



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# Apiosinukleosidien synteesi ja ominaisuudet

Walteri Elo

Bio-organisen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

12.5.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Waltteri Elo

**Otsikko:** Apioosinukleosidien synteesi ja ominaisuudet

**Ohjaaja:** Heidi Korhonen

**Sivumäärä:** 16 sivua

**Päivämäärä:** 12.5.2026

---

Apioosinukleosidit (apioNA) ovat muokattujen nukleosidien joukko, joiden sokeriosa on luonnollisista nukleosideista (DNA:n deoksiriboosi ja RNA:n riboosi) poiketen apioosi. Deoksiriboosiin ja riboosiin verrattuna sen rengasrakenne haaroittuu 3'-hiilestä. Niiden rakenne muistuttaa treosinukleosideja. Koska treosinukleosideilla on löydetty jo antiviraalisia, kasvainten vastaisia sekä eksonukleaasien vastaisia ominaisuuksia, on herännyt kiinnostus tutkia apioosinukleosideja mahdollisten vastaavien ominaisuuksien takia.

Apioosinukleosidien valmistamiseen on kehitetty monia synteessireittejä. Tässä tutkielmassa käsitellään kahta näistä, joissa apioosinukleosidien synteesi esitetään sokerien esiasteiden valmistuksesta valmiiksi nukleosideiksi.

Apioosinukleosideilla on havaittu lääketieteellisesti kiinnostavia ominaisuuksia. Terminaalisten apioosinukleotidien on havaittu suojaavan niitä sisältäviä oligonukleotideja eksonukleaasien entsyymaattiselta pilkkomiselta. Apioosinukleosideilla on kuitenkin epävakauttava vaikutus duplekseissa, mutta tätä voitaisiin käyttää hyödyksi antisense-terapiaissa. Kahdelta adensiinianalogilta on löydetty HI-viruksen vastaisia ominaisuuksia, ja adeniinia sisältävillä apioNA aihiolääkkeillä sekä muutamalla tioapioosinukleosidijohdannaisella on havaittu sytotoksisia vaikutuksia eri syöpälinjoja vastaan.

---

**Avainsanat:** apioosinukleosidit, muokatut nukleosidit,

## Sisällys

<b>1</b>	<b>Johdanto .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Xenonukleiinihapot .....</b>	<b>6</b>
2.1	Treosirunkoiset nukleiinihapot.....	6
2.2	Apioosinukleosidit ja ApioNA.....	7
<b>3</b>	<b>Apioosinukleosidien synteesi .....</b>	<b>8</b>
3.1	Sokeriesiasteen valmistus .....	8
3.2	Apioosinukleosidien valmistus.....	9
3.3	Synteesireittien vertailu .....	12
3.4	Nukleosiditrifosfaatin valmistus .....	13
<b>4</b>	<b>Apioosinukleosidien ominaisuudet .....</b>	<b>15</b>
4.1	Eksonukleaasiresistenssi .....	15
4.2	Apioosinukleosidien vaikutus kaksoiskierteen stabiiliuteen.....	16
4.3	HI-viruksen vastaiset ominaisuudet .....	17
4.4	Sytotoksiset ominaisuudet .....	18
<b>5</b>	<b>Johtopäätökset ja yhteenveto .....</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>Viitteet .....</b>	<b>20</b>

## Lyhenteet

DNA = Deoksiribonukleiinihappo (engl. Deoxyribonucleic acid)

RNA = Ribonukleiinihappo (engl. Ribonucleic acid)

apioNA = Apioosinukleiinihappo (engl. Apiose nucleic acid)

TNA = Treosinukleiinihappo (engl. Threose Nucleic acid)

XNA = Xenonukleiinihappo (engl. Xenonucleic acid)

AIBN = Atsobisisobutyronitriili (engl. azobisisobutyronitrile)

TEMPO = 2,2,6,6-tetrametyylipiperidiini-1-yylioksyyl (engl. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl)

BpioNA = 3'-etyteeni-TNA (3'-C-pidennetty treosinukleiinihappo)

p-TsOH = *p*-tolueenisulfonihappo

DIAD = Di-isopropyliatsodikarboksyylaatti

TBDPSCI = *Tert*-butyldifenyylisilyylikloridi (engl. *tert*-butyldiphenylsilyl chloride)

DMAP = 4-dimetyyliaminopyridiini

BSA = Bis(trimetyylisilyyli)asetamidi (engl. *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide)

TMSOTf = Trimetyylisilyylitrifluorometaanisulfonaatti (engl. Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate)

TBAF = Tetrabutyliammoniumfluoridi (engl. Tetra-*n*-butylammonium fluoride)

TBS = *Tert*-butyylidimetyylisilyyli (engl. *tert*-Butyldimethylsilyl)

DIBAL-H = Di-isobutyylialumiinihydridi (engl. Diisobutylaluminium hydride)

TBSCl = *Tert*-butyylidimetyylisilyylikloridi

CPG = Kontrolloitu huokoinen lasi (engl. Controlled pore glass)

HBTU = *O*-(bentsotriatsol-1-yyli) -*N, N, N', N'*-tetrametyyliuroniumtetrafluorofosfaatti (engl. 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)

DIPEA = Di-isopropylietyyliamiini (engl. *N,N*-Diisopropylethylamine)

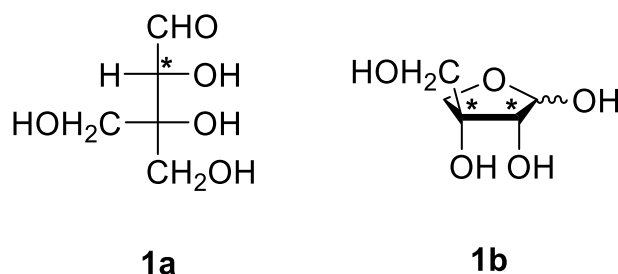
RT = Käänteiskopioijaentsyymi (engl. Reverse transcriptase)

HIV = Immuunikatovirus (engl. Human immunodeficiency virus)

# 1 Johdanto

1900-luvun alkupuolella Saksassa persiljan glykosideja tutkinut kemisti Eduard Vongerichten onnistui eristämään flavonoidiglykosidi apiinin. Apiinista taas hän onnistui hydrolysoimaan *D*-glukoosiapigeniiniä ja tässä vaiheessa vielä tuntematonta pentoosisokeria. Tämä uusi sokeri ei kuitenkaan ollut kemiallisilta ominaisuuksiltaan samanlainen kuin toiset pentoosit arabinoosi ja ksyloosi. Vongerichten nimesi tämän uuden sokerin apioosiksi. Perusteellisemman tutkimuksen jälkeen apioosi tunnistettiin sitä sisältävien kasvien soluseinien yhtenä polymeerisenä rakenneosana.<sup>1</sup>

Luonnossa esiintyvä *D*-apioosi löytyy joko avoketjuisessa muodossa tai syklisenä furanoosina. Avoketjuinen apioosi sisältää vain yhden kiraalisen keskuksen, joka sijaitsee sen C2-hiilessä. *D*-apioosin ollessa syklinen muodostuu sille uusi kiraalinen keskus myös C3-hiileen.<sup>1</sup> Kiraaliset keskuksat on esitetty kuvassa 1. *D*- ja *L*-apioosien olemassaolo ja konfiguraatio saatiin varmistettua 1955, kun ne molemmat onnistuttiin syntetisoimaan kemiallisesti. Tämä löytö lisäsi kiinnostusta apioosin tapaisiin yhdisteisiin, joka johti näiden yhdisteiden löytämiseen uusista kasveista yhä nopeammin.<sup>1</sup>



**Kuva 1.** Avoketjuinen (**1a**) ja syklinen *D*-apioosi (**1b**). Näiden kiraaliset keskuksat on merkitty kuvaan \*-merkillä.

Apioosista tekee kiinnostavan sen rakenteen samankaltaisuus DNA:n deoksiriboosin ja RNA:n riboosisokerin kanssa. Tämän takia siitä on kiinnostuttu nukleosidianalogien näkökulmasta, erityisesti potentiaalisten farmakologisten ominaisuuksien takia. Sekä *D*- että *L*-apioosinukleosideja tutkitaan mahdollisten HI-viruksen vastaisten vaikutusten takia.<sup>2,3</sup> Erityisesti 3'-fosfometyloitujen adeniini- ja tymiiniemästä sisältävien nukleosidianalogien on nähty vaikuttavan lupaavasti HI-virusta vastaan, ja myös kemiallisesti muokattujen apioosinukleosidien antiviraalisia ominaisuuksia on tutkittu tämän tiedon pohjalta<sup>3</sup>. Apioosinukleosidin rakenne muistuttaa paljon jo tunnettua

treosinukleosidia, jonka stabiilisuus nukleaaseja vastaan ja kyky pariutua DNA- tai RNA juosteen kanssa on jo tutkittu.<sup>4</sup> Tässä tutkielmassa käsitellään, kuinka apioosia sisältäviä nukleosidianalogeja voidaan syntetisoida ja käydään tarkemmin läpi, millaisia ominaisuuksia näillä on.

## 2 Xenonukleiinihapot

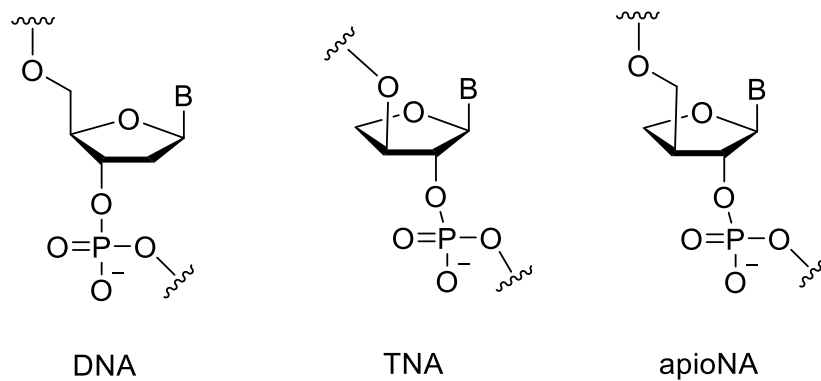
Luonnosta eliöistä löytyvät nukleiinihapot DNA ja RNA ovat informaationaalisia makromolekyylejä, jotka koostuvat sokeri-, fosfaatti- ja emäsosasta. Tunnettu näiltä nukleiinihapoilta löytyvä ominaisuus on niiden kaksoiskiertainen rakenne, kun komplementaariset emäkset sitoutuvat vetysidoksilla Watson-Crick emäspariutumisen sääntöjen mukaisesti. Periaatteet, joilla näiden luonnollisten nukleiinihappojen dupleksien rakenne muodostuu, pätevät myös keinotekoisissa nukleiinihapoissa, jos niiden rakenteet muistuttavat kemiallisesti DNA:ta tai RNA:ta.<sup>5</sup> Näillä nukleiinihappoanalogeilla voitaisiin luoda uusia sovelluksia diagnostiikkaan ja oligonukleotidilääkkeiden alalle.

Tämä on johtanut kemistit tutkimaan esimerkiksi sokeriosaltaan muokattuja nukleosideja. Näistä muodostettuja nukleiinihappoja kutsutaan xenonukleiinihapoiksi (XNA:ksi).<sup>5,6</sup> XNA:ta on alettu tutkimaan sen mahdollisten hyödyllisten ominaisuuksien takia, niin kehitys- kuin lääketarkoituksiinkin. Ominaisuudet, jotka XNA:ssa erityisesti kiinnostavat ovat sen mahdollinen vakaampi hybridisaatio, tehokkaampi reaktiivisuus eri synteeseissä ja resistenssi nukleaaseille.<sup>6</sup> Tutkimukset ovat osoittaneet, että osalla XNA-nukleosideista on jopa joissain tapauksissa DNA:ta ja RNA:ta vahvempi emäspariutumiskyky.<sup>5</sup> Yksi tällainen paljon tutkimuksen kohteena ollut XNA on TNA.<sup>4-9</sup>

### 2.1 Treosirunkoiset nukleiinihapot

Kuten johdannossa mainittiin, TNA:lla ja apioNA:lla on toistensa kanssa hyvin samankaltaiset rakenteet. TNA:ssa sokeriosan tilalla on deoksiriboosin tai riboosin sijasta treosisokeri. DNA:han ja RNA:han verrattuna TNA:lla on myös yhden hiiliatomin lyhyempi toistuva runko-osa.<sup>7,10</sup> Treosilla ei ole 5'-hiiliatomia, jonka vuoksi TNA:ssa yksiköt ovat linkittyneet fosfodiesterisidoksella 2'- ja 3'-hydroksyyliiryhmistään toisin kuin luonnollisilla nukleiinihapoilla, joilla fosfodiesterisidos on 3' ja 5' hydroksyyliiryhmien välillä (kuva 2). TNA voi tästä huolimatta pariutua komplementaarisesti sekä DNA:n että RNA:n kanssa ja muodostaa A-tyyppin kaksoiskiirteen.<sup>9</sup> TNA:ta on myös ehdotettu RNA:n mahdolliseksi esiasteeksi sen kemiallisen yksinkertaisuuden takia riboosiin verrattuna ja kykyyn siirtää geneettistä informaatiota. Geneettisen informaation siirtymisellä tarkoitetaan TNA:n

kyky toimia koodaavana juosteena transkriptiolle, josta saadaan TNA:n geneettisen informaation sisältävä RNA.<sup>9</sup> TNA on resistentti endo- ja eksonukleaaseille sekä happokatalyyttistä hajoamista vastaan.<sup>9,10</sup> Koska apioosinukleotidit ja treosinukleotidit molemmat liittyvät uusiin nukleotideihin 2'- ja 3'-hydroksyyliiryhmistään on herännyt kysymys, voisiko apioNA:lla olla samanlaisia tai parempia ominaisuuksia näillä osa-alueilla.<sup>4</sup>



**Kuva 2.** DNA:n, TNA:n ja apioNA:n rakenteet. B kuvastaa nukleotidin emäsosaa.

## 2.2 Apioosinukleosidit ja ApioNA

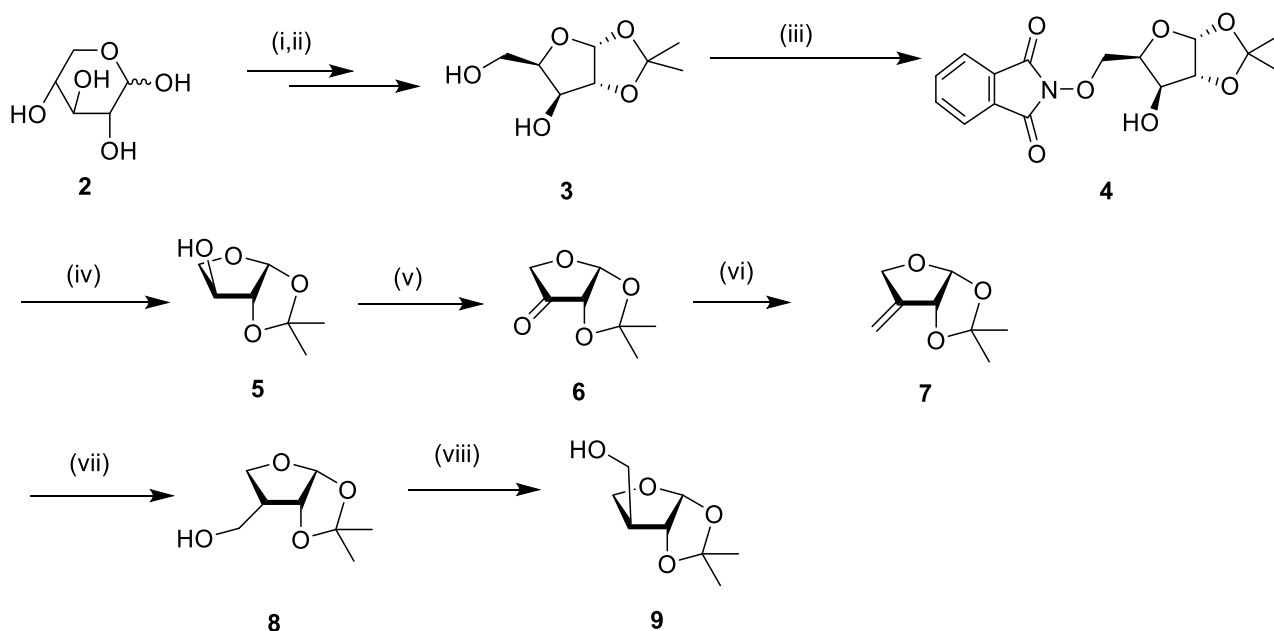
Kuten TNA:ssa, myös apioosinukleosideissa deoksiriboosi ja riboosi on korvattu toisella sokerilla. Apioosinukleosidien tapauksessa sokeriosana on apioosi.<sup>4</sup> Apioosiin on onnistuttu kemiallisesti liittämään kaikki neljä RNA:n yleisintä emästä (A,U G ja C) sekä tymiinin ja 5-metyylisytyosiinin. Näistä kaikista on saatu myös valmistettua niitä sisältäviä oligonukleotideja (apioNA).<sup>4</sup> Apioosinukleosidit, ovat metyloituneita 3'-aseman hiilestään, minkä takia niiden runkorakenteet ovat yhden sidoksen pidempiä kuin TNA:n ja täten yhtä pitkiä kuin luonnolliset nukleosidit.<sup>11</sup> Kun verrataan DNA:han, huomataan apioNA:n olevan sen paikkaisomeeri. Kuvasta 2 voidaan nähdä, kuinka kaikki kolme nukleinihappoa ovat rakenteeltaan samankaltaisia. Kun apioosinukleosideja on valmistettu, on huomattu vaikeuksia säilyttää niiden luonnosta saatavien pentoosisokerien stereokemiallinen puhtaus.<sup>4</sup> Koska eri stereoisomeereillä voidaan havaita merkittäviä toisistaan poikkeavia ominaisuuksia, pyritään luomaan uusia synteesireittejä, joista saataisiin stereokemiallisesti mahdollisimman puhdas tuote, jotta juuri kyseisen tuotteen ominaisuudet voitaisiin selvittää.<sup>4</sup>

### 3 Apioosinukleosidien synteesi

Apioosinukleosideille on kehitetty monia erilaisia synteesireittejä<sup>4,8,11,12</sup>. Niissä on kuitenkin useasti ongelmina pitkät ja työläät synteesit, runsas suojaryhmien käyttö ja rajallinen funktionaalisten ryhmien sietokyky<sup>8</sup>. Tavoitteena on tuotteen anomeerinen puhtaus, eli vain tietyn sokerin konfiguraation esiintyminen lopputuotteessa. Koska mahdollisia synteesitapoja on paljon, keskitytään tässä tutkielmassa Jauregui-Matos *et al.*<sup>4</sup> ja Gao *et al.*<sup>8</sup> esittämiin synteesireitteihin.

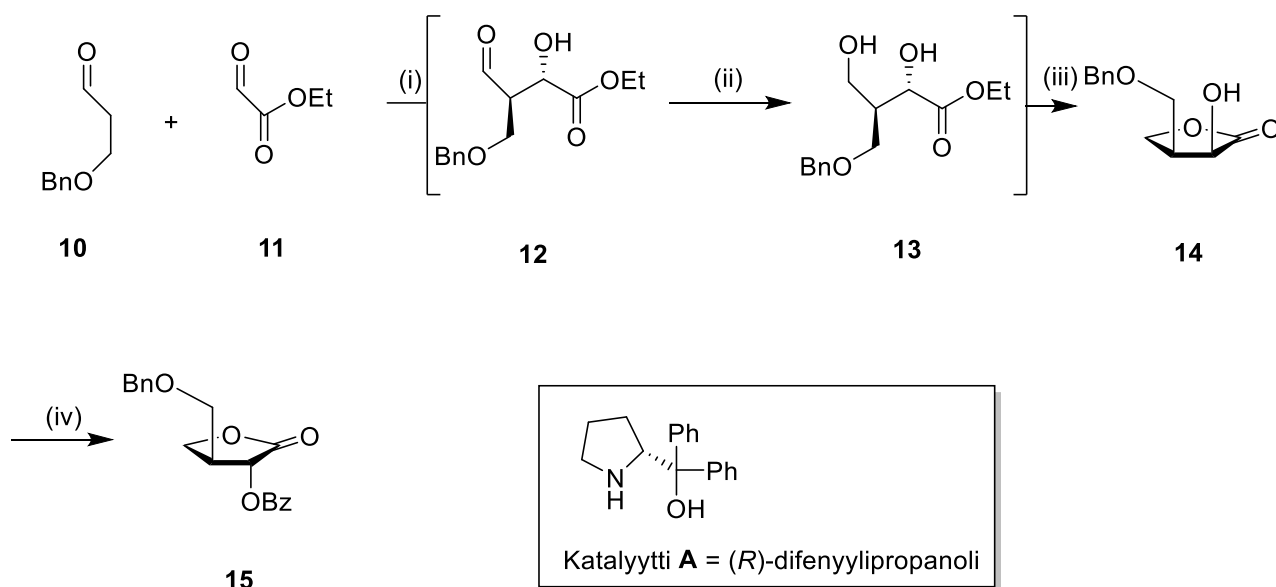
#### 3.1 Sokeriesiasteen valmistus

Ensimmäinen vaihe näissä nukleosidisynteseissä on sokeriesiasteen muodostaminen Jauregui-Matos *et al.*<sup>4</sup> aloittavat sokeriesiastesynteesinsä Toti *et al.*<sup>2</sup> kehittämällä synteesireitillä. Kyseisen synteesireitti, joka on esitettyä kaaviossa 1, aloitetaan *D*-(+)-ksyloosin (**2**) asetonidisuojauksella, josta valmistuu 1,2-*O*-isopropylideeni-*D*-ksylofuranosia (**3**). Primaarinen hydroksyyliiryhmä aktivoidaan Mitsunobun reaktiolla tuotteeksi **4**, minkä jälkeen se deoksigenoidaan AIBN-välitteisesti 1,2-*O*-isopropylideeni-*D*-treosiksi (**5**). Tätä seuraa sekundaarisen hydroksyyliiryhmän hapetus ja Wittigin reaktio, muodostaen tuotteen **7**. Tämä tuote edelleen reagoi hydroboraatio-oksidaatioissa tuotteeksi **8**, joka kolmen happo- ja emäksäksittelysyklin jälkeen muodostaa esiasteen **9**.



**Kaavio 1.** Sokeriesiasteen valmistaminen *D*-(+)-ksyloosista.<sup>4</sup> Reagenssit: (i) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, asetoni; (ii) 80% etikkahappo; (iii) *N*-hydroksiftaali-imidi, trifenyylifosfiitti, di-isopropyyliatsodikarboksylaatti, tetrahydrofuraani; (iv) Bu<sub>3</sub>SnH, AIBN, tolueni; (v) TEMPO, bis(asetoksi)jodibentseeni, dikloorimetaani; (vi) MePPh<sub>3</sub>Br, *tert*-amyylialkoholi, NaH, tetrahydrofuraani; (vii) BH<sub>3</sub>-SMe<sub>2</sub>, NaBO<sub>3</sub>•4H<sub>2</sub>O, tetrahydrofuraani, vesi; (viii) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sitten Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (kolme kertaa), asetoni.

Gao *et al.*<sup>8</sup> käyttämässä synteessireitissä, jonka sokeriesiasteen valmistus on esitettyä kaaviossa 2 synteesi aloitetaan stereoselektiivisellä 3-bentsyylioksiopropanaalin (**10**) aldoliadditiolla polymeerisen etyyli glykoksylaatin (**11**) kanssa katalyytin **A** katalysoimana. Syntynyt aldoliadditiotuote **12** pelkistetään natriumboorihydridillä alkoholiksi **13**. Seuraavaksi alkoholille tehdään happokatalyyttinen molekyylin sisäinen syklisoituminen *p*-TsOH:n avulla, josta muodostuu laktoni **14**. Laktonin C2-hydroksyyli ryhmä on kuitenkin suuntautunut ylöspäin, joten sille pitää suorittaa konfiguraation inversio, ennen kuin myöhempiä sovelluksia voidaan suorittaa. Tämä suoritettiin Mitsunobun reaktiolla käyttämällä PPh<sub>3</sub>:tä ja DIAD:a sekä bentsoehappoa nukleofiilina. Reaktio liitti siis samalla bentsoyylin suojarahmaksi ja käänsi samalla sen konfiguraation, jolloin muodostuu yhdiste **15**.<sup>8</sup>

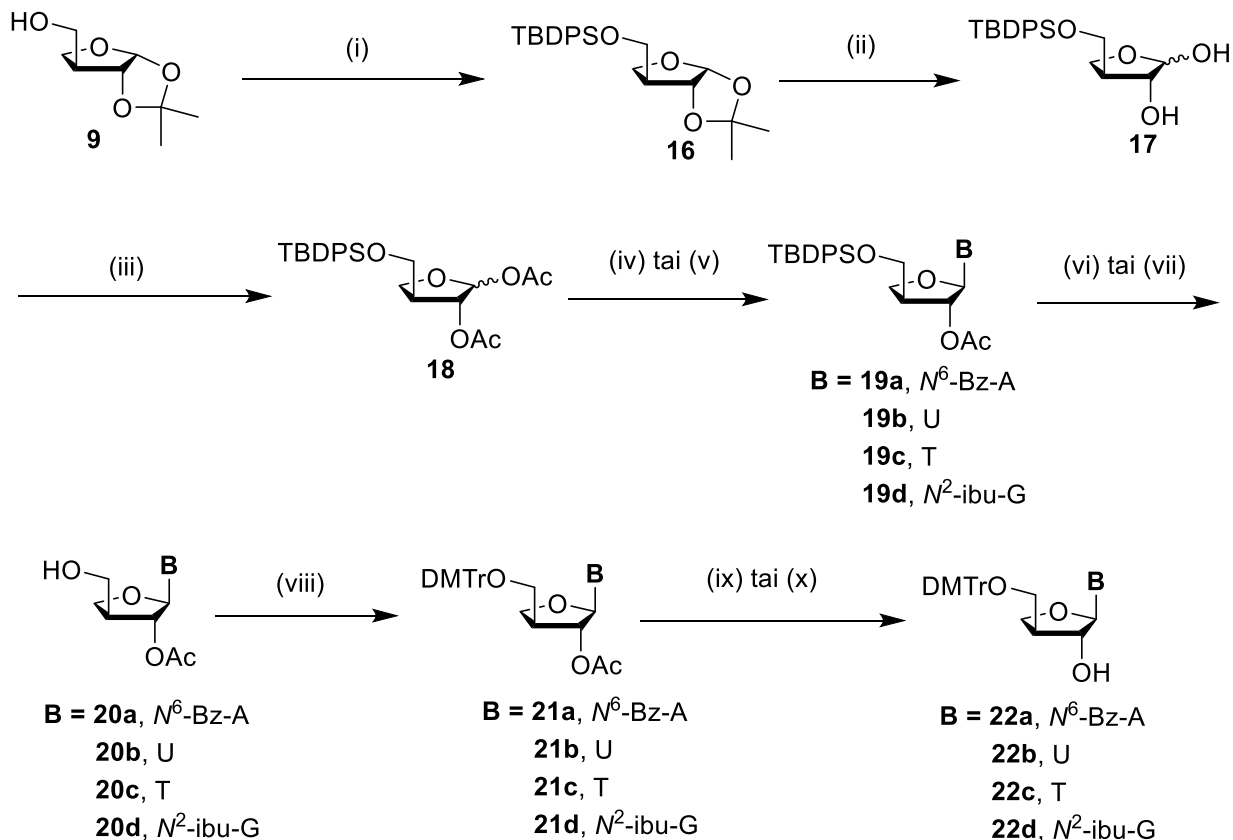


**Kaavio 2.** Gao *et al.*<sup>8</sup> raportoimaa synteessireittiä mukailleen sokerin esiasteen valmistus ja siihen käytetty katalyytti **A**. Reagenssit: i) Katalyytti **A** (3 mol%), THF-H<sub>2</sub>O; ii) NaBH<sub>4</sub>, MeOH; iii) *p*-TsOH, THF; iv) Bentsoehappo, PPh<sub>3</sub>, DIAD, THF.

### 3.2 Apioosinukleosidien valmistus

Jauregui-Matos *et al.*<sup>4</sup> käyttämä synteessireitti apioosinukleosidien valmistamiseksi on esitetty kaaviossa 3, jonka ensimmäinen vaihe on välituotteen **9** primaarisen 4'-hydroksyyli ryhmän suojaus TBDPSCl:n avulla, joka imidatsolin läsnä ollessa muodosti yhdisteen **16**. Tätä seuraa ketaalisuojauksen poisto 1,0 M booritrikloridin DCM- ja *n*-heksaaniliuoksessa, joka tuottaa anomeerisen seoksen dioleita **17**. Dioleihin lisätään asyyli suojaus etikkahappoanhydridin avulla

pyridiinin läsnä ollessa, joka DMAP:n katalysoimana valmistaa suojatun 3'-deoksiapioosisokerin **18**.<sup>4</sup>

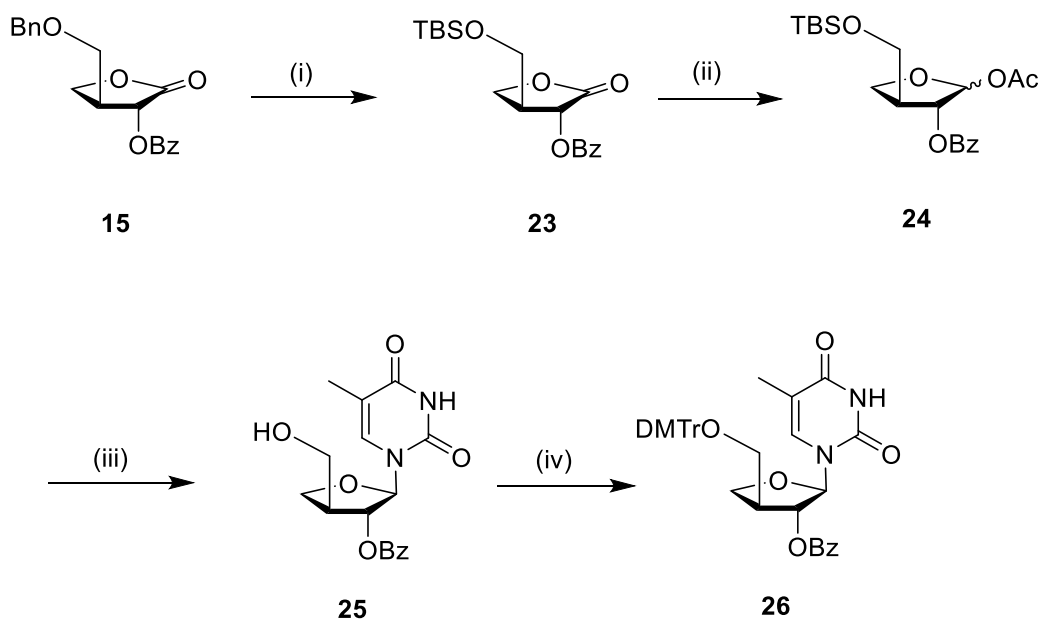


**Kaavio 3.** Jauregui-Matos *et al.* julkaisema synteesireitti apioosinukleosidien valmistamiseksi.<sup>4</sup> Reagenssit: i) TBDPSCl, imidatsoli, DCM; ii) 1.0 M BCl<sub>3</sub>, DCM/heksaani; iii) etikkahappo anhydridi, pyridiini, DMAP; iv) **19a**: N<sup>6</sup>-Bz-A; **19b**: U; **19c**: T; **19a-19c**: BSA, 1,2-dikloorietaani, TMSOTf; (v) **19d**: N<sup>2</sup>-ibu-G 1. BSA, TMSOTf, tolueni, O<sup>6</sup>-difenylikarbamoyyli-N<sup>2</sup>-isobutyylimuaniini; 2. 20% TFA DCM:ssä; (vi) **20a-20c**: 1.0 M TBAF THF:ssä (vii) **20d**: 37% HF·3Et<sub>3</sub>N, THF; (viii) dimetoksitrietylikloridi, DMAP, pyridiini; (ix) **22a-22c**: 1 M NaOH THF:MeOH (1:1):ssä (x) **22d**: 1 M NaOH pyridiini:EtOH (3:2).

Nämä 3'-deoksiapioosisokerit muokataan silyl-Hilbert—Johnson/Vorbrüggenin reaktion parametrien mukaan<sup>13</sup>, johon kuuluu BSA:n käyttö silyloivana yhdisteenä, TMSOTf:n käyttö Lewisin happona ja 1,2-dikloorietaani (DCE) käyttö liuottimena. Optimoitujen reaktio-olosuhteiden ansiosta tuotteeksi saatiin pelkästään toivotut anomeerit **19**. Silyylisuojausten poisto primaarisesta alkoholista 1,0 M tetrabutyyliammoniumfluoridin THF-liuoksella tai 37 % HF:n trietyyliamiini-liuoksella muodostaa tuotteet **20a-d** hyvällä saannolla. Nämä tuotteet suojataan vielä trityloimalla 4,4'-dimetoksitrietylikloridilla käyttäen katalyyttinä DMAP:tä kuivassa pyridiinissä, jolloin muodostui tuotteet **21a-d**. Nukleosidin valmistuksen viimeisenä vaiheena poistetaan sokerin 2'-

hydroksyyli­ryhmän asetyylisuojaus. Yhdisteiden **21a** ja **21b** poistetaan 1 M NaOH:n vesiliuoksella tetrahydrofuraanissa ja metanolissa (1:1) 25°C. Yhdisteen **21d** suojaus pitää poistaa 0°C:ssa, jotta nukleoemäksen eksosyklisen aminoryhmän suojaus ei irtoa. Synteesin päätökseenä saadaan valmistettua U:ta, T:tä, N<sup>6</sup>-Bz-A:ta ja N<sup>2</sup>-ibu-G:tä sisältävät apioosinukleosidit **22a-d**.<sup>4</sup>

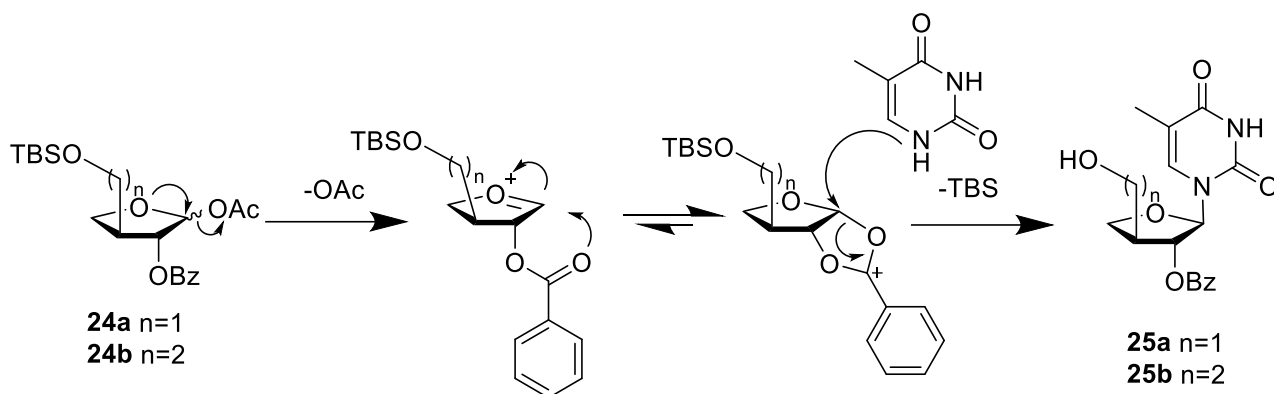
Gao *et al.*<sup>8</sup> jatkavat kaaviossa 2 aloitettua synteesireittiä, kaaviossa 4 esitetyllä reitillä, jossa aikaisemmin valmistettua yhdistettä **15** muokataan nukleosidiksi. Muokkaus aloitetaan kaksivaiheisella reaktiolla, jossa ensimmäinen vaihe on bentsyyli­ryhmän selektiivinen poisto Pd(OH)<sub>2</sub>:n katalysoimalla vedytyksellä, jonka jälkeen yhdiste suojataan TBS:llä käyttäen katalyyttinä imidatsolia yhdisteeksi **23**. Yhdisteen laktoni-osa pelkistetään DIBAL-H:lla 78°C:ssa hemiasetaaliksi, joka asetyloidaan yhdisteeksi **24**.<sup>8</sup>



**Kaavio 4.** Gao *et al.* raportoima apioositymidin synteesireitti.<sup>8</sup> Reagenssit: i) 1. H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, THF; 2. TBSCl, imidatsoli, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; ii) 1. DIBAL-H, THF; 2. Ac<sub>2</sub>O, DMAP, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; iii) 1. tymiini, BSA, TMSOTf, CH<sub>3</sub>CN; 2. Et<sub>3</sub>N•3HF, THF; iv) 1. Dimetoksitriitylikloridi, pyridiini; 2. 7 M NH<sub>3</sub>-MeOH

Yhdisteeseen liitetään Vorbrüggenin glykosylaatiolla<sup>14</sup> BSA-aktivoitu tymiini TMSOTf:n katalysoimana<sup>8,14</sup>. Reaktiolla saadaan muodostettua pelkästään β-anomeeria C2-bentsyyli­ryhmän osallistumisen avulla. Bentsyyli­ryhmän karbonyyli­happi reagoi hiilirenkaan anomeerisen hiilen kanssa kaavion 5 mukaan, jolloin muodostuu bisyklinen asyyloksoniumioni välituote. Tämä estää

reaktion  $\alpha$ -asemaan, eli BSA-aktivoitun tyymiin nukleofiilinen hyökkäys tuottaa halutun  $\beta$ -nukleosidin. Suojattua nukleosidiväliainetta käsitellään vielä  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ :llä, joka poistaa TBS suojaryhmän muodostaen nukleosidin **25**. Synteesin päätteeksi nukleosidin 5'-hydroksyyli-ryhmä suojataan vielä dimetoksitrietyylikloridilla ja 2'-O bentsoyylisuojaus poistetaan. Näin saadaan valmis suojattu apioosinukleosidi **26**.<sup>8</sup>



**Kaavio 5.** Bisyklisen asyyloksoniumionin muodostuminen ja tyymiin hyökkäyksen ohjautuminen  $\beta$ -asemaan.

### 3.3 Synteesireittien vertailu

Kuten tutkielmassa jo aikaisemmin mainittiin, nukleosidien synteesissä tärkeitä tekijöitä ovat synteesireitin pituus ja yksinkertaistaminen, sekä tuotteiden oikea konfiguraatio haluttujen ominaisuuksien aikaansaamiseksi. Jauregui-Matos *et al.* raportoimalla<sup>4</sup> synteesillä (kaavioissa 1 ja 3) saadaan anomeerisesti puhdasta vain  $\beta$ -konfiguraatiota sisältäviä nukleosideja ja niihin pystyttiin liittämään neljää eri nukleoemästä (U, T, G ja A). Verrattuna Gao *et al.* julkaisemaan synteesiin<sup>8</sup> se on kuitenkin pitkä ja työläs koostuen 15:stä vaiheesta, Gaon julkaiseman synteesin koostuessa vain 10:stä vaiheesta. Synteesin lyhyemmän pituuden lisäksi Gaon julkaisemasta synteesireitistä saadaan myös ainoastaan  $\beta$ -konfiguraatiota sisältäviä tuotteita. Julkaisussa ei kuitenkaan esitetty kuin tyymiemästä sisältäviä nukleosideja.

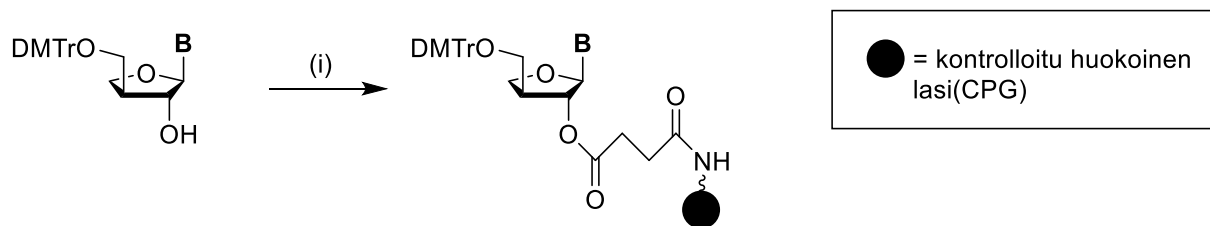
Kun verrataan näitä kahta synteesireittiä muihin aikaisemmin julkaistuissa artikkeleissa esitettyihin<sup>3,12,15-17</sup>, niin huomataan niiden onnistuvan kuitenkin ratkaisemaan aiempia haastavia ongelmia, stereokemian ja pitkien synteesireittien osalta<sup>3,4,8</sup>. Retrosynteesin avulla suunniteltu D- ja L-apioosinukleosidien synteesi oli lyhyempi, mutta kohtasi ongelmia esimerkiksi anomeerien puhtaudessa tuottaen sekä  $\alpha$ - että  $\beta$ -konfiguraation sisältäviä nukleosideja.<sup>3</sup> Toinen retrosynteesillä

suunniteltu synteesi taas korjasi tämän ongelman mutta oli pidempi, ja tuotti näistä muista eroten 3'-deoksiapioosinukleosidien sijasta 3'-hydroksyyliiryhmän sisältäviä nukleosideja.<sup>12</sup>

### 3.4 Nukleosiditriposfaatin valmistus

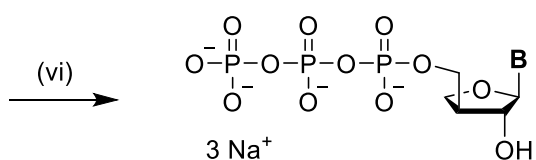
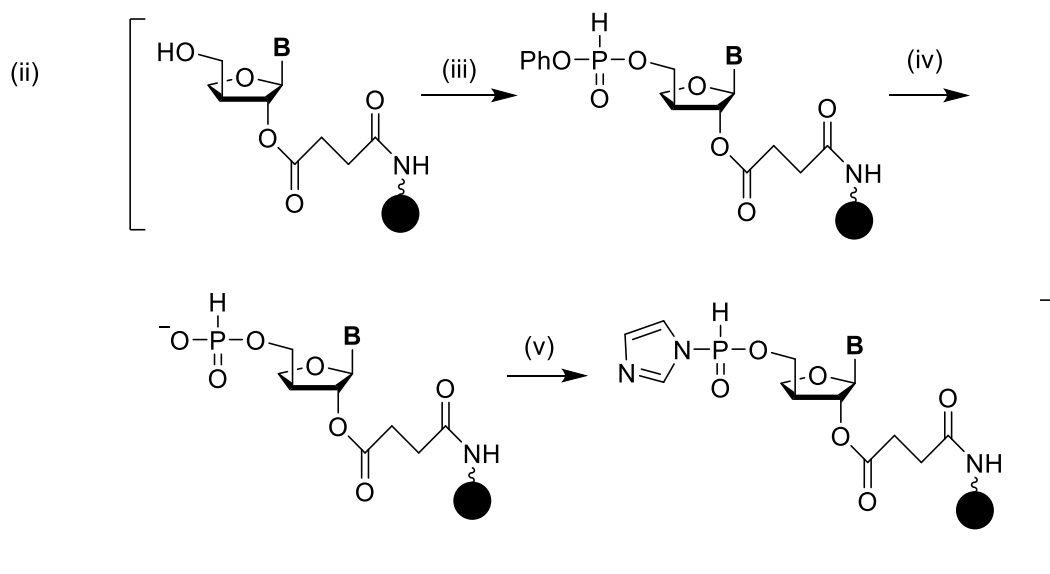
Eliöissä DNA:n ja RNA:n synteessissä käytettävät nukleotidit ovat ennen oligonukleotidiketjuksi yhdistämistä trifosfaattimuodossa. Kemiallisesti modifioituja oligonukleotideja valmistaessa käytetään DNA- ja RNA synteessin lähtöaineina yleisesti nukleotideja, jotka ovat fosforamidiittijohdannaisia tai trifosfaattimuodossa. Normaalisti muokatut 20–30 nukleotidin nukleotidiketjut syntetisoidaan automatisoidulla DNA-syntetisaattorilla fosforamidiittikemiaa käyttäen. Tällä metodilla ei voida kuitenkaan luoda suuria DNA- tai RNA- molekyyliä, joita varten täytyy käyttää DNA-polymeraaseja, jotka tunnistavat 5'-trifosfaatteja substraattina.<sup>18</sup> Lopputuloksesta riippuen voidaan siis käyttää molempia menetelmiä, mutta käsitellään tässä tutkielmassa Jauregui-Matos *et al.*<sup>4</sup> artikkelissaan käyttämä trifosfaatteihin perustuva synteessireitti.

Synteesi, joka esitettyinä kaaviossa 6, aloitetaan yhdisteiden **22a-d** käsittelyllä meripihkahappoanhydridillä, jota seuraa liittäminen amiinimuokattuun kontrolloituun huokoiseen lasiin (CPG) muodostaen yhdisteet **27a-d**. Näistä muodostetaan H-fosfonaattikemiaa käyttäen trifosfaatit **28a-d**.<sup>4</sup> Synteesi hyödynsi kiintokantajamenetelmää, jossa nukleosidit ovat kiinnittyneet huokoiseen lasipartikkeliin. Tämä ei kuitenkaan ole ainut vaihtoehto, sillä trifosfaatteja voidaan valmistaa myös nestefaasisynteessillä, jossa reaktio tapahtuu liuoksessa.<sup>4,11</sup>



**B = 22a**,  $N^6$ -Bz-A  
**22b**, U  
**22c**, T  
**22d**,  $N^2$ -ibu-G

**B = 27a**,  $N^6$ -Bz-A  
**27b**, U  
**27c**, T  
**27d**,  $N^2$ -ibu-G



**B = 28a**,  $N^6$ -Bz-A  
**28b**, U  
**28c**, T  
**28d**,  $N^2$ -ibu-G

**Kaavio 6.** Nukleosiditriposfaatin synteesi kiintokantajalle. Reagenssit: (i): a) meripihkahappoanhydridi, DMAP, DCM; b) HBTU, asetonitriili, DIPEA, CPG 600 Å; (ii) dikloorietikkahappo, tolueni; (iii): difenyylifosfiitti, pyridiini; (iv): trietyyliammoniumbikarbonaatti, vesi,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; (v): BSA/ $\text{CBrCl}_3$ /imidatsoli,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; (vi) tributyliammoniumpyrofosfaatti, dimetyyliformamidi.<sup>4</sup>

## 4 Apioosinukleosidien ominaisuudet

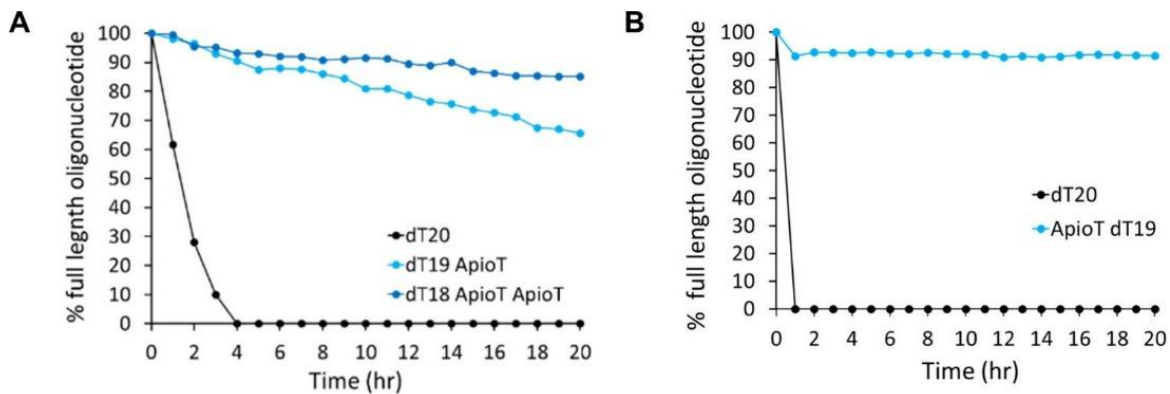
Muokatut nukleosidit ovat suuri joukko biologisesti aktiivisia yhdisteitä, joiden potentiaali lääkekehityksessä tekevät niistä kiinnostavan tutkimuskohteen. Niiden fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ovat johtaneet niiden tutkimuksen antiviraalisten ja kasvainten vastaisten vaikutusten etsimiseen.<sup>12</sup> Koska nukleiinihappoaptameerit ovat suhteellisen helppoja eristää toistaan spesifistä sitoutumista käyttäen, voitaisiin niitä käyttää hyödyllisinä lääkeaineina. Ne voisivat toimia niin nukleiinihappovasta-aineina proteiini-kohteita vastaan kuin oligonukleotidipohjaisten lääkeaineiden kuljettajina kohdesoluihin reseptori-välitteisesti endosytoosilla.<sup>11</sup>

Koska TNA:sta on löydetty jo antiviraalisia, sekä eksonuklaasien vastaisia ominaisuuksia, on tutkimus suuntautunut myös sitä muistuttavaan apioNA:han.<sup>4</sup> Käydään siis seuraavissa kappaleissa läpi niistä jo löydettyjä ominaisuuksia ja niiden luomia positiivisia puolia, sekä haasteita niiden käytölle lääkeaineina.

### 4.1 Eksonukleasiresistenssi

Yksi tärkeistä ominaisuuksista, joka on tehnyt apioosinukleosideista ja niiden johdannaista kiinnostavan tutkimuskohteen on niiden eksonukleaseja aiheuttamaa pilkkoutumista estävät ominaisuudet. Niiden vaikutusta oligonukleotidien eksonukleasiresistenssiin on tutkittu ketjun sekä 3'- että 5'-terminaalisisista päistä.<sup>4,8</sup> Terminaalisesti näin muokatuissa DNA oligonukleotideissa huomattiin apioosinukleotideja sisältävien oligonukleotidien vastustavan 3'- ja 5'-eksonukleasien hajottavaa vaikutusta. Tämä vaikutus on nähtävillä kuvassa 3, jossa huomataan sinisellä kuvattujen apioNA:ta sisältävien oligonukleotidien hajoavan hitaammin, kuin pelkkää DNA sisältävät oligonukleotidit.<sup>4</sup> Kuvassa 3 on esitetyt Jauregui-Matos *et al.* <sup>4</sup>:n tutkimat 20-meeriset tymidiinioligonukleotidit sisälsivät 3'-päässä yhden (dT19 ApioT) tai kaksi (dT18 ApioT ApioT) apioosinukleotidia tai 5'-päässä yhden apioosinukleotidin (ApioT dT19).

Havaittu stabiloiva vaikutus ei tarvinnut tiofosfaattiliitosta, poiketen muista nukleiinihapoista, vaan jopa heikkeni niitä käytettäessä.<sup>4,8</sup> Syyksi stabiloivalle vaikutukselle arvellaan molekyylien mallintamisen avulla olevan apioosinukleotidin vaikutus eksonukleasien aktiiviseen kohtaan. DNA:n terminaalisisissa päissä ne aiheuttavat muutoksia fosfaattiryhmien paikoissa ja suuntautumisessa, jolloin entsyymaattinen pilkkoutuminen vaikeutuu.<sup>4</sup>



**Kuva 3.** Terminaalisen apioNA:n suojaava vaikutus nukleasilta A: dT19 ApioT ja dT18 ApioT ApioT: apioosinukleotidit ovat oligonukleotidin 3'-päässä, käytetty käärmemyrkyn fosfodiesteriäsi; B: ApioT dT19: apioosinukleotidi on oligonukleotidin 5'-päässä, käytetty fosfodiesteriäsi II. Kuva on kopioitu lähteestä 4: reprinted with permission from Jauregui-Matos, V.; Datta, D.; Kundu, J.; Kumar, V.; Harp, J. M.; Adebayo, A.; Donnelly, D.; Medina, E.; Chaput, J. C.; Egli, M.; Manoharan, M. Synthesis and Biophysical Properties of 3'-Deoxy-β- d -Apio- d -Furanosyl Nucleic Acids. ACS Chem. Biol. **2025**, 20 (11), 2698–2708. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5c00591>. Copyright © 2025, American Chemical Society

Gao *et al.* tutkivat julkaisussaan<sup>8</sup> 3'-pään terminaalisten apioosinukleosidien vaikutusta entsyymaattiseen pilkkoutumiseen. 3'-päässä apioosinukleotidit sisältävät oligonukleotidit olivat fosfodiesteriäsin läsnä ollessa noin 34 kertaa pysyvämpiä kuin luonnollinen DNA. Vaikka Jauregui-Matos *et al.*<sup>4</sup> käyttivät samanlaista oligonukleotidia sekä samaa fosfodiesteriäsiä tutkimuksessaan, havaitsivat he kuitenkin ehjää oligonukleotidia olevan yli 70 % vielä 20 tunnin jälkeen, toisin kuin Gao *et al.*<sup>8</sup> joiden oligonukleotidi puoliutui jo hieman yli tunnissa. Kun ApioNA:ta verrataan TNA:n ja BpioNA:n tarjoamiin suojauksiin, jotka olivat DNA:han verrattuna 55 ja 59 kertaa paremmat, huomataan ApioNA:n vaikutuksen olevan näitä heikompi. Tämän arvellaan johtuvan sen tukirangan RNA:ta muistuttavasta kuusi-jäsenisestä rakenteesta, joita muilla TNA:sta muokatuilla sokereilla ei ole, niiden ollessa joko yhden atomin pidempiä tai lyhyempiä.<sup>8</sup>

## 4.2 Apioosinukleosidien vaikutus kaksoiskierteen stabiiliuteen

Kun apioosinukleotidin sisältämä oligonukleotidi pariutuu RNA-, DNA- tai RNA/DNA-hybridi kaksoiskierteen kanssa huomataan sen laskevan kaksoiskierteen sulamislämpöä.<sup>4</sup> Jo yksi apioosinukleotidi 12 nukleotidin RNA-juosteen keskellä laskee kaksoiskierteen sulamislämpötilaa 5–6°C:lla. Destabiloivassa vaikutuksessa ei huomattu eroa puriini apioNA:en ja pyrimidiini apioNA:en

välillä. TNA-TNA parin tavoin myös yhden apioNA-apioNA parin huomattiin vertailuissa suurin sulamislämpötilaa laskeva vaikutus (9,8–11,8°C). ApioNA:n sisältämä ylimääräinen metyleeni TNA:han verrattuna johtaa pinoutumisvoimien heikkenemiseen, joka on tärkeä tekijä nukleiinihappojen kaksoiskierteen vakaudessa. Se saattaa selittää epävakauden vaikka TNA:ta pidemmän rungon olisi voitu olettaa stabiloivan paritumista.<sup>4</sup>

Tämä destabiloiva vaikutus muodostaa haasteen apioosinukleotidien käyttöön terapeuttisina nukleiinihapoissa. Sille voitaisiin kuitenkin löytää tätä ominaisuutta hyödyntäviä sovelluskohteita. Esimerkiksi strategisella nukleotidin paikan valitsemisella juosteessa voitaisiin saavuttaa terapeuttisen oligonukleotidin tehokkaampi vapautuminen antisense-terapiassa.<sup>4</sup> Antisense-terapiassa käytetään oligonukleotidien kykyä sitoutua niille komplementaarisiin sekvensseihin lähetti-RNA:ssa.<sup>19</sup> ApioNA:den käyttö RNAasi-perusteisessa antisense-terapiassa mahdollistaisi fosforotioaattien käytön vähentämisen ja muihin kuin haluttuihin proteiinkohteisiin tapahtuvan sitoutumisen vähenemisen, joka olisi terapialle turvallisuusetu.<sup>4</sup>

### 4.3 HI-viruksen vastaiset ominaisuudet

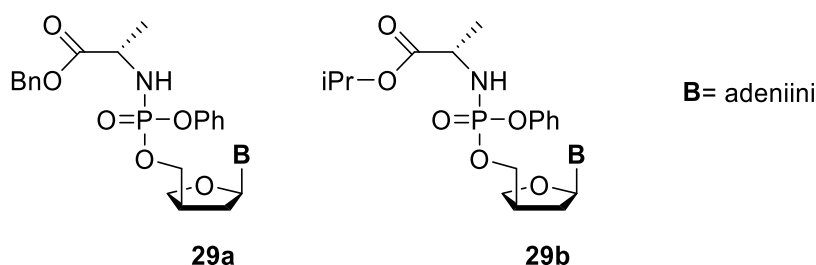
Tutkijat ovat löytäneet joitakin nukleosideja, joilla on havaittu aktiivisuutta HIV:tä vastaan inhiboimalla niiden käänteiskopioijaentsyymiä (RT).<sup>15</sup> Inhiboimiseen on tutkimuksissa huomattu tarvittavan nukleosidin 2',3'-dideoksimuoto, jolloin viruksen DNA-ketjun piteneminen voidaan estää.<sup>3,15</sup> Modifioitujen nukleosidien tutkimukseen panostetaan edelleen, jotta saataisiin kehitettyä analogeja, jotka olisivat vähemmän haitallisia ja eivät aiheuttaisi resistenssiä HI-viruksilla.<sup>15</sup>

Esimerkkejä analogeista, joilla on näitä antiviraalisia ominaisuuksia ovat 2',3'-substituoitumattomat-2',3'-dideoksinukleosidit, mutta nämä eivät kuitenkaan ole ongelmattomia. Näistä ainakin 2',3'-dideoksisytidiinillä on todettu sivuoireita, kuten polyneuropatiaa mitokondriaalisen DNA:n inhibition takia, ja resistenttien kantojen syntymistä.<sup>3</sup> Jin *et al.*<sup>3</sup> raportoivat tutkimuksessaan syntetisoineen D- ja L-apio 2',3'-dideoksisytidiini analogeja, joiden tehokkuutta HIV-1 vastaan testattiin MT-4 soluissa. Lopputuloksena ei kuitenkaan todettu huomattavaa antiviraalista vaikutusta tai sytotoksisuutta. Tämän arveltiin johtuvan heikommasta affiniteetista solun kinaaseille, trifosfaattimuodon puutteesta johtuen.<sup>3</sup>

Apioosinukleosidien antiviraalisiin ominaisuuksiin palattiin kuitenkin, kun 3'-*O*-fosfometyloiduilta adeniini ja tymiini analogeilta löydettiin HIV:n vastaisia ominaisuuksia<sup>2</sup>. Tämä johti uusien

adeniiniin ja tyymiiniin pohjautuvien apioosinukleosidi aihiolääkkeiden kehittämiseen. Ehto sille, että nämä aihiolääkkeet osoittavat hyvää biologista aktiivisuutta on niiden trifosfaattien toiminta sopivana substraattina käänteiskopiointientsyymeille.<sup>2</sup>

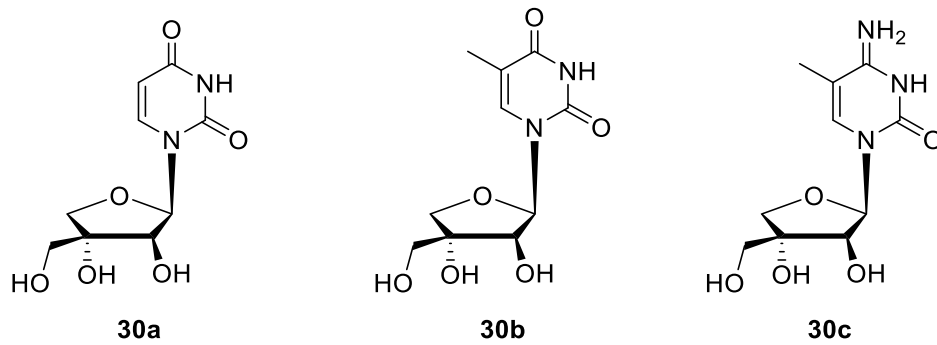
Tutkimus osoitti 2',3'-dideoksi-β-D-apio-D-furanoadenosiinin toimivan viruksen DNA-polymeraasin kanssa, joka hyväksyi sen viruksen DNA-juosteen lopettajaksi. Tämän löydön perusteella muokattiin kaksi adeniinia sisältävää apioosinukleosidia fosfoamidaatti aihiolääkkeiksi. Nämä analogit **29a** ja **29b**, jotka esitettynä kuvassa 4, osoittivat hyvää HIV:n vastaista vaikutusta, joka perustui niiden tehokkuuteen muuttua monofosfaateiksi biomäärityksissä.<sup>2</sup>



**Kuva 4.** Huomattavaa HI-viruksen vastaista vaikutusta näyttäneet yhdisteet.

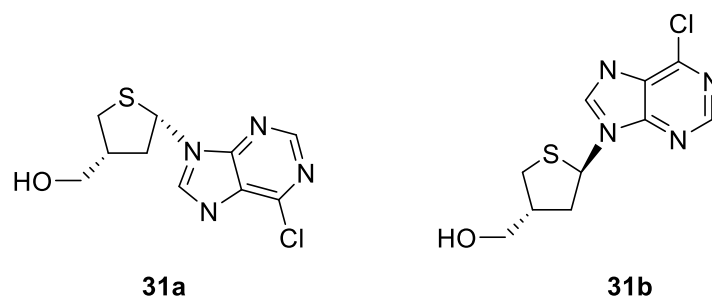
#### 4.4 Sytotoksiset ominaisuudet

Muokatut nukleosidit, kuten 2'-fluori-4'-seleno-ara-sytosiini ovat osoittaneet tehokasta kasvainten vastaista aktiivisuutta.<sup>20</sup> Apioosinukleosideista kuitenkin vain muutama on osoittanut merkittävää biologista aktiivisuutta samalla tavalla. Niiden sytotoksisuutta haluttiin kuitenkin testata uudelleen, mutta ensin muokkaamalla niiden C5-hiiltä Vorbrüggenin glykosylaatiolla ja 2'-hydroksyyliiryhmän inversiolla. Näin muokattujen nukleosidien sytotoksisia vaikutuksia testattiin tämän jälkeen kahta rinta-, yhtä paksusuolen- ja yhtä munasarjasyöpälinjaa vastaan. Kolmen kuvassa 5 esitetyn muokatun apioosinukleosidi analogin **30a**, **30b** ja **30c** huomattiin estävän tietyn rintasyöpälinjan kasvua ja olevan mahdollisia lähtökohtia tehokkaammille syöväntä vastaisille yhdisteille.<sup>12</sup>



**Kuva 5.** Sytotoksisia ominaisuuksia osoittaneet apioarabinofuranoosit<sup>12</sup>

Koska apiodideoksinukleosideilla on hyvin samankaltaiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet kuin luonnollisilla nukleosideilla, johti se myös toisen tutkimusryhmän muokkaamaan niitä erilaisella tavalla. Artikkelissa 17 päädyttiin syntetisoimaan tioapiodideoksinukleosideja, joissa apioosisokerin rengashappi korvataan rikkiatomilla. Tutkimuksella oli alun perin pyrkimys luoda antiviraalisia nukleosideja, mutta tulokset osoittivatkin näin muokattujen nukleosidien olevankin sytotoksisia antiviraalisuuden sijaan. Valmistetuista yhdisteistä kuvassa 6 esitetyt 6-klooripuriinijohdannaiset **31a** ja **31b**, osoittautuivat hyvin sytotoksisiksi keuhko- ja paksusuolen syöpäsoluille. Yhdiste **31a** tappoi 40 % syöpäsoluviljelmistä ja yhdiste **31b** taas tappoi 18,5 % paksusuolisyöpäsoluista ja 38,2 % keuhkocyöpäviljelmän soluista.<sup>17</sup>



**Kuva 6.** Sytotoksista aktiivisuutta osoittaneet 6-klooripuriinijohdannaiset.<sup>17</sup>

## 5 Johtopäätökset ja yhteenveto

Apioosinukleosidit ovat siis lääkekehityksen kannalta kiinnostava kehityskohde, joilla voi olla monia sovelluksia. Niistä johdetuista analogeista on löydetty sekä HIV:n vastaista antiviraalista vaikutusta, että sytotoksista vaikutusta rinta-, paksusuoli- ja keuhkocyöpää vastaan. Myös niiden korkea

resistenssi eksonukleaaseille ja duplekseja epävakauttava vaikutus tarjoavat mahdollisuuksia terapeuttisille sovelluksille.

Vaikka suurin osa apioosinukleosideista ei ole osoittanut merkittävää biologista aktiivisuutta, tai niiden ominaisuudet eivät ole olleet jo aikaisemmin löydettyjä lääkeaineita tehokkaampia tai turvallisempia, voisivat niiden ominaisuudet, kuten muokattavuus ja DNA:ta muistuttava rakenne, mahdollistaa niistä vielä tulevaisuudessa nykyistä tehokkaampia lääkeaineita. Nukleosidien tutkimus on siis tärkeä osa lääkekehitystä ja oligonukleotideilla hoidettavien sairauksien hoitoa.

## 6 Viitteet

- (1) Pičmanová, M.; Møller, B. L. Apiose: One of Nature's Witty Games. *Glycobiology* **2016**, *26* (5), 430–442. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww012>.
- (2) Toti, K. S.; Derudas, M.; Pertusati, F.; Sinnaeve, D.; Van den Broeck, F.; Margamuljana, L.; Martins, J. C.; Herdewijn, P.; Balzarini, J.; McGuigan, C.; Van Calenbergh, S. Synthesis of an Apionucleoside Family and Discovery of a Prodrug with Anti-HIV Activity. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (11), 5097–5112. <https://doi.org/10.1021/jo500659e>.
- (3) Jin, D. Z.; Kwon, S. H.; Moon, H. R.; Gunaga, P.; Kim, H. O.; Kim, D.-K.; Chun, M. W.; Jeong, L. S. Synthesis of D- and L-Apio Nucleoside Analogues with 2'-Hydroxyl Group as Potential Anti-HIV Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (5), 1101–1109. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.12.002>.
- (4) Jauregui-Matos, V.; Datta, D.; Kundu, J.; Kumar, V.; Harp, J. M.; Adebayo, A.; Donnelly, D.; Medina, E.; Chaput, J. C.; Egli, M.; Manoharan, M. Synthesis and Biophysical Properties of 3'-Deoxy-β-D-Apio-D-Furanosyl Nucleic Acids. *ACS Chem. Biol.* **2025**, *20* (11), 2698–2708. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5c00591>.
- (5) Chaput, J. C.; Egli, M.; Herdewijn, P. The XNA Alphabet. *Nucleic Acids Res* **2025**, *53* (13), gkaf635. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf635>.
- (6) Chaput, J. C. Redesigning the Genetic Polymers of Life. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54* (4), 1056–1065. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00886>.
- (7) Ebert, M.-O.; Mang, C.; Krishnamurthy, R.; Eschenmoser, A.; Jaun, B. The Structure of a TNA–TNA Complex in Solution: NMR Study of the Octamer Duplex Derived from α-(1)-Threofuranosyl-(3'-2')-CGAATTCG. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (45), 15105–15115. <https://doi.org/10.1021/ja8041959>.

- (8) Gao, Y.; Xiong, C.; Zhang, C.; Wen, J.; Chen, X.; Li, X.; Dai, Z.; Zhou, L.; Mei, H. 3'-C-Extended TNA: De Novo Synthesis, Enhanced Exonuclease Resistance, and Functional siRNA 3'-Overhang Modifications Without Compromising Gene Silencing. *Chemistry – A European Journal* **2025**, *31* (54), e02182. <https://doi.org/10.1002/chem.202502182>.
- (9) Culbertson, M. C.; Temburnikar, K. W.; Sau, S. P.; Liao, J.-Y.; Bala, S.; Chaput, J. C. Evaluating TNA Stability Under Simulated Physiological Conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26* (10), 2418–2421. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.118>.
- (10) Yu, H.; Zhang, S.; Dunn, M. R.; Chaput, J. C. An Efficient and Faithful In Vitro Replication System for Threose Nucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (9), 3583–3591. <https://doi.org/10.1021/ja3118703>.
- (11) Kataoka, M.; Kouda, Y.; Sato, K.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Highly Efficient Enzymatic Synthesis of 3'-Deoxyapionucleic Acid (apioNA) Having the Four Natural Nucleobases. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (30), 8700–8702. <https://doi.org/10.1039/C1CC12980E>.
- (12) Sivakrishna, B.; Islam, S.; Santra, M. K.; Pal, S. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Apioarabinofuranosyl Pyrimidines. *Drug Development Research* **2020**, *81* (3), 274–282. <https://doi.org/10.1002/ddr.21613>.
- (13) Vorbrüggen, H.; Bennua, B. Nucleoside Syntheses, XXV1) A New Simplified Nucleoside Synthesis. *Chemische Berichte* **1981**, *114* (4), 1279–1286. <https://doi.org/10.1002/cber.19811140407>.
- (14) Sau, S. P.; Fahmi, N. E.; Liao, J.-Yu.; Bala, S.; Chaput, J. C. A Scalable Synthesis of  $\alpha$ -l-Threose Nucleic Acid Monomers. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (6), 2302–2307. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02768>.
- (15) Sells, T. B.; Nair, V. Synthetic Approaches to Novel Cis and Trans Dideoxynucleosides of the Apiose Family. *Tetrahedron* **1994**, *50* (1), 117–138. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80740-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80740-7).
- (16) Kataoka, M.; Sato, K.; Matsuda, A. Synthesis of 3'-Deoxyapionucleoside Triphosphates and Their Incorporation Into DNA by DNA Polymerase. *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, *52* (1), 281–282. <https://doi.org/10.1093/nass/nrn142>.
- (17) Moon, H. R.; Kim, H. O.; Lee, S. K.; Choi, W. J.; Chun, M. W.; Jeong, L. S. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Thioapio Dideoxynucleosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10* (5), 1499–1507. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00417-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00417-5).
- (18) Ali, Md. M.; Imoto, S.; Li, Y.; Sasaki, S.; Nagatsugi, F. Incorporation of an Inducible Nucleotide Analog into DNA by DNA Polymerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (7), 2859–2863. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.024>.

- (19) Crooke, S. T.; Seth, P. P.; Vickers, T. A.; Liang, X. The Interaction of Phosphorothioate-Containing RNA Targeted Drugs with Proteins Is a Critical Determinant of the Therapeutic Effects of These Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (35), 14754–14771. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c04928>.
- (20) Jeong, L. S.; Tosh, D. K.; Choi, W. J.; Lee, S. K.; Kang, Y.-J.; Choi, S.; Lee, J. H.; Lee, H.; Lee, H. W.; Kim, H. O. Discovery of a New Template for Anticancer Agents: 2'-Deoxy-2'-Fluoro-4'-Selenoarabinofuranosyl-Cytosine (2'-F-4'-Seleno-Ara-C). *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (17), 5303–5306. <https://doi.org/10.1021/jm900852b>.