

Passerini- ja Ugi-reaktiot luonnonainesynteessissä

Pro gradu-tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Kemian laitos
Rakenne- ja synteetikemia
17.12.2015
Saara Hartikainen

Tiivistelmä

Tämän pro gradu -tutkielman kirjallisessa osassa käsitellään Passerini- ja Ugi-reaktioita luonnonainesynteesin näkökulmasta. Lisäksi kirjallisessa osuudessa esitellään luonnonainesynteesiä joissa näitä multikomponenttireaktioita on hyödynnetty. Kirjallisen osan ensimmäinen puolisko alkaa lyhyellä johdannolla jossa esitellään luonnonainesynteesiä ja multikomponenttireaktioita yleisemmin. Tästä jatketaan Passerini- ja Ugi-reaktioihin ja niiden erityispiirteisiin.

Luonnonainesynteesiä käsittelevät luvut on jaoteltu sen mukaan millaisia funktionaalisia ryhmiä Passerini- tai Ugi-reaktiolla on esiteltyihin luonnonaineisiin valmistettu, joko suoraan näillä reaktioilla tai niitä seuraavilla jatkoreaktioilla. Luonnonainesynteesien käsittelyssä on keskitytty lähinnä Passerini- ja Ugi-reaktioon synteesissä, muut reaktiot synteesireiteistä on jätetty vähemmälle huomiolle. Lisäksi käsittelyssä keskitytään näiden kahden reaktion mahdolliseen selektiivisyyteen ja siihen johtaneisiin syihin.

Tutkielman kokeellisessa osassa suunniteltiin ja toteutettiin kahden luonnonaineen – nostosiini A:n ja B:n – kokonaissynteesi viimeisiä vaiheita lukuun ottamatta. Valmistuksessaan tämä synteesi on ensimmäinen näiden kahden luonnonaineen kokonaissynteesi. Synteesireitissä hyödynnettiin Passerini-reaktiota sen alkuvaiheessa, mikä mahdollisti reaktion karboksyylihappokomponentin valinnan siten että tuotteen diastereomeerien erotus oli mahdollista. Tämä taas mahdollisti synteesin myöhemmän vaiheen välituotteen kiderakenteen määrittämisen, minkä vuoksi nostosiinien A ja B tuntemattoman stereokeskuksen konfiguraation selvittäminen onnistuu synteesin lopullisista tuotteista.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	i
Sisällysluettelo	ii
Esipuhe.....	iv
Lyhenteet.....	v
KIRJALLINEN OSA	1
1 Johdanto	1
2 Isosyanidipohjaiset multikomponenttireaktiot	4
2.1 Isosyanidit ja niiden reaktiivisuus.....	6
2.2 Passerini-reaktio.....	7
2.3 Ugi-reaktio	11
2.4 Stereoselektiiviset Passerini- ja Ugi-reaktiot	14
2.4.1 Stereoselektiiviset Passerini-reaktiot.....	15
2.4.2 Diastereoselektiiviset Ugi-reaktiot	19
3 Peptidit	22
3.1 (±)-Viridihappo	22
3.2 (-)-Muraymysiini D2.....	25
4 α-Ketoamidit	29
4.1 Eurystatiini A	32
4.2 Syklotheonamidi C.....	35
5 Laktaamit ja laktonit	40
5.1 (±)-Dysibetaiini ja (-)-dysibetaiini	42
5.2 Omuralidi ja laktakystiini	48
5.3 (+)-Hydrastiini	51
6 Piperatsiinijohdannaiset	53
6.1 Ekteinaskidiini 743	54
6.2 (-)-Fruktigeniini A ja (-)-5- <i>N</i> -asetyyliardeemini	59
7 Tiatsolit	62
7.1 Tubulyysiinit U ja V	65
7.2 (-)-Basillamidi C	70
8 Yhteenvedo	72

KOKEELLINEN OSA.....	74
9 Työn tarkoitus	74
10 Ensimmäisen sukupolven synteesi: Aha-reitti	75
11 Toisen sukupolven synteesi: Passerini-reitti	76
11.1 Lähtöaineiden valmistus	77
11.2 Passerini-reaktio ja tuotteen hydrolyysi.....	79
11.3 Arginiinin kytkentä	83
11.4 Tulokset.....	86
12 Yhteenveto	88
13 Synteesiohjeet	89
13.1 2-hydroksi-4-(4-metoksifenyyli)butaanihappo (5) ⁷²	90
13.2 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-metyyli-2-amino-3-metyylipentanoaatin hydrokloridi (9).....	90
13.3 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-metyyli-2-(2-hydroksi-4-(4-metoksifenyyli)butanamidi)-3- metyylipentanoaatti (3)	91
13.4 3-(<i>p</i> -metoksifenyyli)propanaali (12).....	92
13.5 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-metyyli-2-formamido-3-metyylipentanoaatti (20).....	93
13.6 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-metyyli-2-isosyano-3-metyylipentanoaatti (13).....	93
13.7 (<i>S</i>)-metyyli-2-amino-5-(3-nitroguanidino)pentanoaatti (23)	94
13.8 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-metyyli-2-(2-(2-klooriasetoksi)-4-(4-metoksifenyyli)butanamido)-3- metyylipentanoaatti (11d ja 11d*)	95
13.9 (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-(2-hydroksi-4-(4-hydroksifenyyli)butanamido)-3- metyylipentanaanihappo (25).....	96
13.10 (2 <i>S</i>)-metyyli-2-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-(2-hydroksi-4-(4-metoksifenyyli)butanamido)-3- metyylipentanamido)-5-(3-nitroguanidino)pentanoaatti (31)	97
Lähdeluettelo.....	99
Liitteet	105

Esipuhe

Pro gradu -tutkielmani kokeellinen ja kirjallinen osa on tehty Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella syksyjen 2014–2015 välisenä aikana professori Petri Pihkon tutkimusryhmässä. Tutkielmani aihe muodostui kokeellisessa osassa hyödynnetyn Passerini-reaktion ympärille, jolloin pääsin kirjallisessa osuudessa käsittelemään syvemmin jo entuudestaan mielenkiintoiseksi kokemaani aihetta. Samalla tutkielman otsikko kuvaa myös kokeellisessa osassa tehtyä työtä. Sekä kokeellisen että kirjallisen osan aineistona on käytetty alan tutkimusartikkeleita sekä muutamaa kattavampaa katsausartikkelia ja oppikirjaa. Tiedonhaussa on hyödynnetty pääsääntöisesti Reaxysia ja Scifinderia.

Haluan kiittää professori Petri Pihkoa neuvoista, ohjauksesta sekä mahdollisuudesta osallistua tutkimusryhmän toimintaan kuluneen vuoden aikana. Tutkielmani kokeellisen osan ohjaajaa – FT Gokarneswar Sahooa – kiitän kaikesta siitä opista ja ohjauksesta jota olen häneltä saanut ja kiitänkin häntä siksi myös hänen omalla äidinkielellään: Dhanyabad. Erityiset kiitokset osoitan maisteriopiskelijakollegoilleni, Suville ja Samille, te olette tehneet viimeisestä opiskeluvuodestani erityisen hauskan ja tukenne on ollut minulle korvaamatonta. Haluan myös kiittää muita Pihko Groupin jäseniä hulvattomista hetkistä kuluneen vuoden aikana.

Edellä mainittujen lisäksi haluan vielä erikseen kiittää avomiestäni Timoa tuesta ja kannustuksesta opintojeni aikana. Hän on aina jaksanut kuunnella kemia-aiheisia höpötyksiäni, vaikka niiden merkitys ei hänelle yhteiskuntatieteilijänä ole välttämättä auennut. Lisäksi perheeni tuki on ollut merkittävässä roolissa opintojeni kuluessa.

Koen sisäistäneeni viimeisen vuoden aikana enemmän kemiaa kuin aikaisemman neljän opintovuoteni aikana yhteensä. Tämä lienee seurausta siitä että olen päässyt hyödyntämään aikaisempia opintojani käytännössä. Siksi haluankin lopuksi kiittää Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen henkilökuntaa saamastani koulutuksesta ja FT, dos. Juhani Huuskosta tutkielmani arvioinnista.

Jyväskylässä 8.12.2015

Saara Hartikainen

Lyhenteet

Ac	Asetyyli
ACN	asetonitriili
Aha	α -hydroksihappo
aq.	vesiliuos
Boc	<i>tert</i> -butyloksikarbonyyli
BOM	bentsyloksimetyyliasetaaali
Bn	bentsyyli
Bu	butyyli
Cbz	karbobentsyyli-ryhmä
CSA	kamferisulfonihappo
CtC	syklotheonamidi C
Cy	sykloheksyyli
DCC	disykloheksyylikarbodi-imidi
DCM	dikloorimetaani
<i>de</i>	diastereomeerinen ylimäärä, diastereomeric excess
DEBT	3-(dietoksisfosforyloksi)-1,2,3-bentsotriatsiini-(3 <i>H</i>)-oni
DIBAL	di-isobutyylialumiinihydridi
DIEA	di-isopropylietyyliamiini
DMB	dimetoksibentsyyli
DMF	dimetyyliformamidi
<i>dr</i>	diastereomeerisuhte
EDC	1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidi
<i>ee</i>	enantiomeerinen ylimäärä, enantiomeric excess
Et	etyyli

Et-770	ekteinaskidiini 770
Et-743	ekteinaskidiini 743
FGI	Funktionaalisen ryhmän muutos, Functional Group Interchange
Fmoc	fluorenyylimetyloksikarbonyyli
HDMS	bis(trimetyyli)silyyliamiini
HFIP	heksafluoroisopropanoli
Hex	heksaani
HOBt	1-hydroksibentsotriatsoli
HPLC	high performance liquid chromatography
<i>i-</i>	<i>iso-</i>
L-Arg	L-arginiini
L-Ile	L-isolesiini
Me	metyyli
Mep	<i>N</i> -metyylipipekoliinihappo
NMM	<i>N</i> -metyylimorfoliini
NMR	ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
OBn	bentsyloksi
OIC	domino-olefinaatio/isomerisaatio/Claisen-toisiintuminen
PADAM	Passerini-reaktio, amiinin suojanpoisto, asyylivaellus, PADAM-sekvenssi
PCP	parakloorifenyyl
Pd/C	palladium-hiili
PED	propyyliendopeptidaasi
Ph	fenyyl
PMB	4-metoksibentsyyl
PMP	4-metoksifenyyl

pNP	4-nitrofenyyli
Pr	propyyli
PS	pelkistävä syklistaatio
PyBOP	bentsotriatsol-1-yl-oksitripyrrolidinofosfoniumheksafluorofosfaatti
RT	huoneen lämpö, Room Temperature
<i>s</i> -	<i>sec</i> -
<i>t</i> -	<i>tert</i> -
TBS	<i>tert</i> -butyyilisilyyli
TFA	trifluoroetikkahappo
THF	tetrahydrofuraani
TLC	ohutlevykromatografia, Thin Layer Chromatography
Tuv	tubovaliini
Tup	tubufenyylialaniini

KIRJALLINEN OSA

1 Johdanto

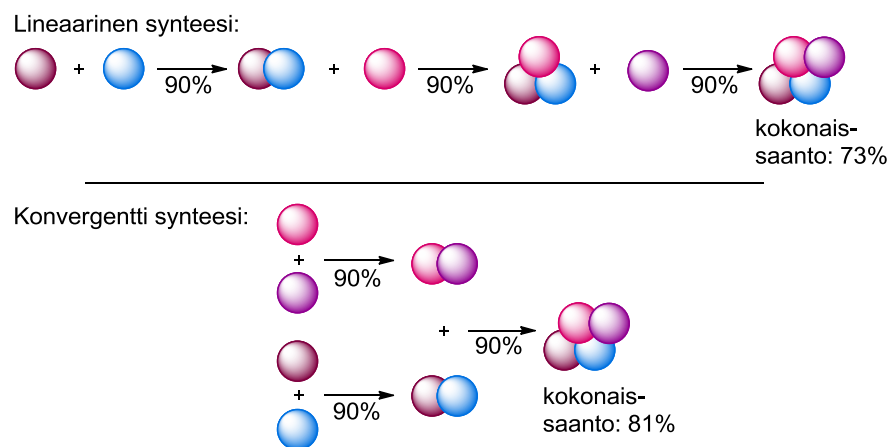
*”Hiiliyhdistysten monilukuisuus johtuu hiiliatomien kyvystä sitoutua toisiinsa hyvinkin pitkiksi ketjuiksi tai suljetuiksi renkaiksi. Vaikka orgaanisissa yhdistyksissä esiintyy vain muutamia harvoja alkuaineita, ennen kaikkea hiiltä, vetyä, happea ja typpeä, on atomien keskinäiseen kytkeytymiseen ja molekyylin suuruuteen nähden hyvin monia eri mahdollisuuksia.”*¹

Näin kirjoitti Arvi Talvitie orgaanisista yhdisteistä korkeakoulutason oppikirjassaan vuodelta 1944.¹ Vanhahtavasta kielestään ja raskaista lauserakenteista huolimatta tämä pitää edelleen paikkansa. Orgaaniset yhdisteet koostuvat edelleen vuonna 2015 lähinnä hiilestä, vedystä, hapesta ja typestä. Luonnonaineiksi kutsutaan eliökunnan tuottamia sekundaarisia aineenvaihduntatuotteita eli sekundaarimetaboliitteja – yhdisteitä jotka eivät suoranaisesti osallistu biologisten organismien kasvuun, metabolisiin reitteihin tai lisääntymiseen.^{2,3} Näin ollen luonnonaineet kuuluvat orgaanisten yhdisteiden joukkoon, joten niidenkin voidaan todeta koostuvan pääsääntöisesti hiilestä, vedystä, hapesta ja typestä. Lisäksi luonnonaineiden monimuotoisuus – ja monilukuisuus – on vertaansa vailla, eliökunta on kykenevä tuottamaan mitä erilaisimpia orgaanisia yhdisteitä, ja tästä johtuen ainoa luonnonaineita yhdistävä tekijä onkin niiden alkuperä.

Synteesi määritellään Kielitoimiston sanakirjassa jonkin yhdisteen valmistamisena tai syntymisenä alkuaineista tai yksinkertaisemmista yhdisteistä.⁴ Luonnonainesynteesi tarkoittaa siten synteesejä joilla valmistetaan sekundaarimetaboliitteja yksinkertaisemmista yhdisteistä ilman biologisia reagensseja – kuten entsyymejä. Koska luonnonaineet ovat usein rakenteeltaan monimutkaisia, niiden synteettinen valmistaminen vaatii myös uusien reaktioiden kehittämistä. Tästä johtuen luonnonainesynteesi onkin olennainen osa kemian perustutkimusta. Tämän lisäksi uuden luonnonaineen rakenne varmistuu viimeistään sen ensimmäisen synteesin yhteydessä, kun synteesituotetta ja sen luonnosta eristettyä esikuvaa voidaan verrata toisiinsa.^{2,3}

Luonnonainesynteesi ei ole kuitenkaan vain kemian perustutkimuksen yksi osa-alue.^{2,3} Useilla sekundaarimetaboliiteilla on lääkinällisiä tai muita biologisia ominaisuuksia joiden tutkimuksen kannalta toimiva synteesireitti on olennainen sekä tuotteen saatavuuden että sen kustannustehokkuuden kannalta. Lisäksi synteettisin keinoin sekundaarimetaboliiteista voidaan tuottaa erilaisia analogeja, joiden biologiset ominaisuudet eroavat alkuperäisestä luonnonaineesta.

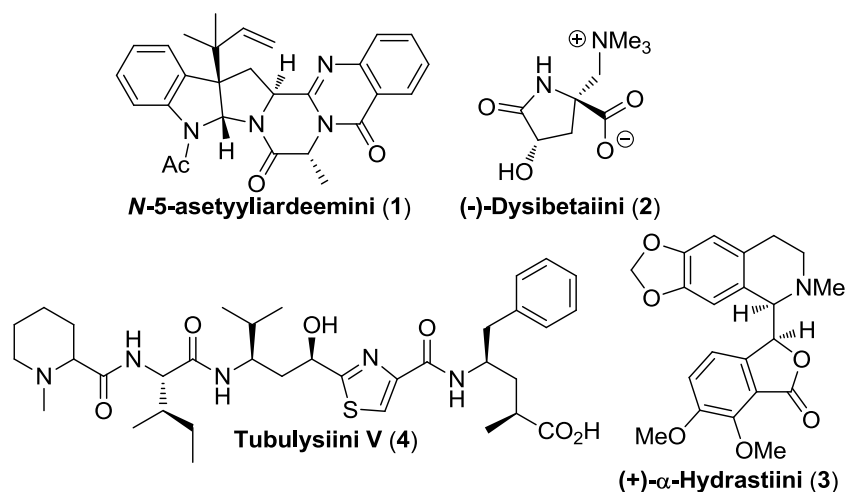
Koska luonnonaineet itsessään ovat monimuotoinen joukko, myös niiden synteesireitit eroavat toisistaan huomattavasti.^{2,5} Luonnonainesynteesit – kuten muutkin synteesit – voidaan kuitenkin jaotella karkeasti kahteen luokkaan: lineaarisiin ja konvergentteihin (eli haarautuneisiin) synteeseihin. Linearisessa synteesissä lähtöaineista tuotteeseen päästään reaktiosarjassa, jossa yhden reaktion tuotteeseen lisätään seuraavassa reaktiossa yksi uusi osanen (kuva 1). Konvergentti synteesi on taas haarautunut synteesireitti jossa kaksi tai useampi fragmentti liitetään toisiinsa yhdellä reaktiolla (kuva 1). Näistä yksinkertaisista malleista on nähtävissä miten konvergentilla synteesireitillä on mahdollista päästä samaan tuotteeseen vähemmällä peräkkäisillä vaiheilla. Lisäksi kokonaissaannot ovat konvergenteissa synteesissä teoreettisesti lineaarisia synteesiä korkeammat. Kolmen peräkkäisen 90% saantoisen vaiheen jälkeen lineaarisesta synteesistä saadaan tuotetta 73% kokonaissaannolla. Konvergentissa synteesissä vastaavaan tuotteeseen päästään vain kahdessa peräkkäisessä vaiheessa jolloin kokonaissaanto on 81%, vaikka vaiheita kummassakin reitissä on yhtä monta.



Kuva 1: Lineaarinen ja konvergentti synteesi

Konvergentin synteessin kaaviokuvassa kaksi palloa reagoivat keskenään muodostaen uuden kahden pallon yhdisteen (kuva 1).^{5,6} Jos kuvassa reagoivia palloja olisi yksi enemmän, kyseessä olisi pallojen multikomponenttireaktio. Määritelmällisesti multikomponenttireaktio on kolmen tai useamman yhdisteen reaktio, jonka tuotteessa ovat tallella suurin osa tai kaikki lähtöaineiden atomeista. Tällaiset reaktiot ovat omiaan juuri konvergenteissa synteeseireiteissä, sillä niillä on mahdollista – ja pakollista – yhdistää useampi molekyyli yhdeksi tuotteeksi yhdellä reaktiolla. Kaksi ehkä tunnetuinta multikomponenttireaktiota ovat Passerini- ja Ugi-reaktiot. Niitä kutsutaan isosyanidipohjaisiksi multikomponenttireaktioiksi, johtuen siitä että kummassakin yhtenä lähtöaineena on isosyanidi. Tyypillisimmin näitä reaktioita on hyödynnetty lääkeainesynteesissä, mutta viime vuosikymmeninä niiden käyttö myös luonnonainesynteesissä on hitaasti yleistynyt.⁶⁻⁸

Kuvassa 2 nähdään pintaraapaisua luonnonaineiden monimuotoisuudesta. Jokainen näistä sekundaarimetaboliiteista on valmistettu Passerini- tai Ugi-reaktiota hyödyntämällä. *N*-5-Asetyyliardeeminin (**1**) synteesissä Ugi-reaktio on toiseksi viimeinen vaihe, mitä seuraa enää yksi syklisaatio.⁹ Dysibetainin (**2**) kohdalla Ugi-reaktio on synteessin ensimmäisiä vaiheita jossa muodostetaan tuotteen γ -laktaamirengas.¹⁰ Hydrastiinin (**3**) erään välituotteen valmistus onnistuu osittain intramolekulaarisella Passerini-reaktiolla, jolla muodostettiin molekyylin laktonirengas.¹¹ Tubulysiini V:n (**4**) tiatsolirengaan valmistaminen onnistui eräällä Passerini-reaktion muunnelmalla.¹²



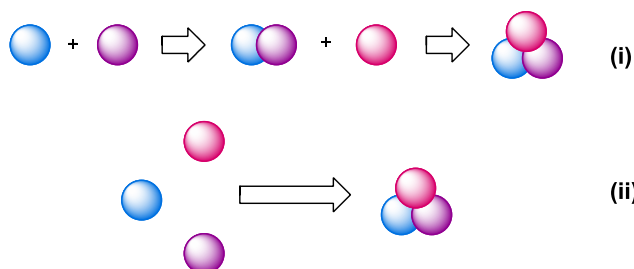
Kuva 2: Passerini- ja Ugi-reaktiolla valmistettuja luonnonaineita.^{9–12}

Tässä tutkielmassa käsitellään Passerini- ja Ugi-reaktioita luonnonainesynteesin näkökulmasta. Luku 2 kertoo millaisia reaktioita Passerini- ja Ugi-reaktiot ovat, niiden mekanismeja, millaisia tuotteita niillä on mahdollista valmistaa sekä näiden reaktioiden stereoselektiivisyyttä. Luvuissa 3–7 esitellään luonnonainesynteesiä joissa näitä multikomponenttireaktioita on hyödynnetty. Luonnonaineiden jaottelu on tehty sen mukaan millaisia rakenteita Passerini- ja Ugi-reaktiolla on lopulliseen tuotteeseen saatu aikaan. Tästä johtuen osa rakenteista ei välttämättä ole valmistettavissa suoraan kummallakaan reaktiolla, vaan niiden muodostaminen vaatii vielä näitä multikomponenttireaktioita seuraavia jatkoreaktioita. Jokainen luonnonainesynteesiä käsittelevä luku alkaa pienellä johdannolla siitä kuinka kukin funktionaalisuus voidaan Passerini- tai Ugi-reaktiota hyödyntämällä valmistaa.

2 Isosyanidipohjaiset multikomponenttireaktiot

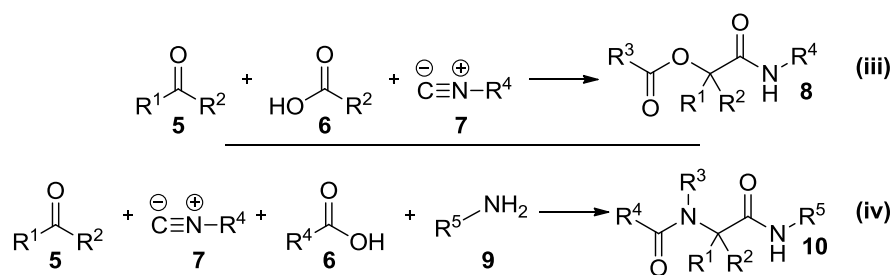
Isosyanidipohjaisissa multikomponenttireaktioissa – kuten multikomponenttireaktioissa yleensäkin – kolme tai useampi lähtöaine reagoi keskenään muodostaen tuotteen jossa kaikki tai suurin osa lähtöaineiden atomeista on läsnä.⁶ Toisena vaatimuksena on että yksi näistä lähtöaineista on isosyanidi. Lisäksi yhtenä tärkeänä isosyanidipohjaisten multikomponenttireaktioiden ominaisuutena voidaan pitää niiden suoma mahdollisuutta valmistaa suhteellisen monimutkaisia yhdisteitä yksinkertaisistakin lähtöaineista vain

yhdellä vaiheella. Tämä etu nousee paremmin esille kun yleistä multikomponenttireaktiota verrataan perinteiseen reaktiosarjaan (kuva 3). Verrattuna perinteiseen kahden lähtöaineen reaktioon (i, kuva 3) multikomponenttireaktioilla (ii, kuva 3) voidaan saavuttaa haluttu tuote yhdellä vaiheella, kun kahden lähtöaineen reaktioilla sama tuote saavutettiin kahdessa tai useammassa vaiheessa.



Kuva 3: Multikomponenttireaktio verrattuna kahden komponentin reaktiosarjaan.⁶

Tunnetuimmat isosyanidipohjaiset multikomponenttireaktiot ovat Passerini- ja Ugi-reaktiot.^{6,8,13,14} Passerini-reaktiossa (iii, kaavio 1) karbonyyliyhdiste **5**, karboksyylihapo **6** ja isosyanidi **7** reagoivat keskenään muodostaen α -asyloksiamideja **8**. Ugi-reaktiossa (iv, kaavio 1) edellä mainittujen lisäksi mukana on amiini **9**, jolloin tuotteena saadaan α -asyyliaminokarboksamiineja **10**.

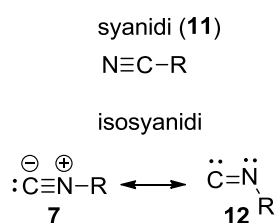


Kaavio 1: Passerini- ja Ugi-reaktiot.¹³

Koska kumpikin näistä reaktioista nojaa vahvasti isosyanideihin, seuraavaksi käsitellään lyhyesti niiden rakennetta, reaktiivisuutta ja valmistusta.

2.1 Isosyanidit ja niiden reaktiivisuus

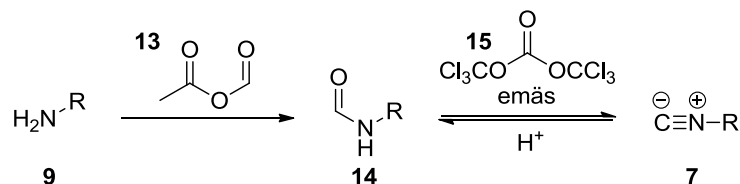
Isosyanidit – aikaisemmin myös isonitriilit – ovat vetysyanidin ja sen johdannaisten isomeerejä (kuva 4).^{15,16} Syanidissa (**11**) R-ryhmä on kiinnittyneenä hiileen ja isosyanidissa (**7** ja **12**) taas typeen. Isosyanidilla on kaksi resonanssirakennetta, joissa toisessa hiiltä ja typpä yhdistää kolmoissidos (**7**) ja toisessa kaksoissidos (**12**). Kolmoissidosvaihtoehdossa hiilellä on negatiivinen varaus ja typpellä positiivinen kun kaksoissidoksen kohdalla kumpikin atomi on neutraali. Todellisuudessa isosyanideissa on enemmän kolmoissidosluonnetta, jolloin rakenne **7** on lähempänä totuutta. Isosyanidien onkin todettu olevan muodollisesti divalentti funktionaalinen ryhmä. Riippuen reaktioolosuhteista isosyanidit voivat toimia sekä elektrofiileinä että nukleofiileinä. Tämän lisäksi isosyanidit ovat suhteellisen stabiileja yhdisteitä, mikä tekee niistä varsin käyttökelpoisen funktionaalisuuden.



Kuva 4: Syanidi ja isosyanidin resonanssirakenne

Isosyanideja valmistetaan tyypillisesti amiineista *N*-formyloinnin ja dehydraation kautta (kaavio 2).^{6,17} *N*-formyloinnissa amiinista (**9**) muodostetaan muurahaishapon amidi (**14**). Tämä vaihe toteutetaan yleensä seka-anhydridimenetelmällä käyttäen esimerkiksi muurahaishapon ja etikkahapon anhydridiä (**13**). Muodostunut *N*-formamidi (**14**) muunnetaan vastaavaksi isosyanidiksi (**7**) dehydraatiolla. Yleisesti käytettyjä reagensseja dehydraatiossa ovat trifosgeeni (**15**) tai fosforyylikloridi (POCl₃). Lisäksi reaktiossa tarvitaan emästä. Muitakin dehydraatiomenetelmiä on kehitetty, mutta näiden suosio ei ole yltänyt *N*-formylointireitin tasolle. Luonnonainesynteesin kannalta olennaista on, että *N*-formylointireitillä aminohappoestereiden isosyanointi onnistuu ilman rasemisaatiota. Näin ollen enantiopuhtaiden luonnollisten aminohappojen käyttö isosyanidipohjaisissa multikomponenttireaktioissa on mahdollista. Ennen isosyanointia aminohapon karbok-

syylihappo on kuitenkin esteröitävä, sillä isosyanidit ovat hapoille herkkiä ja hajoavat takaisin vastaaviksi *N*-formamideiksi happojen vaikutuksesta.



Kaavio 2: Isosyanidien synteesi *N*-formyloinnilla ja dehydraatiolla.

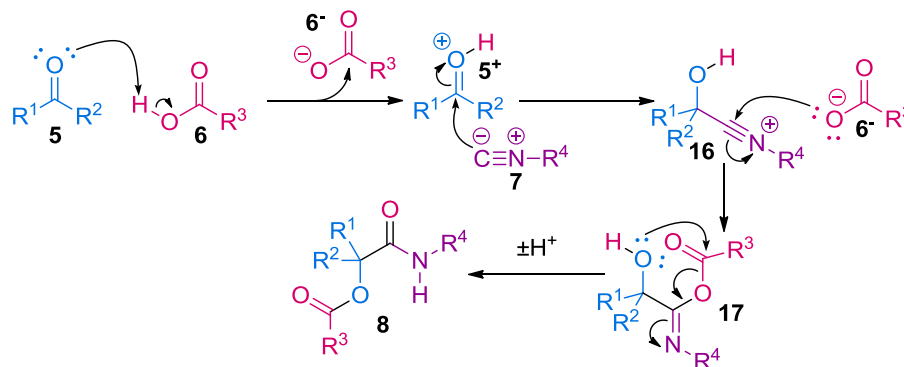
Isosyanidit eivät tyypillisesti ole terveydelle haitallisia muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta.⁶ Useilla haihtuvilla isosyanideilla on kuitenkin vahva ja epämiellyttävä hajua jota on kuvailtu muun muassa äärimmäisen voimakkaaksi, läpitunkeväksi ja kuvottavaksi. Isosyanideja onkin tutkittu niiden hajun vuoksi ei-tappavina aseina. Lisäksi hajua on epäilty yhdeksi syyksi niiden vähäiselle tutkimukselle 1900-luvun alkupuoliskolla. Todellinen syy tähän lienee kuitenkin niiden valmistuksen hankaluus ennen *N*-formylointireitin kehitystä 1950-luvulla.

2.2 Passerini-reaktio

Passerini-reaktio on vuonna 1921 julkaistu isosyanidipohjainen multikomponenttireaktio josta saadaan tuotteena α -asyloksiamideja karbonyyliyhdisteen, karboksyylihapon ja isosyanidin välisessä reaktiossa.^{8,18} Reaktiossa muodostuu kolme uutta sidosta jotka yhdistävät kaikki kolme lähtöainetta kaikkine atomeineen yhdeksi molekyyliksi. Tämä reaktio nimettiin kehittäjänsä – Mario Passerinin – mukaan ja edelleen se on yksi merkittävimmistä multikomponenttireaktioista.

Passerini-reaktiolle on esitetty vuosien varrella erilaisia mekanismeja. Suurin ratkaisematon kysymys liittyy välivaiheiden varauksiin: onko mekanismin jokin välivaihe ioninen vai ei?^{8,19} Ioninen mekanismi (kaavio 3) lähtee liikkeelle aldehdydin **5** protonoitumisella karboksyylihapolla **6** jolloin muodostuu karboksylaatti-ioni **6** ja oksoniumioni **5**⁺. Tätä seuraa isosyanidin nukleofiilinen additio protonoituneeseen aldehdydiin mistä saadaan välituotteeksi nitrilium-kationi **16**. Karboksylaatti **6** toimii seuraavassa vaiheessa nukleofiilinä nitrilium-kationiin **16** kohdistuvassa additiossa mistä muodostuu

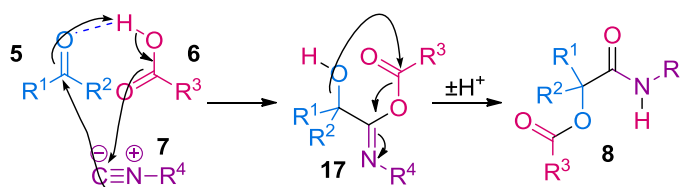
imiini **17**, josta asyylitoisiintumisen ja amidin tautomerisaation jälkeen muodostuu α -asyloksiamidi **8**. Reaktiossa muodostuneet uudet sidokset nähdään tuotteessa mustalla.



Kaavio 3: Passerini-reaktion ioninen mekanismi.⁸

Tuotteessa karboksyylihappo (aniliininpunaisella) on jakautunut kolmeen osaan reaktion aikana ja isosyanidin hiilestä (violetilla) muodostuu α -asyloksiamidin karbonyylihiili (kaavio 3). Aldehydin happi (sinisellä) taas saa tuotteessa paikkansa asyylihappena joka liittää asyyliryhmän muuhun molekyyliin.

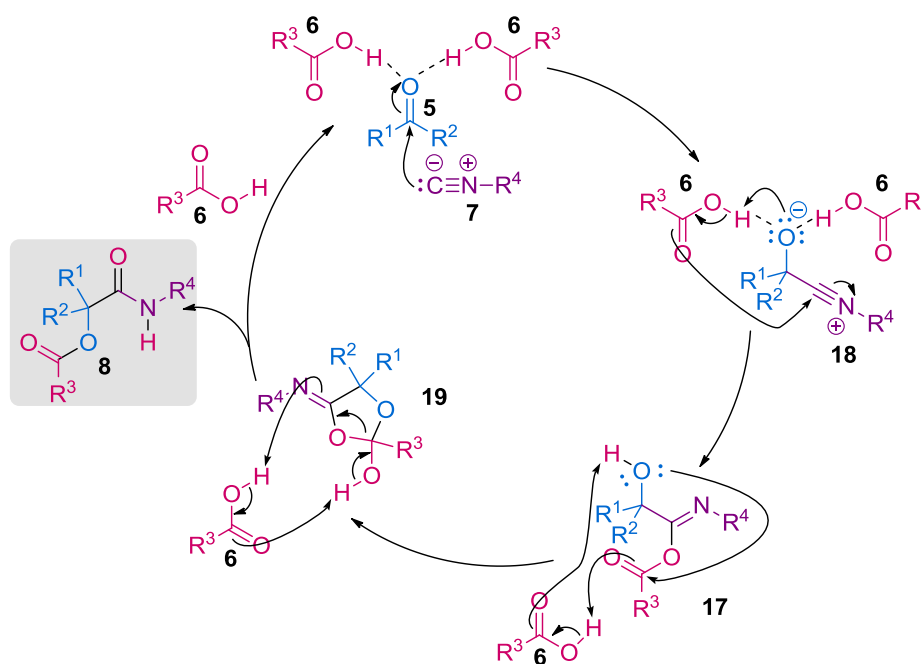
Passerini-reaktio tehdään tyypillisesti poolittomissa liuottimissa, joten ioninen mekanismi saattaa vaikuttaa varauksetonta mekanismia epätodennäköisemmältä.^{8,19} Nykyään yleisesti hyväksytty reaktiomekanismi onkin varaukseton ja näin tarjoaa yhden selityksen poolittomien liuottimien reaktiota kiihdyttävälle vaikutukselle (kaavio 4). Tässä mekanismissa kaikki kolme lähtöainetta reagoivat keskenään yhdessä vaiheessa muodostaen imiinin **17**. Tästä jälleen asyylitoisiintumisen ja protoninsiirron myötä päästään α -asyloksiamidituotteeseen **8**.



Kaavio 4: Yleisesti hyväksytty Passerini-reaktion mekanismi.⁸

Kaavion 4 mekanismia on vuosia pidetty parhaimpana mallina Passerini-reaktiolle. Tuoreiden laskennallisten tulosten perusteella näyttää kuitenkin siltä että ioninen meka-

nismi olisi energetisesti edullisempi.²⁰ Toisin kuin on ajateltu, tämä ei ole ristiriidassa kokeellisten havaintojen kanssa. Aproottiset liuottimet kiihdyttävät reaktiota vahvistamalla lähtöaineiden välisiä vetysidoksia. Vastikään julkaistussa uusitussa Passerini-reaktion mekanismissa reaktio kulkee varautuneiden välivaiheiden kautta tuotteeseen (kaavio 5). Tämä laskennallinen mekanismi lähtee liikkeelle isosyanidin (**7**) hiilen nukleofiilisella additiolla aldehydin (**5**) karbonyylihiileen samalla kun kaksi karboksyylihappoa (**6**) stabiloivat muodostuvaa iminium-kationia (**18**) vetysidoksillaan. Tätä seuraa karbonyylihapen protonoituminen karboksyylihapolla imiiniksi **17**. Tästä päästään viisirenkaaseen **20** karboksyylihappovälitteisen toisiintumisen tuloksena. Viisirengas **19** edelleen toisiintuu karboksyylihapon toimiessa protoninvälittäjänä α -asyloksiamidiksi **8** ja karboksyylihapoksi **6**. Karboksyylihappo toimii tämän mekanismin mukaan reaktiossa sekä lähtöaineena että katalyyttinä, sillä se palaa syklin lopussa muuttumattomana uudelleen kierto.



Kaavio 5: Passerini-reaktion katalyyttinen sykli.²⁰

Tämä uusittu mekanismi vaikuttaa ensisilmäyksellä eroavan edeltäjistään huomattavasti. Lähemmän tarkastelun jälkeen kuitenkin on todettavissa että suurin ero on karboksyylihapon vetysidosvälitteinen katalyyysi reaktiossa sekä välivaiheen **19** viisirengas

josta lopullinen tuote muodostuu. Erotten kaavioiden 3 ja 4 mekanismeista, tässä asyyli-vaellus ei suoraan tuota α -asyloksiamidituotetta vaan muodostaa viisirenkaan **19**. Näitä tuloksia ei kuitenkaan ole vielä varmennettu kokeellisesti, joten todistus pohja tältä mekanismilta vielä puuttuu. Tämä mekanismi kuitenkin selittäisi Passerini-reaktion kiihtymisen kun liuottimena käytetään vettä.²¹

Isosyanidipohjaisten multikomponenttireaktioiden lähtöainevalikoima on tyypillisesti hyvin laaja.^{8,13} Sama on totta myös Passerini-reaktion kohdalla, mikä johtuu sen miedoista ja hiukan happamista reaktio-olosuhteista. Reaktio sietää muun muassa estereitä, ntriilejä, amideja, imidejä, sulfonamideja, atsideja, aromaattisia nitroryhmiä, fosfonaatteja, *N*-nitroguanidiineja ja atso-yhdisteitä. Passerini-reaktion voidaankin sanoa olevan lähtöaineidensa suhteen hyvin spesifinen reaktio, sillä se vaatii kaikki kolme lähtöainetta käynnistyäkseen, mutta kun tämä ehto toteutuu, eivät muut funktionaaliset ryhmät juurikaan reaktiota häiritse. Näin ollen onkin järkevämpää tarkastella substituentteja joiden on todettu haittaavan tai voidaan päätellä haittaavan Passerini-reaktiota.

Ilmeistä on että Passerini-reaktiossa substituentteina ei voida käyttää karboksyylihappoja, karbonyyliryhmiä tai isosyanideja tai näiden kaltaisesti Passerini-reaktiossa reagoivia ryhmiä. Tästä poikkeuksena ketoniryhmä ei välttämättä häiritse reaktiota, jos lähtöaineena käytetään aldehydiä. Aldehydit reagoivat tyypillisesti ketoneita nopeammin, jolloin yleensä substituenttina ketonit eivät aiheuta ongelmia. Mutta kun reaktiossa käytetään lähtöaineena ketonia, aldehydit täytyy suojata jotta ne eivät häiritse reaktiota.^{8,14}

Amiineista vain tertiääriset amiinit eivät estä Passerini-reaktiota.^{8,22} Muut amiinit kondensoituvat imiiniksi karbonyyliyhdisteen kanssa, jolloin reaktio saattaa edetä Ugi-reaktiona Passerini-reaktion sijaan. Vahvasti emäksisillä tertiäärisillä amiineilla Passerini-reaktio voi kuitenkin estyä, sillä reaktiossa käytetty karboksyylihapo todennäköisesti näissä olosuhteissa deprotonoituisi täysin estäen sen protoninvälitystoiminnan. Heikosti emäksisten tertiääristen amiinien läsnä ollessa Passerini-reaktio on kuitenkin mahdollinen.

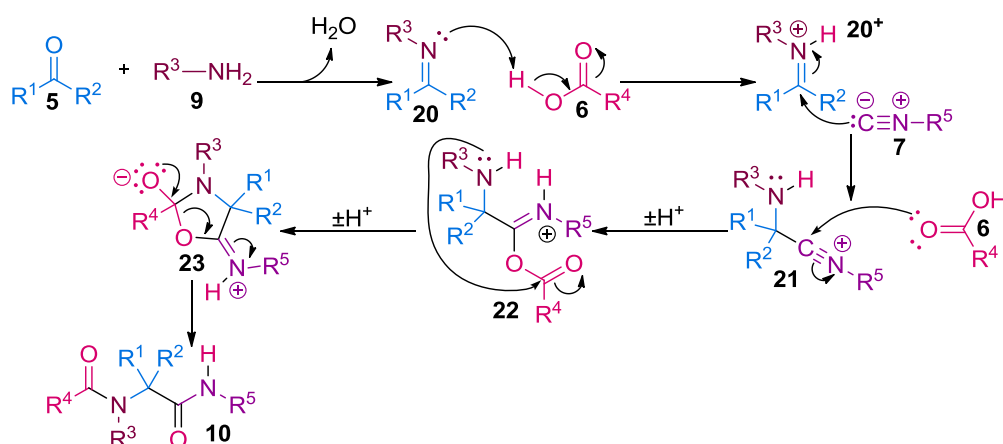
Passerini-reaktion mekanismeissa on hydroksyyllisiä välituotteita, mistä johtuen suojaamattomat OH-ryhmät aiheuttavat sivutuotteita toisiintumisvaiheessa. Tästä johtuen on suositeltavaa suojata OH-ryhmät soveltuvin suojaryhmin Passerini-reaktiota varten.

Edellä mainittujen lisäksi suurin rajoittava tekijä Passerini-reaktiolle on käytettyjen lähtöaineiden koko.^{8,23} Tyypillisesti reaktio hidastuu huomattavasti tai joissain tapauksissa estyy kokonaan kun käytetään yhtä tai useampaa kookasta tai steerisesti estynyttä lähtöainetta. Kamferi ei esimerkiksi reagoi lainkaan Passerini-reaktiolla. Joissain tapauksissa kookkaiden yhdisteiden reaktioita voidaan nopeuttaa suorittamalla reaktio korkeassa paineessa.

2.3 Ugi-reaktio

Ugi-reaktio on karbonyyliyhdisteen, isosyanidin, karboksyylihapon ja amiinin välinen reaktio josta saadaan tuotteena α -aminokarboksamideja.^{13,14} Reaktio julkaistiin vuonna 1959 ja siitä on sen jälkeen kehittynyt laajasti hyödynnetty multikomponenttireaktio niin lääkeaine- kuin luonnonainesynteessissäänkin. Reaktiossa muodostuu kolme uutta sidosta – yksi C-C-sidos ja kaksi heterosidosta – jotka liittävät lähtöaineet yhteen yhdeksi molekyyliksi. Koska reaktion ensimmäisessä vaiheessa muodostuu kondensaatiossa imiini, reaktiota on kutsuttu myös Ugi-kondensaatioreaktioksi.

Ugi-reaktion mekanismi alkaa imiinikondensaatiolla, missä karbonyyliyhdiste **5** ja amiini **9** muodostavat imiinin **20**. Tämän jälkeen imiini **20** vastaanottaa protonin karboksyylihapolta **6**, jolloin muodostuu iminiumioni **20**⁺. Mahdollista on – ja jopa todennäköistä – että nämä kaksi vaihetta tapahtuvat samanaikaisesti, jolloin iminiumioni **20**⁺ muodostuu suoraan kondensaatiovaiheessa. Iminiumioni on vastaavaa aldehydiä – tai ketonia – reaktiivisempi, jolloin isosyanidi kohdistaa nukleofiilisen addition iminiumioniin **20**⁺. Näin muodostuu amiini **21**, joka edelleen muodostaa asyloksi-imiinin **22** karboksyylihapon addition tuloksena. Tätä seuraa toisiintuminen viisirenkaaksi **23**, josta muodostuu α -aminokarboksamidi **10** karbonyylihapen palautumisen tuloksena.



Kaavio 6: Ugi-reaktion mekanismi, kun karboksyylihapo on nukleofiilinä.¹³

Reaktio voidaan toteuttaa lisäämällä isosyanidi ja karboksyylihapo valmiiseen imiiniin, mikä osoittaa imiininmuodostuksen olevan reaktion ensimmäinen vaihe.^{6,13,14,21} Ugi-reaktio on näin ollen ajateltavissa myös imiinin, nukleofiilin ja isosyanidin välisenä kolmen komponentin reaktiona. Reaktio-olosuhteiltaan ja toteutukseltaan Ugi-reaktio eroaa huomattavasti Passerini-reaktiosta. Ugi-reaktio on voimakkaan eksoterminen ja yleensä isosyanidi lisätään hyvin jäähdytettyyn kolmen muun komponentin liuokseen. Joissakin tapauksissa Ugi-reaktio on valmis muutamassa minuutissa kun taas toisinaan reaktion valmistumisessa saattaa kestää viikkoja. Metanoli on tyyppillisin Ugi-reaktiossa käytetty liuotin, mutta myös muut alhaisen molekyylipainot alkoholit sopivat reaktiolle. Lisäksi aproottiset pooliset liuottimet kuten DMF, THF ja kloroformi ovat mahdollisia. Reaktioita voidaan kiihdyttää Lewis-hapolla, mikä saattaa olla tarpeen kun käytetään heikosti elektrofiilisiä imiinejä. Parhaat saannot reaktiossa saadaan lähtöaineiden korkealla konsentraatiolla (yleensä 0,5–2M).

Kuten Passerini-reaktiollakin, myös Ugi-reaktion lähtöainevalikoima on laaja.^{6,14} Suurin rajoittava tekijä löytyy lähtöaineiden funktionaalisista ryhmistä, sillä substituentteina vapaat amiinit, imiinit, karboksyylihapot ja karbonyyliyhdisteet eivät sovellu Ugi-reaktioon. Toinen rajoittava tekijä löytyy Ugi-reaktion ja Passerini-reaktion yhteisistä lähtöaineista. Eräillä liuottimilla – kuten dikloorimetaanilla (DCM) ja tolueenilla – ja kookkailla substituentteilla Passerini-reaktio saattaa kilpailla Ugi-reaktion kanssa sivureaktiona. Amiinit liukenevat yleensä huonosti perinteisiin Passerini-reaktion liuottimiin,

jolloin olosuhteet ovat edullisemmat Passerini-reaktiolle ja Ugi-reaktio estyy täysin. Myös muut lähtöaineiden väliset sivureaktiot ovat mahdollisia ja Ugi-reaktiolle onkin tyypillistä että kvantitatiivisiin saantoihin päästään harvoin, joskin se on mahdollista kun reaktio-olosuhteet optimoidaan huolellisesti. Yleisin tapa estää sivureaktioita on lisätä isosyanidi sekä nukleofiili jo etukäteen kondensoituun imiiniin. Tämän menetelmän teho perustuu esikondensoidun imiinin karbonyylihiilen elektrofiilisyyden nousuun jo ennen muiden lähtöaineiden lisäystä. Tällöin muut mahdolliset sivureaktiot lähtöaineiden välillä estyvät ja samalla isosyanidin hydrolysoituminen vastaavaksi formamidiksi reaktion nukleofiilin vaikutuksesta estyy.

Ugi-reaktion tuotteen tyyppi vaihtelee huomattavasti riippuen käytetystä nukleofiilista ja amiinista. Karbonyyliyhdisteen ja isosyanidin rakenteella taas ei ole merkitystä muodostuvan tuotteen perusrakenteen kannalta, jolleivät nämä yhdisteet sisällä sekundaarisia reaktioita mahdollistavia ryhmiä. Näin ollen tuotteen rakenne määräytyy pääsääntöisesti käytetyn amiinin ja nukleofiilin perusteella.

Karboksylihappojen lisäksi Ugi-reaktiossa on mahdollista käyttää suurta määrää erilaisia nukleofiilejä.^{13,14} Reaktiota on toteutettu muun muassa vetyatsidilla, syanaatilla, tio-syanaatilla, hiilihapon monoestereillä, sekundaaristen amiinien suoiloilla ja vetyselenidillä. Tärkein vaatimus nukleofiilille on, että se muodostaa muiden lähtöaineiden kanssa välituotteen **22** joka toisiintumisen jälkeen muodostaa lopullisen tuotteen **10** (kaavio 6). Tästä johtuen tiolaatti-ionit eivät sovellu Ugi-reaktion nukleofiileiksi, sillä ne muodostavat isosyanidien kanssa irreversiibelisti α -aminoalkylaatiotuotteen, minkä vuoksi Ugi-reaktio estyy.

Yleistäen voidaan sanoa että mikä tahansa riittävän nukleofiilisen NH-ryhmän sisältävä amiini reagoi Ugi-reaktiossa.^{6,13,14} Käytännössä kuitenkin ammoniakilla saannot jäävät usein alhaisiksi, mikä johtuu muodostuvista sivutuotteista. Tästä syystä ammoniakki korvataan yleensä jollain helposti hydrolysoitavalla primaarisella amiinilla tai ammoniumasetaatilla. Koska ainoana vaatimuksena amiinille on NH-ryhmä, tertiääriset amiinit eivät sovellu Ugi-reaktiolle.

Ugi-reaktio ei juuri rajoita karbonyyliyhdisteiden tai isosyanidien rakennetta.¹⁴ Tärkeintä on että nämä kaksi funktionaalista ryhmää ovat läsnä reaktioseoksessa ja että karbonyyliyhdiste muodostaa iminiumionin 20^+ johon isosyanidin on mahdollista hyökätä. Merkittävin yhteinen rajoitus karbonyyliyhdisteiden ja isosyanidien kohdalla on niiden steerinen estyneisyys ja koko. Yhtäläisyytenä Passerini-reaktion kanssa myös Ugi-reaktiossa ketonit reagoivat tyypillisesti aldehydejä hitaammin, jolloin ketoniryhmä ei välttämättä häiritse aldehydiin kohdistuvaa Ugi-reaktiota.

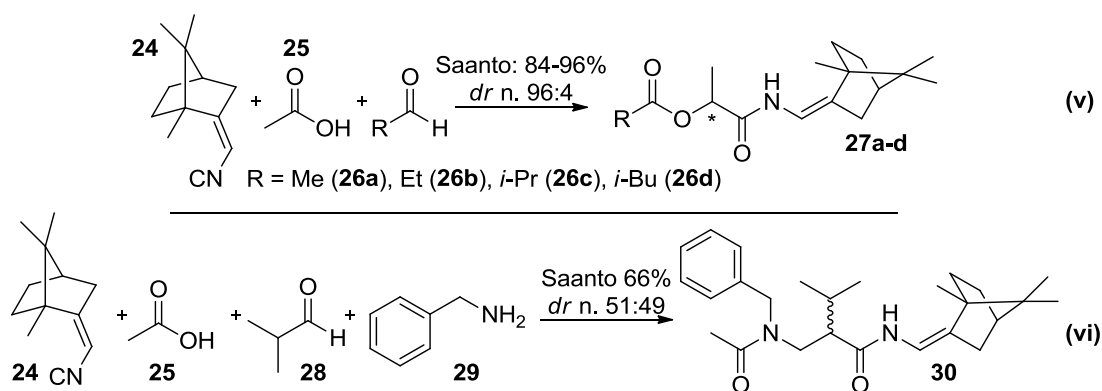
Kaikilla edellä mainituin perustein Ugi-reaktiota voidaan kutsua ”kaikki käy”-reaktioksi. Reaktio on toteutettavissa laajalla lähtöaineiden kirjolla ja lähtöaineiden substituenteillekin rajoituksia on vähän. Suojaryhmien avulla nämäkin muutamat ongelmat ovat helposti vältettävissä.

2.4 Stereoselektiiviset Passerini- ja Ugi-reaktiot

Luonnonaineet ovat tyypillisesti puhtaita enantiomeerejä tai diastereomeerejä, mistä johtuen niiden selektiivinen valmistaminen on atomiekonomian kannalta järkevää.^{2,7} Lääkeainesynteesin kannalta tilanne on samankaltainen, saman aineen kahdella diastereomeerillä tai enantiomeerillä voi olla lääkinnällisesti hyvin erilaiset vaikutukset, mistä johtuen stereopuhtaan tuotteen valmistaminen on kannattavampaa – ja turvallisempaa – kuin raseemisen seoksen. Tämän vuoksi stereoselektiivisten Passerini- ja Ugi-reaktioiden kehitys on viimeisen kahdenkymmen vuoden aikana ollut kiivasta. Tästä huolimatta Ugi-reaktiosta ei vielä ole onnistuttu kehittämään enantioselektiivistä versiota, ja Passerini-reaktiollekin kehitettyjen metodien selektiivisyydet ovat parhaimmillaan kohtalaisia tai erinomaisia mutta vain hyvin spesifisissä tapauksissa. Kummankin reaktion diastereoselektiivisyyttä on kuitenkin mahdollista ohjata kiraalisten lähtöaineiden avulla.

Yksi ensimmäisistä stereoselektiivisistä isosyanidipohjaisista multikomponenttireaktioista toteutettiin steerisesti estyneellä kamferin isosyanidijohdannaisella **24** (v, kaavio 7).^{8,24} Tällä menetelmällä saatiinkin Passerini-reaktion tuotteita **27a-d** hyvällä diastereomeerisuhteella (*dr* noin 96:4) kun reaktion aldehydeinä käytettiin yksinkertaisia alkyyli-substituoituja aldehydejä (**26a-d**). Lisäksi tässä reaktiossa saannot olivat korkeat

(84–96%), huolimatta kookkaasta ja jäykästä isosyanidikomponentista. Näiden kokeiden tuloksena voidaan yksiselitteisesti todeta isosyanidikomponentilla olevan vaikutusta Passerini-reaktion stereoselektiivisyyteen. Samaa ei voida sanoa Ugi-reaktiosta (vi, kaavio 7). Samaisella kamferijohdannaisella (**24**) sekä etikkahapolla (**25**), isobutyyrialdehydillä (**28**) ja bentsyyliamiinilla (**29**) *dr*:t jäivät noin 51:49 ja tuotteen **30** saantokin jäi huomattavasti Passerini-reaktiota alhaisemmaksi. Näistä tuloksista voidaan päätellä että Ugi-reaktiossa isosyanidin vaikutus stereoselektiivisyyteen on olematon.²⁴



Kaavio 7: Passerini- Ugi-reaktiot kamferin isosyanidijohdannaisella.²⁴

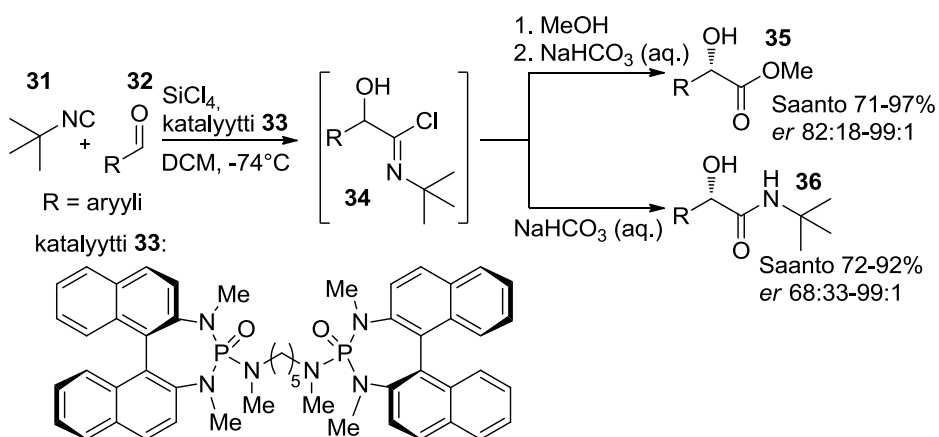
Nämä kaksi reaktiota osoittavatkin perustavanlaatuisen eron Passerini- ja Ugi-reaktioiden välillä. Vaikka nämä kaksi reaktiota yhdistetään helposti samaan luokkaan niiden samankaltaisuuden vuoksi, eroavat ne mekanismeiltaan niin paljon, että stereoselektiivisyyden kannalta yleensä toiselle reaktiolle toimiva metodi ei tuota tulosta toisella. Tästä johtuen näiden kahden reaktion stereoselektiivisyyttä käsitellään tässä tutkielmassa erillisissä luvuissa.

2.4.1 Stereoselektiiviset Passerini-reaktiot

Edellä mainitun kamferin isosyanidijohdannaisen lisäksi Passerini-reaktion diastereoselektiivisyyteen voidaan vaikuttaa myös reaktion muiden komponenttien välityksellä.⁸ Poikkeuksena tästä ovat aldehydit, jotka saattavat rasemisoitua kun stereokeskus on α -hiilessä. Diastereoselektiivisyydelle yleisenä vaatimuksena on, että käytettävä kiraalinen komponentti on suhteellisen kookas ja siten suosii vain toisen diastereomeerin muodostusta.

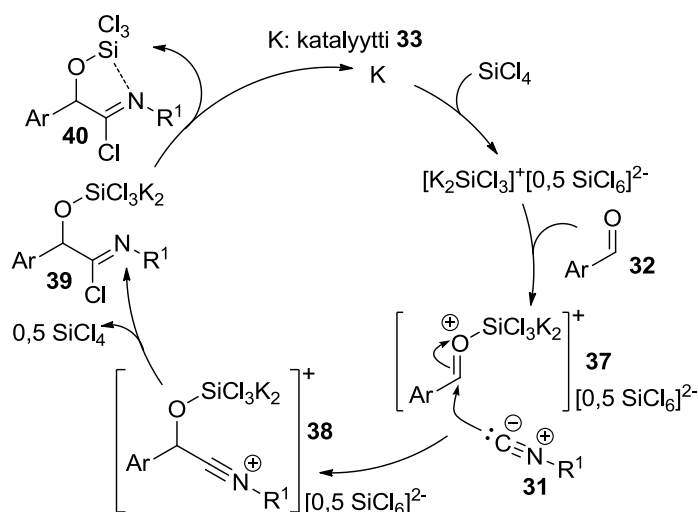
Enantioselektiivisten reaktioiden kohdalla tilanne on hiukan diastereeselektiivisiä reaktioita haastavampi.^{8,25} Ensinnäkin käytetyn katalyytin olisi pystyttävä reaktion edetessä sitoutumaan kaikkiin reaktion kolmeen komponenttiin ja tuotteen muodostuttua päästämään ne irti. Haasteellisen tästä tekee se tosiasia että käytännössä Passerini-reaktion lähtöaineet ja tuote muistuttavat toisiaan funktionaalisten ryhmien osalta niin paljon, että tuotteen irtoaminen katalyytistä ei ole itsestäänselvyys. Toisen ongelman tuottaa katalysoimattoman reaktion eteneminen taustareaktiona, jolloin enantioselektiivisyys jää alhaiseksi kun katalysoimaton reaktio tuottaa jatkuvasti raseemista seosta tuotteesta. Tästä syystä enantioselektiiviset Passerini-reaktiot tyypillisesti toteutetaan alhaisessa lämpötilassa ja isosyanidi lisätään hitaasti reaktioseokseen katalysoimattoman reaktion hillitsemiseksi.

Nämä ongelmat on kuitenkin pystytty jossain määrin voittamaan katalysoidulla reaktiolla jossa karboksyylihapon sijaan käytetään piitetrakloridia (SiCl_4) Lewis-happona ja kiraalisena katalyyttinä fosforiamidia **33**. (kaavio 8).^{8,26} Reaktiosta saadaan tuotteena joko α -hydroksimetyyliesteriä **35** tai α -hydroksiamidia **36** riippuen reaktion jälkikäsitteilyolosuhteista (MeOH , NaHCO_3 tai pelkkä NaHCO_3). Välituotteena reaktiosta saadaan imiiniä **34**. Tällä reaktiolla päästään parhaimmillaan erinomaisiin enantiomeerisuhteisiin (*er* 68:33–99:1, kaavio 8) ja hyviin saantoihin, mutta koska reaktion substraattiseuloissa reaktiota testattiin vain aromaattisilla aldehydeillä, sen laajemmista käyttömahdollisuuksista ei vielä nykyisellään ole tietoa. Lisäksi reaktion isosyanidikomponenttina käytettiin vain *tert*-butyyli-isosyanidia **31**, mikä ei vielä kerro mitään reaktion soveltuvuudesta esimerkiksi aminohappojen isosyanidijohdannaisille.



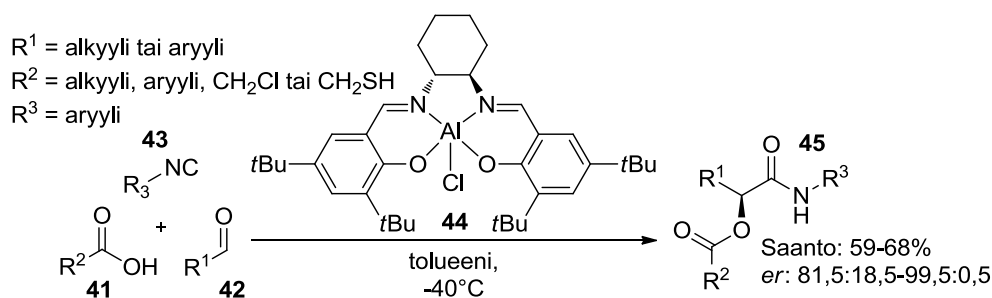
Kaavio 8: Enantioselektiivinen Passerini-reaktio piitetrakloridilla.^{8,26}

Reaktiossa piitetrakloridi toimii karboksyylihapon korvaajana johon kiraalinen katalyytti sitoutuu ja näin siirtää stereoinformaatiota muodostuvaan tuotteeseen (kaavio 9).^{26,27} Reaktion hypoteettisesta mekanismista nähdään kuinka katalyytti **K** muodostaa kompleksin piitetrakloridin kanssa, joka edelleen muodostaa sidoksen aldehydin **32** happeen jolloin muodostuu ionipari **37** (kaavio 9). Seuraavassa vaiheessa tapahtuu Passerini-reaktion tyypillinen isosyanidin **31** additio, josta muodostuu ionipari **38**. Tätä seuraa ioniparin **38** purkautumisen tuloksena kompleksi **39**, josta katalyytin irtoamisen jälkeen muodostuu edelleen välituote **40**, jossa piitrikloridi on vielä kiinnittyneenä karbonyylihapteen. Reaktion sammutusolosuhteista riippuen välituotteesta **40** muodostuu joko metyyliesteri **35** tai α -hydroksiamidi **36**.



Kaavio 9: Piitetrakloridireaktion hypoteettinen katalyyttinen sykli.²⁷

Klassisella Passerini-reaktiolla tilanne on edeltävää reaktiota haastavampi, sillä yhtäkään reaktion komponenteista ei tällöin voida korvata jollain muulla vastaavalla yhdisteellä. Muutamia enantioselektiivisiä klassisia Passerini-reaktioita on kuitenkin kehitetty, mutta niiden saannot sekä enantioselektiivisyydet jäävät yleensä vain tyydyttävälle tasolle muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta.⁷ Tällainen poikkeus on Zhu *et al.*²⁵ kehittämä enantioselektiivinen Passerini-reaktio (kaavio 10). Reaktion katalyyttinä käytettiin salen-alumiinikompleksia **44**, jolla tuotetta **45** saatiin kohtalaisella saannolla (59–68%) ja kohtalaisesta erinomaisiin ulottuvilla enantiomeerisuhteilla (*er* 81,5:18,5–99,5:0,5). Reaktion todettiin toimivan vähintään kohtalaisesti sekä aryyli- että alkyylisubstituoiduilla karboksyylihapoilla (**41**), aldehydeillä (**42**) ja isosyanideilla (**43**).



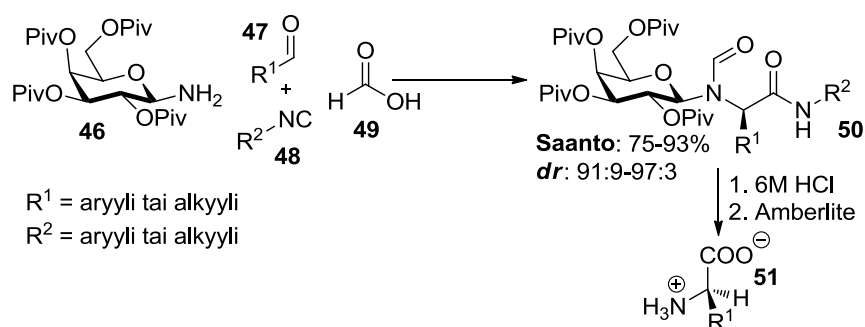
Kaavio 10: Salen-katalysoitu enantioselektiivinen Passerini-reaktio.²⁵

Vastaavanlaisella salen-katalyytillä voidaan myös valmistaa 5-(1-hydroksialkyyli)tetra-soleja enantioselektiivisesti kun karboksyylihappo korvataan vetyatsidilla.^{7,28} Parhaimmillaan näiden enantioselektiivisten reaktioiden saannot ja selektiivisyydet ovat luonnonainesynteesiin soveltuvalla tasolla, mutta vain hyvin spesifisillä lähtöaineilla. Erinomaiseen selektiivisyyteen (99,5:0,5) päästiin kaavion 10 reaktiossa vain kloorietikkahapon, isobutyrylaldehydin ja 1-isosyano-4-metoksibentseenin yhdistelmällä. Enantioselektiivisten Passerini-reaktioiden kehitystyö on kuitenkin useamman tutkimusryhmän kohteena ja voidaankin olettaa että lähivuosina näistä reaktioista kehitetään vielä parempia versioita.

2.4.2 Diastereoselektiiviset Ugi-reaktiot

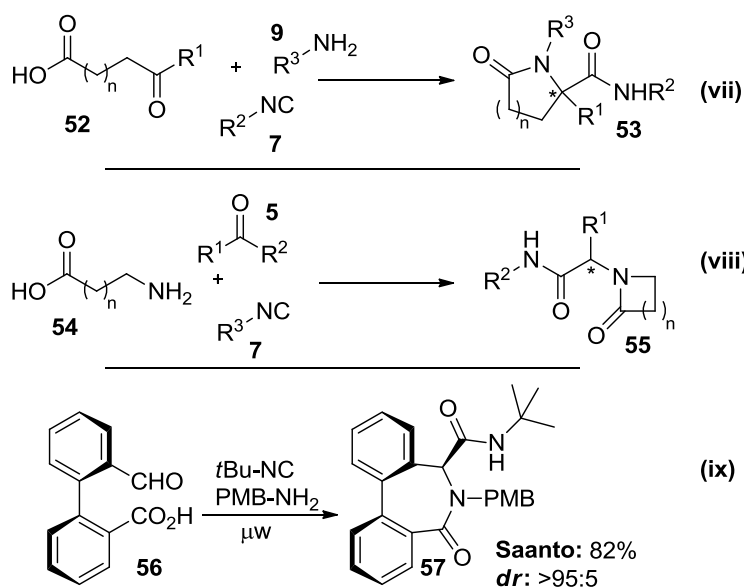
Koska Ugi-reaktiosta ei ole vielä onnistuttu kehittämään enantioselektiivistä muunnella, käydään tässä luvussa lyhyesti läpi vain diastereoselektiivisiä Ugi-reaktioita.^{7,14} Diastereoselektiiviset Ugi-reaktiot ovat olleet tutkimuksen kohteena jo vuosikymmeniä, joten erilaisia esimerkkejä näistä reaktioista on useita. Vaikka periaatteellisella tasolla Ugi-reaktion jokainen komponentti voisi potentiaalisesti siirtää stereoinformaatiota tuotteeseen, ei tämä käytännössä pidä paikkaansa. Tämä nähtiin aikaisemmin esitellyn kamferin isosyanidijohdannaisella toteutetun Ugi-reaktion kohdalla (luku 2.4). Lähtökohtaisesti voidaankin todeta isosyanidin olevan huono stereoinformaation lähde Ugi-reaktiossa. Tyypillisesti stereoselektiivisissä Ugi-reaktioissa hyödynnetään stereoinformaation lähteenä kiraalista amiinia tai imiiniä tai kahden komponentin yhdistelmä lähtöaineita, kuten ketohappoja tai aminohappoja.

Kun Ugi-reaktion amiinina käytettiin galaktopyranosyyliamiinijohdannaista **46**, saatiin reaktiosta tuotetta **50** 75–93% saannolla ja 91:9–97:3 diastereomeerisuhteella (kaavio 11).²⁹ Reaktio on toteutettavissa aryyli- tai alkyylisubstituoidulla aldehydillä (**47**) ja isosyanidilla (**48**) kun karboksyylihappona käytetään muurahaishappoa (**49**). Tämän reaktion tuotteesta pystytään muodostamaan kahdessa vaiheessa aminohappo **51**, jossa Ugi-reaktiossa muodostunut stereoinformaatio säilyy ilman rasemisaatiota.



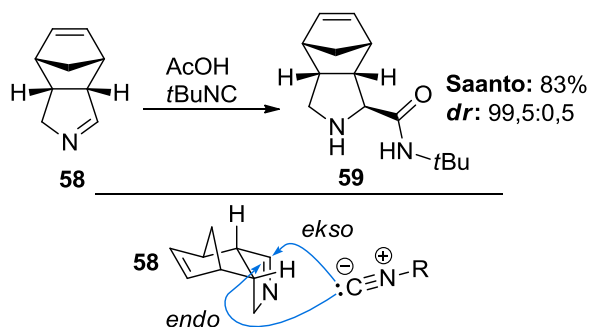
Kaavio 11: Diastereoselektiivinen Ugi-reaktio galaktopyranosyyliamiini-johdannaisella.²⁹

Edeltävää reaktiota käytetympi metodi luonnonainesynteeseissä käytetyissä diastereoselektiivisissä Ugi-reaktioissa on yhdistää kaksi lähtöaineiden funktionaalisuutta yhteen – kiraaliseen ja/tai steerisesti estyneeseen – molekyyliin. Tällöin ideaalitulanteessa reaktiosta saadaan tuotteena vain yhtä diastereomeeriä (kaavio 12). Tyypillisesti lähtöaineiden funktionaalisuuksista samaan yhdisteeseen sijoitetaan karboksyylihappo ja karbonyyliyhdiste tai amiini (**52** ja **54**). Näillä reaktioilla saadaan tuotteena laktaameja (**53** ja **55**), joiden renkaan koko riippuu käytetyn lähtöaineen hiiliketjun pituudesta. Reaktioissa tuotteeseen muodostuu stereokeskus (merkitty tähdellä, kaavio 12) kun karbonyyliyhdiste on epäsymmetrinen. Käytännön esimerkkinä tällaisesta syklistoivasta Ugi-reaktiosta nähdään kaavion 12 alaosassa (ix), reaktiossa kiraalinen ja steerisesti estynyt oksohappo **56** reagoi diastereoselektiivisesti p-metoksibentsyyliamiinin (PMB-NH₂) sekä *tert*-butyyli-isosyanidin kanssa muodostaen ε-laktaamin **57** 82% saannolla diastereomeerisuhteen ollessa yli 95:5.



Kaavio 12: Intramolekulaarisia Ugi-reaktioita

Kun Ugi-reaktiossa käytetään lähtöaineena syklistä imiiniä, puhutaan Ugi-Joullié-reaktiosta.⁷ Diastereoselektiivisenä Ugi-Joullié-reaktio on mahdollinen kun käytetty syklinen imiini on sterisest estynyt, jolloin reaktio on suotuistampi vain yhdestä suunnasta. Tässä esimerkkitapauksessa (kaavio 13) käytetyn imiinin kuppimainen rakenne estää reaktion täysin bisyklin **58** *endo*-puolelta, jolloin tuotteena saadaan vain toista kahdesta mahdollisesta diastereomeeristä (**59**, kaavio 13).

Kaavio 13: Diastereoselektiivinen Ugi-Joullié -reaktio sterisest estyneellä sykllisellä imiinillä **58**.⁷

Näistä edellä esitellyistä esimerkeistä voidaan todeta, että vaikka Ugi-reaktiolle ei vielä ole onnistuttu kehittämään enantioselektiivistä metodia, sen diastereoselektiiviset versiot ovat parhaimmillaan käyttökelpoisia luonnonainesynteisissä. Tosin on hyvin toden-

näköistä että selektiivisyyden aiheuttanut ryhmä joudutaan poistamaan tuotteesta myöhemmässä vaiheessa synteesiä, mikä ei välttämättä ole kovin onnistunut strateginen valinta.

3 Peptidit

Sekä Ugi- että Passerini-reaktion tuotteena saadaan amideja, joten näiden reaktioiden avulla eripituisten peptidiketjujen tuottaminen on yksinkertaista. Kun lisäksi otetaan huomioon että reagoivien komponenttien amidiryhmät eivät häiritse tai estä näitä reaktioita, on sekä Passerini- että Ugi-reaktiolla mahdollista yhdistää toisiinsa eripituisia peptidiketjuja.

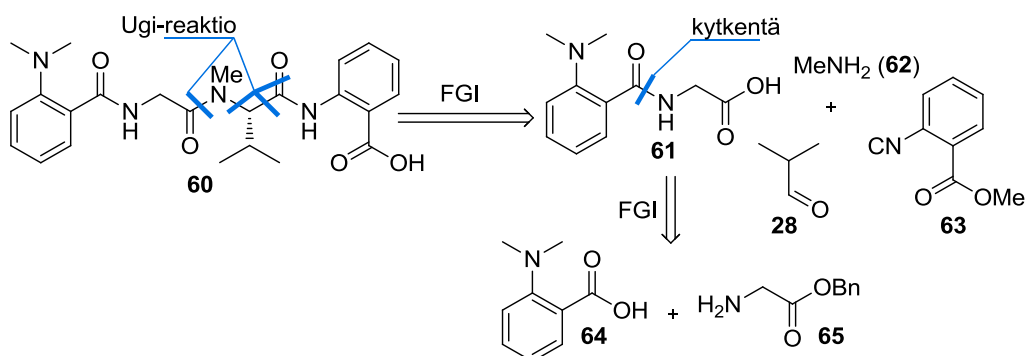
Koska Ugi-reaktiolla on mahdollista tuottaa erilaisia asyklisiä peptidiketjuja, onkin luonnollista että reaktiota on hyödynnetty juuri tässä tarkoituksessa myös luonnonainesynteesissä. Seuraavissa kappaleissa käydään läpi kaksi synteesiä joissa Ugi-reaktiota on hyödynnetty luonnonaineen rungon fragmenttien yhdistämiseen ketjuksi synteesin loppuvaiheissa. Ugi-reaktion käyttö pakottaa synteesit konvergenteiksi, sillä jokainen reaktion lähtöaineista valmistetaan omaa reittiään ja yhdistetään lopulliseksi tuotteeksi vasta synteesin loppupuolella.

3.1 (±)-Viridihappo

(-)-Viridihappo (kaavio 14, **60**) on eräiden *Penicillium*-suvun sienien tuottama tetrapeptidi.^{30,31} Sitä on löydetty muun muassa *P. viridicatum*, *P. nordicum* ja *P. aurantiogriseum* kantojen tuottamana. *P. nordicum*in raakauutteen perusteella viridihappo saattaa olla sytotoksinen eräitä solulinjoja kohtaan. Puhtaan raseemisen viridihapon on todettu olevan antibioottinen gram-negatiivista *Aliivibro fischeri* bakteeria kohtaan, mikä pysyttiin osoittamaan tässä esitetyn raseemisen synteesin tuotteesta. Tässä esitellyssä synteesireitissä hyödynnetään Ugi-reaktiota amidisidosten muodostukseen, jolloin viridihapon rakenne saadaan koottua kokonaisuudessaan yhteen yhdellä reaktiolla.

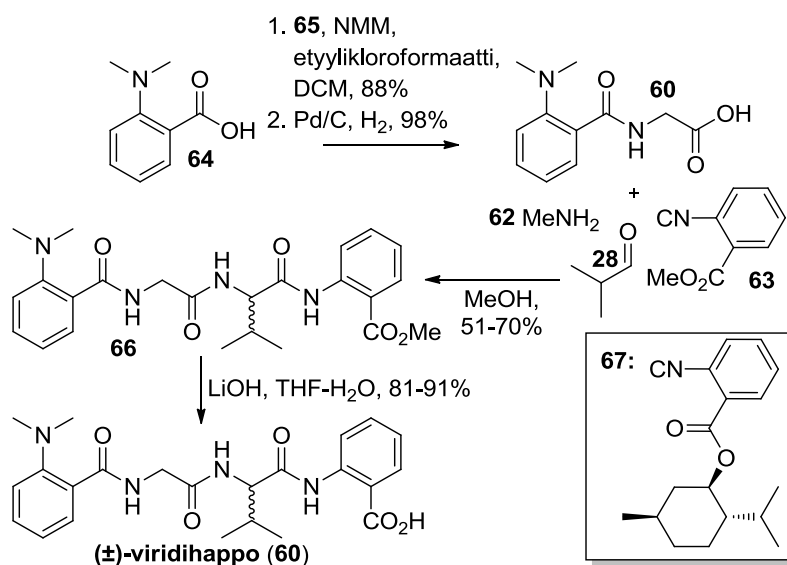
Viridihapon retrosynteesi on erittäin suoraviivainen (kaavio 14).³⁰ Ensimmäisessä vaiheessa nähdään Ugi-reaktion vaatimat katkaisut, josta saadaan karboksyylihappo **61**,

aromaattinen isosyanidi **63**, isobutyryyaldehydi **28** sekä metyyliamiini **62** reaktion lähtöaineiksi. Näistä karboksyylihappo **61** voidaan muodostaa karboksyylihapposta **64** ja bentsyylisuojatusta (OBn) glysiinistä **65** kytkentäreaktiolla.



Kaavio 14: Viridihapon retrosynteesi.³⁰

Ugi-reaktion karboksyylihappo **61** valmistettiin kytkemällä glysiini (**65**, kaavio 15) ja karboksyylihappo **64** yhteen seka-anhydridimenetelmällä. Tätä seurasi glysiinitähteen bentsyylisuojan poisto pelkistämällä, jolloin tuotteena saatiin karboksyylihappo **61**. Synteesin Ugi-reaktiosta saatiin tuotteena raseemista esterä **66** jonka metyyli hydrolysoitiin viridihapoksi **60** sekä sen enantiomeeriksi (ei kuvassa) litiumhydroksidilla. Näiden kahden enantiomeerin erottaminen ei onnistunut Ugi-reaktion tuotteesta tai valmiista (\pm)-viridihaposta. Ugi-reaktion selektiivisyyttä yritettiin nostaa isosyanidilla **67**, mutta reaktion saannot jäivät 47%:in eikä minkäänlaista enantioselektiivisyyttä reaktiossa havaittu, eli tuotteena saatiin 1:1 raseeminen seos kuten isosyanidilla **63**.



Kaavio 15: Viridihapon synteesi.³⁰

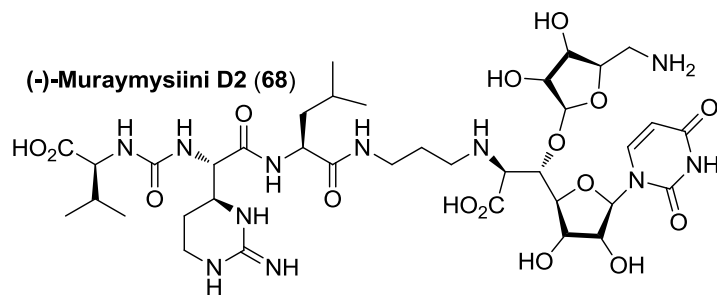
Isosyanidikomponentilla ei ole todettu olevan vaikutusta Ugi-reaktion stereoselektiivisyyteen.^{7,14} Esimerkiksi aikaisemmin esitellyllä kookkaalla ja jäykällä kamferijohdannaisella ei Ugi-reaktiossa saavutettu minkäänlaista selektiivisyyttä, toisin kuin Passerini-reaktiossa (ks. luku 2.4). Tästä johtuen ei ole yllätys että tässäkin synteesissä isosyanidin vaihtaminen kookkaampaan ja kiraaliseen versioon ei tuottanut haluttua selektiivisyyttä. Se ainoastaan pienensi reaktion saantoa, mikä sekään ei yllätä, sillä Ugi-reaktion saannot saattavat laskea kun reaktiossa käytetään steerisesti estyneitä lähtöaineita. Lisäksi tässä käytetyn mentynyyljohdannaisen **67** stereokeskukset ovat suhteellisen kaukana Ugi-reaktiossa muodostuvasta uudesta stereokeskuksesta, mikä vähentänee sen mahdollisuuksia tällaiseen toimintaan edelleen. Raseemisella synteesituotteella pysyttiin kuitenkin tutkimaan viridihapon antibioottisuutta, mikä ei aikaisemmin ole ollut mahdollista.³⁰

Tällä synteesireitillä saadaan tuotettua (±)-viridihappoa 27% saannolla ja kun kyseessä on raseeminen tuote, puhdasta luonnollista (-)-viridihappoa saadaan noin 14%:n saannolla, jota ei kuitenkaan pystytty eristämään enantiomeeristään. Samassa artikkelissa, jossa Ugi-reitti on kuvattu, puhdasta (-)-viridihappoa pystyttiin perinteisten peptidikytkentöjen avulla valmistamaan 28% kokonaissaannolla. Niinpä tässä yhteydessä Ugi-reaktio ei välttämällä ollut onnistunut valinta. Tosin Ugi-reaktiolla voidaan tuottaa hel-

posti erilaisia viridihapon analogeja, mikä ei yhtä helposti onnistu peptidikytkentäreitillä.

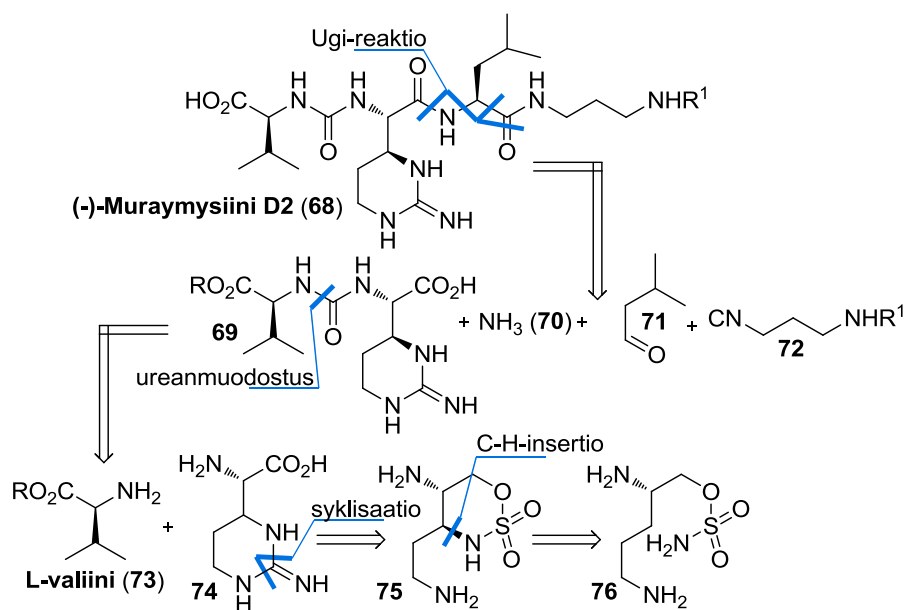
3.2 (-)-Muraymyysiini D2

Muraymyysiinit ovat *Streptomyces sp.* bakteerikannasta eristettyjä sekundaarimetaboliitteja.^{32,33} Ne ovat osoittaneet antimikrobiaalisia ominaisuuksia gram-positiivisia bakteereja kohtaan estämällä näiden bakteerien soluseinän biosynteesiä. Ensimmäinen (-)-muraymyysiini D2:n (**68**, kuva 5) kokonaissynteesi ja samalla myös ensimmäinen muraymyysiinisynteesi julkaistiin vuonna 2010 ja olennaisessa osassa synteesissä on Ugi-reaktio.



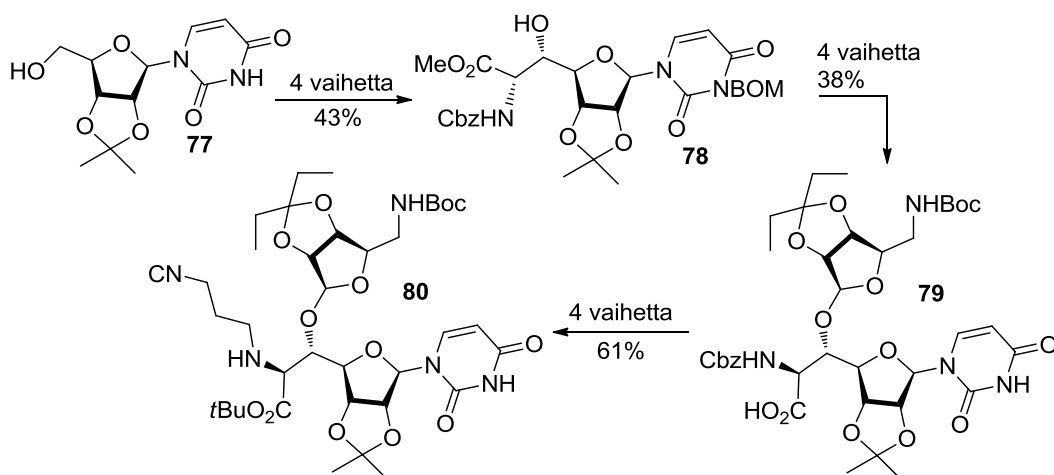
Kuva 5: (-)-Muraymyysiini D2 (**68**).

Muraymyysiini D2:n retrosynteesin (kaavio 16) ensimmäinen vaihe paljastaa Ugi-reaktion lähtöaineet – karboksyylihappon **69**, ammoniakkin **70**, aldehydin **71** sekä isosyanidin **72**. Seuraavassa vaiheessa muodostetaan Ugi-reaktion aldehydi L-valiinista (**69**) ja syklistä guanidiiniyhdisteestä **74**. Viimeisissä retrosynteesin vaiheissa guanidiiniyhdiste syklistoidaan ja renkaan aihio muodostetaan sulfamaatin CH-insertiolla diamiinista **75**, joka valmistetaan sulfamaatista **76**.



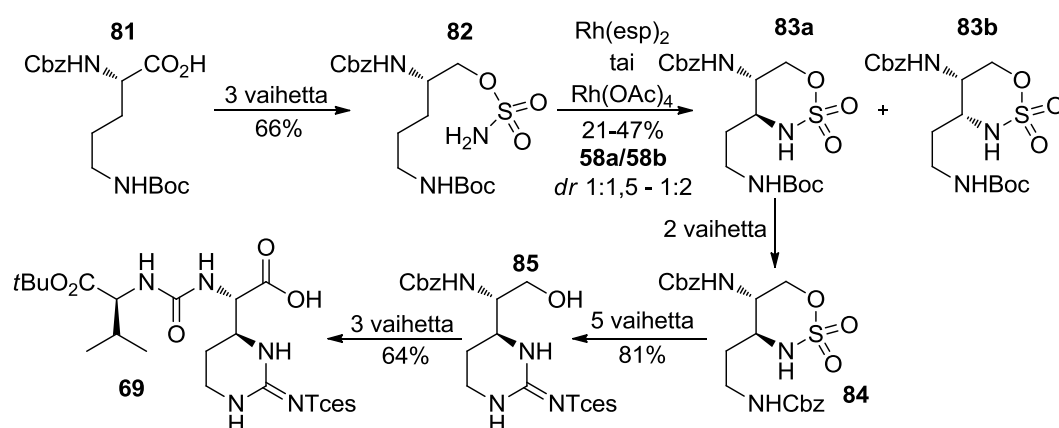
Kaavio 16: Muraymyysiini D2:n retrosynteesi.³³

Tämän synteesin isosyanidi valmistettiin jo aikaisemmin julkaistulla menetelmällä isopropylideneuridiinista **77** (kaavio 17).³³ Ensimmäisissä vaiheissa siihen liitettiin metyyliesteri Wittig-reaktiolla, urearenkaan NH-ryhmä suojattiin bentsyloksimetyylikloridilla (BOM) ja muodostettu amiini suojattiin Cbz-ryhmällä (karbobentsyyliiryhmä), jolloin tuotteena saatiin metyyliesteri **78**. Tätä seurasi molekyylin viimeisen puuttuvan fragmentin kiinnitys ja metyyliesterin hydrolyysi karboksyylihapoksi **79**. Isosyanidiin **80** päästi nelivaiheisella reaktiosarjalla 61% saannolla.



Kaavio 17: Isosyanidin synteesi muraymyysiini D2:n Ugi-reaktioon.^{33,34}

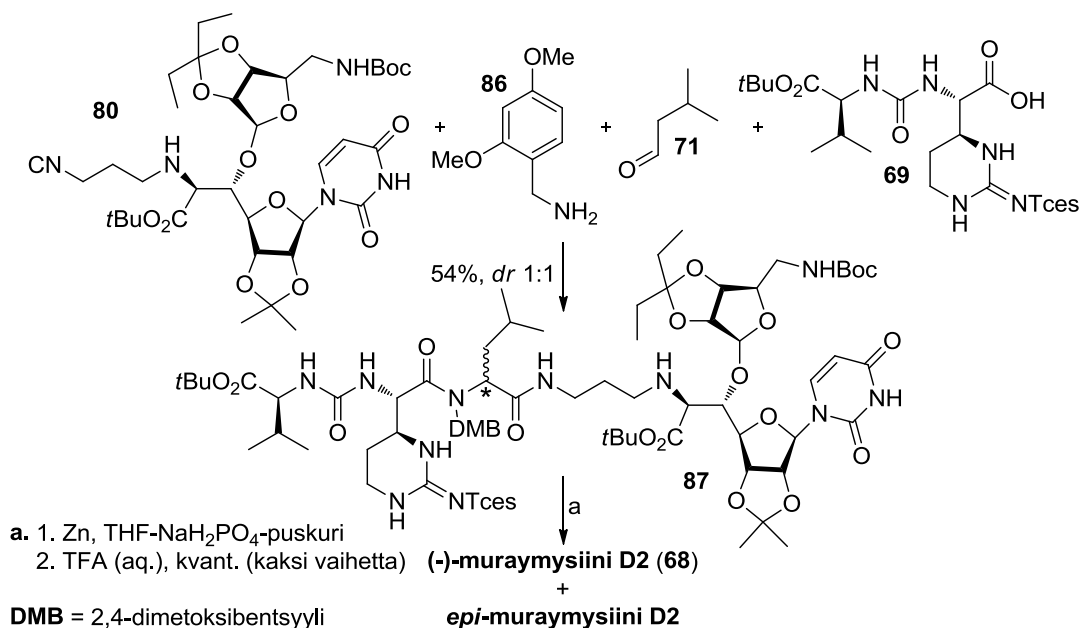
Ugi-reaktion karboksyylihapon synteesissä käytettiin lähtöaineena Boc- (*tert*-butyloksikarbonyyli) ja Cbz-suojattua L-ornitiinia (**81**, kaavio 18), josta valmistettiin sulfamaatti **82** kolmessa vaiheessa 66% saannolla.³³ Tätä seurasi sulfamaatin syklistiaatio oksatiatsinaaniksi **83a** sekä sen diastereomeeriksi **83b**. Saannot jäivät tässä reaktiossa suhteellisen alhaiseksi (21–47%), ja lisäksi reaktio suosi hiukan enemmän tässä ei-toivottua diastereomeeriä **83b** (*dr* 1:1,5-2). Synteesiä jatkettiin kuitenkin eteenpäin puhtaalla **83a**:lla. Suojaryhmän vaihdon jälkeen yhdisteen **84** oksatiatsaanirengas purettiin ja muraymysiini D2:n guanidiinirengas rakennettiin viidessä vaiheessa Tces-suojatuksi (2,2,2-trikloorietoksisulfonyyli) syklistiseksi guanidiiniksi **85**. Lopuksi guanidiiniin **85** liitettiin vielä puuttuva L-valiini-urea-fragmentti kolmessa vaiheessa 64% saannolla, mistä saatiin Ugi-reaktion karboksyylihappo **69**.



Kaavio 18: Ugi-reaktion karboksyylihapon synteesi muraymysiini D2:n kokonaissynteesissä.³³

Tässä synteesissä Ugi-reaktion amiinina käytettiin retrosynteesistä poiketen 2,4-dimetoksibentsyyliamiinia **86** ja aldehydinä 3-metylibutanaalia (**71**, kaavio 19).³³ Tuotteena saatiin peptidi **87** kahden diastereomeerin 1:1 seoksena leusiinifragmentin suhteen (tähdellä merkitty, kaavio 19). Muraymysiiniin D2 (**68**) päästiin hydrolysoimalla Ugi-reaktiossa muodostuneen tertiäärisen amiinin dimetoksibentsyyliiryhmä sekä karboksyylihappojen *tert*-butyyliesterit kahdessa vaiheessa kvantitatiivisella saannolla. Ugi-reaktion tuotteesta diastereomeerien erottaminen ei onnistunut ja niiden NMR-spektrissä havaittiin vain monimutkainen diastereomeerien ja rotameerien seos. Tästä

johtuen diastereomeerit pystyttiin erottamaan toisistaan vasta viimeisten suojaryhmien poistovaiheiden jälkeen HPLC:lla. Luonnosta eristetyin muraymyysiini D2:n rakenne pystyttiin varmentamaan (-)-muraymyysiini D2:ksi (**68**) vertaamalla näitä kahta synteettistä diastereomeeriä luonnosta eristettyyn vastineeseensa.

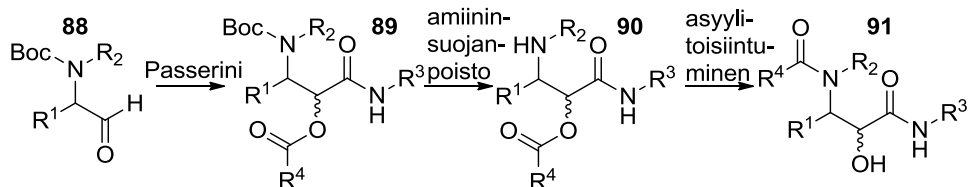


Kaavio 19: Muraymyysiini D2:n synteessin Ugi-reaktio ja viimeiset vaiheet.

Tämä synteesi on hyvä esimerkki konvergentista luonnonainesynteesistä.³³ Kaksi tämän synteessin Ugi-reaktion lähtöaineista valmistettiin suhteellisen pitkien synteessireittien kautta ja ne yhdistettiin toisiinsa vasta viimeisissä vaiheissa. Tätä seurasivat suojaryhmien poistot, mistä luonnonainetta ja sen diastereomeeriä saatiin kvantitatiivisella saannolla. Tässä synteessissä Ugi-reaktion sijaan olisi voitu hyödyntää myös perinteisempiä amidisidoksen muodostusreaktioita. Ugi-reaktion käyttöä kuitenkin perusteltiin tarpeella valmistaa muraymyysiinien analogeja niiden mahdollisten antibioottisten ja muiden biologisten ominaisuuksien tutkimiseksi. Lisäksi Ugi-reaktiosta johtuen tämä synteessireitti tarjoaa mahdollisuuden valmistaa myös muita Ugi-reaktiolle soveltuvia muraymyysiinejä sekä muraymyysiini D2:n analogeja tässä esitellyn synteessireitin avulla.

4 α -Ketoamidit

Funktionaalisuutena luonnonaineissa α -ketoamidit toimivat tyypillisesti proteaasient-syymien inhibiittoreina. Tästä johtuen α -ketoamideja esiintyy laajalti erilaisissa luonnonaineissa.^{23,35} Koska α -ketoamidit ovat herkkiä emäksille, niiden synteesit ovat ajoit-tain osoittautuneet haasteellisiksi. Yhden ratkaisun tähän ongelmaan tarjoaa PADAM-sekvenssi, joka on lyhenne termeistä ”**P**asserini reaction, **A**mine **D**eprotection, **A**cy-l **M**igration”, suomeksi Passerini-reaktio, amiinin suojanpoisto, asyyli-toisiintuminen (kaavio 20). Sekvenssistä saadaan tuotteena α -hydroksi- β -aminohappo **91**, joka muo-dostuu *O,N*-asyylitoisiintumisen tuotteena Passerini-reaktion α -asyloksiamidituotteesta **90**. Sekvenssi alkaa klassisella Passerini-reaktiolla, jonka aldehydikomponentti sisältää suojatun amiinin (**88**). Passerini-reaktion jälkeen (**89**) suojarahmä poistetaan ja tätä seu-uraa emäksellä käynnistettävä *O,N*-asyylitoisiintuminen (**90** \rightarrow **91**), missä asyloksiamidin R-ryhmä siirtyy suojaamattomalle amiinille, jolloin yhdisteeseen muodostuu uusi amidi ja samalla Passerini-reaktiossa syntyneestä α -asyloksiamidista **90** muodostuu α -hydroksiamidi **91**.³⁵ Tämä hydroksiamidi on hapetettavissa edelleen α -ketoamidiksi.

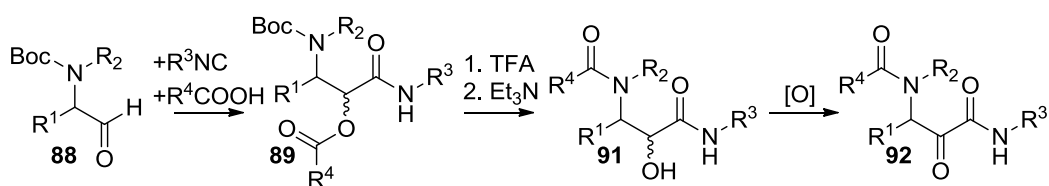


Kaavio 20: PADAM-sekvenssi

PADAM-sekvenssillä pystytään tuottamaan pitkiäkin ketjumaisia molekyylejä yhdellä vaiheella ja kahdella reaktiolla. PADAM-sekvenssin substraattivalikoima (taulukko 1) osoittaa hyvin miten käytännöllisestä menetelmästä on kyse. Näissä kokeissa sekvenssin lähtöaineena käytettiin *N*-substituoitua aldehydiä **88**, josta saatiin Passerini-reaktion tuotteena α -asyloksiamidia **85**. Boc-suojanpoiston (TFA) ja *O,N*-asyylitoisiintumisen jälkeen päästiin α -hydroksi- β -aminohappoon **91**, joka vielä lopuksi hapetettiin α -ketoamidiksi **92** (taulukko 1). Jokaisessa kokeessa PADAM-sekvenssin jälkeen saanto oli vähintään 75%:a ja hapetuksen jälkeenkin saannot pysyivät vielä alhaisimmillaankin lähellä 50%:a.³⁵ Tässä substraattiseulassa tarkasteltiin laajalti erilaisten R-ryhmien so-

veltuvuutta reaktiosarjaan. Pääsääntöisesti vaikuttaa siltä että PADAM-sekvenssiin soveltuvat käytettäväksi niin aromaattiset kuin alifaattisetkin substituentit. Lisäksi sekvenssissä kokeiltiin myös muutamia suojattuja aminohappoja karboksyylihappokomponentteina, joilla reaktiosarjan saannot pysyivät kohtalaisina tai hyvinä (taulukko 1, kokeet 10–15). Myös syklisillä aldehydeillä sekvenssin saannot olivat erinomaiset (taulukko 1, kokeet 16–18).

Taulukko 1: PADAM-sekvenssin substraattivalikoima



Koe	R ¹	R	R ³	R ⁴	Saanto- % (89)	dr (89)	Saanto- % (91)	Saanto- % (kok.)
		2						
1	Bn	H	Bn	PhCH ₂	81	67:33	81	77
2	Bn	H	Bn	Ph	67	62:38	96	64
3	Bn	H	<i>t</i> -Bu	Pr	82	71:29	86	71
4	Bn	H	MeO ₂ CCH ₂	PhCH ₂	91	64:36	99	90
5	Bn	H	MeO ₂ CCH ₂	<i>s</i> -Bu	73	63:37	68	50
6	Me	H	Bn	Pr	85	65:35	94	80
7	Me	H	Cy	<i>p</i> -MePh	80	67:33	77	62
8	Me	H	MeO ₂ CCH ₂	Bn	71	63:37	84	60
9	Et	H	<i>t</i> -Bu	Bn	83	69:31	89	74
10	Et	H	Bu	L-(Z)-Leu	65	61:39	91	59
11	Et	H	BnO ₂ CCH ₂ CH ₂	L-(Z)-Leu	69	66:34	92	64
12	Et	H	MeO ₂ CCH ₂	L-(Boc)-Leu	59	66:34	83	49
13	<i>i</i> -Pr	H	MeO ₂ CCH ₂	(Z)-Gly	77	60:40	75	58
14	<i>i</i> -Pr	H	MeO ₂ CCH ₂	L-(Boc)-Phe	95	52:48	75	71
15	<i>i</i> -Pr	H	MeO ₂ CCH ₂	D-(Boc)-Phe	89	63:37	77	72
16	-(CH ₂) ₃ -	Cy		Bn	85	69:31	99	85
17	-(CH ₂) ₃ -	Bn		Pr	93	62:38	80	65
18	-(CH ₂) ₃ -	<i>t</i> -Bu		Bn	94	65:35	97	91
19	MeOCH ₂	H	Bn	Pr	95	57:43	88	93
20	MeOCH ₂	H	Cy	Bn	95	61:39	82	78

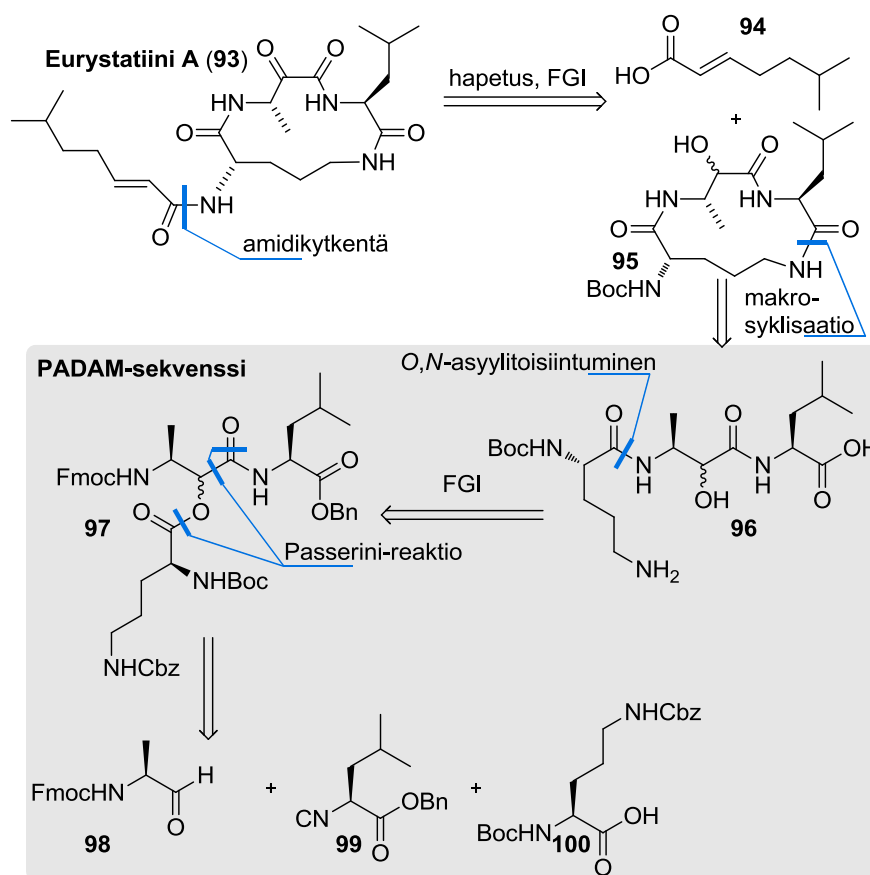
Tämä lähtöainevalikoiman monipuolisuus selittyi Passerini-reaktiolla, sillä sekvenssin substraattivalikoima on yhtä laaja kuin klassisessa Passerini-reaktiossakin. Tässä seulas- sa ainoana amiinin suojarahmänä käytettiin Boc:a, mutta sekvenssi on toteutettavissa

myös muilla suojaryhmillä.^{23,35} Erityisesti α -ketoamideille PADAM-sekvenssi tarjoaa helpon valmistustavan ja lisäksi suoraan sekvenssin jälkeinen α -hydroksiamidituote toimii hyvänä piilona ketoamidille ennen varsinaista hapetusta. Lisäksi hapetusvaiheessa Passerini-reaktiossa muodostunut stereokeskus tuhoetaan, jolloin reaktiolle tyypillinen keho stereoselektiivisyys ei tässä tapauksessa ole haitaksi.

4.1 Eurystatiini A

Eurystatiini A on *Streptomyces eurythermus* bakteerin tuottama makrosyklinen prolyyliendopeptidaasi-inhibiittori.^{36,37} Prolyyliendopeptidaasi (PED) on seriiniproteaasi joka katalysoi muun muassa oksitosiinin, angiotensiini I ja II:n sekä vasopressiinin hydrolyysiä. Tämän kaltaisilla spesifisillä proteaasi-inhibiittoreille on mahdollisesti löydettävissä lääkinnällisiä sovelluksia esimerkiksi Alzheimerin-taudin, tromboosin, erilaisten syöpien tai AIDS:n hoidossa. Rakenteeltaan eurystatiini A on heteromakrosyklinen tetrapeptidi, joka koostuu leusiini-, ornitiini- ja α -ketoalanamidi-alayksiköistä. Sen inhibitiivominaisuudet aiheutuvat α -ketoalanamidi-yksikön kiinnittymisestä PED:iin.

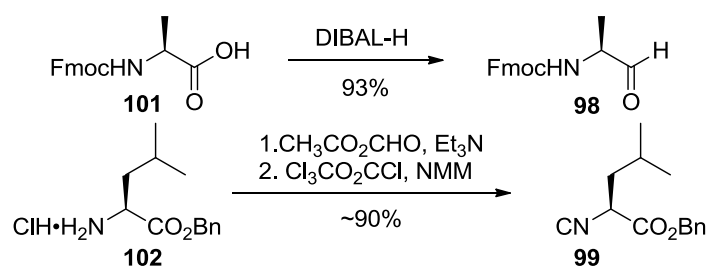
Semple *et. al.*³⁷ julkaisivat vuonna 2001 eurystatiini A:n (**93**, kaavio 21) kokonaissynteesin, jossa hyödynnettiin PADAM-sekvenssiä synteesin alkuvaiheessa eurystatiini A:n makrosyklin tripeptidin valmistuksessa. Tässä retrosynteesissä (kaavio 21) ensimmäinen katkaisu tehdään hepteenihappojohdannaisen ja makrosyklin yhdistävään amidiin, mistä jäljelle jää hepteenihappo **94** sekä makrosykli **95**. Kun makrosykliin **95** tehdään katkaisu alaniinin ja ornitiinin yhdistävään amidiin, saadaan reaktion lähtöaineeksi PADAM-sekvenssin lopullinen tripeptidiketju **96**. Tästä taas päästään Passerini-reaktion Fmoc-suojattuun tuotteeseen **97** kun ornitiinifragmentti siirtyy *O,N*-asyylivaelluksen lähtöpisteeseen, Passerini-reaktiossa muodostuvaan stereokeskukseen. Kun α -asyloksiamidiin **97** tehdään Passerini-reaktion katkaisut, saadaan tämän synteesin lähtöaineiksi alaniinin aldehydijohdannainen **98**, L-leusiinin isosyanidi **99** sekä Boc- ja Cbz-suojattu L-ornitiini **100**.



Kaavio 21: Semple *et. al.* retrosynteesi Eurystatiini A:lle.³⁷

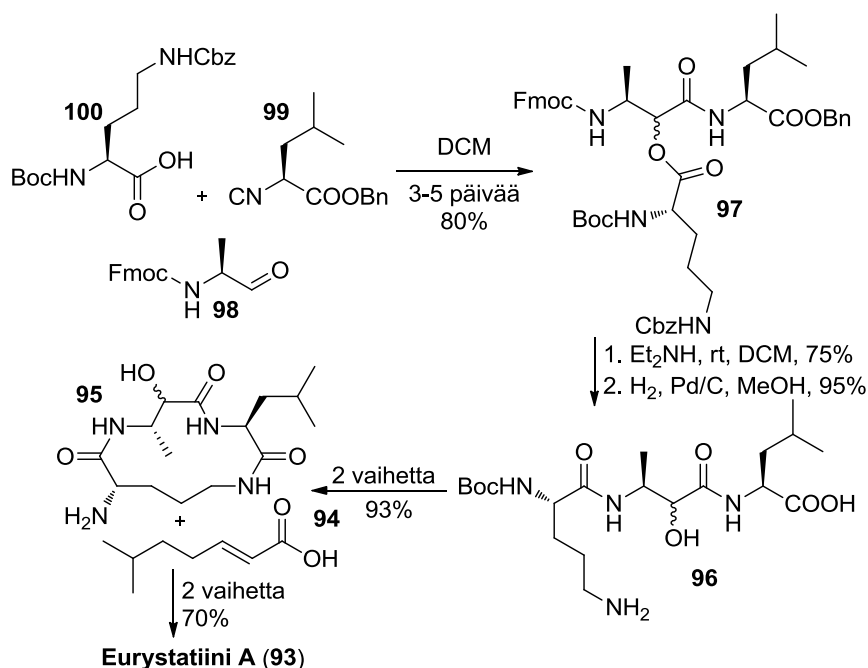
Eurystatiini A:n retrosynteesi koostuu näin neljästä vaiheesta, joista kaksi viimeistä katkaisua muodostavat PADAM-sekvenssin. Koska eurystatiini A koostuu luonnollisista aminohapoista, kaikki tämän synteessin lähtöaineet olivat saatavissa enantiopuhtaina. Tästä johtuen synteessin aikana ei muodosteta yhtäkään uutta lopulliseen tuotteeseen jäävää stereokeskusta.

Passerini-reaktiota varten *N*-Fmoc-suojatun (fluorenyylimetyloksikarbonyyli) *L*-alaniinin (**101**) karboksyylihappo pelkistettiin di-isobutyryyalumiinihydridillä 93% saannolla aldehydiksi **98** (kaavio 22).³⁷ *L*-leusiinin bentsyyliesterin (**102**) amiinista valmistettiin haluttu isosyanidi **99** *N*-formyylireittä (kaavio 22). Amiini *N*-formyloitiin etikkahapon ja muurahaishapon anhydridillä, minkä jälkeen tuotteesta saatiin difosgeenidehydraatiolla isosyanidi **99** noin 90% saannolla.



Kaavio 22: Passerini-reaktion aldehydin ja isosyanidin valmistus eurystatiini A:n synteesissä.³⁷

Passerini-reaktio on tämän synteesin ensimmäinen varsinainen vaihe, josta saadaan tuotteena α -asyloksiamidi **97** 80% saannolla (kaavio 23). Amiinin Fmoc-suojaryhmän poisto sekä asyylitoisiintuminen saatiin aikaan yhdessä vaiheessa dietyyliamiinilla, mitä seurasi vielä karboksyylihapon bentsyyლისuojan poisto pelkistämällä aminohapoksi **96**. Tätä seuraa Boc-suojaryhmän poisto ja syklisaatio kahden vaiheen jälkeen 93% saannolla makrosykliksi **95** ja hepteenihapon **94** kytkentä sekä α -hydroksiamidin hapetus α -ketoamidiksi **93** synteesin viimeisessä vaiheessa.



Kaavio 23: Eurystatiini A:n synteesi

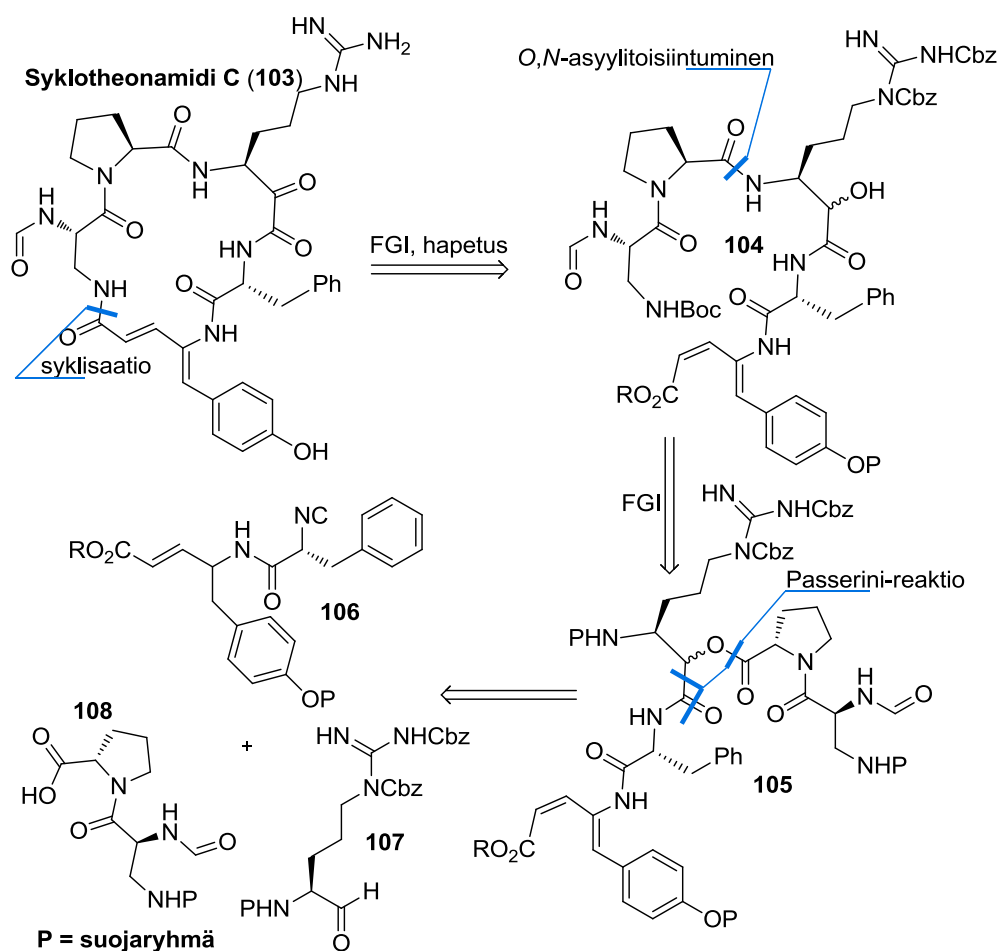
PADAM-sekvenssin avulla eurystatiini A:n makrosyklin rakenne muodostettiin jo synteessin ensimmäisessä vaiheessa.³⁷ Tämän jälkeen jäljelle jäi vain suojaryhmien poistoja, makrosyklisaatio sekä viimeisen hiiliketjun kytkentä, joista kaikki toteutettiin tunnetuin menetelmin. Tämä synteesi etenee lähtöaineista tuotteeseen yhdeksässä vaiheessa 20–26% kokonaissaannolla. Synteessissä pystytään pitämään emäsherkkä α -ketoamidi-ryhmä α -hydroksiamidina synteessin viimeiseen vaiheeseen saakka, mikä mahdollistaa myös emäksisten olosuhteiden hyödyntämisen synteessireitissä ilman varsinaisten suojar ryhmien tarvetta.

4.2 Syklotheonamidi C

Syklotheonamidit ovat kahdesta *Theonella*-suvun sienieläimistä eristettyjä pentapeptidiä luonnonaineita.^{38,39} Syklotheonamidi C (CtC, **103**, kaavio 24) kuuluu syklotheonamidien perheeseen ja sen on osoitettu olevan tehokas trombiini-inihiittori. Trombiini on yksi veren hyytymiseen osallistuvista seriini-proteaaseista. CtC sitoutuu trombiinin α -ketohomoarginiinifragmentinsa välityksellä estäen trombiinin toiminnan ja

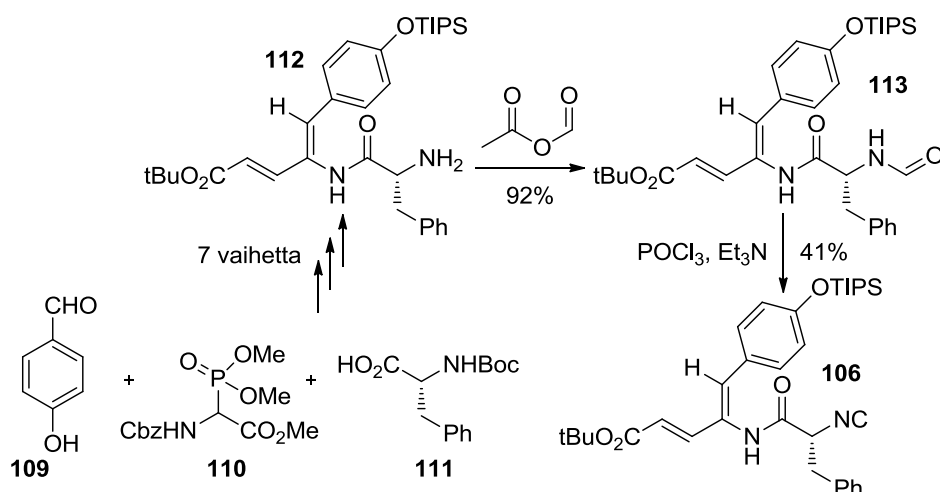
näin veren hyytymisen. CtC:lla saattaakin olla lääkinnällistä käyttöä nykyisten verenohennuslääkkeiden rinnalla.

CtC (**103**) rakentuu viidestä aminohaposta, jotka muodostavat sen makrosyklin substituentteineen (kaavio 24).³⁹ Eurystatiini A:n tavoin CtC:ssä on hapoille herkkä α -ketoamidiryhmä, mikä on tuottanut haasteita aikaisemmissa synteeseissä. Aitken *et al.*³⁹ julkaisivat vuonna 2009 CtC:n synteessin jossa α -ketoamidiongelma on vältetty pelkistämällä α -hydroksiamidi α -ketoamidiksi vasta synteessin viimeisessä vaiheessa samoin kuin eurystatiini A:n synteessissä. Tästä johtuen retrosynteessin (kaavio 24) ensimmäinen varsinainen katkaisu tehdään funktionaalisen ryhmän muutoksen ja hapetuksen jälkeen CtC:n (**103**) makrosykliin mistä saadaan avoketjuinen PADAM-sekvenssin *O,N*-asyylivaelluksen tuote **104**. Tätä edeltää Fmoc-suojattu Passerini-tuote **105**, mistä päästään synteessin kolmeen lähtöaineeseen – isosyanidiin **106**, aldehydiin **107** ja karboksyylihappoon **108** – tekemällä Passerini-reaktiolle tyypilliset katkaisut.



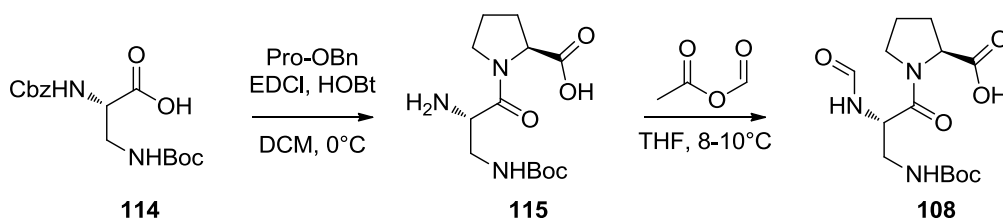
Kaavio 24: CtC:n retrosynteesi

Samoin kuin eurystatiini A:n synteesissä, tässäkin isosyanidi (**106**) valmistettiin *N*-formyylireitin kautta (kaavio 25).^{39,40} Erona edelliseen tässä käytettiin dehydraatiossa difosgeenin sijaan fosforyylitrikloridia. Reaktion alhainen saanto (41%) herättääkin kysymyksen siitä olisiko tässä parempi vaihtoehto kuitenkin ollut di- tai trifosgeeni. Tässä lähtöaineena käytetty amiini **112** valmistettiin seitsemässä vaiheessa 4-hydroksibentsaldehydistä **109**, Boc-suojatusta L-fenyylialaniinista **111** ja fosfonaatista **110**. Amiinista **112** valmistettiin *N*-formamidi **113** seka-anhydridimenetelmällä, josta edelleen valmistettiin isosyanidi **106** fosforyylitrikloridilla.



Kaavio 25: CtC:n Passerini-reaktion isosyanidin **106** synteesi.^{37,41}

Dipeptidi **108** valmistettiin suojatusta diaminohaposta **114** suojaamalla sen amiinit ensin Cbz- ja Boc-ryhmillä Izumiyan menetelmällä, minkä jälkeen tämä tuote kytkettiin OBn-suojattuun proliiniin EDC:lla (1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi) ja HOBt:lla (1-hydroksibentsotriatsoli) amiiniksi **115** (kaavio 26).^{39,42} Lopulta yhdisteen **115** suojaamaton amiini *N*-formyloitiin muurahaishapon ja etikkahapon anhydridillä dipeptidiksi **108**.

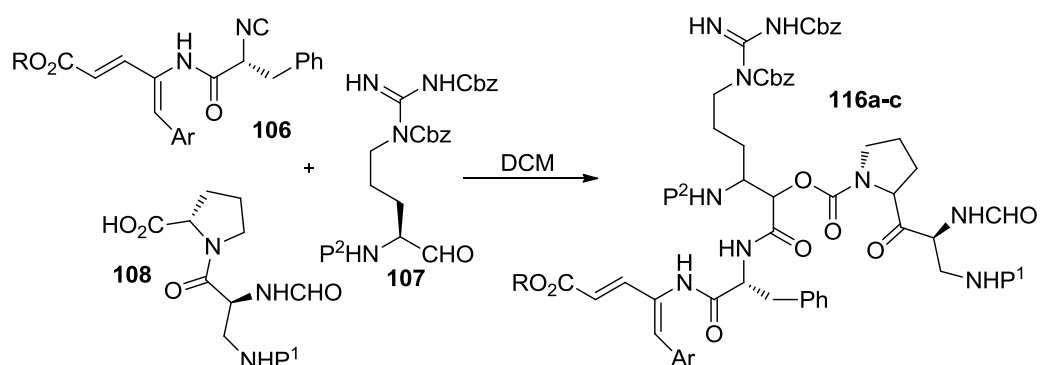


Kaavio 26: Dipeptidin **108** synteesi.⁴²

Kun Passerini-reaktion lähtöaineet saatiin valmistettua, huomio siirrettiin itse reaktioon.³⁹ Koska lähtöaineissa oli useampi suojattu amiini ja lisäksi yksi esteriryhmä, oli ne valittava siten että PADAM-sekvenssin suojapoistovaiheessa arginiinifragmentin amiinisuojaryhmä voitiin poistaa selektiivisesti. Tästä johtuen yksi amiineista suojattiin Boc-ryhmillä ja toinen Fmoc-ryhmillä (taulukko 2). Lisäksi estereiden kohdalla testattiin sekä metyyli- että *tert*-butyyliestereitä (kokeet 1–3 ja 4–5, taulukko 2). Korkein saanto näissä kokeissa saatiin tuotteelle **106b** (koe 2, taulukko 2), mutta synteesissä

päädyttiin kuitenkin käyttämään tuotetta **106c** (koe 4, taulukko 2), johtuen mahdollisuudesta Boc- ja *t*-Bu-ryhmien samanaikaiseen hydrolyysiin ennen syklisaatiota.

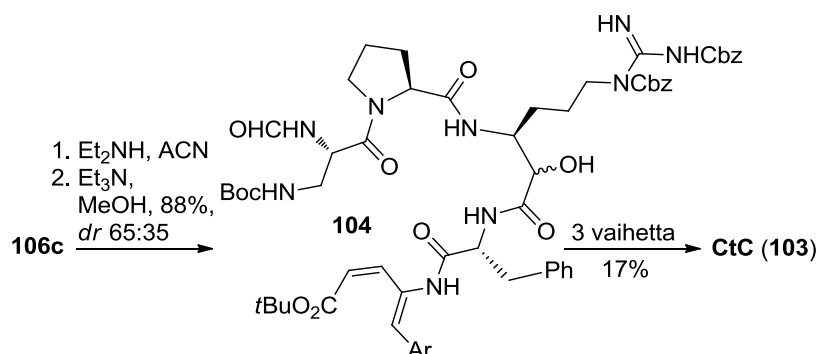
Taulukko 2: Passerini-reaktion suojaryhmien optimointi CtC:n synteesissä



Koe*	R	P ¹	P ²	Tuote	Saanto-%
1	Me (1 ekv.)	Fmoc (1,2 ekv.)	Boc (1,2 ekv)	106a	0
2	Me (1 ekv.)	Boc (1,2 ekv)	Fmoc (1,2 ekv.)	106b	57
3	Me (1 ekv.)	Boc (2,3 ekv)	Fmoc (2,3 ekv.)	106b	53
4	<i>t</i> -Bu (1 ekv.)	Boc (1,2 ekv)	Fmoc (1,2 ekv.)	106c	44
5	<i>t</i> -Bu (1 ekv.)	Boc (1,2 ekv)	Fmoc (1,2 ekv.)	106c	13

* 0,02 M liuos isosyanidin suhteen DCM:ssa, reaktioaika 3-6 päivää

Passerini-reaktion jälkeen arginiinifragmentin Fmoc-suojia poistettiin dietyyliamiinilla (kaavio 27), mitä seurasi suoraan trietyyliamiinilla käynnistetty asyylivaellus. Tuotteena tästä saatiin α -hydroksiamidin **104** diastereomeerien 65:35 seos 88% saannolla (kaavio 27). Tässä tapauksessa selektiivisyys aiheutui todennäköisesti reaktiossa käytetyistä kookkaista lähtöaineista. Tämän jälkeen pentapeptidi **104** syklisoitiin ja sen α -hydroksiamidiryhmä hapetettiin α -ketoamidiksi ja jäljelle jääneet suojaryhmät poistettiin. Viimeisten kolmen vaiheen jälkeen CtC:tä (**103**) saatiin 17% saannolla (kaavio 27).

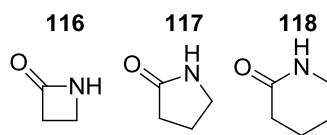


Kaavio 27: CtC-synteesin viimeiset vaiheet.

CtC ja eurytatiini A ovat rakenteeltaan samankaltaisia polypeptidejä. Tästä johtuen ei olekaan ihme että myös niiden kokonaissynteetit muistuttavat toisiaan. Kummassakin synteesissä Passerini-reaktio on varsinaisen synteesin ensimmäinen vaihe, mitä seuraa suojanpoisto, asyyliitoisiintuminen ja syklistaatio. Tämän jälkeen kohdemolekyylin perusrunko on valmiina ja jäljelle jää enää hapetusreaktio ja eurytatiini A:n tapauksessa molekyylin hännän kytkeäntä runkoon. Suurimpana erona CtC:n synteesissä verrattuna eurytatiini A:han on CtC:n suuremmasta koosta johtuen sen Passerini-reaktiossa käytetyt huomattavasti kookkaammat lähtöaineet. Nämä kaksi synteesiä tukevat omalta osaltaan aikaisemmin esitettyä väitettä Passerini-reaktion lähtöaineiden koon vaikutuksesta reaktion saantoihin (luku 2.2). Näiden kahden esimerkin perusteella näyttäisi siltä että ainakin joissakin tapauksissa kookkaat lähtöaineet todella laskevat Passerini-reaktion saantoa. CtC:n synteesissä Passerini-reaktion saanto jäi 44%:in ja eurytatiini A:n synteesissä päästiin jopa 80%:in. Toisaalta CtC:n synteesissä Passerini-reaktion huolellinen optimointi olisi saattanut parantaa reaktion saantoa.

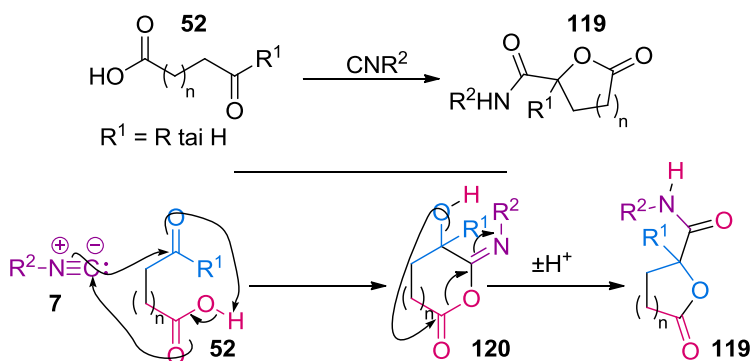
5 Laktaamit ja laktonit

Laktaamit ovat syklisiä amideja, joita esiintyy erilaisissa luonnonaineissa (kuva 6).^{43,44} Vasemmalta oikealle kuvassa nähdään β -laktaami (**116**), γ -laktaami (**117**) ja δ -laktaami (**118**). Luvussa 2.4.2 diastereoselektiivisten Ugi-reaktioiden yhteydessä todettiin, että erilaisia laktaameja on mahdollista valmistaa Ugi-reaktiolla sijoittamalla lähtöaineissa karboksyylihapo sekä amiini tai karbonyyliyhdiste samaan molekyyliin.



Kuva 6: Laktaameja

Laktonien valmistus on mahdollista osin intramolekulaarisella Passerini-reaktiolla, kun karbonyyliyhdiste sekä karboksyylihapo ovat samassa molekyylissä (**52**, kaavio 28). Tällöin tuotteessa **119** asyloksiryhmä muodostaa laktonirenkaan. Mekanismi ei tässä reaktiossa poikkea mitenkään klassisesta Passerini-reaktion mekaniemistä (kaavio 28), tässäkin isosyanidin **7** additio oksohappoon **52** käynnistää reaktioketjun välituoteimidaatiksi **120**, joka asyylitoisiintumisen tuloksena muodostaa laktonituotteen **119**. Näin ollen lähtöaineet jakautuvat tuotteessa samoin kuin ketjumaisissa Passerini-reaktion tuotteissa. Muodostuvan laktonin reankaan koko riippuu karbonyyliyhdistettä ja karboksyylihappoa yhdistävän hiiliketjun pituudesta.



Kaavio 28: Osittain intramolekulaarinen Passerini-reaktio

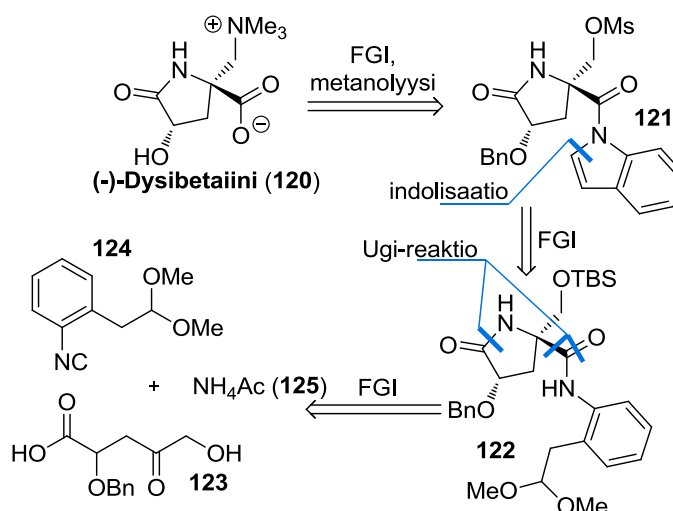
Sekä laktaameja että laktoneja esiintyy laajalti luonnonaineissa ja näitä on valmistettu sekä Ugi- että Passerini-reaktioilla. Ugi-reaktio tarjoaa laktaamien valmistuksessa mahdollisuuden laktaamin NH-ryhmän suojaamiseen kun syklisaatiosta vastuussa on oksohapo, jolloin amiinin sivuketjuksi voidaan valita jokin suojaryhmäksi soveltuva ryhmä. Laktonien valmistus Passerini-reaktiolla on yksivaiheinen metodi substituoitujen laktonien synteesiin.

Seuraavissa kappaleissa käsitellään kolme erilaista synteesiä joissa on hyödynnetty osittain intramolekulaarista Passerini- tai Ugi-reaktiota laktonien ja laktaamien valmistuksessa. Etuna näissä syklistaatioreaktioissa on myös niiden potentiaalinen diastereoselektiivisyys, kun syklistoivana lähtöaineena käytetään esimerkiksi steerisesti estynyttä yhdistettä.

5.1 (±)-Dysibetaiini ja (-)-dysibetaiini

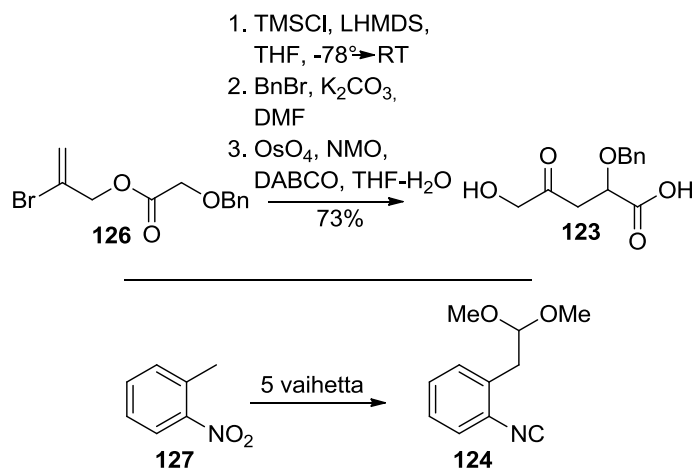
Dysibetaiini on mikronesialaisesta *Dysidea herbacea* sienieläimestä eristetty epätavallinen syklinen aminohappo.^{10,45,46} Injektoituna intraserebraalisesti dysibetaiini aiheuttaa hiirillä raapimista, mikä saattaa olla merkki dysibetaiinin sitoutumisesta glutamaattireseptoreihin. Dysibetaiini onkin potentiaalinen neuroeksitotoksiini. Rakenteeltaan dysibetaiini on substituoitu γ -laktaami, jonka rengasrakenteessa yhtenä substituenttina on betaiiniryhmä (**120**, kaavio 29). Kobayashi *et. al.*^{10,46} on kehittänyt dysibetaiinille kaksi synteesireittiä yhden raseemiselle (±)-dysibetaiinille ja toisen puhtaalle (-)-dysibetaiinille.

Dysibetaiinin (**120**) ja sen epimeerin retrosynteesissä (kaavio 29) päästään usean funktionaalisen ryhmän muutoksen sekä metanolyysin tuloksena *N*-asyyli-indolituotteeseen **121**, joka voidaan valmistaa Ugi-reaktion tuotteesta **122** indolisaatiolla.⁴⁶ Retrosynteesin viimeisistä Ugi-katkaisuista saadaan lähtöaineiksi aromaattinen isosyanidi **124** γ -ketohappo **123**, sekä ammoniumasetatti **125**.



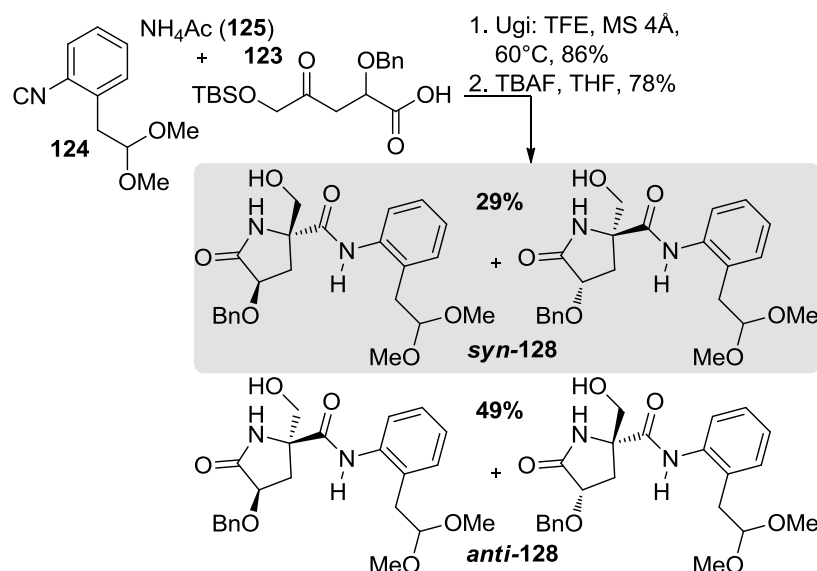
Kaavio 29: (±)-Dysibetainin retrosynteesi

Ugi-reaktion ensimmäinen lähtöaine – γ -ketohappo **123** – valmistettiin kolmessa vaiheessa esteristä **126** Ireland-Claisen toisiintumisella ja Upjohn-hapetuksella (kaavio 30) kahdessa vaiheessa 73% saannolla.⁴⁶ Isosyanidi **124** valmistettiin 2-nitrotolueenista **127** viidessä vaiheessa. Ensin molekyyliin muodostettiin dimetoksietyyliryhmä, minkä jälkeen nitroryhmä muunnettiin amiinin kautta isosyanidiksi *N*-formylointireittiä (kaavio 30).

Kaavio 30: (±)-Dysibetainin lähtöaineiden synteetit.^{46,47}

Ugi-reaktiossa käytetyn γ -ketohapon **123** ansiosta reaktio on osittain intramolekulaarinen.⁴⁶ Muina lähtöaineina reaktiossa käytettiin ammoniumasetaattia **125** sekä isosyani-

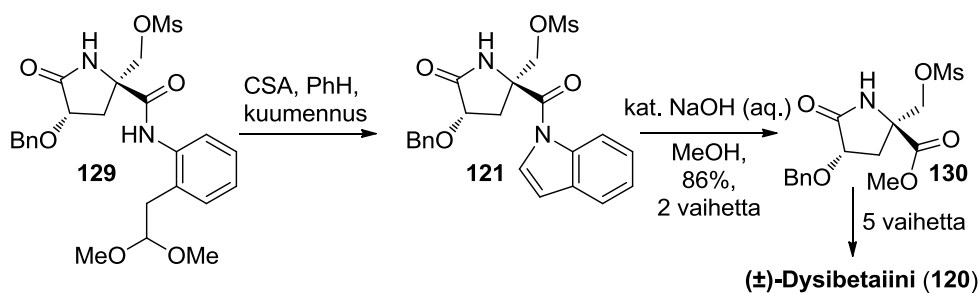
dia **123**. Ammoniumasetaattia päädyttiin tässä käyttämään ammoniakkin sijaan muodostamaan haluttu sekundaarinen amiini. Teoriassa olisi ollut mahdollista että ammoniumasetaatti olisi toiminut reaktion karboksyylihappokomponenttina, mutta tähän viittaavia sivutuotteita ei reaktiossa havaittu. Isosyanidi **123** valikoitui reaktion isosyanidikomponentiksi, jotta toinen Ugi-reaktiossa muodostuvista amideista pysyttiin metanolysoimaan selektiivisesti Ugi-reaktion jälkeen. Ugi-reaktiota seurasi TBS-suojan poisto, minkä jälkeen *syn*- ja *anti*-diastereomeerien (*syn*-**128** ja *anti*-**128**) puhdistus oli mahdollista. Luonnollista *syn*-enantiomeeriparia *syn*-**128** saatiin puhdistuksen jälkeen 29% saannolla ja *anti*-enantiomeerejä *anti*-**128** 49% saannolla. Tästä voidaankin päätellä Ugi-reaktion olleen hiukan selektiivisempi *anti*-diastereomeerin suuntaan.



Kaavio 31: Ugi-reaktio (\pm)-dysibetaiinien synteesissä.⁴⁶

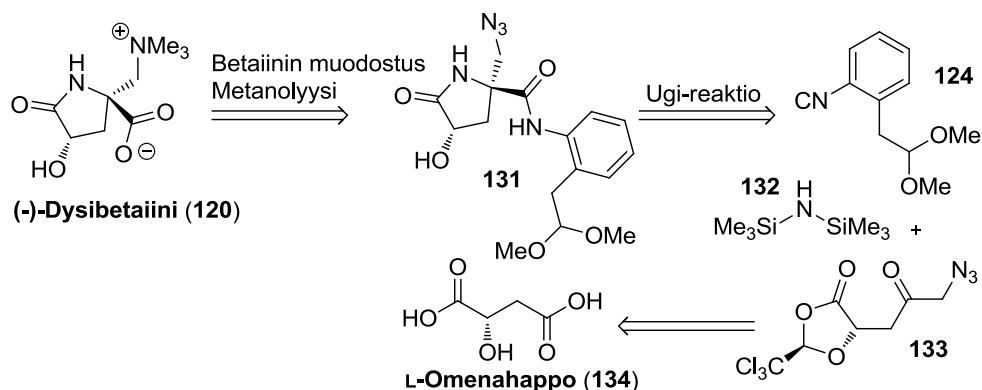
Ugi-reaktion tuotteessa on kaksi amidia, mutta vain toinen näistä pitäisi seuraavissa vaiheissa hydrolysoida. Kahden amidin läsnäolo tuotteessa voi siksi alustavasti vaikuttaa ongelmalliselta valinnalta.^{10,46} Reaktiossa käytetyn isosyanidin ansiosta toisen amidin kemoselektiivinen metanolyysi kuitenkin onnistui, sillä isosyanidi mahdollistaa tuotteen indolisaation kuumentamalla sitä CSA:n (kamferisulfonihapon) ja bentseenin kanssa (kaavio 32). Indoli hyvänä lähtevänä ryhmänä hydrolysoituu huomattavasti mie-
dommissa olosuhteissa laktonirenkaan amidiin verrattuna. Ennen indolisaatiota tuotteen **128** OH-ryhmä mesyloitui yhdisteeksi **129**. Seuraavan vaiheen tuotteena saatiin indolia

121, jonka indoliamidin selektiivinen metanolyysi onnistui katalyyttisellä määrällä natriumhydroksidia 86% saannolla metyyliesteriksi **130**. Viimeisissä vaiheissa metyyliesterin **130** mesyyliryhmästä (Ms) muodostettiin dysibetaiinin trimetyyliammonium ja metyyliesteri hydrolysoitiin vastaavaksi asetaatiksi, jolloin tuotteena saatiin raseemista (\pm)-dysibetaiinia (**120**).



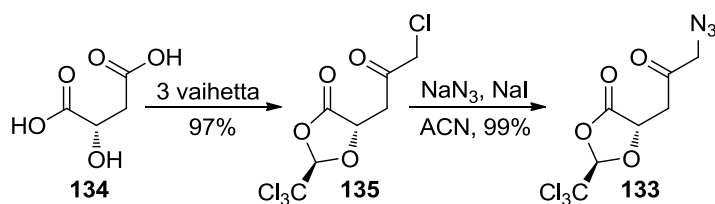
Kaavio 32: Ugi-tuotteen indolisaatio ja metanolyysi (\pm)-dysibetaiinin synteesissä.⁴⁶

Tässä synteesissä onnistuttiin valmistamaan dysibetaiinia ja sen epimeeriä 16 vaiheessa 9% saannolla. Kyseessä on kuitenkin raseeminen synteesi, joten samainen tutkimusryhmä jatkoi työtään synteesin parissa ja onnistui myöhemmin kehittämään asymmetrisen kokonaissynteesin puhtaalle ($-$)-dysibetaiinille (**120**). Tässä synteesissä hyödynnetään myös Ugi-reaktiota sekä isosyanidia **124** (kaavio 33). Suurin ero edelliseen synteesiin verrattuna löytyy Ugi-reaktion karboksyylihappo-karbonyyliyhdisteestä (kaavio 33). Edellisen synteesin γ -ketohappo **123** on korvautunut α -atsidiketonilla **133**, jota valmistetaan L-omenahaposta **134**. Lisäksi amiinina tässä synteesissä käytettiin bis(trimetyyli)silyyli-amiinia (HDMS, **132**) ammoniumasetaatin sijaan. Käytännössä tämä synteesi eroaa siis edeltäjästään lähinnä Ugi-reaktiota edeltävissä vaiheissa ja itse Ugi-reaktiossa. Muuten synteesi kulkee hyvin samoilla linjoilla edellisen kanssa.



Kaavio 33: (-)-Dysibetaiinin retrosynteesi.¹⁰

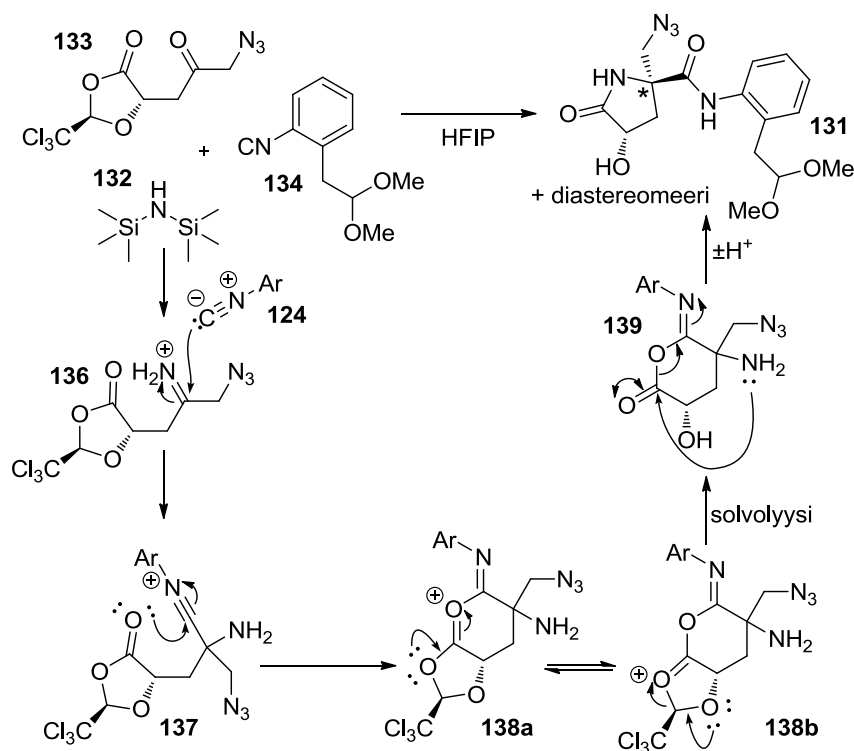
Tässä synteesissä (-)-dysibetaiinin γ -laktaamirenkaan pohjana toimi L-omenahappo **134**, josta valmistettiin ensin klooriketoni **135** mistä edelleen muodostettiin α -atsidiketoni **133** (kaavio 34). Näin γ -laktaamirenkaan OH-stereokeskus (merkitty, tähdellä, kaavio 34) on valmiina jo lähtöaineessa, jolloin tuotteena saadaan puhtaasta (-)-dysibetaiinia, kun Ugi-reaktiossa muodostuneet diastereomeerit erotetaan toisistaan.



Kaavio 34: α -klooriketoniin valmistus (-)-dysibetaiinin synteesissä.¹⁰

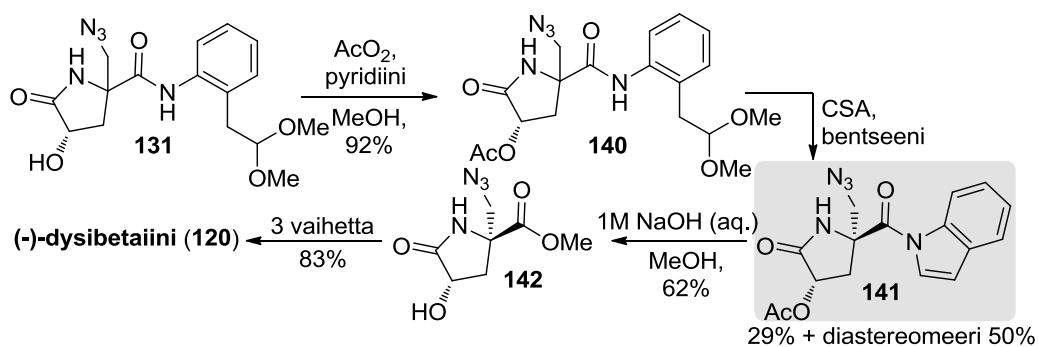
Edeltävän reaktiosarjan välituotteesta – α -klooriketoniasta **135** yritettiin valmistaa Ugi-reaktioon soveltuvaa γ -ketohappoa (vertaa kaavioon 30), mikä osoittautui haasteelliseksi. Kokeiluissa metodeissa oli useita vaiheita ja ne olivat lisäksi saannoiltaan alhaisia. Tästä johtuen Ugi-reaktiota päätettiin kokeilla suoraan α -atsidiketonilla **133**, mikä yllättäen osoittautui onnistuneeksi vaihtoehdoksi (kaavio 35). Optimoinnin jälkeen reaktiosarjasta saatiin γ -laktaamia **131** 59% saannolla kun liuottimena käytettiin heksafluoroisopropanolia (HFIP). Tämän reaktion laskennallinen mekanismi kulkee alkuun kuten klassisen Ugi-reaktion mekanismi (kaavio 35). Atsidiketoniin **133** ja HDMS:n (**132**) välisen kondensaation tuloksena saadaan imiini **136**, josta isosyanidin addition tuloksena muodostaa iminiumin **137**. Välituotteen **137** sisäisen sykklisaation tuloksena saadaan imiini

138 jolla on kaksi resonanssirakennetta **138a** ja **138b**. Solvolyyisin tuloksena suojaryhmänä toiminut klooriryhmä irtoaa, jolloin muodostuu laktoni **139**, joka toisiintumisen jälkeen muodostaa laktaamin **131**.



Kaavio 35: Ugi-reaktio ja sen oletettu mekanismi (-)-dysibetainin synteesissä.¹⁰

Vaikka tässä synteesissä Ugi-reaktion lähtöaineista vain yksi on sama edelliseen synteesiin verrattuna, ainoa ero tuotteessa on atsidiryhmä edellisen silyylisuojatun OH-ryhmän tilalla. Atsidin mukanaolo jo tässä vaiheessa synteesiä vähentää myöhempiä muokkausvaiheita huomattavasti. Ugi-reaktiota seurasi laktaamirenkaan OH-ryhmän asetylaatio (**140**) ja edellisestä dysibetainisynteesistä tuttu indolisaatio CSA:lla (kaavio 36). Indolisaation tuotteen kaksi diastereomeeriä puhdistettiin, jolloin tuotteena saatiin indolia **141** 29% saannolla ja sen diastereomeeriä 50% saannolla. Synteesin viimeisissä vaiheissa indoli metanolysoitiin selektiivisesti metyyliesteriksi **142** minkä jälkeen dysibetainin (**120**) betaiini muodostettiin kolmivaiheisella reaktiosarjalla.



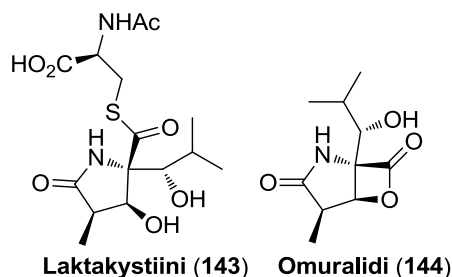
Kaavio 36: (-)-Dysibetaiinisynteesin viimeiset vaiheet.¹⁰

Tässä synteesissä (-)-dysibetaiiniin päästään 11 vaiheessa 11% kokonaissaannolla, mikä on pieni parannus edelliseen synteesiin nähden. Vaikka tällä synteesillä pystyttiinkin valmistamaan puhdasta (-)-dysibetaiinia, itse synteesireitti ei kuitenkaan ole selektiivinen, sillä Ugi-reaktiassa muodostuneet diastereomeerit eroteltiin toisistaan kromatografisesti synteesin seuraavassa vaiheessa. Parannuksena edelliseen synteesiin tässä kuitenkin hyödynnettiin lähtöaineena L-omenahappoa, jossa γ -laktaamirenkaan OH-ryhmän konfiguraatio oli jo valmiina. Näissä kahdessa esitellyssä dysibetaiinin synteesissä Ugi-reaktiolla oli olennainen rooli, sillä sen avulla pystyttiin tuottamaan dysibetaiinin γ -laktaami helposti yhdessä vaiheessa. Lisäksi Ugi-reaktiossa käytetty isosyanidi mahdollisti seuraavissa vaiheissa amidin selektiivisen metanolyysin indolin muodostuksen kautta, ilman γ -laktaamin avautumista. Samanlainen esimerkki Ugi-reaktion jälkeisestä indolinmuodostuksesta nähdään myös seuraavan kappaleen omuralidin ja laktakystiinin formaalisynteesissä.

5.2 Omuralidi ja laktakystiini

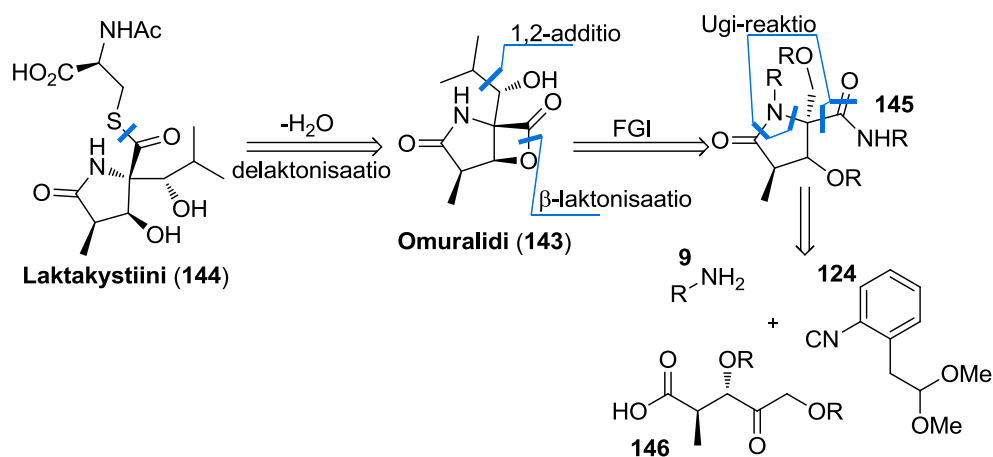
Laktakystiini (**143**) on *Streptomyces* sp. bakteerin tuottama proteasomi-inhibiittori, joka sytotoksisuutensa vuoksi on potentiaalinen antitumoraalinen sekundaarimetaboliitti (kuva 7).^{48,49} Laktakystiini hajoaa solun ulkopuolella omuralidiksi (**144**) jonka on todettu olevan todella spesifi proteasomi-inhibiittori (kuva 7). Nimensä omuralidi on saanut löytäjänsä – vuoden 2015 lääketieteen nobelistin, Satoshi Ōmuran⁵⁰ – mukaan. Laktakystiini on rakenteeltaan substituoitu γ -laktaami ja omuralidi sisältää γ -laktaamirenkaan

lisäksi β -laktonirenkaan (kuva 7). Solun ulkopuolisessa mediassa laktakystiinin kysteinisivuketju hydrolysoituu ja tuotteesta muodostuu omuralidin laktonirengas.



Kuva 7: Laktakystiini ja omuralidi.

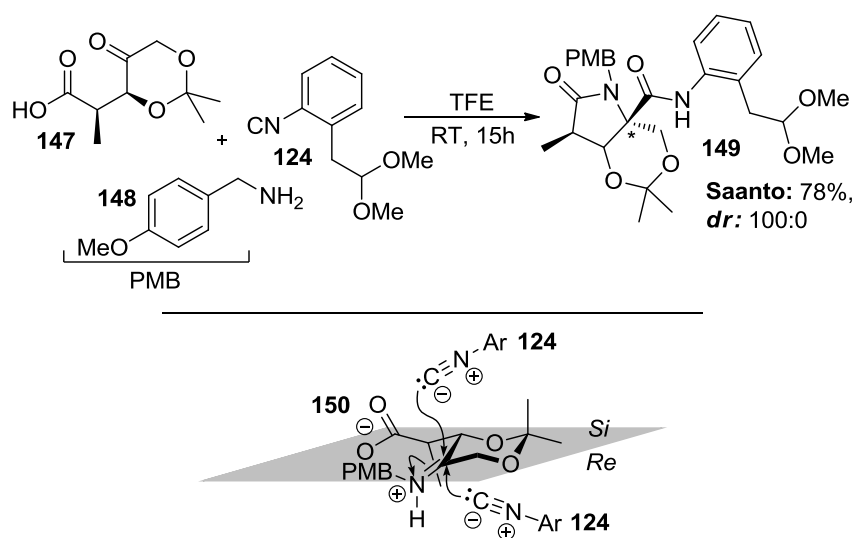
Kobayashi *et. al.*⁴⁹ ovat kehittäneet laktakysteiniinille ja omuralidille formaalin kokonais-synteesin, jossa hyödynnetään diastereoselektiivistä osittain intramolekulaarista Ugi-reaktiota. Tässä retrosynteesissä (kaavio 37) ensimmäinen katkaisu tehdään kysteinisivuketjuun, mistä päästään omuralidin γ -laktaami- β -laktoniin **143**. Omuralidin katkaisujen – 1,2-alkyyliaddition sekä β -laktonisaation – tuloksena saadaan Ugi-reaktion γ -laktaamituote **145**, jota voidaan valmistaa isosyanidista **124**, kiraalisesta ketohaposta **146** sekä tarkoitukseen soveltuvasta amiinista **9**.



Kaavio 37: Omuralidin retrosynteesi diastereoselektiivisellä Ugi-reaktiolla.⁴⁹

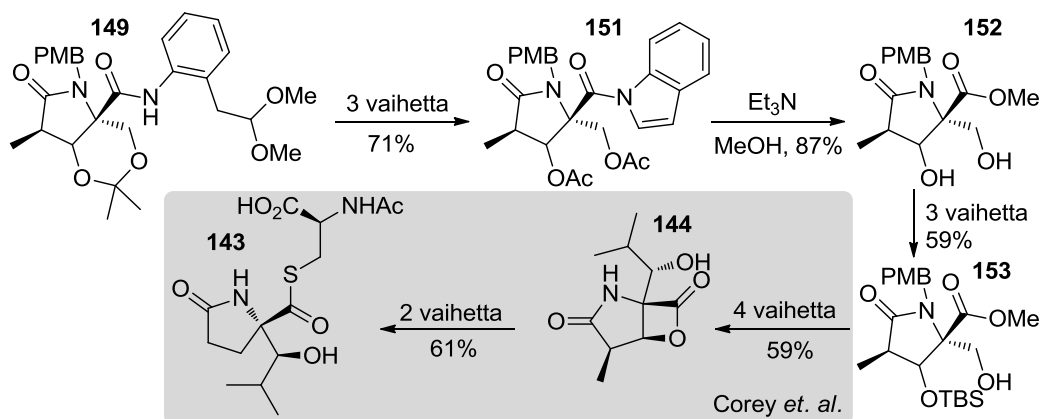
Isosyanidina Ugi-reaktiossa käytettiin dysibetaiinien synteesistä tuttua isosyanidia **124**, joka tässäkin mahdollisti kemoselektiivisen metanolyysin synteesin edetessä (kaavio 38).⁴⁹ Amiiniksi tähän reaktioon valittiin PMB-NH₂ (**148**), jonka aryyliiryhmä toimii γ -

laktaamin suojaryhmänä myös Corey *et. al.*⁵¹ synteessissä, minkä pohjalle tämä formaalisynteesi on kehitetty. Reaktion ketohappona käytettiin kiraalista dioksaanijohdannaista **147**. Tässä reaktiossa isosyanidin additio pääsee tapahtumaan vain *Si*-fasiaalisesti imiinin **150**, mistä johtuen tuotteen stereokeskuksen konfiguraation on *R* (**149**, tähdellä merkitty, kaavio 38). *Re*-fasiaalinen additio estyy ketohapon α -metyyliryhmän vuoksi. Tässä diastereoselektiivinen Ugi-reaktion tuotteena saatiin γ -laktaamia **149** 78% saannolla ja 100:0 diastereomeerisuhteella.



Kaavio 38: Omuralidin ja laktakystiinin formaalisynteesin diastereoselektiivinen Ugi-reaktio.

Ugi-reaktiota tässä synteessissä – kuten dysibetaiinienkin synteeseissä – seurasi ensin Ugi-tuotteen indolisointi kolmessa vaiheessa diamidiksi **144** 71% saannolla (kaavio 39) samalla kun dioksaanirengas purettiin.⁴⁹ Tätä seurannut metanolyysi tuotti metyyliesteriä **145** 87% saannolla. Erotten dysibetaiinisynteeseistä, tässä metanolyysissä käytettiin stoikiometristä määrää dimetyyliamiinia, jolla poistettiin laktaamirenkaan OH-substituenttien asetyyliryhmät samanaikaisesti. Näistä sekundaarinen OH-ryhmä suojattiin seuraavissa vaiheissa TBS:lla (**146**, *tert*-butyyilisilyyli). Tästä eteenpäin synteesi kulkee Corey *et. al.* kehittämän reitin mukaisesti, ensin omuralidiksi (**137**) ja siitä edelleen laktonirenkaan avauksen ja kysteiinin kytkennän tuotteena laktakystiiniksi (**136**).⁵¹



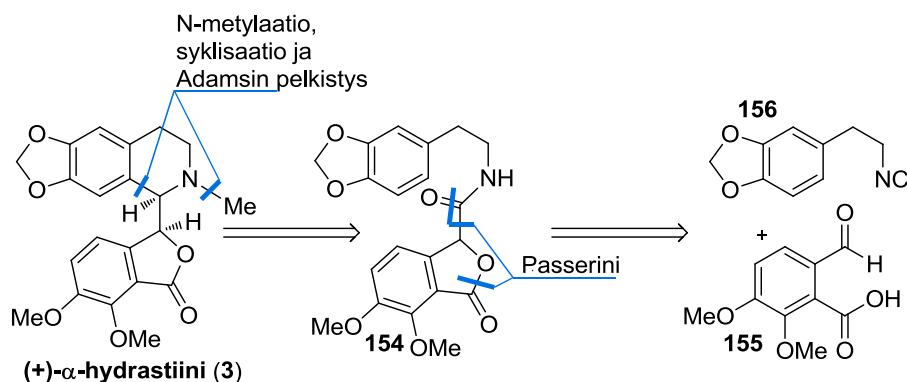
Kaavio 39: Omuralidin ja laktakystiinin formaalin kokonaissynteesin Ugi-reaktiota seuraavat vaiheet.^{49,51}

Formaalina omuralidin ja laktakystiinin kokonaissynteesinä tämä tarjoaa erilaisen vaihtoehdon välituotteen **153** valmistamiselle diastereoselektiivisen Ugi-reaktion kautta. Selektiivisyyttä ohjaavana lähtöaineena reaktiossa käytetty ketohappo **147** hoiti tehtävänsä erinomaisesti, sillä tuotteena reaktiosta saatiin vain haluttua diastereomeeriä hyvällä saannolla. Tällä formaalisynteesillä olisi mahdollista tuottaa laktakystiiniä 13% saannolla ja omuralidia 21% saannolla Ugi-reaktiosta lähtien. Erityistä eleganssia tähän synteisiin tuo Ugi-reaktiossa käytetty ketohappo **147** sekä jälleen isosyanidi **124**. Ketohapon **147** avulla Ugi-reaktio tuottaa vain luonnollista diastereomeeriä hyvällä saannolla ja isosyanidin **124** ansiosta tässäkin synteesissä selektiivinen amidin metanolyysi onnistuu hyvällä saannolla kahdessa vaiheessa.

5.3 (+)-Hydrastiini

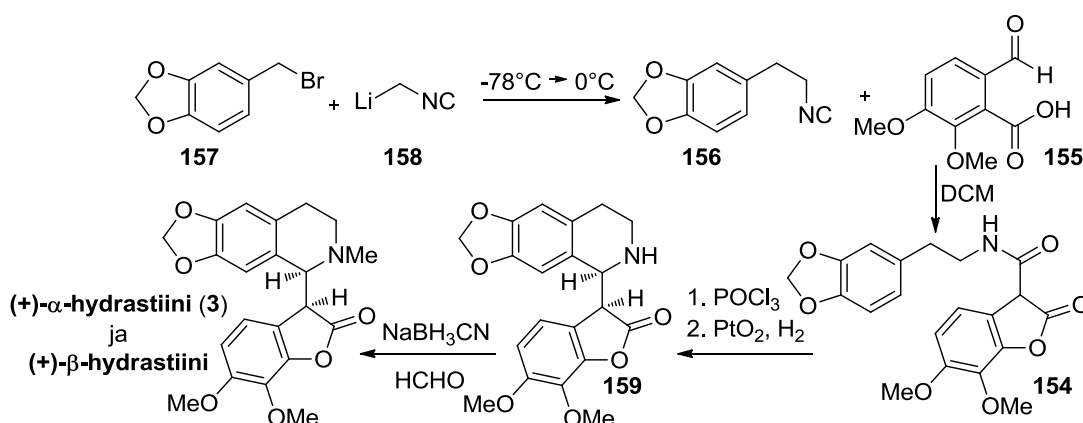
Hydrastiini (**3**, kuva 2) on alkaloidi, jota herra Alfred Durand eristi ensimmäisen kerran vuonna 1851 *Hydrastis Canadensis*-kasvista.^{11,52} Tuolloin hydrastiinin tarkka rakenne jäi vielä määrittämättä, joskin Durand pystyi selvittämään tutkimansa aineen olevan emäksinen ja näin ollen sisältävän typpeä – missä hän oli täysin oikeassa. Myöhemmin on selvitetty hydrastiinin olevan isokinolinialkaloidijohdannainen, joka rakentuu kahdesta yhteen liittyneestä rengasjärjestelmästä (**3**, kaavio 40). Pohjois-Amerikan alkupe räisasukkaat käyttivät *Hydrastis Canadensistä* sekä väriaineena että tulehduslääkkeenä ja kasvilla on todettu olevan myös sekä ripulia että ummetusta helpottavia vaikutuksia.

Hydrastiinin retrosynteesin (kaavio 40) ensimmäisissä vaiheiden – *N*-metylaation, syklisaation ja Adamsin pelkistyksen – jälkeen päästään käsiksi osittain intramolekulaarisen Passerini-reaktion tuotteeseen **154**. Passerini-reaktion tyypillisillä katkaisuuilla saadaan reaktion lähtöaineiksi opiaanihappo (**155**) sekä isosyanidi **156**.



Kaavio 40: Hydrastiinin retrosynteesi.

Aikaisemmat hydrastiinin kokonaissynteetit kärsivät ongelmista laktonin **154** valmistuksessa. Falck ryhmä ratkaisi tämän ongelman Passerini-reaktion avulla (kaavio 41).¹¹ Synteesi lähtee liikkeelle isosyanidin **156** valmistuksella, joka toteutetaan alkyloimalla α -litiometyyli-isosyanidi **158** piperonylibromidilla **157**. Tätä seuraavassa Passerini-reaktiossa isosyanidi **156** reagoi opiaanihapon **155** kanssa, muodostaen laktonin **154** 71%:n saannolla. Tämän synteesin Passerini-reaktio on näin osittain intramolekulaarinen, kun aldehydi ja karboksyylihappo sijaitsevat samassa molekyylissä, jolloin tuotteena saadaan laktoneja. Passerini-reaktiota seuraava Bischler-Napieralski syklisaatio suoritettiin POCl_3 :lla, ja tästä saatu imiini pelkistettiin Adamsin katalyytillä (PtO_2). Näin tuotteena saatiin norhydrastiini (**159**). Viimeisessä vaiheessa norhydrastiinin typpi metyloitiin pelkistävässä olosuhteissa (syanoboorihydridi, NaBH_3CN), jolloin tuotteena saatiin raseemista (+)-hydrastiinia (**3**).

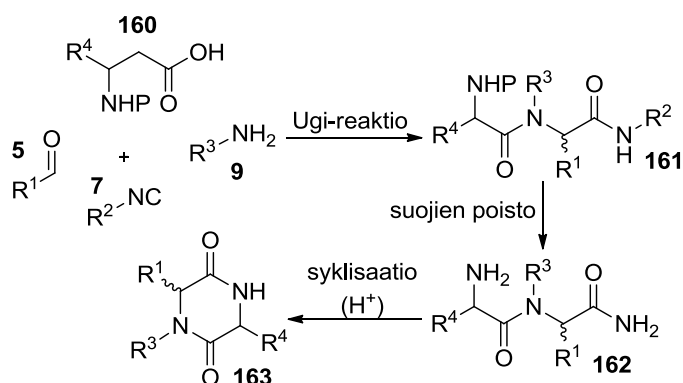


Kaavio 41: Falckin hydrastiinisynteesi

Tämä synteesi on tietävästi ensimmäinen luonnonainesynteesi jossa Passerini-reaktiota on hyödynnetty. Reaktion avulla onnistuttiin tuottamaan aikaisemmissa synteesissä ongelmalliseksi osoittautunut väliaine **154** hyvällä saannolla. Lisäksi synteesi on lyhyt, lähtöaineista tuotteeseen päästään viidessä vaiheessa. Passerini-reaktio ei kuitenkaan ole enantioselektiivinen, joten tässä synteesissä saadaan tuotteena (+)- α -hydrastiinia (**3**, kaavio 41) sekä sen isomeeria (+)- β -hydrastiinia (ei kuvassa). Jos klassisesta Passerini-reaktiosta olisi olemassa helposti sovellettava enantioselektiivinen versio, voitaisiin tämä synteesi mahdollisesti toteuttaa tällaisenaan enantioselektiivisenä.

6 Piperatsiinijohdannaiset

Piperatsiinit ovat tyydyttyneitä kuusirenkaisia heterosykkejä, joissa on kaksi typpiatomia asemilla 1 ja 4 (kaavio 42), jolloin niiden johdannaisia saadaan aikaan korvaamalla renkaan vetyatomeja muilla funktionaalisilla ryhmillä.⁵³ Ugi-reaktion tuotteista voidaan valmistaa piperatsiinijohdannaisia kun jokin reaktion lähtöaine sisältää suojatun amiinin jonka suojauksen purkamisen jälkeen tehdään piperatsiinisyklisaatio (kaavio 42). Niinpä Ugi-reaktion avulla voidaan valmistaa piperatsiinijohdannaisia kolmivaiheisella reaktiosarjalla. Ugi-reaktiossa lähtöaineina on tällöin suojattu aminohappo **160**, karbonyyliyhdiste **5**, isosyanidi **7** sekä amiini **9**. Tuotteesta reaktiosta saadaan amidi **161**, josta muodostuu primaarinen amiini **162** suojanpoiston jälkeen, joka on edelleen syklisoitavissa piperatsiinijohdannaiseksi **163** happamissa olosuhteissa.



Kaavio 42: Ugi-reaktio ja sitä seuraavat vaiheet piperatsiinijohdannaiseksi.⁵³

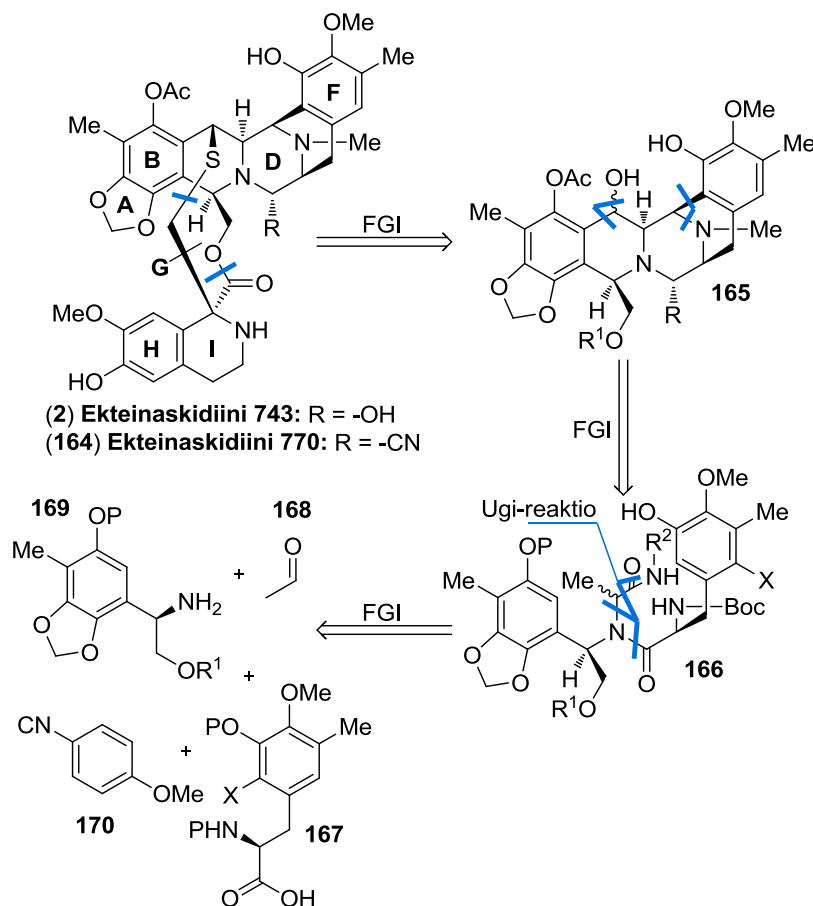
Tällainen piperatsiinien synteesi on verrattavissa PADAM-sekvenssiin, sillä piperatsiinisyklisaatio on tässäkin reaktiosarjassa mahdollinen vain jos jokin lähtöaine sisältää suojatun amiinin, joka voi syklisoitua. Ugi-reaktion laajan substituenttisiedon ansiosta reaktiosarja ei juuri rajaa reaktion lähtöaineiden substituentteja, jolloin tämä menetelmä on laajasti hyödynnettävissä luonnonainesynteesissä.

6.1 Ekteinaskidiini 743

Ekteinaskidiini 743 (**2**, Et-743, kuva 2) on *Ecteinascidia turbinata* vaippaeläimestä eristetty voimakkaasti antitumoraalinen tetrahydroisokinoliinialkaloidi (kuva 2).⁵⁴⁻⁵⁶ Se aiheuttaa eräissä syöpäsolulinjoissa solukuolemaan johtavaa DNA:n pilkkoutumista. Et-743 on myynnissä syöpälääkkeenä kauppanimellä Yondelis, ja se on hyväksytty pehmytkudossarkooman hoitoon Euroopassa, Venäjällä sekä Etelä-Koreassa. Lääkeainekäytössä Et-743 kulkee nimellä Trabectedin. Ekteinaskidiini-770:ssä (**157**, Et-770, kaavio 43) on R-ryhmänä syanoryhmä hydroksyyliiryhmän sijaan.

Et-743:n (**2**) ja Et-770:n (**164**) retrosynteesissä (kaavio 43) ensimmäiset katkaisut tehdään kymmenrenkaaseen, jolloin jäljelle jää kookas kuuden renkaan muodostama rakenne **165**.⁵⁴ Seuraavista katkaisuisista saadaan Ugi-reaktiolla muodostettava yhdiste **166**, jonka lähtöaineiksi saadaan, isosyanidi **170**, asetaldehydi **168**, amiini **169** sekä karboksyylihapo **167**. Koska Et-743 on raskaasti substituoitu monimutkainen polysyklinen yhdiste, sen kokonaissynteesi on väistämättä pitkä. Tässä Ugi-reaktiota hyödyntävässä synteesissä lähtöaineista tuotteeseen päästään 43 reaktiossa. Samassa synteesissä onnis-

tuttiin myös valmistamaan ekteinaskidiini 770:aa. Koska Et-743 on jo käytössä lääkkeenä, sen kokonaissynteesin kehittäminen suureen mittakaavaan laskisi lääkkeen hintaa huomattavasti. Tällä hetkellä Et-743 maksaa 100 miljoonaa euroa kilolta. Nykyään Et-743:a valmistetaan semisynteesillä toisesta hiukan edullisemmasta luonnonaineesta – syanosafraasiini B:stä.⁵⁷

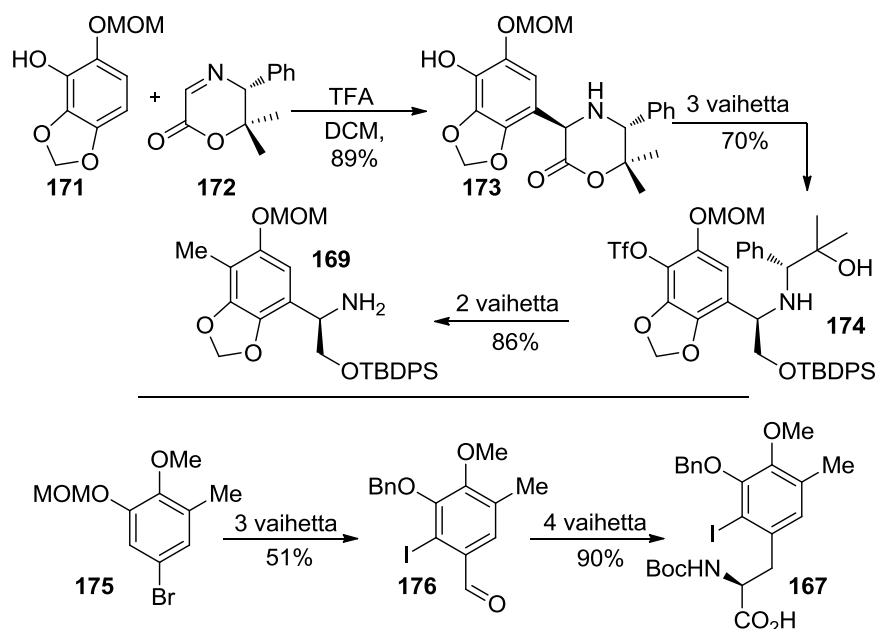


Kaavio 43: Ekteinaskidiini 743 ja 770 retrosynteesi.

Tämä synteesi lähtee luonnollisesti liikkeelle Ugi-reaktion lähtöaineiden valmistuksella.⁵⁴ Näistä karboksyylihapo **167** ja amiini **169** valmistettiin useampivaiheisella synteesillä kiraalista apuainetta **172** hyödyntäen (kaavio 44). Amiinin **169** synteesi lähti liikkeelle fenolin **171** ja kiraalisena apuaineena käytetyn iminolaktonin **172** stereoselektiivisellä Mannich-tyyppisellä reaktiolla. Tämä reaktio tuotti vain haluttua diastereomeeriä **173** 89% saannolla. Tätä seurasi fenolin triflointi, pelkistävä renkaan avaus sekä primäärisen alkoholin silylointi *tert*-butyylidifenyylikloridilla tuotteeksi **174**. Triflaatin

metylointi suoritettiin Pd/C-katalysoidulla ristikytkennällä MeZnCl:lla. Aminoalkoholin hapettava katkaisu suoritettiin lyijytetra-asetaatilla mistä muodostunut imiini muunnettiin amiiniksi hydroksyyliamiinilla, jolloin tuotteena saatiin amiini **169**. Tällä menetelmällä tuotettiin Et-743:n kymmenrenkaan yksi stereokeskus hyvin varhaisessa vaiheessa synteesiä.

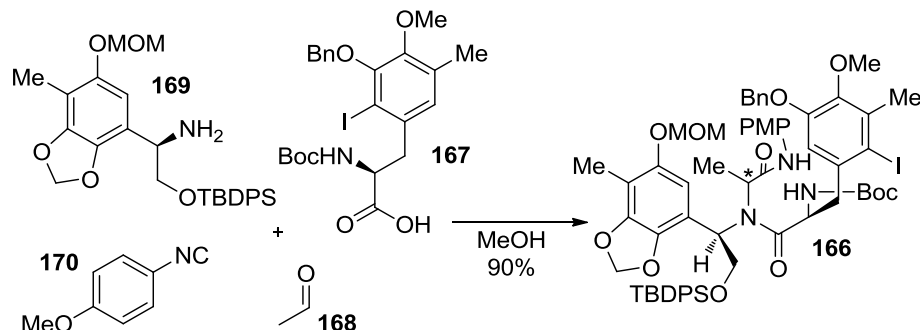
EF-fragmentin, eli Ugi-reaktion karboksyylihapon **167** synteesissä lähtöaineena käytettiin bromidia **175**, josta valmistettiin bentsaldehydi **176** (kaavio 44). Tämän jälkeen aldehydiin **176** liitettiin sivuketju neljässä vaiheessa, jolloin tuotteena saatiin karboksyylihappoa **167** hyvällä saannolla (90%).



Kaavio 44: Ekteinaskidiini 743:n AB- ja EF-fragmenttien synteesit.⁵⁴

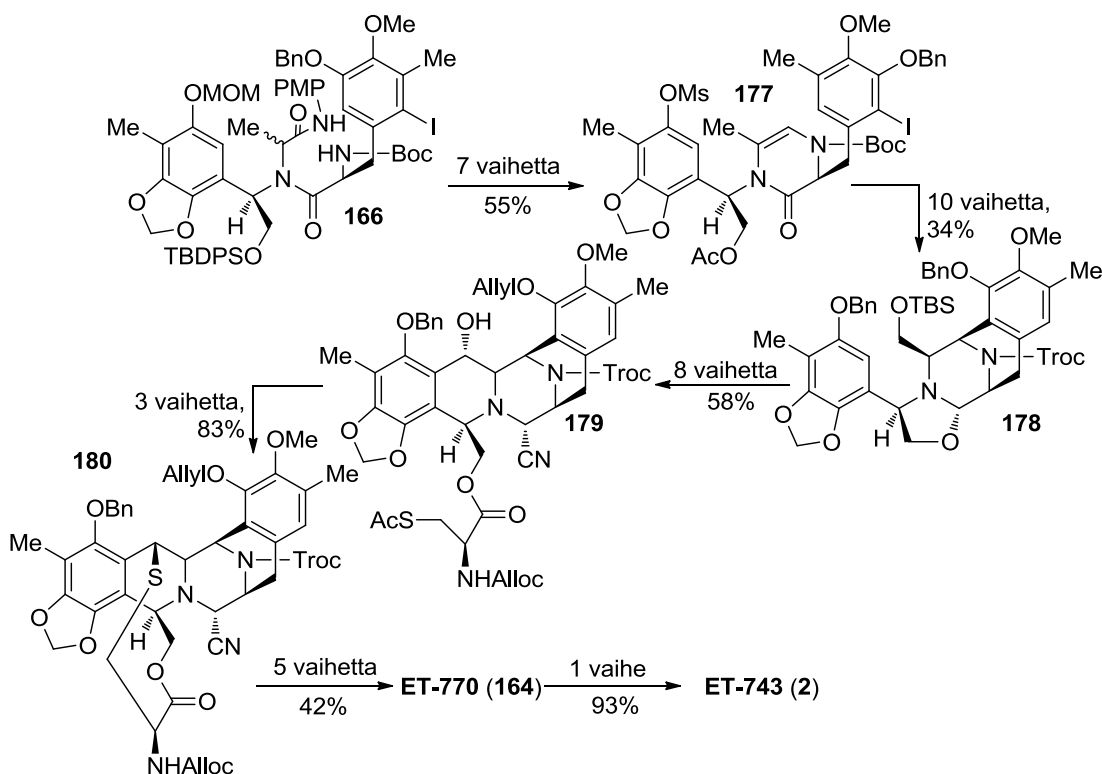
Tämän synteesin Ugi-reaktiossa aikaisemmin valmistetut AB- ja EF-fragmentti (**167** ja **169**) liitettiin yhteen asetaldehydinin **168** ja aromaattisen isosyanidin **170** avulla (kaavio 45). Reaktiosta saatiin tuote **166** jossa kaikki Et-743:n välituotteen **165** (kaavio 43) atomit ovat valmiina. Koska reaktiossa käytettiin kiraalista amiinia sekä karboksyylihappoa, tuotteessa on Et-743:n seitsemästä stereokeskuksesta jo tässä vaiheessa synteesiä. Reaktiossa muodostui myös yksi uusi stereokeskus (merkitty tähdellä, kaavio 45), mutta tämän suhteen reaktio ei ollut selektiivinen. Tuotetta **166** saadaan siten Ugi-

reaktiolle tyypillisesti kahden diastereomeerin seoksena. Tämä stereokeskus poistetaan kuitenkin synteesin seuraavissa vaiheissa ennen Et-743 C-renkaan muodostusta.



Kaavio 45: Ekteinaskidiini 743-synteesin Ugi-reaktio.⁵⁴

Ugi-reaktion jälkeen synteesissä muodostettiin Et-743:n ABCDEF-fragmentti syklisoi-
malla C-, D-, ja F-renkaat. Et-743:n D-rengas on piperatsiinijohdannainen, jonka val-
mistaminen onnistuu poistamalla amiinin suojaryhmä Ugi-reaktion tuotteesta ja muo-
dostamalla sidos kahden amiinin välille. Ugi-reaktion tuotteesta piperatsiinijohdannai-
seen **177** päästiin tässä synteesissä seitsemässä vaiheessa, joiden aikana yhdisteen suoja-
ryhmiä vaihdettiin toisiin ja Ugi-reaktioissa muodostunut stereokeskus hapetettiin kak-
soissidokseksi. Välituotteesta **177** 10 vaiheen jälkeen päästiin tuotteeseen **178**, jossa
enää C-rengas on avonaisena. Tästä kahdeksan vaihetta myöhemmin on synteesissä
edetty tuotteeseen, jossa koko ABCDEF-fragmentti on koossa ja GHI-fragmentin aihio
on liitetty yhdisteeseen. Lisäksi tuotetta **179** edeltävissä vaiheissa suojaryhmiä on jou-
duttu vaihtamaan, jotta ne soveltuisivat synteesin seuraaviin vaiheisiin. Et-743:n kym-
menrenkas on valmiina tuotteessa **180**, mitä seuraa enää 5 vaihetta Et-770:en (**164**) ja
tästä yksi vaihe Et-743:en (**2**).



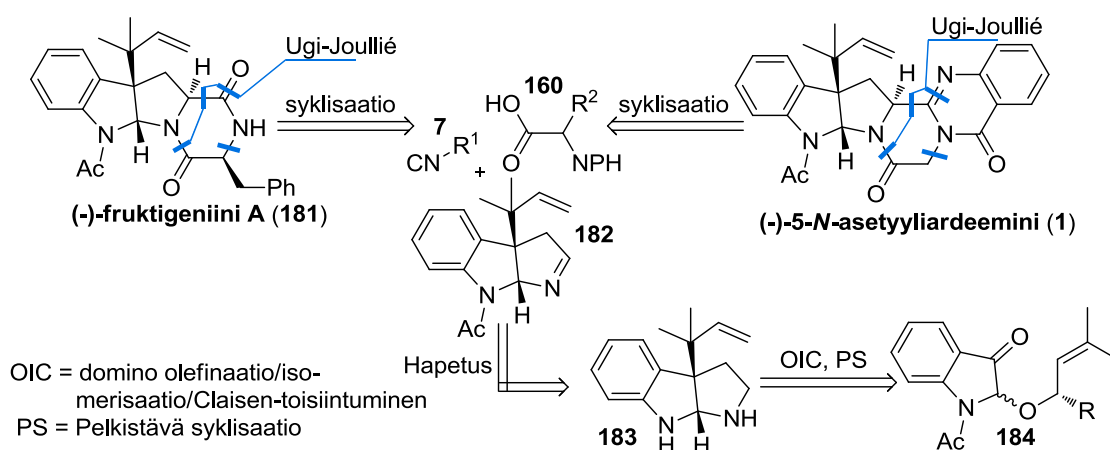
Kaavio 46: Et-743:n ja Et-770:n synteesin Ugi-reaktiota seuraavat vaiheet.⁵⁴

Suurin osa tämän synteesin vaiheista kuuluu suojaryhmien vaihtoon ja poistoon. Herääkin kysymys, olisiko tämä synteesi voitu toteuttaa hiukan vähemmällä vaiheilla valitsemalla suojaryhmät sopivimmiksi koko synteesin kannalta. Toisaalta kyseessä on kookkaahko luonnoina, jonka rakenne on suhteellisen monimutkainen, mikä usein tekee synteesireitistä haasteellisemmän toteutettavan. Tosin Coreyn enantioselektiivinen Et-743-synteesi oli vain 25 vaiheinen⁵⁸ ja tämä synteesi taas siitä 18 vaihetta pidempi. Vain vaikuttaa myös siltä että tässä esitellyn synteesin kehittänyt ryhmä ei itsekään ollut kovin vakuuttunut Ugi-reaktion käytöstä Et-743:n synteesissä, sillä kymmenen vuotta myöhemmin julkaistussa artikkelista ideasta oli luovuttu kokonaan ja synteesireitti oli lyhennetty 26 vaiheeseen.⁵⁹ Kaiken kaikkiaan tämä synteesi antaa kuitenkin yhden hyvän esimerkin Ugi-reaktion käytöstä luonnoinaesynteesissä. Lisäksi tämä on tietävästi ensimmäinen synteesi jossa Ugi-reaktiota on hyödynnetty näin kookkaan ja monimutkaisen molekyylin valmistuksessa. Ugi-reaktiolla asetetaan paikoilleen suuri osa Et-

743:n atomeista jo synteesin alkuvaiheessa, mikä on kuitenkin strategiana mielenkiintoinen vaikka toteutus jäikin tässä hiukan ontumaan.

6.2 (-)-Fruktigeniini A ja (-)-5-N-asetyyliardeemini

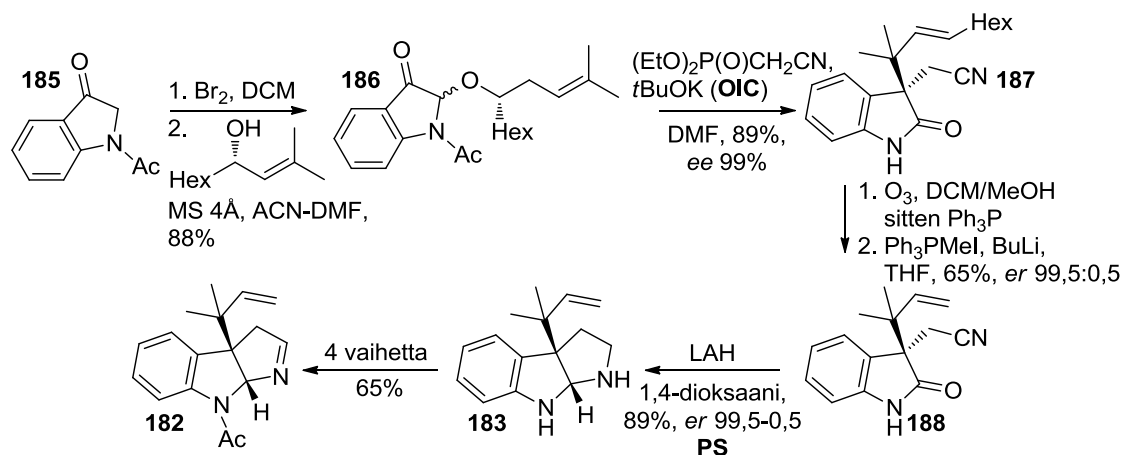
(-)-Fruktigeniini A (**181**, kaavio 47) on *Penicillium fructigenum* sienestä eristetty alkaloidi, jonka on todettu estävän erään leukemiasolulinjan kasvua.^{9,60,61} (-)-5-N-Asetyyliardeemini (**1**, kaavio 47) taas on *Aspergillus fischerii* (*brasieliensis* variaatio) sienestä eristetty voimakkain tunnettu syöpäkasvainten monilääkeresistenssiä hillitsevä yhdiste. Kumpikin luonnonaine sisältää substituoidun piperatsiinirenkaan, ja niiden valmistaminen onkin mahdollista samasta perusrakenneyksiköstä **182** Ugi-Joullié-reaktiolla (kaavio 47). Näiden kahden retrosynteesi lähteekin liikkeelle Ugi-Joullié-reaktiolla ja syklisaatiolla, mistä saadaan tuotettua kumpikin luonnonaine muuntelemalla reaktion isosyanidin (**7**) ja karboksyylihapon (**160**) R-ryhmiä (kaavio 47). Ugi-Joullié-reaktion karbonyylikomponenttina tässä käytettiin syklistä imiiniä **182**, joka voidaan valmistaa indolijohdannaisesta **183** OIC-PS-reaktioilla (domino olefinaatio/isomerisaatio/Claisen-toisiintuminen ja pelkistävä syklisaatio) ensin indoliksi **183** ja siitä edelleen hapettamalla imiiniksi **182**. Koska tässä kolmen komponentin reaktiossa käytetään amiinin ja karbonyyliyhdisteen sijaan syklistä imiiniä, kyseessä on Ugi-Joullié-reaktio.



Kaavio 47: (-)-Fruktigeniini A:n ja (-)-5-N-asetyyliardeeminin retrosynteesi.⁹

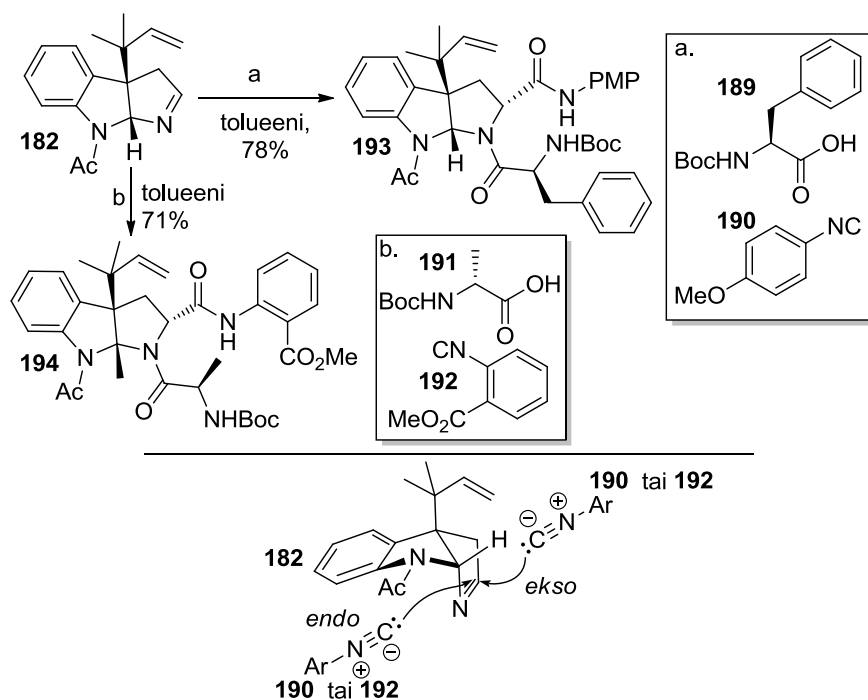
Imiinin **182** lähtöaineena käytettiin 1-asetyyli-indolin-3-onia (**185**), joka bromattiin selektiivisesti, minkä jälkeen bromi substituutiin (*S*)-2-metyyli-deken-4-olilla indoliksi

186 (kaavio 48).⁹ Tätä seurasi OIC-vaihe, missä muodostettiin ensimmäinen luonnonainneiden yhteinen stereokeskus 99% *ee*:llä (**187**, kaavio 48). Seuraavassa vaiheessa molekyylistä poistettiin heksyyli-ryhmä (**188**, kaavio 48), mitä seurasi pelkistävä syklisaatio LAH:llä bisykliksi **183**. Viimeisissä neljässä vaiheessa molekyyliin liitettiin asetaatti-ryhmä ja toinen amiineista iminoitiin Ugi-Joullié-reaktion sykliseksi imiiniksi **182**.



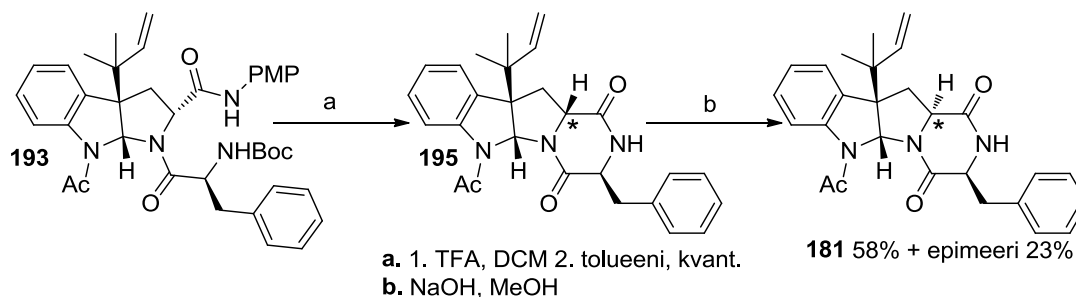
Kaavio 48: Iminin **176** synteesi.⁹

Imiini **182** on ainoa näiden synteesien Ugi-Joullié-reaktion yhteinen lähtöaine.⁹ Muut reaktion lähtöaineet määräytyivät tuotteen mukaan. Fruktigeniini A:lla isosyanidina oli 4-metoksifenyyli-isosyanidi **190** ja karboksyylihappona Boc-suojattu L-fenyylialaniini **189** (a., kaavio 49). 5-*N*-Asyyliardeeminille isosyanidina käytettiin metyyli-2-isosyanobentsoattia **192** ja karboksyylihappona Boc-suojattua D-alaniinia **191** (b., kaavio 49). Kummassakin reaktiossa liuottimena käytettiin toluenia. Näistä reaktioista saatiin tuotteina amidit **193** ja **194**. Fruktigeniini A:n synteesissä Ugi-Joullié-reaktio tuotti selektiivisesti diastereomeeriä **193** 78% saannolla. Selektiivisyys selittyy imiinin **182** kuppi-maisella rakenteella, joka esti reaktion *endo*-puolelta täysin (kaavio 49). Asetyyliardeeminilla tuotteena saatiin vain luonnollista diastereomeeriä **194** 71% saannolla, jolloin tässäkin reaktiossa imiinin **182** muoto esti *endo*-puoleisen reaktion. Nämä Ugi-Joullié-reaktiot ovatkin malliesimerkki onnistuneesta diastereoselektiivisyydestä luonnonainesynteesissä.



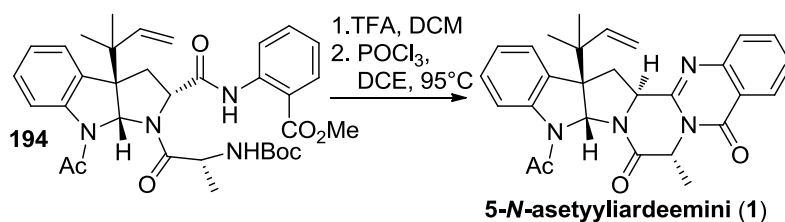
Kaavio 49: Ugi-reaktio Fruktigeniini A:lle (a) ja (5)-*N*-Asetyyliardeeminille (b).⁹

Fruktigeniini A:n synteesissä Ugi-reaktiota seurasi suojaryhmien poisto (Boc ja 4-metoksi-fenyyl, PMP) sekä syklisaatio, josta tuotteena saatiin fruktigeniini A:n epimeeriä **195** (tähdellä merkitty, kaavio 50).⁹ Epimeeri isomerisoitiin (-)-Fruktigeniini A:ksi (**181**) alhaisessa lämpötilassa natriumhydroksidin metanoliliuoksessa 58% saannolla.



Kaavio 50: (-)-Fruktigeniini A:n synteesin viimeiset vaiheet.⁹

5-*N*-asetyyliardeeminin synteesissä puolestaan Ugi-reaktion tuotteesta **194** poistettiin suojaryhmät ja hydrolyysituote syklisoitiin (-)-5-*N*-asetyyliardeeminiksi (**1**) fosforyyli-kloridilla (kaavio 51).⁹ Tuotteena viimeisestä reaktiosta saatiin puhdasta luonnollista diastereomeeriä, mikä selittyy reaktion aikaisella isomerisaatiolla.

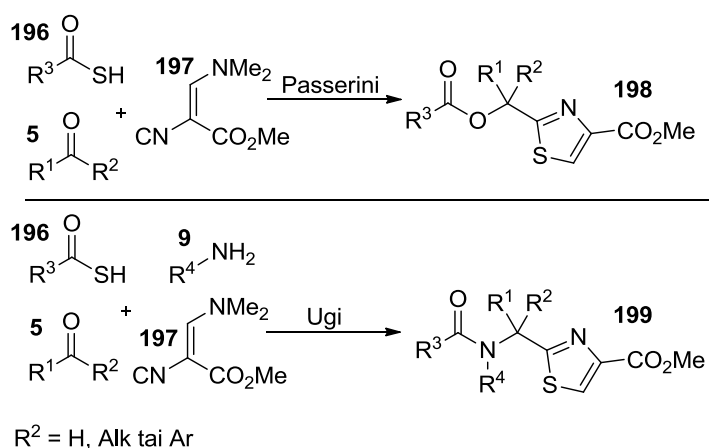


Kaavio 51: (5)-*N*-asetyyliardeemini-synteesin viimeinen vaihe.⁹

Nämä kaksi synteesiä ovat hyviä esimerkkejä Ugi-reaktion monipuolisuudesta. Muuntelemalla vain karboksyylihappoa ja isosyanidia reaktiosta saadaan tuotteena kaksi erilaista yhdistettä joista pystyttiin vain muutamalla vaiheella muokkaamaan kaksi yllättävän erilaista luonnonainetta. Näissä synteeiseissä Ugi-Joullié-reaktio onnistui diastereoselektiivisenä, koska reaktioissa käytettiin kuppimaista syklistä imiiniä **182**. Ugi-reaktion ja viimeisten vaiheiden isomerisaatioiden avulla esitetyillä synteeiseillä voidaan valmistaa näitä sekundaarimetaboliitteja ilman tarvetta diastereomeerien puhdistukseen synteesin välituotteista tai ylimääräisten kiraalisten apuaineiden poistoa. Lisäksi kummatkin näistä synteeiseistä ovat suhteellisen lyhyitä kun huomioidaan kohdemolekyylien koko, joten näitä synteeisejä voidaan pitää hyvinä esimerkkeinä siitä mihin Ugi-reaktiota hyödyntämällä parhaimmillaan päästään.

7 Tiatsolit

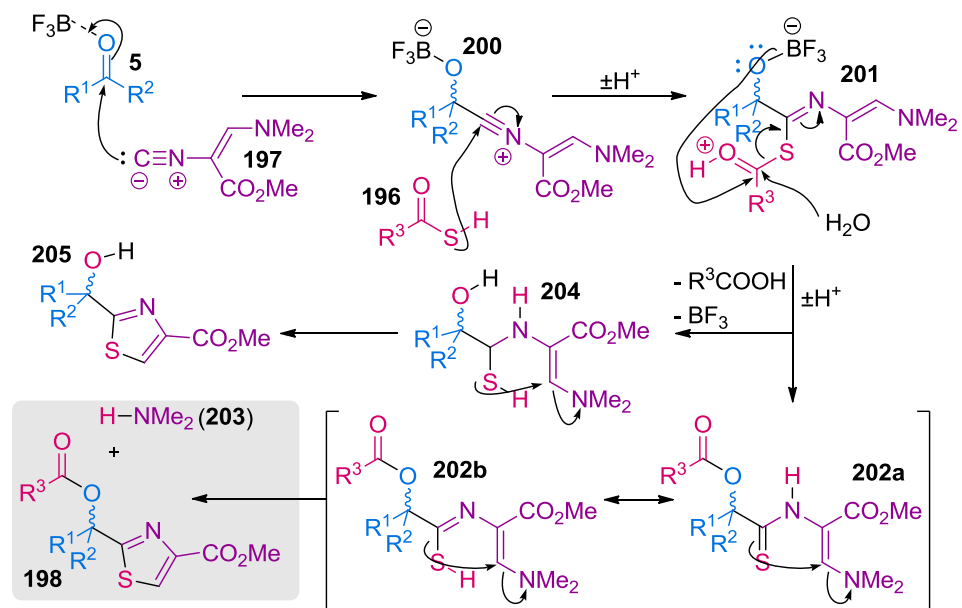
Kun Passerini- tai Ugi-reaktiossa käytetään karboksyylihapon sijaan tiolihappoa **169** ja isosyanidina Schöllkopfin isosyanidia **197**, saadaan reaktioiden tuotteina tiatsoleja (**198** ja **199**, kaavio 52). Näiden reaktioiden kohdalla tiatsolien muodostuminen perustuu tiolihapon rikin ja Schöllkopfin isosyanidin yhteistoimintaan reaktion viimeisissä vaiheissa. Schöllkopfin isosyanidin dimetyyliaminoryhmä toimii näissä reaktioissa hyvänä lähtevänä ryhmänä, jolloin syklistä tiatsoliksi muodostuminen mahdollistuu.^{62,63}



Kaavio 52: Tiatsoleja muodostavat Passerini- ja Ugi-reaktiot.^{62,63}

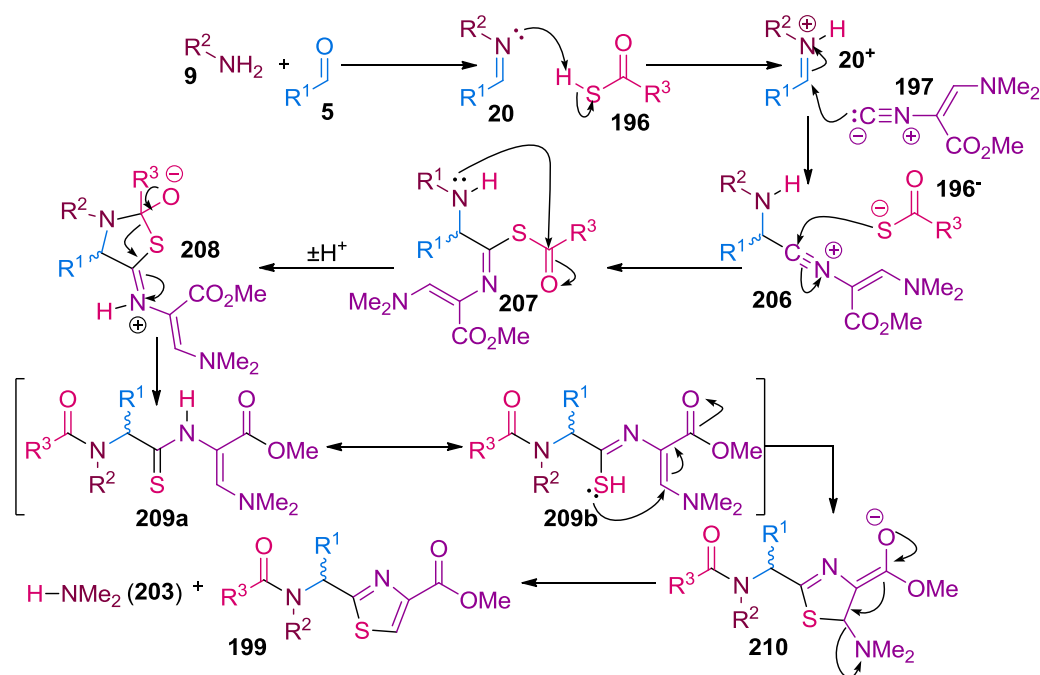
Tiatsoleja muodostavassa Passerini-reaktiossa tarvitaan aldehydin, Schöllkopfin isosyanidin ja tiolihapon lisäksi vielä Lewis-happokatalyytiksi booritrifluoridietraattia (BF₃•OEt₂) nostamaan aldehydin karbonyylihiilen elektrofiilisyyttä.^{62,63} Ugi-reaktiolla ei tällaista vaatimusta ole, mikä johtuu reaktion ensimmäisen vaiheen imiinin muodostuksesta. Koska reaktioiden tuotteita tarkastelemalla tuskin on täysin selvää, miten lähtöaineista päästään tuotteiksi, on näiden kummankin reaktion mekanismit perusteltua käydä läpi. Molemmille reaktioille on kehitetty vain laskennalliset mekanismit, jotka perustuvat Passerini- ja Ugi-reaktioiden tunnettuihin ja yleisesti hyväksytyihin mekanismeihin.

Passerini-reaktion tiolihappomekanismissa ensimmäisessä vaiheessa tapahtuu booritrifluoridin karbonyylin aktivaatio (**5**), mikä mahdollistaa Schöllkopfin isosyanidin (**197**) addition karbonyyliyhdisteeseen iminiumiksi **200** (kaavio 53).⁶³ Tätä seuraa tiolihapon **196** additio isosyanidin hiileen, mistä muodostuu imiini **201** joka transasylaation tuloksena toisiintuu Passerini-reaktion tuotetta muistuttavaksi tioamidiksi **202a** jolla on myös resonanssirakenne **202b**. Mekanismin viimeisessä vaiheessa tioamidin rikki muodostaa sidoksen Schöllkopfin isosyanidin kaksoissidokseen jolloin dimetyyliamiini (**203**) irtoaa molekyylistä ja tuotteena saadaan 2-asyloksitiatsoli **198**. Tästä reaktiosta saadaan sivutuotteena 2-asyylitiatsolin lisäksi 2-hydroksitiatsolia **205**, jos reaktioseoksessa on vettä. Tällöin vesi käynnistää syklisaation jolloin asyyliryhmä irtoaa (**204**) ja tuotteeseen saadaan hydroksyyliryhmä asyyliryhmän sijaan.



Kaavio 53: Passerini-reaktion tiatsolimudostuksen mekanismi.⁶³

Vastaavan Ugi-reaktion mekanismi muistuttaa klassisen Ugi-reaktion mekanismia.^{64,65} Kuten Passerini-reaktionkin kohdalla, tiatsoli muodostuu toisiintumisen tuloksena Ugi-reaktion tuotteesta. Ensimmäisissä vaiheissa muodostuu imiini **20**, jonka tioli happo **196** protonoi iminium-ioniksi **20⁺** (kaavio 54). Tätä seuraa Schöllkopfin isosyanidin **197** additio aminiumiksi **206**, johon deprotonoitunut tioli happo **196** hyökkää muodostaen imiinin **207**. Tätä seuraa amiinityypen elektroniparin luovutus tioli hapon karbonyylihiille, jolloin muodostuu syklinen iminium **208**, joka karbonyylihapen palautumisen myötä muodostaa Ugi-tuotteen **209** jolla on kaksi resonanssimuotoa (**209a** ja **209b**). Näistä **202b**:n tiolista muodostuu sidos isosyanidin kaksoissidokseen, mikä aiheuttaa metyyliesterin enolisaation enolaatiksi **210**. Enolaatti voi edelleen purkautua siten, että dietyyliamiini (**203**) irtoaa molekyylistä ja tuotteena muodostuu tiatsoli **199**.



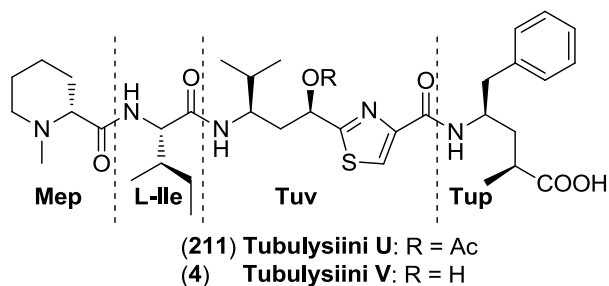
Kaavio 54: Ugi-reaktion tiatsolimuodostuksen mekanismi.^{64,65}

Näiden kummankin reaktion merkittävin vaihe on varsinaisia nimoreaktioita seuraava tiatsolisyklisaatio. Syklisaatioissa rikin käynnistämä reaktio johtaa dimetyyliamiinin irtoamisen molekyylistä, jolloin tuotteena muodostuu tiatsolirengas. Ilman tähän tarkoitukseen soveltuvaa isosyanidia syklisoitumista ei tapahtuisi. Samoin kävisi jos tioliha-pon sijaan käytettäisiin karboksyylihappoa Schöllkopfin isosyanidin kanssa, sillä näistä reaktioista saadaan tuotteena klassisia Passerini- ja Ugi-tuotteita.⁶⁶ Molemmat näistä reaktioista rajoittavat käytettävien lähtöaineiden valikoimaa vain isosyanidin osalta, jolloin reaktion lähtöaineiden substraattivalikoima on silti laaja. Tosin reaktioita on kehitetty vain pienikokoisilla tiolihapoilla, johtuen kookkaampien tiolihapojen huonosta saatavuudesta.^{63,67}

7.1 Tubulyysiinit U ja V

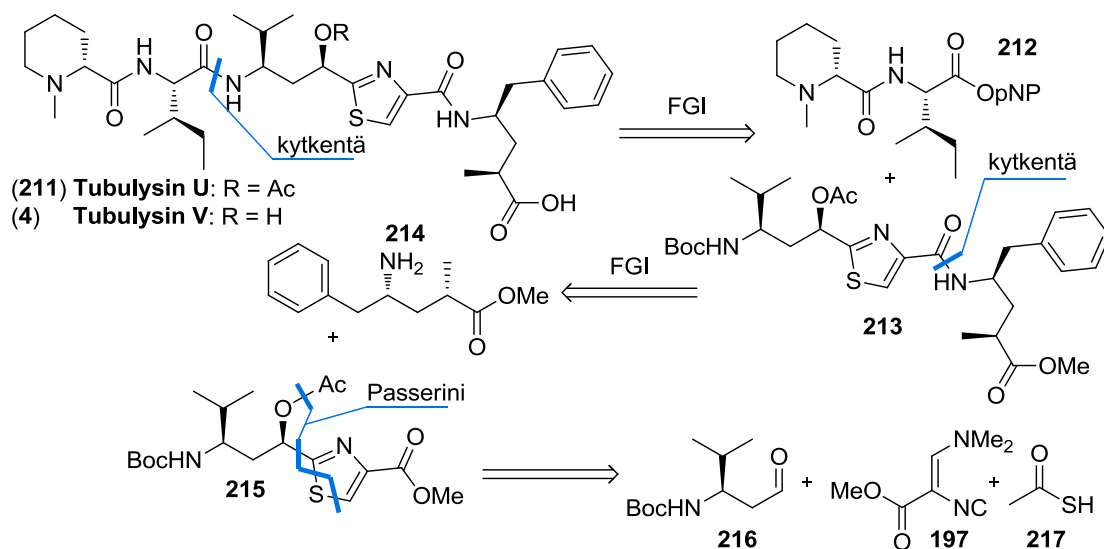
Tubulyysiinit ovat sytostaattisia yhdisteitä joita on eristetty *Archangium gephyra* ja *Angiococcus disciformis* mykobakteerien kannoista.^{12,68} Nimensä mukaisesti niiden sytostaattinen vaikutus perustuu tubuliinin hajoittamiseen soluissa. Rakenteeltaan tubulyysiinit ovat pentapeptidejä jotka koostuvat pääsääntöisesti harvinaisista aminohapoista

(kuva 8). Tubulyysiinit U (**203**) ja V (**4**) rakentuvat *N*-metyylipipekoliinihaposta (Mep), L-isolesiinista (L-Ile), tubuvaliinista (Tuv) sekä tubufenyylialaniinista (Tup).



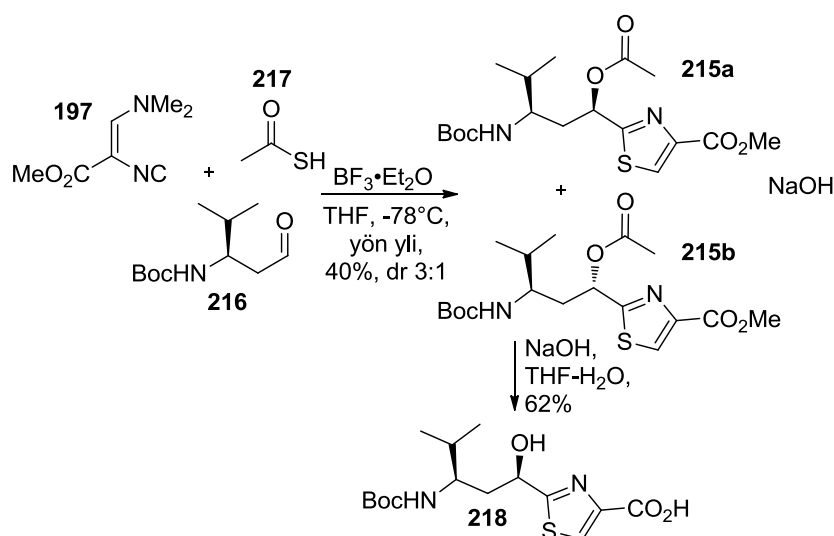
Kuva 8: Tubulyysiini U ja V

Koska tubulyysiineissä on harvinaisia aminohappoja, niiden synteettinen valmistaminen on osoittautunut haasteelliseksi.¹² Suurimpia ongelmia synteessissä on ollut Tuv-yksikön kahden stereokeskuksen ja tiatsolirenkaan valmistus (kuva 8). Dömling *et. al*¹² kehittivät ensimmäisen tubulyysiinisynteesin, jossa Tuv-yksikön haasteet ratkaistiin Passerini-reaktion tiatsolimunnella (kaavio 55). Tubulyysiini U:n ja V:n retrosynteesi lähtee liikkeelle Ile- ja Tuv-yksiköiden välisellä katkaisulla, mistä jää jäljelle Mep-Ile-fragmentti **212** sekä Tuv-Tup-fragmentti (**213**, kaavio 55). Tuv-Tup-yksiköiden välisestä katkaisusta saadaan vapaa Tup-fragmentti **214** sekä Tuv-fragmentti **215**. Tuv-fragmentti (**215**) on valmistettavissa Passerini-reaktiolla Boc-suojatusta L-valiinista **216**, Schöllkopfin isosyanidista **197** sekä eteenitiolihaposta **217**.



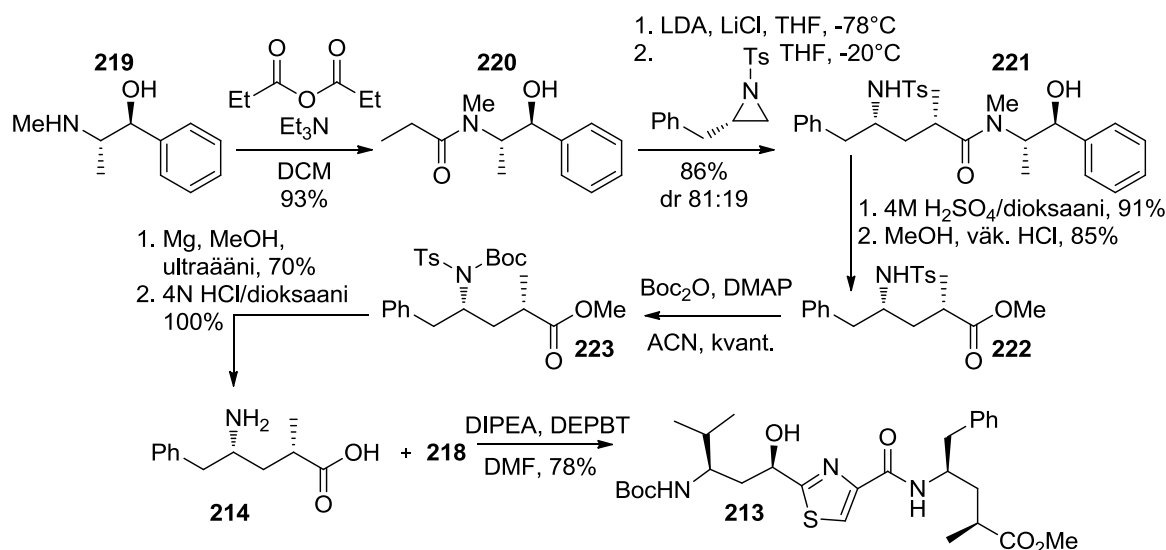
Kaavio 55: Tubulyysiinien U ja V retrosynteesi.¹²

Retrosynteettisen analyysin perusteella Passerini-reaktio on synteessin ensimmäinen vaihe. Reaktiolla saatiin tuotettua 2-asyloksitiatsolia **215** 40% saannolla ja 3:1 diastereomeerien suhteella (kaavio 56).^{63,69} Kuten jo aikaisemmin on todettu, tässä reaktiossa oli välttämätöntä käyttää Lewis-happoaktivaattorina booritrifluoridia aldehydin **216** aktivaatioon. Poiketen klassisesta Passerini-reaktiosta, tässä reaktio suoritettiin alhaisessa lämpötilassa 2-hydroksitiatsolituotteen **205** välttämiseksi (kaavio 53). Vaikka reaktion diastereoselektiivisyyttä ei voi varsinaisesti kehua, saavutetussa 3:1 selektiivisyydestä on silti merkittävää hyötyä tässä synteessissä. Tässä tapauksessa selektiivisyyden aiheutti todennäköisesti kiraalinen aldehydi **216**. Muodostuneesta kahdesta diastereomeeristä päätuote **215a** (*R,R*) erotettiin ja synteesiä jatkettiin puhtaalla diastereomeerillä, jonka asyyliryhmä ja metyyliesteri hydrolysoitiin seuraavassa vaiheessa natriumhydroksidilla 2-hydroksitiatsoliksi **218**.

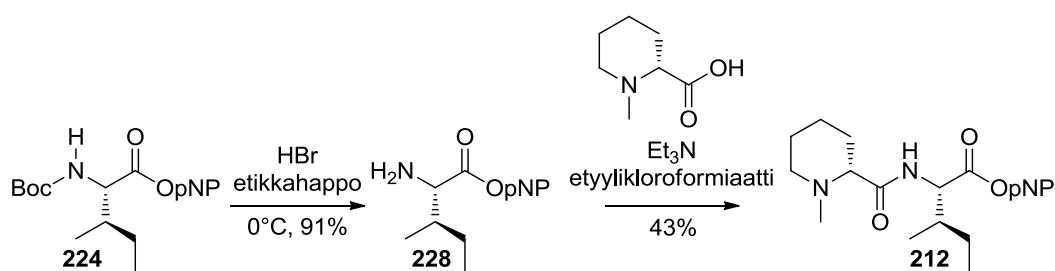


Kaavio 56: Tuv-fragmentin synteesi Tubulyysiinien U ja V synteesissä¹²

Synteesissä käytetty Tuv-Tup-fragmentti **213** valmistettiin kahdeksassa vaiheessa lähtien aromaattisesta amiinista **219** (kaavio 57), jota tässä käytetään kiraalisena apuaineena molekyylin varsinaisten stereokeskuksen muodostamiseksi.¹² Ensimmäisessä vaiheessa lähtöaineen **219** sekundaariseen amiiniin liitettiin propionihappo, jolloin saatiin tertiäärinen amidi **220**. Seuraavassa vaiheessa muodostettiin tubulyysiinien ensimmäiset stereokeskukset liittämällä amidiin **220** Tup-yksikön hiilirunko tuotteeksi **221** 86% saannolla ja 81:19 diastereomeerien suhteella. Tätä seurasi kiraalisen apuaineen hydrolyysi ja muodostuneen karboksyylihapon esteröinti metyyliesteriksi **214**, jonka amiiniin liitettiin seuraavassa vaiheessa Boc-ryhmä yhdisteeksi **215**. Viimeisenä vaiheena ennen Tuv-fragmentin kytkentää yhdisteen **215** amiiniin ryhmät poistettiin, jolloin tuotteena saatiin Tup-fragmentti **214**. Tätä seurasi Tup- ja Tuv-fragmenttien (**214** ja **218**) kytkentä diisopropylietyyliamiinilla (DIPEA) ja 3-(dietoksisfosforyloksi)-1,2,3-bentsotriatsiini-4-(3*H*)-onilla (DEPBT) Tuv-Tup-fragmentiksi **213** 78% saannolla.

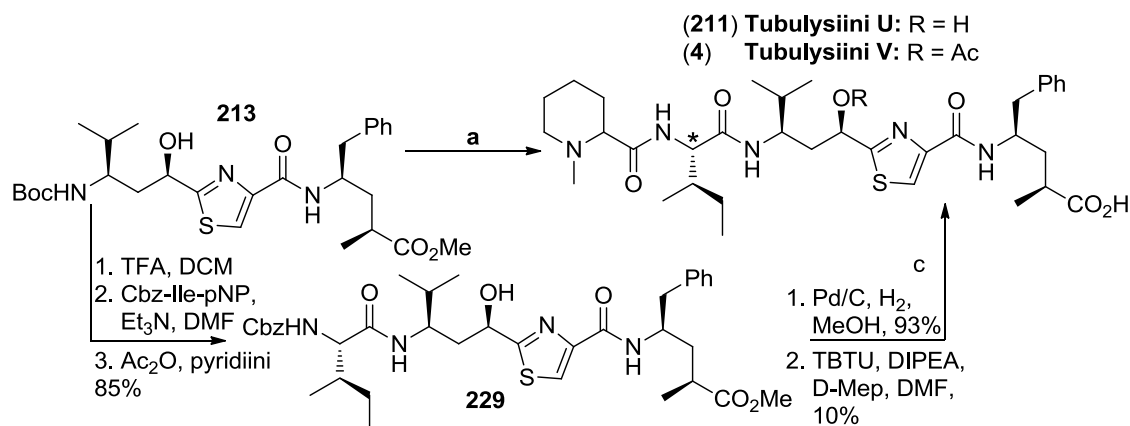
Kaavio 57: Tuv-Tup-fragmentin synteesi.¹²

Mep-Ile-yksikön valmistus tapahtui kahdessa vaiheessa suojatusta isoleusiinista **224**. Ensimmäisessä vaiheessa lähtöaineen amiinin Boc-suojaus poistettiin (**228**).¹² Tätä seurasi D-pipekolihapon liittäminen isoleusiiniin seka-anhydridimenetelmällä josta saatiin tuotteena 4-nitrofenyyლისuojattu (pNP) Mep-Ile-yksikkö **212** kahden vaiheen jälkeen 39%:n saannolla.

Kaavio 58: Mep-Ile-fragmentin synteesi.¹²

Tubulysiini U:ta ja V:tä yritettiin tämän synteessin yhteydessä valmistaa myös reitillä jossa Mep-yksikkö olisi liitetty molekyyliin viimeisenä (reitti bc, kaavio 59).¹² Useista yrityksistä huolimatta parhaimmillaankin viimeisen Mep-palan kytkentäreaktion saanto jäi 10%:in. Tästä johtuen synteesi päätettiin toteuttaa Mep-Ile-fragmentilla **212**, vaikka kytkentäreaktiossa isoleusiinin α -hiili epimerisoitui kvantitatiivisesti (tähdellä

merkitty, kaavio 59). Diastereomeerien erotuksen ja selektiivisen entsyymihydrolyysin tuotteena saatiin tubulyysiinejä U (**211**) ja V(**4**).



- a. 1. TFA, DCM 2. **212**, Et₃N, DMF 3. Ac₂O, pyridiini, 83%, *dr* 1:1(*)
 4. sianmaksaesteraasi, fosfaattipuskuri pH 7,2, 61%

Kaavio 59: Tubulyysiinien synteesin viimeiset vaiheet

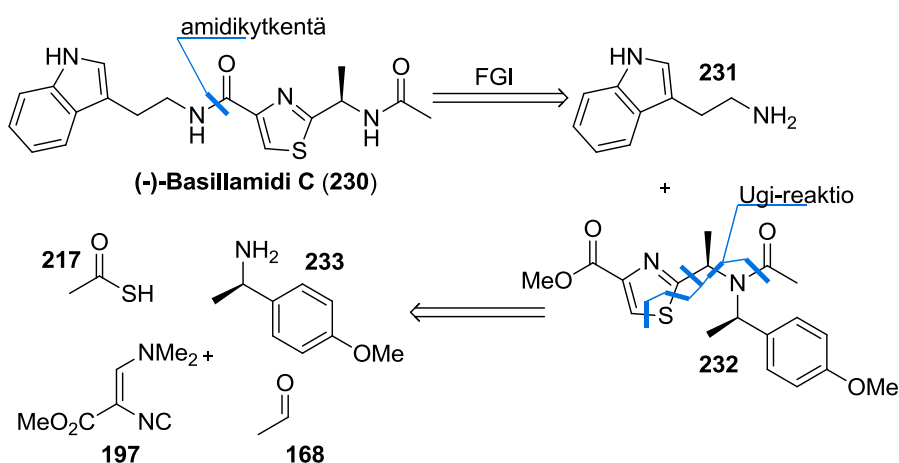
Tubulyysiinien U ja V synteseissä onnistuttiin valmistamaan haastava tiatsolirengas yhdellä reaktiolla hyödyntämällä Passerini-reaktion tiatsolimuunnelmaa. Synteesissä onnistuttiin myös tuottamaan yksi tubulyysiinien stereokeskuksista hyvällä selektiivisyydellä kiraalisen apuaineen avulla. Muut stereokeskukset valmiissa luonnonaineissa saatiin aikaan käyttämällä lähtöaineina yleisten aminohappojen puhtaita enantiomeerejä. Synteesin loppuvaiheessa kuitenkin stereoinformaatiota menetettiin kun isoleusiinin stereokeskus rasemisoitui viimeisessä kytkentävaiheessa. Tämä ongelma ratkaistiin erottamalla nämä kaksi muodostunutta diastereomeeriä toisistaan, jolloin lopputuotteisiin päästiin erotuksen jälkeen kahdessa (V) tai yhdessä (U) vaiheessa. Koska kyseessä on ensimmäinen tubulyysiinien kokonaissynteesi, tämä voi toimia mallina tuleville tubulyysiinien synteseille.

7.2 (-)-Basillamidi C

(-)-Basillamidi C on tiatsoli-5-karboksi-2-etyyli-indoli jota on eristetty ensimmäisen kerran vuonna 2007 gram-positiivisesta *Bacillus endophyticus* bakteerista.^{64,70} Myöhemmin basillamidi C:tä on löydetty useiden muidenkin bakteerikantojen tuottamana

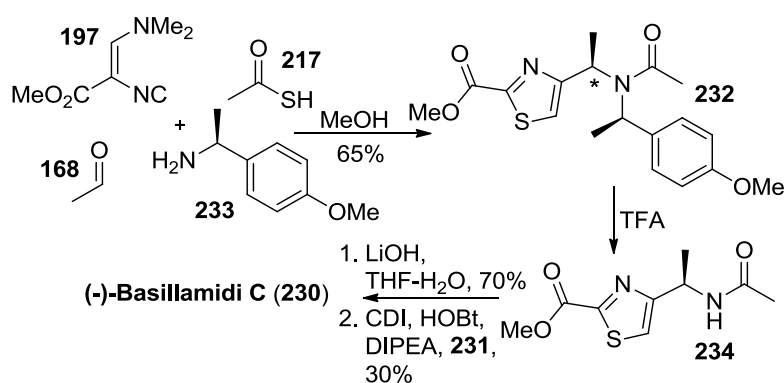
ympäri maailman. Koska basillamidi C:tä on eristetty vain hyvin pieniä määriä, sen biologista aktiivisuutta ei ole vielä tutkittu.

Basillamidi C:n (**230**) retrosynteettisessä analyysissä molekyylistä voidaan erottaa kaksi fragmenttia – tryptamiini **231** sekä tiatsoli **232** (kaavio 60).⁶⁴ Tiatsoli **232** on valmistettavissa Schöllkopfin isosyanidista **197**, eteenitiolihaposta **217**, asetaldehydistä **168** ja aromaattisesta amiinista **233** Ugi-reaktion tiatsolimuunnelmalla. Tässä Ugi-reaktiossa olisi perusteltua käyttää amiinina ammoniakkaa tai ammoniumasetaattia aromaattisen aldehydin sijaan. Etenkin ammoniakilla saatavien alhaisten saantojen johdosta tässä kuitenkin päädyttiin hyödyntämään kiraalista amiinia **233**.



Kaavio 60: Basillamidi C:n retrosynteesi

Ensimmäinen vaihe tässä basillamidi C:n synteesissä oli Schöllkopfin isosyanidin **197**, eteenitiolihapon **217**, asetaldehydin **168** ja amiinin **233** välinen Ugi-reaktio, josta saatiin tuotteena tiatsolia **232** 65% saannolla (kaavio 61).⁶⁴ Kiraalisen amiinin **233** toivottiin ohjaavan reaktion selektiivisyyttä, mutta turhaan, reaktiossa saatiin kahden diastereomeerin 1:1 seosta (tähdellä merkitty, kaavio 61), jotka kuitenkin pystyttiin erottamaan toisistaan kromatografisesti. Ugi-reaktiota seurasi tertiäärisen amidin hydrolyysi TFA:lla sekundaariseksi amidiksi **234**. Tämän jälkeen amidin **234** metyyliesteri hydrolysoitiin vastaavaksi karboksyylihapoksi 70% saannolla. Viimeisessä vaiheessa molekyyliin liitettiin tryptamiini **231** ja reaktiosta saatiin puhdasta (-)-basillamidi C:tä (**230**) 30% saannolla.



Kaavio 61: Basillamidi C:n synteesi.⁶⁴

Tässä synteesissä kaupallisista lähtöaineista tuotteeseen päästään neljässä vaiheessa.⁶⁴ Tuotteena saadaan joko luonnonaineen ja sen enantiomeerin raseeminen seos tai puhdasta luonnonainetta jos välituotteen diastereomeerit erotellaan toisistaan. Tämän synteesin kehitysvaiheessa Ugi-reaktioon pyrittiin saamaan stereoselektiivisyyttä erilaisten kiraalisten amiinien ja Lewis-happokatalyyysin avulla, mutta kokeet eivät tuottaneet haluttua tulosta. Tämä kertoo omalta osaltaan asymmetristen Ugi-reaktioiden kehityksen tarpeesta ja toisaalta myös haasteista. Koska kyseessä oli kuitenkin basillamidi C:n ensimmäinen kokonaissynteesi, tässä tapauksessa luonnonaineen kummankin enantiomeerin valmistaminen oli perusteltua sen rakenteen varmistamiseksi. Synteesireitin lyhyden ja Ugi-reaktion ansiosta tällä menetelmällä pystyttiin valmistamaan myös erilaisia basillamidi C:n analogeja.

8 Yhteenveto

Sekä Passerini- että Ugi-reaktio ovat lääkeainesynteesin puolella laajalti hyödynnettyjä reaktioita. Niiden käyttö on kuitenkin sekundaarimetaboliittien puolella ollut vähäisempää. Joissain tapauksissa näiden reaktioiden käytön tekee ongelmalliseksi niiden alhainen tai olematon selektiivisyys. Kummastakin reaktiosta on kehitetty myös selektiivisiä versioita, mutta ne eivät ole sovellettavissa sellaisenaan kuin hyvin spesifisissä tapauksissa. Diastereoselektiivisinä näitä reaktioita voidaan ideaalitapauksessa toteuttaa retrosynteesin analyysin mukaisilla lähtöaineilla – kuten nähtiin muun muassa omuralidin ja 5-*N*-asetyyliardeeminin tapauksissa. Mutta diastereoselektiivisyydellekään ei varsinaisesti ole olemassa yhtään laajemmin sovellettavaa metodologiaa jota voitaisiin hyödyntää

luonnonainesynteesissä luotettavasti. Oletettavaa kuitenkin on että selektiivisten Passerini- ja Ugi-reaktioiden kehitys jatkuu tulevaisuudessakin.

Puutteistaan huolimatta näiden reaktioiden käyttö on ollut suurimmassa osassa tässä tutkielmassa läpi käydyissä synteesissä perusteltua. Eurystatiini A:n ja Syklotheonamidi C:n kohdalla Passerini-reaktiossa muodostunut stereokeskus poistettiin synteesin viimeisessä vaiheessa, jolloin reaktion epäselektiivisyys oli näissä synteesissä merkityksetöntä. Toisaalta niissä tapauksissa joissa Passerini- tai Ugi-reaktioissa muodostunut stereokeskus on jäänyt paikalleen tuotteeseen, on muodostuneiden diastereomeerien tai enantiomeerien erottaminen kromatografisesti ollut mahdollista. Tässä mielessä ainoita epäonnisia synteesireittejä olivat vain viridihappo, hydrastiini sekä (\pm)-dysibetaiini.

Yhtenä yhdistävänä tekijänä Passerini- ja Ugi-reaktioita hyödyntäville synteesille voidaan pitää niiden multikomponenttireaktiota seuraavien vaiheiden pieni määrä. Ainoana poikkeuksena tästä on ekteinaskidiini 743, jonka synteesissä Ugi-reaktiota seurasi vielä 44 vaihetta. Mutta kuten jo synteesin kohdalla tuli todetuksi, Ugi-reaktio ei siinä yhteydessä välttämättä ollut kovin onnistunut strateginen valinta. Tyypillisesti näyttää kuitenkin olevan niin että Passerini- tai Ugi-reaktion tuotteesta päästään lopulliseen sekundärimetaboliittiin yleensä alle kymmenessä vaiheessa, parhaimmillaan 1–2 vaiheessa.

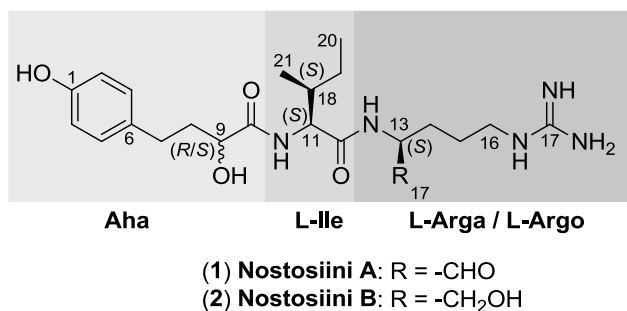
Toinen näille reaktioille tyypillinen ominaisuus tulee erityisen hyvin esiin muun muassa muraymysiini D2:n sekä syklotheonamidi C:n synteesissä. Näissä kummassakin synteesissä reaktioiden tuotteet ovat jopa hämmästyttävän kookkaita molekyyliä, joita kuitenkin pystyttiin tuottamaan yhdellä reaktiolla suhteellisen hyvillä saannoilla. Nämä reaktiot ovat todella toteutettavissa hyvinkin kookkailla lähtöaineilla ja ne eivät juuri erilaisista substituenteista häiriinny.

Seuraavaksi nähdään vielä yksi esimerkki isosyanidipohjaisen multikomponenttireaktion käytöstä luonnonainesynteesissä. Tämän tutkielman kokeellisessa osassa suunniteltiin ja toteutettiin kahden luonnonaineen osittainen synteesi, jossa hyödynnettiin Passerini-reaktiota.

KOKEELLINEN OSA

9 Työn tarkoitus

Nostosiinit ovat iranilaiselta riisipelloilta eristetyyn *Nostoc sp.* syanobakteerikannan tuottamia trypsiini-inhibiittoreita.⁷¹ Ensieristuksen yhteydessä nostosiineja pystyttiin tunnistamaan kuusi erilaista (A-F), jotka kaikki koostuvat kolmesta fragmentista. Näistä runsaimmat – nostosiinit A (**1**) ja B (**2**, kuva 9), koostuvat aromaattisesta α -hydroksihappotähteestä (Aha), L-isoleusiinitähteestä (L-Ile) sekä L-arginaalista (L-Arg, **1**) tai L-argininolista (**2**, kuva 9). Nostosiineissa D ja F L-isoleusiinin tilalla on L-valiinitähde ja nostosiineissa C ja E hiilessä 9 ei ole hydroksyyli ryhmää. Vaikka nostosiinit onnistuttiin niiden ensieristuksen yhteydessä karakterisoimaan suhteellisen hyvin, avoimeksi jäi C9-stereokeskuksen konfiguraatio (kuva 9), jota ei pystytty yksiselitteisesti selvittämään. Sivonen *et al.* pitivät kuitenkin tälle stereokeskukselle R-konfiguraatiota todennäköisempänä vaihtoehtona nostosiineille A ja B tehtyjen telakoitumistutkimusten perusteella. Konfiguraatiolla R,S,S,S nostosiini A:n trypsiini-inhibiitio telakoitumistutkimuksissa oli lähempänä sen mitattua inhibiitiovaikutusta kuin jos konfiguraatio olisi S,S,S,S.⁷¹ Telakointitutkimuksissa C9-stereokeskuksen ollessa R nostosiinit A ja B sitoutuivat huomattavasti paremmin trypsiiniin kuin konfiguraatiolla S.



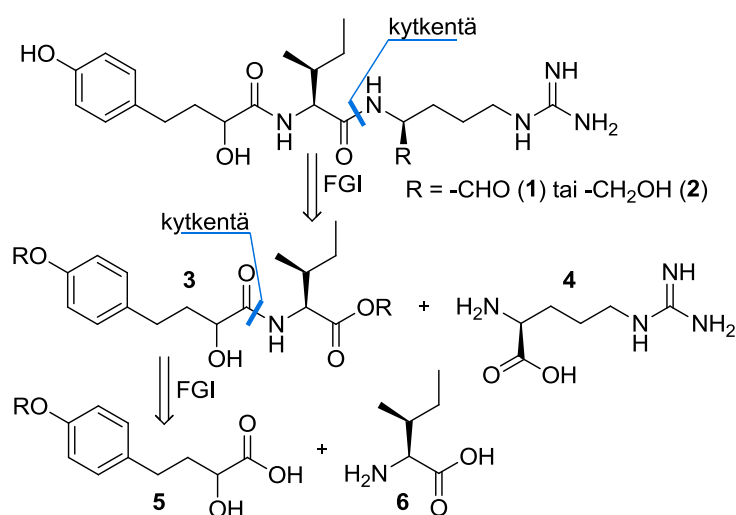
Kuva 9: Nostosiini A ja B.⁷¹

Tämän maisteritutkielman kokeellisessa osassa suunniteltiin kaksi kokonaissynteesiä nostosiineille A ja B. Näistä kahdesta toinen toteutettiin tämän tutkielman puitteissa viimeisiin vaiheita lukuun ottamatta. Toteutettu synteesisuunnitelma perustuu Passerini-reaktion käyttöön synteesin alkuvaiheessa, mistä johtuen tämä synteesireitti nimettiin

Passerini-reitiksi. Toinen synteesisuunnitelma nojasi kytkentäreaktioihin, joten Aha-fragmentin valmistaminen oli synteesin ensimmäinen vaihe ja reitti nimettiin tästä syystä Aha-reitiksi.

10 Ensimmäisen sukupolven synteesi: Aha-reitti

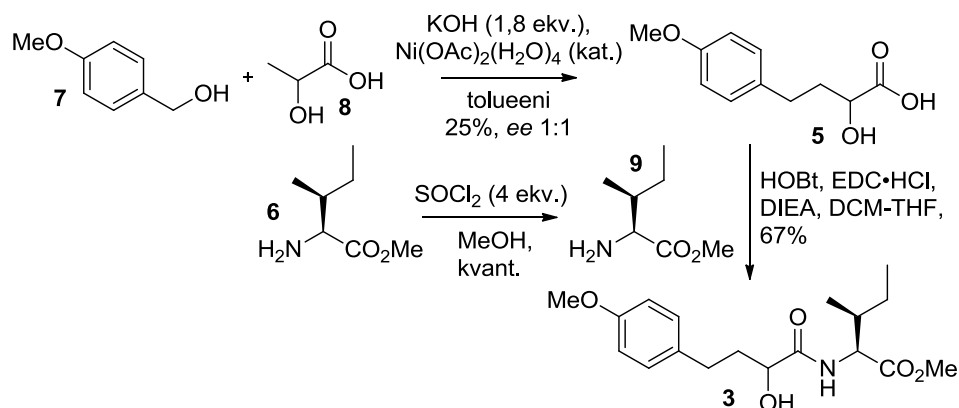
Nostosiinit A ja B koostuvat kolmesta fragmentista jotka yhdistyvät toisiinsa kahdella amidisidoksella. Tästä johtuen niiden ensimmäisen sukupolven retrosynteesi keskittyi näiden amidisidosten ympärille (kaavio 62). Ensimmäisen vaiheen amidikytkentä tehdään L-Ile- ja L-Arg-fragmenttien välille, mistä saadaan Aha-Ile-fragmentti **3** sekä L-arginiini **4**. Seuraavassa vaiheessa amidikytkentä osuu Aha:n ja L-Ile:n välille, jolloin jäljelle jäävät aromaattinen α -hydroksihappo **5** sekä L-isoleusiini **6**.



Kaavio 62: Ensimmäisen sukupolven retrosynteesi nostosiini A:lle ja B:lle.

Tämän synteesisuunnitelman perustella nostosiinien A ja B synteesissä tarvitaan kolmea lähtöainetta, α -hydroksihappoa **5**, L-isoleusiinia **6** sekä L-arginiinia **4**. Näistä α -hydroksihappo voidaan valmistaa maitohapon (**8**) ja 4-metoksibentsyylialkoholin (**7**) välisellä nikkelikatalysoidulla dehydraatioreaktiolla (kaavio 63).⁷² Parhaimmillaan tämän reaktion saanto oli 25%, eikä sitä saatu nostettua useista yrityksistä huolimatta. Kytkentää varten L-isoleusiinin (**6**) karboksyylihappo esteröitiin metyyliesterikseen **9** kvantitatiivisella saannolla.⁷³ Aminohappoesterin **9** ja α -hydroksihapon **5** välisestä kyt-

kentäreaktiosta saatiin dipeptidiä **3** hyvällä saannolla (67%).⁷⁴ Tämä reaktio pystyttiin kuitenkin toteuttamaan vain kerran, koska edeltävän reaktion saannot jäivät alhaisiksi.

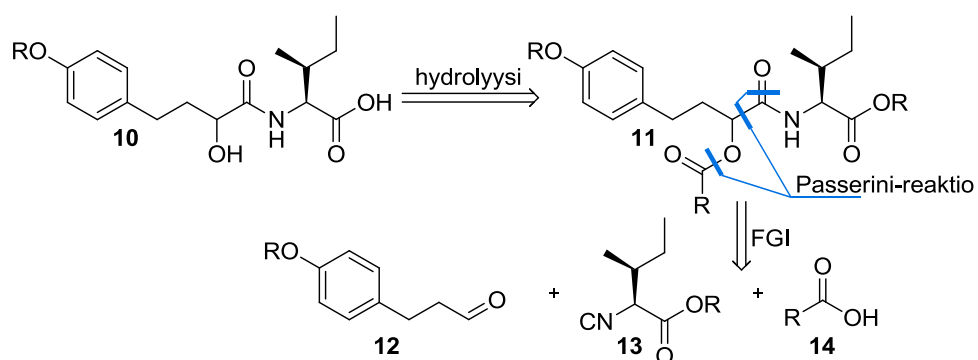


Kaavio 63: α -hydroksihapporeitin ensimmäiset vaiheet.

Tämä ensimmäisen sukupolven synteesi jouduttiin hylkäämään jo tutkielman alkuvaiheissa, johtuen ensimmäisen reaktion alhaisista saannoista. Tästä johtuen nostosiineille A ja B suunniteltiin uusi synteesireitti, jota käydään läpi seuraavassa kappaleessa.

11 Toisen sukupolven synteesi: Passerini-reitti

Edellisen Aha-reitin ongelmista heränneet ajatukset johtivat seuraavan sukupolven synteesisuunnitelmaan, jossa haluttiin välttää erillisen α -hydroksihapon valmistaminen kokonaan. Tähän tarkoitukseen soveltuvaksi reaktioksi Passerini-reaktio oli omiaan α -asyloksiamidi-tuotteensa ansiosta (ks. kappale 2.2). Tässä työssä nostosiini A:n ja B:n toisen sukupolven synteesi eroaakin edeltäjästään vain Aha-Ile-fragmentin rakentamisen osalta (kaavio 64). Uusittu synteesisuunnitelma lähteekin liikkeelle suoraan Aha-Ile-fragmentista **10** josta päästään α -asyloksiamidiin **11** hydrolyysin tuloksena (kaavio 64). Tästä edelleen saadaan Passerini-reaktion katkaisujen mukaisesti lähtöaineiksi aromaattinen aldehydi **12**, isosyanidi **13** sekä jokin karboksyylihappo **14** (kaavio 64). Koska karboksyylihapposta muodostuva asyloksiryhmä hydrolysoidaan jo synteesin seuraavassa vaiheessa, pystyttiin se valitsemaan siten että se mahdollistaisi Passerini-reaktion tuotteen diastereomeerien erotuksen puhdistusvaiheessa.

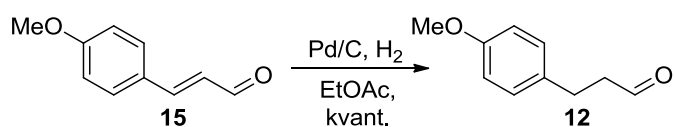


Kaavio 64: Nostosiini A:n ja B:n toisen sukupolven retrosynteesi

Synteesisuunnitelman kirkastuttua synteesissä päästiin seuraavaan vaiheeseen – lähtöaineiden valmistukseen. Passerini-reaktion lähtöaineista aldehydi **12** ja isosyanidi **13** ovat tunnettuja yhdisteitä ja ne voidaan valmistaa tunnetuin menetelmin. Samoin synteesissä myöhemmin käytettävä L-arginiinin metyyliesteri.

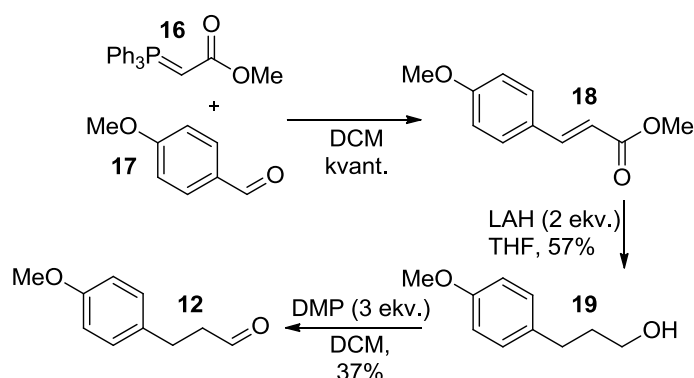
11.1 Lähtöaineiden valmistus

Passerini-reaktion lähtöaineiden valmistus aloitettiin aldehydistä **12**. Tässä päädyttiin käyttämään lähtöaineena trans-4-metoksikanelialdehydiä **15**, jonka kaksoissidos pelkistettiin Pd/C- vedytyksellä aldehydiksi **12** kvantitatiivisella saannolla (kaavio 65).



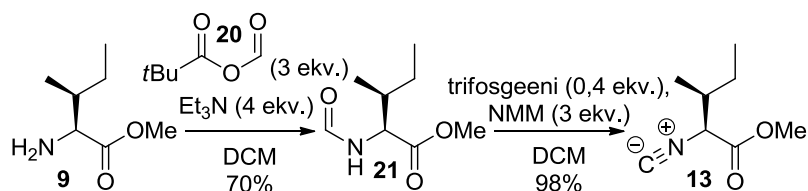
Kaavio 65: Trans-4-metoksikanelialdehydin kaksoissidoksen pelkistys aldehydiksi **12**.

Myös toista, hiukan pidempää menetelmää aldehydin **12** valmistuksessa kokeiltiin (kaavio 66). Tässä synteesissä lähdettiin liikkeelle Wittig-reaktiolla, josta saatiin tuotteena metyyli-3-(4-metoksifenyyli)akrylaattia **18** kvantitatiivisella saannolla. Tästä pelkistettiin sekä kaksoissidos että esteriryhmä alkoholiksi **19** LAH:llä (litiumalumiinihydridi). Tästä saatu tuote **18** hapetettiin edelleen aldehydiksi **12** Dess-Martin perjodaanilla. Tällä menetelmällä saatiin tuotettua aldehydiä **12** kolmen vaiheen jälkeen 21% saannolla, kun Pd/C-pelkistyksellä saman aldehydin saanto yhden vaiheen jälkeen oli kvantitatiivinen.



Kaavio 66: 3-(p-metoksifenyyl)propanaalin synteesi parametoksibentsaldehydistä.

Passerini-reaktion isosyanidin valmistaminen toteutettiin tässä synteessissä kolmivaiheisesti *N*-formyylireitin kautta, lähtien liikkeelle jo edellisen synteisireitin yhteydessä valmistetusta metyyliesteristä **9** (kaavio 67).^{23,75,76} Aminohappoesteri **9** *N*-formyloitiin seka-anhydridillä **20** *N*-formamidiksi **21**. Tämän reaktion saannot jäivät toivottua alhaisemmiksi (70%), johtuen esterin purkautumisesta reaktion aikana. Viimeisessä vaiheessa *N*-formamidi **21** isosyanoitiin trifosgeenilla ja NMM:lla 98% saannolla isosyanidiksi **13**.

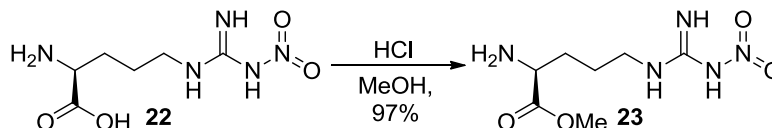


Kaavio 67: L-isoleusiinin isosyanointi

N-formamidin **20** isosyanointia yritettiin myös POCl₃:lla. Reaktio itsessään eteni hyvin, reaktioseoksen NMR-spektrissä ja TLC:lla nähtiin lähtöaineen täysi konversio. Tuotetta ei kuitenkaan pystytty eristämään reaktioseoksesta. Reaktiosta saatiin eristettyä ainoastaan lähtöainetta **20** sekä sitä vastaavaa amiinia **9**.

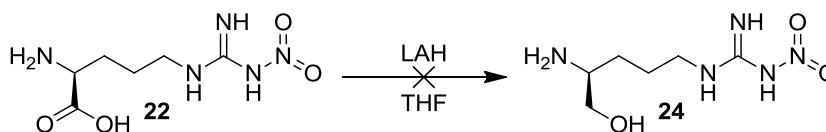
L-arginiinin guanidiiniryhmä on suhteellisen reaktiivinen suojaamattomana ja lisäksi sen emäksisyydestä johtuen suojaamattoman guanididiiniryhmän kanssa pylväskromatografia silikageelissä olisi ollut vaivalloista tai mahdotonta. Tästä johtuen tässä synteessissä päädyttiin käyttämään puhtaan L-arginiinin **4** sijaan lähtöaineena jo valmiiksi suojattua

*N*_ω-nitro-L-arginiinia **22**. Ennen varsinaista kytkentäreaktiota L-arginiinin karboksyyli-happo metyloitiin metyyliesteriksi **23** HCl:lla ja metanolilla (kaavio 68).



Kaavio 68: Nitro-L-arginiinin esteröinti.

Tässä yhteydessä kokeiltiin myös L-arginiinin pelkistystä vastaavaksi alkoholiksi (**24**, kaavio 69), mutta johtuen nitro-L-arginiinin **22** huonosta liukoisuudesta THF:in reaktio ei edennyt ja pelkistyksestä luovuttiin. Pelkistysmenetelmä olisi vähentänyt synteessin vaiheita sillä nostosiini B:n OH-ryhmä olisi näin saatu valmistettua jo ennen arginiinin liittämistä molekyyliin, jolloin nostosiini A:n aldehydi olisi voitu valmistaa hapettamalla nostosin B:n esiasteesta alkoholi aldehydiksi.



Kaavio 69: Nitro-L-arginiinin pelkistysyritys.

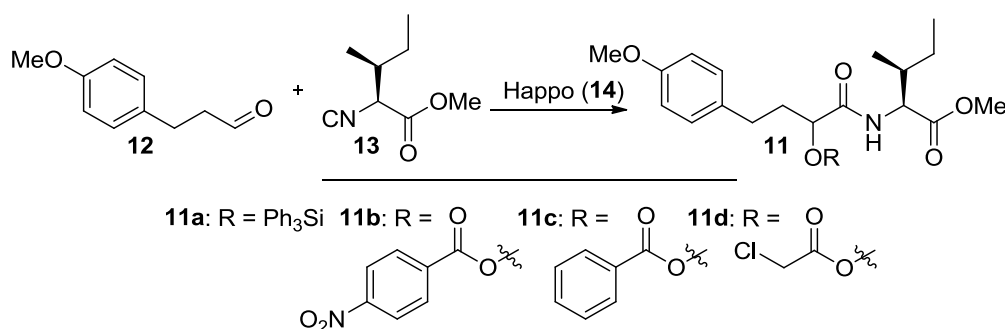
Kun synteessin kaikki tarvittavat lähtöaineet oli valmistettu, käännyttiin synteessin ensimmäisen varsinaisen vaiheen – Passerini-reaktion – pariin.

11.2 Passerini-reaktio ja tuotteen hydrolyysi

Kun kaksi Passerini-reaktion kolmesta lähtöaineesta oli valmistettu, edessä oli reaktion karboksyylihappokomponentin valinta. Koska Passerini-reaktiossa on mahdollista käyttää karboksyylihappojen lisäksi myös muita nukleofiilejä, yksi testireaktioista suoritettiin trifenyylisilanolilla (**14a**).⁷⁷ Muut seulonnassa mukana olleen yhdisteet olivat 4-nitrobentsoehappo (**14b**), bentsoehappo (**14c**) sekä monokloorietikkahappo (**14d**, taulukko 3). Kaikissa seulonnan reaktioissa reaktioaika oli 24 tuntia. Seulonnan tulosten perusteella Passerini-reaktion karboksyylihappoksi valittiin kloorietikkahappo (**14d**) sillä ainoastaan sillä saatiin aikaan tuote (**11c**, koe 4, taulukko 3) jonka kaksi diastereomeeriä

pystyttiin erottamaan toisistaan flash-pylväskromatografialla. Trifenyyლისilanolilla (**14a**, koe 1, taulukko 3) reaktio ei käynnistynyt lainkaan, johtuen todennäköisesti isosyanidin **13** esteriryhmästä joka hydroksyyliiryhmää voimakkaampana Lewis-emäksenä sitoutui silanoliin ja reaktio ei päässyt käynnistymään. Ongelma olisi ollut kierrettävissä pelkistämällä metyyliesteri alkoholiksi, mutta tämä olisi vain pidentänyt synteesiä ilman minäänlaista etua karboksyylihappoon verrattuna. Koska seulontareaktioiden saannot jäivät alle 40%:in, oli seuraavaksi edessä Passerini-reaktion optimointi saannon nostamiseksi.

Taulukko 3: Passerini-reaktion happoseulonta

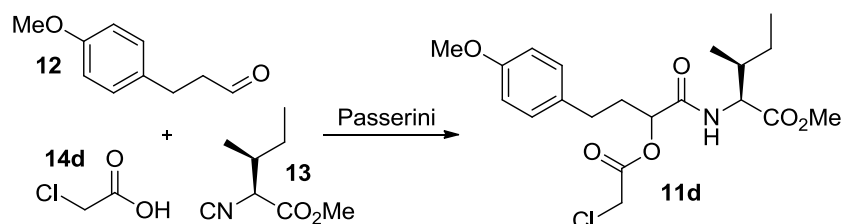


Koe	Happo	Liutin	Tuote	Saanto-%	Diastereomeerien erottuminen (TLC)
1	Ph ₃ SiOH (14a)	tolueeni	11a	0	-
2	4-NO ₂ -Ph-CO ₂ H (14b)	DCM	11b	35	Ei
3	Ph-CO ₂ H (14c)	DCM	11c	32	Ei
4	Cl-AcOH (14d)	DCM	11d	30	Kyllä

Passerini-reaktion optimoinnissa reaktio suoritettiin erilaisissa olosuhteissa parhaan mahdollisen saannon saavuttamiseksi. Kirjallisuuden mukaan tyypillisiä Passerini-reaktion liuottimia ovat DCM:n lisäksi tolueeni ja joissain tapauksissa myös metanoli.⁷⁸ Pelinski *et al.* ovat kehittäneet myös täysin liuottimettoman version reaktiosta.⁷⁹ Näiden edellä mainittujen lisäksi tässä optimoinnissa reaktiota testattiin myös asetonitrilissä (ACN). Seulonnan tuloksena reaktion saanto onnistuttiinkin nostamaan alkuperäisestä 30%:sta 80%:in (kokeet 1-2, taulukko 4) liuottimettomalla reaktiolla. Tämä havainto pitää yhtä sen tosiasian kanssa että Passerini-reaktio on tyypillisesti parhaimmillaan korkeissa konsentraatioissa, tässä tapauksessa äärettömällä konsentraatiolla. Liuottimista selkeästi parhaiten tähän reaktioon soveltui tolueeni (koe 4, taulukko 4) ja huonoim-

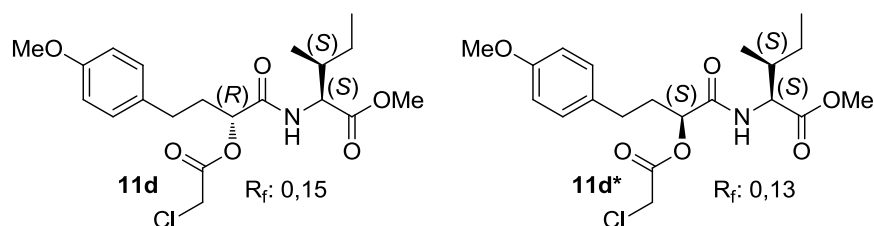
min asetonitriili (koe 6, taulukko 4). Ehkä jopa hiukan yllättäen seulonnan alhaisin saanto saatiin tolueenissa refluksointiolosuhteissa reaktiolla (koe 3, taulukko 4). Tärkeimpänä tuloksena tässä seulonnassa oli kuitenkin reaktion saannon nouseminen erinomaiselle tasolle.

Taulukko 4: Passerini-reaktion optimoinnin tulokset



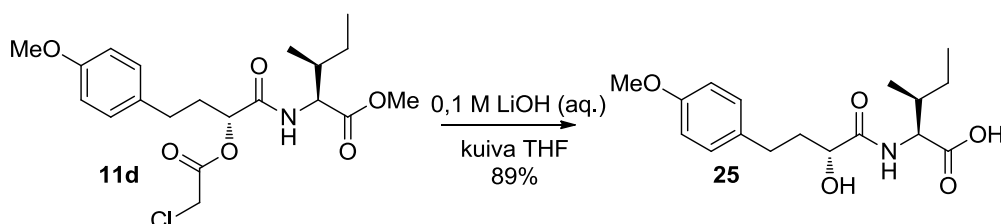
Koe	Liutotin	Lämpötila (C°)	Reaktioaika	Saanto-%
1	-	100	20 min	80
2	-	180	4 min	79
3	tolueeni	120	20 min	26
4	tolueeni	RT	24 h	60
5	MeOH	RT	24 h	51
6	ACN	RT	24 h	43

Kun Passerini-reaktio oli saatu optimoitua, päästiin käsiksi synteesin toiseen avainvaiheeseen – diastereomeerien erotukseen. Erotus toteutettiin automaattisella flash-kromatografiilla (CombiFlash R_f), jolla paras erotustulos saatiin käyttämällä eluenttina dietyylieetterin ja heksaanin 10–50% seosta flash-pylväskromatografiassa käytetyn 10–35% etyyliasetaatin ja heksaanin seoksen sijaan (ks. liitteet). Tästä eteenpäin synteesiä pystyttiin jatkamaan puhtailla diastereomeereillä (**11d**, **11d***, kuva 10), mikä helpotti NMR-spektrien tulkintaa huomattavasti. Seuraavat vaiheet toteutettiin TLC:lla ylempänä erottuvalla diastereomeerillä (**11d**, R_f: 0,15), mikä osoittautui myöhemmin onnistuneeksi valinnaksi, kun otetaan huomioon että tässä vaiheessa synteesiä ei vielä ollut tietoa ylemmän ja alemman diastereomeerin C9-konfiguraatioista.



Kuva 10: α -Asyloksiamidin **11d** kaksi diastereomeeriä.

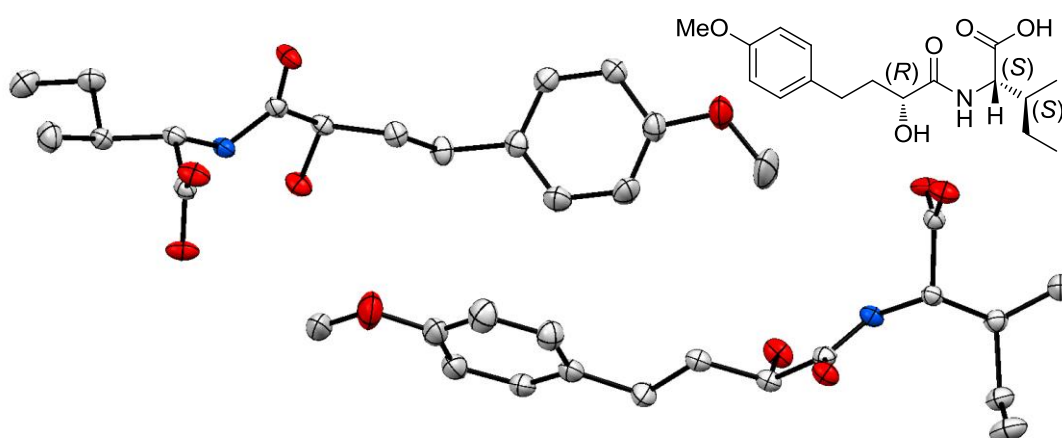
Seuraavassa vaiheessa α -asyloksiamidin **11d** ylemmän diastereomeerin asyloksi- ja esteriryhmät hydrolysoitiin 0,1 M LiOH:lla (kaavio 70). Tästä tuotteena saatiin karboksyylihappo **25**. Reaktiosta havaittiin että nestekromatografiatason THF:n sisältämät säilöntäaineet estivät metyyliesterin hydrolyysin ja tuottivat tunnistamattomia sivutuotteita reagoidessaan litiumhydroksidin kanssa. Ongelma ratkaistiin käyttämällä reaktiossa kuivattua tai säilöntäaineetonta THF:a vaikka reaktioseokseen lisättiin myös vettä. Kuivalla THF:lla reaktio eteni loppuun asti ja tuotti karboksyylihappoa **25** erinomaisella saannolla (89%).



Kaavio 70: Passerinituotteen **11d** hydrolyysi

Tässä reaktiossa sekä asyloksi- että esteriryhmät hydrolysoituivat, jolloin muodostui karboksyylihapon **25** lisäksi metanolia sekä kloorietikkahappoa (**14d**). Tuotteen **25** erottamiseksi kloorietikkahaposta (**14d**) ainoaksi toimivaksi metodiksi osoittautui sen kiehtaminen ulos seoksesta vakuumilinjassa 100°C:ssa, jolloin kloorietikkahappo kiteytyi kolvin yläosaan. Tämän lisäksi erotusmenetelminä kokeiltiin pylväskromatografiaa sekä atseotrooppista haihdutusta tolueenista, joista kumpikaan ei tuottanut toivottua tulosta. Puhdistuksen jälkeen tuote kiteytyi ohuiksi neulakiteiksi, mistä FT Kaisa Heltunen määrittä yhdisteen kiderakenteen röntgenkristallografisesti (kuva 11). Tarkemmat tulokset mittauksesta tullaan julkaisemaan synteesin valmistuttua vertaisarvioidussa tieteellisessä julkaisussa. Kuten aikaisemmin todettiin, tässä vaiheessa synteesissä käy-

tettiin α -asyloksiamidin **11d** ylempää diastereomeeriä, jonka konfiguraatioksi kiderakenteen määrittämisen myötä osoittautui *R,S,S* (kuva 10 ja kuva 11). Näin ollen kiderakenne määritettiin sattumalta juuri siitä diastereomeeristä jonka konfiguraatio on se jota nostosiineja eristänyt tutkimusryhmä piti todennäköisempänä vaihtoehtona niiden rakenteelle (kuva 11).⁷¹ Mittauksessa tuntematonta stereokeskusta verrattiin jo tunnettuihin L-isolesiiniin stereokeskuksiin. Kuvasta 11 nähdään C9:n OH-ryhmän asema ja suunta verrattuna L-isolesiinin alkyyliketjuun, joka osoittaa aina eri suuntaan kuin isolesiinin stereokeskukset.



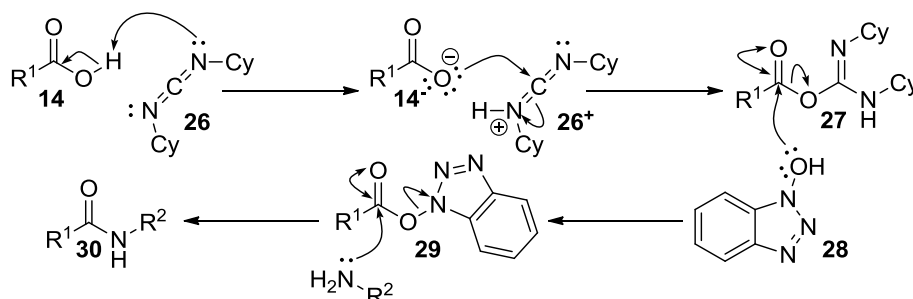
Kuva 11: Karboksyylihapon **24** kiderakenne.

Näiden vaiheiden jälkeen synteesissä oli edessä viimeinen osa, metyyliesterin **23** kytkentä karboksyylihappon **25** ja sitä seuraava pelkistys ja suojiin poisto sekä nostosiini A:lle vielä viimeinen hapetus aldehydiksi.

11.3 Arginiinin kytkentä

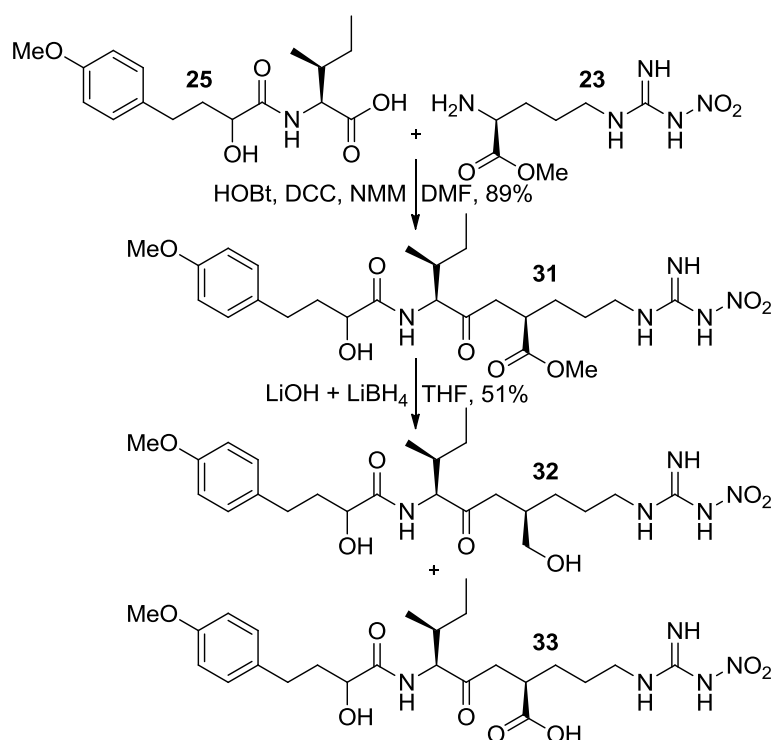
Amidisidosten muodostukseen on olemassa useampi vaihtoehtoinen menetelmä, jotka usein perustuvat seka-anhydridin muodostukseen reaktion aikana.⁴³ Yksi yleisimmistä menetelmistä hyödyntää ensin disykloheksyylikarbodi-imidiä (**26**, DCC, kaavio 71) seka-anhydridin **27** muodostukseen karboksyylihapon kanssa, minkä jälkeen 1-hydroksibentsotriatsolilla (**28**, HOBT, kaavio 71) muodostetaan vielä välituote **29** ennen varsi-naista amidin muodostusta mekanismin viimeisessä vaiheessa, josta tuotteena saadaan peptidi **30**. Amidin muodostus olisi mahdollista myös suoraan seka-anhydridistä **27**,

mutta tämä usein johtaa amiinin rasemisaatioon, mistä johtuen HOBt:a käytetään väli-
tuotteen **29** muodostukseen etenkin peptidisynteesissä.



Kaavio 71: KytKentäreaktio DCC:lla ja HOBt:lla.⁴³

Tässäkin synteesissä DCC-HOBt-yhdistelmä tuotti toivottuja tuloksia, karboksyyliha-
pon **25** ja nitro-L-arginiinin metyyliesterin (**23**) välisestä kytKentäreaktiosta saatiin tuot-
teena kiteistä peptidiä **31** 89% saannolla (kaavio 72).⁸⁰ Tässä yhteydessä kytKentäreak-
tiota kokeiltiin myös PyBOP:lla (bentsotriatsol-1-yl-oksitripyrrolidinofosfoniumhek-
safluorofosfaatti), mutta reaktion saannot jäivät huomattavasti DCC-HOBt-menetelmää
alhaisemmiksi. KytKentäreaktiota seurasi arginiinin esterin pelkistys alkoholiksi **32**,
mikä yritettiin toteuttaa 0,2M litiumbooritetrahydridillä (LiBH_4). Tähän päädyttiin
 LiBH_4 :n kemoselektiivisyyden vuoksi, sillä sen tiedetään pelkistävän estereitä alkoho-
leiksi mutta ei sekundaarisia amideja, toisin kuin lähisukulaisensa natriumboori-
hydridi.⁸¹ Johtuen kiinteän litiumboorihydridin hajoamisesta osittain litiumhydroksidik-
si säilytyksen aikana, tuotteena reaktiosta saatiin karboksyylihapon **33** ja alkoholin **32**
seos. Tästä johtuen alkoholia **32** ei pystytty karakterisoimaan lainkaan. Raakatuotteen
positiivisen polarisaation ESI-profiilimassaspektrissä havaittiin kuitenkin piikki m/z -
arvolla 533,83, mikä viittaa vahvasti alkoholin **32** natriumadduktiin $[\text{M}+\text{Na}^+]$, vaikka
tulos ei tarkkaan massa-olekaan soveltuva.



Kaavio 72: Karboksyylihapon **25** ja nitro-L-arginiinin metyyliesterin (**23**) kytkentäreaktio sekä sitä seuraava metyyliesterin pelkistys litiumboorihydridillä.

Osittain onnistuneen pelkistuksen jälkeen huomio siirrettiin metoksisuojaryhmän poistoon. Sen irrotukseen kokeiltiin alumiinikloridia ja 1-dekaanitiolia, joka on hyväksi todettu menetelmä fenyylisten metoksiryhmien poistoon.^{82,83} Tässä tapauksessa menetelmä ei kuitenkaan tuottanut toivottua tulosta. Ryhmän poisto onnistui vain yksinkertaisimmalla käytetyllä malliaineella – *p*-metoksibentsyylialkoholilla (kokeet 1–2, taulukko 5). Kokeissa 2 ja 4 reaktioseoksessa oli mukana fenyylialaniini-glysiinidi-peptidiä todentamassa amidisidosten säilyvyyden reaktion aikana. Kokeiden 3 ja 4 osalta on todettava että on todennäköistä että *trans-p*-metoksikanelialdehydin kaksoissidos esti reaktion etenemisen (taulukko 5). Tämä oli kuitenkin varsinaisen reaktion kannalta merkityksen tosiseikka, sillä tästä huolimatta peptidin **31** metoksiryhmä pysyi tiukasti paikallaan jopa 24 tunnin reaktioajan kuluttua. Vertailuna todettakoon että 4-metoksibentsyylialkoholilla reaktio eteni loppuun asti alle tunnissa. Positiivisena sivuhuomiona näistä testeistä voidaan todeta että peptidi **31** oli eristettävissä vahingoittumattomana reaktioseoksesta.

Taulukko 5: Metoksiyhmän poistotestit

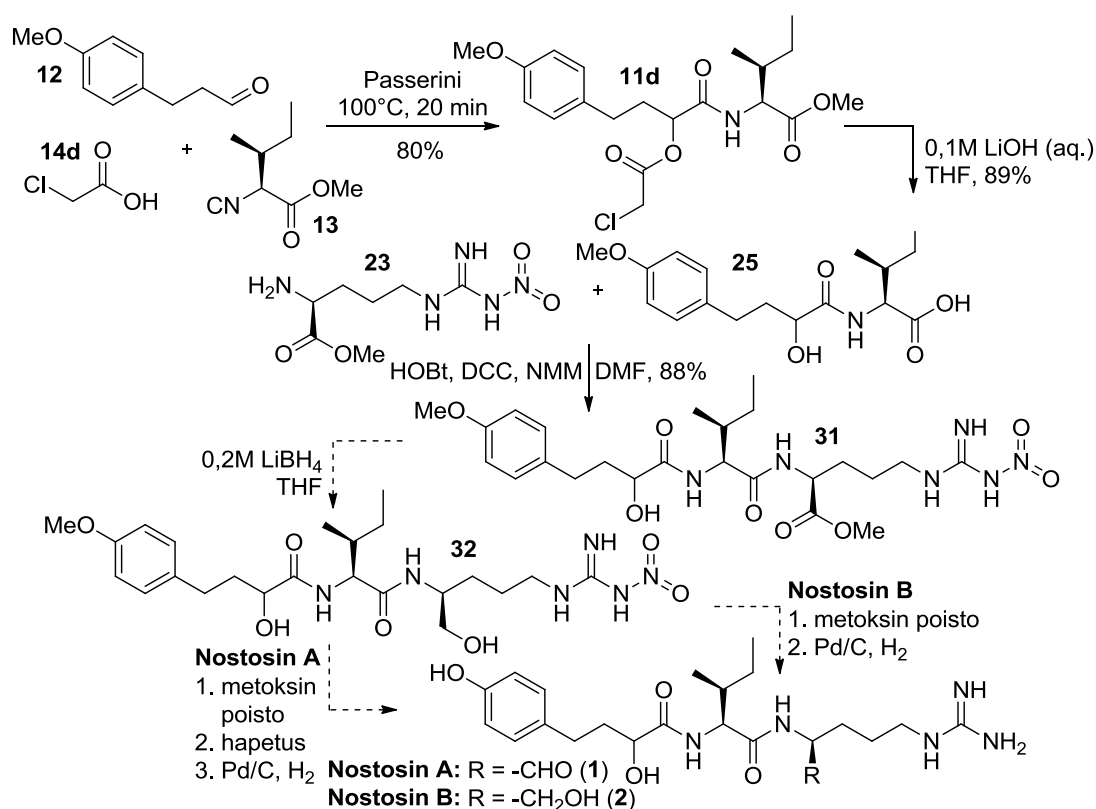
Koe	Lähtöaine	peptidi	AlCl ₃ ekv.	tioli ekv.	metoksi irti
1	p-MeO-BnOH	Ei	5	3	Kyllä
2	p-MeO-BnOH	Kyllä	10	3	Kyllä
3	trans-p-MeO-kanelialdehydi	Ei	5	3	Ei
4	trans-p-MeO-kanelialdehydi	Kyllä	10	3	Ei
5	30	Ei	15	3	Ei

Demetylointiin liittyvien ongelmien vuoksi, tätä synteesiä ei tämän tutkielman puitteissa ehditty saattamaan loppuun. Nostosiini B:stä jäätettiin tässä kolmen vaiheen päähän ja nostosiini A olisi vaatinut vielä neljä reaktiota.

11.4 Tulokset

Tämän maisteritutkielman kokeellisen osan tavoitteena oli suunnitella ja toteuttaa kokonaissynteetit nostosiini A:lle ja B:lle ja täten onnistua määrittämään näiden luonnonainesten yhden tuntemattoman stereokeskuksen konfiguraatio. Koska näitä synteesejä ei ehditty tutkielman rajoissa toteuttamaan loppuun asti, jäi osa näistä tavoitteista toteutumatta. Synteesi on kuitenkin tässä vaiheessa jo niin pitkällä, että se on suhteellisen lyhyessä ajassa vietävissä loppuun asti, jäljellä on kuitenkin enää vain kolme tai neljä vaihetta (kaavio 73). Lisäksi synteesin lopullisista tuotteista – nostosiini A:sta ja B:stä – pystytään todentamaan varsinaisen luonnonaineen C₉-stereokeskuksen konfiguraatio, johtuen karboksyylihapon **25** kiderakenteen määrittämisestä. Lisäksi kiderakenne määritetään myös peptidistä **31**, mikä tarjoonnee lisäinformaatiota nostosiinien rakenteesta synteesien valmistuttua. Tämä toisen sukupolven synteesireitti tarjosi sattuman kautta useita positiivisia yllätyksiä. Ensimmäkin Passerini-reaktion tuotteen (**11d**) diastereomeerien erottaminen oli tällainen yllätys. Tämä taas mahdollisti kiderakenteen määrittämisen karboksyylihapon **25**, kun synteesiä pystyttiin Passerini-reaktion jälkeen jatkamaan puhtailla diastereomeereillä. Kolmas positiivinen yhteensattuma oli karboksyylihapon **25** kiderakenne, joka osoitti käytetyn diastereomeerin olevan C₉-konfiguraatioltaan sama kuin nostosiinien A ja B oletetaan olevan. Tämä ei olisi välttämättä ollut mahdollista jos synteesiä olisi jatkettu Passerini-reaktion jälkeen niin sanotulla alemmalla diastereomeerillä (*S,S,S*).

Yhteenvedona tämän tutkielman puitteissa toteutuneet synteisin reaktiot sekä synteisin viimeiset toteutumattomat vaiheet nähdään kaaviossa 72. Synteisin ensimmäisessä vaiheessa aldehydi **12**, isosyanidi **13** ja kloorietikkahappo (**14d**) muodostivat α -asyloksiamidin **11d** Passerini-reaktiossa. Tämän tuotteen diastereomeerit eroteltiin ja näin synteisiä jatkettiin puhtaalla *R,S,S*-diastereomeerillä. Passerini-reaktion tuote **14d** hydrolysoitiin 0,1M litiumhydroksidilla karboksyylihapoksi **25**, joka synteisin seuraavassa vaiheessa kytkettiin metyyliesteriin **23** peptidiksi **31**. Tätä seuraavaa pelkistysvaihetta yritettiin suorittaa, mutta johtuen LiBH_4 :n pilaantumisesta säilytyksessä, tuotteena saatiin alkoholin **32** ja sitä vastaavan karboksyylihapon **33** seos. Vaikka kyseinen testi-reaktio ei tuottanutkaan haluttua alkoholia **32** puhtaana tuotteena, voidaan reaktiosta kuitenkin todeta, että puhtaalla litiumboorihydridillä pelkistys onnistuisi varmasti. Peptidistä **31** yritettiin myös poistaa sen metoksiyhmää alumiinikloridilla ja 1-dekaanitiolilla siinä kuitenkin onnistumatta.

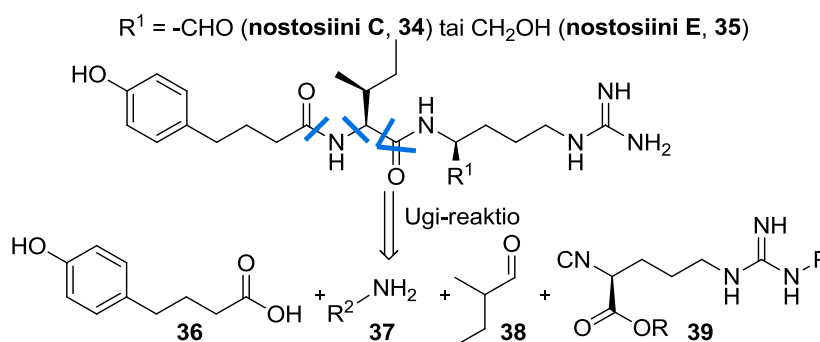


Kaavio 73: Nostosiini A:n ja B:n kokonaissynteesi

12 Yhteenveto

Tässä maisteritutkielmassa suunniteltiin synteesisreitti nostosiini A:lle ja B:lle, joka toteutettiin viimeisiä vaiheita lukuun ottamatta. Synteessissä hyödynnettiin Passerini-reaktiota, joka mahdollisti synteessin välituotteen **25** kiderakenteen määrittämisen ja sitä kautta varmistaa nostosiinien A ja B tuntemattoman stereokeskuksen konfiguraation kun synteesi saatetaan loppuun. Lisäksi Passerini-reaktio mahdollistaa tämän saman synteesisreitin hyödyntämisen myös nostosiinien D ja F synteeseissä, jotka eroavat nostosiineista A ja B vain keksimmäisen fragmentin suhteen (ks. luku 9). Tosin jatkossa metoksyryhmän korvaaminen jollakin muulla soveltuvalla ja helpommin poistettavalla suojarahmällä – esimerkiksi bentsyloksi – on suositeltavaa. Toisaalta on myös mahdollista että fenolinen hydroksyyli ryhmä ei edes vaadi suojausta tässä synteessissä.

Kuten luvussa 9 todettiin, nostosiineissa C (**34**) ja F (**35**) ei ole muille nostosiineille tyypillistä α -hydroksiryhmää (kaavio 74). Tämä pieni rakenne-ero mahdollistaa näiden kahden luonnonaineen valmistamisen Ugi-reaktiolla (kaavio 74) karboksyylihaposta **36**, amiinista **37**, aldehydistä **38** sekä isosyanidista **39**. Todennäköisesti tuotetta saadaan reaktiosta kahden diastereomeerin 1:1 seoksena, mutta jos näiden erottaminen mahdollista, saadaan näitä kahta luonnonainetta valmistettua suhteellisen lyhyellä synteesisreitillä. Periaatteessa reaktiossa voisi käyttää amiinina ammoniakkaa, mutta todellisuudessa järkevämpi vaihtoehto olisi vähintäänkin ammoniumasetaatti, PMP-NH₂ tai jokin kiraalinen amiini joka ohjaisi reaktion diastereoselektiivisyyttä.



Kaavio 74: Ugi-reaktio nostosiineille C ja E

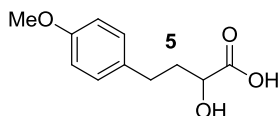
Toinen mahdollinen jatkotutkimuksen kohde tämän synteesireitin osalta on sen muuntaminen stereoselektiiviseksi. Kuten luvussa 2.4 todettiin, hyviä enantioselektiivisiä Passerini-reaktioita on vähän, mutta ei ole kuitenkaan täysin mahdotonta että jokin näistä nykyään tunnetuista menetelmistä olisi sovellettavissa tähän synteesireittiin, esimerkiksi jompikumpi luvun 2.4 enantioselektiivisistä Passerini-reaktioista. Enantioselektiivisissä Passerini-reaktioissa karboksyylihappokomponentti on korvattu usein soveltuvalla Lewis-hapolla, jolloin tuotteena reaktiosta saadaan suoraan α -hydroksiamideja, jolloin asyloksiryhmän hydrolyysi ei olisi enää tarpeen.

Suurin tämän tutkielman saavutus lienee jo edellä mainittu C9-stereokeskuksen konfiguraation määrittäminen, mikä kuitenkin onnistuu vasta kun valmiit nostosiinit A ja B saadaan aikaan. Lisäksi tämä synteesireitti on tiettävästi viides luonnonainesynteesi jossa hyödynnetään Passerini-reaktiota ja neljäs jossa käytössä on klassinen Passerini-reaktio. Näin ollen synteesin valmistuessa sen uutuusarvo ei nojaa vain luonnonaineeseen itseensä vaan myös sen synteesireittiin.

13 Synteesiohjeet

Kaikki reaktiot suoritettiin argonin alla, uunikuivatuilla välineillä ja kuivilla liuottimilla, ellei toisin mainita. Liuottimet kuivattiin MBraunin SPS-800 liuotinkuivauslaitteistolla. Konsentroidit suoritettiin rotavaporilla. Analyttisina TLC-levyinä käytettiin Merck silica gel F254 (230–400 mesh) levyjä. Flash-kromatografiset puhdistukset tehtiin Merck silica gel 60 (230–400 mesh) silikalla p.a. laatuilla liuottimilla. ^1H - ja ^{13}C -NMR mittaukset tehtiin Brüker Avance 300 tai 500 Hz spektrometrilla. NMR-spektrien kemialliset siirtymät ilmoitetaan ppm:na suhteessa käytetyn deuteroidun liuottimen signaaleihin. IR-spektrit mitattiin Brüker Tensor 27 FTIR-spektrometrilla. Tarkat massat määritettiin MicroMass LCT Premier-massaspektrometrillä. Kiraalisten yhdisteiden kiertokulmat mitattiin Perkin-Elmer 343-polarimetrillä ja ne on ilmoitettu huoneenlämpötilassa (22°C).

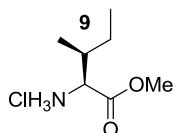
13.1 2-hydroksi-4-(4-metoksifenyyl)butaanihappo (**5**)⁷²



Maitohappo (1,2 ekv., 3,6 mmol, 0,30 mL) lisättiin kaliumhydroksidin (1,8 ekv., 8,5 mmol, 477 mg, 6 mL H₂O, 10 mL tolueeni) 0°C:een vesi-tolueeniliuokseen kolviin johon oli kytketty Dean-Stark laitteisto. Liuosta pidettiin 135°C:ssa 75 minuuttia kunnes nestettä ei enää kondensoitunut laitteistoon. Reaktioseos haihdutettiin vielä kuivaksi rotavaporilla. Tämän jälkeen lisättiin p-metoksibenstyylialkoholi (1,0 ekv., 3,1 mmol, 430 mg) sekä Ni(OAc)₂(H₂O)₄ (0,050 ekv., 0,15 mmol, 38 mg) ja seosta lämmitettiin 160°C:ssa 3 tuntia. Reaktion valmistuttua kolviin lisättiin 20 mL 1:1 vesi-tolueeniseosta kiinteiden hiukkasten liuottamiseksi. Orgaaninen faasi erotettiin vesifaasista, joka happamoitettiin (pH 0,5) väkevällä HCl:lla ja uutettiin kolmesti etyyliasetaatilla. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin Na₂SO₄:lla ja haihdutettiin kuivaksi rotavaporilla. Jäännökseksi saadusta kiinteästä seoksesta poistettiin jäljelle jäänyt Ni-katalyytti liuottamalla se DCM:in jolloin tuotteena saatiin valkoinen kiinteä aine **5**. Saanto 0,76 mmol, 160 mg, 26%.

R_f(20% EtOAc-Hex): 0,11; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 7,14 (2H, d, *J*= 8,5 Hz); 6,83 (2H, d, *J*= 8,5 Hz); 4,25 (1H, dd, *J*= 3,9 Hz, 4,1 Hz); 3,79 (3H, s); 2,76 (2H, t, *J*= 8,1 Hz); 2,15 (1H, m); 2,0 (1H, m); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): 178,3; 158,1; 132,7; 129,5; 114,0; 69,4; 55,3; 35,9; 30,1. Tuotteen spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.⁷²

13.2 (2*S*,3*S*)-metyyli-2-amino-3-metyylipentanoaatin hydrokloridi (**9**)

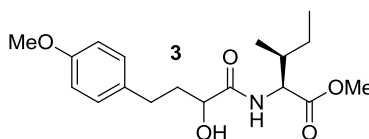


Tionyylikloridia (1,7 ekv., 5 mL, 8,2 g, 68,9 mmol) lisättiin metanoliin (14,5 ekv., 24 mL) 0°C:ssa tipoitain ja sekoitettiin puoli tuntia. Tämän jälkeen kiinteä L-isoleusiini (1 ekv., 5,04 g, 38,1 mmol) lisättiin liuokseen ja sekoitettiin yön yli reaktioseoksen lämpö-

tilan noustessa huoneenlämpöön. Seuraavana päivänä reaktioseoksen $^1\text{H-NMR}$ spektristä nähtiin että reaktiossa oli jäljellä reagoimatonta L-isoleusiinia, joten tionyylikloridia lisättiin vielä 2 mL:aa (0,7 ekv., 3,3 g, 27,6 mmol) ja reaktiota jatkettiin vielä kahden päivän ajan. Kun reaktio oli edennyt loppuun, jäljellä oleva liuotin haihdutettiin alipaineessa kaliumhydroksidiansan kanssa, josta jäännöksenä saatiin kiinteä, kiteinen valkoinen aine – L-isoleusiinin metyyliesterin hydrokloridi **9** – jota kuivattiin korkeassa alipaineessa vielä kahden päivän ajan. Saanto: 7,0 g, 38,7 mmol, kvant.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz CDCl_3): 8,82 (3H, s); 4,03 (1H, s); 3,81 (3H, s); 2,20 (1H, m); 1,50 (2H, m); 1,10 (3H, d, $J=6,9$ Hz); 0,97 (3H, t, $J=7,4$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 168,9; 57,6; 53,0; 36,6; 25,7; 15,2; 11,8. Tuotteen spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.⁸⁴

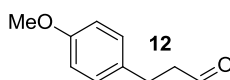
13.3 (2*S*,3*S*)-metyyli-2-(2-hydroksi-4-(4-metoksifenyyl)butanamidi)-3-metyylipentanoaatti (**3**)



Karboksylihappo **5** (1,0 ekv., 58,5 μmol , 12,3 mg), EDC·HCl (1,1 ekv., 64,2 μmol , 12,3 mg) ja HOBt (1,1 ekv., 63,7 μmol , 8,6 mg) liuotettiin 4 mL:aan 1:1 DCM-THF:ia, seosta sekoitettiin 0°C :ssa kunnes kaikki kiinteä oli liuennut. Tämän jälkeen kiinteä metyyliesteri **9** (1,1 ekv., 59,0 μmol , 10,7 mg) ja DIEA (1,1 ekv., 132 μmol , 17,1 mg, 23 μL) lisättiin ja reaktiota sekoitettiin huoneenlämmössä 2 tuntia, minkä jälkeen DIEA:ia lisättiin vielä 12 μL :aa kun TLC:lla havaittiin että reaktio ei ollut edennyt. Reaktiota sekoitettiin lisäyksen jälkeen huoneenlämmössä yön yli. Tuote erotettiin lisäämällä reaktioon 3 mL kylläistä NaHCO_3 :a ja DCM:a ja erottamalla orgaaninen kerros. Vesifaasi pestiin EtOAc:lla ja orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja liuotin haihdutettiin rotavaporilla. Raakatuotteena saatu neste puhdistettiin pylväskromatografialla (30–50% EtOAc-Hex). Tuotteena saatiin paksu oranssin keltainen öljy **3**. Saanto 39,1 μmol , 13,2 mg, 67%

R_f(50% EtOAc-Hex); ¹H NMR (300 MHz CDCl₃): 7,13 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 6,99 (1H, 2xd, *J*= 9,0 Hz); 6,82 (2H, d, *J*= 8,6 Hz); 4,58 (1H, dd, *J*= 3,8 Hz, 5,02 Hz); 4,15 (1H, pent., *J*= 3,8 Hz, 4,0 Hz); 3,78 (3H, s); 3,73 (3H, s); 2,71 (2H, t, *J*= 7,9 Hz); 2,11 (1H, m); 1,91 (2H, m); 1,41 (1H, m); 1,17 (2H, m); 0,91 (6H, d+t päällekkäin); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): 173,6; 173,6; 172,5; 172,2; 158,0; 133,2; 133,1; 129,4; 114,0; 113,9; 71,6; 71,5; 62,2; 56,2; 56,1; 55,3; 52,1; 52,1; 37,8; 37,8; 36,7; 36,6; 33,7; 30,4; 30,3; 25,2; 25,1; 15,5; 15,5; 15,4; 15,4; 11,48.

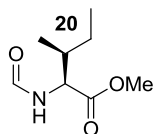
13.4 3-(p-metoksifenyyli)propanaali (**12**)



Trans-4-metoksikanelialdehydi (**15**, 1,00 ekv., 2,00 g, 12,5 mmol) liuotettiin etyyliaseetaattiin (10 mL) ja seokseen lisättiin 5% Pd/C-katalyyttiä (0,13 g). Reaktioastia huuhdeltiin ensin kolmella vakuumi-argonsyklillä ja kaasukehä vaihdettiin vetyyn kolmella vakuumi-vetyhuuhtelusyklillä. Reaktioseosta sekoitettiin 4,5 tuntia. Sekä TLC:n että NMR:n mukaan lähtöaine ei ollut kulunut loppuun, jolloin suspensioon lisättiin argonvakuumisykliä jälkeen vielä 0,20 g Pd/C:tä minkä jälkeen kaasukehä vaihdettiin takaisin vetyyn vakuumi-vetyykleillä ja reaktion annettiin jatkua yön yli. Lopuksi palladium-hiili vakuumisuodatettiin sintterin läpi ja suodos konsentroitiin rotavaporilla ja kuivattiin vakuumilinjassa. Tuotteena saatiin aldehydiä **12** keltaisena öljynä, 2,05 g, 12,48 mmol, kvantitatiivinen saanto. **12** muodostaa valkoisia kiteitä pitkän jääkaappisäilytyksen aikana.

R_f (20% EtOAc-Hex): 0,49, värjäytyy vanilliinilla tumman siniseksi, hajoaa TLC-levyllä; ¹H NMR (300 MHz CDCl₃): 9,81 (1H, t, *J*= 1,5 Hz); 7,12 (2H, 2xd, *J*= 8,7 Hz); 6,83 (2H, d, *J*= 8,7 Hz); 3,79 (3H, s); 2,91 (3H, t, *J*= 7,5 Hz); 2,70 (2H, m). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 201,9; 158,2; 132,4; 129,3; 114,1; 55,3; 45,6; 27,3; Tuotteen spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.⁸⁵

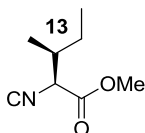
13.5 (2*S*,3*S*)-metyyli-2-formamido-3-metyylipentanoaatti (**20**)



Pivaloyylikloridi (3,0 ekv., 4,0 mL, 4,0 g, 33,6 mmol), muurahaishappo (3,3 ekv, 1,5 mL, 1,8 g, 38,6 mmol) ja trietyyliamiini (2,2 ekv., 3,7 mL, 2,7 g, 26,4 mmol) liuotettiin dikloorimetaaniin (1 mL) ja sekoitettiin 0°C:ssa kahden tunnin ajan, jolloin muodostui näiden kahden anhydridi. Anhydridin muodostusta seurattiin NMR:n avulla. 3 tunnin kuluttua anhydridin muodostuttua reaktioon lisättiin L-isoleusiinin metyyliesterin hydrokloridia (**9**, 1 ekv., 2,0 g, 11,0 mmol) sekä trietyyliamiinia (1,2 ekv., 1,9 mL, 1,3 g, 13,2 mmol) ja annettiin reaktion lämmetä huoneenlämpöiseksi yön yli sekoittaen. Tämän jälkeen liuotin haihdutettiin ja tuote puhdistettiin flash-pylväskromatografisesti (50–60% EtOAc-Hex). Tuotteena *N*-formyloitua isoleusiinin metyyliesteriä (**20**) saatiin keltaisena öljynä. Saanto: 1,2 g, 6,9 mmol, 62%.

R_f (80% EtOAc-Hex): 0,46, KMnO_4 -värjäys; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8,24 (1H, s); 6,10 (1H, s); 4,70 (1H, dd, $J=4,9$ Hz, 8,9 Hz); 3,75 (3H, s); 1,93 (1H, m); 1,43 (1H, m); 1,18 (2H, m); 0,93 (3H, t, $J=3,4$ Hz, päällekkäin 0,92 d:n kanssa) 0,92 (3H, d, $J=6,9$ Hz, päällekkäin 0,93 t:n kanssa); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 171,2; 159,7; 54,1; 51,4; 37,2; 26,2; 24,3; 14,5; 10,7. Tuotteen spektri vastaa kirjallisuusarvoja.⁸⁴

13.6 (2*S*,3*S*)-metyyli-2-isosyano-3-metyylipentanoaatti (**13**)

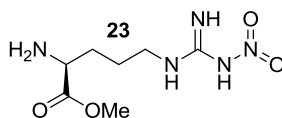


Formamidi **20** (1 ekv., 205 mg, 1180 μmol) liuotettiin 1,5 mL:aan DCM:a ja jäädytettiin -78°C :ksi. Erillisessä kolvissa argonin alla punnittua trifosgeenia (0,35 ekv, 134 mg, 451 μmol) liuotettiin 1,5 mL:an DCM:a ja liuos lisättiin yhdisteen **20** liuokseen erittäin hitaasti (5–10 min kuluessa). Tämän jälkeen reaktioseokseen lisättiin NMM:a (1,7 ekv., 250 μL , 230 mg, 2270 μmol) hitaasti tipoittain noin 5 minuutin kuluessa. Re-

aktioseosta pidettiin -78°C :ssa 2 tunnin ajan jatkuvasti sekoittaen, jolloin sen väri muuttui hitaasti vaalean keltaisesta oranssiksi. Kun kaikki lähtöaine oli kulunut reaktiosta, kolviin lisättiin 20 mL:a vettä septumin läpi reagoimattoman trifosgeenin hajottamiseksi reaktioseoksesta kaasumaiseksi fosgeeniksi (tuuletusneula). Tämän jälkeen reaktioseoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöiseksi. Orgaaninen faasi erotettiin ja vesifaasi pestiin kahdesti DCM:lla. Orgaaniset faasit yhdistettiin ja kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja liuotin haihdutettiin. Tuotteena saatiin puhdasta L-isoleusiinin isosyanidia (**13**), joka käytettiin seuraavaan vaiheeseen sellaisenaan. Saanto 98%, paksu, oranssi ja voimakkaan epämiellyttävän hajuinen neste.

R_f (20% EtOAc-Hex): 0,52 värjäytyy vanilliinilla keltaiseksi; ^1H NMR (300 MHz): 4,18 (1H, d, $J= 4,5$ Hz); 3,81 (3H, s); 2,08 (1H, m); 1,39 (3H, m); 1,07 (3H, d, $J= 6,8$ Hz); 0,93 (3H, t, $J= 7,4$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 166,9; 160,3; 62,0; 53,0; 37,6; 24,1; 15,9; 11,1; Tuotteesta mitatut spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.⁸⁶

13.7 (S)-metyyli-2-amino-5-(3-nitroguanidino)pentanoaatti (**23**)

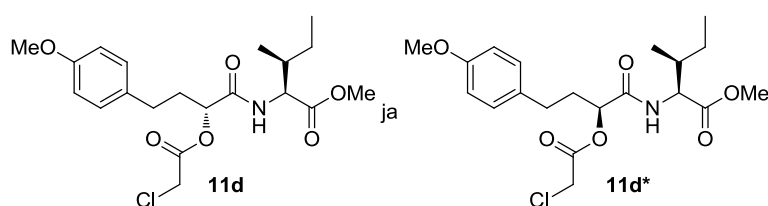


N_{ω} -Nitro-L-arginiini (**21**, 1,0 ekv., 1,0 g, 4,7 mmol) lietettiin erityiskuivaan metanoliin (2×70 ekv., 2×15 mL, 2×740 mmol). Tästä suspensiosta johdettiin HCl:a läpi 30 minuutin ajan, josta ensimmäisen 15 minuutin kuluessa lähtöaine **21** liukeni hapotettuun metanoliin ja liuoksen väri muuttui kirkkaasta vaalean ruskeaksi. Seuraavaksi liuosta ref-luksoitiin 15 minuutin ajan (hauteen lämpötila 100°C). Tämän jälkeen liuotin haihdutettiin, ja haihdutusjäännös (vaalean ruskea vaahto), joka liuotettiin uudelleen ekstra-kuivaan metanoliin. Tämän jälkeen kaikki edellä mainitut vaiheet toistettiin kertaalleen, minkä jälkeen NMR-näytteestä pystyttiin toteamaan lähtöaineen täysi kulumisen reaktiosta. Lopuksi muodostunut kiinteä vaahto liuotettiin mahdollisimman pieneen määrään metanolia (noin 1 mL), jolloin muodostuneeseen paksuun ruskeaan nesteeseen lisättiin Et_2O :ä (0,5 mL) kunnes muodostui valkea, samea ja kevyt sakka. Seosta pidettiin noin 2 tuntia pakastimessa. Liuotinten haihdutuksen ja kuivauksen jälkeen tuotteena saatiin L-

arginiinin metyyliesterin kloridisuola (**23**). Saanto: 1,4 g, 4,5 mmol, 96%, hailakan punaruskea kiinteä vaaho.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): 4,27 (1H, t, $J=6,4$ Hz); 3,91 (3H, s); 3,40 (2H, t, $J=6,7$ Hz); 2,08 (2H, m); 1,82 (2H, m); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): 170,9; 73,5; 62,3; 53,8; 41,6; 28,7; 25,8; Tuotteen spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.⁸⁷

13.8 (2*S*,3*S*)-metyyli-2-(2-(2-klooriasetoksi)-4-(4-metoksifenyyl)butanamido)-3-metyylipentanoaatti (**11d** ja **11d***)



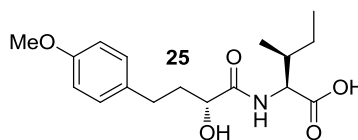
3-(*p*-metoksifenyyl)propanaali (**12**, 1,1 ekv., 470 mg, 2,86 mmol), kloorietikkahappo (**14d**, 1,1 ekv., 263 mg, 2,78 mmol) sekä isosyanidi **13** (1,0 ekv., 408 mg, 2,63 mmol) punnittiin 5 mL. Reaktioseos asetettiin esilämmitetylle öljyhauteelle 100°C:een ja sitä sekoitettiin 20 minuuttia jolloin seoksen väri muuttui vaalean keltaisesta oranssiksi tai ruskeaksi. Reaktioseos joka oli tässä vaiheessa paksua nestettä liuotettiin 20% etyyliasetaatin ja heksaanin seokseen ja siirrostettiin silikapylväeseen. Tuote puhdistettiin suoraan flash-kromatografialla, eluenttina 20–25% etyyliasetatti-heksaani, jolloin saatiin α -asyloksiamidia **11d** hailakan keltaisena öljynä. Saanto: 787 mg, 1,90 mmol, 72%. Diastereomeerien erotuksessa käytettiin CombiFlash® R_f – automaattista pylväskromatografia. CombiFlashille tuote adsorboitiin silikaan. Fraktioiden keruun, konsentroinnin ja yhdistämisen jälkeen tuotteena saatiin puhtaita *R,S,S*- ja *S,S,S*-diastereomeerejä sekä pieni määrä niiden seosta. Eluenttina 10–40% dietyylieetterin ja heksaanin seos. 439 mg:sta diastereomeerien seosta saatiin puhdistettua *R,S,S* diastereomeeriä 124 mg, 299 μmol , 28% ja *S,S,S* diastereomeeriä 126 mg, 304 μmol , 29% sekä näiden seosta 150 mg, 362 μmol , 34%. Diastereomeerien erotus TLC:lla suoritettiin ajamalla levy neljästi, eluenttina 20% EtOAc heksaanissa.

Diastereomeerien seos: IR (filmi, cm^{-1}): 3325; 2962; 2878; 1740; 1668; 1511; 1244; 1175; 1149; 1034; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7,08 (2H, d), 6,81 (2H, d), 6,10 (1H, bd), 5,27 (1H, m), 4,59 (1H, m), 4,03 (2H, d), 3,71 (3H, s), 3,74 (3H, s), 2,66 (1H, t), 2,21 (2H, m), 1,93 (1H, m), 1,43 (1H, m), 1,20 (2H, m), 0,92 (6H, m); HRMS (ESI^+): m/z laskettu $[\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{ClNa}]^+$ 463,1497, m/z mitattu 436,1491, $\Delta(m/z) = 0,6$ mDa.

(*R,S,S*): R_f (25% EtOAc-Hex): 0,15; $[\alpha]_D^{20}(\text{DCM}) = +18,4^\circ$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7,09 (2H, d, $J=8,5$ Hz); 6,82 (2H, d, $J=8,6$ Hz); 6,60 (1H, d, $J=8,6$ Hz); 5,28 (1H, t, $J=5,9$ Hz); 4,58 (1H, dd $J=4,7$ Hz, 8,5 Hz); 4,03 (2H, d, $J=5,2$ Hz); 3,78 (3H, s); 3,75 (3H, s); 2,66 (2H, t, $J=7,6$ Hz); 2,22 (2H, m); 1,91 (1H, m); 1,42 (1H, m); 1,18 (2H, m); 0,92 (3H, t, $J=7,3$ Hz, päällekkäin 0,88 dubletin kanssa); 0,88 (3H, d, $J=6,9$ Hz, päällekkäin 0,92 tripletin kanssa); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 172,1; 168,8; 166,1; 158,2; 132,6; 129,5; 114,2; 75,2; 56,3; 55,4; 52,4; 40,6; 38,0; 33,3; 30,2; 25,3; 15,6; 11,7.

(*S,S,S*): R_f (25% EtOAc-Hex): 0,14; $[\alpha]_D^{20}(\text{DCM}) = +9,4^\circ$; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7,08 (2H, d, $J=8,6$ Hz); 6,83 (2H, d, $J=8,6$ Hz); 6,59 (1H, d, $J=8,6$ Hz); 5,22 (1H, t, $J=5,9$ Hz); 4,60 (1H, dd $J=4,7$ Hz, 8,6 Hz); 4,09 (2H, d, $J=3,0$ Hz); 3,78 (3H, s); 3,74 (3H, s); 2,66 (2H, t, $J=7,7$ Hz); 2,21 (2H, m); 1,93 (1H, m); 1,43 (1H, m); 1,19 (2H, m); 0,93 (6H, d+t päällekkäin); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 172,1; 168,7; 166,2; 158,2; 132,5; 129,4; 114,1; 75,3; 56,4; 55,4; 52,4; 40,7; 38,1; 33,6; 30,2; 25,3; 15,6; 11,7.

13.9 (2*S*,3*S*)-2-(2-hydroksi-4-(4-hydroksifenyyli)butanamido)-3-metyylipentaanihappo (25)

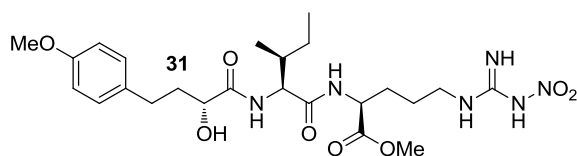


Passerini reaktion tuote **11d** (1,0 ekv., 294 mg, 710 μmol) liuotettiin 24 mL:an kuivaa tai lisääineetonta THF:a. Liuokseen lisättiin 24 mL:a 0,1M LiOH (aq., 3,3 ekv., 58,2 mg, 2430 μmol) 0°C :ssa. Reaktiota sekoitettiin huoneenlämmössä 6 tuntia, minkä jälkeen reaktiokolvi siirrettiin jääkaappiin yön yli. Ylimääräinen LiOH poistettiin seokses-

ta laimentamalla reaktioseos etyyliasetaatilla ja säätämällä seoksen pH noin 1:een 1M HCl:lla. Orgaaninen faasi erotettiin ja vesifaasi pestiin kertaalleen etyyliasetaatilla. Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na₂SO₄:lla ja konsentroidtiin ruskeaksi paksuksi nesteeksi. Kloorietikkahappo kiehutettiin seoksesta ulos korkeassa alipaineessa 100°C:n öljyhauteella, jolloin kloorietikkahappo kiinteytyi kolvin yläosaan ja alaosaan jäi puhdas karboksyylihappo **25**. Tuote liuotettiin DCM:in ja metanoliin ja konsentroidtiin ja kuivauksen jälkeen tuotteena saatiin valkoisia neulakiteitä. Saanto: 204 mg, 631 μmol, 89%. Kiderakenteen määrittystä varten tuote kiteytettiin etyyliasetaatti-heksaani difuusiokiteytyksellä.

(*R,S,S*): Sulamisväli: 135,3–137,1°C; $[\alpha]_D^{20}$ (MeOH)=+26,6°; IR (filmi, cm⁻¹): 3378; 3297; 2922; 2612; 2353; 1719; 1511; 1225; 1099; 681; 457; ¹H NMR (300 MHz, MeOD): 7,76 (1H, d, *J*= 8,5 Hz); 7,12 (2H, d, *J*= 8,7 Hz); 6,82 (2H, d, *J*= 8,7 Hz); 4,40 (1H, q, *J*= 5,1 Hz); 4,06 (1H, dd, *J*= 4,0 Hz, 3,8 Hz); 3,76 (3H, s); 2,67 (2H, t, *J*= 8,0 Hz); 1,95 (3H, m); 1,54 (1H, m); 1,26 (2H, m); 0,95 (6H, d+t); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD): 176,9; 159,4; 135,0; 130,4; 114,9; 72,1; 57,6; 55,7; 38,8; 37,8; 31,2; 26,2; 16,0; 11,9; HRMS (ESI⁺): *m/z* laskettu [C₁₇H₂₅NO₅Na]⁺ 346,1625, *m/z* mitattu 346,1625, Δ(*m/z*) = 0,0 mDa.

13.10 (2*S*)-metyyli-2-((2*S*,3*S*)-2-(2-hydroksi-4-(4-metoksifenyli)butanamido)-3-metyylipentanamido)-5-(3-nitroguanidino)pentanoaatti (**31**)



Karboksyylihappo **25** (1 ekv., 10,0 mg, 30,9 μmol), metyyliesteri **23** (1,0 ekv., 10,9 mg, 35,9 μmol) ja HOBt (5,0 ekv., 21,3 mg, 157 μmol) liuotettiin 2 mL:an DMF:a ja liuos neutraloitiin NMM:lla pH 7:ään ja jäädytettiin 0°C:ksi. Kiinteä DCC (1,1 ekv., 8,4 mg, 40,7 μmol) lisättiin ja reaktiota sekoitettiin huoneenlämmössä 54 tuntia. Tämän jälkeen reaktioseos laimennettiin etyyliasetaatilla ja orgaaninen faasi pestiin kahdesti vedellä, kuivattiin Na₂SO₄:lla ja konsentroidtiin. Peptidi **31** puhdistettiin flash-

pylväskromatografialla (eluentti 2,5–10% MeOH–DCM). Saanto: 14,7 mg, 27,3 μmol , 88%, vaalean keltainen kiinteä (kiteinen) aine.

(*R,S,S*): R_f (10% MeOH-DCM): 0,42; Sulamisväli: 58,1–138,3°C (amorfinen); $[\alpha]_D^{20}$ (MeOH) = $-7,6^\circ$; IR (filmi, cm^{-1}): 3321; 2927; 2850; 2345; 1741; 1625; 1511; 1243; 1087; 1032; 516; ^1H NMR (300 MHz, MeOD): 8,01 (1H, s); 7,10 (2H, d, $J = 8,5$ Hz); 6,83 (2H, d, $J = 8,5$ Hz); 4,49 (1H, q, $J = 4,6$ Hz); 2,28 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 4,07 (1H, dd, $J = 3,6$ Hz, 4,3 Hz); 3,76 (3H, s); 3,72 (3H, s); 3,23 (2H, m); 2,65 (2H, t, $J = 8,1$ Hz); 1,97 (2H, m); 1,68 (2H, m); 1,27 (2H, m); 0,97 (6H, d+t); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD): 177,0; 173,8; 173,4; 161,0; 159,4; 134,9; 130,4; 144,8; 72,0; 58,5; 55,6; 52,7; 41,6; 38,4; 37,9; 34,8; 31,2; 29,6; 26,8; 26,1; 25,9; 15,8; 11,2; HRMS (ESI⁺): m/z laskettu $[\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_8\text{Na}]^+$ 561,2643, mitattu m/z 561,2635, $\Delta(m/z) = 0,8$ mDa.

Lähdeluettelo

- (1) Talvitie, A. *Epäorgaaninen kemia*, 2. painos.; WSOY, 1944.
- (2) Nicolau, K. C.; Sorensen, E. J. 1996; pp 1–18.
- (3) Nicolaou, K.; Vourloumis, D.; Winssinger, N.; Baran, P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39 (1), 44–122.
- (4) “Synteesi” <http://www.kielitoimistonsanakirja.fi/> (accessed Sep 8, 2015).
- (5) Warren, S.; Wyatt, P. In *Organic Synthesis - The Disconnection Approach*; 2008; p 314.
- (6) Dömling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39 (18), 3168–3210.
- (7) Van Berkel, S. S.; Bögels, B. G. M.; Wijdeven, M. A.; Westermann, B.; Rutjes, F. P. J. T. *European J. Org. Chem.* **2012**, 2012 (19), 3543–3559.
- (8) Banfi, L.; Riva, R. *The Passerini Reaction*; Wiley, 2005.
- (9) Takiguchi, S.; Iizuka, T.; Kumakura, Y.; Murasaki, K.; Ban, N.; Higuchi, K.; Kawasaki, T. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (4), 1126–1131.
- (10) Isaacson, J.; Kobayashi, Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48 (10), 1845–1848.
- (11) Falck, J. R.; Manna, S. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22 (7), 619–620.
- (12) Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q.-Z.; Lu, Y.; Wessjohann, L. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45 (43), 7235–7239.
- (13) Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2005.
- (14) Ugi, I.; Lohberger, S.; Karl, R. In *Comprehensive Organic Synthesis Vol.2*; Trost, B. M., Fleming, I., Heathcock, C. H., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1991; pp 1083–1109.
- (15) IUPAC Gold Book - isocyanides <http://goldbook.iupac.org/I03270.html> (accessed Apr 17, 2015).
- (16) *Isocyanide chemistry : applications in synthesis and material science*; Wiley-VCH, 2012.

- (17) Porcheddu, A.; Giacomelli, G.; Salaris, M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (6), 2361–2363.
- (18) Passerini, M. *Gazzeta Chim. Ital.* **1921**, *51*, 126–129.
- (19) (Merck). In *The Merck Index*; Oxford Book Company, 2001; pp 181–182.
- (20) Ramozzi, R.; Morokuma, K. *J. Org. Chem.* **2015**.
- (21) Pirrung, M. C.; Sarma, K. Das. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (2), 444–445.
- (22) Venkatraman, S.; Velazquez, F.; Wu, W.; Blackman, M.; Madison, V.; Njoroge, F. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (7), 2151–2155.
- (23) Ugi, I.; Werner, B.; Dömling, A. *Molecules* **2003**, *8* (1), 53–66.
- (24) Bock, H.; Ugi, I. *J. für Prakt. Chemie/Chemiker-Zeitung* **1997**, *339* (1), 385–389.
- (25) Wang, S.-X.; Wang, M.-X.; Wang, D.-X.; Zhu, J. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *120* (2), 394–397.
- (26) Denmark, S. E.; Fan, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (26), 7825–7827.
- (27) Denmark, S. E.; Fan, Y. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (24), 9667–9676.
- (28) Yue, T.; Wang, M.-X.; Wang, D.-X.; Zhu, J. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47* (49), 9454–9457.
- (29) Kunz, H.; Pfrengle, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (2), 651–652.
- (30) Neves Filho, R. A. W.; Stark, S.; Westermann, B.; Wessjohann, L. A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2085–2090.
- (31) Larsen, T. O.; Gareis, M.; Frisvad, J. C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (21), 6148–6152.
- (32) McDonald, L. A.; Barbieri, L. R.; Carter, G. T.; Lenoy, E.; Lotvin, J.; Petersen, P. J.; Siegel, M. M.; Singh, G.; Williamson, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (35), 10260–10261.
- (33) Tanino, T.; Ichikawa, S.; Shiro, M.; Matsuda, A. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (5), 1366–1377.
- (34) Hirano, S.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44* (12), 1854–1856.

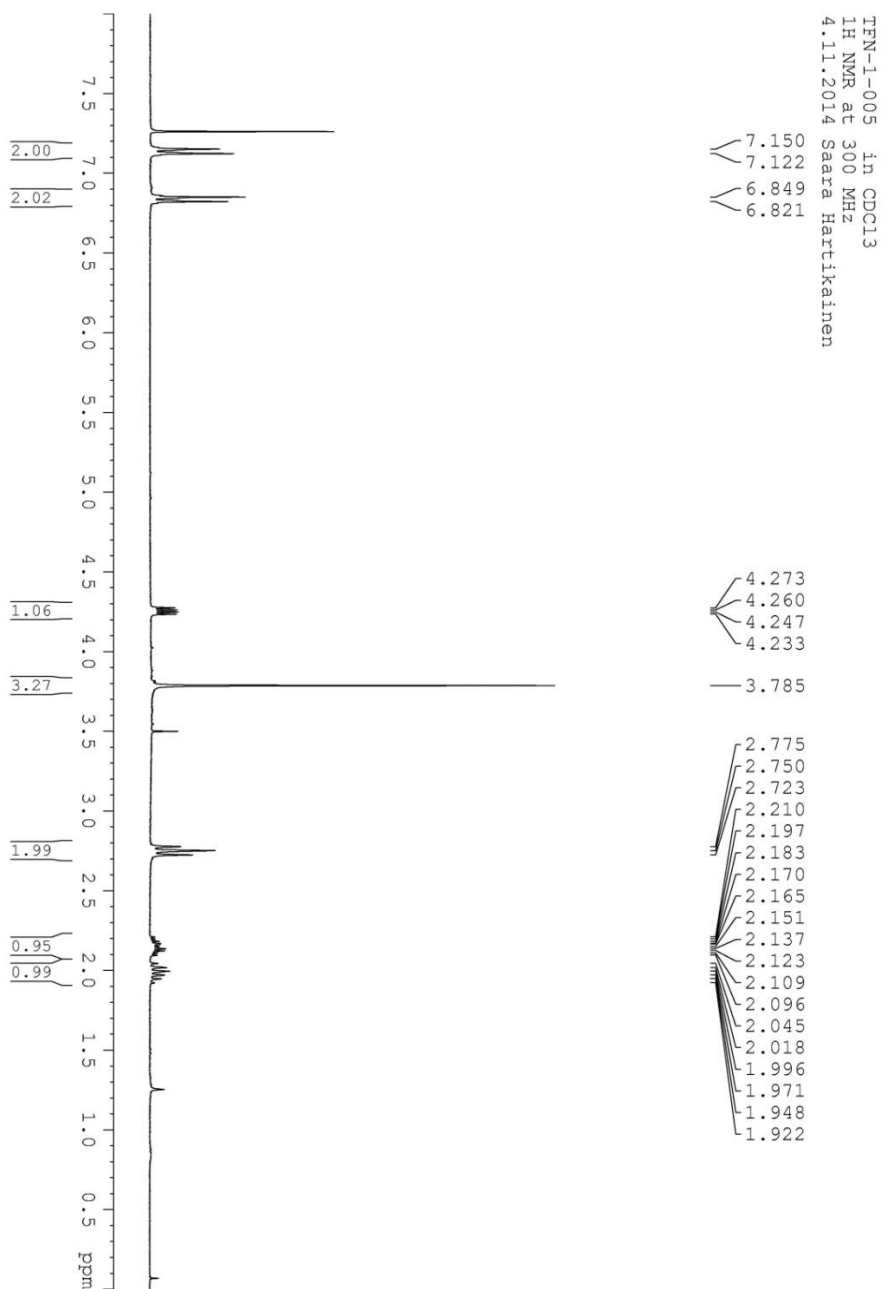
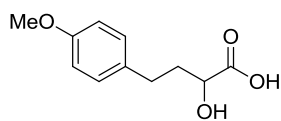
- (35) Banfi, L.; Guanti, G.; Riva, R. *Chem. Commun.* **2000**, No. 11, 985–986.
- (36) Toda, S.; Obi, Y.; Numata, K.-I.; Hamagishi, Y.; Tomita, K.; Komiyama, N.; Kotake, C.; Furumai, T.; Oki, T. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1992**, *45* (10), 1573–1579.
- (37) Owens, T. D.; Araldi, G.-L.; Nutt, R. F.; Semple, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (36), 6271–6274.
- (38) Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3* (8), 1115–1122.
- (39) Faure, S.; Hjelmgaard, T.; Roche, S. P.; Aitken, D. J. *Org. Lett.* **2009**, *11* (5), 1167–1170.
- (40) Aitken, D. J.; Faure, S.; Roche, S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (49), 8827–8830.
- (41) Wasserman, H. H.; Petersen, A. K. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (26), 8972–8973.
- (42) Roche, S. P.; Faure, S.; El Blidi, L.; Aitken, D. J. *European J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (30), 5067–5078.
- (43) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*, 1. painos.; Oxford University Press: New York, 2001.
- (44) Gorzynski Smith, J. *Organic Chemistry*; McGraw-Hill: New York, 2006.
- (45) Sakai, R.; Oiwa, C.; Takaishi, K.; Kamiya, H.; Tagawa, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (38), 6941–6944.
- (46) Isaacson, J.; Loo, M.; Kobayashi, Y. *Org. Lett.* **2008**, *10* (7), 1461–1463.
- (47) Kobayashi, K.; Yoneda, K.; Mizumoto, T.; Umakoshi, H.; Morikawa, O.; Konishi, H. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (25), 4733–4736.
- (48) Omura, S.; Matsuzaki, K.; Fujimoot, T.; Kosuge, K.; Furuya, T.; Fujita, S.; Nakagawa, A. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1991**, *44* (1), 117–118.
- (49) Gilley, C. B.; Buller, M. J.; Kobayashi, Y. *Org. Lett.* **2007**, *9* (18), 3631–3634.
- (50) Satoshi Omura - Facts
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/omura-facts.html (accessed Oct 22, 2015).
- (51) Corey, E. J.; Li, W.; Nagamitsu, T. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1998**, *37* (12), 1676–1679.

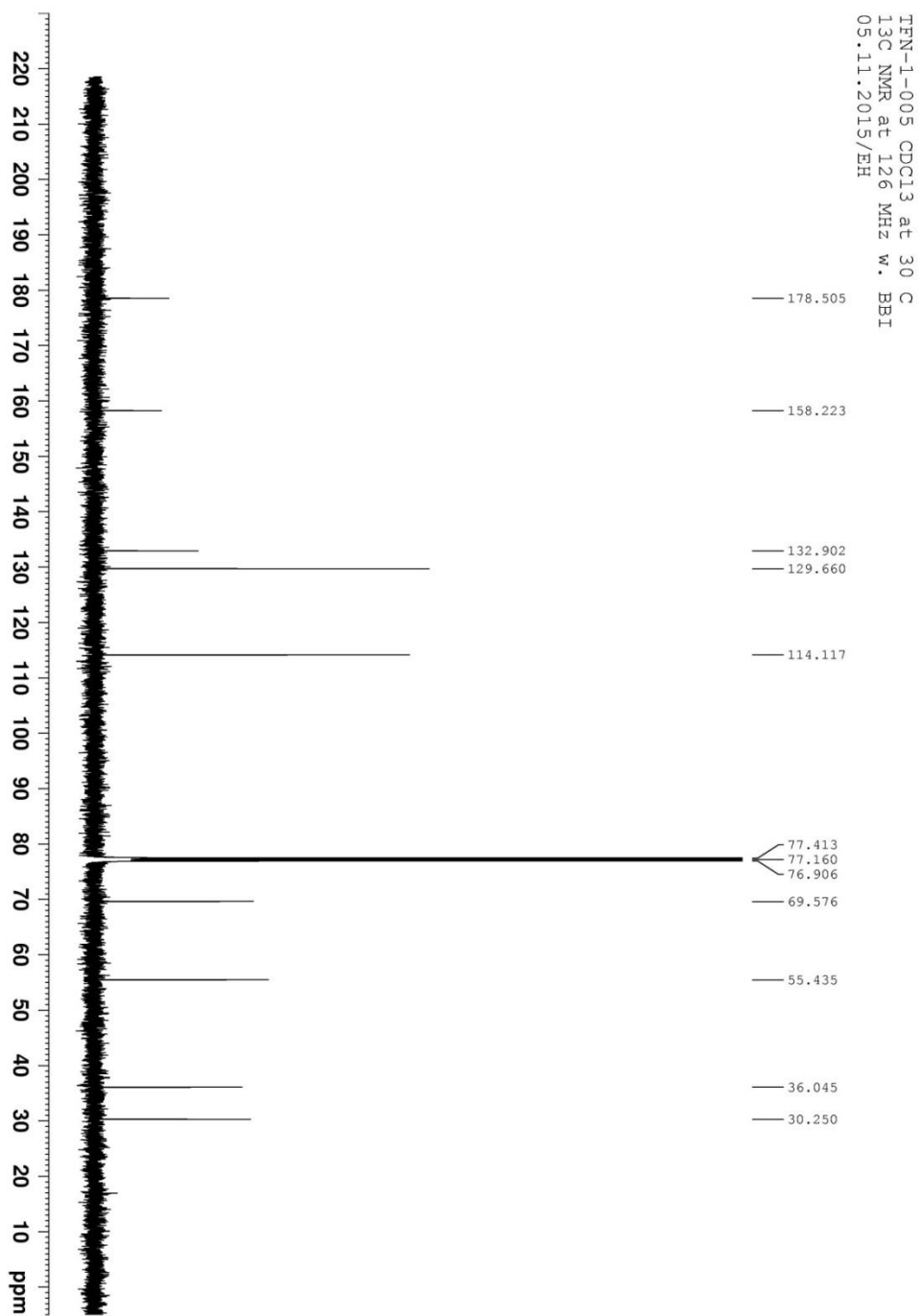
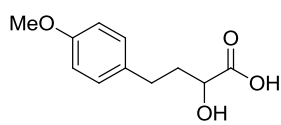
- (52) Durand, A. A. B. *Am. J. Pharm.* **1851**, 112–118.
- (53) Jida, M.; Soueidan, M.; Willand, N.; Agbossou-Niedercorn, F.; Pelinski, L.; Laconde, G.; Deprez-Poulain, R.; Deprez, B. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (14), 1705–1708.
- (54) Endo, A.; Yanagisawa, A.; Abe, M.; Tohma, S.; Kan, T.; Fukuyama, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (23), 6552–6554.
- (55) Erba, E.; Bergamaschi, D.; Bassano, L.; Damia, G.; Ronzoni, S.; Faircloth, G. .; D’Incalci, M. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37* (1), 97–105.
- (56) J. Monk, B.; Dalton, H.; Benjamin, I.; Tanovic, A. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18* (25), 3754–3769.
- (57) Cuevas, C.; Pérez, M.; Martín, M. J.; Chicharro, J. L.; Fernández-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; de la Calle, F.; García, J.; Polanco, C.; Rodríguez, I.; Manzanares, I. *Org. Lett.* **2000**, *2* (16), 2545–2548.
- (58) Corey, E. J.; Gin, D. Y.; Kania, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (38), 9202–9203.
- (59) Kawagishi, F.; Toma, T.; Inui, T.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (37), 13684–13687.
- (60) Arai, K.; Kimura, K.; Mushiroda, T.; Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bulletin* **1989**, *37* (11), 2937–2939.
- (61) Karwowski, J. P.; Jackson, M.; Rasmussen, R. R.; Humphrey, P. E.; Podding, J. B.; Kohl, W. L.; Scherr, M. H.; Kadam, S.; McAlpine, J. B. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1993**, *46* (3), 374–379.
- (62) Dömling, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4* (3), 318–323.
- (63) Henkel, B.; Beck, B.; Westner, B.; Mejat, B.; Dömling, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (50), 8947–8950.
- (64) Wang, W.; Joyner, S.; Khoury, K. A. S.; Dömling, A. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 529–532.
- (65) Koopmanschap, G.; Ruijter, E.; Orru, R. V. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10* (1), 544–598.
- (66) Bienayme, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (24), 4255–4258.
- (67) Henkel, B.; Sax, M.; Dömling, A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (18), 3679–3682.

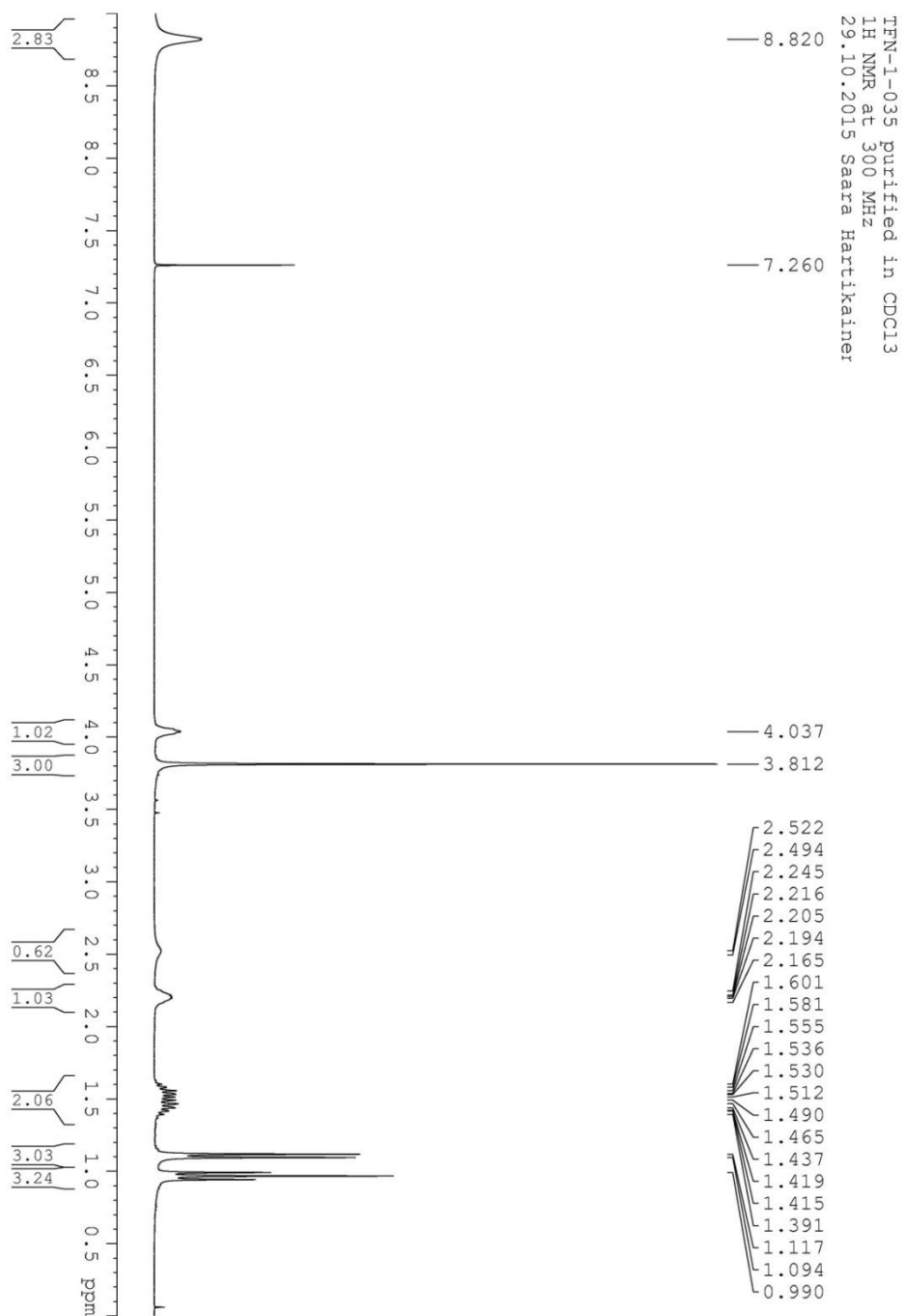
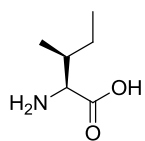
- (68) Sasse, F.; Sieinmez, H.; Heil, J.; Höfle, G.; Reichenbach, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2000**, *53* (9), 879–885.
- (69) Wang, R.; Tian, P.; Lin, G. *Chinese J. Chem.* **2013**, *31* (1), 40–48.
- (70) Socha, A. M.; Long, R. A.; Rowley, D. C. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (11), 1793–1795.
- (71) Liu, L.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Nowruzzi, B.; Permi, P.; Zhang, Y. Z.; Xhaard, H.; Fewer, D. P.; Sivonen, K. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (8), 1784–1790.
- (72) Tang, G.; Cheng, C.-H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (11-12), 1918–1922.
- (73) Nie, Y.; Da, Y.; Zheng, H.; Yang, X.; Jia, L.; Wen, C.; Liang, L.; Tian, J.; Chen, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (8), 2747–2761.
- (74) France, B.; Bruno, V.; Nicolas, I. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (2), 158–161.
- (75) Bapuso, M. Process for the preparation of orlistat, 2010.
- (76) Socha, A. M.; Tan, N. Y.; LaPlante, K. L.; Sello, J. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (20), 7193–7202.
- (77) Soeta, T.; Kojima, Y.; Ukaji, Y.; Inomata, K. *Org. Lett.* **2010**, *12* (19), 4341–4343.
- (78) Reaxys-search: “Passerini Reaction” www.reaxys.com (accessed Oct 10, 2014).
- (79) Bousquet, T.; Jida, M.; Soueidan, M.; Deprez-Poulain, R.; Agbossou-Niedercorn, F.; Pelinski, L. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (3), 306–308.
- (80) Pfeiffer, F. R.; Chambers, P. A.; Hilbert, E. E.; Woodward, P. W.; Ackerman, D. M. *J. Med. Chem.* **1984**, *27* (3), 325–341.
- (81) Soai, K.; Ookawa, A. *J. Org. Chem.* **1986**, *51* (21), 4000–4005.
- (82) Kumagai, N. Henkilökohtainen tiedonanto 7.9.2015.
- (83) Node, M.; Nishide, K.; Fuji, K.; Fujita, E. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (22), 4275–4277.
- (84) Aitali, M.; Allaoud, S.; Karim, A.; Meliet, C.; Mortreux, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11* (6), 1367–1374.
- (85) Christensen, S. H.; Olsen, E. P. K.; Rosenbaum, J.; Madsen, R. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (3), 938–945.

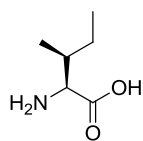
- (86) Bowers, M. M.; Carroll, P.; Joullie, M. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, No. 5, 857.
- (87) Wang, G.-J.; Lai, T.-C.; Chen, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39 (7), 611–617.

Liitteet

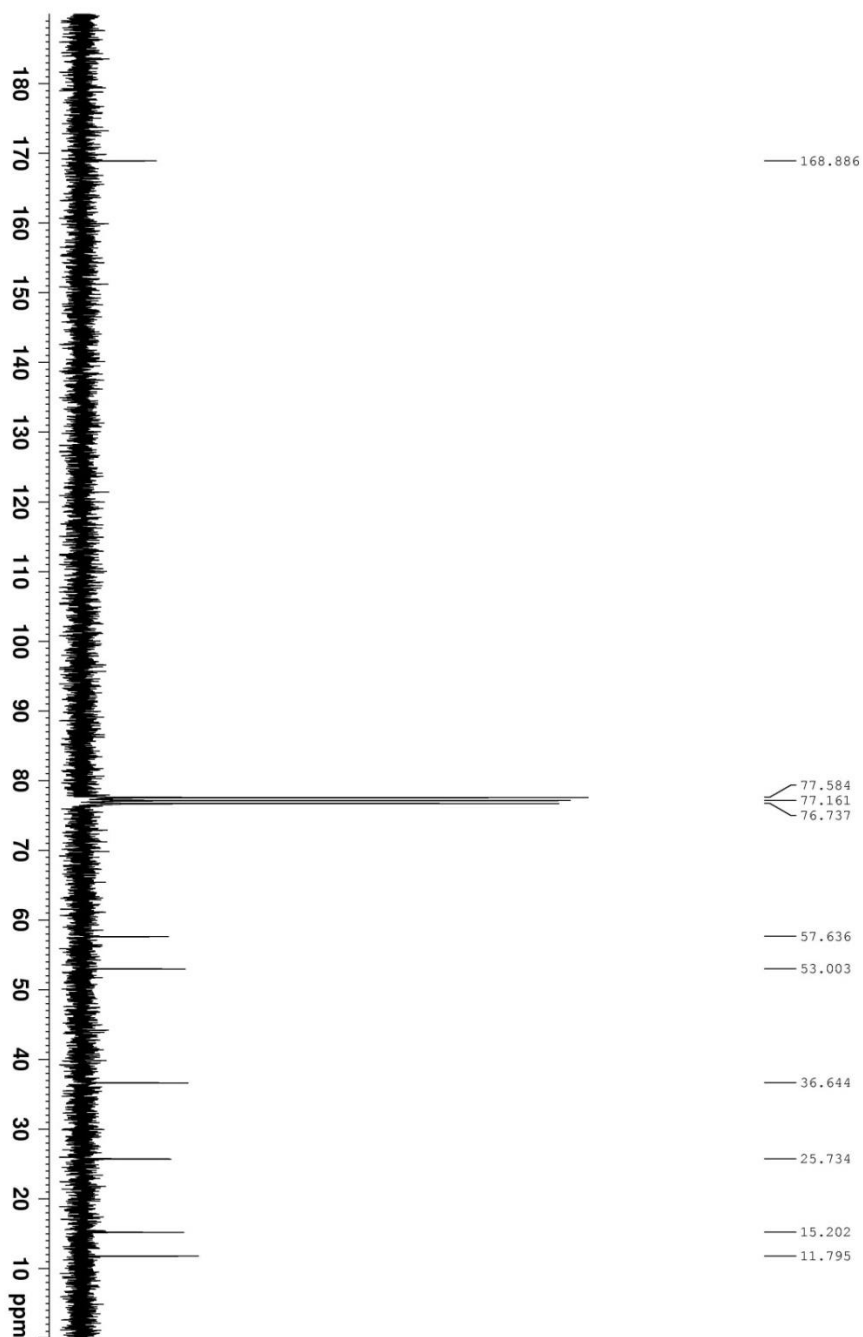


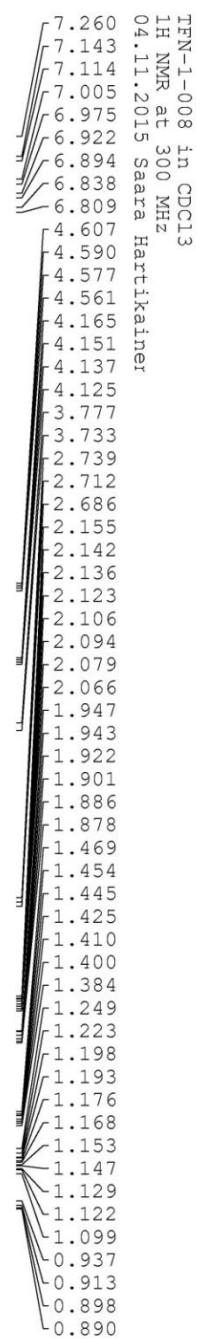
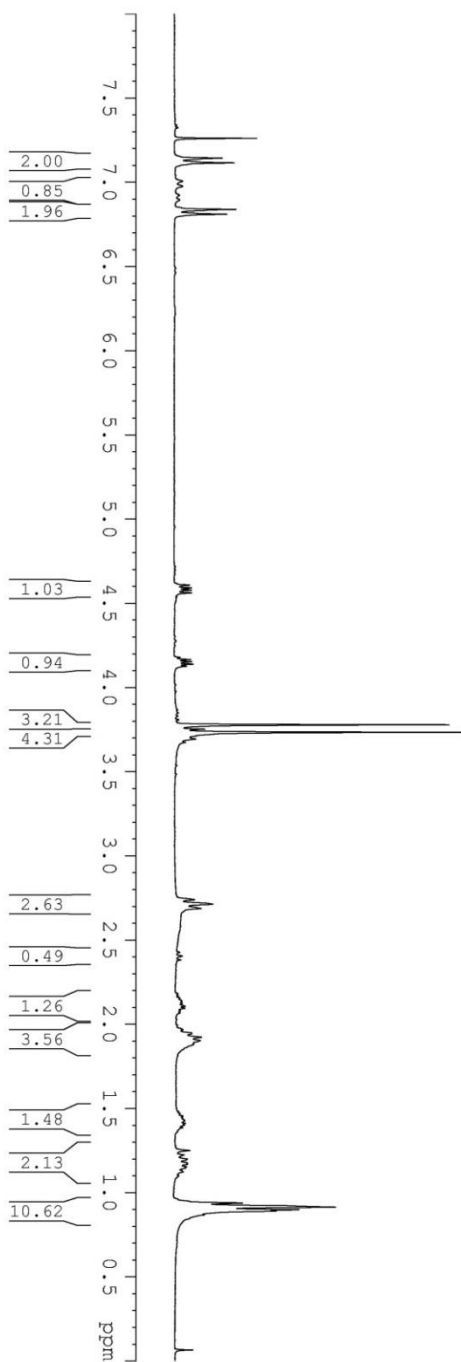
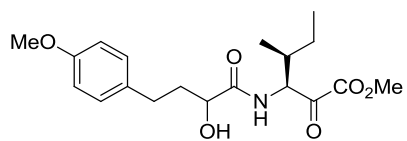


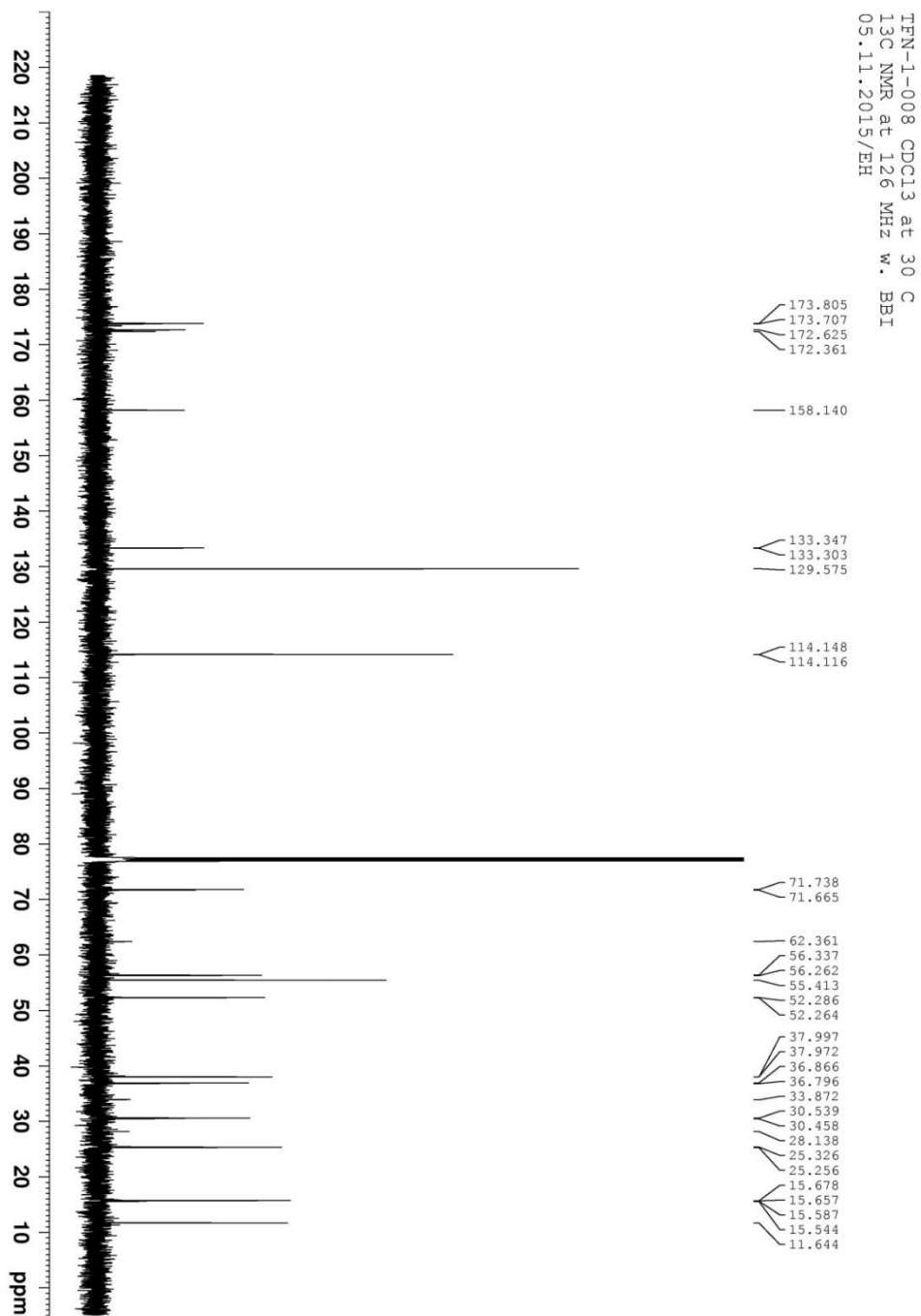
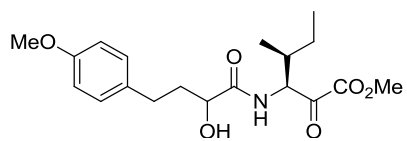


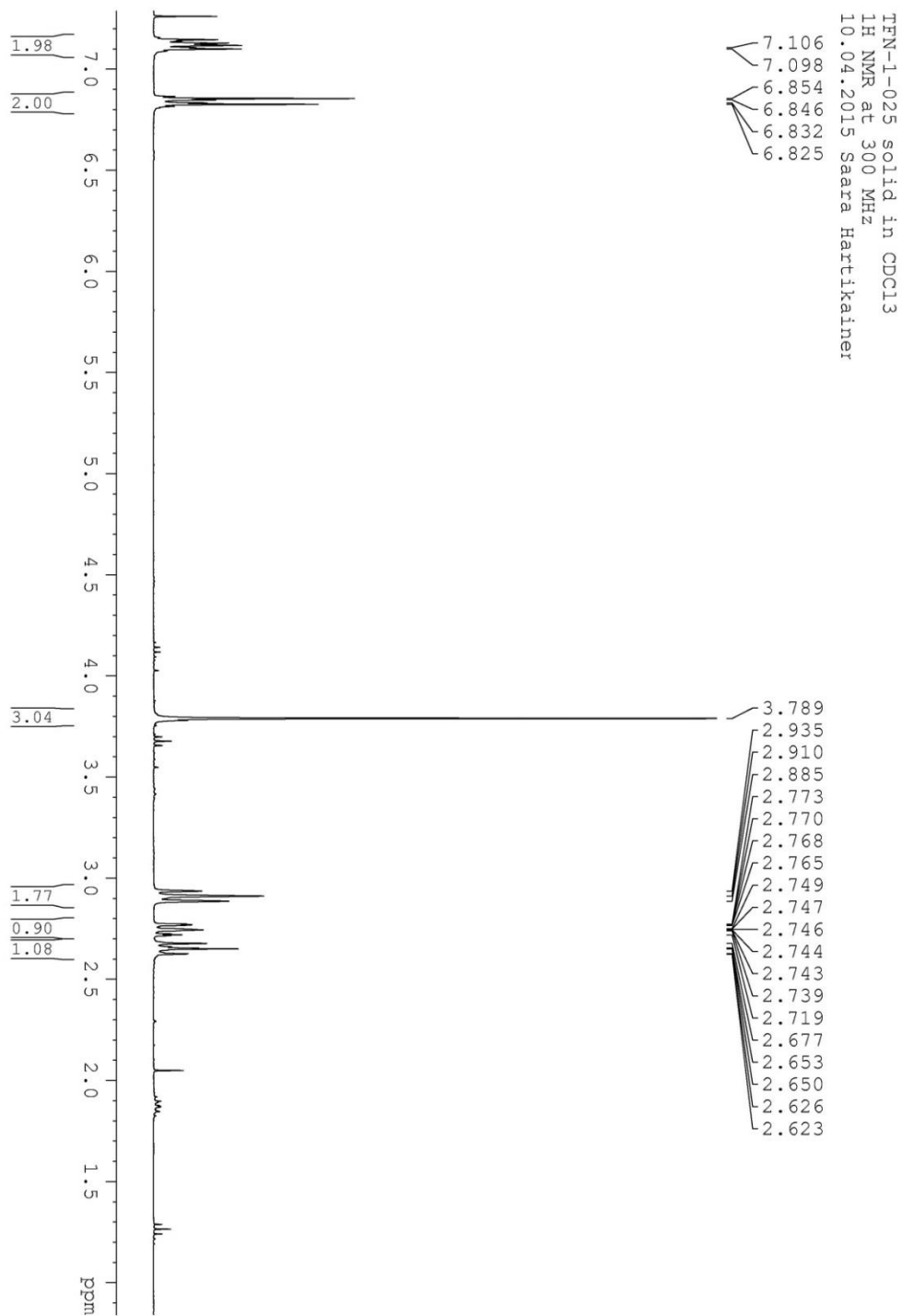
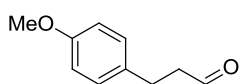


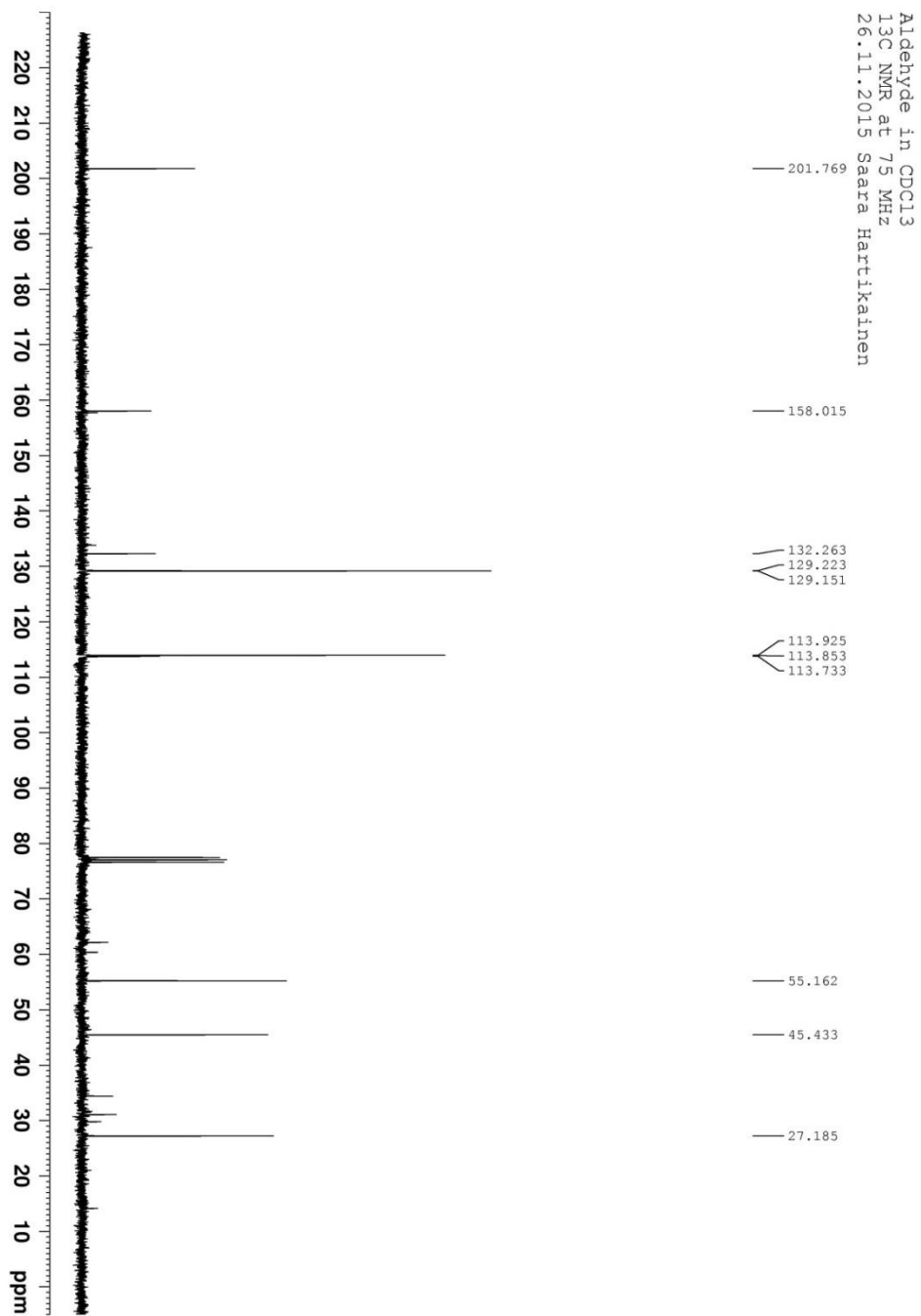
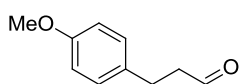
TFN-1-035 purified in CDCl₃
13C NMR at 75 MHz
29.10.2015 Saara Hartikainen

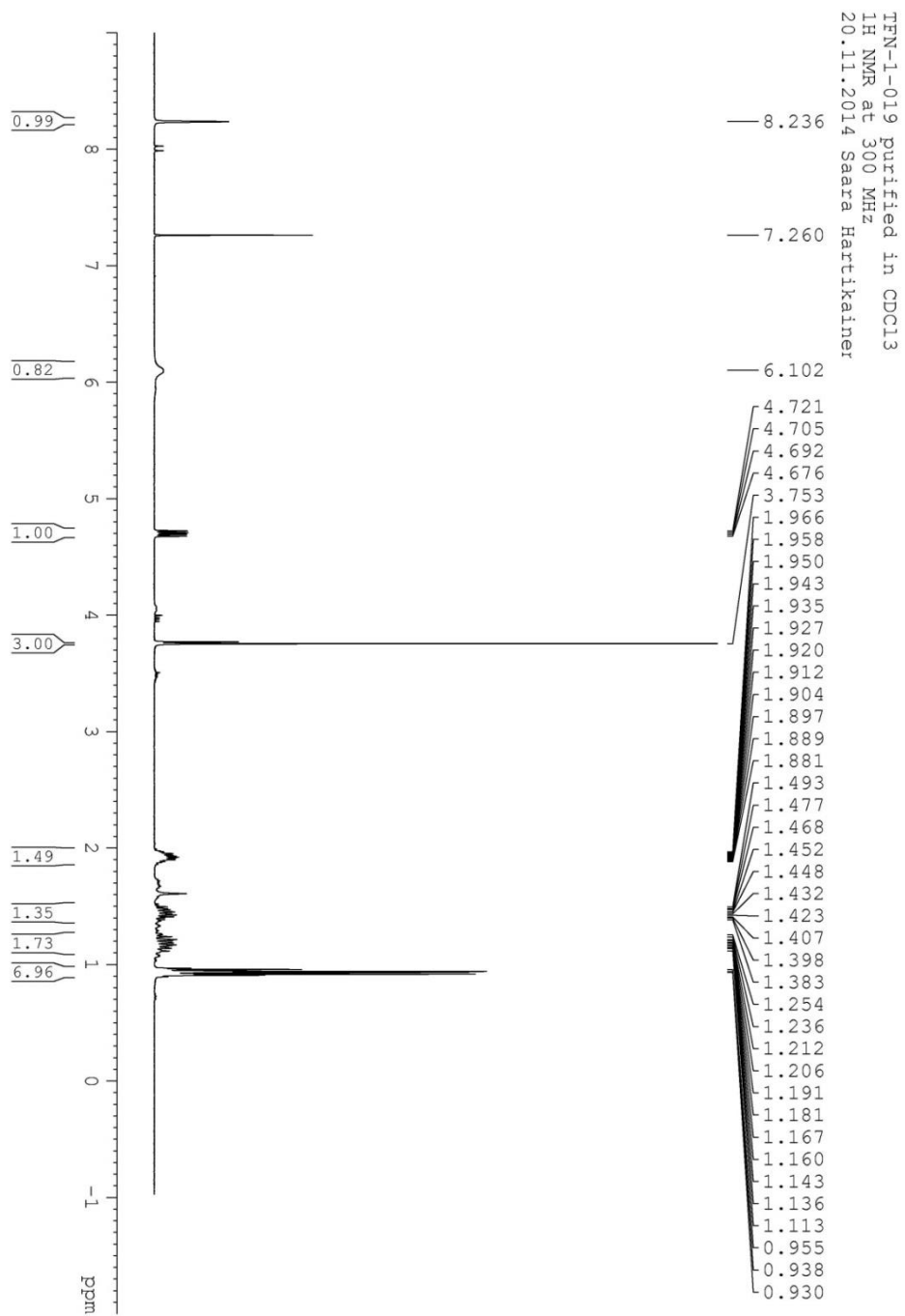
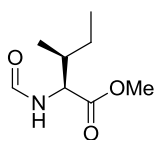


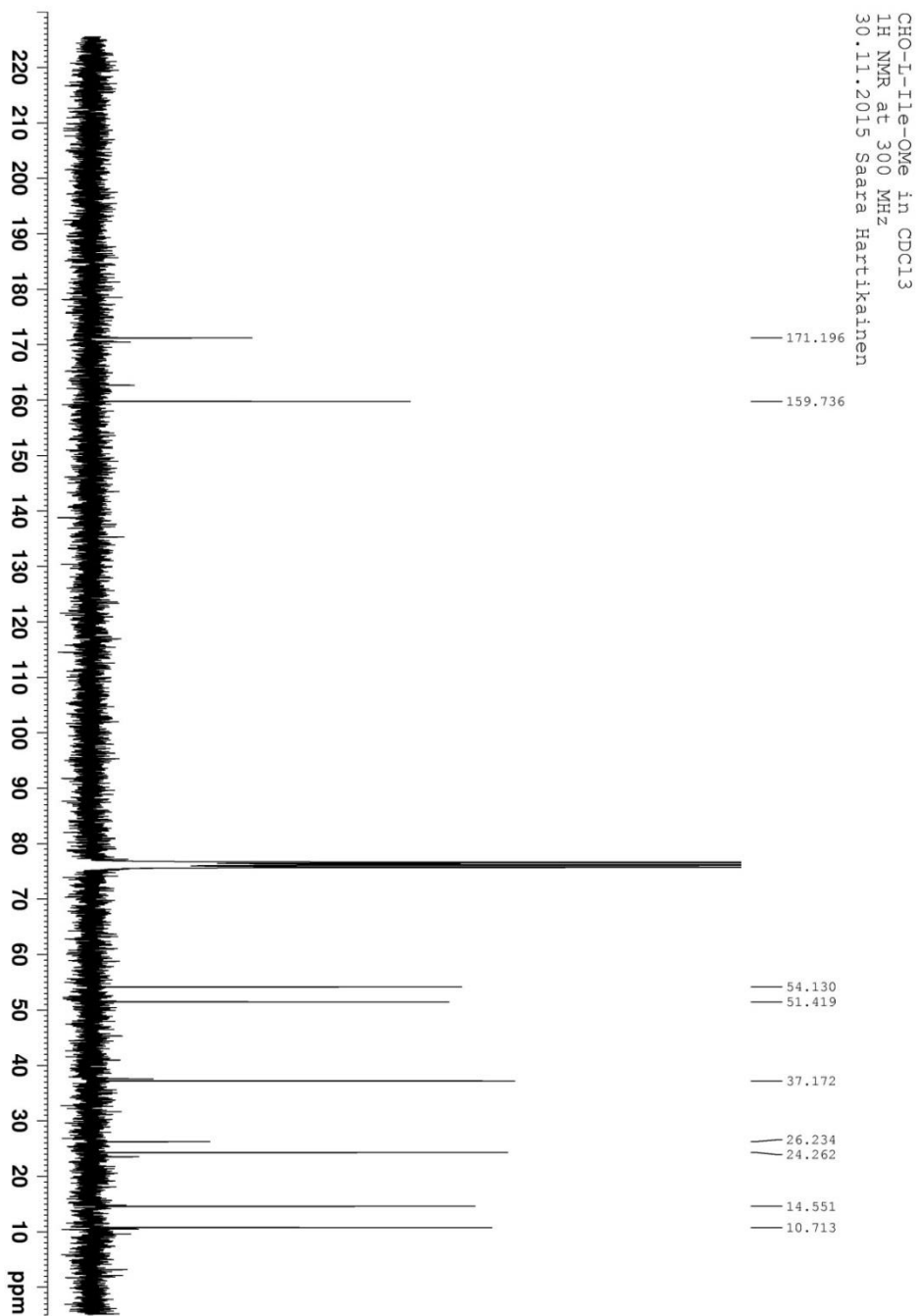
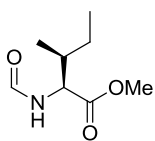


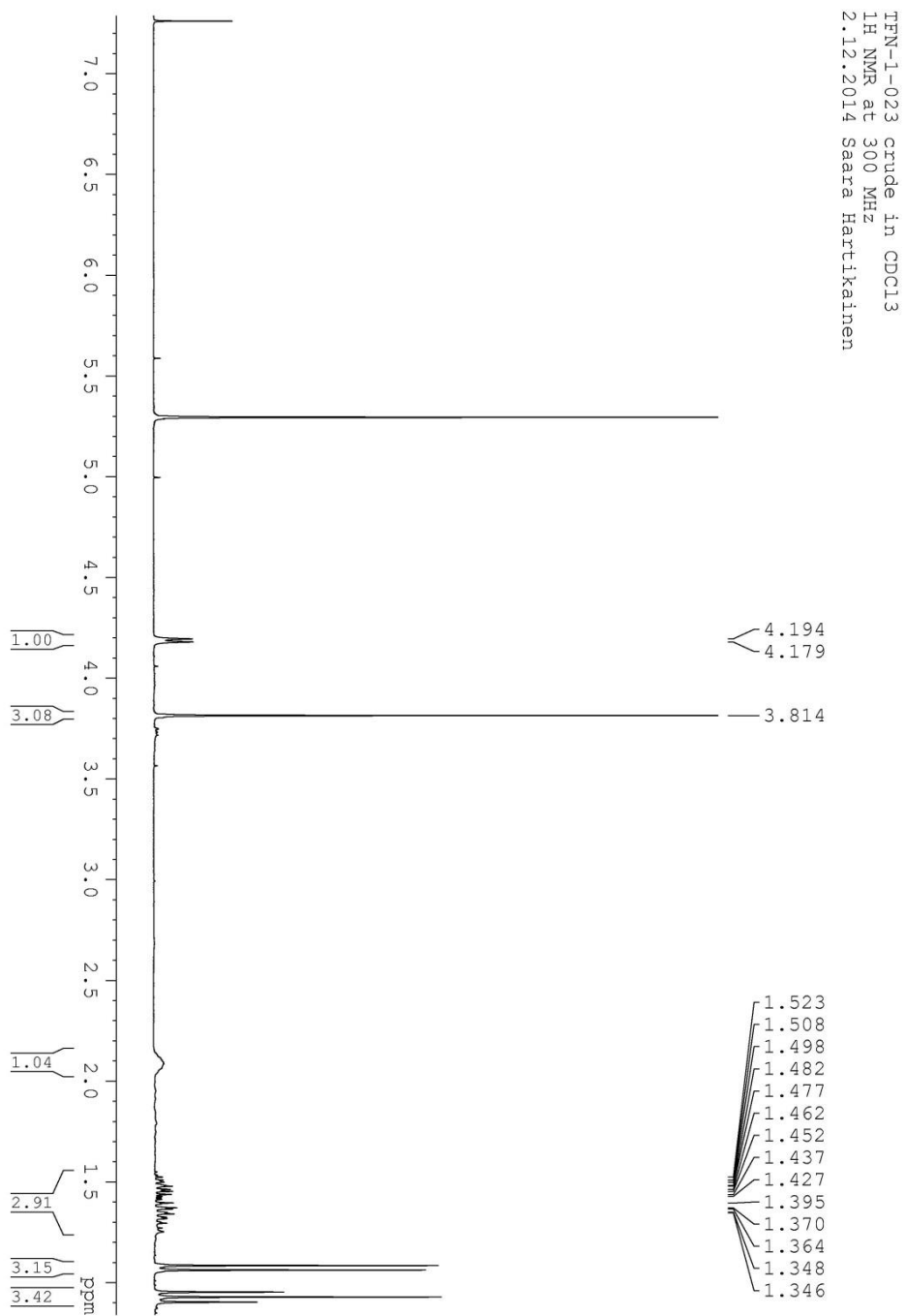
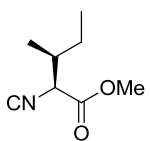


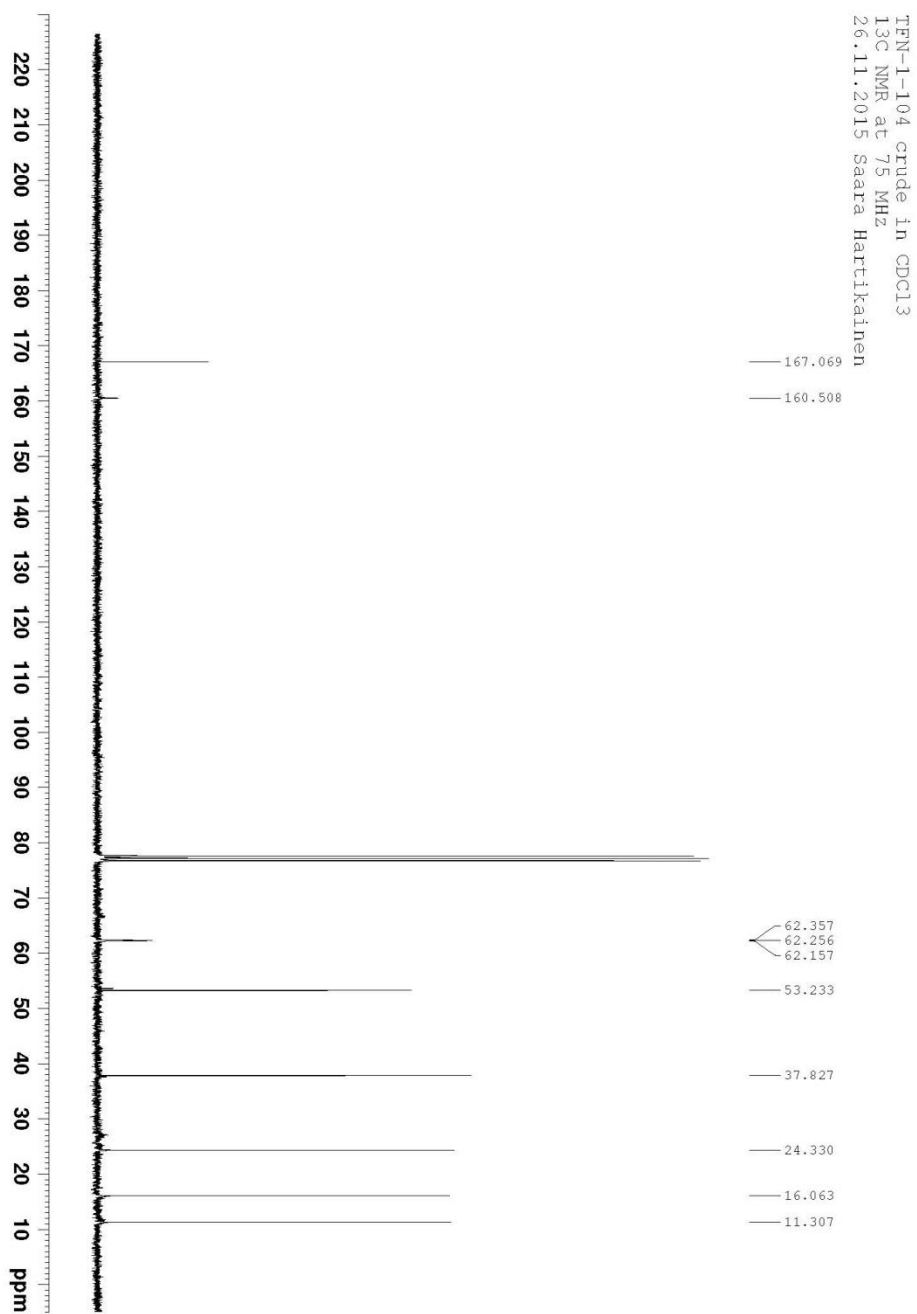
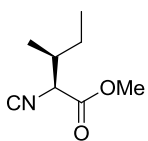


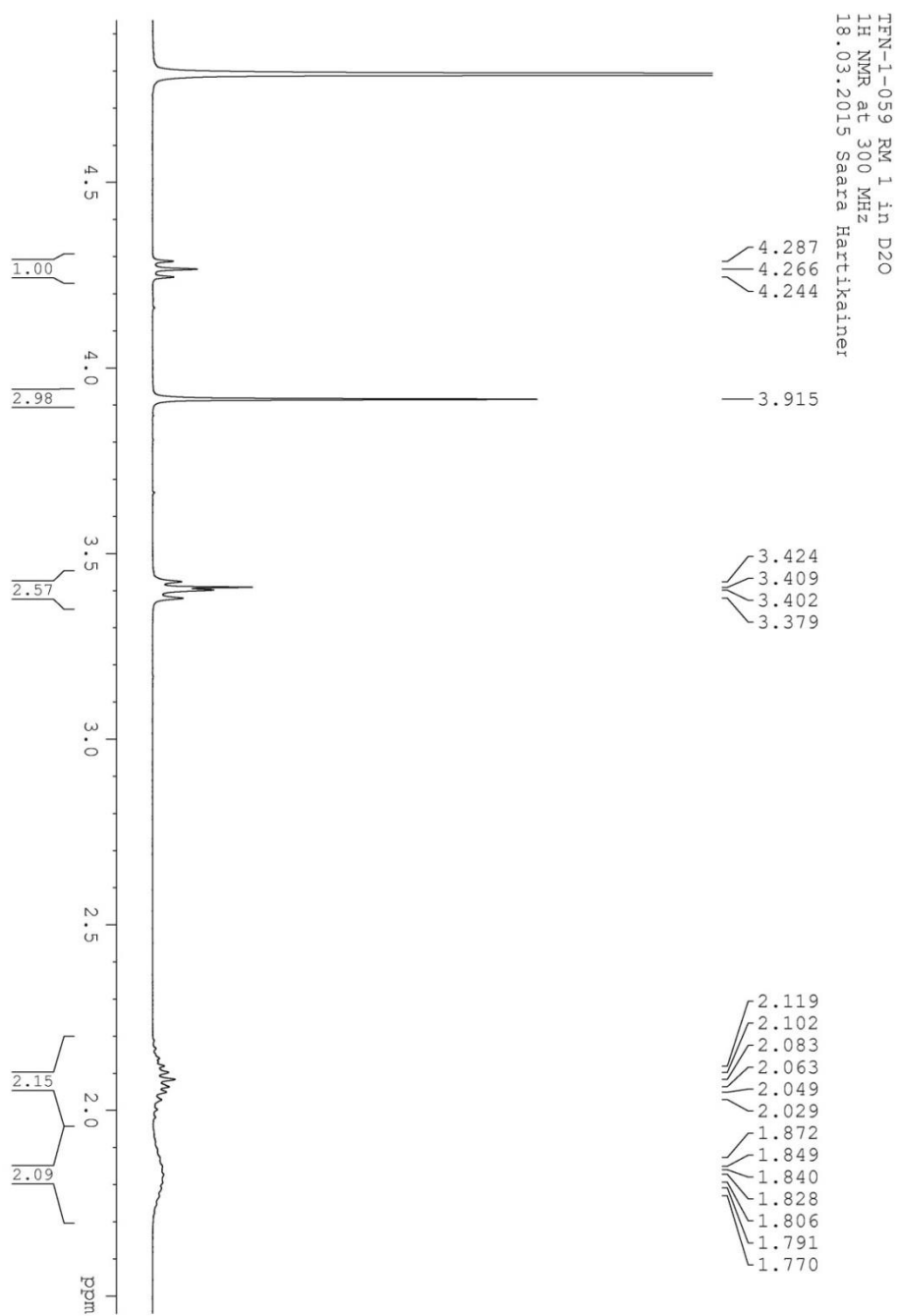
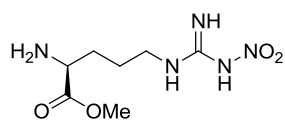


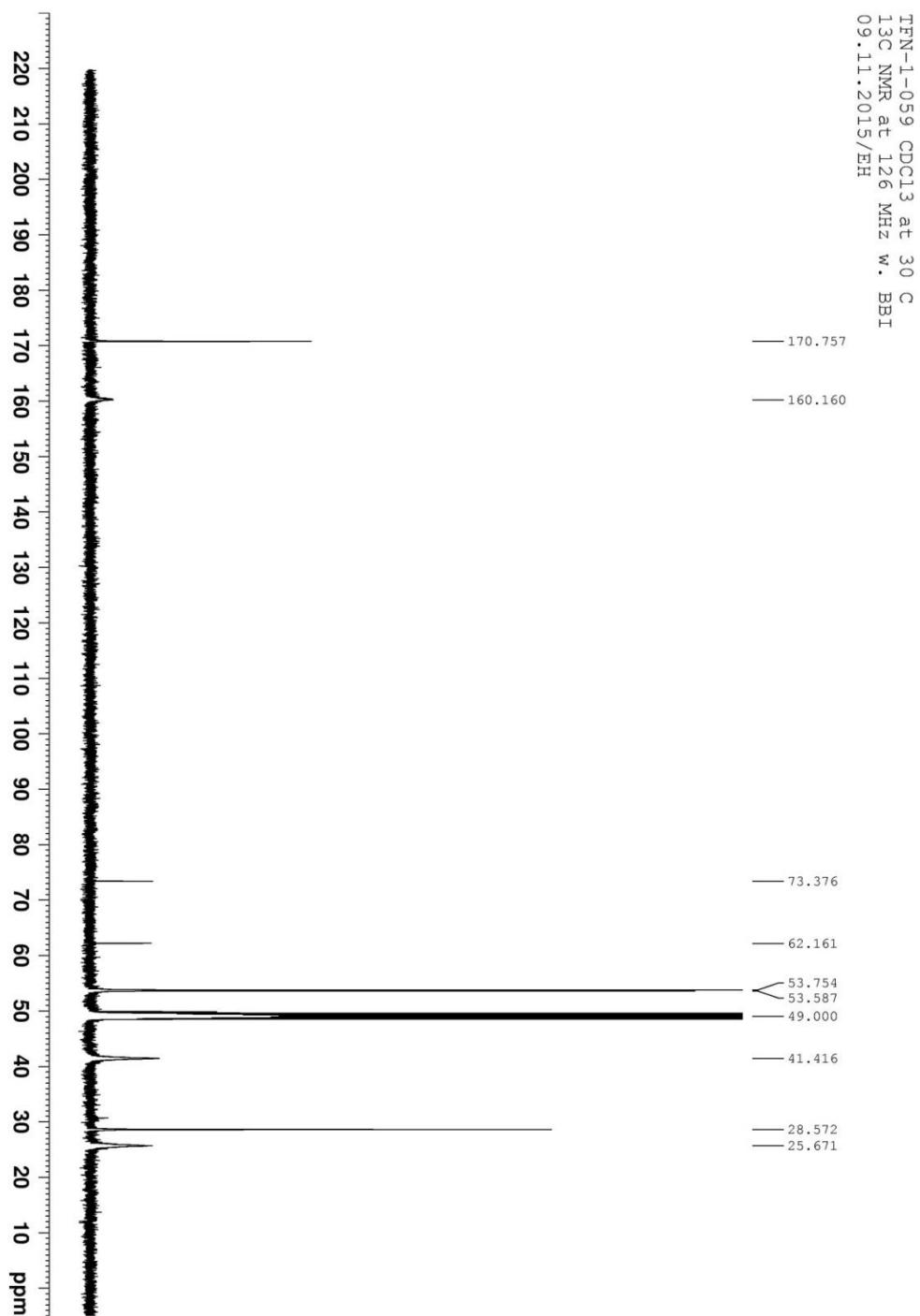
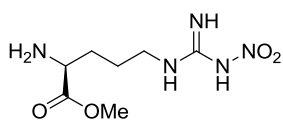


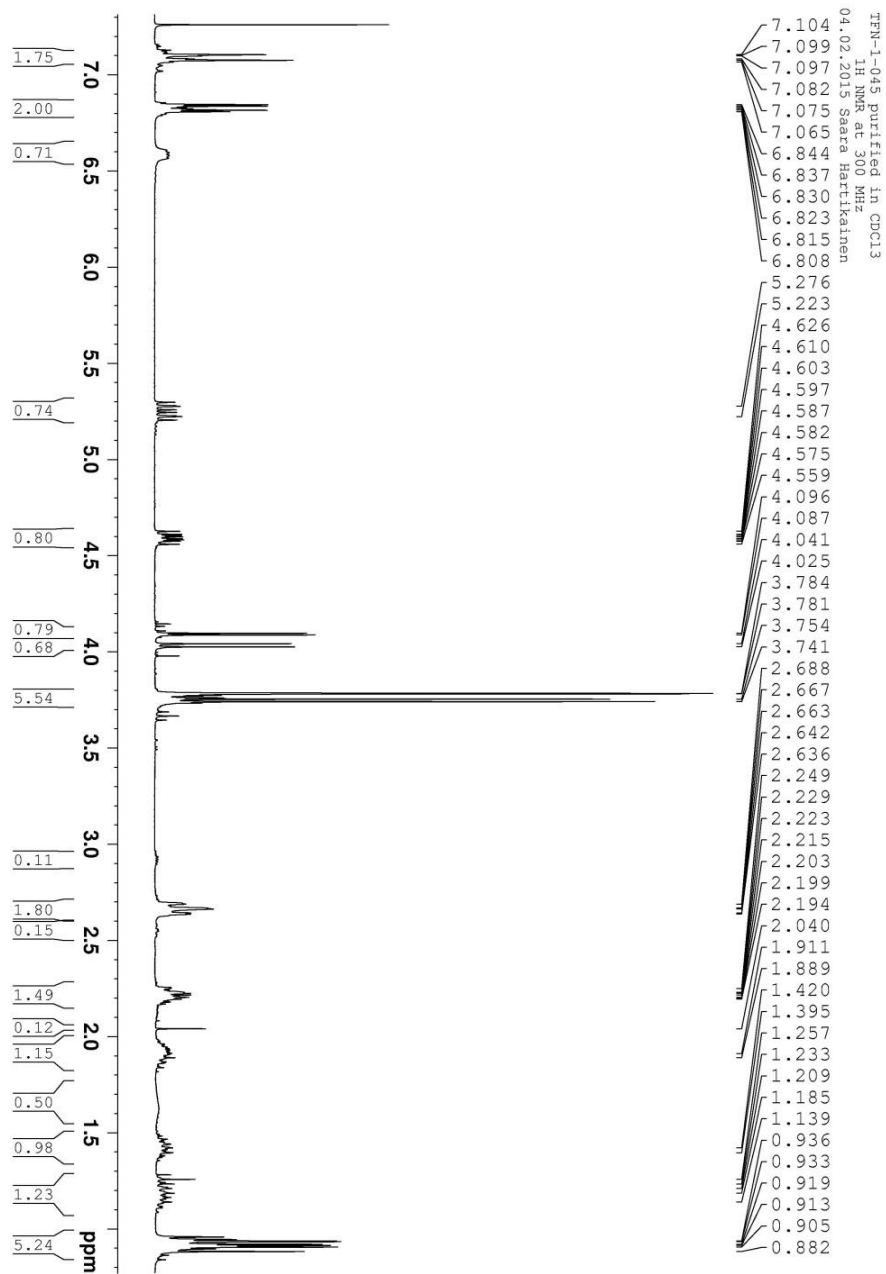
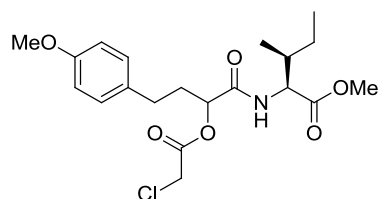


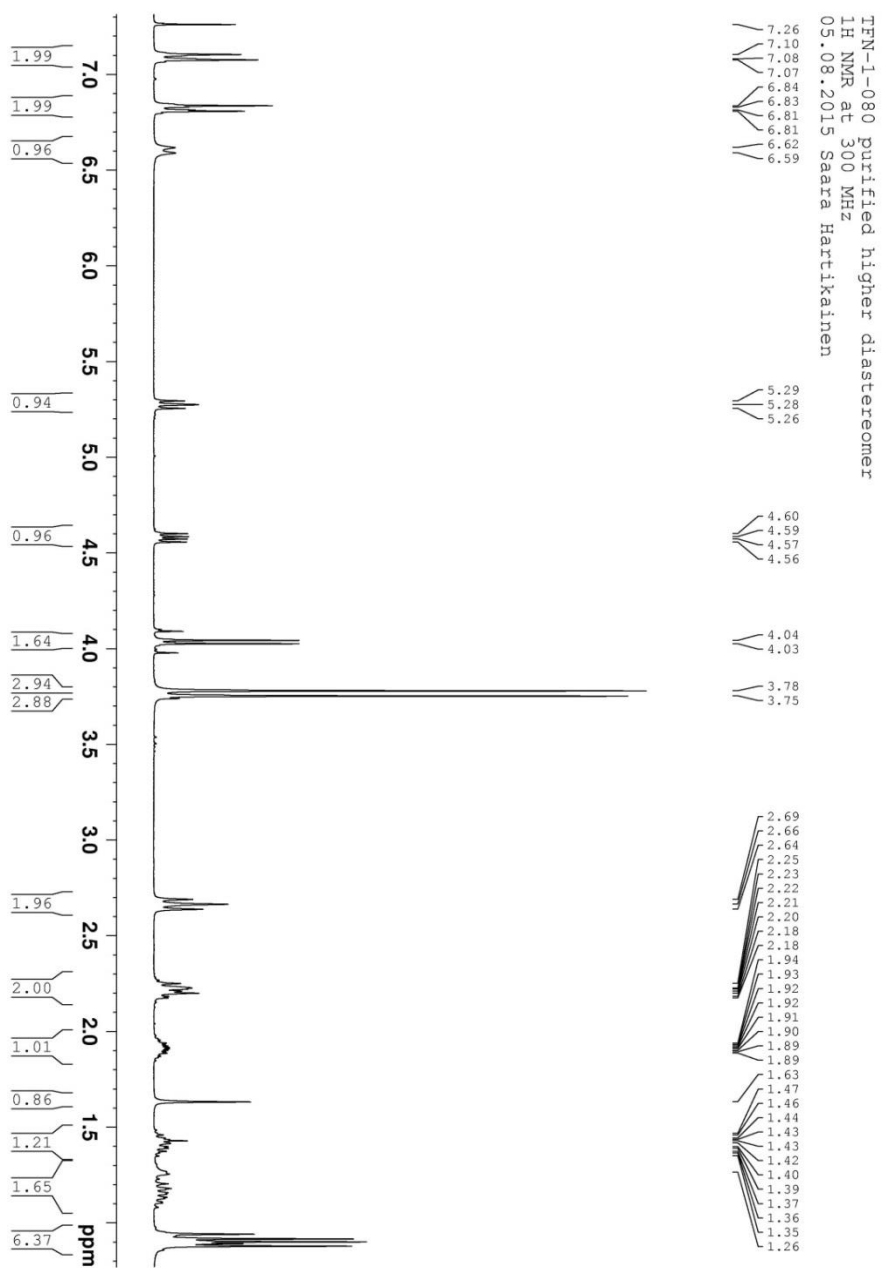
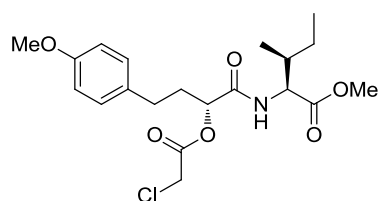


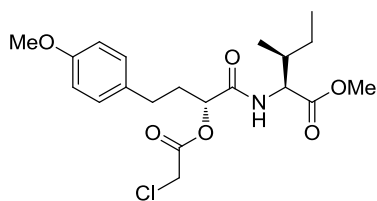




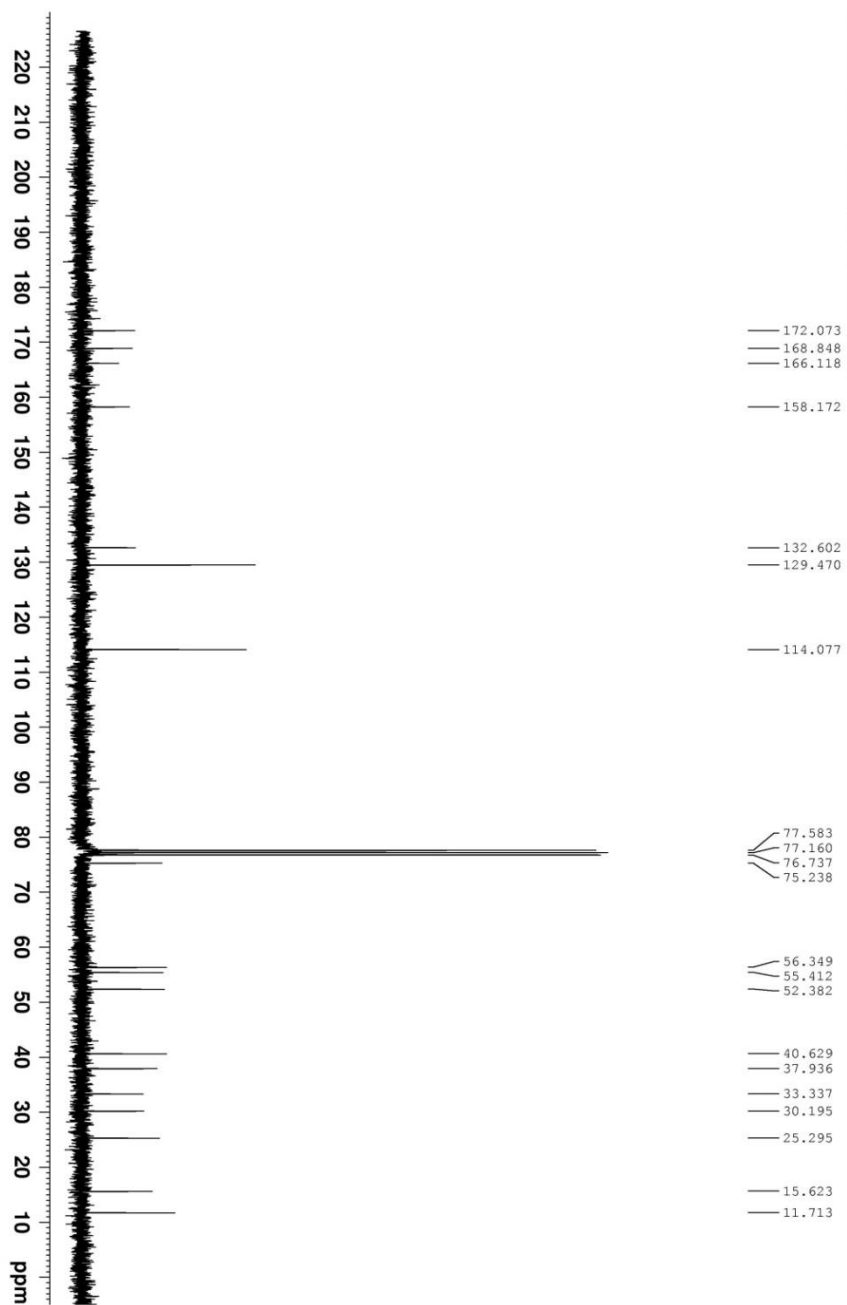


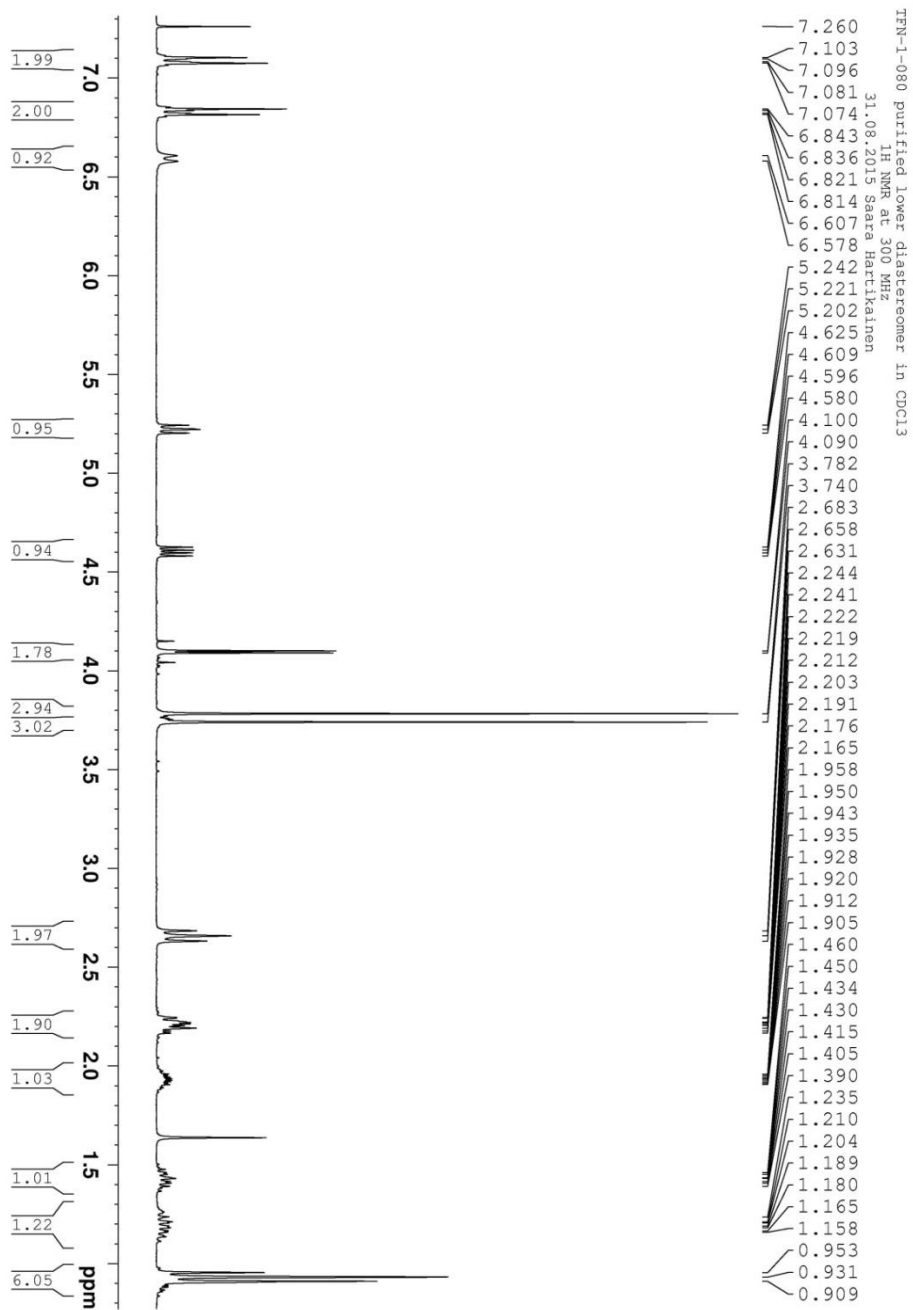
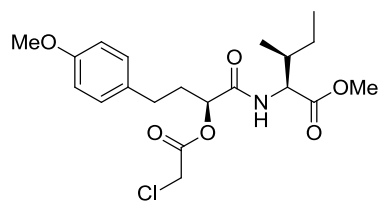


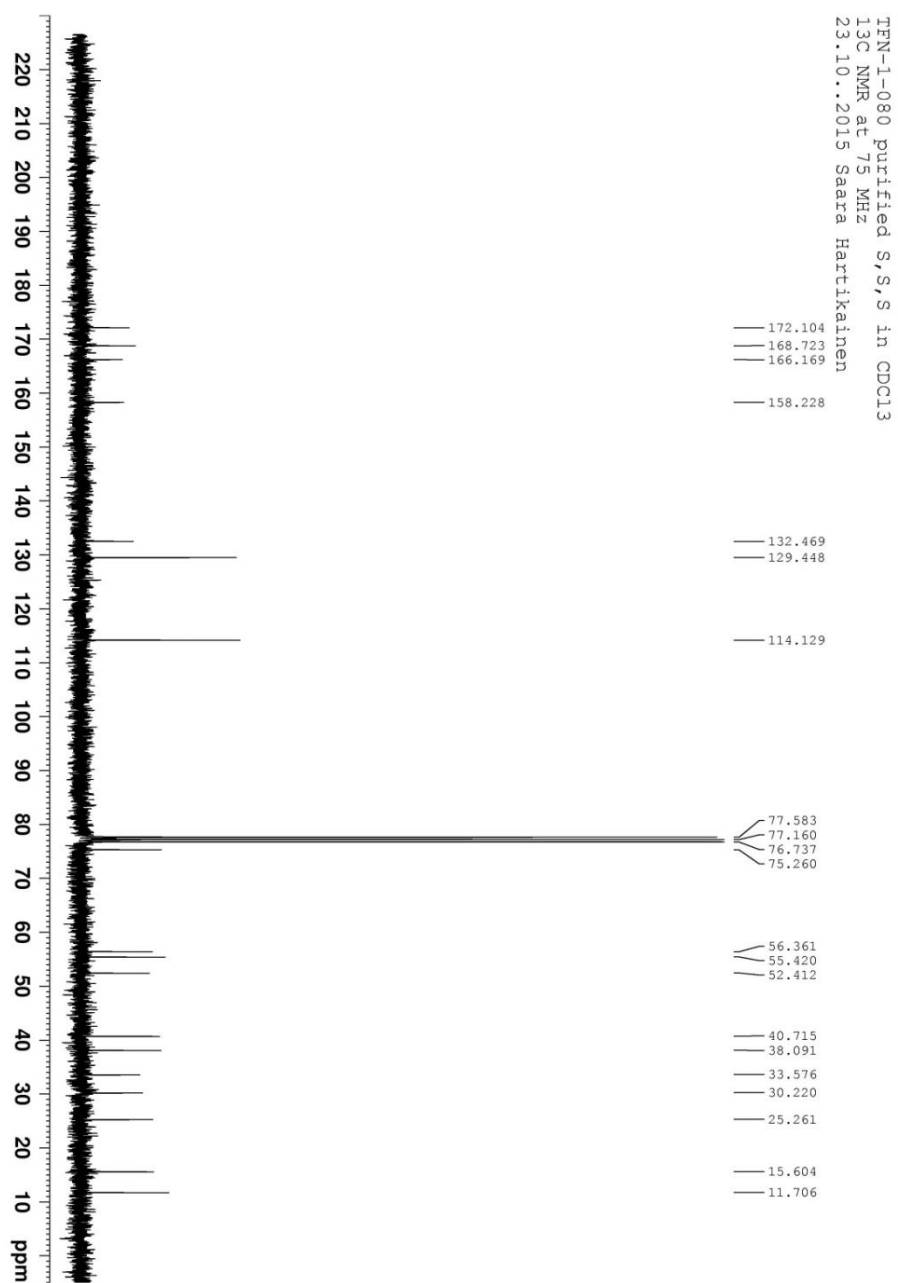
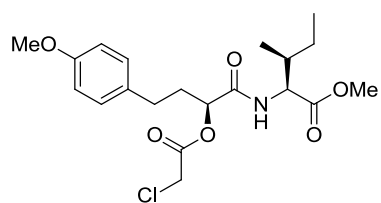




TFN-1-080 purified R,S,S in CDCl₃
13C NMR at 75 MHz
23.10.2015 Sara Hartikainen







Sample: TFN-080

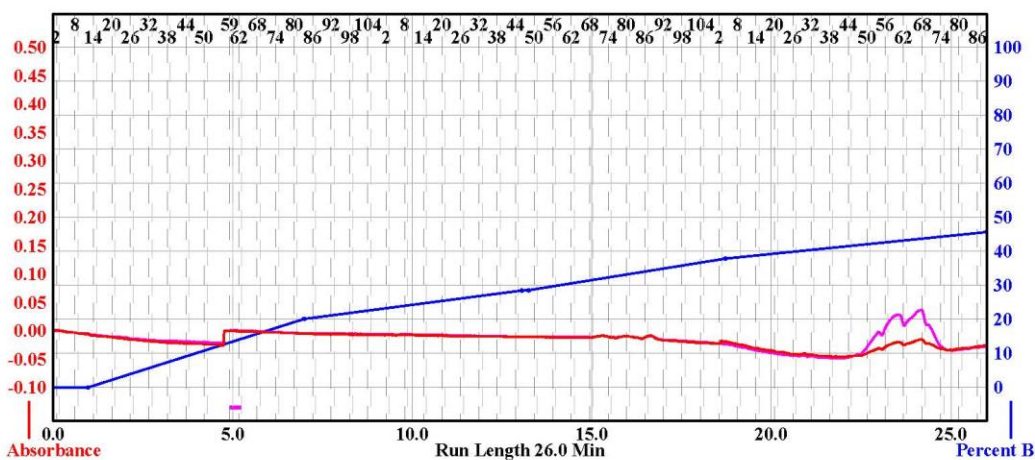
Rf 200

Wednesday 05 August 2015 12:44PM

RediSep Column: Silica 24g Gold
 SN: E041073849912 Lot: 2216383070Y
 Flow Rate: 35 ml/min
 Equilibration Volume: 121.0 ml
 Initial Waste: 0.0 ml
 Air Purge: 1.0 min
 Solvent: A1 hexane
 Solvent: B1 ethyl acetate

Peak Tube Volume: Max.
 Non-Peak Tube Volume: Max.
 Loading Type: Solid
 Wavelength 1 (red): 254nm
 Peak Width: 1 min
 Threshold: 0.20 AU
 Wavelength 2 (purple): 280nm

Run Notes:

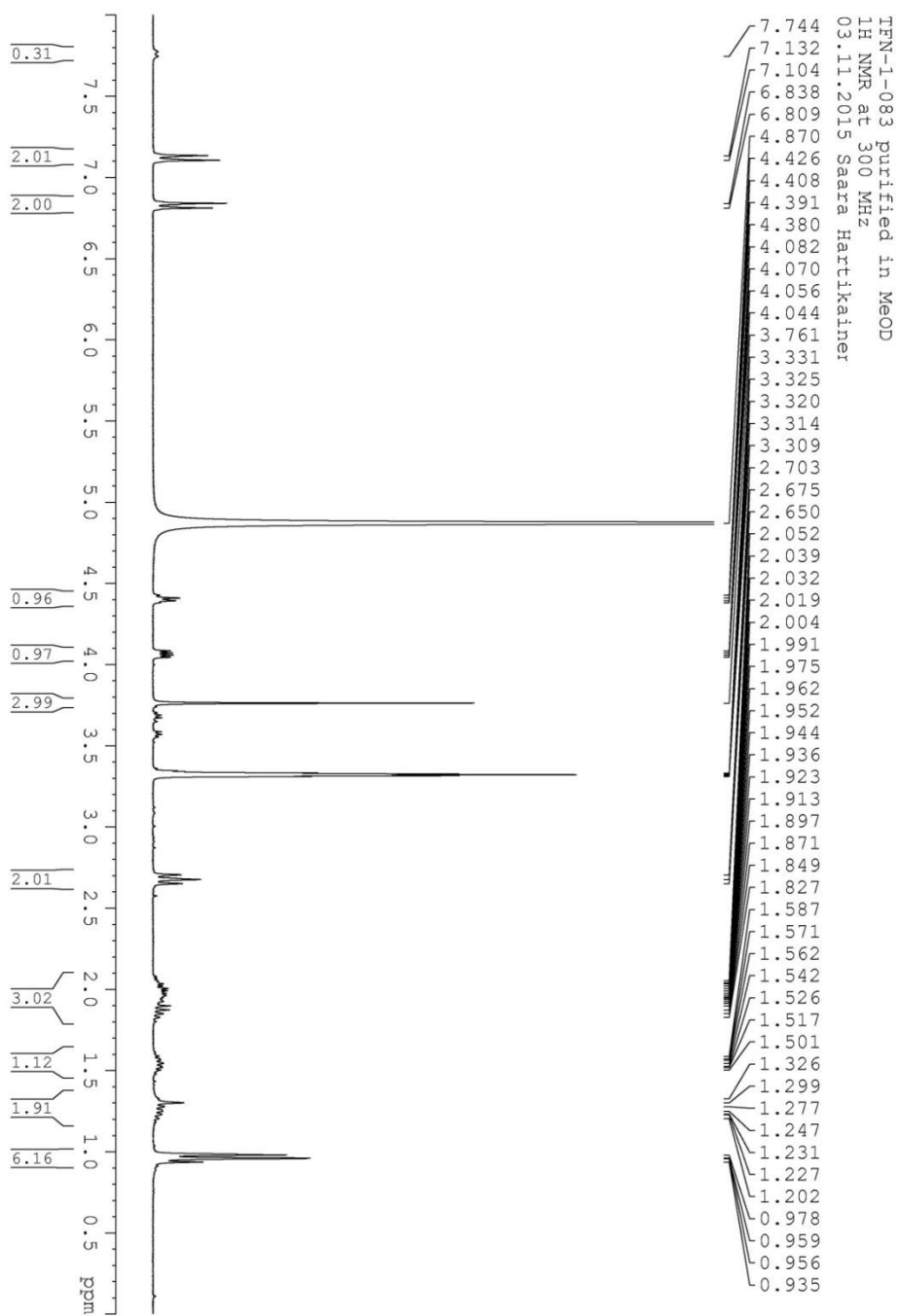
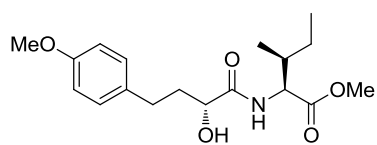


Rack A					Rack B					Peak #	Start Tube	End Tube
108	107	106	104	103	108	107	106	104	103	1	A:59	A:62
97	98	99	100	101	97	98	99	100	101			
86	85	84	83	82	86	85	84	83	82			
75	76	77	78	79	75	76	77	78	79			
64	63	62	61	60	64	63	62	61	60			
53	54	55	56	57	53	54	55	56	57			
42	41	40	39	38	42	41	40	39	38			
31	32	33	34	35	31	32	33	34	35			
20	21	22	23	24	20	21	22	23	24			
09	10	11	12	13	09	10	11	12	13			
08	07	06	05	04	08	07	06	05	04			
07	08	09	10	11	07	08	09	10	11			
06	05	04	03	02	06	05	04	03	02			
05	06	07	08	09	05	06	07	08	09			
04	03	02	01	00	04	03	02	01	00			
03	04	05	06	07	03	04	05	06	07			
02	01	00	99	98	02	01	00	99	98			
01	02	03	04	05	01	02	03	04	05			

Duration	%B	Solvent A	Solvent B
0.0	0.0	A1 hexane	B1 ethyl acetate
1.0	0.0	A1 hexane	B1 ethyl acetate
6.0	20.2	A1 hexane	B1 ethyl acetate
6.1	28.5	A1 hexane	B1 ethyl acetate
0.2	28.6	A1 hexane	B1 ethyl acetate
5.5	37.9	A1 hexane	B1 ethyl acetate
7.3	45.7	A1 hexane	B1 ethyl acetate

13 mm x 100 mm Tubes

13 mm x 100 mm Tubes



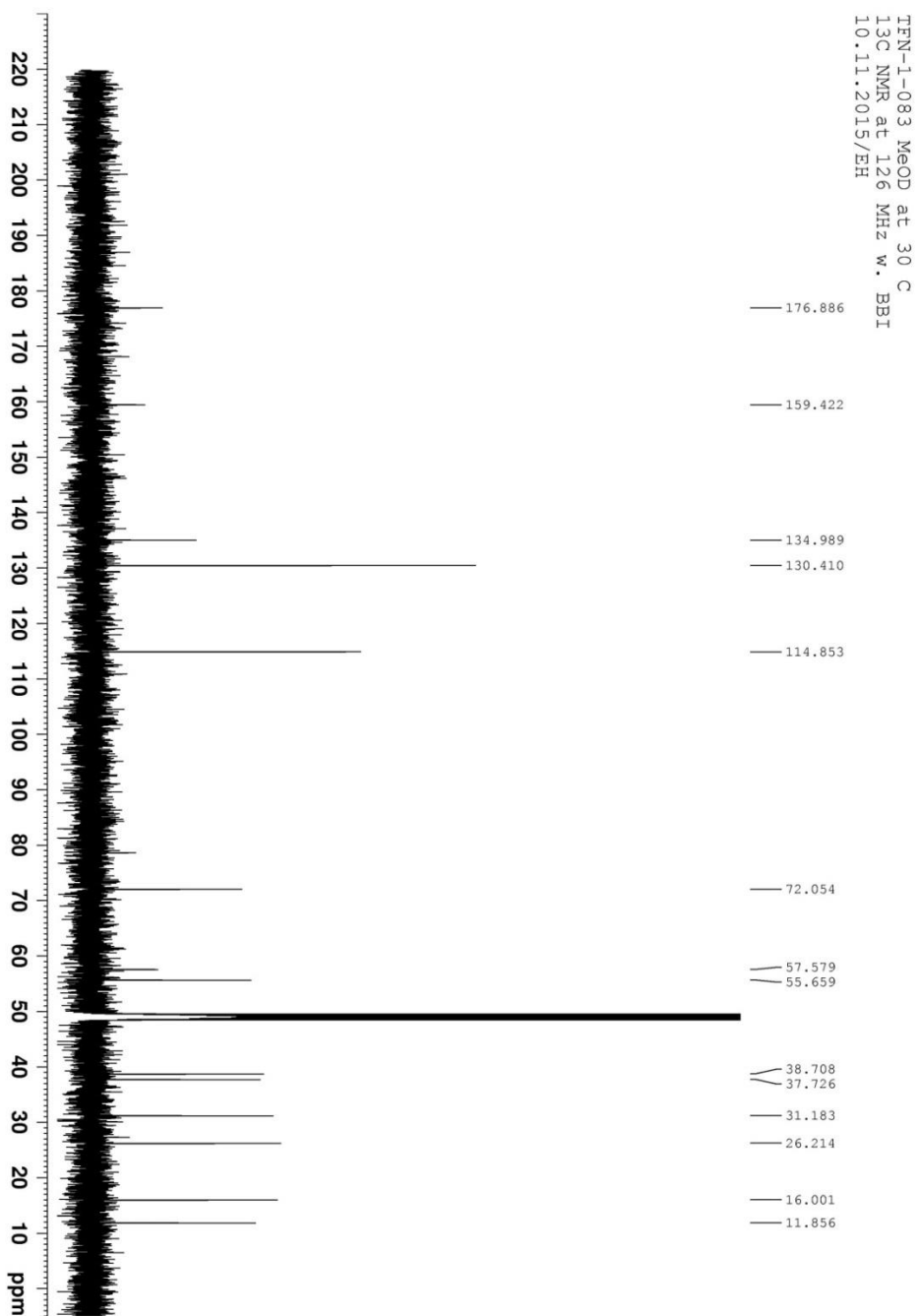
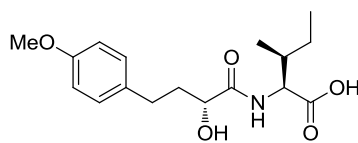
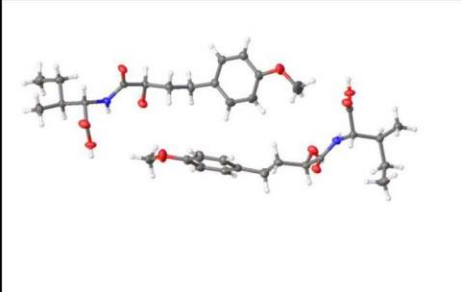


Table 1. Crystal Data and Details of Data Collection

Name of the Compound		Structure Solved by	
khe013Mo-exp_1156_raf2		Kaisa Helttunen	
Structural Formula		Chemical Formula	
		C ₁₇ H ₂₅ NO ₅	
		Cell Constants with Standard Deviations	
		a [Å] = 10.70349(18) b [Å] = 13.6196(2) c [Å] = 24.1228(4) α [°] = 90 β [°] = 90 γ [°] = 90 V [Å ³] = 3516.54(11) T [°C] = -153.0	
Molecular weight	Crystal Colour	Crystal Size	
$M_r = 323.38 \text{ g mol}^{-1}$	colourless	0.20 x 0.15 x 0.05 mm	
Molecules in Unit Cell	Calculated Density	F(000) = 1392 e	
$Z = 8$	$D_{\text{calc}} = 1.222 \text{ Mg/m}^3$		
Crystal System	Space Group	Refl. Used for Cell Parameters	
orthorhombic	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	CCD measurement	
Wavelength	Monochromator / Filter	Oscillation Angle and Exposure Time	
$\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$	mirror	1.0° / 120 s	
Absorption Coefficient	Method of Absorption Correction	Absorption Correction	
$\mu = 0.089 \text{ mm}^{-1}$	Abspack	min: 49.4 % max: 100.0 %	
Reflections Collected	No. of Independent Reflections	Internal Consistency	
39275	8364	$R_{\text{av}} = 0.0497$	
No. of Observed Reflections	No. of Refined Parameters	Detector to Crystal Distance	
6833	441	$D_x = 50 \text{ mm}$	
R	R_w^2	Error of Fit	
$R = 0.0442$	$R_w^2 = 0.0964$	1.062	
Final Maximum Shift/Error	Final Difference Fourier	Flack parameter	
0.00 Å	0.22 and -0.23 e.Å ⁻³	-	
Isotropic Extinction Coefficient	Remarks		
-	Agilent SN-Mo Sample from Saara Hartikainen, crystallized from EtOAc with hexane diffusion. C10 chirality (R) deduced from known chirality of C12 (S).		

