

γ -kiraalisen PNA:n synteesi

Sanna Parkkali
Pro Gradu -tutkielma
Bio-organinen kemia
Kemian laitos
Turun yliopisto
Huhtikuu 2022

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin
Originality Check -järjestelmällä.*

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

PARKKALI SANNA: γ -kiraalisen PNA:n synteesi

Pro Gradu -tutkielma, (30 sivua + 27 liitettä)

Huhtikuu 2022

PNA (*peptide nucleic acid*, peptidinukleiinihappo) on synteettinen DNA:n ja RNA:n johdannainen, jossa sokerifosfaattirunko on korvattu varauksettomalla peptidirungolla. PNA:lla on ominaisuuksia, jotka poikkeavat negatiivisesti varautuneista oligonukleotideista. Näitä ovat esimerkiksi entsymaattinen pysyvyys, huomattavan korkea sitoutumisaffiniteetti kohde-DNA:han ja RNA:han. Modifioimattomalla PNA:illa on tiettyjä rajoituksia, kuten heikko vesiliukoisuus ja taipumus aggregoitumiseen.

Yksi vaihtoehto PNA:n ominaisuuksien parantamiseen on γ -kiraalisten osien lisääminen PNA-monomeereihin. Nämä γ -asemaan lisätyt funktionalisuudet parantavat esimerkiksi PNA:n vesiliukoisuutta, soluihin ottoa, sitoutumisaffiniteettia, PNA-DNA- ja PNA-RNA-dupleksien stabiilisuutta ja jopa sekvenssispesifisyyttä. γ -PNA:iden parantuneet sitoutumisominaisuudet johtuvat osittain niiden pre-organisoiduudesta kierteisestä rakenteesta. Ominaisuuksien parantumiseen vaikuttaa myös millainen funktionalisuus γ -asemaan liitetään.

Tässä tutkielmassa kerrotaan kolmen erilaisen γ -kiraalisen PNA-monomeerin synteeseistä. Lähtöaineena käytettiin L-lysiiniä. Nukleoemäksenä näissä monomeereissä on tymiini. Nämä kolme monomeeriä eroavat toisistaan γ -aseman funktionalisuuden perusteella. Yhdessä monomeerissä on aminoryhmä, toisessa guanidiiniryhmä ja kolmannessa atsidiryhmä. Myös monomeerien enantiopuhtaus tutkittiin. Rakenneyksikköjen soveltuvuutta PNA:n syntetisoimiseksi ei työn puitteissa kuitenkaan ehditty valmistamaan.

Asiasanat: PNA, γ -PNA, kiraalisuus, γ -kiraalinen, synteesi

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
1.1. PNA.....	1
1.2. γ -kiraallinen PNA	3
1.2.1. Erilaisia γ -kiraalisia PNA:ita	5
1.2.2. γ -PNA-sovellukset	10
1.3. Työn tarkoitus	11
2. Tulokset ja niiden tarkastelu	12
2.1. PNA-monomeerien synteesi.....	12
2.1.1. (R)-isomeerin synteesi	15
2.2. Enantiopuhtaus	16
2.3. PNA:n synteesi	16
3. Kokeellinen osa	17
3.1. PNA-rakenneyksiköiden synteesi	17
3.1.1. γ -kiraalisten PNA-monomeerien synteesi	17
3.1.2 (R)-isomeerin valmistus	23
3.2. Enantiopuhtauden määrittäminen.....	24
4. Yhteenveto	24
5. Viiteluettelo	25
6. Liitteet	30

Lyhenteet

PNA = peptidinukleiinihappo

DNA = deoksiribonukleiinihappo

RNA = ribonukleiinihappo

TFPNA = *triplex forming PNA* eli tripleksin muodostava PNA

miniPEG = dietyylyglykoli

G-clamp = 9-(2-guanidinoetoksi)fenoksatsiini

Fmoc = fluorenyylimetyloksikarbonyyli-suojaryhmä

Boc = *tert*-butyloksikarbonyyli-suojaryhmä

DMF = dimetyyliformamidi

BOP = bentsotriatsol-1-yylioksitris(dimetyyliamino)fosfoniumheksafluorofosfaatti

DIEA = *N,N*-di-isopropyylietyyliamiini

THF = tetrahydrofuraani

LiAlH₄ = litiumalumiinihydridi

NaHSO₄ = natriumvetysulfaatti

AcOH = etikkahappo

MeOH = metanoli

NaBH₃CN = natriumsyanoboorihydridi

All = allyyli

Pd(PPh₃)₄ = tetrakis(trifenyylifosfiini)palladium

PhSiH₃ = fenyylisilaani

TFA = trifluoretikkahappo

DCM = dikloorimetaani

TEA = trietyyliamiini

K₂CO₃ = kaliumkarbonaatti

CuSO₄ = kuparisulfaatti

TfN₃ = trifluorimetaanisulfonyyliatsidi

HPLC = high performance liquid chromatography eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia

NMR = nuclear magnetic resonance eli ydinmagneettinen resonanssi

TLC = thin layer chromatography eli ohutkerroskromatografia

KHSO₄ = kaliumvetysulfaatti

LiCl = litiumkloridi

NaCl = natriumkloridi

NaHCO_3 = natriumvetykarbonaatti

Na_2SO_4 = natriumsulfaatti

CDCl_3 = deuteroitu kloroformi

KH_2PO_4 = kaliumdivetyfosfaatti

ESI⁺-MS = electrospray ionization mass spectrometry eli sähkösumutus-ionisaatio massaspektrometri

MeCN = asetonitriili

H_2O = vesi

DMSO = dimetyylisulfoksidi

NaN_3 = natriumatsidi

Tf_2O = trifluorimetaanisulfonihappoanhydridi

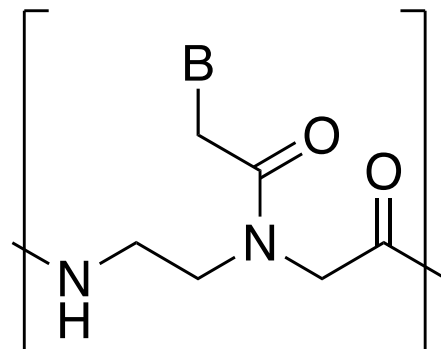
1. Johdanto

1.1. PNA

Peptidinukleiinihapot (PNA, *peptide nucleic acid*) (kuva 1) ovat synteettisiä nukleiinihappojen johdannaisia. Niissä on sokerifosfaattirungon sijasta peptidirunko, joka koostuu *N*-(2-aminoetyyli)glysiini-yksiköistä.^{1,2} Nukleoemäket ovat kiinni tässä rungossa metyleenikarbonyyliryhmän välityksellä. Ne on suunniteltu sekvenssispesifiseksi sitoutumaan joko DNA:han tai RNA:han Watson-Crick- ja Hoogsteen-emäspariutumisella samalla tavalla kuin DNA ja RNA sitoutuvat,^{1,3,4} mutta PNA:lla on havaittu olevan korkeampi sitoutumisaffiniteetti sekä parempi sekvenssiselektiivisyys. PNA-DNA-hybrideillä on myös korkeampi pysyvyys,^{1,2} mihin osasyynä on se, että PNA- ja DNA-juosteiden välillä ei ole elektrostaattista repulsiota PNA:n rungon neutraaliuden vuoksi.³ PNA:t pystyvät sitoutumaan vastinolonukleotidijuosteen kanssa joko antiparalleelista (kaksoiskierteessä aminotermius vasten 3'-terminusta) tai paralleelista (aminotermius vasten 5'-terminusta), edellisen ollessa kuitenkin yleensä huomattavasti suotuisampaa.³ PNA:t eivät myöskään ole alttiita nukleasien tai proteasien aiheuttamalle hajoamiselle,¹ koska entsyymit eivät tunnista niitä synteettisen rungon vuoksi. PNA:n runko on joustava aminoetyylilinkkereiden suhteen, DNA:n rakenteen ollessa jäykkä.¹ Modifioimattomilla PNA:illa on kuitenkin tiettyjä rajoituksia, kuten esimerkiksi heikko vesiliukoisuus, alhainen solun läpäisevyys, taipumus aggregoitumiseen sekä vaikeuksia poistua endosomeista.⁵ Näiden ominaisuuksien parantamiseksi, PNA:ihin on kehitetty erilaisia modifikaatioita. Modifioidut PNA:t voivat myös muodostaa pysyvämmän kaksoiskierteen DNA:n kanssa kuin modifioimaton PNA.⁶

Suhteellisen lyhyet PNA:t voivat hiljentää geenejä, mutta pienetkin muutokset PNA:n pituudessa tai kohdepaikassa voivat vaikuttaa hiljenemiseen.⁷ Esimerkiksi hydrofobisten osien lisääminen PNA:han voi parantaa merkittävästi geenin hiljenemisen tehokkuutta.⁷ Jotta geenit saataisiin hiljennettyä, pitää PNA:t kuitenkin ensin saada kuljetettua solukalvon läpi solulimaan ja sieltä tumaan.

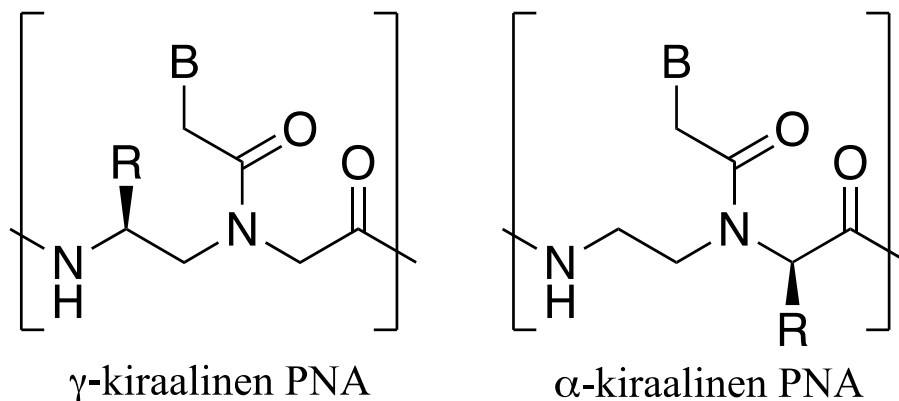
PNA:ita on yritetty kuljettaa soluihin monin tavoin. Esimerkiksi liittämällä PNA:han kantajapeptidejä niiden kulkeutumista soluihin ja tumaan voidaan parantaa.⁷ Tämän lisäksi



Kuva 1 modifioimaton PNA-monomeeri, B = emäs (sytoosiini, guaniini, adeniini tai tyymiini)

haaroittuneita peptidejä voidaan käyttää PNA:iden kuljettamiseen.⁷ PNA:n kuljetus soluihin voi tapahtua myös kompleksina lipidin ja DNA:n kanssa.^{8,9} PNA:iden kuljetukseen on käytetty myös muun muassa nanopartikkeleita.¹⁰ PNA:iden, joihin on liitetty kationisia kantajapeptidejä, jotka sisältävät joko arginiini- tai lysiinitähteitä, on havaittu estävän geeniekspressiota paremmin kuin tavallisten PNA:iden.⁷ Lysiini-tähteiden lukumäärä ja stereokemia vaikuttaa geeniekspression hiljenemiseen mutta yli kahdeksan lysiinitähteen lisäämisen hyöty on enää vähäinen.

PNA-peptidikonjugaatit kulkeutuvat soluihin endosytoosin kautta ja vapautuminen endosomeista sytoplasmaan on geenin hiljentämisen tehokkuutta rajoittava tekijä. Lisäaineiden käyttöä on tutkittu parantamaan vapautumista endosomeista.⁷ Kalsium-ionien lisääminen soluväliaineeseen parantaa PNA:n aiheuttamaa geenin hiljentämistä, mutta samalla lisää solukuolemaa, koska kalsium-ionien lisääminen johtaa usein sakan muodostumiseen eri elatusaineolosuhteissa. Tämä taas vähentää kokeiden toistettavuutta. Klorokiinin lisääminen ei merkittävästi paranna PNA:n tehokkuutta, mutta lisää kalsium-ionien tavoin solukuolemaa ja siten vähentää kokeiden toistettavuutta.⁷



Kuva 2 kiraaliset PNA-monomeerit, B = emäs (tymiini, sytosiini, guaniini tai adeniiini)

Kiraalisten yksiköiden (kuva 2) lisääminen PNA:n runkoon voi parantaa sitoutumisaffiniteettia sekä sekvenssispesifisyyttä.¹¹ Tämä johtuu ainakin osittain siitä, että kiraaliset yksiköt saavat PNA:n pre-organisoidumaan oikea- tai vasenkätiseksi kierteeksi. Erityisesti oikeakätinen kierre parantaa PNA:n sitoutumisominaisuuksia. Kiraalisia yksiköitä voidaan lisätä PNA:han joko α - tai γ -asemaan (kuva 2). Stereokemia vaikuttaa kiraalisen modifikaation aiheuttamaan kaksoiskiirteen pysyvyyteen. Esimerkiksi α -modifioitujen PNA:iden (kuva 2) tapauksessa stereokemialtaan D-muodon PNA:t paransivat PNA-DNA-kaksoiskiirteen pysyvyyttä L-muotoa enemmän.⁶ Tämä johtuu siitä, että α -D-PNA saa PNA-DNA-dupleksin laskostumaan oikea-kätiseksi kierteeksi kun α -L-PNA vastaavasti vasenkätiseksi.¹¹ Myös modifikaation sijainnilla on

vaikutusta ja esimerkiksi vähäisintä stabilisaatio on silloin kuin modifikaatio sijaitsee keskellä sekvenssiä,⁶ mutta keskellä sekvenssiä olevat modifikaatiot voivat toisaalta parantaa sekvenssiselektiivisyyttä.¹¹ Myös modifikaatioiden lukumäärä vaikuttaa. Esimerkiksi lisäämällä α -asemaan kolme D-konfiguraation kiraalista monomeeriä saadaan sekvenssispesifisyyttä parannettua yhteen kiraaliseen yksikköön verrattuna, ja kun nämä kolme kiraalista D-monomeeriä lisätään juosteen keskelle (ns. kiraalinen laatikko) vaikutus suurenee entisestään.¹¹ Myös pysyvyys paranee sen mukaan mitä enemmän modifikaatioita PNA:han on liitetty.⁶ Kiraaliset modifikaatiot PNA:ssa eivät vähennä PNA:n sekvenssiselektiivisyyttä vaan pikemminkin voivat jopa parantaa sitä.^{6,11}

Kolmoiskierteen muodostava PNA (TFPNA, *triplex forming PNA*) kykenee sitoutumaan kaksijuosteiseen DNA:han tai RNA:han Hoogsteen-emäspariutumisella.¹² Näiden TFPNA:iden rungon hienosäädöllä voi olla suuri rooli kaksijuosteisen DNA:n ja RNA:n optimaalisessa tunnistuksessa.

Terapeuttisten sovellutusten lisäksi PNA:ta voidaan hyödyntää diagnostiikassa korkean affiniteetin hybridisaatiokoettimena.¹³

1.2. γ -kiraalinen PNA

γ -kiraalisessa PNA:ssa peptidirungon γ -asemaan (kuva 2) on liitetty sivuketju. γ -modifioidulla PNA:lla on useita etuja verrattuna modifioimattomaan PNA:han, kuten parantunut vesiliukoisuus¹⁴, parempi soluihin otto^{6,12,15-17} sekä suurempi sitoutumisaffiniteetti DNA:han^{6,18,19,20} ja RNA:han.^{12,21} Funktionaalisten ryhmien valinnalla voidaan säädellä mainittuja ominaisuuksia^{16,20,22-24}. γ -PNA:t myös sitoutuvat erittäin sekvenssispesifisesti^{15,17,18,20,23,25}. Myöskään γ -PNA:n sivuketjujen polaarisuus, varaus, aromaattisuus tai alifaattisuus ei vaikuta merkittävästi PNA:n sekvenssispesifisyyteen tai sitoutumistehokkuuteen.²⁰ Sen sijaan ne ovat tärkeitä ominaisuuksia soluun otton, endosomaalisen vapautumisen, liukoisuuden ja aggregoitumisen ehkäisemisen kannalta. γ -PNA:t emäspinoutuvat enemmän ja ovat siten rakenteeltaan jäykempiä.²⁵ γ -PNA:t voidaan ohjata laskostumaan oikea- tai vasenkätiseksi kierteeksi yksinkertaisesti γ -aseman stereokemiaa muuttamalla.²⁵ Oligomeerin kierteisyys tulee selvemmäksi, kun PNA:n γ -modifioitujen monomeerien määrä kasvaa.²³ Tämä γ -PNA:n pre-organisointuminen on ainakin osasyynä γ -PNA:n suurempaan sitoutumisaffiniteettiin modifioimattomaan PNA:han nähden.^{23,25} Vasen- ja oikeakätiset γ -PNA-kierteet eivät pysty hybridisoitumaan keskenään.²⁵ Oikeakätinen γ -PNA pystyy sitoutumaan komplementaarisesti sekä DNA- että RNA-juosteiden kanssa.²⁵

Sekä oikea- että vasenkätinen γ -PNA-kierre pystyy sitoutumaan modifioimattoman PNA-juosteen kanssa.²⁵

γ -PNA myös pystyy tunkeutumaan kaksijuosteiseen B-DNA:han ja sitoutumaan sekvenssispesifisesti.²⁷⁻³¹

Tämä sitoutuminen tapahtuu juosteinvaasiomekanismilla Watson-

Crick-emäspariutumisella. Juosteinvaasio (kuva 3) on γ -PNA:iden ominaisuus, eikä sitä ole huomattu tapahtuvan tavallisella

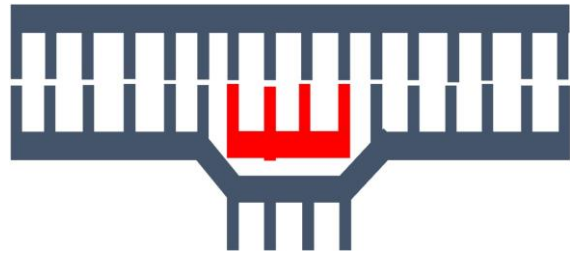
modifioimattomalla PNA:lla. γ -PNA pystyy sitoutumaan kaksijuosteiseen DNA:han tai RNA:han myös muodostamalla kolmoiskierrteen (kuva 4).^{12,15,32} Tällöin sitoutuminen tapahtuu Hoogsteen-emäspariutumisella.

γ -PNA-DNA-kaksoiskierrteen

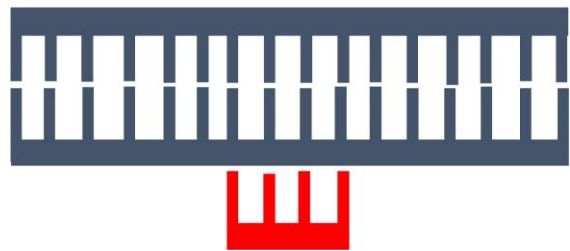
rakenne on määritelty 1,7 Å:n tarkkuudella.²⁶ γ -PNA-DNA-kaksoiskierre omaksuu P-muodon²⁶, joka on lähempänä A- kuin B-tyypin kierrettä. γ -PNA:n tapauksessa L-isomeeri stabiloi PNA/DNA-kaksoiskierrettä^{6,20} kun taas D-isomeerillä on päinvastainen vaikutus²⁰. Tämä stabiilius kasvoi γ -substituutioiden lukumäärän kasvaessa.⁶ Tässä tutkielmassa tarkoitetaan aina γ -L-PNA:ita jollei toisin mainita. γ -D-isomeerin pysyvyyttä heikentävä vaikutus johtuu todennäköisesti sivuketjun ja PNA-DNA-kaksoiskierrteen sisäosien välisestä steerisistä repulsiosta.²⁰ Tätä repulsiota ei tapahdu γ -L-muodolla. Tämän vuoksi on tärkeää, että γ -PNA-monomeerit eivät juurikaan rasemoidu synteesimenettelyn aikana, ja että syntyvä PNA on enantiopuhdas.^{33,34} Tätä varten on kehitelty erilaisia γ -PNA-monomeerien ja -oligomeerien synteesimenetelmiä.³³⁻³⁷ Yhtenä esimerkkinä kehitetyistä synteesimenetelmistä on Fmoc-pohjaiset strategiat^{33,36,38}, joissa PNA-monomeerin ketjun pidennykseen käytettävä primäärinen aminoryhmä on suojattu Fmoc-ryhmällä ja sivuketju tarvittaessa esimerkiksi Boc-ryhmällä tai jollain muulla happolabiililla tai ortogonaalisella suojaryhmällä. Toinen vaihtoehto on, että primäärinen aminoryhmä on suojattu Boc-ryhmällä¹⁴ ja sivuketju emäslabiililla suojaryhmällä.

Verrattuna tavalliseen modifioimattomaan PNA:han tai L- ja D- α -PNA:han, γ -PNA sitoutuu DNA:han nopeimmin ja sillä on myös korkein sulamislämpötila.^{6,20} γ -PNA

Tämä sitoutuminen tapahtuu juosteinvaasiomekanismilla Watson-



Kuva 3 PNA:n (punainen) sitoutuminen DNA:han juosteinvaasiomekanismilla



Kuva 4 PNA:n (punainen) sitoutuminen DNA:han tripleksin muodostumisella Hoogsteen-emäspariutumisella

ei myöskään aggregoidu niin herkästi kuin tavallinen modifioimaton PNA.²⁰ Voidaan myös todeta, että sitoutumistehokkuus riippuu pääasiassa sivuketjun asemasta (γ - vai α - asema) ja stereokemiasta (D- vai L-isomeeri) eikä niinkään sivuketjun koosta, hydrofobisuudesta tai varauksesta.²⁰

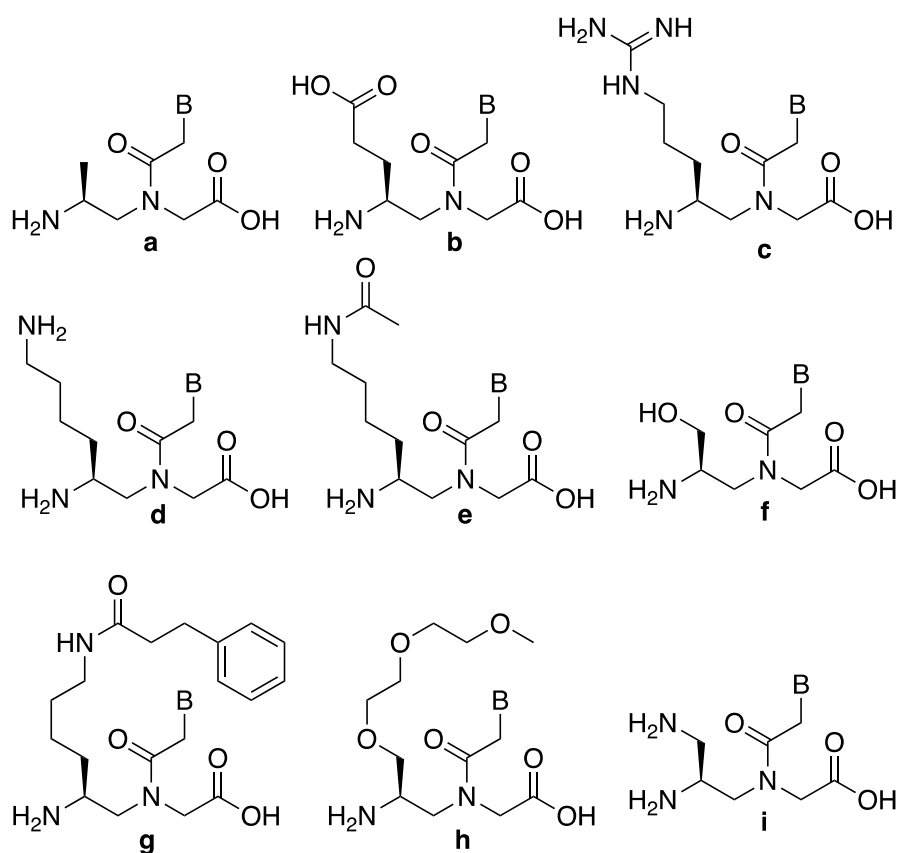
Negatiivisesti tai positiivisesti varautuneet funktionaaliset ryhmät γ -asemassa voivat vaikuttaa merkittävästi sitoutumisaffiniteettiin.^{15,39} Kun γ -PNA-DNA-kaksoiskierteeseen lisätään yksi positiivisesti varautunut PNA-monomeeri, pysyvyyden havaitaan olevan kääntäen verrannollinen (negatiivinen suolariippuvuus) NaCl-konsentraation kanssa (tarkastelurajoissa). Kun ko. monomeeri vaihdetaan negatiivisesti varautuneeseen monomeeriin, γ -PNA-DNA-kaksoiskiirteen pysyvyydessä ei havaita vastaavaa suolariippuvuutta (neutraali suolariippuvuus). Kun negatiivisesti varautuneita ryhmiä lisätään kolmeen, γ -PNA-DNA-kaksoiskiirteen suolariippuvuus muuttuu neutraalista positiiviseksi³⁹, kun taas positiivisesti varautuneiden ryhmien lukumäärää γ -PNA:ssa lisättiin, pysyy suolariippuvuus edelleen negatiivisena. PNA-RNA-kaksoiskierteissä ryhmien vaikutus on melko samankaltainen.³⁹ Positiivisesta suolariippuvuudesta huolimatta negatiivisesti varautunut PNA sitoutuu positiivisesti varautunutta PNA:ta hieman heikommin DNA:han³⁹, mutta RNA:han paremmin, kun negatiivisesti varautuneita ryhmiä on vähintään kolme.³⁹ Näistä tuloksista voidaan päätellä, että negatiivisesti varautuneiden ryhmien lisääminen γ -PNA:han voi itseasiassa lisätä sitoutumisaffiniteettia RNA:han kohdistetuissa γ -PNA:issa. Yllättävää on se, että PNA:n varauksettoman rungon on oletettu olevan yksi PNA:n eduista, mutta negatiivisen varauksen lisääminen runkoon ei kuitenkaan merkittävästi vähennä sitoutumisaffiniteettia fysiologisissa olosuhteissa.

1.2.1. Erilaisia γ -kiraalisia PNA:ita

Erilaisia γ -kiraalisia PNA:ita on valmistettu useita. Ne eroavat toisistaan γ -aseman sivuketjun rakenteelta sekä myös nukleoemäskoostumukseltaan. Myös amino- ja karboksiterminuksiin on voitu myös lisätä erilaisia ryhmiä. Seuraavaksi käsitellään näitä erilaisia γ -PNA-rakenteita ja niiden ominaisuuksia.

Ensimmäisen valmistetun γ -kiraalisen PNA-monomeerin γ -asemassa oli metyyliiryhmä.⁴⁰ Metyyliiryhmää γ -asemassa (kuva 5a) on käytetty myös yhdessä muiden γ -aseman modifikaatioiden kanssa^{25,27–29}.

γ -PNA-monomeerien, jotka on valmistettu lysiinistä, sivuketjussa on aminobutyyliryhmä (kuva 5d).³³ Tätä γ -PNA:n sivuketjun amiinia voidaan helposti muokata erilaisilla ryhmillä.¹⁸ Tällaisia modifikaatioita ovat esimerkiksi asetamidin (kuva 5e), fenyylipropanihapon (kuva 5g) tai tiatsolioranssin lisääminen γ -sivuketjun amiiniin. Kaikissa näissä kolmessa tapauksessa modifikaatio lisäsi PNA:n muodostaman kaksoiskierrteen pysyvyyttä ja sitoutuminen oli kaikkien kohdalla sekvenssispesifistä. Näiden lysiinipohjaisten γ -PNA:iden erilaiset sivuketjurakenteet eivät heikennä PNA:iden kykyä sitoutua komplementaarisesti DNA:han, RNA:han tai PNA:han. Tutkielman kokeellisessa osiossa myös kerrotaan lysiinipohjaisten γ -PNA-monomeerien synteeseistä.



Kuva 5 Esimerkkejä erilaisista γ -PNA-monomeerien sivuketjuista; a) metyyli, b) karboksietyyli, c) guanidiini, d) aminobutyli, e) asetamidi, f) hydroksimetyyli, g) fenyylipropanihappo, h) miniPEG ja i) aminometyyli. B = emäs (esimerkiksi sytosiini, guaniini, adeniini tai tymiini)

Myös muista aminohapoista on valmistettu γ -kiraalista PNA:ta. Tällaisia ovat esimerkiksi glutamiinihaposta valmistetut PNA:t.^{34,41} Niissä γ -sivuketjuna on karboksietyyliiryhmä (kuva 5b). Arginiinista valmistetuissa γ -PNA:issa taas sivuketjuna on guanidinyylipropyyliryhmä (kuva 5c).¹⁹ Myös seriinistä on valmistettu γ -PNA:ta.^{23,42} Niissä γ -PNA-monomeereissä on sivuketjuna hydroksimetyyliryhmä (kuva 5f).

PNA:n γ -asemaan on myös liitetty aminometyyliryhmiä (kuva 5i).^{6,12,17} Kationiset aminometyyleeni-PNA:t stabiloivat PNA-DNA-duplekseja verrattuna modifioimattomaan PNA:han.^{6,17} γ -aminometyyleeni-PNA:t ovat myös stabiilimpia kuin vastaavat α -PNA:t. Pysyvyyden kasvaminen ei kuitenkaan ollut epäspesifistä, sillä yksikin virhe komplementaarisessa sekvenssissä johtaa kaksoiskiirteen pysyvyyden heikentymiseen verrattuna tavalliseen PNA:han.⁶ Nämä γ -PNA:t ovat myös sekvenssiselektiivisempiä kuin vastaavat α -modifioidut PNA:t.¹⁷ Ne kulkeutuivat soluihin tehokkaasti ja niiden kulkeutuminen on parempaa kuin vastaavilla modifioimattomilla tai α -modifioiduilla PNA:illa.^{6,17} Ne myös lokalisoituivat tumaan ja niillä on myös matala toksisuus soluissa.⁶

Myös sulfaattiosia on liitetty PNA:n γ -asemaan.¹⁵ Sulfaattiosa on monilta ominaisuuksiltaan samankaltainen kuin DNA:n fosfaatti. Sillä on negatiivinen varaus ja samankaltainen geometria ja polaarisuus. Näiden sulfaattiosan sisältävien PNA-DNA-kaksoiskierteiden pysyvyyden on havaittu olevan riippuvainen ionivahvuudesta. Nämä PNA:t kykenevät muodostamaan kolmoiskierteitä. Niiden biologinen aktiivisuus on modifioimatonta PNA:ta korkeampi, joka johtuu niiden tehokkaammasta kulkeutumisesta soluihin. Nämä PNA:t ovat ensimmäisiä antigeenisia γ -PNA:ita, joilla on negatiivinen varaus. Sulfaattiryhmän lisääminen γ -asemaan vaikuttaa positiivisesti PNA-oligomeerin sitoutumisominaisuuksiin sekä biologiseen aktiivisuuteen. Ne myös osoittavat voimakasta antigeeniaktiivisuutta sekä vahvaa sitoutumisselektiivisyyttä, eivätkä ne myöskään ole toksisia soluissa.

PNA:n γ -asemaan on myös liitetty dietyleeniglykoliketju (miniPEG) (kuva 5h).^{10,14,30,32,38,43-48} Tällainen miniPEG-PNA pystyy tunkeutumaan B-DNA:han ja tunnistus tapahtuu erittäin sekvenssispesifisesti. γ -miniPEG-PNA:t voivat sitoutua kaksijuosteiseen DNA:han myös muodostamalla kolmoiskiirteen.⁴⁶ Yksi γ -miniPEG-PNA-modifikaatio PNA:ssa riittää pre-organisomaan PNA:ta riittävästi oikeakätiseksi kierteeksi.¹⁴ MiniPEG-yksiköiden lisääminen PNA:han tiukentaa oligomeerin kierrettä ja tekee siitä siten jäykemmän ja kompaktimman.¹⁴ Kaksoiskiirteen pysyvyys kasvoi miniPEG-yksiköiden lukumäärän lisääntyessä.¹⁴ Yhden miniPEG-modifikaation sisältämä PNA sitoutuu noin kaksi kertaa nopeammin kuin modifioimaton PNA.¹⁴ Se myös paransi PNA:n vesiliukoisuutta lähes kaksinkertaiseksi ja näiden modifikaatioiden lisääminen PNA-runkoon paransi vesiliukoisuutta entisestään.¹⁴ Nämä modifikaatiot myös vähentävät aggregoitumista ja epäspesifistä sitoutumista muihin makromolekyyleihin.^{14,30} Tämän PNA:n invasiotehokkuus B-DNA-dupleksiin riippuu

lämpötilasta.³⁰ Invaasionopeuteen taas vaikuttaa ionivahvuus. Fysiologisessa ionivahvuudessa tämä PNA ei pysty tunkeutumaan B-DNA:han, vaan sitoutuminen B-DNA:han rajoittuu suhteellisen alhaisiin ionivahvuuksiin.³⁰ γ -miniPEG-PNA:t pystyvät inhiboimaan onkogeenistä mikroRNA:ta silloin, kun nämä γ -PNA:t kuljetetaan soluun nanopartikkeleiden mukana.⁴⁵ Ne inhiboivat kasvaimen kasvua paljon tehokkaammin kuin modifioimattomat PNA:t. Näillä γ -miniPEG-PNA:illa on myös mahdollista estää ihmisen beetta-talasseemiaan liittyvän mutaation toimintaa ja siten estää sairautta ilmenemästä.⁴⁶ Tällä hetkellä tätä on testattu vasta hiirimallilla ja nanopartikkeleilla kuljettamalla. γ -miniPEG-PNA:ta tutkittu myös mahdollisena biomateriaalina.^{42,43,47,48}

PNA:n γ -asemaan voidaan myös liittää guanidinoryhmiä.^{12,16,19} Tällaiset γ -PNA:t sitoutuvat DNA:han ja RNA:han poikkeuksellisen suurella affiniteetilla ja sekvenssiselektiivisyydellä. Nämä ryhmät on voitu liittää γ -asemaan esimerkiksi joko metyyli-,¹² propyyli-¹⁹ tai butyylikäsivarren¹⁶ kautta. Ko. PNA:t tunkeutuvat nisäkässoluihin suhteellisen helposti. Guanidinobutyylyliryhmiä on havaittu tarvittavan vähintään neljä kappaletta, jotta PNA pääsee kulkemaan solukalvon läpi soluihin.¹⁶ Lyhyemmällä guanidinyylimetyylisivuketjulla jo kaksi modifikaatiota riittää solukalvon läpäisyyn, kunhan modifikaatiot ovat peräkkäisissä monomeereissa.¹² PNA:lla, jossa on γ -guanidiini-modifikaatioita esimerkiksi kolme peräkkäin, on matalampi sitoutumisaffiniteetti kuin sellaisella PNA:lla, jossa nämä modifikaatiot eivät ole peräkkäin.¹⁶ Kun ko. tetra- γ -guanidino-PNA on leimattu rodamiinilla, sen on havaittu kulkeutuvan HeLa-soluihin samalla tehokkuudella kuin TAT-proteiini. Näillä guanidinoryhmän sisältävillä γ -PNA:illa oli myös resistenssiä entsyymattista hajoamista vastaan toisin kuin modifioimattomilla PNA:illa.¹⁹

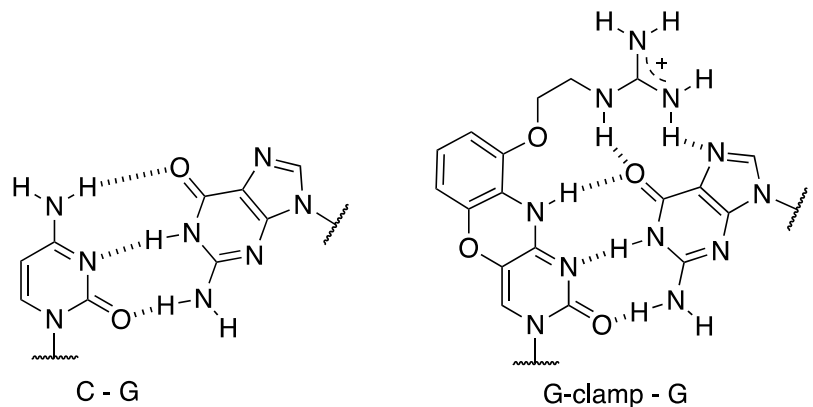
Myös γ -hydroksimetyyli-PNA:ita on tutkittu.^{23,42,49} Niitä on käytetty esimerkiksi TFPNA:issa, joissa γ -hydroksimetyyli-modifikaatio vaikutti selektiivisyyteen PNA/RNA- ja (PNA)₂/RNA-kompleksien muodostumisen välillä.⁴⁹ Hydroksimetyyliryhmä γ -PNA:ssa parantaa PNA:n sitoutumista DNA:han sekä RNA:han.²³ Sen lisäksi hydroksimetyyliryhmä parantaa sekvenssiselektiivisyyttä.

PNA:n γ -asemaan on liitetty myös merkaptometyyliryhmiä.^{22,50} Merkaptoryhmä PNA:n γ -asemassa tarjoaa konjugaatiokohdan, jota voidaan funktionalisoida selektiivisesti. Merkaptoryhmän lisääminen ei vaikuta negatiivisesti PNA:n sitoutumiseen DNA:han.⁵⁰ Merkaptoryhmä ei vaikuttanut myöskään merkittävästi PNA:n sitoutumisominaisuuksiin RNA:han.²² γ -merkaptoryhmää on käytetty esimerkiksi fluoroforien liittämiseen.^{18,24} Fluoroforin liittäminen PNA:n γ -asemaan ei vaikuttanut

PNA:n sitoutumisominaisuuksiin.²⁴ Tiatsolioranssi on yksi γ -PNA:han liitetty fluorofori. Sitä sisältävän PNA:n taustafluoresenssi on vähäinen, mutta sitoutuessaan komplementaariseen DNA:han fluoresenssi lisääntyy voimakkaasti.¹⁸

PNA:sta on valmistettu myös monomeereja, joissa on stereogeeninen keskus sekä α - että γ -asemassa.⁵¹ Tässäkin kaksoiskiraalisessa tapauksessa γ -substituentin L-muoto ja α -substituentin D-muoto stabiloi PNA/DNA-kaksoiskierrettä eniten. α -substituentin L-muodolla pysyvyys oli myös modifioimatonta PNA:ta korkeampi toisin kuin γ -aseman D-muodolla. α -substituentin stereokemialla ei siis ole niin suurta merkitystä kuin γ -substituentin.

γ -kiraalisuutta on myös käytetty yhdessä emäsmodifikaatioiden kanssa. Ko. γ -PNA:issa on käytetty esimerkiksi ns. G-clamp sytosiinianalogia [i.e. sytosiinin 9-(2-guanidinoetoksi)fenok-satsiini-addukti]^{28,29}. γ -asemassa on käytetty



Kuva 6 Normaali sytosiinin guaniinin emäspariutuminen sekä sytosiinianalogi G-clamp-nimisen emäksen sitoutuminen guaniiniin emäspariutumisella

metyyliryhmää. Tällä nukleoemässubstituutiolla pystytään kasvattamaan γ -PNA:iden affiniteettia merkittävästi DNA-juosteen komplementaarisiiin guaniiniemäksiin ja siten kykyä tunkeutua B-DNA:han. Ajatus perustuu siihen, että G-clamp sitoutuu guaniiniin useammalla vetysidoksella kuin sytosiini (kuva 6). Sitoutuminen on sekvenssiselektiivistä ja se tapahtuu juosteinvaasiomekanismilla.^{28,29} Jo yhden tai kaksi G-clamp-nukleoemästä sisältävä PNA pystyy sitoutumaan kaksijuosteiseen DNA:han²⁹, mutta kun tällainen PNA sisälsi kolme G-clamp-nukleoemästä, sitoutuminen B-DNA:han onnistui myös fysiologisesti merkittävässä ionivahvuudessa.^{28,29}

γ -PNA:ihin voidaan liittää modifikaatioita myös amino- ja karboksiterminukseen. Tästä esimerkkinä on γ -PNA, joka sisältää kovalenttisesti kytketyn akridiiniosan PNA:n karboksipäässä.²⁷ Tämä γ -PNA pystyy tunkeutumaan B-DNA:han sekvenssispesifisesti. γ -asemassa tällä PNA:lla on käytetty metyyliryhmää. Ilman akridiini-osaa γ -PNA ei pystynyt sitoutumaan B-DNA:n kanssa. Tämäkin B-DNA:han tunkeutuminen on tehokkainta alhaisilla ionivahvuuksilla ja γ -PNA:n sitoutumisvapaenergia täytyy vielä nousta, jotta sitoutuminen tapahtuisi fysiologisessa ionivahvuudessa. Toinen ja paljon

käytetty terminaalien modifikaatio PNA:issa on niiden ketjun pidentäminen lysiinitähteillä.^{14,17,29} Lysiinitähteet parantavat γ -PNA:n vesiliukoisuutta.¹⁴ Myös lauriinihappoa on liitetty γ -PNA:n aminoterminuksessa.⁴⁷ Sen tarkoituksena on taas ollut hydrofobisuuden kasvattaminen.

1.2.2. γ -PNA:n sovellukset

γ -PNA:n ominaisuuksia voidaan hyödyntää geeniekspression säätelyn lisäksi myös erilaisissa sovelluksissa, kuten diagnostisina työkaluina. Seuraavaksi esitellään esimerkkejä tällaisista sovelluksista.

Ensimmäinen esimerkki γ -PNA:n käytöstä erilaisissa sovelluksissa on γ -PNA:n käyttö geenien "viivakoodaamisessa".⁵² Tämä tapahtuu niin, että erittäin sekvenssispesifisiä γ -PNA-koettimia liitetään kiinteään alustaan kiinnitettyihin nanohuokosiin. Geenit sitoutuvat PNA-koettimiin ja geenit saadaan "viivakoodattua" laskemalla kuhunkin geeniin kiinnittyneiden koettimien lukumäärä ja mittaamalla niiden suhteelliset etäisyydet eli paikallistamalla niiden sijainnit DNA-molekyylissä. Näillä nanohuokos- γ -PNA-koettimilla pystytään havaitsemaan ja luokittelemaan läheisesti sukua olevien viruslatyyppien geenejä.

γ -PNA:ta on käytetty koettimena muissakin sovelluksissa. Esimerkiksi γ -PNA:ita, joihin on liitetty massaa lisääviä molekyylejä ("massatagit"), voidaan liittää nanohuokosiin⁵³ ja niitä voidaan sitten käyttää tunnistamaan kaksijuosteisesta DNA:sta geneettisiä mutaatioita tai niiden puuttumista massaspektrometrisesti. Tämä tapahtuu niin, että otetaan pieni näyte, esimerkiksi poskinäyte, josta muodostetaan muutaman sadan emäsparin pituinen sekvenssi. Tämä sekvenssi inkuboidaan γ -PNA:n kanssa, ja kohdesekvenssiä vastaava PNA havaitaan käyttämällä nanohuokosia. Tätä voitaisiin hyödyntää esimerkiksi syövän hoitoon liittyvässä diagnostiikassa. Sen avulla voitaisiin tunnistaa syövästä tiettyjä geenejä, joiden tiedetään reagoivan hyvin tiettyihin hoitoihin.

γ -PNA:ita voidaan myös yrittää hyödyntää diagnostisina työkaluina, kuten esimerkiksi patogeenintunnistusalustoissa.⁵⁴ Tämä alusta sisältää γ -modifioituja PNA:ita. Nämä γ -PNA:t pystyvät tunkeutumaan kaksoiskierteiseen DNA:han. Tällä alustalla pystyy tunnistamaan bakteeri- ja sienipatogeenejä suoraan verestä ilman soluviljelyä. Tämä tunnistus tapahtuu nopeasti alle 2,5 tunnissa. Alustan kliininen käyttökelpoisuus on osoitettu ja se saavutti vaikuttavia tuloksia. Tämän alustan tehokkuus on yhtä hyvä, ellei

parempi kuin perinteisten viljelymenetelmien tehokkuus patogeenien havaitsemisessa ja tunnistamisessa.

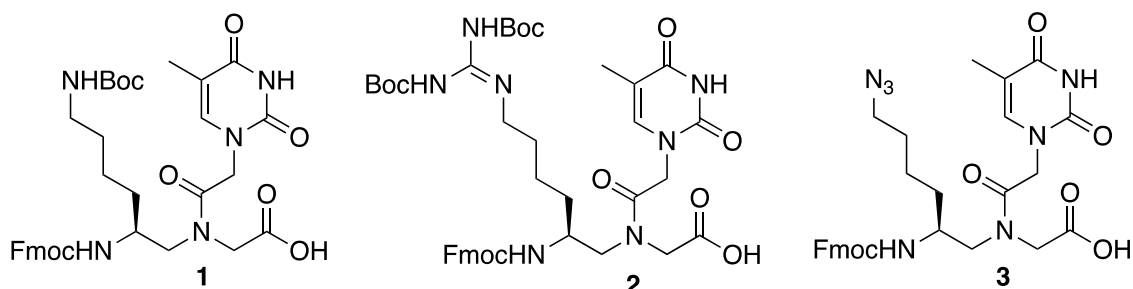
γ -PNA:ista on valmistettu myös biosiruja.⁴⁴ Näissä siruissa käytetty γ -PNA sisältää γ -asemassa miniPEG-ryhmää. Mikrosirut valmistetaan "Film spotting"-nimisellä menetelmällä. Sillä saadaan helposti ja edullisesti muodostettua γ -PNA-matriisia, jossa on säännöllinen kuvio, tasainen luminesenssi ja erittäin alhainen taustafluoresenssi. γ -PNA:illa on näissä siruissa erinomainen selektiivisyys ja herkkyys. DNA-kohteet sitoutuvat hyvin γ -PNA:iden kanssa myös fysiologisissa olosuhteissa. Näillä biosiruilla pystytään havaitsemaan mutaatioita esimerkiksi BRCA1- ja 3099delIT-geeneistä SSarc-puskurissa, seerumissa ja virtsassa. γ -PNA on näissä siruissa selvästi parempi kuin modifioimaton PNA.

γ -PNA:ista on myös valmistettu erilaisia nanomateriaaleja. Niistä on valmistettu esimerkiksi nanokuituja.^{42,43,48} Näissä nanokuituja muodostavissa PNA:issa on γ -asemassa käytetty esimerkiksi hydroksyyylimetyyliä.⁴² Toinen nanokuiduissa käytetty γ -PNA on miniPEG-PNA.^{43,48} Nanokuituja voidaan valmistaa myös γ -PNA/DNA-hybrideistä pelkkien γ -PNA-nanokuitujen lisäksi.⁴⁸ Niistä molemmista saadaan muodostettua nopeasti nanokuituja helpolla yksivaiheisella strategialla. Nämä nanokuidut voivat kasvaa useiden mikronien pituisiksi⁴³ ja ne muodostuvat nippuina.⁴⁸

1.3. Työn tarkoitus

Tämän työn tarkoituksena oli valmistaa ensin kolme erilaista γ -kiraalista PNA-monomeeriä. Monomeerit valmistetaan L-lysiinistä ja ne eroavat toisistaan γ -kiraalisen osan funktionalisuuksilta. Kaikissa kolmessa funktionalisuus on liittynään butyyლისivuketjun päähän. Ensimmäisessä näistä monomeereistä (yhdiste **1**, kuva 7) γ -kiraalisessa osassa on aminoryhmä. Toisessa monomeerissä (yhdiste **2**, kuva 7) on guanidiiniryhmä. Kolmannessa monomeerissä (yhdiste **3**, kuva 7) taas on atsidiryhmä. Monomeereissä käytetään Fmoc-suojaryhmää sekä yhdisteiden **1** ja **2** sivuketjuissa Boc-suojaryhmää. Kaikissa näissä monomeereissä on nukleoemäksenä tymiini. Näistä yhdisteistä ainakin yhdisteet **1** ja **2** löytyvät aiemmista julkaisuista, mutta hieman erilaisella synteessillä³³ tai kokonaan eri suojaryhmästrategialla¹⁹. Näitä kahta funktionalisuutta, eli amino- ja guanidiiniryhmää, löytyy myös muista julkaisuista, mutta eri mittaisilla hiiliketjuilla, esimerkiksi aminometyylinä tai guanidinyylimetyylinä.¹²

Näitä kolmea valmistettua PNA-rakenneyksikköä on tarkoitus käyttää automatisoidussa PNA-synteesissä. PNA:n sekvenssiksi on suunniteltu Lys-CTA GTA TGA AAG AGA GAC ATT G -sekvenssiä. Lopullisena tavoitteena on näiden γ -kiraalisten PNA:iden ominaisuuksien testaus erilaisilla kokeilla kuten esimerkiksi solukokeilla. Tässä tutkielmassa ei kuitenkaan päästä monomeerien synteesiä pidemmälle

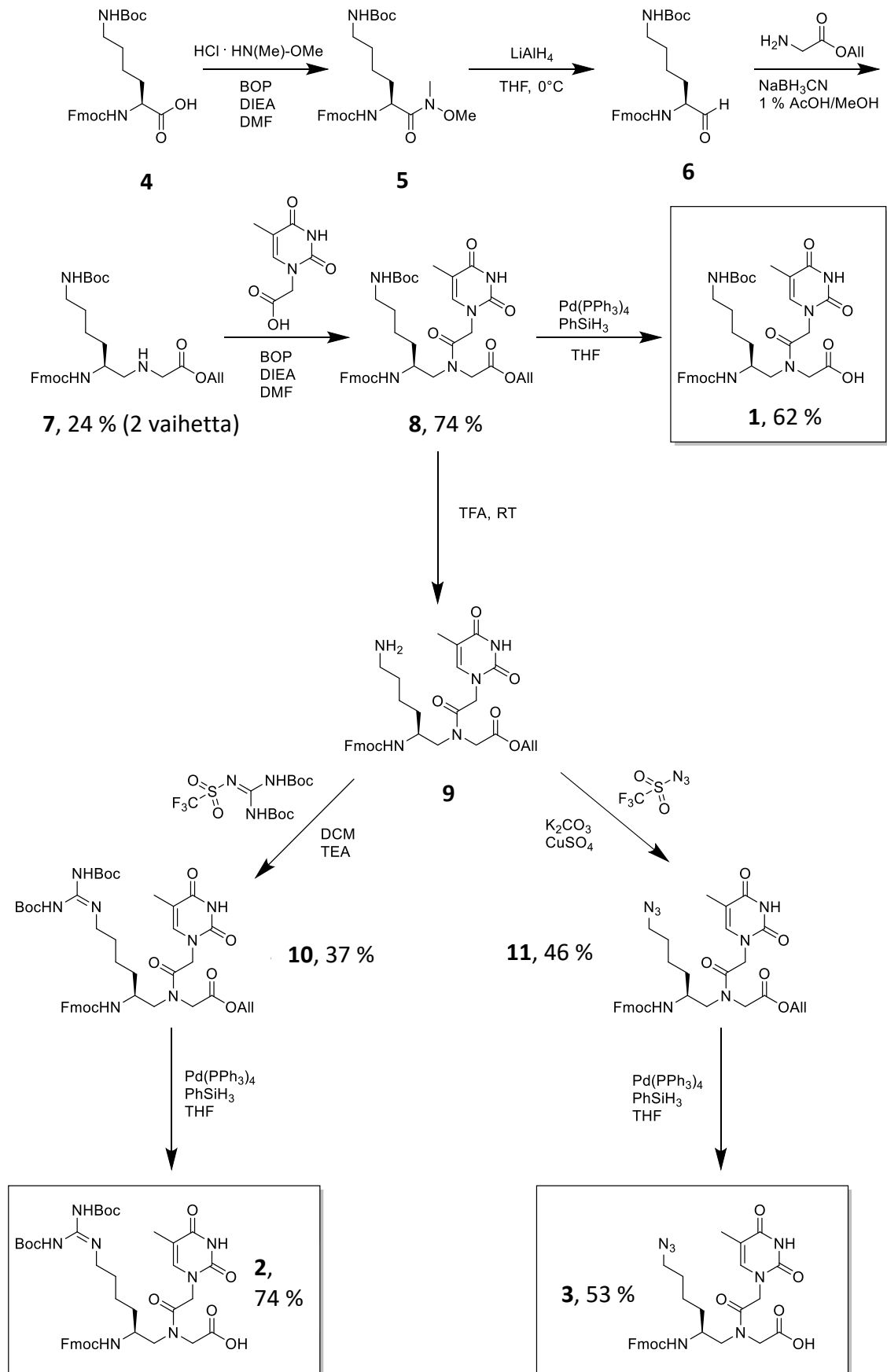


Kuva 7 Valmistettavat γ -kiraaliset PNA-monomeerit

2. Tulokset ja niiden tarkastelu

2.1. PNA-monomeerien synteesi

Työn γ -kiraaliset PNA-monomeerit syntetisoitiin kaavion 1 mukaisesti. Tarkemmin vaiheet on esitetty osiossa 3.1.1. Ensimmäisessä vaiheessa Fmoc-L-lysiini(Boc)-OH:n (yhdiste **4**, kaavio 1) annettiin reagoida *N,O*-dimetyylihydroksyyliamiinihydrokloridin kanssa fosfoniumaktivaattorin (BOP) ja *N,N*-di-isopropyli etyyliamiin läsnä ollessa. Reaktiossa syntyi kvantitatiivisesti Weinrebin amidi **5** (kaavio 1), joka käytettiin seuraavaan vaiheeseen ilman kromatografista puhdistusta. Seuraavaksi Weinrebin amidi **5** pelkistettiin varovasti LiAlH_4 :lla typpi-ilmakehässä 0°C :ssa. Saatu aldehydi **6** puhdistettiin pylväskromatografisesti ja se käytettiin välittömästi seuraavana vaiheena olevaan pelkistävään aminaatioon. Aldehydi **6** ja glysiiniallyyliesterin sulfonihapposuola liuotettiin 1 % AcOH:MeOH-liuokseen. Joukkoon lisättiin NaBH_3CN 0°C :ssa. Lisäyksen jälkeen reaktion annettiin tapahtua huoneenlämpötilassa. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa muodostui yhdiste **7** (kaavio 1) 24 % saannolla lähtien yhdisteestä **5**. Yhdiste **7** karakterisoitiin NMR- ja massaspektrometrisesti (liitteet 1 ja 2).

Kaavio 1 γ -kiraalisten PNA-monomeerien synteysi

Seuraavaksi yhdisteen **7** annettiin reagoida tymiini-1-etikkahapon kanssa. Kuten yllä, amidikytkentään käytettiin aktivaattorina BOP:ia ja emäksenä reaktiossa oli DIEA. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa muodostui yhdiste **8** (kaavio 1) 74 % saannolla. Yhdiste **8** karakterisoitiin NMR- ja massaspektrometrisesti (liitteet 3–6). Tätä yhdistettä käytettiin kahteen seuraavaan reaktioon.

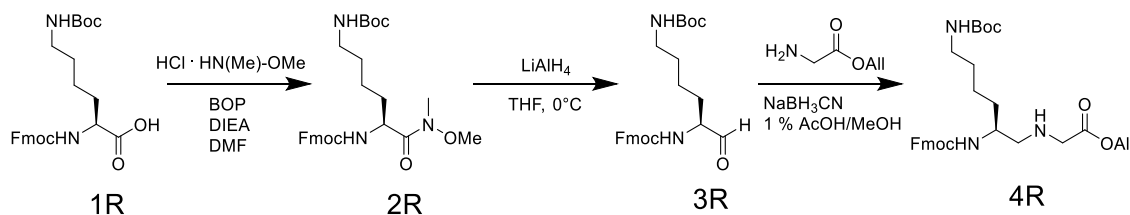
Yhdisteestä **8** poistettiin allyylisuojarahma Pd(PPh₃)₄:n sekä PhSiH₃:n avulla typpi-ilmakehässä. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa syntyi ensimmäinen (**1**) halutuista kolmesta PNA-synteesiin soveltuvasta γ -kiraalisesta rakenneyksiköstä (kaavio 1) 62 % saannolla. Yhdiste **1** karakterisoitiin NMR- ja massaspektrometrisesti (liitteet 7–9).

Rakenneyksiköiden **2** ja **3** syntetisoimiseksi yhdisteestä **8** poistettiin Boc-suojarahma trifluoroetikkahapon liuoksella huoneenlämpötilassa. Reaktiossa syntyi yhdiste **9** (kaavio 1). Yhdistettä **9** käytettiin kahteen eri reaktioon. Ensimmäisessä niistä yhdisteen **9** vapaa aminoryhmä guanidinyloitiin 1,3-di-Boc-2-(trifluorometyylisulfonyyli)guanidiinilla. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa syntyi yhdiste **10** (kaavio 1) 37 % saannolla. Yhdiste **10** karakterisoitiin NMR- ja massaspektrometrisesti (liitteet 10–13). Yhdisteestä **10** poistettiin allyylisuojarahma Pd(PPh₃)₄:n sekä PhSiH₃:n avulla typpi-ilmakehässä. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa muodostui yhdiste **2** (kaavio 1) 74 % saannolla. Yhdiste **2** karakterisoitiin NMR- ja massaspektrometrisesti (liitteet 14–17).

Yhdisteen **9** vapaa aminoryhmä myös atsidoitiin Cu(I)-katalyytisellä diazoniumsiirtoreaktiolla käyttäen TfN₃:ia. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa muodostui yhdiste **11** (kaavio 1) 46 % saannolla. Yhdiste **11** karakterisoitiin NMR- ja massaspektrometrisesti (liitteet 18–21). Tämän jälkeen yhdisteestä **11** poistettiin allyylisuojarahma Pd(PPh₃)₄:n sekä PhSiH₃:n avulla typpi-ilmakehässä. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Tässä reaktiossa syntyi yhdiste **3** (kaavio 1) 53 % saannolla. Yhdiste **3** karakterisoitiin NMR- ja massaspektrometrisesti (liitteet 22–25).

Kaikkien haluttujen monomeerien synteesi saatiin suoritettua onnistuneesti. Yhdisteen **1** kokonaissaannoksi saatiin 11 % lähtien yhdisteestä **1**. Yhdisteen **2** kokonaissaannoksi saatiin 5 % ja yhdisteen **3** kokonaissaannoksi 4 % lähtien myös yhdisteestä **1**. Synteesin heikompia vaiheita olivat pelkistävä aminaato (**7**), sekä yhdisteen **9** vapaan aminoryhmän funktionalisoinnit. Yhdisteen **7** muodostuminen oli saannoltaan pienin (24 %) ja osoittautui näin ollen synteesien pullonkaulaksi. Yhdisteen **9** vapaan aminoryhmän guanidinylointi ja atsidointi jäivät myös alle 50 % saannon.

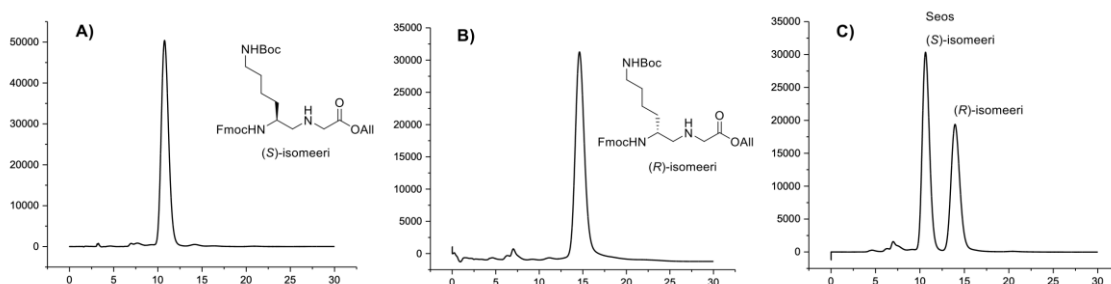
2.1.1. (R)-isomeerin synteesi



Kaavio 2 (R)-isomeerin synteesi

Yhdisteestä **7** valmistettiin myös (R)-isomeerinen muoto (yhdiste **4R**, kaavio 2). Yhdiste valmistettiin, jotta sitä voitaisiin käyttää vertailuyhdisteenä yhdisteen **7** enantiopuhtauden varmistukseen. Tämä yhdiste valmistettiin siis aivan vastaavasti kuin yhdiste **7**, mutta reaktion lähtöaineena käytettiin Fmoc-D-lysiini(Boc)-OH:ta (yhdiste **1R**, kaavio 2) L-muodon sijasta. Tarkemmin reaktio on kuvattu osiossa 3.1.2. Ensimmäisessä vaiheessa yhdisteen **1R** (kaavio 2) ja *N,O*-dimetyylihydroksyyliamiinihydrokloridin annettiin reagoida huoneenlämpötilassa käyttäen aktivaattorina BOP:ia. Reaktiossa muodostui yhdistettä **2R** (kaavio 2) 77 % saannolla. Seuraavassa vaiheessa yhdiste **2R** liuotettiin THF:iin ja LiAlH₄ lisättiin reaktioseokseen typpi-ilmakehässä 0°C:ssa. Sen jälkeen, kun tuotteen havaittiin muodostuneen, reaktio pysäytettiin lisäämällä reaktioseokseen 1 M NaHSO₄:ia. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa muodostui yhdistettä **3R** (kaavio 2), joka käytettiin välittömästi seuraavaan vaiheeseen. Yhdiste **3R** ja glysiiniallyyliesterin sulfonihapposuola liuotettiin 1 % AcOH:MeOH-liuokseen ja joukkoon lisättiin NaBH₃CN 0°C:ssa. Lisäyksen jälkeen pelkistävän aminaation annettiin tapahtua huoneenlämpötilassa. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Reaktiossa muodostui yhdistettä **4R** (kaavio 2) 9 % saannolla yhdisteestä **2R** lähtien. Yhdiste **4R** karakterisoitiin massaspektrometrisesti (liitteet 26 ja 27). Yhdisteen **4R** kokonaissaannoksi saatiin 7 % lähtien yhdisteestä **1R**. Yhdisteen heikko kokonaissaanto riippuu ainakin osittain siitä, että työskentely ei ollut kovin tarkkaa, sillä kyseistä referenssiyhdistettä tarvittiin vain pieni määrä enantiopuhtauden määrittämistä varten.

2.2. Enantiopuhtaus



Kuva 8 Enantiopuhautuksen määrittäminen

PNA-monomeerien enantiopuhkaus määritettiin yhdisteen **7** ja sitä vastaavan (*R*)-isomeerin (**4R**) vertailulla kiraalisella HPLC:lla. Kuvassa 8 on esitetty näytteiden HPLC-kromatogrammit. Näyte A sisälsi pelkästään yhdistettä **7**, näyte B taas sisälsi pelkästään yhdistettä **4R** ja kolmas näyte oli A:n ja B:n seos. Kuten kuvasta 8 näkee, näytteestä A tulee piikki noin 11 minuutin kohdalle, näytteestä B tulee piikki noin 15 minuutin kohdalle ja näytteestä C tulee kaksi piikkiä, joista toinen tulee noin 11 minuutin ja toinen noin 15 minuutin kohdalle. Näistä tuloksista voidaan päätellä, että kiraalinen kromatografia kykeni erottamaan yhdisteen **7** enantiomeerit hyvin (11 vs. 15 min) ja että yhdiste **7** on enantiopuhdasta. Synteesin (kaavio 1) myöhemmät vaiheet eivät ole enää kriittisiä mahdollisen rasemoitumisen suhteen, joten voidaan myös olettaa, että syntetisoidut PNA-rakenneyksiköt ovat enantiopuhdaita. Kriittisimmät vaiheet rasemoitumiselle ovat Weinreb- amidin pelkistys aldehydiksi (**6**) ja sitä seuraava pelkistävä aminaatio (**7**).

2.3. PNA:n synteesi

Työn alkuperäisenä tavoitteena oli tehdä vielä syntetisoiduista γ -kiraalisista PNA-monomeereistä PNA:ta. Tämä ei kuitenkaan työajan puitteissa onnistunut peptidisyntetisaattorin ongelmien vuoksi.

3. Kokeellinen osa

3.1. PNA-rakenneyksiköiden synteesi

PNA-rakenneyksiköiden kokonaisreaktio on kuvattu kaaviossa 1. Kaaviossa 2 on kuvattu (R)-isomeerisen PNA-rakenneyksikön synteesi. Liuottimet kuivattiin molekyyliseuloilla. Tuotteet ja osa välituotteista karakterisoitiin Bruker micrQTOF-Q-massaspektrometrillä sekä Brukerin NMR-spektrometrillä (500 MHz).

3.1.1. γ -kiraalisten PNA-monomeerien synteesi

Fmoc-lysiini(Boc)-*N*-metoksi-*N*-metyyliamidi (5): *N,O*-dimetyylihydroksyyliamiinihydrokloridi (23 mmol, 2,3 g) liuotettiin 100 ml:aan dimetyyliformamidia. Fmoc-lysiini(Boc)-OH (4, kaavio 1) (21 mmol, 10 g), BOP (21 mmol, 9,4 g) ja DIEA (49 mmol, 8,6 ml) lisättiin joukkoon tässä järjestyksessä. Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion eteneminen todettiin ohutkerroskromatografialla (TLC)(DCM:MeOH 90:10, *v/v*), jonka jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin 100 ml:aan etyyliasetaattia ja tätä liuosta pestiin kolme kertaa 1 M KHSO₄-liuoksella sekä kerran LiCl-liuoksella, kylläisellä NaCl-liuoksella ja kylläisellä NaHCO₃-liuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Sitten tuote haihdutettiin dikloorimetaanista kolme kertaa ja se haihdutettiin kuiviin (valkoinen vaahto) vakuuissa öljypumpulla. Yhdisteen **5** saanto: 11 g (100 %). Raakatuote (**5**) käytettiin seuraavaan reaktiovaiheeseen ilman pylväspuhdistusta.

Fmoc-lysiini(Boc)-H (6): Fmoc-lysiini(Boc)-*N*-metoksi-*N*-metyyliamidi (**5**) (26 mmol, 13 g) liuotettiin 100 ml:aan kuivaa tetrahydrofuraania. Typpikaapissa, samalla jäähauteessa sekoittaen, seokseen lisättiin LiAlH₄:a (26 mmol, 13 ml) tipoittain 20 minuutin aikana. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (etyyliasetatti:heksaani 1:1, *v/v*). Reaktio pysäytettiin lisäämällä joukkoon 100 ml 1 M NaHSO₄-liuosta. Tämän jälkeen tetrahydrofuraani haihdutettiin ja jäljelle jäänyttä vesifaasia pestiin kolme kertaa etyyliasetaatilla. Yhdistettyä orgaanista faasia pestiin vielä kylläisellä NaCl-liuoksella. Tämän jälkeen orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin melkein kuiviin. Jäännökseen lisättiin hieman 1 % AcOH:MeOH-liuosta, jonka jälkeen seos haihdutettiin täysin kuiviin. Tämän jälkeen jatkettiin suoraan seuraavaan vaiheeseen.

Allyyli-(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)glysiinaatti (7): Fmoc-lysiini(Boc)-H (**6**) ja glysiiniallyyliesterin sulfonihapposuola (53 mmol, 15 g) liuotettiin 1 % AcOH:MeOH-liuokseen (100ml). Seokseen lisättiin NaBH₃CN (53 mmol, 3,3 g)

samalla jäähauteessa sekoittaen. Tämän jälkeen jäähaude poistettiin ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion eteneminen todettiin TLC:llä (etyyliasettaatti:heksaani 1:1, v/v), jonka jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin. Raakatuote liuotettiin 100 ml:aan etyyliasettaattia, jonka jälkeen sitä pestiin kylläisellä NaHSO₄-liuoksella ja kylläisellä NaCl-liuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (etyyliasettaatti:heksaani 80:20, v/v). Yhdisteen **7** saanto: 3,5 g (2 vaihetta, 24 %). Yhdisteen **7** ¹H-NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 7,78 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, Fmoc-H), 7,63 (2H, d, *J* = 7,35 Hz, Fmoc-H), 7,42 (2H, t, *J* = 7,3 ja 7,5 Hz, Fmoc-H), 7,34 (2H, t, *J* = 7,2 Hz, Fmoc-H), 5,92 (1H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 5,34 (3H, m, O-CH₂-CH-CH₂ ja Fmoc-NH), 4,67 (2H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 4,40 (2H, m, Fmoc-CH-CH₂-O), 4,24 (1H, t, *J* = 6,7 Hz, Fmoc-CH-CH₂-O), 3,80 (1H, s, Boc-NH), 3,68 (2H, q, *J* = 17,4, 17,6 ja 35,65 Hz, NH-CH₂-CO₂), 3,13 (2H, s, Boc-NH-CH₂), 2,97 (1H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-NH), 2,23 (3H, s, Fmoc-NH-CH-CH₂-NH ja Fmoc-NH-CH-CH₂-NH), 1,51 (2H, d, *J* = 5,85 Hz, Boc-NH-CH₂-CH₂) ja 1,45 (13H, s, Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂, Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂ ja Boc-CH₃:t). Yhdisteen **7** ESI⁺-MS: *m/z* havaittu 552,3060 [M+H]⁺, laskettu 552,30681. Yhdisteen **7** NMR- ja MS-spektrit löytyvät liitteistä 1–2.

Allyyli-(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-N-[2-(tymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysinaatti (8**):** Yhdiste **7** (2,9 mmol, 1,6 g) ja tymiini-1-etikkahappo (4,6 mmol, 850 mg.) liuotettiin kuivaan dimetyyliformamidiin (12 ml). Seokseen lisättiin joukkoon BOP (4,6 mmol, 2,1 g) ja DIEA (5,8 mmol, 1,0 ml), jonka jälkeen reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion eteneminen tarkastettiin TLC:llä (DCM:MeOH 90:10, v/v). Tämän jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin ja raakatuote liuotettiin 100 ml:aan etyyliasettaattia. Orgaanista faasia pestiin kerran 10 % KH₂PO₄-liuoksella ja kerran kylläisellä NaHCO₃-liuoksella. Sitten orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (DCM:MeOH 98:2, v/v). Yhdisteen **8** saanto: 1,5 g (74 %). Yhdisteen **8** ¹H-NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 9,17 (1H, d, *J* = 29,45 Hz, tymiini-NH), 7,73 (2H, d, *J* = 7,45 Hz, Fmoc-H), 7,56 (2H, q, *J* = 5,8, 6,8 ja 8,65 Hz, Fmoc-H), 7,37 (2H, t, *J* = 7,4 Hz, Fmoc-H), 7,28 (2H, q, *J* = 4,75, 7,35 ja 9,15 Hz, Fmoc-H), 6,81 (1H, d, *J* = 19,75 Hz, Fmoc-H), 5,88 (1H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 5,26 (2H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 4,63 (4H, dd, *J* = 4,9, 5,75, 26,4 ja 27,25 Hz, Boc-NH, Fmoc-NH ja O-CH₂-CH-CH₂), 4,45 (3H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N ja tymiini-CH₂-CO), 4,25 (3H, m, Fmoc-CH-CH₂-O ja Fmoc-CH-CH₂-O), 3,83 (2H, m, N-CH₂-CO₂), 3,57 (1H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N), 3,34 (1H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N), 3,08 (2H, s, Boc-NH-CH₂), 1,85 (3H, d, *J*

= 4,65 Hz, tyymiini-CH₃) ja 1,42 (15H, s, Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂, Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂, Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂ ja Boc-CH₃:t). Yhdisteen **8** ¹³C-NMR δ_C (500 MHz, CDCl₃): 168,8, 168,0, 164,2, 156,5, 156,3, 151,1, 144,1, 143,9, 143,8, 141,3, 141,1, 141,0, 131,5, 131,1, 127,7 (d, *J* = 19,95 Hz), 127,1, 125,1 (t, *J* = 55,2 ja 28,55 Hz), 120,0, 119,7, 118,9, 110,7, 79,2, 66,7, 66,5, 66,0, 52,5, 51,6, 50,2, 49,9, 49,7, 47,7, 47,5, 47,3, 47,2, 40,0, 39,8, 36,8 (d, *J* = 16,3 Hz), 31,9, 31,4, 29,7, 28,4, 22,9 (d, *J* = 40,75 Hz) ja 12,3. Yhdisteen **8** ESI⁺-MS: *m/z* havaittu 756,3187 [M+K]⁺, laskettu 756,3005. Yhdisteen **8** NMR- ja MS-spektrit löytyvät liitteistä 3–6.

(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]-glysinaatti (1): Yhdiste **8** (0,65 mmol, 470 mg) liuotettiin 15 ml:aan tetrahydrofuraania. Tämän jälkeen liuokseen lisättiin tyypikaapissa Pd(PPh₃)₄ (0,038 mmol, 52 mg) sekä PhSiH₃ (1,30 mmol, 160 µl). Liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 2 h. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (DCM:MeOH 80:20, *v/v*). Liuos haihdutettiin kuiviin, jonka jälkeen raakatuote liuotettiin 100 ml:aan etyyliasettaattia. Tätä liuosta pestiin kolme kertaa kylläisellä NaHSO₄-liuoksella ja kolme kertaa kylläisellä NaCl-liuoksella. Sitten orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (MeCN:H₂O 90:10, *v/v*). Yhdisteen **1** saanto: 270 mg (62 %). Yhdisteen **1** ¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO): 11,23 (1H, s, tyymiini-NH), 7,89 (2H, d, *J* = 7,25 Hz, Fmoc-H), 7,70 (2H, d, *J* = 6,45 Hz, Fmoc-H), 7,40 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, Fmoc-H ja OH), 7,34 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, Fmoc-H ja Fmoc-NH), 7,19 (1H, d, *J* = 15,7 Hz, Boc-NH), 6,74 (1H, s, tyymiini-H), 4,44 (2H, q, *J* = 9,05, 16,4 ja 16,7 Hz, tyymiini-CH₂-CO), 4,23 (3H, d, *J* = 11,65 Hz, Fmoc-CH-CH₂-O ja Fmoc-CH-CH₂-O), 3,68 (2H, s, N-CH₂-CO₂), 3,58 (1H, s, Fmoc-NH-CH-CH₂-N), 3,47 (4H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N ja Boc-NH-CH₂), 2,87 (3H, d, *J* = 4,75 Hz, tyymiini-CH₃), 1,36 (13H, s, Boc-CH₃:t, Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂ ja Boc-NH-CH₂-CH₂) ja 1,20 (2H, d, *J* = 31,25 Hz, Boc-NH-CH₂-CH₂-CH₂). Yhdisteen **1** ¹³C-NMR δ_C (500 MHz, DMSO): 171,9, 168,3, 164,9, 156,4, 156,0, 151,5, 144,4 (d, *J* = 48,7 Hz), 142,6, 141,2, 128,1, 127,6, 125,8, 120,5, 108,4, 77,7, 65,7, 50,1, 48,2, 47,3, 32,1, 29,9, 28,7, 23,4, ja 23,0. Yhdisteen **1** ESI⁺-MS: *m/z* havaittu 716,2272 [M+K]⁺, laskettu 716,26924. Yhdisteen **1** NMR- ja MS-spektrit löytyvät liitteistä 7–9.

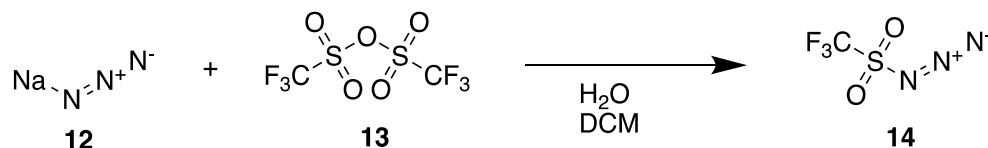
Allyyli-(S)-(N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]-glysinaatti (9): Yhdiste **8** (0,70 mmol, 500 mg) liuotettiin 15 % TFA/DCM-liuokseen ja liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa noin kolme tuntia. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla (etyyliasettaatti:metanoli 90:10, *v/v*). Reaktioseos haihdutettiin kuiviin

ja haihdutusjäännöstä haihdutettiin vielä kolme kertaa tolueenista ja kolme kertaa DCM:sta. Raakatuote **9** käytettiin sellaisenaan kahteen eri reaktioon.

Allyyli-(S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometylene)amino]-heksyyli}-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatti (10): Yhdiste **9** (2,5 mmol, 1,6 g), TEA (5,0 mmol, 700 µl) ja 1,3-di-Boc-2-(trifluorometyylisulfonyyli)guanidiini (5,0 mmol, 2,0 g) liuotettiin 15 ml DCM:a. Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla (DCM:MeOH 90:10, v/v). Reaktioseokseen lisättiin 60 ml DCM:a ja sitä pestiin kaksi kertaa 1 M NaHSO₄-liuoksella, kaksi kertaa kylläisellä NaHCO₃-liuoksella ja kaksi kertaa kylläisellä NaCl-liuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (DCM:MeOH 97:3, v/v). Yhdisteen **10** saanto: 810 mg (37 %). Yhdisteen **10** ¹H-NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 11,53 (1H, d, *J* = 16,15 Hz, tyymiini-NH), 8,51 (1H, d, *J* = 22,05 Hz, Boc-NH), 7,77 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, Fmoc-H), 7,60 (2H, q, *J* = 6, 7,15 ja 7,65 Hz, Fmoc-H), 7,42 (2H, t, *J* = 7,35 ja 7,5 Hz, Fmoc-H), 7,32 (2H, m, Fmoc-H), 6,99 (1H, d, *J* = 20,55 Hz, tyymiini-H), 5,92 (1H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 5,32 (2H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 4,67 (2H, dd, *J* = 4,9, 5,65, 23,5 ja 24,25 Hz, O-CH₂-CH-CH₂), 4,44 (3H, m, Fmoc-CH-CH₂-O ja Fmoc-CH-CH₂-O), 4,28 (1H, m, Boc-NH), 4,22 (2H, t, *J* = 4,95 ja 6,4 Hz, tyymiini-CH₂-CO), 3,90 (2H, m, N-CH₂-CO₂), 3,64 (1H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N), 3,38 (3H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N ja Boc-NH), 1,90 (3H, d, *J* = 3,35 Hz, tyymiini-CH₃), 1,55 (4H, d, *J* = 5,1 Hz, (di-Boc-guanidiini)N-CH₂ ja (di-Boc-guanidiini)N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1,52 (20H, t, *J* = 4 ja 7,85 Hz, (di-Boc-guanidiini)N-CH₂-CH₂ ja Boc-CH₃:t) ja 1,28 (2H, s, (di-Boc-guanidiini)N-CH₂-CH₂-CH₂). Yhdisteen **10** ¹³C-NMR δ_C (500 MHz, CDCl₃): 163,8, 143,8, 141,3, 131,5, 131,1, 127,8, 127,1, 120,0, 119,0, 66,7, 66,1, 29,7, 28,3, 28,1 (d, *J* = 6,6 Hz), 27,8 ja 12,3 (d, *J* = 10,35 Hz). Yhdisteen **10** ESI⁺-MS: m/z havaittu 882,3699 [M+Na]⁺, laskettu 882,4008. Yhdisteen **10** NMR- ja MS-spektrit löytyvät liitteistä 10–13.

(S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometylene)amino]heksyyli}-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatti (2): Yhdiste **10** (0,99 mmol, 850 mg) liuotettiin 23 ml:aan tetrahydrofuraania. Tämän jälkeen liuokseen lisättiin typpikaapissa Pd(PPh₃)₄ (0,050 mmol, 74 mg) sekä PhSiH₃ (2,0 mmol, 245 µl). Liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 2 h. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (MeCN:H₂O 90:10, v/v). Liuos haihdutettiin kuiviin, jonka jälkeen raakatuote liuotettiin 100 ml:aan etyyliasetaatia. Tätä liuosta pestiin kolme kertaa kylläisellä NaHSO₄-liuoksella ja kolme kertaa kylläisellä NaCl-liuoksella. Sitten orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla,

suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (MeCN:H₂O 90:10, v/v). Yhdisteen **2** saanto: 600 mg (74 %). Yhdisteen **2** ¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO): 11,49 (1H, s, OH), 11,20 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, tyymiini-NH), 8,26 (1H, t, *J* = 5,25 ja 5,6 Hz, Fmoc-NH), 7,89 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, Fmoc-H), 7,69 (2H, t, *J* = 7,3 ja 14,3 Hz, Fmoc-H), 7,41 (2H, t, *J* = 7,6 ja 7,2 Hz, Fmoc-H), 7,32 (2H, m, Fmoc-H), 7,19 (1H, d, *J* = 13,25 Hz, tyymiini-CH), 4,40 (2H, m, Fmoc-CH-CH₂-O), 4,22 (2H, Fmoc-CH-CH₂-O ja Boc-NH), 3,72 (2H, d, *J* = 19,1 Hz, tyymiini-CH₂-CO₂), 3,62 (1H, d, *J* = 23,45 Hz, Fmoc-NH-CH-CH₂-N), 3,35 (2H, m, N-CH₂-CO₂), 3,24 (2H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N), 3,05 (1H, m, Boc-NH), 1,76 (5 H, s, tyymiini-CH₃ ja (di-Boc-guanidiini)N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1,69 (2H, s, (di-Boc-guanidiini)N-CH₂-CH₂), 1,44 (11H, s, (di-Boc-guanidiini)N-CH₂ ja Boc-CH₃) ja 1,37 (11H, s, (di-Boc-guanidiini)N-CH₂-CH₂-CH₂ ja Boc-CH₃). Yhdisteen **2** ¹³C-NMR δ_C (500 MHz, DMSO): 171,9, 164,9, 155,7, 151,5, 144,3, 141,2, 127,8 (d, *J* = 259 Hz), 120,5, 108,3, 83,3, 78,6, 47,3, 28,5, 28,1, 23,0 ja 12,3. Yhdisteen **2** ESI⁺-MS: *m/z* havaittu 820,3675 [M+H]⁺, laskettu 820,38758. Yhdisteen **2** NMR- ja MS-spektrit löytyvät liitteistä 14–17.



Kaavio 3 TfN₃:n synteesi

Seuraavaksi valmistettiin TfN₃-liuosta ja K₂CO₃-CuSO₄-vesiliuosta, jotta TfN₃-ryhmä voitiin liittää yhdisteeseen **9**: NaN₃ (46 mmol, 3,0 g) (yhdiste **12**, kaavio 3) liuotettiin veteen (7,5 ml) ja joukkoon lisättiin DCM:a (12,4 ml). Typpikaapissa, samalla jäähauteessa sekoittaen, joukkoon lisättiin tipoittain Tf₂O:ta (9,2 mmol, 1,5 ml) (yhdiste **13**, kaavio 3). Sekoitusta jäähauteessa jatkettiin yksi tunti, jonka jälkeen sekoitusta jatkettiin huoneenlämpötilassa toinen tunti. Joukkoon lisättiin 2 ml vettä ja 5,3 ml DCM:a. Orgaaninen faasi erotettiin. Vesifaasia pestiin DCM:lla. Tämän jälkeen yhdistettyä orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO₃-liuoksella. Orgaaninen faasi eli TfN₃-liuos (yhdiste **14**, kaavio 3) otettiin talteen seuraava reaktiota varten. CuSO₄ • 5 H₂O-liuos valmistettiin liuottamalla CuSO₄:a (0,059 mmol, 14,7 mg) 8 ml:aan vettä. K₂CO₃ (0,16 mmol, 23 mg) liuotettiin 430 µl:aan vettä ja valmistetusta CuSO₄ • 5 H₂O-vesiliuoksesta otettiin joukkoon 130 µl:n näyte.

Allyyli-(S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysinaatti (11**):** Yhdiste **9** (0,16 mmol, 100 mg) liuotettiin 360 µl DCM:a.

Tähän joukkoon lisättiin K_2CO_3 - $CuSO_4$ -vesiliuos sekä vielä 860 μ l DCM:a ja 570 μ l MeOH:a. Tähän lisättiin vielä 3,0 ml aiemmin valmistettua TfN_3 -liuosta (**14**). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (DCM:MeOH 90:10, v/v ja MeCN:H₂O 90:10, v/v). Tämän jälkeen joukkoon lisättiin 20 ml DCM:a ja 15 ml kylläistä $NaHCO_3$ -liuosta. Orgaaninen faasi erotettiin ja vesifaasia pestiin kolme kertaa DCM:lla. Yhdistetyt orgaaniset faasit kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (DCM:MeOH 92,5:7,5, v/v). Yhdisteen **11** saanto: 49 mg (46 %). Yhdisteen **11** ¹H-NMR δ_H (500 MHz, $CDCl_3$): 9,52 (1H, d, $J = 66,45$ Hz, tyymiini-NH), 8,66 (1H, s, Fmoc-NH), 7,76 (2H, d, $J = 4,15$ Hz, Fmoc-H), 7,59 (2H, t, $J = 7,55$ ja 10,75 Hz, Fmoc-H), 7,39 (2H, t, $J = 6,85$ ja 3,2 Hz, Fmoc-H), 7,30 (2H, t, $J = 7,05$ ja 6,4 Hz, Fmoc-H), 6,96 (1H, d, $J = 29$ Hz, tyymiini-CH), 5,91 (1H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 5,29 (2H, m, O-CH₂-CH-CH₂), 4,68 (3H, q, $J = 20,2$, 5,45 ja 19,85 Hz, Fmoc-NH-CH-CH₂-N ja O-CH₂-CH-CH₂), 4,43 (4H, m, N-CH₂-CO₂ ja tyymiini-CH₂-CO), 4,23 (2H, m, Fmoc-NH-CH-CH₂-N), 4,00 (1H, d, $J = 17,2$ Hz, Fmoc-CH-CH₂-O), 3,67 (2H, m, Fmoc-CH-CH₂-O), 3,27 (2H, t, $J = 6,10$ ja 7,65 Hz, N₃-CH₂), 1,87 (3H, D, $J = 4,25$ Hz, tyymiini-CH₃) ja 1,42 (6H, m, N₃-CH₂-CH₂, N₃-CH₂-CH₂-CH₂ ja N₃-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂). Yhdisteen **11** ¹³C-NMR δ_C (500 MHz, $CDCl_3$): 168,8, 164,4, 156,4, 151,2 (d, $J = 110$ Hz), 144,0 (d, $J = 145$ Hz), 141,3, 140,9, 136,1, 131,5, 127,7, 127,1, 125,2 (d, $J = 16,6$ Hz), 120,0, 110,7, 66,5, 52,4, 51,1, 49,9 (t, $J = 63,4$ ja 69,8 Hz), 47,3 (d, $J = 43,8$ Hz), 31,8 (d, $J = 177$ Hz), 28,5 (d, $J = 38,5$ Hz), 23,2 (d, $J = 134$ Hz) ja 12,3. Yhdisteen **11** ESI⁺-MS: m/z havaittu 666,2467 [M+Na]⁺, laskettu 666,26467. Yhdisteen **11** NMR- ja MS-spektrit löytyvät liitteistä 18–21.

(S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysinaatti (3**):** Yhdiste **11** (1,1 mmol, 690 mg) liuotettiin 25 ml:aan tetrahydrofuraania. Tämän jälkeen liuokseen lisättiin $Pd(PPh_3)_4$ (0,054 mmol, 117 mg) sekä $PhSiH_3$ (2,1 mmol, 265 μ l) tyypikaapissa. Liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 2 h. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (MeCN:H₂O 90:10, v/v). Liuos haihdutettiin kuiviin, jonka jälkeen raakatuote liuotettiin 100 ml:aan etyyliasetaattia. Tätä liuosta pestiin kolme kertaa kylläisellä $NaHSO_4$ -liuoksella ja kolme kertaa kylläisellä $NaCl$ -liuoksella. Sitten orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (MeCN:H₂O 90:10, v/v). Yhdisteen **3** saanto: 350 mg (53 %). Yhdisteen **3** ¹H-NMR δ_H (500 MHz, DMSO): 7,89 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, Fmoc-H), 7,84 (2H, d, $J = 7,45$ Hz, Fmoc-H), 7,42 (2H, t, $J = 7,45$ ja 6,65 Hz, Fmoc-H), 7,35 (3H, td, $J = 0,95$ ja 7,5 Hz, Fmoc-H ja tyymiini-NH), 7,26 (1H, t,

$J = 17,7$ ja $2,15$ Hz, tyymiini-CH), $6,28$ (2H, s, OH ja Fmoc-NH), $4,44$ (2H, s, Fmoc-CH-CH₂-O), $3,73$ (2H, m, tyymiini-CH₂-CO), $3,45$ (2H, m, N-CH₂-CO₂), $3,29$ (4H, m, Fmoc-CH-CH₂-O, Fmoc-NH-CH-CH₂-N ja Fmoc-NH-CH-CH₂-N), $1,74$ (3H, d, $J = 1,7$ Hz, tyymiini-CH₃) ja $1,35$ (8H, m, N₃-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂, N₃-CH₂-CH₂-CH₂, N₃-CH₂-CH₂ ja N₃-CH₂). Yhdisteen **3** ¹³C-NMR δ_C (500 MHz, DMSO): 164,9, 151,6, 143,0, 142,7, 139,9, 137,9, 129,4, 127,8, 121,9, 120,5, 110,2, 108,4, 51,0, 48,3, 32,1, 28,6, 23,1 ja 12,4. Yhdisteen **3** ESI⁺-MS: m/z havaittu 642.2000 [M+K]⁺, laskettu 642,20730. Yhdisteen **3** NMR- ja MS-spektrit löytyvät liitteistä 22–25.

3.1.2 (R)-isomeerin valmistus

Fmoc-D-lysiini(Boc)-N-metoksi-N-metyyliamidi (2R): *N,O*-dimetyylihydrok-syyliamiinihydrokloridi (1,2 mmol, 120 mg) liuotettiin 5 ml dimetyyliformamidia. Fmoc-D-lysiini(Boc)-OH (**1R**, kaavio 2) (1,1 mmol, 0,5 g), BOP (1,1 mmol, 470 mg) ja DIEA (2,5 mmol, 430 μl) lisättiin joukkoon tässä järjestyksessä ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa yön yli. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (DCM:MeOH 90:10, *v/v*), jonka jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin 20 ml:aan etyyliasettaattia ja tätä liuosta pestiin kolme kertaa 1 M NaHSO₄-liuoksella sekä kerran LiCl-liuoksella, kylläisellä NaCl-liuoksella ja kylläisellä NaHCO₃-liuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Sitten tuote haihdutettiin dikloorimetaanista kolme kertaa ja se haihdutettiin kuiviin vakuuissa öljypumpulla. Yhdisteen **2R** saanto: 550 mg (77 %). Raakatuote käytettiin seuraavaan reaktiovaiheeseen ilman pylväspuhdistusta.

Fmoc-D-lysiini(Boc)-H (3R): Edellisessä reaktiossa valmistettu yhdiste **2R** (kaavio 2) (0,64 mmol, 330 mg) liuotettiin 5 ml kuivaa tetrahydrofuraania. Typpikaapissa, samalla jäähautteessa sekoittaen, seokseen lisättiin LiAlH₄:a (0,64 mmol, 320 μl) tipoittain 20 minuutin aikana. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (etyyliasettaatti:heksaani 1:1, *v/v*). Reaktio pysäytettiin lisäämällä joukkoon 5 ml 1 M NaHSO₄:a. Tämän jälkeen tetrahydrofuraani haihdutettiin ja jäljelle jäänyttä vesifaasia pestiin kolme kertaa etyyliasetaatilla. Yhdistettyä orgaanista faasia pestiin vielä kylläisellä NaCl-liuoksella. Tämän jälkeen orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin melkein kuiviin. Jäännökseen lisättiin hieman 1 % AcOH:MeOH-liuosta, jonka jälkeen haihdutusta jatkettiin täysin kuiviin. Tämän jälkeen yhdiste **3R** käytettiin välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

Allyyli-(R)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)glysinaatti (4R): Yhdiste **3R** (kaavio 2) ja glysiini allyyliesterin sulfonihapposuola (1,3 mmol, 370 mg) liuotettiin 1 % AcOH:MeOH-liuokseen (5 ml). Seokseen lisättiin NaBH₃CN (1,3 mmol, 81 mg) samalla jäähauteessa sekoittaen. Tämän jälkeen jäähaude poistettiin ja reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Reaktion eteneminen todettiin TLC:lla (etyyliasettaatti:heksaani 1:1, v/v), jonka jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin. Raakatuote liuotettiin 20 ml:aan etyyliasettaattia, jonka jälkeen sitä pestiin kylläisellä NaHSO₄-liuoksella ja kylläisellä NaCl-liuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (etyyliasettaatti:heksaani 70:30, v/v). Yhdisteen **4R** saanto: 41 mg (2 vaihetta, 9 %). Yhdisteen **4R** ESI⁺-MS: havaittu 552,2926 [M+H]⁺ (liitteet 26 ja 27), laskettu 552,30681.

3.2. Enantiopuhtauden määrittäminen

PNA-monomeerien enantiopuhtauden määrittäminen tehtiin yhdisteestä **7** ja tämän (R)-isomeeristä (yhdiste **4R**, kaavio 2). Enantiopuhtaus määritettiin HPLC:lla kiraalisella Lux Cellulose (250 x 5 mm, 5 μm) -kolonnilla. Ajoliuoksena käytettiin isopropanoli:heksaani 70:30 (v/v) -liuosta. Virtausnopeutena käytettiin 1,0 ml min⁻¹ ja havaitseminen tehtiin 260 nm aallonpituudella. Ensimmäinen näyte A, jossa oli yhdistettä **7** noin 2 mg liuotettuna 500 μl ajoliuosta. Seuraavaksi ajettiin näyte B, jossa oli yhdistettä **4R** noin 2 mg liuotettuna 500 μl ajoliuosta. Viimeisenä ajettiin näyte C, jossa oli otettu näytteistä A ja B saman suuruiset osat ja sekoitettu ne yhteen. Kuvassa 8 on esitetty näytteiden A, B ja C tulokset.

4. Yhteenveto

Työssä haluttiin syntetisoida kolmea erilaista γ-kiraalista PNA-rakenneyksikköä. Niiden kaikkien synteesit onnistuivat synteesisuunnitelman mukaan ja kohtuullisen hyvillä saannoilla. Synteesituotteet olivat enantiopuhtaita. Seuraavaksi näistä γ-PNA-monomeereistä voidaan valmistaa PNA:ta ja PNA:sta tutkia miten nämä valmistetut monomeerit vaikuttavat PNA:iden ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi solunläpäisykykyyn tai sitoutumisominaisuuksiin.

5. Viiteluettelo

1. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. & Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**, 1497–1500 (1991).
2. Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. & Berg, R. H. Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1895–1897 (1992).
3. Egholm, M. *et al.* PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365**, 566–568 (1993).
4. Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. & Berg, R. H. Recognition of Guanine and Adenine in DNA by Cytosine and Thymine Containing Peptide Nucleic Acids (PNA). *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9677–9678 (1992).
5. Nielsen, P. E. Addressing the challenges of cellular delivery and bioavailability of peptide nucleic acids (PNA). *Q. Rev. Biophys.* **38**, 345–350 (2005).
6. Mitra, R. & Ganesh, K. N. Aminomethylene peptide nucleic acid (am-PNA): Synthesis, regio-/stereospecific DNA binding, and differential cell uptake of (α/γ , R / S) am-PNA analogues. *J. Org. Chem.* **77**, 5696–5704 (2012).
7. Hu, J. & Corey, D. R. Inhibiting gene expression with Peptide Nucleic Acid(PNA) - Peptide Conjugates that Target Chromosomal DNA. *Biochemistry* **46**, 7581–7589 (2007).
8. Janowski, B. A. *et al.* Inhibiting Transcription of Chromosomal DNA With Antigene Peptide Nucleic Acids. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 210–215 (2005).
9. Janowski, B. A., Hu, J. & Corey, D. R. Silencing gene expression by targeting chromosomal DNA with antigene peptide nucleic acids and duplex RNAs. *Nat. Protoc.* **1**, 436–443 (2006).
10. Ricciardi, A. S. *et al.* In utero nanoparticle delivery for site-specific genome editing. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
11. Sforza, S., Corradini, R., Ghirardi, S., Dossena, A. & Marchelli, R. DNA binding

- of a D-Lysine-based chiral PNA: Direction control and mismatch recognition. *European J. Org. Chem.* 2905–2913 (2000).
12. Tähtinen, V., Verhassel, A., Tuomela, J. & Virta, P. γ -(S)-Guanidinylmethyl-Modified Triplex-Forming Peptide Nucleic Acids Increase Hoogsteen-Face Affinity for a MicroRNA and Enhance Cellular Uptake. *ChemBioChem* **20**, 3041–3051 (2019).
 13. Cattani-Scholz, A. *et al.* PNA-PEG modified silicon platforms as functional bio-interfaces for applications in DNA microarrays and biosensors. *Biomacromolecules* **10**, 489–496 (2009).
 14. Sahu, B. *et al.* Synthesis and characterization of conformationally preorganized, (R)-diethylene glycol-containing γ -peptide nucleic acids with superior hybridization properties and water solubility. *J. Org. Chem.* **76**, 5614–5627 (2011).
 15. Avitabile, C. *et al.* γ sulphate PNA (PNA S): Highly selective DNA binding molecule showing promising antigene activity. *PLoS One* **7**, e35774 (2012).
 16. Sahu, B. *et al.* Synthesis of conformationally preorganized and cell-permeable guanidine-based γ -peptide nucleic acids (γ GPNA). *J. Org. Chem.* **74**, 1509–1516 (2009).
 17. Mitra, R. & Ganesh, K. N. PNAs grafted with (α/γ , R/S)-aminomethylene pendants: Regio and stereo specific effects on DNA binding and improved cell uptake. *Chem. Commun.* **47**, 1198–1200 (2011).
 18. Englund, E. A. & Appella, D. H. γ -Substituted Peptide Nucleic Acids Constructed from L-Lysine are a Versatile Scaffold for Multifunctional Display. *Angew. Chemie* **119**, 1436–1440 (2007).
 19. Manicardi, A. *et al.* Cellular Uptakes, Biostabilities and Anti-miR-210 Activities of Chiral Arginine-PNAs in Leukaemic K562 Cells. *ChemBioChem* **13**, 1327–1337 (2012).
 20. Kleiner, R. E., Brudno, Y., Birnbaum, M. E. & Liu, D. R. DNA-templated polymerization of side-chain-functionalized peptide nucleic acid aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 4646–4659 (2008).

21. Oyaghire, S. N. *et al.* RNA G-Quadruplex Invasion and Translation Inhibition by Antisense γ -Peptide Nucleic Acid Oligomers. *Biochemistry* **55**, 1977–1988 (2016).
22. de Koning, M. C. *et al.* Synthesis of thiol-modified peptide nucleic acids designed for post-assembly conjugation reactions. *Tetrahedron* **62**, 3248–3258 (2006).
23. Dragulescu-Andrasi, A. *et al.* A simple γ -backbone modification preorganizes peptide nucleic acid into a helical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10258–10267 (2006).
24. Englund, E. A. & Appella, D. H. Synthesis of γ -substituted peptide nucleic acids: A new place to attach fluorophores without affecting DNA binding. *Org. Lett.* **7**, 3465–3467 (2005).
25. Sacui, I., Hsieh, W. C., Manna, A., Sahu, B. & Ly, D. H. Gamma Peptide Nucleic Acids: As Orthogonal Nucleic Acid Recognition Codes for Organizing Molecular Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 8603–8610 (2015).
26. Yeh, J. I. *et al.* Crystal structure of chiral γ PNA with complementary DNA strand: Insights into the stability and specificity of recognition and conformational preorganization. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10717–10727 (2010).
27. Rapireddy, S., He, G., Roy, S., Armitage, B. A. & Ly, D. H. Strand invasion of mixed-sequence B-DNA by acridine-linked, γ -peptide nucleic acid (γ -PNA). *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15596–15600 (2007).
28. Rapireddy, S., Bahal, R. & Ly, D. H. Strand invasion of mixed-sequence, double-helical B-DNA by γ -peptide nucleic acids containing G-clamp nucleobases under physiological conditions. *Biochemistry* **50**, 3913–3918 (2011).
29. Chenna, V. *et al.* A simple cytosine to G-clamp nucleobase substitution enables chiral γ -PNAs to invade mixed-sequence double-helical B-form DNA. *ChemBioChem* **9**, 2388–2391 (2008).
30. Bahal, R., Sahu, B., Rapireddy, S., Lee, C. M. & Ly, D. H. Sequence-Unrestricted, Watson-Crick Recognition of Double Helical B-DNA by (R)-MiniPEG- γ PNAs. *ChemBioChem* **13**, 56–60 (2012).

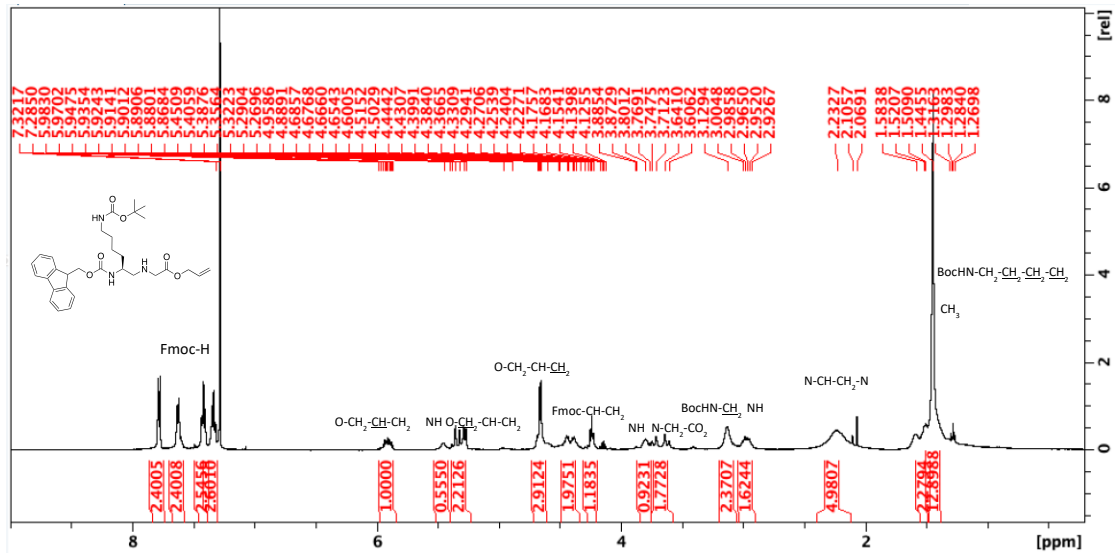
31. He, G., Rapireddy, S., Bahal, R., Sahu, B. & Ly, D. H. Strand invasion of extended, mixed-sequence B-DNA by γ PNAs. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 12088–12090 (2009).
32. Bahal, R. *et al.* Single-Stranded Gamma-PNAs for In Vivo Site-Specific Genome Editing via Watson-Crick Recognition. *Curr. Gene Ther.* **14**, 331–342 (2014).
33. Huang, H. *et al.* Preparation and determination of optical purity of γ -lysine modified peptide nucleic acid analogues. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 517–522 (2012).
34. Periyalagan, A., Kim, Y.-T. & Hong, I. S. Synthesis and Characterization of Optically Pure Gamma-PNA Backbones by SIBX-Mediated Reductive Amination. *Bull. Korean Chem. Soc.* **42**, 1304–1309 (2021).
35. Hsieh, W. C., Shaikh, A. Y., Perera, J. D. R., Thadke, S. A. & Ly, D. H. Synthesis of (R)- and (S)-Fmoc-Protected Diethylene Glycol Gamma PNA Monomers with High Optical Purity. *J. Org. Chem.* **84**, 1276–1287 (2019).
36. Wu, Y. & Xu, J.-C. Synthesis of chiral peptide nucleic acids using Fmoc chemistry. *Tetrahedron* **57**, 8107–8113 (2001).
37. Falkiewicz, B., Kołodziejczyk, A. S., Liberek, B. & Wiśniewski, K. Synthesis of achiral and chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers using Mitsunobu reaction. *Tetrahedron* **57**, 7909–7917 (2001).
38. Dong, B. *et al.* Synthesis and characterization of (R)-miniPEG-containing chiral γ -peptide nucleic acids using the Fmoc strategy. *Tetrahedron Lett.* **60**, 1430–1433 (2019).
39. De Costa, N. T. S. & Heemstra, J. M. Evaluating the Effect of Ionic Strength on Duplex Stability for PNA Having Negatively or Positively Charged Side Chains. *PLoS One* **8**, (2013).
40. Kosynkina, L., Wang, W. & Liang, T. C. A convenient synthesis of chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers. *Tetrahedron Lett.* **35**, 5173–5176 (1994).
41. Dezhnevov, A. V. *et al.* Synthesis of anionic peptide nucleic acid oligomers including γ -carboxyethyl thymine monomers. *Mendeleev Commun.* **25**, 47–48 (2015).

42. Kumar, S., Dhami, I., Thadke, S. A., Ly, D. H. & Taylor, R. E. Rapid self-assembly of γ PNA nanofibers at constant temperature. *Biopolymers* **112**, (2021).
43. Kumar, S., Liu, Y. & Taylor, R. E. Self-assembly of gamma-modified peptide nucleic acids into complex nanostructures in organic solvent mixtures. *J. Vis. Exp.* **2020**, 1–21 (2020).
44. Dong, B. *et al.* Film-Spotting chiral miniPEG- γ PNA array for BRCA1 gene mutation detection. *Biosens. Bioelectron.* **136**, 1–7 (2019).
45. Gupta, A. *et al.* Anti-tumor Activity of miniPEG- γ -Modified PNAs to Inhibit MicroRNA-210 for Cancer Therapy. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **9**, 111–119 (2017).
46. Bahal, R. *et al.* In vivo correction of anaemia in β -thalassemic mice by γ PNA-mediated gene editing with nanoparticle delivery. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
47. Malik, S. *et al.* Head on Comparison of Self- and Nano-Assemblies of Gamma Peptide Nucleic Acid Amphiphiles. *Adv. Funct. Mater.* **32**, 1–12 (2022).
48. Kumar, S., Pearse, A., Liu, Y. & Taylor, R. E. Modular self-assembly of gamma-modified peptide nucleic acids in organic solvent mixtures. *Nat. Commun.* **11**, 1–10 (2020).
49. Tähtinen, V., Granqvist, L., Murtola, M., Strömberg, R. & Virta, P. 19F NMR Spectroscopic Analysis of the Binding Modes in Triple-Helical Peptide Nucleic Acid (PNA)/MicroRNA Complexes. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 7113–7124 (2017).
50. Dose, C. & Seitz, O. Convergent synthesis of peptide nucleic acids by native chemical ligation. *Org. Lett.* **7**, 4365–4368 (2005).
51. Tedeschi, T., Sforza, S., Corradini, R. & Marchelli, R. Synthesis of new chiral PNAs bearing a dipeptide-mimic monomer with two lysine-derived stereogenic centres. *Tetrahedron Lett.* **46**, 8395–8399 (2005).
52. Singer, A., Rapireddy, S., Ly, D. H. & Meller, A. Electronic barcoding of a viral gene at the single-molecule level. *Nano Lett.* **12**, 1722–1728 (2012).
53. Morin, T. J. *et al.* Nanopore-based target sequence detection. *PLoS One* **11**, 1–21 (2016).

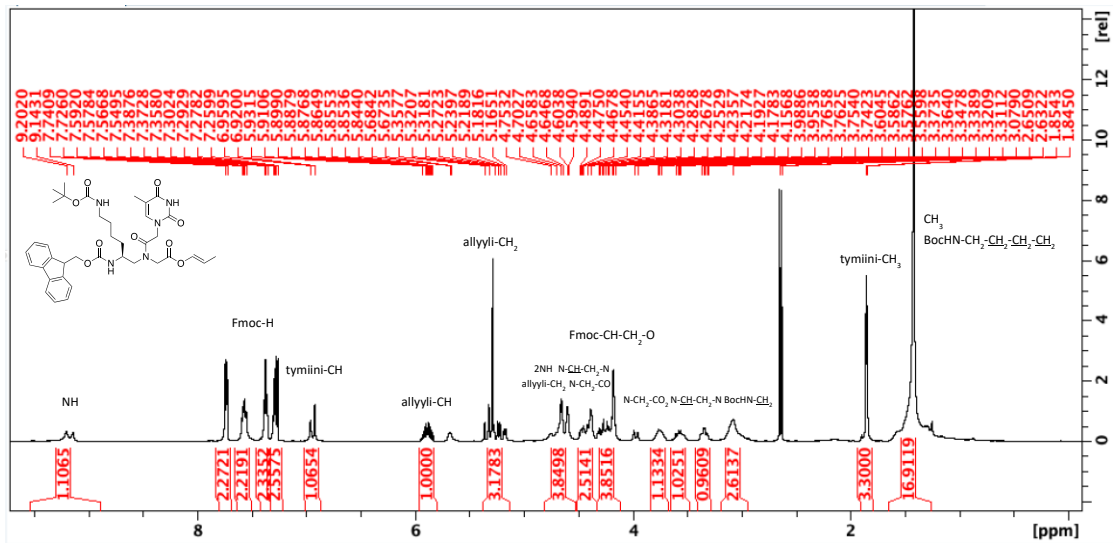
54. Nölling, J. *et al.* Duplex DNA-invading γ -modified peptide nucleic acids enable rapid identification of bloodstream infections in whole blood. *MBio* 7, (2016).

6. Liitteet

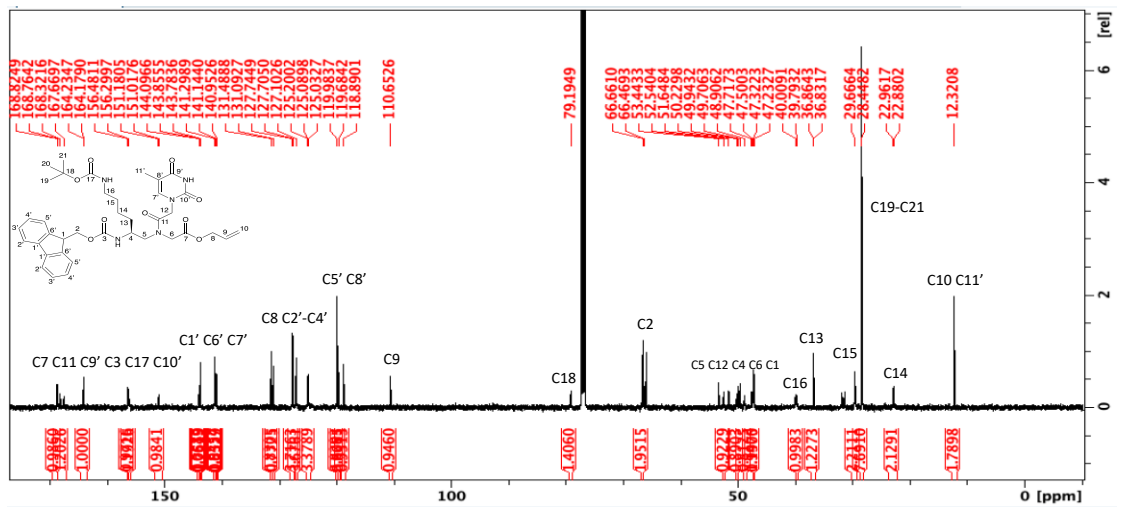
Liite 1. Allyyli-(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)glysinaatin (7) ¹H-NMR-spektri



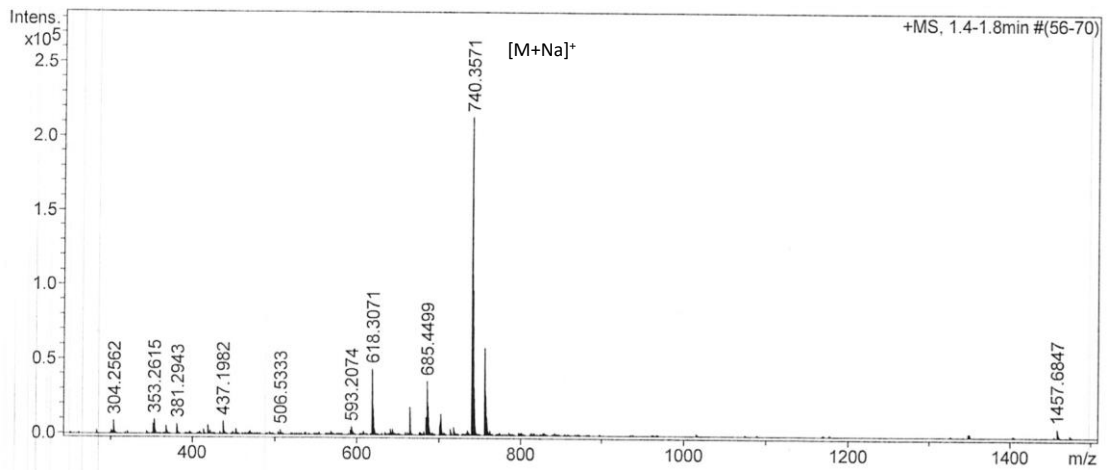
Liite 3. Allyyli-(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysiinaatin (**8**) ¹H-NMR-spektri



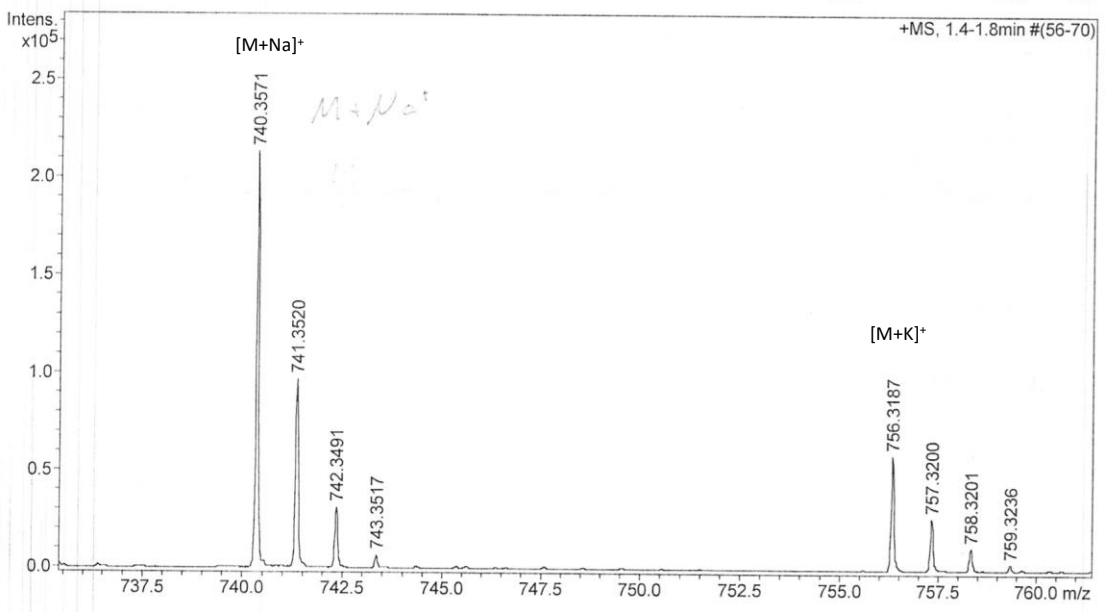
Liite 4. Allyyli-(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysiinaatin (**8**) ¹³C-NMR-spektri



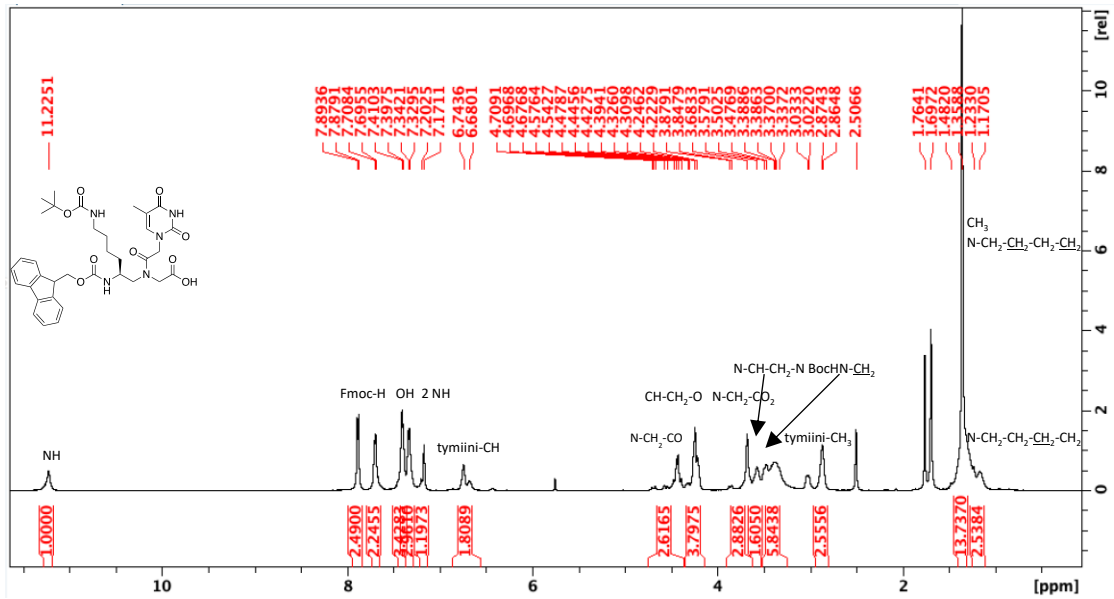
Liite 5. Allyyli-(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)-
 asetyyli]glysinaatin (**8**) massaspektri



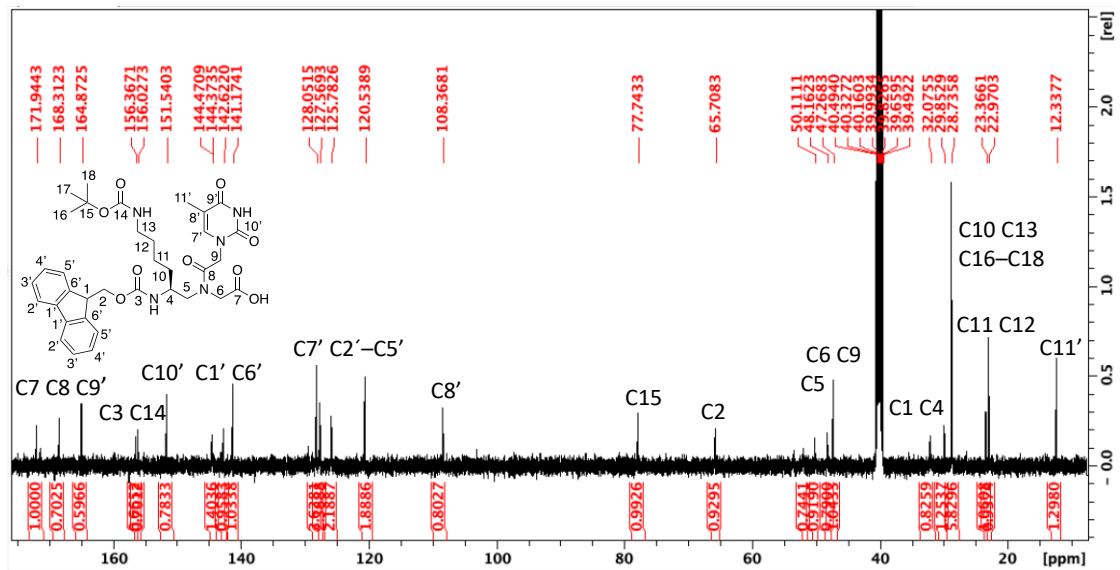
Liite 6 Lähennetty allyyli-(S)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-
 N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (**8**) massaspektri



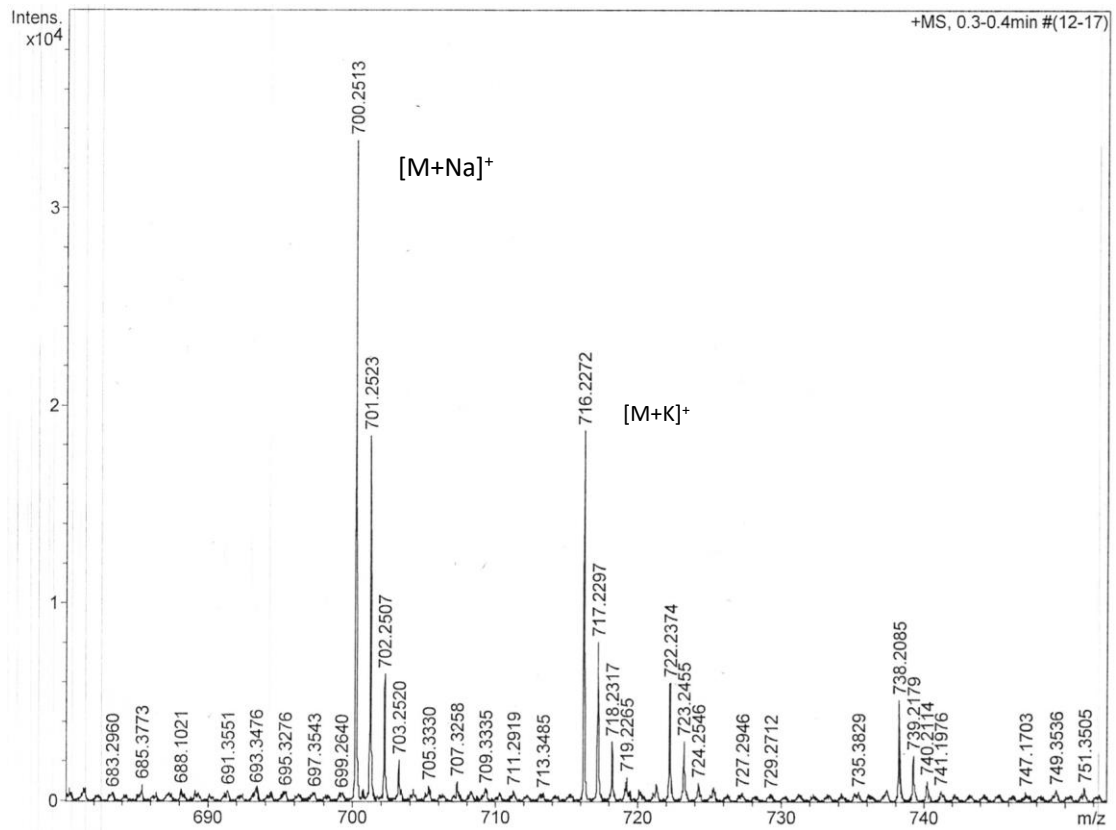
Liite 7. (S)-(*N*⁶-Boc-*N*²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-*N*-[2-(tyymiini-*N*¹-yyli)asetyyli]-glysinaatin (**1**) ¹H-NMR-spektri



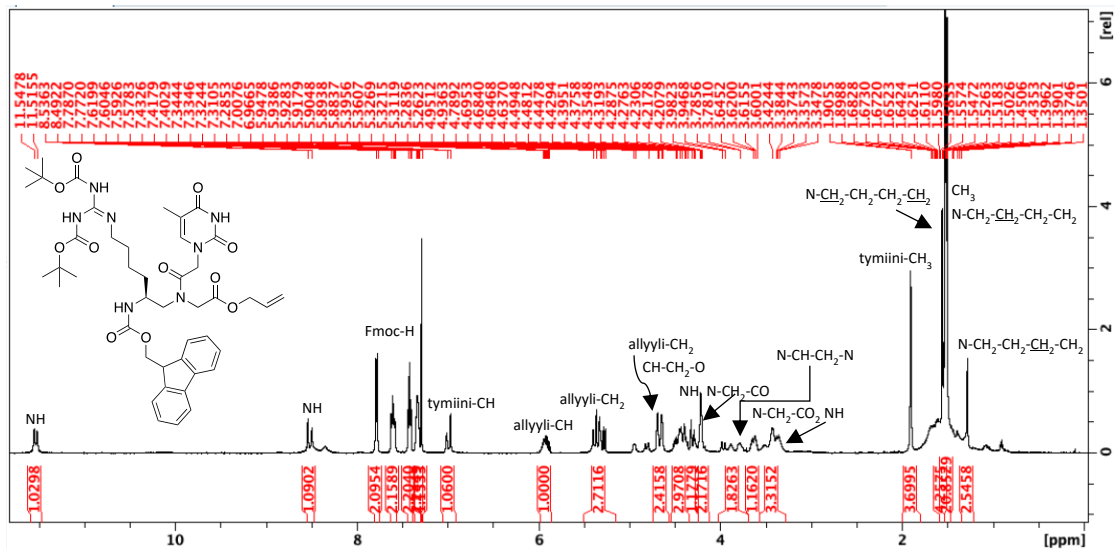
Liite 8. (S)-(*N*⁶-Boc-*N*²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-*N*-[2-(tyymiini-*N*¹-yyli)asetyyli]-glysinaatin (**1**) ¹³C-NMR-spektri



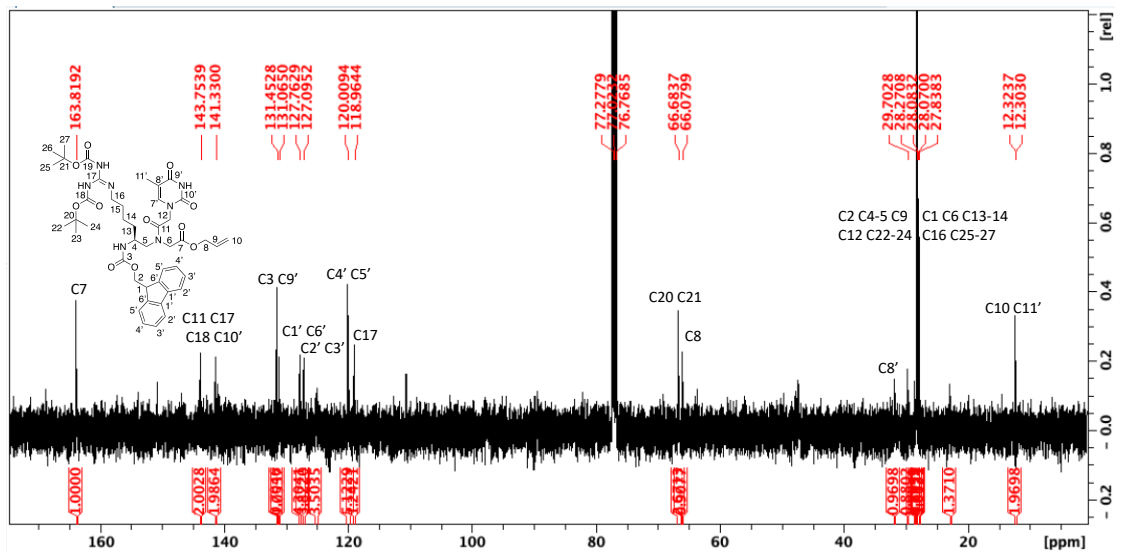
Liite 9. (S)-(*N*⁶-Boc-*N*²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)-*N*-[2-(tyymiini-*N*¹-yyli)asetyyli]-glysinaatin (**1**) massaspektri



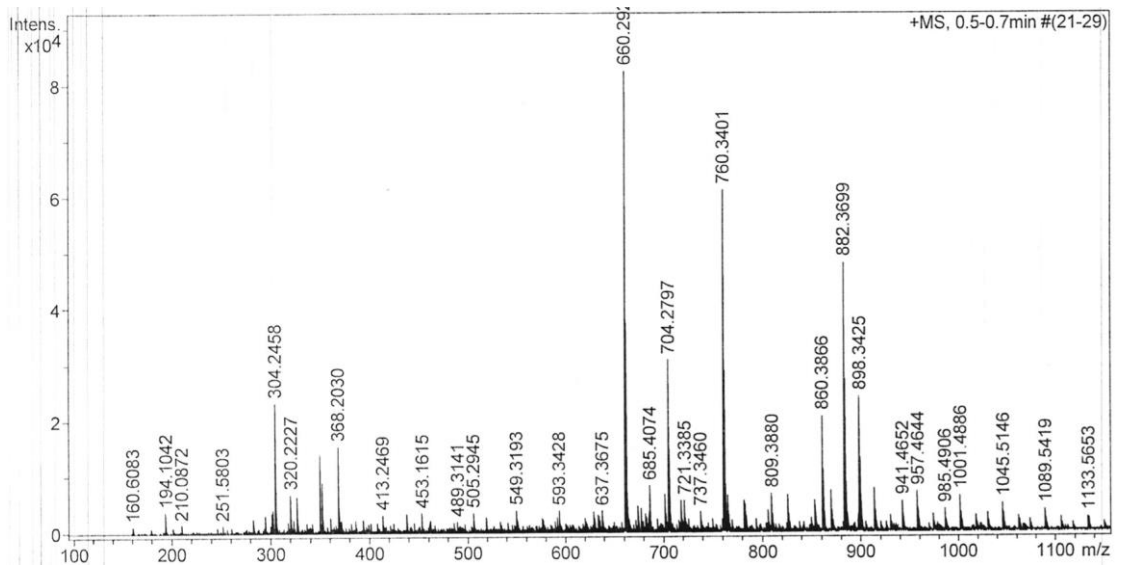
Liite 10. Allyyli-(S)-{*N*²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometyleeni)amino]-heksyyli}-*N*-[2-(tyymiini-*N*¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (**10**) ¹H-NMR-spektri



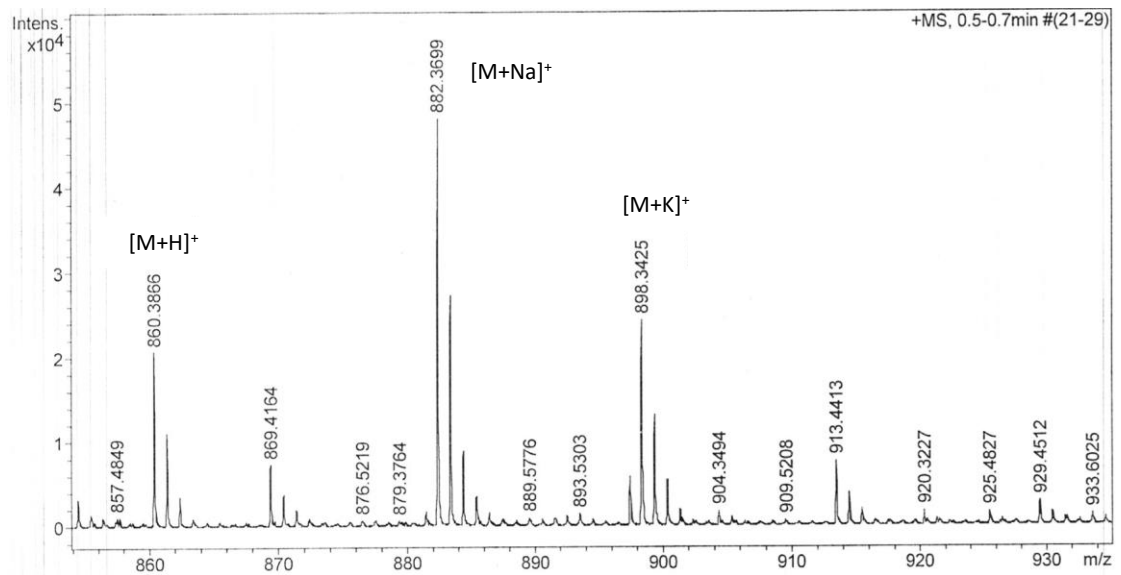
Liite 11. Allyyli-(S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometyleeni)amino]-heksyyli}-N-[2-(tymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (**10**) ¹³C-NMR-spektri



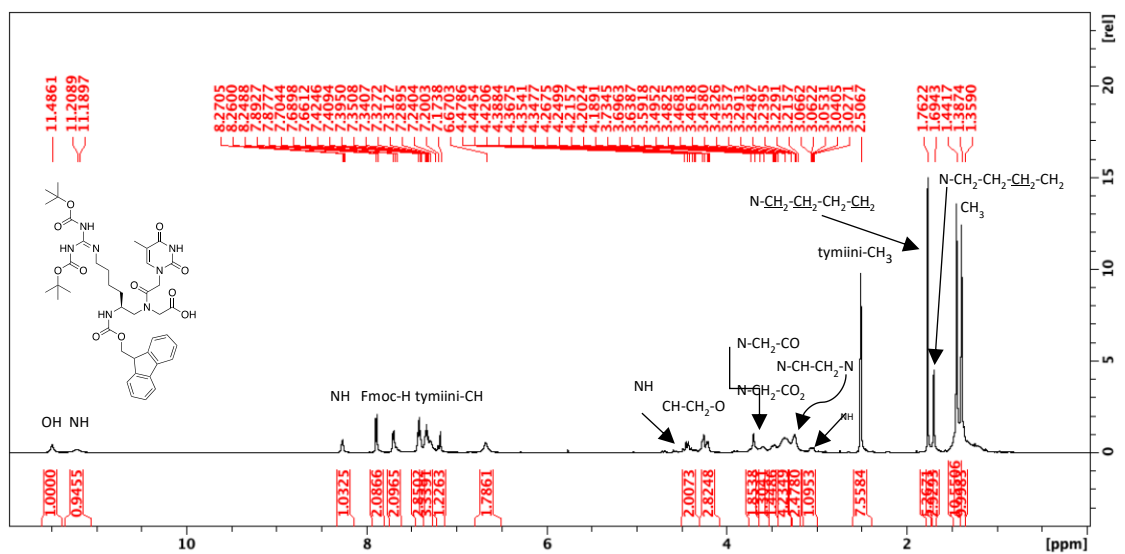
Liite 12. Allyyli-(S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometyleeni)amino]-heksyyli}-N-[2-(tymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (**10**) massaspektri



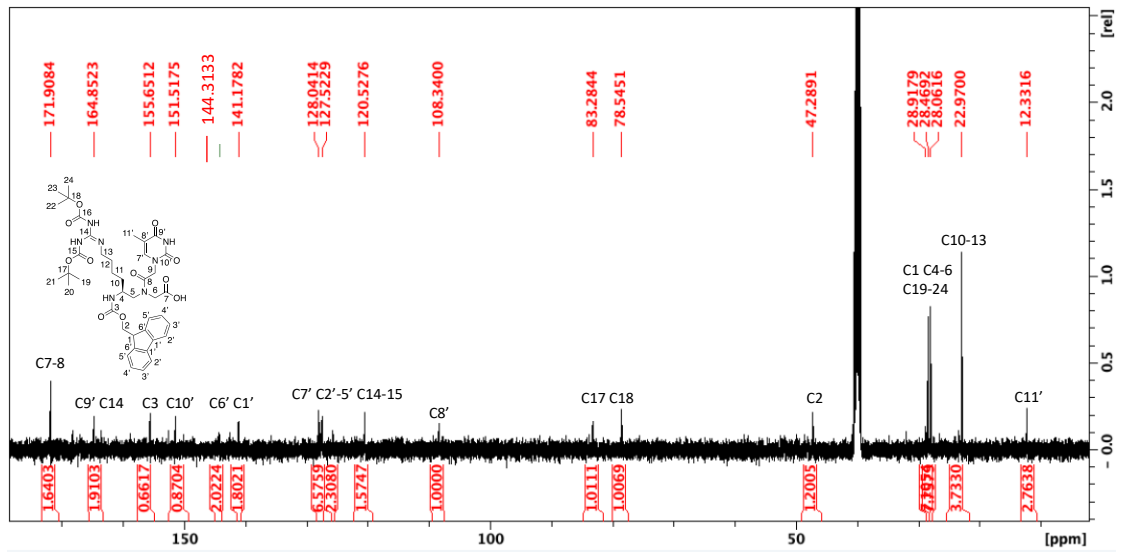
Liite 13. Lähennetty allyyli-(S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diamino-metyyleni)amino]heksyyli}-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (**10**) massaspektri



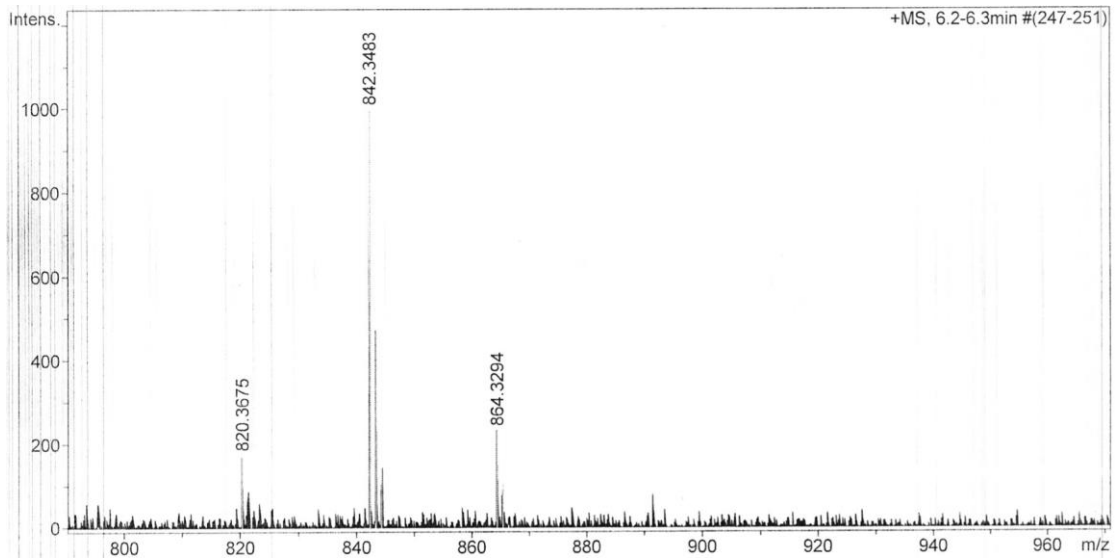
Liite 14. (S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometyyleni)amino]heksyyli}-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (**2**) ¹H-NMR-spektri



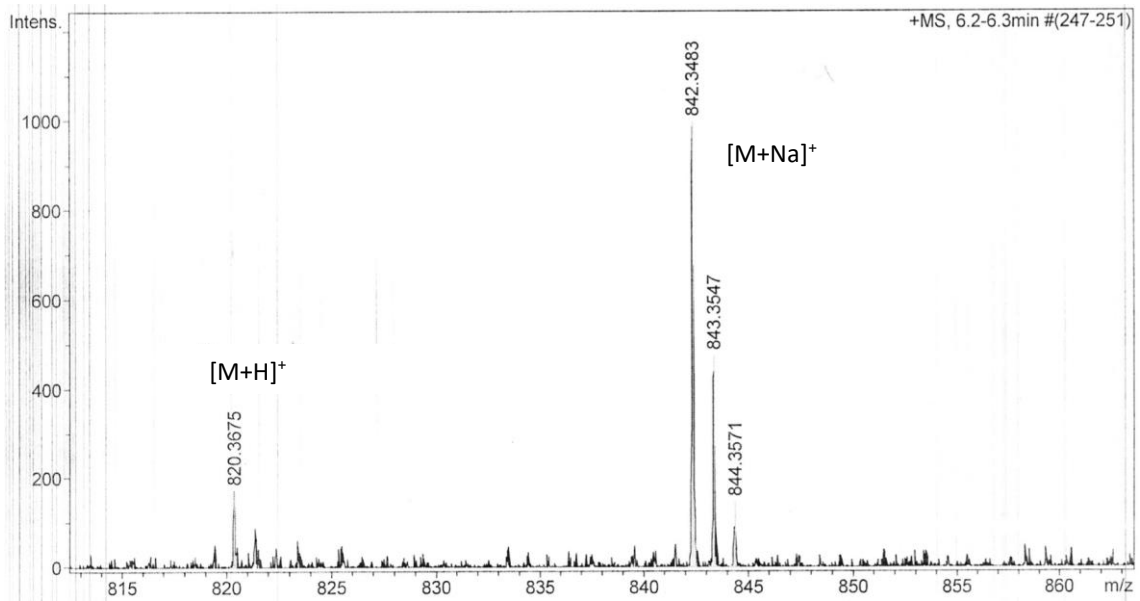
Liite 15. (S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometyyleeni)amino]heksyyli}-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (2) ¹³C-NMR-spektri



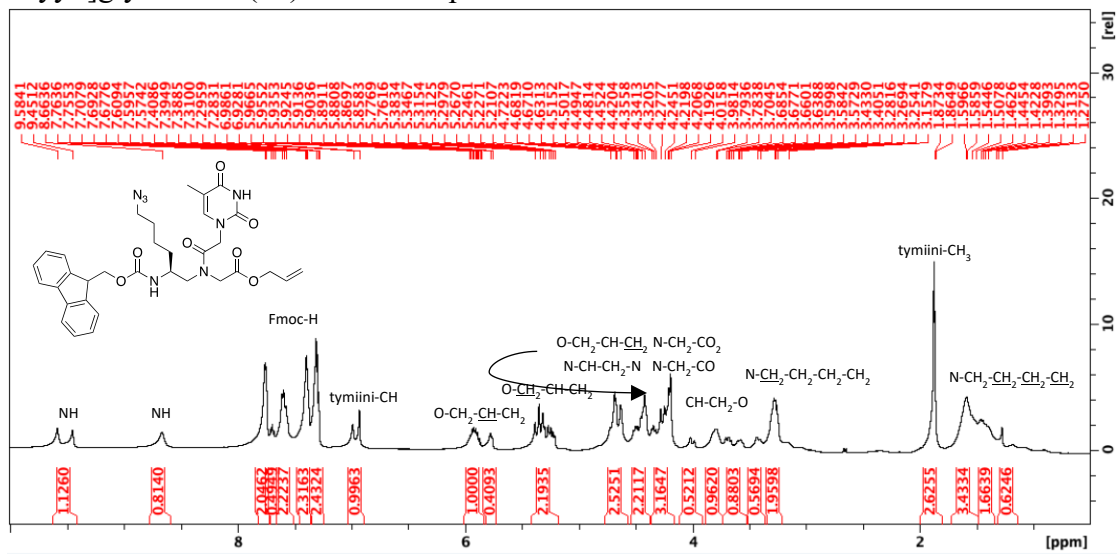
Liite 16. (S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometyyleeni)amino]heksyyli}-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (2) massaspektri



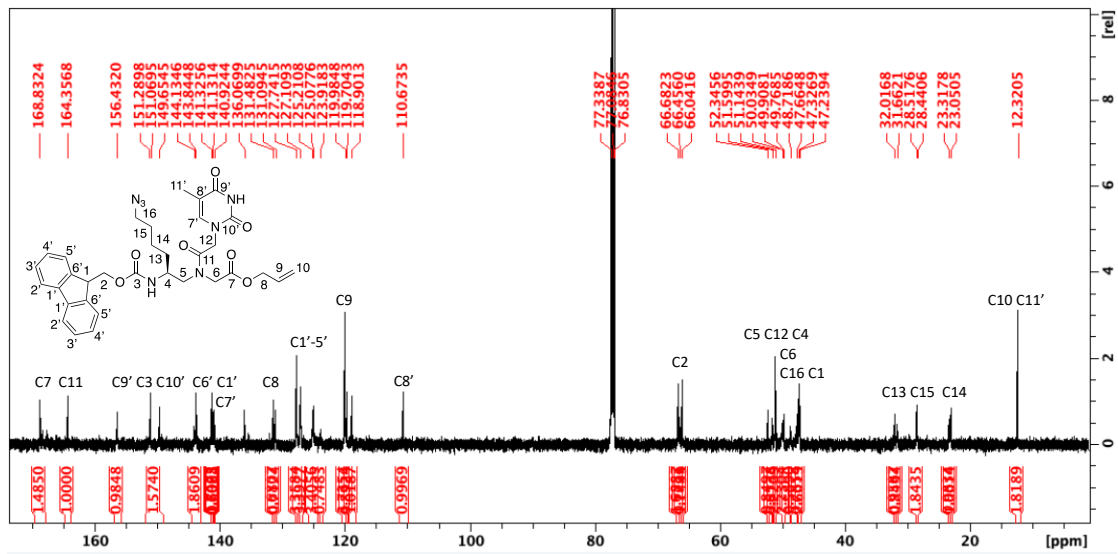
Liite 17. Lähennetty (S)-{N²-Fmoc-2-amino-6-[(bis-Boc-diaminometyyleni)amino]-heksyyli}-N-[2-(tymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysinaatin (**2**) massaspekttri



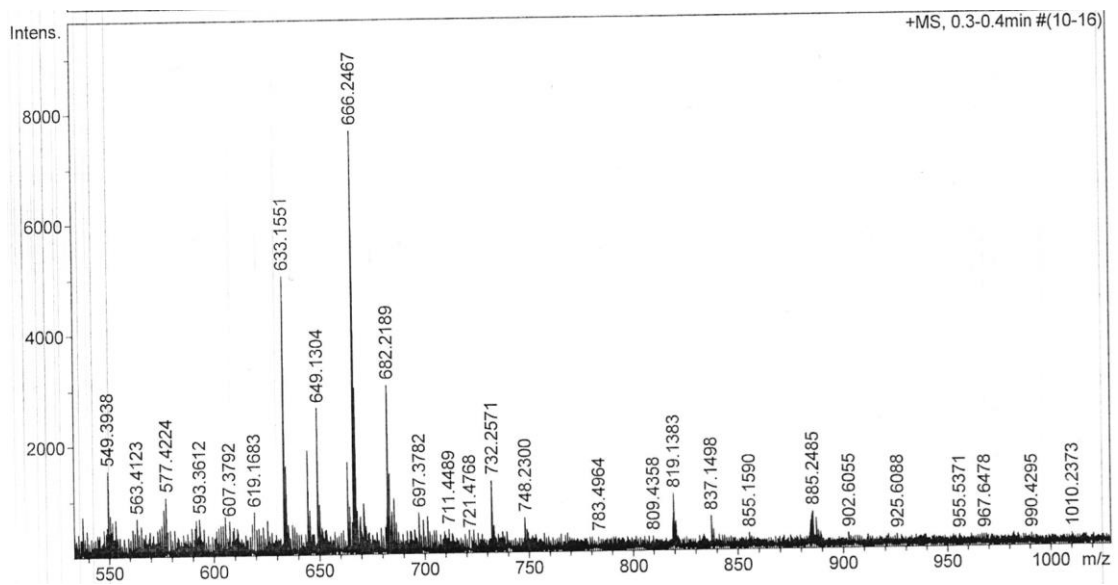
Liite 18. Allyyli-(S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysinaatin (**11**) ¹H-NMR-spekttri



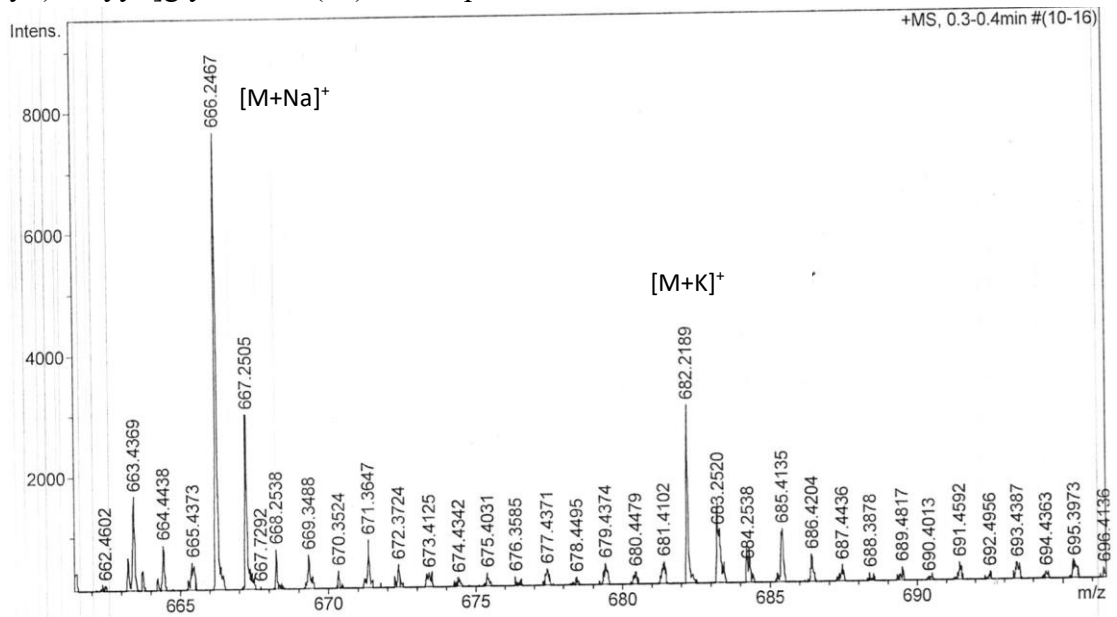
Liite 19. Allyyli-(S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysinaatin (**11**) ¹³C-NMR-spektri



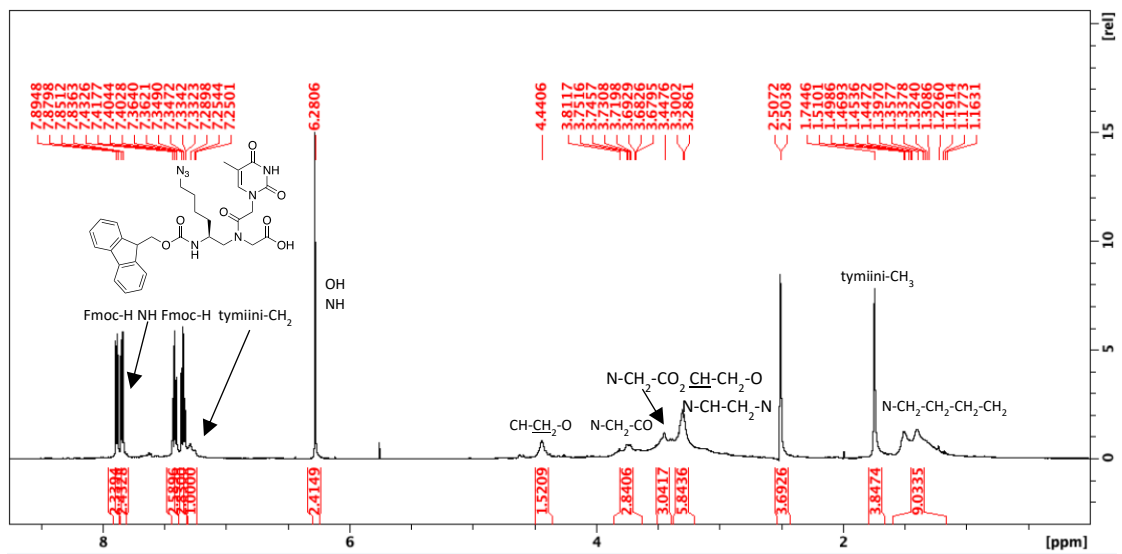
Liite 20. Allyyli-(S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysinaatin (**11**) massaspektri



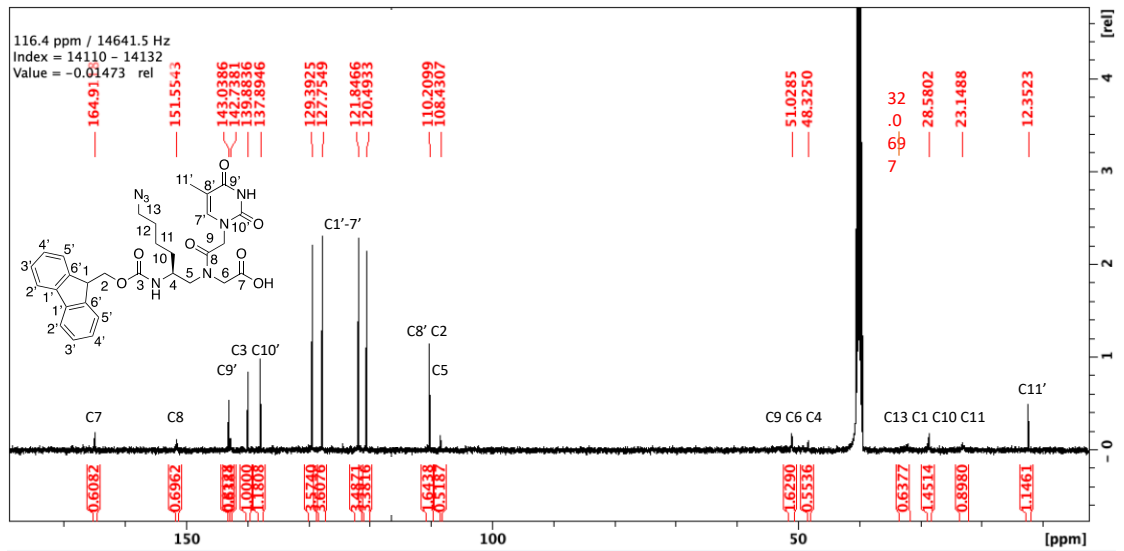
Liite 21. Lähennetty allyyli-(S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysiinaatin (**11**) massaspektri



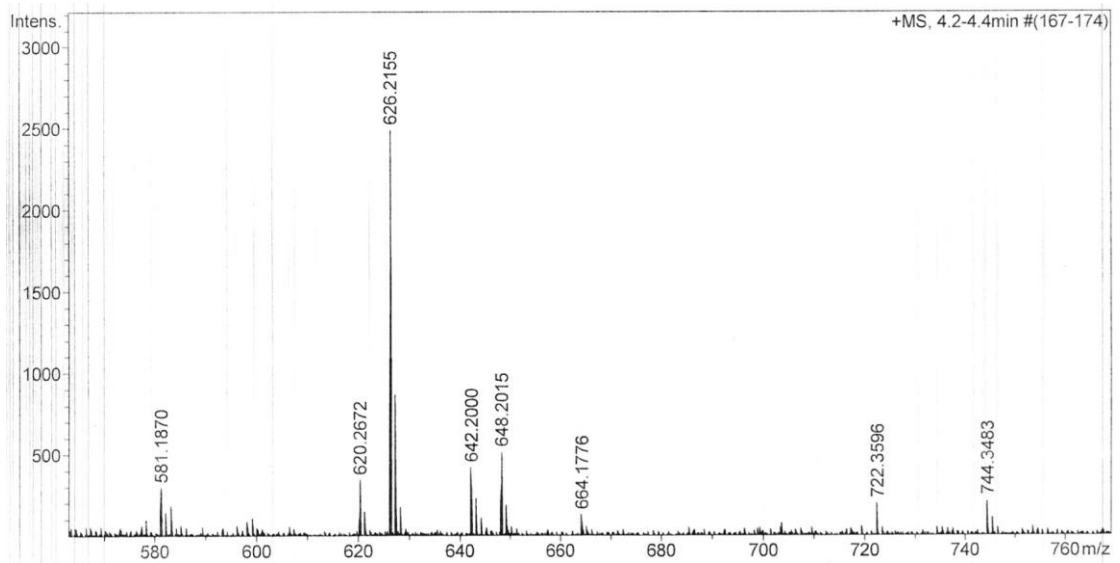
Liite 22. (S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]glysiinaatin (**3**) ¹H-NMR-spektri



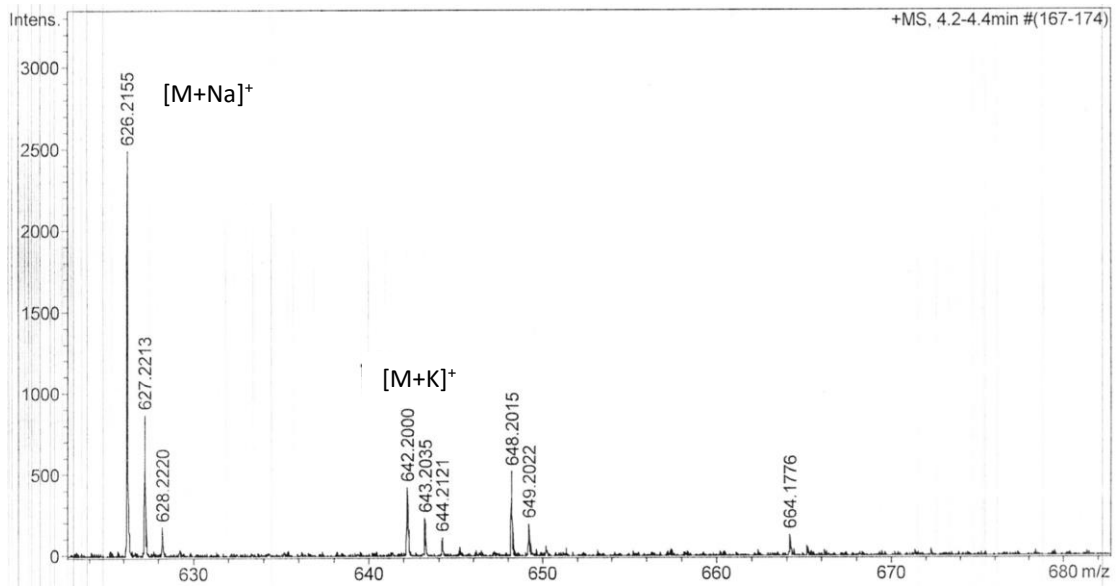
Liite 23. (S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]-glysinaatin (**3**) ¹³C-NMR-spektri



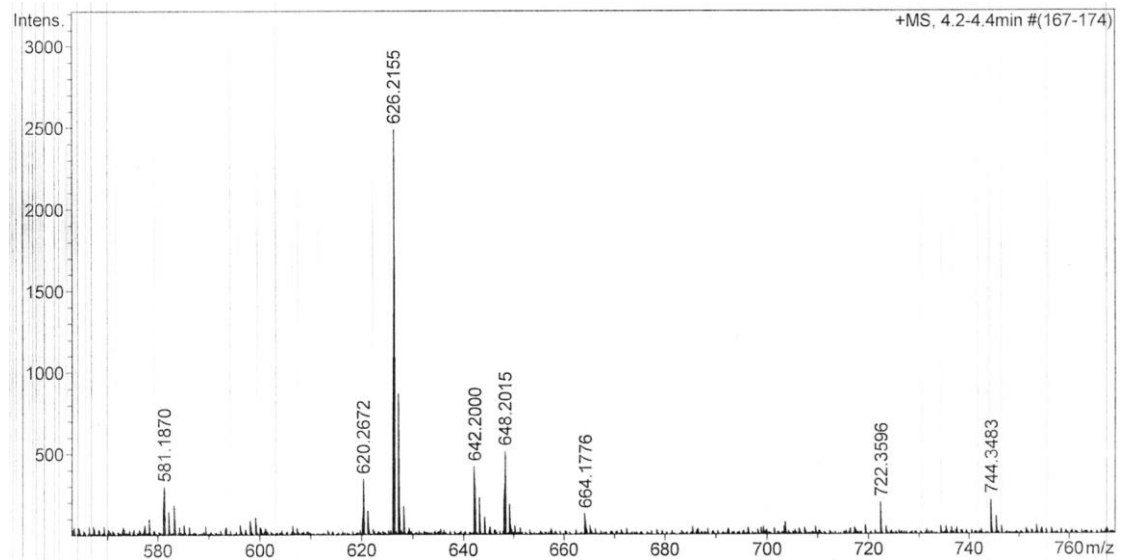
Liite 24. (S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tyymiini-N¹-yyli)asetyyli]-glysinaatin (**3**) massaspektri



Liite 25. Lähennetty (S)-(N²-Fmoc-2-amino-6-atsidoheksyyli)-N-[2-(tymiini-N¹-yyli)-asetyyli]glysinaatin (**3**) massaspektri



Liite 26. Allyyli-(R)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)glysinaatin (**4R**) massaspektri



Liite 27. Lähennetty allyyli-(R)-(N⁶-Boc-N²-Fmoc-2,6-diaminoheksyyli)glysinaatin (**4R**) massaspektri

