



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# **Kemiallinen glykosylaatio vesiliuoksessa**

Silja Arohonka

Bio-orgaanisen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

20.4.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Silja Arohonka

**Otsikko:** Kemiallinen glykosylaatio vesiliuoksessa

**Ohjaaja:** Heidi Korhonen

**Sivumäärä:** 22 sivua

**Päivämäärä:** 20.4.2026

---

Soluissa glykosylaatio tapahtuu entsyymien avustamana veden läsnä ollessa. Tämän takia myös kemiallisesti suoritettavaa glykosylaatiota vesiliuoksessa halutaan kehittää. Tämä vähentää orgaanisten liuottimien käyttöä ja tekee menetelmästä ympäristöystävällisemmän vaihtoehdon. Veteen puhtaana reaktioliuottimena liittyy kuitenkin paljon haasteita. Glykosyylidonori on altis hydrolyysille ja keskeisenä kysymyksenä onkin, miten glykosyyliakseptorin (alkoholi, tioli tai amiini) nukleofiilisyyttä voidaan kasvattaa liuottimena olevaa vesimolekyyliä tehokkaammaksi.

Useita menetelmiä glykosylaatiolle veden läsnä ollessa on kehitetty. Hiilihydraatin anomeerista ryhmää voidaan muokata elektronegatiivisemmaksi, jolloin elektrofiilisen promoottorin lisäys reaktioliuokseen edesauttaa reaktiota. Elektrofiiliseksi promoottoriksi valitaan yhdiste, jolla on korkea affiniteetti hiilihydraatin muokattua anomeerista substituenttia kohtaan, ja se voi olla esimerkiksi happo tai emäs. Hiilihydraatti voidaan muuntaa myös nukleofiiliseksi emäksen avulla, jolloin se voi itse hyökätä elektrofiiliseen yhdisteeseen. Glykosylaatio voidaan suorittaa myös esimerkiksi dehydraatiolla, jolloin veden lohkeaminen reaktiossa saa aikaan uuden glykosidisen sidoksen.

Olemassa olevia menetelmiä voidaan soveltaa aina oligosakkaridien muodostuksesta nukleosidien ja glykoproteiinien muodostukseen. Melkein kaikissa menetelmissä veden lisäksi reaktioliuokseen tarvitaan myös orgaaninen apuliuotin. Puhtaassa vedessä tapahtuvia reaktioita on huomattavasti vähemmän. Tutkielmassa käsitellään *O*-, *N*- ja *S*-glykosidisten sidosten muodostamista eri menetelmin veden läsnä ollessa.

---

**Avainsanat:** Glykosylaatio, vesiliuos

## Sisällys

<b>1</b>	<b>Johdanto</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Glykosylaation perusperiaate</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>O-glykosylaatio vesiliuoksessa</b> .....	<b>4</b>
3.1	Koenigs-Knorr glykosylaatio.....	4
3.2	O-glykosylaatio dehydraatiolla.....	5
3.3	Glykosyylifluoridit.....	7
3.4	Nukleofiilinen hyökkäys alkyylihalidiin .....	8
<b>4</b>	<b>N-glykosylaatio vesiliuoksessa</b> .....	<b>9</b>
4.1	N-glykosylaatio dehydraatiolla.....	10
4.2	Pelkistävä aminaatio .....	11
4.3	Glykosyylihalidit.....	12
4.4	Anomeerisen NH <sub>2</sub> -ryhmän asylaatio .....	14
<b>5</b>	<b>S-glykosylaatio vesiliuoksessa</b> .....	<b>15</b>
5.1	S-glykosylaatio dehydraatiolla.....	15
5.2	Glykosyylihalidit.....	16
5.3	Anomeerisen SH-ryhmän reaktiot.....	17
5.3.1	Tio-Michaelin additio.....	17
5.3.2	Nukleofiilinen aromaattinen substituutio .....	18
<b>6</b>	<b>Yhteenveto</b> .....	<b>19</b>
<b>7</b>	<b>Viitteet</b> .....	<b>20</b>

## Lyhenteet

DBSA	dodekyylibentseenisulfonihappo
BSA	naudan seerumin albumiini (engl. bovine serum albumin)
DMF	dimetyyliformamidi
Cbz	bentsyylioksidikarbonyyli
THF	tetrahydrofuraani
Fmoc	fluorenyylimetoksidikarbonyyli
SPPS	kiinteän faasin peptidisynteesi (engl. solid phase peptide synthesis)

## 1 Johdanto

Hiilihydraattien muodostamat glykosidiset sidokset ovat tärkeässä roolissa esimerkiksi solujen rakenteissa ja solusignaaloinnissa.<sup>1,2</sup> Solusta yli 70 prosenttia on vettä<sup>3</sup> ja solun entsyymit ohjaavat glykosylaatioreaktiota tässä vesiympäristössä.<sup>2</sup> Kemiallinen glykosylaatio vesiliuoksessa ilman ohjaavia entsyymejä on kuitenkin haastavaa. Tällöin vesi toimii nukleofiilisenä kilpailijana, joka voi hyökätä hiilihydraattiin halutun rakenteen sijasta. Tämän takia kemiallinen glykosylaatio on ollut pitkään suositumpaa suorittaa orgaanisessa liuotimessa.<sup>2</sup>

Kemiallista glykosylaatiota vesiliuoksessa halutaan kuitenkin kehittää monesta syystä. Koska glykosylaatio tapahtuu luonnossa veden läsnä ollessa, on vesiliuos tutkimusympäristönä mielenkiintoinen. Orgaaniset liuottimet ovat usein haitallisia tai myrkyllisiä, joten niiden vähentäminen tai korvaaminen on ympäristöystävällistä ja noudattaa kestävän kemian mukaisia tavoitteita.<sup>2</sup> Hiilihydraattien rooli lääkekehityksessä on myös selvästi kasvussa<sup>1</sup>, minkä takia niiden käyttömahdollisuuksia luontaisessa liuotimessa on tärkeää tutkia.

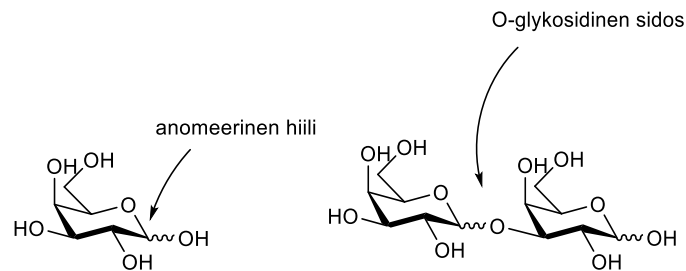
Usein hiilihydraattien hydroksyyliiryhmiä joudutaan suojaamaan suojaryhmillä, jotta reaktio saadaan tapahtumaan halutusta kohdasta.<sup>4</sup> Käytetyt suojaryhmät ovat usein hydrofobisia, mikä vaatii vähemmän polaarisen liuottimen ts. orgaanisen liuottimen läsnäoloa.<sup>2</sup> Mahdollisuus pysyvän karbokationin muodostumiseen tekee anomeerisesta asemasta kuitenkin erityislaatuisten muihin asemiin verrattuna. Tämä mahdollistaa siihen kohdistuvat reaktiot selektiivisesti, jolloin suojaryhmien käyttö ei ole välttämätöntä.<sup>4</sup>

Tutkimuksessa keskitytään *O*-, *N*- ja *S*-glykosidisten sidosten muodostumiseen erilaisin menetelmin vesiliuoksessa. Ilmi tulevien menetelmien lisäksi myös useita muita vaihtoehtoja on kehitetty.

## 2 Glykosylaation perusperiaate

Kemiallisessa glykosylaatioreaktiossa muodostuu glykosidinen sidos sokerirenkaan ja nukleofiilin välille.<sup>5</sup> Nukleofiilinä voi toimia toinen sokeriyksikkö, tai hiilihydraatista poikkeava rakenne eli aglykoni.<sup>6</sup> Elektrofiilinä toimivan sokeriyksikön osalta glykosidinen sidos muodostuu sen anomeeriseen hiileen. Anomeerinen hydroksyyliiryhmä on happamampi kuin sokerin muut hydroksyyliiryhmät, mikä mahdollistaa sen käytön selektiivisenä nukleofiilinä tai aktivoinnin muiden OH-ryhmien läsnä ollessa.<sup>7</sup> Reaktiossa on otettava huomioon myös anomeerisen hiilen stereokemia:

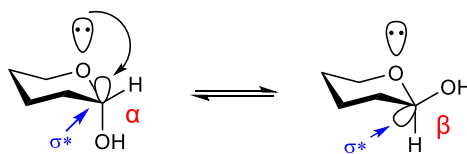
anomeerinen hiili on stereogeeninen keskus, jolloin reaktiossa voi muodostua kaksi eri diastereomeeriä.<sup>8</sup>



**Kuva 1.** Glukoosiyksikön rakenne ja esimerkki glykosidisesta sidoksesta.

Anomeerisen C1-aseman mahdollisia konformaatioita ovat aksiaalinen  $\alpha$ -anomeeri, sekä ekvatoriaalinen  $\beta$ -anomeeri. Aksiaalisessa asemassa anomeerisen hiilen substituentti sijoittuu kohtisuoraan keskimääräiseen rengastasoon nähden, kun taas ekvatoriaalisessa asemassa oleva substituentti sijoittuu enemmän renkaan tasoisesti.

Edward ja Lemieux määrittivät anomeerisen efektin vuosina 1955-1958, joka perustuu sokerirenkaan anomeerisen substituentin stereokemiaan. Määritelmän perusteella anomeeriseen  $\alpha$ -asemassa sijaitsevaan elektronegatiiviseen substituenttiin kohdistuu stabiloiva anomeerinen efekti. Tätä voi perustella molekyyliorbitaalien asettumisella: rengashapen aksiaalinen vapaa elektronipari, sekä glykosidisen sigma-sidoksen ”antibonding” orbitaali asettuvat aksiaalisessa  $\alpha$ -anomeerissa saman suuntaisesti. Seurauksena on elektroninen delokalisaatio, joka stabiloii  $\alpha$ -anomeeria. Ekvatoriaalisessa  $\beta$ -asemassa kyseistä stabilisaatiota ei esiinny (Kaavio 1).<sup>6</sup>

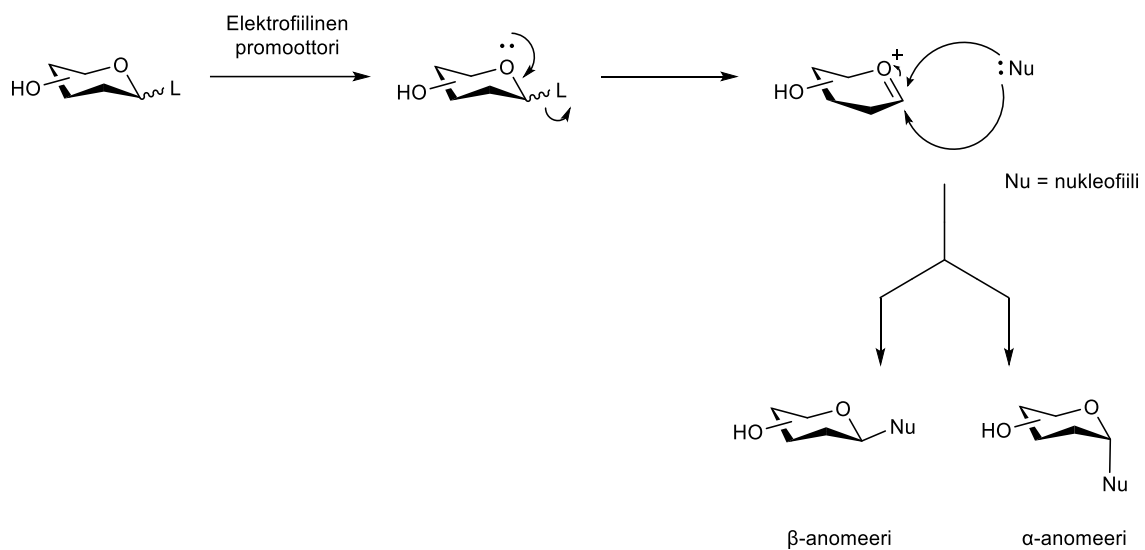


**Kaavio 1.** Anomeerinen efekti molekyyliorbitaaleilla perusteltuna<sup>6</sup>

Ennen glykosidisen sidoksen muodostusta sokerin anomeerisen hiilen substituentti voidaan muokata hyväksi lähteväksi ryhmäksi.<sup>6</sup> Elektronegatiivisuutensa ansiosta hyviä lähteviä ryhmiä ovat esimerkiksi halogeenit. Lähtevän ryhmän irrotessa voi muodostua litistyneessä tuolikonformaatioissa oleva oksokarbeeniumkationi-intermediaatti.<sup>6</sup> Nukleofiilinä toimiva aglykoni tai toinen sokeriyksikkö hyökkää tähän kationiin  $S_N1$ -mekanismilla, jolloin muodostuu haluttu glykosidinen sidos. Sidoks voi muodostua myös  $S_N2$ -mekanismilla, jolloin oksokarbeeniumkationi-intermediaattia

ei synny. Eräs esimerkki tästä on lähtevän ryhmän koordinoituminen promoottorina toimivaan metallisuolaan<sup>9</sup>, jolloin nukleofiilin hyökkäys ja lähtevän ryhmän poistuminen tapahtuvat saman aikaisesti.

Nukleofiilin hyökkäys voi johtaa  $\alpha$ - tai  $\beta$ -muotoisen tuotteen muodostumiseen riippuen siitä, hyökkääkö nukleofiili sokerirenkaan ylä- vai alapuolelta.<sup>6</sup> Kun hyökkäys tapahtuu sokerirenkaan alapuolelta, syntyy  $\alpha$ -anomeeri. Kun hyökkäys tapahtuu sokerirenkaan yläpuolelta, syntyy  $\beta$ -anomeeri.<sup>6</sup>



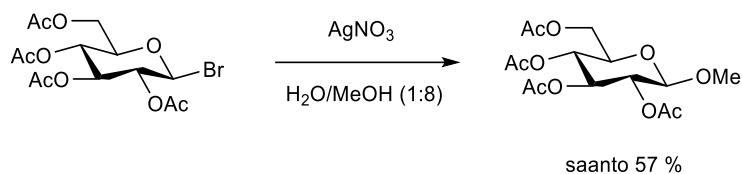
**Kaavio 2.** Glykosylaation mekanistinen reitti  $S_N1$ -reaktion kautta<sup>6</sup>

### 3 O-glykosylaatio vesiliuoksessa

*O*-glykosylaatioissa suurena haasteena on veden kilpaileva nukleofilisyys ja tätä kautta hydrolysoitumisen mahdollisuus. Glykosyyliakseptorin nukleofilisyyttä voidaan kuitenkin kasvattaa hydrolyysin hallitsemiseksi esimerkiksi hydroksyyliin koordinoituvan metalli-ionin avulla.

#### 3.1 Koenigs-Knorr glykosylaatio

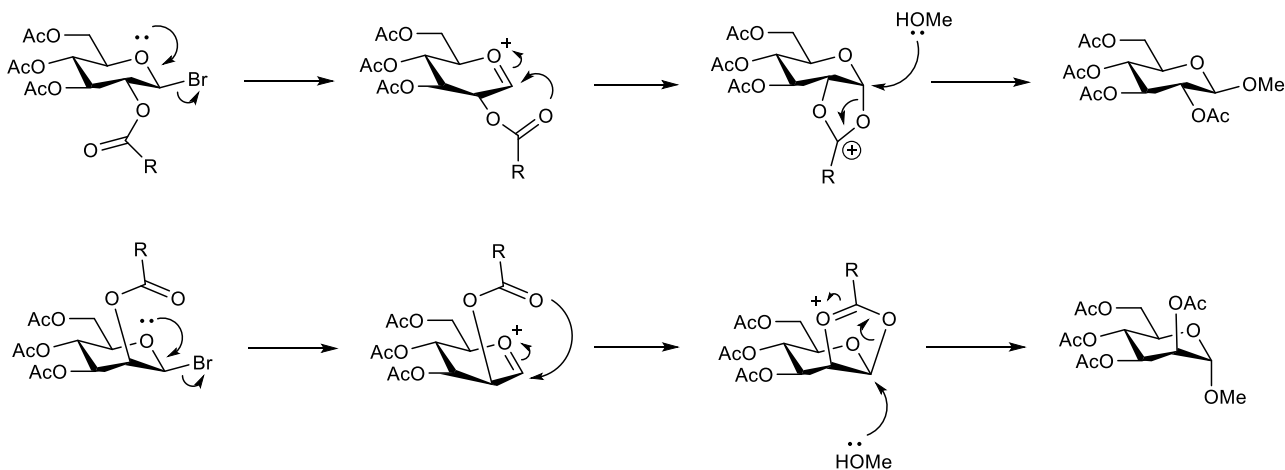
Koenigs ja Knorr suorittivat ensimmäisen *O*-glykosylaation vesiliuoksessa vuonna 1901. Kyseisessä menetelmässä hiilihyaatrin anomeeriseen hiileen on liitetty halogeeni, joka reagoi alkoholin kanssa hopeasuolan läsnä ollessa.<sup>2</sup>



### Kaavio 3. Alkuperäinen Koenigs-Knorr glykosylaatio <sup>2</sup>

Vesi toimii reaktiossa nukleofiilisenä kilpailijana alkoholia vastaan, minkä takia reaktio suosii vedettäviä olosuhteita. Reaktio on kuitenkin onnistunut myös veden läsnä ollessa, mutta sitä on ollut selkeästi vähemmän kuin reagoivaa metanolia (1:8). Myös suojaryhmistä johtuva rasvaliukoisuuden kasvu vaatii orgaanisen liuottimen läsnäoloa.<sup>2</sup> Hopeaioni toimii elektrofiilisenä promoottorina (Lewisin happo) ja koordinoituu halogeeniatomiin tehden siitä paremman poistuvan ryhmän. Sivutuotteena muodostuu saostuva hopeahalidi.

Kun glykosyylihalidin hydroksyyliiryhmät suojataan asetyyliiryhmillä, oksoniumkationi stabiloituu asyylioksokarbeeniokationin muodostumisen kautta. 2-aseman asyyliisubstituentti ohjaa hyökkäystä niin, että muodostuva *O*-glykosidinen sidos tuottaa transglykosidisen sidoksen. Anomeria riippuu 2-aseman asyyliisubstituentin suunnasta (Kaavio 4).<sup>6</sup>



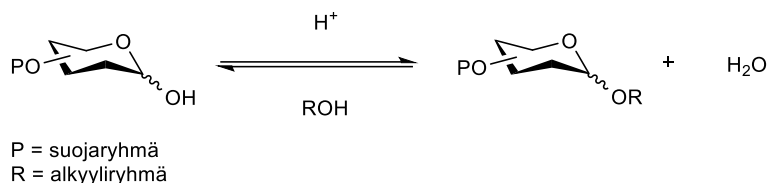
### Kaavio 4. C2-asyyliisubstituentin vaikutus glykosidisen sidoksen stereokemiaan <sup>6</sup>

Alkuperäisessä julkaisussa glykosyylihalidina käytettiin tetra-*O*-asetyloitua glykosyylibromidia, jolloin saatiin muodostettua tetra-*O*-asetyloitu metyyli- $\beta$ -D-glykosidi. Saannoksi saatiin 57 %.<sup>2</sup>

## 3.2 *O*-glykosylaatio dehydraatiolla

*O*-glykosylaatio voidaan tehdä myös dehydraatiolla, jossa sokerin anomeerista hydroksyyliiryhmää ei ole muokattu paremmaksi lähteväksi ryhmäksi, vaan se toimii suoraan glykosyyliidonorina.<sup>10</sup> Tämä

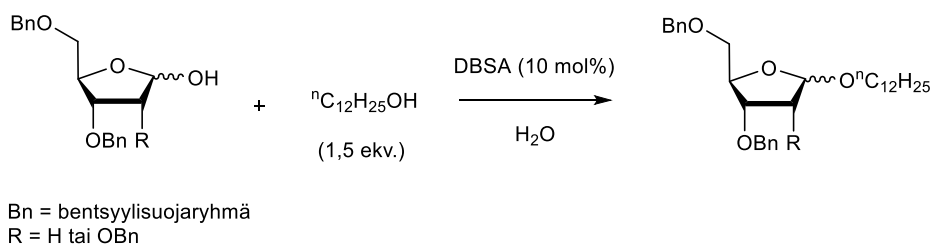
on ympäristöystävällisempi ratkaisu, sillä sivutuotteena muodostuu vain vettä. Tätä lähestymistapaa on käytetty sokerien glykosylaatioissa käyttämällä ylimäärää sokeriin hyökkäävää nukleofiilia ROH (Kaavio 5) ja stoikiometristä määrää Brønstedin happoa elektrofiilisenä promoottorina. Menetelmää kutsutaan Fischerin glykosidaatioksi.<sup>11</sup>



**Kaavio 5.** *O*-glykosylaatio Fischerin glykosidaatiolla.<sup>11</sup>

Monet dehydratiiviset menetelmät ovat rajoittuneet yksinkertaisten glykosidien tai 2-deoksisokereiden valmistukseen, ja menetelmän soveltaminen monimutkaisempien oligosakkaridien synteisiin on edelleen haastavaa esimerkiksi prosessin käännteisyyden vuoksi.<sup>10,11</sup> Usein tarvitaan myös ylimäärä Brønstedin happoa.<sup>12</sup>

Aoyama ja Kobayashi suorittivat *O*-glykosylaation vesiliuoksessa käyttäen katalyyttinä Brønstedin hapon ja pinta-aktiivisen aineen yhdistelmäkatalyyttinä, dodekyylibentseenisulfonihappoa (DBSA).<sup>12</sup> Sokereihin liitettiin alkoholeja, joilla oli pitkä hydrofobinen hiiliketju. DBSA ja hydrofobinen alkoholi muodostivat emulsiopisaroiita, joiden vettä hylkivä sisäosa sulki pois ympäröivän vesiliuoksen, sekä reaktion aikana muodostuvan veden. Myös sokerin muut hydroksyylioryhmät suojattiin hydrofobisilla bentsyyliisuojausjauksilla. Mitä hydrofobisempi substraatti, sitä parempi saanto reaktiosta saatiin.<sup>12</sup>



**Kaavio 6.** DBSA-katalysoitu dehydratiivinen *O*-glykosylaatio<sup>12</sup>

Kun reaktio suoritettiin *O*-bentsyyliisuojatulla 2-deoksi-ribofuranosilla, suurta  $\alpha$ - ja  $\beta$ -anomeerien selektiivisyyttä ei esiintynyt. Kun sama reaktio suoritettiin *O*-bentsyyliisuojatulla ribofuranosilla, anomeerisen hiilen viereinen substituentti ohjasi reaktiota kohti  $\beta$ -anomeerin muodostumista<sup>12</sup>

samaan tapaan kuin Koenigs-Knorr -reaktiossa. Sokerin 2-aseman substituentin vaikutus näkyi myös reaktioajassa sekä saannossa (Taulukko 1).

**Taulukko 1.** Hiilihydraatin 2-aseman substituentin vaikutus glykosidisen sidoksen stereokemiaan, reaktionopeuteen ja saantoon <sup>12</sup>

R	Olosuhteet	Saanto-%	$\alpha/\beta$
H	40°C, 3 h	88	36/64
OBn	40°C, 12 h	83	9/91

Kun sokerin anomeerinen hydroksyyli-ryhmä protonoidaan, siitä muodostuu hyvä lähtevä ryhmä (H<sub>2</sub>O). Vesi lohkeaa pois ja pitkäketjuinen alkoholi hyökkää anomeeriseen hiileen. Näin saadaan muodostettua glykosidinen sidos ilman välituotteita.<sup>13</sup> Dehydratiiviset reaktiot vesiliuoksessa ovat kuitenkin haastavimpia suoritettavia glykosylaatioreaktioita<sup>12</sup>, ja usein joudutaankin turvautumaan hydrofobisiin emulsiomenetelmiin.

### 3.3 Glykosyylifluoridit

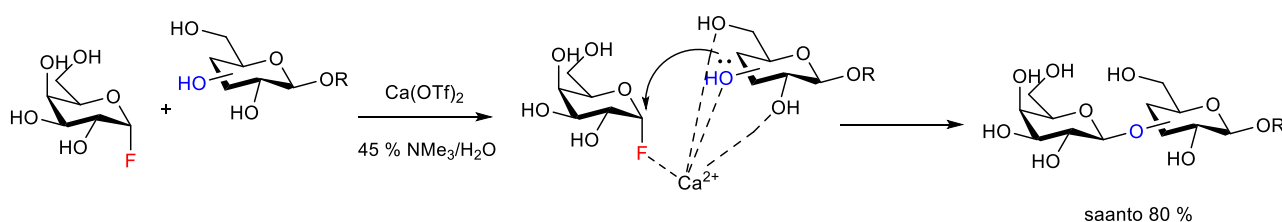
Glykosyylifluorideissa anomeeriseen hiileen on liitetty fluori. Niiden monipuolisuus perustuu parempaan lämpö- ja kemialliseen stabiilisuuteen verrattuna muihin glykosyylihalideihin:<sup>6</sup> fluori on halogeeneistä kooltaan pienin, minkä ansiosta hiilen ja fluorin orbitaalit pääsevät tehokkaasti päällekkäin. Tällöin niiden välinen sidosenergia on suurempi ja sidoksen katkaiseminen vaikeampaa. Sidoksen vahvuuden ansiosta ne ovat vähemmän alttiita hydrolyysille.<sup>2</sup>

Suuren sidosenergian takia fluori on huono lähtevä ryhmä proottisissa liuottimissa, ja se vaatii erillisen aktivoinnin esimerkiksi Lewisin hapolla. Vakautensa ansiosta glykosyylifluoridit ovatkin hyvä lähtöaine vesiympäristössä tapahtuvalle glykosylaatioreaktiolle.<sup>9</sup>

Vuonna 2016 Miller työryhmineen demonstroi glykosyylifluoridien käytön glykosylaatioreaktiossa vesiliuoksessa.<sup>9</sup> Sekä glykosyylidonori että glykosyyliakseptori olivat suojaamattomia.<sup>2</sup> Kalsiumsuolan ja tertiäärisen emäksisen amiinin todettiin edistävän reaktiota korkealla paikkaselektiivisyydellä vastaanottavan sokerin 3-asemaan. Luovuttavan  $\alpha$ -D-glykosyylifluoridin stereokemia muuttui  $\alpha$ -anomeerista  $\beta$ -anomeeriksi.<sup>9</sup>

Reaktio toteutettiin käyttäen 45-prosenttista trimetyyliamiinin vesiliuosta, johon oli lisätty kalsiumtriflaattia ( $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ ).<sup>9</sup> Kalsiumionit toimivat reaktiossa Lewisin haponä. Fluoridi-ioni koordinoituu kalsiumin kanssa, ja glykosylaatioreaktio tapahtuu  $\text{S}_{\text{N}}2$ -mekanismilla.

Muutoin vesiliuoksessa epävakaa Lewisin happo toimii emäksiseen ligandiin koordinoitumisen ansiosta myös vesiliuoksessa.<sup>14</sup> Lisäksi sokereilla on korkea affiniteetti kalsiumionille niiden hydroksyyliyhmiensä ansiosta, joiden kanssa kalsiumioni muodostaa kelaattikompleksin. Tämän kelaattikompleksin muodostuminen on suotuisampaa kuin kalsiumionin koordinoituminen moneen eri vesimolekyylisiin. Kelaattikompleksin ansiosta hyökkäävä sokeri saadaan houkutelua kohti luovuttavaa sokeria. Poistuva fluori reagoi veden kanssa muodostaen happaman ympäristön, jonka trimetyyliamiini neutraloi.



**Kaavio 7.** *O*-glykosidisen sidoksen muodostuminen glykosyylifluoridista Lewisin haponä avulla.

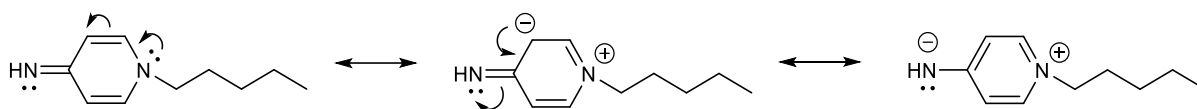
Olosuhteet: 30 °C, 48 h<sup>9</sup>

Erona Koenigs-Knorr-reaktioon, asyyli suojarahmiä ei vaadita, sillä sekä luovuttava että vastaanottava sokeri reagoivat kalsiumionin ohjauksen avulla.

### 3.4 Nukleofiilinen hyökkäys alkyylihalidiin

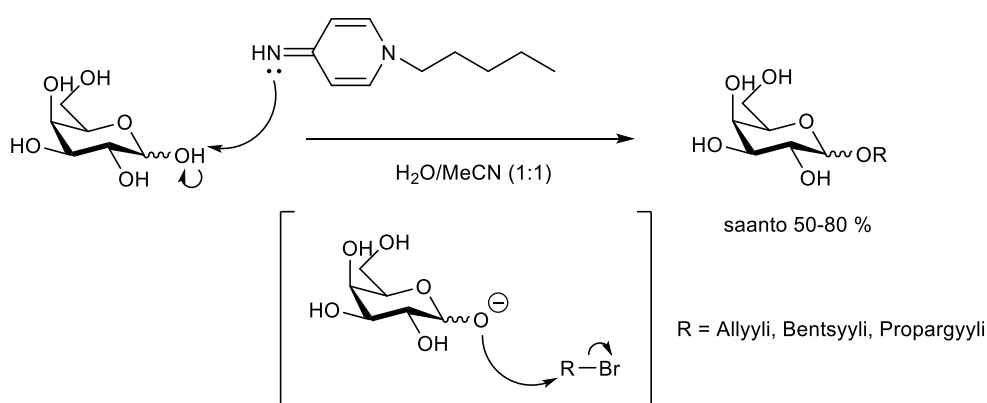
Anomeerinen OH-ryhmä on happamampi kuin muut hiilihydraatin OH-ryhmät.<sup>2</sup> Tämän ansiosta se voidaan deprotonoida selektiivisesti, jonka jälkeen se toimii itse nukleofiilinä. Promootorina voidaan käyttää emästä, joka deprotonoi anomeerisen OH-ryhmän. Eräs tällainen reaktio on alkyylihalidin reaktio sokerin hydroksyyliyhmiensä kanssa.

Vuonna 2022 Dey ja Jayaraman raportoivat pyridoni-imiinin toimivan hyvänä emäksenä edistäen selektiivistä  $\text{S}_{\text{N}}2$ -reaktiota sokerin anomeerisen OH-ryhmän ja alkyylibromidin välillä.<sup>7</sup> Sokeri on reaktiossa suojaamaton ja vesiliuoksessa.<sup>2</sup> Ylivoimaisesti tehokkaimmaksi pyridoni-imiiniksi todettiin 4-pyridoni-imiini sen imiini- ja pyridiinityppien mahdollistaman elektronien delokalisoitumisen ansiosta.<sup>7</sup>



**Kaavio 8.** 4-Pyridoni-imiinin resonanssirakenteita

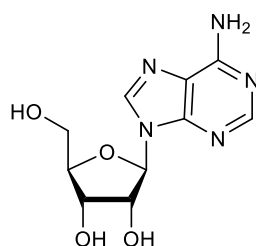
Pyridoni-imiini deprotonoi tehokkaasti anomeerisen hydroksyyliiryhmän, jolloin hiilihyaatista saadaan nukleofiilinen ja se hyökkää alkyylibromidiin.<sup>7</sup> Reaktio suoritettiin veden ja asetonitrilin 1:1 liuoksessa.<sup>2</sup> Asetonitriliä tarvittiin apuliuottimena alkyylibromidin liuottamiseksi.<sup>7</sup> Saaduissa tuotteissa  $\beta$ -anomeeri oli suurimmassa osassa suotuisampi, minkä voidaan ajatella johtuvan veden määrästä liuottimessa, joka on jopa puolet.<sup>2,7</sup> Veden läsnäolo vähentää anomeerisen efektin vaikutusta. Tämä johtuu muun muassa veden muodostamista vetysidoksista.<sup>2</sup>



**Kaavio 9.** Nukleofiilinen hyökkäys alkyylihalidiin emäspromoottorin avulla. Kaavio on muokattu versio lähteestä<sup>7</sup>

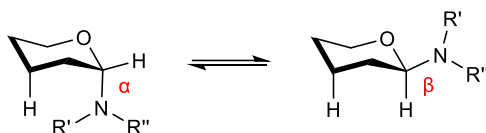
#### 4 N-glykosylaatio vesiliuoksessa

*O*-glykosylaation lisäksi *N*-glykosylaatio on yleinen luonnossa tapahtuva reaktio. Tärkeän ryhmän muodostavat esimerkiksi nukleosidit, joissa sokeri- ja emäsosa ovat liittyneet toisiinsa *N*-glykosidisella sidoksella (Kuva 2).<sup>2</sup>



**Kuva 2.** Nukleosideilla, kuten adenosinilla, sokeri- ja emäsosa ovat liittyneet toisiinsa *N*-glykosidisella sidoksella.

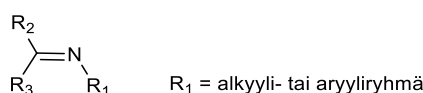
Luonnossa esiintyvät *N*-glykosidit ovat pääasiassa ekvatoriaalisessa  $\beta$ -muodossa. Tämä johtuu muun muassa steerisistä esteistä, jota esiintyisi aksiaalisessa asemassa 1,3-diakiaalisten vuorovaikutusten vuoksi<sup>2</sup> (Kaavio 10). Happi on elektronegatiivisempi kuin typpi, minkä vuoksi anomeerinen efekti on *O*-glykosideilla merkittävämpi.



**Kaavio 10.** *N*-glykosidi hakeutuu  $\beta$ -konformaatioon 1,3-diakiaalisten vuorovaikutusten aiheuttaman steerisen esteen takia

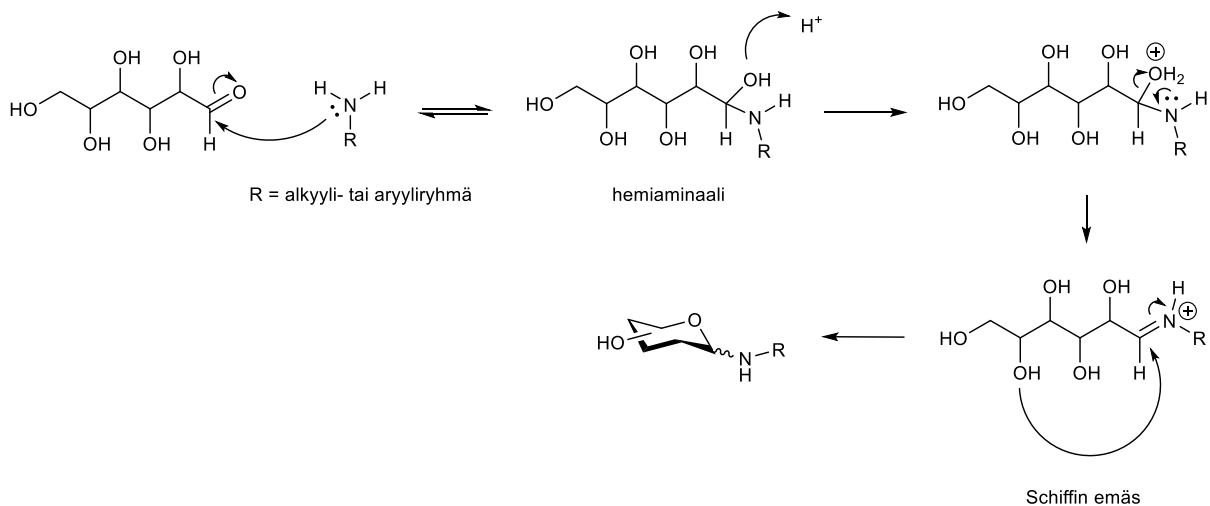
#### 4.1 *N*-glykosylaatio dehydraatiolla

Eräs dehydraatiolla valmistettava orgaanisten yhdisteiden ryhmä ovat Schiffin emäkset. Schiffin emäksen tunnistaa hiilen ja typen välisestä kaksoissidoksesta, jossa lisäksi kaksoissidoksen tyyppi on sitoutunut alkyyl- tai aryyli-ryhmään. Schiffin emäksiä kutsutaan myös imiineiksi, ja niitä käytetään laajasti esimerkiksi lääketieteessä niiden hyvän biologisen aktiivisuuden vuoksi.<sup>15</sup>



**Kuva 3.** Schiffin emäksen rakenne<sup>15</sup>

Kun primäärinen tai sekundäärinen amiini reagoi sokerin asyklisen aldehydimuodon kanssa, saadaan välivaiheiden kautta Schiffin emäs. Reaktio voidaan jakaa kahteen eri osaan. Ensin amiini hyökkää nukleofiilisesti karbonyylihiileen, jolloin muodostuu hemiaminaali-intermediaatti (Kaavio 11).<sup>15</sup> Reagoivaa amiinia on oltava ylimäärä liuoksessa, jotta se kykenee kilpailemaan nukleofiilisen veden kanssa.<sup>16</sup> Reaktion nopeutta rajoittavassa vaiheessa hemiaminaalista lohkeaa vesi happokatalyysin avulla. Happokonsentraatio ei saa kuitenkaan olla liian suuri, jotta nukleofiilinen amiini ei protonoidu.<sup>15</sup> Dehydraation jälkeen on muodostunut Schiffin emäs. Asyklisen hiilihydraattiketjun oma hydroksyyli-ryhmä pääsee hyökkäämään intramolekulaarisesti nopeammin kuin ulkopuolinen vesi  $sp^2$ -hybridisoituneeseen hiileen, jolloin muodostuu vakaampi syklinen *N*-glykosidi.



**Kaavio 11.** *N*-glykosidisen sidoksen muodostuminen dehydraatiolla Schiffin emäksen kautta. Kaavio on muokattu lähteestä <sup>15</sup>

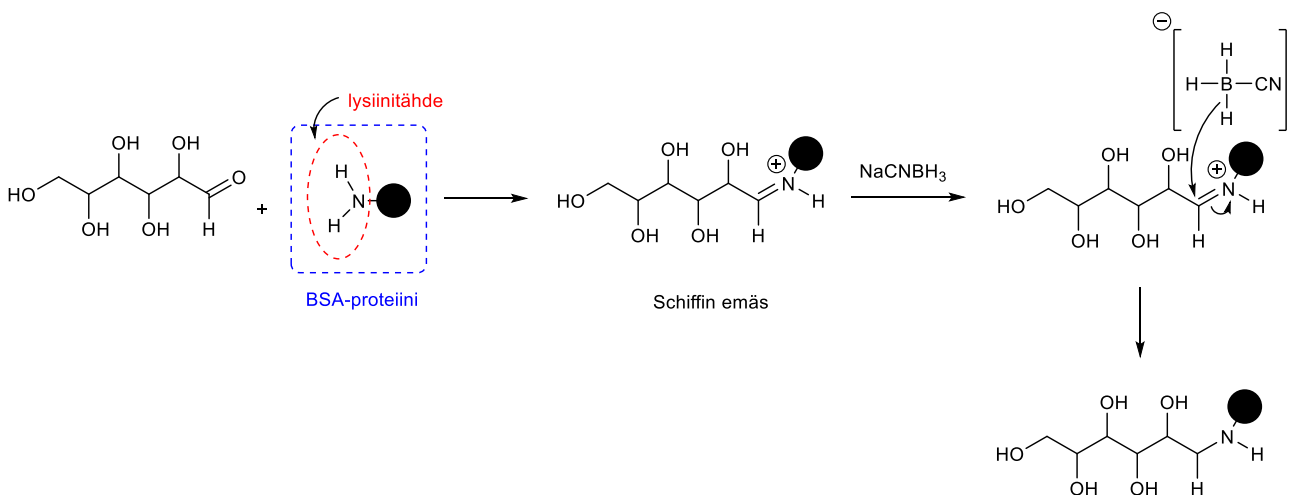
Schiffin emäksen muodostuminen on käänteinen reaktio, ja monet näistä emäksistä voivat hydrolysoitua takaisin lähtöaineikseen happamista olosuhteista.<sup>15</sup> Primääristen ja alifaattisten sekundääristen amiinien *N*-glykosidit käyvät läpi mutarotaation liuoksessa. Tämän ajatellaan tapahtuvan Schiffin emäksen kautta. Aromaattiset sekundääriset amiinit eivät kuitenkaan käy läpi mutarotaatiota. Tämä johtuu NH-ryhmän alhaisemmasta emäksisyydestä, jolloin taipumus muodostaa iminiumioni on alhaisempi.<sup>2</sup>

## 4.2 Pelkistävä aminaatio

Dehydratiivisissa olosuhteissa Schiffin emäksistä voi muodostua syklisiä *N*-glykosideja. Jos tämä halutaan kuitenkin estää, voidaan asyklinen imiini pelkistää amiiniksi, jolloin rengastautomeeriä ei pääse muodostumaan. Pelkistimenä käytetään yleensä natriumsyanoboorihydridiä (NaBH<sub>3</sub>CN) ja menetelmää kutsutaan Borchin pelkistäväksi aminaatioksi.<sup>2</sup> Menetelmä perustuu syanoboorihydridianionin kykyyn pelkistää Schiffin emäs.<sup>17</sup>

Vuonna 1976 Schwartz ja Gray kokeilivat erilaisten sokerien reaktiota naudan seerumin albumiinin (BSA) lysiinitähteisiin fosfaattipuskuriliuoksessa.<sup>17</sup> BSA on stabiili proteiini, jota kerätään naudan verestä.<sup>18</sup> Sitä käytetään esimerkiksi entsyymien stabilointiin, ja se toimii myös hyvänä kuljettajana.<sup>19</sup> Lysiinitähde sisältää primäärisen amiinin, joka toimii nukleofiilina reagoiden sokerialdehydin kanssa ja muodostaen Schiffin emäksen (Kaavio 12).

Schwartz ja Gray huomasivat, että syanoboorihydridianioni kykeni pelkistämään Schiffin emäksen pH:n ollessa yli 5. Pelkistävän aminaation nopeuden huomattiin kasvavan korkeammilla pH-arvoilla aina arvoon 9 saakka. Borch *et al.* olivat todenneet aiemmin, että vedettömässä metanolissa pelkistävä aminaatio tapahtuu nopeimmin pH:n ollessa 7.<sup>17</sup> Tällöin Schiffin emäksen muodostuminen on kyseisissä olosuhteissa optimaalista. Schwartzin ja Grayn saamat tulokset viittaavat siihen, että veden läsnä ollessa Schiffin emäksen muodostuminen ei olisi nopeutta rajoittava tekijä pelkistävässä aminaatioissa.<sup>17</sup>



**Kaavio 12.** BSA-proteiinin liittäminen sokeritähteeseen *N*-glykosidisella sidoksella pelkistävän aminaation avulla. Olosuhteet: fosfaattipuskuriliuos, pH 6-9, 37 °C. Kaavio on muokattu lähteestä<sup>2</sup>

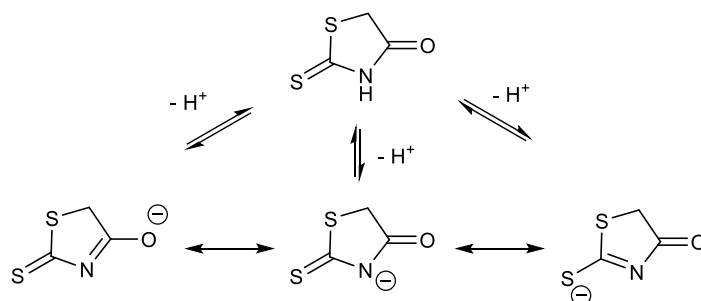
Dehydratiivisessa *N*-glykosylaatioissa siis hydroksyyliiryhmä hyökkää intramolekulaarisesti imiinin karbonyylihiileen, jolloin muodostuu syklinen *N*-glykosidinen rakenne. Pelkistävän aminaation tapauksessa lisätty syanoboorihydridianioni toimii hydroksyyliiryhmää parempana elektroninluovuttajana pelkistäen imiinin, jolloin hydroksyyliiryhmä ei pääse hyökkäämään ja rengasrakennetta ei muodostu.

### 4.3 Glykosyylihalidit

Glykosyylihalideista muodostetaan *N*-glykosideja amiinien nukleofiilisellä hyökkäyksellä glykosyylihalidiin. Reaktiota kutsutaan aza-Koenigs-Knorr-reaktioksi, sillä idea on sama kuin Koenigs-Knorr-reaktioissa - nyt glykosyylihalidin kanssa reagoiva nukleofiili on amiini alkoholin sijaan. Glykosyylihalideista vain glykosyyliklorideja sekä glykosyylibromideja on käytetty *N*-glykosylaatioreaktioissa vesiliuoksessa.<sup>2</sup>

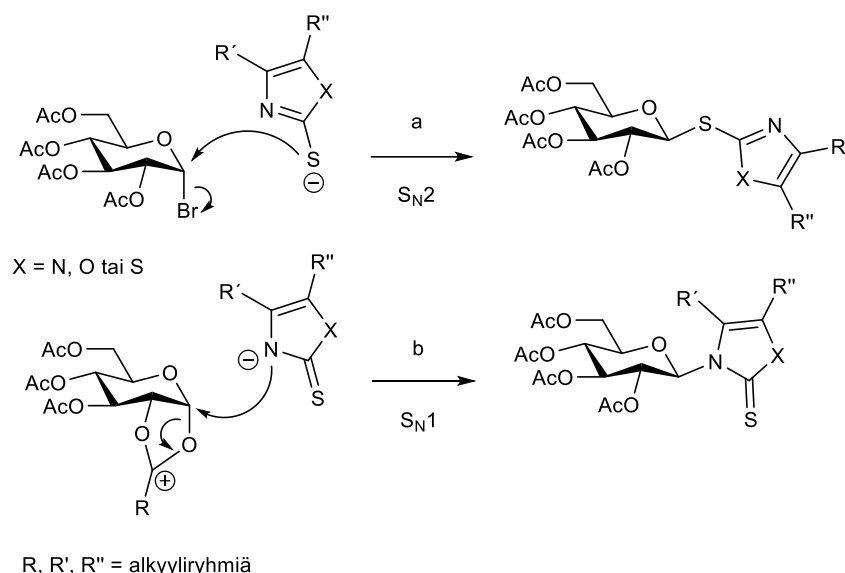
Ensimmäinen *N*-glykosylaatio vesiliuoksessa glykosyylihalideja käyttäen suoritettiin vuonna 1960 Bognárin ja Wieniawskin toimesta.<sup>2</sup> Toisin kuin dehydratiivisessa *N*-glykosylaatioissa ja pelkistävässä aminaatioissa, tässä reaktiossa sokeri suojattiin asetyylisuojaksilla.

Bognár ja Wieniawski käyttivät sokerina asetyloitua glykosyylibromidia ja nukleofiilinä rodaniinijohdannaisia.<sup>2</sup> Reaktio suoritettiin asetonin vesiliuoksessa natriumhydroksidin läsnä ollessa.<sup>2</sup> Rodaniinit ovat viisijäsenisiä heterosyklisiä yhdisteitä. Niiden rengasrakenteessa on tiokarbonyyli- ja karbonyyliryhmä (Kuva 4). Rodaniinirengas on reaktiivinen, ja siihen voidaan liittää erilaisia sivuketjuja renkaan nukleofiilisen NH-ryhmän tai tiolin kautta. Bognár ja Wieniawski eivät havainneet tiolitautomeerin aiheuttamaa kilpailevaa *S*-glykosylaatiota. Tämä johtuu luultavasti siitä, että karbonyyliryhmä osallistuu resonanssiin, mikä aiheuttaa vähemmän elektronitiheyttä rikille.<sup>2</sup>



**Kaavio 13.** Rodaniinin rakenne sekä resonanssirakenteita

Hieman myöhemmin Nuhn ja Wagner tutkivat glykosylaatiota asetyloidun glykosyylibromidin ja useiden *N*-heterosyklisten yhdisteiden välillä asetonin vesiliuoksessa.<sup>2</sup> He havaitsivat, että *N*-heterosykliset yhdisteet, joissa oli hydroksi- tai tioliryhmä 2- tai 4-asemassa rengastyyppien nähden, muodostivat *N*-glykosidien, sekä *O*- tai *S*-glykosidien seoksia tautomerisaation johdosta.<sup>2</sup> Tautomerisaatio on suotuisampaa verrattuna rodaniinijohdannaisiin, sillä näissä yhdisteissä ei ole karbonyyliryhmää. Lähempään tarkkailuun Nuhn ja Wagner ottivat imidatsoli-, oksatsoli-, ja tiatsolionit. Kävi ilmi, että liuoksen poolisuus vaikuttaa siihen, minkä tautomeerin kautta glykosidinen sidoks muodostuu. Asetonin vesiliuoksessa nukleofiili reagoi ensisijaisesti rikkiatomin kautta tiolitautomeerina muodostaen *S*-glykosidisen sidoksen  $S_N2$ -mekanismin kautta (Kaavio 14a). Poolittomassa liuotuksessa nukleofiili suosi *N*-glykosylaatiota  $S_N1$ -mekanismilla (Kaavio 14b). Koska poolisissa olosuhteissa tiolitautomeeri on suotuisampi, *N*-glykosidisen sidoksen muodostaminen vesiliuoksessa tällä menetelmällä on hankalaa.



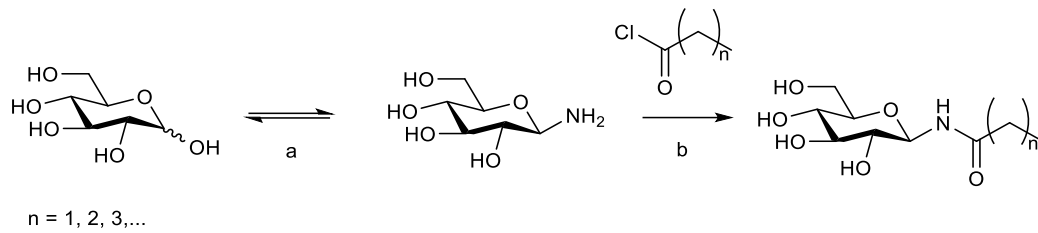
**Kaavio 14.** Liuoksen poolisuuden vaikutus tautomerisaatioon ja muodostuvaan glykosidiseen sidokseen. Reagenssit: a) H<sub>2</sub>O/asetoni (1:3), KOH. b) DMF, Hg-suola.<sup>2</sup> Asyyli suojaus ohjaa tuotteita kohti β-anomeeriä (ks. Kaavio 4).

#### 4.4 Anomeerisen NH<sub>2</sub>-ryhmän asylaatio

Sokereiden reaktiot ammoniakkin tai primääristen amiinien kanssa saavat aikaan glykosyyliamiineja. Ne eivät kuitenkaan ole stabiileja, vaan ovat alttiita hydrolyysille neutraalissa sekä lievästi happamassa vesiliuoksessa ilman pelkistystä tai muita jatkotoimenpiteitä. Niiden asyylijohdannaiset ovat kuitenkin vakaita.<sup>20</sup> Kuten aiemmissa tapauksissa on käynyt ilmi, asyyliiryhmiä käytetään laajasti suojarahminä hiilihydraattikemiassa. Asyyliiryhmiä voidaan liittää hiilihydraattien hydroksyyliiryhmien lisäksi myös amiineihin. Tyypillisesti glykosyyliamiinien asylointiin on käytetty anhydridejä, asyyliklorideja tai aktivoituja estereitä.<sup>2</sup> Hiilihydraatin anomeerisessa asemassa oleva amiini toimii hyvänä nukleofiilinä.

Okai *et al.* suorittivat ensimmäisen glykosyyliamiinin asylaation vuonna 1984.<sup>2</sup> Reaktio oli additio-eliminaatioreaktio *N*-Cbz-*L*-asparagiinihappoanhydridin kanssa. Asyylikloridit ovat kuitenkin elektrofiilisempiä kuin anhydridit<sup>2</sup> ja täten niiden reaktio amiinien kanssa tapahtuu tehokkaammin. Lubinenau *et al.* muunsivat hiilihydraateista niitä vastaavia glykosyyliamiineja ammoniakkin vesiliuoksessa ammoniumvetykarbonaatin läsnä ollessa. Myös vastaavia glykosyylikarbamaatteja muodostui vähän (< 8 %). Tämän jälkeen glykosyyliamiinit liuotettiin etanolin vesiliuokseen ja lisättiin asyylikloridi, jolloin saatiin *N*-asyyliglykosyyliamiineja. Kun käytettiin 3:1 EtOH/ H<sub>2</sub>O liuosta, asyylikloridia oli ylimäärä natriumkarbonaatin läsnä ollessa. 2:1 EtOH/ H<sub>2</sub>O liuoksessa

glykosyyliamiinia oli ylimäärä, eikä natriumkarbonaattia tarvittu glykosyyliamiinin toimiessa myös emäksenä.<sup>20</sup>



**Kaavio 15.** Anomeerisen NH<sub>2</sub>-ryhmän asylaatio. Olosuhteet ja reagenssit: a) 0,2 M glukoosi, 0,2 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 16 M NH<sub>3</sub> vesiliuos, 42°C, 36 h. b) 3:1 tai 2:1 EtOH/H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0°C, saanto 45-56 %.<sup>2,20</sup>

Anhydridien ja asyylikloridien lisäksi glykosyyliamiineja voidaan asyloida aktiivisten estereiden avulla vesiliuoksessa. Tätä menetelmää on käytetty muodostamaan esimerkiksi Fmoc-suojattuja asparagiini-*N*-glykosideja glykopeptidien kiinteän faasin synteesiä varten.<sup>2</sup>

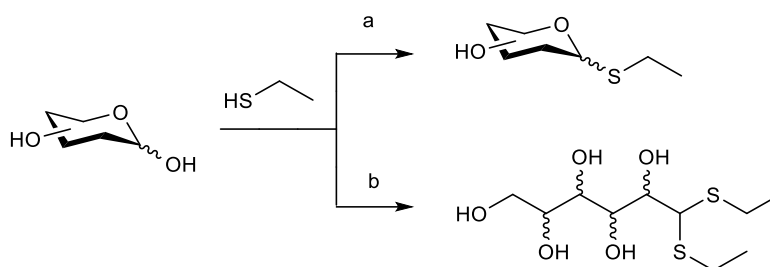
## 5 S-glykosylaatio vesiliuoksessa

Anomeerisen rikin omaavia hiilihydraattijohdannaisia ei juurikaan esiinny luonnossa.<sup>21</sup> Näitä rikkivälitteisiä sokeriketjuja halutaan kuitenkin kehittää, sillä ne kestävät paremmin kemiallista hydrolyysiä, kuin *O*-välitteiset sokeriketjut. Happi- ja rikkiatomit ovat myös rakenteellisesti samankaltaisia<sup>22</sup> muodostaen tyypillisesti kaksi kovalenttistä sidosta. Tämän vuoksi rikkivälitteistä sidosta voisi hyödyntää yleisemmän *O*-glykosidisen sidoksen jäljittelyssä.

Tioglykosidisen sidoksen on havaittu tehostavan biologisia aktiivisuuksia, kuten kasvaimia tuhoavia vaikutuksia. Tioglykosidit ovat siis potentiaalisia kehityskohteita lääketieteellisyydessä.<sup>23</sup>

### 5.1 S-glykosylaatio dehydraatiolla

Hiilihydraatin reaktio tiolin kanssa vesiliuoksessa käyttäen vahvaa happokatalyyttiä voi johtaa tioglykosidiin (Kaavio 16a) tai asykliseen etyyliatioasetaaliin eli merkaptaaaliin, (Kaavio 16b). Pacsu *et al.* osoittivat, että etyyliatioasetaali muuttuu elohopeakloridikäsittelyllä välivaiheen kautta joko tioglykosidiksi tai hydrolysoituu takaisin glukoosiksi. Sopivien olosuhteiden löytäminen tioglykosidin muodostukselle etyyliatioasetaalin sijaan on ollut haastavaa, ja riippuu paljon kyseessä olevasta hiilihydraatista.<sup>2</sup>

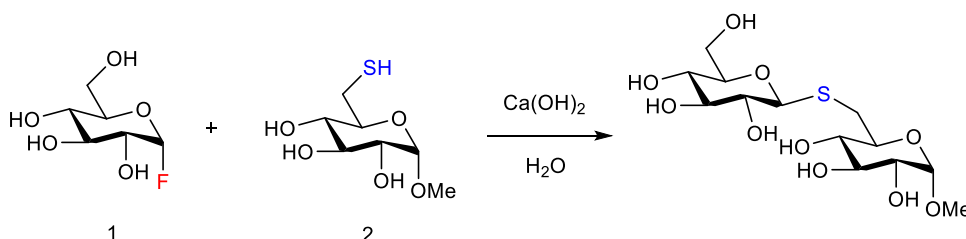


**Kaavio 16.** Happokatalysoitu *S*-glykosylaatio dehydraatiolla. Olosuhteet ja reagenssit: 22 % HCl:n vesiliuos. a) reaktioaika tunteja b) reaktioaika minuutteja.<sup>2</sup>

## 5.2 Glykosyylihalidit

Zhang *et al.* ovat tutkineet *S*-glykosylaatiota vesiliuoksessa glykosyylifluoridin sekä tioliakseptorin välillä emäksisissä olosuhteissa.<sup>23</sup> *O*-glykosylaatiota käsitellessä kävi ilmi, kuinka Miller *et al.* ovat tutkineet regioselektiivistä *O*-glykosylaatiota suojaamattomasta fluoridisokerista vesiliuoksessa (Kaavio 7). Menetelmässä käytettiin kalsiumtriflaattia, sekä 45 % natriumatsidin vesiliuosta.<sup>9</sup> Zhang *et al.* yrittivät soveltaa samoja olosuhteita *S*-glykosidisen sidoksen muodostamiseen glukopyranosyylifluoridin sekä 6-SH-modifioidun metyyli-glukopyranosidin välille. Tämä ei kuitenkaan tuottanut tulosta.<sup>23</sup>

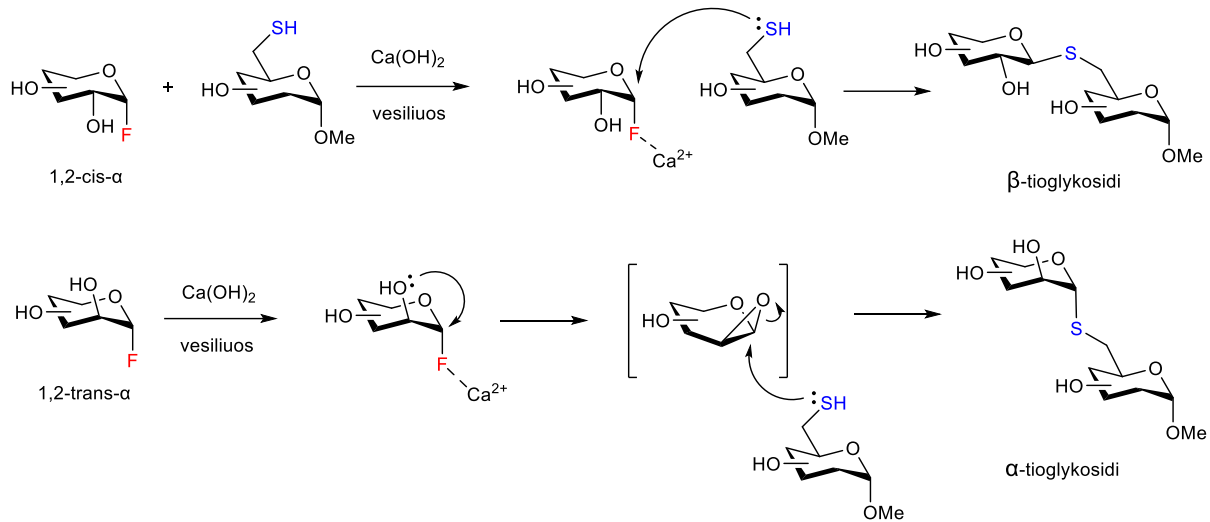
Wadzinski *et al.* raportoivat, että glykosyylifluoridit voivat reagoida fenolien kanssa kalsiumhydroksidin läsnä ollessa vesiliuoksessa.<sup>24</sup> Tämän perusteella Zhang *et al.* kokeilivat käyttää kalsiumhydroksia tehostavana emäksenä, jolloin *S*-glykosidinen disakkaridi saatiin 98 % saannolla puolessa tunnissa. Korkeaan saantoon sekä reaktionopeuteen vaikuttavat sekä tiolin vahva nukleofiilisyyys verrattuna happeen, että kalsiumfluoridisaostuman muodostuminen.<sup>23</sup>



**Kaavio 17.** *S*-glykosidisen sidoksen muodostuminen glykosyylifluoridista emäskatalyyysin avulla. Olosuhteet ja reagenssit: 3 ekv.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , 0,5 h, rt. 1: 3 ekv. 2: 0,5 M.<sup>23</sup>

Reaktiossa glykosyyliidonorin fluoridi koordinoituu kalsiumionin kanssa. Glykosyylifluorididonorin 2-OH-ryhmän konfiguraatio kuitenkin vaikuttaa tuotteen stereokemiaan. 1,2-cis- $\alpha$ -fluoridiglykosideilla tioli hyökkää anomeeriseen hiileen vastakkaiselta puolelta (yläpuolelta)  $\text{S}_{\text{N}}2$ -

mekanismilla. Tällöin syntyy  $\beta$ -tioglykosidi. 1,2-trans- $\alpha$ -fluoridiglykosideilla 2-OH pääsee hyökkäämään anomeeriseen hiileen intramolekulaarisesti renkaan yläpuolelta, jolloin muodostuu epoksidi-intermediaatti. Tioli hyökkää intermediaatin anomeeriseen hiileen vastakkaiselta eli  $\alpha$ -puolelta, jolloin saadaan  $\alpha$ -tioglykosidi.<sup>23</sup>



**Kaavio 18.** Glykosyylifluoridin 2-OH-ryhmän konfiguraation vaikutus tuotteen stereokemiaan<sup>23</sup>

### 5.3 Anomeerisen SH-ryhmän reaktiot

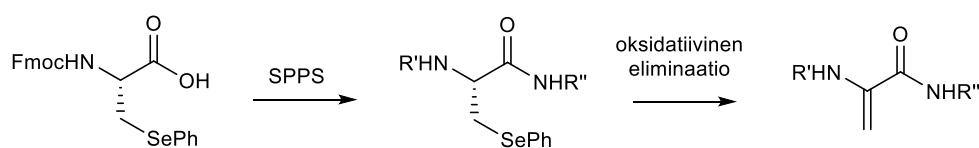
1-tioglykosidit ovat tärkeitä sokerijohdannaisia, sillä ne ovat stabiileja glykosyyliendonoreita. Tämän ansiosta niitä käytetään yhä enemmän esimerkiksi oligosakkaridien synteesissä.<sup>25</sup>

#### 5.3.1 Tio-Michaelin additio

Tio-Michaelin additioreaktiossa tioli reagoi aktivoituun alkeeniin eli Michael-akseptoriin.<sup>26</sup> Luonnolliset peptidit sisältävät nukleofiilisiä, happamia tai emäksisiä aminohappotähteitä. Fenyyliselenokysteiniinistä voidaan kuitenkin muokata dehydroalaniiniin sisältävä peptidi, joka tekee rakenteesta elektrofiilisen. Zhu *et al.* ovat kehittäneet kemoselektiivisen ligaatiomenetelmän tiolien ja elektrofiiliseksi muokatun suojaamattoman peptidin välille.<sup>27</sup>

Dehydroalaniini on aminohappotähte, joka sisältää alkeeniosan. Tämän takia sitä voidaan hyödyntää peptidien muokkauksessa elektrofiiliseksi. Fenyyliselenokysteini voidaan liittää peptideihin kiinteän faasin peptidisynteesissä (SPPS). Suojaryhmien poiston sekä kiinteästä faasista irrotuksen jälkeen tapahtuu oksidatiivinen eliminaatio, jolloin saadaan elektrofiilinen dehydroalaniini (Kaavio 19). Tämä tarjoaa keinon nukleofiilin kemoselektiiviselle konjugoinnille.<sup>27</sup>

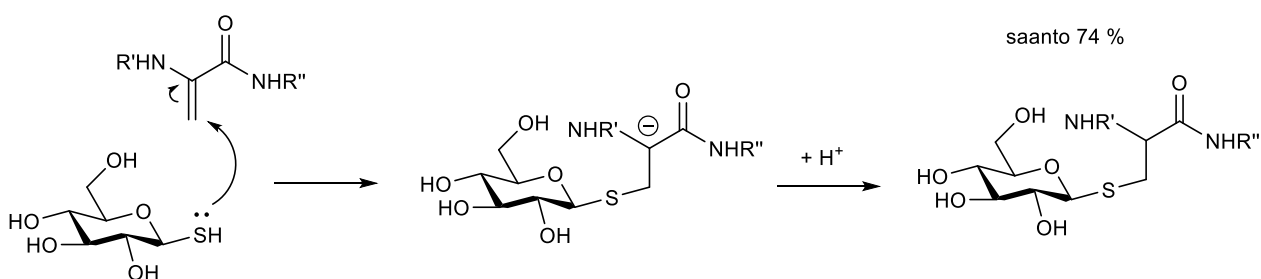
R' & R'' = aminohappo



**Kaavio 19.** Dehydroalaniinin muodostaminen fenyyliselenokysteineistä.<sup>27</sup>

Zhu *et al.* havaitsivat, että suojaamattoman  $\beta$ -tioglukoosin liittäminen dehydroalaniinin sisältävään tripeptidiin vesiliuoksessa sai aikaan halutun glykopeptidin 74 % saannolla. Tämä oli parempi tulos kuin asetyloidulla tai *N*-asetyloidulla  $\beta$ -tioglukoosilla (62 %).<sup>27</sup>

R' & R'' = aminohappo



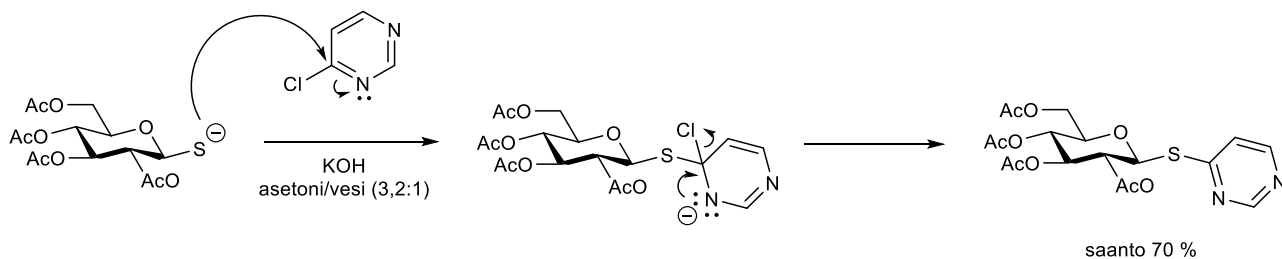
**Kaavio 20.** *S*-glykosidisen sidoksen muodostuminen tioglukoosin ja peptidin välille Tio-Michaelin additiolla vesiliuoksessa.<sup>27</sup>

### 5.3.2 Nukleofiilinen aromaattinen substituuio

Nukleofiilisessä aromaattisessa substituuioissa ( $S_NAr$ ) nukleofiili reagoi aromaattiseen renkaaseen, joka sisältää hyvän lähtevän ryhmän. Mitä polarisempi ja kooltaan suurempi lähtevä ryhmä on, sitä helpommin se irtoaa. Reaktiossa täytyy ottaa huomioon myös nukleofiilin koko sekä sen emäksisyys. Lisäksi tarvitaan usein vedettömät reaktio-olosuhteet tai vahva emäs promoottoriksi.<sup>28</sup> Reaktion edellytyksenä on resonanssin stabiloima negatiivisesti varautunut intermediaatti. Tämän mahdollistavat aromaattisessa renkaassa olevat elektroneja puoleensa vetävät substituentit, jotka ovat sijoittuneet orto- ja para-asemiin.<sup>28</sup>

Aza-Koenigs-Knorr-glykosylaatiosta puhuttaessa kävi ilmi, kuinka *N*-heterosykliset yhdisteet, joissa on hydroksi- tai tioliryhmä 2- tai 4-asemassa rengastyypeen nähden, muodostavat *N*-glykosidien, sekä *O*- tai *S*-glykosidien seoksia. Jotta *S*-glykosidinen sidos saatiin todettua, valmistettiin vertailuyhdiste aromaattisen substituution avulla.<sup>2</sup> Niin kuin Koenigs-Knorr-reaktiossa, myös tässä tapauksessa käytettiin asetyylisuojaattua glukoosia. Tetra-asetyylitioglukoosi toimii nukleofiilinä

aromaattisessa substituutiossa 4-klooripyrimidiiniin. Kaliumhydroksidi on vahva emäs ja toimii reaktiossa promoottorina deprotonoiden tetra-asetyylitioglukoosin tioliryhmän, jolloin siitä saadaan nukleofiilisempi. Tämän myötä se pääsee hyökkäämään 4-klooripyrimidiinin hiileen numero neljä, joka on elektrofiilisin siinä kiinni olevan kloorin myötä. Kaliumionit stabiloivat negatiivisesti varautuneesta intermediaatista poistuvan kloridi-ionin.



**Kaavio 21.** Tioglukoosin nukleofiilinen aromaattinen substituutio.<sup>2,28</sup>

## 6 Yhteenveto

Glykosidisen sidoksen muodostuminen on edellytys monelle luonnolliselle rakenteelle aina oligosakkarideista nukleosideihin ja glykopeptideihin. Tämän vuoksi erilaisten kemiallisten reaktioreittien kehittäminen on tärkeä tutkimuskohde, jota voidaan mahdollisesti hyödyntää esimerkiksi lääkekehityksessä. Kehittyneimmät glykosylaatioreaktiot vesiliuoksessa vaativat vettä nukleofiilisemmän nukleofiilin, kuten amiinin tai sulfidin.<sup>2</sup> Lisäksi voidaan käyttää esimerkiksi koordinoivia happoja tai emäksiä, jotka ohjaavat uuden glykosidisen sidoksen muodostumista katalyyttisesti.<sup>9</sup> Sokeri voidaan muuntaa myös nukleofiiliksi emäksen avulla, jolloin se voi hyökätä elektrofiiliin.<sup>7</sup> Vesi voidaan myös mahdollisesti eristää reaktiokeskuksesta muodostamalla hydrofobisia emulsiopisaroita.<sup>12</sup> Glykosylaation kehittäminen luonnollisessa ja ympäristöystävällisessä vesiliuoksessa on ajankohtainen tutkimuskohde, ja uusia menetelmiä kehitetään jatkuvasti. Suurena motiivina menetelmien kehittämiseksi onkin haitallisten orgaanisten liuottimien vähentäminen. Puhtaassa vedessä tapahtuvia glykosylaatioreaktioita on edelleen kuitenkin vain harvoja, ja suurin osa esitellyistä reaktioreiteistä vaatii orgaanisen apuliuottimen veden rinnalle.<sup>2</sup>

## 7 Viitteet

- (1) Villadsen, K.; Martos-Maldonado, M. C.; Jensen, K. J.; Thygesen, M. B. Chemoselective Reactions for the Synthesis of Glycoconjugates from Unprotected Carbohydrates. *ChemBioChem* **2017**, *18* (7), 574–612. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600582>.
- (2) Fischer, N. H.; Pedersen, C. M. Chemical Glycosylations in Water and Aqueous Media. *Chem. Rev.* **2025**, *acs.chemrev.5c00638*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5c00638>.
- (3) Cooper, G. M. The Molecular Composition of Cells. In *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition; Sinauer Associates, 2000.
- (4) Downey, A. M.; Hockek, M. Strategies toward Protecting Group-Free Glycosylation through Selective Activation of the Anomeric Center. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1239–1279. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.123>.
- (5) Cumpstey, I. On a So-Called “Kinetic Anomeric Effect” in Chemical Glycosylation. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (13), 2503–2508. <https://doi.org/10.1039/C2OB06696C>.
- (6) Das, R.; Mukhopadhyay, B. Chemical O-Glycosylations: An Overview. *ChemistryOpen* **2016**, *5* (5), 401–433. <https://doi.org/10.1002/open.201600043>.
- (7) Dey, K.; Jayaraman, N. Anomeric Alkylations and Acylations of Unprotected Mono- and Disaccharides Mediated by Pyridoneimine in Aqueous Solutions. *Chem. Commun.* **2022**, *58* (13), 2224–2227. <https://doi.org/10.1039/D1CC07056H>.
- (8) Chatterjee, S.; Moon, S.; Hentschel, F.; Gilmore, K.; Seeberger, P. H. An Empirical Understanding of the Glycosylation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (38), 11942–11953. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b04525>.
- (9) Pelletier, G.; Zwicker, A.; Allen, C. L.; Schepartz, A.; Miller, S. J. Aqueous Glycosylation of Unprotected Sucrose Employing Glycosyl Fluorides in the Presence of Calcium Ion and Trimethylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (9), 3175–3182. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b13384>.
- (10) Gin, D. DEHYDRATIVE GLYCOSYLATION WITH 1-HYDROXY DONORS. *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21* (7–9), 645–665. <https://doi.org/10.1081/CAR-120016485>.
- (11) Hsu, M.-Y.; Lam, S.; Wu, C.-H.; Lin, M.-H.; Lin, S.-C.; Wang, C.-C. Direct Dehydrative Glycosylation Catalyzed by Diphenylammonium Triflate. *Molecules* **2020**, *25* (5), 1103. <https://doi.org/10.3390/molecules25051103>.
- (12) Aoyama, N.; Kobayashi, S. Dehydrative Glycosylation in Water Using a Brnsted Acid--Surfactant-Combined Catalyst.
- (13) O’Neill, S.; Rodriguez, J.; Walczak, M. A. Direct Dehydrative Glycosylation of C1-Alcohols. *Chem. – Asian J.* **2018**, *13* (20), 2978–2990. <https://doi.org/10.1002/asia.201800971>.

- (14) Kobayashi, S.; Ogawa, C. New Entries to Water-Compatible Lewis Acids. *Chem. – Eur. J.* **2006**, *12* (23), 5954–5960. <https://doi.org/10.1002/chem.200600385>.
- (15) Anamika, S.; Chaturvedi, P. Review on Schiff Bases. *World J. Pharm. Sci.* **2021**, 133–140.
- (16) Smith, L. I.; Anderson, R. H. THE REARRANGEMENT OF THE 3-C-PHENYLTRIOSES. *J. Org. Chem.* **1951**, *16* (6), 963–971. <https://doi.org/10.1021/jo01146a021>.
- (17) Schwartz, B. A.; Gray, G. R. Proteins Containing Reductively Aminated Disaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, *181* (2), 542–549. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90261-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90261-2).
- (18) Shah, S. A.; Sohail, M.; Khan, S.; Minhas, M. U.; de Matas, M.; Sikstone, V.; Hussain, Z.; Abbasi, M.; Kousar, M. Biopolymer-Based Biomaterials for Accelerated Diabetic Wound Healing: A Critical Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 975–993. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.007>.
- (19) Babitha, S.; Rachita, L.; Karthikeyan, K.; Shoba, E.; Janani, I.; Poornima, B.; Purna Sai, K. Electrospun Protein Nanofibers in Healthcare: A Review. *Int. J. Pharm.* **2017**, *523* (1), 52–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.013>.
- (20) Lubineau, A.; Augé, J.; Drouillat, B. Improved Synthesis of Glycosylamines and a Straightforward Preparation of *N*-Acylglycosylamines as Carbohydrate-Based Detergents. *Carbohydr. Res.* **1995**, *266* (2), 211–219. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00275-K](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00275-K).
- (21) Oscarson, S. S-Glycosylation. In *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I–III*; Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K., Thiem, J., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2001; pp 643–671. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56874-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56874-9_20).
- (22) Wan, L.-Q.; Zhang, X.; Zou, Y.; Shi, R.; Cao, J.-G.; Xu, S.-Y.; Deng, L.-F.; Zhou, L.; Gong, Y.; Shu, X.; Lee, G. Y.; Ren, H.; Dai, L.; Qi, S.; Houk, K. N.; Niu, D. Nonenzymatic Stereoselective S-Glycosylation of Polypeptides and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (31), 11919–11926. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c05156>.
- (23) Zhang, G.-L.; Gadi, M. R.; Cui, X.; Liu, D.; Zhang, J.; Saikam, V.; Gibbons, C.; Wang, P. G.; Li, L. Protecting-Group-Free S-Glycosylation towards Thioglycosides and Thioglycopeptides in Water. *Green Chem. Int. J. Green Chem. Resour. GC* **2021**, *23* (8), 2907–2912. <https://doi.org/10.1039/D1GC00098E>.
- (24) *Rapid Phenolic O-Glycosylation of Small Molecules and Complex Unprotected Peptides in Aqueous Solvent - PMC*. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5964040/> (accessed 2026-03-18).
- (25) *Thieme E-Journals - Synthesis / Abstract*. <https://www-thieme-connect-de.ezproxy.utu.fi:2443/products/ejournals/abstract/10.1055/s-1994-25704> (accessed 2026-03-31).
- (26) *Thia-Michael Addition - an overview | ScienceDirect Topics*. <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.utu.fi:2443/topics/chemistry/thia-michael-addition> (accessed 2026-03-24).

(27) *Convergent Synthesis of Peptide Conjugates Using Dehydroalanines for Chemoselective Ligations* | *Organic Letters*. <https://pubs-acsc-org.ezproxy.utu.fi:2443/doi/10.1021/ol1015648a> (accessed 2026-03-23).

(28) Goldstein, S. W.; Bill, A.; Dhuguru, J.; Ghoneim, O. Nucleophilic Aromatic Substitution—Addition and Identification of an Amine. *J. Chem. Educ.* **2017**, *94* (9), 1388–1390. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00680>.