

2'-Metoksiamino-ryhmä molekyyllinsisäisenä nukleofiilisenä  
katalyyttinä fosfodiesterisidoksen muodostumisessa

Pro gradu -tutkielma

Kemian laitos

Bio-organinen kemia

Jenna Lappi

Lokakuu 2023

Turku

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

# TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

LAPPI JENNA: 2'-Metoksiamino-ryhmä molekyyllinsisäisenä nukleofiilisenä katalyyttinä fosfodiesterisidoksen muodostumisessa

Pro Gradu -tutkielma, 36 s., liitteet 7 s.

Lokakuu 2023

---

Templaattinauhan ohjaama DNA:n kopiointi on perusta geneettisen informaation siirrolle ja transkriptiolle. Soluissa kopiointi tapahtuu entsyymien avulla. Lääketieteen ja teollisuuden sovelluksissa replikointireaktio halutaan toteuttaa ilman entsyymejä, koska entsyymit ovat kalliita ja herkkiä reaktio-olosuhteille.

Ei-entsyymaattisen replikoinnin tutkimuksen tavoitteena on kehittää menetelmiä, joilla voidaan korvata entsyymipohjaisten menetelmien käyttö sovelluksissa. Lisäksi tutkimuksen tavoitteena on saada enemmän tietoa siitä, miten geenejä mahdollisesti on kopioitu ennen entsyymien kehittymistä.

Projektissa selvitettiin 2'-metoksiaminoryhmän roolia molekyyllinsisäisenä nukleofiilisenä katalyyttinä fosfodiesterisidoksen muodostamisessa. Tulosten perusteella 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini ei muodostanut vesiliuoksessa pH-alueella 5-9 aktivoitua nukleosidifosfaatin, tymidiini-5'-O-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatin, kanssa fosforamidaattisidosta. Todennäköisesti aminometoksiryhmä muodostaa liian labiileja tuotteita, jotka hajoavat nopeasti tai ryhmä ei ole niin nukleofiilinen kuin oletettiin.

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin hydrolyyttisiä reaktioita seurattiin 90 °C:ssa. Hydrolyysireaktioiden tutkimuksessa saatiin selvitettyä useimmat hajoamistuotteet, reaktioreitit ja reaktionopeudet pH-alueella 1–11,2.

Avainsanat: templaatin ohjaama synteesi, katalyyysi, kinetiikka

# Sisälllys

## Lyhenteet ja symbolit

1 Johdanto .....	1
1.1 Mekanismit ja reaktio-olosuhteet.....	3
1.2 Templaatti .....	6
1.3 Aluke .....	8
1.4 Aktivoidut nukleotidit .....	9
1.4.1 Fosfaattiosan modifikaatiot.....	10
1.4.2 Emäsmoifikaatiot .....	11
1.5 2'-Metoksiaminoryhmä.....	12
1.6 Yhteenveto .....	13
2 Tulokset ja niiden tarkastelu .....	13
2.1 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin hydrolyyttiset reaktiot	13
2.1.1 Tuotejakauma.....	14
2.1.2 pH-nopeusprofiili .....	19
2.1.3 Reaktiomekanismit.....	21
2.2.    2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-N-fosforamidaatin)	
synteesit.....	23
2.2.1 Fosforimidatsolistrategia.....	24
2.2.2 TBDMS-suojaryhmästrategia .....	26
2.2.3 Markiewicz-suojaryhmästrategia .....	27
3 Johtopäätökset ja yhteenveto.....	27
4 Kokeelliset menetelmät .....	28
4.1 Yleiset menetelmät.....	28
4.2 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin kineettiset mittaukset..	28
4.3 Tymidiini-5'-O-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatti .....	30
4.4    2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-N-fosforamidaatin)	
synteesi fosforimidatsoli-strategialla vesiliuoksessa.....	31

4.5	5'-(4,4'-dimetoksitriityli)-3'- <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini.....	31
4.6	2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'- <i>N</i> -fosforamidaatin) synteesi käyttäen TBDMS-suojaryhmästrategiaa .....	33
4.7	2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani-1,3-diyyli)-uridiini .....	34
4.8	2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'- <i>N</i> -fosforamidaatin) synteesi käyttäen Markiewicz-suojaryhmästrategiaa .....	35
5	Viitteet.....	36
6	Liitteet .....	43

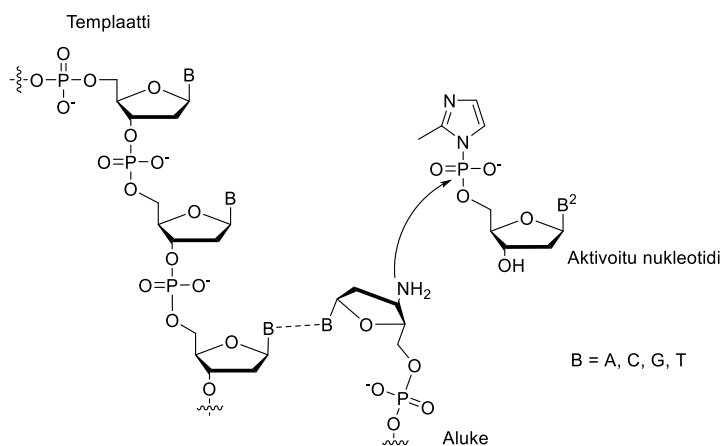
## Lyhenteet ja symbolit

2-AmIm	2-aminoimidatsoli
2-MeIm	2-metyyli-imidatsoli
2'-N-UpT	2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiini
2'-NHOMeUrd	2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini
2'-NHOMeUrd-3'-P	2'-deoksi-2'-(metoksiamino)-uridiini-3'-monofosfaatti
5'-TMP	tymidiini-5'-monofosfaatti
DCM	dikloorimetaani
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DMTr	4,4'-dimetoksitriityyli
EtOAc	etyliasetaatti
LC/MS	nestekromatografia/massaspektrometri
MeOH	metanoli
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
TBDMS	<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli
TBDMSCl	<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyylikloridi
THF	tetrahydrofuraani
TLC	ohutlevykromatografia

# 1 Johdanto

Templaatin ohjaama DNA-alukkeen jatkaminen luo molekulaarisen perustan DNA:n replikaatiolle ja transkriptiolle.<sup>1</sup> Solussa DNA:n replikaatiossa DNA-helikaasi avaa DNA:n kaksoiskierrteen,<sup>2</sup> minkä jälkeen DNA-primaasi syntetisoi alukkeen ribonukleosifitriposfaateista,<sup>3</sup> ja hybridisoi alukkeen templaattinauhan. DNA-polymeraasi jatkaa aluketta liittämällä templaattinauhan emäsjärjestyksen perusteella oikean deoksinukleotidin fosfodiesterisidoksella alukkeen vapaaseen 3'-hydroksyyliin (3'-OH). Ensyymit korjaavat mahdolliset virheet sekvenssissä. Transkriptiossa RNA-polymeraasi avaa DNA:n kaksoiskierrteen ja alkaa ilman aluketta liittämään yhteen ribonukleotideja samantapaisilla fosfodiesterisidoksilla kuin DNA:n replikaatiossa templaattinauhan emäsjärjestyksen mukaisesti. Tämä lähetti-RNA:n esiaste käsitellään entsyymaattisesti ja muodostunut lähetti-RNA siirretään ribosomiin. Ribosomissa aminohappoja liitetään toisiinsa peptidisidoksilla lähetti-RNA:n emäsjärjestyksen mukaan aminohappoketjuksi, josta rakentuu proteiini.<sup>2</sup>

Ei-entsyymaattisessa replikoinnissa oligonukleotidialukkeen jatkuminen perustuu siihen, kuinka hyvin nukleotidit reagoivat keskenään ja tunnistavat toisensa. Mekanistisesti ei-entsyymaattisessa replikaatiossa nukleofiili eli aluke reagoi elektrofiilin eli aktivoidun nukleotidin kanssa muodostaakseen sidoksen.<sup>4</sup> Alukkeen terminaalinen hydroksyyliin tai aminoryhmä (Kaavio 1) hyökkää nukleofiilina aktivoidun nukleotidin fosfaattiryhmään, jolloin todennäköisesti muodostuu pentavalenttinen intermediaatti. Ellei fosfaatin lähtevä ryhmä jo ole Westheimerin sääntöjen<sup>5</sup> mukaisesti apikaalisessa asemassa, tapahtuu pseudorotaatio. Mahdollisen pseudorotaation jälkeen lähtevä ryhmä irtoaa.<sup>6</sup>



**Kaavio 1.** Ei-entsyymaattinen replikointi käyttäen templaattia, aluketta ja aktivoitua nukleotidia.

Ei-entsyymäattinen replikointi perustuu emäspariutumiseen ja nukleotidien kemialliseen reaktiivisuuteen, joten se saattaa mallintaa geneettisen informaation kopiointia ennen entsyymien ja ribotsyymien kehittymistä.<sup>6</sup> Voisi olla mahdollista kehittää tekosolu, joka replikoi DNA:ta itsenäisesti.<sup>7</sup> Ei-entsyymäattinen replikointi on halvempaa kuin entsyymäattinen, koska siinä ei tarvitse käyttää entsyymejä tai trifosfaattinukleosideja reagensseina. Tämä olisi erittäin suotavaa varsinkin sekvenssoinnin sovelluksissa.<sup>8</sup> Ei-entsyymäattista replikaatiota voitaisiin käyttää sellaisten sairauksien diagnosoinnissa, jotka johtuvat yhdestä väärästä nukleotidista geenissä sekä sen avulla voitaisiin mahdollisesti räätälöidä sairauden hoitoa yksilöllisesti. Reaktiota voitaisiin hyödyntää myös antiviraalisten antisense-RNA-lääkkeiden valmistuksessa. Ei-entsyymäattisen replikoinnin tutkimuksessa voidaan mahdollisesti löytää uusia tapoja syntetisoida ei-kanonisia oligomeerejä.<sup>9</sup> Ei-kanonisia rakenteita tutkitaan mahdollisina lääkkeinä<sup>10</sup> ja ei-entsyymäattisesti kopioitavia, muokattuja nukleoemäksiä sisältäviä oligonukleotideja voidaan mahdollisesti käyttää hybridimateriaalien valmistukseen.<sup>9</sup>

Jotta kopioitava sekvenssi ja rakenne säilyy, täytyy sekvenssin pituuden ja emäjärjestyksen säilyä alkuperäisenä.<sup>9</sup> Nykyisin tunnetut nukleotidiketjujen jatkamiseen tarkoitetut kemialliset menetelmät eivät ole niin tarkkoja ja nopeita kuin entsyymit.<sup>8</sup> Polymeraasit käyttävät replikaatioreaktiossa trifosfaattinukleosideja, mutta laboratorioolosuhteissa trifosfaattinukleosidit eivät ole tarpeeksi reaktiivisia reagoimaan keskenään.<sup>9</sup> Tällä hetkellä ei esimerkiksi ole mahdollista ei-entsyymäattisesti replikoida RNA-ketjua, joka on tarpeeksi pitkä koodaamaan oligo- tai polypeptidiä. Lisäksi reaktio ei replikoi templaatin sekvenssiä tarpeeksi tarkasti ja luotettavasti. Reaktiot eivät ole kvantitatiivisia ja reaktiossa syntyy seos erimittaisia oligonukleotideja.<sup>6</sup> Luonnolliset DNA-alueet eivät ole tarpeeksi reaktiivisia ei-entsyymäattiseen replikointiin.<sup>4</sup> DNA-sekvenssin ei-entsyymäattisessa replikoinnissa yksi suurimmista ongelmista on kopioinnin tarkkuus,<sup>1</sup> koska jopa yli 25 %:a emäksistä saattaa olla virheellisiä.<sup>11</sup> Replikointireaktio, jossa käytetään kaikkia neljää kanonista nukleoemästä, ei ole vielä onnistunut.<sup>1</sup> Nukleoemäksistä erityisesti tymiiniä on vaikea lisätä ketjuun, koska tymiini ei sitoudu niin tiukasti templaatoivaan emäkseen kuin sytosiini, adeniini tai guaniini.<sup>12</sup> Myös templaatin viimeinen nukleotidi on huomattavasti hitaampi liittää ketjuun verrattuna muihin templaatin nukleotideihin.<sup>13</sup>

Replikointireaktio perustuu vuorovaikutuksiltaan heikkoon Watson-Crick emäspariutumiseen templaatin ja nukleotidin välillä, minkä takia reaktiota ei voi tehostaa käyttämällä rajuja olosuhteita tai korkeita lämpötiloja.<sup>6</sup> Yleensä reaktiot tehdään vedessä,

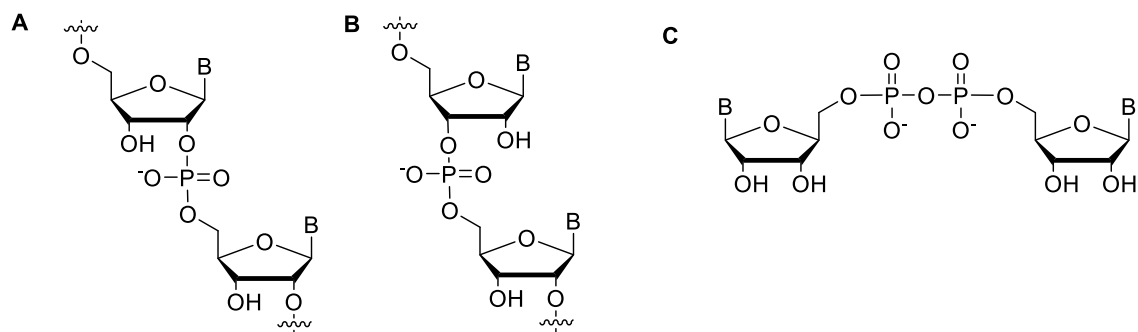
koska vedessä emäspariutuminen toimii niin kuin solussa.<sup>4</sup> Vesi ja nukleotidien hydroksyyliiryhmät ovat kilpailevia nukleofiileja, joiden reaktiivisuus on samaa luokkaa. Vettä on reaktioseoksessa huomattavasti enemmän kuin nukleotideja, joten vesi reagoi usein aktivoitujen nukleotidien kanssa.<sup>4</sup> Vedessä aktivoitujen nukleotidien hydrolyysiä ei voida välttää, ja se kiihtyy, jos reaktioseoksessa on divalenttisiä metalli-ioneja.<sup>14</sup> Hydrolyysin takia ei-entsymaattisissa reaktioissa käytetään ylimäärin aktivoituja monomeereja. Kun aktivoitu monomeeri hydrolysoituu, aktiivisten monomeerien konsentraatio liuoksessa vähenee, mikä hidastaa alukkeen jatkoa.<sup>6</sup> Hydrolysoitunut monomeeri voi myös sitoutua templaattiin aktivoidun monomeerin sijaan, mikä osaltaan inhiboi reaktiota.<sup>15</sup>

### 1.1 Mekanismit ja reaktio-olosuhteet

Ei-entsymaattinen replikointi on mekanistisesti kondensaatioreaktio, jossa muodostuu polymeeri.<sup>9</sup> Reaktiossa on luultavasti kaksi vaihetta. Ensin templaatti ja aluke dimerisoituvat, minkä jälkeen alukkeeseen lisätään nukleotideja.<sup>16</sup> Reaktiomekanismi on todennäköisesti nukleofiilinen bimolekulaarinen substituutioreaktio eli S<sub>N</sub>2-reaktio.<sup>17</sup> Oletetaan, että templaattit ja alukkeet löytävät toisensa reaktioseoksessa diffuusion ja sattuman kautta. Yhdisteet asettuvat antiparalleeliseen asentoon, minkä jälkeen ne muodostavat kaksoiskierteitä.<sup>18</sup> Samanaikaisesti vapaat nukleotidit vuorovaikuttavat templaatin kanssa.<sup>16</sup>

Divalenttiset metalli-ionit voivat kelatoitua 5'-fosfaatin hapen ja hyökkäävän 2'- tai 3'-OH:n välille,<sup>19</sup> jolloin ne lähestyvät toisiaan. Reaktiossa voi muodostua kolme erilaista sidosta, 2',5'- tai 3',5'-fosfodiesterisidos tai 5',5'-pyrofosfaattisidos (Kuva 1), riippuen reaktion regioselektiivisyydestä.<sup>9</sup> Ribonukleotidien tapauksessa 2'-OH ja 3'-OH ovat keskenään kilpailevia nukleofiileja, joista 2'-OH on nukleofiilisempi. 2'-deoksiribonukleotidien reaktiomekanismi on erilainen kuin ribonukleotidien reaktiomekanismi, koska divalenttisen metalli-ionin kelatoitumisen vaikutus on heikompi 2'-OH:n puuttumisen takia. Lisäksi samasta syystä riboosin konformaatio on DNA:ssa erilainen kuin RNA:ssa. DNA hydrolysoituu hitaammin neutraaleissa ja hieman emäksisissä olosuhteissa kuin RNA.<sup>9</sup>



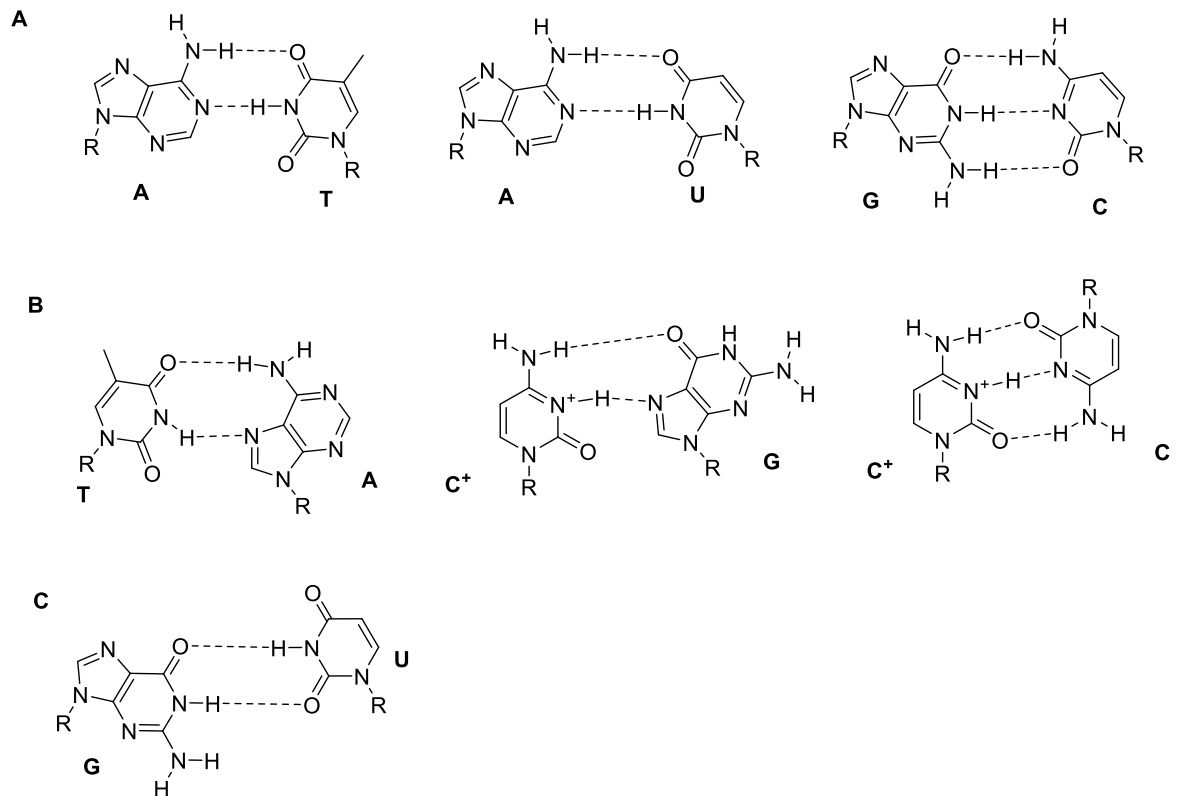


**Kuva 1.** Mahdolliset fosfodiesterisidokset. A) 2',5'-fosfodiesterisidos B) 3',5'-fosfodiesterisidos C) 5',5'-pyrofosfaattisidos.

Reaktioon vaikuttavat lisäksi vapaiden nukleotidien ja oligonukleotidiketjun väliset vuorovaikutukset sekä nukleotidien ja oligonukleotidien vuorovaikutukset reaktioseoksen muiden komponenttien kanssa. Vesi peittää oligonukleotidiketjun varauksia, joten se vaikuttaa merkittävästi siihen, miten oligonukleotidiketju on orientoitunut avaruudellisesti.<sup>9</sup> Myös metalli-ionien koordinoituminen oligonukleotidiketjuun vaikuttaa konformaatioon.<sup>20</sup> Metallionit, esimerkiksi  $Mg^{2+}$  ja  $Pb^{2+}$ , stabiloivat oligonukleotidin rakennetta ja katalysoivat kondensaatioreaktiota. Metallionit kelatoituvat suoraan tai veden välityksellä fosfaattirungon negatiivisiin varauksiin, jolloin oligonukleotidin kokonaisvaraus laskee. Templaatti/aluke/monomeeri–systemissä muodostuva dupleksi on stabiilimpi, kun metallionit peittävät fosfaattirungon negatiivisia varauksia, minkä takia reaktioseoksessa yleensä on korkea ionivahvuus. Lisäksi metallionit vaikuttavat nukleoemästen protonoitumiseen. Metallionien läsnäolo reaktioseoksessa vaikuttaa hyökkäävän hydroksyyli-ryhmän nukleofilisuuteen ja tuo reaktioseoksen reaktiivisia osia lähemmäs toisiaan, minkä takia reaktion aktivaatioenergia laskee.<sup>9</sup>

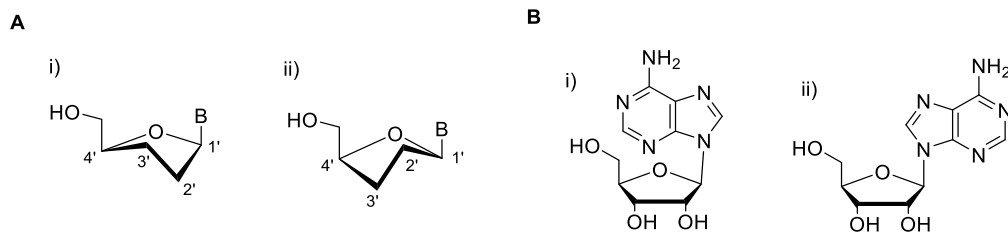
Nukleoemästen pinoutuminen ja vetysidokset emästen välillä vaikuttavat vapaiden nukleotidien ja oligonukleotidiketjun välisiin vuorovaikutuksiin. Pyrimidiini- ja puriinirenkaiden delokalisoituneet elektronit vuorovaikuttavat lähellä olevan nukleoemäksen kanssa  $\pi$ - $\pi$ -vuorovaikutuksin. Nämä vuorovaikutukset pakottavat oligonukleotidin planaarisuuteen ja pinoavat emäkset toistensa päälle. Pyrimidiini- ja puriinirenkaat ovat hydrofobisia, joten niiden pinoutuminen on vesiliuoksessa suotuisaa.<sup>9</sup> Emästen pinoutuminen vaikuttaa eniten nukleotidien kaksoiskierteiden stabiiliuteen vesiliuoksessa.<sup>21</sup> Emäspariutuminen perustuu nukleoemästen typpi- ja happiatomien vapaiden elektroniparien sekä toisen nukleoemäksen hydroksyyli- tai aminoryhmien vetysten välille muodostuviin vetysidoksiin. Vesiliuoksessa vesimolekyylit

usein sitoutuvat nukleoemäksiin vetysidoksin ja syrjäyttävät näin emäsparit. Jos veden vetysitoutumista nukleoemäksiin estetään, emäspariutuminen on tarkempaa. Vettä voidaan esimerkiksi sitoa ioneihin tai viilentää reaktioluosta lähelle 0 °C:ta tai sen alle.<sup>9</sup> Emäspariutuminen ei rajoitu Watson-Crick-emäspareihin (Kuva 2 A). Esimerkiksi *wobble*- ja Hoogsteen-emäsparit (Kuva 2 B ja 2 C) ovat tunnettuja biologisissa organismeissa.<sup>22,23</sup> Watson-Crick kanonista poikkeavien emäsparien muodostuminen häiritsee ei-entsyymaattista replikointia.<sup>24</sup>



**Kuva 2.** A) Watson-Crick-emäsparit, B) Hoogsteen-emäspareja<sup>22</sup> ja C) *wobble*-emäspari G-U.<sup>23</sup>

Myös riboosirenkaan konformaatio vaikuttaa oligonukleotidin asentoon ja siihen, miten emäkset pääsevät vuorovaikuttamaan.<sup>9</sup> Kaksoiskierteen geometria vaikuttaa nukleofiilin ja elektrofiilin asentoihin. A-muotoisessa kaksoiskiarteessä oligonukleotidiketjun sokeriosat ovat muodossa C3'-endo ja *N*-glykosidisidos anti-muodossa. B-muotoisessa oligonukleotidiketjussa nukleotidin sokeriosa on muodossa C2'-endo ja *N*-glykosidisidos anti-muodossa (Kuva 3 A ja 3 B).<sup>25</sup> A-muotoisessa kaksoiskiarteessä 3'-OH osoittaa pois päin kaksoiskierteen rungosta ja voi helpommin hyökätä aktivoituun monomeeriin. B-muotoisessa kaksoiskiarteessä 3'-OH osoittaa kohti kaksoiskierteen keskustaa.<sup>26</sup> RNA suosii A-muotoa<sup>7</sup> ja DNA suosii solussa B-muotoa.<sup>27</sup>



**Kuva 3.** A) Furanoosirenkaan mahdolliset konformaatiot. i) C3'-endo ja ii) C2'-endo. B) *N*-glykosidisidoksen mahdolliset konformaatiot. i) syn ja ii) anti. Piirretty mukailien Bansal *et al.*<sup>25</sup>

Liuoksen pH vaikuttaa nukleoemästen protonaatioon, ja se muuttaa niiden sähköisiä vuorovaikutuksia, mikä vaikuttaa merkittävästi niiden emäspariutumiseen. Lisäksi liuoksen pH vaikuttaa oligonukleotidin fosfaattirungon varauksiin.<sup>9</sup>

Templaatti/aluke-kompleksiin on alhaisessa lämpötilassa sitoutunut enemmän vapaita nukleotideja kuin korkeammassa lämpötilassa.<sup>4</sup> Korkeampi lämpötila nopeuttaa kondensaatioreaktiota mutta samalla sivureaktioiden osuus kasvaa. Aktivoitujen nukleotidien puoliintumisaika on pienempi korkeammassa lämpötiloissa. Alemmat lämpötilat stabiloivat heikkoja intermolekulaarisia vuorovaikutuksia, kuten emäspariutumista ja emästen pinoutumista. Näiden tekijöiden takia alemmissa lämpötiloissa saadaan todennäköisesti termodynaamisesti suotuisampaa 3'-sidoksellista tuotetta.<sup>9</sup> Jos systeemissä on paljon G-C-emäspareja, vastinnauhojen erottamiseen tarvitaan korkeampi lämpötila. Jos reaktiossa käytetään liian korkeaa lämpötilaa, saattaa reaktiossa muodostua templaattista riippumattomia oligonukleotideja.<sup>28</sup> Jotta templaatin ja vapaiden nukleotidien emäspariutuminen olisi mahdollisimman spesifistä, templaatin ohjaamissa replikointireaktioissa lämpötila pidetään yleensä 0 °C ja 4 °C välillä.<sup>9</sup>

## 1.2 Templaatti

Templaattivaikutukseen eli siihen, kuinka voimakkaasti vapaat nukleotidit sitoutuvat templaatoivaan nukleoemäkseen, vaikuttaa pinoutuminen, vetysidoksien määrä emäksien välillä<sup>12</sup> ja sekundääriset sähköiset vuorovaikutukset.<sup>29</sup> Templaattivaikutus on myös riippuvainen alukkeen 3'-ryhmän nukleofiilisyydestä ja monomeerin fosfaattiosan aktiivisuudesta.<sup>6</sup> Pinoutuminen vaikuttaa eniten emäksen templaattiin sitoutumisen vapaan energian määrään.<sup>12</sup> Yksikin heikosti templaattiin sitoutuva emäs voi pysäyttää reaktion.<sup>13</sup> Templaattivaikutus ei kuitenkaan pääasiallisesti määrää, liittyykö nukleotidi alukkeen jatkoksi.<sup>12</sup>

Vesiliuoksessa suurin osa aktivoituista nukleotideista ei ole sitoutuneena aluke/templaatti-rakenteeseen. Yksi tapa tehostaa ei-entsymaattista replikointia on vahvistaa templaattivaikutusta, jolloin alukkeen päässä oleva nukleofiilinen ryhmä on jäsentynyt niin, että se voi hyökätä aktivoituun nukleotidiin.<sup>4</sup>

Oligonukleotidiketjun konformaatio, jonka määrittää sekundääristen ja tertiääristen rakenteiden vuorovaikutus, vaikuttaa sen funktionaalisuuteen. Rakenteiden muodostumiseen vaikuttaa oligonukleotidin sekvenssi ja oligonukleotidin vuorovaikutus liuoksen komponenttien kanssa.<sup>9</sup> RNA voi laskostua erilaisiin rakenteisiin.<sup>30</sup> Nämä rakenteet saattavat estää alukkeen jatkumisen, koska vuorovaikutus alukkeen ja templaattinauhan välillä on voimakkaampaa kuin templaatin ja monomeerien välinen vuorovaikutus. RNA:ta voidaan estää tekemästä tällaisia rakenteita kelatoimalla RNA:han metalli-ioneja tai käyttämällä reaktiossa molekyyliä tai pintoja, jotka avaavat nukleiinihappoketjuja vuorovaikuttamalla ketjun riboosi-fosfaattirungon kanssa.<sup>9</sup> Templaattivaikutus on voimakkaampi, kun kaksoiskierre on A-muodossa<sup>4</sup> ja ei-entsymaattinen replikointi on nopeampaa A-muotoisilla kaksoiskierteillä, kuten RNA tai LNA, kuin B-muotoisella DNA:lla.<sup>7,31</sup>

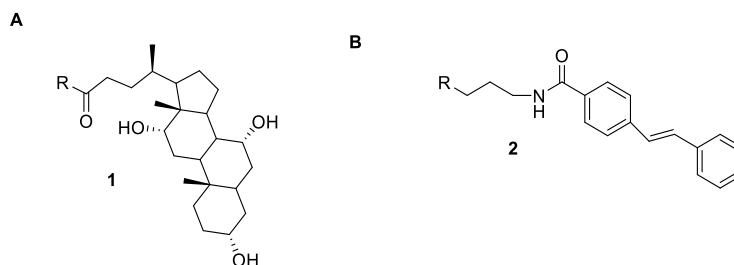
Templaatin hybridisaatiolla, kolmiulotteisella rakenteella ja sekvensillä<sup>11</sup> on merkitystä hyvän saannon saavuttamiseen. Mitä enemmän templaatissa on sytosiinia guaniinin verrattuna, sitä tehokkaammin uusi nukleotidi liittyi ketjuun.<sup>32</sup> Guaniininukleotidi on helpointa liittää alukkeen jatkoksi, koska guaniini-sytosiini emäsparissa on kolme vetysidosta ja guaniini puriiniemäksenä pinoutuu vahvemmin kuin pyrimidiiniemäkset.<sup>4</sup> Poly(C, G)-templaattit kuitenkin muodostavat intra- ja intermolekulaarisia rakenteita, jotka inhiboivat ei-entsymaattista oligomerisaatiota.<sup>32</sup> Sekvenssin vaikutuksella alukkeen jatkumiseen voidaan ajatella olevan kolme yleissääntöä: 1) guaniini ja sytosiini jatkavat aluketta nopeammin kuin adeniini tai tymiini, 2) puriinit liittyvät alukkeen jatkoksi nopeammin kuin pyrimidiinit ja 3) alukkeeseen liittyneen emäksen viereiset emäkset eivät vaikuta reaktion nopeuteen niin paljon kuin templatoiva emäs.<sup>11</sup>

Sekä DNA:lla että RNA:lla alukkeen jatkaminen nopeutuu, jos templaatissa on edempänä alukkeesta (*downstream*-asemassa) avustava oligonukleotidiketju.<sup>33,34</sup> Todennäköisesti kompleksin rakenne on tällöin jäykempi ja avustava ketju vahvistaa pinoutumista, minkä takia vapaa nukleotidi kiinnittyy voimakkaammin templaattiin.<sup>13</sup>

Templaatin immobilisaatiolla voidaan parantaa replikointireaktion nopeutta ja tarkkuutta. Magneettisiin rautaoksidihelmiin kiinnitetty RNA-templaatti pystyy matalassa

lämpötilassa (0 °C tai alle) kopioimaan sen kaikkia nukleoemäksiä neljä kertaa peräkkäin lähes kvantitatiivisesti.<sup>15</sup> Reaktiossa aluke jatkui oikealla emäksellä pääsääntöisesti yli 90 %:n varmuudella. Templaatin kiinnittämisen avulla reaktioseoksesta voidaan poistaa hydrolysoituneita monomeereja ja korvata niitä aktivoituilla monomeereillä. Immobilisointi saattaa myös auttaa oligonukleotidiketjuja irtoamaan toisistaan. Reaktio on kuitenkin hidas, sillä kvantitatiivisen reaktion saamiseksi reaktioajat saattoivat olla jopa 10 päivää. Monomeerejä myös lisättiin useasti.<sup>15</sup>

Koolihapolla **1** (Kuva 4 A) substituoidut DNA-templaattit tehostavat deoksiadenosiinin, deoksiguanososiinin, ja tymidiinin liittymistä ketjuun sekä parantavat reaktion tarkkuutta huomattavasti. Esimerkiksi alukkeen jatkuminen deoksiadenosiinilla nopeutui 6,5-kertaiseksi. Koolihapolla substituoiden templaatin virhetaso oli 27 %.<sup>35</sup> Stilbeenianalogilla **2** (Kuva 4 B) substituoiduilla templaateilla voidaan reaktiota nopeuttaa jopa 19,6-kertaiseksi, ja se nopeuttaa kaikkien neljän kanonisen nukleoemäksen liittymistä ketjuun.<sup>36</sup> Substituentit ovat lipofiilisiä, joten ne todennäköisesti saavat vapaan nukleotidin pysymään kauemmin templaatin ja alukkeen lähellä. Tällöin alukkeella on aikaa tehdä nukleofiilinen hyökkäys nukleotidin fosfaattiosaan.<sup>13</sup>



**Kuva 4.** A) Koolihappo ja B) stilbeenianalogi.

### 1.3 Aluke

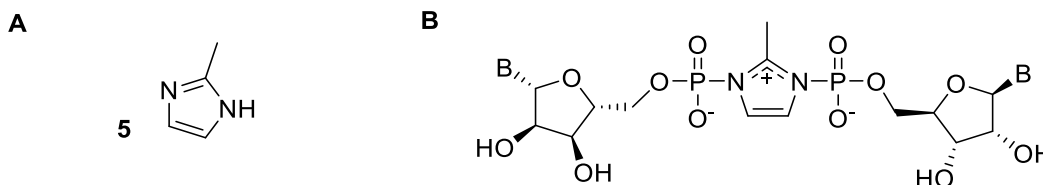
Alukkeen käyttö nopeuttaa reaktiota, koska templaatin mukaisen dimeerin muodostuminen on reaktion nopeutta rajoittava vaihe.<sup>17</sup> Alukkeen kiinnittyminen templaattiin mahdollistaa alukkeen ja vapaiden nukleotidien emäspinoutumisen, mikä nopeuttaa vapaiden nukleotidien kiinnittymistä templaattiin.<sup>9</sup>

Alukkeen käytön ongelmana on, että templaatti/aluke-dupleksi ei ole kovin stabiili, koska käytetyt ketjut ovat lyhyitä. Ratkaisuna on käytetty alemmaa lämpötilaa sekä templaatin



### 1.4.1 Fosfaattiosan modifikaatiot

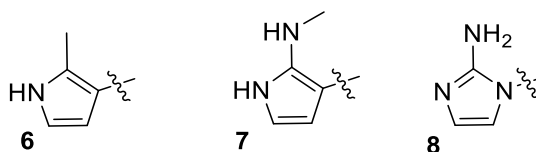
2-Metyyli-imidatsoli (2-MeIm) **5** (Kuva 6 A) tehostaa alukkeen jatkumista. 2-MeIm:lla aktivoitunut guanosiini-5'-monofosfaatin ja templaativan poly(C):n reaktiossa muodostuu pitkiä ja pääasiassa 3',5'-linkittyneitä oligonukleotideja alhaisessa lämpötilassa ja neutraalissa pH:ssa.<sup>45</sup> Na<sup>+</sup>- ja Mg<sup>2+</sup>-ionien konsentraatio vaikuttaa merkittävästi reaktion tehokkuuteen ja regioselektiivisyyteen.<sup>45</sup> 2-MeIm:n katalyyttinen vaikutus perustuu todennäköisesti siihen, että se muodostaa neutraalissa pH:ssa imidatsolisiltaisen dinukleotidi-intermediaatin (Kuva 6 B).<sup>46-48</sup> 2-MeIm:lla tehdyt reaktiot ovat kuitenkin hitaita ja ne toimivat parhaiten templaateilla, joissa on paljon sytosiinia.<sup>7</sup> Muita nukleoemäksiä sisältävillä templaateilla saanto on heikko ja joitain sekvenssejä ei voida kopioida lainkaan.<sup>49</sup>



**Kuva 6.** A) 2-Metyyli-imidatsoli ja B) imidatsolisiltainen dinukleotidi-intermediaatti. Intermediaatti piirretty mukaillen Walton *et al.*<sup>46</sup>

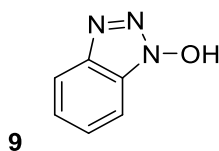
Liian suuri substituentti imidatsolijohdannaisten 2-asemassa hidastaa alukkeen jatkumista.<sup>50</sup> Reaktion nopeus laskee myös silloin, kun lähtevän ryhmä pK<sub>a</sub>-arvo pienenee. 2-metyylipyrrolilla **6** aktivoitunut guanosiinimonofosfaatit eivät pysty katalysoimaan ei-entsymaattista replikointia. Tämä viittaa siihen, että vierekkäisten lähtevien ryhmien pinoutuminen tai vetysitoutumiseen kykenevä aminoryhmä eivät yksistään riitä ei-entsymaattisen reaktion katalysointiin. 2-metyyliaminoimidatsoli **7** ei katalysoi reaktiota todennäköisesti liian suuren steerisen esteen vuoksi. 2-Aminoimidatsolilla (2-AmIm) **8** aktivoitunut guanosiinimonofosfaatit saivat 2-metyyliimidatsolilla aktivoitujen sytosiinimonomeerien liittymään ribonukleotidiketjuun seitsemän kertaa nopeammin verrattuna 2-MeIm:lla aktivoituihin sytosiinimonomeereihin. Todennäköisesti 2-AmIm nopeuttaa 2-aminoimidatsolisiltaisen dinukleotidi-intermediaatin muodostumista, koska 2-AmIm:n N3 on nukleofiilisempi kuin 2-MeIm:n N3.<sup>50</sup> RNA:n replikoimisessa AU ja UA sekvenssit ovat vaikeita kopioida<sup>49</sup> mutta käyttämällä 2-AmIm:lla aktivoituja kanonisia nukleotideja näitä

sekvenssejä sisältävät templaatit voitiin kopioida yli 85 %:n saannolla vuorokaudessa.<sup>50</sup> Rakenteet on esitetty kuvassa 7.



**Kuva 7.** 2-Metyylipyrroli **6**, 2-metyyliaminoimidatsoli **7** ja 2-aminoimidatsoli **8**.

Hydroksibentsotriatsolilla **9** (Kuva 8) aktivoitua ribonukleotideja jatkavat muokkaamatonta RNA-aluketta nopeammin kuin 2-metyyli-imidatsolilla aktivoitua ribonukleotideja.<sup>34</sup> Optimaalinen pH reaktiolle on 8,9, mikä todennäköisesti johtuu asemassa 7 olevan atsatyypin emäksisyydestä.<sup>34</sup> Pyridiini katalysoi reaktiota korkeissa millimolaarisissa konsentraatioissa.<sup>8</sup> Oksiatsabentsotriatsolit voivat parantaa nukleotidin sitoutumista templaatti/aluke-dupleksiin.<sup>39</sup>



**Kuva 8.** Hydroksibentsotriatsoli **9**.

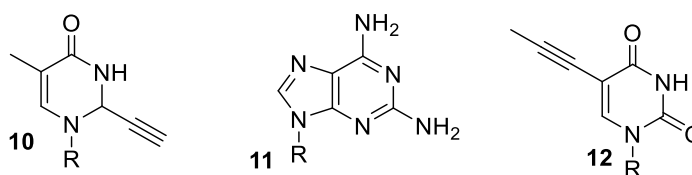
#### 1.4.2 Emäsmodyfikaatit

Luonnollisista deoksinukleotideista tymidiinin monofosfaatti kopioituu usein virheellisesti ei-entsymaattisessa replikaatiossa, koska se emäspariutuu heikosti ja muodostaa *wobble*-emäsparin guaniinin kanssa.<sup>1</sup> Aktivoitu tymidiinin etynyylipyridonianalogi **10** (Kuva 9) jatkaa aluketta aktivoituun tymidiiniin verrattuna 5,3 kertaa nopeammin. Analogi ei inhiboi muiden nukleoemäksien liittymistä alukkeeseen eikä analogin liittyminen alukkeeseen huononna seuraavaan nukleoemäksen liittymisen tarkkuutta.<sup>1</sup>

Diaminopuriini **11** voi muodostaa kolme vetysidosta urasiilin kanssa. Sen käyttö adeniinin sijaan nukleoemäksenä nopeuttaa 2-metyyli-imidatsolilla aktivoitua urasiilin liittymistä ketjuun.<sup>51</sup> Diaminopuriinin templatointireaktio on noin kolme kertaa tehokkaampi kuin vastaava adeniinin templatointireaktio.<sup>51</sup> 2-metyyli-imidatsolilla aktivoitu diaminopuriinimonomeeri myös jatkaa aluketta tehokkaammin kuin



adeniinimonomeeri, kun tymiini on templatoina emäs.<sup>52</sup> Diaminopuriini toimii erityisen hyvin yhdistettynä 5-propynyliurasiiliin **12**.<sup>53</sup>

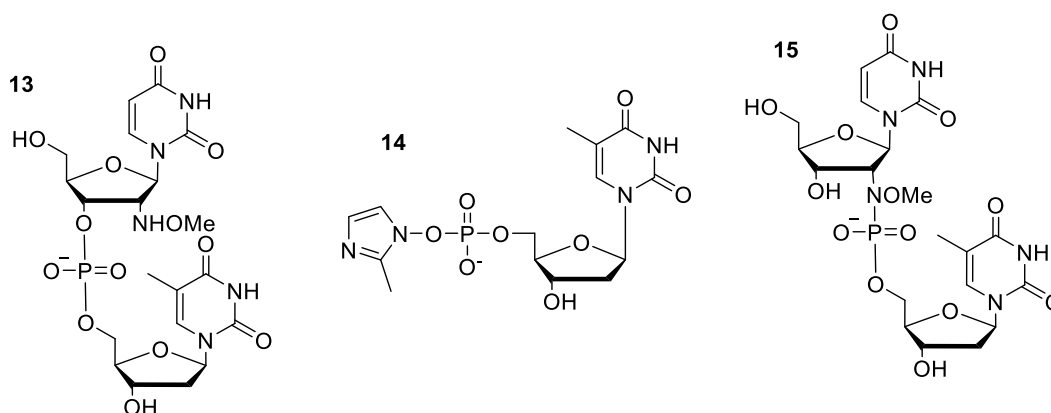


**Kuva 9.** Etynyylipyridoni **10**, diaminopuriini **11** ja 5-propynyliurasiili **12**.

### 1.5 2'-Metoksiaminoryhmä

2'-Metoksiaminoryhmän toimintaa on tutkimusryhmässämme tutkittu 2'-*N*-(metoksi)aminoryhmällä modifioitujen oligonukleotidien ja peptidialdehydien välisessä reaktiossa.<sup>54,55</sup> Reaktiossa muodostuu *N*-metoksioksatsolidiini oligonukleotidin ja peptidin välille. Kun pH on hieman hapan, reaktio on reversiibeli ja dynaaminen. pH:ssa 7 tuotteet ovat pysyviä.

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää 2'-metoksiaminoryhmän vaikutusta molekyyllinsisäisenä nukleofiilisenä katalyyttinä fosfodiesterisidoksen muodostumisessa. Kokeellisessa osiossa tutkittiin 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin (2'-*N*-UpT) (**13**) (Kuva 10) hydrolyysireaktioita. Lisäksi tutkittiin fosforamidaattisidoksen muodostumista vesiliuoksessa käyttäen imidatsolilla aktivoitua tymidiinin monofosfaattia (**14**) Työssä yritettiin myös kehittää synteesimenetelmä 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** syntetisoimiseksi käyttämällä silyyli- ja dimetoksitrietyylisuojausjauksia 5'- ja/tai 3'-asemissa.



**Kuva 10.** 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiini **13**, tymidiini-5'-*O*-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatti **14** ja 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2-*N*-fosforamidaatti) **15**.

## 1.6 Yhteenveto

Ei-entsymaattisessa templatoidussa replikaatiossa alukkeen nukleofiilinen ryhmä reagoi aktivoituneen nukleotidin elektrofiilisen ryhmän kanssa. Reaktiossa syntyy pentavalentti intermediaatti, joka hajoaa Westheimerin sääntöjen mukaisesti. On havaittu, että imidatsolilla aktivoituneet nukleotidit reagoivat imidatsolisiltaisen intermediaatin kautta.

Templaattivaikutusta tehostaa emäspinoutuminen, oligonukleotidin A-muotoinen konformaatio, suurempi määrä vetysidoksia templaatoivan emäksen ja aktivoituneen nukleotidin emäksen välillä, avustavan oligonukleotidin käyttö, templaatin immobilisaatio ja templaatin substituointi lipofiilisillä ryhmillä.

Vapaat nukleotidit kiinnittyvät templaattiin paremmin alukkeita käytettäessä, koska vapaiden nukleotidien ja alukkeen emäkset voivat emäspinoutua. Aluke/templaattidupleksi ei ole kovin stabiili, koska reaktioissa käytetyt ketjut ovat lyhyitä. Dupleksin labiiliuden takia reaktioissa käytetään matalia lämpötiloja ja templaattien ylimäärää alukkeisiin verrattuna. Lisäksi hydroksyyli-ryhmien korvaaminen aminoryhmillä nopeuttaa reaktiota.

2-Metyyli-imidatsolilla aktivoituneet nukleotidit tehostavat alukkeen jatkamista. 2-Aminoimidatsolilla aktivoituneet ribonukleotidit ja hydroksibentsotriatsolilla aktivoituneet ribonukleotidit ovat 2-metyyli-imidatsoleja tehokkaampia jatkamaan aluketta. Liian suuri substituentti imidatsolijohdannaisen 2-asemassa ja liian pieni lähtevän ryhmän  $pK_a$ -arvo hidastavat ei-entsymaattista replikaatiota.

Ei-entsymaattisen replikaation tehokkuutta voidaan parantaa myös käyttämällä muokattuja nukleoemäksiä. Diaminopuriini adeniinin sijasta nopeuttaa alukkeen jatkoa, kun käytetään 2-metyyli-imidatsolilla aktivoitua urasiilia. Diaminopuriini yhdistettynä 5-propynyliurasiiliin tehostaa ei-entsymaattista replikaatiota erityisen paljon.

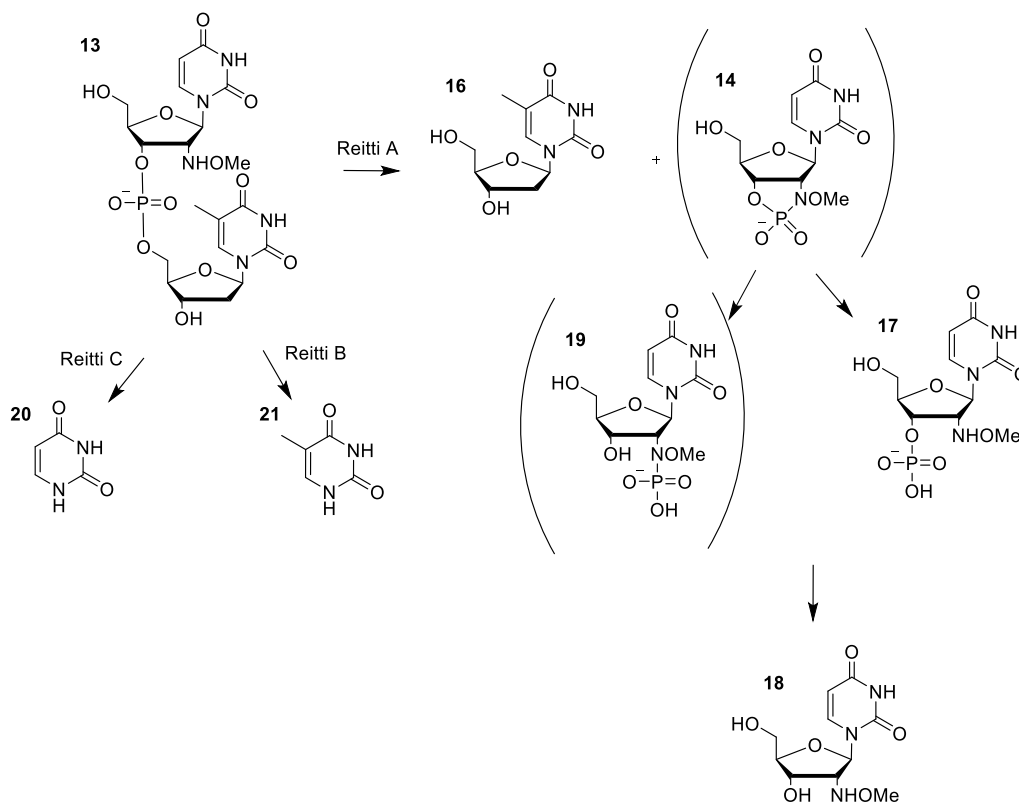
## 2 Tulokset ja niiden tarkastelu

2.1 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin hydrolyyttiset reaktiot  
2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin (13) hydrolyyttisiä reaktioita seurattiin vesiliuoksissa 90 °C:n lämpötilassa pH-alueella 1–11,2. Reaktioiden etenemistä

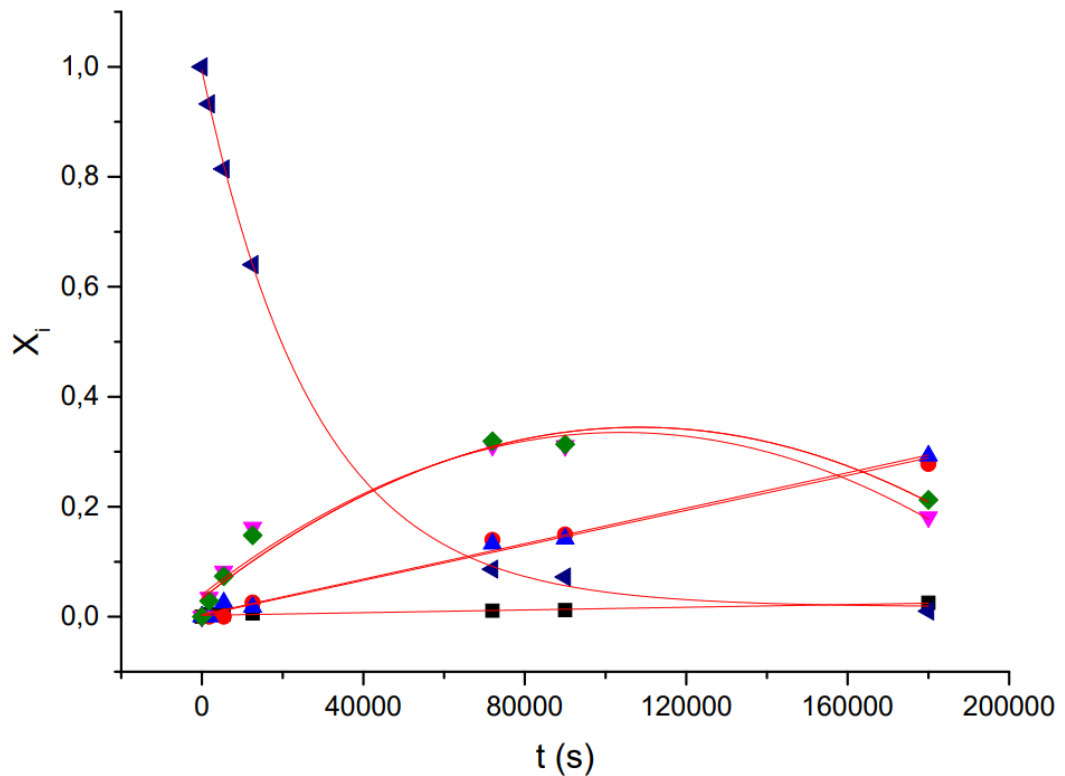
seurattiin nestekromatografisesti käyttäen eluenteina trietyyliammoniumasetattia ja asetonitriiliä. Muodostuneet hajoamistuotteet tunnistettiin nestekromatografisesti vertailemalla kaupallisten referenssiyhdisteiden retentioaikoja havaittujen tuotteiden retentioaikoihin ja/tai massaspektrometrisesti.

### 2.1.1 Tuotejakauma

Happamissa olosuhteissa (pH 1–2) 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiini (**13**) pilkkoutuu (Kaavio 2, Reitti A) mitä todennäköisimmin syklisen 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini-2',3'-monofosfaatin **14** kautta tymidiiniksi (**16**) ja 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini-3'-monofosfaatiksi (**17**; 2'-NHOMeUrd-3'-P), joka defosforyloituu edelleen 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiiniksi (**18**). Reaktiossa voi muodostua myös 2'-*N*-fosforamidaatti **19**. Huomionarvoista kuitenkin on, että happamissa olosuhteissa P-N-sidoksen tiedetään olevan labiili,<sup>56</sup> joten reaktiossa mahdollisesti muodostuvaa 2'-*N*-fosforamidaattia **19** eikä syklistä fosforamidaattia **14** havaittu akkumuloituvan. Depyridiminaatio urasiiliksi (**20**; Reitti C) ja tymiiniksi (**21**; Reitti B) kilpailee pilkkoutumisen kanssa. Esimerkiksi pH:ssa 1 muodostuu urasiilia 3 % ja tymiiniä 28 % (Kuva 11).

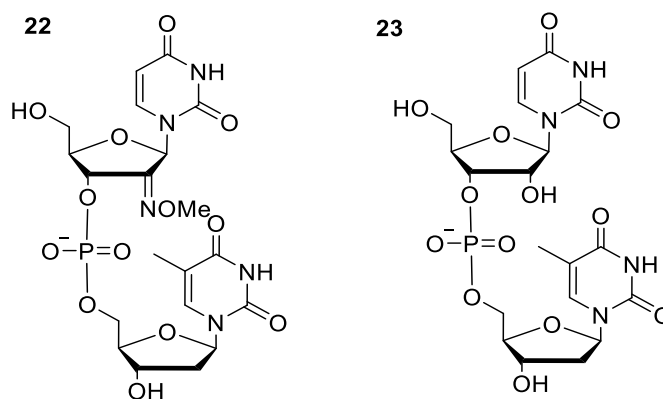


**Kaavio 2.** Dimeerin **13** hydrolyttiset reaktiot happamissa olosuhteissa.

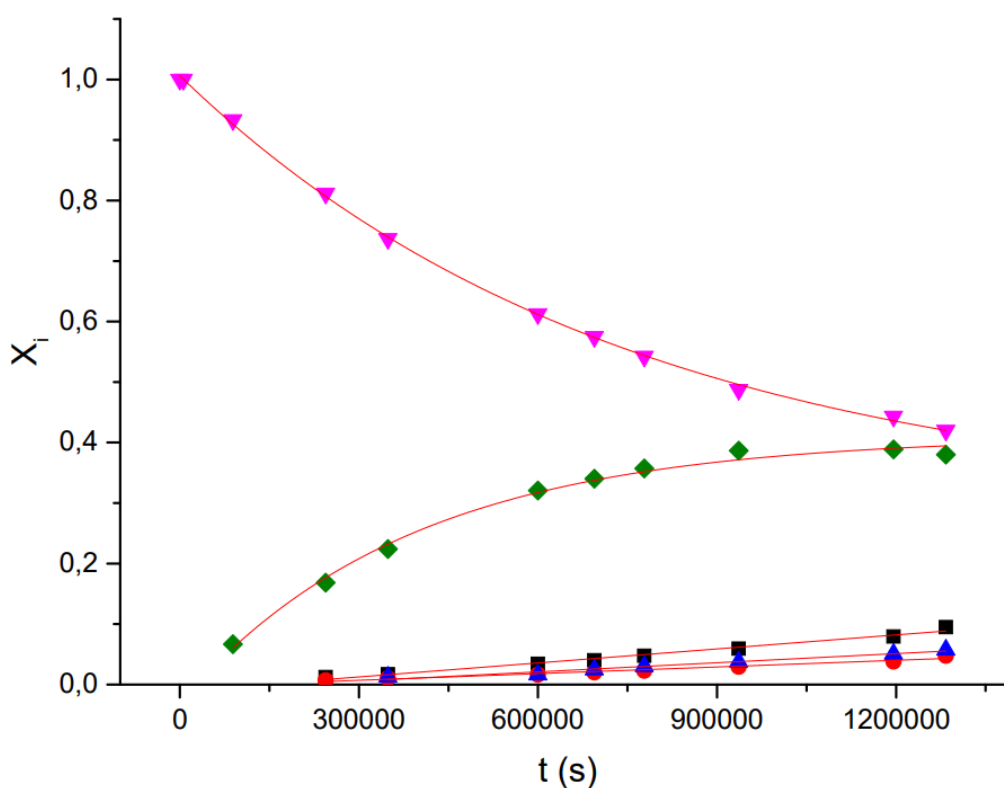


**Kuva 11.** Tuotejakauma pH:ssa 1. Tummansininen kolmio = dimeeri **13**, vihreä neliö = tymidiini, pinkki kolmio = fosfaatti **17** tai **19**, punainen ympyrä = tymiini, sininen kolmio = 2'-NHOMeUrd **18**, musta neliö = urasiili.

Lievästi happamissa olosuhteissa (pH 3–5) tuotejakauma on monimutkainen. Depyrimidinaatio urasiiliksi (**20**) ja tymiiniksi (**21**) kilpailee selkeästi pilkkoutumisen kanssa. Esimerkiksi pH:ssa 5 havaitaan kahden puoliintumisajan jälkeen urasiilia 22 % ja tymiiniä 7 %. Lisäksi havaitaan lähtöaineen alkoksiamiiniryhmän hapettuminen oksiimieetteriksi, jolloin muodostuu dinukleosidifosfaatti **22** (Kuva 12). Huomionarvoista on, että hapettuminen tapahtui myös ditiotreitolin läsnäollessa. Siirryttäessä pH:sta 3 vähemmän happamampiin reaktioliuoksiin yhdisteen **22** osuus kasvaa, ollen selkeä päätuote pH:ssa 6 (Kuva 13). Vain pieniä määriä (< 10 %) havaitaan urasiilia (**20**), tymiiniä (**21**) ja tymidiiniä (**16**). pH:ssa 3 havaitaan myös yhdiste, joka massa-analyysin mukaan sopisi dinukleosidifosfaatiksi (**23**; UpT). Lähtöaineen **13** isomeraatiota dinukleosidi-2',5'-(2'-N-fosforamidaatiksi) **15** ei havaita happamissa olosuhteissa.



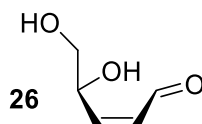
**Kuva 12.** Molekyylirakenteet lähtöaineen **13** hapettuneelle oksimieetterille **22** ja dinukleosidifosfaatille UpT **23**.



**Kuva 13.** Tuotejakauma pH:ssa 6. Pinkki kolmio = yhdiste **13**, vihreä neliö = yhdiste **22**, musta neliö = urasiili, sininen kolmio = tymidiini, punainen ympyrä = tymiini.

Emäksisissä olosuhteissa (pH 10,2–11,2) depyridimidaatio on vallitseva reaktio. Päätuotteina havaitaan urasiili (**20**) ja tymidiini-5'-monofosfaatti (**24**; TMP, Kaavio 3, Reitti C). Uraasiilin irtoaminen tuottaa syklisen oksokarbeniumionin, johon vesi hyökkää. Muodostuneen välituotteen **25** eliminaatioreaktio tuottaa 4,5-dihydroksi-2-(metoksiamino)pent-2-enaalin (**26**, Kuva 14) ja 5'-TMP:n (**24**) (katso mekanismikappale 2.1.3). Uraasiilia sekä myös tymiiniä voi mahdollisesti muodostua myös Reitin A kautta.

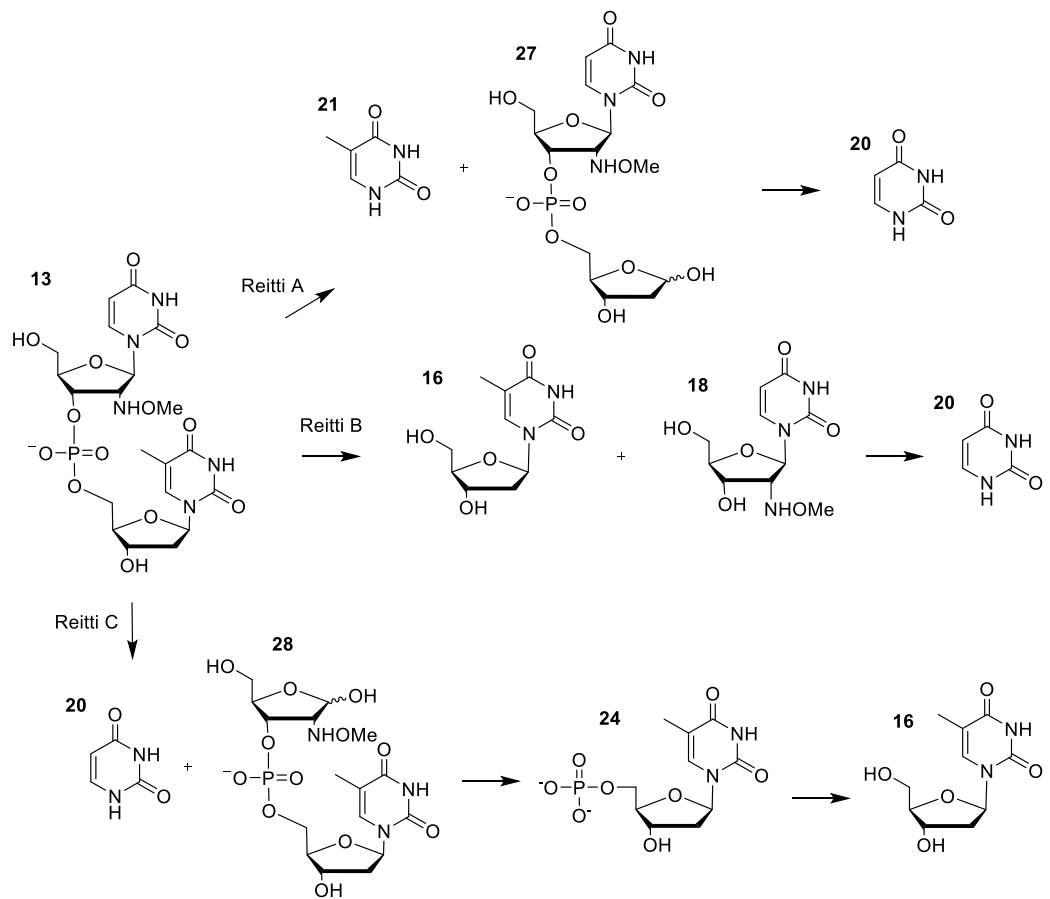
Fosforidiesterisidoksen intermolekulaarinen hydrolyysi 5'-TMP:ksi on epätodennäköistä, koska tuotteita **17** tai **18** ei havaita (Reitti B). Näin ollen tymidiini muodostuu mitä todennäköisemmin 5'-TMP:n defosforylaation kautta. Tuotejakauma pH:ssa 11,2 on esitetty kuvassa 15. Massa-analyyseissä havaitut massat on esitetty taulukossa 1.



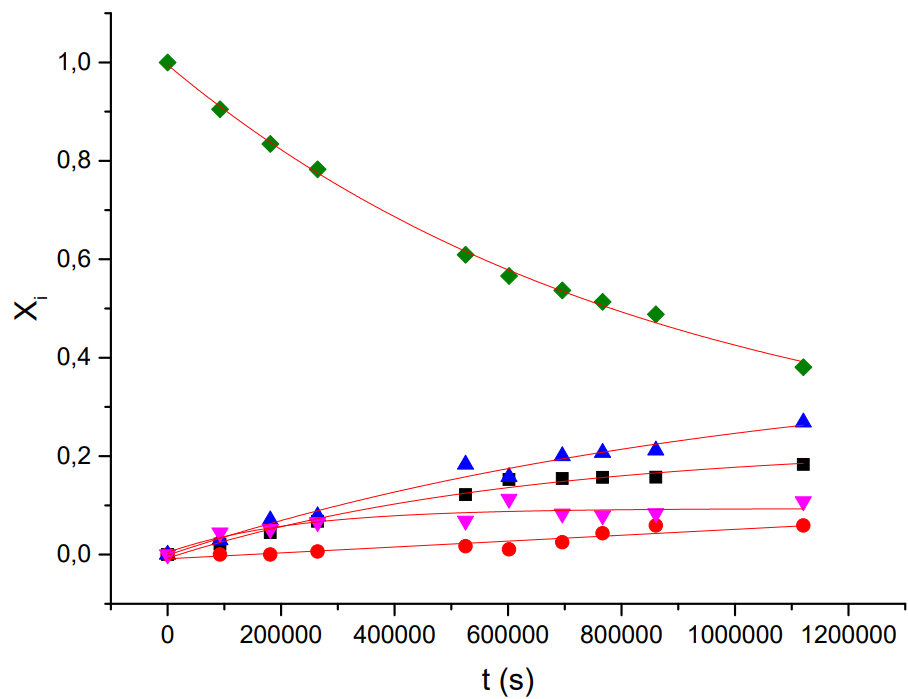
**Kuva 14.** Emäksisissä olosuhteissa muodostuva hajoamistuote **26**.

**Taulukko 1.** Dimeerin **13** hydrolyysin tutkimuksen massa-analyyseissä havaitut massat.

Yhdiste	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M-H] <sup>-</sup>
<b>16</b>		265,1	241,1
<b>17</b>	354,0		352,1
<b>18</b>	274,0		
<b>20</b>	113,1		
<b>22</b>			574,1
<b>23</b>			547,0
<b>26</b>		184,1	



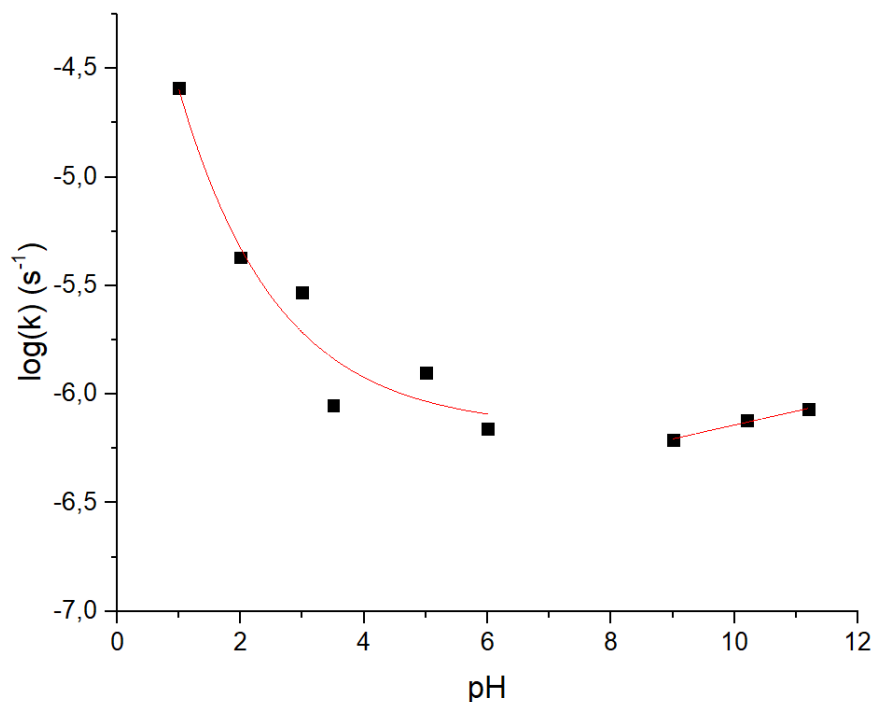
**Kaavio 3.** Dimeerin **13** hydrolyttiset reaktiot emäksisissä olosuhteissa.



**Kuva 15.** Tuotejakauma pH:ssa 11,2. Vihreä neliö = yhdiste **13**, sininen kolmio = TMP, musta neliö = urasiili, pinkki kolmio = tymidiini, punainen ympyrä = tymiini.

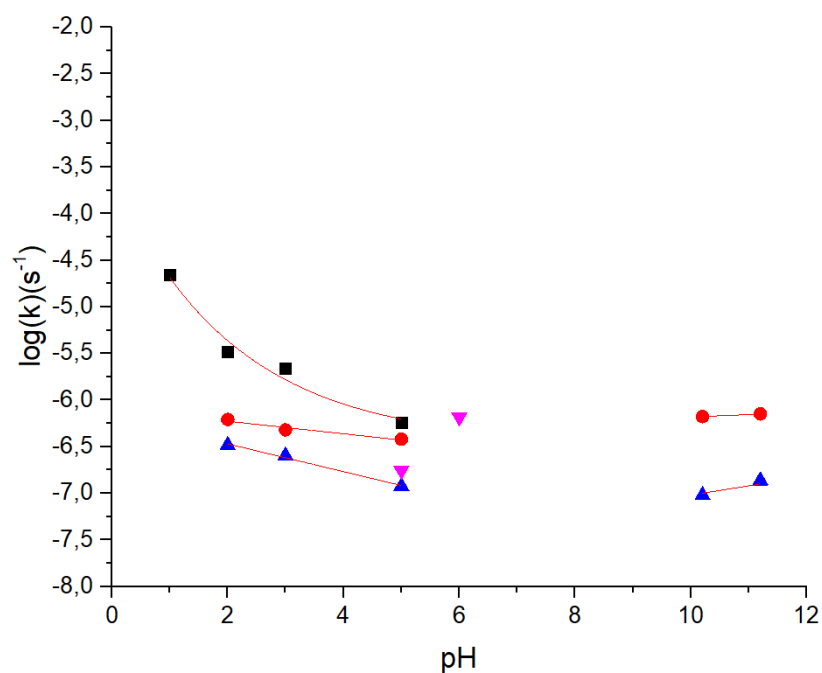
### 2.1.2 pH-nopeusprofiili

Dimeerin **13** hydrolyysin pH-nopeusprofiili pH-alueella 1–11,2 on esitetty kuvassa 16 ja osareaktioille kuvassa 17. Dimeerin **13** kokonaishäviämisen ja osareaktioiden nopeusvakiot sekä puoliintumisajat on esitetty taulukossa 2. Lähtöaineen pilkkoutuminen noudattaa happamissa olosuhteissa (pH 1–2) ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaa hydroniumionin konsentraation suhteen. Pilkkoutuminen on pH:sta riippumatonta, kun pH on > 2. Havaitut depyridiminaatioiden nopeudet ovat lähes pH:stä riippumattomia. Depyrimidinaatio urasiiliksi on nopeampi reaktio kuin tymiinin irtoaminen, mikä on sopusoinnussa aikaisempien tutkimuksien kanssa.<sup>57</sup> Esimerkiksi, lievästi happamissa olosuhteissa urasiili irtoaa noin kaksi kertaa nopeammin kuin tymiini, kun emäksisissä olosuhteissa urasiilin irtoaminen on noin seitsemän kertaa nopeampaa kuin tymiinin irtoaminen. Dimeerin **13** hapettumisen nopeusvakio pH:ssa 6 on  $6,55 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .



**Kuva 16.** pH-nopeusprofiili lähtöaineen **13** kokonaishäviämiselle.





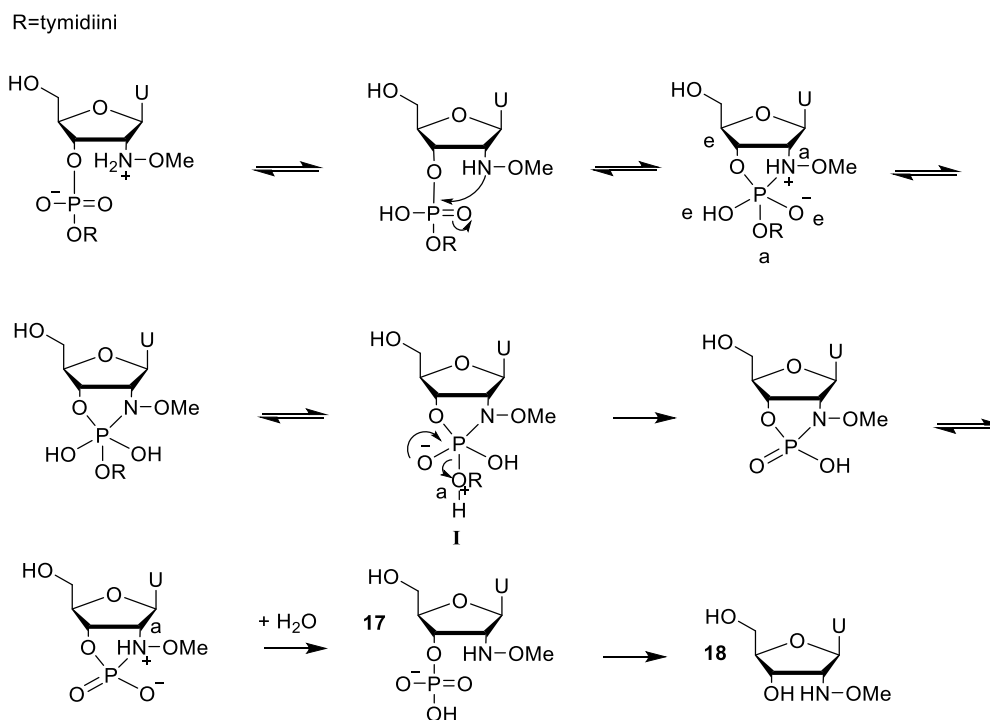
**Kuva 17.** pH-nopeusprofiili lähtöaineen **13** osareaktioille. Musta neliö = pilkkoutuminen, punainen ympyrä = urasiilin irtoaminen, sininen kolmio = tymiinin irtoaminen, pinkki kolmio = lähtöaineen hapettuminen

**Taulukko 2.** Havaitut lähtöaineen **13** kokonaishäviämisen ja osareaktioiden nopeusvakiot sekä puoliintumisajat lämpötilassa 90 °C.

pH	$k_{hav} / 10^{-6} s^{-1}$	$t_{1/2, hav} / h$	$k_{pilkk} / 10^{-6} s^{-1}$	$k_{ura} / 10^{-6} s^{-1}$	$k_{thy} / 10^{-6} s^{-1}$	$k_{hap} / 10^{-6} s^{-1}$
1	25,9	7,45	22,2			
2	4,24	45,2	3,30	0,618	0,327	
3	2,93	65,6	2,20	2,64	0,253	
3,5	0,900	214				
5	1,25	154	0,575	0,380	0,119	0,176
6	0,694	301				0,655
9	0,615	313				
10,2	0,760	253		0,665	0,095	
11,2	0,846	228		0,709	0,137	

### 2.1.3 Reaktiomekanismit

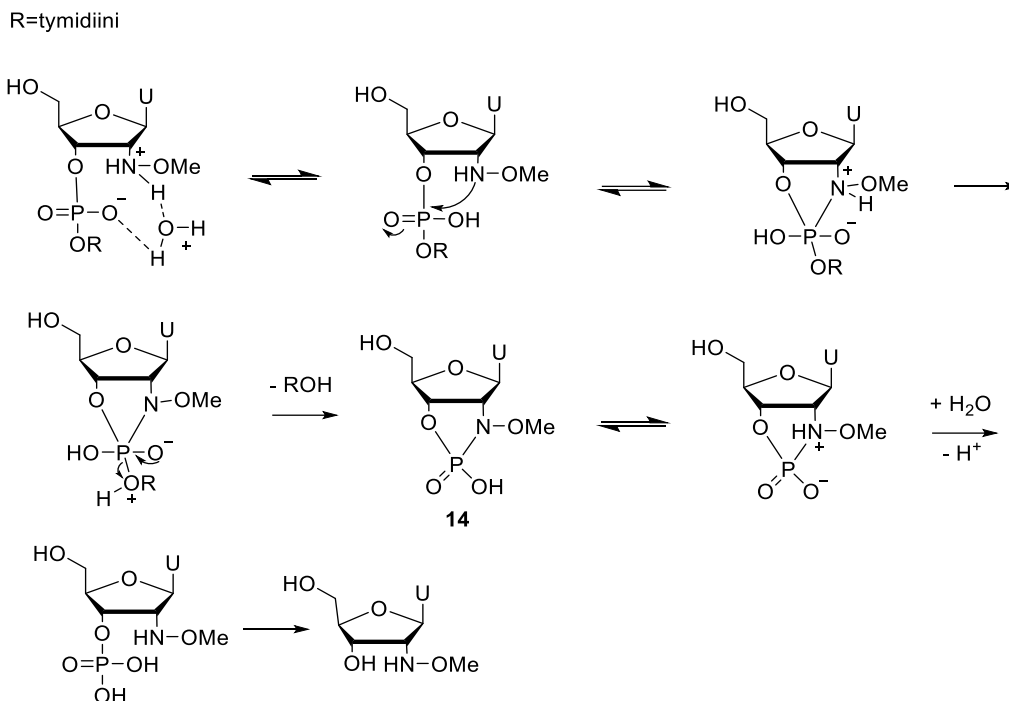
**Happokatalyyttinen pilkkoutuminen.** 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin (**13**) 2'-metoksiaminoryhmän  $pK_a$ -arvo on noin 4,8.<sup>58</sup> Näin ollen vallitseva ionimuoto happamissa olosuhteissa ( $pH < 5$ ) on neutraali kahtaisioni. Reaktion ollessa 1. kertalukua hydroniumionin konsentraation suhteen, reaktiivinen ionimuoto on monokationi. Mekanistisesti, P-N-sidoksen pilkkoutumisessa protoni siirtyy nopeassa esitasapainossa 2'-metoksiaminon typeltä fosfodiesterisidoksen hapelle (Kaavio 4). 2'-Aminometoksiryhmän typen hyökätessä fosforiin muodostuu syklinen pentakoordinaatiivinen fosforaaniväliuote. Nopeutta rajoittavassa vaiheessa 5'-O protonoituu ja muodostunut syklinen väliuote **I** hajoaa Westheimerin sääntöjen<sup>4</sup> mukaisesti P-O-sidoksen katketessa apikaalisesta asemasta sykliseksi fosforamidaatiksi **14**, joka hydrolysoituu edelleen mitä todennäköisimmin 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini-3'-monofosfaatin kautta (**17**) 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiiniksi (**18**).



**Kaavio 4.** Happokatalyyttinen pilkkoutuminen. Piirretty mukailleen Ora *et al.*<sup>56</sup>

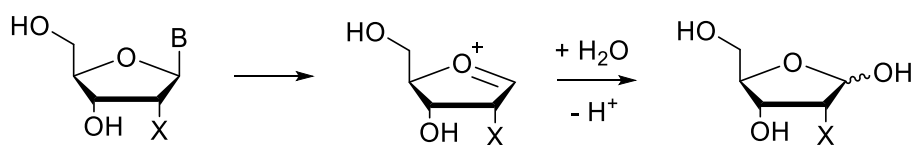
**pH:sta riippumaton pilkkoutuminen.** pH-nopeusprofiilin perusteella pilkkoutuminen on pH:sta riippumattonta lievästi happamissa olosuhteissa ( $pH > 2$ ). Näissä olosuhteissa reaktio tapahtuu näin ollen neutraalin ionimuodon kautta. Eräs mekanismivaihtoehto on protonin siirto veden välityksellä typeltä hapelle (Kaavio 5). Tämän jälkeen 2'-N hyökkää

apikaalisesta asemasta fosforiin muodostaen pentakoordinaatiivisen fosforaanivälituotteen. P-O5'-sidoksen katketessa 5'-hapon protonoitessa, tymidiini irtoaa ja muodostuu syklinen intermediaatti **14**, joka hydrolysoituu edelleen aminouridiiniksi.



**Kaavio 5.** pH:sta riippumaton pilkkoutuminen. Piirretty mukaillen Ora *et al.*<sup>56</sup>

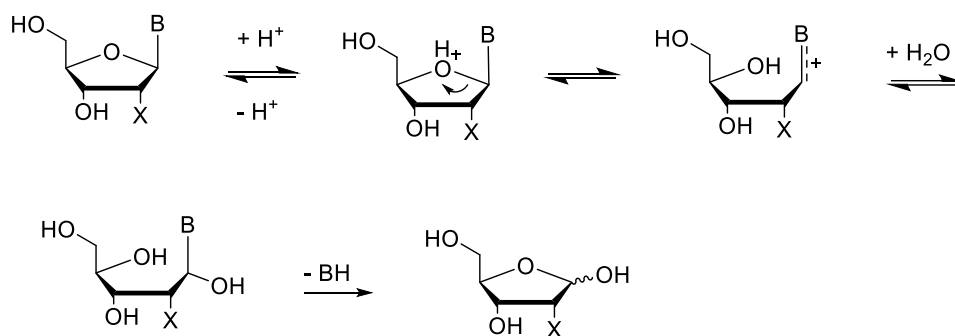
**pH:sta riippumaton depyrimidinaatio.** *N*-Glykosidisen sidoksen hydrolyysin todettiin olevan pH:sta riippumaton pH-alueella 2–5. Todennäköisesti nukleosidin emäksen irtoaminen unimolekulaarisesti tuottaa syklisen oksokarbeniumionin, johon vesi hyökkää (Kaavio 6). Mekanismi eroaa happokatalysoidulle *N*-glykosidisen sidoksen katkeamiselle ehdotetusta mekanismista, joka tapahtuu todennäköisemmin renkaan aukeamisella O4'-hapon protonaation jälkeen (Kaavio 7).<sup>59</sup>



B = urasiili tai tymiini  
X = H tai NHOMe

**Kaavio 6.** pH:sta riippumaton depyrimidinaatio. Piirretty mukaillen Ora *et al.*<sup>60</sup>

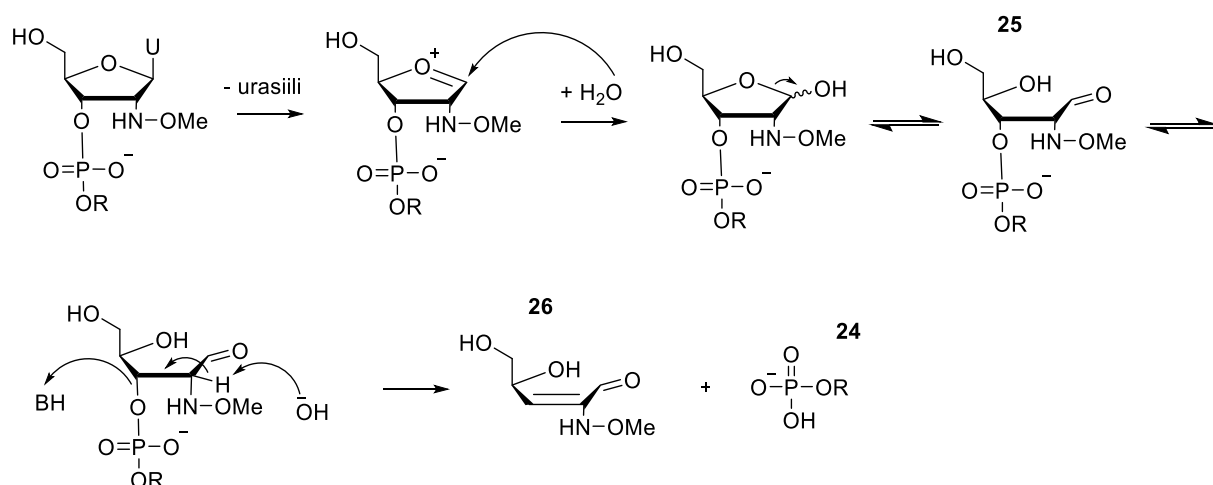
B = urasiili tai tymiini  
X = H tai NHOMe



**Kaavio 7.** Depyrimidinaatio hapossa. Piirretty mukaillen Oivanen *et al.*<sup>59</sup>

Emäksisissä olosuhteissa (pH 10-11) havaittiin, että *N*-glykosidisen sidoksen katkettua ja oksokarbeniumionin hydrolysoituttua sokerirengas aukeaa eliminaatiomekanismissa 4,5-dihydroksi-2-(metoksiamino)pent-2-enaaliksi (**26**) ja 5'-TMP:ksi (**24**) (Kaavio 8).

R=tymidiini

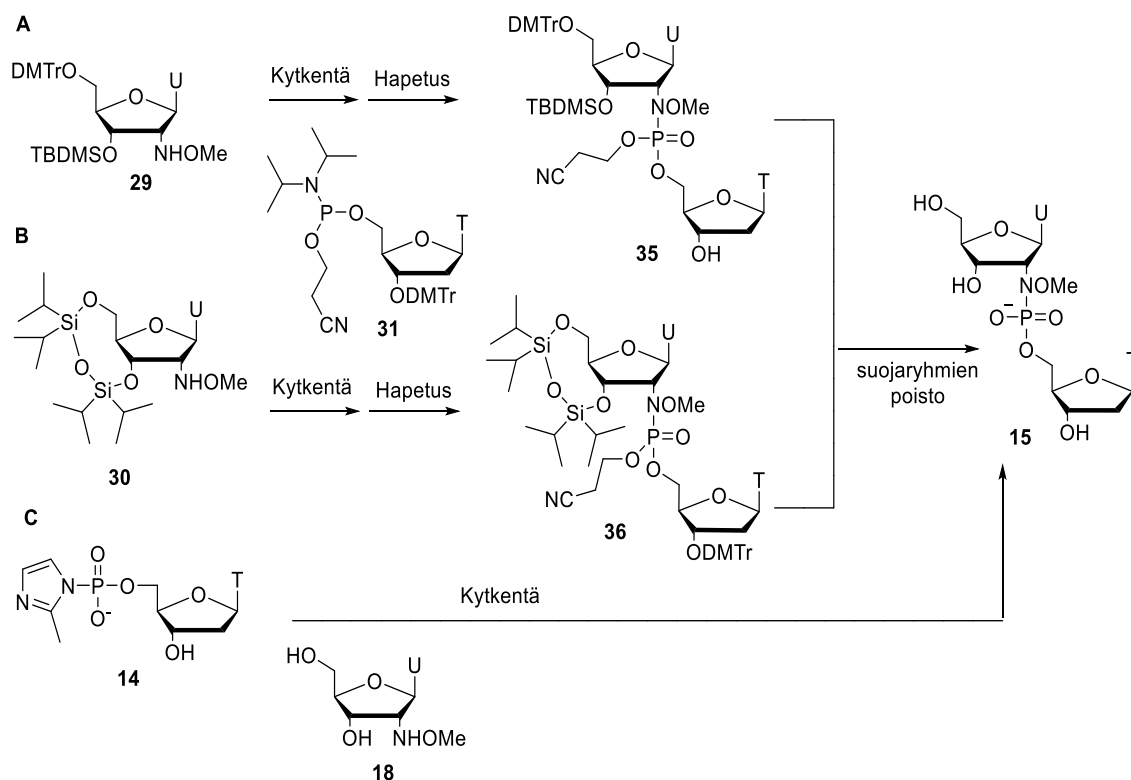


**Kaavio 8.** Uraasiilin irtoaminen ja sitä seuraava eliminaatioreaktio emäksessä. Piirretty mukaillen Gatesin artikkelista.<sup>61</sup>

## 2.2. 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-*N*-fosforamidaatin) synteetit

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** syntetisoimiseksi käytettiin P(III)- ja P(V)-kemialla. Fosforamidiittimenetelmää käytettäessä lähtöaineena kytkennässä oli 5'-(4,4'-dimetoksitriityyli)-3'-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini (**29**; Kaavio 9 A) tai 2'-

deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani-1,3-diiyli)uridiini (**30**; Kaavio 9 B) sekä kaupallinen 5'-(4,4'-dimetoksitriityyli)-tymidiini-5'-fosforamidiitti (**31**). P(V)-kemiaa sovellettaessa tymidiini-5'-monofosfaatti aktivoitiin metyyli-imidatsolilla fosforimidatsolidiksi **14** ja kytkentä suoritettiin vesiliuoksessa (Kaavio 9 C).



**Kaavio 9.** Dinukleosidifosforamidaatin **15** yleinen synteesikaavio.

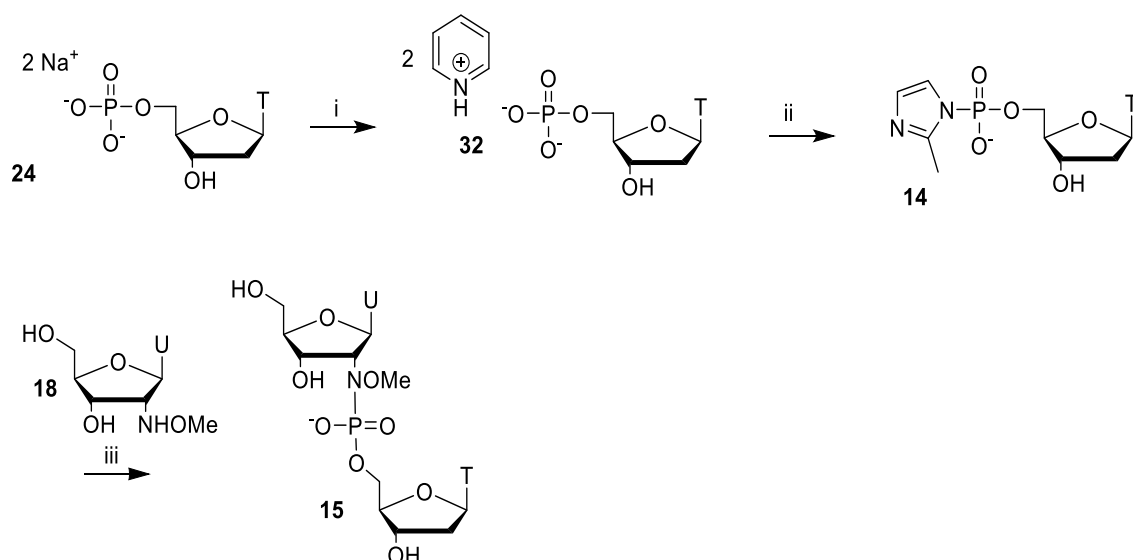
### 2.2.1 Fosforimidatsolistrategia

Tymidiinimonofosfaatin dinatriumsuola **24** muutettiin pyridinium-muotoisella Dowex-ioninvaihtohartsilla tymidiinimonofosfaatin dipyridiniumsuolaksi **32** (Kaavio 10). Yhdiste **32** aktivoitiin liittämällä sen fosfaattiosaan 2-metyyli-imidatsoli DMSO:ssa. Seuraavassa vaiheessa oli tarkoitus korvata vesiliuoksessa tymidiini-5'-*O*-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatin **14** imidatsoliryhmä 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinilla **18** dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** muodostamiseksi. Kytkentää seurattiin vesiliuoksissa 25 °C:ssa pH:ssa 5, 7 ja 9. Yhdisteen **14** havaittiin hydrolysoituvan pääasiassa tymidiini-5'-monofosfaatiksi (**24**) (Kaavio 11) kaikissa tutkituissa reaktioluoksissa. Lisäksi havaittiin pieni määrä dimeeriä **33** (3-5 %) pH:ssa 5 ja 7 (Kaavio 12). Yhdisteen **14** hydrolyysi on pH:ssa 7 ( $t_{1/2} = 60,4$  h) 1,3-kertaisesti hitaampi

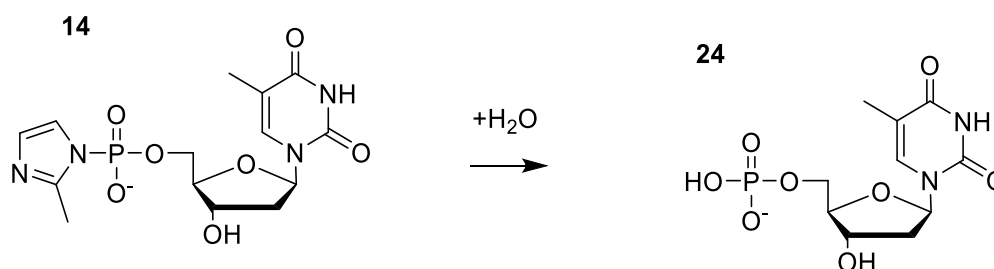
kuin pH:ssa 5 ( $t_{1/2} = 46,5$  h). Reaktio hidastuu edelleen emäksisissä olosuhteissa, ja pH:ssa 9 ( $t_{1/2} = 101$  h) hydrolyysi on 1,67-kertaisesti hitaampi kuin pH:ssa 7. Yhdisteen **14** hajoamisen nopeusvakiot ja puoliintumisajat ovat koottuina taulukossa 3. Nukleosidin tyypiatomin nukleofiilistä hyökkäystä fosforiatomiin ei havaittu.

**Taulukko 3.** Ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiot ja puoliintumisajat yhdisteen **14** hydrolyysille lämpötilassa 25 °C.

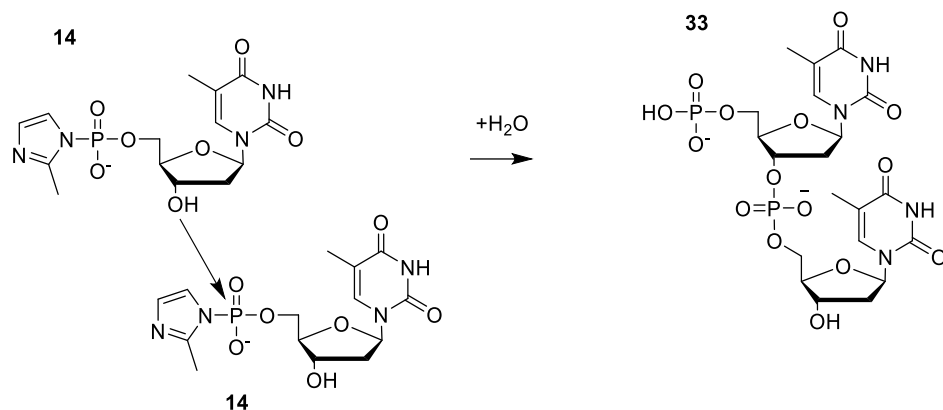
pH	$k / 10^{-6} \text{ s}^{-1}$	$t_{1/2} / \text{h}$
5	4,14	46,5
7	3,19	60,4
9	1,89	102



**Kaavio 10.** Dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** synteesi käyttäen fosforimidatsolistrategiaa. i) pyridiniummuotoinen Dowex-ioninvaihtohartsii) 2-metyyli-imidatsoli, trifenyylifosfiini, 2,2'-dipyridylsulfidi, TEA, DMSO iii) H<sub>2</sub>O



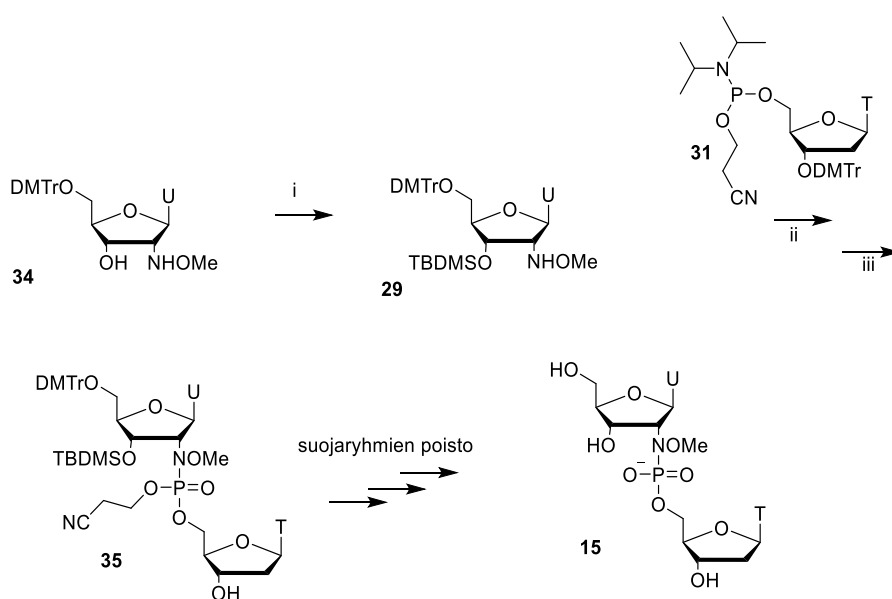
**Kaavio 11.** Yhdisteen **14** hydrolyysi.



**Kaavio 12.** Tymidiini-5'-*O*-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatin **14** dimeroituminen.

### 2.2.2 TBDMS-suojaryhmästrategia

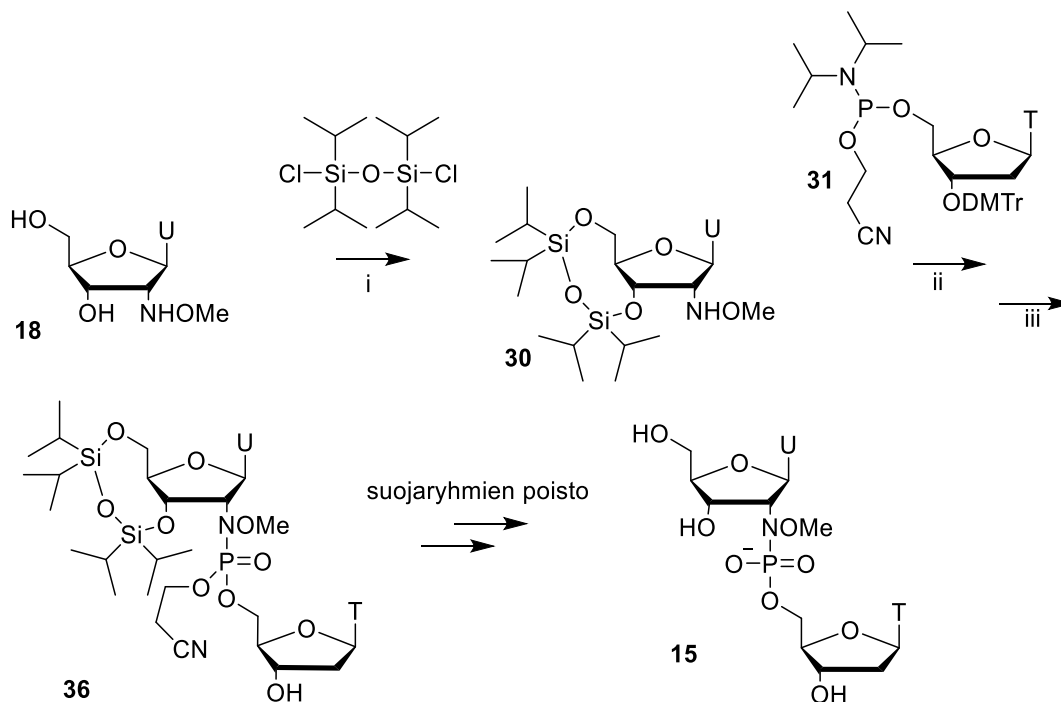
4,4'-Dimetoksitriityyli-2'-deoksi-2'-(metoksiamido)uridiinin **34** 3'-hydroksyyli-ryhmä suojattiin *tert*-butyylidimetoksisilyyllillä käsittelemällä yhdistettä **34** *tert*-butyylidimetoksisilyylikloridilla pyridiinissä (Kaavio 13). 3'-*O*-TBDMS-suojaryhmästrategiassa 5'-(4,4'-dimetoksitriityyli-3'-*tert*-butyylidimesilyyli-2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini (**29**) kytkettiin dimetoksitriityyli-suojatun tymidiini-5'-fosforamidiitin **31** kanssa asetonitrilissä käyttäen aktivaattorina 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetratsolia. Fosfiitin hapettamiseksi fosfaatiksi **35** käytettiin jodin vesiliuosta. Haluttua tuotetta ei kuitenkaan muodostunut.



**Kaavio 13.** Dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** synteesi käyttäen TBDMS-suojaryhmästrategiaa. i) TBDMS-Cl, pyridiini ii) 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetratsoli, MeCN iii) Oxidizer tai I<sub>2</sub>, THF, H<sub>2</sub>O, 2,6-lutidiini

### 2.2.3 Markiewicz-suojaryhmästrategia

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-*N*-fosforamidaatin) syntetisoimiseksi 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini **18** silyloitiin 1,3-dikloro-1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaanilla pyridiinissä (Kaavio 14). 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani-1,3-diyyli)uridiini (**30**) kytkettiin dimetoksitriptyyli-suojatun tymidiini-5'-fosforamidiitin **31** kanssa asetonitrilissä käyttäen aktivaattorina 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetratsolia ja fosfiitti hapetettiin jodin vesiliuoksella vastaavaksi fosfaatiksi **36**. Tuotetta ei kuitenkaan havaittu muodostuvan.



**Kaavio 14.** Dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** synteisi käyttäen Markiewicz-suojaryhmästrategiaa. i) pyridiini ii) 5-(bentsyylitio)-1*H*-tetratsoli, MeCN iii) I<sub>2</sub>, THF, H<sub>2</sub>O, 2,6-lutidiini

### 3 Johtopäätökset ja yhteenveto

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin (**13**) hydrolyyttisiä reaktioita seurattiin vesiliuoksissa 90 °C:n lämpötilassa pH-alueella 1–11,2. Happamissa olosuhteissa dimeerin pilkkoutuminen ja depyrimidinaatio kilpailevat. Lievästi happamissa olosuhteissa depyrimidinaatio kilpailee selkeästi pilkkoutumisen kanssa.



Lievästi happamissa olosuhteissa dimeeri myös hapettuu ja hapettuminen on pääreaktio pH:ssa 6. Emäksisissä olosuhteissa depyrimidinaatio on vallitseva reaktio.

Dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** synteesiyritykset eivät onnistuneet. 2-NHOMeUrd:n **18** metoksiaminoryhmän nukleofiilista hyökkäystä tymidiini-5'-*O*-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatin **14** fosforiin ei havaittu. Vesiliuoksessa tymidiini-5'-*O*-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatin **14** havaittiin hydrolysoituvan 5'-TMP:ksi. Käytettäessä TBDMS- ja Markiewicz-suojaryhmästrategioita dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** muodostumista tuotteena ei havaittu. Syynä saattaa olla yhdisteiden **35** ja **36** nopea hydrolyyttinen hajoaminen hapetettaessa.

Tutkimustulosten mukaan metoksiaminoryhmä ei katalysoinut fosfodiesterisidoksen muodostumista. Voidaankin olettaa, että metoksiaminoryhmä on vähemmän nukleofiilinen kuin mitä arvioitiin tai metoksiaminoryhmä saattaa myös olla niin hyvä lähtevä ryhmä, ettei pysyviä tuotteita muodostu.

## 4 Kokeelliset menetelmät

### 4.1 Yleiset menetelmät

Asetonitriili ja 5-(bentsyyllitio)tetratsoli kuivattiin 3 Å molekyylliseuloilla. Pyridiini kuivattiin 4 Å molekyylliseuloilla. Kiinteät reagenssit kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa fosforipentoksidin kanssa. NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz AVANCE-III – NMR-spektrometrillä. Massaspektrit mitattiin Agilent 6120 kvadrupoli LC-ESI-MS:llä. Kinetiikkatutkimuksissa reaktioiden etenemistä seurattiin PerkinElmer Flexar HPLC:llä käyttäen Hypersil C18 kolonnia (4,6 x 250 mm x 5 µm).

### 4.2 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin kineettiset mittaukset

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3'-5'-tymidiinin **13** hydrolyysiä seurattiin vesiliuoksissa 90 °C:n lämpötilassa pH-alueella 1–11.2. Reaktioliuosten hydroniumionin konsentraatio laskettiin kirjallisuudesta löytyvien  $pK_a$ -arvojen perusteella ja säädettiin vetykloridilla, formaatti-, asetaatti- HEPES-, MES-, glysiini ja fosfaatti-puskureilla ((pH = 1; 0,1 M HCl), (pH = 2; 0,01 M HCl), (pH = 3; 0,05 M/0,01 M HCOOH/HCOONa), (pH = 4; 0,02 M/0,04 M HCOOH/HCOONa), (pH = 5; 0,02 M/0,04 M CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa), (pH = 6; 0,048 M/0,012 M HEPES/HEPESNa), (pH = 7; 0,02 M/0,04 M HEPES/HEPESNa), (pH = 8; 0,04 M/0,02 M Gly/GlyNa), (pH = 9;

0,01 M/0,05 M Gly/GlyNa), (pH = 10,2; 0,044 M/0,016 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Na) ja (pH = 11,2; 0,013 M/0,047 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Na). Reaktioliuosten ionivahvuudet säädettiin 0,1 M:iin NaCl:n avulla. Temperoituun reaktioliuokseen (1980 µl) lisättiin 20 µl yhdisteen **13** kantaliuosta. Reaktioäytteet (130 µl) otettiin sopivin väliajoin ja pysäytettiin jäädyttämällä jäävesihauteessa sekä neutraloimalla joko natriumasetaatilla tai etikkahapolla (pH 1 26 µl 2 M AcONa; pH 2 20 µl 0,2 M AcONa; pH 3 10 µl 2 M AcONa; pH 3,5 9 µl 2 M AcONa; pH 4 8 µl 2 M AcONa; pH 5 5 µl 2 M AcONa; pH 9 5 µl 2 M CH<sub>3</sub>COOH; pH 10,2 3 µl 2 M CH<sub>3</sub>COOH ja pH 11,2 8 µl 2 M CH<sub>3</sub>COOH). Reaktion etenemistä seurattiin RP-HPLC:llä käyttäen eluenteina trietyyliammoniumasetaattia (50 mM) ja asetonitriiliä. Asetonitriilin pitoisuutta kasvatettiin ensimmäisen kolmen minuutin aikana kahteen prosenttiin, minkä jälkeen asetonitriilin pitoisuutta nostettiin seuraavan 30 min aikana 50 %:iin. Injektiotilavuus oli 45 µl:aa. Detektioaallonpituus oli 266 nm. Hydrolyysissä muodostuneet hajoamistuotteet identifioitiin vertailemalla retentioaikoja kaupallisiin referensseihin tai massaspektrometrisesti. Massa-analyysissä asetonitriilin pitoisuus nostettiin ensimmäisen 10 min aikana 2 %:iin ja sitten seuraavien 30 min aikana 60 %:iin. Eluenteina käytettiin muuraishapon vesiliuos (0,1 %) ja asetonitriiliä.

Pseudo-ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiot lähtöaineen **13** häviämislle laskettiin käyttäen integroitua 1. kertaluvun nopeusyhtälöä (kaava 1).

$$\ln[\mathbf{13}]_t = -k_1 t + \ln[\mathbf{13}]_0 \quad (1)$$

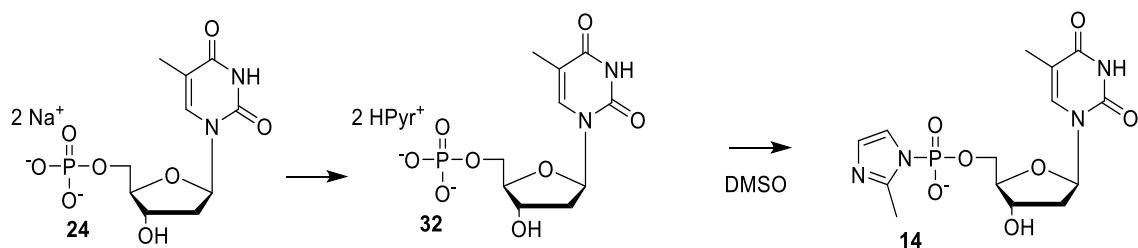
Reaktioiden puoliintumisajat laskettiin kaavalla 2.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2)$$

Osareaktioiden nopeusvakiot laskettiin kaavalla 3, jossa [13]<sub>0</sub> ja [13]<sub>t</sub> ovat lähtöaineen konsentraatiot reaktion alussa ja hetkellä *t*. Kaavassa 3 *x* tarkoittaa yhdisteen **18**, **21** tai **24** konsentraatiota ajanhetkellä *t* korjauskerroin huomioituna (*x* = 2 x **18**, 2 x **21** tai 2 x **24**).

$$k_x = \frac{[x]}{[\mathbf{13}]_0 - [\mathbf{13}]_t} \quad (3)$$

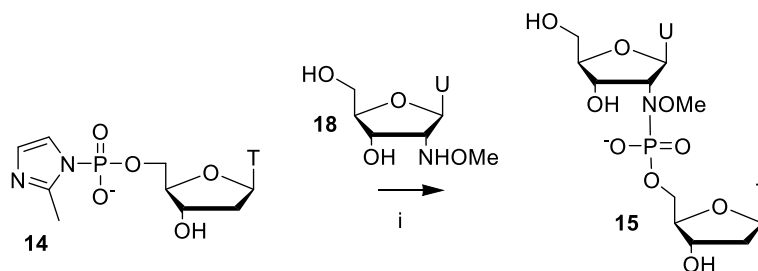
### 4.3 Tymidiini-5'-O-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatti



**Kaavio 15.** Reagenssit: 2-metyyli-1H-imidatsoli, TEA, trifenyylifosfiini, 2,2'-dipyridylsulfidi

Synteesissä noudatettiin aiemmin julkaistua menetelmää (Kaavio 15).<sup>35</sup> Tymidiini-5'-monofosfaatin dinatriumsuola **24** (0,825 mmol, 302 mg) muutettiin pyridiniummuotoon **32** käyttäen pyridiniummuotoon muutettua Dowex 50W X8 ioninvaihtohartsia. Yhdiste **24** liuotettiin veteen (3 ml), siirrettiin ioninvaihtopylvääseen ja eluoiitiin vedellä. UV-aktiiviset fraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Haihdutusjäännös haihdutettiin alipaineessa kuivasta pyridiinistä (2 x 10 ml). Haihdutusjäännös kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. Saanto oli 306 mg (76,2 %). Tymidiini-5'-monofosfaatin dipyridiniumsuola **32** (399 mg, 0,828 mmol) liuotettiin DMSO:hon (9,4 ml) ja reaktioluokseen lisättiin 2-metyyli-1H-imidatsoli (1,093 g, 13,31 mmol), TEA (270 µl, 1,94 mmol), trifenyylifosfiini (763 mg, 2,91 mmol) ja 2,2'-dipyridylsulfidi (611 mg, 2,77 mmol) typpisuojakaasussa. Seoksen annettiin reagoida 2 h ajan. Reaktioseos lisättiin typpisuojakaasussa pisaroittain jääkylmän NaClO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (185 mg, 1,32 mmol), kuivan asetonin (82 ml) ja kuivan eetterin (52 ml) liuokseen ja liuosta sekoitettiin 20 min jäähauteessa. Muodostunut sakka suodatettiin, ja sitä pestiin asetonii:eetteri- liuoksella (4 x 50 ml, 1:1, v/v) kunnes sakan keltainen väri katosi. Sakka kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. Tuotteen **14** saanto oli 177 mg (55,4 %). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500MHz): δ = 11.24 (1H, s, NH) 7.76 (1H, s, H6), 7.10 (1H, s, imidatsoli), 6.72 (1H, s, imidatsoli), 6.19 (1H, t, *J* = 5 Hz, H4'), 5.29 (1H, s, 3'-OH), 4.17 (1H, s, H3'), 3.79 (1H, s, H1'), 3.69 (2H, t *J* = 10 Hz, H5', H5''), 2.42 (3H, s, CH<sub>3</sub> imidatsoli), 2.09 (2H, m, *J* = 5 Hz, H2', H2''), 2.03 (1H, m, *J* = 5 Hz, P-OH), 1.82 (3H, s, CH<sub>3</sub> tymiini). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz): δ = 164.24, 150.97, 146.80, 143.88, 136.59, 124.51, 122.45, 110.25, 86.10, 84.21, 71.35, 65.38, 31.16, 14.94, 12.10.

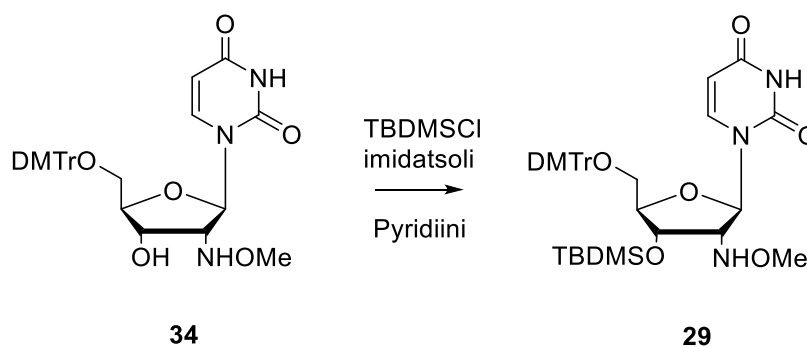
#### 4.4 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-*N*-fosforamidaatin) synteesi fosforimidatsoli-strategialla vesiliuoksessa



**Kaavio 16.** Reagenssit: i) H<sub>2</sub>O

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridiinin **18** kytkentäreaktioita (Kaavio 16) seurattiin 25 °C:ssa puskuriliuoksissa pH:ssa 5,5 (0,16 M/0,04 M MES/MesNa), 7 (0,15 M/0,05 M HEPES/HEPESNa) ja 7,9 (0,06 M/0,14 M HEPES/HEPESNa). Puskuriliuosten ionivahvuus säädettiin magnesiumkloridilla (0,08 M) ja natriumkloridilla (0,4 M). Yhdisteen **14** kantaliuosta (0,26 M; 3,4 µl) ja yhdisteen **18** kantaliuosta (0,30 M; 3,0 µL) lisättiin 43,6 ml:aan puskuriliuosta. Reaktioliuoksesta otettiin 5 µl:n näytteitä, jotka pysäytettiin 0,1 molaarisella trietyyliammoniumasetaatilla (198 µl) pH:ssa 5,5 ja 7. pH:ssa 7,9 käytettiin 28,1 µL trietyyliammoniumliuosta (0,1 M). Reaktioiden etenemistä seurattiin RP-HPLC:llä. Eluentteina käytettiin trietyyliammoniumasetaattia (50 mM) ja asetonitriiliä, jonka pitoisuus kasvatettiin 20 min:ssa 60 %:iin. Injektioilavuus oli 14 µl. Yhdisteen **14** havaittiin hydrolysoituvan pääasiassa tymidiini-5'-monofosfaatiksi (**24**). Sivutuotteena muodostuu myös dinukleosidia pTpT (**33**) (3–5 %). Dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaatin) **15** ei havaittu muodostuvan.

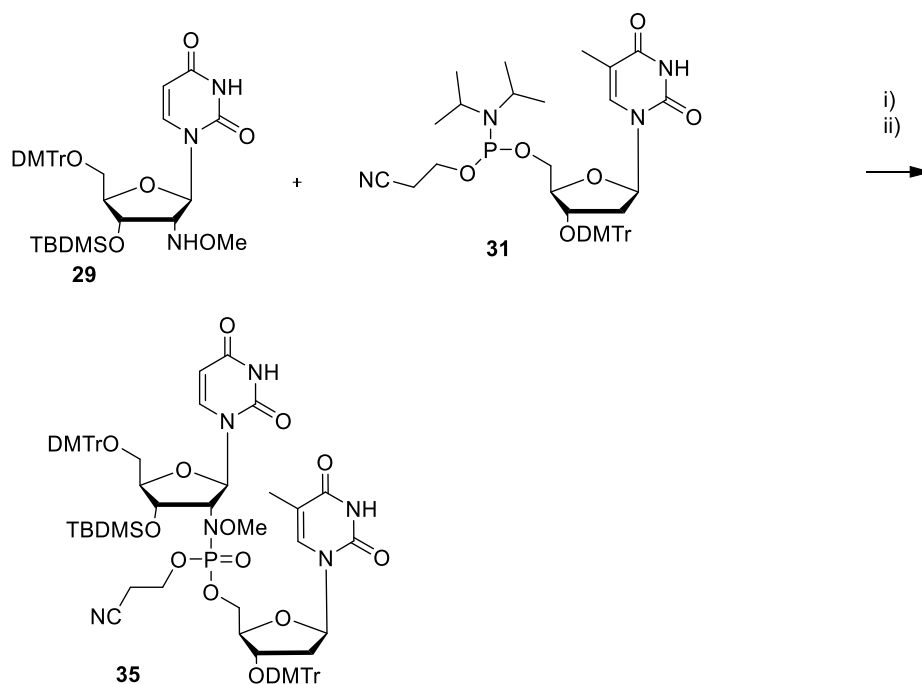
#### 4.5 5'-(4,4'-dimetoksitriityyli)-3'-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini



**Kaavio 17.** 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3'-*O*-TBDMS-5'-*O*-DMTr-uridiinin synteesi.

Synteesissä sovellettiin aiemmin julkaistua menetelmää (Kaavio 17).<sup>62</sup> 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-5'-*O*-DMTr-uridiini **34** (187 mg, 0,325 mmol) ja imidatsoli (95 mg, 1,4 mmol) kuivattiin haihduttamalla kolme kertaa kuivasta pyridiinistä alipaineessa. Yhdiste **34** liuotettiin kuivaan pyridiiniin (2,0 ml) ja reaktioseokseen lisättiin TBDMSCl (63 mg, 0,42 mmol). Seosta sekoitettiin lämpötilassa 43 °C ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä. Ajoliuoksena käytettiin metanolin ja etyyliasetaatin seosta (5:95, v:v) tai etyyliasetaattia. Reaktiota sekoitettiin yön yli lämpötilassa 32 °C, minkä jälkeen reaktioliuokseen lisättiin TBDMSCl (26 mg, 0,17 mmol) kuivassa pyridiinissä (0,3 ml), koska reaktion todettiin olevan kesken. Reaktiota sekoitettiin yön yli lämpötilassa 32 °C. Reaktio oli vieläkin kesken, joten reaktioon lisättiin TBDMSCl (27 mg, 0,18 mmol). Reaktiota sekoitettiin yön yli lämpötilassa 32 °C. Reaktioliuos haihdutettiin alipaineessa ja haihdutusjäännös siirrettiin erotussuppiloon DCM:llä (80 ml). Orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:lla (2 x 30 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin etyyliasetaattia, jossa oli 1 % pyridiiniä. Tuotteen **29** saanto oli 98 mg (44 %). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz): δ = 11.37 (1H, s, NH) 7.74 (1H, d, *J* = 10 Hz, H6) 7.37 (2H, d, *J* = 5 Hz, Ar) 7.32 (2H, t, *J* = 10 Hz, Ar) 7.25 (5H, d, *J* = 5 Hz, Ar) 6.90 (4H, d, *J* = 10 Hz, Ar) 6.38 (1H, d, *J* = 10 Hz, Ar) 5.86 (1H, d, *J* = 5 Hz, Ar) 5.50 (1H, d, *J* = 10 Hz, H5) 4.34 (1H, t, *J* = 5 Hz, H3') 3.91 (1H, m, *J* = 5 Hz, H1', H4') 3.74 (7H, m, *J* = 10 Hz, CH<sub>3</sub> DMTr) 3.42 (3H, s, H2', H5', H5'') 0.84 (3H, s, NHOMe) 0.79 (9H, s, silyylin *tert*-butyyli) 0,04 (3H, s, CH<sub>3</sub> silyyli) <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz): δ = 163.45, 158.66, 150.86, 145.00, 141.80, 136.63, 135.73, 130.19, 128.35, 127.29, 124.37, 113.70, 102.36, 86.50, 84.12, 26.27, 18.20, -4.49.

#### 4.6 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-N-fosforamidaatin) synteesi käyttäen TBDMS-suojaryhmästrategiaa

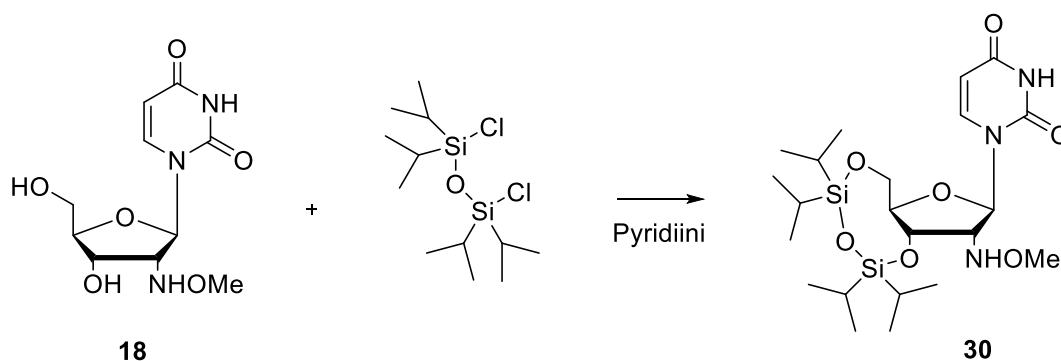


**Kaavio 18.** Reagenssit: i) MeCN, 5-(bentsyylitio)-1H-tetratsoli ii) Oxidizer

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3'-O-TBDMS-5'-O-DMTr-uridiini **29** (44 mg, 0,077 mmol) kuivattiin haihuttamalla alipaineessa kuivasta asetonitriilistä (Kaavio 18). Yhdiste **29** ja tymidiini-5'-fosforamidiitti **31** kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa fosforipentoksidin päällä. Yhdiste **29** (44 mg, 0,077 mmol) liuotettiin typpisuoja-kaasussa kuivaan asetonitriiliin (1 ml). Reaktioseokseen lisättiin tymidiini-5'-fosforamidiitti **31** (64 mg, 0,086 mmol) ja 5-(bentsyylitio)-1H-tetratsoli (0,092 mmol, 0,37 ml, 0,25 M asetonitriilissä). Reaktiota seurattiin  $^{31}\text{P}$ -NMR:llä. NMR:n perusteella reaktiota ei ollut tapahtunut 1 h 45 min kuluttua, joten reaktioseokseen lisättiin 5-(bentsyylitio)-1H-tetratsolia (0,31 ml). Uusi NMR-näyte otettiin 3 h reaktion aloittamisesta, jonka perusteella reaktioseokseen päätettiin lisätä hapetin (Oxidizer, 0,02 M, Sigma Aldrich) aluksi 5,2 ml ja 30 min jälkeen hapetinta lisättiin vielä 1 ml. Reaktiota sekoitettiin yön yli. Reaktioseos siirrettiin DCM:n (40 ml) avulla erotussuppiloon. Orgaanista faasia pestiin 10 %:lla  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ : vesiliuoksella (2 x 25 ml) ja kylläisellä NaCl:lla (2 x 20 ml). Orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin, ja se kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa fosforipentoksidin päällä. LC/MS-analyysissä ei löytynyt dinukleosidi-2',5'-(2'-N-fosforamidaattia) **15**.

Synteesi toistettiin mutta fosfiitti hapetettiin 0,1 M:lla jodiliuoksella THF:n, veden ja 2,6-lutidiinin seoksessa (2,9 ml/1,4 ml/0,7 ml). Reaktiota sekoitettiin yön yli. Reaktioliuos siirrettiin erotussuppiloon 40 ml:lla DCM:ää. Orgaanista faasia pestiin Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:lla (3 x 25 ml) ja NaCl:n kylläisellä vesiliuoksella (2 x 25 ml). Toisen NaCl pesun aikana koko seos muuttui sameaksi. Erotussuppiloon lisättiin 25 ml DCM, ja faasit saatiin eroteltua. Orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin, ja se analysoitiin LC/MS:llä. Analyysissä ei löytynyt dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaattia) **15**.

#### 4.7 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani-1,3-diyyli)-uridiini

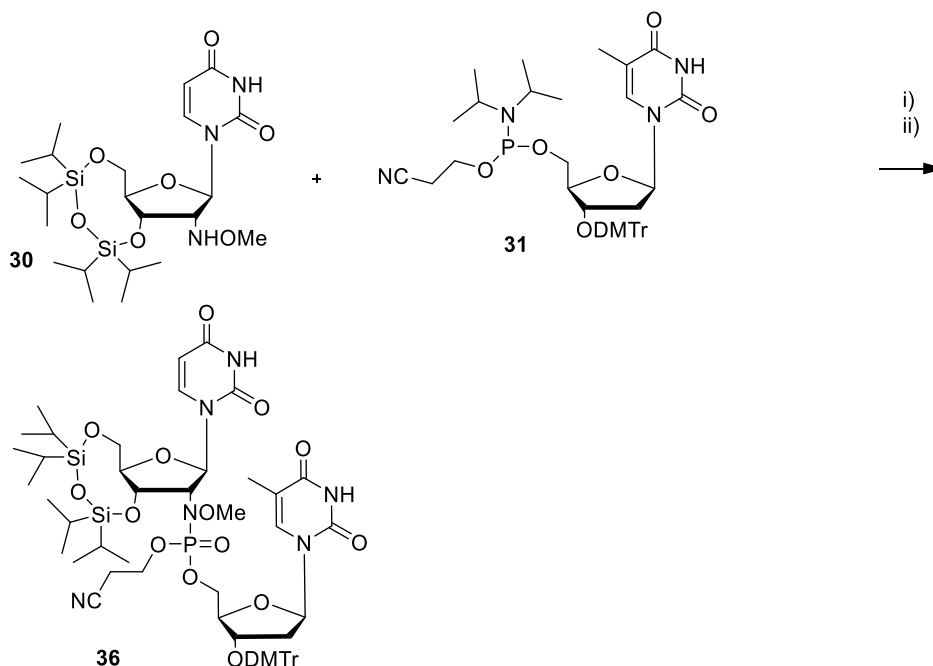


**Kaavio 19.** 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani-1,3-diyl)-uridiinin synteesi.

Synteesissä noudatettiin aiemmin julkaistua menetelmää (Kaavio 19).<sup>63</sup> 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridiini **18** (148 mg, 0,61 mmol) liuotettiin kuivaan pyridiiniin (1 ml). Reaktioliuokseen lisättiin 1,3-dikloro-1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani (0,210 ml, 0,668 mmol) ja reaktioliuosta sekoitettiin yön yli. Reaktio pysäytettiin lisäämällä reaktioseokseen metanolia (0,2 ml) ja reaktioliuosta sekoitettiin 10 min. Seokseen lisättiin kloroformia (20 ml), ja orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:lla (2 x 15 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja kuivattiin alipaineessa. Haihdutusjäännös haihdutettiin alipaineessa tolueenista (2 x 10 ml) ja kloroformista (2 x 15 ml). Haihdutusjäännös kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti. Aluksi ajoliuoksena käytettiin 15 % EtOAc:a DCM:ssä. EtOAc:n pitoisuutta nostettiin vaiheittain 50 %:iin. Tuotefraktiot haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Tuotteen **30** saanto oli 0,104 g (33,1)%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): = 7.64 (1H, d, *J* = 5 Hz, H6) 5.76 (1H, d, *J* = 5 Hz, H1') 5.71 (1H, d, *J* = 5 Hz,

H5) 4.64 (1H, s, H4') 4.06 (1H, d,  $J = 5$  Hz, H5') 4.04 (1H, s, H3', H2') 3.83 (3H, s, NHOMe) 1.28 (2H, s, silyyli CH<sub>2</sub>) 0.90 (1H, m,  $J = 2$  Hz, H2') 0.09 (1H, s, CH<sub>3</sub> silyyli)

#### 4.8 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-2',5'-tymidiini-(2'-*N*-fosforamidaatin) synteesi käyttäen Markiewicz-suojaryhmästrategiaa



**Kaavio 20.** Reagenssit: i) MeCN, 5-(bentsyylitio)-1H-tetratsoli ii) I<sub>2</sub>, THF, H<sub>2</sub>O, 2,6-lutidiini

2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani-1,3-diyli)-uridiini **30** (52 mg, 0,10 mmol) ja tymidiini-5'-fosforamidiitti **31** (89 mg, 0,11 mmol) liuotettiin kuivaan asetonitriiliin (1 ml) typpisuojakaasussa (Kaavio 20). Reaktioseokseen lisättiin 5-(bentsyylitio)-1H-tetratsoli (0,485 ml, 0,120 mmol). Reaktioseosta sekoitettiin yön yli, minkä jälkeen fosfiitti hapetettiin fosfaatiksi 0,1 M:lla jodiliuksella (THF 3,48 ml, H<sub>2</sub>O 1,68 ml, 2,6-lutidiini 0,84 ml). Reaktiota sekoitettiin yön yli. Reaktioliuos siirrettiin erotussuppiloon 40 ml:lla DCM:ää. Orgaanista faasia pestiin Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:llä (2 x 20 ml) ja kylläisellä NaCl-liuksella (2 x 20 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Massa-analyysissä ei löytynyt haluttua dinukleosidi-2',5'-(2'-*N*-fosforamidaattia) **15**.

Synteesi toistettiin. 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyylidisiloksaani-1,3-diyli)-uridiini **30** (47 mg, 0,092 mmol) ja tymidiini-5'-fosforamidiitti **31** (77 mg, 0,10 mmol) liuotettiin typpikaapissa asetonitriiliin (1 ml). Reaktioseokseen



lisättiin 5-(bentsyyllitio)-1H-tetratsoli (1,1 ml, 0,28 mmol). Reaktioliuokseen lisättiin hapetusliuos (0,1 M I<sub>2</sub>, 2,9 ml THF, 1,4 ml H<sub>2</sub>O, 0,7 2,6-lutidiini). Reaktioliuosta sekoitettiin yön yli, minkä jälkeen reaktioseos siirrettiin DCM:n (40 ml) avulla erotussuppiloon. Orgaaninen faasi haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Massa-analyysin perusteella tuotetta ei muodostunut.

## 5 Viitteet

1. Han, J., Kervio, E. & Richert, C. High Fidelity Enzyme-Free Primer Extension with an Ethynylpyridone Thymidine Analog. *Chemistry - A European Journal* **27**, 15918–15921 (2021).
2. Alberts, B. *Molecular biology of the cell*. (W. W. Norton & Company, 2022).
3. Frick, D. N. & Richardson, C. C. DNA Primases. *Annu Rev Biochem* **70**, 39–80 (2001).
4. Kaiser, A. & Richert, C. Nucleotide-based copying of nucleic acid sequences without enzymes. *Journal of Organic Chemistry* **78**, 793–799 (2013).
5. Westheimer, F. H. Pseudo-Rotation in the Hydrolysis of Phosphate Esters. *Acc Chem Res* **1**, 70–78 (1968).
6. Sosson, M. & Richert, C. Enzyme-free genetic copying of DNA and RNA sequences. *Beilstein J. Org. Chem* **14**, 603–617 (2018).
7. Schrum, J. P., Ricardo, A., Krishnamurthy, M., Blain, J. C. & Szostak, J. W. Efficient and rapid template-directed nucleic acid copying using 2'-amino-2',3'-dideoxyribonucleoside-5'-phosphorimidazole monomers. *J Am Chem Soc* **131**, 14560–14570 (2009).
8. Röthlingshöfer, M. *et al.* Chemical primer extension in seconds. *Angewandte Chemie - International Edition* **47**, 6065–6068 (2008).
9. Dörr, M., Löffler, P. M. G. & Monnard, P.-A. Non-enzymatic Polymerization of Nucleic Acids from Monomers: Monomer Self-

- Condensation and Template-Directed Reactions. *Curr Org Synth* **9**, 735–763 (2012).
10. Kusser, W. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *Reviews in Molecular Biotechnology* **74**, 27–38 (2000).
  11. Kervio, E., Hochgesand, A., Steiner, U. E. & Richert, C. Templating efficiency of naked DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12074–12079 (2010).
  12. Kervio, E., Claasen, B., Steiner, U. E. & Richert, C. The strength of the template effect attracting nucleotides to naked DNA. *Nucleic Acids Res* **42**, 7409–7420 (2014).
  13. Rojas Stütz, J. A., Kervio, E., Deck, C. & Richert, C. Chemical Primer Extension: Individual Steps of Spontaneous Replication. *Chem Biodivers* **4**, 784–802 (2007).
  14. Kanavarioti A., Bernasconi C. F., Doodokyan D. L. & Alberas D. J. Magnesium Ion Catalyzed P-N Bond Hydrolysis in Imidazolide-Activated Nucleotides. Relevance to Template-Directed Synthesis of Polynucleotides. *Journal of American Chemical Society* **111**, 7247–7257 (1989).
  15. Deck, C., Jauker, M. & Richert, C. Efficient enzyme-free copying of all four nucleobases templated by immobilized RNA. *Nat Chem* **3**, 603–608 (2011).
  16. Kanavarioti, A. Template-Directed Chemistry and the Origins of the RNA World. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* **24**, 479–494 (1994).
  17. Kanavarioti, A., Bernasconi, C. F., Alberas, D. J. & Baird, E. E. Kinetic Dissection of Individual Steps in the Poly(C)-Directed Oligoguanylate Synthesis from Guanosine 5'-Monophosphate 2-Methylimidazolide. *J. Am. Chem. Soc* **115**, 8537–8546 (1993).
  18. Miles, H. T. & Frazier, J. Infrared Study of G-C Complex Formation in Template-dependent Oligo(G) Synthesis. *J Mol Biol* **162**, 219–230 (1982).
  19. Gordon, P. M., Sontheimer, E. J. & Piccirilli, J. A. Kinetic characterization of the second step of group II intron splicing: Role of metal ions and the cleavage site 2'-OH in catalysis. *Biochemistry* **39**, 12939–12952 (2000).

20. Sigel, R. K. O. & Sigel, H. A stability concept for metal ion coordination to single-stranded nucleic acids and affinities of individual sites. *Acc Chem Res* **43**, 974–984 (2010).
21. Crothers, D. M. & Zimm, B. H. Theory of the melting transition of synthetic polynucleotides: Evaluation of the stacking free energy. *J Mol Biol* **9**, 1–9 (1964).
22. Takahashi, S. & Sugimoto, N. Watson-Crick versus Hoogsteen Base Pairs: Chemical Strategy to Encode and Express Genetic Information in Life. *Acc Chem Res* **54**, 2110–2120 (2021).
23. Varani, G. & McClain, W. H. The G·U wobble base pair: A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO Rep* **1**, 18–23 (2000).
24. Joyce, G. F., Inoue, T. & Orgel, L. E. Non-enzymatic template-directed synthesis on RNA random copolymers. Poly(C, U) templates. *J Mol Biol* **176**, 279–306 (1984).
25. Bansal, A., Kaushik, S. & Kukreti, S. Non-canonical DNA structures: Diversity and disease association. *Front Genet* **13**, 1–30 (2022).
26. Kozlov, I. A. & Orgel Leslie E. Nonenzymatic Template-directed Synthesis of RNA from Monomers. *Mol Biol* **34**, 781–789 (2000).
27. Richmond, T. J. & Davey, C. A. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**, 145–150 (2003).
28. Fakhru, H., Inoue, T. & Orgel, L. E. Temperature-dependence of the Template-directed Synthesis of Oligoguanylates. *Tetrahedron* **40**, 39–45 (1984).
29. Pranata, J., Wierschke, S. G. & Jorgensen, W. L. OPLS Potential Functions for Nucleotide Bases. Relative Association Constants of Hydrogen-Bonded Base Pairs in Chloroform. *J. Am. Chem. Soc* **113**, 2810–2819 (1991).
30. Mortimer, S. A., Kidwell, M. A. & Doudna, J. A. Insights into RNA structure and function from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* **15**, 469–479 (2014).

31. Zhang, S., Zhang, N., Blain, J. C. & Szostak, J. W. Synthesis of N3'-P5'-linked Phosphoramidate DNA by Nonenzymatic Template-Directed Primer Extension. *J. Am. Chem. Soc* **135**, 924–932 (2013).
32. Joyce, G. F. & Orgel, L. E. Non-enzymic template-directed synthesis on RNA random copolymers. Poly(C, G) templates. *J Mol Biol* **188**, 433–441 (1986).
33. Hagenbuch, P., Kervio, E., Hochgesand, A., Plutowski, U. & Richert, C. Chemical primer extension: Efficiently determining single nucleotides in DNA. *Angewandte Chemie - International Edition* **44**, 6588–6592 (2005).
34. Vogel, S. R., Deck, C. & Richert, C. Accelerating chemical replication steps of RNA involving activated ribonucleotides and downstream-binding elements. *Chemical Communications* 4922–4924 (2005) doi:10.1039/b510775j.
35. Rojas Stütz, J. A. & Richert, C. A steroid cap adjusts the selectivity and accelerates the rates of nonenzymatic single nucleotide extensions of an oligonucleotide. *J Am Chem Soc* **123**, 12718–12719 (2001).
36. Rojas Stütz, J. A. & Richert, C. Tuning the reaction site for enzyme-free primer-extension reactions through small molecule substituents. *Chemistry - A European Journal* **12**, 2472–2481 (2006).
37. Lohrmann, R. & Orgel, L. E. Polymerization of Nucleotide Analogues I: Reaction of Nucleoside 5'-Phosphorimidazolides with 2'-Amino-2'-Deoxyuridine. *J.Mol.Evol* **7**, 253–267 (1976).
38. Kanavarioti, A., Stronach, M. W., Ketner, R. J. & Hurley, T. B. Large Steric Effect in the Substitution Reaction of Amines with Phosphoimidazole-Activated Nucleosides. *Journal of Organic Chemistry* **60**, 632–637 (1995).
39. Kervio, E., Sosson, M. & Richert, C. The effect of leaving groups on binding and reactivity in enzyme-free copying of DNA and RNA. *Nucleic Acids Res* **44**, 5504–5514 (2016).
40. Gryaznov, S. M. & Winter, H. RNA mimetics: oligoribonucleotide N3'→P5' phosphoramidates. *Nucleic Acids Res* **26**, 4160–4167 (1998).

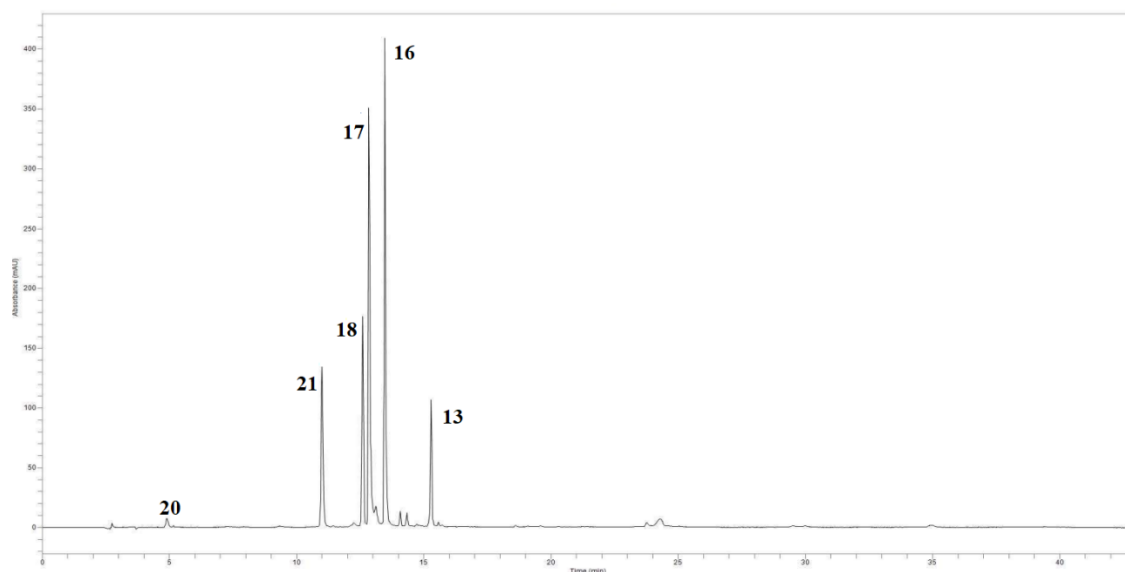
41. Naylor, R. & Gilham, P. T. Studies on Some Interactions and Reactions of Oligonucleotides in Aqueous Solution. *Biochemistry* **5**, 2722–2728 (1966).
42. Sulston, J., Lohrmann, R., Orgel, L. E. & Miles, H. T. Nonenzymatic Synthesis of Oligoadelylates on a Polyuridylic Acid Template\*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**, 726–733 (1968).
43. Orgel, L. E. & Lohrmann, R. Prebiotic Chemistry and Nucleic Acid Replication. *Acc Chem Res* **7**, 368–377 (1974).
44. Schneider-Bernloehr, H. *et al.* Non-enzymic Synthesis of Deoxyadenylate Oligonucleotides on a Polyuridylylate Template. *J. Mol. Biol* **37**, 151–155 (1968).
45. Inoue, T. & Orgel, L. E. Substituent Control of the Poly(C)-Directed Oligomerization of Guanosine 5'-Phosphoroimidazolide. *J. Am. Chem. Soc* **103**, 7666–7667 (1981).
46. Walton, T. & Szostak, J. W. A Highly Reactive Imidazolium-Bridged Dinucleotide Intermediate in Nonenzymatic RNA Primer Extension. *J Am Chem Soc* **138**, 11996–12002 (2016).
47. Walton, T., Zhang, W., Li, L., Tam, C. P. & Szostak, J. W. The Mechanism of Nonenzymatic Template Copying with Imidazole-Activated Nucleotides. *Angewandte Chemie* **58**, 10812–10819 (2019).
48. Walton, T., Pazienza, L. & Szostak, J. W. Template-Directed Catalysis of a Multistep Reaction Pathway for Nonenzymatic RNA Primer Extension. *Biochemistry* **58**, 755–762 (2019).
49. Wu, T. & Orgel, L. E. Nonenzymatic Template-Directed Synthesis on Hairpin Oligonucleotides. 3. Incorporation of Adenosine and Uridine Residues. *American Chemical Society* **114**, 7963–7969 (1992).
50. Li, L. *et al.* Enhanced nonenzymatic RNA copying with 2-aminoimidazole activated nucleotides. *J Am Chem Soc* **139**, 1810–1813 (2017).
51. Kozlov, I. A. & Orgel, L. E. Nonenzymatic oligomerization reactions on templates containing inosinic acid or diaminopurine nucleotide residues. *Helv Chim Acta* **82**, 1799–1805 (1999).

52. Hartel, C. & Göbel, M. W. Substitution of adenine by purine-2,6-diamine improves the nonenzymatic oligomerization of ribonucleotides on templates containing thymidine. *Helv Chim Acta* **83**, 2541–2549 (2000).
53. Chaput, J. C., Sinha, S. & Switzer, C. 5-Propynyluracil·diaminopurine: an efficient base-pair for non-enzymatic transcription of DNA. *Chemical Communications* **2**, 1568–1569 (2002).
54. Aho, A., Sulkanen, M., Korhonen, H. & Virta, P. Conjugation of oligonucleotides to peptide aldehydes via a pH-responsive N-methoxyoxazolidine linker. *Org Lett* **22**, 6714–6718 (2020).
55. Aho, A., Äärelä, A., Korhonen, H. & Virta, P. Expanding the Scope of the Cleavable N-(Methoxy)oxazolidine Linker for the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates. *Molecules* **26**, 490–501 (2021).
56. Ora, M., Mattila, K., Lö, T., Oivanen, M. & Lö, H. Hydrolytic Reactions of Diribonucleoside 3',5'-(3'-N-Phosphoramidates): Kinetics and Mechanisms for the P-O and P-N Bond Cleavage of 3'-Amino-3'-deoxyuridylyl-3',5'-uridine. *Journal of American Chemical Society* **124**, 14364–14372 (2002).
57. Shapiro, R. & Kang, S. Uncatalyzed Hydrolysis of Deoxyuridine, Thymidine, and 5-Bromodeoxyuridine\*. *Biochemistry* **8**, 1806–1810 (1969).
58. Hall, H. K. J. Correlation of the Base Strengths of Amines. *Journal of American Chemical Society* **79**, 5441–5444 (1957).
59. Oivanen, M. *et al.* Additional Evidence for the Exceptional Mechanism of the Acid-catalysed Hydrolysis of 4-Oxopyrimidine Nucleosides: Hydrolysis of 1-(1-Alkoxyalkyl)uracils, Seconucleosides, 3'-C-Alkyl Nucleosides and Nucleoside 3',5'-Cyclic Monophosphates. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2**, 309–314 (1994).
60. Ora, M., Murtola, M., Aho, S. & Oivanen, M. Hydrolytic reactions of 3-N-phosphoramidate and 3-N-thiophosphoramidate analogs of thymidylyl-3,5-thymidine. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2**, 593–600 (2004).

61. Gates, K. S. An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. *Chem Res Toxicol* **22**, 1747–1760 (2009).
62. Moyroud, E., Biala, E. & Strazewski, P. Synthesis and enzymatic digestion of an RNA nonamer in both enantiomeric forms. *Tetrahedron* **56**, 1475–1484 (2000).
63. Kvassiouk, E., Pfleiderer, W. & Chemie, F. New Building Blocks for Photolithographic Syntheses of Oligoribonucleotides. *Helv Chim Acta* **94**, 362–370 (2011).

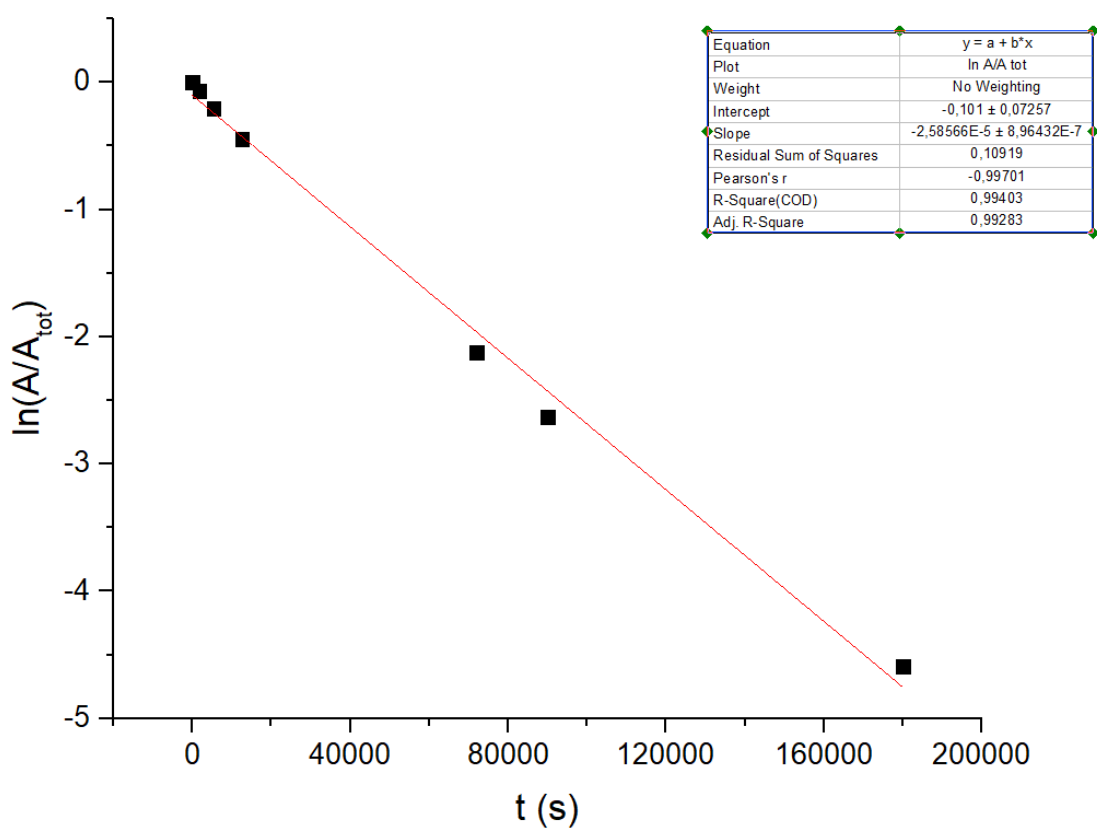
## 6 Liitteet

**Liite 1.** 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3'-5'-tymidiinin hydrolyysin tutkimuksen HPLC-ajo pH:ssa 1.



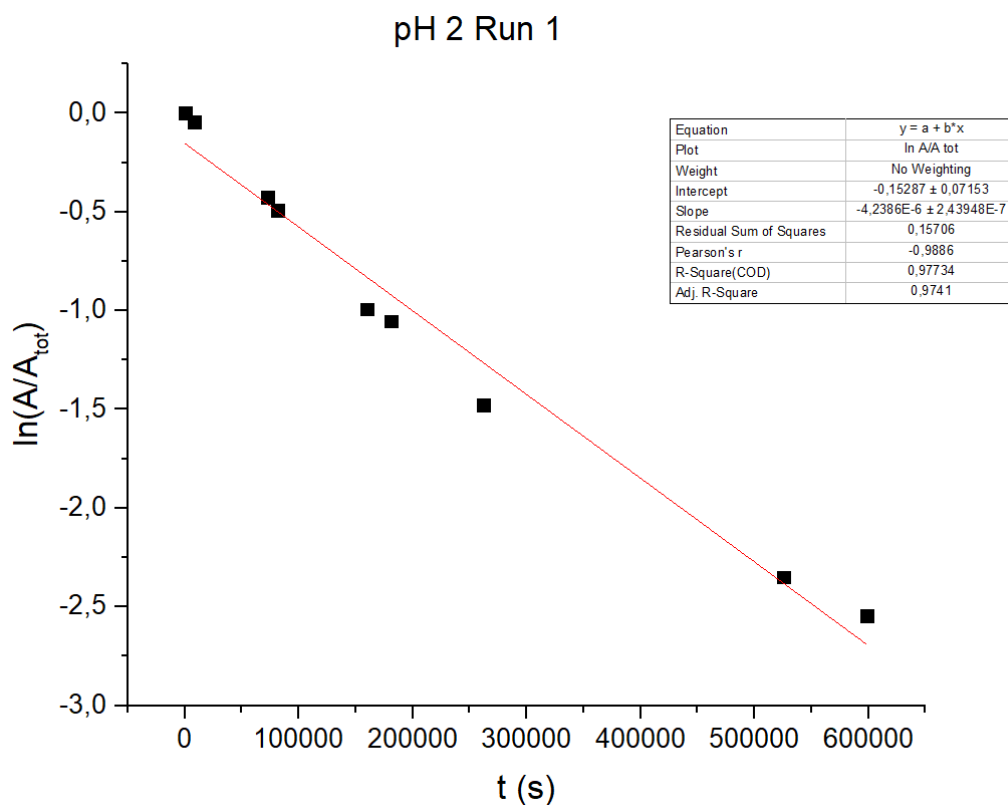
**Liite 2.** 1. Kertaluvun nopeusvakioiden määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 1).

pH 1 Run 2

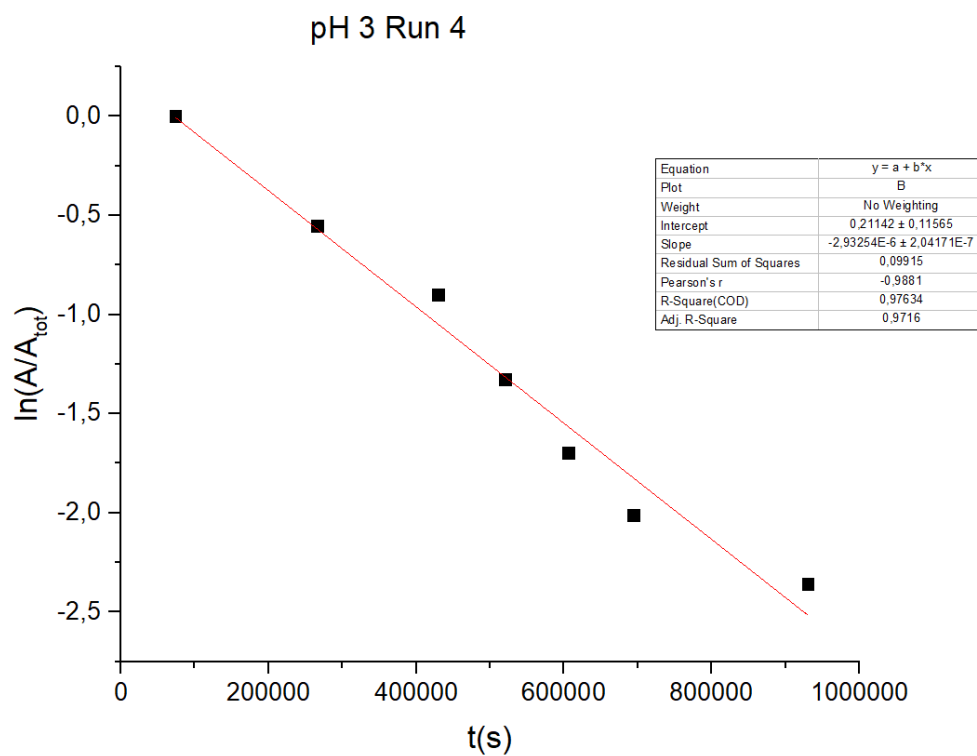




**Liite 3.** 1. Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 2).

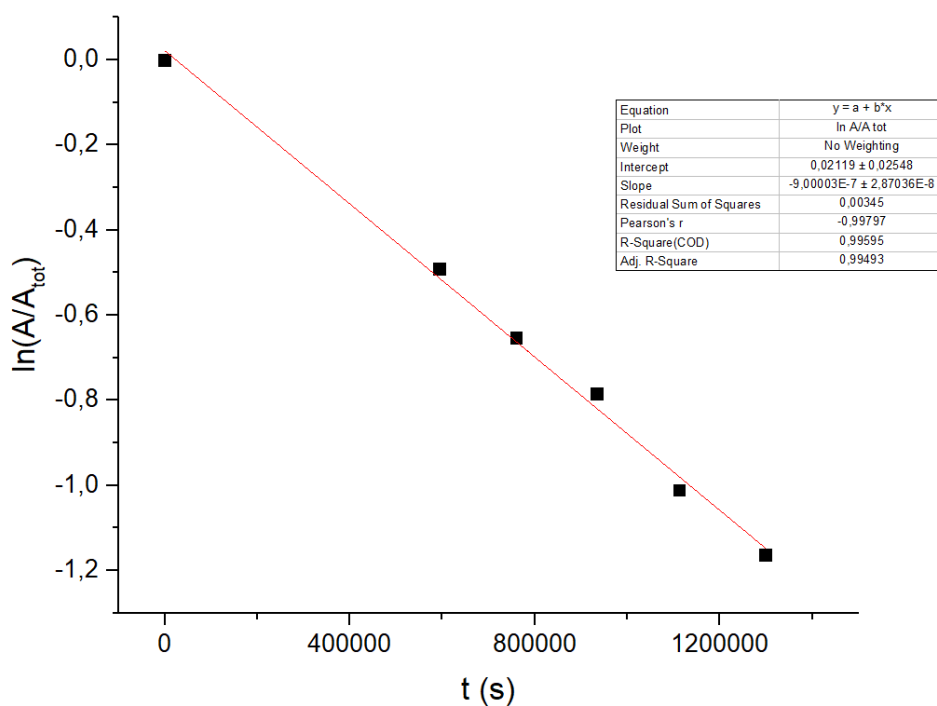


**Liite 4.** 1. Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 3).



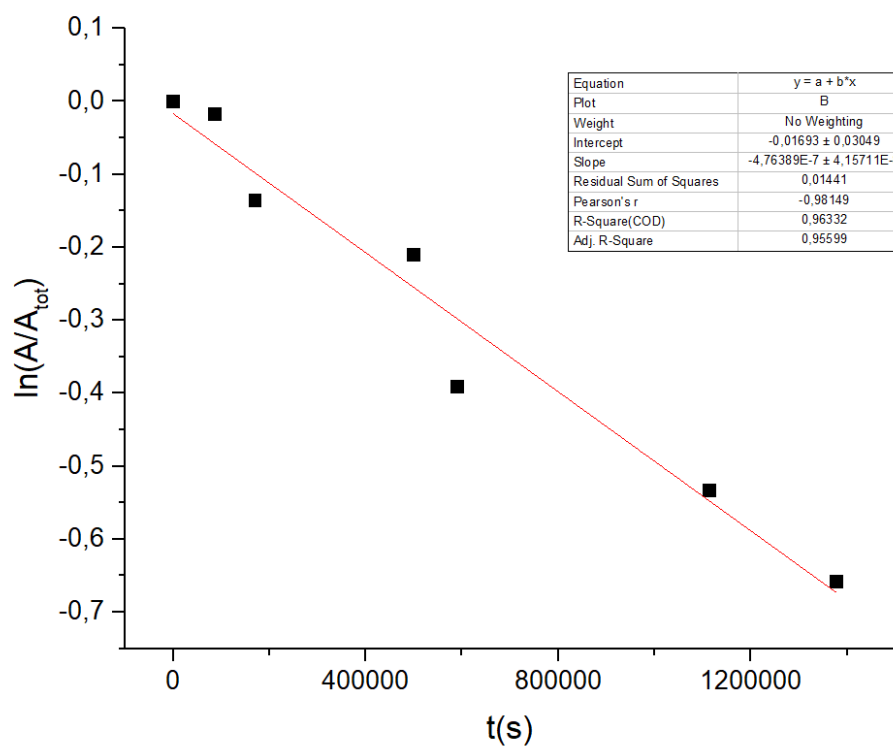
**Liite 5.** 1. Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 3,5).

pH 3,5 Run 14

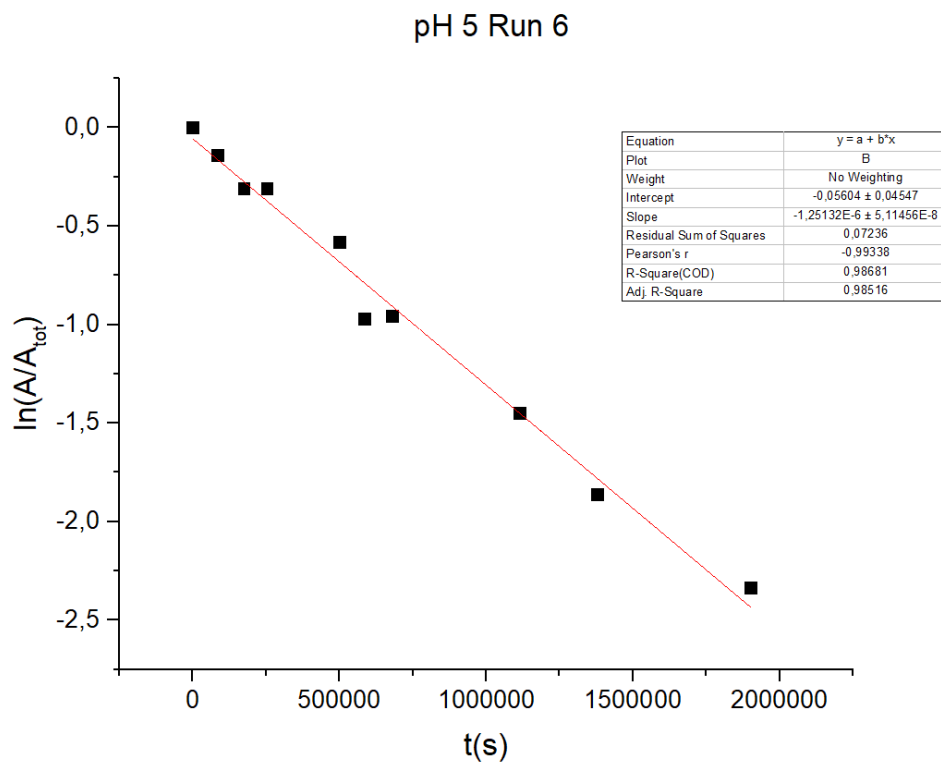


**Liite 6.** 1. Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 4).

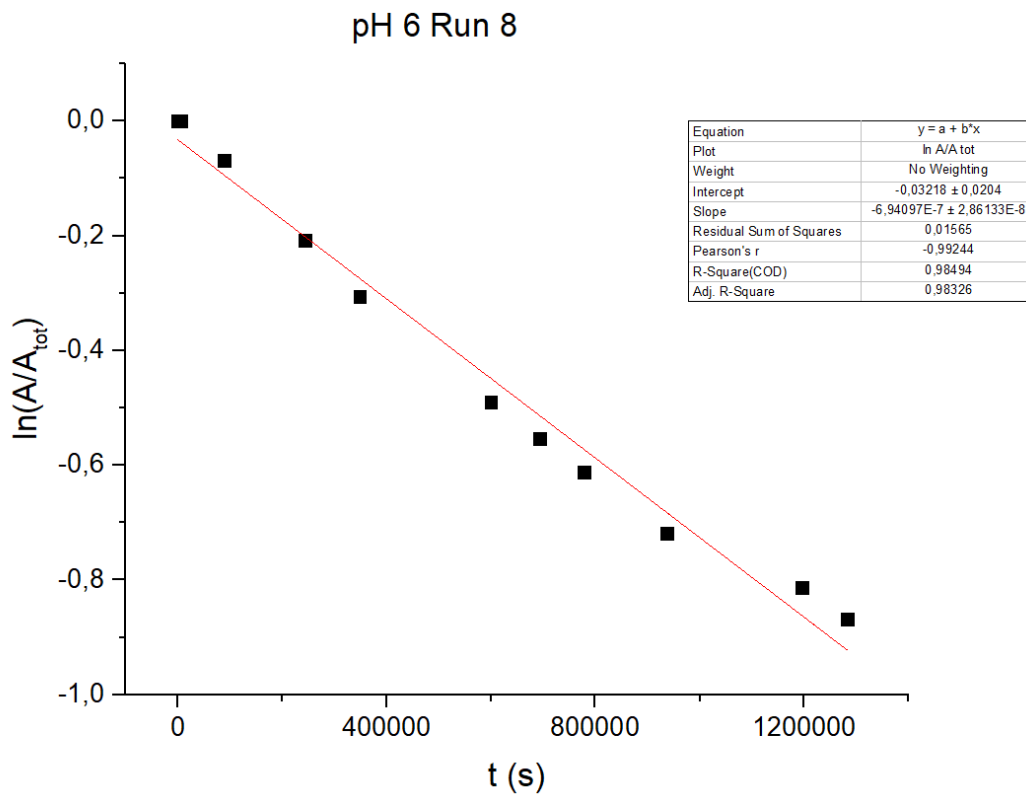
pH 4 Run 5



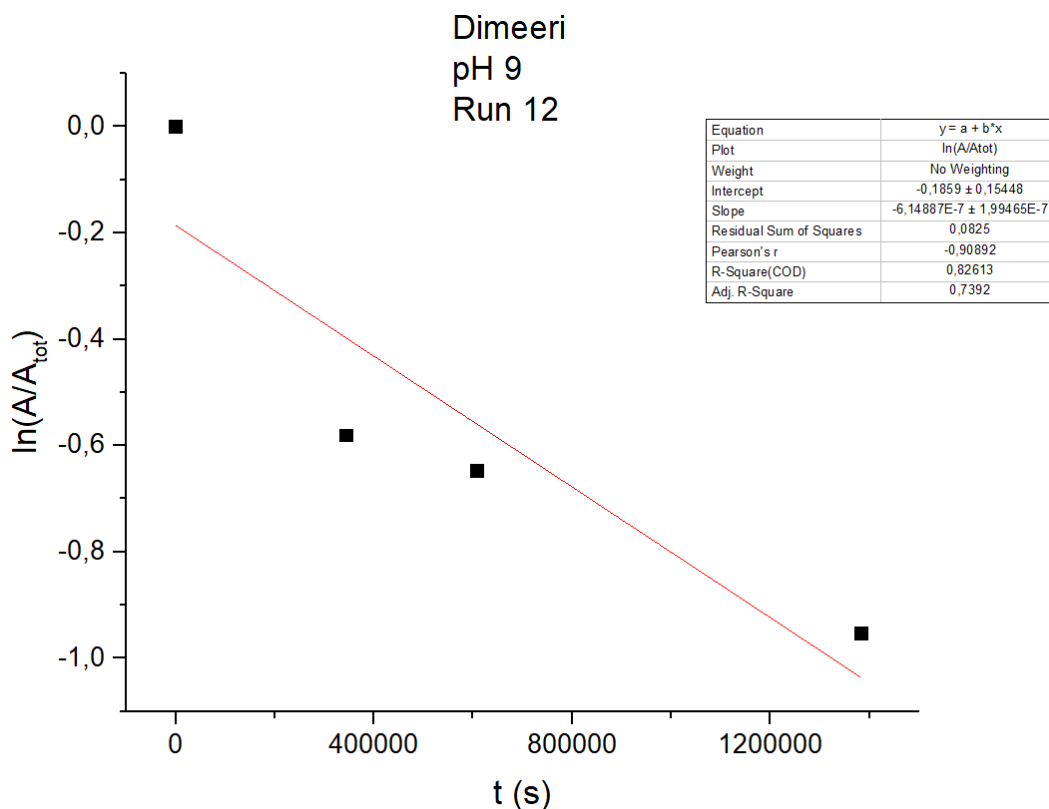
**Liite 7. 1.** Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 5).



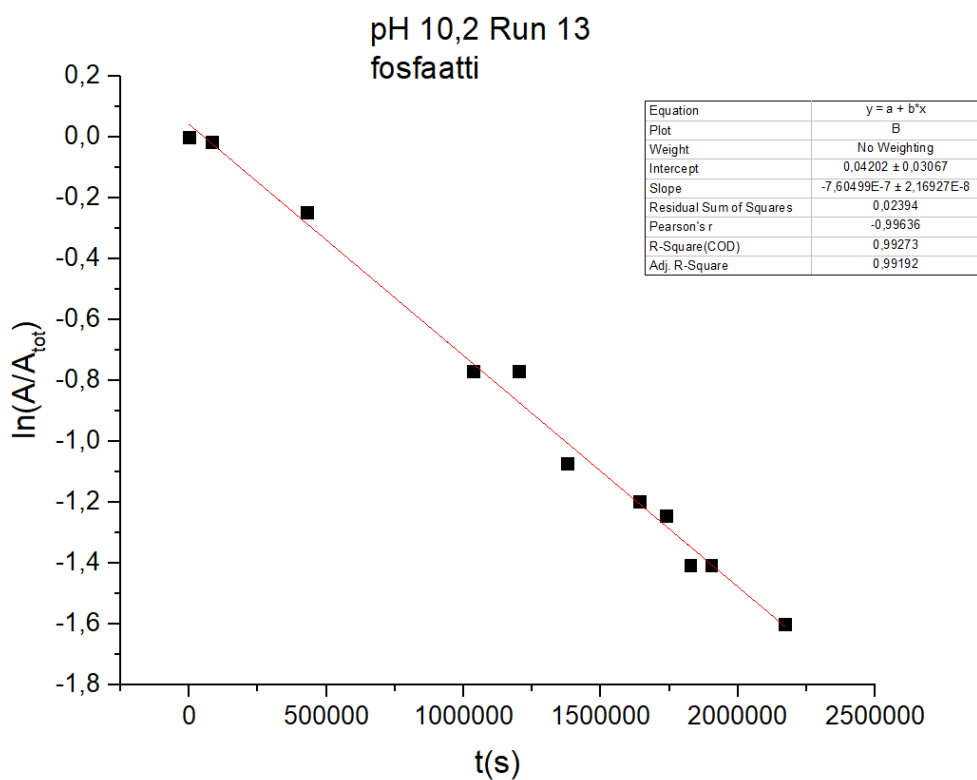
**Liite 8. 1.** Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 6).



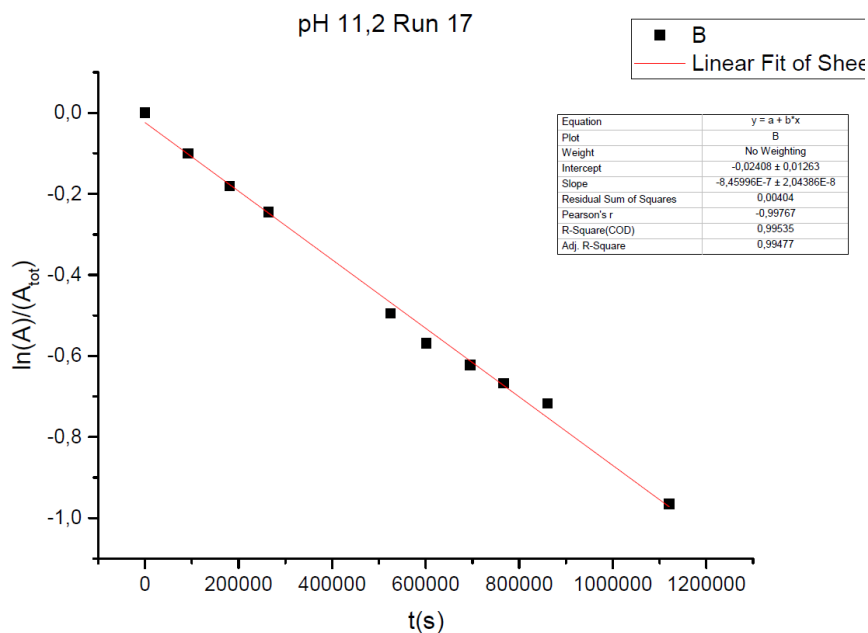
**Liite 9.** 1. Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 9).



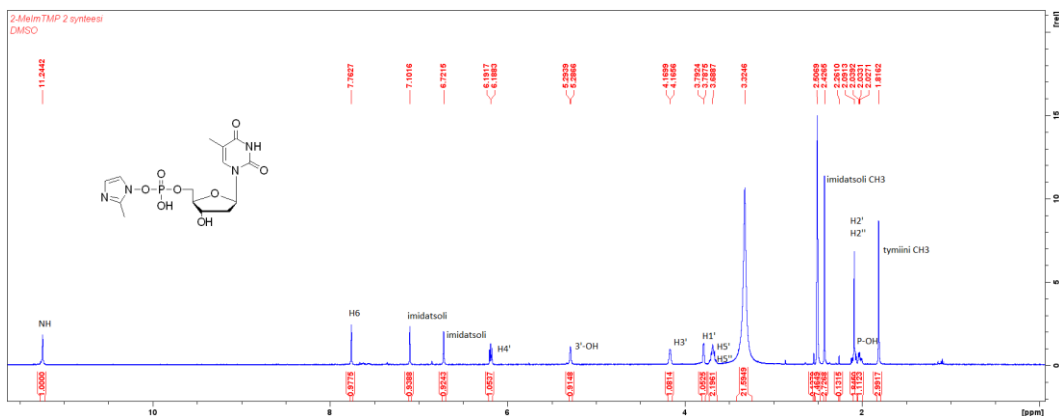
**Liite 10.** 1. Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 10,2).



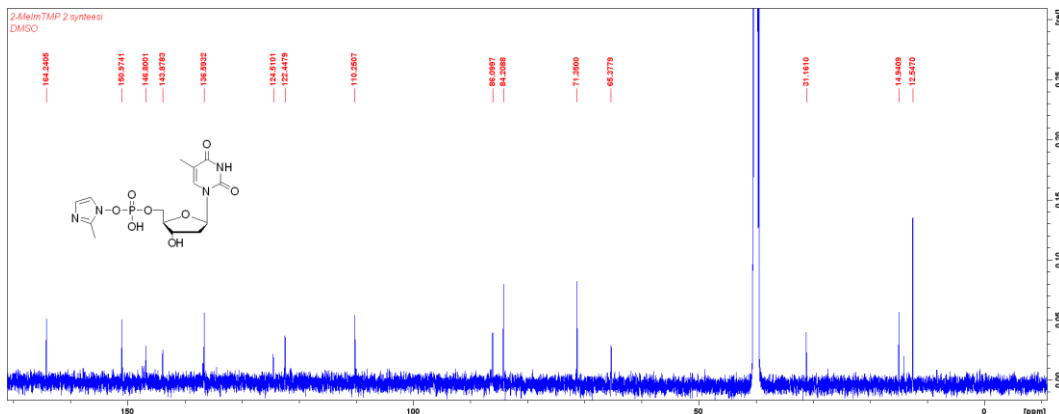
**Liite 11.** 1. Kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 2'-deoksi-2'-(metoksiamino)uridylyyli-3',5'-tymidiinin häviämiseksi (pH 11,2).



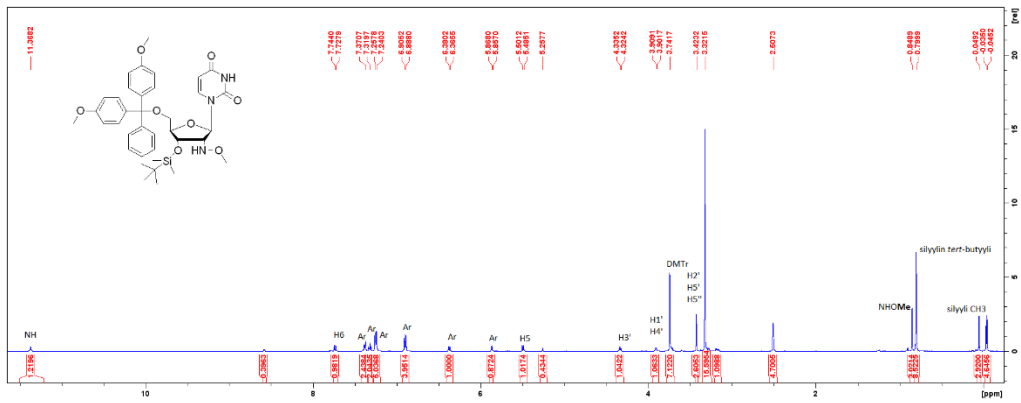
**Liite 12.** Tymidiini-5'-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatin (**14**)  $^1\text{H-NMR}$ -spektri



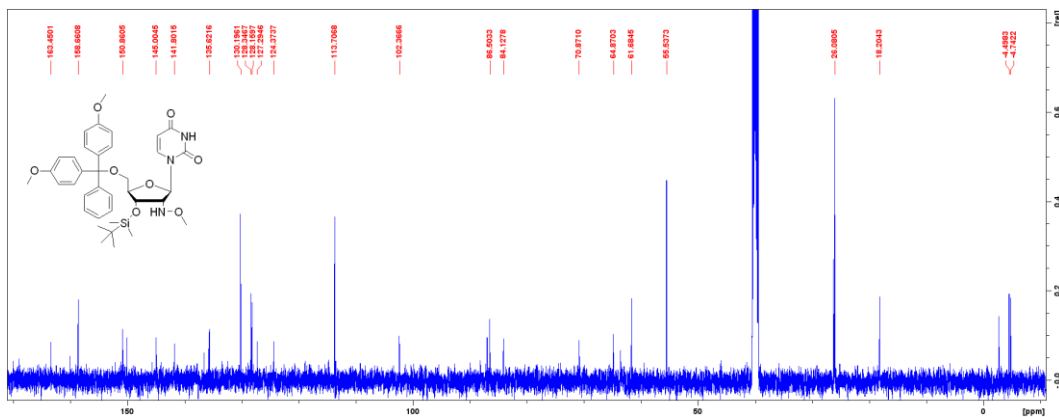
**Liite 13.** Tymidiini-5'-(2-metyyli-imidatsoli)monofosfaatin (**14**)  $^{13}\text{C-NMR}$ -spektri



**Liite 14.** 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3'-*O*-TBDMS-5'-*O*-DMTr-uridiinin (**29**) <sup>1</sup>H-NMR-spektri



**Liite 15.** 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3'-*O*-TBDMS-5'-*O*-DMTr-uridiinin (**29**) <sup>13</sup>C-NMR-spektri



**Liite 16.** 2'-Deoksi-2'-(metoksiamino)-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloksaani-1,3-diyl)-uridiinin (**30**) <sup>1</sup>H-NMR-spektri

