

Atsakruunujen bisykliset metallikompleksit ja niiden sovellutukset

Pro gradu -tutkielma

Ilkka Sevon

Turun yliopisto, Kemian laitos

20014 Turun yliopisto

Elokuu 2020

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

ILKKA SEVON: Atsakruunujen bisykliset metallikompleksit ja niiden sovellutukset

Pro gradu -tutkielma, 58 sivua

Orgaaninen kemia ja kemiallinen biologia

Elokuu 2020

Atsakruunujen bisyklisten metallikompleksien parissa tehdään nykyään mielenkiintoista tutkimusta ja niillä on suuri potentiaali tulla hyödynnetyksi esimerkiksi biolääketieteellisissä sovellutuksissa. Monissa tutkimuksissa on havaittu, että monilla näillä komplekseilla on merkittäviä katalyyttisiä ominaisuuksia biologisissa prosesseissa. Ne voivat toimia esimerkiksi keinotekoisina esteraaseina, fosfodiesteriaseina ja peptidaaseina. Niitä voidaan käyttää myös molekyylikytkiminä ja -sensoreina sekä mahdollisesti lääkeaineiden tai geneettisen materiaalin vektoreina. Tässä tutkielmassa paneudutaan eritoten bisyklisiin metallikomplekseihin. Kahden metalli-ionin on havaittu vaikuttavan komplekseissa synergisesti. Tällöin myös näiden molekyylien katalyyttiset potentiaalit ovat merkittävästi suurempia, kuin yksittäisten metalli-ionien vaikutuksesta voisi päätellä. Molemmat metalli-ionit osallistuvat esimerkiksi hydrolyyttisissä reaktioissa sekä molekyylien tunnistamiseen, että niiden pilkkomiseen.

Tutkielman kirjallisessa osassa käsitellään erilaisia atsakruunutyyppejä ja niiden synteesejä sekä lopuksi esitellään niistä tehtyä tutkimusta ja mahdollisia sovellutuksia. Pääpaino on annettu biolääketieteellisille sovellutuksille, vaikka atsakruunukomplekseilla saattaa olla tulevaisuudessa käyttöä myös esimerkiksi nanokoneina tai älypolymeereinä. Tutkielman kokeellisessa osassa yritettiin valmistaa kolme atsakruunutähdettä sisältävä haaroittunut molekyyli, jolla olisi mahdollisesti ollut fosfodiesterisidoksia pilkkovia katalyyttisiä ominaisuuksia mutta synteesi osoittautui hankalaksi, joten kokeellisessa osuudessa tyydyttiin valmistamaan vain itse atsakruunutähde.

Asiasanat: atsakruunu, metallikompleksi, bisyklinen, hydrolaasi, fosfodiesteriasei

SISÄLLYS

1. JOHDANTO	1
2. MAKROSYKLISTEN POLYAMIINIEN ELI POLYATSAKRUUNUJEN VALMISTUS	2
2.1. Makrosykliset polyamiinit	2
2.2. Yleistä synteeseistä	3
2.3. Renkaansulkemisstrategiat	4
2.4. Makrosykliefekti	9
2.5. Synteesiesimerkkejä	10
2.5.1. Atsakruunurenkaiden tyyppien suojaryhmistä	10
2.5.2. Synteesejä	11
3. ATSAKRUUNUJEN BISIYKLISTEN METALLIKOMPLEKSIEN SOVELLUTUKSET	15
3.1. Rakenne, ominaisuudet ja molekulaarinen tunnistaminen	15
3.2. Metallikompleksien kaviiteetin suunnittelu	16
3.3. Dinukleotidit	21
3.4. Spiroatsakruunut	26
3.5. Kryptandit	27
3.5.1. Yleistä kryptandeista	27
3.5.2. Kryptandien synteesit	27
3.6. Biolääketieteelliset sovellutukset ja niiden tulevaisuuden näkymiä	28
3.6.1. Yleistä	28
3.6.2. MRI -sovellutuksia (varjoaineet)	29
3.6.3. Esteraasit, fosfodiesteriaasit ja peptidaasit	31
3.6.4. Molekyylikoneet, -kytkimet ja -sensorit	34
3.6.5. Supramolekulaariset polymeerit	37

4.	TETRAVALENTIN 1,5,9-TRIATSASYKLODODEKAANIN VALMISTUS	37
4.1.	Kokeellisen työn johdanto.....	37
4.2.	Tulokset ja niiden tarkastelu	38
4.3.	Työn kokeellinen suoritus	38
4.3.1.	Yleiset menetelmät.....	38
4.3.2.	Valmistetut molekyylit.....	40
4.3.3.	Synteesit	44
5.	JOHTOPÄÄTÖKSET JA YHTEENVETO.....	55
6.	LÄHTEET.....	56

KÄYTETYT LYHENTEET

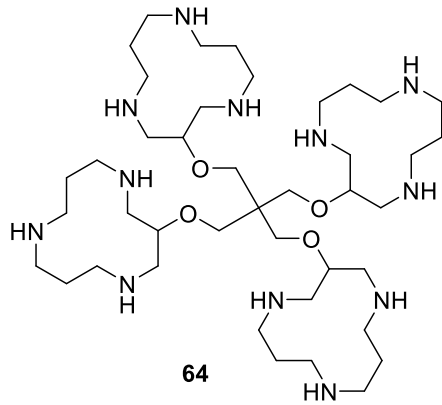
<i>t</i> -Boc	<i>tert</i> -butoksikarbonyyli
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyylidikarbonaatti
DCM	dikloorimetaani
DMSO	dimetyylisulfoksidi
Ph	fenyyl-
TASD	1,5,9-triatsasyklododekan-3-oli
TBD	triatsabisyklodekeeni
TFA	trifluoretikkahappo
THF	tetrahydrofuraani
TLC	ohutkerroskromatografia
Ts	paratolueenisulfonyyli- (tosyyli-)

1. JOHDANTO

Monien luonnossa esiintyvien entsyymien kofaktoreina toimivat metalli-ionit. Erityisesti ensimmäiseen siirtymämetallisarjaan kuuluvia ioneja sisältäviä aktiivisia keskuksia on näissä usein kaksi tai useampia ja ne toimivat yhteistyössä toisiaan vahvistaen.¹ Luonnon entsyymit ovat usein monimutkaisia ja nykyään pyritäänkin kehittämään rakenteeltaan yksinkertaisempia, mutta silti halutut ominaisuudet sisältäviä keinotekoisia katalyyttisiä entsyymejä. Biomimeettisillä entsyymeillä saattaa olla suuri merkitys tulevaisuuden lääkekehityksessä ja molekyyli-teknologiassa.

On havaittu, että joillakin atsakruunujen Zn^{2+} -ionikomplekseilla on kyky pilkkoa spesifisesti fosfodiesterisidoksia RNA-molekyylissä (fosfodiesteriaasit)². Monia atsakruunujen metalli-ionikomplekseja voidaan käyttää katalysoimaan myös monia muita hydrolyyttisiä reaktioita kuten aminohappojen estereiden ja peptidien hydrolyysireaktioita (esteraasit ja peptidaasit)³. Atsakruunukomplekseja voidaan käyttää esimerkiksi molekyylien tunnistamis- ja pilkkomistehtävissä, molekyylikytkiminä, sensoreina ja jopa suurempien molekyylien kuljettamiseen käytettävänä vektoreina.⁴ Viimeksi mainittuihin monimutkaisempiin tehtäviin on mahdollisesti kehitettävissä sovellutuksia kryptandien tutkimuksen kautta.

Erikoistyössä pyrittiin valmistamaan pentaerytritolirakenteeseen perustuva haaroittunut molekyyli **64**, joka sisältää neljä 1,5,9-triatsasyklododekaanitähdettä (Kuva 1). 1,5,9-triatsasyklododekaanin Zn^{2+} -kompleksi kykenee katalysoimaan fosfodiesterisidoksen pilkkoutumista mutta toisaalta myös muodostamaan ternäärisen kompleksin urasiilin, tyimiinin ja vähäisissä määrin guaniinin kanssa.⁵ Tämän vuoksi kohteena olevalla rakenteella saattaa olla mielenkiintoisia fosfodiesterisidoksen pilkkoutumista katalysoivia ominaisuuksia urasiilirikkaiden RNA-sekvenssien kanssa. Mielenkiintoinen tilanne voisi syntyä esimerkiksi, kun kyseinen rakenne kohdennetaan kolmen urasiilin pullistuman sisältävään kaksoiskiarteeseen.



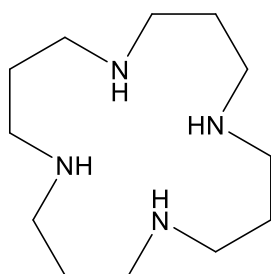
Kuva 1. Työssä tavoitellun molekyylin rakenne

2. MAKROSYKLISTEN POLYAMIINIEN ELI POLYATSAKRUUNUJEN VALMISTUS

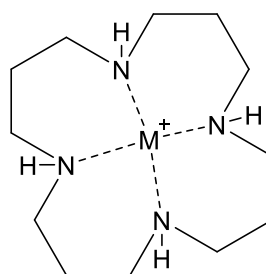
2.1. Makrosykliset polyamiinit

Makrosykliset polyamiinit (MPAt) eli polyatsakruunut ovat heterosyklisiä, useita sekundaarisia amiinisidoksia sisältäviä yhdisteitä, joiden renkaassa on hiilen lisäksi tyyppeä. Polyatsakruunut, kuten kruunueetterit, kykenevät kelatoimaan metalli-ioneja, anioneja, kationeja ja neutraaleja molekyyliä selektiivisesti itseensä koordinaatiosidoksilla. Selektiivisyyteen vaikuttaa mm. renkaan koko ja sitovien tyyppien määrä, niiden reaktiokyky ja makrosyklin konformaatio. Toisin kuin happikruunut, jotka sitovat itseensä pääasiassa alkali- ja maa-alkalimetalleja, polyatsakruunut kykenevät sitomaan itseensä siirtymämetalleja ja ammoniumsuoloja (typpiatomit ovat vähemmän elektronegatiivisia, joten elektroniparit ovat paremmin käytettävissä kompleksointireaktioissa). Polyatsakruunuja käytetään mm. katalyyttinä, metalli-ionien erottelemiseen, metallikationien viemiseen reaktioon tai siitä poistamiseen. Biosovelluksissa polyatsakruunuja voidaan käyttää hyväksi esim. ioninkuljetuksessa poolittoman solumembraanin läpi. Protonoidut MPAt sitoutuvat voimakkaasti tiheiden anionien sekä mono- ja polyfosfaattien kanssa. Atsakruunujen spesifisyyttä substraatille voi kasvattaa lisäämällä steerisiä esteitä sitoutumiskohtien lähelle. Lariaattiatsakruunueettereissä yleensä yhdessä tyypessä on hiilivetyhantä, jossa on eetteriryhmä. Substraatti reagoi hännän kanssa ja hiilivetyketju taipuessaan asettaa metalli-ionin atsakruunurenkaan sisälle. Ensimmäiset polyatsakruunut syntetisoitiin jo

ennen happea sisältävien kruunueettereiden löytämistä. Ensimmäinen synteettinen makrosykli, muodostettiin pyrrolin ja asetonin kondensaationa suolahapossa. Syklaamin (Kuva 2) syntetisoi ensimmäisen kerran J. van Alphen 1937. Sen ja metalli-ionin muodostama kelaatti on esitetty kuvassa 3. Tässä kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan polyatsakruunujen synteesejä.^{6,7,8,9}



Kuva 2. Syklaami



Kuva 3. Metallionin ja syklaamin muodostama kelaatti

2.2. Yleistä synteeseistä

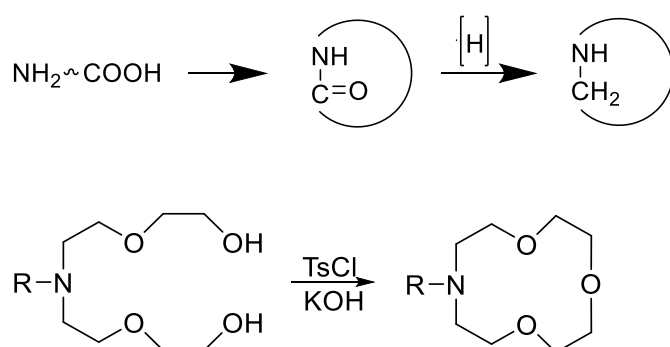
Syntetisoitava hiili-typpi-heterosykli voidaan koota yhdestä, kahdesta tai useammasta molekyylisestä. Kun rengas muodostetaan yhdestä molekyylisestä, puhutaan joskus nk. ”käärme-strategiasta”, jossa molekyylin toinen pää reagoi toisen pään kanssa esim. Williamsonin eetterisynteesin kautta.^{6,7} Yhden molekyylin tekniikoista käytetään myös syklo-dimerisaatiota, jossa kaksi antiparalleelia monomeeria, joiden välillä vaikuttaa molekyylien välisiä vuorovaikutuksia, esimerkiksi vetysidoksia, reagoivat kuumennettaessa muodostaen dimeerin. Yleisin makrosyklien valmistustapa on kuitenkin yhdistää kaksi eri molekyyliä, joissa kummassakin on kaksi reaktiivista kohtaa. Näiden kahden molekyylin kondensaatiossa lohkeaa pienempi molekyyli. Kun keski- tai suurikokoista rengasrakennetta aletaan rakentamaan useammasta molekyylisestä, alkaa entropian vaikutus tulla merkittäväksi ja saannot putoavat nopeasti, ellei apuna synteesissä käytetä templaattia kuten metalli-iona, jolloin koordinaatiosidokset auttavat reaktantteja löytämään reaktiossa oikeanlaisen aseman. Termodynaaminen kontrolli stabiloi rakenteet, jotka ilman metalli-ionin läsnäoloa eivät kykenisi saavuttamaan sykloisaatiolle suotuista asemaa. Atsakruunujen syntetisointi on toisinaan vaikeaa, sillä ihanteellisesti tulisi löytää typpisuojarahma, joka samalla aktivoisi typen ja olisi helposti irrotettavissa ilman, että rengasrakenne hajoaa. Lisäksi monet reaktiot on suoritettava

laimeissa reaktioliuoksissa, jotta vältettäisiin polymerisaatiota. Reaktio-olosuhteita muuttamalla voidaan vaikuttaa siihen, onko hallitsevana reaktiona syklisaatio vai polymerisaatio.⁹

2.3. Renkaansulkemisstrategiat

Renkaan muodostaminen yhdellä sidoksella

Rengas voidaan muodostaa antamalla lineaarisen molekyylin reaktiivisten ryhmien reagoida molekyylin sisäisesti, jolloin tuloksena on polyatsakruunuja syntetisoitaessa yleensä amidisidos ja syklopeptidejä rakennettaessa usein myös disulfidisidos.^{6,7,9} ”Okaharan” renkaansulkemisreaktiossa α,ω -dioli muodostaa itsensä kanssa makrosyklin tosyylikloridin ja emäksen läsnä ollessa. Reaktiossa saavutetaan hyviä saantoja ja lähtöaineet ovat helposti valmistettavissa tai hankittavissa.



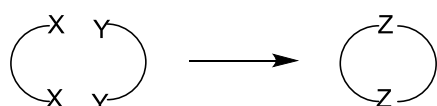
Kaavio 1. Molekyylin sisäisiä renkaanmuodostumisreaktioita

Renkaan muodostaminen kahdella tai useammalla sidoksella (1:1, 2:1, 2:2, 3:3, 4:4 ja useamman substraatin syklisaatiot)

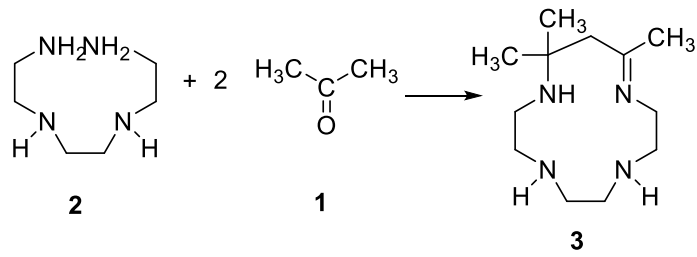
Yleensä makrosyklit valmistetaan kahden sidoksen yhtäaikaisen muodostumisen kautta. Tällöin toisen substraatin kaksi funktionaalista ryhmää reagoi toisen substraatin kahden funktionaalisen ryhmän kanssa muodostaen renkaan.^{6,7,8,9} Reaktioiden saannot ovat yleensä hyviä, mikäli käytetään metalli-iona reaktion templaattina, käytetään hyväksi molekyylien välisiä vetysidoksia tai reaktiota laimeassa liuoksessa. Kahden sidoksen

menetelmää käytetään usein polyatsakruunujen valmistuksessa. Asetonin (1) tai aldehydin reaktio trietyleenitetraamidin (2) kanssa on esimerkki 2:1 syklisaatioreaktiosta. Reaktiossa muodostuu tyydyttymätön 13-jäseninen makrosykli (E)-11,11,13-trimetyyli-1,4,7,10-tetra-atsasyklotridek-13-eeni (3). 2:2 syklisaatiossa muodostuu neljä uutta sidosta neljän substraatin välille. Reaktio suoritetaan templaatti-menetelmällä tai laimeassa liuoksessa. Sivutuotteina saadaan myös 1:1 syklisaatiotuote (samoin kuin pieniä määriä 3:3, 4:4, jne. tuotteita). Jos yksi reaktanteista on jäykkärakenteinen, pienenee 1:1 syklisaation osuus reaktiossa. Suurempi konsentraatio suosii 2:2 syklisaatiotuotteita mutta myös polymeeria syntyy tällöin enemmän. Yksi esimerkki jäykästä difunktionaalista molekyylistä, joka reagoi 2:2 syklisaatiossa ennemmin kuin 1:1 syklisaatiossa, on katekoli, joka reagoi dietyleeniglykolin dikloori-johdannaisen kanssa, jolloin muodostuu 18-crown-6. Tämä Pedersenin löydös johti lopulta kruunueetteriligandien kehittämiseen, jotka muodostavat moninaisia komplekseja metallisten ja orgaanisten kationien kanssa. Templaattiefektillä on suuri vaikutus siihen, syntyykö reaktiossa pääasiassa 2:2 vai 1:1 syklisaatiotuotteita. Riippuen metalli-ionin koosta ja koordinaatio-ominaisuuksista, sillä on usein tärkeä rooli näissä reaktioissa. Joskus pienemmät kationit suosivat 2:2 syklisaatiota, koska suuremmissa makrosykleissä on heteroatomeihin koordinoitunut kaksi kationia.^{6,7,9} 3:3, 4:4, 5:5, jne. syklisaatiotuotteet ovat usein sivutuotteita 1:1 tai 2:2 syklisaatioreaktioista. Tyydyttymättömiä maksosyklejä voidaan muodostaa asetonista (tai muusta ketonista) ja 1,2-diaminoetaanin (4) tai 1,3-diaminopropanin johdannaisista.^{6,7,9} Reaktiossa neljä asetonimolekyyliä reagoi kahden diamino-yhdisteen kanssa ilman templaattia tai metalli-ioni-templaatin läsnä ollessa.⁷

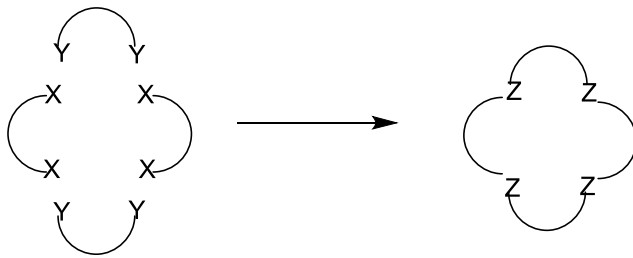
Ammoniumsuola (1E,7E)-5,5,7,12,12,14-heksametyyli-1,4,8,11-tetra-atsasyklotetradeka-7,14-dieeni (5) saatiin muodostumaan ilman templaatti-ioneja. 4:2 syklisaatiossa neljän samanlaisen molekyylin reaktiiviset kohdat reagoivat kahden keskenään samanlaisen molekyylin reaktiivisten kohtien kanssa. Renkaan muodostumisia kahdella tai useammalla sidoksella on esitetty kaaviossa 2.



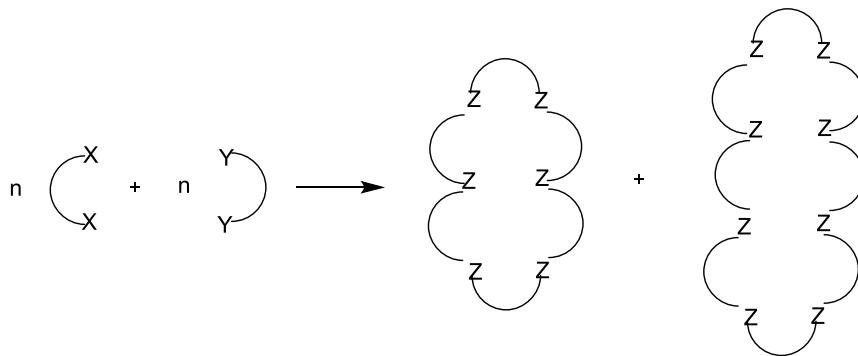
1:1 syklisaatiossa kahdessa samanlaisessa molekyyllissä on kaksi reaktiivista kohtaa, jotka reagoivat toisen molekyylin reaktiivisten kohtien kanssa.



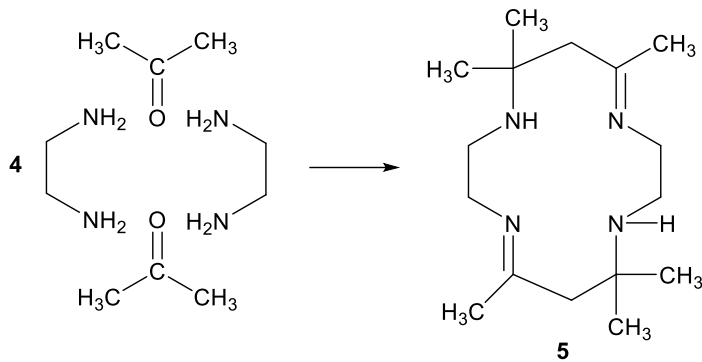
2:1 syklistisaatioissa kahden samanlaisen molekyylin kaksi reaktiivista kohtaa reagoivat sekä toistensa, että kolmannen erilaisen molekyylin reaktiivisten kohtien kanssa.



2:2 syklistisaatioon osallistuu kaksi molekyyliä, joiden reaktiiviset kohdat reagoivat toistensa reaktiivisten kohtien kanssa niin, että erilaiset molekyylit renkaassa vuorottelevat.



Useamman substraatin syklistisaatioissa on kahdenlaisia molekyyliä, jotka reagoivat toistensa kanssa niin, että erilaiset molekyylit renkaassa vuorottelevat. Erilaisia molekyyliä on yleensä yhtä suuri määrä.

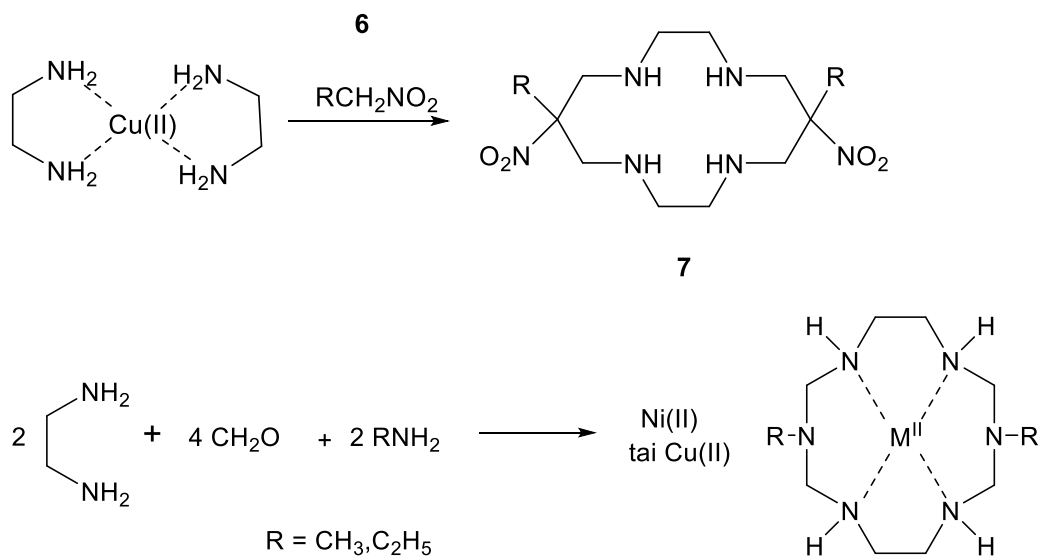


4:2 syklistaatiossa neljän samanlaisen molekyylin reaktiiviset kohdat reagoivat kahden keskenään samanlaisen molekyylin reaktiivisten kohtien kanssa.

Kaavio 2. Renkaan muodostuminen kahdella tai useammalla sidoksella

Atsakruunujen synteesi templaatilla

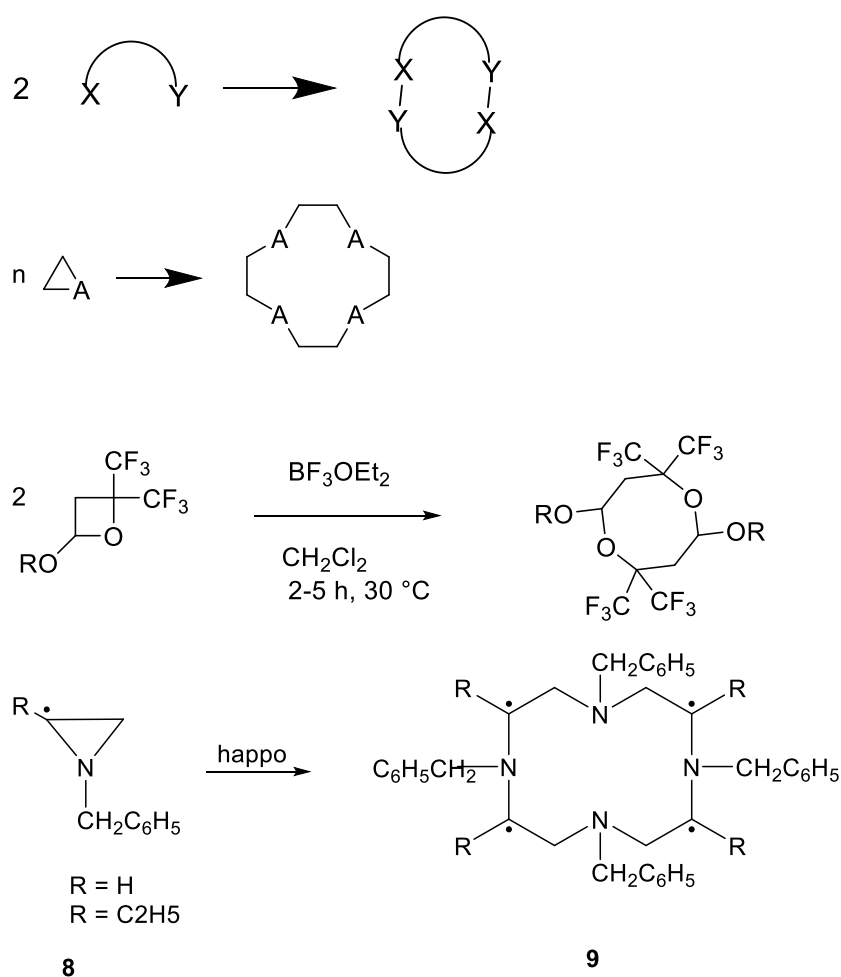
Käyttämällä metalli-ionitemplaatteja, voidaan muodostaa useamman substraatin muodostamia makrosyklejä. Kuparin ja monihampaisten amiinien muodostama kompleksi reagoi esimerkiksi formaldehydin, nitrometaanin tai dietyylimalonaatin kanssa, jolloin saadaan kaaviossa 3 esitetyllä periaatteella esimerkiksi makrosykli 7. Toisia amiineja voidaan käyttää myös renkaan muodostamiseen. Tällöin kahdeksan molekyyliä reagoi muodostaen heksa-atsa-makrosyklin.¹⁰



Kaavio 3. Atsakruunujen synteesiä templaatin avulla

Renkaan dimerisaatiot ja oligomerisaatiot

Renkaan dimerisaatiossa rengas avautuu, jolloin sen avautumiskohdassa olevat reaktiiviset ryhmät muodostavat reagoidessaan uuden makrosyklin, jossa renkaan koko kaksinkertaistuu (Kaavio 4). Mikäli 7-rengas avautuu, se voi dimerisoitua esimerkiksi 14-renkaaksi. Mikäli 7-rengas muodostaa pidempiä renkaita, kutsutaan reaktiotyyppiä oligomerisaatioksi (Kaavio 4). Templaatti saattaa edistää dimerisoitumista. Tällä menetelmällä on saatu hiilisubstituoituja syklaameja korkealla saannolla.⁷ On myös raportoitu renkaan koon pienenemistä 14-renkaasta 7-renkaaksi.¹⁰ Etyleenioksidin ja atsiridiinin johdannaisia voidaan käyttää makrosyklien rakentamisessa. Substituoitu atsiridiini tai etyleenioksidi itsekondensoituu renkaanavauksessa muodostaen trimeerejä, tetrameerejä ja niin edelleen.⁷ Makrosyklin koko riippuu pääasiassa siitä, mitä lähtöainetta käytetään. *N*-bentsyyliatsiridiinin (**8**) tapauksessa muodostuva makrosykli on tetra-atsa-12-kruunu-4 (**9**) (Kaavio 4). Avoketjuiset yhdisteet reagoivat vastaavasti muodostaen tämän tyyppisiä makrosyklejä. Radikaalin merkitys reaktiossa on vetää elektroneja pois tyveltä, jolloin resonanssin vuoksi molekyylin toinen puoli stabiloituu ja tyyppistä katkeaa hapon vaikutuksesta vain se sidos, joka ei ota osaa resonanssirakenteeseen.



Kaavio 4. Renkaan muodostuminen dimerisaatiossa ja oligomerisaatiossa. Esimerkissä 4-renkaisesta yhdisteestä dimeroituu 8-renkainen yhdiste¹¹ ja 3-rengas oligomerisoituu 12-renkaaksi (tetra-atsa-12-kruunu-4).

2.4. Makrosykliefekti

Termi kuvaa sitä, kuinka paljon stabiilimpi makrosyklinen ligandi on kompleksoituessaan metalli-ionin kanssa kuin ilman metalli-ionin vaikutusta. Ilmiölle voidaan antaa joitakin termodynaamisia selityksiä. Termodynaaminen kontrolli stabilisoi rakenteet, jotka eivät olisi vallitsevia ilman metalli-ionin läsnäoloa. Entalpian muutokseen vaikuttavat mm. liukeneminen ja konformaation muutokset sidoksen muodostuessa. Entropiaan vaikuttaa reaktioon osallistuvien jäsenten määrä ja erityisesti liuotinvaiikutukset. Reaktioissa metalli-ioni-templaattilla kineettinen efekti koordinoi reaktantit sopiviin asemiin

kondensaatioreaktiota varten.¹⁰ Makrosyklin ja metalli-ionin kompleksinmuodostuskykyyn vaikuttaa pääasiassa sitoutumispaikkojen määrä makrosyklissä, sitoutumiskohdan (typpi, happi, rikki..) elektronegatiivisuus, (metalli-ionin) koko ja varaus sekä poolisuus, metalli-ioneilla myös ioniparivuorovaikutus. Atsakruunut sitovat siirtymämetalleja. Sitoutumispaikkojen tulisi sijaita siten, että ne maksimoivat ligandi-metalli-ionivuorovaikutuksen. Makrosyklin konformaatio sanelee myös sen, sitoutuuko metalli-ioni mieluummin makrosyklin sisään vai hieman sen ulkopuolelle.¹⁰ Makrosyklin joustavuuteen vaikuttaa renkaan rakenne: tyydyttynyt hiilivetyrunko joustaa enemmän kuin aromaattisista ryhmistä koostuva runko. Lisää jäykkyyttä runkoon saadaan liittämällä siihen esim. esterisidoksia. Myös renkaita lisäämällä voidaan makrosykliä jäykistää, kuten esim. kryptandeissa, jotka ovat eräänlaisia ”kolmiulotteisia” atsakruunuja, joissa on useampi rengas. Ja tietenkin mitä suurempi makrosykli on, sitä enemmän se joustaa.¹⁰ Protonoituja atsakruunuja voidaan käyttää anionien sitomiseen. Anioni voi olla yksinkertainen epäorgaaninen anioni (esim. halidi-ioni) tai karboksylaatti/polykarboksylaatti, fosfaatti, polyfosfaatti tai nukleotidi, tai anioninen metallikompleksi. Vuorovaikutuksena ovat elektrostaattiset vuorovaikutukset ja vetysidokset protonoitujen makrosyklisen amiinien ja anionisten substraattien välillä. Kolmityyppiset 9-renkaat ovat liian pieniä, jotta niiden kaviiteettiin mahtuisi metalli-ioni (esim. 1,4,7-triatsasyklononaani). Metallit usein koordinoituvatkin näissä makrosyklin tason ulkopuolelle. Nelityypiset renkaat muistuttavat luonnonyhdisteitä kuten porfyriiniä. Nelityypisillä renkailla onkalon koko ei ole niinkään merkittävä tekijä metalli-ionin spesifisyyden kanssa. Kasvattamalla renkaan kokoa viidestä kuuteen, kompleksien stabiilisuus kasvaa pienten metallien kohdalla, suurten metallien kustannuksella.¹⁰

2.5. Synteesiesimerkkejä

2.5.1. *Atsakruunurenkaiden typen suojaryhmistä*

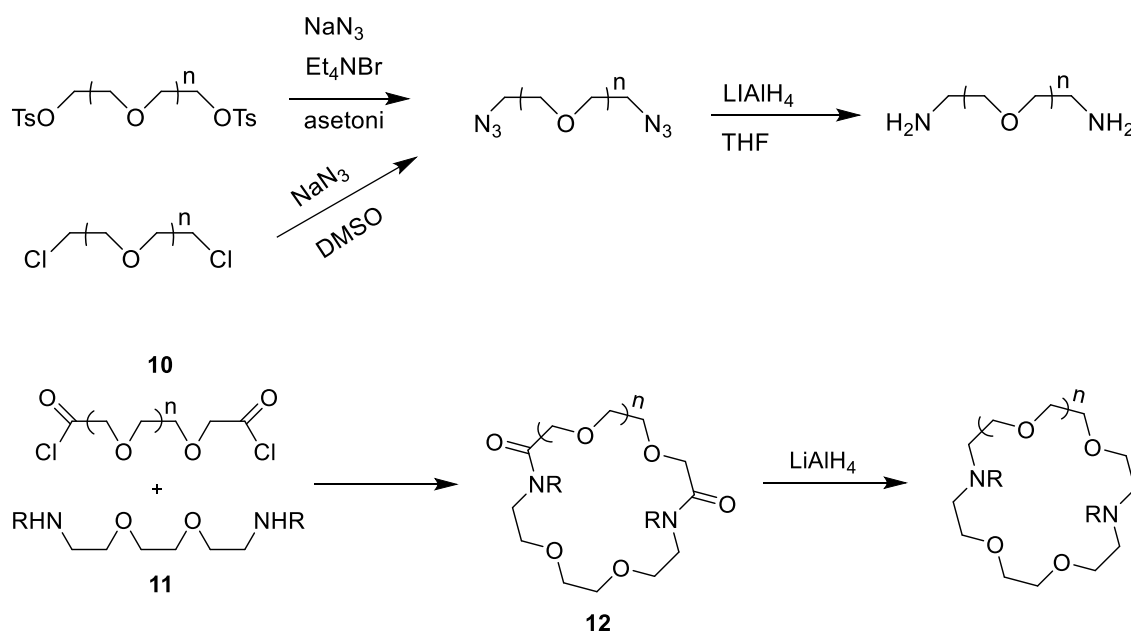
Mikäli renkaan synteesistrategiana on muodostaa bis-tosyyliamidin ja alkyyliditosylaatin kondensaatti, tyyppiä ei tarvitse suojata. N-tosyyli-ryhmä aktivoi typen ja suojaa sitä. Tosyyli-ryhmien poisto vaatii kuitenkin melko radikaalit olosuhteet, kuten väkevän rikkihapon, natriumetoksidin tai litiumalumiinihydridin käyttöä. Trifluoriasetyyli-ryhmiä

voidaan käyttää myös suojaryhminä mutta saannot renkaansulkemisreaktioissa ovat pienet, samoin kuin etoksikarbonyyliryhmää käytettäessä. Sekundaarisilla amiineilla BOC-suojauksella on huomattu olevan käyttöarvoa. Formyyli-suojaryhmällä on saatu hyviä tuloksia, kun käytetään metyyli- tai etyyliformiaattia. Formyyli-ryhmä on vahvasti elektronegatiivinen, eikä steerisiä vaatimuksia käytännössä ole. N-formyyli-ryhmä voidaan poistaa väkevällä HCl:lla, 10% rikkihapolla, H/Pd/C-pelkistyksellä, 15% vetyperoksidilla tai NaOH-liuoksella.^{6,7,9}

2.5.2. Synteesejä

Diatsakruunujen synteesi

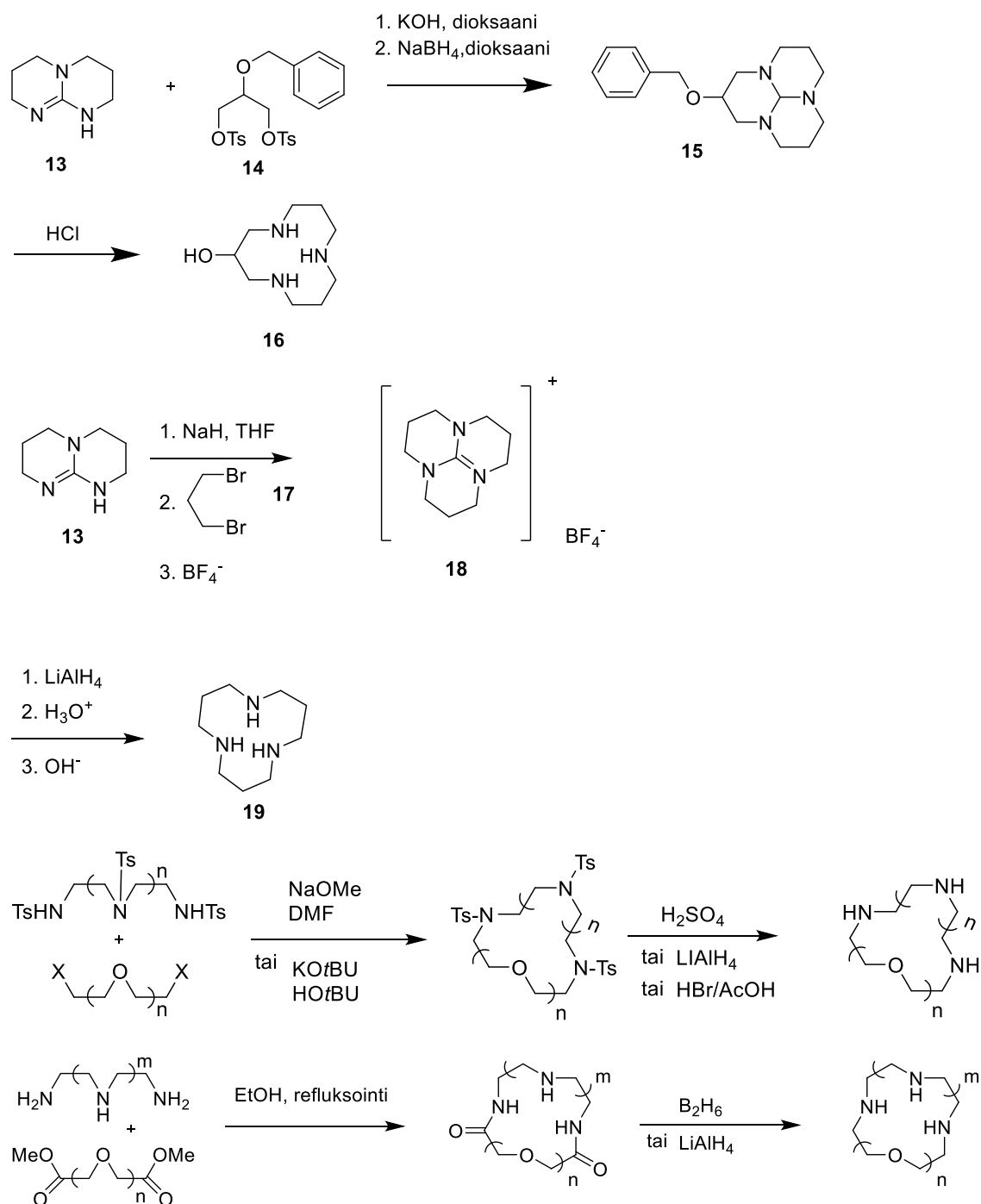
Diatsakruunut ovat tärkeitä, koska niistä voidaan valmistaa kryptandeja ("kolmiulotteisia" monirenkaisia atsakruunuja), N-substituoituja ligandeja ja niiden kompleksointikyky muistuttaa monissa biologisissa prosesseissa esiintyvää ominaisuutta. Seuraavaksi kuvailussa "raputekniikassa" annetaan esim. alkyyli-/asyylidikloridin (**10**) ja primaarisen/sekundaarisen diamiinin (**11**) kondensoitua diatsarenkaaksi⁸ (**12**) (Kaavio 5). Tämän yhden reaktiovaiheen synteessin saannot ovat hyviä, halvat lähtöaineet ovat helposti saatavilla, eikä typen suojaryhmiä tarvita. Lähtöaineina diamiineille ovat esimerkiksi tosyloidut diolit ja alkyylidikloridit.



Kaavio 5. Diamiinin ja erään diatsakruunun synteetit

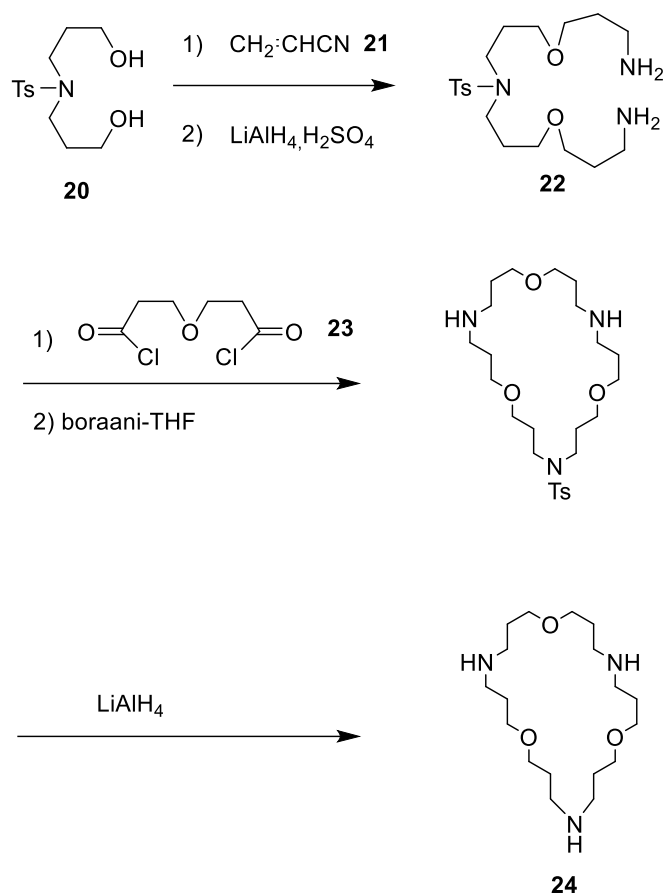
Triatsakruunujen synteesi

Triatsakruunuja voidaan syntetisoida käyttämällä lähtöaineena triatsabisyklodekeeniä, TBD (vahva guanidiiniemäs) tai käyttämällä ”raputekniikkaa” (Kaavio 6).



Kaavio 6. Kaksi erilaista triatsakruunujen synteesiä käyttämällä triatsabisyklodekeeniä TBD lähtöaineena sekä kaksi synteesiä käyttämällä ”raputekniikkaa”.

Symmetrisiä kruunueettereitä valmistetaan käyttämällä etyleeni- ja propyleeni-siltoja sekä N-tosyyliaminoglykolia (**20**) lähtöaineina. Glykolin annetaan reagoida akrylonitriilin (**21**) kanssa ja pelkistyksen jälkeen saadaan triamiini **22**, josta rakennetaan atsakruunu **24** (Kaavio 7).

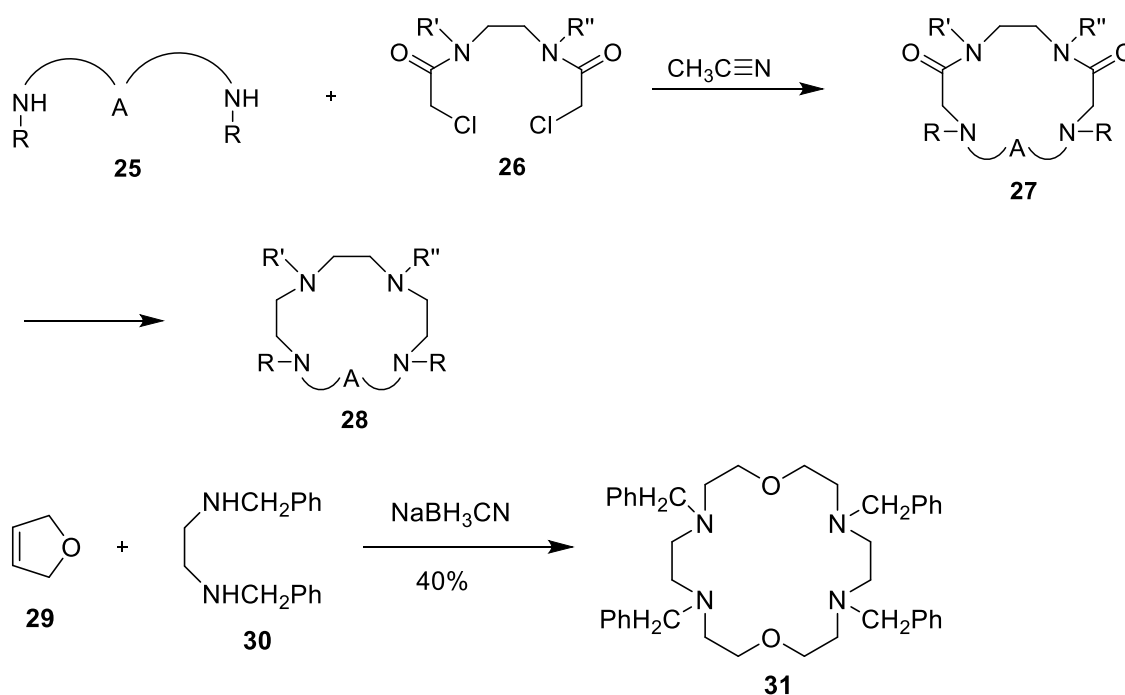


Kaavio 7. Esimerkki symmetristen atsakruunujen synteesistä

Tetra-atsakruunujen synteesi

Tetra-atsakruunu-rakenteita löytyy luonnossa esimerkiksi porfyriineistä. Tetra-atsakruunuilla on havaittu, että molekyylin kaviteetin koko ei ole kovin merkityksellinen metalli-ioniin kohdistuvan selektivisyyden kannalta. Paljon merkityksellisempää kelaatin pysyvyyden kannalta on atsakruunun eri konformeerien stabiilisuus.¹⁰ Kaaviossa 8 on esitetty tetra-atsakruunun **28** synteesi käyttäen lähtöaineena sekundaarista amiinia **25** ja toisena lähtöaineena bis(2-klooriasetamidi):n johdannaista **26**, joka on reaktiivisempi kuin tavalliset alkyylidikloridit¹⁰. ”Raputekniikassa” yhdisteellä **26** on kaksi reaktiivista

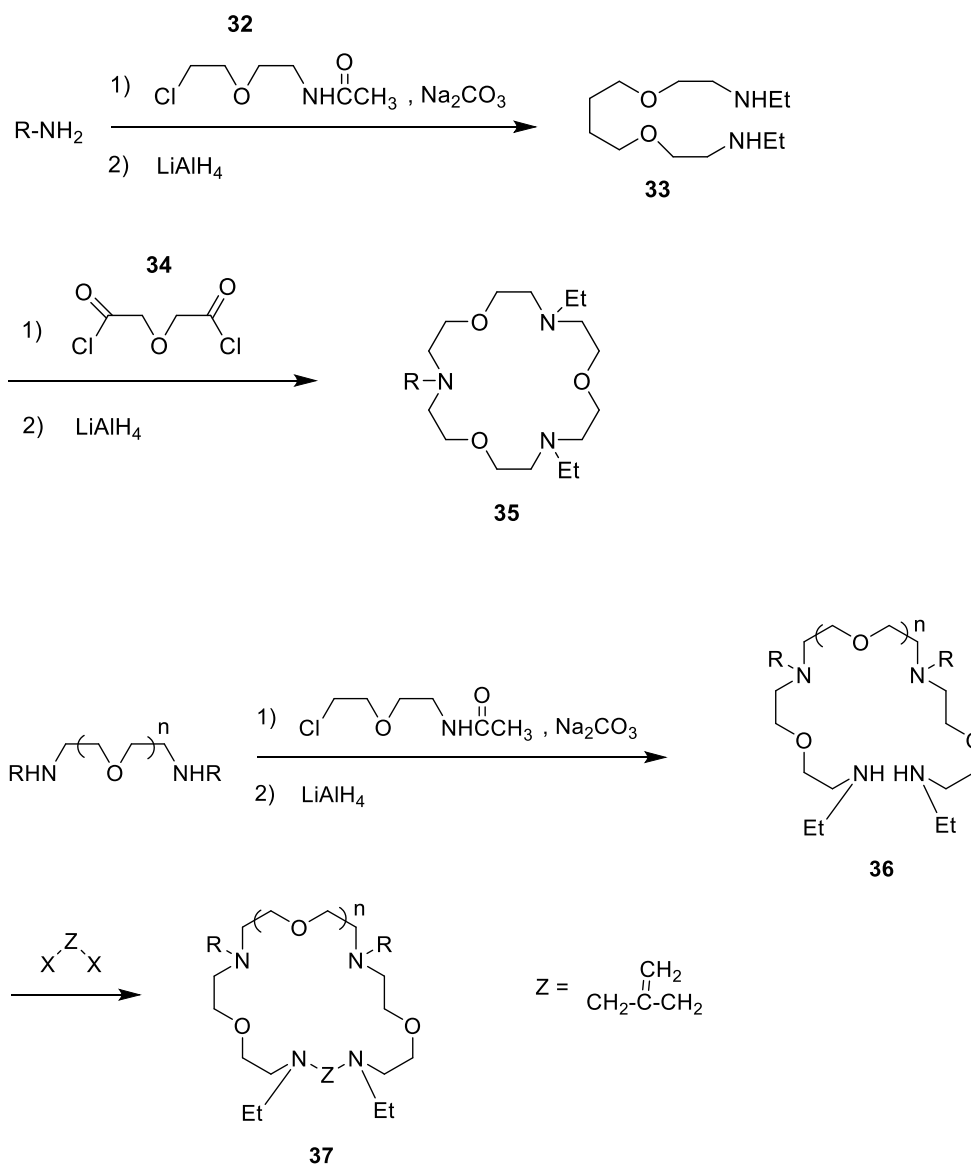
alkyylikloridiryhmää ja on valmis reagoimaan primaarisen tai sekundaarisen amiinin kanssa. Lähtöaine on helposti valmistettavissa diamiineista ja kloorietikkahappoanhydridistä. Kaaviossa 8 on esitetty myös yhden vaiheen synteesi, jolla voidaan valmistaa symmetrinen tetra-atsa-18-kruunu-6-yhdiste, 4,7,13,16-tetrabentsyyli-1,10-dioksa-4,7,13,16-tetra-atsasyklo-oktadekaani (**31**) käyttämällä lähtöaineina 2,5-dihydrofuraania (**29**) ja dibentsyylietaani-1,2-diamiinia (**30**).



Kaavio 8. Esimerkkejä tetra-atsakruunujen synteseistä (jälkimmäinen **31** on symmetrinen).

N-alkyloitujen triatsa- ja tetra-atsakruunujen synteesi

N-alkyloitujen triatsa- ja tetra-atsa-kruunujen valmistuksessa avainyhdiste on N-[2-(2-kloorietoksi)etyyli]asetamidi. Reaktiossa käytetään kaksi ekvivalenttia asetamidia **32** yhtä primaarista amiinia kohti. Tämän jälkeen tuotteen annetaan reagoida vielä dihapokloridin **34** kanssa, jolloin pelkistuksen jälkeen saadaan symmetrinen 18-kruunu-6 **35**. Kaaviossa 9 on esitetty alkyloitujen tri- ja tetra-atsakruunujen synteesit.



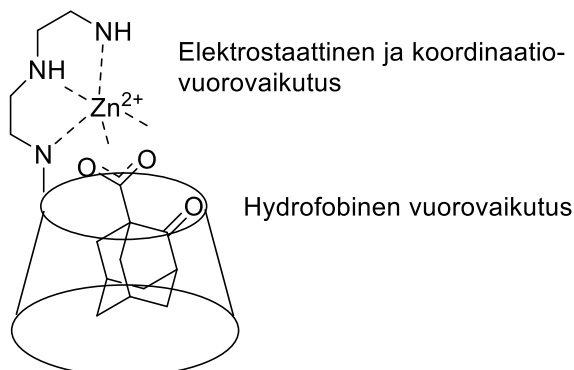
Kaavio 9. N-alkyloitujen triatsakruunun ja tetra-atsakruunun synteesit

3. ATSAKRUUNUJEN BISYKLISTEN METALLIKOMPLEKSIEN SOVELLUTUKSET

3.1. Rakenne, ominaisuudet ja molekulaarinen tunnistaminen

Bisykliset metallikompleksit eroavat merkittävästi yksirenkaisista vastaineistaan. Bisyklisissä metallikomplekseissa kaksi metalli-iona ovat lähekkäin toisiaan, joten ne voivat vuorovaikuttaa toisiinsa – eritoten jos ne ovat paramagneettisia. Lisäksi kun niiden etäisyys toisistaan on oikeanlainen, ne voivat sitoutua ja näin tunnistaa erilaisia

substraatteja ja vaikuttaa niiden aktivoitumiseen spesifisemmin. Ne voivat siis tietyissä tilanteissa jäljitellä luonnon omia biologisia metalloproteiineja. Metallionit voivat sijaita kompleksissa toisiinsa nähden eri topologioissa. Metallikeskusten etäisyyttä toisiinsa voidaan helpoiten säätää muuttamalla keskusrakenteeseen liittyneen linkkerin pituutta. Tällöin on kuitenkin kiinnitettävä huomiota tarvittavan jäykkyyden aikaansaamiseen metalli-ionikeskusten välillä. Linkkeri on usein hiili-hiili- tai typpi-typpi-sidoksinen ketju. Metallionikeskukset ovat yleensä keskenään homotooppisia, eli niissä on samanlaiset renkaat ja metalli-ionit. Kuitenkin heteroditooppisia makrosyklejäkin on syntetisoitu mutta niiden synteesit ovat monimutkaisempia.²¹ Molekulaarisessa tunnistamisessa esiintyy monenlaisia vuorovaikutuksia. Ligandi vuorovaikuttaa monesti sekä metallikeskukseen, että sitä ympäröivän kaviteetin kanssa. Vuorovaikutukset eivät rajoitu pelkästään elektrostaattisiin vuorovaikutuksiin metallionin (kuva 4) kanssa vaan myös ympäristöllä, jossa kompleksi muodostuu, on merkitystä. Vedessä hydrofobisten vuorovaikutusten lisäksi stabiilisuuteen ja näin tunnistamiseen vaikuttaa vesimolekyylien liikkuvuus ja hylkimisvaikutus, jotka vaikuttavat kokonaisentropiaan¹¹.

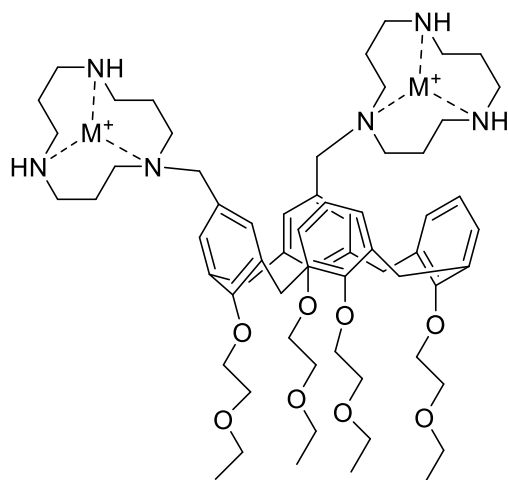


Kuva 4. Molekyylin vuorovaikutukset kaviteetin kanssa

3.2. Metallikompleksien kaviteetin suunnittelu

Kun suunnitellaan keinotekoisia entsyymejä, jotka matkivat luonnossa esiintyviä metallikomplekseja, on otettava huomioon useita asioita. Katalysoivan vaikutuksen aikaansaamiseksi, on katalyytin pystyttävä muodostamaan samantyyppisiä koordinaatiosidoksia kuin luonnolliset entsyymit. Tärkeintä on keinotekoisien entsyymien

orientaatio ja liikkuvuus katalysoitavassa reaktiossa. Metallikationia ympäröivä tasku tulee olla oikean kokoinen ja muotoinen. Lisäksi katalyytin muu rakenne tulee olla juuri sopivan joustava mutta myös jäykkä.¹² Metallikompleksilla on useampi tehtävä. Se on osallisena molekyylin tunnistamisessa ja sen on myös ohjattava transiitotilaa ja reaktiota oikeaan suuntaan. Metallioni ja siihen liittyneet donorit kuten typpi, happi tai rikki muodostavat ensimmäisen (primaarisen) koordinaatiokehän. Ensimmäinen koordinaatiokehä tulee suunnitella siten, että sillä on riittävä kyky toimia Lewisin haponna, sillä on halutunlaiset elektrostaattiset vuorovaikutukset ja hapetus-pelkistys potentiaali.¹² Sekundaarisen koordinaatiokehän muodostavat keinotekoisen katalyytin molekyyliin liitetyt funktionaaliset ryhmät, jotka auttavat esimerkiksi katalyytin liittymistä substraattiin (koordinaatio), suojelemaan metalli-ioniä tai irrottamaan katalyytin tuotteet. Tämän sekundaarisen kehän biologisissa entsyymeissä muodostaa proteiinien laskostuminen, jota on vaikea matkia käyttämällä pientä keinotekoista molekyyliä. Sekundaarista koordinaatiokehää voidaan muokata ja säätää liittämällä siihen esimerkiksi H-sidoksen luovuttajia tai vastaanottajia. Näin voidaan edistää epätavallisten välituotteiden muodostumista ja stabiloida niitä.¹² Yksi keino on käyttää apuna tunnettuja makrosyklejä kuten kaliksareenejä tai syklodekstriinejä, jotka voidaan funktionalisoida donoriryhmillä metalli-ionin sitoutumista varten (Kuva 5). Kolmannen koordinaatiokehän muodostaa entsyymien kolmiulotteinen rakenne, joka muodostaa erityisen taskun, joka parantaa substraatin sitoutumista ja selektiivisyyttä. Se myös osallistuu reaktiotuotteiden poistoon ja sillä on merkitystä vesimolekyylien sijoittumisessa ja protonien siirrossa. Vedellä on sitoutumisissa erittäin suuri merkitys, sillä se kilpailee elektrostaattisista vuorovaikutuksista (varaus, dipolit ja vetysidokset) muiden substraattien kanssa. Näillä vuorovaikutuksilla on merkittävä rooli reaktiivisuudessa ja selektiivisyydessä. Kolmannen koordinaatiokehän vaikutusta kutsutaan myös nimellä *cavity effect*.¹²



Kuva 5. Atsakruunu-metallikomplekseja liitetty kaliks[4]areeniin.¹³

Synteesistrategioissa molekyylin keskusrakenteeseen liitetään kovalenttisesti ligandeja, joissa on linkkerin välityksellä kiinni metallikompleksi. Synteesissä voidaan käyttää myös toista lähestymistapaa, jossa koko katalyytti syntetisoidaan ensimmäisenä ilman metalli-ioneja, jotka sitten tuodaan yhdisteeseen myöhemmin. Linkkerin pituutta, keskusrakenteen muotoa ja jäykkyyttä muuttamalla voidaan vaikuttaa siihen, millä etäisyydellä ja missä asennossa metallikompleksit suhteessa toisiinsa ovat. Keskusrakenteessa on myös funktionaalisia ryhmiä, joilla pyritään vaikuttamaan esimerkiksi katalyytin spesifisyyteen tai katalyysikykyyn. Kun valitaan uuden molekyylin keskusrakennetta, tulee pohtia muun muassa ympäristöä, jossa sitä on tarkoitus käyttää. Esimerkiksi kaliksareenit eroavat syklodekstriineistä merkittävästi. Syklodekstriinit ovat veteen liukenevia ja hydrofobinen efekti saa lipofiilisen substraatin hakeutumaan syklodekstriinin keskukseen vesiliuoksissa. Tämä ominaisuus yleensä pysyy, vaikka syklodekstriiniin liitetään funktionaalisia ryhmiä. Kaliksareenit ovat veteen liukenemattomia ja niitä tulee muokata merkittävästi, jotta ne olisivat veteen liukenevia. Nämä muokkaukset eivät taas usein sovi yhteen muiden metallikompleksiin tehtävien funktionalisointien kanssa. Ne liukenevat siis käytännössä vain orgaanisiin liuottimiin ja tämän vuoksi niitä ei yleensä voida käyttää molekyylireseptoreina mutta niitä voidaan käyttää jonkun toisen rakenteen perustana. Kaliksareenit eivät siis itsessään ota osaa katalyysireaktioon vaan toimivat metallikompleksiligandien tukirankana. Kaliksareenejä voidaan myös jäykistää muodostamalla kovalenttisia sidoksia sen fenolisten ryhmien välille.

Toisin kun kaliksareenit, syklodekstriinit pystyvät sitoutumaan substraattiin vesiliuoksissa. Tällöin substraatit pääsevät aktiivisen metallikationin lähelle ja niillä on kineettinen vaikutus metallikationiin. Joustavampiin kaliks[6]areeneihin voidaan liittää kolme yksihampaista donori-ryhmää 1-,3- ja 5- aseisiin. Nämä voivat olla esimerkiksi pyridiini- tai imidatsolirenkaita. Tällöin ensimmäinen koordinaatiokehä muodostuu pseudo-tetrahedraalisella tavalla, jossa metalli-ioniin (Zn^{II} tai Cu^{II}) on koordinoituneina kolme typpidonoria ja yksi ligandi. Cu^{II} -komplekseilla voi metalliin koordinoitua lisäksi yksi vesimolekyyli, jolloin voidaan puhua 5-koordinoituneesta kompleksista. Vierasmolekyyli voi olla primaarinen amiini, alkoholi, amidi tai nitrili. Näiden sitoutumiseen eivät vaikuta vain koordinaatiosidokset metalli-ionin kanssa vaan myös vetysidokset ja $CH-\pi$ -sidokset. Näitä kaliksareeneja sanotaan ”suppilokomplekseiksi”, *funnel complex*, koska vierasmolekyylin on mentävä niiden läpi saavuttaakseen metalli-ionin ja toimii näin myös selektiivisenä reseptorina neutraaleille ja tietyn kokoisille ja muotoisille (lineaariset, ei rengasmaiset, steeriset esteet). Primääriset amiinit ovat parhaimpia donoreita, sitten tulevat alkoholit jne. Sekundääriset amiinit eivät sitoudu metalli-ioneihin. ”Pehmeämpi” Cu^I -ioni muodostaa 2- ja 4- arvoisia koordinaatiosidoksia. Sekä Zn^{II} , että Cu^{II} -ionikompleksit muodostavat 5-arvoisia koordinaatiosidoksia. Porfyriinit ovat voimakkaasti kelatoivia tasomaisia ligandeja. Monenlaisiin keskusrakenteisiin (kaliksareenit, resorsinareenit, syklodekstriinit ja niin edelleen) voidaan liittää ligandeiksi porfyriinejä. Kun porfyriini on liittynyt keskusrakenteeseen kahdella linkkerillä siten, että sen toinen puoli on aina keskusrakenteeseen päin, voi tarpeeksi pieni vierasmolekyyli koordinoitua porfyriinikompleksiin joko endo- tai ekso-puolelta. Tarpeeksi pieni molekyyli suosii yleensä endo-puolta suuremman sitoutumisvakion vuoksi, suuremmat sitoutuvat ekso-puolelle. Monesti metalli-ioni ja kaviteetti toimivat yhdessä vierasmolekyylin sitoutumisessa. Näin ei ole asian laita kaliks[4]areenien kanssa, joissa vierasmolekyylin ei tarvitse olla tekemisissä kaliksareenin kaviteetin kanssa.¹² Tunnistuksen mekanismina entalpian lisäksi (elektrostaattiset vuorovaikutukset) vedessä on hydrofobinen efekti (entropian kasvu). Elektrostaattiset vuorovaikutukset ovat pääosassa orgaanisissa liuotimissa (orgaaninen liuotin kilpailee vierasmolekyylin kanssa) ja hydrofobiset vuorovaikutukset vedessä. Orgaanisessa liuotimessa metalli-ionin läsnäolo on pakollinen, jotta ligandi voisi vuorovaikuttaa kaliksareeni-kaviteetin kanssa. Ligandin sitoutumiseen vaikuttavat siis koordinaatio metalli-ioniin ja vuorovaikutukset kaviteetin

kanssa. Lisäämällä kompleksiin yksi uusi metallikeskus, syntyy uusia sidoksia (metalliligandi- H-sidos, elektrostaattiset vuorovaikutukset) ja näin affiniteetti ja selektiivisyys parantuvat. Tämä tekee kuitenkin molekyylistä monimutkaisemman suunnitella ja syntetisoida. Joustavissa rakenteissa korostuu vierasmolekyylin tunnistaminen indusoidun sovitteen mekanismilla ”induced-fit”-prosessissa, jossa vierasmolekyylillä muuttuu isäntämolekyylin konformaatiota.

Ensimmäinen, toinen ja kolmas koordinaatiokehä ovat tärkeitä käsitteitä biomimeettisten makrosyklien suunnittelussa. Monihampaisen ligandin suunnittelussa tärkeää on ensimmäinen koordinaatiokehä, jossa on tiukasti kiinni metalli-ioni ja jolta löytyy vapaita paikkoja substraattien ja liuottimien vuorovaikutukselle. Tällöin merkittävässä roolissa on vapaiden elektronien jakautuminen ja geometria. Geometrisesti tripodiset polyatsaligandit toimivat selektiivisyytensä vuoksi paremmin kuin tasomaiset. Toinen koordinaatiokehä tarkoittaa ligandiin liittyneitä muita ryhmiä, jotka vaikuttavat metallionin aktiivisuuteen sekundaaristen vaikutusmekanismien kautta (vetysidoksen luovuttaja/vetysidoksen vastaanottaja). Kolmas koordinaatiokehä on kauempana ja luonnossa esiintyvien entsyymejä ajatellen hankalammin jäljiteltävissä. On kuitenkin havaittu, että entsyymaattinen tasku on välttämätön substraatin sitoutumisessa, selektiivisyydessä ja tuotteen poistamisessa. Se myös vaikuttaa vesimolekyylien sijoittumiseen eritoten, mikäli ne osallistuvat reaktioon tai protonin siirtoon redoxprosesseissa. Parhaiten näitä entsyymaattisia taskuja simuloi makrosykli, jotka muodostavat kaviteetin metalli-ionin ympärille.¹² Entsyymien tärkeimpiä ominaisuuksia on niiden kyky toimia vesiliuoksissa. Vesi on elektrostaattisten vuorovaikutusten kilpailuareena, jossa H-sidokset, dipoli-sidokset ja varaukset ovat merkityksellisiä reaktiivisuuden, selektiivisyyden ja tehokkuuden kannalta. Suurin osa keinotekoisista entsyymeistä eivät kuitenkaan ole vesiliukoisia. Tähän on syynsä. Luonnon entsyymeissä metalli-ioni on syvällä entsyymien sisällä, jossa olosuhteet muistuttavat enemmän orgaanista liuotinta kuin vesiliuosta. Jos metalli-ioni on ”näkyvissä” vesiliuoksissa, se muodostaa helposti veden kanssa hydro/okso-yhdisteitä, jotka dimeroituvat, polymeroituvat ja sakkautuvat. Lisäksi sekä suunnittelun, että synteessin kannalta on vaikeaa valmistaa molekyyli, joka samanaikaisesti pystyisi metalli-ioni -koordinaatioon, olisi suojassa vedeltä ja olisi veteen liukeneva.¹²

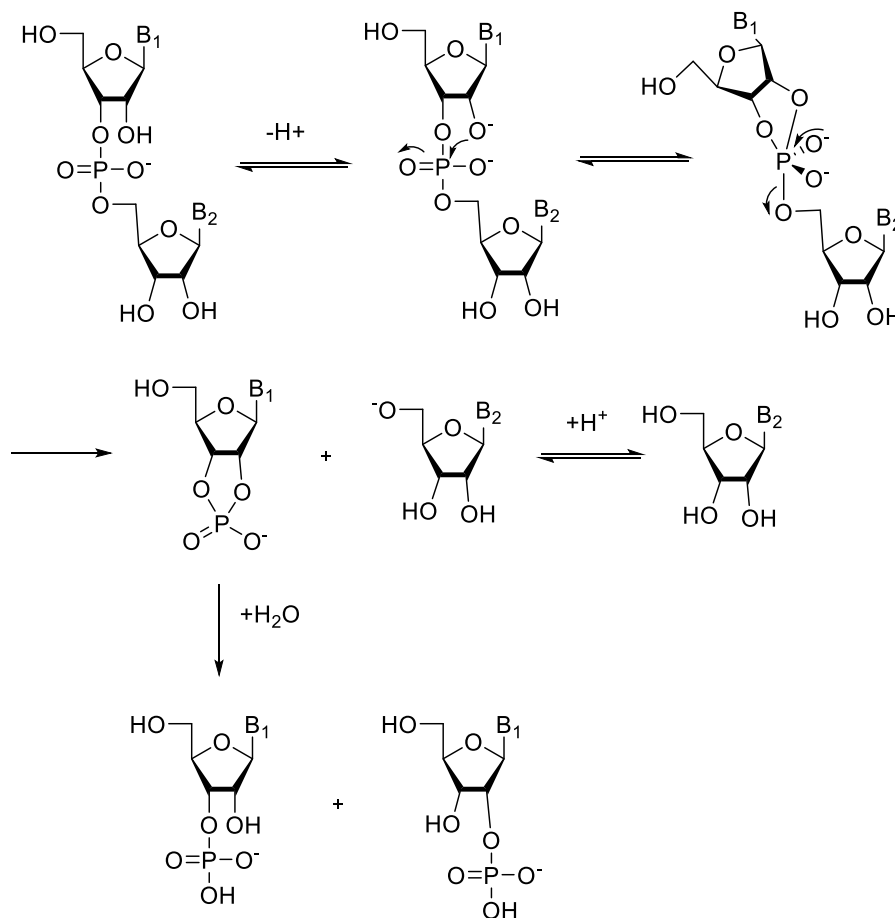
Monia keinotekoisia entsyymejä suunnitellaan käytettäväksi hydrolyytisissä katalyysissä. Hydrolyytiset metalloentsyymit käyttävät esimerkiksi Zn^{II} -ionia Lewisin happona, joka vahvistaa koordinaation kautta $P=O$ tai $C=O$ sidosten elektrofiilisyyttä ja/tai sitoutuneen veden nukleofiilisyyttä. Mononukleaariset Cu^I -kompleksit vuorovaikuttavat hapen kanssa muodostaen ensin Cu^{II} -superokso intermediaatin ja edelleen stabiilimman dinukleaarisen perokso-yhdisteen, joka voi tämän jälkeen toimia hapettavana agenttina. Luonnon entsyymeissä proteiinitasku suojelee tällaisia addukteja dimerisaatiolta ja rajoittaa kontaktia liuottimen kanssa. Keinotekoisissa katalyyteissä tätä proteiinitaskua matkitaan kaviteetilla. Biomimeettisten kaviteettipohjaisten kompleksien toiminta perustuu kahteen erilaiseen strategiaan: 1) Valmistetaan yksi tai useita ligandeja, joissa on sitoutumispaikka metalli-ionille. Näitä ligandeja voidaan liittää keskusruntoon tarpeen mukaan. Näillä ligandeilla on tunnetut koordinaatio-ominaisuudet ja niitä voidaan liittää haluttu määrä. Yleensä ongelmana näissä on ligandien metalli-ionien reaktiivisen keskuksen ja tukirangan välinen orientaatio. Ligandien välille voidaan kuitenkin tuoda kovalenttisiä linkkereitä tuomaan jäykkyyttä rakenteeseen mutta tämä on usein synteessin kannalta haastavaa. 2) Toinen strategia on tuoda donori-atomeita itse makrosykliin, joka määrittelee kaviteetin. Tässä strategiassa ongelma on oikeanlaisen geometrian saavuttaminen. Hyvänä puolena on metalli-ionin sijainti eristyksissä.¹²

3.3. Dinukleotivat atsakruunut

Aikoinaan huomattiin, että geenin ilmenemistä voidaan estää syntetisoimalla kyseisen geenin koodaaman proteiinin informaatiota välittävän lähetti-RNAn antisense-juoste, joka sitoutuessaan mRNA-ketjuun estää sen toiminnan ja näin geenin ilmenemisen.¹⁴ Tällä periaatteella voidaan hoitaa monia tarttuvia tauteja, perinnöllisiä sairauksia ja syöpiä. Lähetti-RNA:n toimimattomaksi tekemisen sijaan voidaan käyttää tapoja, joilla halutut RNA-juosteet saadaan katalyyttisesti pilkottua osiin. Tällöin geenin ilmeneminen estyy ja katalyytti voi jatkaa toimintaansa toisen RNA-juosteen kohdalla. Lisätuna pilkotut RNA-juosteet palaavat elimistössä takaisin kiertoon.² Tähän pulmaan vastaa osittain keinotekoisien ribonukleasien kehitys, mikä on nykyisin yksi erittäin tärkeä biolääketieteellisen tutkimuksen kohde. Monet dinukleotivat atsakruunut ovat hyviä ehdokkaita ribonukleaseiksi. Kuten dinukleotivissa atsakruunuissa, myös monissa luonnon ribonukleaseissa on useita sitoutumispaikkoja metalli-ioneille. Nämä

mahdollistavat varauksen siirron ja allosteriset ominaisuudet, joita yleensä havaitaan biologisissa systeemeissä.¹⁵ Keinotekoiselta ribonukleasilta vaaditaan kaksi ominaisuutta: 1) Sen täytyy tunnistaa RNA-juosteesta oikea kohta ja sitoutua siihen. 2) Se pystyy tehokkaasti pilkkomaan fosfodiesterisidoksen sitoutumiskohdastaan.

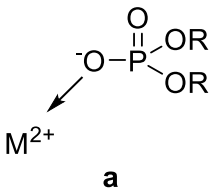
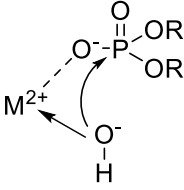
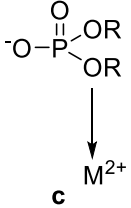
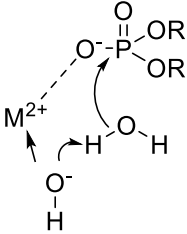
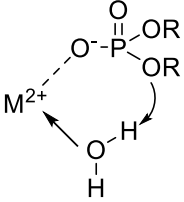
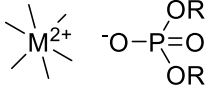
Elävässä solussa RNA-sekvenssin tunnistaminen tapahtuu horisontaalisesti, jossa nukleinihappoemäkset tunnistavat parinsa vetysidosten avulla ja sitten sitoutuvat elektrostaattisten ja hydrofobisten vuorovaikutusten sanelemana.² Keinotekoisien ribonukleasien toimintastrategiana voisi olla ratkaisu, jossa pilkkottavalle RNA-sekvenssille tehdään synteettinen 17-22 nukleotidia sisältävä antisense-oligonukleotidi, johon on kiinnitetty fosfodiesterisidoksia pilkkova entsyymaattinen osa. Monilla metallioneilla ja niiden hydrokso-komplekseilla on havaittu olevan entsyymaattista vaikutusta fosfodiesterisidosten pilkkoutumisessa. Näitä ovat esimerkiksi Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} ja Cu^{2+} . Kaaviossa 10 on kuvattu fosfodiesterisidoksen emäskatalyyttinen hydrolyysimekanismi.



Kaavio 10. Nukleinihapon fosfodiesterisidoksen hydrolyysi eli pilkkoutuminen²

Vaikka RNA onkin erittäin pysyvä normaaleissa olosuhteissa (aq., pH 7, 25 °C) ja fosfodiesterisidoksen puoliintumisaika on n. 110 vuotta, on sopivissa olosuhteissa sen 2'-OH-ryhmä altis reaktiolle, jossa metalli-ioni korvaa OH-ryhmän vedyn. Metalli-ioni saa aikaan ensin 2'-oksidianionin muodostumisen, mikä polarisoi P-O-sidoksen, jolloin oksianioni reagoi edelleen fosforin kanssa. Tällöin fosforin elektronitiheys pienenee mutta suurenee jälleen välituotteen lohjetessa. Nyt myös katkeavan 5'-O-P-sidoksen hapen elektronitiheys laskee.² Metallikationi-kompleksi siis katalysoi ensin 3',5'-fosfodiesterisidoksen transesterifikaatiota 2',3'-sykliseksi fosfaatiksi. Metalli-ioni voi vaikuttaa fosfodiesterisidoksen katalyysiin kolmella suoralla ja kolmella epäsuoralla mekanismilla (Taulukko 1).

Taulukko 1. Metallionin mahdolliset katalyyttiset mekanismit fosfodiesterisidoksen pilkkoutumisessa³

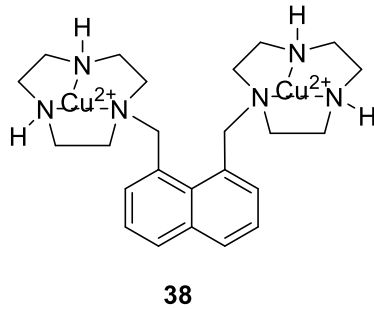
<p>Suorat katalyysimekanismit</p>	<p>Lewis happo -aktivointi. (fosforyylihappi koordinoituu metalliin → aktivointi) → nukleoofiilinen</p>  <p style="text-align: center;">a</p>	<p>Nukleoofiili koordinoituu metalli-ioniin ja aktivoi lähtevän ryhmän.</p>  <p style="text-align: center;">b</p>	<p>Lähtevän ryhmän aktivointi, jossa lähtevän ryhmän happi koordinoituu metalliin.</p>  <p style="text-align: center;">c</p>
<p>Epäsuorat katalyysimekanismit</p>	<p>Metalliin koordinoituneet hydroksidit toimivat emäskatalyyttinä.</p>  <p style="text-align: center;">d</p>	<p>Metalliin koordinoituneet vesimolekyylit toimivat happokatalyyttinä.</p>  <p style="text-align: center;">e</p>	<p>Elektrostaattinen vuorovaikutus metallin ja koordinoitumattoman fosforin välillä.</p>  <p style="text-align: center;">f</p>

Käytetyin metalli-ioni synteettisissä fosfodiesteraseissa on Zn^{2+} . Zn^{2+} -ioni esiintyy kofaktorina myös luonnon omassa hydrolaasissa. Se on kohtuullisen hyvä Lewisin happo, sillä on nopea ligandinvaihto, se on myrkytön, eikä hapetus-pelkistys-reaktioita esiinny. Luonnollisen hydrolaasin Zn^{2+} -keskuksessa ei esiinny myöskään ligandikentän stabilisaatioenergiaa. Se siis omaksuu hyvin reaktiossa vaadittavan koordinaation.³

Myös harvinaiset maametallikompleksit ovat kiinnostuksen kohteina niiden korkean ionisen potentiaalin takia ja ne ovat myös voimakkaita Lewisin happoja. Ligandien rakenteet ovat myös merkityksellisiä. Niiden rakenne vaikuttaa siihen, minkä kokoisia metalli-ioneja ne pystyvät stabiloimaan.

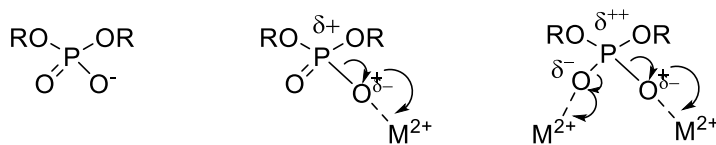
Periaatteessa myös vapaat metalli-ionit pystyisivät katalysoimaan em. reaktiota mutta tarvitaan kuitenkin sopiva ligandi, joka sitoo metalli-ionin RNA-juosteen kohdan tunnistavaan anti-sense-oligonukleotidiin. Tällöin myös metalli-vesi-ionin happamutta voidaan säätää, metalli-ionien sakkautuminen voidaan estää ja ligandin avulla voidaan saavuttaa metalli-ionien välinen oikeanlainen etäisyys ja orientaatio.²

Luonnon omassa entsyymeissä on monesti myös kaksi tai useampia metalli-ioneja aktiivisissa katalyyttisissä keskuksissa. Näitä ovat esimerkiksi: alkalinen fosfataasi (AFOS, maksaentsyymi, Zn^{2+} , Mg^{2+}), purppurahapon fosfataasi (Fe^{3+} , Zn^{2+}), ribonukleaasi H (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}), fosfotriesteri (Zn²⁺, Zn²⁺) ja ureaasi (Ni^{2+} , Ni^{2+}). Luonnon esimerkin viitoittamana on päätelty ja tutkimuksissa myös havaittu, että vähintään kaksi metalli-iona sisältävät katalyytit ovat tehokkaimpia monien biologisten sidosten hydrolyysissä². Joissakin uudemmissa tutkimuksissa on lisäksi havaittu, että heterodinukleaariset metalli-ionikompleksit ovat parempia katalyyttejä kuin homodinukleaariset metalli-ionikompleksit.² Yksi esimerkki homodinukleaarisesta metalli-ionikompleksista on 1,8-bis(1,4,7-triatsasyklononan-1-yyli)naftaleeni- Cu^{2+} -kompleksi (**38**), joka pilkkoo adenylyyli-3',5'-adenosiinin (ApA) 500 kertaa nopeammin kuin yksiytiminen 1,4,7-triatsasyklononanin Cu^{2+} -kompleksi (kuva 6).



Kuva 6. Homodinuklearinen ApA-hydrolaasi²

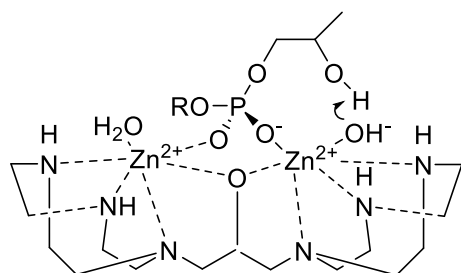
Oleennaista kaksiytimisten hydrolaasien tehokkuuden kannalta on metalli-ionien etäisyys toisistaan, molekyylin jäykkyys sekä muodostuvan metalli-vesi-ionin happamuus. Kaksiytimisten hydrolaasien toiminnan mekanismeja saattaa olla useita mutta seuraavassa kaaviossa 11 on yksi mahdollisista malleista.



aktivoimaton 1 x Lewis happo-aktivointi 2 x Lewis happo-aktivointi

Kaavio 11. Mahdollinen metalli-fosfaattikompleksin muodostuminen HPNP-pilkkoutumisessa²

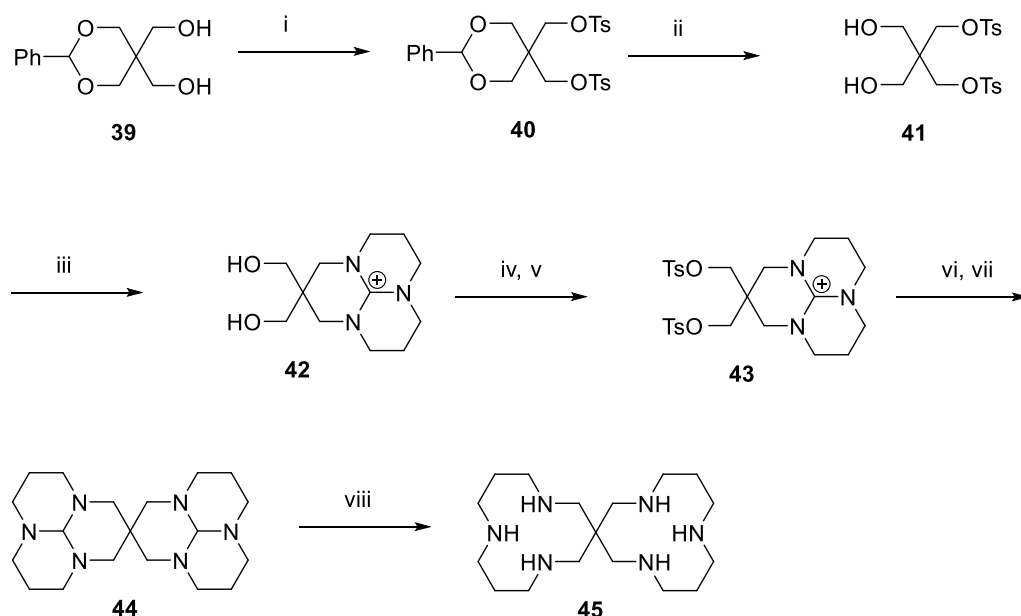
HPNP-pilkkoutumisessa etuna on sopivalla etäisyydellä sijaitsevat metalli-ionit. Kun metalli-ionit ovat lähekkäin, on varaustiheys ja näin katalyyttinen aktiivisuus suuri mutta tällöin on syytä pohtia varausten välisiä elektrostaattisia vuorovaikutuksia (hylkimistä). Hylkimistä voidaan vähentää tuomalla metalli-ionien väliin jokin varjostava ryhmä. Seuraavassa kuvassa 7 varjostavana ryhmänä on käytetty alkoksi-ryhmää.



Kuva 7. Alkoksiryhmän varjostus dinukletoivassa hydrolyyttisessä entsyymissä²

3.4. Spiroatsakruunut

Monissa keinotekoisissa ribonukleaseissa käytetään metallikomplekseja, jotka on kiinnitetty linkkereihin keskusrakenteeseen. On myös mahdollista valmistaa spiroyhdisteitä, joissa näitä linkkereitä ei ole. Spiroyhdisteet voivat mahdollisesti toimia myös fosfodiesteraaseina. Seuraavassa erään tällaisen spiro-molekyylin synteesi.¹⁹ Todennäköistä kuitenkin on, että spiro-atsakruunu-metallikomplekseissa metalli-ionien etäisyys on liian suuri katalyyttistä aktiivisuutta ajatellen.²



(i) TsCl, Py, rt; (ii) H₂ (5 atm), 10% Pd/C, EtOH, 15h, rt; (iii) TBD, DME, 24 h, 40°C; (iv) TsCl, DMAP, Py/DCM (1:1), 24 h, 0°C; (v) NaBH₄, THF, 48h, rt; (vi) TBD, DME, 24 h, 40°C; (vii) NaBH₄, DME, 48 h, rt; (viii) aq. HCl (6mol L⁻¹), 1 week at reflux

Kaavio 12. Erään spiroyhdisteen synteesi²

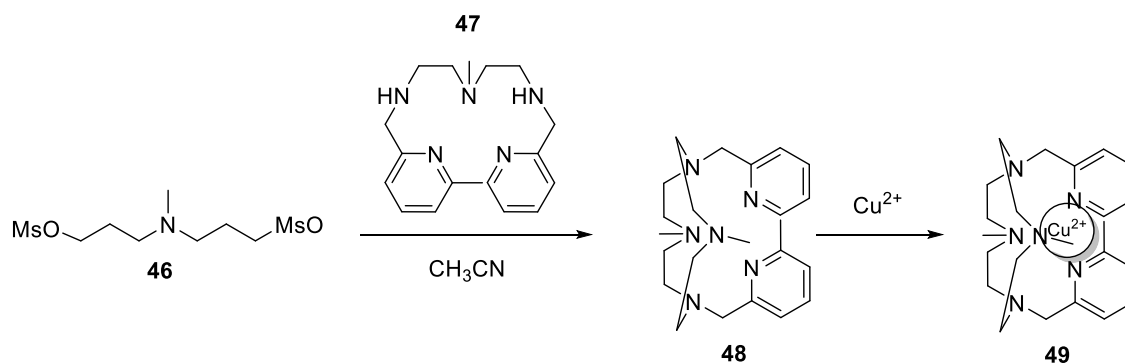
3.5. Kryptandit

3.5.1. *Yleistä kryptandeista*

Kryptandit ovat ”kolmiulotteisia” kruunueetterien analogeja. Useat niistä ovat myös atsakruunueettereitä tyypin sitoutumisominaisuuksien vuoksi. Ne ovat selektiivisempiä ja ne sitoutuvat lujemmin koordinaatiokeskukseen kuin ”kaksiulotteiset” analoginsa, osittain siksi, että niillä on enemmän sitoutumiskohtia. Niiden kompleksit ovat lipofiilisiä ja niiden avulla voidaan liuottaa tavallisesti liukenemattomia suoloja orgaanisiin liuottimiin. Niitä on hyödynnetty molekyylin tunnistuksessa, katalyyssissä, kuljetuksessa ja molekyylielektronikassa. Tulevaisuudessa niitä voitaisiin mahdollisesti käyttää abiottisina reseptoreina tai molekyylivektoreina, jolloin ne kuljettaisivat esimerkiksi lääkeaineita solumembraanien läpi. Jotkut kryptandit kykenevät myös stabiloimaan erikoisilla hapetusluvulla esiintyviä metalli-ioneja tai esim. hapen tai kosteuden kanssa reagoivia yhdisteitä.

3.5.2. *Kryptandien synteetit*

Kryptandien synteetit ovat usein monivaiheisia ja niissä on verrattain pienet saannot. Yleensä synteetit tehdään matalissa konsentraatioissa, jotta vältetään polymerisointireaktiot. Yleisenä synteestistrategiana on tehdä ensin yksirenkainen kruunuyhdiste, johon liitetään ylimääräinen ketju, jolloin muodostuu kaksirenkainen kolmiulotteinen kruunuyhdiste (Kaavio 13). Reaktiona on yleensä Schiffin emäksen kondensaatio, jossa sidoksia muodostuu amiinien ja aldehydien välille. Kryptandeja voidaan valmistaa myös käyttämällä haluttua metalli-iona matriisina, jonka ympärille sopivasti valitut reaktiiviset yhdisteet muodostavat häkin. Myös kondensaatioreaktioita, joissa jokin makrosykli kondensoituu jonkin toisen yhdisteen kanssa, tunnetaan.²² Uusien isäntä- ja kuljetusmolekyylien suunnittelu on yksi kryptandien tärkeimmistä kehityslinjoista. Yksinkertaisten kruunueetterien kyvyt muodostaa komplekseja ovat varsin rajatut verrattuna kryptandeihin.²³



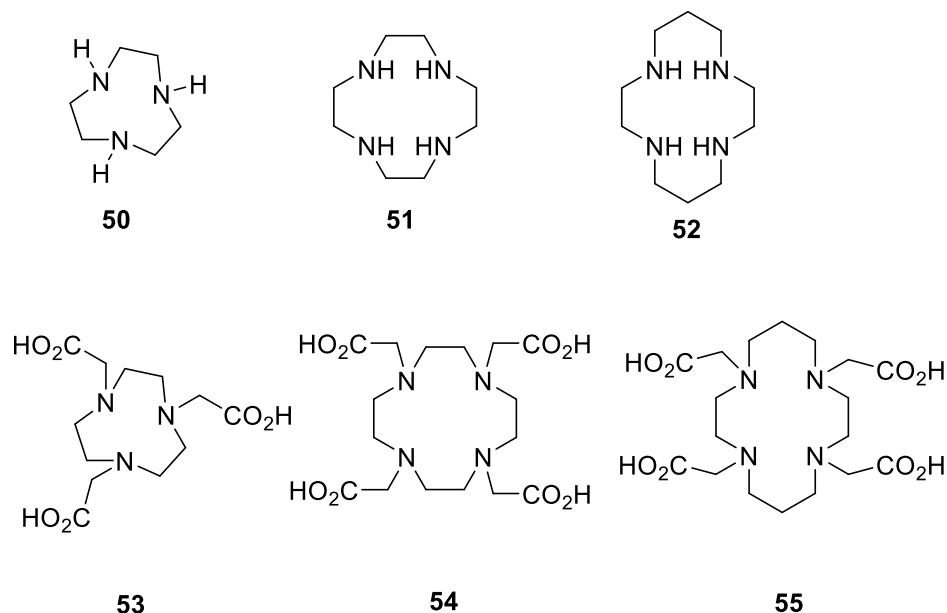
Kaavio 13. Esimerkki kryptandin synteesistä (2,2'-bipyridiinin kuparikompleksi **49**)²²

3.6. Biolääketieteelliset sovellutukset ja niiden tulevaisuuden näkymiä

3.6.1. Yleistä

Kelatoivien makrosykliligandien tutkimus saattaa tuoda tulevaisuudessa läpimurtoja sairauksien hoidossa. Makrosyklisiä ligandeja funktionalisoimalla voidaan muuttaa niiden koordinaatio-ominaisuuksia ja siten myös metalli-ionien käyttäytymistä biologisissa systeemeissä. Uudenlaisen koordinaatiokemian avulla voidaan tulevaisuudessa kehittää uusia strategisesti tiettyyn tarkoitukseen kehitettyjä lääkkeitä ja geeniterapiahoitoja. Käytetyimpiä makrosyklejä ovat atsakruunut. Atsakruunuille on kehitetty useita valmistus- ja funktionalisointimenetelmiä. Käytetyimpiä atsakruunuja ovat rengaskokonsa vuoksi TACN (1,4,7-triatsasyklononaani **50**), sykleeni (1,4,7,10-tetra-atsasyklododekaani **51**) ja syklaami (1,4,8,11-tetra-atsasyklotetradekaani **52**) sekä näiden johdannaiset NOTA (**53**), DOTA (**54**) ja TETA (**55**)²⁴ (Kuva 8). Yksi makrosyklejä sisältävien molekyylien suurimmista synteettisistä ja lääketieteellisistä haasteista on kehittää niistä sellaisia, että ne ovat veteen liukenevia, säilyvät esimerkiksi verenkierrossa pitkään (veren kuvan saamiseksi) ja läpäisevät solukalvon. Monet nykyisistä molekyyleistä toimivat vain solun tai verisuonten ulkopuolella. Uusia, tiettyihin soluihin ja kudoksiin hakeutuvia kuvantamisaineita voitaisiin kehittää. Ne mahdollisesti kykenisivät kohdistumaan niiden solujen reseptoreihin, jotka ovat yli-ilmenevinä joissakin sairauksissa, kuten esimerkiksi progesteroni-reseptoreihin rintasyövässä.²⁴ Varjoaineet voisivat toimia periaatteella, jossa ne hakeutuvat tiettyihin kudoksiin luonnollisten kuljetus- ja sitoutumismekanismien avulla. Mikäli ne sitoutuisivat esimerkiksi fosfaattiryhmiin, ne mahdollisesti voisivat kulkeutua luuhun.

Yhtenä päämääränä on myös kehittää pitkään verenkierrossa pysyviä aineita ("blood pool imaging"). On haastavaa kehittää yhdisteitä, jotka läpäisevät solukalvon riittävässä määrin, jotta ne voidaan havaita. Nykyiset yhdisteet ovat lähinnä solun ulkopuoliseen toimintaan kykeneviä.



Kuva 8. Eräitä käytetyimpiä atsakruunuligandeja ja niiden analogeja²⁴

3.6.2. MRI-sovellutuksia (varjoaineet)

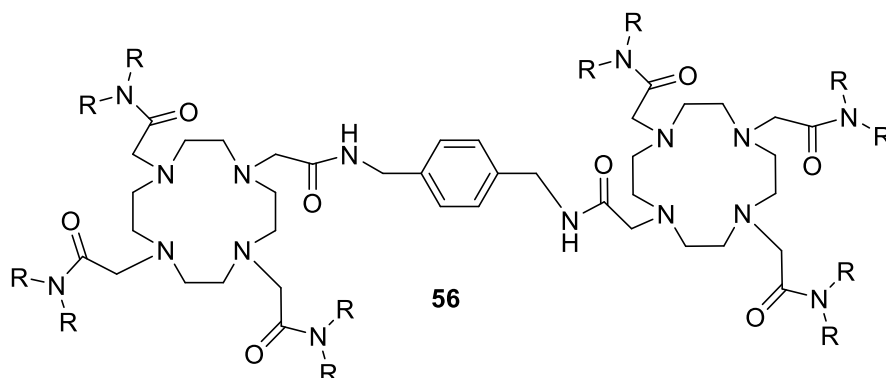
Makrosykliset kelatoivat molekyylit pystyvät muodostamaan erittäin pysyviä komplekseja siirtymäalkuaineiden ja lantanidien kanssa. Niitä voidaan funktionalisoida ja näin hienosäätää niiden ominaisuuksia. Makrosyklisiä metalli-ionikomplekseja voidaan käyttää eri kuvantamistekniikoissa kuten MRI, SPECT ja PET. Varsinaiseen terapeuttiseen käyttöön, lukuun ottamatta joitain radioisotoopin sisältäviä komplekseja, on sovellutuksia kehitetty niukalti. Yleisimmät makrosyklit ovat atsakruunuja (TACN eli 1,4,7-triatsasyklononaani, sykleeni eli 1,4,7,10-tetra-atsasyklododekaani ja syklaami 1,4,8,11-tetra-atsasyklotetradekaani). Nämä ovat yleistyneet, koska niissä on sopivia ominaisuuksia, kuten kaviteetin koko ja tunnettu synteesimenetelmä sekä useita funktionalisointimenetelmiä.²⁴ MRI-kuvantamistekniikalla saadaan biologisista näytteistä ja eliöistä kolmiulotteisia kuvia. Menetelmä perustuu vedessä olevien protonien resonanssiin. Jotkin MRI-varjoaineet kykenevät pidentämään tai lyhentämään näiden protonien relaksaatioaikoja, mikä saa ne näkymään MRI-kuvissa kirkkaina täplinä. Tämä

perustuu protonien ja varjoaineissa olevien paramagneettisten metalli-ionien vuorovaikutukseen, jolloin vedessä olevien protonien kiertoliike nopeutuu tai hidastuu. Tällöin myös aika, joka protoneilta kestää polarisoitua magneettikentän suuntaiseksi muuttuu ja tämä aika voidaan havaita.²⁵ Kuvantamismenetelmissä käytettävistä metalli-ioneista mielenkiintoisimpia ovat gadolinium(III) ja europium(III). Gadolinium on paramagneettinen sen seitsemän parittoman elektronin vuoksi. Myös relaksaatioaika on pitkä. Yleensä kelatoivat molekyylit suunnitellaan niin, että ionille jää vain yksi tai kaksi vapaata paikkaa, johon vesimolekyyli voi sitoutua. Kelatoiva molekyyli on yleisesti gadoliniumin tapauksessa käytetty 12-rengas. (14-renkaat on huomattu liian epästabiileiksi)²⁴. 12-renkaan jäykkyyttä tulisi kuitenkin kasvattaa. On yritetty kehittää varjoaineita, jotka reagoisivat jotenkin ympäröivään biokemialliseen ympäristöönsä. Tähän mennessä on kehitetty vain passiivisia, konsentraatioeroihin perustuvia yhdisteitä. Europium on paramagneettinen lantanidi, jolla on merkittävät luminesenssiominaisuudet. Eu^{2+} :lla on hyvät relaksaatio-ominaisuudet, optiset ominaisuudet ja se voidaan havaita MRI-laitteilla (paramagneettinen, 7 paritonta valenssielektronia). Eu^{2+} -ioni on vähemmän myrkyllinen kuin Eu^{3+} -ioni ja sillä on parempi relaksaatiokyky. Eu^{2+} -ioni ei ole kuitenkaan normaalisti oksidatiivisesti vakaa mutta kryptandeja hyväksi käyttämällä Eu^{2+} -ioni voidaan suojata hapettavilta vaikutuksilta. Eu^{3+} -ionilla on hyvät paramagneettiset ominaisuudet (vaikkakin heikommat kuin Eu^{2+} :lla) sen kuuden parittoman valenssielektronin vuoksi. Sillä on vahva fotoluminesenssi punaisilla aallonpituuksilla (585–630 nm). Eu-komplekseilla saattaa olla tulevaisuudessa paljonkin käyttöä kuvantamissovellutuksissa.

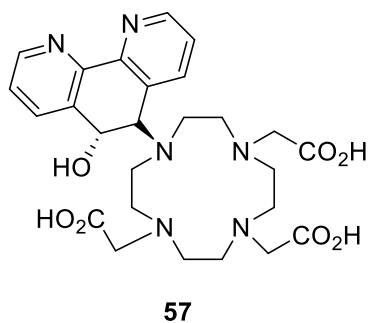
Relaksaation parantaminen

Agentit tulisi suunnitella niin, että ne eivät vuorovaikuttaisi sellaisten biologisten molekyylien kanssa, jotka pienentävät relaksaatiota. Toinen strategia on lisätä metallikeskusten määrää. Näitä on alun perin tutkittu mRNA:n pilkkovien katalyyttien osalta mutta ne soveltuvat mahdollisesti myös MRI varjoaineille. Esimerkkinä sykleeniligandit, jotka on erotettu p-ksylyyli-linkkerillä kuvassa 9. Sykleeniligandin tilalla voidaan käyttää myös sen johdosta, jossa sykleeniin on lisätty koordinoiva ryhmä (kuva 10). Se mahdollistaa useamman paramagneettisen metalli-ionin liittymisen mutta ei reagoi itse gadolinium-keskuksen kanssa. Tällöin saavutetaan korkea relaksaatiokyky. Europium-ioneja käytettäessä voitaisiin yhdistää sen fluoresenssikyvyyt ja sen näkyminen myös MRI-laitteilla. Fluoresenssia voitaisiin käyttää hyväksi, kun ollaan lähellä

tutkittavaa kudosta ja MRI-tekniikkaa tutkittaessa kudoksia etäältä silloin kun fluoresenssia ei voida helposti havaita.¹⁰ Tällä tekniikalla esimerkiksi syövät ensin paikallistettaisiin MRI:n avulla ja ne voitaisiin poistaa tarkasti fluoresoivan vaikutuksen ohjauksella. Europium ei ole yhtä myrkyllinen kuin gadolinium, joka samankaltaisella koollaan ja varauksellaan Ca^{2+} -ionien kanssa häiritsee kalsiumin metaboliaa kehossa. Sopivia ligandeja käyttämällä toksisuutta voidaan kuitenkin vähentää.



Kuva 9. Sykleeniligandit erotettuna p-ksylyyli-linkkerillä²⁴



Kuva 10. Modifioitu sykleenitähde²⁴

3.6.3. Esteraasit, fosfodiesteriaasit ja peptidaasit

Jotkut atsakruunujen bisykliset metalli-ionikompleksit pystyvät jäljittelemään luonnossa esiintyvien katalyyttisten entsyymien toimintaa, joilla on vastaavassa katalyysissä myös kaksi tai kolme aktiivista, metalliatomin sisältävää keskusta. Keinotekoisia hydrolaaseja on tutkittu melko paljon niiden tehokkuuden ja selektiivisyyden vuoksi. Niiden käyttöä

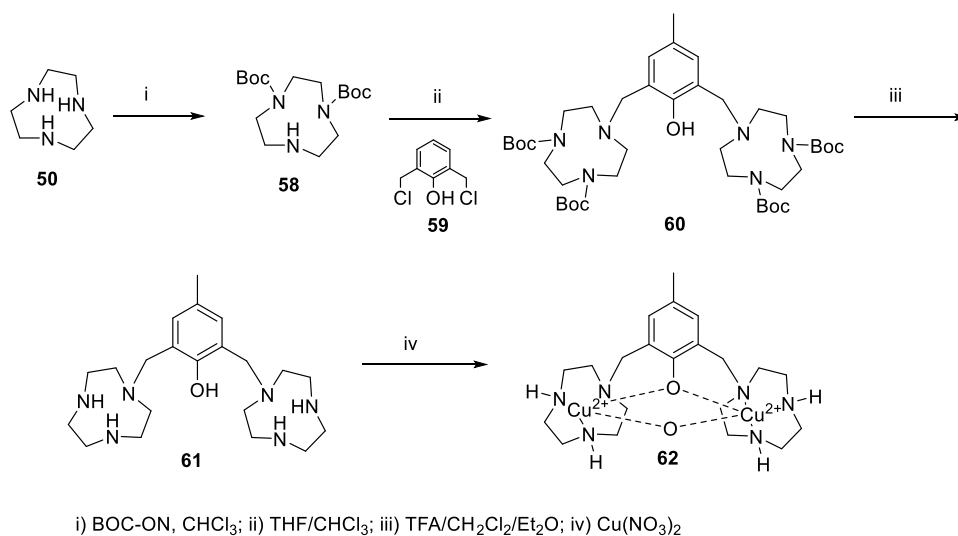
rajoittaa melko monimutkainen valmistusprosessi, epästabiilisuus kehon ulkopuolella ja korkea hinta. Niiden merkitys geenilääketieteessä, molekulaarisessa biologiassa on kuitenkin merkittävä niin luonnollisten entsyymien toiminnan ymmärtämisen, kuten myös terapeuttisten sovellutusten kehittämisen vuoksi.³ Yleensä atsakruunujen metallikompleksit toimivat hydrolyysissä kahden mekanismin kautta: toinen atsakruunu-metallikompleksitähde toimii esterisidoksen tunnistavana osana ja toinen katalysoi sidoksen pilkkoutumista. Olennaista synteettisissä katalyyteissä on metalli-ionien etäisyys toisistaan, joka vastaa substraatissa sidoksen pilkkoutumisessa syntyvän transitiotilan aktiivisten kohtien etäisyyttä ja näin stabiloii transitiotilaa. Vähintään kaksi metalli-atsakruunukompleksia liitetään runkoon etäisyydelle, jossa steeriset ja kineettiset ominaisuudet ovat halutut. Molekyylillä ei saisi olla liian jäykkä mutta ei myöskään liian joustava. Luonnossa esiintyvillä entsyymeillä on usein apunaan 'induced fit'-mekanismi, jossa entsyymi muovautuu sidosten muodostumisen aikana oikeanlaiseen muotoon. Keinotekoiset entsyymit ovat usein liian jäykkiä tai joustavia. Liian jäykät eivät pysty mukautumaan geometrisiin muutoksiin dynaamisen katalyyttisen prosessin aikana ja liian joustavat molekyylit eivät pääse vaikuttamaan substraattiin tarpeeksi lähelle tai riittävän kauan. Luonnossa esiintyvien entsyymien jäljittelemiseksi paremmin, tulisi biomimeettisessä katalyytissä olla useampia katalyyttisiä keskuksia.

Metallikationi toimii katalyyssissä Lewisin hapon tapaan aktivoiden nukleofiilin, substraatin, transitiotilan ja lähtevän ryhmän. Yleensä lähellä esteraasien aktiivista keskusta on neutraaleja, negatiivisesti tai positiivisesti varautuneita aminohappoja, jotka edesauttavat reaktioita. Luonnossa toimivat monimutkaisemmat metalli-esteraasit hyödyntävät sitoutumisessa useampia sitoutumiskohtia ja myös monimutkaisempaa rakennettaan. Tämä ominaisuus on hankala tuoda yhtä tehokkaana yksinkertaisempiin molekyyliin. Reaktiot, joihin viime aikoina on yritetty kehittää abioottisia entsyymejä/katalyyttejä ovat pääasiassa hydrolyyttisiä reaktioita: Aminohappojen estereiden, peptidien, fosfaattidiestereiden hydrolyysireaktioita (esteraasit, peptidaasit, fosfodiesteraasit).

Fosfodiesteraasit

Normaaliolosuhteissa fosfodiesterisidokset ovat negatiivisesti varautuneita, eivätkä ne pilkkoudu helposti hydrolyyttisesti, mikä tekee RNA- ja DNA-molekyyleistä varsin pysyviä.² Keinotekoiset fosfodiesterisidoksia pilkkovat katalyytit tuovat monia uusia

mahdollisuuksia muun muassa geeniterapiahoitoihin. Metallioniina biologisesti aktiivisissa komplekseissa käytetään yleensä divalentteja metallioneja kuten Zn^{2+} . Cu^{2+} -ioneja ei ole havaittu biologisissa hydrolyyttisissä entsyymeissä mutta abioottisissa reaktioissa niillä on havaittu olevan katalyyttistä kykyä. Monissa näistä keinokeisissa entsyymimalleissa on kaksi aktiivista keskusta, jotka on liitetty toisiinsa linkkerin avulla. Aktiivisissa keskuksissa kaksi metallionia toimivat Lewisin happoina. Luonnollisiin entsyymeihin verrattuna nämä toimivat vain tyydyttävästi. Ongelmina ovat huono sitoutuvuus ja huono katalysointikyky, mikä johtunee metallionien heikosta yhteisvaikutuksesta. Monista keinokeisista katalyyteistä puuttuvat myös useammat katalyyttiset keskukset, jotka kykenisivät sitoutumaan, aktivoimaan substraatin, stabiloimaan transitiotilan ja lähtevän ryhmän samaan aikaan.¹⁸ Kaksirenkaisilla kupariatsakruunu-komplekseilla on havaittu olevan selektiivistä aktiivisuutta tiettyjä syöpäsoluja, kuten esimerkiksi haimasyöpäsoluja kohtaan.¹⁵ Nämä kompleksit aiheuttavat syöpäsoluissa apoptoosin, solun itsetuhomekanismin käynnistymisen. Syövän hoitoon yleisesti käytetyillä antineoplastisilla platinaa sisältävillä lääkkeillä on lukuisia haittavaikutuksia, mm. myrkyllisyys ja resistenssin kehittyminen. Useiden Cu-kompleksien on havaittu osoittavan sytotoksisuutta syöpäsoluja kohtaan sekä *in vitro*, että *in vivo*. Näillä komplekseilla on havaittu olevan DNA:n fosfodiesterisidoksia pilkkovia ominaisuuksia, jotka saattavat selittää niiden aktiivisuuden solun itsetuhomekanismin käynnistymisessä. Mekanismi voidaan selittää reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumisessa samalla, kun Cu^{II} -ioni pelkistyy Cu^I -ioniksi esimerkiksi askorbiinihapon vaikutuksesta. Erään Cu-kompleksin synteesi on esitetty kaaviossa 14.

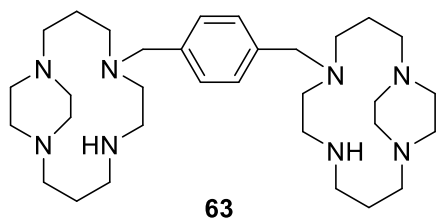


Kaavio 14. Esimerkki kaksirenkaisen kupari-kompleksin syntesistä¹⁶

Peptidaasit

Samoin kuin fosfodiesterasien, myös peptidaasien toiminta perustuu makrosyklisiin komplekseihin, jotka sitoutuvat koordinaatiosidoksin proteiineihin. Näiden avaruudelliseen suuntautumiseen vaikuttavat myöskin donorin orientaatio ja metallikeskuksen geometriset ominaisuudet. Siten myös peptidaasien ominaisuuksia voidaan muuttaa valitsemalla sopiva metalli-ioni ja suunnittelemalla oikeanlainen ligandi sivuhaaroinen.

Yhdessä merkittävässä tutkimuksessa on tutkittu keinotekoisia kelatoivia molekyyliä, jotka kykenevät sitoutumaan CXCR4-reseptoriin. Tämä reseptori on yksi niistä solun pintareseptoreista, joita mm. HIV ja jotkin syövät käyttävät hyväkseen. Näissä synteettisissä molekyyliissä on käytetty syklaamia ligandin perusrakenteena (joissakin jäykistettynä). Syklaamin on havaittu olevan tärkeässä osassa proteiineihin sitoutuvissa metallikomplekseissa. Seuraavan kuvan 11 molekyylillä **63** on Zn^{2+} -kompleksimuodossaan havaittu olevan HIV-virusta inhiboivia vaikutuksia.²⁴



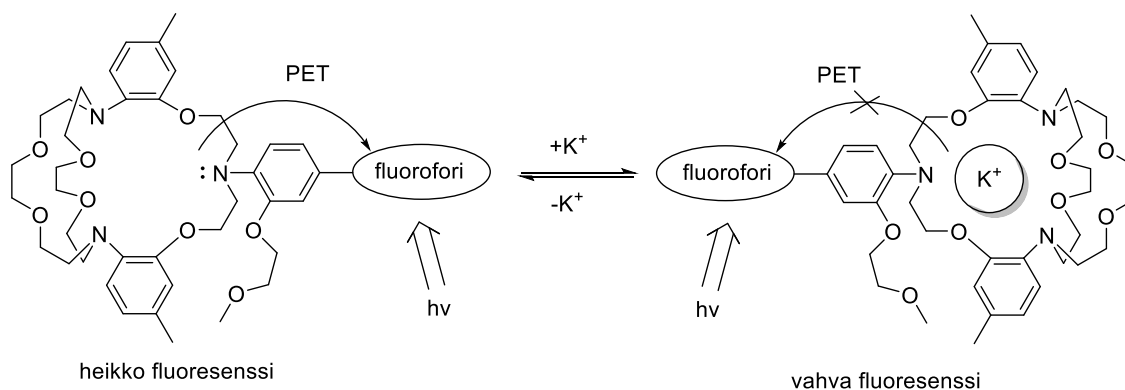
Kuva 11. Molekyyli, jonka Zn^{2+} -kompleksilla on HIV-virusta inhiboivia vaikutuksia²⁴

3.6.4. Molekyylikoneet, -kytkimet ja -sensorit

Fluoresoivat kryptandit alkalimetalli- ja pH-sensoreina

Eri metalli-ionit ja pH ovat erittäin tärkeitä muuttujia biologisissa prosesseissa. Sinkki on toiseksi yleisin hivenaine raudan jälkeen ihmiskehossa. Se on tärkeä normaalille kasville, se esiintyy lukuisissa biologisissa prosesseissa mukaan lukien entsyymien katalyyttisissä reaktioissa, hermosignaalien välityksessä, solukuoleman säätelyssä, immunitettä, lisääntymistä, solukuljetusta ja aineenvaihduntaa säätelevissä reaktioissa.²⁷

Kruunuyhdisteet sitovat tehokkaasti erilaisia pieniä ioneja kuten alkali- ja maaalkalimetalli-ioneja. Viime vuosina on herännyt mielenkiinto sellaisia kruunuyhdisteitä kohtaan, joihin on liitetty fluoresoiva tähde, jolloin kelaattien muodostuminen voidaan mahdollisesti havaita.²⁶ (Kaavio 15).



Kaavio 15. Valon indusoima elektroninsiirtomekanismi kryptandi-pohjaisissa antureissa²⁵

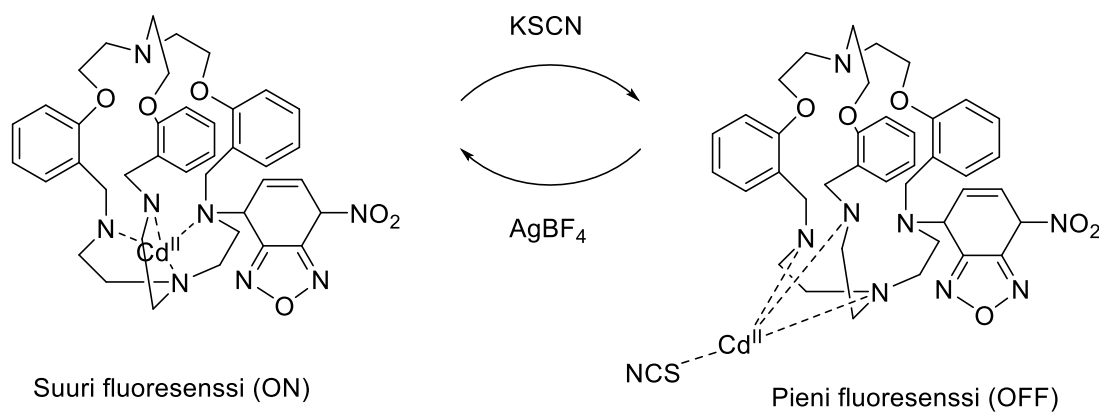
Kryptandit molekyylikytkiminä (ärsykkeeseen reagoivat kryptandit)

Kryptandien eräs kehityssuunta ovat molekyylikytkimet. Tällöin ne voisivat reagoida ulkopuoliseen ärsykkeeseen kuten happamuuteen, ioneihin, valoon tai ne voisivat havaita tiettyjä hapetus-pelkistysreaktioita. Jotta kryptandit voisivat toimia kytkiminä, niiden tasapainotilaa tulee siis voida keinotekoisesti muuttaa. Kryptandit voisivat toimia myös päälle ja pois kytkettävänä katalyytteinä, monimutkaisina ohjattavina molekyylikoneina kuten molekyyliensoreina, molekyylin pilkkojina tai molekyylikytkiminä. Kemosensorit ja kryptandihin perustuvat reseptorit reagoivat mikroskooppisessa maailmassa tapahtuviin muutoksiin (esimerkiksi varausten sijoittuminen makrosyklissä) ja ne voidaan havaita makromaailmassa (esimerkiksi fluoresenssi). Fotokemiallisissa/fotofysikaalisissa prosesseissa reseptoriin koordinoituva ioni tai vierasmolekyylit aiheuttaa muutoksia sen koordinoitumisessa ja näin myös sen muodossa. Tämä aiheuttaa energian muutoksia, jotka välittyvät linkkerin kautta fluoroforille, jolloin muutokset koordinoitumisessa voidaan havaita. Mekanismina on elektronien siirtyminen, ”photoinduced electron transfer” (PET). Mekanismissa kruunuyhdisteen tyypin vapaat elektroniparit siirtyvät virittyneelle fluoroforille PET:n kautta sammuttaen sen. Kun

metalli-ioni sitoutuu reseptoriin näiden vapaiden elektronien kautta, elektroneja ei siirry ja fluorofori on aktiivinen.²² Kryptandien muodostamat kompleksit ovat erittäin pysyviä, eivätkä voi siten toimia kytkimenä suoraan. Mikäli täydellinen kompleksin muodostus estetään esimerkiksi steerisin keinoin, voidaan aikaansaada tilanne, jossa kryptandin muodostama kompleksi on vain osittainen ja esimerkiksi metalli-ioni ei ole kokonaan kryptandin sisällä. Tällöin kompleksin muodostuminen on mahdollisesti reversiibeli tapahtuma ja kompleksin tilaa voidaan muuttaa pienellä ulkoisella ärsykkeellä.

Lateraalisesti epäsymmetriset kryptandit molekyylikytkiminä

Kryptandeissa, jotka on muodostettu päistään typpi-atomeissa/-atomeissa kiinni olevista ketjuista, metallikationin tapaa sitoutua kryptandiin voidaan muuttaa muokkaamalla typpi-atomin kykyä toimia elektronien luovuttajana. Typpi-atomiin voidaan liittää elektroneja puoleensa vetäviä ryhmiä, joilla voidaan säädellä kyseistä ominaisuutta. Tällöin voidaan mahdollisesti vaikuttaa siihen, sijaitseeko metallikationi kompleksin sisällä vai ulkopuolella. Ominaisuutta tarkkaan muokkaamalla voidaan tällaisista komplekseista muodostaa kemiallisia kytkimiä sijoittamalla kationi sisä- ja ulkotilojen väliin, jolloin kompleksi saattaa tulla herkäksi muille muuttujille kuten lämpötilalle, muille ioneille jne. (Kaavio 16). Metallionin sijoittumiseen kompleksissa vaikuttavat kuitenkin monet muutkin tekijät kuten kryptaatti-efekti, metallionin kavitteettia suurempi koko, ligandin rakenne ja jäykkyys sekä donorien lukumäärä ja sijainti. Kun kryptandiin liitetään elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, joka samalla toimii steerisenä esteenä metallikationin sitoutumiselle kompleksin sisäpuolelta, metallikationi saattaa pyrkiä sitoutumaan siihen ulkopuolelta.²³



Kaavio 16. Fluoresoivan molekyyliensensorin/-kytkimen periaate (Cd^{II}-kompleksi)²³

3.6.5. Supramolekulaariset polymeerit

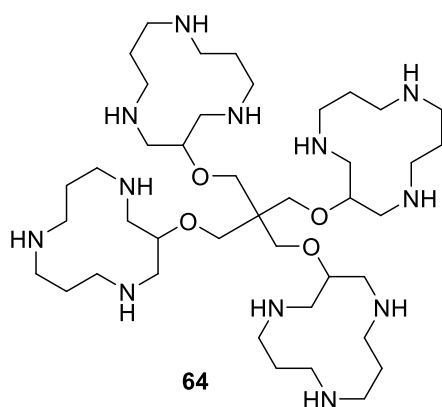
Supramolekulaariset polymeerit voisivat koostua kryptandi-monomeereista, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa ei-kovalenttisin sidoksin tai dynaamisin kovalenttisin sidoksin. Niiden etu tavallisiin polymeereihin verrattuna on niiden kyky reagoida ärsykkeisiin, uudelleen käyttö, itsekorjautuvuus, biologinen hajoavuus ja muistiominaisuudet. Kryptandeilla on lisäksi yleensä useita sitoutumispaikkoja, mikä takaa suuremman polymerisaatioasteen.

4. TETRAVALENTIN 1,5,9-TRIATSASYKLODODEKAANIN VALMISTUS

4.1. Kokeellisen työn johdanto

Erikoistyössä pyrittiin valmistamaan pentaerytritolirakenteeseen perustuva haaroittunut molekyyli **64**, joka sisältää neljä 1,5,9-triatsasyklododekaanitähdettä (Kuva 1). 1,5,9-triatsasyklododekaanin Zn^{2+} -kompleksi kykenee katalysoimaan fosfodiesterisidoksen pilkkoutumista mutta toisaalta myös muodostamaan ternäärisen kompleksin urasiilin, tymiinin ja vähäisissä määrin guaniinin kanssa.⁵ Tämän vuoksi kohteena olevalla rakenteella saattaa olla mielenkiintoisia fosfodiesterisidoksen pilkkoutumista katalysoivia ominaisuuksia urasiilirikkaiden RNA-sekvenssien kanssa.

Mielenkiintoinen tilanne voisi syntyä esimerkiksi, kun kyseinen rakenne kohdennetaan kolmen urasiilin pullistuman sisältävään kaksoiskiarteeseen.



Kuva 1. Työssä tavoitellun molekyylin rakenne (uudestaan)

4.2. Tulokset ja niiden tarkastelu

Työssä valmistetun ligandin, 1,5,9-triatsasyklododekan-3-oli-tähteen (TASD) (71) synteesi eteni kirjallisuuslähteissä kuvatulla tavalla⁵. TASD:in liittäminen pentaerytritolirakenteeseen osoittautui kuitenkin ongelmalliseksi. Kun TASD:ia yritettiin liittää pentaerytrityylitetrabromidiin, saatiin väärä tuote. Syynä saattoi mahdollisesti olla steeriset vaikutukset ja/tai muuten pieni todennäköisyys sille, että ligandit kiinnittyisivät pentaerytrityylirakenteen jokaiseen neljään haaraan. Pentaerytrityylin haaraisuuden vuoksi reagenssien metyylitiometyloinneissa saannot olivat myös pieniä. Metyylitiometyloidut lähtöaineet eivät olleet myöskään kovin reaktiivisia liitosreaktioissa ja reaktioiden tasapaino oli selvästi lähtöaineiden puolella. Sivureaktioista yleisin oli *t*-Boc-suojatun atsakruunun dimeroituminen. Kun liitosreaktioita yritettiin *t*-Boc-suojaamattomalla ligandilla (tertiäärinen amiini), muodostui ongelmaksi bentsyyliiryhmän irtoaminen ja guanidiniumin muodostuminen. Yleensä melko suoraviivainen Pd/C/H₂-pelkistys eteni työssä jostain syystä oksidatiiviseen suuntaan. Viimeisenä tyydyttymätöntä atsakruunua käsiteltiin trifluorietikkahapolla. Tällöin bentsyyliiryhmä irtosi mutta tuotteeseen jäi edelleen kaksoissidos. TFA ei kyennyt irrottamaan bentsyyliiryhmää tyydyttyneessä ligandissa. Lopuksi valmistettiin vain pelkkä *t*-Boc-suojattu ligandi, ja erikoistyö päätettiin.

4.3. Työn kokeellinen suoritus

4.3.1. Yleiset menetelmät

Laitteet

¹H-NMR ja ¹³C-NMR -spektrit mitattiin Bruker 400 MHz spektrometrillä. MS-spektrit mitattiin massaspektrometrillä.

Synteesistrategia

Synteesin strategiana oli valmistaa ensin pentaerytritoliin liitettävä 1,5,9-triatsasyklododekan-3-oli T ASD (71). Liittämistä varten T ASD:n aminoryhmät suojattiin *tert*-butoksykarbonyyli-suojauksella (*t*-Boc).

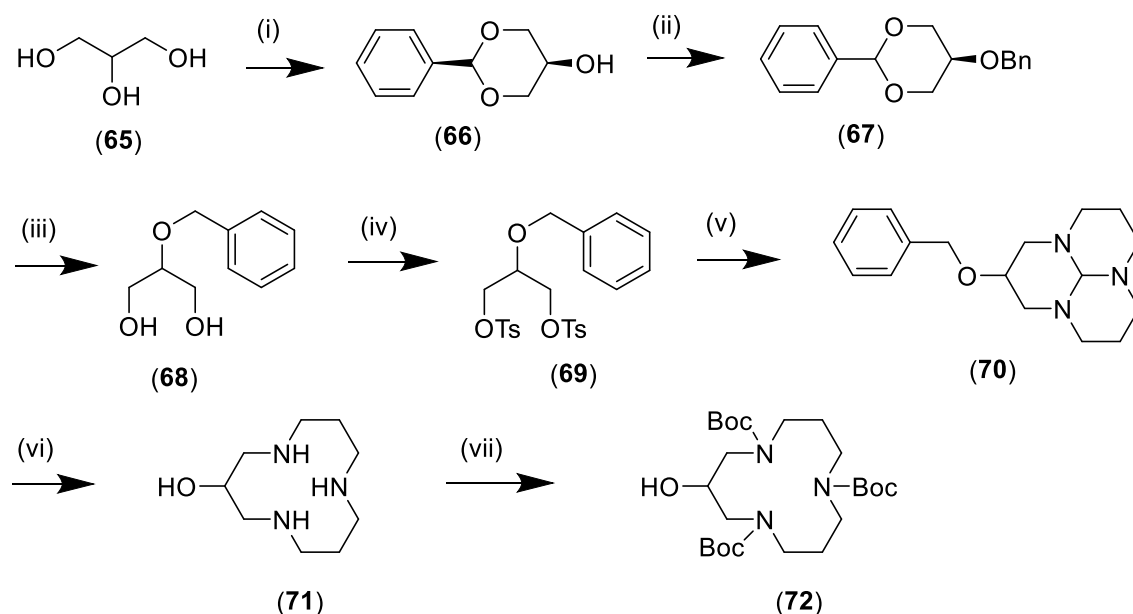
Synteesin toisessa vaiheessa atsakruunurakennetta yritettiin liittää eetterisidoksella pentaerytritolirakenteeseen S_N2 -substituutiolla. Menetelminä käytettiin mm. Williamsonin eetterisynteesiä ja asetaalin muodostusta, jossa toisen reaktantin hydroksyyli-ryhmä on ensin metyyliometyloitu.

Taulukko 2. Synteseissä käytetyt kemikaalit

REAGENSSI	PUHTAUS (%)	MOOLIMASSA (g mol ⁻¹)	TIHEYS (g cm ⁻³)
glyseroli	>99,5	92,10	
bentsaldehydi	>98	106,13	1,04
tolueeni	>99,7	92,14	0,864
bentsyylikloridi	>99	126,59	
kaliumhydroksidi	>85	56,11	
bentseeni		78,11	
metanoli	99,8	32,04	
vetykloridi	37	36,46	1,19
<i>p</i> -tolueenisulfonyylikloridi	98	190,65	
tetrahydrofuraani	99,9	72,11	0,887
natriumhydroksidi	99	40,00	
natriumboorihydridi		37,83	
<i>t</i> -butyylialkoholi	99,5		
di- <i>tert</i> -butyylidikarbonaatti, Boc ² O		218,25	
pentaerytritoli	98	136,15	
dimetyylisulfoksidi	99,5	78,12	1,100
etikkahappo	>99,8		
etikkahappoanhydridi	97		
tetrabutyyliammoniumbromidi	99	322,38	
CuBr ₂	99,5	223,372	
C/Pd 10 % jauhe (50% vettä)			
dietyylieetteri			
dikloorimetaani			
dimetyyliformamidi			
etanoli (ETAX)			
anisoli	99,5	108,14	
trifluoretikkahappo		114,02	1,48
trietyyliamiini			
triatsabisyklodekeeni (TBD)			
kaliumjodidi			
natriumhydridi			
C(CH ₂) ₄ Br ₄			

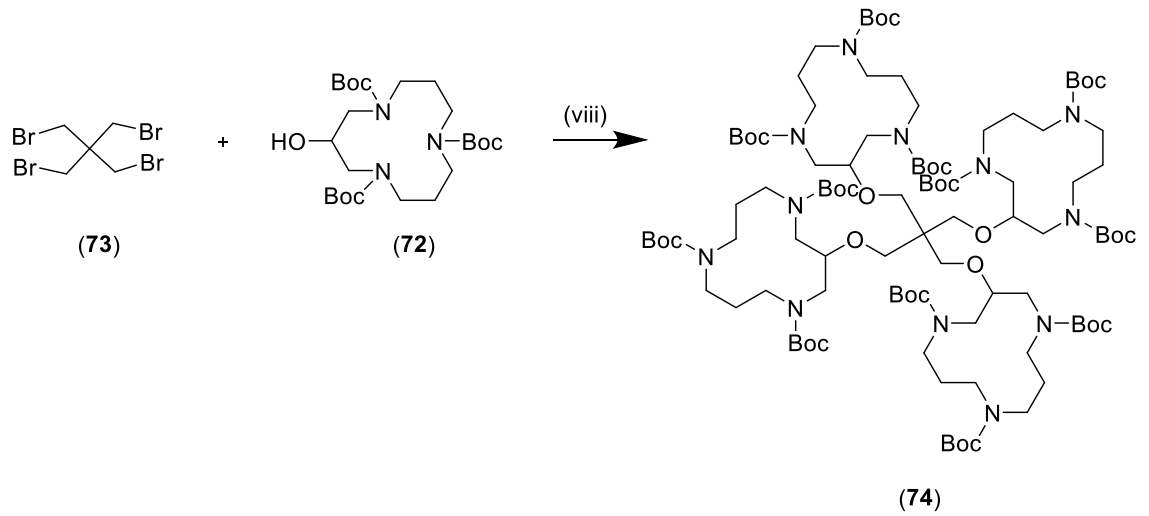
4.3.2. Valmistetut molekyylit

Kaaviossa 17 on kuvattu *t*-Boc-suojatun 1,5,9-triatsasyklododekan-3-olin synteesi.



Kaavio 17. 1,5,9-triatsasyklododekan-3-oli-tähteen (71) synteesi

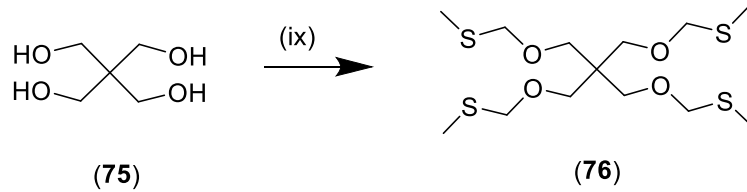
- (i) PhCHO, tolueni, väkevää H_2SO_4 :a (kat.), refluksointi (2,5 tuntia)
- (ii) PhCH_2Cl , KOH, bentseeni, refluksointi
- (iii) HCl, MeOH(aq)
- (iv) TsCl, THF (aq), NaOH (3-5 °C)
- (v) 1. TBD, KOH, dioksaani, refluksointi (48 tuntia). 2. NaBH_4 , dioksaani, sekoitus (48 tuntia)
- (vi) HCl(aq, 4 mol dm^{-3}), refluksointi (4 päivää)
- (vii) Boc_2O , $^t\text{BuOH}$ (aq), NaOH, sekoitus 40 °C:ssa (2 päivää)



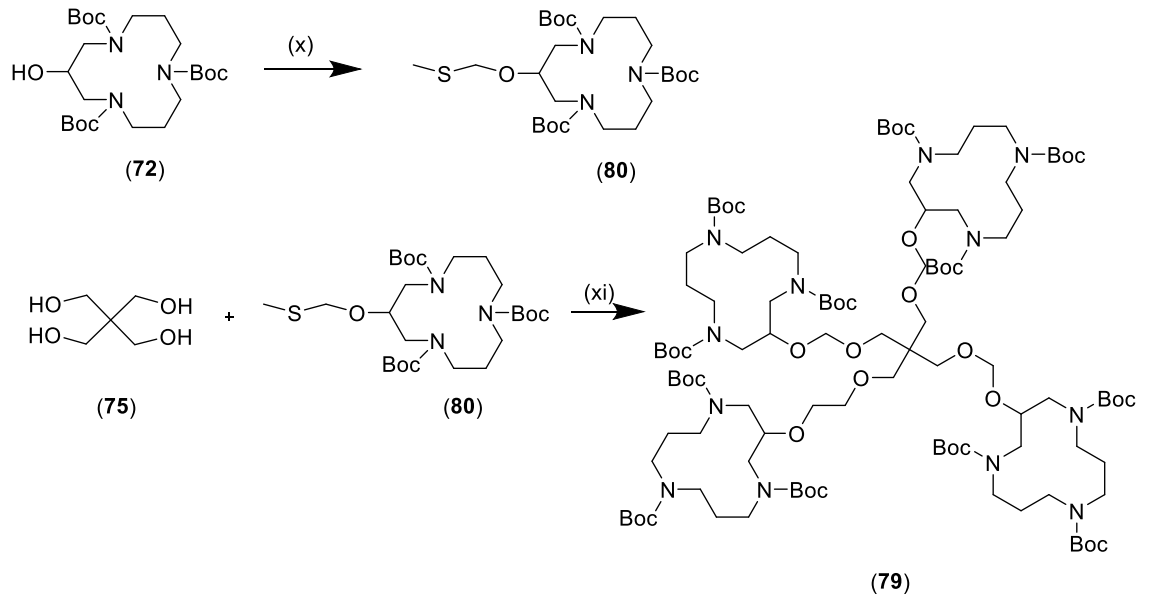
Kaavio 18. Atsakruunun (72) liittäminen pentaerytrityylitetrabromidiin (73).

(viii) KI, NaH (60% dispersio öljyssä), 20°C, 24 tuntia

(ix) Ac₂O, AcOH, DMSO, 24 tuntia



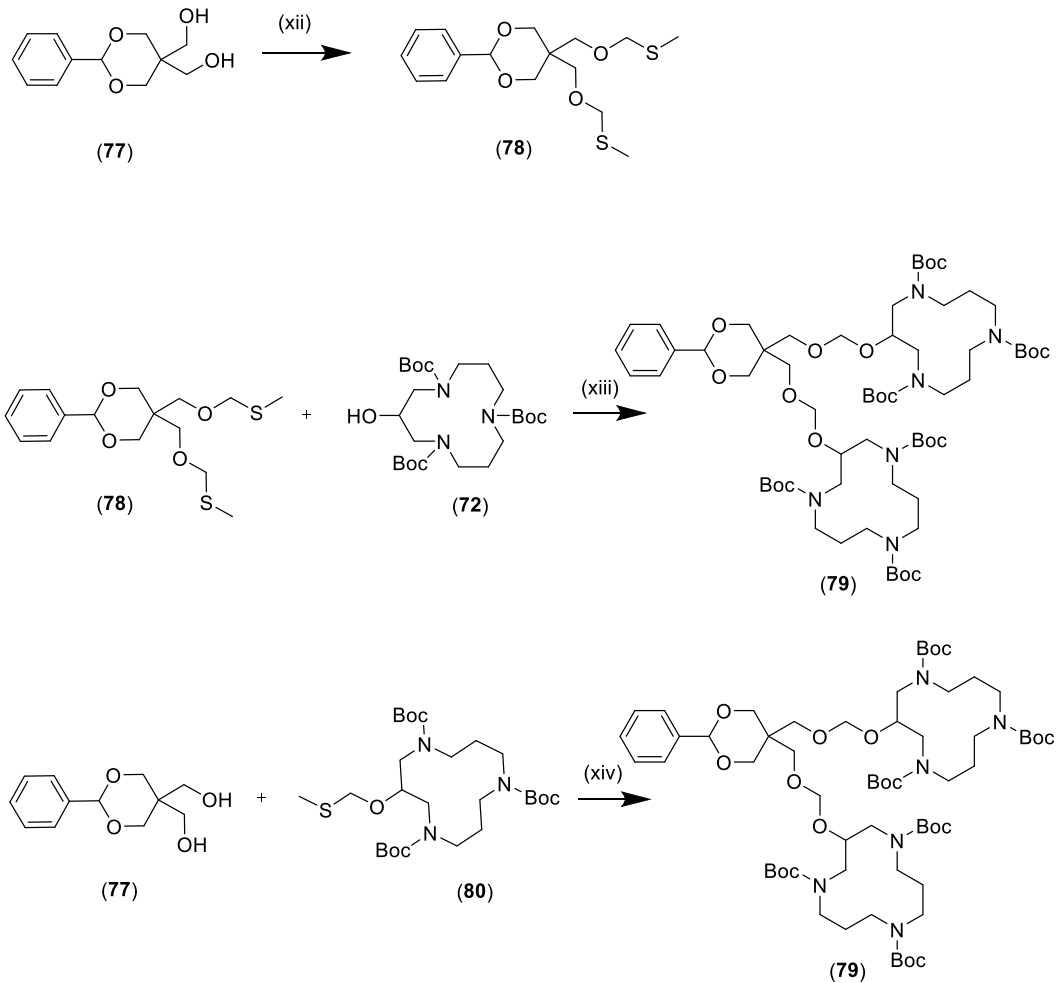
Kaavio 19. Pentaerytritolin (11) metyylitiometylointi



Kaavio 20. Atsakruunun (72) metyylitiometylaatio ja liittäminen pentaerytritoliin (75)

(x) Ac₂O, AcOH, DMSO, 24 tuntia

(xi) Bu₄NBr, CuBr₂, CH₂Cl₂ (kuiva), 0 -->20°C, 36 tuntia



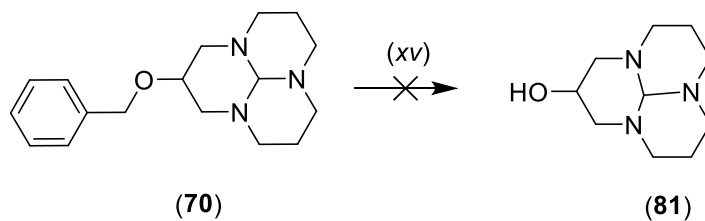
Kaavio 21. Atsakruunun (72) ja bentsylideenisuojatun pentaerytritolin (77) liittäminen metyylitiometyyliryhmän avulla

(xii) Ac_2O , AcOH, DMSO, 24 tuntia

(xiii) Bu_4NBr , CuBr_2 , CH_2Cl_2 (kuiva), $0 \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 36 h

(xiv) Bu_4NBr , CuBr_2 , CH_2Cl_2 (kuiva), $0 \rightarrow 20^\circ\text{C}$, 36 h

(xv) Pd/C, H_2 , EtOH, 10 bar



Kaavio 22. 8-(bentsylioksi)heksahydro-1H,4H,7H-3a,6a,9a-triatsafenaleenin hydraus

4.3.3. *Synteesit*

Ligandin synteesi

***cis*-5-hydroksi-2-fenyyl-1,3-dioksaani (66)**

Glyserolia (**65**) (120 ml, 1,64 mol) ja bentsaldehydiä (131 ml, 1,28 mol) refluksoitin toluenissa (189 ml, 1,77 mol) rikkihapon (95-97%, 9 tippaa) toimiessa katalyyttinä. Refluksointi suoritettiin Dean-Stark vedenpoistolaitteistolla käyttäen tyypeä suojakaasuna. Vettä alkoi erottua, kun reaktioliuos saavutti 110 °C:n lämpötilan. Reaktion kuluessa liuoksen väri muuttui keltaisesta tummanpunaiseksi. Refluksoinnin (2,5 h) jälkeen vettä oli erottunut 23 ml. Jäähdytynyt liuos neutraloitiin vedettömällä natriumkarbonaatilla, jonka jälkeen liuos suodatettiin. Liuottimena toiminut tolueni haihdutettiin pois alennetussa paineessa. Tämän jälkeen liuos sisälsi pääasiassa reaktiossa reagoimatonta glyserolia, toivottua reaktiotuotetta ja mahdollisesti myös bentsaldehydiä. Tuotteen kiteytyminen oli hidasta, eikä valmiin tuotekiteen lisäyksellä ollut vaikutusta kiteytymiseen. Muutaman päivän säilytyksen (-16 °C) jälkeen tuotetta oli kuitenkin kiteytynyt. Saalis oli pieni, vain 4-5 grammaa kuivaamatonta tuotetta. Paksua glyserolipitoista seosta laimennettiin dietyylieetterillä, ja tuotetta kiteytettiin uudelleen -16 °C:n lämpötilassa yön yli. Nyt tuotetta oli kiteytynyt enemmän mutta saalis oli silti pieni. Tuotetta **66** uudelleenkiteytettiin kahdesti dietyylieetteri/petrolieetteristä (100 ml/10 ml) -16 °C:n lämpötilassa, jolloin saatiin valkoisia kiteitä. Kiteet kuivattiin vakuumieksikaattorissa. Saalis: 9,80 g (4 %).

Edellä mainittu reaktio suoritettiin uudelleen käyttäen glyserolin (**65**) ja bentsaldehydin stoikiometrisenä suhteena 1:1. Tällä yritettiin välttää ylimääräisen glyserolin jäämistä liuokseen, mikä vaikeutti kiteytymistä. Reaktioaikaa myös pidennettiin (4,5 h), jolloin vettä erottui 35 ml. Tässä reaktiossa reagenssit olivat: glyseroli (147 ml, 2,00 mol), bentsaldehydi (205 ml, 2,01 mol), rikkihappo (95-97 %, katal. määrä \approx 11 tippaa), tolueni (232 ml, liuotin). Saalis: 43,0 g (11 %).

Tuote karakterisoitiin MS- ja NMR-spektroskooppisesti. ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.53-7.37 (5H, m), 5.57 (1H, s), 4.22-4.13 (5H, m), 3.64 (*cis*, 1H, d?), 3.06 (*trans*, 1H, d?). Hydroksyyllivedyn piikki ei näy.

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 137.84, 129.10, 128.32, 125.88, 101.70, 72.31, 64.03

***cis*- ja *trans*-5-(bentsyylioksi)-2-fenyyl-1,3-dioksaani (67)**

Cis-2-fenyyl-1,3-dioksan-5-olia (**66**) (21,0 g, 0,113 mol), bentsyylikloridia (29,5 g, 0,233 mol) ja KOH:a (13,6 g, 0,243 mol, jauhattu) refluksotiin bentseenissä (600 ml, kuivattu molekyyliseuloilla) 12 tuntia Dean-Stark-vedenpoistolaitteistolla 80 °C:n lämpötilassa. Reaktion aikana liuoksen väri muuttui tummaksi. Reaktioliuos jäädytettiin huoneenlämpötilaan ja sitä pestiin ensin vedellä, sitten 5 % NaHCO_3 -vesi-liuoksella ja lopuksi vielä vedellä. Tuoteliuos kuivattiin Na_2SO_4 :lla, ja liuotin haihdutettiin pois alennetussa paineessa, jolloin muodostui kellertävä öljymäinen neste, joka myöhemmin viileässä kiteytyi keltaisiksi neulamaisiksi kiteiksi. Tuotetta **67** pestiin kylmällä dietyylieetterillä, jolloin kiteiden väri muuttui valkoiseksi. Tutkittaessa tuotetta ohutkerroskromatografisesti levyllä näkyi vain yksi tuotepiste. Tämän vuoksi päätettiin siirtyä seuraavaan reaktiovaiheeseen ilman puhdistusta. Saalis: 23,7 g (77 %).

Reaktio suoritettiin toistamiseen samoilla reagenssimäärillä kuin aikaisemmin, jolloin saalis oli 23,5 g (76 %). Tuote karakterisoitiin MS- ja NMR-spektroskooppisesti.

^1H NMR (CDCl_3): δ 7.56-7.29 (10H, m), 5.58 (1H, s), 4.73 (2H, s), 4.39 (2H, dd), 4.06 (2H, dd), 3.37 (1H, quin)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 138.12, 128.92, 128.47, 128.22, 127.77, 126.21, 101.42, 70.31, 69.19, 69.03

2-(bentsyylioksi)propaani-1,3-dioli (68)

5-(Bentsyylioksi)-2-fenyyl-1,3-dioksaania (**67**) (15,0 g, 55,6 mmol) liuotettiin 300 ml MeOH:a ja tähän lisättiin 1 mol dm^{-3} HCl-liuosta. Liuosta refluksotiin 1,5 tuntia 68 °C:n lämpötilassa, minkä jälkeen haihtuvat liuottimet haihdutettiin alipaineessa.

Kellertävänä öljynä erottuneen 2-(bentsyylioksi)propaani-1,3-diolin saaliiksi punnittiin 11,7 g (115 %). Saanto kertoo mahdollisesti tuotteeseen jääneestä liuottimesta. Tuote käytettiin seuraavassa reaktiossa puhdistamatta.

Reaktiovaihe suoritettiin uudelleen kaksinkertaisilla reagenssimäärillä, jolloin saalis oli 19,4 g (95 %).

Tuote karakterisoitiin MS- ja NMR-spektroskooppisesti. ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.38-7.27 (5H, m), 4.63 (2H, s), 3.77 (2H, dd), 3.70 (2H, dd), 3.56 (1H, quin)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 137.94, 128.60, 128.03, 127.92, 79.07, 71.92, 62.00

2-(bentsyylioksi)propaani-1,3-diiyli-bis(4-metyylibentseenisulfonaatti) (69)

2-(bentsyylioksi)propaani-1,3-diolia (**68**) (11,2 g, 61 mmol) ja NaOH-vesi-liuosta (100 ml, 2,2 mol dm^{-3}) liuotettiin THF:iin (270 ml). Liuosta sekoitettiin suolavesijäähautteessa ja siihen lisättiin 1 tunnin aikana tiputussuppilosta THF:iin (165 ml) liuotettua *p*-tolueenisulfonyylikloridia (25,8 g, 135 mmol). Lisäyksen jälkeen sekoitusta jatkettiin edelleen ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla 10-15 min välein. 16 h jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä reaktioliuokseen väkevää HCl:n vesiliuosta. THF haihdutettiin pois alennetussa paineessa ja reaktiotuotteita uutettiin viisi kertaa DCM:lla (5 x 60 ml). Halutut reaktiotuotteet sisältänyt orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4 :lla, minkä jälkeen seos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa. Lopuksi tuote uudelleenkiteytettiin etanolista. Saalis: 19,5 g (64 %).

Tuote karakterisoitiin MS- ja NMR-spektroskooppisesti. ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.74 (4H, d), 7.34-7.27 (7H, m), 7.20-7.18 (2H, m), 4.50 (2H, s), 4.08-4.01 (7H, m), 3.81 (1H, quin), 2.46 (6H, s)

^{13}C NMR (CDCl_3): δ 145.14, 136.97, 132.44, 129.95, 128.45, 127.97, 127.79, 73.83, 72.54, 67.70, 21.68

8-(bentsyylioksi)dekahydro-3a,6a,9a-triatsafenaleeni (70)

2-(bentsyylioksi)propaani-1,3-diiyli-bis(4-metyylibentseenisulfonaatti):a (**69**) (4,0 g, 8,2 mmol), 1,5,7-triatsabisyklo[4.4.0]dek-5-eeniä ja KOH:a (1,84 g, 33 mmol; jauhettu) sekoitettiin kuivaan 1,4-dioksaaniin (120 ml) ja reaktioseosta refluksoitiin 100 °C:ssa kaksi vuorokautta. Punertavan ja sakkaisen reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, minkä jälkeen siihen lisättiin varovasti NaBH_4 :a (1,5 g, 40 mmol). Seosta sekoitettiin neljä vuorokautta (ylimäärin). Tämän jälkeen liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa ja sakkaan lisättiin vettä (40 ml). Tuotetta uutettiin viisi kertaa

DCM:lla (5 x 20 ml) ja orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin Na₂SO₄:lla. Seos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa, jolloin saatiin öljymäinen tuote (**70**), joka myöhemmin kiteytyi.

Vaiheet suoritettiin kaksi kertaa uudelleen käyttämällä kummallakin kerralla ensimmäisessä reaktiovaiheessa 10 g 2-(bentsyylioksi)propani-1,3-diyyli-bis(4-metyylibentseenisulfonaatti):a (**69**). Muita reagensseja ja liuottimia käytettiin samassa stoikiometrisessä suhteessa kuin aikaisemminkin. Näistä reaktioista syntyneet tuotteet käytettiin seuraavassa synteesivaiheessa erillisissä reaktioissaan.

1,5,9-triatsasyklododekan-3-oli (71)

Edellisessä synteesivaiheessa saatu tuote (**70**) liuotettiin sellaisenaan 4 mol dm⁻³ HCl:n vesiliuokseen ja reaktioliuosta refluksoitiin neljä vuorokautta. Tämän jälkeen liuotin haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa ja kellertävän vaaleaa saostumaa pestiin MeOH:lla (32 ml), johon keltainen sivutuote jäi. Tuote saatiin trihydrokloridina (vaaleita kiteitä) ja se kuivattiin vakuumiexsikaattorissa. Saalis: 1,56 g (64 %).

Edellä kuvattu reaktio suoritettiin myös edellisen synteesivaiheen kahdelle muulle ”tuote-erälle”. Näistä reaktioista saaliit olivat: 5,65 g (93 %) ja 3,49 g (57 %). Tuote karakterisoitiin MS- ja NMR-spektroskooppisesti. ¹H NMR (D₂O): δ 4.70 (1H, quin), 3.38-3.14 (12H, m), 2.16-2.11 (4H, quin)

¹³C NMR (D₂O): δ 61.71, 48.04, 43.25, 41.08, 19.28

tri-*tert*-butyyli-3-hydroksi-1,5,9-triatsasyklododekaani-1,5,9-trikarboksylaatti (72)

1,5,9-triatsasyklodekan-3-oli trihydrokloridia (**71**) (3,49 g, 11,8 mmol) liuotettiin *tert*-butanolin (75 ml) ja NaOH:n (aq, 50 ml, 2,9 mol dm⁻³) seokseen. Tähän seokseen lisättiin Boc₂O:a (di-*tert*-butyyli-dikarbonaattia) (8,49 g, 38,9 mmol) *tert*-butanolissa (30 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 24 tunnin ajan, minkä jälkeen lämpötila nostettiin 40-50 °C:een ja sekoitusta jatkettiin vielä kolme vuorokautta. Liuotin haihdutettiin pois alennetussa paineessa, ja reaktiotuotteeseen lisättiin 30 ml vettä. Tuote-vesi-seosta uutettiin dikloorimetaanilla (5 x 25 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin Na₂SO₄:lla,

minkä jälkeen liuos haihdutettiin kuiviin. Tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin MeOH : DCM (5:95) -seosta. Saalis: 1,92 g (33 %).

Reaktiovaihe suoritettiin toisen kerran, jolloin 1,5,9-triatsasyklodekan-3-oli trihydrokloridia (**71**) käytettiin 5,58 g, 18,8 mmol. Muita reaktiokomponentteja käytettiin samassa stoikiometrisessä suhteessa kuin aikaisemminkin. Saalis: 4,17 g (45 %). Tuote karakterisoiitiin MS- ja NMR-spektroskooppisesti. ¹H NMR (CDCl₃): δ 4.02 (1H, quin), 3.48-3.22 (12H, m), 1.80 (4H, quin), 1.47 (18H, s), 1.46 (9H, s)
¹³C NMR (CDCl₃): δ 155.78, 80.76, 79.64, 73.73, 53.41, 47.96, 28.46, 28.38

Ligandin liittäminen pentaerytritoli-rakenteeseen

Syntetisoitua tri-*tert*-butyyli-3-hydroksi-1,5,9-triatsasyklododekaani-1,5,9-trikarboksylaattia yritettiin seuraavaksi liittää tavoitemolekyylin keskuksena toimivaan pentaerytritryylirakenteeseen. Reaktiota kokeiltiin ensin koeputkimittakaavassa.

Seuraavista yhdisteistä valmistettiin 1 ml:n DMF-liuokset:

1. tri-*tert*-butyyli-3-hydroksi-1,5,9-triatsasyklododekaani-1,5,9-trikarboksylaatti (**72**) (253 mg, 520 μmol, 5 ekv)
2. C(CH₂)₄Br₄ (40 mg, 100 μmol)
3. KI (17 mg, 100 μmol)
4. NaH (60% dispersio öljyssä) (17 mg, 100 μmol)

Jokaisesta neljästä liuoksesta otettiin reaktioliuokseen 250 μl, jolloin sen kokonaistilavuudeksi tuli 1 ml. Reaktioliuosta sekoitettiin ja reaktion annettiin edetä yön yli huoneenlämpötilassa. Reaktion etenemistä seurattiin TLC-ajoilla. Ajoliuokseksi valittiin 5 % MeOH/DCM -liuos. TLC-ajoa varten näyte uutettiin DMF:n ajoa haittaavien ominaisuuksien vuoksi ensin vesi-dietyylieetteri seoksella. Näyte otettiin eetterifaasista. Em. reaktio suoritettiin myös 50 °C asteen lämpötilassa. Reaktiotuotteita analysoitiin massaspektrometrisesti. Muodostuva tuote oli väärä ja sivureaktioita oli paljon. Tämä synteesitie hylättiin.

Metyylitiometyloitujen pentaerytritoliin valmistus

Seuraavaksi atsakruunuligandia yritettiin liittää metyylitiometyloituun pentaerytritoliin ja bentsylideenisuojattuun pentaerytritoliin. Tätä varten syntetisoitiin ensin metyylitiometyloitu pentaerytritoli ja sen jälkeen metyylitiometyloitu bentsylideenisuojattu pentaerytritoli.

Metyylitiometyloitu pentaerytritoli (76)

Pentaerytritolia (**75**) (2,0 g, 15 mmol) liuotettiin DMSO:iin (54 ml). Tähän liuokseen lisättiin etikkahappoa (11 ml) ja etikkahappoanhydridiä (35 ml). Reaktioliuosta sekoitettiin viisi vuorokautta, jonka aikana reaktion etenemistä seurattiin TLC-ajoilla (5 % MeOH / DCM). Reaktioliuoksen väri muuttui punertavaksi. Reaktioliuokseen lisättiin vettä (100 ml) ja sitä uutettiin viisi kertaa dietyylieetterillä (5 x 50 ml), jolloin punertava väri jäi vesifaasiin. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja faasia pestiin kaksi kertaa kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (2 x 50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, minkä jälkeen seos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa. DMSO:n poistamiseksi käytettiin öljypumppua ja N₂-loukkaa.

Raakasaaliiksi saatiin 4,2 g. Tuote puhdistettiin kaksi kertaa pylväskromatografisesti (0,8 % MeOH / DCM). Tuotefraktio fraktioitui puhdistuksen alkupuolella. Saaliiksi saatiin 0,21 g (3 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskooppisesti. Massaspektrometrillä tehty analyysi vahvisti, että tuote oli haluttu. Saannosta ja TLC-ajoista päätellen sivu- ja osittaisreaktioita esiintyi paljon. ¹H NMR (CDCl₃): δ 4.62 (8H, s), [3.77, 3.53] (8H, s), 2.12 (12H, s)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 75.90, 75.80, 67.53, 65.76, 44.01, 13.91

Metyylitiometyloitu bentsylideenisuojattu pentaerytritoli (78)

Vastaava metyylitiometylaatioreaktio suoritettiin bentsylideenisuojatulle pentaerytritolille käyttäen lähtöaineena bentsylideenisuojattua pentaerytritolia (**77**) (2,0 g, 8,9 mmol). Muiden reagenssien määrät olivat samat kuin pentaerytritolilla suoritettussa reaktiossa. Reaktio oli edennyt loppuun vuorokauden aikana. Puhdistusvaiheet

suoritettiin vastaavasti kuin pentaerytritollilla suoritettussa reaktiossa. Tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Saalis: 0,83 g (27 %).

Massaspektrin mukaan tuote oli oikea.

Atsakruunuligandin (72) liittäminen metyyliometyloituun bentsylideenisuojattuun pentaerytritoliin (79)

Metyyliometyloitua bentsylideenisuojattua pentaerytritolia (78) (0,050 g, 145 μmol) ja *t*-Boc-suojattua atsakruunua (72) (0,214 g, 438 μmol ; 3 ekv) liuotettiin kuivattuun dikloorimetaaniin (2 ml). Liuokseen lisättiin 0,2 g aktivoituja molekyyliseuloja ja sitä jäähdytettiin jäävesihauteessa (0 °C). Tähän liuokseen lisättiin tetrabutyyliammoniumbromidia (0,094 g, 290 μmol , 2 ekv, 0 °C) ja $\text{CuBr}_2 \cdot \text{a}$ (0,065 g, 290 μmol , 2 ekv, 0 °C). Seosta sekoitettiin ja sen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan, jossa sitä sekoitettiin edelleen 1,5 vuorokautta. Reaktion päätyttyä musta seos suodatettiin ja sakkaa pestiin pienellä määrällä etyyliasetaattia. Liuokseen lisättiin kylläistä NaHCO_3 -vesiliuosta. Tuotetta uutettiin kolme kertaa etyyliasetaatilla. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin Na_2SO_4 :lla. Liuos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa. Jäljelle jäi vihertävän kellertävä öljy. Tuotetta ja lähtöainetta vertailtiin ajamalla niistä TLC. Huomattiin, että tuote oli pääasiassa kokonaan lähtöainetta. Tästä syystä tämä synteesitie hylättiin. Myös synteesitie, jossa metyyliometyloidun bentsylideenisuojatun pentaerytritolin tilalla käytettäisiin metyyliometyloitua pentaerytritolia, hylättiin näiden reaktioiden samankaltaisuuden pohjalta. Sivureaktioiden osuus olisi jälkimmäisessä myös odotetusti suurempi.

***t*-Boc-suojatun atsakruunun metyyliometylaatio ja edelleen liittäminen pentaerytritoliin**

Seuraavaksi kokeiltiin erilaista lähestymistapaa, jossa metyyliometyyliryhmä liitetään *t*-Boc-suojattuun atsakruunuun ja tämä edelleen pentaerytritoliin.

Atsakruunun metyyliometylaatio (80)

t-Boc-suojattua atsakruunua (tri-tert-butyyl-3-hydroksi-1,5,9-triatsasyklododekaani-1,5,9-trikarboksylaatti) (72) (0,85 g, 1,7 mmol) liuotettiin 54 ml DMSO:a. Tähän

liuokseen lisättiin sekoittaen 11 ml etikkahappoa ja 35 ml etikkahappoanhydridiä. Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa kolme vuorokautta, jonka jälkeen reaktioliuoksen väri oli muuttunut kellertävästä punertavaksi. Reaktioliuokseen lisättiin 100 ml vettä ja sitä uutettiin viisi kertaa dietyylieetterillä (5 x 50 ml). Eetterifaasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, seos suodatettiin ja liuotin haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa öljypumpulla N₂-loukkua käyttäen.

Tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (0,8 % MeOH / DCM). Saalis oli niin pieni, ettei sen määrä ollut kunnolla mitattavissa.

Reaktio suoritettiin uudestaan. Lähtöainetta, *t*-Boc-suojattua atsakruunua, (**72**) käytettiin jälleen 0,85 g. Myös muita reagensseja käytettiin sama määrä kuin aikaisemmin suoritettussa reaktiossa. TLC-ajoilla seurattiin reaktion edistymistä. Reaktio oli edennyt loppuun 2 päivän kuluttua. Reaktioseosta uutettiin ensin vesi-dietyylieetteri seoksella kuten aikaisemminkin ja tämän jälkeen koottua orgaanista faasia vielä kylläisellä NaHCO₃-liuoksella. Orgaaninen eetterifaasi kuivattiin Na₂SO₄:lla ja liuotin haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti 4 % MeOH/DCM – ajoliuoksella. DMSO -jäämät haittasivat puhdistusta, eivätkä fraktiot kunnolla erottuneet. Tehtiin toinen puhdistus käyttämällä ajoliuoksena 35 % etyyliasetaatin ja petrolieetterin seosta. Tällöin DMSO jäämät eivät haitanneet puhdistusta. Puhdistetun tuotteen massaksi saatiin 0,50 g (52 %). Massaspektri ja NMR vahvistivat tuotteen olevan haluttu. ¹H NMR (CDCl₃): δ 4.66 (2H, s), 4.12 (1H, quin), 3.56-3.06 (12H, m), 2.09 (3H, s), 1.81 (4H, quin), 1.45 (27H, s)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 171.09, 79.97, 73.93, 72.03, 47.18, 44.69, 29.47, 28.40, 13.35

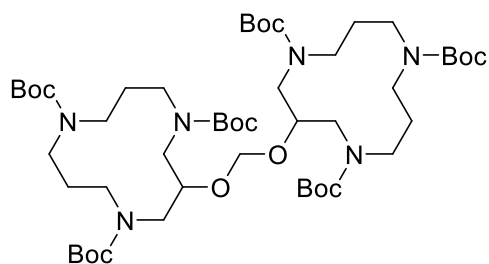
NMR-spektrissä näkyvien ylimääräisten piikkien vuoksi oli syytä epäillä, että tuote sisälsi edelleen epäpuhtauksia. Nyt voitiin kuitenkin yrittää metyyliotiometyloidun atsakruunun liittämistä bentsylideenisuojattuun pentaerytritoliin.

Metyyliotiometyloidun atsakruunun (80) liittämisen bentsylideenisuojattuun pentaerytritoliin (77)

Metyyliotiometyloitua *t*-Boc-suojattua atsakruunua (**77**) (100 mg; 183 μmol; 3 ekv) ja bentsylideenisuojattua pentaerytritolia (**80**) (13,7 mg, 61 μmol) liuotettiin kuivattuun dikloorimetaaniin (2 ml). Mukana reaktiossa oli myös pieni määrä aktivoituja

molekyyliseuloja. Molekyyliseulojen annettiin vaikuttaa kaksi vuorokautta. Liuos laitettiin jäävesihauteeseen ja siihen lisättiin tetrabutyyliammoniumbromidia (39,4 mg, 120 μmol , 2 ekv) sekä kuparibromidia (27,3 mg, 120 μmol , 2 ekv).

Reaktioseos oli aluksi ruskeanvioletti mutta sen väri muuttui 30 min kuluessa ruohonvihreäksi. Reaktioseoksen annettiin lämmetä vähitellen huoneenlämpötilaan. Reaktioseosta sekoitettiin vielä kolmectoista vuorokautta. Aika ajoin reaktioseoksesta ajettiin TLC-ajoja. Huolimatta pitkästä reaktioajasta reaktio ei milloinkaan suosinut lopputuotteita vaan reaktion päätyttyä oli lähtöainetta seoksessa vielä runsaasti jäljellä. Tuoteseoksesta suodatettiin pois kiinteät suolat ja liuosta uutettiin viisi kertaa dietyylieetteri-vesi-seoksella. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin Na_2SO_4 :lla. Liuotin haihdutettiin kuiviin. Tuotteesta ajettiin massaspekttri, jonka mukaan oikeaa tuotetta syntyi myös hieman mutta pääosin tuote koostui lähtöaineesta ja useista sivureaktiotuotteista, joista vallitsevin oli *t*-Boc-suojatun atsakruunun dimeeri (Kuva 12). Toiseksi vallitsevin tuote oli yhdiste, jossa vain yksi atsakruunu oli liittynään. Tämä synteesitie hylättiin.



Kuva 12. *t*-Boc-suojatun atsakruunun dimeeri (epäpuhtaus). $M = 1009,6311 \text{ g/mol}$

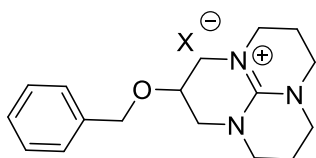
Metyylitiometyloidun atsakruunun liittämistä kokeiltiin myös pentaerytritoliin. Hallitseva reaktio oli *t*-Boc-suojatun atsakruunun dimeroituminen, kuten edellisessä reaktiossakin. Tuotteen määrä oli punnitukseen ja NMR-karakterisointiin liian pieni. Tämä synteesitie hylättiin.

Seuraavaksi vaihdettiin synteesistrategiaa. Koska edellisissä reaktioissa kuluivat loppuun viimeiset valmistetut atsakruunut, jouduttiin atsakruunua valmistamaan lisää. Tällä kertaa synteesistrategiaa kuitenkin muutettiin siten, ettei atsakruunua enää *t*-Boc-suojattu.

heksahydro-1H,3a¹H,4H,7H-3a,6a,9a-triatsafenalen-2-oli

8-(bentsyylioksi)heksahydro-1H,4H,7H-3a,6a,9a-triatsafenaleenia (**70**) (2,50 g, 8,7 mmol) liuotettiin puhtaaseen etanoliin (20 ml). Liuokseen lisättiin palladium-hiiltä (125 mg, 5 %). Tuotetta sekoitettiin ja sitä vedytettiin paineistetulla vedyllä (10 bar) kolmen vuorokauden ajan. Tuote suodatettiin ja C/Pd-jauhetta huuhdeltiin vielä etanolilla. Liuotin haihdutettiin kuiviin alennetussa paineessa, minkä jälkeen tuotetta kuivattiin vakuumieksikaattorissa fosforipentoksidin päällä 24 tuntia.

Tuotteesta otettiin massa- ja NMR-spektrit. Massaspektrin mukaan vedytys ei ollut edennyt toivotulla tavalla. Bentsyyliiryhmä ei ollut lähtenyt irti ja tuotteeseen oli muodostunut kaksoissidos (Kuva 13). Aivan kuin reaktio olisi edennyt väärään, hapettavaan suuntaan. Saalis (ei-toivottu tuote): 2,4 g (94 %).



Kuva 13. C/Pd/H₂ -hydrauksessa mahdollisesti saatu ei-toivottu tuote

Tälle virheellisesti hapettuneelle tuotteelle **83** suoritettiin synteessin 5. vaiheen NaBH₄-pelkistys uudelleen.

Vetykäsittelyssä jostain syystä hapettunut 8-(bentsyylioksi)dekahydro-3a,6a,9a-triatsafenaleeni (2,35 g, 8,2 mmol) liuotettiin kuivaan 1,4-dioksaaniin (100 ml) ja liuokseen lisättiin varovasti natriumboorihydridiä, NaBH₄ (4,2 g, 0,11 mol). Reaktioseosta sekoitettiin ja reagenssin annettiin hydrautua kaksi viikkoa. Tämän jälkeen suoritettu TLC-ajo vahvisti reaktion tapahtuneen. Puhdistusvaiheet olivat samat kuin aikaisemmin reaktiossa (v). Kirkkaahko öljymäinen neste kiteytyi myöhemmin.

Saalis: 2,0 g (85 %).

Tuotteesta ajettiin MS- ja NMR-spektrit. MS-spektri vahvisti tuotteen olevan oikea.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.23 (1H, s), 4.52 (1H, s), 3.95 (1H, quin), 3.75-3.06 (12H, m), 1.09 (4H, quin)

¹³C NMR (CDCl₃): Spektrin data ei ollut luotettavaa.

NaBH₄-pelkistyskäsittely tehtiin myös toiselle tuotepuolikkaalle. Saalis: 1,7 g, (71 %). Nyt voitiin koittaa Pd/C/H₂ – käsittelyä uudelleen. Tällä kertaa reaktioseosta sekoitettiin ja sitä vedytettiin H₂:lla 12 bar paineessa neljä vuorokautta. Myöskään nyt reaktio ei edennyt haluttuun suuntaan. Saalis (ei-toivottu tuote **83**): 0,75 g (37 %).

Myös kolmas Pd/C/H₂ -käsittely epäonnistui.

Saalis (ei-toivottu tuote **83**): 0,95 g (56 %).

Seuraavaksi kokeiltiin erilaista lähestymistapaa bentsyyliiryhmän irrotukseen. Bentsyyliiryhmää yritettiin seuraavaksi irrottaa trifluoretikkahapolla. Epäonnistuneessa C/Pd/H₂-vedytyksessä saatua yhdistettä (**83**) otettiin 0,25 g ja se lisättiin yhdessä anisolin (1,1 ekv) (0,11 g) kanssa pieneen määrään trifluoretikkahappoa. Reaktioseosta sekoitettiin, jolloin sen väri muuttui pian punertavaksi. Reaktiossa anisolin tarkoituksena oli sitoa itseensä mahdollisesti irtoava bentsyylikationi. Sekoitusta jatkettiin yön yli, jonka jälkeen liuoksen väri oli tummanpunainen. Väri saattoi johtua anisoliin sitoutuneesta bentsyylikationista. TLC ei tuonut selvyttä reaktion etenemisestä.

Reaktioliuoksesta otettiin näyte ja siitä haihdutettiin pois vapaana oleva TFA. Näyte neutraloitiin pyridiinillä, joka sen jälkeen haihdutettiin. Tämän jälkeen näyte huuhdeltiin vedellä. Tuotteesta ajettiin massaspektri, jonka perusteella voitiin havaita, että bentsyyliiryhmä oli nyt lähtenyt irti.

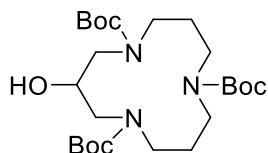
Pd/C/H₂-vedytyksessä syntyneet väärät reaktiotuotteet pelkistettiin jälleen NaBH₄:llä: 1,35 g lähtöainetta liuotettiin 60 ml kuivaa 1,4 dioksaania ja tähän lisättiin varovasti 1,0 g NaBH₄. Reaktioseosta sekoitettiin yli kaksi vuorokautta. Liuos suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin, jolloin saatiin ”mentolin”tuoksuinen neste. Massaspektri varmisti, että tuote on oikea.

Pd/C/H₂ –pelkistysten epäonnistuttua päätettiin kokeilla bentsyyliiryhmän irrottamista suoraan trifluoretikkahapolla. Reaktiossa syntyvälle TFA-suolalle suoritettiin ioninvaihto.

2-(bentsyylioksi)heksahydro-1H,4H,7H-3a,6a,9a-triatsafenaleenia (**70**) (2,80 g, 9,7 mmol) ja 1,16 g anisolia (1,1 ekv) liuotettiin trifluoretikkahappoon. Reaktioon annettiin edetä yön yli. Jäljelle jäänyt happo haihdutettiin pois ja punaruskealle liuokselle

suoritettiin ioninvaihto. NMR- ja MS-spektrien mukaan trifluorietikkahappo ei reaktiossa ollut kyennyt irrottamaan bentsyyliryhmää.

Tässä vaiheessa tuotteiden / lähtöaineiden loputtua valmistettiin vielä 9,90 g *t*-Boc-suojattua 1,5,9-triatsasyklododekan-3-olia (**72**) (Kuva 14) alkaen erikoistyon ensimmäisestä reaktiosta, minkä jälkeen erikoistyo päätettiin.



(8)

Kuva 14. Boc-suojattu 1,5,9-triatsasyklododekan-3-oli (**72**).

5. JOHTOPÄÄTÖKSET JA YHTEENVETO

Erikoistyössä ei esitetyillä menetelmillä kyetty valmistamaan tavoitemolekyyliä. Syinä olivat mahdollisesti steeriset vaikutukset ja/tai monihaarainen pentaerytritolirakenne, johon neljän ligandin liittäminen yhtä aikaa tuottaa lukuisia sivutuotteita. Myös debentsyylaatioreaktio epäonnistui tuntemattomasta syystä työn loppuvaiheessa. Ilmeisesti pentaerytritoli-rakenne ei esitetyillä reaktioilla ole kovin otollinen kohde 1,5,9-triatsasyklododekaanitähteen liittämiselle. Atsakruunun valmistaminen onnistui hyvin kuten lähteissä oli esitetty.

Monet keinotekoiset atsakruunu-siirtymämetallikompleksit osoittavat katalyyttistä aktiivisuutta nukleinihappojen, fosfaattiestereiden ja proteiinien hydrolyysissä. On havaittu, että kun metalli-ionikeskusten määrää näissä molekyyleissä lisätään, katalyyttinen teho kasvaa, usein yhteisvaikutuksellisesti. Näiden molekyylien suunnittelu ja valmistaminen on kuitenkin kallista ja aikaa vievää. Suunniteltujen atsakruunu-kompleksien suhteellinen yksinkertaisuus lienee myös syynä siihen, miksi näillä molekyyleillä ei saavuteta samanlaisia aktiivisuuksia, selektiivisyyksiä ja spesifisyyksiä kuin luonnollisilla entsyymeillä. Ongelmana on usein myös keinotekoisien molekyylien myrkyllisyys sekä niiden toimimattomuus ja halutunlainen kulkeutuminen kehossa. Kuitenkin näillä komplekseilla on havaittu olevan katalyyttistä vaikutusta, joten

mahdollisesti niiden analogeilla saattaa olla tulevaisuudessa terapeuttista arvoa, heti kun niiden toimintaa sisällä kehossa tai solussa on saatu paranneltua.

6. LÄHTEET

- 1) Ferrarresso, L.G.; de Arruda, E.G.R.; de Moraes, T.P.L; Fazzi, R.B.; Da Costa Ferreira, A.M.; Abbehausen, C. Copper(II) and zinc(II) dinuclear enzymes model compounds: The nature of the metal ion in the biological function. *J. Mol. Struct.* **2017**, 1150, 316-328
- 2) Wang, Q. *Synthesis of Dinucleating Azacrown Ligands and Studies on Their Metal Ion Complexes as Cleaving Agents of RNA Phosphodiester Bonds*. Väitöskirja, Turun yliopisto, **2007**.
- 3) Yu, L.; Li, F-z; Wu, J-y; Xie, J-q, Li, S. Development of the aza-crown ether metal complexes as artificial hydrolase. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 154, 89-102
- 4) Bag, B.; Mukhopadhyay, P.; Bharadwaj, P. K. *Curr. Sci.* **2006**, 91, 1166-1175
- 5) Wang, Q.; Lönnberg, H. Simultaneous Interaction with Base and Phosphate Moieties Modulates the Phosphodiester Cleavage of Dinucleoside 3',5'-Monophosphates by Dinuclear Zn²⁺ Complexes of Di(azacrown) Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10716
- 6) Bradshaw, J.; Krakowiak, K.; Zamecka-Krakowiak, D. Synthesis of Aza-Crown Ethers. *Chem. Rev.* **1989**, 89, 929-972
- 7) Bradshaw, J.; Krakowiak, K.; Izatt, R. General Synthetic Methods for the Polyaza-crown Macrocycles Chemistry of Heterocyclic Compounds. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, 51, 73-115
- 8) Bradshaw, J.; Krakowiak, K. Synthesis of Azacrown Macrocycles and Related Compounds by a Crablike Cyclization Method: A Short Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2000**, 39, 3499-3507
- 9) Parker, D. *Macrocyclic synthesis – A Practical Approach*. **1996**. Department of Chemistry, University of Durham, UK
- 10) Bowman-James, K. *Macrocyclic Ligands*. University of Kansas, Lawrence, KS, USA, **2011**
- 11) Petrov, V. A; Marshall, W. Acid catalyzed cyclodimerization of 2,2-bis(trifluoromethyl)-4-alkoxy-oxetanes and -thietanes. Synthesis of 2,2,6,6-tetrakis(trifluoromethyl)-4,8-dialkoxy-1,5-dioxocanes and 3,3,7,7-

- tetrakis(trifluoromethyl)-9-oxa-2,6-dithia-bicyclo[3.3.1]nonane. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2010**, 6, 46
- 12) Rebilly, J-N.; Colasson, B.; Bistri, O.; Overa, D.; Reinaud, O. Biomimetic cavity-based metal complexes. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 467-489
 - 13) Cacciapaglia, R.; Casnati, A.; Mandolini, L.; Reinhoudt, D. N.; Salvio, R.; Sartori, A.; Ungaro, R. Di- and trinuclear arrangements of zinc(II)-1,5,9-triazacyclododecane units on the calix[4]arene scaffold: Efficiency and substrate selectivity in the catalysis of ester cleavage. *Inorg. Chim. Acta*, **2007**, 360, 981-986
 - 14) Zamecknik, P.C.; Stephenson, M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl Acad. Sci*, **1978**, 75, 280-284.
 - 15) Khoramdareh, Z.K., Hosseini-Yazdi, S.A., Spingler, B., Khandar, A.A. Synthesis, characterization, spectrophotometric and electrochemistry studies, and DNA cleavage of copper(II) complexes of a new azacrown bis-macrocycle and its mono-cyclic analogue. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, **2014**, 80, 391–399
 - 16) Montagner, D.; Gandin, V.; Marzano, C.; Erxleben, A. DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclonane) copper complex. *J. Inorg. Biochem.*, **2015**, 145, 101-107
 - 17) Yu, L.; Li, J-y.; Xie, J-q.; Li, S. Development of the aza-crown ether metal complexes as artificial hydrolase. *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, 154, 89-102
 - 18) Molenveld, P.; Engbersen, J.F.; Reinhoudt, D.N. Dinuclear metallo-phosphodiesterase models: application of calix[4]arenes as molecular scaffolds. *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, 29, 75–86
 - 19) Wang, Q., Mikkola, S., Lönnberg, H. Synthesis of 2,6,10,14,18,22-hexaazaspiro[11.11]tricosane, the first example of a spiro aza crown derived from 2,2-bis(aminomethyl)propane-1,3-diamine. *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 2735–2737
 - 20) Han, G.; Deng, Y.; Ling, J.; Shen, Z. Research into europium complexes as magnetic resonance imaging contrast agents (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, February **2015**, 1561-1566 (<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2015.2297> 8.3.2020)
 - 21) Chand, D.; Ghosh, P.; Shukla, R.; Sengupta, S.; Das, G.; Bandyopadhyay, P.; Bharadwaj, P. Synthesis and uses of macrobicyclic cryptands: From complexation of

- transition metal ions to molecular devices. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*, **1996**, 108, 229-233
- 22) Voloshin, Y., Belaya, I. Krämer, R. *Cage Metal Complexes – Clathrochelates Revisited.*, Springer, Switzerland, **2017**, 3-20
- 23) Bag, B., Mukhopadhyay, P., Bharadwaj, P.K. Exocyclic coordination and translocation of metal ions in laterally non-symmetric aza cryptands. *Current Science*, **2006**, vol. 91, no. 9, 1166-1175
- 24) Mewis, R.E.; Archibald, S.J. Biomedical applications of macrocyclic ligand complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, **2010**, 254, 1686–1712
- 25) Mishra, A.; Fouskova, P.; Angelovski, G.; Balogh, E.; Mishra, A. K.; Logothetis, N.K.; Toth, E. Facile Synthesis and Relaxation Properties of Novel Bispolyazamacrocyclic Gd³⁺ Complexes: An Attempt towards Calcium-Sensitive MRI Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 1370-1381
- 26) Yin, J.; Hu, Y.; Yoon, J. Fluorescent probes and bioimaging: alkali metals, alkaline earth metals and pH. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 4619
- 27) Bhanja, A.K.; Patra, C.; Mondal, S.; Mishra, S.; Saha, K.D.; Sinha, C. Macrocyclic aza-crown chromogenic reagent to Al³⁺ and fluorescence sensor for Zn²⁺ and Al³⁺ along with live cell application and logic operation. *Sensors and Actuators B*, **2017**, 252, 257–267
- 28) Kaden, T.A. Dinuclear metal complexes of bis-macrocycles. *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 190-192, 371-389