

**SYKLISTEN
DINUKLEOSIDIMONOFOSFAATTIEN
JA NIIDEN ANALOGIEN VALMISTAMINEN**

Pro Gradu- tutkielma
Kristian Lautkoski
Lääkekehityksen kemia
Kemian laitos
Turun Yliopisto
Maaliskuu 2020

Turun Yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä.

Tämä Pro Gradu- tutkielma on omistettu kihlatulleni Ellille, joka antoi jatkuvan tukensa tutkielman kirjoittamiseen, sekä aikaansa esilukemiseen.

Suurin kiitos kuuluu yliopistonlehtori FT Mikko Oralle, jonka kärsivällisyys ja asiantuntijuus on ollut ensiarvoisen tärkeää läpi erikoistyön ja tutkielman.

Lopuksi haluan vielä kiittää professori Pasi Virtaa, joka mahdollisti tutkielmani lopullisen version.

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

LAUTKOSKI, KRISTIAN: Syklisten dinukleosidimono fosfaattien ja niiden analogien valmistaminen

Pro Gradu- tutkielma, 49s.

Maaliskuu 2020

Syklisen diguanosiinimono fosfaatin (c-di-GMP) on lukuisten tutkimusten pohjalta havaittu olevan erinomainen ilmaisimolekyyli bakteereissa. Alhaisilla bakteeripitoisuuksilla c-di-GMP pystyy muun muassa säätelemään bakteerien liikkuvuutta ja leviämistä elimistössä sekä pysäyttämään solusyklin. Lisäksi se hidastaa solunjakautumista, jonka pohjalta on havaittu vaikutuksia myös ihmisen syöpäsolujen toimintaan.

Biofilmit ovat mikrobien muodostamia järjestäytyneitä yhteisöjä, jotka saavat muodostuessaan aikaan useita kroonisia ja pysyviä tulehduksia elimistössä. Biofilmien patogeenisia bakteereita ovat muun muassa koleraa aiheuttava *Vibrio cholerae*, sairaalabakteeri *Pseudomonas aeruginosa* ja *Staphylococcus aureus* eli stafylokokki. Solunsisäisten pitoisuuksien ollessa korkealla c-di-GMP:n on havaittu pystyvän säättämään biofilmin muodostusta tai jopa estämään sen synnyn kokonaan. Maailmanlaajuisella tasolla c-di-GMP tunnetaan bakteerien toisilähettimolekyylinä (*engl. second messenger*).

Sykliset bis-(3',5')-dinukleotidit eli sykliset dinukleosidimono fosfaatit ovat biologisesti aktiivisia yhdisteitä, joiden uskotaan olevan tärkeitä myös bakteeriperäisten biofilmien säätelyssä. Tutkijoiden tultua vakuuttuneiksi c-di-GMP:n antibakteerisista ominaisuuksista, mielenkiinto erilaisten syklisten dinukleosidimono fosfaattien ja niiden modifioitujen analogien valmistamiseksi on kasvanut.

Tutkielman kirjallisessa osassa on esitetty erilaisia syklisten dinukleosidimono fosfaattien synteesimenetelmiä. Syklisten dinukleosidimono fosfaattien synteesi voidaan tehdä kahdella eri tavalla, joko entsyymaattisesti tai kemiallisesti. Kemiallisessa menetelmässä nukleotidin syklisaatio toteutetaan käyttämällä fosforamiditi-, fosfoesteri- ja vetyfosfonaatti-kemiaa. Näistä kaksi jälkimmäistä ovat käytetyimmät syklisten dinukleosidimono fosfaattien valmistuksessa. Myös tukirankamenetelmiä, joissa nukleoemäkset liitetään fosfaatti-sokeri-renkaaseen, on jälkepäin raportoitu.

Kemiallista synteesiä hyödyntäen tutkijat ovat valmistaneet myös syklisten dinukleosidimono fosfaattien analogeja, jotka muistuttavat biologisilta ominaisuuksiltaan hyvin paljon modifioimattomia yhdisteitä. Valmistettaessa analogeja, voidaan modifioida joko yhdisteen fosfaatti-, emäs- tai sokeriosaa.

Kokeellisessa osassa on yksityiskohtaisesti selostettu syanoetyyli-, *tert*-butyylidimetyylisilyyli- ja bentsoyyliryhmillä suojatun syklisen diadenosiinimono fosfaatin (c-di-AMP) synteesi ja karakterisointi. Lopputuotteen saanto oli 42%, mikä oli riittävä jatkotutkimuksille.

ASIASANAT: Syklinen dinukleosidimono fosfaatti, c-di-GMP, c-di-AMP, syklisaatio, fosforotioaatit, fosforotioaatit

SISÄLLYSLUETTELO

I JOHDANTO	1
II KIRJALLINEN OSA	3
1. Sykliset dinukleosidimono fosfaatit	3
1.1. Syklisten dinukleosidimono fosfaattien rakenne	3
1.2. Syklisten dinukleosidimono fosfaattien nimeäminen	4
2. Syklisten dinukleosidimono fosfaattien valmistaminen	5
2.1. Bioentsymaattinen synteesi	6
2.2. Kemialliset synteetit	7
2.2.1. Synteesi nukleosidi-5'-fosfaatista (Reitti A ₁)	8
2.2.2. Synteesi nukleosidi-3'-fosfaatista (Reitti A ₂)	9
2.2.3. Synteesi dinukleosidimono fosfaateista (Reitti B)	10
2.2.4. Synteesi 5'-fosfaatin sisältävistä dinukleotideista (Reitti C)	11
2.2.5. Synteesi 3'-fosfaatin sisältävistä dinukleotideista (Reitti D)	12
2.2.5.1 Fosfodiesterimenetelmä (Reitti D ₁)	13
2.2.5.2. Fosfotriesterimenetelmä eli Hayakawan menetelmä (Reitti D ₂)	14
2.2.5.2.1. Suojatun dinukleosidi-3'-fosfaatin valmistaminen fosforamiditiimenetelmällä	15
2.2.5.2.2. Fosfotriesterisidoksen muodostaminen	16
2.2.5.2.3. Syklisaatio liuksessa	18
2.2.5.2.4. Syklisaatio kiinteässä faasissa	20
2.2.5.3. Vetyfosfonaattimenetelmä eli Jonesin menetelmä (Reitti D ₃)	23
2.2.2.3.1. Jonesin yksivaiheinen synteesi	24
2.2.2.3.2. Syklisaatio ja suojaryhmien poisto	25
2.3. Tukirankamenetelmä	26
2.3.1. Syklisen tukirangan valmistaminen	27
2.3.2. Emäksen liittäminen tukirankaan	28

3. Modifioitujen syklisten dinukleosidimonofosfaattien valmistaminen	28
3.1. Fosfaattimodifioidut analogit	29
3.1.1. Sykliset diguanosiini fosforomonotioaatit	29
3.1.2. Sykliset diguanosiini fosforoditioaatit	32
3.1.3. Sykliset diguanosiini fosforotritioaatit	35
3.1.4. Sykliset dinukleosidifosforotioaatit	35
3.1.5. <i>Bis</i> -karbamaatit	36
3.2. Emäs-modifioidut analogit	37
3.2.1. Bromi-, tio- ja metyyli tioanalogien valmistus	37
3.2.2. Fenyyl- ja asetofenyyliaanalogien valmistus	38
3.3. Sokeri-modifioidut analogit	39
3.4. Analogit ilman nukleoemästä	40
4. Johtopäätökset	41
III KOKEELLINEN OSA	42
1. Tulokset ja niiden tarkastelu	42
2. Menetelmät	44
2.1. Yleiset menetelmät	44
2.2. <i>N</i> ⁶ -bentsoyyli-2'- <i>O</i> -(tert-butyyli dimetyylisilyyli)adenosiini-3'-(allyyli,2-syanoetyyli(fosfaatin) valmistus	45
2.3. Suojatun adenylyyli(3',5')adenosiini-3'-fosfaatin valmistus	46
2.4. Suojatun syklisen bis (3',5')diadenyylihapon (c-di-AMP) valmistus	48
3. Yhteenveto	49
IV KIRJALLISUUSLÄHTEET	50
Lyhenneluettelo	

I JOHDANTO

Bakteereja esiintyy sekä pinnallisesti että luonnossa. Ensimmäiseksi mainittu viittaa laboratorio-olosuhteisiin, jossa bakteeri esiintyy vapaassa yksisoluisessa muodossa ja jälkimmäinen monisoluisen järjestäytyneeseen mikrobiyhteisöön, mistä käytetään nimitystä biofilmi.¹ Biofilmit ovat mukautuvia kasvumuotoja, jotka edistävät patogeenisien bakteerien selviytymistä ja muodostuessaan saavat aikaan useita kroonisia ja pysyviä tulehduksia elimistössä.²

Biofilmien on yleisesti todettu olevan immuuneja elimistön puolustusmekanismeille ja antibiooteille. Niiden muuttuvat elinolosuhteet, kuten alhainen pH, saattavat alentaa aineenvaihdunnallista aktiivisuutta ja näin ollen myös antimikrobiaalista aktiivisuutta. Biofilmien bakteereissa saattaa lisäksi tapahtua geenimuuntumia, jotka lisäävät huomattavasti bakteerien vastustuskykyä. Jos osa bakteerista pääsee kiinnittymään kasvamattomiin, matalan aineenvaihduntatason soluihin, kehittää se siellä uuden tulehduksia aiheuttavan biofilmin.

Nykyiset hoitomuodot pyrkivät tuhoamaan ja ennaltaehkäisemään biofilmien aiheuttamia tulehduksia muun muassa verhoamalla mahdollisen tai oletetun tulehdusalueen antibiootilla tai antimikrobilla. Ennaltaehkäiseviä entsyymejä on kehitetty jo vuosien ajan, mutta kaikesta tästä vaivasta huolimatta biofilmit ovat kasvattaneet vastustuskykyään näitä vasta-aineita kohtaan. Tästä johtuen on siirrytty vaihtoehtoisten terapeuttisten keinojen tutkimiseen.^{3,4}

Syklinen diguanosiinimonofosfaatti, c-di-GMP löydettiin vuonna 1987 Jerusalemin yliopiston tutkijoiden toimesta. Kuluneiden vuosien aikana yhdisteen on todettu olevan yksi yleisimmistä ja tärkeimmistä ilmaisimolekyyleistä bakteereissa.^{1,5} Alhaisilla pitoisuuksilla c-di-GMP kykenee säätelemään bakteerien liikkuvuutta, solunjakautumista, eriytymistä ja leviämistä elimistössä sekä pysäyttämään solusyklin. Solunsisäisten pitoisuuksien ollessa korkealla on yhdisteen havaittu pystyvän säättämään biofilmin muodostusta tai jopa estämään sen synnyn kokonaan.⁶ Maailmanlaajuisella tasolla c-di-GMP tunnetaan bakteerien toisiolähttimolekyylinä (*engl. second messenger*).

Saadessaan biofilmin muodostumisen kuriin, c-di-GMP:n läsnäolo on ensiarvoisen tärkeää akuuttien, patogeenisten ja tarttuvien tulehduksien hoidossa. Biofilmien patogeenisia bakteereita ovat muun muassa koleraa aiheuttava *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* eli stafylokokki sekä sairaalabakteerina tunnettu *Pseudomonas aeruginosa*. Näistä viimeiseksi mainittu on ollut eniten

tutkittu bakteeri biofilmianalytiikassa. Lukuiset kokeet nisäkkäillä ovat saaneet tutkijat vakuuttuneeksi c-di-GMP:n olevan tulevaisuuden yhdiste rokotemarkkinoilla.

Tutkijoiden tultua vakuuttuneiksi syklisen diguanosiinimono fosfaatin ominaisuuksista ovat he osoittaneet kiinnostuksensa myös muiden syklisten dinukleosidimono fosfaattien käytöstä mahdollisina antibakteerien vaikutusaineina.¹ Muuan muassa syklisen diadenosiinimono fosfaatin (c-di-AMP) on havaittu toimivan signaalimolekyylinä DNA:n itiöjakautumisessa ja syklisen diinosiinimono fosfaatin (c-di-IMP) edistävän limakalvoroikkeiden toimintaa.

Tämän Pro Gradu- tutkielman kirjallisessa osassa on esitetty erilaisia syklisten dinukleosidimono fosfaattien synteesimenetelmiä, joissa keskeisinä yhdisteinä ovat syklinen diguanosiinimono fosfaatti, c-di-GMP ja syklinen diadenosiinimono fosfaatti, c-di-AMP. Syklisten dinukleosidimono fosfaattien synteesi voidaan tehdä kahdella eri tavalla, joko entsyymattisesti tai kemiallisesti. Kemiallisessa menetelmässä nukleotidin sykliisaatio toteutetaan käyttämällä fosforamidiitti-, fosfoesteri- ja vetyfosfonaatti-kemialla. Näistä kaksi jälkimmäistä ovat käytetyimmät syklisten dinukleosidimono fosfaattien valmistuksessa. Myös tukirankamenetelmiä, joissa nukleoemäkset liitetään fosfaatti-sokeri-renkaaseen, on jälkepäin raportoitu.

Kemiallista synteesiä hyödyntäen tutkijat ovat valmistaneet myös syklisten dinukleosidimono fosfaattien analogeja, jotka muistuttavat biologisilta ominaisuuksiltaan hyvin paljon modifioimattomia yhdisteitä. Valmistettaessa analogeja, voidaan modifoida joko yhdisteen fosfaatti-, emäs- tai sokeriosaa. Kirjallisen osan loppupuoli käsittelee syklisten dinukleosidimono fosfaattien ja niiden modifioitujen analogien rakennetta ja synteesiä.

Synteesit on esitetty seuraaville yhdisteille: c-di-AMP, c-di-CMP, c-di-GMP, c-di-IMP, c-di-TMP, c-di-UMP, c-di-XMP, c-di-YMP, c-ApCp, c-ApGp, c-ApTp, c-ApUp, c-CpTp, c-GpCp, c-GpIp, c-GpTp, c-GpUp, c-GpXp, c-IpUp, c-UpTp, c-GpsGp, c-GpsGps, c-GpsGpss, c-di-AMP^(5'S), c-di-CMP^(5'S), c-di-GMP^(5'S), c-di-TMP^(5'S), c-CpAp^(5'S), c-CpGp^(5'S), c-GpAp^(5'S), c-TpAp^(5'S), c-TpCp^(5'S), c-TpGp^(5'S), Gd_{NHCO}Gd_{NHCO}, c-di-⁸BrGMP, c-di-⁸SHGMP, c-di-⁸MeSGMP, c-di-⁸PhGMP, c-di-⁸AcPhGMP, c-di-GMP_{2'F}, c-di-GMP_{2'OMe}, c-TpUp_{2'OMe} sekä analogi ilman emäsosaa (*engl.* abasic analogue)

Tutkielman kokeellisessa osassa on valmistettu syanoetyyli- (CE-), *tert*-butyyliidimetyylisilyyli- (TBDMS-) ja bentsoyyliryhmillä (Bz-) suojattu syklinen diadenosiinimono fosfaatti (c-di-AMP) 42% saannolla. Synteesin eri vaiheet ja spektrometrinen karakterisointi esitetään osiossa yksityiskohtaisesti.

II KIRJALLINEN OSA

1. Sykliset dinukleosidimonofosfaatit

Sykliset *bis*-(3',5') -dinukleotidit eli sykliset dinukleosidimonofosfaatit ovat biologisesti aktiivisia yhdisteitä, jotka säätelevät esimerkiksi bakteerien selluloosa- ja DNA-synteesiä sekä estävät syöpäsolun kasvua ja bakteerien solujenvälisiä vuorovaikutuksia.⁷ Niiden uskotaan olevan tärkeitä myös bakteeriperäisten biofilmien säätelyssä. Tutkimuksia biologisesta potentiaalista on tehty vuosikymmenten ajan.

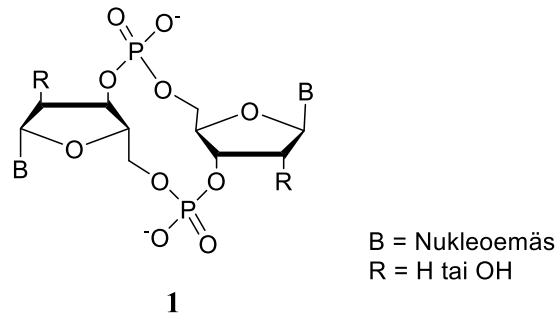
Syklisiä dinukleosidimonofosfaatteja on syntetisoitu solututkimuksia varten. Eniten syntetisoitu ja tutkittu analogi on syklinen diguanosiinimonofosfaatti (c-di-GMP), joka on havaittu erinomaiseksi ilmaisimolekyyliksi bakteereissa. Tutkijoiden havaitsemat c-di-GMP:n hyvät biologiset ominaisuudet ovat siirtäneet tutkijoiden kiinnostuksen myös muihin syklisiin dinukleosidimonofosfaatteihin ja niiden biologisiin ominaisuuksiin.^{1,6}

Tutkimusten tarkoituksena ei ole ainoastaan löytää uusia syklisiä dinukleosidimonofosfaatteja, joiden ominaisuudet vastaavat c-di-GMP:n ominaisuuksia, vaan halutaan myös selvittää yhdisteiden toiminnallisuutta paremmin. Käytännössä tämä tarkoittaa tutkimusta siitä, miten erilaiset sykliset dinukleosidimonofosfaatit vaikuttavat soluissa ja mikä on käytettävän nukleoemäksen rooli vuorovaikutuksessa.¹

1.1 Syklisten dinukleosidimonofosfaattien rakenne

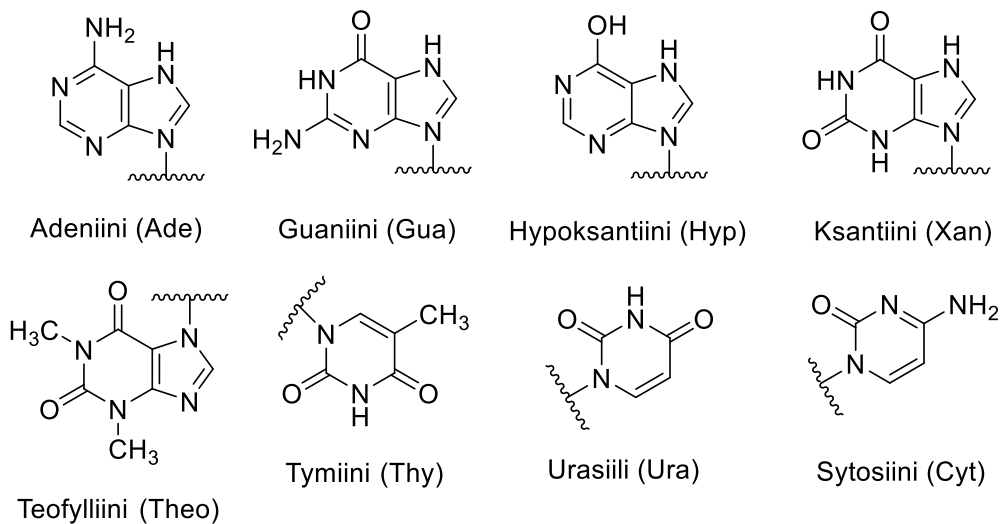
Syklinen *bis*-(3',5') -dinukleotidi eli syklinen dinukleosidimonofosfaatti **1** on rengasrakenteinen kahden ribonukleotidin yhdiste, joka muodostuu kolmesta komponentista (KUVA 1). Ensimmäinen on yhdisteen ominaisuuksiin vaikuttava, tyypipohjainen nukleoemäs (B). Toisena komponenttina on sokeriosa, joka on käytännössä aina riboosi. Kolmas komponentti on tukirankana toimiva fosfaatti, jonka sitoutuminen tapahtuu intramolekulaarisella fosfodiesterisidoksella.

Komponentit sitoutuvat toisiinsa siten, että nukleoemäs on kiinnittynyt riboosin 1'-hiileen ja fosfaattiryhmä riboosin 5'-hiileen. Tämän lisäksi fosfaattiryhmä on sitoutunut toiseen nukleotidiin, jolloin rakentuu 12-jäseninen rengasmainen sokeri-fosfaattitukiranka. Tukiranka on erittäin jäykkä, minkä ansiosta nukleotidit pysyvät samassa tasossa, keskimääräisellä 6,8 Å:n etäisyydellä toisistaan.



KUVA 1. Syklinen bis-(3',5') -dinukleosidihappo eli syklinen dinukleosidimonofoosfaatti.

Tässä tutkielmassa esitetyissä synteeseissä nukleoemäksenä toimivat adeniiini, guaniini, hypoksantiini, ksantiini, teofylliini, tymiini, sytosiini tai uridiini (KUVA 2).



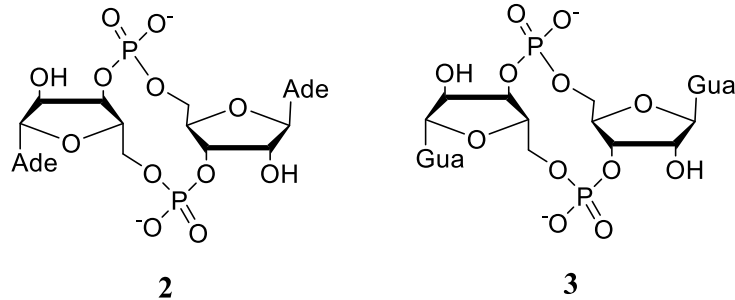
KUVA 2. Syklisen dinukleosidimonofoosfaattien nukleoemäkset. Suluissa emästen lyhenteet.

1.2 Syklisen dinukleosidimonofoosfaattien nimeäminen

Nukleoemäkset B₁ ja B₂ määrittävät syklisen dinukleosidimonofoosfaatin nimen. Nukleoemästen ollessa keskenään samanlaiset, kyseessä on symmetrinen syklinen dinukleosidimonofoosfaatti.¹ Tästä kaupallisesti saatavilla olevasta yhdistetyypistä käytetään jatkossa lyhennettä c-di-NMP.

Lyhenteessä N edustaa ribonukleosidia, joka emäksestä riippuen on adeniini (Ado,A), guaniini (Guo,G), inosiini (Ino,I), ksantosiini (X), 7-β-D-ribofuranosyyli-teofylliini (Y), uridiini (Urd,U) tai sytidiini (Ctd,C). Deoksiribonukleosidien tapauksessa käytetään tymidiinille lyhennettä T.

Tutkielmaa ajatellen merkittävimmät yhdisteet ovat syklinen diadenosiinimono fosfaatti (c-di-AMP, **2**) ja syklinen diguanosiinimono fosfaatti (c-di-GMP, **3**). Yhdisteessä **2** molempina nukleoemäksinä toimii adeniini ja yhdisteessä **3** vastaavasti guaniini (KUVA 3).



KUVA 3. Syklisen diadenosiinimono fosfaatin **2** ja syklisen diguanosiinimono fosfaatin **3** rakenteet.

Sykliset dinukleosidimono fosfaatit, joissa nukleoemäkset ovat keskenään erilaiset, vaativat muodostuakseen laboratoriosynteesin. Tästä täysin synteettisestä yhdistetyypistä käytetään merkintää c-NpNp, jossa N edustaa ribonukleosideja aakkosellisessa järjestyksessä ja p edustaa 5'-aseman fosfotriesteri-sidosta. Fosforotioaattien tapauksessa merkitään fosfodiesteri-sidokseen liittyntä rikkiatomia kirjaimella s, esim. c-NpsNp.

2. Syklisten dinukleosidimonofosfaattien valmistaminen

Syklisten dinukleosidimonofosfaattien synteesi voidaan tehdä kahdella eri tavalla, joko entsyymaattisesti tai kemiallisesti.¹ Kemiallinen synteesi voidaan vielä jakaa kolmeen eri menetelmään, joista ensimmäinen vaihtoehto tunnetaan perinteisenä nukleotidin syklistaationa. Siinä käytetään lähtöaineena nukleotidia, jolloin emäs on jo valmiina liittyneenä tai soveltaen siten, että lähtöaineena käytetään kaupallista suojattua nukleosidi-3'-fosforamidiittia.

Kirjallisuudessa toista menetelmää kutsutaan synteeseitistä riippuen joko fosfoesterimenetelmäksi tai vetyfosfonaattimenetelmäksi. Nämä laajennetut nukleotidin syklistaatiomenetelmät ovat käytetyimmät syklisen dinukleosidimonofosfaattien valmistuksessa.

Kolmas kemiallisen synteessin vaihtoehto on valmistaa eräänlainen syklinen tukiranka, johon emäkset liitetään.^{8,9} Tukiranka kuitenkin rajoittaa saatavien lopputuotteiden määrää, sillä tukirankaan ei voi liittää kahta eri emästä.

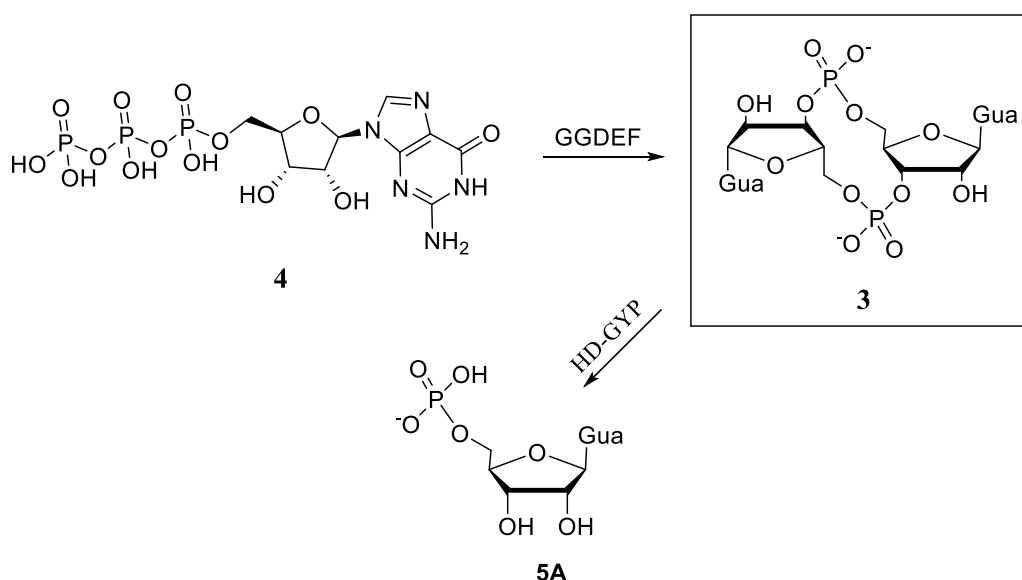
2.1. Bioentsymaattinen synteesi

Entsymaattisesti toteutettu biosynteesi on vanhimpia syklisten dinukleosidimono fosfaattien valmistamiseen käytettyjä menetelmiä.¹ Pääasiassa c-di-GMP:n synteeseissä käytetyn menetelmän heikkoutena pidetään korkeita valmistuskustannuksia, synteessin pitkää kestoa ja heikkoa saantoa. Lopputuotteen on myös havaittu herkästi hydrolysoituvan, minkä vuoksi menetelmä soveltuu erittäin pienien määrien synteisiin.

Yhdisteen metabolian tutkimiseen hyödynnetyssä synteessissä lähtöaineena on käytetty kahta guanosiiniri-fosfaattimolekyyliä (GTP, **4**). Käytännössä synteessissä lähtöaineet saatetaan rengasmuotoon 170-jäsenisen aminohappoketjun (GGDEF) avulla. GGDEF-domeenin avulla tehtävää syklistaatiota kutsutaan nimellä diguanylaattisyklaasi (DGC).

Diguanylaattisyklaasilla valmistettua c-di-GMP:tä on myös hydrolysoitu eri proteiindomeenilla, jotta on pystytty tutkimaan yhdisteen metaboliaa tarkemmin sekä myös mahdollistamaan kemiallisia synteesejä, joissa lähtöaineena on käytetty nukleosidin 5'-monofosfaattia. Hydrolyysissä pääasiallinen domeeni on ollut HD-GYP, joka hydrolysoi c-di-GMP:n kahdeksi guanosiini-5'-monofosfaatiksi (**5B**). Hydrolyysi tunnetaan myös nimellä syklisen nukleotidin fosfodiesteriäsi (KAAVIO 1). Molemmat reaktiot toteutetaan MgCl₂-puskuroidussa liuoksessa, ja pysäytetään etyleenidiammintetraetikkahapossa (EDTA) refluksoiden.

GGDEF-domeenin runkona on (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe)-aminohappoketju ja HD-GYP-domeenilla vastaavasti (His-Asp-Gly-Tyr-Pro)-aminohappoketju.

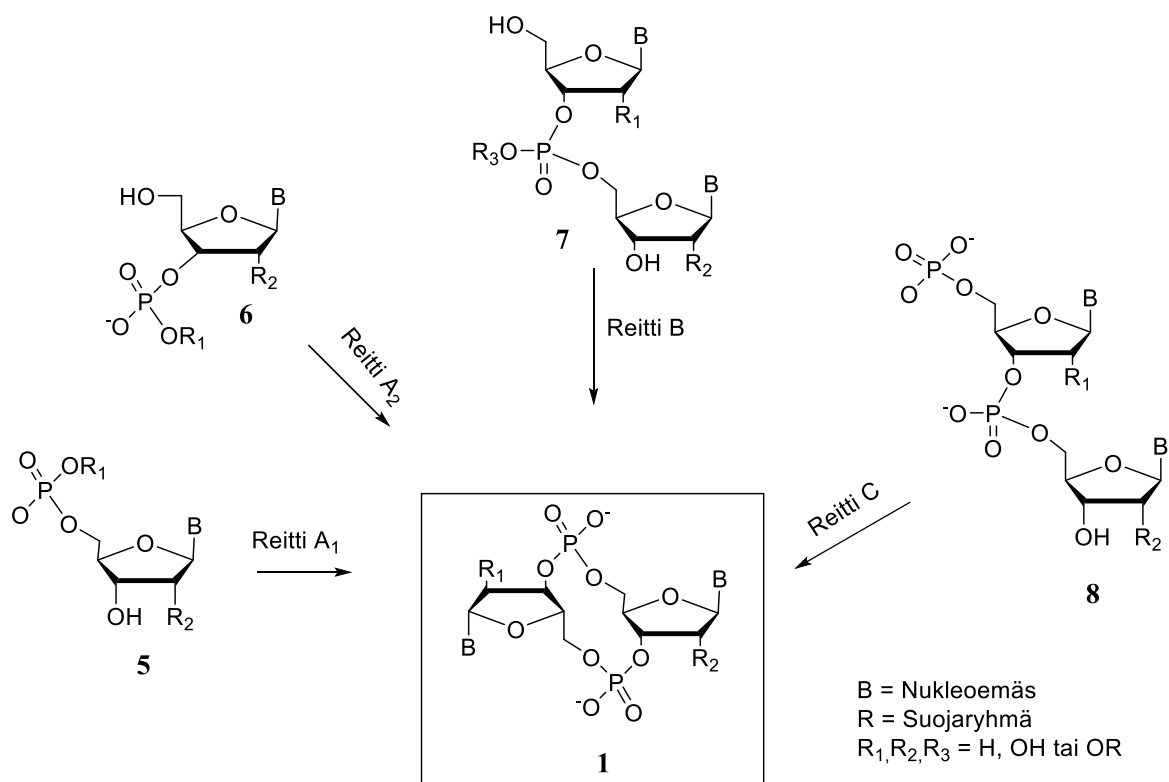


KAAVIO 1. Diguanylaattisyklaasi ja nukleotidin fosfodiesteriäsi proteiindomeeneilla.

2.2. Kemialliset synteesit

Pääasiallisesti syklisiä dinukleosidimono fosfaatteja (c-di-NMP) on syntetisoitu nukleotidin syklistaatiolla. Tämä menetelmä on ollut käytetyin tutkijoiden keskuudessa sen monipuolisuuden, suoraviivaisuuden ja helppouden vuoksi.⁹

Nukleotidin syklistaatiossa on raportoitu neljä käyttökelpoista variaatiota. Ensimmäinen menetelmä perustuu nukleosidi-3'- tai -5'-fosfaatin dimerisaatioon (Reitti A), toinen dinukleosidimono fosfaatin syklistointiin fosforyloimalla (Reitti B) ja kolmas 5'-asemassa olevan fosfaatin aktivointiin (Reitti C) (KAAVIO 2).



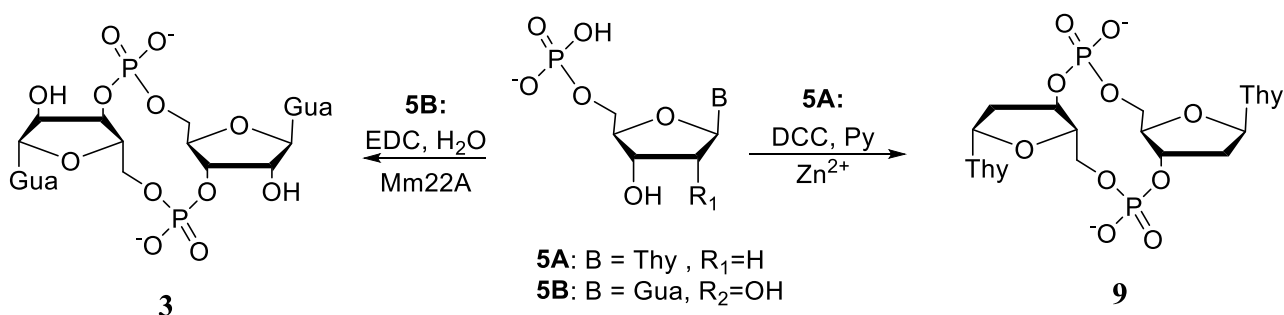
KAAVIO 2. Nukleotidien syklistaatioiden yksinkertaistetut synteesireitit A-C.

Neljäs menetelmä perustuu 3'-fosforin sisältävien dinukleotidien 3'-fosforiatomin aktivointiin, ja lähtöaineesta riippuen se voidaan jakaa kolmeen osaan. Lähtöaineena voi toimia joko syklisen dinukleosidin fosfomonoesteri, fosfodiesteri tai vetyfosfonaatti (Ks. KAAVIO 8). Menetelmät tunnetaan nimillä fosfodiesterimenetelmä (Reitti D₁), fosfotriesterimenetelmä (Reitti D₂) ja vetyfosfonaattimenetelmä (Reitti D₃).

2.2.1. Synteesi nukleosidi-5'-fosfaatista (Reitti A₁)

Khoranan työryhmä on raportoinut syklisen ditymidiinimono fosfaatin, (c-di-TMP, **9**) dimerisaation, jossa lähtöaineena on käytetty tymidiini-5'-monofosfaattia (**5A**).¹⁰ Dimerisaatio tehtiin pyridiinissä (Py), divalentin sinkki-ionin läsnä ollessa. Reaktion aktivaattorina toimi *N,N'*-disykloheksyylikarbodiamidi (DCC). NH₃:EtOH-ajoliuksella silikakromatografisesti puhdistetun lopputuotteen saanto on ollut 74 %.

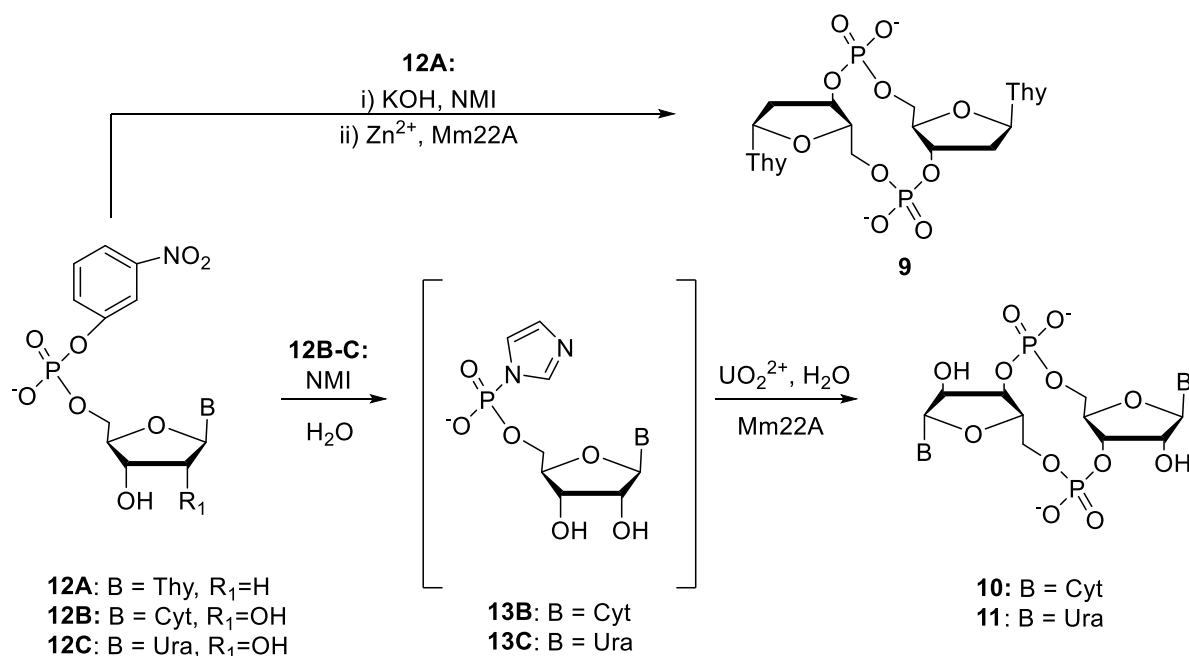
Tutkimuksessa havaittiin synteesin olevan mahdollinen myös vedessä, pyridiinin sijaan. Kun aktivaattorina käytettiin DCC:n sijasta vesiliukoista 1-etyyli-3-(3-dimetyyli-aminopropyyli)-karbodiamidia (EDC), saatiin guanosiini-5'-monofosfaatti **5B** dimerisoitua noin 5% saannolla. Reaktion katalyyttina toimi montmorilloniitti 22 (Mm22A) (KAAVIO 3). EDC:n toimiessa aktivaattorina, yhdiste **5A** ei dimerisoitunut steerisen esteen vuoksi, joten synteesi koettiin käyttökelpoiseksi ainoastaan c-di-GMP:n (**3**) valmistamiseksi. Muita analogeja ei ole tällä menetelmällä onnistuttu valmistamaan.



KAAVIO 3. Tymidiini- ja guanosiini-5'-monofosfaatin dimerisaatio.

Shimidzun työryhmä on raportoinut syklisen disytidiinimono fosfaatin, (c-di-CMP, **10**) sekä syklisen diuridiinimono fosfaatin (c-di-UMP, **11**) dimerisaation.¹¹ Lähtöaineena on käytetty nukleosidi-5'-*p*-nitrofenyyli fosfaattia (**12**). Reaktio tehtiin vedessä *N*-metyyli-imidatsolin (NMI) katalysoimana, jolloin välituotteena saatiin nukleosidin fosforimidatsolijohdannainen (**13**). Välituote katalysoitiin montmorilloniitilla vedessä, uranyyli-ionien läsnä ollessa. Saanto oli 56%.

Mikäli lähtöaineena käytetään tymidiini-5'-*p*-nitrofenyyli fosfaattia ja reaktion annetaan tapahtua kaliumhydroksidin vesiliuoksessa, saadaan dimerisoitua yhdiste **9** ilman välituotteita, 74% saannolla. Tässä reaktiossa Zn²⁺-ionien havaittiin nostavan saantoa reilusti (KAAVIO 4).



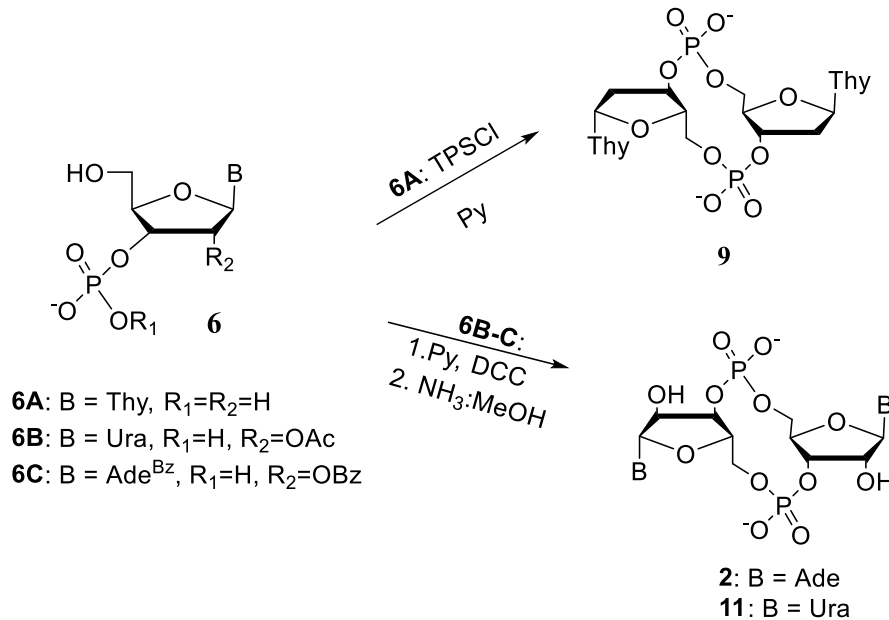
KAAVIO 4. Tymiini-, sytiini- ja uridiini-5'-*p*-nitrofenyylifosfaatin dimerisaatio.

Metalli-ionien vaikutusta nukleosidi-5'-fosforimidatsolin polymerisaatiossa on tutkittu. Adenosiini- ja guanosiinijohdannaisten tapauksessa metalli-ionit estävät syklisen rakenteen syntymisen. Inosiini-, uridiini- ja sytosiinijohdannaisten synteeseissä parhain divalentti metalli-ioni on ollut Pb²⁺, vaikka saannot ovat olleet alle 10%. Toistaiseksi parhaat saannot on saatu uridiini-ioneilla kaavion 4 mukaisessa dimerisaatiossa (56%), sekä *c*-di-TMP:n (**9**) dimerisaatiossa sinkki-ioneilla (74%).

2.2.2. Synteesi nukleosidi-3'-fosfaatista (Reitti A₂)

Sykliset ditymiini-, diuridiini- ja diadenosiinimono fosfaatit on raportoidusti valmistettu käyttämällä lähtöaineena vastaavaa nukleosidi-3'-fosfaattia (**6**).¹ Yhdisteen **9** dimerisaatio tehtiin pyridiinissä 2,4,6-tri-isopropyylibentsosulfonyylikloridin (TPSCl) toimiessa aktivaattorina. Myös EDC:tä käytettiin aktivaattorina, mutta dimerisaatiota ei tapahtunut.

Asetyyliryhmällä (Ac-) suojatun uridiini-3'-fosfaatin reaktio pyridiinissä DCC:n aktivoimana antoi lopputuotteeksi yhdisteen **11**. Bentsoyyliryhmällä (Bz-) suojatun adenosiini-3'-fosfaatin reaktio pyridiinissä DCC:n aktivoimana antoi lopputuotteeksi yhdisteen **2**. Asetyyl- ja bentsoyyliryhmät on poistettu käsittelemällä yhdistettä ammoniakki-metanoliliuoksella (1:1) (KAAVIO 5). Reaktioiden saannot olivat alhaiset, 10-15%.



KAAVIO 5. Tymiini-, uridiini- ja adensiini-3'-monofosfaatin dimerisaatio.

2.2.3. Synteesi dinukleosidimonofoosfaateista (Reitti B)

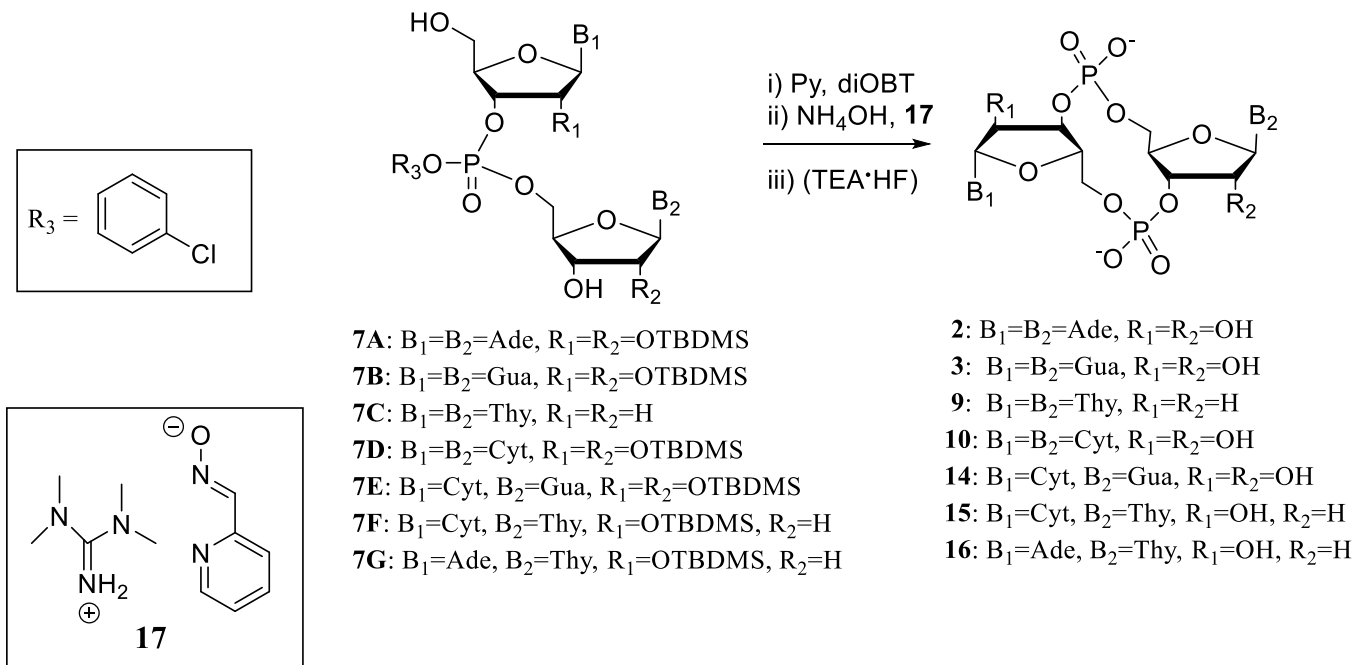
Kyseisessä menetelmässä dinukleosidimonofoosfaattien syklisaatio vaatii onnistuakseen lähtöaineeksi fosfotriesterirakenteen. Tämän lisäksi lähtöaineen tulee olla vain osittain suojattu. Toisin sanoen, reaktion mahdollistamiseksi 3'- ja 5'-asemien hydroksyyli-ryhmät on jätetty suojaamatta, sillä nämä asemat ovat syklisaation kannalta reaktiivisesti oleelliset.

Capobiancon työryhmä on valmistanut syklisiä dinukleosidimonofoosfaatteja fosforylointimenetelmällä.¹² Lopputuotteina saatiin saman nukleotidin yhdisteet c-di-AMP (**2**), c-di-GMP (**3**), c-di-TMP (**9**) sekä c-di-CMP (**10**). Näiden yhdisteiden lisäksi lopputuotteina on saatu myös kolme yhdistettä, joissa nukleotidit ovat keskenään erilaiset. Nämä jälkimmäiset yhdisteet ovat c-CpGp (**14**), c-CpTp (**15**) ja c-ApTp (**16**). Lopputuotteiden saanto vaihteli 54% ja 84% välillä, suurin saanto oli yhdisteellä **2**. Jokainen tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti.

Syklisaatiossa käytettiin lähtöaineina *tert*-butyyliidimetyylisilyyli- (TBDMS-) ja kloorifenyyliryhmällä suojattua dinukleosidimonofoosfaattia **7**. Fosforylointireagenssina oli 2-kloorifenyylidi-*O,O*-bis (1-bentsotriatsolyyli)fosfaattia (diOBT) ja liuottimena pyridiini. Lähtöaineen 3'- ja 5'-asemien hydroksyyli-ryhmät on jätetty suojaamatta, jotta syklisaatio saatiin toteutettua.

Syklisaation jälkeen kloorifenyylisuojarahmät poistettiin *N*¹,*N*¹,*N*³,*N*³-tetrametyyliguanidinium-syn-pyridiini-2-karboxaldoksimaatilla (**17**) ammoniumhydroksidissa. TBDMS-suojaryhmät on poistettu

trietyyliammoniumfluoridilla (TEA•HF), jolloin lopputuotteena on saatu sykline n dinukleosidimono fosfaatti (KAAVIO 6).



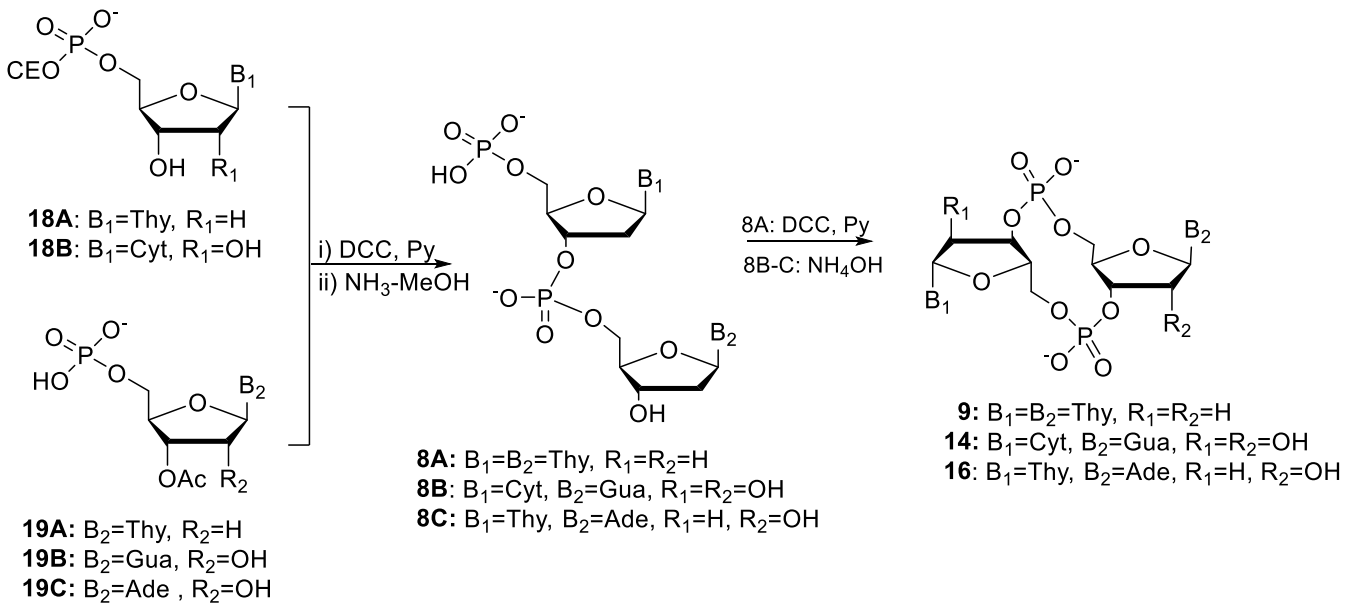
KAAVIO 6. Capobiancon työryhmän fosforyointimenetelmä.

2.2.4. Synteesi 5'-fosfaatin sisältävistä dinukleotideista (Reitti C)

Khoranan työryhmä on raportoinut syklisten dinukleosidimono fosfaattien synteesestä, missä syklistaatio on tehty aktivoimalla dinukleosidin 5'-asemassa oleva fosfaatti.¹⁰ Lopputuotteina on saatu c-di-TMP (**9**), c-CpGp (**14**) ja c-ApTp (**16**) (KAAVIO 7).

Synteesien lähtöaineina on käytetty syanoetyyliryhmällä (CE-) suojattua nukleosidi-5'-fosfaattia (**18**) ja 3'-asetyylisuojattua nukleosidi-5'-fosfaattia (**19**). Lähtöaineiden kytkeytyminen toteutettiin vedettömässä pyridiinissä ylimäärän DCC:n toimiessa aktivaattorina. Suojaryhmät poistettiin NH₃: MeOH (1:1)-liuoksessa refluksoiden, jolloin muodostui lineaarinen dinukleosidimono fosfaatti (**8**).

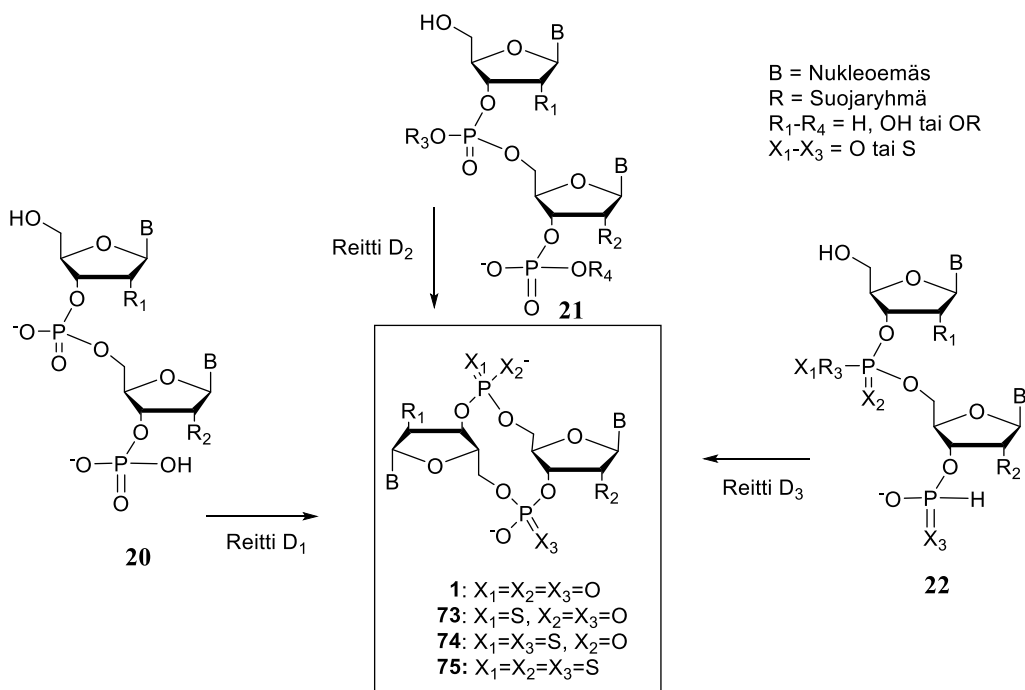
5'-Aseman fosforiatomi aktivoitiin käsittelemällä saatua yhdistettä **8A** pyridiinissä runsaan DCC:n läsnäollessa, jolloin saatiin lopputuotteena c-di-TMP (**9**) 80% saannolla. Kahden eri nukleosidin yhdisteet **14** ja **16** saatiin käsittelemällä yhdisteitä **8B** ja **8C** ammoniumhydroksidissa refluksoiden. Tuotteiden saannot olivat 18% ja 36%.



KAAVIO 7. Khoranan aktivointimenetelmä 5'-asemassa olevaan fosfaattiin.

2.2.5. Synteesi 3'-fosfaatin sisältävistä dinukleotideista (Reitti D)

Neljännessä kemiallisessa synteesimenetelmässä aktivoidaan 3'-asemassa oleva fosfaatti. Synteesimenetelmästä riippuen käytetään joko fosfoesterikemiaa (Reitit D₁ ja D₂) tai vetyfosfonaattikemiaa (Reitti D₃) (KAAVIO 8).



KAAVIO 8. 3'-Fosfaatin sisältävien dinukleotidien yksinkertaistetut synteesireitit.

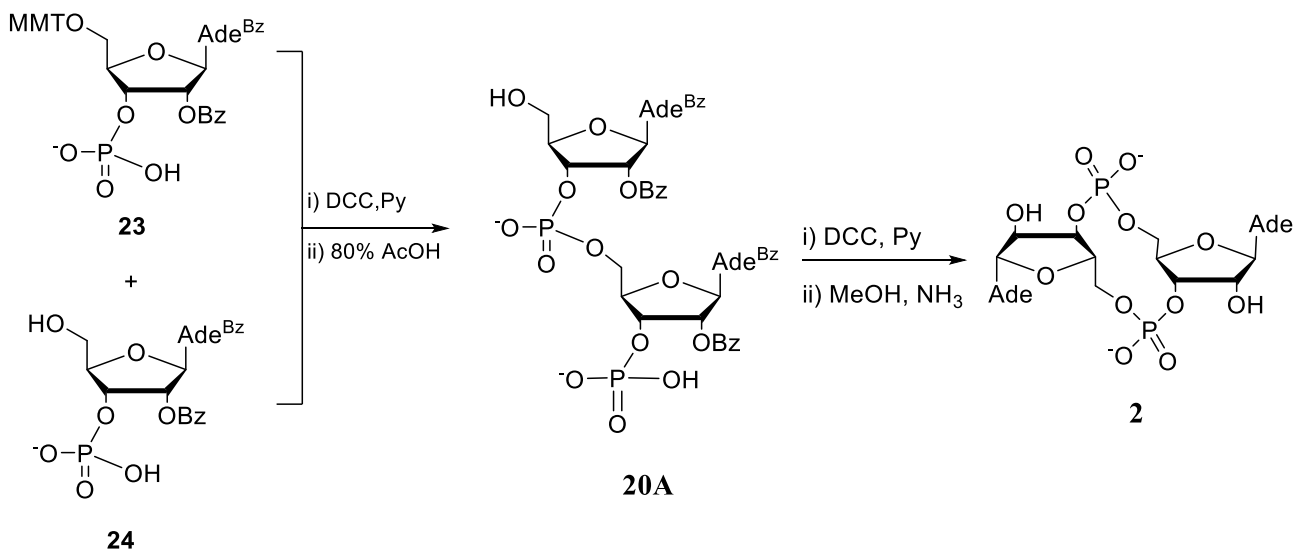
Kyseiset menetelmät ovat eniten raportoituja menetelmiä syklisten dinukleosidimonofosfaattien valmistuksessa. Poikkeuksen tekee fosfodiesterimenetelmä, jonka käyttämisestä on raportoitu vain kerran. Myös tutkielman kokeellisessa osassa suojattu syklinen diadenosiinimonofosfaatti on valmistettu soveltaen fosfotriesterimenetelmää eli Hayakawan menetelmää.¹⁷

2.2.5.1. Fosfodiesterimenetelmä (Reitti D₁)

Ohtsukan työryhmä on valmistanut yhdisteen **2** käyttämällä lähtöaineina 5'-*O*-monometoksitriityyli-*N*⁶,2'-*O*-dibentsoyyliadenosiini-3'-fosfaattia **23** ja *N*⁶,2'-*O*-dibentsoyyliadenosiini-3'-fosfaattia **24**, DCC:n toimiessa aktivaattorina.¹

Etikkahappokäsittelyn jälkeen saatiin tuotteena lineaarinen *N*⁶,2'-*O*-dibentsoyyliadenylyyli-(3',5')-*N*⁶,2'-*O*-dibentsoyyliadenosiini-3'-fosfaatti (**20A**). Välituotteen saanto oli 8%. Välituotteessa yhden sokerimolekyylin 3'-hiilen ja toisen sokerin 5'-hiilen välillä oleva fosfodiesterisidos määrittelee menetelmän nimen.

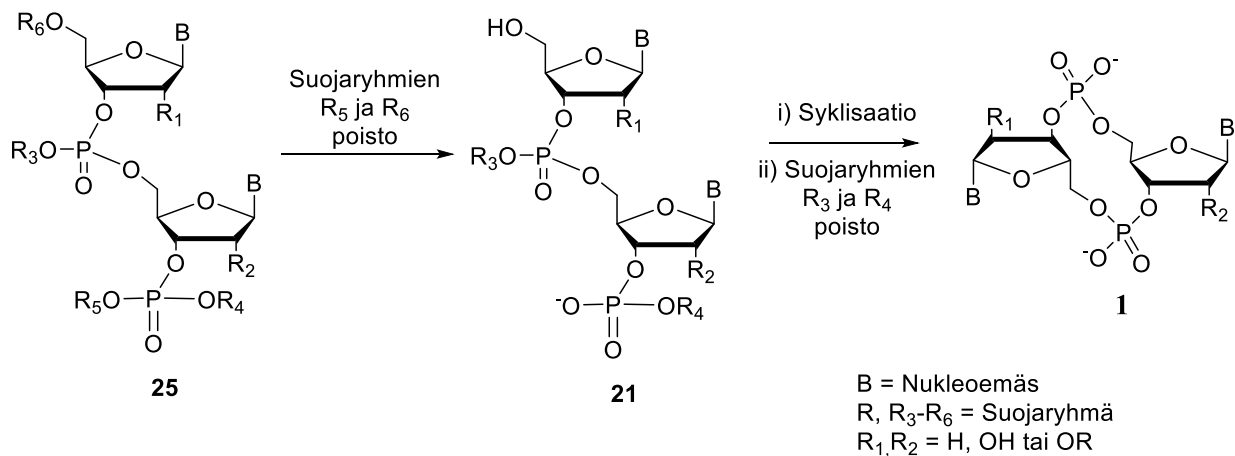
Bentsoyylisuojatun fosfodiesteriyhdisteen **20A** syklistaatio toteutettiin pyridiinissä, jossa oli ylimäärä aktivaattorina toimivaa DCC:tä. Syntyneen tuotteen bentsoyyliiryhmät poistettiin NH₃: MeOH (1:1)-liuoksessa refluksoiden, jolloin lopputuotteena saatiin syklinen diadenosiinimonofosfaatti *c*-di-AMP **2**, 19% saannolla (KAAVIO 9).



KAAVIO 9. *c*-di-AMP:n syntesi fosfodiesterimenetelmällä.

2.2.5.2. Fosfotriesterimenetelmä eli Hayakawan menetelmä (Reitti D₂)

Fosfotriesterimenetelmän ensimmäisenä esittäjänä pidetään Baselin yliopiston työryhmää.⁸ Hayakawa sovelsi menetelmää omissa kokeissaan, minkä vuoksi menetelmää kutsutaan myös Hayakawan menetelmäksi (KAAVIO 10).⁹ Hayakawan menetelmä on kaikkein eniten hyödynnetty variaatio syklisten dinukleosidimono fosfaattien valmistamisessa.



KAAVIO 10. Hayakawan menetelmän yksinkertaistettu synteesireitti.

Fosfotriesterimenetelmä eroaa fosfodiesterimenetelmästä siten, että lähtöaineessa yhden sokerimolekyylin 3'-hiilen ja toisen sokerin 5'-hiilen välillä on fosfotriesterisidos. Menetelmän käyttö vaatii lähtöaineessa **25** suojatun fosfaattirakenteen, jotta rengasrakenteen muodostamisessa vältetään muita reaktioita.

Suojattu fosfaattirakenne **25** saadaan liittämällä asetonitrilissä yhteen suojattu nukleosidi-3'-fosforamidiitti ja siitä valmistettu suojattu nukleosidi-3'-fosfaatti, *N*-metyyli-imidatsolin (NMI) läsnäollessa. Synteesimenetelmänä on sovellettu nukleosidifosfaattien dimerisaatiota (Reitti A).

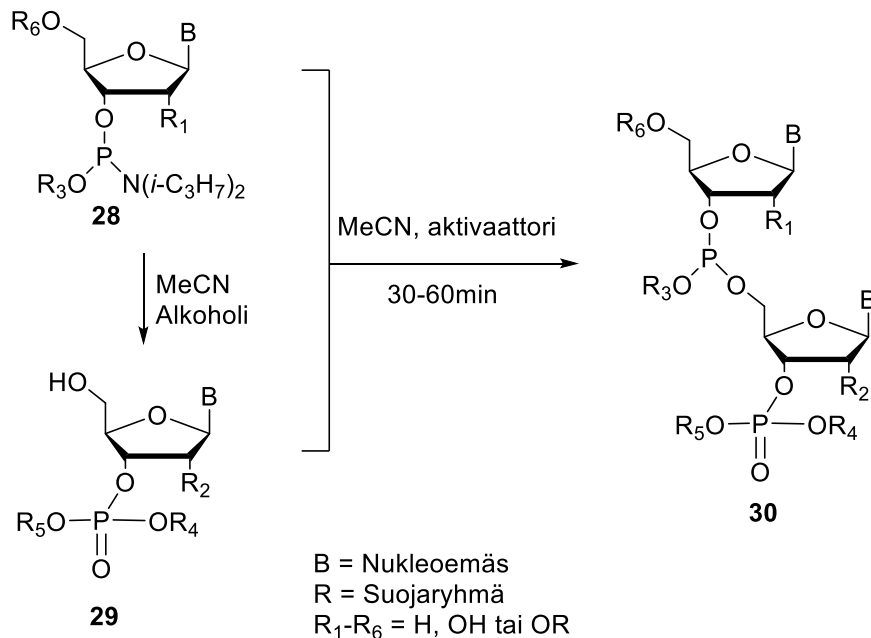
Yhdisteen **21** syklisaation jälkeen poistetaan loput suojaryhmät, ja raakatuote puhdistetaan silikageelikromatografisesti. Lopputuotteena saadaan syklinen dinukleosidimono fosfaatti **1**. Menetelmää hyödyntäen on valmistettu *c*-di-AMP (**2**), *c*-di-CMP (**10**), *c*-di-GMP (**3**), *c*-di-IMP (**26**), *c*-di-TMP (**9**), *c*-di-UMP (**11**), *c*-di-XMP (**27**) sekä lukuisia kahden eri nukleotidin syklisiä yhdisteitä.¹

Koska Hayakawan menetelmä on eniten hyödynnetty variaatio syklisten dinukleosidimono fosfaattien valmistamisessa, käydään menetelmän välivaiheet tässä tutkielmassa läpi mahdollisimman yksityiskohtaisesti.

2.2.5.2.1. Suojatun dinukleosidi-3'-fosfaatin valmistaminen fosforamidiittimenetelmällä

Fosforamidiittimenetelmä on erittäin käyttökelpoinen menetelmä lineaaristen dinukleotidien valmistamisessa. Alun perin sitä on hyödynnetty kiinteässä faasissa, mutta myöhemmin myös nestemäisessä synteesissä. Suojattuja fosforamidiitteja on saatavilla kaupallisesti, joten niiden hyödyntäminen on aikaa säästävää.

Käytettäessä lähtöaineena asetonitriliin liuotettua fosforamidiittia **28** saadaan alkoholikäsitteilyllä valmistettua fosfaattijohdannaisia **29**, jotka voidaan sitten liittää alkuperäiseen fosforamidiittiin aktivaattorin läsnä ollessa. Tällä tavoin saadaan muodostettua lineaarinen dimeeri **30**, jossa on intramolekulaarinen fosfodiesterisisidos (KAAVIO 11).¹

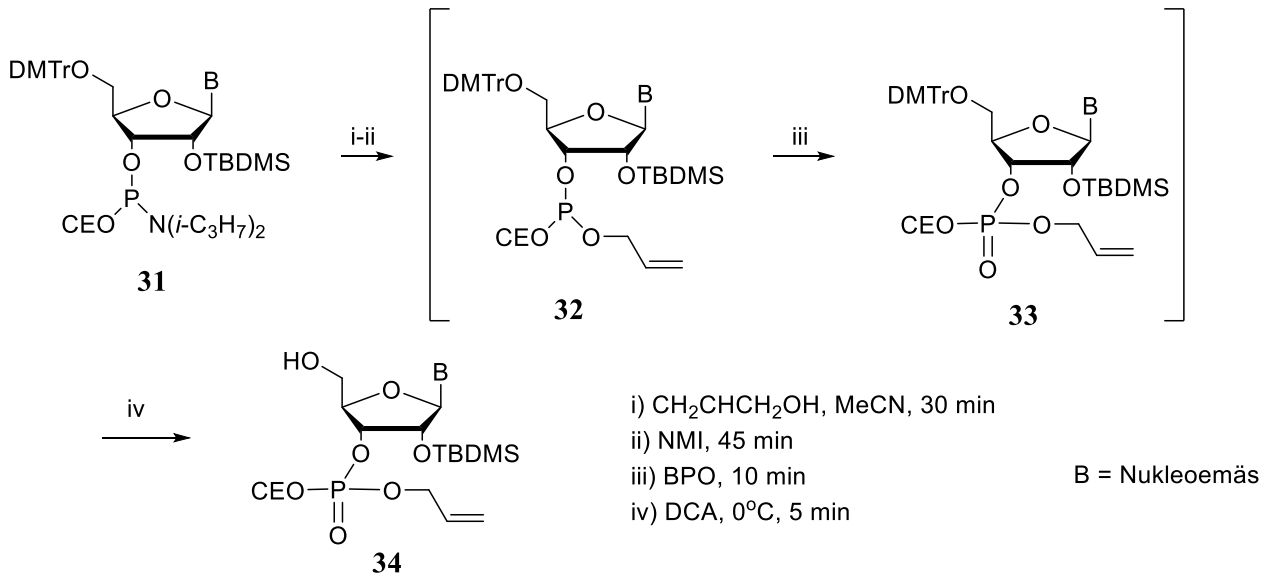


KAAVIO 11. Fosforamidiittimenetelmän yksinkertaistettu synteesireitti.

Chingin työryhmä Singaporen yliopistosta on valmistanut suojatun nukleosidi-3'-fosfaatin **34** käyttämällä lähtöaineena suojattua nukleosidi-3'-fosforamidiittia **31** (KAAVIO 12).¹³

TBDMS-, 4,4'-dimetoksitryyli- (DMTr-) ja CE-ryhmillä suojatusta nukleosidi-3'-fosforamidiitista **31** on valmistettu suojattu nukleosidi-3'-(allyyli, 2-syanoetyyli)fosfiitti **32** korvaamalla diisopropyyliminoryhmä allyylialkoholilla asetonitrilissä (MeCN), *N*-metyyliimidatsolin (NMI) toimiessa aktivaattorina.

Tämän jälkeen fosfiitti **32** on hapetettu vastaavaksi fosfaatiksi **33** butanoniperoksidilla (BPO) ja väliaikainen 4,4'-dimetoksitriityyli-suojaryhmä (DMTr-) poistettu dikloorietikkahapon (DCA) vesiliuoksella. Tuotteena on saatu suojattu nukleosidi-3'-(allyyli,2-syanoetyyli)fosfaatti (**34**) 57% saannolla.



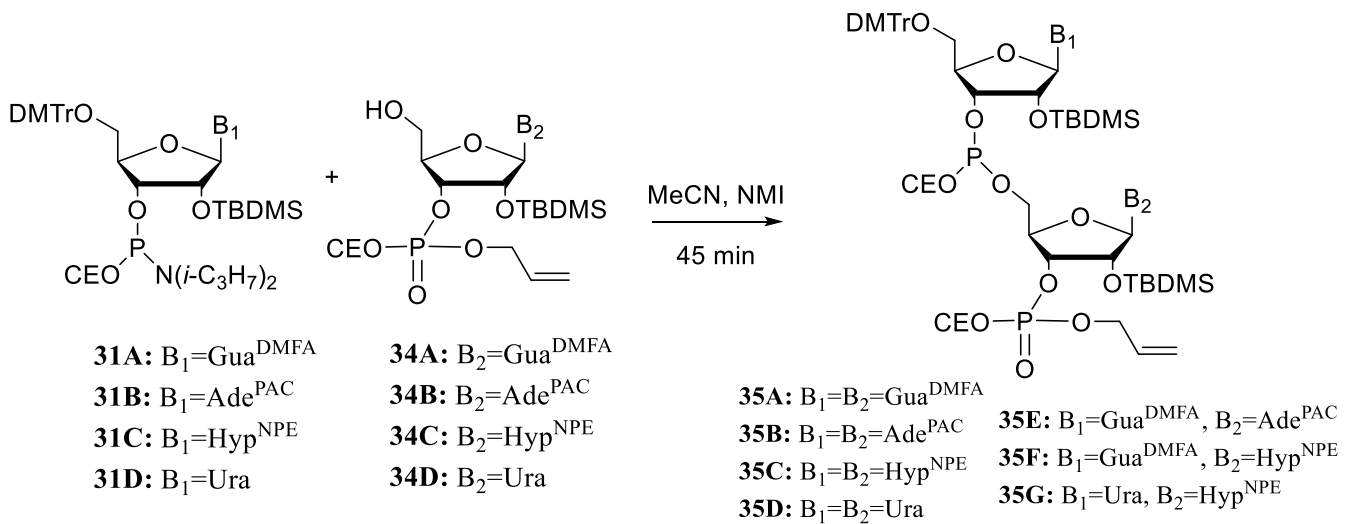
KAAVIO 12. Suojatun nukleosidi-3'-(allyyli, 2-syanoetyyli)fosfaatin valmistaminen.

2.2.5.2.2. Fosfotriesterisidoksen muodostaminen

Fosforamidiittimenetelmällä valmistetut yhdisteet toimivat lähtöaineina lineaarisen fosfaattidimeerin muodostamisessa. Reaktiomekanismia hyödyntäen, ovat sekä Chingin ryhmä Singaporesta että Hyodon ryhmä Japanista valmistaneet suojatun dinukleosidifosfaatin (**21**).^{13,14}

Chingin ryhmän nukleoemäksinä on ollut dimetyyliformamidi-ryhmällä suojattu guaniini (Gua^{DMFA}), 2-(4-nitrofenyyli)etyyliryhmällä suojattu hypoksantiini (Hyp^{NPE}) sekä suojaamaton urasiili (Ura). Hyodon ryhmä on edellä mainittujen emästen lisäksi käyttänyt fenoksisetyyliryhmällä suojattua adeniinia (Ade^{PAC}).

Synteesin alku noudattaa molemmissa tutkimusryhmissä samaa mekanismia. Suojattu nukleosidi-3'-fosforamidiitti **31** ja siitä aiemmin valmistettu suojattu nukleosidi-3'-(allyyli, 2-syanoetyyli)fosfaatti **34** on liitetty yhteen asetonitrilissä *N*-metyyliimidatsolin (NMI) läsnä ollessa. Reaktiotuotteena on saatu 42% saannolla fosfiitti **35** (KAAVIO 13).



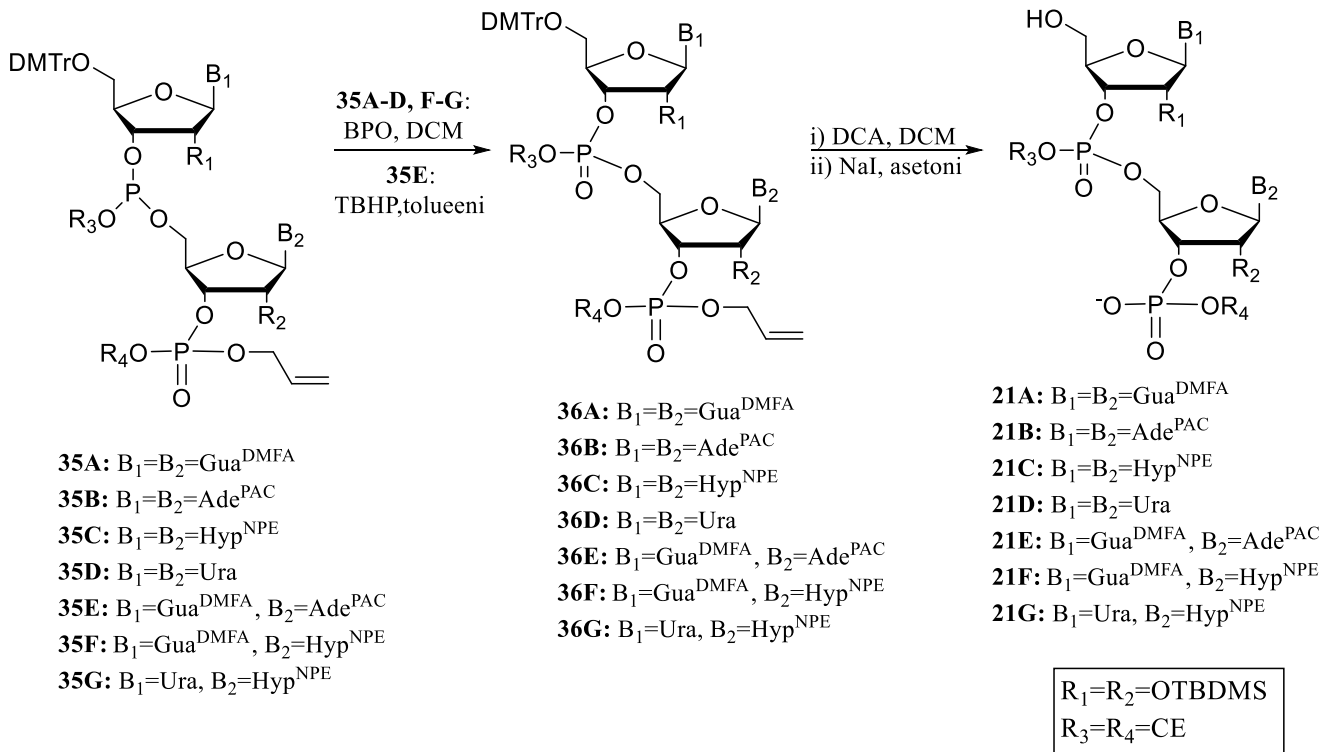
KAAVIO 13. Dinukleosidi-3'-(allyyli,2-syanoetyyli)fosfiitin valmistaminen.

Fosfiitit ovat erittäin reaktiivisia yhdisteitä, minkä vuoksi suojaryhmien käyttäminen on välttämätöntä ei-toivottujen sivureaktioiden välttämiseksi. Suojaryhmien on tämän lisäksi oltava erilaisia, jotta kyetään selektiivisesti poistamaan kukin suojaryhmä yksi kerrallaan.

Yhdiste **35** on hapetettu vastaavaksi fosfaatiksi **36** butanoniperoksidilla (BPO) dikloorimetaanissa (DCM). Suojatun adenylyyli(3',5')guanosiini-3'-fosfiitin **35E** hapettaminen vastaavaksi fosfaatiksi **36E** on Hyodon ryhmässä tehty butanoniperoksidin sijaan *tert*-butyylihydroperoksidilla (TBHP) toluenissa.

Hapettamisen jälkeen on väliaikainen DMTr-suojaryhmä poistettu dikloorietikkahapon (DCA) ja dikloorimetaanin (DCM) seoksella. Lopuksi on vielä allyylisuojaryhmä poistettu natriumjodidilla asetonissa refluksoiden, jolloin tuotteena on saatu yhdiste **21**, 50-66% saannolla (KAAVIO 14). Suurin saanto todettiin guanosiiniyhdisteellä **21A**.

Yhdiste **21** sisältää fosfotriesterisidoksen nukleotidien välillä. Fosfotriesterimenetelmän nimi juontuu tämän yhdistetyypin käytöstä lähtöaineena syklisten dinukleosidimonoosfaattien syklisaatiossa. Syklisaatio voidaan toteuttaa joko liuoksessa tai kiinteän kantajan avulla, joista molemmat tavat käsitellään seuraavissa kappaleissa.



KAAVIO 14. Fosfotriesterisidoksen muodostaminen.

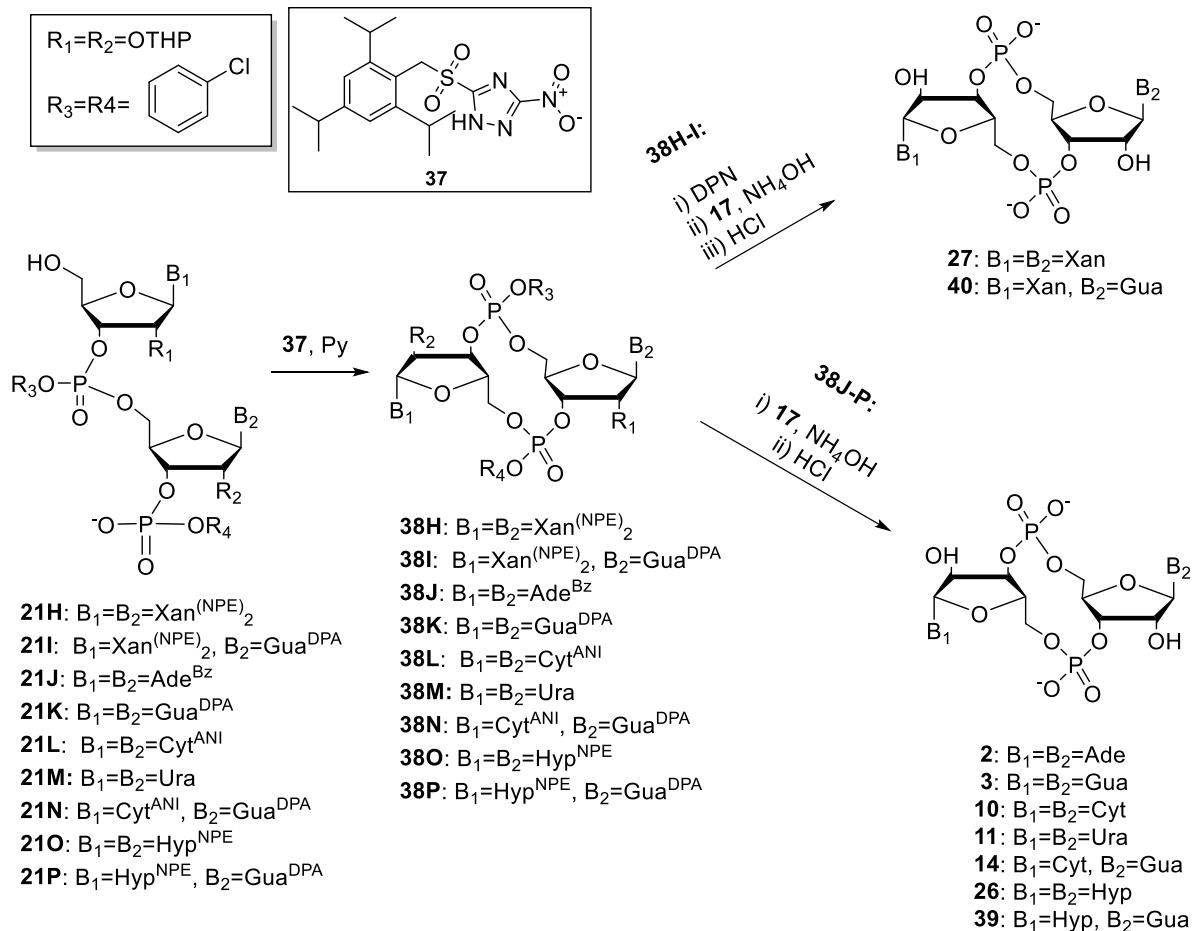
2.2.5.2.3. Syklisaatio liuoksessa

Yhdisteen **21** kaltaisten dinukleotidien syklisaation on huomattu toteutuvan parhaiten, kun lähtöaine on liuotettu pyridiiniin aryylisulfonyyliatsolidin toimiessa aktivaattorina. Parhaimmaksi aktivaattoriksi on lukuisilla tutkimuksilla todettu 2,4,6-*tri*-isopropyylibentsosulfonyyli-3-nitro-1,2,4-triatsoli (TPSNT, **37**).¹⁵ Tämän menetelmän avulla on valmistettu yhdeksän erilaista syklistä dinukleosidimono fosfaattia: *c*-di-AMP (**2**), *c*-di-GMP (**3**), *c*-di-CMP (**10**), *c*-di-IMP (**26**), *c*-di-UMP (**11**), *c*-di-XMP (**27**), *c*-CpGp (**14**), *c*-IpGp (**39**) ja *c*-XpGp (**40**) (KAAVIO 15).¹⁶

Rossin työryhmän synteeseissä nukleoemäksinä ovat toimineet adeniini, guaniini, hypoksantiini, ksantiini, sytidiini ja uridiini. Emäs on synteestistä riippuen suojaamaton tai suojattu joko bentsoyyli- (Bz-), 2-(4-nitrofenyyli)etyyli- (NPE-), dihydroksifenyylialaniini- (DPA) tai anisoyyli- (ANI-) ryhmällä.

Syklisaation jälkeen 2-kloorifenyyli-ryhmät on poistettu *N*¹,*N*¹,*N*³,*N*³-tetrametyyliguanidium-syn-pyridiini-2-karboksaldoksimaatilla (**17**) pyridiinissä, asyyli-suojaryhmät NH₄OH-liuoksella ja tetrahydropyranyyli-ryhmät (THP-) väkevällä suolahapolla.

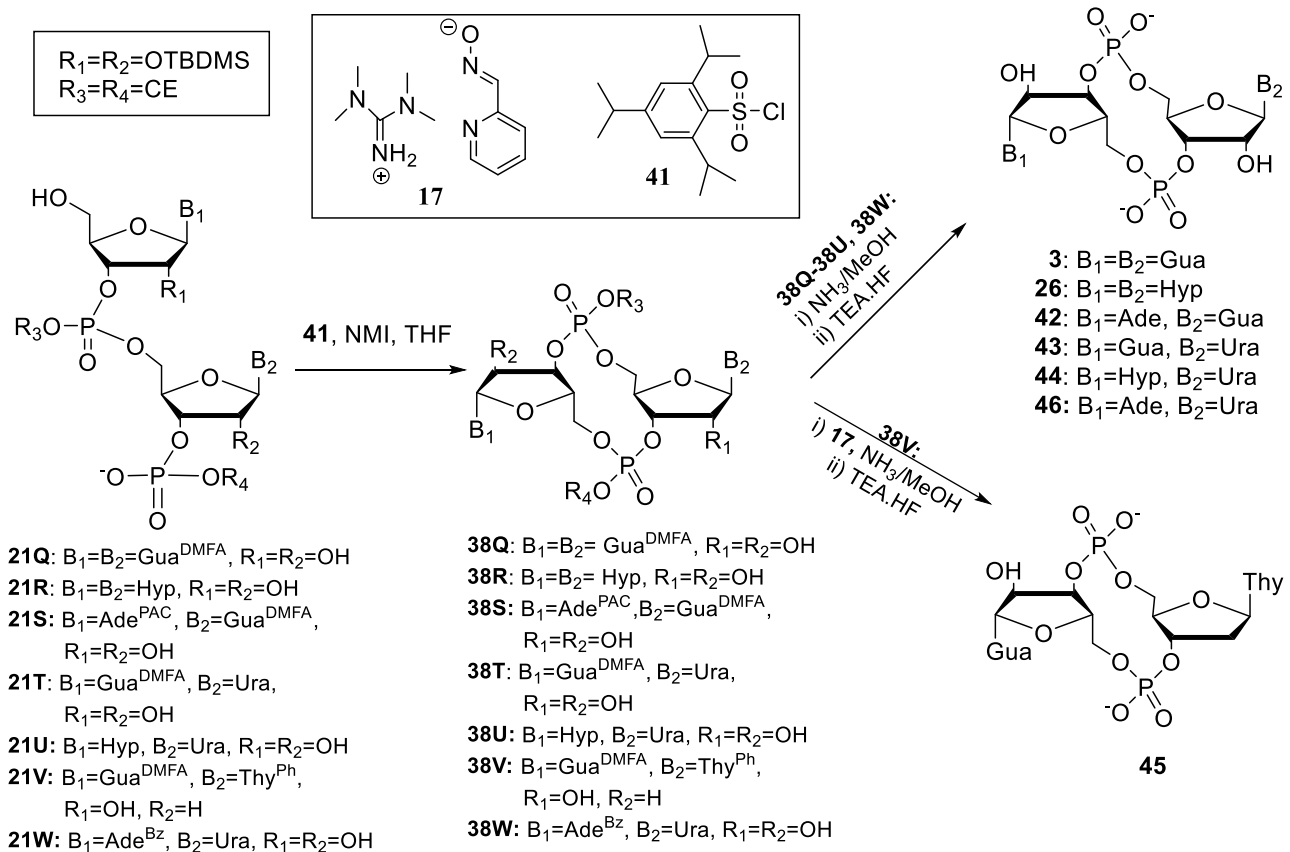
Yhdisteiden *c*-di-XMP (**27**) ja *c*-XpGp (**40**) tapauksessa NPE-suojaryhmät on poistettu 1,5-diatsa-bi-syklo[4,3,0]non-5-eenin (DPN) avulla. Lopputuotteiden saannot vaihtelivat 50-74% välillä, suurin saanto yhdisteellä **2**.¹



KAAVIO 15. Syklisaatio pyridiinissä TPSNT:n aktivoimana.

Tutkimusten pohjalta erittäin käyttökelpoinen aktivaattori syklisaatiossa on myös 2,4,6-trisopropyylibentsosulfonyylikloridi (TPSCL, **41**). Käytettäessä lähtöaineena yhdistettä **21** kuivassa tetrahydrofuraanissa (THF) *N*-metyyli-imidatsolin (NMI) läsnäollessa, on suojaryhmien poiston jälkeen lopputuotteina saatu *c*-di-GMP (**3**), *c*-di-IMP (**26**), *c*-di-UMP (**11**), *c*-ApGp (**42**), *c*-GpUp (**43**), *c*-IpUp (**44**), *c*-GpTp (**45**) ja *c*-ApUp (**46**) (KAAVIO 16).^{9,13,14} Tällä menetelmällä on tutkielman kokeellisessa osassa valmistettu TBDMS-, CE- ja Bz-suojattu *c*-di-AMP (**38Y**).¹⁷

Hyodon ja Chingin työryhmien synteeseissä nukleoemäksinä ovat toimineet adeniini, guaniini, hypoksantiini, tyymiini ja uridiini. Emäs on synteesisistä riippuen suojaamaton tai suojattu joko dimetyyliformamid- (DMFA-), bentsooyli- (Bz-), fenoksiasetyyli- (PAC-) tai fenyyl- (Ph-) ryhmällä. Syklisaation jälkeen DMFA-, PAC-, Bz- ja syanoetyyliryhmät on poistettu $\text{NH}_3\text{:MeOH}$ -liuksella, silyyliryhmät $\text{TEA}\cdot\text{HF}$ -liuksella ja tyymiinin fenyyliryhmä yhdisteellä **17**. Lopputuotteiden saannot vaihtelivat välillä 50-66%, ollen suurin yhdisteellä **3**.



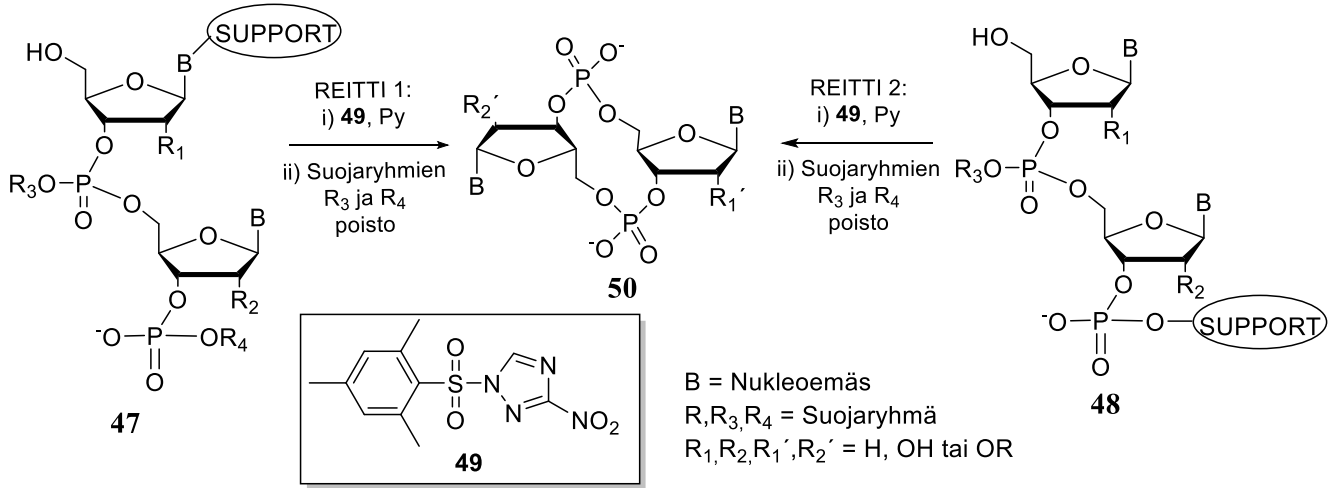
KAAVIO 16. Syklisaatio tetrahydrofuraanissa TPSCl:n aktivoimana.

2.2.5.2.4. Syklisaatio kiinteässä faasissa

Oligonukleotidien valmistaminen liuoksessa on todettu suoraviivaiseksi, mutta työlääksi menetelmäksi. Tämän vuoksi tutkijat ovat kiinnittäneet huomionsa syklisen dinukleotidien syklisaatioon kiinteässä faasissa, johon on kehitetty kaksi erilaista käyttökelpoista menetelmää.¹

Ensimmäisessä menetelmässä (Reitti 1) syklisaatiossa lähtöaineena käytetään nukleosidi-3'-fosfaattia **47**, jonka nukleoemäkseen on ankkuroitunut kiinteä kantaja (*engl.* solid support). Kiinteä kantaja toimii reaktiossa samalla emäksen suojaryhmänä.

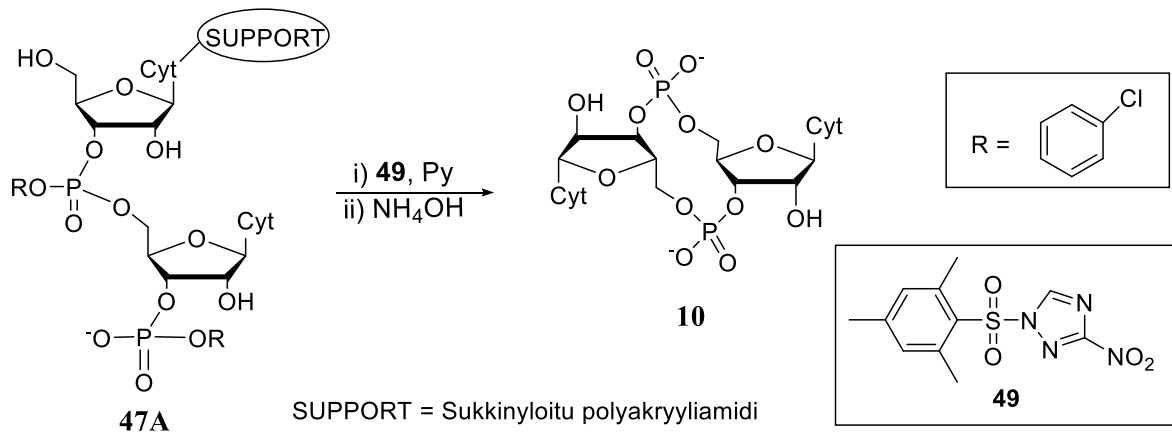
Toisessa menetelmässä (Reitti 2) kiinteä kantaja on liittyneenä 3'-fosfaattiryhmään (**48**). Syklisaatio toteutetaan 1-(mesityleenisulfonyyli)-3-nitro-1,2,4-triaatsolin (MSNT, **49**) läsnäollessa (KAAVIO 17). MSNT on kolmas hyväksi todettu aktivaattori, TPSNT:n ja TPSCl:n ohella.



KAAVIO 17. Yksinkertaistettu syklisaatio kiinteän kantajan (SUPPORT) avulla.

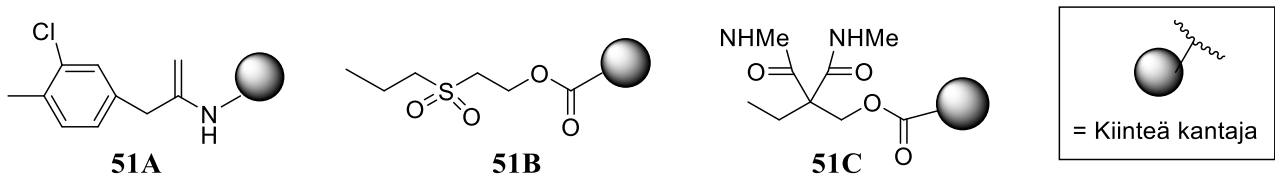
On huomioitava, että reitti 1 on käytännöllinen ainoastaan, mikäli nukleoemäksessä on eksosyklinen aminoryhmä. Tämä rajaa mahdollisen nukleoemäksen kolmeen vaihtoehtoon (Cyt, Ade ja Gua). Menetelmää on toistaiseksi käytetty ainoastaan syklisen disytidiinimono fosfaatin valmistuksessa.^{18,19}

Lähtöaineena on käytetty fosfaattisiltaan (R₃-R₄) kloorifenyylisuojustua sytosiinijohdannaisista **47A**, missä kiinteänä kantajana sytosiinille on toiminut sukkinylöitu polyakryyliamidi. Syklisaatio on toteutettu pyridiinissä MSNT:n läsnä ollessa. Suojaryhmät on lopuksi poistettu väkeväällä NH₄OH:lla, jolloin tuotteena on saatu c-di-CMP (**10**) alhaisella 7% saannolla (KAAVIO 18).



KAAVIO 18. c-di-CMP:n synteysi nukleoemäkseseen ankkuroidulla kiinteällä kantajalla.

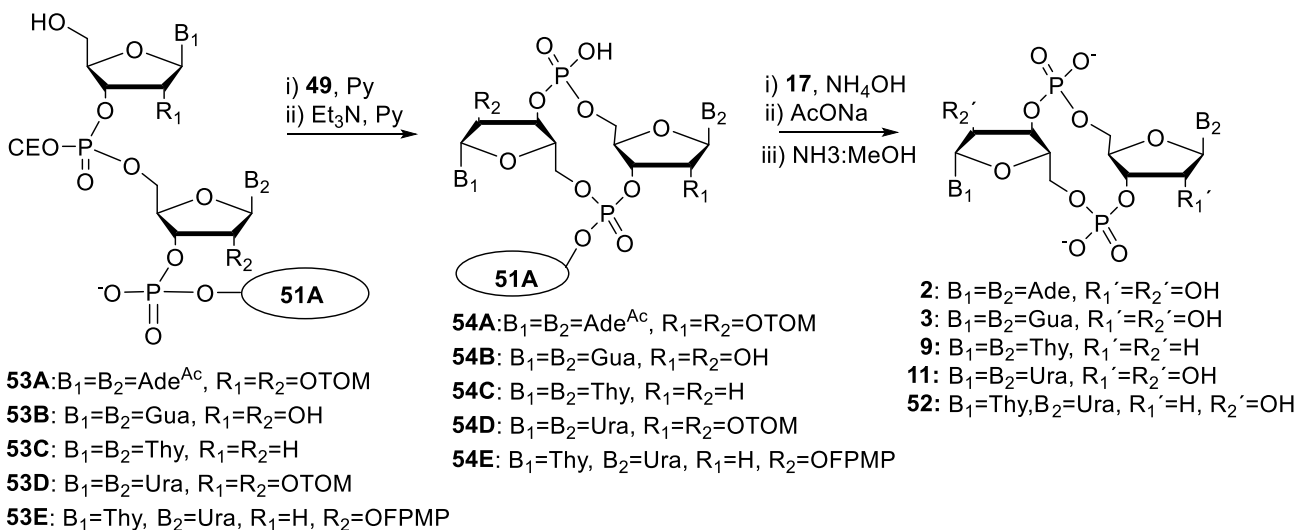
Reitti 2 taas ei rajoita käytettävää nukleoemästä, sillä kiinteä kantaja on liittyneenä 3'-fosfaattiin, toimien myös suojaryhmänä. Raportoitujen synteesien pohjalta yhdisteen **48** nukleosidien välinen fosfodiesterisidos on lähes poikkeuksetta suojattu syanoetyyli-ryhmällä. Kiinteän kantajan (**51**) runkona on synteesistä riippuen toiminut joko (A) 1-hydroksi-2-klorofen-4-yyli-, (B) hydroksietyyli-sulfonyyli- tai (C) 1-hydroksi-2,2-(dikarboksietyyliamido)propyyli-ryhmä (KUVA 4).



KUVA 4. Synteesien kiinteät kantajat ja niiden runkomolekyylit A-C.

Menetelmää hyödyntäen Pedroson on työryhmä käyttänyt kiinteänä kantajana yhdistettä **51A**. He ovat valmistaneet yhdisteet c-di-AMP (**2**), c-di-GMP (**3**), c-di-TMP (**9**), c-di-UMP (**11**) ja c-TpUp (**52**) (KAAVIO 19).^{20,21} Saannot vaihtelivat 3%:sta (c-di-UMP) ja 50%:iin (c-di-AMP).

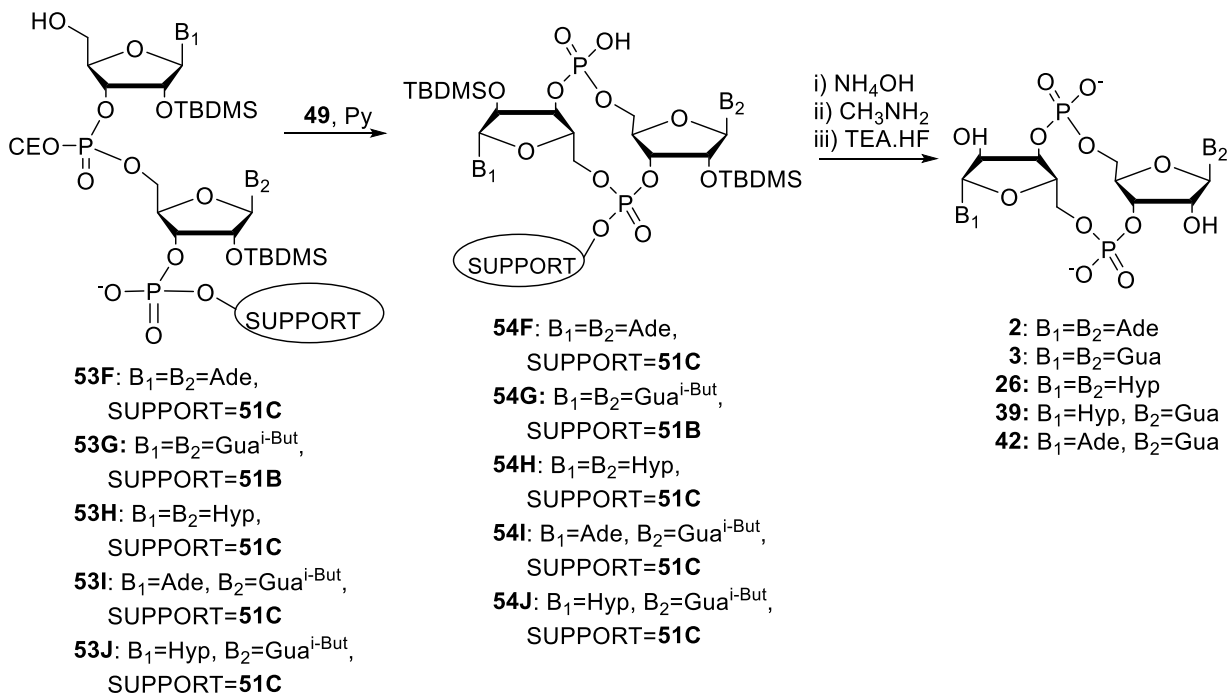
Lähtöaineena käytetty suojattu 3'-fosfaatin sisältävä dinukleotidi **53** on liuotettu pyridiiniin MSNT:n (**49**) läsnä ollessa. Syklisen yhdisteen **54** syanoetyyli-suojaryhmät on poistettu trietyyliamiinilla (Et₃N), kiinteä kantaja on poistettu yhdisteen **17** avulla ammoniumhydroksidissa. Triisopropyyliisilylioksimetyyli- (TOM-) ja 1-(2-fluorofenyyli)-4-metoksi-piperidiini-4-yyli- (FPMP-) ryhmät on poistettu natriumasetaatilla (AcONa). Lopuksi asetyyliryhmät on poistettu ammoniakki-metanoliliuoksella (1:1).



KAAVIO 19. Pedroson työryhmän syklistaatio ja suojaryhmien poisto.

Sintimin ja Shanananin työryhmät ovat käyttäneet kiinteinä kantajina yhdisteitä **51B** ja **51C**. He ovat valmistaneet yhdisteet c-di-AMP (**2**), c-di-GMP (**3**), c-di-IMP (**26**), c-GpIp (**39**) ja c-ApGp (**42**) (KAAVIO 20).^{22,23}

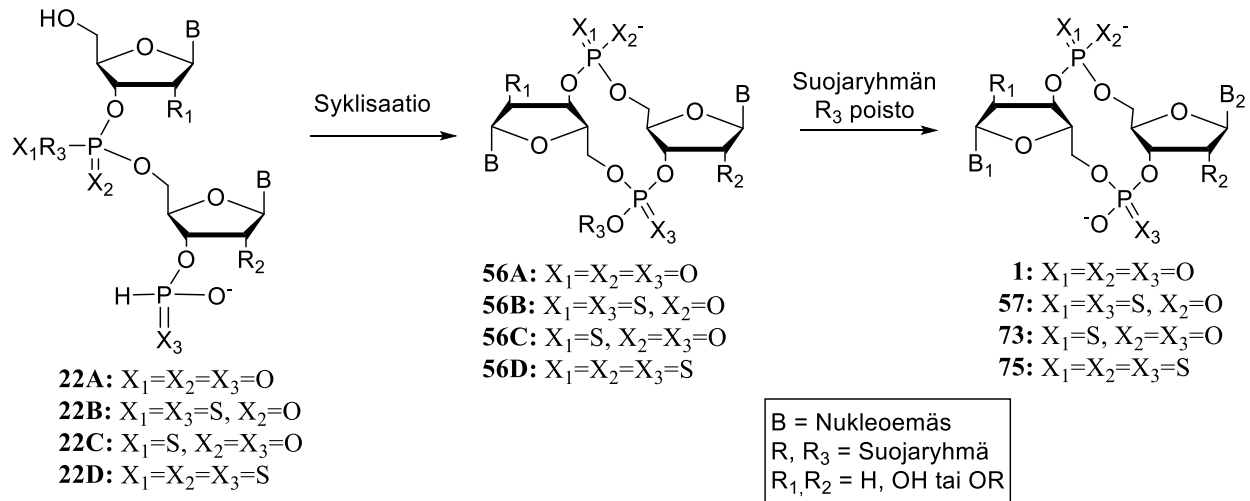
Lähtöaineina on käytetty suojattuja dinukleotideja **53**, jotka on liotettu pyridiiniin MSNT:n (**49**) läsnäollessa. Tämän jälkeen syklisen yhdisteen **55** syanoetyyli-suojaryhmät on poistettu trietyyliamiinissa (Et₃N), sekä kiinteät kantajat ja isobutyryyliryhmät metyyliamiinilla ammoniumhydroksidissa. Lopuksi on vielä poistettu silyyliryhmät TEA•HF-liuoksella. Näissä synteeseissä saannon on havaittu olevan jopa 95%.



KAAVIO 20. Sintimin ja Shanananin työryhmien syklisaatio ja suojaryhmien poisto.

2.2.5.3. Vetyfosfonaattimenetelmä eli Jonesin menetelmä (Reitti D₃)

Kolmannessa menetelmässä käytetään 3'-vetyfosfonaattiryhmän sisältäviä dinukleotideja syklisten dinukleosidimonofoosfaattien syntentisoimiseksi, mikä tunnetaan nimellä vetyfosfonaattimenetelmä. Menetelmän on todettu toimivan ainoastaan liuoksessa, ja sitä hyödyntäen on valmistettu myös syklisten dinukleosidimonofoosfaattien rikki- ja happianalogeja. Alun perin menetelmän esitti Jonesin työryhmä, minkä vuoksi menetelmä tunnetaan myös nimellä Jonesin menetelmä (KAAVIO 21).²⁴



KAAVIO 21. Jonesin vetyfosfonaattimenetelmän yksinkertaistettu synteesireitti.

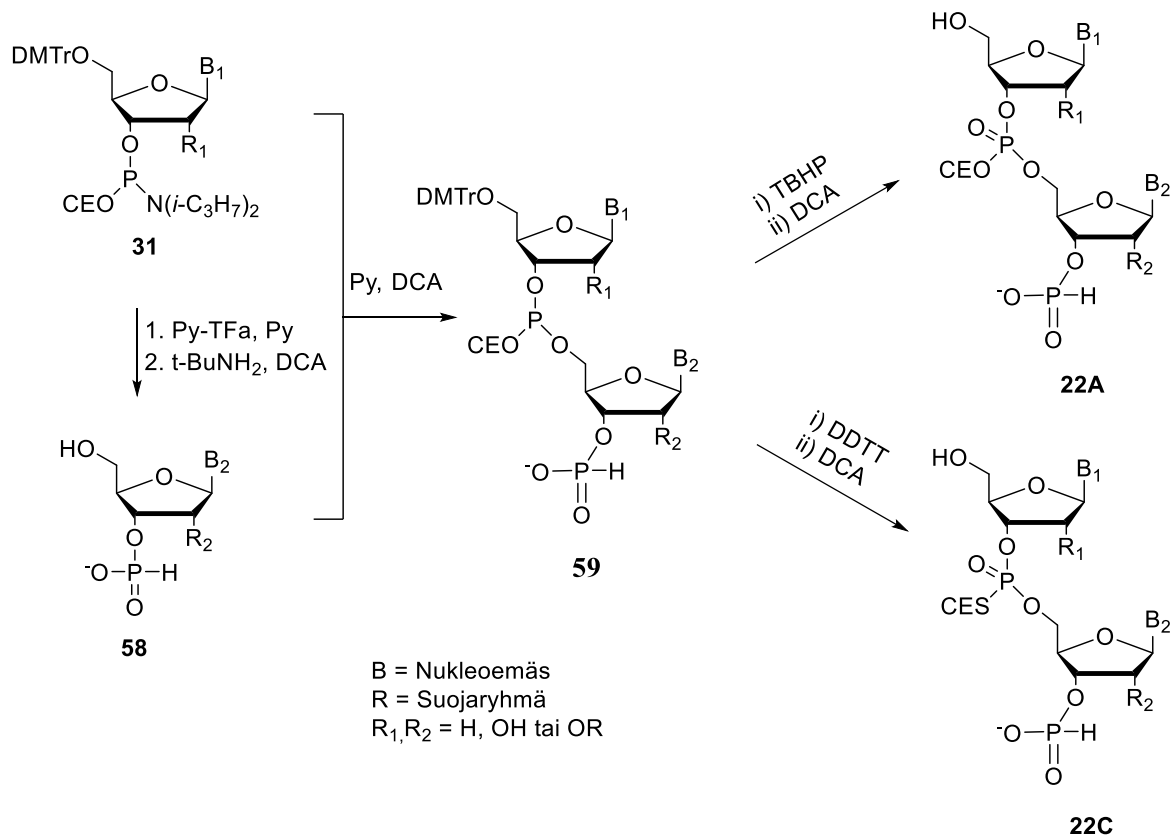
Lähtöaineina käytetään nukleosidi-3'-fosforamidiittia ja siitä valmistettua nukleosidi-3'-fosfonaattia, mitkä liitetään yhteen aktivaattorin läsnä ollessa. Tällöin muodostuu lineaarinen dinukleotidi **22**, jonka 3'-asemassa on fosfonaattiryhmä. Syklisaation ja suojaryhmien poistamisen jälkeen saadaan lopputuotteena syklinen dinukleosidimonofosfaatti **1** tai syklinen di-nukleosidifosforoditioaatti **57**.

Fosforotioaatit ovat syklisten dinukleosidimonofosfaattien rikkianalogeja, joissa yksi tai useampi fosfotriesterisidoksen happiatomi on korvattu rikkiatomilla. Näitä analogeja käsitellään tutkimuksessa tarkemmin omana kappaleenaan.

2.2.5.3.1. Jonesin yksivaiheinen synteesi

Jones on esittänyt yksivaiheisen synteesin (Engl. One pot synthesis) lineaarisen dinukleosidifosfaatin **22** valmistamiseen.²⁵ Lähtöaineena on käytetty kaupallista suojattua fosforamidiittia **31**, joka on hydrolysoitu pyridiini-trifluorietikkahapon (Py-TFA) avulla pyridiinissä. Tuotteen väliaikainen *iso*-propyyli-suojaryhmä on poistettu *tert*-butyyliamiinilla ja DMTr-suojaryhmä dikloorietikkahapon (DCA) vesiliuoksella.

Lopputuotteeksi saatu fosfonaatti **58** ja suojattu fosforamidiitti **31** on liitetty yhteen pyridiinissä DCA:n läsnä ollessa. Välituotteena saatu fosfiitti **59** hapetettiin vastaavaksi fosfaatiksi **22** joko *tert*-butyylihydroperoksidilla (TBHP) tai 3-(dimetyyliaminometyleeni)-5-tionilla (DDTT), DMTr-suojaryhmä on poistettu dikloorietikkahapon (DCA) vesiliuoksella. (KAAVIO 22).



KAAVIO 22. Jonesin yksivaiheinen synteesi.

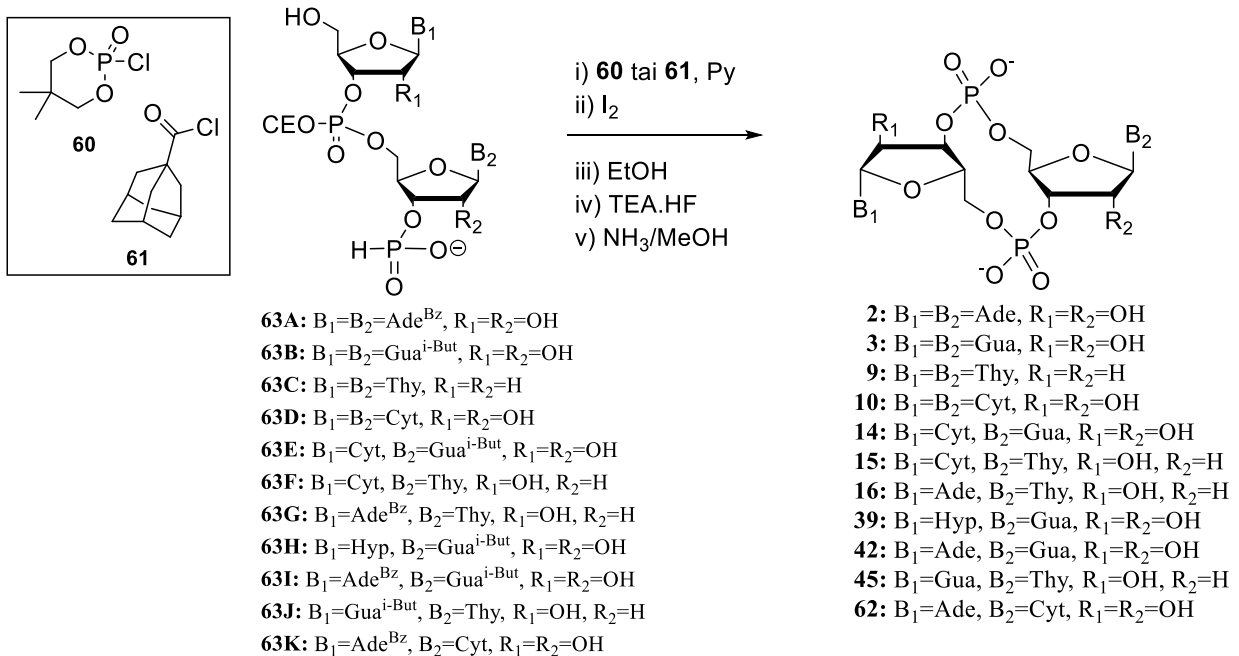
2.2.5.3.2. Syklisaatio ja suojaryhmien poisto

Kun syklisaatiossa hyödynnetään vetyfosfonaattimenetelmää, on reaktiossa käytettävä kondensoivaa reagenssia sekä hapetusreagenssia, joista jälkimmäinen on pääasiassa jodi. Yleisimmin pyridiinissä tehtävässä reaktiossa muodostuu väliaikainen anhydridi liuoksessa olevan 5,5-dimetyyli-2-okso-2-kloori-1,2,3-deoksifosforinaanin (DMOCP, **60**) tai adamantyylikloridin (**61**) vaikutuksesta. Edellä mainitut kaksi yhdistettä ovat käytetyimmät fosfonaattiyhdisteiden syklisaatiossa.

Anhydridin hapettaminen jodilla tuottaa lähtöaineesta riippuen joko suojatun, syklisen dinukleosidimono fosfaatin tai dinukleosidifosforoditioaatin. Lopuksi yhdisteen suojaryhmät poistetaan, ja saadaan haluttu lopputuote. Puhtailla reagensseilla saannot voivat olla jopa yli 70%.

Vetyfosfonaattimenetelmällä on Jones työryhmineen valmistanut yksitoista erilaista syklistä dinukleosidimono fosfaattia: c-di-AMP (**2**), c-di-GMP (**3**), c-di-TMP (**9**), c-di-CMP (**10**), c-CpGp (**14**), c-CpTp (**15**), c-ApTp (**16**), c-GpIp (**39**), c-ApGp (**42**), c-GpTp (**45**) ja c-ApCp (**62**) (KAAVIO 23).²⁶

Yhdisteen **63** syklistaatio on toteutettu pyridiinissä DMOCP:n tai adamantyylikloridin läsnäollessa. Reaktion nopeus on suurempi käytettäessä DMOCP:tä, saannot taas havaittiin suuremmiksi adamantyylikloridilla. Syklinen yhdiste on tämän jälkeen hapetettu jodilla. Isobutyryyli-suojaryhmät on poistettu etanolissa, syanoetyyliryhmät TEA•HF-liuoksella ja bentsoyyliryhmät ammoniakki-metanoliliuoksella (1:1). Lopputuotteen saannot olivat 58-76%, joista korkein oli adamantyylikloridin aktivoimalla yhdisteellä **2**.



KAAVIO 23. Syklistaatio vetyfosfonaattimenetelmällä.

2.3. Tukirankamenetelmä

Vähiten käytetty, muista kemiallisista synteesityypeistä eroava vaihtoehto on nimeltään tukirankamenetelmä. Menetelmässä valmistetaan eräänlainen syklinen sokeri-fosfaatti-tukiranka, johon haluttu nukleoemäs liitetään.^{8,9} Vaikka menetelmä mahdollistaa useiden syklisten (3',5')-dinukleotidien valmistamisen, on sen haittapuolena rajoitettu lopputuotteiden määrä.

Tukirankaan ei ole mahdollista ei liittää kahta eri nukleoemästä, joten menetelmä soveltuu ainoastaan symmetrisille dinukleotideille, kuten c-di-GMP. Tukirankamenetelmä on toistaiseksi ainoa, jolla on valmistettu syklisen dinukleosidimono fosfaatin teofylliinijohdannainen, c-di-YMP (**64**).

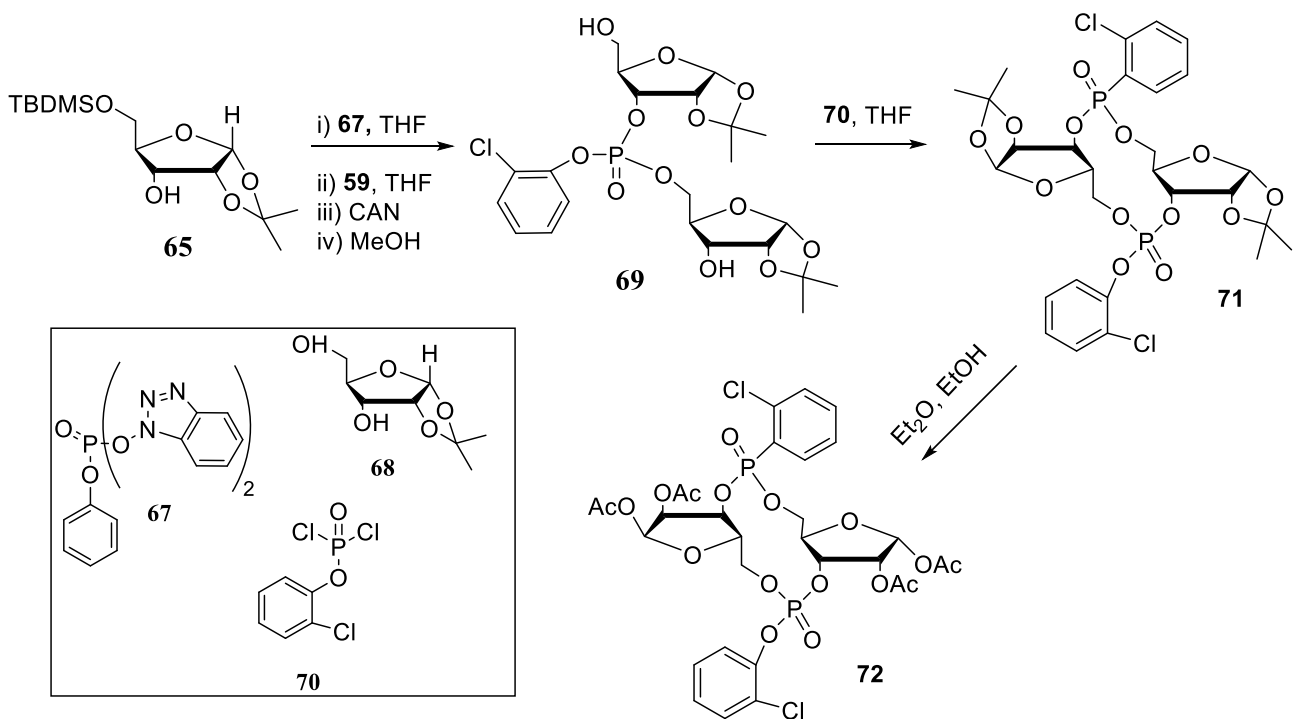
Menetelmän kehittäjä, Giesen työryhmä on raportoinut neljän syklisten dinukleosidimonofosfaatin synteesin tukirankamenetelmällä. Nukleoemäksinä ovat toimineet *iso*-butyryylisuojuattu guaniini (Gua^{i-But}) ja adeniini (Ade^{i-But}), 2-(4-nitrofenyyli)etyyliryhmällä suojuattu urasiili (Ura^{NPE}) sekä suojaamaton 7-β-D-ribofuranosyyli-teofylliini.

Tymiinin N¹- ja teofylliinin N⁷-asemien suojaamista ei tarvittu, sillä reaktion haluttiin toteutuvan näihin asemiin. Guaniinin, adeniinin ja urasiilin NH₂-ryhmä vaati suojauksen, jotta alkylaatio N⁹-asemaan toteutui N⁷-aseman sijasta.¹

2.3.1. Syklisten tukirangan valmistaminen

Giesen työryhmä on fosforyloinut TBDMS-suojuatun ribofuraanosin **65** 2-kloorifenyyli-*O,O*-bis (1-bentsotriatsolyyli)fosfaatilla (diOBT, **67**) tetrahydrofuraanissa (THF). Fosforyloinnin jälkeen tuote on liitetty yhteen suojaamattoman ribofuraanosin **68** kanssa. Tuotteena saadun suojuatun dinukleotidin TBDMS-suojaryhmät poistettu ceriumammoniumnitraatilla (CAN) metanolissa. Reaktio tuottaa diribosidimonofosfaatin (**69**).

Yhdisteen **69** syklistaatio on tehty tetrahydrofuraanissa 2-kloorifenyyylifosforidiklooriesterin (**70**) läsnä ollessa. Tuotteena saadun suojuatun syklisten yhdisteen **71** asetaalisuojaryhmät on korvattu asetaattisuojuaryhmillä käsittelemällä yhdistettä etikkahappoanhydridillä etikkahapossa. Lopputuotteena on saatu syklinen tukirankayhdiste (**72**) (KAAVIO 24).



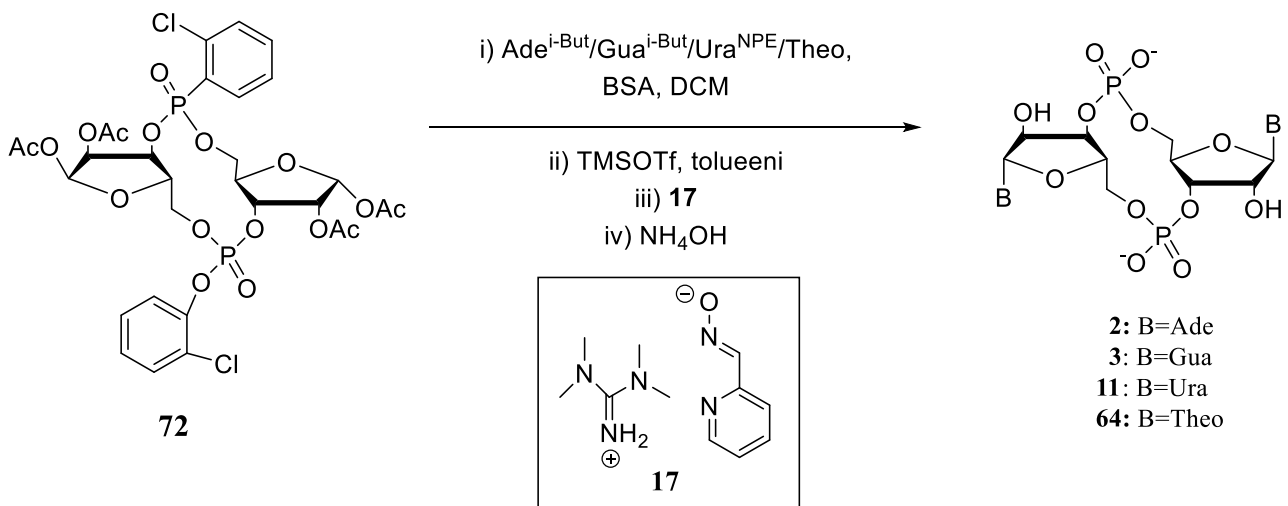
KAAVIO 24. Syklisten tukirangan valmistaminen.

2.3.2. Emäksen liittäminen tukirankaan

Liitettävä nukleoemäs luotetaan dikloorimetaaniin (DCM) *N,O*-bis(trimetyylisilyyli)asetamidin (BSA) ja tukirankayhdisteen (**72**) läsnä ollessa. Haihduttamisen jälkeen seos on liuotettu tolueniin trimetyylisilyylitriplaatin (TMSOTf) toimiessa katalyyttinä, jolloin tuotteena saadaan suojattu syklinen dinukleosidimono fosfaatti.⁸

Tukirankayhdisteen kloorifenyyl- ja uridiinin NPE-suojaryhmät on poistettu käsittelemällä yhdistettä *syn*- N^1, N^1, N^3, N^3 -tetrametyyliguanidinium-*syn*-pyridiini-2-karboksaldoksimaatilla (**17**) ammoniumhydroksidissa. Guaniinin ja adeniinin isobutyryyli- (*i*-But-) ja tukirankayhdisteen asetylisuojaryhmät on poistettu käsittelemällä yhdistettä ammoniakki-metanoliliuoksella (1:1).

Käsittelyn ja puhdistamisen jälkeen on halutuksi lopputuotteeksi saatu *c*-di-AMP (**2**), *c*-di-GMP (**3**), *c*-di-TMP (**9**), *c*-di-UMP (**11**) ja *c*-di-YMP (**64**) (KAAVIO 25).



KAAVIO 25. Emäksen liittäminen tukirankaan.

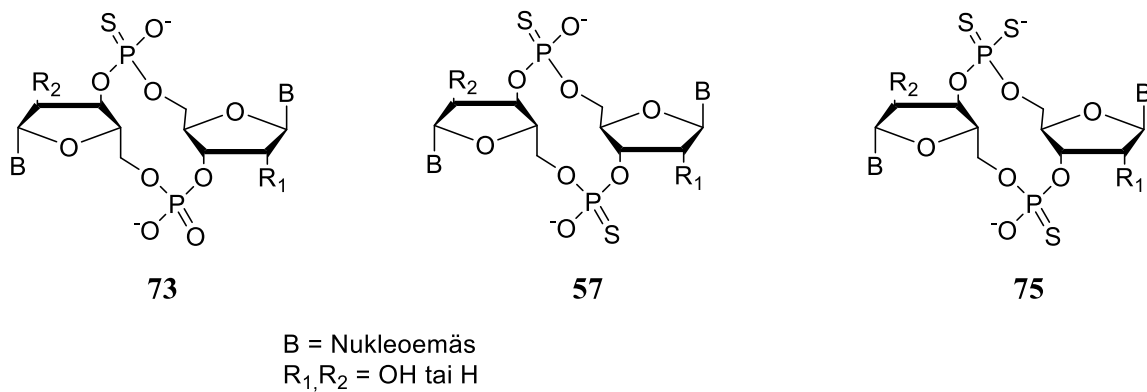
3. Modifioitujen syklisten dinukleosidimonofosfaattien valmistaminen

Sykliset dinukleosidimono fosfaatit ovat rengasrakenteisia kahden ribonukleotidin yhdistettä, joissa nukleotidit ovat kiinnittyneet toisiinsa kahdella intramolekulaarisella fosfodiesterisidoksella. Tälle sitoutumiselle rakentuu 12-jäseninen rengasmaisen sokeri-fosfaattitukiranka.⁸ Sokeri on pääasiassa aina riboosi. Valmistettaessa analogeja, voidaan modifioida joko yhdisteen fosfaatti-, emäs- tai sokeriosaa. Raportoiduissa synteeseissä on nukleoemäksenä pääasiassa toiminut guaniini.¹

3.1. Fosfaattimodifioidut analogit

Syklisen dinukleosidimonofosfaatin fosfaattiosaa modifioimalla saadaan valmistettua fosforotioaatteja, joissa yksi tai useampi fosfodiesterin silloittumaton happiatomi korvataan rikkiatomilla. Rikkiatomien määrästä riippuen analogituotteena saadaan joko syklinen dinukleosidifosforomonotioaatti (73), dinukleosidifosforoditioaatti (57) tai dinukleosidifosforotritioaatti (75) (KUVA 5).

Sykliset diguanosiinifosforotioaatit ovat olleet tutkijoiden mielenkiinnon kohteina, sillä ne ovat biologialtaan samankaltaisia kuin *c*-di-GMP. Lisäksi syklisen fosforotioaattien kemia on hyvin lähellä syklisen dinukleosidimonofosfaattien kemiaa, joten hyväksi koetut Hayakawan ja Jonesin menetelmät toimivat soveltaen myös tässä tapauksessa.



KUVA 5. Syklisen di-nukleosidifosforotioaattien rakennekaavat.

3.1.1. Sykliset diguanosiinifosforomonotioaatit

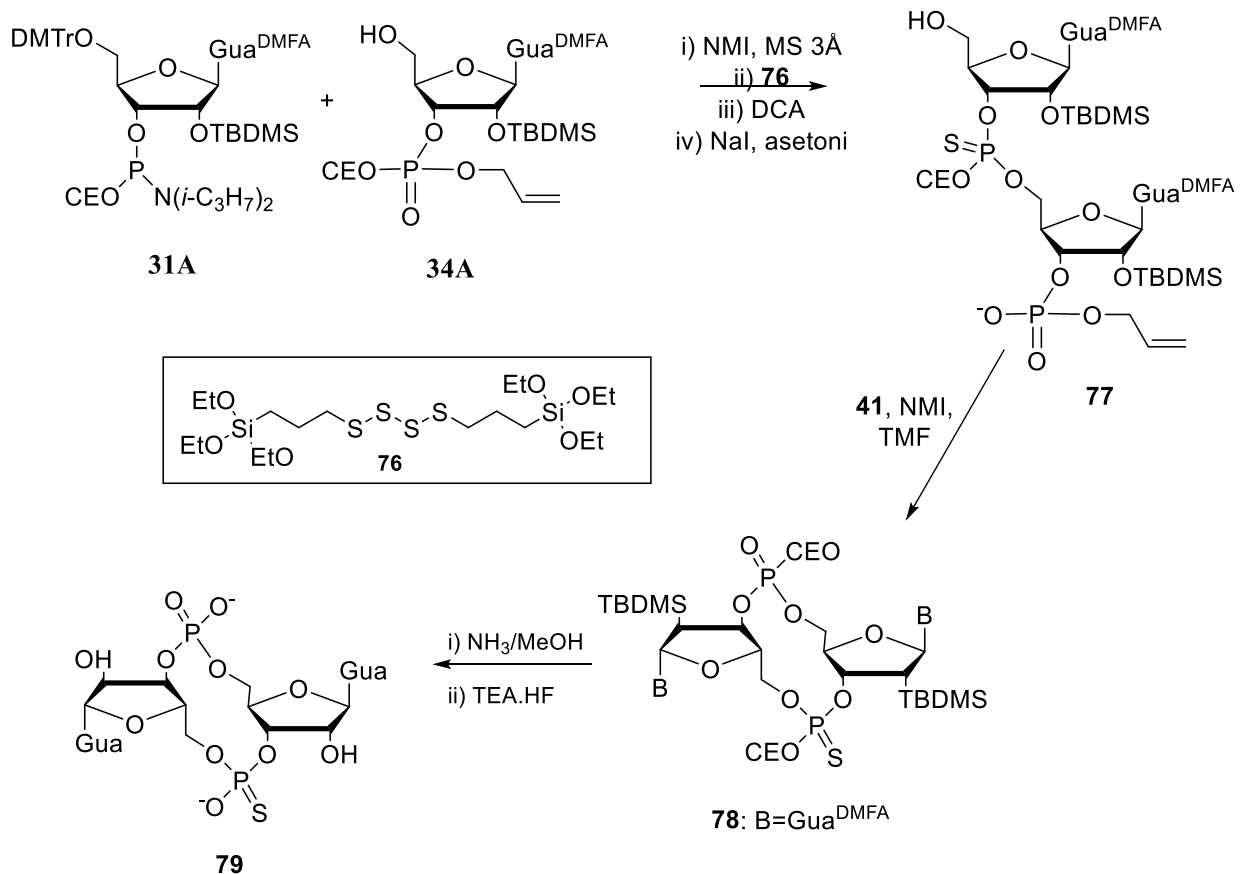
Kirjallisuudesta löytyy neljä synteesiesimerkkiä *c*-di-GMP:n (3) fosforomonotioaattianalogien valmistamiseksi, mitkä käydään seuraavaksi läpi omina kappaleinaan. Fosforotioaattien tapauksessa merkitään fosfotriesterisidokseen liittynyttä rikkiatomi kirjaimella *s*. Esimerkiksi syklinen diguanosiinifosforomonotioaatti merkitään *c*-GpsGp.

Hyodon¹⁴ ja Yanin²⁷ työryhmät ovat valmistaneet diastereomeerien seoksia ja Rossin⁷ työryhmän raportti käsittelee diastereomeerisesti puhtaiden *R_p*- ja *S_p*-fosforomonotioaattien valmistusta fosfotriesterimenetelmällä, jossa *R_p*- ja *S_p*-diastereomeerit ovat erotettu toisistaan. Zhaon²⁸ työryhmä hyödyntää stereoselektiivistä fosfonaattimenetelmää.

Hyodon ja Yanin tioaattidiastereomeerien synteesi noudattaa sovellettuna Hayakawan fosfotriesterimenetelmää (s.14.). Synteesin lähtöaineina toimivat DMFA-suojattu guanosiini-3'-fosforamidiitti (**31A**) ja DMFA-suojattu guanosiini-3'-(allyyli, 2-syanoetyyli)fosfaatti (**34A**) liitetään yhteen 3Å molekkyliseulojen kuivaaman *N*-metyyli-imidatsolin (NMI) läsnä ollessa.^{14,27}

Rikkiatomi liitetään hapettamalla fosfiittia *bis*-(3-trietoksisilyylipropyyli)tetrasulfidilla (TEST, **76**). Hapettamisen jälkeen väliaikainen DMTr-suojaryhmä poistetaan dikloorietikkahapon vesiliuoksella ja allyylisuojarahmä natriumjodidissa refleksoiden.

Tuotteen **77** syklistaatio toteutetaan tetrahydrofuraanissa, TPSCIn (**41**) aktivoimana ja NMI:n läsnä ollessa. Lopuksi syklisen yhdisteen **78** silyyli- ja syanoetyylisuojarahmät poistetaan käsittelemällä yhdistettä ammoniakki-metanoliliuoksella (1:1). Lopputuotteena saadaan syklinen di-guanosiinifosforomonotioaatti, *c*-GpsGp (**79**) *R*_P- ja *S*_P-diastereomeerien seoksena (KAAVIO 26).

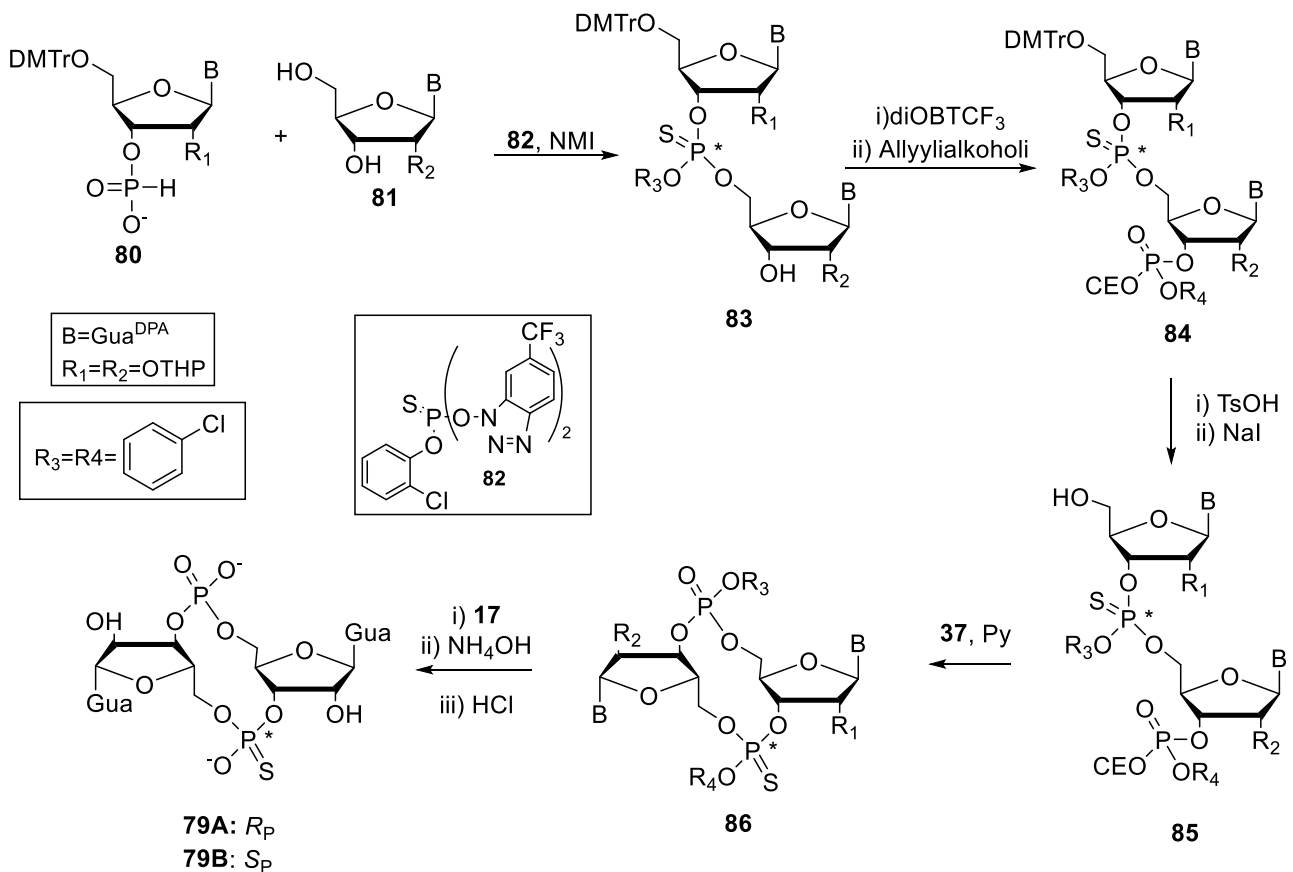


KAAVIO 26. *c*-GpsGp:n *R*_P- ja *S*_P-diastereomeerien synteesi.

Rossin työryhmä on valmistanut HPLC:llä erotetut, puhtaat c-GpsGp:n (**79**) R_P - ja S_P -stereomeerit (KAAVIO 27).⁷ Lähtöaineina käytetyt DMTr-, dihydroksifenyylialaniini- (DPA-) ja THP-suojattu guanosiinjohdannainen **80** ja THP-suojattu guanosidi **81** liitettiin yhteen fosforylaatiotekijän **82** ja N -metyyli-imidatsolin (NMI) läsnä ollessa, jolloin syntyi tuotteena diastereomeeri (**83**).

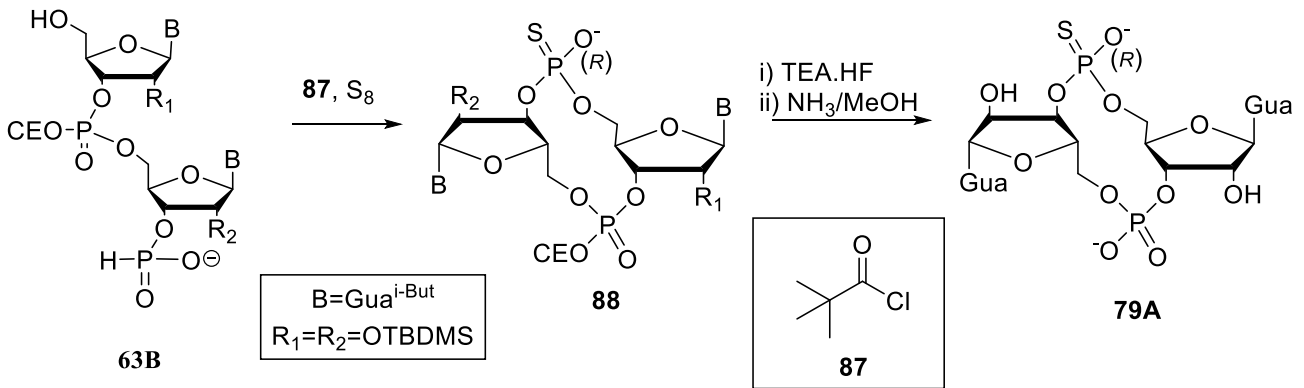
Tämän jälkeen yhdisteen **83** hydroksyyliiryhmä 3'-asemassa fosforyloitiin 2-kloorifenyyl- O,O -bis(1-(6-trifluorometyyli)-bentsotriatsolyyli)fosfaatilla (diOBTCF₃) allyylialkoholissa. Yhdisteen **84** väliaikaiset DMTr- ja allyylisuojarahmät poistettiin tosyylihapolla (TsOH) ja natriumjodidilla.

Tuotteen **85** syklistaatio toteutettiin pyridiinissä TPSNT:n (**37**) aktivoimana, jonka jälkeen suojarahmien poisto toteutettiin kaavion 15 (s.19) mukaisesti. 2-kloorifenyyliryhmät poistettiin N^1,N^1,N^3,N^3 -tetrametyyliguanidinium-syn-pyridiini-2-karboksaldoksimaatilla (**17**) pyridiinissä, asyylisuojarahmät NH₄OH-liuoksella ja tetrahydropyranyyliiryhmät (THP-) väkevällä suolahapolla. Lopputuotteina saatiin puhtaat c-GpsGp:n R_P - ja S_P -stereomeerit (**79A** ja **79B**), 48% ja 55% saannoilla.



KAAVIO 27. Syklisten dinukleosidimono fosfaattien R_P - ja S_P -fosforomontioaattianalogien synteesi.

Zhaon työryhmä on raportoinut c-GpsGp:n R_P -diastereomeerin (**79A**) synteesin.²⁸ Syklisaatiolla valmistetun vetyfosfonaattidiesterin sulfurisaatio antaa tuotteena R_P -diastereomeerin. Synteesin lähtökohtana on ollut Jonesin menetelmä, jota soveltaen suojattu yhdiste **63B** syklisoitiin pivaloyylikloridilla (**87**) ja S_8 -hapetettiin. Tämän jälkeen yhdisteen (**88**) isobutyryyliryhmät poistettiin metyyliamiinilla vedessä ja silyyliryhmät TEA•HF-liuoksella (KAAVIO 28).



KAAVIO 28. Stereoselektiivinen syklisaatio c-GpsGp:n R_P -stereomeerille vetyfosfonaattimenetelmällä.

3.1.2. Sykliset diguanosiinifosforoditioaatit

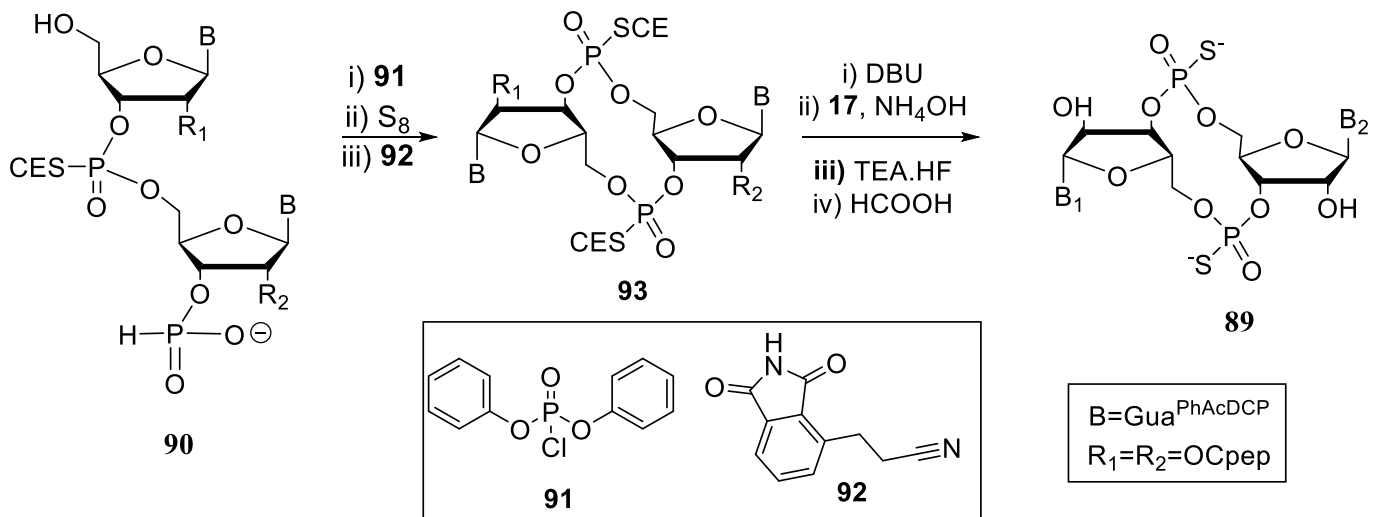
Ottaen huomioon, että fosforotioaatteja on valmistettu ainoastaan käyttäen nukleoemäksenä guaniinia, on symmetriasta johtuen olemassa vain kolme erilaista fosforoditioaatin diastereomeeria: $[R_P, R_P]$, $[S_P, S_P]$ ja $[R_P, S_P] = [S_P, R_P]$.¹ Paljon käytetty menetelmä syklisten diguanosiinifosforoditioaattien (c-GpsGps, **89**) valmistamiseen on Jonesin synteesi, jota seuraa tuotteen syklisaatio vetyfosfonaattimenetelmällä.²⁵ Menetelmä on tuottanut joko diastereomeerien seoksen tai puhtaat diastereomeerit, jotka on HPLC:llä erotettu.

Kolmen diastereomeerin seos sykliselle diguanosiinifosforoditioaatille (**89**) on raportoitu käyttäen hyväksi vetyfosfonaattimenetelmää.²⁷ Lähtöaineena on käytetty suojattua lineaarista guanosiiinifosforomonotioaattidimeeriä **90**, jonka syklisaatio on toteutettu difenyylikloorifosfaatin (**91**) avulla. Väliaine on tämän jälkeen S_8 -hapetettu, S -(2-syanoetyyli)ftaalimidin (**92**) toimissa rikin siirtäjänä. Nukleoemäksenä toimiva guaniini on suojattu kolmella suojaryhmällä, jotta vältetään sivureaktioilta rikin siirtämisen aikana.

Syklisaation jälkeen poistettiin ensin yhdisteen **93** syanoetyyliryhmät 1,8-diatsabisyklo[5,4,0]undek-7-eenin (DBU) avulla. Tämän jälkeen poistettiin asetyyli-, 2,5-dikloorifenyyl- (DCP-) ja

fenyylisuojaryhmät N^1, N^1, N^3, N^3 -tetrametyyliguanidinium-syn-pyridiini-2-karboksaldoksimaatilla (**17**) ammoniumhydroksidissa.

Lopuksi vielä poistettiin 1-(4-kloorifenyyl)-4-etoksi-piperidin-4-yyli-ryhmä (Cpep-) TEA•HF-liuoksella happamissa olosuhteissa. Lopputuotteena on saatu c-GpsGps:n (**89**) [R_P, R_P]-, [S_P, S_P]- ja [R_P, S_P]-stereomeerien seos (KAAVIO 29).

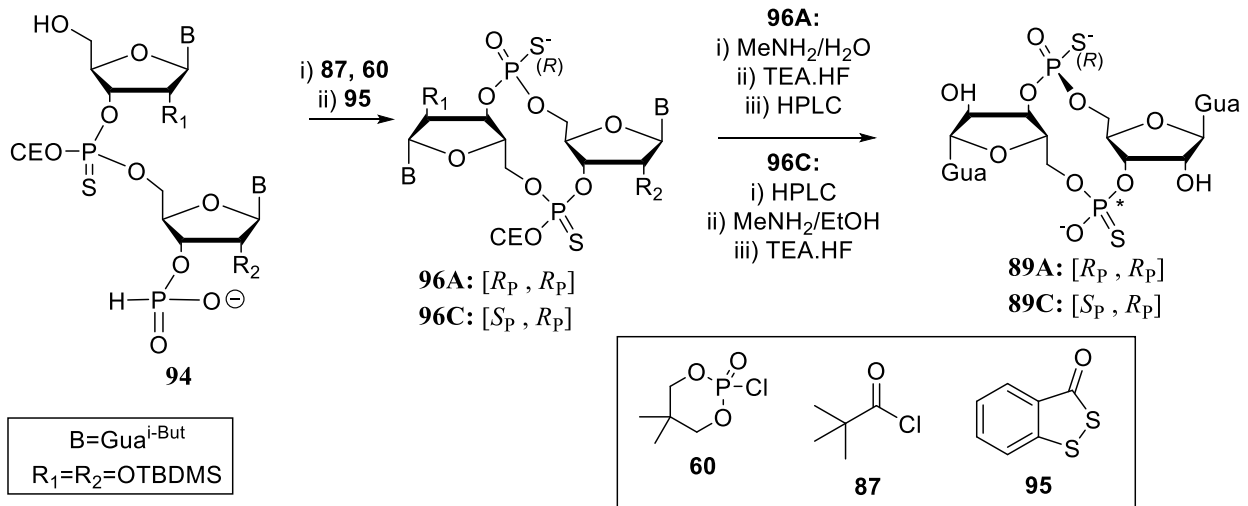


KAAVIO 29. Synteesi c-GpsGps:n [R_P, R_P]-, [S_P, S_P]- ja [R_P, S_P]-stereomeerien seokselle

Jones työryhmineen sovelsi yhden vaiheen synteesiä valmistaen kaksi c-GpsGps:n stereomeeria.²⁵ Lähtöaineena on käytetty CE-, TBDMS- ja isobutyryylisuojattua lineaarista guanosiini-fosforomonotioaattidimeeriä **94**, jonka syklistaatio toteutettiin pivaloyylikloridilla (**87**) DMOCP:n (**60**) läsnä ollessa ja sulfurisatio 3-*H*-1,2-bentsoditiol-3-onin (**95**) avulla.

Syklisaation jälkeen stereomeeriseoksen **96** isobutyryyliryhmät poistettiin metyliamiinilla vedessä ja silyyli- sekä syanoetyyliryhmät TEA•HF-liuoksella. [R_P, R_P]-stereomeeri erotettiin HPLC:n avulla. [S_P, R_P]-stereomeerin tapauksessa erottelu on tehty ensin, jonka jälkeen isobutyryyliryhmät on poistettu metyliamiinilla etanolissa.

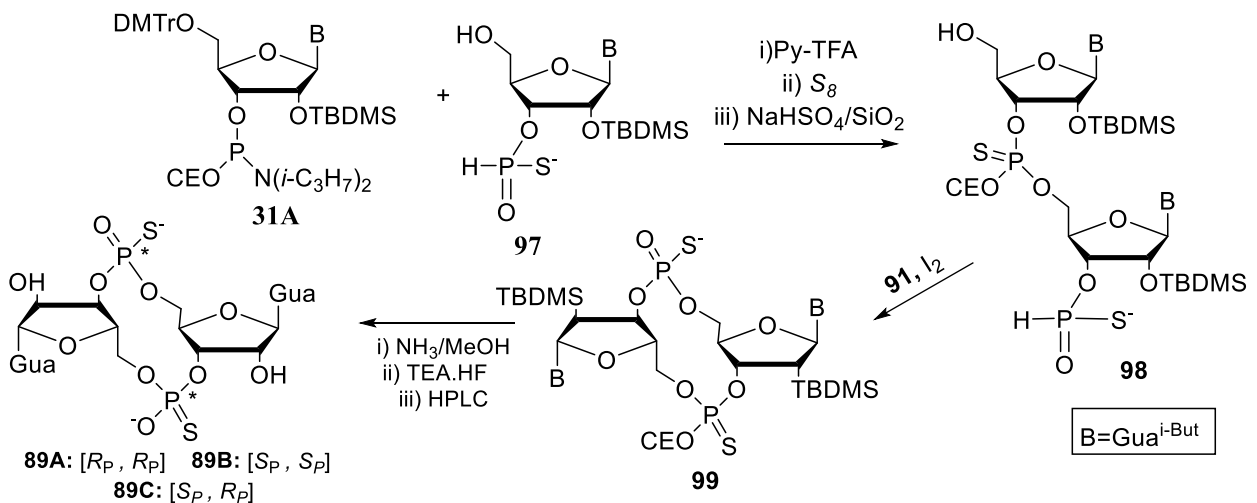
Lopuksi on poistettu silyyli- sekä syanoetyyliryhmät edellä esitetyllä tavalla. Lopputuotteina saatiin syklisen di-guanosiinifosforoditiaatin [R_P, R_P]-stereomeeri (**89A**) ja [S_P, R_P]-stereomeeri (**89C**), 56% ja 61% saannoilla (KAAVIO 30).



KAAVIO 30. Synteesi c-GpsGps:n [R_P, R_P]- ja [S_P, R_P]-stereomeereille.

Zhaon työryhmä on valmistanut ja erotellut c-GpsGps:n (**89**) kaikki kolme stereomeeria, käyttäen hyväksi fosforamidiitti- ja fosfonaattimenetelmien yhdistelmää.²⁸ Aluksi DMTr-, CE- ja TBDMS-suojattu guanosiini-3'-fosforamidiitti (**31A**) ja TBDMS-suojattu guanosiini-3'-tiofosfonaatti (**97**) liitettiin yhteen pyridiini-trifluorietikkahapossa (Py-TFA). Välituote on tämän jälkeen S₈-hapetettu ja käsitelty NaHSO₄/SiO₂-liuoksella, jolloin syntyy lineaarinen dimeeri **98**.

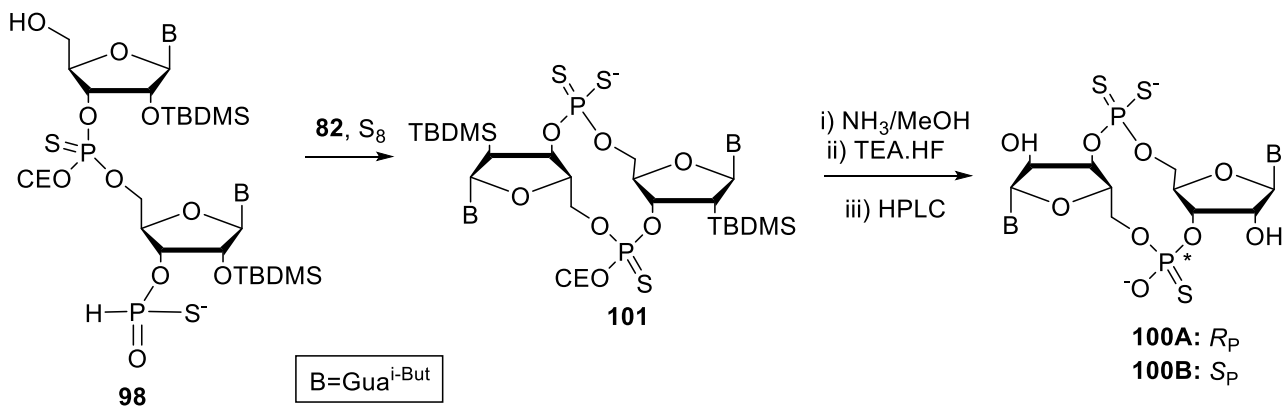
Yhdisteen **98** syklistaatio toteutettiin difenyylikloorifosfaatin (**91**) avulla, jodin toimiessa hapetusreagenssina. Muodostuneen yhdisteen **99** isobutyryyliryhmät poistettiin metyyliamiinilla vedessä ja TBDMS- sekä CE-ryhmät TEA•HF-liuoksella. Lopputuotteeksi saatiin HPLC:llä erotetut c-GpsGps:n (**89**) [R_P, R_P], [S_P, S_P] ja [S_P, R_P]-stereomeerit (KAAVIO 31).



KAAVIO 31. Synteesi c-GpsGps:n [R_P, R_P], [S_P, S_P] ja [S_P, R_P]-stereomeereille.

3.1.3. Sykliset diguanosiinifosforotritioaatit

Syklisen di-guanosiinifosforotritioaatin, *c*-GpsGpss (**100**) synteesi on toteutettu vain kerran.²⁸ Zhaon työryhmä sovelsi edellä esitettyä kolmen stereomeerin synteesiä, käyttäen lähtöaineena yhdistettä **98**. Syklisaatio toteutettiin tässäkin difenyylikloorifosfaatin (**82**) avulla, mutta hapetusreagenssina jodin sijasta käytettiin S₈:aa. Syklisaation jälkeen yhdisteen **101** suojaryhmät on vielä poistettu, lopputuotteeksi saatiin HPLC-erotetut *c*-GpsGpss:n (**100**) [*R*_P, *R*_P]- ja [*S*_P, *S*_P]-stereomeerit, 59% saannoilla (KAAVIO 32).



KAAVIO 32. Synteesi syklisen *c*-GpsGpss:n [*R*_P, *R*_P] ja [*S*_P, *S*_P]-stereomeereille.

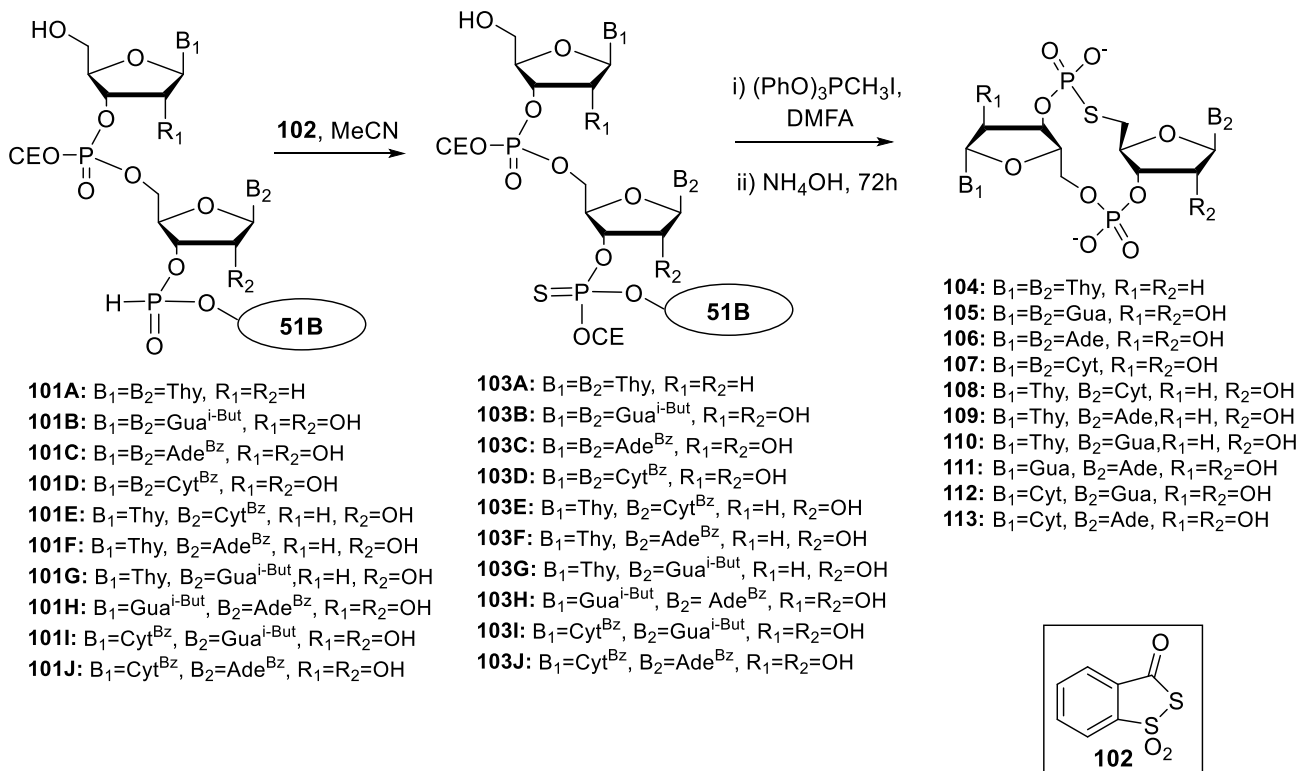
3.1.4. Sykliset dinukleosidifosfortiolaatit

Edellä käsitellyissä fosforotioaateissa C5'-asemassa happi toimii siltamolekyylinä. Puhuttaessa fosfortiolaatista siltamolekyylinä toimii hapen sijasta rikkiatomi, josta tässä tutkielmassa käytetään merkintää (5'S). Tiolaatteja on modifioitu myös emäs- ja sokeriosan suhteen.

Koolin ryhmä on valmistanut kymmenen erilaista syklisiä dinukleosidifosfortiolaattia.²⁹ Lähtöaineena on käytetty lineaarista suojattua nukleosidifosfonaattia **101**, jonka 3'-aseman fosfaatti on suojattu kiinteällä kantajalla **51B**. Rikitys toteutettiin Beaucagen reagenssilla eli 3-*H*-1,2-bentsoditiol-3-oni-1,1-diksidin (**102**) avulla asetonitriilissä.

Välituotteeksi saatu yhdiste **103** jodinoitiin (PhO)₃PCH₃I:llä, dimetyyliformamidin (DMFA) läsnä ollessa. Syanoetyyli-, bentsoyyli- ja iso-butyryyli-suojaryhmät sekä kiinteä kantaja poistettiin pitkällä NH₄OH-käsittelyllä. Lopputuotteiksi saatiin *c*-di-TMP^(5'S) (**104**), *c*-di-GMP^(5'S) (**105**), *c*-di-AMP^(5'S) (**106**), *c*-di-CMP^(5'S) (**107**), *c*-TpCp^(5'S) (**108**), *c*-TpAp^(5'S) (**109**), *c*-TpGp^(5'S) (**110**), *c*-GpAp^(5'S) (**111**),

c-CpGp^(5'S) (**112**) ja c-CpAp^(5'S) (**113**) (KAAVIO 33). Saannot vaihtelivat 37% ja 71% välillä, joista alhaisin yhdisteellä **110** ja korkein yhdisteellä **105**.



KAAVIO 33. Syklisten dinukleosidifosforotiolaattien synteisi.

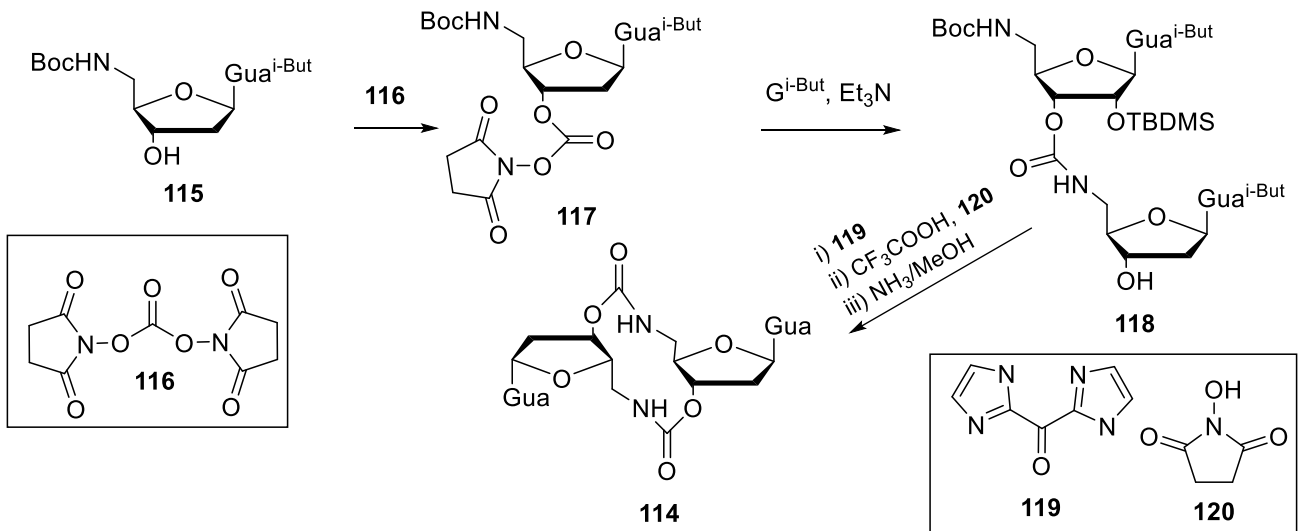
3.1.5. Bis-karbamaatit

Syklisiä dinukleotidi-*bis*-karbamaatteja on tutkittu erittäin vähän.¹ Yhdistetyypissä syklisen dinukleotidin kaksi fosfotriesterisidosta on korvattu isosteerisillä karbamaattisidoksilla.. Toistaiseksi ainut valmistettu *bis*-karbamaattianalogi on syklinen diguanosiini-*bis*-karbamaatti, c-Gd_{NHCO}Gd_{NHCO} (**114**).

Klinen³⁴ ryhmä valmisti yhdisteen käyttämällä lähtöaineena *tert*-butyylioksikarbonyyli- (Boc-) ja isobutyryylisuojaattua guanosiinijohdannaista **115**, jonka 3'-hydroksyyli-ryhmä korvattiin *N*-sukkinimidyylikarbonaattiryhmällä, *N,N'*-disukkinimidyylikarbonaatin (**116**) läsnä ollessa. Muodostunut nukleosidi **117** liitettiin yhteen suojatun guanosiinin (G^{i-But}) kanssa trietyyliamiinissa.

Lineaarisen karbamaatin **118** sykliisaatio toteutettiin karbonyyli-imidatsolin (**119**) toimissa aktivaattorina. BOC-suojaryhmä poistettiin trifluorietikkahapolla, *N*-hydroksisukkinimidin (**120**)

katalysoidessa reaktiota. Iso-butyryyliryhmät käsittelemällä yhdistettä $\text{NH}_3:\text{MeOH}$ (1:1)-liuoksella. Lopputuotteena saatiin $c\text{-Gd}_{\text{NHCO}}\text{Gd}_{\text{NHCO}}$ (**114**) 29% saannolla (KAAVIO 34).



KAAVIO 34. Syklisen diguanosiini-*bis*-karbamaatin valmistaminen.

3.2. Emäs-modifioidut analogit

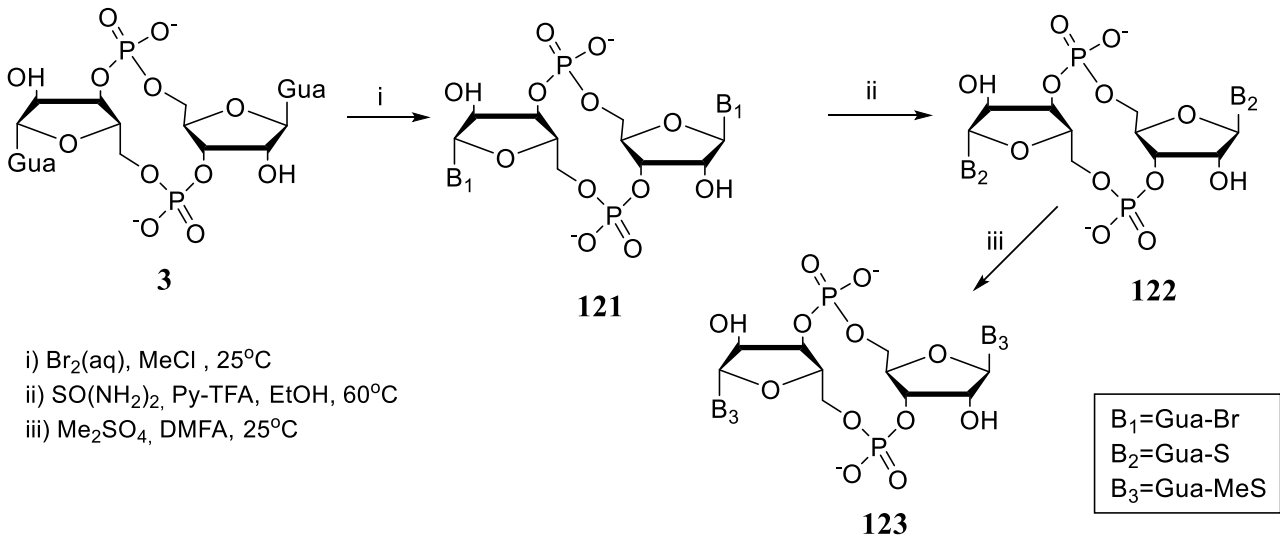
Elizabeth Veliath on väitöskirjatyönsä kokeellisessa osiossa valmistanut viisi erilaista $c\text{-di-GMP}$:n (**3**) emäsmodioitua analogia.³¹ C8-aseman emäsosaan on liitetty substituentiksi liitetty bromi-, tio-, metyylitio-, fenyyl- ja asetofenyyliryhmät. Analogit valmistettiin hemisynteisillä guaniinitasapainon tutkimista varten. Hemisynteesi on yksinkertainen ja edullinen tapa valmistaa kaupallisesta yhdisteestä uusia analogeja modifioimalla yhdisteen tiettyä rakenneosaa.

3.2.1. Bromi-, tio- ja metyylitioanalogien valmistus

Syklisen diguanosiinimono fosfaatin bromi-, tio- ja metyylitioanalogien valmistaminen toteutettiin kolmivaiheisella synteesillä. Veliathin työryhmä aloitti synteesin käyttämällä lähtöaineena suojaamatonta $c\text{-di-GMP}$:tä (**3**), jonka emäsosan C8-aseman bromaaminen suoritettiin bromin vesiliuoksessa huoneenlämpötilassa. Reaktio keskeytettiin syklohekseenillä, jonka jälkeen raakatuote uutettiin metyleenikloridiin. Silikageelipuhdistuksen jälkeen saatiin lopputuotteena syklinen dibromiguanosiinimono fosfaatti, $c\text{-di-}^8\text{BrGMP}$ (**121**) 82% saannolla.

Seuraavaksi bromianalogin annettiin reagoida tioureaan kanssa etanolin vesiliuoksessa, pyridiini-trifluoretikkahapon (Py-TFA) toimiessa aktivaattorina. Puhdistamisen jälkeen saatiin lopputuotteena syklinen ditioguanosiinimono fosfaatti, c-di-^{8SH}GMP (**122**) 71% saannolla.

Synteesin kolmannessa vaiheessa tioanalogi metyloitettiin lisäämällä siihen kuivaa dimetyyliformamidia (DMFA) ja dimetyylisulfaattia. Lopputuotteena saatiin syklinen dimetyylitioguanosiinimono fosfaatti, c-di-^{8MeS}GMP (**123**) 73% saannolla (KAAVIO 35).

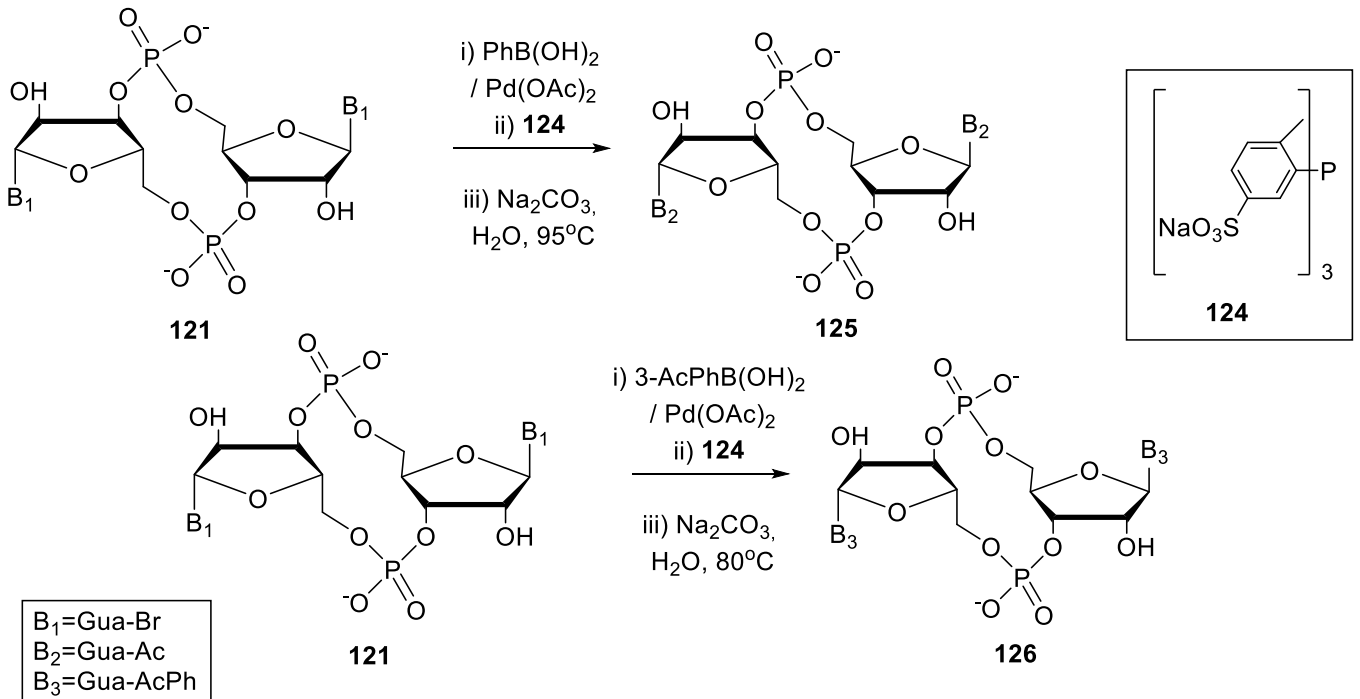


KAAVIO 35. Syklisen diguanosiinimono fosfaatin bromi-, tio-, ja metyylitioanalogien synteesit.

3.2.2. Fenyyl- ja asetofenylianalogien valmistus

Suzukin asylointireaktiota³² soveltaen Veliath työryhmineen antoi bromianalogin **121** reagoida boorifenyylihapossa, tris-(4,6-dimetyyli-3-sulfonaattifenyyl)fosfiinin (TXPTS, **124**) toimiessa aktivaattorina. Palladiumasetaatin katalysoiman reaktion asylointituote liuotettiin Na₂CO₃:n vesiliuokseen, jolloin lopputuotteena saatiin syklinen difenyyliguanosiinimono fosfaatti, c-di-^{8Ph}GMP (**125**) 67 % saannolla.

Kun bromianalogin **121** annettiin reagoida 3-asetyyli-boorifenyylihapossa TXPTS:n aktivoimana ja palladiumasetaatin katalysoimana, saatiin puhdistettuna lopputuotteena syklinen diasetofenyyliguanosiinimono fosfaatti, c-di-^{8AcPh}GMP (**126**) 75% saannolla. Synteesin lämpötila pidettiin alempana kuin fenylianalogin tapauksessa, jotta välttyttiin liialliselta hydrolyysiltä (KAAVIO 36).



KAAVIO 36. Syklisen diguanosiinimono fosfaatin fenyyl- ja asetofenyylianalogien synteesi.

3.3. Sokeri-modifioidut analogit

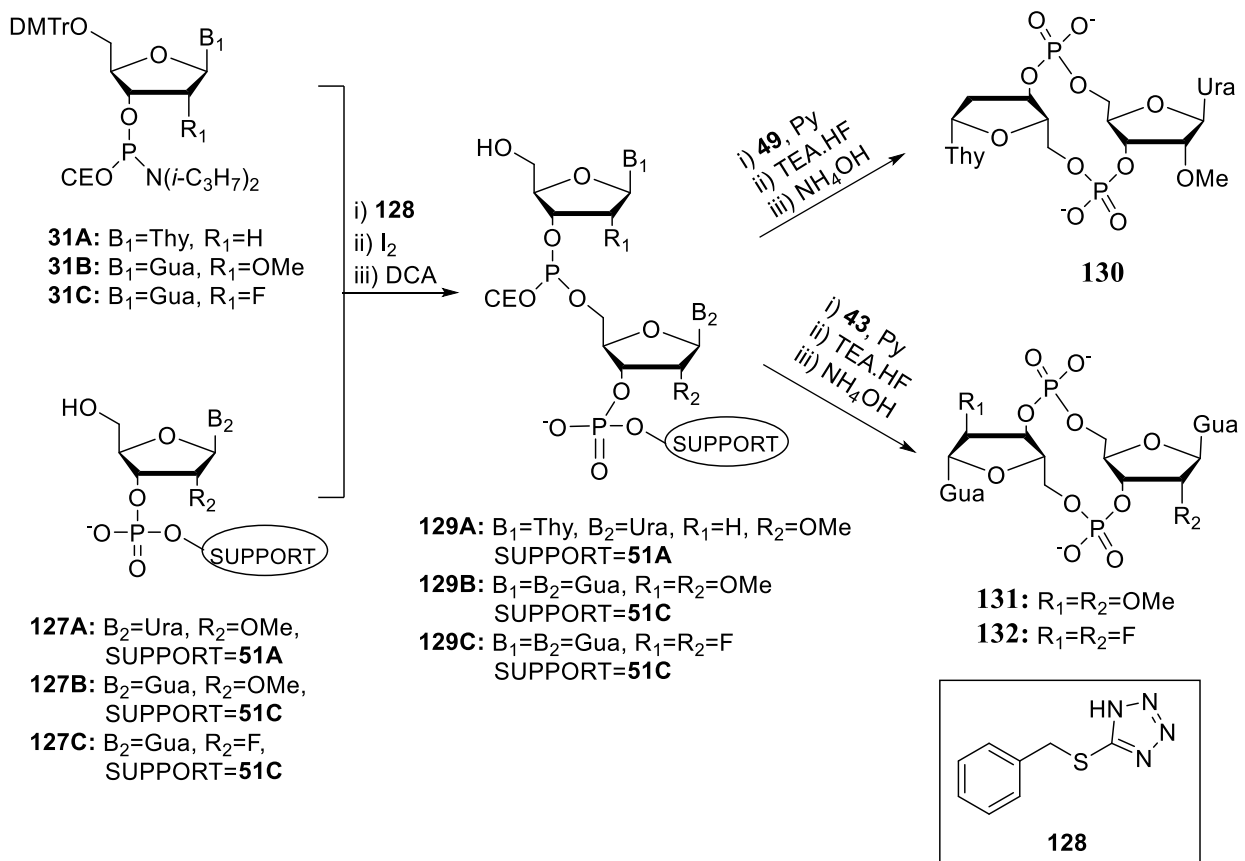
Sokeri-modifioiduissa analogeissa on sokeriosan 2'-asemaan liitetty funktionaalinen ryhmä. Kirjallisuudessa raportoidut funktionaaliset ryhmät ovat joko metyyli- tai fluoriryhmä.¹ Friedenin³³ työryhmä on valmistanut metyylisubstituoitun c-TpUp:n ja Shanananin³⁴ työryhmä c-di-GMP:n metyyli- ja fluorijohdannaiset (KAAVIO 37).

Molemmat työryhmät hyödynsivät syklisaatiota kiinteällä kantajalla (s.20). Lähtöaineena on käytetty kaupallista suojattua fosforamidiittia **31** ja suojattua nukleosidi-fosfaattia **127** kiinteällä kantajalla. Frieden käytti kiinteää kantajaa **51A** ja Shananan vastaavasti **51C**:tä. Fosfaatin sokeriosan 2'-asema oli metyloitu tai fluorattu.

Lähtöaineet liitettiin yhteen 5-bentsyylimerkaptotetrasolin (**128**) läsnä ollessa ja hapetettiin jodilla. Väliaikaiset DMTr-suojaryhmät poistettiin DCA-liuoksella, jolloin saatiin nukleotidi-dimeeri **129**. Reaktin seuraavassa vaiheessa hyödynnettiin fosfotriesterimenetelmää, kun dimeeri syklisoitiin kiinteässä faasissa.

Dimeerin **129** syklisaatio toteutettiin 1-(mesityleenisulfonyyli)-3-nitro-1,2,4-triatsolin (MSNT, **49**) avulla pyridiinissä. Lopuksi poistettiin syanoetyyliryhmät TEA•HF-liuoksella ja kiinteät kantajat

väkevällä NH_4OH -käsittelyllä. Lopputuotteena saatujen yhdisteiden $c\text{-TpUp}_2'\text{OMe}$ (**130**), $c\text{-di-GMP}_2'\text{OMe}$ (**131**) ja $c\text{-di-GMP}_2'\text{F}$ (**132**) saannot olivat melko alhaiset: 28%, 34% ja 29%.³⁴



KAAVIO 37. Syntesi $c\text{-TpUp}_n$ ja $c\text{-di-GMP}_n$:n metyyli- ja fluorijohdannaisille.

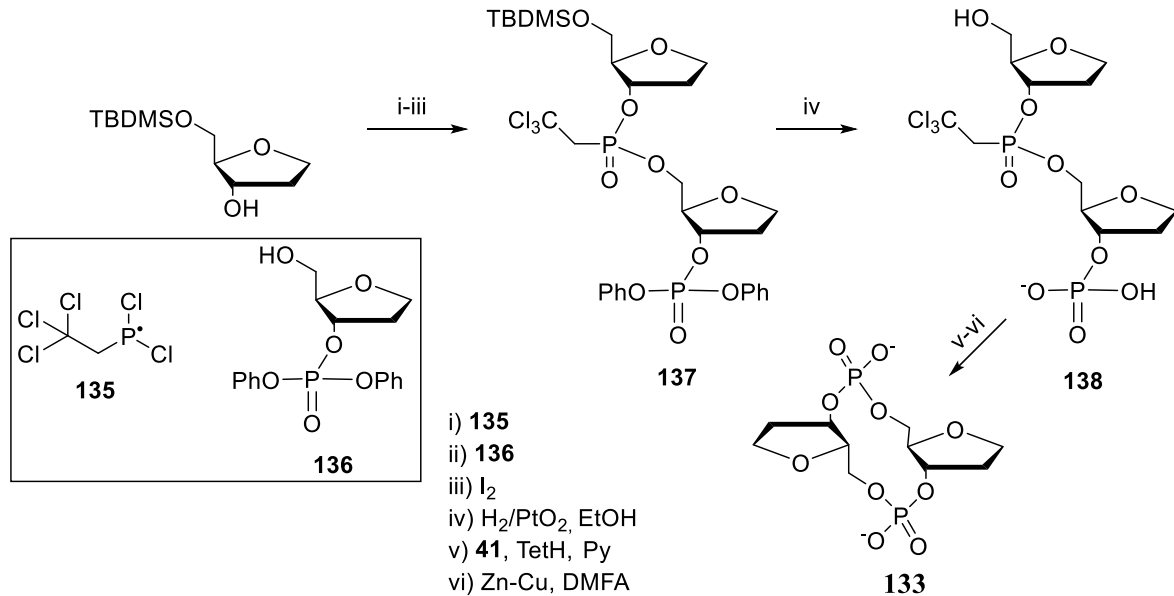
3.4. Analogit ilman nukleoemästä

Tuoreimmat julkaisut syklistä dinukleosidimonofosfaateista ovat käsitelleet analogityyppiä, jossa esiintyy vai sokeri-fosfaatti-tukiranka ilman nukleoemästä (engl. abasic analogue).³⁵ Chenaultin työryhmä on esittänyt syklisen (3',5')-bis(1,4-anhydro-2-deoksi-D-erytropentitoli)-3-fosfaatin (**133**) synteesin (KAAVIO 38).

Lähtöaineena on käytetty TBDMS-suojattua nukleosidia **134**, joka on liitetty yhteen 2,2,2-trikloorietyylifosfotrikloridiitin (**135**) kanssa tetrahydrofuraanissa. Reaktioastiaan on sitten lisätty 1,4-anhydro-2-deoksi-D-erytro-pentitol-3-difenyylifosfaattia (**136**), ja välituotteena syntynyt fosfiittiyhdiste hapetettiin jodilla lineaariseksi fosfaattidimeeriksi (**137**).

Yhdisteen **137** vuorokauden kestänyt vedytys platinaoksidin avulla etanolissa poisti silyyli- ja fenyyliryhmät, muodostaen lineaarisen dimeerin **138**. Syklisaatio toteutettiin pyridiinissä, TPSCl:n (**41**) aktivoimana, 1*H*-tetratsolin (TetH) läsnä ollessa.

Lopuksi trikloorietyyli- (CCl₃) suojaryhmä poistettiin sinkin ja kuparin seoksella kuivan dimetyyliformamidin (DMFA) läsnä ollessa. Lopputuotteena saatiin syklinen (3',5')-bis(1,4-anhydro-2-deoksi-D-erythropentitoili)-3-fosfaatti (**133**) jopa 96% saannolla.



KAAVIO 38. Chenaultin synteisi analogille ilman nukleoemästä.

4. Johtopäätökset

Kuluneen kolmen vuosikymmenen aikana syklisten dinukleosidimonofosfaattien ja niiden analogien synteetit ovat kehittyneet huomattavasti. Erilaisia (3',5')-dinukleotideja on valmistettu useita kymmeniä ja tulevaisuudessa määrän odotetaan roimasti kasvavan. Fosfoesteri- ja vetyfosfonaattimenetelmät koetaan tänä päivänä parhaimmiksi vaihtoehdoiksi syklisten dinukleosidimonofosfaattien syklisaatiossa, kun taas fosforamidiittimenetelmä soveltuu parhaiten lineaarisen dinukleotidien synteeseihin.

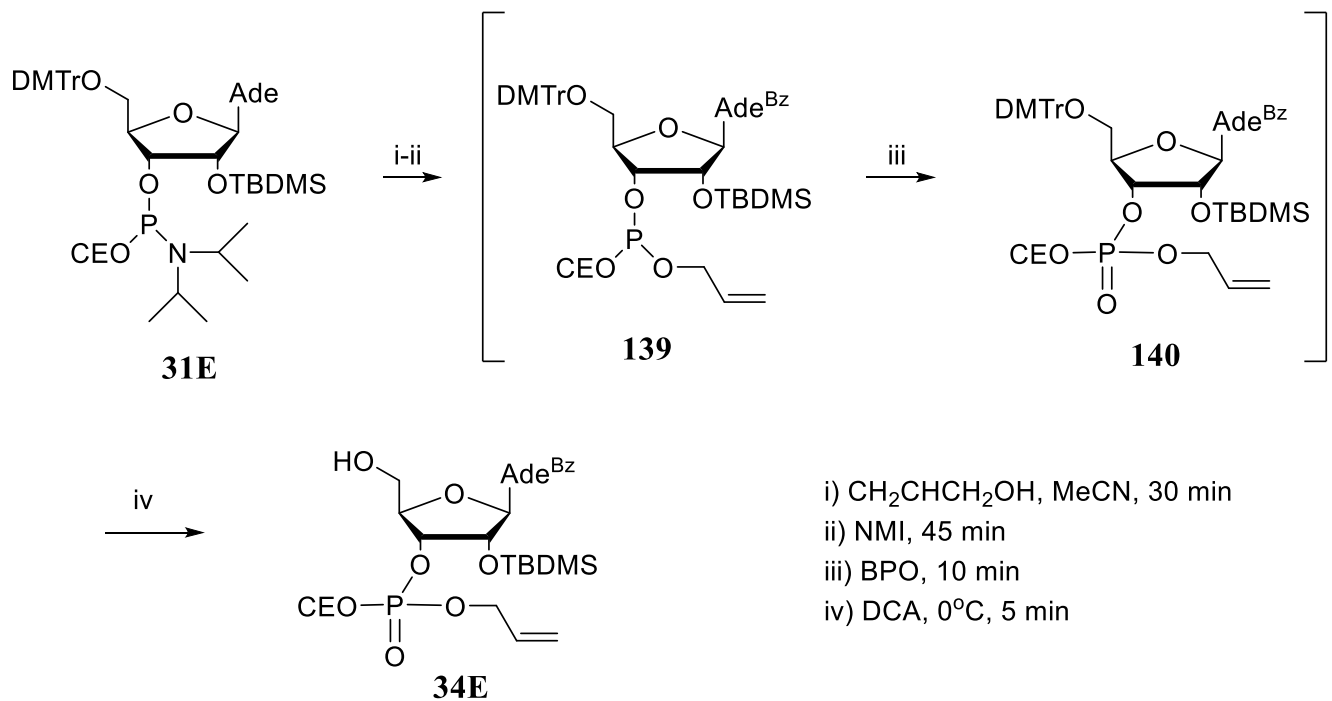
Tutkijat ovat yksimielisiä siitä, että syklisten dinukleosidimonofosfaattien synteeseissä hankalin vaihe on syklisaation toteuttaminen. Laboratorio-olosuhteiden parantamisen toivotaan tuovan uusia ja eksperimentaalisesti tarkempia tutkimustuloksia lähitulevaisuudessa. Biofilmejä sekä syklisten dinukleosidimonofosfaattien ja analogien vaikutusta niihin tutkitaan päivä päivältä enemmän.¹

III KOKEELLINEN OSA

1. Tulokset ja niiden tarkastelu

Tertbutyylidimetyylisilyyli- (TBDMS-), syanoetyyli- (CE-) ja bentsoyyli- (Bz-)ryhmillä suojattu syklinen diadenosiinimono fosfaatti (c-di-AMP) (**38Y**) valmistettiin kuten alla on esitetty. Suojatusta adenosiiini-3'-fosforamidiitista (**31E**) valmistettiin adenosiiini-3'-(allyyli, 2-syanoetyyli)fosfiitti (**139**) korvaamalla diisopropyyliaminoryhmä allyylialkoholilla asetonitrilissä (MeCN), tetratsolin (TetH) toimiessa aktivaattorina.¹⁴

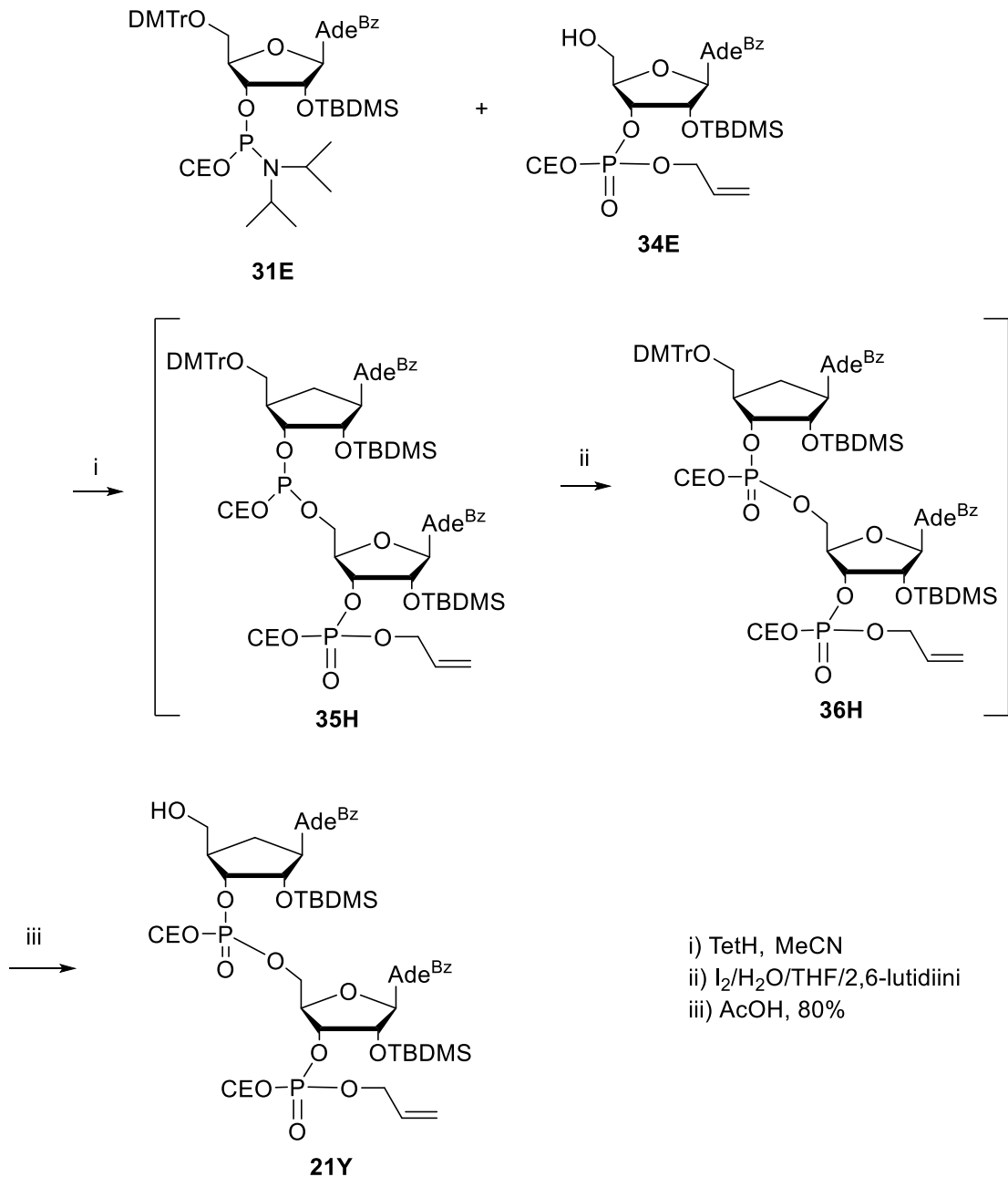
Tämän jälkeen fosfiitti **139** hapetettiin fosfaatiksi **140** jodilla ja väliaikainen 4,4'-dimetoksitriptyylisuojarahmä (DMTr-) poistettiin etikkahapon vesiliuoksella (80% AcOH), jolloin tuotteena saatiin (*N*⁶-bentsoyyli-2'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)adenosiini-3'-(allyyli,2-syanoetyyli)fosfaatti (**34E**) 62% saannolla (KAAVIO 39).



KAAVIO 39. (*N*⁶-bentsoyyli-2'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)adenosiini-3'-(allyyli,2-syanoetyyli)fosfaatin valmistus.

Fosforamidiitti (**31E**) ja suojattu adenosiiini-3'-fosfaatti (**34E**) liitettiin yhteen asetonitrilissä tetratsolin läsnä ollessa. Muodostunut dinukleosidifosfiitti **35H** hapetettiin vastaavaksi fosfaatiksi **36H** jodilla ja

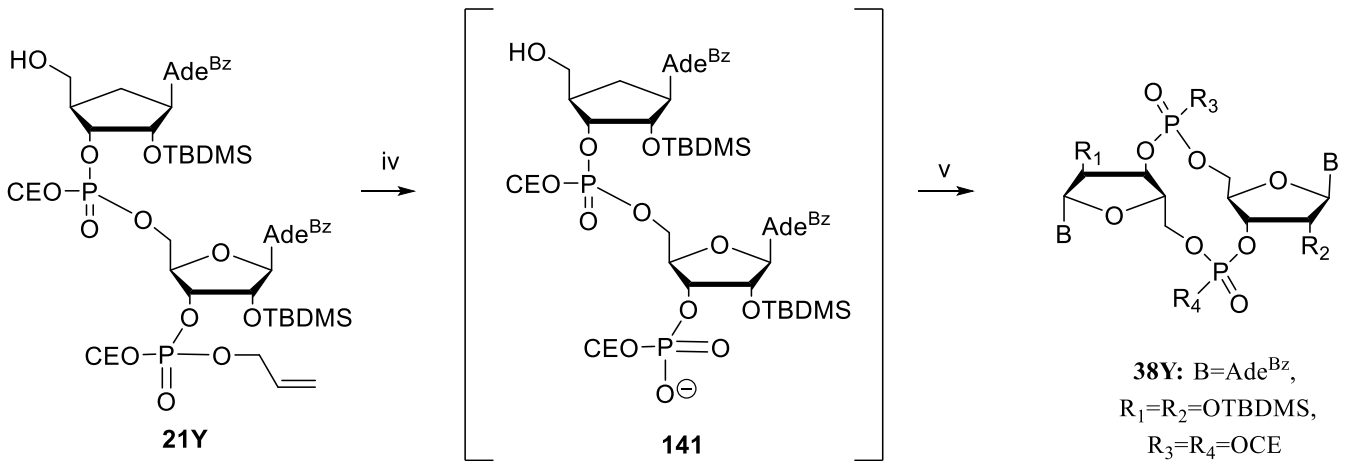
väliaikainen dimetoksitriityyliryhmä poistettiin etikkahapon vesiliuoksella, jolloin tuotteena saatiin suojattu adenylyyli(3',5')adenosiini-3'-fosfaatti (**21Y**) 81% saannolla (KAAVIO 40).



KAAVIO 40. Suojatun adenylyyli(3',5')adenosiini-3'-fosfaatin valmistus.

Suojatun adenylyyli(3',5')adenosiini-3'-fosfaatin **21Y** allyylisuojarahmā poistettiin natriumjodidilla asetonissa refluksoiden.¹³ Muodostuneen tuotteen **141** syklistaatio suoritettiin tetrahydrofuraanissa 2,4,6-tri-isopropyylibentseenisulfonyylin (TPS) ja *N*-metyyli-imidatsolin (NMI) läsnä ollessa. Sulfonyyliryhmä toimii hyvänä poistuvana ryhmänä 5'-OH:n hyökätessä fosforiin.

Lopputuotteena saatiin TBDMS-, CE- ja Bz-ryhmillä suojattu syklinen diadenosiinimonofofaatti (c-di-AMP) (**38Y**) 42% saannolla (KAAVIO 41).



iv) NaI, asetoni, refluksointi
 v) TPSCI, NMI, THF

KAAVIO 41. Suojatun c-di-AMP:n valmistus.

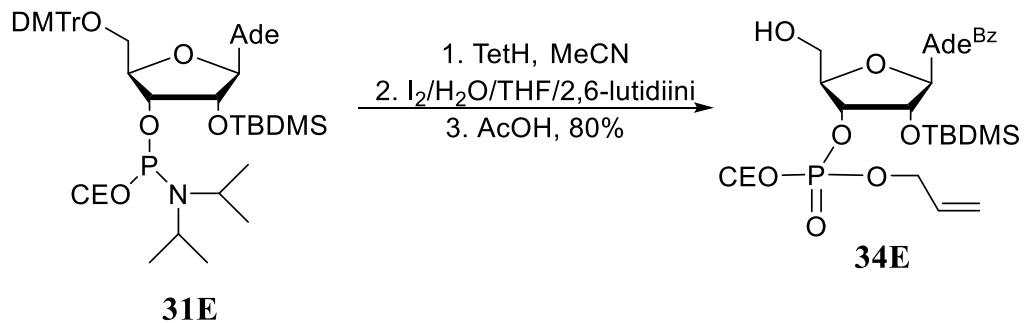
2. Menetelmät

2.1. Yleiset menetelmät

Reaktioastiat pestiin tarvittaessa asetonilla ja liekitettiin. Yhdisteiden **139** ja **35H** synteesi suoritettiin tyypissä. Alkyylialkoholi, asetonitriili, aseton, tolueni ja tetrahydrofuraani kuivattiin 3Å:n molekyyliuuloilla. ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, ³¹P-NMR-, HSQC- ja COSY-spektrit mitattiin JEOL JNM-LA400-spektrometrillä. Massaspektrit ajettiin ESI PE SCIEX API 365 LC/MS/MC-kolmoiskvadrupolimassaspektrometrillä ja tarkat massat (HRMS) Bruker micrOTOF_Q-massaspektrometrillä.

Väliuotteet **34E** ja **21Y** sekä synteesin lopputuote **38Y** puhdistettiin silikageelikromatografisesti ja karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. Tuotteiden homogeenisuus tarkastettiin ohutlevykromatografisesti ja HPLC:llä.

2.2. N^6 -bentsoyyli-2'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)adenosiini-3'-(allyyli,2-syanoetyyli)fosfaatin valmistus



KAAVIO 42. N^6 -bentsoyyli-2'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)adenosiini-3'-(allyyli,2-syanoetyyli)fosfaatin valmistus.

[(N^6 -bentsoyyli-2'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityyli)-adenosin-3'-yyli)-2-syanoetyyli(*N,N*-di-isopropyyli)]fosforamidiitti (**31E**) (1.51 g, 1.52 mmol) liuotettiin typpipussissa kuivaan asetonitriliin (4.6 ml). Seokseen lisättiin tetratsolia (5.4 ml, 2.43 mmol, 0.45M MeCN-liuos) ja allyylialkoholia (0.12 ml, 1.83 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin magneettisekoittajalla (2 h) ja reaktion edistymistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (EtOAc:DCM (3:7, v/v)).

Reaktioastia poistettiin typpipussista ja seokseen lisättiin jodi (1.16 g, 4.57 mmol) liuotettuna tetrahydrofuraanin, veden ja 2,6-lutidiinin seokseen (45.7 ml, 26.1 ml/13.1mol/6.5 ml).

Reaktio pysäytettiin 16 h kuluttua haihduttamalla liuotin pois alipaineessa ja uudelleenhaihduttamalla haihdutusjäännös dikloorimetaanista (30 ml). Haihdutusjäännös liuotettiin dikloorimetaaniin (30 ml) ja orgaanista faasia pestiin kaksi kertaa 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -liuksella

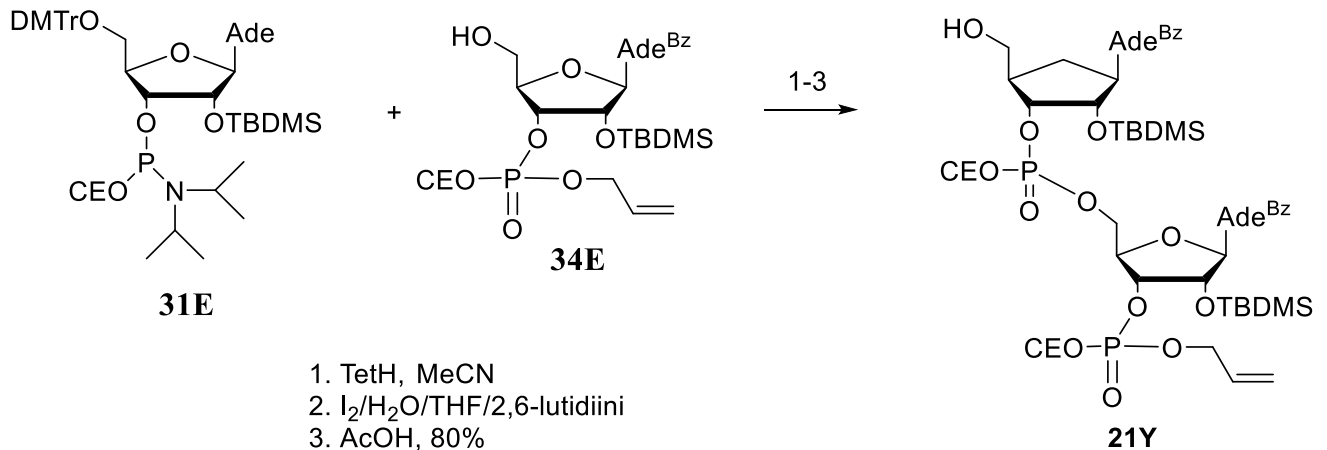
(30 ml) ja kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla. Suodatuksen jälkeen liuotin haihdutettiin pois alipaineessa ja haihdutusjäännöstä kuivattiin yön yli vakuumiyksikkäattorissa fosforipentoksidin (P_2O_5) päällä.

Haihdutusjäännös liuotettiin 80% etikkahapon vesiliuokseen ja reaktion annettiin edetä 20 h. Reaktioedistymistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (DCM:MeOH (9:1, v/v)). Reaktioliuos haihdutettiin puoleen tilavuuteen, minkä jälkeen haihdutusjäännös uudelleenhaihdutettiin kaksi kertaa vedestä (30 ml) alipaineessa. Haihdutusjäännöstä kuivattiin yön yli vakuumiyksikkäattorissa P_2O_5 :n päällä.

Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuksena käytettiin ensin etyyliasetaatia ja dikloorimetaanin seosta (3:7, v/v), kunnes dimetyylitrietyyli saatiin eluoitua ulos silikapylvästä. Tämän jälkeen ajoliukseksi vaihdettiin dikloorimetaanin ja metanolin seos (9:1, v/v). Tuotefraktiot haihdutettiin kuiviin ja uudelleenhaihdutettiin kaksi kertaa kuivasta asetonitriilistä (30 ml). Lutidiinin poistamiseksi tuotetta kuivattiin yön yli vakuumeiksikkaattorissa P_2O_5 :n päällä, jonka jälkeen tuote siirrettiin -18°C :een.

Saanto (**34E**) oli 0,63 g (62%). R_f (**34E**) = 0,49 ja 0,53. MS (ESI⁺), $C_{29}H_{39}N_6O_8PSi^+$ [M+H]⁺: laskettu m/z 659,2, löydetty m/z 659,2. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : -0.10 (s, 3H, CH₃Si), -0.35 (d, 3H, J = 9.00 Hz, CH₃Si), 0.76 (d, 9H, J = 2.5 Hz, (CH₃)₃Si), 2.82 (t, 2H, CH₂CN), 3.85 (m, 1H, 5'), 4.00 (d, 1H, H5'), 4.33 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 4.67 (OCH₂ allyyli), 5.02 (m, 1H, H3'), 5.23 (m, 1H, H2'), 5.35 (dd, 1H, =CH₂), 5.45 (dd, 1H, =CH₂), 5.90 – 5.92 (dd, 1H, H1'), 5.95 - 6.10 (m, 2H, CH ja H4'), 7.56 (t, 2H, J = 7.50 Hz, Bz), 7.64 (t, 1H, J = 7.50 Hz, Bz) 8.05 (d, 2H, J = 7.50 Hz, Bz), 8.09 - 8.10 (m, 1H, H2), 8.82 (s, 1H, H8), 9.21 (br.s, 1H, NH). ¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 17.87, 19.75, 25.44, 62.14, 62.62, 69.06, 73.18, 76.79, 77.05, 77.30, 78.90, 86.52, 90.63, 113.58, 116.28, 119.37, 124.36, 127.90, 128.95, 131.84, 133.03, 133.41, 143.01, 150.41, 150.55, 152.37, 164.41. ³¹P-NMR ((CH₃)₂CO, 500 MHz) δ : -1,59.

2.3. Suojatun adenylyyli(3',5')adenosiini-3'-fosfaatin valmistus



KAAVIO 43. Suojatun adenylyyli(3',5')adenosiini-3'-fosfaatin valmistus.

Yhdiste **31E** (0.83 g, 0.84 mmol) haihdutettiin kaksi kertaa kuivasta asetonitriilistä (25 ml) ja haihdutusjäännös liuotettiin typpipussissa kuivaan asetonitriiliin (2.52 ml). Seos lisättiin kvantitatiivisesti yhdisteen **34E** (0.58 g, 0.88 mmol) joukkoon. Seokseen lisättiin tetratsolia (3.9 ml, 1.76 mmol, 0.45 MeCN-

liuos). Seosta sekoitettiin magneettisekoittajalla (2 h 45 min) ja reaktion edistymistä seurattiin massaspektrometrisesti.

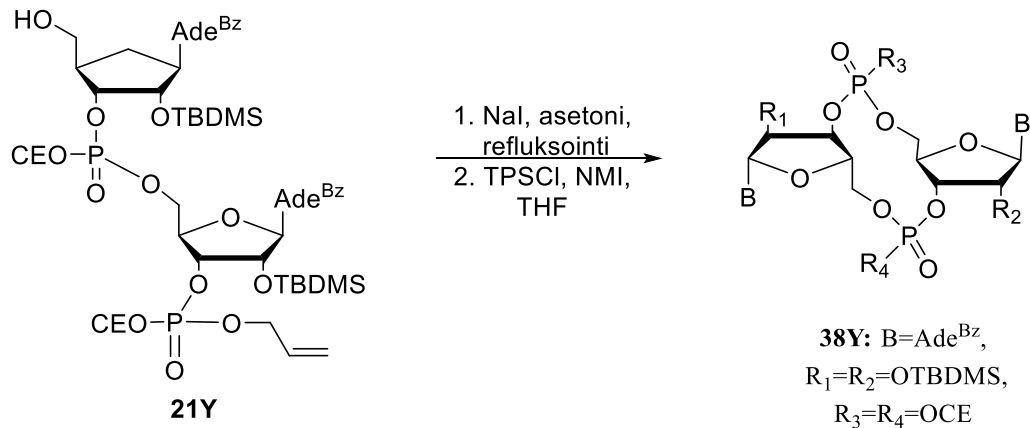
Reaktioastia poistettiin tyypipussista ja seokseen lisättiin jodia (0.64 g, 2.52 mmol) liuotettuna tetrahydrofuraanin, veden ja 2,6-lutidiinin seokseen (25.2 ml, 14.4 ml/7.2 ml/3.6 ml). Reaktion edistymistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (DCM:MeOH (9:1, v/v)). Reaktio pysäytettiin 18 h kuluttua haihduttamalla liuotin pois alipaineessa ja uudelleenhaihduttamalla haihdutusjäännös dikloorimetaanista (30 ml). Haihdutusjäännös liuotettiin dikloorimetaaniin (40 ml) ja orgaanista faasia pestiin kaksi kertaa 10% NaHSO₃-liuksella (30 ml) ja kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla. Suodatuksen jälkeen liuotin haihdutettiin pois alipaineessa ja haihdutusjäännöstä kuivattiin yön yli vakuumieksikkaattorissa P₂O₅:n päällä.

Haihdutusjäännös liuotettiin 80% etikkahapon vesiuokseen ja reaktion annettiin edetä 20 h. Reaktion edistymistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (DCM:MeOH (9:1, v/v)). Reaktioliuos haihdutettiin puoleen tilavuuteen, minkä jälkeen haihdutusjäännös uudelleenhaihdutettiin kaksi kertaa vedestä (30 ml) alipaineessa. Haihdutusjäännöstä kuivattiin yön yli vakuumieksikkaattorissa P₂O₅:n päällä.

Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin ensin etyyliasetaatin ja dikloorimetaanin seosta (3:7, v/v), kunnes dimetyylitriityyli saatiin eluoitua ulos silikapylvästä. Tämän jälkeen ajoliuokseksi vaihdettiin dikloorimetaanin ja metanolin seos (9:1, v/v). Tuotefraktiot haihdutettiin kuiviin ja uudelleenhaihdutettiin kolme kertaa kuivasta asetonitriilistä (25 ml). Lutidiinin poistamiseksi tuotetta kuivattiin yön yli vakuumieksikkaattorissa P₂O₅:n päällä, jonka jälkeen tuote siirrettiin -18°C:een.

Saanto (**21Y**) oli 0,86 g (81%). R_f (**21Y**) = 0,40 ja 0,45. MS (ESI⁺), C₅₅H₇₂N₁₂O₁₅P₂Si₂⁺ [M+H]⁺: laskettu m/z 1259,4, löydetty m/z 1259,9. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : -0.38 - 0.74 (m, 3H, CH₃Si), 0.81 – 0.84 (m, (CH₃)₃Si), 2.78 – 2.82 (m, 2H, CH₂CN), 3.76 – 3.91 (m, 1H, H5''), 3.700 – 3.941 (m, 1H, H5'), 4.50 – 4.32 (m, 6H, OCH₂CH₂CN ja H5' ja H5''), 4.54 – 4.68 (m, 4H, OCH₂ allyyli ja 2xH4'), 5.00 – 5.14 (m, 1H, H3'), 5.19- 5.23 (m, 1H, H2'), 5.32 – 5.47 (m, 2H, =CH₂), 5.91 – 6.10 (m, 3H, CH ja 2xH1'), 7.40 – 7.70 (m, 6H, Bz), 7.95 – 8.10 (m, 4H, Bz), 8.26 ja 8.40 (m, 1H, H2), 8.75 (d, 1H, H8), 8.82 (m, 1H, H8), 9.10 ja 9.15 (br.s, 1H, NH). ¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : -4.94, 17.96, 19.75, 20.99, 22.80, 25.48, 62.46, 62.62, 69.35, 73.20, 73.74, 75.22, 76.00, 76.83, 77.09, 77.34, 79.41, 86.02, 89.19, 90.12, 113.08, 116.52, 119.59, 121.63, 123.76, 124.23, 127.89, 128.81, 128.87, 128.94, 131.71, 132.88, 132.99, 133.48, 141.85, 143.71, 143.88, 149.94, 150.39, 151.55, 152.22, 152.79, 156.45, 164.41. ³¹P-NMR ((CH₃)₂CO, 500 MHz) δ : -2.02, -1.85, -1.41, -1.56.

2.4. Suojatun syklisen bis (3',5')diadenyylihapon (c-di-AMP) valmistus



KAAVIO 44. Suojatun c-di-AMP:n valmistus.

Natriumjodidi (0.3 g, 2.0 mmol) haihdutettiin kaksi kertaa kuivasta asetonista (25 ml) ja liuotettiin kuivaan asetoniin (6.05 ml). Seos lisättiin kvantitatiivisesti yhdisteen **21Y** (0.25 g, 0.20 mmol) joukkoon. Reaktioseosta refluksoitii 2 h 15 min, samalla sekoittaen. Reaktioidistymistä seurattiin sekä ohutlevykromatografisesti (DCM:MeOH (9:1,v/v)), että massaspektrometrisesti. Reaktio pysäytettiin haihduttamalla liuotin pois alipaineessa.

Haihdutusjäännös liuotettiin dikloorimetaaniin (100 ml) ja seokseen lisättiin trietyyliammonium-asetaatipuskuria (80 ml, pH~7). Vesifaasia uutettiin kolme kertaa dikloorimetaanilla (30 ml) ja orgaaninen faasi kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla. Suodatuksen jälkeen liuotin haihdutettiin pois alipaineessa ja haihdutusjäännös uudelleenhaihdutettiin kolme kertaa kuivasta toluenista (50 ml).

Haihdutusjäännös liuotettiin kuivaan tetrahydrofuraaniin (150 ml). Seokseen lisättiin *N*-metyyliimidatsolia (0.113 ml, 1.41 mmol) ja 2,4,6-tri-isopropyylibentseenisulfonyylikloridia (0.43 g, 1.41 mmol).² Reaktio annettiin edetä sekoituksessa 60 h, jonka aikana syklisen yhdisteen **130** havaittiin muodostuneen. Reaktioidistymistä seurattiin sekä ohutlevykromatografisesti (DCM:MeOH (9:1, v/v)), että massaspektrometrisesti.

Reaktioseokseen lisättiin tislattua vettä (30 ml) ja sekoittamista jatkettiin 1 h ajan. Reaktio keskeytettiin haihduttamalla liuotin (THF) pois alipaineessa. Haihdutusjäännös liuotettiin etyyliasetattiin ja seosta pestiin kylläisellä NaCl-liuoksella. Vesifaasia uutettiin kuusi kertaa dikloorimetaanilla (25 ml) ja yhdistetyt orgaaniset faasit haihdutettiin. Muodostunut valkoinen sakka suodatettiin imulla ja suodos jätettiin yön yli -18°C:een. Suodos haihdutettiin alipaineessa ja haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti.

Ajoliuksena käytettiin ensin dikloorimetaanin ja metanolin seosta (97:3, v/v), kunnes sulfonyyli (TPS) saatiin eluoitua ulos silikapylvästä. Tämän jälkeen ajoliukseksi vaihdettiin erilainen dikloorimetaanin ja metanolin seos (19:1, v/v). Syklisen bis (3',5')diadenyylihapon **38Y** homogeenisuus tarkastettiin ohutlevykromatografisesti (DCM:MeOH (9:1, v/v)) ja HPLC:llä. Tuotetta kuivattiin yön yli vakuumeiksiikkaattorissa P₂O₅:n päällä.

Saanto (**38Y**) oli 0,10 g (42%). R_f (**38Y**) = 0.33. MS (ESI), C₅₂H₆₆N₁₂O₁₄P₂Si₂Na⁺ [M+Na]⁺: laskettu *m/z* 1224,4, löydetty *m/z* 1224,6. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: -0.23 – 0.94 (m, CH₃Si), 1.21 – 1.43 (m, (CH₃)₃Si), 2.88 (t, *J* = 6.4 Hz, CH₂CN), 4.20 (m, H5' ja H5''), 4.30 – 4.53 (m, OCH₂CH₂CN), 4.85 (m, H4'), 5.38 (m, H3'), 5.60 (m, H2'), 5.95 – 5.96 (d, H1'), 7.51 – 7.53 (m, Bz), 7.62 (m, Bz), 8.02 – 8.04 (m, Bz), 8.04 – 8.06 (m, H2), 8.82 (m, H8). ¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 17.808, 19.800, 24.368, 25.412, 25.621, 29.424, 29.714, 30.322, 34.516, 62.904, 65.702, 70.746, 76.727, 77.045, 77.363, 81.680, 81.162, 116.089, 123.990, 125.512, 127.858, 128.913, 132.883, 133.597, 142.978, 143.279, 149.913, 151.357, 152.816. ³¹P-NMR ((CH₃)₂CO, 400 MHz) δ: -4.80, -3.95, 0.09, 1.24.

3. Yhteenveto

Erikoistyössä syntetisoitiin onnistuneesti syanoetyyli-, tertbutyylidimetyylisilyyli- ja bentsoyyliryhmiillä suojattu syklinen diadenosiinimono fosfaatti. Synteesivaiheiden saannot vaihtelivat 40%:n ja 80%:n välillä. Lopputuotteen NMR-spektreissä oli havaittavissa hieman epäpuhtauksia. ³¹P-NMR-spektrissä on neljä pääpiikkiä siirtymäarvoilla 1.24, 0.09, -3.95 ja -4.80 ppm sekä lukuisia muita pienempiä signaaleja. Yhdiste **38Y** on *R_P*- ja *S_P*-diastereomeerien seos. Mahdolliset diastereomeerien kombinaatiot ovat [*R_P*, *R_P*], [*S_P*, *S_P*], [*R_P*, *S_P*] ja [*S_P*, *R_P*]. Koska [*R_P*, *S_P*] = [*S_P*, *R_P*] ovat keskenään identtiset, ³¹P-NMR:ssä esiintyvä suurin neljäs signaali (1.24 ppm) voi olla mahdollisesti fosfodiesteri, joka muodostuu syanoetyylin irrotessa silikageelipuhdistuksessa. Lopullinen saanto oli 42%.

IV KIRJALLISUUSLÄHTEET

1. Clivio, P. ; Coantic-Castex, S. ; Guillaume, D. *Chem. Rev.* **2013**, 113, 7354-7401
2. del Pozo, J. L.; Patel, R. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, 82, 204
3. Walters, M. C.; Roe, F.; Bugnicourt, A.; Franklin, M. J.; Stewart, P. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 317
4. Lynch, A. S.; Robertson, G. T. *Annu. Rev. Med.* **2008**, 59, 415
5. Ryjenkov, D. A.; Tarutina, M.; Moskvina, O. V.; Gomelsky, M. J. *Bacteriol.* **2005**, 187, 1792
6. Jenal, U.; Malone, J. *Annu. Rev. Genet.* **2006**, 40, 385
7. Ross, P.; Mayer, R.; Weinhouse, H.; Amikam, D.; Huggirat, Y.; Benziman, M.; de Vroom, E.; Fidder, A.; de Paus, P.; Sliedregt, L. A. J. M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18933–18943
8. Amiot, N.; Heintz, K.; Giese, B. *Synthesis* **2006**, 24, 4230–4236
9. Hyodo, M.; Hayakawa, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, 77, 2089
10. Khorana, H.G. ; Tener, G.M ; Markam, R. ; Pol, E.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6223
11. Shimidzu, T.; Murakami, A. *Tetrahedron* **1981** , 37, 51
12. Capobianco, M.L.; Carcuro, A.; Tondelli, L.; Garbesi, A.; Bonora, G.M. *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 2661
13. Ching, S. M.; Tan, W. J.; Chua, K. L.; Lam, Y., *Bioorg Med Chem.* **2010**, 18, 6657-6665
14. Hyodo, M.; Sato, Y.; Hayakawa, Y., *Tetrahedron.* **2006**, 62, 3089-3094
15. de Rooij, J.F.M. ; Wille-Hazeleger, G. ; van Deursen, P.H. ; Serdijn, J. ; van Boom, J.H. *Recl.: J.R. Neth. Chem. Soc.* **1979**, 98, 537
16. Ross, P. ; Mayer, R. ; Weinhouse, H. ; Amikam, D. ; Huggirat, Y. ; Benziman, M ; de Vroom, E. ; Fidder, A. ; de Paus, P. ; Sliedregt, L.A. ; van der Marel, G.A. van Boom, J.H. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18933
17. Ora, M.; Martikainen, K.; Lautkoski, K. *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, 26, 218-225
18. Barbato, S.; De Napoli, L. ; Mayol, L. ; Piccialli, G. ; Santacroce, C. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5727
19. De Napoli, L. ; Messere, A. ; Montesarchio, D. ; Piccialli, G. ; Santacroce, C. *Nucleosides nucleotides* **1993**, 12, 21
20. Alazzouzi, E. ; Escaja, N. ; Grandas, A. ; Pedroso, E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1506
21. Pedroso, E. ; Escaja, N. ; Frieden, M. ; Grandas, A. *Methods Mol. Biol.* **2005**, 288, 101
22. Kiburu, I. ; Shurer, A. ; Yan, L. ; Sintim, H. O. *Mol. Biosyst.* **2008**, 4, 518

23. Smith, K.D. ; Shananan C.A. ; Moore, E.L. ; Simon, A.C. ; Strobel, S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 7757
24. Zeng, F. ; Jones, R.A. *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 1679
25. Gaffney, B. L.; Veliath, E.; Zhao, J.; Jones, R. A. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3269-3271
26. Zhang, Z.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16700
27. Yan, H. ; Wang, X. ; KuoLee, R. ; Chen, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5631
28. Zhao, J. ; Veliath, E.; Kim, S.; Gaffney B.L.; Jones R.A. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2009**, *28*, 352
29. Smietana, M. ; Kool, E.T *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3702
30. Kline, T. ; Jackson, S.R. ; Deng, W. ; Verlinde, C.L. ; Miller, S.I. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2008**, *27*, 1282
31. Veliath, E. Ph.D. Thesis, University of New Jersey, New Brunswick Rutgers, NJ, 2011
32. Western, E. C., Daft, J. R., Johnson, E. M., Gannett, P. M. and Shaughnessy, K. H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6767–6774
33. Frieden, M. ; Grandas, A. ; Pedroso, E. *Chem. Commun.* **1999**, *16*, 1593
34. Shananan, C.A. ; Gaffney, B.L. ; Jones, R.A. ; Strobel, S.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15578
35. Chenault, H.K. ; Mandes, R.F. ; *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 11033

Lyhenneluettelo

3-AcPhB(OH) ₂	3-asetyyli-boorifenyylihappo
A	Adenosiiini
Ac	Asetyyli-
Ade	Adeniini
ANI	Anisoyyli-
Boc	<i>tert</i> -butyylioksidikarbonyyli-
BPO	Butanoniperoksidi
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimetyylisilyyli)asetamidi
Bz	Bentsoyyli-
C	Sytidiini
CAN	Ceriumammoniumnitraatti
CCl ₃	Trikloorietyyli-
CE	Syanoetyyli-
Cpep	1-(4-kloorifenyyli)-4-etoksi piperidin-4-yyli
Cyt	Sytosiini
DBU	1,8-diatsabisyklo[5,4,0]undek-7-eeni
DCA	Dikloorietikkahappo
DCC	<i>N, N'</i> -disykloheksyylikarbodiamidi
DCM	Dikloorimetaani
DCP	2,5-dikloorifenyyli
DDTT	3-(dimetyyliaminometyleeni)-5-tioni
DGC	Diguanylaattisyklaasi
diOBT	2-kloorifenyyli- <i>O, O</i> -bis(1-bentsotriatsolyyli)fosfaatti
diOBTfCF ₃	2-kloorifenyyli- <i>O, O</i> -bis(1-(6-trifluorometyyli)-bentsotriatsolyyli)fosfaatti
DMFA	<i>N,N</i> -dimetyyliformamidi
DMOCP	5,5-dimetyyli-2-okso-2-kloori-1,2,3-deoksisoforinaani
DMTr	4,4'-dimetoksitrietyyli-
DCA	Dikloorietikkahappo
DPA	Dihydroksifenyylialaniini-
DPN	1,5-diatsabi-syklo[4,3,0]non-5-eeni
EDC	1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)-karbodiamidi

EDTA	etyleenidiammintetraetikkahappo
Et ₃ N	trietyyliamiini
EtOAc	Etyyliaetaatti
EtOH	Etanoli
FPMP	1-(2-fluorofenyyli)-4-metoksi piperiini-4-yyli
G	guanosiiini
GGDEF	(Gly-Gly-Asp-Glu-Phe)-aminohappoketju
Gua	Guaaniini
HD-GYP	(His-Asp-Gly-Tyr-Pro)-aminohappoketju
Hyp	Hypoksantiini
I	Inosiiini
i- But	<i>iso</i> -butyryyli-
MeCN	Asetonitrili
MeOH	Metanoli
MeS	Metyylitio-
Mm22A	Montmorilloniitti 22
MMT	Monometoksitrietyyli
MSNT	1-(mesityleenisulfonyyli)-3-nitro-1,2,4-triaatsoli
NMI	<i>N</i> -metyyliimidatsoli
NPE	2-(4-nitrofenyyli)etyyli
PAC	Fenoksiaetyyli-
Pd(OAc) ₂	Palladiumasetaatti
Ph	Fenyyli-
PhB(OH) ₂	Boorifenyylihappo
Py	Pyridiini
Py-TFA	Pyridiini-trifluoretikkahappo
SO(NH ₂) ₂	Tiourea
T	Tymidiini
TBDMS	<i>Tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-
TBHP	<i>Tert</i> -butyylhydroperoksidi
TEA • HF	Trietyyliammoniumfluoridi
TEST	<i>Bis</i> -(3-trietoksisilyylipropyli)tetrasulfidi

TetH	1 <i>H</i> -tetratsoli
Theo	Teofylliini
THF	Tetrahydrofuraani
THP	Tetrahydropyranyyli
Thy	Tymiini
TMSOTf	Trimetyylisilyylitriplaatti
TOM	Tri-isopropyylisilyylioksimetyyli-
TPS	2,4,6-tri-isopropylibentsosulfonyyli-
TPSCL	2,4,6-tri-isopropylibentsosulfonyylikloridi
TPSNT	2,4,6-tri-isopropylibentsosulfonyyli-3-nitro-1,2,4-triatsoli
TsOH	Tosyylihappo
TXPTS	<i>Tris</i> -(4,6-dimetyyli-3-sulfonaattofenyyli)fosfiini
U	Uridiini
UO ₂ ²⁺	Uranyyli-ioni
Ura	Urasili
X	Ksantosiini
Xan	Ksantiini
Y	7-β-D-ribofurano-syl-teofylliini