

N-metoksi-1,3-oksatsinaanioligonukleotidisynteesin suojaryhmästrategia

Pro Gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Kemian laitos
Bio-organinen kemia
Josefiina Wallin
Toukokuu 2022

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

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

WALLIN, JOSEFIINA: *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanioligonukleotidisynteesin suojaryhmästrategia

Pro Gradu -tutkielma, 32 s., 25 liites.

Toukokuu 2022

Oligonukleotidilääkkeet ovat yleistyneet ja kehittyneet huomattavan paljon lähiaikoina. Useita oligonukleotidilääkkeitä on hyväksytty potilaskäyttöön, ja niitä kehitetään jatkuvasti lisää. Terapeuttisten oligonukleotidien käytössä on kuitenkin vielä haasteita, ja oligonukleotidien modifikaatioilla on runsaasti potentiaalia vastata näihin haasteisiin.

N-metoksi-1,3-oksatsinaaninukleosidit ovat uusi konfiguraalisesti joustavien nukleosidianalogien luokka. Dynaamisen kombinatorisen kemian avulla emäsosan on mahdollista sitoutua nukleosidiin reversiibelisti olosuhteiden muutoksen aikaansaamana. Dynaaminen kombinatorinen kemia perustuu reversiibeliin reaktioon, jonka tasapainotila on olosuhteiden, kuten konsentraation tai lämpötilan, muutoksella mahdollista "jäädyyttää".

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää toimiva suojaryhmästrategia *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanioligonukleotidisynteesille. Työssä syntetisoitiin (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioli ja tutkittiin useiden eri bentsaldehydien hydrolyysia siitä UV-spektrofotometrisesti. Hydrolyysimittausten perusteella suojaryhmänä pysyvä aldehydi olisi sellainen, jossa olisi elektroneja puoleensa vetävä substituentti. Työssä syntetisoitiin (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolia vastaava suojattu fosforamidiitti. Fosforamidiitin synteesissä valittiin emäsosan paikalle liitettäväksi suojaryhmäksi 4-hydroksibentsaldehydi, jonka hydroksiryhmä suojattiin bentsoyyliesterinä. 4-bentsyylioksibentsaldehydin voitiin päätellä olevan pysyvä oligonukleotidisynteesin oloissa, ja bentsoyyliiryhmän irtoavan ammonolyysin oloissa, muuttaen elektroneja puoleensa vetävän 4-bentsyylioksi-substituentin elektroneja luovuttavaksi 4-hydroksi-substituentiksi. Tätä fosforamidiittia käyttäen syntetisoitiin onnistuneesti kaksi lyhyttä oligonukleotidia. Suojaryhmien todettiin kestävän oligonukleotidisynteesin ajan, mutta irtovan viimeistään synteesin jälkeisessä HPLC-puhdistuksessa.

Avainsanat: oligonukleotidi, suojaryhmät, hydrolyysi, oksatsinaanit

Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	1
1.1 Terapeuttiset oligonukleotidit.....	1
1.1.1 Sokeriosan modifikaatiot.....	2
1.1.2 Emäsosan modifikaatiot.....	3
1.1.3 Fosfaattiosan modifikaatiot.....	4
1.1.4 Oligonukleotidien konjugaatiot.....	5
1.2 Dynaaminen kombinatoriikka.....	5
1.2.1 Ei-kovalenttiset sidokset dynaamisessa kombinatoriikassa.....	6
1.2.2 Kovalenttiset sidokset dynaamisessa kombinatoriikassa.....	7
1.2.3 SELEX ja molekyylikirjastot.....	7
1.2.4 Polymerisaatio ja makrosyklisaatio.....	7
1.2.5 Biologisia sovelluksia.....	8
1.3 Työn tarkoitus.....	8
2. Tulokset ja niiden tarkastelu.....	10
2.1 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin synteesi.....	10
2.2 Hydrolyysimittaukset.....	10
2.3 Fosforamidiitin synteesi	16
2.4 Oligonukleotidisynteesit.....	17
3. Materiaalit ja menetelmät.....	23
3.1 Yleiset menetelmät.....	23
3.2 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin synteesi.....	23
3.2.1 (2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5-((<i>S</i>)-1-metoksi-2-oksoetoksi)-2-fenyyli-1,3-dioksaani-4- karboksialdehydi (1)	23
3.2.2 (2 <i>S</i> , <i>E</i>)-2-metoksi-2-(((2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4-((<i>E</i>)-(metoksiimino)metyyli)-2-fenyyli-1,3-dioksa- 5-yyli)oksi)asetaldehydin <i>O</i> -metyylioksiimi (2)	23
3.2.3 <i>N</i> -(2-(((2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-4-((metoksiamino)metyyli)-2-fenyyli-1,3-dioksanyyli)oksi)etyyli- <i>O</i> - metyylihydroksyyliamiini (3)	24
3.2.4 (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioli (4)	25
3.3 4-(6-((bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi) (diisopropyyliamino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoatti	25

3.3.1	4-bentsyylioksisibentsaldehydi (9)	25
3.3.2	4-(5-hydroksi-6-(hydroksimetyyli)-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoatti (5)	26
3.3.3	4-(6-((bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-hydroksi-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoatti (6)	26
3.3.4	4-(6-((bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)(diisopropyylimino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoatti (7)	27
3.4	Hydrolyysimittaukset.....	27
3.5	Oligonukleotidien synteesit.....	29
4.	Johtopäätökset ja yhteenveto.....	31
5.	Viitteet.....	33
6.	Liitteet.....	39

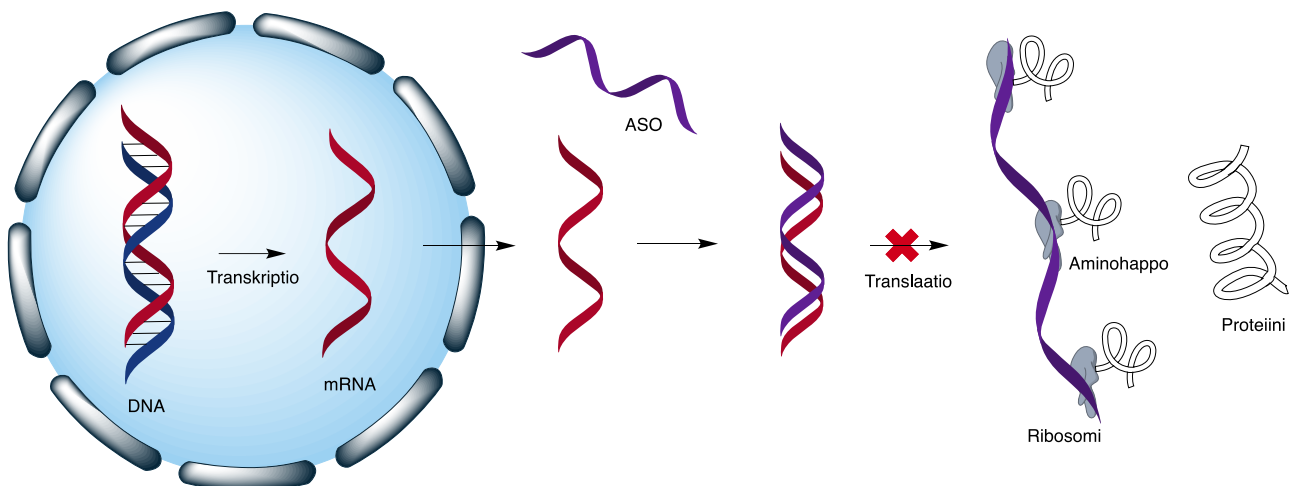
Lyhenneluettelo

FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (Food and Drug Administration)
DMD	Duchennen lihasdystrofia (Duchenne muscular dystrophy)
ASO	Antisense-oligonukleotidi
BBB	Veri-aivoeste (blood-brain barrier)
PNA	Peptidinukleiinihappo
LNA	Lukittu nukleiinihappo (locked nucleic acid)
UNA	Ei-lukittu nukleiinihappo (unlocked nucleic acid)
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
siRNA	Pieni häiritsevä RNA (small interfering RNA)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
RNA	Ribonukleiinihappo
DCC	Dynaaminen kombinatorinen kemia (dynamic combinatorial chemistry)
DCL	Dynaaminen kombinatorinen molekyylikirjasto (dynamic combinatorial library)
TBDMS	tert-butyylidimetyylisilyylikloridi
DMTr	4,4'-dimetoksitriityyli
TEAA	Trietyyliammoniumasetatti
DCM	Dikloorimetaani
TLC	Ohutkerroskromatografia (thin-layer chromatography)
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
MES	2-(<i>N</i> -morfoliino)etaanisulfonihappo
HEPES	4-(2-hydroksietyyli)piperatsiini-1-etaanisulfonihappo
ACN	Asetonitrili
TEA	Trietyyliamiini

1. Johdanto

1.1 Terapeuttiset oligonukleotidit

Terapeuttiset oligonukleotidit ovat potentiaalisia lääkkeitä useiden eri sairauksien hoidossa. Niiden toiminta perustuu kykyyn muokata tai estää soluissa tapahtuvaa proteiinisynteesiä kuvan 1 mukaisesti. Tällä hetkellä FDA on hyväksynyt potilaskäyttöön 14 eri oligonukleotidilääkettä.¹ Oligonukleotidilääkkeet pohjautuvat Watson-Crick-emäspariutumiseen, joka on hyvin säännönmukaista, ja siksi oikean sekvenssin suunnittelu oligonukleotidilääkkeelle on suhteellisen mutkatonta. Antisense-tekniikkaan perustuvia lääkkeitä on kehitetty useita muun muassa Duchennen lihasdystrofian (DMD) hoitoon.² DMD:n hoitoon kehitettyjä FDA:n hyväksymiä terapeuttisia oligonukleotideja ovat casimerseeni³, viltolarsen⁴, golodirseeni⁵ ja eteplirseeni⁶. Muidenkin harvinaisten sairauksien hoitoon on kehitetty antisense-oligonukleotidilääkkeitä (ASO) yksilön genomien sekvenssin perusteella.^{7,8}



Kuva 1. Terapeuttisten oligonukleotidien toiminta perustuu niiden kykyyn muokata tai estää soluissa tapahtuvaa proteiinisynteesiä.

Lääkekäyttöön suunniteltavilla oligonukleotideilla on kuitenkin useita haasteita. Terapeuttisten oligonukleotidien ongelmia ovat muun muassa niitä elimistössä hajottavat nukleaasit. Oligonukleotideja on kuitenkin mahdollista suojata nukleaaseilta esimerkiksi liposomien avulla tai kemiallisesti modifioimalla itse oligonukleotidi paremmin nukleaaseja kestäväksi.⁹ Yksi haaste on myös oligonukleotidien heikko farmakokinetiikka, etenkin niiden kuljetus muuhun kohdekudokseen tai elimeen kuin maksaan.¹⁰ Yksijuosteiset antisense-oligonukleotidit (ASO) siirtyvät verestä kudoksiin suhteellisen nopeasti, minuuttien tai tuntien aikana.¹¹ Oligonukleotidit ovat hydrofiilisiä, joten ne eivät helposti läpäise solukalvoa. ASO:t pääsevät soluihin sisälle suurimmaksi osaksi

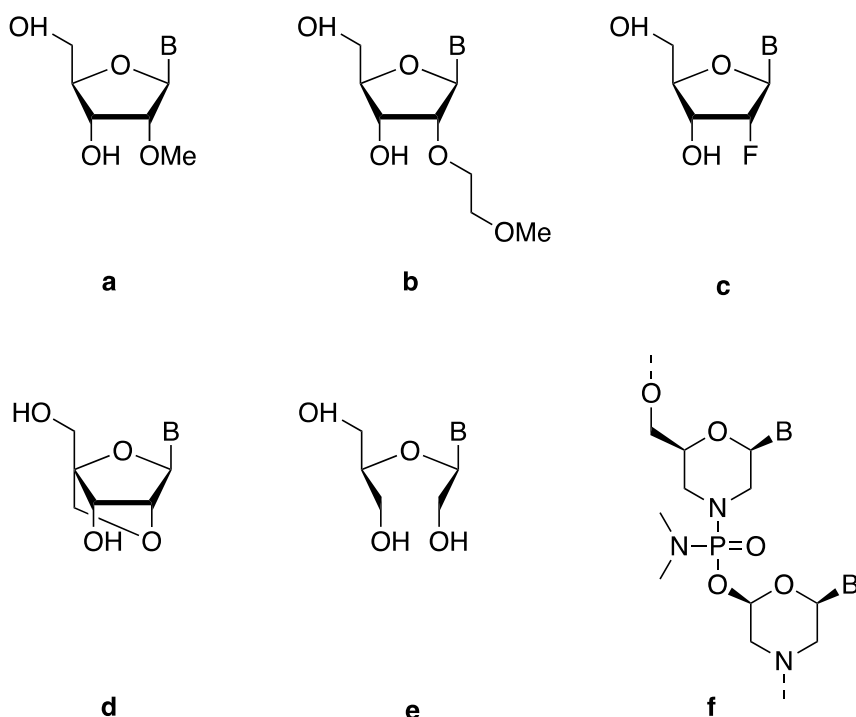
endosytoosin avulla.¹¹ Oligonukleotidien kuljetus veri-aivoesteen (BBB) läpi on myös merkittävä haaste. Oligonukleotidilääkkeiden on kuitenkin mahdollista saavuttaa aivokudos ja selkäydin, kun ne annostellaan selkäydinnesteeseen. Esimerkiksi Huntingtonin tautia tutkittaessa oligonukleotidilääkeaineen injektointi suoraan selkäydinnesteeseen on todettu toimivaksi.¹² Myös oligonukleotidien hybridisaatioaffiniteetti kohdejuosteeseen on edelleen haaste. Esimerkiksi γ PNA:lla on kuitenkin todettu olevan suhteellisen hyvä hybridisaatioaffiniteetti ja -selektiivisyys.^{13,14}

Oligonukleotidien modifikaatiot ovat avainasemassa niiden kehityksessä. Oligonukleotideja modifioimalla on mahdollista saada parempi resistanssi nukleaaseille, korkeampi sisäänotto soluihin, parempi farmakokinetiikka tai korkeampi hybridisaatioaffiniteetti kohdejuosteeseen. Modifikaatioita on mahdollista tehdä usealla tavalla ja useaan eri osaan oligonukleotideissa. Yleisiä modifikaatioita ovat sokeriosan modifikaatio, emäsosan modifikaatio ja fosfaattiosan modifikaatio.

1.1.1 Sokeriosan modifikaatiot

Sokeriosan modifikaatioilla voidaan pyrkiä parantamaan muun muassa oligonukleotidin metabolista stabiiliutta ja farmakokinetiikkaa. Sokeriosan modifikaatioita on esitetty kuvassa 2. Modifikaatiot tehdään yleensä sokeriosan 2'-paikalle. Eräitä tutkittuja ja lupaavia modifikaatioita ASO:issa ovat 2'-O-Me ja 2'-O-MOE modifikaatiot. Sokeriosan 2C':n elektronegatiiviset substituentit, kuten fluoro, metoksi ja metoksietyyli, saavat aikaan sokeriosan 3'-endo-konformaation.¹⁵⁻¹⁷ C₃-endo-konformaatio nostaa hybridisaatioaffiniteettia ja stabiloi entsyymattista pilkkoutumista vastaan. 2'-O-MOE-modifioituja gapmeeri-ASO:ja on tutkittu syövän, sydän- ja verisuonitautien sekä metabolisten sairauksien hoidossa.¹⁸ 2'-OMe-modifikaation on todettu muokkaavan oligonukleotidista stabiilimman ja 2'-OMe deoksiribonukleotideja voidaankin käyttää esimerkiksi RNA:n hybridisaatiokoettimena, sillä niiden T_m on korkeampi kuin vastaavilla ei-modifioidulla.¹⁹ LNA-modifikaatio (locked nucleic acid) vähentää sokeriosan joustavuutta ja nostaa huomattavasti oligonukleotidin hybridisaatioaffiniteettia, sillä β -D-LNA:n metyleenisilta 2'O:n ja 4'-C:n välillä aiheuttaa sokeriosan jähmettymisen C₃-endo-konformaatioon.^{20,21} LNA-modifioituja oligonukleotideja on tutkittu muun muassa syövän hoidossa.¹⁸ UNA-modifioitu (unlocked nucleic acid) sokeriosa on asyklinen, sillä sokeriosasta puuttuu sidokset C2' ja C3'-hiilien väliltä.²² Morfoliino-modifikaatiossa sokeriosa on korvattu morfolinorenkaalla ja fosfodiesterisidos on korvattu fosforodiamidaattiryhmällä. Morfoliino-modifioidut oligonukleotidit ovat sekvenssispesifisiä ja

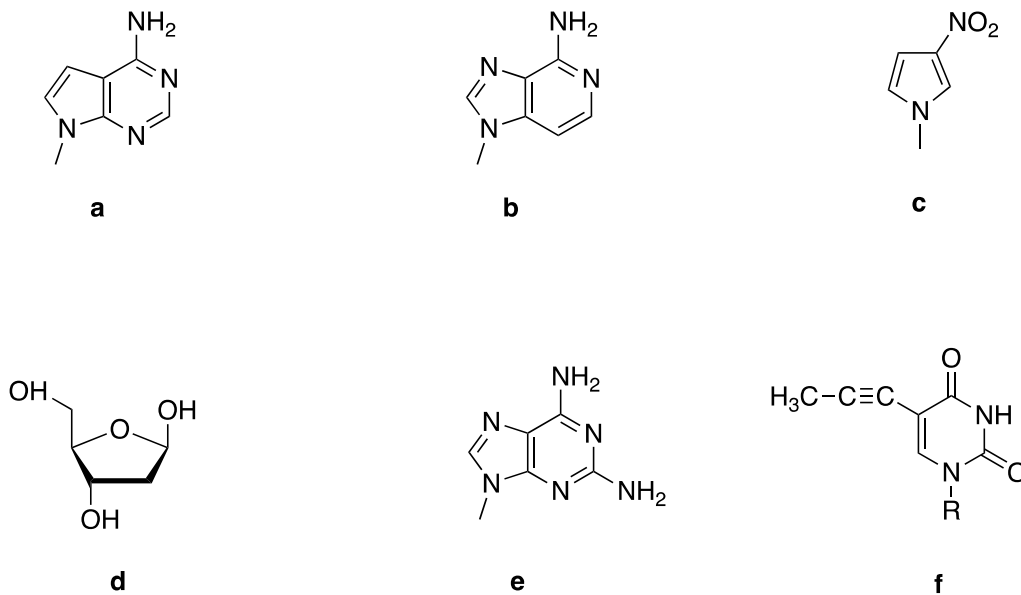
pysyviä biologisissa oloissa. Ne eivät aktivoi RNAasi H:tä, vaan niiden toiminta perustuu steeriselle esteelle.^{23,24}



Kuva 2. Sokeriosan 2'-modifikaatiota: a) 2'-OMe; b) 2'-O-ethyl; c) 2'-F; d) LNA; e) UNA; f) morfolino-DNA

1.1.2 Emäsosan modifikaatiot

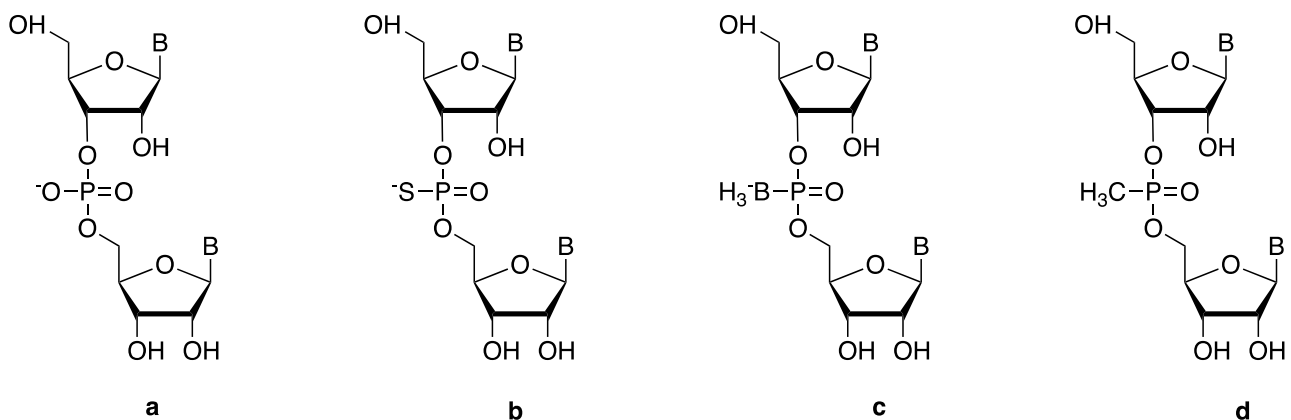
Emäsosaa on mahdollista modifioida useilla eri tavoilla. Emäsosan modifikaatioita on esitetty kuvassa 3. Eräs tapa on luonnollisen emäsosan muokkaukset, kuten funktionaalisen ryhmän vaihtaminen toiseksi. Esimerkiksi alkynylyl-substituentit, kuten 5-propynylyli, suojaavat oligonukleotidia nukleaaseilta steerisen esteen avulla.²⁵ 2,6-diaminopuriini puolestaan stabiloi kaksoiskierrettä.²⁶ Toisenlaisia modifikaatioita ovat luonnollisen emäsosan korvaaminen kokonaan erilaisella yhdisteellä, esimerkiksi jo yli 30 vuotta sitten bentseenillä.²⁷ On myös mahdollista liittää muita suhteellisen yksinkertaisia hiilivetyjä ja heterosyklisiä yhdisteitä emäsosan paikalle. Tällaisia yhdisteitä suunniteltaessa on otettava huomioon monia tekijöitä, muun muassa emäsosien pinoutuminen DNA-ketjussa, johon vaikuttaa vahvasti emäsosan paikalle liitettävän yhdisteen koko ja hydrofobisuus.²⁸ Toisaalta, on myös mahdollista jättää emäsosan paikka kokonaan tyhjäksi. Tällaista oligonukleotidia voitaisiin käyttää esimerkiksi linkkerinä tai koettimena vahingoittuneen DNA:n korjauksessa.²⁸



Kuva 3. Emäsosan modifikaatioita: a) 7-deatsaadeniini; b) 3-deatsaadeniini; c) 3-nitropyrröli; d) emäksetön nukleosidi; e) 2,6-diaminopuriini; f) 5-propynyyl U

1.1.3 Fosfaattiosan modifikaatiot

Fosfaattiosan modifikaatiot voivat suojata oligonukleotideja nukleaaseilta. Luonnollinen nukleosidien välinen sidos on fosfodiesterisidos, ja modifioituja nukleosidien välisiä sidoksia on tutkittu useita. Modifioituja nukleosidien välisiä sidoksia ovat muun muassa fosforotioaatti-, boranofosfaatti- ja metyylifosfonaattisidokset (kuva 3). Niiden avulla voidaan kasvattaa oligonukleotidien nukleasiresistanssia ja puoliintumisaikaa *in vivo*.²⁹ Fosforotioaattisidos on yksi käytetyimmistä oligonukleotidien modifikaatioista, ja yksi sen merkittävistä ominaisuuksista on resistanssi nukleaaseille.³⁰ Tämän lisäksi näin modifioidut oligonukleotidit sitoutuvat korkeammalla affiniteetilla proteiineihin, joka parantaa esimerkiksi solunottoa.^{31,32}



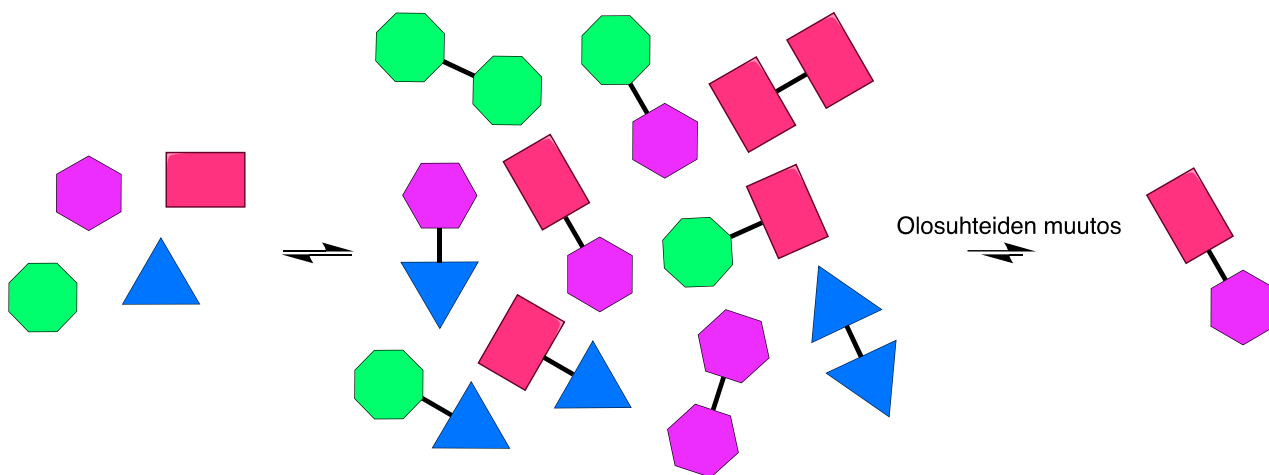
Kuva 4. Oligonukleotidin luonnollinen ja modifioidut fosfaattiosat a) fosfodiesterisidos; b) fosforotioaattisidos; c) boranofosfaattisidos; d) metyylifosfonaattisidos

1.1.4 Oligonukleotidien konjugaatiot

Oligonukleotideihin on myös mahdollista konjugoida lisäksi erilaisia molekyyliä parantamaan niiden ominaisuuksia. Antisense-oligonukleotidien konjugoimisella voidaan saavuttaa muun muassa parempi resistanssi nukleaaseille, korkeampi sitoutumisaffiniteetti kohdejuosteeseen ja matalampi toksisuus.³³ Yksi merkittävä terapeuttisten oligonukleotidien haaste vielä tänäkin päivänä on niiden farmakokinetiikka ja soluunotto. Näitä ominaisuuksia on yritetty parantaa useilla eri tavoilla. Muun muassa lipofiilisten ominaisuuksien voidaan ajatella olevan hyödyllisiä soluunoton kannalta, etenkin maksasoluissa. Esimerkiksi kolesterolimolekyylin liittäminen siRNA:n koodaavan juosteen 3'-päähän pyrrolidiinilinkerillä sai aikaan farmakologisten ominaisuuksien paranemisen *in vivo* ja *in vitro*.³⁴ Myös lipofiilisemmäksi modifioidun siRNA:n soluunottoa on tutkittu. Tutkimuksessa siRNA:han konjugoitiin kolesterolia, litokoolihappoa ja lauriinihappoa. Modifioidun siRNA:n todettiin ekspressoituvan paremmin kuin ei-modifioidun.³⁵

1.2 Dynaaminen kombinatorinen kemia

Dynaaminen kombinatorinen kemia on kemiaa termodynaamisessa tasapainossa. Reaktio ja yhdisteet ovat tasapainotilassa, ja tätä tasapainotilaa voidaan siirtää tuotteiden tai lähtöaineiden puolelle olosuhteiden muutoksella. Tällainen muutos voi olla esimerkiksi pH-arvon tai lämpötilan muutos. Olosuhteiden muutos ei kuitenkaan saisi olla äärimmäinen tai aiheuttaa muita reaktioita.³⁶ Muutoksia voi tapahtua kovalenttisissa sidoksissa, ei-kovalenttisissa sidoksissa tai koordinaatiosidoksissa.³⁶ Dynaaminen kombinatorinen kemia eroaa perinteisestä kombinatorisesta kemiasta.³⁷ Dynaamisessa kombinatoriikassa hyödynnetään reversiibeilejä, tasapainotilassa olevia reaktioita, joissa on sekä reaktion lähtöaineita että tuotteita. Reversiibeli kemiallinen reaktio saavuttaa tasapainotilan, joka voidaan "jäädyyttää" reaktio-olosuhteiden muutoksella. Dynaamisen kombinatoriikan periaate on esitetty kuvassa 5. Perinteisessä kombinatorisessa kemiassa sen sijaan hyödynnetään irreversiibeilejä reaktioita muuttumattomien molekyylikirjastojen luomisessa.^{38,39} Dynaamista kombinatorista kemiaa on tutkittu jo suhteellisen pitkään ja ensimmäinen maininta dynaamisesta kombinatoriikasta löytyy jo vuodelta 1996.⁴⁰



Kuva 5. Dynaamisessa kombinatoriikassa reaktio ja yhdisteet ovat tasapainotilassa, ja tätä tasapainotilaa on mahdollista siirtää tuotteiden tai lähtöaineiden puolelle olosuhteiden muutoksella.

Dynaaminen kombinatorinen kemia mahdollistaa suurten yhdistemäärien seulonnan ilman jokaisen yhdisteen syntetisoimista erikseen.⁴¹ Molekyylit ovat kirjastossa termodynaamisessa tasapainotilassa, ja olosuhteiden muutos aiheuttaa tasapainotilaan muutoksen kohti haluttua tuotetta.^{36,41–43} Eräs käytetyimmistä metodeista todistaa tasapainon saavuttaminen on osoittaa, että sama yhdistekoostumus voidaan saavuttaa useammasta eri lähtöpisteestä, eli useammasta eri yhdistekoostumuksesta käsin.³⁶ Voidaan myös varmistaa, että olosuhteiden muutoksen aiheuttama muutos yhdistekoostumuksessa ei ole pysyvä, vaan yhdistekoostumus palautuu alkuperäiseen silloin, kun olosuhteet palautetaan.³⁶ Dynaamista kombinatoriikkaa on tutkittu onnistuneesti muun muassa pienten, nukleiinihappoja stabiloivien, molekyylien³⁹ ja modifioitujen aptameerien seulonnassa⁴¹. Dynaamista kombinatoriikkaa on hyödynnetty myös ligandien seulontaan käyttäen templaattina DNA:n sekundäärirakenteita.⁴⁴ Dynaamisia reaktiota on mahdollista hyödyntää myös muun muassa DNA-templatoituissa ligaatioissa. Esimerkiksi DNA-templatoitu *N*-metoksiaminoglykosylaatio on reversiibeli pH:ssa 5, mutta lähes irreversiibeli pH:ssa 7, ja siten glykosylaatiota voitaisiinkin hyödyntää dynaamisissa ja pH-kontrolloiduissa reaktioissa.⁴⁵

1.2.1 Ei-kovalenttiset sidokset dynaamisessa kombinatoriikassa

Ei-kovalenttiset sidokset yleensä muodostuvat ja hajoavat suhteellisen nopeasti, jolloin myös tasapainotila reaktiossa saavutetaan suhteellisen nopeasti. Tällaiset yhdisteet, varsinkin liuoksessa, ovat haastavia eristää ja analysoida. Esimerkiksi metalli-ligandi-koordinaatiosidosten

substituutioreaktioiden pitää olla dynaamisessa kombinatoriikassa nopeita ja reaktionopeus riippuu muun muassa metallin ominaisuuksista ja varauksesta sekä ligandien mahdollisesti aiheuttamista steerisistä esteistä.³⁶ Templatoidut synteesit perustuvat pitkälti ei-kovalenttisiin sidoksiin, kuten vetysidoksiin, elektrostaattisiin voimiin, metallien koordinaatiosidoksiin ja π - π -pinoutumiseen.⁴⁶

1.2.2 Kovalenttiset sidokset dynaamisessa kombinatoriikassa

Reaktiot, joissa muodostuu tai hajoaa kovalenttisiä sidoksia, tasapainottuvat yleensä suhteellisen hitaasti.³⁶ Tasapainotilan saavuttamista voidaan luonnollisesti nopeuttaa käyttämällä katalyyttiä. Tällaisessa tapauksessa poistamalla katalyytti voisi olla mahdollista pysäyttää kyseinen reaktio ja eristää yhdisteet.³⁶ Symmetriset ja epäsymmetriset kovalenttiset sidokset omaavat erilaisia ominaisuuksia dynaamisessa kombinatoriikassa. Sidoksen symmetrisyys vaikuttaa esimerkiksi yhdisteen oligomerisoitumiseen.³⁶ Reversiibelit kovalenttiset sidokset mahdollistavat olosuhteisiin sopeutuvan ja dynaamisesti käyttäytyvän systeemin, joka muistuttaa vastaavia supramolekulaarisia systeemejä.⁴⁷

1.2.3 SELEX ja molekyylikirjastot

SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) on keino seuloa suuria määriä yksijuosteisia oligonukleotideja molekyylikirjastossa.^{37,41} SELEXin avulla voidaan seuloa esimerkiksi oligonukleotideja, joilla on korkea affiniteetti tiettyyn molekyyliin. SELEXiä on käytetty muun muassa seulomaan RNA-sekvenssejä, jotka sitoutuisivat spesifisesti kohdemolekyyliin.^{48–50} SELEX ja DCC on mahdollista yhdistää tehokkaamman modifioitujen aptameerien *in vitro* seulonnan aikaansaamiseksi. SELEX on kehitetty aptameerien *in vitro* seulontaan ja toimii monistamalla potentiaalisia yhdisteitä, mutta aptameereja voidaan yleensä modifioida vasta SELEXin jälkeen. Onnistuneen modifikaation seulonta normaalisti on haastavaa. SELEXin aikana voidaan kuitenkin käyttää hyödyksi reversiibelisti sitoutuvia pienmolekyyliä, kuten aldehydejä, suuntaamaan seulontaa kohti tiettyä nukleinihappoa.⁴¹

1.2.4 Polymerisaatio ja makrosyklisaatio

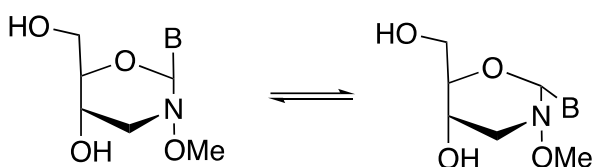
Oligomeerien muuttumiseen polymeereiksi DCC-molekyylikirjastossa vaikuttaa muun muassa yhdisteiden konsentraatio.^{36,51,52} Yhdistekirjaston monimuotoisuuteen vaikuttavat useat seikat. Muun muassa rakennuspalikoiden joustavuus voi vaikuttaa merkittävästi syntyviin tuotteisiin. Esimerkiksi makrosyklisiä yhdisteitä tutkittaessa joustamattomien rakennuspalikoiden, kinkonidiini-

monomeerien, todettiin tuottavan lähes ainoastaan trimeerejä, kun taas joustavien, kiniini-monomeerien, todettiin tuottavan lisäksi syklisiä dimeerejä, trimeerejä ja tetrameerejä.⁵³ Kirjaston monipuolisuutta voidaan lisätä joustavien ja pienikokoisten molekyylien avulla, sillä ne voivat muodostaa siltoja joustamattomampien yhdisteiden välille.³⁶

1.2.5 Biologisia sovelluksia

Dynaamisia molekyylikirjastoja voidaan käyttää hyödyksi, kun etsitään tai kehitetään yhdisteitä, jotka osallistuvat tunnistusreaktioihin soluissa. Dynaamisten kirjastojen sovellutuksia hyödynnetään myös muun muassa foldameerien, eli intramolekulaaristen vuorovaikutuksien voimasta itsestään laskostuvien oligomeerien, ja aggregaattien, eli toisiaan puoleensa vetävien oligomeerijuosteiden kompleksien, seulonnassa.^{36,54,55} Myös reseptorien tutkiminen hyötyy dynaamisesta kombinatoriikasta.^{56,57} Reseptoreja tutkittaessa on mahdollista syntetisoida vain erilaisia fragmentteja potentiaalisista reseptoreista ja tutkia, mihin fragmenttiin molekyyli kiinnittyy ja millä tavalla, välttyen kokonaisten reseptorien syntetisoinnilta.³⁶

1.3 Työn tarkoitus

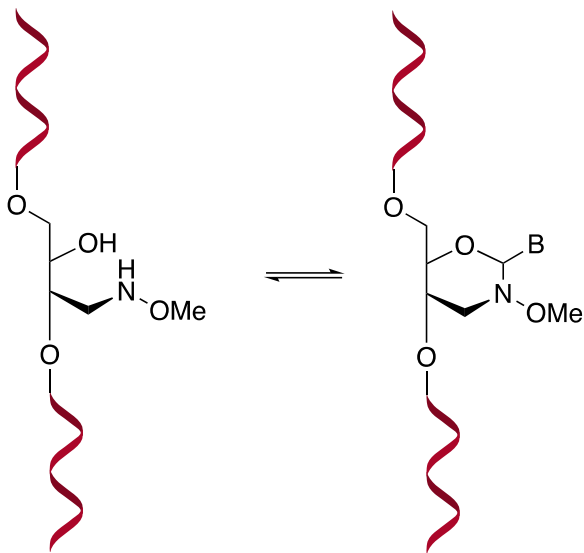


Kaavio 1. *N*-metoksi-1,3-oksatsinaaninukleotidi

N-metoksi-1,3-oksatsinaaninukleosidit (kaavio 1) ovat uusi konfiguraationaalisesti joustavien nukleosidianalogien luokka. Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää toimiva suojaryhmästrategia *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanien oligonukleotidisynteesille. Työssä syntetisoitiin (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioli ja sitä vastaava fosforamidiitti, jota käytettiin onnistuneesti oligonukleotidisynteesissä.

Tutkimuksessa valmistetun oligonukleotidin merkittävänä ominaisuutena on dynaaminen kombinatoriikka. Toisin sanoen oligonukleotidin sokeriosaan olisi mahdollista liittää reversiibelisti, olosuhteita lievästi muuttamalla, mikä tahansa luonnollinen tai modifioitu emäsosa. Emäsosan reversiibeli liittäminen oligonukleotidiin on kuvattu kaaviossa 2. Modifioituja ja

keinotekoisia emäsosia ja niiden hyötyjä on tutkittu huomattavan paljon. Tämän vuoksi yksinkertainen menetelmä liittää moninaisia emäsosia jo valmiiseen oligonukleotidiketjuun toisistaan valtavasti uusia mahdollisuuksia.



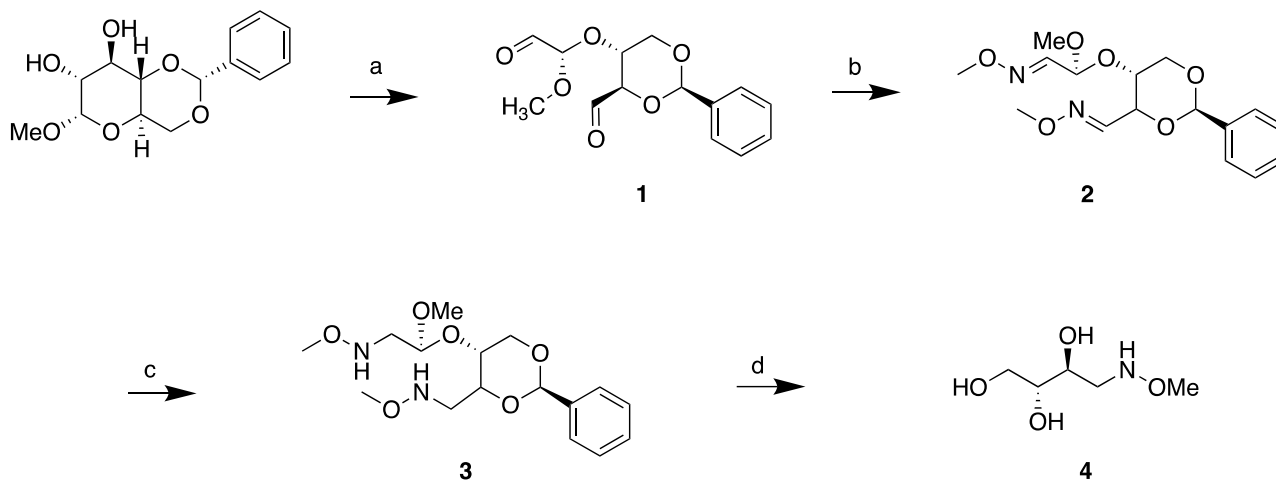
Kaavio 2. Emäsosan liittäminen reversiibelisti

Työssä haluttiin löytää sopiva suojaryhmä (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolille oligonukleotidisynteesiä varten. (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolille on kehitetty suojaryhmästrategia myös aiemmin. Fosforamidiitin valmistaminen tällä menetelmällä on kuitenkin suhteellisen työlästä, ja lisäksi oligonukleotidisynteesin jälkeen TBDMS-suojaryhmä on irrotettava erikseen. Lisäksi menetelmää käyttäen oligonukleotidisynteesin trityylivaste oli vain 64 %.⁵⁸ Tämän vuoksi työn tavoitteena oli kehittää parempi suojaryhmästrategia (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolille.

Aldehydin voitiin päätellä toimivan suojaryhmänä, sillä se voitaisiin syklisoida (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin kanssa, saaden täten suojattua sekä metoksiamino että toinen hydroksyyliiryhmä. Syklisaation odotettiin tuottavan päätuotteena kuusirenkainen *N*-metoksi-1,3-oksatsinaani ja vähäisempänä tuotteena viisirenkainen *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiini. Merkittävin haaste suojaryhmälle oli oligonukleotidisynteesin detritylaatiovaihe, jolloin happamat olosuhteet voisivat hydrolysoida 1,3-oksatsinaanin. Pääteltiin kuitenkin, että vedettömät olosuhteet voisivat pitää tasapainon 1,3-oksatsinaanin puolella ja täten suojaryhmä kestäisi oligonukleotidisynteesin olosuhteet.

2. Tulokset ja niiden tarkastelu

2.1 (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamiino)butaani-1,2,3-triolin synteesi



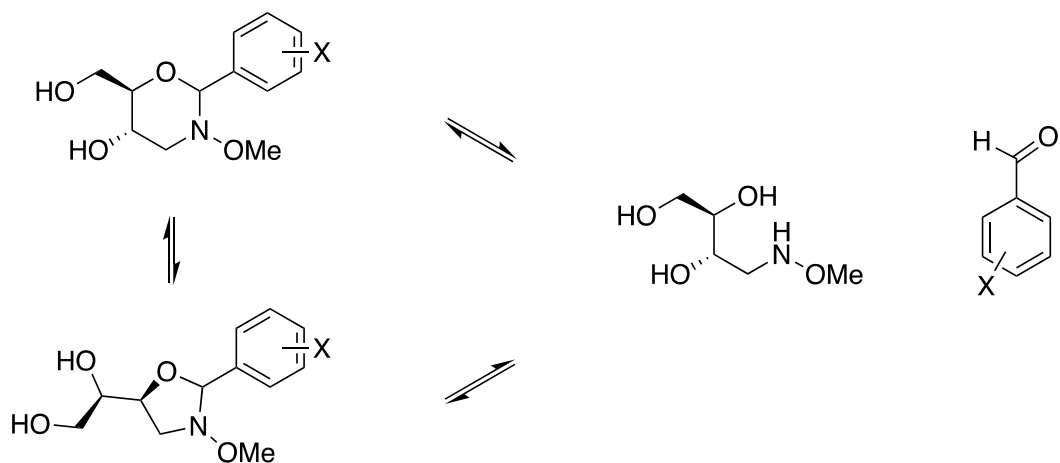
Kaavio 3. (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamiino)butaani-1,2,3-triolin synteesi. a) NaIO₄, MeOH/H₂O, 25 °C, 16 h; b) *O*-metyylihydroksiamiini, pyridiini, 80 °C, 16 h; c) NaCNBH₃, DCM/MeOH, pH 4, 25 °C, 16 h; d) 1,3-propaaniditioli, HCl, 40 °C, 16 h

(2*S*,3*R*)-4-(metoksiamiino)butaani-1,2,3-trioli (4) syntetisoitiin kaavion 3 mukaisesti. 4,6-*O*-bentsylideeni- α -D-glukopyranosidista valmistettiin ensin dialdehydi 1 hapetusreaktiolla. Reaktiossa käytettiin hapettimena natriumperjodaattia. Välituote 2 valmistettiin dialdehydistä 1 oksimaatiolla *O*-metyylihydroksyyliamiinin kanssa. Oksiimi 2 pelkistettiin metoksiamiiniksi 3 käyttäen pelkistimenä natriumsyanoboorihydriä. Tuote 4 valmistettiin poistamalla välituotteesta 3 asetaalisuojaryhmät happokatalyyttisesti 1,3-propaaniditiolin läsnä ollessa.

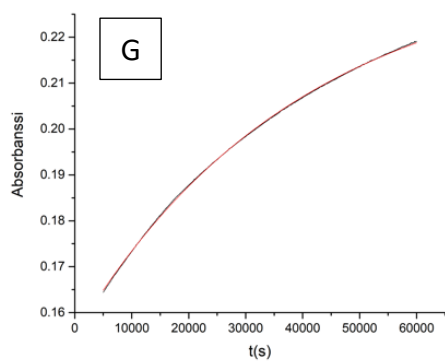
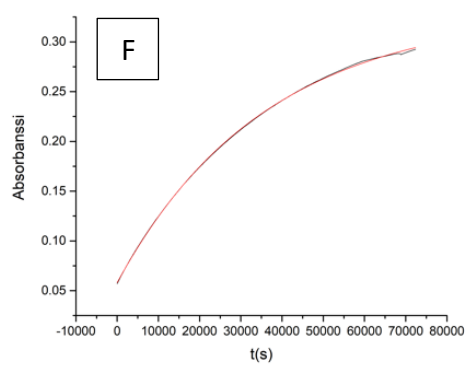
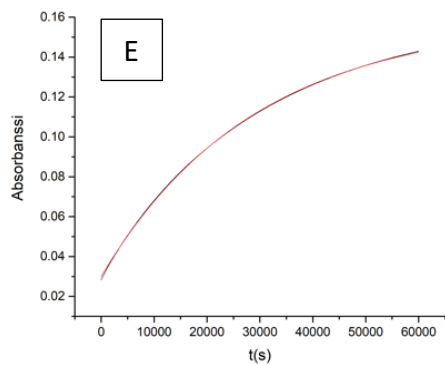
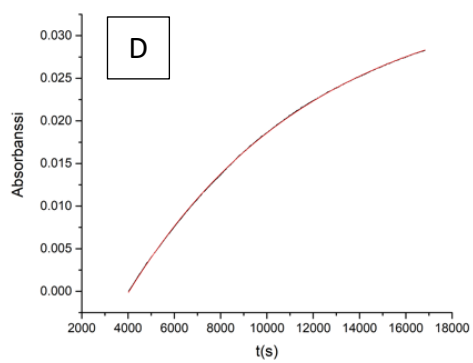
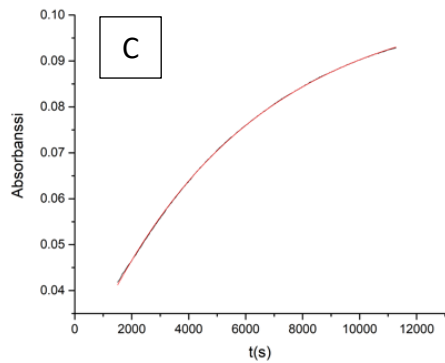
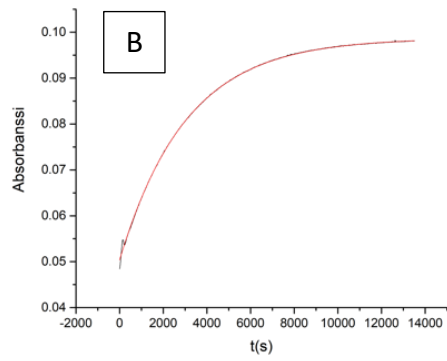
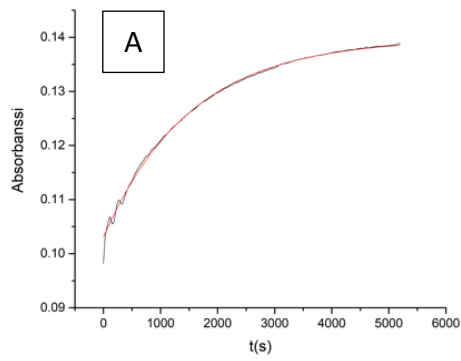
2.2 Hydrolyysimittaukset

Sopiva suojaryhmä oligonukleotidisynteesiä varten pyrittiin selvittämään tutkimalla useiden eri bentsaldehydien hydrolyysiä (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamiino)butaani-1,2,3-triolista kaavion 4 mukaisesti. Hydrolyysimittauksissa tutkittiin yhteensä kahdeksan eri bentsaldehydin hydrolyysiä 4-(metoksiamiino)butaani-1,2,3-triolista pH 5 puskuriliuoksessa, 55 °C lämpötilassa ja 10 μ M konsentraatiossa. Tasapaino saatiin ensin *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin puolelle valmistamalla jokaisen bentsaldehydin reaktioliuos kyseisen bentsaldehydin kantaliuoksesta (1,0 mM), 4-(metoksiamiino)butaani-1,2,3-triolin kantaliuoksesta (1,0 mM) ja pH 5 -puskuriliuoksesta (30 mM). Reaktioliuosta inkuboitiin huoneenlämmössä 20 h tasapainon ajamiseksi *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin puolelle. Tutkittaviksi bentsaldehydeiksi valittiin sekä sellaisia, joilla on elektroneja

puoleensa vetävä substituentti että sellaisia, joilla on elektroneja luovuttava substituentti. Kuvassa 5 on esitetty tutkittujen reaktioseosten UV-absorbanssit ajan funktiona pH:ssa 5. Hydrolyysireaktiossa vapautuneen bentsaldehydin määrää voitiin seurata mittaamalla absorbanssin kasvua tutkittavan bentsaldehydin absorptiomaksimin aallonpituudella. Voidaan myös todeta, että bentsaldehydit absorboivat UV-säteilyä huomattavasti korkeammalla aallonpituudella kuin tuotteet. Tämä johtuu aldehydin karbonyylisidoksen ja bentseenirenkaan välisestä konjugaatiosta.

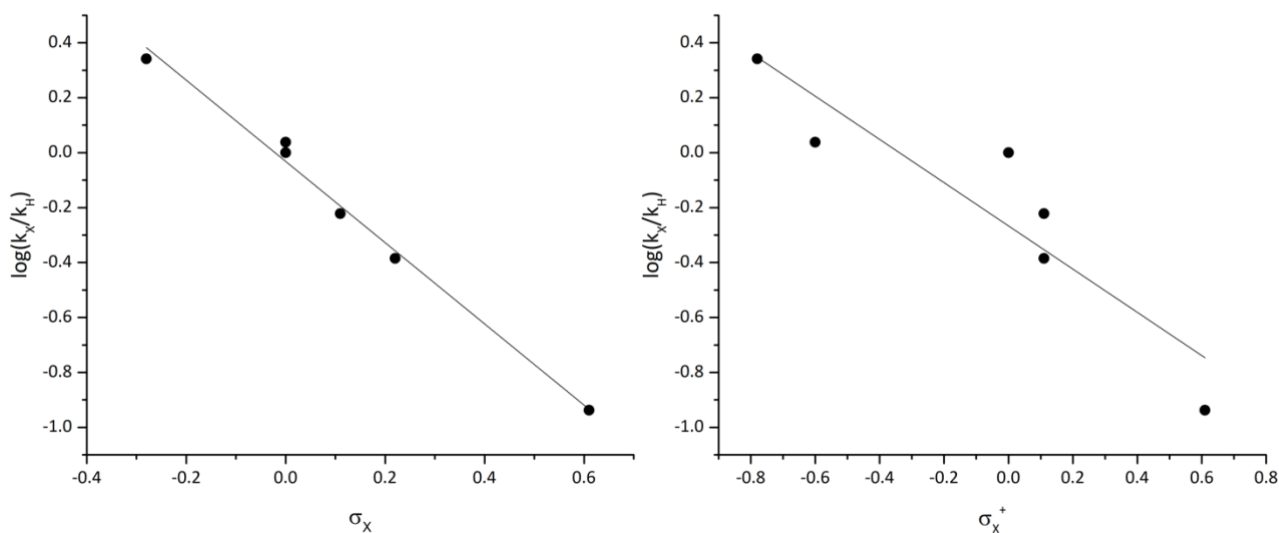


Kaavio 4. *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiinin ja *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin hydrolyysi (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioliksi ja substituoiduksi bentsaldehydiksi.



Kuva 5. Tutkittujen reaktioseosten UV-absorbanssit ajan funktiona pH:ssa 5, 55 °C lämpötilassa ja 10 μM konsentraatiossa. Bentsaldehydin substituenttina: a) 4-MeO, b) 4-MeS, c) 3-MeO, d) 4-Cl, e) 3-CN, f) 3-NO₂, g) 4-NO₂

Kaikkien hydrolyysireaktioiden voidaan todeta olevan ensimmäisen kertaluvun reaktioita. Hydrolyysinopeuden logaritmin voidaan todeta riippuvan lineaarisesti käytetyn bentsaldehydin Hammettin substituenttivakiosta. Reaktion reaktiovakio on $\rho = -1,40 \pm 0,05$, josta voidaan päätellä bentsyylihiileen kehittyvän iminiumionin. Tämän karbokationin bentsyylihiileen resonanssin stabilisaation merkityksen voidaan olettaa olevan vähäinen, sillä nopeusvakiot vastaavat Hammettin σ -arvoja. Kuvassa 6 on esitetty hydrolyysin nopeusvakion logaritmin riippuvuus sekä sigma- että sigma⁺-substituenttivakiosta. Kaavioista voidaan havaita, että sigma-arvot ovat toimivammat tässä tapauksessa.

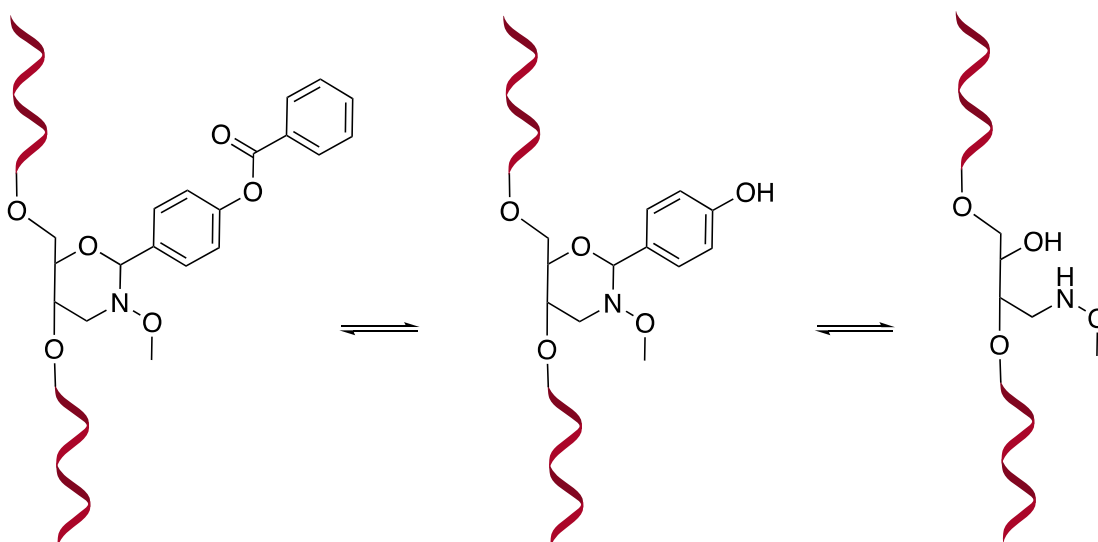


Kuva 6. Kahdeksan eri bentsaldehydin hydrolyysin nopeusvakion logaritmin riippuvuus käytetyn bentsaldehydin Hammettin substituenttivakiosta.

Suojaryhmänä parhaiten toimivan aldehydin voidaan todeta olevan sellainen, jonka substituentti olisi elektroneja puoleensa vetävä oligonukleotidisynteesin oloissa, mutta elektroneja luovuttava, kun oligonukleotidi irrotetaan kiinteältä kantajalta. Taulukossa 1 on esitetty tutkittujen aldehydien sigma- ja sigma⁺-substituenttivakiot, hydrolyysireaktioiden ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiot sekä puoliintumisajat. 4-bentsoyloksibentsaldehydi valittiin suojaryhmäksi, sillä sen voitiin päätellä olevan pysyvä oligonukleotidisynteesin oloissa. Lisäksi pääteltiin bentsoyyliryhmän irtoavan ammonolyysin oloissa, muuttaen elektroneja puoleensa vetävän 4-bentsyylioksi-substituentin elektroneja luovuttavaksi 4-hydroksi-substituentiksi. 4-bentsoyloksibentsaldehydin irtoaminen oligonukleotidista on esitetty kaaviossa 5.

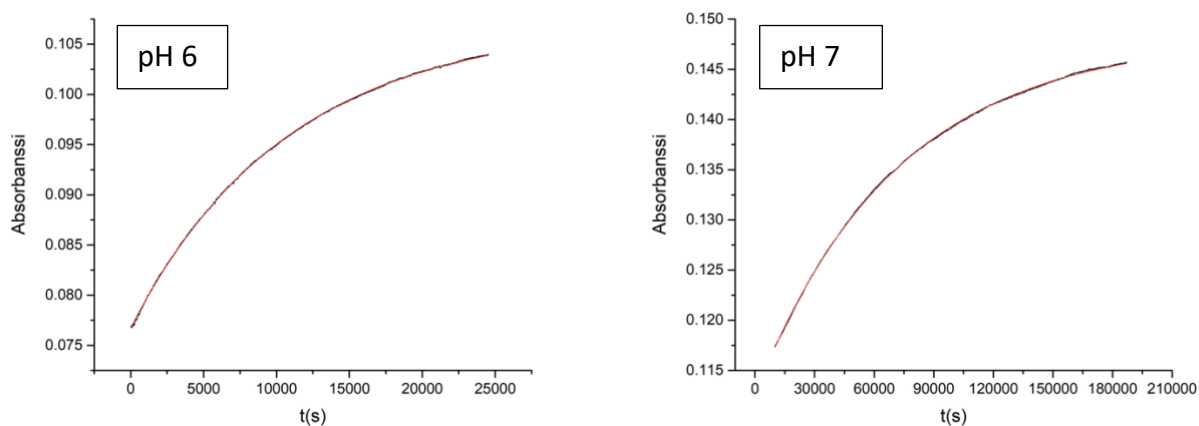
Taulukko 1. Kaikkien tutkittujen aldehydien Hammettin sigma- ja sigma+ -substituenttivakiot, hydrolyysireaktioiden ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiot ja puoliintumisajat.

Substituentti	σ_x	σ_x^+	k_{obs}	$\log(k_{\text{obsX}}/k_{\text{obsH}})$	t1/2 / h
4-OMe	-0,28	-0,78	6,58E-04	0,3409	0,3
4-SMe	0,00	-0,60	3,27E-04	0,0377	0,6
H	0,00	0,00	3,00E-04	0,0000	0,6
3-MeO	0,11	0,11	1,80E-04	-0,2217	1,1
4-Cl	0,22	0,11	1,24E-04	-0,3854	1,6
3-CN	0,61	0,61	3,47E-05	-0,9376	5,6
3-NO ₂	0,71	0,71	2,79E-05	-1,0321	6,9
4-NO ₂	0,78	0,78	2,53E-05	-1,0745	7,6
4-bentsoyylioksi	0,13	0,13			
4-OH	-0,38	-0,92			

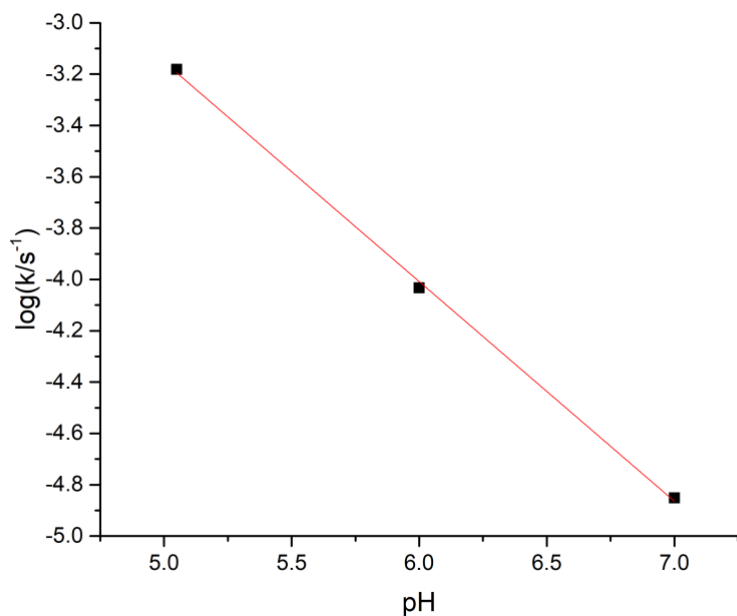


Kaavio 5. 4-(bentsoyloksi)bentsaldehydin irtoaminen oligonukleotidista

Pääasiassa hydrolyysimittaukset tehtiin pH:ssa 5, mutta 4-metoksibentsaldehydin hydrolyysiä (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolista tutkittiin myös pH:ssa 6 ja 7 (kuva 7). Tutkimuksen perusteella voidaan todeta hydrolyysireaktion olevan ensimmäisen kertaluvun reaktio hydroksidi-ionin suhteen pH:n lähestyessä neutraalia kuvan 8 mukaan.

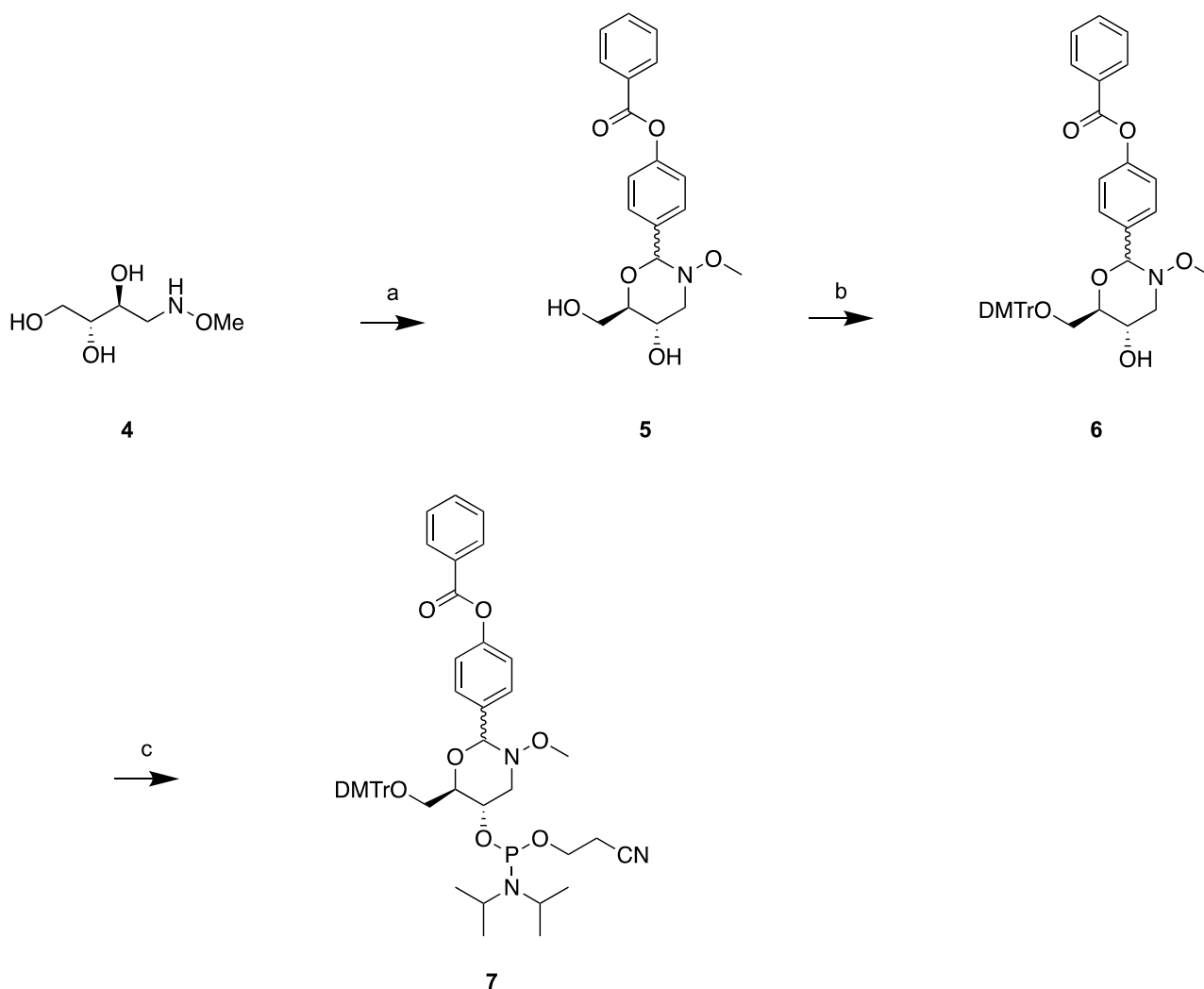


Kuva 7. Tutkittujen reaktioseosten UV-absorbanssit ajan funktiona pH:ssa 6 ja 7, 55 °C lämpötilassa ja 10 μM konsentraatiossa bentsaldehydin substituenttina ollessa 4-metoksi.



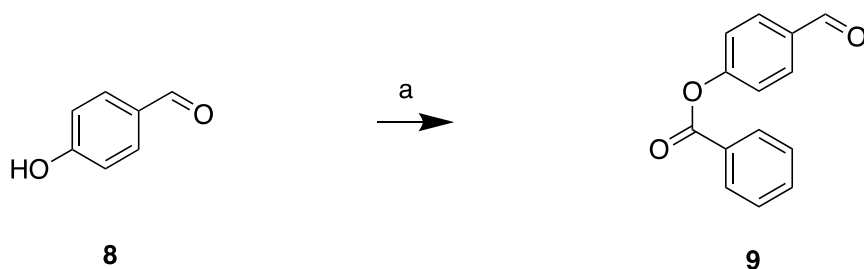
Kuva 8. 4-metoksibentsaldehydin hydrolyysireaktion nopeusvakioiden logaritmin riippuvuus pH:sta.

2.3 Fosforamidiitin synteesi



Kaavio 6. 4-bentsoyylioksibentsaldehydisuojatun (2*R*,3*S*)-4-metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin fosforamidiitin synteesi. a) 4-(bentsoyloksi)bentsaldehydi, AcOH, 1,4-dioksaani, 50 °C, 16 h; b) DMTrCl, CH₂Cl₂, pyridiini, N₂ atmosfääri, 25 °C, 16 h; c) 2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyyliklorofosforamidiitti, Et₃N, CH₂Cl₂, N₂ atmosfääri, 25 °C, 1 h.

(2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolia vastaava fosforamidiitti syntetisoitiin kaavion 6 mukaisesti. Ensin (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioliin liitettiin 4-bentsoyylioksibentsaldehydi (9) happamissa olosuhteissa. 4-bentsoyylioksibentsaldehydi syntetisoitiin kaavion 7 mukaisesti suojaamalla 4-hydroksibentsaldehydin OH-ryhmä bentsoyyliesterinä. Yhdisteen 5 primääriseen hydroksyyliiryhmään liitettiin dimetoksitriyylisuojarahmä. Reaktio oli herkkä vedelle, joten se tehtiin tyypiatmosfäärissä käyttäen kuivia liuottimia. Yhdisteeseen 6 liitettiin fosforamidiittiryhmä. Reaktio oli herkkä vedelle, joten se tehtiin tyypiatmosfäärissä käyttäen kuivia liuottimia.

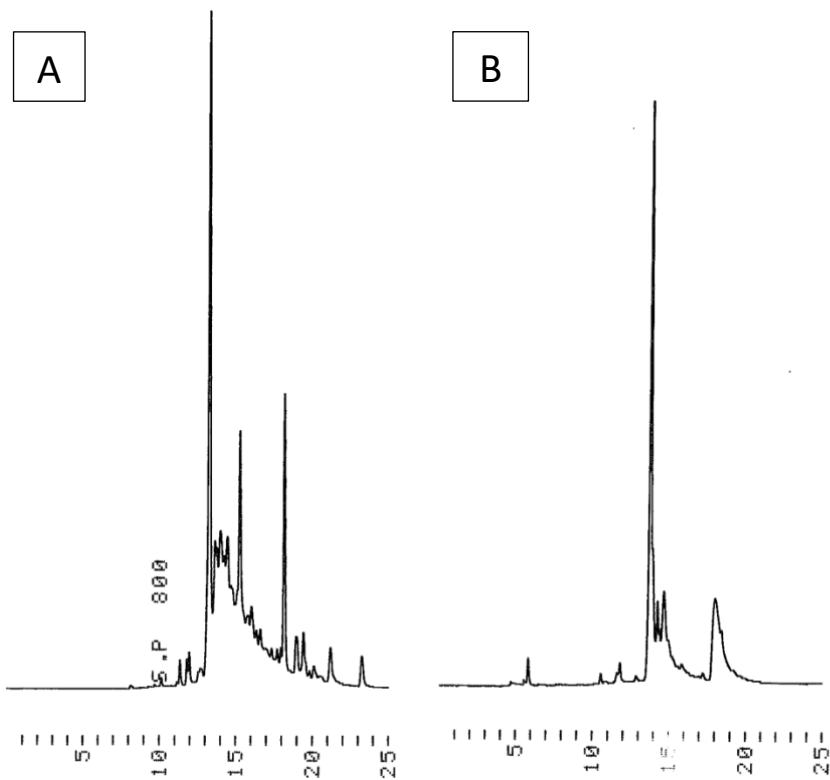


Kaavio 7. 4-bentsoyylioksibentsaldehydin synteesi. a) bentsoyylikloridi, Et₃N/DCM, 0 °C, 3 vrk

2.4 Oligonukleotidisynteesit

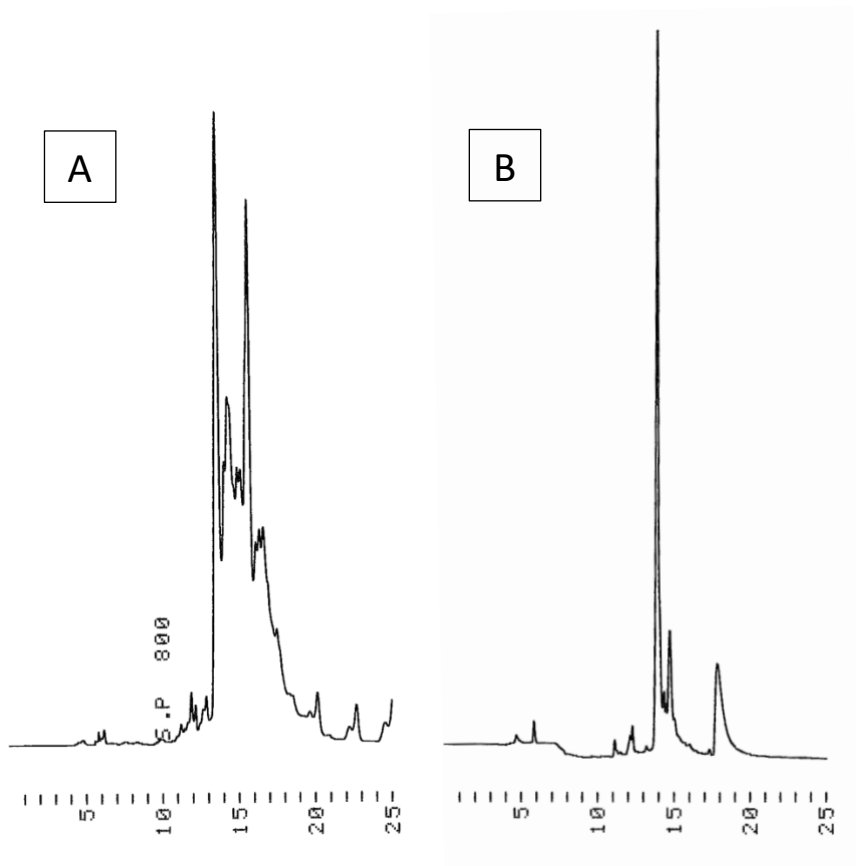
Oligonukleotidit **ON1** ja **ON2** (5'-CGAGCXCTGGC-3' ja 5'-CGAGXXXTGGC-3', jossa X viittaa modifioituun nukleotidiin) syntetisoitiin käyttäen kaupallisia DNA-fosforamidiittirakenneyksiköitä ja itse syntetisoitua fosforamidiittirakenneyksikköä **7** sekä sytidiinikantajaa.

ON1 syntetisoitiin käyttäen itse syntetisoitua fosforamidiittirakenneyksikköä, ja täten myös voitiin osoittaa suojaryhmästrategian toiminta. **ON1** syntetisoitiin kiinteällä kantajalla, ja irrotettiin kantajalta ammoniakkin väkevällä vesiliuksella. Oligonukleotidisynteesin trityylivaste pysyi tasaisena ja synteessin onnistuminen varmistettiin vielä massaspektrometrisesti. Massaspektristä huomattiin 4-hydroksibentsaldehydisuojaryhmän olevan vielä osittain kiinni, mutta myös irronneen osittain. **ON1** puhdistettiin HPLC:llä ja raakatuotteen HPLC-kromatogrammista (kuva 9A) huomattiin oligonukleotidin olevan kontaminoitunut. Kontaminaation selvitetiin johtuvan fosfiittitriesterisidosten osittaisesta sulfurisatiosta fosforotioaattisidoksi synteessin aikana, ilmeisesti johtuen vuotavasta sulfurisointireagenssin linjasta. Tämän vuoksi kontaminaatiota pyrittiin poistamaan hapettamalla. Ensin hapetusta testattiin pienellä erällä. HPLC:n perusteella (kuva 9B) voitiin todeta suuren osan sivutuotteista hapettuneen halutuksi päätuotteeksi, joten myös loppu **ON1** käsiteltiin näin.

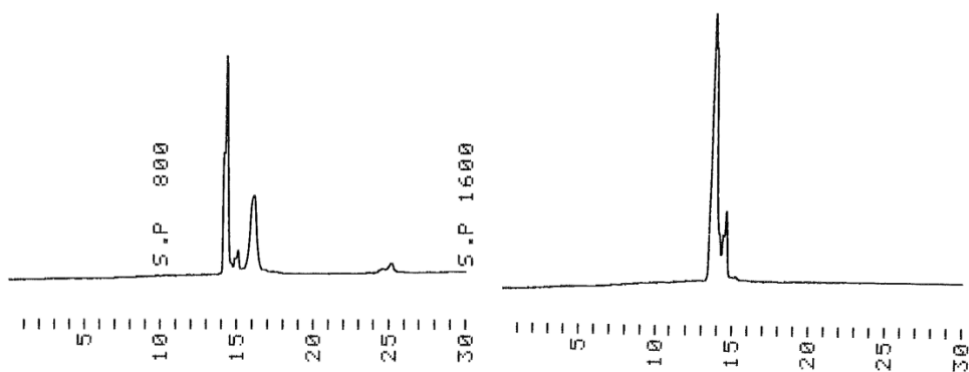


Kuva 9. RP-HPLC-profiili A) **ON1** kontaminoituneesta raakatuotteesta, B) **ON1** testihapetuksen jälkeen. HPLC ajettiin menetelmä A:n mukaisesti, joka on kuvattu yleiset menetelmät-osiossa.

Hapetusreaktion jälkeen **ON1** puhdistettiin HPLC:llä. Kuvassa 10A on esitetty **ON1** ennen hapetusta ja HPLC-puhdistusta ja kuvassa 10B niiden jälkeen. Myös massaspektrin mukaan **ON1** oli nyt suhteellisen puhdasta. Bentsaldehydisuojaryhmä oli suurimmaksi osaksi irronnut. Bentsaldehydisuojaryhmän voidaan siis todeta kestävän oligonukleotidisynteesin olot, mutta irtoavan suhteellisen pian etenkin HPLC-puhdistuksen olosuhteissa. Paljaan **ON1**:n HPLC-kromatogrammi on esitetty kuvassa 11A ja seoksen, jossa suojaryhmä on irronnut vain osittain kuvassa 11B.

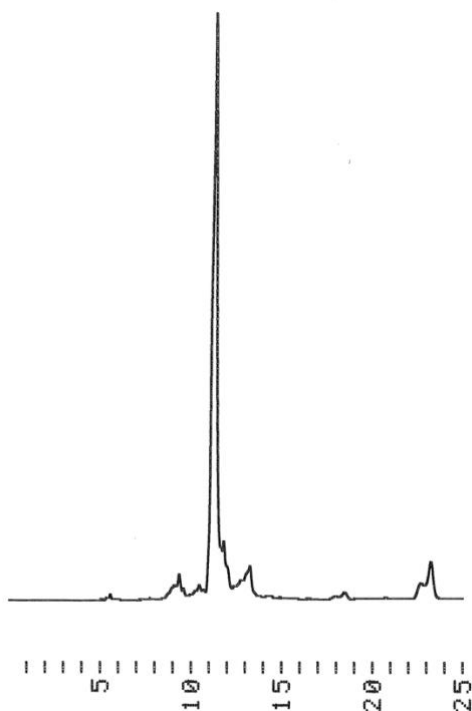


Kuva 10. RP-HPLC-profiili **ON1**, ennen hapetusta ja hapetuksen jälkeen. HPLC ajettiin menetelmä A:n mukaisesti, joka on kuvattu yleiset menetelmät-osiossa.



Kuva 11. RP-HPLC-profiili **ON1**, aldehydisuojaryhmän irtoaminen HPLC-puhdistuksen oloissa. HPLC ajettiin menetelmä A:n mukaisesti, joka on kuvattu yleiset menetelmät-osiossa.

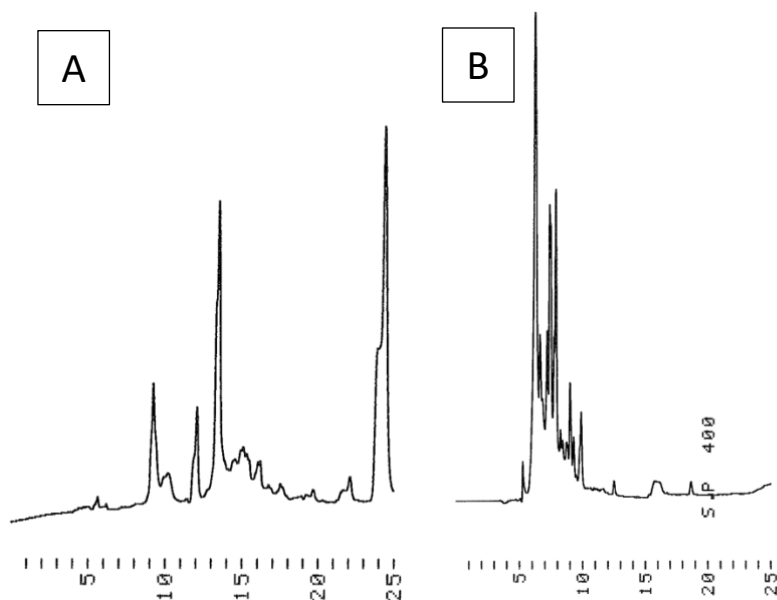
ON1 syntetisoitiin vielä uudestaan samoista lähtöaineista ja muuten samoissa olosuhteissa mutta siten, että syntetisaattorin sulfurisaatioreagenssijonossa oli pelkkää asetonitriliä. **ON1** puhdistettiin HPLC:llä (kuva 12). Puhdistetusta oligonukleotidista mitattiin myös massaspektri, jonka perusteella voitiin todeta oligonukleotidisynteesin onnistuneen jälleen halutusti ja bentsaldehydisuojaryhmän irronneen kokonaan HPLC-puhdistuksen oloissa.



Kuva 12. RP-HPLC-profiili **ON1**:n toisesta synteesistä. HPLC ajettiin menetelmä A:n mukaisesti, joka on kuvattu yleiset menetelmät-osiossa.

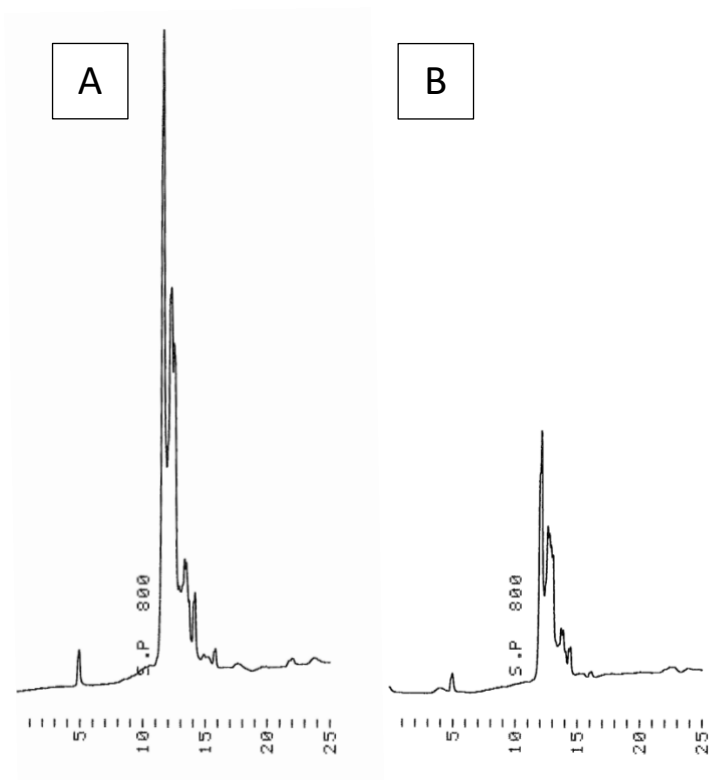
Suojaryhmästrategian toimintaa haluttiin tutkia myös useamman modifioidun nukleotidin oligonukleotidin synteesissä. **ON2** syntetisoitiin kiinteällä kantajalla ja irrotettiin kantajalta ammoniakki väkevällä vesiliuoksella. **ON2** puhdistettiin RP-HPLC:llä; raakatuotteen HPLC-kromatogrammi on esitetty kuvassa 13A ja puhdistetun **ON2**:n kuvassa 13B. Puhdistetusta **ON2**:sta mitattiin myös massaspektri, jonka perusteella voitiin varmistaa oligonukleotidisynteesin onnistuneen halutusti ja siten myös suojaryhmästrategian toimineen toivotulla tavalla. **ON2**:ssa on keskellä kolme modifioitua nukleotidia, joissa kaikissa 4-hydroksibentsaldehydisuojaryhmä on tasapainossa hydrolysoituneen muodon kanssa. Suojaryhmän irtoaminen voidaan nähdä sekä massaspektrissä että HPLC-kromatogrammissa. **ON2**:n tapauksessa osa suojaryhmistä oli siis kiinni

vielä ensimmäisen HPLC-puhdistuksen jälkeen. Tämä saattaa johtua korkeammasta konsentraatiosta, jolloin tasapaino ei ajaudu yhtä voimakkaasti hydrolysoituneen muodon puolelle. Myös useiden vierekkäisten suojarahmien aiheuttama steerinen este saattaa hidastaa suojarahmien irtoamista.

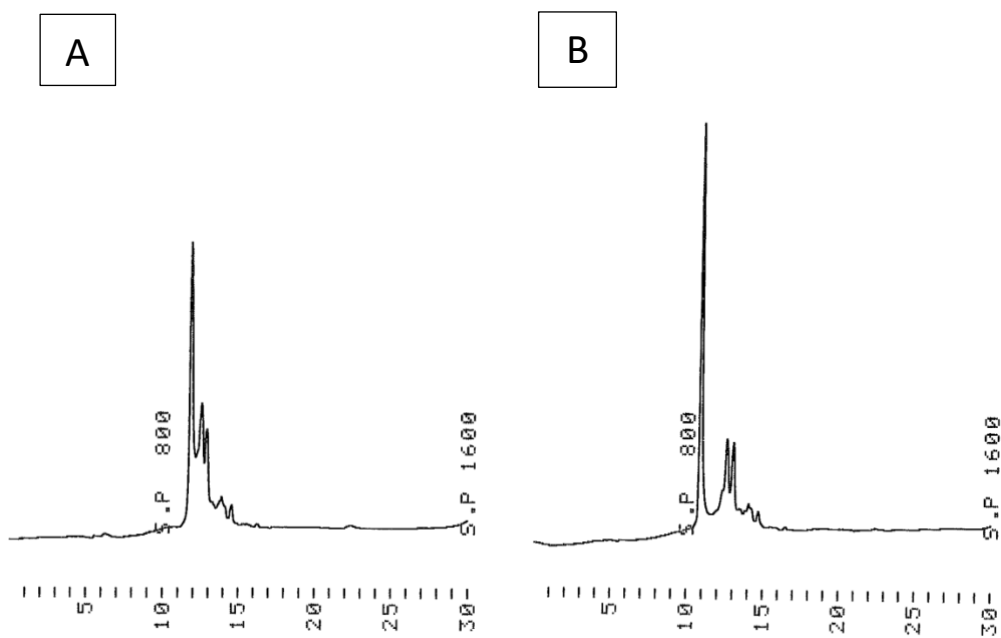


Kuva 13. A) RP-HPLC-profiili **ON2** raakatuote, B) RP-HPLC-profiili **ON2** puhdistettu tuote

Tasapainotilaa haluttiin tutkia vielä pH:n muutosten avulla. **ON2** jaettiin tasan kahteen Falcon-putkeen, ja toiseen lisättiin 150 μ l pH 5 -puskuriliuosta. HPLC-kromatogrammien (kuva 14) perusteella ei voida todeta muutosta tasapainotilassa. Muutoksia tasapainossa haluttiin tutkia vielä pH:n muutosten lisäksi myös konsentraation muutosten avulla. Tätä varten kummatkin liuokset laimennettiin 2,000 ml tilavuuteen. pH 5 liuos laimennettiin pH 5 -puskuriliuoksella ja pH 7 liuos laimennettiin pH 7 -puskuriliuoksella. Liuosten annettiin reagoida 25 °C lämpötilassa valolta suojattuina 3 vrk. HPLC-kromatogrammien (kuva 15) perusteella nähdään muutosta etenkin irronneen bentsaldehydisuojaryhmän määrässä.



Kuva 14. RP-HPLC-profiili **ON2** A) pH:ssa 7, B) pH:ssa 5



Kuva 15. RP-HPLC-profiili **ON2:n** laimennos A) pH:ssa 7, 25 °C lämpötilassa, 3 vrk ajan; B) pH:ssa 5, 25 °C lämpötilassa, 3 vrk ajan

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Yleiset menetelmät

Synteeseissä käytettiin kaupallisia reagensseja ja liuottimia. Et₃N kuivattiin kalsiumhydridillä ja liuottimet 4 Å molekyyliseuloilla. NMR-spektrit mitattiin Bruker BioSpin 500 MHz - ja 600 MHz - NMR spektrometrillä. Massaspektrit mitattiin Bruker micrOTOF-Q -massaspektrometrillä. Hydrolyysimittauksissa käytettiin PerkinElmer Lambda 35 UV/vis-spektrofotometriä, johon oli liitettynä Peltier-termostaatti. HPLC-puhdistuksissa käytettiin semipreparatiivista Thermo ODS Hypersil (250 x 10 mm, 5 µm) -kolonnia ja 260 nm detektioaallonpituutta. HPLC-menetelmänä A käytettiin: 5-20 % ACN 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH=7,0), 260 nm detektioaallonpituus, Thermo ODS Hypersil-kolonne (250 x 10 mm, 5 µm)), virtausnopeus 3 ml/min. HPLC-menetelmänä B käytettiin: 5-25 % ACN 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH=7,0), 260 nm detektioaallonpituus, Thermo ODS Hypersil-kolonne (250 x 10 mm, 5 µm)), virtausnopeus 3 ml/min.

3.2 (2S,3R)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioli

3.2.1 (2R,4R,5R)-5-((S)-1-metoksi-2-oksoetoksi)-2-fenylyli-1,3-dioksaani-4-karboksaldehydi (1)

4,6-O-bentsylideeni- α -D-glukopyranosidi (4,908 g; 17,40 mmol) liuotettiin metanoliin (100 ml). Liuos jäädytettiin n. 0 °C:een vesi-jäähauhteessa. NaIO₄ (18,7829 g; 88,0136 mmol) liuotettiin veteen (300 ml). Liuokset yhdistettiin. Saatua reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Seuraavana päivänä reaktioseokseen lisättiin etyyliasettaattia (400 ml) ja seos imusuodatettiin Celiten läpi. Vesifaasi ja orgaaninen faasi erotettiin erotussuppilossa ja orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla. Kuivattu orgaaninen faasi suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös suspentoitiin etyyliasettaattiin (400 ml), suodatettiin Celiten läpi ja haihdutettiin kuiviin. Tämä käsittely toistettiin neljästi. Tuotetta **1** saatiin 1,89 g (39 %).

3.2.2 (2S,E)-2-metoksi-2-(((2R,5R)-4-((E)-(metoksiimino)metyyli)-2-fenylyli-1,3-dioksa-5-yyli)oksi)asetaldehydin O-metyylioksiimi (2)

Yhdiste **1** liuotettiin pyridiiniin (50 ml) ja liuokseen lisättiin noin 6 ekvivalenttia O-metyylihydroksiamiinia (8,8163 g; 105,5 mmol). Reaktioliuosta sekoitettiin 80 °C lämpötilassa yön yli. Seuraavana päivänä reaktioliuos haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin dikloorimetaaniin (100 ml) ja uutettiin kylläisellä NaHCO₃:n vesiliuoksella (100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla ja haihdutettiin kuiviin. Tuotetta **2** saatiin 1,8876 g (91 %). Liitteessä 1. ¹H

NMR, liitteessä 2. COSY ja liitteessä 3. HSQC. ^1H NMR δ_{H} (500 MHz; CD_3Cl): 3,44 (3H, s, CHOCH_3), 3,73 (1H, t, $J=10,7$ Hz, OCH_2), 3,92 (6H, m, NOCH_3), 4,38 (1H, m, OCH_2CHCH), 4,41 (1H, m, OCH_2), 4,96 (1H, d, $J=6,0$ Hz, CHOCH_3), 5,56 (1H, s, BzCH), 7,27 (1H, t, $J=7,0$ Hz, CHCHOCH_3), 7,38 (3H, m, $p,m\text{-Bz}$), 7,44 (1H, d, $J=7,1$ Hz, NCHCHCH), 7,50 (2H, m, $o\text{-Bz}$).

3.2.3 *N*-(2-(((2*R*,5*R*)-4-((metoksiamino)metyyli)-2-fenyyl-1,3-dioksanyyli)oksi)etyyli-*O*-metyylihydroksyyliamiini (3)

Lähtöaine **2** liuotettiin dikloorimetaanin (5 ml) ja metanolin (5 ml) seokseen. Lisättiin noin 6 ekvivalenttia natriumsyanoboorihydridiä (2,3108 g; 36,7723 mmol). Reaktioliuoksen pH säädettiin neljään etikkahapon avulla ja pidettiin liuoksen pH neljässä etikkahapon lisäyksillä (n. 3 ml). Reaktioliuosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä, jonka jälkeen se laimennettiin dikloorimetaanilla (100 ml) ja pestiin kylläisellä NaHCO_3 :n vesiliuoksella (100 ml). Saatu vesifaasi uutettiin dikloorimetaanilla (100 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin MgSO_4 :lla ja haihdutettiin kuiviin. NMR-spektrin perusteella reaktiota piti vielä jatkaa, joten haihdutusjäännös liuotettiin dikloorimetaanin (5 ml) ja metanolin (5 ml) seokseen ja lisättiin noin 3 ekvivalenttia natriumsyanoboorihydridiä (1,1596 g; 18,4532 mmol). Liuoksen pH säädettiin neljään etikkahapon avulla ja liuoksen pH pidettiin neljässä etikkahapon lisäyksillä (n. 3 ml). Reaktioliuosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Seuraavana päivänä reaktioseos laimennettiin dikloorimetaanilla (100 ml) ja pestiin kylläisellä NaHCO_3 :n vesiliuoksella. Saatu vesifaasi uutettiin dikloorimetaanilla (100 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina trietyyliamiinin, metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:3:96, v/v). Tuotteen $R_f = 0,24$ ($\text{Et}_3\text{N}:\text{MeOH}:\text{DCM} = 1:3:96$, v/v). Saatu tuote puhdistettiin uudelleen silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina trietyyliamiinin, metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:2:97, v/v). Tuotteen $R_f = 0,14$ ($\text{Et}_3\text{N}:\text{MeOH}:\text{DCM} = 1:2:96$, v/v). Tuotetta **3** saatiin 1,0301 g (56 %). Liitteessä 4. ^1H NMR δ_{H} (500 MHz; CD_3Cl): 3,00 (1H, m, $\text{NHCH}_2\text{CHOCH}_3$), 3,05 (1H, m, $\text{NHCH}_2\text{CHOCH}_3$), 3,12 (1H, m, NHCH_2CHCH), 3,48 (3H, m, CHOCH_3), 3,54 (1H, m, NHCH_2CHCH), 3,54 (3H, m, NOCH_3), 3,56 (3H, s, NOCH_3), 3,64 (1H, dd, $J=8,5$ Hz, OCH_2), 3,81 (1H, m, OCH_2CH), 3,98 (1H, m, OCH_2CHCH), 4,43 (1H, dd, $J=4,1$ Hz, OCH_2), 4,79 (1H, t, $J=4,5$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CHOCH}_3$), 5,52 (1H, d, $J=5,6$ Hz, BzCH), 7,38 (3H, m, $p,m\text{-Bz}$), 7,49 (2H, m, $o\text{-Bz}$). Liitteessä 5. ^{13}C NMR δ_{C} (500 MHz; CD_3Cl): 52,6 (NHCH_2CHCH), 53,9 ($\text{NHCH}_2\text{CHOCH}_3$), 55,2 (CHOCH_3), 61,3 (NHOCH_3), 61,6 (NHOCH_3), 68,5 (OCH_2CH), 69,7 (OCH_2), 76,6 (OCH_2CHCH), 100,1 (CHOCH_3), 101,0 (BzCH), 126,1 ($o\text{-Bz}$), 128,2 ($m\text{-Bz}$), 129,1 ($p\text{-Bz}$), 137,5 (C-Bz).

3.2.4 (2R,3S)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioli (4)

Lähtöaine **3** liuotettiin 4750 µl:aan HCl:a ja sen joukkoon lisättiin 1504 µl 1,3-propaaniditiolia. Seosta sekoitettiin yön yli 40 °C:ssa. Reaktioliuos liuotettiin veteen (100 ml) ja pestiin kolmesti dikloorimetaanilla (100 ml). Vesifaasiin lisättiin HO⁻-muotoista anioninvaihtohartsia, kunnes liuoksen pH oli 9. Anioninvaihtohartsia poistettiin suodattamalla normaalipaineessa. Vesifaasi pestiin vielä kolmesti dikloorimetaanilla (100 ml) ja haihdutettiin kuiviin. Tuotetta **4** saatiin 0,3909 g (78 %). Liitteessä 6. ¹H NMR, liitteessä 7. COSY ja liitteessä 8. HSQC. ¹H NMR δ_H (600 MHz; D₂O): 2,74 (1H, dd, *J*=9,2 Hz, CH₂NH), 3,11 (1H, dd, *J*=2,6 Hz, CH₂NH), 3,44 (3H, s, OCH₃), 3,49 (1H, m, CH₂OH), 3,52 (1H, m, CHCH₂OH), 3,64 (1H, dd, *J*=2,8 Hz, CH₂OH), 3,70 (1H, m, CHCH₂NH).

3.3 4-(6-((bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)(diisopropyyliamino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoaatti

3.3.1 4-bentsoyylioksibentsaldehydi (9)

4-hydroksibentsaldehydi (**8**) (3,0051 g; 24,607 mmol) liuotettiin kahdesti kuivaan pyridiiniin (20 ml) ja haihdutettiin kuiviin. 4-hydroksibentsaldehydi liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (70 ml) ja lisättiin kuivaa trietyyliamiinia (5 ml). Reaktioseos jäähdytettiin jäähäuteen avulla 0 °C:een. Kylmään reaktioseokseen lisättiin tipoittain bentsoyylikloridia (4,2 ml; 36 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin 3 vuorokautta huoneenlämmössä. Koko reaktio suoritettiin typpiatmosfäärissä. Reaktioseokseen lisättiin kylläistä NaHCO₃:n vesiliuosta (60 ml). Faasit erotettiin ja vesifaasi uutettiin kolmesti dikloorimetaanilla (70 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kylläisellä NaCl:n vesiliuoksella (200 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin NaSO₄:lla, suodatettiin normaalipaineessa ja haihdutettiin kuiviin. Liuoksessa todettiin NMR:n perusteella olevan vielä reagoimatonta bentsoyylikloridia. Haihdutusjäännös liuotettiin dikloorimetaaniin (100 ml) ja pestiin kolmesti NaCl:lla (100 ml) ja kerran kylläisellä NaHCO₃:n vesiliuoksella (100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin NaSO₄:lla, suodatettiin normaalipaineessa ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:99, v/v). Tuote tunnistettiin ohutlevykromatografisesti, tuotteen R_f = 0,62 (MeOH:DCM 1:99, v/v). 4-bentsoyylioksibentsaldehydiä (**9**) saatiin 2,26 g (40 %).

3.3.2 4-(5-hydroksi-6-(hydroksimetyyli)-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoaatti (5)

Lähtöaine **4** (0,1751 g; 1,158 mmol) liuotettiin dioksaaniin (5 ml) ja lisättiin noin 1 ekvivalentti 4-bentsoyylioksisibentsaldehydiä (**9**, 0,2655 g; 1,174 mmol). Liuoksen pH säädettiin 5:een etikkahapolla ja sekoitettiin huoneenlämmössä 3 h. Reaktio ei kuitenkaan edennyt halutusti TLC:n perusteella, joten reaktioliuoksen pH:ta päätettiin laskea ja lämpötilaa nostaa. Liuoksen pH laskettiin neljään etikkahapolla. Liuosta sekoitettiin 50 °C lämpötilassa yön yli. Seuraavana päivänä liuos neutraloitiin trietyyliamiinilla (pH 8) ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina trietyyliamiinin, metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:7:92, v/v). Tuotteen $R_f = 0,22$ ($\text{Et}_3\text{N}:\text{MeOH}:\text{DCM}$ 1:7:92, v/v). Tuotetta **5** saatiin 0,2718 g (65 %). Liitteessä 9. ^1H NMR ja liitteessä 10. COSY. ^1H NMR δ_H (600 MHz; DMSO): 2,86 (1H, m, CH_2NOCH_3), 3,04 (2H, s, CH_2NOCH_3), 3,18 (1H, d, $J=5,2$ Hz, CHCH_2OH), 3,43 (2H, m, CH_2OH), 3,57 (3H, m, OCH_3), 3,72 (1H, m, CHOH), 4,10 (1H, m, CHCH_2OH), 4,61 (1H, s, CHOH), 5,30 (1H, m, OCH), 7,29 (2H, m, *m*-Ph), 7,57 (2H, m, *o*-Ph), 7,62 (2H, t, $J=7,7$ Hz, *m*-Bz), 7,76 (1H, t, $J=7,2$ Hz, *p*-Bz), 8,15 (2H, d, $J=8,0$ Hz, *o*-Bz).

3.3.3 4-(6-((bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-hydroksi-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoaatti (6)

Lähtöaine **5** (0,2718 g; 0,7563 mmol) liuotettiin kahdesti kuivaan pyridiiniin (20 ml) ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin kuivaan pyridiiniin (10 ml) ja liuokseen lisättiin noin 1,1 ekvivalenttia dimetoksitrietylikloridia (0,2826 g; 0,8341 mmol) liuotettuna kuivaan dikloorimetaaniin (2,0 ml). Koko reaktio suoritettiin typpiatmosfäärissä. Liuosta sekoitettiin huoneenlämmössä yön yli. Seuraavana päivänä liuos haihdutettiin lähes kuiviin ja jäännös liuotettiin dikloorimetaaniin (50 ml). Liuosta pestiin kylläisellä NaHCO_3 :n vesiliuoksella (50 ml) ja orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4 :lla, suodatettiin normaalipaineessa ja haihdutettiin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina trietyyliamiinin, metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:2:97, v/v). Tuotteen $R_f = 0,13$ ($\text{Et}_3\text{N}:\text{MeOH}:\text{DCM}$ 1:2:97, v/v). Tuote kuivui yön yli eksikkaattorissa. Tuotetta **6** saatiin 0,4197 g (83 %). Liitteessä 11. ^1H NMR. ^1H NMR δ_H (600 MHz; DMSO): 2,39 (1H, s, CH_2NOCH_3), 2,62 (1H, s, CH_2NOCH_3), 2,89 (1H, m, $\text{CHCH}_2\text{ODMTr}$), 3,03 (3H, s, NOCH_3), 3,55 (2H, m, DMTrOCH_2), 3,86 (6H, m, ArOCH_3), 4,91 (1H, s, OH), 5,48 (1H, s, OCHN), 6,89 (4H, m, *o*-PhOMe), 7,31 (9H, m, *m*-PhOMe, *o,m,p*-Ph), 7,46 (2H, m, *m*-PhOBz), 7,63 (2H, m, *o*-PhOBz), 7,78 (2H, m, *m*-Bz), 8,15 (1H, m, *p*-Bz), 8,58 (2H, m, *o*-Bz).

3.3.4 4-(6-((bis(4-metoksifenylyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)

(diisopropyliamino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoaatti (7)

Lähtöaine **6** (0,4197 g; 0,6342 mmol) liuotettiin kolmesti kuivaan tolueeniin (30 ml) ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (4,0 ml) ja liuokseen lisättiin 5 ekvivalenttia kuivaa trietyyliamiinia (442 µl; 3,17 mmol) ja 1,2 ekvivalenttia 2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyliklorofosforamidiittia (170 µl; 0,761 mmol). Koko reaktio suoritettiin tyypiatmosfäärissä. Reaktioliuosta sekoitettiin tunti huoneenlämmössä, jonka jälkeen lisättiin dikloorimetaania (50 ml) ja pestiin kylläisellä NaHCO₃:n vesiliuoksella (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:llä, suodatettiin normaalipaineessa ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina trietyyliamiinin, etyyliasetaatin ja heksaanin seosta (1:40:59, v/v). Tuote tunnistettiin ohutlevykromatografisesti, R_f = 0,59 (Et₃N:EtOAc:heksaani 1:40:59, v/v). Tuotetta **7** saatiin 0,2453 g (44 %). Liitteessä 12. ¹H NMR, liitteessä 13. ¹³C NMR, liitteessä 14. ³¹P NMR, liitteessä 15. COSY, liitteessä 16. HSQC, liitteessä 17. HMBC, liitteessä 18. massaspektri. ¹H NMR δ_H (500 MHz; CD₃CN): 0,93 (6H, d, J=6,8 Hz, CH(CH₃)₂), 1,11 (6H, d, J=6,8 Hz, CH(CH₃)₂), 2,66 (2H, m, POCH₂CH₂), 3,02 (1H, m, OCHCH₂NO), 3,17 (3H, s, NOCH₃), 3,32 (1H, m, DMTrOCH₂), 3,43 (1H, m, DMTrOCH₂), 3,47 (2H, m, CH(CH₃)₂), 3,67 (1H, m, POCH₂CH₂), 3,77 (6H, s, ArOCH₃), 3,81 (1H, m, POCH₂CH₂), 3,88 (1H, m, DMTrOCH₂CH), 3,89 (1H, m, OCHCH₂NO), 4,11 (1H, m, OCHCH₂NO), 5,47 (1H, m, OCHN), 6,88 (4H, m, *m*-PhOMe), 7,25 (1H, m, *p*-Ph), 7,33 (2H, m, *m*-Ph), 7,35 (2H, m, *m*-PhOBz), 7,42 (4H, m, *o*-PhOMe), 7,57 (2H, m, *o*-Ph), 7,60 (2H, m, *m*-Bz), 7,72 (2H, m, *o*-PhOBz), 7,73 (1H, m, *p*-Bz), 8,21 (2H, m, *o*-Bz). ¹³C NMR δ_C (500 MHz; CD₃CN): 20,1 (POCH₂CH₂), 23,8 (CH(CH₃)₂), 24,1 (CH(CH₃)₂), 42,9 (CH(CH₃)₂), 54,9 (ArOCH₃), 55,8 (OCHCH₂NO), 58,0 (POCH₂CH₂), 60,0 (NOCH₃), 62,3 (OCHCH₂NO), 63,7 (DMTrOCH₂), 80,6 (DMTrOCH₂CH), 85,6 (Ar₃C), 90,8 (OCHN), 113,0 (*m*-PhOMe), 118,7 (CN), 121,3 (*m*-PhOBz), 126,8 (*p*-Ph), 127,8 (*m*-Ph), 128,1 (*o*-Ph), 128,3 (*o*-PhOBz), 128,9 (*m*-Bz), 129,6 (C1-PhOBz), 129,9 (*o*-Bz), 130,1 (*m*-PhOMe), 130,2 (C1-Bz), 133,9 (*p*-Bz), 136,0 (C1-PhOMe), 145,5 (C1-Ph), 150,6 (*p*-PhOBz), 158,6 (*p*-PhOMe), 165,1 (CO-Bz). ³¹P NMR δ_P (500 MHz; CD₃CN): 148,2. ESI⁺ -TOF: *m/z* 862,3846 [M + H]⁺ (havaittu), *m/z* 862,3827 [M + H]⁺ (laskettu).

3.4 Hydrolyysimittaukset

(2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin ja substituoitujen bentsaldehydien kondensaatiotuotteiden hydrolyysireaktioita seurattiin UV/vis -spektrofotometrillä. Mittaukset suoritettiin 55 °C lämpötilassa ja 10 µM konsentraatiossa. Mittauksissa käytettiin pH 5, 6 ja 7 -

puskuriliuoksia, joiden ionivahvuus oli 0,100 M. pH 5 -puskuriliuos valmistettiin liuottamalla 452 µl etikkahappoa, 1,8220 g natriumasetaattia ja 4,5460 g NaCl:a 1,000 litraan mQ-vettä. pH 6 -puskuriliuos valmistettiin liuottamalla 6,3922 g MES:a, 18,88 ml 1 M NaOH:a ja 7,4744 g NaCl:a 1,000 litraan mQ-vettä. pH 7 -puskuriliuos valmistettiin liuottamalla 3,8246 g HEPES:a, 3,6359 g HEPESNa:a ja 5,0301 g NaCl:a 1,000 litraan mQ-vettä.

(2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin 0,010 M kantaliuos valmistettiin liuottamalla 0,3909 g (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolia 250 ml:aan mQ-vettä. Jokaisesta tutkitusta bentsaldehydistä valmistettiin 0,010 M kantaliuos veteen tai metanoliin liukoisuudesta riippuen. Bentsaldehydin ja 4-klooribentsaldehydin kantaliuokset valmistettiin veteen. 4-nitrobentsaldehydin, 4-metoksibentsaldehydin, 4-metyyliotiobentsaldehydin, 3-nitrobentsaldehydin, 3-syanobentsaldehydin ja 3-metoksibentsaldehydin kantaliuokset valmistettiin metanoliin.

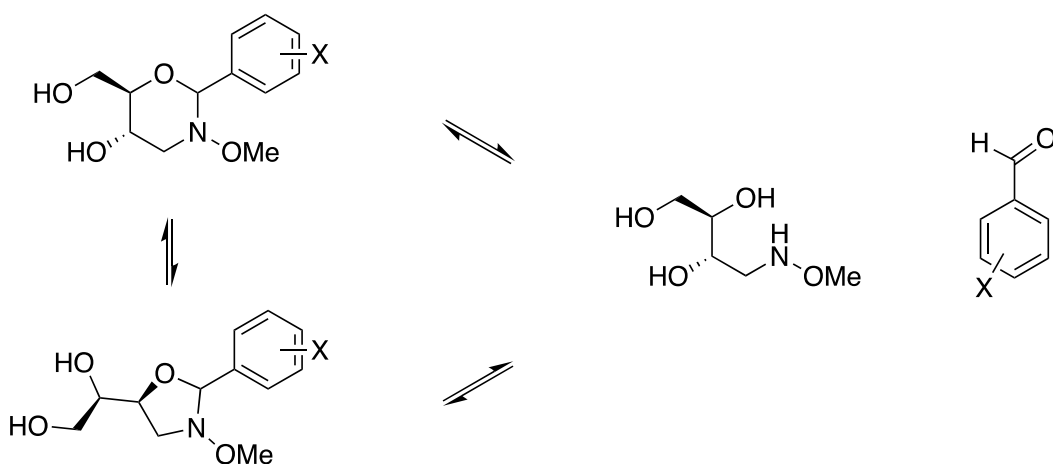
Jokaisen bentsaldehydin reaktioliuos valmistettiin sekoittamalla 100 µl kyseisen bentsaldehydin kantaliuosta, 200 µl (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin kantaliuosta ja 200 µl pH 5 -puskuriliuosta Eppendorf-putkessa. Näiden reaktioliuosten annettiin olla huoneenlämmössä, valolta suojattuina 20 h.

Mittausta varten reaktioliuos laimennettiin pH 5 -puskuriliuoksella 10 µM konsentraatioon ja lämmitettiin 55 °C lämpötilaan. Mittauksen aallonpituus valittiin käytetyn bentsaldehydin mukaan mittaamalla ensin pelkän kyseisen bentsaldehydin UV-spektri. Bentsaldehydien UV-spektrejä on esitetty liitteissä 19–25. Hydrolyysimittauksissa käytetyt aallonpituudet on esitetty taulukossa 2.

4-metoksibentsaldehydin hydrolyysimittaukset pH:ssa 6 ja 7 suoritettiin muuten samoin kuin edellä, mutta reaktioliuos laimennettiin pH 6 tai pH 7 -puskuriliuoksella ennen mittausta pH 5 -puskuriliuoksen sijaan. Bentsaldehydien hydrolyysireaktiot on esitetty kaaviossa 5.

Taulukko 2. Bentsaldehydien hydrolyysimittauksissa käytetyt absorptioaallonpituudet

Substituentti (X)	λ / nm
4-MeO	284
4-MeS	315
H	248
3-MeO	255
4-Cl	258
3-CN	243
3-NO ₂	233
4-NO ₂	266



Kaavio. 5 *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin ja *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiinin hydrolyysi (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioliksi ja substituoiduksi bentsaldehydiksi. Bentsaldehydin substituentit on esitetty taulukossa 2.

3.5 Oligonukleotidisynteesit

ON1 (5'-CGAGCXCTGGC-3') syntetisoitiin ÄKTA oligopilot plus -automaattisella DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen kiinteänä kantajana Ac-dC-CPG:tä (48 $\mu\text{mol g}^{-1}$). Aktivaattorina käytettiin 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetrasoli-liuosta. Trityyliyväste pysyi vakaana koko synteesin ajan. Synteesin jälkeen kiinteä kantaja kuivattiin eksikkaattorissa. **ON1** irrotettiin kiinteältä kantajalta

suspentoimalla kuivattu kiinteä kantaja 1 ml:aan 25 % ammoniakkin vesiliuosta ja antamalla seoksen reagoida 55 °C lämpötilassa yön yli. Nestefaasi erotettiin ja kylmäkuivattiin ja haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen (1000 µl). Synteesin onnistuminen varmistettiin mittaamalla raakatuotteen massaspektri (oligoa sekä kiinni että irronneena). Oligonukleotidi puhdistettiin RP-HPLC:llä menetelmä A:n mukaisesti. Oligonukleotidissa havaittiin epäpuhtautta, jonka selvitetiin johtuvan fosfiittitriesterisidosten osittaisesta sulfurisatiosta fosforotioaattisidoksiksi synteesin aikana, ilmeisesti johtuen vuotavasta sulfurisointireagenssin linjasta. Oligonukleotidiliuos hapetettiin epäpuhtauden poistamiseksi. Valmistettiin reaktioliuos oligonukleotidista (10 µl) ja hapettimesta (30 µl) reagoimaan yön yli. Hapettimena käytettiin Sigma-Aldrichin valmista hapetinliuosta, joka sisälsi pyridiiniä, jodia ja vettä. Vastaavasti valmistettiin myös toinen reaktioliuos 2 h reaktioajalla. Reaktion jälkeen liuokset pestiin dietyylieetterillä (40 µl), haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännökset liuotettiin mQ-veteen (100 µl). Reaktion onnistuminen varmistettiin RP-HPLC:llä menetelmä A:n mukaisesti. Tämän perusteella hapetettiin vastaavasti puolet syntetisoidusta oligonukleotidista (450 µl) yön yli. Reaktioliuos pestiin dietyylieetterillä neljästi, sentrifugoitiin, nestefaasi haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen (1,0 ml). Liuos puhdistettiin RP-HPLC:llä menetelmä A:n mukaisesti. Saadut fraktiot kylmäkuivattiin, ja niistä mitattiin massaspektrit. Puhdistettiin myös käsittelemätön oligonukleotidi HPLC:llä menetelmä A:n mukaisesti. Saadut fraktiot kylmäkuivattiin ja niistä mitattiin massaspektri. Ajettiin HPLC-kromatogrammit piikeistä 1. ja 2. menetelmä A:n mukaisesti.

ON1 syntetisoitiin uudestaan. **ON1** syntetisoitiin muuten samoin kuin ensimmäisellä kerralla, mutta syntetisaattorin sulfurisointireagenssilinjassa oli pelkkää asetonitriiliä. Massaspektri liitteessä 26. ESI⁺ -TOF: m/z 1619,9 [M – 2H]²⁻ (havaittu), 1619,8 [M – 2H]²⁻ (laskettu).

ON2 (5'-CGAGXXXTGGC-3') syntetisoitiin ÄKTA oligopilot plus -automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen kiinteänä kantajana Ac-dC-CPG:tä (48 µmol g⁻¹). Kiinteä kantaja kuivattiin eksikkaattorissa, liuotettiin 1 ml:aan 25 % ammoniakkaa ja seoksen annettiin reagoida 55 °C lämpötilassa yön yli. Liuos kylmäkuivattiin ja liuotettiin mQ-veteen. **ON2** puhdistettiin RP-HPLC:llä menetelmä B:n mukaisesti. Saadut fraktiot kylmäkuivattiin. Fraktioista mitattiin massaspektrit. Oikeaksi todetusta fraktiosta mitattiin HPLC-kromatogrammi menetelmä A:n mukaisesti. Fraktio jaettiin tasan kahteen Falcon-putkeen (150 µl + 150 µl). Toiseen lisättiin pH 5 -puskuriliuosta 150 µl. Liuokset puhdistettiin uudestaan RP-HPLC:llä menetelmä A:n mukaisesti. Kummatkin liuokset laimennettiin 2,000 ml tilavuuteen. pH 5 -näytteeseen lisättiin 1700 µl pH 5 -puskuria ja toiseen 1850 µl pH 7 -puskuria. Liuokset säilytettiin huoneenlämmössä valolta

suojattuina 3 vrk. Liuokset puhdistettiin RP-HPLC:llä menetelmä B:n mukaisesti. Massaspektri liitteessä 27. ESI⁺-TOF: m/z 1543,9 [M – 2H]²⁻ (havaittu), 1543,8 [M – 2H]²⁻ (laskettu).

4. Johtopäätökset ja yhteenveto

(2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin synteesi onnistui suhteellisen hyvin, kokonaissaannolla 14,9 %. Kokonaissaantoa olisi parantanut erityisesti parempi saanto yhdisteen **1** synteessissä. Oletettavasti tämän synteessin viimeisessä vaiheessa, Celiten läpi suodatuksessa, kadotettiin odotettua enemmän tuotetta. Pieniä määriä tuotetta kerääntyi kiinteänä Celiten pinnalle. Kiinteä tuote Celiten pinnalla liukeni kelvollisesti etyyliasetattiin ja osittain saatiin suodatettua Celiten läpi. Tulevaisuudessa tämä voisi olla mahdollista välttää muun muassa vähentämällä suodatuskertoja tai huuhtelemalla Celiteä enemmän etyyliasetaatilla suodatusten jälkeen. Myös yhdisteen **3** synteesiä voisi olla mahdollista parantaa, sillä pelkistys vaati odotettua pidemmän reaktioajan. Synteesiä yritettiin ensin tehdä yön yli, mutta reaktio ei ollut valmis. Reaktiota jatkettiin vielä uudelleen yön yli, jolloin pelkistys oli valmis ja saatiin halutusti pelkistynyttä yhdistettä **3**. Pidempi reaktioaika mahdollistaisi pelkistyksen reaktion loppuun asti kerralla, ilman turhia välivaiheita. Tämä voisi myös parantaa synteessin saantoa. (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin voitiin NMR-spektrometrisesti todeta olevan puhdasta.

Hydrolyysimittausten perusteella saatiin runsaasti tietoa useiden eri bentsaldehydien hydrolyysinopeudesta (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolista. Hydrolyysimittausten avulla pystyttiin myös päättelemään sopiva aldehydisuojaryhmä käytettäväksi oligonukleotidisynteessissä. Mittauksista saadun datan perusteella päädyttiin käyttämään 4-bentsoyylioksibentsaldehydiä suojaryhmänä. Vaikka tämän tutkimuksen tavoitteena oli nimenomaan kehittää suojaryhmästrategia (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolille oligonukleotidisynteesiä varten, saatiin tehdyistä hydrolyysimittauksista myös huomattavasti hyödyllistä tietoa eri bentsaldehydien substituenttien ominaisuuksien vaikutuksista tasapainoreaktiossa.

Hydrolyysimittaukset onnistuvat hyvin. Muutamissa hydrolyysikäyrissä nähdään kuitenkin alussa pientä epätasaisuutta. Tämän voisi olettaa johtuvan pienistä ongelmista liukoisuudessa. Kaikki bentsaldehydit pyrittiin ensisijaisesti liuottamaan veteen liuoksia tehdessä. Kuitenkin osa bentsaldehydeistä ei liuennut veteen, jolloin ne liuotettiin veden sijasta metanoliin. Saattaa olla, että liukoisuus vesipohjaiseen puskuriliuokseen ei ollut jokaisen bentsaldehydin tapauksessa aivan riittävä.

Fosforamidiitin synteesi onnistui suhteellisen hyvin. Synteesin kokonaissaanto oli 24,6 %. Aiemmassa tutkimuksessa⁵⁸ valmistettiin fosforamidiitti samaan tarkoitukseen, mutta eri suojaryhmästrategialla. Tämän fosforamidiitin saanto (2*S*,3*R*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolista oli 5,9 %. Saanto uudessa menetelmässä on siis aiempaan tutkimukseen verrattuna huomattavasti parempi. Reaktio-olosuhteita voisi kuitenkin olla mahdollista vielä optimoida paremman saannon saavuttamiseksi. Syntetisoitu fosforamidiitti oli myös tarvittavan puhdasta, ja sen puhtaus varmistettiin NMR- ja MS-spektroskopisesti.

Suojaryhmästrategia osoittautui toimivan oligonukleotidisynteesissä hyvin. **ON1**:n synteesissä oli kuitenkin aluksi jonkin verran ongelmia syntetisaattorin kontaminaation takia. Suojaryhmät toimivat halutusti oligonukleotidisynteesin ajan, mutta saatu oligonukleotidi oli kontaminoitunut ilmeisesti syntetisaattorin vuotavan sulfurisointireagenssiliinan takia. Fosfiittitriesterisidokset olivat osittain sulfurisoituneet fosforotioaattisidoksiksi synteesin aikana. Kontaminaatiota pyrittiin poistamaan hapetusreaktiolla ja näin saatiin suhteellisen puhtas tuote. Syntetisoitaessa **ON1** uudelleen korvaamalla sulfurisointireagenssi asetoniitriilillä saatiin puhtas tuote. Aldehydisuojaryhmä pysyi kiinni synteesin ajan, mutta irtosi suhteellisen nopeasti HPLC-puhdistuksen oloissa. Ihanteellinen aldehydisuojaryhmä olisi voinut olla vielä hieman pysyvämpi. Suojaryhmänä pysyvä aldehydi olisi sellainen, jossa olisi elektroneja puoleensa vetävä substituentti. Myös **ON2**:n synteesi onnistui hyvin. Jälleen aldehydisuojaryhmät pysyivät kiinni synteesin ajan, mutta irtosivat suhteellisen nopeasti HPLC-puhdistuksen oloissa.

Oligonukleotidisynteesien pohjalta voidaan todeta kehitetyn suojaryhmästrategian olevan parempi kuin aiemmin kehitetyn. Aiemmassa tutkimuksessa saatu modifioidun fosforamidiitin trityyliyivaste oli 64 %, mutta nyt trityyliyivaste pysyi vakaana koko synteesin ajan. Bentsaldehydisuojaryhmä irtoaa suhteellisen nopeasti HPLC-puhdistuksen oloissa, mutta myöskään liian pysyvä suojaryhmä ei ole toivottu. Tulevaisuudessa voitaisiin siis esimerkiksi hydrolyysimittauksista saadun datan perusteella tutkia myös hieman pysyvämpää suojaryhmää suojatun 4-hydroksibentsaldehydin tilalle. Yleisesti pysyviä suojaryhmiä olisivat sellaiset bentsaldehydijohdannaiset, joilla olisi elektroneja puoleensa vetävä substituentti.

5. Viitteet

- (1) Xiong, H.; Veedu, R. N.; Diermeier, S. D. Recent Advances in Oligonucleotide Therapeutics in Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (7).
<https://doi.org/10.3390/ijms22073295>.
- (2) Verhaart, I. E. C.; Aartsma-Rus, A. Therapeutic Developments for Duchenne Muscular Dystrophy. *Nature Reviews Neurology* **2019**, *15* (7), 373–386.
<https://doi.org/10.1038/s41582-019-0203-3>.
- (3) Shirley, M. Casimersen: First Approval. *Drugs* **2021**, *81* (7), 875–879.
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01512-2>.
- (4) Dhillon, S. Viltolarsen: First Approval. *Drugs* **2020**, *80* (10), 1027–1031.
<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01339-3>.
- (5) Heo, Y. A. Golodirsen: First Approval. *Drugs*. Adis February 1, 2020, pp 329–333.
<https://doi.org/10.1007/s40265-020-01267-2>.
- (6) Lim, K. R. Q.; Maruyama, R.; Yokota, T. Eteplirsen in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Medical Press Ltd. February 28, 2017, pp 533–545. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97635>.
- (7) Kim, J.; Hu, C.; Moufawad El Achkar, C.; Black, L. E.; Douville, J.; Larson, A.; Pendergast, M. K.; Goldkind, S. F.; Lee, E. A.; Kuniholm, A.; Soucy, A.; Vaze, J.; Belur, N. R.; Fredriksen, K.; Stojkowska, I.; Tsytsykova, A.; Armant, M.; DiDonato, R. L.; Choi, J.; Cornelissen, L.; Pereira, L. M.; Augustine, E. F.; Genetti, C. A.; Dies, K.; Barton, B.; Williams, L.; Goodlett, B. D.; Riley, B. L.; Pasternak, A.; Berry, E. R.; Pflock, K. A.; Chu, S.; Reed, C.; Tyndall, K.; Agrawal, P. B.; Beggs, A. H.; Grant, P. E.; Urion, D. K.; Snyder, R. O.; Waisbren, S. E.; Poduri, A.; Park, P. J.; Patterson, A.; Biffi, A.; Mazzulli, J. R.; Bodamer, O.; Berde, C. B.; Yu, T. W. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *New England Journal of Medicine* **2019**, *381* (17), 1644–1652. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1813279>.
- (8) Hagedorn, P. H.; Yakimov, V.; Ottosen, S.; Kammler, S.; Nielsen, N. F.; Høg, A. M.; Hedtjärn, M.; Meldgaard, M.; Møller, M. R.; Ørum, H.; Koch, T.; Lindow, M. Hepatotoxic Potential of Therapeutic Oligonucleotides Can Be Predicted from Their Sequence and Modification Pattern. *Nucleic Acid Therapeutics* **2013**, *23* (5), 302–310.
<https://doi.org/10.1089/nat.2013.0436>.

- (9) Behlke, M. A. Chemical Modification of SiRNAs for In Vivo Use. *Oligonucleotides* **2008**, *18*, 305–320.
- (10) Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Research October 1, 2020, pp 673–694.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>.
- (11) Geary, R. S.; Norris, D.; Yu, R.; Bennett, C. F. Pharmacokinetics, Biodistribution and Cell Uptake of Antisense Oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2015**, *87*, 46–51.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.008>.
- (12) Kordasiewicz, H. B.; Stanek, L. M.; Wancewicz, E. v.; Mazur, C.; McAlonis, M. M.; Pytel, K. A.; Artates, J. W.; Weiss, A.; Cheng, S. H.; Shihabuddin, L. S.; Hung, G.; Bennett, C. F.; Cleveland, D. W. Sustained Therapeutic Reversal of Huntington's Disease by Transient Repression of Huntingtin Synthesis. *Neuron* **2012**, *74* (6), 1031–1044.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.009>.
- (13) Canady, T. D.; Berlyoung, A. S.; Martinez, J. A.; Emanuelson, C.; Telmer, C. A.; Bruchez, M. P.; Armitage, B. A. Enhanced Hybridization Selectivity Using Structured GammaPNA Probes. *Molecules* **2020**, *25* (4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040970>.
- (14) Sahu, B.; Sacui, I.; Rapireddy, S.; Zanotti, K. J.; Bahal, R.; Armitage, B. A.; Ly, D. H. Synthesis and Characterization of Conformationally Preorganized, (R)-Diethylene Glycol-Containing γ -Peptide Nucleic Acids with Superior Hybridization Properties and Water Solubility. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (14), 5614–5627. <https://doi.org/10.1021/jo200482d>.
- (15) Nishizaki, T.; Iwai, S.; Ohtsuka, E.; Nakamura, H. Solution Structure of an RNA,2'-O-Methylated RNA Hybrid Duplex Containing an RNA,DNA Hybrid Segment at the Center †, ‡. *Biochemistry* **1997**, *36* (9), 2577–2585.
- (16) Pallan, P. S.; Greene, E. M.; Jicman, P. A.; Pandey, R. K.; Manoharan, M.; Rozners, E.; Egli, M. Unexpected Origins of the Enhanced Pairing Affinity of 2'-Fluoro-Modified RNA. *Nucleic Acids Research* **2011**, *39* (8), 3482–3495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1270>.
- (17) Malek-Adamian, E.; Patrascu, M. B.; Jana, S. K.; Martínez-Montero, S.; Moitessier, N.; Damha, M. J. Adjusting the Structure of 2'-Modified Nucleosides and Oligonucleotides via C4'- α -F or C4'- α -OMe Substitution: Synthesis and Conformational Analysis. *Journal of Organic Chemistry* **2018**, *83* (17), 9839–9849. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01329>.
- (18) Prakash, T. P. An Overview of Sugar-Modified Oligonucleotides for Antisense Therapeutics. *Chemistry & Biodiversity* **2011**, *8* (9), 1616–1641.

- (19) Inoue, H.; Hayase, Y.; Hnura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. Synthesis and Hybridization Studies on Two Complementary Nona(2'-O-Methyl)Ribonucleotides. *Nucleic Acids Research* **1987**, *15* (15), 6131–6148.
- (20) Elayadi, A. N.; Braasch, D. A.; Corey, D. R. Implications of High-Affinity Hybridization by Locked Nucleic Acid Oligomers for Inhibition of Human Telomerase. *Biochemistry* **2002**, *41* (31), 9973–9981. <https://doi.org/10.1021/bi025907j>.
- (21) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T. Stability and Structural Features of the Duplexes Containing Analogues with a Fixed N-Type Conformation, 2'-O,4'-C-Methyleneribonucleosides. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (30), 5401–5404.
- (22) Langkj, N.; Pasternak, A.; Wengel, J. UNA (Unlocked Nucleic Acid): A Flexible RNA Mimic That Allows Engineering of Nucleic Acid Duplex Stability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (15), 5420–5425.
- (23) Summerton, J.; Weller, D. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **1997**, *7* (3), 187–195.
- (24) Summerton, J. Morpholino Antisense Oligomers: The Case for an RNase H-Independent Structural Type. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1489* (1), 141–158.
- (25) Ötvös, L.; Sági, J.; Sági, G.; Szemzo, A. Base Modified Oligodeoxynucleotides. II. Increase of Stability to Nucleases by 5-Alkyl-,5-(1-Alkenyl)- and 5-(1-Alkynyl)-Pyrimidines. *Nucleosides and Nucleotides* **1999**, *18* (9), 1929–1933. <https://doi.org/10.1080/07328319908044854>.
- (26) Herdewijn, P. Heterocyclic Modifications of Oligonucleotides and Antisense Technology. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **2000**, *10* (4), 297–310.
- (27) Millican, T. A.; Mockl, G. A.; Chauncey, M. A.; Patell, T. P.; Eaton, M. A. W.; Gunning, J.; Cutbush, S. D.; Neidle, S.; Mann, J. Synthesis and Biophysical Studies of Short Oligodeoxynucleotides with Novel Modifications: A Possible Approach to the Problem of Mixed Base Oligodeoxynucleotide Synthesis. *Nucleic Acids Research* **1984**, *12* (19), 7435–7453.
- (28) Kool, E. T. Replacing the Nucleobases in DNA with Designer Molecules. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35* (11), 936–943. <https://doi.org/10.1021/ar000183u>.
- (29) Juliano, R. L. The Delivery of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **2016**, *44* (14), 6518–6548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw236>.

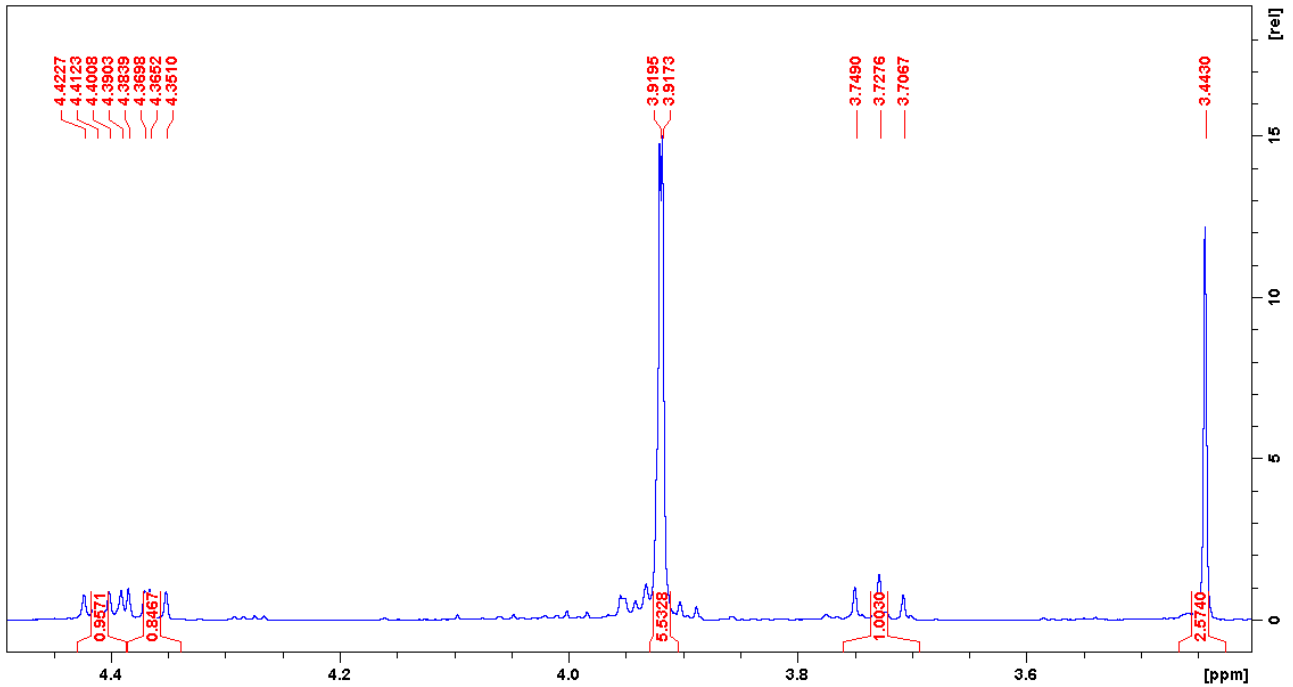
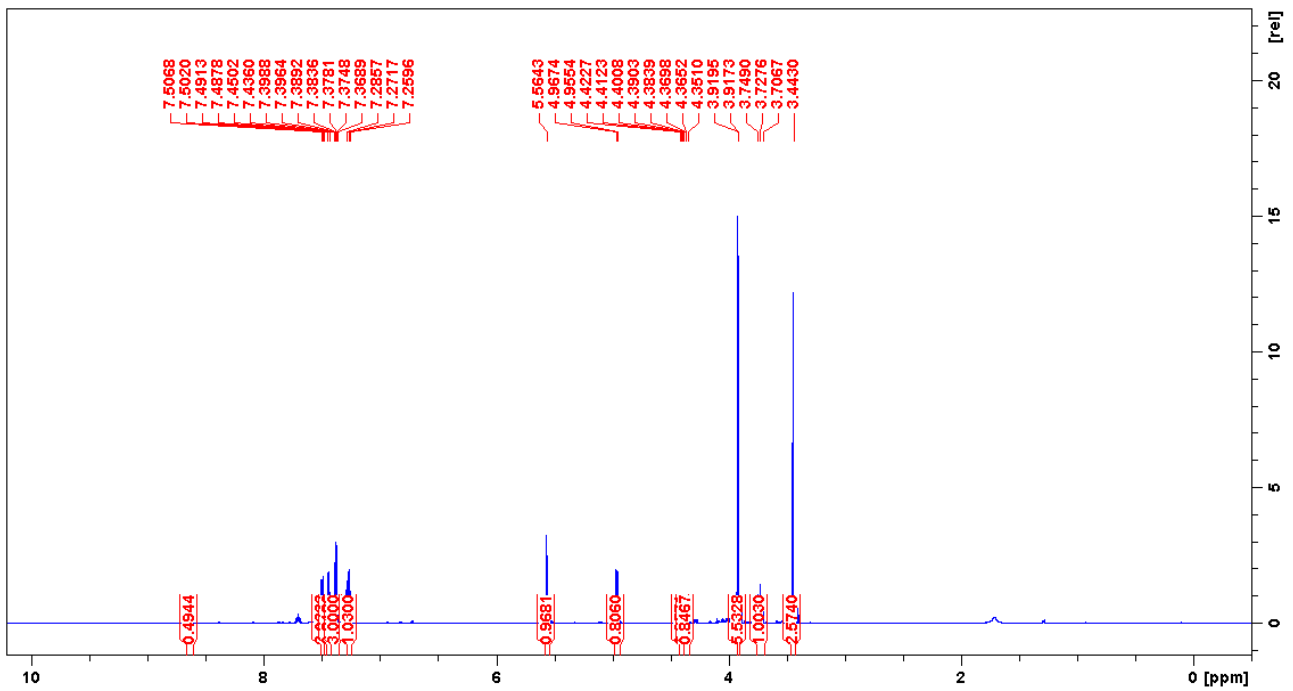
- (30) Eckstein, F. Phosphorothioates, Essential Components of Therapeutic Oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics* **2014**, *24* (6), 374–387. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>.
- (31) Gaus, H. J.; Gupta, R.; Chappell, A. E.; Østergaard, M. E.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. Characterization of the Interactions of Chemically-Modified Therapeutic Nucleic Acids with Plasma Proteins Using a Fluorescence Polarization Assay. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47* (3), 1110–1122. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1260>.
- (32) Crooke, S. T.; Wang, S.; Vickers, T. A.; Shen, W.; Liang, X. H. Cellular Uptake and Trafficking of Antisense Oligonucleotides. *Nature Biotechnology* **2017**, *35* (3), 230–237. <https://doi.org/10.1038/nbt.3779>.
- (33) Manoharan, M. Oligonucleotide Conjugates as Potential Antisense Drugs with Improved Uptake, Biodistribution, Targeted Delivery, and Mechanism of Action. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **2002**, *12*, 103–128.
- (34) Soutschek, J.; Akinc, A.; Bramlage, B.; Charisse, K.; Constien, R.; Donoghue, M.; Elbashir, S.; Geick, A.; Hadwiger, P.; Harborth, J.; John, M.; Kesavan, V.; Lavine, G.; Pandey, R. K.; Racie, T.; Rajeev, K. G.; Röhl, I.; Toudjarska, I.; Wang, G.; Wuschko, S.; Bumcrot, D.; Koteliansky, V.; Limmer, S.; Manoharan, M.; Vornlocher, H.-P. Therapeutic Silencing of an Endogenous Gene by Systemic Administration of Modified siRNAs. *Nature* **2004**, *432*, 173–178.
- (35) Lorenz, C.; Hadwiger, P.; John, M.; Vornlocher, H. P.; Unverzagt, C. Steroid and Lipid Conjugates of siRNAs to Enhance Cellular Uptake and Gene Silencing in Liver Cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14* (19), 4975–4977. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.07.018>.
- (36) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J. L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chemical Reviews* **2006**, *106* (9), 3652–3711. <https://doi.org/10.1021/cr020452p>.
- (37) Eaton, B. E.; Larry Gold; Hicke, B. J.; Nebojsa, J.; Jucker, F. M.; Sebesta, D. P.; Tarasow, T. M.; Willis, M. C.; Zichi, D. A. Post-SELEX Combinatorial Optimization of Aptamers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1997**, *5* (6), 1087–1096.
- (38) Lowe, G. Combinatorial Chemistry. *Chemical Society Reviews* **1995**, *24* (5), 309–317.
- (39) Bugaut, A.; Toulmé, J. J.; Rayner, B. Use of Dynamic Combinatorial Chemistry for the Identification of Covalently Appended Residues That Stabilize Oligonucleotide Complexes. *Angewandte Chemie - International Edition* **2004**, *43* (24), 3144–3147. <https://doi.org/10.1002/anie.200454041>.

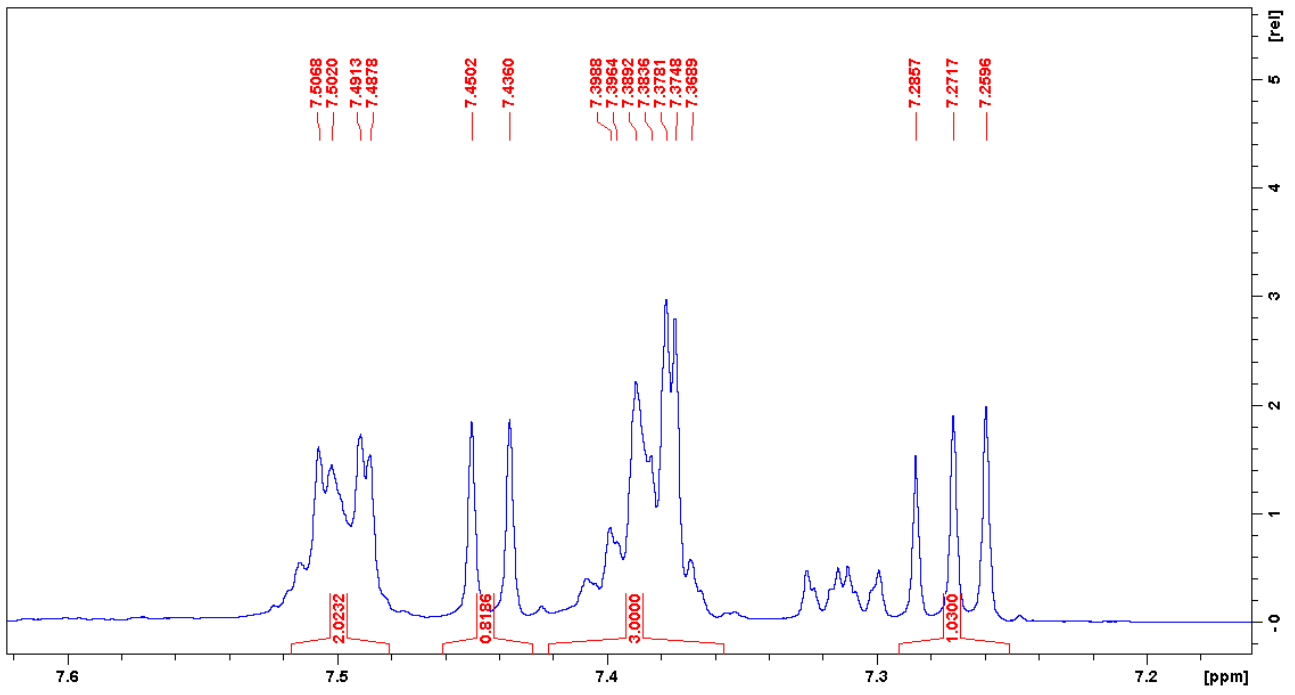
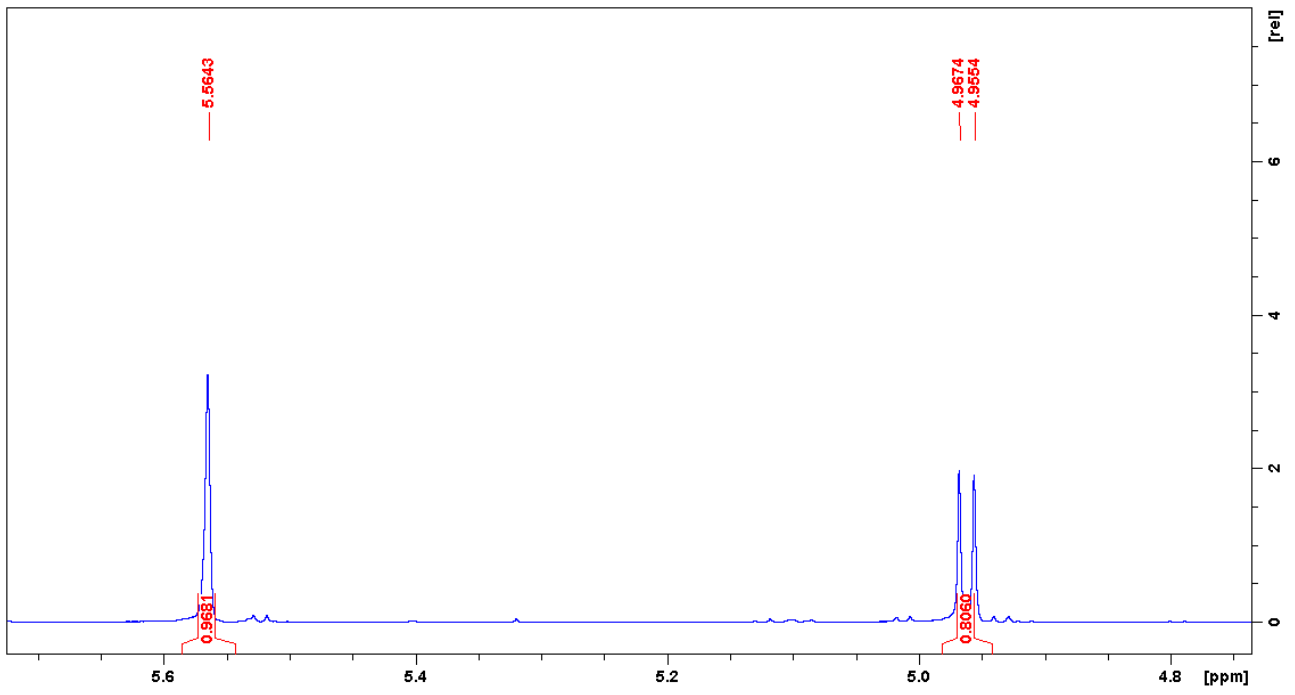
- (40) Brady, P. A.; Bonar-Law, R. P.; Rowan, S. J.; Suckling, C. J.; Sanders, J. K. M. "Living" Macrolactonisation: Thermodynamically-Controlled Cyclisation and Interconversion of Oligocholates. *Chemical Communications* **1996**, 5 (9), 319.
- (41) Bugaut, A.; Toulmé, J. J.; Rayner, B. SELEX and Dynamic Combinatorial Chemistry Interplay for the Selection of Conjugated RNA Aptamers. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2006**, 4 (22), 4082–4088. <https://doi.org/10.1039/b610890c>.
- (42) Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides in Water. *J Am Chem Soc* **2000**, 122 (48), 12063–12064. <https://doi.org/10.1021/ja005507o>.
- (43) Li, J.; Nowak, P.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Libraries: From Exploring Molecular Recognition to Systems Chemistry. *J Am Chem Soc* **2013**, 135 (25), 9222–9239. <https://doi.org/10.1021/ja402586c>.
- (44) Ladame, S.; Whitney, A. M.; Balasubramanian, S. Targeting Nucleic Acid Secondary Structures with Polyamides Using an Optimized Dynamic Combinatorial Approach. *Angewandte Chemie - International Edition* **2005**, 44 (35), 5736–5739. <https://doi.org/10.1002/anie.200501450>.
- (45) Österlund, T.; Korhonen, H.; Virta, P. DNA-Templated N (Me)-Alkoxyamine Glycosylation. *Organic Letters* **2018**, 20 (6), 1496–1499. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00113>.
- (46) Meyer, C. D.; Joiner, C. S.; Stoddart, J. F. Template-Directed Synthesis Employing Reversible Imine Bond Formation. *Chemical Society Reviews* **2007**, 36 (11), 1705–1723. <https://doi.org/10.1039/b513441m>.
- (47) Herrmann, A. Dynamic Combinatorial/Covalent Chemistry: A Tool to Read, Generate and Modulate the Bioactivity of Compounds and Compound Mixtures. *Chemical Society Reviews* **2014**, 43 (6), 1899–1933. <https://doi.org/10.1039/c3cs60336a>.
- (48) Robertson, D. L.; Joyce, G. F. Selection in Vitro of an RNA Enzyme That Specifically Cleaves Single-Stranded DNA. *Nature* **1990**, 344, 467–468.
- (49) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science (1979)* **1990**, 249 (4968), 505–510.
- (50) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, 346, 818–822.

- (51) Au-Yeung, H. Y.; Pantoş, G. D.; Sanders, J. K. M. Dynamic Combinatorial Donor-Acceptor Catenanes in Water: Access to Unconventional and Unexpected Structures. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (5), 1257–1268. <https://doi.org/10.1021/jo101981p>.
- (52) Au-Yeung, H. Y.; Cougnon, F. B. L.; Otto, S.; Pantoş, G. D.; Sanders, J. K. M. Exploiting Donor-Acceptor Interactions in Aqueous Dynamic Combinatorial Libraries: Exploratory Studies of Simple Systems. *Chemical Science* **2010**, *1* (5), 567–574. <https://doi.org/10.1039/c0sc00307g>.
- (53) Rowan, S.; Sanders, J. Building Thermodynamic Combinatorial Libraries of Quinine Macrocycles. *Chemical Communications* **1997**, No. 15, 1407–1408.
- (54) Pappas, C. G.; Liu, B.; Marić, I.; Ottel , J.; Kiani, A.; van der Kloek, M. L.; Onck, P. R.; Otto, S. Two Sides of the Same Coin: Emergence of Foldamers and Self-Replicators from Dynamic Combinatorial Libraries. *J Am Chem Soc* **2021**, *143* (19), 7388–7393. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c00788>.
- (55) Hunt, R. A. R.; Frederick Ludlow, R.; Otto, S. Estimating Equilibrium Constants for Aggregation from the Product Distribution of a Dynamic Combinatorial Library. *Organic Letters* **2009**, *11* (22), 5110–5113. <https://doi.org/10.1021/ol901656x>.
- (56) de Bruin, B.; Hauwert, P.; Reek, J. N. H. Dynamic Combinatorial Chemistry: The Unexpected Choice of Receptors by Guest Molecules. *Angewandte Chemie - International Edition* **2006**, *45* (17), 2660–2663. <https://doi.org/10.1002/anie.200504480>.
- (57) Otto, S.; Kubik, S. Dynamic Combinatorial Optimization of a Neutral Receptor That Binds Inorganic Anions in Aqueous Solution. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (26), 7804–7805. <https://doi.org/10.1021/ja0351589>.
- (58) Afari, M. N. K.; Virta, P.; Lönnberg, T. N-Methoxy-1,3-Oxazinane Nucleic Acids (MOANAs) – a Configurationally Flexible Backbone Modification Allows Post-Synthetic Incorporation of Base Moieties. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2022**, *20* (17), 3480–3485. <https://doi.org/10.1039/D2OB00465H>.

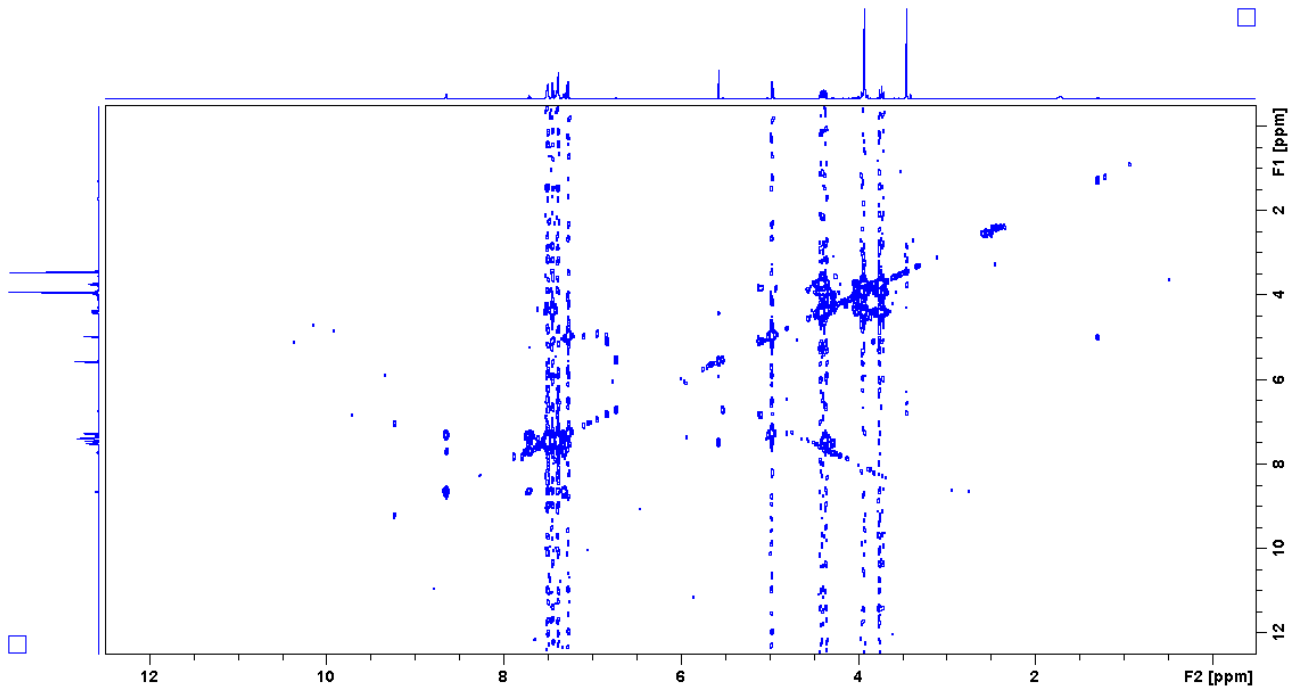
6. Liitteet

Liite 1. (2*S*,*E*)-2-metoksi-2-(((2*R*,5*R*)-4-((*E*)-(metoksiimino)metyyli)-2-fenyyli-1,3-dioksa-5-yyli)oksi)asetaldehydin *O*-metyylioksiimin (**2**) ¹H NMR-spektri

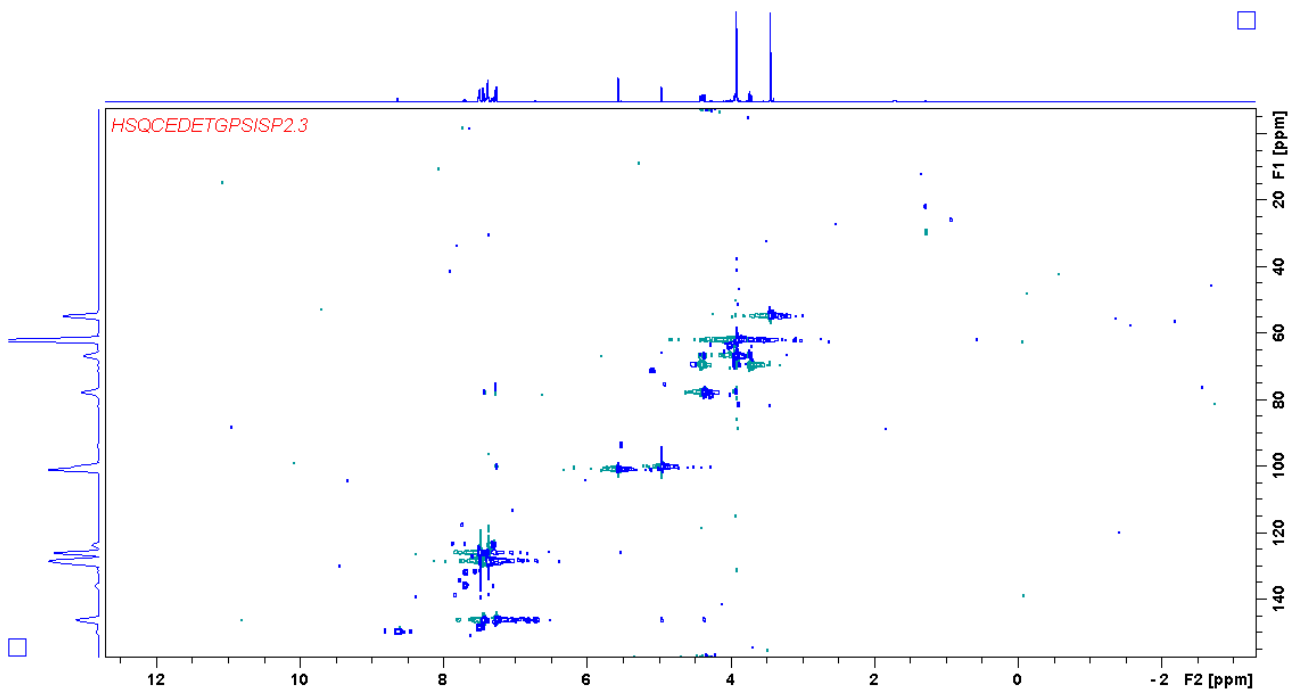


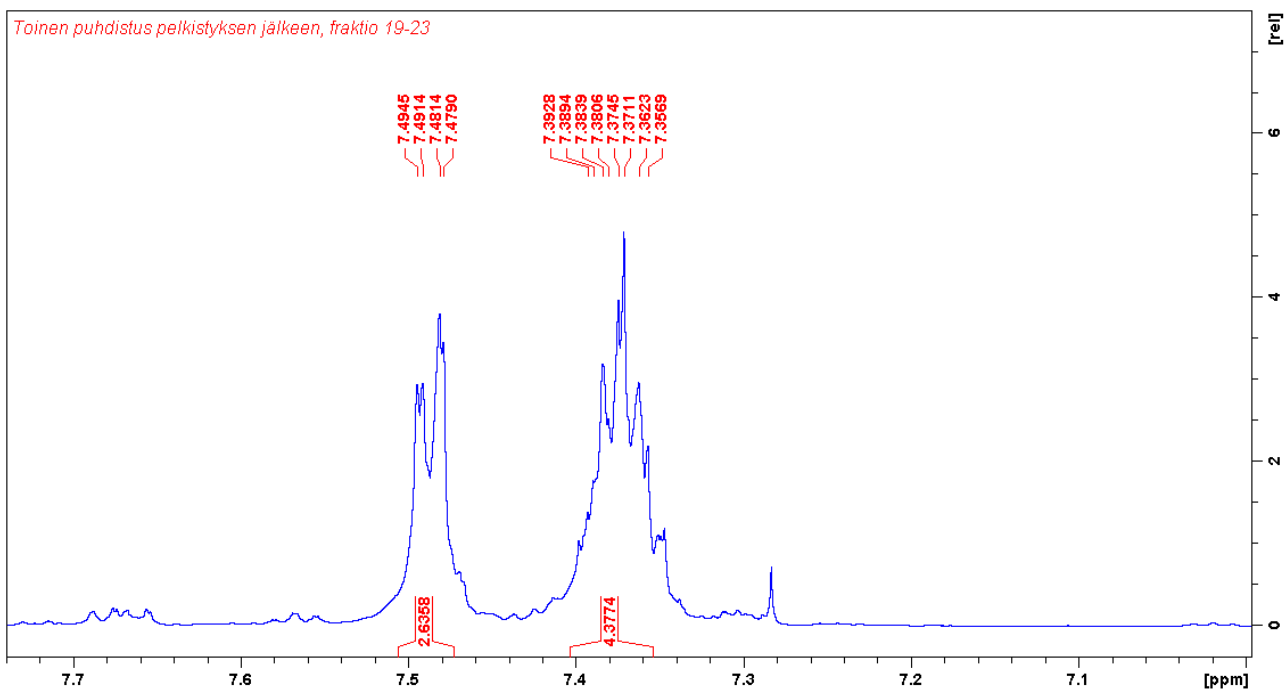
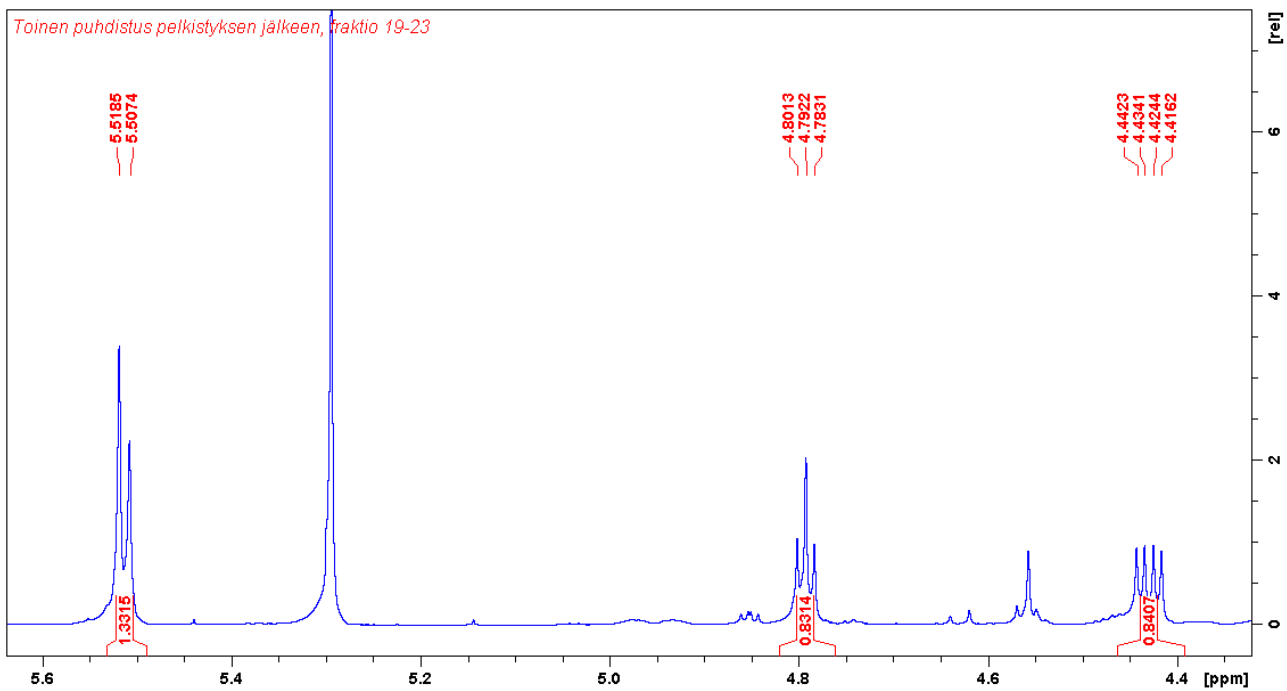


Liite 2. (2*S,E*)-2-metoksi-2-(((2*R,5R*)-4-((*E*)-(metoksiimino)metyyli)-2-fenyyli-1,3-dioksa-5-yyli)oksi)asetaldehydin *O*-metyylioksiimin (2) COSY

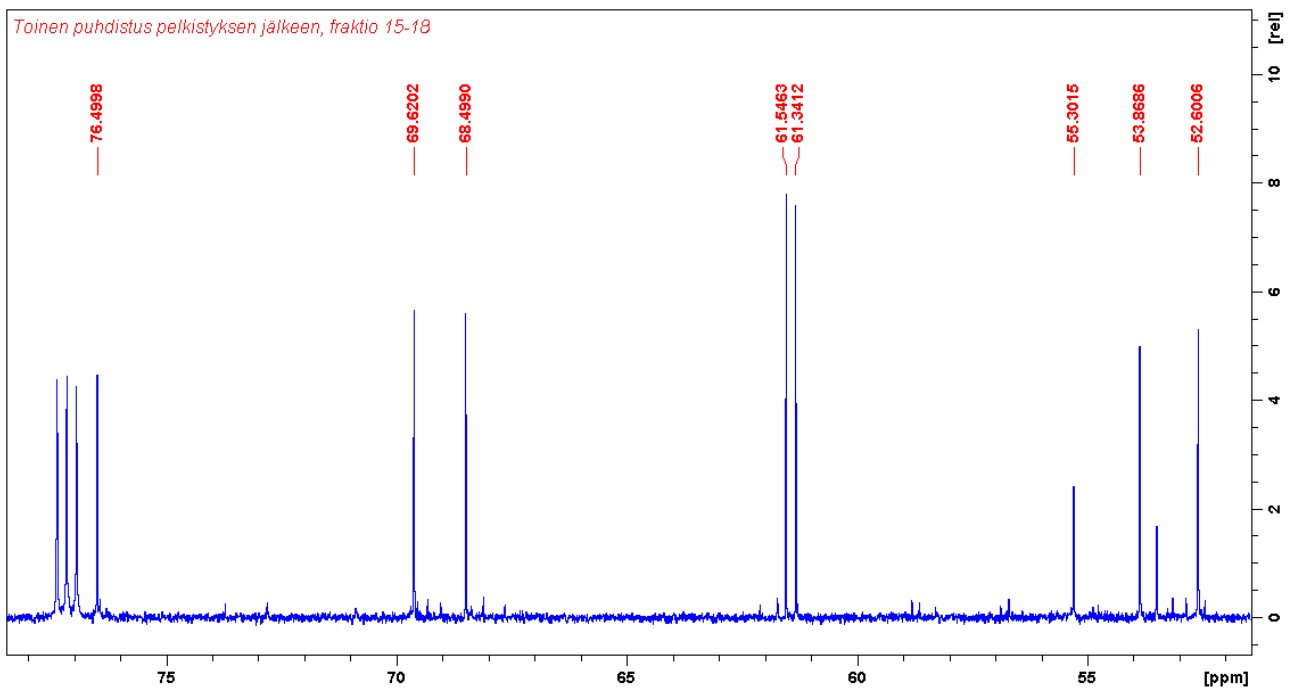
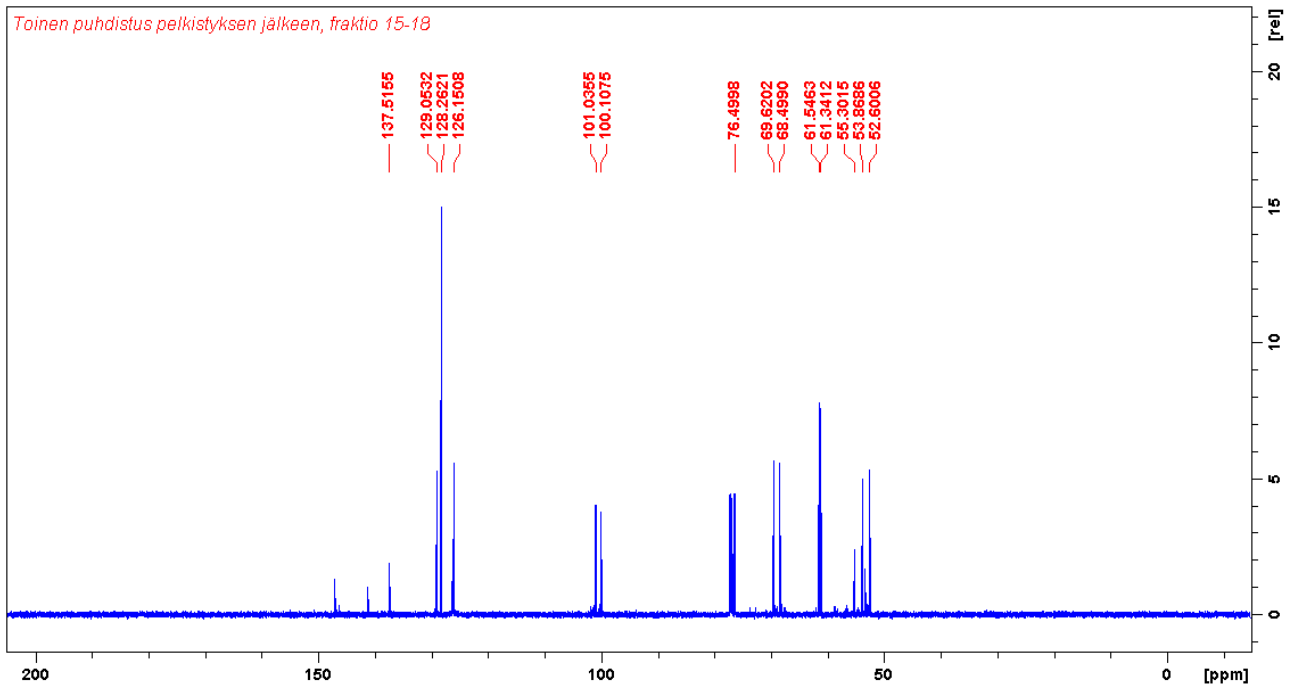


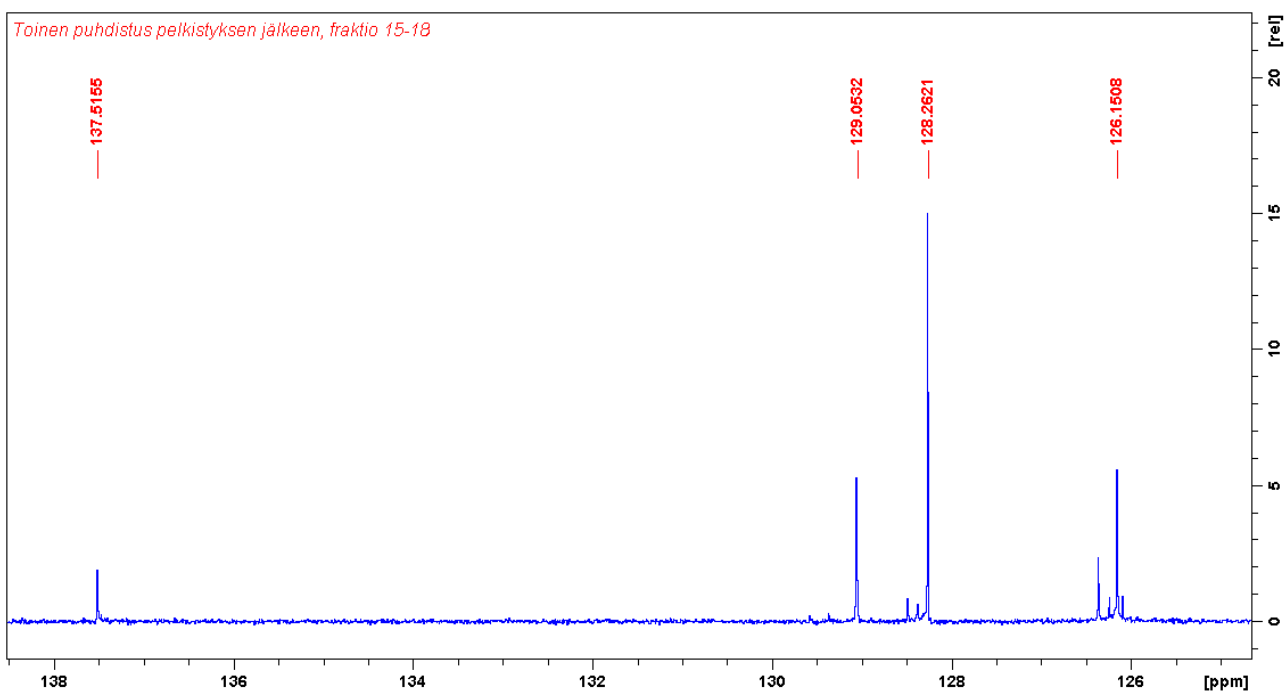
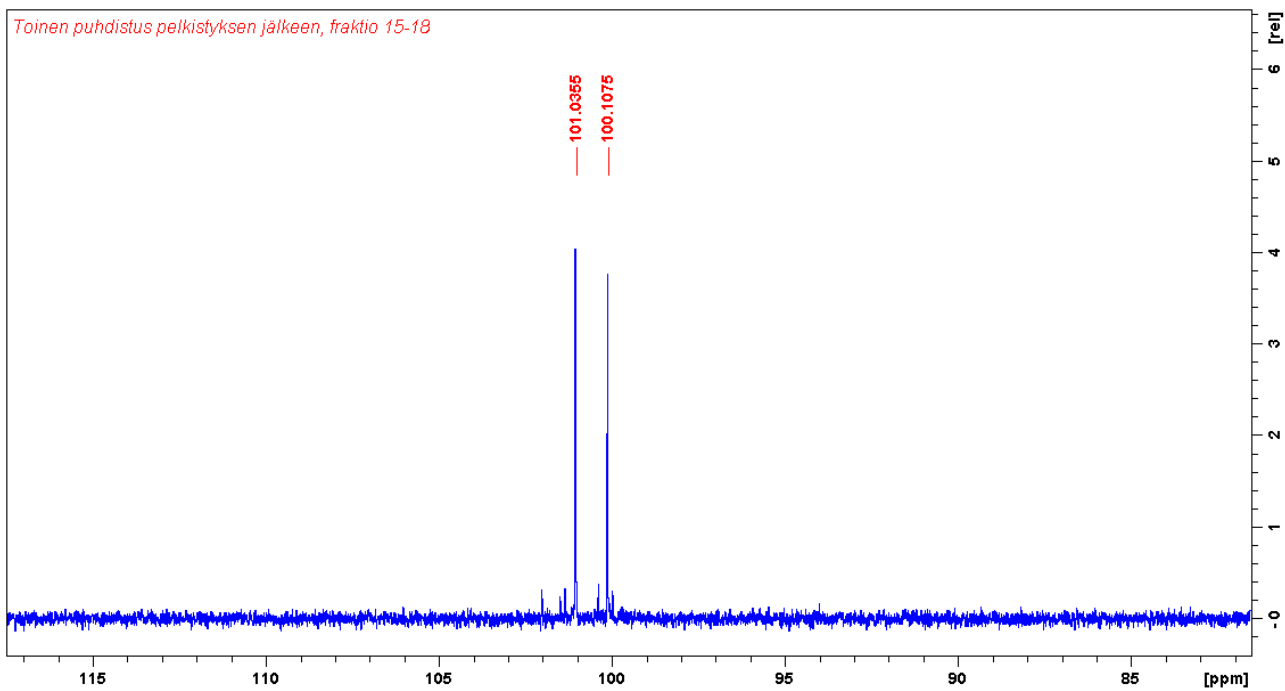
Liite 3. (2*S,E*)-2-metoksi-2-(((2*R,5R*)-4-((*E*)-(metoksiimino)metyyli)-2-fenyyli-1,3-dioksa-5-yyli)oksi)asetaldehydin *O*-metyylioksiimin (2) HSQC



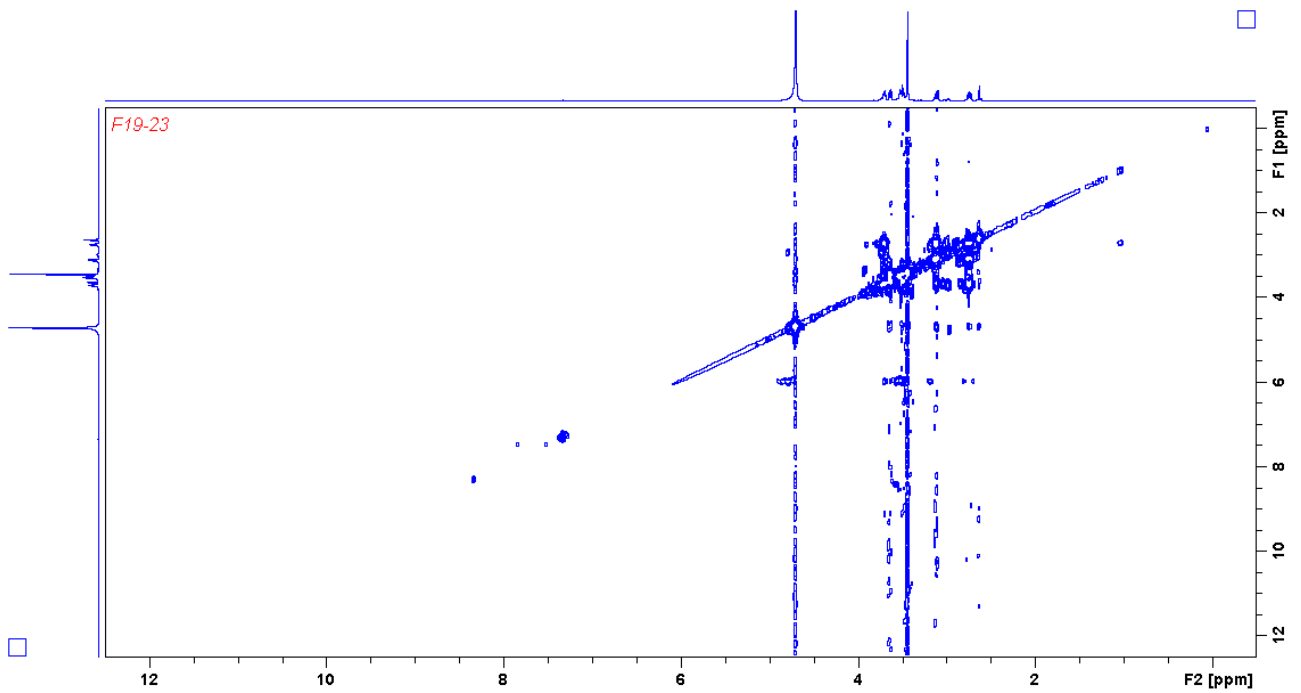


Liite 5. *N*-(2-(((2*R*,5*R*)-4-((metoksiamiino)metyyli)-2-fenylyli-1,3-dioksanyyli)oksi)etyyli-*O*-metyylihydroksyliamiinin (**3**) ¹³C NMR-spektri

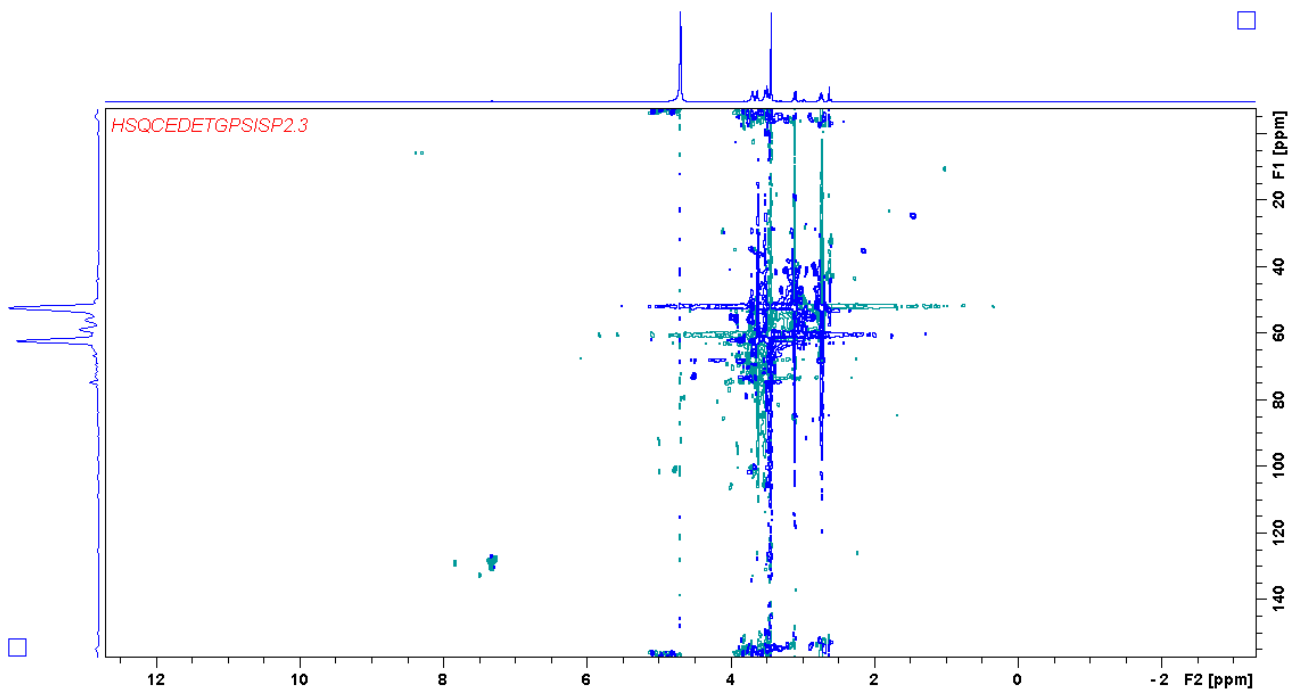




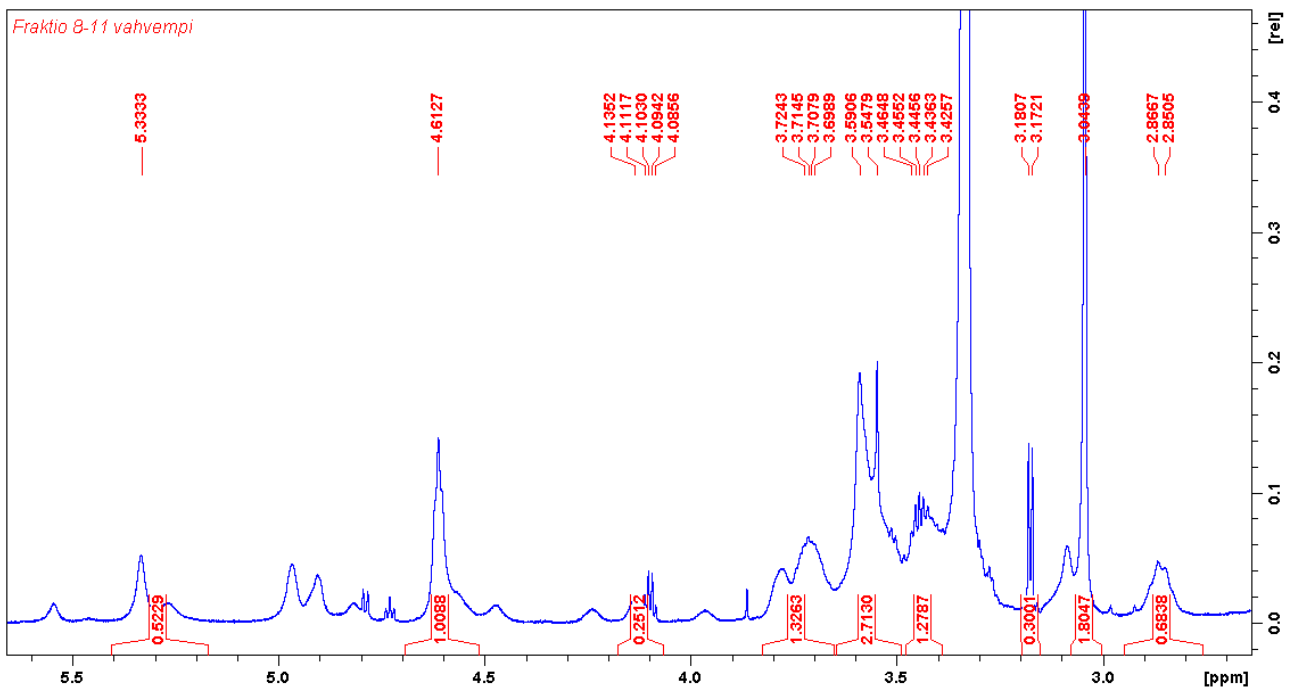
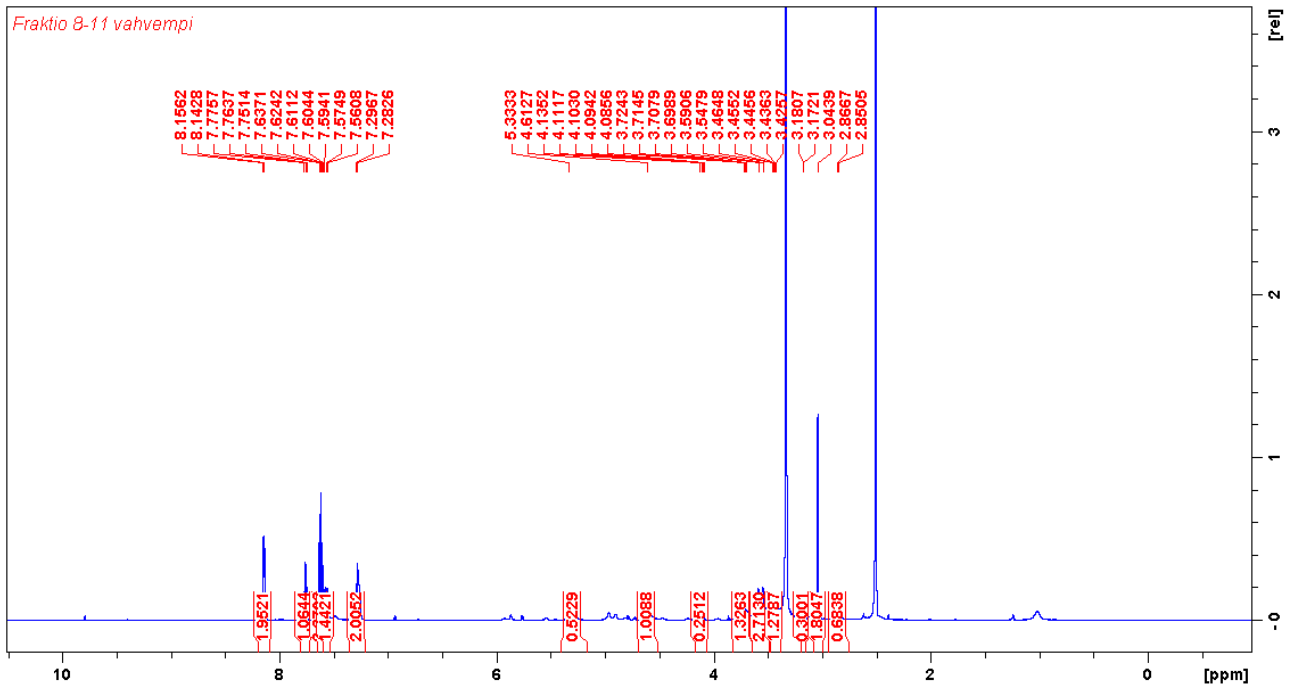
Liite 7. (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin (**4**) COSY

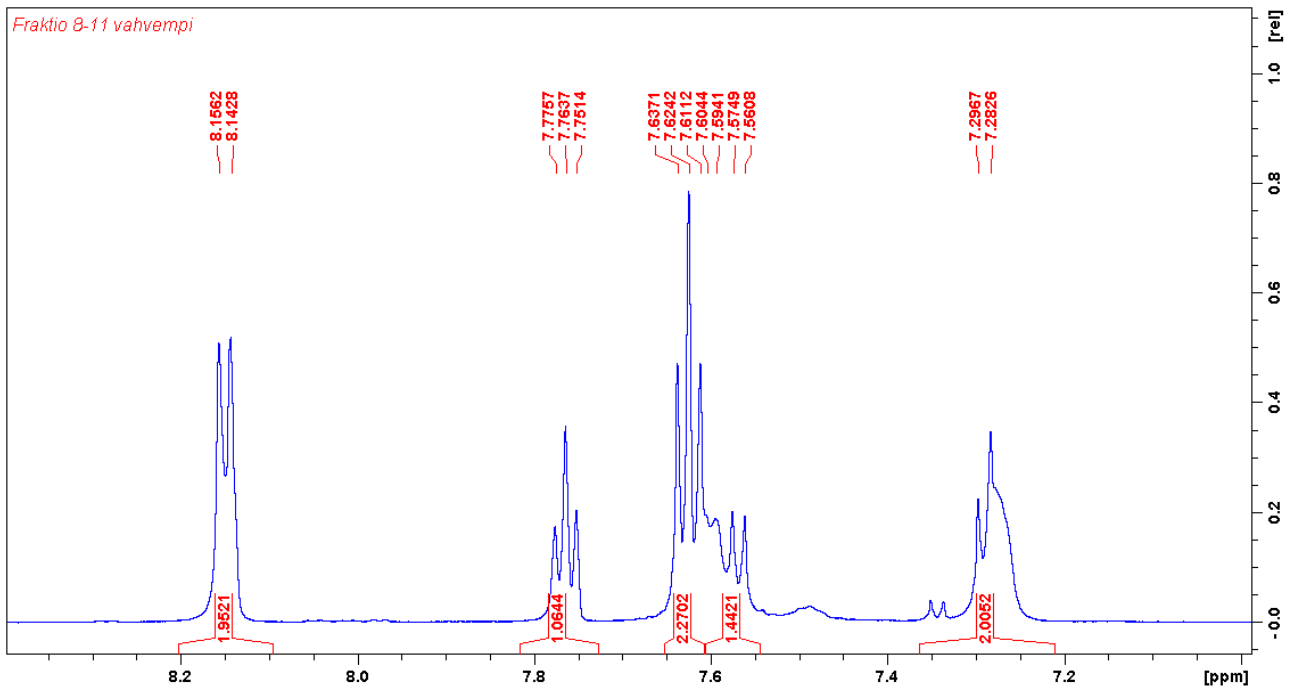


Liite 8. (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin (**4**) HSQC

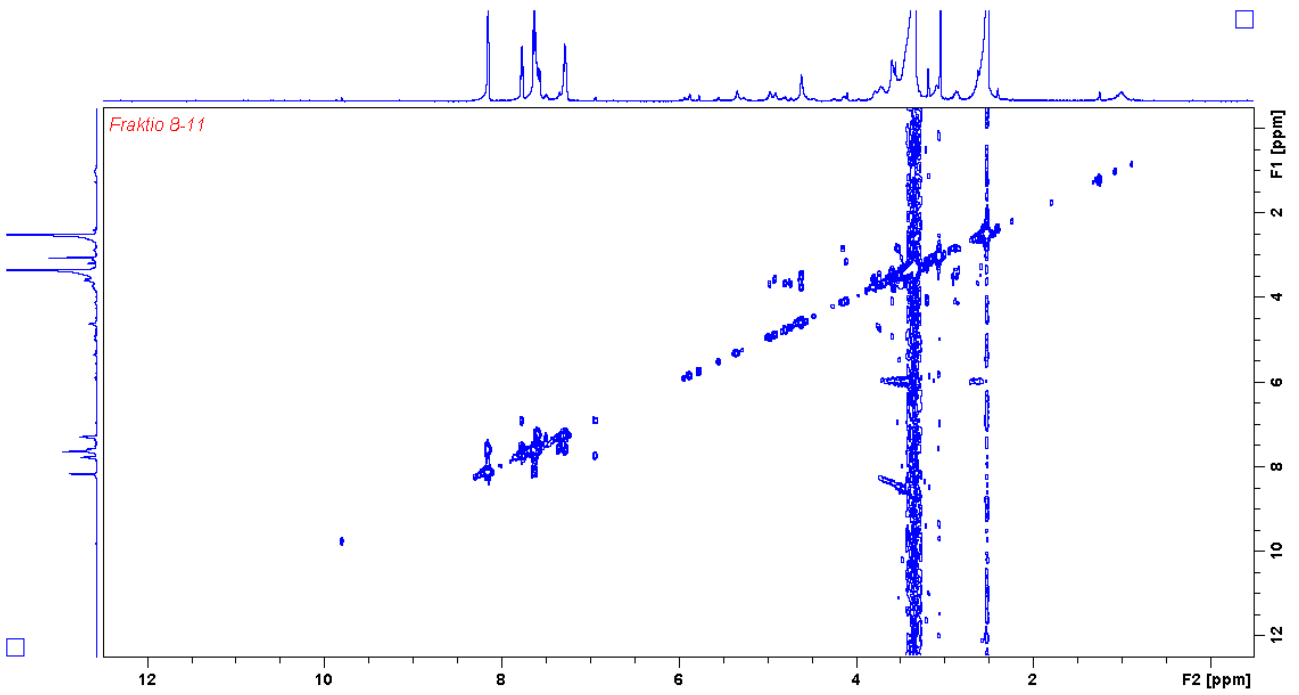


Liite 9. 4-(5-hydroksi-6-(hydroksimetyyli)-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoaatin (5) ¹H NMR-spektri

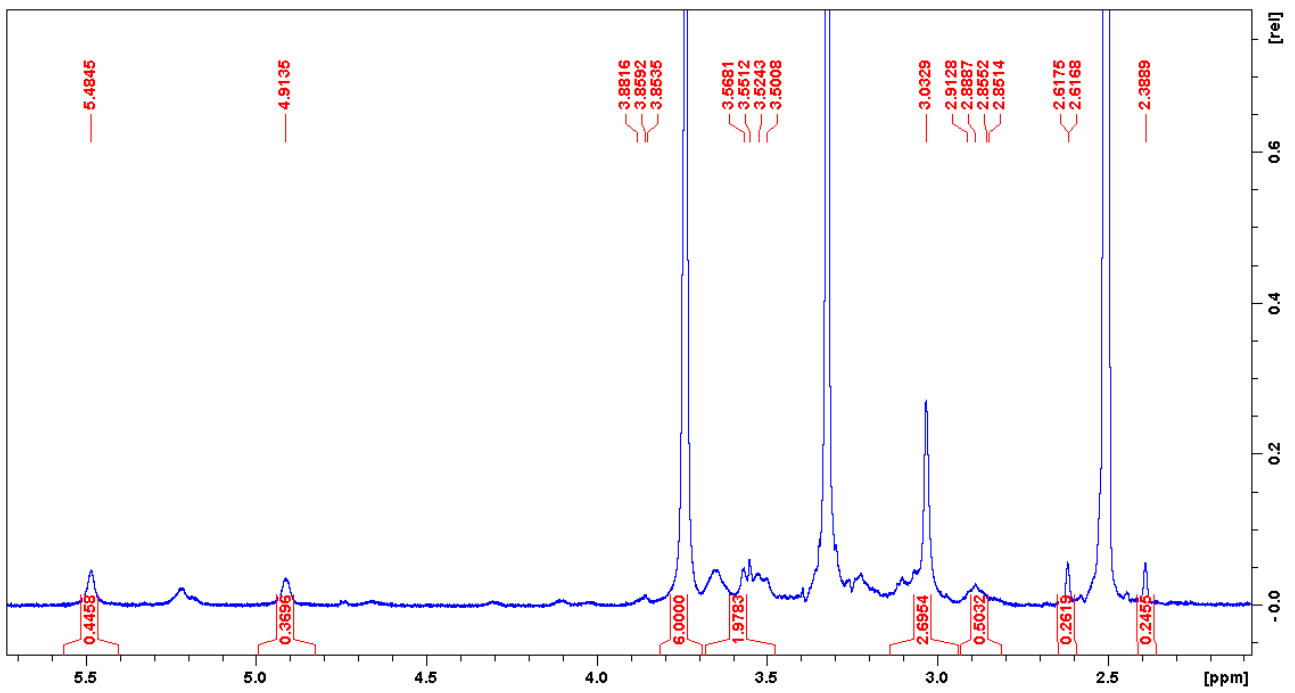
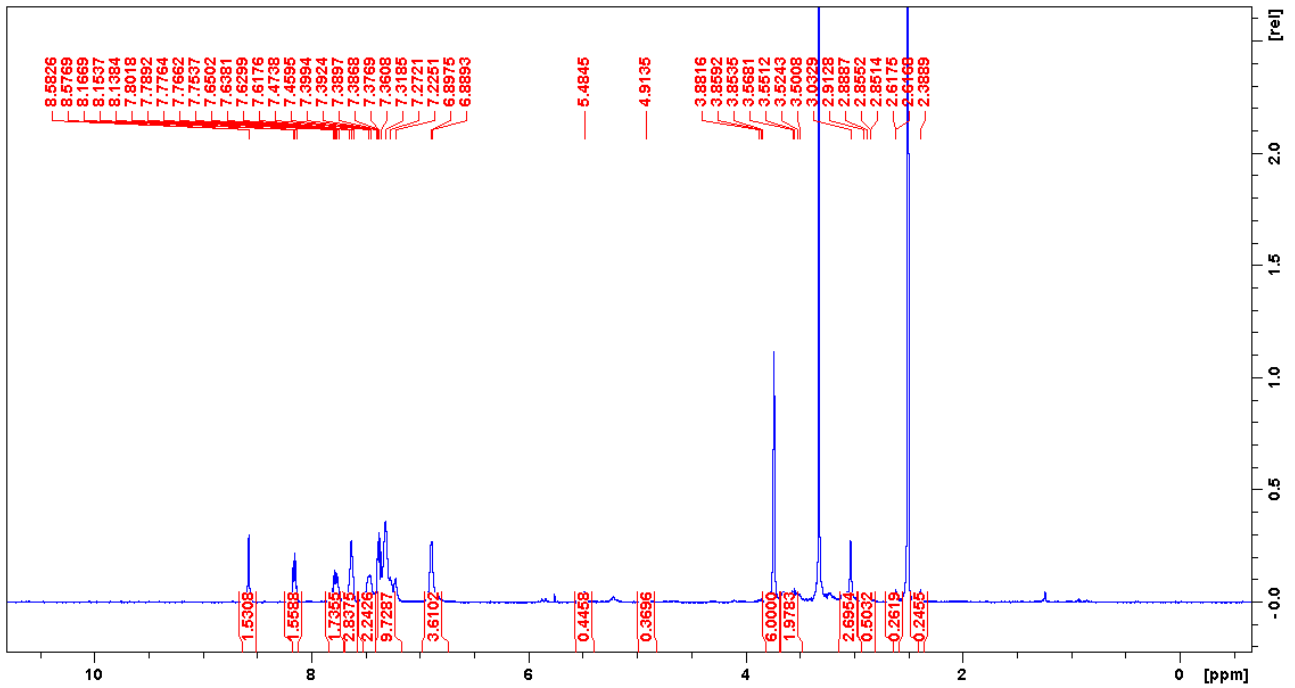


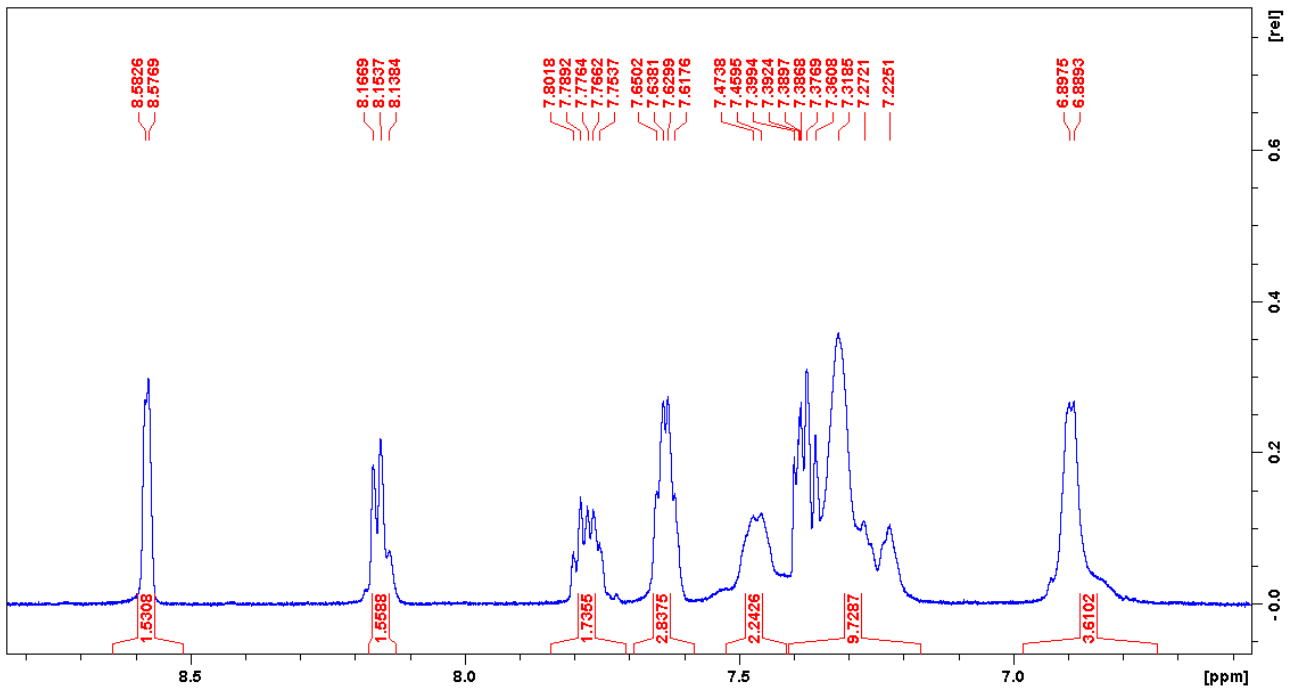


Liite 10. 4-(5-hydroksi-6-(hydroksimetyyli)-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoaatin (5) cosy

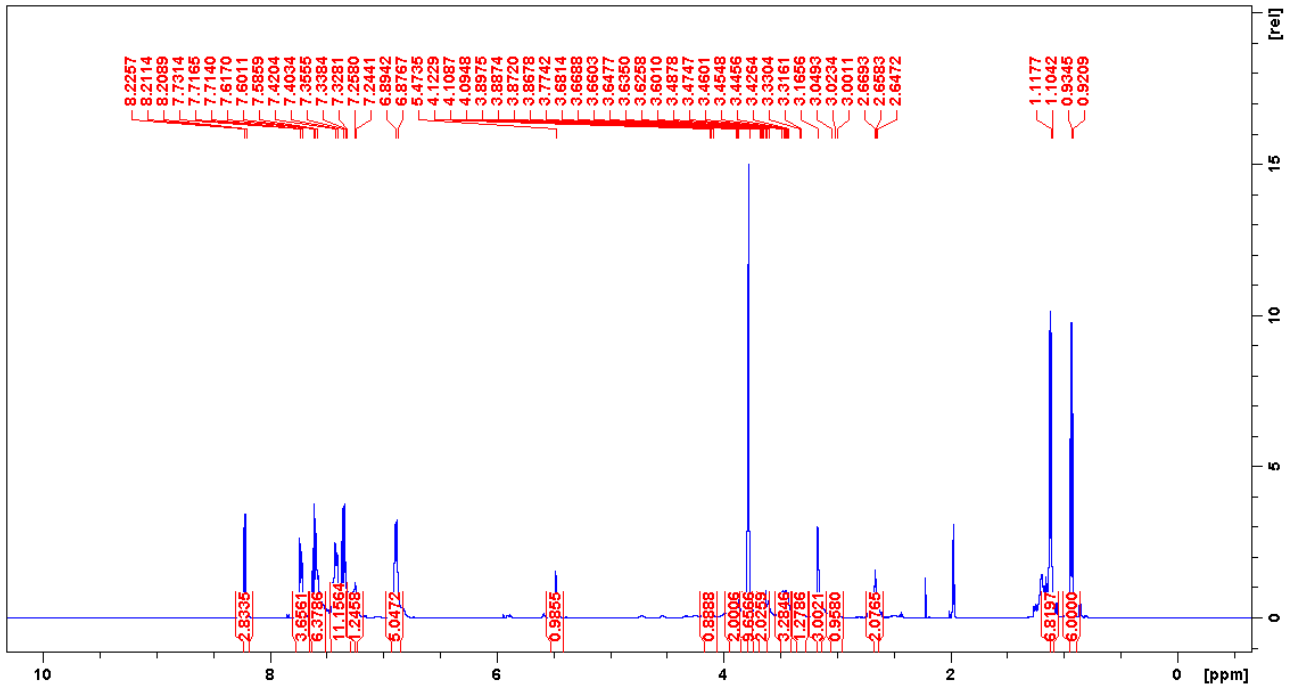


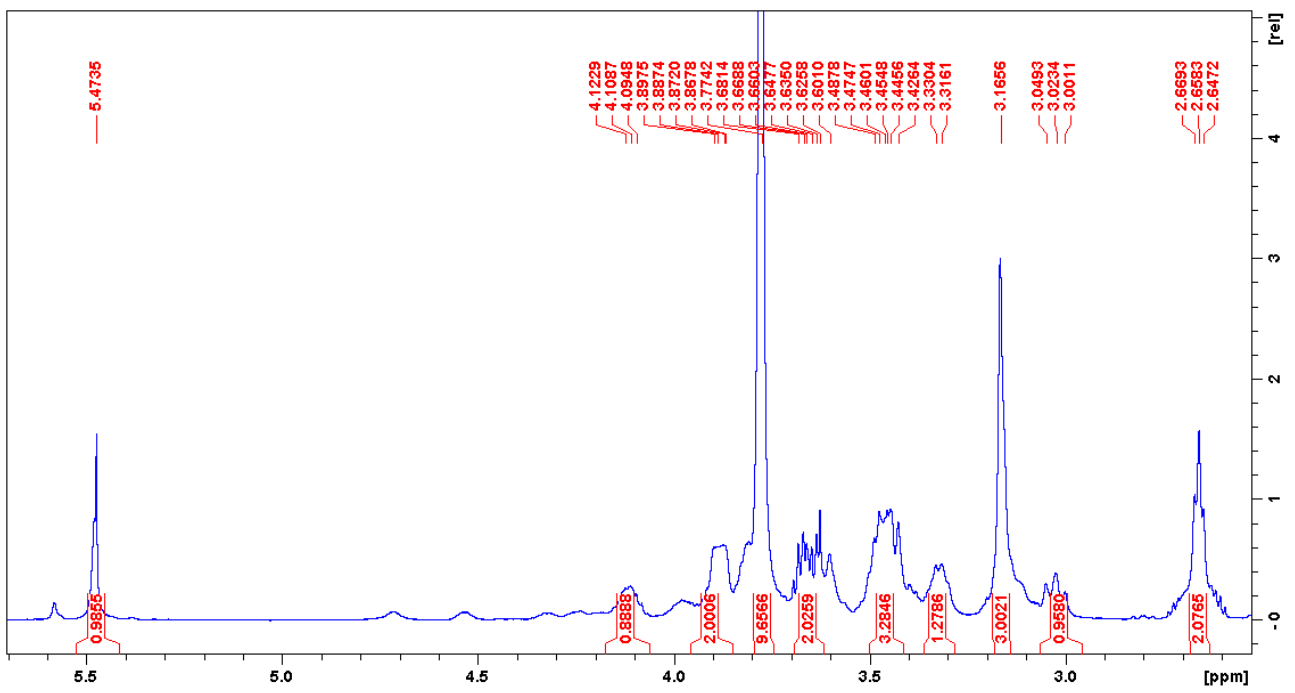
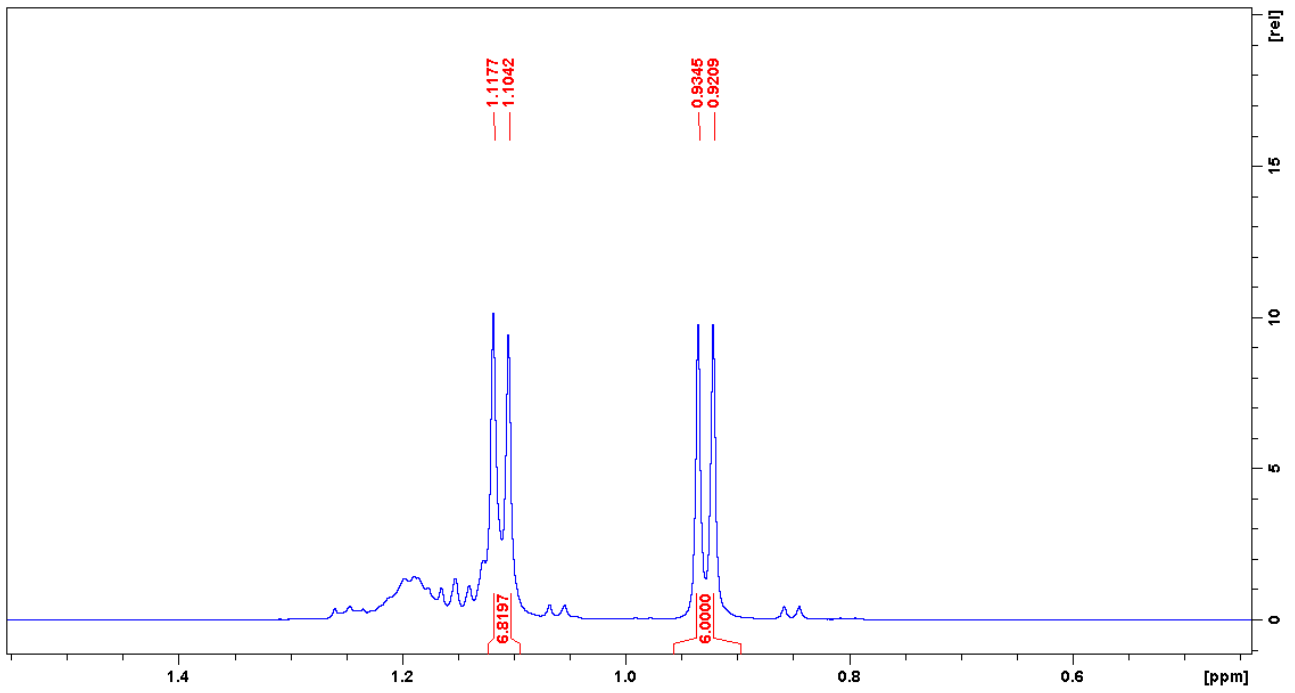
Liite 11. 4-(6-((bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-hydroksi-3-metoksi-1,3-oksatsinyyli)fenyylibentsoaatin (**6**) ^1H NMR-spektri

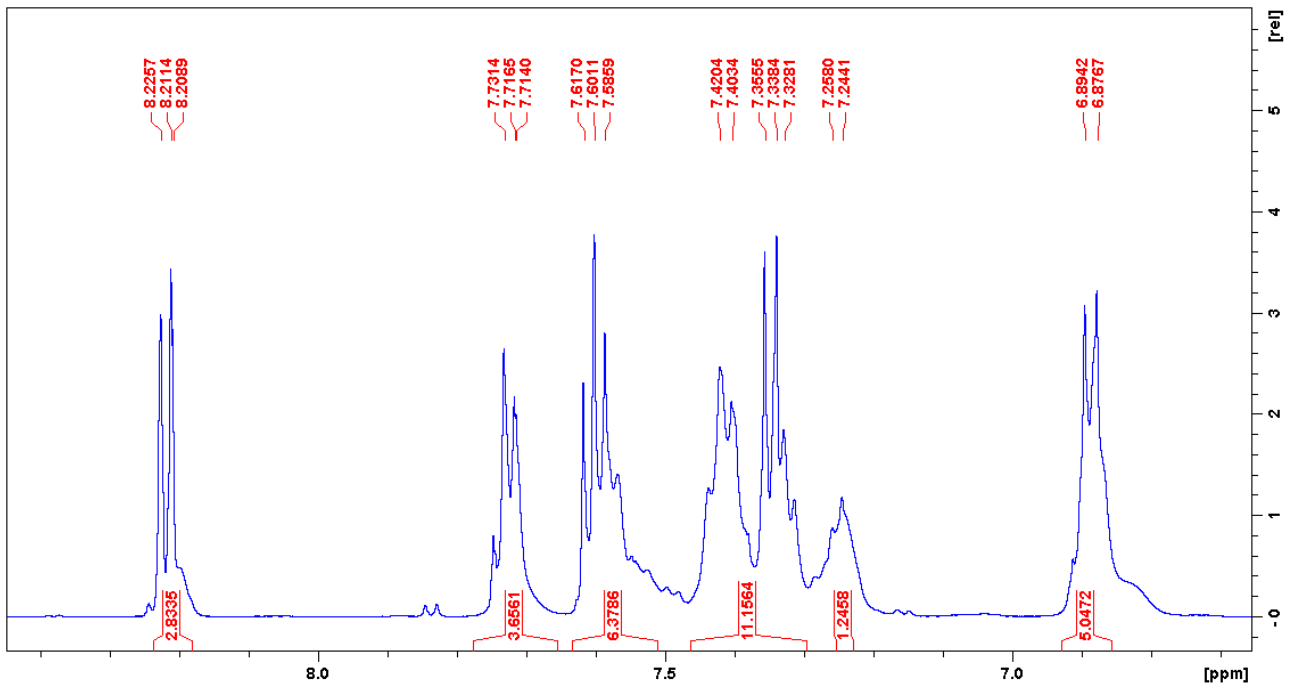




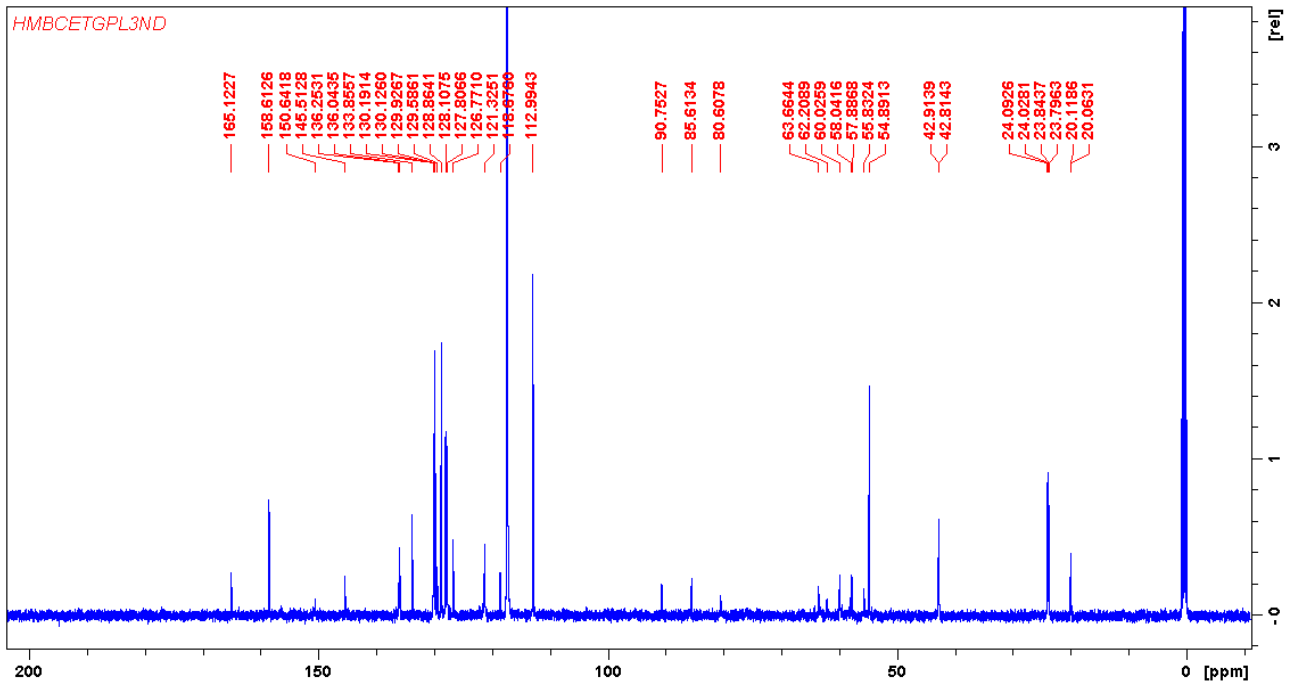
Liite 12. 4-(6-((bis(4-metoksifenyylä)(fenyylä)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)
(diisopropyylämino)fosfänyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyyläbentsoatäin (**7**) ¹H NMR-
spektri

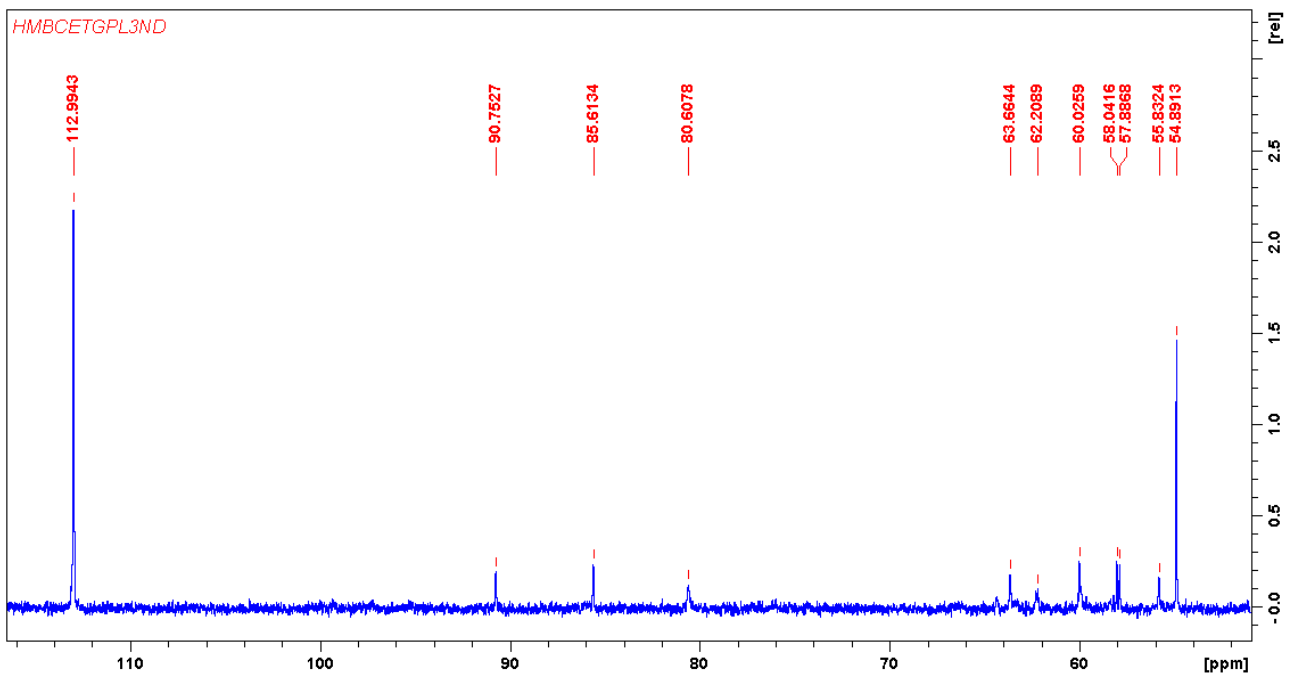
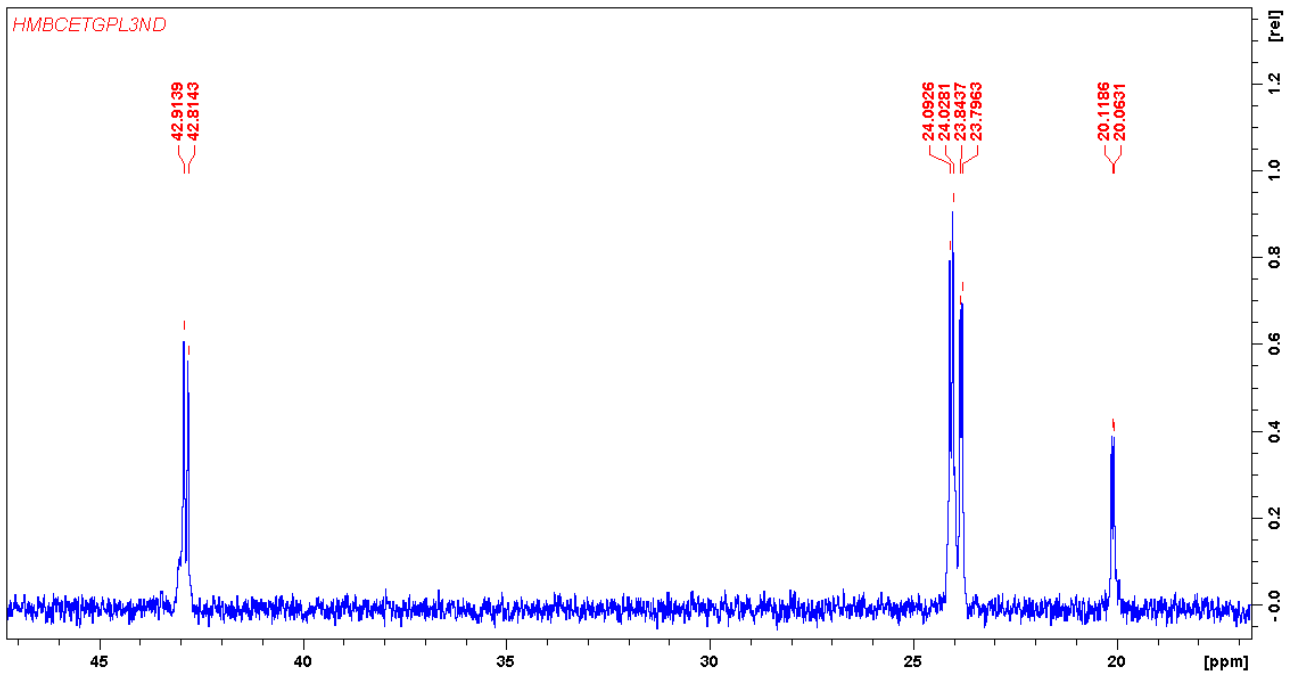


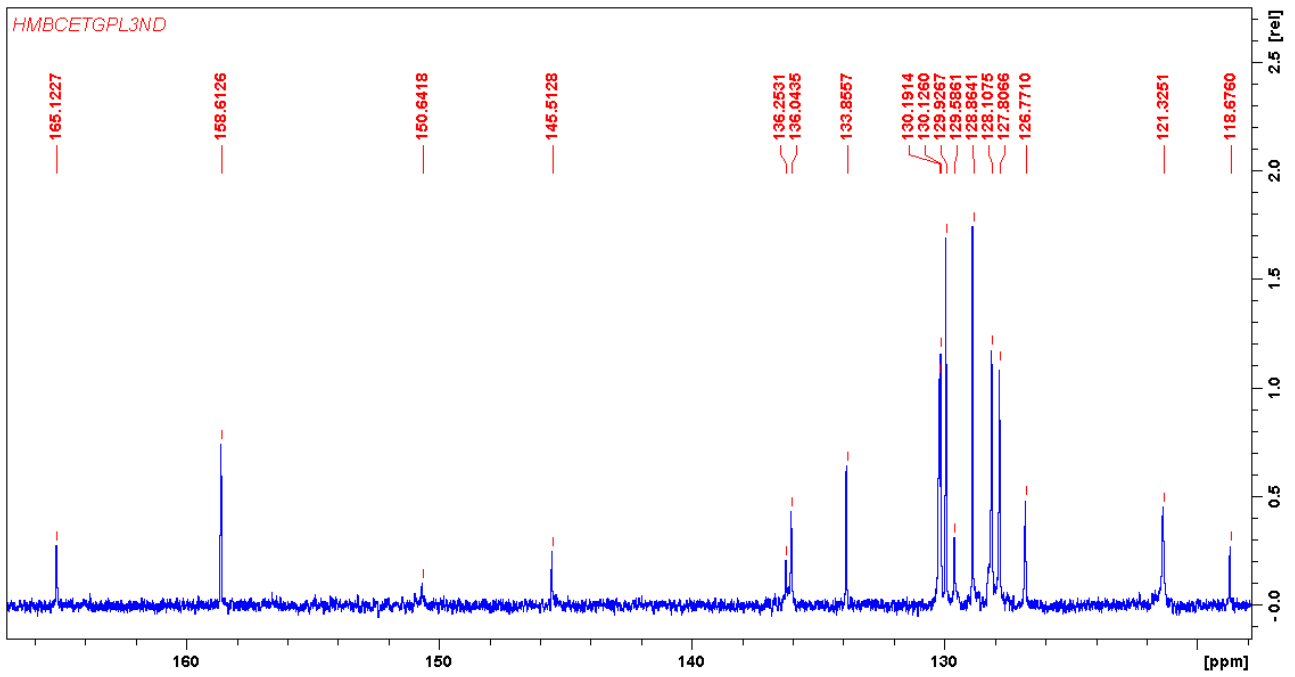




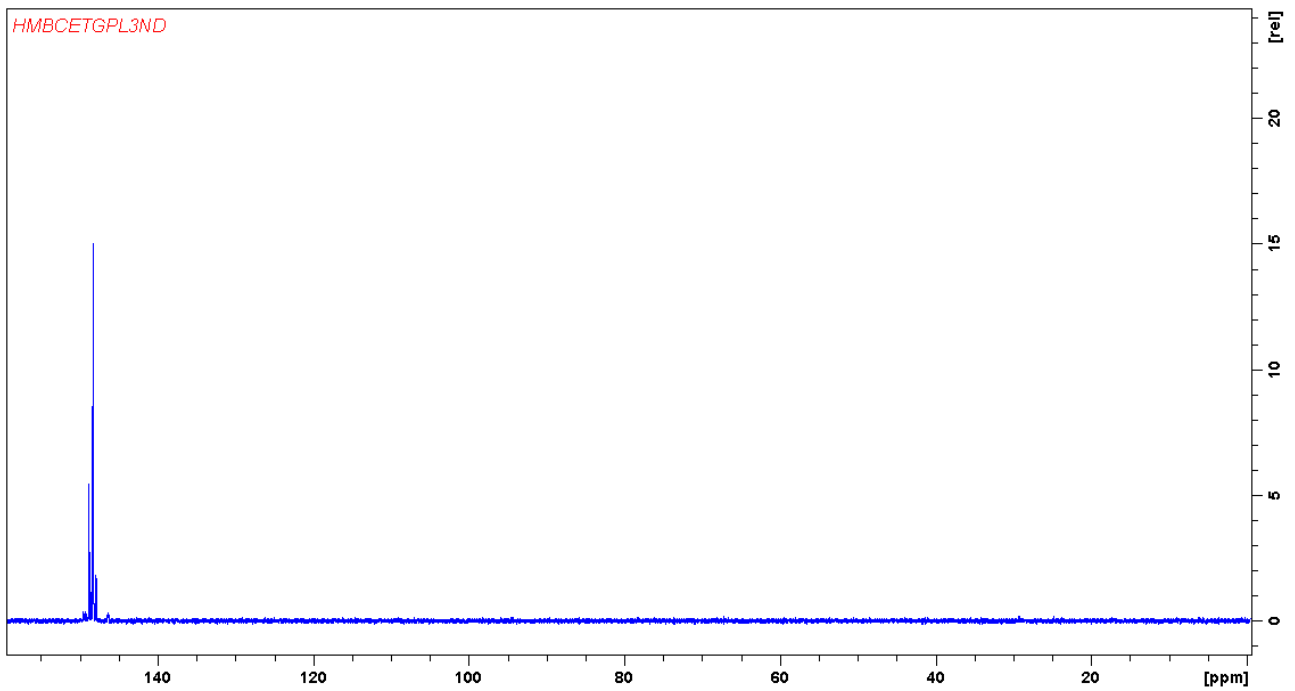
Liite 13. 4-(6-((bis(4-metoksifenyylä)(fenyylä)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)(diisopropyylämino)fosfaneyylä)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyyläbentsoatin (**7**) ^{13}C NMR-spektri

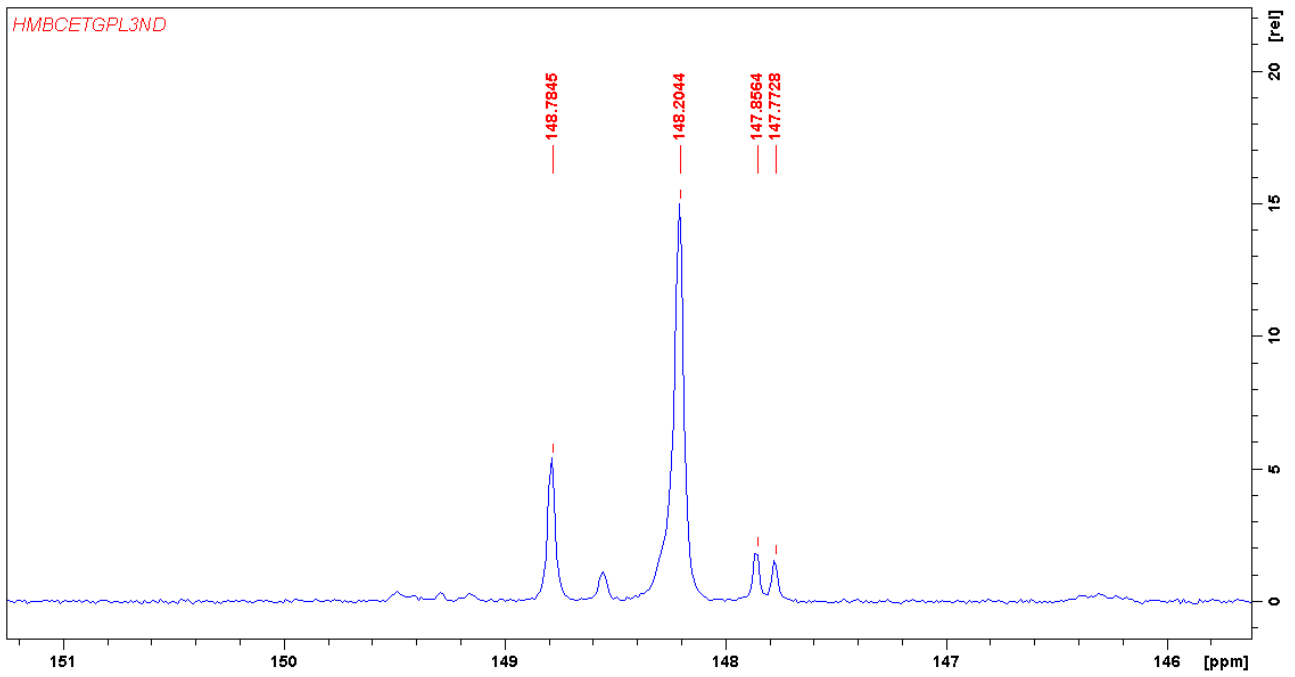




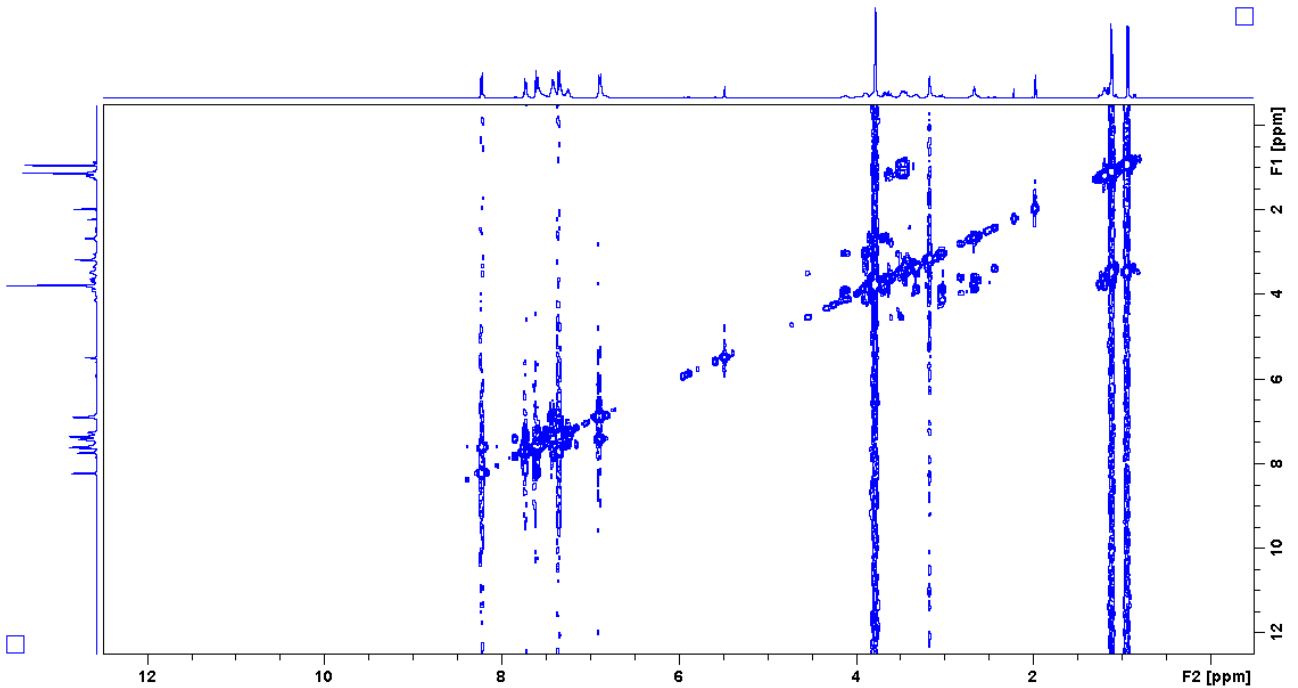


Liite 14. 4-(6-((bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)
(diisopropyylimino)fosfaneeyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoatin (**7**) ^{31}P NMR-
spektri

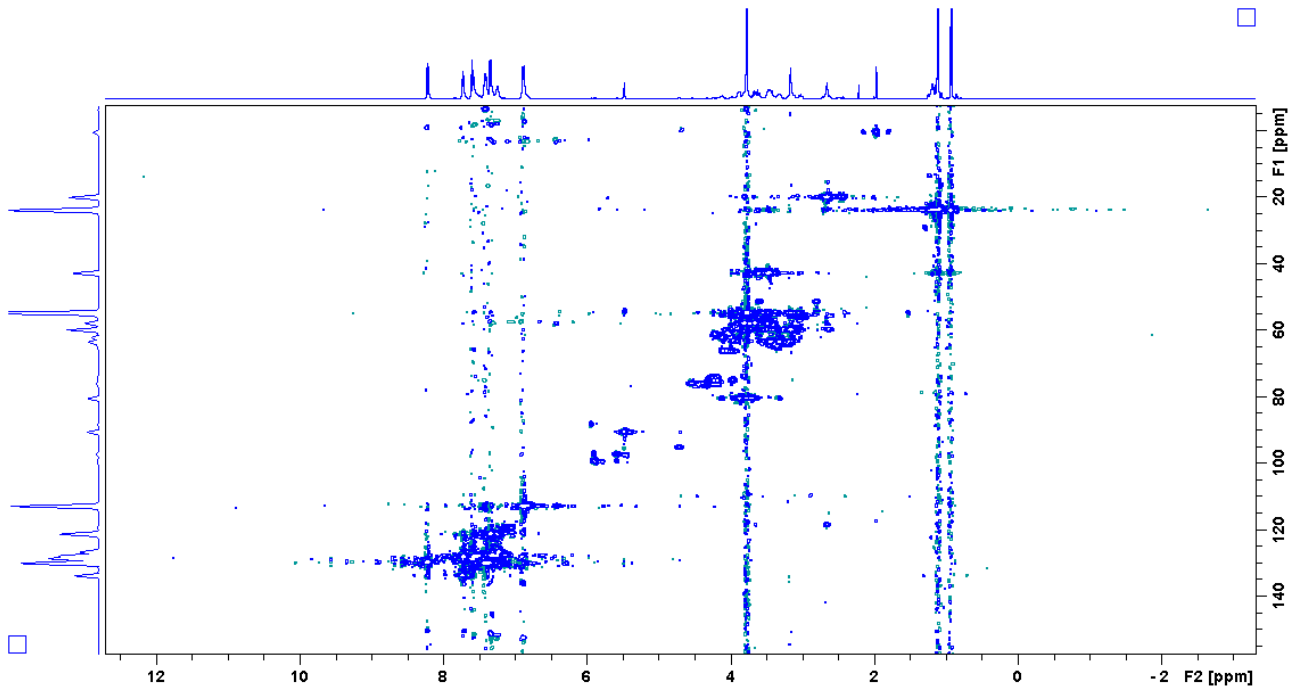




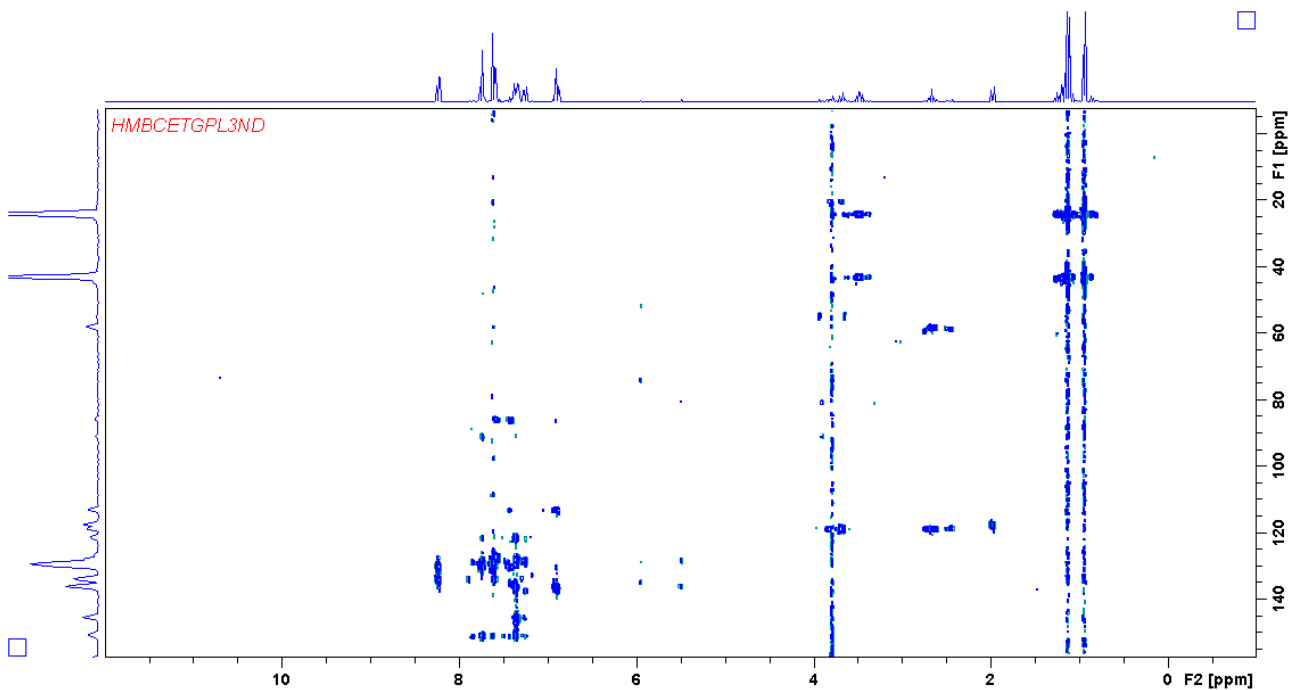
Liite 15. 4-(6-((bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)
(diisopropyylimino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoatin (**7**) COSY



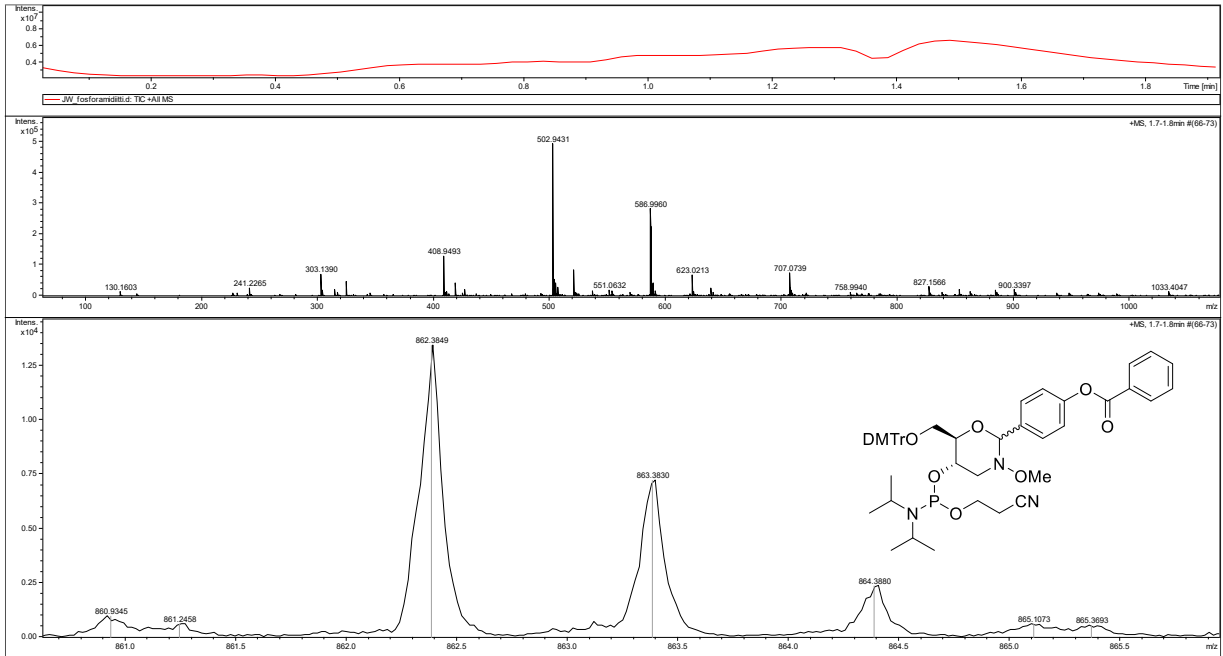
Liite 16. 4-(6-((bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)
(diisopropyliamino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoaatin (7) HSQC



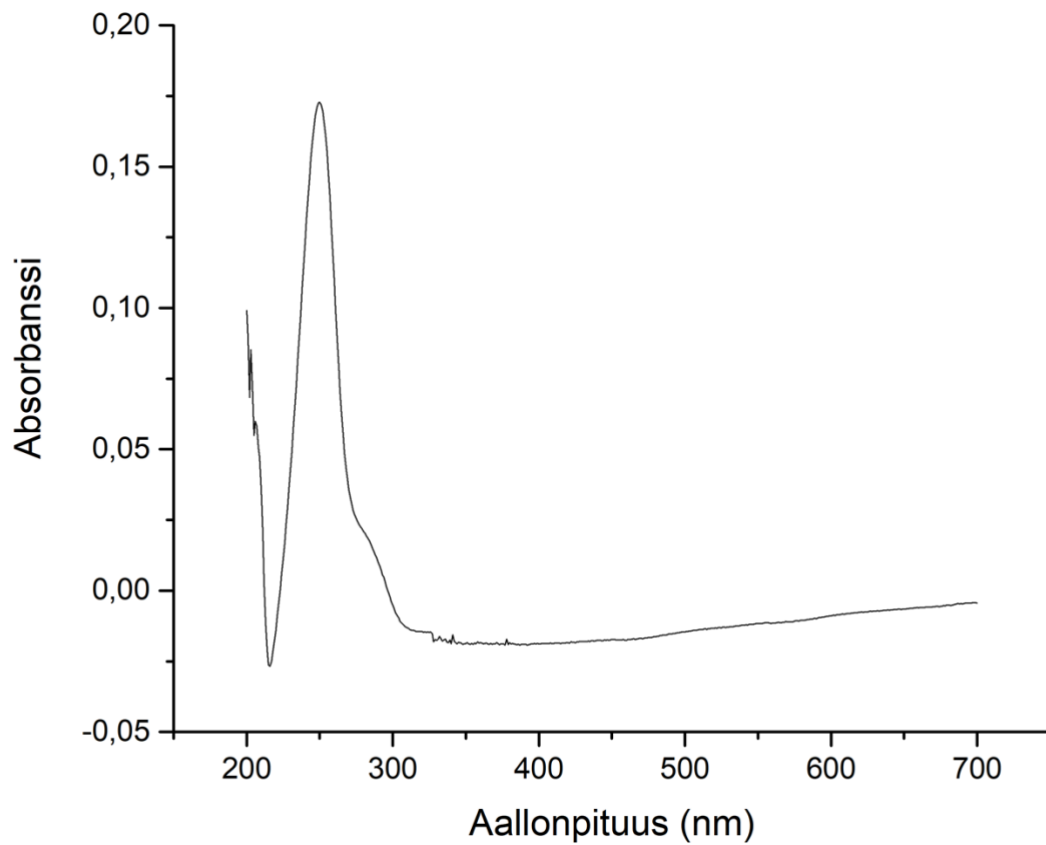
Liite 17. 4-(6-((bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)
(diisopropyliamino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoaatin (7) HMBC



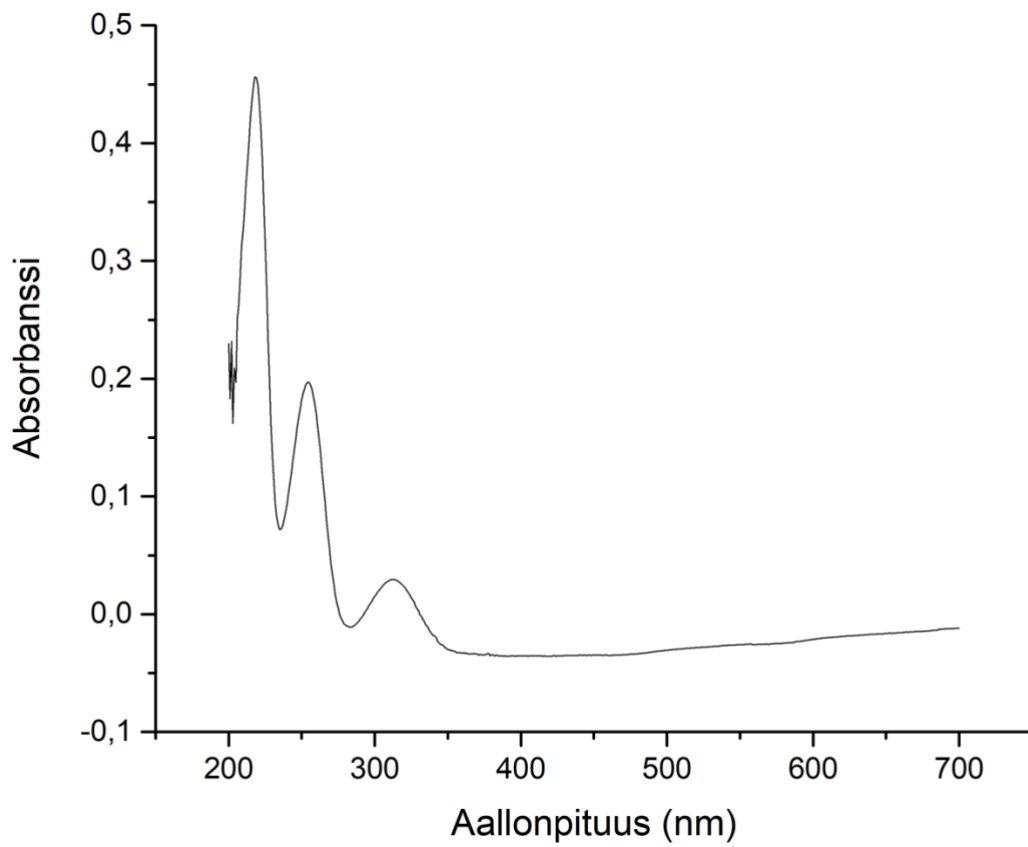
Liite 18. 4-(6-((bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)metyyli)-5-(((2-syanoetoksi)
 (diisopropyyliamino)fosfaneyyli)oksi)-3-metoksi-1,3,oksatsinyyli)fenyylibentsoaatin (**7**)
 massaspektri



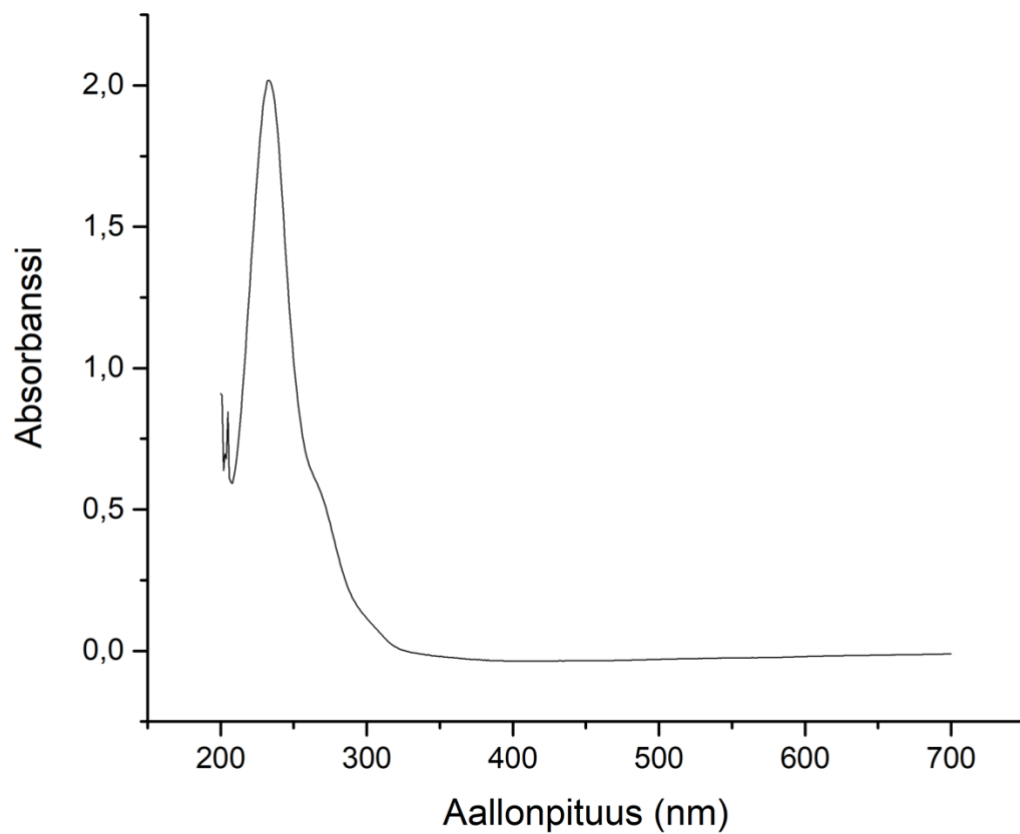
Liite 19. Bentsaldehydin UV-spektri



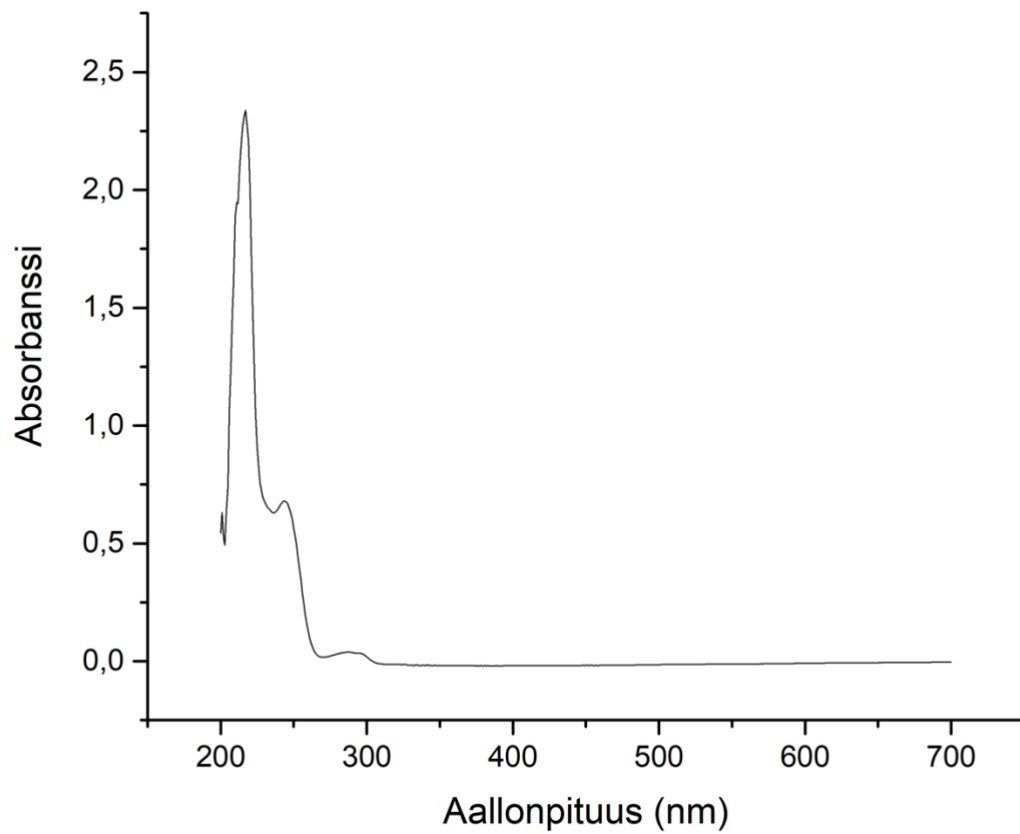
Liite 20. 3-metoksibentsaldehydin UV-spektri



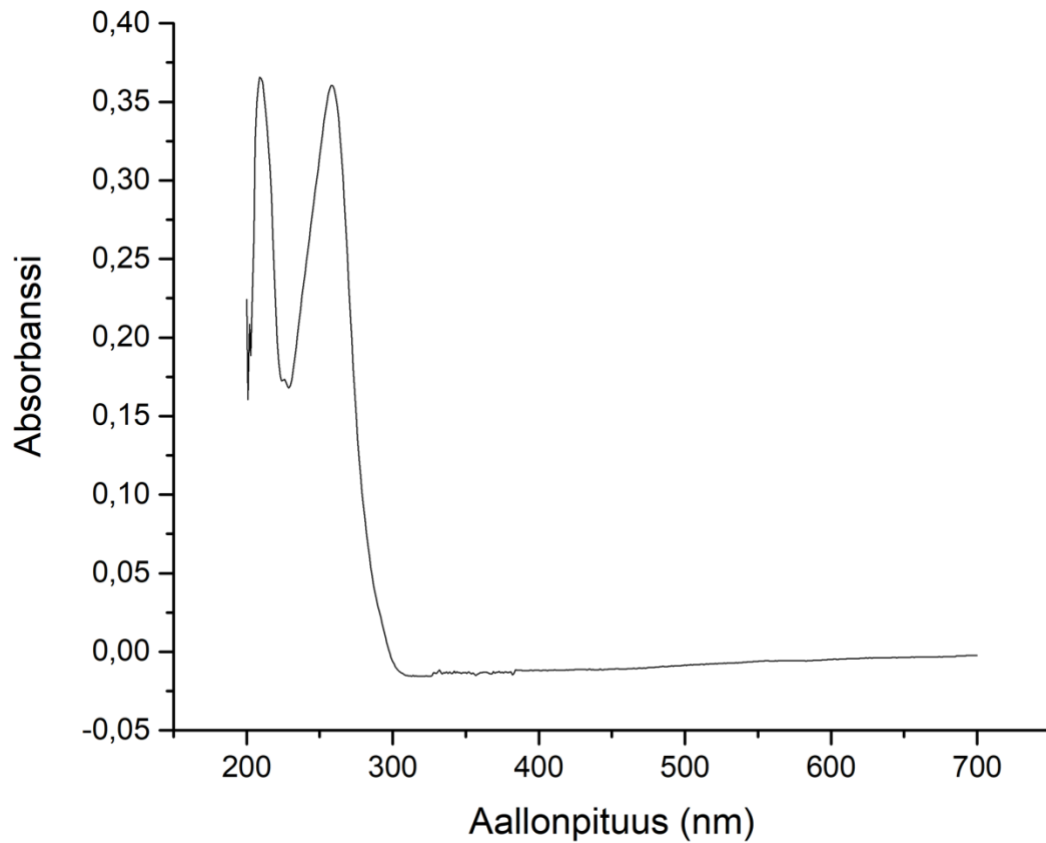
Liite 21. 3-nitrobentsaldehydin UV-spektri



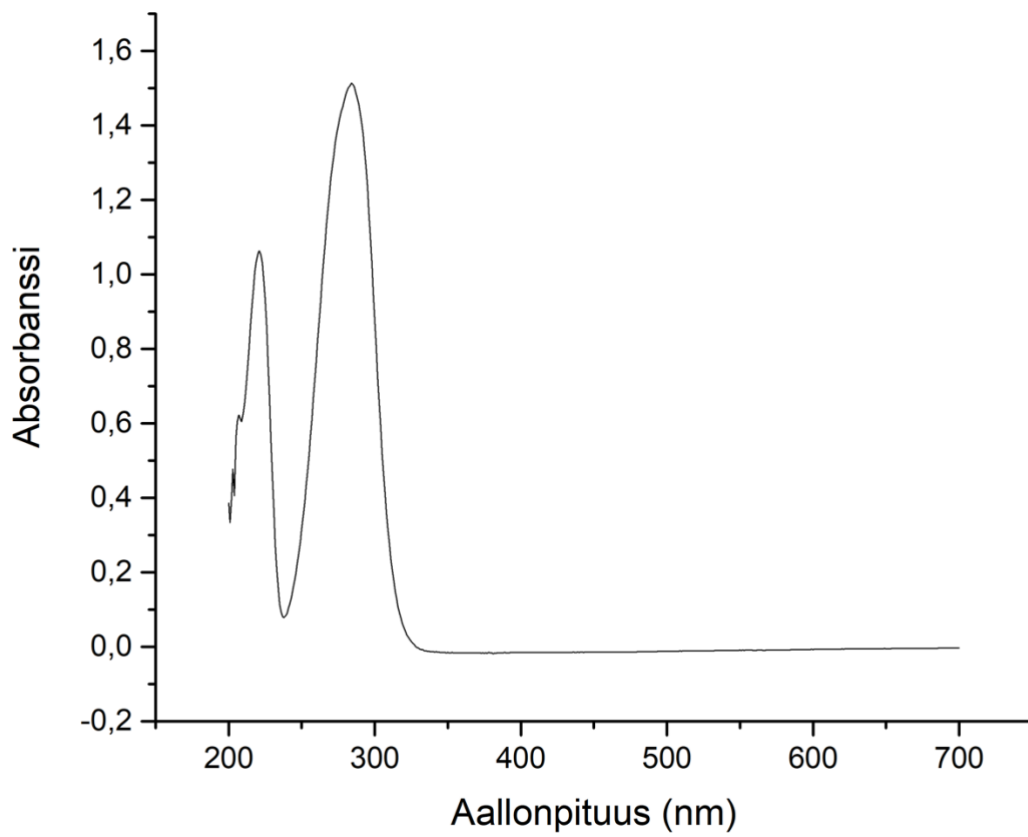
Liite 22. 3-syanobentsaldehydin UV-spektri



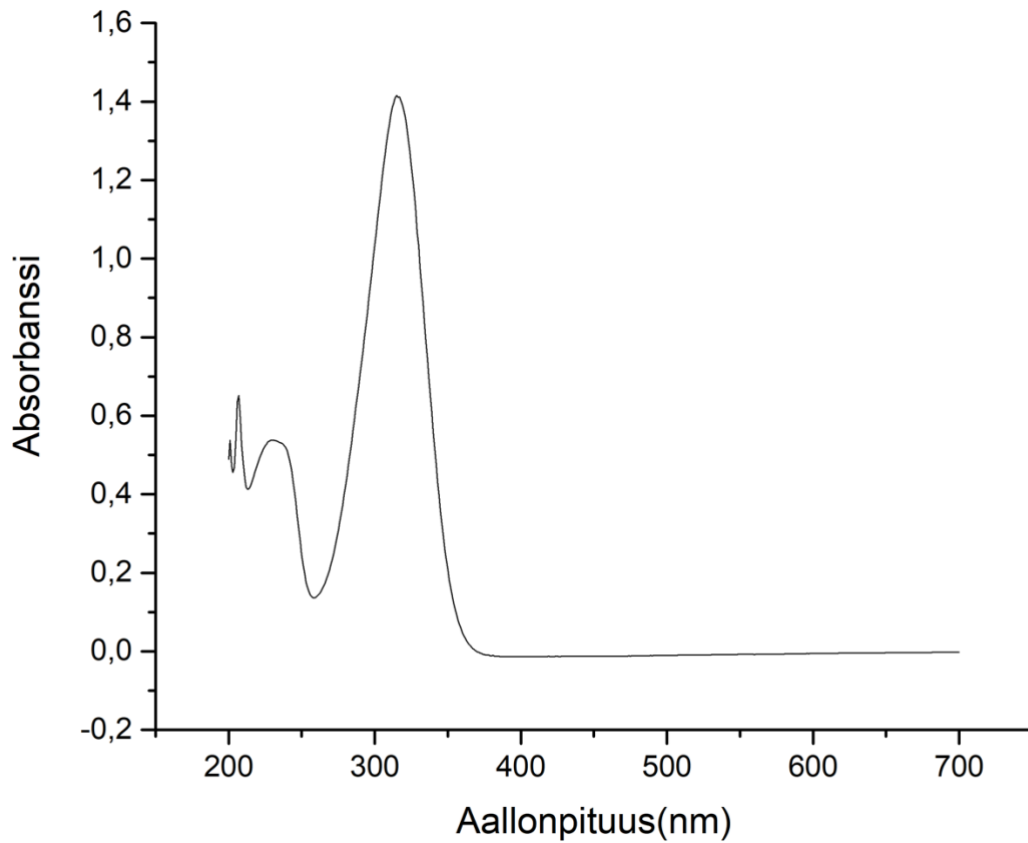
Liite 23. 4-klooribentsaldehydin UV-spektri



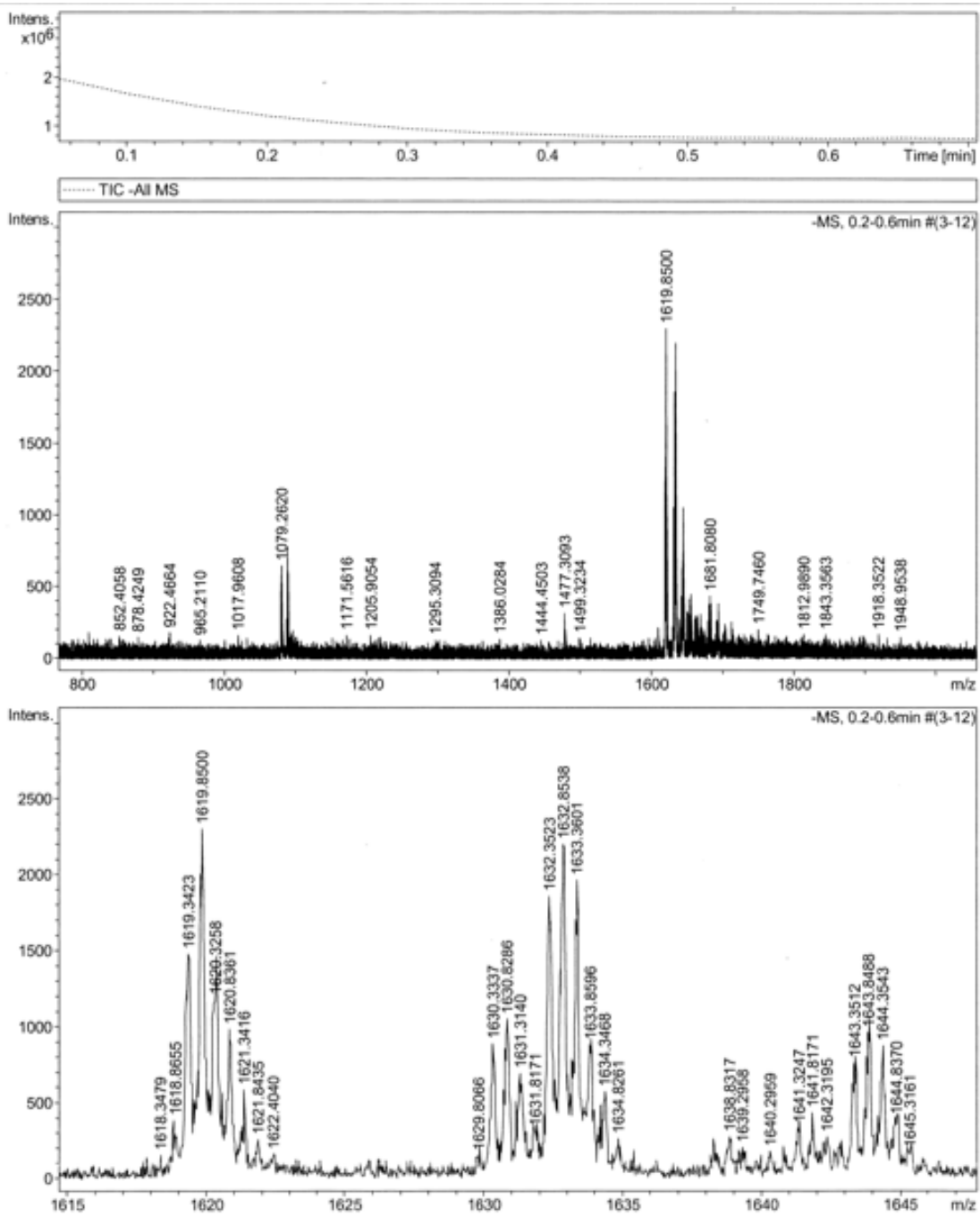
Liite 24. 4-metoksibentsaldehydin UV-spektri



Liite 25. 4-metyyliotiobentsaldehydin UV-spektri



Liite 26. **ON1** massaspektri



Liite 27. **ON2** massaspektri

