



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# Vaihtoehtoiset 5´-suojarahmät oligonukleotidisynteessissä

Minttu Pirttimaa

Bio-organisen kemian tutkimusryhmä

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

5.5.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijät(t):** Minttu Pirttimaa

**Otsikko:** Vaihtoehtoiset 5'-suojaryhmät oligonukleotidisynteesissä

**Ohjaaja(t):** Mikko Ora

**Sivumäärä:** 15 sivua

**Päivämäärä:** 5.5.2025

---

Tavallisesti oligonukleotidit syntetisoidaan kiinteällä kantajalla käyttäen fosforamidiittimenetelmää. 5'-Hydroksyyliiryhmän suojauksessa yleisimmin käytetty suojaryhmä on 4,4'-dimetoksitriityyli (DMTr). Terapeuttisten oligonukleotidien kasvava kysyntä asettaa haasteita oligonukleotidien valmistukselle. Kustannustehokkaampia, ympäristöystävällisempiä ja suuremman mittakaavan synteesimenetelmiä tarvitaan.

Vaihtoehdon dimetoksitriitylille tarjoaa asetaalisuojaryhmät, joita on käytetty syntetisoitaessa oligonukleotideja liukoisella kantajalla. DMTr-ryhmän irtoaminen liuoksessa on reversiibeli prosessi, jolloin triityyli ei välttämättä ole optimaalinen valinta 5'-hydroksyyliiryhmän suojaryhmäksi. Asetaalisuojaryhmien, 2-metoksi-prop-2-yylin (MIP) ja 2-isopropoksi-prop-2-yylin (IIP), irtoaminen tapahtuu pseudo-irreversiibelisti, jonka takia ne soveltuvat hyvin liuosfaasisynteesiin. Sivutuotteena muodostuu haihtuvia tuotteita kuten asetonia ja metanolia tai isopropanolia. Asetaalisuojaryhmät irtoavat myös huomattavasti nopeammin verrattuna dimetoksitriityliin.

Myös piksyyl- ja fotolabiileja suojaryhmiä on käytetty 5'-suojaryhminä. Piksyyliryhmä on happolabiilimpi kuin dimetoksitriityyli, ja sen happolabiilisuutta pystytään säätämään liittämällä 9-fenyylirenkaaseen erilaisia substituentteja. Lisäksi piksyylisuojaryhmillä suojatut nukleosidit kiteytyvät paremmin kuin dimetoksitriitylillä suojatut nukleosidit. Fotolabiilit suojaryhmät voidaan irrottaa sopivan aallonpituuden valolla, ja ne ovat osoittautuneet käyttökelpoiseksi valinnaksi oligonukleotidimikrosirujen synteesissä.

LuK-tutkielmassa käsitellään 5'-hydroksyyliiryhmän suojausmenetelmiä ja esitetään suojaryhmien irrottamiseen käytettyjä olosuhteita oligonukleotidisyntetiikassa.

---

**Avainsanat:** 5'-hydroksyyliiryhmä, nukleosidi, oligonukleotidi, suojaryhmä

## Sisällysluettelo

1. Johdanto .....	1
2. 5'-Hydroksyyli­ryhmän suo­jaus oligonukleotidisyntetiikassa .....	1
2.1. Trityylisuo­jaryhmä .....	3
2.2. Piksyylisuo­jaryhmä .....	7
2.3. Fotolabiilit suo­jaryhmät .....	9
2.4. Asetaalisuo­jaryhmät .....	10
2.4.1 2-Metoksi­prop-2-yyli (MIP).....	10
2.4.2 2-Isopropoksi­prop-2-yyli (IIP).....	12
3. Yhteenveto .....	14
4. Viitteet.....	16

## Lyhenneluettelo

Ade	adenosiini
Bz-PPPOC	bentsoyyli-2-(2-nitrofenyyli)propoksikarbonyyli
CRISPR	klusteroitu säännöllisesti levittäytynyt lyhyt palindrominen toisto (engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeat)
Cyt	sytosiini
DBU	1,8-diatsabisykloundek-7-eeni
DCI	4,5-disyanoimidatsoli
DCM	dikloorimetaani
DDQ	2,3-dikloori-5,6-disyano-1,4-bentsokinoni
DIEA	di-isopropylietyyliamiini
DMAP	4-dimetyyliaminopyridiini
DMPx	2,7-dimetyylipiksyyli
DMPx-Cl	2,7-dimetyylipiksyylikloridi
DMPx-OH	2,7-dimetyyli-9-fenyyliksanteeni-9-oli
DMTr	4,4'-dimetoksitriityyli
DMTr-Cl	4,4'-dimetoksitriityylikloridi
DNA	deoksiribonukleinihappo
FDA	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto
Gua	guaniini
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia
IIP	2-isopropoksiprop-2-yyli
MBDPE	<i>p</i> -metoksibentsyyli-2,7-dimetyylipiksyylieetteri
MIP	2-metoksiprop-2-yyli
MMTr	monometoksitriityyli

NaOAc	natriumasetaatti
NPPOC	2-(2-nitrofenyyli)propoksikarbonyyli
py	pyridiini
RP-HPLC	käänteisfaasikromatografia
SPh-NPPOC	tiofenyyli-2-(2-nitrofenyyli)propoksikarbonyyli
TBAF	tetrabutyyliammoniumfluoridi
TBDMS	<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli
TBS	<i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli
THF	tetrahydrofuraani
Thy	tymidiini
TPB	tris(pentafluorifenyyli)boraani
Tx	9-( <i>p</i> -tolyyli)ksanteeni-9-yl
XNA	ksenonukleiinihappo

## 1. Johdanto

Synteettisten oligonukleotidien rakenneanalogeja käytetään kasvavassa määrin monien sairauksien, kuten esimerkiksi familiaalisen hyperkolesterolemian [1] ja spinaalisen lihasatrofian [2] hoidossa. Tällä hetkellä Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (FDA) on hyväksynyt yhdeksäntoista terapeutista oligonukleotidiä lääkekäyttöön. Lisäksi on meneillään satoja kliinisiä tutkimuksia. [3]

Nykyään suurin osa oligonukleotideista syntetisoidaan fosforamidiittimenetelmää käyttäen kiinteällä kantajalla. [3] Synteesimenetelmissä on oleellista sopivan suojaryhmän käyttö sokerirenkaan 5'-hydroksyyli ryhmässä. Yleensä 5'-hydroksyyli ryhmä suojataan 4,4'-dimetoksitriityyllä (DMTr), mutta myös esimerkiksi piksyylisuojaryhmiä, fotolabiileja suojaryhmiä ja asetaalisuojaryhmiä on käytetty. [3]

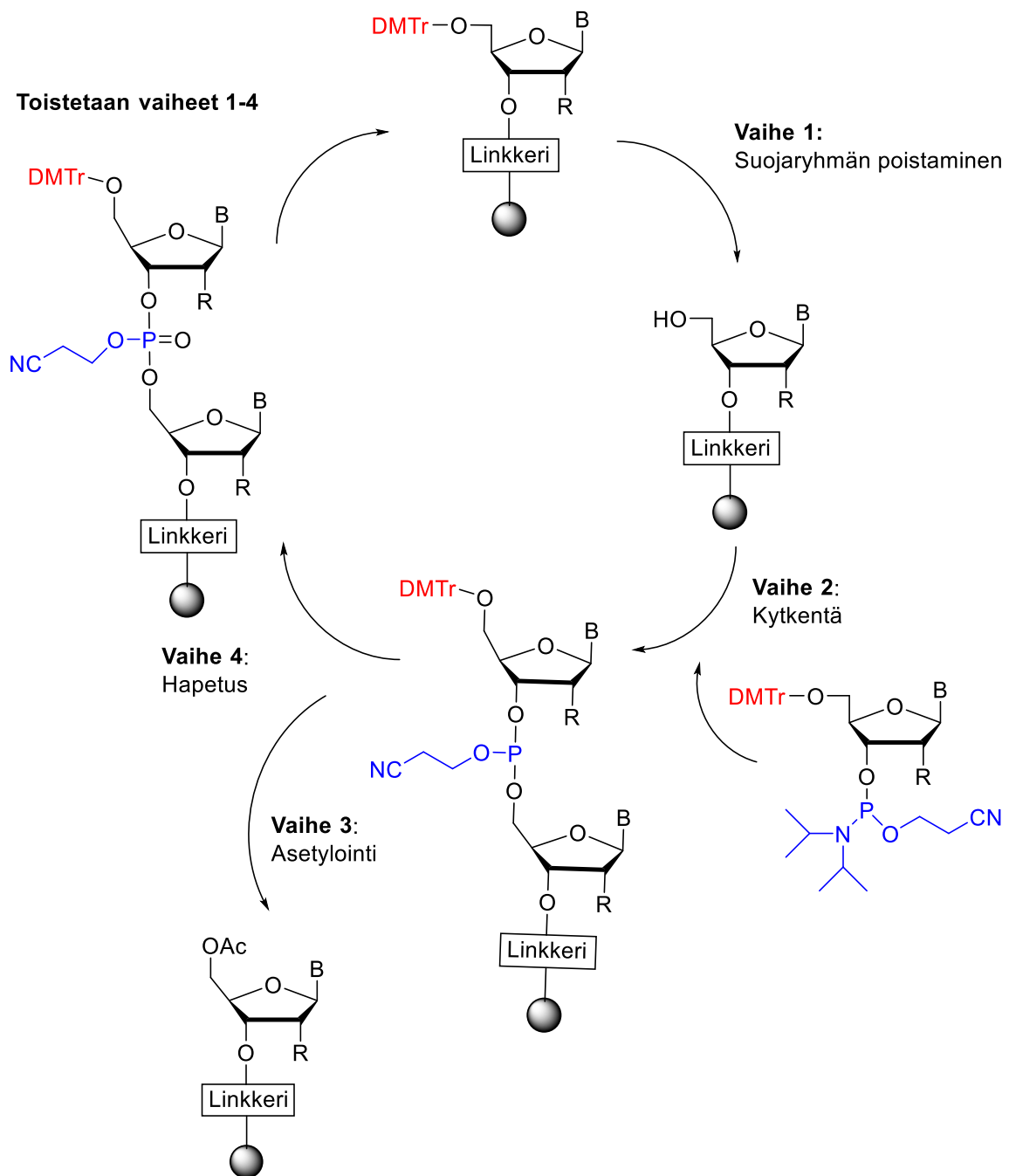
Terapeuttisten oligonukleotidien kysynnän kasvaessa mielenkiinto suuremman mittakaavan synteesimenetelmien kehittämiseen sekä kiinteällä kantajalla että liuosfaasissa vihreämpää kemialla käyttäen on lisääntynyt. [4] Liuosfaasisynteesin etuna kiintokantajasynteesiin verrattuna on pienempi liuotinkulutus ja pienemmät reagenssimäärät. [5], [6] Oligonukleotidien synteesimenetelmien ja suojaryhmien kehittämisen lisäksi, CRISPR-menetelmä (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), joka mahdollistaa DNA-juosteen muokkauksen halutussa genomissa on herättänyt kiinnostusta lääkekehityksessä. [7] Myös rakenteellisesti muokatut ei-luonnolliset ksenonukleinihapot (XNA), jotka kykenevät hybridisoitumaan kohde sekvenssin kanssa ja varastoimaan sekä siirtämään geneettistä tietoa, ovat kiinnostava tutkimuskohde. [8]

Tutkielmassa käsitellään perinteisen DMTr-suojaryhmästrategian lisäksi vaihtoehtoisia suojaryhmämenetelmiä 5'-hydroksyyli ryhmälle sekä esitetään suojaryhmien poistossa käytettyjä olosuhteita oligonukleotidisyntetiikassa.

## 2. 5'-Hydroksyyli ryhmän suojaus oligonukleotidisyntetiikassa

Vuonna 1981 Beaucage ja Caruthers [9] esittivät uraauurtavan oligonukleotidien synteesimenetelmän, jossa kytkentä suoritettiin 5'-O-suojattuja nukleosidifosforamidiittiyksiköitä käyttäen. Nykyään oligonukleotidien kemiallinen synteesi tehdäänkin yleisimmin fosforamidiittimenetelmällä kiinteällä kantajalla (Kaavio 1). [10] Synteesisyklin ensimmäisessä

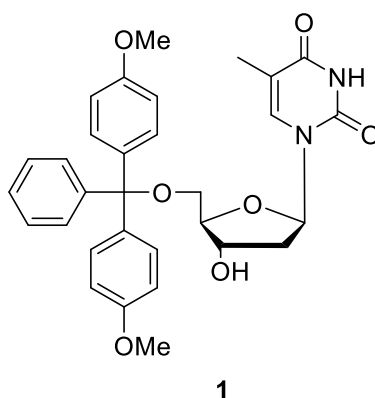
vaiheessa linkkerin välityksellä kiinteään kantajaan sidotun nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmän trityylisuojaus poistetaan. Tämän jälkeen kyseisen nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmä reagoi nukleosidifosforamidiitin kanssa aktivaattorin läsnä ollessa hyökäten fosforiatomiin ja muodostaen fosfori-happisidoksen. Reagoimattomat 5'-hydroksyyliiryhmät asetyloidaan, jotta ne eivät reagoi seuraavassa kytkevävaiheessa. Muodostunut fosfiittitriesteri hapetetaan jodilla stabiilimmaksi fosfaattitriesteriksi. Synteesisykliä toistetaan, kunnes saadaan halutun mittainen oligonukleotidi. [10] Koska oligonukleotidien kemiallinen synteesi tehdään tavallisesti 3'-5'-suunnassa, ei 3'-hydroksyyliiryhmälle tarvita erillistä suojaryhmää, koska se on sidottu kiinteään kantajaan. [3]



**Kaavio 1.** Oligonukleotidisynteesi kiinteällä kantajalla käyttäen fosforamidiittimenetelmää.

## 2.1. Trityylisuojarahmä

4,4'-Dimetoksitriityliä (DMTr) on käytetty nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmän suojaamiseen ensimmäistä kertaa jo vuonna 1963 (Kuva 1, **1**). [11] Dimetoksitriitylistä on tullut yleisimmin käytetty suojarahmä 5'-hydroksyyliiryhmälle oligonukleotidien valmistuksessa. [3] Triityyli voidaan liittää nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmään spesifisesti ja poistaa vedettömällä hapolla. Poiston yhteydessä tapahtuu värireaktio, jonka avulla detriitylaatiota on mahdollista seurata. Mono- ja dimetoksitriitylit ovat stabiileja fosforamidiittimenetelmän kytkentäolosuhteissa, joissa käytetään aktivaattoreita. [3]



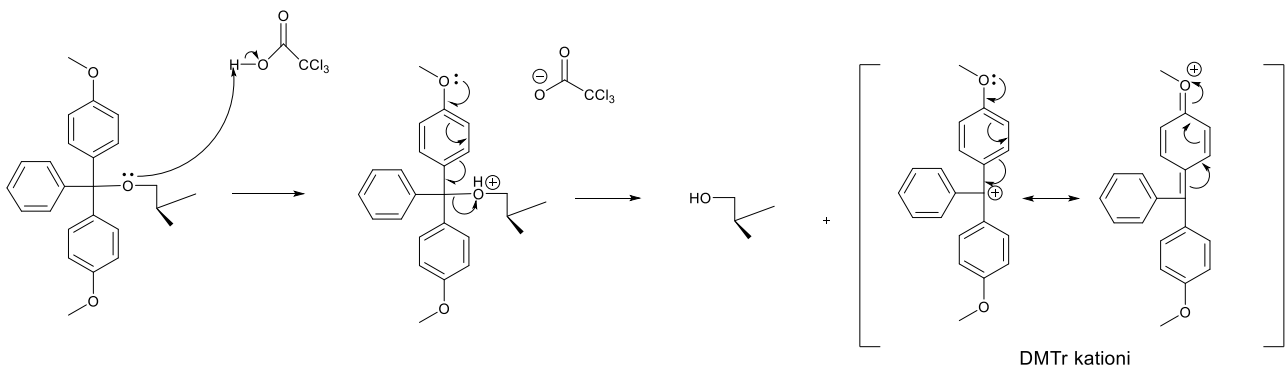
**Kuva 1.** 5'-*O*-Dimetoksitriitylitymidiini.

DMTr-suojarahmä liitetään selektiivisesti nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmään yleensä 4,4'-dimetoksitriitylikloridilla (DMTr-Cl) pyridiinissä 4-dimetyyliaminopyridiin (DMAP) läsnä ollessa (Kaavio 2). DMTr-Cl on kuitenkin herkkä kosteudelle ja se on kallis reagenssi suuremman mittakaavan synteesiin. [3] Shabsavarin työryhmä [12] onkin tutkinut monometoksitriityli- ja dimetoksitriitylialkoholin käyttöä suojatessaan nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmän. Triitylialkoholi **4a-b** reagoi trifluorietikkahappoanhydridin kanssa dikloorimetaanissa argonsuojakaasun alla, jolloin muodostuu tuotteet **5a-b**, joita käytetään nukleosidien tritylaatioon di-isopropyylietyyliamiinin (DIEA) läsnä ollessa tetrahydrofuraanissa (THF) (Kaavio 3). [12] Menetelmää käyttämällä vältettiin kalliiden hopeasuolojen käyttö, joita on käytetty aikaisemmin muun muassa alkoholien tritylaatioissa. [13] Myös Valeru työryhmineen [14] on käyttänyt 4,4'-dimetoksitriitylialkoholia stabiilimpana ja taloudellisempänä vaihtoehtona Amberlyst-15 katalyytin läsnä ollessa.



Käytettäessä tritylaatioissa mikroaaltosäteilytystä, voidaan välttää pyridiini-liuottimen käyttö nukleosidin 5'-hydroksyyli-ryhmän reagoimassa trityyli-, monometoksitriityyli- tai dimetoksitriitylikloridin kanssa trietyyliamiinin läsnä ollessa. [15] Myös 2,6-lutidiinia on käytetty emäksenä pyridiinin sijaan kilogramma mittakaavan synteesissä. [16]

Kaaviossa 4 on kuvattu detritylaation mekanismi. Yleensä detritylaatio tehdään di- tai trikloorietikkahapolla dikloorimetaanissa tai muussa vedettömässä liuottimessa. [3] Detritylaatioolosuhteissa havaitaan yleensä sivureaktiona tapahtuva depurinaatio erityisesti pitkiä oligonukleotidejä valmistessa ja suuremman mittakaavan synteesissä. [17] Optimaalisinta olisikin, jos detritylaatio voitaisiin tehdä neutraaleissa olosuhteissa depurinaation minimoimiseksi. [3]



**Kaavio 4.** Detritylaation mekanismi. [10]

Detritylaatioissa käytettävien happojen on havaittu sitoutuvan voimakkaasti oligonukleotidiin. [18] Hapon konsentraation nostaminen johtaa nopeampaan ja täydellisempään detritylaatioon samalla vähentäen oligonukleotidin altistumisaikaa hapolle. [18] Tutkittaessa detritylaation- ja sivureaktiona tapahtuvan depurinaation suhdetta di- ja trikloorietikkahapossa, tulosten perusteella optimaalisinta olisi käyttää 15 %:sta dikloorietikkahapoa dikloorimetaanissa. Kyseisessä olosuhteissa saavutettiin mahdollisimman nopea detritylaatio ja minimaalinen depurinaatio. [19] Koska dikloorimetaani on haitallinen ja mahdollisesti syöpää aiheuttava liuotin, sen korvaamista toluenilla on tutkittu oligonukleotidien synteesissä. [20]

DMTr-suojaa on käytetty myös kilogramma mittakaavan oligonukleotidisynteesissä käyttämällä konvergentti-liuosfaasisynteesiä. [21] DMTr-suojauksen irrottamiseen käytettiin trifluorietikkahapoa tiolin ( $C_{12}H_{25}SH$ ) läsnä ollessa, jolloin detritylaatio onnistui lähes täydellisesti (> 99.9 %). Menetelmällä valmistettiin 18- ja 34-meerisiä oligonukleotidejä. [21]

Kun halutun mittainen oligonukleotidiketju on syntetisoitu, viimeinen 5'-suojaryhmän poisto voidaan tehdä kahdella eri tavalla. [3] Trityl-off menetelmässä 5'-suojaryhmä poistetaan ennen kuin oligonukleotidi irrotetaan kiinteästä kantajasta ammonolyysillä. Trityl-on menetelmässä 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaryhmä jätetään paikoilleen, kun oligonukleotidi irrotetaan kiinteästä kantajasta. Menetelmän etuna on hydrofobisemman 5'-suojatun kohdeoligonukleotidin helpompi puhdistaminen käänteisfaasikromatografisesti lyhyemmistä sekvensseistä, joissa ei ole 5'-O-suojaryhmää. Poistettaessa 5'-suojaryhmä vasta kantajalta irrotuksen ja puhdistuksen jälkeen, depurinaation riski kuitenkin kasvaa. [3]

Depurinaatoriskiä voidaan pienentää käyttämällä joko mahdollisimman lyhyttä suojaryhmäpoistoaikaa tai säätämällä pH optimaaliseksi. [3] Jälkimmäisessä vaihtoehdossa suojaryhmän poistossa käytetään miedosti hapanta natriumasetaatipuskuria (pH 3.0–3.2) di- tai trikloorietikkahapon sijaan. [22] Käytännössä oligonukleotidin käänteisfaasikromatografisen puhdistuksen jälkeen (RP-HPLC) eluentin puskurikomponentit poistetaan, minkä jälkeen detritylaatio suoritetaan miedosti happamassa NaOAc -puskuriliuoksessa (10mM) ja määritetään  $t_{1/2}$  vs. pH käyrä jokaiselle yksittäiselle sekvenssille ja detektoidaan lyhin mahdollinen käsittelyaika, jossa 5'-O-suojaryhmä irtoaa annetuissa reaktioparametreissa. Tämä mahdollistaa detritylaation suorittamisen toistettavasti ilman HPLC-seurantaa. [22] Noudatettaessa kyseistä menetelmää depurinaation osuus saatiin merkittävästi pienennettyä (< 1 %) syntetisoitaessa 20-meerisiä oligonukleotidifosforotioaattisekvenssejä. [23]

Käytettäessä trityl-on-menetelmässä patruunapuhdistusta, detritylaatio suositellaan suoritettavaksi 3 % dikloorietikkahapolla ja 1 minuutin käsittelyajalla yhdistettynä puhdistetun oligonukleotidin pesuun puskuroidulla asetonitriilillä. [24] Jos asetonitriilin vesiliuos (pH=5.5) puskuroitiin natriumkarbonaatilla, liuoksen pH nousi 7.5:een, jolloin depurinaatiota ei havaittu valmistaessa 20- ja 30-meerisiä oligonukleotidisekvenssejä. [24]

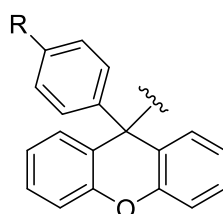
Detritylaatiota suoritettaessa on käytetty myös Dowex-H<sup>+</sup> -ioninvaihtohartsia, jolloin detritylaation on havaittu tapahtuvan noin 10 min:ssa, joka on huomattavasti nopeammin kuin tunnissa tapahtuva detritylaatio 80 % etikkahappokäsittelyssä. [25] Aikaisemmin mainitussa tutkimuksessa detritylaatioissa käytettiin Amberlyst-15 katalyyttiä ja metanolia liuottimena. [14] Detritylaatio voidaan suorittaa myös silikageelikromatografisen puhdistuksen aikana käyttämällä trifluorietikkahappoa eluentissa. [26] Myös erilaisia Lewis-happoja kuten ceriumtriflaattia [27],

antimonitrikloridia [28] ja indium(III)triflaattia [29] on käytetty katalysoimaan trityylin irtoamista nukleosideista.

## 2.2. Piksyylisuojarahmä

Chattopadhyaya ja Reese [30] esittivät 9-fenyylisanteeni-9-yylin (Piksyyli, Kuva 2, **10a**) vaihtoehtoiseksi suojarahmäksi trityylille. Nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmä suojataan piksyylillä käyttäen 9-kloori-9-fenyylisanteenia pyridiinissä. Piksyylijohdannaiset kiteytyvät paremmin kuin dimetoksitrityyllä suojatut yhdisteet, mutta piksyylin happolabiilius on hyvin samankaltainen kuin dimetoksitrityylin. Piksyyliryhmän poistonopeus vaihtelee 8–15 minuutin välillä 80 %:ssa etikkahapon vesiliuoksessa 20°C:ssa. Samoissa olosuhteissa dimetoksitrityylin irtoaminen tapahtuu 16 minuutissa. [30]

Piksyyliryhmän happolabiiliisuutta on mahdollista säädellä lisäämällä 9-fenyylirenkaaseen elektroneja luovuttavia tai vastaanottavia substituentteja. Esimerkiksi *p*-metyyli-ryhmän liittäminen fenyylirenkaaseen tekee ryhmästä happolabiilimman. [31] Reesen ja Yan'in [32] tutkimuksissa piksyyli- (**10a**) ja 9-(*p*-tolyyli)ksanteeni-9-yyli (Tx, Kuva 2, **10b**) -ryhmien irtoamisen puoliintumisajat olivat 198 ja 60 sekuntia, kun taas dimetoksitrityylin 450 sekuntia, kun poisto tehtiin dikloorietikkahapolla (5 ekv.) pyrrolin (15 ekv.) läsnä ollessa 0°C:ssa. Nopeamman irtoamisen perusteella piksyyli- ja Tx-ryhmien käyttöä suositeltiin DMTr-ryhmän sijaan 5'-hydroksyyliiryhmän suojaamiseen. [32]



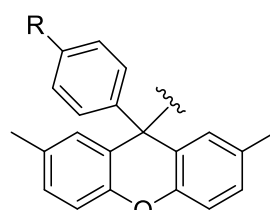
**10**

**a:** R = H (Piksyyli)  
**b:** R = Me (Tx)

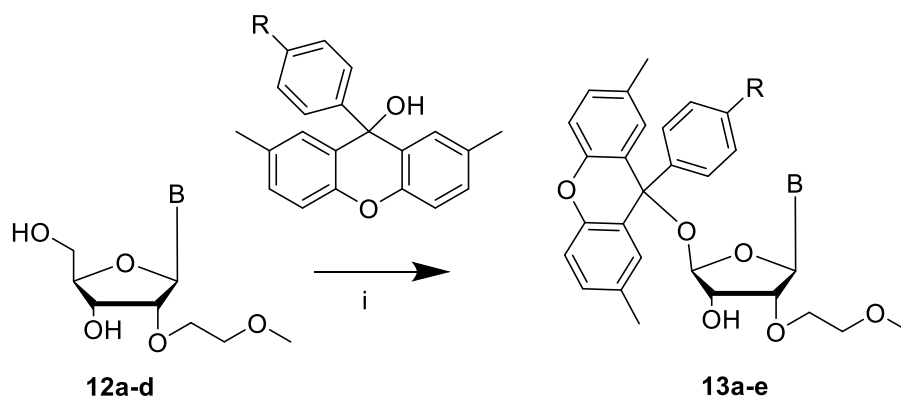
**Kuva 2.** Piksyyli- ja Tx-ryhmä.

Myös piksyyliryhmän rakenneanalogia, 2,7-dimetyylipiksyyliä (DMPx, Kuva 3, **11a**) voidaan käyttää 5'-suojarahmäenä oligonukleotidien synteesissä. [33] 2,7-Dimetyyli-9-fenyylisanteeni-9-oli (DMPx-

OH) voidaan valmistaa Friedel-Crafts reaktiolla di-*p*-tolyylietterin reagoiessa bentsoehapon kanssa sinkkikloridin ja fosforyylikloridin läsnä ollessa 95°C:ssa. [34] DMPx-OH:n liittämässä nukleodisin 5'-hydroksyyliin käytetään tris(pentafluorifenyyli)boraania (TPB) katalyyttinä (Kaavio 5). DMPx:llä suojatut nukleosidit kiteytyvät helposti. DMPx-ryhmä irrotetaan dikloorietikkahapolla dikloorimetaanissa pyrrolin läsnä ollessa. *para*-Substituentit 9-fenyyliinirengas (Kuva 3, **11a-e**) vaikuttavat ryhmän irtoamisnopeuteen. Yhdisteiden **11a-e** puoliintumisajat olivat: 9, 40, 5, 15 ja 63 sekuntia. Elektroneja vastaanottavien substituenttien, kuten bromin, liittämisen fenyyliinirengas todettiin siis hidastavan irtoamisnopeutta. [34]

**11**

- a: R = H (DMPx)
- b: R = Br
- c: R = Ph
- d: R = t-Bu
- e: R = NO<sub>2</sub>

**Kuva 3.** Substituoitu DMPx-ryhmä. [34]**12a-d****13a-e**

- a: B = 5-Me-U
- b: B = 5-Me-C<sup>Bz</sup>
- c: B = A<sup>Bz</sup>
- d: B = G<sup>iBu</sup>

- a: R = H
- b: R = Br
- c: R = Ph
- d: R = t-Bu
- e: R = NO<sub>2</sub>

**Kaavio 5.** DMPx-suojattujen nukleosidien valmistaminen. Olosuhteet ja reagenssit: i) 3 mol% Lewis happo, DCM, refluksointi, 3–4 h. [34]

Myös *p*-metoksibentsyyli-2,7-dimetyylipiksyylieetteriä (MBDPE) on käytetty reagenssina 2,3-dikloori-5,6-disyano-1,4-bentsokinonin (DDQ) läsnä ollessa suojaessa nukleosidin 5'-hydroksyyli-ryhmä DMPx-ryhmällä. [35] MBDPE valmistetaan *p*-metoksibentsyylialkoholin reagoitessa DMPx-OH:n kanssa dikloorimetaanissa kupari(II)nitraatin toimiessa katalyyttinä. DMPx-suojaryhmä voidaan poistaa metanolissa DDQ:lla huoneenlämmössä. DDQ:n käyttäminen mahdollistaa suojaryhmän liittämisen ja poistamisen neutraaleissa olosuhteissa. [35] On myös raportoitu, että nukleosidin 5'-hydroksyyli-ryhmä voidaan suojata käyttämällä DMTr-OH:ta tai DMPx-OH:ta dikloorimetaanissa kupari(II)nitraatin läsnä ollessa refluksoimalla. [36] Myös suojaryhmän poistaminen onnistuu metanolissa käyttämällä kyseistä katalyyttiä. Kupari(II)nitraatti oli edullisempi katalyytti verrattuna aikaisemmin esitettyyn TPB:hen. [34] Lisäksi tutkimuksessa voitiin välttää vähemmän stabiilien ja kalliimpien DMTr-Cl:n ja DMPx-Cl:n käyttö, joka mahdollistaa taloudellisemman vaihtoehdon suuremman skaalan synteisiin. [36]

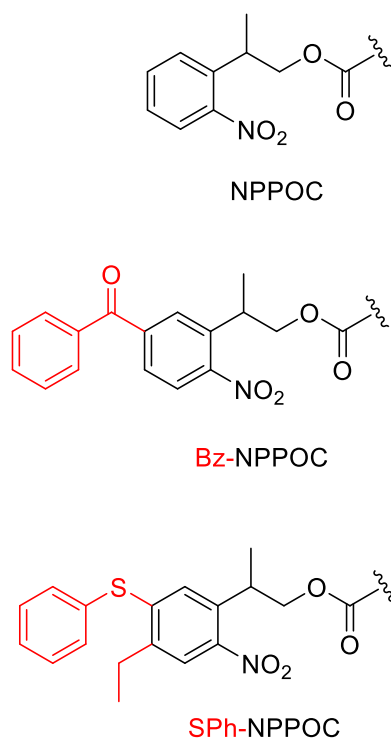
DMPx-ryhmää on käytetty 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaamiseen myös 8-aryyli-substituoiduissa 2'-deoksiganosiinien tapauksessa. [37] 8-Aryyli substituotujen yhdisteiden on kuitenkin todettu olevan suhteellisen herkkiä hydrolyysille happamissa liuoksissa, joissa DMTr-ryhmä poistetaan. Näin ollen oligonukleotidien synteesi onnistui paremmin DMPx-suojaryhmää käyttäen, joka voitiin poistaa laimeammassa olosuhteissa 0,5 % dikloorietikkahapolla. [37]

### 2.3. Fotolabiilit suojaryhmät

Fotolabiilit suojaryhmät voidaan irrottaa sopivan aallonpituuden omaavalla valolla. [38] Fotolabiileissa suojaryhmissä on kromofori, joka aktivoituu säteilytettäessä. Sopivan kromoforin valitseminen tekee suojaryhmän poistamisesta hyvin selektiivisen. Fotolabiileja suojaryhmiä ei ole kuitenkaan käytetty oligonukleotidisyntetiikassa kovinkaan paljon muihin suojaryhmiin verrattuna, niiden eduista huolimatta. [38]

Oligonukleotidimikrosirujen valmistuksessa on käytetty fotolabiileja suojaryhmiä. Eräs fotolabiili 5'-hydroksyyli-ryhmän suojauksessa käytetty ryhmä on 2-(2-nitrofenyyli)propoksikarbonyyli (NPPOC, Kuva 4). [39] Kyseisen ryhmän fotolyttistä tehokkuutta on parannettu substituomalla nitrofenyylirengas bentsoyylillä tai tiofenyyllillä ja etyyllillä. [40] Bentsoyyl-2-(2-nitrofenyyli)propoksikarbonyylin (Bz-NPPOC, Kuva 4) ja tiofenyyli-2-(2-nitrofenyyli)propoksikarbonyylin (SPh-NPPOC, Kuva 4) on todettu irtoavan fotolyttisesti 2- ja 12-

kertaa nopeammin kuin NPPOC-ryhmän. Näin ollen kyseisten suojaryhmien avulla on mahdollista nopeuttaa fotolitografisten mikrosirujen valmistusta huomattavasti. [40]



**Kuva 4.** NPPOC-, Bz-NPPOC- ja SPh-NPPOC-ryhmät.

## 2.4. Asetaalisuojaryhmät

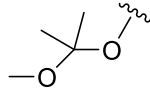
Liuosfaasisynteesi mahdollistaa muun muassa liuottimien ja reagenssien käytön minimoinnin verrattuna kiinteällä kantajalla suoritettavaan synteesiin, samalla vähentäen muodostuvien jätteiden määrää ja kustannuksia. Huomionarvoista on, että liukoisen kantajan käytöllä on mahdollista yhdistää kiintokanta- ja liuosfaasisynteesin parhaat puolet. [5], [6]

DMTr-ryhmä ei ole paras mahdollinen 5'-hydroksyyliiryhmän suojaryhmä liuosfaasisynteesissä, mikä johtuu detritylaation reversiibeliydestä. [41] Onkin esitetty, että liuosfaasisynteesissä voitaisiin käyttää asetaalisuojaryhmiä, koska niiden poistaminen tapahtuu pseudo-irreversiibelisti. [42], [43]

### 2.4.1 2-Metoksiprop-2-yyli (MIP)

Oligonukleotidien liuosfaasisynteesissä on käytetty asetaalisuojaryhmänä 2-metoksiprop-2-yyliä (MIP, Kuva 5), joka on dimetoksitriityyliä happolabiilimpi ja atomieconomisempi. [41] Mahdollisena

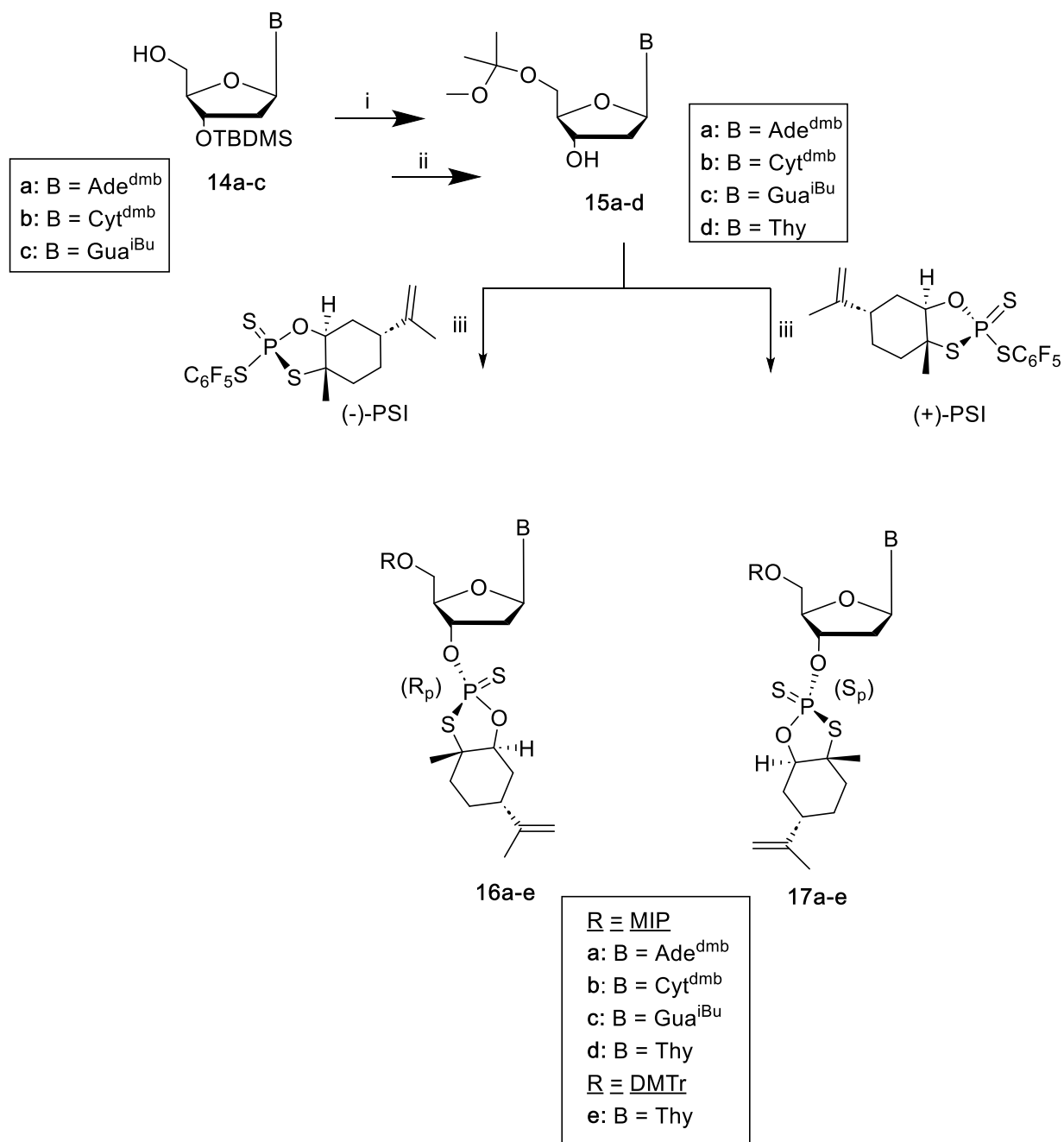
ongelmana MIP-suojaryhmän käytössä voi olla se, että nukleotidi jää liian hydrofiiliseksi ryhmän pienen koon takia. [41]



**Kuva 5.** 2-Metoksi-prop-2-yyli suojaryhmä.

Molina työryhmineen [44] on käyttänyt 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaukseen MIP-ryhmää valmistaessaan lyhyitä oligodeoksiribonukleotidejä liuoksessa käyttämällä  $\beta$ -syklodekstriiniä liukoisena kantajana. MIP-ryhmä poistettiin happokatalysoidulla metanolyysillä, mikä muodosti haihtuvina tuotteita asetonia ja metanolia. [44] Toisessa tutkimuksessa [45] MIP-ryhmää on käytetty 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaamiseen valmistaessa lyhyitä oligoribonukleotidejä liuoksessa. Liukoisena kantajana käytettiin saostettavaa pentaerytritolin johdannaista. Sokeriosassa käytetyt suojaryhmät, 2'-OH:n 2-syanoetyyli ja 5'-OH:n MIP, ovat pieniä ja melko polaarisia, jotka yhdessä liukoisen kantajan kanssa mahdollistivat saostuksen metanolista jokaisen synteosivaiheen jälkeen. [45]

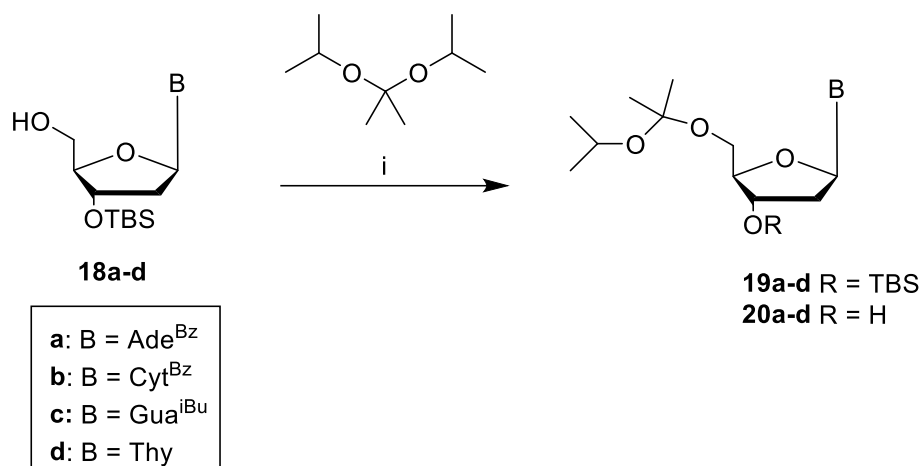
MIP-suojaryhmää on käytetty myös syntetisoitaessa stereokontrolloidusti fosforotioaattioligonukleotidejä P(V)-kemialla käyttäen. [42] Nukleosidit aktivoitiin limoneenista valmistetuilla (+)- ja (-)- $\Psi$ -reagensseilla (Kaavio 6). [42]



**Kaavio 6.** 3'-O-Ψ-aktivoitujen 5'-O-MIP-2'-deoksinukleosidien synteesi. Olosuhteet ja reagenssit: i) 2,2-dimetoksipropani, THF, TsOH·H<sub>2</sub>O, rt., 3 h. ii) TBAF·3H<sub>2</sub>O, THF, rt., 2 h – yön yli. iii) (-) -PSI/ (+) -PSI, DBU, MeCN, rt., 2 h. [42]

#### 2.4.2 2-Isopropoksi-2-yyli (IIP)

Myös 2-isopropoksi-2-yyli (IIP) -ryhmän on havaittu olevan toimiva valinta nukleosidien 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaamiseen liuosfaasisynteesissä. [43] IIP-ryhmä liitetään nukleosidiin happokatalysoidulla transasetalisaatiolla 2,2-di-isopropoksi-2-yyliä (Kaavio 7). [43]

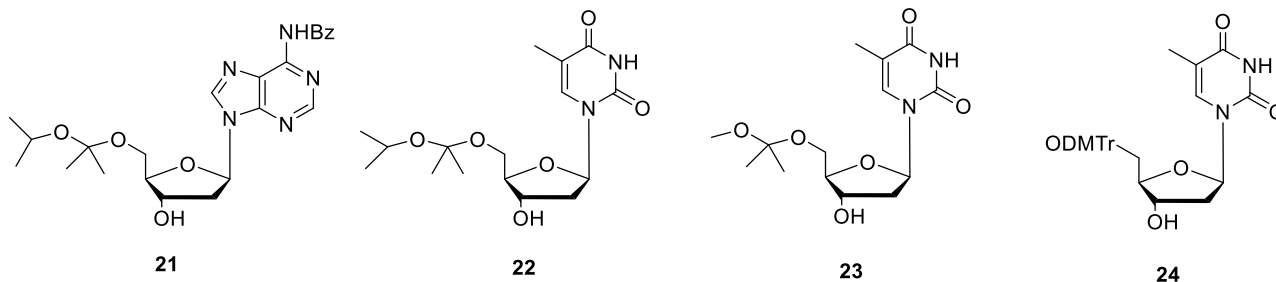


**Kaavio 7.** Nukleosidin 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaaminen IIP-ryhmällä. Reagenssit: i) 2,2-diisopropoksi-2-yyli-ryhmä. [43]

2-Isopropoksi-2-yyli-ryhmä on happolabiilimpi kuin MIP-ryhmä. [43] IIP-ryhmä voidaan poistaa happokatalyyttisesti miedolla karboksyylihappokäsittelyllä. Poistossa muodostuu haihtuvina sivutuotteina asetonia ja isopropanolia. Tutkimustulosten perusteella (Taulukko 1) IIP-ryhmän irtoaminen tapahtuu noin 15 kertaa nopeammin kuin MIP-ryhmän. Detritylaatio on huomattavasti hitaampi kuin IIP-ryhmän irtoaminen samoissa olosuhteissa. Myös IIP-suojatun adenosiinin depurinaatio tapahtuu huomattavasti hitaammin verrattuna IIP:n irtoamiseen. [43]

**Taulukko 1.** 5'-O-Suojattujen nukleosidien suojaryhmien irtoamisen ja depurinaation puoliintumisajat. [43]

Nukleosidi	5'-O-suojauksen irtoaminen $t_{1/2/s}$	Depurinaatio $t_{1/2/s}$
N <sup>6</sup> -bentsoyyli-2'-deoksi-5'-O-IIP-adenosiini ( <b>21</b> )	6±1	25000 ± 110
2'-deoksi-5'-O-IIP-tymidiini ( <b>22</b> )	10±2	-
2'-deoksi-5'-O-MIP-tymidiini ( <b>23</b> )	125±6	-
2'-deoksi-5'-O-DMTr-tymidiini ( <b>24</b> )	560±54	-



**Kuva 6.** IIP- MIP- ja DMTr -suojatut nukleosidit. [43]

Tutkittaessa [43] IIP-ryhmän stabiilisuutta fosforamidiittimenetelmässä kytkentävaiheessa käytettävien happamien aktivaattorien 1*H*-tetratsolin ja 4,5-disyanoimidatsolin (DCI) läsnä ollessa, IIP-suojaryhmän ei todettu irtoavan tetratsolia käytettäessä, mutta DCI:n tapauksessa IIP irtoaa huomattavasti kahden tunnin aikana. IIP-ryhmää käytettäessä on siis valittava tarkoitukseen sopiva aktivaattori. [43]

### 3. Yhteenveto

4,4'-Dimetoksitriityli (DMTr) on käytetyin suojaryhmä 5'-hydroksyyliiryhmän suojaamisessa oligonukleotidien synteeseissä. Tritylaatioissa triityylikoholien käyttöä on tutkittu, jotta voitaisiin välttää kosteus herkkien ja kalliiden triityylikloridien käyttö. [12], [14] Myös detritylaatioissa käytettäviä reaktio-olosuhteita on tutkittu säätämällä käytettävän hapon konsentraatiota niin, että detritylaatio tapahtuu tehokkaasti, mutta depurinaation osuus olisi minimaalinen. [18], [19] Liuoksen pH:ta säätämällä pyritään optimoimaan 5'-suojaryhmän irrottaminen. [22], [24] Myös vaihtoehtoisia suojaryhmiä kuten piksyyli- ja fotolabiileja suojaryhmiä on esitetty dimetoksitriitylin korvaamiseksi. Piksyyliryhmä irtoaa noin 2 kertaa nopeammin kuin dimetoksitriityli. [32] Piksyylin ja sen rakenneanalogin DMPx:n irtoamisnopeutta voidaan myös helposti säädellä lisäämällä 9-fenyylirenkaseen substituentteja. [31], [34] Lisäksi piksyylillä ja DMPx:llä suojatut yhdisteet kiteytyviä paremmin kuin dimetoksitriitylillä suojatut yhdisteet. [30], [34] DMPx-ryhmä on myös mahdollista irrottaa 0,5 % dikloorietikkahappokäsittelyllä, joka on miedompi kuin dimetoksitriitylin poistoon tarvittavat olosuhteet. [37] Fotolabiilit suojaryhmät taas mahdollistavat suojaryhmän poistamisen valolla, eikä happokäsittelyä tarvita ollenkaan. Tällaisten suojaryhmien fotolyyttistä tehokkuutta on onnistuttu parantamaan, jopa 12 kertaisesti. [40]

Perinteiselle kiintokantajasynteetille tarvitaan kuitenkin uusia vaihtoehtoja, jotta suuremman mittakaavaan synteesit olisivat mahdollisia terapeuttisten oligonukleotidien kysynnän kasvaessa. Liuosfaasisynteesi on yksi lupaava vaihtoehto, jonka avulla synteesin mittakaavaa voidaan suurentaa ja samalla noudattaa vihreän kemian periaatteita. [5], [6] Liuosfaasisynteesiin tarvitaan kuitenkin uudenlainen suojaryhmästrategia, koska DMTr-ryhmän detritylaatio on liuoksessa reversiibeli prosessi. [41] Asetaalisuojaryhmät, MIP ja IIP, ovat eräs vaihtoehto 5'-hydroksyyli-ryhmän suojaukseen, koska niiden poistaminen tapahtuu pseudo-irreversiibelisti muodostaen haihtuvia sivutuotteita kuten asetonia ja alkoholia. [42]-[45] DMTr-suojaa on käytetty konvergentti-liuosfaasisynteesissä syntetisoidessa oligonukleotidejä kilogramma mittakaavassa, jolloin DMTr-suojastrategian käyttökin osoittautui toimivaksi. [21]

## 4. Viitteet

- [1] F. J. Raal, R.D. Santos, D.J. Blom, A.D. Marais, M.J. Charng, W.C. Cromwell, R.H. Lachmann, D. Gaudet, J.L. Tan, S. Chasan-Taber, D.L. Tribble, J.D. Flaim ja S.T. Crooke, “Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial,” *The Lancet*, **2010**, *375*, 998–1006, doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60284-x.
- [2] C. A. Chiriboga, K.J. Swoboda, B.T. Darras, S.T. Innaccone, J. Montes, D.C. De Vivo, D.A. Norris, C.F. Bennett ja K.M. Bishop, “Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy,” *Neurology*, **2016**, *86*, 890–897, doi.org/10.1212/wnl.0000000000002445.
- [3] H. Seliger ja Y. S. Sanghvi, “An Update on Protection of 5'-Hydroxyl Functions of Nucleosides and Oligonucleotides,” *Curr. Protoc.*, **2024**, *4*, e999, doi: 10.1002/cpz1.999.
- [4] R. Obexer, M. Nassir, E. R. Moody, P. S. Baran, ja S. L. Lovelock, “Modern approaches to therapeutic oligonucleotide manufacturing,” *Science*, **2024**, *384*, eadl4015, doi.org/10.1126/science.adl4015.
- [5] B. I. Andrews, F.D. Antia, S.B. Brueggemeier, L.J. Diorazio, S.G. Koenig, M.E. Kopach, H. Lee, M. Olbrich ja A.L. Watson, “Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing,” *J. Org. Chem.*, **2021**, *86*, 49–61, doi.org/10.1021/acs.joc.0c02291.
- [6] A. G. Molina ja Y. S. Sanghvi, “Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions,” *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2019**, *77*, e82, doi.org/10.1002/cpnc.82.
- [7] J. Y. Wang ja J. A. Doudna, “CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning,” *Science*, **2023**, *379*, eadd8643, doi.org/10.1126/science.add8643.
- [8] A. I. Taylor, G. Houlihan, ja P. Holliger, “Beyond DNA and RNA: The Expanding Toolbox of Synthetic Genetics,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2019**, *11*, a032490, doi.org/10.1101/cshperspect.a032490.
- [9] S. L. Beaucage ja M. H. Caruthers, “Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis,” *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 1859–1862, doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90461-7.
- [10] “ATDBio - Nucleic Acids Book - Chapter 5: Solid-phase oligonucleotide synthesis.” Viitattu: 28.1.2025. <https://atdbio.com/nucleic-acids-book/Solid-phase-oligonucleotide-synthesis>
- [11] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, ja H. G. Khorana, “Studies on Polynucleotides. XXIV. The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4). Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3' Phosphates,” *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 3821–3827, doi.org/10.1021/ja00906a021.

- [12] S. Shahsavari, J. Chen, T. Wigstrom, J. Gooding, A. Gauronskas, ja S. Fang, "Tritylation of alcohols under mild conditions without using silver salts," *Tetrahedron Lett.*, **2016**, *57*, 3877–3880, doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.07.062.
- [13] J. T. I. Lundquist, A. D. Satterfield, ja J. C. Pelletier, "Mild and adaptable silver triflate-assisted method for trityl protection of alcohols in solution with solid-phase loading applications," *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 3915–3918, doi.org/10.1021/ol0614018.
- [14] A. Valeru, Z. Luo, S. Penjarla, I. Khan, B. Liu, B. Sngepu, Y. Xu ja J.Xie, "Renewable amberlyst-15 catalyzed highly regioselective tritylation and deprotection of sugar-based diols," *J. Carbohydr. Chem.*, **2018**, *37*, 318–326, doi: 10.1080/07328303.2018.1487974.
- [15] N. Zekri, R. F. Alamdari, ja A. Khalafi-Nezhad, "A solvent free and selective method for preparation of triphenylmethyl ethers of alcohols and nucleosides," *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, **2010**, *24*, 299–304, doi.org/10.4314/bcse.v24i2.54764.
- [16] A. K. McPherson, D. Capaldi, L. Chen, ja P. Olsen, "An Improved Process for the Manufacture of 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>2</sup>-isobutyryl-2'-O-(2-methoxyethyl)guanosine," *Org. Process Res. Dev.*, **2020**, *24*, 2583–2590, doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00261.
- [17] H. Seliger, "Protection of 5'-Hydroxy Functions of Nucleosides," *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2000**, *00*, 2.3.1-2.3.34, doi.org/10.1002/0471142700.nc0203s00.
- [18] C. H. Paul ja A. T. Royappa, "Acid Binding and Detritylation During Oligonucleotide Synthesis," *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 3048–3052, doi.org/10.1093/nar/24.15.3048.
- [19] M. Septak, "Kinetic Studies on Depurination and Detritylation of CPG-Bound Intermediates During Oligonucleotide Synthesis," *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 3053–3058, doi.org/10.1093/nar/24.15.3053.
- [20] A. H. Krotz, D. L. Cole, ja V. T. Ravikumar, "Synthesis of an antisense oligonucleotide targeted against C-raf kinase: efficient oligonucleotide synthesis without chlorinated solvents," *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 435–439, doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00253-3.
- [21] X. Zhou, W.F. Kiesman, W. Yan, H. Jiang, F.D. Antia, J. Yang, Y.A. Fillon, L. Xiao ja X. Shi, "Development of Kilogram-Scale Convergent Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides," *J. Org. Chem.*, **2022**, *87*, 2087–2110, doi.org/10.1021/acs.joc.1c01756.
- [22] A. H. Krotz, B. McElroy, A. N. Scozzari, D. L. Cole, ja V. T. Ravikumar, "Controlled detritylation of antisense oligonucleotides," *Org. Proc. Res. Dev.*, **2003**, *7*, 47–52, doi.org/10.1021/op020068u.
- [23] A. H. Krotz, D. L. Cole, ja V. T. Ravikumar, "Synthesis of Antisense Oligonucleotides with Minimum Depurination," *Nucl. Nucl. Nucl. Acids*, **2003**, *22*, 129–134, doi.org/10.1081/ncn-120019499.
- [24] G. Scott, "Avoiding Depurination During Trityl-on Purification (TN-0008)," **2007**, Phenomenex. Viitattu: 3.3.2025. <https://www.phenomenex.com>

- [25] R. P. Iyer, Z. Jiang, D. Yu, W. Tan, ja S. Agrawal, "Detritylation of DMT-oligonucleotides using cationic ion-exchange resin," *Patentti 5808042*, **1998**, <https://patents.google.com/patent/US5808042A/en>.
- [26] A. K. Pathak, V. Pathak, L. E. Seitz, K. N. Tiwari, M. S. Akhtar, ja R. C. Reynolds, "A facile method for deprotection of trityl ethers using column chromatography," *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 7755–7757, doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01645-8.
- [27] A. Khalafi-Nezhad ja R. F. Alamdari, "Efficient and catalytic deprotection of triphenylmethyl ethers with Ce(OTf)<sub>4</sub>," *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 6805–6807, doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00616-0.
- [28] Q. Wu, Y. Wang, W. Chen, ja H. Liu, "Mild, Efficient, and Selective Cleavage of Trityl Ethers with Antimony Trichloride," *Synth. Commun.*, **2006**, *36*, 1361–1366, doi: 10.1080/00397910500522041.
- [29] V. Kumar, N. Yadav, ja K. P. R. Kartha, "In(III) triflate-catalyzed detritylation and glycosylation by solvent-free ball milling," *Carbohydr. Res.*, **2014**, *397*, 18–26, doi.org/10.1016/j.carres.2014.08.002.
- [30] J. B. Chattopadhyaya ja C. B. Reese, "The 9-phenylxanthen-9-yl protecting group," *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1978**, *15*, 639–640, doi: 10.1039/C39780000639.
- [31] P. R. J. Gaffney, C. Liu, M. V. Rao, C. B. Reese, ja J. G. Ward, "Some substituted 9-phenylxanthen-9-yl protecting groups," *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1991**, *6*, 1355–1360, doi: 10.1039/P19910001355.
- [32] C. B. Reese ja H. Yan, "Alternatives to the 4,4'-dimethoxytrityl (DMTr) protecting group," *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 2567–2570, doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.152.
- [33] Q. Song, S. Khammungkhune, B. Ross, ja R. Griffey, "Substituted Pixyl Protecting Groups for Oligonucleotide Synthesis," *Patentti 2007/0276139 A1*, **2007**, <https://patents.google.com/patent/US20070276139A1/en>.
- [34] S. Banerjee, P. Srishylam, S. Rajendra Prasad, M. T. Migawa, E. E. Swayze, ja Y. S. Sanghvi, "Scalable synthesis of substituted 2,7-dimethyl-9-phenylxanthen-9-ol (DMPx-OH): useful for the preparation of crystalline 5'-O-DMPx-protected nucleosides," *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 4669–4672, doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.06.081.
- [35] S. Penjarla, A. R. Reddy, S. Banerjee, S. Penta, ja Y. S. Sanghvi, "DDQ mediated regiospecific protection of primary alcohol and deprotection under neutral conditions: Application of new p-methoxy benzyl-pixyl ether as reagent of choice for nucleoside protection," *Tetrahedron Lett.*, **2017**, *58*, 2588–2591, doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.05.066.
- [36] S. Penjarla, S. R. Prasad, D. S. Reddy, S. Banerjee, S. Penta, ja Y. S. Sanghvi, "Copper(II)nitrate catalyzed regioselective protection of primary alcohols with 4,4'-dimethoxytrityl and 2,7-dimethyl-9-phenyl xanthen-9-yl groups in nucleosides and carbohydrates," *Nucl. Nucl. Nucl. Acids*, **2018**, *37*, 232–247, doi.org/10.1080/15257770.2018.1460480.

- [37] M. Sproviero, K. M. Rankin, A. A. Witham, ja R. A. Manderville, "Utility of 5'-O-2,7-dimethylpixyl for solid-phase synthesis of oligonucleotides containing acid-sensitive 8-aryl-guanine adducts," *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 692–699, doi.org/10.1021/jo4024842.
- [38] M. Schelhaas ja H. Waldmann, "Protecting Group Strategies in Organic Synthesis," *Angew. Chem. Int. Edd. in Engl.*, **1996**, *35*, 2056–2083, doi.org/10.1002/anie.199620561.
- [39] M. Beier ja J. D. Hoheisel, "Production by quantitative photolithographic synthesis of individually quality checked DNA microarrays," *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, e11, doi.org/10.1093/nar/28.4.e11.
- [40] N. Kretschy, A.-K. Holik, V. Somoza, K.-P. Stengele, ja M. M. Somoza, "Next-Generation o-Nitrobenzyl Photolabile Groups for Light-Directed Chemistry and Microarray Synthesis," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 8555–8559, doi.org/10.1002/anie.201502125.
- [41] Z. Liang, H. Koivikko, M. Oivanen, ja P. Heinonen, "Tuning the stability of alkoxyisopropyl protection groups," *Beilstein J. Org. Chem.*, **2019**, *15*, 746–751, doi.org/10.3762/bjoc.15.70.
- [42] P. Rosenqvist, V. Saari, E. Pajuniemi, A. G. Molina, M. Ora, A. Horvath, ja P. Virta, "Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support," *J. Org. Chem.*, **2023**, *88*, 10156–10163, doi.org/10.1021/acs.joc.3c01006.
- [43] Z. Liang, P. Rosenqvist, E. Pajuniemi, M. Ora, P. Heinonen, P. Virta, ja M. Oivanen "5'-O-(2-Isopropoxyprop-2-yl)-protected Phosphoramidite Building Blocks in the Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis," *Eur. J. Org. Chem.*, **2023**, *26*, e202300614, doi.org/10.1002/ejoc.202300614.
- [44] A. G. Molina, V. Kungurtsev, P. Virta, ja H. Lönnberg, "Acetylated and Methylated  $\beta$ -Cyclodextrins as Viable Soluble Supports for the Synthesis of Short 2'-Oligodeoxyribonucleotides in Solution," *Molecules*, **2012**, *17*, 12102–12120, doi.org/10.3390/molecules171012102.
- [45] A. G. Molina, A. M. Jabgunde, P. Virta, ja H. Lönnberg, "Solution phase synthesis of short oligoribonucleotides on a precipitative tetrapodal support," *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, *10*, 2279–2285, doi: doi.org/10.3762/bjoc.10.237.