



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Fosfodiestereiden metalli-ionikatalyyttinen pilkkoutuminen:
nukleofiilin ja lähtevän ryhmän vaikutus reaktiivisuuteen

Emilia Poijärvi

Pro gradu -tutkielma

Lääkekehityksen kemia

Kemian laitos

Turun yliopisto

Kesäkuu 2023

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

Pääaine: Bio-orgaaninen kemia, Lääkekehityksen kemia

Tekijä: Emilia Poijärvi

Otsikko: Fosfodiesterien metalli-ionikatalyyttinen pilkkoutuminen: nukleofiilin ja lähtevän ryhmän vaikutus pilkkoutumiseen

Ohjaajat: Satu Mikkola ja Heidi Korhonen

Sivumäärä: 40 sivua + liitteet 6 sivua

Päivämäärä: Kesäkuu 2023

Fosfodiesterisidoksella on elintärkeä rooli kemiallisessa biologiassa, koska se liittyy nukleosidiryhmien nukleinihappoihin. DNA ja RNA ovat fosfodiesterisiä, joiden erona on, että RNA:n sokerirenkaassa on 2'-OH-ryhmä, joka voi toimia intramolekulaarisena nukleofiilina. Hydroksyyli-ryhmä tekee RNA:n fosfodiesterisidoksesta kemiallisesti ja entsyymillisesti vähemmän pysyvän verrattuna DNA:han. Fosfodiesterisidoksen pilkkoutuminen on biologinen perusreaktio, jota katalysoivat proteiini- ja RNA-entsyymit. Reaktion puoliintumisaika neutraaleissa olosuhteissa ja huoneenlämpötilassa on arviolta 100 vuotta. On kuitenkin jo kauan tiedetty, että tätä perusreaktiota voidaan katalysoida metalli-ioneiden avulla. Metallionit voivat tehostaa nukleofiilista hyökkäystä sekä lähtevän ryhmän poistumista.

Viimeisten vuosikymmenten aikana fosfodiesterisidoksen metalli-ionivälitteinen pilkkoutuminen on herättänyt suurta kiinnostusta ja tutkimuksien päätavoitteina on ollut ymmärtää metalli-ionien rooli katalyysissä, sekä tarve kehittää riittävän tehokas katalyytti RNA:n pilkkoutumiselle. Synteettisten metallonukleaasien tutkimuksen eteen onkin tehty paljon, jotta saataisiin työväline RNA:n pilkkoutumiselle niin laboratorio- kuin terapeuttisessa käytössä. Tehokkaimmiksi metalli-ionikatalyyteiksi ovat osoittautuneet Cu^{2+} - ja Zn^{2+} -kompleksit.

Tämän projektin tarkoituksena oli tutkia biologisten fosfaattien pysyvyyttä erilaisten RNA:n kaltaisten malliyhdisteiden avulla. Yhdisteissä esiintyy joko intra- tai intermolekulaarinen nukleofiili, sekä lähtevät ryhmät vaihtelevat. Projektissa käytettiin Cu^{2+} ja Zn^{2+} -pohjaisia metalli-ionikatalyyttejä. Metallionikompleksien katalysoimaa pilkkoutumisreaktioita seurattiin HPLC-laitteiston avulla yleensä vähintään yhden puoliintumisaajan verran. Pilkkoutumisreaktioille laskettiin nopeusvakiot, jotta saatiin tietoa tutkituista yhdisteistä ja niiden katalyyttisestä reaktiivisuudesta eri olosuhteissa. Nopeusvakioita vertailtiin katalysoimattoman reaktion kanssa ja todettiin, että käytetyt metalli-ionikatalyytit pilkkovat tehokkaasti käytettyjä RNA-malliyhdisteitä.

Avainsanat: fosfodiesterisidos, pilkkoutuminen, RNA, metalli-ionikatalyytti

Sisällysluettelo

| | |
|--|----|
| 1. Johdanto | 1 |
| 1.1. Spesifinen emäksen katalysoima ja spontaani pilkkoutuminen | 3 |
| 1.2. Malliyhdisteet | 5 |
| 1.3. Metallionivälitteinen fosfodiesterisidoksen pilkkoutuminen..... | 6 |
| 1.4. Metallionikatalyytit | 9 |
| 1.4.1. Funktionaalisten ryhmien vaikutus katalyyttiseen aktiivisuuteen..... | 9 |
| 1.4.2. Metallionikatalyytit erilaisten malliyhdisteiden pilkkoutumisessa | 11 |
| 1.5. Lähtevän ryhmän vaikutus | 15 |
| 1.6. Projektin tarkoitus | 18 |
| 2. Kokeellinen osa..... | 19 |
| 2.1. Yleiset kokeelliset menetelmät..... | 19 |
| 2.2. Reaktioliuokset | 23 |
| 2.3. HPHP:n synteesi..... | 23 |
| 2.3.1. Hydrolyysireaktio..... | 23 |
| 2.3.2. Reaktio epoksipropaanin kanssa | 24 |
| 2.4. CPHP:n synteesi | 25 |
| 2.4.1. Hydrolyysireaktio..... | 25 |
| 2.4.2. Reaktio epoksipropaanin kanssa | 26 |
| 2.5. Sinkkiligandin synteesi..... | 27 |
| 3. Tulokset ja niiden tarkastelu | 29 |
| 4. Johtopäätökset..... | 37 |
| Viitteet | 38 |
| Liitteet | 41 |

Lyhenteet

| | |
|---------|---|
| AcOH | Etikkahappo |
| ApA | Adenylyyli-3',5'-adeniini |
| ATP | Adenosiinitrifosfaatti |
| BDNPP | Bis-2,4-dinitrofenyylifosfaatti |
| BiPy | 2,2-Bipyridiini |
| BNPP | Bis-4-nitrofenyylifosfaatti |
| DCM | Dikloorimetaani |
| DNA | Deoksiribonukleiinihappo |
| DPP | Difenylylifosfaatti |
| EDTA | Etyleenidiamiinitetraetikkahappo |
| HPCP | 2-Kloorifenyyli (2-hydroksyylipropyyli)fosfaatti |
| HPHP | 2-Hydroksipropyyli fenyylifosfaatti |
| HPNP | 2-Hydroksipropyyli-4-nitrofenyylifosfaatti |
| MeCN | Asetontriili |
| MOPSO | 3-Morfoliini-2-hydroksipropaani sulfonihappo |
| MS | Massaspektroskopia |
| NaOH | Natriumhydroksidi |
| NMR | Ydinmagneettinen resonanssi |
| RNA | Ribonukleiinihappo |
| RP-HPLC | Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinessetekromatografia |
| TerPy | 2,6-Bis(2-pyridyyli)pyridiini |
| TLC | Ohutkerroskromatografia |
| UMP | Uridiini monofosfaatti |

UpU

Uridylyyli-3',5'-uridiini

UV

Ultraviolettisäteily

1. Johdanto

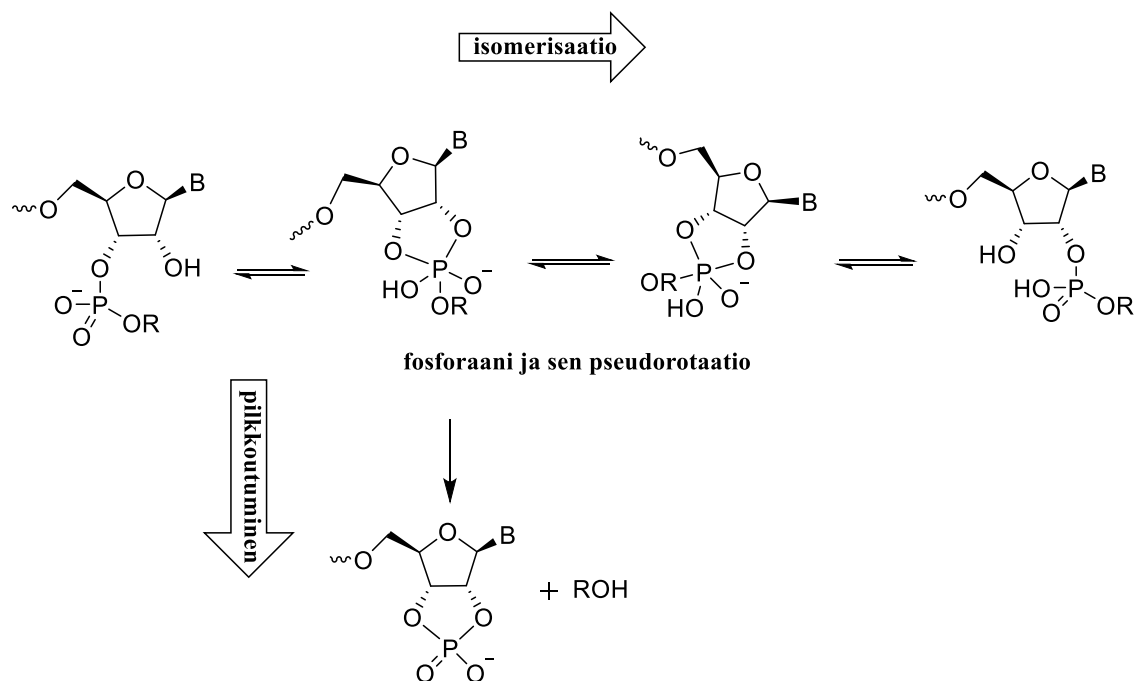
Fosfaattiesterit ja anhydritit hallitsevat elävää maailmaa. Suurin osa koentsyymeistä on fosfori- tai pyrofosforihapon estereitä. Tärkeimmät biokemiallisen energian varastot ATP, fosfokreatiini ja fosfoenolipalorypalehappo ovat fosfaatteja. Geneettiset materiaalit DNA ja RNA ovat fosfodiesteriä.¹ Fosforiesterisidoksella on elintärkeä rooli kemiallisessa biologiassa, koska se liittyy nukleosidiyksiköt nukleiinihappoiksi. RNA molekyyleillä on merkittävä rooli monissa solunsisäisissä tapahtumissa sekä geneettisen informaation kantajana että katalyyttinä.² Kemiallisesti RNA muistuttaa DNA:ta. Se on polymeeri, joka on rakennettu monomeerisistä nukleosideista 3'-5'-fosfodiesterisidoksin. Kuitenkin RNA:n 2'-hydroksiryhmä tarjoaa sille kyvyn toimia intramolekulaarisena nukleofiilinä, jolloin sen fosfodiesterisidokset ovat kemiallisesti ja entsyymaattisesti vähemmän pysyviä kuin DNA:ssa.³ Tämä on yksi syy miksi halutaan ymmärtää RNA:n kemiallinen käyttäytyminen paremmin, jonka vuoksi fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisen mekanismi ja kinetiikka on herättänyt suurta kiinnostusta.² RNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutuminen on biologinen perusreaktio, jota katalysoi proteiini- ja RNA-entsyymit. Pienten molekulaaristen yhdisteiden katalyysiä on tutkittu, jotta saataisiin syvempi ymmärrys siitä, miten entsyymit vaikuttavat reaktioihin, joissa RNA on osallisena.²

1960-luvulta lähtien on tiedetty, että metalli-ionit katalysoivat RNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutumista fysiologisessa pH:ssa.⁴ Pienten synteettisten metallonukleaasien tutkimuksen eteen on investoitu paljon, jotta saataisiin työväline RNA:n pilkkoutumiselle. Ne olisivat potentiaalisia työkaluja terapeuttisessa käytössä sekä monipuolisia vaihtoehtoja nukleaaseille laboratorioskäytössä. Metallonukleaasit olisivat myös tärkeitä keinotekoisien reseptorien kehitykselle, jotka ovat oleellisia biologisesti tärkeiden fosfaattien toiminnassa.⁵ Lisäksi niiden avulla voitaisiin poistaa myrkyt tuholaisaineista ja kemiallisista aseista, koska niissä on yleensä fosfaattiesterin kaltaisia rakenteita.⁶ Monet tutkimukset ovat keskittyneet di- ja polynukleaaristen metallikompleksien synteisiin, koska nämä kompleksit sitoutuvat voimakkaammin fosfaattiin. Lisäksi ne ovat reaktiivisempia fosfaattiestereiden pilkkoutumisessa, kuin niiden mononukleaariset vastineet.⁵

Viimeisten vuosikymmenten aikana fosfodiesterisidoksen metalli-ionivälitteinen pilkkoutuminen on herättänyt suurta kiinnostusta ja monia artikkeleita on julkaistu asiasta. Tutkimuksien päätavoitteina on ollut ymmärtää metalli-ionien rooli katalyyssissä

ja tarve kehittää riittävän tehokas katalyytti RNA:n pilkkoutumiselle.⁷ Huoneenlämpötilassa ja neutraaleissa olosuhteissa RNA on hyvin pysyvä. Puoliintumisaika fosfodiesterisidoksen pilkkoutumiselle on arviolta 100 vuotta.⁸

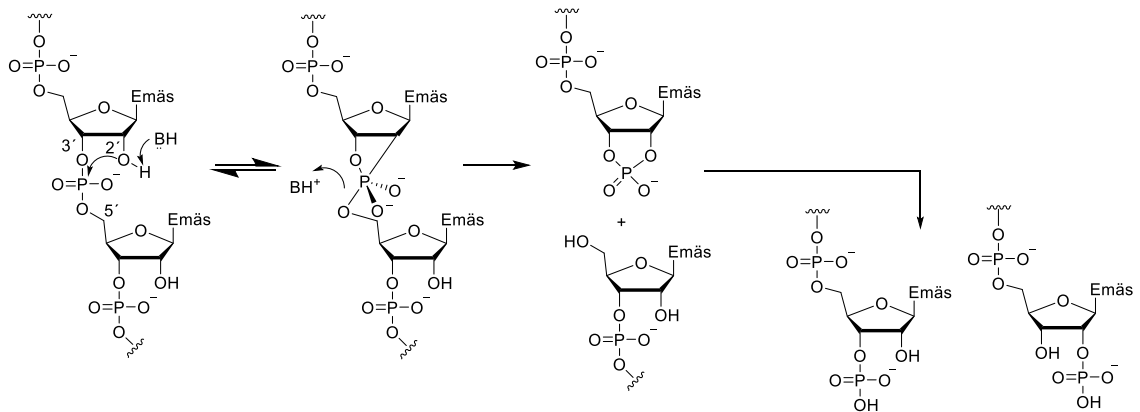
Kineettiset tutkimukset hydronium-, hydroksidi- ja metalli-ioneilla fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisessa ovat todistaneet sen, että suurempi katalyyttinen aktiivisuus voidaan saavuttaa yhdistämällä oikeanlaiset tekijät, jotka vaikuttavat pilkkoutumisnopeuteen.² Pilkkoutumisen ensimmäinen vaihe on intramolekulaarinen transesterifikaatio, jossa sokeriosan 2'-OH hyökkää fosfaattiryhmään, kuten Brown ja Todd todistivat jo aikaisissa tutkimuksissaan⁹, ja muodostuu Westheimerin sääntöjen¹⁰ mukaan pentakoordinoitunut fosforaani-intermediaatti (Kaavio 1).⁷



Kaavio 1. Fosfodiesterisidoksen intramolekulaarinen transesterifikaatioreaktio ja isomerisaatio. Kaavio on piirretty viitteessä 7 esitettyä mukailleen.

Fosforaenin jatkoreaktio riippuu olosuhteista: emäksisissä olosuhteissa lähestyvä nukleofiili deprotonoituu ja muodostuu dianioninen fosforaani. Reaktion intermediaatti ei ole riittävän pitkäikäinen, jotta sille tapahtuisi pseudorotaatio eikä emäksen katalysoimaa fosfaatin kulkeutumista ole koskaan havaittu.¹¹ Neutraaleissa ja happamissa olosuhteissa muodostunut fosforaani on riittävän pysyvä käymään läpi kaksi erilaista reaktiota.² Eksosyklisen P-O-sidoksen pilkkoutuminen johtaa 2',3'-syklisen fosfaattiryhmän muodostumiseen ja 5'-sitoutuneen nukleosidin irtoamiseen (Kaavio 2). Syklinen 2',3'-fosfaatti hydrolysoituu seokseksi 2'- ja 3'-fosfaatteja.² Endosyklisen 3'-P-O-sidoksen pilkkoutuminen saa aikaan

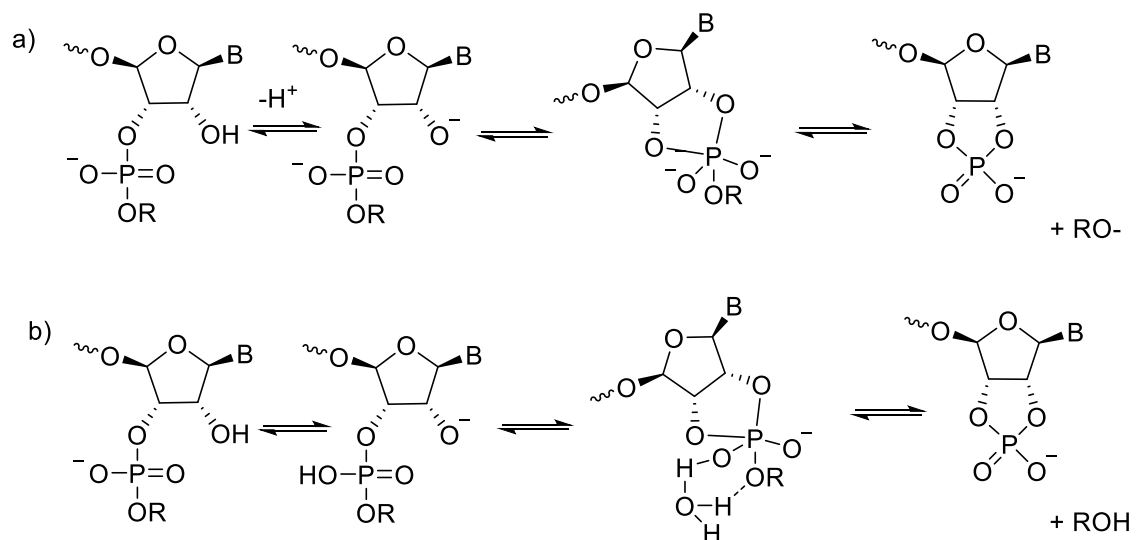
fosforiatomin ympärillä pseudorotaation, jolloin muodostuu lähtöaineen 2',5'-isomeeri (Kaavio 1).² Katalysoimattomassa reaktiossa lähtevän ryhmän poistuminen on nopeutta rajoittava vaihe.¹¹



Kaavio 2. RNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisen mekanismi. Kaavio on piirretty viitteessä 2 esitettyä mukailien.

1.1. Spesifinen emäksen katalysoima ja spontaani pilkkoutuminen

Yksittäisen fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisen puoliintumisaika huoneenlämpötilassa pH:ssa 5–6 on noin 100 vuotta, jossa spontaani hydrolyysireaktio vallitsee. On arvioitu, että lähestyvän nukleofiilin (2'-OH) deprotonaatio ja poistuvan ryhmän protonaatio (5'-O) nopeuttavat reaktiota kertoimella 10^6 .² Aikaisempien tutkimusten¹² mukaan pääasialliset reaktiomekanismit neutraaleissa fysiologisissa olosuhteissa ovat spontaani- ja emäksen katalysoima pilkkoutuminen (Kaavio 3). Mitä huonompi lähtävä ryhmä on, sitä suurempi on spontaanin pilkkoutumisen aste. Mekanistisesti nämä kaksi reaktiota ovat melko erilaiset.⁷



Kaavio 3. Fosfodiesterisidoksen pääasialliset pilkkoutumismekanismit neutraaleissa olosuhteissa ilman metalli-iona. a) emäksinen pilkkoutuminen b) spontaani pilkkoutuminen. Kaavio on piirretty viitteessä 12 esitettyä mukailleen.

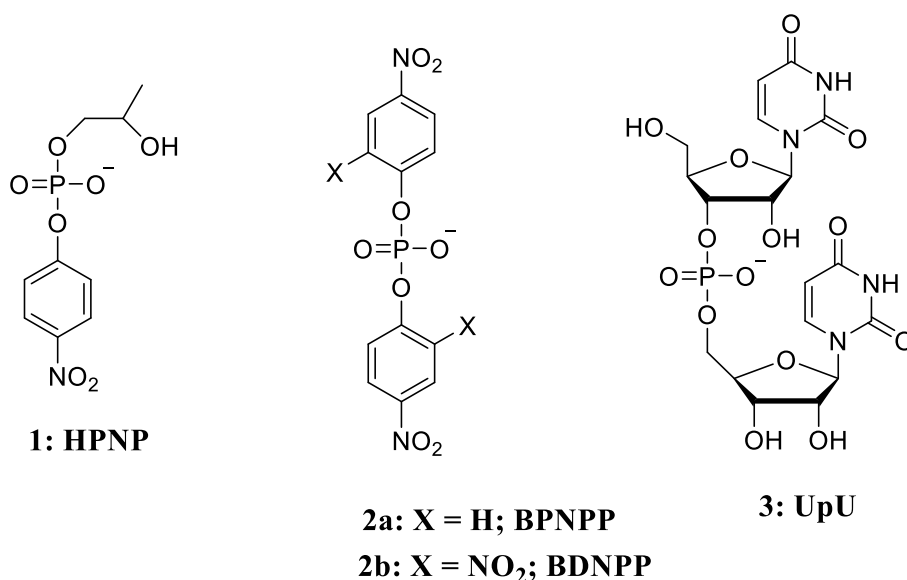
Pääasiallinen reaktiomekanismi RNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutumiselle pH:n ollessa yli 7, on hydroksidi-ionin katalysoima transesterifikaatioreaktio 2',3'-sykliseksi fosfaatiksi (Kaavio 3a).² Alussa tapahtuu nopea 2'-hydroksiryhmän deprotonaatio, jonka jälkeen 2'-oksianioni hyökkää fosforiatomiin, jolloin muodostuu fosforaani-intermediaatti. Samanaikaisesti 5'-sitoutunut nukleosidi poistuu oksianionina. β_{lg} -arvo -1.28 kertoo siitä, että lähtevä ryhmä poistuu alkoksiryhmänä.¹³ Alkyyliestereistä johdetulla dianionisella fosforaanilla on rajallinen elinikä, ja tämän intermediaatin hajoaminen myöhäisen transiittilan kautta on nopeutta rajoittava vaihe transesterifikaatioreaktiossa sykliseksi fosfaatiksi.² Aryyliestereillä nopeutta rajoittava vaihe kuitenkin on tämän intermediaatin muodostuminen. Tämä ero mekanismeissa on tärkeä huomata, koska HPNP-yhdiste on usein käytetty RNA-malliyhdiste RNA:n pilkkoutumisen mekanistisessa tutkimuksessa, ja tämän vuoksi tuloksia, joita on esitetty HPNP:n pilkkoutumisesta ei voi suoraan yleistää RNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutumiseen.² Hydroksidi-ionin katalysoimaa isomerisaatiota ei ole havaittu, koska dianioninen fosforaani-intermediaatti on liian lyhytikäinen käydäkseen läpi pseudorotaation tai kineettisesti näkyvän monoanionisen fosforaanin protonaation. Heikosti emäksisissä olosuhteissa monoanionisen fosforaanin protonaatio olisi kuitenkin termodynaamisesti suotuisaa.¹³ Isomerisaatio on yleisesti nopeampi reaktio kuin pilkkoutuminen, joten monoanionisen intermediaatin hajoaminen 2',3'-sykliseksi fosfaatiksi täytyy olla ainakin osittain pilkkoutumisreaktion nopeutta rajoittava vaihe.¹²

Vähemmän huomiota on saanut RNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutuminen pH:sta riippumatta, joka on havaittu vain kapealla pH-alueella suurinpiirtein pH:ssa 5. Pienille molekulaarisille pilkkoutumisvälittäjille tämä spontaani pilkkoutuminen voi olla oikeampi malli kuin hydroksidi-ionin katalysoima reaktio.² Spontaani pilkkoutuminen on kaksivaiheinen prosessi, jossa intermediaattina toimii monoanioninen fosforaani (Kaavio 3b).⁷ Tässä reaktiossa 2'-hydroksiryhmä hyökkää neutraaliin fosfaattiin, jonka jälkeen todennäköisesti vesimolekyyli välittää protonin lähestyvältä nukleofiililta fosforyylihapelle. Alkoksiryhmän hapen protonaatio johtaa sidoksen pilkkoutumiseen, kun taas neutraalin fosforaani-intermediaatin pseudorotaatio ja P-O-3'-sidoksen pilkkoutuminen johtaisi isomerisaatioon.¹²

Spontaaniin pilkkoutumiseen vaikuttaa nukleofiilin asema, elektrofiilinen keskus ja lähtevien ryhmien suhteet toisiinsa. Kun nukleofiilinen 2'-happi ja poistuva 5'-happi ovat fosforikeskukseen nähden linjassa, niillä on kaksi aksiaalista asemaa trigonaalisen bipyramidin geometriassa.¹⁴

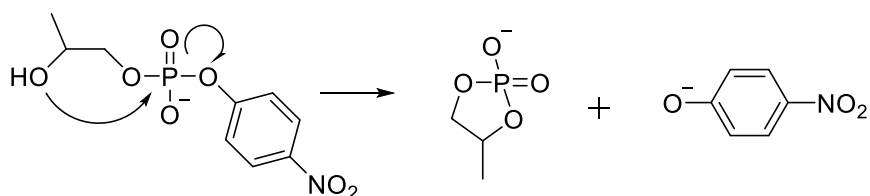
1.2. Malliyhdisteet

Tutkimukset RNA:n kaltaisilla malliyhdisteillä kertovat nukleiinihappojen hydrolyysin ja transesterifikaatioreaktion mekanismista.² Yksityiskohtainen ymmärrys näistä kemiallisista prosesseista olisi välttämätöntä, kun suunnitellaan keinotekoisia fosfoesteraaseja, joilla on entsyymien kaltaisia katalyyttisiä ominaisuuksia.



Kuva 1. Yleisesti tutkimuksissa käytettyjä RNA:n kaltaisia malliyhdisteitä.

HPNP:n (Kuva 1, 1) valinta mallisubstraatiksi perustuu sen saatavuuteen ja laajalle levinneeseen käyttöön, ja lisäksi tietysti siihen, että sen havaittu reaktio on intramolekulaarinen transesterifikaatioreaktio.¹⁵ *p*-nitrofenyyli-ryhmä on hyvä lähtevä ryhmä ja sen vuoksi HPNP on erittäin reaktiivinen. Sen intramolekulaarinen nukleofiili on taipuisampi kuin nukleosidien 2'-OH-ryhmä, ja sen pK_a on myös korkeampi. Tämän vuoksi tehokas katalyytti HPNP:lle ei välttämättä ole tarpeeksi tehokas katalyytti nukleosidifosfodiesteriä.¹⁶ Verrattaessa keskenään HPNP:n 2'-OH-ryhmää ja nukleosidin ribosirenkaan 2'-OH-ryhmää, on havaittu, että ribosirenkaan hydroksiryhmä on tehokkaampi nukleofiili kuin HPNP:n. Todennäköisesti nukleosidirakenne vaikuttaa 2'-OH-ryhmän asemaan niin, että se on nukleofiilisen hyökkäyksen kannalta paremmassa asemassa. HPNP:n 2'-OH-ryhmä pääsee liikkumaan vapaammin, ja siksi sen nukleofiilinen hyökkäys ei ole niin tehokas.⁵ HPNP kuitenkin reagoi nopeasti huoneenlämpötilassa ja sen reaktioita on helppo seurata. Reaktion lopputuloksena saadaan 4-nitrofenolaattia ja syklistä propyleenifosfaattia. (Kaavio 4).¹⁵ Toinen yleisesti käytetty malliyhdiste on bis-4-nitrofenyyli fosfaatti BPNPP (2a, kuva 1).



Kaavio 4. HPNP:n intramolekulaarinen transesterifikaatioreaktio. Kaavio on piirretty viitteessä 17 esitettyä mukaillen.

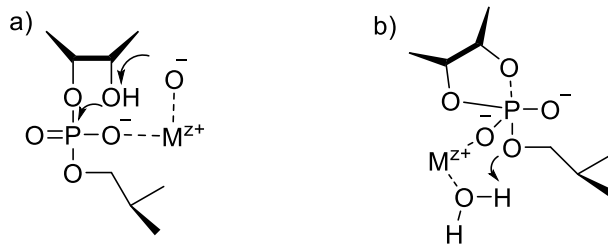
1.3. Metallionivälitteinen fosfodiesterisidoksen pilkkoutuminen

Metallionivälitteisen pilkkoutumisreaktion nopeus on osoitettu ilmentävän 1. kertaluvun riippuvuutta katalyytin konsentraatiosta.¹¹ Aikaisempien tutkimusten mukaan metallionin katalyyttinen aktiivisuus riippuu katalyytin akvaligandin happamuudesta. Tehokkaiksi katalyyteiksi ovat osoittautuneet metallit ja niiden kompleksit, joissa akvaligandin pK_a -arvo on alhainen.¹¹

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet sen, että siirtymämetallionikompleksien katalyyttinen aktiivisuus riippuu metallionin luonteesta.¹⁸ Metallionilla täytyy olla suuri Lewisin happamuus sekä sen ligandinvaihdon täytyy olla nopea, jotta se olisi

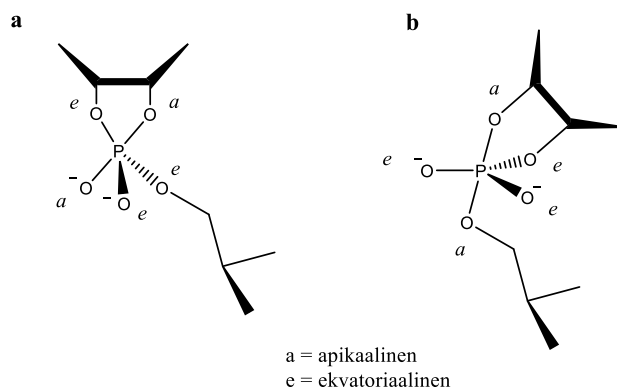
tarpeeksi tehokas hydrolyyttinen katalyytti. Yleensä keinotekoiset systeemit ovat perustuneet Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} ja lantanoidi-ioneihin Eu^{3+} ja Ce^{4+} .⁶ Lantanoidi-ionit ovat ainutlaatuisia niiden luminesenssiominaisuuksien vuoksi, niillä on kapeaviivainen emissiospektri sekä pitkä luminesenssiaika. Suurin osa metalli-ioneista, jotka ovat tärkeitä biologisissa ja toiminnallisissa rakenteissa, eivät osoita luminesenssia biologisessa ympäristössä. Monet Europium- (Eu^{3+}) ja Terbium-ionit (Te^{3+}) ovat kuitenkin luminoivia, kun ne sisällytetään keinotekoisiiin biologisiin järjestelmiin.¹⁹ Tehokkaimmiksi katalyyteiksi ovat kuitenkin osoittautuneet Cu^{2+} - ja Zn^{2+} -kompleksit.¹⁸ Zn^{2+} on oikeastaan ainoa metalli, jota kohdataan usein luonnonmukaisissa ja keinotekoisissa järjestelmissä. Tämä johtuu siitä, että Zn^{2+} on hyvä Lewisin happo ja sen ligandinvaihto on nopeaa. Se ei myöskään ole myrkyllinen eikä redoksi-aktiivinen.⁶ On myös havaittu, että bimetalliset kompleksit voivat olla 100 kertaa tehokkaampia, kuin niiden monometalliset vastineet.⁷ On osoitettu, että monet tärkeät entsyymit, jotka hydrolysoivat fosfaattiestereitä, sisältävät kaksi metalli-iona. Tällaisia ovat esimerkiksi 3'-5'-eksonukleaasi ja RNAasi H.²⁰ Liun ja Hamiltonin²¹ tutkimuksissa HPNP:n pilkkoutumisnopeus Cu^{2+} -TerPy:n dimeerin kanssa kasvoi 51-kertaisesti verrattuna monometallisen Cu^{2+} -TerPy:n kanssa. Metallionit voivat tehostaa sekä nukleofiilistä hyökkäystä että lähtevän ryhmän poistumista.⁷

RNA:n malliyhdisteiden metalli-ionivälitteiselle pilkkoutumiselle ei ole yhtä yksittäistä mekanismia, joka pätee kaikkiin reaktioihin.⁷ On välttämätöntä, että vuorovaikutus substraatin ja katalyytin välillä on voimakasta, mutta koordinoituneen metalli-ionikatalyytin rooli ei ole selvä. Kannatusta on saanut koordinoituneen metalli-ionikatalyytin elektrofiilinen katalyysi ja mekanismivaihtoehdoksi on myös esitetty yleistä happo- tai emäskatalyysiä koordinoituneen metalli-ionin vesi- tai hydroksiligandin toimiessa katalyyttinä.⁷ Tutkittaessa uridiini 3'-aryyli- ja alkyylifosfaattien Zn-katalyyttistä pilkkoutumista¹¹ todettiin, että lähtevät alkyyliryhmät poistuvat metalli-ionikatalyytin läsnäollessa alkoholina ja aryylliset lähtevät ryhmät poistuvat oksianionina. Metallionin kanssa pH:n nousu kasvattaa pilkkoutumisen nopeutta, ja siihen vaikuttaa myös selkeästi metalli-ionin happamuus sekä metalli-ionin ja substraatin välinen voimakkuus. Näiden perusteiden pohjalta voitaisiin päätellä, että metalli-ioni toimii intrakompleksisena emäskatalyyttinä (Kaavio 5a). Metallionikatalyyttinen pilkkoutuminen muistuttaa siis emäskatalyyttistä pilkkoutumista siinä mielessä, että reaktiossa ei ole pysyvää intermediaattia.¹¹ Metallionikompleksit voivat toimia myös kompleksinsisäisenä happokatalyyttinä (Kaavio 5b).



Kaavio 5. Mahdollisia mekanismeja, miten metalli-ionikatalyytti osallistuu RNA:n pilkkoutumisreaktioon a) intrakompleksisena emäskatalyyttinä b) intrakompleksisena happokatalyyttinä. Kaavio on piirretty viitteessä 11 esitettyä mukailten.

RNA:n pilkkoutumisreaktiota voidaan nopeuttaa helpottamalla protoninsiirtoa lähestyvältä nukleofiililta 2'-OH lähtevälle ryhmälle 5'-O. Vartenotettavia vaihtoehtoja pilkkoutumisreaktion nopeuttajiksi ovat molekyylit ja ionit, jotka tehostavat 2'-OH:n deprotonoitumista ja vähentävät fosforiatomin elektronitiheyttä fosforaani-intermediaatin muodostuksen aikana, mutta mahdollistavat kuitenkin elektronitiheyden nousun P-O5'-sidoksen pilkkoutuessa. Toinen tekijä, joka vaikuttaa RNA:n fosfodiesterisidoksen pysyvyyteen on sen sekundaarinen rakenne. Westheimerin sääntöjen¹⁰ mukaan nukleofiilit voivat liittyä pentakoordinaatiiviseen intermediaattiin ja poistua siitä vain apikaalisen aseman kautta.⁴ Kaksoiskierteessä emästen pinoutuminen pakottaa 5'-O-sidoksen ekvatoriaaliseen asentoon (kuva 2a) ja dianioninen fosforaani on liian pysymätön, jotta 5'-O-sidos voisi kiertyä apikaaliseen asemaan pseudorotaation kautta (Kuva 2b).⁴ Elektronegatiiviset ligandit suosivat apikaalista asentoa ja negatiivisesti varautuneet happiatomit ovat lukittuna ekvatoriaaliseen asentoon.¹⁰ Keinotekoiset nukleasit pitäisi siis suunnitella niin, että fosfodiesterisidos, joka halutaan pilkkoa, ei sijaitsisi kaksoiskierteessä. Kun keinotekoinen nukleasi sitoutuu kohteeseensa, se ei myöskään saisi jäädä kaksoiskierteeseen.⁴



Kuva 2. 5'-sitoutuneen nukleosidin a) ekvatoriaalinen ja b) apikaalinen asema fosforaani-intermediaatin kanssa. Kuva mukailtu viitteestä 4.

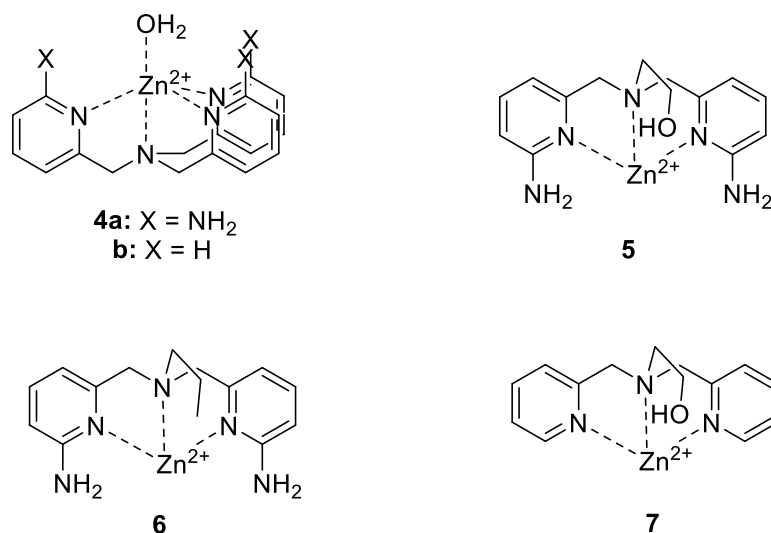
1.4. Metallionikatalyytit

Siirtymämetallikompleksit, jotka pystyisivät katalysoimaan fosfodiesterisidoksen pilkkoutumista, olisivat hyödyllisiä RNA-rakenteen tutkimuksessa ja ribonukleasien synteettisinä analogeina.²² Keinotekoiset ribonukleasit voitaisiin valmistaa siirtymämetallikompleksin kovalenttisella kiinnityksellä oligonukleotidiin, joka sitten sitoutuisi RNA:han sekvenssispesifisellä tavalla. Keinotekoisilla katalyyteillä voisi olla lukuisia käyttökohteita bioteknologian, kemoterapian ja lääketieteen aloilla.¹⁶ Vaikka fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisen nopeus siirtymämetallien akvaioneilla on yleensä heikkoa, oikeanlaisella ligandikompleksilla voidaan saavuttaa suurempi katalyyttinen aktiivisuus ja suurempi vastustuskyky saostumiselle.¹⁶

1.4.1. Funktionaalisten ryhmien vaikutus katalyyttiseen aktiivisuuteen

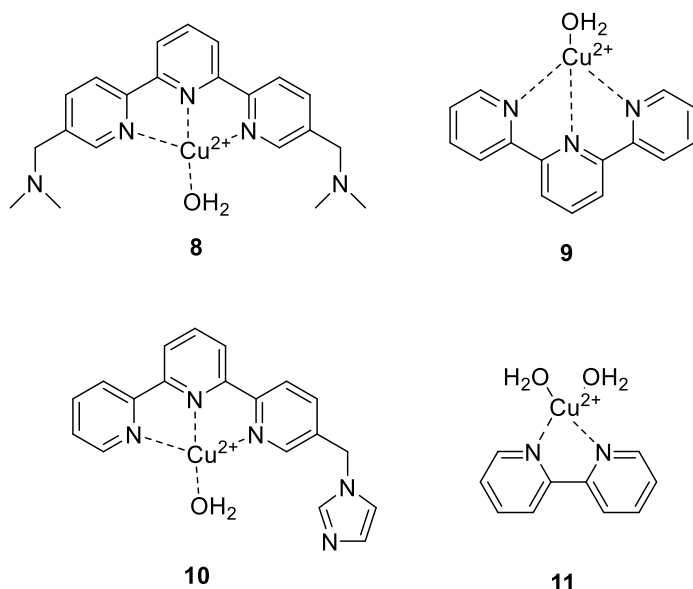
Reaktiivisemmän ligandikompleksin etsinnässä yksi vaihtoehto on lisätä orgaanisia funktionaalisia ryhmiä ligandin strategisiin kohtiin, jotka pystyvät kasvattamaan ligandin katalyyttistä aktiivisuutta.²⁵ Orgaaniset ryhmät, jotka kykenevät toimimaan nukleofiilinä tai vetysidoksen luovuttajina nostavat huomattavasti metallikompleksin hydrolyyttistä aktiivisuutta.²³ Metalliligandiin voidaan liittää esimerkiksi ammonium-, amino- tai guanidiini ryhmä, jotka ovat hyviä vetysidoksen luovuttajia. Varsinkin 2-amino substituenttien lisääminen pyrimidiinirenkaseen on osoittautunut lupaavaksi modifikaatioksi Cu^{2+} , Co^{3+} ja Zn^{2+} kompleksien kanssa.⁵ On esimerkiksi havaittu, että kompleksi **4a** pilkkoo HPNP-yhdisteen 750 kertaa nopeammin kuin sama yhdiste **4b** ilman aminoryhmiä, jotka voivat luovuttaa vetysidoksen.²⁴ Mancinin ryhmä^{23,25} syntetisoi sarjan sinkkikomplekseja (**5–7**), jotka ilmensivät molempia hyviä katalyyttisiä ominaisuuksia amiiniryhmän (vetysidoksen luovuttaja) sekä hydroksyyliiryhmän (nukleofiili) avulla. Sinkkikompleksien perusrakenteena oli bis-2-pyridinyylimetyyliamiini, johon oli liittyneenä joko amino- tai hydroksyyliiryhmä, tai kompleksissa oli vain yksi aminoryhmä kahden sijaan. Vertailukohteena oli myös sinkkikompleksi, josta puuttuivat molemmat orgaaniset ryhmät.²³ Näiden yhdisteiden katalyyttisiä ominaisuuksia tutkittiin BPNPP:n ja HPNP:n pilkkoutumisreaktioissa. Tehokkaimmaksi katalyytiksi BPNPP:n pilkkoutumisessa osoittautui sinkkikompleksi **5**. Ligandin kaksi primääristä aminoryhmää ovat oikeassa asemassa, kun ne muodostavat vetysidoksen metallikoordinoitun substraatin kanssa. Tämä kasvattaa Lewisin happoaktiivisuutta.²⁵ HPNP:n pilkkoutumisessa ligandin hydroksyyliiryhmällä ei näyttänyt olevan vaikutusta pilkkoutumisreaktion reaktiivisuuteen, koska

nopeusvakioiden arvot olivat identtiset katalyytin **5** ja **6** kanssa.²³ Tutkimuksissa BPNPP:n kanssa selvisi myös, että alkoksinen nukleofiili on 17-kertaa reaktiivisempi kuin metalliin sitoutunut hydroksidi (vertaa: kompleksi **5** ja **6**). Toisaalta, tärkeämpi vaikutus näyttäisi olevan primäärisillä aminoryhmillä, jotka kasvattavat 230-kertaisesti aktiivisuutta (vertaa: kompleksi **5** ja **7**).²⁵



Kuva 3. Sinkkikompleksi **4** ja Mancinin ryhmän tutkimuksissa käytettyjä sinkkikomplekseja **5–7**.^{23,25}

Sternin ja hänen työryhmänsä²² tutkimuksista voidaan päätellä, että terpyridiinipohjaiset metalli-ionikatalyytit voivat edistää RNA:n transesterifikaatioreaktiota. Liu ja Hamilton²⁶ tutkivat HPNP:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutumista erilaisilla kupariterpyridiinikomplekseilla (**8,10**) sekä kupariterpyridiinillä (**9**). Kompleksit **8** ja **10** sisältävät erilaisia perifeerisiä emäsryhmiä. Perifeeriset tertiääriset aminoryhmät nostivat pilkkoutumisen aktiivisuutta pH:ssa 7, ja esimerkiksi kompleksi **8** hydrolysoi HPNP-yhdisteen 7-kertaisella nopeudella verrattuna kupariterpyridiiniin (**9**). Tutkimuksissa kävi kuitenkin ilmi, että kompleksit **8** ja **9** ovat yhtä tehokkaita katalyyttejä korkeassa pH:ssa ja, että tertiäärinen aminoryhmä ei sitoutuisi Cu²⁺-ioniin steeristen esteiden vuoksi. Alhaisessa pH:ssa Cu²⁺-ioniin sitoutunut hydroksidiryhmä on protonoitunut ja perifeerinen tertiäärinen aminoryhmä mahdollistaa yleisen emäskatalyyttisen pilkkoutumisen. Perifeerinen imidatsolirengas kompleksissa **10** taas laski aktiivisuutta yli 8-kertaisesti verrattuna yhdisteeseen CuTerPy (**9**).²⁶ Yksi mahdollinen selitys aktiivisuuden alentumiselle on se, että imidatsoliryhmä aiheuttaa dimerisaatiota, ja se valtaa metallin koordinoitumiskohdan, jota vesi tai substraatti käyttäisi.²⁶



Kuva 4. Tutkimuksissa käytettyjä erilaisia kuparikatalyyttejä.

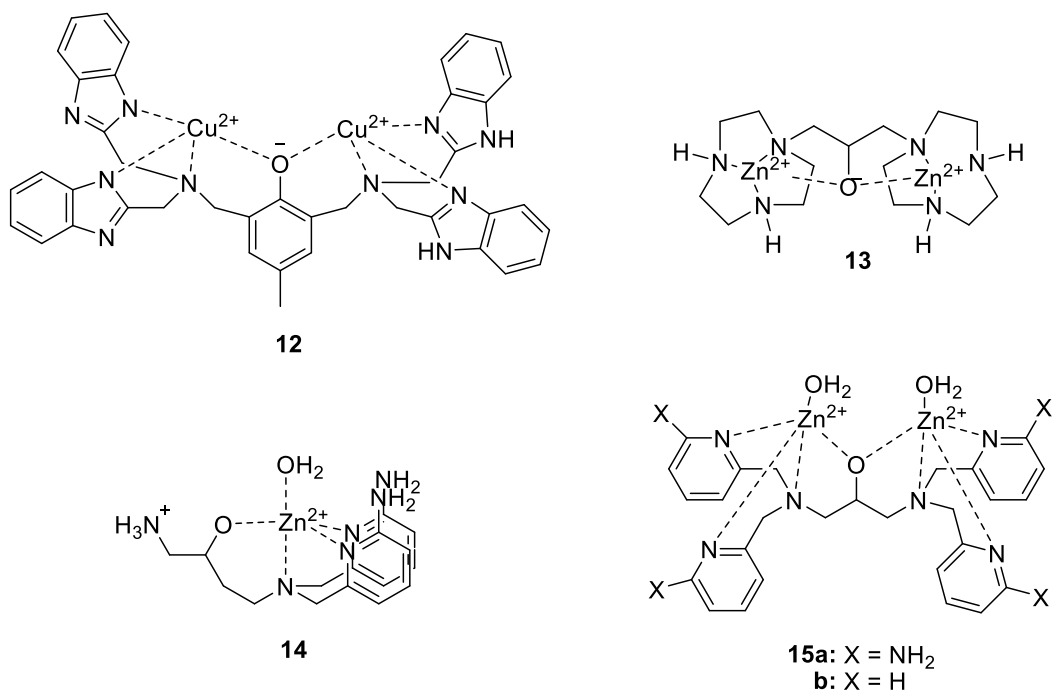
Aiemmin esitellyistä yhdisteistä on löytynyt hyvää katalyyttistä aktiivisuutta, mutta ei merkittävää emäselektiivisyyttä. On kuitenkin olemassa tutkimuksia, joissa on havaittu jonkin verran myös emäselektiivisyyttä.²⁷ Liittämällä kovalenttisesti CuBiPy- (**11**) ja CuTerPy-(**9**)ligandit toistensa kanssa saadaan nostettua katalyysitehokkuuden lisäksi myös emäselektiivisyyttä ribonukleosidi 2',3'-monofosfaattien kanssa. Luonnollisten ribonukleaasien pilkkoessa RNA:n fosfodiesterisidosta, ribonukleosidi 2',3'-monofosfaatit ovat reaktion intermediaatteja. CuBiPy-CuTerPy-kompleksi on erittäin selektiivinen adeniinin kanssa, ja se hydrolysoi ApA:n 12, 17 ja 87-kertaa nopeammin kuin CpC:n, UpU:n ja GpG:n. CuTerPy (**9**) yksin hydrolysoi 8-kertaisella nopeudella tehokkaimmin ApA:n, verrattuna hitaimpaan reaktioon UpU:n kanssa.²⁷

1.4.2. Metalli-ionikatalyytit erilaisten malliyhdisteiden pilkkoutumisessa

Kuten aiemmin kerrottiin, bimetalliset sinkki- ja kuparikompleksit ovat osoittaneet tehokkuutta fosforiesterisidoksen pilkkoutumisessa. Esimerkiksi kuparikompleksi **12** on osoittanut tehostavansa HPNP:n transesterifikaatioreaktiota 5-kertaisesti.²⁰ Se on tehokkaampi katalyytti kuin sen monometallinen vastine.

Bimetallinen sinkkikatalyytti **13** on myös tehokas katalyytti pilkkomaan RNA-malliyhdistettä HPNP. Kompleksi on erittäin liukoinen veteen ja se sitoutuu kahdella Zn²⁺-ionillaan tehokkaasti substraattiin.²⁸ On todettu, että Zn²⁺-ionit koordinoituvat typeen ja happeen, kun ne ovat fosfataasien katalyyttisinä keskuksina. On esitetty, että

nämä erilaiset donoriympäristöt Zn^{2+} -ionien ympärillä ovat tärkeitä säädeltäessä sinkki-ionien happamuutta, ja niillä voi olla elintärkeä rooli yhdisteen katalyyttisessä tehokkuudessa.²⁹



Kuva 5. Tutkimuksissa käytettyjä erilaisia mono- ja dinukleaarisia metallikomplekseja.

Erilaiset metalli-ionikompleksit suosivat erityyppisiä fosfoestereitä substraattina. Esimerkiksi HPNP:n reagoiessa sinkkikompleksin **14** kanssa, ammoniumryhmä vaikuttaa fosfaattidiestereiden reaktiivisuuteen usealla eri tavalla. Se helpottaa alkoksidi-nukleofiilin muodostumista laskemalla sen pK_a :ta kahdella yksiköllä. Lisäksi sen positiivinen varaus käyttää elektrostaattisia vaikutuksia, jonka vuoksi reaktion transiittila stabiloituu ja systeemin aktiivisuus kasvaa.³⁰ Reagoiessa BPNPP:n kanssa tämä vaikutus ei kuitenkaan ole niin suuri.³⁰ Eroja on havaittu myös yksinkertaisemmilla katalyyteillä, kuten voidaan havaita taulukon 2 tuloksista. Taulukkoon 2 on koottu erilaisten metalli-ionien ja niiden kompleksien katalyyttisiä aktiivisuuksia.

Taulukko 2. Metallionien ja niiden kompleksien katalyyttisiä aktiivisuuksia ($k_{\text{rel}} = k_{\text{obs}} / k_{\text{uncat}}$) tietyissä olosuhteissa ([katalyytti], pH, lämpötila). k_{obs} = havaittu nopeusvakio, k_{uncat} = katalysoimattoman reaktion nopeusvakio.

| Katalyytti | k_{rel} BPNPP (2a) | k_{rel} HPNP (1) | k_{rel} UpU (3) tai 17c ^a |
|--------------------------------------|---|---|---|
| Zn ²⁺ (aq) | | 150; 0,5 mmol l ⁻¹ pH 7,0; 37 °C ^b | 32; UpU, 1 mmol l ⁻¹ pH 7,0; 80 °C ^b |
| Eu ³⁺ (aq) | | 7700; 0,5 mmol l ⁻¹ pH 7,0; 37 °C ^b | 475; UpU, 1 mmol l ⁻¹ pH 7,0; 80 °C ^b |
| Cu ²⁺ (aq) | 27; 0,1 mmol l ⁻¹ pH 6,5; 75 °C ^c | | |
| Cu ²⁺ -BiPy (11) | 2000; 1 mmol l ⁻¹ pH 6,5; 75 °C ^c | 144; 2 mmol l ⁻¹ pH 7,0; 25 °C ^d | 291; 17c, 10 mmol l ⁻¹ pH 6,6; 90 °C ^e |
| Cu ²⁺ -TerPy (9) | - ^g | 52; 2 mmol l ⁻¹ pH 7,0; 25 °C ^f | 2164; 17c, 10 mmol l ⁻¹ pH 6,6; 90 °C ^e |
| 8 | | 353; 2 mmol l ⁻¹ pH 7,0; 25 °C ^f | |

^a Yhdisteen **17c** lähtevän ryhmän pK_a on sama kuin dinukleosidi monofosfaateilla

^b viitteestä 31, ^c viitteestä 32, ^d viitteestä 21, ^e viitteestä 7, ^f viitteestä 26,

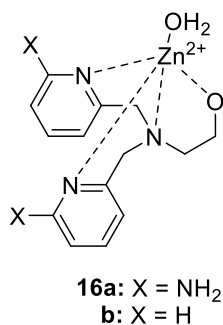
^g Ei ole havaittu katalyysiä, kirjoitettu viitteestä 33. Taulukko mukailtu viitteestä 34.

CuBiPy (**11**) ja jo edellä mainittu CuTerPy (**9**) sekä niiden johdokset ovat myös paljon käytettyjä metalli-ionikatalyyttejä RNA:n fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisessa.⁷ Alkyyliestereiden fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisessa 10 mM CuTerPy (**9**) on 10-kertaa parempi katalyytti kuin 10 mM CuBiPy (**11**). Katalyyttisen aktiivisuuden ei havaita laskevan, vaikka lähtevän ryhmän pK_a -arvo kasvaa. Uridiini 3'-aryyliestereiden fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisessa CuTerPy (**9**) on melko hyvä katalyytti, kun taas CuBiPy (**11**) on tässäkin tapauksessa heikompi. Lähtevän ryhmän happamuuden kasvaessa katalyysitehokkuus kasvaa, joka havaitaan vielä selkeämmin CuBiPy:llä (**11**). Cu²⁺-komplekseilla havaitaan myös, että katalyysitehokkuus laskee, kun reaktion

lämpötila kasvaa. Aryyliestereillä lähtevän ryhmän happamuuden kasvaessa katalyyssitehokkuuden ero CuBiPy (**11**) ja CuTerPy (**9**) välillä pienenee. Uridiini *p*-nitrofenyyliesterin tapauksessa CuTerPy (**9**) ja CuBiPy (**11**) ovat suurinpiirtein yhtä hyviä katalyyttejä.⁷

Aikaisemmissa tutkimuksissa¹⁸ on todettu, että pH:ssa 6.5 ja lämpötilassa 25 °C substraatti sitoutuu täysin sinkkiligandikompleksiin **15a**. Amino-substituoidut pyridiiniiryhmät voivat muodostaa vetysidoksia fosforyylihapen atomien kanssa. UpU:n pilkkoutumisreaktiossa sinkkikatalyytti **15a** on 20-kertaa tehokkaampi kuin sama kompleksi ilman aminoryhmiä (**15b**).²⁹ Kompleksi on yksi tehokkaimmista kemiallisista katalyyteistä luonnollisen RNA-malliyhdisteen pilkkomisessa, jolla on lähtevänä ryhmänä nukleosidi. Suurempia katalyyttisiä aktiivisuuksia on kylläkin raportoitu, mutta niissä substraattina on ollut esimerkiksi malliyhdiste HPNP, joka on reaktiivisempi aryyllisen lähtevän ryhmänsä vuoksi. Aikaisemmin ei ole raportoitu, että metalli-ionipohjaiset katalyytit tehostaisivat isomerisaatioreaktiota. Tämä voidaan selittää sillä, jos pilkkoutumisreaktio tapahtuu dianionisen fosforaanin kautta, niin metalli-ioni ei pysty stabiloimaan fosforaania tarpeeksi, jotta pseudorotaatio tapahtuisi.¹⁶ **15a** on siten ensimmäinen esimerkki metallipohjaisesta systeemistä, joka stabiloii fosforaania tarpeeksi, jotta isomerisaatio on mahdollista.¹⁶ Aikaisemman tutkimuksen pohjalta Korhosen työryhmän tutkimus kertoo siis katalyytti-substraatin ominaisuuksista.¹⁶ Kineettiset tutkimukset osoittivat, että sinkkiligandikompleksi **15a** on tehokas katalyytti HPNP ja UpU substraateille.

Mononukleaarilla sinkkikompleksilla **16a** on kaksi aminopyridiini substituenttia, jotka voivat luovuttaa vetysidoksen, ja jotka uudelleenjärjestäytyvät koordinoituessaan Zn²⁺-ioniin. Dinukleaarisen sinkkikompleksin **15b** rakenne taas mahdollistaa kahden Zn²⁺-ionin olevan vuorovaikutuksessa substraatin kanssa samanaikaisesti.³⁵ Vertailtaessa 2. kertaluvun reaktioita pH:ssa 7,4 huomataan, että molemmat katalyytit **16a** ja **15b** ovat tehokkaita katalyyttejä ja ne pilkkovat HPNP-yhdisteen lähes 200-kertaa tehokkaammin kuin **16b**. Silmiinpistävää kuitenkin on, että monometallisen kompleksin maksimaalinen reaktiivisuus on pääosin samansuuruinen kuin sen dimetallisella vastineella.³⁵



Kuva 6. Tutkimuksissa käytetty sinkkikatalyytti.

Taulukkoon 3 on koottu mono- ja bimetallisten sinkkikompleksien pseudo 1. kertaluvun nopeusvakioita fosfoestereiden pilkkoutumisreaktioissa.

Taulukko 3. Pseudo 1.kertaluvun reaktioiden nopeusvakioita (s⁻¹) fosfoestereiden transesterifikaatioreaktioille, joissa katalyyttinä mono- tai bimetallinen sinkkikompleksi (1 mmol L⁻¹).

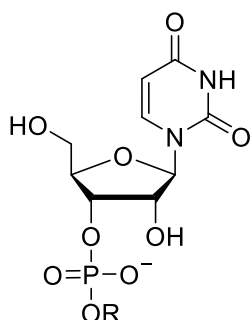
| Katalyytti, olosuhteet | substraatti | <i>k</i> _{obs} /s ⁻¹ |
|--|--------------------|--|
| 15b ; 2,5 mmol l ⁻¹ , pH 7,0; 50 °C ^a | BNPP (2a) | 3,3 x 10 ⁻⁶ |
| 15b ; 1 mmol l ⁻¹ , pH 7,4; 25 °C ^b | HPNP (1) | 6,6 x 10 ⁻⁵ |
| 15a ; 0,2 mmol l ⁻¹ , pH 7,4; 25 °C ^c | HPNP (1) | 0,017 |
| 15a ; 1 mmol l ⁻¹ , pH 6,5; 25 °C ^d | UpU (3) | 26 x 10 ⁻⁶ |
| 16a ; 1 mmol l ⁻¹ , pH 7,4; 25 °C ^b | HPNP (1) | 4,6 x 10 ⁻⁴ |
| 16b ; 1 mmol l ⁻¹ , pH 7,4; 25 °C ^b | HPNP (1) | 3,0 x 10 ⁻⁷ |
| 5 ; 1 mmol l ⁻¹ , pH 7,0; 25 °C ^e | BNPP (2a) | 9,7 x 10 ⁻⁵ |
| 5 ; 1 mmol l ⁻¹ , pH 7,0; 25 °C ^e | HPNP (1) | 2,8 x 10 ⁻⁴ |
| 13 ; 2 mmol l ⁻¹ , pH 7,6; 25 °C ^f | HPNP (1) | 5,0 x 10 ⁻⁴ |

^a viitteestä 29, ^b laskettu 2. kertaluvun nopeusvakiosta viitteestä 35, ^c viitteestä 5, ^d viitteestä 16, ^e laskettu 2. kertaluvun nopeusvakiosta viitteestä 23, ^f laskettu 2. kertaluvun nopeusvakiosta viitteestä 28.

1.5. Lähtevän ryhmän vaikutus

Korhosen työryhmä¹⁶ halusi tutkia UpU:n pilkkoutumis- ja isomerisaatioreaktioita sinkkikompleksin **15a** katalysoimana, ja kiinnittää erityistä huomiota, miten lähtevän ryhmän *pK_a* vaikuttaa reaktioon. Tutkimusta varten he syntetisoivat sarjan uridiini 3'-alkyylifosfaattidiestereitä (**17a-17f**). Tutkimuksessa oli mukana myös uridiini 3'-fenyylifosfaattidiesteri (**17g**). Taulukkoon 4 on koottu erilaisten

uridiinjohdannaisten pilkkoutumis- ja isomerisaatioreaktion nopeusvakiot katalyytin **15a** (1 mM) kanssa pH:ssa 6,5 ja lämpötilassa 25 °C.¹⁶



- 17a:** R = isopropyyli
b: R = metyyli
c: R = etoksietyyli
d: R = 2,2-difluorietyyli
e: R = 2,2-dikloorietyyli
f: R = 2,2,2-trikloorietyyli
g: R = fenyyli

Kuva 7. Lähtevän ryhmän vaikutuksen tutkimisessa käytetyt yhdisteet. Kuva mukailtu viitteestä 16.

Taulukko 4. Erilaisten substraattien p*K*_a-arvot ja nopeusvakiot pilkkoutumis- (*k*_{cl}) ja isomerisaatio-reaktioissa (*k*_{is}). p*K*_a-arvo kuvaa substraatin lähtevää ryhmää. Taulukko tehty viitteessä 16 esitettyä mukailten.

| substraatti | p <i>K</i> _a | <i>k</i> _{cl} [10 ⁻⁶ s ⁻¹] | <i>k</i> _{is} [10 ⁻⁶ s ⁻¹] |
|-------------|-------------------------|--|--|
| 17a | 17,1 | 0,086±0,006 | 0,28±0,01 |
| 17b | 15,5 | 5,8±0,2 | 2,4±0,1 |
| 17c | 14,82 | 4,4±0,4 | 1,2±0,2 |
| 17d | 13,0 | 450±10 | 30±10 |
| 17e | 12,89 | 380±10 | 40±30 |
| 17f | 12,24 | 5030±60 | - ^a |
| 17g | 9,95 | 23 000±5000 | - ^b |

^a Vaikka isomerisaatiota pystyttiin seuraamaan, ei pystytty määrittämään nopeusvakiota.

^b ei havaittu isomerisaatiota.

Kuten taulukosta **4** havaitaan kompleksi **15a** katalysoi alkyylifosfaattien isomerisaatiota heikommin kuin pilkkoutumisreaktiota.¹⁶ Substraatti, jolla on korkein lähtevän ryhmän p*K*_a-arvo (**17a**) on kuitenkin poikkeus. Tutkimuksissa todettiin, että

pilkkoutumisreaktion logaritminen nopeusvakio ei riipu lineaarisesti lähtevän ryhmän pK_a -arvosta. Tämä selitetään sillä, että nopeutta rajoittava vaihe muuttuu. Todettiin myös, että isomerisaatiossa reaktion nopeus ei ole niin riippuvainen esterifioidun alkoholin happamuudesta, kuin pilkkoutumisreaktiossa. Siitä syystä isomerisaation osuus laski kun lähtevän ryhmän pK_a pieneni.¹⁶

Nukleosidi fosfodiesterin pilkkoutumisessa lähtevän ryhmän happamuus vaikuttaa vain vähän happokatalyyttisen reaktion nopeuteen.³⁸ Nukleosidi 3'-aryylifosfaattien pilkkoutumiselle on esitetty β_{lg} arvo -0,27, kun taas nukleosidi 3'-alkyylifosfaateilla se on vielä vähemmän negatiivinen. Happamissa olosuhteissa lähtevänä ryhmänä toimii alkoholi, ja epäherkkyys on selitetty sillä, että elektronegatiivinen ryhmä kiihdyttää nukleofiilista hyökkäystä fosfaatin 2'-OH ryhmään, kun samaan aikaan lähtevän ryhmän hapen protonaatio on hidastunut, koska pK_a on alhaisempi.³⁶ On havaittu myös, että katalyysitehokkuus kasvoi alkyylistereillä, mitä suurempi lähtevän ryhmän pK_a -arvo on, kun taas aryylistereillä tilanne on päinvastainen.¹¹ Aryylioksiryhmä on vähemmän emäksinen kuin alkyyliryhmä, joka tekee siitä paremman lähtevän ryhmän.¹¹

Emäksen katalysoimassa nukleosidi 3'-fosfodiesterin pilkkoutumisessa lähtevänä ryhmänä toimii alkoksianioni. Yleisesti ottaen emäksen katalysoimassa pilkkoutumisessa suhteellisen pieni β_{lg} arvo kertoo siitä, että substraatilla on hyvä arylioksinen lähtevä ryhmä, kun taas substraateilla, joilla on huono lähtevä ryhmä, on erittäin negatiivinen β_{lg} arvo.³⁶ Taulukkoon 5 on koottu β_{lg} -arvoja fosfodiesterien intramolekulaariselle transesterifikaatioreaktiolle, joissa katalyyttinä on ollut metalli-ioni tai niiden kompleksi.

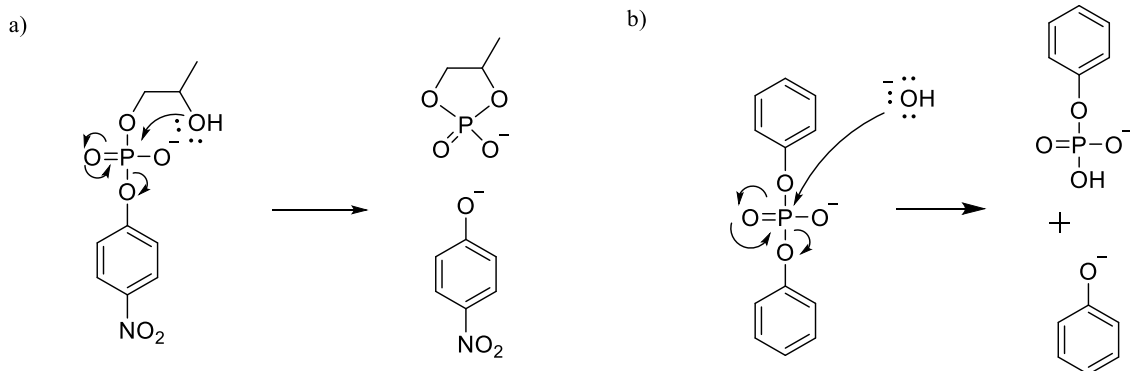
Taulukko 5. Erilaisten substraattien β_{lg} -arvoja erilaisissa olosuhteissa. Taulukko tehty viitteessä 36 esitettyä mukaillen.

| substraatti | katalyytti/olosuhteet | β_{lg} | viite |
|----------------------|---|--------------|-------|
| 3'-UMP alkyyliesteri | 10 mM Zn(NO ₃) ₂ , pH 5,6, 90 °C | -0,32±0,04 | 11 |
| 3'-UMP aryyliesteri | 10 mM Zn(NO ₃) ₂ , pH 5,9; 25 °C | -0,9±0,2 | 11 |
| 3'-UMP alkyyliesteri | 1 mM 15a | -0,92±0,07 | 16 |

1.6. Projektin tarkoitus

Projektin tarkoituksena oli tutkia biologisten fosfaattien pysyvyyttä erilaisten RNA-malliyhdisteiden ja metalli-ionikatalyyttien avulla. Fosfodiesterien metalli-ionikatalyyttisessä pilkkoutumisessa kiinnitetään erityistä huomiota siihen, miten nukleofiilin ja lähtevän ryhmän ominaisuudet vaikuttavat reaktion nopeuteen. Tässä työssä keskitytään tutkimaan erityisesti nukleofiilin vaikutuksia, koska lähtevän ryhmän vaikutusta on tarkasteltu aikaisemmissa tutkimuksissa⁷ ja nukleofiilin vaikutuksesta ei tiedettävästi ole aikaisempaa tutkimusta. Reaktioiden nopeutta tutkitaan kineettisillä mittauksilla HPLC-laitteen avulla.

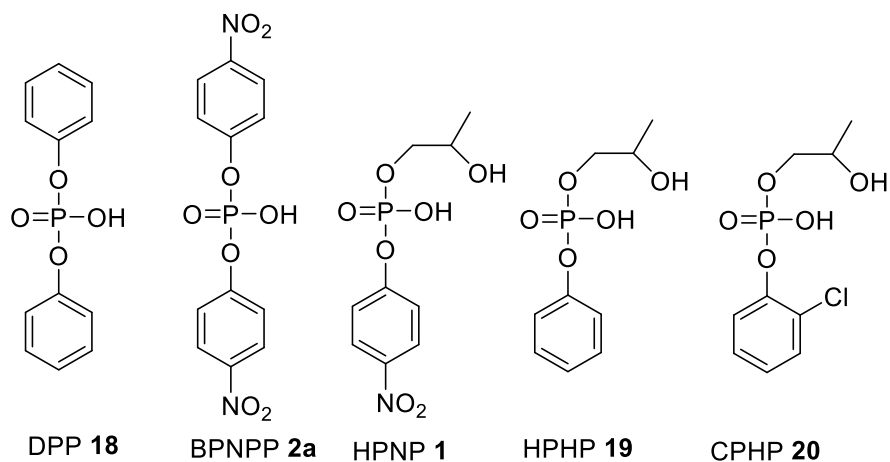
Tutkimissani lähtöaineissa on intra- ja intermolekulaarisia nukleofiilejä. DPP:n ja BPNPP:n reagoissa nukleofiili on molekyylin ulkopuolinen eli intermolekulaarinen, kun taas yhdisteissä HPNP, HPHP ja CPHP on molekyylin sisäinen eli intramolekulaarinen nukleofiili. Reaktioiden lähtevällä ryhmällä tarkoitetaan yhdistettä, joka irtoaa fosfaattiryhmästä. Kaaviossa 5a lähtevä ryhmä on *p*-nitrofenoli ja kaaviossa 5b se on fenoli.



Kaavio 5. a) intramolekulaarinen nukleofiili b) intermolekulaarinen nukleofiili.

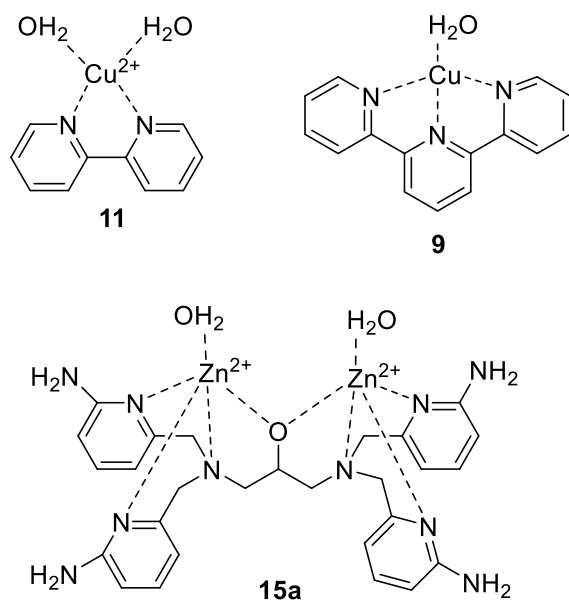
2. Kokeellinen osa

2.1. Yleiset kokeelliset menetelmät



Kuva 8. Projektissa käytetyt lähtöaineet.

Projektissa käytettiin lähtöaineita **18** ja **2a**, jotka olivat kaupallisesti saatavilla. Yhdiste **1** oli syntetisoitu aikaisemmissa tutkimuksissa. Yhdiste **19** syntetisoitiin kohdan 2.3. mukaan ja yhdiste **20** kohdan 2.4 mukaan. Käytetyt lähtöaineet on esitetty kuvassa 8 ja käytetyt metallikatalyytit kuvassa 9. Lähtöaineiden konsentraatio reaktioissa 0,2 mM.



Kuva 9. Projektissa käytetyt metallikatalyytit.

Reaktiot suoritettiin lasiputkissa lämpötiloissa 25 °C ja 90 °C, ja lämpötilaa kontrolloitiin termostoidulla vesihauteella. Reaktioliuosten pH säädettiin happo-, emästäi puskuriliuoksella. Reaktioista otettiin näytteitä sopivilla aikaväleillä yleensä vähintään yhden puoliintumisajan verran ja näytteet siirrettiin jäähauteeseen, kunnes ne analysoitiin HPLC:llä. Reaktioiden pysäyttämiseksi näytteisiin lisättiin 0,1 M EDTA:ta tai 1 M etikkahappoa. EDTA:ta käytettiin kupari- ja sinkkireaktioliuoksen näytteisiin, ja etikkahappoa käytettiin neutraloimaan NaOH-reaktioiden näytteet.

Reaktio seurannassa käytettiin Agilent 1100-nestekromatografialaitteistoa. Yhdisteet detektoitiin diodirividetektorilla. Mittausaallonpituutena käytettiin 260 nm (HPHP), 262 nm (BPNPP ja DPP) ja 270 nm (HPNP, CPHP). Kolonnina käytettiin Thermo Scientificin C18 150 x 4 mm 5 μ kolonnia ja eluentteina etikkahappopuskurin ja asetonitriilin seoksia. Gradienttiolosuhteet eri lähtöaineiden analyysissä on esitetty taulukoissa 6–10.

Taulukko 6. HPNP:n gradienttiolosuhteet reaktioissa.

| aika | MeCN | AcOH-puskuri |
|--------|------|--------------|
| 0 min | 5 % | 95 % |
| 3 min | 30 % | 70 % |
| 10 min | 30 % | 70 % |

Taulukko 7. BPNPP:n gradienttiolosuhteet reaktioissa.

| aika | MeCN | AcOH-puskuri |
|--------|------|--------------|
| 0 min | 15 % | 85 % |
| 10 min | 60 % | 40 % |
| 15 min | 75 % | 25 % |
| 20 min | 15 % | 85 % |

Taulukko 8. DPP:n gradienttiolosuhteet reaktioissa.

| aika | MeCN | AcOH-puskuri |
|--------|------|--------------|
| 0 min | 15 % | 85 % |
| 10 min | 35 % | 65 % |
| 20 min | 35 % | 65 % |

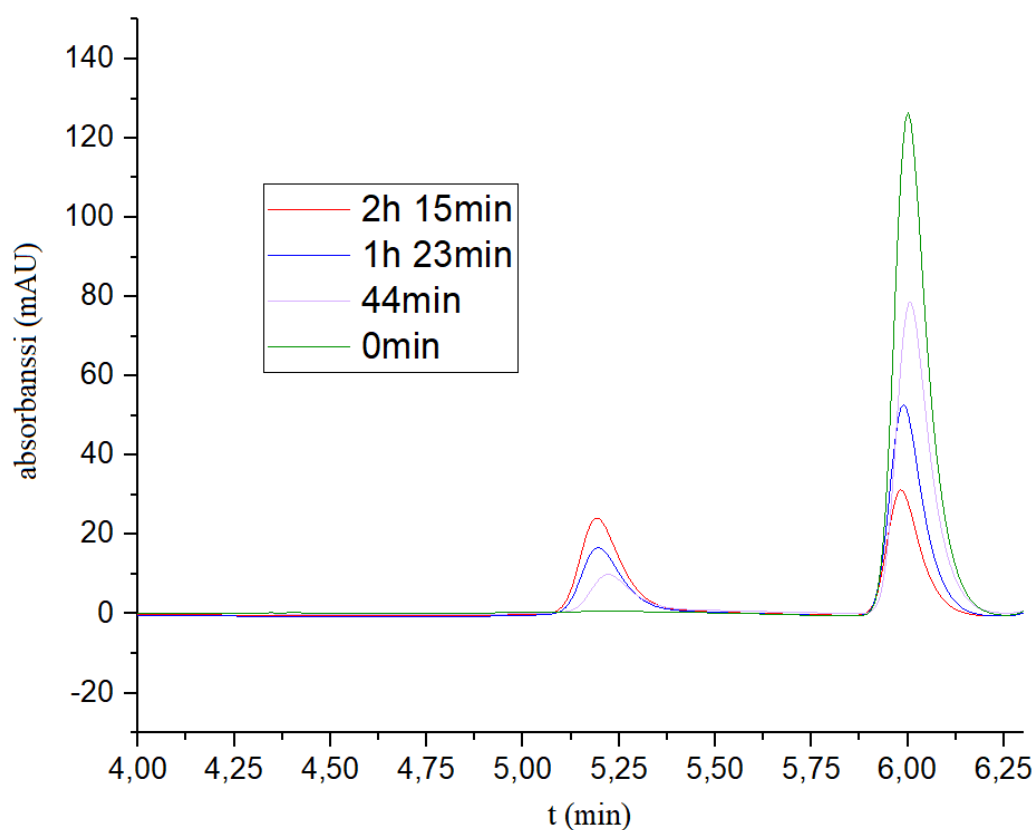
Taulukko 9. CPHP:n gradienttiolosuhteet kinetiikkareaktioissa.

| aika | MeCN | AcOH-puskuri |
|----------|------|--------------|
| 0 min | 8 % | 92 % |
| 2,5 min | 8 % | 92 % |
| 12,5 min | 20 % | 80 % |
| 15 min | 30 % | 70 % |
| 20 min | 8 % | 92 % |

Taulukko 10. HPHP:n gradienttiolosuhteet kinetiikkareaktioissa.

| aika | MeCN | AcOH-puskuri |
|--------|------|--------------|
| 0 min | 5 % | 95 % |
| 10 min | 5 % | 95 % |
| 15 min | 30 % | 70 % |
| 20 min | 5 % | 95 % |

Fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisen nopeusvakio laskettiin seuraamalla substraattipiikin pinta-alan pientymistä ja käyttämällä integroitua nopeuslakia 1. kertaluvun reaktioille. Substraattipiikin pinta-alan pientyminen havainnollistetaan kuvassa 10. Lähtöainepiikki on jälkimmäinen piikki 6 min kohdalla ja tuotepiikki 5,2 min kohdalla. Kuvasta nähdään, miten lähtöainepiikki pienenee ja tuotepiikki kasvaa ajan kuluessa.



Kuva 10. BPNPP ja 5 mM CuBiPy (**11**) reaktion HPLC-kromatogrammit ajanhetkillä 0 min, 44 min, 1 h 23 min ja 2 h 15 min. Mittausaallonpituus: 270 nm. Reaktioolosuhteet: 90 °C; pH 6,7.

HPNP:n reaktio seuranta 0,1 M NaOH-liuoksessa sekä 2 mM **15a** liuoksessa (pH 6.5) suoritettiin VWR UV-1600PC spektrofotometrillä. Spektrofotometrissä käytettiin aallonpituutta 403 nm. HPNP:n pilkkoutuessa emäksisissä olosuhteissa muodostuu 4-nitrofenolaattianioni, joka absorboi voimakkaasti valoa (Kaavio 4). Spektrofotometrillä tehtyjen mittausten nopeusvakiot laskettiin esittämällä $\ln(A_\infty - A_t)$ graafisesti ajan funktiona. A_∞ kuvaa 4-nitrofenolaattianionin UV-absorptiomaksimia aallonpituudessa 403 nm.

Synteesien reagenssit kuivattiin eksikkaattorissa fosforipentoksidilla. Synteesituotteiden NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz Avance III NMR-spektrometrillä. Massaspektrit mitattiin Agilent Infinity ES-API HPLC/MS kvadrupolimassaspektrometrillä.

2.2. Reaktioliuokset

Reaktioliuosten pH säädettiin MOPSO-puskurilla (pK_a 6,9). Ionivahvuus säädettiin arvoon 0,1 M NaNO_3 :lla. CuBiPy ja CuTerPy lisättiin liuoksiin 50 mM kantaliuoksena. Kantaliuokset valmistettiin lisäämällä kuparinitraatin joukkoon noin puolet vettä itse astian tilavuudesta. Reaktioliuos siirrettiin mittapulloon lämpöhauteeseen ja bipyridiini tai terpyridiini lisättiin vähitellen kuparinitraattiliuokseen. MOPSO- ja kuparireaktioliuosten koostumukset on esitetty taulukossa 11.

Taulukko 11. Reaktioliuosten koostumukset.

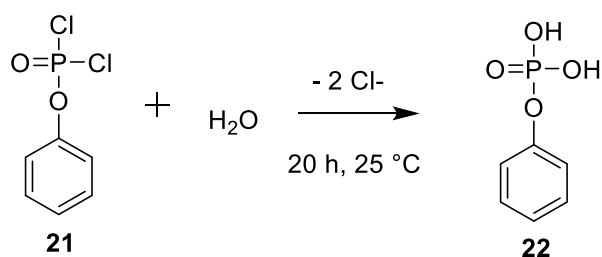
| Reaktioliuos: | MOPSO | NaOH | NaNO ₃ |
|---------------|-------|-------|-------------------|
| MOPSO | 50 mM | 40 mM | 60 mM |
| 10 mM CuBiPy | 50 mM | 40 mM | 50 mM |
| 5 mM CuBiPy | 50 mM | 40 mM | 45 mM |
| 10 mM CuTerPy | 50 mM | 40 mM | 20 mM |
| 5 mM CuTerPy | 50 mM | 40 mM | 45 mM |

2 mM **15a** reaktioliuos valmistettiin sekoittamalla 5,2 mg ligandia **29**, 200 μl 0,1 M Zn^{2+} -liuosta, 5 ml 0,1 M MOPSO-liuosta ja 3 ml vettä. Liuosta sekoitettiin, kunnes ligandi oli kokonaan liuennut. Liuoksen pH säädettiin arvoon 6,5 2 M NaOH-liuoksella. Sen jälkeen lisättiin loppu vesi niin, että liuoksen kokonaistilavuudeksi saatiin 10 ml. Sinkkikompleksista muodostui kirkas geelimäinen liuos.

2.3. HPHP:n synteesi

2.3.1. Hydrolyysireaktio

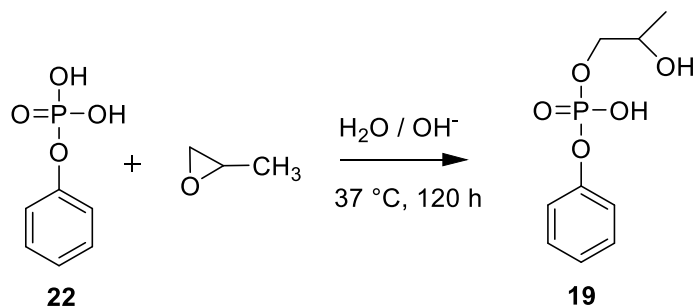
Fenyylidikloorifosfaatti (**21**) (5 g; 3,53 ml; 23,6 mmol) siirrettiin keittopulloon ja keittopullo jäähdytettiin 10 °C:een. Keittopulloon lisättiin 100 ml vettä ja liuosta sekoitettiin magneettisekoittajan avulla 30 minuuttia. Reaktioseoksen annettiin lämmitä huoneenlämpöön ja se jätettiin sekoittumaan yön yli. Reaktioliuos otettiin pois sekoituksesta 20 h jälkeen ja haihdutettiin alipaineessa 50 °C:ssa. Haihdutusjäännökseen lisättiin toluenia (2x25 ml) ja se haihdutettiin pois. Haihdutusjäännös pestiin n-heksaanilla (2x25 ml) ja se jätettiin vakuumiyksikköön kuivumaan. Fenyylifosfaatista (**22**) (4,05 g, 98 %) mitattiin ^{31}P NMR-spektri ja siinä havaittiin fosfaattiryhmän siirtymä -4,3 ppm kohdalla (Liite 1).



Kaavio 6. Fenyylidikloorifosfaatin hydrolyysireaktio.

2.3.2. Reaktio epoksipropaanin kanssa

Fenyylifosfaatista (**22**) osa (0,8005 g; 4,5 mmol) liuotettiin 5 ml:aan vettä. Liuoksen pH säädettiin väkevällä ammoniakkiliuoksella emäksiseksi (pH 8). Puolet liuksesta siirrettiin keittopulloon ja sinne lisättiin 1,2-epoksipropaania (7 ml; 100 mmol). Reaktioliuosta sekoitettiin magneettisekoittajalla 37°C :ssa ja reaktion etenemistä seurattiin RP-HPLC:n avulla. Reaktio pysäytettiin 120 h kuluttua haihduttamalla liuos alipaineessa. Haihdutusjäännöksenä saatiin geelimäinen tuote, joka tarkistettiin LC-MS:n avulla. Tuote liuotettiin pieneen määrään vettä (1,5 ml) ja eluoiitiin Amberlite IR-120 H^+ -ioninvaihtohartsin läpi. Eluoinnista kerättiin fraktioita koeputkiin ja ne tarkistettiin RP-HPLC:llä. Fraktioista puhtain otettiin talteen, tehtiin neutraaliksi väkevällä ammoniakkiliuoksella ja haihdutettiin pienempään tilavuuteen. Fraktio eluoiitiin uudestaan ioninvaihtohartsin läpi. Eluoinnista kerättiin talteen kaksi puhtainta fraktiota, ne yhdistettiin ja niiden pH säädettiin neutraaliksi $\text{Ba}(\text{OH})_2$:lla. Liuos jaettiin falcon-putkiin ja ne kylmäkuivattiin yön yli. Lopputuote 2-hydroksyylipropyyli fenyylifosfaatti (**19**) (0,5 g; 52 %) karakterisoitiin ^1H NMR-, ^{13}C NMR- ja ^{31}P NMR-spektroskopisesti (Liite 2,3 ja 4). Fosforispektrin perusteella lopputuote näytti koostuvan kahdesta isomeerista.



Kaavio 7. Reaktio epoksipropaanin kanssa.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta_{\text{H}} = 7,35\text{--}7,32$ (2H, t, *o*-H4, $J = 7,95;7,85$ Hz); $7,15\text{--}7,14$ (3H, t, *m*-H5, *p*-H5, $J = 4,25;3,9$ Hz); $3,96\text{--}3,84$ (2H, m, H1); $3,76\text{--}3,72$ (1H, m, H2); $1,11\text{--}1,06$ (3H, m, H3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta_{\text{C}} = 151,7$ (C4); $129,7$ (*m*-C6); $124,3$ (*p*-C7); $120,2$ (*o*-C5); $70,8$ (C1); $66,7$ (C2); $17,6$ (C3)

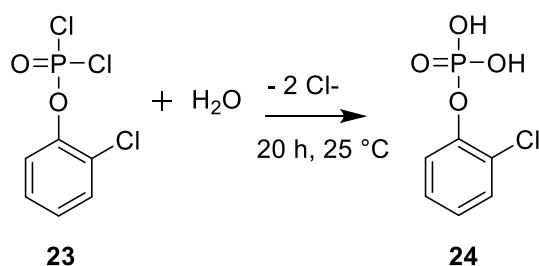
$^{31}\text{P-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta_{\text{P}} = -3,8$ (P-O₄H)

LC-MS (ESI): m/z 231,1 (havaittu) $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 232,17 (laskettu)

2.4. CPHP:n synteesi

2.4.1. Hydrolyysireaktio

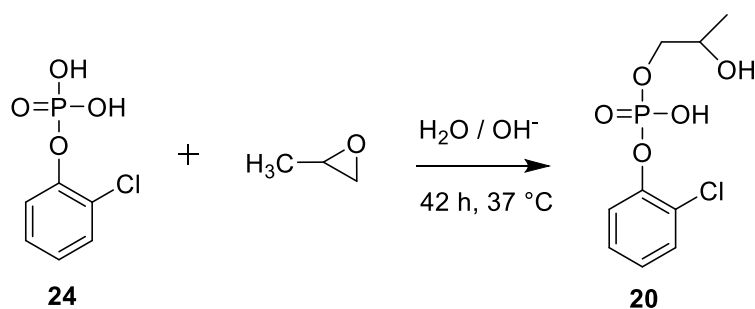
2-kloorifenyylifosforodiklorinaatti (**23**) (5 g; 3,35 ml; 20,3 mmol) siirrettiin keittopulloon ja keittopullo jäädytettiin 10 °C:een. Keittopulloon lisättiin 100 ml vettä ja reaktioliuosta sekoitettiin magneettisekoittajalla 30 minuuttia. Reaktioliuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön ja se jätettiin sekoittumaan yön yli. Reaktioliuos otettiin pois sekoituksesta 20 h jälkeen ja se haihdutettiin alipaineessa 50 °C:ssa. Haihdutusjäännökseen lisättiin tolueenia (2x25 ml) ja se haihdutettiin. Haihdutusjäännös pestiin *n*-heksaanilla (2x25 ml) ja se jätettiin vakuumieksikkaattoriin kuivumaan. 2-kloorifenyylifosfaatti (**24**) karakterisoitiin ^{31}P NMR-spektroskopisesti ja siinä havaittiin fosfaattiryhmän siirtymä -4,4 ppm kohdalla (Liite 5). Spektrissä näkyi pieniä epäpuhtauksia, mutta synteessissä jatkettiin eteenpäin puhdistamattomalla välituotteella.



Kaavio 8. 2-kloorifenyylifosforodikloridaatin hydrolyysireaktio.

2.4.2. Reaktio epoksipropaanin kanssa

2-kloorifenyylifosfaatista (**24**) osa (0,8023 g; 3,84 mmol) liuotettiin 5 ml:aan vettä. Liuoksen pH säädettiin väkevällä ammoniakkiliuoksella emäksiseksi (pH 8). Liuos siirrettiin keittopulloon, lisättiin 1,2-epoksipropaania (10 ml; 142,9 mmol) ja liuos jätettiin sekoittumaan magneettisekoitukseen 37 °C:een. Reaktiota seurattiin NMR:n avulla ja havaittiin, että alle kahden vuorokauden jälkeen lähtöainetta ei ollut enää reaktioliuoksessa jäljellä. Reaktio pysäytettiin 42 h jälkeen haihduttamalla liuos alipaineessa 55 °C:ssa. Haihdutusjäännöksenä jäi geelimäinen tuote. Haihdutusjäännös liuotettiin pieneen määrään vettä (~1,5 ml) ja se eluoiitiin Amberlite IR-20 H⁺ ioninvaihtohartsin läpi. Eluoinnista kerättiin fraktioita koeputkiin ja niiden puhtaus tarkistettiin RP-HPLC:n avulla. Päätettiin yhdistää kaksi puhtainta fraktiota, ja liuos tehtiin neutraaliksi väkevän ammoniakkiliuoksen avulla. Fraktiot haihdutettiin pienempään tilavuuteen öljypumpun avulla ja eluointi tehtiin uudelleen ioninvaihtohartsin läpi. Kerättiin uudelleen fraktioita koeputkiin ja tarkistettiin niiden puhtaus RP-HPLC:n avulla. Kaksi puhtainta fraktiota yhdistettiin ja neutraloitiin Ba(OH)₂:lla. Liuos jaettiin falcon-putkiin ja vietiin kylmäkuivuriin yöksi. Lopputuotetta puhdistettiin semipreparatiivisellä HPLC:llä pieniä määriä kinetiikkamittauksia varten. 2-kloorifenyylidi(2-hydroksyylipropyyli)fosfaatti (**20**) (0,83 g; 78,2 %) karakterisoitiin ¹H NMR-, ¹³C NMR- ja ³¹P NMR-spektroskopisesti (Liite 6,7 ja 8).



Kaavio 9. Reaktio epoksipropaanin kanssa.

¹H-NRM (500 MHz, D₂O): $\delta_H = 7,22\text{--}7,23$ (1H, d, H8, $J = 8,05$ Hz); $7,10\text{--}7,11$ (1H, td, H6, $J = 1,3; 2,55; 8,2$ Hz); $7,03\text{--}7,06$ (1H, dt, H5, $J = 1,55; 7,5; 15,6$ Hz); $6,87\text{--}6,90$ (1H, t, H7, $J = 7,8; 15,2$ Hz); $3,68\text{--}3,77$ (2H, m, H1); $3,56\text{--}3,61$ (1H, m, H2); 1,64 (1H, s); $0,88\text{--}0,90$ (3H, d, $J = 6,45$ Hz);

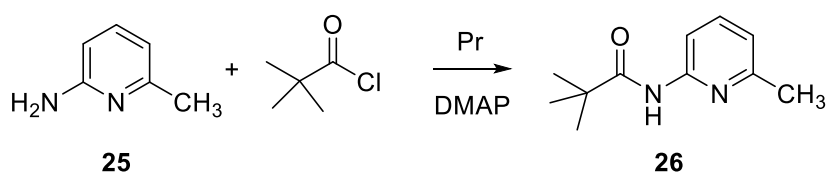
¹³C-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta_C = 147,6$ (C4); 130,3 (C9); 128,1 (C8); 125,2 (C6); 71,0 (C5,C7); 67,9 (C1); 66,5 (C2); 17,6 (C3)

^{31}P -NMR (500 MHz, D_2O): $\delta_{\text{P}} = -4,1$ (P-O₄H)

LC-MS (ES-API): m/z 267,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (havaittu) m/z 267,01 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (laskettu)

2.5. Sinkkiligandin synteesi

Keittopulloon lisättiin 2-amino-6-metyyliipyridiiniä (**25**) (5 g; 0,046 mol), pivaloyylikloridia (6,3 g; 6,43 ml; 0,052 mol), 50 ml kuivaa pyridiiniä ja 51,9 mg 4-dimetyyliaminopyridiiniä (DMAP). Reaktioon annettiin edetä yön yli huoneenlämmössä. Seuraavana päivänä reaktion eteneminen tarkastettiin TLC:llä, jossa käytettiin ajoliuoksena 95 % CH_2Cl_2 ja 5 % MeOH. Todettiin, että reaktio oli riittävästi edennyt, joten voitiin jatkaa synteesissä eteenpäin. Lisättiin 10 ml MeOH reaktion pysäyttämiseksi ja jatkettiin sekoitusta huoneenlämmössä 15 min. Liuos haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttajalla alipaineessa. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (95 % CH_2Cl_2 , 5 % MeOH). 2-pivaloyyliamidi-6-metyyliipyridiini (**26**) (7,63 g; 85,93 %) kuivattiin eksikkaattorissa alipaineessa ja karakterisoitiin ^1H NMR- ja ^{13}C NMR-spektroskopisesti (liite 9 ja 10). Tuote näytti olevan oikeaa, joten jatkettiin seuraavaan synteesivaiheeseen.



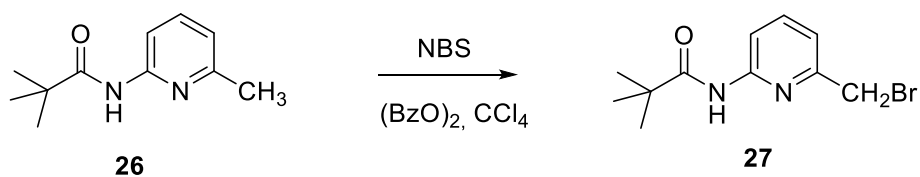
Kaavio 10. Sinkkiligandireaktion ensimmäinen synteesivaihe.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7,83\text{--}7,84$ (1H, d, H2, $J = 8,3$ Hz); $7,35\text{--}7,38$ (1H, t, H3, $J = 7,8$; $15,75$ Hz); $6,66\text{--}6,67$ (1H, d, H4, $J = 7,5$ Hz); $2,24$ (3H, s, H5); $1,11$ (9H, s, H1)

^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 176,9$ (C3); $156,6$ (C8); $150,9$ (C4); $138,5$ (C6); $119,1$ (C7); $110,6$ (C5); $39,7$ (C2); $27,5$ (C1); $24,0$ (C9)

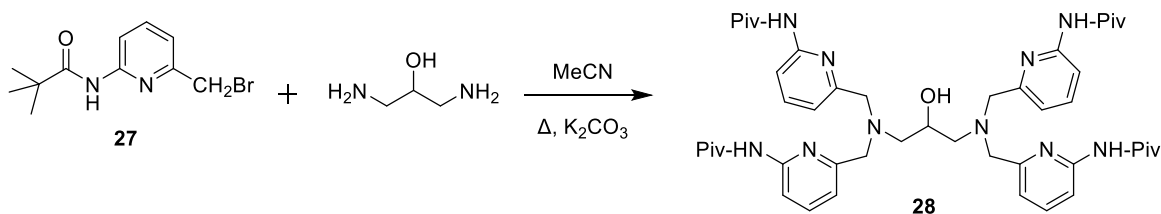
Sinkkiligandireaktion toisessa vaiheessa keittopulloon lisättiin pivaloyylisuojatusta lähtöaineesta (**26**) vain osa (3,50 g; 0,018 mol), N-bromisukkinimidiä (NBS; 3,57 g; 20,06 mol), bentsoyyliperoksidia 20 mg ja kuivaa tetrakloorimetaania 40 ml. Reaktiota refluksoitettiin yön yli ja seuraavana päivänä reaktio todettiin valmiiksi TLC:llä (97 % CH_2Cl_2 , 3 % MeOH). Reaktioliuos suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa.

Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (98 % CH₂Cl₂, 2 % MeOH). 2-pivaloyyliamidi-6-bromimetyylypyridiini (**27**) (0,59 g, 12,15 %) kuivattiin eksikkaattorissa alipaineessa.



Kaavio 11. Sinkkiligandireaktion toinen synteesivaihe.

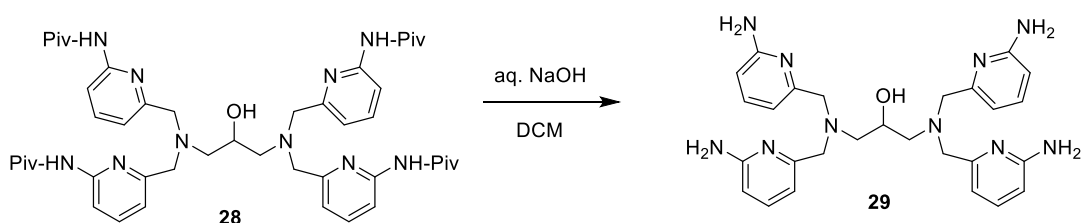
Sinkkiligandireaktion kolmannessa vaiheessa pivaloyylisuojattuun bromituotteeseen (**27**) (0,55 g, 2,06 mmol) lisättiin 1,3-diamino-2-propanolia (0,044 g, 0,49 mmol), kuivaa asetonitriiliä 20 ml ja kaliumkarbonaattia 200,6 mg. Reaktioliuosta refluksottiin yön yli. Seuraavana päivänä tarkistettiin TLC:llä (95 % CH₂Cl₂, 5 % MeOH), että reaktio on mennyt tarpeeksi pitkälle. Reaktio lopetettiin suodattamalla ja haihduttamalla alipaineessa reaktioliuos kuiviin. Lisätin 20 ml vettä ja uutettiin CH₂Cl₂:lla (3x20 ml). TLC:ssä ei näkynyt tuotetta, joten tehtiin uutto vielä toiseen kertaan vedellä ja dikloorimetaanilla. Tuote erottui sen jälkeen TLC:ssä, joten orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:llä ja se jätettiin kuivumaan yön yli. Kuivattu orgaaninen faasi suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa. Haihdutusjäännökseksi jäi keltainen öljymäinen tuote. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (95 % CH₂Cl₂, 5 % MeOH). *N,N,N',N'*-(tetrakis(6-pivaloyyliamidi-2-pyridiinimetyyli)-1,3-diamino)-2-propanoli (0,011 g, 27 %) (**28**) kuivattiin vakuumieksikkaattorissa alipaineessa ja karakterisoitiin ¹H-NMR-spektroskopisesti (liite 11).



Kaavio 12. Sinkkiligandireaktion kolmas synteesivaihe.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ_H = 8,09–8,10 (4H, d, H6, *J* = 8,2 Hz); 8,04 (4H, s, H7); 7,60–7,63 (4H, t, H5, *J* = 7,95; 15,8 Hz); 7,06–7,08 (4H, d, H4, *J* = 7,45 Hz); 3,94–3,98 (1H, m, H1); 3,72–3,82 (8H, k, H3, *J* = 14,75); 2,63–2,66 (2H, dd, H2, *J* = 3,85; 13,3 Hz); 2,57–2,61 (2H, k, H2', *J* = 8,2 Hz); 1,33 (36H, s, H8)

Sinkkiligandireaktion viimeisessä synteisivaiheessa poistettiin suojaryhmät. Suojaryhmälliseen ligandiin (**28**) (0,097 g; 0,11 mmol) lisättiin 30 ml 1 M vetykloridia ja refluksoitii reaktioliuosta yön yli. Reaktioliuoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan ja sitä uutettiin dikloorimetaanilla (3x15 ml). Vesifaasin pH:ksi säädettiin 12 1 M NaOH-liuoksella. Liuos uutettiin dikloorimetaanilla (4x15 ml), orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:llä, suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa. Lopuksi haihdutusjäännös kuivattiin vakuumeiksiikkaattorissa alipaineessa. Lopputuote *N,N,N',N'*-(tetrakis(6-amino-2-pyridiinimetyyli)-1,3-diamino)-2-propanoli (**29**) (47,2 mg; 79 %) oli vaaleankeltainen sakka, joka karakterisoitiin ¹H NMR-spektroskopisesti (liite 12).



Kaavio 13. Sinkkiligandireaktion neljäs synteisivaihe.

¹H-NRM (500 MHz, D₂O): $\delta_H = 7,34\text{--}7,37$ (4H, t, H5, $J = 7,7; 15,25$ Hz); $6,74\text{--}6,76$ (4H, d, H6, $J = 6,65$ Hz); $6,33\text{--}6,34$ (4H, d, H4, $J = 8,1$ Hz); 5,32 (1H, s, H8); 4,40 (8H, s, H7); 3,96 (1H, m, H1); $3,67\text{--}3,75$ (8H, k, H3, $J = 12,25$ Hz); $2,70\text{--}2,72$ (2H, d, H2, $J = 11,65$ Hz); $2,57\text{--}2,61$ (2H, k, H2', $J = 2,7; 7,15$ Hz)

3. Tulokset ja niiden tarkastelu

Lähtöaineiden pilkkoutumisreaktioille laskettiin nopeusvakiot seuraamalla substraattipiikin pinta-alan pientymistä. Muodostettiin ensimmäisen kertaluvun integroidun nopeusyhtälön mukainen suora (Yhtälö 1), jossa x-akselilla on reaktiossa kulunut aika t ja y-akselilla luonnollinen logaritmi substraattipiikin pinta-alasta ($\ln A$). Nopeusvakio on $\ln A$ vs. t suoran kulmakertoimen vastaluku.

$$(1) \ln [\text{lähtöaine}]_t = -kt + \ln [\text{lähtöaine}]_0$$

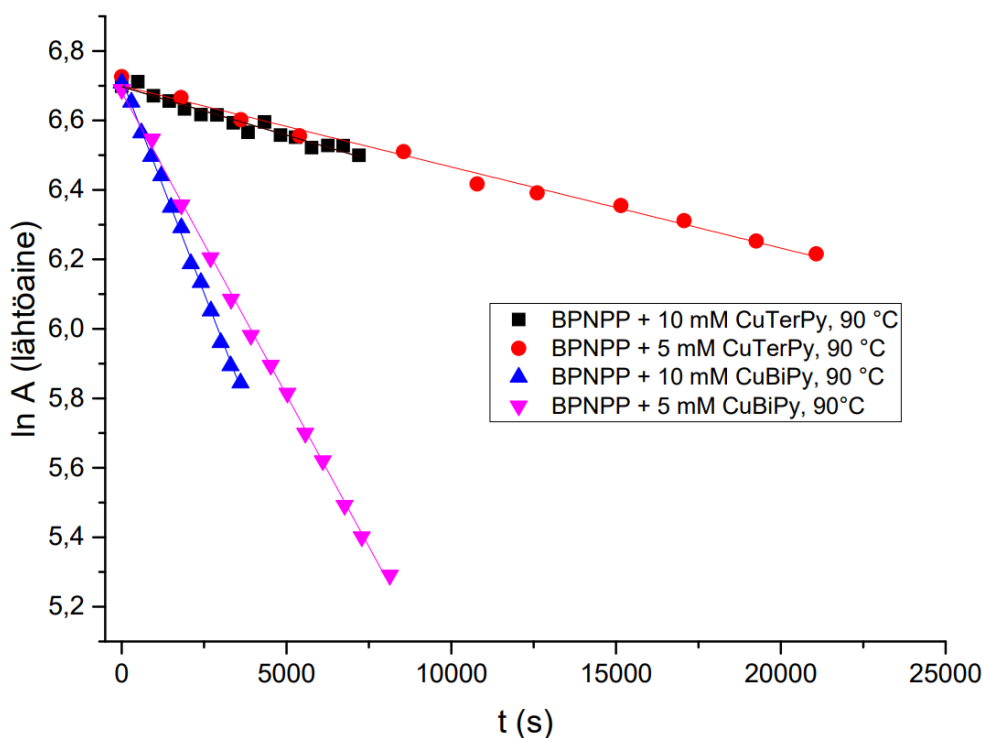
CPHP:n reaktion nopeusvakio 0,1 M NaOH-liuoksessa saatiin suoran luonnollinen logaritmi mooliosuudesta ($\ln x$) vs. t kulmakertoimen vastaluvusta. Mooliosuus x on

$$(2) x = \frac{A}{\Sigma A},$$

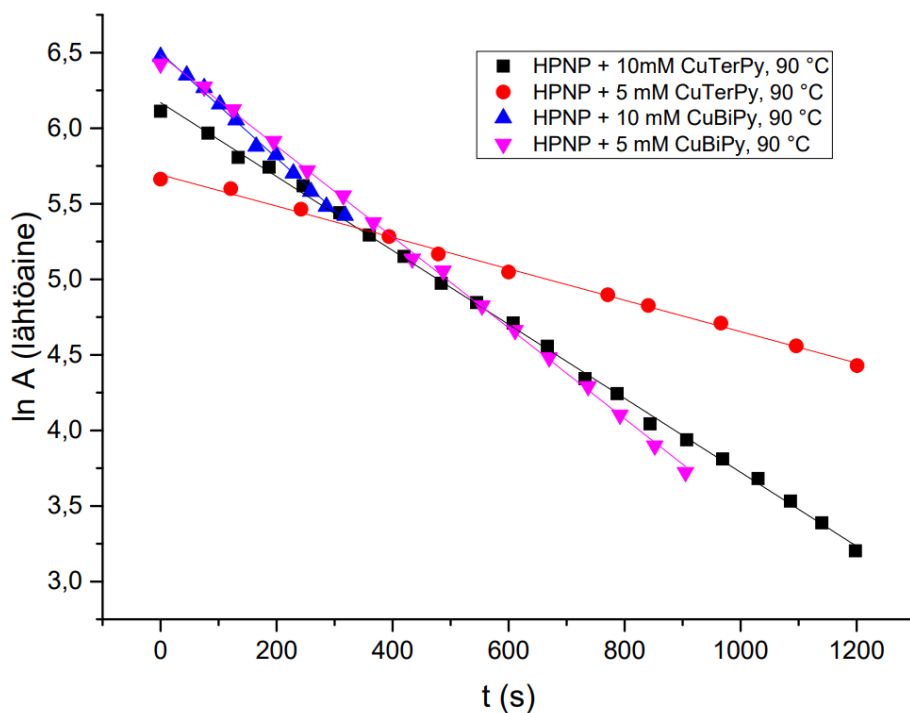
missä A on seurattavan lähtöainepiikin pinta-ala ja ΣA on seurattavan reaktion kaikkien piikkien yhteispinta-ala.

HPNP:n (1) reaktiot 0,1 M NaOH-liuoksessa ja sinkkikompleksin **15a** kanssa suoritettiin UV-spektrofotometrillä. HPNP:n, HPHP:n ja CPHP:n reaktiot 0,1 M NaOH-liuoksessa huoneenlämmössä olivat jo nopeita, joten reaktioita ei yritetty suorittaa 90 °C:ssa, koska niitä olisi ollut vaikea seurata. BPNPP:n (**2a**) reaktio **15a**:n kanssa ei onnistunut, koska näyttäisi siltä, että lähtöaine sitoutuu kompleksin ja sakkautuu reaktiosta. Reaktiot DPP:n (**18**) kanssa eivät onnistuneet, koska lähtöaine sakkaantui reaktioista ulos.

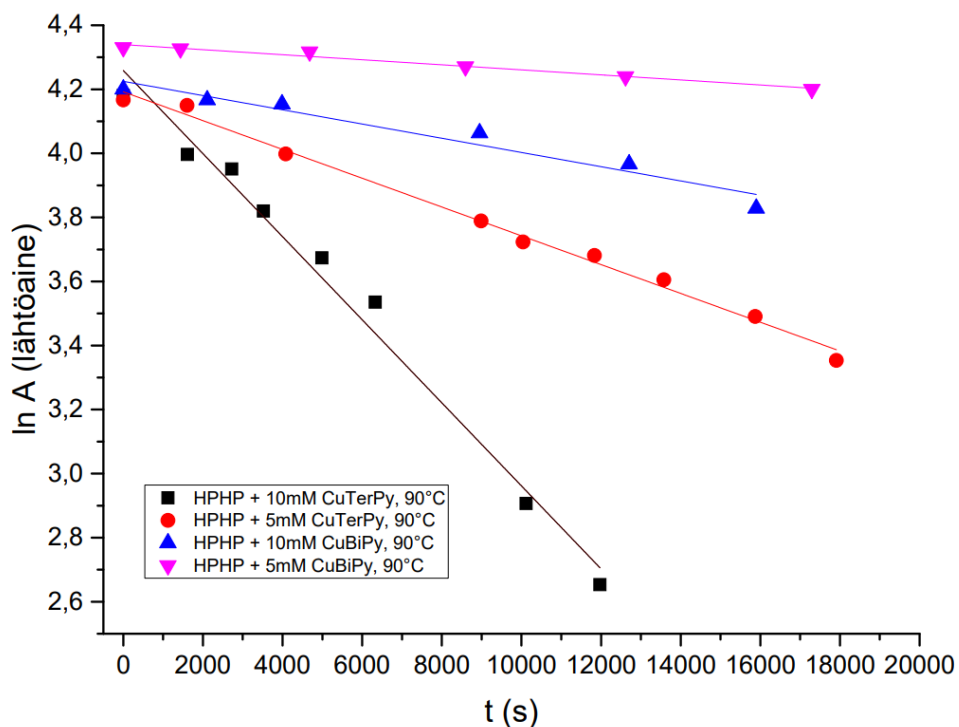
Yhtälön 1 mukaisesti piirretyt kuvaajat kuparikompleksikatalyyttisille reaktioille on esitetty kuvissa 11–14 ja Zn-kompleksin katalysoimille reaktioille kuvissa 15–17. Suorantasoituksella saadut nopeusvakiot on kerätty taulukkoon 12.



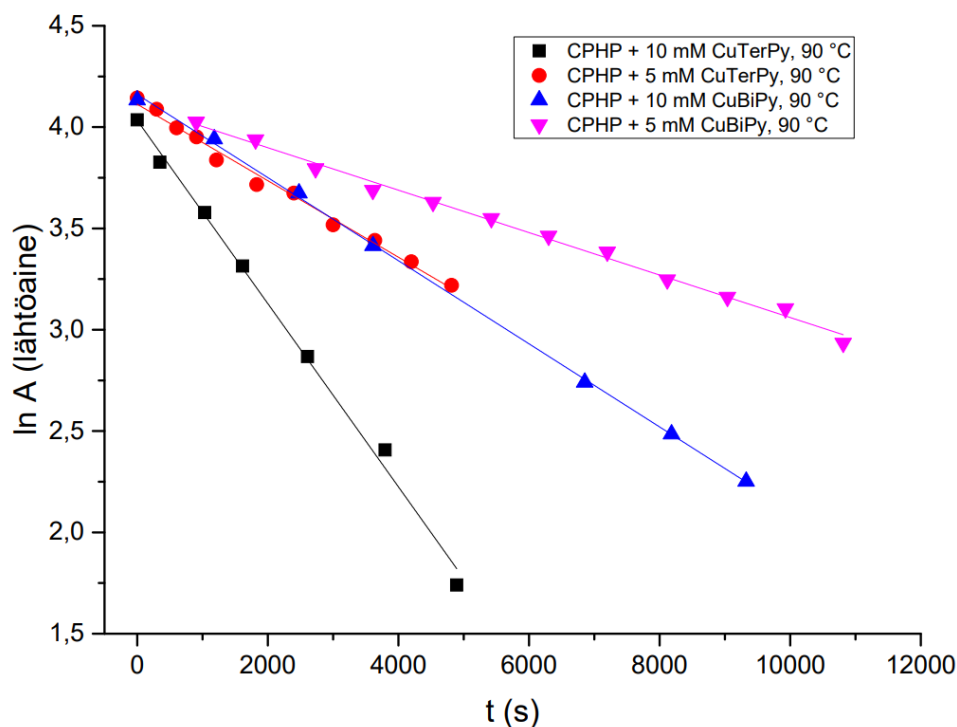
Kuva 11. BPNPP:n (**2a**) reaktio CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoimana pH:ssa 6,7 ja lämpötilassa 90 °C.



Kuva 12. HPNP:n (1) reaktio CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoimana pH:ssa 6,7 ja lämpötilassa 90 °C.



Kuva 13. HPHP:n (19) reaktio CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoimana pH:ssa 6,7 ja lämpötilassa 90 °C.

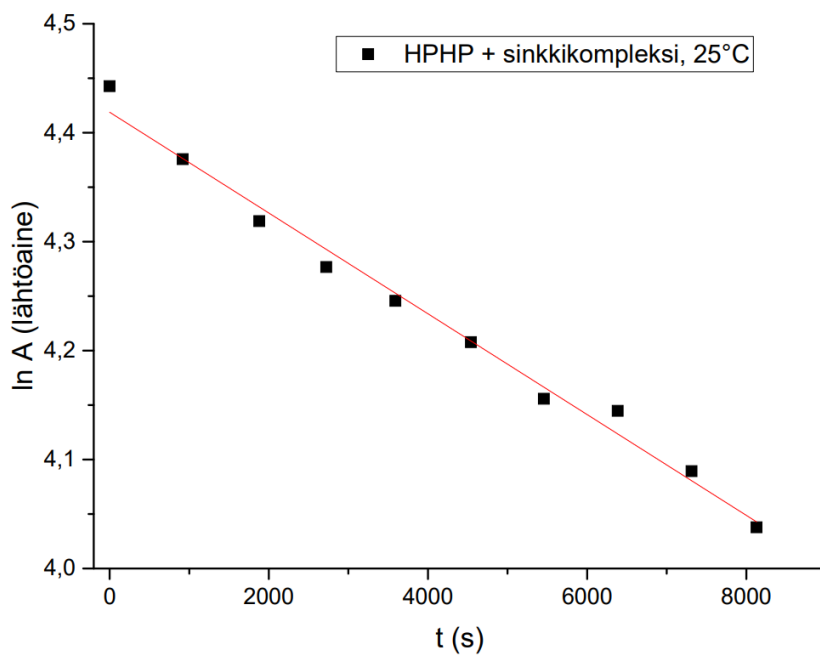


Kuva 14. CPHP:n (20) reaktio CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalysoimana pH:ssa 6,7 ja lämpötilassa 90 °C.

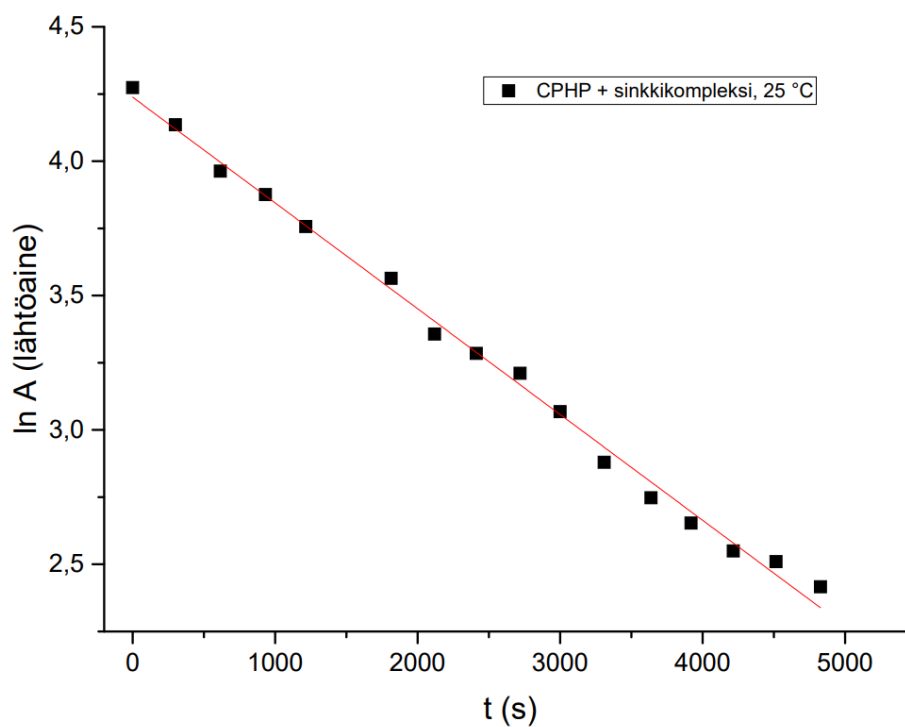
Kuvan 11 ja 12 tuloksia vertaamalla havaitaan, että kuparikompleksien katalyyttitehokkuus laskee järjestyksessä 10 mM CuBiPy > 5 mM CuBiPy > 10 mM CuTerPy > 5 mM CuTerPy. Kuvassa 12 sinisellä merkittyä reaktiota on seurattu lyhemmän aikaa, joten suora jää lyhemmäksi kuin muut. Sen kulmakerroin on kuitenkin jyrkin ja suurin.

Kuvan 13 nopeusvakioita vertaamalla huomataan, että kuparikompleksien katalyyttitehokkuus laskee järjestyksessä 10 mM CuTerPy > 5 mM CuTerPy > 10 mM CuBiPy > 5 mM CuBiPy.

Kuvan 14 nopeusvakioita vertaamalla huomataan, että kuparikompleksien katalyyttitehokkuus CPHP:n pilkkoutumisreaktiossa laskee järjestyksessä 10 mM CuTerPy > 10 mM CuBiPy ~ 5 mM CuTerPy > 5 mM CuBiPy. 10 mM CuBiPy:n ja 5 mM CuTerPy:n reaktioiden nopeusvakiot ovat lähes samat. Näistä kuvista siis yleisesti nähdään, että katalyyttitehokkuus riippuu lähtöaineesta.

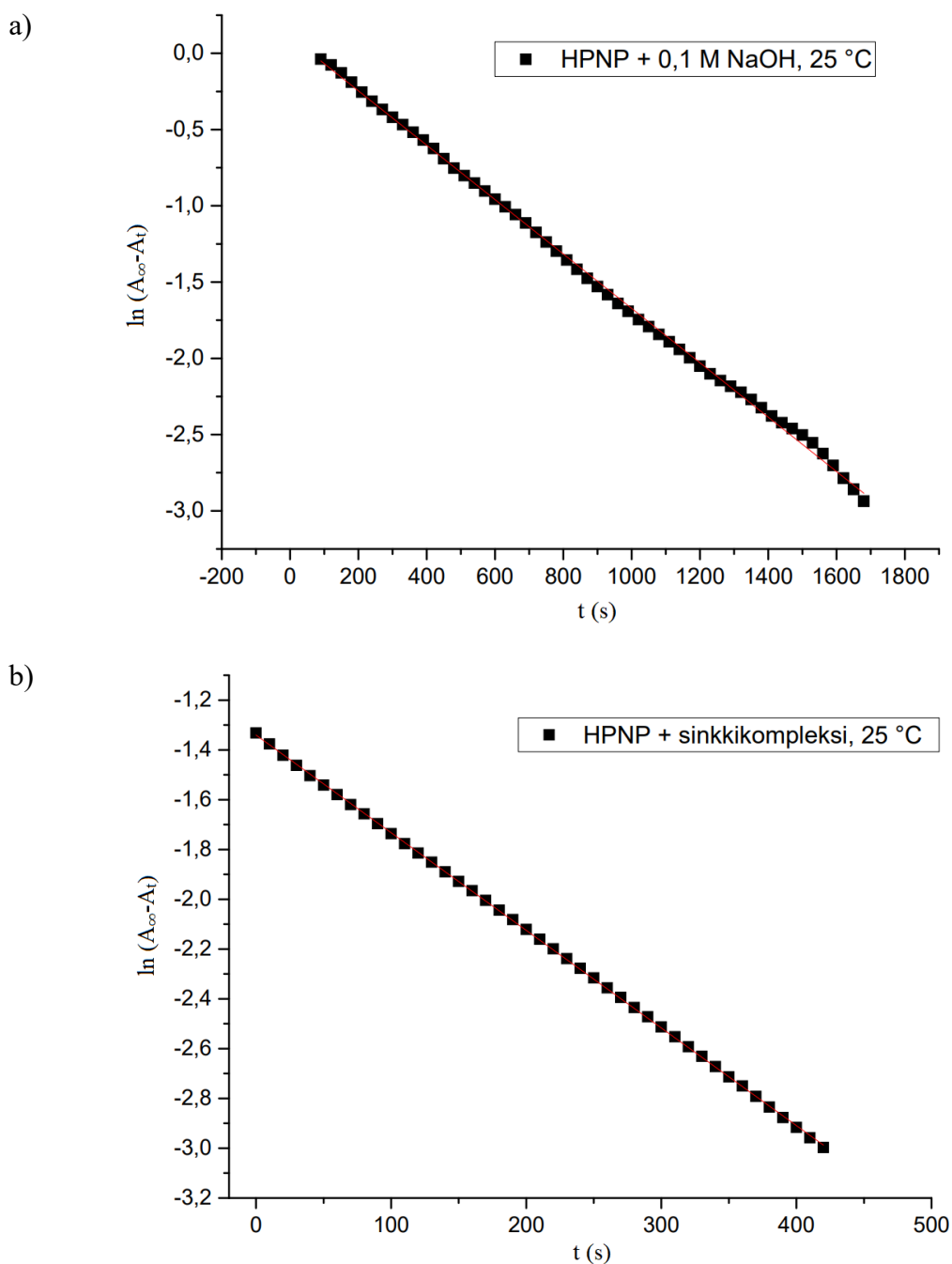


Kuva 15. HPHP:n pilkkoutumisreaktio sinkkikompleksin **15a** katalysoimana pH:ssa 6,5 ja lämpötilassa 25 °C.



Kuva 16. CPHP:n pilkkoutumisreaktio sinkkikompleksin **15a** katalysoimana pH:ssa 6,5 ja lämpötilassa 25 °C.

HPNP:n reaktio 0,1 M NaOH-liuoksessa ja 2 mM sinkkikompleksin **15a** kanssa suoritettiin UV-spektrofotometrillä. Spektrofotometrillä tehtyjen mittausten nopeusvakiot laskettiin esittämällä $\ln(A_\infty - A_t)$ graafisesti ajan t funktiona (Kuva 17). A_∞ kuvaa 4-nitrofenolaattianionin UV-absorptiomaksimia aallonpituudessa 403 nm ja A_t absorptiota ajanhetkellä t .



Kuva 17. HPNP:n UV-spektrofotometrillä tehdyt kinetiikkamittaukset pH:ssa 6,5 ja lämpötilassa 25 °C. a) HPNP:n reaktio 0,1 M NaOH-liuoksen kanssa b) HPNP:n reaktio 2 mM sinkkikompleksin **15a** kanssa.

Verrattaessa kuvia 15 ja 16 havaitaan, että CPHP:n reaktio on nopeampi kuin HPHP:n. Kuvassa 17 havaitaan, että sinkkikompleksi **15a** pilkkoo tehokkaammin HPNP:n fosfodiesterisidoksen kuin NaOH-liuos.

Taulukko 12. Työssä määritetyt nopeusvakiot. Suluissa ilmoitettu katalyyttinen aktiivisuus ($k_{rel} = k_{obs} / k_{uncat}$). k_{obs} = havaittu nopeusvakio, k_{uncat} = katalysoimattoman reaktion nopeusvakio.

| Olosuhteet | BPNPP (2a) $k/10^{-5} s^{-1}$ | HPNP (1) $k/10^{-5} s^{-1}$ | HPHP (19) $k/10^{-5} s^{-1}$ | CPHP (20) $k/10^{-5} s^{-1}$ |
|---|---|--|--|---|
| pK_a^a | 7,14 | 7,14 | 9,95 | 8,48 |
| 0,05 M MOPSO, 90 °C, pH 6,7 | 0,0217±0,0005 $t_{1/2} = 37$ d | 1,04 ± 0,01 $t_{1/2} = 18,5$ h | 0,0356±0,0026 $t_{1/2} = 22,5$ d | 0,0449±0,0039 $t_{1/2} = 17,8$ d |
| 0,1 M NaOH, 90 °C, pH 11,2 | 16,1±0,1 $t_{1/2} = 71,8$ min | - | - | - |
| 0,1 M NaOH, 25 °C, pH 13,0 | - | 178,0±0,8 $t_{1/2} = 6,5$ min | 9,15±0,23 $t_{1/2} = 126$ min | 35,4±1,0 $t_{1/2} = 32,6$ min |
| 10 mM CuTerPy, 90 °C, pH 6,7 | 2,79±0,16(129) $t_{1/2} = 6,9$ h | 245,0±2,0(236) $t_{1/2} = 4,7$ min | 13,0±1,0 (365) $t_{1/2} = 89$ min | 43,5±3,0 (970) $t_{1/2} = 26,5$ min |
| 5 mM CuTerPy, 90 °C, pH 6,7 | 2,34±0,08(108) $t_{1/2} = 8,24$ h | 104,0±1,8(100) $t_{1/2} = 11,1$ min | 4,5±0,1 (126) $t_{1/2} = 4,3$ h | 18,9±0,6 (420) $t_{1/2} = 61,2$ min |
| 10 mM CuBiPy, 90 °C, pH 6,7 | 24,7±0,3(1138) $t_{1/2} = 46,8$ min | 348,0±7,8 (335) $t_{1/2} = 3,3$ min | 2,00±0,06 (56) $t_{1/2} = 9,7$ h | 20,5±0,2 (457) $t_{1/2} = 56,3$ min |
| 5 mM CuBiPy, 90 °C, pH 6,7 | 17,4±0,2 (805) $t_{1/2} = 66,4$ min | 301,0±2,5(290) $t_{1/2} = 3,8$ min | 0,79±0,06 (22) $t_{1/2} = 24,4$ h | 10,5±0,3 (233) $t_{1/2} = 110,3$ min |
| 2 mM sinkki- kompleksi 15a , 25 °C, pH 6,5 | - | 392,0±0,6 (377) $t_{1/2} = 2,95$ min | 4,63±0,18 (130) $t_{1/2} = 4,1$ h | 39,4±0,7 (877) $t_{1/2} = 29,4$ min |

^a lähtöaineen lähtevän ryhmän pK_a , viitteestä 37

BPNPP:llä ja HPNP:llä on sama hyvä lähtevä ryhmä eli *p*-nitrofenoli. Näiden reaktioiden tapauksessa CuBiPy katalysoi fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisreaktiota paremmin kuin CuTerPy. BPNPP:n reaktioiden kanssa ero on vielä selkeämpi, kun nukleofiili on intermolekulaarinen.

CPHP:n ja HPHP:n lähtevät ryhmät ovat huonompia, ja näiden reaktioiden tapauksessa CuTerPy on jonkin verran parempi katalyytti. Aikaisemmin esitetystä tutkimuksesta⁷ on myös havaittu, että CuTerPy olisi parempi katalyytti silloin, kun lähtevä ryhmä on huono. Lisäksi on havaittu, että CuTerPy:n ja CuBiPy:n katalyysitehokkuuden ero pienenisi, kun lähtevän ryhmän happamuus kasvaa, joka on myös havaittu tässä tutkimuksessa.

2-hydroksipropyylifosfaatti-johdokset HPNP, HPHP ja CPHP muodostavat sarjan yhdisteitä, jotka eroavat toisistaan lähtevän ryhmän happamuuden suhteen. Taulukkoon 12 kerätyistä tuloksista laskettiin β_{lg} -arvot $\log k$ vs. pK_a -kuvaajien kulmakertoimesta. Saadut arvot on kerätty taulukkoon 13.

Taulukko 13. Lasketut β_{lg} -arvot eri reaktioille.

| Olosuhteet | β_{lg} -arvo |
|--------------------------------|--------------------|
| MOPSO | -0,51 |
| NaOH | -0,46 |
| 10 mM CuTerPy (9) | -0,45 |
| 5 mM CuTerPy (9) | -0,48 |
| 10 mM CuBiPy (11) | -0,80 |
| 5 mM CuBiPy (11) | -0,92 |
| Sinkkikompleksi (15a) | -0,69 |

Taulukon 13 tuloksista nähdään, että CuBiPyn katalysoimien reaktioiden β_{lg} -arvot ovat negatiivisempia kuin CuTerPy-katalyyttisten reaktioiden. Kuten johdannossa on kerrottu, pieni negatiivinen arvo kertoo siitä, että katalyytti edesauttaa lähtevän ryhmän irtoamista, ja suurempi negatiivinen arvo puolestaan kertoo, että lähtevän ryhmän irtoaminen tapahtuu katalysoimatta tai että se on reaktion nopeutta rajoittava vaihe.³⁶

4. Johtopäätökset

Edellä esitetyt tulokset viittaisivat siihen, että CuBiPy on parempi katalyytti kuin CuTerPy silloin, kun nukleofiili on huono ja lähtevä ryhmä on hyvä. Tämä katalyysitehokkuuden ero näkyy selkeästi HPNP:n ja BPNPP:n reaktioiden välillä. CuTerPy on siis parempi katalyytti silloin, kun lähtevä ryhmä on huonompi. Tämä voidaan nähdä myös verrattaessa HPNP:n ja HPHP:n CuTerPy-katalyyttisiä reaktioita.

Tämän lisäksi tulokset viittaisivat myös siihen, että CuTerPy on tehokkaampi katalysoimaan lähtevän ryhmän poistumista, kun taas CuBiPy katalysoi paremmin nukleofiilistä hyökkäystä. CuBiPy katalysoi BPNPP:n reaktiota selvästi tehokkaammin kuin HPNP:n reaktiota. CuTerPy kohdalla reaktiivisuusero ei ole yhtä selkeä, mutta HPNP:n reaktio nopeutuu jonkin verran enemmän. Taulukkoon 13 kootuista β_{1g} -arvoista voidaan tulkita sama asia. Lähtevän ryhmän ominaisuudet näyttävät vaikuttavan enemmän CuBiPy:n katalysoimissa reaktioissa kuin CuTerPy:n tapauksessa.

Nämä tulokset perustuvat yksittäisiin mittauksiin, ja niitä voidaan ajatella vain suuntaa antavina. Ne ovat kuitenkin sopusoinnussa uridiini-3'-aryyli- ja alkyylifosfaateilla saatujen tulosten kanssa.⁷

Metalli-ionikatalyyttien merkittävyys lääketieteellisessä sekä biokemiallisessa käytössä kasvaa, kun tietoa niiden ominaisuuksista saadaan kerättyä lisää. Niiden ominaisuudet mahdollistavat niin terapeuttisen käytön kuin monipuolisen vaihtoehdon nukleaaseille laboratoriokäytössä tulevaisuudessa.

Viitteet

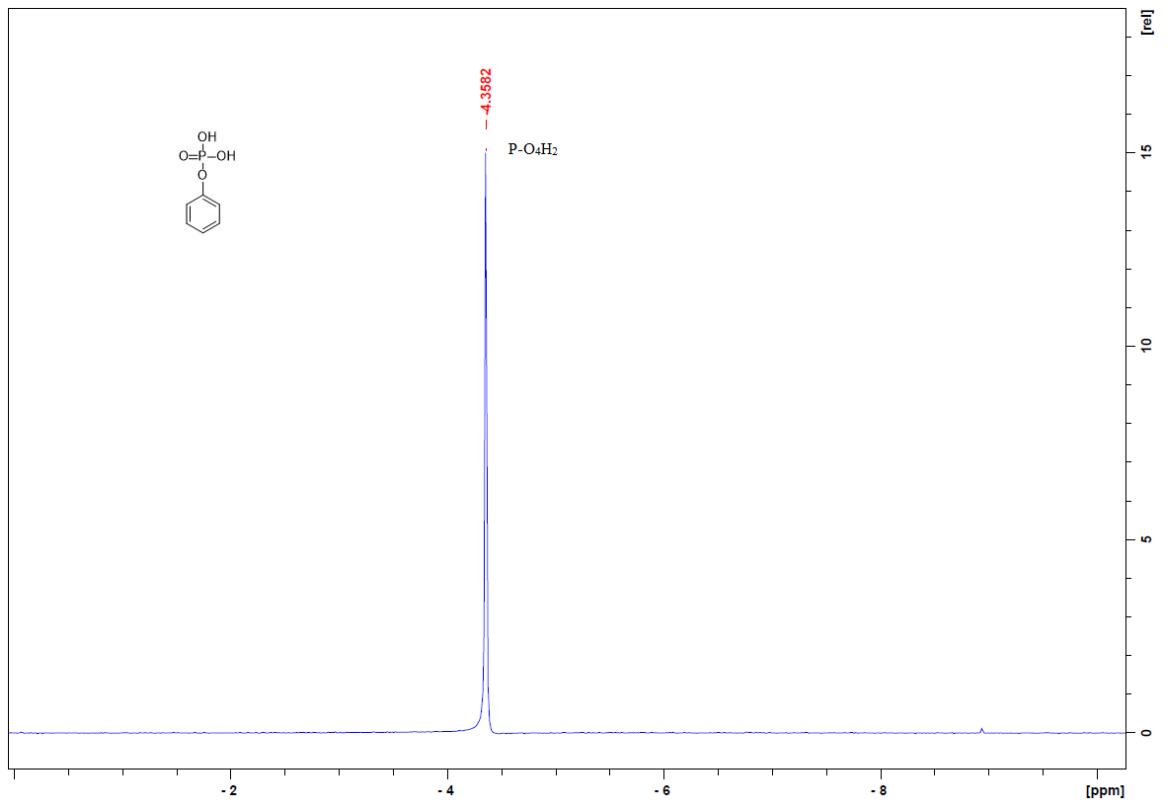
1. Westheimer, F. H., *Science*, **1987**, 235, 4793, 1173–1178
2. Lönnberg, H., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 1687–1703
3. Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R., *PNAS*, **2006**, 103, 11, 4052–4055
4. Niittymäki, T.; Lönnberg, H., *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 15–25
5. Feng, G.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 7056–7059
6. Mancin, F.; Tecilla, P., *New J. Chem.*, **2007**, 31, 800–817
7. Korhonen, H.; Koivusalo, T.; Toivola, S.; Mikkola, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 8324–8339
8. Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 485–493
9. Brown, D. M.; Todd, A. R., *Annu. Rev. Biochem.*, **1955**, 24, 311–338
10. Westheimer, W. H., *Acc. Chem. Res.*, **1968**, 1, 3, 70–78
11. Mikkola, S.; Stenman, E.; Nurmi, E.; Yousefi-Salakdeh, E.; Strömberg, R.; Lönnberg, H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1999**, 1619–1625
12. Kosonen, M.; Yousefi-Salakdeh, E.; Strömberg, R.; Lönnberg, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 1589–1595
13. Kosonen, M.; Yousefi-Salakdeh, E.; Strömberg, R.; Lönnberg, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.*, **1997**, 2661–2666
14. Emilsson, G. M.; Nakamura, S.; Roth, A.; Breaker, R. R., *RNA*, **2003**, 907–917
15. Neverov, A. A.; Lu, Z.; Maxwell, C. I.; Mohamed, M. F.; White, C. J.; Tsang, J. S. W.; Brown, R. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 50, 16398–16405
16. Korhonen, H.; Mikkola, S.; Williams, N. H., *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 659–670
17. Korhonen, H.; *The significance of hydrogen bonding interactions in the cleavage of rna*, Väitöskirja, Turun yliopisto, **2011**

18. Linjalahti, H.; Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Mikkola, S.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 4232–4233
19. Camargo, M. A.; Neves, A.; Bortoluzzi, A. J.; Szpoganicz, B.; Fischer, F. L.; Terenzi, H.; Serra, O. A.; Santos, V. G.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N., *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6013–6025
20. Wall, M.; Hynes, R. C.; Chin, J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, *32*, 11, 1633–1635
21. Liu, S.; Hamilton, A. D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 13, 1779–1784
22. Stern, M.; Bashkin, J. K.; Sall, E. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5357–5359
23. Livieri, M.; Mancin, F.; Saielli, G.; Chin, J.; Tonellato, U., *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 2246–2256
24. Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Rosales, R. T. M.; Williams, N. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 13470–13471
25. Livieri, M.; Mancin, F.; Tonellato, U., Chin. J., *Chem. Commun.*, **2004**, 2862–2863
26. Liu, S.; Hamilton, A. D., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 1107–1110
27. Liu, S.; Hamilton, A.D., *Chem. Commun.*, **1999**, *7*, 587–588
28. Iranzo, O.; Elmer, T.; Richard, J. P.; Morrow, J.R., *Inorg. Chem.*, **2003**, *42*, 7737–7746
29. Yashiro, M.; Kawahara, R., *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, *9*, 914–921
30. Bonomi, R.; Saielli, G.; Tonellato, U.; Scrimin, P.; Mancin, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 32, 11278–11279
31. Breslow, R.; Huang, D.-L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 4080–4083
32. Morrow, J.R.; Trogler, W. C., *Inorg. Chem.*, **1988**, *27*, 3387–3394
33. Jenkins, L. A.; Bashkin, J. K.; Pennock, J. D.; Florián, J.; Warhsel, A., *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 3215–3222
34. Mikkola, S.; Lönnberg, T.; Lönnberg, H., *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, *14*, 803–837

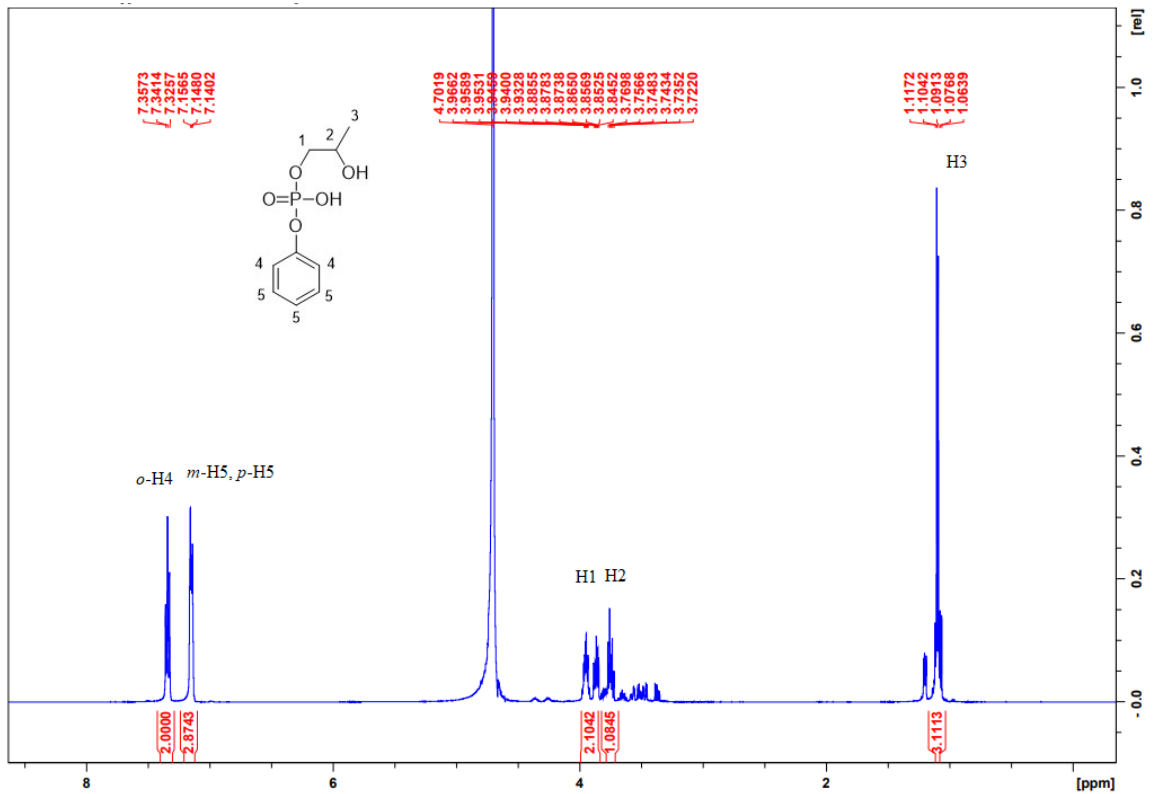
35. Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H., *Chem. Commun.*, **2006**, 1845–1847
36. Korhonen, H.; Williams, N. H.; Mikkola, S., *J. Phys. Org. Chem.*, **2013**, 26, 182–186
37. Davis, A. M.; Hall, A. D.; Williams, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 110, 5105–5108

Liitteet

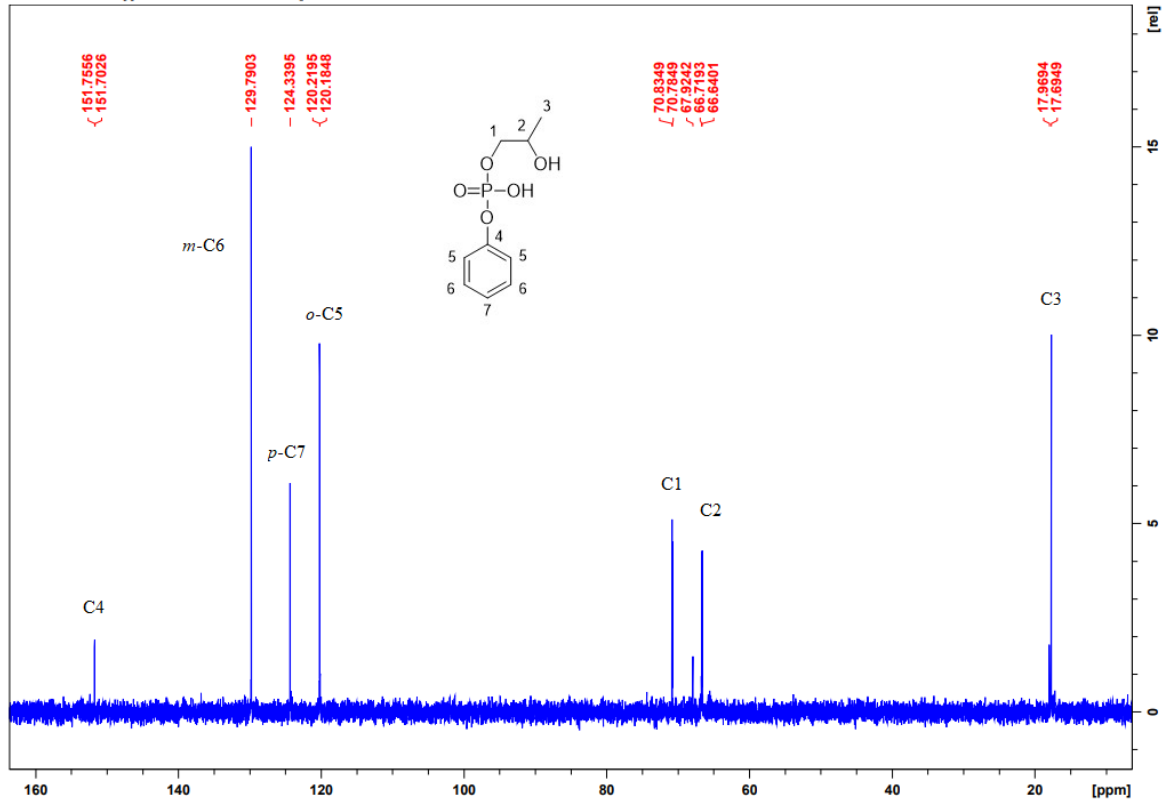
Liite 1. Fenyylifosfaatin (22) ^{31}P -NMR.



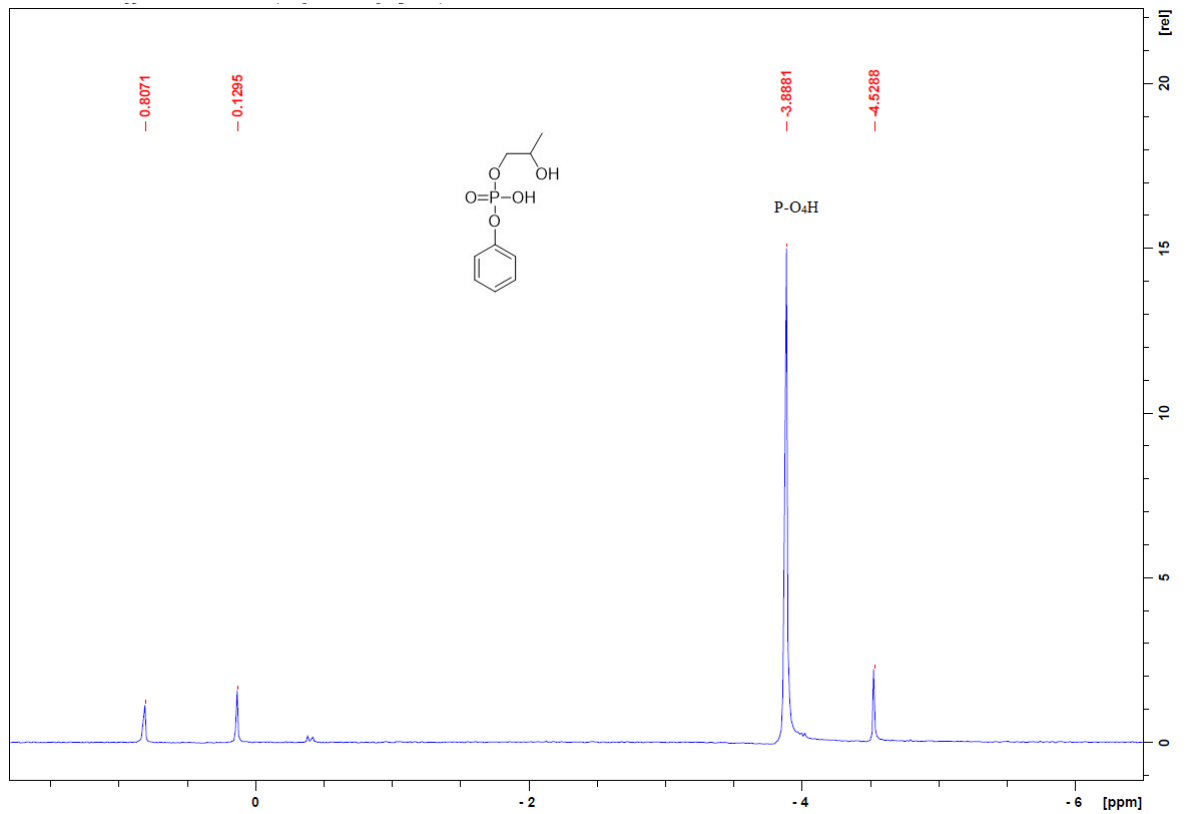
Liite 2. 2-hydroksipropyyli fenyylifosfaatin (19) ^1H -NMR.



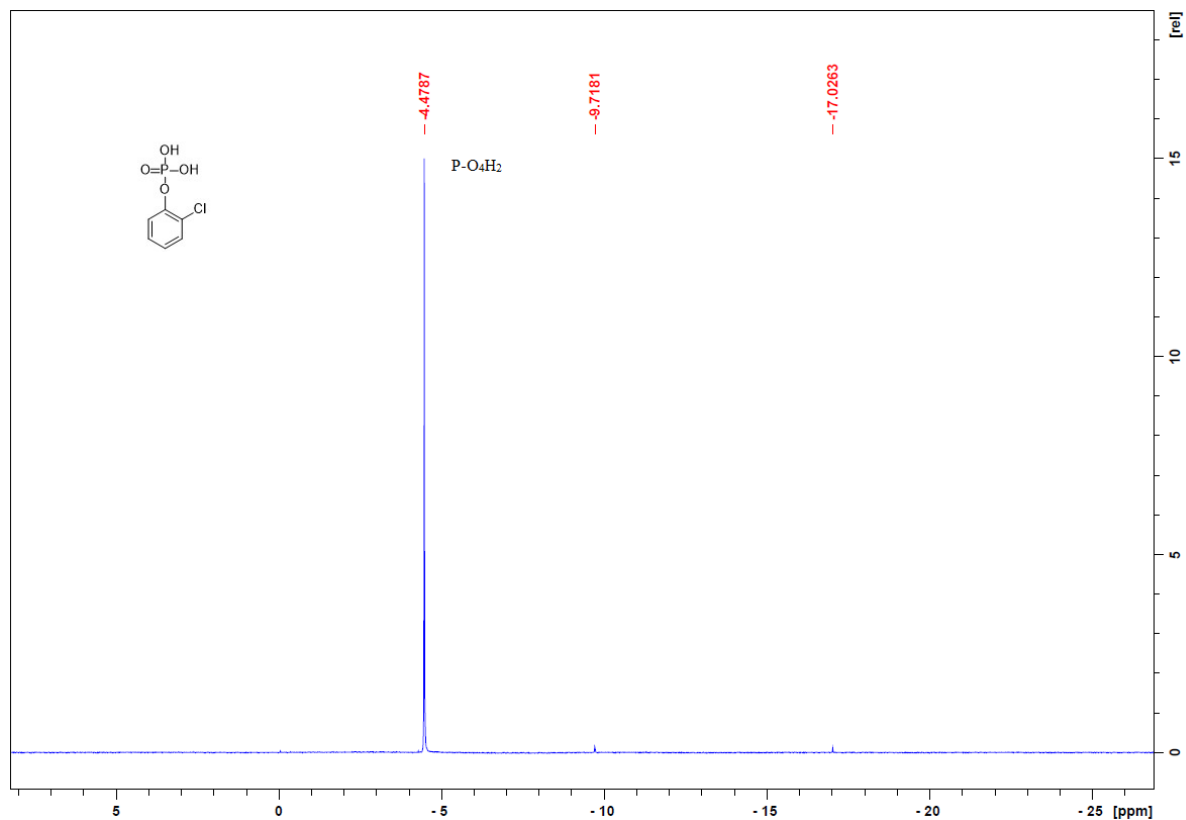
Liite 3. 2-hydroksipropyyli fenyylifosfaatin (**19**) ^{13}C -NMR.



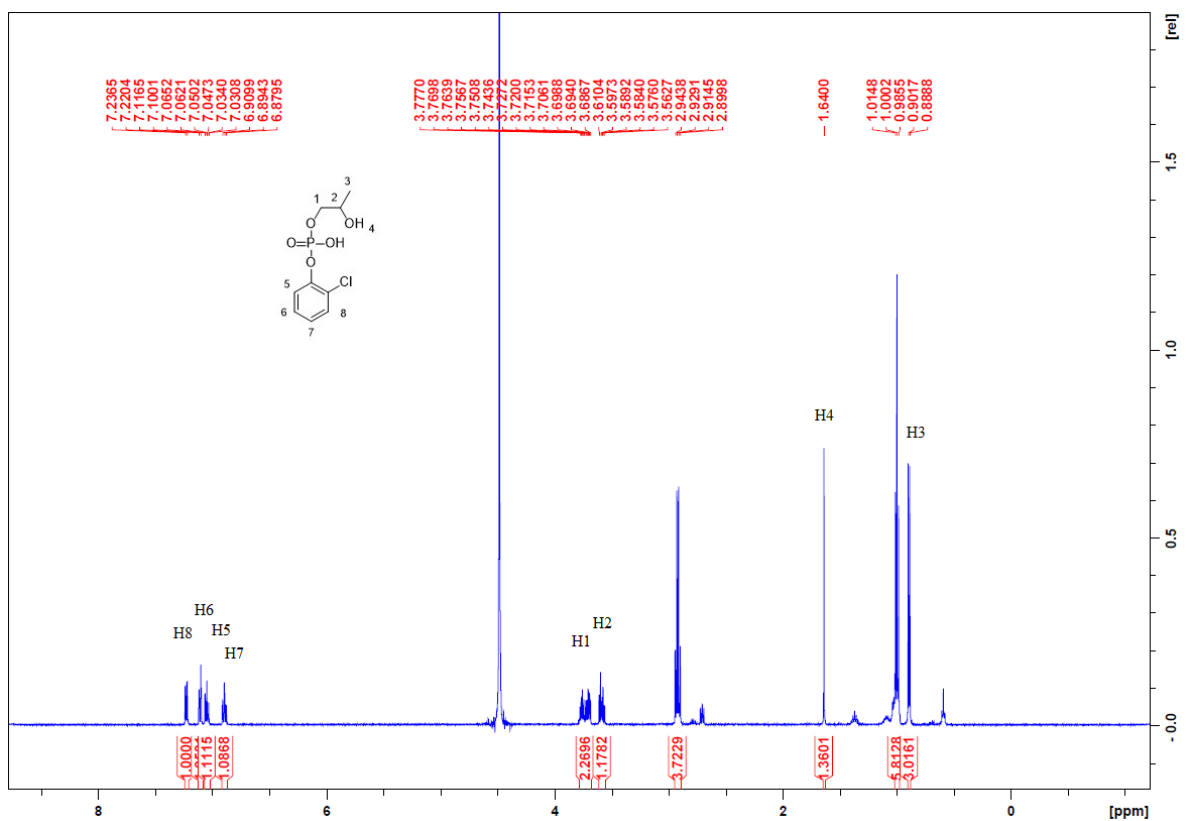
Liite 4. 2-hydroksipropyyli fenyylifosfaatin (**19**) ^{31}P -NMR.



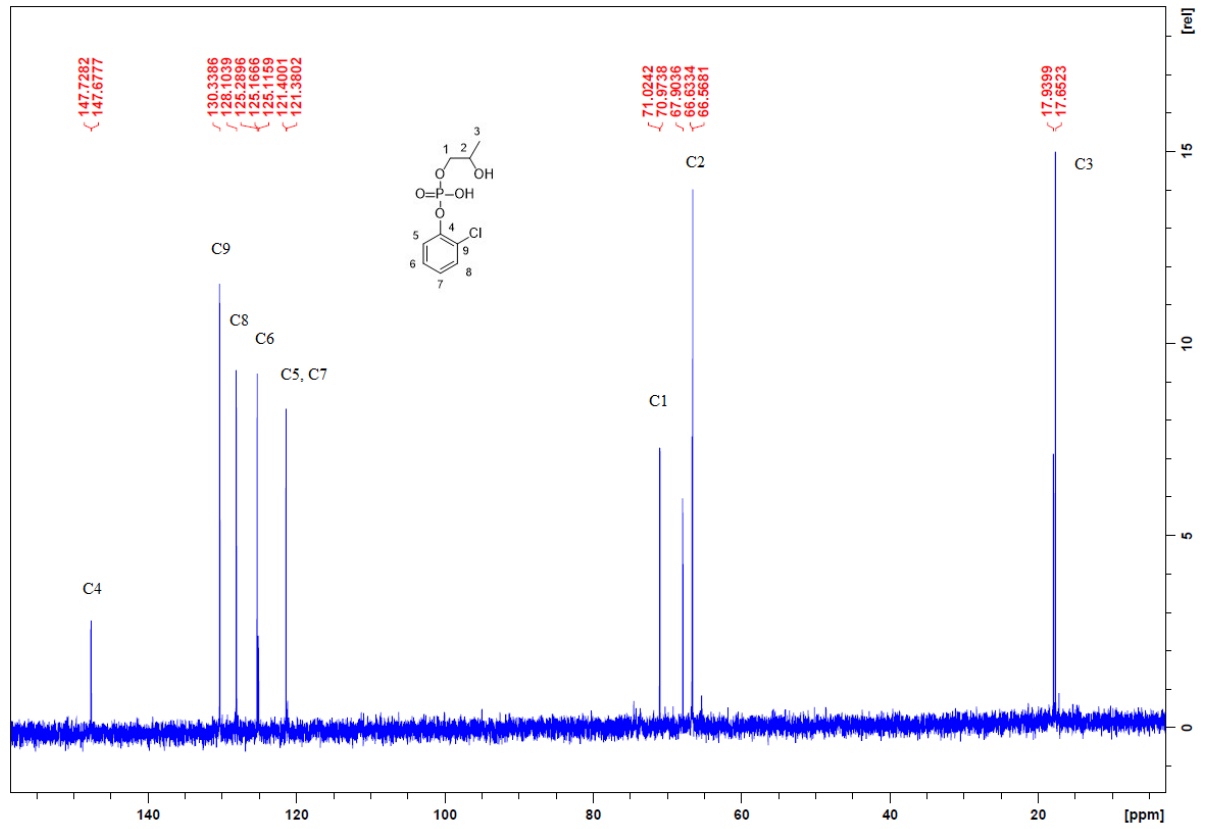
Liite 5. 2-kloorifenyylifosfaatin (**24**) $^1\text{H-NMR}$.



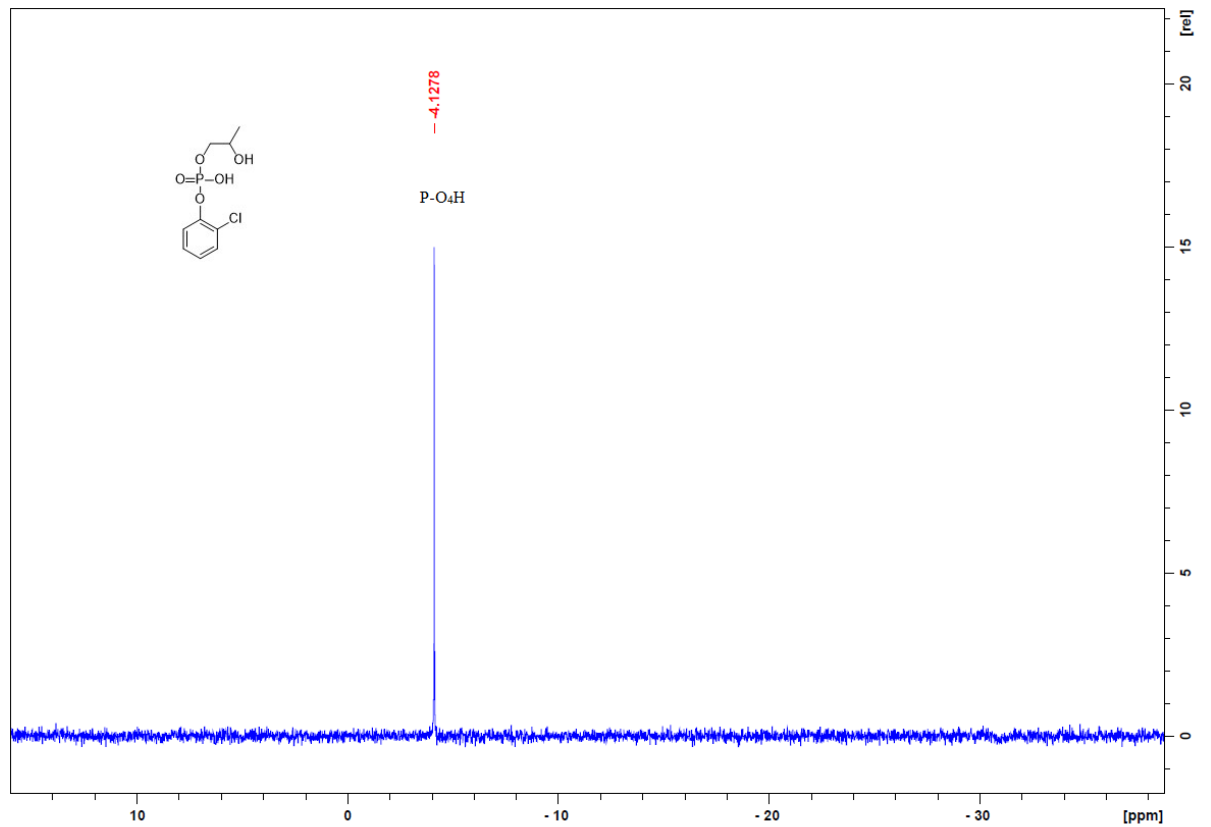
Liite 6. 2-kloorifenyylidi (2-hydroksyylipropyyliin) (**20**) $^1\text{H-NMR}$.



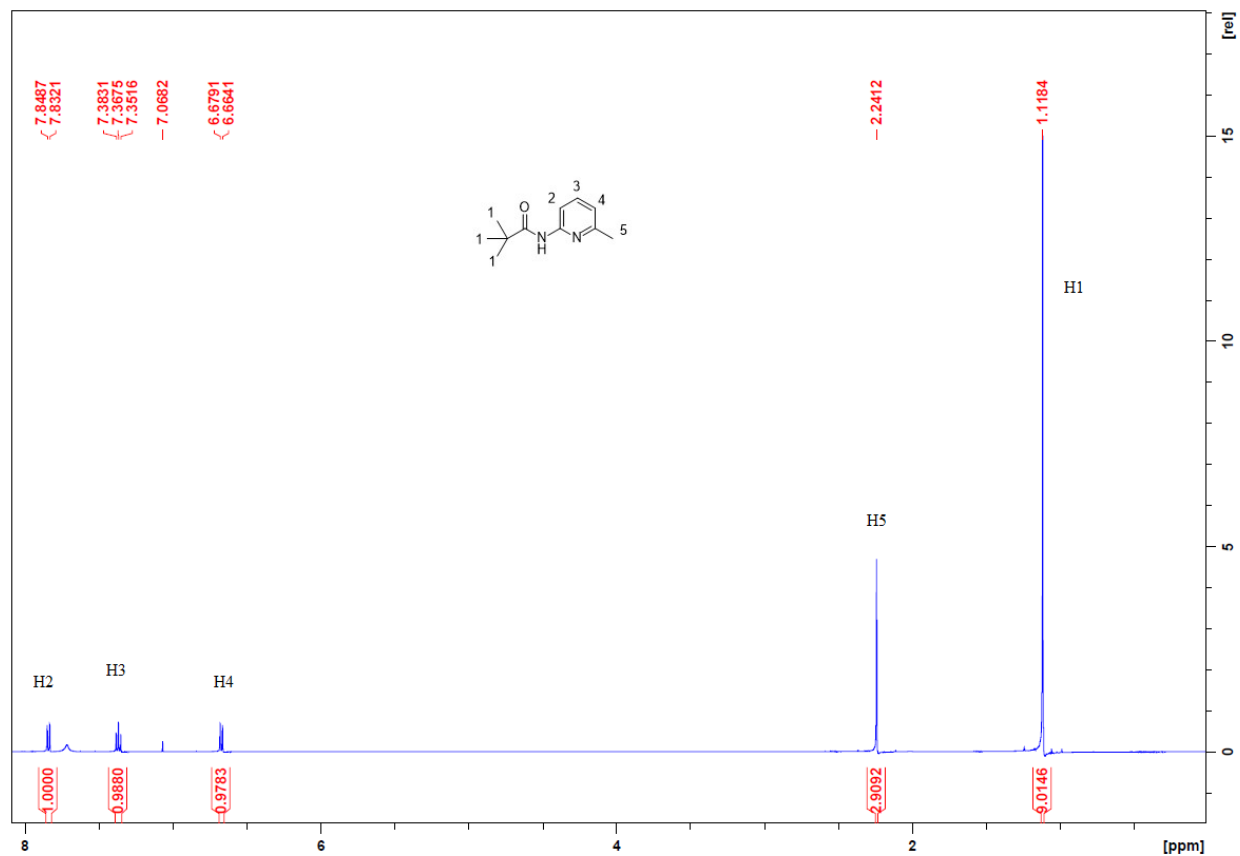
Liite 7. 2-kloorifenyli (2-hydroksyylipropylin) (**20**) ^{13}C -NMR.



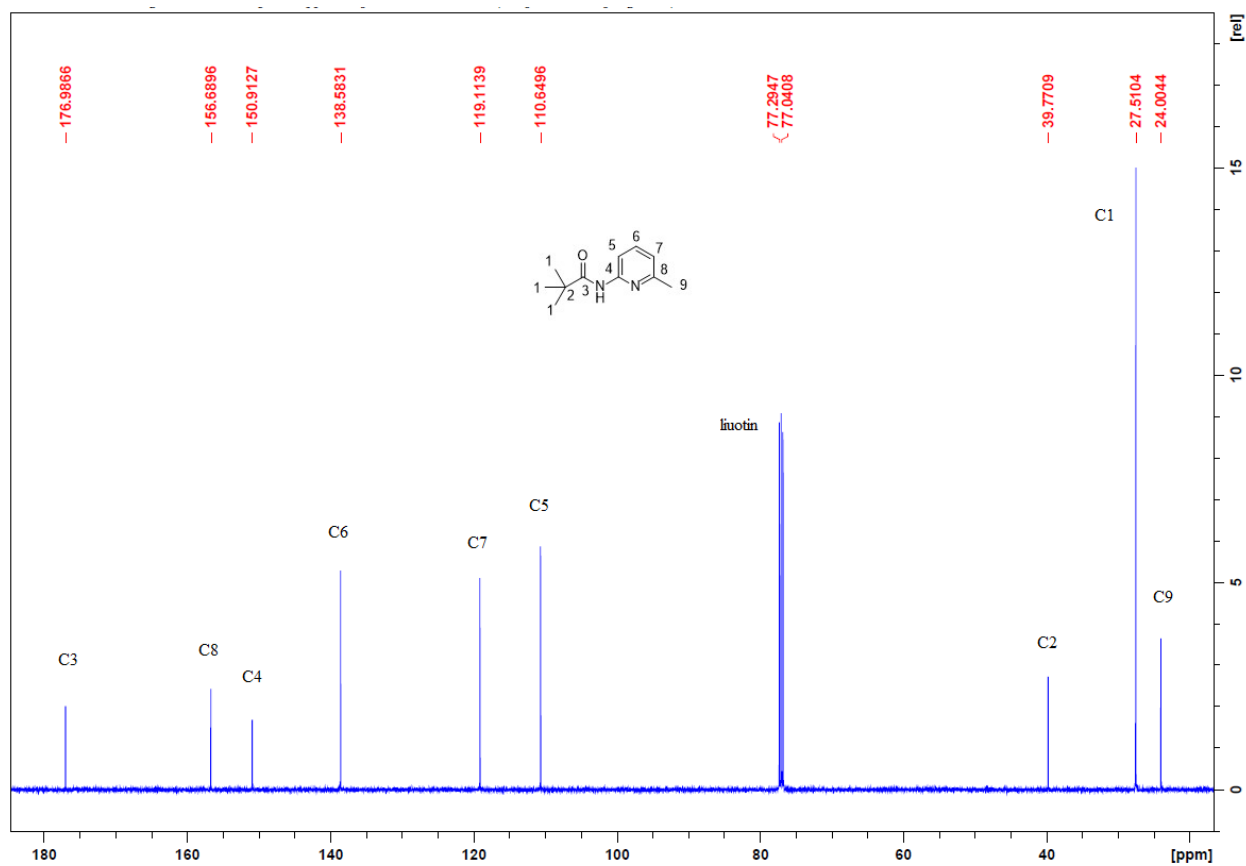
Liite 8. 2-kloorifenyli (2-hydroksyylipropylin) (**20**) ^{31}P -NMR.



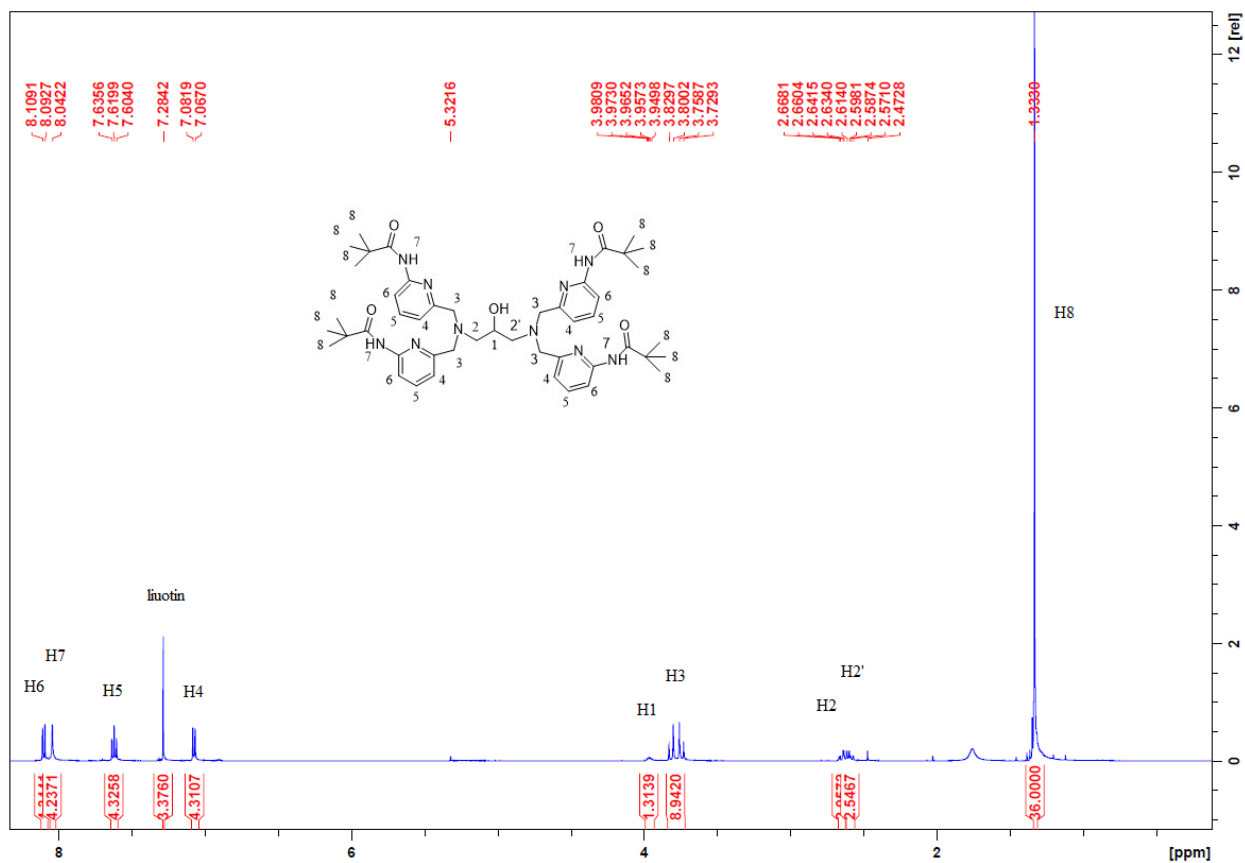
Liite 9. 2-pivaloyyliamidi-6-metyylipyridiinin (**26**) ^1H NMR.



Liite 10. 2-pivaloyyliamidi-6-metyylipyridiinin (**26**) ^{13}C NMR.



Liite 11. *N,N,N',N'*-(tetrakis(6-pivaloyyliamidi-2-pyridiinimetyyli)-1,3-diamino)-2-propanoli (**28**) ^1H NMR.



Liite 12. *N,N,N',N'*-(tetrakis(6-amino-2-pyridiinimetyyli)-1,3-diamino)-2-propanoli (**29**) ^1H NMR.

