimidazolowe pochodne nukleozydów można również wygenerować przez sprzężanie NMP z *N*-metyloimidazolem w obecności trifenylofosfiny i 2,2'-ditiopirydyny. Dalsze traktowanie pirofosforanem *bis*(tetra-*n*-butyloamoniowym) prowadzi do uzyskania odpowiednich NTP. Vasilyeva i in. w syntezie modyfikowanych nukleozydów pirymidynowych uzyskali tą metodą wydajności wyższe w stosunku do metody wykorzystującej dichlorofosforan.⁶⁵

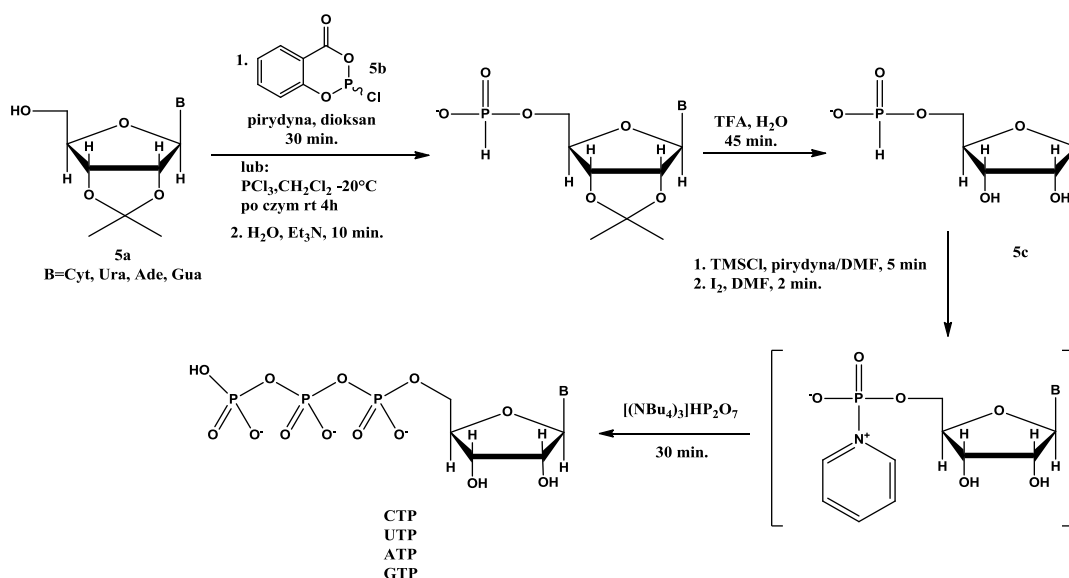
Bogachev opracował procedurę „*one-pot, three-step*” z użyciem bezwodnika trifluorooctowego (TFAA) jako środka aktywującego przekształcenie dNMP do dNTP.⁶⁶ TFAA jest wysoce reaktywny względem fosforanów, grup hydroksylowych oraz grup aminowych, ale też łatwo usuwany z mieszaniny reakcyjnej. Tak więc dokonano aktywacji i ochrony dNMP *in situ* z dużym nadmiarem TFAA w obecności trzeciorzędowej aminy w acetonitrylu. Nadmiar TFAA usunięto pod próżnią. Na tym etapie kluczowe jest utrzymanie warunków bezwodnych. Powstała mieszanina bezwodników została poddana działaniu *N*-metyloimidazolu z wytworzeniem odpowiednich półproduktów fosforano-metyloimidazolowych. Podstawienie pirofosforanu i usunięciu trifluoroacetylowych grup ochronnych pozwoliło uzyskać dATP, dTTP, dGTP i dCTP z 89-92% wydajnością. Warto zauważyć, że w tej procedurze czas reakcji nie przekracza 2-5 min na poszczególnych etapach.

W 2004 roku grupa badawcza Borch'a opracowała strategię z wytworzeniem *in situ* amidofosforanu pirolidonu (Schemat 4)⁶⁷ Wyjściowe amidofosforany diestrów **4a** uzyskano wcześniej w reakcji *one-pot*. Następnie przeprowadzano ich katalityczne uwodornienie, które prowadzi do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji ugrupowania *N*-(3-chlorobutylo)-*N*-metylowego **4b**, a w efekcie do tworzenia produktów pośrednich- amidofosforanów pirolidyniowych **4c**. Dodanie pirofosforanu *tris*(tetra-*n*-butyloamoniowego) prowadzi do powstania dTTP, dCTP i dUTP i innych analogów z wydajnością rzędu 55% do 77%. Zaletami tej metody są krótkie czasy reakcji i łatwy proces oczyszczania. Niestety początkowe etapy prowadzące do otrzymania odpowiednich substratów, w tym ich oczyszczanie mogą być uciążliwe.



Schemat 4: Szlak syntetyczny NTP z wykorzystaniem amidofosforano-pirolidyniowych produktów pośrednich.

W roku 2008, Sun i in. opracowali metodę *one-pot* syntezy NTP z monoestrów nukleozydo 5'-*H*-fosfonianów poprzez amidofosforany pirydyniowe (Schemat 5).⁶⁸ *H*-fosfoniany nukleoozydów **5c** otrzymano w trzech krokach z wydajnościami na poziomie 71-85% przez potraktowanie 2', 3'-izopropylideno nukleozydów **5a** salicylochlorofosforem **5b** lub trichlorkiem fosforu, a następnie hydrolizę za pomocą uwodnionej trietyloaminy i usunięciem grup ochronnych.⁶⁹ Następnie *H*-fosfonian monoestru poddano reakcji silylowania za pomocą chlorku trimetylosililu i utlenianiu jodem. Ostatni etap polegał na podstawieniu otrzymanego amidofosforanu pirofosforanem. Ostateczna wydajność wynosiła między 26 a 53%.



Schemat 5: Przebieg syntezy NTP z monoestrów nukleozydo 5'-H-fosfonianów poprzez amidofosforany pirydyniowe.

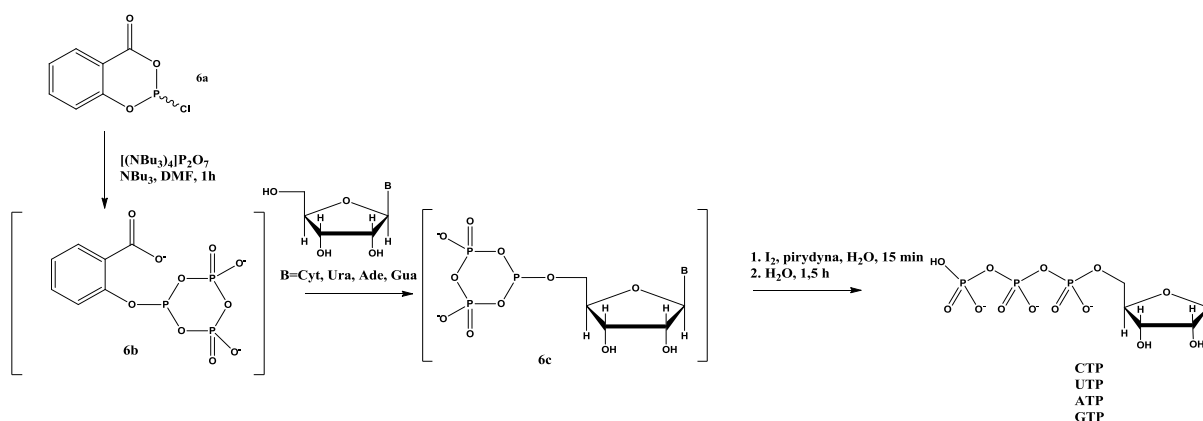
Alternatywne podejście, polega na wykorzystaniu nukleozydo 5'-fosforanu piperidyny. Metoda została zaadaptowana z metody syntezy NDP, przez zastąpienie w ostatnim etapie wodorofosforanu *bis*(tetra-*n*-butyloamoniowego) pirofosforanem *tris*(tetra-*n*-butyloamoniowym). Za pomocą tej metody otrzymano wszystkie dNTP oraz 5'-trifosforan acyklowiru z wydajnością 70-81%.^{70,71}

5.2.1.3 Synteza poprzez mieszane produkty pośrednie P (III) - P (V)

W 1989 Ludwig i Eckstein opisali nowe podejście „*one-pot*” w syntezie dNDP, polegające na fosfitylacji blokowanych nukleozydów za pomocą salicylochlofosforyny.⁷² Kluczowe w tym podejściu jest utrzymanie maksymalnie bezwodnych warunków, aby zapobiec powstawaniu niepożądanych *H*-fosfonianów nukleozydów. Zmieszanie 3'-*O*-acetylotymidyny z 2-chloro-1,3,2-benzodioksofosforin-4-onem w pirydynie/dioksanie prowadzi do powstania pierwszego produktu pośredniego, w postaci dwóch diastereoizomerów charakteryzujących się dwoma sygnałami przy 127,6 i 126,3 ppm (³¹P NMR). Dodanie pirofosforanu *bis*(tri-*n*-butyloamoniowy) generuje kolejny (cykliczny) produkt pośredni, który w widmie ³¹P jest widoczny w postaci dubletu dubletów przy około -19 ppm dla P(V) oraz tripletu przy 105,5 ppm dla P(III). Utlenienie trójwartościowego fosforu Pα jodem w wodnym roztworze pirydyny prowadzi do jednoczesnego otwarcia pierścienia. Usunięcie acetylowej grupy ochronnej pozwala uzyskać finalny dTTP z wydajnością na poziomie 72%. Metoda ta może być też stosowana w serii rybo, ale grupy hydroksylowe w pozycji 2'- i 3' wymagają ochrony. Ponadto

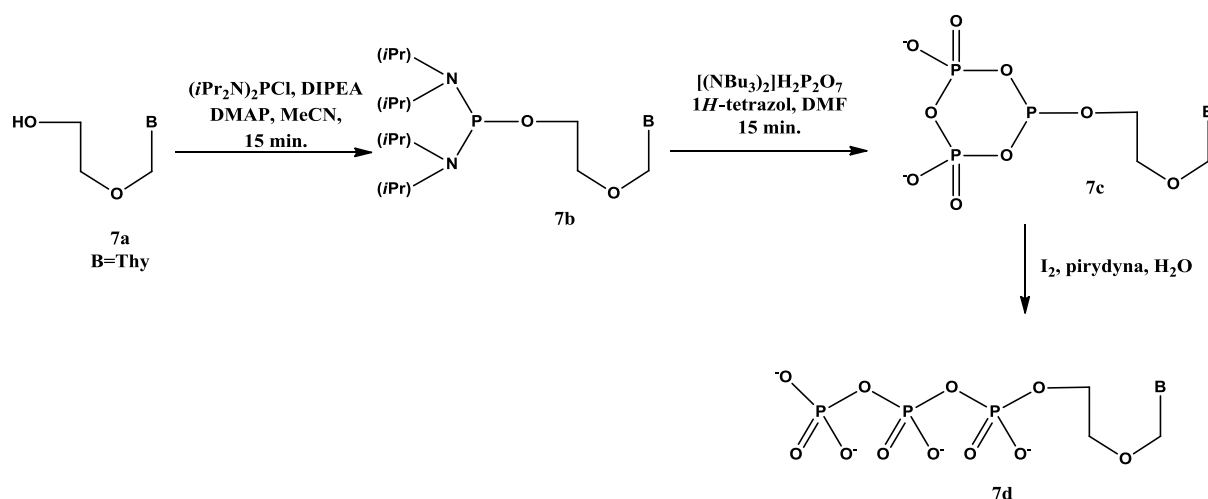
w celu uniknięcia reakcji ubocznych zablokowane muszą być egzocykliczne grupy aminowe zasad heterocyklicznych.⁵⁴ Sposób ten jest również stosowany w syntezie trifosforanów posiadających modyfikacje w obrębie zasad^{73,74} oraz w obrębie pierścienia rybozy.⁷⁵

W latach 2011-2013 zespół Huang'a opracował metodę opartą na hipotezie, że przestrzennie rozbudowany czynnik fosfitylujący będzie selektywnie reagował z pierwszorzędową grupą 5'-OH w przeciwieństwie do drugorzędowych grup 2'- i 3'-OH, unikając w ten sposób dodatkowych etapów syntezy (wprowadzanie i usuwanie grup ochronnych). Nowy odczynnik **6b** został wygenerowany *in situ* w reakcji salicylochlorofosforynu **6a** z nadmiarem pirofosforanu *tetra*(tri-*n*-butylaminowego) (Schemat 6). Regioselektywna reakcja fosfitylacji pozycji 5'- niezablokowanych nukleozydów prowadzi do tworzenia cyklicznych związków pośrednich **6c**, które utleniają się jodem w pirydynie z dodatkiem wody, a następnie hydrolizowane do NTP. Wydajność została oszacowana między 10-50% przed oczyszczeniem za pomocą HPLC. Metoda ta została również zastosowana w syntezie analogów ATP.⁷⁶



Schemat 6: Synteza NTF z wykorzystaniem cyklicznego czynnika fosfitylującego.

Jako alternatywę dla salicylochlorofosforynowego odczynnika fosfitylującego, który jest trudny w użyciu ze względu na swoją wysoką reaktywność i higroskopijność, do wytworzenia pochodnej amidofosforynowej Li i in. wykorzystali *bis*(diizopropyl)-chlorofosforzyn **7b** (Schemat 7).⁷⁷ Reakcję fosfitylacji **7a** przeprowadzono w obecności DMAP i DIPEA. Powstający amidofosforzyn **7b** potraktowano pirofosforanem w obecności tetrazolu, z wytworzeniem cyklicznego związku pośredniego **7c**. Mieszaninę reakcyjną monitorowano za pomocą ^{31}P NMR. Zaobserwowano, że singlet przy 127 ppm (odpowiadający amidofosforynowi), został zastąpiony przez triplet przy 105 ppm dla P(III) oraz dublet przy -20 dla P(V). Następnie **7c** utleniono wodnym roztworem jodu, co doprowadziło do wyizolowania 5'-trifosforanu acyklicznej tymidyny **7d** z 48% wydajnością.

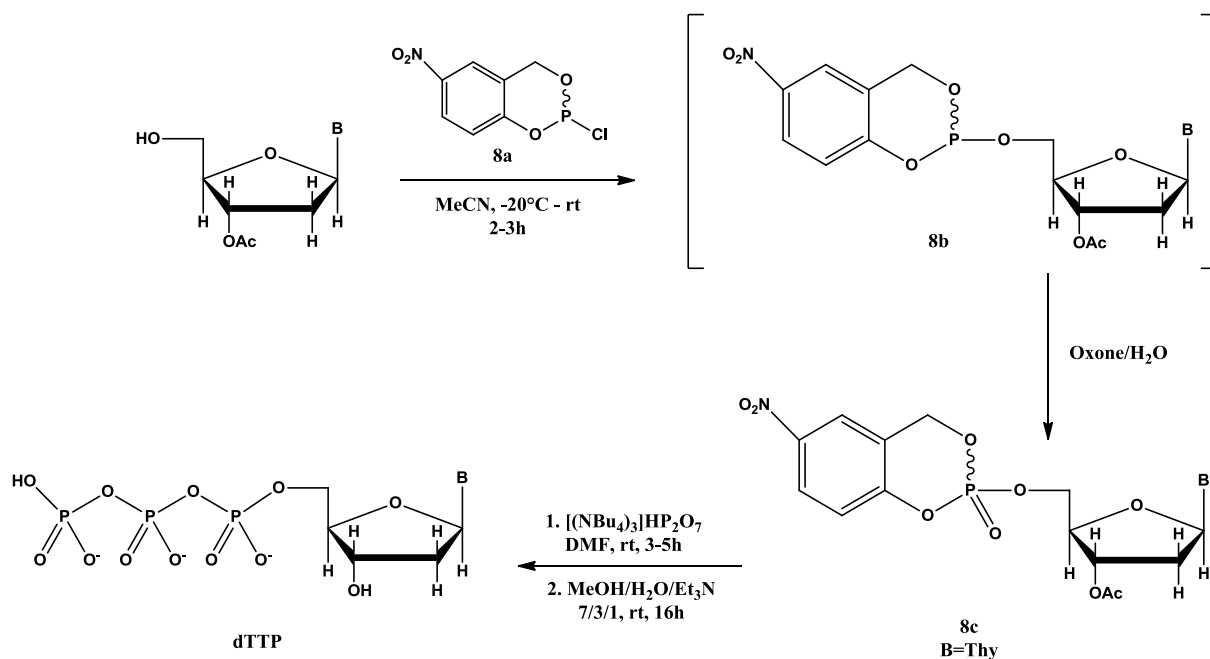


Schemat 7: Synteza metodą amidofosforynową z wykorzystaniem *bis*(diizopropyl)-chlorofosforynu.

Co ciekawe, wszystkie omówione metody obejmujące związki pośrednie P(III)-P(V) użyte w syntezie 5'-trifosforanów nukleozydów mogą być również wykorzystane do otrzymywania ich analogów modyfikowanych na fosforze α , takich jak 5'-(α -P-tiotrifosforany), 5'-(α -P-boranotrifosforany) i 5'-(α -P-selenotrifosforany).

5.2.1.4 Metoda fosfortriestrowa

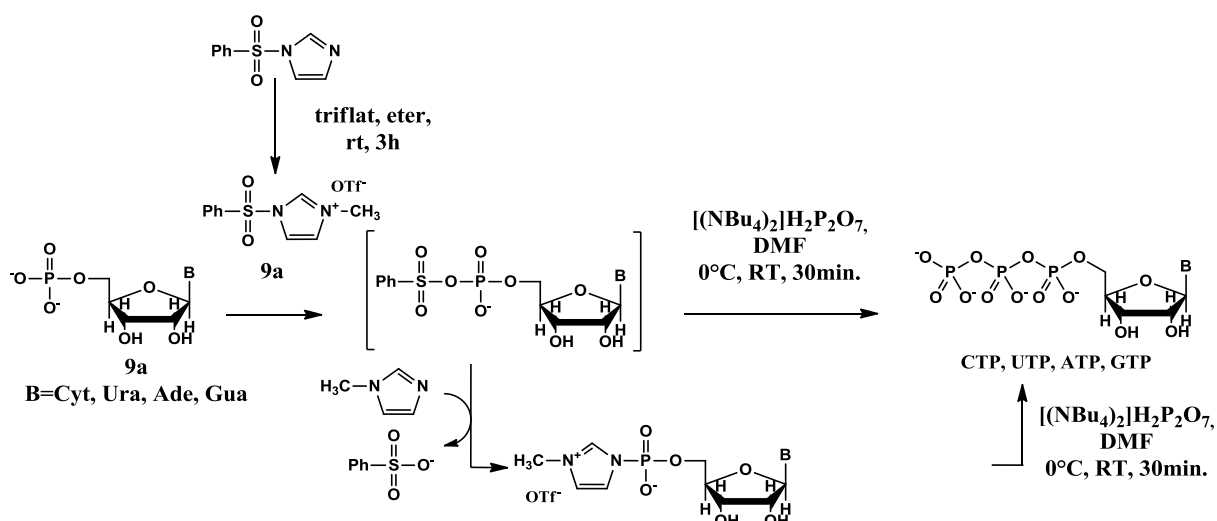
W roku 2009 Meier i in. rozszerzyli wykorzystanie triestru fosforanowego *cycloSal* **8c** - jako związku pośredniego do syntezy NTP w serii deoksy.^{78,79} Powstaje on w wyniku dwuetapowej reakcji. Najpierw w reakcji alkoholu 5-nitrosalicylowego z PCl_3 w pirydynie/ Et_2O w -20°C powstaje chlorofosforan 5-nitrosalicylowy **8a**. Po jego przyłączeniu do 3'-*O*-acetylo-2'-deoksytymidyny, a następnie utlenieniu *in situ* za pomocą Oxone'u (potasowy nadtlenek siarki) uzyskano triester fosforanowy **8c** z całkowitą wydajnością 91%. Schemat 8 przedstawia ścieżkę syntetyczną dla dTTP. Reakcja **8c** z pirofosforanem w DMF, oraz usunięcie grupy acetylowej prowadzi do powstania dTTP z wydajnością 80%. Takie podejście wymaga wprowadzenia *N,O*- grup ochronnych zasad egzocyklicznych ze względu na ich dużą reaktywność z czynnikami fosfitylującymi. Z uwagi na te ograniczenia, ATP, GTP, CTP i UTP otrzymano z 40-65% wydajnością, natomiast karbocykliczne pochodne tymidyny i urydyny zsyntetyzowano z wydajnością 18-19%.⁸⁰



Schemat 8: Triester fosforanowy *cycloSal* jako substrat w syntezie NTP.

5.2.1.5 Syntezy przez fosforan sulfonylu

W 2012 roku Taylor i in. opisał procedurę syntezy polifosforanów nukleozydów i ich analogów stosując sole sulfonyloimidazolu.⁸¹ Procedura ta okazuje się być efektywna w syntezie mono-, di- i trifosforanów nukleozydów, przy czym grupy funkcyjne tych nukleozydów nie wymagają uprzedniego zabezpieczenia. Sól sulfonyloimidazolu **9a** powstaje z wysoką wydajnością przez reakcję fenylosulfonyloimidazolu z trifluorometanosulfonianem metylu w eterze (Schemat 9). Poddanie tetra-*n*-butyloamoniowych soli NMP działaniu **9a** w obecności *N*-metyloimidazolu (NMI) lub *N,N'*-diizopropylloetyloaminy (DIPEA) jako zasady, a następnie wymiana za pomocą pirofosforanu *bis*(tetra-*n*-butylammoniumowego) pozwala uzyskać trifosforany z wysokimi wydajnościami rzędu 84-90%.

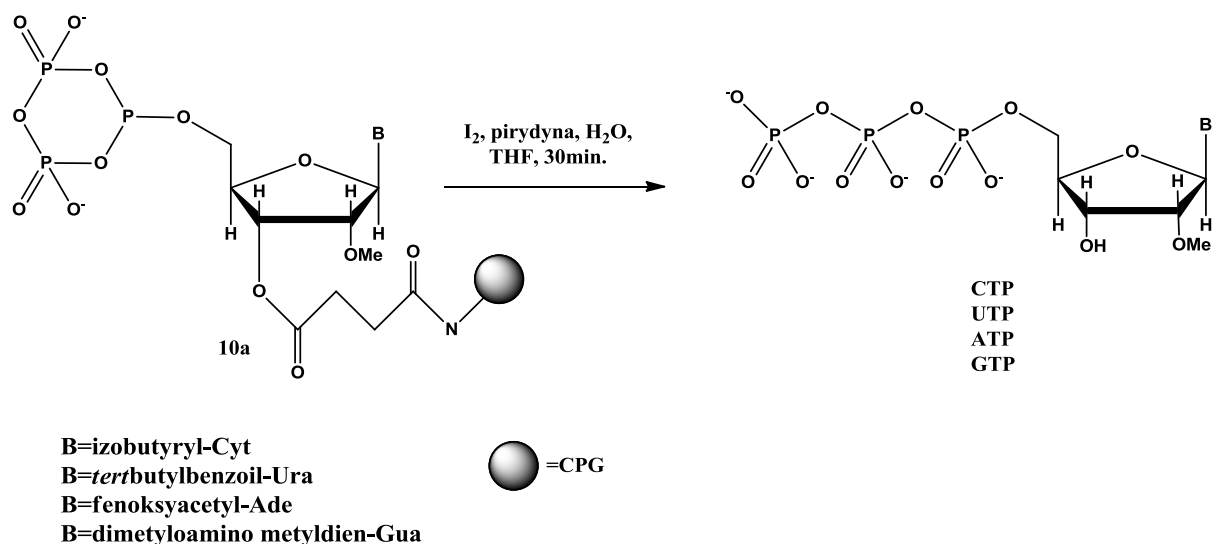


Schemat 9: Synteza polifosforanów nukleozydów i ich analogów z wykorzystaniem soli sulfonyloimidazolu.

5.2.2 Metody syntezy na podłożu stałym

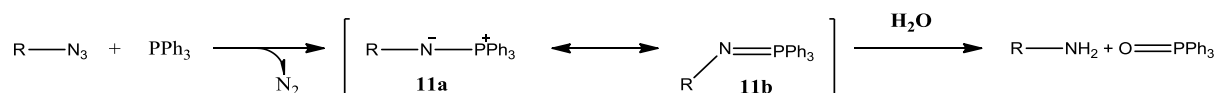
5.2.2.1 Metody wykorzystujące przyłączenie reszty cukrowej do podłoża

W latach 90-tych procedura trifosforylacji Ludwig'a-Eckstein'a zaczęła być wykorzystywana w syntezach na podłożu stałym. Grupa Gaur'a przeprowadziła syntezę 2'-*O*-metylo-rybonukleozydu 5'-trifosforanu na podłożu stałym używając łącznika bursztynianowego, który został przyłączony do CPG funkcjonalizowanego aminopropylem.⁸² Komercyjnie dostępne 5'-*O*-dimetoksytrytyl-*N*-acylo-2'-*O*-metylo rybonukleozydy immobilizowane na wspomnianym podłożu traktowano 3% roztworem kwasu trichlorooctowego w dichlorometanie, w celu usunięcia trytylowej grupy ochronnej, a następnie poddawano reakcji fosfitylacji z salicylochlorofosforanem. Po dodaniu soli pirofosforanu otrzymano charakterystyczne dla wyjściowej procedury produkty cykliczne **10a** (Schemat 10). Trifosforany 2'-*O*-metylo rybonukleozydów otrzymano z wydajnością 60-65%.



Schemat 10: Wykorzystanie procedury Ludwig'a do syntezy 2'-*O*-metylowanych NTP.

Schoetzau i in. opisali syntezę trifosforanów 2' i 3'-amino-5'-nukleozydowych stosując trifenylofosfinę (TPP) związaną na podłożu żywicznym.⁸³ W tym przypadku nie jest wymagany żaden dodatkowy łącznik, gdyż immobilizacja azydonukleozydów zachodzi według reakcji Staudingera pomiędzy trifenylofosfiną i azydkiem, gdzie poprzez usunięcie azotu dochodzi do powstania iminofosforanowego produktu pośredniego **11a-b** (Schemat 11). Pod wpływem wody poddawany jest on hydrolizie prowadząc do otrzymania pierwszorzędowej aminy i tlenku trifenylofosfiny.



Schemat 11: Reakcja Staudingera prowadząca do powstania iminofosforanowego produktu pośredniego.

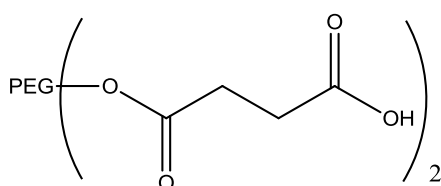
Synteza 3'-amino dNTP polega na połączeniu handlowo dostępnej żywicy polistyrenowej z TPP w celu utworzenia odpowiednich iminofosforanów, które następnie były substratami wykorzystanymi w procedurze Ludwig'a-Eckstein'a otrzymywania 3'-amino dNTP. Wydajność otrzymanych produktów wyznaczona za pomocą HPLC, była w zakresie od 70% do 75%. W przeciwieństwie do analogicznej reakcji prowadzonej w fazie ciekłej, widma ³¹P NMR końcowych produktów nie wykazały obecności produktów ubocznych, takich jak pirofosforan czy nieorganiczny cykliczny trifosforan, które zostały usunięte na etapie płukania przed reakcją utlenienia. Główną wadą tego podejścia jest ograniczona możliwość jej

stosowania do azydenukleozydów jako substratów i otrzymania 2'- lub 3'-amino NTP jako produktów

Trifosforany nukleozydów można również otrzymywać analogicznie jak w przypadku syntezy metodą fosfortriestrową za pomocą *cycloSal*'u, przy użyciu nukleozydów immobilizowanych na podłożu za pomocą linkera bursztynianowego.⁸⁴ Po ostatnim etapie całego szlaku syntetycznego można uzyskać dTTP z 90% wydajnością.

5.2.2.2 Metody wykorzystujące przyłączenie do podłoża poprzez zasady azotowe

W 2009 roku została zaprezentowana metoda przyłączenia nukleozydu do podłoża za pomocą labilnego łącznika bursztynianowego na komercyjnie dostępnym podłożu PEG₄₀₀₀-(OH)₂ (Rysunek 2). Połączenie przygotowanego podłoża z ugrupowaniem zasadowym nukleozydu otworzyło drogę do syntezy NTP. Polega ona na aktywowaniu przyłączonych monofosforanów nukleozydów za pomocą CDI, a następnie kondensacji powstałych pochodnych 5-fosforanoimidazolowych z pirofosforanem tris-tetra-n-butyloamoniowym.



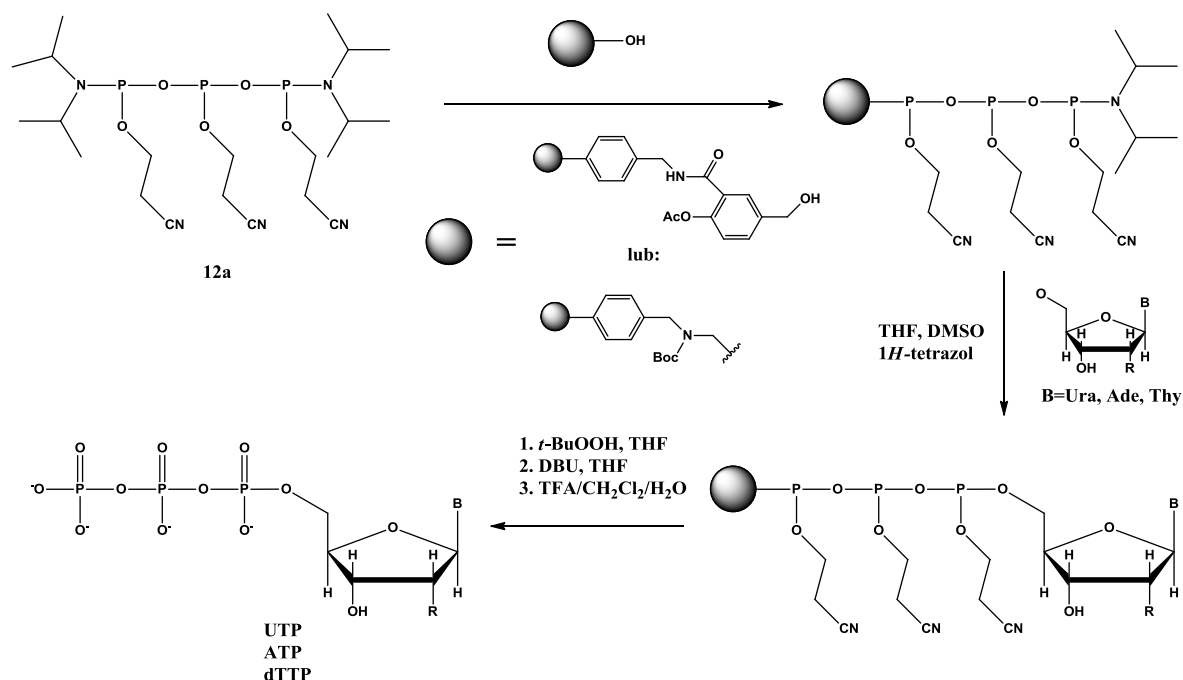
Rys. 2: Struktura łącznika bursztynianowego osadzonego na podłożu PEG₄₀₀₀-(OH)₂.

Odcięcie od podłoża wykonano za pomocą stężonego wodnego roztworu amoniaku, po czym produkty wyizolowano na kolumnie chromatograficznej z odwróconą fazą i za pomocą dializy. Otrzymano CTP, dCTP, ddCTP, araCTP i 3TCTP z 35-92% wydajnością i o 76-87% stopniu czystości. Poprawiło to znacznie wydajności względem analogicznej metody prowadzonej w roztworze.

W 2014 roku, Kore i Parang przedstawili metodę wykorzystującą łącznik jonowy. Użyta do tego celu 1-karboksylometylo-3-metyloimidazolowa (CMMIMBF₄) ciecz jonowa została otrzymana w dwuetapowej syntezie z kwasu bromooctowego i metyloimidazolu. Następnie do otrzymanej cieczy jonowej selektywnie zakotwiczone egzocykliczne grupy aminowe dC i dA, które były przemywane octanem etylu, dzięki czemu nieprzereagowane substraty organiczne przechodziły do górnej warstwy organicznej. Reakcja trifosforylacji była przeprowadzona standardową metodą Ludwig'a. Usunięcie jonowych łączników za pomocą wodorotlenku amonu pozwoliło uzyskać dCTP i dATP z odpowiednio 72% i 69% wydajnością.

5.2.2.3 Metody wykorzystujące łączniki polimerowe

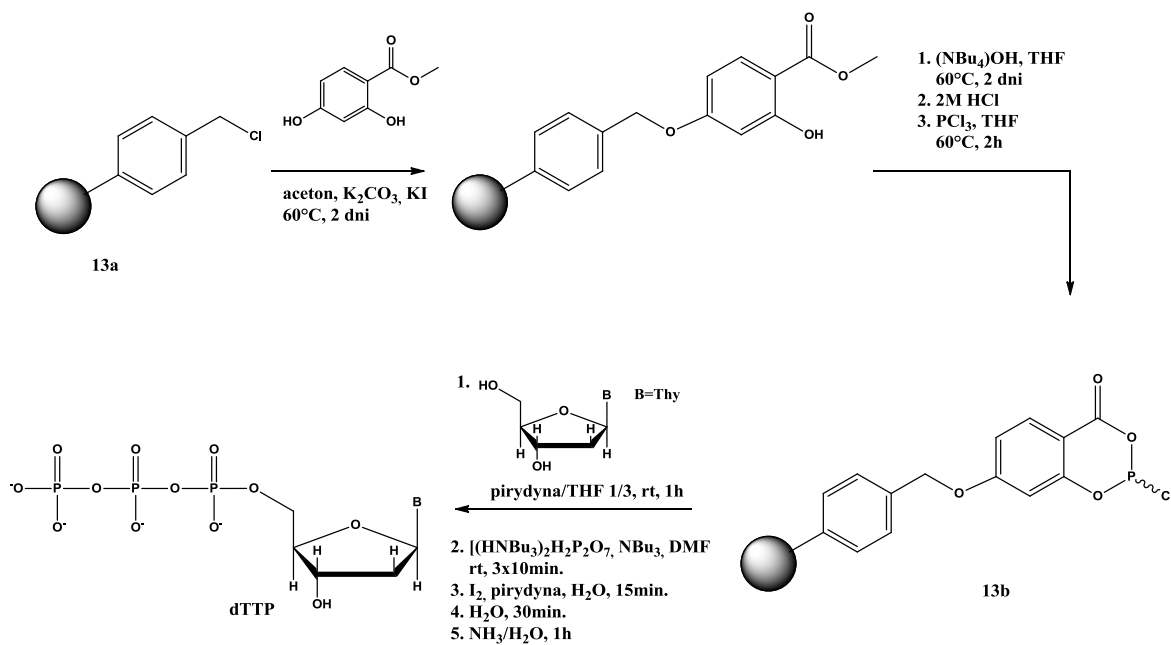
Trifosforany nukleozydów można uzyskać stosując czynnik fosfitylujący na podłożu polistyrenowym (Schemat 12).^{85,86} Został on otrzymany w wyniku reakcji podłoża polistyrenowego z czynnikiem fosfitylującym **12a** w obecności 1*H*-tetrazolu. Należy dodać, że czynnik ten otrzymano z 97% wydajności w czterech etapach, startując od PCl₃, który po syntezie powinien być przechowywany w temperaturze -20 °C (w tych warunkach jest stabilny przez około dwa tygodnie). Sprzężanie niezablokowanych nukleozydów (A, T, U, AZT), utlenianie *t*-BuOOH następnie usunięcie grupy cyjanoetylowej za pomocą DBU i końcowe odmycie z podłoża w warunkach kwasowych pozwoliło uzyskać NTP serii deoksy z 60-79% wydajnością.⁸⁷



Schemat 12: Metoda syntezy NTP za pomocą czynnika fosfitylującego immobilizowanego na podłożu stałym.

W 2007 roku, Bradley i Bruckler opracowali czynnik fosfitylujący immobilizowany na podłożu, który może być wykorzystany do otrzymania NTP.⁸⁸ Metoda ta, oparta na podejściu Ludwig'a-Eckstein'a wykorzystuje chlorofosforan **13b** przyłączony do podłoża chlorometylopolistyrenowego **13a** (Schemat 13). Tak przygotowany układ użyto do syntezy dTTP. W pierwszym etapie 3'-*O*-acetylo-tymidynę poddano reakcji z omawianym chlorofosforanem. Zgodnie ze standardową procedurą dodanie pirofosforanu bis(tri-nbutylammoniumowego) doprowadziło do powstania P(III)-P(V) cyklicznego produktu pośredniego, oraz dodatkowo

odłączenie od podłoża. Po utlenieniu, hydrolizie i usunięciu grup ochronnych (reakcje prowadzone w roztworze) otrzymano dTTP z wydajnością w zakresie od 4% do 50% w zależności od użytego podłoża. Najlepsza wydajność odpowiada zastosowaniu mikroporowatej żywicy polistyrenowej. Niemniej jednak była niższa niż analogicznie prowadzona reakcja w fazie ciekłej.



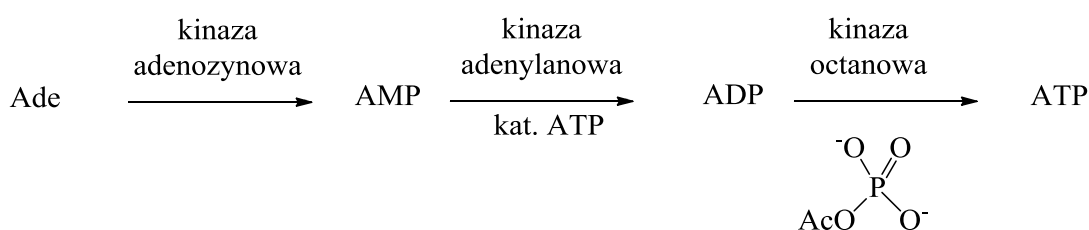
Schemat 13: Modyfikacja metody Ludwig'a-Eckstein'a wykorzystana w syntezie na podłożu stałym.

5.2.3 Metody enzymatyczne

Metody syntezy trifosforanów nukleozydów wspomagane enzymatycznie idealnie nadają się do pewnych zastosowań i mają ograniczoną wartość dla innych. Metody te są niezwykle przydatne przy otrzymywaniu naturalnych trifosforanów, zwłaszcza jeśli produkt może być stosowany bez oczyszczania lub jako mieszanina w połączeniu z innym systemem enzymatycznym do bezpośredniego użycia. Metody biokatalityczne mogą być również stosowane w syntezie trifosforanów nukleozydów z nienaturalnymi zasadami czy resztami cukrowymi, ale wymaga to dobrania takich enzymów, które będą tolerowały nienaturalne substraty i może się okazać się, że dla konkretnego przypadku takiego układu nie da się znaleźć. W konsekwencji, enzymatyczne metody syntezy nienaturalnych trifosforanów nukleozydów są opłacalne tylko wtedy, jeśli oczekiwane zalety takiego podejścia będą przewyższały koszty dodatkowego czasu poświęconego na dobór warunków. Metody chemiczne są prawdopodobnie bardziej korzystne niż enzymatyczne w przypadku otrzymywania małych ilości nowych

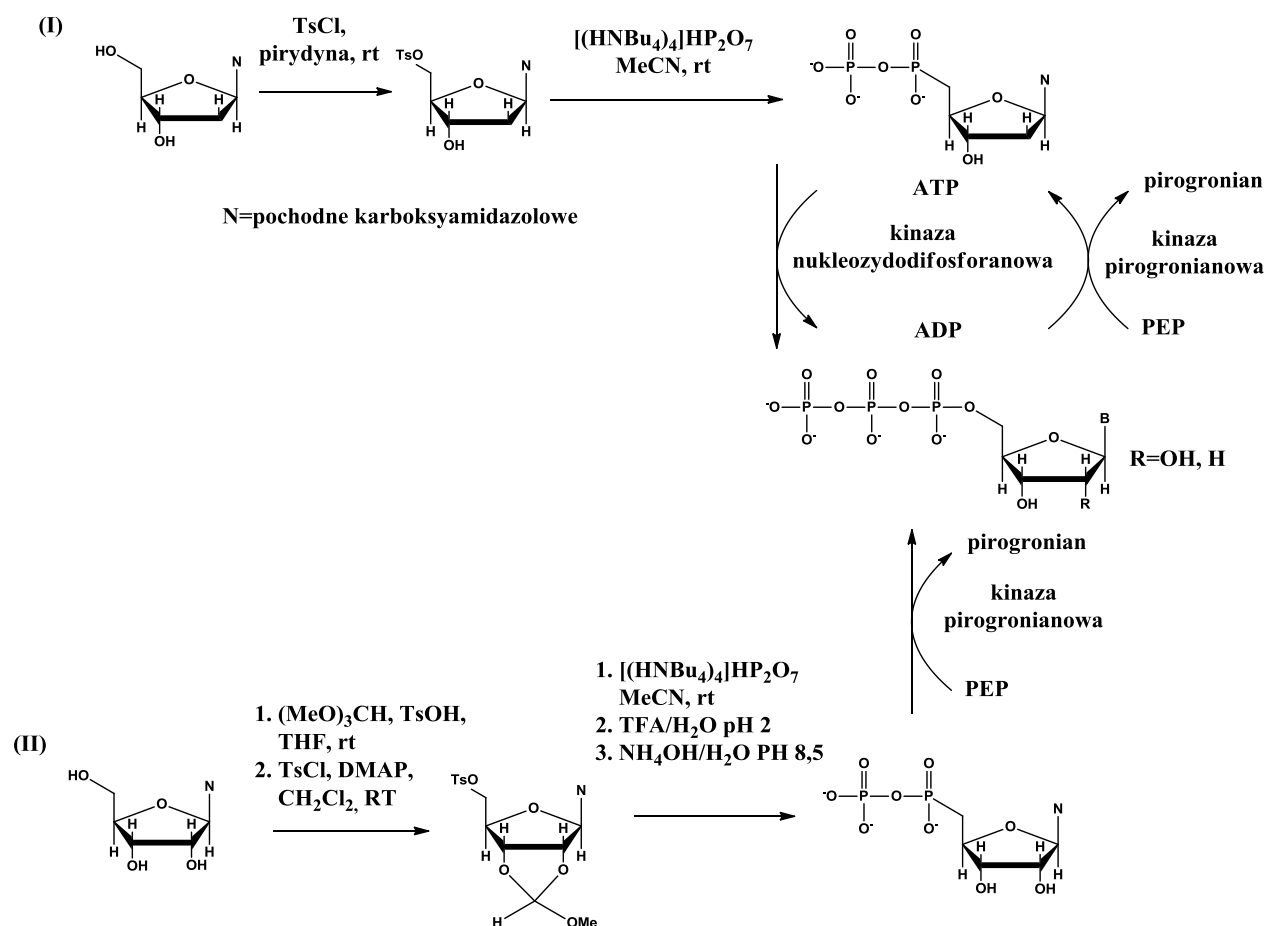
analogów trifosforanów nukleozydów, które nie mogą być substratami reakcji enzymatycznych.

Jednym z pierwszych podejść, które wykorzystywało reakcje enzymatyczną, było użycie mieszaniny trzech enzymów: kinazy adenozynej, kinazy adenyłanowej i kinazy octanowej do przekształcenia adenozynej w ATP z wydajnością 98% (Schemat 14).⁸⁹ Podobnie w biokatalitycznych konwersjach difosforanów nukleozydów do analogicznych trifosforanów stosowano różne kinazy, co pozwalało uzyskać zadowalające wydajności.⁹⁰ Udało się również uzyskać trifosforany α -³²P-znakowane przez połączenie metod chemicznych i biokatalitycznych.⁹¹



Schemat 14: Wysokowydajna metoda syntezy ATP z wykorzystaniem trzech kinaz.

W 2003 roku grupa badawcza Davisson'a wykorzystowała połączenie metod chemicznych i enzymatycznych do syntezy karboksamidazowych analogów (d)NTP, wykorzystując słabą selektywność kinazy nukleozydodifosforanowej w kierunku tych substratów (Schemat 15).^{92,93} Wcześniejsze typowo chemiczne metody syntezy tych analogów były zupełnie nieskuteczne. Odpowiednie difosforany zostały najpierw zsyntezowane w roztworze z 70-91% wydajnością. Wykorzystano reakcję selektywnego 5'-tosylowania odpowiednich pochodnych karboksamidazolowych, a następnie grupy 5'-toluenosulfonowe zastąpiono pirofosforanem *tris*(tetra-*n*-butyloamoniowym). W przypadku pochodnych rybo, 2',3' metoksymetylenowe grupy ochronne zostały wprowadzone przed reakcją tosylowania i zostały usunięte przed reakcją enzymatyczną. Opracowano dwie ścieżki enzymatyczne: (I) w przypadku analogów dNTP adenylotrifosforan służył jako donor fosforanu, a kinaza nukleozydodifosforanowa jako katalizator; układ ten był połączony z użyciem kinazy pirogronianowej i fosfoenolpirogronianu (PEP) do regeneracji ATP, (II) dla analogów NTP reakcję fosforylacji przeprowadzono za pomocą kinazy pirogronianowej z PEP jako donorem fosforanu.



Schemat 15: Połączenie metod chemicznych i enzymatycznych w syntezie karboksyamidazolowych analogów (d)NTP.

W 2007 roku Hennig i in. opisali enzymatyczną syntezę 5'-trifosforanów 5-fluorourydyny (5F-UTP) i 5-fluorocytydyny (5F-CTP) z wykorzystaniem zasady heterocyklicznej i rybozy lub odpowiedniego analogu nukleozydu jako związków wyjściowych.⁹⁴ Proces otrzymania docelowego trifosforanu obejmuje reakcję tworzenia monofosforanów z 5-fluorouracylu w reakcji z uracilo fosforybozylotransferazą (uraP) lub fosforylację 5-fluorocytydyny przez kinazę urydynową. Dwa kolejne etapy fosforylacji zachodzą pod kontrolą kinaz pirymidyno(pirH)-specyficznych oraz pirogronianianowych (pyrK) prowadząc do uzyskania końcowych produktów. Sposób ten pozwala uzyskać wszystkie nukleozydowe mono-, di- i trifosforanowe pochodne 5-fluorourydyny i 5-fluorocytydyny.

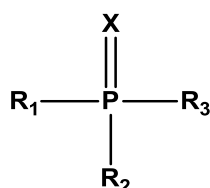
5.3 Identyfikacja fosforanów nukleozydów za pomocą ^{31}P NMR

Magnetyczny rezonans jądrowy fosforu (^{31}P NMR) jest techniką analityczną powszechnie stosowaną w badaniach struktur i reakcji chemicznych mono-, oligo- i polinukleotydów, ich analogów i pochodnych. Teoria przesunięć chemicznych dla ^{31}P NMR jest bardzo złożona i nie

jest tak dobrze rozwinięta jak w przypadku ^1H NMR. Prawdopodobnie dlatego trudno znaleźć (o ile to w ogóle możliwe) oprogramowanie do przewidywania widm fosforowych dla zadanych struktur. Niemniej istnieją pewne prawidłowości, które zostały zbadane i zestawione w kilku pracach przeglądowych dotyczących chemii fosforu. Typowy zakres przesunięcia chemicznego ^{31}P większości znanych pochodnych nukleotydów obejmuje region od 200 ppm do -30 ppm. Wiele pochodnych P(III), rezonuje przy niższych wartościach pola (200 ppm do 50 ppm), podczas gdy pochodne P(V) w zakresie wyższym (70 ppm do -30 ppm). Jak można wywnioskować z poniższego zestawienia, nie ma jednoznacznego związku pomiędzy przesunięciami chemicznymi ^{31}P NMR, a charakterem podstawników przy atomie fosforu. Jednak duża ilość danych doświadczalnych dla nukleotydów i ich pochodnych zgromadzona w spektroskopii ^{31}P NMR przez ponad 50 lat, pomogła wprowadzić prosty zestaw reguł, który jest przydatny w interpretacji zmian przesunięcia chemicznego dla jąder ^{31}P .⁹⁵

5.3.1 Fosfor P(V)

5.3.1.1 Fosforano mono-, di-, triestry oraz ich mono- i diamidy

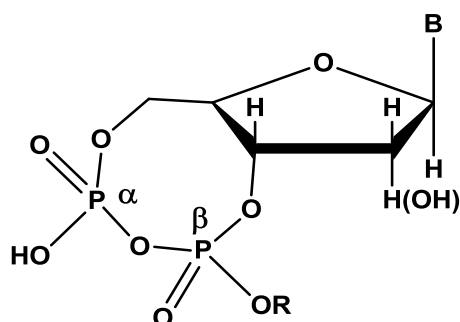


X	R ₁	R ₂	R ₃	δ, ppm	rozpuszczalnik
O	-OH	-OH	5'-O-Nukleozyd	1,2;	H ₂ O, pH 7,0; ⁹⁶
				2,8-3,6;	H ₂ O; ⁹⁷
				0,4 - 1,2	pirydyna ⁸⁰
O	-OH	-OH	3'-O-Nukleozyd	1,0	H ₂ O, pH 7,0 ⁷⁸
O	3'-O-Nukleozyd	-OH	5'-O-Nukleozyd	- 2,0 - 1,0	pirydyna ⁸⁰
O	-OAryl	-OH	5'- lub 3'-O-Nukleozyd	- (5,0 - 6,0)	1,4-dioksan; pirydyna ⁸⁰
O	-OAlkil	-OAlkil	5'- lub 3'-O-Nukleozyd	- (0,7 - 3,0)	pirydyna ⁸⁰
O	-OAryl	-OAlkil	5'- lub 3'-O-Nukleozyd (lub -O-Alkil)	- 7,7	pirydyna ⁸⁰
O	-OAlkil	-OAryl	5'- lub 3'-O-Nukleozyd	- (12,0 - 13,0)	pirydyna ⁸⁰
O	-NH ₂	-OH	5'- lub 3'-O-Nukleozyd	8,8-9,3	D ₂ O ⁸⁰
O	-NH -OAlkil	-OH	5'- lub 3'-O-Nukleozyd	5,0-6,5	pirydyna ⁸⁰

O	-NH Aryl	-OH	5'- lub 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	- 1,0	pirydyna ⁸⁰
O	5'-or 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	-NH ₂	5'- lub 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	10,8 - 12,1	D ₂ O, pirydyna ⁸⁰
O	5'-or 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	-NH-OAlkil	5'- lub 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	8,4-9,2	pirydyna ⁸⁰
O	5'-or 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	-NH Aryl	5'- lub 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	2,6 - 2,8	pirydyna ⁸⁰
O	5'-or 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	-NH Aryl	-O Aryl	- (2,2 - 2,8)	pirydyna ⁸⁰
O	5'-or 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	-NH Aryl	-NH Aryl	2,9	pirydyna ⁸⁰
S	-OH	-OH	5'- lub 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	43,5**	H ₂ O ⁸⁰
S	5'- <i>O</i> -Nukleozyd	-OH	5'- lub 3'- <i>O</i> -Nukleozyd	55,0 - 57,0**	H ₂ O ^{78, 80}
S	5'- <i>O</i> -Nukleozyd	-O-OAlkil (-CNEt)	3'- <i>O</i> -Nukleozyd	69,0**	H ₂ O ⁷⁸

** - dla dwóch diastereoizomerów

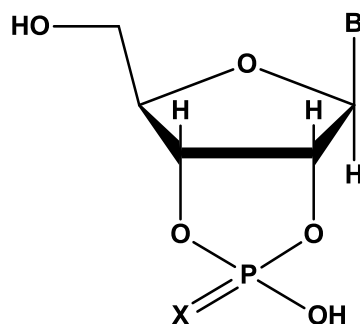
5.3.1.2 Nukleozydo 3', 5'-cyklofosforany



X	δ , ppm	rozpuszczalnik
O	- (1,5 - 2,0)	D ₂ O, pH 7,0 ⁸⁰
S	52,0 - 55,0**	pirydyna ⁸⁰

** - dla dwóch diastereoizomerów

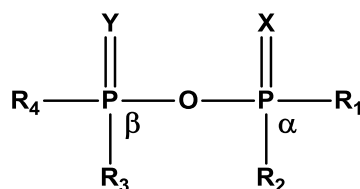
5.3.1.3 Nukleozydo 2', 3'-cyklofosforany



X	δ , ppm	Rozpuszczalnik
O	17,6 - 18,5	DMF, pirydyna; MeOH ⁸⁰
S	75,0 - 76,0**	H ₂ O ⁸⁰

** - dla dwóch diastereoizomerów

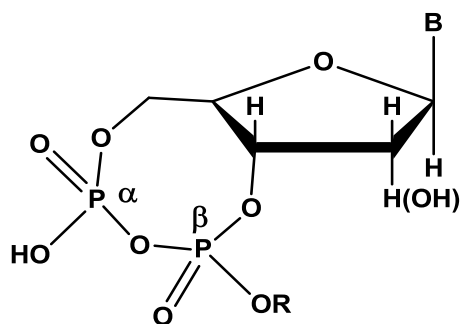
5.3.1.4 Pirofosforanowe pochodne nukleozydów



X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	$\delta\alpha$, ppm	$\delta\beta$, ppm	J _{$\alpha\beta$} , Hz	Rozpuszczalnik
O	O	5'-O-Nukleozyd	-OH	-OH	-OH	- 10	- 6	20,7	H ₂ O ⁷⁸
O	O	3'-O-Nukleozyd	-OH	-OH	-OH	- (10,0 - 11,0)	- (5,0 - 6,0)	21,4	H ₂ O ⁷⁸
O	O	5'-O-Nukleozyd	-OH	-OH	5'- lub 3'-O-Nukleozyd	- (10,0 - 11,0)	- 10	b,d	pirydyna ⁸⁰
O	O	5'-O-Nukleozyd	-OH	-OAryl	-OH	- 11,2	- 16,6	17	pirydyna ⁸⁰
O	O	5'-O-Nukleozyd	-OAryl	-OAryl	5'-O-Nukleozyd	- 19	- 19	n/a	pirydyna ⁸⁰
O	O	5'-O-Nukleozyd	-OH	-OH	-NH ₂	- 11,3	- 0,8	20	D ₂ O, pH 10,0 ⁸⁰
O	O	5'-O-Nukleozyd	-OH	-NHAryl	5'-O-Nukleozyd	- 11,2	- 6,8	17,5	pirydyna ⁸⁰
O	O	5'-O-Nukleozyd	-NHAryl	-NHAryl	5'-O-Nukleozyd	- (7,0 - 7,4)	- (7,0 - 7,4)	n/a	pirydyna ⁸⁰
S	O	5'-O-Nukleozyd	-OH	-OH	-OH	42,1**	- 6,3**	30,8	H ₂ O ⁸⁰
O	S	5'-O-Nukleozyd	-OH	-OH	-OH	- 11,7**	34,0* *	31,2	H ₂ O ⁸⁰

** - dla dwóch diastereoizomerów

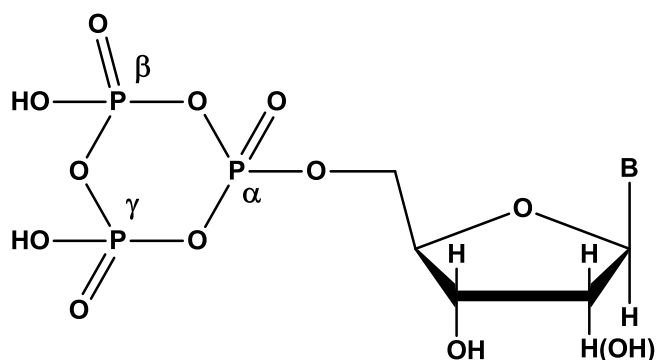
5.3.1.5 Nukleozydo 3', 5'-cyklopirofosforany



R	$\delta\alpha$, ppm	$\delta\beta$, ppm	$J_{\alpha\beta}$, Hz	Rozpuszczalnik
H	- 13,7	- 14,4	27,6	DMF ⁸⁰
3'-O-Nukleozyd	- 13,0	- 15,0	22,0	H ₂ O, pH 9,0 ⁸⁰

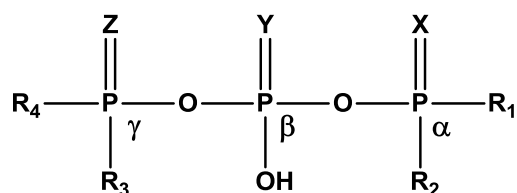
** - dla dwóch diastereoizomerów

5.3.1.6 Nukleozydo 5'-O-trimetafosforany



$\delta\alpha$	$\delta\beta$	$\delta\gamma$	$J_{\alpha\beta}$, Hz	$J_{\beta\gamma}$, Hz	$J_{\alpha\gamma}$, Hz	Rozpuszczalnik
- 23,0	- 24,0	- 24,6	23,5	23,0	23,7	pirydyna ⁸⁰

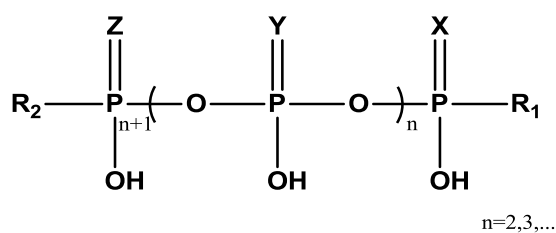
5.3.1.7 Trifosforanowe pochodne nukleozydów



X	Y	Z	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	δ _α , ppm	δ _β , ppm	δ _γ , ppm	J _{αβ} , Hz	J _{βγ} , Hz	Rozp.
O	O	O	-OH	-OH	-OH	-OH	-5,3 (d)	- 18,6 (t)	- 5,3 (d)			H ₂ O ⁷⁸
O	O	O	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	-OH	-(10,0 - 11,0) (d)	- (20,0 - 23,0) (t)	- (5,0 - 7,7) (d)	20	20	H ₂ O, pH 7, ^{78,79,80}
O	O	O	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	5'-O-Nuk.	-11,0 (d)	- 22,6 (t)	- 11,0 (d)	n/a	n/a	H ₂ O, pH 7,0 ⁷⁸
O	O	O	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	-OAryl	-14	- 24,5	- 19,7	n/a	n/a	DMF: pirydyna 1:1 ⁸⁰
O	O	O	5'-O-Nuk.	-Alkil	-OH	-OH	25,0 (d)**	- (23,5 - 24,0) **	- 9,7 (d)**	21,8	19,5	D ₂ O ^{78,99,100}
O	O	O	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	-NHAlkil	-11,8	- 22,0	- 3,6	22,5	22,5	DMSO: Pirydyna 1:1 ⁸⁰
O	O	O	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	-NHAryl	-11,4	- 23,0	- 10,2	n/a	n/a	H ₂ O, pH 11,0 ⁸⁰
S	O	O	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	-OH	42,0 - 44,0 **	- (21,1 - 22,0) **	- (4,7 - 9,6) **	23,0 - 31,8	19,3 - 20,5	H ₂ O, pH 7,0 ^{78,101}
O	S	O	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	-OH	-11,4 **	30,0 **	- 6,0 **	6,5	27,3	H ₂ O, pH 7,0 ⁸⁰
O	O	S	5'-O-Nuk.	-OH	-OH	-OH	-10,6	- 22,0	35,0	19,6	29	H ₂ O, pH 7,0 ⁸⁰

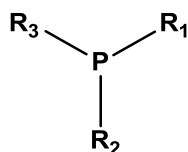
** - dla dwóch diastereoizomerów

5.3.1.8 Polifosforanowe pochodne nukleozydów



n	R ₁	R ₂	δρ ₁ , ppm	δρ _n , ppm	δn+1, ppm	J _{1,2} , Hz	J(n+1), Hz	Rozpuszczalnik
2	5'-O-Nukleozyd	-OH	- 11,0 (d)	- 22,7 (d)	- 10,3	19,0 - 22,0	19,0 - 22,0	H ₂ O
2,3	5'-O-Nukleozyd	5'-O-Nukleozyd	- (10,8 - 11,2) (d)	- 22,7 (d)	- (10,8 - 11,2) (d)	19,0 - 22,0	19,0 - 22,0	H ₂ O, pH 7, ^{78, 80}

5.3.2 Fosfor P(III)



R ₁	R ₂	R ₃	δ, ppm	Rozpuszczalnik
3'-O-Nukleozyd	-Cl	-OAlkil	165,0 - 170,0	*** ⁷⁹
3'- lub 5'-O-Nukleozyd	-N(Alkil) ₂	-OAlkil	149,0 - 150,0**	CD ₃ CN; CDCl ₃ ⁷⁸
-OAlkil	-N(Alkil) ₂	-N(Alkil) ₂	131,0 - 138,0	*** ⁷⁹
-Cl	-Cl	-Cl	215,0 - 220,0	*** ⁷⁹
-OAlkil	-Cl	-Cl	177,0 - 180,0	*** ⁷⁹
-OAryl	-OAryl	-Cl	153,0 - 157,0	*** ⁷⁹
-OAryl	-Cl	-Cl	176,0 - 184,0	*** ⁷⁹
-OAryl	-N(Alkil) ₂	-N(Alkil) ₂	131	*** ⁷⁹
-OAryl	-OAryl	-N(Alkil) ₂	141	*** ⁷⁹
3'- lub 5'-O-Nukleozyd	3'- lub 5'-O-Nukleozyd	-OAlkil	140,0 - 141,0**	CDCl ₃ ⁸⁰

** - dla dwóch diastereoizomerów; *** - patrz odnośnik literaturowy

5.4 Grupy ochronne stosowane w chemii nukleozydów

Grupy ochronne to jedno z podstawowych narzędzi używanych w syntezie chemicznej. Używanie grup ochronnych ma na celu umożliwienie selektywnej reakcji z konkretnym centrum reakcyjnym, bez ingerencji w inne potencjalnie reaktywne w danych warunkach miejsca cząsteczki. Wynika z tego możliwość kolejnego odsłaniania różnych centrów na poszczególnych etapach wieloetapowej syntezy. Z uwagi na obecność w nukleozydach wielu grup funkcyjnych i ich różną reaktywność, grupy ochronne odgrywają ważną rolę w chemii kwasów nukleinowych, w szczególności w kontekście syntezy oligonukleotydów.

Dobre grupy ochronne powinny umożliwiać selektywne zastosowanie i reagować z dobrą wydajnością. Ważne jest utrzymanie stabilności odpowiednio zablokowanych nukleozydów w zróżnicowanych warunkach reakcji oraz ewentualne współdziałanie z innymi grupami ochronnymi stosowanymi w obrębie cząsteczki. Nie powinny powodować powstawania dodatkowych centrów stereogenicznych i nie powinny posiadać dodatkowych grup funkcyjnych, których obecność mogłaby prowadzić do powstawania produktów ubocznych. Powinny również być łatwo i selektywnie usuwalne przy użyciu ogólnodostępnych czynników, których użycie jest nietoksyczne i nie prowadzi do degradacji innych substratów czy pożądaných produktów.

Grupy ochronne mogą pełnić też inne role: jako fluorofores¹⁰², wskaźniki do monitorowania postępów reakcji^{103,104}, wpływać na rozpuszczalność substratów, czy zmiany konformacyjne.¹⁰⁵ Co więcej grupy ochronne mogą również mieć wpływ na stereospecyficzność reakcji.

Z uwagi na dużą różnorodność grup ochronnych, ciężko wprowadzić jeden uniwersalny podział. Nie zawsze wystarczające jest proste rozróżnienie ze względu na budowę chemiczną samej blokady. Podstawowym kryterium jest podział ze względu na chronioną grupę funkcyjną. Jednak nawet w tym przypadku, możemy wprowadzić rozróżnienie ze względu na mechanizm usuwania grupy ochronnej. Oprócz powszechnie używanych grup kwaso- i zasadolabilnych, coraz większe zastosowanie znajdują grupy usuwane w wyniku procesów fizykochemicznych, takich jak utlenianie¹⁰⁶, protonacja¹⁰⁷, redukcja^{108,109}, światłoczułość¹¹⁰ czy zmiany temperatury.

Stosowanie różnych grup ochronnych dla poszczególnych grup funkcyjnych w obrębie cząsteczki, oraz łącząca się z tym konieczność używania odpowiadających im warunków deprotekcji wiąże się z różnego rodzaju problemami wpływającymi na efektywność całej syntezy. Po pierwsze można utracić możliwość selektywnego odblokowywania, przez co narazić się na powstawanie niepożądanych produktów ubocznych, czy wręcz brak możliwości kontynuowania zaplanowanego szlaku syntetycznego. Po drugie, co ma szczególny wpływ w reakcjach na materiale potencjalnie aktywnym biologicznie, można narazić się na toksyczne, czy mutagenne produkty powstające w wyniku usunięcia blokady. Przykładem są grupy 2-cyanoetylowe, które są często stosowane w ochronie centrum fosforowego w amidofosforynowej metodzie syntezy oligonukleotydów.¹¹¹ Podczas odblokowywania pod wpływem amoniaku, w wyniku β -eliminacji otrzymuje się ugrupowanie fosfodiestrowe oraz akrylonitryl jako produkt uboczny. Wykazano, że warunkach odblokowania ma on tendencję do alkilowania zasad nukleinowych.¹¹²

Należy również wspomnieć, że odczynniki używane do deprotekcji często są trudno dostępne i znacząco zwiększają koszty. W kontekście wspomnianych niedogodności poszukuje się innych metod usuwania grup ochronnych. Podczas foto-litograficznej syntezy deoksy oligonukleotydów na powierzchni szklanej, do ochrony centrum amidofosforynowego w pozycji 5' użyto fotolabilnej grupy 3',5'-dimetoksybenzoinyloksykarbonylowej. Jest ona łatwo usuwalna pod wpływem promieniowania UV o długości fali 310nm w niepolarnym rozpuszczalniku lub bez jego użycia.¹¹³ Z kolei w ochronie grup 5'-/3'-hydroksylowych (tą samą metodą), znalazły zastosowanie grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowa¹¹⁴ i 2-(2-nitrofenyl)propyloksykarbonylowa¹¹⁵, usuwane pod za pomocą UV o długości fali 365 nm. Niestety możliwości płynące z zastosowania takich warunków, niosą ze sobą zagrożenia w postaci reakcji ubocznych w obrębie oligonukleotydu, indukowanych użytym promieniowaniem.

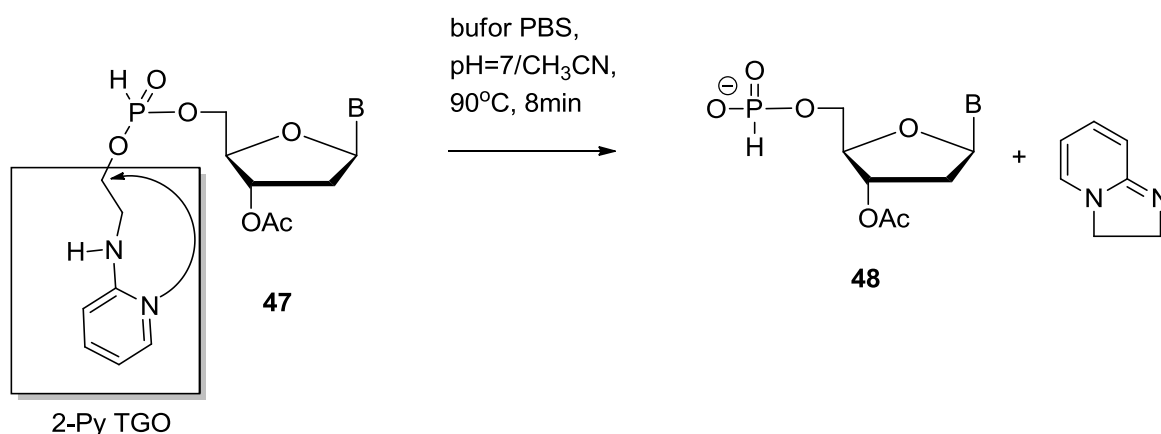
5.4.1 Termolabilne grupy ochronne

Ciekawą koncepcją pozwalającą przynajmniej częściowo rozwiązać problemy z doбором chemicznych i fizycznych czynników odblokowujących, jest użycie termolabilnych grup ochronnych (TGO). Jest to stosunkowo nowe podejście w chemii bioorganicznej, w którym grupy ochronne charakteryzują się określoną zależnością od temperatury otoczenia, przy czym podniesienie temperatury skutkuje usunięciem blokady z ochranianej grupy funkcyjnej. Zazwyczaj termolabilna grupa blokująca jest efektywnie usuwana w wyniku podwyższenia

temperatury w środowisku obojętnym, według mechanizmu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Wśród stosowanych z powodzeniem wariantów TGO wyróżnić można kilka użytecznych przykładów, takich jak: grupa 2-(*N*-formylo-*N*-metyloamino)etylowa, 4-oksopentylowa, 3-(*N*-*tert*-butylokarboksyamido)-1-propylowa, 3-(2-pirydylo)-1-propylowa, czy cały szereg grup 2-benzoamidoetylowych. Przykłady TPG przedstawione w literaturze wskazują, że grupy zawierające ugrupowanie 2-pirydynylowe charakteryzują się najlepszymi parametrami. Ustalono, że reszta *N*-(2-pirydylowa) jest bardzo skutecznym centrum nukleofilowym co doprowadziło do zaprojektowania wielu wariantów 2-pirydylowych grup ochronnych.

5.4.1.1 2-Pirydynylowe Termolabilne grupy ochronne

Szczególnym przypadkiem grup ochronnych są 2-pirydynylowe termolabilne grupy ochronne (2-PyTGO), dla których dokładnie określono mechanizm wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji oraz wskazano zastosowanie w ochronie funkcji hydroksylowej¹¹⁶, fosforanowej¹¹⁷ lub karboksylowej.¹¹⁸ Prekursorami tych grup są alkohole 2-(*N*-pirydynylo)aminoetylowe *N*-(2-PAE), które po raz pierwszy otrzymali w roku 1949 Weiner i Kaye.¹¹⁹ Grupy 2-PyTGO posiadają możliwość łatwej modyfikacji poprzez podstawienie grup funkcyjnych (np. w pierścieniu pirydyny), które mają duży wpływ na stabilność oraz funkcjonalność grupy ochronnej. Najważniejszą cechą tych grup ochronnych jest ścisła zależność procesu odblokowania od temperatury. Odblokowanie bazuje na unikalnym mechanizmie polegającym na wewnątrzcząsteczkowym ataku nukleofilowego endogennego atomu azotu na elektrofilowy atom węgla α łańcucha etylenowego (Schemat 16).



Schemat 16: Przykład 2-Pirydynylowej TGO w ochronie centrum fosforanowego nukleozydu.

Na podstawie badań strukturalnych wykazano ścisłą zależność pomiędzy konformacją cząsteczki determinowaną rodzajem podstawnika w pozycji 2-aminopirydynylowej a szybkością odblokowania 2-Py TGO.¹²⁰ W toku prowadzonych badań nad termolabilnymi grupami ochronnymi określono, że wprowadzenie ugrupowania benzyłowego, wprowadzenie podstawników w pierścieniu pirydynowym czy umieszczenie podstawnika przy węglu α znacznie wpływa na stabilność całej grupy termolabilnej. Istotną rolę w stabilności cząsteczki odgrywają również podstawniki umieszczone w pierścieniu benzyłowym w pozycji para i meta oraz podstawniki w pierścieniu pirydynowym w pozycji 4 i 6. Wprowadzone w pierścieniu benzyłowym atomy fluoru wpływają na szybkość reakcji termocyklizacji poprzez słabe wewnątrzcząsteczkowe oddziaływanie wodorowe, powodując spowolnienie odblokowania w niższych temperaturach.¹¹⁶ Objętościowy podstawnik w pozycji 6 pierścienia pirydyny może spowalniać reakcję termocyklizacji poprzez efekt przestrzennej zawady sterycznej. Pozycja 4 pierścienia pirydyny jest korzystna do zastosowania podstawników oddziałujących z atomem azotu poprzez efekt indukcyjny. I tak wprowadzenie silnie wyciągającego elektrony podstawnika nitrowego znacząco hamuje reakcję termocyklizacji, a jego zmiana na podstawnik aminowy znacznie ją przyspiesza. Przebadano parametry wpływające na wewnątrzcząsteczkową termocyklizację, co w konsekwencji pozwoliło na wybór optymalnej kombinacji i zaprojektowanie wydajnej i użytecznej termolabilnej grupy ochronnej. Dodatkowo użyteczność tych grup wzrasta poprzez fakt obserwowanej naturalnej fluorescencji, która może być dodatkowo wykorzystana, jako element monitorujący poziom zabezpieczenia grupy funkcyjnej.

5.4.1.2 Termolabilne grupy ochronne stosowane w ochronie centrum fosforowego

W 2001 roku, Beaucauge i in. zaproponowali całą serię termolabilnych grup 2-(*N*-formyl-*N*-metylo)aminoetylowych,¹²¹ które w formie amidofosforynu deoksyrybonukleozydu zastosowano w syntezie kwasu oktadekatymidylinowego na podłożu stałym - monomer do potencjalnego zastosowania w wytwarzaniu oligonukleotydów terapeutycznych. Grupę tę można łatwo usunąć z oligonukleotydów w procesie termicznej cyklodeesteryfikacji w pH 7,0 w czasie krótszym niż 3 godziny w 90°C, otrzymując odpowiedni monofosforan i eliminując konieczność użycia stężonego wodorotlenku amonu.

Analogicznie działającą grupą stosowaną do ochrony grup fosforanowych i tiofosforanowych w syntezie oligonukleotydów na fazie stałej jest grupa 3-(*N*-*tert*butylokarboksy-amido)-1-propylowa¹²². Jej skuteczność została potwierdzona w syntezie

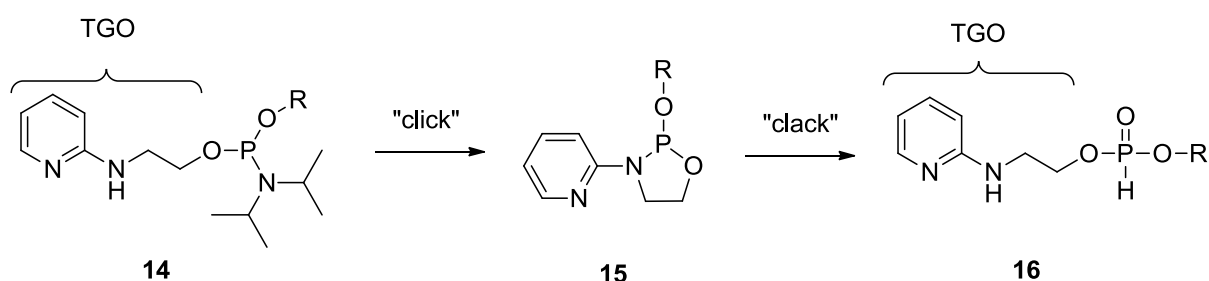
d(ATCCGTAGCTAAGGTCATGC) oraz jego analogu tiofosforanowego z wydajnością porównywalną jak w przypadku użycia grup 2-cyjanoetylowych. Jest ona łatwo usuwalna w ciągu 30 minut po ogrzewaniu w temperaturze 90°C w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) w pH 7,2. Reakcja przebiega szybko, a grupa blokująca odchodzi w formie soli 2- (*tert*butylimino)tetrahydrofuranu.

W tym samym kierunku przebadano i udowodniono właściwości termolabilne grup: 2-[*N*-(2-fluoroacetylo)amino]-1-fenyletylowej, 2-(*N*-acetylamino)etylowej, 2-(*N*-acetylo-*N*-metyloamino)etylowej, 2-(*N,N*-dimetyloaminokarbonyloksy)etylowej, 4-oksopentylowej, 3-(*N,N*-dimetylo-karboksy-amido)-1-propylowej, (2-pirydylo)-1-propylowej i kilku pochodnych grupy 2-benzoamidoetylowej.

Ważną rolę w ochronie centrum fosforowego pełnią opisywane wcześniej 2-Py TGO. Za mechanizm ich usuwania z centrum fosforanowego odpowiada wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja inicjowana nukleofilowym atakiem endogennego atomu azotu, z jednoczesnym odejściem anionu fosforanowego. Temperatura ma w tym przypadku bardzo duży wpływ na kinetykę reakcji, znacznie przyspieszając termocyklizację powyżej 50°C, jednocześnie zmniejszając stabilność układu w temperaturze otoczenia. Grupy te okazały się jednak bardziej nietrwałe niż inne grupy chroniące centrum fosforanowe. Stanowi to problem podczas przechowywania form blokowanych oraz ogranicza liczbę możliwych do przeprowadzenia etapów syntezy, co jest szczególnym utrudnieniem w przypadku syntezy oligonukleotydów. Aby wyeliminować tę wadę, w celu zwiększenia odporności termicznej 2-Py TGO zaproponowano tymczasowe sprzężenie centrum fosforowego w strukturę cykliczną.¹²³

W trakcie prowadzonych badań stwierdzono, że *O*-[*N*-(2-pirydynylo)aminoetylo]*N,N,N',N'*-tetraizopropilo amidofosforyn wobec nadmiaru słabego kwasu w warunkach bezwodnych przez 3 godziny, ulega cyklizacji do 2-*N*-izopropilo-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny. Cyklizacja 2-pirydylowej TGO zachodzi w wyniku nukleofilowego ataku egzocyklicznego azotu na atom fosforu. Siłą napędową reakcji cyklizacji jest obecność dobrej grupy opuszczającej. W zależności od grupy opuszczającej proces ten może zachodzić spontanicznie (w przypadku gdy grupą opuszczającą jest jon chlorkowy) lub jest indukowana protonowaniem (wtedy gdy grupą odchodzącą jest amina). Produkt cyklizacji może być oczyszczony i wyizolowany na kolumnie z żelom krzemionkowym lub w niektórych przypadkach w wyniku krystalizacji.

Metodologię czasowej ochrony własności termolabilnych TGO nazwano "*click-clack*", ponieważ posiada kilka cech tzw. chemii „*click*”.¹²⁴ Podejście to zwiększa stabilność 2-pirydylowej TGO (**14**) tymczasowo tworząc pięcioczłonowy pierścień oksazafosolidyny (**15**) (tzw. „kliknięcie”) co blokuje możliwość nukleofilowego ataku azotu *N*-pirydylowego na atom węgla i całkowicie stabilizuje cząsteczkę termicznie w standardowych warunkach usuwania 2-Py TGO. Oksazafosolidyny są podatne na hydrolytyczne otwarcie pierścienia. Liniową formę TGO, a co za tym idzie jej początkowe właściwości termolabilne, można łatwo odzyskać na drodze hydrolizy kwasowej („*clack*”). W efekcie tego przekształcenia powstaje *H*-fosfonianu diestru (**16**) (Schemat 17). Oderwanie TGO jest bardzo łatwe dzięki procesowi termocyklizacji i trwa około 10 minut w temperaturze 90°C z wytworzeniem *H*-fosfonian monoestru.



Schemat 17: Mechanizm "*click-clack*" – czasowa dezaktywacja i odtworzenie właściwości termolabilnych 2-pirydynylowej grupy ochronnej.

TGO jako propozycja grup ochronnych nie wymaga stosowania drastycznych warunków podczas reakcji jej wprowadzania i usuwania oraz może być stosowana w środowisku wodnym. Usuwanie grupy termolabilnej zachodzi w pH=7 i jest indukowane podwyższeniem temperatury.

W tym kontekście wytworzenie formy TGO w postaci pierścienia oksazafosolidyny gdzie termolabilne właściwości są „zamrożone”, a jednocześnie łatwe do odtworzenia, otwiera drogę do szerokiego zastosowania TGO w praktyce. Grupy te mogą znaleźć zastosowanie w biologii chemicznej gdzie bada się złożone układy występujące w organizmach żywych metodami dobrze poznanymi przez chemików. Badanie układów biologicznych wymaga zastosowania do manipulacji cząsteczkami biologicznymi takich metod chemicznych, które funkcjonują np. w układach wodnych.

5.4.1.3 Termolabilne grupy ochronne stosowane w ochronie grup hydroksylowych

Doświadczenia z blokowaniem centrum fosforowego doprowadziły do zbadania właściwości węglanów w procesie ochrony grup 5'-hydroksylowych podczas syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym.¹²⁵ W tym celu zaprojektowano szereg przestrzennie rozbudowanych grup funkcyjnych tworzących estry kwasu węglowego w pozycji 5'-nukleozydu. Sposób takiego zabezpieczania grupy hydroksylowej, polega na przekształceniu *N*-(2-pirydylo)aminoetanolu [*N*-(2-PAE)] w termolityczny węglan. Istotą procesu odblokowania jest wewnątrzcząsteczkowa, indukowana termicznie cyklodekarbonizacja, wynikająca z oddziaływania pomiędzy azotem z pierścienia pirydyny i elektrofilowym atomem węgla (C8). Rezultatem wewnątrzcząsteczkowej termocyklizacji TGO jest bicykliczny produkt uboczny i odtworzenie grupy 5'-hydroksylowej z jednoczesnym uwolnieniem dwutlenku węgla.

W zależności od użytej modyfikacji i polarności użytego rozpuszczalnika uzyskano różne wydajności odblokowania. Podejście to pozwoliło z szeregu pochodnych wytypować dwie grupy potencjalnie najlepsze do tego celu: 2-(2-pirydylo)amino-1-fenyletylową oraz 2-[*N*-metylo-*N*-(2-pirydylo)]aminoetylową, które ulegają deprotekcji w przedziale do 60 minut w środowisku neutralnym. Pozostałe przebadane modyfikacje wykazywały małą stabilność w warunkach przechowywania, lub powodowały 3'-*O*-deacylację nukleozydu w warunkach podwyższonej temperatury.

Zaletą opisanych TGO względem znanych wcześniej węglanów fotolabilnych, jest brak tworzenia się wolnych rodników podczas reakcji deprotekcji.

5.4.1.4 Termolabilne grupy ochronne stosowane w ochronie zasad azotowych

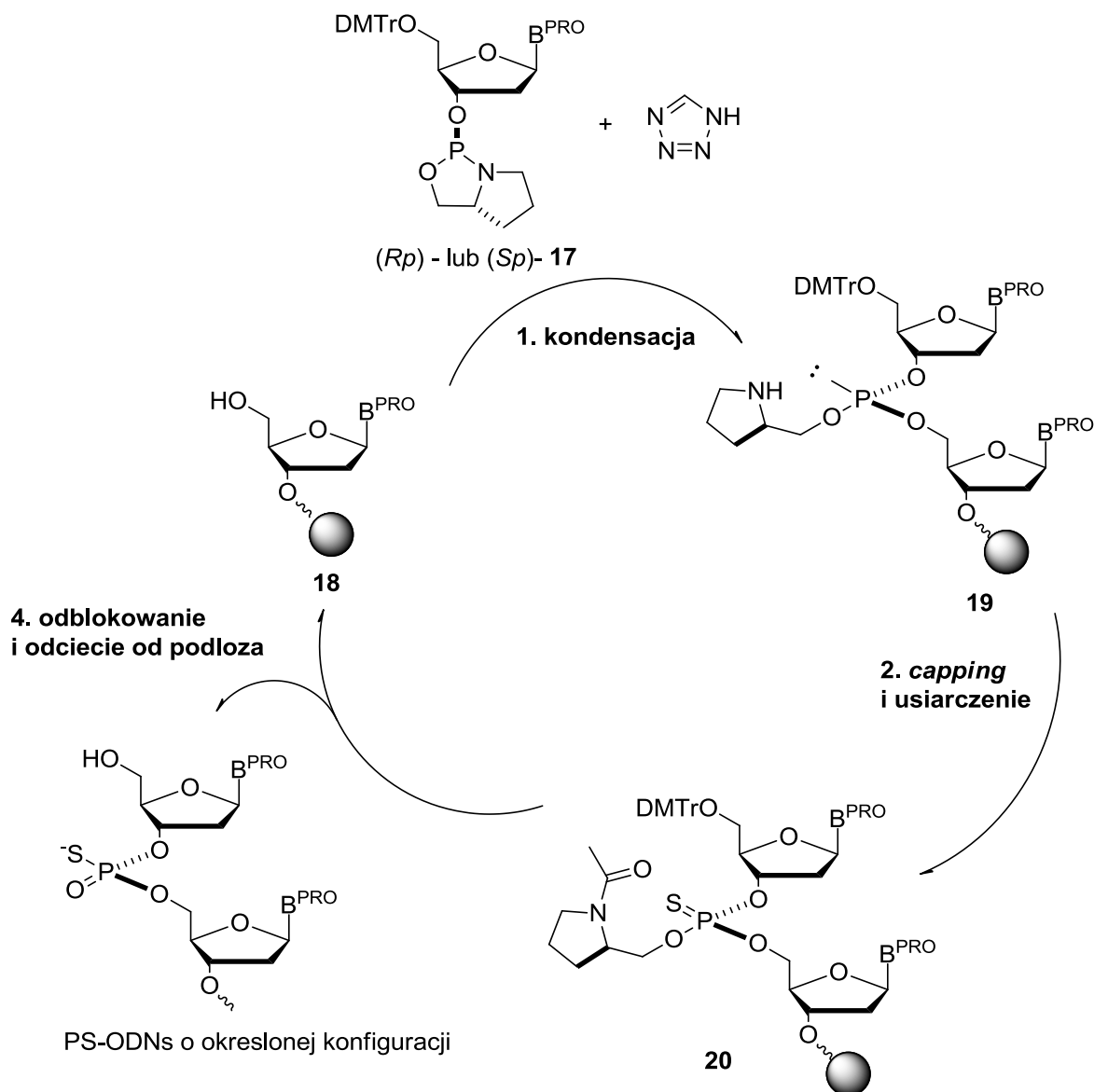
W 2007 roku grupa Sekine pokazała termolabilne właściwości grup karbamoilowych i zaprezentowała ich skuteczność w ochronie nukleozasad.¹²⁶ Ponieważ ochrona tych funkcji w syntezie kwasów nukleinowych metodą amidofosforynową jest wymagana tylko w przypadku cytydyny i adenozyiny, skupiono się jedynie na tych nukleozydach. Przyłączanie odpowiednich pochodnych karbamoilowych do nukleozydów można osiągnąć selektywnie z bardzo dużą wydajnością (87-99%). Najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku pochodnych *N*-arylokarbamoilowych i *N*-(fenylosulfonylo)karbamoilowych, które były stabilne w temperaturze pokojowej, a ulegały całkowitemu odblokowaniu w 80°C w czasie maksymalnie 60 minut.

5.5 Oksazafosfolidyny i ich zastosowanie w syntezie analogów nukleozydów

Chemicznie syntetyzowane oligonukleotydy i ich analogi są wykorzystywane w wielu zastosowaniach, np. diagnostycznych, terapeutycznych, czy nanotechnologii. Wynikające z tego w ostatnich latach rosnące zapotrzebowanie skłania do szukania bardziej efektywnych sposobów ich syntezy niż konwencjonalna metoda amidofosforynowa. Jednym z najbardziej obiecujących do tej pory podejść jest stosowanie monomerów bez ochrony zasad nukleinowych, co zwiększa wydajność syntezy przez wyeliminowanie co najmniej kilku etapów zabezpieczania i odbezpieczania. Do syntezy oligonukleotydów bez ochrony zasad nukleinowych potrzebna jest wysoce *O*-chemoselektywna kondensacja pomiędzy atomem fosforu jednostki monomerowej, a terminalną grupą hydroksylową oligonukleotydu w obecności wysoko reaktywnej niezabezpieczonej grupy aminowej nukleozasady. Stwierdzono, że pięcioczłonowe pierścienie fosfolidynowe są bardzo użyteczne w kontroli stereospecyficzności centrum fosforowego.¹²⁷

Agrawal i in. opracowali syntezę 3'-*O*-oksazafosfolidynowych pochodnych nukleozydów i sposób ich wykorzystania jako jednostek monomerowych w syntezie tiofosforanów oligonukleotydów (Schemat 18).¹²⁸ Monomery **17** zsyntetyzowano przez reakcję odpowiednio chronionych w pozycji 3'-OH nukleozydów z prolinolową pochodną 2-chloro-[1,3,2]-oksazafosfolidyny. Otrzymano stereoselektywnie wyłącznie izomery *trans* zarówno L- i D-prolinoli. Reakcje kondensacji monomerów oksazafosfolidynowych **17**, aktywowane 1 *H*-tetrazolem (jak w przypadku innych powszechnie używanych monomerów w metodzie amidofosforynowej) nie były stereospecyficzne. Uzyskana diastereoselektywność wahała się między od *Rp*: *Sp* = 10:90 do 14:86 dla (*Sp*) oraz *Rp*: *Sp* = 93:7 do 91:9 dla (*Rp*). Częściowa utrata diastereoczystości może być powodowana powtarzalnymi atakami nukleofilowymi 1 *H*-tetrazolu na chiralny atom fosforu, prowadząc do jego epimeryzacji. Kolejne reakcje kondensacji dwóch otrzymywanych izomerów i/lub jego tetrazolidowych produktów pośrednich powodowały powstawanie mieszaniny diastereoizomerycznych produktów. Mimo, że stereoselektywność nie jest wysoka, to metoda ta pozwala uzyskiwać stosunkowo długie oligomery tiofosforanowe w automatycznej syntezie DNA przy użyciu standardowo dostępnych protokołów. Wszystkie (*Rp*) - i (*Sp*)- 18-20-mery, w tym te, które zawierają mieszaninę konfiguracji zsyntetyzowano ze średnio 98% wydajnością na jeden cykl.

Stereoselektywność w tym przypadku jest zależna od struktury monomerów, aktywatora i warunków reakcji.



Schemat 18: Cykl syntetyczny dla PS-ODNs o określonej konfiguracji przy użyciu monomerów oksazafosfolidynowych – pochodnych prolinolowych.

Hayakawa i in. donoszą, że stereoselektywność reakcji prolinolowej 2-chloro-[1,3,2]-oksazafosfolidyny z nukleozydem w fazie ciekłej wahała się od $R_p: S_p = 86:14$ do $> 99:1$ (D-prolinolowe monomery) i od $R_p: S_p = 29:71$ do $1:99$ z L-prolinolowymi odpowiednikami w zależności od użytego aktywatora.¹²⁹ Najlepsze wyniki uzyskuje się stosując triflat *N*-fenyloimidazolu (PhIMT)¹³⁰ lub triflat benzoimidazolowy (BIT),¹³¹ przy czym stereoselektywność była nieznacznie niższa na podłożu stałym (do 94:6). Z kolei monomery pochodne efedryny, okazały się w tym przypadku nieskuteczne ($R_p: S_p = 40:60$) w warunkach

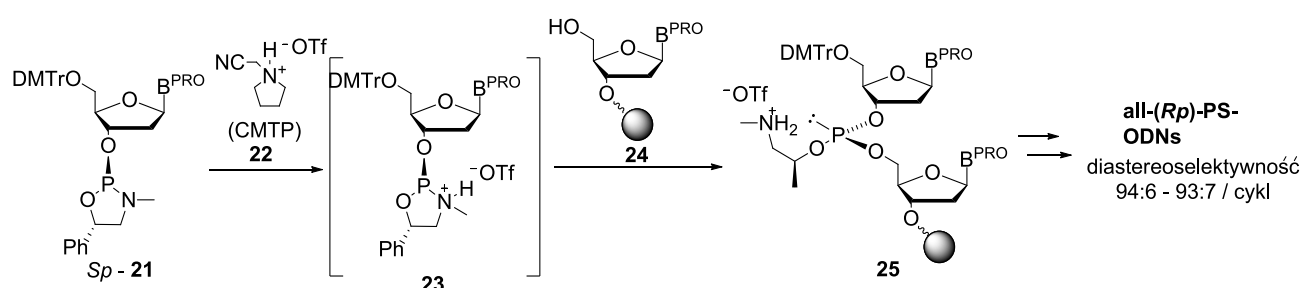
podobnych do tych stosowanych przy z pochodnych prolinolowych. Z kolei L-prolinolowo-oksazafosfolidynowe pochodne 2'-*O*-metylowanych rybonukleozydów pozwoliły uzyskać tiofosforany (*Sp*) z diastereoselektywnością od *Rp*: *Sp* = 2:98 do 4:96, przy czym D-prolinolowe pochodne pozwalały uzyskać (*Rp*) dimery ze znacznie niższą stereoselektywnością od *Rp*: *Sp* = 76:24 do 63:37. Oznacza to, że oddziaływania przestrzenne w rybonukleozydach są ważnym czynnikiem w stereoselektywnej syntezie *P*-chiralnych rybooligonukleotydów.

Just i in. zbadali zależność między uzyskiwaną stereoczystością a temperaturą. Zsyntetyzowali szereg 3'-*O*-oksazafosforinowych pochodnych tymidyny i zastosowali je w syntezie dimerów TT w różnych warunkach reakcji.¹³² Uzyskali doskonałą diastereoselektywność przy niskich temperaturach: *Rp*: *Sp* = 1:40 w temperaturze 0°C do 1:68 w -15 °C (2-bromo-4,5-dicyjanoimidazol, CHCl₃), natomiast znacznie niższą diastereoselektywność zaobserwowano w temperaturze pokojowej (*Rp*: *Sp* = 1:6, 2-bromo-4,5-dicyjanoimidazol MeCN).

Podsumowując, można uniknąć konieczności chromatograficznego rozdziału diastereomerycznych monomerów stosując monomery syntetyzowane w sposób stereoselektywny. Wśród nich są te, które mogą być aktywowane słabymi kwasami, ponieważ są kompatybilne z metodą amidofosforynową, a do syntezy oligomerów mogą być użyte przy użyciu automatycznych syntetyzerów. Niestety problematyczna jest pewna utrata diastereoczystości podczas kondensacji aktywowanej kwasem. Trudno jest opracować stereospecyficzne aktywatory kondensacji zarówno dla analogów rybo- jak i 2'-*O*-deoksyrybonukleotydów. Diastereoselektywność można co prawda poprawić przez zmniejszenie temperatury, ale takie podejście nie nadaje się do syntez na zautomatyzowanym syntetyzerze.

W kontekście powyższych rozważań Wada i in.¹³³ przeprowadzili kompleksowe badania dotyczące wykorzystania oksazafosfolidyn w stereoselektywnej syntezie monomerów, wykorzystywanych do zautomatyzowanej syntezy analogów oligonukleotydów z wykorzystaniem metody amidofosforynowej na podłożu stałym. Założyli oni, że kondensacja diastereomerycznie czystych 3'-*O*-oksazafosfolidynowych pochodnych nukleozydów nastąpi stereospecyficznie jeśli będzie ona napędzana wyłącznie przez *N*-protonowanie pierścienia oksazafosfolidyny bez użycia aktywatora nukleofilowego. Udowodnili zatem, że słabsze nukleofilowe aktywatory nie były skuteczne w tym podejściu, natomiast mniej nukleofilowe sole *N*-(cyjanometylo)dialkiloamonium skutecznie aktywują takie monomery. Za pomocą

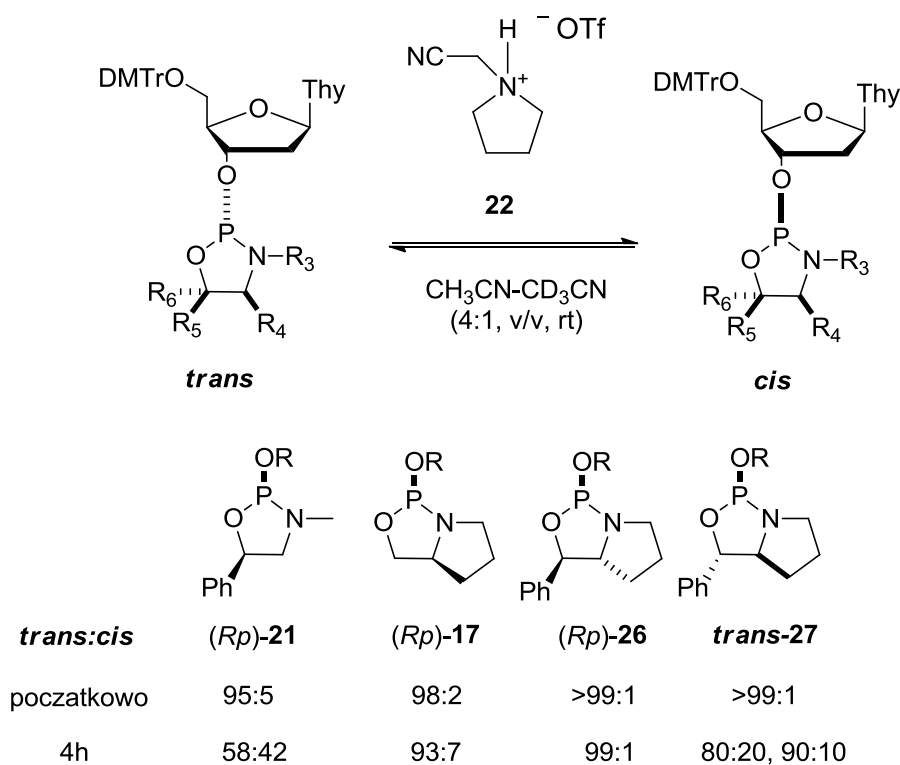
jednego z nich- *N*-(cyjanometylo)pirolidyno- trifluorometanosulfonianu (CMPT **22**)- zsyntezowano na nośniku stałym tiofosforany oligo deoksyrybonukleotydów (PS-ODN) (Schemat 19). Monomery (**21**) wytworzono z odpowiedniej pochodnej 2-chlorooksazafosfolidyny i 3'-OH blokowanych nukleozydów uzyskując stosunek izomerów *trans:cis* 93:7-96:4, po czym izomery *trans* wyizolowano na żelu krzemionkowym z wydajnością 62%-75%. Oczekiwano że CMPT będzie aktywował wiązanie *P-N* monomerów tylko poprzez *N*-protonowanie, a późniejsza kondensacja z 5'-OH nukleozydami lub oligonukleotydami nastąpi bez utraty diastereoczystości. Jednakże analiza HPLC PS-ODN wykazała, że średnia uzyskiwana diastereoselektywność na jeden cykl wynosiła ok 94:6-97:3, przy czym główne produkty były wytwarzane zgodnie z oczekiwaniami z inwersją konfiguracji.



Schemat 19: Stereokontrolowana synteza PS-ODNs z użyciem mniej kwasowego aktywatora **22**.

Ponieważ częściowa utrata diastereoczystości wynikała z epimeryzacji monomerów **21**, powodowanej kwasowością CMPT, zbadano konfiguracyjną stabilność monomerów oksazafosfolidynowych. W tym celu przygotowano szereg pochodnych oksazafosfolidynowych (Schemat 20) uzyskując stosunek izomerów *trans:cis* w zakresie od 95:5 do 99:1 i potraktowano je dwoma równoważnikami CMPT w temperaturze pokojowej. Po 4 godzinach analiza ^{31}P NMR wykazała, że stosunek monomeru *trans* do *cis* zmienił się z 95:5 do 58:42. Inne, bicykliczne pochodne oksazafosfolidynowe wykazały znacznie lepszą stabilność epimeryzacji. W szczególności monomer **26** wykazał jedynie nieznaczny stopień inwersji. Ponadto, izomer *trans* tej pochodnej został otrzymany wyłącznie z odpowiedniej 2-chlorooksazafosfolidyny i blokowanego nukleozydu, dlatego chromatograficzny rozdział diastereoizomerów nie był potrzebny. Monomer ten zastosowano następnie w syntezie PS-ODN na syntetyzerze DNA. Zsyntetyzowano jego osiem pochodnych (izomery (*Rp*) - i (*Sp*) dla każdej nukleozasady) z 44%- 58% wydajnością. Cykl jest podobny do używanego tradycyjnie w metodzie amidofosforynowej, z wyjątkiem użytych odczynników. W etapie kondensacji

użyto odpowiednich monomerów i CMPT. Natomiast do *cappingu* i usiarczenia użyto *N*-trifluoroacetyloimidazolu (CF₃COIm) i disiarczku *N,N'*-dimetylotiuramu (DTD).¹³⁴ Trifluoroacetylowanie zastosowano zamiast acetylacji, ponieważ *N*-acetylowane ugrupowanie pirolidynylometylowe było zbyt stabilne dla całkowitego odblokowania amoniakiem. Średnie wydajności sprzęgania podczas syntezy 8-12-merów wyniosły 95%-99%, a diastereoselektywność nawet 99%.



Schemat 20: Epimeryzacja *trans* nukleozydo-3'-*O*-oksazafosfolidynowych monomerów **17**, **21**, **26** i **27** w obecności CMPT **22**. R₁- 5'-*O*-DMTr-tymidyn-3'-yl. *trans*-**27** był mieszaniną (2*S*, 4*R*, 5*R*) i (2*R*, 4*S*, 5*S*) izomerów, stąd po użyciu **22** uzyskano odpowiednio 80:20 i 90:10.

Następnie metodę oksazafosfolidynową zastosowano do analogicznej syntezy tiofosforanów oligo rybonukleotydu PS-ORNs. Jednakże średnia wydajność sprzęgania dla 4-merów była znacząco niższa (67%-94%) niż w przypadku 20-meru deoksyrybonukleotydu. Niższa reaktywność była najprawdopodobniej spowodowana zawadą przestrzenną grupy 2'-*O*-TBDMS. Problem ten został rozwiązany przez zastosowanie bardziej nukleofilowych aktywatorów azolowych. Zastosowanie PhIMT lub BIT znacznie poprawiło wydajność kondensacji, w których wszystkie 10-merowe tiofosforany urydyny (*Rp*) i (*Sp*) zsyntetyzowano z 97%-99% wydajnością. Diastereoselektywność sprzęgania była porównywalna do

otrzymanej przy użyciu CMPT (96:4 do> 99:1). Mechanizm reakcji przez wspomniane azole nie został wyjaśniony. Może on zachodzić poprzez *N*-protonowanie pierścienia oksazafosfolidyny, jak w przypadku CMPT lub dynamiczną kinetykę rozdziału mieszaniny diastereoizomerycznych azolidowych produktów pośrednich. Skuteczność metody należy przypisać konfiguracyjnej stabilności bicyklicznego monomeru oksazafosfolidynowego, w odróżnieniu od pochodnej monocyklicznej. Wykazano również, że metoda ta jest skuteczna w syntezie innych *P*-chiralnych analogów oligonukleotydów. Reakcja kondensacji bicyklicznych *trans* monomerów oksazafosfolidynowych, zawierających dodatkową grupę metylową w pozycji 5 pierścienia oksazafosfolidyny, aktywowana przez CMPT, prowadzi do czystych diastereogenicznie fosforynowych produktów pośrednich. W warunkach kwaśnych następuje reakcja typu E1, generując odtrytylowany diester 5'-*H*-fosfonianu. W tym dwuetapowym cyklu otrzymuje się stereospecyficznie czyste *H*-fosfoniany oligo deoksyrybonukleotydów. Jest to pierwszy przykład kontrolowanej stereogenicznie syntezy diestrów *H*-fosfonianowych, co jest o tyle istotne, że można je przekształcić w różnorodne *P* modyfikowane analogi fosforanowe. Metoda to pozwoliła uzyskać boranofosforany dinukleotydów, hydroksymetylofosforany, oraz kilka typów amidofosforynów z czystością w zakresie od 98:2 do> 99:1. Otrzymano również 4-mery boranofosforanów, chociaż konwersja *H*-fosfonianów do boranofosforanów i amidofosforynów była mniej skuteczna w porównaniu z analogicznymi pochodnymi PS-ODNs.

Metoda wykorzystująca konfiguracyjnie stabilne oksazafosfolidyny i bicykliczne monomery oraz CMPT (lub azole) stosowana jest w stereospecyficznej syntezie wielu *P*-chiralnych analogów oligonukleotydów. Niestety metoda ma nadal pewne ograniczenia:

1. monomery oksazafosfolidynowe są bardziej wrażliwe na działanie kwasów, niż ich odpowiedniki amidofosforynowe, dlatego wydajność ich oczyszczania jest niska, przy czym nie jest konieczny rozdział diastereomeryczny;
2. Wydajność reakcji kondensacji wymaga poprawy w przypadku syntezy długich oligomerów. W przypadku pochodnych ORN, przydatna może okazać się kombinacja zastosowania CMPT i mniej rozbudowanych grup ochronnych pozycji 2'-OH niż grupy TBDMS.

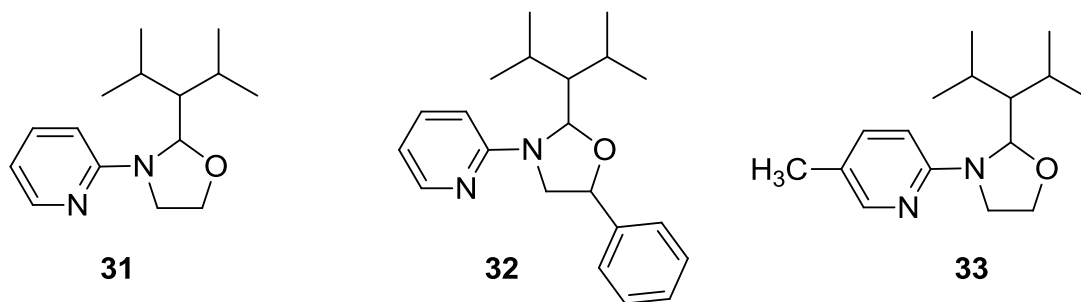
Efektywność konwersji *H*-fosfonianów diestrów do *P*-modyfikowanych analogów fosforanowych, takich jak boranofosforany na podłożu stałym musi być ulepszona.¹³⁵

6 Badania własne. Wyniki i dyskusja

Z przedstawionego powyżej przeglądu literaturowego jasno wynika, że pięcioczłonowe pierścienie fosfolidynowe posiadają duży potencjał w nowoczesnych podejściach syntetycznych biologicznie aktywnych związków. Wynika to z faktu, że reakcje zachodzące z określoną stereospecyficznością przy wysokiej wydajności często wymagają łagodnych warunków. W tym ostatnim przodują nowo projektowane 2-pirydynylove termolabilne grupy ochronne, których usuwanie przebiega w łagodnych warunkach i jest sterowane tylko zmianą temperatury. Połączenie tych dwóch elementów skłoniło mnie do zainteresowania się ciekawymi właściwościami 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny powstałej w wyniku cyklizacji 2-Pirydynylowych termolabilnych grup ochronnych (2-PyTGO). Badania własne przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej polegały na prowadzeniu systematycznych badań w celu określenia podatności 2-Py TGO i ich pochodnych projektowanych dla ochrony centrum fosforanowego na uleganie reakcji cyklizacji oraz badaniu reakcji otwarcia otrzymanego w ten sposób pierścienia 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny pod wpływem czynników nukleofilowych. Do realizacji badań wykorzystałem czynniki nukleofilowe takie jak woda i pirofosforany. Wykorzystanie wody jako czynnika nukleofilowego, obecnego praktycznie w każdym środowisku reakcyjnym, pozwala na poznanie istoty reakcji otwarcia pierścienia oksazafosfolidyny. Natomiast zastosowanie pirofosforanu może prowadzić do otrzymania niezwykle użytecznych z biologicznego punktu widzenia związków jakimi są trifosforany nukleozydów. W związku z powyższym badania prowadzone przeze mnie w trakcie mojego doktoratu wpisują się w nowoczesny nurt projektowania szlaków syntetycznych dla związków o wysokiej aktywności biologicznej.

Do cyklizacji 2-PyTGO z udziałem centrum fosforanowego dochodzi gdy do jego ochrony zastosujemy 2-pirydyloaminoetylową grupę ochronną, która w swojej strukturze posiada 2-rzędową grupę aminową. W wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji wytworzony zostaje wtedy 5-członowy pierścień oksazafosfolidyny.

W mojej pracy koncentrowałem się na opracowaniu wydajnej metody syntezy oraz badaniu właściwości 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolanu oraz jego pochodnych: 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**31**); 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-**5-fenyl**o-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32**) oraz 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-**5-metyl**o-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**33**) (Schemat 21).



Schemat 21: Modyfikacje układu 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]oksazafosfolanowego zsyntetyzowane i użyte do badań.

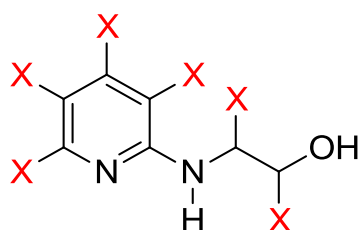
Wytworzony 5-członowy pierścień jako wynik wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji niektórych 2-PyTGO nie posiada już właściwości termolabilnych charakterystycznych dla liniowej struktury grupy ochronnej i jest odporny na działanie podwyższonej temperatury. Jednakże z prowadzonych przeze mnie badań wynika, iż możliwe jest ponowne odtworzenie termolabilnych właściwości grupy ochronnej w wyniku reakcji rozerwania pierścienia oksazafosfolanowego. Określiłem że reakcja otwarcia pierścienia 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]oksazafosfolanowego jest możliwa z wykorzystaniem wody w obecności kwasu. Hydroliza w warunkach kwasowych powoduje rozerwanie wiązania P-N i odtworzenie liniowej formy 2-Py TGO (Schemat 17). Można powiedzieć, że w wyniku cyklizacji 2-PyTGO jego termolabilne właściwości zostały „zamrożone”, a cykliczny pierścień jest formą ochrony termolabilnej grupy ochronnej. Pytanie jakie nasuwa się w tej części pracy, to czy działając czynnikami nukleofilowymi takimi jak pirofosforany również można odtworzyć termolabilne właściwości przez otwarcie formy cyklicznej?

W dalszej części pracy zamierzam przedstawić badania nad reakcją cyklizacji pierścienia oksazafosfolanowego, jak również reakcję jego otwarcia pod wpływem innych niż woda czynników, jakimi są pirofosforany. Badania koncentrowały się również na modyfikacjach w postaci podstawników i określeniu, jaki rodzaj podstawnika ułatwia, a jaki utrudnia cyklizację i dalej poprzez swoje właściwości wpływa na proces otwarcia pierścienia.

6.1 Synteza alkoholi 2-pirydynylowych

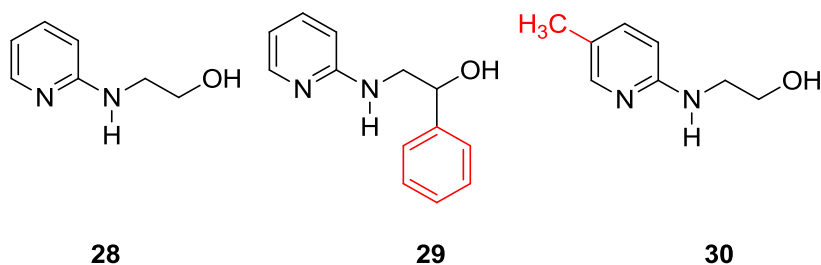
W celu przeprowadzenia syntezy 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny należy przygotować dwufunkcyjne prekursory jakimi są aminoalkohole. W mojej pracy zastosowałem pochodne 2-pirydynyloetanolu, które posiadają dwie reaktywne grupy: grupę hydroksylową -OH oraz grupę iminową -NH. Obie grupy są zdolne do oddziaływania z PCl_3 jednakże ze

względu na swoje właściwości reagują w następującej kolejności: najpierw grupa hydroksylowa, a następnie w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji grupa iminowa (Schemat 25). Należy zwrócić uwagę, że 2-pirydynylove alkohole umożliwiają wprowadzanie modyfikacji, w kluczowych dla przebiegu reakcji częściach: w pierścieniu pirydyny, lub w części alkilowej (Schemat 22). Wprowadzenie modyfikacji w postaci podstawników ma bezpośrednio wpływać na właściwości otrzymanych 3-pirydynylooksazafosfolidyn, w szczególności w procesie cyklizacji i otwarcia pierścienia.



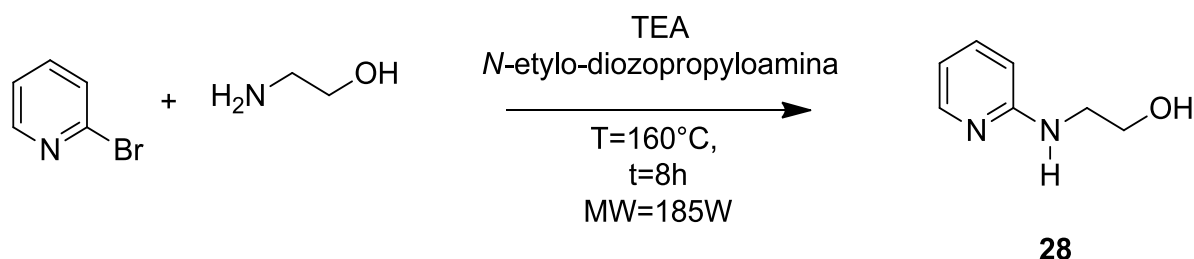
Schemat 22: Miejsca możliwych modyfikacji w alkoholu 2-pirydynylowym.

Oprócz *N*-(2-pirydylo)-2-aminoetanolu (**28**) (alkoholu bez modyfikacji), zdecydowałem się na syntezę analogu *N*-(2-pirydylo)-2-amino-1-fenyletanolu (**29**) z podstawnikiem fenylowym w pozycji 1 aminoalkoholu oraz *N*-(2-pirydylo-5-metylo)-2-aminoetanolu (**30**) z podstawnikiem metylowym w pozycji 5 pierścienia pirydyny (Schemat 23). Modyfikacja zawierająca podstawnik elektrono-donorowy jakim jest grupa metylowa, dostarcza elektrony w kierunku endocyklicznego atomu azotu w pozycji 2 i co za tym idzie wpływa układ elektronowy w pierścieniu oksazafosfolidynowym. Druga modyfikacja opierająca się na podstawniku fenylowym wprowadza zawadę przestrzenną w sąsiedztwie centrum fosforynowego oraz wyciąga elektrony z węgla α w stosunku do grupy hydroksylowej, wywołując ujemny efekt mezomeryczny i zmniejszając gęstość elektronową na tym atomie, co potencjalnie może również wpływać na podatność oksazafosfolidyny na reakcję otwarcia.



Schemat 23. Alkohole 2-pirydynylove prekursorzy 3-pirydynylooksazafosfolidyn wykorzystanych w dalszych badaniach.

Reakcja wykorzystana do syntezy prekursorów przebiega pomiędzy 2-bromopirydyną a aminoalkoholem i jest klasyfikowana jako substytucja nukleofilowa w pierścieniu aromatycznym (Schemat 24). Jest to reakcja endoenergetyczna, wymagająca wysokiej temperatury. Dodatek trietyloaminy ma za zadanie neutralizować wydzielający się w czasie reakcji HBr.



Schemat 24: Synteza alkoholu 2-pirydynyloвого na przykładzie *N*-(2-pirydylo)-2-aminoetanolu (**28**).

Pierwsze próby optymalizacji reakcji podstawienia w pierścieniu aromatycznym prowadziłem stosując metodę ogrzewania konwekcyjnego (za pomocą czaszy grzejnej). Niestety w celu uzyskania wysokich temperatur, ogrzewanie należało prowadzić intensywnie co prowadziło do miejscowych przegrzań mieszaniny reakcyjnej przy ścianach naczynia i wydzielania smolistych zanieczyszczeń- produktów termicznego rozpadu reagentów. Obniżało to całkowitą wydajność, ale również znacząco utrudniało oczyszczanie i izolację pożądanego produktu.

Rozwiązaniem, które wyeliminowało wspomniany problem była zmiana sposobu ogrzewania z konwekcyjnego na mikrofalowe. Przewagą ogrzewania mikrofalowego jest możliwość równomiernego rozłożenia temperatury w całej objętości mieszaniny reakcyjnej, podczas gdy w przypadku ogrzewania konwencjonalnego zewnętrzne źródło ciepła musi ogrzać ścianki naczynia, a dopiero później rozpuszczalnik i reagenty znajdujące się w środku naczynia reakcyjnego. Stosowane do tego celu reaktory mikrofalowe wykorzystują promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie pomiędzy daleką podczerwienią a falami ultrakrótkimi, o długości fali od 1m do 1cm, co odpowiada częstotliwości od 0,3 do 300 GHz. Promieniowanie może wspomagać przebieg reakcji chemicznej poprzez mikrofalowe ogrzewanie dielektryczne, które wynika ze zdolności danego reagenta (i/lub rozpuszczalnika) do pochłaniania energii przyporządkowanej promieniowaniu mikrofalowemu oraz jej zamianie na energię cieplną. Może to zachodzić na dwa sposoby: poprzez rotację cząsteczek dipolowych lub przewodnictwo jonowe. W ogrzewaniu bazującym na rotacji dipoli, cząsteczki będące dipolami próbują ustawić się zgodnie z kierunkiem i zwrotem zmiennego pola elektromagnetycznego, dzięki

czemu poruszają się, a energia kinetyczna, którą przekazują sobie cząsteczki podczas zderzeń zamieniana jest na ciepło równomiernie w całej objętości. Drugi mechanizm opiera się na przewodnictwie jonowym. Obecne w środowisku jony poruszają się zgodnie z kierunkiem zmiennego pola elektrycznego, a zderzanie się migrujących jonów z jonami poruszającymi się w przeciwnym kierunku wywołuje efekt cieplny, który jest tym większy, im większe jest stężenie i ruchliwość jonów. Wynika to wprost z natury promieniowania mikrofalowego. Dodatkowo zastosowane urządzenie pozwala na bardzo precyzyjną kontrolę temperatury i czasu grzania, co ułatwia zoptymalizowanie warunków reakcji, oraz zapewnia powtarzalność wyników. W moich badaniach stosowałem reaktor zarówno z komorą otwartą jak i zamkniętą (ciśnieniowy) – Rys.3.



A



<http://cem.com>

B

Rys. 3: Używane podczas badań reaktory mikrofalowe: **A:** Ertec© (z komorą otwartą), **B:** Discover SP (ciśnieniowy z komorą zamkniętą).

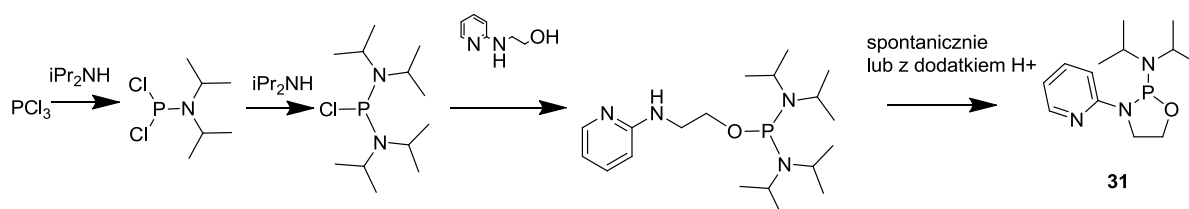
Większość syntez wykonałem przy pomocy reaktora z tzw. otwartą komorą (metoda niskociśnieniowa). Natomiast próby w reaktorze zamkniętym (metoda ciśnieniowa) wykazały, że ten typ reaktorów znacznie przesuwa równowagę reakcji podstawienia 2-bromopirydyny w kierunku produktów, co w konsekwencji przekłada się na wzrost wydajności. Z obecnego stanu wiedzy wiadomo, że ogrzewanie mikrofalowe to przede wszystkim nowy sposób dostarczania ciepła, ale potencjalny wpływ promieniowania mikrofalowego na trwałość wiązań reagujących ze sobą cząsteczek też nie jest bez znaczenia. Wpływ ten jest jednak trudny obecnie do jednoznacznego określenia dla badanego typu reakcji.

W całym procesie optymalizacji warunków reakcji dość istotnym punktem był dobór odpowiedniego rozpuszczalnika. W pierwszej kolejności zastosowałem tradycyjnie stosowany

ksylen, ze względu na jego wysoką temperaturę wrzenia $T_w=138-142^\circ\text{C}$. Był on rozpuszczalnikiem stosowanym w metodzie ogrzewania konwekcyjnego, więc porównanie obu metod wydawało się być łatwiejsze. Niestety ksylen jest rozpuszczalnikiem o niskiej wartości stałej dielektrycznej ($\epsilon=2,27-2,56$ w zależności od izomeru) co w kontekście wykorzystania w reakcjach wspomaganych mikrofalowo jest kluczowym parametrem. Co prawda reakcja w ksylenie nie przegrzewała się, ale nie udało się również uzyskać pożądanej temperatury, przez co nawet długi czas ogrzewania prowadził do niezadowalających wydajności. Wynika to z faktu, że zwiększanie mocy w reaktorze mikrofalowym powodowało zbyt dużą wartość energii odbitej, co w konsekwencji nie przekładało się na podniesienie temperatury, a było niebezpieczne dla urządzenia. Rozpuszczalnikiem, który ma wyższą od ksylenu wartość stałej dielektrycznej jest DMF i jest rekomendowany w literaturze¹³⁶ jako rozpuszczalnik w reakcjach wspomaganych mikrofalowo. Przeprowadzone testy wykazały, że wykorzystując DMF, można bez problemu osiągnąć temperaturę bliską wrzenia i utrzymywać ją przez dłuższy czas. Mimo tego, otrzymane wydajności były niezadowalające, a reakcja musiała być prowadzona przez wiele godzin. Stosowanie rozpuszczalników powoduje rozcieńczanie substratów, co ma przełożenie na przebieg całego procesu. Dobre wyniki osiągnąłem eliminując rozpuszczalnik i stosując nadmiar etanoloaminy (etanoloamina jest wtedy rozpuszczalnikiem dla drugiego substratu). Etanoloamina ma wysoką temperaturę wrzenia $t_w=170^\circ\text{C}$, więc mogła być zastosowana jednocześnie jako substrat i rozpuszczalnik. Stała dielektryczna etanoloaminy wynosi $\epsilon=2,37$ ¹³⁷, zatem nie jest to dobry rozpuszczalnik w kontekście stosowania mikrofal, natomiast dużo korzystniejszą pod tym kątem stałą dielektryczną ma pirydyna ($\epsilon=13,5$)¹³⁸ oraz jej pochodne, w tym 2-bromopirydyna, co przy dużym stężeniu tego substratu prawdopodobnie było wystarczające do uzyskania optymalnej temperatury reakcji. Duży nadmiar stechiometryczny jednego z reagentów dodatkowo przesuwa równowagę reakcji w stronę produktów, co w konsekwencji korzystnie wpłynęło na wydajność całego procesu. Reakcję prowadziłem przez 8 godzin i zdecydowałem się ją zakończyć, przy braku dalszych postępów. Czysty produkt w postaci ciała stałego o barwie białej wyizolowałem za pomocą chromatografii kolumnowej używając chlorku metylenu z dodatkiem metanolu w zmiennym gradiencie od (1% do 5% metanolu). Najlepszą wydajność uzyskałem w przypadku *N*-(2-pirydylo)-2-aminoetanolu (**28**) około 95%; dla *N*-(2-pirydylo)-2-amino-1-fenyletanolu (**29**) i *N*-(2-pirydylo-5-metylo)-2-aminoetanolu (**30**) wydajności wynosiły odpowiednio 51% i 74%.

6.2 Synteza oksazafosfolidyn

[1,3,2]oksazafosfolidyny są grupą związków heterocyklicznych, których podstawą strukturalną jest pięcioczłonowy pierścień zawierający atom tlenu, azotu oraz fosforu. Pierścień oksazafosfolidyny jest strukturą trwałą, która trudno ulega rozpadowi, zatem wykorzystywanie reakcji otwarcia pierścienia musi być poprzedzone zmianą tych właściwości. Obecność podstawnika pirydynylowego przy atomie azotu oksazafosfolidyny obniża trwałość wiązania P-N i umożliwia łatwe otwarcie pierścienia pod wpływem słabego kwasu. Otrzymywanie 2-pirydynylowych pochodnych [1,3,2]oksazafosfolidyn jest procesem wieloetapowym, wymaga zastosowania w reakcji z trójchlorkiem fosforu dwufunkcyjnych związków – aminoalkoholi 2-pirydynylowych. Obecność ugrupowania pirydynylowego, jest również kluczowa, ponieważ umożliwia łatwe odblokowanie na zasadzie cyklodestryfikacji w odtwarzającej się w wyniku decyklizacji 2-PyTGO. Istotną zaletą obecności ugrupowania 2-pirydynylowego w omawianych aminoalkoholach, jest jego wpływ na powstającą w kolejnym etapie oksazafosfolidynę.

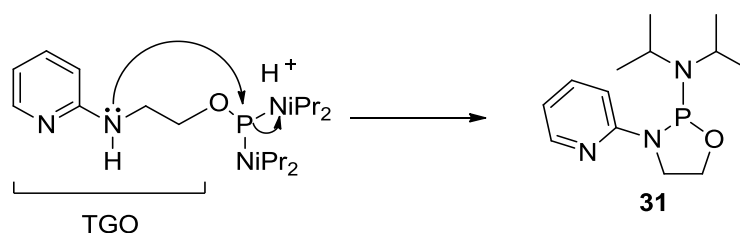


Schemat 25: Przebieg reakcji syntezy [1,3,2]oksazafosfolidyny.

Zaproponowany przeze mnie schemat syntezy 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]oksazafosfolidyny rozpoczyna się od reakcji PCl_3 z diizopropylloaminą (Schemat 25). Reakcja jest wrażliwa na obecność wody, co powoduje sporo problemów syntetycznych i wymaga szczególnej uwagi na każdym etapie. PCl_3 jest związkiem reaktywnym, i w obecności wody (przy czym wystarczy niewielka ilość, np. wilgoć z powietrza) ulega gwałtownej reakcji hydrolizy z wydzielaniem gazowego HCl . Dlatego istotne jest zadbanie o warunki bezwodne polegające na: suszeniu szkła reakcyjnego, użyciu możliwie bezwodnych rozpuszczalników i reagentów (najlepiej o zawartości wody poniżej 10 ppm), oraz napełnianiu naczyń reakcyjnych bezwodnym gazem obojętnym (np. argonem). Mechanizm reakcji przebiega etapowo, gdzie kolejno atomy chloru w cząsteczce PCl_3 są podstawiane przez cząsteczki diizopropylloaminy. Szybkość kolejnych etapów jest różna, pierwsze podstawienie następuje od razu, drugie zajmuje kilka godzin ze względu na mniejszą reaktywność pochodnej monopodstawionej, oraz powstałą częściową zawadę przestrzenną. Właśnie ze względu na dużą zawadę przestrzenną trzeci atom chloru nie

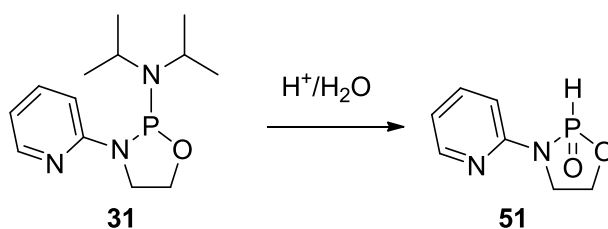
podlega podstawieniu. Wykorzystuje się to w kolejnym trzecim etapie gdzie następuje podstawienie mniejszych alkoholi 2-pirydynylowych. Stosowanie nadmiarów stechiometrycznych diizopropylaminy, nie tylko przyspiesza reakcję, ale przede wszystkim pozwala neutralizować powstający w reakcji HCl (Schemat 25).

Jak wspomniano powyżej aminoalkohol 2-pirydynylowy nie powoduje takiej zawady przestrzennej jak cząsteczka diizopropylaminy, co umożliwia jego podstawienie. Ważne z punktu widzenia wydajności jest odpowiednie przygotowanie alkoholu poprzez długotrwałe suszenie. Powstały w ten sposób amidofosforyn jest liniową formą 2-pirydynylowej Termolabilnej Grupy Ochronnej. Jest to produkt termodynamicznie nietrwały i podlega samoistnie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny. Dzieje się to na drodze ataku nukleofilowego wolnej pary elektronów egzocyklicznego atomu azotu na atom fosforu z równoczesnym odejściem jednej z grup diizopropylaminowych (Schemat 26).



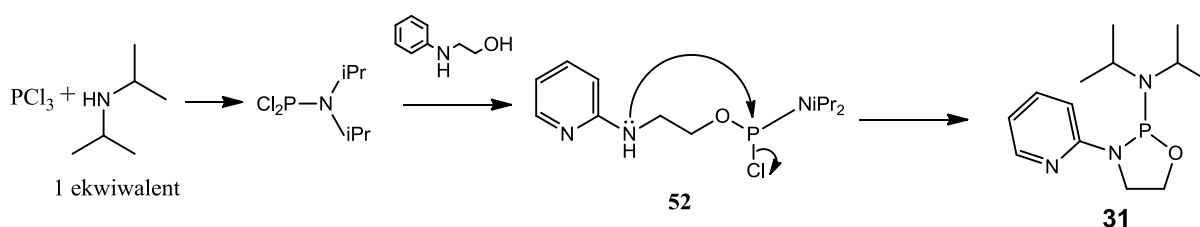
Schemat 26: Mechanizm wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z uformowaniem pierścienia oksazafosfolidynowego.

Proces ten można przyspieszyć poprzez dodanie słabego kwasu, np. 1-*H*-tetrazolu, który ułatwia protonację atomu azotu w podstawionej aminie. Należy jednak mieć na uwadze, że stosowanie dodatkowego kwasu w obecności nawet niewielkich ilości wody w środowisku reakcyjnym może prowadzić do reakcji niepożądanego, czyli powstawania cyklicznego *H*-fosfonianu, produktu ubocznego obniżającego końcową wydajność (Schemat 27).



Schemat 27: Przekształcenie 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny do 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksaza-*H*-fosfolidyn-2-onu (**51**).

Inną metodą jest podstawienie tylko jednego atomu chloru w PCl_3 za pomocą diizopropylaminy, a następnie przyłączenie aminoalkoholu 2-pirydynyloвого. W powstałym mono-chloro podstawionym produkcie przejściowym (**52**), następuje wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja, prowadząca do 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**31**) (Schemat 28). Reakcja ta zachodzi spontanicznie i bardzo szybko, ponieważ odchodzący anion chlorkowy jest lepszą grupą opuszczającą niż grupa diizopropylaminowa. Dużą zaletą tego podejścia jest zmniejszenie ilości etapów reakcji o jeden (podstawienie diizopropylaminy), oraz dużo szybsza cyklizacja prowadząca do pierścienia oksazafosfolidyny. Niestety wysoka reaktywność omawianego chloro- podstawionego produktu pośredniego (**52**) (Schemat 28) powoduje trudności w kontrolowaniu reakcji co może prowadzić do obniżenia wydajności.



Schemat 28: Procedura syntezy 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny z wykorzystaniem mono chloro- podstawionego produktu pośredniego.

Optymalizacja warunków reakcji pozwoliła mi na określenie parametrów i doprowadzenie do osiągnięcia nawet 80% wydajności całego procesu. Jak już wspomniano, najważniejszym czynnikiem decydującym o wydajności jest utrzymanie na każdym etapie możliwie bezwodnych warunków. Zauważyłem, że wydajność reakcji może być uzależniona nawet od względnej wilgotności powietrza danego dnia. Proces prowadziłem w obojętnym rozpuszczalniku jakim jest benzen, który dobrze rozpuszczał wszystkie substraty i stosunkowo łatwo może zostać osuszony. Dodatkowo powstające w reakcji sole nieorganiczne nie rozpuszczają się w benzenie, przez co łatwo można je odizolować w procesie oczyszczania. Wstępne podczyszczenie mieszaniny reakcyjnej można uzyskać stosując ekstrakcję pomiędzy fazą organiczną (benzen/trietyloamina 95:5), a fazą wodną. Niepożądana hydroliza jest blokowana przez utrzymanie zasadowego pH dzięki obecności trietyloaminy. Z praktycznego punktu widzenia bezpieczniejszym i prostszym rozwiązaniem okazało się nałożenie częściowo odparowanej mieszaniny reakcyjnej na kolumnę z żelom krzemionkowym *silica gel* 60 F₂₅₄. Podczas przemywania kolumny chromatograficznej stosowałem jako eluent fazy benzen/trietyloamina 9:1 co pozwoliło na łatwy rozdział składników mieszaniny dzięki różnicom w migracji przez kolumnę chromatograficzną. Otrzymywany produkt po liofilizacji

z benzenu można bezpiecznie przechowywać w zamrażarce stosując atmosferę gazu obojętnego argonu. W temperaturze pokojowej omawiane oksazafosfolidyny mają postać gęstego oleju lub wosku. Ze względu na reaktywność oksazafosfolidyny jej długie przechowywanie nie jest wskazane, gdyż prowadzi do rozkładu. Dlatego po izolacji i charakterystyce spektralnej najkorzystniej jest przekształcić ją do formy stabilniejszej np. pochodnej nukleozydu.

Ze względu na wspomnianą wrażliwość na wilgoć, monitorowanie reakcji za pomocą chromatografii TLC jest bardzo trudne, dlatego pomocnym narzędziem jest analiza ^{31}P NMR.

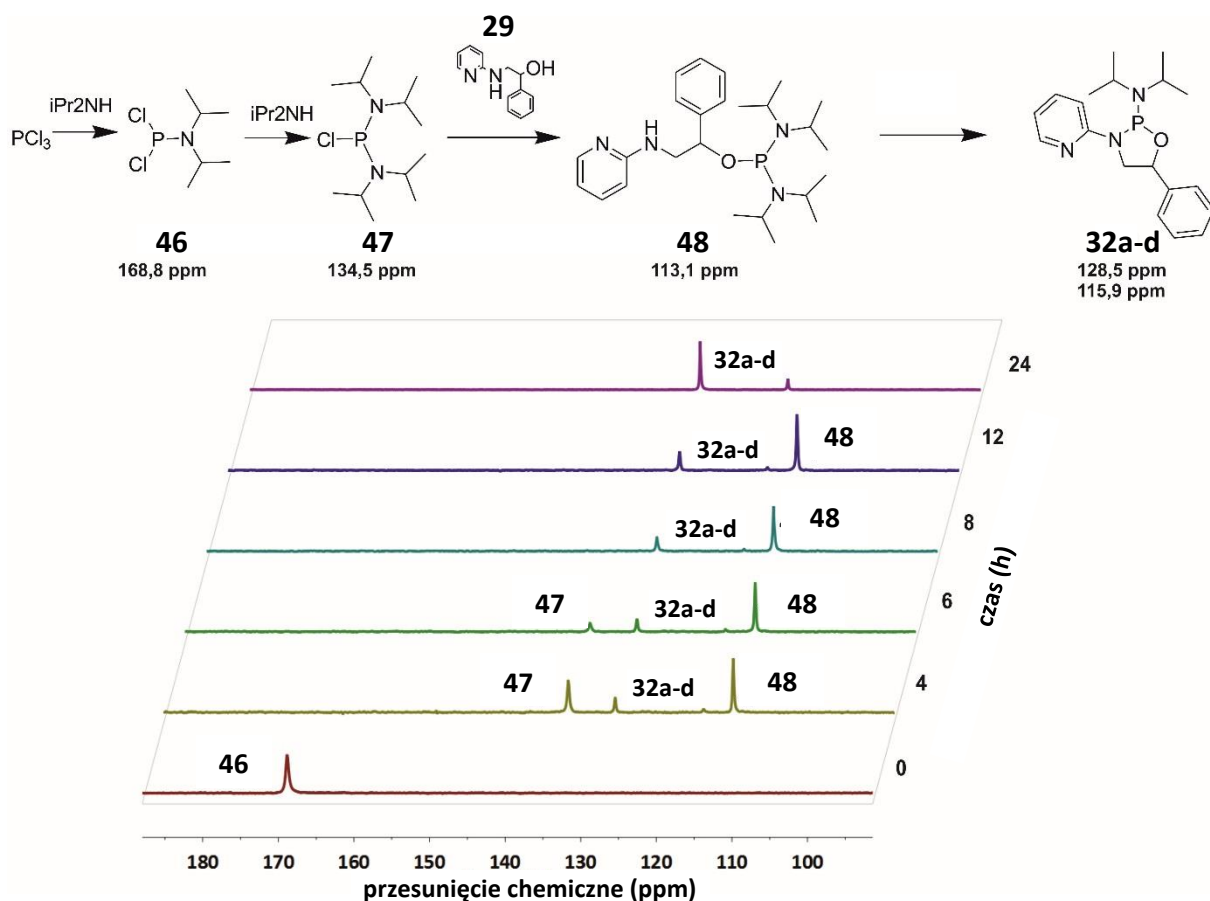
W ramach prac badawczych otrzymałem 3 modyfikacje 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (schemat 21). Układem odniesienia była dla mnie 2-*N*-Dizopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyna (**31**), która została w naszym zespole już wcześniej przebadana i opisane zostały jej właściwości jako stabilnej formy 2-Py TGO. Zdecydowałem się również na wprowadzenie dwóch rodzajów podstawników: przestrzennie zawadzonej grupy fenylowej oraz elektronodonorowej grupy metylowej. W pierwszym przypadku otrzymałem 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-**5-fenylo**-[1,3,2]-oksazafosfolidynę (**32**). Prowadzone badania z taką modyfikacją miały odpowiedzieć na pytanie jak taki obszernie przestrzennie podstawnik jak grupa fenylova, umieszczony blisko centrum fosforowego będzie wpływał na ułożenie cząsteczki w przestrzeni oraz na dostępność centrum fosforowego podczas ataku nukleofilowego. Badania koncentrowały się także na określeniu wpływu podstawnika na reakcję tworzenia i otwierania pierścienia oksazafosfolidyny. Zastosowanie drugiej modyfikacji czyli podstawnika metylowego w pozycji 5 pierścienia pirydynowego pozwoliło na otrzymanie 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-**5-metylo**-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**33**). Rolą podstawnika metylowego powinno być dostarczanie elektronów do pierścienia. Ponieważ podstawnik umieszczono w pozycji 5, największy wpływ powinien mieć na pozycję *para*, czyli na atom węgla połączony z azotem w pierścieniu oksazafosfolidyny. Z kolei siła wiązania między tym atomem azotu a atomem fosforu jest miejscem kluczowym w kontekście otwierania pierścienia.

6.2.1 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-

oksazafosfolidyna(32). Stereochemia i badania krystalograficzne

Grupa fenylova jest dużym podstawnikiem, który umieszczony blisko centrum fosforowego może wpływać na jego reaktywność. Zaprojektowałem modyfikację 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny, polegającą na umieszczeniu podstawnika fenylowego w pozycji 5

pierścienia oksazafosfolidyny (**32**) (Schemat 21). Wprowadzenie takiego przestrzennie dużego podstawnika miało w założeniu spowodować zawadę przestrzenną, ograniczyć możliwość swobodnego rotowania cząsteczki w osi wiązania atomu fosforu z atomem tlenu z nukleozydu. Nie wiadomo jednak czy takie przestrzenne ułożenie będzie ustawiało centrum reakcyjne w sposób ułatwiający atak nukleofilowy na atom fosforu. Dodatkowo, węgiel C5 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny stał się chiralny, co spowodowało otrzymanie mieszaniny diastereoizomerów. Praca z mieszaniną diastereoizomerów jest dodatkową trudnością gdyż wymaga pracochłonnych metod rozdzielania. W toku prac zaobserwowałem iż 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyna łatwo krystalizuje. Opracowałem zatem metodę krystalizacji omawianej pochodnej, która pozwoliła mi na rozdział diastereoizomerów jak również korelację badań krystalograficznych (otrzymanych po izolacji odpowiednich kryształów), z analizą za pomocą rezonansu magnetycznego ^{31}P NMR. Na poniższym schemacie przedstawione są widma ^{31}P NMR kolejnych etapów syntezy 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32**).

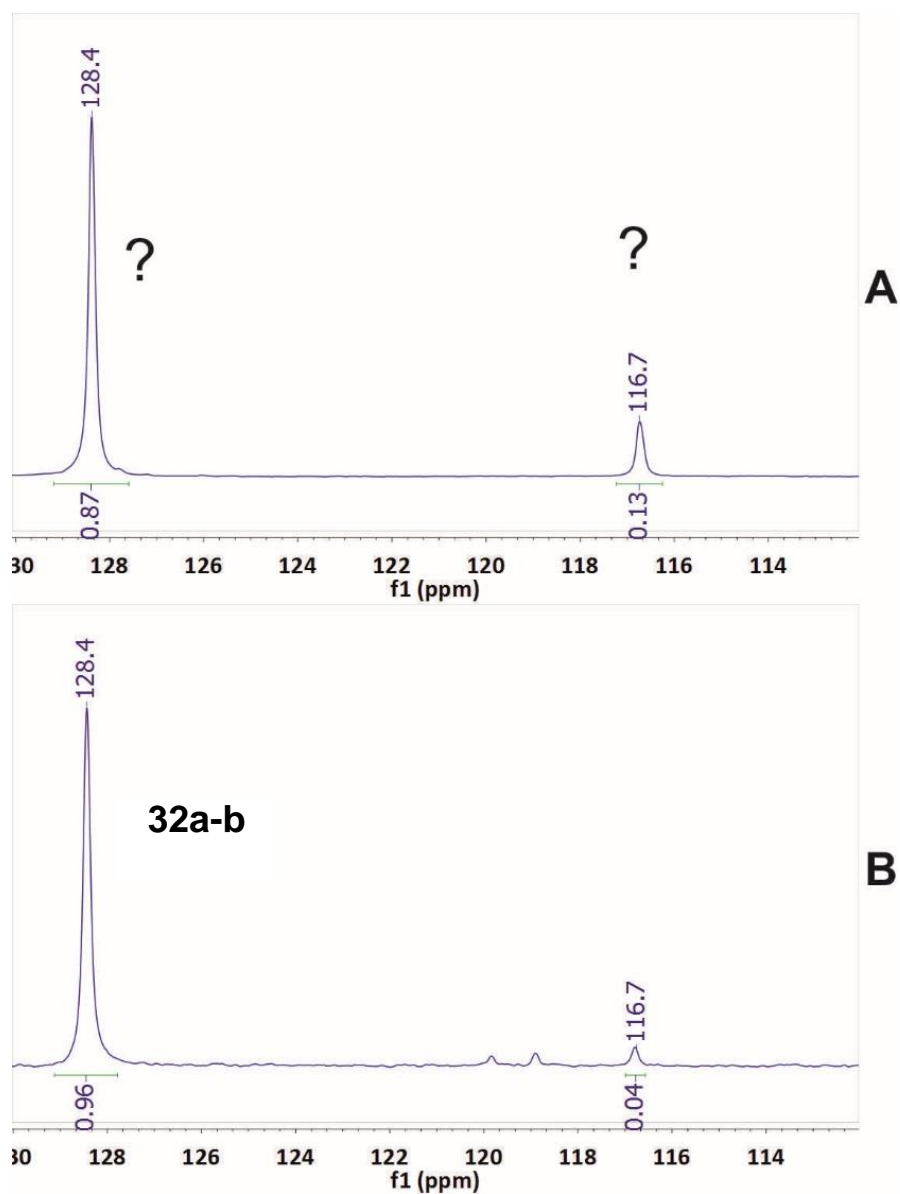


Schemat 29: Przebieg reakcji syntezy 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-yl)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32**) wraz z analizą ^{31}P NMR poszczególnych etapów.

6.2.1.1 *Badanie stereospecyficzności wewnątrzcząsteczkowej P-cyklizacji*

P-Cyklizacja amidofosforynu zawierającego liniową formę termolabilnej grupy ochronnej (**48**) prowadzi do 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl- [1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32**). Biorąc pod uwagę, centrum stereogeniczne na chiralnym atomie węgla, oraz drugie centrum stereogeniczne powstające w momencie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji na atomie fosforu, spodziewałem się uzyskać mieszaninę czterech produktów. Jednakże analiza za pomocą magnetycznego rezonansu ³¹P NMR wykazała powstanie tylko dwóch sygnałów. Dodatkowo należy zaznaczyć, że produkty powstawały jednocześnie, jednakże w różnych proporcjach, a ich przesunięcia chemiczne były podobne (analiza ³¹P NMR: dwa sygnały w stosunku 87:13 przy przesunięciu chemicznym wynoszącym odpowiednio 128,4 ppm i 116,7 ppm), co świadczy że mamy do czynienia raczej z mieszaniną diastereoizomerów niż reakcją następczą. Z uwagi na taki obraz widm fosforowych, nie mogłem ocenić, czy otrzymuję wszystkie możliwe kombinacje stereoizomerów, czy obecność dwóch pików wskazuje na powstawanie tylko dwóch produktów. Możliwa jest również sytuacja, że dwa diastereoizomery nie różniące się w właściwościami chemicznymi posiadają to samo przesunięcie chemiczne, ponieważ są względem siebie enancjomerami). Za pomocą chromatografii kolumnowej mogłem oczyścić produkty z zanieczyszczeń, jednak nie pozwoliło to na rozdział poszczególnych stereoizomerów. Czystość otrzymanej mieszaniny diastereoizomerów potwierdziłem analizą ¹H NMR oraz spektroskopią mas.

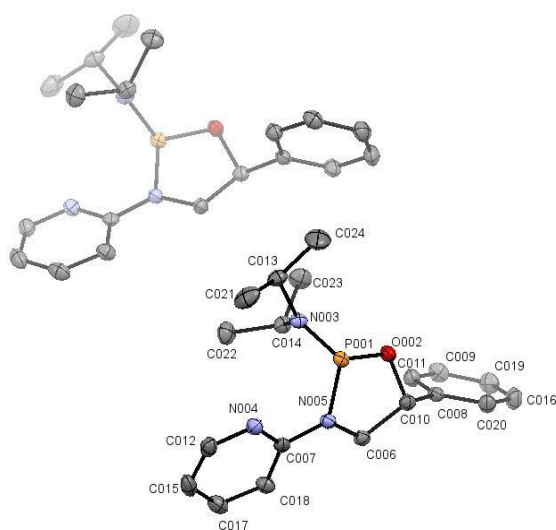
Otrzymane wyniki eksperymentalne doprowadziły mnie do wniosku, że cyklizacja racemicznej mieszaniny **48** zachodzi wprawdzie z silną stereopreferencją, ale prowadzi do powstania mieszaniny wszystkich czterech możliwych stereoizomerów (**32a-d**). Jednakże analiza ³¹P NMR wykonana w achiralnym rozpuszczalniku (benzen) wykazała dwa sygnały o różnych intensywnościach i przesunięciach chemicznych 128,4 ppm dla jednej pary enancjomerów i 116,7 ppm dla drugiej. Diastereoizomery zgrupowane są w dwóch parach enancjomerów w obrębie jednego sygnału na widmie ³¹P NMR dla każdej pary, gdyż posiadają one takie same przesunięcie chemiczne. Na tym etapie przypisanie odpowiednich sygnałów poszczególnym diastereoizomerom było niemożliwe (Schemat 30A).



Schemat 30: Analiza ^{31}P NMR 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32**): **A**-mieszanina wszystkich izomerów; **B**- widmo otrzymane po ponownym rozpuszczeniu kryształów.

6.2.1.2 Rozdział diastereoizomerów oraz określenie ich konfiguracji absolutnej

Ponieważ w trakcie oczyszczania zauważyłem, że oczyszczane diastereoizomery posiadają zdolność do krystalizacji, w ciągu dalszych badań podjąłem próbę krystalizacji mieszaniny izomerów. Oczyszczone metodami chromatograficznymi związki **32a-d** zostały pozostawione na kilka dni w czystym heksanie, w naczyniu umożliwiającym jego powolne odparowywanie. W wyniku tych działań otrzymałem kryształy o strukturze prostopadłościanu (wymiary kryształów wybranych do analiz: 0,5mm x 0,3mm x 0,15mm i 0,14mm x 0,16mm x 0,04mm) i poddałem analizie strukturalnej.

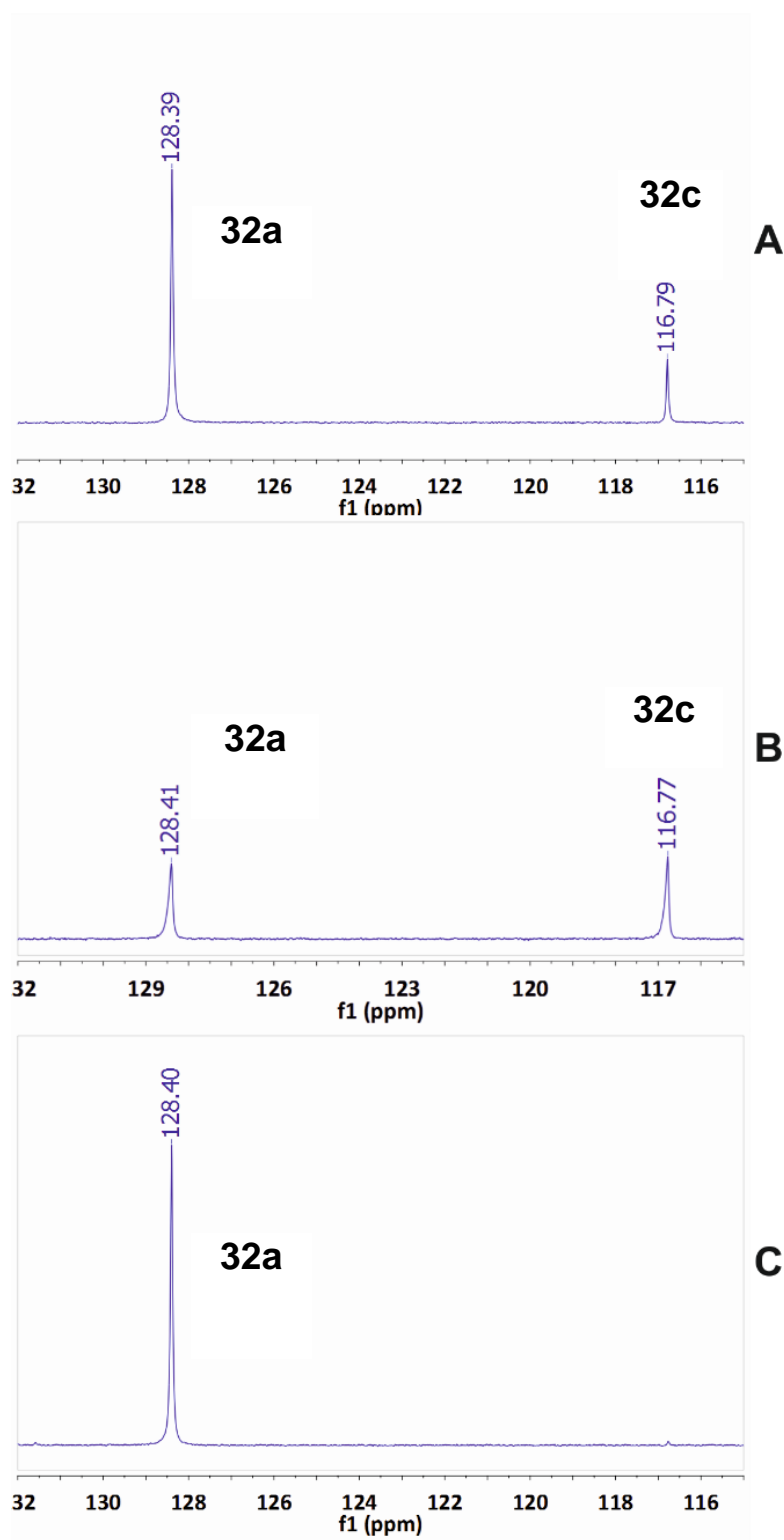


Schemat 31: Obraz ułożenia cząsteczek 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (32a i 32b) otrzymany metodami krystalograficznymi.

Analiza ^{31}P NMR kryształów ponownie rozpuszczonych w benzenie wykazała obecność tylko jednego piksu (128,4 ppm), natomiast ich analiza krystalograficzna potwierdziła obecność tylko dwóch enancjomerów **32a i 32b** co pozwoliło przypisać im konfigurację absolutną (odpowiednio R_C , S_P i S_C , R_P – Schemat 30B). Świadczy to dobitnie o fakcie, że ta para diastereoizomerów jest w stosunku do siebie enancjomerami o tej samej wartości przesunięcia chemicznego. Można jednak sytuację znacznie uprościć eliminując ilość powstałych diastereoizomerów stosując 2-pirydynylowy aminoalkohol o określonej już konfiguracji na atomie węgla. Konfiguracja na tym atomie węgla nie zmienia się podczas *P*-cyklizacji.

W związku z powyższą obserwacją zdecydowałem się powtórzyć syntezę fenyłowej pochodnej oksazafosfolidyny wykorzystując zsyntezowany do tego celu 2-amino-1-fenyletanol **29b** o określonej konfiguracji *R* na chiralnym atomie węgla. Jeżeli początkową mieszaninę dwóch diastereoizomerów zastąpimy jednym, to mieszanina po cyklizacji będzie zawierać tylko 2

diastereoizomery. W wyniku *P*-cyklizacji **48** o konfiguracji *R* otrzymałem takie samo widmo ³¹P NMR jak w przypadku mieszaniny racemicznej **32a**: dwa piki w stosunku około 85:15 (Schemat 32A). Zastosowanie substratu o określonej konfiguracji na atomie węgla pozwoliło wyeliminować z puli możliwych produktów enancjomer **32b** (*ScRp*), który wcześniej tworzył w kryształach parę z enancjomerem **32a** (*RcSp*) charakteryzującą się fosforowym przesunięciem chemicznym w widmie P NMR $\delta=128,4$ ppm. Produkty *P*-cyklizacji **48** o konfiguracji *R* również krystalizowały, ale ich analiza krystalograficzna wykazała inny skład diastereoizomerów: **32a** (*RcSp*) i **32c** (*RcRp*), jednakże w takim samym stosunku molowym. Udowodniłem to ponownie rozpuszczając otrzymany kryształ i analizując mieszaninę za pomocą ³¹P NMR (dwa sygnały w równym stosunku, Schemat 32B). Ponieważ **32c** w wyniku stereoselektywnej *P*-cyklizacji powstaje w mniejszej ilości, prawdopodobnie wszystkie jego cząsteczki biorą udział w kokrystalizacji z **32a**, pozostały po krystalizacji roztwór zawierał tylko czysty diastereoizomer **32a** (*RcSp*) sygnał charakteryzujący się przesunięciem chemicznym na widmie fosforowym $\delta=128$ (Schemat 32C). Omawiany proces diastereoselektywnego oczyszczania przez krystalizację pozwala na pozbycie się z mieszaniny przez krystalizację diastereoizomeru, który obecny jest w mniejszej ilości oraz otrzymanie jednego diastereoizomeru, który powstaje w przewadze podczas *P*-cyklizacji.

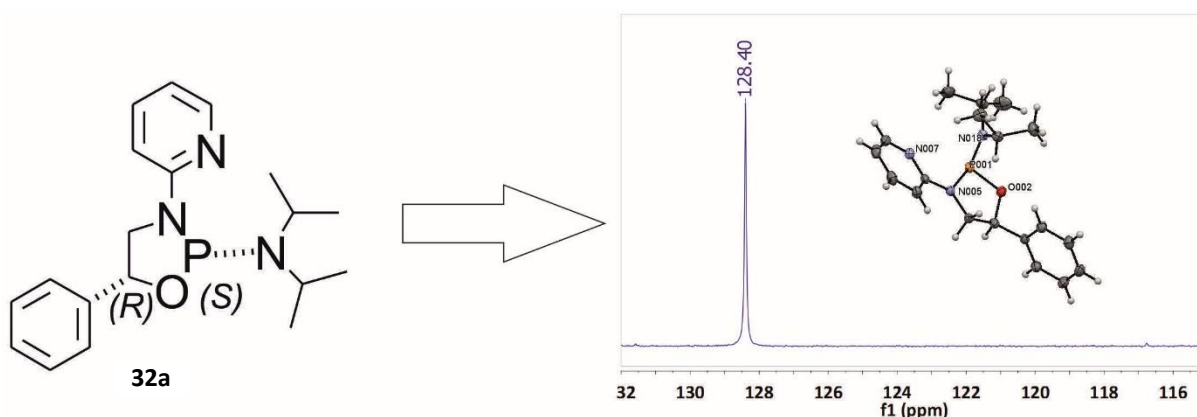


Schemat 32: Analiza ^{31}P NMR 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenilo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny o określonej konfiguracji *R* na chiralnym atomie węgla C5: **A** – mieszanina wszystkich izomerów; **B**- widmo otrzymane po ponownym rozpuszczeniu kryształów; **C**- widmo roztworu pozostałego po krystalizacji.

Na podstawie otrzymanych danych doświadczalnych określiłem zależność pomiędzy konfiguracją absolutną i przesunięciami chemicznymi sygnałów poszczególnych diastereoizomerów w widmach ^{31}P NMR. Uzyskane dane pokazują, że para enancjomerów **32a** i **32b** występuje jako jeden sygnał na widmie ^{31}P NMR z przesunięciem równym 128ppm, druga para enancjomerów, **32c** i **32d** występuje jako sygnał z przesunięciem 116 ppm.

Dane krystalograficzne i analizy za pomocą rezonansu jądrowego ^{31}P NMR wykazały pośrednio, że grupa fenylova ułożona jest w konfiguracja *syn* względem podstawnika przy atomie fosforu (w stosunku do pierścienia oksazafosfolidyny), co świadczy o tym, że takie ułożenie jest najkorzystniejsze energetycznie. Częściowa stereoselektywność tej cyklizacji spowodowana jest zawadą przestrzenną jaką tworzą trzy przestrzennie duże podstawniki w obrębie pierścienia oksazafosfolidyny.

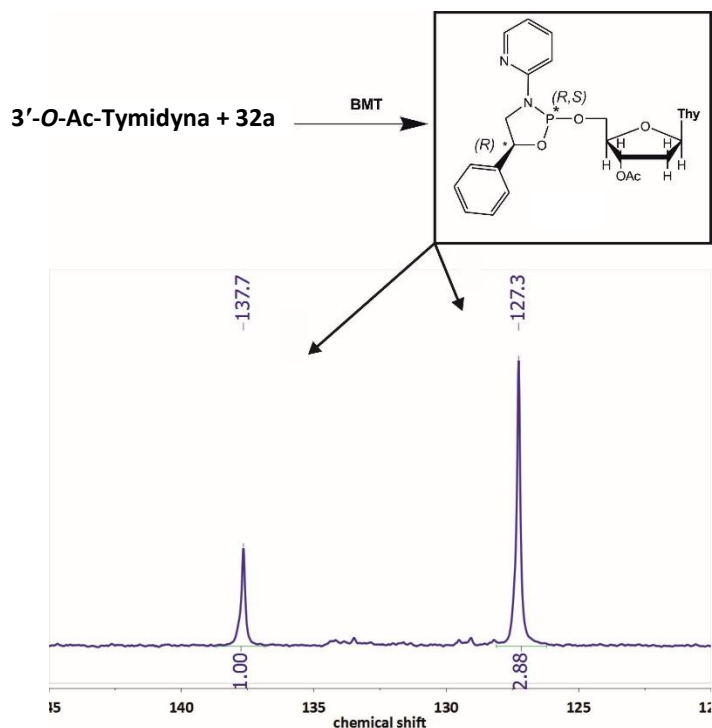
6.2.1.3 Próby zastosowania 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (32a) w stereoselektywnej syntezie fosforanów i tiofosforanów nukleozydów



Schemat 33: Wyizolowany przez krystalizację i scharakteryzowany czysty diastereoizomer – struktura chemiczna, obraz cząsteczki w kryształach, czystość potwierdzona za pomocą ^{31}P NMR.

Otrzymanie czystego diastereoizomeru o określonej konfiguracji pozwala na badanie stereochemii reakcji fosfitylacji nukleozydów za pomocą 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny. Diastereoisomer R_cS_p (**32a**- Schemat 33) poddałem reakcji z 3'-*O*-acetylotymidyną posiadającą wolną pierwszorzędową grupę hydroksylową oraz z 5'-*O*-DMT tymidyną, która zawierała niezabezpieczoną drugorzędową grupę hydroksylową (Schemat 34). Każdy z tych substratów, niezależnie od rzędowości grupy hydroksylowej, powodował

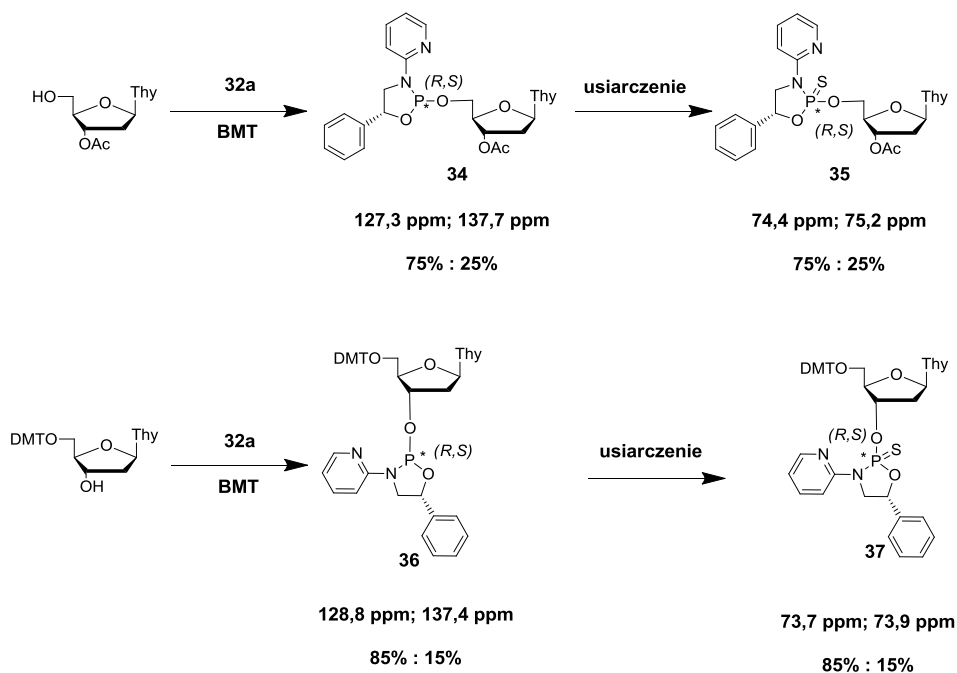
powstanie dwóch produktów kinetycznych w nierównych proporcjach, co świadczy o częściowej utracie czystości stereogenicznej na centrum fosforowym.



Schemat 34: Utrata stereoczystości podczas fosfitylacji na przykładzie reakcji oksazafosfolidyny o znanej konfiguracji absolutnej z 3'-O-acetylo-tymidyną.

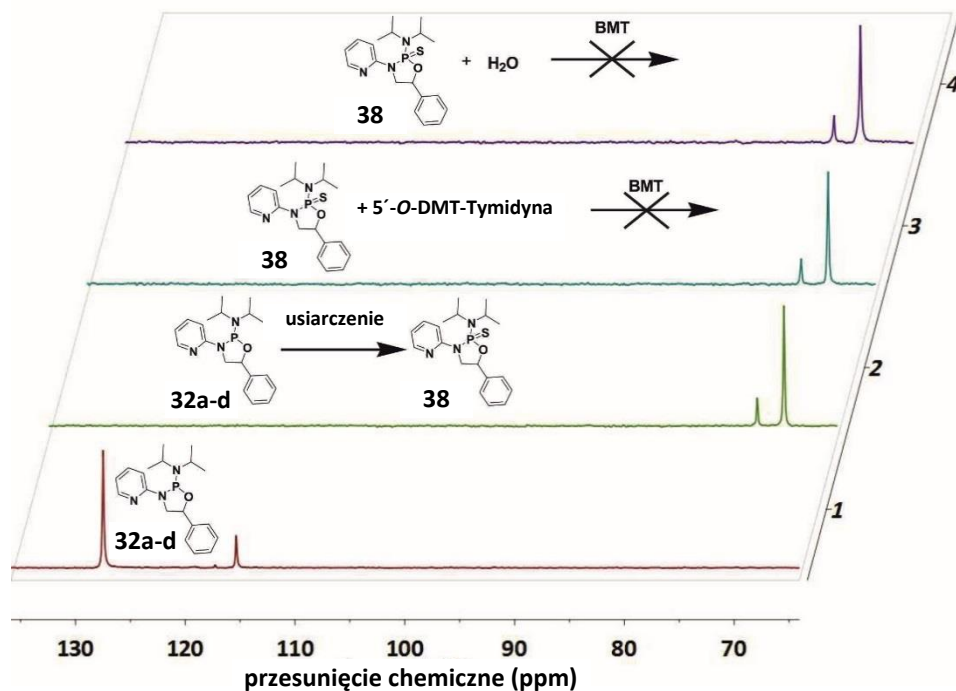
Wiadomo, że reakcje fosfitylacji katalizowane słabymi kwasami, na przykład 1-*H*-tetrazolem, zachodzą z inwersją konfiguracji.¹³³ W oparciu o badania kinetycznej i termodynamicznej stabilności wytworzonego produktu, mogłem stwierdzić, że fosfitylacja za pomocą 32a prowadzi do powstania dwóch epimerów w proporcji 75:25 w przypadku reakcji w pozycji 5' (Schemat 35) oraz 85:15 w przypadku pozycji 3' nukleozydu, co wynika właśnie z niecałkowitej inwersji konfiguracji na atomie fosforu.

Kolejnym etapem wpływającym na stereochemię centrum fosforowego może być utlenianie. Jednakże zamiana konfiguracji w przypadku 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]oksazafosfolidyny jest możliwa tylko i wyłącznie gdy nastąpi otwarcie i ponowne zamknięcie pierścienia oksazafosfolidyny. Usiarczenie i utlenienie otrzymanych pochodnych nukleozydowych nie zmieniło wzajemnych proporcji stereoizomerów (Schemat 35), a tym samym nie zachodziło ze zmianą konfiguracji.



Schemat 35: Fosfitylacja wolnych grup -OH w pozycjach 3' i 5' nukleozydów, oraz usiarczenie atomu fosforu otrzymanych w ten sposób pochodnych.

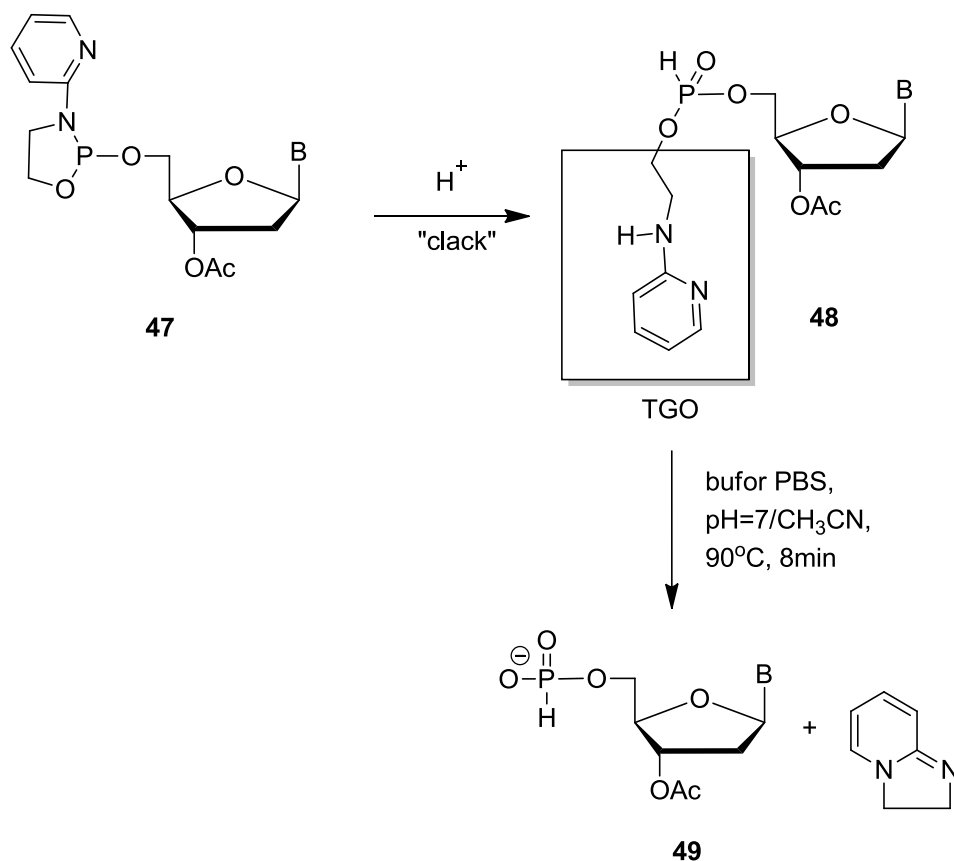
Usiarczanie oksazafosfolidyny do pochodnej tiofosforanowej (**38**) (Schemat 36) pozwoliło ocenić, czy wpływ podstawienia atomu siarki może zapobiec inwersji konfiguracji i otworzyć drogę do stereospecyficznej syntezy tiofosforanów nukleozydów (Schemat 36). Po usiarczeniu atomu fosforu stosunek diastereoizomerów pozostał w tych samych proporcjach co w wyjściowej oksazafosfolidynie, czyli nie doszło do inwersji konfiguracji. Jednak tio- pochodna oksazafosfolidyny (**38**) nie jest podatna na protonację atomu azotu i w konsekwencji nie można jej włączyć do nukleozydu, a w warunkach hydrolizy w warunkach kwasowych nie jest podatna na otwarcie pierścienia.



Schemat 36: Usiarczenie 3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny, próba podstawienia otrzymanej pochodnej (**38**) do nukleozydu oraz badanie trwałości w warunkach hydrolizy w warunkach kwasowych.

6.3 Wykorzystanie 3-(pirydyn-2-yl)-oksazafosfolidyn nukleozydów w syntezie trifosforanów nukleozydów

Największą zaletą stosowania 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyn jest ich podatność na otwarcie pierścienia oraz prosta procedura wprowadzania tego cyklicznego ugrupowania fosforynowego do nukleozydu. Otwarcie pierścienia pod wpływem czynników nukleofilowych powoduje odtworzenie termolabilnej grupy ochronnej, której łatwe usunięcie w warunkach obojętnych pozwala na współdziałanie z innymi grupami ochronnymi stosowanymi w chemii organicznej. Otwarcie pierścienia i przywrócenie właściwości termolabilnych zachodzi na drodze hydrolizy w środowisku kwaśnym i jest możliwe dzięki obecności ugrupowania pirydynyowego, które wpływa na trwałość wiązania P-N.



Schemat 37: Hydroliza kwasowa oksazafosfolidyny – otwarcie pierścienia i przywrócenie funkcji TGO.

Zaplanowane prace rozpocząłem od testowania trwałości pierścienia 3-(Pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny w obecności wody i słabego kwasu jakim jest kwas octowy. W wyniku tej reakcji okazało się, że następuje rozerwanie wiązania N-P i otrzymujemy diester *H*-fosfonianowy (**48**), w którym odtworzona jest liniowa grupa TGO. Z kolei grupę ochronną można usunąć pod wpływem zwiększenia temperatury co powoduje powstanie monoestru *H*-fosfonianowego (**49**). Temperatura i środowisko wodne powodują wewnątrzcząsteczkową termocyklizację, która zachodzi w trakcie termoodblokowania, wytwarzając charakterystyczny produkt bicykliczny (**41**) powodując tym samym usunięcie termolabilnej grupy ochronnej (schemat 37). Reakcja otwarcia pierścienia przebiega z udziałem anionu oksonionowego (hydroniowego, wytworzonego podczas autohydrolizy wody w środowisku kwaśnym) i mechanistycznie jest przyłączeniem nowego podstawnika (OH) do centrum fosfonowego (**49**). Poprzez analogię można stwierdzić, że zastosowanie innych anionów otwierałoby drogę do syntezy kolejnych klas związków, w zależności od użytego czynnika nukleofilowego. W wyniku takiej reakcji (otwarcie pierścienia oksazafosfolidyny) powstałby produkt pośredni z termolabilną grupą 2-PyTGO. Należy jednak odpowiedzieć sobie na pytanie: czy stosując inne

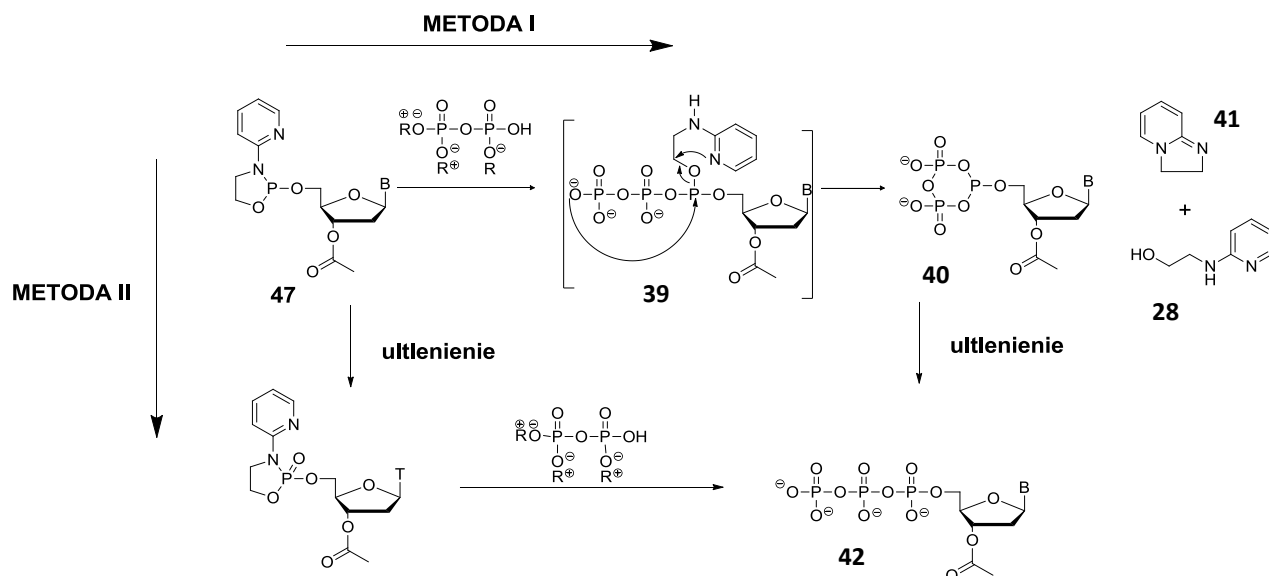
niż woda czynniki nuklofilowe, usunięcie grupy termolabilnej na drodze termocyklizacji będzie możliwe. Odblokowanie na drodze termocyklizacji zachodzi tylko wtedy, gdy związek, potencjalny produkt takiego odblokowania, będzie termodynamicznie trwalszy niż przed odblokowaniem. Oznacza to, że 2-TGO odtwarzająca się podczas otwarcia pierścienia oksazafosfolidyny nie w każdym układzie musi być dobrą grupą opuszczającą. W tym miejscu należy rozważyć wpływ dodatkowych modyfikacji w postaci grup o charakterze elektronowym lub objętościowym na stabilność oksazafosfolidyny w warunkach ataku nukleofilowego, jak również na labilność odtwarzającej się grupy termolabilnej.

Do dalszych badań wybrałem pirofosforany jako ciekawy przykład użytecznych nukleofili. Jeżeli atak pirofosforanu na ugrupowanie 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]okszafosfolidyny powiedzie się, a usunięcie grupy termolabilnej będzie możliwe to w wyniku takiej reakcji powinniśmy otrzymać trifosforany nukleozydów, związki o ogromnym potencjale aplikacyjnym w biochemii (Schemat 38). Trifosforany to przede wszystkim chemiczne magazyny energii, które regulują procesy biochemiczne zachodzące w komórkach organizmów żywych.

Wybór pirofosforanu jako czynnika nukleofilowego pozwolił zatem jednocześnie na badanie mechanizmu reakcji nukleofilowego otwarcia pierścienia 3-(pirydyn-2-yl)-okszafosfolidyny, oraz na próbę opracowania nowej, prostej i efektywnej syntezy trifosforanów nukleozydów – związków o szerokim zakresie zastosowań praktycznych.

Idea prowadząca do otrzymania trifosforanów nukleozydów przedstawiona została na Schemacie 36 i przedstawia dwie hipotetyczne metody syntezy trifosforanów wspomaganym usunięciem termolabilnej grupy ochronnej.

termolabilnej grupy ochronnej.

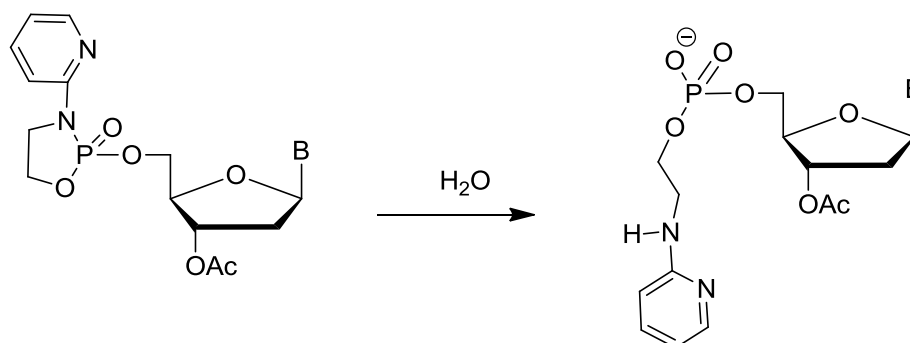


Schemat 38: Dwie rozważane koncepcje syntezy trifosforanów nukleozydów: I – atak pirofosforanu na fosfor P(III) i późniejsze utlenienie, II – utlenienie fosforu do postaci P(V) i atak pirofosforanu w kolejnym etapie.

Założeniem pierwszego podejścia było badanie podatności oksazafosfolidyny na nukleofilowy atak pirofosforanu, co pozwoliłoby w konsekwencji na otwarcie pierścienia i odtworzenie 2-PyTGO. Produktem pośrednim w takim przypadku powinien być fosforano-triester (**39**). Jednakże spodziewałem się, że będzie to produkt termodynamicznie nietrwały i w konsekwencji nastąpi jego szybkie przekształcenie do cyklicznego produktu pośredniego-metafosfonianu fosforanu (**40**). Wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja łańcucha polifosforowego powinna być siłą napędową odejścia termolabilnej grupy, której eliminacja może zachodzić na dwóch drogach: hydrolizy w środowisku kwaśnym, co prowadzi do usunięcia alkoholu 2-pirydynylowego (**28**) lub na drodze wewnątrzcząsteczkowej termocyklizacji, która prowadzi do charakterystycznego produktu bicyklicznego (**41**). Metafosfoniano fosforan w wyniku utlenienia przekształca się w liniową formę trifosforanu nukleozydu (**42**). Etap ten i związana z nim reakcja są opisane w literaturze.²⁶

Natomiast drugie podejście zakłada odwrócenie kolejności i rozpoczęcie procesu syntezy od utlenienia 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny do jej tlenku, a następnie badanie podatności na nukleofilowe otwarcie pierścienia pod wpływem pirofosforanów. Eliminuje się w ten sposób możliwość niepożądanego hydrolizy do *H*-fosfonianów pod wpływem wody. Powstawanie *H*-fosfonianów oraz produktów ich dalszych przemian jest czynnikiem utrudniającym końcowe oczyszczanie. Wcześniejsze prace¹¹⁷ w naszym zespole pokazują, że otwarcie pierścienia tlenku oksazafosfolidyny jest możliwe (Schemat 39), jednak trudno na

początkowym etapie przewidzieć czy powstała forma liniowa będzie posiadać właściwości termolabilne.



Schemat 39: Otwarcie pierścienia tlenku oksazafosfolidyny pod wpływem wody.

W przedstawionej dysertacji prowadzone przez mnie prace koncentrowały się na podejściu pierwszym, natomiast podejście drugie jest w obszarze zainteresowań zespołu projektowego i nie będzie dalej omawiane w pracy. Przedstawienie tej metody jest dopełnieniem wiedzy na temat reaktywności 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny.

Przedstawione rozważania nakreśliły następujące kierunki badawcze:

- badanie wpływu modyfikacji 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny na reakcję otwarcia pod wpływem pirofosforanów
- Dobór odpowiedniego pirofosforanu pod względem właściwości nukleofilowych oraz zawartości wody
- Dobór czynnika utleniającego

6.4 Pirofosforany jako czynniki nukleofilowe

Pirofosforan jest kwasem czteroprotonowym, w którym każdy z anionów kwasowych jest potencjalnym centrum nukleofilowym. Kwas pirofosforowy jest przy tym cząsteczką stosunkowo niedużą, co ogranicza wpływ ewentualnej zawady przestrzennej. Reakcja 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny z pirofosforanem wymaga przede wszystkim warunków bezwodnych. Przeprowadzając ją w rozpuszczalnikach organicznych (łatwych do wysuszenia) napotkamy na problem z rozpuszczeniem pirofosforanu. Kwas pirofosforowy, jak i jego sole nieorganiczne (występujące często w postaci uwodnionej), są związkami praktycznie nierozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych. Dlatego aby przeciwdziałać temu zjawisku stosuje się pirofosforany w postaci soli z obszernymi alifatycznymi kationami amoniowymi, które ułatwiają rozpuszczanie w rozpuszczalnikach organicznych. Analiza

literaturowa pokazuje, że najpowszechniej stosowane w reakcjach podobnego typu są organiczne sole kwasu pirofosforowego przedstawione w tabeli 1.

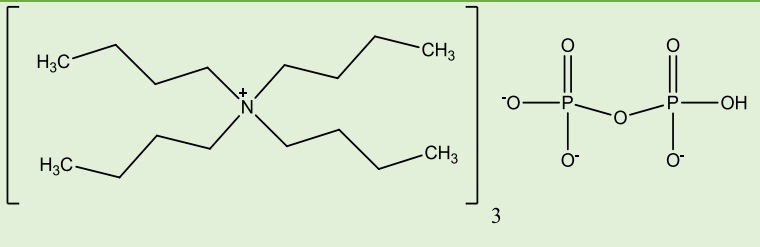
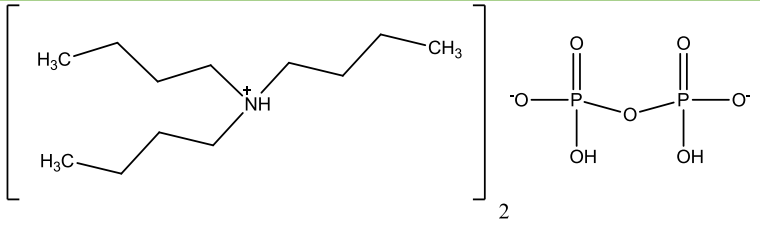
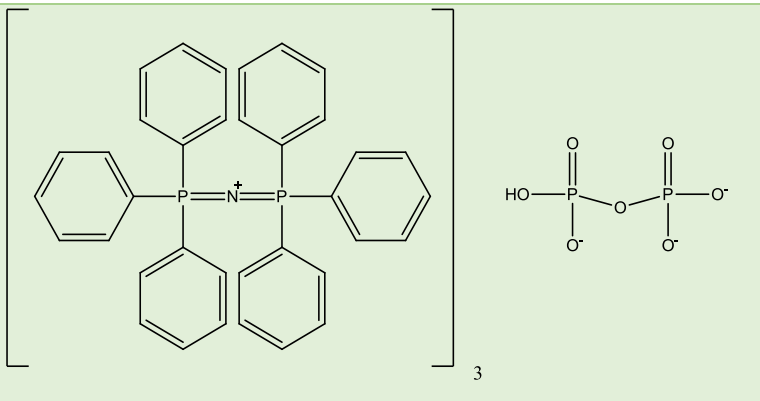
Nazwa	Struktura
pirofosforan <i>tris</i> (tetrabutylaminowy)	
pirofosforan <i>bis</i> (tributylaminowy)	
Pirofosforan <i>tris</i> { <i>bis</i> (trifenylfosforanyl-dieno)aminowy} (PPN)	

Tabela 2: Zestawienie soli kwasu pirofosforowego stosowanych w badaniach.

Pirofosforan *tris*(tetrabutylaminowy) jest popularnym substratem w wielu metodach syntezy trifosforanów nukleozydów. Obecność trzech mocno rozgałęzionych kationów aminowych pozwala na użycie rozpuszczalników organicznych, co w kontekście reakcji bardzo podatnych na hydrolizę jest pożądane. Niestety związek ten, występujący w postaci białego proszku jest wyjątkowo hydrofilowy (właściwości silnie higroskopijne). W kontakcie z powietrzem atmosferycznym momentalnie pochłania wilgość, co można obserwować przez zmianę jego struktury krystalicznej (rozpuszcza się). Ta właściwość czyni ten pirofosforan uciążliwym, gdyż wymaga długiego procesu suszenia pod próżnią przed reakcją i utrzymywania możliwie suchych warunków na każdym jej etapie. Dodatkowo powinien być przechowywany w zamrażarce w niskiej temperaturze w warunkach bezwodnych. Utrudnia to przygotowanie większych ilości tego preparatu do wykorzystania w terminie późniejszym. Każdorazowo przed planowaną syntezą syntezę musi być odpowiednio przygotowana nowa porcja.

Dostępna w literaturze preparatyka jednoznacznie wskazuje, że do reakcji stosuje się duże nadmiary pirofosforanu (często rzędu 8-9 ekwiwalentów). Niestety nie znalazłem jednoznacznego wyjaśnienia przyczyny takiego postępowania, więc zakładam, że takie nadmiary zostały wyznaczone empirycznie, jako pozwalające na otrzymanie najlepszych wydajności w najkrótszym czasie. Przyczyn zapewne jest kilka. Po pierwsze może mieć to związek z równowagą jonową w roztworze i szybką migracją jonów, przez co w danym momencie tylko pewna część substratu jest reaktywna. Po drugie pirofosforan *tris*(tetrabutylloaminowy) względem kwasu difosforowego, ma tylko jedną reaktywną grupę hydroksylową. Utrudniony jest też dostęp do centrum reakcyjnego ze względu na otoczenie obszernych kationów. Oprócz wynikającej z tego faktu mniejszej reaktywności, pod uwagę należy wziąć prawdopodobną niższą kwasowość związku soli pirofosforanowych, mimo że oznaczanie pKa tych związków jest trudne lub niemożliwe i wymaga obecności wody, co nie oddaje rzeczywistych warunków reakcji. Wskazuje to jednak, że już wyjściowo nie można tej reakcji uznać za bardzo efektywną i prawdopodobnie tłumaczy stosowanie takich nadmiarów.

Inną kombinacją pirofosforanu w postaci soli alkiloaminowej jest pirofosforan *bis*(tributylloaminowy), który ma dwie wolne grupy hydroksylowe, a zastosowane kationy aminowe są mniej rozgałęzione. Wypróbowanie w reakcji tego pirofosforanu wiązało się z założeniem, że będzie on bardziej kwasowy od swojego odpowiednika z jedną wolną grupą OH, oraz z uwagi na mniejszą ilość kationów (które są również mniej obszerne przestrzennie) centrum reakcyjne będzie łatwiej dostępne i w związku z tym będzie można użyć mniejszych nadmiarów, co w praktyce oznaczałoby wprowadzanie mniejszych ilości wody z odczynnikiem.

Trzecim zaproponowanym do badań czynnikiem nukleofilowym jest pirofosforan *tris*{*bis*(trifenylfosforanylidieno)aminowy} (PPN), wykorzystywany do syntezy trifosforanów nukleozydów jako zamiennik pirofosforanu *tris*(tetrabutylloaminowego).¹³⁹ Jak widać w tabeli 2, kationy aminowe zostały zastąpione kationami *bis*(trifenylfosforanylidienowymi). Preparatyka tego odczynnika jest prosta, nie wymaga drogich odczynników, a jego największą zaletą jest brak właściwości higroskopijnych i możliwość wysuszenia oraz przechowywania w postaci ciała stałego przez dłuższy czas.

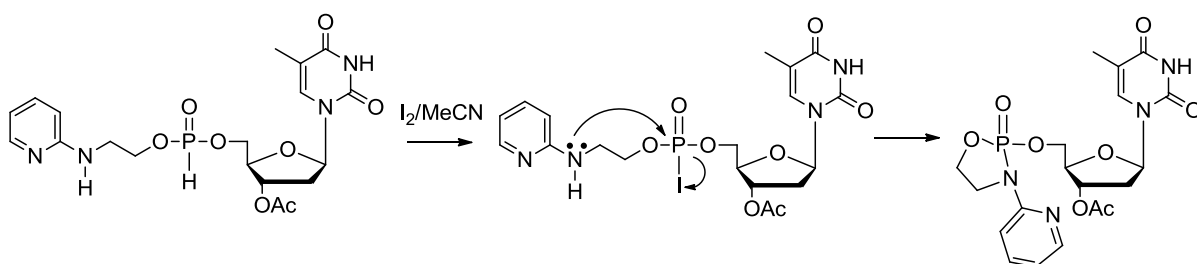
6.5 Wybór czynnika utleniającego

Omawiana sekwencja reakcji chemicznych rozpoczyna się od związków gdzie atom fosforu jest na III stopniu utlenienia, ale końcowy produkt- trifosforan ma już stopień utlenienia V. W

związku z powyższym w ścieżce syntetycznej należy uwzględnić etap utlenienia. Jest to istotny element syntezy, gdyż stosowanych jest wiele czynników utleniających w zależności od właściwości chemicznych centrum fosforowego.

Najpopularniejszym jest utlenianie jodem w obecności nukleofilowej zasady jaką jest pirydyna. Mechanizm zakłada w pierwszej kolejności podstawienie atomu jodu w miejsce pary elektronowej na atomie fosforu, a następnie szybkie podstawienie przez cząsteczkę pirydyny. Dopiero później następuje atak cząsteczki wody i wytworzenie formy fosforanowej.

Niestety stosując 2-pirydynylowe grupy ochronne nie możemy stosować jodu jako czynnika utleniającego. Opisana została wewnątrzcząsteczkowa reakcja cyklizacji z udziałem 2-PyTGO podczas utleniania przy użyciu jodu.¹¹⁷ Udowodniono, że 2-pirydynylowy atom azotu jest zdolny do podstawienia atomu jodu w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji prowadzącej do oksazafosfolidyny.

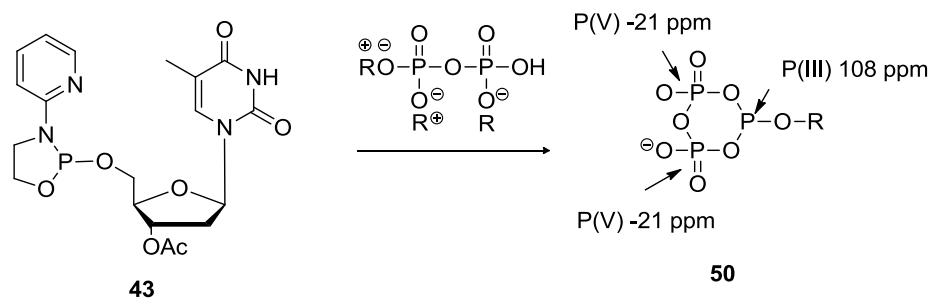


Schemat 40: Cyklizacja 2-PyTGO w warunkach utleniania pod wpływem jodu.

Dlatego w dalszych pracach aby wyeliminować możliwość wewnątrzcząsteczkowego udziału 2-PyTGO w reakcji podstawienia zastosowałem wodoronadtlenek *tert*-butylu w formie 5,5 M rotworu w bezwodnym dekanie. Jest to handlowo dostępny, bardzo powszechnie używany czynnik utleniający. Zaletą stosowania takiego odczynnika jest jednoetapowy mechanizm bezpośredniego utlenienia, który nie wymaga przyłączenia jodu i powstawania bardzo reaktywnego produktu przejściowego, który prowadzi do powtórnej cyklizacji. Dodatkowo ułatwia utrzymanie bezwodnych warunków, które są niewskazane na żadnym etapie reakcji. Zastosowanie wodoronadtlenku *tert*-butylu pozwoliło na szybkie utlenienie P(III) do P(V) co mogłem obserwować jako zanik sygnału od fosforu P(III) podczas analizy ³¹P NMR. Szybkość tego etapu jest na tyle duża, że eliminuje konkurencyjne reakcje uboczne. Należy dodać, że brak zawartości wody w dodawanym roztworze pozwolił na uniknięcie powstawania niepożądanego cyklicznego *H*-fosfonianu.

6.6 Zastosowanie pirofosforanu *tris*(tetrabutylaminowego) jako czynnika nukleofilowego

Rozpoczynając prace nad opracowaniem metody syntezy trifosforanów nukleozydów wypróbowałem kilka wariantów polegających na zmianie kolejności działań na poszczególnych etapach, stosowania różnych nadmiarów pirofosforanu, oraz doboru rozpuszczalnika. Zdecydowałem się na wybór acetonitrylu jako medium reakcji, gdyż jest on rozpuszczalnikiem dobrze rozpuszczającym nukleozydy z grupą oksazafosfolidynową oraz pozwala na osiągnięcie niskiej zawartości wody (ok. 5-10 ppm). Podczas optymalizacji warunków reakcji udowodniłem że najlepsze rezultaty osiągnąłem poprzez dodanie do wysuszonej oksazafosfolidynowej pochodnej nukleozydu 6 ekwiwaleatów pirofosforanu rozpuszczonego w bezwodnym acetonitrylu. Kolba reakcyjna była napełniona gazem obojętnym (argonem), co pozwoliło na wyeliminowanie tlenu i wody z powietrza. W krótkim czasie ok 30 minut obserwowałem za pomocą ^{31}P NMR zanik dwóch sygnałów (129,8ppm i 125,5ppm) pochodzących od fosforu w pierścieniu oksazafosfolidyny i powstawanie charakterystycznego tripletu przy ok 107 ppm powstającego od atomu fosforu P(III), oraz odpowiadających mu dwóch sygnałów przy ok. -19 ppm pochodzących od dwóch atomów P(V) w powstającym produkcie pośrednim (**50**) (Schemat 41).



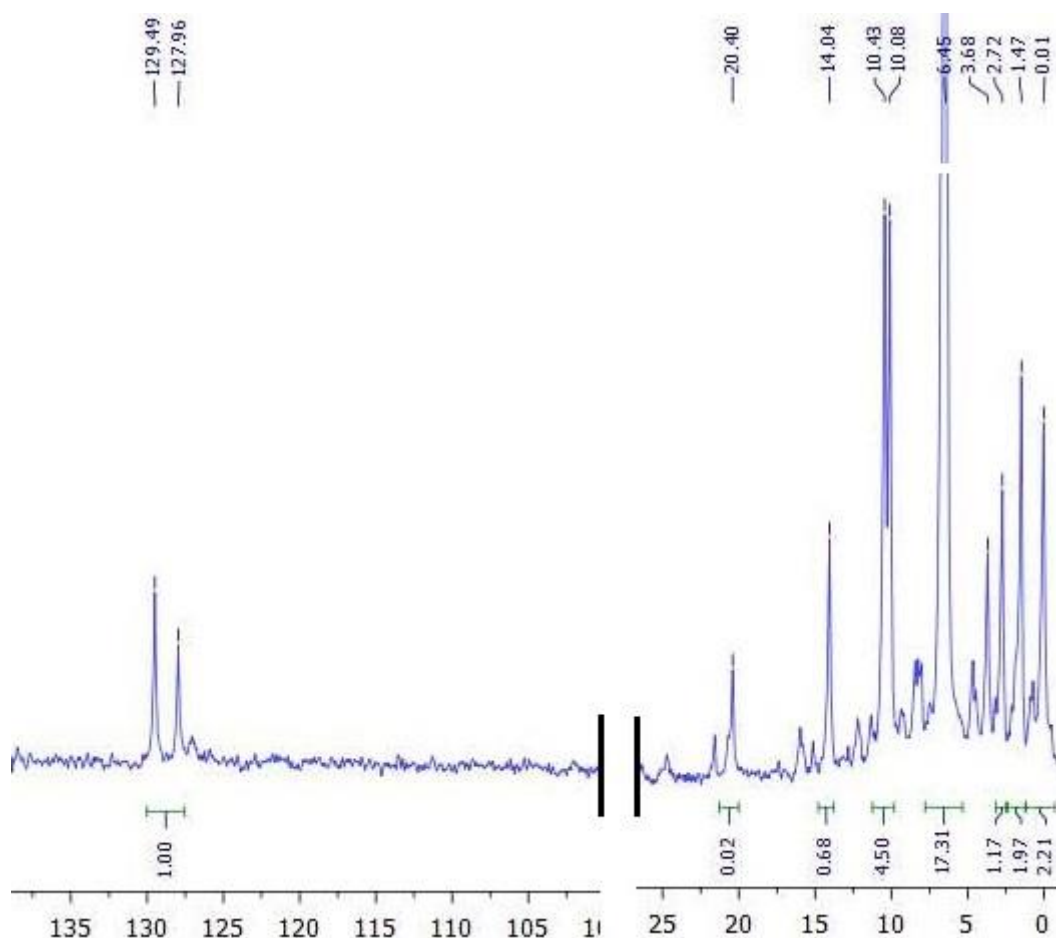
Schemat 41: Powstawanie cyklicznego produktu pośredniego w reakcji oksazafosfolidyny z pirofosforanem.

Niestety obserwowaną reakcją uboczną była hydroliza, wynikająca z obecności niemożliwych do całkowitego wyeliminowania ilości wody w mieszaninie reakcyjnej. Następnym krokiem było utlenienie atomu fosforu P(III) otrzymanego związku, powodujące w założeniu otwarcie pierścienia i powstanie trifosforanu nukleozydu. Po dodaniu czynnika utleniającego nie udało mi się zaobserwować charakterystycznej grupy sygnałów (ok. -6, -11 i -23 ppm – kolejno od atomów P γ , P α i P β) wskazujących na powstawanie trifosforanu. Obserwowałem natomiast

bardzo dużo trudnych do zidentyfikowania sygnałów, prawdopodobnie produktów rozpadu zarówno cyklicznego produktu pośredniego, jak i produktów reakcji ubocznych. Również analiza TLC nie pozwoliła na wyodrębnienie jakichkolwiek fosforanów nukleozydów. Na tym etapie przyjąłem przypuszczenie, że w wyniku pierwszego etapu reakcji grupą odchodzącą był nukleozyd, a nie tak jak zaplanowałem odtwarzająca się grupa termolabilna..

6.7 Zastosowanie pirofosforanu *bis*(tributyloaminowego) jako czynnika nukleofilowego

Pirofosforan *bis*(tributyloaminowy) miał w założeniu być bardziej reaktywny dzięki dwóm grupom OH, oraz mniejszemu wpływowi sterycznemu obszernych kationów aminowych. Zastosowanie tego związku powinno pomóc w szybszym przebiegu reakcji i pozwolić na odejście termolabilnej grupy ochronnej. Wyniki z przeprowadzonej z jego wykorzystaniem syntezy wskazywały, że nie jest to wygodny czynnik nukleofilowy w kontekście zaplanowanej syntezy. Kontrola reakcji za pomocą ^{31}P NMR wykazała co prawda zanikanie sygnałów od atomu fosforu w oksazafosfolidynie (129,5 ppm oraz 127,96 ppm), natomiast zamiast spodziewanego cyklicznego produktu przejściowego **50**, otrzymywałem szereg sygnałów od powstających produktów ubocznych. Analiza ^{31}P NMR wskazuje, że głównym produktem ubocznym są w tej sytuacji jest *H*-fosfonian, co wskazuje bezpośrednio na dużą zawartość wody w dodawanym substracie, a pośrednio na słabą reaktywność tego pirofosforanu względem oksazafosfolidyny. Z uwagi na trudności z pozbyciem się wody z tego odczynnika jego gorszą reaktywność oraz słabszą rozpuszczalność w środowisku reakcji (acetonitryl), zdecydowałem się nie kontynuować badań z wykorzystaniem pirofosforanu *bis*(tributyloaminowego).

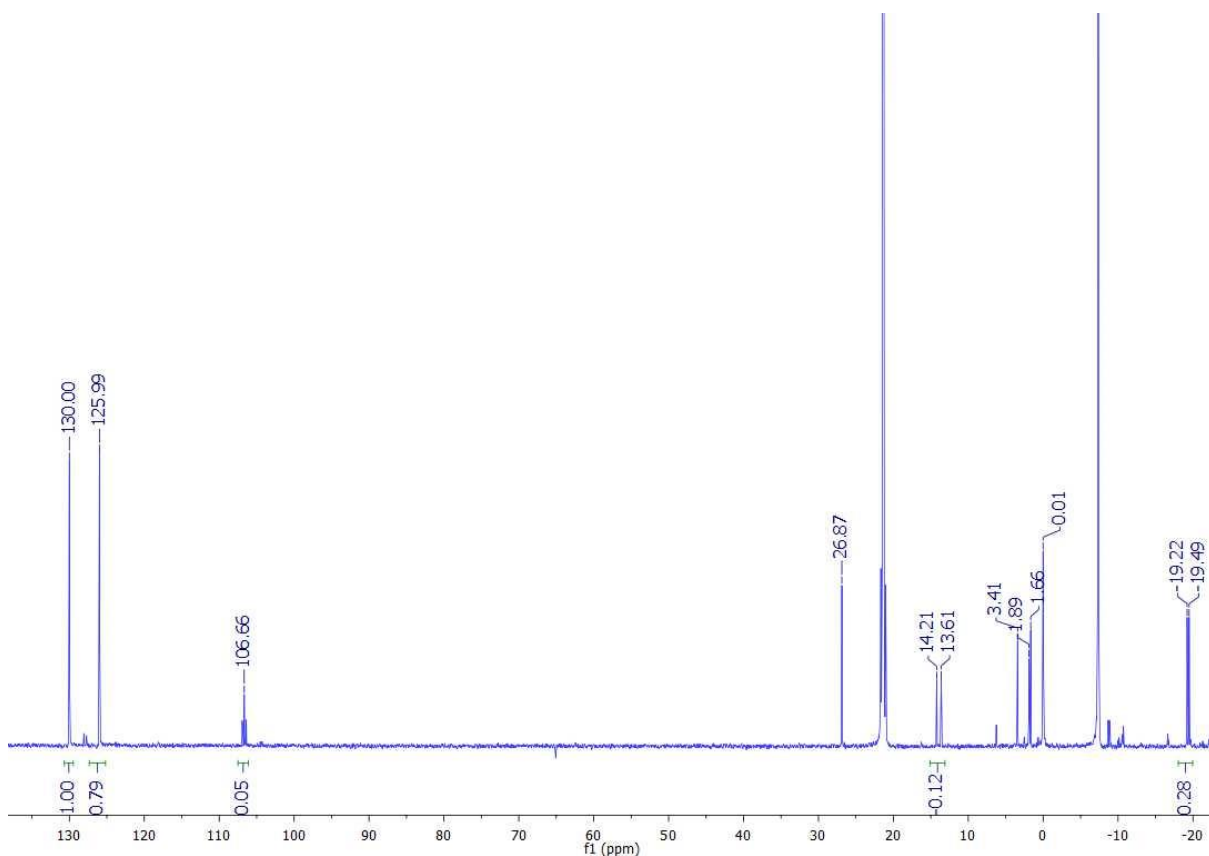


Schemat 42: Widmo ^{31}P NMR z przebiegu reakcji z wykorzystaniem pirofosforanu *bis*(tributyloaminowego).

6.8 Zastosowanie hydrofobowego pirofosforanu PPN jako czynnika nukleofilowego

Zastosowanie pirofosforanu *tris*{*bis*(trifenylfosforanyl-dieno)aminowego} (PPN), jest korzystne z uwagi na brak właściwości higroskopijnych. Pozwala to na rozwiązanie problemu z całkowitym wysuszeniem czynnika nukleofilowego, a dzięki temu zmniejszenie strat wydajnościowych powodowanych ubocznymi reakcjami hydrolizy. Oprócz potencjalnego zwiększenia wydajności, chciałem uzyskać prostszy w interpretacji obraz widm ^{31}P NMR przez brak produktów hydrolizy, oraz produktów ich dalszego rozpadu np. podczas reakcji utleniania. Reakcje z użyciem tego pirofosforanu rzeczywiście charakteryzują się mniejszą zawartością wody. Niestety problemem jaki napotkałem w trakcie prac była niższa reaktywność pirofosforanu PPN. Pozwalał on co prawda na formowanie się niewielkiej ilości pośredniego metafosfonianu fosforanu **50**, ale po ustaleniu się pewnego stanu równowagi reakcja zatrzymywała się i nie obserwowałem dalszego ubywania substratu na rzecz powstawania

pożądanego produktu. W celu przesunięcia równowagi reakcji stosowałem duże nadmiary pirofosforanu (nawet 9:1 w stosunku do substratu oksazafosfolidynowego), co nie przyniosło spodziewanego rezultatu. Reakcję monitorowałem przez 94 godziny i przy braku postępów zdecydowałem się zatrzymać. Zastosowany pirofosforanu PPN jest prawdopodobnie zbyt słabym nukleofilem, żeby pozwolić na wydajne otwieranie pierścienia oksazafosfolidyny. Dodatkowo, znaczenie na przebieg tej reakcji może mieć jego wielkość, która z uwagi na obecność trzech kationów z sześcioma podstawnikami fenyłowymi w każdym, może być zbyt zawadzona przestrzenie i utrudniać dostęp do centrum reakcyjnego.

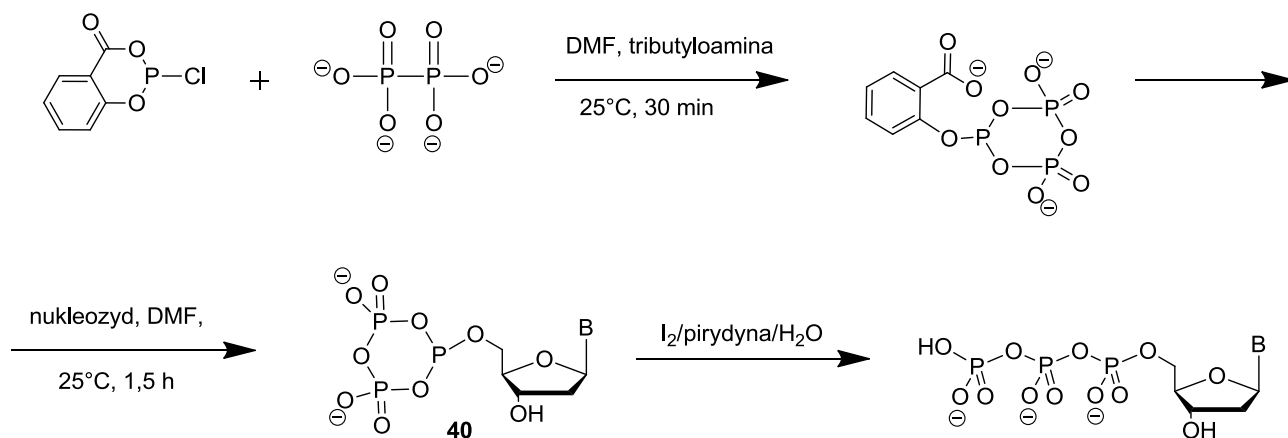


Schemat 43: Widmo ^{31}P NMR reakcji nukleozydowej oksazafosfolidyny **43** z pirofosforanem PPN.

6.9 Synteza cyklicznego czynnika trifosforylującego

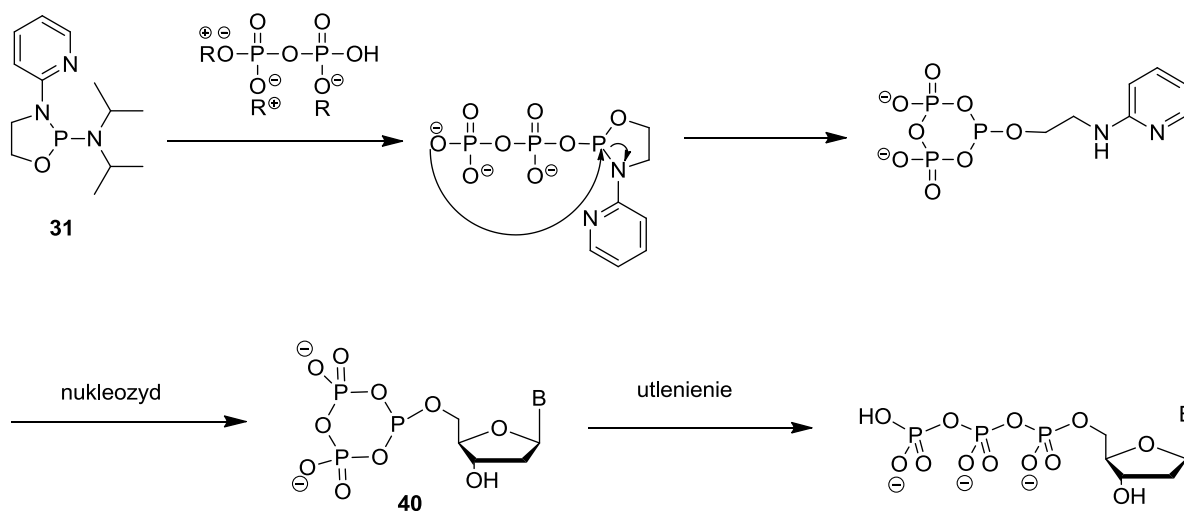
Prowadząc badania nad otwarciem pierścienia oksazafosfolidyny za pomocą pirofosforanów, mając na uwadze możliwość zastosowania tych reakcji w kontekście syntezy trifosforanów nukleozydów, postanowiłem zbadać nieco inną koncepcję, polegającą na wytworzeniu cyklicznego czynnika fosfitylującego, zawierającego trzy atomy fosforu, który po reakcji z

nukleozydem prowadziłby to uzyskania NTP. Pomysł oparłem na znanej z literatury strategii (Schemat 44).¹⁴⁰



Schemat 44: Synteza NTP przez wytworzenie łagodnego czynnika fosfitylującego i jego przyłączenie do nukleozydu (prezentowana metoda za: Caton-Williams, J.; Smith, M.; Carrasco, N.; Huang, Z., *Org. Letters* 2011, 13 (16), 4156–4159).

Przeprowadziłem zatem reakcję 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**31**) z pirofosforanem *tris*(tetrabutylaminowym). W założeniu atak pirofosforanu miał spowodować otwarcie pierścienia oksazafosfolidyny, po czym powinna nastąpić wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja prowadząca do wytworzenia sześcioczłonowego pierścienia metafosfonianu fosforanu. W wyniku tego powinna odtworzyć się liniowa forma 2-PyTGO jako konsekwencją otwarcia pierścienia oksazafosfolidyny. Tak przygotowany czynnik planowałem wykorzystać w reakcji z nukleozydem (Schemat 45).



Schemat 45: Planowany przebieg wytworzenia cyklicznego czynnika trifosforylującego z wykorzystaniem otwarcia pierścienia oksazafosfolidyny w celu syntezy NTP.

Badania nad takim podejściem pokazały jednak, że pierścień oksazafosfolidyny w formie amidofosforynu nie jest podatny na atak pirofosforanu. Pomimo użycia nadmiaru pirofosforanu względem oksazafosfolidyny analiza ^{31}P NMR nawet po dłuższym czasie nie wykazała żadnej zmiany. Ponieważ dopiero protonacja atomu azotu pozwala na podstawienie aminy diizopropylowej, do mieszaniny reakcyjnej dodałem słabego kwasu jakim jest BMT, jednakże jedynym efektem jaki obserwowałem było wytworzenie cyklicznego *H*-fosfonianu (**51**), który jest przedstawiony na Schemacie 27. Metoda nie pozwoliła na uzyskanie zakładanych rezultatów. Natomiast pozwoliła spojrzeć na reakcję otwarcia pierścienia oksazafosfolidyny trochę z innej strony. Otwarcie pierścienia oksazafosfolidyny jest zależne od otoczenia i zachodzi jeżeli wynikiem takiego przekształcenia jest produkt termodynamicznie trwalszy.

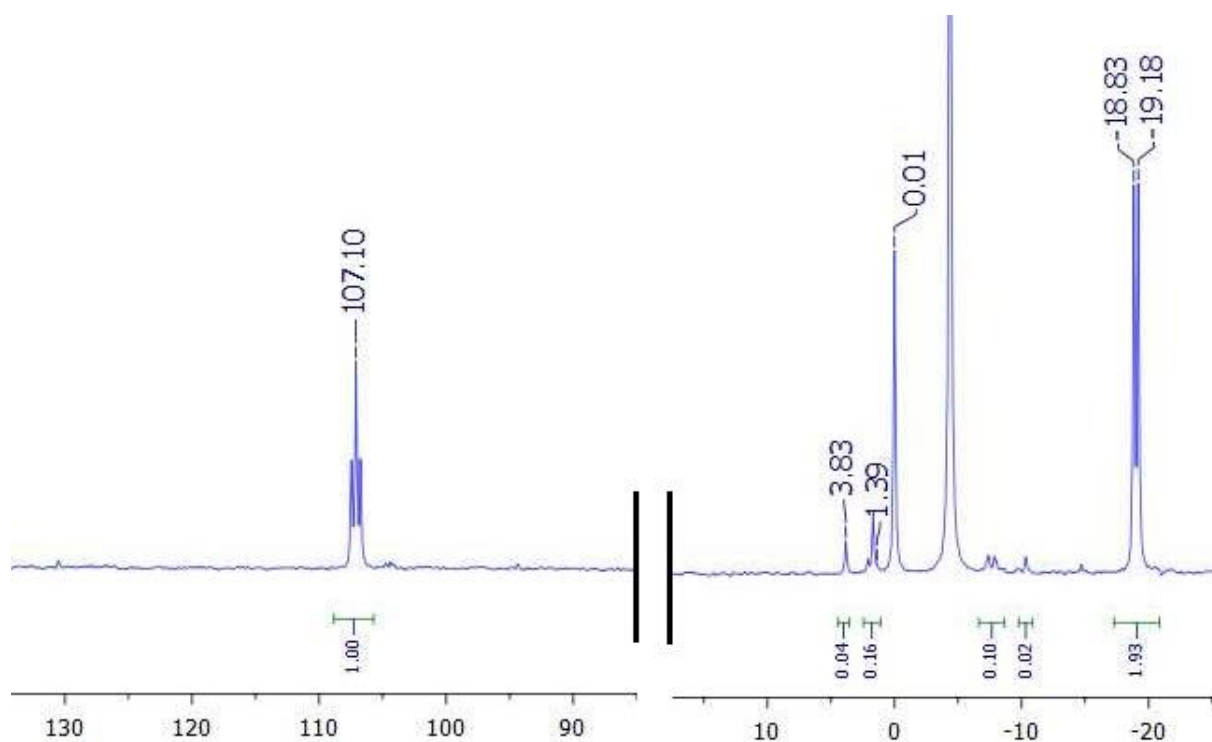
6.10 Podsumowanie wyników i dyskusja

W trakcie prac badawczych przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej opracowałem i wykonałem syntezę trzech cyklicznych pochodnych 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny: 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**31**); 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl- [1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32**) oraz 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo-5-metylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**33**). Różnią się one właściwościami oraz reaktywnością zarówno podczas cyklizacji jak i otwierania pierścienia [1,3,2]oksazafosfolidyny. Przeprowadzenie syntezy, określenie mechanizmu cyklizacji jak również metod ich oczyszczania pozwoliło mi uzyskać związki, które mogły być potencjalnymi substratami w syntezie ważnych biologicznie komponentów. W celu dalszego prowadzenia badań postanowiłem zbadać ich podatność na atak nukleofilowy pirofosforanu. Wybór takiego czynnika nukleofilowego podyktowany był potencjalnymi praktycznymi zastosowaniami takiej reakcji, prowadzącymi w przypadku użycia nukleozydowych pochodnych oksazafosfolidyny do opracowania nowej metody syntezy trifosforanów nukleozydów. W pierwszej kolejności przeprowadziłem opracowanie i optymalizację metody syntezy modyfikowanych alkoholi 2-pirydynyloowych, jako prekursorów oksazafosfolidyny. W kolejnym etapie pracy otrzymane aminoalkohole wykorzystałem do syntezy odpowiednich oksazafosfolidyn. 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl- [1,3,2]-oksazafosfolidynę (**32**) otrzymałem w postaci czterech diastereoizomerów. Pogłębione badania nad tą modyfikacją pozwoliły na poznanie struktury krystalicznej, określenie konfiguracji absolutnej na dwóch centrach stereogenicznych i przypisanie poszczególnym stereoizomerom odpowiadających im sygnałów na widmie ^{31}P NMR. Uzyskana wiedza pozwoliła na badania mechanizmów reakcji z

nukleozydem, oraz prób wykorzystania do stereoselektywnej syntezy fosforanów i tiofosforanów nukleozydów.

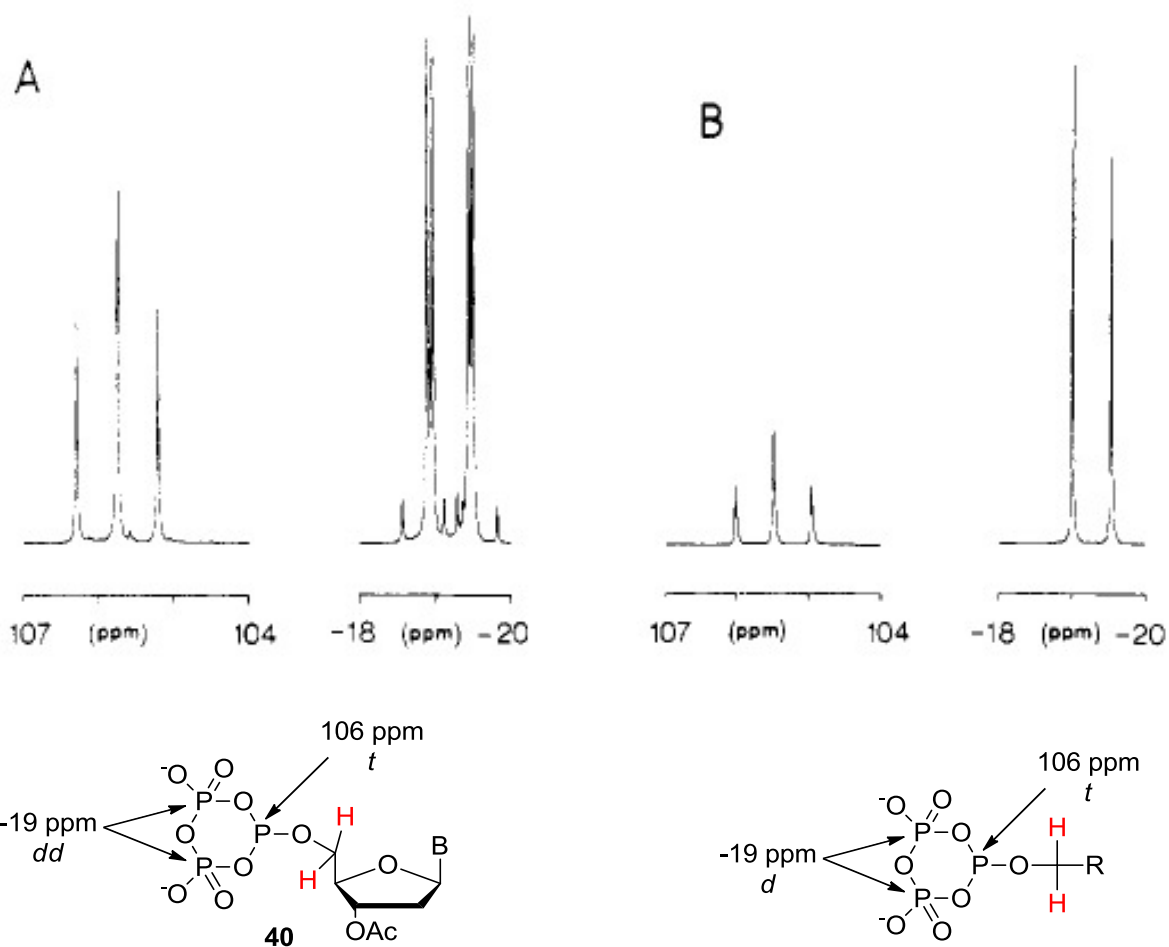
Zebrana analiza literaturowa oraz przygotowane nukleozydowe pochodne omawianych oksazafosfolidyn pozwoliły na opracowanie strategii wykorzystania 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny w syntezie trifosforanów nukleozydów. Podczas optymalizacji i badania różnych pochodnych pirofosforanów jako czynników nukleofilowych, ostatecznie wybrałem pirofosforan *tris*(tetrabutylamoniowy) jako najodpowiedniejszy ze względu na dobrą rozpuszczalność w stosowanym rozpuszczalniku (acetonitryl), oraz zdecydowanie najlepszą reaktywność względem 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny. Z uwagi na możliwość występowania niepożądanych reakcji wewnątrzcząsteczkowych z udziałem 2-pirydynolowych TGO zrezygnowałem z zastosowania jodu jako czynnika utleniającego. Dobre rezultaty udało mi się osiągnąć stosując wodoronadtlenek *tert*-butylu, który oprócz powszechnie wykorzystywanych właściwości utleniających, dostępny jest w wygodnej formie – jako roztwór w bezwodnym dekanie. Wykonałem dużą ilość powtórzeń reakcji, co pozwoliło mi znaleźć zależności pomiędzy przygotowaniem odczynników, stosowanym rozpuszczalnikiem, kolejnością działań i sposobami oczyszczania i analizą powstających produktów.

Układem modelowym, od którego rozpocząłem badania nad trwałością oksazafosfolidyny i opracowaniu potencjalnych warunków syntezy trifosforanów poprzez nukleofilowe otwarcie była 3'-*O*-acetylo-5'-[(3-pirydyn-2-ylo)-(1,3,2)-oksazafosfolidyno]tymidyna (**43**). Reakcja z 6-cio krotnym nadmiarem pirofosforanu prowadziła do stosunkowo szybkiego powstawania produktu pośredniego charakteryzującego się na widmie ^{31}P NMR trypletem o przesunięciu chemicznym $\delta = 107$ ppm (odpowiadającym atomowi fosforu P(III) uformowanym metafosfonianu fosforanu) oraz odpowiadającym temu sygnałowi dubletowi przy -19 ppm świadczącemu o przyłączeniu do cząsteczki dwóch atomów fosforu P(V) (Schemat 46).



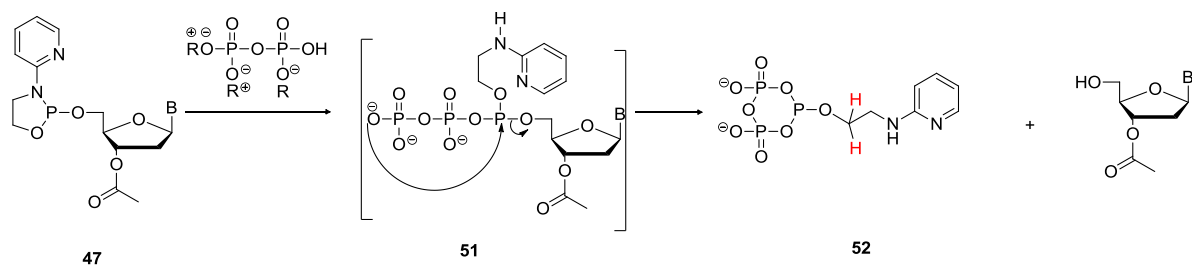
Schemat 46: Widmo ^{31}P NMR pierwszego etapu reakcji – widoczny tryplet przy 107 ppm i odpowiadający mu dublet przy -19 ppm. Duży sygnał przy ok. -4 ppm pochodzi od pirofosforanu.

Na podstawie analizy widm ^{31}P NMR można było wnioskować że przebieg reakcji jest zgodny z oczekiwaniami, czyli atak pirofosforanu prowadzi do otwarcia pierścienia oksazafosfolidyny i usunięciu grupy termolabilnej. Jeżeli tak się stało to powinien powstać stan przejściowy (**39**) niemożliwy do zarejestrowania za pomocą ^{31}P NMR, który w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji części trifosforanowej, prowadzi do produktu przejściowego - metafosfonianu fosforanu nukleozydu (**40**). Nieoczekiwanie obserwowaliśmy wspomniany dublet przy -19 ppm, świadczący o obecności atomów fosforu P(V). Według wiedzy literaturowej⁷² jeżeli otrzymywany jest nukleozydowy metafosfonian fosforanu, sygnał ten powinien przyjmować postać dubletu dubletów, a rozszczepienie to powinno być wynikiem wpływu heterotopowych (w tym przypadku konkretnie diastereotopowych) protonów przy węglu w pozycji 5' nukleozydu (Schemat 47). Rozszczepienie takie wynika z braku płaszczyzny symetrii cząsteczki.



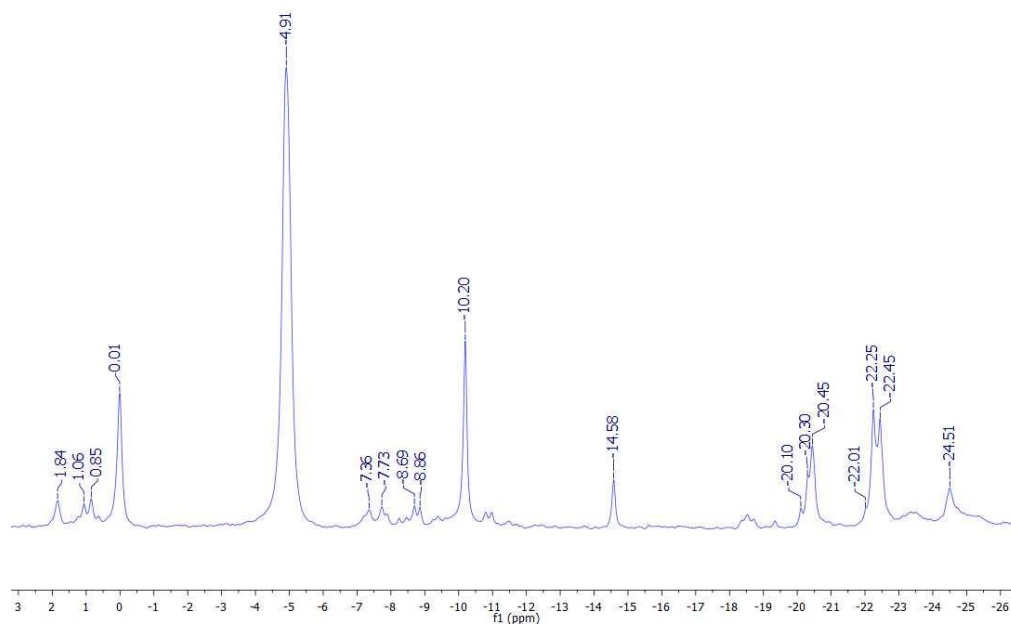
Schemat 47: Widma metafosfonianu fosforanu, produktu pośredniego przed utlenieniem do trifosforanu; **A:** tryplet, oraz odpowiadający mu dublet dubletów wynikający z rozszczepienia przez diastereotopowe atomy wodoru przy węglu C5' nukleozydu; **B:** tryplet, oraz odpowiadający mu dublet- brak rozszczepienia sygnałów wynika z obecności homotopowych atomów wodoru przy atomie węgla α w symetrycznym podstawniku (prezentowane skany widm za: Ludwig, J.; Eckstein, F., J. Org. Chem. 1989, 54 (3), 631–635).

Zastanawiający inny obraz w widmie ^{31}P NMR był trudny do interpretacji na tym etapie badań i przyjąłem założenie, że jest to efekt stosowania innego rozpuszczalnika, który często ma wpływ na brak rozszczepień sygnałów w widmach ^{31}P NMR i nie jest łatwy, a często nawet możliwy do przewidzenia. Brak rozszczepienia byłby możliwy również gdyby nukleozyd został usunięty ze związku **51**, a 2-pirydynylova termolabilna grupa ochronna pozostała przyłączona do metafosfonianu fosforanu **52** (Schemat 48).



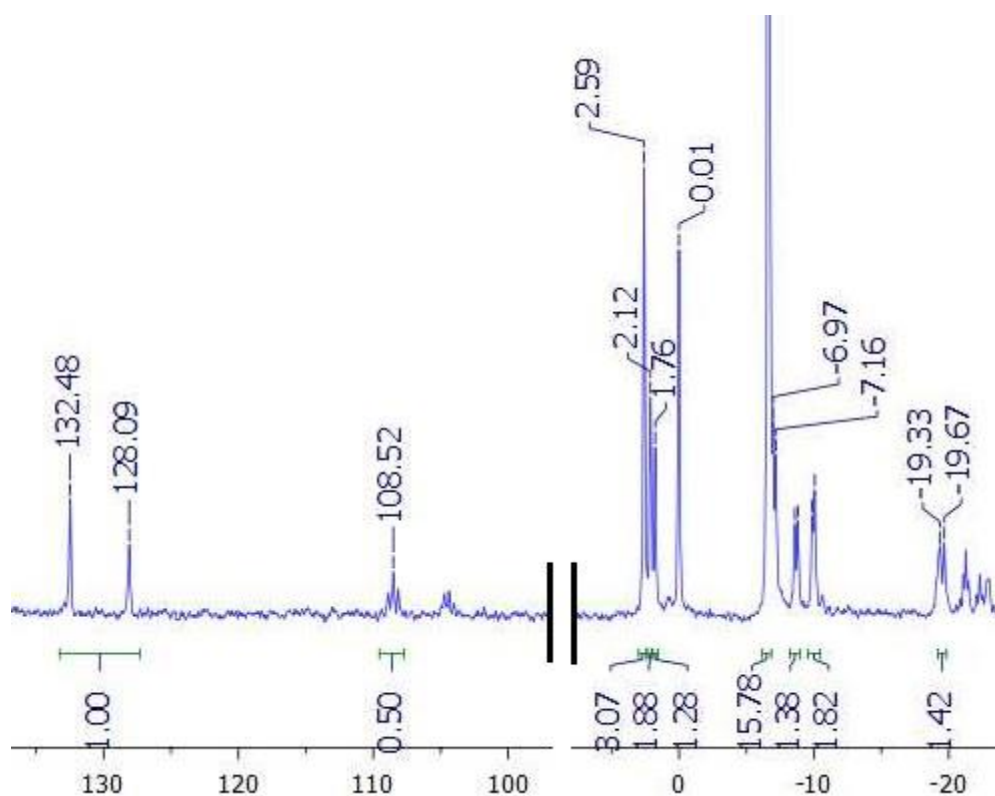
Schemat 48: Postulowany przebieg reakcji pirofosforanu z oksazafosfolidynową pochodną tymidyny.

Założenie to było mało prawdopodobne, gdyż w dotychczasowych badaniach pokazano że grupa termolabilna jest łatwo usuwana z centrum fosforanowego, a nukleozyd nie jest dobrą grupą odchodzącą. Postulowane otwarcie pierścienia oksazafosfolidyny powinno prowadzić do odtworzenia dobrej grupy odchodzącej jaką jest 2-Py TGO. Dalsze prace koncentrowały się na poddawaniu mieszaniny reakcyjnej działaniu czynnika utleniającego, który w założeniu miał spowodować utlenienie atomu fosforu P(III) i otwarcie sześcioczłonowego pierścienia, a w konsekwencji uzyskanie trifosforanu nukleozydu. Podczas utleniania zaobserwowałem szybki zanik trypletu przy 107 ppm, co świadczy o utlenieniu fosforu P(III), natomiast w wyniku tej reakcji zamiast charakterystycznych sygnałów dla trifosforanu otrzymałem szereg trudnych do zidentyfikowania sygnałów i grup sygnałów fosforanowych w zakresie przesunięć chemicznych między 3 ppm a -25 ppm (Schemat 49).



Schemat 49: Widmo ^{31}P NMR otrzymane w wyniku reakcji utleniania. Brak spodziewanych sygnałów charakterystycznych dla trifosforanu nukleozydu (dublet -6 ppm, dublet -11 ppm, tryplet -23 ppm), widoczne sygnały produktów ubocznych.

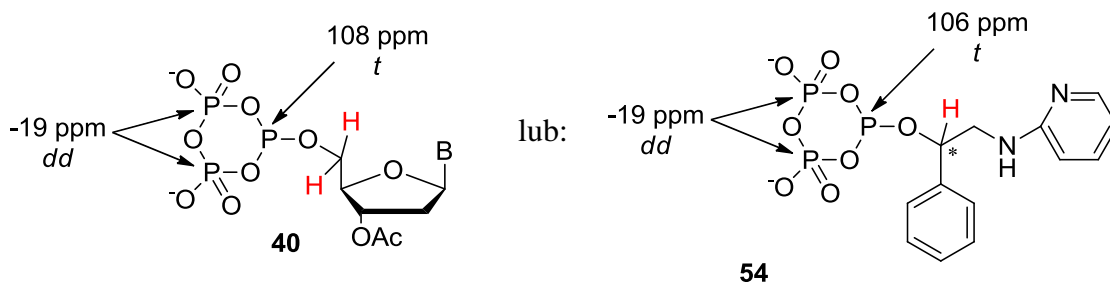
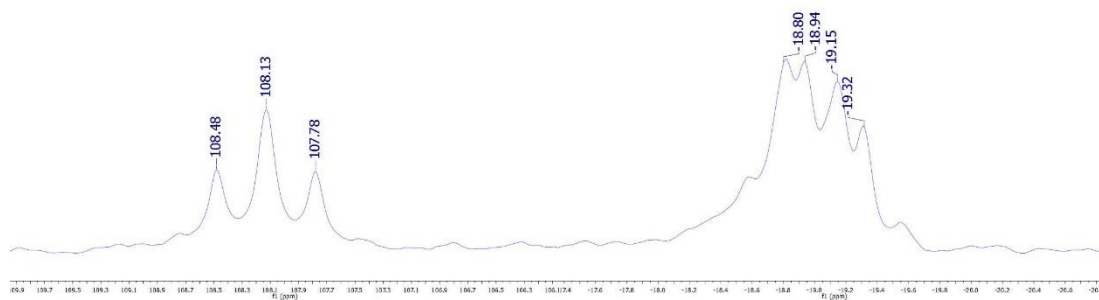
Z uwagi na trudności w wyizolowaniu poszczególnych produktów, oraz skomplikowany obraz NMR, postanowiłem sprawdzić działanie układu z wykorzystaniem kolejnej modyfikacji (**44**), która zawiera podstawnik metylowy w pierścieniu pirydynowym. Efekt donujący elektrony grupy metylowej w pozycji 5 pierścienia pirydyny, oraz jej wpływ na gęstość elektronową pirydynowego atomu azotu powinien mieć znaczenie w przebiegu reakcji otwarcia pierścienia oksazafosfolidyny pod wpływem czynnika nukleofilowego. Przeprowadzenie reakcji w analogicznych warunkach jak w przypadku pierwszej oksazafosfolidyny pozwoliło zauważyć zdecydowanie wolniejsze powstawanie produktu przejściowego **40** obserwowane za pomocą analizy ^{31}P NMR jako trypletu od atomu fosforu P(III) przy przesunięciu 108 ppm (Schemat 50).



Schemat 50: Widmo ^{31}P NMR pierwszego etapu reakcji. Widoczne są sygnały 132,48 ppm i 128,09 ppm pochodzące od substratu **44**, powstający tryplet przy 108 ppm wraz z odpowiadającym mu dubletem przy -19 ppm (pochodzące od matafosfonianu fosforanu) oraz szereg sygnałów pochodzących od konkurencyjnych reakcji ubocznych.

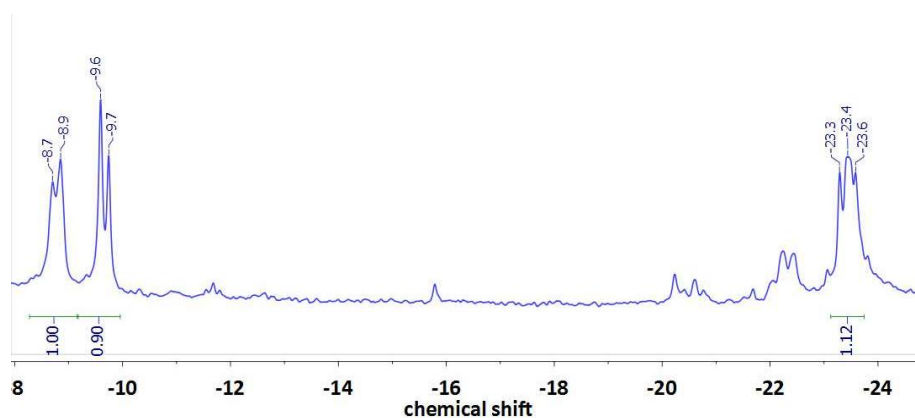
Sygnal przy -6,9 pochodzący od pirofosforanu charakteryzuje się dużą integracją świadcząca o stosowaniu dużych nadmiarów tego reagenta, co nie miało przełożenia na przyspieszenie reakcji i nie spowodowało zaniku sygnałów 132,48 ppm i 128,09 ppm pochodzących od nukleozydowego substratu. Skutkiem wolno zachodzącej reakcji, była przewaga reakcji konkurencyjnych, które z uwagi na obecność wody niemożliwą do całkowitego wyeliminowania z mieszaniny reakcyjnej powodowały powstawanie szeregu produktów ubocznych, możliwych do obserwowania w postaci sygnałów ^{31}P NMR (Schemat 50). Biorąc pod uwagę brak możliwości uzyskania w zaplanowanych warunkach reakcji pożądanego produktu oraz przewagę powstawania produktów ubocznych, udowodniłem że właściwości tej modyfikacji nie poprawiają podatności pierścienia oksazafosfolidyny na otwarcie pod wpływem pirofosforanu i uznałem ten układ za niespełniający oczekiwań.

Trzecią wybraną przeze mnie pochodną była oksazafosfolidyna (**45**) zawierająca grupę fenylową w sąsiedztwie atomu fosforu. Modyfikacja ta została dokładnie przebadana, gdyż podstawnik fenyłowy w pierścieniu oksazafosfolidyny pozwala otrzymać formę krystaliczną oraz dokonać pomiarów dyfrakcji promieni rentgenowskich. Na podstawie tych pomiarów uzyskać można rozmieszczenie przestrzenne całej cząsteczki. Duży przestrzennie podstawnik z jednej strony potencjalnie mógł utrudniać dostęp czynnika nukleofilowego do centrum reakcyjnego, z drugiej jednak strony mógł powodować takie przestrzenne ułożenie centrum fosforowego, które sprzyjałoby przyłączeniu części pirofosforanowej i ułożeniu odtwarzającej się 2-Py TGO w pozycji ułatwiającej odejście. Już pierwsze próby pokazały, że reakcja z pirofosforanem zachodzi stosunkowo szybko, przy czym wystarczył jedynie trzykrotny nadmiar pirofosforanu względem **45** (w odróżnieniu do stosowania sześciokrotnych nadmiarów w stosunku do **43**), a co za tym idzie minimalizuje się powstawanie ubocznych produktów hydrolizy. Dodatkowo, w odróżnieniu od prób z poprzednio stosowanymi modyfikacjami, charakterystycznemu trypletowi dla fosforu P(III) towarzyszył dublet dubletów, spodziewany dla diastereotopowych protonów przy atomie węgla w pozycji 5' nukleozydu. Jednakże na tym etapie nie musiał to być rezultat świadczący o produkcie nukleozydowym, ponieważ należy zwrócić uwagę, iż ugrupowanie 2-Py TGO z uwagi na podstawnik fenyłowy przy chiralnym atomie węgla, charakteryzuje się (podobnie jak w przypadku nukleozydu) brakiem płaszczyzny symetrii i może skutkować podobnym obrazem na widmie ^{31}P NMR (Schemat 51).



Schemat 51: Sygnały ^{31}P NMR otrzymane podczas reakcji 45 z pirofosforanem *tris*(tetrabutylaminowym). Dublet dubletów przy 19 ppm nie jest dowodem na otrzymanie pochodnej nukleozydowej, gdyż taki sam obraz może być spowodowany heterotopowym atomem wodoru przy chiralnym atomie węgla α 2-Py TGO.

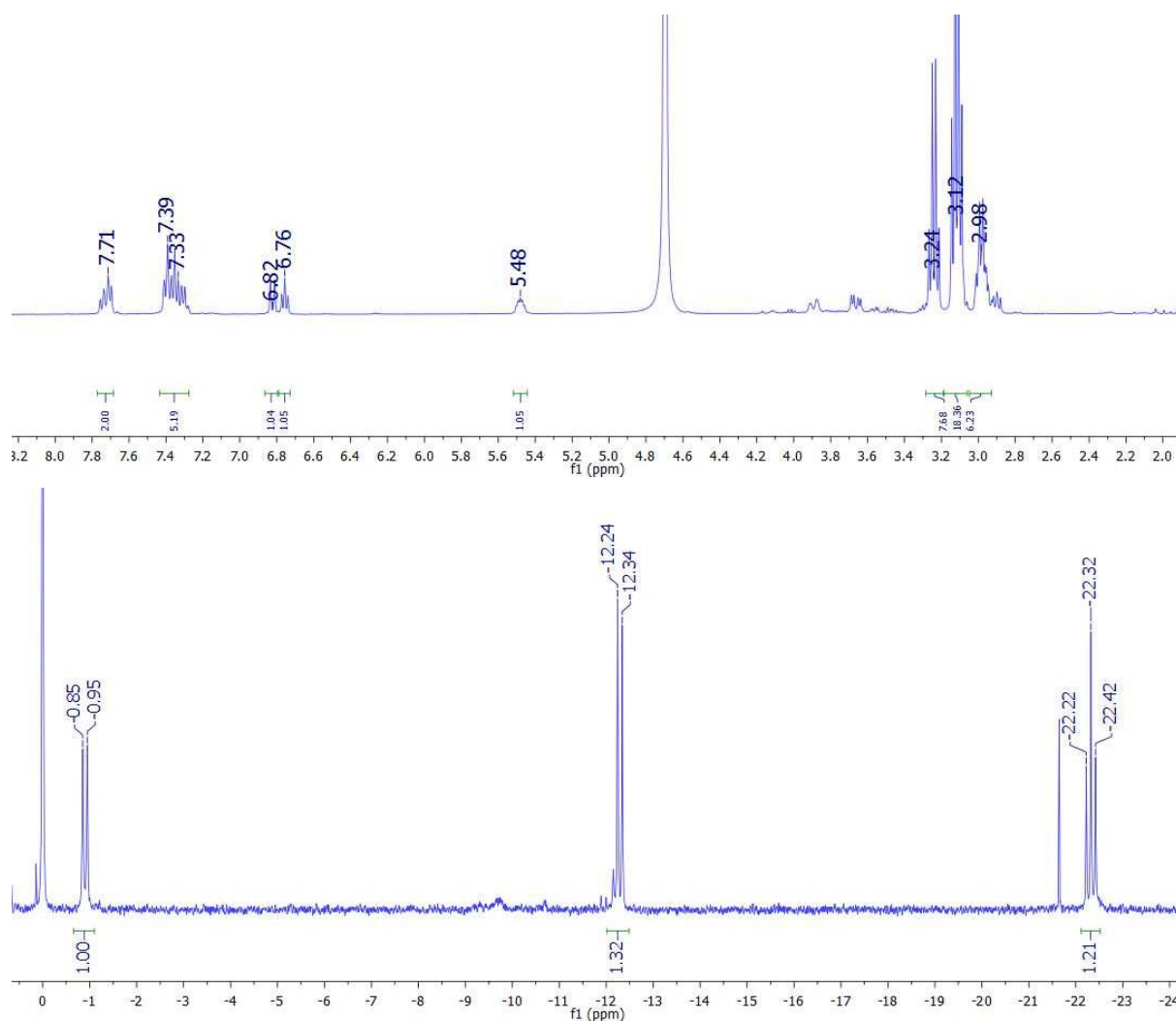
Utlenienie otrzymanego produktu przejściowego za pomocą wodoronadtlenku *tert*butylu zachodziło szybko i wydajnie. Pozwoliło to przyjąć, że po otwarciu pierścienia powstaje jeden główny produkt charakteryzujący się dwoma dubletami przy -8,8 ppm i -9,6 ppm (potencjalnie odpowiadającymi atomom fosforu P_γ i P_α) oraz odpowiadającym im trypletem przy -23,4 ppm charakterystycznym dla atomu P_β (Schemat 52).



Schemat 52: Sygnały ^{31}P NMR wskazujące na obecność trzech atomów fosforu w otrzymanym związku.

Po pozostawieniu mieszaniny w amoniaku, celem usunięcia grupy acetylowej z pozycji 3' nukleozydu, oraz wymianie kationów w powstałym trifosforanie, otrzymałem związek którego widmo ^{31}P NMR wskazywało na grupy sygnałów o przesunięciu chemicznym $\delta = -1,5$ ppm (potencjalnie P γ), $\delta = -12,6$ ppm (potencjalnie P α) oraz $\delta = -22,7$ ppm (potencjalnie P β). Takie przesunięcia są charakterystyczne dla trifosforanów. Mieszaninę reakcyjną poddałem wstępnemu oczyszczaniu na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym *silica gel* 60 F₂₅₄, używając jako eluentu fazy izopropanol/woda/amoniak w stosunku 7:2:1. Z uwagi na niewystarczające efekty takiego oczyszczania zdecydowałem się dodatkowo na użycie kolumny jonowymiennej ze złożem DOWEX, a następnie rozdział za pomocą złoża typu DEAE Sephadex A-25. Z uwagi na trudne do odizolowania zanieczyszczenia problematyczna była ocena produktu za pomocą chromatografii TLC, oraz technik spektroskopowych.

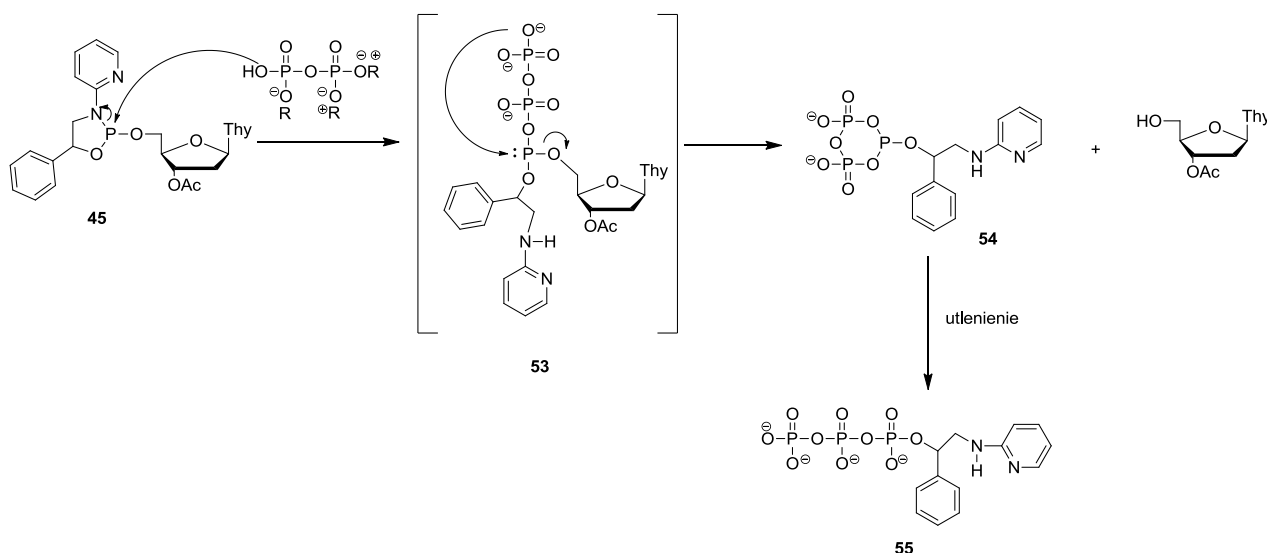
Ostatecznie, dzięki korelacji widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR oraz COSY, poszerzonej analizą masową i HPLC potwierdziłem, że uzyskany trifosforan jest nienukleozydowy i jest trifosforanem 2-Py TGO (**55**). Widmo protonowe zawiera charakterystyczne sygnały od pirydylowych i fenyloowych atomów wodoru w zakresie przesunięć chemicznych 6,6 – 7,8 ppm oraz grupy sygnałów od kationów *tert*butyloaminowych między 2,8 a 3,3 ppm, przy czym brakuje sygnałów charakterystycznych dla protonów nukleozydowych. Widmo fosforowe wskazuje na powstanie trifosforanu, przy czym dublet przy ok. -0,9 ppm jest zbyt przesunięty w kierunku wyższych wartości przesunięcia chemicznego względem znanego z literatury obrazu widma ^{31}P NMR dla trifosforanu nukleozydu (Schemat 53).



Schemat 53: Widmo ^1H NMR oraz ^{31}P NMR otrzymanego produktu.

Uzyskanie takiego niespodziewanego wyniku można wyjaśnić na dwa sposoby, przy czym niemożliwe jest do określenia, według którego z mechanizmów reakcja rzeczywiście przebiega. Ponieważ wynik był inny niż spodziewany trifosforan nukleozydowy, starałem się znaleźć potwierdzenie mechanistyczne takiego przebiegu reakcji. Pierwszy postulowany mechanizm (schemat 54) zakłada otwarcie pierścienia oksazafosfolidyny pod wpływem ataku pirofosforanu. Powstaje stan przejściowy, w którym atom fosforu P(III) znajduje się w centrum piramidy bitrygonalnej. Jest to prawdopodobnie najbardziej kluczowy moment dla dalszego przebiegu reakcji, w którym podstawniki przy atomie fosforu ustawiają się w pozycjach apikalnych (będącymi pozycjami preferencyjnymi dla łatwego odejścia danego podstawnika) i ekwatorialnych (analogicznie decydujących o pozostaniu danego podstawnika w obrębie cząsteczki). W pozycjach apikalnych ustawiać się będą podstawniki o niższej energii względnej. Dodatkowo pozycja ekwatorialna jest bardziej „zatłoczona”, co wynika z mniejszych kątów między wiązaniami, przez co wpływ na ułożenie w danej pozycji może mieć

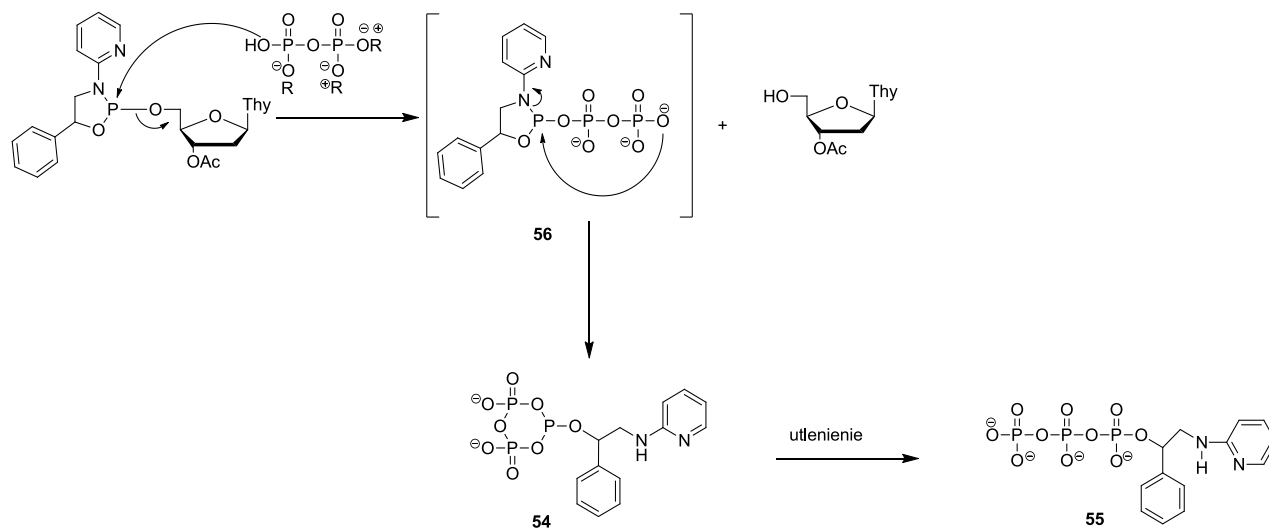
też wielkość samych podstawników lub ich przestrzenne ułożenie.¹⁴¹ W omawianym przypadku prawdopodobnie dochodzi do sytuacji, w której podstawnik nukleozydowy ustawia się w pozycji apikalnej, przez co w momencie wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji części pirofosforanowej jest on preferencyjną grupą odchodzącą (**53**), prowadząc do powstania metafosfonianu fosforanu z przyłączoną 2-Py TGO (**54**), który w wyniku utlenienia prowadzi do liniowej formy takiego trifosforanu (**55**).



Schemat 54: Postulowany mechanizm reakcji 3'-*O*-acetylo-5'-*O*-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl-(1,3,2)oksazafosolidyno]tymidyny z pirofosforanem tris(tetrabutylamoniowym).

Drugi możliwy mechanizm polega na odejściu nukleozydu w pierwszej kolejności tj. podczas ataku nukleofilowego pirofosforanu (schemat 55). Znany jest w literaturze¹⁴¹ wpływ pierścienia pięciocłonowego (jakim w tym przypadku jest oksazafosolidyna) na ułatwienie odejścia podstawnika przy atomie fosforu. Jest to co prawda dużo bardziej istotne w przypadku fosforu P(V), jednak zauważalne jest również w przypadku fosforu P(III). Efekt ten został opisany na modelu, w którym podstawnikiem odchodzącym jest atom chloru, dla którego szybkość odejścia w momencie ataku nukleofilowego na atom fosforu jest 10⁵ razy szybsza w przypadku gdy fosfor jest heteroatomem w pierścieniu pięciocłonowym, niż w przypadku gdy przyłączone są do niego dwa podstawniki alkilowe. Świadczy to o wymuszaniu przez pierścień ustawiania się podstawników przy atomie fosforu w pozycjach apikalnych, w przeciwieństwie do podstawników alkilowych, które mają więcej stopni swobody i mogą same zajmować te pozycje. W proponowanym mechanizmie, po przyłączeniu reszty pirofosforanowej z jednoczesnym odejściem nukleozydu, powstawałby niemożliwy do zarejestrowania stan

przejęciowy (**56**), który w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji przekształciłby się w powstania metafosfonian fosforanu z przyłączoną grupą 2-Py TGO (**54**), jako efektem otwarcia pierścienia oksazafosfolidynowego. Utlenienie tego produktu prowadzi do liniowej formy takiego trifosforanu (**55**).



Schemat 55: Alternatywny mechanizm reakcji 3'-*O*-acetylo-5'-*O*-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl-(1,3,2)oksazafosfolidyno] tymidyny z pirofosforanem tris(tetrabutylaminowym).

6.11 Najważniejsze uzyskane wyniki

1. Opracowanie wydajnej metody syntezy aminoalkoholi 2-pirydynylowych (prekursorów 2-Py TGO) z wykorzystaniem wspomaganie mikrofalowo.
2. Określenie, na przykładzie trzech modyfikacji, warunków i mechanizmów zachodzących podczas wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji prowadzącej do wytworzenia pierścienia [1,3,2]-oksazafosfolidynowego.
3. Oznaczenie konfiguracji absolutnej dla czterech diastereoizomerów 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32a-d**) na podstawie dyfrakcji promieni rentgenowskich dla otrzymanych kryształów.
4. Korelacja danych krystalograficznych z analizą ³¹P NMR, polegająca na przypisaniu wartości przesunięcia chemicznego poszczególnym diastereoizomerom.
5. Opracowanie metody izolacji *R,S* diastereoizomeru 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (**32a**) za pomocą krystalizacji par enancjomerów.
6. Określenie kluczowych parametrów przydatności dla trzech badanych pirofosforanów w reakcjach z [1,3,2]-oksazafosfolidynami.
7. Wykazanie przydatności wodoronadtlenku *tert*butylu w reakcjach utleniania z udziałem 2-Py TGO.
8. Opracowanie modelu pozwalającego na systematyczne badanie właściwości otrzymanych wcześniej [1,3,2]-oksazafosfolidynowych analogów nukleozydów.
9. Określenie wpływu grupy metylowej w 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo-5-metylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidynie (**33**) oraz fenylowej w 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenyl-[1,3,2]-oksazafosfolidynie (**32**) na podatność na nukleofilowy atak pirofosforanów.
10. Zaproponowanie dwóch mechanizmów wyjaśniających atak pirofosforanu na pierścień oksazafosfolidyny, w wyniku którego otrzymywany jest trifosforan 2-pirydynyloetylowy zamiast trifosforanu nukleozydu.

7 Streszczenie

Celem pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmu cyklizacji oraz nukleofilowego otwarcia pierścienia 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny. Aby to osiągnąć opracowano najpierw chemiczną metodę syntezy dwufunkcyjnych aminoalkoholi 2-pirydynylowych, które po przyłączeniu do centrum fosforanowego ulegają cyklizacji, tworząc pięcioczłonowy pierścień [1,3,2]-oksazafosfolidyny. Otrzymywane w ten sposób 3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny są podatne na działanie czynników nukleofilowych i w środowisku kwaśnym ulegają hydrolizie. Badanie podatności na otwarcie pod wpływem czynnika nukleofilowego prowadzono z wykorzystaniem różnych anionów difosforanowych.

W ramach prac badawczych prowadzonych podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej, określono wpływ dwóch modyfikacji na przebieg wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji prowadzącej do wytworzenia pierścienia [1,3,2]-oksazafosfolidynowego. Określono również kluczowe parametry przydatności dla trzech badanych pirofosforanów, jako czynników nukleofilowych podczas otwarcia pierścienia [1,3,2]-oksazafosfolidynowego. Wykazano również przydatność wodoronadtlenku *tert*butylu w reakcjach utleniania z udziałem 2-Py TGO.

Ponadto oznaczono konfigurację absolutną dla czterech diastereoizomerów 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny na podstawie dyfrakcji promieni rentgenowskich dla otrzymanych kryształów. Korelacja danych krystalograficznych z analizą ³¹P NMR pozwoliła przypisać wartości przesunięcia chemicznego poszczególnym diastereoizomerom. Zebrane dzięki temu dane pozwoliły opracować metodę izoaleji *R,S* diastereoizomeru 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny za pomocą krystalizacji par enancjomerów.

W wyniku prowadzonych badań zaproponowano dwa mechanizmy wyjaśniające atak pirofosforanu na pierścień oksazafosfolidyny, które pozwalają wytłumaczyć otrzymywanie trifosforanu 2-pirydynylo-etylowego zamiast trifosforanu nukleozydu.

8 Abstract

The aim of the thesis was to scrutinize the mechanism of the cyclization and nucleophilic ring opening of 3-(pyridin-2-yl)-[1,3,2]-oxazaphospholidine. For this purpose, a chemical method of bifunctional 2-aminopyridynyl alcohols synthesis was developed. When those aminoalcohols are attached to the phosphate center, they cyclize to form a five-membered [1,3,2]-oxazaphospholidine ring. 3-(pyridin-2-yl)-[1,3,2]-oxazaphospholidines are susceptible to nucleophilic agents and undergo hydrolysis in an acidic environment. Testing susceptibility of the ring to opening under the influence of a nucleophiles was carried out using a variety of pyrophosphate anions.

As a part of the research, influence of two modifications in intramolecular cyclization to form an [1,3,2]-oxazaphospholidine ring was determined. Moreover, key relevance parameters for the three examined pyrophosphate agents were identified, which are nucleophiles for the [1,3,2]-oxazaphospholidine ring opening. The usefulness of *tert*-butyl hydroperoxide for oxidative reactions involving 2-Py TGO was additionally proved..

In addition, the absolute configuration for the four diastereoisomers of 2-*N*-isopropylamino-3-(pyridin-2-yl)-5-phenyl-[1,3,2]-oxazaphospholidine was determined by X-ray diffraction pattern in obtained crystals. Correlation of crystallographic data with ³¹P NMR analysis allowed to assign the chemical shift values of individual diastereomers. This data allowed to develop a method of *R,S* 2-*N*-isopropylamino-3-(pyridin-2-yl)-5-phenyl-[1,3,2]-oxazaphospholidine diastereoisomer isolation by pairs of enantiomers crystallization.

As a result of research, two mechanisms of pyrophosphate attack on the oxazaphospholidine ring have been proposed. They help to explain obtaining an 2-aminopyridynyl-ethanol triphosphate instead of a nucleoside triphosphate.

9 Część eksperymentalna

9.1 Materiały i metody

Odczynniki chemiczne i rozpuszczalniki dostępne handlowo zostały zakupione i stosowano bez dalszego oczyszczania.

Benzen był destylowany z nad P₂O₅ i CaH₂ i przechowywany nad sitami molekularnymi 3 Å. Użyto komercyjnie dostępnego bezwodnego acetonitrylu (maksymalnie 30 ppm H₂O) i również był przechowywany nad sitami molekularnymi 3 Å, aby obniżyć zawartość wody do ok. 5 ppm. Te same sita molekularne były również stosowane do utrzymania bezwodnych amin.

Odczynniki występujące w formie stałej suszono przez liofilizację z benzenu.

Postęp reakcji monitorowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach szklanych o wymiarach 2,5 cm × 7,0 cm. Płytki były pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego *silica gel* 60 F₂₅₄.

Rozdziały chromatograficzne na kolumnie chromatograficznej przeprowadzano przy użyciu żelu krzemionkowego 60 (70-230 mesh).

9.1.1 Reaktory mikrofalowe

Użyto reaktorów: ERTEC z otwartym naczyniem i chłodnicą zwrotną, zakres mocy 0-750 W z płynną regulacją, częstotliwość pola 2,45 GHz, opcja monitorowania mocy odbitej. Pomiar temperatury reakcji prowadzono za pomocą pirometru z możliwością monitorowania w zakresie 0-500 °C oraz reaktor CEM Discover z zamkniętą komorą ciśnieniową, mocy wyjściowej 300 W, częstotliwością magnetronu 2,45GHz, kontrolą temperatury w zakresie 15-450 °C i sterowaniem ciśnieniem w zakresie do 21 bar (200 pomiarów ciśnienia na minutę)

9.1.2 Spektroskopia ¹H, ¹³C, ³¹P NMR i spektrometria mas

Widma NMR uzyskano się za pomocą spektrometru Bruker (400 lub 500 MHz dla ¹H i 125 MHz dla ¹³C). Do analizy ³¹P NMR wykorzystano aparat Varian 300 MHz oraz spektrometr Bruker 400 MHz. Przesunięcia chemiczne δ podano w częściach na milion (ppm). Jako wzorzec wewnętrzny użyty został rozpuszczalnik deuterowany (DMSO-d₆ = 2.50 ppm). Wartości *J* podano w Hz. Skrótów stosowane w opisie rezonansów: *s* (singlet), *d* (dublet), *t* (triplet), *br.* (szeroki), *dd* (dublet dubletów), *ddd* (dublet dubletów dubletów) oraz *m* (multiplet).

Spektrometr mas był wyposażony w źródło jonizacji typu elektrosprej (ESI) oraz analizator Q-TOF. Parametry źródłowe były następujące: napięcie źródła ESI 3,2 kV, nebulizacja azotem w 0,4 bar, natężenie przepływu suchego gazu 4,0 l / min w temperaturze 220 ° C lub 50 °C.

9.1.3 Krystalografia – pomiary rentgenowskie i metody obliczeniowe

Wszystkie kryształy otrzymano z heksanu przez powolne odparowanie w temperaturze pokojowej do momentu zauważenia pierwszych kryształów. Następnie roztwór był pozostawiony się w temperaturze 5° C przez noc. Analizy przeprowadzono w temperaturze 130 K na dyfraktometrze SuperNova¹⁴² z lustrzanym monochromatorem na promieniowanie CuK α ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$). Skorygowano efekt polaryzacji Lorentza i absorbcję. Parametry komórki elementarnej wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów z odpowiednio 5558 (próbka A) i 22781 (próbka B0) odbiciami wyższej intensywności, wybranymi z całego eksperymentu. Do rozwiązania struktur użyto programu SIR92¹⁴³. Udoskonalenie z procedurą pełnej matrycy F² przeprowadzono na SHELXL97¹⁴⁴. Funkcja $\Sigma w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2$, gdzie $w^{-1} = [\sigma^2(F_o)^2 + A \cdot P^2 + B \cdot P]$ i $P = [\text{Max}(F_o^2, 0) + 2F_c^2]/3$, została zminimalizowana. Wszystkie atomy nie będące atomami wodoru uszczegółowiono anizotropowo, a pozycje atomów wodoru zostały obliczone i doprecyzowane dzięki modelowi sztywnego unoszenia. Dane krystalograficzne (bez czynników strukturalnych) zostały zdeponowane w Cambridge Crystallographic Data Centre, Nr CCDC-1435750 (A) i CCDC-1435740 (B0).

9.1.4 Chromatografia HPLC

Analizy HPLC były wykonywane na aparacie Thermo wyposażonym w kolumnę chromatograficzną Luna 3 mm, C18(2) 100 Å, 150 x 4,6 mm lub SupelcosilLC-18S 5 mm, 25 x 4,6 mm.

9.1.5 Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografię cienkowarstwową TLC przeprowadzono na płytkach silica gel 60 F254 stosując następujące fazy rozwijające: DCM/MeOH (9,5:0,5 oraz 9:1 v:v), benzen/trietyloamina (1:1 v:v), izopropanol/woda/amoniak (7:2:1 v:v).

9.1.6 Pomiar zawartości wody

Pomiary zawartości wody przeprowadzono metodą Karla-Fischera na kulometrze TitroLine KF.

9.2 Synteza alkoholi 2-pirydynylowych

9.2.1 Synteza *N*-(2-pirydylo)-2-aminoetanolu (28)

W kolbie okrągłodennej na 25 ml zmieszano 1,2 ml (12,7 mmol) 2-bromopirydyny i 2,27 ml (38 mmol) etanoloaminy. Do mieszaniny dodano 2,29 ml (16,5 mmol) trietyloaminy oraz katalityczną ilość (kilka kropel) *N*-etylodiizopropylloaminy. Kolbę z mieszaniną reagentów umieszczono w reaktorze mikrofalowym i stosowano ogrzewanie w temperaturze 66°C przy mocy urządzenia 150 W, dodatkowo zastosowano mieszanie magnetyczne i chłodnicę zwrotną. Postęp reakcji badano w krokach co 60 minut za pomocą płyt TLC używając jako eluentu mieszaniny: chlorek metylenu/metanol w proporcji 95:5. Po każdym kroku dodawano ubywających *N*-etylodiizopropylloaminy i trietyloaminy, aby wyrównać straty powstałe przez odparowanie. Reakcję zakończono po 8 godzinach. Otrzymaną mieszaninę odparowano, a następnie wyizolowano na kolumnie z żelom krzemionkowym, elując chlorkiem metylenu z dodatkiem metanolu (gradient od 1% do 5% metanolu). Zebrane frakcje odparowano i wysuszono na linii próżniowej z ok. 95% wydajności w postaci białego proszku.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; DMSO-*d*₆) δ 7,94 (dd; $J=1,25$; 5,05 Hz; 1H); 7,33 (dd; $J = 1,99$; 7,09 Hz; 1H); 6,48 (d; $J = 8,5$ Hz; 1H); 6,44 (dd; $J = 7,09$ Hz; 1H); 6,42 (m; 1H); 4,76 (m; 1H); 3,52 (t; $J = 6,01$ Hz; 2H); 3,31 (q; $J = 5,82$; 6,01 Hz; 2H),

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; DMSO-*d*₆) δ 43,9; 60,6; 108,6; 111,8; 137,0; 147,8; 159,3.

HRMS (ESI-*q*-TOF) m/z : $[M+H]^+$ masa obliczona dla $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$ $[M+H]^+$ 139,0871, masa znaleziona: 139,0863 m/z .

9.2.2 Synteza *N*-(2-pirydylo)-2-amino-1-fenyletanolu (29)

W kolbie okrągłodennej na 25 ml zmieszano 1,152 g (7,3 mmola) 2-bromopirydyny i 2g (14,6 mmol) 2-amino-1-fenyletanolu. Do mieszaniny dodano 0,96 g trietyloaminy (1,3 eq nadmiar względem 2-bromopirydyny) oraz katalityczną ilość (kilka kropel) *N*-etylodiizopropylloaminy. Kolbę z mieszaniną reagentów umieszczono w reaktorze mikrofalowym i stosowano ogrzewanie w zakresie temperatur 158°C - 165°C przy mocy urządzenia 185 W, dodatkowo zastosowano mieszanie magnetyczne i chłodnicę zwrotną. Postęp reakcji badano w krokach co 60 minut za pomocą płyt TLC używając jako eluentu mieszaniny: chlorek metylenu/metanol w proporcji 95:5. Po każdym kroku dodawano ubywających *N*-etylodiizopropylloaminy i trietyloaminy, aby wyrównać straty powstałe przez odparowanie. Reakcję zakończono po 8

godzinach. Otrzymaną mieszaninę odparowano, a następnie wyizolowano na kolumnie z żelem krzemionkowym, eluując chlorkiem metylenu z dodatkiem metanolu (gradient od 1% do 5% metanolu). Zebrane frakcje odparowano i wysuszono na linii próżniowej, otrzymując 800 mg produktu (ok. 51% wydajności) w postaci białego proszku.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz; DMSO) δ 7,97 (dd; $J = 5,0; 1,2$ Hz; 1H); 7,38 – 7,31 (m; 5H); 7,25 – 7,22 (m; 1H); 6,52 (dd; $J = 11,4; 7,2$ Hz; 2H); 6,48 – 6,46 (m; 1H); 5,67 (s; 1H); 4,75 (dd; $J = 7,7; 4,3$ Hz; 1H); 3,51 (ddd; $J = 13,4; 6,7; 4,3$ Hz; 1H); 3,32 – 3,24 (m; 1H),

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz; DMSO) δ 158,8; 147,3; 144,3; 136,6; 127,9; 126,8; 126,0; 111,6; 108,6; 71, 6; 49,3,

HRMS (ESI-q-TOF) m/z : $[M+H]^+$ masa obliczona dla $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$: 215,1179; masa znaleziona: 215,1178.

9.2.3 Synteza *N*-(2-pirydyn-ylo-5-metylo)-2-aminoetanolu (30)

W kolbie okrągłodennej na 25 ml zmieszano 1g (5,9 mmola) 2-bromo-5-metylo-pirydyny i 0,72g (11,8 mmol) 2-amino-1-fenyletanolu. Do mieszaniny dodano 0,77g trietyloaminy (1,3 eq nadmiar względem 2-bromo-5-metylo-pirydyny) oraz katalityczną ilość (kilka kropel) *N*-etylo-diizopropylaminy. Kolbę z mieszaniną reagentów umieszczono w reaktorze mikrofalowym i stosowano ogrzewanie w zakresie temperatur 158°C - 165°C przy mocy urządzenia 185 W, dodatkowo zastosowano mieszanie magnetyczne i chłodnicę zwrotną. Postęp reakcji badano w krokach co 60 minut za pomocą płyt TLC używając jako eluentu mieszaniny: chlorek metylenu/metanol w proporcji 95:5. Po każdym kroku dodawano ubywających *N*-etylo-diizopropylaminy i trietyloaminy, aby wyrównać straty powstałe przez odparowanie. Reakcję zakończono po 8 godzinach. Otrzymaną mieszaninę odparowano, a następnie wyizolowano na kolumnie z żelem krzemionkowym, eluując chlorkiem metylenu z dodatkiem metanolu (gradient od 1% do 5% metanolu). Zebrane frakcje odparowano i wysuszono na linii próżniowej, otrzymując 670mg produktu (ok. 74% wydajności) w postaci białego proszku.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; DMSO- d_6) δ 7,77 (s; 1H); 7,19 (d; $J = 8,5$ Hz; 1H); 6,41 (d; $J = 8,5$ Hz; 1H); 6,19 (d; $J = 5,7$ Hz; 1H); 4,74 (s; 1H); 3,50 (t; $J = 6,1$ Hz; 2H); 3,26 (d; $J = 6,0$ Hz; 2H); 2,08 (s; 3H),

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz; DMSO) δ 157,66; 147,13; 138,09; 119,92; 108,35; 60,74; 44,19; 17,43.

9.2.4 Synteza 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (31)

W zamkniętej septą okrągłodennej kolbie na 25 ml, wypełnionej argonem, rozpuszczono 0,089 g (0,65 mmola) PCl_3 w bezwodnym benzenie (5 ml) i zaopatrzone w balon wypełniony argonem. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni z lodem i ochłodzono do 0°C po czym dodano za pomocą strzykawki bezwodną diizopropylaminę 0,363 g (3,58 mmola). Mieszaninę pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej, a następnie przechowywano przez 24 godziny. Do próbki NMR wypełnionej gazem obojętnym pobrano strzykawką próbkę i szczelnie zamknięto. Monitorowano poziom konwersji substratów poprzez widma ^{31}P NMR. Po pełnej konwersji dichlorku diizopropylamidofosforu (utrata sygnału $\delta=168,8$ ppm) do *bis*(diizopropylamino) chlorofosfiny ($\delta=134,5$ ppm), ochłodzono mieszaninę do 0°C w łaźni lodowej. W ciągu 3 godzin dodawano kroplami *N*-(2-pirydylo)-2-aminoetanolu (0,09 g, 0,65 mmol) rozpuszczonego w 5 ml bezwodnego benzenu przy obecności strumienia gazu obojętnego. Reakcję prowadzono przez około 12 godzin z mieszaniem w temperaturze pokojowej. Monitorowano postęp reakcji za pomocą ^{31}P NMR aż do utworzenia *N,N*-*bis*(diizopropylamino)-2-pirydynylo-etylofosfiny o przesunięciu chemicznym ^{31}P $\delta=123$ ppm. Po upływie kolejnych 12 godzin produkty spontanicznej cyklizacji obserwuje się przy 115,3 ppm. Odparowano nadmiar benzenu, lecz nie do całkowitego wysuszenia. W celu oczyszczenia, produkt surowy poddano chromatografii z użyciem żelu krzemionkowego (około 30-50 x n gramów uzyskanej mieszaniny poreakcyjnej), wymywając za pomocą eluentu benzen/trietyloamina 95:5 (v/v). Frakcje analizowano metodą TLC z użyciem 95:5 (v/v) benzen/trietyloamina ($R_f=0,73$) i ^{31}P -NMR ($\delta=115,3$ ppm). Produkt powinien być wymywany z początkowymi frakcjami. Odparowano połączone frakcje pod zmniejszonym ciśnieniem z zastosowaniem wyparki obrotowej. Zliofilizowano produkt z benzenu, otrzymując go w postaci jasnożółtego wosku (70%).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8,12 (dd; $J=0,6$; 4,85 Hz; 1H); 7,55 (dd; $J=1,94$; 7,24 Hz; 1H); 6,76 (dd; $J=0,6$; 8,4 Hz; 1H); 6,71 (dd; $J=0,6$; 4,85 Hz; 1H); 4,22 (m; 2H); 3,78 (m; 1H); 3,43 (m; 2H); 3,36 (m; 1H); 1,29 (m; 6H); 1,06 (m; 6H);

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 156,4; 153,4; 148,3; 137,5; 116,2; 110,2; 109,1; 66,3; 62,1; 25,2; 23,6; 22,5; 22,4;

^{31}P NMR (121 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 115,4.

9.2.5 Synteza 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (32)

W zamkniętej septą okrągłodennej kolbie na 25 ml, wypełnionej argonem, rozpuszczono 89 mg (0,65 mmola) PCl_3 w bezwodnym benzenie (5 ml) i zaopatrzone w balon wypełniony argonem. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni z lodem i ochłodzono do 0°C po czym dodano za pomocą strzykawki bezwodną diizopropylaminę 0,363 g (3,58 mmola). Mieszaninę pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej, a następnie przechowywano przez 24 godziny. Do próbki NMR wypełnionej gazem obojętnym pobrano strzykawką próbkę i szczelnie zamknięto. Monitorowano poziom konwersji substratów poprzez widma ^{31}P NMR. Po pełnej konwersji dichlorku diizopropylamidofosforu (utrata sygnału $\delta=168,8$ ppm) do *bis*(diizopropylamino)chlorofosforyny ($\delta=134,5$ ppm), ochłodzono mieszaninę do 0°C w łaźni lodowej. W ciągu 3 godzin dodawano kroplami *N*-(2-pirydylo)-2-amino-1-fenyloetanolu (0,14g, 0,65 mmol) rozpuszczonego w 5 ml bezwodnego benzenu przy obecności strumienia gazu obojętnego. Reakcję prowadzono przez około 12 godzin z mieszaniem w temperaturze pokojowej. Monitorowano postęp reakcji za pomocą ^{31}P NMR aż do utworzenia *N,N*-*bis*(diizopropylamino)-2-pirydynylo-1-fenylo-etylofosforyny o przesunięciu chemicznym ^{31}P $\delta=113,1$ ppm. Po upływie kolejnych 12 godzin produkty spontanicznej cyklizacji obserwuje się dwa sygnały przy $\delta=115,9$ ppm i $\delta=128,5$ ppm odpowiadające wszystkim czterem stereoizomerom. Odparowano nadmiar benzenu, lecz nie do całkowitego wysuszenia. W celu oczyszczenia, produkt surowy poddano chromatografii z użyciem żelu krzemionkowego (około 30-50 x n gramów uzyskanej mieszaniny poreakcyjnej), wymywając za pomocą eluentu benzen/trietyloamina 95: 5 (v/v). Frakcje analizowano metodą TLC z użyciem 95:5 (v/v) benzen/trietyloamina ($R_f=0,69$) i ^{31}P -NMR ($\delta=115,9$ ppm i $\delta=128,5$ ppm). Produkt powinien być wymywany z początkowymi frakcjami. Odparowano połączone frakcje pod zmniejszonym ciśnieniem z zastosowaniem wyparki obrotowej. Zliofilizowano produkt z benzenu, otrzymując 0,188 g produktu w postaci białego proszku.

Procedura krystalizacji.

Otrzymany produkt rozpuszczono w 5 ml *n*-heksanu i pozostawiono do wykrywania. Po kilku godzinach, kryształy wysuszono. Oczekiwaną strukturę produktu potwierdzono przez analizę krystalograficzną.

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,11 (dd; $J = 4,9; 1,2$ Hz; 1H); 7,58 – 7,55 (m; 1H); 7,49 – 7,48 (m; 2H); 7,42 (dd; $J = 14,3; 6,6$ Hz; 2H); 7,34 (t; $J = 7,8$ Hz; 1H); 6,74 (d; $J = 8,3$ Hz; 1H);

6,72 (*dd*; $J = 6,9; 5,1$ Hz; $1H$); 5,19 (*dd*; $J = 9,9; 6,3$ Hz; $1H$); 4,04 (*ddd*; $J = 12,0; 10,1; 6,3$ Hz; $1H$); 3,24 (*td*; $J = 10,1; 1,5$ Hz; $1H$)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 156,7; 156,6; 148,1; 140,2; 137,7; 136,9; 126,7; 126,1; 114,4; 109,1; 77,2; 50,5; 44,9; 44,8; 25,1; 23,8

^{31}P NMR (300MHz, benzen) δ 128,5; 116,9;

HRMS (ESI-*q*-TOF) m/z : $[M+H]^+$ masa obliczona dla: $C_{19}H_{27}N_3OP$: 344,1892; masa znaleziona: 344,1888.

9.2.6 Synteza 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-yl-5-metylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (33)

W zamkniętej septą okrągłodennej kolbie na 25 ml, wypełnionej argonem, rozpuszczono 89 mg (0,65 mmola) PCl_3 w bezwodnym benzenie (5 ml) i zaopatrzone w balon wypełniony argonem. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w łaźni z lodem i ochłodzono do $0^\circ C$ po czym dodano za pomocą strzykawki bezwodną diizopropylaminę 363 mg (3,58 mmola). Mieszaninę pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej, a następnie przechowywano przez 24 godziny. Do próbki NMR wypełnionej gazem obojętnym pobrano strzykawką próbkę i szczelnie zamknięto. Monitorowano poziom konwersji substratów poprzez widma ^{31}P NMR. Po pełnej konwersji dichlorku diizopropylamidofosforu (utrata sygnału $\delta=168,8$ ppm) do *bis*(diizopropylamino)chlorofosfiny ($\delta=134,5$ ppm), ochłodzono mieszaninę do $0^\circ C$ w łaźni lodowej. W ciągu 3 godzin dodawano kroplami *N*-(2-pirydylo-5-metylo)-2-aminoetanolu (0,098g, 0,65mmol) rozpuszczonego w 5 ml bezwodnego benzenu przy obecności strumienia gazu obojętnego. Reakcję prowadzono przez około 12 godzin z mieszaniem w temperaturze pokojowej. Monitorowano postęp reakcji za pomocą ^{31}P NMR aż do utworzenia *N,N*-*bis*(diizopropylamino)-(2-pirydynylo-5-metylo)-etylofosfiny o przesunięciu chemicznym ^{31}P NMR = 123,3 ppm. Po upływie kolejnych 12 godzin produkty spontanicznej cyklizacji obserwuje się sygnał przy 115,6ppm. Odparowano nadmiar benzenu, lecz nie do całkowitego wysuszenia. W celu oczyszczenia, produkt surowy poddano chromatografii z użyciem żelu krzemionkowego (około 30-50 x n gramów uzyskanej mieszaniny poreakcyjnej), wymywając za pomocą eluentu benzen/trietyloamina 95:5 (v/v). Frakcje analizowano metodą TLC z użyciem 95:5 (v/v) benzen/trietyloamina ($R_f = 0,75$) i ^{31}P -NMR ($\delta=115,6$ ppm). Produkt powinien być wymywany z początkowymi frakcjami. Odparowano połączone frakcje pod

zmniejszonym ciśnieniem z zastosowaniem wyparki obrotowej. Zliofilizowano produkt z benzenu, otrzymując 144 mg produktu w postaci białego proszku.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; DMSO- d_6) δ 7,97 (d; $J = 5,1$ Hz; 1H); 6,61 (s; 1H); 6,57 (d; $J = 5,2$ Hz; 1H); 4,30 – 4,07 (m; 2H); 3,77 (td; $J = 6,8$; 3,3 Hz; 1H); 3,41 (dq; $J = 10,3$; 7,0 Hz; 2H); 3,37 – 3,29 (m; 1H); 2,21 (s; 3H); 1,19 (d; $J = 6,8$ Hz; 6H); 1,06 (d; $J = 6,7$ Hz; 6H),

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz; DMSO) δ 156,72; 156,58; 147,89; 147,73; 147,71; 115,73; 109,69; 109,59; 66,45; 66,34; 45,22; 45,12; 44,39; 44,37; 25,24; 25,14; 23,67; 23,62; 21,15,

$^{31}\text{P NMR}$ (300 MHz, benzen): $\delta = 115,5$.

9.2.7 Synteza 3'-O-acetylo-5'-O-[2-tio-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (35)

3'-O-acetylo-5'-O-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-(1,3,2)-oksazafosfolidyno]tymidynę (50 mg, 0,95 mmol) rozpuszczonego w bezwodnym acetonitrylu (4,75 ml), a następnie dodano (3 eq, 90 mg, 2,8 mmola) siarki. Mieszaninę reakcyjną mieszano w atmosferze ochronnej argonu i monitorowano za pomocą spektroskopii $^{31}\text{P NMR}$. Po 15 minutach reakcja dobiegła końca. Wydajność określono na podstawie powierzchni pików $^{31}\text{P NMR}$ i wyniosła około 90%.

$^{31}\text{P NMR}$ (300 MHz, acetonitryl): $\delta = 74,4$; 75,2 ppm,

HRMS (ESI-q-TOF): masa obliczona dla: $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7\text{PS}$ [$M + H$] $^+$ = 559.1411, masa znaleziona: 559.1439.

9.2.8 Synteza 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3'-O-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (36)

2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidynę (150 mg, 0,43 mmol) i 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidynę (240 mg, 0,55 mmola) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (5,5 ml). Następnie dodano benzyliotetrazolu (0,5 eq, 41 mg, 0,22 mmola). Reakcję monitorowano metodą spektroskopii $^{31}\text{P NMR}$ i zakończono po 24 h. Otrzymaną mieszaninę zateżono na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie oczyszczono na kolumnie z żelem krzemionkowym, eluując mieszaninę fazą dichlorometan/metanol (gradient metanolu 0 \rightarrow 5% w chlorku metylenu). Frakcje zateżono i wysuszono przez liofilizację z benzenu. Produkt uzyskano z wydajnością 52% (180 mg).

^1H NMR (500 MHz; [D6]DMSO): $\delta = 11,32$ (s; 1 H); 8,06 (dd; $J = 4,9$; 1,8 Hz; 1 H); 7,63 (td; $J = 7,8$; 1,9 Hz; 1 H); 7,51 (s; 1 H); 7,47 (d; $J = 7,1$ Hz; 3 H); 7,42 (t; $J = 7,3$ Hz; 2 H); 7,40–7,31 (m; 4 H); 7,28 (t; $J = 7,5$ Hz; 2 H); 7,21 (d; $J = 8,9$ Hz; 4 H); 6,84 (pd; $J = 8,8$; 3,3 Hz; 6 H); 5,78 (dd; $J = 10,0$; 6,3 Hz; 1 H); 4,98 (ddt; $J = 10,1$; 6,8; 3,4 Hz; 1 H); 4,03 (d; $J = 3,9$ Hz; 1 H); 3,73 (d; $J = 1,6$ Hz; 2 H); 3,70 (d; $J = 3,3$ Hz; 6 H); 3,27–3,15 (m; 2 H); 2,44 (q; $J = 7,1$ Hz; 2 H); 1,49 (s; 3 H) ppm,

^{13}C NMR (500 MHz; DMSO): $\delta = 163,6$; 158, 1; 158,1; 155,5; 155,4; 150,3; 150,3; 147,8; 144,6; 138,7; 138,7; 138,5; 138,4; 135,7; 135,3; 135,2; 135,2; 135,1; 129,7; 129,62; 128,5; 127,8; 127,6; 126,3; 126,3; 115,4; 115,2; 113,2; 109,7; 107,7; 107,6; 85,9; 84,0; 84,0; 83,7; 81,3; 81,2; 74,0; 73,9; 63,1; 55,0; 55,0; 55,0; 45,7; 11,7; 11,6 ppm,

^{31}P NMR (300 MHz; acetonitryl): $\delta = 137,36$; 128,79 ppm,

HRMS (ESI-q-TOF): masa obliczona dla: $\text{C}_{44}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{NaO}_8\text{P}$ [$M + \text{Na}$] $^+$ 809,2711 masa znaleziona: 809,2714.

9.2.9 Synteza 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3'-O-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-2-tio-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (37)

5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3'-O-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidynę (50 mg, 0,64 mmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (3,25 ml), a następnie dodano siarki (3eq, 60 mg, 2,8 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano w atmosferze ochronnej argonu i monitorowano za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR. Po 30 minutach reakcję zakończono. Otrzymano wydajność około 95%, określoną na podstawie powierzchni sygnałów rejestrowanych w widmie ^{31}P NMR.

^{31}P NMR (300 MHz; acetonitryl): $\delta = 73,7$; 73,9 ppm;

HRMS (ESI-q-TOF): masa obliczona dla: $\text{C}_{44}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{NaO}_7\text{PS}$ [$M + \text{Na}$] $^+$ 841,2431; masa znaleziona: 841,2398.

9.2.10 Synteza 2-N-izopropylamino-2-tio-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidyny (38)

2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidynę (50 mg, 0,145 mmola) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (2,25 ml), a następnie dodano siarki (3 eq, 14 mg, 0,43 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano w atmosferze ochronnej argonu i

monitorowano za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR. Po 30 minutach reakcję zakończono. Wydajność określono na około 95% na podstawie powierzchni pików na widmie ^{31}P NMR.

^{31}P NMR (300 MHz, acetonitryl): $\delta = 68,9; 71,4$ ppm.

HRMS (ESI-q-TOF): masa obliczona dla: $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{NaOPS}$ [$M + \text{Na}$] $^+$ 398,1426, masa znaleziona: 398,1429.

9.2.11 Synteza 3'-O-acetylo-5'-[(3-pirydyn-2-ylo)-(1,3,2)-oksazafosfolidyno]tymidyny (43)

3'-O-acetylotymidynę 177mg (0,47 mmola) i 2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-[1,3,2]-oksazafosfolidynę (100 mg, 0,47 mmola) zmieszano w kolbie okrągłodennej na 10ml i rozpuszczono w 2 ml suchego acetonitrylu mieszając na mieszadle magnetycznym przez 5 minut. Dodano kroplami 0,25 M roztwór benzylotetrazolu w suchym acetonitrylu (2,37ml, 0,47 mmola) i mieszano przez 2 godziny. Monitorowano poziom konwersji za pomocą ^{31}P NMR. Do próbek NMR napełnionych gazem dodano za pomocą strzykawki próbkę mieszaniny do analizy i szczelnie zamknięto. W toku reakcji obserwowano stopniowe zanikanie sygnału od oksazafosfolidyny ($\delta = 115$ ppm) przy jednoczesnym pojawieniu się dwóch pików od powstających diastereoizomerów przy $\delta=129,8$ ppm (s; 1P) i $\delta=125,5$ ppm (s; 1P). Reakcję zatrzymano przez dodanie roztworu 1 ml diizopropylaminy w 20ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną przemyto w rozdzielaczu trzy razy: po 50ml nasyconego roztworu wodnego wodorowęglanu sodu i dwa razy 50 ml wody MiliQ. Zebrano warstwę organiczną i wysuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 . Odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono przez chromatografię kolumnową. Zaznaczono linię ołówkiem w odległości 1,5 – 2 cm od dołu płyty. Surowy produkt rozpuszczono w minimalnej ilości (0,5ml) DCM nałożono pipetą automatyczną równomiernie wzdłuż całej linii ołówka. Umieszczono płytkę PLC w komorze chromatograficznej wypełnionej 100 ml eluenta 89:6:5 (v/v/v), dichlorometan/metanol/trietyloamina i zamknięto. Po rozwinięciu eluenta na całą wysokość płyty, wyjęto ją z komory i po odparowaniu nadmiaru eluentu zaznaczono ołówkiem rozdzielone plamy obserwując je w promieniowaniu UV. Następnie zeszkrobano właściwą plamę skalpelem i wymyto produkt z żelu za pomocą tego samego eluentu jak w przypadku oczyszczania. Odparowano otrzymany roztwór i zliofilizowano z benzenu otrzymując produkt z w postaci białego proszku (wydajność 65%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz; CdCl_2) δ (ppm) 8,9 (d; $J=4,95$ Hz; 1H); 7,62–7,58 (m; 2H); 7,34 (s; 1H); 6,80–6,77 (m; 1H); 6,20–6,19 (m; 1H); 5,30–5,28 (m; 1H); 4,57–4,48 (m; 2H); 4,14–4,07 (m; 1H); 4,01–3,97 (m; 1H); 3,59–3,52 (m; H); 3,47–3,39 (m; 1H); 2,29–2,26 (m; 1H); 2,20–2,18 (m; 1H); 2,01 (s; 3H); 1,78 (d; $J=1,12$ Hz; 3H);

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; Cd_3CN) δ (ppm) 170,6; 163,0; 156,2; 150,6; 138,3; 128,2; 115,4; 110,4; 107,6; 84,3; 83,6; 74,8; 69,3; 63,8; 45,8; 43,5; 36,9; 20,2; 11,6;

$^{31}\text{P NMR}$: δ (ppm) 129,8 (m; 1P); 125,5 (m; 1P),

ESI-MS: masa obliczona dla: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_7\text{PNa}$ [$M + \text{Na}$] $^+$ 473,1304; masa znaleziona: 473,1216 m/z; Mp: 86–88 °C.

9.2.12 Synteza 3'-O-acetylo-5'-[3-(pirydyn-2-ylo-5-metylo)-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (44)

3'-O-acetylotymidynę 156 mg (0,55 mmola) i 2-N-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo-5-metylo)- [1,3,2]-oksazafosfolidynę (155 mg, 0,55 mmola) zmieszano w kolbie okrągłodennej na 10 ml i rozpuszczono w 2 ml suchego acetonitrylu mieszając na mieszadle magnetycznym przez 5 minut. Dodano kroplami 0,25 M roztwór benzyliotetrazolu w suchym acetonitrylu (1,206 ml, 0,35 mmol) i mieszano przez 2 godziny. Monitorowano poziom konwersji za pomocą $^{31}\text{P NMR}$. Do probówek NMR napełnionych gazem dodano za pomocą strzykawki próbkę mieszaniny do analizy i szczelnie zamknięto. W toku reakcji obserwowano stopniowe zanikanie sygnału od oksazafosfolidyny przy jednoczesnym pojawieniu się pików od powstających diastereoizomerów przy $\delta=128,5$ ppm (s; 1P) i $\delta=124,9$ ppm (s; 1P). Reakcję zatrzymano przez dodanie roztworu 1 ml diizopropylaminy w 20 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną przemyto w rozdzielniku trzy razy: po 50 ml nasyconego roztworu wodnego wodorowęglanu sodu i dwa razy 50 ml wody MiliQ. Zebrano warstwę organiczną i wysuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 . Odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono przez chromatografię kolumnową (około 30-50 x n gramów uzyskanej mieszaniny poreakcyjnej), wymywając za pomocą eluenta: chlorek metylenu/metanol (gradient metanolu 0->5% w chlorku metylenu (v/v)). Frakcje analizowano za pomocą $^{31}\text{P NMR}$ ($\delta=128,5$; 124,9 ppm). Produkt powinien być wymywany z początkowymi frakcjami. Odparowano połączone frakcje pod zmniejszonym ciśnieniem z zastosowaniem wyparki obrotowej. Zliofilizowano produkt z benzenu, otrzymując 105 mg produktu w postaci białego proszku.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz; DMSO- d_6) δ 11,27 (s; 1H); 7,93 (dd; $J = 7,3; 2,2$ Hz; 1H); 7,59 (dd; $J = 4,0; 1,5$ Hz; 1H); 7,48 (dt; $J = 8,4; 2,0$ Hz; 1H); 6,64 (dd; $J = 8,4; 4,7$ Hz; 1H); 6,16 (ddd; $J = 9,0; 5,9; 3,8$ Hz; 1H); 5,16 (ddt; $J = 49,6; 4,2; 2,3$ Hz; 1H); 4,50 (dtd; $J = 10,6; 8,4; 6,9; 3,8$ Hz; 2H); 4,06 (dd; $J = 15,7; 3,0$ Hz; 2H); 3,99 – 3,88 (m; 1H); 3,66 – 3,50 (m; 1H); 3,41 (ddd; $J = 8,9; 5,5; 3,3$ Hz; 2H); 2,44 (q; $J = 7,1$ Hz; 1H); 2,26 – 2,19 (m; 1H); 2,17 (d; $J = 3,9$ Hz; 3H); 2,03 (d; $J = 9,7$ Hz; 3H); 1,72 (dd; $J = 24,6; 1,1$ Hz; 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz; DMSO) δ 169,98; 163,55; 153,66; 150,39; 147,44; 138,96; 135,47; 123,96; 109,79; 107,26; 83,70; 82,91; 74,45; 74,25; 63,54; 45,65; 43,27; 36,06; 20,71; 16,99; 12,01; 11,54,

$^{31}\text{P NMR}$ (300MHz; benzen) δ 128,5; 124,9.

9.2.13 Synteza 3'-*O*-acetylo-5'-*O*-[3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-(1,3,2)-oksazafosfolidyno] tymidyny (45)

3'-*O*-acetylotymidynę 156 mg (0,55 mmola) i 2-*N*-izopropylamino-3-(pirydyn-2-ylo)-5-fenylo-[1,3,2]-oksazafosfolidynę (190 mg, 0,55 mmola) zmieszano w kolbie okrągłodennej na 10 ml i rozpuszczono w 2 ml suchego acetonitrylu mieszając na mieszadle magnetycznym przez 5 minut. Dodano kroplami roztwór benzylotiotetrazolu w suchym acetonitrylu (0,25 M; 1,206 ml, 0,35 mmol) i mieszano przez 2 godziny. Monitorowano poziom konwersji za pomocą $^{31}\text{P NMR}$. Do próbek NMR napełnionych gazem dodano za pomocą strzykawki próbkę mieszaniny do analizy i szczelnie zamknięto. W toku reakcji obserwowano stopniowe zanikanie sygnałów od oksazafosfolidyny ($\delta=115,9$ ppm i $\delta=128,5$ ppm) przy jednoczesnym pojawieniu się czterech pików od powstających diastereoizomerów przy $\delta=127,6$ ppm (s; 1P) ppm, $\delta=132,6$ (s; 1P), $\delta=134$ ppm (s; 1P) i $\delta=137,8$ ppm (s; 1P). Reakcję zatrzymano przez dodanie roztworu 1 ml diizopropylaminy w 20 ml chlorku metylenu. Warstwę organiczną przemyto w rozdzielaczu trzy razy: po 50 ml nasyconego roztworu wodnego wodorowęglanu sodu i dwa razy 50 ml wody MiliQ. Zebrano warstwę organiczną i wysuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 . Odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono przez chromatografię kolumnową (około 30-50 x n gramów uzyskanej mieszaniny poreakcyjnej), wymywając za pomocą eluenta: chlorek metylenu/metanol (gradient metanolu 0->5% w chlorku metylenu (v/v)). Frakcje analizowano za pomocą $^{31}\text{P NMR}$ ($\delta=127,6; 132,6; 134; 137,8$ ppm). Produkt powinien być wymywany z początkowymi frakcjami. Odparowano połączone

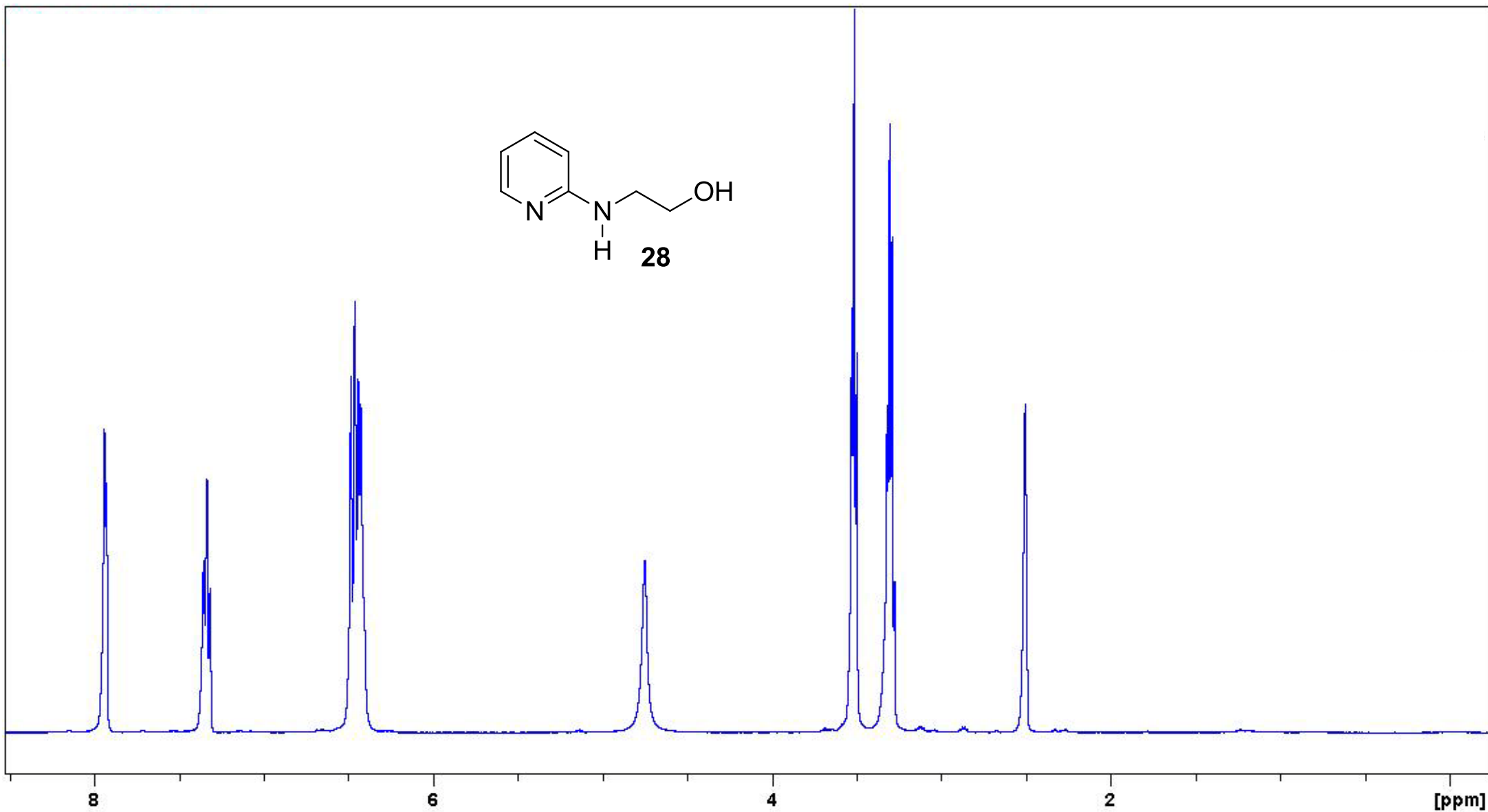
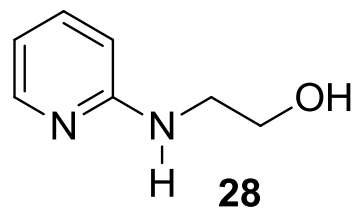
frakcje pod zmniejszonym ciśnieniem z zastosowaniem wyparki obrotowej. Zliofilizowano produkt z benzenu, otrzymując 90 mg produktu w postaci białego proszku.

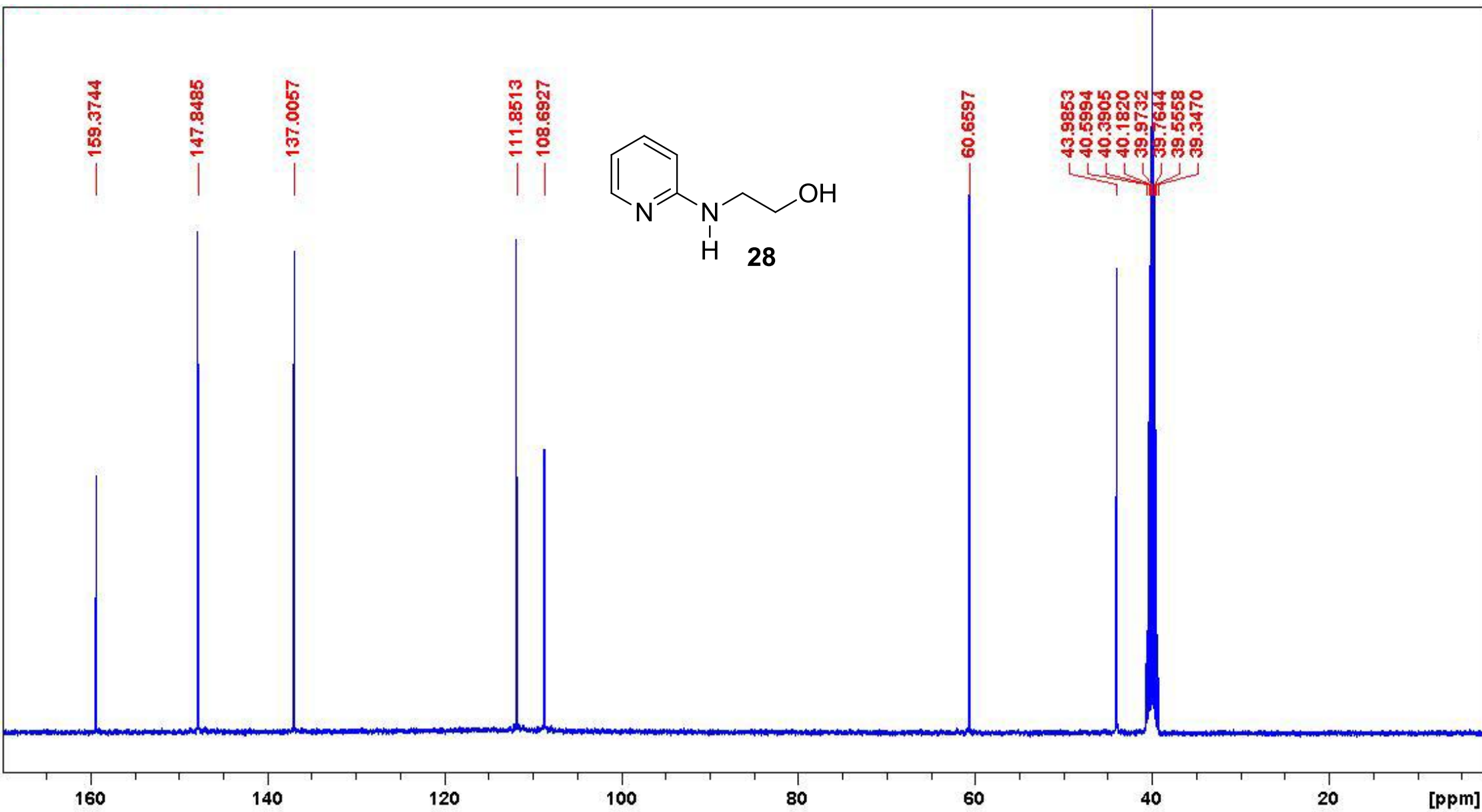
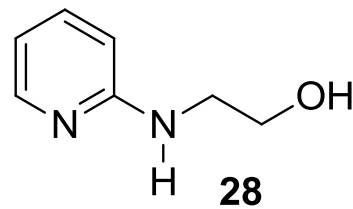
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz; DMSO) δ 11,33 (s; 1H); (t; 1H); 7,6d (d; $J = 11,4$ Hz; 1H); 7,49 (dd; $J = 11,1$; 8,1 Hz; 2H); 7,45 – 7,35 (m; 4H); 6,87 – 6,84 (m; 1H); 6,73 (dd; $J = 8,3$; 4,3 Hz; 1H); 5,84 (ddd; $J = 13,1$; 10,1; 6,4 Hz; 1H); 5,20 (dd; $J = 12,4$; 5,6 Hz; 2H); 4,20 – 3,99 (m; 4H); 3,97 (d; $J = 1,9$ Hz; 2H); 2,27 (dd; $J = 8,5$; 6,1 Hz; 2H); 2,06 (s; 3H); 1,78 (s; 3H)

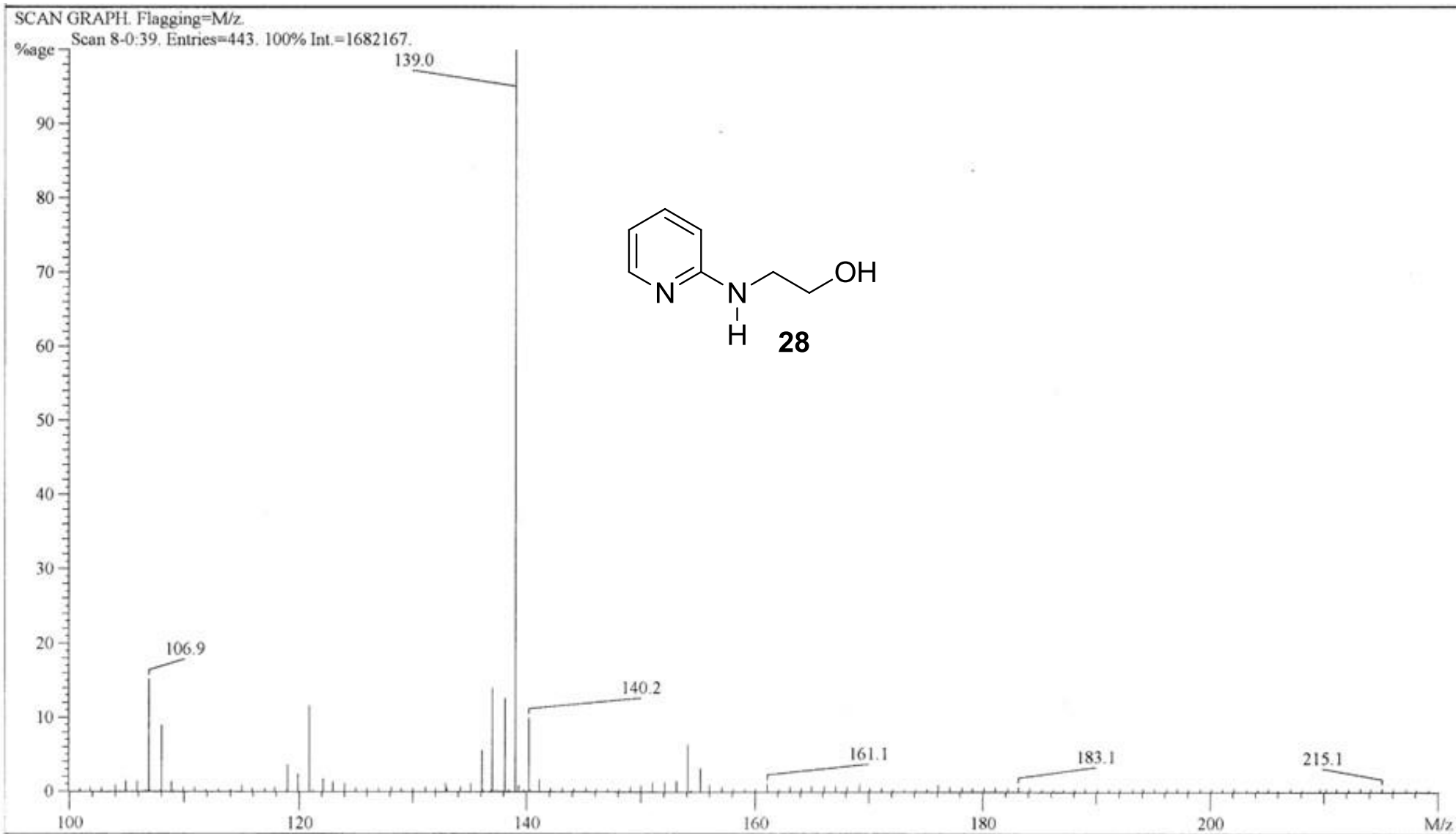
$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz; DMSO) δ 170,0; 163,7; 163,6; 150,5; 147,8; 138,5; 128,5; 128,3; 126,5; 126,4; 115,5; 109,9; 109,7; 107,8; 107,7; 84,6; 83,7; 74,7; 61,3; 36,5; 20,9; 12,3;

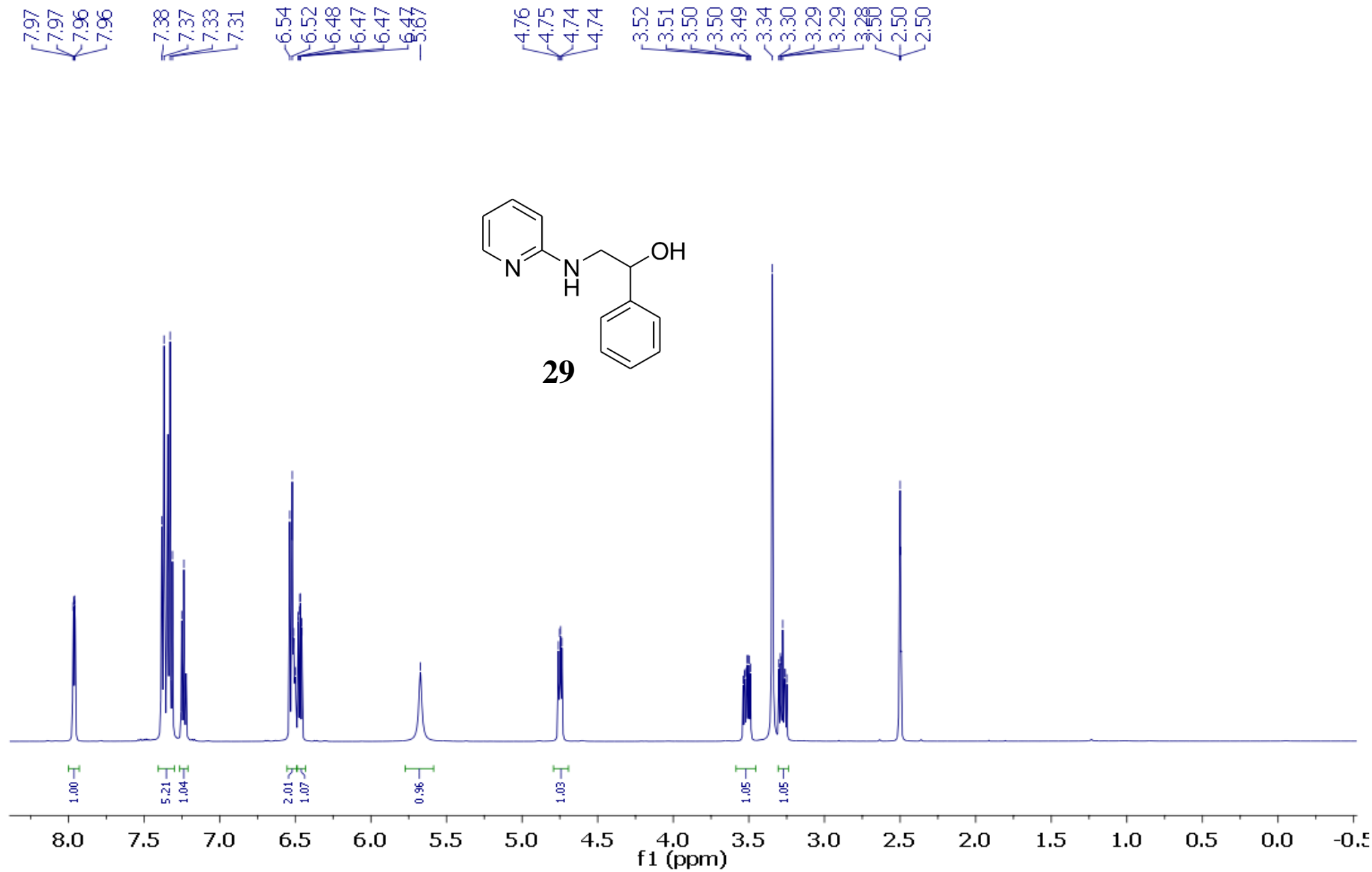
HRMS (ESI-q-TOF) m/z : $[M+H]^+$ masa obliczona dla: $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$: 527,1696; masa znaleziona: 527,1692.

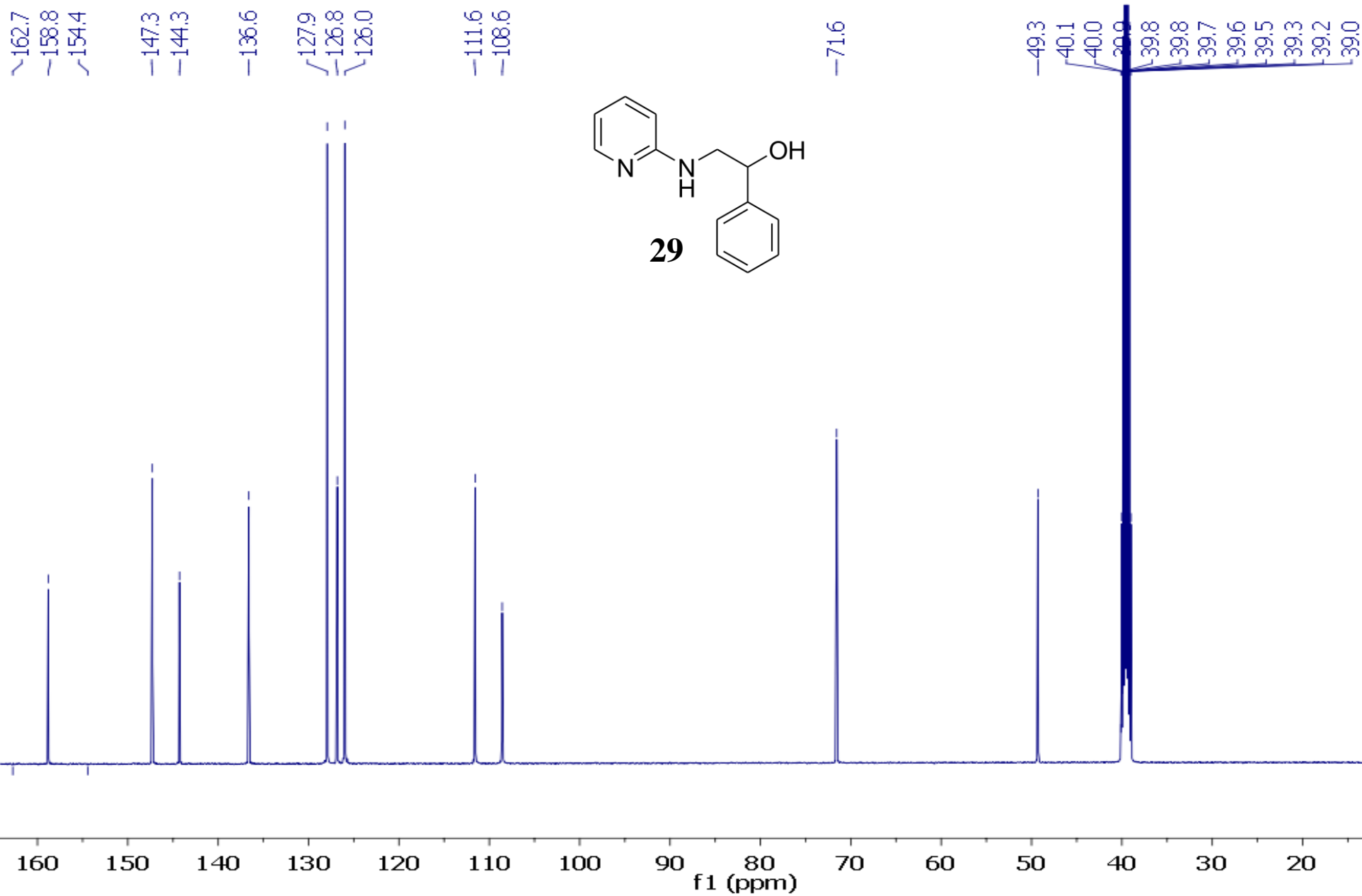
10 Atlas widm NMR i masowych











Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

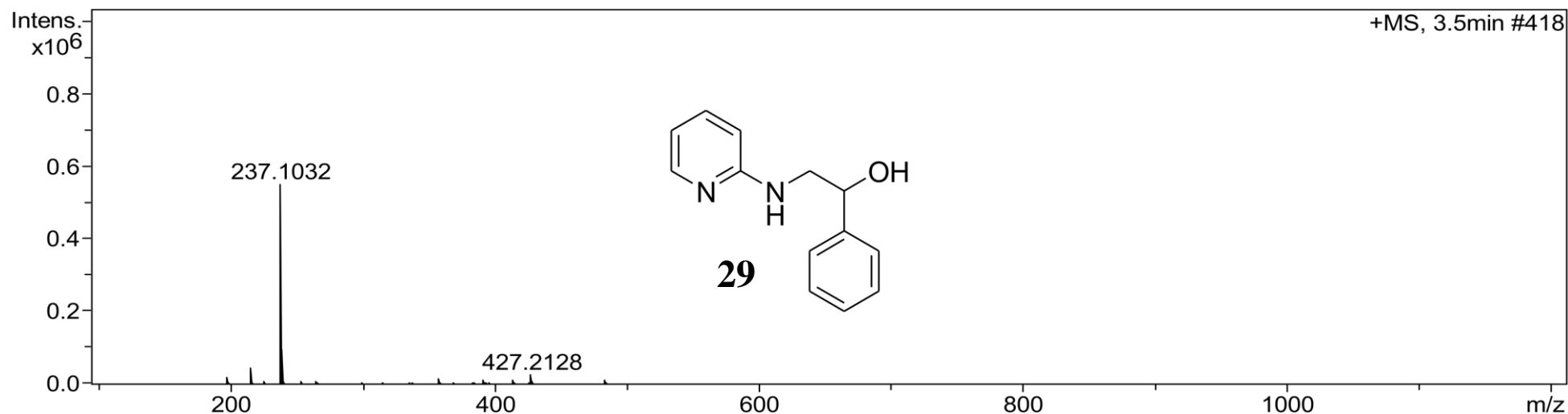
Analysis Name D:\Data\Basia\zlecone\15_10_08_B_pos.d
 Method ewelina.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 10/8/2015 2:59:07 PM

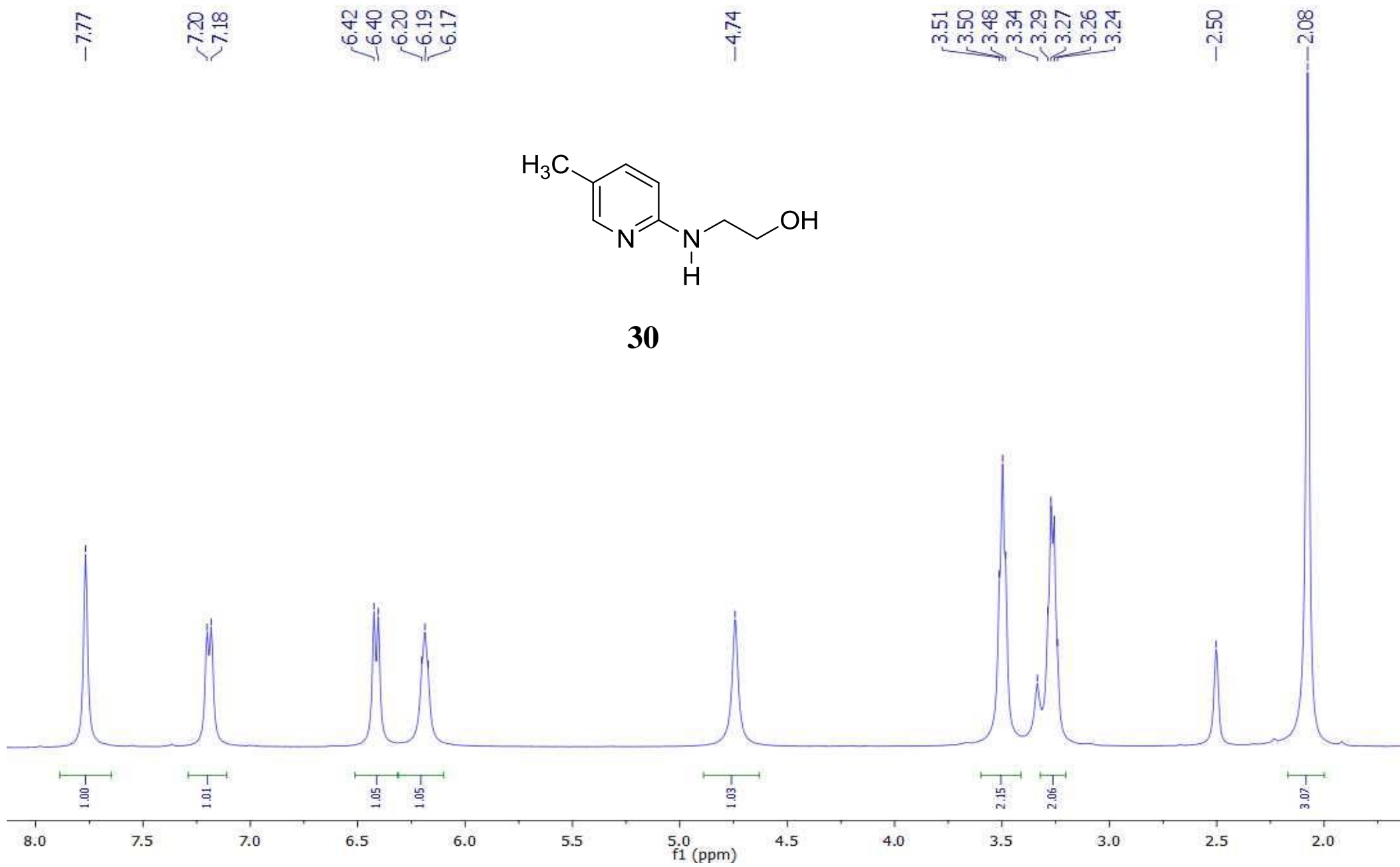
Operator Bruker Customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 128

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1200 m/z	Set Collision Cell RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Me an err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSi gm a	Std I	Std Me an m/z	Std I Var Norm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
215.1178	1	C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O	215.1179	0.2	0.8	7.5	ok	even	8.7	15.3	0.3	6.6	0.8	842.7



-157.66

-147.13

-138.09

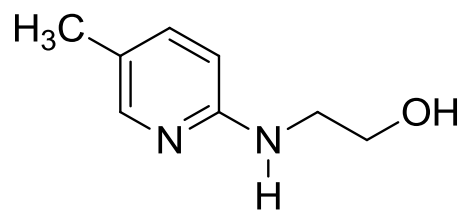
-119.92

-108.35

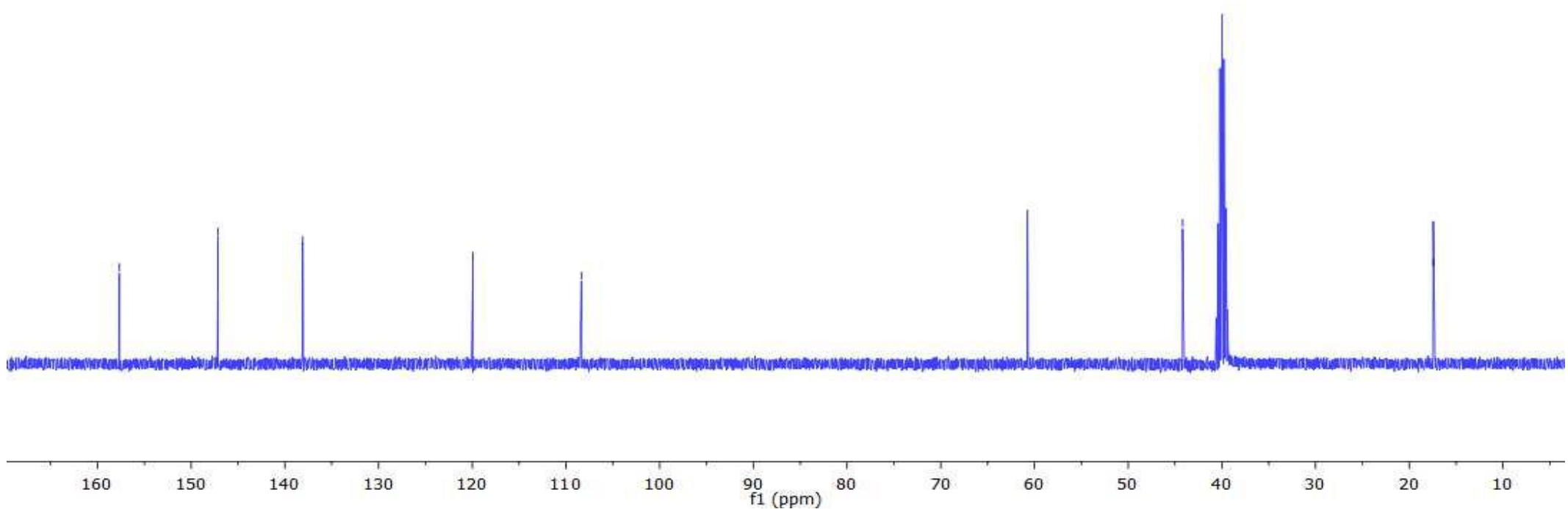
-60.74

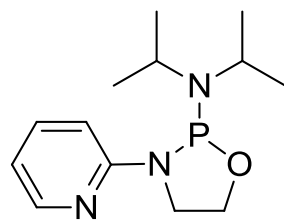
-44.19

-17.43

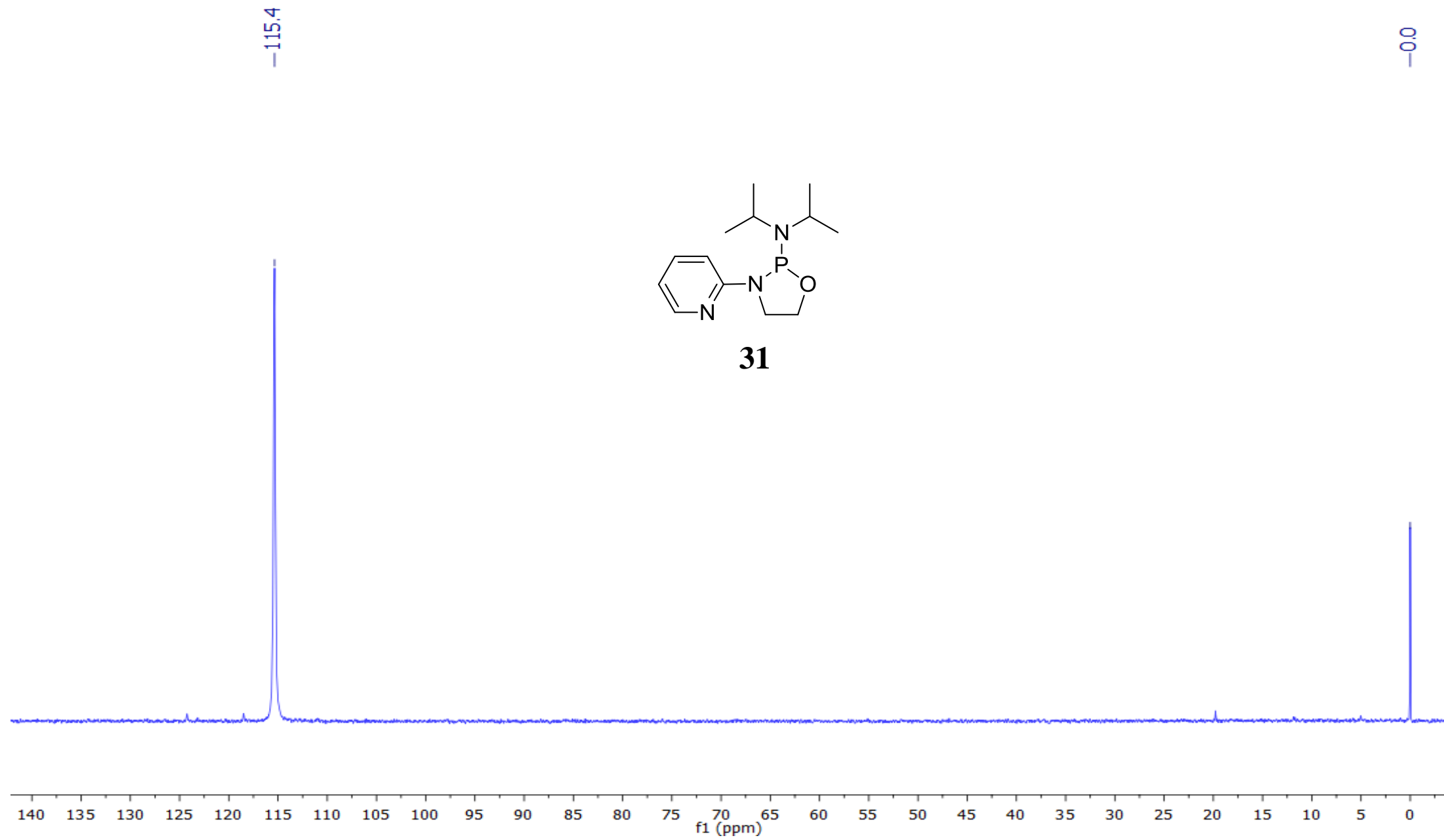


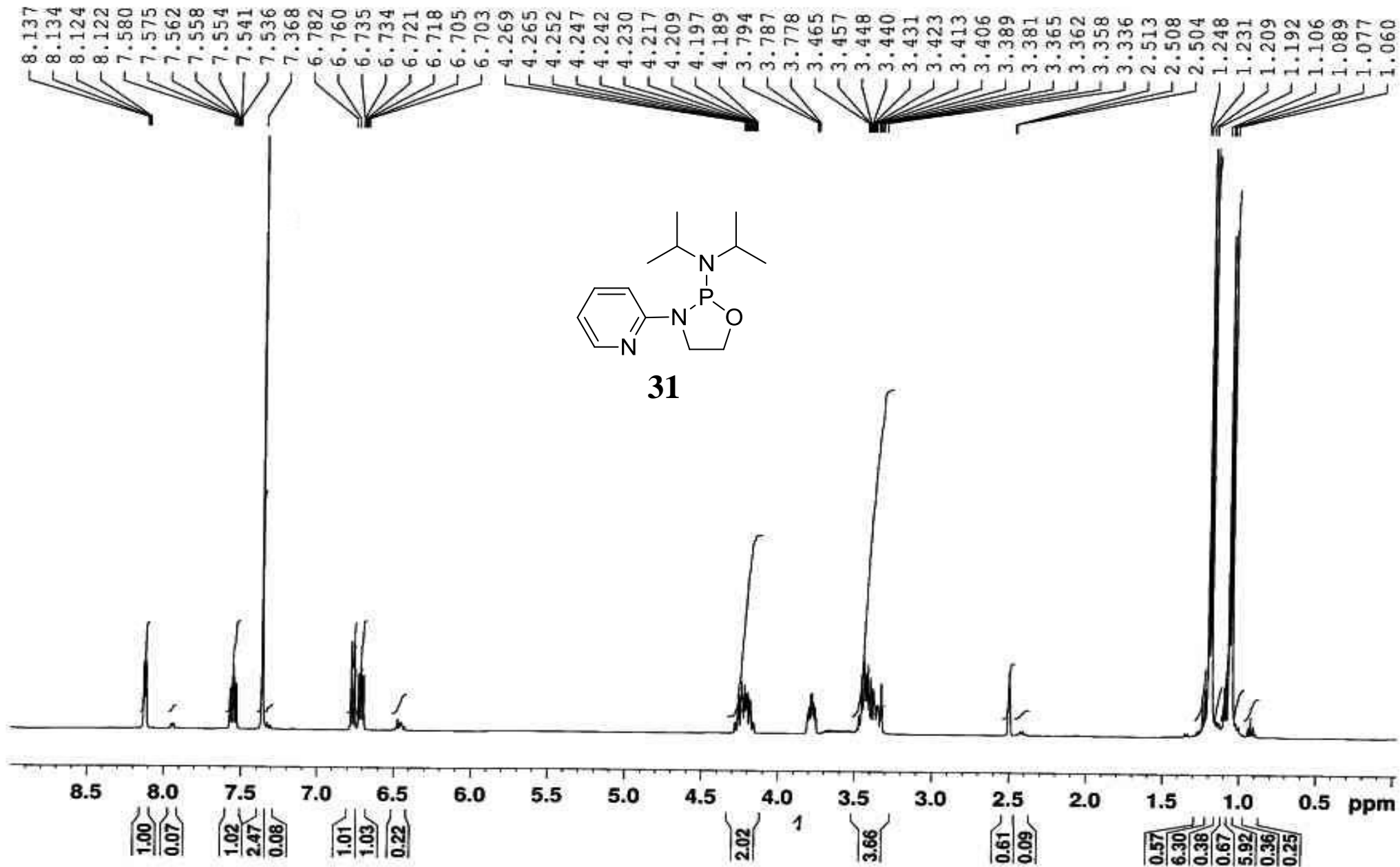
30

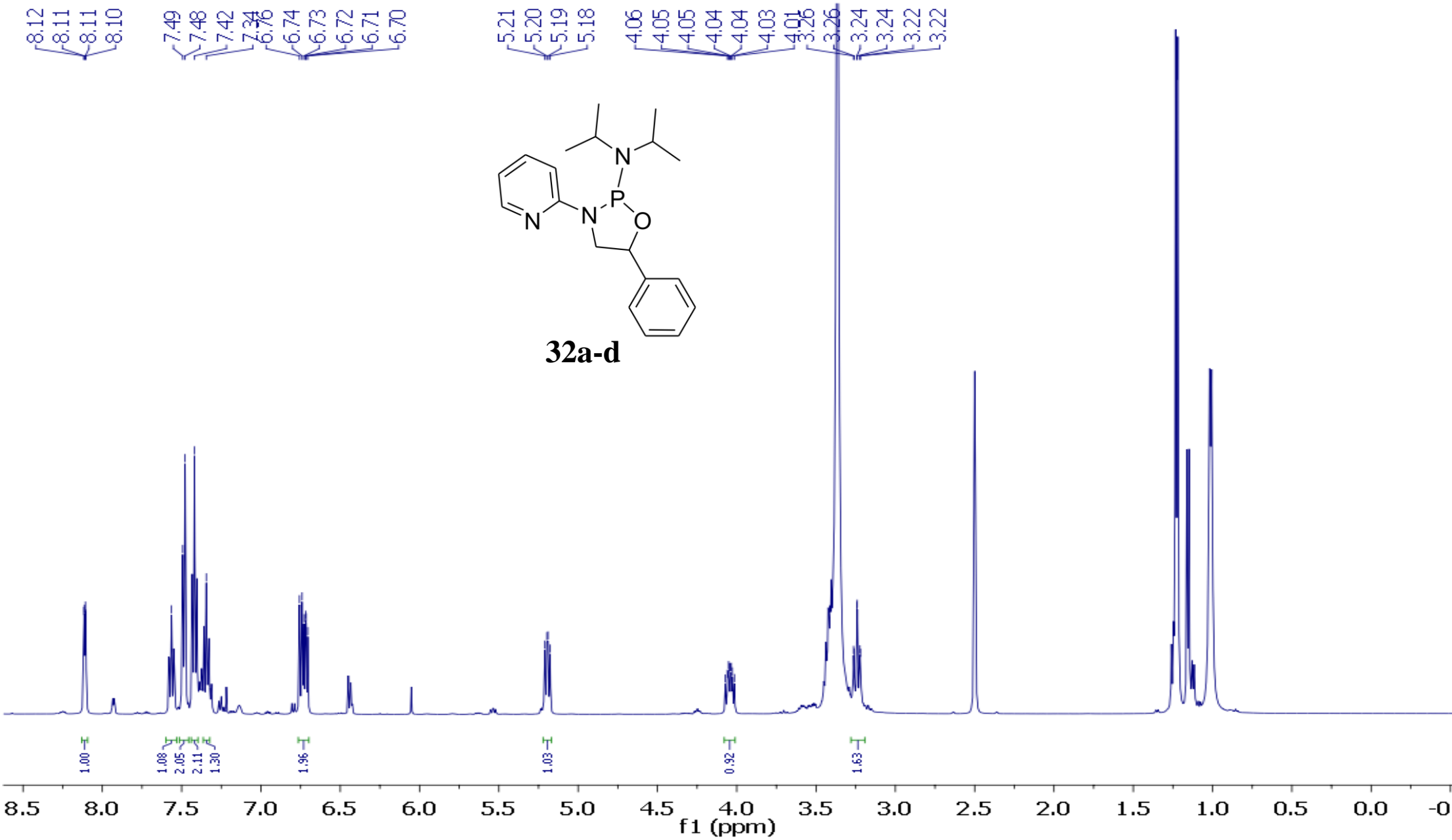




31







156.7
156.6

148.1

140.2

137.7

136.9

126.7

126.1

114.4

109.1

109.1

77.2
77.2

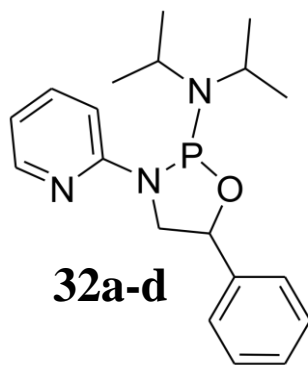
50.5

44.9

44.8

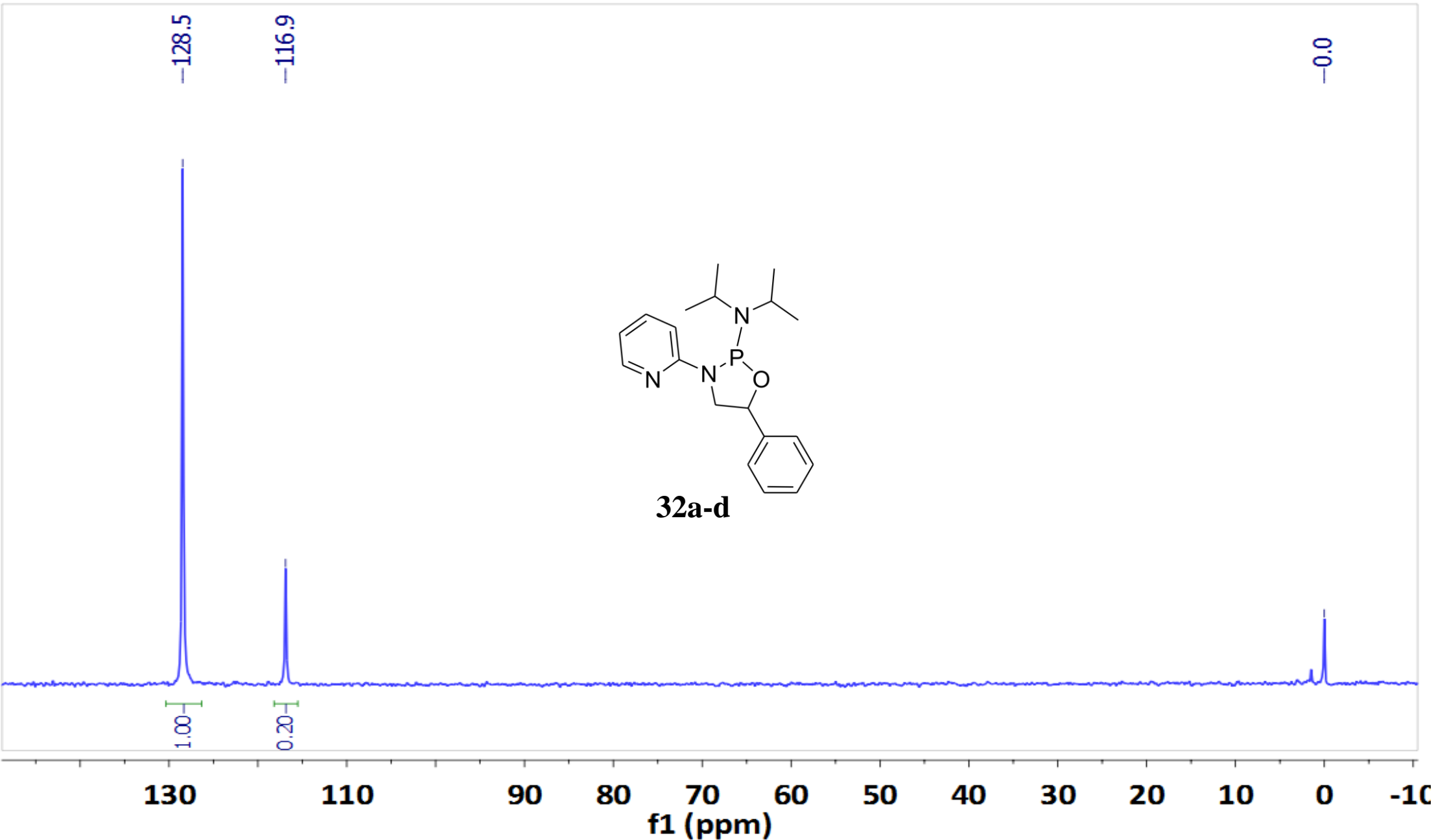
25.2

23.8

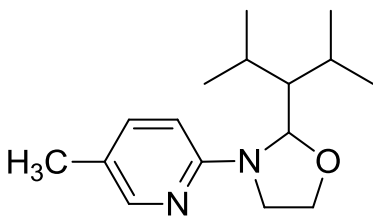


160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

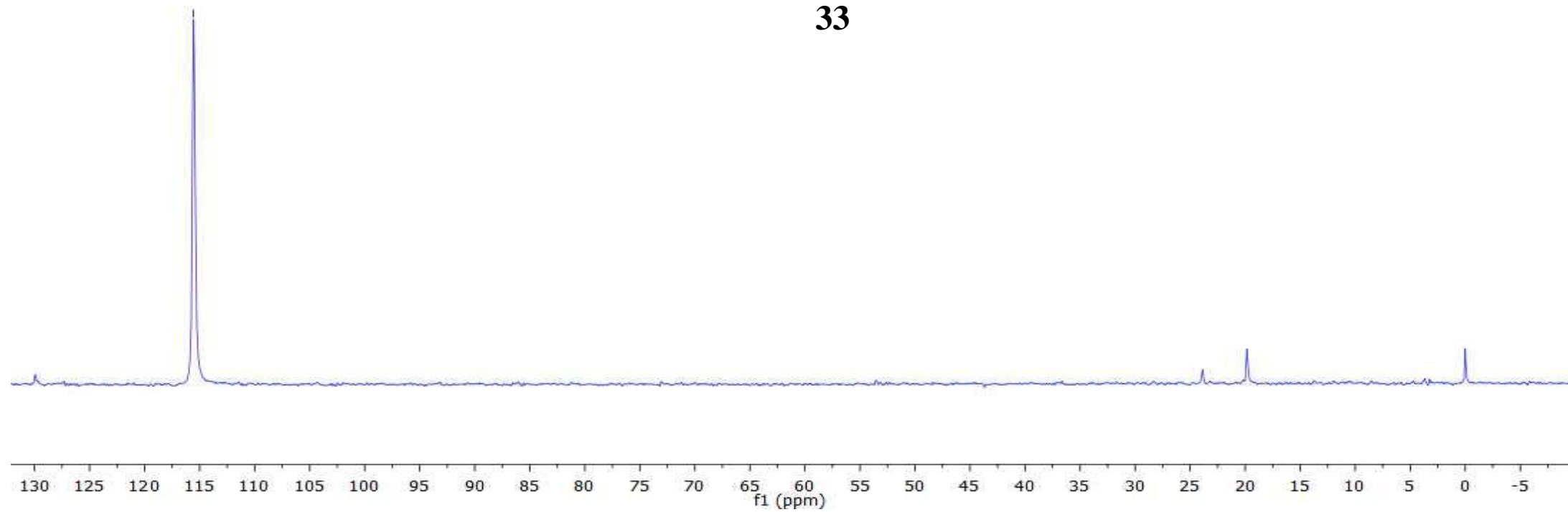
f1 (ppm)

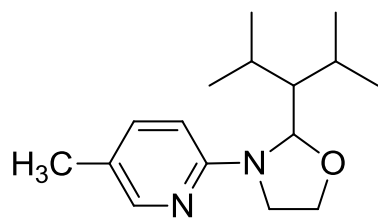


-115.55

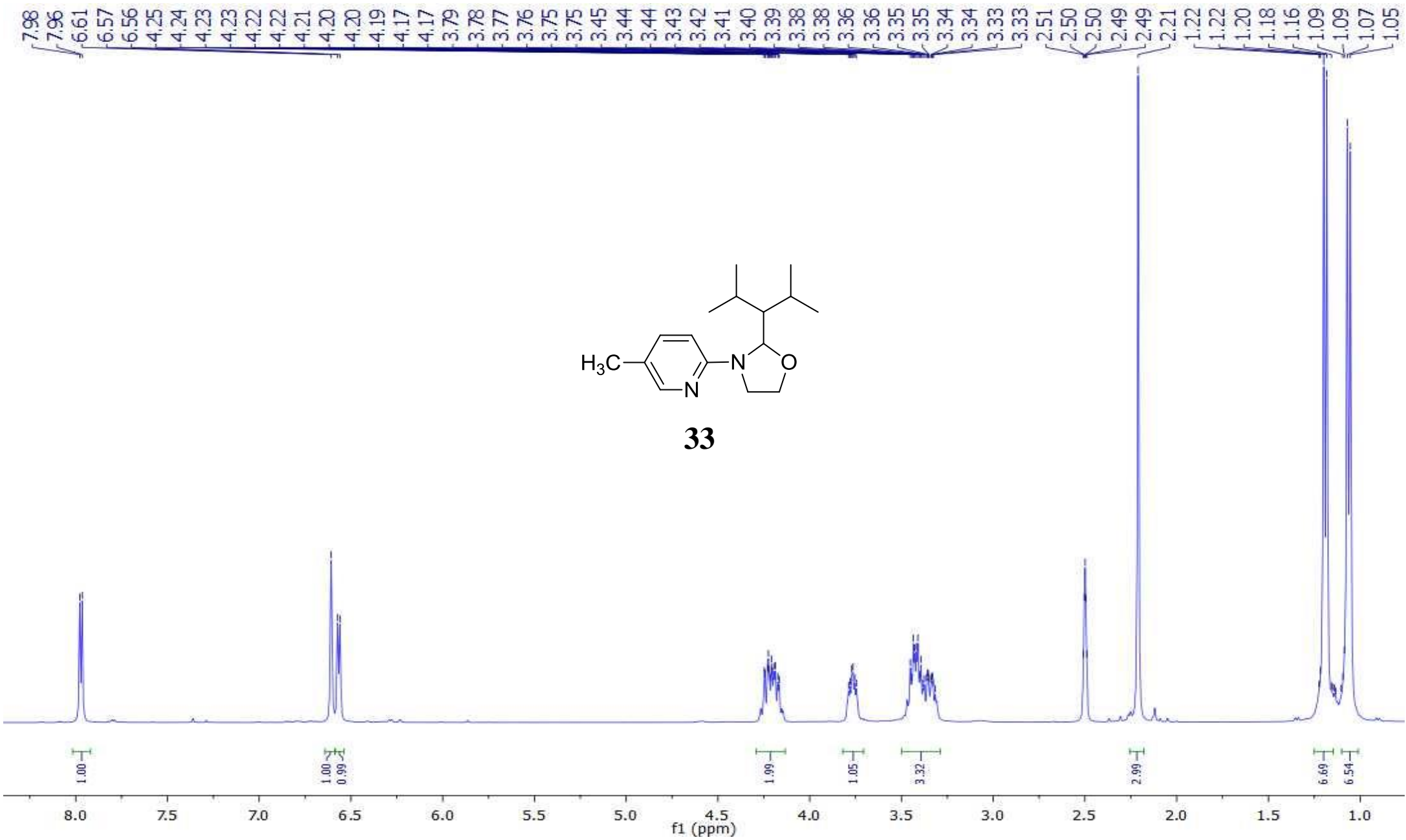


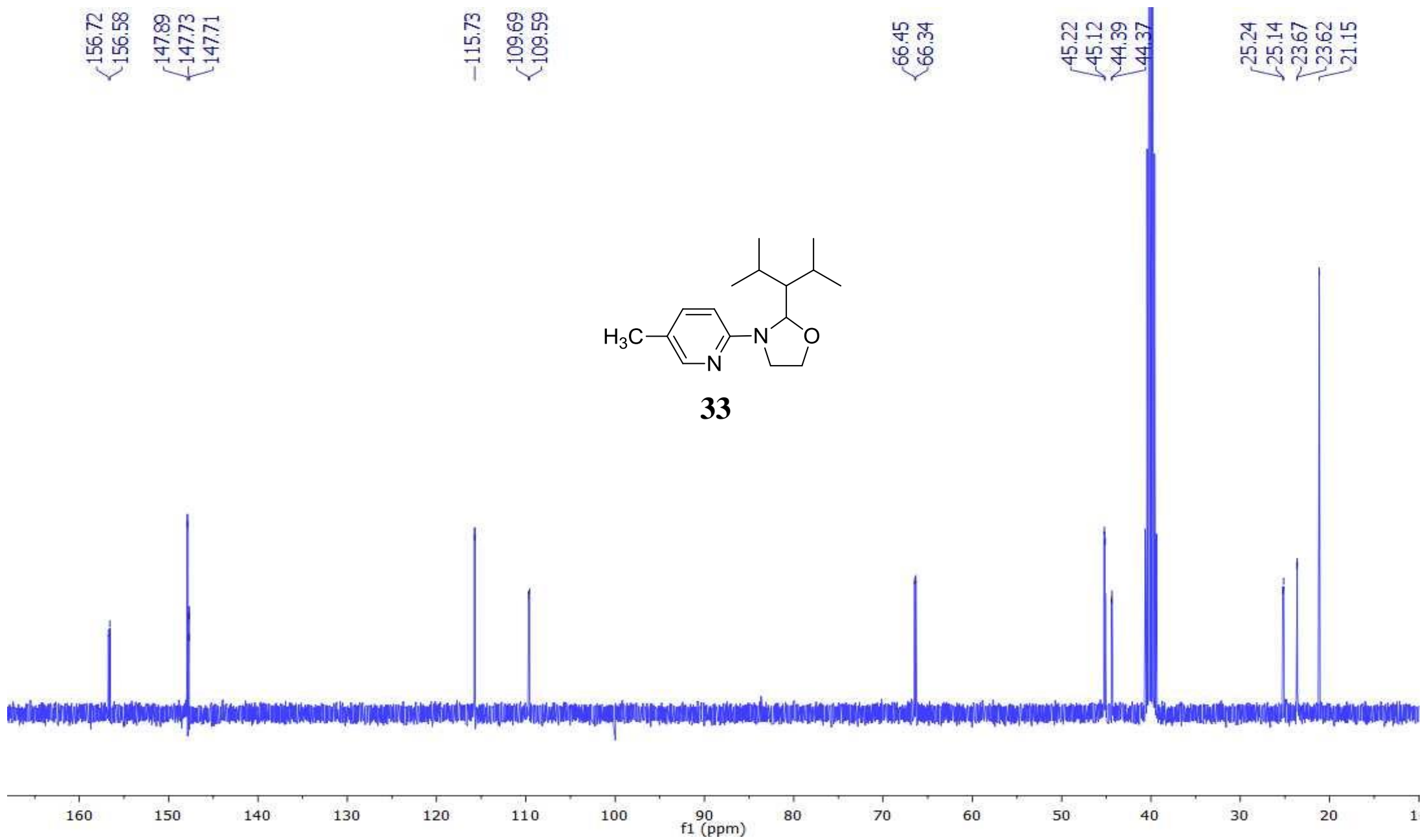
33





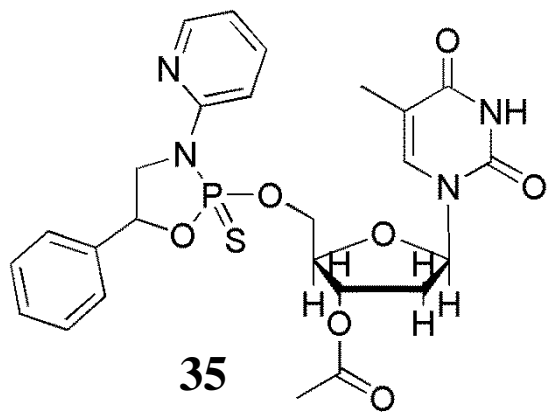
33





75.2
74.4

0.0



Exp

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Piasecka\zlecone\Kaczynski c.d
 Method ewelina.m
 Sample Name A
 Comment

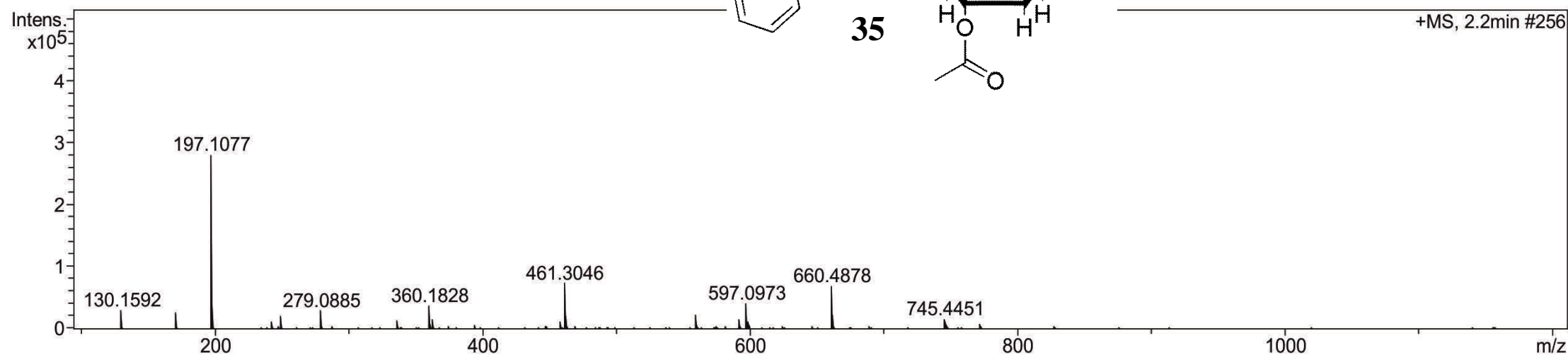
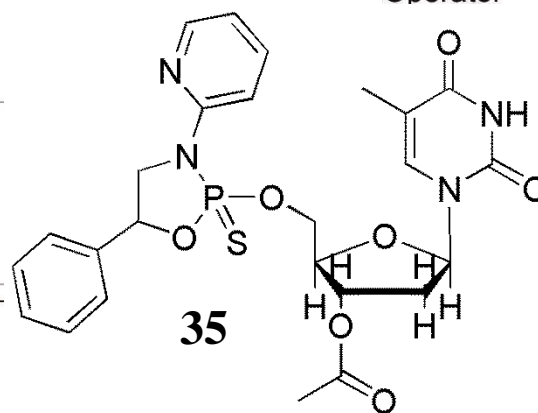
Acquisition Date 3/3/2016 12:40:53 PM

Operator Ser# Bruker Customer
 128 micrOTOF-Q

Acquisition Parameter

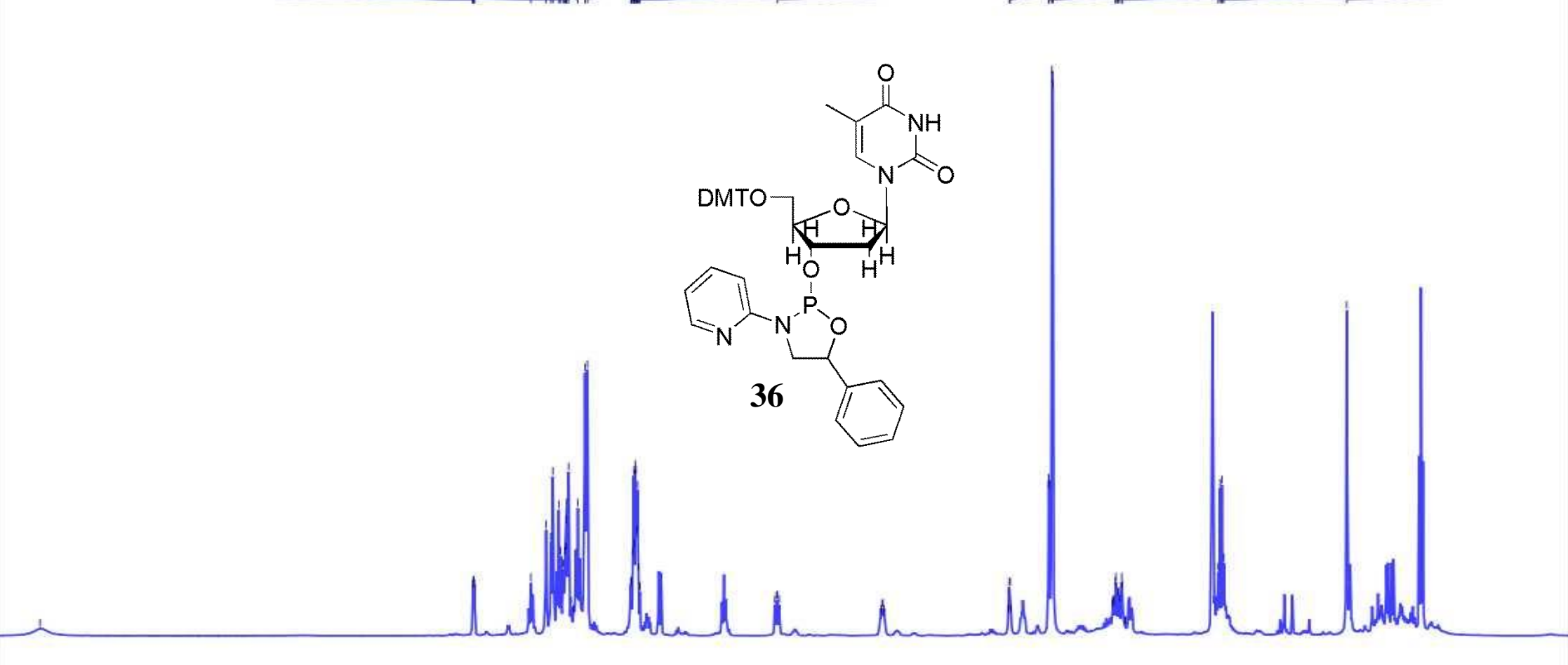
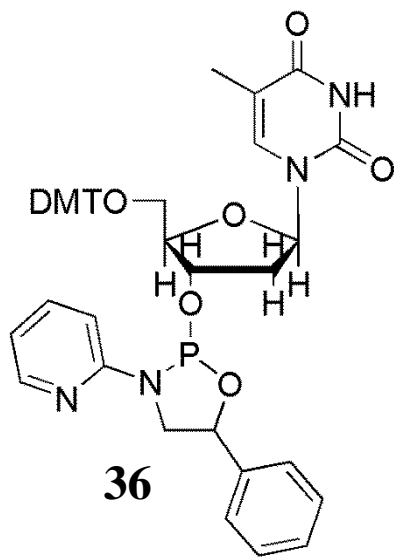
Source Type ESI
 Focus Not active
 Scan Begin 100 m/z
 Scan End 1200 m/z
 Ion Polarity
 Set Capillary
 Set End Plate Offset
 Set Collision Cell RF

nebulizer 0.4 Bar
 Dry Heater 220 °C
 Dry Gas 4.0 l/min
 Sift Valve Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-R rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mea n m/z	Std I VarNo rm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
559.1431	1	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₇ PS	559.1411	-3.6	-4.5	14.5	ok	even	11.6	18.0	2.8	10.3	2.7	842.7

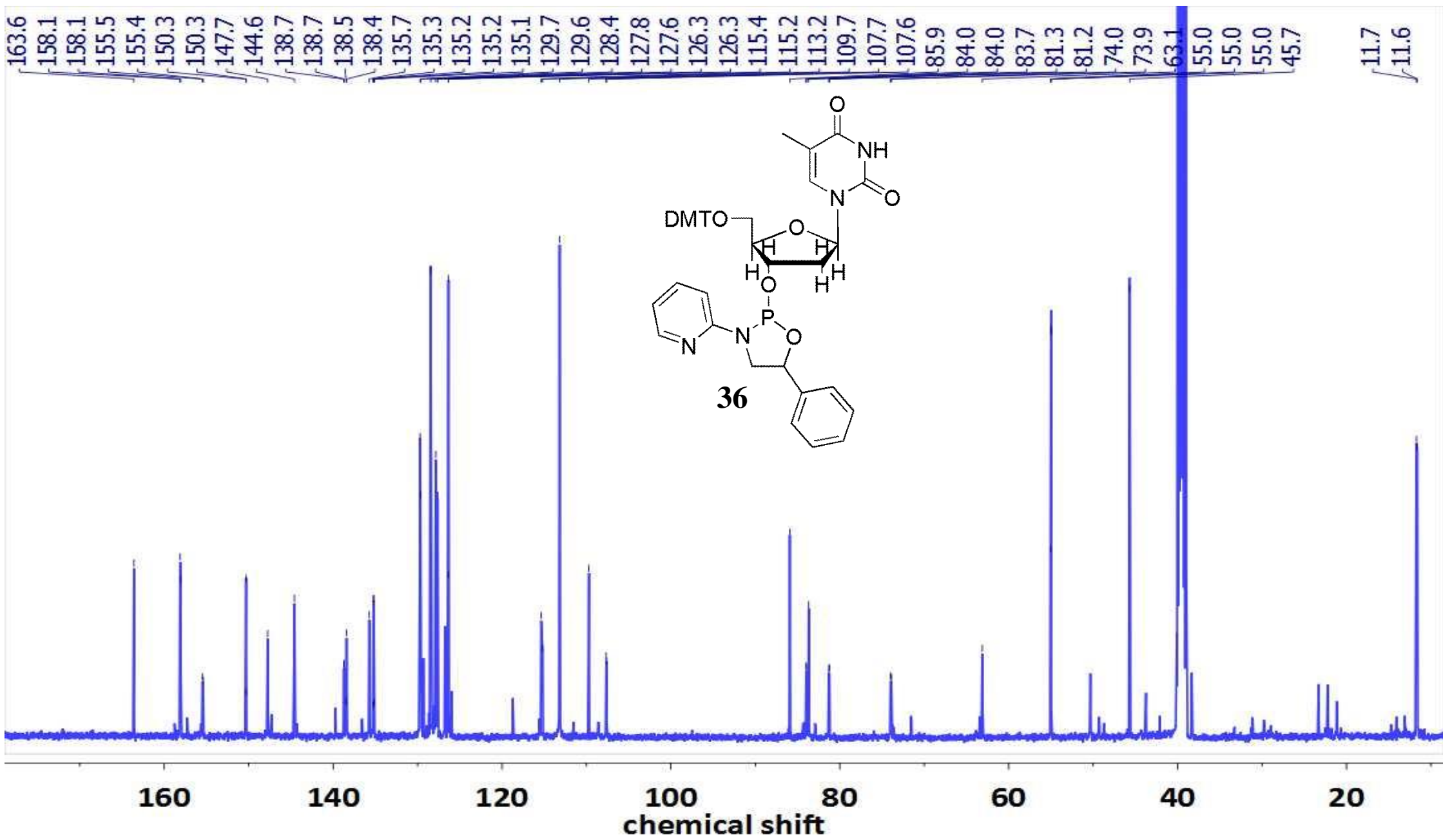
8.07
8.06
8.06
8.05
7.63
7.51
7.48
7.46
7.42
7.40
7.39
7.37
7.37
7.36
7.36
7.35
7.28
7.22
7.20
6.88
6.87
6.86
6.86
6.85
6.84
6.84
6.83
6.83
6.82
6.81
5.77
4.03
4.02
3.73
3.73
3.71
3.70
3.23
3.23
3.21
3.20
3.18
3.18
2.46
2.44
2.43
2.41
1.49

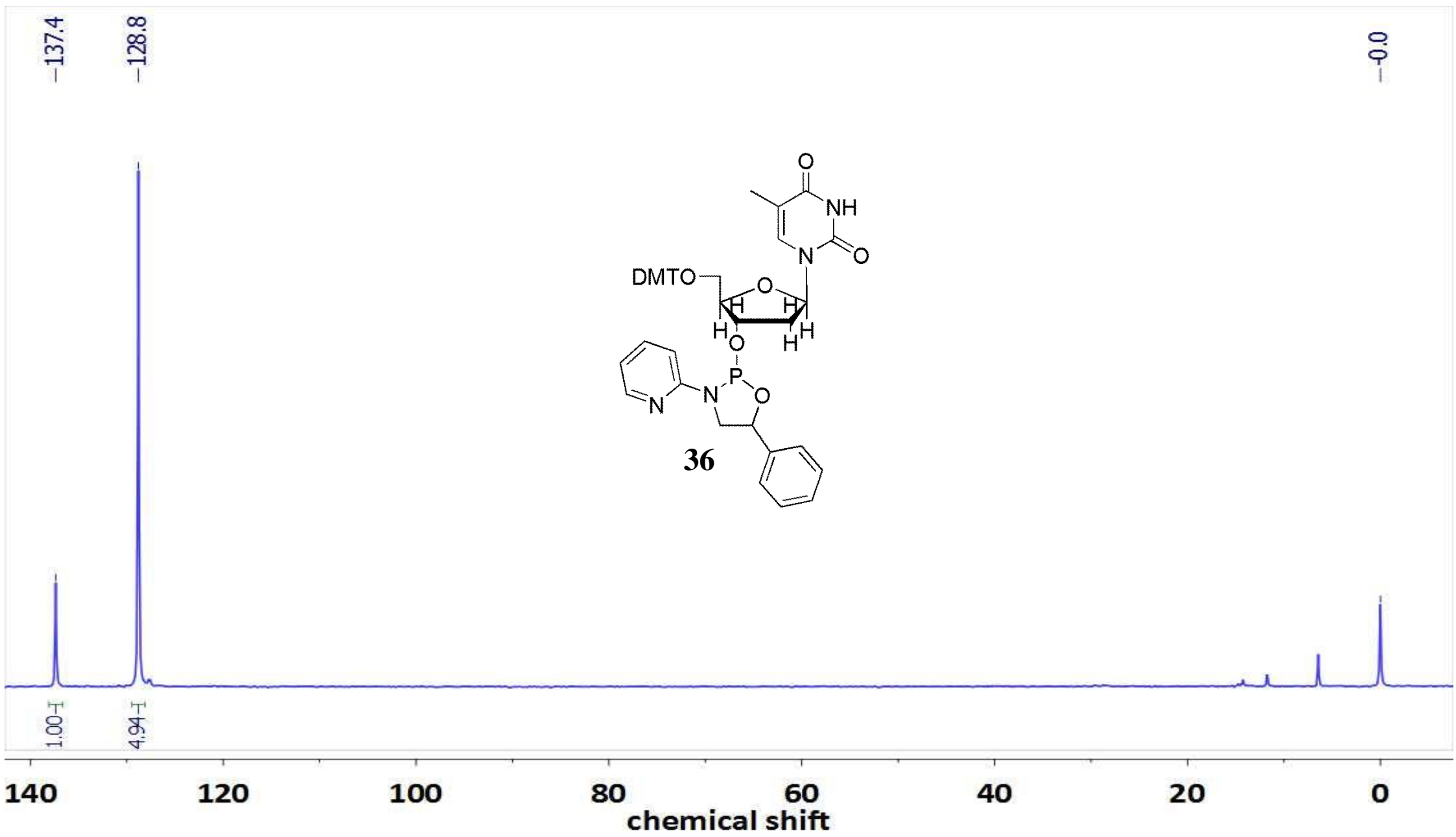


1.04
0.98
1.21
1.20
2.78
2.33
4.36
2.64
5.46
6.14
1.15
1.00
0.97
1.05
1.64
6.12
2.68
2.90
3.00

11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

chemical shift





Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

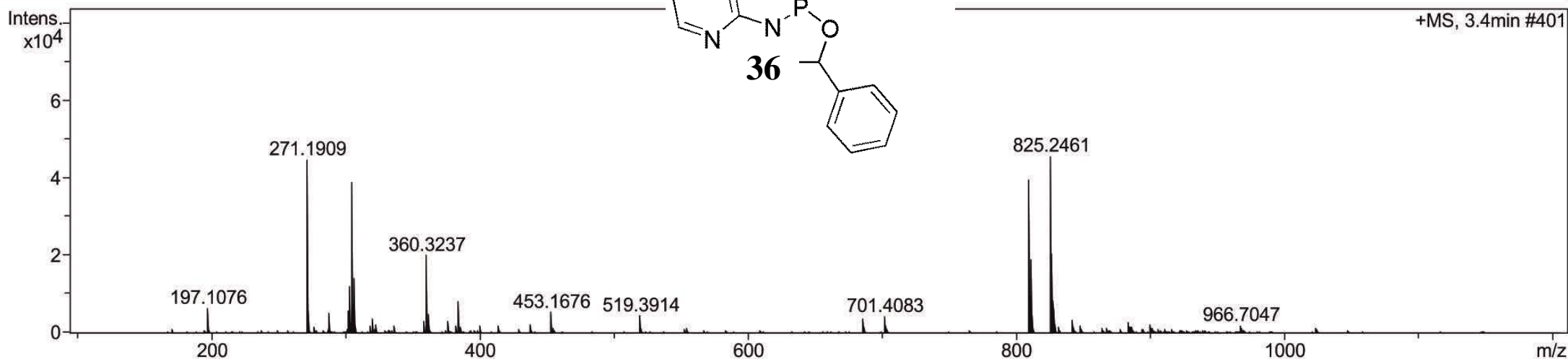
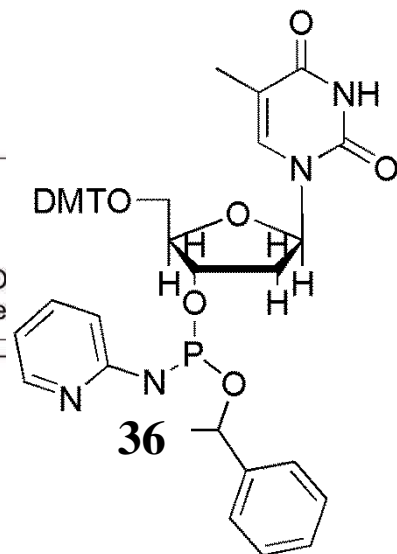
Analysis Name D:\Data\Piasecka\zlecone\Kaczynski A.d
 Method ewelina.m
 Sample Name A
 Comment

Acquisition Date 3/3/2016 11:11:55 AM
 Operator Bruker Customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 128

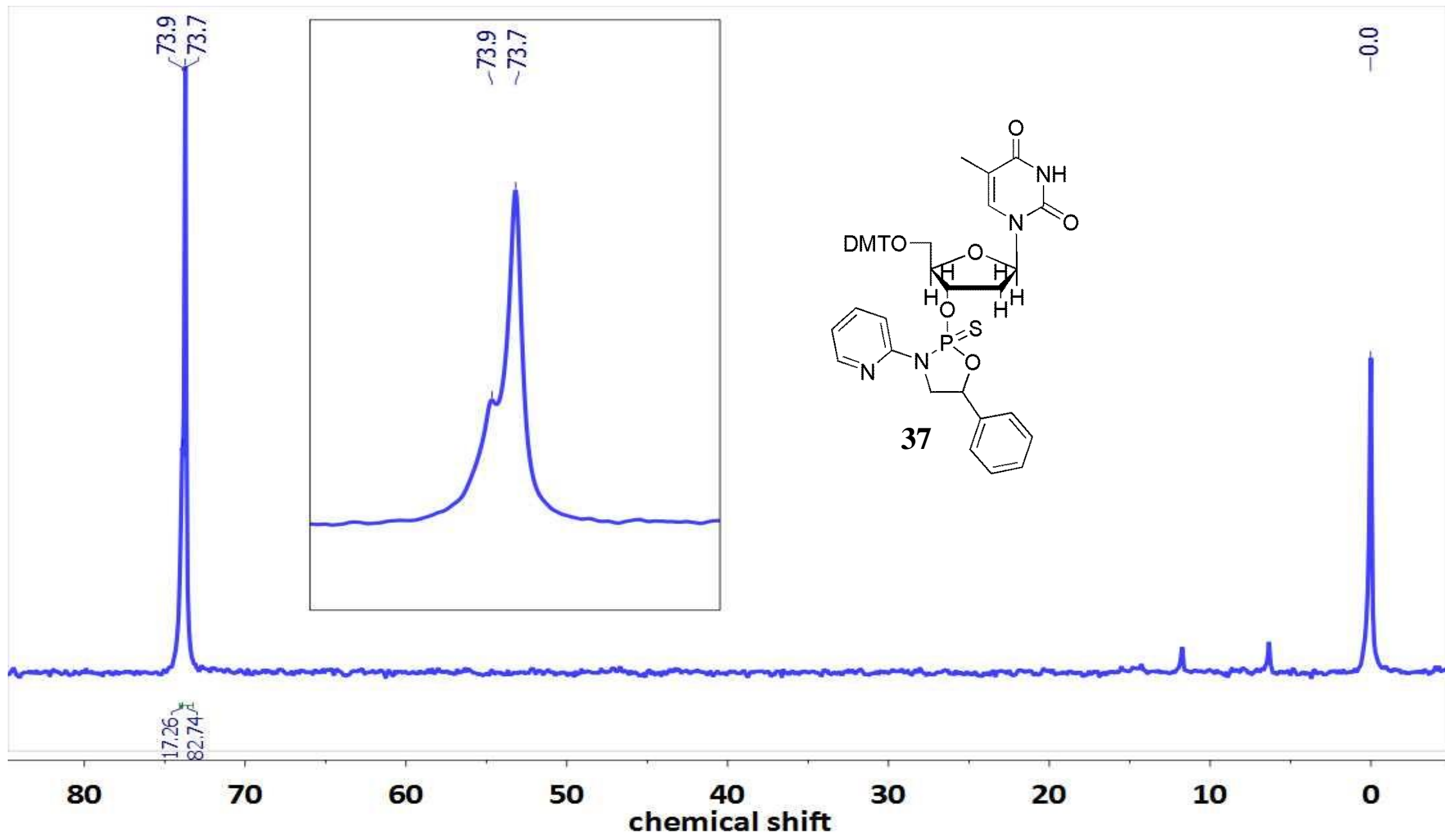
Acquisition Parameter

Source Type ESI
 Focus Not active
 Scan Begin 100 m/z
 Scan End 1200 m/z
 Ion Polarity
 Set Capillary
 Set End Plate O
 Set Collision Ce

Set Nebulizer 0.4 Bar
 Set Dry Heater 220 °C
 Set Dry Gas 4.0 l/min
 Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-R rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
809.2714	1	C ₄₄ H ₄₃ N ₄ NaO ₈ P	809.2711	-0.5	0.0	25.5	ok	even	12.6	18.4	0.6	7.2	1.3	842.7



Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Piasecka\zlecone\Kaczynski b.d
 Method ewelina.m
 Sample Name A
 Comment

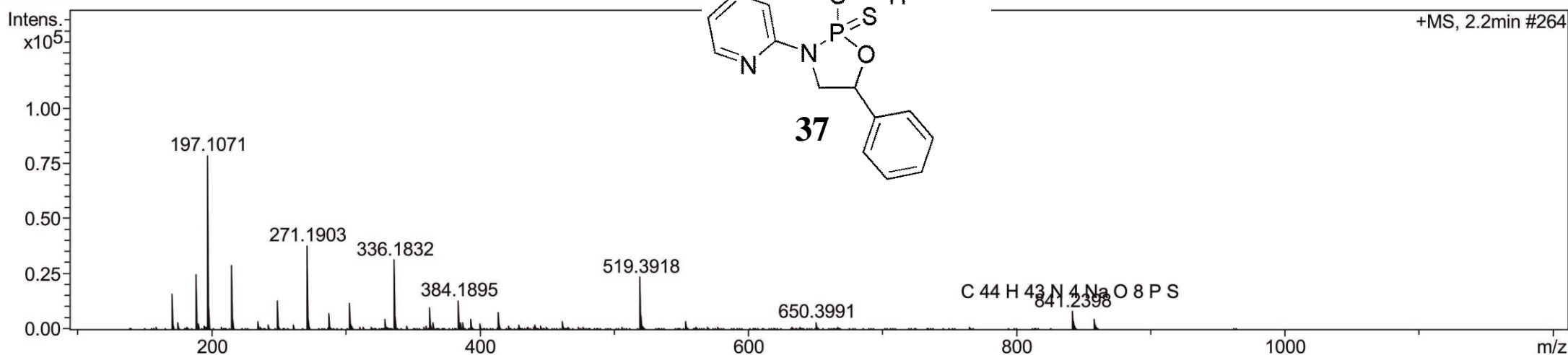
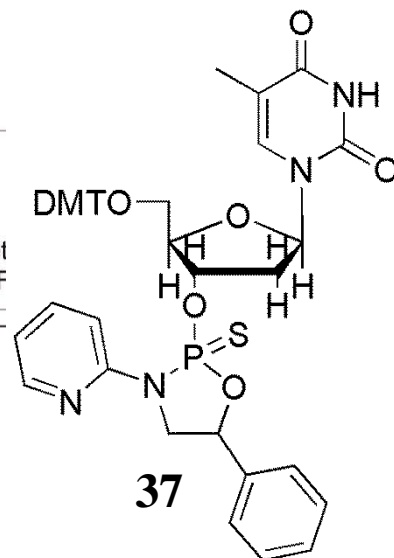
Acquisition Date 3/3/2016 12:30:43 PM

Operator Bruker Customer
 Instrument / Ser# microTOF-Q 128

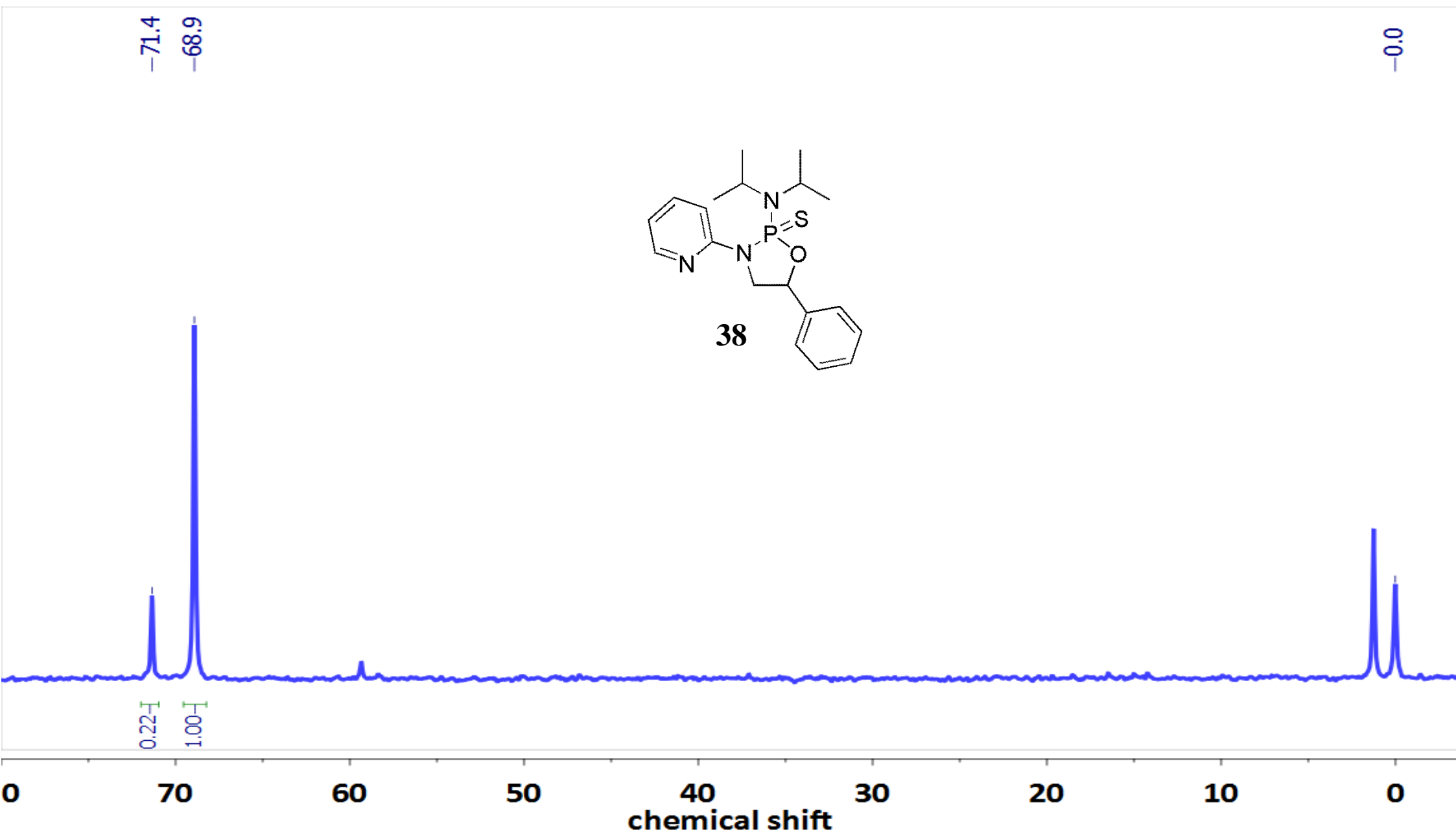
Acquisition Parameter

Source Type ESI Ion Polarity
 Focus Not active Set Capillary
 Scan Begin 100 m/z Set End Plate Offset
 Scan End 1200 m/z Set Collision Cell RF

Set Nebulizer 0.4 Bar
 Set Dry Heater 220 °C
 Set Dry Gas 4.0 l/min
 Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-R rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
841.2398	1	C ₄₄ H ₄₃ N ₄ NaO ₈ P ₂ S	841.2431	4.0	4.4	25.5	ok	even	14.1	18.0	3.9	5.7	2.7	842.7



Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Piasecka\zlecone\Kaczynski d.d
 Method ewelina.m
 Sample Name A
 Comment

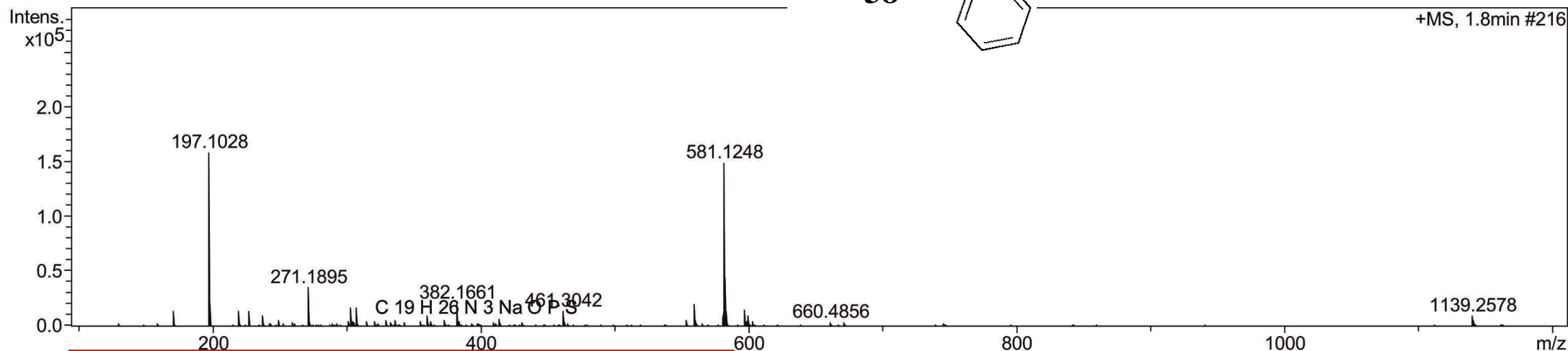
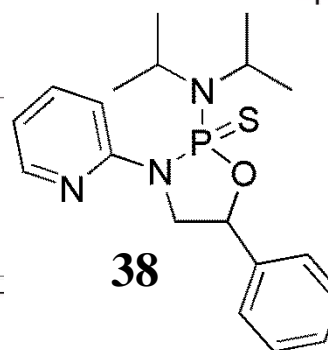
Acquisition Date 3/3/2016 12:46:23 PM

Operator
 ument / Ser# Bruker Customer
 micrOTOF-Q 128

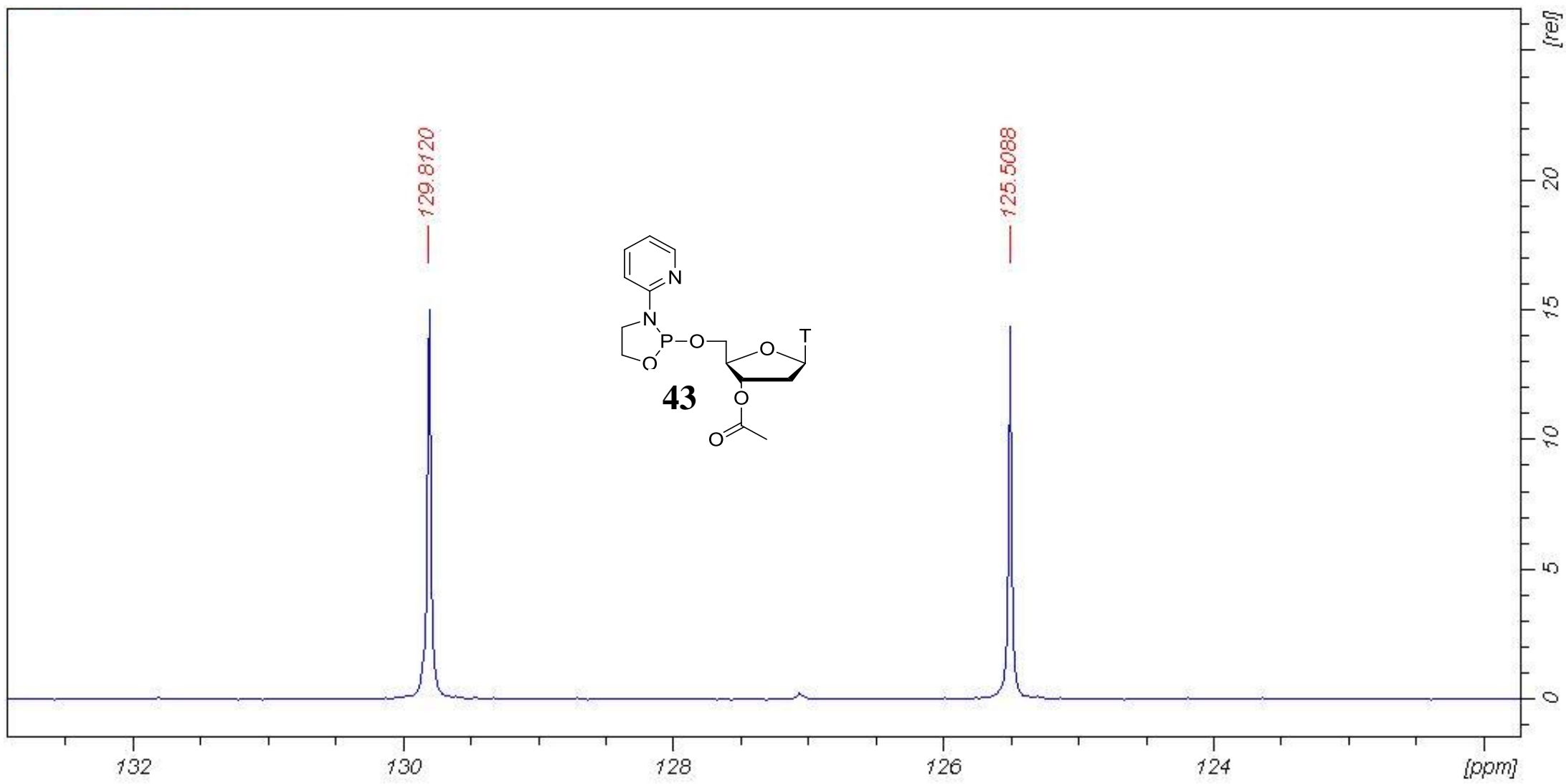
Acquisition Parameter

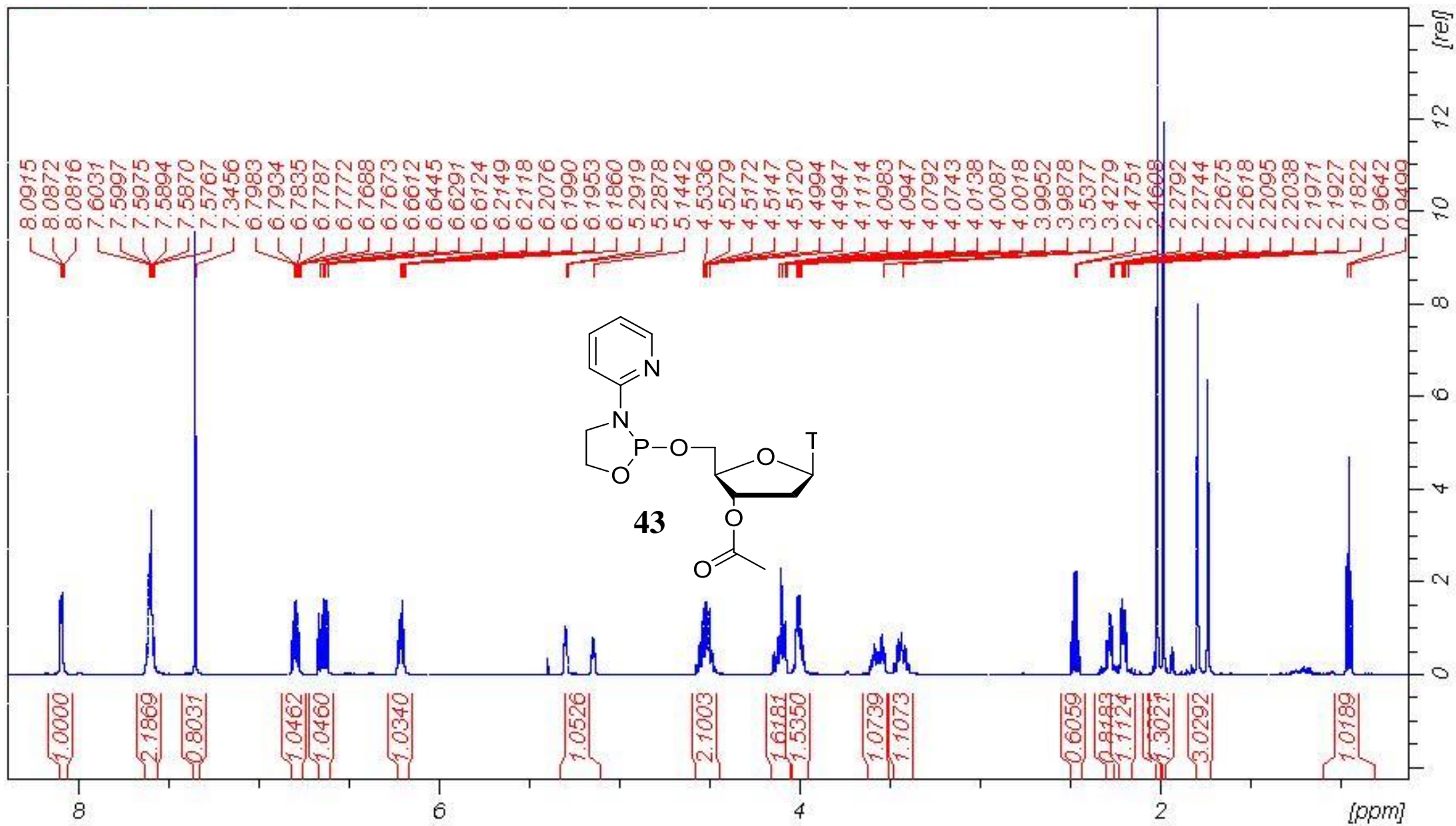
Source Type ESI Ion Polarity
 Focus Not active Set Capillary
 Scan Begin 100 m/z Set End Plate Offset
 Scan End 1200 m/z Set Collision Cell RF

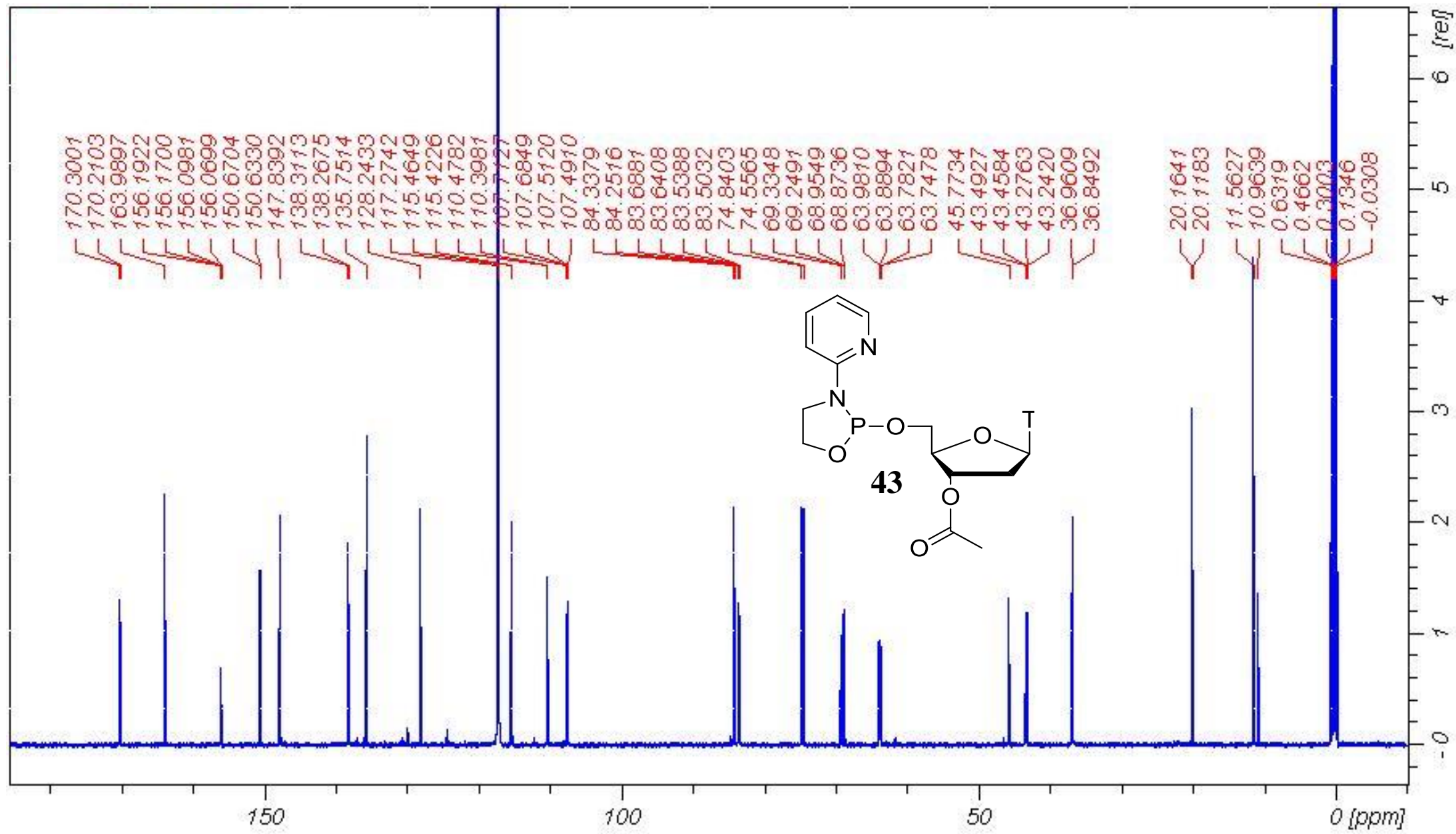
Set Nebulizer 0.4 Bar
 Set Dry Heater 220 °C
 Set Dry Gas 4.0 l/min
 Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-R rule	e ⁻ Conf	mSigma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarN	Std m/z Diff	Std Comb Dev
398.1429	1	C 19 H 26 N 3 Na O P S	398.1426	-0.7	-18.2	8.5	ok	even	140.2	238.6	12.7	92.8	16.9	842.7

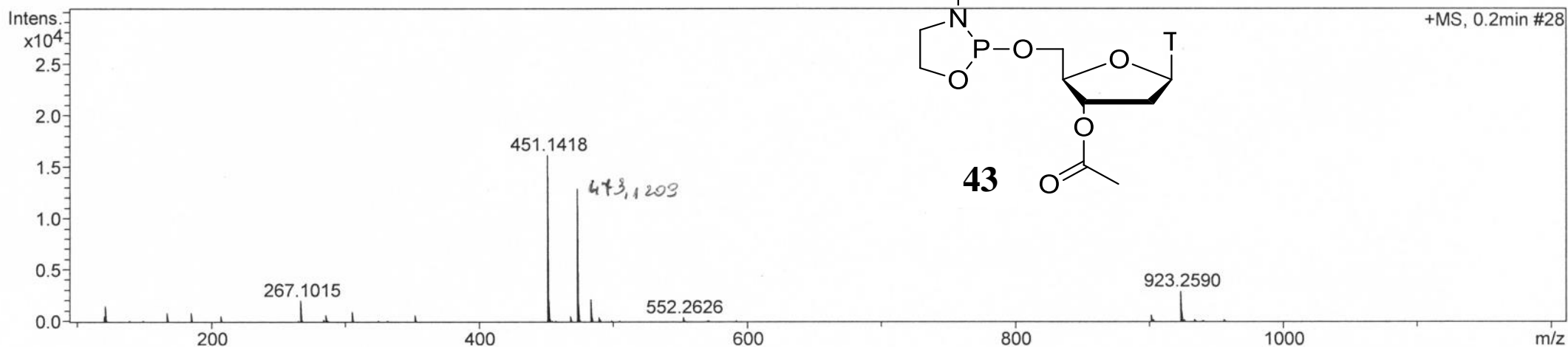




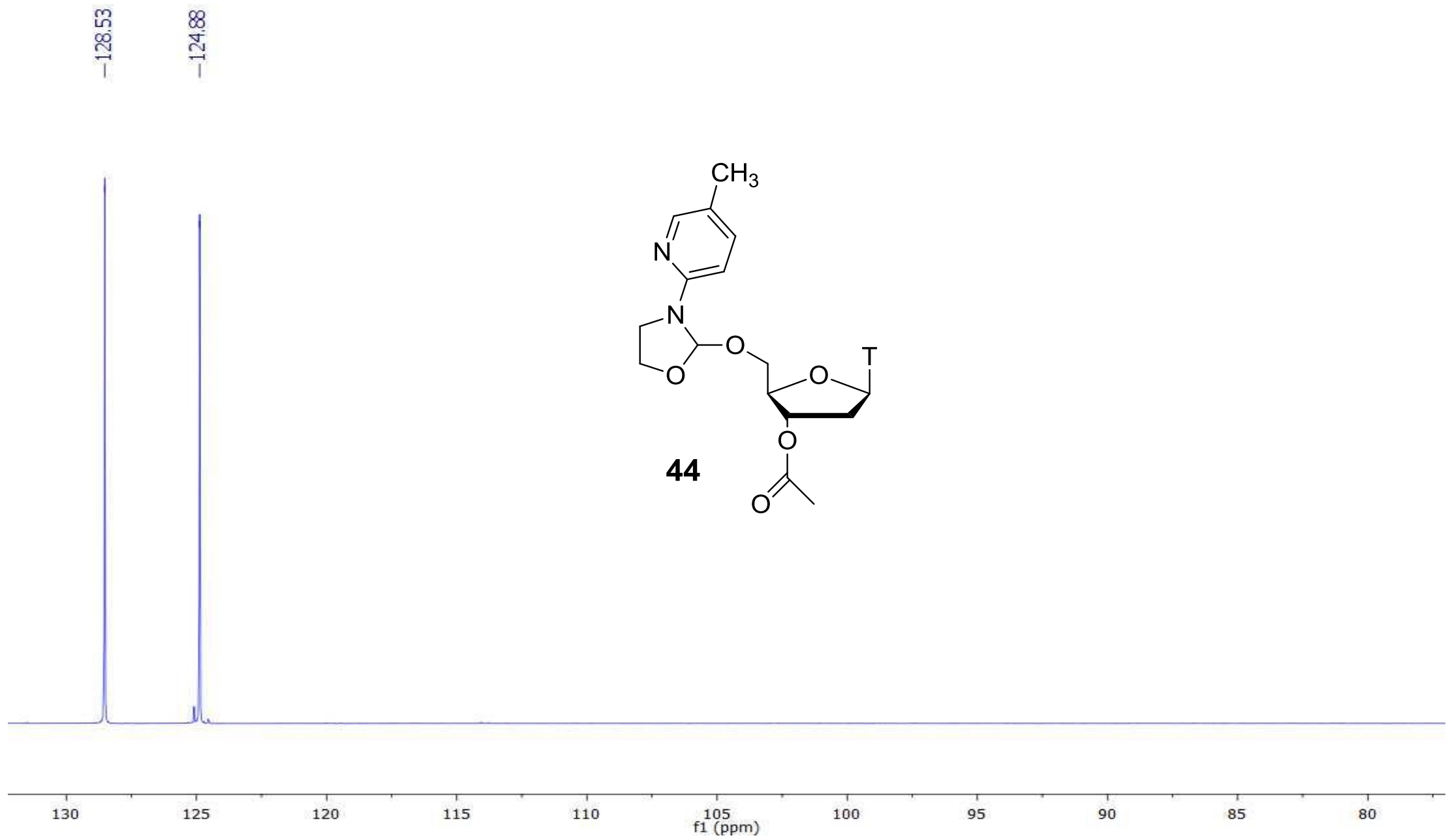


Acquisition Parameter

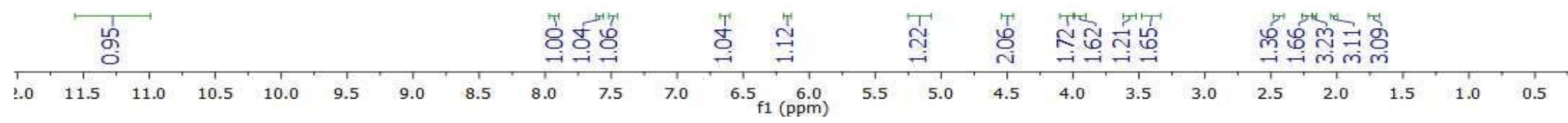
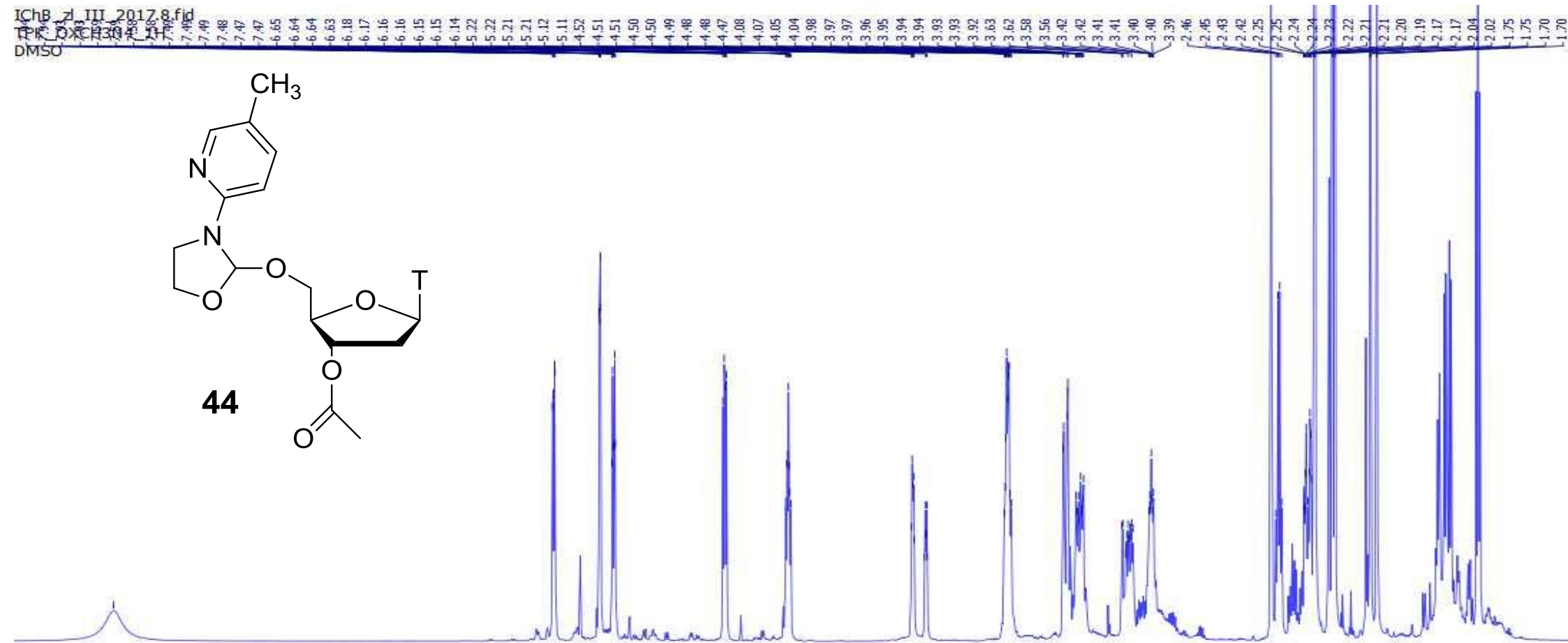
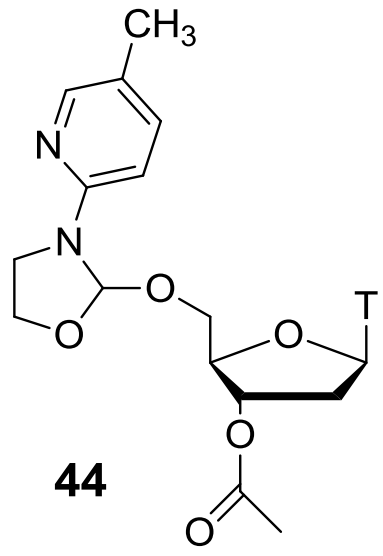
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	 <p>43</p>	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V		Set Dry Heater	80 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V		Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1200 m/z	Set Collision Cell RF	200.0 Vpp		Set Divert Valve	Source

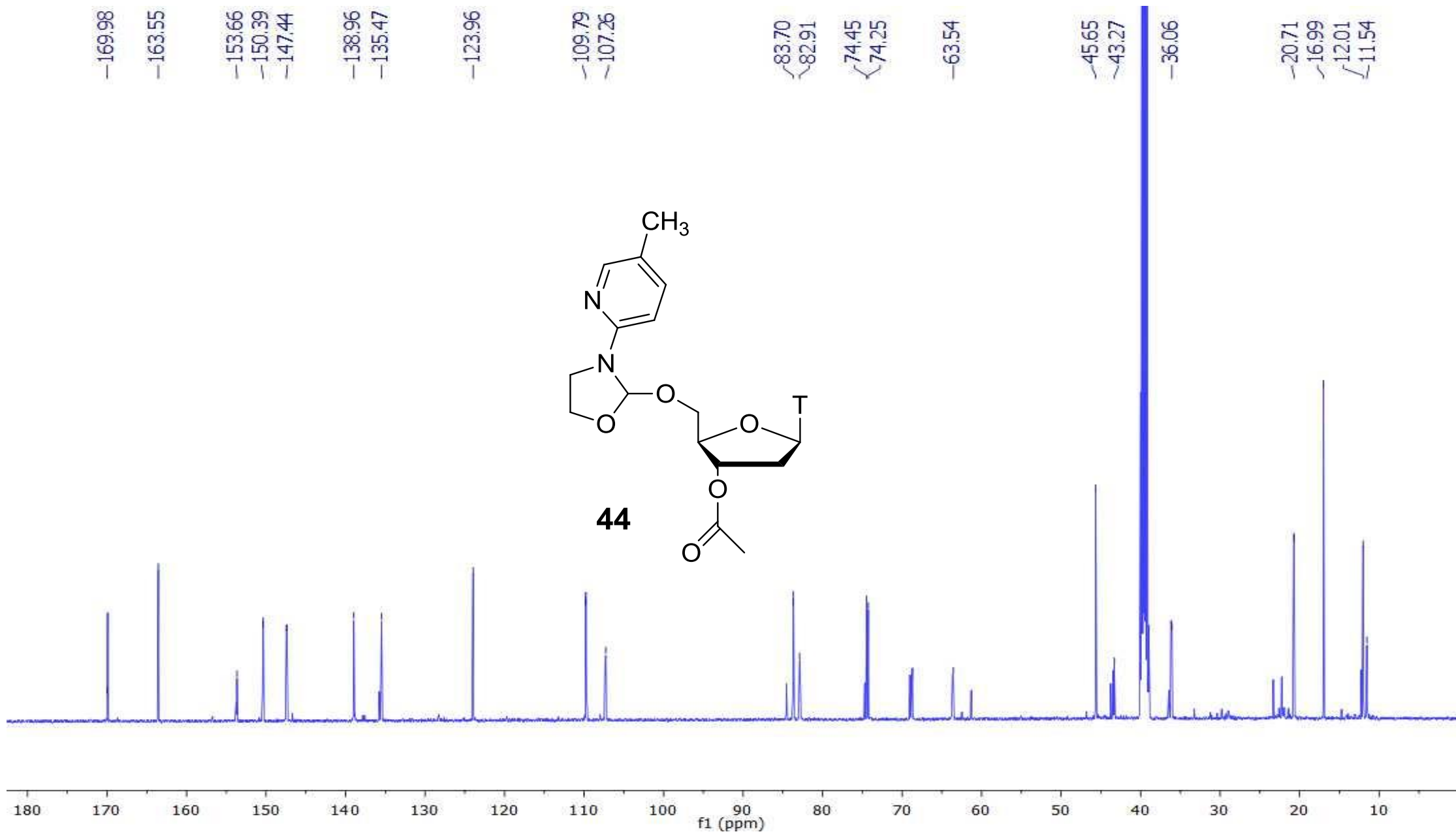


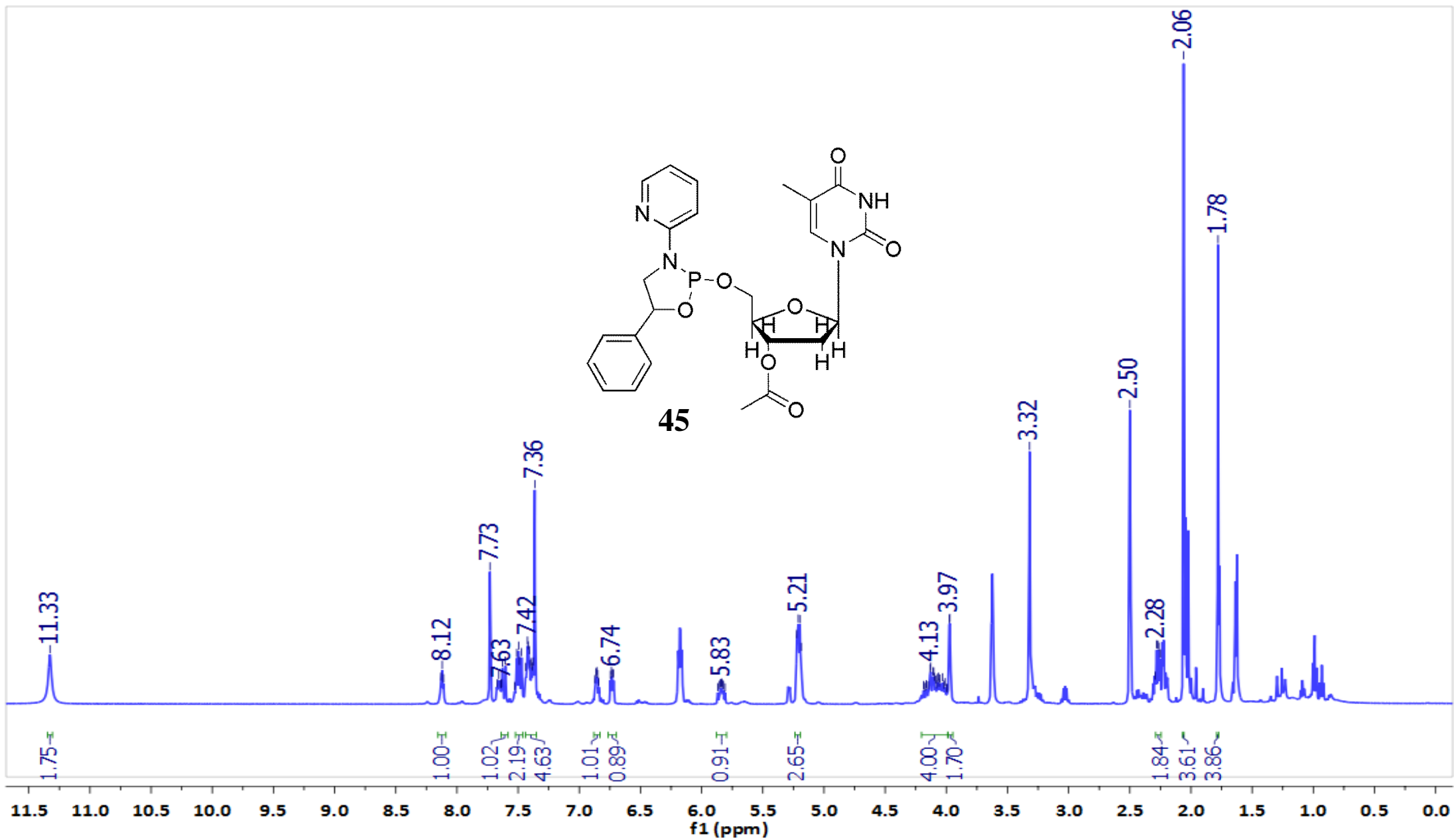
Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSigma a	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
-----------	---	---------	-----	-----------	----------------	-----	--------	---------------------	----------	-------	--------------	---------------	--------------	--------------

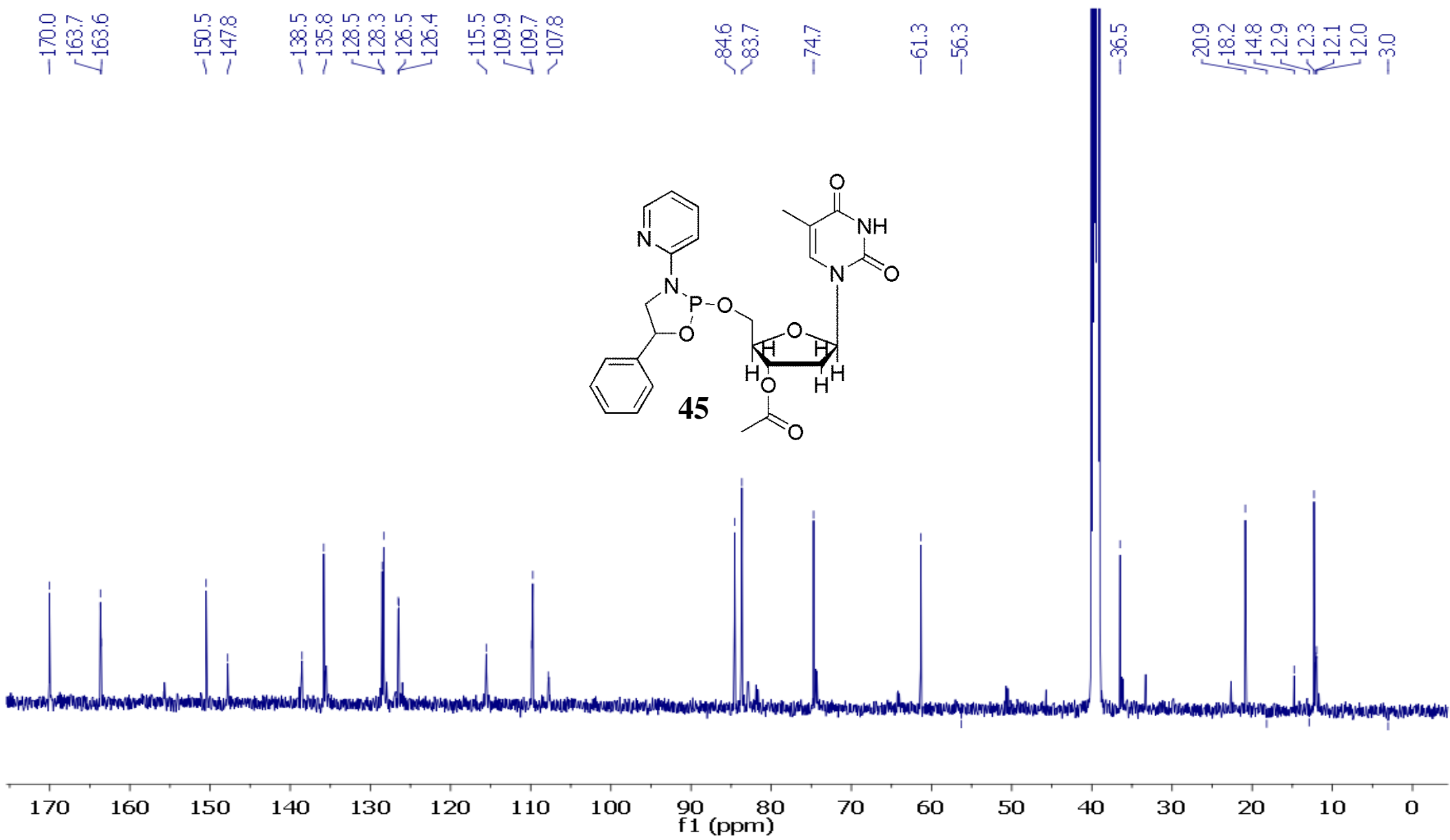


IChB 7_III_2017_8.fid
 PK 0XCH304 211
 DMSO

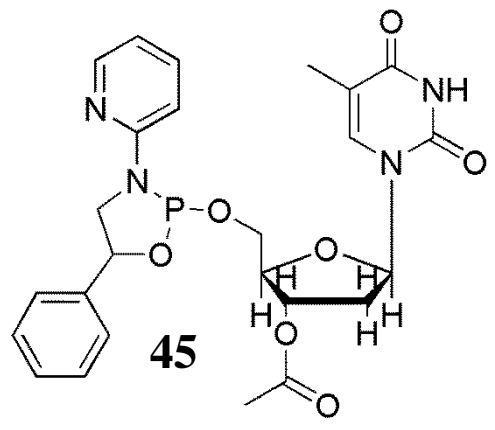






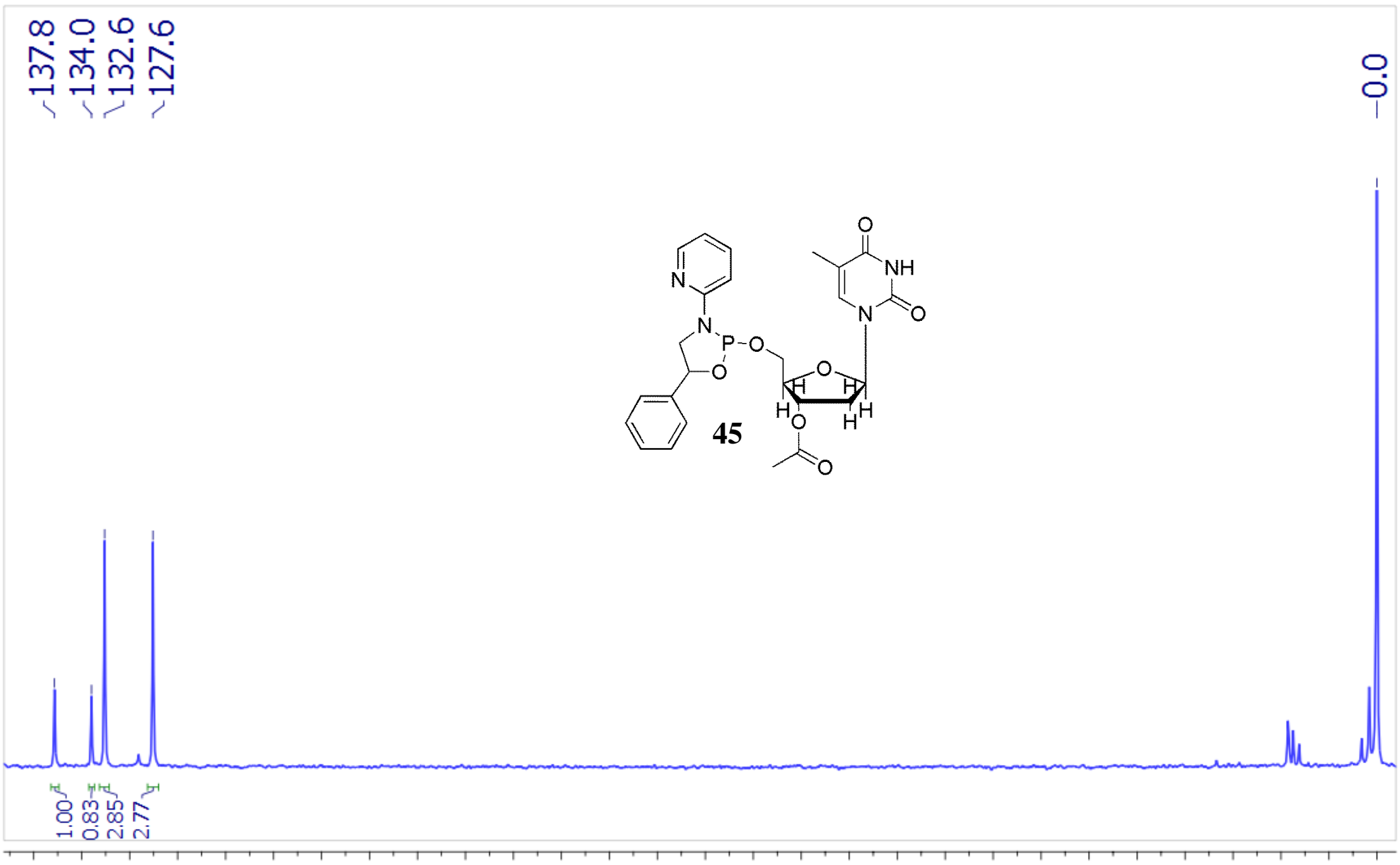


137.8
134.0
132.6
127.6



-0.0

1.00
0.83
2.85
2.77



Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

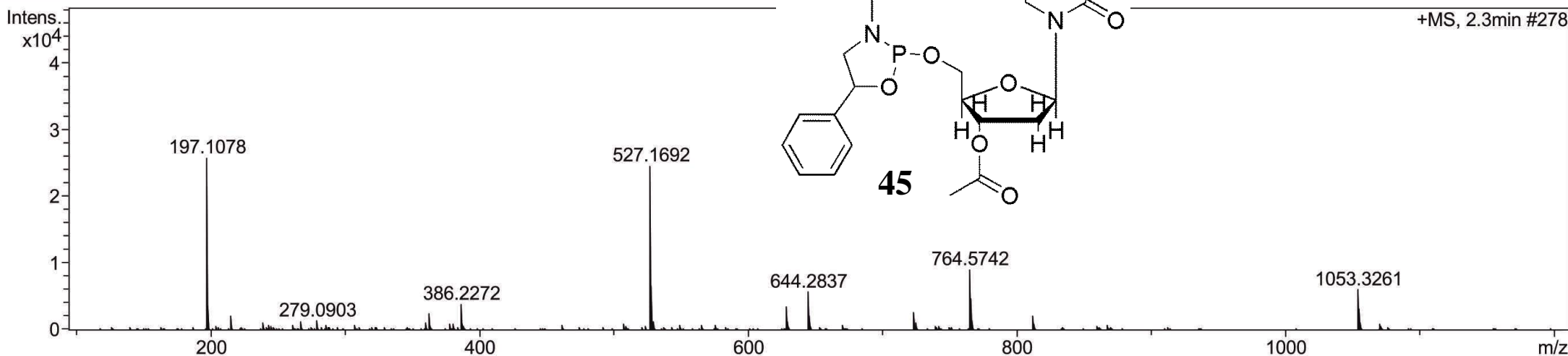
Analysis Name D:\Data\Basia\zlecone\151102_2_pos.d
 Method ewelina.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 11/2/2015 12:30:59 PM
 Operator
 Instrument / Ser# Bruker Customer
 micrOTOF-Q 128

Acquisition Parameter

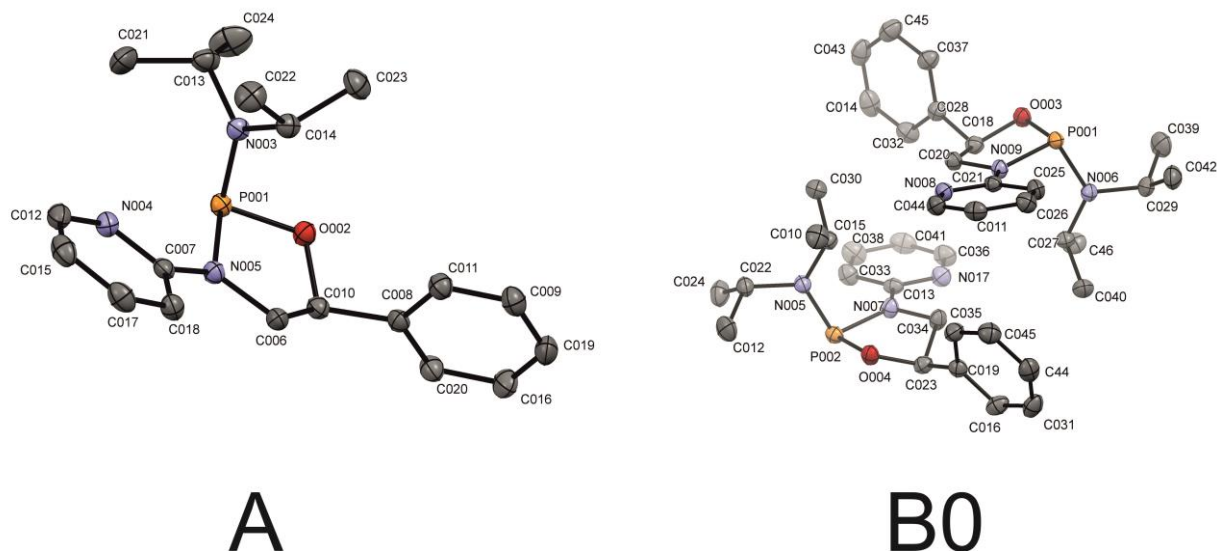
Source Type ESI
 Focus Not active
 Scan Begin 100 m/z
 Scan End 1200 m/z
 Ion Polarity
 Set Capillary
 Set End Plate Offset
 Set Collision Cell RF

bulizer 0.4 Bar
 / Heater 50 °C
 / Gas 4.0 l/min
 / ert Valve Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf	mSig ma	Std I	Std Mean m/z	Std I VarNorm	Std m/z Diff	Std Comb Dev
527.1692	1	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₇ P	527.1690	-0.3	-0.0	14.5	ok	even	7.3	11.3	0.6	3.9	1.8	842.7

11 Dane krystalograficzne



Rys. 4: Widok asymetrycznych jednostek związków **32a** i **32b** (A) oraz **32a** i **32c** (B0). Elipsoidy zostały nakreślone z 50% poziomem prawdopodobieństwa. Atomy wodoru zostały pominięte dla czytelności.

	A	B0
Wzór chemiczny	C ₁₉ H ₂₆ N ₃ OP	C ₁₉ H ₂₆ N ₃ OP
Masa cząsteczkowa	343,40	343,40
T [K]	130	130
λ [Å]	1,54184	1,54184
Układ krystalograficzny	jednoskośny	jednoskośny
Grupa przestrzenna	P2 ₁ /c	P2 ₁
F(000)	736	736
μ [mm⁻¹]	1,399	1,388
Z	4	4
a [Å]	9,659 (2)	9,897 (1)
b [Å]	13,208 (3)	14,187 (1)
c [Å]	14,652 (3)	13,230 (1)
β [°]	100,475 (2)	93,978 (1)
V [Å³]	1838,11	1853,12
ρ_{calc} [g cm⁻³] – gęstość obliczona	1,241	1,231
Zarejestrowane refleksy	7745	30798
refleksty symetrycznie niezależne / R_{int}	3690 / 0,0190	7706 / 0,0171
Liczba udokładnianych parametrów	218	433

Goof	1,102	1,080
R / wR² (I>4σ)	0,0341 / 0,0896	0,0251 / 0,0665
R / wR² (dla wszystkich refleksów)	0,0370 / 0,0909	0,0255 / 0,0666
Maksimum / minimum gęstości elektronowej [e Å⁻³]	0,28 / -0,33	0,18 / -0,26

Tabela 3: Zestawienie danych krystalograficznych.

12 Bibliografia

- 1 LIU, X.; TAKAHASHI, H.; HARADA, Y.; OGAWARA, T.; OGIMURA, Y.; MIZUSHINA, Y.; SANEYOSHI, M.; YAMAGUCHI, T. *NUCL. ACIDS RES.* 2007, 35, 7140–7149.
- 2 TOMIKAWA, A.; SATO-KIYOTAKI, K.; OHTSUKI, C.; HIRAI, T.; YAMAGUCHI, T.; KAWAGUCHI, T.; YOSHIDA, S.; SANEYOSHI, M., *NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES* 1998, 17, 487–501.
- 3 FURMAN, R.R.; HOELZER, D., *SEMIN. ONCOL.* 2007, 34, S29–S34.
- 4 KLOEPFFER, A.E.; ENGELS, J.W., *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS* 2005, 24, 651–654.
- 5 DOMAOAL, R.A.; MCMAHON, M.; THIO, C.L.; BAILEY, C.M.; TIRADO-RIVES, J.; OBIKHOD, A.; DETORIO, M.; RAPP, K.L.; SILICIANO, R.F.; SCHINAZI, R.F.; ANDERSON, K.S., *J. BIOL. CHEM.* 2008, 283, 5452–5459.
- 6 BROOKINGS, D.; DAVENPORT, R.J.; DAVIS, J.; GALVIN, F.C.A.; LLOYD, S.; MACK, S.R.; OWENS, R.; SABIN, V.; WYNN, J., *BIOORG. MED. CHEM. LETT.* 2007, 17, 562–565.
- 7 EL-TAYEB, A.; QI, A.; M^ULLER, C.E., *J. MED. CHEM.* 2006, 49, 7076–7087.
- 8 BRAZDILOVA, P.; VRABEL, M.; POHL, R.; PIVONKOVA, H.; HAVRAN, L.; HOCEK, M.; FOJTA, M., *CHEM. EUR. J.* 2007, 13, 9527–9533.
- 9 BROWNLEE, G. G.; FODOR, E.; PRITLOVE, D. C.; GOULD, K. G.; DALLUGE, J. J., *NUCLEIC ACIDS RES.* 1995, 23, 2641–2647.
- 10 XIONG, A. S.; PENG, R. H.; ZHUANG, J.; GAO, F.; LI, Y.; CHENG, Z. M.; YAO, Q. H., *FEMS MICROBIOL. REV.* 2008, 32, 522–540.
- 11 JOYCE, G. E. *ANGEW. CHEM., INT. ED.* 2007, 46, 6420–6436.
- 12 HORNUNG, V.; ELLEGAST, J.; KIM, S.; BRZOZKA, K.; JUNG, A.; KATO, H.; POECK, H.; AKIRA, S.; CONZELMANN, K. K.; SCHLEE, M.; ENDRES, S.; HARTMANN, G. *SCIENCE* 2006, 314, 994–997.
- 13 ALLAM, R.; PAWAR, R. D.; KULKARNI, O. P.; HORNUNG, V.; HARTMANN, G.; SEGERER, S.; AKIRA, S.; ENDRES, S.; ANDERS, H. J. *EUR. J. IMMUNOL.* 2008, 38, 3487–3498.
- 14 PEYRANE, F.; SELISKO, B.; DECROLY, E.; VASSEUR, J. J.; BENARROCH, D.; CANARD, B.; ALVAREZ, K. *NUCLEIC ACIDS RES.* 2007, 35, E26.

-
- 15 POECK, H.; BESCH, R.; MAIHOEFER, C.; RENN, M.; TORMO, D.; MORSKAYA, S. S.; KIRSCHNEK, S.; GAFFAL, E.; LANDSBERG, J.; HELLMUTH, J.; SCHMIDT, A.; ANZ, D.; BSCHIEDER, M.; SCHWERD, T.; BERKING, C.; BOURQUIN, C.; KALINKE, U.; KREMMER, E.; KATO, H.; AKIRA, S.; MEYERS, R.; HACKER, G.; NEUENHAHN, M.; BUSCH, D.; RULAND, J.; ROTHENFUSSER, S.; PRINZ, M.; HORNUNG, V.; ENDRES, S.; TUTING, T.; HARTMANN, G. *NAT. MED.* 2008, 14, 1256–1263
- 16 KEVIN BURGESS AND DAN COOK, *CHEM. REV.* 2000, 100, 2047-2059
- 17 MILEWSKA, Z.; PANUSZ, H. *ANAL. BIOCHEM.* 1974, 57, 8.
- 18 MICHELSON, A. M.; TODD, A. R. *J. CHEM. SOC.* 1949, 2487.
- 19 MAHONEY, C. W.; YOUNT, R. G. *ANAL. BIOCHEM.* 1984, 138, 246.
- 20 YOSHIKAWA, M.; KATO, T.; TAKENISHI, T. *TETRAHEDRON LETT.* 1967, 50, 5065.
- 21 CRAMER, F.; WINTER, M. *CHEM. BER.* 1961, 94, 989.
- 22 HOLY, A. J. CARBOHYDR., *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES* 1975, 2, 63.
- 23 DAWSON, W. H.; CARGILL, R. L.; DUNLAP, R. B. *J. NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES* 1977, 4, 363.
- 24 IMAI, K.-I.; FUJII, S.; TAKANOHASHI, K.; FURUKAWA, Y.; MASUDA, T.; HONJO, M. *J. ORG. CHEM.* 1969, 34, 1547.
- 25 KUCEROVA, Z.; HOLY, A.; BALD, R. W. *COLLECT. CZECH. CHEM. COMMUN.* 1972, 37, 2052.
- 26 LUDWIG, J. *ACTA BIOCHIM. BIOPHYS. ACAD. SCI. HUNG.* 1981, 16, 131.
- 27 RUTH, J. L.; CHENG, Y.-C. *MOL. PHARMACOL.* 1981, 20, 415.
- 28 FELDMANN, W. *CHEM. BER.* 1967, 100, 3850.
- 29 SCHWARTZ, A. W. *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.* 1969, 1393.
- 30 LUDWIG, J. *BIOACT. MOL.* 1987, 3, 201.
- 31 SEELA, F.; MURTH, H.-P.; ROLING, A. *HELV. CHIM. ACTA* 1991, 74, 554.
- 32 ARABSHAHI, A.; FREY, P. A., *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* 1994, 204(1), 150–155.
- 33 ECKSTEIN, F. *ANNU. REV. BIOCHEM.* 1985, 54, 367–402.
- 34 MISHRA, N. C.; BROOM, A. D. *J. CHEM. SOC., CHEM. COMMUN.* 1991, 18, 1276–1277.

-
- 35 EL-TAYEB, A.; QI, A. D.; MULLER, C. E., *J. MED. CHEM.*, 2006, 49 (24), PP 7076–7087
- 36 GILLERMAN, I.; FISCHER, B., *NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS 2010*, 29 (3), 245–256.
- 37 AKETANI, S.; TANAKA, K.; YAMAMOTO, K.; ISHIHAMA, A.; CAO, H. H.; TENGEIJI, A.; HIRAOKA, S.; SHIRO, M.; SHIONOYA, M., *J. MED. CHEM.* 2002, 45 (25), 5594–5603.
- 38 ALEXANDROVA, L. A.; IVANOV, M. A.; VICTOROVA, L. S.; KUKHANOVA, M. K., *NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS 2007*, 26 (8–9), 1083–1086.
- 39 BALINTOVA, J.; POHL, R.; HORAKOVA, P.; VIDLAKOVA, P.; HAVRAN, L.; FOJTA, M.; HOCEK, M., *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES, AND DNA. CHEM. - EUR. J.* 2011, 17 (50), 14063–14073.
- 40 BALINTOVA, J.; POHL, R.; HORAKOVA, P.; VIDLAKOVA, P.; HAVRAN, L.; FOJTA, M.; HOCEK, M., *EUR. J.* 2011, 17 (50), 14063–14073.
- 41 DADOVA, J.; VIDLAKOVA, P.; POHL, R.; HAVRAN, L.; FOJTA, M.; HOCEK, M., *J. ORG. CHEM.* 2013, 78 (19), 9627–9637.
- 42 HOCEK, M., *J. ORG. CHEM.* 2014, 79 (21), 9914–9921.
- 43 IVANOV, A. A.; KO, H.; COSYN, L.; MADDILETI, S.; BESADA, P.; FRICKS, I.; COSTANZI, S.; HARDEN, T. K.; VAN CALENBERGH, S.; JACOBSON, K. A., *J. MED. CHEM.* 2007, 50 (6), 1166–1176.
- 44 KALACHOVA, L.; POHL, R.; BEDNAROVA, L.; FANFRLIK, J.; HOCEK, M., *ORG. BIOMOL. CHEM.* 2013, 11 (1), 78–89.
- 45 KNOBLAUCH, B. H. A.; MULLER, C. E.; JARLEBARK, L.; LAWOKO, G.; KOTTKE, T.; WIKSTROM, M. A.; HEILBRONN, E., *J. MED. CHEM.* 1999, 34 (10), 809–824.
- 46 MARUOKA, H.; JAYASEKARA, M. P. S.; BARRETT, M. O.; FRANKLIN, D. A.; DE CASTRO, S.; KIM, N.; COSTANZI, S.; HARDEN, T. K.; JACOBSON, K. A., *J. MED. CHEM.* 2011, 54 (12), 4018–4033.
- 47 RIEDL, J.; HORAKOVA, P.; SEBEST, P.; POHL, R.; HAVRAN, L.; FOJTA, M.; HOCEK, M., *EUR. J. ORG. CHEM.* 2009, 2009 (21), 3519–3525.
- 48 VASILYEVA, S. V.; BUDILKIN, B. I.; KONEVETZ, D. A.; SILNIKOV, V. N., *NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS 2011*, 30 (10), 753–767.

-
- 49 SHI, J.; ZHOU, L.; ZHANG, H.; MCBRAYER, T. R.; DETORIO, M. A.; JOHNS, M.; BASSIT, L.; POWDRILL, M. H.; WHITAKER, T.; COATS, S. J.; ET AL. *MED. CHEM. LETT.* 2011, 21 (23), 7094–7098.
- 50 WENGE, U.; EHRENSCHWENDER, T.; WAGENKNECHT, H.-A., *BIOCONJUGATE CHEM.* 2013, 24 (3), 301–304.
- 51 BHUSHAN, R. G.; VINCE, R., *BIOORG. MED. CHEM.* 2002, 10 (7), 2325–2333.
- 52 SAUER, R.; EL-TAYEB, A.; KAULICH, M.; MUELLER, C. E., *BIOORG. MED. CHEM.* 2009, 17 (14), 5071–5079.
- 53 KOVACS, T.; OTVOS, L., *TETRAHEDRON LETT.* 1988, 29 (36), 4525–4528.
- 54 KORE, A. R.; SHANMUGASUNDARAM, M.; SENTHILVELAN, A.; SRINIVASAN, B., *NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS* 2012, 31 (5), 423–431.
- 55 KORE, A. R.; SHANMUGASUNDARAM, M.; SENTHILVELAN, A.; SRINIVASAN, B., *CURRENT PROTOCOLS IN NUCLEIC ACID CHEMISTRY; JOHN WILEY & SONS: NEW YORK, 2012; VOL. 49, UNIT 13.10.*
- 56 KORE, A. R.; SENTHILVELAN, A.; SRINIVASAN, B.; SHANMUGASUNDARAM, M., *CAN. J. CHEM.* 2013, 91 (8), 718–720.
- 57 KORE, A. R.; SRINIVASAN, B., *TETRAHEDRON LETT.* 2012, 53 (31), 4012–4014.
- 58 KORE, A. R.; YANG, B.; SRINIVASAN, B., *TETRAHEDRON LETT.* 2013, 54 (39), 5325–5327.
- 59 KORE, A. R.; YANG, B.; SRINIVASAN, B., *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS* 2014, 33 (12), 767–773.
- 60 SHANMUGASUNDARAM, M.; SENTHILVELAN, A.; XIAO, Z.; KORE, A. R., *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS* 2016, 1.
- 61 MOFFATT, J. G., *CAN. J. CHEM.* 1964, 42 (3), 599–604.
- 62 MOFFATT, J. G.; KHORANA, H. G., *J. AM. CHEM. SOC.* 1961, 83 (3), 649–658.
- 63 VANBOOM, J. H.; CREA, R.; LUYTEN, W. C.; VINK, A. B., *TETRAHEDRON LETT.* 1975, 16 (32), 2779–2782.
- 64 HOARD, D. E.; OTT, D. G., *J. AM. CHEM. SOC.* 1965, 87 (8), 1785–1788.

-
- 65 VASILYEVA, S. V.; BUDILKIN, B. I.; KONEVETZ, D. A.; SILNIKOV, V. N., *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS* 2011, 30 (10), 753–767.
- 66 BOGACHEV, V. S., *BIOORG. KHIM.* 1996, 22 (9), 699–705 (IN RUSSIAN).
- 67 WU, W. D.; FREEL MEYERS, C. L.; BORCH, R. F., *ORG. LETT.* 2004, 6 (13), 2257–2260.
- 68 SUN, Q.; EDATHIL, J. P.; WU, R.; SMIDANSKY, E. D.; CAMERON, C. E.; PETERSON, B. R., *ORG. LETT.* 2008, 10 (9), 1703–1706.
- 69 SUN, Q.; LIU, S.; SUN, J.; GONG, S.-S., *CHIN. CHEM. LETT.* 2014, 25 (3), 427–430.
- 70 SUN, Q.; GONG, S. S.; SUN, J.; LIU, S.; XIAO, Q.; PU, S. Z., *J. ORG. CHEM.* 2013, 78 (17), 8417–8426.
- 71 SUN, Q.; SUN, J.; GONG, S.-S.; WANG, C.-J.; PU, S.-Z.; FENG, F.-D., *RSC ADV.* 2014, 4 (68), 36036–36039.
- 72 LUDWIG, J.; ECKSTEIN, F., *J. ORG. CHEM.* 1989, 54 (3), 631–635.
- 73 VAUGHT, J. D.; BOCK, C.; CARTER, J.; FITZWATER, T.; OTIS, M.; SCHNEIDER, D.; ROLANDO, J.; WAUGH, S.; WILCOX, S. K.; EATON, B. E., *J. AM. CHEM. SOC.* 2010, 132 (12), 4141–4151.
- 74 HOLLENSTEIN, M., *CHEM. - EUR. J.* 2012, 18 (42), 13320–13330.
- 75 HOLLENSTEIN, M.; WOJCIECHOWSKI, F.; LEUMANN, C. J., *BIOORG. MED. CHEM. LETT.* 2012, 22 (13), 4428–4430.
- 76 TOTI, K. S.; DERUDAS, M.; PERTUSATI, F.; SINNAEVE, D.; VAN DEN BROECK, F.; MARGAMULJANA, L.; MARTINS, J. C.; HERDEWIJN, P.; BALZARINI, J.; MCGUIGAN, C.; ET AL., *J. ORG. CHEM.* 2014, 79 (11), 5097–5112.
- 77 LI, P.; DOBRIKOV, M.; LIU, H. Y.; SHAW, B. R., *ORG. LETT.* 2003, 5 (14), 2401–2403.
- 78 WARNECKE, S.; MEIER, C., *J. ORG. CHEM.* 2009, 74 (8), 3024–3030.
- 79 WOLF, S.; ZISMANN, T.; LUNAU, N.; WARNECKE, S.; WENDICKE, S.; MEIER, C. A., *EUR. J. CELL BIOL.* 2010, 89 (1), 63–75.
- 80 MAHLER, M.; REICHARDT, B.; HARTJEN, P.; VAN LUNZEN, J.; MEIER, C., *CHEM. - EUR. J.* 2012, 18 (35), 11046–11062.
- 81 MOHAMADY, S.; DESOKY, A.; TAYLOR, S. D., *ORG. LETT.* 2012, 14 (1), 402–405.

-
- 82 GAUR, R. K.; SPROAT, B. S.; KRUPP, G., *TETRAHEDRON LETT.* 1992, 33 (23), 3301–3304.
- 83 SCHOETZAU, T.; HOLLETZ, T.; CECH, D., *CHEM. COMMUN.* 1996, No. 3, 387–388.
- 84 TONN, V. C.; MEIER, C., *CHEM. - EUR. J.* 2011, 17 (35), 9832–9842.
- 85 AHMADIBENI, Y.; PARANG, K., *ORG. LETT.* 2005, 7 (25), 5589–5592.
- 86 AHMADIBENI, Y.; PARANG, K., *CURRENT PROTOCOLS IN NUCLEIC ACID CHEMISTRY; JOHN WILEY & SONS: NEW YORK, 2008; VOL. 33, UNIT 13.8.*
- 87 AHMADIBENI, Y.; PARANG, K., *ORG. LETT.* 2005, 7 (25), 5589–5592.
- 88 BRADLEY, M.; BRUCKLER, C., *INTERNATIONAL PATENT WO2007110624A2, 2007.*
- 89 BAUGHN, R. L.; ADALSTEINSSON, O.; WHITESIDES, G. M. *J. AM. CHEM. SOC.* 1978, 100, 304.
- 90 KAMIYA, H.; KASIA, H. *NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES* 1999, 18, 307.
- 91 SYMONS, R. H., *METHODS ENZYMOL.* 1974, 29, 102.
- 92 WU, W. D.; BERGSTROM, D. E.; DAVISSON, V. J., *J. ORG. CHEM.* 2003, 68 (10), 3860–3865.
- 93 WU, W.; BERGSTROM, D. E.; DAVISSON, V. J., *CURRENT PROTOCOLS IN NUCLEIC ACID CHEMISTRY; JOHN WILEY & SONS: NEW YORK, 2004; VOL. 16, UNIT 13.2.*
- 94 HENNIG, M.; SCOTT, L. G.; SPERLING, E.; BERMEL, W.; WILLIAMSON, J. R., *J. AM. CHEM. SOC.* 2007, 129(48), 14911-21
- 95 STRONA INTERNETOWA: <http://www.trilinkbiotech.com/tech/31p.asp>
- 96 TRI LINK BIOTECHNOLOGIES, INC. DATA.
- 97 M.M. CRUTCHFIELD, ET. AL, *TOPICS IN PHOSPHORUS CHEMISTRY. NEW YORK, INTESCIENCE PUBLISHERS, 1967.*
- 98 A.V. LEBEDEV, A.I. REZVUKHIN, *NUCL. ACIDS RES.*, 1984, V.12, N14 5547-5566.
- 99 HIGUCHI H., ENDO T., KAJI A., 1990, *BIOCHEMISTRY*, 29, 8747-8753.
- 100 VICTOROVA L.S., DYATKINA N.B., MOZZHERIN D.F., ATKAZHEV A.M., CRAYEVSKY A.A., KUKHANOVA M.K., *NUCL. ACIDS RES.*, 1992, V.20, N4, 783-789.
- 101 J. LUDWIG, F. ECKSTEIN, *J. ORG. CHEM.*, 1989, V.54, N3, 631-635.
- 102 JANA, A.; ATTA, S.; SARKAR, S. K.; SINGH, N. D .P. *TETRAHEDRON* 2010, 66, 9798–9807.

-
- 103 LEIKAUF, E.; KOSTER, H. *TETRAHEDRON* 1995, 51, 5557–5562.
- 104 SEHALLER, H.; WEIMANN, G.; LERCH, B.; KHORANA, H. G. *J. AM. CHEM. SOC.* 1963, 85, 3821–3827.
- 105 ISIDRO-LLOBET, A.; ALVAREZ, M.; ALBERICIO, F. *CHEM. REV.* 2009, 109, 2455–2504.
- 106 TLAIS, S. F.; LAM, H.; HOUSE, S. E.; DUDLEY, G. B. *J. ORG. CHEM.* 2009, 74, 1876–85.
- 107 REESE, C. B.; THOMPSON, A. *J. CHEM. SOC., PERKIN TRANS. 1* 1988, 2881–2885.
- 108 MAIRANOVSKY, V. G. *ANGEW. CHEM., INT. ED. ENGL.* 1976, 15, 281.
- 109 YUS, M.; MARTÍNEZ, P.; GUIJARRO, D. *TETRAHEDRON* 2001, 57, 10119.
- 110 GIVENS, R. S.; CONRAD, P. G. II; YOUSEF, A. L.; LEE, J.-I., *CRC HANDBOOK OF ORGANIC PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, 2ND ED.*
- 111 SINHA, N. D.; BIERNAT, J.; MCMANUS, J.; KOSTER, H. *NUCLEIC ACIDS RES.* 1984, 12, 4539–4557.
- 112 WILK, A.; GRAJKOWSKI, A.; PHILLIPS, L. R.; BEAUCAGE, S. L. *J. ORG. CHEM.* 1999, 64, 7515–7522.
- 113 PIRRUNG, M. C.; BRADLEY, J.-C. *J. ORG. CHEM.* 1995, 60, 6270 - 6276.
- 114 MCGALL, G. H.; BARONE, A. D.; DIGGELMAN, M.; FODOR, S. P. A.; GENTALEN, E.; NGO, N. *J. AM. CHEM. SOC.* 1997, 119, 5081-5090.
- 115 GIEGRICH, H.; EISELE-BÜHLER, S.; HERMANN, C.; KVASYUK, E.; CHARUBALA, R.; PFLEIDERER, W. *NUCLEOSIDES NUCLEOTIDES* 1998, 17, 1987- 1996.
- 116 CHMIELEWSKI M.K. *TETRAHEDRON LETTERS* 2012, 53, 666-669.
- 117 RATAJCZAK, T.; CHMIELEWSKI M.K., *J. ORG. CHEM.* 2012, 77, 7866–7872.
- 118 BRZEZINSKA, J.; WITKOWSKA, A.; BALABAŃSKA, S, AND CHMIELEWSKI, M. K., *ORGANIC LETTERS* 2016, 18 (13), PP 3230–3233.
- 119 N. WEINER AND I. A. KAYE, *J. ORG. CHEM.*, 1949, 14, 868–872.
- 120 CHMIELEWSKI, M.K.; TYKARSKA, E.; MARKIEWICZ, W.T.; RYPNIEWSKI W.R., *NEW J. CHEM* 2012, 36, 603 – 612.
- 121 GRAJKOWSKI, A.; WILK, A.; CHMIELEWSKI, M.K; PHILLIPS, L. R.; BEAUCAGE, S. L., *ORG. LETT.*, 2001, 3 (9), PP 1287–1290

122 WILK, A.; CHMIELEWSKI, M. K.; GRAJKOWSKI, A.; PHILLIPS, L. R.; BEAUCAGE, S. L. *J. ORG. CHEM.* 2002, 67, 6430–6438.

123 CHMIELEWSKI, M. K., *ORG. LETT.* 2009, 11, 3742–3745.

124 KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. *ANGEW. CHEM., INT. ED.* 2001, 40, 2004–2021.

125 CHMIELEWSKI, M. K.; MARCHAN, V.; CIEŚLAK, J.; GRAJKOWSKI, A.; LIVENGOOD, V.; MUNCH, U.; WILK, A.; BEAUCAGE, S. L. *J. ORG. CHEM.* 2003, 68, 10003–10012.

126 OHKUBO, A.; KASUYA, R.; MIYATA, K.; TSUNODA, H.; SEIO, K.; SEKINE, M. *ORG. BIOMOL. CHEM.* 2009, 7, 687–694.

127 NATSUHISA OKA , YUKIHIRO MAIZURU, MAMORU SHIMIZU & TAKESHI WADA, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS*, 2010, 29:2, 144-154

128 R. P. IYER, D. YU, N.-H. HO, W. TAN AND S. AGRAWAL, *TETRAHEDRON: ASYMMETRY*, 1995, 6, 1051–1054.; R. P. IYER, M.-J. GUO, D. YU AND S. AGRAWAL, *TETRAHEDRON LETT.*, 1998, 39, 2491–2494.; M. GUO, D. YU, R. P. IYER AND S. AGRAWAL, *BIOORG. MED. CHEM. LETT.*, 1998, 8, 2539–2544. ; D. YU, E. R. KANDIMALLA, A. ROSKEY, Q. ZHAO, L. CHEN, J. CHEN AND S. AGRAWAL, *BIOORG. MED. CHEM.*, 2000, 8, 275–284.

129 M. HYODO, H. ANDO, H. NISHITANI, A. HATTORI, H. HAYAKAWA, M. KATAOKA AND Y. HAYAKAWA, *EUR. J. ORG. CHEM.*, 2005, 5216–5223.

130 Y. HAYAKAWA, R. KAWAI, A. HIRATA, J. SUGIMOTO, M. KATAOKA, A. SAKURAYA, M. HIROSE AND R. NOYORI, *J. AM. CHEM. SOC.*, 2001, 23, 8165–8176.

131 Y. HAYAKAWA, M. KATAOKA AND R. NOYORI, *J. ORG. CHEM.*, 1996, 61, 7996–7997.

132 E. MARSAULT AND G. JUST, *TETRAHEDRON*, 1997, 53, 16945–16958. ; Y. JIN AND G. JUST, *J. ORG. CHEM.*, 1998, 63, 3647–3654.

133 N. OKA, T. WADA AND K. SAIGO, *J. AM. CHEM. SOC.*, 2002, 124, 4962–4963. ; N. OKA, T. WADA AND K. SAIGO, *J. AM. CHEM. SOC.*, 2003, 125, 8307–8317. ; T. WADA, Y. MAIZURU, M. SHIMIZU, N. OKA AND K. SAIGO, *BIOORG. MED. CHEM. LETT.*, 2006, 16, 3111–3114. ; N. OKA, M. YAMAMOTO, T. SATO AND T. WADA, *J. AM. CHEM. SOC.*, 2008, 130, 16031–16037. ; N. OKA, T. KONDO, S. FUJIWARA, Y. MAIZURU AND T. WADA, *ORG. LETT.*, 2009, 11, 967–970.; N. IWAMOTO, N. OKA, T. SATO AND T. WADA, *ANGEW. CHEM., INT. ED.*, 2009, 48, 496–499.

134 Q. SONG, Z. WANG AND Y. S. SANGHVI, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES NUCLEIC ACIDS*, 2003, 22, 629–633.

135 NATSUHISA OKAA AND TAKESHI WADA, *CHEM SOC REV. 2011 DEC*;40(12):5829-43.

136 MICROWAVE ASSISTED ORGANIC SYNTHESIS, POD REDAKCJĄ: JASON TIERNEY, PELLE, LIDSTRÖM, BLACKWELL PUBLISHING LTD 2005, ISBN 1-4051-1560-2

137 IKADA, EIJI; HIDA, YOSHINORI; OKAMOTO, HIROYOSHI; HAGINO, JINKO; KOIZUMI, NAOKAZU, *BULLETIN OF THE INSTITUTE FOR CHEMICAL RESEARCH, KYOTO UNIVERSITY (1969)*, 46(5): 239-247

138 KIRK-OTHMER, *ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY (4TH EDITION)*, s: 1-33

139 HEIDI J. KORHONEN, HANNAH L. BOLT, LEYRE VICENTE-GINES,

DANIEL C. PERKS, DAVID R. W. HODGSON, PHOSPHORUS, SULFUR, AND SILICON, 190:758–762, 2015

140 CATON-WILLIAMS, J.; SMITH, M.; CARRASCO, N.; HUANG, Z., *ORG. LETTERS 2011*, 13 (16), 4156–4159.

141 JOHN EMSLEY, DENIS HALL, „THE CHEMISTRY OF PHOSPHOROUS”, HARPER & ROW, PUBLISHERS, 1975

142 AGILENT TECHNOLOGIES (2010). *CRYSTALIS PRO, VERSION 171.35.4, AGILENT TECHNOLOGIES*.

143 A. ALTOMARE, G. CASCARANO, C. GIACOVAZZO, A. GUALARDI, *J. APPL. CRYST.* 1993 26, 343

144 G. M. SHELDRIK, *ACTA CRYST.* 2008 A64, 112.