

Oligonukleotidien synteesi liukoisella saostettavalla kantajalla

Pro gradu -tutkielma

Kemian laitos

Bio-orgaaninen kemia

Tiia Ylikangas

Toukokuu 2021

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Kemia

Tekijä: Tiia Ylikangas

Otsikko: Oligonukleotidien synteesi liukoisella saostettavalla kantajalla

Ohjaajat: Mikko Ora ja Petja Rosenqvist

Sivumäärä: 33 sivua

Päivämäärä: Toukokuu 2021

Oligonukleotidien käytön yleistyminen lääkekehityksessä on luonut tarpeen valmistaa niitä entistä suuremmissa mittakaavassa. Oligonukleotideja tuotetaan teollisuuden tarpeisiin yleisimmin automatisoidussa synteesissä kiintokantajalla käyttäen hyväksi fosforamidiittikemiaa. Teollisessa tuotannossa on kuitenkin tarve edellä mainittua paremmin skaalautuville valmistusmenetelmille. Valmistusprosessien kehittämisessä tulee ottaa huomioon myös entistä enemmän ekologisesti kestäviä ratkaisuja. Yhtenä kustannustehokkaana vaihtoehtona on oligonukleotidien synteesi liuoksessa liukoisella, saostettavalla kantajalla.

Liuossynteesissä kasvavan oligonukleotidiketjun ensimmäinen nukleosidi on ankkuroitu linkkerin välityksellä kantajaan, joka on liukoinen reaktio-olosuhteissa mutta saostuu helposti liuotinosuhteita muuttamalla. Synteesissä voidaan käyttää fosforamidiitti-, *H*-fosfonaatti- ja fosfotriesterimenetelmää. Jokaisessa näistä menetelmistä toistetaan useampivaiheista reaktiosykliä ja jokainen sykli pidentää kantajaan ankkuroitua kasvavaa polymeeriketjua yhdellä nukleotidilla. Reaktiosyklin jälkeinen puhdistus voidaan tehdä helposti saostamalla. Tämä sopii paremmin suuremman mittakaavan synteesiin kuin perinteisempi kromatografinen puhdistus.

Pro gradu -tutkielman johdanto-osassa käsitellään liukoisen saostettavan kantajan käyttöä oligonukleotidien syntetiikassa. Kokeellisessa osassa on kehitetty ja optimoitu lyhyen oligodeoksiribonukleotidin synteesistrategia käyttäen asetaalisuojattua tymidiinifosforamidiittia rakennusyksikkönä ja tetrapodaalista pentaerytritolipohjaista kantajaa.

Avainsanat: liuossynteesi, oligonukleotidi, liukoinen saostettava kantaja, fosforamidiittimenetelmä, asetaalisuojaus

Sisällysluettelo

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Johdanto | 1 |
| 1.1 | Yleisimmät liukoiset saostettavat kantajat | 2 |
| 1.2 | Oligodeoksiribonukleotidien synteesi fosforamidiittimenetelmällä | 4 |
| 1.3 | Oligodeoksiribonukleotidien synteesi <i>H</i> -fosfonaattimenetelmällä | 7 |
| 1.4 | Oligodeoksiribonukleotidien synteesi fosfotriesterimenetelmällä | 9 |
| 1.5 | Oligoribonukleotidien synteesi fosforamidiittimenetelmällä | 10 |
| 1.6 | Suojaryhmästrategian haasteet liuosynteisissä | 12 |
| 1.7 | Yhteenveto | 13 |
| 2 | Tulokset ja niiden tarkastelu | 15 |
| 2.1 | Tetravalentin nukleosidiklusterin synteesi | 15 |
| 2.2 | Oligodeoksiribonukleotidin synteesi | 19 |
| 2.2.1 | 5'-O-(Metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-[(2-syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitin synteesi | 20 |
| 2.2.2 | Kytkentäreaktio | 20 |
| 2.2.3 | Hapetus | 21 |
| 2.2.4 | Suojaryhmän poisto | 22 |
| 2.2.5 | Saostus | 23 |
| 2.2.6 | Kantajasta irrottaminen | 24 |
| 2.3 | Johtopäätökset ja yhteenveto | 25 |
| 3 | Kokeelliset menetelmät | 26 |
| 3.1 | Yleiset kokeelliset menetelmät | 26 |
| 3.2 | Liukoisen saostettavan kantajan synteesi | 26 |
| 3.2.1 | 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-(6-karboksi-4-oksoheksanoyyli)tymidiini (6) | 26 |
| 3.2.2 | 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]tymidiini (7) | 27 |
| 3.2.3 | N ⁶ -(2,4-Dimetylibentsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(prop-2-yn-1-yyli-N-metyyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (10) | 27 |
| 3.2.4 | N ⁶ -(2,4-Dimetylibentsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (11) | 28 |
| 3.2.5 | 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(prop-2-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]tymidiini (9) | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.2.6 | 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]tymidiinin (7) kytKentä tetrakis[[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli]metaaniin | 29 |
| 3.2.7 | N ⁶ -(2,4-Dimetyylibentsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiinin (11) ja N ⁶ -(2,4-dimetyylibetsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(prop-2-yn-1-yyli-N-metyyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiinin (10) kytKentä tetrakis[[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli]metaaniin | 30 |
| 3.3 | T-pentameerin (16) valmistus | 31 |
| 3.3.1 | 5'-O-(2-metoksi-isopropyli)tymidiini-3'-O-[(2-syanoetyyli)- (N,N-di-isopropyli)]fosforamidiitti (13) | 31 |
| 3.3.2 | Pentameerin (T ₅ ; 16) synteesi liukoisella saostettavalla kantajalla | 32 |
| | Lähteet | 34 |
| | Liitteet | 37 |

Lyhenteet

| | |
|-------|--|
| BOP | (bentsotriats-1-yyli)tris(dimetyyliamino)fosfoniumheksafluorifosfaatti |
| DBU | 1,8-diatsabisykloundek-7-eeni |
| DCA | dikloorietikkahappo |
| DCE | 1,2-dikloorietaani |
| DCI | 4,5-disyanoimidatsoli |
| DIPEA | <i>N,N</i> -diisopropylethylamine, <i>N,N</i> -di-isopropylietyyliamiini |
| diOBT | 2-kloorifenyyli- <i>O,O</i> -bis(1-bentsotriatsoyyli)fosfaatti |
| DMSO | dimetyylisulfoksidi |
| DMTr | 4,4-dimetoksitriityyli |
| ETT | 5-etyylitio-1 <i>H</i> -tetratsoli |
| HOBT | hydroksibentsotriatsoli |
| mCPBA | <i>m</i> -klooriperbentsoehappo |
| MIP | metoksi-isopropyyli |
| MSNT | 1-(2-mesityleenisulfonyyli)-3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triatsoli |
| NBS | <i>N</i> -bromibutaani-imidi |
| NMI | 1-metyyli-imidatsoli |
| PE | pentaerytritoli |
| PEG | polyetyleeniglykoli |
| TBAF | tetrabutyyliammoniumfluoridi |
| TBHP | <i>tert</i> -butyylihydroperoksidi |
| TCA | trikloorietikkahappo |
| TEA | trietyyliamiini |

TEAA trietyyliammoniumasetatti

TES trietyylisilaani

TetH tetratsoli

1 Johdanto

Oligonukleotideja valmistetaan teollisessa mittakaavassa käyttämällä yleensä automatisoitua synteesiä kiintokantajalla.^{1,2} Tällöin ensimmäinen nukleosidi kiinnitetään liukenemattomaan kantajaan, kuten ristisilloitettuun polystyreeniin tai huokoiseen lasiin, kovalenttisellä sidoksella. Oligonukleotidiketjun pidentäminen tehdään toistamalla nelivaiheista reaktiosykliä (suojaryhmän irrotus, kytkentäreaktio, asetylointi ja hapetus), jossa jokaisen reaktion jälkeen epäpuhtaudet ja ylimääräiset reagenssit pestään pois. Syklejä toistetaan niin monta kertaa, kunnes saadaan haluttu lopputuote.³ Hyviä puolia tässä ovat prosessin automatisointi ja välituotteiden helppo puhdistus synteesisykliä välillä. Kiintokantajamenetelmässä tarvitaan kuitenkin suuret reagenssiylimäärät varmistamaan kytkentäreaktiot nukleotidien välillä.⁴ Lisäksi huuhteluihin tarvittavien liuottimien osuus on merkittävä. Suuren mittakaavan synteesissä kiintokantajamenetelmän käytettävyys kohtaa rajansa. On siis kehitettävä synteesimenetelmiä, jotka vastaavat paremmin teollisuuden tarpeisiin. Tavoitteena on löytää ympäristöystävällinen, turvallinen ja kustannustehokas ratkaisu.⁵

Vaihtoehtoinen menetelmä oligonukleotidisynteesille on käyttää liukoista kantajaa. Tässä ensimmäinen nukleosidi on ankkuroitu kantajaan, joka on liukoinen reaktio-olosuhteissa ja rakenneyksiköiden liittäminen kasvavaan ketjuun voidaan tehdä liuoksessa. Menetelmä toistaa samankaltaisia useamman vaiheen reaktiosyklejä, joissa tapahtuu uuden nukleosidin kytkentä kasvavaan polymeeriketjuun. Jokaisen kytkennän jälkeen kantaja voidaan erottaa käytetyistä reagensseista ja reagoimattomista lähtöaineista saostamalla, kromatografisesti, nanosuodatuksella⁶ tai uutolla⁷. Liuossynteesin avulla voidaan päästä kiintokantajasynteesiä suurempiin tuotemääriin ilman kalliita teollisuusmittakaavan automatisoituja laitteita, vähemmällä lähtöainemäärillä ja ilman kallista kantajapolymeeriä.¹ Välituotteiden puhdistus, joka perustuu kromatografiseen puhdistukseen on turhan työläs suuren mittakaavan tuotantoon.

Oligonukleotidien valmistamista liuoksessa voidaan kutsua perinteiseksi synteesimenetelmäksi, joka kehittyi samanaikaisesti liuoksessa tapahtuvan polypeptidisynteesitutkimuksen rinnalla. Vuonna 1967 Hikoya Hayatsu ja Har Gobind Khorana työryhmineen julkaisivat artikkelin oligonukleotidisynteesistä liuoksessa. He käyttivät liukoista polystyreenikantajaa ja 5'-monometoksitriptylinukleosidianalogia, mikä mahdollisti kondensaatioreaktioiden suorittamisen täysin homogeenisessä liuoksessa. Reaktiossa 3'-O-asetyylylitymidiini-5'-fosfaatti kytketään polystyreeniin kiinnitettyyn tymidiinin 2-mesityleenisulfonyylikloridin toimiessa aktivaattorina. Reaktioseokseen lisätään metanolia,

jolloin reagoimattomat trityylikloridiryhmät muuttuvat vastaaviksi metyylietteereiksi. Muodostunut raakatuote eristetään lisäämällä reaktioliuokseen vettä ja suodattamalla tai sentrifugoimalla kasvava nukleotidiketju. Tällä menetelmällä onnistuttiin syntetisoimaan trinukleotideja, mutta pidempien sekvenssien synteesi osoittautui hankalaksi. Nykyisistä synteessimenetelmistä poiketen Hayatsu ja Khorana kasvattivat oligonukleotidiketjua 5'-3'-suunnassa, mikä mukailee luonnossa tapahtuvaa entsyymikatalysoitua DNA-synteesiä.⁸ Tämän urauurtavan tutkimuksen jälkeen on kehitetty lukuisia synteesisstrategioita ja liukoisia kantajia oligonukleotidisynteisiin.

Perinteisten, erityisesti kiinteäkantajamentelmässä käytettyjen, kytkentäreaktioiden ja suojaryhmien soveltaminen liuosfaasissa edellyttää reaktio-olosuhteiden optimointia uudelleen ja uusien suojaryhmästrategioiden kehittämistä. Perinteisellä fosforamidiittimenetelmällä saavutetaan yleensä hyvät kytkentäsaannot. Mitä enemmän reaktiovaiheita synteesisykliin sisältyy, sitä työläemmäksi synteessin suorittaminen käy ja sitä huonommin se on skaalattavissa suuren mittakaavan tuotantoon. Ympäristökysymyksillä on myös entistä suurempi rooli eri synteessimenetelmien kehityksessä tänä päivänä. Tässä pro gradu –tutkielmassa esitetään lyhyen oligodeoksiribonukleotidin synteesisstrategian kehitystä liuoksessa käyttäen metoksiisopropyyli (MIP) -suojattua tymidiinifosforamidiittia ja tetrapodaalista pentaerytritoli-pohjaista levulinoyylilinkkerin sisältävää kantajaa, joka mahdollistaisi oligonukleotidisekvenssien irrotuksen ortogonaalisissa olosuhteissa. Työ on osa ACS GreenChemistry Instituutin rahoittamaa kestävän kehityksen projektia.

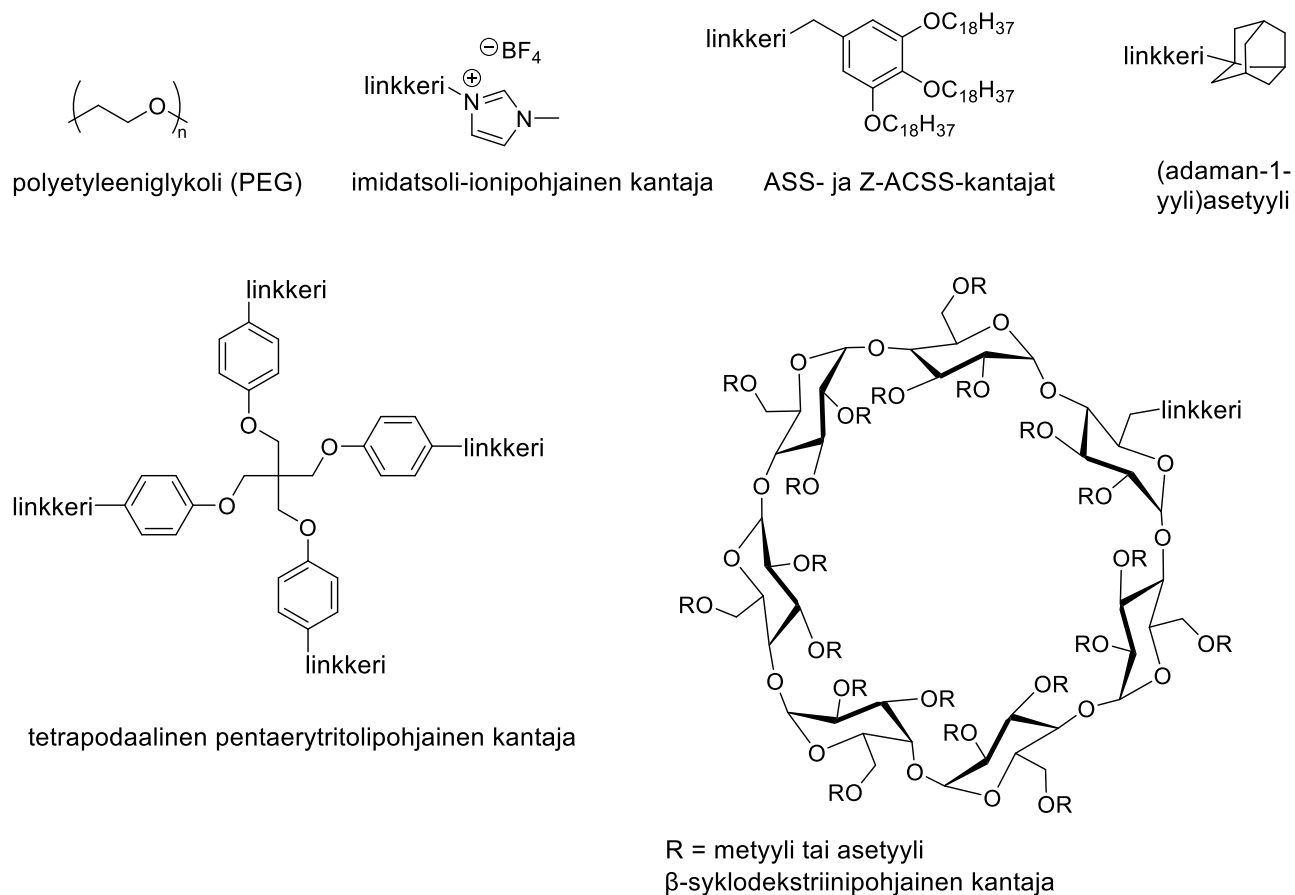
1.1 Yleisimmät liukoiset saostettavat kantajat

Di- ja trinukleotidejä on mahdollista valmistaa liuoksessa helposti nukleotideista ilman, että niitä on ankkuroitu mihinkään kantajaan.^{9,10} Tätä pidempien oligonukleotidien synteesi tarvitsee kuitenkin yleensä kantajan, johon nukleosidi on kiinnitetty linkkerin avulla. Liuoksessa tehtävässä synteessissä kantaja on liukoinen reaktio-olosuhteiden orgaanisessa liuottimessa, mutta se on helposti saostettavissa olosuhteita muuttamalla. Kuvassa 1 on esitetty raportoitujen liukoisten kantajien rakenteet. Käytetyimpiin saostettaviin kantajiin kuuluvat pentaerytritoli- ja polyetyleeniglykolikantajat. Myös edellä mainittuja suuremmilla ja hydrofobisemmilla yhdisteillä, ASS- ja Z-ACSS-kantajilla eli liukoisilla alkyyliketjuisilla ja karboksibentsyyli-rakenteisilla alkyyliketjukantajilla, on raportoitu erityisesti RNA-synteessimenetelmiä.^{11,12} Liuossynteessissä voidaan käyttää myös muita liukoisia kantajia, kuten (adaman-1-yyli)-asetyyli- ja beeta-syklodekstriinipohjaisia rakenteita. Näiden

puhdistusmenetelmä perustuu saostamisen sijasta kromatografiseen puhdistukseen tai uuttamiseen, joten niiden tarkempi tarkastelu on jätetty tämän tutkielman ulkopuolelle.

Polyetyleeniglykolipohjainen (PEG) kantaja on ollut yksi käytetyimmistä liukoisista kantajista jo siitä lähtien, kun se ensimmäisen kerran raportoitiin liuoksessa suoritettuna peptidisynteesin yhteydessä.¹³ Polyetyleeniglykolilla on monia hyviä liukoiselle kantajalle edellytettäviä ominaisuuksia. Se esimerkiksi mahdollistaa asetonitriilin käytön reaktioluottimena. Asetonitriili puolestaan on yleisin oligonukleotidisynteesissä käytettävä liuotin. Polaarisenä ja aproottisena luottimena siihen liukenevat pääsääntöisesti kaikki synteesin eri vaiheissa käytetyt reagenssit. Tämän lisäksi asetonitriili on suhteellisen edullista.¹⁴ Polyetyleeniglykolipohjainen kantaja mahdollistaa nopean puhdistusvaiheen syklien välillä, sillä se saostuu muun muassa dietyylieetteristä.¹⁵ Käyttöä rajoittavana tekijänä mainittakoon, että käytetyn PEG:in pituus vaikuttaa voimakkaasti siihen, kuinka hyvin kantaja lopulta saostuu liuoksesta. Tyypillisesti polyetyleeniglykolin moolimassa vaihtelee 400 ja 4000 daltonin välillä oligonukleotidisynteesissä.¹⁶

Tetrapodaalisella pentaerytritoli (PE) -pohjaisella rakenteella on monia hyviä ominaisuuksia liukoiseksi saostettavaksi kantajaksi. Rakenne on säteittäissymmetrinen, stabiili ja kompakti neljällä ankkurointihaaralla. Rakenteen ansiosta väli- ja sivutuotteita on helppo seurata MS-, NMR- ja HPLC-analytiikalla. Se saostuu helposti metanolista ja parhaimmillaan jokaisessa synteesisyklissä tarvitaan vain kaksi saostusta sivutuotteiden ja muiden reagenssien poistoon reaktioseoksesta.^{17,18} Kvantitatiivinen saostuminen metanolista vaatii kuitenkin pienten hydrofobisten suojarahmien käytön nukleosidien 5'- ja 2'-hydroksyyliiryhmissä. Ammonolyysin jälkeen kantajarakenteen jäännös on helppo eristää suodattamalla, sillä se saostuu ammoniakkin vesiliuoksesta valkoisena sakkana.¹⁹



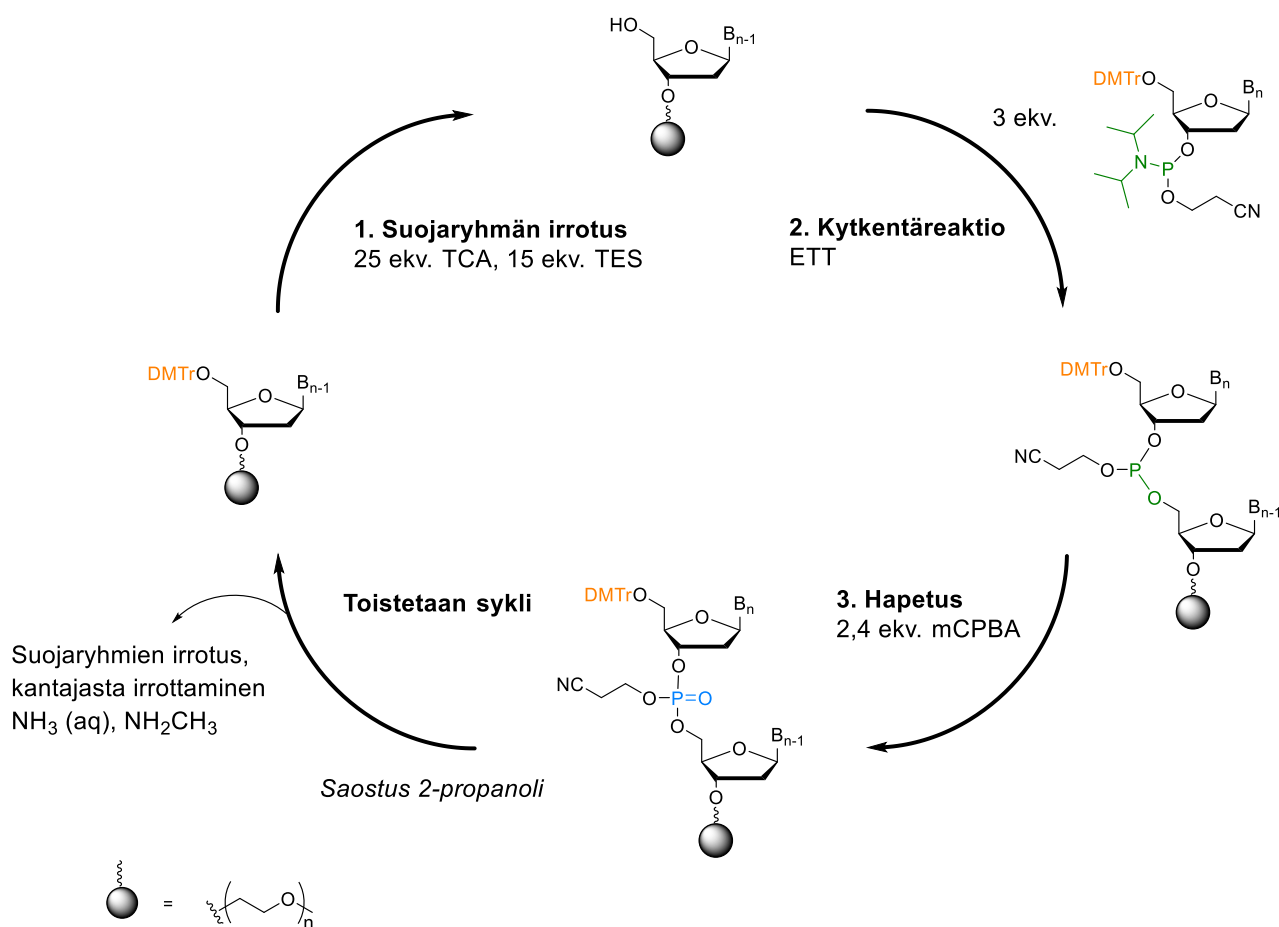
Kuva 1. Yleisimmät liuossynteesissä käytetyt liukoiset kantajat.

Imidatsoli-ioni on positiivisesti varautunut molekyyli, jonka vastaionina liuoksessa toimii yleisimmin tetrafluoriboraatti-anioni. Liukoinen, ioniseen nesteeseen perustuva imidatsoli-ionikantaja on raportoitu toimineen niin lyhyiden oligonukleotidien²⁰ kuin myös oligosakkaridien²¹ ja oligopeptidien²² synteesissä. Käytettäessä ionista imidatsolipohjaista kantajaa oligonukleotidien syntetisoimiseksi, ensimmäisen detritylaatiovaiheen on havaittu olevan suhteellisen hidas. Tämä johtuu todennäköisesti ionisen kantajan positiivisen varauksen ja detritylaation protonaatiokohdan läheisyydestä. Havaittu ongelma on ratkaistu käyttämällä Brönstedin hapon sijasta Lewisin happoa (ZnBr_2) ja scavenger-reagenssina pyrroolia. Syntetisoitavan oligonukleotidin pituuden kasvaessa detritylaatio nopeutuu jälleen.²³

1.2 Oligodeoksiribonukleotidien synteesi fosforamidiittimenetelmällä

Fosforamidiittimenetelmä on tällä hetkellä yleisin strategia, kun DNA:n ja RNA:n synteesiä toteutetaan kiinteällä kantajalla sekä suuremman että pienemmän skaalan synteesissä.³ Menetelmä on ensimmäisen kerran raportoitu onnistuneesti liuossynteesissä Gian Maria Bonoran tutkimusryhmän tekemänä vuonna 1993 (kaavio 1).²⁴ Mielenkiinto liuoksessa

2).²⁵ Tässä menetelmässä nelihääräisen PEG-OH-kantajan annetaan reagoida dimetoksitrietyloidun tymidiinifosforamidiitin ja 5-(etyylitio)-1*H*-tetratsolin (ETT) kanssa kuivassa asetonitriilissä. Reaktioseokseen lisätään tämän jälkeen kaksi ja puoli ekvivalenttia *m*-klooriperbentsoehappoa (mCPBA) fosforamidiittiin nähden huoneenlämmössä. Hapetuksen jälkeen dimetoksitrietyyli poistetaan käyttäen ylimäärin trikloorietikkahappoa (25 ekvivalenttia) dikloorimetaanissa. Scavenger (poistaja) -reagenssina käytetään trietyylisilaania (15 ekvivalenttia) DMTr-kationin eliminoimiseen. Raakatuote puhdistetaan vasta tämän jälkeen ensimmäisen kerran syklin aikana saostamalla 2-propanolista. Sykliä kohden reaktion saanto on keskimäärin 94,3 %.



Kaavio 2. Oligodeoksiribonukleotidin synteesi liukoisella saostettavalla PEG-kantajalla alkyyli-*H*-fosforamidiittimenetelmällä.²⁵

Waltherin ja hänen kollegoidensa tekemä merkittävä kehitys oligonukleotidisyntetiikassa mahdollistaa yhden saostuksen synteesisyklin, jolloin kytkenän ja hapetuksen täytyy tapahtua ilman välituotteiden puhdistusta. Tämä edellyttää muun muassa hapetusreaktion ja saostusmenetelmän optimointia. *Tert*-butyylihydroperoksidi (TBHP) on yleisesti fosforamidiittimenetelmässä käytetty hapetin, jota Walther kokeili ensimmäisenä

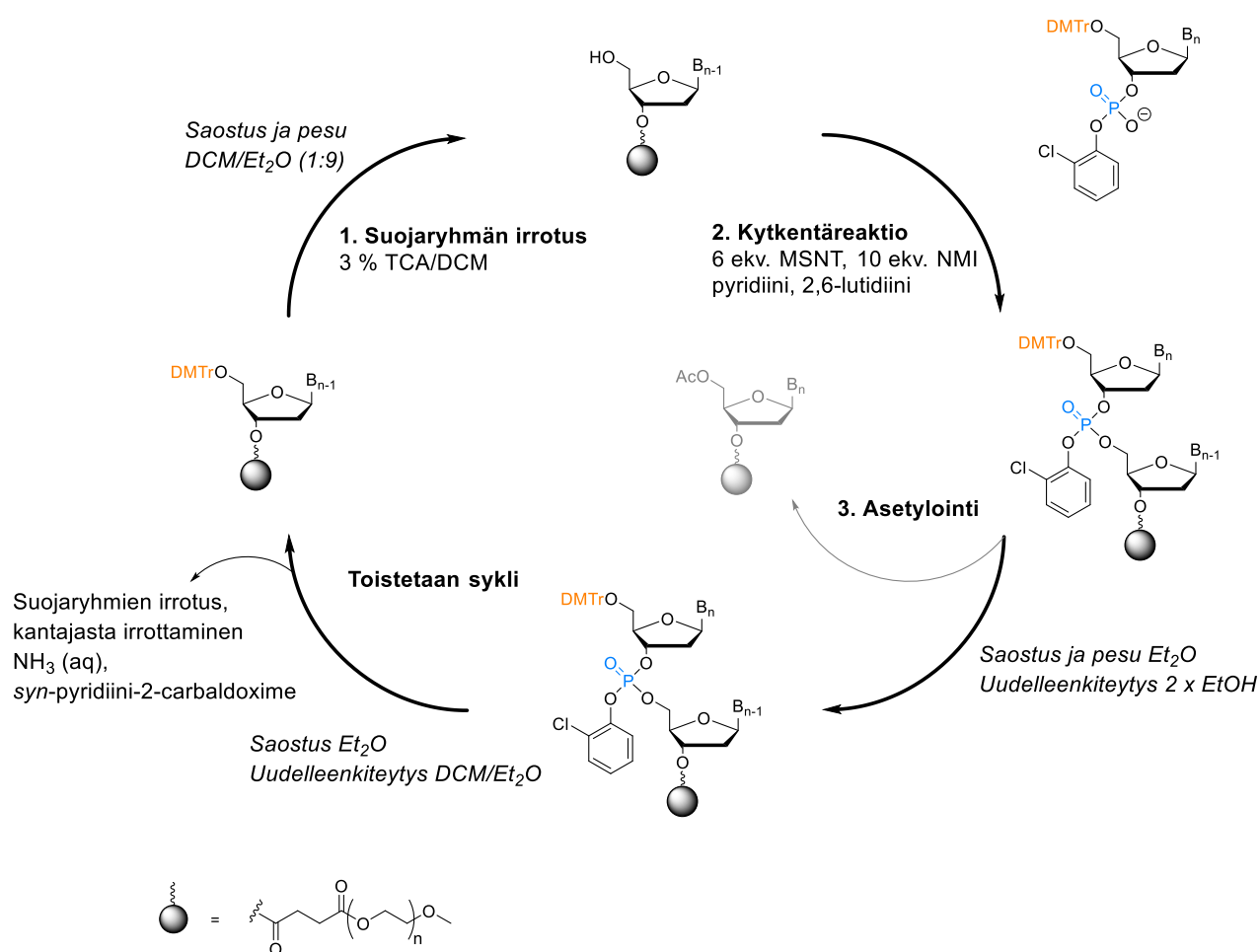
synteesissään. Tällöin hapettumisvaiheen aikana reaktioseokseen havaittiin muodostuvan sivutuote. Verrokkikokeessa, jossa he lisäsivät *tert*-butanolia TBHP:n sijasta, ei havaittu vastaavaa sivutuotetta. Todennäköisesti TBHP siis reagoi liuokseen jääneiden ylimääräreagenssien kanssa epäsuotuisalla tavalla. *Tert*-butyylihydroperoksidin vaihtaminen *m*-klooriperbentsoehappoon oli menestyksekkäs parannus. Suojaryhmien kvantitatiivista irtoamista tehostetaan käyttämällä DMTr-kationien poistajia, scavenger-reagensseja. Tämän lisäksi käytettäessä dikloorietikkahappoa trikloorietikkahapon sijasta ei myöskään havaita merkittävää depurinaatiota. Erona Bonoran julkaisuun oli raakatuotteen saostaminen 2-propanolista dietyylieetterin sijaan.

1.3 Oligodeoksiribonukleotidien synteesi *H*-fosfonaattimenetelmällä

H-fosfonaattimenetelmässä kytkentäreaktiossa käytetään nukleosidi-*H*-fosfonaattia, joka on rakenteeltaan varsin stabiili fosforamidiittiin verrattuna, mutta myös reaktiivinen sopivan aktivaattorin läsnä ollessa. Vetyfosfonaatti voidaan hapettaa jodilla viidenarvoiseksi fosforiksi joko kytkentäreaktion aikana tai vasta ennen oligonukleotidin puhdistusta ja eritystä. Alkyyliyetyfosfonaattien tapauksessa ei tarvita erillistä hapetusvaihetta jokaisen synteesisyklin päätteeksi. *H*-fosfonaattikemiaa on kuitenkin tutkittu yllättävän vähän liuossynteesissä. Tähän mennessä on raportoitu vain yksi onnistunut synteesi muokkaamattomien oligonukleotidien *H*-fosfonaattimenetelmällä polyetyleeniglykolikantajaa käyttäen (kaavio 3). Manikrao Salunkhe tutkimusryhmineen lähtivät kehittämään vaihtoehtoista synteesistrategiaa, jossa yksi kytkentäsykli sisältäisi aiempaa vähemmän reaktiovaiheita ja välivaiheet olisivat helposti puhdistettavissa. Tässä menetelmässä 3'-terminaalinen nukleosidi ankkuroidaan polyetyleeniglykolikantajaan sukkinyyli-linkkerin välityksellä. 5'-Suojaryhmä irrotetaan 6 % dikloorietikkahapolla dikloorimetaanissa ja välivaihe saostetaan ja pestään etyyliasetaatilla. 5'-*O*-(4,4'-dimetoksitrietyyli)-2'-deoksiribonukleosidi-3'-(2-syanoetyyli-*H*-fosfonaatti) kytketään kasvavaan oligonukleotidiketjuun etyyliasetaatin ja trietyyliamiinin seoksessa (4:1, v/v) käyttäen aktivaattorina *N*-bromibutaani-imidiä. Jokaisen kytkennän jälkeen välituote saostetaan dietyylieetteristä ja uudelleenkitytetään MeCN/Et₂O-seoksesta. Reagoimattomat hydroksyyli-ryhmät deaktivoidaan asetylaatiolla ja välituote saostetaan uudestaan dietyylieetteristä. Menetelmää käyttäen kyettiin valmistamaan malliyhdisteeksi DNA-dekameeri (5'-ACG GGC CCG T-3') 75 % saannolla.

1.4 Oligodeoksiribonukleotidien synteesi fosfotriesterimenetelmällä

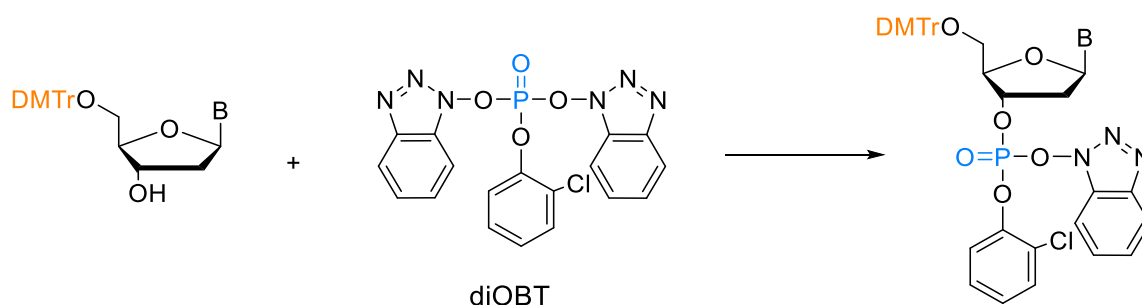
Kaaviossa 4 on esitetty oktameerin synteesi käyttäen fosfotriesterikemiaa ja polyetyleeniglykolikantajaa.¹⁵ Nukleosidi on kiinnitetty kantajaan 3'-sukkinyylilinkkerin välityksellä. 5'-DMTr-suojaryhmä poistetaan 3 % TCA/DCM-käsittelyllä. Nukleosidi-3'-(2-kloorifenyyl)fosfaatin kytkennässä pyridiinin ja 2,6-lutidiinin seoksessa käytetään MSNT-aktivaattoria ja *N*-metyyli-imidatsolia nukleofiilisenä katalyyttinä. Jokaista kytkentäsykliä seuraa saostaminen ja uudelleenkiteytys dietyylieetteristä, jonka jälkeen reagoimattomat 5'-OH-ryhmät asetyloidaan ja välituote saostetaan uudelleen DCM/Et₂O-seoksesta. Lopputuotteena syntyneen oktameerin 5'-TAGCGCTA-3' kokonaissaanto on 79 %.



Kaavio 4. Oligodeoksiribonukleotidin synteesi liukoisella saostettavalla PEG-kantajalla fosfotriesterimenetelmällä.¹⁵

Bonora työryhmineen on valmistanut oligodeoksinukleotideja fosfotriesterimenetelmällä myös suuremmissa skaalassa.²⁹ Synteessissä käytetään 1-hydroksibentsotriatsoli (HOBT) -aktivoituja nukleosideja (kaavio 5), joiden avulla kytkentäreaktio onnistuttiin suorittamaan ilman MSNT-

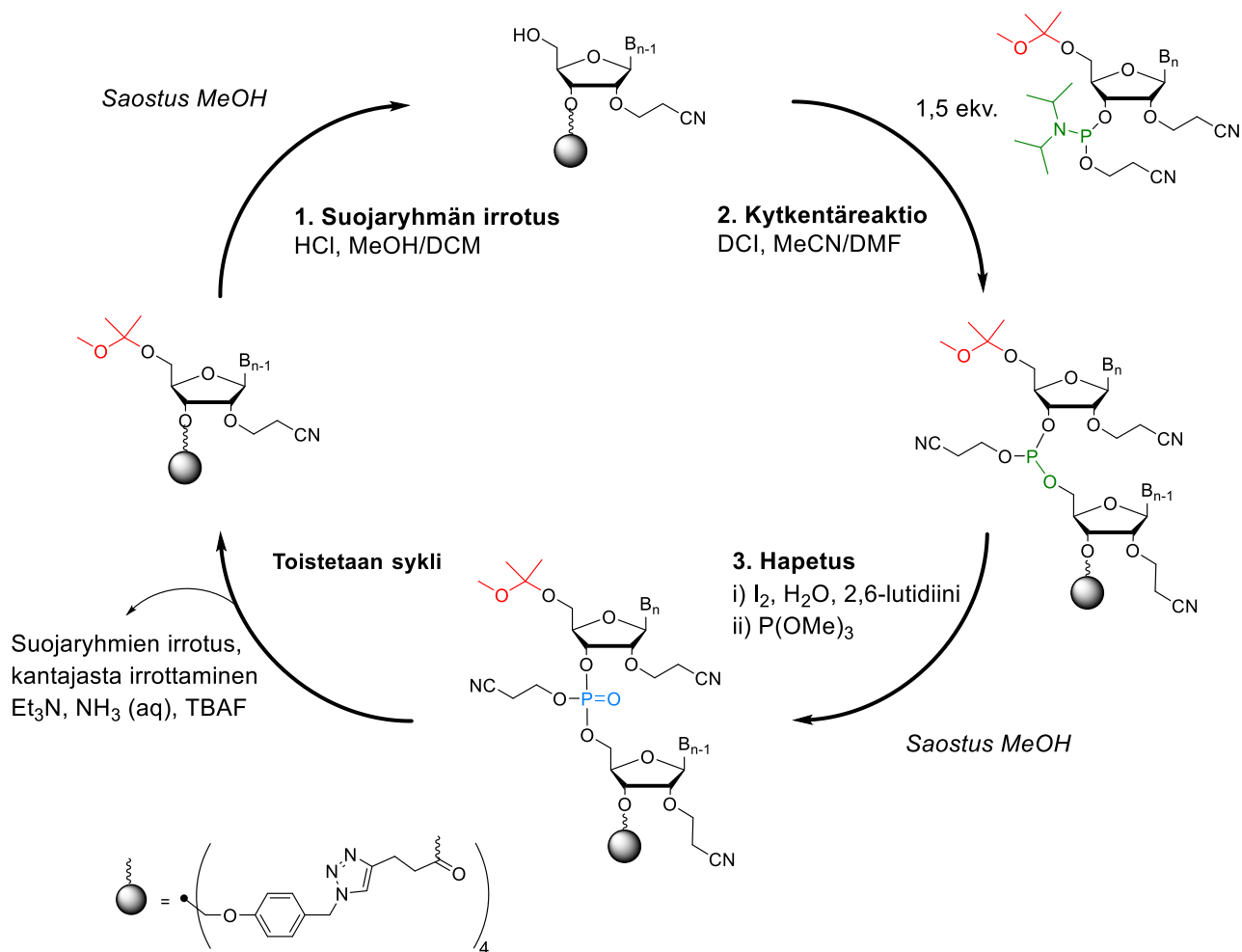
aktivaattoria. Kantajaan sidotun nukleosidin 5'-OH ryhmän ja 2-kloorifenyyl-*O,O*-bis(1-bentsotriatsoyyli)fosfaatinukleosidin annettiin reagoida kuivassa dioksaanissa *N*-metyyliimidatsolikatalyytin läsnä ollessa. Muodostunut oligonukleotidi saostettiin dietyylieetteristä, pestiin eetterillä ja uudelleenkiteytettiin etanolista. Reagoimattomat 5'-hydroksyyliiryhmät asetyloitiin 10 % etikkahappoanhydridin liuoksella pyridiinissä. Kokonaissaanto 5'-TAGCGCTA-3' DNA-malliyhdisteelle oli 63,5 %, eikä MSNT-aktivaattorin käytöstä aiheutuvaa sivutuotteiden muodostumista havaittu.



Kaavio 5. Bonoran valmistama fosfaatinukleosidi suojatun 5'-nukleosidin ja 2-kloorifenyyl-*O,O*-bis(1-bentsotriatsoyyli)fosfaatin (diOBT) välisellä reaktiolla.²⁹

1.5 Oligoribonukleotidien synteesi fosforamidiittimenetelmällä

Pentaerytritolipohjainen kantaja soveltuu sekä oligodeoksiribo-¹⁹ että oligoribonukleotidien¹⁷ synteisiin fosforamidiittimenetelmällä. Liukoista alkyyliketjuista kantajaa käyttäessä on päästy gramman saantoihin jopa 21 nukleotidiä pitkän RNA:n synteessissä.¹¹ DNA-synteesiin verrattuna RNA-syntetiikka on haastavampaa 2'-hydroksyyliiryhmästä johtuen, joten oikeanlaisten suojaryhmien valinta 2'-asemaan on tärkeää.³⁰ Oligoribonukleotidipentameeri voidaan syntetisoida käyttäen 5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)- ja 2'-*O*-tert-butyylidimetyylisilyylisuojustuja nukleosideja, joita on kaupallisesti saatavilla. Näiden käyttäminen oligoribonukleotidien synteessissä vaatii saostuksen vedestä ja flash-kromatografiapuhdistuksen jokaisen kytkentäsyklin jälkeen.¹⁸ Pienikokoiset, hydrofobiset suojaryhmät, kuten 2'-syanoetyyli- ja 5'-metoksi-isopropyli, mahdollistavat puolestaan välituotteiden saostuksen metanolista, mikä on huomattavasti helpompi ja vähemmän työläs tapa kytkentöjen väliselle puhdistukselle.¹⁷



Kaavio 6. Oligoribonukleotidin synteisi liukoisella saostettavalla tetrapodaalisella kantajalla fosforamidiittimenetelmällä.¹⁷

RNA-pentameerin synteisissä on käytetty fosforamidiittikemiaa, 5'-asetalisuojaryhmää ja kantajana tetrapodaalista pentaerytritolin johdannaista (kaavio 6). Kytkenöt suoritetaan asetonitriilin ja dimetyyliformamidin 1:1 seoksessa typpiatmosfäärissä. Nukleosidifosforamidiittia käytetään 1,5 ekvivalenttia jokaiseen kantajaan ankkuroidun nukleosidin 5'-hydroksyyliiryhmää kohden. Jokaisen kytkennän jälkeen fosfiittitriesterit hapetetaan jodilla tetrahydrofuraanin ja 2,6-lutidiinin vesiliuoksessa. Hapetusreaktio päätetään trimetyylifosfiitilla DMF:ssä, reaktioseos haihdutetaan öljymäiseksi raakatuotteeksi ja saostetaan kylmästä metanolista. Metoksi-isopropyyliisuoja-ryhmät poistetaan HCl:llä metanolin ja dikloorimetaanin seoksessa, jonka jälkeen reaktioseos neutraloidaan pyridiinillä. Reaktioseoksen konsentroidin jälkeen tuote saostetaan kylmästä metanolista. Synteisisykliä toistettiin niin kauan, kunnes halutun mittainen oligonukleotidiketju on saavutettu. Muodostunut sekvenssi irrotetaan kantajasta 25 % ammoniakkin vesiliuoksessa. Tällä

menetelmällä valmistettiin 5'-UUGCA-3' malliyhdiste 54 % saannolla, keskimääräisellä 86 % saannolla kytkentää kohden.¹⁷

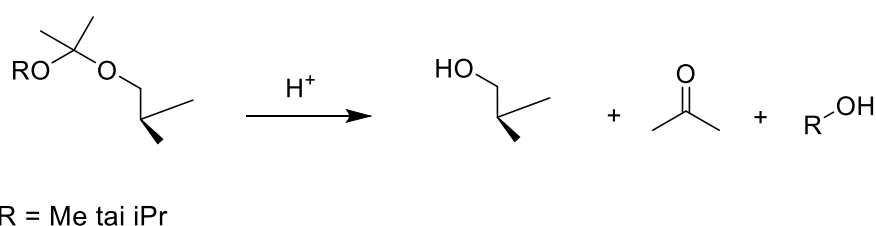
1.6 Suojaryhmästrategian haasteet liuossynteisissä

5'-Hydroksyyliiryhmän suojaamiseen käytetään yleisimmin 4,4'-dimetoksitriytyyliiryhmää. Sen käyttöä puoltavat monet hyvät ominaisuudet, kuten suojauksen liittäminen selektiivisesti primääriseen hydroksyyliiryhmään ja DMTr-suojattujen nukleosidien kaupallinen saatavuus.^{31,32} Dimetoksitriytyyli on happolabiili ja se voidaan irrottaa esimerkiksi trikloorietikkahapolla (TCA) dikloorimetaanissa (DCM).²⁵ Dimetoksitriytylikarbokationin muodostuminen on kuitenkin reversiibeli reaktio. Liuoksessa kvantitatiivista suojaryhmän irtoamista voidaan tehostaa scavenger-reagenssien avulla. Trialkyyilisilaanit ovat heikkoja pelkistimiä, jotka pelkistävät triytylikationin liuksesta ja ajavat siten reaktiotasapainoa lopputuotteiden suuntaan.²⁵ Trialkyyilisilaaia käyttäessä on havaittu muiden suojaryhmärakenteiden, kuten bentsoyylin ja levolinoyylin, pysyvän stabiilina fosforotioaattioligonukleotidin synteesissä.³³ Kiinteällä kantajalla tapahtuvassa synteesissä triytylin käyttö ei ole ongelma, sillä irronnut suojaryhmä huuhdellaan pois reaktion aikana kolonnista, mutta sen käyttö on haastavaa liuoksessa tehtävässä synteesissä.

Triytylin irtoamista 5'-hydroksyyliiryhmästä voidaan tehostaa liuoksen happamuutta nostamalla. Se ei kuitenkaan voi olla ratkaisu tehokkaaseen suojaryhmän poistoon, sillä happokatalysoidun reaktion ohella voi tapahtua ei-toivottu sivureaktio, depurinaatio. Depurinaatiossa *N*-glykosidinen sidos sokeriosan ja puriinin välillä katkeaa. Ongelma esiintyy erityisesti sekvensseissä, jotka sisältävät adensiiniä tai guansiiniä.³⁴ Trikloorietikkahapon tai jonkin vahvemman hapon käyttäminen voi johtaa merkittävään depurinaatioon. Toisaalta heikomman hapon käyttäminen sen sijaan voi aiheuttaa epätäydelliseen suojaryhmien irtoamisen.³⁵ Bentsoyllisuojarhmä, joita käytetään yleensä puriinien eksosyklisen aminoryhmien suojaukseen, voi myös irrota vahvempia happoja käyttäessä. Sekvenssit, joissa on merkittävä määrä adeniinia, ovat siis pullonkaula liuoksessa tehtävässä synteesissä.²⁵

5'-Hydroksyyliiryhmän suojauksen poisto on keskeinen vaihe oligonukleotidien synteesissä, sillä se toistuu jokaisen synteesisyklin aikana. Jos suojaryhmän käyttöön liittyvät ongelmat kumuloituvat, ne viime kädessä haittaavat merkittävästi kokonaisreaktion saantoa. On siis kehitettävä parempia, liuossynteesiin sopivampia suojaryhmästrategioita. Tällä hetkellä asetaalisuojauksen käyttö vaikuttaa potentiaaliselta vaihtoehdolta perinteiselle triytyllisuojukselle (kaavio 7). Metoksi-isopropyyliaetaalin (MIP) käyttö 5'-

hydroksyyliiryhmän suojauksessa lyhyen oligodeoksiribonukleosidin synteesissä fosforamidiittikemiaa ja liukoista beeta-syklodekstriinikantajaa käyttäen on raportoitu onnistuneesti.³⁶ Tämän suojaryhmän etuina on, että se irtoaa helposti happokatalyyttisesti ja lopputuotteena muodostuu helposti haihtuvaa asetonia ja metanolia.³⁷ Ne ovat siis helposti eristettävissä reaktioseoksesta ilman ylimääräisiä reaktiovaiheita tai ylimääräisten reagenssien kulutusta. Valitettavasti oligonukleotidisynteesiin tarvittavia 5'-*O*-MIP-suojattuja rakennuspalikoita ei ole tällä hetkellä kaupallisesti saatavilla. Asetaalisuojaryhmänä voidaan myös käyttää happolabiilimpaa 2-(isopropoksi)isopropyyli-suojasta metoksiisopropyyliisujaryhmän tilalla.



Kaavio 7. Metyyli-isopropyyli- ja 2-(isopropoksi)isopropyyli-suojauksen happokatalyyttinen irrotus, jossa reaktiotuotteena muodostuu asetonia ja alkoholia.

1.7 Yhteenveto

Viime vuosina kiinnostus vaihtoehtoisiin menetelmiin oligonukleotidien liuosynteesissä on kasvanut. Polyetyleeniglykolikantaja on ehdottomasti tutkituin ja käytetyin yhdiste liukoista kantajista, jota on käytetty niin fosforamidiittimenetelmässä, *H*-fosfonaattimenetelmässä ja fosfotriesterimenetelmässä. Polyetyleeniglykoli saostuu helposti niin dietyylieetteristä kuin etanolista tai 2-propanolista, ja parhaimmillaan raakatuotteen puhdistuksen voidaan suorittaa saostuksella reaktiosyklin aikana. Pentaerytritolipohjaista kantajaa käytettäessä voidaan päästä myös vähäisiin saostusmääriin raakatuotteiden puhdistuksessa, minkä lisäksi sillä on monia muita hyviä ominaisuuksia polyetyleeniglykoliin verrattuna.

Fosforamidiittimenetelmä on puolestaan suosituin kytkentämenetelmä, mutta se sisältää yhden reaktiovaiheen enemmän fosfotriesteri- tai hapettavaan *H*-fosfonaattimenetelmään verrattuna. Tämä voi olla merkittävä tekijä, kun synteesimenetelmiä suunnitellaan suurempaan, teolliseen tuotantoon. Oligonukleotidisynteesiin kuluva aikaa voidaan myös lyhentää kytkemällä kasvavaan oligonukleotidiketjuun di- tai trinukleotidejä yksittäisten nukleotidien sijasta.

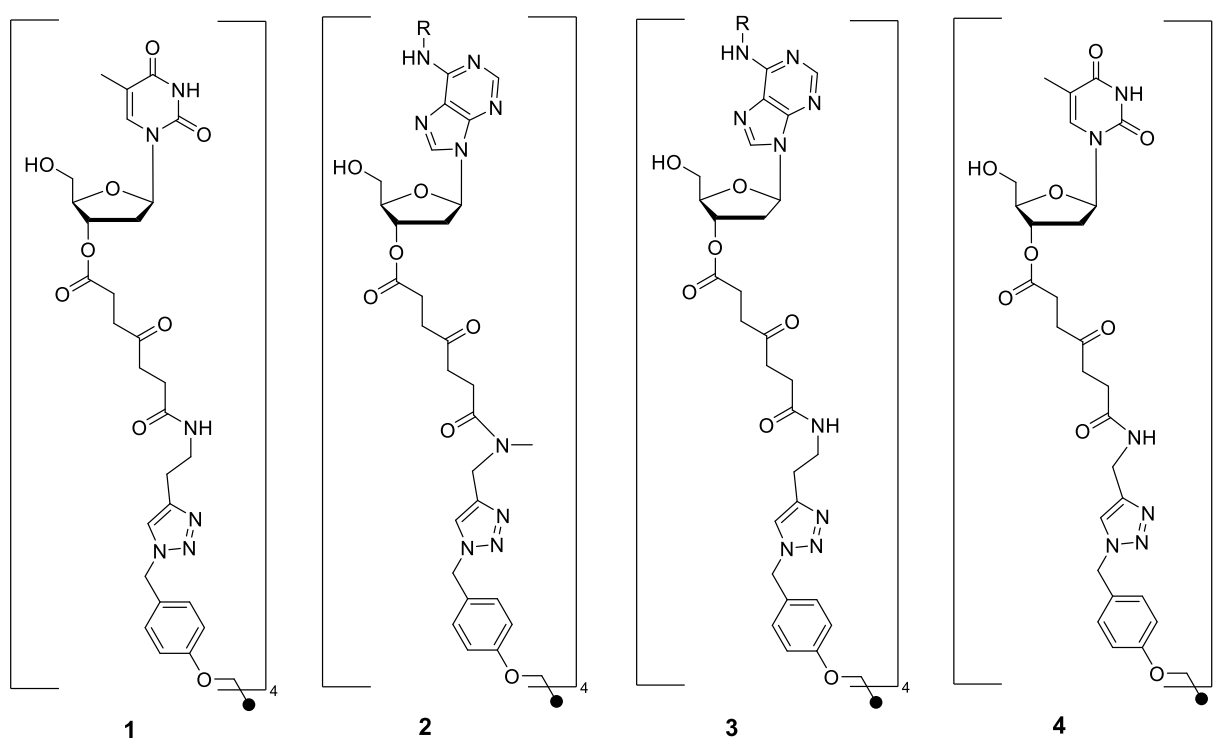
Enemmistö oligonukleotidien synteesitutkimuksista perustuu happolabiiliin 5'-aseman dimetoksitriitylisuojaukseen, vaikka sen käytön tiedetään johtavan poikkeuksetta sivureaktioihin, kuten depurinaatioon. Asetaalisuojaryhmät, kuten metoksi-isopropyli, vaikuttavat hyviltä korvaavilta vaihtoehdoilta dimetoksitriitylille. Asetaalihydrolyysi on detritylaatiota huomattavasti nopeampi. Vaihtoehtoisen suojaryhmien käyttö voi tosin vaatia jo olemassa olevien synteesistrategioiden kehittämistä paremmin toimiviksi.

Tämän projektin tavoitteena oli kehittää uusi liukoinen ja saostettava pentaerytritolipohjainen kantaja oligonukleotidisynteesiin. Saostamisen ansiosta se soveltuisi hyvin lyhyiden oligodeoksiribonukleotidien valmistukseen, ja levolinoyylilinkkerirakenne mahdollistaisi syntyneen oligonukleotidin irrotuksen kantajalta suojatussa muodossa. Tavoitteena oli myös ottaa käyttöön vaihtoehtoinen asetaalisuojaryhmästrategia ja suunnitella uusi yhden saostuksen synteesiprotokolla.

2 Tulokset ja niiden tarkastelu

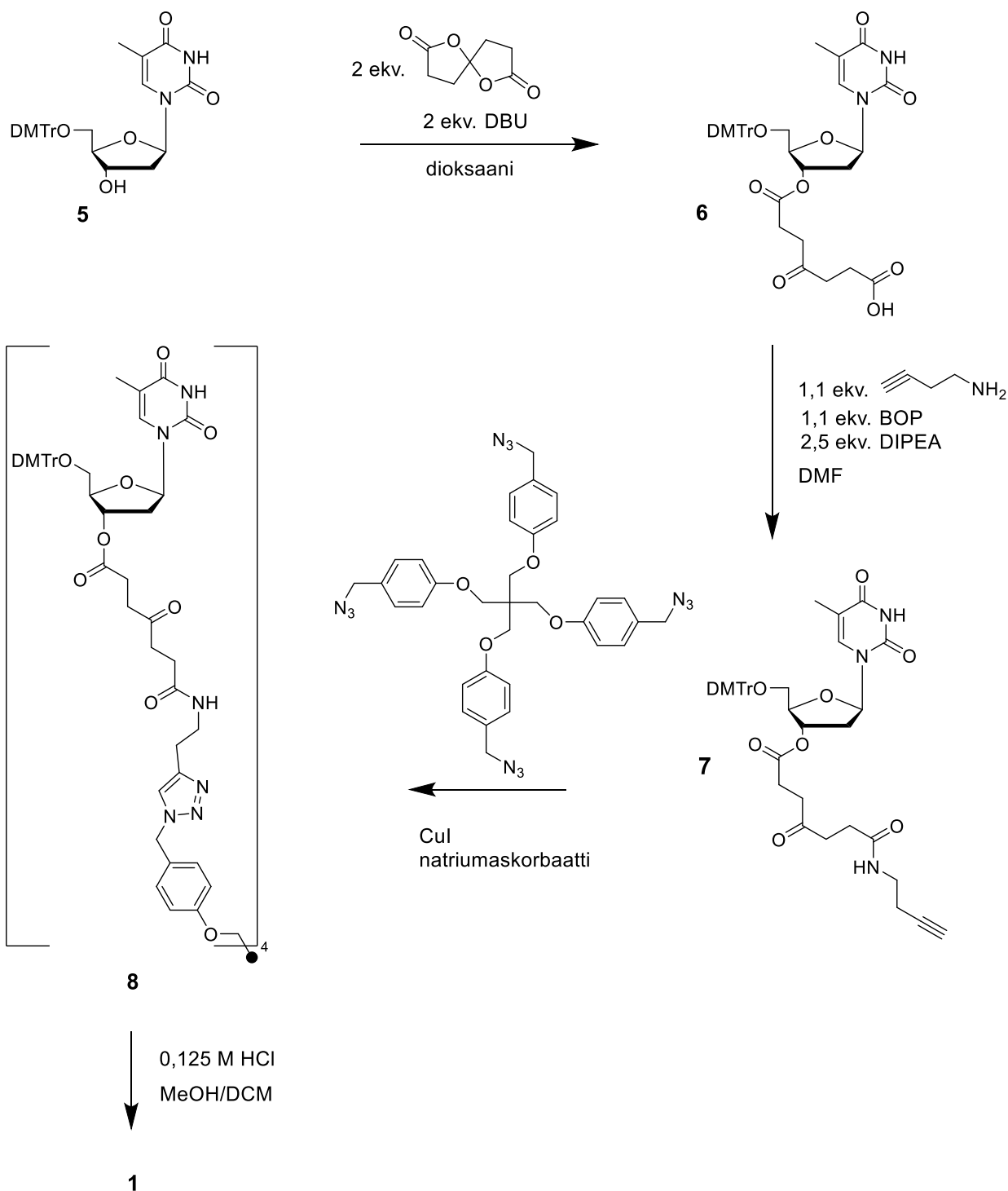
2.1 Tetraivalentin nukleosidiklusterin synteesi

Projektin yhtenä tavoitteena oli syntetisoida oligonukleotidien valmistamiseksi liukoisia ja saostettavia tetrapodaalisia pentaerytritolipohjaisia kantajia, joihin nukleosidi (tymidiini tai adenosini) on kiinnitetty levulinoyylilinkkerin välityksellä (kuva 2; yhdisteet **1**, **2**, **3** ja **4**). Kantajien amidisidoksen muodostamisessa käytettiin joko propargyyliamiinia, 1-amino-3-butyyniä tai sekundääristä *N*-metyylipropargyyliamiinia. Amidisidoksen ja kantajan triatsolirakenteen väliin jää tällöin yksi (yhdisteet **2**, **4**) tai kaksi (yhdisteet **1**, **3**) hiiliatomia ja yhdisteen **2** tapauksessa amidisidoksen tyypeen kiinnittynyt vety on korvautunut metyyliiryhmällä. Levulinoyyliryhmä on happostabiili ja se voidaan katkaista selektiivisesti ja ortogonaalisesti hydratsiinillä.³⁸ Kaaviossa 8 on esitetty synteessireitti levulinoyylilinkkerin sisältävän tetrapodaalisen kantajan (**1**) valmistamiseksi. Synteesin tarkempi kuvaus on esitetty osiossa 3.2.



R = 2,4-dimetyylibentsoyyli

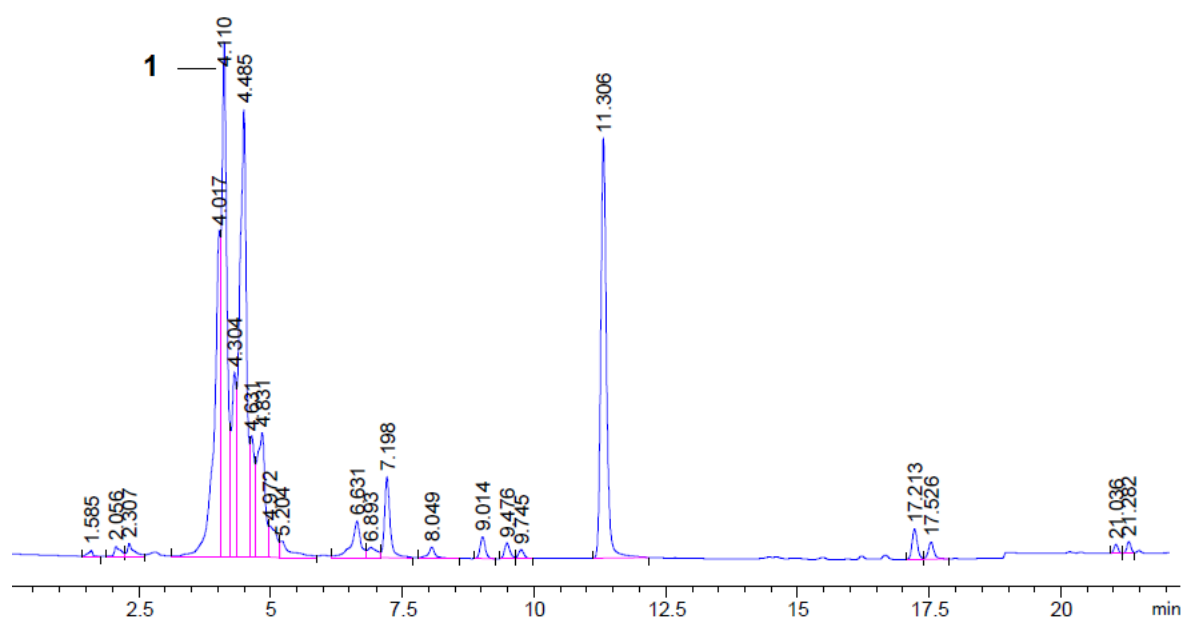
Kuva 2. Tetraivalenttien nukleosidiklusterien rakenteet.



Kaavio 8. Levulinoyylilinkkerin sisältävän tetrapodaalisen kantajan **1** synteesi.

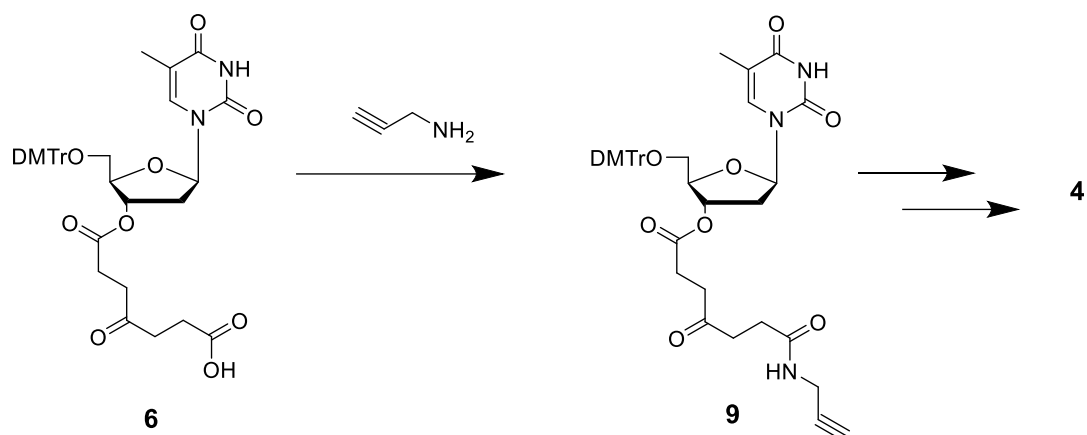
5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityyli)tymidiinin (**5**) ja 1,6-dioksaspiro[4.4]nonaani-2,7-dionin välinen reaktio suoritettiin dioksaanissa voimakkaan emäksen, DBU:n, läsnäollessa.³⁹ Ensimmäisen vaiheen tuotteena muodostui 5'-O-(4,4'-dimetoksitriityyli)-3'-O-(6-karboksi-4-oksoheksanoyyli)tymidiini (**6**). Amidisidos muodostettiin yhdisteen **6** ja 1-amino-3-butyynin reagoitessa dimetyyliformamidissa käyttäen emäksenä di-isopropylietyyliamiinia (DIPEA).

Aktivaattorina reaktiossa käytettiin BOP-reagenssia. Kuparikatalysoitu alkyynin **7** ja pentaerytritolikantajan atsidijohdannaisen välinen 1,3-dipolaarinen sykloadditioreaktio suoritettiin dimetyyliformamidissa.⁴⁰ Reaktiossa käytettiin katalyyttinen määrä kuparijodidia ja natriumaskorbaattia. Yhdisteen **8** trityylisuojarahmian poistamiseen käytettiin vetykloridiliuosta metanolin ja dikloorimetaanin seoksessa (1:1, v/v). Reaktioseos neutraloitiin pyridiinillä. Raakatuotteesta havaittiin LC-MS:n perusteella muodostuneen oikeaa lopputuotetta (ESI-MS: m/z 736,3 $[M-H]^-$; t_R = 4,11 min), mutta myös monia tuntemattomia sivutuotteita (kuva 3). Aikataulun puitteissa tuotetta **1** ei saatu puhdistettua silikageelikromatografisesti.



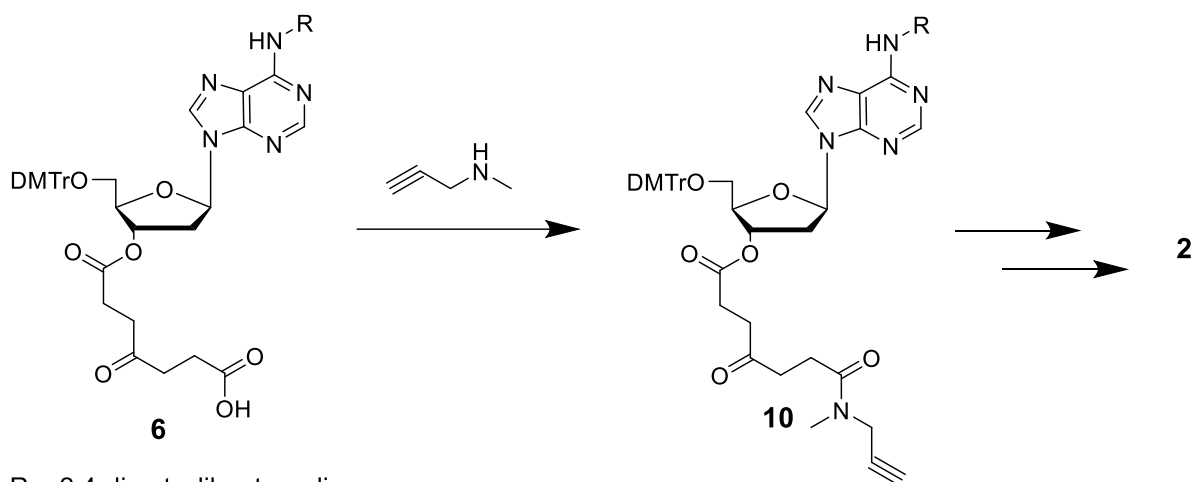
Kuva 3. HPLC/MS-kromatogrammi T-kantajan detritylaatiosta, josta huomataan lopputuotteen (**1**; t_R = 4,11 min) lisäksi mahdollisesti epätäydellisiä kytKentöjä (ensimmäinen rykelmä), joita ei saatu eroteltua silikageelikromatografisesti. Jälkimmäinen signaali t_R = 11,3 min on trityylistä. Ajo-olosuhteet: katso yleiset kokeelliset menetelmät.

Muodostettaessa amidisidosta propargyyliamiinilla (kaavio 9) havaittiin muodostuneen massaltaan oikea tuote (ESI-MS: m/z 736,3 $[M-H]^-$). Silikageelikromatografisessa puhdistuksessa kuitenkin havaittiin kyseisen tuotteen hajoavan. Raakatuote hajosi molemmissa tapauksissa useammaksi tuotteeksi puhdistuksessa, eikä lopputuotetta saatu eristettyä.



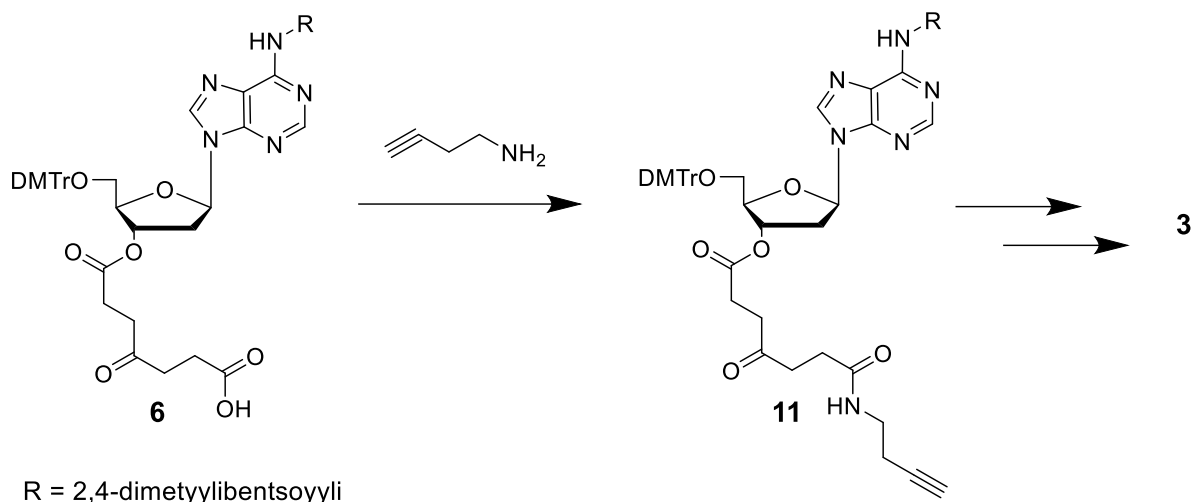
Kaavio 9. Levulinoyylilinkkerin sisältävän tetrapodaalisen tymidiinikantajan **4** synteesi.

On mahdollista, että yhdisteen **2** ja propargyyliamiinin reaktiossa muodostuu amidin (**9**) sijasta labiili imiini. Vastaavaa ongelmaa ei havaittu *N*-metyylipropargyyliamiinin (kaavio 10) tai 1-amino-3-butyynin (kaavio 11) tapauksessa.



Kaavio 10. Levulinoyylilinkkerin sisältävän tetrapodaalisen adensiinikantajan **2** synteesi.

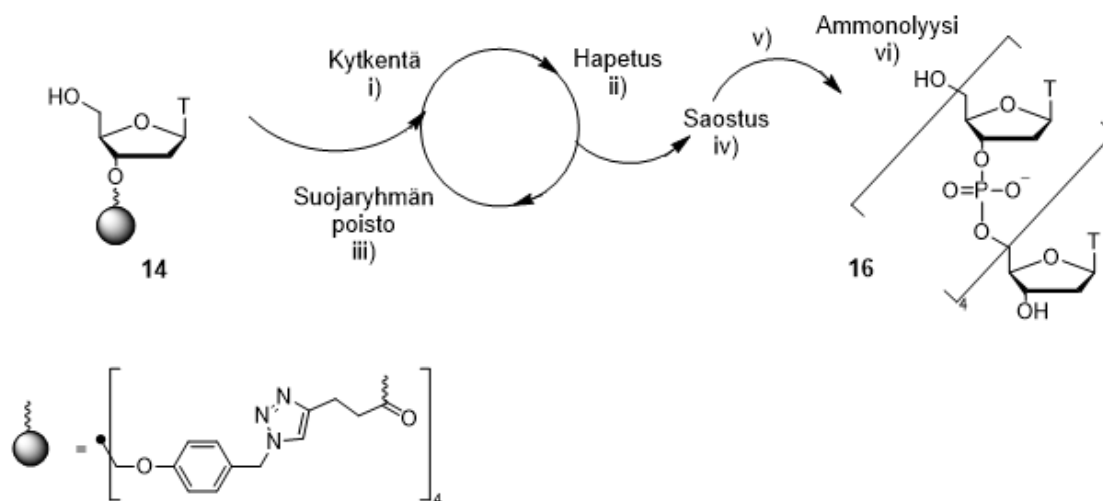
Adensiinikantajan (**3**) synteesi on esitetty kaaviossa 11. Synteesi suoritettiin vastaavalla tavalla kuin yhdisteen **1** tapauksessa. Adensiinin emäsosan aminoryhmän suojarahmänä käytettiin 2,4-dimetyyliibentsyyliä.



Kaavio 11. Levulinoyliinlinkkerin sisältävän tetrapodaalisen adensiinikantajan **3** synteesi.

2.2 Oligodeoksiribonukleotidin synteesi

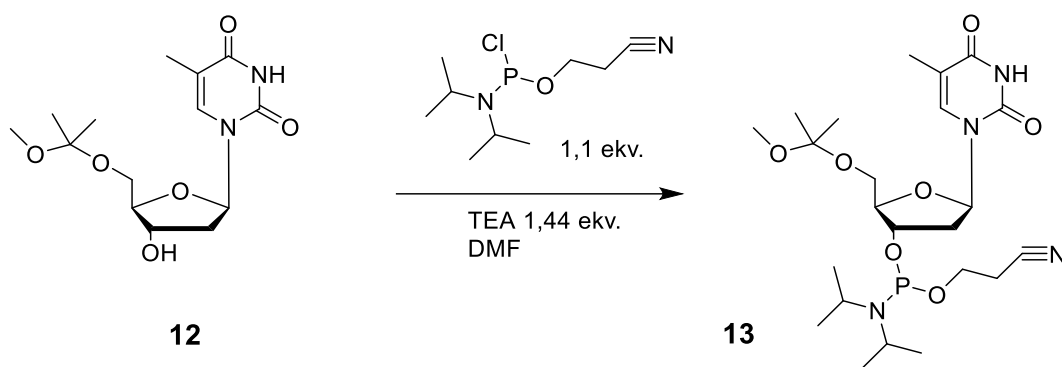
Projektin toisena tavoitteena oli kehittää ja optimoida synteesistrategia deoksiribonukleotidipentameerille käyttäen asetaalisuojaryhmää 5'-aseman suojauksessa, hapettimena *m*-klooriperbentsoehappoa ja suojaryhmän irrotuksessa dikloorietikkahappoa. Oligonukleotidin synteesi on kuvattu kaaviossa 12. Aikaisemmin raportoiduissa tutkimuksissa valmistettaessa oligonukleotideja liukoisella saostettavalla kantajalla on käytetty fosforamidiittikemiaa sekä kahden saostuksen strategiaa dimetoksitriitylin toimiessa 5'-aseman suojaryhmänä.¹⁹ Nyt reaktiosyklien välillä käytetään yhden saostuksen strategiaa.



Kaavio 12. (i) Yhdiste **13**, tetratsoli, MeCN/DMF 1:1; (ii) *m*-CPBA; (iii) DCA/DCM; (iv) saostus metanolista; (v) toistetaan sykli i-iv neljä kertaa; (vi) NH₃ (25 %).

2.2.1 5'-O-(Metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-[(2-syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitin synteesi

5'-O-(Metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-[(2-syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitti (**13**) syntetisoitiin kaavion 13 esittämällä tavalla. Synteesin tarkempi kuvaus on esitetty osiossa 3.3.1.

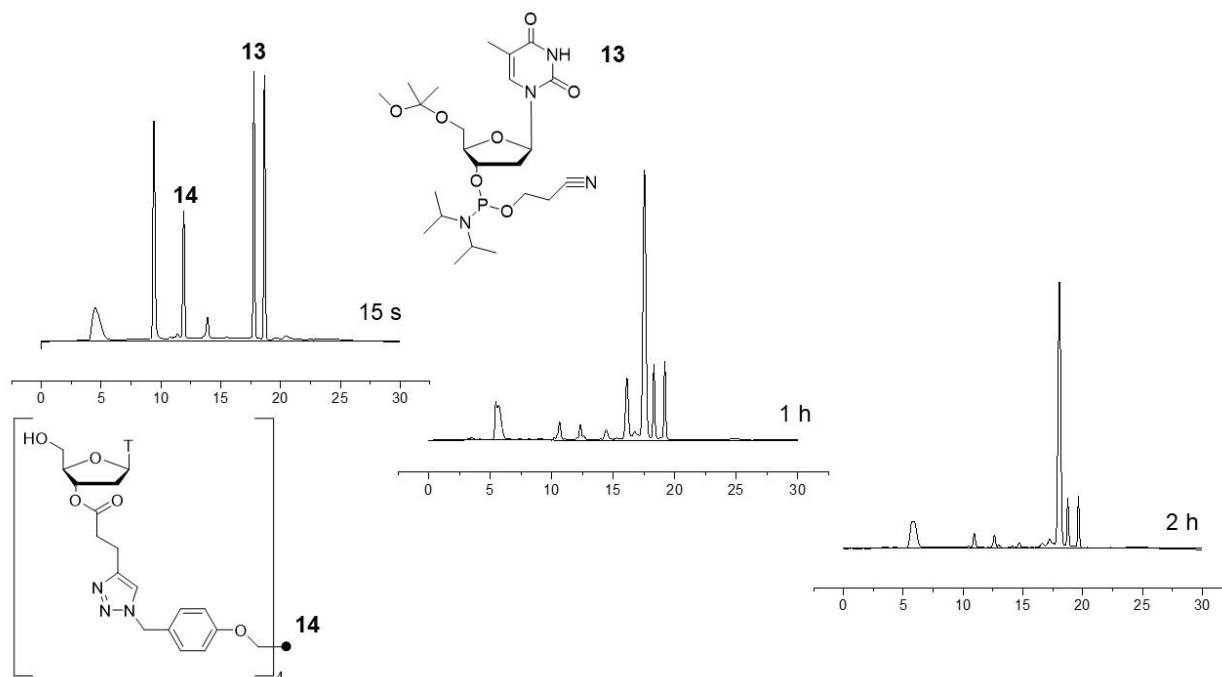


Kaavio 13. 5'-O-Metoksimetyylietyylisuojatun tymidiinifosforamidiitin (**13**) synteesikaavio.

5'-O-(Metoksi-isopropyyli)tymidiinin (**12**) fosfitylointi suoritettiin trietyyliamiinin läsnä ollessa dikloorimetaanissa korvaamalla fosfitylointireagenssin kloori nukleosidin 3'-OH ryhmällä. Tuote **13** puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen eluenttina 2 % TEA, 2,5 % MeOH dikloorimetaanissa. Tuotteen **13** saannoksi saatiin 79 %

2.2.2 KytKentäreaktio

KytKentäreaktiossa 5'-O-(metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-[(2-syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitin **13** ($t_R = 18,3$ ja $19,0$ min) di-isopropyyliaminoligandi korvataan yhdisteen **14** ($t_R = 11,9$ min) 5'-hydroksyyli ryhmällä asetonitriilin ja dimetyyliformamidin 1:1 seoksessa tetratsolin toimiessa aktivaattorina. Ensimmäisessä reaktiosykliissä fosforamidiittiä käytettiin kuusi ekvivalenttia kantajaan nähden. KytKentäreaktiota seurattiin RP-HPLC:llä ottamalla näytteet 15 s, 1 h ja 2 h kohdalla (kuva 4). Epätäydelliset kytKentän nähtiin kromatogrammissa mono-, di- ja trisubstituoituina kytKentöinä nelihaaraiseen kantajaan (**14**).

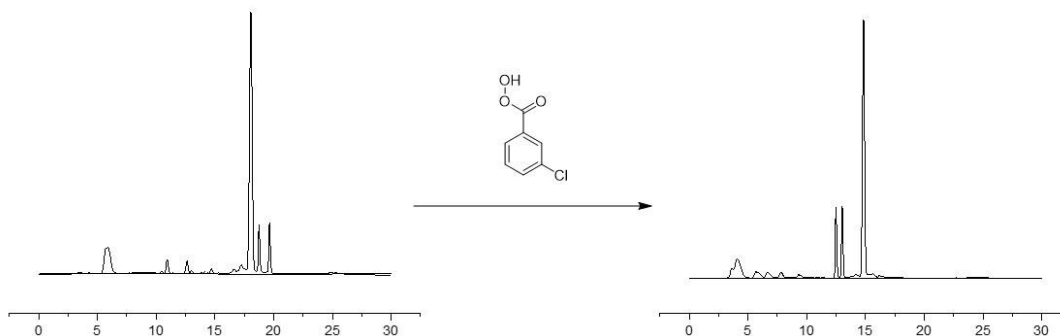


Kuva 4. RP-HPLC kromatogrammit reaktioseoksesta heti kytkentäreaktion alussa, tunnin ja kahden tunnin kuluttua.

Seuraavien kytkentäsykliä kytkentäreaktiot seurasivat edellä kuvattua synteesistrategiaa, mutta nukleosidifosforamidiitin määrä reaktioseoksessa nostettiin kahdeksaan ekvivalenttiin. Tämän ansiosta kytkentäreaktion reaktioaika lyheni kahteen tuntiin jokaisessa myöhemmässä kytkennässä.

2.2.3 Hapetus

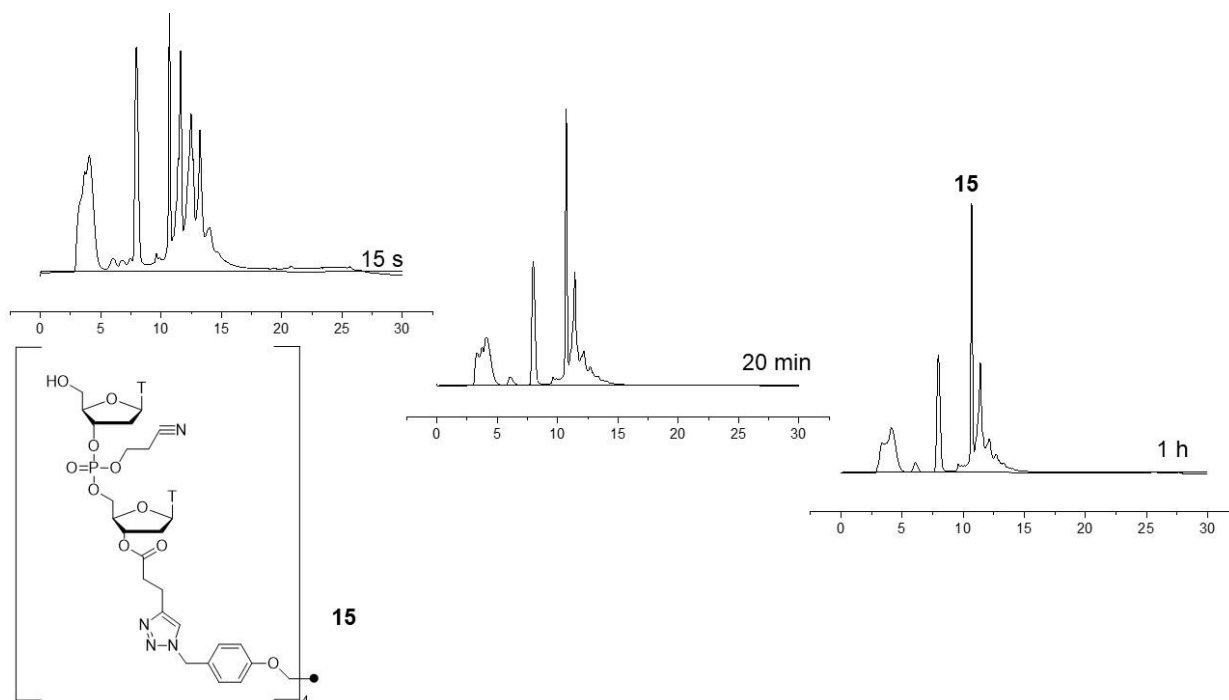
Kytkevävaiheessa muodostunut fosfiittitriesteri ($t_R = 18,1$ min) hapetetaan fosfaattitriesteriksi ($t_R = 14,8$ min) *m*-klooriperbentsoehappolla. Hapetinta käytettiin 2,5 ekvivalenttia käytettyyn asetaalisuojattuun nukleosidifosforamidiittiin **13** nähden. Reaktiota seurattiin nestekromatografisesti ja HPLC-grammista havaitaan myös ylimäärin olleen asetaalisuojatun nukleosidifosforamidiitin hapettuminen. Hapettuminen tapahtui nopeasti kahdessa minuutissa.



Kuva 5. RP-HPLC kromatogrammit reaktioseoksesta ennen hapettimen lisäämistä ja kaksi minuuttia sen jälkeen.

2.2.4 Suojaryhmän poisto

Asetaalisuojaryhmä irrotettiin dikloorietikkahapolla dikloorimetaanissa. Ensimmäisessä kytkennässä käytettiin DCA/DCM-liuosta kymmenen tilavuusprosenttia reaktioseoksen tilavuudesta. Suojaryhmien irtoamista seurattiin RP-HPLC:llä ottamalla näytteet 15 s, 20 min ja 60 min kohdalla. Myöhemmissä suojaryhmän irrotusreaktioissa DCA/DCM-liuoksen pitoisuus reaktioseoksessa nostettiin 12,5 tilavuusprosenttiin. Suojaryhmät olivat täydellisesti irronneet alle 20 minuutissa. Happokäsittelyn aikana havaittiin välituotteen (**15**; $t_R = 10,8$ min) lisäksi myös syanoetyyliryhmän irtoaminen rakenteesta ($t_R = 10,6$ min; Kuva 6).



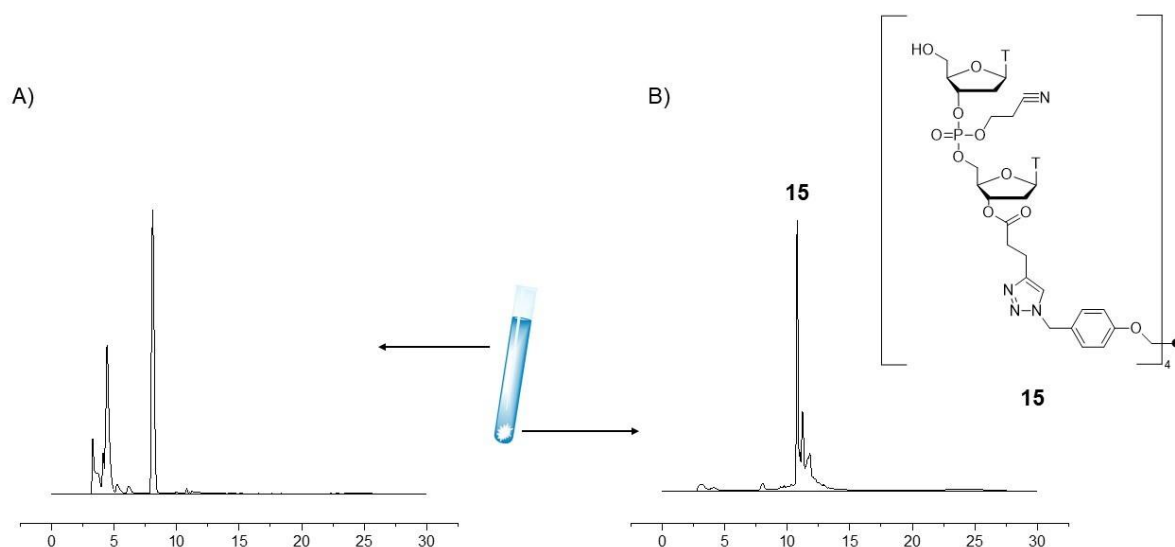
Kuva 6. RP-HPLC kromatogrammit reaktioseoksesta suojaryhmän irrotuksessa heti hapon lisäämisen jälkeen, 20 minuutin ja tunnin kuluttua.

Aikaisemmin tässä projektissa optimoidessa suojaryhmän poistamisen olosuhteita on todettu dikloorietikkahapon soveltuvan metyyli-isopropyyლისuojaryhmän irrotukseen parhaiten. 5'-Metyyli-isopropyylyliryhmä hydrolysoituu noin 1100 kertaa nopeammin kuin 4,4'-dimetokritrityyli 10 tilavuusprosenttiossa DCA/MeOH-liuoksessa. Depurinaation on havaittu olevan näissä olosuhteissa noin 2600 kertaa hitaampi kuin asetaalisuojaryhmän irtoaminen ja noin 2,4 kertaa hitaampi kuin detritylaatio, kun kyseessä on 2'-deoksiadenosiini. Nukleosideilla tehdyissä mittauksissa on myös todettu, että detritylaation reaktionopeus on 5000 kertaa nopeampi adenosiinin depurinaatioon verrattuna, kun suojaryhmän poisto suoritettiin dikloorietikkahapossa trietyylisilaanin toimiessa scavenger-reagenssina.²⁵

2.2.5 Saostus

5'-Suojaryhmän poistamisen jälkeen tuote **15** saostetaan kylmästä metanolista ja seos sentrifugoitiin. Yksi saostuskerta oli riittävä välituotteen puhdistamiseksi (kuva 7), sillä tuote saostui kvantitatiivisesti metanolista muodostaen sakan. Muut reagenssiylimäärät jäivät metanoliin. Vastaava synteesistrategia 5'-metoksi-isopropyyლისuojaryhmällä, tetrapodaalisella pentaerytritolikantajalla ja fosforamidiittikytkennällä on raportoitu aiemmin RNA-pentameerin valmistamiseksi, mutta tällöin välituote saostettiin kaksi kertaa metanolista.¹⁷ Yhden saostuksen puhdistustaktiikka oligonukleotidien liuossynteesissä on raportoitu ensimmäistä

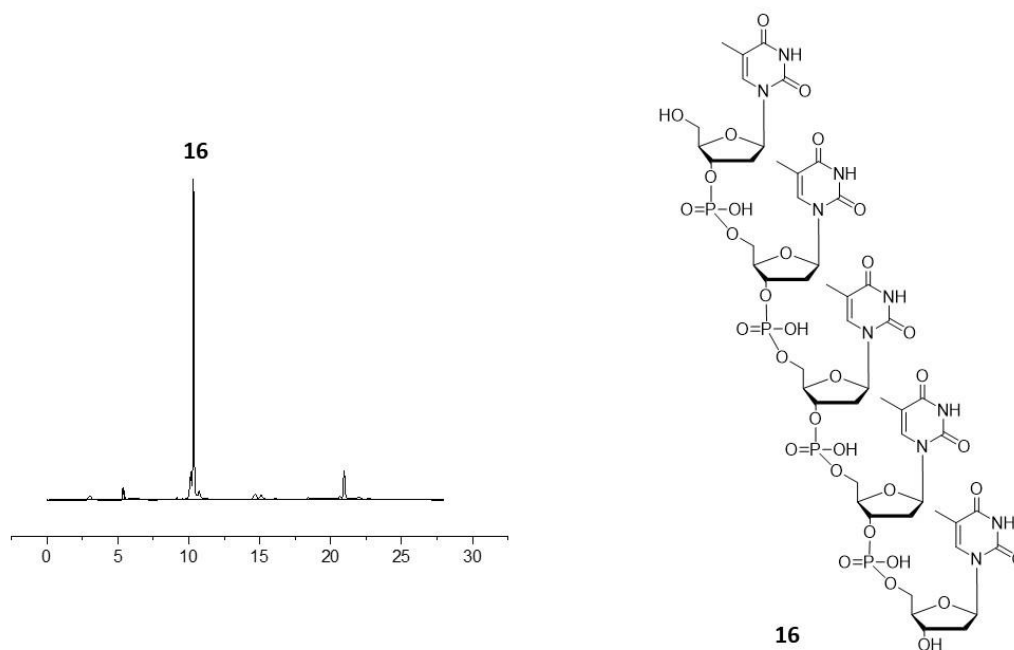
kertaa Waltherin tutkimusryhmän toimesta (katso kappale 1.2.).²⁵



Kuva 7. RP-HPLC kromatogrammit metanoliliuoksesta, josta välituote on saostettu (A) ja saostuksessa muodostuneesta valkoisesta sakasta (B, välituote **15**).

2.2.6 Kantajasta irrottaminen

Oligonukleotidi (T₅, **16**; t_R = 10,3 min) irrotetaan kantajasta ja syanoetyyliryhmät fosfaateista käsittelemällä yhdistettä 25 % ammoniumhydroksidiliuoksella (kuva 8).



Kuva 8. RP-HPLC kromatogrammi tymidiinipentameerin (**16**) ammonolyysin jälkeen.

2.3 Johtopäätökset ja yhteenveto

Tymidiinipentameeri (T₅; **16**) syntetisoitiin onnistuneesti. Kokonaissaannoksi saatiin 24,5 %. Kokonaissaantoa laski erityisesti alkupään kytkentöjen huonommat saannot. Nostamalla nukleosidifosforamidiitin pitoisuutta 1,5 ekvivalentista kahteen ekvivalenssiin kantajan yhtä haaraa kohden saatiin kytkentäreaktion saantoa parannettua loppua kohden 73 %:sta jopa 94 %:iin. Yhden saostuksen strategia riittää raakatuotteen kvantitatiiviseen puhdistukseen jokaisen syklin välissä, mitä ei ole tietääksemme ennen raportoitu vastaavanlaisella kantajalla fosforamidiittimenetelmällä suoritettavassa oligonukleotidien liuossynteesissä.

Tetrapodaalisia pentaerytritolipohjaisia kantajia, joihin tymidiini tai adensiini on liitetty levulinoyylilinkkerin välityksellä, ei onnistuttu syntetisoimaan riittävän puhtaina käytettäväksi oligonukleotidien synteetikarkoituksiin. Synteessissä ongelmia aiheuttivat amidisidoksen muodostuminen nukleosidin karboksyylihappojohdannaisen ja propargyyliamiinin välillä. Onnistunut kondensaatioreaktio tapahtui puolestaan käyttämällä 1-amino-3-butyyniä ja *N*-metyylipropargyyliamiinia. Tätä seuraavan sykloadditioreaktion havaittiin myös onnistuneen, mutta reaktioseokseen jäi useita sivutuotteita, joita ei onnistuttu karakterisoimaan. Raakatuotteen puhdistus osoittautui hankalaksi. Tuotetta ei saatu eristettyä epäpuhtauksien joukosta silikageelikromatografisesti. Raakatuote vaikutti olevan myös epästabiili silikageelin läsnä ollessa. Synteessin puhdistusta tulisi vielä siis kehittää niin, että lopputuote saataisiin erotettua epäpuhtauksista ja sen tulisi sopia suuremman mittakaavan synteeseihin. Tulevaisuudessa mahdollisena vaihtoehtoisena ortogonaalisena linkkerinä voisi toimia disulfidilinkkeri.⁴¹

3 Kokeelliset menetelmät

3.1 Yleiset kokeelliset menetelmät

Synteeseissä käytettiin kaupallisia reagensseja ja liuottimia. Reaktioliuottimet kuivattiin molekyyliseuloilla ja reaktiossa käytettävät nukleosidit kuivattiin eksikkaattorissa fosforipentoksidin päällä. NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz NMR-spektrometrillä. Massaspektrit mitattiin Bruker micrQTOF massaspektrometrillä ja Agilent Infinity ES-API HPLC/MS kvadrupolimassaspektrometrillä. Reaktioiden etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti (TLC), massaspektrometrisesti ja nestekromatografisesti. HPLC/MS-analyyseissä käytettiin ajoliuoksena asetonitriilin ja veden seosta, joka sisälsi 0,1 % muurahaishappoa. Gradientissa asetonitriilin pitoisuus kasvatettiin 25 %:sta 95 %:iin 25 minuutin aikana. C-18 kolonni, 150 x 4,6 mm, 5 μ m, λ = 260 nm. Nestekromatografiolla suoritetuissa seurannoissa ajoliuoksena käytettiin asetonitriilin (40 %) ja 50 mM:n trietyyliammoniumasetaatin seosta. C-18 kolonni, 250 x 4 mm, 5 μ m; virtausnopeus 1 ml/min; λ = 260 nm. Oligonukleotidisynteesin eri vaiheita seurattiin RP-HPLC:lla ottamalla 5 μ l näytteitä. Näytteiden pysäytysliuoksena käytettiin 460 μ l 50 mM trietyyliammoniumasetaatipuskuria (TEAA).

3.2 Liukoisen saostettavan kantajan synteesi

3.2.1 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-(6-karboksi-4-oksoheksanoyyli)tymidiini (6)

5'-O-Dimetoksitriptyylitymidiini **5** (5,0 g, 9,2 mmol) liuotettiin kuivaan dioksaaniin. Reaktioliuokseen lisättiin dioksaaniin liuotettu 1,6-dioksaaspiro[4.4]nonaani-2,7-dioni (3,0 g, 19 mmol) ja 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni (2,8 ml, 19 mmol). Reaktioon annettiin edetä yön yli huoneenlämmössä. Reaktioliuos puhdistettiin silikageelikromatografisesti (1 % pyridiini, 4 % MeOH, DCM). Tuote **6** (6,0 g, 84 %) kuivattiin eksikaattorissa alipaineessa ja karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopisesti (liitteet 1 ja 2).

¹H-NMR δ _H (500 MHz, CDCl₃): 8,63 (2H, m, pyridiini) 7,73 (1H, m, pyridiini), 7,61 (1H, s, H6), 7,40–7,24 (9H, m, DMTr), 7,40–7,24 (2H, m, pyridiini), 6,84 (4H, d, DMTr, J = 8,9 Hz), 6,42 (1H, dd, H1', J = 5,6; 8,7 Hz), 5,52 (1H, d, H3', J = 5,8 Hz) 4,14 (1H, d, H4', J = 1,6 Hz), 3,80 (6H, s, O-Me), 3,46 (2H, m, H5'), 2,80 (4H, m, CH₂CH₂), 2,64 (4H, m, CH₂CH₂), 2,48 (1H, m, H2'), 2,41 (1H, m, H2''), 1,36 (3H, s, Me). ¹³C-NMR δ _C (125 MHz, CD₃Cl): 207,0 (C=O), 172,1 (C=O), 163,8 (C4), 158,8 (DMTr), 150,7 (C2), 149,1 (pyridiini), 136,6 (DMTr),

135,5 (C6), 135,3 (pyridiini), 128,1 (DMTr), 124,0 (C=O), 124,0 (pyridiini), 111,8 (C5), 84,4 (C1'), 84,0 (C4'), 75,6 (C3'), 63,7 (C5'), 55,2 (O-Me), 37,9 (C2'), 37,1 (CH₂), 37,1 (CH₂) 30,9 (CH₂), 28,1 (CH₂) 11,6 (Me). HRMS (ESI): *m/z* 723,2498 [M+Na]⁺ (havaittu); *m/z* 723,2524 [M+Na]⁺ (laskettu).

3.2.2 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]tymidiini (**7**)

Yhdiste **6** (2,0 g, 2,9 mmol), 1-amino-3-butyyni (0,33 g, 3,2 mmol) ja DIPEA (1,2 ml, 7,2 mmol) liuotettiin kuivaan DMF:ään. Reaktioliuokseen lisättiin DMF:ään liuotettu BOP-reagenssi (1,4 g, 3,2 mmol). Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Reaktioliuokseen lisättiin etyyliasetaattia ja orgaanista faasia pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (1 % pyridiini, 7,5 % MeOH, DCM). Tuote **7** (2,1 g, 96 %) kuivattiin eksikkaattorissa alipaineessa ja karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopisesti (liitteet 3 ja 4).

¹H-NMR δ_H (500 MHz, CD₃Cl): 8,66 (2H, s, pyridiini), 8,36 (1H, s, NH), 7,76 (1H, m, pyridiini), 7,62 (1H, s, H6), 7,40–7,26 (9H, m, DMTr), 7,20 (2H, m, pyridiini), 6,85 (4H, m, DMTr), 6,42 (1H, dd, H1', *J* = 5,8; 8,8 Hz), 6,12 (1H, s, NH-amidisidos), 5,47 (1H, d, H3', *J* = 5,3 Hz), 4,15 (1H, d, H4', *J* = 1,3 Hz), 3,81 (6H, m, O-Me), 3,48 (2H, m, H5'), 3,39 (2H, q, NHCH₂, *J* = 6,4; 12,7; 19,1 Hz), 2,82 (4H, m, CH₂CH₂), 2,62 (2H, t, CH₂), 2,50 (2H, t, CH₂, *J* = 6,6; 13,3 Hz), 2,39 (2H, td, H2', *J* = 2,5; 6,4 Hz), 3,03 (1H, t, ≡CH, *J* = 2,6; 5,2 Hz), 1,40 (3H, d, Me, *J* = 12,2 Hz). ¹³C-NMR δ_C (125 MHz, CD₃Cl): 207,6 (C=O), 172,0 (C=O), 171,8 (C=O), 163,3 (C4), 158,8 (DMTr), 150,3 (C2), 149,1 (pyridiini), 136,7 (C6), 135,4 (pyridiini), 130,1 (DMTr), 129,1 (DMTr), 128,0 (DMTr), 127,1 (DMTr), 124,0 (pyridiini), 113,3 (DMTr), 111,7 (C5), 87,2 (-C≡), 84,3 (C1'), 83,8 (C4'), 75,7 (C3'), 69,9 (≡CH), 63,8 (C5'), 55,3 (O-Me), 38,1 (NHCH₂), 37,8 (C2'), 37,6 (CH₂CH₂), 37,0 (CH₂CH₂) 29,9 (CH₂CH₂), 28,1 (CH₂) 11,6 (Me). HRMS (ESI): *m/z* 774,2945 [M+Na]⁺ (havaittu); *m/z* 774,2997 [M+Na]⁺ (laskettu).

3.2.3 N⁶-(2,4-Dimetyyllibentsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(prop-2-yn-1-yyli-N-metyyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (**10**)

Yhdiste **6** (1,0 g, 1,2 mmol), *N*-metyyllipropargyyliamiini (0,11 ml, 1,3 mmol) ja DIPEA (0,52 ml, 3,0 mmol) liuotettiin DMF:ään. Reaktioliuokseen lisättiin DMF:ään liuotettu BOP-reagenssi (0,58 g, 1,3 mmol). Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä kahden tunnin ajan.

Reaktioliuokseen lisättiin etyyliasetaattia ja orgaanista faasia pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (1 % pyridiini, 6 % MeOH, DCM). Tuote **10** (0,89 g, 84 %) kuivattiin eksikkaattorissa alipaineessa ja karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopisesti (liitteet 5 ja 6).

¹H-NMR δ_H (500 MHz, CD₃Cl): 8,72 (1H, s, H8), 8,63 (2H, s, pyridiini), 8,16 (1H, s, H2), 7,72 (1H, t, pyridiini), 7,58–7,27 (3H, m, 2,4-dimetyylibentsoyyli), 7,28–7,10 (9H, m, DMTr), 7,22 (2H, m, pyridiini), 6,80 (4H, m, DMTr), 6,51 (1H, t, H1', $J = 8,0$; 14,1 Hz), 5,55 (1H, d, H3', $J = 5,75$ Hz), 4,32 (1H, s, H4'), 4,18 (2H, s, -N-CH₂-), 3,78 (6H, s, O-Me), 3,44 (2H, d, H5', $J = 4,0$ Hz), 3,08 (3H, s, N-CH₃), 3,03 (1H, m, H2'), 2,97 (2H, m, CH₂CH₂), 2,89 (2H, m, CH₂CH₂), 2,81 (2H, m, CH₂CH₂), 2,67 (1H, m, H2''), 2,65 (2H, m, CH₂CH₂), 2,56 (3H, s, 2,4-dimetyylibentsoyyli), 2,38 (3H, s, 2,4-dimetyylibentsoyyli). ¹³C-NMR δ_C (125 MHz, CD₃Cl): 207,7 (C=O), 172,1 (C=O), 171,2 (C=O), 166,7 (C=O), 158,6, 130,0, 128,1, 127,9, 126,9 ja 113,2 (DMTr), 152,7 (C8), 149,5, 135,5 ja 123,9 (pyridiini), 151,5 (C6), 149,5 (C4), 138,0, 132,5, 131,7, 127,5 ja 126,6 (2,4-dimetyylibentsoyyli), 141,6 (C2), 84,5 (C1'), 84,3 (-C \equiv), 75,4 (C3'), 72,9 (\equiv C-H), 63,6 (C5'), 55,2 (O-Me), 39,3 (CH₂), 37,9 (C2'), 37,3 (CH₂CH₂), 37,0 (CH₂CH₂), 36,9 (CH₂CH₂), 36,4 (C4), 34,2 (N-CH₃), 28,1 (CH₂CH₂), 21,4 (2,4-dimetyylibentsoyyli), 20,3 (2,4-dimetyylibentsoyyli). HRMS (ESI): m/z 893,3854 [M+H]⁺ (havaittu); m/z 893,3869 [M+H]⁺ (laskettu).

3.2.4 N⁶-(2,4-Dimetyylibentsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (**11**)

Yhdiste **6** (2,0 g, 2,4 mmol), 1-amino-3-butyyni (0,28 g, 2,6 mmol) ja DIPEA (1,0 ml, 6,0 mmol) liuotettiin DMF:ään. Reaktioliuokseen lisättiin DMF:ään liuotettu BOP-reagenssi (1,6 g, 2,6 mmol). Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä kahden tunnin ajan. Reaktioliuokseen lisättiin etyyliasetaattia ja orgaanista faasia pestiin vedellä ja kylläisellä NaCl-vesiliuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin Na₂SO₄:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös puhdistettiin silikageelikromatografisesti (1 % pyridiini, 7,5 % MeOH, DCM). Tuote **11** (1,8 g, 84 %) kuivattiin eksikkaattorissa alipaineessa ja karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopisesti (liitteet 7 ja 8).

¹H-NMR δ_H (500 MHz, CD₃Cl): 8,72 (1H, s, H8), 8,62 (2H, s, pyridiini), 8,16 (1H, s, H2), 7,70 (1H, t, pyridiini), 7,58–7,21 (3H, m, 2,4-dimetyylibentsoyyli), 7,30–7,01 (9H, m, DMTr), 7,38

(2H, m, pyridiini), 6,80 (4H, d, DMTr), 6,52 (1H, m, H1', $J = 5,8; 8,3; 14,1$ Hz), 6,06 (1H, s, NH-amidisidos), 5,55 (1H, d, H3', $J = 5,7$ Hz), 4,32 (1H, s, H4'), 3,78 (6H, s, O-Me), 3,45 (2H, d, H5', $J = 3,9$ Hz), 3,37 (4H, m, CH₂CH₂), 3,03 (1H, m, H2'), 2,84 (4H, m, CH₂CH₂), 2,65 (4H, m, CH₂CH₂), 2,56 (3H, s, 2,4-dimetyylibentsoyyli), 2,51 (1H, m, H2''), 2,38 (3H, s, 2,4-dimetyylibentsoyyli), 2,00 (1H, m, ≡C-H). ¹³C-NMR δ_C (125 MHz, CD₃Cl): 207,6 (C=O), 172,0 (C=O), 166,7 (C=O), 163,8 (C=O), 158,6, 130,0, 128,1, 127,9, 127,0 ja 113,2 (DMTr), 152,7 (C8), 151,4 (C6), 149,7, 135,5 ja 123,0 (pyridiini), 149,2 (C4), 138,0, 132,5, 131,7, 127,5 ja 126,6 (2,4-dimetyylibentsoyyli), 141,2 (C2), 86,7 (-C≡), 84,5 (C1'), 84,4 (C4'), 75,5 (C3'), 70,0 (≡C-H) 63,6 (C5'), 55,2 (O-Me), 38,1 (CH₂CH₂), 38,0 (C2'), 37,4 (CH₂CH₂), 37,0 (CH₂CH₂), 29,8 (CH₂CH₂), 28,0 (CH₂CH₂), 21,4 (CH₂CH₂), 20,3 (2,4-dimetyylibentsoyyli), 19,4 (2,4-dimetyylibentsoyyli). HRMS (ESI): m/z 893,3868 [M+H]⁺ (havaittu); m/z 893,3869 [M+H]⁺ (laskettu).

3.2.5 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(prop-2-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]tymidiini (**9**)

Yhdisteen **9** syntetisoinnissa käytettiin samaa menetelmää kuin yhdisteiden **7**, **10**, ja **11** valmistuksessa. Imiinin muodostumista yritettiin estää käyttämällä vähemmän amiinilähtöainetta ja BOP-reagenssia, molempia vain 0,95 ekvivalenttia. Raakatuotetta ei myöskään puhdistettu, vaan synteesissä jatkettiin eteenpäin click-reaktiolla. Tämän lisäksi yhdiste **9** yritettiin syntetisoida siten, että lähtöaine **6** aktivoitiin DIPEA:lla ja 0,95 ekv. BOP-reagenssilla ennen 0,95 ekvivalentin propargyyliamiinin lisäystä kolmessa osassa 15 minuutin aikana. Tuotetta **9** ei kuitenkaan havaittu. Raakatuotteen silikageelikromatografisessa puhdistuksessa eluentina käytettiin sekä 1 % pyridiinin, 4 % metanolin ja dikloorimetaanin seosta, että 1 % trietyyliamiinin, 2–10 % metanolin ja etyyliasetaatin seosta. Oikeaa tuotetta ei muodostunut.

3.2.6 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriptyyli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]tymidiinin (**7**) kytkentä tetrakis{[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli}metaaniin

Yhdiste **7** (1,0 g, 1,4 mmol) ja tetrakis{[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli}metaani (0,16 g, 0,23 mmol) liotettiin kuivaan DMF:ään. Reaktioluosta sonikoitiin 30 minuutin ajan, jota seurasi 10 minuutin kuplitus typpellä. Kuparijodidi (42 mg, 0,22 mmol) lisättiin reaktioseokseen typpi-atmosfäärissä. Reaktioon annettiin edetä vuorokauden ajan huoneenlämmössä

magneettisekoituksessa. Ensimmäisen vuorokauden jälkeen reaktioseoksen lämpötila nostettiin huoneenlämmöstä 40 celsiusasteeseen ja kahden vuorokauden jälkeen 50 celsiusasteeseen reaktion etenemisen nopeuttamiseksi. Vuorokauden kuluttua reaktion aloittamisesta reaktioseokseen lisättiin spaattelin kärjellinen kuparijodidia ja natriumaskorbaattia (43 mg, 0,22 mmol) mahdollisen kuparijodidin hapettumisen estämiseksi. Kolmen vuorokauden jälkeen reaktioseos haihdutettiin kuiviin ja puhdistettiin silikageelikromatografisesti (gradientti 1 % pyridiini, 6–20 % MeOH, DCM). Saatu raakatuote **8** liuotettiin 0,125 M HCl MeOH/DCM (1:1) -liuokseen, annettiin reagoida 40 minuutin ajan, neutraloitiin pyridiinillä ja haihdutettiin kuiviin. Tuotetta **1** yritettiin puhdistaa silikageelikromatografisesti (gradientti 10–20 % MeOH, DCM) ja se karakterisoitiin ¹H NMR- ja ¹³C NMR-spektroskopisesti (liitteet 9 ja 10). Raakatuote sisälsi useita tuntemattomaksi jääneitä piikkejä, joita ei pystytty identifioimaan.

¹H-NMR δ_H (500 MHz, CD₃Cl): 9,70 (1H, s, NH), 8,02 (2H, s, pyridiini), 7,78 (1H, t, pyridiini, $J = 7,5; 15,1$ Hz), 7,58 (1H, s, H₆), 7,40–7,20 (9H, m, DMTr), 7,24 (2H, m, pyridiini), 7,19–6,88 (4H, m, fenyylili), 6,85 (4H, m, DMTr), 6,75 (1H, s, NH-amidi), 6,36 (1H, t, H1', $J = 7,9; 14,6$ Hz), 5,44 (2H, m, H3'), 4,13 (2H, m, H4'), 3,80 (6H, s, O-Me), 3,64 (1H, s, N-CH=), 3,50 (2H, m, H5'), 3,45 (4H, m, CH₂CH₂), 2,97 (2H, s, C-CH₂-O), 2,77 (6H, m, CH₂CH₂), 2,56 (2H, m, CH₂CH₂), 2,44 (4H, m, CH₂CH₂), 2,43 (2H, m, H2'), 1,39 (3H, s, Me). ¹³C-NMR δ_C (125 MHz, CD₃Cl): 206,9 (C=O), 172,1 (C=O), 163,8 (fenyylili), 158,8 (C=O), 158,6, 130,1, 129,7, 128,0, 127,4 ja 113,3 (DMTr), 152,7 (C8), 150,7, 135,2 ja 121,4 (pyridiini), 136,8 (fenyylili), 132,3 (C6), 127,2 (fenyylili), 111,8 (C5), 84,2 (C1'), 83,6 (C4'), 75,8 (C3'), 63,8 (C5'), 55,3 (O-Me), 38,9 (C2'), 37,7 (C-CH₂-O), 37,1 (N-CH=), 36,4–25,4 (CH₂CH₂), 11,6 (Me). MS (ESI): m/z 1227,1 [M-H]²⁻ (havaittu); m/z 1227,5 [M-H]²⁻ (laskettu).

3.2.7 *N*⁶-(2,4-Dimetyyllibentsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriityyli)-3'-O-[7(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiinin (**11**) ja *N*⁶-(2,4-dimetyyllibetsoyyli)-5'-O-(4,4'-dimetoksitriityyli)-3'-O-[7-(prop-2-yn-1-yyli-*N*-metyyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiinin (**10**) kytkentä tetrakis{[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli}metaaniin

Yhdisteen **11** (0,89 g, 0,98 mmol) ja tetrakis{[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli}metaanin (0,11 g, 0,16 mmol) välinen sykloadditioreaktio suoritettiin vastaavalla tavalla mitä on kuvattu yhdisteen **7** tapauksessa. Kuparijodidia ja natriumaskorbaattia käytettiin 29 mg; 0,16 mmol ja 31 mg; 0,16 mmol. Tämän jälkeen suoritettavat vaiheet kantajien synteesissä tässä kappaleessa on suoritettu bio-organisen kemian tutkimusryhmän muiden henkilöiden toimesta. Click-

reaktiolla tetrakis{[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli}metaaniin kiinnitetty N^6 -(2,4-dimetyyli)betsoyyli)-5'-*O*-(4,4-dimetoksitriityyli)-3'-*O*-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-dioksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini liuotettiin 0,100 M HCl MeOH/DCM (1:1) -liuokseen. Raakatuotteen **3** silikageelikromatografisessa puhdistuksessa (10–20 % MeOH/DCM) ei saatu tuotetta erottumaan puhtaana, eikä sitä näin ollen pystytty karakterisoimaan luotettavasti. Yhdisteen **10** (0,77 g, 0,86 mmol) valmistuksessa käytettiin samaa menetelmää kuin yhdisteiden **7** ja **11** tapauksessa. Lähtöaineina käytettiin tetrakis{[4-(atsidometyyli)fenoksi]metyyli}metaania (0,095 g, 0,14 mmol), kuparijodidia (28 mg, 0,15 mmol) ja natriumaskaattia (29 mg, 0,15 mmol). Raakatuotetta puhdistettiin silikageelikromatografisesti (0,5 % pyridiini, 5–10 % MeOH/DCM). Raakatuote liuotettiin 0,100 M HCl MeOH/DCM (1:1) -liuokseen, annettiin reagoita 30 minuutin ajan, neutraloitiin pyridiinillä ja haihdutettiin kuiviin. Raakatuotetta **2** puhdistettiin silikageelikromatografisesti (10–20 % MeOH/DCM). HPLC-analyysin perusteella tuotteen mukana on edelleen merkittäviä määriä epäpuhtauksia, eikä tuotetta pystytty karakterisoimaan luotettavasti. Tuoteseoksesta löydetty HRMS (ESI): m/z 1512,1485 $[M+2H]^{2+}$ (havaittu); m/z 1512,1402 $[M+2H]^{2+}$ (laskettu).

3.3 T-pentameerin (16) valmistus

3.3.1 5'-*O*-(2-metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-*O*-[(2-syanoetyyli)-(*N,N*-di-isopropyyli)]fosforamidiitti (**13**)

Yhdiste **12** (0,50 g, 1,6 mmol) liuotettiin DMF:ään typpiatmosfäärissä. Reaktioliuokseen lisättiin 2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyylikloori (390 μ l, 1,7 mmol) ja TEA (320 μ l, 2,3 mmol). Reaktioon annettiin edetä huoneenlämmössä neljän tunnin ajan. Tuote **13** puhdistettiin silikageelikromatografisesti (2 % TEA, 2,5 % MeOH, DCM). Tuote **13** (0,59 g, 72 %), karakterisointi ^1H -, ^{13}C - ja ^{31}P -NMR-spektroskopisesti (liitteet 11, 12 ja 13).

^1H -NMR δ_{H} (500 MHz, asetonitriili- d_3): 9,20 (1H, s, NH), 7,54 (1H, m, H6), 6,27 (1H, t, H1', $J = 6,8$; 13,4 Hz), 4,56 (1H, m, H3'), 4,16 (1H, m, H4'), 3,65 (2H, m, H5'), 3,20 (4H, d, syanoetyyli, $J = 6,7$ Hz), 2,69 (2H, t, H2', $J = 5,9$ Hz), 1,87 (3H, s, Me) 1,37 (6H, d, MIP, $J = 5,9$ Hz), 1,26 (3H, m, MIP), 1,22 (14H, d, *N*-di-isopropyyli, $J = 6,8$ Hz). ^{13}C -NMR δ_{C} (125 MHz, asetonitriili- d_3): 163,7 (C=O), 150,5 (C=O), 135,7 (C6), 118,6 ($-\text{C}\equiv\text{N}$), 110,1 (C5), 85,1 (C4'), 84,9 (C1'), 74,0 (C3'), 60,7 (syanoetyyli), 58,5 (C5'), 48,2 (*N*-di-isopropyyli), 43,1 (C2'), 23,8 (*N*-di-isopropyyli), 22,1 (MIP), 20,1 (MIP), 11,6 (Me). ^{31}P -NMR δ_{P} (202 MHz,

asetonitriili-d₃): 147,9 (d, $J = 17,7$ Hz). HRMS (ESI): m/z 553,2360 [M+K]⁺ (havaittu); m/z 553,2188 [M+K]⁺ (laskettu).

3.3.2 Pentameerin (T₅; **16**) synteesi liukoisella saostettavalla kantajalla

Yhdiste **14** (110 mg, 56 μ mol) ja 5'-O-(2-metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-O-[(2-syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitti **13** (180 mg, 0,35 mmol, 6,0 ekv.) liuotettiin kuivaan DMF:n (1,4 ml) ja asetonitriilin (0,65 ml) seokseen. Reaktioseokseen lisättiin tetratsoli (0,45 M liuos asetonitriilissä, 0,75 ml, 6,0 ekv.). KytKentäreaktion annettiin edetä typpiatmosfäärissä huoneenlämmössä kahden tunnin ajan, jonka jälkeen seokseen lisättiin 3-klooriperbentsoehappo (190 mg, 1,1 mmol). Kahden minuutin jälkeen reaktioseokseen lisättiin 10 % 600 mg/ml DCA/DCM-liuosta ja onnistuneen RP-HPLC-analyysin jälkeen reaktioseos lisättiin tipoitain jääkylmään metanoliin (60 ml). Tunnin aikana kaikki asetaalisuojaryhmät eivät olleet vielä irronneet täydellisesti. Hitaaseen irtoamiseen oli syynä reaktioseoksen pitäminen jäähauteessa ensimmäisen kytkennän eri vaiheiden välillä, jotta RP-HPLC-ajo ehdittiin ajaa ennen seuraavaan reaktiovaiheeseen jatkamista. Metanoliseosta sentrifugoitiin 20 minuutin ajan (kierrosnopeus 9500 rpm) ja metanoli dekantoiitiin pois muodostuneen valkoisen sakan päältä. Sakka kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa.

KytKentäsyklot toistettiin edellä kuvatulla tavalla (kytkentä, hapetus, suojaryhmän irrotus, saostus) käyttämällä jälkimmäisissä sykleissä yhteensä 8 ekvivalenttia 5'-O-(2-metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-O-[(2-syanoetyyli)-(N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiittia **13** ja 12,5 % 600 mg/ml DCA/DCM-liuosta per kytkentä. Muodostunut tuote irrotettiin kantajasta ja fosfaattiryhmien syanoetyyliryhmät poistettiin ammonolyysillä. Muodostunut tuote punnittiin kierrekorkilliseen eppendorf-putkeen, joka täytettiin 25 % ammoniumhydroksidiliuoksella ja annettiin reagoida 55 °C lämpöuunissa kolmen tunnin ajan. Muodostunut ammonolyysituote liuotettiin veteen, pestiin dikloorimetaanilla ja haihdutettiin kuiviin. Tuote **16** analysoitiin RP-HPLC:lla (kuva 8) ja karakterisoitiin ¹H-, ¹³C- ja ³¹P-NMR-spektroskopisesti (liitteet 14, 15 ja 16).

Tymidiinipentameerin saanto määritettiin UV-Vis-spektrofotometrian avulla. Analyysiin valmistettiin kaksi eri tymidiinipentameerin vesiliuosta, 6,7 μ M ja 6,1 μ M, joiden absorbanssit mitattiin 260 nm:n aallonpituudella. Vastaaviksi absorbanssin arvoiksi saatiin 0,5005 ja 0,5834, jolloin reaktion kokonaissaantoprosentti on 24,5 % ja sykliä kohden kytkennän saanto on 70,3 %.

$^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500 MHz, DMSO): 7,74 (1H, m, H6), 7,29–6,75 (m, kantajasta), 6,18 (1H, m, H1'), 4,74–4,32 (1H, m, H3'), 4,11–3,88 (1H, m, H4'), 3,85–3,59 (2H, m, H5'), 3,05–2,36 (m, kantajasta), 2,21–2,03 (2H, m, H2'), 1,79 (3H, m, Me). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (125 MHz, DMSO): 173,7; 158,7; 146,9 (kantajasta), 164,3 (C=O), 151,0 (C=O), 136,4 (C6), 130–115,3 (kantajasta), 110,3 (C5), 86,7; 85,1 (C4'), 84,2 (C1'), 75,3; 71,7 (C3'), 65,1; 61,9 (C5'), 52,6–44,7 (kantajasta), 38,7 (C2'), 35,7–16,7 (kantajasta), 12,3 (Me). $^{31}\text{P-NMR}$ δ_{P} (202 MHz, DMSO): -2,29 (s), -2,41 (s), -2,48 (s). HRMS (ESI): m/z 728,1230 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ (havaittu); m/z 728,1336 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ (laskettu).

Lähteet

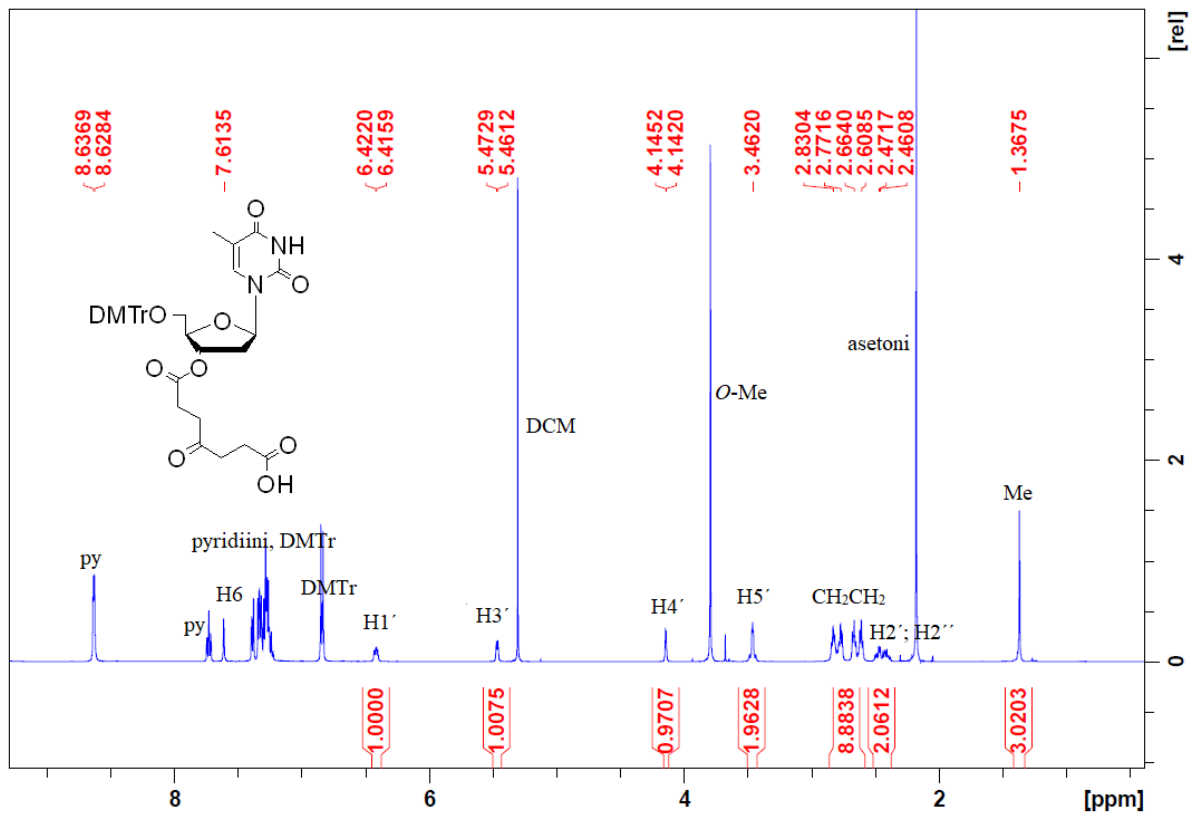
1. Lönnberg H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J. Org. Chem.* 2017;13:1368-1387. doi:10.3762/bjoc.13.134
2. Sanghvi YS. A status update of modified oligonucleotides for chemotherapeutics applications. *Curr. Protoc Nucleic Acid Chem.* Published online 2011:1-22. doi:10.1002/0471142700.nc0401s46
3. Kosuri S, Church GM. Large-scale de novo DNA synthesis: Technologies and applications. *Nat. Methods.* 2014;11(5):499-507. doi:10.1038/nmeth.2918
4. Sanghvi YS, Ravikumar VT, Scozzari AN, Cole DL. Applications of green chemistry in the manufacture of oligonucleotide drugs. *Pure Appl. Chem.* 2001;73(1):175-180. doi:10.1351/pac200173010175
5. Sanghvi YS, Guo Z, Pfundheller HM, Converso A. Improved process for the preparation of nucleosidic phosphoramidites using a safer and cheaper activator. *Org. Process. Res. Dev.* 2000;4(3):175-181. doi:10.1021/op990086k
6. Kim JF, Gaffney PRJ, Valtcheva IB, et al. Organic Solvent Nanofiltration (OSN): A New Technology Platform for Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis (LPOS). *Org. Process Res. Dev.* 2016;20(8):1439-1452. doi:10.1021/acs.oprd.6b00139
7. De Koning MC, Ghisaidoobe ABT, Duynstee HI, Ten Kortenaar PBW, Filippov D V., Van Der Marel GA. Simple and efficient solution-phase synthesis of oligonucleotides using extractive work-up. *Org. Process Res. Dev.* 2006;10(6):1238-1245. doi:10.1021/op060133q
8. Hayatsu H, Khorana HG. Polynucleotides. LXXII. Deoxyribooligonucleotide synthesis on a polymer support. *J Am Chem Soc.* 1967;89(15):3880-3887. doi:10.1021/ja00991a035
9. Virnekas B, Ge L, Plukthun A, Schneider KC, Wellnhofer G, Moroney SE. Trinucleotide phosphoramidites: Ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(25):5600-5607. doi:10.1093/nar/22.25.5600
10. Suchsland R, Appel B, Müller S. Synthesis of Trinucleotide Building Blocks in Solution and on Solid Phase. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 2018;75(1):1-26. doi:10.1002/cpnc.60
11. Kim S, Matsumoto M, Chiba K. Liquid-phase RNA synthesis by using alkyl-chain-soluble support. *Chem - A. Eur. J.* 2013;19(26):8615-8620. doi:10.1002/chem.201300655
12. Matsuno Y, Shoji T, Kim S, Chiba K. Synthetic Method for Oligonucleotide Block by Using Alkyl-Chain-Soluble Support. *Org. Lett.* 2016;18(4):800-803. doi:10.1021/acs.orglett.6b00077
13. Bayer E, Mutter M. Liquid Phase Peptide Synthesis. *Nature.* 1972;237(2):512-513.
14. Gaytán P. Chemical synthesis of oligonucleotides using acetone as a washing solvent. *Biotechniques.* 2009;47(2):701-702. doi:10.2144/000113206
15. Bonora GM, Scremin CL, Colonna FP, Garbesi A. HELP (high efficiency liquid phase) new oligonucleotide synthesis on soluble polymeric support. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(11):3155-

3159. doi:10.1093/nar/18.11.3155
16. Gravert DJ, Janda KD. Organic synthesis on soluble polymer supports: Liquid-phase methodologies. *Chem Rev.* 1997;97(2):489-509. doi:10.1021/cr960064l
 17. Molina AG, Jabgunde AM, Virta P, Lönnberg H. Solution phase synthesis of short oligoribonucleotides on a precipitative tetrapodal support. *Beilstein J. Org. Chem.* 2014;10(I):2279-2285. doi:10.3762/bjoc.10.237
 18. Molina A, Jabgunde A, Virta P, Lönnberg H. Assembly of Short Oligoribonucleotides from Commercially Available Building Blocks on a Tetrapodal Soluble Support. *Curr. Org. Synth.* 2014;12(2):202-207. doi:10.2174/1570179411666141120215703
 19. Kungurtsev V, Laakkonen J, Molina AG, Virta P. Solution-phase synthesis of short oligo-2'-deoxyribonucleotides by using clustered nucleosides as a soluble support. *European J. Org. Chem.* 2013;(29):6687-6693. doi:10.1002/ejoc.201300864
 20. Donga RA, Khaliq-Uz-Zaman SM, Chan TH, Damha MJ. A novel approach to oligonucleotide synthesis using an imidazolium ion tag as a soluble support. *J. Org. Chem.* 2006;71(20):7907-7910. doi:10.1021/jo061279q
 21. Huang JY, Lei M, Wang YG. A novel and efficient ionic liquid supported synthesis of oligosaccharides. *Tetrahedron Lett.* 2006;47(18):3047-3050. doi:10.1016/j.tetlet.2006.03.002
 22. Miao W, Chan TH. Ionic-liquid-supported peptide synthesis demonstrated by the synthesis of Leu5-enkephalin. *J. Org. Chem.* 2005;70(8):3251-3255. doi:10.1021/jo050006c
 23. Donga RA, Hassler M, Chan TH, Damha MJ. Oligonucleotide synthesis using ionic liquids as soluble supports. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2007;26(10-12):1287-1293. doi:10.1080/15257770701530533
 24. Bonora GM, Biancotto G, Maffini M, Scremin CL. Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(5):1213-1217. doi:10.1093/nar/21.5.1213
 25. Creusen G, Akintayo CO, Schumann K, Walther A. Scalable one-pot-liquid-phase oligonucleotide synthesis for model network hydrogels. *J. Am. Chem. Soc.* 2020;142(39):16610-16621. doi:10.1021/jacs.0c05488
 26. Padiya KJ, Salunkhe MM. Large scale, liquid phase oligonucleotide synthesis by alkyl H-phosphonate approach. *Bioorganic Med. Chem.* 2000;8(2):337-342. doi:10.1016/S0968-0896(99)00287-4
 27. Reese CB, Song Q. A new approach to the synthesis of oligonucleotides and their phosphorothioate analogues in solution. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 1997;7(21):2787-2792. doi:10.1016/S0960-894X(97)10073-7
 28. Reese CB, Yan H. Solution phase synthesis of ISIS 2922 (Vitravene) by the modified H-phosphonate approach. *J. Chem. Soc. Perkin I.* 2002;2(23):2619-2633. doi:10.1039/b208802a
 29. Borona GM, Scremin CL, Colonna FP. Large Scale H.E.L.P. Synthesis of

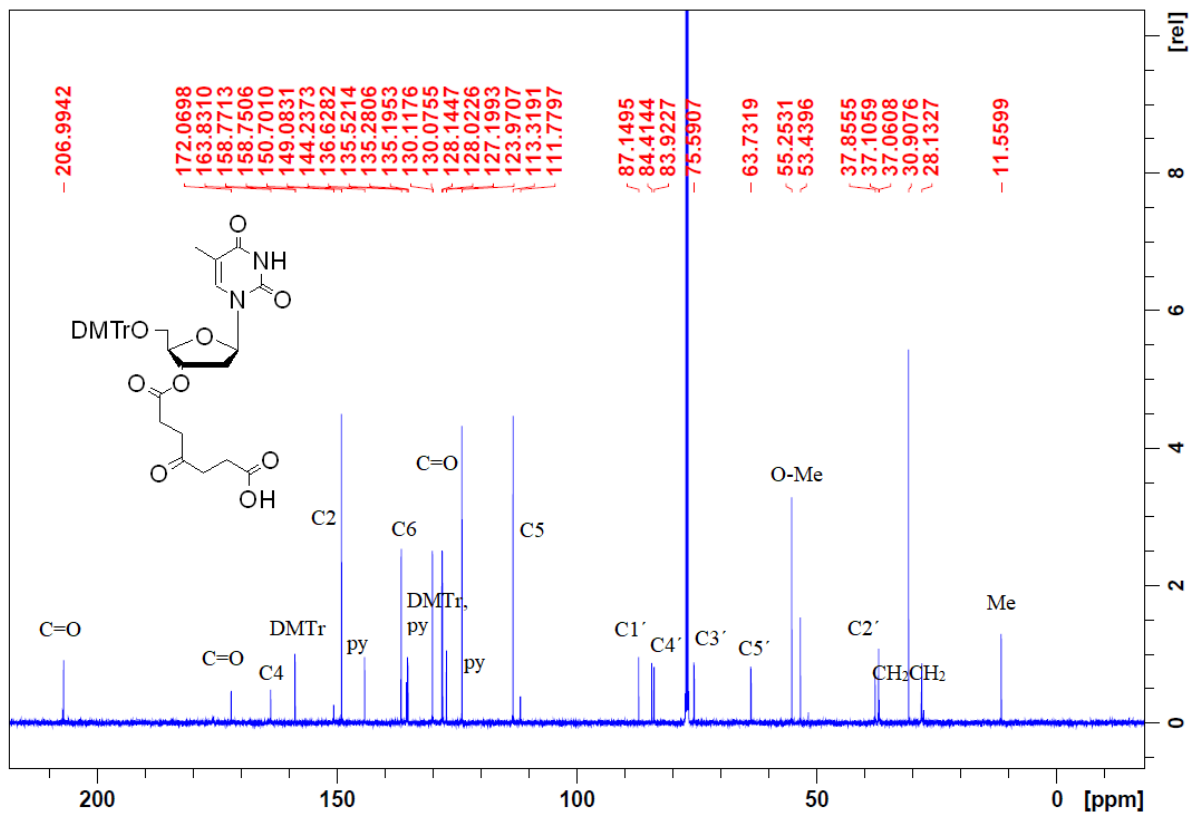
- Oligodeoxynucleotides by the Hydroxybenzotriazole Phosphotriester Approach. *Pergamon Press*. 1991;32(27):3251-3254.
30. Reese CB. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org. Biomol. Chem.* 2005;3(21):3851-3868. doi:10.1039/b510458k
 31. Schaller H, Weimann G, Lerch B, Khorana HG. 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(23):3821-3827. doi:10.1021/ja00906a021
 32. Reese CB, Yan H. Alternatives to the 4,4'-dimethoxytrityl (DMTr) protecting group. *Tetrahedron Lett.* 2004;45(12):2567-2570. doi:10.1016/j.tetlet.2004.01.152
 33. Ravikumar VT, Krotz AH, Cole DL. Efficient synthesis of deoxyribonucleotide phosphorothioates by the use of DMT cation scavenger1. *Tetrahedron Lett.* 1995;36(37):6587-6590. doi:10.1016/00404-0399(50)1346-J
 34. Sierzchala AB, Dellinger DJ, Betley JR, Wyrzykiewicz TK, Yamada CM, Caruthers MH. Solid-Phase Oligodeoxynucleotide Synthesis: A Two-Step Cycle Using Peroxy Anion Deprotection. *J. Am. Chem. Soc.* 2003;125(44):13427-13441. doi:10.1021/ja030376n
 35. Septak M. Kinetic studies on depurination and detritylation of CPG-bound intermediates during oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(15):3053-3058. doi:10.1093/nar/24.15.3053
 36. Molina AG, Kungurtsev V, Virta P, Lönnberg H. Acetylated and methylated β -cyclodextrins as viable soluble supports for the synthesis of short 2'-oligodeoxyribo-nucleotides in solution. *Molecules.* 2012;17(10):12102-12120. doi:10.3390/molecules171012102
 37. Liang Z, Koivikko H, Oivanen M, Heinonen P. Tuning the stability of alkoxyisopropyl protection groups. *Beilstein J. Org. Chem.* 2019;15:746-751. doi:10.3762/bjoc.15.70
 38. Geurink PP, Florea BI, Li N, et al. A cleavable linker based on the levulinoyl ester for activity-based protein profiling. *Angew Chemie - Int. Ed.* 2010;49(38):6802-6805. doi:10.1002/anie.201001767
 39. Leisvuori A, Poijärvi-Virta P, Virta P, Lönnberg H. 4-Oxoheptanedioic acid an orthogonal linker for solid-phase synthesis of base-sensitive oligonucleotides.pdf. *Tetrahedron Lett.* 2008;49:4119-4121.
 40. Kungurtsev V, Lönnberg H, Virta P. Synthesis of protected 2'-O-deoxyribonucleotides on a precipitative soluble support: a useful procedure for the preparation of trimer phosphoramidites. *RSC Adv.* 2016;6(107):105428-105432. doi:10.1039/c6ra22316h
 41. Jabgunde AM, Molina AG, Virta P, Lönnberg H, Flitsch S. Preparation of a disulfide-linked precipitative soluble support for solution-phase synthesis of trimeric oligodeoxyribonucleotide 3-(2-chlorophenylphosphate) building blocks. *Beilstein J. Org. Chem.* 2015;11:1553-1560. doi:10.3762/bjoc.11.171

Liitteet

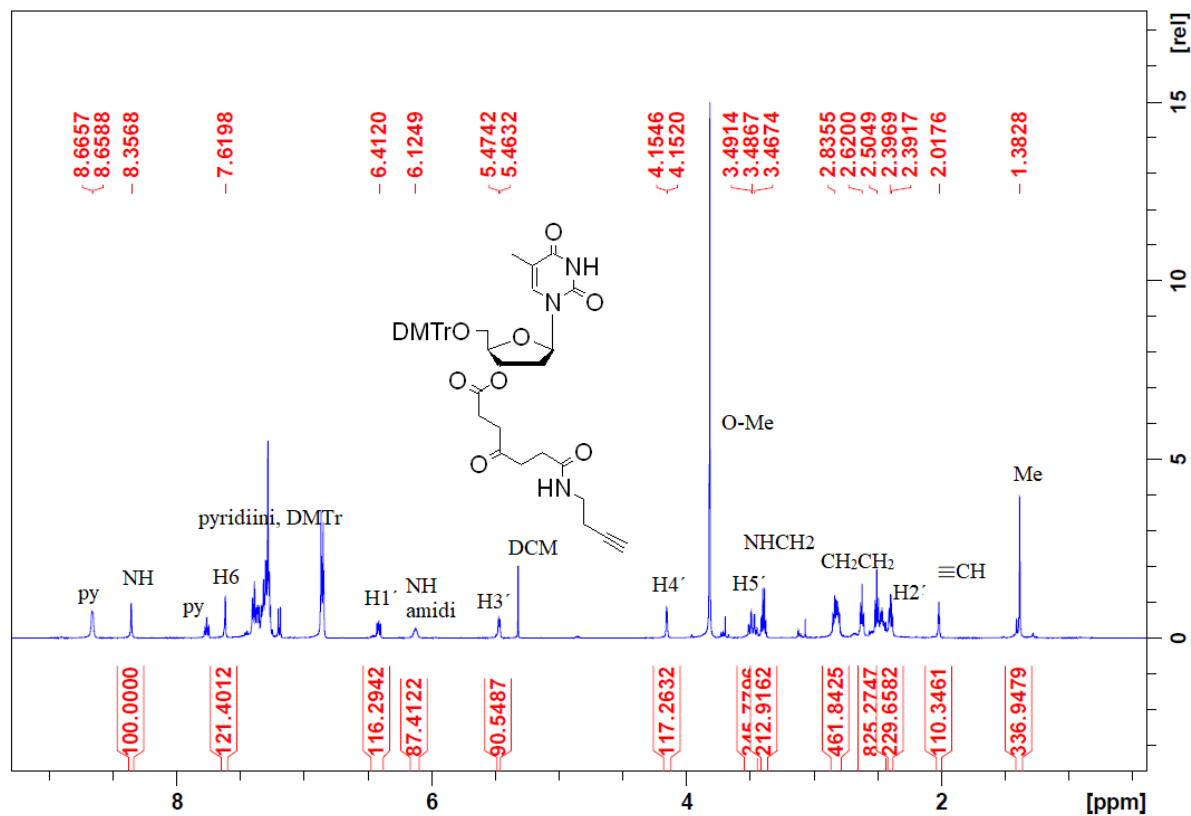
Liite 1. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-3'-O-(6-karboksi-4-oksoheksanoyyli)tymidiini (**6**) $^1\text{H-NMR}$.



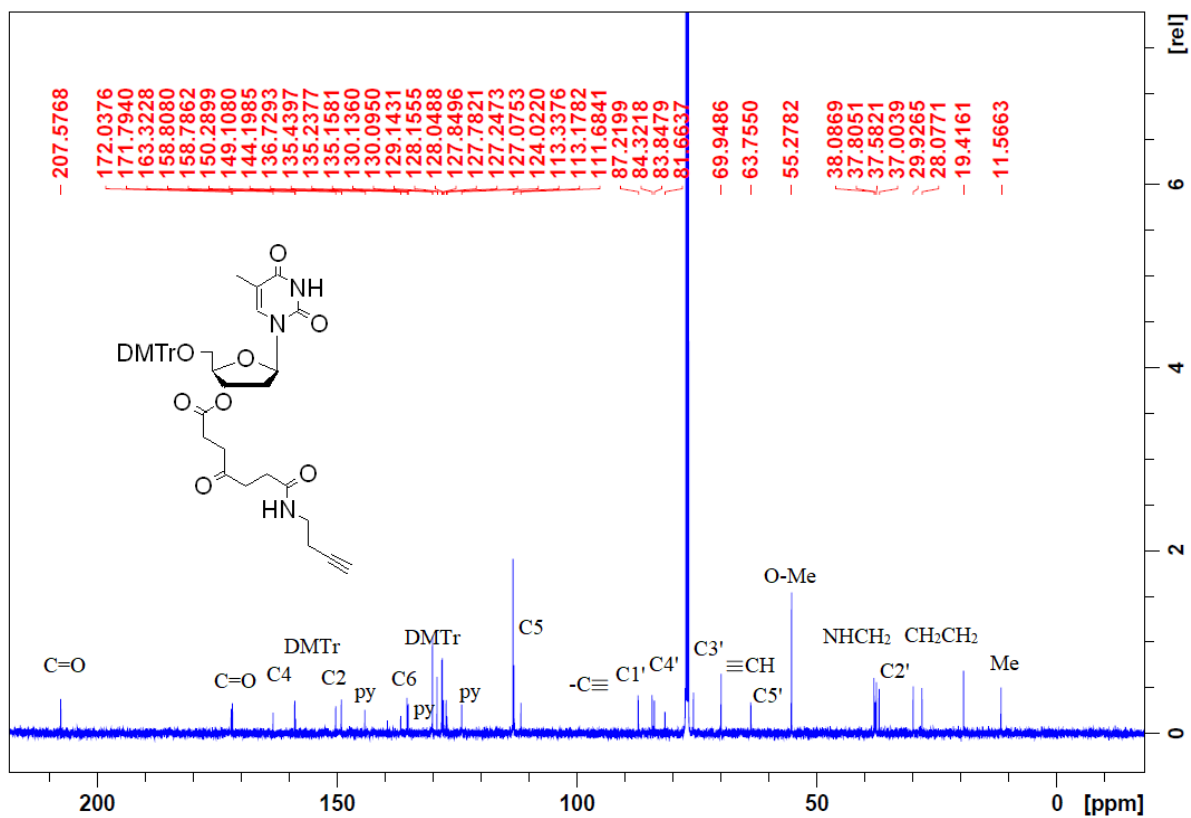
Liite 2. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-3'-O-(6-karboksi-4-oksoheksanoyyli)tymidiini (**6**) $^{13}\text{C-NMR}$.



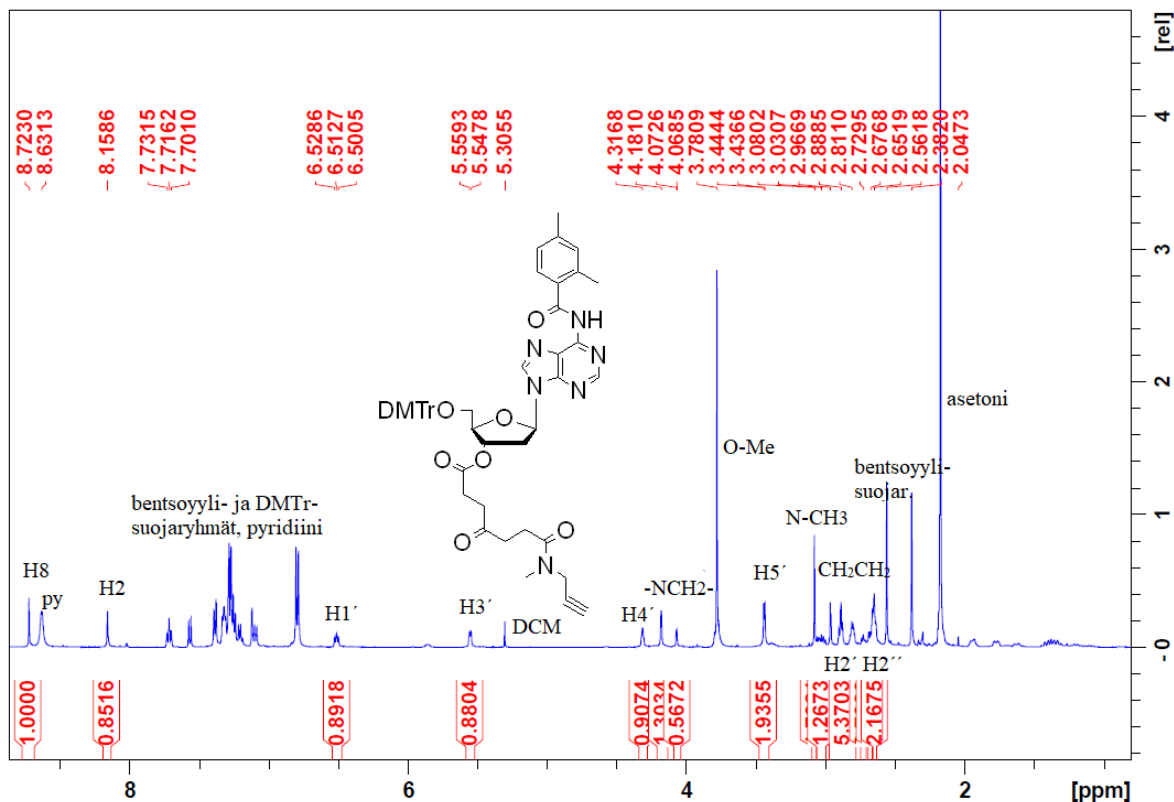
Liite 3. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-diksoheptanoyyli]tymidiini (7)
¹H-NMR.



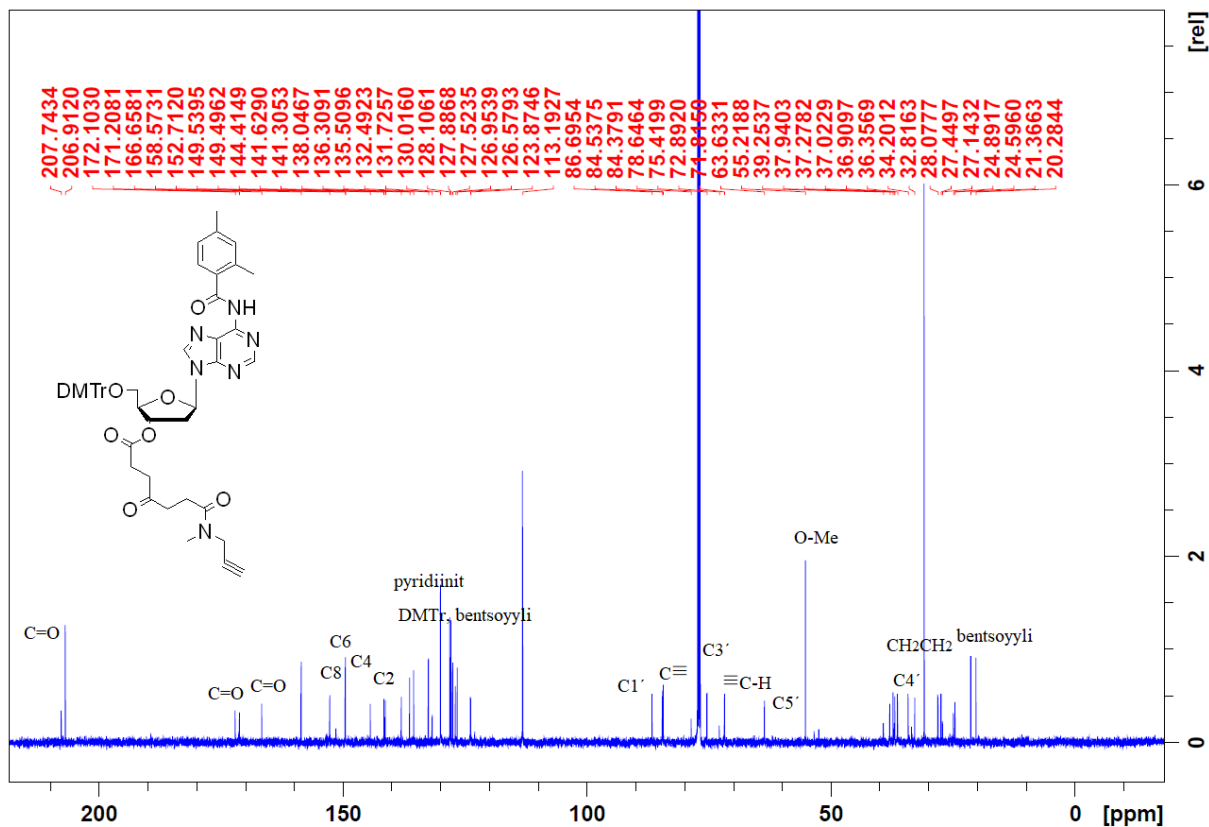
Liite 4. 5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-3'-O-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-diksoheptanoyyli]tymidiini (7)
¹³C-NMR.



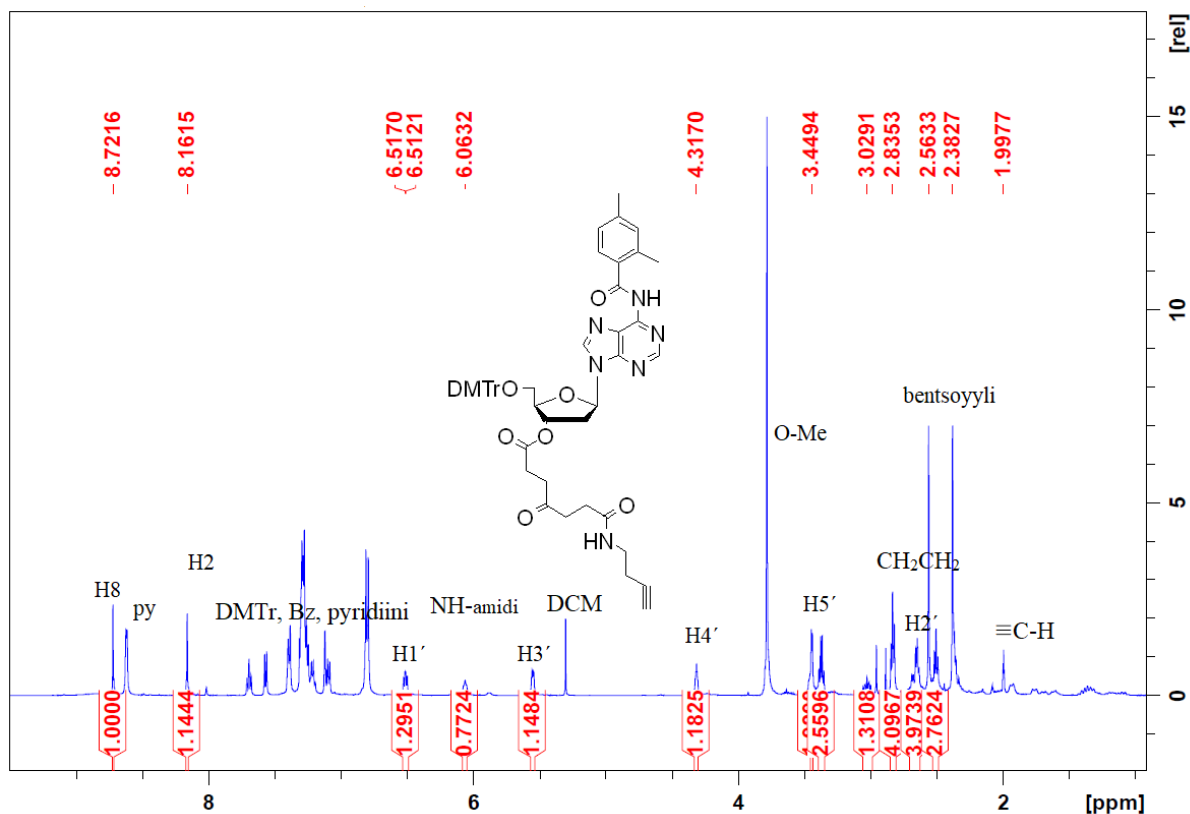
Liite 5. *N*⁶-(2,4-Dimetyylibentsooyli)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)-3'-*O*-[7-(prop-2-yn-1-yyli-*N*-metyyliamino)-4,7-diksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (**10**) ¹H-NMR.



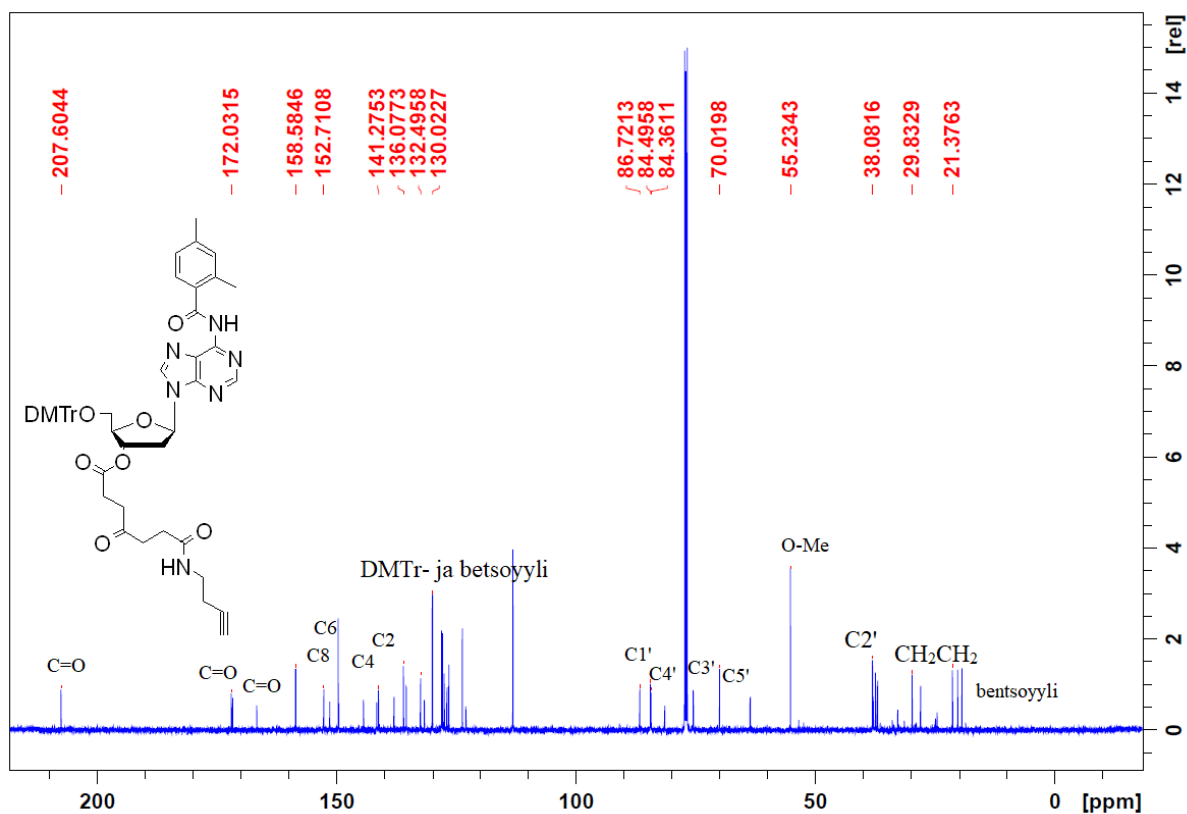
Liite 6. *N*⁶-(2,4-Dimetyylibentsooyli)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityli)-3'-*O*-[7-(prop-2-yn-1-yyli-*N*-metyyliamino)-4,7-diksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (**10**) ¹³C-NMR.



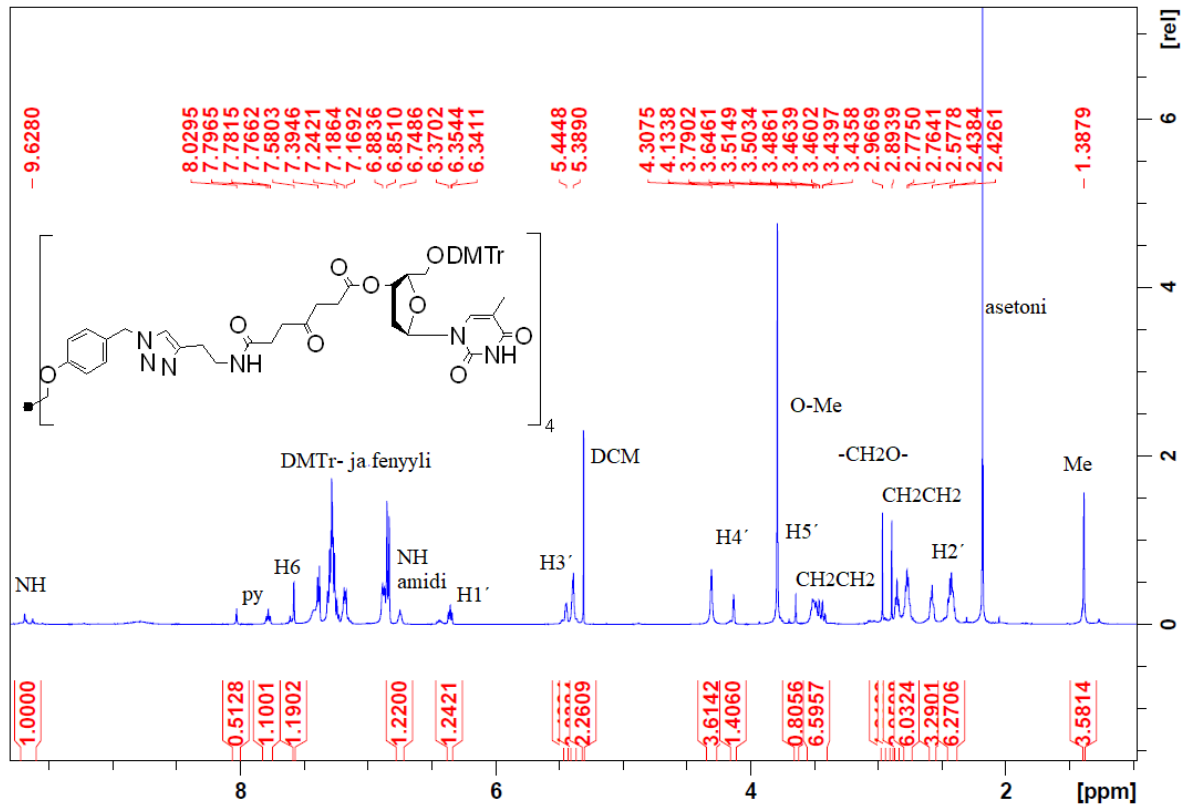
Liite 7. *N*⁶-(2,4-Dimetyylibentsoyyli)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityyli)-3'-*O*-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-diooksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (**11**) ¹H-NMR



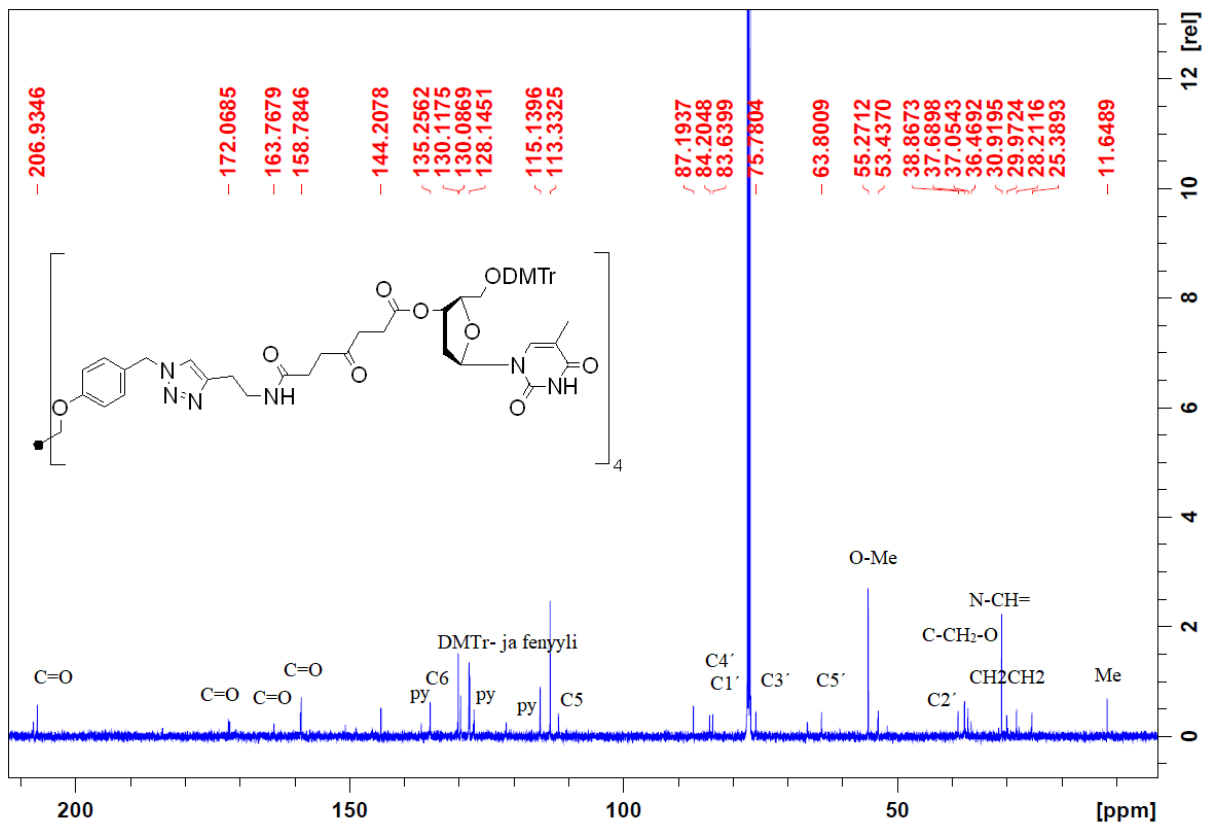
Liite 8. *N*⁶-(2,4-Dimetyylibentsoyyli)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksitriityyli)-3'-*O*-[7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-diooksoheptanoyyli]-2'-deoksiadenosiini (**11**) ¹³C-NMR



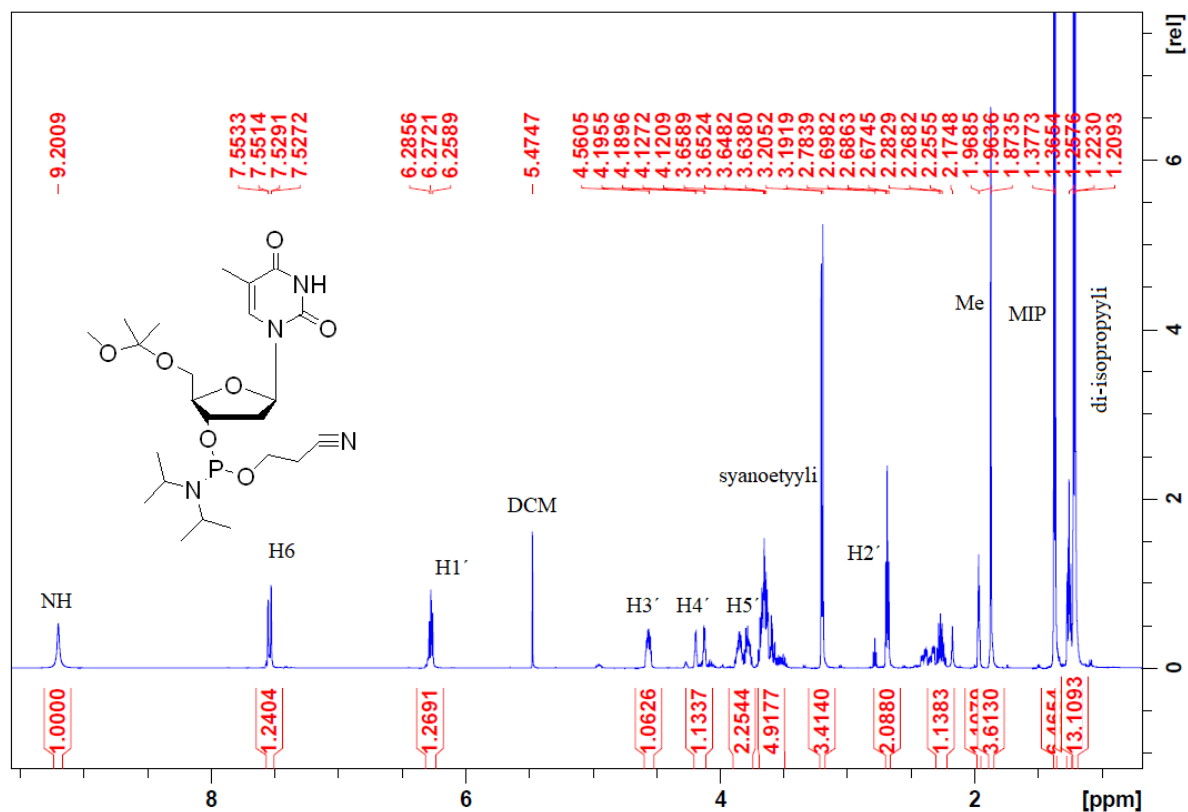
Liite 9. Tetrakis({4-[4-{3-[5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-3'-O-7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-diooksoheptanoyyli]tymidiini-(1H-1,2,3-triatsoli-1-yl)metyyli]fenoksi]metyyli}metaani (8) $^1\text{H-NMR}$



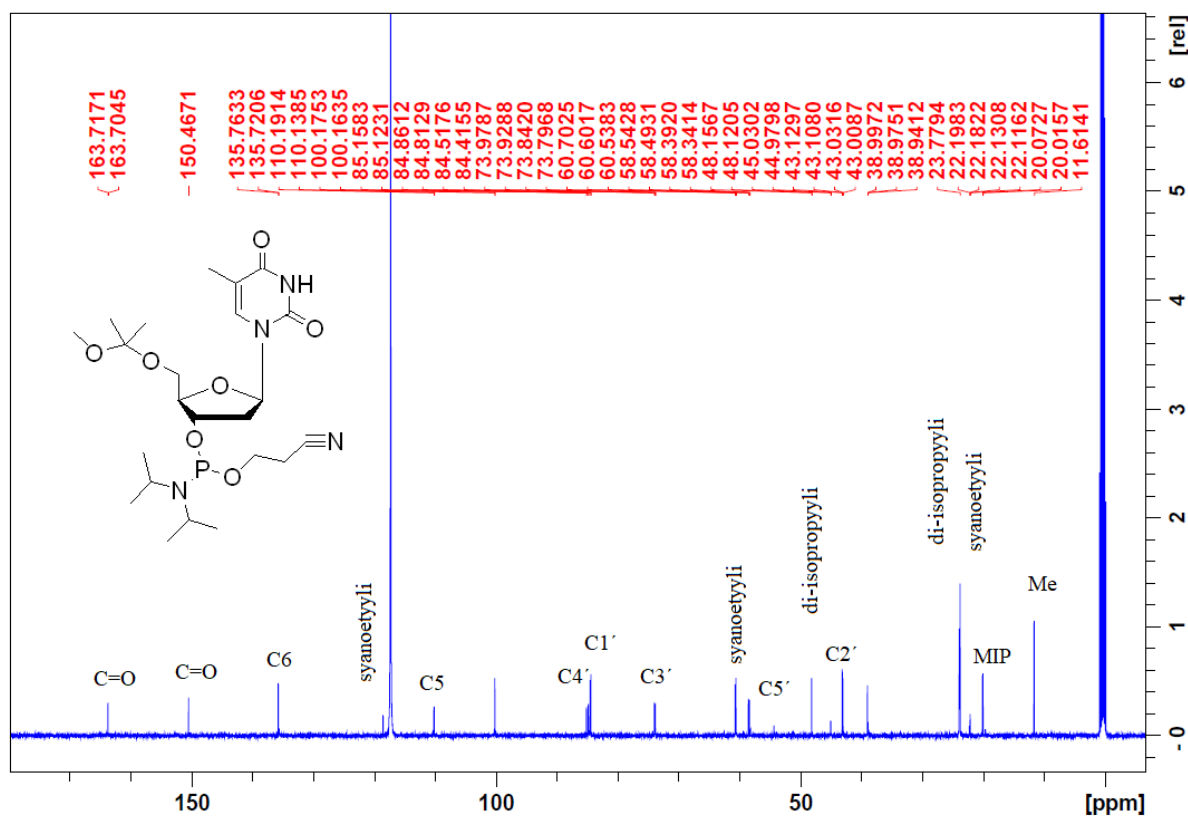
Liite 10. Tetrakis({4-[4-{3-[5'-O-(4,4'-Dimetoksitriityli)-3'-O-7-(but-3-yn-1-yyliamino)-4,7-diooksoheptanoyyli]tymidiini-(1H-1,2,3-triatsoli-1-yl)metyyli]fenoksi]metyyli}metaani (8) $^{13}\text{C-NMR}$



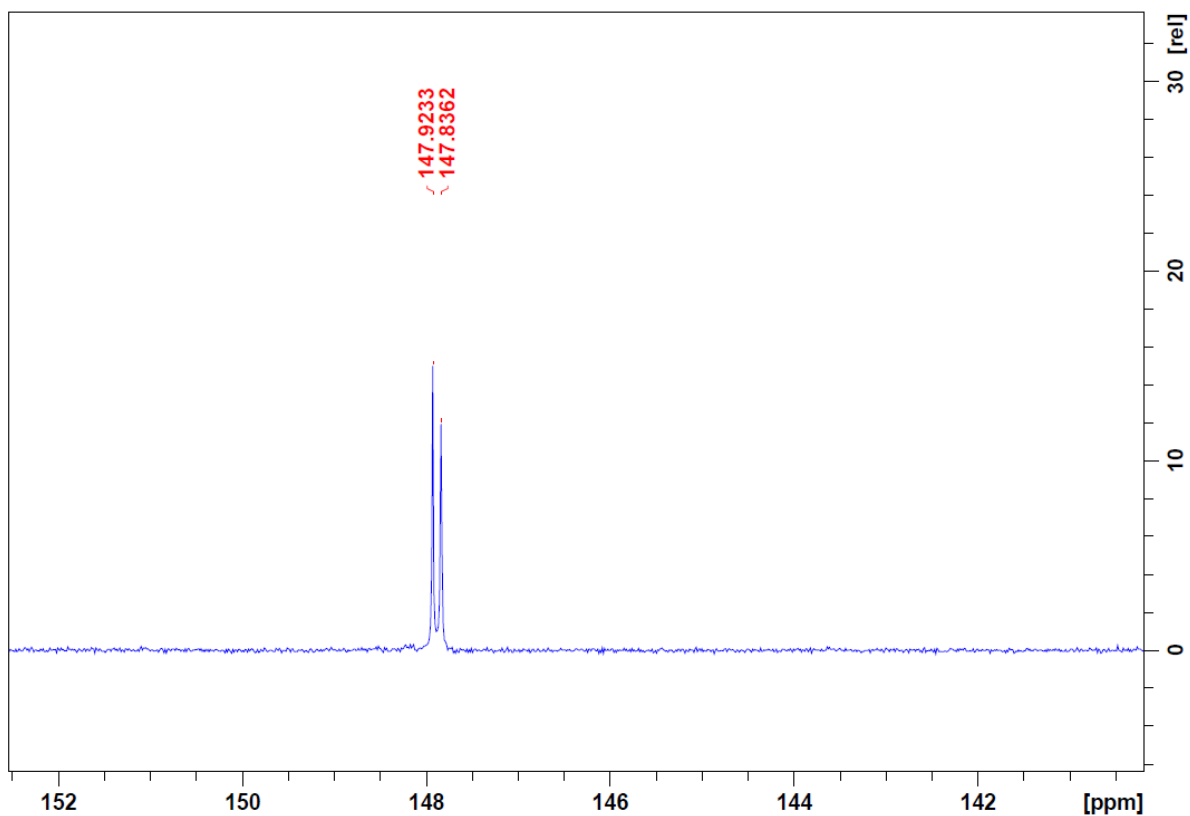
Liite 11. 5'-O-(2-metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-O-[(2-syanoetyyli)- (N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitti (13) ¹H-NMR.



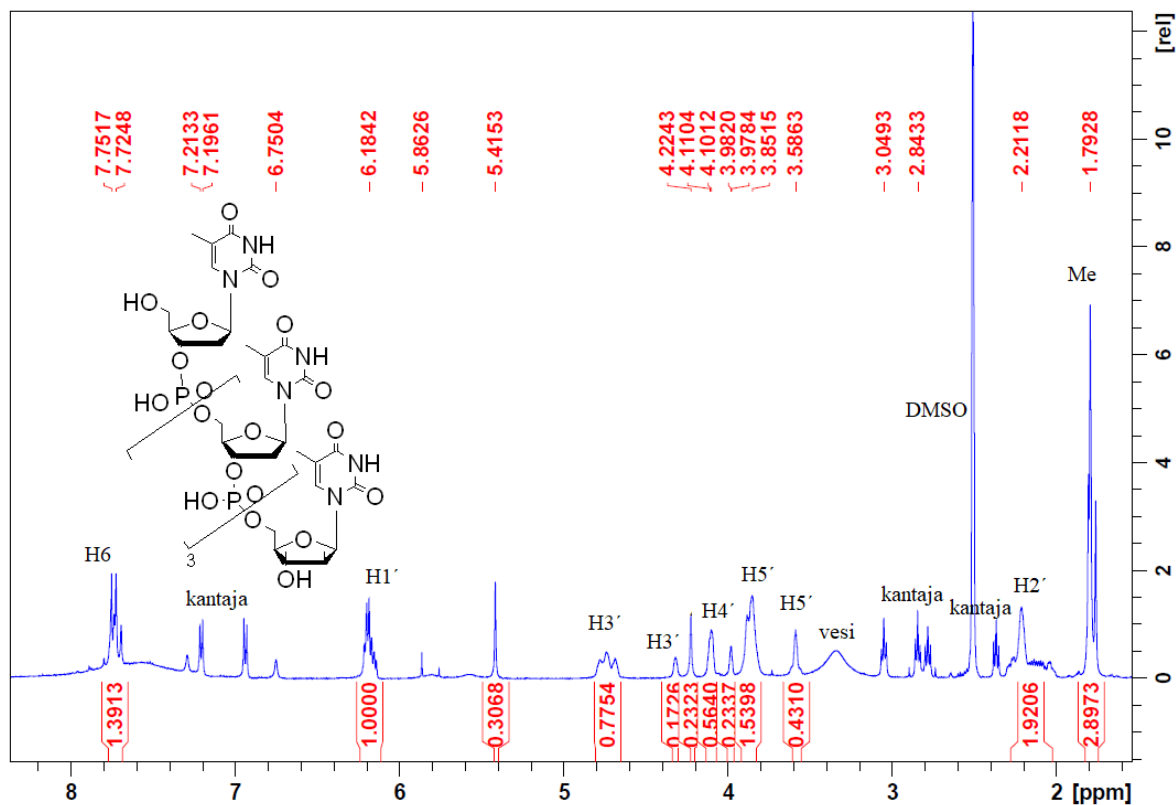
Liite 12. 5'-O-(2-metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-O-[(2-syanoetyyli)- (N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitti (13) ¹³C NMR.

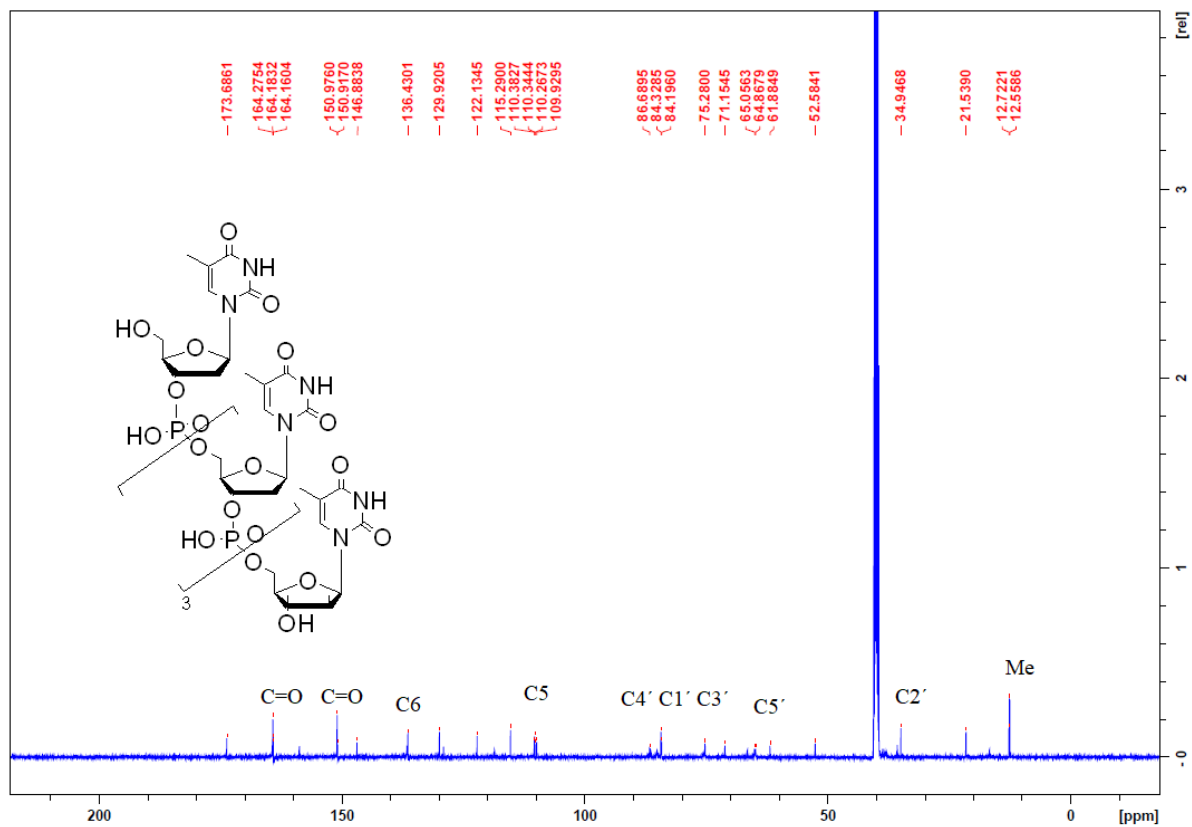


Liite 13. 5'-O-(2-metoksi-isopropyyli)tymidiini-3'-O-[(2-syanoetyyli)- (N,N-di-isopropyyli)]fosforamidiitti (13) ^{31}P NMR.



Liite 14. Tymidiinipentameeri (T₅; 16) ^1H NMR.



Liite 15. Tymidiinipentameeri (T₅; **16**) ¹³C NMR.Liite 16. Tymidiinipentameeri (T₅; **16**) ³¹P NMR.