



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Asetaalisuojaryhmien käyttö oligonukleotidien liuosfaasisynteeseissä

Ella Pajuniemi

Bio-orgaaninen kemia

Pro gradu -tutkielma

Kemian laitos

Turun Yliopisto

Lokakuu 2023

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

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

PAJUNIEMI, ELLA: Asetaalisuojaryhmien käyttö oligonukleotidien liuosfaasisynteeseissä

Pro Gradu -tutkielma, 36 s. + liitteet 16 s.

Lokakuu 2023

Oligonukleotidien yleistynyt käyttö lääketieteessä on asettanut uusia vaatimuksia synteesismenetelmille. Kustannustehokkaampien ja vihreämpien menetelmien kehittäminen on tärkeä askel tulevaisuuden oligonukleotidisynteeseille. Perinteisessä, teollisuudessa käytettävässä kiintokantajalla tehtävässä synteeseissä joudutaan käyttämään suuria ylimääriä reagensseja ja liuottimia. Vaihtoehdon tarjoaa liuosfaasisynteesi, jossa reagenssien kulutus on pienempi.

Liuosfaasisynteesit asettavat uusia vaatimuksia suojaryhmästrategioille. Esimerkiksi yleisesti käytetyn 5'-O-DMTr-suojaryhmän irtoaminen on osittain reversiibeli prosessi liuoksessa. Happolabiilit asetaalisuojat sitä vastoin mahdollistavat irreversiibelin irtoamisen, minkä ansiosta niiden käyttö liuosfaasissa voi olla erinomainen vaihtoehto perinteisille suojaryhmille. Asetaalisuojan rakennetta modifioimalla voidaan vaikuttaa oligonukleotidin rasvaliukoisuuteen ja suojaryhmän happolabiilisuuteen, mikä mahdollistaa erilaiset reaktio-olosuhteet. Asetaalisuojaryhmiä käyttämällä voidaan lisäksi minimoida depurinaatiota, joka on yksi merkittävimmistä sivureaktioista oligonukleotidisyntetiikassa.

Pro gradu -projektissa tutkittiin, miten asetaalisuojaryhmät, 2-metoksi-prop-2-yyli (MIP) sekä 2-isopropoksi-prop-2-yyli (IIP), soveltuvat oligonukleotidien liuosfaasisynteeseihin. Synteeseissä käytettiin liukoista saostettavaa tetrapodaalista pentaerytritolipohjaista kantajaa. Projektissa valmistettiin oligonukleotidejä perinteisesti fosforamidiittikemiaa käyttäen, mutta myös fosforotioaatteja enantiopuhtaasti P(V)-kemiaa hyödyntäen. Fosforotioaattitrimeerit valmistettiin stereokontrolloidusti käyttäen apuaineena (+)- ja (-)-limoneenia, joista valmistettiin (+)- ja (-)- Ψ -aktivoitunut 5'-O-MIP-suojatut tymidiinit.

Avainsanat: asetaalisuojaryhmä, liuosfaasisynteesi, oligonukleotidi, fosforotioaatti, vihreä kemia

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	1
1.1	Asetaalisuojaryhmät	3
1.1.1	Asetaalin käyttö 5'-OH:n suojaryhmänä	4
1.1.2	Asetaalin käyttö 2'-OH:n suojaryhmänä	5
1.2	Oligonukleotidien synteesi liukoisella kantajalla	6
1.3	Fosforotioaattien stereokontrolloidut liuosfaasisynteesit	8
1.4	Yhteenveto	11
2	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	13
2.1	5'-O-suojattujen 2'-deoksiribonukleosidien happokatalysoitu metanalyysi	13
2.2	Synteesimenetelmät di- ja trinukleotidifosfodiesterille	14
2.2.1	Fosfitylointi	14
2.2.2	Kytkeä.....	14
2.2.3	Hapetus	16
2.2.4	Deasetalisaatio	16
2.2.5	Kantajasta irrottaminen.....	16
2.3	Stereokontrolloidut synteesimenetelmät di- ja trinukleotidifosforotioaateille	17
2.3.1	Asetaalisuojatun tymidiinin aktivointi Ψ -reagenssilla	17
2.3.2	Kytkeä.....	19
2.3.3	Suojaryhmän poisto	20
2.3.4	Kantajasta irrottaminen.....	21
2.4	Johtopäätökset ja yhteenveto	22
3	KOKEELLISET MENETELMÄT	23
3.1	Yleiset menetelmät	23

3.2	5'-O-suojattujen 2'-deoksiribonukleosidien kineettiset mittaukset	23
3.3	Nukleosidifosforamidiitit.....	24
3.3.1	<i>N</i> ⁶ -bentsoyyli-2'-deoksi-5'- <i>O</i> -IIP-adenosiini- 3'-(2-syanoetyyli- <i>N,N</i> -di-isopropyli)-fosforamidiitti	24
3.3.2	<i>N</i> ⁶ -bentsoyyli-2'-deoksi-5'- <i>O</i> -IIP-sytidiini-3'-(2-syanoetyyli- <i>N,N</i> -di-isopropyli)-fosforamidiitti	25
3.3.3	<i>N</i> ² -isobutyryyli-2'-deoksi-5'- <i>O</i> -IIP-guanosiini-3'-(2-syanoetyyli- <i>N,N</i> -di-isopropyli)-fosforamidiitti	25
3.4	Heteromeeristen fosfodiesterien synteesit.....	26
3.4.1	dC-T.....	26
3.4.2	dA-dC-T.....	27
3.4.3	dG-dC-T.....	28
3.5	Asetaalisuojatut Ψ-aktivoituvat tymidiinit.....	28
3.5.1	(-)-limoneenioksidi	28
3.5.2	(+)-limoneenioksidi	29
3.5.3	(+)-Ψ-reagenssi.....	30
3.5.4	(-)-Ψ-reagenssi.....	31
3.5.5	(+)-Ψ-reagenssilla aktivoitu 5'- <i>O</i> -(2-metoksi-prop-2-yyli)-tymidiini.....	31
3.5.6	(-)-Ψ-reagenssilla aktivoitu 5'- <i>O</i> -(2-metoksi-prop-2-yyli)-tymidiini.....	32
3.6	Homomeeristen tymidiinifosforotioaattien synteesit	33
3.6.1	T(<i>R</i> _P)T-PE.....	33
3.6.2	T(<i>S</i> _P)T-PE	33
3.6.3	T(<i>R</i> _P)T(<i>R</i> _P)T.....	34
3.6.4	MIP-T(<i>S</i> _P)T(<i>S</i> _P)T	35
4	VIITTEET	37
5	LIITTEET	41

Lyhenneluettelo

DCA	dikloorietikkahappo
DCM	dikloorimetaani
DBU	1,8-diatsabisykloundek-7-eeni
DMF	dimetyyliformamidi
DMTr	dimetoksitriityli
DNA	deoksiribonukleiinihappo
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
IIP	2-isopropoksi-prop-2-yyli
LPOS	oligonukleotidien liuosfaasisynteesi (liquid phase oligonucleotide synthesis)
mCPBA	m-klooriperbentsoehappo
MeOH	metanoli
MeCN	asetonitriili
MIP	2-metoksi-prop-2-yyli
MOM	metoksimetyyli
MS	massaspektrometri
NMR	ydinmagneettinen resonanssi
PE	pentaerytritoli
PEG	polyetyleeniglykolipolymeeri
RNA	ribonukleiinihappo
RP-HPLC	käänteisen faasin korkean erotuskyvyn nestekromatografia
SPOS	Kiinteän faasin oligonukleotidisynteesi (Solid phase oligonucleotide synthesis)

TBDMS	tert-butyylidimetyylisilyyli
TBDPS	tert-butyylidifenyylisilyyli
TEA	trietyyliamiini
TEAA	trietyyliammoniumasettaatti
TetH	tetratsoli
TFA	trifluoretikkahappo
TLC	ohutkerroskromatografia
THP	tetrahydropyranyyli

1 JOHDANTO

Oligonukleotidilääkkeet ovat yksi- tai kaksijuosteisia synteettisiä nukleiinihappopolymeerejä, joilla voidaan vaikuttaa geenien ilmenemiseen.¹ Oligonukleotidit sitoutuvat RNA:han tai DNA:han komplementaarisesti muodostamalla Watson-Crick-emäsparit kohdejuosteen emästen kanssa. Lääkekehityksessä eniten käytetyt oligonukleotidit ovat yksijuosteisia antisense-oligonukleotidejä.² Oligonukleotidit voidaan kohdistaa erittäin tarkasti kohteeseen, jonka nukleotidisekvenssi tunnetaan. Oligonukleotidejä on mahdollista käyttää jopa harvinaisten sairauksien hoitoon potilasspesifisesti.³ Tällä hetkellä kliinisissä tutkimuksissa on yli sata oligonukleotidilääkettä ja kaupallisessa levityksessä 12.^{4,5} Uuden sukupolven lääkkeenä ne eivät kuitenkaan ole vielä täysin ongelmattomia.⁵ Ongelmia aiheuttaa esimerkiksi annostelu, jota voidaan parantaa muokkaamalla uutta lääkeainetta niin, että se muistuttaa kemiallisilta ominaisuuksiltaan enemmän perinteisiä lääkeaineita. Tämä onnistuu esimerkiksi lisäämällä kovalenttisia vuorovaikutuksia funktionaalisiin ryhmiin, jotka osallistuvat solukalvon läpäisyyn tai soluun kohdentumiseen tai nanopartikkeleilla. Antisense-oligonukleotidien kemialliset modifikaatiot voivat lisätä nukleaaresistenssiä ja vähentää myrkyllisyyttä.⁶ Eräs tärkeistä ominaisuuksista lääkeaineille on stereokemiallinen puhtaus.⁷ Enantiopuhtaat fosforotioaatit ovat mahdollinen ratkaisu oligonukleotidilääkkeiden stereokemian kontrolloimiseen.

Oligonukleotidien kysyntä lääketieteen ja teollisuuden tutkimuskäyttöön on lisääntynyt huomattavasti.⁸ Lisääntynyt kysyntä on asettanut uusia vaatimuksia oligonukleotidien valmistamiselle. Tällä hetkellä lääketieteellisyydessä valmistetaan oligonukleotidejä pääasiallisesti automatisoidusti kiinteällä kantajalla fosforamidiittikemiaa hyödyntäen.⁹ Kilogrammaskaalan synteetit kiinteällä kantajalla ovat kuitenkin osoittautuneet melko epäkäytännöllisiksi,⁴ koska ne eivät ole kustannus- tai energiatehokkaita. Heterogeenisiä kiinteän faasin synteesejä ei voida optimoida loputtomiin kahden faasin asettamien rajoitusten takia.¹⁰ Vierekkäin rakentuvat oligonukleotidiketjut voivat myös muodostaa keskenään vuorovaikutuksia keskenään sekä aiheuttaa steeristä ahtautta.⁵ Synteetin mittakaavan kasvattaminen vaatii suuremmalle tuotantomäärälle sopivien syntetisaattorien ja synteetikolonniin kehittämistä sekä synteeseihin erikoistuneita laitoksia.¹¹ Siksi oligonukleotidien valmistusprosessien kehittäminen onkin tärkeä askel lääkekehityksessä. Perinteisessä, teollisuudessa käytettävässä kiintokantajalla tehtävässä synteetissä joudutaan

käyttämään suuria ylimääriä reagensseja ja liuottimia. Ympäristöystävällisemmän ja kustannustehokkaamman vaihtoehdon tarjoaa mahdollisesti liuosfaasisynteesi, esimerkiksi liukoisella kantajalla, jossa reagenssien kulutus on pienempi.⁹

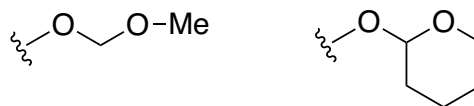
Liuosfaasisynteesit asettavat uusia vaatimuksia suojaryhmästrategioille. Suojaryhmän pitäisi mahdollistaa prosessitehokkuuden kasvattaminen ja parantaa kasvavan oligonukleotidin liukoisuutta reaktioliuoksessa, mikä on entistä tärkeämpi ominaisuus liuosfaasissa. Optimaalinen suojaryhmä hajoaa haihtuviksi sivutuotteiksi, mikä taas helpottaa tai vähentää synteesin puhdistusvaiheita.¹⁰ Esimerkiksi yleisesti käytetyn DMTr-suojaryhmän irtoaminen on osittain reversiibeli prosessi liuoksessa.¹¹ Happolabiilit asetaalisuojat sitä vastoin mahdollistavat pseudo-irreversiibelin irtoamisen, minkä ansiosta niiden käyttö liuosfaasissa voi olla erinomainen vaihtoehto perinteisille suojaryhmille.^{10,12} Asetaalisuojaryhmiä käyttämällä ja niiden rakennetta modifioimalla voidaan mahdollisesti minimoida depurinaatiota, joka on yksi merkittävimmistä sivureaktioista oligonukleotidisyntetiikassa happamissa olosuhteissa.¹³

Tuhansien kilogrammojen synteesit monimutkaisille ja suurille oligonukleotidimolekyyleille on tärkeä ja ajankohtainen kehitysaskel oligonukleotidien valmistuksessa. Oligonukleotidien kustannustehokkaat synteesit mahdollistavat laajemman lääkevalikoiman laajemmalle potilaskannalle.^{5,14} Monet lähtöaineista ja liuottimista on valmistettu uusiutumattomista raaka-aineista.⁹ Esimerkiksi pyridiiniä valmistetaan muun muassa kivihiilitervasta¹⁵ ja dikloorimetaania metaania klooraamalla.¹⁶ Oligonukleotidien valmistuksessa syntyy paljon ylimääräistä jätettä, erityisesti synteesi- ja puhdistusvaiheissa. Tämä johtuu siitä, että kiinteällä kantajalla suoritettussa synteesissä lähtöaineita ja liuottimia joudutaan käyttämään suuria ylimääriä. Suurien ylimäärien lisäksi suojaryhmien käytön takia synteesit eivät ole atomieconomisia. Suojaryhmien käyttö lisää reaktiovaiheita ja siten syntyvien jätteiden määrää. Vihreämpien oligonukleotidisynteesien kehittäminen on välttämätön askel kestävän kehityksen kannalta.⁹

Tässä projektissa tutkittiin, miten perinteistä dimetoksitriityliä ympäristöystävällisempi asetaalisuojaryhmästrategia soveltuu oligonukleotidien ja näiden fosforotioaattianalogien liuosfaasisynteesiin. Synteesissä käytettiin liukoista saostettavaa nelihaaraista pentaerytritolipohjaista kantajaa.

1.1 Asetaalisuojaryhmät

Asetaaleja käytetään yleisesti nukleosidien hydroksyyliyhmiin suojauksessa syntetisoitaessa oligonukleotideja. Happolabiileina suojaryhminä ne ovat stabiileja emäksisissä olosuhteissa, mutta hydrolysoituvat helposti happamissa olosuhteissa aldehydeiksi ja alkoholeiksi.¹⁷ Asetaaliryhmän ominaisuuksia, kuten lipofiilisyyttä ja stabiilisuutta voidaan säätää rakennetta muokkaamalla, joten asetaaliryhmiä voidaan käyttää monissa erilaisissa olosuhteissa. Hydrolyysin nopeus riippuu asetaaliryhmän elektronin luovutus- tai vastaanottokyvystä. Asetaalin happolabiilisuus kasvaa, kun asetaalihiileen lisätään ryhmä, joka kykenee luovuttamaan elektroneja. Tämä johtuu syntyvän karbokationin pysyvyyden kasvusta. Yleisesti käytettyjä asetaalisuojaryhmiä ovat esimerkiksi metoksimetyyli ja tetrahydropyranyyli (THP).¹¹

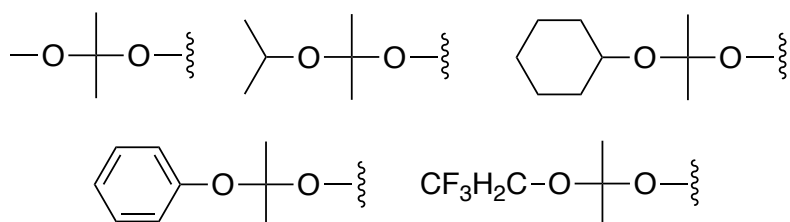


Kuva 1. MOM- ja THP-asetaalisuojaryhmät

Asetaalisuojaryhmien käyttöä oligonukleotidisynteesissä on tutkittu vastamaan erityisesti liuosfaasin asettamiin haasteisiin. Yleisesti oligonukleotidien synteesissä kiinteällä kantajalla käytetään 5'-*O*-dimetoksitriityyli-suojaryhmästrategiaa, mutta liuosfaasissa hydrofobisemman dimetoksitriitylin poistaminen voi olla vaikeampaa kuin kiinteällä kantajalla. Dimetoksitriitylin irtoaminen triityyli-kationina on olosuhteista ja erityisesti liuotinseoksesta riippuva prosessi. Dimetoksitriityliryhmän irtoaminen on liuotimessa reversiibeli prosessi, jossa triityloidun ja detrityloidun yhdisteen välille muodostuu tasapaino.¹¹ Happolabiilit asetaalisuojaryhmät irtoavat irreversiibelisti ja irtoavan suojaryhmän hajoamistuotteet ovat haihtuvia, joten synteesin puhdistusvaiheet yksinkertaistuvat tai niitä ei tarvita ollenkaan.¹⁰ Erittäin herkkien yhdisteiden suojaamiseen on käytetty happolabiileja asetonipohjaisia asetaalisuojaryhmiä. Ne ovatkin osoittautuneet lupaavaksi vaihtoehdoksi oligonukleotidien suojaamiseksi liuosfaasisynteesissä ja tarjoavat vaihtoehdon 5'-*O*-dimetoksitriitylisuojaukselle.

1.1.1 Asetaalin käyttö 5'-OH:n suojaryhmänä

Asetonipohjaiset asetaalit ovat erittäin happolabiileja suojaryhmiä, joita voidaan käyttää erityisesti hapoille herkkien yhdisteiden suojaamisessa. Pseudoirreversiibeli asetaaliryhmän irtoaminen voidaan suorittaa miedoissa olosuhteissa. Hajoamisessa syntyvät sivutuotteet, alkoholi ja asetoni, voidaan poistaa reaktioseoksista helposti joko haihuttamalla tai uuttamalla. Erilaisia asetonipohjaisia asetaalisuojaryhmiä (kuva 2) on käytetty toistaiseksi vähän oligonukleotidien valmistuksessa. 2-Metoksi-prop-2-yyლისuojaryhmää (MIP) on käytetty 5'-hydroksyylin suojaamiseen oligoribonukleotidien liuosfaasisynteesissä (Katso kappale 1.2).¹⁸ 2-Metoksi-prop-2-yyლისuojaryhmä on helposti irtoava ja atomiekonomialtaan hyvä. Se hajoaa happamissa olosuhteissa haihtuviksi hydrolyysituotteiksi, asetoniksi ja metanoliksi. Dimetoksitriityliä happolabiilimpana ryhmänä MIP on vaihtoehto oligonukleotidien 5'-hydroksyyli-ryhmien suojaamiseen. MIP on kuitenkin kooltaan niin pieni, että se voi tehdä suojatusta yhdisteestä liian hydrofiilisen, joka aiheuttaa liukosuuongelmia tuotteen eristämässä ja puhdistamisessa synteesin aikana.^{11,18} 2-Metoksi-isoprop-2-yyლისuojaryhmässä ei ole kiraalista keskusta, mikä estää diastereomeerisen seosten syntymisen toisin kuin esimerkiksi THP:llä.¹⁹



Kuva 2. Asetonipohjaisia asetaalisuojaryhmiä.

2-Isopropoksi-prop-2-yyli-ryhmä (IIP) on happolabiilimpi vaihtoehto 2-metoksi-prop-2-yyლისuojaryhmälle. Hydrolyysissä se hajoaa isopropanoliksi ja asetoniksi. IIP irtoaa kymmenen kertaa¹⁰ nopeammin happamissa olosuhteissa ja lisää nukleosidien lipofiilisuutta toisin kuin MIP. IIP-suojatut nukleosidit liukenevat helpommin orgaanisiin liuottimiin, mikä helpottaa synteesiä erityisesti liuosfaasissa ja tuotteen eristämistä reaktioseoksista.¹⁰ 2-Bentsyylioksi-propan-2-yyლისuojaus voidaan poistaa neutraaleissa olosuhteissa, mutta sen käyttö

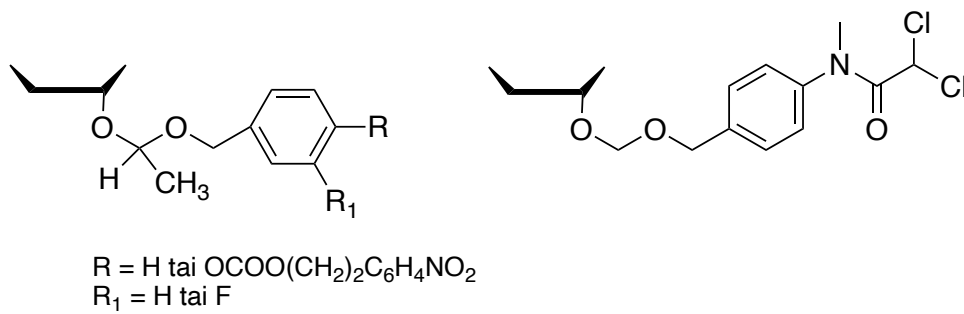
ei ole yleistynyt oligonukleotidisyntetisissä. Myöskään IIP:tä, sykloheksaania ja 2,2,2-trifluoroetyloksia ei ole aiemmin käytetty asetaalisuojaryhminä oligonukleotidisynteesissä.¹¹

Asetaalisuojaryhmien irrottamisen miedot olosuhteet vähentävät depurinaatiota. Depurinaatio, eli puriiniemästen adeniinin ja guaniinin irtoaminen, on hallitseva sivureaktio erityisesti pitkien oligonukleotidiketjujen synteesissä. Depurinaatiota tapahtuu kuitenkin myös joissain määrin lyhyempien nukleotidiketjujen synteesissä.¹³ Depurinaatiota voidaan vähentää käyttämällä miedompia olosuhteita.¹⁰ Asetaalin hydrolyysi tapahtuu useimmiten oksokarbeniumionin kautta. Muodostuvan oksokarbeniumionin poolisuus ja stabiilius määrittelevät kumpi alkoksiryhmistä protonoituu ja vapautuu alkoholina.²⁰

1.1.2 Asetaalin käyttö 2'-OH:n suojaryhmänä

Asetaalisuojaryhmiä on käytetty myös oligoribonukleosidien 2'-hydroksyyli-ryhmän suojaamiseen kiinteän kantajan synteesissä. 2'-OH täytyy suojata siten, että se kestää esimerkiksi 5'-O-DMTr-suojaryhmän poiston reaktio happamat olosuhteet. Kun asetaali poistetaan 2'-OH:sta, olosuhteiden on oltava tarpeeksi miedot, jotta 2'-OH ei hyökkää nukleofiilisesti viereiseen 3'-5'-fosfodiesterisidokseen. Näin RNA-juoste pysyy stabiilina eikä katkea.^{21, 22} Liian iso suojaryhmä 2'-OH:ssa toimii steerisenä esteenä kytkentäreaktiossa mikä vaikuttaa reaktion tehokkuuteen. Esimerkiksi yleisesti käytetyn 2'-O-TBDMS-ryhmän aiheuttama steerinen este pidentää RNA:n synteesissä kytkentäaikaakin noin kahdeksankertaisesti verrattuna DNA:n kytkentäreaktioon.²³ Lisäksi 2'-OH:ssa on käytettävä sellaisia suojaryhmiä, jotka ei irrotessaan alkyloi nukleotidin emäosaa.²² Asetaalien käyttö 2'-O-suojaryhmänä mahdollistaa tehokkaammat RNA-synteesit ja estää RNA-juosteen katkeamisen.

2'-OH:n suojaamiseen voidaan käyttää esimerkiksi erilaisia bentsyyliasetaaaleja (kuva 3). Bentsyylioksietyliasetaalin erilaiset nitrofenyylijohdannaiset mahdollistavat asetaalin käytön 2'-OH:n suojaamisessa happamissa olosuhteissa. Suojaryhmä irtoaa kaksivaiheisessa prosessissa, jossa vahvalla emäksellä poistetaan ensin osa suojaryhmästä β -eliminaatiolla, minkä jälkeen asetaali voidaan irrottaa erittäin miedolla hapolla.²⁴ Myös 4-(*N*-diklooriasetyyli-*N*-metyyliamino)bentsyylioksimetyyli-suojaryhmää voidaan käyttää 2'-O-suojaryhminä.²²



Kuva 3. 2'-O-bentsyylioksietyyli-²⁴ ja 2'-O-4-(N-diklooriasetyyli-N-metyyliamino)bentsyylioksiimetyyli suojarahmät.²²

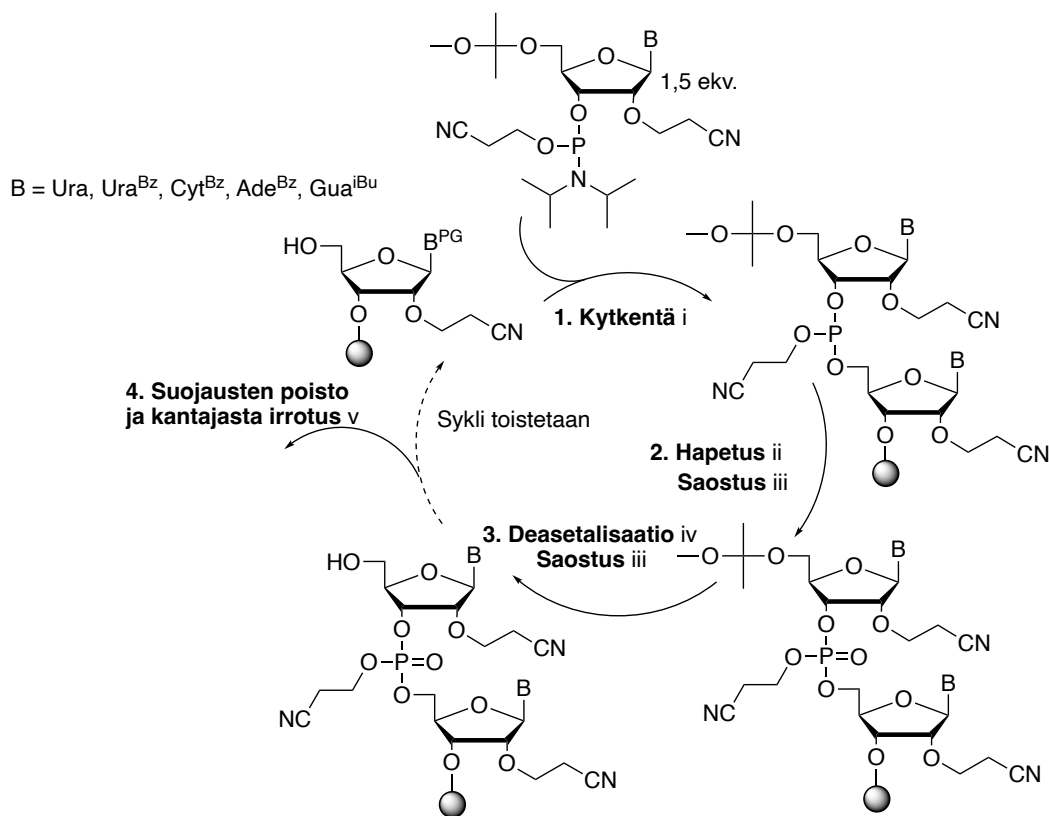
RNA-teknologioita käytetään erityisesti geenien ilmenemisen kontrolloimiseen. Se on lisännyt synteettisten oligoribonuklotidien kysyntää ja vaatinut ribonukleosidifosforamidiittimenetelmän kehittämistä niin, että kytkentäkinetiikka ja -tehokkuus vastaisivat deoksiribonukleotidifosforamidiittien kytkentää.²²

1.2 Oligonukleotidien synteesi liukoisella kantajalla

Liuosfaasisynteesit tarjoavat uuden ja kustannustehokkaamman vaihtoehdon perinteisille kiintokantajalla tehdyille synteeseille. On mahdollista, että liuosfaasisynteesissä reaktio voitaisiin saattaa loppuun niin, että käytetään pienempiä reagenssiylimääriä. Lisäksi prosessin mittakaavan kasvattaminen on suoraviivaisempaa eikä kallista kiinteää kantajaa tarvittaisi.²⁵ Perinteisessä kiintokantajan fosforamidiittimenetelmässä toistetaan reaktiosykliä, joka sisältää 5'-suojarahmän irrotuksen, kytkennän, asetyloinnin ja hapetuksen. Ylimääräiset reagenssit sekä epäpuhtaudet pestään pois. Oligonukleotidien synteesissä liukoisella kantajalla liuos tarjoaa homogeeniset olosuhteet reaktiolle.²⁵ Tämä mahdollistaa lineaarisemman reaktiokinetiikan ja reagenssien tasaisemman jakautumisen niin, että reagenssit ovat paremmin saatavilla reaktioseoksessa.⁴ Homogeenisuuden ansiosta reaktion toteuttaminen suuremmilla skaaloilla on mahdollista.²⁶ Siinä missä kiinteällä kantajalla suoritettavat synteetit eivät ole suurien reagenssiylimäärien takia kustannustehokkaita ja kymmenien kilogrammojen skaalat vaikea toteuttaa, liuosfaasi voi tarjota ratkaisun näihin ongelmiin.¹⁸ Sen lisäksi liuosfaasi mahdollistaa oligonukleotidien valmistamisen tavallisilla laboratoriotarvikkeilla.²⁵ Liuosfaasisynteesien kehittäminen voi osoittautua hyödylliseksi erityisesti lyhyiden oligonukleotidien

valmistamiseen, joita käytetään esimerkiksi tutkimustarkoituksiin. Liuosfaasi mahdollistaa isompien määrien valmistamisen kerralla yksinkertaisilla metodeilla ja tarvikkeilla. Myös pidempien oligonukleotidien valmistamisen liuoksessa on mahdollista. Koska välituotteet ovat liukoisia, jokaista synteesin vaihetta voidaan tarkkailla keräämällä reaaliaikaista dataa ja siten optimoida esimerkiksi reagenssien kulutuksen vähentämiseksi.⁹

Liukoista kantajaa voidaan hyödyntää myös oligoribonukleotidien synteesissä. Lyhyiden RNA-sekvenssien kysyntä tutkimustarkoituksiin on usein suurempi kuin mitä kiinteän kantajan synteesin mittakaavassa voidaan valmistaa. Kaupallisesti saatavilla olevissa oligoribonukleotideissa on 2'-OH:ssa isoja hydrofobisia suojaryhmiä, jotka hankaloittavat esimerkiksi metanolisaostusta. Esimerkiksi hydrofiilisemmän 2-syanoetyylin käyttö 2'-asemassa mahdollistaa valmiin nukleotidin erottamisen reaktioseoksesta saostamalla (kaavio 1).



Kaavio 1. Oligoribonukleotidin synteesi liukoisella saostettavalla neliahaaraisella kantajalla 5'-O-MIP-suojattuina fosforamiditeja käyttäen. (i) DCI 1,5 ekv. DMF/MeCN (ii) I₂, 2,6-lutidiini/H₂O/THF (1:2:4), asetylointi P(OMe)₃ (iii) MeOH-saostus (iv) HCl 15 mmol/l, MeOH/DCM (2:5), MeOH-saostus (v) Et₃N (aq.) NH₃ (aq.), TBAF THF:ssä.²⁵

Yleisesti oligonukleotidit syntetisoidaan nelivaiheisessa synteesisyklissä fosforamidiittikemiaa hyödyntäen.⁴ Kaaviossa 1 on esitetty liukoisella kantajalla suoritettava oligonukleotidin synteesisykli, jossa suojaryhmänä on käytetty asetonipohjaista 2-metoksi-prop-2-yyli (MIP)-suojausta. Kytkenässä nukleosidifosforamidiitti aktivoidaan esimerkiksi tetratsolilla, joka protonoi lähtevän dialkyyliaaminoryhmän ja hyökkää fosforiin. Kytkenässä uusi nukleosidifosforamidiitti liitetään kasvavan oligonukleotidiketjun 5'-päähen. Tämän jälkeen muodostunut fosfiittitriesteri hapetetaan fosfaatiksi, jolloin muodostuu fosfotriesteri. Viimeisessä vaiheessa MIP-suojaryhmä poistetaan 5'-asemasta.⁵ Synteesisykli voidaan toistaa tai valmiin oligonukleotidin kantaja, syanoetyyliryhmät ja emästen suojaryhmät poistetaan ammonolyysissä.⁹

Liuosfaasisynteesissä kantajaan rakentuva oligonukleotidi eristetään reaktioseoksesta esimerkiksi saostamalla, kromatografisesti, nanosuodattamalla tai uuttamalla.²⁵ Saostuksessa reaktioseos lisätään liuottimeen, esimerkiksi dietyylieetteriin²⁶, metanoliin²⁷ tai isopropanoliin.¹² Ylimääräiset reagenssit sekä epäpuhtaudet liukenevat liukseen.⁴ Nanosuodatuksessa molekyylit erotetaan toisistaan kalvon avulla orgaanisessa faasissa. Kalvo kestää kovat reaktio-olosuhteet ja pH-vaihtelut. Kalvon avulla pystytään erottamaan myös nanomittakaavan molekyyliä. Nanosuodatuksen avulla reaktioseoksesta voidaan erottaa ylimääräiset reagenssit ja epäpuhtaudet, mutta kantaja ja siihen rakentuva oligonukleotidiketju eivät pääse kalvon läpi. Raakatuote voidaan helposti puhdistaa seuraavaa vaihetta varten.⁵

Tässä projektissa syntetisoitiin lyhyitä di- ja trideoksiribonukleotidijä saostettavalla nelihaarisella liukoisella kantajalla fosforamidiittimenetelmällä käyttäen IIP-suojausta.

1.3 Fosforotioattien stereokontrolloidut liuosfaasisynteesit

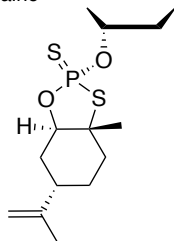
Modifioimalla oligonukleotidin fosfodiesterisidos tiofosfodiesterisidokseksi korvaamalla ei-silloittava happiatomi rikillä²⁸ voidaan vaikuttaa koko molekyylin ominaisuuksiin merkittävästi.²⁹ Modifikaatio parantaa oligonukleotidin nukleaasiresistenssiä, farmakokinetiikkaa, RNA-affiniteettia sekä biodistributiota.^{29,30} Fosforotioaatin *R_p*-isomeeri

muodostaa stabiilimpia kaksijuosteisia rakenteita ja vaikuttaa tehokkaammin RNAasi H:n toimintaan.³¹ *S_P*-enantiomeeri ei ole yhtä herkkä nukleasientsyymille.²⁹

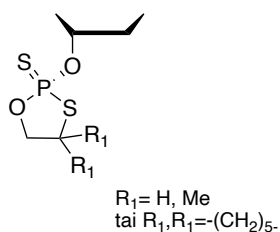
Fosforotioaatteja voidaan valmistaa liuosfaasissa perinteisesti fosforamidiiti³²-, *H*-fosfonaatti³³-, ja fosfotriesterimenetelmiä³⁴ käyttäen, jolloin tuotteena saadaan fosforotioaattien diastereomeerien seos. Kytkenässä muodostuneet fosfiittitriesterit tai vetyfosfonaatit sulfurisoidaan fosforotioaatiksi. Synteesistrategiat liukoisella kantajalla ovat perustuneet saostettavan liukoisen kantajan (SPG)³⁵ ja polyetyleeniglykolipolymeerien (PEG)^{36,37} sekä fosforamidiittikemian²⁶ käyttöön. Synteesisyklin aikana on käytetty useita sakkautuksia dietyylieetteristä ja suodatusta. Lääkekehityksen näkökulmasta katsottuna diastereomeerisen seoksen muodostuminen ei ole toivottavaa. Tästä syystä kehitetään fosforotioaattien stereokontrolloituja synteesimenetelmiä.

Fosforotioaattien stereokontrolloiduissa synteeseissä käytetään kiraalisia apuaineita (kuva 4). Synteesimenetelmät perustuvat muun muassa P(V)-oksatiafosfolaanisulfidi-^{38,39}, oksatiafosfolaan-⁴⁰, *N*-asyylioksatsafosfolidiini-⁴¹, SOSICS-menetelmän oksatsafosfolidiini-⁴² ja oksatsafosfolidiinirakenteseihin^{43,44} sekä tri⁴⁵- ja tetrasyklisiin⁴⁶ rakenteisiin. Tutkimuksissa saatujen tulosten perusteella stereokemiallinen selektiivisyys, kytkentätehokkuus ja saannot voivat vaihdella menetelmäkohtaisesti merkittävästi.

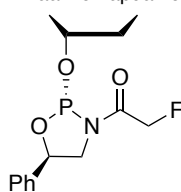
P(V)-oksatiafosfolaanisulfidi-
menetelmään perustuva kiraalinen
apuaine^{38,39}



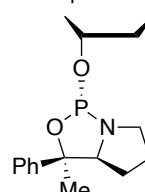
Oksatiafosfolaanimenetelmän
kiraaliset apuaineet⁴⁰



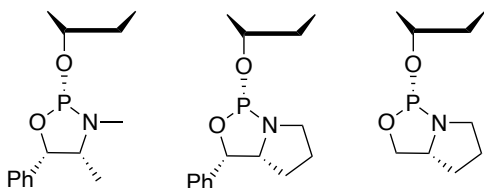
N-asyylioksa-
fosfolidiinimenetelmän
kiraalinen apuaine⁴¹



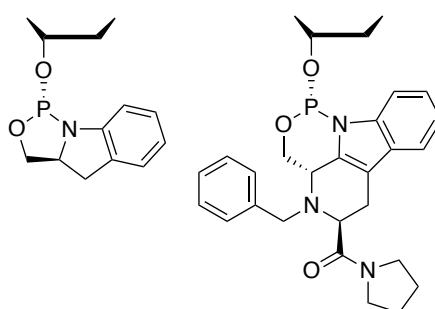
Oksatsafosfolidiinirakenteeseen
perustuvan SOSICS-menetelmän
kiraalinen apuaine⁴²



Oksatsafosfolidiinimenetelmän kiraalisia apuaineita^{43,44}

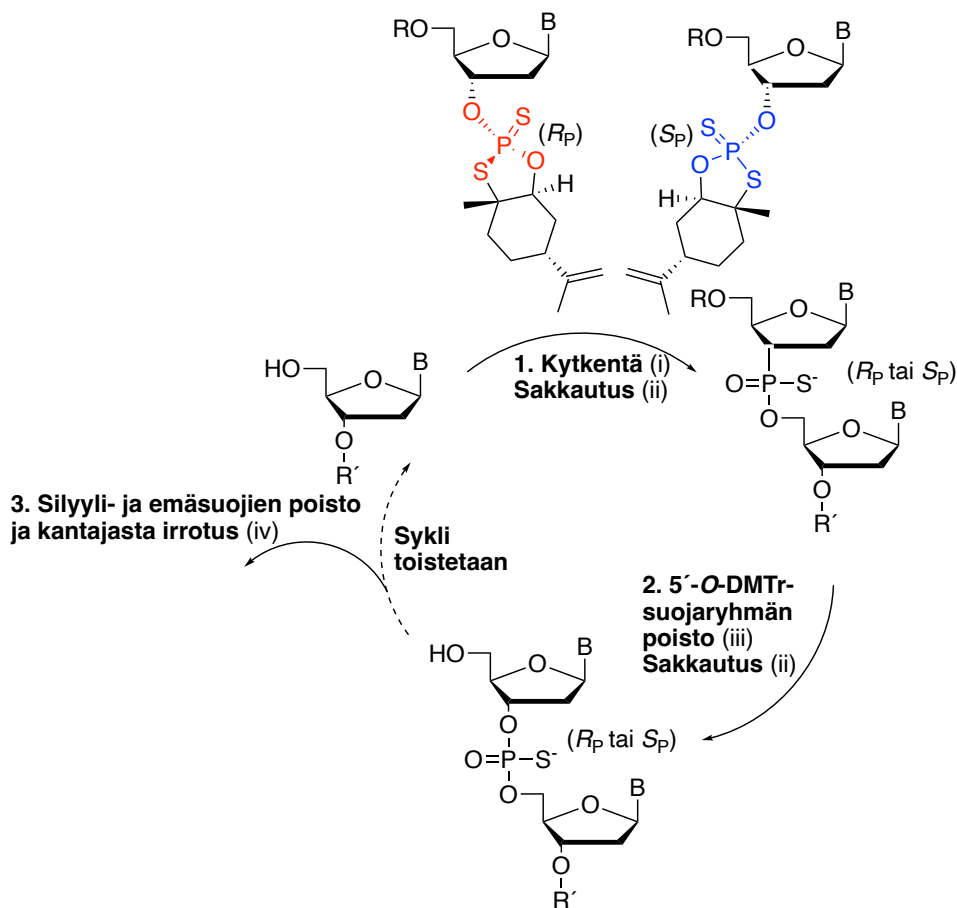


Tri- ja tetrasykliset kiraaliset apuaineet^{45,46}



Kuva 4. Fosforotioaattien stereokontrolloiduissa synteeseissä käytettyjä kiraalisia apuaineita.

Baranin kehittämässä menetelmässä fosforotioaatit syntetisoidaan stereokontrolloidusti kiinteällä kantajalla käyttäen P(V)-oksatiafosfolaanisulfidien rakenteeseen perustuvaa menetelmää (kaavio 2).³⁸ Synteesimenetelmä perustuu limoneenista valmistettavaan Ψ -reagenssin käyttöön.²⁹ Limoneeni on ympäristöystävällinen, sitruunan kuoresta eristettävä terpeeni.³⁹ Limoneenistä saadaan melko yksinkertaisella synteisillä valmistettua Ψ -reagenssi, jota voidaan käyttää nukleosidin aktivoimiseen.³⁹ Nyt esitettävässä tutkimusprojektissa dimetoksitriitylin tilalla 5'-OH:n suojauksessa käytetään asetaalisuojaryhmää¹² ja liukoiseen saostettavaan kantajaan kytketty tuote eristetään reaktioseoksesta saostamalla kylmästä isopropanolista. Kytkenöt suoritetaan Ψ -aktivoituilla tymidiineillä.



Liuksessa $R=R' = \text{TBDPS}$

Kiinteällä kantajalla $R = \text{sukkinyyli-linkkeri-CPG}$, $R' = \text{DMTr}$

Kaavio 2. Fosforotioattien valmistamien stereokontrolloidusti liukoisella kantajalla.¹² (i) 1,7 ekv., R_P -tai S_P -akivoitua nukleosidia, 2,7 ekv. DBU (ekv. /5'-OH-ryhmä), Py/MeCN (2:3, v/v), rt., etikkahappo (3 ekv.); (ii) saostus kylmästä metanolista (iii) 5% DCA MeOH/DCM-liuksessa, rt., pyridiini (2 ekv./DCA); (iv) 25 % ammoniakkin vesiliuos, 55 °C. Silyylin poisto: HF/Pyridiini, imidatsoli..

1.4 Yhteenveto

Oligonukleotidilääkkeiden käytön oletetaan lisääntyvän tulevaisuudessa. Lääkkeiden kysynnän lisääntyminen lisää myös lääketieteellisuuden päästöjä ja täten vaikutusta ympäristöön ja ekosysteemeihin. Näin ollen vihreämpien synteesimenetelmien kehittäminen käsi kädessä synteesien optimoinnin kanssa on tärkeä kehitysaskel kohti kestävämpää kemiaa. Myös antibioottiresistenttien mikrobin kehittyminen voi nopeutua.⁴⁷ Kestävän kehityksen periaatteet on hyvä ottaa huomioon lääketieteellisuuden kehityksessä, jotta luonnon monimuotoisuus ja tulevien sukupolvien elämä saadaan turvattu.

Kiinteällä kantajalla suoritettavien oligonukleotidisynteesin korvaaminen (SPOS) liukoisella kantajalla suoritettavilla synteesimenetelmillä (LPOS) vähentää ylimääräistä liuotinten kuluttamista mahdollistaen kustannustehokkaammat ja reagensseja säästävämät oligonukleotidisynteesit. Sen lisäksi homogeenisessä ympäristössä tapahtuvissa reaktioissa kantajan aiheuttaman steerisen esteen vaikutus pienenee ja reagenssit ovat paremmin saatavilla. Näin suurten reagenssiylimäärien käyttöä voidaan välttää.

Liuosfaasi tuo kuitenkin haasteita suojaryhmästrategioille. Perinteiset suojaryhmät eivät toimi liuosfaasissa samalla tavalla kuin kiinteässä faasissa. Siksi uusien strategioiden kehittäminen on tärkeää. Yksi vaihtoehto on korvata perinteiset suojaryhmät, kuten dimetoksitrietyylisuojaryhmät, asetyylisuojaryhmillä. Happolabiilit asetaalit saadaan poistettua ympäristöystävällisemmin ja syntyvät sivutuotteet ovat haihtuvia, jolloin on mahdollista välttää ylimääräisiä puhdistusvaiheita.

Tässä projektissa tutkitaan, miten asetaalisuojaryhmästrategiat toimivat syntetisoitaessa oligonukleotideja liukoisella saostettavalla kantajalla. IIP-suojaryhmää käytetään nukleosidifosforamidiittien 5'-hydroksyyliiryhmän suojaamiseen. Fosforotioaattien synteesissä 5'-OH suojataan MIP-ryhmällä.

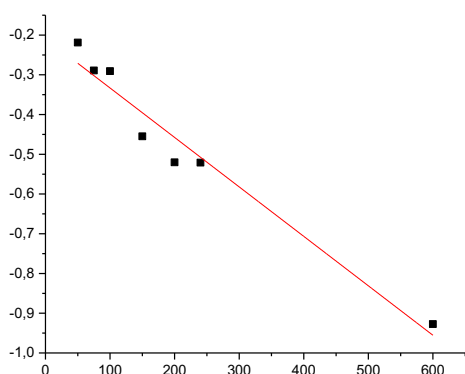
2 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

2.1 5'-O-suojattujen 2'-deoksiribonukleosidien happokatalysoitu metanolyysi

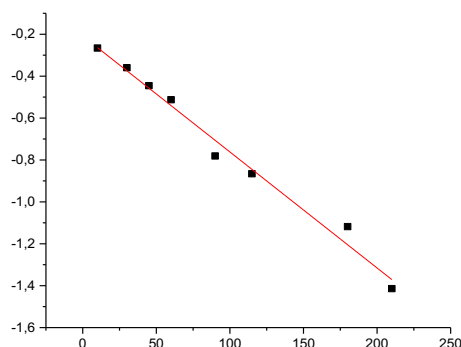
Asetaali- ja dimetoksitriityylisuojarahmian irtoamisen sekä depurinaation tutkimiseksi 2'-deoksi-5'-O-DMTr-tymidiinin (**1**), 2'-deoksi-5'-O-MIP-tymidiinin (**2**) ja *N*⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-adenosiinin (**3a**) happokatalysoitua metanolyysiä tutkittiin muurahaishapon dikloorimetaanin ja metanolin seoksessa 25 °C:ssa. Havaitut puoliintumisajat on esitetty taulukossa 1. Halogenoitujen happojen (kuten DCA ja TFA) korvaaminen karboksyylihapolla, mahdollistaa vihreämmän synteesimenetelmän ja depurinaation minimoinnin 5'-O-suojarahmian irrotuksen aikana synteesisykleissä.

nukleosidi	5'-O-suojarahmian irtoaminen k_1 (s ⁻¹)	5'-O-suojarahmian irtoaminen $t_{1/2}$ (s)	depurinaatio k_1 (s ⁻¹)	depurinaatio $t_{1/2}$ (s)
1	0,00124	559	NA	NA
2	0,00554	125	NA	NA
3	0,113	6,12	0,0000280	24800

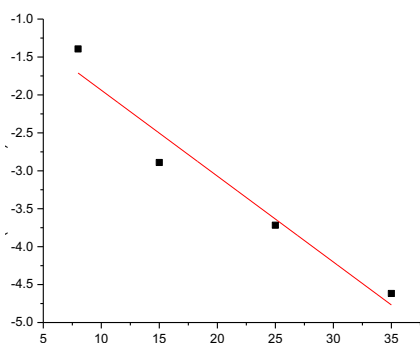
Taulukko 1. Suojarahmian irrottamisen ja depurinaation ensimmäisen kertaluvun nopeusvakiot ja puoliintumisajat



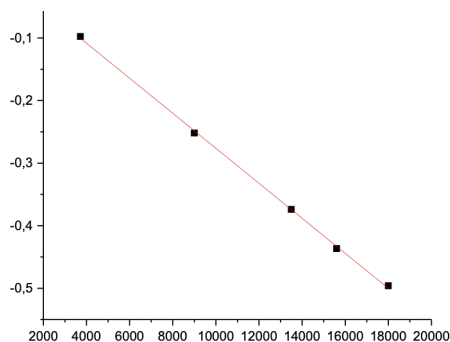
Kuva 5. 1. kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 5'-O-DMTr-tymidiinin (**1**) deasetalisaatiolle lämpötilassa 25°C. $t_{1/2} = 13,4$ min



Kuva 6. 1. kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 5'-O-MIP-tymidiinille (**2**) deasetalisaatiolle lämpötilassa 25°C. $t_{1/2} = 3,0$ min



Kuva 7. 1. kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 5'-O-IIP-deoksiadenosiinin (**3a**) deasetalisaatiolle lämpötilassa 25°C. $t_{1/2} = 8,8$ s

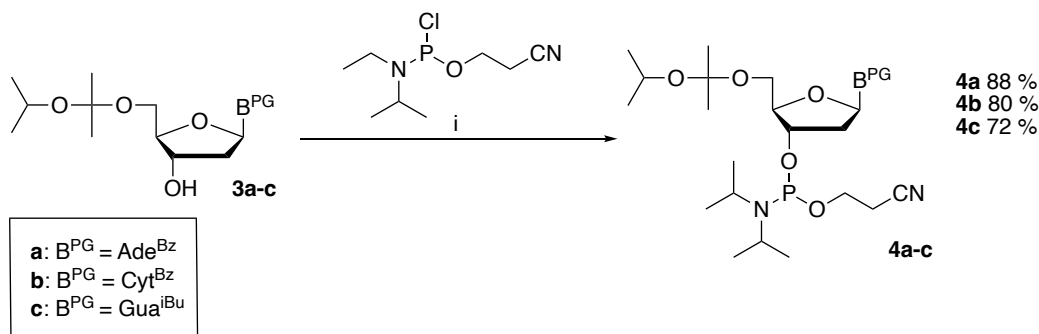


Kuva 8. 1. kertaluvun nopeusvakion määrittäminen graafisesti lineaarisella regressiolla 5'-O-IIP-deoksiadenosiinin (**3a**) depurinaatiolle lämpötilassa 25°C. $t_{1/2} = 9,9$ h.

2.2 Synteesimenetelmät di- ja trinukleotidifosfodiesterille

2.2.1 Fosfitylointi

N^6 -bentsoyyli-2'-deoksi-5'-*O*-IIP-adenosiini (**3a**) fosfityloitiin 1-kloori-1-(2-syanoetoksi)-*N,N*-diisopropyylifosfanamidiitilla (1,1 ekv.) trietyyliamiinin läsnäollessa dikloorimetaanissa typpi-ilmakehässä. Vastaavasti fosfityloitiin myös N^6 -bentsoyyli-2'-deoksi-5'-*O*-IIP-sytidiini (**3b**) ja N^2 -isobutyryyli-2'-deoksi-5'-*O*-IIP-guanosiini (**3c**).

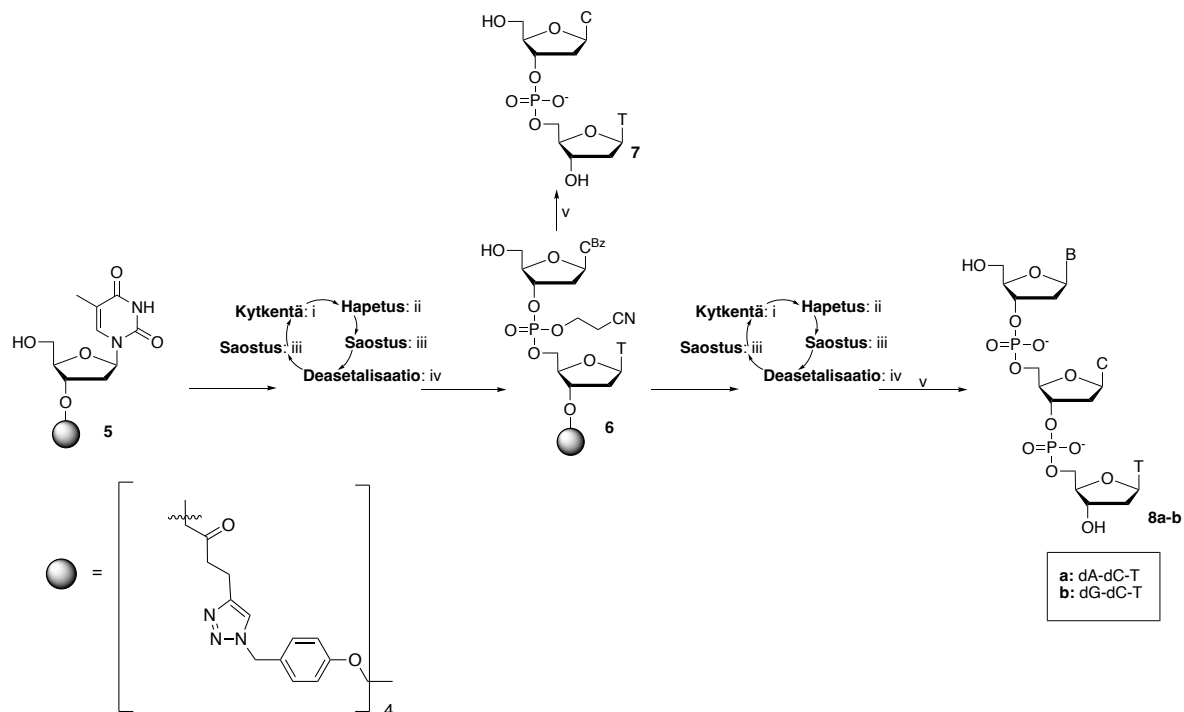


Kaavio 3. Fosfitylointireaktio (i) TEA 1,44 ekv., DMF, 3 h, rt.

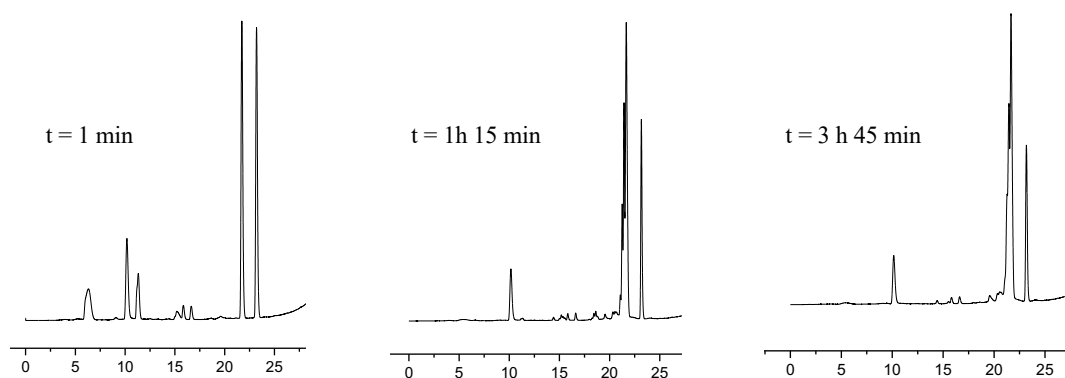
2.2.2 Kytcentä

Synteesisyklit fosforamidiittien valmistamiseksi sisältävät 5'-*O*-asetaalisojatun nukleosidifosforamidiitin (**4a-c**; 2 ekv. 5'-OH:ta kohti) kytkennän nelihaaraiseen liukoiseen

kantajaan sidottuun tymidiiniin (**5**) 5'-OH-ryhmään typpi-ilmakehässä. Kytkenässä aktivaattorina käytettiin tetratsolia ja liuottimena DMF:n ja asetonitriilin seosta. Reaktioita seurattiin RP-HPLC:lla.



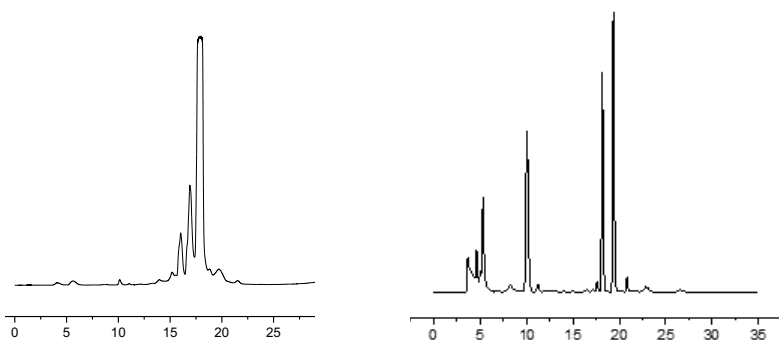
Kaavio 4. Fosforamidiittien kytkenäsykli (i) DMF, MeCN, TetH (ii) mCPBA (iii) iPrOH (iv) 6 % HCOOH, DCM/MeOH (2:1, v/v) (v) 25 % NH₃



Kuva 9. Fosfityloidun deoksisytidiinin (**4b**) kytkenän RP-HPLC-seuranta dC-T-PE-dimeerin **6** valmistamiseksi.

2.2.3 Hapetus

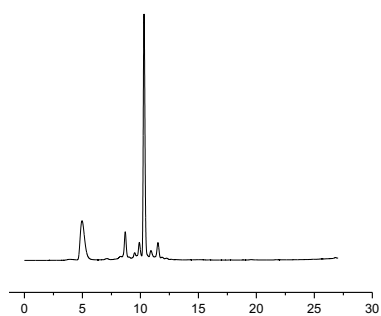
Kytkenässä muodostunut fosfiittitriesteri hapetettiin m-klooriperbentsoehapolla (1,9 ekv. nukleosidifosforamidiittiin nähden) fosfaatiksi. Hapettuminen tapahtui noin viidessä minuutissa, jonka jälkeen reaktioseos saostettiin kylmästä isopropanolista.



Kuva 10. Hapetuksen onnistuminen tarkistettiin RP-HPLC:llä: hapetuksen jälkeinen tuotesakka **6** ja isopropanolisuernatantti.

2.2.4 Deasetalisaatio

IIP-suojaryhmä poistettiin 6 %:lla muurahaishapolla dikloorimetaanin ja metanolin seoksessa (2:1 v/v). Deasetalisaatiota seurattiin HPLC:lla. Suojaryhmä irtoaa noin kuudessa minuutissa, jonka jälkeen happo neutraloitiin pyridiinillä (2 ekv. HCOOH:n nähden) depurinaation minimoimiseksi. Reaktioseos saostettiin uudelleen kylmästä isopropanolista.

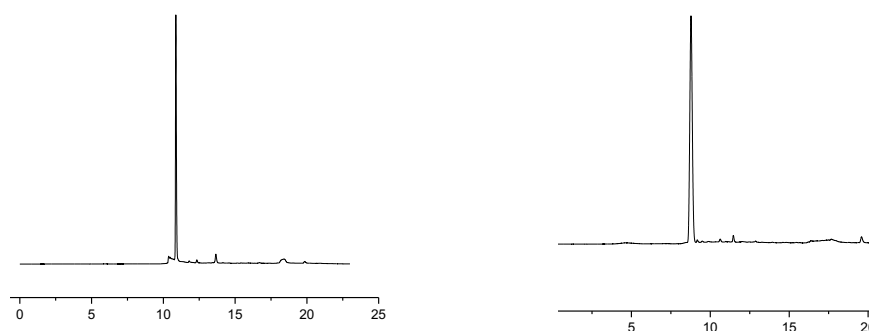


Kuva 11. **6**:n deasetalisaation RP-HPLC-kromatogrammi

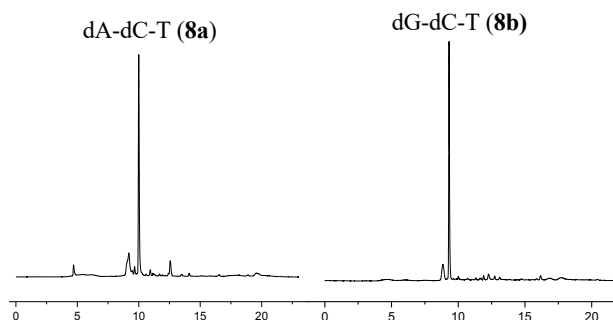
2.2.5 Kantajasta irrottaminen

Syanoetyyliryhmät, emästen suojaryhmät ja PE-T-kantaja irrotettiin ammonolyysissä 25 % ammoniakkiuoksella 55 °C:ssa. Dimeerillä käytetty reaktioaika oli kolme tuntia ja trimeereillä

noin 20 h. Ammonolyysin onnistuminen tarkistettiin RP-HPLC:lla. Synteesisyklien kokonaissaannot vaihtelivat välillä 44–70 %.



Kuva 12. RP-HPLC-kromatogrammit ammonolysoidun **6:n** tuotteelle (**7**).

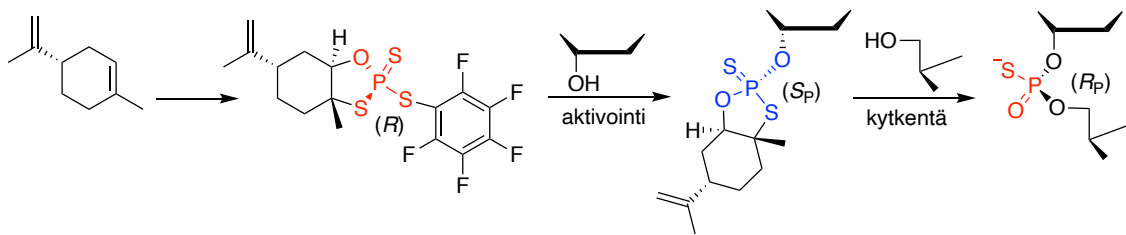


Kuva 13. Valmiiden trimeerien (**8a/b**) puhtaus tarkistettiin RP-HPLC:llä.

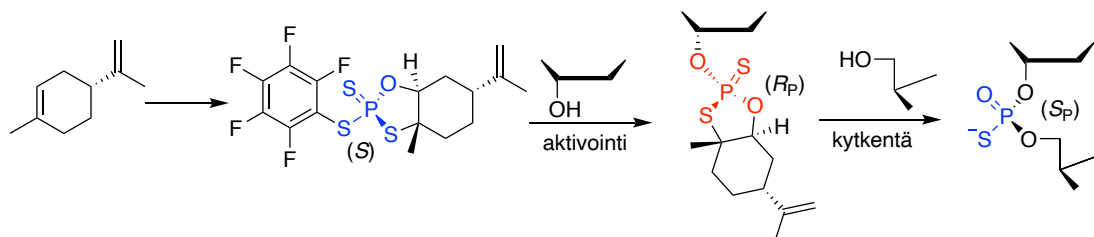
2.3 Stereokontrolloidut synteesimenetelmät di- ja trinukleotidifosforotioaateille

2.3.1 Asetaalisuojatun tymidiinin aktivointi Ψ -reagenssilla

Oksatiafosfolaanisulfidi-rakenteeseen perustuvalla stereokontrolloidulla synteesimenetelmällä voidaan syntetisoida fosforotioaatteja stereokontrolloidusti. Tymidiini aktivointiin (+)- ja (-)- Ψ -reagensseilla. Lähtöaineina (+)- Ψ - ja (-)- Ψ -reagenssien (**12** ja **15**) synteeseille (kaaviot 5 ja 6) käytettiin (-)- ja (+)- limoneenia (**9** ja **13**). Koska limoneeni esiintyy sekä (-)- että (+)-muodoissa, siitä voidaan syntetisoida enantiopuhtaasti (+)- ja (-)- Ψ -reagenssit. Nukleosidin aktivointi Ψ -reagensseilla ja kytkentä tiofosfodiesterisidokseksi tuottaa stereokontrolloidusti joko *S*- tai *R*-enantiomeerin (kaaviot 6 ja 7).^{38, 48}

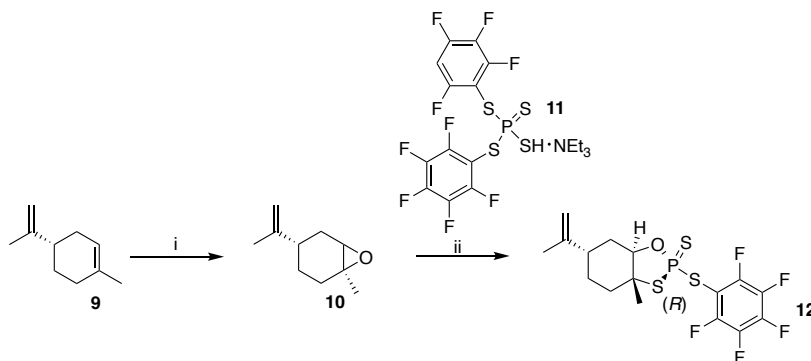


Kaavio 5. (-)-limoneenia voidaan käyttää apuaineena stereokontrolloidussa fosforotioaattisynteessissä.³⁸

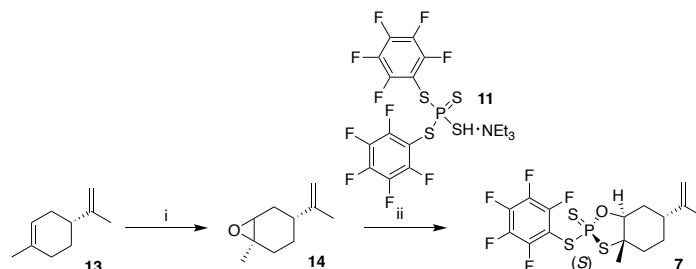


Kaavio 6. (+)-limoneeni voidaan käyttää apuaineena stereokontrolloidussa fosforotioaattisynteessissä.³⁸

Synteesin ensimmäisessä vaiheessa (-)-*cis*-limoneeni (**9**) epoksidoitiin (-)-limoneenioksidiksi (**10**) käyttäen vetyperoksidia (Kaavio 4). Vastaavasti (+)-*cis*-limoneenistä (**13**) valmistettiin (+)-limoneenioksidi (**14**). Stereopuhdas tuote saatiin hajottamalla reaktiossa sivutuotteena muodostunut toinen enantiomeeri pyrrolidiinikäsittelyllä.



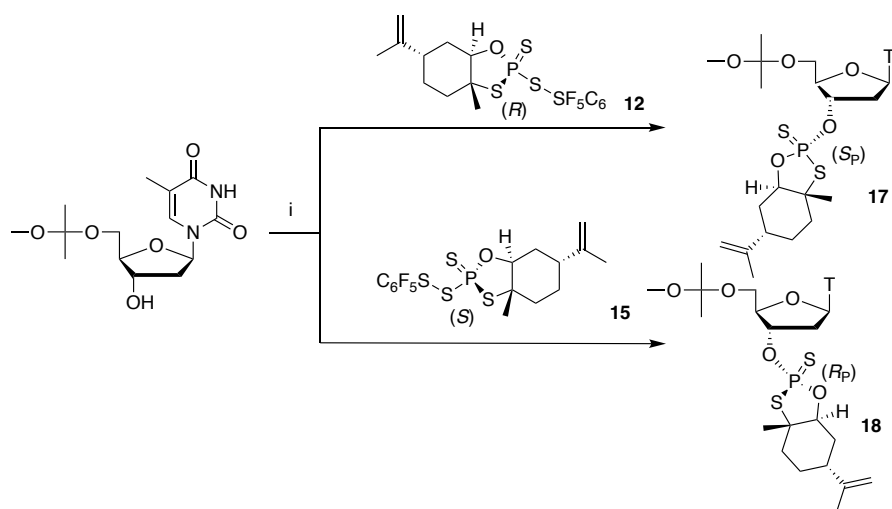
Kaavio 7. (-)-limoneenin (**9**) synteisi (+)- Ψ -reagenssiksi (**12**). (i) 1. H₂O₂ (30 %), fenyylifosfiinihappo, metyyliatriktyyliammoniumvetysulfaatti, Na₂SO₄, Na₂WO₄·2 H₂O, H₂O 2. pyrrolidiini, H₂O, 85 °C, 36 h. (ii) TFA, DCM, 35 °C, 1 h.



Kaavio 8. (+)-limoneenin synteisi (**13**) (-)- Ψ -reagenssiksi (**15**) (i) 1. H₂O₂ (30 %), fenyylifosfiinihappo, metyyliatriktyyliammoniumvetysulfaatti, Na₂SO₄, Na₂WO₄·2 H₂O, H₂O 2. pyrrolidiini, H₂O, 85 °C, 36 h. (ii) TFA, DCM, 35 °C, 1 h.

Toisessa vaiheessa (-)-limoneenioksidi (**10**) tiolysoitiin trietyyliammonium-bis-(pentafluorotiofenoli)fosforiditiaatilla (**11**) dikloorimetäänissa TFA:n läsnä ollessa, jolloin muodostui (+)- Ψ -reagenssi (**12**). (+)-limoneenioksidin (**13**) tiolyysi tuotti vastaavasti (-)- Ψ -reagenssin (**15**).

Kolmannessa vaiheessa 5'-O-MIP-tymidiiniin (**16**) 3'-OH aktivoitiin Ψ -reagensseilla (**12** ja **15**) stereokontrolloidusti. Liuottimena käytettiin asetonitriiliä, ja reaktion aktivaattorina toimi DBU. Synteeseissä muodostuivat 3'- Ψ aktivoidut 5'-O-MIP-suojatut tymidiinit **17** ja **18** (kaavio 9).



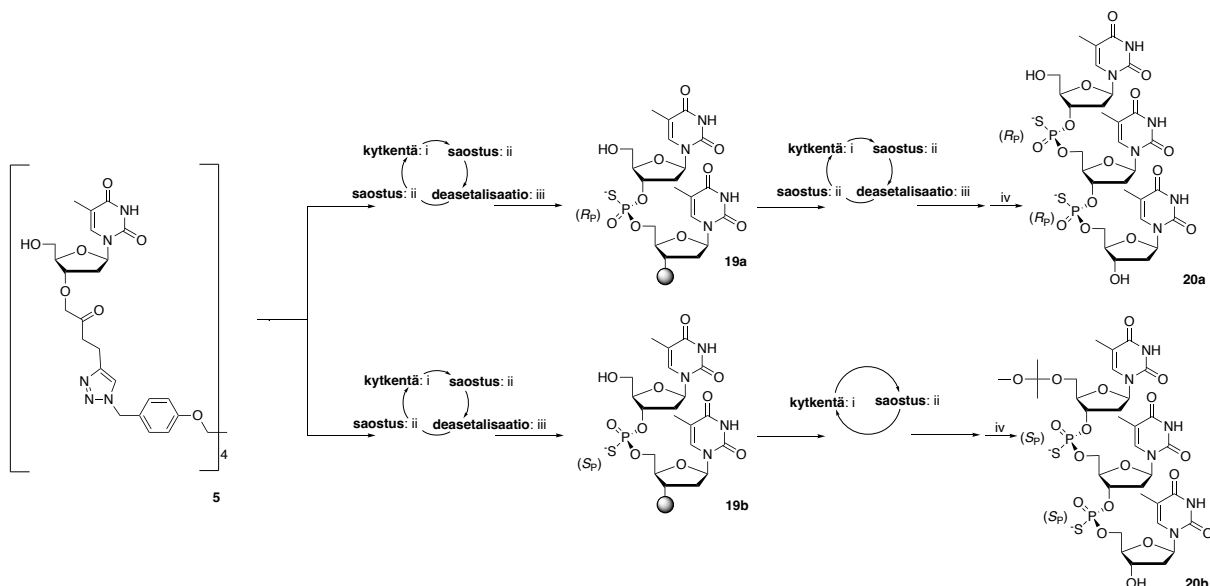
Kaavio 9. Tymidiiniin (**16**) aktivointi stereokontrolloidusti Ψ -reagensseilla (**12/15**). (i) MeCN, DBU, 1 h, rt

2.3.2 KytKentä

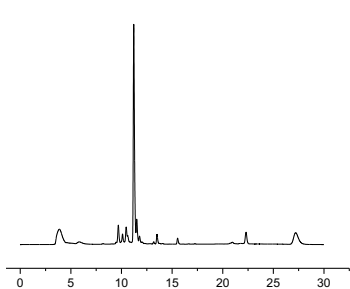
Stereokontrolloidussa LPOS-menetelmässä synteesisyklin ensimmäisessä vaiheessa (+/-)- Ψ -aktivoitu 5'-O-MIP-tymidiini (**17/18** 1,6-1,8 ekv. 5'-OH:ta kohden) kytkettiin (5'-HO-T)₄PE-kantajaan (**5**) typpi-ilmakehässä huoneenlämmössä DBU-aktivaattorin läsnäollessa. Liuottimena käytettiin asetonitriilin ja DMF:n seosta. Reaktiota seurattiin RP-HPLC:lla (kuva 13). Kytkennän reaktioaika oli 10 minuuttia, minkä jälkeen DBU neutraloitiin dikloorietikkahapolla (DCA) transesterifikaation estämiseksi sakkautuksessa. Kantajaan sidottu fosforotioaattidimeeri (**19a/b**) saostettiin kylmästä isopropanolista.

Trimeerien valmistamiseksi DBU neutraloitiin ja MIP-suojaryhmä poistettiin, jonka jälkeen synteesisyklin kytkentä toistettiin, kuten edellä on kuvattu. 5'-T(R_P)T(R_P)T-PE-3' (**20a**) syntetisoitiin kytkemällä (+)- Ψ -aktivoitu 5'-O-MIP-tymidiini (**17**) kantajaan sidottuun

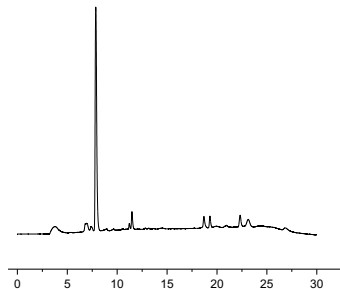
fosforotioaattidimeeriin **19a** (5'-HO-T(*R_p*)T-3'-PE) (kuvat 7-13). Vastaavasti 5'-T(*S_p*)T-PE-3' (**19b**) ja (-)-Ψ-aktivoitu 5'-*O*-MIP-tymidiini (**18**) kytkettiin toisiinsa. Yhdisteen **19b** tapauksessa DBU:ta ei neutraloitu, koska MIP-suojaryhmä haluttiin säilyttää 5'-asemassa.



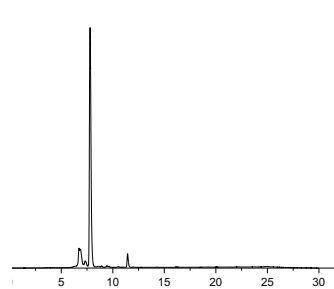
Kaavio 10. Fosforotioaattien synteesit (i) DMF, MeCN, DBU (ii) *i*PrOH-saostus (iii) 4 % DCA, DCM/MeOH (2:1) (iv) 25 % NH₃ 55 °C



Kuva 14. 5'-*O*-MIP-T(*R_p*)T-PE-3' kytkennän RP-HPLC-kromatogrammi, kun reaktio oli mennyt loppuun (*t*=10 min).



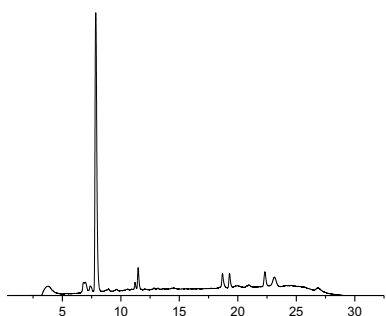
Kuva 15. 5'-T(*R_p*)T-PE-3' DCA-lisäyksen RP-HPLC-kromatogrammi.



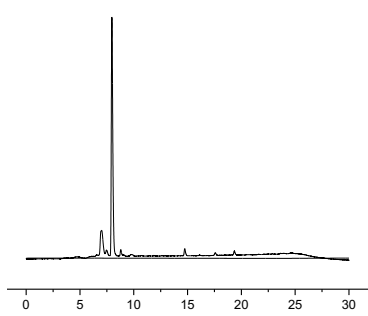
Kuva 16. 5'-T(*R_p*)T-PE-3' RP-HPLC-kromatogrammi sakkautuksen jälkeen.

2.3.3 Suojaryhmän poisto

Deasetilointi suoritettiin DCA:lla (4 %) dikloorimetaanin ja metanolin seoksessa (2:1, *v/v*) (kuva 16). Suojaryhmä irtosi 10 minuutissa täydellisesti. Tämän jälkeen reaktioseos sakkautettiin uudelleen kylmästä isopropanolista.



Kuva 17. Deasetalisaation RP-HPLC-kromatogrammi.

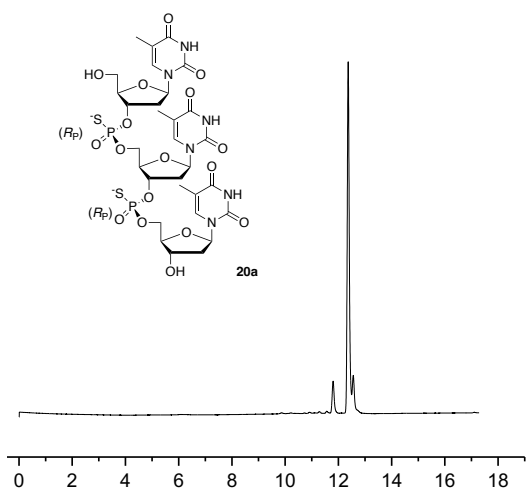


Kuva 18. RP-HPLC-kromatogrammi tuotteelle **19a** sakkautuksen jälkeen.

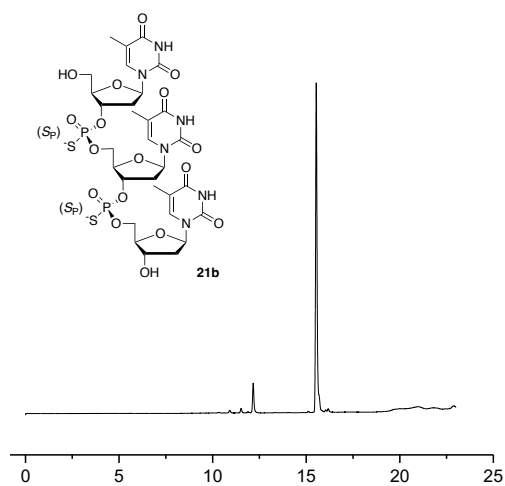
Tuote (**19b**) saostettiin kylmästä *tert*-butyyli-metyylieetteristä (kuva 15). 5'-asetaalisoijan säilyttäminen mahdollistaa esimerkiksi 3'-aseman muuttamisen fosforamidiitiksi tai aktivoinnin Ψ -reagenssilla myöhempiä synteesiä varten.

2.3.4 Kantajasta irrottaminen

Synteesien viimeisessä vaiheessa kantaja irrotettiin fosforotioaateista ammonolyysillä 55 °C:ssa, jolloin saatiin 5'-T(*R_p*)T(*R_p*)T-3' (**20a**) sekä 5'-MIP-T(*S_p*)T(*S_p*)T-3' (**20b**) (kuvat 18 ja 19). Ammonolyysin jälkeen tuotteet puhdistettiin HPLC:lla (kuvat 18 ja 19). NMR-karakterisoinnin perusteella voitiin kuitenkin todeta, että asetaalisuoja olikin lähtenyt irti **20b**:n 5'-asemasta ja syntynyt tuote oli 5'-T(*S_p*)T(*S_p*)T-3' (**21b**, kuva 19).



Kuva 19. T(*R_p*)T(*R_p*)T (**20a**) RP-HPLC-kromatogrammi



Kuva 20. T(*S_p*)T(*S_p*)T (**21b**) RP-HPLC-kromatogrammi

2.4 Johtopäätökset ja yhteenveto

Projektissa tutkittiin asetaalisuojaryhmien soveltuvuutta oligonukleotidien liuosfaasisynteeseissä. Synteeseissä käytettiin liukoista saostettavaa pentaerytritolipohjaista kantajaa **1**. Kytkennät suoritettiin Ψ -aktivoituilla tymidiineillä (**9/10**) tai nukleosidifosforamidiiteilla (**16a-c**). Projektissa valmistettiin fosforotioaattitriemerit T(*R_P*)T(*R_P*)T (**13a**) ja T(*S_P*)T(*S_P*)T (**14b**) käyttäen MIP-suojaryhmästrategiaa. IIP-suojaryhmästrategiaa hyödynnettiin, kun syntetisoitiin heteromeeriset fosfodiesterit dC-T (**18**), dA-dC-T (**19a**) ja dG-dC-T (**19b**). IIP ei sovellu fosforotioaattien suojaryhmäksi esitetyssä synteessimenetelmässä, koska se on liian labiili irroten osittain säilytyksessä ja PSI-aktivoitujen nukleosidien silikageelikromatografisessa puhdistuksessa. Siksi fosforotioaattien synteeseissä hyödynnettiin MIP-suojaryhmästrategiaa. Fosforotioaatit **13a** ja **14b** onnistuttiin syntetisoimaan enantiopuhtaasti. Yhdisteen **14b** tapauksessa MIP-suojaryhmä oli tarkoitus jättää 5'-O-asemaan, mutta sen todettiin irronneen HPLC-puhdistuksessa. Asetaalisuojaryhmät tarjoavat toimivan suojaryhmästrategian oligonukleotidien syntetiikassa.

Heteromeeristen fosfodiesterien **18** ja **19a/b** synteeseissä depurinaatiota ei havaittu sivureaktiona. Puriiniemäs pysyy kiinni deoksiriboosisokerissa, koska deasetalisaatiossa käytetty muurahaishappo mahdollistaa riittävän miedot reaktioolosuhteet. Asetaalisuojaryhmästrategiaa voidaankin käyttää mahdollisesti myös pidempien oligonukleotidien reaktioissa. IIP on selkeästi kineettisten mittausten perusteella happolabiilein suojaryhmästrategia (kuva 7). Myös MIP (kuva 6) on selvästi happolabiilimpi kuin yleisesti käytetty dimetoksitriptyyli-suojaryhmä (kuva 5).

Triemerien joukossa havaittiin RP-HPLC:n perusteella ja HRMS-karakterisoinnissa epäpuhtauksina vajaasti kytkeytyneet dimeerit (osuus n. 10 %), jotka eivät olleet reagoineet kytkentävaiheessa. Tämä johtuu mahdollisesti dimeerin dC-T:n joukkoon jääneistä isopropanoli- ja muurahaishappojäämistä sakkautusten yhteydessä. Myöhemmin dA-dC-T ja dG-dA-dC-T onnistuttiin syntetisoimaan paremmilla saannoilla ja kohtuullisen puhtaasti. Asetaalin poiston jälkeen ennen seuraavaa kytkentää sentrifugoitu sakka haihdutettiin useaan kertaan kuivista liuottimista, mikä mahdollisti myös kuivemmat reaktio-olosuhteet. Koska kosteus on merkittävä tekijä synteesisyklin kytkentävaiheessa, sen pääsy reaktioseokseen vaikuttaa reaktion etenemiseen. Tämä korostuu pienen skaalan reaktioissa. Jos reaktion skaalaa kasvatetaan, vähenee kosteuden merkitys.

3 KOKEELLISET MENETELMÄT

3.1 Yleiset menetelmät

DCM, DMF ja pyridiini kuivattiin 4 Å molekyyliuseuloilla ja MeCN kuivattiin 3 Å molekyyliuseuloilla. DBU ja TEA kuivattiin CaH₂:llä. Tuotteet karakterisoitiin NMR spektroskopisesti (Bruker Biospin 500 ja 600 MHz NMR spektrometri). Korkean resoluution massaspektri saatiin elektronisuihkuionisaatiolla (Bruker Daltonics micrOTOF-Q- ja Waters RDa HRMS-massaspektrit). Reaktioita seurattiin ohutkerroskromatografisesti (TLC) tai korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPLC). Fosforotioaattien ja nukleosidifosforamidiittien homogeenisuus sekä reaktioseoksista otettujen näytteiden koostumus analysoitiin C18 kolonnilla (RP HPLC; Shimadzu LCsolution) (4.6 x 250 mm, 5 µm, virtausnopeus 1 ml/min). HPLC-seurannoissa ja puhdistuksissa käytettiin ajoliuksena 50 mM trietyyliammoniumasetaattia sekä asetonitriiliä. Reaktioseoksista otettiin 2 µl:n näytteet reaktioiden seuranta varten, jotka laimennettiin 200 µl:lla HPLC-puskuria, joka sisälsi 70 % asetonitriiliä. Synteesien seurannoissa asetonitriilin pitoisuutta kasvatettiin 40 %:sta 100 %:iin kahdenkymmenen minuutin aikana. Fosforotioaattien ammonolyysin seurannoissa asetonitriilin pitoisuutta kasvatettiin 10 %:sta 70 %:in 15 min aikana (virtausnopeus 1 ml/min). Fosforamidiittien ammonolyysin seurannoissa asetonitriililiuoksen pitoisuutta kasvatettiin 6 %:sta 45 %:in 15 min aikana (virtausnopeus 1 ml/min). Tuotteet havaittiin UV-detektorilla käyttäen aallonpituutena 260 nm:ä. Fosforotioaatit puhdistettiin RP-HPLC:llä (Merck Hitachi) C18 kolonnilla (10 x 250 mm, 5 µm, virtausnopeus 3 ml/min), eluentina käytettiin 50 mM TEAA-puskuria ja MeCN:ä (lineaarinen gradientti 11 %:sta 55 %:in MeCN 15 minuutissa).

3.2 5'-O-suojattujen 2'-deoksiribonukleosidien kineettiset mittaukset

Suojaryhmän irtoamisen ja depurinaation havainnollistamiseksi 2'-deoksi-5'-O-DMTr-tymidiinin (**1**; 1 ekv.; 21,2 nmol; 11,5 mg), 2'-deoksi-5'-O-MIP-tymidiinin (**2**; 1,0 ekv.; 21,2 nmol; 6,7 mg) ja N⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-adenosiinin (**3a**; 1 ekv.; 21,2 nmol; 9,7 mg) happokatalysoitua metanolyysiä tutkittiin samoissa olosuhteissa huoneenlämpötilassa. Suojatut nukleosidit **1**, **2** ja **3a** liuotettiin 6 % muurahaishapon liuokseen DCM/MeOH-seokseen (2:1, v/v) Eppendorf-putkessa. Metanolyysin etenemistä seurattiin RP-HPLC:llä. 2 µl:n näytteitä otettiin sopivin väliajoin. Reaktio pysäytettiin lisäämällä näytteeseen trietyyliamiinia (2 ekv. verrattuna muurahaishappoon), jäädytettiin ja laimennettiin MeCN/H₂O-seoksella (200 µl,

1:1, v/v). Näytteiden koostumus analysoitiin RP-HPLC:llä. Esitetyt puoliintumisajat (kappale 2.1, taulukko 1) laskettiin soveltamalla ensimmäisen kertaluvun nopeusvakion yhtälöä lähtöainepiikin pienenemiseen.

3.3 Nukleosidifosforamidiitit

3.3.1 N⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-adenosiini- 3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyyli)-fosforamidiitti

N⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-adenosiini (**3a**; 1 ekv; 1,1 mmol; 500 mg) liuotettiin dikloorimetaaniin (5,7 ml). Reaktioliuokseen lisättiin TEA (1,44 ekv.; 1,6 mmol; 0,220 ml) ja 1-kloori-1-(2-syanoetoksi)-N,N-diisopropyylifosfanamidiitti (1,2 ekv.; 1,3 mmol; 0,294 ml). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä noin kolme tuntia, minkä jälkeen reaktion eteneminen tarkistettiin TLC-kromatografisesti (DCM, 10 % MeOH, 1 % TEA). Reaktioseos puhdistettiin silikakromatografisesti. Ajoliuksena käytettiin etyyliasetaatti-heksaaniliuosta (2:1, v/v, 3 % TEA). Liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa ja tuote kuivattiin vakuuieksikaattorissa. Saanto oli 0,63 g (88,8 %). Yhdiste **4a** ($R_f = 0,25$) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): $\delta = 9,30$ (1H, s, NH), 8,64 (1H, d, $J = 8,36$ Hz, H2); 8,34 (1H, d, $J = 12,33$ Hz, H8); 7,99 (1H, t, $J = 19,91$ Hz, Bz); 7,69-7,65 (1H, m, Bz); 7,59-7,53 (2H, m, Bz); 6,52-6,49 (1H, m, H1'); 4,91-4,82 (1H, m, H3'); 4,26-4,18 (1H, m, H4'); 3,93-3,61 (7H, m, OCH, OCH₂, 2 x NCH, H5' ja H5''); 3,03-2,95 (1H, m, H2'); 2,73-2,62 (3H, m, CH₂ ja H2''); 1,31; 1,30; 1,30 ja 1,29 (6H, s, 2 x CH₃ ketaalissa), 1,26 ja 1,24 (12 H, d, $J = 6,50$ ja 7,00 Hz, 4 x CH₃ N,N-diisopropyyli), 1,03-1,01 (6H; m; 2 x CH₃ isopropoksi). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN): $\delta = 152,4$ (C6); 152,3 (C8); 150,4 ja 150,3 (C4); 143,0 (C2); 133,1; 129,3; 128,7 ja 125,3 (Bz), 124,3 (C5), 119,1 (CN), 100,9 ja 100,8 (C ketaalissa), 86,2; 86,1; 86,0 ja 85,9 (C4'), 84,7 ja 84,7 (C1'), 74,1; 74,0; 74,0 ja 73,8 (C3') 63,5 ja 63,5 (OCH), 61,5 ja 61,4 (C5'), 59,2; 59,1; 59,1 ja 59,0 (OCH₂), 43,7; 43,7; 43,61 ja 43,6 (CHN), 39,3; 39,2 ja 39,2 (C2'), 25,8 ja 25,7 (CH₃ ketaalissa), 24,5; 24,5; 24,5; 24,5; 24,4; 24,3; 24,3 ja 24,2 (CH₃ N,N-diisopropyyli- ja isopropoksi-ryhmissä), 20,7 ja 20,6 (CH₂). ³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN): $\delta = 147,94$ ja 147,78 ppm. HRMS (ESI): m/z [M+Na]⁺ (havaittu); 678,3139 [M+Na]⁺ (laskettu); 678,3123.

3.3.2 *N*⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-*O*-IIP-sytidiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyyli)-fosforamidiitti

*N*⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-*O*-IIP-sytidiini (**3b**; 1 ekv.; 1,1 mmol; 500,4 mg) liuotettiin dikloorimetaaniin (6,0 ml) typpi-atmosfäärissä. Reaktioliuokseen lisättiin TEA (1,44 ekv., 1,7 mmol; 0,233 ml) ja 1-kloori-1-(2-syanoetoksi)-*N,N*-diisopropyyli-fosfanamidiitti (1,1 ekv.; 1,3 mmol; 0,287 ml). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä noin kolme tuntia, minkä jälkeen reaktion eteneminen tarkastettiin ohutkerroskromatografialla (DCM, 10 % MeOH, 1 % TEA). Reaktioseos puhdistettiin silikakromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin etyyliasetaatti-heksaaniliuosta (2:1, v/v, 3 % TEA). Liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa ja tuote kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. Saanto oli 0,55 g (80,1 %). Yhdiste **4b** ($R_f = 0,44$ ja $0,32$) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): $\delta = 9,09$ (1H, s, NH); $8,24$ (1H, d, $J = 7,68$ Hz, H6); $7,89$ (2H, d, $J = 8,03$ Hz, Bz); $7,68-7,64$ (2H, m, Bz); $7,57-7,54$ (1H, m, Bz); $7,43$ (1H, s, H5); $6,20-6,10$ (1H, m, H1'); $4,58-4,52$ (1H, m, H3'); $4,30-4,18$ (1H, m, H4'); $4,07-3,97$ (1H, m, OCH), $3,88-3,63$ (6H, m, 2 x NCH, H5' ja H5''); $2,69-2,57$ (3H, m, CH₂ ja H2'); $2,31-2,25$ (1H, m, H2''); $1,40$, $1,39$; $1,38$ ja $1,36$ (6H, s, 2 x CH₃ ketaalissa), $1,22$ (12H, d, $J = 7,00$ Hz, 4 x CH₃ *N,N*-diisopropyyli), $1,16$ ja $1,14$ (6H, d, $J = 6,00$ Hz, 2 x CH₃ isopropoksi). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN): $\delta = 163,2$ (C4), $155,1$ (C2), $145,4$ (C6), $134,4$; $129,2$; $128,7$; $128,6$ ja $128,6$ (Bz), $119,1$ (CN), $101,1$ (C ketaalissa), $96,3$ (C5), $87,6$ (C1'), $86,50$ ja $86,5$ (C4'), $74,1$; $73,9$ ja $73,7$ (C3'), $63,8$ (C5'), $61,2$ (C5'), $59,1$ ja $59,0$ (OCH₂), $43,7$ ja $43,6$ (CHN), $41,0$ ja $40,9$ (C2') $25,8$ ja $25,7$ (CH₃ ketaalissa), $24,5$; $24,5$; $24,5$; $24,4$ ja $24,3$ (CH₃ *N,N*-diisopropyyli- ja isopropoksiryhmissä), $20,7$ ja $20,6$ (CH₂). ³¹P NMR (202 MHz, CD₃CN): $\delta = 147,98$ ja $147,93$ ppm. HRMS (ESI): m/z 654,3027 [M+Na]⁺ (havaittu); [M+Na]⁺; (laskettu); 654,2997.

3.3.3 *N*²-isobutyryyli-2'-deoksi-5'-*O*-IIP-guanosiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyyli)-fosforamidiitti

*N*²-isobutyryyli-2'-deoksi-5'-*O*-IIP-guanosiini (**3c**; 1 ekv.; 1,1 mmol; 500 mg) liuotettiin dikloorimetaaniin (5,7 ml). Reaktioliuokseen lisättiin TEA (1,44 ekv.; 1,6 mmol; 0,220 ml) ja 1-kloro-1-(2-syanoetoksi)-*N,N*-diisopropyyli-fosfanamidiitti (1,2 ekv.; 1,3 mmol; 0,294 ml). Reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämmössä noin kolme tuntia, minkä jälkeen reaktion eteneminen tarkistettiin ohutkerroskromatografialla (DCM, 10 % MeOH, 1 % TEA). Reaktioseos puhdistettiin silikakromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin dikloorimetaanin ja

metanolin liuosta (95:5, v/v, 3 % TEA). Liuottimet haihdutettiin pois alipaineessa ja tuote kuivattiin vakuumeiksikaattorissa. Saanto oli 0,53 g (72,8 %). Yhdiste **4c** ($R_f = 0,55$) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): $\delta = 7,89$ (1H, s, H8); 6,20 (1H, dd, $J=6,50$ ja 6,50 Hz, H1'); 4,77–4,69 (1H, m, H3'); 4,22–4,17 (1H, m, H4'); 3,91–3,59 (7H, m, OCH, OCH_2 , 2 x NCH, H5' ja H5''), 2,88–2,81 (1H, m, H2'), 2,77–2,70 (3H, m, CH *i*Bu, ja CH_2), 2,55 (1H, m, H2''); 2,2 (H_2O); 1,34 ja 1,32 (1H, s, 2 x CH_3 ketaalissa), 1,25–1,21 (3H, m, *i*Bu:n CH ja CH_2) 1,07–1,04 (6H, m, isopropoksin 2 x CH_3). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): $\delta = 180,5$ ja 180,5 (C=O *i*Bu), 155,9 (C6), 149,2 ja 149,1 (C2), 148,6 (C4), 138,0 ja 137,9 (C8), 121,7 ja 121,6 (C5), 119,2 ja 119,2 (CN), 100,9 (C ketaalissa), 86,2; 86,2; 86,0 ja 86,0 (C4'), 84,1 (C1'), 75,6; 74,4; 74,3 ja 74,2 (C3'), 63,6 ja 63,5 (OCH), 61,7 ja 61,6 (C5'), 59,0; 59,0; 58,9 ja 58,9 (OCH_2), 43,7; 43,7; 43,6 ja 43,6 (CHN), 39,3; 39,3 ja 39,3 (C2'), 36,2 ja 36,2 (CH *i*Bu), 25,8; 25,7; 25,7 ja 25,7 (CH_3 ketaalissa), 24,5; 24,5; 24,5; 24,4; 24,3; 24,3 ja 24,3 (CH_3 *N,N*-diisopropyli- ja isopropoksi-ryhmissä), 20,72; 20,70 ja 20,66 (CH_2). ^{31}P NMR (202 MHz, CD_3CN): $\delta = 147,98$ ja 147,77 ppm. HRMS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (havaittu); 660,3245. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (laskettu); 660,3244.

3.4 Heteromeeristen fosfodiesterien synteesit

3.4.1 dC-T

PE-T (**5**; 1 ekv.; $5,1 \times 10^{-5}$ mol; 99,6 mg) liuotettiin kuivaan DMF:in (1,5 ml) N_2 -atmosfäärissä. Seokseen lisättiin asetonitriiliin (0,7 ml) liuotettu fosfityloitu IIP-dC (**4b**; 8 ekv.; 0,41 mmol; 259 mg) ja tetratsoli (8 ekv.; 0,41 mmol; 0,91 ml). Reaktiota seurattiin HPLC:lla 3 h 45 min, minkä jälkeen reaktioseokseen lisättiin mCPBA (15 ekv.; 0,77 mmol; 171,7 mg). Hapetettu tuote sakkautettiin kylmästä isopropanolista (62,6 ml) ja sentrifugoitiin. Isopropanoli dekantoitiin pois ja sakka kuivattiin vakuumeiksikaattorissa. Saanto oli 204,4 mg (96,75 %). Kuivattu sakka liuotettiin dikloorimetaanin ja metanolin seokseen (DCM:MeOH 2:1 v/v; 0,481 ml). Seokseen lisättiin muurahaishappoa (15 ekv.; 0,77 mmol; 0,029 ml). Reaktiota seurattiin RP-HPLC:llä. Seokseen lisättiin 25 minuutin kuluttua pyridiiniä (2 ekv. HCOOH:on nähden, 1,5 mmol; 0,124 ml). Seos sakkautettiin uudelleen kylmästä isopropanolista (12,7 ml) ja sentrifugoitiin. Reaktioliuotin dekantoitiin pois ja sakka kuivattiin vakuumeiksikaattorissa. Saanto oli 145,0 mg (75,9 %). 3'-dC-T-PE-5':n (**6**) joukkoon (7 mg; 0,0075 mmol) lisättiin 25 %:sta ammoniakkiuosta (1,2 ml) kierrekorkillisessa mikrosentrifugiputkessa. Reaktioliuosta inkuboitiin 55 °C:ssa noin neljä tuntia. Seos kaadettiin kvantitatiivisesti keittopulloon veden avulla ja haihdutettiin alipaineessa ammoniakki pois. Suodatettiin sakka pois alipaineessa ja

sakkaa huuhdeltiin vedellä. Suodoksesta tarkastettiin ammonolyysin onnistuminen RP-HPLC:lla. Vesifaasia uutettiin etyyliasetaatilla kolme kertaa. Tuotteen puhtaus varmistettiin RP-HPLC:lla. UV-saanto oli 95,9 %. Synteesisyklin kokonaissaanto oli 70,4 %. Yhdiste **7** karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): $\delta = -1,03$ ppm. ESI⁺-HRMS: m/z 530,1293 [M-H]⁻ (havaittu); 530,1294 [M-H]⁻ (laskettu).

3.4.2 dA-dC-T

dC-T-PE (**7**; 1 ekv.; 0,03 mmol; 111,3 mg) liuotettiin kuivaan DMF:ään (0,98 ml) N_2 -atmosfäärissä. Seokseen lisättiin asetonitriliin (0,45 ml) liuotettu fosfityloitu IIP-dA (**4a**; 8 ekv.; $2,4 \times 10^{-4}$ mol; 156 mg) ja tetratsoli (8 ekv.; 0,24 mmol; 0,52 ml). Reaktiota seurattiin HPLC:llä. Neljän tunnin jälkeen reaktioseokseen lisättiin 4 ekv. tetratsolia, koska reaktio oli pysähtynyt. 6 h 40 min jälkeen seokseen lisättiin vielä 4 ekv. fosfityloitua nukleosidia ja tetratsolia. 7h 40 min kuluttua reaktioseos hapetettiin mCPBA:lla (22,5 ekv.; 0,77 mmol; 150,3 mg). Hapetusreaktiota seurattiin HPLC:lla. Hapetettu tuote sakkautettiin kylmästä isopropanolista (49,4 ml) ja sentrifugoitiin. Isopropanoli dekantoiitiin pois sakan joukosta, ja sakka kuivattiin vakuumeiksikkaattorissa. Saanto oli 160,1 mg (89,5 %). Kuivattu sakka liuotettiin dikloorimetaanin ja metanolin seokseen (DCM:MeOH 2:1 v/v; 0,28 ml). Seokseen lisättiin muurahaishappoa (15 ekv.; 0,45 mmol; 16,7 μl) ja annettiin reagoida. Reaktio pysäytettiin 10 minuutin kuluttua lisäämällä pyridiiniä (2 ekv. HCOOH:n nähden, 0,89 mmol; 72 μl). Seos sakkautettiin uudelleen kylmästä isopropanolista (7,4 ml) ja sentrifugoitiin. Reaktioliuotin dekantoiitiin pois ja sakka kuivattiin vakuumeiksikkaattorissa. Saanto 75,1 mg (50,2 %). 3'-dA-dC-T-PE-5':n joukkoon (5,3 mg; 0,95 μmol) lisättiin 25 %:sta ammoniakiliuosta (1,2 ml) kierrekorkillisessa mikrosentrifugiputkessa. Reaktioluosta inkuboiitiin 55 °C:ssa noin 21 h. Seos kaadettiin kvantitatiivisesti keittopulloon veden avulla ja haihdutettiin alipaineessa ammoniakki pois. Suodatettiin sakka pois alipaineessa ja sakkaa huuhdeltiin vedellä. Suodoksesta tarkastettiin ammonolyysin onnistuminen HPLC:lla. Suodosta uutettiin etyyliasetaatilla kolme kertaa. Tuotteen puhtaus varmistettiin RP-HPLC:lla UV-saanto oli 119 % (kvantitatiivinen). Synteesin kokonaissaanto oli 44,9 %. Yhdiste **8a** karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): $\delta = -1,03$ ja $-1,18$ ppm. ESI⁺-HRMS: m/z 843,1956 [M-H]⁻ (havaittu); 843,1870 [M-H]⁻ (laskettu).

3.4.3 dG-dC-T

dC-T-PE (**7**; 1 ekv.; 0,018 mmol; 67,8 mg) liuotettiin kuivaan DMF:ään (0,53 ml) N₂-atmosfäärissä. Seokseen lisättiin asetonitriiliin (0,25 ml) liuotettu fosfityloitu IIP-dG (**4c**; 8,4 ekv.; 0,15 mmol; 97,6 mg), tetratsoli (8,4ekv.; 0,41 mmol; 0,32 ml) ja pyridiini (15 μ l). Reaktiota seurattiin HPLC:lla. Kun aikaa oli kulunut 2 h 50 min, reaktioseokseen lisättiin vielä tetratsolia ja fosfityloitua dG:a (4 ekv.). Viiden tunnin kuluttua reaktioseokseen lisättiin mCPBA (23,3 ekv.; 0,42 mmol; 94,8 mg) ja annettiin reagoida 15 min. Hapetettu tuote sakkautettiin kylmästä isopropanolista (22,4 ml) ja sentrifugoitiin. Isopropanoli dekantoitiin pois sakan joukosta, ja sakka kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa. Saanto oli 88,2 mg (87,94 %). Kuivattu sakka liuotettiin dikloorimetaanin ja metanolin seokseen (2:1, 271 μ l). Seokseen lisättiin muurahaishappoa (15 ekv. teoreettiseen sakkaan nähden, $2,7 \times 10^{-4}$ mol; 16,2 μ l) ja annettiin reagoida. Seokseen lisättiin 6 min kuluttua pyridiiniä (2 ekv. HCOOH:on nähden; 0,54 mmol; 69,4 μ l). Seos sakkautettiin uudelleen kylmästä isopropanolista (7,2 ml) ja sentrifugoitiin. Liuotin dekantoitiin pois ja sakka kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa. Saanto oli 63,5 mg (72,4 %). 3'-dG-dC-T-PE-5':n joukkoon (6 mg; 1,1 μ mol) lisättiin 25 %:sta ammoniakiliuosta (1,2 ml) kierrekorkillisessa mikrosentrifugiputkessa. Inkuboitiin 55 °C:ssa noin 19 h. Seos kaadettiin kvantitatiivisesti keittopulloon veden avulla ja haihdutettiin alipaineessa ammoniakki pois. Suodatettiin sakka pois alipaineessa ja sakkaa huuhdeltiin vedellä. Suodoksesta tarkastettiin ammonolyysin onnistuminen HPLC:lla. Suodosta uutettiin etyyliasetaatilla kolme kertaa. Tuotteen puhtaus varmistettiin RP-HPLC:lla UV-saanto oli 97,3 %. Synteesin kokonaissaanto oli 62 %. Yhdiste **8b** karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ³¹P NMR (202 MHz, D₂O): $\delta = -1,04$ ja $-1,16$ ppm. ESI⁺-HRMS: *m/z* 859,1911 [M-H]⁻ (havaittu); 859,1819 [M-H]⁻ (laskettu).

3.5 Asetaalisuojatut Ψ -aktivoidut tymidiinit

3.5.1 (-)-limoneenioksidi

Metyylitrioktyyliammoniumsulfaatti (0,02 ekv.; 2,2 mmol; 1,03 g), vetyperoksidi (1,1 ekv.; 0,12 mol; 12,35 ml), fenyylifosfonihappo (0,01 ekv.; 1,1 mmol; 0,17 g), natriumsulfaatti (0,3 ekv.; 0,033 mol; 4,62 g) ja natriumvolframidihydraatti (0,02 ekv.; 2,2 mmol; 0,7266 g) liuotettiin veteen (6 ml). Reaktioliuokseen lisättiin (-)-limoneeni (**9**; 1 ekv.; 0,11 mol; 17,78 ml) kolmessa osassa siten, että reaktioseos ei lämmennyt. Reaktioseosta sekoitettiin noin 22 tuntia ja reaktion

etenemistä seurattiin TLC-kromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin 100 % dikloorimetaania ja levyt värjättiin KMnO_4 -liuoksella. Reaktioseoksen joukkoon lisättiin heksaania (15 ml) ja orgaanista faasia pestiin 10 % natriumbisulfaatilla (6 ml), kylläisellä natriumvetykarbonaatilla (6 ml) sekä kylläisellä natriumkloridiliuoksella (6 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa. Haihdutusjäännökseen lisättiin pyrrolidiinia (1,0 ekv.; 0,11 mol; 9,19 ml) ja vettä (0,8 ekv.; 0,088 mol; 1,59 ml). Keittopulloon yhdistettiin pystyjäähdytin vesikierrolla ja seoksen annettiin reagoida 85 °C:ssa 24 h toisen enantiomeerin tuhoamiseksi. Vuorokauden kuluttua enantiopuhtaus tarkastettiin ^1H NMR:llä. Halutun enantiomeerin lisäksi sivutuotteena havaittiin toista enantiomeeria, joten reaktiota jatkettiin vielä 12 h. Sivutuotteen tuhoutuminen varmistettiin vielä uudestaan ^1H NMR:llä. Reaktioseosten annettiin jäähtyä huoneenlämpöön, jonka jälkeen seokseen lisättiin heksaania (15 ml). Seosta pestiin erotussuppilossa sitruunahapolla (2 x 7,5 ml), kylläisellä natriumvetykarbonaatilla (kunnes liuoksen pH > 7, johon yksi pesukerta (7,5) ml oli riittävä) ja natriumkloridiliuoksella (7,5 ml). Tuote ei kestä kahta useampaa sitruunahappopesua tai väkevämpää sitruunahappoa. Orgaaninen faasi kuivattiin natriumsulfaatilla, suodatettiin, ja liuottimet haihdutettiin alipaineessa. (Huom. Pesun onnistuminen tarkistettiin TLC:llä, jossa ajoliuoksena käytettiin 100 % dikloorimetaania ja levyt värjättiin KMnO_4 -liuoksella sekä kuumennettiin varovasti. Raakatuote (ruskea, öljymäinen neste) puhdistettiin silikakromatografisesti käyttäen ajoliuoksena 100 % dikloorimetaania. Tuotefraktiot yhdistettiin, kuivattiin Na_2SO_4 :lla ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Saanto oli 2,22 g (13 %). Yhdiste **10** ($R_f = 0,55$) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,70$ (1H, s, =C); 4,61 (1H, s, =CH₂); 3,08 (1H, s, O-CH); 2,10 (2H, m, CH₂); 1,85 (2H, m, CH₂); 1,71 (4H, m, CH, CH₃); 1,33 (3H, s, CH₃); 1,19 (2H, m, CH₂). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 149,1$ (=C); 109,2 (=CH₂); 60,6 (O-CH); 57,4 (O-C); 36,2 (CH); 30,9 (CH₂); 28,8 (CH₂); 25,9 (CH₂); 24,3, (CH₃); 21,1 (CH₃).

3.5.2 (+)-limoneenioksidi

(+)-limoneenioksidi (**14**) valmistettiin kuten (-)-limoneenioksidi (**10**). Saanto oli 1,05 g (6,2 %). Yhdiste **14** karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,70$ (1H, s, =CH); 4,61 (1H, s, =CH₂); 3,08 (1H, s, O-CH); 2,10 (2H, CH₂); 1,85 (2H, m, CH₂); 1,71 (4H, m, CH, CH₃); 1,33 (3H, s, CH₃); 1,19 (2H,

m,CH₂). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ= 149,1 (=C); 109,2 (=CH₂); 60,6(O-CH); 57,4(O-C); 36,2 (CH); 30,9 (CH₂); 28,8(CH₂); 25,9(CH₂); 24,3, (CH₃); 21,1(CH₃).

3.5.3 (+)-Ψ-reagenssi

(-)-limoneenioksidi (**10**; 1,5 ekv.; 8,8 mmol; 1,35 g) ja trietyyliammonium-bis-(pentafluorotiofenoli)fosforiditioaatti (**11**; 1 ekv.; 5,9 mmol; 3,5 g) liuotettiin dikloorimetaaniin (17,5 ml) ja reaktioseokseen lisättiin TFA:a (1,5 ekv.; 8,8 mmol; 0,67 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 35 °C:ssa tunnin ajan minkä jälkeen reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön. Reaktio etenemistä seurattiin TLC:llä (100 % DCM, KMnO₄-värjäys). Reaktioseokseen lisättiin heksaania (35 ml) ja seosta pestiin vedellä (17,5 ml), kylläisellä natriumvetykarbonaattiliuoksella (35 ml) ja 10 %:lla kaliumdivetyfosfaattiliuoksella (10,5 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin magnesiumsulfaatilla, suodatettiin ja haihdutettiin noin 7 ml:n tilavuuteen. Haihdutusjäännökseen lisättiin metanolia (17,5 ml), josta haihdutettiin alipaineessa puolet pois. Tämä toistettiin yhteensä kolme kertaa heksaanin poistamiseksi. (Huom. Tuote sakkautui ensimmäisen metanolilisäyksen yhteydessä haihdutuksen aikana). Seosta sekoitettiin jäävesihauteessa (7 °C) 5 min, minkä jälkeen liuos suodatettiin (Büchner-suppilolla). Keittopulloon jäänyttä sakkaa pestiin kylmällä metanolilla (3,5 ml) ja liuos suodatettiin uudestaan. Tuote **12** (valkoinen jauhe) kuivattiin vakuumiyksikkaattorissa ja karakterisoitiin ¹H NMR:llä ja ³¹P NMR:llä. Tuotteen joukossa havaittiin toista diastereoisomeeriä epäpuhtautena. Tuote uudellenkiteytettiin metanolista (13,9 ml) sekoittaen 60 °C:ssa, kunnes kaikki sakka oli liuennut. Seos jäähdytettiin huoneenlämpöön ja siihen lisättiin vettä (1 ml). Seosta sekoitettiin magneettisekoittajalla 20 tuntia, suodatettiin (lasisintterin läpi alipaineen avulla) ja kuivattiin vakuumiyksikkaattorissa. ³¹P NMR:n perusteella tuote ei ollut vielä diastereomeerien suhteen puhdasta, joten edellä mainitut työvaiheet toistettiin, mutta vettä ja metanolia käytettiin 1,5-kertaiset määrät. Tuote uudellenkiteytettiin yhteensä neljä kertaa. Saanto oli 0,49 g (18 %). Yhdiste **12** (R_f = 0,87) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ= 5,02 (1H, s, =CH₂); 4,90 (1H, s, =CH₂); 4,27 (1H, dt, J=12,3 J=8,3 Hz, CH); 2,11(3H, m, CH₂ ja CH); 1,78 (3H, s, CH₃); 1,72 (3H, s CH₃); 1,59 (4H, 2 x CH₂). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ= 145,0 (Bz); 111,7 (=CH₂); 86,6 (=C); 77,0 (O-CH); 38,9 (S-C); 33,7 (CH); 27,7 (CH₂); 23,4 (CH₂); 22,5 (CH₃); 22,0 (2 x CH₃). ³¹P NMR (202 MHz CDCl₃): δ=101,2 ppm.

3.5.4 (-)-Ψ-reagenssi

(+)-limoneenioksidi (**14**; 1,5 ekv.; 6,9 mmol; 1,05 g) ja trietyyliammonium-bis-(pentafluorotiofenoli)fosforiditioaatti (**11**; 1 ekv.; 4,6 mmol; 2,74 g) liuotettiin dikloorimetaaniin (13,69 ml). Reaktioseokseen lisättiin vielä TFA:a (1,5 ekv.; 6,9 mmol; 0,56 ml). Reaktioseosta sekoitettiin 35 °C:ssa tunnin ajan. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön (reaktion eteneminen tarkastettiin TLC:llä (100 % DCM, KMnO₄-värjäys)). Reaktioseokseen lisättiin heksaania (27,4 ml) ja seosta pestiin vedellä (14 ml), kylläisellä NaHCO₃-liuoksella (27,4 ml) ja 10 %:lla KH₂PO₄-liuoksella (8,25 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa noin 7 ml:n tilavuuteen. Haihdutusjäännökseen lisättiin metanolia (13,7 ml), josta haihdutettiin alipaineessa puolet pois. Tämä toistettiin yhteensä kolme kertaa heksaanin poistamiseksi. (Tuote sakkautui ensimmäisen metanolilisyksen yhteydessä haihdutuksen aikana). Seosta sekoitettiin jäävesihauteessa (7 °C) 5 min, minkä jälkeen suodatettiin (Büchner-suppilolla). Keittopulloon jäänyttä sakkaa pestiin kylmällä metanolilla (2,7 ml) ja liuos suodatettiin uudestaan. Tuote **15** (valkoinen jauhe) kuivattiin vakuumieksikkaattorissa ja karakterisoitiin ¹H NMR:llä ja ³¹P NMR:llä. Tuotteen joukossa havaittiin toista diastereoisomeeriä epäpuhtautena. Tuote uudellenkiteytettiin metanolista (11,6 ml) sekoittaen 60 °C:ssa, kunnes kaikki sakka oli liuennut. Seos jäädytettiin huoneenlämpöön ja siihen lisättiin vettä (0,8 ml). Seosta sekoitettiin magneettisekoittajalla 20 tuntia, suodatettiin (lasisinterin läpi alipaineen avulla) ja kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. ³¹P NMR:n perusteella tuote ei ollut vielääkään diastereomeerien suhteen puhdasta, joten edellä mainitut työvaiheet toistettiin, mutta vettä ja metanolia käytettiin 1,5- kertaiset määrät. Tuote puhdistui yhteensä kahden kiteytyksen jälkeen. Saanto oli 0,581 g (23 %). Yhdiste **15** (R_f = 0,86) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ= 5,01 (1H, s, =CH₂); 4,89 (1H, s, CH₂); 4,27 (1H, dt, J=8,50 Hz, J=13,04 Hz, CH); 1,91(3H, m, CH₃); 1,74 (3H, s, CH₃); 1,60(7H, s, 3 x CH₂ ja CH). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ=144,0 (Bz); 110,7 (=CH₂); 85,5 (=C); 75,9 (O-CH); 37,8 (S-C); 32,6 (CH); 26,7 (CH₂); 22,4 (CH₂); 21,5 (CH₂); 23,0 (2 x CH₃). ³¹P NMR (202 MHz CDCl₃): δ=99,5 ppm.

3.5.5 (+)-Ψ-reagenssilla aktivoitu 5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-tymidiini

5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-tymidiini (**16**; 1 ekv.; 0,50 mmol; 0,16 g) ja (+)- Ψ-reagenssi (**12**; 1,3 ekv.; 0,65 mmol; 0,29 g) kuivattiin vakuumieksikkaattorissa yön yli. Yhdiste **12** liuotettiin

asetonitriiliin (4,47 ml) ja lisättiin yhdisteen **16** joukkoon. Reaktioseos jäädytettiin jäävesihauteessa ja siihen lisättiin DBU (1,3 ekv.; 0,65 mmol; 0,097 ml). Reaktioliuosta sekoitettiin 1 h, minkä jälkeen tuote eristettiin lämpökaapissa kuivatun 2,5 cm:n paksuisen silikakerroksen läpi lasisinterissä suodattaen ja käyttäen etyyliasettaattia ajoliuoksena, jossa oli 1 % pyridiiniä. Tuotefraktiot yhdistettiin ja pestiin kylläisellä NaHCO₃:lla (50 ml), tislattulla vedellä (50 ml) ja 10 %:lla KH₂PO₄-liuoksella. Orgaanien faasi kuivattiin MgSO₄:lla (50 ml) ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Tuote puhdistettiin silikakromatografisesti ajoliuoksena etyyliasettaatin ja heksaaniin seos (1:1), jossa oli 1 % pyridiiniä. Applikoitaessa tuotetta silikapylvääseen se sakkasi etyyliasettaatin ja heksaanin seoksesta (v/v, 1:1), jossa oli 1 % pyridiiniä, mutta liukeni etyyliasettaatin ja 1 % pyridiinin seokseen. Näin ollen applikointi silikapylvääseen suoritettiin jälkimmäisellä liuoksella. Tuotefraktiot yhdistettiin, kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin alipaineessa. Puhdistus toistettiin käyttäen ajoliuoksena dikloorimetaanin, metanolin ja pyridiinin seosta (95:4:1). Tuote haihdutettiin kahdesti dikloorimetaanista. Saanto oli 0,171 g (68 %). Yhdiste **17** (R_f = 0,54) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,67 (1H, s, NH); 7,62 (1H, s, H1'); 6,45 (1H, dd, J=5,4, ja 9,2 Hz, H4'); 5,11 (1H, s, =CH₂); 4,93 (1H, s, =CH₂); 4,52 (1H, m, H3'); 3,77 (1H, d, J= 10,5 Hz, H5'); 3,70 (1H, d, J = 11,6 Hz, H5'); 3,28 (3H, s, CH₃); 2,53 (1H, q, J=5,7 Hz, H6); 2,20 (2H, m, H2'); 1,97 (3H, s, CH₃, C5); 1,84 (3H, q, CH₃); 1,73 (3H, s, CH₃); 1,58 (8H, s, 3 x CH₂ ja 2 x CH); 1,43 (6H, s, 2 x CH₃). ³¹P NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 101,6 ja 101,7 ppm. HRMS (ESI) m/z: [M + Na]⁺ laskettu 583,1672; havaittu 583,1689.

3.5.6 (-)-Ψ-reagenssilla aktivoitu 5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-tymidiini

5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-tymidiini (**16**; 1 ekv.; 0,42 mmol; 0,13 g) ja (-)-Ψ-reagenssi (**15**; 1,3 ekv.; 0,55 mmol; 0,24 g) kuivattiin vakuumieksikaattorissa yön yli. Yhdiste **15** liuotettiin asetonitriiliin (3,76 ml) ja lisättiin yhdisteen **16** joukkoon. Reaktioseos jäädytettiin jäävesihauteessa ja siihen lisättiin DBU (1,3 ekv.; 0,55 mmol; 0,082 ml) (Reaktiota seurattiin TLC:llä käyttäen ajoliuoksena 100 % etyyliasettaattia.). Reaktioliuosta sekoitettiin 1 h, minkä jälkeen tuote eristettiin lämpökaapissa kuivatun 2,5 cm:n paksuisen silikakerroksen läpi lasisinterissä suodattaen ja käyttäen etyyliasettaattia ajoliuoksena, jossa oli 1 % pyridiiniä. Tuotefraktiot yhdistettiin ja pestiin kyläisellä NaHCO₃:lla (50 ml), tislattulla vedellä (50 ml) ja 10 % KH₂PO₄-liuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO₄:lla (50 ml) ja haihdutettiin kuiviin

alipaineessa. Tuote puhdistettiin silikakromatografisesti ajoliuksena etyyliasetaatin ja heksaaniin seos (1:1), jossa oli 1 % pyridiiniä. Tuotefraktiot yhdistettiin, kuivattiin magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin alipaineessa. Saanto oli 0,179 g (76 %). Yhdiste **18** ($R_f = 0,50$) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,64$ (1H, s, NH); 7,63 (1H, s, H1'); 6,45 (1H, q, $J=15,3$ Hz, H4'); 5,10 (1H, s, =CH₂); 4,94 (1H, s, =CH₂); 4,51 (1H, dt, $J=6,7$ ja 13,3 Hz, H3'); 3,72 (2H, ddd, $J=2,5, 10,7, 17,4$ Hz, H5'); 3,28 (3H, s, CH₃); 2,53 (1H, dd, $J=5,0, 8,8$ Hz, H6); 2,20 (2H, m, H2'); 1,97 (3H, s, CH₃ C5); 1,83(3H, s, CH₃); 1,73(3H, s, CH₃); 1,58 (8H, s, 3xCH₂ ja 2xCH); 1,43 (6H, s, 2x CH₃). ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3): $\delta = 102$ ppm. HRMS (ESI) m/z: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ laskettu 583,1672; havaittu 583,1689.

3.6 Homomeeristen tymidiinifosforotioaattien synteesit

3.6.1 T(R_p)T-PE

(+)- Ψ -reagenssilla aktivoitu 5'-O-MIP-tymidiini (**17**; 7,26 ekv.; 0,15 mmol; 85,7 mg) ja PE-T-kantaja (**5**; 1 ekv.; 0,021 mmol; 41,07 mg) liuotettiin asetonitriilin (0,39 ml) ja dimetyyliformamidin (0,39 ml) seokseen johon lisättiin DBU (7,26 ekv.; 0,15 mmol; 22,9 μl). Reaktiota seurattiin RP-HPLC:llä (katso yleiset menetelmät) ja reaktion tapahduttua DBU neutraloitiin dikloorietikkahapolla (1,05 ekv. DBU:hun; 0,16 mmol; 13,3 μl). KytKentä tapahtui 10 min:ssa. Tuote sakkautettiin kylmästä isopropanolista (30 ml, Falcon-putkessa), sentrifugoitiin (25 min, 4 °C) ja isopropanoli dekantoiitiin pois. Sakka liuotettiin dikloorimetaanin (1,3 ml) ja metanolin (0,65 ml) seokseen, joka sisälsi 4 % DCA:ta (76 μl). Asetaalisuojaryhmän irrottua (10 min) tuote sakkautettiin uudelleen kylmästä isopropanolista (30 ml) ja sentrifugoitiin (25 min, 4 °C). Muodostunut keltainen sakka otettiin talteen dekantoinnalla isopropanoli pois. Saanto oli 70,2 mg (101 %), joten tuote **19a** sisälsi joitain epäpuhtauksia tai liuotinjäämiä.

3.6.2 T(S_p)T-PE

(-)- Ψ -reagenssilla aktivoitu 5'-O-MIP-tymidiini (**18**; 6,35 ekv.; 0,13 mmol; 74,7 mg) ja PE-T-kantaja (**5**; 1 ekv.; 0,021 mmol; 41,07 mg) liuotettiin asetonitriilin (0,34 ml) ja dimetyyliformamidin (0,34 ml) seokseen, johon lisättiin DBU (6,35 ekv.; 0,13 mmol; 19,9 μl).

Reaktiota seurattiin HPLC:llä (katso yleiset menetelmät) ja reaktion tapahduttua DBU neutraloitiin dikloorietikkahapolla (1,05 ekv. to DBU; 0,14 mmol; 11,6 μ l). (Huom! Kytkenän reaktioaika oli 10 min, mutta DBU lisättiin reaktioliuokseen 75 min kohdalla). Tuote sakkautettiin kylmästä isopropanolista (29,9 ml), sentrifugoitiin (25 min, 4 °C) ja isopropanoli dekantoiitiin pois. Sakka liuotettiin dikloorimetaanin (1,1 ml) ja metanolin (0,55 ml) seokseen, joka sisälsi 4 % DCA:ta (66 μ l). Asetaalisuojaryhmän irrottua (10 min) tuote **19b** sakkautettiin uudelleen kylmästä isopropanolista (29,9 ml) ja sentrifugoitiin (25 min, 4 °C). Saanto oli 52,3 mg (75 %).

3.6.3 T(R_p)T(R_p)T

Kantajaan sidottu fosforotioaattidimeeri (**19a**; 1 ekv.; 0,016 mmol; 52,7 mg) ja (+)- Ψ -reagenssilla aktivoitu 5'-O-MIP-tymidiini (**17**; 6,5 ekv.; 0,11 mmol; 59,5 mg) liuotettiin asetonitriiliin (0,27 ml) ja dimetyyliformamidin (0,27 ml) seokseen johon lisättiin DBU (6,5 ekv.; 0,11 mmol; 15,9 μ l). Reaktion tapahduttua (75 min) reaktioliuokseen lisättiin DCA (1,05 ekv.; 9,21 μ l) DBU:n neutraloimiseksi. Tuote saostettiin kylmällä isopropanolilla (35 ml) ja muodostunut sakka liuotettiin dikloorimetaanin (0,88 ml) metanolin seokseen (0,44 ml), joka sisälsi 4 %:a DCA:a MIP-suojaryhmän poistamiseksi. Reaktiota seurattiin HPLC:llä 20 min, minkä jälkeen reaktioliuokseen lisättiin DCA:a (29 μ l; nyt 6 %:n reaktioliuos DCA:n suhteen). Tuote sakkautettiin 10 min jälkeen kylmällä isopropanolilla (35 ml), sentrifugoitiin ja dekantoiitiin. Saanto oli 62,9 mg (85 %). Fosforotioaattitrimeri (20 mg) liuotettiin (kierrekorkillisessa mikrosentrifugiputkessa) 25 %:seen ammoniakkin vesiliuokseen (2 ml). Reaktioseosta pidettiin 55 °C:ssa (lämpökaapissa) 3 h, minkä jälkeen se siirrettiin veden avulla keittopulloon ja haihdutettiin alipaineessa. Haihdutusjäännös siirrettiin kvantitatiivisesti veden avulla 100 μ l:n erissä eppendorf-putkeen, johon lisättiin etyyliasetaattia (300 μ l). Seos sentrifugoitiin, etyyliasetaattifaasi pipetoiitiin pois ja vesifaasiin jäänyt tuote (**20a**) puhdistettiin HPLC:llä. Tuotefraktiot yhdistettiin ja tuote kylmäkuivattiin. Tuotteen homogeenisuus tarkistettiin HPLC:llä. Saanto oli 6,52 mg (kokonaissaanto 41 %). Yhdiste **20a** karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti. ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 7,72(1H, s, H6), 7,67(1H, s, H6), 7,57 (1H, s, H6), 6,22 (2H, m, H1'), 6,16 (1H, t, J=21,4 Hz, H1'), 4,99 (1H, m, H3'), 4,89 (1H, m, H3'), 4,50 (1H, m, H3'), 4,35 (1H, m, H4'), 4,15 (1H, m, H4'), 4,08 (5H, m, H4', 2 x H5', 2 x H5''), 3,77 (1H, dd, J = 8,0 Hz ja J = 12,50 Hz, H5'), 3,74 (1H, dd, J = 8,8 Hz ja J = 12,3 Hz, H5''), 2,46 (2H, m, H2' ja H2''), 2,27(4H, m, 2xH2' ja 2xH2''), 1,86 (6H, s, 2xCH₃), 1,80(s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 166,3; 166,3 ja 166,3 (C4);

151,5; 151,4 ja 151,4 (C2); 137,2 ja 137,0 (C6); 111,7; 111,6 ja 111,5 (C5); 85,6 ja 85,5 (C4'); 85,2; 85,1; 85,0 ja 85,0 (C4' ja C1'); 84,3; 84,3; 84,2 ja 84,2 (C4'); 76,3; 76,2; 75,8; 75,7 ja 70,7 (C3'); 65,2; 65,1; 64,9; 64,9 ja 60,9 (C5'); 38,9; 38,0 ja 37,6 (C2'); 11,8; 11,7 ja 11,6 (CH3). ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = 55,5 ja 55,4 ppm

3.6.4 MIP-T(S_P)T(S_P)T

Kantajaan sidottu fosforotioaattidimeeri (**19b**; 1 ekv.; 0,016 mmol; 52,3 mg) ja (-)-Ψ-reagenssilla aktivoitu 5'-O-MIP-tymidiini (**18**; 7,2 ekv.; 0,12 mmol; 63,3 mg) liuotettiin asetonitriiliin (0,3 ml) ja dimetyyliformamidin (0,3 ml) seokseen johon lisättiin DBU (6,5 ekv.; 0,12 mmol; 17,4 μl). Reaktion tapahduttua (75 min kuluttua) tuote saostettiin kylmällä *tert*-butyyli-metyylieetterillä (30 ml). Seos sentrifugoitiin ja dekantoitiin. Sakasta ajettiin HPLC, jossa näkyi useita piikkejä tuotepiikin lisäksi. Sakan joukkoon lisättiin kylmää isopropanolia (30 ml) mahdollisten epäpuhtauksien liuottamiseksi. Fosforotioaattitriimeeri (20 mg) liuotettiin (kierrekorkillisessa mikrosentrifugiputkessa) 25 %:een ammoniakkin vesiliuokseen (2 ml). Reaktioseosta pidettiin 55 °C:ssa (lämpökaapissa) 3 h, minkä jälkeen se siirrettiin veden avulla keittopulloon ja haihdutettiin alipaineessa. Haihdutusjäännös siirrettiin kvantitatiivisesti veden avulla 100 μl:n erissä eppendorf-putkeen, johon lisättiin etyyliasetaattia (300 μl). Seos sentrifugoitiin, etyyliasetaattifaasi pipetoitiin pois ja vesifaasiin jäänyt tuote (**20b**) puhdistettiin HPLC:llä. Tuotefraktiot yhdistettiin ja tuote kylmäkuivattiin. Tuotteen homogeenisuus tarkistettiin HPLC:llä. Tuote on kuvassa 20 näkyvä isoin piikki. Kuvassa 20 näkyvä pieni piikki on kolonnista tai HPLC-laitteistosta johtuva piikki, ei tuotteen epäpuhtaus. NMR-karakterisoinnin perusteella havaittiin, että asetaalisuojaryhmä oli lähtenyt irti ja syntynyt tuote olikin 5'-T(S_P)T(S_P)T-3' (**21b**). ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ= 7,67(2H; d; *J*=13,2 Hz; H6), 7,59 (1H; s; H6), 6,23 (2H; m; H1'), 6,15 (1H; t; *J*=21,4 Hz; H1'), 4,99 (1H; m; H3'), 4,89(1H; m; H3'), 4,51(1H; m; H3'), 4,32(1H; m; H4'), 4,16–4,07(6H; m; 2xH4'; 2xH5'; 2xH5''), 3,78(1H; dd; *J*=13,3 Hz ja *J*=3,23 Hz; H5'), 3,73 (1H; dd; *J*=4,31 Hz ja *J*= 11,49 Hz; H5''), 2,48(2H; m; H2'; H2''), 2,35–2,26 (4H; m, 2xH2' ja 2xH2''), 1,86 (6H; s; 2xCH₃), 1,80(3H; s; CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 166,4; 166,3 ja 166,3 (C4), 151,6; 151,5 ja 151,4 (C2), 137,3; 137,3 ja 137,2 (C6), 111,7; 111,6 ja 111,4 (C5), 85,5 ja 85,5 (C4'), 85,1; 85,1; 85,1; 85,0 ja 84,9 (C4', C1'), 84,0; 84,0; 84,0 ja 83,9 (C4'), 76,1; 76,0; 75,2; 75,1 ja 70,8 (C3'), 65,5;

65,4; 65,4; 65,3 ja 60,9 (C5'), 38,8; 37,9; 37,9; 37,7 ja 37,7 (C2'), 11,7; 11,7 ja 11,5 (CH₃). ³¹P
NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = 55,3 ja 55,2 ppm.

4 VIITTEET

1. Gheibi-Hayat, S. M., Jamialahmadi, K., Antisense Oligonucleotide (AS-ODN) Technology: Principle, Mechanism and Challenges, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **2021**, *68*, 1086–1094.
2. Mourné, L.; Marie, A. C.; Crouvezier, N., Oligonucleotide Therapeutics: From Discovery and Development to Patentability. *Pharmaceutics*, **2022**, *14*, 260.
3. Roberts, T. C., Langer, R., Wood, M. J. A., Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 673–694
4. Molina, A. G., Sanghvi, Y. S., Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2019**, *77*, 1–17.
5. Kim, J. F.; Gaffney, P. R.J.; Valtcheva, I. B.; Williams, G.; Buswell, A. M.; Anson, M. S.; Livingston, A. G.. Organic Solvent Nanofiltration (OSN): A New Technology Platform for Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis (LPOS). *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1439–1452.
6. Ravikumar, V. T., Cole, D. L., Development of 2'-O-methoxyethyl phosphorothioate oligonucleotides as antisense drugs under stereochemical control, *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, *6*, 798–806.
7. Iwamoto, N.; Butler, D. C. D.; Svrzikapa, N.; Mohapatra, S.; Zlatev, I.; Sah, D. W. Y.; Meena; Standley, S. M; Lu, G.; Apponi, L. H.; Frank-Kamenetsky, M.; Zhang, J. J.; Vargeese, C.; Verdine, G. L., Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides., *Nat. Biotech.*, **2017**, *35* 845–851.
8. Sandahl, A. F.; Nguyen, T. J. D.; Hansen, R.A.; Johansen, M. B.; Skrydstrup, T.; Gothelf, K. V., On-demand synthesis of phosphoramidites. *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 1–7.
9. Andrews, B. I.; Antia, F. D.; Brueggemeier, S. B.; Diorazio, L. J.; Koenig, S.; Kopach, M. E.; Lee, H.; Olbrich, M.; Watson, A. L.. Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem.*, **2021**, *86*, 49–61.
10. Liang, Z.; Rosenqvist, P.; Pajuniemi, E.; Ora, M.; Heinonen, P.; Virta, P.; Oivanen, M., 5'-O-(2-Isopropoxyprop-2-yl)-protected Phosphoramidite Building Blocks in the Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis., *European J. Org. Chem.* **2023**, *23*.
11. Liang, Z.; Koivikko, H.; Oivanen, M; Heinonen, P., Tuning the stability of alkoxyisopropyl protection groups. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2019**, *15*, 746–751.
12. Rosenqvist P.; Saari V.; Pajuniemi E.; Gimenez Molina A.; Ora M.; Horvath A.; Virta P., Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support., *J. Org. Chem.*, **2023**, *88*, 10156-10163.
13. LeProust, E. M.; Peck, B. J.; Spirin, K.; McCuen, H. B.; Moore, B.; Namsaraev, E.; Caruthers, M. H., Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process., *Nucleic Acids Res.*, **2010**, *38*, 2522–2540.

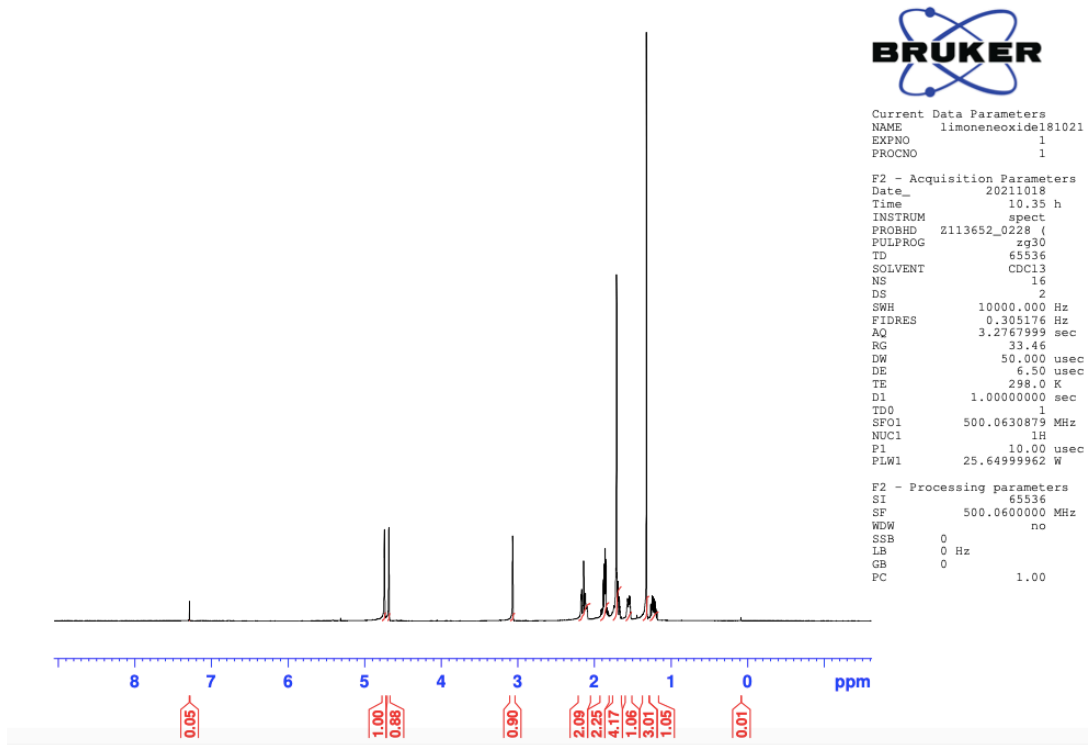
14. Lajmi, A. R., Schwartz, L. & Sanghvi, Y. S. Membrane purification of an antisense oligonucleotide. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 651–657.
15. Some Industrial Chemicals., *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*, **2000**, *77*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK390856/> (viitattu 14.9.2023).
16. American Chemical Society: Molecule of the Week: Dichloromethane. <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/d/dichloromethane.html> (viitattu 14.9.2023).
17. Liu, B., Thayumanavan, S., Substituent Effects on the pH Sensitivity of Acetals and Ketals and Their Correlation with Encapsulation Stability in Polymeric Nanogels, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 2306-2317.
18. Molina, A. G.; Kungurtsev, V.; Virta, P.; Lönnberg, H., Acetylated and methylated β -cyclodextrins as viable soluble supports for the synthesis of short 2'-oligodeoxyribonucleotides in solution., *Molecules* **2012**, *17*, 12102–12120.
19. Wuts, P. G. M., Greene, T. W., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis.*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, Yhdysvallat, 2014. Viitattu 6.9.2023. doi:10.1002/0470053488 3.
20. Wann, S. R., Kreevoy, M. M., Acetal Hydrolysis: The A1 Mechanism. *J. Org. Chem.*, **1981**, *46*, 419–423.
21. Griffin, B. E.; Jarman, M.; Reese, C. B., The Synthesis of oligoribonucleotides – IV: Preparation of dinucleoside phosphates from 2',5'-protected ribonucleoside derivatives., *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 639–662.
22. Cieślak, J.; Grajkowski, A.; Kauffman, J. S.; Duff, R. J.; Beaucage, S. L.. The 4-(*N*-dichloroacetyl-*N*-methylamino)benzyloxymethyl group for 2'-hydroxyl protection of ribonucleosides in the solid-phase synthesis of oligoribonucleotides. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 2774–2783.
23. Gough, G. R.; Miller, T. J.; Mantick, N. A., p-Nitrobenzyloxymethyl: A new fluoride-removable protecting group for ribonucleoside 2'-hydroxyls. *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 981–982.
24. Matysiak, S.; Pfleiderer, W., Nucleotides: Acetals as new 2'-*O*-protecting functions for the synthesis of oligoribonucleotides: Synthesis of monomeric building units and oligoribonucleotides. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, *84*, 1066–1085.
25. Lönnberg, H., Synthesis of oligonucleotides on a soluble support., *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1368–1387.
26. Bonora, G. M.; Biancotto, G.; Maffini, M.; Scremin, C. L., Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach., *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*, 1213–1217.

27. Kungurtsev, V.; Laakkonen, J.; Molina, A. G.; Virta, P., Solution-phase synthesis of short oligo-2'-deoxyribonucleotides by using clustered nucleosides as a soluble support., *European J. Org. Chem.* **2013**, 6687–6693.
28. Matzura, H., Eckstein, F. A, Polyribonucleotide Containing Alternating $\rightarrow P = O$ and $\rightarrow P = S$ Linkages., *Eur. J. Biochem.* **1968**, 3, 448–452.
29. Jahns, H.; Taneja, N.; Willoughby, J.r L.S.; Akabane-Nakata, M.; Brown, C. R; Nguyen, T.; Bisbe, A.; Matsuda, S.; Hettinger, M.; Manoharan, R. M.; Rajeev, K. G; Maier, M. A; Zlatev, I.; Charisse, K.; Egli, M.; Manoharan, M., Chirality matters: Stereo-defined phosphorothioate linkages at the termini of small interfering RNAs improve pharmacology in vivo. *Nucleic Acids Res.*, **2022**, 50, 1221–1240.
30. Wan, W. B.; Migawa, M.T.; Vasquez, G.; Murray, H. M.; Nichols, J. G.; Gaus, H.; Berdeja, A.; Lee, S.; Hart, C. E.; Lima, W. F.; Swayze, E. E.; Seth, P. P., Synthesis, biophysical properties and biological activity of second-generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, 13456.
31. Krieg, A. M.; Guga, P.; Stec, W., P-Chirality-Dependent Immune Activation by Phosphorothioate CpG Oligodeoxynucleotides. *Oligonucleotides*, **2003**, 13, 491–499.
32. Beaucage, S. L., Caruthers, M. H., Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis., *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, 1859–1862.
33. Reese, C. B., Song, Q., A new approach to the synthesis of oligonucleotides and their phosphorothioate analogues in solution., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2787–2792.
34. Barber, I.; Imbach, J. L.; Rayner, B., Solution-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligodeoxynucleosides by the Phosphotriester Method., *Antisense Res. Dev.* **1995**, 5, 39–47.
35. Zhou, X.; Kiesman, W. F.; Yan, W.; Jiang, H.; Antia, F. D.; Yang, J.; Fillon, Y. A.; Xiao, L.; Shi, X., Development of Kilogram-Scale Convergent Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides., *J. Org. Chem.*, **2022**, 87, 2087–2110.
36. Ballico, M.; Drioli, S.; Morvan, F.; Xodo, L.; Bonora, G. M., Triple, MPEG-Conjugated, Helix-Forming Oligonucleotides (TRIPEGXs): Liquid-Phase Synthesis of Natural and Chimeric 'All-Purine' Sequences Linked to High Molecular Weight Poly(ethylene glycols), *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 719-725.
37. Scremin, C. L.; Bonora, C. M., Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on Polyethylene Glycol Support., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 4663-4666.
38. Huang, Y.; Knouse, K. W.; Qiu, S.; Hao, W.; Padial, N. M.; Vantourout, J. C.; Zheng, B.; Mercer, S. E.; Lopez-Ogalla, J.; Narayan, R.; Olson, R. E.; Blackmond, D. G.; Eastgate, M. D.; Schmidt, M.A.; McDonald, I. M.; Baran, P. S., A P(V) platform for oligonucleotide synthesis. *Science*, **2021**, 373, 1265–1270.
39. Virta, P., More versatile synthesis of oligonucleotides. *Science* **2021**, 373, 1196–1197.

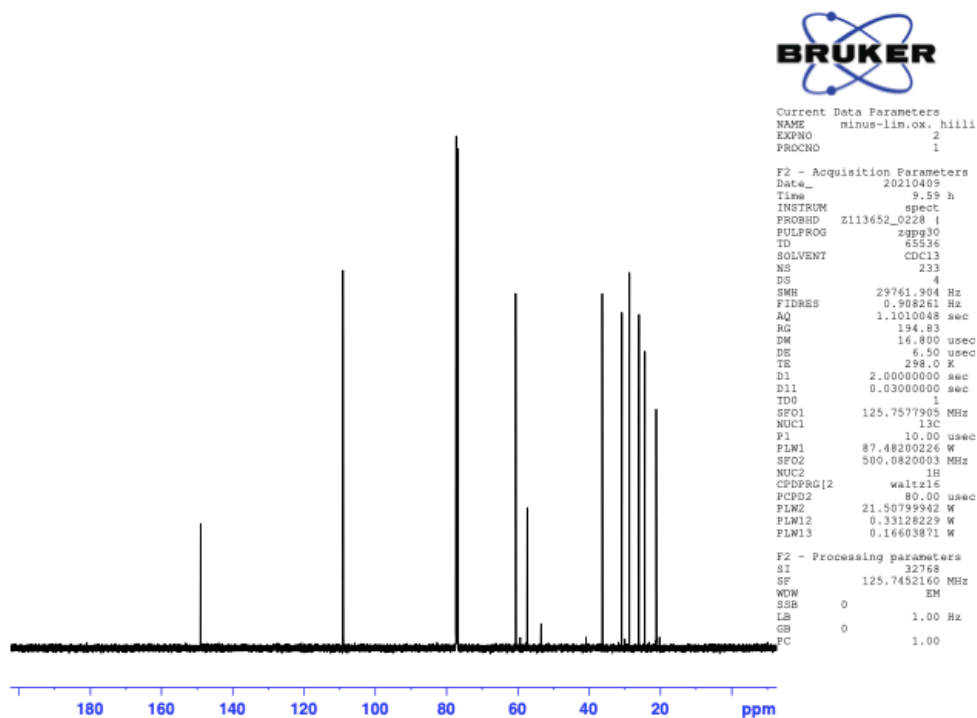
40. Stec, W. J.; Karwowski, B.; Boczkowska, M.; Guga, P.; Koziolkiewicz, M.; Sochacki, M.; Wieczorek, M. W.; Błaszczak, J., Deoxyribonucleoside 3'-O-(2-thio- and 2-oxo-'spiro'-4,4-pentamethylene- 1,3,2-oxathiaphospholane)s: Monomers for stereocontrolled synthesis of oligo(deoxyribonucleoside phosphorothioate)s and chimeric PS/PO oligonucleotides., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 7156–7167.
41. Wilk, A., Grajkowski, A., Phillips, L. R. & Beaucage, S. L. Deoxyribonucleoside cyclic N-acylphosphoramidites as a new class of monomers for the stereocontrolled synthesis of oligothymidyl- and oligodeoxycytidyl- phosphorothioates. *J Am Chem Soc* **122**, 2149–2156 (2000).
42. Iwamoto, N.; Oka, N.; Sato, T.; Wada, T., Stereocontrolled solid-phase synthesis of oligonucleoside H-phosphonates by an oxazaphospholidine approach., *Angew. Chem. - International Edition* **2009**, *48*, 496–499.
43. Oka, N.; Yamamoto, M.; Sato, T.; Wada, T., Solid-phase synthesis of stereoregular oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates using bicyclic oxazaphospholidine derivatives as monomer units. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16031–16037.
44. Iyer, R. P.; Guo, M. J.; Yu, D.; Agrawal, S., Solid-phase stereoselective synthesis of oligonucleoside phosphorothioates: The nucleoside bicyclic oxazaphospholidines as novel synthons., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 2491–2494.
45. Sakamuri, S.; Liu, D.; Eltepu, L.; Liu, B.; Reboton, L. J.; Preston, R.; Bradshaw, C. W., Identification of a Tricyclic P^{III} Chiral Auxiliary for Solid-Supported Synthesis of Stereopure Phosphorothioate-Containing Oligonucleotides., *ChemBioChem.*, **2020**, *21*, 1298–1303.
46. Lu, Y.; Just, G., Stereoselective Synthesis of R_P- and S_P-Dithymidine Phosphorothioates via Chiral Indolooxazaphosphorine Derived from Tryptophan, *Organometallics*, **2000**, *2*, 4521–4524.
47. Wynendaele, E.; Furman, C.; Wielgomas, B.; Larsson, P.; Hak, E.; Block, T.; Van Calenbergh, S.; Willand, N.; Markuszewski, M.; Odell, L. R.; Poelarends, G. J.; De Spiegeleer, B., Sustainability in drug discovery, *Med. Drug Discov.* **2021**, *12*, 100107.
48. Knouse, K. W.; deGruyter, J. N.; Schmidt, M. A.; Zheng, B.; Vantourout, J. C.; Kingston, C.; Mercer, S. E.; McDonald, I. M.; Olson, R. E.; Zhu, Y.; Hang, C.; Zhu, J.; Yuan, C.; Wang, Q.; Park, P.; Eastg, P. S., Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science* **2018**, *10*, 279-288.

5 LIITTEET

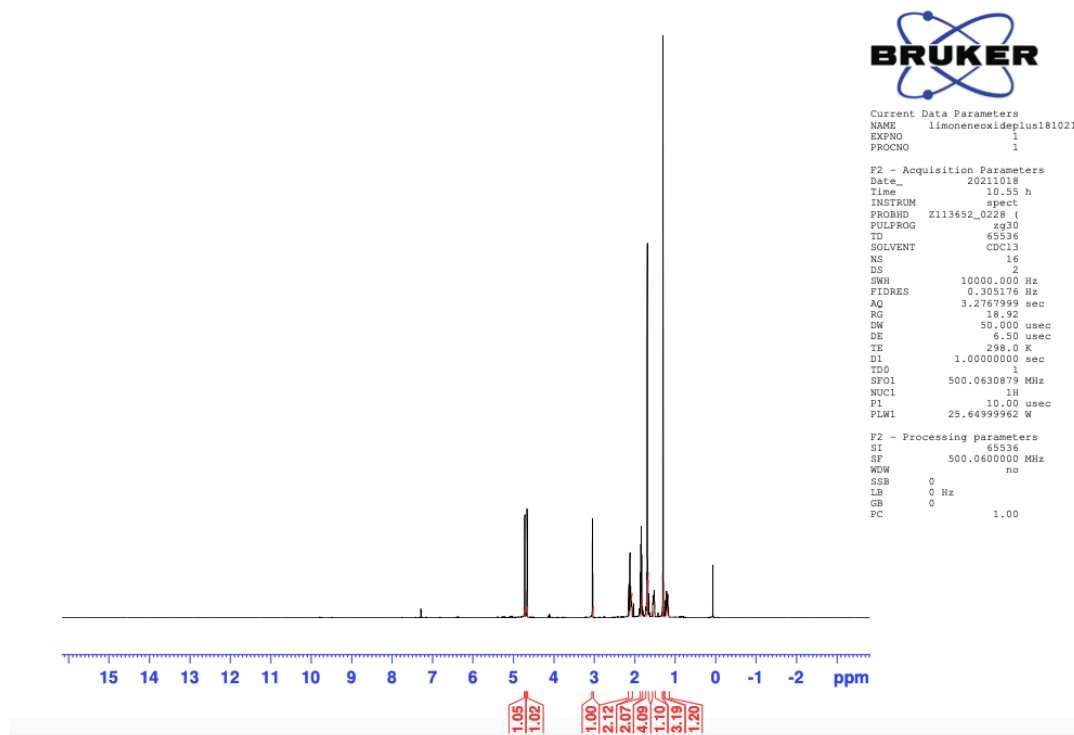
Liite 1. (-)-limoneenioksidi ¹H NMR



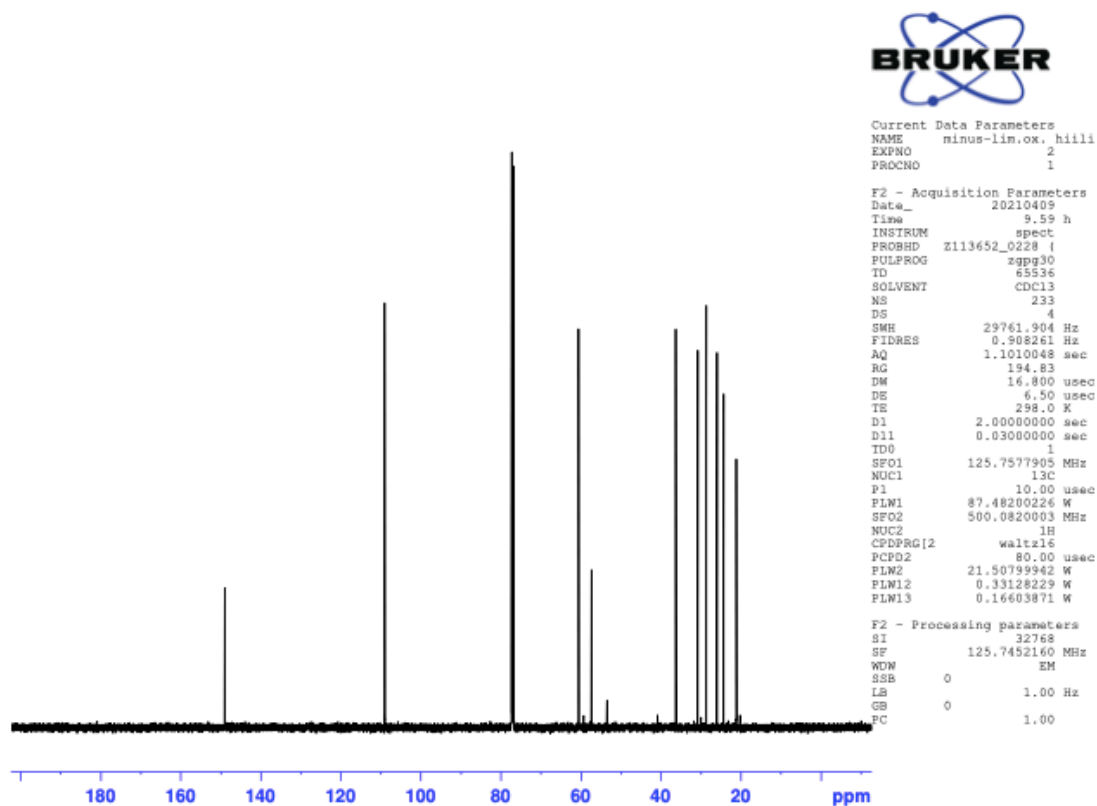
Liite 2. (-)-limoneenioksidi ¹³C NMR



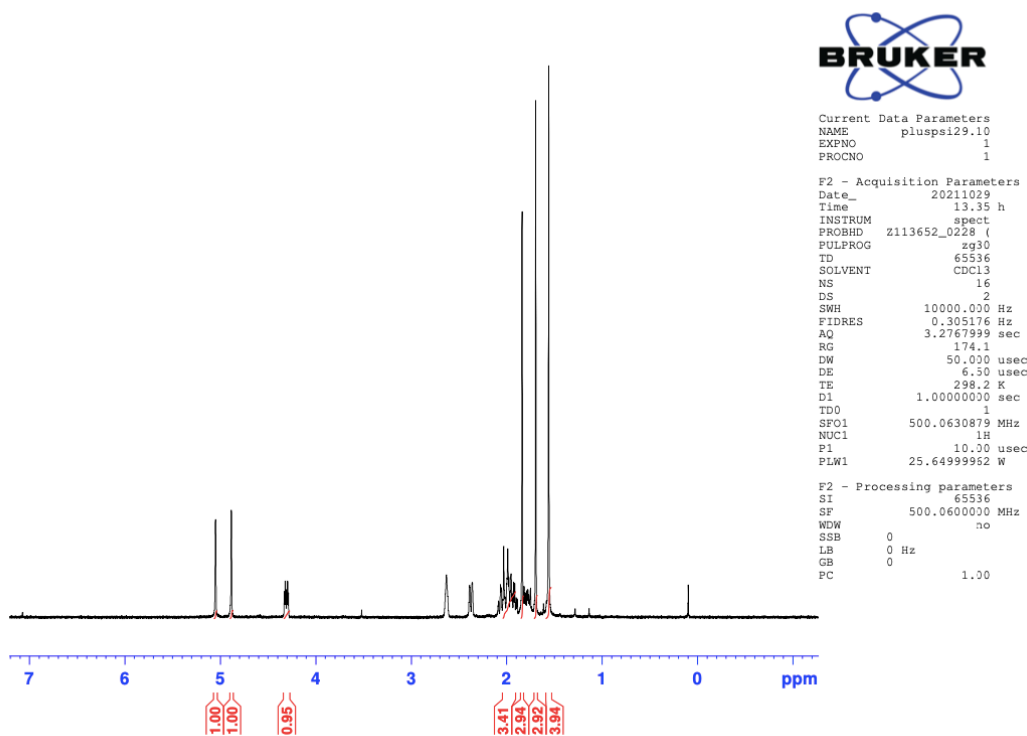
Liite 3. (+)-limoneenioksidi ¹H NMR



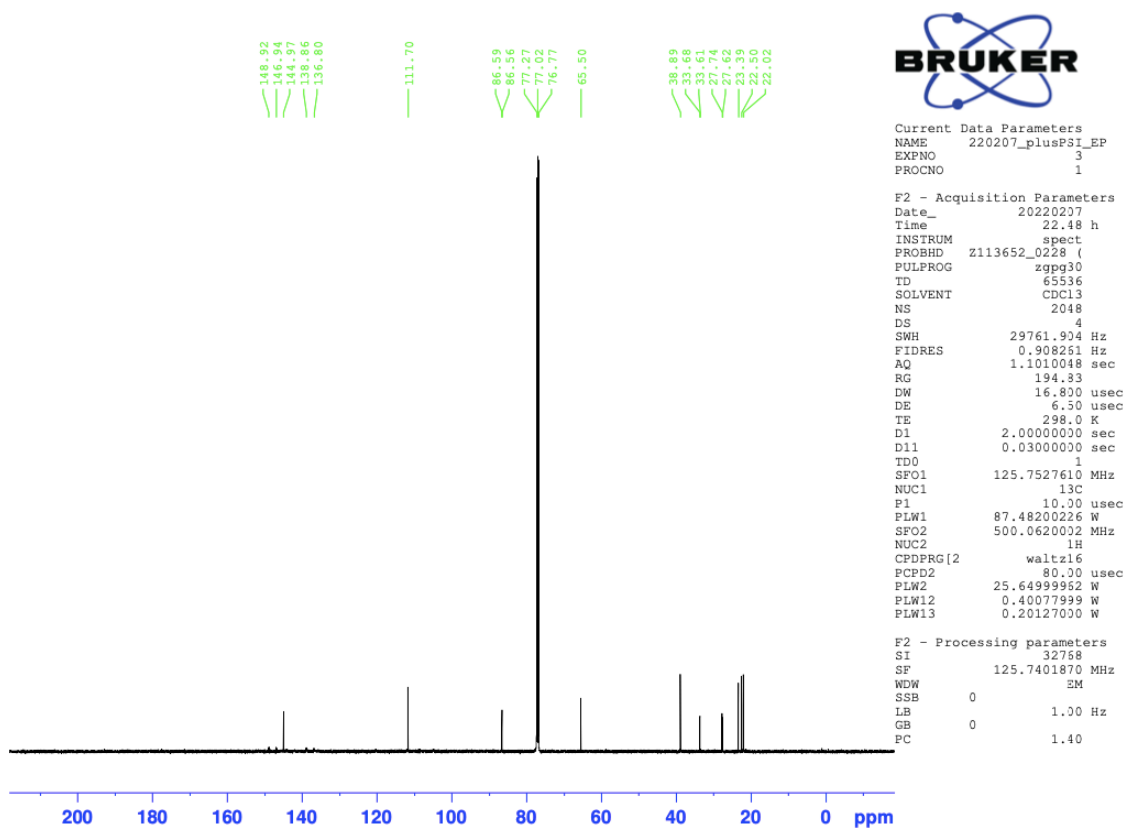
Liite 4. (+)-limoneenioksidi ¹³C NMR



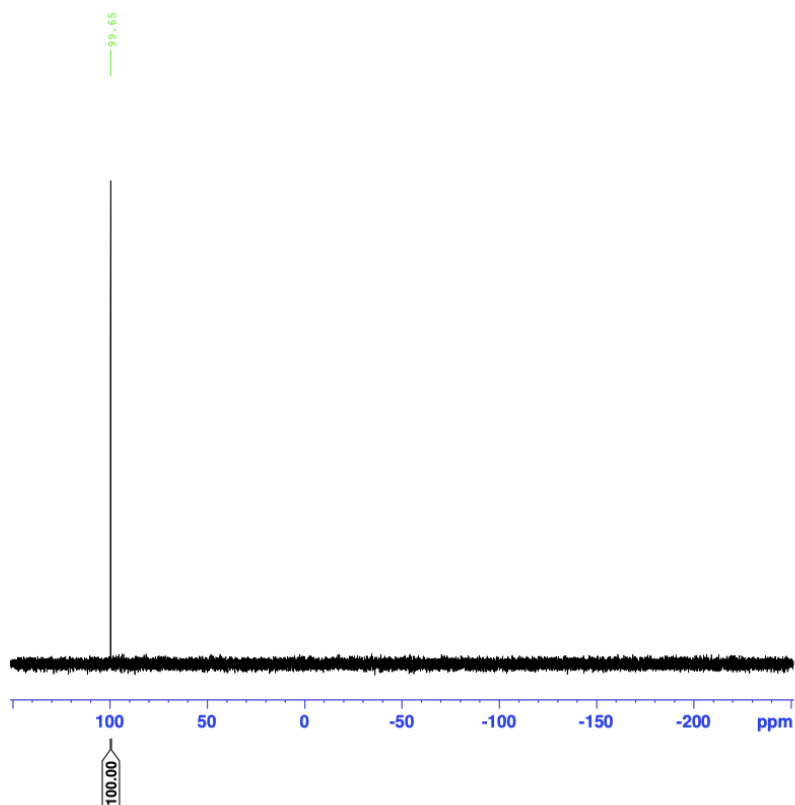
Liite 5. (+)-PSI-reagenssi ¹H NMR



Liite 6. (+)-Ψ-reagenssi ¹³C NMR



Liite 7. (+)- Ψ -reagenssi ^{31}P NMR



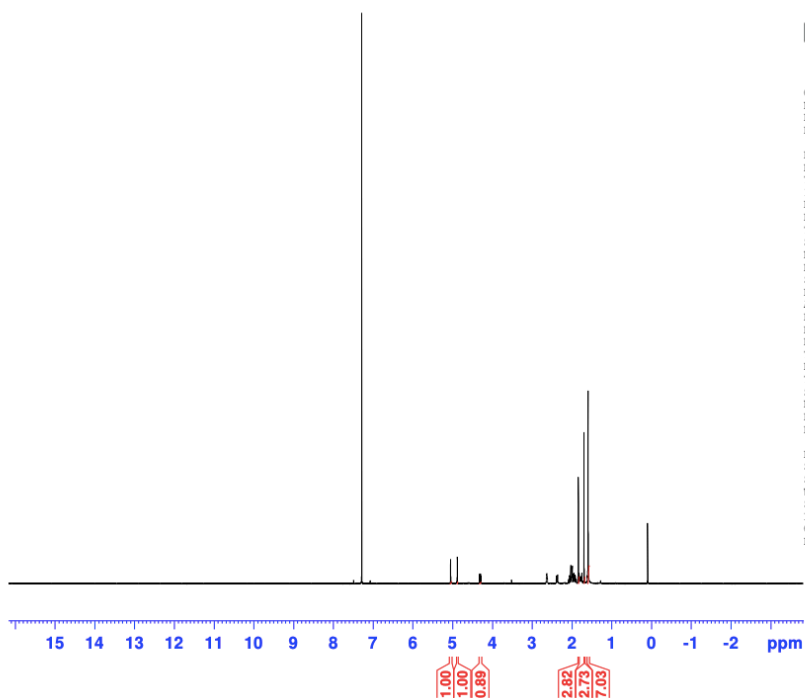
```

Current Data Parameters
NAME      220207_plusPsi_EP
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20220207
Time      16.38 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z113652_0228 (
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         4
SWH        81521.742 Hz
FIDRES     2.487846 Hz
AQ         0.4019541 sec
RG         194.83
DW         6.133 usec
DE         6.50 usec
TE         298.2 K
D1         2.0000000 sec
D11        0.0300000 sec
TDO        1
SFO1       202.4178770 MHz
NUC1       31P
P1         14.00 usec
PLW1       46.70600128 W
SFO2       500.0620002 MHz
NUC2       1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2      80.00 usec
PLW2       25.64999962 W
PLW12      0.40077999 W
PLW13      0.20127000 W

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         202.4279984 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

Liite 8. (-)- Ψ -reagenssi ^1H NMR



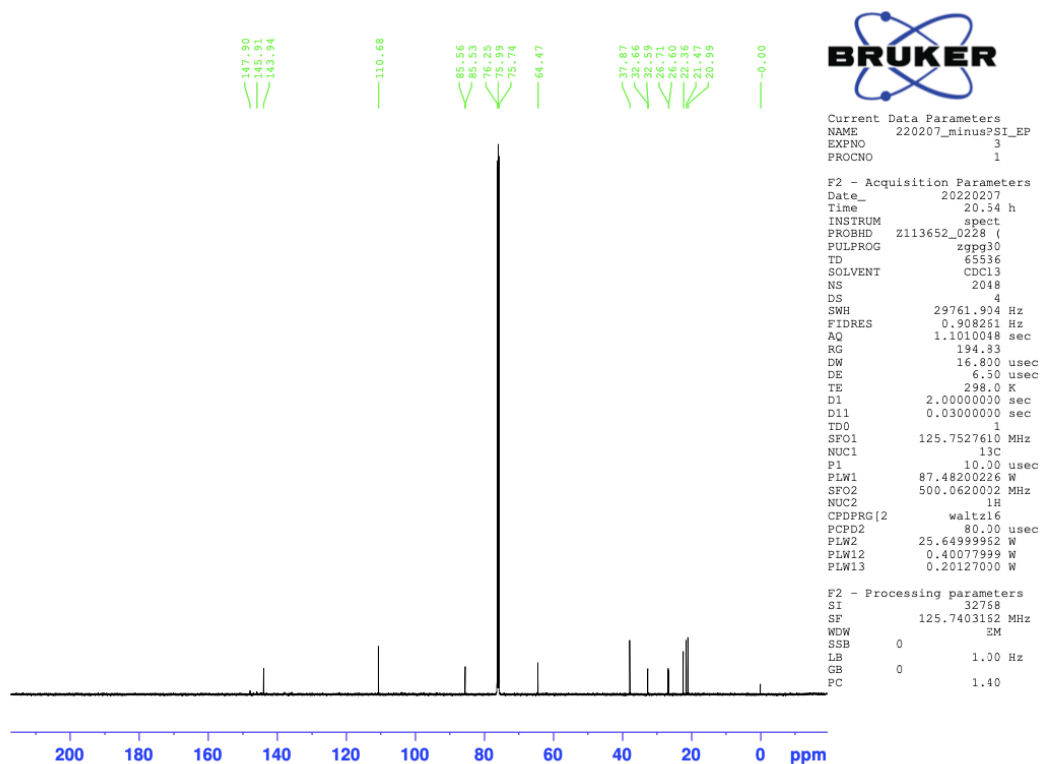
```

Current Data Parameters
NAME      minuspsi_271021
EXPNO     1
PROCNO    1

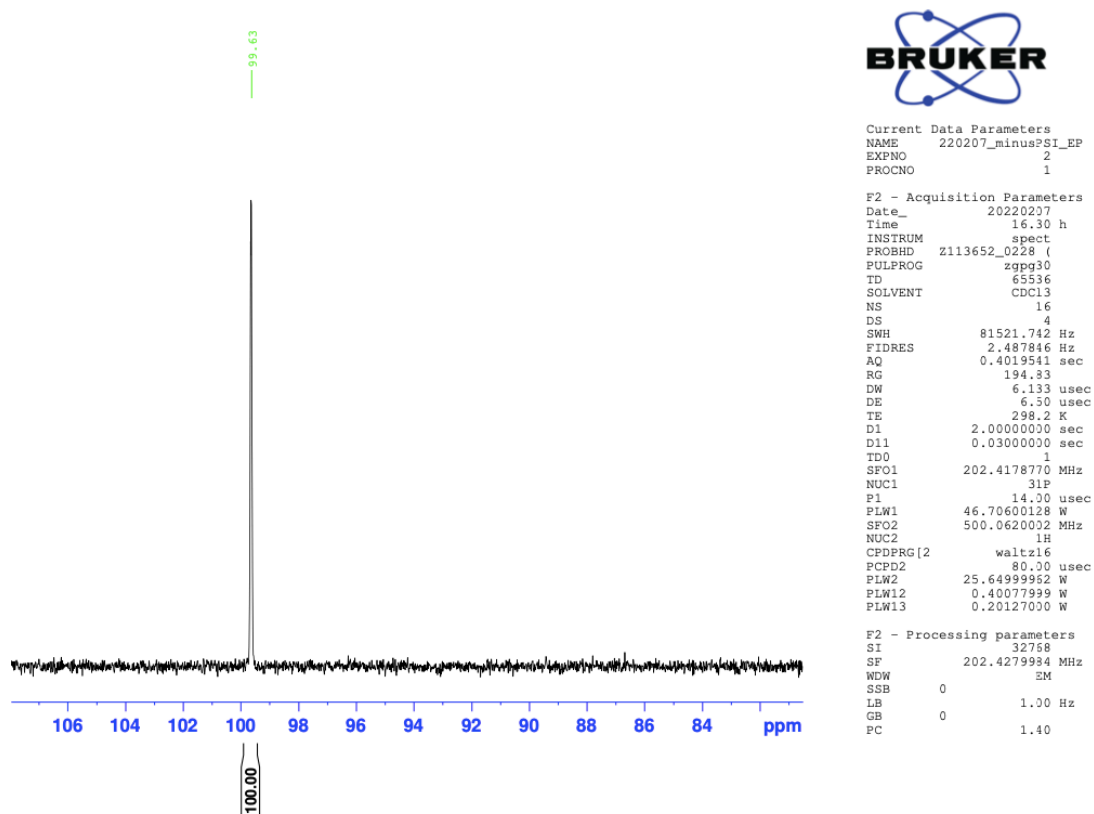
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20211027
Time      8.45 h
INSTRUM   spect
PROBHD    Z113652_0229 (
PULPROG   zg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         2
SWH        10000.000 Hz
FIDRES     0.305176 Hz
AQ         3.2767999 sec
RG         171.44
DW         50.000 usec
DE         6.50 usec
TE         298.0 K
D1         1.0000000 sec
TDO        1
SFO1       500.1230882 MHz
NUC1       1H
P1         10.00 usec
PLW1       19.68700027 W

F2 - Processing parameters
SI         65536
SF         500.1200000 MHz
WDW        no
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

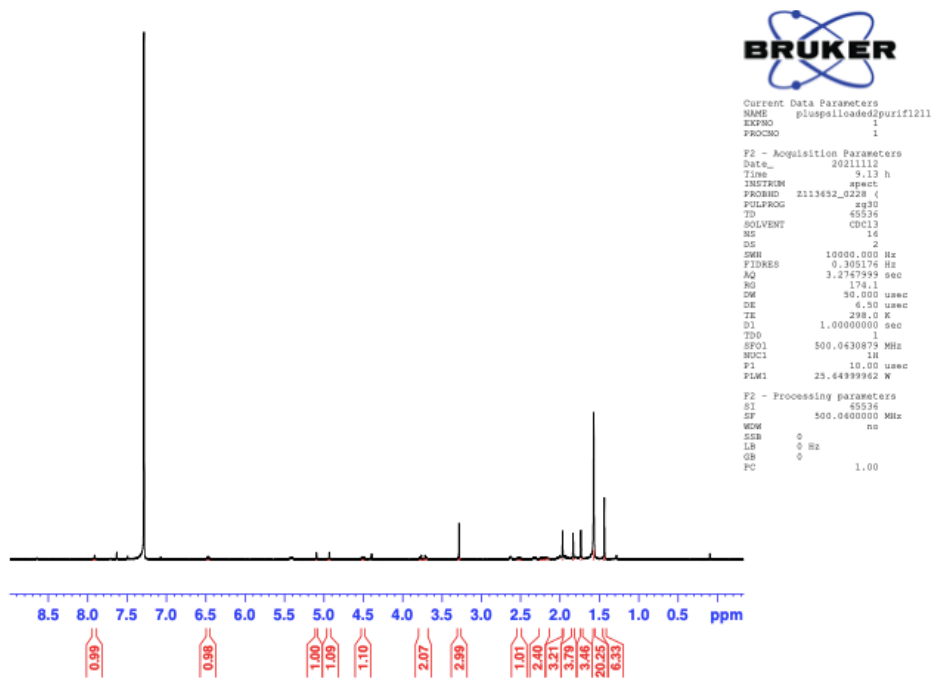
Liite 9. (-)-Ψ-reagenssi ¹³C NMR



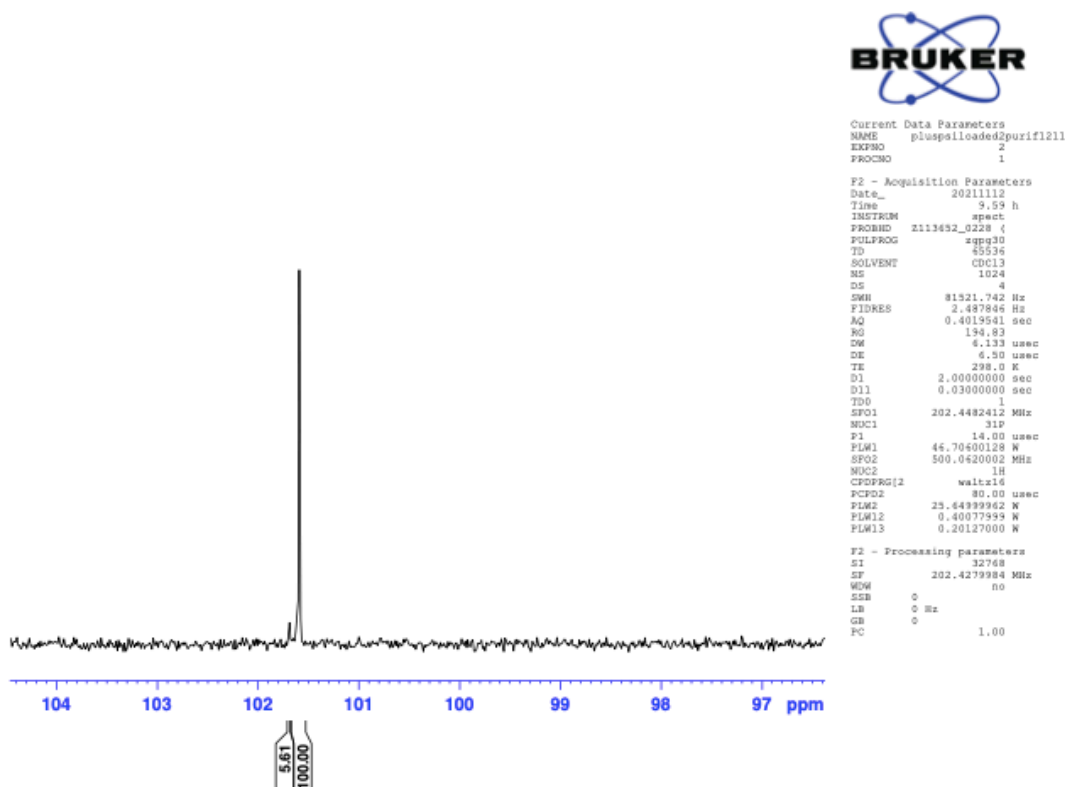
Liite 10. (-)-Ψ-reagenssi ³¹P NMR



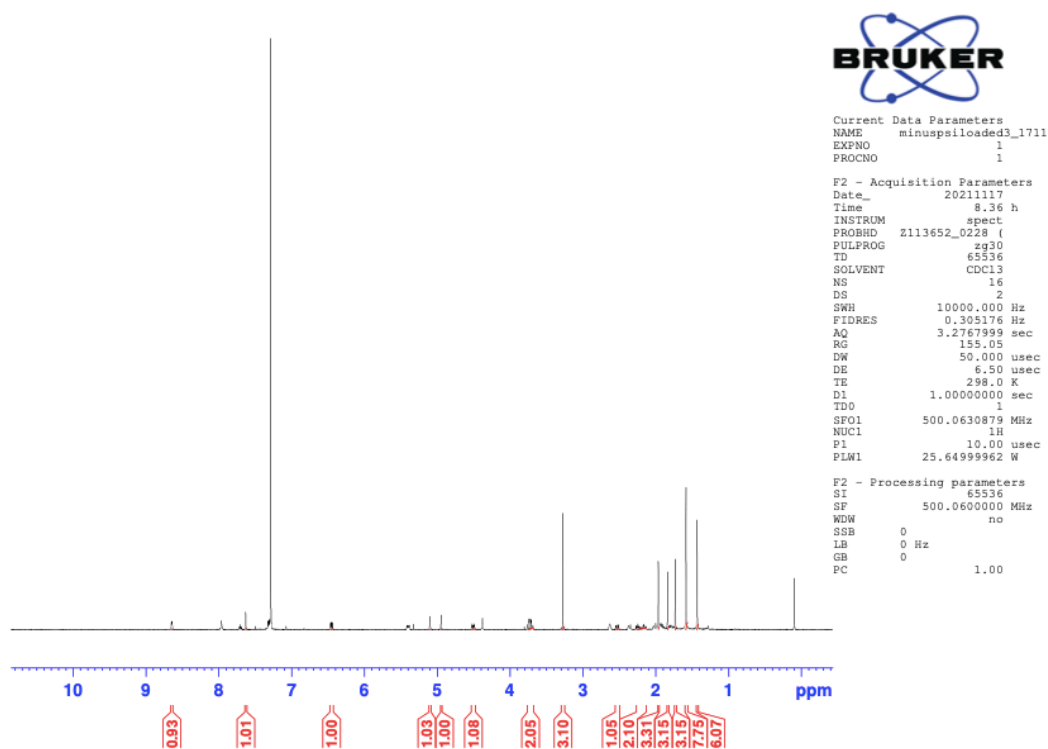
Liite 11. (+)- Ψ -reagenssilla aktivoitu 5'-MIP-tymidiini ^1H NMR



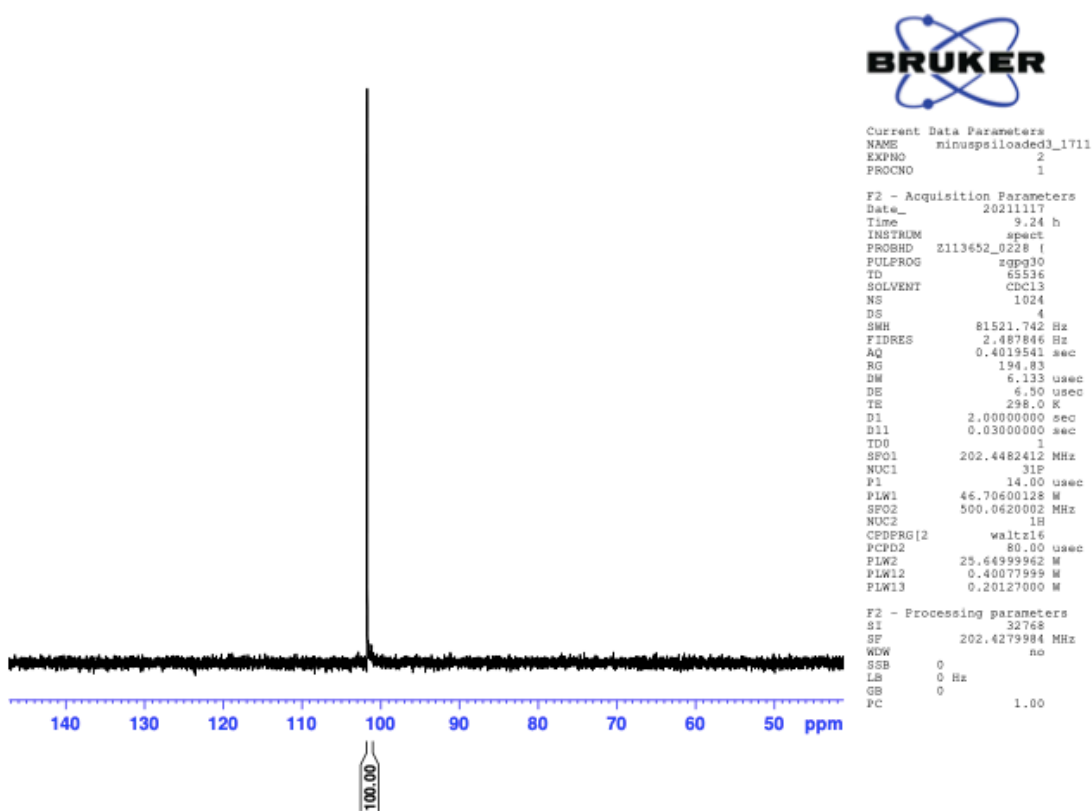
Liite 12. (+)- Ψ -reagenssilla aktivoitu 5'-MIP-tymidiini ^{31}P NMR



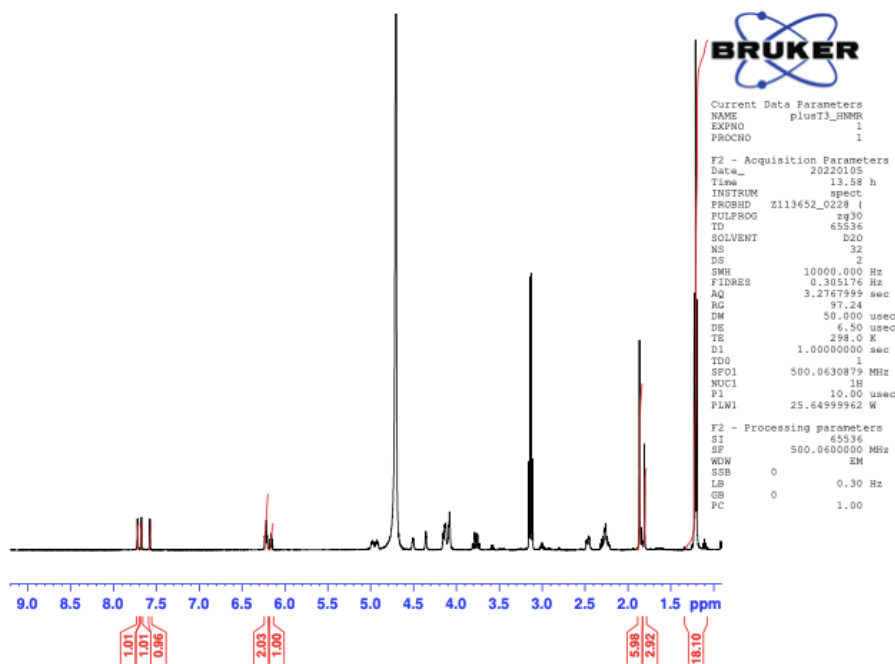
Liite 13. (-)-Ψ-reagensilla aktivoitu 5'-MIP-tymidiini ¹H NMR



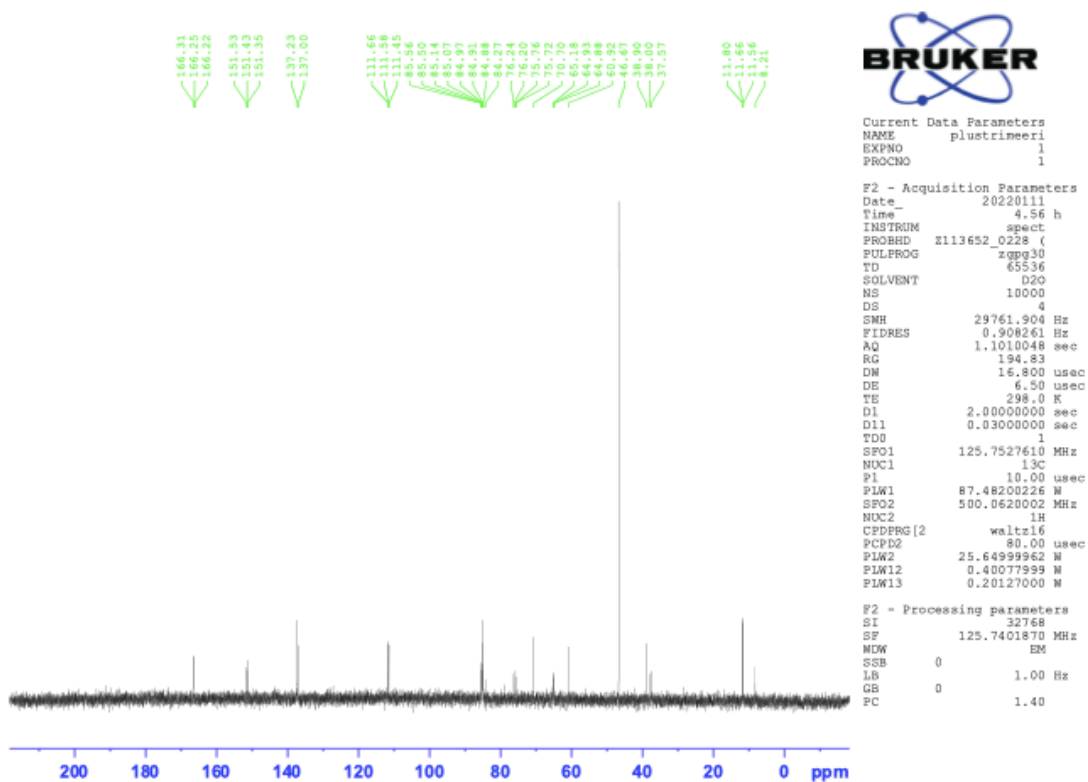
Liite 14. (-)-Ψ-reagensilla aktivoitu 5'-MIP-tymidiini ³¹P NMR



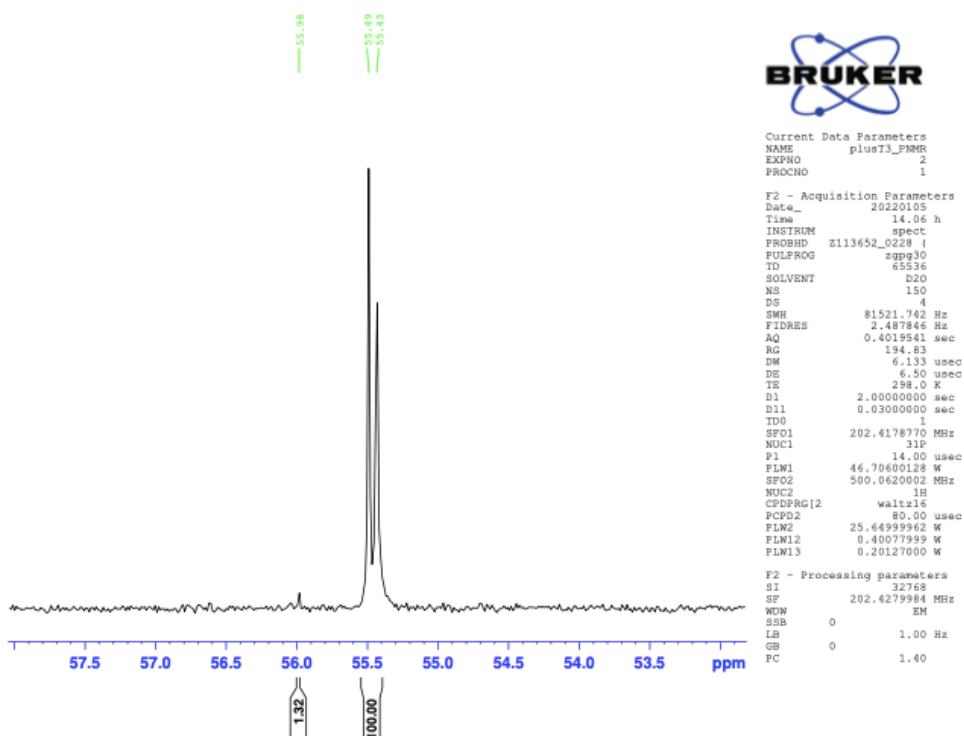
Liite 15. 5'-T(R_p)T(R_p)T-3' ¹H NMR



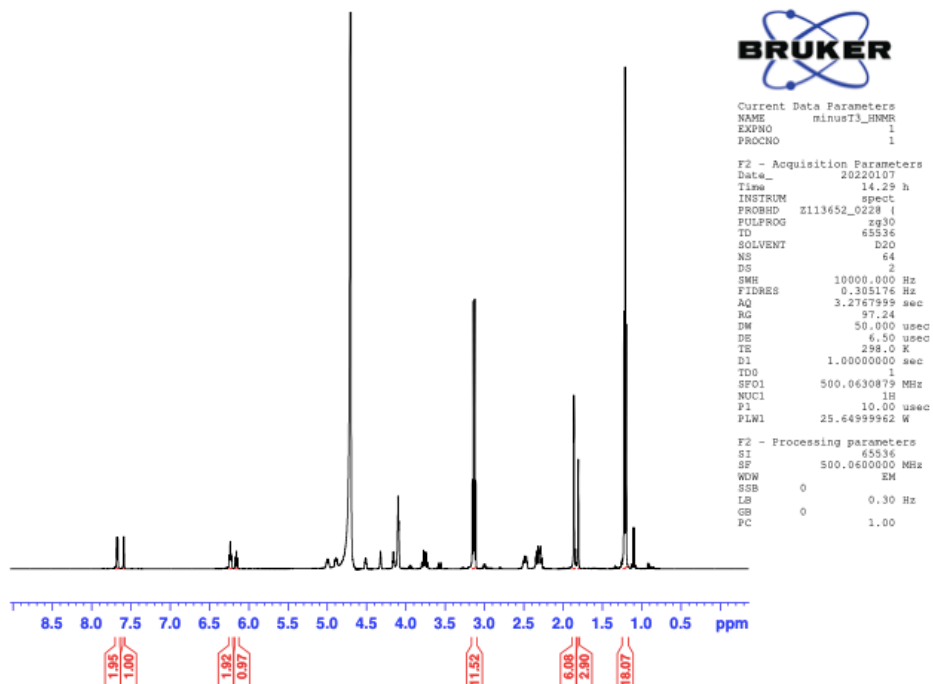
Liite 16. 5'-T(R_p)T(R_p)T-3' ¹³C NMR



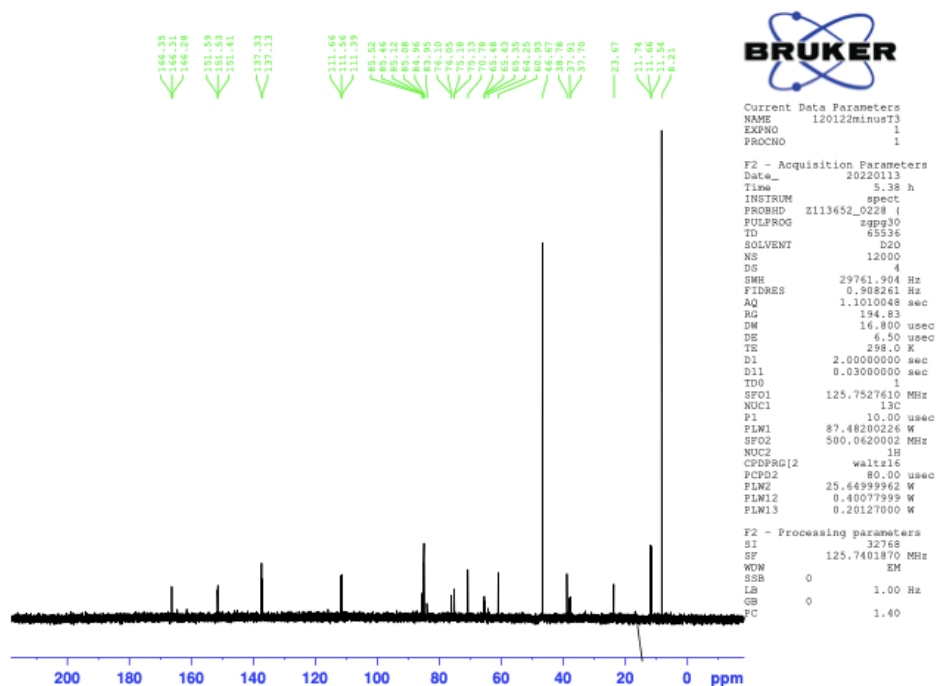
Liite 17. 5'-T(R_p)T(R_p)T-3' ³¹P NMR



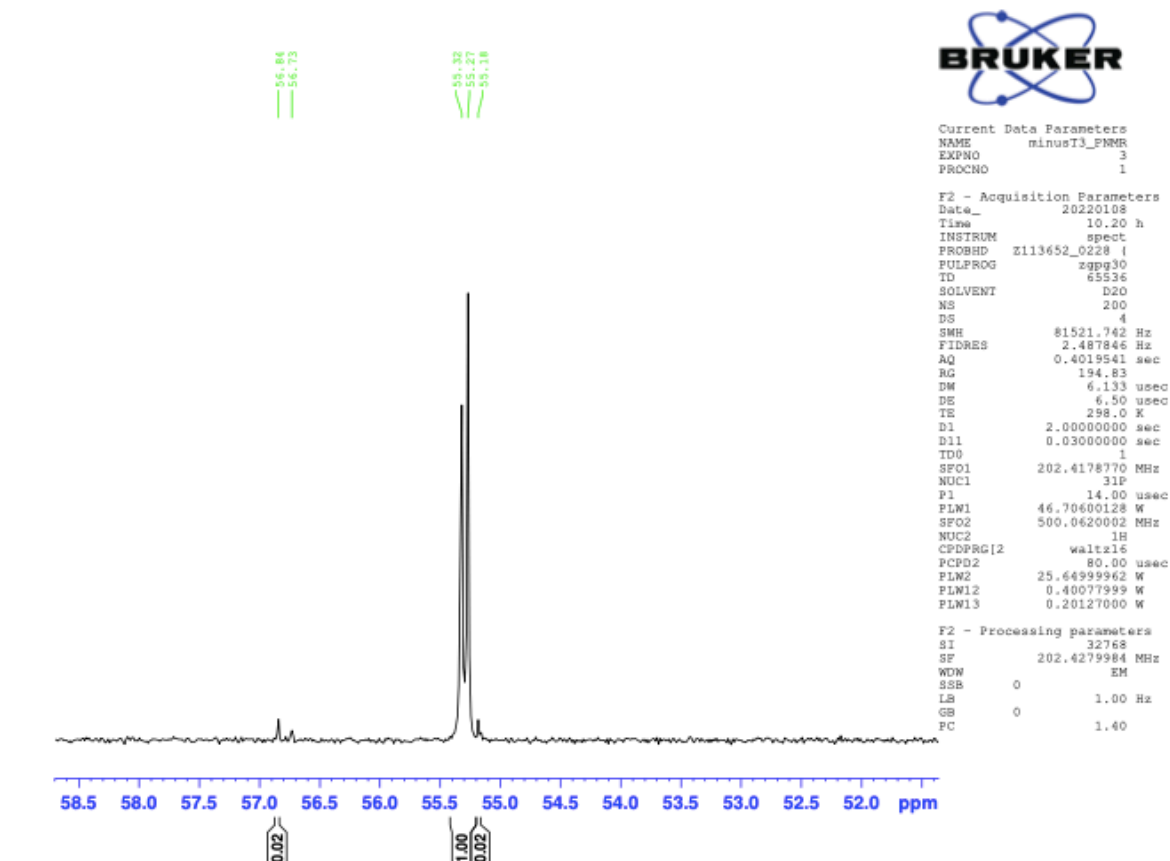
Liite 18. 5'-T(S_p)T(S_p)T-3' ¹H NMR



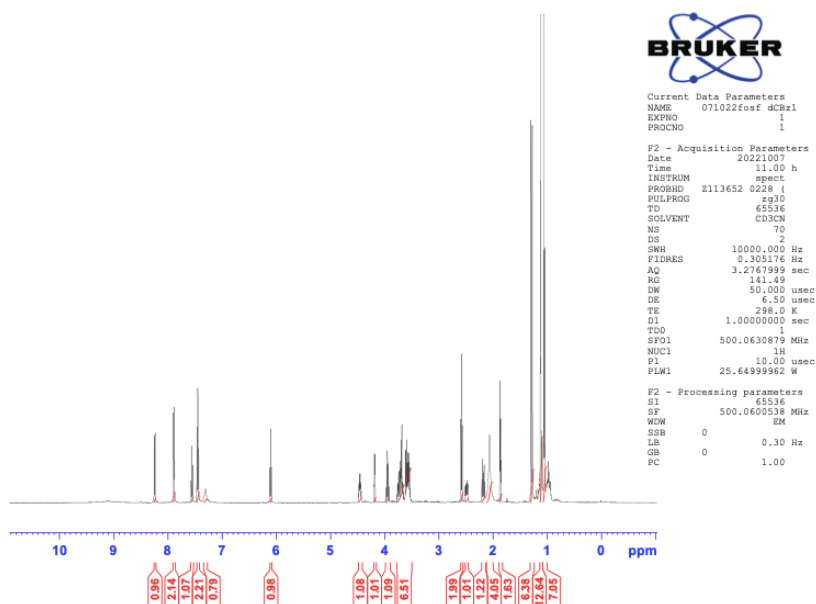
Liite 19. 5'-T(S_P)T(S_P)T-3' ¹³C NMR



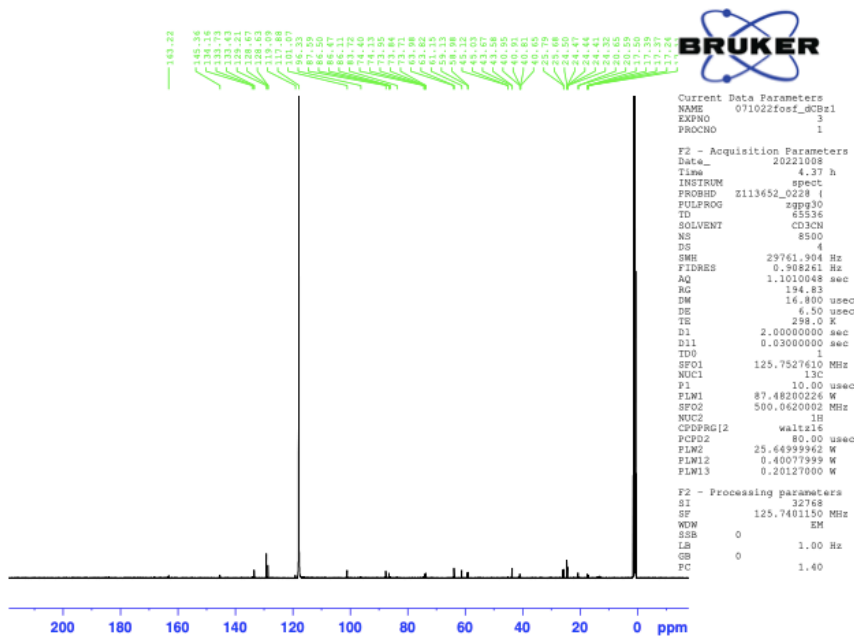
Liite 20. 5'-T(S_P)T(S_P)T-3' ³¹P NMR



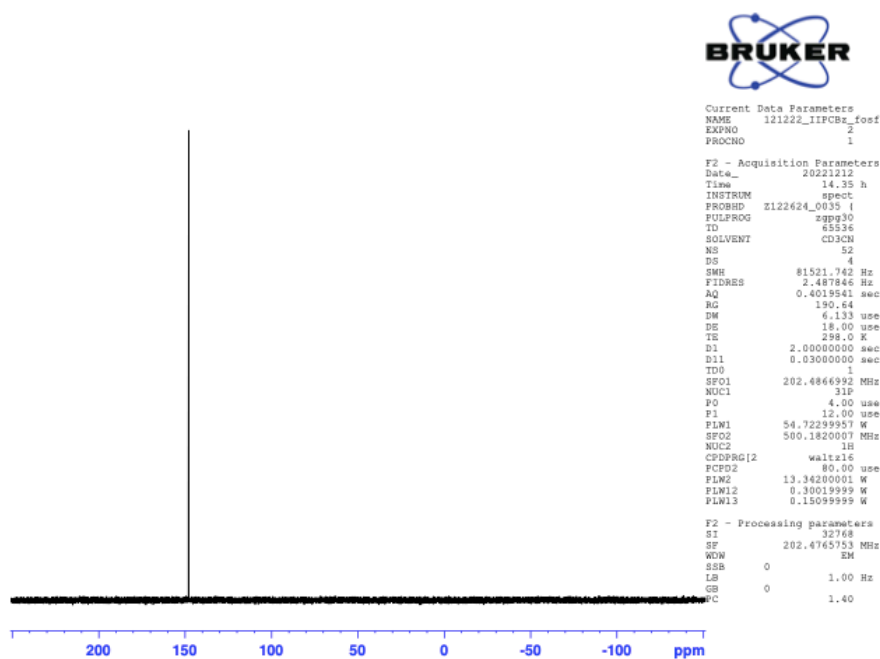
Liite 21. N⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-sytidiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyli)-fosforamidiitti ¹H NMR



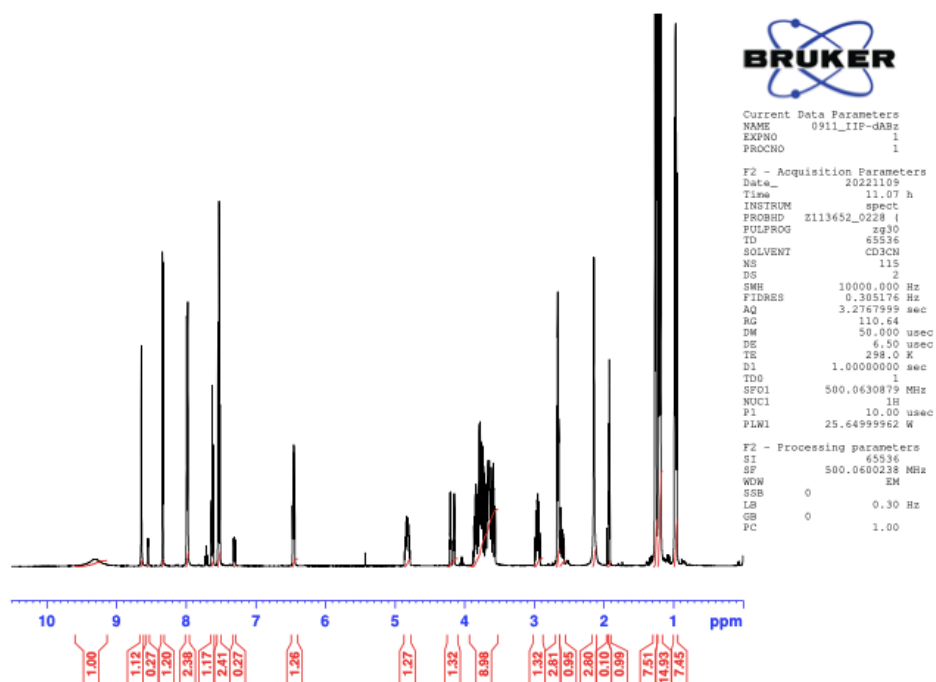
Liite 22. N⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-sytidiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyli)-fosforamidiitti ¹³C NMR



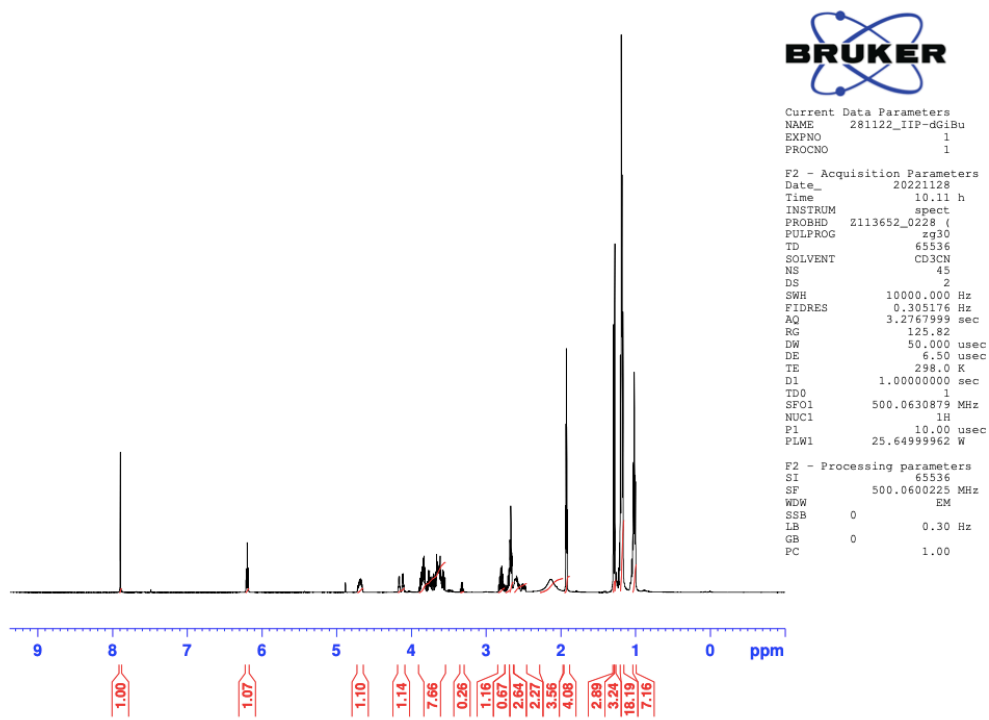
Liite 23. N⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-sytidiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyyli)-fosforamidiitti³¹P NMR



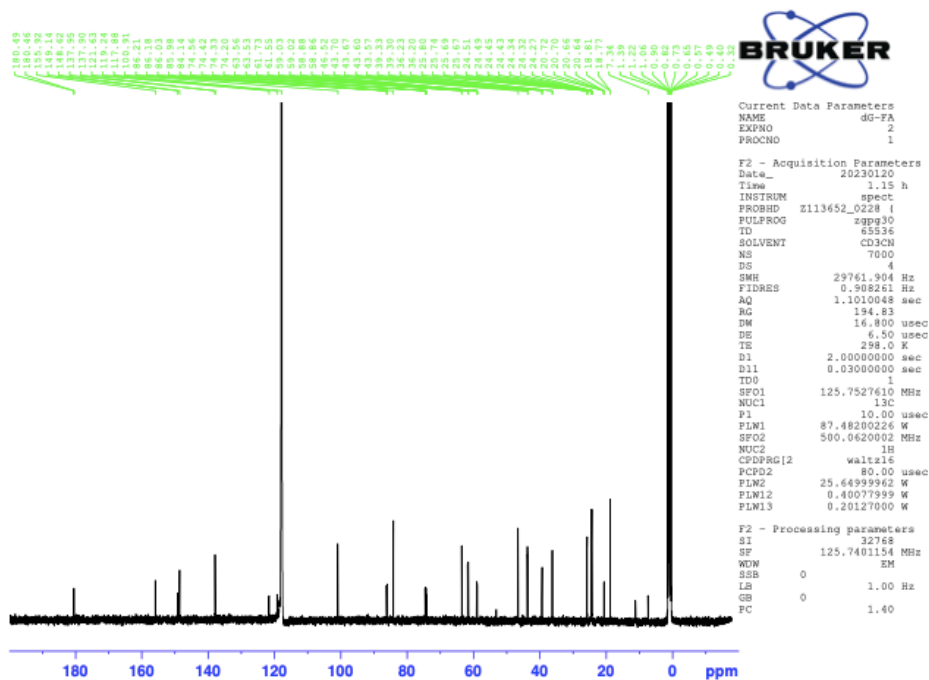
Liite 24. N⁶-bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-adenosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyyli)-fosforamidiitti¹H NMR



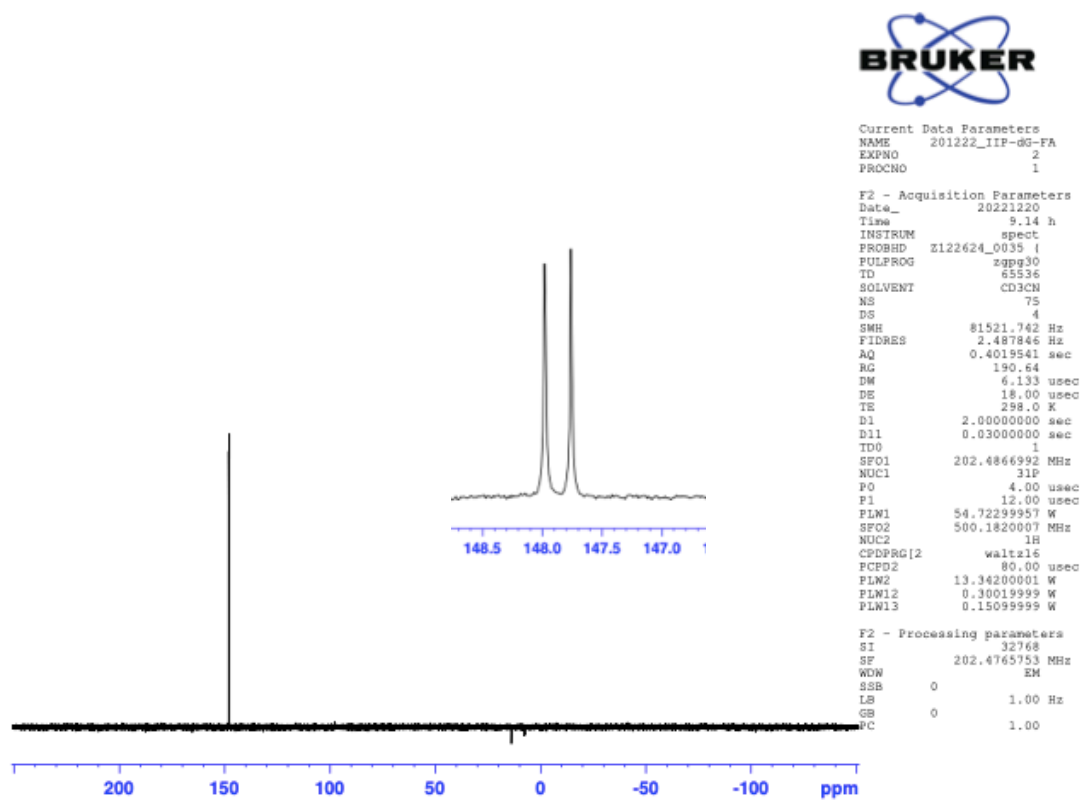
Liite 27. N²-isobutyryyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-guanosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyyli)-fosforamidiitti ¹H NMR



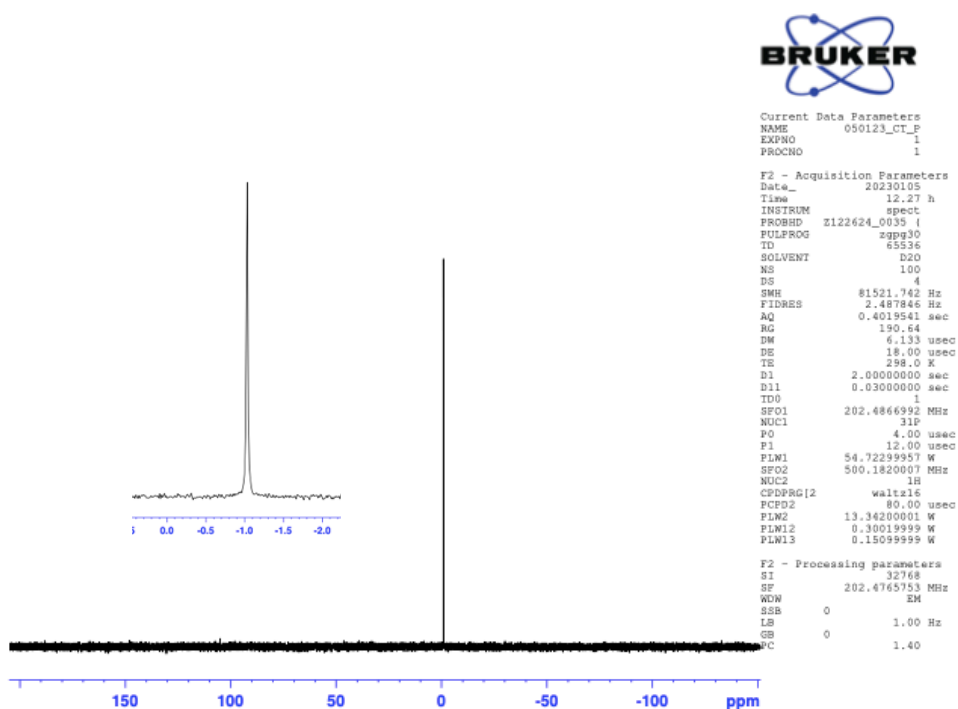
Liite 28. N²-isobutyryyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-guanosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyyli)-fosforamidiitti ¹³C NMR



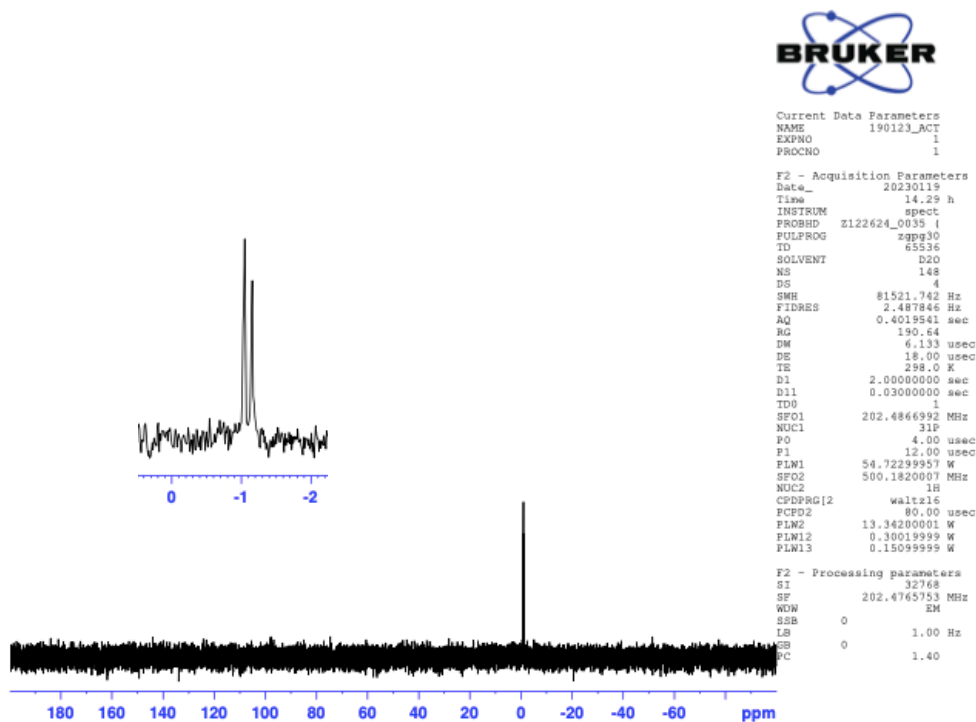
Liite 29. N²-isobutyryyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-guanosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-di-isopropyyli)-fosforamidiitti³¹P NMR



Liite 30. dC-T ³¹P NMR



Liite 31. dA-dC-T ³¹P NMR



Liite 32. dG-dC-T ³¹P NMR

