

N-metoksioksatsolidiini-ligaatio ja sen soveltaminen nukleiinihappokemiassa

Mika Sulkanen

Orgaaninen kemia ja

kemiallinen biologia

Turun yliopisto

Toukokuu 2020

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

MIKA SULKANEN: *N*-metoksioksatsolidiini-ligaatio ja sen soveltaminen nukleiinihappokemiassa

Pro gradu -tutkielma, 40 s., liitteet 12 s.

Kemia

Toukokuu 2020

Tutkielman tarkoituksena oli tutkia *N*-metoksioksatsolidiinin muodostumista. Kyseisessä aiemmin julkaisemattomassa rakenteessa on yhtäläisyyksiä aiemmin tunnettuihin happamuuteen reagoiviin konjugaattirakenteisiin, joita ovat oksiimi, hydratsoni ja neoglykosidit. Näiden konjugaattirakenteiden muodostumiselle on yhteistä α -nukleoofiilisen typen kondensoituminen karbonyylihiileen. *N*-metoksioksatsolidiini-rakenne syntyy *N*-oksiamiinin ja aldehydin reagoidessa.

Tutkimuksia varten syntetisoitiin malliyhdisteeksi 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiini, jonka annettiin reagoida erilaisten pienmolekyylialdehydien kanssa. Mallireaktioiden avulla pystyttiin arvioimaan oksatsolidiinin muodostumisen nopeutta, tasapainosaantoa ja näiden pH-riippuvuutta. Lisäksi syntetisoitiin aldehydin 5'-asemassaan sisältävä 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiini, jolla pyrittiin mallintamaan *N*-metoksioksatsolidiinin soveltuvuutta mahdollisessa DNA-templatoidussa ligaatiossa. Tutkittavia pienmolekyylejä olivat asetialdehydi, butanaali, hippuraldehydi ja 3-bentsyylioksi-1-propanaali. Ligaatioreaktiot tehtiin huoneenlämpötilassa puskuroidussa vesiliuoksessa pH:ssa 4,5 ja 6 ja reaktioita seurattiin RP-HPLC:llä. *N*-metoksioksatsolidiini-ligaation havaittiin olevan nopein pH:ssa 4 ja hidastuvan, kun pH nousee. Reaktio on reversiibeli. Tasapainosaanto vaihtelee riippuen yhdisteestä, ja mitä poolittomampi hiilivetyketju on aldehydin rakenteessa ennen aldehydiä, sitä nopeampi on ligaatio.

Pienmolekyylireaktioiden tuloksena *N*-metoksioksatsolidiini-ligaation havaittiin soveltuvan makromolekyylien, esimerkiksi peptidit ja oligonukleotidit, väliseen ligaatioon. 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini ja 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin välinen reaktio antoi lisäksi viitteitä *N*-metoksioksatsolidiinin soveltuvuudesta DNA-templatoituun ligaatioon ja polymerisaatioon.

Tutkielman tärkeimmät lähteet ovat:

Benizri, S.; Gissot A; Martin A; Violet B; Grinstaff M. W, and Barthélémy P. *Bioconjugate Chemistry*. **2019**, *30*, 366-383.

Bargh, J. D.; Isidro-Llobet A; Parker J. S, and Spring D. R. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 4361-4374.

Baudendistel, O. R.; Wieland D. E.; Schmidt M. S.; Wittmann V. *Chem.-Eur.J.* **2016**, *22*, 17359-17365.

Asiasanat: *N*-metoksioksatsolidiini-ligaatio, biokonjugaatit, nukleosidikonjugointi, konjugaatit, ligaatio, pH-riippuvainen, reversiibeli, kinetiikka, happolabiili, nukleosidit, nukleotidit.

Lyhenteet

siRNA	Small Interfering RNA, pieni häiritsevä RNA
mRNA	Messenger RNA, lähetti RNA
PEG	Polyetyleeniglykoli
GalNAc	<i>N</i> -asetyyliagalaktosamiini
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, ligandien systemaattinen kehittäminen eksponentiaalisesti rikastamalla
TFA	Trifluorietikkahappo
PAGE	Polyakryyliamidi geelelektroforeesi
iPCR	Immuno-PCR, PCR = polymeraasiketjureaktio
PLA	Proximity ligation assay, läheisyys-ligaatio määrittäminen
DTPC	DNA-templatoitu proteiini konjugointi
DMTr	4,4-dimetoksitriityli
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi
CDI	1,1'-karbonyylidiimidatsoli
DBU	1,8-diatsabisykloundek-7-eeni
TLC	Ohutlevykromatografia
ESI-TOF	Sähkösumutusionisaatio-lentoaika (massaspektrissä)
RP-HPLC	Korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografia
DMAP	4-dimetyyliaminopyridiini
LCAA-CPG	Huokoinen lasikantaja, jossa pitkäketjuisia alkyylimiamiineja
PyBOP	Bentsotriatsolyyli-1-oksitripyrrolidinofosfoniumheksafluorifosfaatti
DMF	Dimetyyliformamidi

DCM	Dikloorimetaani
DIEA	Di-isopropylietyyliamiini
THF	Tetrahydrofuraani
TBDMSCl	Tert-butyylidimetyylisilyyli
AMC	Allyylimetyylikarbonaatti
TREAT-HF	Trietyyliamiini trihydrofluoridi
PMB	<i>Para</i> -metoksibentsyyli
CAN	Keriumammoniumnitraatti
TEAA	Trietyyliammoniumasetaatti
Bn	Bentsoyyli

Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	1
1.1 Biomolekyylikonjugaatit ja konjugoinnin kemia	1
1.2 Happolabiilit ligaatiomenetelmät.....	7
1.2.1 Oksiimi.....	8
1.2.2 Hydratsoni	10
1.2.3 Neoglykosidit	11
1.2.4 <i>N</i> -metoksioksatsolidiini.....	12
1.3 Hypoteesi ja tavoitteet	13
2. Tulokset ja niiden tarkastelu.....	14
2.1 5'- <i>O</i> -DMTr-2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamino)uridiinin synteesi.....	14
2.2 2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamino)uridiini	15
2.3 Liittäminen kantajaan	16
2.4 Kantajasta irrottaminen.....	18
2.5 2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamino)uridiinin ligaatiot	18
2.6 5'- <i>O</i> -(oksoetyyli)tymidiinin synteesi.....	21
2.7 5'- <i>O</i> -(oksoetyyli)tymidiinin ligaatio.....	25
3. Johtopäätökset ja yhteenveto	27
4. Kokeelliset menetelmät	28
4.1 Yleiset kokeelliset menetelmät	28
4.2 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin synteesi	28
4.2.1 5'- <i>O</i> -(dimetoksitrityyli)-2,2'- <i>O</i> -anhydrouridiini (2).....	28
4.2.2 2'- <i>N</i> ,3'- <i>O</i> -karbonyyli-2'-deoksi-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimetoksitrityyli)-2'-(<i>N</i> -metoksiamiini)uridiini (5)	29
4.2.3 5'- <i>O</i> -(4,4'-dimetoksitrityyli)-2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamiini)uridiini (6) ..	30
4.2.4 2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamiini)uridiini (7).....	31
4.2.5 3'-(dihydro-2,5-furaanidioni)-2'-deoksi-2'-(<i>N</i> -metoksiamiini)uridiini (8) ..	32
4.2.6 Liittäminen kantajaan.....	32
4.2.7 Trityylianalyysi	32
4.2.8 Nukleosidin irrotus kantajasta.....	33
4.3 5'- <i>O</i> -(oksoetyyli)tymidiinin synteesi.....	33
4.3.1 3'- <i>O</i> -TBDMS-tymidiini (11)	33
4.3.2 <i>N</i> ³ - <i>para</i> -metoksibetsyyli-3'-TBDMS-tymidiini (13).....	34
4.3.3 <i>N</i> ³ - <i>para</i> -metoksibetsyyli-5'-(1-propeeni)-3'-TBDMS-tymidiini (14).....	35

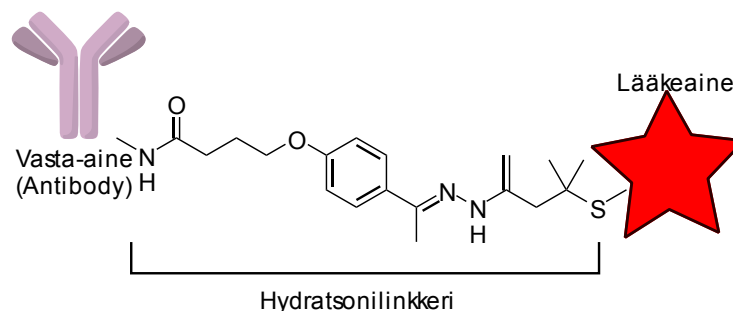
4.3.4 N^3 - <i>para</i> -metoksibetsyyli-5'-[1,2-(OAc) ₂ -propeeni]-3'-TBDMS-tymidiini (16)	36
4.3.5 N^3 - <i>para</i> -metoksibetsyyli-5'-[1,2-(OAc) ₂ -propeeni]-tymidiini (17)	37
4.3.6 5'-[1,2-(OAc) ₂ -propeeni]-tymidiini (18)	38
4.3.7 5'- <i>O</i> -(oksoetyyli)tymidiini	40
Lähdeluettelo	
Liitteet	

1. Johdanto

1.1 Biomolekyylikonjugaatit ja konjugoinnin kemia

Biomolekyylikonjugaatit ovat usein biopolymeerien (oligonukleotidit, peptidit, hiilihydraatit, lipidit) hybridirakenteita. Biomolekyylikonjugaateiksi kutsutaan myös rakenteita, joissa biopolymeereihin on konjugoitu jotain abioottisia rakenteita. [1]

Huolimatta biomolekyylikonjugaattien huomattavasta määrästä ja toimintatavan eroista, on tietty rakenteellinen yhtäläisyys havaittavista niistä kaikista. Kuvassa 1 on esitetty esimerkki biomolekyylikonjugaatista. Kyseisessä esimerkissä konjugaatti koostuu vasta-aineesta, jonka tehtävänä on toimia soluun ohjaavana ja soluun tunkeutumista helpottavana osana sekä sen kuljettamasta lääkeaineesta.[1-3] Edellä mainittujen osien välissä on ne yhteen liittävä rakenne, jota kutsutaan linkkeriksi. Kuvassa olevassa esimerkissä vasta-aineen ja lääkeaineen välillä on happolabiili hydratsonilinkkeri. Vasta-aineissa on usein yhteen vasta-aineeseen liitetty useita biomolekyyliä tai lääkeaineita.[4]



Kuva 1. Esimerkki biomolekyylikonjugaatista. Konjugaatit koostuvat usein soluspesifyyttä tai soluun tunkeutumista helpottavasta osasta (kuvassa vasta-aine) ja vaikuttavasta osasta, jotka on liitetty toisiinsa rakenteella, jota kutsutaan linkkeriksi.

Linkkerit voidaan jakaa hajoaviin ja pysyviin linkkereihin. Pysyvissä linkkereissä konjugaatti sitoutuu kohteeseensa, kun siinä on yhä paikallaan linkkeri-ryhmä. Pysyvä linkkerirakenne ei siis irtoa endosomissa ja lysosomissa, vaikka soluun tunkeutumista helpottava osa irtoaa. Hajoavissa linkkereissä soluun tunkeutumista helpottavan osan lisäksi linkkerirakenne irtoaa[5] ja irtoaminen voi perustua endosomin ja lysosomin happamiin olosuhteisiin, entsyymeihin tai solun pelkistäviin olosuhteisiin.[2]

Jotta konjugointimenetelmät olisivat käyttökelpoisia erityisesti biomolekyyliä konjugoitaessa, pitää niillä olla tiettyjä ominaisuuksia. Steeriset esteet vaikeuttavat ja

hidastavat konjugoinnin nopeutta, minkä vuoksi konjugoinnin mahdollistavan kemiallisen rakenteen tulisi olla mahdollisimman yksinkertainen.[6] Fysiologisten olosuhteiden kestävyys on tärkeää erityisesti biomolekyylejä konjugoitaessa, jotta haluttu konjugaatti saataisiin kohteeseensa solun sisälle. Puoliintumisajan pitää siis olla veriplasmassa tarpeeksi suuri. Konjugaatin ennenaikainen hajoaminen voi tehdä konjugaatista liian myrkyllisen tai sen lääkinnällinen vaikutus voi pienentyä niin paljon, ettei konjugaatti ole enää lääkinnällisesti käyttökelpoinen. Konjugaatin pitää myös hajota riittävän tehokkaasti kohteeseensa päästyään. Konjugointimenetelmä ei myös saa tehdä soluun ohjaavasta osasta (esim. vasta-aine) tai lääkinnällisestä osasta tehottomampaa.[3] Konjugoinnin pitää myös olla selektiivinen. Toisin sanoen konjugoinnissa reagoivat ryhmät eivät saa reagoida minkä tahansa muun kemiallisen ryhmän kanssa. Konjugointimenetelmillä, joilla on riittävä selektiivisyys, suojaryhmiä ei tarvitse käyttää. Eri sovelluksissa toimiakseen konjugointimenetelmän ei tulisi häiritä biologisia prosesseja solussa tai metaboliaa.[6]

Biomolekyylikonjugaateissa konjugoitu lääkeaine voi olla aiemmin tunnettu lääkeaine, jonka konjugoimalla halutaan päätyvän kohteeseensa tehokkaammin. Biomolekyyleistä oligonukleotidien toiminta lääkeaineina perustuu niiden kykyyn estää haitallisen geenin ilmeneminen. Oligonukleotidien kohteita solussa ovat yleensä pre-mRNA, mRNA, proteiinit ja harvemmin DNA. Oligonukleotidien käyttö lääkeaineina ei ole ongelmatonta. Vaikeuksia tuottaa oikeaan soluun kohdistaminen, soluun tunkeutuminen, kohteeseen liittymisen tehokkuus, nukleaasin sietokyky ja oikeaan kohteeseen pääseminen solun sisällä.[7, 8] Erityisesti oligonukleotideille yleinen negatiivinen varaus estää pääsyn solun sisään.[1, 9]

Kun oligonukleotidi on selvinnyt hajoamatta verenkierrossa, sen pitäisi päästä solukalvon läpi solulimaan tai tumaan, jossa sen pitäisi riittävällä tehokkuudella sitoutua kohde-RNA:han. Varauksettomiksi muokattujen oligonukleotidien on havaittu tunkeutuvan soluun endosytoosin kautta, mutta pääsy endosomista solulimaan on aktiivisuuden rajoittavin vaihe. Nukleosidien välillä olevat fosfodiesterisidokset ovat alttiita nukleaasille. Sen sijaan fosforotioaatti- ja metyylifosfonaattisidokset kestävät nukleaasia paremmin. Oligonukleotidin pituus vaikuttaa sekä sitoutumisen voimakkuuteen että spesifisyyteen. Pidemmät oligonukleotidit sitoutuvat voimakkaammin kohteeseensa ja

niiden spesifisyys on parempi. Tämä ei kuitenkaan päde huomattavan pitkiin oligonukleotideihin.[10]

Oligonukleotidin soluun pääsyyn ja soluspesifisyyteen voidaan vaikuttaa konjugoimalla niitä erilaisiin yhdisteisiin tai käyttämällä erilaisia kuljettimia. Kuljettimina on käytetty esimerkiksi liposomeja, lipidejä, abioottisia polymeerejä, aptameereja[1], ja vastaaineita[2, 5]. Myös viruksien käyttöä kuljettimina on tutkittu.[11] Konjugoitavina ryhminä on käytetty hiilihydraatteja ja peptidejä [5, 7, 8, 12]. Seuraavissa kappaleissa on kerrottu lyhyesti edellä mainituista yhdisteistä ja kuljettimista hieman tarkemmin.

Lipidit ja polymeerit (esim. polyetylenimiini) järjestäytyvät elektrostaattisten vuorovaikutusten kautta itsestään negatiivisesti varautuneen oligonukleotidin ympärille. Endosytoosin avulla muodostunut aggregaatti pääsee soluun ja vapautuu solulimaan. Lipidien ja polymeerien ongelmana on niiden myrkyllisyys, aggregaatin pysyvyys fysiologisissa olosuhteissa sekä päätyminen maksaan.[13]

PEG-konjugoiduissa oligonukleotideissa polyetyleeniglykoli muodostaa steerisen esteen, joka estää nukleasien toimintaa ja stabiloi näin oligonukleotidin rakennetta. Tunkeutuminen soluun tapahtuu, kun PEG-konjugaatit muodostavat misellin. *N*-asetyyliagalaktosamiini-siRNA -konjugaatteja (GalNAc-siRNA) voidaan valmistaa helposti liittämällä kiinteän kantajan DNA-synteesin aikana GalNAc 3'-tai 5'-päähen oligonukleotidia fosforidiesteri-sidoksella. GalNAc sitoutuu solussa esim. ASGPR-reseptoriin, mikä johtaa endosytoosiin. [13]

Liittämällä oligonukleotidi E-vitamiiniin (α -tokoferoli) saadaan oligonukleotidi kohdistettua paremmin soluihin. E-vitamiinin ja oligonukleotidin väliin tarvitaan myös E-vitamiinia ja oligonukleotidia tosistaan etäännyttävä käsivarsirakenne, jotta oligonukleotidi säilyttäisi toimintakykynsä.[14] Samoin kolesteroli tarvitsee riittävän etäisyyden oligonukleotidiin, jotta oligonukleotidin geenin ilmentymistä inhiboiva vaikutus säilyisi. Kolesterolin on havaittu pitkittävän oligonukleotidien säilymistä verenkierrassa. Kolesterolin on havaittu myös auttavan konjugaattia vapautumaan endosomista. Oligonukleotidi voidaan liittää kolesteroliin joko 3'-päästä tai 5'-päästä. Rasvahapoista muun muassa palmitiinihappoa on käytetty oligonukleotidien soluun kohdistuksessa.[13]

Aptameerit ovat DNA ja RNA oligonukletidiketjuja jotka sitoutuvat kohteeseensa (esimerkiksi proteiiniin) kolmiulotteisen rakenteensa perusteella. SELEX-menetelmällä saadaan selville tietyn solun antigeeniin sitoutuva aptameeri. Aptameerin sitoutuminen solun pinnan antigeeniin johtaa endosytoosiin. Koska aptameerit koostuvat nukleosideistä, ongelmana on niiden hajoaminen nukleaasien pilkkomisen seurauksena. Aptameerien etuina ovat, että ne ovat erittäin kohdespesifisiä, kuten vasta-aineet, mutta halvempia valmistaa sekä vähemmän myrkyllisiä.[15]

Harvinaisempia konjugaatteja ovat muun muassa pallomaiset nukleiinihapot, joissa esimerkiksi kultananopartikkelin ympärille on liitetty nukleiinihappoja siten, että niistä muodostuu pallomainen rakenne.[13] Seuraavissa kappaleissa käsitellään hieman syvällisemmin tämän tutkielman kannalta tärkeämmät oligonukleotidi-peptidi-konjugaatit ja oligonukleotidi-vasta-aine-konjugaatit.

Oligonukleotidi voidaan konjugoida peptidiin, jonka tiedetään tunkeutuvan soluun. Sen lisäksi, että oligonukleotidi-peptidi-konjugaattien tarkoituksena on ollut pääasiassa soluspesifyyden ja soluun tunkeutumisen mahdollistaminen, niiden on havaittu myös parantavan oligonukleotidin pysyvyyttä. Joissain tapauksissa myös sitoutumisen kohde-RNA:han on todettu tehostuvan.[12] Konjugaatista riippuen oligonukleotidi voi vapautua endosomista suoraan solulimaan tai kulkea lysosomin kautta. Peptidiosa on usein suhteellisen lyhyt, alle 30 aminohapon mittainen. Ongelmia konjugaateissa tuottaa peptidin ja oligonukleotidien eroavaisuudet. Peptidit ovat usein kationisia, kun taas oligonukleotidit anionisia. Tällöin osarakenteiden aktiivinen toiminta voi heikentyä elektrostaattisen vuorovaikutuksen seurauksena. Tuloksena voi olla myös niukkaliukoisia aggregaatteja.[13]

Peptidejä ja oligonukleotideja voidaan valmistaa automatisoidusti syntetisaattoreilla. Konjugaattien valmistamiseen on yleensä käytetty kahta tapaa. Oligonukleotidi ja peptidi voidaan syntetisoida erikseen ja sen jälkeen ne konjugoidaan post-synteettisesti liuoksessa. Toinen tapa on valmistaa peptidi ja oligonukleotidi samalla kiinteällä kantajalla, mutta tällöin ongelmana on automaattisen peptidisynteesin ja oligonukleotidisynteesin eroavaisuudet. Usein peptidi syntetisoidaan ensin käyttäen Fmoc/tBu-kemiaa. Peptidin sivuketjujen suojaryhmäkemiaan joudutaan tekemään epätavallisia ratkaisuja, jotta se olisi yhteensopiva oligonukleotidisynteesin kanssa. Tämä

on yksi merkittävimmistä ongelmista, jonka vuoksi yhdellä kantajalla tehtävä synteesi ei ole kovin käyttökelpoinen menetelmä tuottaa oligonukleotidi-peptidi-konjugaatteja.[12]

Käyttökelpoisempi tapa oligonukleotidi-peptidi-konjugaattien valmistamiseen on syntetisoida ne erikseen kiinteällä kantajalla. Oligonukleotidi ja peptidi irrotetaan kantajistaan ja puhdistetaan erikseen, minkä jälkeen konjugointi tapahtuu liuoksessa. Sekä aminohapoista että nukleosideista on kaupallisesti saatavilla erilaisia aminohappoanalogeja ja nukleosidianalogeja, joilla voidaan konjugoita peptidi ja oligonukleotidi muun muassa disulfidi-, maleimidi- tai tioetterisidoksella. Riippuen käytettävästä konjugointimenetelmästä myös välipuhdistuksia saatetaan joutua tekemään. Lopputuote puhdistetaan useimmiten RP-HPLC:llä tai PAGE:lla (polyakryyliamidi geielektroforeesi).[12] Ongelmia aiheuttaa peptidien ja oligonukleotidien liukoisuuseroista. Oligonukleotidit ovat vesiliukoisia, kun taas tietyt peptidit saattavat tarvita poolittomammat olosuhteet. Tämän vuoksi konjugointi tehdään usein veden ja orgaanisen liuottimen seoksessa.[16]

Vasta-aineet ovat immuunisysteemin tuottamia Y:n muotoisia glykoproteiineja. Sitoutuessaan taudinaiheuttajan antigeeniin solun pinnalla vasta-aineet voivat merkata taudinaiheuttajia immuunipuolustuksen tuhottavaksi tai sitoutuessaan ne voivat inhiboida taudinaiheuttajan elintärkeän toiminnan. [17, 18]

Koska vasta-aineet ovat erittäin spesifisiä antigeeniin sitoutumisensa suhteen, ne ovat käyttökelpoisia kohdistamaan oligonukleotideja haluttuun soluun.[4, 5, 9] Sen lisäksi, että vasta-aine sitoutuu antigeeniin, pitää sitoutumisen johtaa endosytoosiin. Antigeeniä pitää myös olla riittävästi solupinnalla, jotta oligonukleotidiä päätyisi riittävästi soluun.[5] Edellä mainitun lisäksi vasta-aineen valitseminen, joka sitoutuisi oikeaan soluun, on hankalaa. Vasta-aine ei saisi sitoutua muiden kuin haluttujen solujen antigeeniin.[13] Ongelmana on, että useat antigeenit, jotka löytyvät esimerkiksi syöpäsolujen pinnalta, löytyvät myös tavallisten solujen pinnalta.[5] Kuten muissakin oligonukleotidikonjugaateissa, tarpeeksi tehokasta siirtymistä solun ulkopuolelta endosomiin ja sieltä solulimaan on hankala saavuttaa.[13] Tiettyyn soluun kohdistamisen lisäksi vasta-aineen liittäminen oligonukleotidiin estää sen poistumista kehosta munuaisten suodattamana kokonsa ansiosta ja lisää konjugaatin pysyvyyttä verenkierrossa.[18]

Vasta-aineeseen on useimmiten konjugoitu linkkerin avulla enemmän kuin yksi oligonukleotidi. Fysiologisissa olosuhteissa vasta-aineet ovat positiivisesti varautuneita ja kuten aiemmin on mainittu, oligonukleotidit negatiivisesti varautuneita. Riippuen siitä, kuinka monta oligonukleotidia vasta-aineeseen on liitetty, muuttuu konjugaatin kokonaisvaraus. Konjugoitujen oligonukleotidien määrä vaikuttaa moniin konjugaatin ominaisuuksiin, muun muassa antigeeniin sitoutumiseen, liukoisuuteen ja aggregaattien muodostumiseen. Lääkeaineiden soluun kohdistamisen ja tunkeutumisen lisäksi vasta-aine-oligonukleotidi-konjugaatteja käytetään erilaisissa analyysimenetelmissä, esimerkiksi immuno-PCR (iPCR) ja PLA (proximity ligation assay).[4]

Vasta-aineen sidos oligonukleotidiin voi olla kovalenttinen tai ei-kovalenttinen. Sidokset, jotka eivät ole kovalenttisia ovat yleisempiä analyysimenetelmissä. Tunnetuin näistä on streptavidini-biotiini-ligaatio. Streptavidin-biotiini-ligaation etuna on sen helppo sovellettavuus eri käyttötarkoituksiin. Puhdistusta ei välttämättä tarvita, jolloin jo pieni määrä vasta-ainetta riittää konjugaatin valmistukseen. Konjugaatio menetelmän heikkoutena on streptavidin-biotiini-sidoksen heikko pysyvyys. Protamiini on yleisin polypeptideistä, joilla vasta-aine liitetään oligonukleotidiin. Protamiinin ja oligonukleotidin välinen sidos voi olla kemiallinen tai ne voivat muodostaa kompleksin.[4]

Kovalenttisessa sidoksessa vasta-aine liitetään oligonukleotidiin usein lysiinin tai kysteiinin sivuketjuista ja joskus myös tyrosiinin ja arginiinin sivuketjuista.[4, 5] Koska lysiiniin konjugoitujen oligonukleotidien on havaittu vaikuttavan negatiivisesti konjugaatin stabiilisuuteen ja muihin farmakokineettisiin omaisuuksiin, on konjugointia lysiiniin vältetty uusimmissa vasta-ainekonjugaateissa.[5] Kovalenttisia konjugointimenetelmiä on useita. Muun muassa lysiinin sivuketjujen pelkistävä aminointi, amiini-tioli -konjugointi, jossa vasta-aineeseen liitetty maleimidi reagoi oligonukleotidiin liitetyn tiolin kanssa, DNA-templatoitu proteiini konjugointi (DTPC) ja erilaiset click-kemian reaktiot. Yhteistä näille menetelmille on, että ne vaativat usein sekä vasta-aineen että oligonukleotidin muokkaamista.[4] Hydratsoniligaatio ja oksiimiligaatio esitellään edempänä tässä tutkielmassa.

1.2 Happolabiilit ligaatiomenetelmät

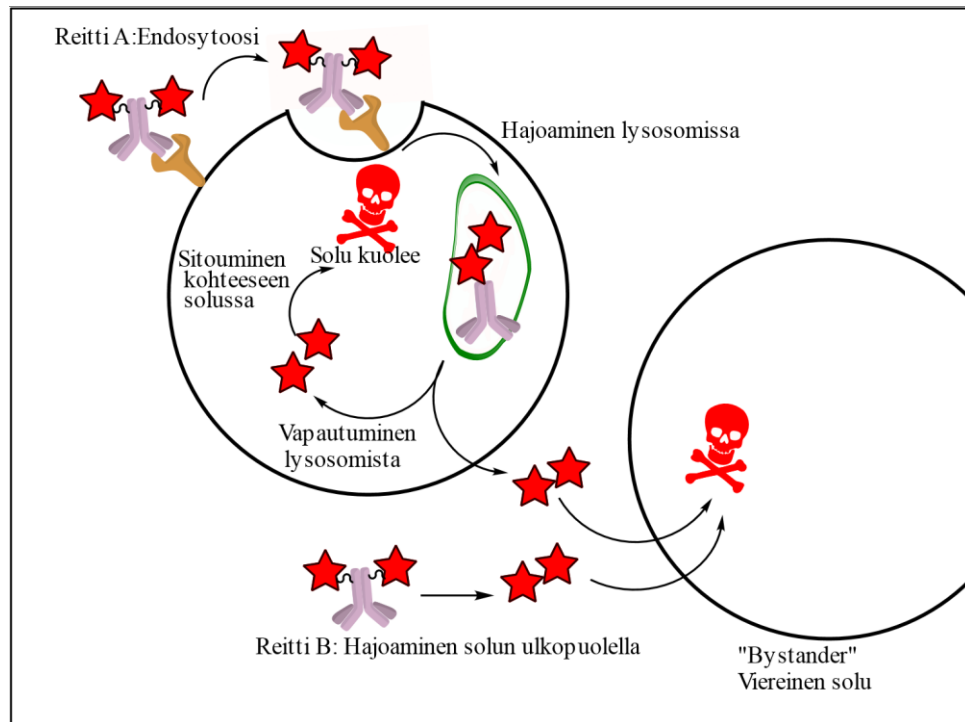
Konjugointimenetelmiä, joiden konjugaatio ja vapautuminen solussa perustuvat siihen, että tuotteet ovat pysyvämpiä eri pH:ssa ovat esimerkiksi oksiimin ja hydratsonin muodostuminen. Näiden yleinen toimintaperiaate solussa on esitetty kaaviossa 1.

Toiminta perustuu siihen, että fysiologisissa olosuhteissa, (esim. veriplasmassa) pH:ssa 7,4, konjugaatit ovat riittävän stabiileja. Käytännössä konjugaatit ovat riittävän stabiileja, kun niiden pitoisuus kohteeseensa päästyään on lääkinnällisesti riittävä määrällä, joka ei aiheuta vakavia sivuvaikutuksia. Konjugaatin soluun ohjaava osa (esim. kuvassa 1 vasta-aine) sitoutuu solunpintaan, mikä johtaa endosytoosiin. Kun konjugaatit tunkeutuvat solun sisälle endosytoosissa (pH 5,5, - 6,2) ja päätyvät solun lysosomiin (pH 4,5 – 5,0), ne altistuvat happamille olosuhteille. Konjugaatti hajoaa siten, että sen lääkinnällinen osa eli lääkeaine vapautuu endosomiin, jonka jälkeen se täytyy vielä päästä sytosoliin ennen kohdettaan. Sitoutuessaan kohteeseensa, lääkeaine voi aiheuttaa esimerkiksi syöpäsolun kuoleman. Kyseinen endosytoosin ja lysosomin kautta tapahtuva lääkeaineen tunkeutuminen soluun on kuvattu kuvassa 1 reittinä A.[2, 3, 9]

Endosytoosin lisäksi lääkeaine hajotessaan solun ulkopuolella voi päätyä muun muassa diffuusion kautta soluun. Hajoaminen solun ulkopuolella on esitetty kuvassa 1 reittinä B. Oligonukleotidit eivät yleensä voi päätyä soluun varauksensa vuoksi ilman kuljettimia tai niihin konjugoituja rakenteita. Tämän vuoksi ei ole toivottavaa, että oligonukleotidikonjugaatti hajoaisi solun ulkopuolella. Osassa tutkimuksia on kuitenkin havaittu, että ilman reittiä B vasta-ainekonjugaatit ovat olleet huomattavasti tehottomampia.[2] Vasta-ainekonjugaattien tutkimustulokset viittaavat siihen, että solun ulkopuolella tapahtuvalla konjugaatin hajoamisella voi olla huomattava vaikutus konjugaatin tehokkuuteen, vaikka kyseinen reitti ei olekaan ollut suunniteltu.

Lääkeaine voi myös lysosomista vapauduttuaan päätyä solun ulkopuolelle ja päätyä viereiseen soluun (bystander-efekti). Bystander-efektin kautta tapahtuvaa reittiä on pidetty erityisesti pienien varauksettomien lääkeaineiden osalta tärkeänä mekanismina tappaen syöpäsoluja.[3] Näkemys perustuu siihen, että vasta-aine-lääkeaine-konjugaatit eivät pääse tehokkaasti tunkeutumaan syöpäsolukkaan. Tästä seuraa, että konjugaatin pitoisuus ei ole riittävä syöpäsoluissa, jotka ovat kaukana konjugaattia levittävistä verisuonista.[19] Bystander-efektin avulla lääkeaine pääsisi siirtymään syvemmälle

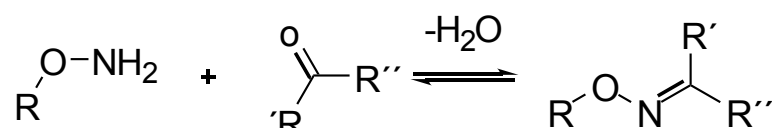
kasvainsolukkuon. Bystander-efekti saattaa parantaa konjugaatin tehokkuutta myös tilanteessa, jossa vain osassa soluista on konjugaatin vasta-aineen antigeeniä. Tällöin lääkettä päätyisi myös viereisiin syöpäsoluihin, joissa kyseistä antigeeniä ei ole.[3]



Kaavio 1. Happolabiilin lääkinnällisen biokonjugaatin soluun tunkeutuminen, vapautuminen ja toiminta syöpäsolussa. Kuva piirretty lähteiden [2, 3] kuvia jäljitellen.

1.2.1 Oksiimi

Oksiimi muodostuu, kun alkoksiamiinin α -nukleofiilinen tyyppi hyökkää aldehydin tai ketonin karbonyylihiileen. Kondensiossa vapautuu vesimolekyyli. Reaktio on esitetty kaaviossa 2. Kaaviosta nähdään myös oksiimin ja alkoksiamiinin rakenne. Oksiimit ovat pysyvämpiä kuin hydratsonit. Oksiimin muodostumisen nopeus on pH riippuvainen ja reaktio on reversiibeli.[6] Oksiimin muodostuminen on nopeinta pH:ssa 4-5.[20-22]



Kaavio 2. Oksiimin muodostuminen.

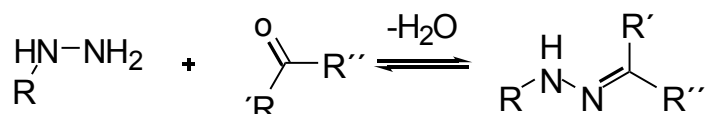
Jotta oksiimin muodostuminen olisi riittävän nopea tehokkaaseen ligaatioon, pitää oksiimin, aldehydin tai ketonin pitoisuus olla liuoksessa vähintään millimolaariskaalassa. Aniliinilla ja muilla aniliinijohdannaisilla on raportoitu olevan nukleofiilinen katalyyttinen vaikutus oksiimin muodostumiseen. Aniliini toimii katalyyttina sekä pH:ssa 4,5 että pH:ssa 7,0.[21] Aniliinijohdannaiset, joissa aniliinin aromaattiseen renkaaseen on substituoitu elektroneja luovuttavia ryhmiä, ovat usein aniliinia parempia katalyytteja. Näistä johdannaisista hyvä esimerkki on *para*-metoksaniliini.[6] Myös suolapitoisuudella on havaittu olevan vaikutusta reaktion nopeuteen. Suuremmissa NaCl-pitoisuuksissa reaktio on nopeampi.[23] Katalyytteja tarvitaan erityisesti reaktioolosuhteissa, joissa konsentraatiot ovat pienet, kuten esimerkiksi leimauksessa ja muissa detektiomenetelmiin liittyvissä konjugaatioissa. Katalyytit tietysti myös katalysoivat käänteistä reaktiota, tasapainoasema vain saavutetaan nopeammin reversiibeileissä reaktioissa.[6]

Aldehydin tai ketonin rakenne vaikuttaa oksiimin muodostumisen nopeuteen ja saantoon. Aryyialdehydit reagoivat nopeammin, kun ne ovat substituoitu metoksilla tai kloorilla orto-asemasta.[24] Fosfaatti orto-asemassa tekee reaktiosta edellä mainittuja vielä nopeamman.[25] Kuitenkin alifaattiset aldehydit reagoivat nopeammin kuin aryylliset aldehydit. Aldehydit, joiden lähellä on emäksinen ryhmä reagoivat nopeammin molekyyllinsisäisen happo-emäs -katalyyysin ansiosta. Steerisillä esteillä ei ole kovinkaan suurta vaikutusta aldehydien ja ketonien reagoimisnopeuteen. Aldehydit reagoivat nopeammin kuin ketonit.[26] Nämä aldehydien ja ketonien rakenteen ominaisuudet pätevät myös hydratsonin tapauksessa.[6]

Oksimaatiota on käytetty oligonukleotidi-peptidi-konjugaattien valmistukseen [27] Konjugaattien saannot ovat eri tutkimuksissa vaihdelleet huomattavasti. Kuitenkin parhaimmat saannot ovat olleet yli 50 % pH:ssa 4–5.[7, 27] Aryyialdehydin on havaittu tekevän konjugaateista pysyvämpiä kuin mitä alifaattisten aldehydien konjugaatit ovat. Aromaattiset oksiimikonjugaatit kestävät hydrolyysiä hyvin pH-alueella 4–9 ja 24–48 tunnin ajanjaksolla hydrolysoituneen ligaatiotuotteen määrä oli 10–20%. Sekä aromaattisen että alifaattisen aldehydirakenteen konjugaattien hydrolyysi ei ole merkittävä 24 tunnin ajanjaksolla pH:ssa 4–9. [28]

1.2.2 Hydratsoni

Kuten oksiimin tapauksessa, myös hydratsoni muodostuu, kun α -nukleofiilinen tyyppi hyökkää aldehydin tai ketonin karbonyylihiileen ja kondensaatiossa vapautuu vesimolekyyli. Hydratsonin muodostuminen on useimmiten nopeampi reaktio kuin oksiimin muodostuminen.[6] Kaaviossa 3 on esitetty hydratsonin muodostuminen. Hydratsoni on rakenteeltaan hyvin samanlainen kuin oksiimi, vain happi on vaihtunut typeksi. Hydratsonin muodostuminen on nopeinta pH:ssa 4–5 ja reaktio on reversiibeli.[29]



Kaavio 3. Hydratsonin muodostuminen

Erona hydratsonin ja oksiimin välillä on niiden pysyvyys. Hydratsoni on alttiimpi hydrolyysille.[30] Oksiimilla voidaan konjugoida happamissakin olosuhteissa suhteellisen pysyviä konjugaatteja, vaikka happamat olosuhteet edistävät hydrolyysia. Edellä mainittujen pysyvyystekijöiden vuoksi hydratsoni on oksiimeja parempi vaihtoehto biomolekyylikonjugaattien valmistukseen. Oksiimeille ja hydratsoneille yhteisiä hyviä puolia biomolekyylien konjugoinnissa on, ettei näitä ryhmiä esiinny luonnostaan biomolekyyliissä, konjugointi on tehokasta ja ne eivät reagoi helposti muiden funktionaalisten ryhmien kanssa. Huonoja puolia ovat aldehydien mahdollinen myrkyllisyys ja joissain tapauksissa katalyyttien tarve.[31]

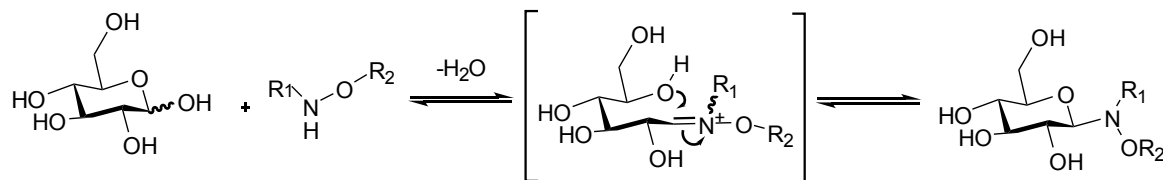
Hydratsonille sopivat samat katalyytit kuin oksiimille. Näitä katalyyttejä ovat muuan muassa aniliini, aniliinijohdannaiset ja erilaiset amiinit. Katalyyysin mekanismi on tyypillinen nukleofiilisen katalyyysin mekanismi, jossa katalyytti ensin hyökkää karbonyylihiileen muodostaen tetraedrin välituotteena. Välituotteen hajotessa imiiniksi vesi lohkeaa. α -nukleofiilisen tyyppin hyökätessä entiseen karbonyylihiileen muodostuu toinen tetraedrivalituote, joka hajoaa oksiimiksi tai hydratsoniksi katalyytin poistuessa.[6] Aldehydin ja ketonin rakenteen vaikutus reaktion nopeuteen on sama hydratsoneilla ja oksiimeilla. Näistä tekijöistä on kerrottu oksiimin yhteydessä. Myös hydratsonin rakenne vaikuttaa reaktion nopeuteen. Hydratsonit, joissa on elektroneja puoleensa vetäviä ryhmiä, ovat hitaampia reagoimaan. Sen sijaan hydratsonit, joissa on

joko happo- tai emäsryhmä lähellä α -nukleofiilistä tyyppeä, ovat nopeampia reagoimaan.[32]

Hydratsoniligatoitujen peptidi–oligonukleotidi-konjugaattien on raportoitu olevan stabiileja fysiologisissa olosuhteissa ja ligaatioreaktio on nopea.[33] Hydratsoni voidaan liittää sekä 3'-päähen että 5'-päähen. Saannot vaihtelevat välillä 47–80 %. [33, 34] Koska hydratsoniligatoidut konjugaatit eivät ole yhtä stabiileja kuin oksiimit, käytetään hydratsoniligaatiota sellaisten konjugaattien valmistuksessa, jossa konjugaatin halutaan hajoavan hallitusti. Kun halutaan tuottaa pysyviä konjugaatteja, valintana on usein oksiimi.[6]

1.2.3 Neoglykosidit

Neoglykosidaatio esitetään usein siten, että *N*-oksiamiiniryhmän α -nukleofiilinen typpi hyökkää sokerin avonaiseen muotoon, aldehydin karbonyylihiileen. Edellä mainittu reaktio on esitetty kaaviossa 4. Käytännössä *N*-oksiamiiniryhmä reagoi minkä tahansa aldehydin ja ketonin kanssa. Kuten oksiimin ja hydratsonin tapauksessa, myös neoglykosidaatiossa lohkeaa yksi vesimolekyyli reaktiossa. Oksiamiini voi olla sekundaarinen tai primaarinen. Kaaviossa 4 oleva *N*-oksiamiini on sekundaarinen.[35]



Kaavio 4. Neoglykosidaatio kun *N*-oksiamiini hyökkää D-glukoosin avonaisen muodon aldehydiin.

Neoglykosidaatiossa liuottimena käytetään usein puskuriliuosta, joista yleisin on etikkahapon puskuriliuos.[35, 36] Etikkahappo-asetatti -puskuriliuos on sopiva pH-alueelle, jossa neoglykosidaatio on nopein. Kokeellisesti on havaittu, että neoglykosidaatio on nopein pH:ssa 3-5.[36, 37] Hyvin matalassa pH:ssa, kuten 2, hydrolyysi on vallitseva ja johtaa tuotteen hajoamiseen sekä epäedulliseen tasapainosaantoon.[37] Myös noin pH:ssa 4 tuote hajoaa hydrolyysissä, mutta on pysyvä pH:ssa 7.[38] Matalassa pH:ssa α -nukleofiilisen tyypin hyökkäys karbonyylihiileen määrittää reaktion nopeuden. Korkeassa pH:ssa reaktion nopeuden määrittävä vaihe on

veden eliminaatio. Edellä mainitun teorian perusteella optimi pH olisi 4,5 kun otetaan huomioon, että tuotteet eivät ole alhaisemmassa pH:ssa riittävän pysyviä. Optimi pH saattaa vaihdella riippuen aldehydin reaktiivisuudesta. Reaktion saanto ja nopeus eivät muutu lineaarisesti pH:n mukaan.[36]

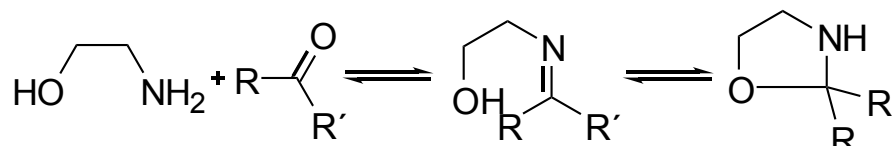
Usein sokereita konjugoitaessa halutaan, että sokerin rengasrakenne säilyy. Sokerista riippuen muodostuu rengasrakenteista tuotetta α - ja β -anomeerien seoksena sekä avonaista muotoa Z- ja E-konformaatiolla eri suhteissa.[37] Pääosin samat katalyytit, jotka toimivat oksiimeille ja hydratsoneille toimivat myös neoglykosideille, mikä on luonnollista, sillä kaikki kolme perustuvat α -nukleofiilisen tyypin hyökkäykseen karbonyylihiileen. Katalyyttien reaktiomekanismi on nukleofiilinen hyökkäys karbonyylihiileen.[39] Katalyyttejä neoglykosideille ovat muun muassa aniliini[40], aminobentsoehapot, antraniilihapot[39] ja aniliinijohdannaiset[41, 42] (esim. *m*-fenyylidiamiini ja 2-amino-4-nitrofenoli).

Neoglykosidaatiota on käytetty eri biomolekyylien glykosidaatiossa[43-45], detektiomentelmissä[37, 46, 47], sokerirakenteiden eristämisessä rakennetutkimuksia varten[48, 49], leimauksessa[50] ja lääkeaineiden kohdentamisessa[51-53]. Neoglykosidaatiota on käytetty DNA-templatoidussa lugaatiossa,[54] mutta ei oligonukleotidikonjugaattien valmistamiseen.

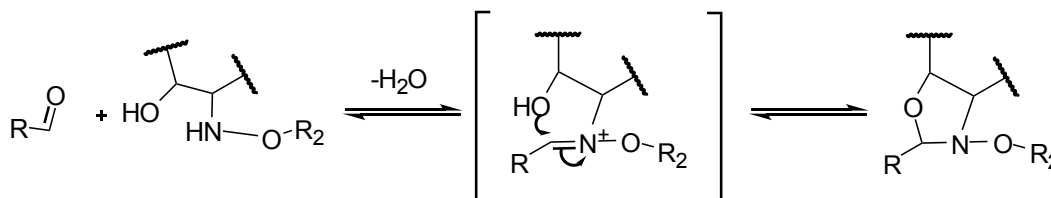
1.2.4 N-metoksioksatsolidiini

Oksatsolidiini on 5 osainen tyyppiä ja hapestä koostuva hiilivety rengasrakenne. Kun hapen ja tyypin välillä on yksi hiili on kyseessä 1,3-oksatsolidiini, joka rakenteellisesti muistuttaa *N*-metoksioksatsolidiinia. Oksatsolidiinin muodostuessa α -nukleofiilinen tyyppi hyökkää karbonyyliyhdisteen karbonyylihiileen, jonka jälkeen β -hydroksiryhmä hyökkää entiseen karbonyylihiileen.[55] *N*-metoksioksatsolidiinin muodostumisessa ainoa ero on, että tyyppi ei ole primaarinen, vaan siihen on liitetty metoksi-ryhmä. Kaaviossa 5 on esitetty oksatsolidiinin muodostuminen, kuten se kirjallisuudessa yleensä

esitetään.[55] Kaaviossa 6 on esitetty tämän tutkielman kannalta oleellisen *N*-metoksioksatsolidiin muodostuminen.



Kaavio 5. Oksatsolidiin muodostuminen



Kaavio 6. *N*-metoksioksatsolidiin muodostuminen. Oletettu mekanismi noudattaa oksatsolidiin muodostumisen mekanismia ja sitä ei ole tässä tapauksessa todistettu.

1,3-oksatsolidiin on raportoitu hydrolysoituvan nopeasti. Hydrolyysi tapahtuu, kun happi–hiili-sidos katkeaa ja rengasrakenne avautuu. Renkaan aukeaminen on happokatalyyttinen ja korkeammassa pH:n arvoissa tapahtuu renkaan uudelleen sulkeutuminen. Renkaan avautuminen hydrolyysissa ei ole enää pH riippuvainen pH arvoa 5 emäksisimmissä liuoksissa.[56]

1.3 Hypoteesi ja tavoitteet

Hydratsonin ja oksiimin muodostuminen ovat pH-riippuvaisia reaktioita, joita on käytetty konjugointimenetelminä. Näitä menetelmiä on onnistuneesti käytetty erilaisten oligonukleotidikonjugaattien valmistukseen. Myös neoglykosidi on happolabiili ja ominaisuuksiltaan se muistuttaa hydratsonia ja oksiimia.

Työssä tarkoituksena oli tutkia *N*-metoksioksatsolidiin muodostumista ja määrittää muodostumisen pH-riippuvuudesta kertovia parametreja. Näitä parametreja olivat tasapainosaanto, tasapainovakio ja puoliintumisaika. Parametrit saadaan sovitetusta yhtälöstä, kun RP-HPLC:llä on mitattu kromatogrammi ja laskettu kromatogrammista piikkien pinta-alat, jotka kertovat tuotteiden ja lähtöaineiden pitoisuuden. Toivottuja tuloksia olivat, että reaktio olisi reversiibeli, nopea pH:ssa 4-5 ja suhteellisen pysyvä pH:ssa 7. Ligaation tulisi myös toimia vesiliuoksessa ja tasapainosaannon toivottiin olevan suurempi kuin neoglykosidiligaatioissa *N*-metoksioksatsolidiini-rengasrakenteen

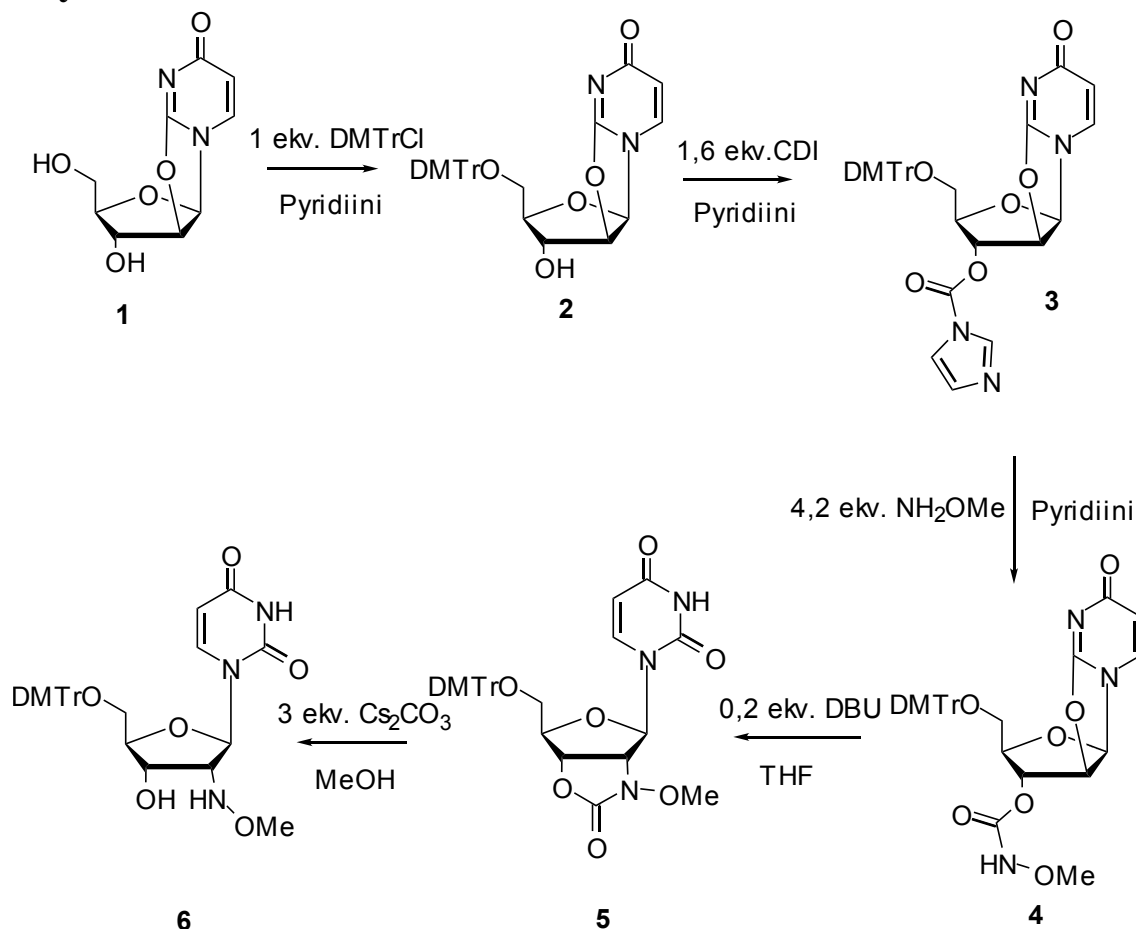
vuoksi. Tutkimuksia varten syntetisoitiin *N*-oksiamiiniryhmän 2'-asemassa sisältävä 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiini ja aldehydin 5'-asemassa sisältävä 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiini. Tulosten perusteella voitaisiin alustavasti arvioida *N*-metoksioksaatsolidiinin käyttökelpoisuutta erilaisten konjugaattien valmistuksessa, joita ovat esimerkiksi oligonukleotidi-peptidi-konjugaatit ja oligonukleotidi-vasta-aine-konjugaatit. Toinen sovelluskohde olisi DNA-templatoitu ligaatio ja polymerisaatio, johon erityisesti 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin ligaation tulokset liittyvät.

2. Tulokset ja niiden tarkastelu

Tässä osiossa on esitelty työstä saadut tulokset. Synteetit on esitelty pintapuoleisesti ja niiden tarkempi kuvaus löytyy osiosta 4. Kokeelliset menetelmät.

2.1 5'-*O*-DMTr-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin

synteesi

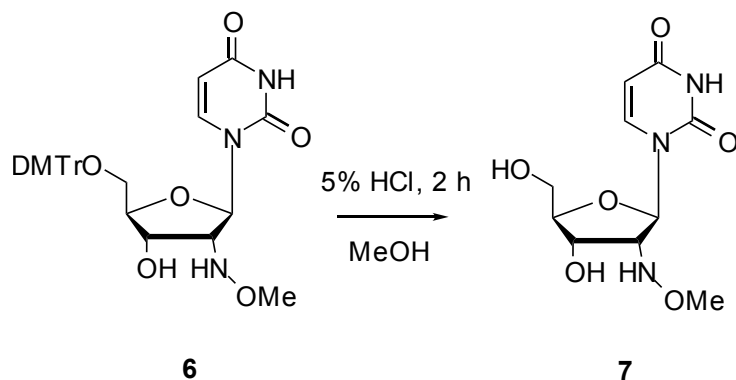


Kaavio 7. 5'-*O*-DMTr-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin synteesi.

5'-O-DMTr-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiini syntetisoitiin yllä olevan kaavion esittämällä tavalla (Kaavio 7). Synteesin tarkempi kuvaus on esitetty tämän tutkielman osiossa 4. Kokeelliset menetelmät. Synteesi noudattaa pääosin aiemmin julkaistua (Ogawa, A. *et al.*, [57]) synteesiä.

Lähtöaineena käytettiin kaupallisesti saatavilla olevaa 2,2'-anhydrouridiinia (**1**). Lähtöaineen (**1**) 5'-OH suojattiin DMTr:llä jolloin saatiin tuote **2**. Tuote puhdistettiin ja karakterisoitiin NMR-spektroskopiolla sekä massaspektrometrisesti. DMTr-suojaryhmän käyttö on tarpeen, jotta seuraavassa vaiheessa vain 3'-aseman hydroksiryhmä hyökkää 1,1'-karbonyyli-imidatsolin (CDI) karbonyylihiileen ja muodostuu pääasiassa vain yhtä tuotetta (**3**). Kun kaikki CDI oli reagoanut, lisättiin reaktioliuokseen metoksiamiinin hydrokloridia, jolloin muodostui tuotetta **4**. Reaktioliuos konsentroidtiin ja raakatuote liuotettiin etyyliasetaattiin. Orgaanista faasia pestiin vedellä ja haihdutettiin sitten kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin, ja joukkoon lisättiin DBU:ta. DBU toimii emäksenä ja deprotonoi typen, joka hyökätessään 2'-asemaan sulkee karbamaattirenkaan ja muodostuu nukleosidianalogi **5**. Puhdistuksen jälkeen tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrisesti. Nukleosidianalogi **5** liuotettiin kuivaan metanoliin ja joukkoon lisättiin cesiumkarbonaattia. Cesiumkarbonaatti avaa karbamaattirenkaan nukleofiilisen substituution avulla ja tuote **6** muodostuu. Silikageelikromatografiolla puhdistettu tuote **6** karakterisoitiin NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrisesti.

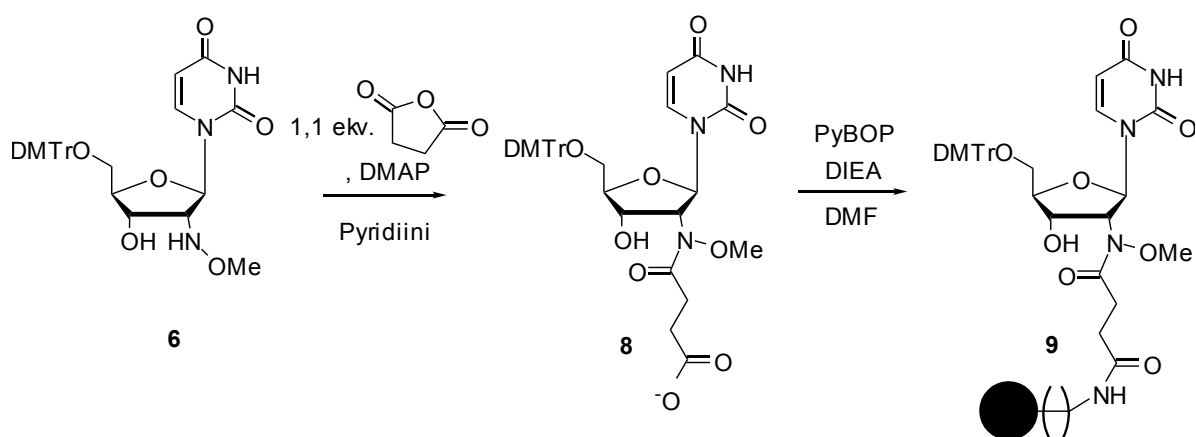
2.2 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiini



Kaavio 8. 5'-O-DMTr-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin detritylointi.

2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin ligaatio reaktioita varten 5'-*O*-DMTr-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinista (**6**) poistettiin trityylisuojarahmä. Trityylin poistamiseen käytettiin 5% HCl -liuosta, jota lisättiin tuotteen **6** metanoliliuokseen, kunnes havaittiin TLC:llä, että suurin osa tuotteesta **6** oli detrityloitunut ja tuote **7** muodostunut. Tuotteen **7** riittävän puhtauden saavuttamiseksi ligaatioreaktioita varten, tuote **7** puhdistettiin HPLC:llä.

2.3 Liittäminen kantajaan



Kaavio 9. 5'-*O*-DMTr-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin liittäminen kantajaan.

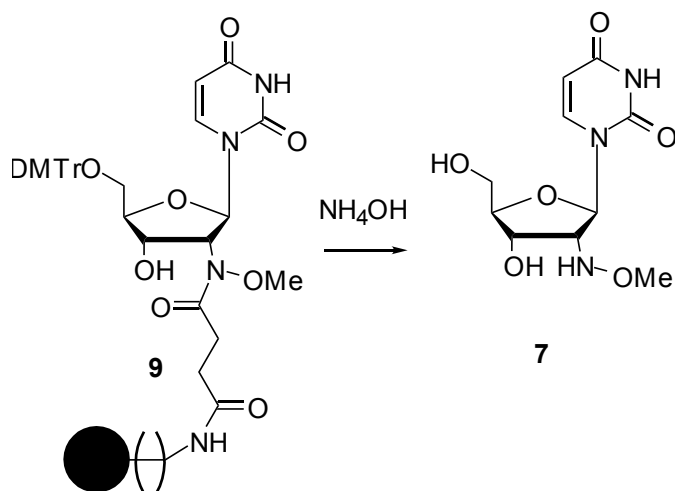
2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiini aloittaa nukleosidiketjun, kun 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiini halutaan liittää osaksi oligonukleotidia. Tällöin nukleosidiketjun suunnan voidaan ajatella olevan 5'-päästä 3'-pään. Vaikka oligonukleotidi syntetisoidaan automaattisesti DNA-syntetisaattorilla, on synteessin suunnittelun kannalta järkevää liittää ensimmäinen nukleosidi ilman syntetisaattoria kantajaan. Tässä työssä toteutettu kantajaan liittäminen noudattaa aiemmin julkaistua yleistä tapaa liittää ensimmäinen nukleosidi amino-ryhmillä päällystettyyn kantajaan.

Tuote **6** liuotettiin kuivaan pyridiiniin ja joukkoon lisättiin meripihkahappoanhydridiä sekä DMAP:ia katalyytiksi. Kun reaktio oli kulunut loppuun ja tuote **7** muodostunut, jaettiin raakatuote kahteen osaan, joista toisella puoliskolla liittäminen kantajaan tehtiin raakatuotteella sellaisenaan ja toisella puoliskolla silikageelikromatografisen puhdistuksen jälkeen. Molemmilla puoliskoilla kantajaan liittäminen onnistui. Kantajana

oli LCAA-CPG-kantaja, joka aktivoitiin käsittelemällä sitä 10 % TEA/metanoli -liuoksella. Kantaja kuivattiin alipaineessa eksikaattorissa fosforipentoksidin päällä. Tuote **8** liuotettiin DMF:ään. Liuotinta lisättiin, kunnes muodostui hyvä suspensio ja kantaja peittyi kokonaan. Suspensioon lisättiin PyBOP:ia ja emäkseksi DIEA:ta. Kun reaktio oli kulunut loppuun, reaktiosuspensio pestiin DMF:llä ja DCM:llä. Reagoimaton kantaja ja mahdolliset suojaamattomat hydroksiryhmät suojattiin asetyloimalla. Asetylointiin käytettiin kaupallisia Cap A- ja Cap B-liuoksia. Liuoksia käytettiin suhteessa 1:1 (Kokoliuos: etikkahappoanhydridi: lutidine:1-metyyli-imidatsoli:THF, 5:5:8:82, v:v:v:v). Lopuksi kantaja (**9**) kuivattiin alipaineessa eksikaattorissa fosforipentoksidin päällä ja siirrettiin kylmäsäilytykseen (2°C).

Jotta oligonukleotidisynteesi voitaisiin suunnitella, pitää tietää kuinka moneen kantajan aminoryhmään nukleosidi on liittynyt. Tätä kuvataan suureella *loading*. Kantajan loading määritettiin trityylianalyysillä. Trityylianalyysissä kantajaa punnittiin mikrosentrifuugiputkeen ja päälle lisättiin 3 % trikloorietikkahappo/dikloorimetaani -liuosta. Kyseinen happoliuos aiheuttaa trityylisuojarahmian irtoamisen. Liuos siirrettiin 10 ml mittapulloon ja täytettiin merkkiin asti edellä mainitulla happoliuoksella. Mittapullosta otettiin näyte kyvetiin ja näytteen absorbanssi mitattiin UV-spektrofotometrillä. Irronneen trityylin määrä on suoraan verrannollinen kantajaan liittyneiden nukleosidianalogien määrään. Absorbanssin mittaamalla ja tuntemalla tilavuuden, jossa detritylointi on tapahtunut, voidaan loading laskea. Näytteen absorbanssiksi mitattiin $A_{504} = 0,923$ josta laskettiin trityylin moolimäärä per gramma kantaja. Tulokseksi saatiin $loading = 21,7 \mu\text{mol/g}$. Kyseinen loading arvo on hyvää keskitasoa ja sopii hyvin onnistuneen automaattisen oligonukleotidisynteesin toteuttamiseen.

2.4 Kantajasta irrottaminen

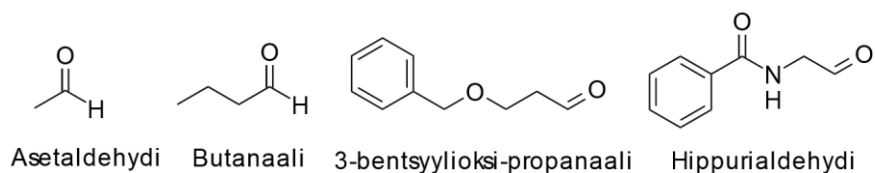


Kaavio 10. 5'-O-DMTr-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin irrottaminen kantajasta.

Oligonukleotidisynteesin jälkeen syntetisoitu oligonukleotidi pitää saada irtoamaan kantajasta. Jotta voitaisiin varmistaa, että näin todella voidaan tehdä, testattiin kantajasta irrotusta kantajalla **9**. Kyseinen aminolyysi toteutettiin siten, että näyteputkeen punnittiin kantajaa ja putki täytettiin 25% ammoniumhydroksidiliuoksella. Näyteputki asetettiin lämpöuuniin 55°C lämpötilaan tunnin ajaksi. RP-HPLC-MS:llä ajetusta massaspektristä havaittiin m/z 274,1 $[M+H]^+$, joka on 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin massa. Samalla tapahtui detrityloituminen. Tuloksista voidaan päätellä, että kantajasta irrottaminen tapahtuu onnistuneesti ja automaattinen oligonukleotidisynteesi voidaan toteuttaa.

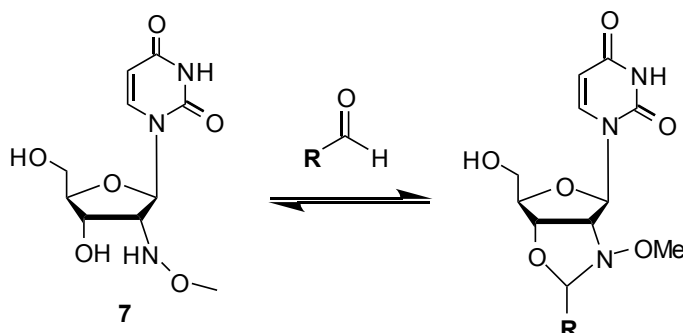
2.5 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin ligaatiot

2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin (**7**) ligaatioita eri aldehydyhdisteiden kanssa testattiin ja ligaaation kineettiset parametrit mitattiin. Aldehydyhdisteitä olivat asetraldehydi, butanaali, hippurialdehydi ja 3-bentsyylioksi-1-propanaali. Kyseiset aldehydyhdisteet on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Taulukossa 1 esitetyt aldehydyhdisteet.

Ligaatioreaktiot tehtiin huoneenlämpötilassa (21°C) ja pH:ssa 4, 5 ja 6. Aldehydyhdisteen ja 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin (**7**) pitoisuudet olivat yhtä suuret (5 mM) ja ne reagoivat asetaattipuskuriliuoksessa. (100 ml). Reaktioita seurattiin RP-HPLC:lla. Kaaviossa 11 on esitetty ligaatioreaktiot. Kaaviosta 10 nähdään myös *N*-metoksioksatsolidiini-ligaatiossa syntyvä rengasrakenne. Alla olevassa taulukossa on esitetty saadut ligaatioreaktioiden kineettiset parametrit.



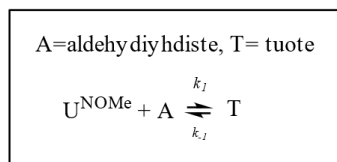
Kaavio 11. 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin **7** ligaatioit kuvassa 2 esitettyjen aldehydyhdisteiden kanssa.

Taulukko 1. Reaktiolämpötila 21 °C. $c(7) = c(\text{aldehydi}) = 5 \text{ mM}$. Reaktioliuoksen pH säädettiin puskuriliuoksella (0,1 M). Detektio UV:lla 260 nm.

R	pH	t0.5	Tasapainosaanto (%)	Tasapainovakio (K /M)
Me	4	7.93 min	59	693 ± 29
Me	5	26.2 min	62	856 ± 27
Me	6	3.93 h	67	1211 ± 39
Pr	4	11.9 min	62	835 ± 49
Pr	5	40 min	54	499 ± 7
Pr	6	4.12 h	49	379 ± 3
BzNHCH ₂	4	4.85 h	82	4958 ± 50
BzNHCH ₂	5	45 h	86	9038 ± 1265
BnOCH ₂ CH ₂	4	21.6 min	64	959 ± 28
BnOCH ₂ CH ₂	5	1.92 h	66	1144 ± 39
BnOCH ₂ CH ₂	6	25.0 h	63	939 ± 34

Taulukon 1 puoliintumisajan parametrin nähdään, että ligaatioreaktio on nopein pH:ssa 4 ja hidastuu, kun pH nousee. Tasapainosaannon pH-riippuvaisuudesta ei voida tehdä päätelmiä, vaan aldehydyhdisteen rakenne näyttää määrittävän sen, onko tasapainosaanto suurempi alhaisessa kuin korkeassa pH:ssa. Hippurialdehydin ja 3-bentsyylioksi-1-propanaalin ligaatioparametrejä verratessa nähdään, että 3-bentsyylioksi-1-propanaalin pidempi ja poolittomampi hiiliketju ennen aldehydiryhmää oletettavasti tekee ligaatiosta nopeamman.

Ligaatio on 2. kertaluvun reaktio tuotteiden suuntaan (kondensaatio) ja pseudo 1. kertaluvun reaktio lähtöaineiden suuntaan (hydrolyysi). Alla on esitetty funktio, jolla on tehty käyrän sovitus mittauspisteisiin. Sovitetusta käyrästä on saatu taulukon 1 kineettiset parametrit.



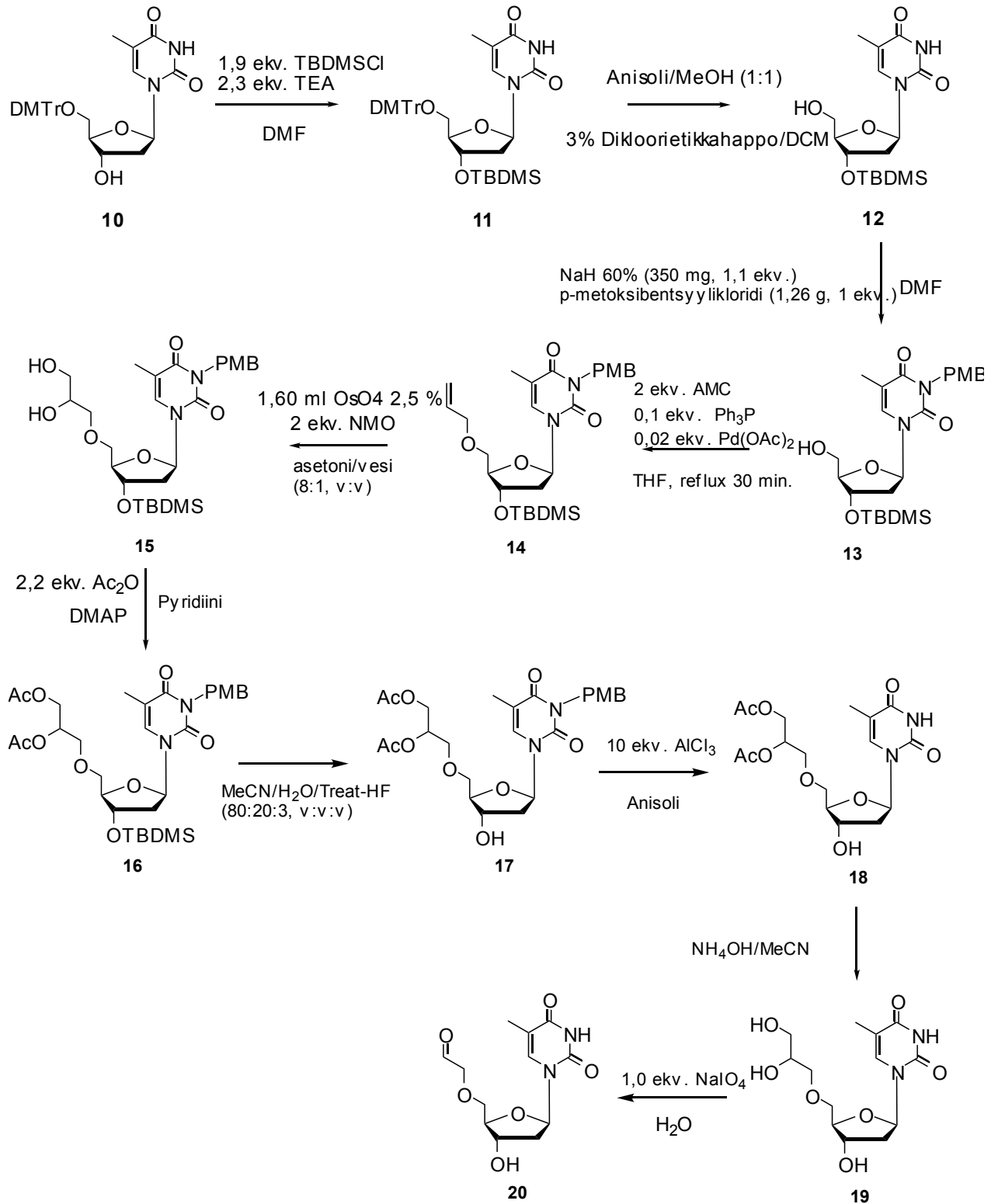
$$T(t) = \frac{(1 - e^{-\beta t}) / 2k_1}{\frac{1}{\infty - \beta} \frac{e^{(-\beta t)}}{\alpha + \beta}}$$

$$\alpha = (U_0^{NOMe} + A_0)k_1 + k_{-1}$$

$$\beta = \sqrt{\alpha^2 - 4k_1^2 U_0^{NOMe} A_0}$$

2.6 5'-O-(oksoetyyli)tymidiinin synteesi

5'-O-(oksoetyyli)tymidiini syntetisoitiin kaavion 12 esittämällä tavalla. Synteessin tarkempi kuvaus on esitetty tämän tutkielman osiossa 4. Kokeelliset menetelmät.



Kaavio 12. 5'-O-(oksoetyyli)tymidiinin synteesi.

Lähtöaineena käytettiin 5'-DMTr-tymidiiniä (**10**), joka liuotettiin DMF:ään. Tert-butyylidimetyylisilylikloridi (TBDMSCl) ja trietyyliamiini (TEA) lisättiin liukseen. Lähtöaineena käytettiin 5'-asemaltaan suojattua 5'-DMTr-tymidiiniä jotta silylointi saataisiin varmasti 3'-asemaan. Suojaryhmät myös liitettiin paikalleen yksi kerrallaan, jotta myöhempi allylointi varmasti osuisi 5'-asemaan. Ensimmäisen vaiheen tuotteena muodostui 5'-asemaltaan ja 3'-asemaltaan suojattu nukleosidianalogi **11**. Raakatuote **11** käytettiin ilman välipuhdistuksia seuraavaan vaiheeseen jossa 5'-aseaman DMTr-suojaryhmä poistettiin liuottamalla tuote 3% dikloorietikkahappo/DCM liukseen. Liuokseen lisättiin anisoli/metanoliliuosta sitomaan irtoavaa DMTr-kationia, jolloin saatiin puhtaampi raakatuote. Muodostunut nukleosidianalogi **12** puhdistettiin silikageelikromatografisesti, karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrisesti.

Tuote **12** liuotettiin DMF:ään ja joukkoon lisättiin natriumhydroksidia emäksen N³ deprotonoimiseksi, jonka jälkeen liukseen lisättiin *para*-metoksibentsyylikloridia emäksen N³ suojaamiseksi. Muodostunut nukleosidianalogi **13** puhdistettiin silikageelikromatografisesti, karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrisesti.

Seuraavassa vaiheessa nukleosidinalogin **13** 5'-asemaan liitettiin allyyli. Allyylimetyylikarbonaatti (AMC) ja trifenyylifosfiini (Ph₃P) lisättiin liukseen. Katalyytiksi lisättiin palladiumasettaattia (Pd(OAc)₂). Reaktio on siten palladiumkatalysoitu allylointi. Synteesi tehtiin aiemmin julkaistua menetelmää noudattaen (*T. Niittymäki et al. 2007, [58]*). Jo raakatuote oli suhteellisen puhdas ja saanto oli 90 % johtuen palladiumkatalysoidun allyloinnin tehokkuudesta. Tuote **14** puhdistettiin silikageelikromatografisesti, karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrisesti.

Edellisen vaiheen allyylinukleosidianalogi **14** liuotettiin asetoniv/vesi -liukseen ja joukkoon lisättiin *N*-metyylimorfoliini-*N*-oksidia. Hetken kuluttua lisättiin 2,5 w-% OsO₄ liuosta (*tert*-butanolissa). Osmiumtetraoksidi hapettaa allyylin dioliksi (tuote **15**) ja *N*-metyylimorfoliini-*N*-oksidi hapettaa reaktiossa pelkistyneen osmiumin (hapetusluku VI) takaisin hapetuslukuun VIII. Tällöin voidaan käyttää erittäin myrkyllistä osmiumtetraoksidia pienempi määrä. Tässä vaiheessa synteesiä voitaisiin hapettaa dioli natriumperjodaatilla (NaIO₄) aldehydiksi, jos valmistettaisiin vain 5'-*O*-

(oksoetyyli)tymidiini, mutta koska haluttiin valmistaa myös tuotteen **18** fosforamidaatti, näin ei tehty.

Dioli (tuote **15**) asetyloitiin ilman välipuhdistuksia etikkahappoanhydridillä ja nukleosidianalogi **16** puhdistettiin silikageelikromatografisesti, karakterisoitiin ^1H NMR- ja ^{13}C NMR-spektroskopiolla ja massaspektometrisesti.

Nukleosidianalogista **16** irrotettiin *tert*-butyylidimetyylisilyyli-suojaryhmä MeCN/H₂O/TREAT-HF (v:v:v, 80:20:3) liuoksella. TREAT-HF on trietyyliamiiniin liuotettua vetyfluoridia. Happolabiilien asetaalisuojauksien takia TREAT-HF -liuos säädettiin pH:seen 7 lisäämällä trietyyliamiinia. Tuote **17** puhdistettiin silikageelikromatografisesti, karakterisoitiin ^1H NMR- ja ^{13}C NMR-spektroskopiolla ja massaspektometrisesti.

Para-metoksibentsyyli-suojaryhmän (PMB) poistaminen osoittautui ongelmalliseksi. Keriumammoniumnitraattia (CAN) käyttämällä tuotteen **18** saanto jäi noin kahteen prosenttiin. Myös palladiumkatalyyttistä vedytystä yritettiin. Kokeiltuja menetelmiä irrottaa PMB-suojaryhmä on esitetty taulukossa 2.

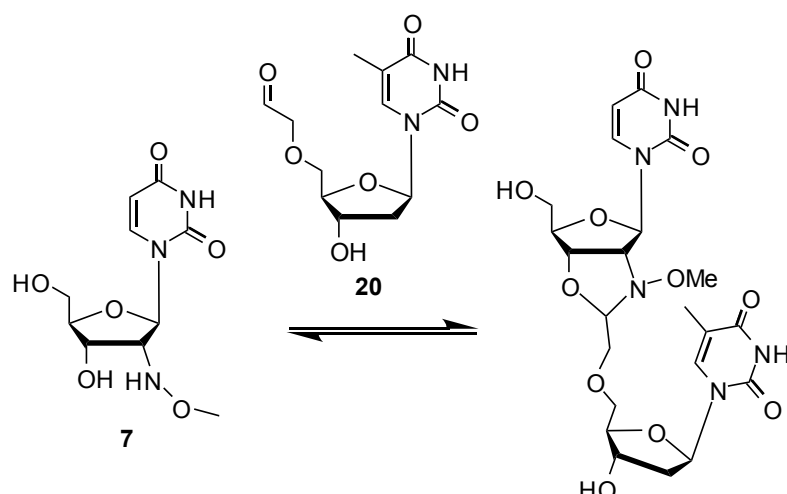
Taulukko 2. *Para*-metosibentsyyli-suojaryhmän poistoon käytettyjä menetelmiä ja menetelmien tuloksia.

Menetelmä	Lämpötila (°C)	Vetykaasun paine (ATM)	Tuote/saanto
CAN	Huoneenlämpötila	-	18/2 %
TFA	Huoneenlämpötila	-	Ei reaktiota
Pd/C	Huoneenlämpötila	1	Ei reaktiota
Pd/C	Huoneenlämpötila	15	Sivutuoteseos
Pd(OH) ₂ /C	Huoneenlämpötila	1	Ei reaktiota
Pd(OH) ₂ /C	Huoneenlämpötila	12	Sivutuoteseos
Pd(OH) ₂ /C	60	1	Ei reaktiota
Pd(OH) ₂ /C + NaOH	60	1	Sivutuoteseos, deasetylaatio
AlCl ₃	Huoneenlämpötila	-	18/9-27 %

Taulukossa esitetyt tulokset ovat yhtenäisiä *T. Torii et al. 2007* julkaisussaan esitettyjen Bn-suojaryhmän poistoon käytettyjen menetelmien tulosten kanssa. Palladiumkatalyyttisellä vedytyksellä suojaryhmän irtoamista ei tapahdu normaalipaineessa tai lämpötilaa nostamalla. Kun painetta nostetaan, muodostuu mutkikas eri tuotteiden seos. *T. Torii et al. 2007* julkaisussaan toteavat, että Bn-suojaryhmän irtoaa, kun käytetään natriumhydroksidia ja 80°C lämpötilaa.[59] Tuotteesta **17** irtoavat asetyylisuojaryhmät kyseisellä menetelmällä. Lopulta päädyttiin käyttämään alumiinikloridia, jolla saatiin riittävästi eristettyä tuotetta **18**. Kuten keriumammoniumnitraatti, myös alumiinikloridi irrottaa suojaryhmän hapettamalla. Ongelmana *para*-metoksibentsyyli-suojaryhmän irrottamisessa on erityisesti se, että tarpeeksi tehokkaita menetelmiä suojaryhmän poistamiseen ei voida käyttää muiden suojaryhmien takia. Liuottimena reaktiossa käytettiin anisolia, joka samalla sitoi irtoavaa PMB-suojaryhmäkationia. Tuote **18** puhdistettiin silikageelikromatografisesti, karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopiolla ja massaspektrometrisesti.

Nukleosidianalogista **18** tehtiin 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiini kahdessa perättäisessä vaiheessa. Tuote **17** liuotettiin asetonitriiliin ja liukseen lisättiin ammoniumhydroksidia asetyylisuojaryhmien poistamiseksi. Liuos siirrettiin lämpökaappiin kolmeksi tunniksi 55°C lämpötilaan, minkä jälkeen liuos haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös (**19**) liuotettiin pieneen määrään vettä ja natriumperjodaattia (NaIO₄) lisättiin liukseen. Kun noin 1,5 tuntia oli kulunut ja dioli hapettunut aldehydiksi, liuos suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin kylmäkuivauksessa. Kylmäkuivauksen jälkeen raakatuote **20** liuotettiin veteen ja puhdistettiin RP-HPLC:llä semipreparatiivisella kolonnilla. RP-HPLC:llä puhdistettaessa voitiin havaita, että edellisessä vaiheessa tuote ei ollut täysin puhdas. On oletettavaa, että alumiinikloridin hapetusreaktio tuottaa sivutuotteita, jotka eluoituvat samassa vaiheessa itse tuotteen kanssa. Tuotteen **18** epäpuhtaus on nähtävissä sen NMR-spektreistä, joissa on jonkin verran tunnistamattomia lyhtyitä tai leveitä piikkejä.

2.7 5'-O-(oksoetyyli)tymidiinin ligaatio



Kaavio 13. 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin (7) ligaatio 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin (20) kanssa.

2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin (7) ligaatioita 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin (20) kanssa mitattiin pH:ssa 4 ja 5. Kaaviossa 13 on esitetty ligaatioreaktio. Molempien nukleosidien pitoisuus oli 3 mM asetaattipuskuriliuoksessa. Ligaatioreaktioita seurattiin ottamalla 1 μ l näytteitä pysäytysliuokseen (74 μ l, 100 mM, pH 7, trietyyliammoniumasetaattipuskuri (TEAA), vedessä) ja ajamalla RP-HPLC:llä gradienttiajo (0–40 % 25 min. MeCN/TEAA (50mM, vedessä)).

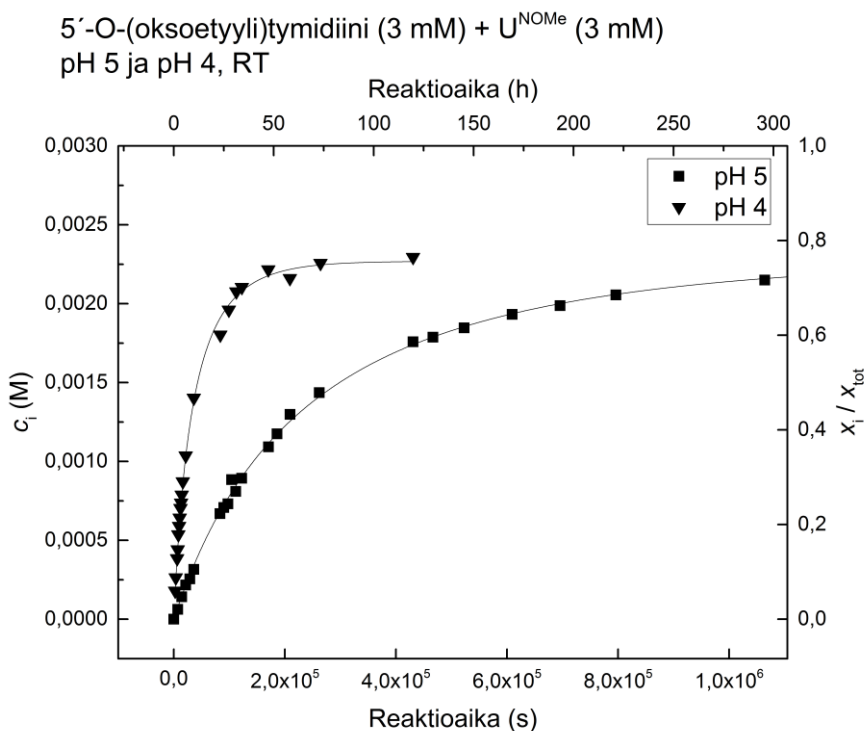
Taulukossa 3 on esitetty mittauksissa saadut parametrit. Kuten edellä mainituissa ligaatioreaktioissa, myös tässä tapauksessa ligaatio on 2. kertaluvun reaktio tuotteiden suuntaan (kondensaatio) ja pseudo 1. kertaluvun reaktio lähtöaineiden suuntaan (hydrolyysi).

Kuten tässä tutkielmassa aiemmin esitetyissä 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiininligaatioissa, myös ligaatiossa 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin kanssa ligaatio on pH-riippuvainen ja hitaampi pH:ssa 5. Tasapainosaannolla ja tasapainovakiolla ei käytännössä ole eroa pH 5 ligaation ja pH 4 ligaation välillä. Kuvassa 1. on esitetty ligaatioreaktion kuvaajat pH:ssa 4 ja 5. Kuvaajasta nähdään, että reaktion nopeus muuttuu huomattavasti eri pH:ssa. Tasapainoaseman saavuttaneesta reaktiosta ajettiin massaspektri Bruker Daltonics micrQTOF massaspektrometrillä. Havaittiin massat ESI⁺-MS: m/z 562,1624 [M+Na]⁺, 578,1385 [M+K]⁺. Ligaatiotuotteen laskettu

massa m/z 562,1756 $[M+Na]^+$. Havaitut massat ovat kalium- ja natriumaddukti. HPLC-grammeissa näkyvien duplettien vuoksi ajettiin myös HPLC-MS (Agilent 6120) ja tuotepiikkien massaspektreissä näkyivät samat massat. Dupletit voivat johtua kolonnista, epäpuhtaudesta tai stereoisomeereistä.

Taulukko 3. Reaktiolämpötila 21 °C. $c(7) = c(20) = 3$ mM. Reaktioliuoksen pH säädettiin puskuriliuoksella (0,1 M). Detektio UV:lla 260 nm.

pH	t _{0.5}	Tasapaino-saanto (%)	Tasapaino-vakio (K / M)
4	6,95 h	76	4239 ± 249
5	49,79 h	76	4479 ± 342



Kuva 3. 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamino)uridiinin ligaatio 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin kanssa pH:ssa 4 ja 5.

3. Johtopäätökset ja yhteenveto

2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini syntetisoitiin onnistuneesti. 5'-DMTr-2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin liittäminen kantajaan ja kantajasta irrottaminen onnistuivat. Automaattinen oligonukleotidisynteesi on siten mahdollista 5'-DMTr-2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin kantajalla.

5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin synteesissä ongelmia aiheutti PMB-suojaryhmä. Allylointi ja hapettaminen dioliksi sekä aldehydiksi olivat tehokkaita. Näiden hapetusmenetelmien saannot olivat kaikki yli 70%. Sen sijaan synteesin suojaryhmäkemiaa pitäisi kehittää, jos synteesiä halutaan tehostaa. *Para*-metoksibentsyyli-suojaryhmä vaikuttaa olevan liian pysyvä, että se voitaisiin poistaa nukleosidianalogista ilman, että myös muut suojaryhmät lähtisivät irti. Kuitenkin synteesi voidaan nähdä onnistuneena, kun otetaan huomioon että 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiiniä saatiin eristettyä ja synteesi pystytään tekemään sellaisen välivaiheen kautta, josta voidaan tehdä fosforamidiittinukleosidi. Fosforamidiittinukleosidia voitaisiin käyttää automaattisessa DNA-syntetisaattorissa oligonukleotidin syntetisoimiseen ja tämän oligonukleotidin avulla voitaisiin tutkia DNA-templatoitua ligaatiota. Onnistunut ligaatio nukleosidien 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin ja 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin välillä herättää kiinnostusta tutkia jatkossa *N*-metoksioksatsolidiin soveltuvuutta DNA-templatoidussa ligaatiossa ja polymerisaatiossa. DNA-templatoidussa ligaatiossa molekyylien välinen tunnistus tapahtuu nukleoemästen avulla. DNA-polymerisaatiossa nukleosidit järjestäytyisivät itsestään rakenteiksi *N*-metoksioksatsolidiin ja aldehydin ligaation avulla.

Ligaatiot 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin ja aldehydyhdisteiden välillä näyttävät toimivan, kuten on ennustettu. Ligaatio on pH-riippuvainen; nopein pH:ssa 4 ja hidastuu pH:ssa 5 ja 6. Tasapainosaanto on yhdisteriippuvainen, ja riippuen yhdisteestä se on joko suurempi pH:ssa 6 kuin pH:ssa 4 tai toisinpäin. Verratessa hippurialdehydin ja 3-bentsyylioksi-1-propanaalin ligaatioparametrejä nähdään, että 3-bentsyylioksi-1-propanaalin pidempi ja poolittomampi hiiliketju ennen aldehydyhmää oletettavasti tekee ligaatiosta nopeamman. Näin ollen olisi ligaation nopeuden kannalta järkevää pyrkiä kehittämään sellaisia aldehydyhdisteitä tai nukleosidianalogeja, joissa aldehydyhmä olisi vähintään kahden CH₂-ryhmän päässä joko hapesta tai typestä.

Tuotteisiin syntyy yksi tai useampi stereokeskus ja tuote on stereisomeerien seos. Tämä näkyy HPLC-grammeissa kahtena toisistaan erottuvana piikkinä. 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinin ligaatioissa edellä mainitut kaksi piikkiä hajosivat vielä dupleteiksi. Nämä dupletit ovat todennäköisesti isomeerien seos tai johtuvat epäpuhtaudesta 5'-*O*-(oksoetyyli)tymidiinissä.

4. Kokeelliset menetelmät

4.1 Yleiset kokeelliset menetelmät

Reaktioluottimet kuivattiin molekyyliseuloilla. Lähtöaineet, reagenssit, katalyytit ja luottimet olivat kaupallisista lähteistä peräisin ja käytettiin sellaisenaan, ellei toisin mainita. NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz AVANCE-III - ja Bruker 600 MHz AVANCE-III –NMR-spektrometrillä. Massaspektrit mitattiin Bruker Daltonics micrQTOF massaspektrometrillä. Reaktioiden etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (TLC) ja HPLC-MS:llä (Agilent 6120).

4.2 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin synteesi

4.2.1 5'-*O*-(dimetoksitriityyli)-2,2'-*O*-anhydrouridiini (2)

Eksikaattorissa fosforipentoksidin päällä kuivattu 2,2'-anhydrouridiini (1) (3.0 g, 13,3 mmol) liuotettiin 60 millilitraan kuivaa pyridiiniä. DMTrCl (4,52 g, 13,3 mmol) lisättiin erissä liuokseen. Reaktion annettiin edetä yön yli, jonka jälkeen liuos konsentroidiin ja siirrettiin erotussuppiloon. Konsentroituu liuokseen lisättiin etyyliasetaattia (140 ml). Orgaanista faasia pestiin kylläisillä NaHCO₃:n (40 ml) ja NaCl (3 × 20 ml) vesiliuoksilla. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksestä haihdutettiin toluenia pyridiinin poistamiseksi ja dikloorimetaania toluenin poistamiseksi. Haihdutusjännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (10 % metanoli, dikloorimetaani). Tuote (2) kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote 2 (2,71 g, 39 %) oli valkoinen, vaahtomainen jauhe (hieman punertava). Tuote 2 karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektroskopisesti (Liitteet 1 ja 2) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: m/z 529,1938 [M+H]⁺ (havaittu), 551,1867 [M+Na]⁺, 567,1559 [M+K]⁺. m/z 529,1969 [M+H]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 5,86 ppm. $R_f = 0,45$ (10 % metanoli, dikloorimetaani)

¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 7,32-6,76 (14H, m, H6, Ph), 5,17 (1H, d, $J = 5,7$ Hz, H1'), 5,95 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, H5), 5,30 (1H, m, H2'), 4,48 (1H, s, H4'), 4,42 (1H, m, H3'), 3,77 (6H, s, OMe), 3,09 (1H, dd, $J = 5,0$ Hz ja 10,3 Hz, H5'a), 2,96 (1H, dd, $J = 7,1$ Hz ja 10,3 Hz, H5'b), 2,58.

¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃): 55,2 (O-Me(Tr.)), 62,8 (C5'), 75,6 (C3'), 77,3 (CDCl₃), 86,3 (C4'), 87,4 (C2'), 89,3 (C tert.), 90,1 (C1'), 110,0 (C5), 113,2-158,4 (Ph,C6), 159,6 (C2), 172,3 (C4).

4.2.2 2'-N,3'-O-karboxyli-2'-deoksi-5'-O-(4,4'-dimetoksitriityli)-2'-(N-metoksiamiini)uridiini (5)

Nukleosidianalogi **2** (2,53 g, 4,89 mmol) liuotettiin kuivaan pyridiiniin (15 ml) ja liuokseen lisättiin 1,23 g (7,32 mmol) 1,1'-karboxylidi-imidatsolia. Reaktiota seurattiin TLC:llä, ja noin vuorokauden kuluttua HPLC-MS:llä varmistettiin, että oikeaa tuotetta **3** oli syntynyt. Tämän jälkeen lisättiin vielä 120 mg (0,74 mmol) karboxylidi-imidatsolia. Kun lähtöaine (**2**) oli kulunut loppuun, lisättiin 1,73 g (20,7 mmol) metoksiamiinin hydrokloridia. Reaktioon annettiin edetä yön yli, jolloin HPLC-MS osoitti lähtöaineen (**3**) kuluneen loppuun ja tuotteen **4** muodostuneen. Reaktioliuos konsentroidiin ja jäännös liuotettiin etyyliasetaattiin. Orgaanista faasia pestiin kahteen kertaan vedellä ja kahteen kertaan kylläisellä natriumkloridiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla ja konsentroidiin haihduttamalla alipaineessa. Jäännös liuotettiin tetrahydrofuraaniin (20 ml) ja joukkoon lisättiin 145 μ l (0,98 mmol) DBU:ta. Reaktioon annettiin edetä yön yli, jolloin TLC:n perusteella reaktio lähtöaine (**4**) oli kulunut loppuun ja myös HPLC-MS vahvisti tämän. Liuotin haihdutettiin alipaineessa ja haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (10 % metanoli, dikloorimetaani). Tuote puhdistettiin vielä kahteen kertaan uudelleen silikageelikromatografisesti (3 % metanoli, dikloorimetaani; 2 % metanoli, dikloorimetaani). Tuote (**5**) kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote (**5**) (1,76 g, 60 %) oli vaalea jauhe. Tuote karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektroskopisesti (Liite 3 ja 4) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: *m/z* 624,1808 [M+Na]⁺ (havaittu), 640,1571 [M+K]⁺ (havaittu). *m/z* 624,19525 [M+Na]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 23 ppm. R_f = 0,3 (3 % metanoli, dikloorimetaani)

¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 8,66 (1H, m, 3-NH), 7,55 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H₆), 7,39-6,84 (13H, m, Ph), 7,33-7,24 (2H, CDCl₃, pyridiini) 6,09 (1H, d, *J* = 1,4 Hz, H₁'), 5,53 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H₅), 5,32 (1H, s, DCM) 5,17 (1H, dd, *J* = 5,7 Hz ja 8,4 Hz, H₃'), 4,56 (1H, dd, *J* = 1,4 Hz ja 8,4 Hz, H₂'), 4,32 (1H, dd, *J* = 4,1 Hz ja 9,2 Hz, H₄'), 3,98 (3H, s, NO-Me), 3,81 (6H, s, OMe(Tr.)) 3,55 (2H, m, H₅'a, H₅'b).

¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃): 53,3 (DCM), 55,3 (O-Me(Tr), 62,2 (C₂'), 64,4 (C₅'), 67,7 (NO-Me) 75,0 (C₃'), 77,3 (CDCl₃), 85,1 (C₄'), 87,1 (C₁'), 90,7 (C(tert.)), 103,2 (C₅), 113,4 (Ph), 123,78 (Pyridiini), 127,2 (Ph), 128,0- 150,0 (Ph, pyridiini), 149,8 (O-CO-N) 156,4 (C₂), 158,8 (Ph), 162,9 (C₄).

4.2.3 5'-O-(4,4'-dimetoksitriityyli)-2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamiini)uridiini (6)

Nukleosidianalogi **5** (1,59 g, 2,64 mmol) liuotettiin kuivaan metanoliin (30 ml) ja siihen lisättiin cesiumkarbonaattia (2,56 g, 7,86 mmol. Kun reaktio oli edennyt yön yli, TLC osoitti, että kaikki lähtöaine oli kulunut. Reaktioliuos haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös liuotettiin etyyliasetaatiiin (130 ml) ja sitä pestiin vedellä (2×20 ml) ja kylläisellä NaCl-liuoksella (20 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin NaSO₄-lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (3 % metanoli, dikloorimetaani). Tuote **6** oli valkoinen, vaahtomainen jauhe (0,59 g, 39 %). Tuote karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektroskopisesti (Liite 5 ja 6) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: *m/z* 576,2339 [M+H]⁺ (havaittu), 598,2130 [M+Na]⁺, 614,1895 [M+K]⁺. *m/z* 576,2340 [M+H]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 0,24 ppm. R_f = 0,5 (3 % metanoli, dikloorimetaani)

¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 8,94 (1H, s, 2-NH), 7,76 (1H, d, *J* = 8,2 Hz, H₆), 7,40 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, Ph), 7,34-7,25 (7H, m, Ph), 6,87 (4H, d, *J* = 8,6 Hz, Ph), 6,40 (1H, d, *J* = 4,5 Hz, 2'-NH), 6,01 (1H, d, *J* = 6,3 Hz, H₁'), 5,44 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H₅), 5,32 (s,

DCM), 4,45 (1H, m, H3'), 4,26 (1H, q, $J = 3,1$ Hz, H2'), 3,82 (6H, s, O-Me(Tr.)), 3,76 (1H, m, H4'), 3,63 (3H, s, NO-Me), 3,47 (2H, m, H5'a, H5'b).

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 55,3 (O-Me), 62,5 (C2'), 63,3 (C5'), 68,1 (NO-Me), 70,7 (C3'), 86,0 (C4'), 87,2 (C1'), 102,5 (C5), 113,3 (Ph), 127,2-135,3 (Ph), 140,016 (C6), 144,2 (Ph), 150,7 (C2), 158,7 (Ph), 163,0 (C4).

4.2.4 2'-deoksi-2'-(*N*-metoksiamiini)uridiini (7)

5'-DMTr-2'-*N*-oksiamiini-uridiini (**6**) (53mg, 92 μmol) liuotettiin metanoliin (2 ml). Joukkoon lisättiin 5% HCl-liuosta (5 μl). 40 min kuluttua reaktioseokseen lisättiin toiset 5 μl 5% HCl-liuosta. Kahden tunnin kuluttua TLC:n perusteella suurin osa lähtöaineesta **6** oli detrityloitu. Reaktioliuokseen lisättiin vettä (10 ml), ja vesifaasia pestiin dikloorimetaanilla (5 \times 8 ml). Pesun onnistuminen tarkistettiin TLC:llä. Vesifaasi kylmäkuivattiin ja puhdistettiin sitten HPLC:llä (gradientti 100% vedestä 70% asetonitriiliin 15 minuutissa). Tuotteen **7** saanto (14,1 mg, 56 %) määritettiin UV-spektrofotometrisesti:

Tuote **7** liuotettiin veteen (0,25 ml) ja siitä otettiin näyte, josta tehtiin 100-kertainen laimennos. Laimennoksen UV-absorbanssi mitattiin 260 nm:n aallonpituudella. Absorbanssin avulla laskettiin liuoksen konsentraatio ja konsentraatiosta saatiin tuotteen saanto.

$$c = \frac{A_{260}}{\epsilon l} = \frac{1,032 \text{ ABS}}{10\,000 \cdot 0,5 \text{ mm}} \cdot 100 = 0,2064 \text{ M}$$

Tuote **7** karakterisoitiin ^1H NMR- ja ^{13}C NMR -spektroskopisesti (Liite 7 ja 8). 2D ^1H NMR COSY -spektriä käytettiin apuna (Liite9). $R_f = 0,25$ (5 % metanoli, dikloorimetaani)

^1H NMR δ_{H} (600 MHz, DMSO): 7,75 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H6), 6,00 (1H, d, $J = 6,2$ Hz, H1'), 5,82 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H5), 4,70 (5H, s, DMSO), 4,32 (1H, dd, $J = 6,0$ Hz ja 4,9 Hz, H3'), 4,02 (1H, dd, $J = 7,80$ Hz ja 4,4 Hz, H4'), 3,77 (2H, m, H2' ja H5'a), 3,69 (1H, m, H5'b)

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO): 30,2 (asetoni, CH_3), 61,1 (C5'), 61,2 (C2'), 64,4 (NO-Me), 69,2 (C3'), 85,7 (C1'), 87,0 (C4'), 102,7 (C5), 142,2 (C6), 151,7 (C2), 166,3 (C4), 215,4 (acetone, CH).

4.2.5 3'-(dihydro-2,5-furaanidioni)-2'-deoksi-2'-(N-metoksiamiini)uridiini (8)

Nukleosidianalogi **6** (142 mg, 0,24 mmol) liuotettiin kuivaan pyridiiniin (1 ml) keittopullossa. Joukkoon lisättiin meripihkahappoanhydridiä (27 mg, 0,27 mmol) ja liuos jätettiin reagoimaan yön yli. Seuraavan päivänä ajettiin TLC, jonka perusteella päätettiin lisätä yksi kide DMAP:a katalyytiksi ja vielä hieman meripihkahappoanhydridiä (5,7 mg, 0,06 mmol). Liuos jätettiin reagoimaan yön yli. Pyridiini haihdutettiin pois alipaineessa ja haihdutusjäännöksestä haihdutettiin vielä tolueenia. Puolella tuotteesta testattiin, että liittäminen kantajaan toimii. Testaus suoritettiin samoin kuin seuraavaksi on kuvailtu. Toinen puolikas puhdistettiin silikageelikromatografisesti (gradientti 2-10% metanoli, dikloorimetaani). Tuotefraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuotetta saatiin eristettyä 37,4 mg. Tuotteesta **8** ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: *m/z* 698,2321 [M+Na]⁺ (havaittu), 714,2055 [M+K]⁺ (havaittu). *m/z* 714,2056 [M+K]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 0,14 ppm.

4.2.6 Liittäminen kantajaan

LCAA-CPG-kantaja (151 mg) käsiteltiin 10 % TEA/metanoli-liuoksella ja kuivattiin eksikaattorissa fosforipentoksidin päällä. Joukkoon lisättiin nukleosidianalogi **8** (20,6 mg, 30,5 µmol), joka oli liuotettu DMF:iin (200 µl). Suspensioon lisättiin DMF:ää, kunnes kantaja peittyi täysin liuottimella. Suspensioon lisättiin PyBOP:ia (17,5 mg, 33,6 µmol) ja DIEA:ta (10,6 µl, 61,0 µmol) ja reaktion annettiin edetä yön yli. Reaktiosuspensio pestiin DMF:llä ja DCM:llä. Reagoimattomat hydroksiryhmät ja aminoryhmät asetyloitiin Cap A ja Cap B liuosten 1:1 sekoituksella (etikahappoanhydridi: lutidine:1-metyyli-imidatsoli:THF, 5:5:8:82, v:v:v:v). Kantaja **9** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa.

4.2.7 Trityylianalyysi

Kantajaa **9** punnittiin 5,6 mg mikrosentrifuugiputkeen ja siihen lisättiin 3 % trikloorietikkahappo/dikloorimetaani -liuosta. Liuos siirrettiin 10 ml mittapulloon ja

mikrosentrifuugiputki huuhdeltiin 3 % trikloorietikkahappo/dikloorimetaani -liuoksella. Mittapullo täytettiin merkkiin asti kyseisellä liuoksella. Mittapullostä otettiin näyte kyvetiin ja näytteen absorbanssi mitattiin UV-spektrofotometrillä. Näytteen absorbanssiksi mitattiin $A_{504} = 0,923$. Trityylin moolimäärä per gramma kantajaa laskettiin alla olevan kaavan mukaan $Loading = 21,7 \mu\text{mol/g}$.

$$Loading = \frac{A_{504} \cdot V}{76} \cdot \frac{1000}{m} = \frac{0,923 \cdot 10 \text{ ml}}{76} \cdot \frac{1000}{5,6 \text{ mg}} = 21,7 \mu\text{mol/g}$$

4.2.8 Nukleosidin irrotus kantajasta

Tuotetta **9** punnittiin pieneen lasiseen näyteputkeen 5,3 mg ja putki täytettiin 25% ammoniumhydroksidiliuoksella. Putki suljettiin ja laitettiin laboratoriuuniin 55°C lämpötilaan tunnin ajaksi. Tunnin kuluttua ajettiin HPLC-MS, josta havaittiin massa m/z 274,1 $[M+H]^+$ (**7**).

4.3 5'-O-(oksoetyyli)tymidiinin synteesi

4.3.1 3'-O-TBDMS-tymidiini (**11**)

5'-O-DMTr-tymidiini (**10**) (8,75 g, 16,1 mmol) liuotettiin kuivaan dimetyyliformamidiin (50 ml). TBDMSCl (2,90 g, 19,32 mmol) ja TEA (1,38 ml, 19,32 mmol) ja yksi kide DMAP:ia lisättiin liuokseen. Reaktio annettiin edetä yön yli. Kun TLC:llä havaittiin, että reaktio ei ollut kulunut loppuun, lisättiin vielä TBDMSCl (0,73 g, 4,83 mmol) ja TEA (0,48 g, 7,25 mmol). 2 h kuluttua TLC:n perusteella lisättiin TBDMSCl (0,73 g, 4,83 mmol) ja TEA (0,48 g, 7,25 mmol), minkä jälkeen lisättiin vielä 0,1 ekv. TBDMSCl (0,24 g, 1,61 mmol) ja 0,2 ekv. TEA (0,33 g, 3,22 mmol). Reaktio annettiin edetä yön yli. Liuos konsentroidiin ja siirrettiin erotussuppiloon. Konsentroiduun liuokseen lisättiin vettä (500 ml). Vesifaasia uutettiin 3x70 ml etyyliasetaatilla. Uutokset yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksestä haihdutettiin toluenia DMF jäänteiden poistamiseksi.

5'DMTr-3'-TBDMS-tymidiini (**11**) liuotettiin 3% dikloorietikkahappo/DCM liuokseen (150ml). Joukkoon lisättiin anisoli:MeOH (1:1) liuosta trityylin sitomiseksi. 6 h kuluttua liuos konsentroidiin ja siirrettiin erotussuppiloon. Konsentroiduun liuokseen lisättiin

etyyliasettaattia (150 ml) ja sitä pestiin kylläisillä NaHCO₃:n (4 × 50 ml) ja NaCl:n (1 × 50 ml) vesiliuoksilla. Orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (gradientti 2%-10 % metanoli/dikloorimetaani). Tuote (**12**) kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **3** (2,93 g, 52 %) oli valkoinen, vaahtomainen jauhe. Tuote **12** karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektroskopisesti (Liitteet 9 ja 10) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: *m/z* 357,1718 [M+H]⁺, 379,1644 [M+Na]⁺, 395,1380 [M+K]⁺. *m/z* 379,1660 [M+Na]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 4,22 ppm. R_f = 0,48 (6 % metanoli, dikloorimetaani)

¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 7,38 (1H, s, H₆), 6,15 (1H, d, *J* = 6,8 Hz, H₁'), 4,52 (1H, m, H₄'), 3,95 (1H, q, *J* = 2,84 Hz, H₃'), 3,93 (1H, q, *J* = 2,93 Hz, H₅' a), 3,78 (1H, m, H₅' b), 2,38 (1H, m, H₂' a), 2,24 (1H, m, H₂' b), 1,93 (3H, d, *J* = 1,10 Hz, C5-Me), 0,91 (9H, s, Si-tBu), 0,11 (6H, s, Si-Me₂)

¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃): 163,5 (C₄), 150,3 (C₂), 137,0 (C₆), 111,0 (C₅), 87,1 (C₄'), 71,6 (C₃'), 62,1 (C₅'), 40,5 (C₂'), 25,7 (Si-tBU), 12,5 (C₅-CH₃), -4,7 (Si-Me₂)

4.3.2 *N*³-*para*-metoksibetsyyli-3'-TBDMS-tymidiini (**13**)

3'-TBDMS-tymidiini (**12**) (2,93 g, 8,22 mmol) liuotettiin kuivaan dimetyyliformamidiin (60 ml). 60 % natriumhydridia (350 mg, 9,04 mmol) lisättiin liuokseen ja tymidiinin emäksen *N*³ typhen annettiin deprotonoitua 30 minuuttia. Joukkoon lisättiin *para*-metoksibetsyylikloridi (1,26 mg, 8,22 mmol). Reaktioon annettiin edetä yön yli. Kun TLC:llä havaittiin, että reaktio oli kulunut loppuun, liuos siirrettiin erotussuppiloon ja lisättiin 10% NH₄Cl (500 ml) vesiliuosta. Vesifaasia uutettiin etyyliasetaatilla (3 × 150 ml) ja orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaCl:n (2 × 70 ml) vesiliuoksella. Uutokset yhdistettiin ja orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla. Orgaaninen faasi suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (30 % etyyliasetatti/heksaani). Tuote **13** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **13** (2,80 g, 52 %) oli väritön öljy. Tuote **13** karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektroskopisesti (Liitteet 11 ja 12) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: m/z 477,2417 [M+H]⁺, 499,2220 [M+Na]⁺, 515,1971 [M+K]⁺. m/z 499,2230 [M+Na]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 2,00 ppm. R_f = 0,67 (6 % metanoli, dikloorimetaani)

¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 7,49 (1H, s, PMB), 7,47 (1H, s, PMB), 7,31 (1H, d, J = 1,1 Hz, H6), 6,85 (1H, s, PMB), 6,83 (1H, s, PMB), 6,17 (1H, t, J = 6,82 Hz, H1'), 5,07 (2H, m, PMB), 4,51 (1H, m, H4'), 3,94 (1H, m, H3'), 3,92 (1H, m, H5'a), 3,80 (3H, s, O-Me), 3,77 (1H, m, H5'b), 2,36 (1H, m, H2'a), 2,22 (1H, m, H2'b), 1,95 (3H, d, J = 1,07 Hz, C5-Me), 0,92 (9H, s, Si-tBu), 0,11 (6H, s, Si-Me₂)

¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃): 163,3 (C4), 151,0 (C2), 134,9 (C6), 130,9 (PMB), 130,8 (PMB), 129,1 (PMB), 113,7 (PMB), 87,8 (C1'), 87,5 (C4'), 71,7 (C3'), 62,2 (C5'), 43,9 (PMB) 40,5 (C2'), 25,7 (Si-tBU), 13,3 (C5-CH₃), -4,8 (Si-Me₂)

4.3.3 *N*³-*para*-metoksibetsyyli-5'-(1-propeeni)-3'-TBDMS-tymidiini (14)

Nukleosidianalogi (**13**) (2,74 g, 5,75 mmol) liuotettiin kuivaan tetrahydrofuraaniin (25 ml). Allyylimetyylikarbonaatti (1,34 g, 11,5 mmol), Pd(OAc)₂ (25,8 mg, 115 μ mol) ja Ph₃P (151 mg, 575 μ mol) lisättiin liuokseen ja refluksoitettiin 30 minuuttia. Liuos haihdutettiin kuiviin ja haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (30 % etyyliasetaatti/heksaani). Tuote **14** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **5** (2,68 g, 90 %) oli kellertävä öljy. Tuote **14** karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektroskopisesti (Liitteet 13 ja 14) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: m/z 517,2599 [M+H]⁺, 539,2554 [M+Na]⁺, 555,2288 [M+K]⁺. m/z 539,2548 [M+Na]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 1,11 ppm. R_f = 0,88 (3 % metanoli, dikloorimetaani)

¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃): 7,62 (1H, s, H6), 7,48 (1H, s, PMB), 7,46 (1H, s, PMB), 6,85 (1H, s, PMB), 6,83 (1H, s, PMB), 6,40 (1H, t, J = 6,5 Hz, H1'), 5,93 (1H, m, Allyl), 5,31 (1H, d, J = 17,2 Hz, Allyl), 5,24 (1H, d, J = 10,4 Hz, Allyl), 5,09 (1H, s, PMB), 5,06 (1H, s, PMB), 4,46 (1H, m, H4'), 4,07 (2H, m, Allyl), 3,99 (1H, q, J = 2,7 Hz, H3'), 3,80 (3H, s, O-Me), 3,73 (1H, dd, J = 2,5 Hz ja 10,3 Hz, H5'a), 3,60 (1H, dd, J = 2,4 Hz ja

10,7 Hz, H5' b), 2,27 (1H, m, H2' a), 2,12 (1H, m, H2' b), 1,93 (3H, s, C5-Me), 0,91 (9H, s, Si-tBu), 0,09 (6H, d, $J = 2,0$ Hz, Si-Me₂)

¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃): 163,5 (C4), 159,0 (PMB) 151,0 (C2), 134,0 (C6), 133,9 (Allyl) 130,8 (PMB), 129,4 (PMB), 117,5 (Allyl), 113,7 (PMB), 110,0 (C5), 86,4 (C1'), 85,6 (C3'), 72,4 (Allyl), 72,0 (C4'), 68,5 (C5'), 55,3 (O-Me), 43,9 (PMB) 41,4 (C2'), 25,7 (Si-tBU), 13,3 (C5-CH₃), -4,8 (Si-Me₂)

4.3.4 *N*³-*para*-metoksibetsyyli-5'-[1,2-(OAc)₂-propeeni]-3'-TBDMS-tymidiini (16)

Nukleosidianalogi **14** (1,62 g, 3,14 mmol) liuotettiin vesi-asetoni liuokseen (1:8, 6,2 ml vesi, 52 ml asetoni). Liuokseen lisättiin *N*-metyylimorfoliini-*N*-oksidi (735 mg, 6,28 mmol) ja sitten *tert*-butanoliin liuotettu OsO₄ (1,6 ml, 2,5 m-%), 0,12 mmol). Reaktio annettiin edetä 24 h. Reaktio pysäytettiin lisäämällä Na₂S₂O₃ (25 ml, 0,2 M, aq.) liuosta. Liuos siirrettiin erotussuppiloon ja uutettiin dikloorimetaanilla (2 × 50 ml) ja orgaanista faasia pestiin Na₂S₂O₃ (3 × 25 ml) 0,2 M vesiliuoksella. Uutokset yhdistettiin ja orgaaninen faasi kuivattiin NaSO₄:lla. Orgaaninen faasi suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tuote **15** oli kellertävä tahmea öljy.

Tuote **15** liuotettiin pyridiiniin (25 ml). Etikkahappoanhydridi (661 mg, 615 μl) ja yksi DMAP kide lisättiin liuokseen. Reaktio annettiin edetä yön yli. Liuos konsentroitiin ja siirrettiin erotussuppiloon, jonne lisättiin etyyliasetaatia (70 ml). Faasia pestiin kylläisillä NaHCO₃:n (3 × 25 ml) ja NaCl:n (1 × 25 ml) vesiliuoksilla. Orgaaninen faasi kuivattiin NaSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Jäännöksestä haihdutettiin tolueenia pyridiinijäänteiden poistamiseksi. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (4 % metanoli/dikloorimetaani). Tuote **16** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **16** (1,69 g, 84 %) oli väritön öljy. Tuote **16** karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR -spektroskopisesti (Liitteet 15 ja 16) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: m/z 635,2709 [M+H]⁺, 657,2794 [M+Na]⁺, 673,2589 [M+K]⁺. m/z 657,2814 [M+Na]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 3,04 ppm. R_f = 0,82 (6 % metanoli, dikloorimetaani)

^1H NMR δ_{H} (600 MHz, CDCl_3): 7,47 (1H, s, PMB), 7,46 (1H, s, PMB), 7,39 (1H, dd, $J = 1,2$ Hz ja 12,4 Hz, H6), 6,84 (1H, s, PMB), 6,83 (1H, s, PMB), 6,37 (1H, m, H1'), 5,26 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 5,10-5,03 (2H, m, PMB), 4,38 (1H, m, H4'), 4,34 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 4,15 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 3,96 (1H, m, H3'), 3,80 (3H, s, O-Me), 3,76-3,55 (4H, m, H5' ab ja 5'-propane-1,2-diyl), 2,25 (1H, m, H2'a), 2,08 (6H, s, AcO(2xMe)), 2,03 (1H, m, H2'a), 1,96 (3H, q, $J=1,2$ Hz, C5-Me), 0,90 (9H, d, $J=3,0$ Hz, Si-tBu), 0,09 (6H, m, $J=2,0$ Hz, Si-Me₂).

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 170,5 (AcO), 163,4 (C4), 159,0 (PMB) 151,0 (C2), 133,5 (C6), 130,9 (PMB), 130,8 (PMB), 129,6 (PMB), 113,8 (PMB), 113,7 (PMB), 110,3 (C5), 86,0 (C1'), 85,5 (C3'), 72,0 (C4'), 70,9 (C5'), 69,7 (CC-OAc), 62,6 (C-OAc), 55,2 (O-Me), 43,9 (PMB) 41,1 (C2'), 25,7 (Si-tBU), 20,7 (AcO), 13,4 (C5-CH₃), -4,7 (Si-Me₂).

4.3.5 *N*³-*para*-metoksibetsyyli-5'-[1,2-(OAc)₂-propeenil]-tymidiini (17)

Nukleosidianalogi (**16**) (1,49 g, 2,85 mmol) liuotettiin MeCN/H₂O/Treat-HF (v:v:v, 80:20:3) liuokseen (80 ml), joka oli säädetty trietyyliamiinilla pH:seen 7. Reaktioon annettiin edetä yön yli. Liuokseen lisättiin Treat-HF (1,38 g, 8,55 mmol). Lisäys toistettiin 6 h kuluttua. Liuokseen lisättiin vielä Treat-HF:a (0,46 g, 2,85 mmol) ja reaktioon annettiin edetä yön yli. Liuos siirrettiin erotussuppiloon ja lisättiin etyyliasetaattia (90 ml). Orgaanista faasia pestiin kylläisillä NaHCO₃:n (3 × 30 ml) ja NaCl:n (1 × 30 ml) vesiliuoksilla. Orgaaninen faasi kuivattiin NaSO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (gradientti 2-4 % metanoli/dikloorimetaani). Tuote **17** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **17** (1,02 g, 82 %) oli väritön öljy. Tuote **17** karakterisoitiin ^1H NMR- ja ^{13}C NMR -spektroskopisesti (Liitteet 17 ja 18) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: m/z 521,2143 [M+H]⁺, 543,1983 [M+Na]⁺, 559,1867 [M+K]⁺. m/z 521,2130 [M+H]⁺ (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 2,49 ppm. $R_f = 0,48$ (6 % metanoli, dikloorimetaani)

^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3): 7,47 (1H, s, PMB), 7,45 (1H, s, PMB), 7,40 (1H, dd, $J = 1,0$ Hz ja $4,0$ Hz, H6), 6,84 (1H, s, PMB), 6,82 (1H, s, PMB), 6,36 (1H, m, H1'), 5,27 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 5,06 (2H, d, $J=2,08$ Hz, PMB), 4,45 (1H, m, H4'), 4,33 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 4,19 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 4,00 (1H, m, H3'), 3,79 (3H, s, O-Me), 3,77-3,56 (4H, m, H5' ab ja 5'-propane-1,2-diyl), 2,35 (1H, m, H2'a), 2,15 (1H, m, H2'a), 2,09 (6H, t, $J=2,1$ Hz, AcO(2xMe)), 1,96 (3H, s, C5-Me),

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 170,7 (AcO), 163,4 (C4), 159,1 (PMB) 150,9 (C2), 133,5 (C6), 130,9 (PMB), 130,8 (PMB), 129,2 (PMB), 113,7 (PMB), 110,2 (C5), 85,3 (C1'), 84,9 (C3'), 71,2 (C4'), 70,7 (C5'), 69,7 (CC-OAc), 62,6 (C-OAc), 55,2 (O-Me) 43,9 (PMB), 40,5 (C2'), 21,0 (AcO), 13,4 (C5-CH₃)

4.3.6 5'-[1,2-(OAc)₂-propeeni]-tymidiini (18)

- a) Nukleosidianalogi (**17**) (94 mg, 180 μmol) liuotettiin anisoliin (2 ml). Alumiinikloridi (AlCl_3) (238 mg, 1,80 mmol) lisättiin liuokseen liuotettuna anisoliin (2 ml) ja reaktion annettiin edetä yön yli huoneenlämmössä. Reaktio pysäytettiin lisäämällä metanolia (2 ml). Liuos konsentroidiin ja anisoli-haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (6 % metanoli/dikloorimetaani). Tuote **18** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **18** (11 mg, 15 %) oli väritön, tahmea, kiteinen, kiinteä.
- b) Nukleosidianalogi (**17**) (130 mg, 249 μmol) liuotettiin anisoliin (3 ml) typpi-ilmakehässä. Alumiinikloridi (AlCl_3) (67 mg, 498 μmol) lisättiin liuokseen liuotettuna anisoliin (0,5 ml). Reaktioastia jäähdytettiin jäällä (0°C, typpi-ilmakehä) ja alumiinikloridin lisäys tapahtui 0°C lämpötilassa. 2h kuluttua AlCl_3 (133 mg, 996 μmol) lisättiin liuokseen liuotettuna anisoliin (1 ml). Reaktio astia jäähdytettiin jäällä (0°C, typpi-ilmakehä) ja alumiinikloridin lisäys tapahtui 0°C lämpötilassa. 2 h kuluttua toistettiin edellinen AlCl_3 (133 mg, 996 μmol) lisäys ja reaktion annettiin edetä yön yli huoneenlämmössä. Reaktioastiaa jäähdytettiin jäällä ja reaktio pysäytettiin lisäämällä kuivaa metanolia (2 ml, 0°C). Liuos konsentroidiin ja anisoli-haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (6 % metanoli/dikloorimetaani). Tuote puhdistettiin uudestaan silikageelikromatografisesti

(6 % metanoli/dikloorimetaani). Minkä jälkeen Tuote **18** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **18** (27 mg, 27 %) oli väritön, tahmea, kiteinen, kiinteä.

c) Nukleosidianalogi (**17**) (117 mg, 224 μmol) liuotettiin anisoliin (2 ml) typpi-ilmakehässä. Alumiinikloridi (AlCl_3) (60 mg, 448 μmol) lisättiin liuokseen liuotettuna anisoliin (0,5 ml). Reaktioastia jäähdytettiin jäällä (0°C , typpi-ilmakehä) ja alumiinikloridin lisäys tapahtui 0°C lämpötilassa. Jää hauteen annettiin sulaa ja reaktion annettiin edetä yön yli huoneenlämmössä. AlCl_3 (133 mg, 896 μmol) lisättiin liuokseen liuotettuna anisoliin (1 ml). Reaktio astia jäähdytettiin jäällä (0°C , typpi-ilmakehä) ja alumiinikloridin lisäys tapahtui 0°C lämpötilassa. Jää hauteen annettiin sulaa ja reaktion annettiin edetä yön yli huoneenlämmössä. Reaktioastiaa jäähdytettiin jäällä ja reaktio pysäytettiin lisäämällä kuivaa metanolia (3 ml, 0°C). Liuos konsentroidtiin ja anisoli-haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (6 % metanoli/dikloorimetaani). Tuote puhdistettiin uudestaan silikageelikromatografisesti (6 % metanoli/dikloorimetaani), minkä jälkeen Tuote **18** kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa. Tuote **18** (8,6 mg, 9,6 %) oli väritön, tahmea, kiteinen, kiinteä

Tuote **18** karakterisoitiin ^1H NMR- ja ^{13}C NMR -spektroskopisesti (Liitteet 19 ja 20) ja siitä ajettiin massaspektri.

ESI⁺-MS: m/z 423,1350. 423,1375 m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$] (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 5,79 ppm. $R_f=0,38$ (6 % metanoli, dikloorimetaani).

^1H NMR δ_{H} (600 MHz, CDCl_3): 8,69 (1H, NH), 7,41 (1H, dd, $J=1,0$ Hz ja 11,9 Hz, H6), 6,08 (1H, t, $J=7,0$ Hz, H1'), 5,20 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 4,34 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 4,24 (1H, d, $J=3,1$ Hz, H4'), 4,18 (1H, m, 5'-propane-1,2-diyl), 4,08 (1H, dd, $J=2,9$ Hz ja 12,1 Hz, H3'), 3,73-3,50 (4H, m, H5' ab ja 5'-propane-1,2-diyl), 2,36 (2H, m, H2' ab), 2,12 (3H, d, $J=3,2$ Hz, AcO) 2,10 (3H, s, AcO), 1,93 (3H, s, C5-Me),

^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3): 170,8 (AcO), 170,5 (AcO), 163,6 (C4), 150,3 (C2), 137,0 (C6), 128,5 (PMB trace), 113,9 (PMB trace), 110,4 (C5), 87,3 (C1'), 85,0 (C4'), 79,8 (C3'), 70,0 (C5'), 69,9 (CC-OAc), 62,6 (C-OAc), 40,8 (C2'), 21,0 (AcO), 20,8 (AcO), 12,5 (C5-CH₃)

4.3.7 5'-O-(oksoetyyli)tymidiini

Nukleosidianalogi (**18**) (11,4 mg, 28 μmol) liuotettiin pieneen määrään asetonitriiliä ja joukkoon lisättiin noin 4 ml ammoniumhydroksidia. Liuos siirrettiin lämpökaappiin (55°C) kolmeksi tunniksi, jonka jälkeen se haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös (**19**) liuotettiin pieneen määrään vettä ja natriumperjodaatti (NaIO_4) (1,0 ekv., 6,1 mg) lisättiin liuokseen. 1,5 h kuluttua liuos suodatettiin ja vesi haihdutettiin kylmäkuivauksessa. Raakatuote liuotettiin veteen ja puhdistettiin HPLC:llä. Tuote **20** (6,04 mg, 75,7 %) oli valkoinen jauhe. Tuote **20** karakterisoitiin massaspektrometrisesti.

ESI⁺-MS: m/z 307,0898 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 323,0648 $[\text{M}+\text{K}]^+$. m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 307,090 (laskettu). Ero lasketulla ja havaitulla 0,85 ppm.

Lähdeluettelo

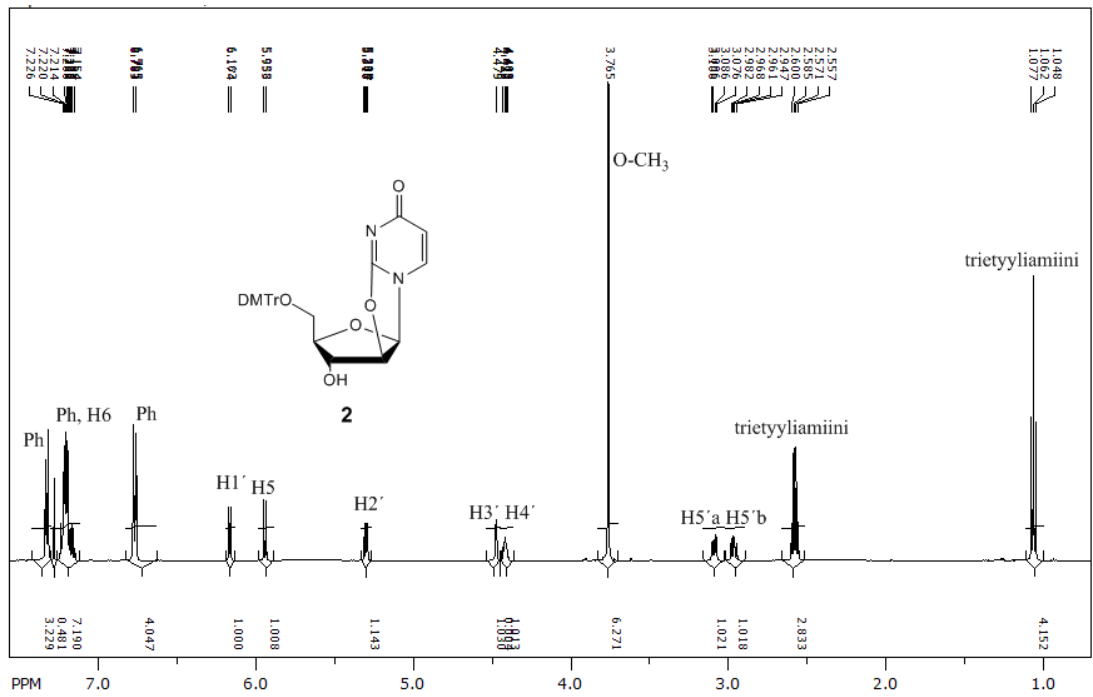
1. Winkler, J. *Therapeutic Delivery*. **2013**, *4*, 791-809.
2. Bargh, J. D.; Isidro-Llobet A; Parker JS, and Spring DR. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 4361-4374.
3. Chari, R. V. J.; Miller ML, and Widdison WC. *Angewandte Chemie International Edition*. **2014**, *53*, 3796-3827.
4. Dovgan, I.; Koniev O; Kolodych S, and Wagner A. *Bioconjugate Chemistry*. **2019**, *30*, 2483-2501.
5. Shim, H. *Biomolecules*. **2020**, *10*, 360.
6. Kölmel, D. K. & Kool ET. *Chemical Reviews*. **2017**, *117*, 10358-10376.
7. Forget, D.; Boturyn D; Defrancq E; Lhomme J, and Dumy P. *Chemistry – A European Journal*. **2001**, *7*, 3976-3984.
8. Singh, Y.; Edupuganti OP; Villien M; Defrancq É, and Dumy P. *Comptes Rendus Chimie*. **2005**, *8*, 789-796.
9. Yarian, F.; Alibakhshi A; Eyvazi S; Arezumand R, and Ahangarzadeh S. *Journal of Cellular Physiology*. **2019**, *234*, 16724-16738.
10. Milligan, J. F.; Matteucci MD, and Martin JC. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1923-1937.
11. Reynolds, P. N.; Zinn KR; Gavriilyuk VD; Balyasnikova IV; Rogers BE; Buchsbaum DJ; Wang MH; Miletich DJ; Grizzle WE; Douglas JT; Danilov SM, and Curiel DT. *Molecular Therapy*. **2000**, *2*, 562-578.
12. Tung, C. & Stein S. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 605-618.
13. Benizri, S.; Gissot A; Martin A; Vialet B; Grinstaff MW, and Barthélémy P. *Bioconjugate Chemistry*. **2019**, *30*, 366-383.
14. Asami, Y.; Yoshioka K; Nishina K; Nagata T, and Yokota T. *Drug Discoveries & Therapeutics*. **2016**, *10*, 256-262.
15. Kruspe, S. & Giangrande PH. *Biomedicines*. **2017**, *5*, 45.
16. Soukchareun, S.; Tregear GW, and Haralambidis J. *Bioconjugate Chemistry*. **1995**, *6*, 43-53.
17. P. J. Klasse. *Advances in Biology*. **2014**, *2014*, 1-24.

18. Ryman, J. T. & Meibohm B. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. **2017**, *6*, 576-588.
19. Heine, M.; Freund B; Nielsen P; Jung C; Reimer R; Hohenberg H; Zangemeister-Wittke U; Wester H; Lüers GH, and Schumacher U. *PloS One*. **2012**, *7*, e36258.
20. Agten, S. M.; Suylen DPL, and Hackeng TM. *Bioconjugate Chem*. **2016**, *27*, 42-46.
21. Dirksen, A.; Hackeng TM, and Dawson PE. *Angewandte Chemie International Edition*. **2006**, *45*, 7581-7584.
22. Ulrich, S.; Boturyn D; Marra A; Renaudet O, and Dumy P. *Chemistry – A European Journal*. **2014**, *20*, 34-41.
23. Wang, S.; Nawale GN; Kadekar S; Oommen OP; Jena NK; Chakraborty S; Hilborn J, and Varghese OP. *Scientific Reports*. **2018**, *8*, 2193-7.
24. Wolfenden, R. & Jencks WP. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2763-2768.
25. Crisalli, P. & Kool ET. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1646-1649.
26. Kool, E. T.; Park D, and Crisalli P. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17663-17666.
27. Damien Forget; Olivier Renaudet; Didier Boturyn; Eric Defrancq, and Pascal Dumy. **2001**
28. Murat, P.; Spinelli N; Dumy P, and Defrancq E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2009**, *19*, 6534-6537.
29. King, T. P.; Zhao SW, and Lam T. *Biochemistry*. **1986**, *25*, 5774-5779.
30. Kalia, J. & Raines RT. *Angewandte Chemie International Edition*. **2008**, *47*, 7523-7526.
31. Spicer, C. D.; Pashuck ET, and Stevens MM. *Chemical Reviews*. **2018**, *118*, 7702-7743.
32. Kool, E. T.; Crisalli P, and Chan KM. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1454-1457.
33. Ollivier, N.; Olivier C; Gouyette C; Huynh-Dinh T; Gras-Masse H, and Melnyk O. *Tetrahedron Letters*. **2002**, *43*, 997-999.
34. Kozlov, I. A.; Melnyk PC; Stromborg KE; Chee MS; Barker DL, and Zhao C. *Biopolymers*. **2004**, *73*, 621-630.
35. Peri, F.; Dumy P, and Mutter M. *Tetrahedron*. **1998**, *54*, 12269-12278.
36. Baudendistel, O. R.; Wieland DE; Schmidt MS, and Wittmann V. *Chemistry – A European Journal*. **2016**, *22*, 17359-17365.

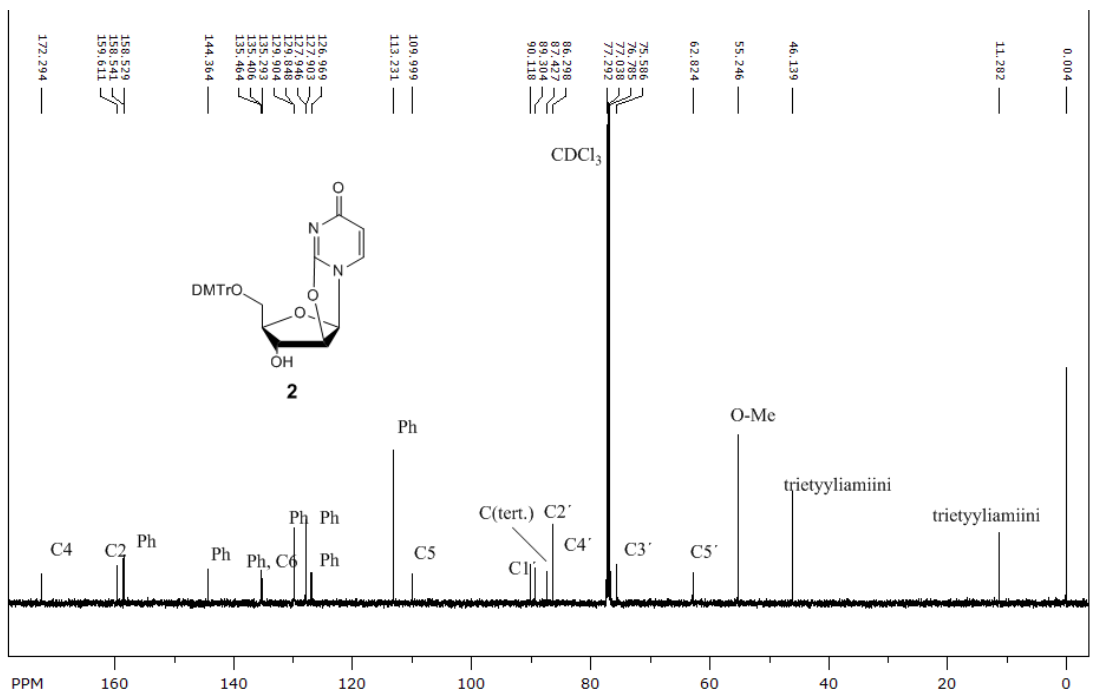
37. Jiménez-Castells, C.; Torre BG; Andreu D, and Gutiérrez-Gallego R. *Glycoconjugate Journal*. **2008**, *25*, 879-887.
38. Munneke, S.; Hill JC; Timmer MSM, and Stocker BL. *European Journal of Organic Chemistry*. **2017**, *2017*, 3722-3728.
39. Loskot, S. A.; Zhang J, and Langenhan JM. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12189-12193.
40. Thygesen, M. B.; Munch H; Sauer J; Cló E; Jørgensen MR; Hindsgaul O, and Jensen KJ. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1752-1755.
41. Larsen, D.; Pittelkow M; Karmakar S, and Kool ET. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 274-277.
42. Rashidian, M.; Mahmoodi MM; Shah R; Dozier JK; Wagner CR, and Distefano MD. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 333-342.
43. Ishida, J.; Hinou H; Naruchi K, and Nishimura S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*. **2014**, *24*, 1197-1200.
44. David H. Live; R. Ajay Kumar; Xenia Beebe, and Samuel J. Danishefsky. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1996**, *93*, 12759-12761.
45. Carrasco, M. R.; Nguyen MJ; Burnell DR; MacLaren MD, and Hengel SM. *Tetrahedron Letters*. **2002**, *43*, 5727-5729.
46. Lee, M. & Shin I. *Organic Letters*. **2005**, *7*, 4269-4272.
47. Zhou, X. & Zhou J. *Biosensors and Bioelectronics*. **2006**, *21*, 1451-1458.
48. Lohse, A.; Martins R; Jørgensen MR, and Hindsgaul O. *Angewandte Chemie International Editio*. **2006**, *45*, 4167-4172.
49. Nishimura, S.; Niikura K; Kuroguchi M; Matsushita T; Fumoto M; Hinou H; Kamitani R; Nakagawa H; Deguchi K; Miura N; Monde K, and Kondo H. *Angewandte Chemie International Edition*. **2004**, *44*, 91-96.
50. Ramsay, S. L.; Freeman C; Grace PB; Redmond JW, and MacLeod JK. *Carbohydrate Research*. **2001**, *333*, 59-71.
51. Langenhan, J. M.; Endo MM; Engle JM; Fukumoto LL; Rogalsky DR; Slevin LK; Fay LR; Lucker RW; Rohlfing JR; Smith KR; Tjaden AE, and Werner HM. *Carbohydrate Research*. **2011**, *346*, 2663-2676.
52. Joseph M. Langenhan; Noël R. Peters; Ilia A. Guzei; F. Michael Hoffmann; Jon S. Thorson, and Kyriacos C. Nicolaou. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ.* **2005**, *102*, 12305-12310.

53. Griffith, B. R.; Krepel C; Fu X; Blanchard S; Ahmed A; Edmiston CE, and Thorson JS. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8150-8155.
54. Österlund, T.; Korhonen H, and Virta P. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1496-1499.
55. Bergmann, E. D. *Chem. Re.* **1953**, *53*, 309-352.
56. Fife, T. H. & Hutchins JEC. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2099-2104.
57. Ogawa, A.; Tanaka M; Sasaki T, and Matsuda A. *Journal of Medicinal Chemistry.* **1998**, *41*, 5094-5107.
58. Niittymäki, T.; Virta P; Ketomäki K, and Lönnberg H. *Bioconjugate Chemistry.* **2007**, *18*, 1583-1592.
59. Torii, T.; Izawa K; Cho DH, and Jang DO. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acid.* **2007**, *26*, 985-988.

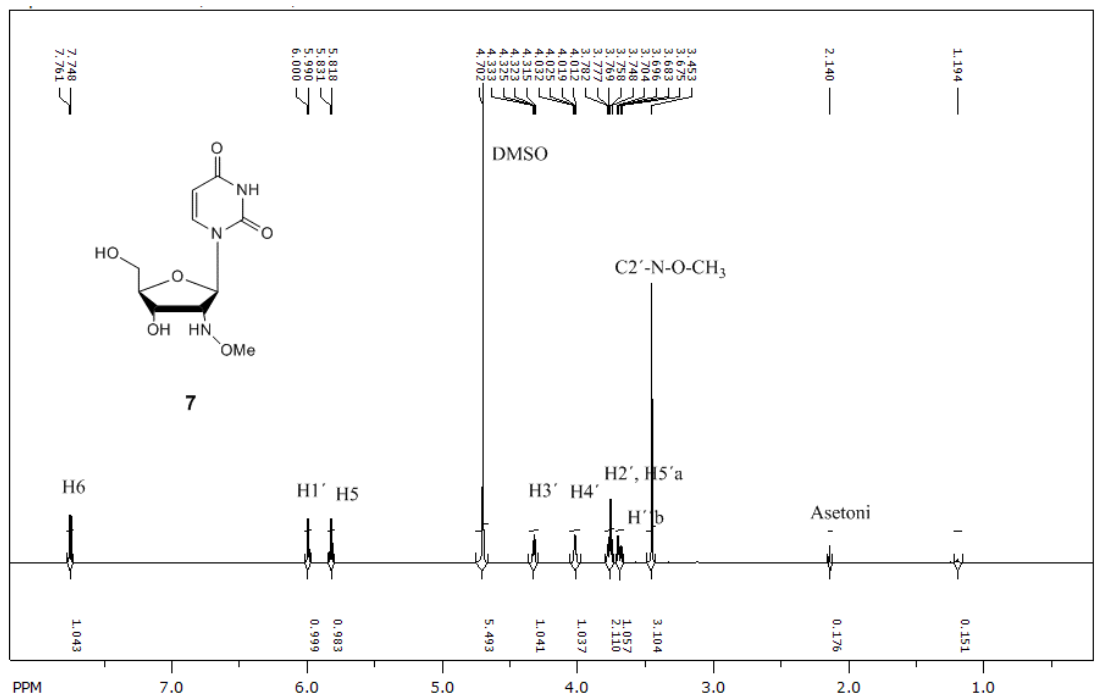
Liite 1



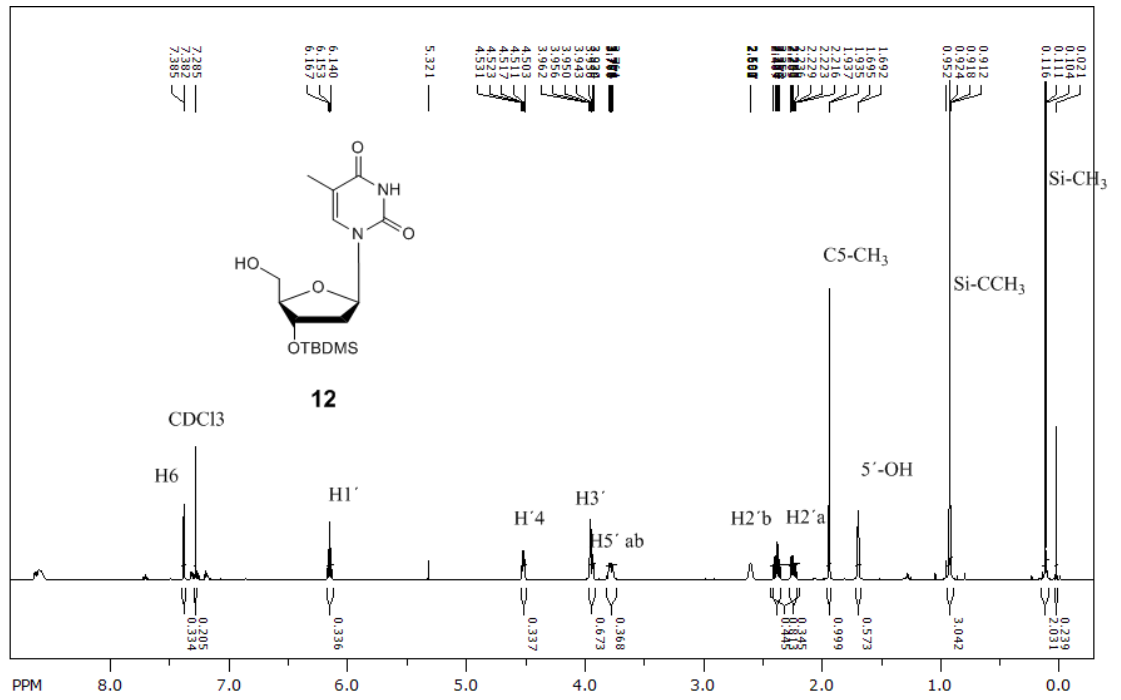
Liite 2



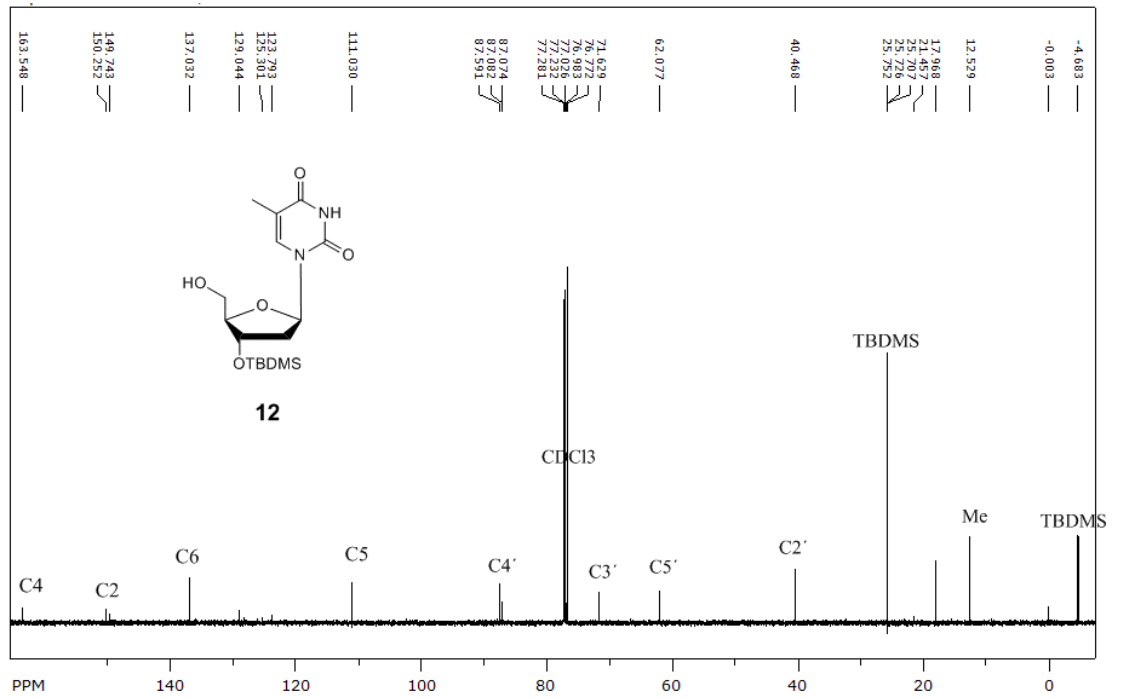
Liite 7



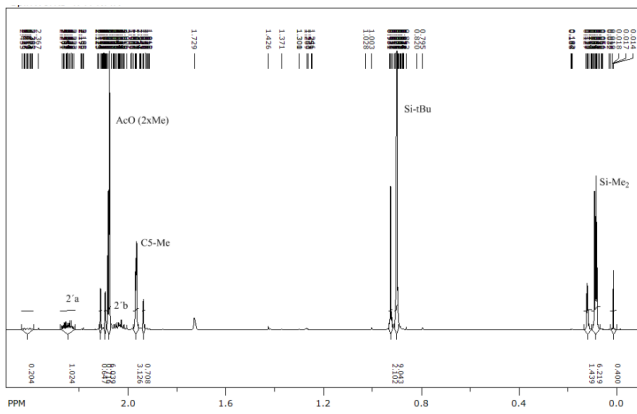
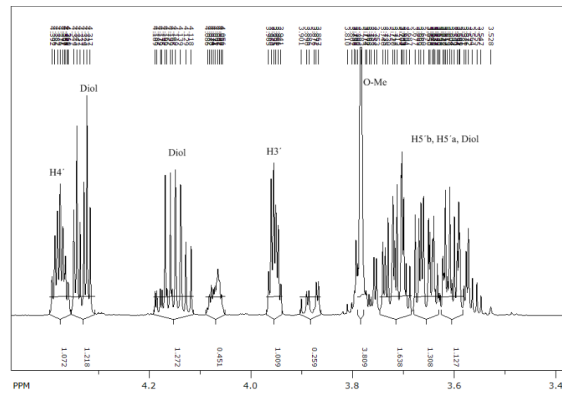
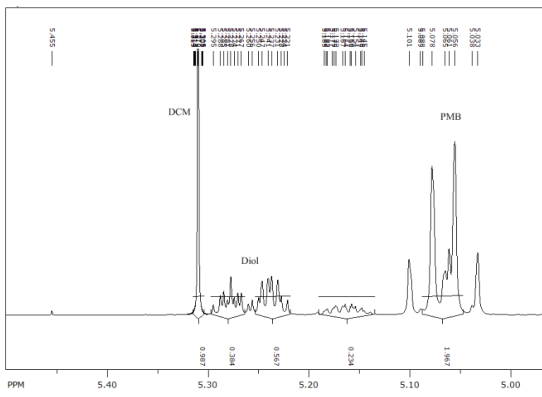
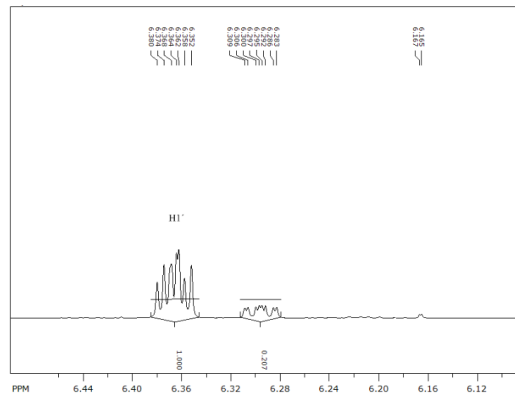
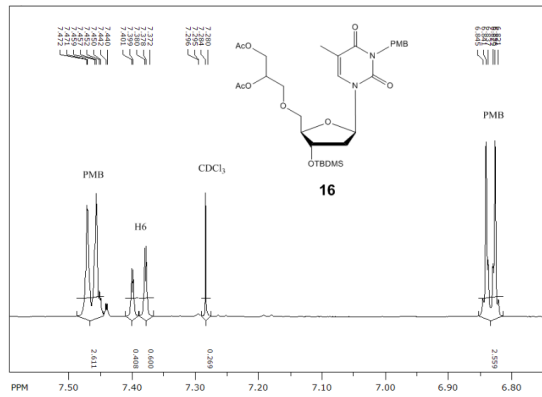
Liite 9



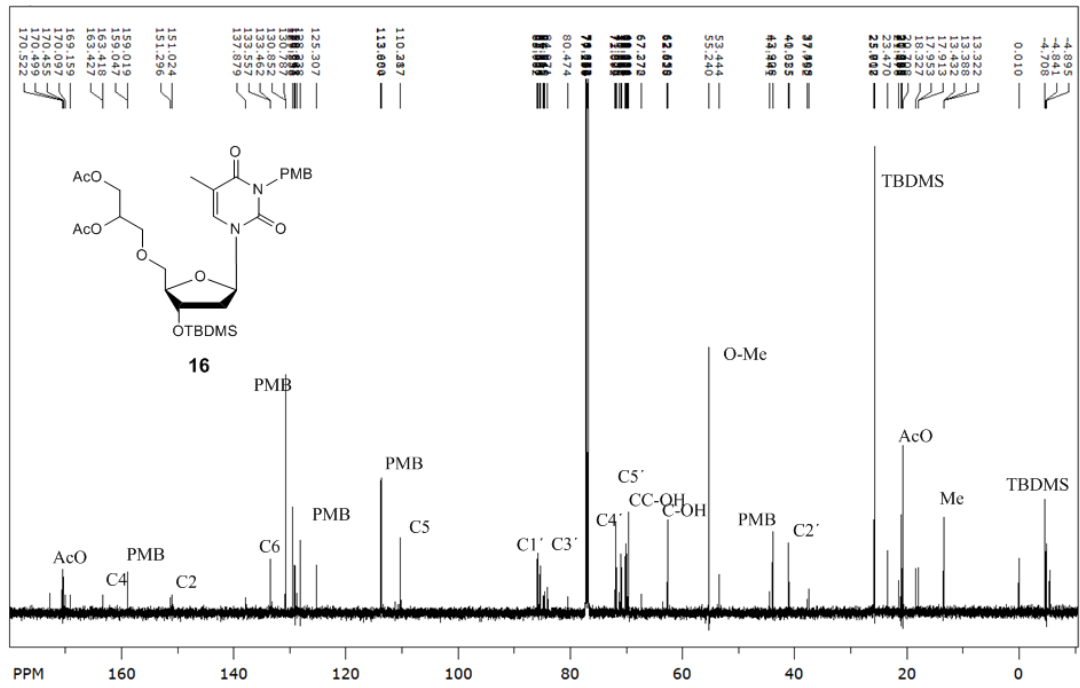
Liite 10

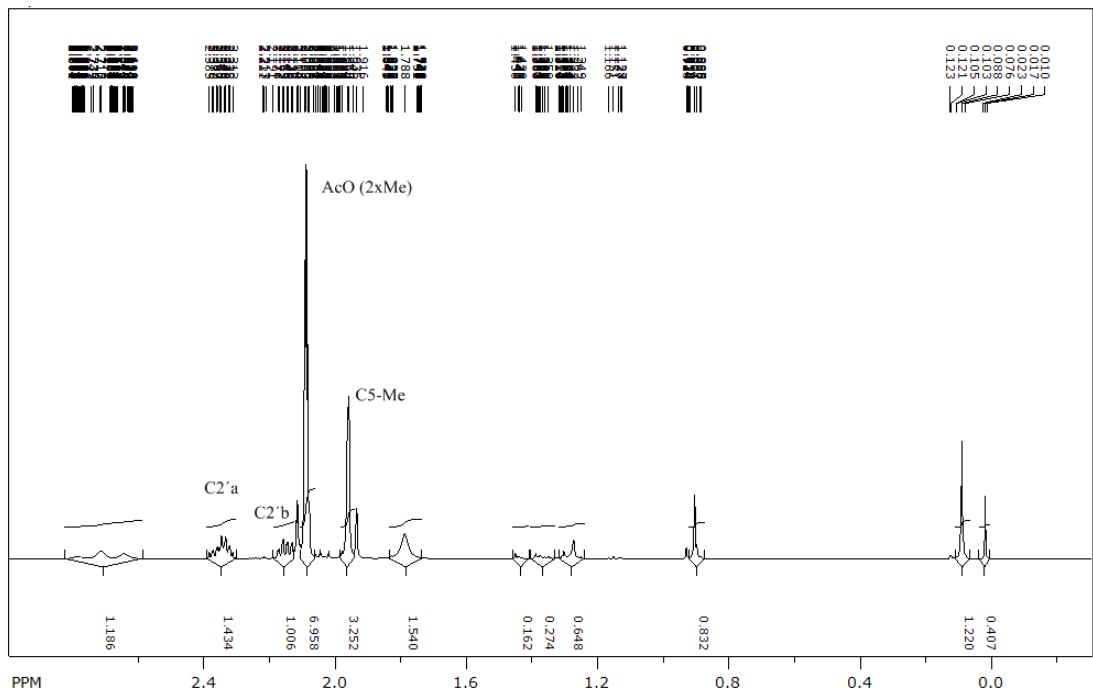


Liite 15

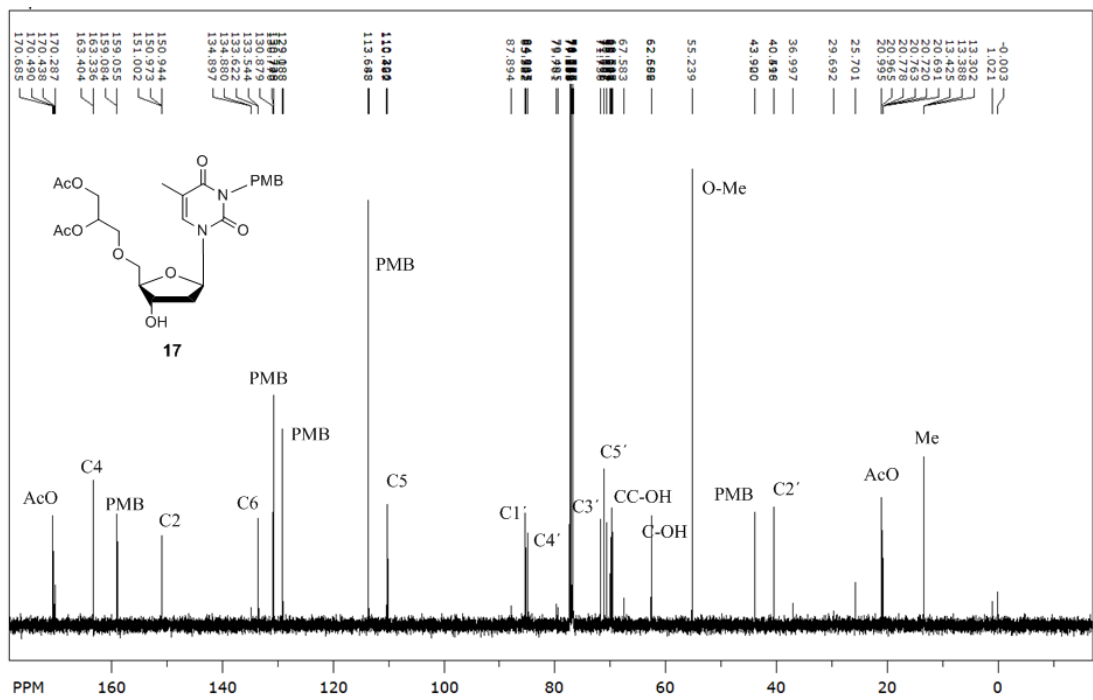


Liite 16





Liite 18



Liite 20

