

NUKLEOEMÄSANALOGIEN REVERSIIBELI LIITTÄMINEN
N-METOKSIOKSATSOLIDIINIGLYKOLINUKLEIINIHAPPO
(MOGNA) -RUNKOON

Pro Gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Kemian laitos
Lääkekehityksen kemia
Ninna Heikinmäki
Joulukuu 2023

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

HEIKINMÄKI, NINNA: Nukleoemäsanalogien reversiibeli liittäminen *N*-metoksi-oksatsolidiiniglykolinukleiinihappo (MOGNA) -runkoon

Pro Gradu -tutkielma, 31 s. 32 liites.

Kemia

Joulukuu 2023

Nukleiinihappojen kasvava käyttö biolääketieteellisissä sovelluksissa on lisännyt tarvetta valmistaa kemiallisesti modifioituja DNA- ja RNA-analogeja, joilla on luonnollisia nukleiinihappoja paremmat biologiset ominaisuudet. Kemiallisen modifioinnin kohteena voivat olla yksittäisten nukleotidien emäs-, sokeri- tai fosfaattiosat. Myös useamman rakenneosan modifikaatiot ovat mahdollisia. Tällaisten modifioitujen nukleiinihappojen eli ksenonukleiinihappojen (XNA) toivottuna ominaisuutena on luonnollisille nukleiinihapoille ominainen hybridisoituminen. Modifioitujen nukleiinihappojen rakenteet, kuten rungon syklistyys ja varauksellisuus vaikuttavat siihen, pystyvätkö XNA:t hybridisoitumaan joko itsensä tai luonnollisten nukleiinihappojen kanssa ja siten muodostamaan erilaisia sekundaarirakenteita.

1,3-oksatsinaanit ja -oksatsolidiinit ovat tyydyttyneitä happea ja tyypeä sisältäviä viisi- ja kuusirenkaisia heterosykkejä, joita voidaan hyödyntää muun muassa orgaanisissa synteeseissä välituotteina. Tässä työssä niitä käytettiin XNA-oligonukleotidien runkorakenteina. 1,3-oksatsinaanit ja -oksatsolidiinit muodostuvat aminoalkoholien ja karbonyyliyhdisteiden välisillä kondensaatioreaktioilla ja hydrolysoituvat nopeasti vesiliuoksessa sekä lievästi happamissa olosuhteissa.

Tämän Pro Gradu -tutkielman alkuperäisenä tavoitteena oli tutkia *N*-metoksi-1,3-oksatsinaaninukleiinihapon (MOANA) ristiinpariutumista DNA:n ja RNA:n kanssa. Työn alussa valmistettiin modifioitu oligonukleotidi MOANA-fosforamidiittia käyttäen, mutta massaspektrometrian perusteella fosforamidiitin synteesissä suojaryhmänä käytetty 4-bentsoyylioksibentsaldehydi osoittautui liian pysymättömäksi. Tämän vuoksi fosforamidiitti päätettiin valmistaa uudelleen käyttäen tällä kertaa suojaryhmänä pysyvämpää 4-nitrobentsaldehydiä.

Uuden fosforamidiitin synteesissä muodostui lopputuotteena oletetun kuusirenkaisen 1,3-oksatsinaanin sijaan viisirenkainen oksatsolidiini. Valmistettu *N*-metoksioksatsolidiiniglykolinukleotidi liitettiin onnistuneesti osaksi viittä eri DNA-hiusneulaoligonukleotidia siten, että sen vastinpareina olivat vuorotellen nukleosidit A, C, G, T ja pelkkä sokeri S. 4-nitrobentsaldehydin todettiin olevan pysyvämpi suojaryhmä kuin 4-bentsoyylioksibentsaldehydi ja sen täydelliseen irtoamiseen oligonukleotideista vaadittiin erillinen happokäsittely. Syntetisoiduista *N*-metoksioksatsolidiiniglykolinukleiinihappo (MOGNA) -oligonukleotideista mitattiin sulamislämpötilat, joiden perusteella oligonukleotidit olivat kaksoiskierteisessä muodossa huoneenlämpötilassa ja pH:ssa 5,5. Lisäksi niiden sitoutumista kolmen eri mallialdehydin kanssa tutkittiin. Parhaiten MOGNA-oligonukleotidit sitoutuivat urasiilin rakennetta muistuttavan aldehydijohdannaisen kanssa.

Avainsanat:

”Base filling” -menetelmä, hybridisaatio, ksenonukleiinihapot, 1,3-oksatsinaanit, 1,3-oksatsolidiinit

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
1.1. Ksenonukleiinihapot	1
1.1.1. Hybridisaatio	1
1.1.2. Vaikutus sekundaarirakenteisiin.....	2
1.1.3. Entsymaattinen ja ei-entsymaattinen polymerisaatio.....	5
1.1.4. ”Base filling” -menetelmä.....	7
1.2. 1,3-oksatsinaanit ja -oksatsolidiinit.....	9
1.2.1. Muodostuminen ja hydrolyysi	10
1.2.2. Ligaatiomekanismi.....	11
1.2.3. 5- Ja 6-jäsenisten renkaiden muodostumisen kinetiikkaan ja tasapainoon vaikuttavat tekijät.....	11
1.3. Tutkimusprojektin tarkoitus	13
2. Tulokset ja niiden tarkastelu	14
2.1. MOANA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit.....	14
2.2. Fosforamidiitin synteesi.....	16
2.3. MOGNA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit.....	17
2.4. Sulamislämpötilamittaukset	23
2.5. Tasapainomittaukset.....	24
3. Materiaalit ja menetelmät.....	25
3.1. Yleiset menetelmät.....	25
3.2. MOANA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit.....	26
3.3. 4-nitrobentsaldehydisuojatun (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolifosforamidiittirakenneyksikön synteesi	26
3.3.1. 1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etaani-1,2-dioli (2).....	26
3.3.2. 2-bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etanoli (3).....	27

3.3.3. 2-(bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidi-nyyli)etyyli-(2-syanoetyyli)-di-isopropyylifosforamidiitti (4)	27
3.4. MOGNA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit.....	28
3.5. Sulamislämpötilamittaukset	29
3.6. Tasapainomittaukset	30
4. Johtopäätökset ja yhteenveto	30
5. Viitteet	32
6. Liitteet	36

Lyhenneluettelo

DNA	Deoksiribonukleiinihappo
RNA	Ribonukleiinihappo
XNA	Ksenonukleiinihappo (engl. xeno nucleic acid)
TNA	Treosinukleiinihappo (engl. threose nucleic acid)
HNA	Heksitolinukleiinihappo (engl. hexitol nucleic acid)
CeNA	Syklohekseninukleiinihappo (engl. cyclohexene nucleic acid)
LNA	Lukittu nukleiinihappo (engl. locked nucleic acid)
tcd	Trisyklo-DNA (engl. tricyclo-DNA)
FNA	Joustava nukleiinihappo (engl. flexible nucleic acid)
GNA	Glykolinukleiinihappo (engl. glycol nucleic acid)
PNA	Peptidinukleiinihappo
PMO	Fosforodiamidaatti-morfoliino-oligonukleotidi (engl. phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide)
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (engl. Food and Drug Administration)
PAA	Polymeraasiaktiivisuuden määrittäminen (engl. polymerase activity assay)
CSR	Lokeroitu itsekopiointi (engl. compartmentalized self-replication)
sp-CSR	Lyhytpaikkainen CSR (engl. short-patch CSR)
CST	Lokeroitu itsemerkintä (engl. compartmentalized self-tagging)
DrOPS	Mikrofluidinen kaksoisemulsiopisarapohjainen optinen polymeraasinlajittelumenetelmä (engl. microfluidic double emulsion droplet-based optical polymerase sorting method)
MOANA	<i>N</i> -metoksi-1,3-oksatsinaaninukleiinihappo
MOGNA	<i>N</i> -metoksioksatsolidiiniglykolinukleiinihappo
TBDMS	<i>tert</i> -Butyylidimetyylisilyyli
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografia
DMTr	4,4'-dimetoksitriityyli
TLC	Ohutkerroskromatografia (engl. thin-layer chromatography)
ACN	Asetonitriili
TEAA	Trietyyliammoniumasetatti

1. Johdanto

1.1. Ksenonukleiinihapot

Deoksiribonukleiinihappo (DNA) ja ribonukleiinihappo (RNA) ovat luonnollisia nukleiinihappoja, jotka tallentavat, levittävät ja ilmentävät geneettistä informaatiota.¹ Ne koostuvat fosfodiesterisidoksilla toisiinsa liittyneistä sokerifosfaattiosista sekä viidestä nukleoemäksestä; adeniinista (A), guaniinista (G), sytosiinistä (S), tymiinistä (T) ja urasiilista (U).^{2,3} DNA:lla ja RNA:lla on useita ominaisuuksia, joiden ansiosta niitä voidaan hyödyntää muun muassa diagnostiikassa ja lääkeaineina. Näitä ovat esimerkiksi niille ominainen emäspariutumisen, hyvä vesiliukoisuus sekä denaturoitumis- ja uudelleenlaskostumiskyky ennustettavien ja ohjelmoitavien vuorovaikutusten kautta. Eduistaan huolimatta luonnollisilla nukleiinihapoilla on huono kemiallinen ja biologinen pysyvyys sekä kapea kemiallinen monimuotoisuus, mitkä rajoittavat niiden käyttöä lääkkeinä. Näiden ongelmien ratkaisemiseksi sekä uusien ominaisuuksien saavuttamiseksi on kehitetty runkorakenteiltaan erilaisia DNA- ja RNA-analogeja. Tällaisia kemiallisesti modifioituja luonnollisten nukleiinihappojen analogeja kutsutaan ksenonukleiinihapoiksi (XNA).^{4,5}

DNA:n ja RNA:n tapaan XNA:t ovat sekvenssispesifisiä polymeerejä, jotka voivat tallentaa ja levittää geneettistä informaatiota.^{6,7} Niissä esiintyvät modifikaatiot voivat olla joko yksittäisiä nukleotidien emäs-, sokeri- tai fosfaattiosien modifikaatioita tai ne voivat olla näiden yhdistelmiä. Nukleoemästen modifioinnilla voidaan säädellä muodostuvien emäsparien lujutta ja spesifisyyttä, kun taas fosfodiesterirungon modifikaatioilla voidaan parantaa yhdisteen farmakokineettisiä ominaisuuksia sekä nukleaasiresistenssiä. Myös sokeriosien modifikaatioilla on edullisia vaikutuksia nukleaasiresistenssiin ja lisäksi ne säätelevät sekundaarirakenteiden muodostumista sekä yhdisteen toksisuutta. Uudenlaisten rakenteiden ja parantuneiden ominaisuuksiensa ansiosta XNA:illa on mahdollisuus laajentaa nukleiinihappojen käyttöä erilaisissa biolääketieteellisissä sovelluksissa.^{4,5,8}

1.1.1. Hybridisaatio

Luonnollisille nukleiinihapoille on tyypillistä hybridisoituminen eli pariutumisen komplementaaristen DNA- ja RNA-sekvenssien kanssa vetysidosten välityksellä. Hybridisaation seurauksena muodostuu kaksoiskierteisiä rakenteita, jotka voivat olla DNA/DNA-, DNA/RNA- tai RNA/RNA-rakenteisia.² Kun kaksoiskierre muodostuu vain yhden tyyppisestä molekyylistä (esim. DNA/DNA), on kyseessä homodupleksi ja kun se muodostuu kahdesta eri tyyppisestä molekyylistä

(esim. DNA/RNA), on kyseessä puolestaan heterodupleksi. Näiden perinteisten kaksoiskierteisten rakenteiden lisäksi nukleiinihapot voivat muodostaa muun muassa hiusneulasilmukoita, rakenteen sisäisiä silmukoita sekä G-kvadruplekseja.⁷

Hybridisaatio mahdollistaa useita elämälle tärkeitä tapahtumia, kuten DNA:n replikaation, transkription RNA:ksi ja translaation peptideiksi, minkä takia se on toivottu ominaisuus myös synteettisesti valmistetuilla nukleiinihappojen analogeilla. Rakenteista riippuen XNA-molekyylit tunnistavat luonnolliset nukleiinihapot ja voivat siten hybridisoitua joko keskenään tai DNA:n tai RNA:n kanssa. Kahdesta XNA-juosteesta muodostuvat homodupleksit ovat yleensä pysyvämpiä kuin heterodupleksit, joissa XNA-juostetta vastassa on joko DNA- tai RNA-juoste.⁹ Muodostuvien kaksoiskierteiden lopulliseen koostumukseen ja pysyvyyteen vaikuttavat kuitenkin XNA-runkojen rakenteet.¹⁰⁻¹²

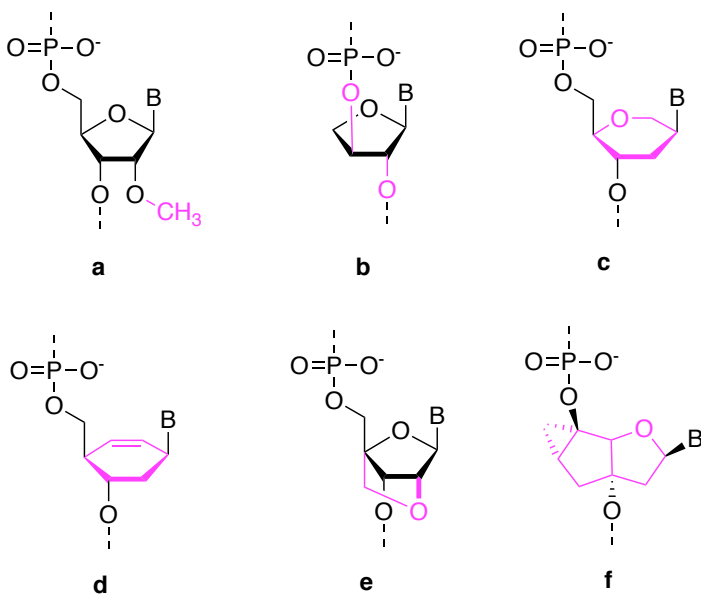
1.1.2. Vaikutus sekundaarirakenteisiin

Sykliset XNA:t ovat DNA:sta ja RNA:sta johdettuja yhdisteitä, joissa deoksiriboosiin tai riboosiin on yleensä tehty vain pieniä, rengasrakenteen säilyttäviä modifikaatioita. Kuvassa 1 on esitetty syklisten XNA:jen rakenteita. Pienillä modifikaatioilla voidaan parantaa XNA:jen ominaisuuksia ja samalla säilyttää niiden rakenteellinen samankaltaisuus luonnollisten nukleiinihappojen kanssa. Tällaiset XNA:t muodostavat pysyviä kaksoiskierteisiä rakenteita sekä itsensä että DNA:n ja RNA:n kanssa. Esimerkiksi riboosin 2'-hydroksyyliiryhmän metylaatio saa aikaan nukleasiresistenssin ja lisäksi se parantaa yhdisteen ristiinpariutumista erityisesti komplementaarisen RNA:n kanssa tehden siitä potentiaalisen RNA-lääkkeen.¹³ Treosinukleiinihappo (engl. threose nucleic acid, lyh. TNA) on puolestaan esimerkki sellaisesta viisirenkaan sisältävästä XNA-rakenteesta, johon on tehty useampia modifikaatioita, mutta joka siitä huolimatta pystyy muodostamaan pysyviä homo- ja heteroduplekseja.¹⁴ Toisin kuin luonnollisissa nukleiinihapoissa TNA:ssa fosfaatit ovat liittyneenä happeen sokerirenkaan 3'- ja 2'-asemissa eikä se sisällä metyleenisiltaa sokerirenkaan ja fosfaattiryhmän hapen välillä. TNA/TNA-dupleksin rakenne muistuttaa A-muotoista DNA:ta tai RNA:ta. Erona on se, että TNA/TNA-kaksoiskierteessä fosforiatomien välinen etäisyys on hieman lyhyempi. Kaksoiskierteiden lisäksi TNA muodostaa myös G-kvadruplekseja.^{3,15}

Myös kuusijäsenisen sokeriosan sisältävät XNA-rakenteet muodostavat pysyviä homo- ja heteroduplekseja itsensä ja DNA:n ja RNA:n kanssa. Muun muassa heksitolinukleiinihappo (engl. hexitol nucleic acid, lyh. HNA) ja syklohekseeninukleiinihappo (engl. cyclohexene nucleic acid, lyh. CeNA) ovat tällaisia XNA:ja. HNA:ssa C4':n ja C1':n väliin on lisätty ylimääräinen hiili ja nukleoemäs on liittyneenä C2'-asemaan. HNA:a sisältävät kaksoiskierteet ovat pysyvämpiä kuin

pelkkien luonnollisten nukleinihappojen muodostamat dupleksit (DNA/DNA, RNA/RNA, DNA/RNA) ja lisäksi HNA/HNA- sekä HNA/RNA-rakenteet muodostavat A-muotoisia kierteitä.^{15,16} Myös CeNA, jossa nukleinihapon sokeriosa on korvattu nimensä mukaisesti syklohekseeniryhmällä, ristiinpariutuu pysyvästi sekä itsensä että DNA:n ja RNA:n kanssa.^{3,17}

Syklisten XNA:jen kykyyn muodostaa pysyviä kaksoiskierrerakenteita vaikuttavat niiden jäykät ja konformaationaalisesti rajoittuneet rakenteet, joiden ansiosta ne voivat esijärjestäytyä kaksoiskierteisiä duplekseja muistuttaviin rakenteisiin ja vähentää siten lopullisten kompleksien muodostumisen entropiakustannuksia.^{10,18} Vähäiset entropiakustannukset lisäävät muodostuvien kompleksien pysyvyyksiä. Tämä ominaisuus huomataan erityisesti lukitulla nukleinihapolla (engl. locked nucleic acid, lyh. LNA) sekä trisyklo-DNA:lla (engl. tricyclo-DNA, lyh. tcd), jotka ovat erittäin jäykkärakenteisia XNA:ja. LNA:lla on C3'-endo-muotoon lukittu rakenne, joka on saatu aikaan yhdistämällä 2'-happi 4'-hiileen metyleeniryhmällä. LNA muodostaa pysyviä homodupleksi-rakenteita ja ristiinpariutuu korkealla affiniteetilla myös DNA:n ja etenkin RNA:n kanssa. Tcd:ssa furanoosirengas on silloitettu C3' ja C5' eteenilinkkerillä ja lisäksi C5'- ja C6'-asemat on yhdistetty syklopropyyliyksiköllä, joka stabiloi karbosyklisen viisijäsenen renkaan haluttuun kierteiseen asentoon. Tcd on jäykin XNA-rakenne, joten se sitoutuu erittäin voimakkaasti komplementaarisiiin tcd-oligomeereihin sekä DNA:han ja RNA:han. LNA:n ja tcd:n korkeat affiniteetit erityisesti RNA:han tekevät niistä potentiaalisia nukleinihapolääkkeitä.^{12,15}

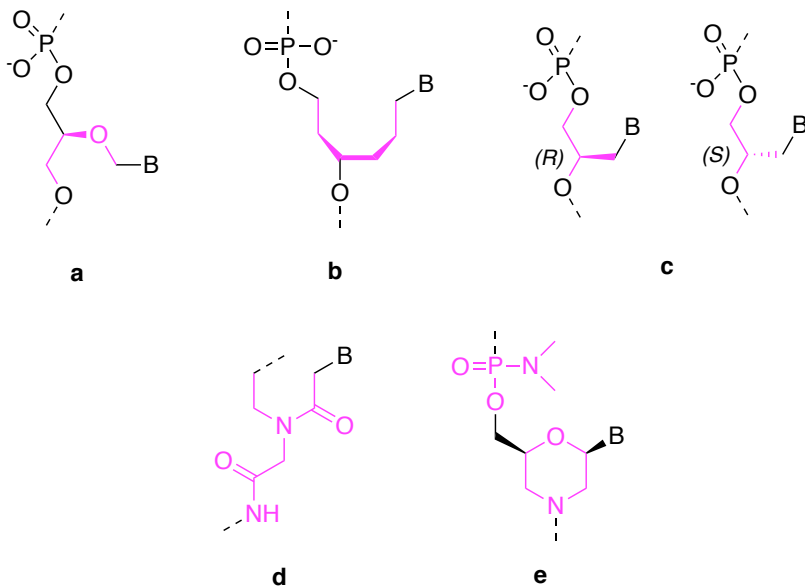


Kuva 1. Syklisiä XNA:ja: a) 2'OMe RNA; b) TNA; c) HNA; d) CeNA; e) LNA ja f) trisyklo-DNA.

Toisin kuin syklisillä XNA-rakenteilla, ei-syklisillä XNA:illa on lineaariset ja joustavat rungot. Tällaiset joustavat runkorakenteet aiheuttavat korkeat entropiakustannukset, jotka eivät ole edullisia

kaksoiskierteiden muodostuksessa. Joustavien nukleiinihappojen (engl. flexible nucleic acid, FNA) tapauksessa, joista C2'-atomi on poistettu deoksiriboosista, tämä pitääkin paikkansa, koska ne eivät hybridisoidu itsensä eivätkä DNA:n kanssa. Samalla tavoin ei-syklinen dihydroksipentyylinukleiinihappo (engl. dihydroxypentyl nucleic acid), josta on poistettu O4' ei muodosta duplekseja itsensä eikä DNA:n kanssa. Ei-syklisistä ja negatiivisesti varautuneen fosfodiesterirungon sisältävistä XNA-rakenteista glykolinukleiinihappo (engl. glycol nucleic acid, lyh. GNA) on ensimmäinen, jonka tiedetään muodostavan pysyvä GNA/GNA-kaksoiskierre. GNA on syklisestä TNA:sta johdettu rakenne, jossa sokeriosan tilalla on propyleeniglykoli. Pysyvän homodupleksin muodostaminen on mahdollista, koska GNA kykenee esijärjestäytymään yksijuosteiseen kierteiseen tilaan, mikä alentaa kaksoiskierteen muodostukseen tarvittavia entropiakustannuksia.^{10,12}

Jäykkyyden lisäksi myös rungon varauksella on vaikutusta XNA:jen hybridisaatioon. Esimerkiksi peptidinukleiinihappo (engl. peptide nucleic acid, PNA) ja fosforodiamidaattimorfoliino-oligonukleotidi (engl. phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide, PMO) ovat varauksettomia XNA-yhdisteitä, jotka molemmat muodostavat pysyviä homo- ja heteroduplekseja DNA:n ja RNA:n kanssa. PNA:ssa negatiivisesti varautunut fosfaattirunko on korvattu varauksettomalla peptidirungolla, mikä tekee sen rakenteesta ei-syklisen ja osittain joustavan. Vaikka joustavilla XNA:illa on yleensä jäykkiä XNA:ja korkeammat entropiakustannukset eivätkä ne sen takia kykene muodostamaan pysyviä dupleksirakenteita, niin PNA:n tapauksessa joustavan rungon aiheuttamat entropiakustannukset kuitenkin tasapainottuvat PNA-rungon neutraalilla varauksella, jolloin kaksoiskierteen muodostuksessa ei tapahdu varauksen hylkimistä ja kaksoiskierre pääsee muodostumaan. Varauksettomuuden vuoksi muodostuvat PNA/DNA-dupleksit ovat jopa pysyvämpiä kuin niiden DNA/DNA-vastineet. PMO:ssa varaukseton fosforodiamidaattiryhmä on kiinnittynyt kuusijäseniseen morfoliinirenkaaseen. PMO:lla on korkeampi affiniteetti RNA:n kuin DNA:n kanssa, minkä takia sillä on potentiaalia antisense-oligonukleotidilääkkeiden runkorakenteena. Tällä hetkellä Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (FDA) onkin hyväksynyt neljä PMO:iin perustuvaa nukleiinihappolääkettä (eteplirsien, golodirsien, viltolarsen ja casimersen) käytettäväksi Duschennen lihasdystrofian hoitoon.¹⁹ Ei-syklisen XNA:jen sekä varauksettoman runkorakenteen sisältävien XNA:jen rakenteita on esitetty kuvassa 2.^{10,12,20}



Kuva 2. Ei-syklisiä XNA:ja ja varauksettoman rungon sisältäviä XNA:ja: a) FNA; b) DihydroksipentyyliINA; c) (*R*)- ja (*S*)-GNA; d) PNA ja e) PMO.

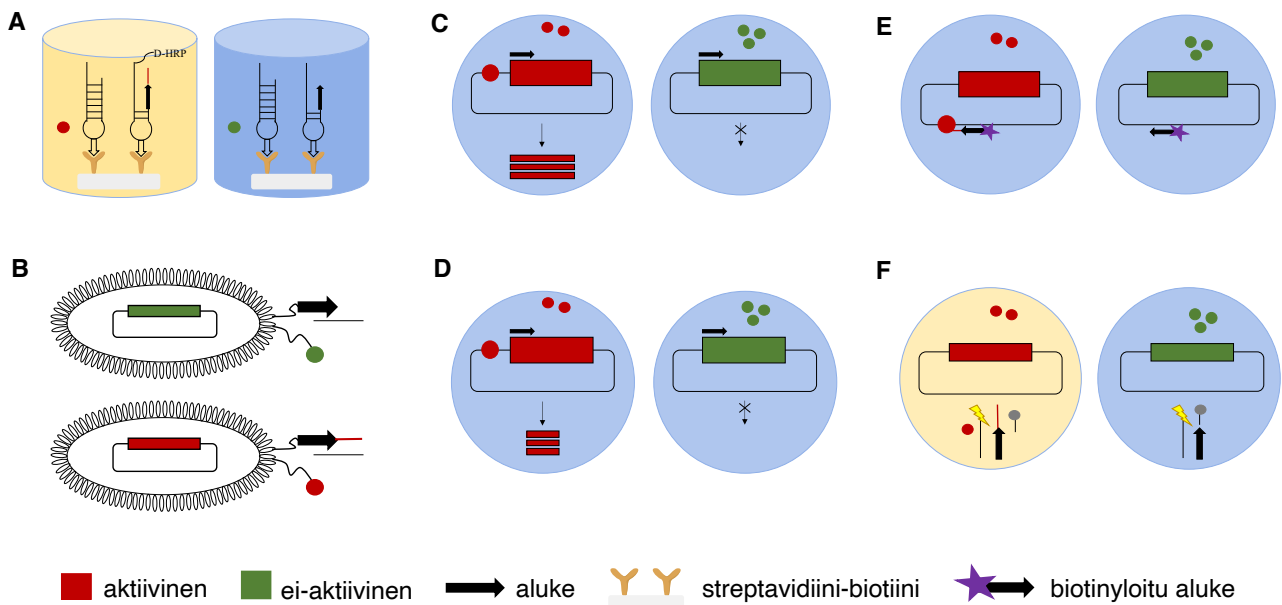
1.1.3. Entsymaattinen ja ei-entsymaattinen polymerisaatio

XNA:jen valmistuksessa yleisesti käytetty menetelmä on automatisoitu kiinteän kantajan synteesi, joka perustuu fosforamidiittimonomeerien käyttöön.²¹ Vaikka kiinteäfaasisynteesi on tehokas ja tarkka menetelmä, se soveltuu pääasiassa vain pienen mittakaavan nukleiinihapposynteesiin. Lisäksi joidenkin XNA:jen sisältämät funktionaaliset ryhmät ovat liian herkkiä kyseiselle menetelmälle ilman erityistä suojausta. Tällaisia funktionaalisia ryhmiä ovat kaikki herkästi hapettuvat ja nukleofiilien kanssa reagoivat ryhmät.²² XNA:jen kasvava käyttö bioteknologiassa sekä lääkeaineina on lisännyt tarvetta kehittää uusia, tehokkaita synteesimenetelmiä niiden korkealaatuiseen suuren mittakaavan valmistukseen.²³

Modifioitujen nukleiinihappojen entsymaattinen ja ei-entsymaattinen polymerisaatio ovat vaihtoehtoisia menetelmiä kiinteän kantajan synteesille. Nämä menetelmät mahdollistavat myös XNA-aptameerien ja -DNA-Atsyymien kehittämisen SELEX-menetelmällä.²⁴ Entsymaattisessa polymerisaatiossa kemiallisesti muokatut XNA:t toimivat substraatteina XNA-ketjujen muodostumista katalysoiville luonnollisille tai modifioituille polymeraasientsyymeille, kun taas ei-entsymaattisessa polymerisaatiossa XNA-ketjujen synteesi tapahtuu ilman entsyymejä.²⁵

Nukleiinihappojen ei-entsymaattisessa polymerisaatiossa nukleotidit järjestäytyvät itse templaatin päälle emäsparivuorovaikutusten kautta ja polymerisoituvat, jolloin templaatin emäsjärjestys kopioituu käänteisenä muodostuvalle polymeerille. Tätä samaa menetelmää on laajennettu käytettäväksi eri XNA-kemioille ja tähän mennessä XNA-monomeereja onkin liitetty

onnistuneesti toisiinsa muun muassa pelkistävällä aminoinnilla, kuparikatalysoidulla napsautusligaatiolla sekä fosforamidiitligaatiolla.⁴ Nukleinihappojen entsyymaattisessa synteesissä entsyymit katalysoivat polymeerien muodostumista. Myös tätä menetelmää on onnistuttu hyödyntämään joidenkin XNA:jen, kuten TNA:n²⁶ synteesissä, mutta sen laajempaa käyttöä rajoittaa kuitenkin XNA-rakenteiden tunnistamiseen ja käsittelemiseen kykenevien luonnollisten polymeeraasien vähäisyys. Entsyymaattisten synteesimenetelmien kannalta onkin tärkeää luoda uusia XNA:ja tunnistavia polymeeraaseja.^{3,7,23,24,27}



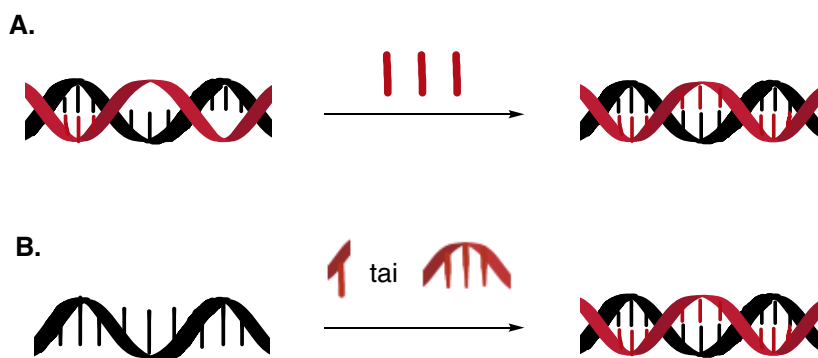
Kuva 3. XNA-polymeraasien kehittämiseen laadittuja valinta- ja seulontamenetelmiä: A) PAA; B) faaginäyttö; C) CSR; D) sp-CSR; E) CST ja F) DrOPS. Fluoresenssi merkattu keltaisella. D-HRP = digoksigeenilla leimattu oligonukleotidi ja HRP-entsyymillä konjugoitu vasta-aine. (Mukailtu lähteistä^{27,28})

Sopivien XNA-polymeraasien kehittämiseksi on laadittu useita valinta- ja seulontamenetelmiä. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi kuvassa 3 esitetyt polymeeraasiaktiivisuuden määrittäminen (engl. polymerase activity assay, lyh. PAA) ja faaginäyttö (engl. phage display) sekä liuoksessa tapahtuvaan polymeeraasien ohjattuun evoluutioon perustuvat lokeroitu itsekopiointi (engl. compartmentalized self-replication, lyh. CSR), lyhytpaikkainen CSR (engl. short-patch CSR, lyh. sp-CSR), lokeroitu itsemerkintä (engl. compartmentalized self-tagging, lyh. CST) ja mikrofluidinen kaksoisemulsiopisarapohjainen optinen polymeeraasinlajittelumenetelmä (engl. microfluidic double emulsion droplet-based optical polymerase sorting method, lyh. DrOPS).^{3,27,28} Näitä

polymeraasivalinta- ja seulontamenetelmiä hyödyntämällä on löydetty useille XNA:ille, mukaan lukien HNA:lle, CeNA:lle ja LNA:lle sopivia polymeraaseja.⁷

Vaikka entsyymattainen polymerisaatio vaatii sopivien XNA-polymeraasien kehittämistä, on se nopeampi ja tarkempi menetelmä XNA:jen valmistamiseen kuin ei-entsyymattainen templaattiohjattu polymerisaatio.²³ Kuitenkin ei-entsyymattaisen polymerisaation riippumattomuus entsyymeistä on kasvattanut kiinnostusta kehittää juuri entsyymivapaita synteesi- ja lugaatiomenetelmiä.

1.1.4. ”Base filling” -menetelmä

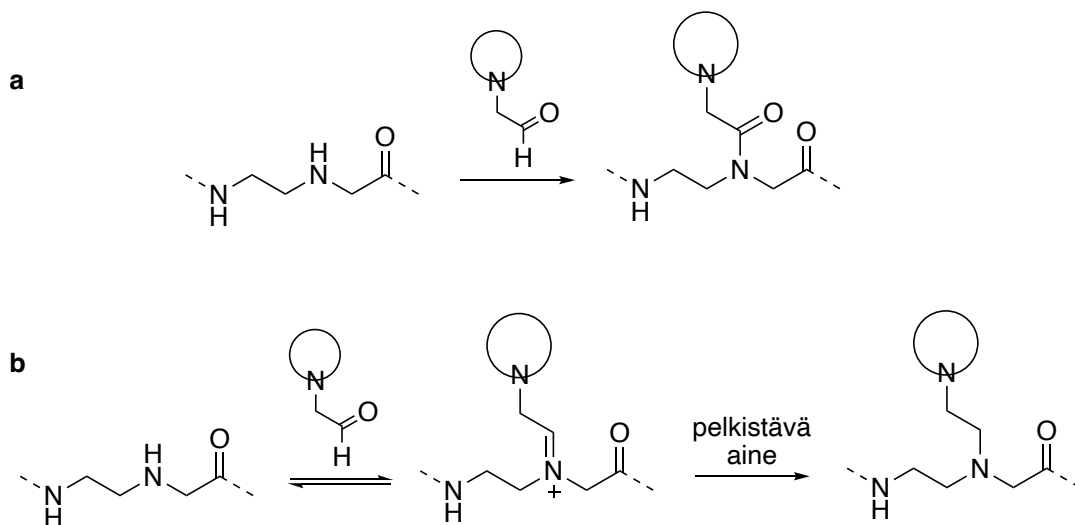


Kaavio 1. Nukleiinihapposynteesi A) ”base filling” -menetelmällä ja B) ei-entsyymattisella synteesillä. (Mukailtu lähteestä²⁹)

”Base filling” tarkoittaa menetelmää, jossa yksittäisiä nukleoemäksiä liitetään emäksettömään nukleiinihapporunkoon (kaavio 1A). Kyseessä on vaihtoehtoinen menetelmä nukleiinihappojen ei-entsyymattiselle synteesille (kaavio 1B). Näistä menetelmistä ”base filling”:llä on parempi sekvenssispesifisyys ja lisäksi sillä muodostuu vähemmän turhia ei-templaoituja reaktiotuotteita.²⁹

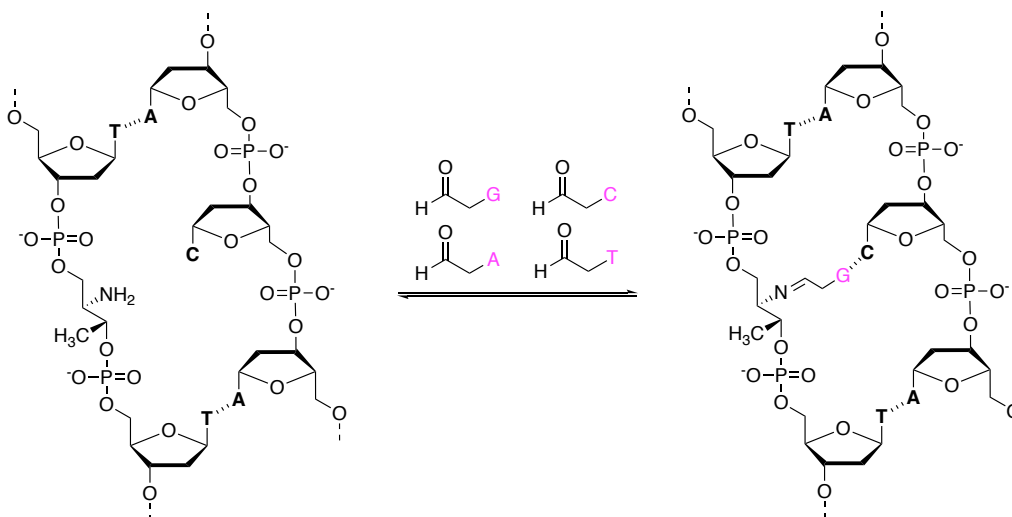
Heemstra ja Liu²⁹ esittelivät ”base filling” -menetelmän ensimmäisen kerran vuonna 2009 PNA-rungolle. Tutkimuksissaan he onnistuivat lisäämään nukleoemästen seoksesta yksittäisen emäksen PNA-juosteeseen sekä amiinin asylointiin että pelkistävään aminaatioon perustuvalla ”base filling”:llä (kaavio 2). Emäksen lisäystä ohjasivat Watson-Crick-emäspariutumisen sekä emästen pinoutumisvuorovaikutukset ja pelkistävällä aminaatiolla saatiin parempi saanto ja selektiivisyys

kuin amiinin asyloinnilla. Emäksen liittämisen PNA-juosteen keskelle todettiin myös olevan tehokkaampaa kuin sen liittämisen juosteen päähän.



Kaavio 2. ”Base filling” a) amiinin asyloinnilla ja b) pelkistävällä aminaatiolla. (Mukailtu lähteestä²⁹)

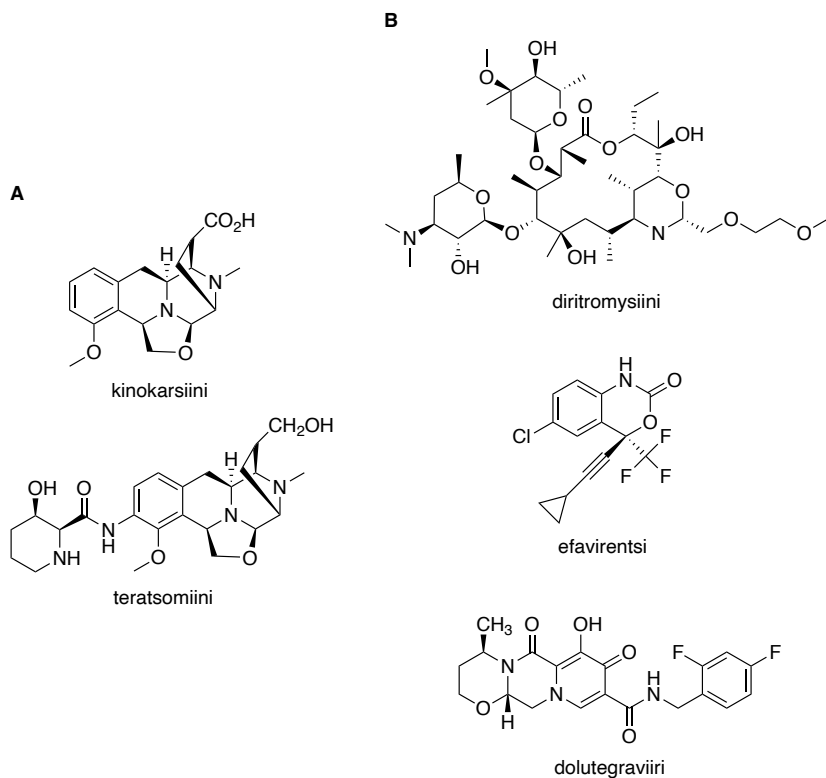
Myös Kanlidere *et al.*³⁰ (2016) hyödynsivät tutkimuksissaan imiinin muodostukseen perustuvaa ”base filling” -menetelmää. He lisäsivät muokattuja nukleoemäksiä onnistuneesti 2-aminobutaani-1,3-diolilla modifioituun DNA-rakenteeseen (kaavio 3), mutta rungon joustavuudesta johtuen saavutettu selektiivisyys oli kuitenkin heikompaa verrattuna PNA:n ”base filling”:llä saatuihin tuloksiin. Jo näiden tutkimusten perusteella ”base filling”:n voidaan todeta olevan tärkeä menetelmä tulevaisuudessa lääketieteellisten sovellusten kannalta, sillä se antaa mahdollisuuden valmistaa nukleiinihappoja, joilla on tarkasti määritellyt emäsekvenssit.



Kaavio 3. Muokattujen nukleoemästen lisäys 2-aminobutaani-1,3-diolilla modifioituun DNA-rakenteeseen imiinin muodostukseen perustuvalla ”base filling”:llä. (Mukailtu lähteestä³⁰)

1.2. 1,3-oksatsinaanit ja -oksatsolidiinit

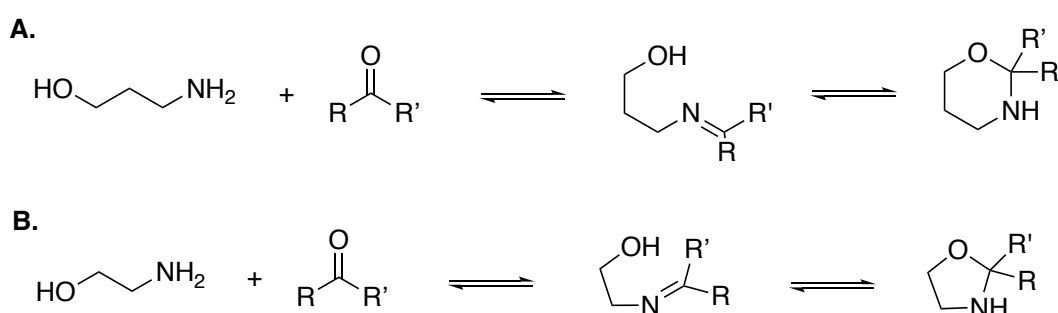
1,3-oksatsinaanit ovat tyydyttyneitä typpi- ja happiatomin sisältäviä kuusirenkaisia heterosykkejä, joissa heteroatomit sijaitsevat toisiinsa nähden 1,3-asemissa. 1,3-Oksatsolidiinit ovat puolestaan 1,3-oksatsinaaneja vastaavia viisijäsenisiä rengasrakenteita.³¹ Tällaiset tyydyttyneet heterosykliset rakenteet voivat olla substituoituina kiraalisia³² ja ne sisältävät useita muunneltavissa olevia kohtia, minkä vuoksi niillä on laaja rakenteellinen monimuotoisuus ja ne soveltuvat hyvin sekä synteettiseen että farmakologiseen käyttöön.³³ Orgaanisissa synteeseissä 1,3-oksatsinaaneja ja -oksatsolidiineja hyödynnetään välituotteina sekä kiraalisina apuaineina.^{34,35} Monilla luonnosta löydettyillä sekä synteettisesti valmistetuilla 1,3-oksatsinaani- tai -oksatsolidiinirenkaan sisältävillä yhdisteillä on huomattu olevan farmakologisia vaikutuksia. Muun muassa kinokarsiini (engl. quinocarcin) ja sen johdannainen teratsomiini (engl. terazomine) ovat oksatsolidiinirenkaan sisältäviä alkaloideja (kuva 4A), jotka estävät kasvainten kasvua, kun taas diritromysiini (engl. dirithromycin), efavirensi (engl. efavirenz) ja dolutegraviiri (engl. dolutegravir) ovat FDA:n käyttöön hyväksymiä 1,3-oksatsinaanin sisältämiä lääkeaineita (kuva 4B), joista ensimmäisellä on antibakteerisia ja kahdella jälkimmäisellä on antiviraalisia ominaisuuksia.^{36–38} Biologisten aktiivisuuksiensa vuoksi kiinnostus 1,3-oksatsinaani- ja oksatsolidiinijohdannaisten valmistukseen laboratorio-olosuhteissa on lisääntynyt viime vuosien aikana.³⁹



Kuva 4. A) Oksatsolidiinin ja B) 1,3-oksatsinaanin sisältävien farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden rakenteet.

1.2.1. Muodostuminen ja hydrolyysi

1,3-oksatsinaaneja ja -oksatsolidiineja muodostuu yksinkertaisilla kondensaatioreaktioilla, kun aminoalkoholit reagoivat aldehydien tai ketonien kanssa (kaavio 4).^{31,39} Reaktioissa nukleofiilinen tyyppi hyökkää karbonyylihiileen, jolloin muodostuu imiiniväliaine. Tämän jälkeen hydroksyyli-ryhmä hyökkää imiinihiileen muodostaen rengasrakenteen. 1,3-oksatsinaaneille ja -oksatsolidiineille on ominaista nopea hydrolysoituminen vesiliuoksessa ja lievästi happamissa olosuhteissa.⁴⁰

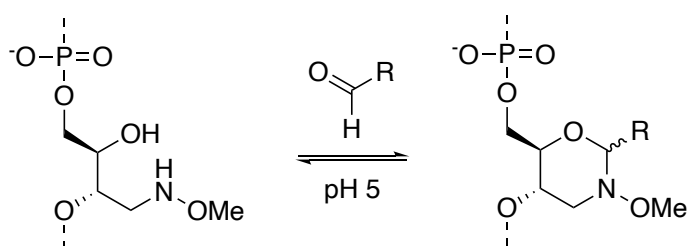


Kaavio 4. 1,3-oksatsinaanin (A) ja oksatsolidiinin (B) muodostuminen.

Tutkimusryhmässämme on aikaisemmin valmistettu *N*-metoksi-substituoituja 1,3-oksatsinaaneja aromaattisten aldehydien ja (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin välisillä kondensaatioilla. Reaktioissa muodostui sivutuotteena myös viisirenkaista *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykolituotetta. *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin ja *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykolin muodostumisreaktioiden raportoitiin olevan palautuvia lievästi happamissa olosuhteissa (pH = 5,0) ja puolestaan lähes palautumattomia neutraalissa ja emäksisessä pH:ssa. Näiden ominaisuuksien ansiosta 1,3-oksatsinaanien sekä -oksatsolidiinien muodostuminen ovat potentiaalisia reaktioita käytettäväksi ”base filling” -menetelmässä. Tutkimusten perusteella *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin sekä *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykolin hydrolyysireaktiot noudattivat ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa. Hydrolyysiä helpottivat aromaattisessa aldehydissä olevat elektroneja luovuttavat substituentit ja hidastivat puolestaan aromaattisessa aldehydissä olevat elektroneja vastaanottavat substituentit.^{41,42}

1.2.2. Ligaatiomekanismi

Palautuva reaktio olosuhteissa, joissa Watson-Crick-emäspariutumissäännöt pätevät, on mahdollistanut 1,3-oksatsinaanien ja -oksatsolidiinien käytön oligonukleotidisynteesin jälkeisessä templatoidussa ligaatioissa.⁴³ Tutkimusryhmämme sai aikaan *N*-metoksi-1,3-oksatsinaaninukleiinihapon (lyh. MOANA), kun nukleiinihapporunkona toimivaan (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioliin kytkettiin emäksen paikalle substituoitu aromaattinen aldehydi 1,3-oksatsinaanin muodostuksen kautta. Ligaatio tapahtui (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioliin ja O2':n välillä kaavion 5 mukaisesti.⁴¹

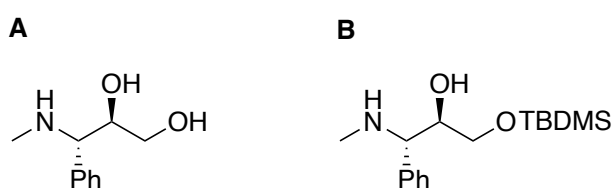


Kaavio 5. Aldehydin ligaatio (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioliin 1,3-oksatsinaanin muodostuksen kautta ja MOANA:n muodostuminen. (Mukailtu lähteestä⁴¹)

1.2.3. 5- Ja 6-jäsenisten renkaiden muodostumisen kinetiikkaan ja tasapainoon vaikuttavat tekijät

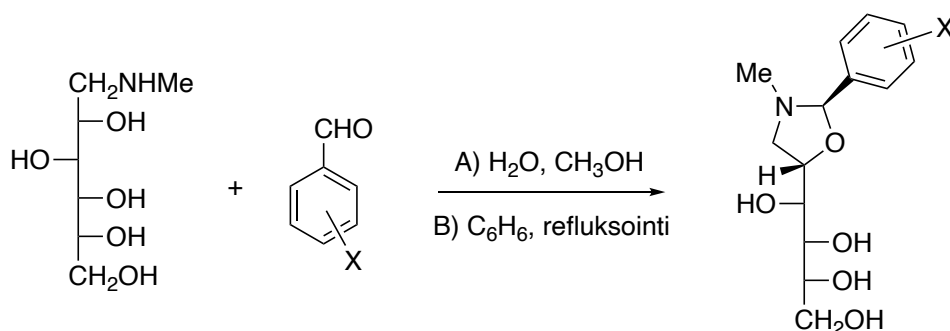
Reaktio-olosuhteet vaikuttavat siihen, syntyykö renkaanmuodostuksessa kuusirenkainen 1,3-oksatsinaani vai viisirenkainen 1,3-oksatsolidiini, mikäli molemmat ovat mahdollisia. Korepin *et al.*⁴⁴ tutkivat vuonna 2001 aminoalkoholien reaktioita karbonyyliyhdisteiden kanssa. CH-happojen (1,1-dinitroetaanin, bromidinitroetaanin ja dinitrometaanin) reaktiot formaldehydin ja aminopropanolin kanssa johtivat *N*-substituoitujen 1,3-oksatsinaanien muodostumiseen hyvällä saannolla. Vastaavat reaktiot NH-happojen (dikarboksamidien, dikarboksimidien, α -aminohappojen syklisten anhydridien ja tyypeä sisältävien heterosyklien) kanssa johtivat samankaltaisiin tuloksiin. Kun aminopropanoli vaihdettiin aminoetanoliiin, saadut tulokset olivat merkittävästi huonommat; reaktiot samojen CH- ja NH-happojen sekä formaldehydin kanssa johtivat vain kahden suhteellisen puhtaan *N*-substituoidun oksatsolidiinituotteen muodostumiseen. Tehdyssä tutkimuksessa 1,3-oksatsinaanien synteesit olivat suhteellisen nopeita (0,5 – 5,5 h), kun taas oksatsolidiinien valmistuksessa reaktioajat olivat selkeästi pidemmät (21 – 25 h).

Hamdach *et al.*⁴⁵ tutkivat 3-fenyyli-3-metyyliamino-1,2-propaanidiolin (kuva 5A) sekä sen *tert*-butyylidimetyylisilyyliryhmällä suojatun johdannaisen (kuva 5B) reaktiota dikloorimetaanin ja formaldehydin kanssa. Tulokset osoittivat, että formaldehydi reagoi aminodiolin primaarisen hydroksyyli­ryhmän kanssa, jolloin tuotteena muodostui pelkästään 1,3-oksatsinaani. Samankaltainen tulos havaittiin aminodiolin ja dikloorimetaanin välisessä reaktiossa. Monosilyloidun aminodiolin tapauksessa reaktiot formaldehydin ja dikloorimetaanin kanssa johtivat ensin oksatsolidiinin muodostumiseen ja vasta sitten 1,3-oksatsinaanin muodostumiseen, kun reaktioaikoja pidennettiin ja lämpötiloja nostettiin. Tutkimuksen perusteella 1,3-oksatsinaani muodostui päätuotteena siis silloin, kun lähtöaineen molemmat substituentit olivat hydroksyyli­ryhmiä. Kun lähtöaineen primaarinen hydroksyyli­ryhmä oli korvattu silyyliryhmällä, oli päätuotteena puolestaan oksatsolidiini.



Kuva 5. A) 3-fenyyli-3-metyyliamino-1,2-propaanidiolin ja B) *tert*-butyylidimetyylisilyylisuo­jatun 3-fenyyli-3-metyyliamino-1,2-propaanidiolin rakenteet.

Martínez *et al.*⁴⁶ tutkivat vuonna 2008 kiraalisten oksatsolidiini­johdannaisten valmistusta *N*-metyyli-_D-glukamiinista ja aromaattisista aldehydeistä. Reaktioissaan he käyttivät kahta eri menetelmää, joista ensimmäisessä *N*-metyyli-_D-glukamiinin annettiin reagoida aldehydin kanssa pienen määrän metanolia sisältävässä vedessä ja toisessa *N*-metyyli-_D-glukamiinin ja aldehydi­johdannaisen seosta refluksoitettiin bentseenissä. *N*-metyyli-_D-glukamiinin reaktio bentsaldehydin sekä 4-NO₂-, 3- ja 4-MeO-, 3-Br-, 4-Cl-, H-, 2-, 3- ja 4-Me- ja 4-Et-substituoidun bentsaldehydin kanssa johtivat molemmilla reaktiomenetelmillä *trans*-oksatsolidiinin muodostumiseen (kaavio 6). Reaktiot naftaldehydin kanssa johtivat puolestaan oksatsolidiinin molempien isomeerien (*trans* ja *cis*) muodostumiseen. Salisyylialdehydin ja kanelialdehydin reaktioissa *N*-metyyli-_D-glukamiinin kanssa muodostui sekä vedessä että bentseenissä kolme tuotetta; *trans*- ja *cis*-1,3-oksatsolidiinit sekä kuusirenkainen 1,3-oksatsinaani. Käytetyillä liuottimilla huomattiin olevan vaikutusta, kun glukamiini reagoi 4-CHO-substituoidun bentsaldehydin kanssa. Vesipitoisessa liuoksessa reaktio oli täysin stereoselektiivinen, sillä tuotteena muodostui vain *trans*-1,3-oksatsolidiini. Refluksointi bentseenissä sai puolestaan aikaan 1,3-oksatsolidiinin molemmat isomeerit sekä 1,3-oksatsinaanin.



Kaavio 6. *N*-metyyli-*D*-glukamiinin reaktio bentsaldehydin ja bentsaldehydijohdannaisten kanssa vesiliuoksessa (A) ja refluksoinnilla bentseenissä (B). Tuotteena muodostui *trans*-1,3-oksatsolidiiniituote. X on 4-NO₂, 3- tai 4-MeO, 3-Br, 4-Cl, H, 2-, 3- tai 4-Me tai 4-Et. (Mukailtu lähteestä⁴⁶)

Kamps *et al.*⁴⁷ tutkivat puolestaan formaldehydin sekä proteiinisynteesissä käytettävien aminohappojen välisiä reaktioita raskaassa vedessä. Reaktiotuotteena muodostui 1,3-oksatsinaani, kun formaldehydi lisättiin homoseriinin sekaan. 1,3-oksatsolidiini muodostui puolestaan formaldehydin reagoiessa seriinin, treoniinin ja *allo*-treoniinin kanssa silloin, kun reaktioita kiihdytettiin emäslisäyksellä. Koska 1,3-oksatsinaanin muodostuminen havaittiin ilman erillistä happo- tai emäslisäystä, voitiin sen päätellä olevan tehokkaampaa kuin 1,3-oksatsolidiinin muodostumisen. Sama tutkimusryhmä selvitti myös pH:n vaikutusta 1,3-oksatsinaanin ja -oksatsolidiinin muodostumiseen antamalla formaldehydin reagoida seriinin, treoniinin, homoseriinin ja 5-hydroksilysiinin kanssa eri pH:n fosfaattipuskureissa. Tulosten perusteella 1,3-oksatsinaanin muodostuminen oli suotuisampaa neutraalissa pH:ssa, kun taas 1,3-oksatsolidiineja muodostui emäksisemmissä olosuhteissa.

Näiden tutkimusten perusteella voidaan siis päätellä, että tilanteissa, joissa sekä 1,3-oksatsinaanin että 1,3-oksatsolidiinin muodostuminen ovat mahdollisia, useat eri tekijät (lähtöaineet, reaktioaika, pH, lämpötila, ym.) vaikuttavat syntyvän rengasrakenteen atomien lukumäärään.

1.3. Tutkimusprojektin tarkoitus

Tämän työn alkuperäisenä tavoitteena oli valmistaa kaksi hiusneulamallista oligonukleotidia, joiden toinen juoste olisi muodostunut MOANA-nukleotideista ja toinen joko DNA:sta tai 2'-OMe-RNA:sta. MOANA-nukleotidien valmistuksessa käytetty 4-metoksiamino-1,2,3-butaanitrioli on potentiaalinen rakenne nukleoemästen reversiibeliin liittämiseen valmiiseen nukleinihappoketjuun joko *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin tai *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykolin muodostuksen kautta.

Tällä menetelmällä emästen liittäminen tapahtuisi kaksoiskierteisessä ympäristössä, minkä takia MOANA-oligonukleotidien sekundaarirakenteita olisi ollut tarkoitus tutkia tarkemmin.

Toivottuja oligonukleotideja ei valitettavasti onnistuttu valmistamaan, sillä jo ensimmäisen oligonukleotidisynteesin aikana modifioidun fosforamidiitin kohdalla tapahtui selkeää pilkkoutumista. Pilkkoutumisen pääteltiin johtuneen 4-metoksiamino-1,2,3-butaanitriolin suojaukseen käytetyn 4-bentsoyylioksibentsaldehydisuojaryhmän pysymättömyydestä, minkä takia MOANA-fosforamidiitti päätettiin syntetisoida uudelleen käyttäen pysyvämpää suojaryhmää, 4-nitrobentsaldehydiä.

Uuden fosforamidiitin synteesissä muodostui hieman yllättäen päätuotteeksi oletetun *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin sijaan *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykoli. Koska muodostuneella 1,3-oksatsolidiinilla on samanlaisia ominaisuuksia kuin 1,3-oksatsinaanilla, niin työtä päätettiin jatkaa sillä. Työn uudeksi tavoitteeksi tuli sellaisten hiusneulaoligonukleotidien valmistaminen, jotka sisälsivät yhden modifioidun *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykolinukleotidin juosteen keskellä ja sitä vastapäätä joko adeniinin, sytosiinin, guaniinin, tyymiinin tai pelkän sokerin. Lisäksi työssä mitattiin tällaisten MOANA-oligonukleotidien sulamislämpötilat ja tutkittiin niiden sitoutumista kolmen eri aldehydijohdannaisen kanssa.

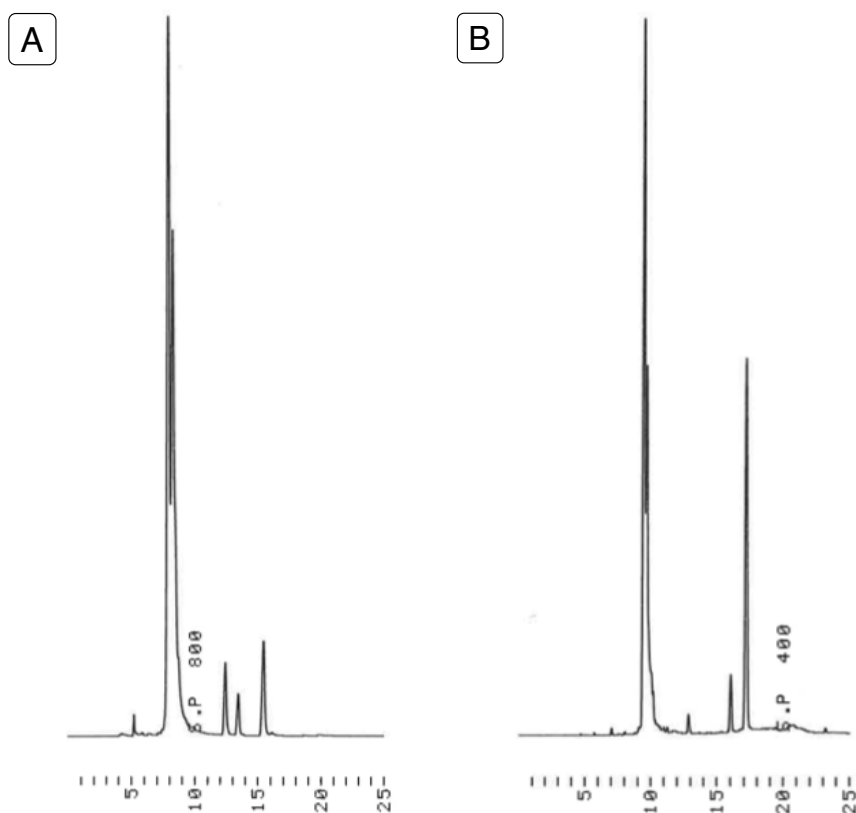
2. Tulokset ja niiden tarkastelu

2.1. MOANA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit

Hiusneulaoligonukleotidi **ON1** (5'-XXXXXXXXXXCCCCTTTTTTTTTTTT-3', jossa X tarkoittaa tutkimusryhmässämme aiemmin valmistettua MOANA-fosforamidiittia) syntetisoitiin kiinteään kantajan menetelmällä käyttäen kaupallisesti saatavilla olevia DNA-fosforamidiittirakenneyksiköitä ja tymidiinikantajaa sekä modifioitua MOANA-fosforamidiittia. Kytkenät tehtiin DNA-kytkennällä. **ON1** irrotettiin kiinteältä kantajalta ammoniakkin väkevällä vesiliuoksella ja puhdistettiin HPLC:lla (kuva 6A). Synteesin onnistumista tutkittiin massaspektrometrisesti.

Oligonukleotidisynteesin aikana trityylivaste pysyi vakaana kaupallisten DNA-fosforamidiittirakenneyksiköiden kytkennöissä, mutta pieneni modifioidun fosforamidiitin kohdalla. Kytkeytymisen voitiin siis todeta olevan heikkoa. Tämän varmisti vielä **ON1**:stä mitattu massaspektri, jonka perusteella täysmittaista oligonukleotidia ei ollut muodostunut tai vaihtoehtoisesti sitä oli muodostunut vain hyvin vähän. Massaspektriä tarkemmin tutkimalla huomattiin, että vain kaksi MOANA-fosforamidiittirakenneyksikköä oli kytkeytynyt onnistuneesti ja niistä jälkimmäisessä oli fosfaatti kiinni. Tämä tarkoitti sitä, että hajoamista oli tapahtunut

suojanpoiston aikana eikä oligonukleotidisynteesin epäonnistumisen syynä ollut pelkästään synteesin aikainen huono kytkeytyminen.

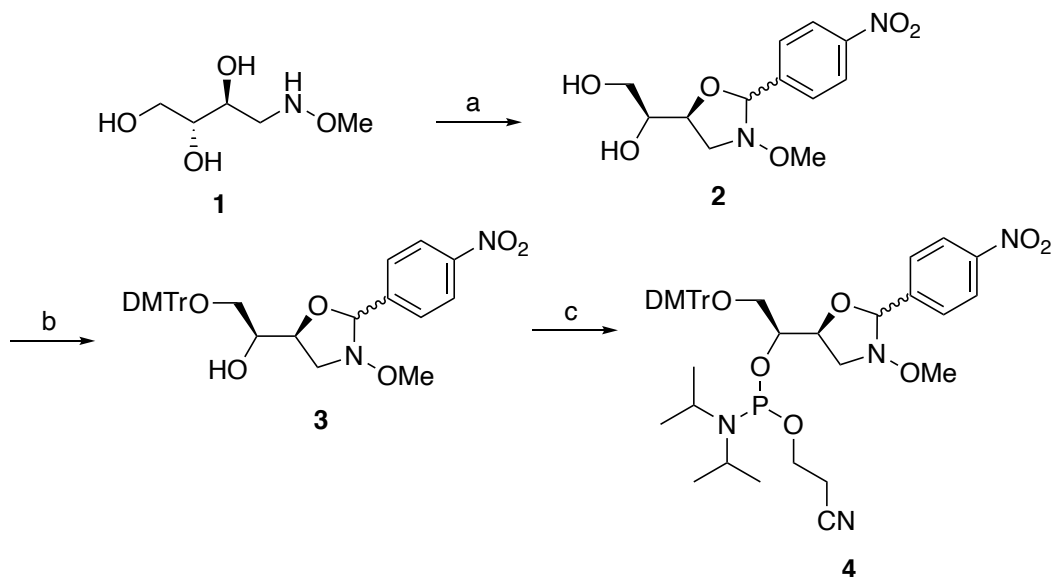


Kuva 6. Raakatuotteen RP-HPLC-profiili A) lyhyemmällä kytkentäajalla syntetisoidusta **ON1**:stä ja B) pidemmällä kytkentäajalla syntetisoidusta **ON1**:stä. HPLC:t ajettiin yleiset menetelmät -osiossa kuvatun menetelmän A mukaisesti.

ON1 syntetisoitiin uudelleen. Synteesi tehtiin samaan tapaan kuin ensimmäisellä kerralla, mutta nyt MOANA-fosforamidiitit kytkettiin DNA-kytkentää pidemmällä RNA-kytkennällä ja suojanpoisto tehtiin lievemmissä olosuhteissa käyttäen ammoniakkin väkevän vesiliuoksen ja metyyliamiinin seosta. Pidemmän RNA-kytkennän oletettiin parantavan kytkentäsaantoa ja lievempien olosuhteiden toivottiin vähentävän suojanpoiston aikana tapahtuvaa hajoamista. Tällä kertaa kytkeytyminen onnistui paremmin kuin ensimmäisessä oligonukleotidisynteesissä, mutta siitä huolimatta trityylivaste pieneni modifioitujen fosforamidiittien kytkennöissä. Kiinteältä kantajalta irrotettu **ON1** puhdistettiin jälleen HPLC:lla (kuva 6B) ja synteesin onnistumista tutkittiin massaspektrometrisesti. Massaspektrin perusteella täysmittaista oligonukleotidia ei löytynyt, vaan pilkkoutumista oli tälläkin kertaa tapahtunut. Koska suojanpoisto tehtiin aiempaa lievemmissä olosuhteissa, voitiin päätellä pilkkoutumisen tapahtuneen jo oligonukleotidisynteesin aikana. Tämä puolestaan viittasi siihen, että

fosforamidiitin suojaamiseen käytetty 4-bentsoyylioksibentsaldehydi oli liian pysymätön. Modifioitu fosforamidiitti päätettiin syntetisoida uudelleen käyttäen suojaryhmänä edellistä pysyvämpää 4-nitrobentsaldehydiä.

2.2. Fosforamidiitin synteesi

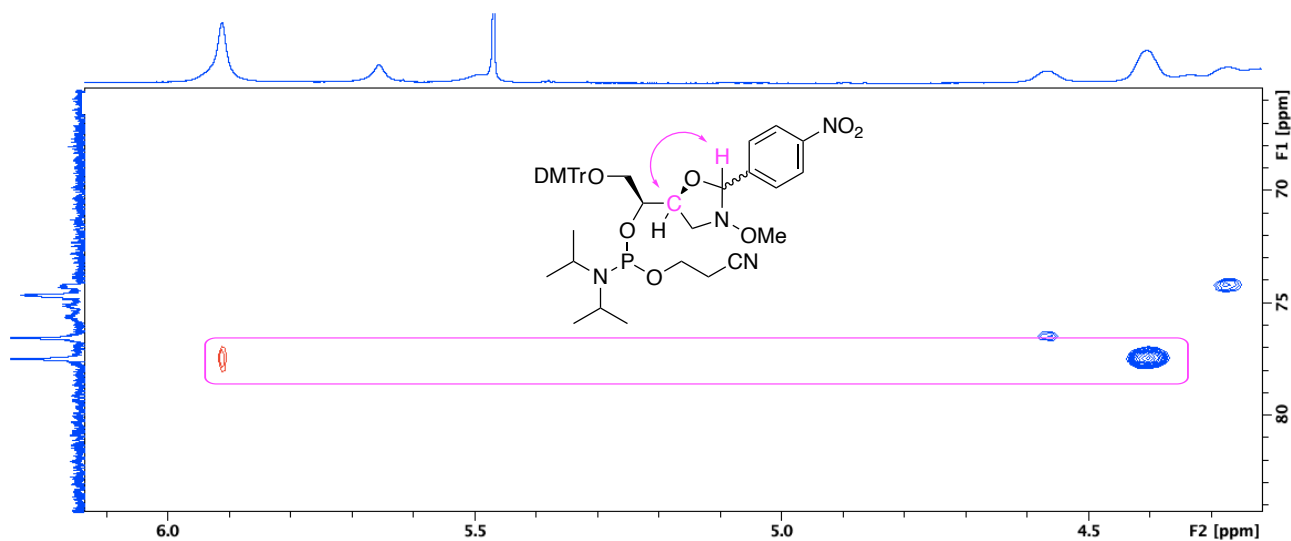


Kaavio 7. 4-nitrobentsaldehydisuojatun (2R,3S)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolifosforamidiittirakenneyksikön 4 valmistus. Reagenssit ja olosuhteet: (a) 4-nitrobentsaldehydi, AcOH, 1,4-dioksaani, 55 °C, 16 h; (b) DMTrCl, CH₂Cl₂, pyridiini, N₂-atmosfääri, 25 °C, 16 h; (c) 2-syaanietyyli-N,N-diisopropylikloorifosforamidiitti, Et₃N, CH₂Cl₂, N₂-atmosfääri, 25 °C, 1 h.

Kaaviossa 7 on esitetty 4-nitrobentsaldehydisuojatun (2R,3S)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolifosforamidiittirakenneyksikön 4 synteesi. Yhdiste 2 valmistettiin ensin liittämällä (2R,3S)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioliin (1) 4-nitrobentsaldehydi happamissa olosuhteissa, minkä jälkeen yhdisteen 2 primääriseen hydroksyyliin liitettiin dimetoksitriitylisuojaryhmä. Lopuksi yhdisteen 3 sekundääriseen hydroksyyliin liitettiin fosforamidiittiryhmä, jolloin saatiin yhdiste 4. Synteesin kaksi viimeistä reaktiota (b ja c) olivat herkkiä vedelle, joten ne tehtiin tyypiatmosfäärissä käyttäen kuivia liuottimia.

Valmistetun fosforamidiitin 4 huomattiin NMR:n perusteella olevan viisirenkainen N-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykoli päätuotteeksi oletetun N-metoksi-1,3-oksatsinaanin sijaan. Kuvassa 7 on esitetty puhdistetun lopputuotteen 4 HSQC- ja HMBC-spektrit, joista nähdään

kytkeytyminen pseudoanomeerisen vedyn ja (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin C3':n välillä. Tämä kytkeytyminen todistaa viisijäsenisen rengasrakenteen muodostumisen.



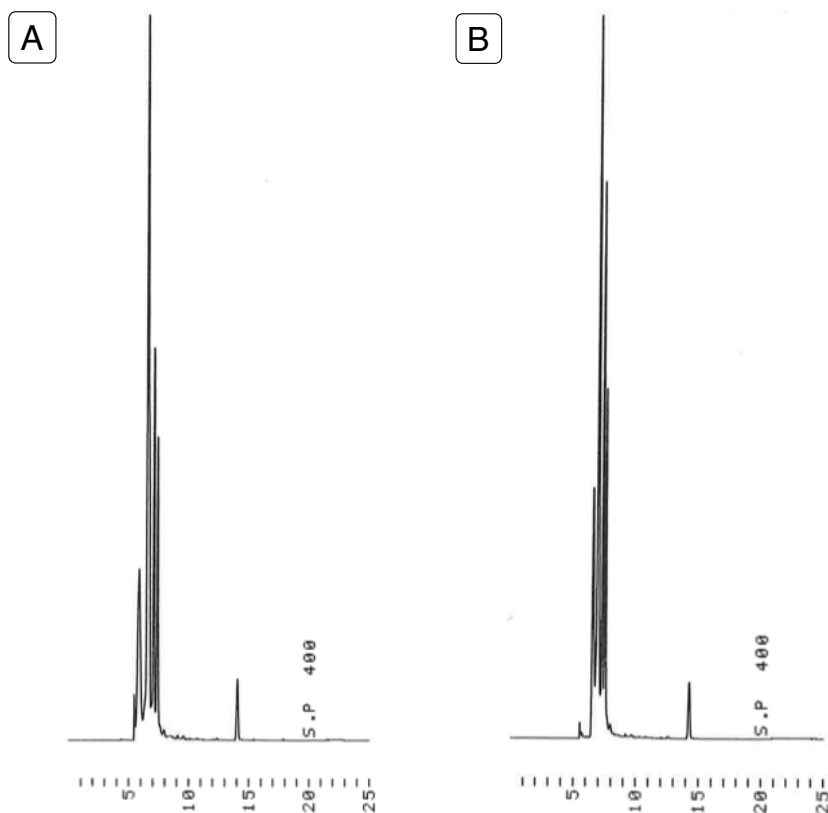
Kuva 7. Lopputuotteen **4** pseudoanomeerisen vedyn ja (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolin C3' välinen yhteys HSQC- ja HMBC-spektreissä. HSQC-spektri on esitetty sinisellä ja HMBC-spektri punaisella.

2.3. MOGNA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit

Valmistetun fosforamidiittirakenneyksikön **4** kytkeytymistä testattiin ensin syntetisoimalla hiusneulaoligonukleotidi **ON2** (5'-AAAAYAAAACCCCTTTTTTTTTT-3', jossa Y tarkoittaa modifioitua MOGNA-fosforamidiittia). Synteesi tehtiin jälleen kiinteän kantajan menetelmällä ja siinä käytettiin kaupallisia DNA-fosforamidiittirakenneyksiköitä, tymidiinikantajaa sekä itse valmistettua MOGNA-fosforamidiittia **4**. Kytkenät tehtiin lyhyemmällä, DNA-fosforamidiiteilla käytetyllä, reaktioajalla. Trityylivaste pieneni noin 35 % modifioidun fosforamidiitin kohdalla, mutta pysyi muuten tasaisena koko synteesin ajan.

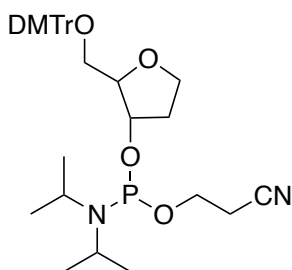
Vertailun vuoksi **ON2** syntetisoitiin uudelleen muuten täysin samoin kuin edellä, mutta nyt modifioitu fosforamidiitti kytkettiin pidemmällä, RNA-fosforamidiiteilla käytetyllä, reaktioajalla. Trityylivaste pieneni noin 25 % MOGNA-fosforamidiitin kohdalla, eli vähemmän kuin DNA-kytkennällä syntetisoidun **ON2**:n tapauksessa, ja pysyi muuten tasaisena. Pidemmän reaktioajan todettiin siis parantavan kytkeytymisaantoa myös uuden fosforamidiitin tapauksessa. Molempien synteesien tapauksessa **ON2** irrotettiin kiinteältä kantajalta ammoniakkin väkevän vesiliuoksen ja metyyliamiinin seoksella, minkä jälkeen oligonukleotidit puhdistettiin HPLC:lla

(kuva 8). Oligonukleotideista mitattiin massaspektrit, joiden perusteella RNA-kytkennällä valmistetun **ON2**:n synteesi onnistui paremmin kuin DNA-kytkennällä valmistetun **ON2**:n synteesi.



Kuva 8. Raakatuotteen RP-HPLC-profiili A) DNA-reaktioajalla syntetisoidusta **ON2**:sta ja B) RNA-reaktioajalla syntetisoidusta **ON2**:sta. HPLC:t ajettiin yleiset menetelmät -osiossa kuvatun menetelmän A mukaisesti.

Hiusneulaoligonukleotidit **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** (5'-GCCAGZGCTCGTTTTTCGAGCYCTGGC-3', jossa Y tarkoittaa modifioitua MOGNA-fosforamidiittia ja Z tarkoittaa DNA-amidiittia A, C, G tai T tai pelkkää sokeria S) syntetisoitiin kiinteän kantajan menetelmällä käyttäen kaupallisesti saatavilla olevia DNA-fosforamidiittirakenneyksiköitä, sytidiinikantajaa, itse syntetisoitua MOGNA-fosforamidiittia **4** sekä emäksentöntä fosforamidiittia S (kuva 9). Modifioidun fosforamidiitin kytkennöissä käytettiin pidempää RNA-reaktioaikaa, mutta muuten kytkennät tehtiin lyhyemmällä DNA-reaktioajalla. Trityylivaste käyttäytyi kaikkien oligonukleotidien **ON3** synteeseissä samalla tavalla; se pieneni modifioidun fosforamidiitin kohdalla, pysyi sen jälkeen vakaana ja pieneni vielä hieman synteessin loppua kohden. Suurin pudotus trityylivasteessa tapahtui **ON3t**:n kohdalla ja pienin puolestaan **ON3s**:n kohdalla. **ON3a**:n, **ON3c**:n, **ON3g**:n, **ON3t**:n ja **ON3s**:n sekvenssit on esitetty taulukossa 1.



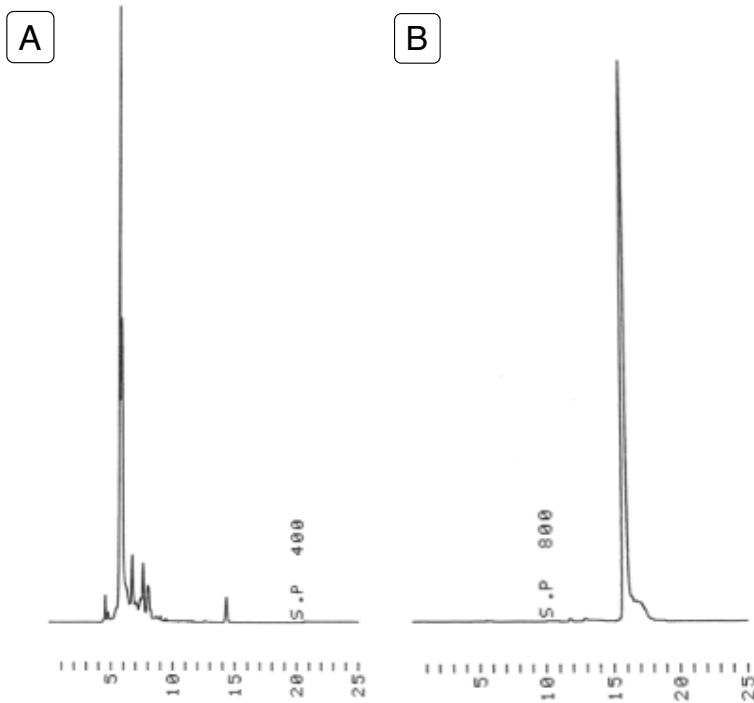
Kuva 9. Työssä käytetyn sokerin (S) rakenne.

Taulukko 1. Työssä syntetisoidut **ON3**:t ja niiden sekvenssit. Y tarkoittaa itse valmistettua MOGNA-fosforamidiittia.

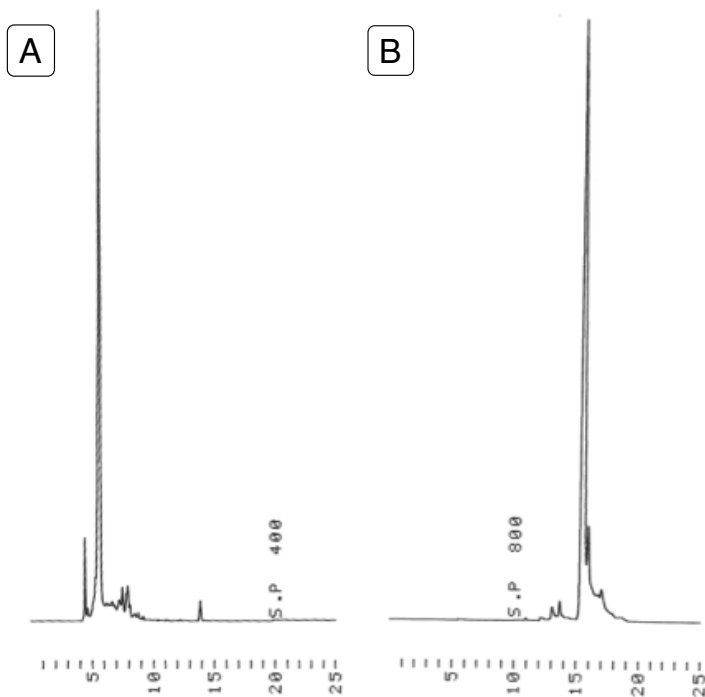
Oligonukleotidi	Sekvenssi
ON3a	5'-GCCAG <u>A</u> GCTCGTTTTTCGAGC <u>Y</u> CTGGC-3'
ON3c	5'-GCCAG <u>C</u> GCTCGTTTTTCGAGC <u>Y</u> CTGGC-3'
ON3g	5'-GCCAG <u>G</u> GCTCGTTTTTCGAGC <u>Y</u> CTGGC-3'
ON3t	5'-GCCAG <u>I</u> GCTCGTTTTTCGAGC <u>Y</u> CTGGC-3'
ON3s	5'-GCCAG <u>S</u> GCTCGTTTTTCGAGC <u>Y</u> CTGGC-3'

ON3:t irrotettiin kiinteältä kantajalta ammoniakkin väkevän vesiliuoksen ja metyyliamiinin seoksella, minkä jälkeen ne puhdistettiin HPLC:lla. Oligonukleotideista mitattiin massaspektrit, joista huomattiin 4-nitrobentsaldehydisuojaryhmän olevan vielä osittain kiinni. Suojaryhmien poistamiseksi oligonukleotidit käsiteltiin 0,2 M TEAA:lla (pH = 5,5), jonka kanssa niiden annettiin reagoita vuorokaudesta useisiin vuorokausiin huoneenlämpötilassa ja valolta suojattuna. Hapolla käsitellyt **ON3**:t puhdistettiin HPLC:lla, minkä jälkeen niistä mitattiin jälleen massaspektrit. Hapon kanssa hieman kauemmin reagoineista oligonukleotideista (**ON3g**, **ON3t** ja **ON3s**) mitattujen massaspektrien perusteella suojaryhmä oli irronnut kokonaan, mutta hapon kanssa lyhyemmän aikaa reagoineissa oligonukleotideissa (**ON3a** ja **ON3c**) suojaryhmä oli massaspektrien perusteella vielä osittain kiinni. **ON3a** ja **ON3c** käsiteltiin vielä uudestaan hapolla, minkä jälkeen ne puhdistettiin HPLC:lla ja niistä mitattiin massaspektrit. Massaspektrien perusteella suojaryhmät oli nyt saatu irti. Kuvissa 10 – 14 on esitetty oligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** RP-HPLC-profiilit ennen happokäsittelyä sekä niiden jälkeen.

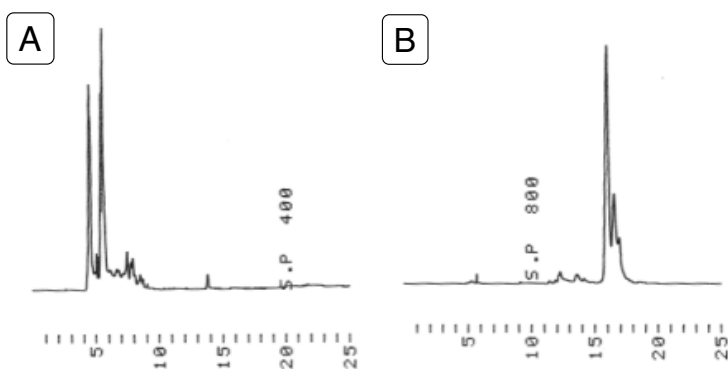
Suojaryhmän irrottamiseksi vaaditut happokäsittelyt vahvistivat 4-nitrobentsaldehydin olevan selkeästi pysyvämpi suojaryhmä kuin MOANA-fosforamidiitin suojaukseen alun perin käytetty 4-bentsoyylioksibentsaldehydi.



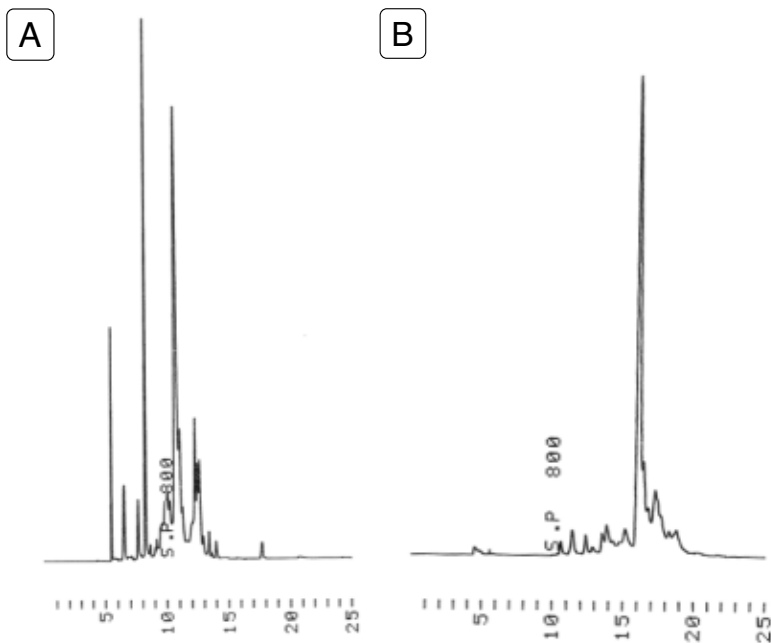
Kuva 10. RP-HPLC-profiili oligonukleotidista **ON3a** A) ennen happokäsittelyä ja B) happokäsittelyn jälkeen. HPLC:t ajettiin yleiset menetelmät -osiossa kuvattujen menetelmien A (ennen happokäsittelyä), C (ensimmäisen happokäsittelyn jälkeen) ja D (toisen happokäsittelyn jälkeen) mukaisesti.



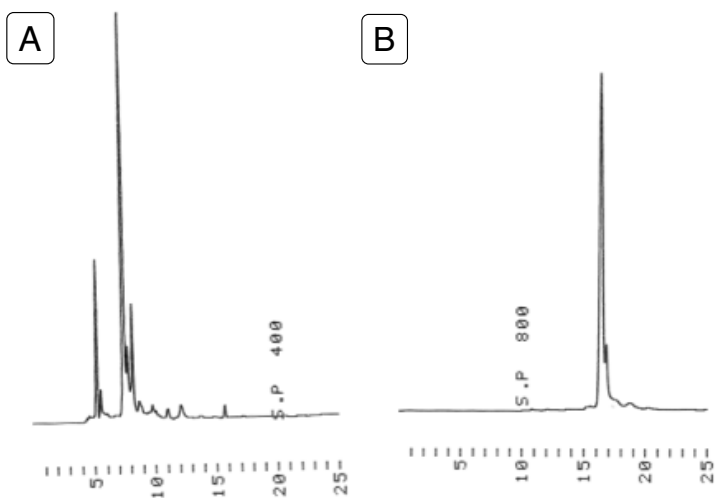
Kuva 11. RP-HPLC-profiili oligonukleotidista **ON3c** A) ennen happokäsittelyä ja B) happokäsittelyn jälkeen. HPLC:t ajettiin yleiset menetelmät -osiossa kuvailtujen menetelmien A (ennen happokäsittelyä), C (ensimmäisen happokäsittelyn jälkeen) ja D (toisen happokäsittelyn jälkeen) mukaisesti.



Kuva 12. RP-HPLC-profiili oligonukleotidista **ON3g** A) ennen happokäsittelyä ja B) happokäsittelyn jälkeen. HPLC:t ajettiin yleiset menetelmät -osiossa kuvattujen menetelmien A (ennen happokäsittelyä) ja D (happokäsittelyn jälkeen) mukaisesti.



Kuva 13. RP-HPLC-profiili oligonukleotidista **ON3t** A) ennen happokäsittelyä ja B) happokäsittelyn jälkeen. HPLC:t ajettiin yleiset menetelmät -osiossa kuvattujen menetelmien B (ennen happokäsittelyä) ja D (happokäsittelyn jälkeen) mukaisesti.

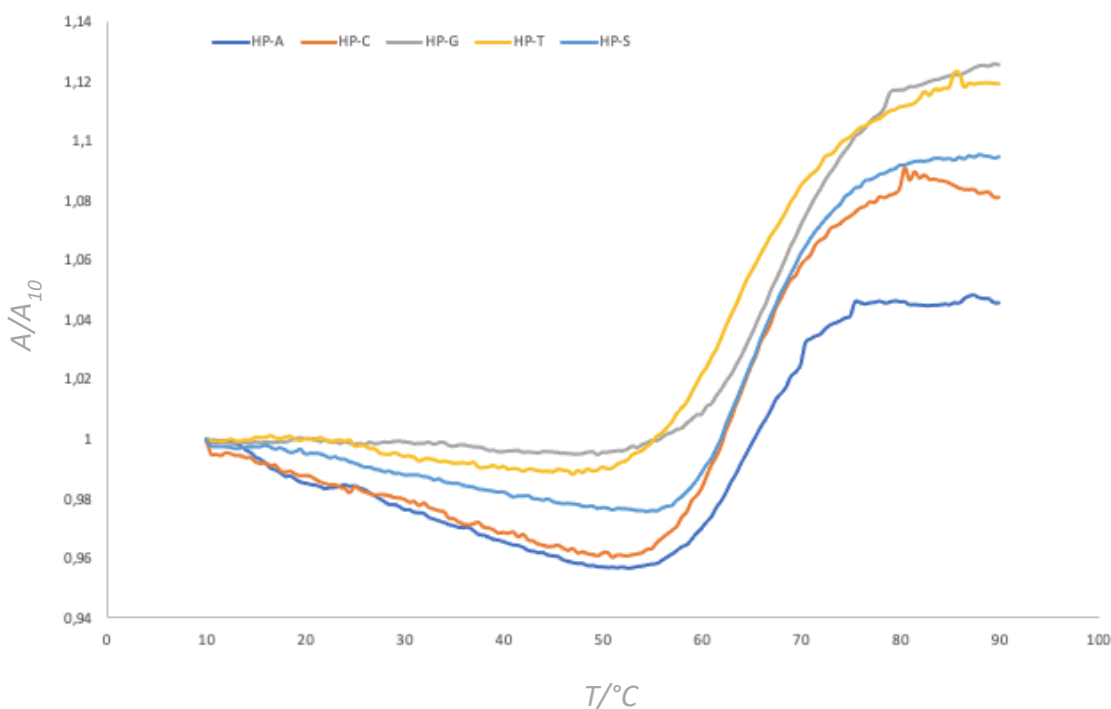


Kuva 14. RP-HPLC-profiili oligonukleotidista **ON3s** A) ennen happokäsittelyä ja B) happokäsittelyn jälkeen. HPLC:t ajettiin yleiset menetelmät -osiossa kuvattujen menetelmien B (ennen happokäsittelyä) ja D (happokäsittelyn jälkeen) mukaisesti.

2.4. Sulamislämpötilamittaukset

Hiusneularakenteessa valmistettujen oligonukleotidien emästen paikat ovat (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolirungon vastakkaisella puolella, jolloin nukleoemästen reversiibeli liittäminen oligonukleotidiin onnistuu kaksoiskierteisissä olosuhteissa. Hiusneulojen toivottiin olevan pysyviä olosuhteissa, joissa nukleoemäsanalogien liittyminen oligonukleotidirunkoon ja siitä irtoaminen olisivat kohtuullisen nopeita.

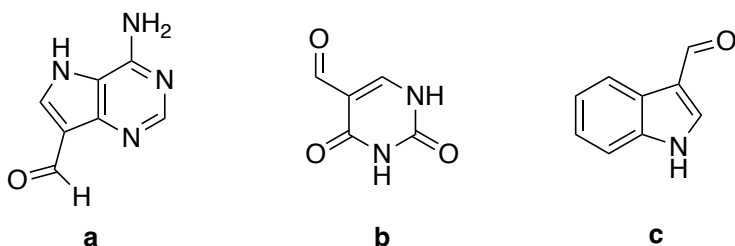
Hiusneularakenteiden varmistamiseksi syntetisoitujen oligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** UV-sulamiprofiilit mitattiin. Mittaukset tehtiin pH:ssa 5,5 käyttäen Nakkodylaattipuskuria. Kaikkien hiusneulojen sulamiskäyrät olivat yksifaasiset ja sigmoidiset (kuva 15) ja sulamislämpötilat vaihtelivat 62 – 67 °C välillä. Korkein sulamislämpötila oli oligonukleotidilla **ON3g** (67,1 °C) ja matalin oligonukleotidilla **ON3t** (62,6 °C). Saatujen UV-sulamislämpötilakäyrien perusteella oligonukleotidien voitiin päätellä olevan kaksoiskierteisessä rakenteessa huoneenlämpötilassa (23 °C) ja pH:ssa 5,5.



Kuva 15. Hiusneulaolikonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** UV-sulamiprofiilit mitattuna huoneenlämpötilassa pH:ssa 5,5.

2.5. Tasapainomittaukset

Valmiiden hiusneularakenteisten oligonukleotidien **ON3** kykyä vastaanottaa joko luonnollisia, osittain tai täysin keinotekoisia emäsosia reversiibelisti (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolirunkoon tutkittiin kolmella eri mallialdehydillä. Aldehydeinä käytettiin 9-formyyli-9-deatsa-adeniinia (**fA**), 5-formyyliurasiilia (**fU**) ja indoli-3-karbaldehydiä (**fI**), joiden rakenteet on esitetty kuvassa 16. Sitoutumisen odotettiin tapahtuvan *N*-metoksioksatsolidiin muodostumisen kautta. Oligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** kantaliuoksista sekä aldehydeistä **fA**, **fU** ja **fI** valmistettiin 500 μM liuokset siten, että jokainen oligonukleotidi sekoitettiin kunkin aldehydin kanssa. Saatujen liuosten annettiin reagoida huoneenlämmössä ja pH:ssa 5,5 valolta suojattuna kaksi viikkoa. Oligonukleotidit **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** sekä aldehydit **fA**, **fU** ja **fI** muodostivat kovalenttisia konjugaatteja, joista mitattiin massaspektit.

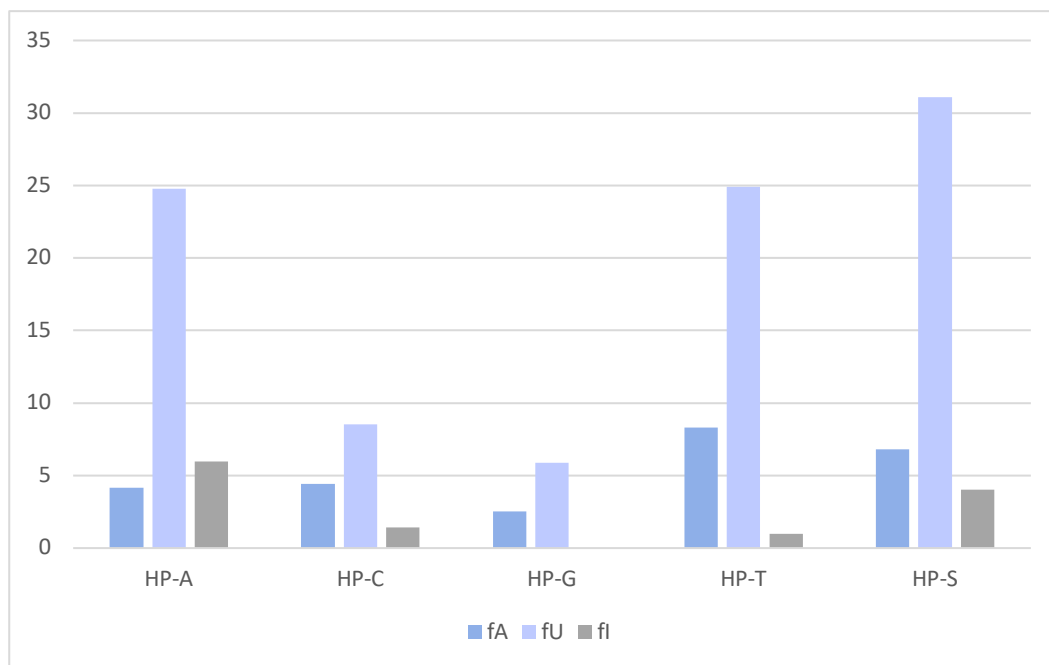


Kuva 16. Affiniteettitutkimuksissa käytetyt mallialdehydit: a) 9-formyyli-9-deatsa-adeniini; b) 5-formyyliurasiili ja c) indoli-3-karbaldehydi.

Kuvasta 17 nähdään, että urasiilianalogilla **fU** oli huomattavasti korkeampi affiniteetti oligonukleotideihin **ON3a**, **ON3t** ja **ON3s** kuin **fA**:lla tai **fI**:llä. Sitoutumisaffiniteetti **ON3c**:hen ja **ON3g**:hen oli alhaisempi ja vastasi enemmän **fA**:n sekä **fI**:n affiniteettejä. Keskimäärin huonointa sitoutuminen oli puriinijohdannaisella **fI**:llä, jolla ei havaittu lainkaan affiniteettiä **ON3g**:hen. Oligonukleotideihin **ON3c** ja **ON3t** sillä oli vain hyvin heikko affiniteetti. Watson-Crick-emäspariutumisperiaatteen mukaisesti adeniinianalogilla **fA** oli korkein sitoutumisaffiniteetti oligonukleotidiin, jossa sitä vastassa oli tymiini (**ON3t**). Tätä teoriaa vahvisti myös **fU**:n korkea affiniteetti adeniinia sisältävään oligonukleotidiin (**ON3a**). Yllättävää oli se, että affiniteetit olivat korkeita myös oligonukleotidiin **ON3s**, jossa aldehydejä vastassa ei ollut emästä. Tämä havainto ei valitettavasti tukenut vetysidosvuorovaikutusten tärkeyttä.

Oligonukleotidien sitoutumisaffiniteetit olivat siis korkeimmat **fU**-aldehydiin, kun taas affiniteetit aldehydeihin **fA** ja **fI** olivat huomattavasti alhaisemmat. Aldehydin **fA** ja osittain myös aldehydin **fU** vahvat riippuvuudet vastakkaisiin nukleoemäksiin viittasivat Watson-Crick-emäsparien

muodostumiseen. Aldehydeillä **fU** tai **fI** ei ollut selkeää sitoutumista vain joko puriini- tai pyrimidiiniemäksiin, mutta **fA**-aldehydin huomattiin suosivan hieman enemmän pyrimidiinejä kuin puriineja vastakkaisena nukleoemäksenä.



Kuva 17. Oligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** %-osuudet massaspektrollä mitattujen UV-spektrien antamista piikkien integraaleista.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. Yleiset menetelmät

Synteeseissä käytetyt reagenssit ja liuottimet olivat kaupallisia. NMR-spektrit mitattiin Bruker BioSpin 500 MHz ja 600 MHz NMR-spektrometreilla ja niiden tulkinnat tehtiin Bruker TopSpin 4.1.3. -ohjelmalla. Massaspektrien mittaukseen käytettiin Waters Acquity RDa -massaspektrometria. Oligonukleotidisynteesit tehtiin automatisoidulla Äkta Oligopilot 10 -DNA/RNA-syntetisaattorilla ja oligonukleotidien UV-sulamisprofiilit mitattiin PerkinElmer Lambda 35 UV/vis-spektrofotometrillä, johon oli liitettyä Peltier-termostaatti. HPLC-puhdistuksissa käytettiin Thermo ODS Hypersil (250 x 10 mm, 5 µm) -kolonnia ja 260 nm detektioaallonpituutta. HPLC-menetelmänä A käytettiin: 10 – 40 % ACN 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH = 7,0), virtausnopeus 3 ml min⁻¹. HPLC-menetelmänä B käytettiin: 7,5 – 30 % ACN 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH = 7,0), virtausnopeus 3 ml min⁻¹. HPLC-menetelmänä C käytettiin: 5 – 25 % ACN 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH = 7,0), virtausnopeus 3 ml min⁻¹. HPLC-menetelmänä D käytettiin: 7,5 – 15 % ACN 25 min aikana, TEAA-puskuri (50 mM; pH = 7,0), virtausnopeus 3 ml min⁻¹.

3.2. MOANA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit

ON1 (5'-XXXXXXXXXXCCCCTTTTTTTTTT-3') syntetisoitiin ÄKTA oligopilot plus -automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen kiinteänä kantajana dT-CPG:tä (36 $\mu\text{mol g}^{-1}$). Fosforamidiittien kytkennöissä käytettiin DNA-reaktioaikaa (120 s). Synteesin jälkeen kiinteä kantaja kuivattiin eksikkaattorissa. **ON1** irrotettiin kiinteältä kantajalta lisäämällä sen joukkoon 25 % ammoniakkin vesiliuosta (1 ml) ja antamalla seoksen reagoida 55 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä nestefaasi erotettiin kiinteästä kantajasta, kylmäkuivattiin ja saatu haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen (1000 μl). **ON1** puhdistettiin RP-HPLC:lla käyttäen menetelmää A. Puhdistuksessa saadut fraktiot kylmäkuivattiin, ja niistä mitattiin massaspektrit.

ON1 syntetisoitiin uudelleen muuten samalla tavoin kuin ensimmäisellä kerralla, mutta nyt modifioidun fosforamidiitin kytkennöissä käytettiin pidempää RNA-reaktioaikaa (1200 s) ja suojanpoisto tehtiin lievemmissä olosuhteissa. Pidempi reaktioaika paransi MOANA-fosforamidiittien kytkentäsaantoa, mutta siitä huolimatta trityyliivaste pieneni niiden kohdalla eikä täydellistä kytkeytymistä saavutettu. Synteesin jälkeen kiinteä kantaja kuivattiin paineilmalla. **ON1** irrotettiin kiinteältä kantajalta lisäämällä sen joukkoon 25 % ammoniakkin vesiliuoksen ja metyyliamiinin seosta (1:1, v/v; 1 ml) ja antamalla sen reagoida 65 °C:ssa 10 min, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin jäähauteella. Nestefaasi erotettiin kiinteästä kantajasta, kylmäkuivattiin ja saatu haihdutusjäännös liuotettiin mQ-veteen (1000 μl). **ON1** puhdistettiin jälleen RP-HPLC:lla menetelmän A mukaisesti. Puhdistuksessa saadut fraktiot kylmäkuivattiin, ja niistä mitattiin massaspektrit. Oligonukleotidin **ON1** pilkkoutumisen vuoksi sille ei ole esitetty massaspektrejä.

3.3. 4-nitrobentsaldehydisuojatun (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolifosforamidiittirakenneyksikön synteesi

3.3.1. 1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etaani-1,2-dioli (**2**)

(2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-trioli (**1**; 0,3166 g; 2,09 mmol) ja 1,2 ekvivalenttia 4-nitrobentsaldehydiä (0,3798 g; 2,51 mmol) liuotettiin 1,4-dioksaaniin (7 ml). Reaktioliuoksen pH säädettiin etikkahapolla 4:ään ja se jätettiin sekoittumaan 55 °C:een yön yli. Seuraavana päivänä reaktioliuos tehtiin emäksiseksi (pH = 9) trietyyliamiinilla ja haihdutettiin täysin kuiviin. 1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etaani-1,2-diolia (**2**) saatiin 0,74 g (124 %). Koska tuotteen **2** saanto on suurempi kuin teoreettisesti on mahdollista, sen voidaan päätellä sisältävän epäpuhtauksia, kuten trietyyliammoniumasetattijäämiä.

3.3.2. 2-bis(4-metoksifenylyli)(fenyyli)metoksi-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidi-nyyli)etanoli (3)

Lähtöaine **2** (0,7392 g; 2,60 mmol) liuotettiin kuivaan pyridiiniin (15 ml) ja haihdutettiin täysin kuiviin pyöröhaihduttajalla. Tämä toistettiin yhteensä kolme kertaa. Haihdutusjäännös liuotettiin kuivaan pyridiiniin (6 ml) ja sen joukkoon lisättiin kuivaan dikloorimetaaniin (2 ml) liuotettu 4,4-dimetoksitrietylikloridi (1,1 ekv.; 0,7805 g; 2,30 mmol). Reaktio tehtiin typpiatmosfäärissä. Reaktioliuos jätettiin sekoittumaan huoneenlämpöön yön yli. Seuraavana päivänä reaktioliuos haihdutettiin osittain kuiviin, haihdutusjäännös laimennettiin dikloorimetaanilla (100 ml) ja pestiin kylläisellä NaHCO₃:n vesiliuoksella (100 ml) kolmesti. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina Et₃N/MeOH/DCM-seosta (1:1:98, v/v). Tuotteen R_f = 0,25 (Et₃N:MeOH:DCM = 1:1:98, v/v). Osa ensimmäisessä puhdistuksessa saaduista fraktioista puhdistettiin uudelleen silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina Et₃N/MeOH/DCM-seosta (1:2:97, v/v). Tuotteen R_f = 0,32 (Et₃N:MeOH:DCM = 1:2:97, v/v). Osa saaduista fraktioista puhdistettiin vielä kolmannen kerran silikageelikromatografisesti käyttäen samaa eluenttia kuin toisessa puhdistuksessa. Tuotteen R_f = 0,48 (Et₃N:MeOH:DCM = 1:2:97, v/v). 2-(bis(4-metoksifenylyli)(fenyyli)metoksi-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etanolioa (**3**) saatiin 0,36 g (29 %). Liitteessä 1. ¹H NMR, liitteessä 2. ¹³C NMR, liitteessä 3. COSY, liitteessä 4. HSQC ja liitteessä 5. HMBC. ¹H NMR δ_H (500 MHz; CD₃CN): 2,83 (1H, t, J = 10,0 Hz, CH₂NOCH₃); 3,11 (3H, s, NOCH₃); 3,22 (2H, m, DMTrOCH₂); 3,44 (1H, d, J = 12,5 Hz, CH₂NOCH₃); 3,78 (3H, s, ArOCH₃); 3,79 (3H, s, ArOCH₃); 3,89 (1H, m, DMTrOCH₂CH); 4,24 (1H, s, DMTrOCH₂CHCH); 5,89 (1H, s, OCHN); 5,96 (1H, s, OH); 6,90 (4H, m, *m*-PhOMe); 7,26 (1H, m, *p*-Ph); 7,34 (2H, m, *m*-Ph); 7,39 (4H, m, *o*-PhOMe); 7,52 (2H, m, *o*-Ph); 7,64 (2H, m, *o*-PhNO₂); 8,18 (2H, d, J = 8,5 Hz, *m*-PhNO₂). ¹³C NMR δ_C (500 MHz; CD₃CN): 54,9 (ArOCH₃); 55,8 (CH₂NOCH₃); 59,9 (NOCH₃); 65,2 (DMTrOCH₂); 71,8 (DMTrOCH₂CH); 77,8 (DMTrOCH₂CHCH); 86,0 (Ar₃C); 99,2 (OCHN); 113,1 (*m*-PhOMe); 123,1 (*m*-PhNO₂); 126,8 (*p*-Ph); 127,6 (*o*-PhNO₂); 127,9 (*m*-Ph); 128,2 (*o*-Ph); 130,1 (*o*-PhOMe); 136,2 (*p*-PhNO₂); 145,3 (C1-PhNO₂); 146,7 (C1-Ph); 147,8 (C1-PhOMe); 158,7 (*p*-PhOMe). HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* 625,1948 [M + H]⁺ (havaittu), *m/z* 625,1947 [M + H]⁺ (laskettu).

3.3.3. 2-(bis(4-metoksifenylyli)(fenyyli)metoksi-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidi-nyyli)etyyli-(2-syanoetyyli)-di-isopropylifosforamidiitti (4)

Lähtöaine **3** (0,3604 g; 0,61 mmol) liuotettiin kuivaan tolueeniin (15 ml) ja haihdutettiin kuiviin yhteensä kolme kertaa. Haihdutusjäännös liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin (4,5 ml).

Reaktioliuokseen lisättiin 5 ekvivalenttia trietyyliamiinia (0,43 ml; 3,07 mmol) ja 1,2 ekvivalenttia 2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyylikloorifosforamidiittia (164 µl; 0,74 mmol). Reaktio tehtiin tyypiatmosfäärissä. Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämmössä 1 h, minkä jälkeen se laimennettiin dikloorimetaanilla (50 ml). Liuos pestiin kylläisellä NaHCO₃:n vesiliuoksella (50 ml) kolmesti. Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina Et₃N/EtOAc/heksaani-seosta (1:30:69, v/v). Tuotteen R_f = 0,38 (Et₃N:EtOAc:heksaani = 1:30:69, v/v). 2-(bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etyyli-(2-syanoetyyli)-di-isopropyyli fosforamidiittiä (**4**) saatiin 0,34 g (71 %). Liitteessä 6. ¹H NMR, liitteessä 7. ¹³C NMR, liitteessä 8. ³¹P NMR, liitteessä 9. COSY, liitteessä 10. HSQC ja liitteessä 11. HMBC. ¹H NMR δ_H (600 MHz; CD₃CN): 1,12 (6H, d, J = 6,8 Hz, CH(CH₃)₂); 1,22 (6H, d, J = 6,8 Hz, CH(CH₃)₂); 2,53 (2H, m, POCH₂CH₂); 2,61 (1H, s, POCH₂CH₂); 3,13 (3H, s, NOCH₃); 3,36 (2H, m, DMTrOCH₂); 3,51 (1H, m, CH₂NOCH₃); 3,65 (1H, s, CH(CH₃)₂); 3,76 (1H, m, POCH₂CH₂); 3,77 (3H, s, ArOCH₃); 3,78 (3H, s, ArOCH₃); 3,86 (1H, m, POCH₂CH₂); 4,02 (1H, s, DMTrOCH₂CH); 4,40 (1H, s, DMTrOCH₂CHCH); 5,91 (1H, s, OCHN); 6,89 (4H, m, *m*-PhOMe); 7,25 (1H, t, J = 7,2 Hz, *p*-Ph); 7,33 (2H, t, J = 7,5 Hz, *m*-Ph); 7,39 (4H, m, *o*-PhOMe); 7,53 (2H, m, *o*-Ph); 7,65 (2H, m, *o*-PhNO₂); 8,19 (2H, d, J = 8,6 Hz, *m*-PhNO₂). ¹³C NMR δ_C (600 MHz; CD₃CN): 20,0 (POCH₂CH₂); 23,9 (CH(CH₃)₂); 24,1 (CH(CH₃)₂); 43,0 (CH(CH₃)₂); 54,9 (ArOCH₃); 56,4 (CH₂NOCH₃); 58,1 (POCH₂CH₂); 60,0 (NOCH₃); 64,3 (DMTrOCH₂); 74,6 (DMTrOCH₂CH); 77,4 (DMTrOCH₂CHCH); 86,2 (Ar₃C); 99,3 (OCHN); 113,1 (*m*-PhOMe); 118,6 (CN); 123,3 (*m*-PhNO₂); 126,8 (*p*-Ph); 127,6 (*o*-PhNO₂); 127,8 (*m*-Ph); 128,2 (*o*-Ph); 130,2 (*o*-PhOMe); 136,0 (*p*-PhNO₂); 145,2 (C1-PhNO₂); 146,5 (C1-Ph); 147,9 (C1-PhOMe); 158,7 (*p*-PhOMe). ³¹P NMR δ_P (500 MHz; CD₃CN): 149,5. HRMS (ESI⁺-TOF): *m/z* 825,3090 [M + H]⁺ (havaittu), *m/z* 825,3025 [M + H]⁺ (laskettu).

3.4. MOGNA:a sisältävien oligonukleotidien synteesit

ON2 (5'-AAAAYAAAACCCCTTTTTTTTTT-3') syntetisoitiin ÄKTA oligopilot plus -automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla käyttäen kiinteänä kantajana dT-CPG:tä (36 µmol g⁻¹). Fosforamidiittien kytkennöissä käytettiin DNA-reaktioaikaa. Vertailun vuoksi **ON2** syntetisoitiin uudestaan muuten samalla tavalla, mutta nyt MOGNA-fosforamidiitti kytkettiin RNA-reaktioajalla. Molemmissa tapauksissa kiinteät kantajat kuivattiin paineilmalla ja suspensoitiin 25 % ammoniakkin vesiliuoksen ja metyyliamiinin seokseen (1:1, v/v; 1 ml). Seosten annettiin reagoida 65 °C:ssa 10 min, minkä jälkeen reaktiot pysäytettiin jäähäuteella. Nestefaasit erotettiin, kylmäkuivattiin ja liuotettiin

mQ-veteen (1000 µl). Molemmat **ON2**-erät puhdistettiin RP-HPLC:lla menetelmän A mukaisesti. Puhdistuksista saadut fraktiot kylmäkuivattiin ja karakterisoitiin massaspektrometrisesti. Kokonaan DNA-reaktioajalla syntetisoidun **ON2**:n massaspektri liitteessä 12 ja MOGNA-fosforamidiitin RNA-reaktioajalla syntetisoidun **ON2**:n massaspektri liitteessä 13.

Myös oligonukleotidit **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** (5'-GCCAGZGCTCGTTTTTCGAGCYCTGGC-3') syntetisoitiin ÄKTA oligopilot plus - automatisoidulla DNA/RNA-syntetisaattorilla. Tällä kertaa kiinteänä kantajana käytettiin dC-CPG:tä (35 µmol g⁻¹). MOGNA-fosforamidiitti kytkettiin RNA-reaktioajalla, mutta muuten käytettiin DNA-reaktioaikaa. Kiinteät kantajat kuivattiin joko paineilmalla tai eksikkaattorissa, minkä jälkeen ne suspensoitiin 25 % ammoniakkin vesiliuoksen ja metyyliamiinin seokseen (1:1, v/v; 1 ml). Seosten annettiin reagoida 65 °C:ssa 10 min, minkä jälkeen reaktiot pysäytettiin jäähauhteella. Nestefaasit erotettiin kiinteistä kantajista, kylmäkuivattiin ja haihdutusjäännökset liuotettiin mQ-veteen (1000 µl). Oligonukleotidit puhdistettiin RP-HPLC:lla siten, että **ON3a**:n, **ON3c**:n ja **ON3g**:n puhdistuksissa käytettiin menetelmää A ja **ON3t**:n sekä **ON3s**:n puhdistuksissa käytettiin menetelmää B. Saadut fraktiot kylmäkuivattiin, ja niistä mitattiin massaspektrit, joiden perusteella suojaryhmän huomattiin olevan vielä osittain kiinni oligonukleotideissa. Suojaryhmän irrottamiseksi kokonaan oligonukleotidia sisältävät fraktiot liuotettiin 0,2 M TEAA-puskuriin (500 µl, pH = 5,5) ja saadut seokset suojattiin valolta. **ON3a** reagoi hapon kanssa huoneenlämmössä vuorokauden verran, **ON3c** ja **ON3s** kaksi vuorokautta, **ON3t** neljä vuorokautta ja **ON3g** seitsemän vuorokautta.

Kertaalleen happokäsiteltyt **ON3a** ja **ON3c** puhdistettiin RP-HPLC:lla menetelmän C mukaisesti, minkä jälkeen puhdistuksissa saadut fraktiot kylmäkuivattiin ja niistä mitattiin massaspektrit. Molempien oligonukleotidien tapauksissa suojaryhmän todettiin olevan vielä osittain kiinni, joten oikeaksi todetut fraktiot liuotettiin uudelleen 0,2 M TEAA-puskuriin (500 µl, pH = 5,5) ja seokset suojattiin valolta. **ON3a** ja **ON3c** reagoivat molemmat hapon kanssa huoneenlämpötilassa vuorokauden verran ennen puhdistusta. Oligonukleotidit puhdistettiin RP-HPLC:lla menetelmällä D, saadut fraktiot kylmäkuivattiin, ja niistä mitattiin massaspektrit. Myös kertaalleen happokäsiteltyt **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** puhdistettiin RP-HPLC:lla menetelmän D mukaisesti. Puhdistuksista saadut fraktiot kylmäkuivattiin, ja niistä mitattiin massaspektrit. Massaspektrit oligonukleotideille **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** on esitetty liitteissä 14 – 18.

3.5. Sulamislämpötilamittaukset

Puhtaiden hiusneulaoligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** sulamislämpötilat mitattiin UV/vis-spektrofotometrillä. Mittauksia varten kaikki oligonukleotidit **ON3** laimennettiin

Na-kakodylaattipuskurilla 1 μM näytteiksi. Käytetyn puskurin pH oli 5,5 ja ionivahvuus 0,10 M. Näytteet laitettiin kvartsikyvetteihin, joiden valotien pituus oli 10 mm. Mittauksissa saatiin kolme lämmitys- ja jäähdytyskäyriä, jotka asettuivat 10 – 90 °C välille. Sulamislämpötilat saatiin UV-sulamisprofiilien ensimmäisiin derivaattakäyriin sovitettuina Gaussin piikkien keskipisteinä.

3.6. Tasapainomittaukset

Sitoutumisaffiniteettimittauksia varten hiusneulaoligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** kantaliuoksista ja mallialdehydeistä **fA**, **fU** ja **fI** valmistettiin 500 μM liuokset. Liuokset tehtiin lisäämällä oikeat määrät mQ-veteen valmistettuja oligonukleotidien kantaliuoksia sekä DMSO:iin (**fA** ja **fI**) tai mQ-veteen (**fU**) liuotettuja aldehydejä. Saadut liuokset kylmäkuivattiin ja liuotettiin Na-kakodylaattipuskuriin (ionivahvuus 0,10 M; pH = 5,5; 20 μl). Liuosten annettiin reagoida huoneenlämmössä kaksi viikkoa valolta suojattuna, minkä jälkeen niistä mitattiin massaspektrit. Koska **ON3g**:n ja **fI**:n välillä ei havaittu affiniteettia, ei niille ole esitetty massaspekttriä. Kaikkien muiden hiusneulaoligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** ja aldehydien **fA**, **fU** ja **fI** muodostamien kovalenttisten konjugaattien massaspektrit on esitetty liitteissä 19 – 32.

4. Johtopäätökset ja yhteenveto

Työn ensimmäisessä vaiheessa suoritettua oligonukleotidisynteesiä lukuun ottamatta kaikki toivotut tuotteet onnistuttiin valmistamaan. Lisäksi näiden valmistuksessa käytetyt puhdistus- ja karakterisointimenetelmät olivat sopivia tehdyille reaktioille. Epäonnistuneen oligonukleotidisynteesin pääteltiin johtuvan MOANA-fosforamidiitin suojaukseen käytetyn 4-bentsoyylioksibentsaldehydin huonosta pysyvyydestä. Koska oligonukleotidin **ON1** synteesi ei onnistunut, piti tutkielman alkuperäistä suunnitelmaa muuttaa. MOANA-fosforamidiitti päätettiin valmistaa uudelleen käyttäen tällä kertaa edellistä pysyvämpää suojausta. Suojaryhmäksi valikoitui 4-nitrobentsaldehydi, joka on aiemmin tehtyjen tutkimusten perusteella osoittautunut jopa seitsemän kertaa pysyvämmäksi kuin 4-bentsoyylioksibentsaldehydi.⁴²

4-nitrobentsaldehydisuojatun (2*R*,3*S*)-4-(metoksiamino)butaani-1,2,3-triolifosforamidiittirakenneyksikön (**4**) synteesi onnistui muuten hyvin, mutta lopputuotteena muodostui oletetun kuusirenkaisen *N*-metoksi-1,3-oksatsinaanin sijaan viisirenkainen *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiiniglykoli. NMR:n ja MS:n perusteella saatu tuote **4** oli kuitenkin riittävän puhdasta, joten työtä päätettiin jatkaa sillä. Kokonaissaannoksi saatiin 20,7 %. Saantoa vähensivät erityisesti

välituotteen **3** puhdistukset, joita tehtiin yhteensä kolme. Vähemmällä puhdistusten määrällä olisi ollut mahdollista saada parempi kokonaissaanto.

Valmistetun MOGNA-fosforamidiitin **4** kytkeytymistä tutkittiin syntetisoimalla kaksi samanlaista hiusneulaoligonukleotidia **ON2**, joista ensimmäisessä modifioitu fosforamidiitti kytkettiin lyhyemmällä DNA-reaktioajalla ja toisessa puolestaan pidemmällä RNA-reaktioajalla. Näistä RNA-reaktioajan todettiin parantavan MOGNA:n kytkeytymistä, minkä takia sitä käytettiin myös seuraavissa oligonukleotidisyntheseissä. MOGNA-fosforamidiitti saatiin liitettyä viiden eri oligonukleotidin (**ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s**) keskelle. Näistä parhaiten onnistui **ON3s**:n synteesi ja huonoiten **ON3t**:n synteesi. 4-nitrobentsaldehydin pysyvyyden vuoksi voitiin olettaa, että sen irrottaminen oligonukleotideista vaatisi yhden tai useamman erillisen happokäsittelyn. Tällä tavoin suojaryhmä saatiinkin irrotettua oligonukleotideista kokonaan.

Puhtaiden oligonukleotidien **ON3a**, **ON3c**, **ON3g**, **ON3t** ja **ON3s** todettiin sulamislämpötilamittausten perusteella olevan kaksoiskierteisessä muodossa affiniteettimittauksissa käytetyissä olosuhteissa. Affiniteettitutkimuksissa aldehydijohdannaiset 9-formyyli-deatsa-adeniini, 5-formyyliurasiili ja indoli-3-karbaldehydi liitettiin kaksoiskierteisten hiusneulaoligonukleotidien 4-metoksiamino-1,2,3-butaanitrioliin *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiin muodostuksen kautta. Uraasilianalogin muodostamien konjugaattien todettiin olevan pysyvämpiä kuin adeniini- ja indolijohdannaisten muodostamien konjugaattien. Aldehydien liittämiseen valmiiseen oligonukleotidirakenteeseen vaikuttivat todennäköisesti ainakin vetysidosvuorovaikutukset.

Tässä tutkimuksessa todettiin 4-bentsoyylioksibentsaldehydillä suojatun MOANA-fosforamidiitin olevan liian pysymätön useamman peräkkäisen nukleotidin kytkentöihin. Työssä onnistuttiin kuitenkin valmistamaan pysyvämpi MOGNA-fosforamidiitti, jolla yksittäisen nukleotidin kytkeytyminen oli riittävän tehokas. Tulevaisuudessa MOGNA-nukleotidit tarvitsevat lisätutkimuksia, jotta voidaan selvittää pystyvätkö ne kytkeytymään kokonaisiksi juosteiksi ja edelleen ristiinpariutumaan DNA:n ja RNA:n kanssa. Tällaisia oligonukleotideja voitaisiin hyödyntää modifioitujen emästen nukleiinihapposynteesin jälkeisessä reversiibelissä liittämässä emäksettömään nukleiinihapporakenteeseen. Tässä työssä saadut tulokset vahvistivat, että 4-metoksiamino-1,2,3-butaanitriolirunkoa voidaan hyödyntää tällaiseen nukleoemästen reversiibeliin lisäämiseen ennalta valmistettuun oligonukleotidirakenteeseen *N*-metoksi-1,3-oksatsolidiin muodostuksen kautta.

5. Viitteet

1. Li M, Yin F, Song L, et al. Nucleic Acid Tests for Clinical Translation. *Chem Rev.* 2021;121(17):10469-10558. doi:10.1021/acs.chemrev.1c00241
2. Zhao Y, Zuo X, Li Q, et al. Nucleic acids analysis. *Sci China Chem.* 2021;64(2):171-203. doi:10.1007/s11426-020-9864-7
3. Sun L, Ma X, Zhang B, et al. From polymerase engineering to semi-synthetic life: artificial expansion of the central dogma. *RSC Chem Biol.* 2022;3(10):1173-1197. doi:10.1039/d2cb00116k
4. Duffy K, Arangundy-Franklin S, Holliger P. Modified nucleic acids: replication, evolution, and next-generation therapeutics. *BMC Biol.* 2020;18(112):1-14. doi:10.1186/S12915-020-00803-6/TABLES/2
5. Tingting T, Shuangyan H, Guoliang K, Xiaobing Z. Functional Xeno Nucleic Acids for Biomedical Application. *Chem Res Chinese Univ.* 2022;38(4):912-918. doi:10.1007/s40242-021-2186-7
6. Fiers G, Chouikhi D, Oswald L, et al. Orthogonal Synthesis of Xeno Nucleic Acids. *Chem - A Eur J.* 2016;22(50):17945-17948. doi:10.1002/chem.201604386
7. Taylor AI, Houlihan G, Holliger P. Beyond DNA and RNA: The Expanding Toolbox of Synthetic Genetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019;11(6):1-15. doi:10.1101/cshperspect.a032490
8. Morihiko K, Kasahara Y, Obika S. Biological applications of xeno nucleic acids. *Mol Biosyst.* 2017;13(2):235-245. doi:10.1039/c6mb00538a
9. Beck KM, Krogh MB, Hornum M, Ludford PT, Tor Y, Nielsen P. Double-headed nucleotides as xeno nucleic acids: information storage and polymerase recognition. *Org Biomol Chem.* 2020;18(36):7213-7223. doi:10.1039/d0ob01426e
10. Murayama K, Asanuma H. Design and Hybridization Properties of Acyclic Xeno Nucleic Acid Oligomers. *ChemBioChem.* 2021;22(15):2507-2515. doi:10.1002/cbic.202100184
11. Efthymiou T, Gavette J, Stoop M, et al. Chimeric XNA: An Unconventional Design for Orthogonal Informational Systems. *Chem - A Eur J.* 2018;24(49):12811-12819. doi:10.1002/chem.201802287
12. Asanuma H, Kamiya Y, Kashida H, Murayama K. Xeno nucleic acids (XNAs) having non-ribose scaffolds with unique supramolecular properties. *Chem Commun.* 2022;58(25):3993-4004. doi:10.1039/d1cc05868a
13. Manoharan M. 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy:

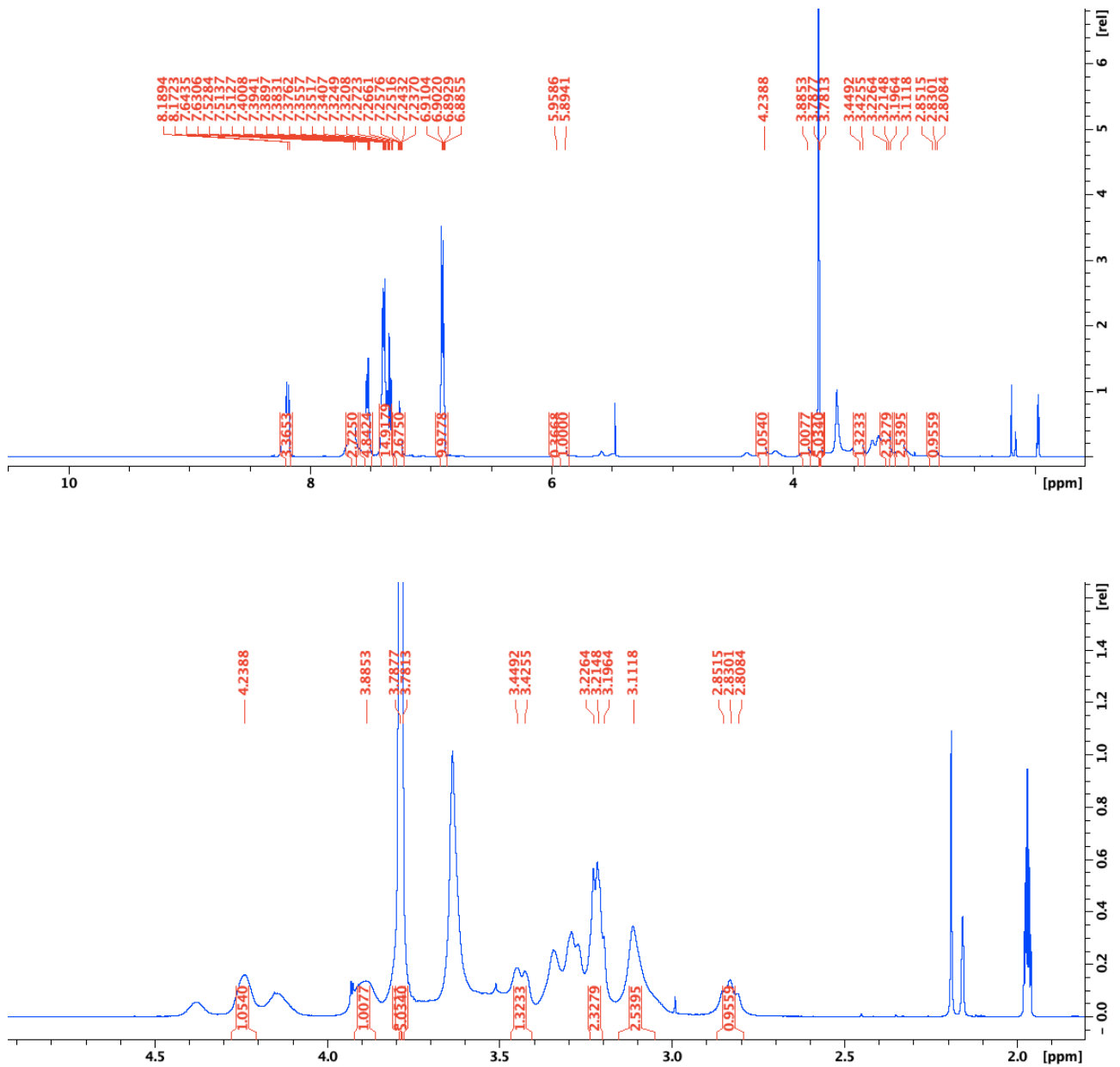
- importance of conformation, configuration and conjugation. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 1999;1489(1):117-130. doi:10.1016/S0167-4781(99)00138-4
14. Zhang W, Kim SC, Tam CP, et al. Structural interpretation of the effects of threo-nucleotides on nonenzymatic template-directed polymerization. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(2):646-656. doi:10.1093/nar/gkaa1215
 15. Appella DH. Non-natural nucleic acids for synthetic biology. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13(5-6):687-696. doi:10.1016/J.CBPA.2009.09.030
 16. Lescrinier E, Esnouf R, Schraml J, et al. Solution structure of a HNA-RNA hybrid. *Chem Biol.* 2000;7(9):719-731. doi:10.1016/S1074-5521(00)00017-X
 17. Nauwelaerts K, Lescrinier E, Sclep G, Herdewijn P. Cyclohexenyl nucleic acids: conformationally flexible oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(8):2452-2463. doi:10.1093/nar/gki538
 18. Leumann CJ. DNA Analogues: From Supramolecular Principles to Biological Properties. *Bioorganic Med Chem.* 2002;10(4):841-854. doi:10.1016/S0968-0896(01)00348-0
 19. Roshmi RR, Yokota T. Pharmacological Profile of Viltolarsen for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: A Japanese Experience. *Clin Pharmacol Adv Appl.* 2021;13:235-242. doi:10.2147/CPAA.S288842
 20. Wu J, Meng Q, Ren H, Wang H, Wu J, Wang Q. Recent advances in peptide nucleic acid for cancer bionanotechnology. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38:798-805. doi:10.1038/aps.2017.33
 21. Glazier DA, Liao J, Roberts BL, et al. Chemical Synthesis and Biological Application of Modified Oligonucleotides. *Bioconjug Chem.* 2020;31(5):1213-1233. doi:10.1021/acs.bioconjchem.0c00060
 22. Hocek M. Synthesis of Base-Modified 2'-Deoxyribonucleoside Triphosphates and Their Use in Enzymatic Synthesis of Modified DNA for Applications in Bioanalysis and Chemical Biology. *J Org Chem.* 2014;79(21):9914-9921. doi:10.1021/jo5020799
 23. Eremeeva E, Herdewijn P. Enzymatic Synthesis Using Polymerases of Modified Nucleic Acids and Genes. In: *Enzymatic and Chemical Synthesis of Nucleic Acid Derivatives.* ; 2018:159-195. doi:10.1002/9783527812103.ch7
 24. Freund N, Fürst MJLJ, Holliger P. New chemistries and enzymes for synthetic genetics. *Curr Opin Biotechnol.* 2022;74:129-136. doi:10.1016/j.copbio.2021.11.004
 25. Pinheiro VB, Holliger P. The XNA world: progress towards replication and evolution of synthetic genetic polymers. *Curr Opin Chem Biol.* 2012;16(3-4):245-252. doi:10.1016/J.CBPA.2012.05.198
 26. Chaput JC, Szostak JW. TNA Synthesis by DNA Polymerases. *J Am Chem Soc.*

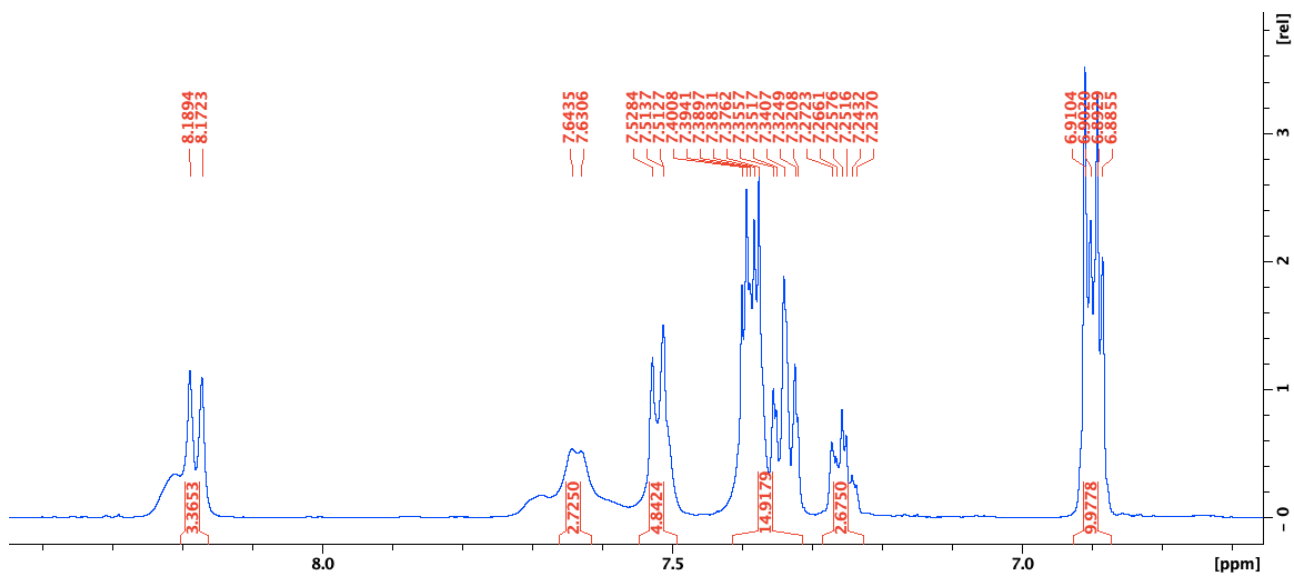
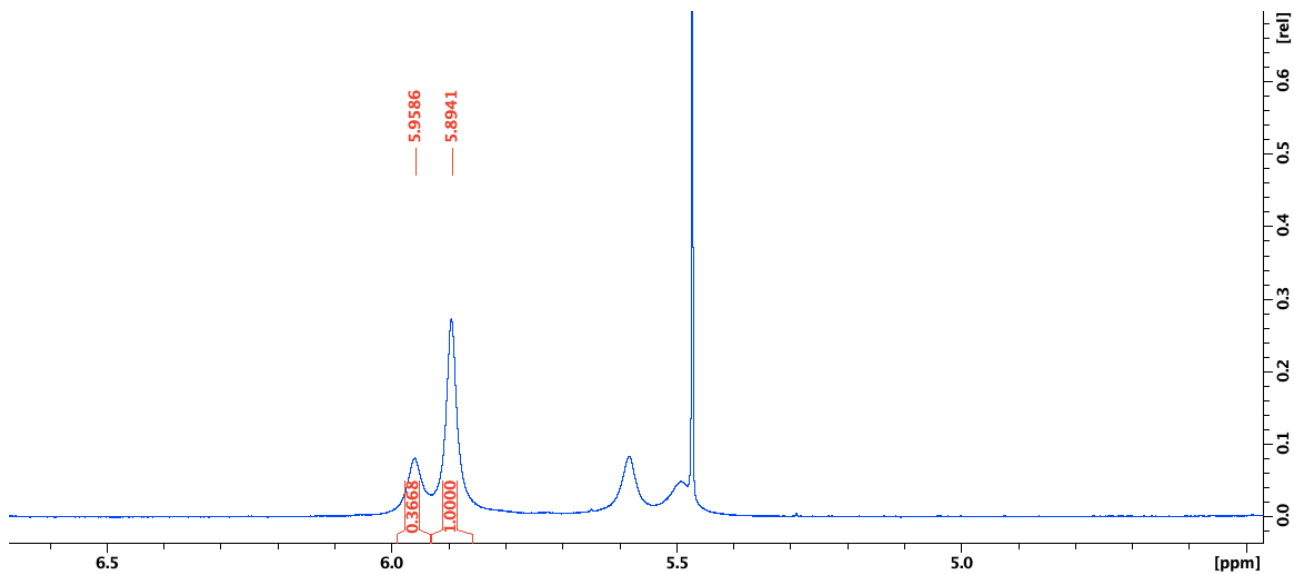
- 2003;125(31):9274-9275. doi:10.1021/ja035917n
27. Houlihan G, Arangundy-Franklin S, Holliger P. Exploring the Chemistry of Genetic Information Storage and Propagation through Polymerase Engineering. *Acc Chem Res.* 2017;50(4):1079-1087. doi:10.1021/acs.accounts.7b00056
 28. Ong JL, Loakes D, Jaroslowski S, Too K, Holliger P. Directed Evolution of DNA Polymerase, RNA Polymerase and Reverse Transcriptase Activity in a Single Polypeptide. *J Mol Biol.* 2006;361(3):537-550. doi:10.1016/j.jmb.2006.06.050
 29. Heemstra JM, Liu DR. Templated Synthesis of Peptide Nucleic Acids via Sequence-Selective Base-Filling Reactions. *J Am Chem Soc.* 2009;131(32):11347-11349. doi:10.1021/ja904712t
 30. Kanlidere Z, Jochim O, Cal M, Diederichsen U. DNA functionalization by dynamic chemistry. *Beilstein J Org Chem.* 2016;12:2136-2144. doi:10.3762/bjoc.12.203
 31. Ding C, Zeng F, Ni J, Wang B, Xie Y. Polynuclear Complexes of Ligands Containing in Situ Formed Oxazinane and Oxazolidine Rings with Appended Alkoxy and Phenol Groups. *Cryst Growth Des.* 2012;12(4):2089-2096. doi:10.1021/cg300096n
 32. Agami C, Couty F, Lequesne C. N-Boc 2-Acyloxazolidines: Useful Precursors to Enantiopure 1,2-Diols via Highly Diastereoselective Nucleophilic Additions. *Tetrahedron.* 1995;51(14):4043-4056. doi:10.1016/0040-4020(95)00145-X
 33. Ni Y, Zuo H, Yu H, Wu Y, Zhong F. Synergistic Catalysis-Enabled Thia-Aza-Prins Cyclization with DMSO and Disulfides: Entry to Sulfenylated 1,3-Oxazinanes and Oxazolidines. *Org Lett.* 2018;20(18):5899-5904. doi:10.1021/acs.orglett.8b02551
 34. Trifunović S, Dimitrijević D, Vasić G, et al. New Simple Synthesis of N-Substituted 1,3-Oxazinane-2-ones. *Synthesis (Stuttg).* 2010;(6):943-946. doi:10.1055/s-0029-1218642
 35. Parida C, Mondal B, Ghosh A, Pan SC. Organocatalytic Asymmetric Synthesis of Spirooxindole Embedded Oxazolidines. *J Org Chem.* 2021;86(18):13082-13091. doi:10.1021/acs.joc.1c00644
 36. Nimmagadda SK, Zhang Z, Antilla JC. Asymmetric One-Pot Synthesis of 1,3-Oxazolidines and 1,3-Oxazinanes via Hemiaminal Intermediates. *Org Lett.* 2014;16(16):4098-4101. doi:10.1021/ol501789c
 37. Wu Y-C, Liron M, Zhu J. Asymmetric Total Synthesis of (-)-Quinocarcin. *J Am Chem Soc.* 2008;130(22):7148-7152. doi:10.1021/ja800662q
 38. Delost MD, Smith DT, Anderson BJ, Njardarson JT. From Oxiranes to Oligomers: Architectures of U.S. FDA Approved Pharmaceuticals Containing Oxygen Heterocycles. *J Med Chem.* 2018;61(24):10996-11020. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00876
 39. Seung YK, Yoseop K, Sung-Gon K. Organocatalytic Enantioselective Synthesis of 1,3-

- Oxazinanones and Hexahydropyrimidines via [4+2]-Annulation of Cyclic N-Sulfimines. *Asian J Org Chem.* 2023;12(5). doi:10.1002/ajoc.202300022
40. Groth T, Meldal M. Synthesis of Aldehyde Building Blocks Protected as Acid Labile N-Boc N,O-Acetals: Toward Combinatorial Solid Phase Synthesis of Novel Peptide Isosteres. *J Comb Chem.* 2001;3(1):34-44. doi:10.1021/cc000057h
41. Afari MNK, Virta P, Lönnberg T. N-Methoxy-1,3-oxazinanone nucleic acids (MOANAs) – a configurationally flexible backbone modification allows post-synthetic incorporation of base moieties. *Org Biomol Chem.* 2022;20(17):3480-3485. doi:10.1039/D2OB00465H
42. Wallin J, Lönnberg T. Improved Synthesis Strategy for N-Methoxy-1,3-oxazinanone Nucleic Acids (MOANAs). *European J Org Chem.* 2022;2022(35). doi:10.1002/EJOC.202200538
43. Afari MNK, Nurmi K, Virta P, Lönnberg T. Watson-Crick Base Pairing of N-Methoxy-1,3-Oxazinanone (MOANA) Nucleoside Analogues within Double-Helical DNA. *ChemistryOpen.* 2023;12(7). doi:10.1002/open.202300085
44. Korepin AG, Galkin P V., Glushakova NM, et al. N-Substituted tetrahydro-1,3-oxazines and oxazolidinones 1. A new version of the Mannich reaction involving amino alcohols. *Russ Chem Bull.* 2001;50:104-109. doi:10.1023/A:1009537504497
45. Hamdach A, El Hadrami EM, Hajji C, Zaballos-García E, Sepulveda-Arques J, Zaragoza RJ. Experimental and theoretical DFT study of the reaction of 3-amino-1,2-diols with dichloromethane and paraformaldehyde. *Tetrahedron.* 2004;60(45):10353-10358. doi:10.1016/j.tet.2004.07.090
46. Martínez RF, Ávalos M, Babiano R, et al. An efficient and highly diastereoselective synthesis of C-glycosylated 1,3-oxazolidinones from N-methyl-D-glucamine. *Tetrahedron.* 2008;64(27):6377-6386. doi:10.1016/j.tet.2008.04.082
47. Kamps JJAG, Hopkinson RJ, Schofield CJ, Claridge TDW. How formaldehyde reacts with amino acids. *Commun Chem.* 2019;2. doi:10.1038/s42004-019-0224-2

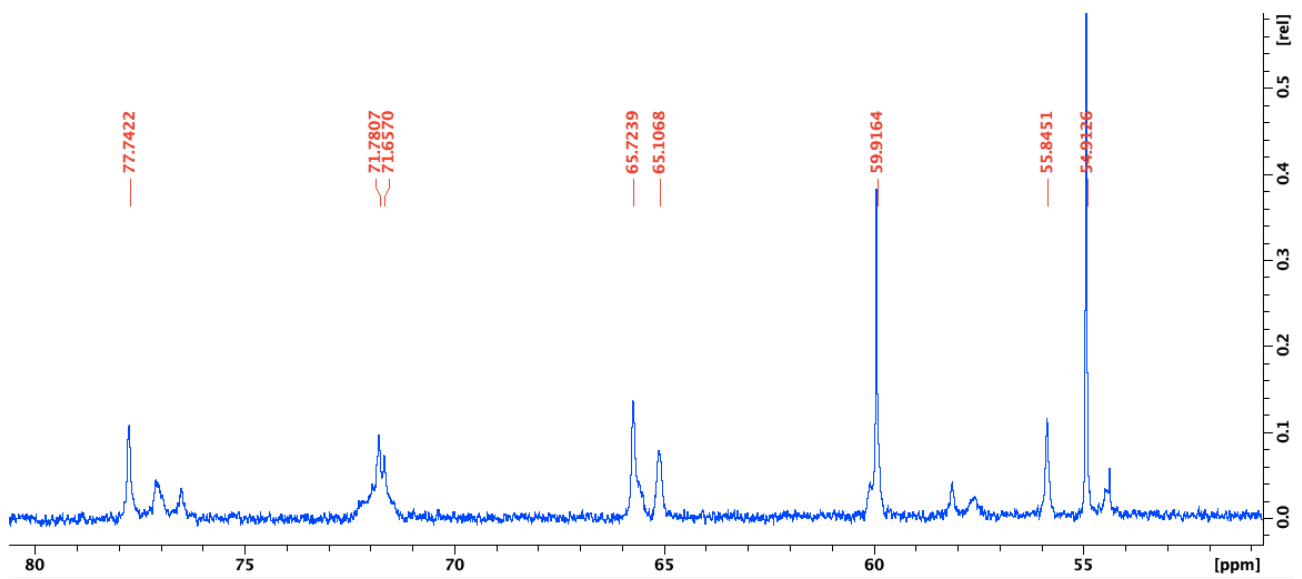
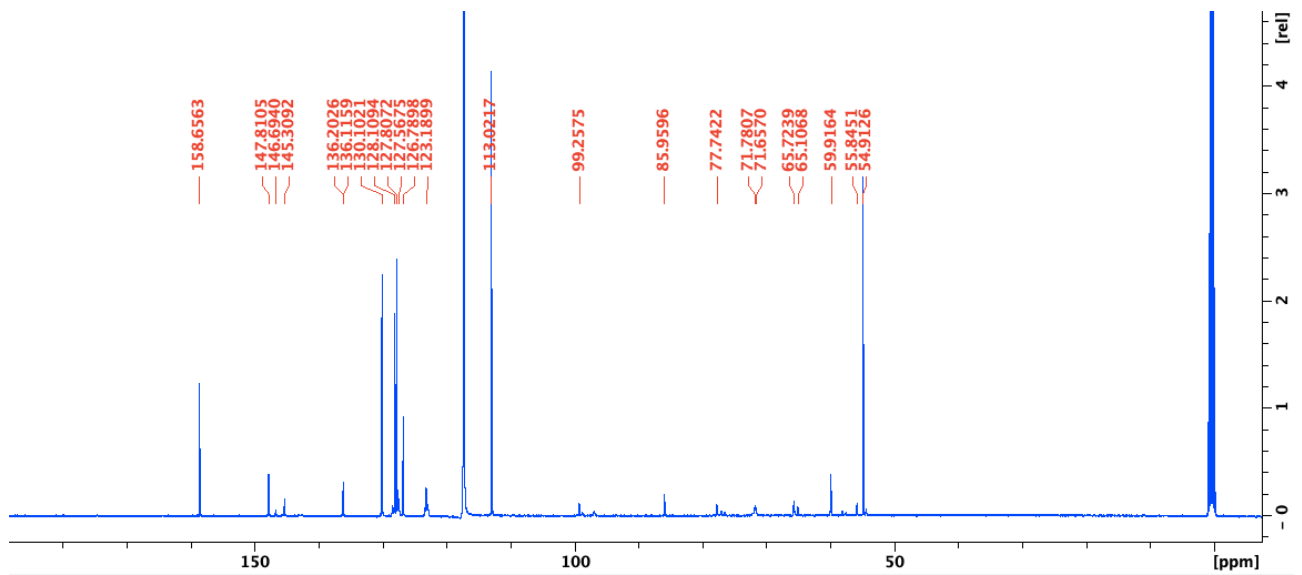
6. Liitteet

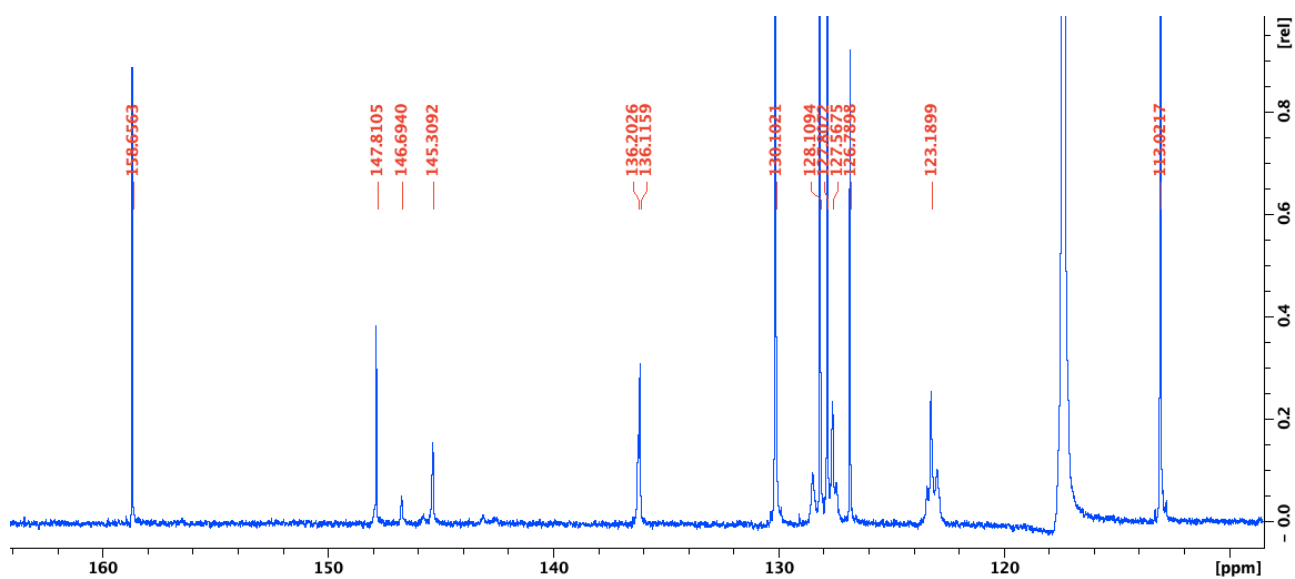
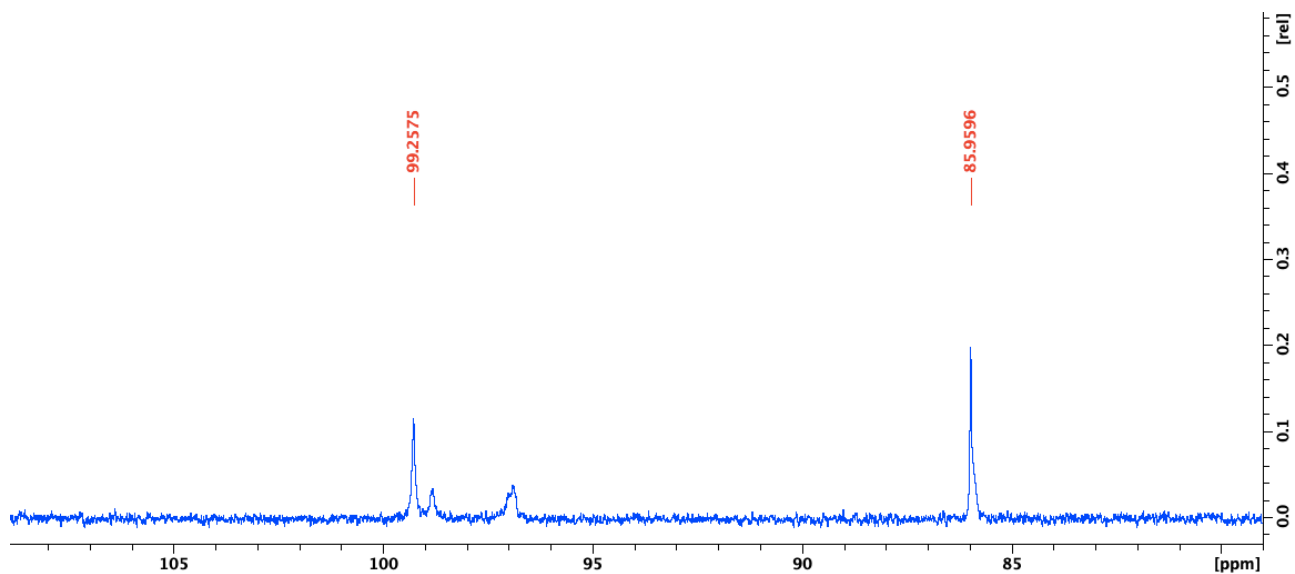
Liite 1. 2-bis(4-metoksifenyyl)(fenyyli)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etanolin (**3**) ^1H NMR-spektri



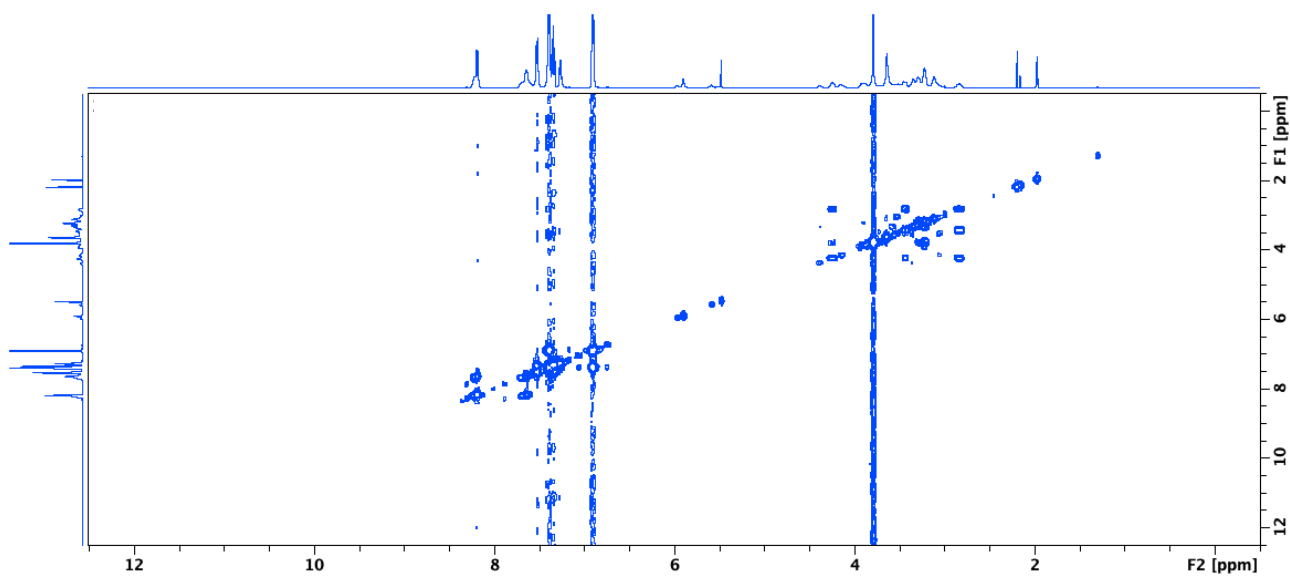


Liite 2. 2-bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etanolin (3) ¹³C NMR-spektri

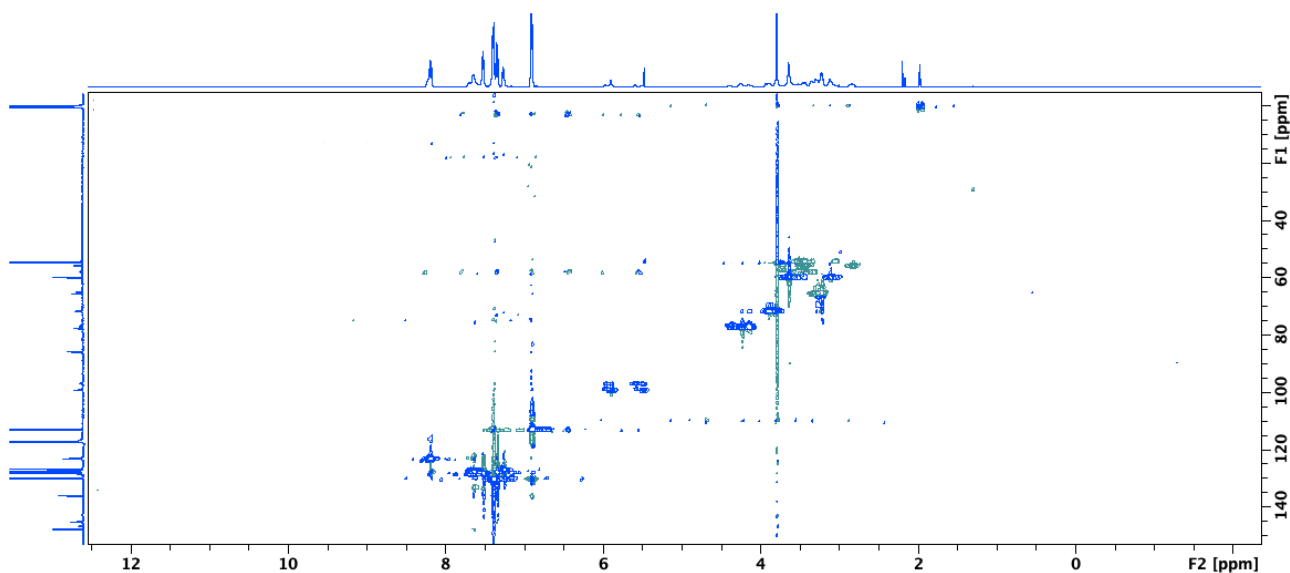


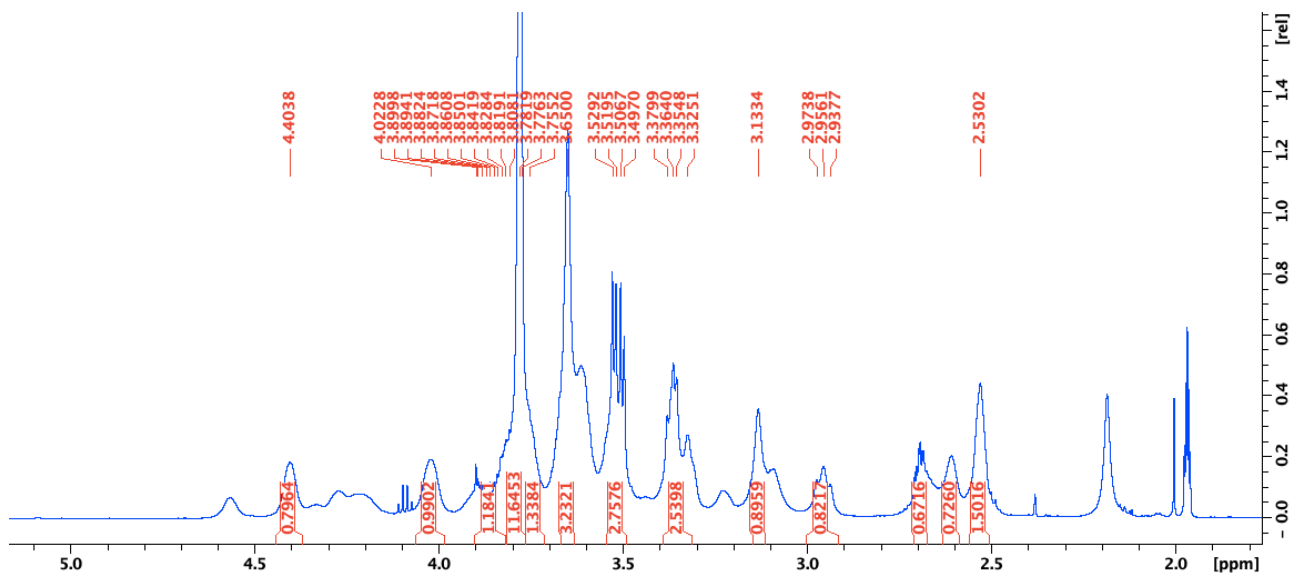
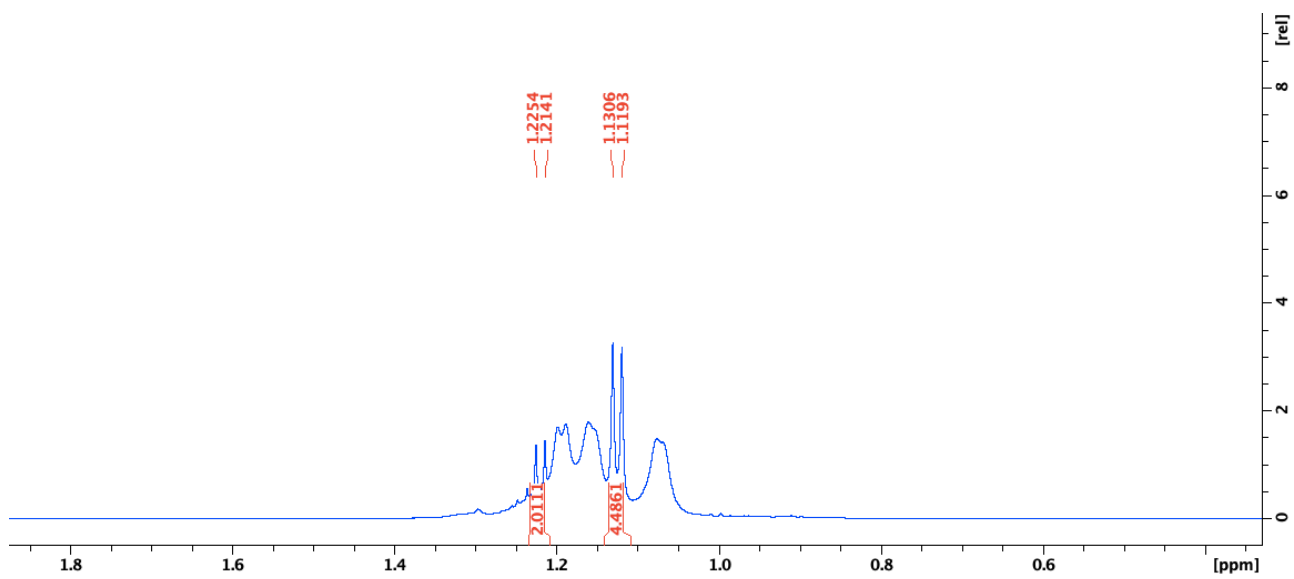


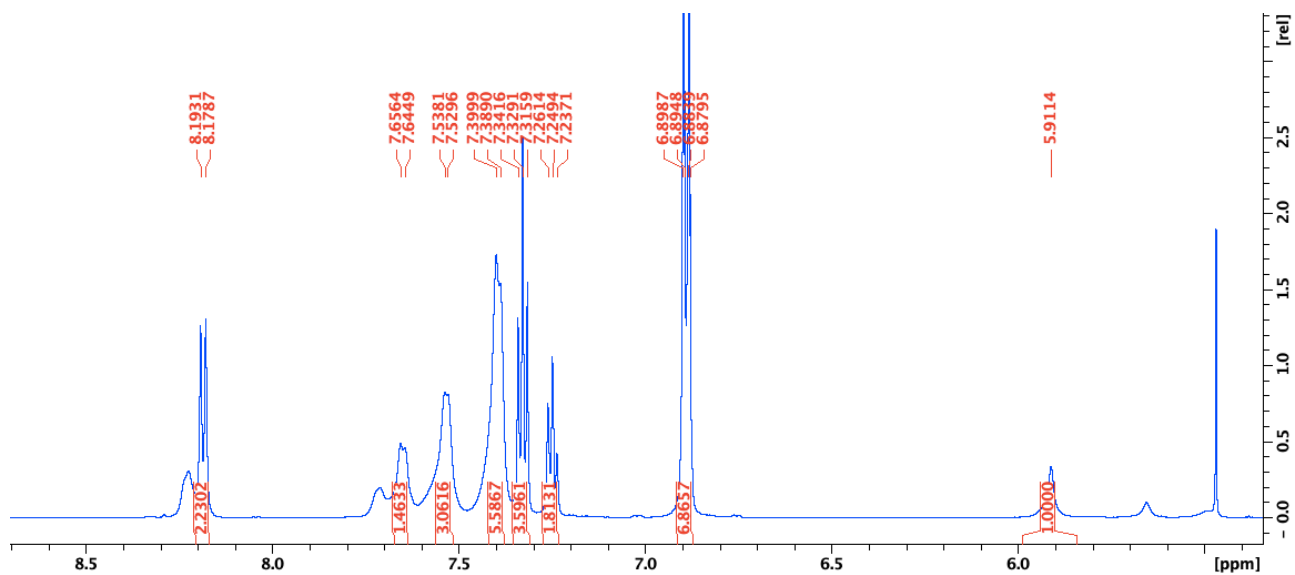
Liite 3. 2-bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etanolin (3) COSY



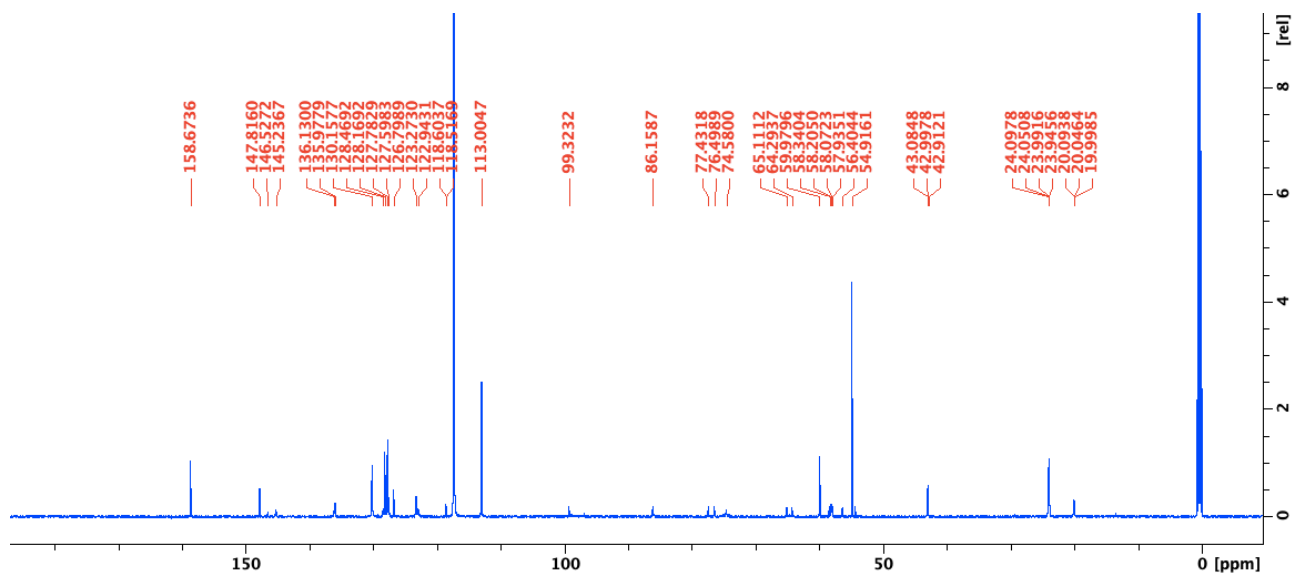
Liite 4. 2-bis(4-metoksifenyyli)(fenyyli)metoksi-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etanolin (3) HSQC

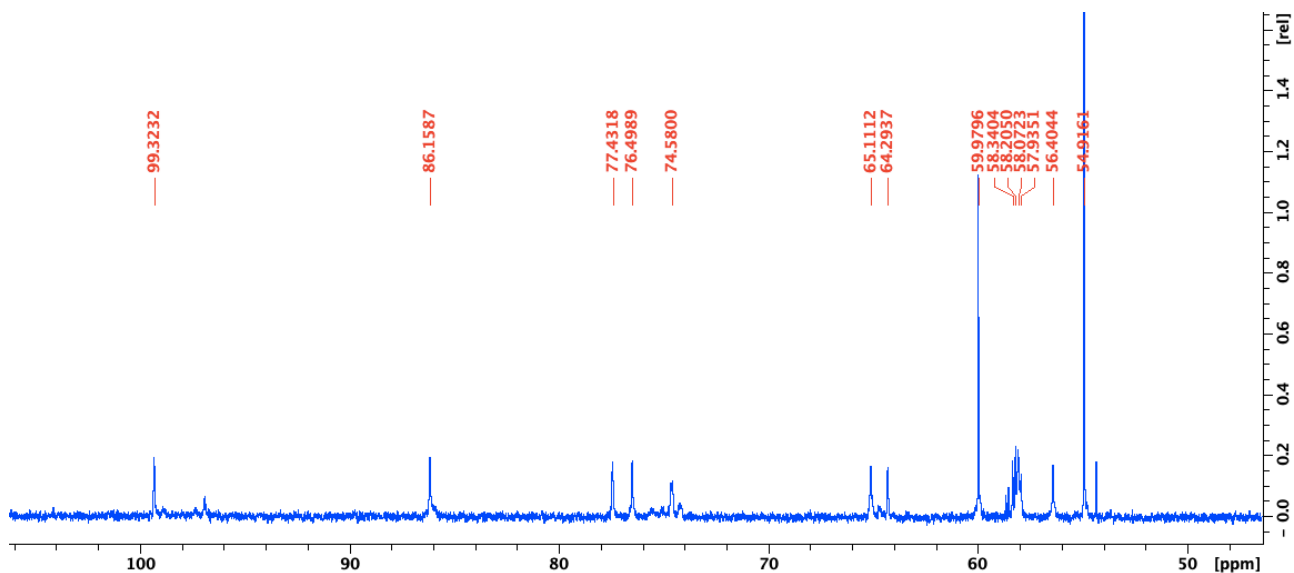
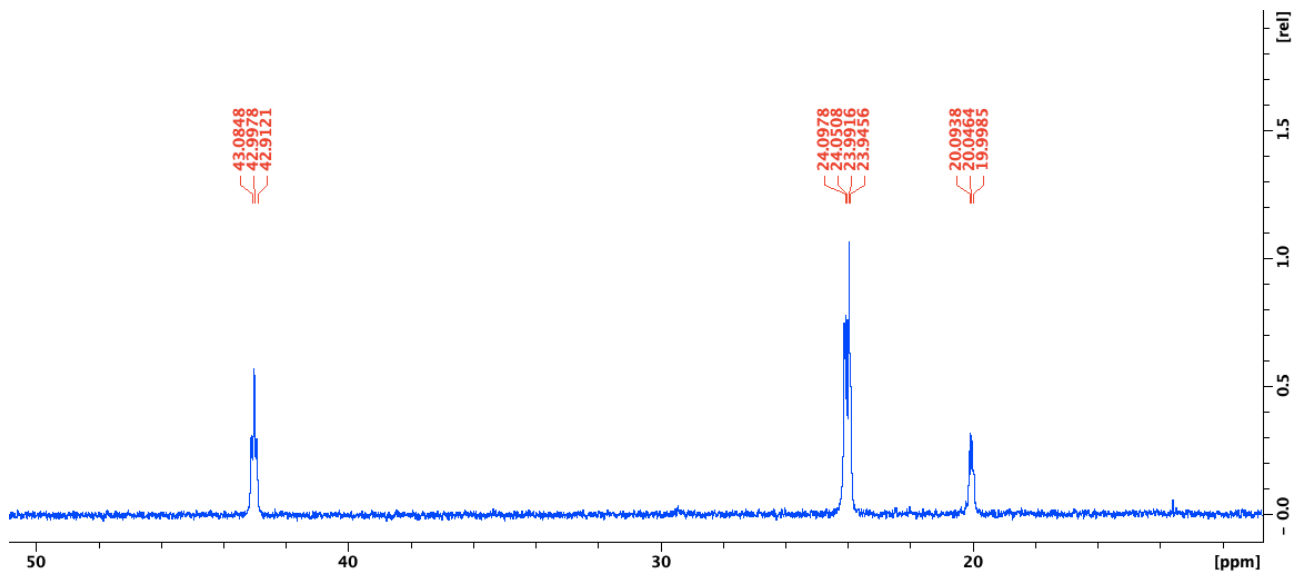


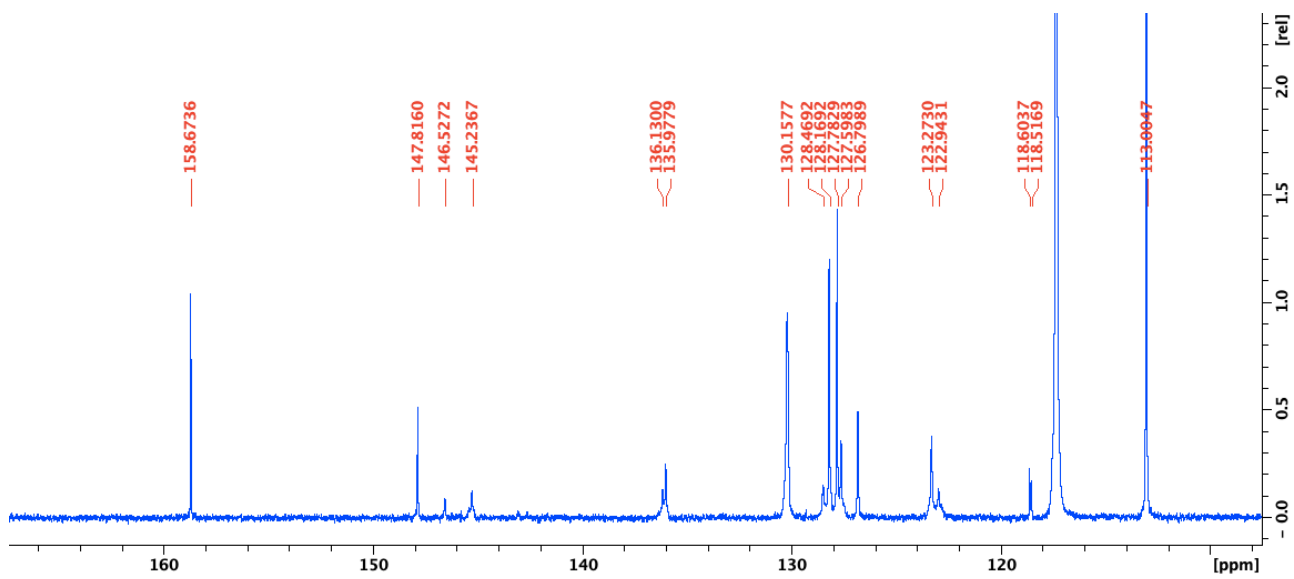




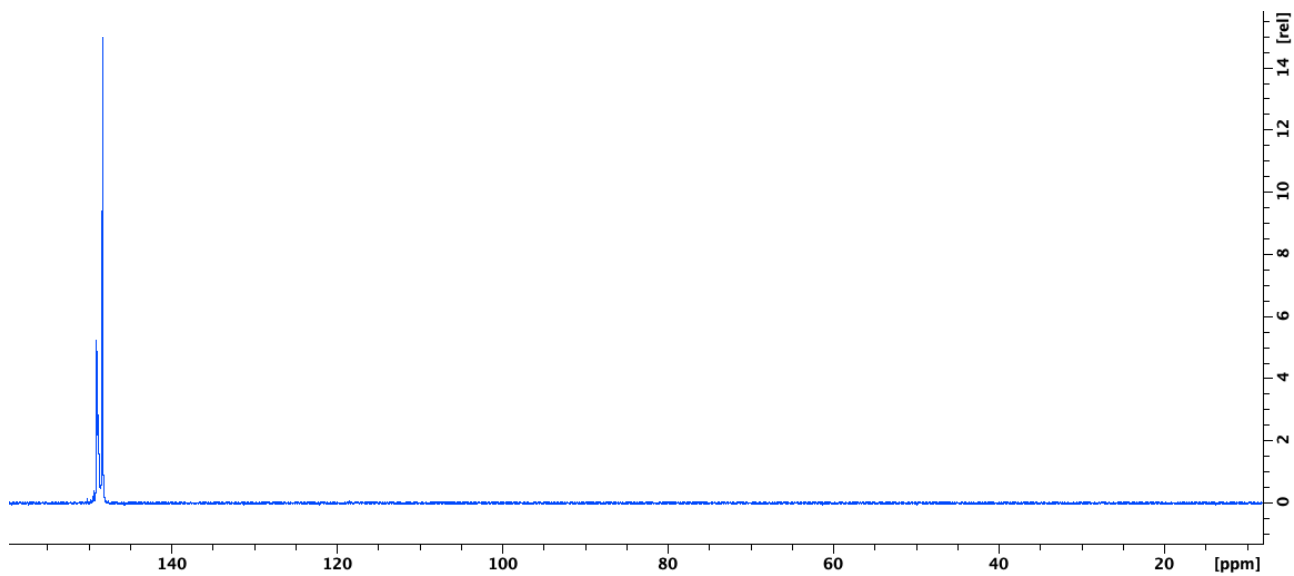
Liite 7. 2-(bis(4-metoksifenyyl)(fenyyl)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyl)-5-oksatsolidinyyl)etyyli (2-syanoetyyl) diisopropyylifosforamidiitin (**4**) ^{13}C NMR-spektri



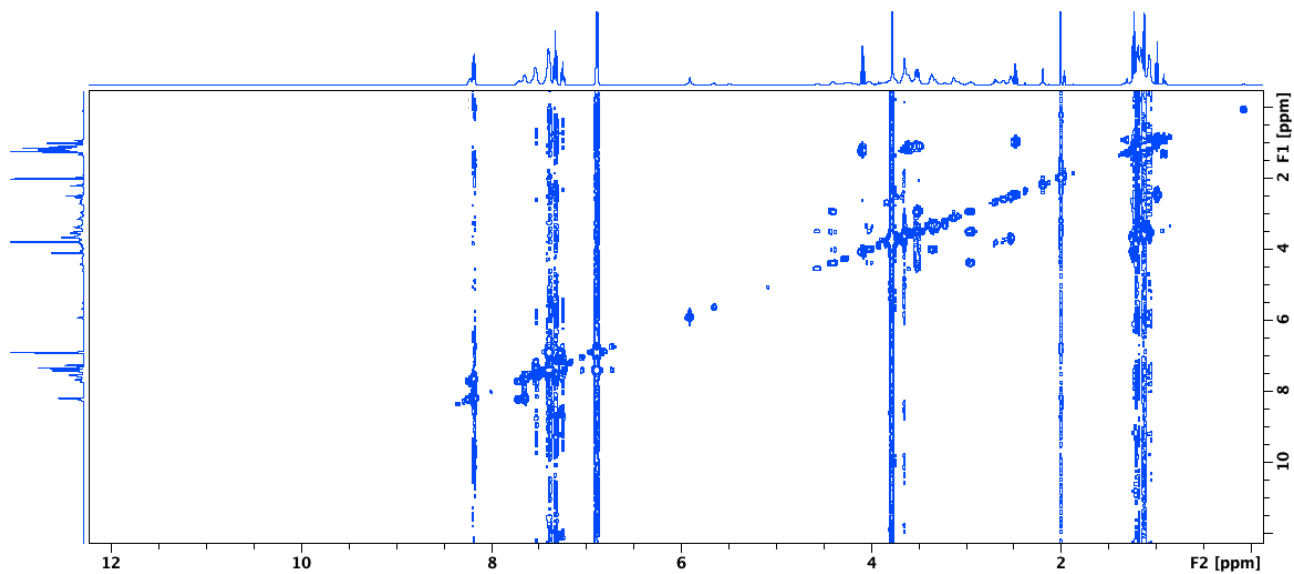




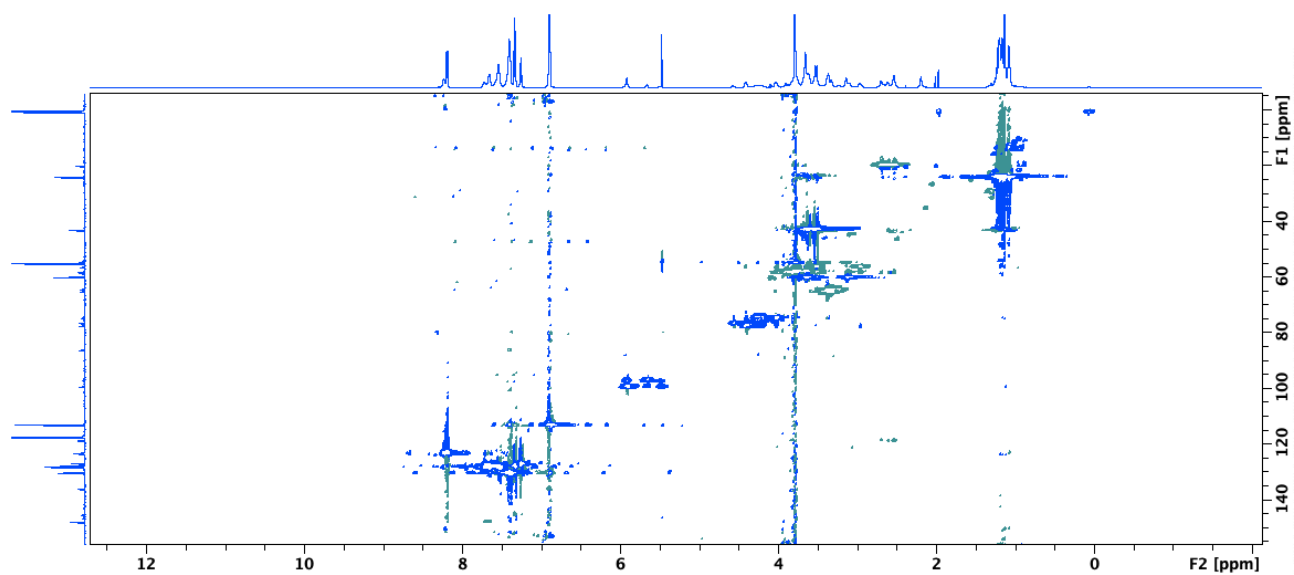
Liite 8. 2-(bis(4-metoksifenyli)(fenyyli)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyli)-5-oksatsolidinyyli)etyyli (2-syanoetyyli) diisopropyylifosforamidiitin (**4**) ^{31}P NMR-spektri



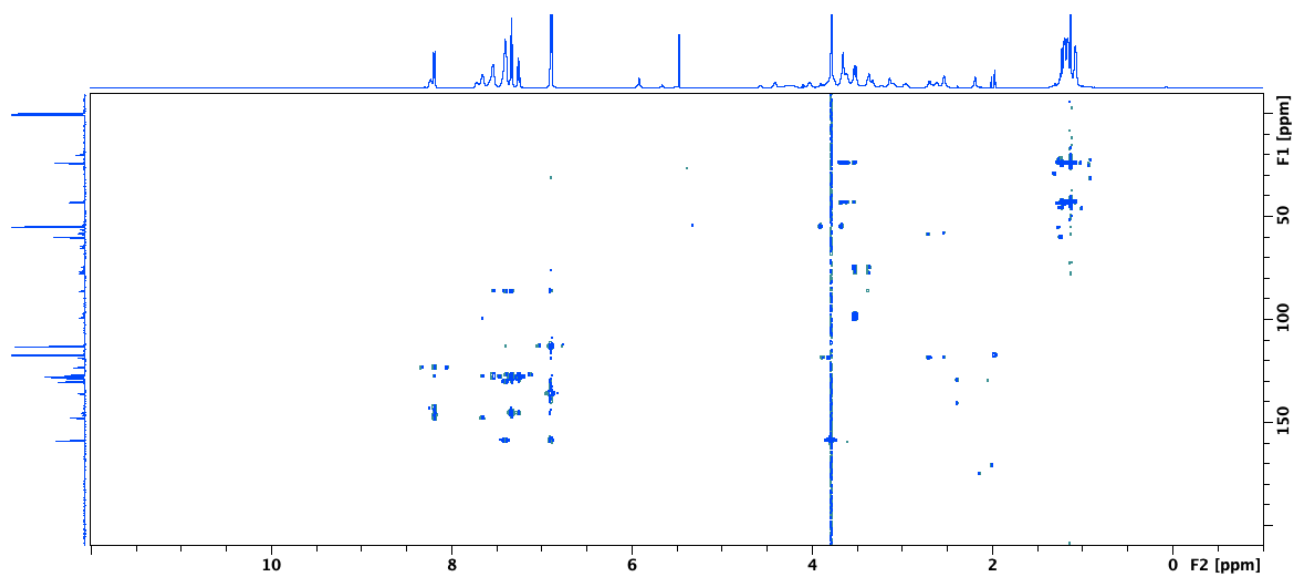
Liite 9. 2-(bis(4-metoksifenyyl)(fenyyl)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyl)-5-oksatsolidinyyl)etyyli (2-syanoetyyli) diisopropyylifosforamidiitin (4) COSY



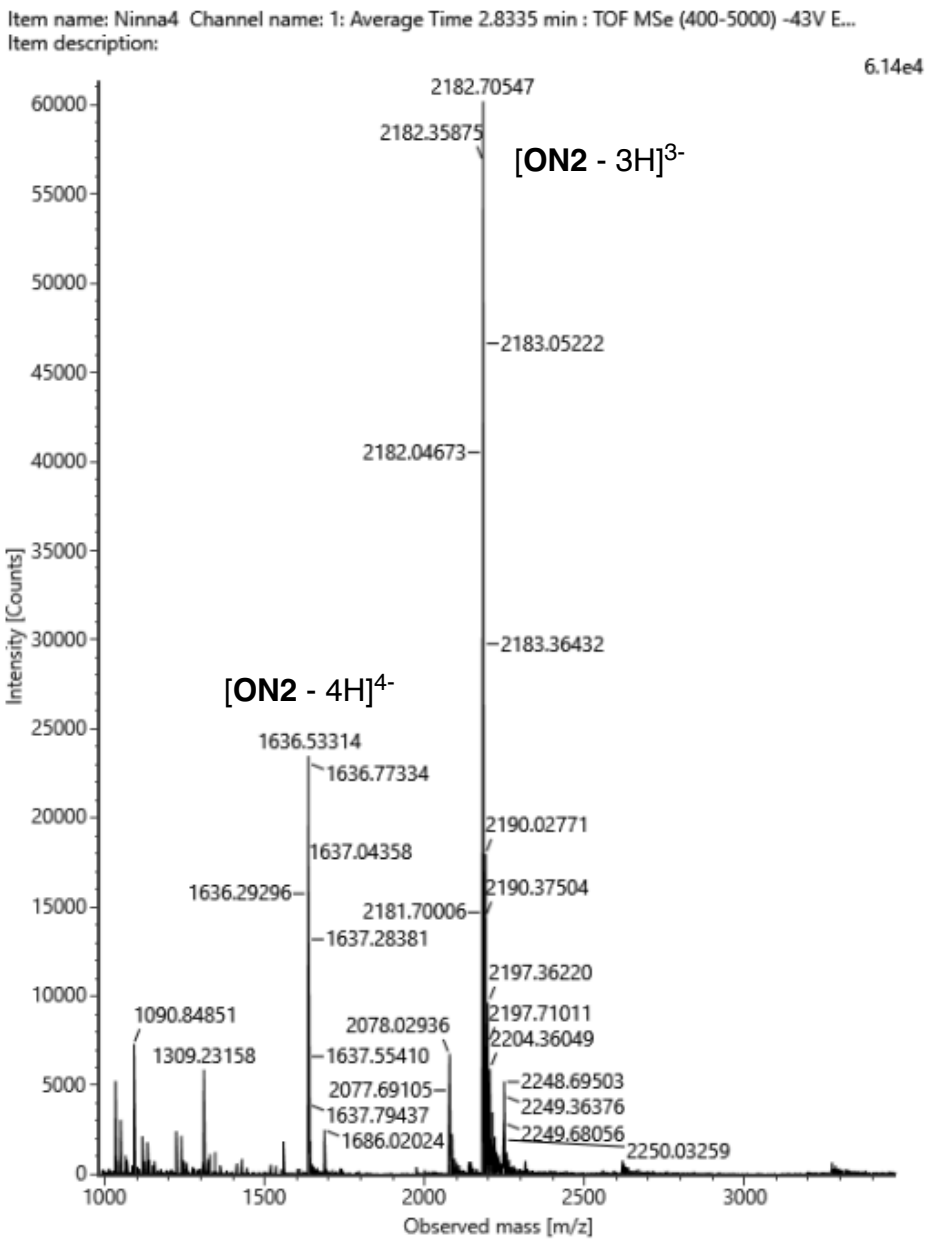
Liite 10. 2-(bis(4-metoksifenyyl)(fenyyl)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyl)-5-oksatsolidinyyl)etyyli (2-syanoetyyli) diisopropyylifosforamidiitin (4) HSQC



Liite 11. 2-(bis(4-metoksifenyyl)(fenyyl)metoksi)-1-(3-metoksi-2-(4-nitrofenyyl)-5-oksatsolidi-nyyli)etyyli (2-syanoetyyli) diisopropyylifosforamidiitin (4) HMBC

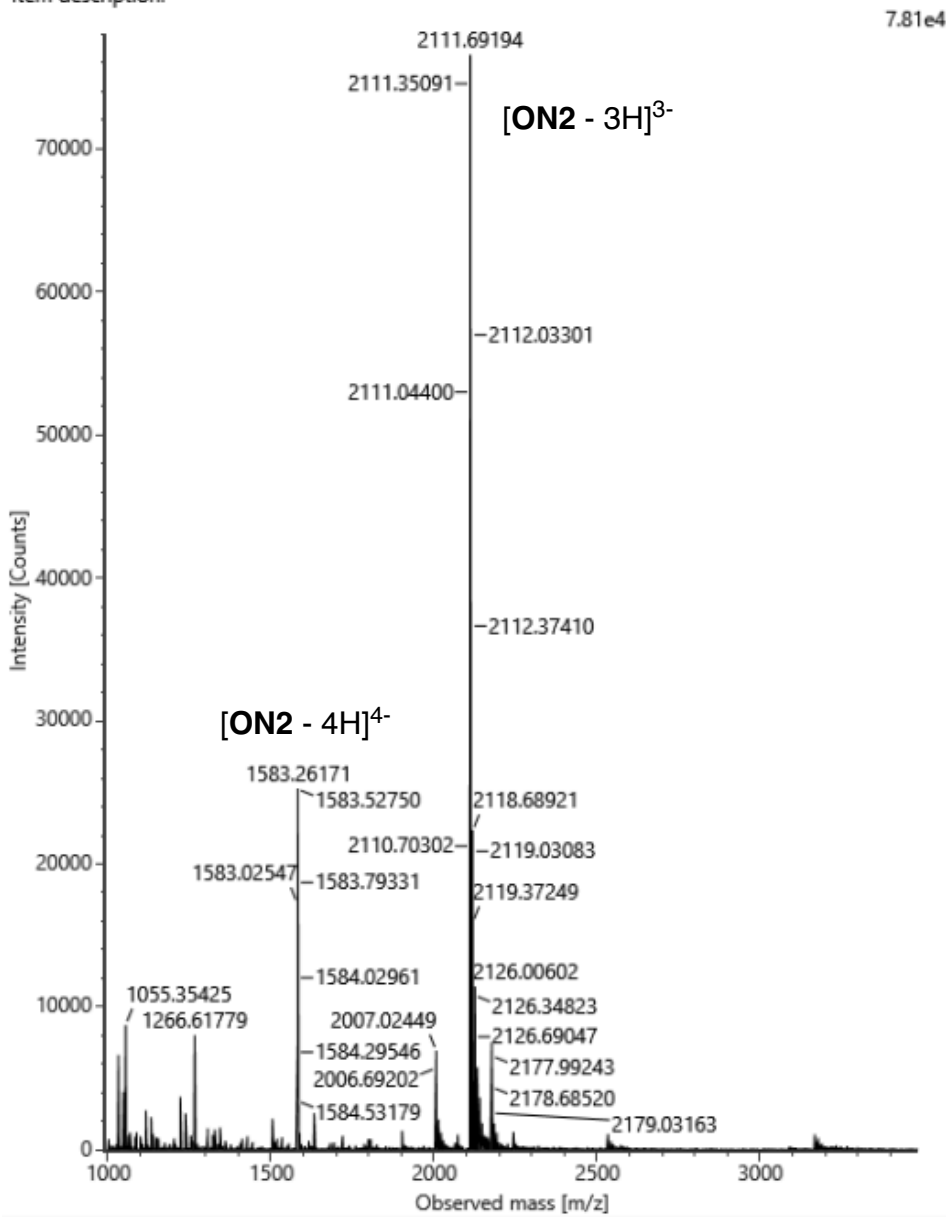


Liite 12. Kokonaan DNA-reaktioajalla valmistetun hiusneulaoligonukleotidin **ON2** massaspektri



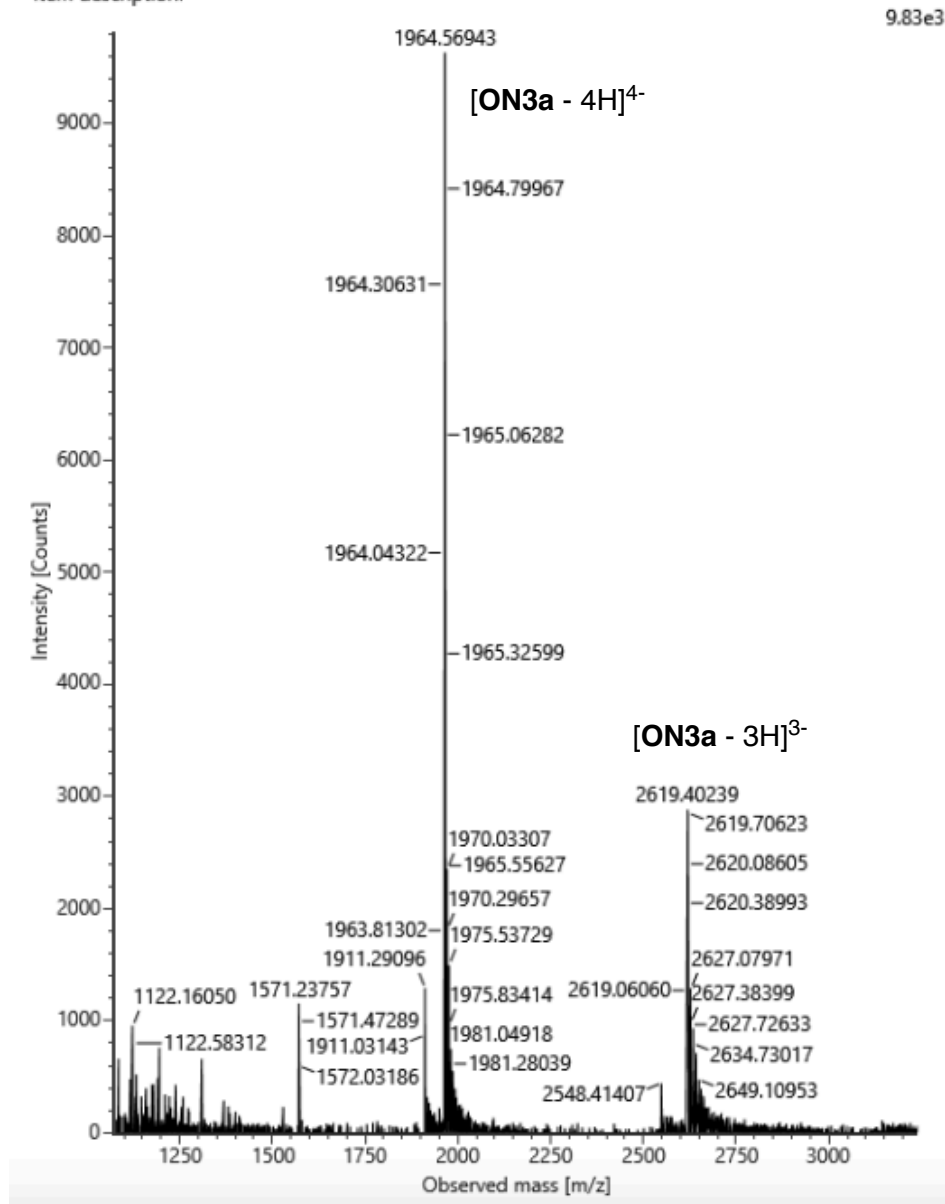
Liite 13. RNA-reaktioaikaa käyttäen valmistetun hiusneulaoligonukleotidin **ON2** massaspektri

Item name: Ninna1 Channel name: 1: Average Time 2.7835 min : TOF MSe (400-5000) -43V E...
Item description:



Liite 14. Hiusneulaoligonukleotidin ON3a massaspektri

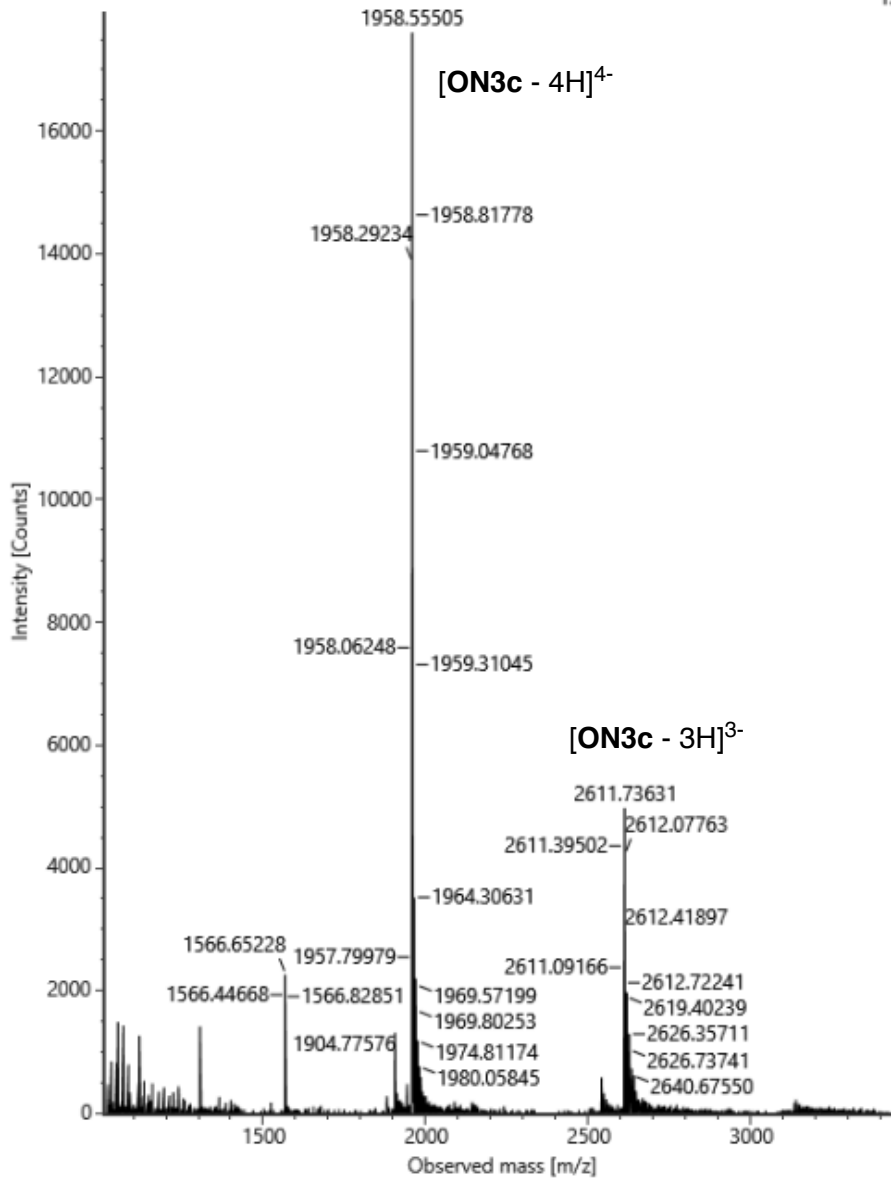
Item name: HP A Channel name: 1: Average Time 3.2668 min : TOF MSe (400-5000) -43V ESL...
Item description:



Liite 15. Hiusneulaoligonukleotidin ON3c massaspektri

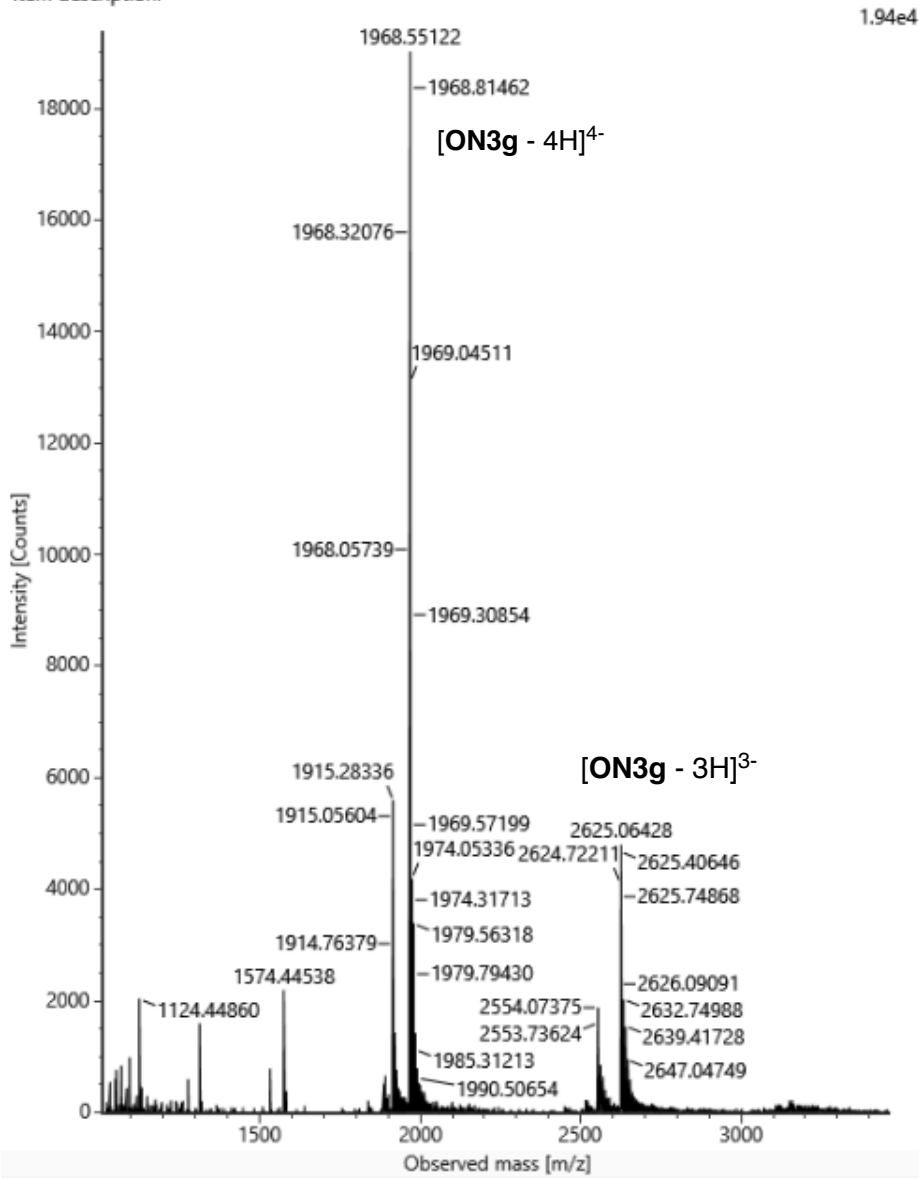
Item name: HP C Channel name: 1: Average Time 3.2668 min : TOF MSe (400-5000) -43V ESL...
Item description:

1.8e4



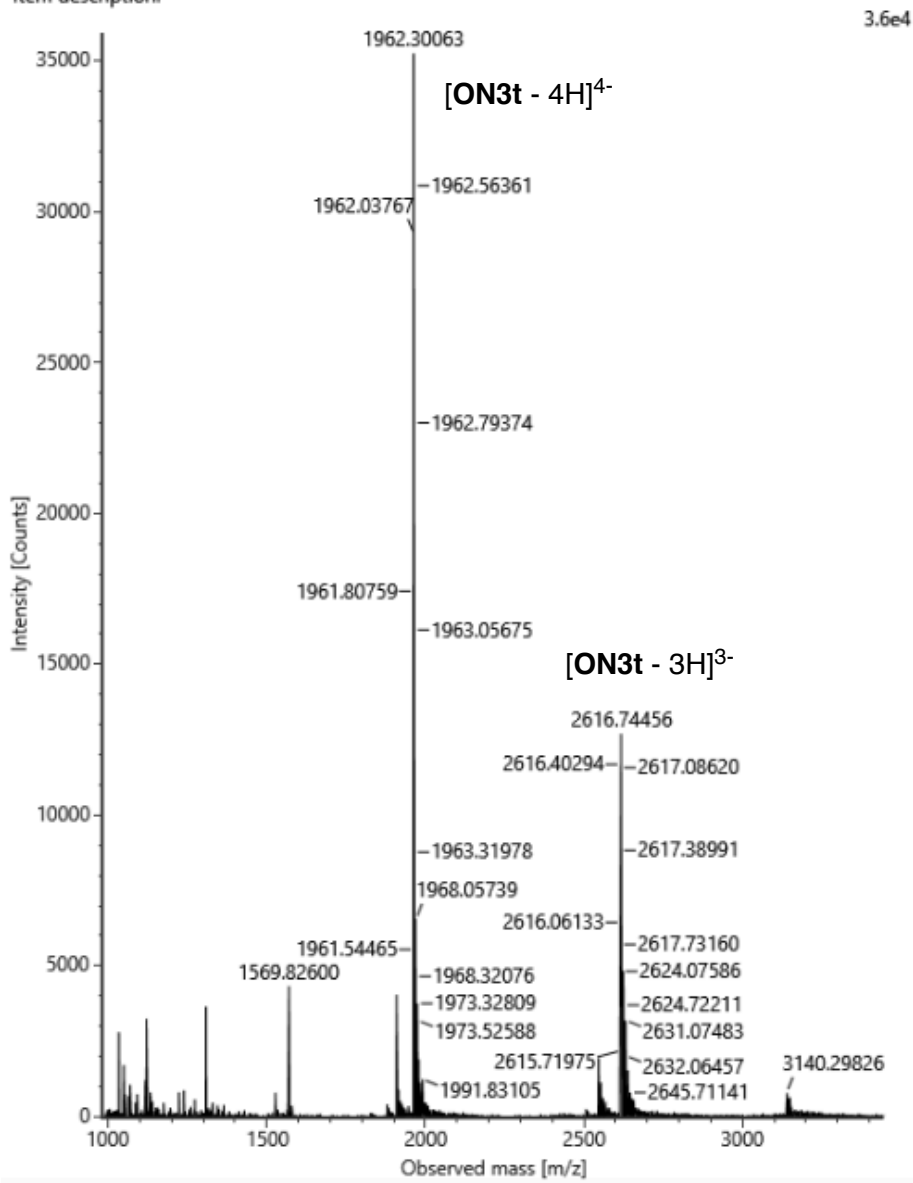
Liite 16. Hiusneulaoligonukleotidin ON3g massaspektri

Item name: HP G Channel name: 1: Average Time 3.2835 min : TOF MSe (400-5000) -43V ESI...
Item description:



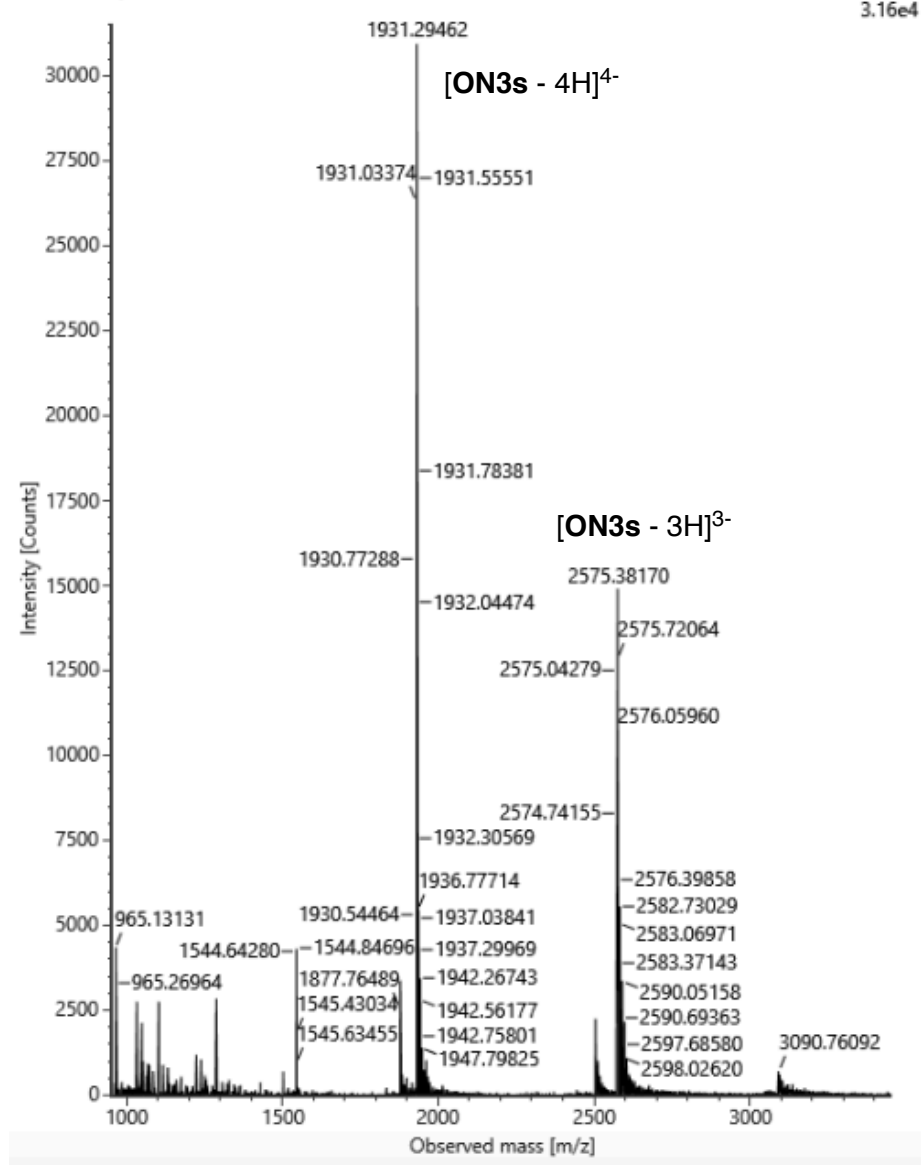
Liite 17. Hiusneulaoligonukleotidin ON3t massaspektri

Item name: HP-T Channel name: 1: Average Time 2.6335 min : TOF MSe (400-5000) -43V ESI...
Item description:



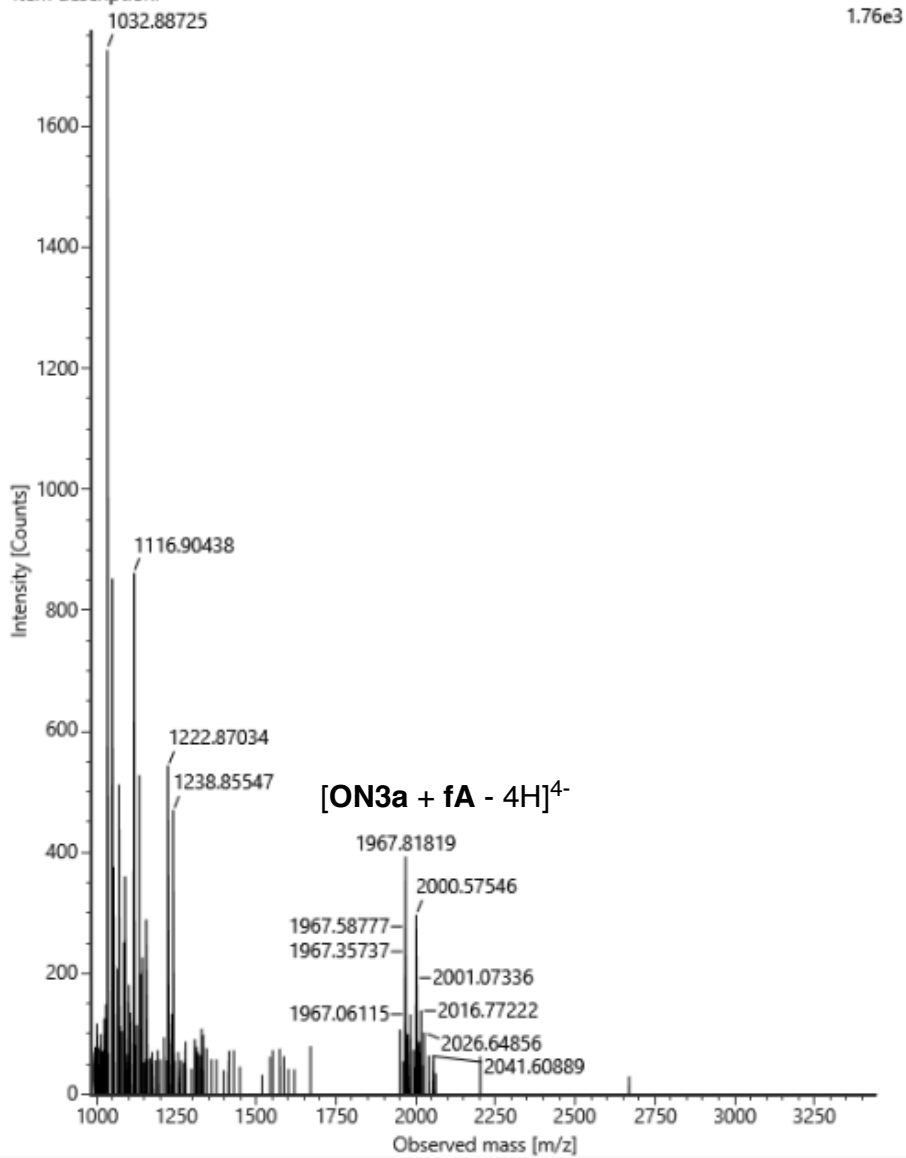
Liite 18. Hiusneulaoligonukleotidin ON3s massaspektri

Item name: HP-S Channel name: 1: Average Time 2.6668 min : TOF MSe (400-5000) -43V ESI...
Item description:

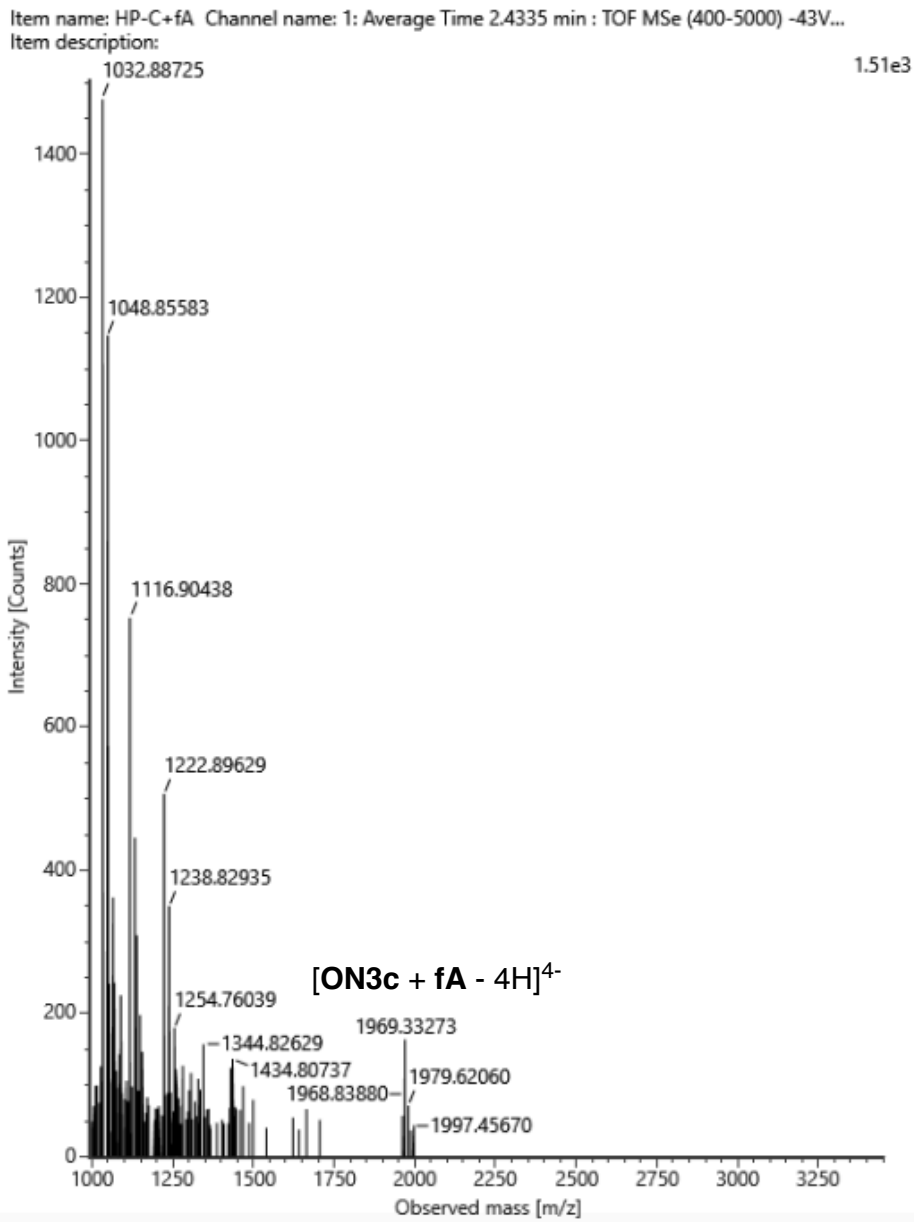


Liite 19. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3a** ja **fA**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

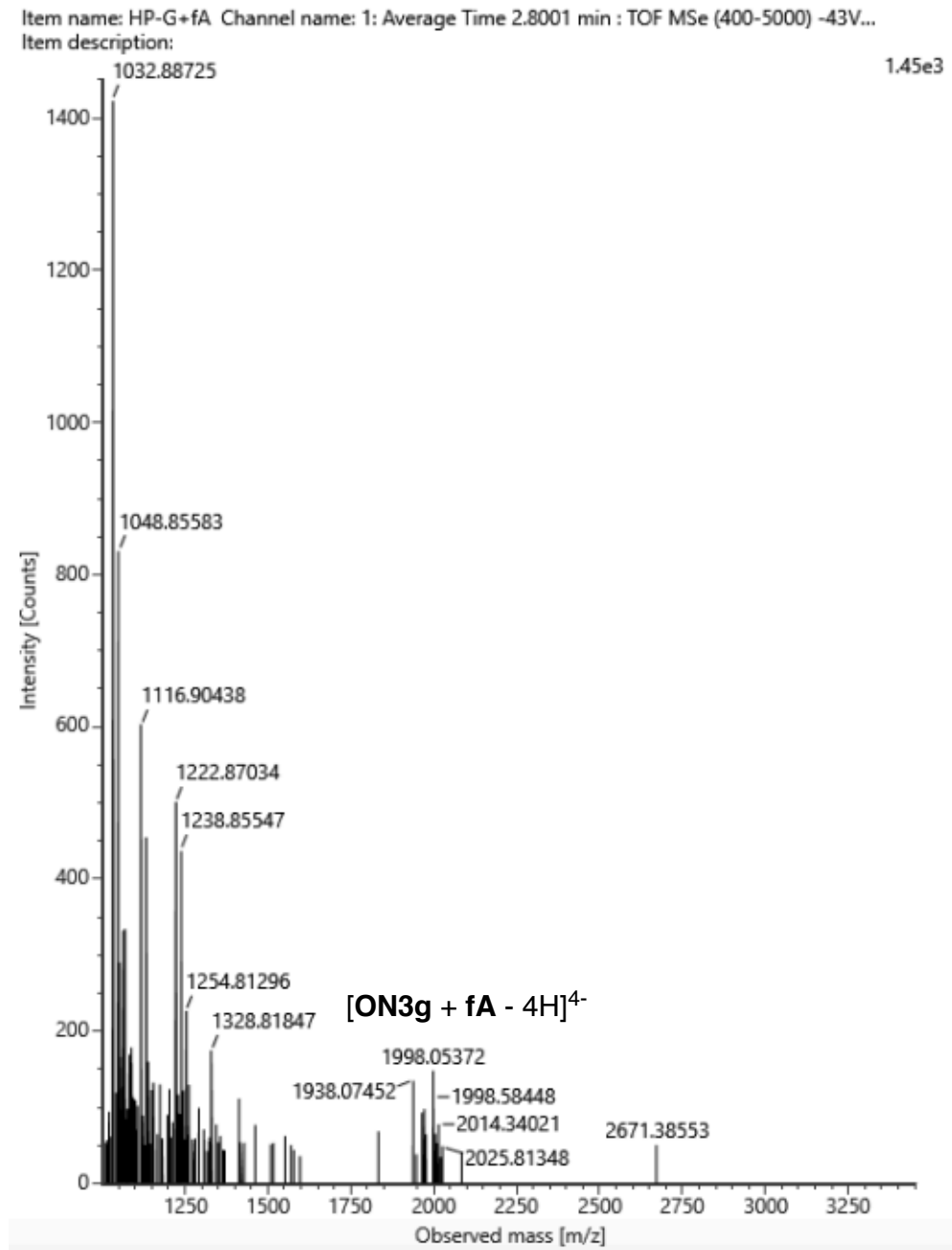
Item name: HP-A+fA Channel name: 1: Average Time 2.4501 min : TOF MSe (400-5000) -43V...
Item description:



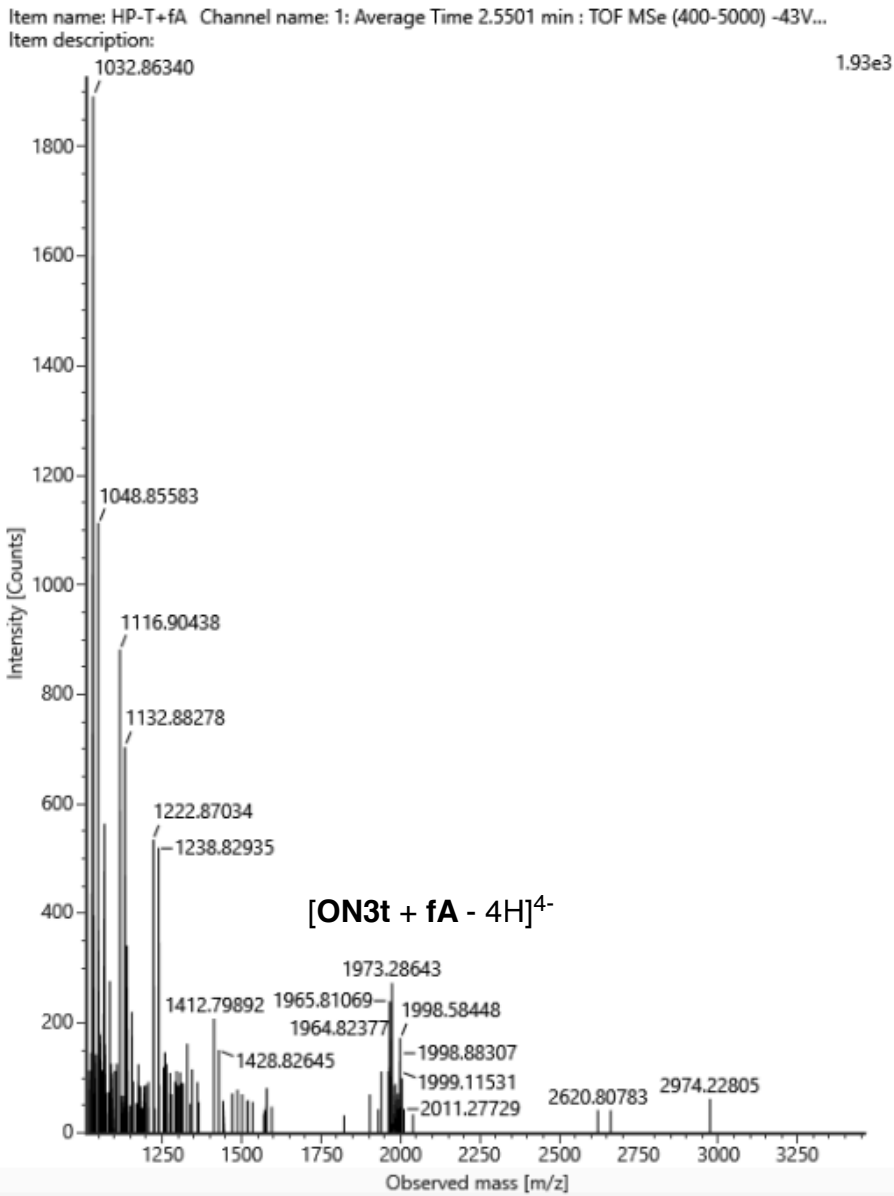
Liite 20. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3c** ja **fA**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri



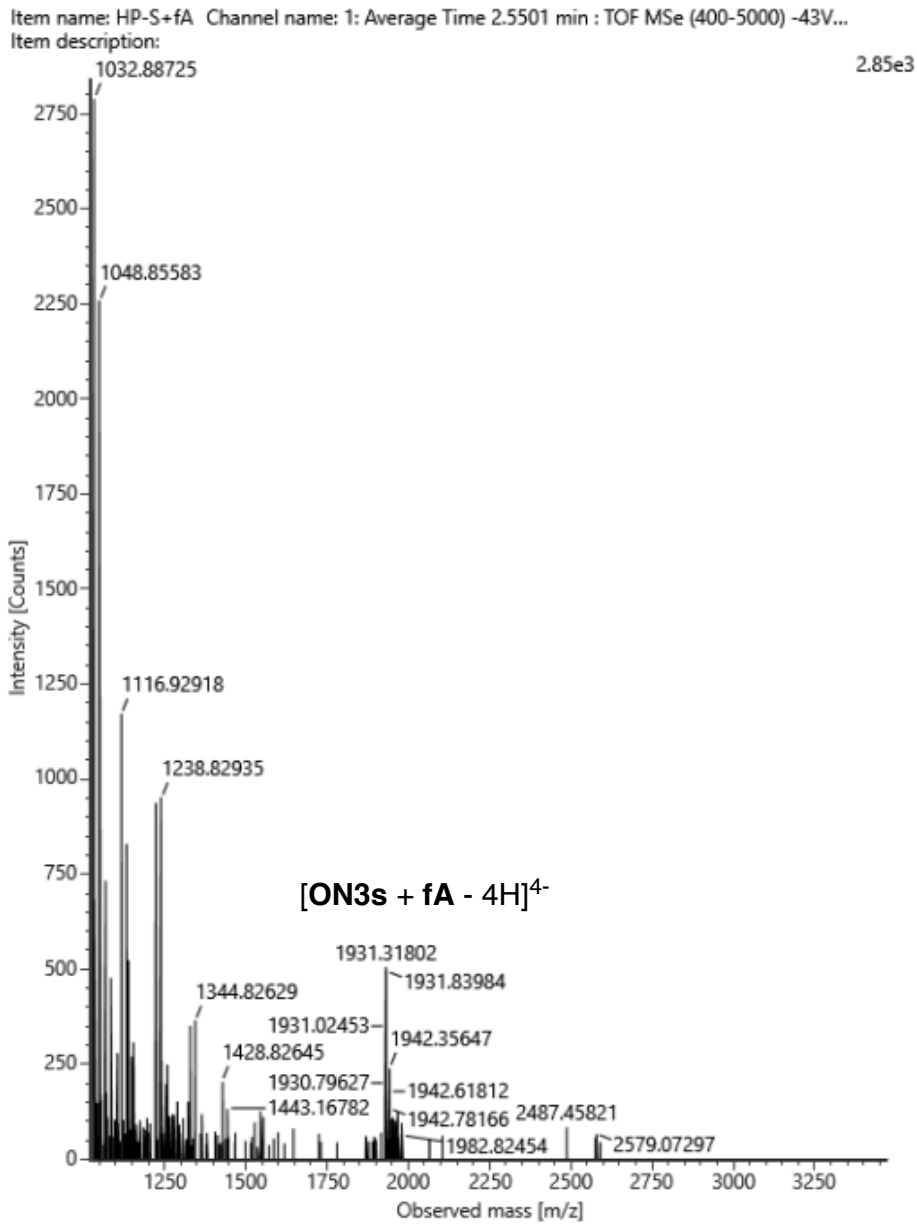
Liite 21. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3g** ja **fA**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri



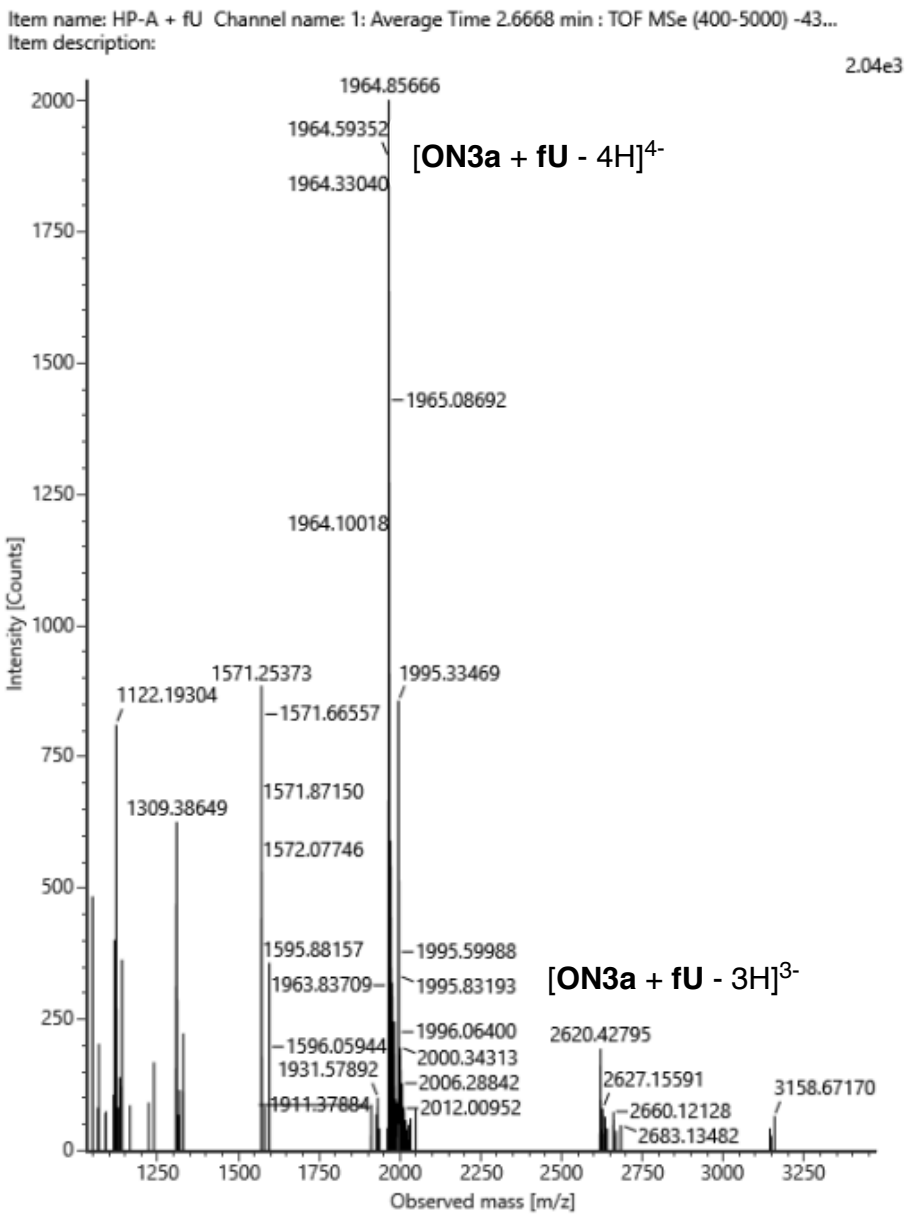
Liite 22. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3t** ja **fA**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri



Liite 23. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3s** ja **fA**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

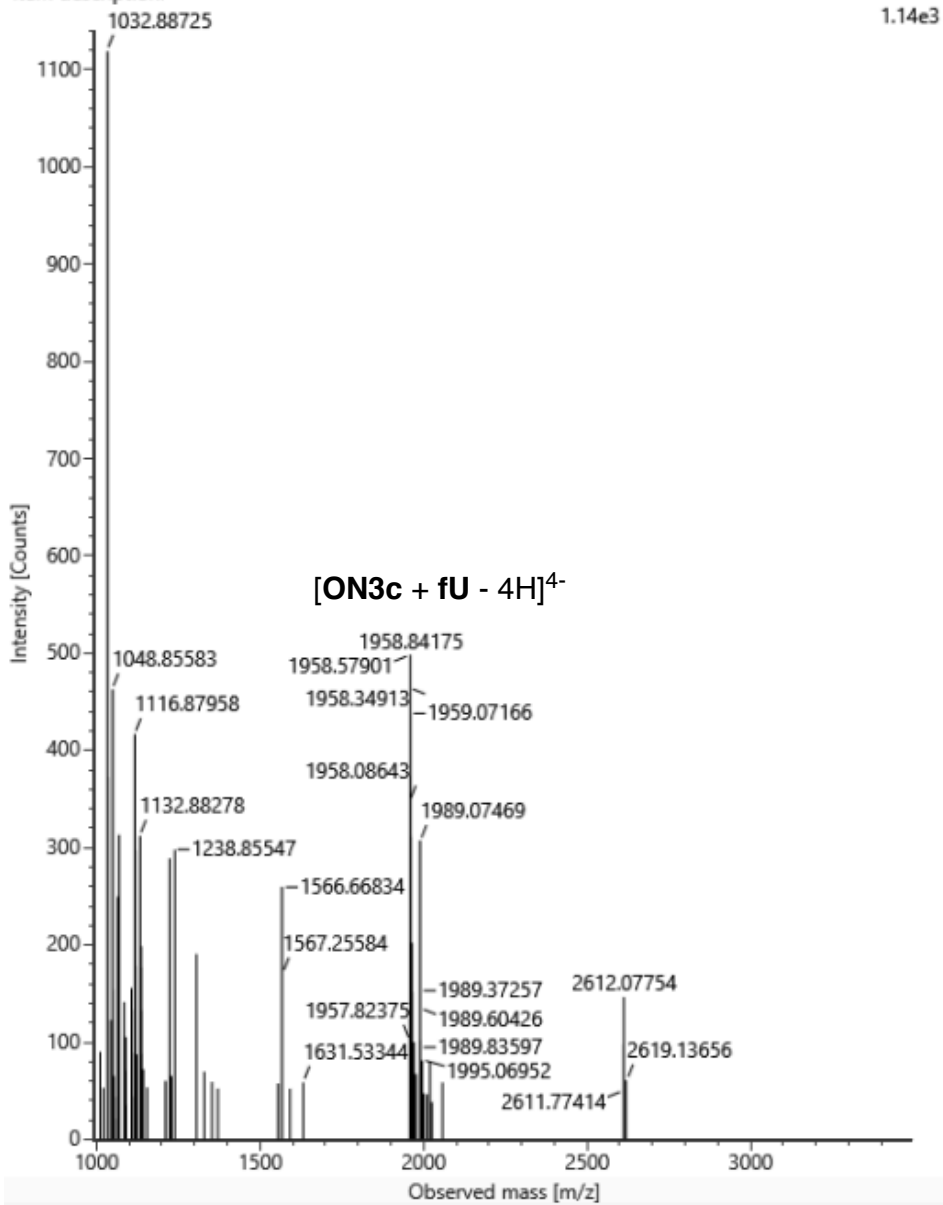


Liite 24. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3a** ja **fU**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

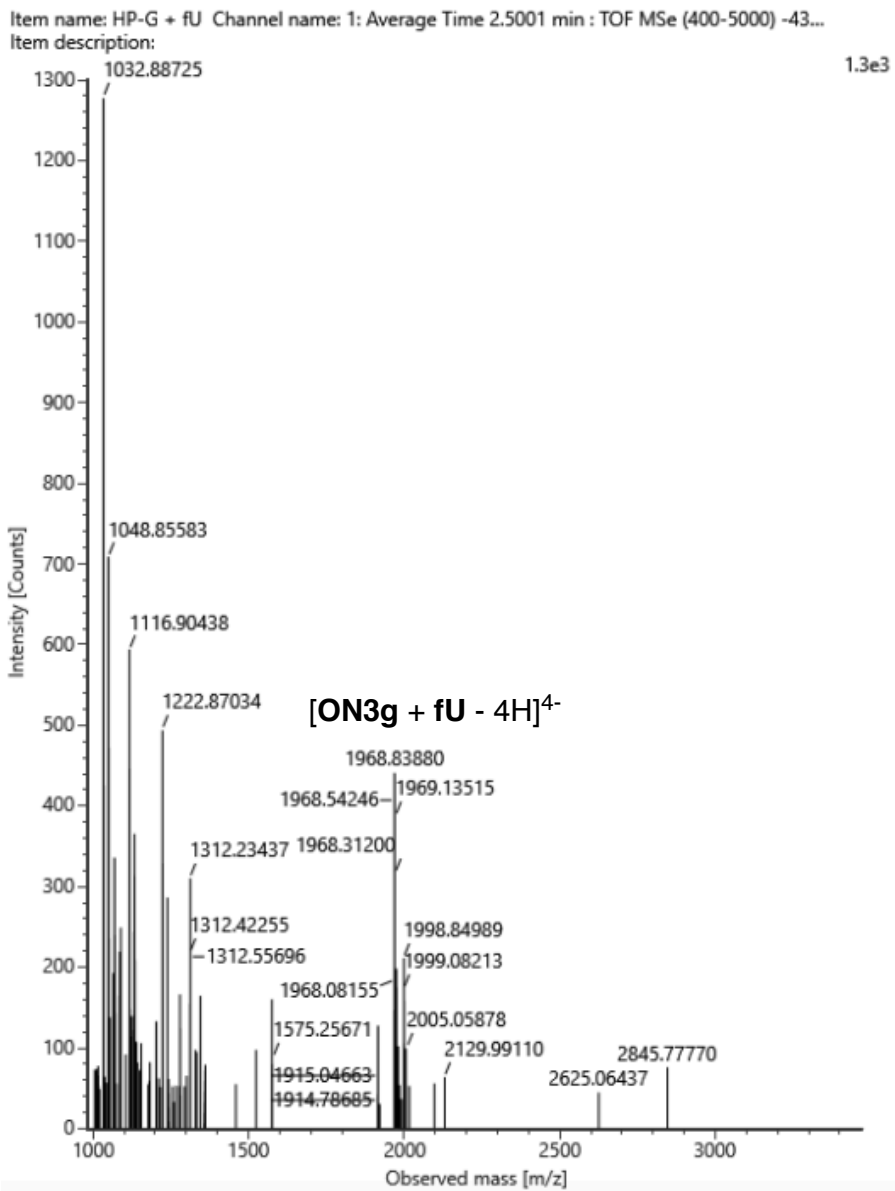


Liite 25. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3c** ja **fU**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

Item name: HP-C + fU Channel name: 1: Average Time 2.5501 min : TOF MSe (400-5000) -43...
Item description:

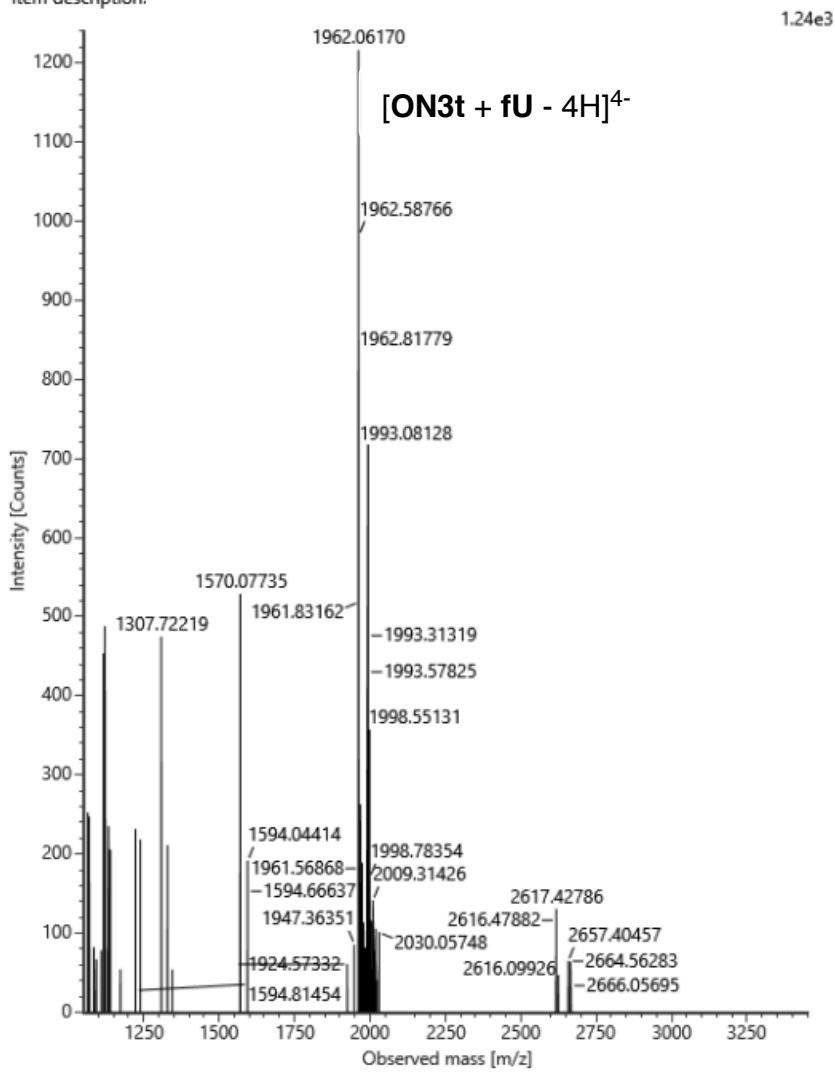


Liite 26. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3g** ja **fU**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri



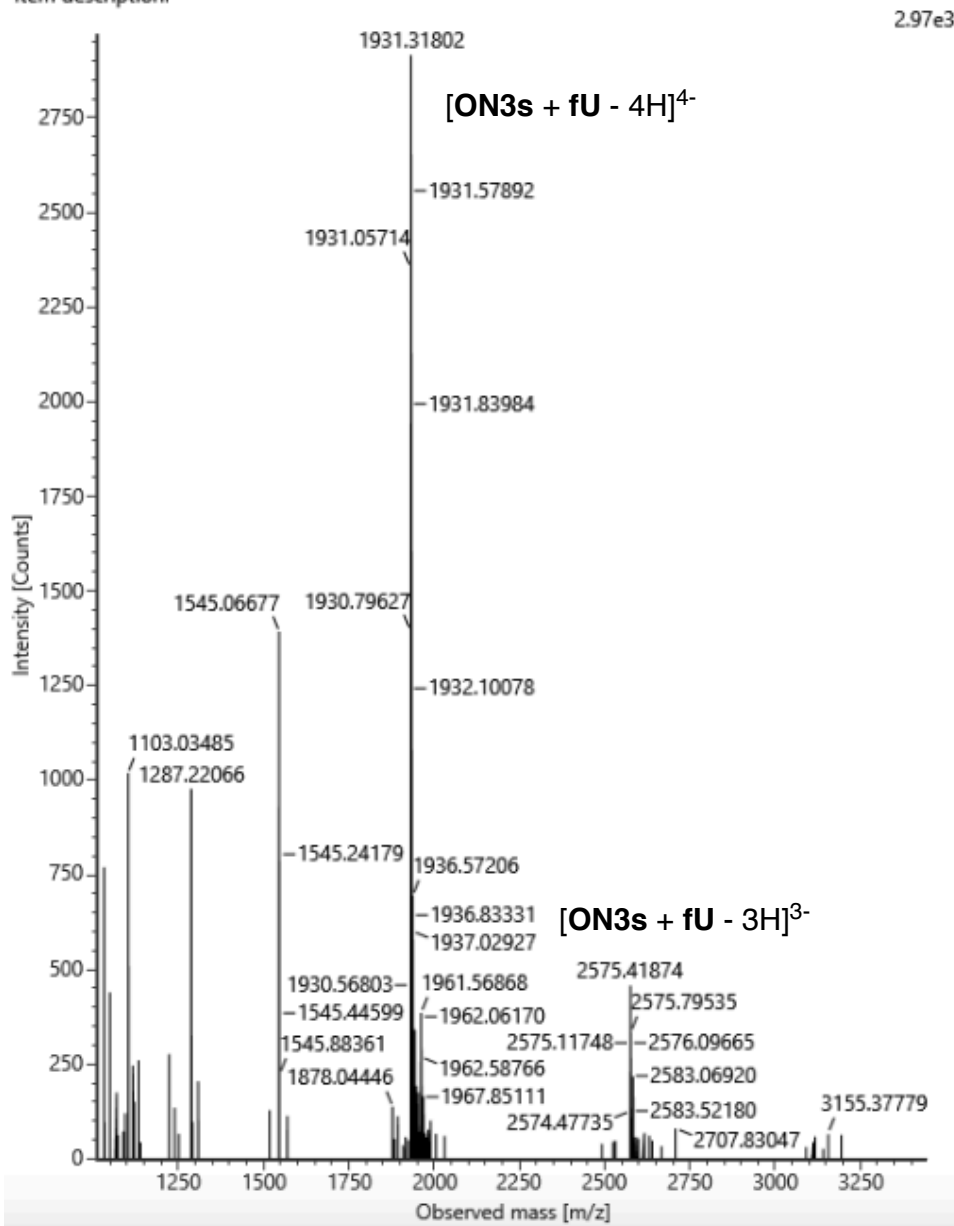
Liite 27. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3t** ja **fU**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

Item name: HP-T + fU Channel name: 1: Average Time 2.6168 min : TOF MSe (400-5000) -43...
Item description:



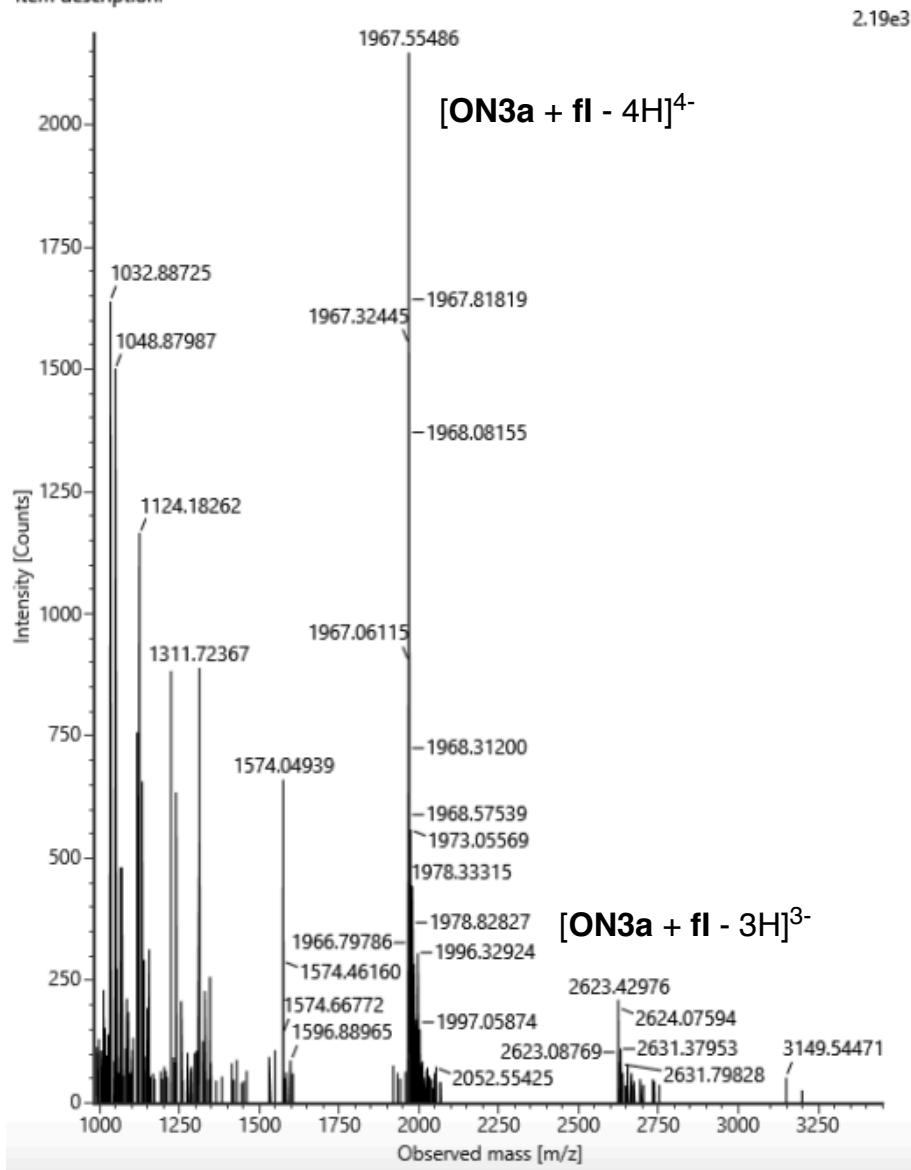
Liite 28. Hiusneulaoligonukleotidin ON3s ja fU:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

Item name: HP-S + fU Channel name: 1: Average Time 2.7168 min : TOF MSe (400-5000) -43...
 Item description:

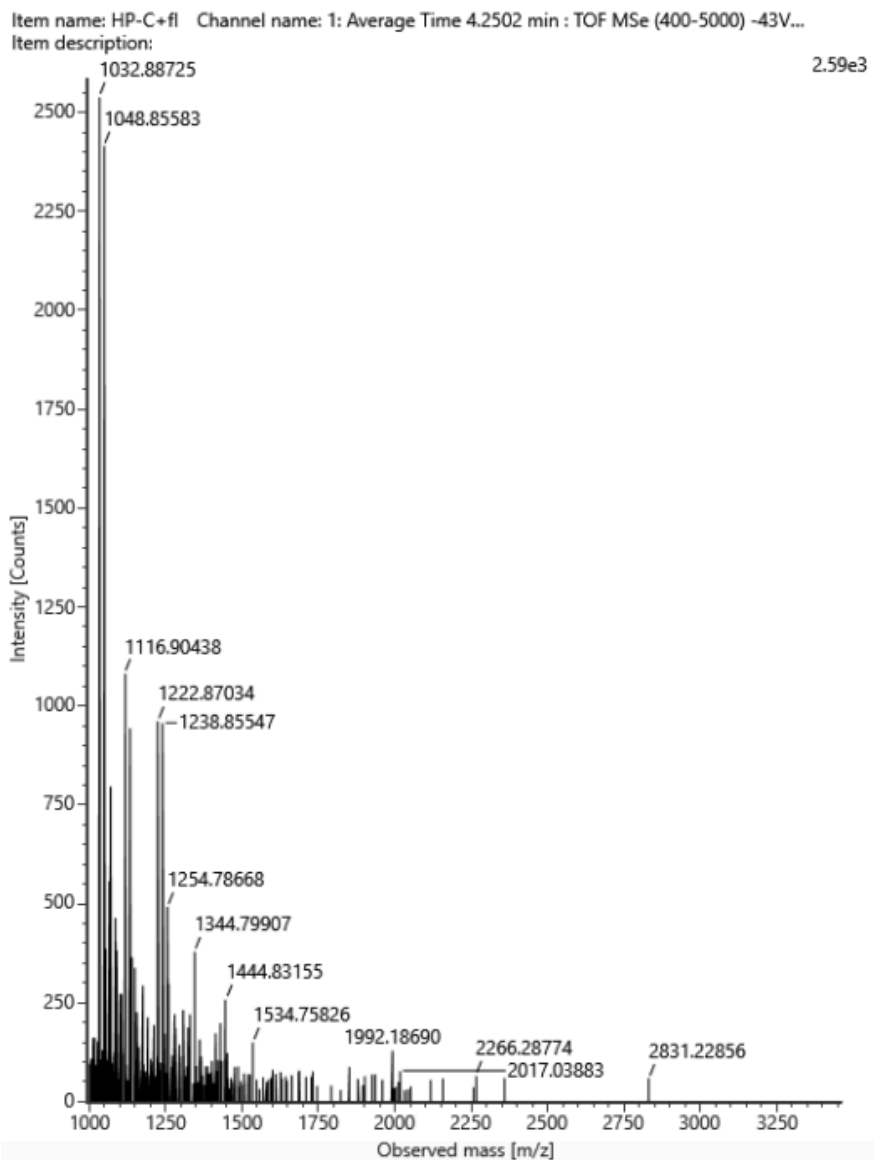


Liite 29. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3a** ja **fl**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

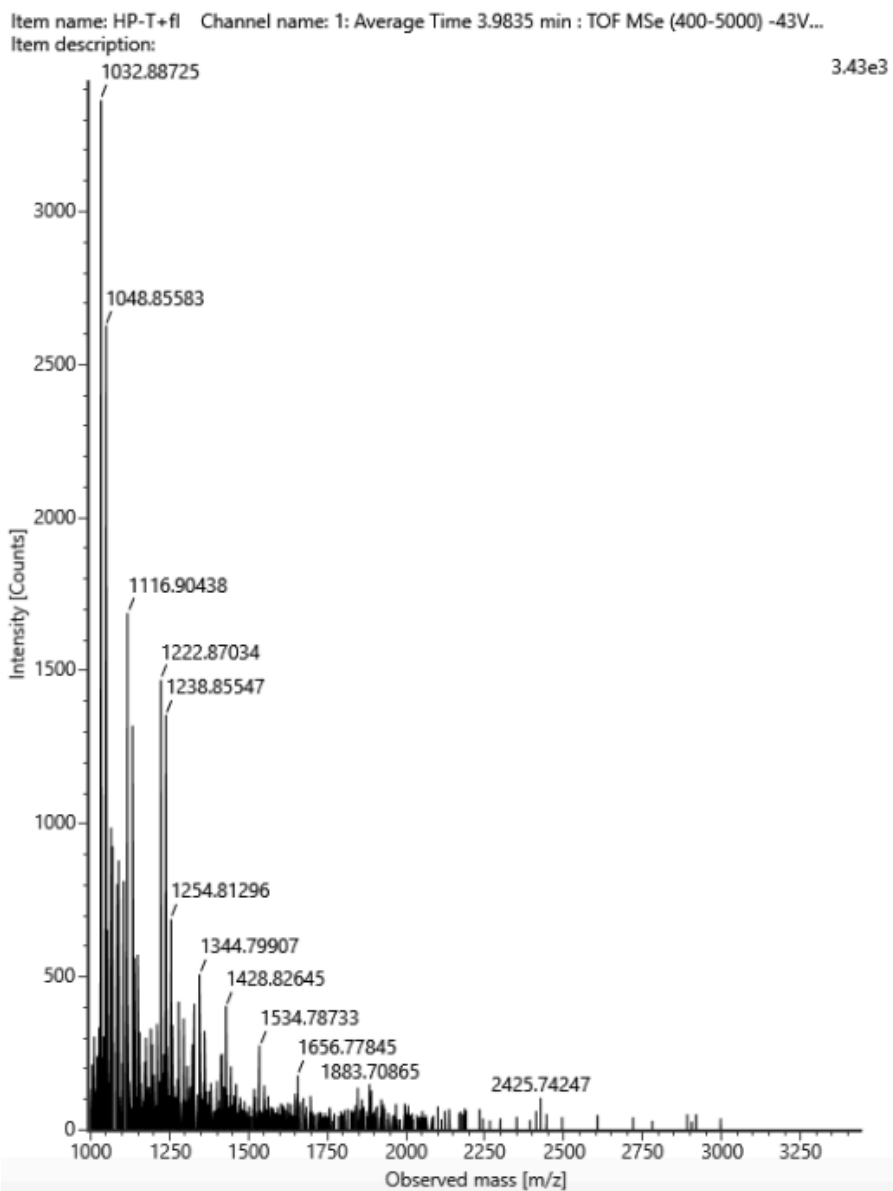
Item name: HP-A+fl Channel name: 1: Average Time 4.0168 min : TOF MSe (400-5000) -43V...
 Item description:



Liite 30. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3c** ja **fl**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri



Liite 31. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3t** ja **fl**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri



Liite 32. Hiusneulaoligonukleotidin **ON3s** ja **fl**:n kovalenttisen konjugaatin massaspektri

Item name: HP-S+fl Channel name: 1: Average Time 4.5002 min : TOF MSe (400-5000) -43V...
Item description:

