



**TURUN  
YLIOPISTO**

## **Oxyma-aktivoitunut fosfotriesterit oligonukleotidien liuosfaasisynteesissä**

Juulia Tuominen

Kemian laitos/Lääkekehityksen kemia

pro gradu -tutkielma

Kemian laitos

Turun yliopisto

Huhtikuu 2025

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

**Oppiaine:** Bio-orgaaninen kemia, lääkekehityksen kemia

**Tekijä:** Juulia Tuominen

**Otsikko:** Oligonukleotidien synteesi fosfotriesterimenetelmällä liuoksessa

**Ohjaaja(t):** Yliopistolehtori Mikko Ora, professori Pasi Virta

**Sivumäärä:** 38 sivua

**Päivämäärä:** 8.4.2025

Tällä hetkellä oligonukleotideja syntetisoidaan automatisoidusti kiinteällä kantajalla fosforamidiittimenetelmällä, joka vaatii suuren ylimäärän liuottimia ja reagensseja. Terapeuttisten oligonukleotidien kysynnän kasvaessa kasvaa samalla tarve kestävämmille synteessimenetelmille sekä suuremman mittakaavan synteeseille. Eräs mahdollinen vaihtoehto näiden kysymysten ratkaisemiseksi on liuosfaasisynteesi. Fosfotriesterimenetelmä on liuosfaasimenetelmistä käytetyin ja sen etuna fosforamidiittikemiaan verrattuna on, ettei erillistä hapetusvaihetta tarvita.

Oligonukleotidien fosfotriesterimenetelmässä hyödynnetään P(V)-kemialla käyttäen rakenneyksikköinä nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfodiesteriä, jotka voidaan aktivoida aryyylisulfonylikloridi, -imidatsoli, -triatoli tai -tetratsoli -kondensointireagenssilla nukleofiilisen katalyytin, kuten *N*-metyyli-imidatsolin (NMI) läsnä ollessa. Kondensointireagenssit voivat kuitenkin aiheuttaa 5'-hydroksyyli-ryhmän sulfonaatiota ja modifikaatioita guaniinissa, jolloin saannot jäävät alhaisiksi. Vaihtoehtoisesti nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfodiesterirakenneyksiköt voidaan muuttaa esiaktivoituiksi 1-hydroksibentsotriatsolyli triestereiksi (HOBt). HOBt:n käytön vahvuutena on fosforyloinnin ja kytkennän tehokkuus. Menetelmä ei myöskään vaadi HOBt-aktivoidun 3'-*O*-aryylifosfotriesterin eristystä ja puhdistusta. HOBt on kuitenkin herkästi räjähtävä, mikä hankaloittaa sen käsittelyä ja kuljetusta.

Etyyli-2-syano-2-(hydroksi-imino)asettaattia (Oxya) on käytetty peptidisyntetiikassa vaihtoehtoisena aktivointireagenssina HOBt:n sijaan. Sen helppo käsiteltävyys ja saatavuus tekevät siitä HOBt:ia houkuttelevamman aktivointireagenssin. Huomionarvoista on, että Oxyaa ei ole aikaisemmin käytetty nukleotidien kytkennöissä.

Pro gradu -projektissa käytettiin aktivointireagenssina 1-hydroksibentsotriatsolia vihreämpää Oxyaa valmistettaessa 3'-*O*-silyyli- ja 3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-asettaali-suojatut dimeeriset kloorifenyylifosfotriesterit liuoksessa. Lisäksi valmistettiin dinukleosidifosfotriesterien fosforamidiittijohdannaiset, joita on mahdollista käyttää rakenneyksikköinä pidempien nukleotidiketjujen valmistuksessa. Myös terameerisen fosfotriesterin syntetisoimista yritettiin oxya-aktivointia käyttäen.

**Avainsanat:** Oxya, oligonukleotidi, liuosfaasisynteesi, fosfotriesterimenetelmä

# Sisällys

<b>1.</b>	<b>Johdanto</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Oligonukleotidien synteesi fosfotriesterimenetelmällä</b> .....	<b>2</b>
1.1.1	Fosfaatin suojaryhmät.....	3
1.1.2	Kondensointireagenssit.....	7
1.1.3	Synteesi liukoisella kantajalla.....	9
<b>1.2.</b>	<b>Oxyrna ja HOBt aktivointireagensseina</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3.</b>	<b>Yhteenvedo</b> .....	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>Tulokset ja niiden tarkastelu</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Synteetit</b> .....	<b>16</b>
2.1.1	Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatin (10) ja bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (9) synteesi.....	17
2.1.2	Dimeeristen fosfotriesterien synteetit.....	18
2.1.3	Dinukleosidifosfotriesterien fosforamidiitti-johdannaisten synteetit.....	20
2.1.4	Tetrameerisen fosfotriesterin synteesi.....	22
<b>2.2</b>	<b>Kinetiikka</b> .....	<b>23</b>
2.2.1	Kytkenän kineettinen seuranta.....	23
2.2.2	Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatin (10) ja bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (9) säilyvyys.....	24
<b>2.3</b>	<b>Johtopäätökset</b> .....	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>Kokeelliset menetelmät</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Yleiset menetelmät</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Synteetit</b> .....	<b>27</b>
3.2.1	Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatti (10).....	27
3.2.2	Bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatti (9).....	27
3.2.3	<i>N</i> <sup>6</sup> -Dimetyylibentsoyyli-3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (11e).....	27
3.2.4	<i>N</i> <sup>2</sup> -Isobutyryyli-3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (11g). .....	28
3.2.5	<i>N</i> <sup>4</sup> -Dimethylbenzoyl-3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyylidimetyylisilyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydylyyli -3', 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (11f).....	29

3.2.6	3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyyli-dimetyylisilyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-tymidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11h).....	29
3.2.7	<i>N</i> <sup>6</sup> -Dimetyylibentsoyyli-3'- <i>O</i> -levulinoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-adenylyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11a).....	31
3.2.8	<i>N</i> <sup>4</sup> -Dimetyylibentsoyyli-3'- <i>O</i> -levulinoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-sytydylyyli -3', 5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11b).....	31
3.2.9	<i>N</i> <sup>2</sup> -Isobutyryyli-3'- <i>O</i> -levulinoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-guanylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11c).....	32
3.2.10	3'- <i>O</i> -levulinoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-tymidylyyli-3'5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11d).....	33
3.2.11	<i>N</i> <sup>6</sup> -Dimetyylibentsoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (16a).....	33
3.2.12	<i>N</i> <sup>4</sup> -Dimetyylibentsoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-sytydylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (16b).....	34
3.2.13	<i>N</i> <sup>2</sup> -Isobutyryyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-guanylyyli-3'5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (17)	35
3.2.14	<i>N</i> <sup>6</sup> -Dimetyylibentsoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatin 3'- <i>O</i> -(2-syanoetyyli- <i>N,N</i> -di-isopropylylifosforamidiitti) (12a).....	35
3.2.15	<i>N</i> <sup>4</sup> -Dimetyylibentsoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli)-sytydylyyl-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatin 3'- <i>O</i> -(2-syanoetyyli- <i>N,N</i> -di-isopropylylifosforamidiitti) (12b) .....	36
3.2.16	3'- <i>O</i> -Levulinoyyli-tymidylyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (18).....	37
3.2.17	<i>N</i> <sup>2</sup> -Isobutyryyli-3'- <i>O</i> -levulinoyyli-5'- <i>O</i> -(2-metoksi-propan-2-yyli) suojatun GTTT-tetrameerin kloorifenylylifosfotriesteri (13).....	37
<b>3.3</b>	<b>Kineettiset menetelmät.....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Oxyrna-aktivoitu kytkentä .....	38
3.3.2	HOBt-aktivoitu kytkentä.....	38
<b>4.</b>	<b>Viitteet .....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>Liitteet .....</b>	<b>43</b>

## Lyhenteet

BST = bentseenisulfonyylitriatsoli

BS-teth = bentseenisulfonyylitetratsoli

DCC = *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide = *N,N'*-disykloheksyylikarbodi-imidi

DCM = dichloromethane = dikloorimetaani

DMF = dimetyyliformamidi

HOAt = 1-hydroksi-7-atsabentsotriatsoli

HOBt = 1-hydroksibentsotriatsoli

HOPO = *N*-hydroksi-2-pyridinoni

LPOS = liquid-phase oligonucleotide synthesis = oligonukleotidien liuosfaasisynteesi

MS = mesityleenisulfonyylikloridi

MSI = mesityleenisulfonyyli-imidatsoli

MST = mesityleenisulfonyylitriatsoli

MS-teth = mesityleenisulfonyylitetratsoli

NMI = *N*-metyyli-imidatsoli

PEG = polyetyleeniglykoli

PG = protecting group = suojaryhmä

p-NBST = p-nitrobentseenisulfonyylitriatsoli

SPOS = solid-phase oligonucleotide synthesis = oligonukleotidien kiinteän faasin synteesi

TBAF = tetrabutyyliammoniumfluoridi

TBDMS = *tert*-butyylidimetyylisilyyli

TCA = trichloroacetic acid = trikloorietikkahappo

TEA = trietyyliamiini

TEA 3HF = trietyyliamiini trihydrofluoridi

TEAA = trietyyliammoniumasettaatti

THF = tetrahydrofuraani

TLC = thin layer chromatography = ohutlevykromatografia

TMG = tetrametyyliguanidi

TPS = tri-isopropyylibentseenisulfonyylikloridi

TPS-teth = tri-isopropyylibentseenisulfonyylitetratsoli

TPSI = tri-isopropyylibentseenisulfonyyli-imidatsoli

TSI = p-tolueenisulfonyyli-imidatsoli

TST = p-tolueenisulfonyylitriatsoli

# 1. Johdanto

Oligonukleotideja syntetisoidaan tällä hetkellä automatisoidusti kiinteällä kantajalla (SPOS) fosforamidiittimenetelmällä<sup>1</sup>, jossa sopivasti suojattu nukleosidi-3'-fosforamidiitti liitetään kasvavaan oligonukleotidiketjuun. Fosforamidiittimenetelmässä välituotteena muodostuva fosfiitti (P(III)) hapetetaan fosfaatiksi (P(V)) heti kytkennän jälkeen. Fosforamidiittimenetelmän eräs vahvuus on ylivoimainen kytkennän tehokkuus verrattuna esimerkiksi vetyfosfonaatti- ja fosfotriesterikemiaan sekä kaupallisesti saatavat reagenssit. Oligonukleotidien valmistaminen kiinteällä kantajalla vaatii kuitenkin suuren ylimäärän reagensseja ja liuottimia, ja sen soveltaminen suuremman mittakaavan synteesiin on haastavaa ja kallista.<sup>2</sup> Terapeuttisten oligonukleotidien käyttö yleisempien sairauksien, kuten sydän- ja verisuonisairauksien ja hepatiitti B:n, hoidossa yleistyy jatkuvasti. Terapeuttisten oligonukleotidien kysynnän kasvaessa kasvaa samalla tarve kestävämmille synteesimenetelmille sekä suuremman mittakaavan synteesille.<sup>3</sup>

Eräs mahdollinen vaihtoehto edellä mainittujen haasteiden ratkaisemiseksi on liuosfaasisynteesi (LPOS), joka mahdollistaa huomattavasti pienemmän reagenssi- ja liuotinmäärien käytön,<sup>2</sup> jolloin oligonukleotidien valmistus on halvempaa.<sup>4</sup> Myös kytkennän seuranta NMR-spektroskopisesti on mahdollista. Liuosfaasisynteesissä pyritään yhdistämään kiinteän kantajan ja klassisen liuosfaasisynteesin hyvät puolet käyttämättä liukoista kantajaa, joka mahdollistaa oligonukleotidivälituotteiden eristämisen ilman kromatografiaa yksinkertaisilla uutoilla, saostuksella ja membraanisuodatuksella.<sup>5</sup>

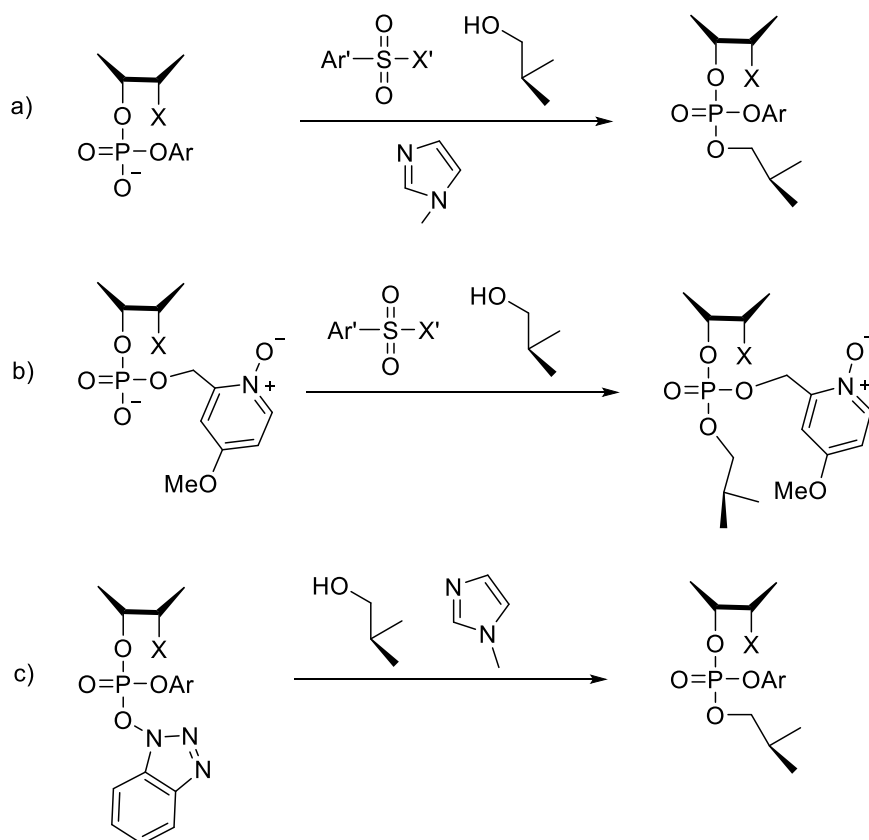
Fosfotriesterimenetelmää on käytetty 1960-luvulta lähtien oligodeoksiribo- ja oligoribonukleotidien valmistuksessa liuoksessa. Fosfotriesterimenetelmä ei vaadi erillistä hapetusvaihtetta. Lisäksi menetelmässä käytetyt rakenneyksiköt ja välituotteet ovat suhteellisen pysyviä. Menetelmä soveltuu myös modifioitujen oligonukleotidien valmistukseen sekä syklisten<sup>6</sup> ja haarautuneiden<sup>7</sup> oligonukleotidien synteesiin. Esimerkiksi oligonukleotidifosforotioaattien stereoselektiivisessä synteesissä on sovellettu P(V)-kemiaa käyttäen 5'-O-asetali- ja 5'-O-dimetoksitriityyli-suojattuja 2'-deoksinukleosideja kiraalisina limoneeniin perustuvina oksatiafosfolaanisulfidijohdannaisina ((+)- ja (-)-Ψ-reagenssit).<sup>8-10</sup> Fosfotriesterimenetelmän haasteina ovat hitaampi kytkentä fosforamidiittimenetelmään verrattuna.<sup>4,5,11</sup>

Pro-gradun kirjallisessa osassa tarkastellaan oligonukleotidien synteesiä fosfotriesterimenetelmällä liuoksessa sekä menetelmässä käytettyjä fosforylointireagensseja, fosforin suojaryhmiä, liukoisia kantajia ja fosfotriesterin aktivointitapoja. Pro-gradu-tutkielman kokeellisessa osassa kehitettiin fosfotriesterimenetelmä, joka perustuu P(V)-oxyma-aktivoitujen nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfotriesterirakenneyksiköiden käyttöön kytkentäreaktiossa.

### 1.1.Oligonukleotidien synteesi fosfotriesterimenetelmällä

Vuonna 1955 Michelson ja Todd fosforyloivat 5'-*O*-asetyylylimidiiniin 3'-bentsyylifosforokloridaatiksi, joka kytkettiin 3'-*O*-asetyylylimidiiniin kuivan pyridiinin ja asetonitriilin liuoksessa lutidiinin läsnä ollessa.<sup>12</sup> Menetelmä sai myöhemmin nimekseen fosfotriesterimenetelmä.

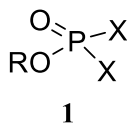
Fosfotriesterimenetelmässä voidaan käyttää rakenneyksikköinä 5'-*O*- ja nukleoemäs-suojattuja nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfodiesteriä, jotka aktivoidaan aryylisulfonyylikloridi, -imidatsoli, -triatoli tai -tetratsoli -kondensointireagenssilla nukleofiilisen katalyytin, kuten *N*-metyyliimidatsolin (NMI) läsnä ollessa (Kaavio 1a). Myös katalyyttisesti aktiivista fosfaatin suojaryhmää, esimerkiksi 4-metoksi-1-oksido-2-pikolyyliä, voidaan käyttää (Kaavio 1b). Vaihtoehtoisesti nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfodiesterirakenneyksiköt voidaan esiaktivoida aryyli(bentsotriatsoyyli)fosfinaatilla aktiivisiksi bentsotriatsoyylifosfotriestereiksi (Kaavio 1c).<sup>5</sup> Fosfaatissa käytettävä suojaryhmä estää pyrofosfaatin muodostumisen sekä negatiivisen varauksen akkumuloitumisen.<sup>13</sup>



Kaavio 1. Kytöntämenetelmät oligonukleotidien synteesissä fosfotriesterimenetelmällä. X = H tai O-PG (Protecting group = suojaryhmä) ja X' = imidatsoli, triatsoli, tetratsoli tai Cl.

### 1.1.1 Fosfaatin suojaryhmät

Fosfotriesterimenetelmässä fosfaatin suojaryhminä on käytetty mm. 2-syanoetyyliä<sup>14</sup>, 2,2,2-trikloorietyyliä<sup>15</sup>, fenyylillä, 4-metoksi-1-oksido-2-pikolyyliä<sup>16</sup> ja erilaisia aryyliiryhmiä<sup>17</sup>. 3'-OH-ryhmä fosforyloidaan tavallisesti aryyli- tai syanoetyylifosforodikloridaatilla (**1a-e**), -fosforodi-imidatsolilla (**1f**)<sup>18</sup> ja -fosforodi-(1,2,4-triatsolilla) (**1g ja -h**)<sup>19</sup> (Kuva 1).<sup>13</sup>



- |                                                           |                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1a:</b> X = Cl; R = CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN | <b>1e:</b> X = Cl; R = 2-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl                                |
| <b>1b:</b> X = Cl; R = CH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>   | <b>1f:</b> X = (CH) <sub>3</sub> N <sub>2</sub> ; R = CH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>   |
| <b>1c:</b> X = Cl; R = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>      | <b>1g:</b> X = (CH) <sub>2</sub> N <sub>3</sub> ; R = 4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl |
| <b>1d:</b> X = Cl; R = 4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl | <b>1h:</b> X = (CH) <sub>2</sub> N <sub>3</sub> ; R = 2-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl |

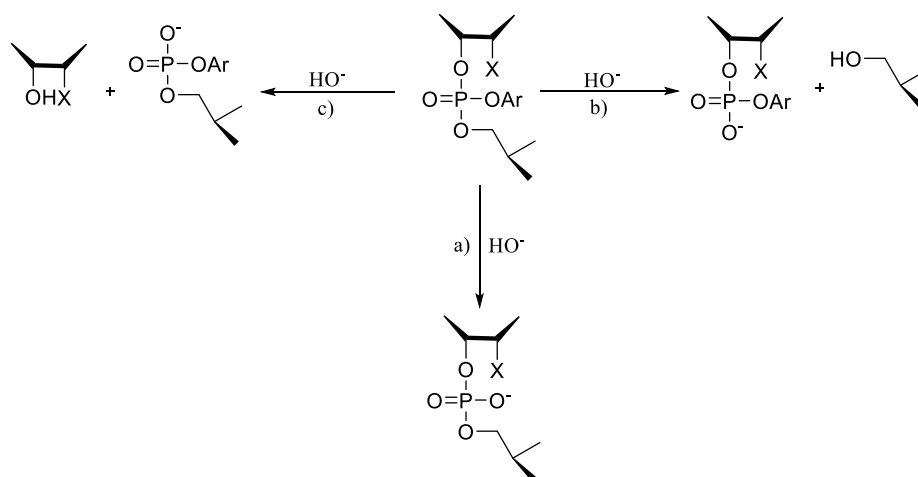
**Kuva 1.** Fosforylintireagensit **1a-h**.

Fosfaatin suojaryhmän tulee olla stabiili poistettaessa 5'-OH:n happolabiili suojaryhmä. Toisaalta fosfaatin suojaryhmän tulee olla helposti irrotettavissa synteesin viimeisenä vaiheena.<sup>17</sup> Michaelsonin ja Toddin menetelmässä fosfaatin suojaryhmänä on käytetty bentsyyliä, joka irtoaa emäksisissä olosuhteissa natriumhydroksidi-käsittelyllä.<sup>12</sup>

Fosforamidiittimenetelmässä yleisesti käytetyn fosfaatin suojaryhmän, 2-syanoetyylin, irrottamiseen käytetään konsentroitua ammoniakkin vesiliuosta. Sen on todettu olevan kuitenkin herkkä ennenaikaiselle irtoamiselle syntetisoitaessa oligonukleotideja liuoksessa.<sup>14</sup> 2,2,2-Trikloorietyylin on todettu olevan riittävän stabiili, mutta suojaryhmän poiston jälkeinen saanto jää alhaiseksi.<sup>20</sup> Fosfaatin suojaryhmäksi onkin vakiintunut 2-kloorifenyyl, joka mahdollistaa stabiilien välituotteiden muodostumisen ja puhdistamisen. Kytöntöjen jälkeen 2-kloorifenyyl poistetaan oksiimikäsitteilyllä.<sup>21,13</sup>

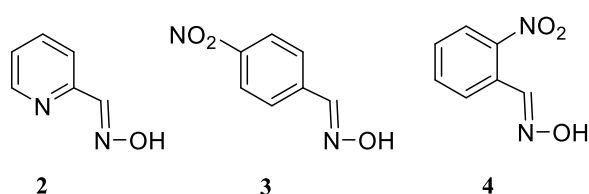
Esimerkiksi dinukleosidimonofosfaatin synteesissä on käytetty 5'-*O*-ketaali-suojattua tymidiiniä, joka fosforyloitiin fenyylifosforodikloridaatilla (**1c**). Muodostunut nukleosidi-3'-*O*-fenyylifosfodiesteri kytkettiin 3'-*O*-asetyylitymidiinin kanssa vedettömässä asetonitriilissä 2,6-lutidiinin läsnä ollessa. Saannoksi raportoitiin 70 %. 3'-*O*-Asetyyli poistettiin NaOH-käsittelyllä (0,1 M; 5 min) ja 5'-OH:n ketaalisuojaus muurahaishappokäsittelyllä. Fosfaatin suojaryhmänä toimineen fenyylin todettiin olevan pysyvä näissä olosuhteissa. Lopulta fenyyl poistettiin NaOH-käsittelyllä (0,1 M; 6 h).<sup>17</sup> Pidempien oligonukleotidien synteesissä on havaittu kilpailevana sivureaktiona myös P-O3'- (Reitti c) ja P-O5'-sidoksen (Reitti b) katkeaminen, poistettaessa fenyylisuojaryhmiä emäksisissä olosuhteissa natriumhydroksidilla (kaavio 2).<sup>22</sup>

2- ja 5-halogeenisubstituoidut fenyylisuojaryhmät ovat substituomatonta fenyylä parempia lähteviä ryhmiä. Kun fosfaatin suojaryhmänä käytetään halogeenisubstituoitua fenyylä, P-O3'- ja P-O5'-sidosten katkeaminen vähentyy kuudesosaan ja aryylisuojaryhmän irtoaminen nopeutuu 22 kertaisesti.<sup>22</sup> 2-kloorifenyyl on yleisesti käytetty fosfaatin suojaryhmä fosfotriesterimenetelmissä.<sup>13</sup>



**Kaavio 2.** P-O3'- ja P-O5'-sidosten katkeaminen (Reitit c ja b) fenyylisuojarahmää poistettaessa. Ar = Fenyylä (Ph), X = H tai OH.

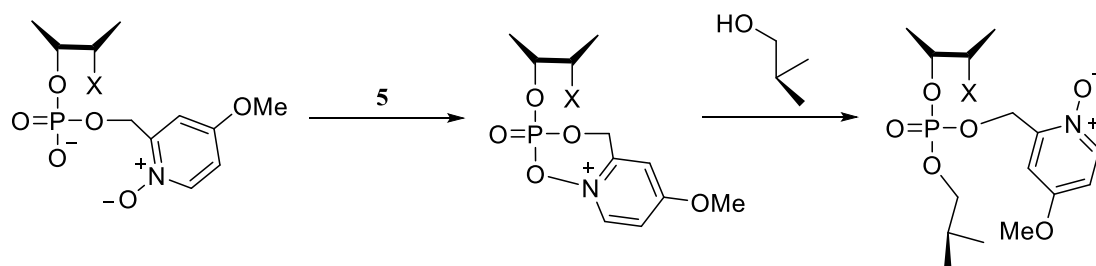
P-O3'- ja P-O5'-sidosten katkeamisen minimoimiseksi on pyritty löytämään tehokkaampia ja selektiivisempiä menetelmiä aryylisuojarahmän poistamiseksi.<sup>23,24,24</sup> Vaihtoehdoksi hydroksidi-nukleofiilille on ehdotettu pyridiini-2-aldoksiimia (2), 4-nitrobentsaldoksiimia (3) ja 2-nitrobentsaldoksiimia (4) (Kuva 2). Tutkittaessa oksimien kykyä poistaa o/p-kloorifenyylisuoja *N*<sup>1</sup>-*N*<sup>1</sup>-*N*<sup>3</sup>-*N*<sup>3</sup>-tetrametyyliguanidinin (TMG) läsnä ollessa veden ja dioksaanin seoksessa (1:1, v:v), 2-nitrobentsaldoksiimin (4) ja pyridiini-2-aldoksiimin (2) todettiin toimivan tehokkaimmin. Näistä 2-nitrobentsaldoksiimi (4) havaittiin tutkituista oksimeista käyttökelpoisimmaksi, sillä se reagoi nopeimmin, eikä fosfotriesterisidoksen katkeamista havaittu (< 0,1 %). Lisäksi reagenssi voidaan poistaa liuksesta uuttamalla.<sup>24</sup>



**Kuva 2.** Pyridiini-2-aldoksiimi (2), 4-nitrobentsaldoksiimi (3) ja 2-nitrobentsaldoksiimi (4).

Fosfaatin suojarahmä voi olla myös katalyyttisesti aktiivinen. Kaaviossa 3 on esitetty 4-metoksi-1-oksido-2-pikolyylifosfaattidiesterin ja nukleosidin 5'-OH:n välinen kytkentä aryylisulfonyylikloridin (5) toimiessa kondensointireagenssina ja fosfaatin suojarahmänä käytetyn heterosyklisen amiinin toimiessa molekyylin sisäisenä katalyyttinä. Katalyyttisesti aktiiviset suojarahmät nopeuttavat kytkentää perustuen naapuriryhmän osallistumiseen.<sup>25</sup>

Kondensaatioissa katalyyttinen suojaryhmä muodostaa reaktiivisen syklisen intermediaatin (Kaavio 3).<sup>16</sup>



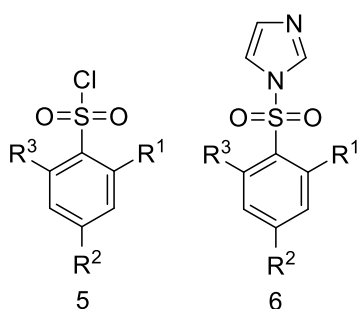
**Kaavio 3.** Katalyyttisesti aktiivinen suojaryhmä, 1-oksido-4-metoksi-2-pikolyyli. X = H tai O-PG.

Verrattaessa 1-metyyli-2-(2-hydroksifenyyl)imidatsoli-, 1-metyyli-2-(4-hydroksifenyyl)imidatsoli-, *p*-kloorifenyyl- ja *o*-kloorifenyyl-suojattujen 5'-O-DMTr-tymidiini-3'-O-fosfodiesterien kytkentää mesityleenisulfonyylikloridin (MS) ja NMI:n läsnä ollessa, havaittiin 1-metyyli-2-(2-hydroksifenyyl)imidatsoli-suojatun nukleosidifosfodiesterin olevan huomattavasti *p*-kloorifenyyl-suojattua reaktiivisempi. Reaktiota seurattiin RP-HPLC:n avulla. Toisaalta 1-metyyli-2-(4-hydroksifenyyl)imidatsoli-suojatun nukleosidifosfodiesterin reaktiivisuus oli vastaava kuin *p*-kloorifenyyl-suojatun. Kun reaktioolosuhteista poistettiin NMI, *p*-kloorifenyyl-suojatun nukleotidin reaktiivisuus laski 90-kertaisesti. Vastaavaa muutosta reaktiivisuudessa ei havaittu 1-metyyli-2-(2-hydroksifenyyl)imidatsoli-suojatun nukleotidin kanssa. Tuloksista voidaan päätellä, että 1-metyyli-2-(2-hydroksifenyyl)imidatsoli osallistuu reaktion nopeutta rajoittavaan vaiheeseen intramolekulaarisesti ja on intermolekulaarista katalyyttiä tehokkaampi. Lisäksi voidaan päätellä, että katalyytin N-hydroksyyli-ryhmän on oltava orto-asemassa osallistuakseen reaktioon. Suojaryhmä voidaan poistaa ammoniumhydroksidi- tai tetrametyyliquadinium 2-pyridinialdoksiimilla.<sup>25</sup>

1-oksido-4-metoksi-2-pikolyylin lisäksi myös 4-metoksi-2-pikolyylin ja 1-oksido-2-pikolyylin on todettu toimivan katalyyttisesti aktiivisina fosfaatin suojaryhminä. Näin suojattujen nukleosidifosfodiesterien kytkentää immobilisoidun 5'-OH-nukleosidin kanssa pyridiinissä sopivan kondensointireagenssin läsnä ollessa on verrattu 1-metyyli-2-(2-hydroksifenyyl)imidatsoli- ja *o*-kloorifenyyl-suojattujen nukleosidifosfodiesterien vastaaviin reaktioihin. Reaktioaika oli 0,5-0,75 minuuttia, riippuen kondensointireagenssista, kun katalyyttisesti aktiivisena suojaryhmänä käytettiin 1-oksido-4-metoksi-2-pikolyyliä. Vastaava reaktio 1-metyyli-2-(2-hydroksifenyyl)imidatsolia käyttäen kesti noin kaksi minuuttia.<sup>16</sup>

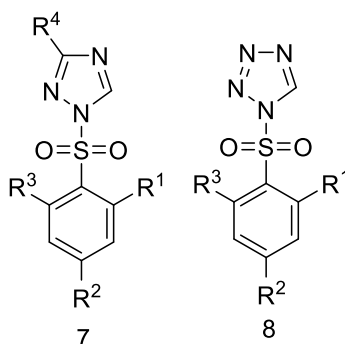
### 1.1.2 Kondensointireagenssit

Fosfotriesterimenetelmässä nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfaattidiesterin ja 5'-OH:n välisessä kytkennässä käytetään kondensointireagenssia yhdessä nukleofiilisen katalyytin kanssa. Yleisimmin käytetty nukleofiilinen katalyytti on *N*-metyyli-imidatsoli (NMI). Myös 4-(dimetyloamino)pyridiiniä ja 5H-tetratsolia on käytetty.<sup>11</sup> Kondensointireagenssina nukleosidifosfodiesterin aktivointiin on käytetty aryylisulfonyyliklorideja (**5a**, **b**), kuten triisopropylibentseenisulfonyylikloridia<sup>26</sup> (TPS; **5a**) ja mesityleenikloridia (MS; **5b**)<sup>27</sup>. Sitä vastoin laajalti käytetty fosfaatin kondensointireagenssi disykloheksyylikarbodi-imidi<sup>28</sup> (DCC) ei kykene aktivoimaan fosfodiesteriä. Aryylisulfonyylikloridit (**5a**, **b**) voivat aiheuttaa vapaan 5'-OH:n sulfonaatiota, jolloin saanto jää alhaiseksi.<sup>29</sup> Myös aryylisulfonyylin imidatsoli- (**6a-c**), triatsoli- (**7a-e**) ja tetratsolijohdannaisten (**8a-c**) käyttökelpoisuutta on tutkittu kondensointireagensseina (kuva 3).<sup>13,29-31</sup>



**5a:** R1 = R2 = R3 = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
**b:** R1 = R2 = R3 = CH<sub>3</sub>

**6a:** R1 = H; R2 = CH<sub>3</sub>; R3 = H  
**b:** R1 = R2 = R3 = CH<sub>3</sub>  
**c:** R1 = R2 = R3 = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>



**7a:** R1 = H; R2 = CH<sub>3</sub>; R3 = R4 = H  
**b:** R1 = R2 = R3 = CH<sub>3</sub>; R4 = H  
**c:** R1 = R2 = R3 = R4 = H  
**d:** R1 = H; R2 = NO<sub>2</sub>; R3 = R4 = H  
**e:** R1 = R2 = R3 = CH<sub>3</sub>; R4 = NO<sub>2</sub>

**8a:** R1 = R2 = R3 = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
**b:** R1 = R2 = R3 = CH<sub>3</sub>  
**c:** R1 = R2 = R3 = H

**Kuva 3.** Kondensointireagenssit **5-8**

Aryylisulfonyyli-imidatsolit (**6a-c**), kuten p-tolueenisulfonyyli-imidatsoli (TSI; **6a**), mesityleenisulfonyyli-imidatsoli (MSI; **6b**) ja tri-isopropylibentseenisulfonyyli-imidatsoli (TPSI; **6c**), on todettu käyttökelpoisiksi kondensointireagensseiksi kytkentäreaktiossa. Käytettäessä kahta ekvivalenttia TSI-, MSI- ja TPSI- kondensointireagenssia (**6a-c**) 3'-hydroksyyli-ryhmän ja 5'-fosforyloidun nukleotidin välinen kytkentä on kuitenkin varsin hidas vastaaviin klorideihin (**5a, b**) verrattuna. Klorideihin (**5a, b**) verrattuna aryylisulfonyyli-imidatsolien (**6a-c**) etuna kuitenkin on, että aryylisulfonyyli-imidatsolit (**6a-c**) eivät aiheuta vapaan 5'-OH:n sulfonaatiota.<sup>30</sup> Aryylisulfonyyli-imidatsolien (**6a-c**) lisäksi vastaavia triatsoli- (**7a-e**) ja tetratsoli-johdannaisia (**8a-c**) on tutkittu kondensointireagensseina.<sup>29,31</sup>

*Narang työryhmineen* on tutkinut aryylisulfonyyli-1,2,4-1*H*-triatsolien (**7a-e**) kykyä toimia kondensointireagenssina 5'-*O*-monometoksitriptyyli-tymidiini-3'-*O*-p-kloorifenyylifosfaatin ja 3'-*O*-asetyyli-tymidiinin välisessä kytkennässä. Aryylisulfonyylien 1,2,4-1*H*-triatsolit (**7a-e**) voidaan valmistaa helposti ja lähes kvantitatiivisesti vastaavista aryylisulfonyyliklorideista (**6a-c**) ja (1*H*)-1,2,4-triatsolista kloroformissa trietyyliamiinin läsnä ollessa. Käytettäessä bentseenisulfonyylitriatsolia (BST; **7c**), p-tolueenisulfonyylitriatsolia (TST; **7a**) ja mesityleenisulfonyylitriatsolia (MST; **7b**) kondensointireagenssina 5'-*O*-MMTr-tymidiini-3'-*O*-p-kloorifenyylifosfaatin ja 3'-*O*-asetyyli-tymidiinin kytkennässä saanto oli 78–85 % reaktioajan ollessa 38–48 h. p-Nitrobentseenisulfonyylitriatsolin (p-NBST; **7d**) käyttö kondensointireagenssina johti 75 %:n saantoon 24 tunnissa. Kytkentä TPS:llä (**5a**) 20 tunnissa jäi saannoltaan huomattavasti triatsoleja (**7a-e**) alhaisemmaksi (18–65 %). Aryylisulfonyylitriatsolien (**7a-e**) käyttö kondensointireagenssina di-, tri- ja heksanukleotidien synteesissä johti 50–80 %:n saantoon. Aryylisulfonyyli-1,2,4-1*H*-triatsolien (**7a-e**) aktivoima kytkentä on lähes yhtä nopea kuin vastaavien kloridien (**5a, b**), mutta johtaa parempaan saantoon. Puriineja sisältävän sekvenssin kytkennässä saannot ovat jääneet alhaisiksi.<sup>29</sup>

Aryylisulfonyyli-1*H*-tetratsolien (**8a-c**) on todettu toimivan kytkentäreaktion kondensointireagenssina aryylisulfonyyli-1,2,4-1*H*-triatsoleja (**7a-d**) ja aryylisulfonyyliklorideja (**5a, b**) tehokkaammin. Kun 5'-*O*-DMTr-nukleosidi 3'-(p-kloorifenyylifosfaatti ja 3'-*O*-bentsoyyli-nukleosidin annettiin reagoida kuivassa pyridiinissä käyttäen tri-isopropylibentseenisulfonyylitetratsolia (TPS-teth; **8a**), mesityleenisulfonyylitetratsolia (MS-teth; **8b**) tai bentseenisulfonyylitetratsolia (BS-teth; **8c**)

kondensointireagenssina, kytkennän saanto oli 74–85 % ja reaktioaika 0,5–1 h. Aryylisulfonyyli-1*H*-tetratsolien (**8a-c**) todettiin kuitenkin olevan melko labiileja.<sup>31</sup>

Aryylisulfonyylitriatsoleista (**7a-e**) poikkeuksellisen tehokas kondensointireagenssi on 1-(mesityleeni-2-sulfonyyli)-3-nitro-1*H*-triatsoli (MSNT; **7e**), joka muiden aryylisulfonyylitriatsolien tapaan (**7a-e**), ei aiheuta vapaan 5'-OH:n sulfonaatiota. Kytkentä on verrattain nopea ja saanto aryylisulfonyyli-1*H*-tetratsolien (**8a-c**) tasoa, minkä lisäksi MSNT (**7e**) on myös suhteellisen stabiili.<sup>23,32</sup> MSNT:n (**7e**) on kuitenkin havaittu aiheuttavan guaniinin O6:n korvautumista 3-nitro-1,2,4-triatso-1-yyllillä guaniinin 5'-OH:n ja nukleosidin välisessä kytkennässä.<sup>33</sup> Tästä huolimatta MSNT (**7e**) on nykyään fosfotriesterimenetelmässä yleisimmin käytetty kondensointireagenssi.<sup>34</sup>

### 1.1.3 Synteesi liukoisella kantajalla

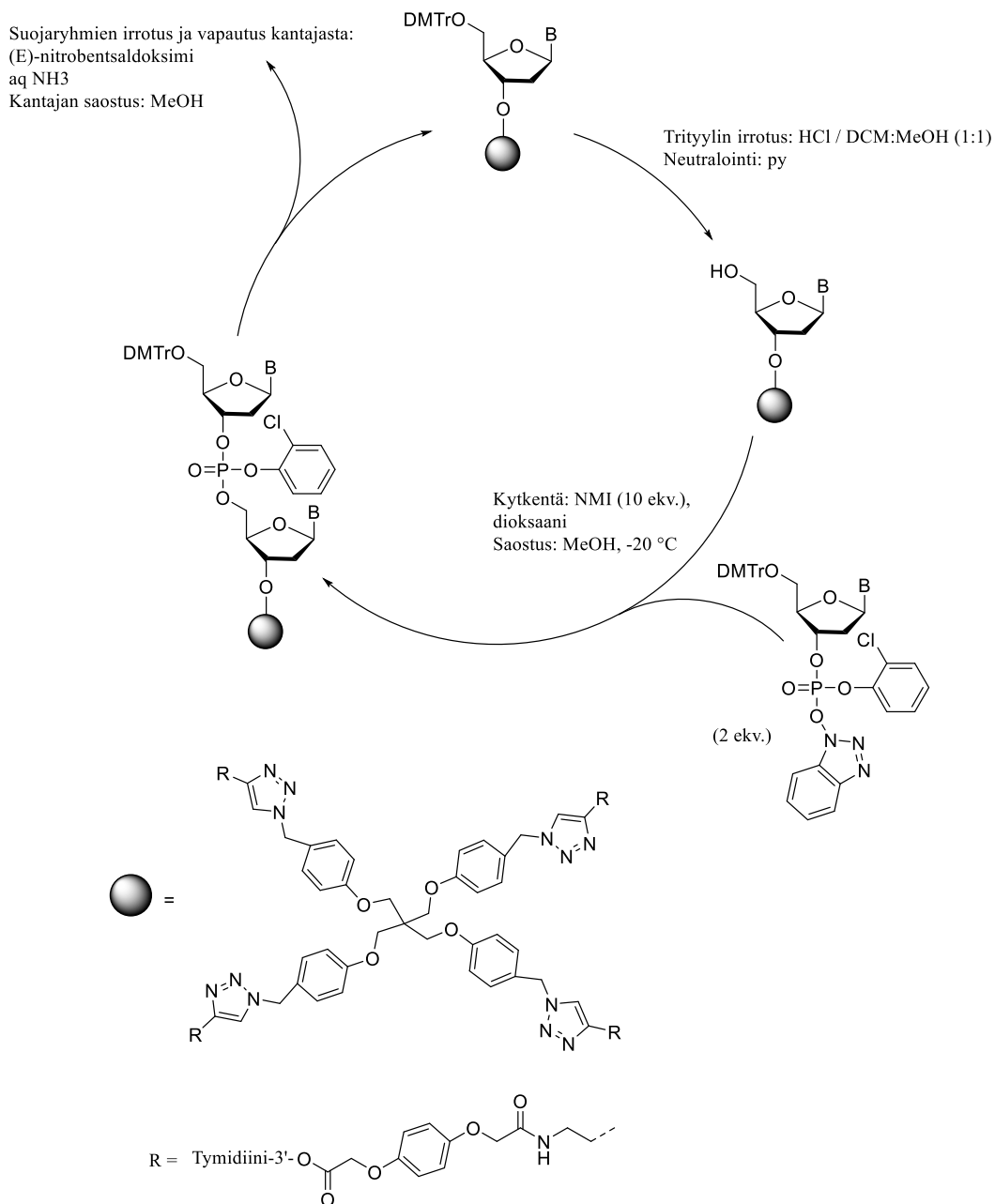
Oligonukleotidien synteesi voidaan suorittaa fosfotriesterimenetelmällä myös liukoisella kantajalla. Liukoista kantajaa käytettäessä välituotteet ja lopputuote voidaan eristää esimerkiksi uuttamalla, saostamalla tai membraanisuodattamalla.<sup>5</sup>

Oktameerinen 5'-TAGCGCTA-3' nukleotidi on syntetisoitu fosfotriesterimenetelmällä käyttäen polyetyleeniglykolia (PEG) liukoisena kantajana (kaavio 4). Synteesin kulkua seurattiin NMR-spektroskopisesti. 5'-*O*-DMTr-2'-deoksinukleosidi kiinnitettiin kantajaan sukkinnaatti-linkkerin avulla. Kantajaan sidotun nukleosidin 5'-OH detrityloitiin trikloorietikkahapolla (TCA) dikloorimetaanissa (DCM) ja muodostunut tuote eristettiin saostamalla dietyylieetteristä (Et<sub>2</sub>O) ja uudelleensaostamalla dikloorimetaanin ja dietyylieetterin seoksesta (9:1, v:v). 5'-DMTr-*O*-nukleosidi-3'-(2-kloorifenyylifosfaatti) kytkettiin pyridiini ja 2,6-lutidiinin seoksessa kasvavaan oligonukleotidiketjuun käyttäen MSNT:tä (**7e**) kondensointireagenssina ja NMI:tä nukleoofiilisenä katalyyttinä. Kunkin kytkennän jälkeen tuote saostettiin etanolista (EtOH). Reagoimaton tuote asetyloitiin pyridiinissä, jonka jälkeen tuote saostettiin DCM/Et<sub>2</sub>O-seoksesta. Kytkentöjen saanto oli keskimäärin 97 % ja kokonaissaanto 7 %. Isobutyryyli-suojatun deoksiguanosiinin tapauksessa kytkennässä havaittiin MSNT-käsittelyn aikana sivureaktio, jossa MSNT:n (**7e**) 3-nitro-1,2,4-triatso-1-yyli korvaa O6:n.<sup>33</sup>

*o*-kloorifenyylisuojarahmät poistettiin syn-pyridini-2-karbaldoksiimilla dioksaanin ja veden seoksessa. Nukleoemästen suojarahmien irrotus ja oligonukleotidin irrotus kantajasta tehtiin



1-yylimetyyli}fenyyli)pentaerytritolia<sup>36</sup> on käytetty liukoisena kantajana oligonukleotidien synteesissä fosfotriesterimenetelmällä (Kaavio 5). Kantajaan sidottu oligonukleotidi liukenee asetonitriiliin ja dimetyyliformamidin (DMF) seokseen (1:1, v:v) sekä dioksaaniin, mutta saostuu metanolissa (MeOH) kvantitatiivisesti. Nelihaaraisen kantajan symmetrisyys mahdollistaa tuotteiden ja välituotteiden karakterisoinnin NMR-spektroskopisesti. Kasvava oligonukleotidiketju oli kiinnitetty pentaerytrioli-kantajaan hydrokinoni-*O,O'*-dietikkahappo-linkkerillä (Q-linkkeri). Oligonukleotidi irrotettiin kantajasta 4 mmol L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-DCM-liuoksella ja reaktio pysäytettiin pyridiniumkloridilla. Q-linkkerin käyttö mahdollisti suojatun oligonukleotidin selektiivisen irrottamisen kantajasta.<sup>34,37</sup>



Kaavio 5. Oligonukleotidin synteysi liukoisella saostettavalla nelihaarisella tetrakis-*O*-(4-{4-[3-(tymidin-3'-yyli)-3-oksopropyyli]-1,2,3-triaatsol-1-yyli-metyyli} fenyli) pentaerytritoli -kantajalla. Rakennusyksikkönä HOBt-aktivoitunut 5'-*O*-DMTr-suojatutu nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfotriesterit ja linkkerinä Q-linkkeri. Nukleofiilisenä katalyyttinä NMI. B = Thy, Cyt<sup>Bz</sup>, Ade<sup>Bz</sup>, Gua<sup>ibu</sup>, R = Q-linkkeri.

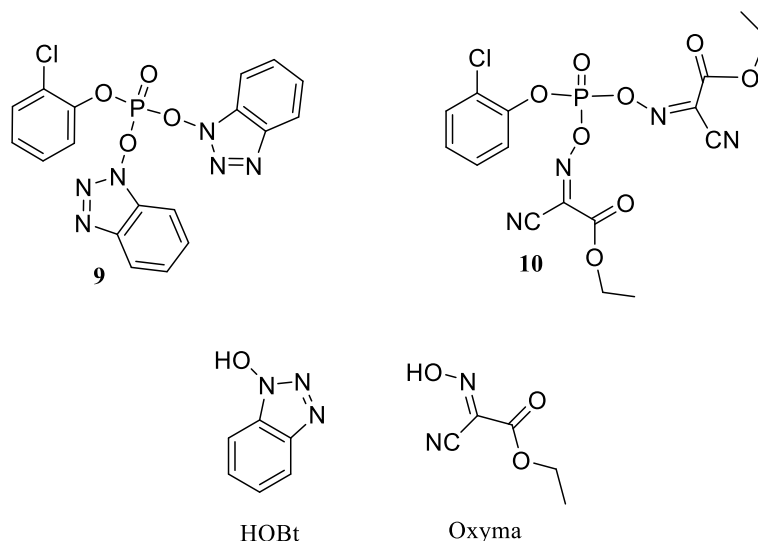
## 1.2. Oxyma ja HOBt aktivointireagensseina

Bentsotriatsolit, kuten 1-hydroksibentsotriatsoli (HOBt), ovat yleisimmin käytettyjä aktivointireagensseja peptidisyntetiikassa. HOBt muodostaa aktiivisen esterin, joka reagoi edelleen amiinin kanssa muodostaen peptidisidoksen. Esterin reaktiivisuus korreloi bentsotriatsolien happamuuden kanssa ( $pK_a$  (HOBt) = 4,60), sillä bentsotriatsoli toimii kytkennässä lähtevänä ryhmänä.<sup>38</sup>

1-hydroksibentsotriatsolia (HOBt) on käytetty myös bifunktionaalisen fosforylointireagenssin, 2-kloorifenyli-*O,O*-bis-(1-bentsotriatsoyyli)-fosfaatin (**9**), valmistuksessa.<sup>39-41</sup> HOBt-aktivoitua fosforylointireagenssin **9** synteessissä aryylifosforodikloridaatti-reagenssin kloorit korvataan HOBt:lla kuivassa dioksaanissa pyridiinin läsnä ollessa. Fosforylointireagenssi **9** säilyy aktiivisena -20 °C:ssa muutaman viikon. Kun HOBt-aktivoitua fosforylointireagenssin **9** annetaan reagoida 5'-suojatun nukleosidin kanssa kuivassa dioksaanissa, 5'-suojattu 3'-*O*-HOBt aryylifosfotriesteri muodostuu 15–30 minuutissa huoneenlämmössä. 5'-suojatun 3'-*O*-HOBt aryylifosfotriesteri ja 3'-suojatun nukleosidin välinen kytkentä NMI:n läsnä ollessa tapahtuu 15–45 minuutissa.<sup>39-41</sup>

HOBt:n käytön vahvuutena on fosforyloinnin ja kytkennän tehokkuus. 3'-*O*-aryylifosfotriesterin ja immobilisoidun 5'-OH-oligonukleotidin välinen kytkentä HOBt-menetelmällä on kolme kertaa nopeampi kuin vastaava kytkentä kondensointireagenssilla **7**. Menetelmä ei vaadi HOBt-aktivoitua 3'-*O*-aryylifosfotriesterin eristystä ja puhdistusta, vaan kytkentä voidaan suorittaa samassa astiassa.<sup>39-41</sup> HOBt-aktivoitua fosforylointireagenssia **9** käytettäessä symmetristen dinukleosidimonofosfaattien muodostuminen on kuitenkin mahdollista. Synteesi on myös tehtävä vedettömissä olosuhteissa, sillä fosforylointireagenssi **9** ja HOBt-aktivoitu 3'-*O*-aryylifosfotriesteri hydrolysoituvat helposti.<sup>13</sup> Lisäksi HOBt on herkästi räjähtävää, mikä hankaloittaa sen kuljetusta, saatavuutta ja käsiteltävyyttä.<sup>42</sup>

Etyyli-2-syano-2-(hydroksi-imino)asettaatti (Oxya) on oksiimi, jonka happamuus on bentsotriatsolien kanssa samaa suuruusluokkaa. Oxyaa voidaan käyttää vaihtoehtoisena aktivointireagenssina peptidisyntetiikassa laajalti käytetyn HOBt:n sijaan. Oxyan rakenteessa lähtevä ryhmä on HOBt:n tavoin N-oksidi (Kuva 4).<sup>38, 43</sup> Oxyan helppo käsiteltävyys ja saatavuus tekevät siitä HOBt:ia houkuttelevamman aktivointireagenssin. Lisäksi Oxyan käyttö aktivointireagenssina peptidisynteseissä on todettu antavan parempia tai vastaavia saantoja verrattaessa moneen muuhun aktivointireagenssiin (HOBt, 1-hydroksi-7-atsabentsotriatsoli (HOAt), *N*-hydroksi-2-pyridinoni (HOPO)). Lisäksi Oxyan kyky kontrolloida kytkennän rasemisaatiota on HOBt:a ja HOPO:a parempi sekä HOAt:iin verrattavissa.<sup>38</sup>



Kuva 4. 1-hydroksibentsotriatsolin (HOBt) ja oxyman sekä fosforylointireagenssien **9** ja **10** rakennekaavat.

Kokeellisen työn tavoitteena oli selvittää, voidaanko Oxymaa käyttää HOBt:n tavoin aktivointireagenssina kytkennässä valmistettaessa lyhyitä dimeerisiä (**11a-h**) ja tetrameerisiä fosfotriestereitä (**13**). Projektissa valmistettiin Oxyma-aktivoitu fosforylointireagenssi bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-klorofenyylifosfaatti (**10**), jota käytettiin edelleen 5'-O-MIP-nukleosidin (**14**) ja 3'-O-suojatun tymidiinin (**15**) kytkennässä.

### 1.3. Yhteenveto

Oligonukleotideja syntetisoidaan perinteisesti automatisoidusti kiinteällä kantajalla fosforamidiittimenetelmällä<sup>1</sup>. Fosforamidiittimenetelmän vahvuuksia ovat ylivoimainen kytkennän tehokkuus verrattuna esimerkiksi vetyfosfonaatti- ja fosfotriestrikemiaan sekä kaupallisesti saatavat reagenssit. Oligonukleotidien valmistaminen kiinteällä kantajalla vaatii kuitenkin suuren ylimäärän reagensseja ja liuottimia, ja sen soveltaminen suuremman mittakaavan synteisiin on haastavaa ja kallista.<sup>2</sup>

Eräs mahdollinen vaihtoehto oligonukleotidien synteisiin liittyvien haasteiden ratkaisemiseksi on liuosfaasisynteesi, jonka vahvuus on, että reagensseja ja liuottimia voidaan käyttää huomattavasti vähemmän,<sup>2</sup> jolloin oligonukleotidien valmistus on halvempaa.<sup>4</sup> Myös kytkennän seuranta NMR-spektroskopisesti on mahdollista. Oligonukleotidiväliuotteiden eristäminen asettaa kuitenkin haasteita.<sup>5</sup>

Fosfotriesterimenetelmä on liuosfaasimenetelmistä käytetyin. Sen etuna on, ettei erillistä hapetusvaihetta tarvita. Fosfotriesterimenetelmässä käytetyt rakenneyksiköt ja väliuotteet ovat

suhteellisen pysyviä, minkä ansiosta niiden käsittely on yksinkertaista. Menetelmä soveltuu niin oligodeoksiribo- kuin oligoribonukleotidien synteesiin. Oligonukleotidien synteesi fosfotriesterimenetelmällä voidaan suorittaa myös liukoisella kantajalla. Liukoista kantajaa käytettäessä välituotteet ja lopputuote voidaan eristää saostamalla tai membraanisuodatuksella.<sup>5</sup> Toisaalta kytkentä fosfotriesterimenetelmällä on hitaampi kuin fosforamidiittimenetelmällä.<sup>4,5,11</sup>

Fosfotriesterimenetelmässä käytettävät rakenneyksiköt, 5'-suojatut nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfodiesterit, voidaan aktivoida aryylisulfonyylikloridi, -imidatsoli, -triatoli tai -tetratsoli -kondensointireagenssilla (**5-8**) nukleofiilisen katalyytin, kuten *N*-metyyli-imidatsolin (NMI), läsnä ollessa. Myös katalyyttisesti aktiivista fosfaatin suojaryhmää voidaan käyttää. Vaihtoehtoisesti nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfodiesterirakenneyksiköt voidaan esiaktivoida aryyli(bentsotriatsoli)fosfinaatilla aktiiviseksi betotriatsoli-*O*-triestereiksi.<sup>5</sup> Fosfaatissa käytettävä suojaryhmä estää pyrofosfaatin muodostumisen sekä negatiivisen varauksen akkumuloitumisen.<sup>13</sup>

Fosfotriesterimenetelmässä käytettäviä fosfaatin suojaryhmiä ovat 2,2,2-trikloorietyyli<sup>15</sup>, erilaiset aryylisuojaryhmät<sup>17</sup> ja katalyyttisesti aktiivinen 4-metoksi-1-oksido-2-pikolyyli. Fosfaatin suojaryhmäksi on vakiintunut 2-kloorifenyyli. Kytkentöjen jälkeen 2-kloorifenyyli poistetaan oksiimikäsittelyllä.<sup>21,13</sup> 5'-*O*-suojatun nukleosidin 3'-OH-ryhmän fosforylointiin nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfaattidiesteriksi käytetään aryylifosforodikloridaattia (**1c-e**) tai -1,2,4-triatolia (**1g-h**).<sup>13</sup>

Nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfaattidiesterin ja 5'-OH:n välisessä kytkennässä käytetään kondensointireagenssia (**5-8**) yhdessä nukleofiilisen katalyytin kanssa. Yleisimmin käytetty nukleofiilinen katalyytti on *N*-metyyli-imidatsoli (NMI). Myös 4-(dimetyloamino)pyridiiniä ja 5H-tetratsolia on käytetty.<sup>11</sup> Kondensointireagenssina nukleosidifosfodiesterin aktivointiin on käytetty aryylisulfonyyliklorideja (**5a, b**), -imidatsoleja (**6a-c**), triatsoleja (**7a-e**) ja tetratsoleja (**8a-c**). Yleisimmin käytetty kondensointireagenssi on MSNT (**7e**).<sup>27</sup>

1-Hydroksibentsotriatsoli (HOBt), on peptidisyntetiikassa käytetty aktivointireagenssi. HOBt:a käytetään myös oligonukleotidien synteesissä 5'-*O*-suojattujen nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfaattidiesterien aktivoinnissa.<sup>39-41</sup> Räjähdysherkkä HOBt on peptidisyntetiikassa korvattu stabiilimmalla etyyli-2-syano-2-(hydroksi-imino)asetaatilla (Oxyma). Sen helppo käsiteltävyys ja saatavuus sekä korkeat saannot ja rasemisaation kontrollointi ovat tehneet siitä

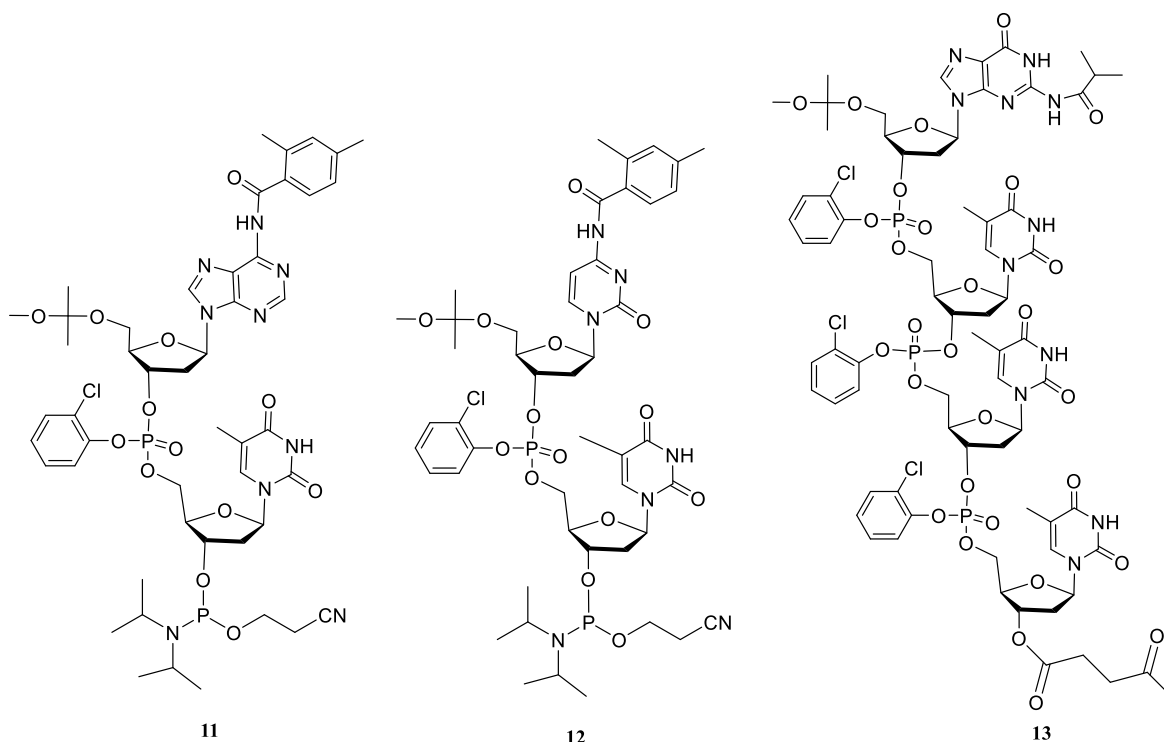
HOBt:a houkuttelevamman aktivointireagenssin.<sup>38</sup> Oxymaa ei ole aikaisemmin käytetty nukleotidisyntetiikassa.

Pro gradu -tutkielman kokeellisessa osassa selvitettiin Oxyman käyttökelpoisuutta fosfotriesterisidosten muodostuksessa tutkimalla oxyma-aktivoitujen 5'-*O*-asetaali-suojattujen nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfotriesterien kytKentäreaktiota 3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)- ja 3'-*O*-levulinoyyli-suojattujen nukleosidien kanssa nukleofiilisen *N*-metyyli-imidatsolikatalyytin läsnä ollessa 1,4-dioksaanin ja pyridiinin seoksessa. KytKentäreaktion nopeutta verrattiin HOBt-aktivoituilla nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfotriesterillä saatuihin tuloksiin.

## 2. Tulokset ja niiden tarkastelu

### 2.1 Synteetit

Pro-gadun kokeellisessa osassa syntetisoitiin liuoksessa fosfotriesterimenetelmällä 3'-*O*-silyyli- ja 3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-asetaali-suojatut dimeeriset fosfotriesterit **11a-h** käyttäen Oxymaa aktivointireagenssina (Kuva 5). Tulokset osoittivat oxyman soveltuvan hyvin fosforylointi- ja kytKentäreaktioissa aktivointireagenssiksi. Lisäksi valmistettiin aryylisuojatun dinukleosidi fosfotriesterin fosforamidiitti-johdannaiset **12a** ja **12b**, joita on mahdollista käyttää rakenneyksikköinä pidempien nukleotidiketjujen valmistuksessa. Myös terameerisen fosfotriestrin **13** syntetisoimista yritettiin oxyma-aktivointia käyttäen.

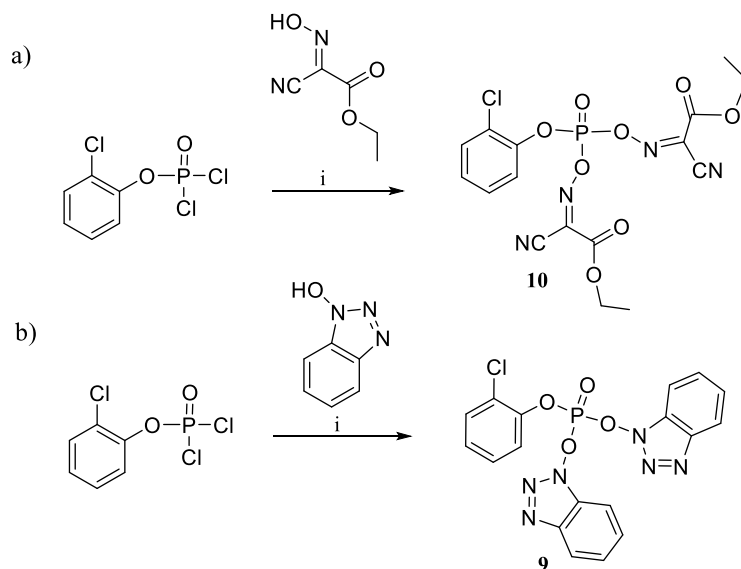


Kuva 5. Fosfotriesterien 10-12 rakennekaavat.

### 2.1.1 Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatin (10) ja bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (9) synteesi

Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatin (10) synteesi on kuvattu Kaaviossa 6a. Lähtöaineena käytetyn 2-kloorifenyylifosforodikloridaatin kloorit korvattiin etyyli-2-syano-2-(hydroksiamino)asetaatilla (2 ekv.) dioksaanissa pyridiinin läsnä ollessa (2 ekv.). Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatin kantaliuos (9) sentrifugoitiin pyridiumkloridin poistamiseksi ja säilöttiin  $-25^{\circ}\text{C}$ :ssa.

Bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatti (9) valmistettiin vastaavalla tavalla kuin fosforylointireagenssi 10 korvaamalla kloorifenyylifosforodikloridaatin kloorit 1-hydroksibentsotriatsolilla (HOBt) (Kaavio 6b).

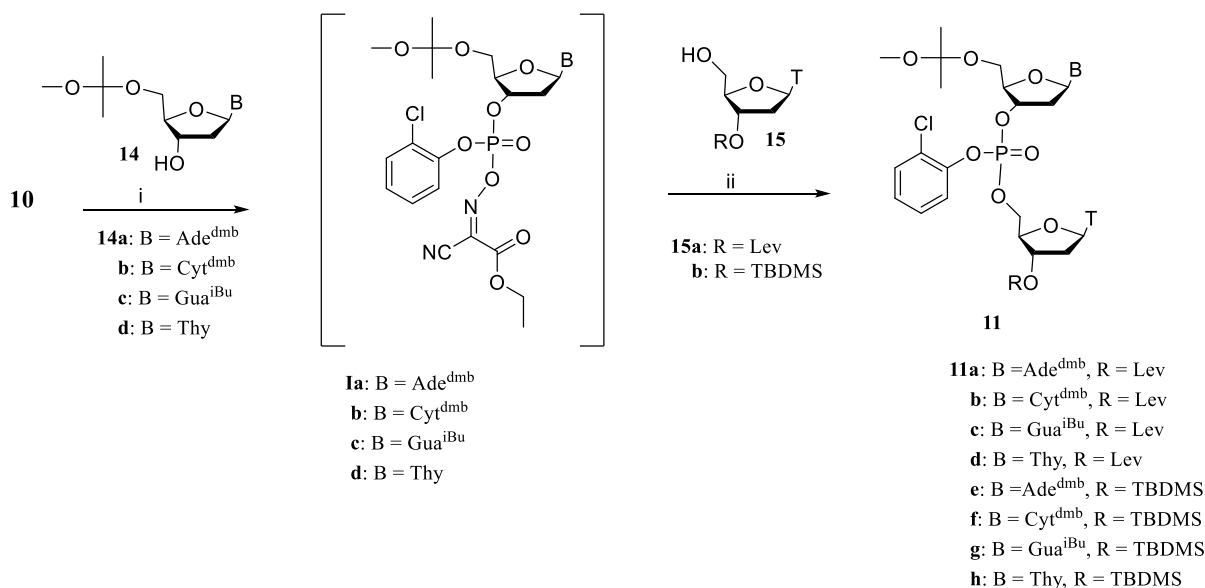


**Kaavio 6.** Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatin (**10**) ja bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (**9**) synteesi. Reagenssit ja olosuhteet: (i) 1,4-dioksaani, pyridiini,  $N_2$ ,  $25^\circ C$ , 2 h.

### 2.1.2 Dimeeristen fosfotriesterien synteisit

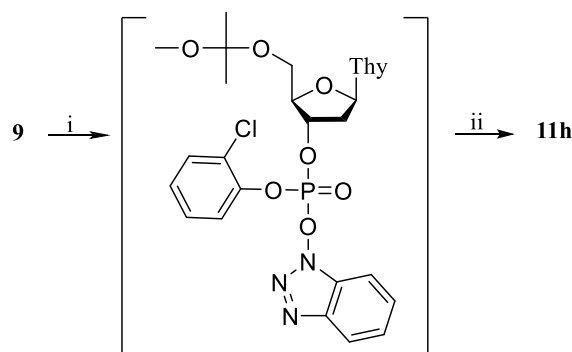
5'-O-(2-Metoksipropan-2-yyli)nukleosidin (**14**) 3'-hydroksyyliiryhmä fosforyloitiin bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatilla (**10**) dioksaanissa pyridiinin läsnä ollessa (kaavio 7).

Kytkentäreaktiossa välituotteen **I** Oxyma-ligandi korvattiin 3'-O-(levulinoyyli)tymidiinillä (**15a**) tai 3'-O-(*tert*-butyylidimetyyllisilyyli)tymidiinillä (**15b**; 3'-O-TBDMS-tymidiini) dioksaanissa NMI:n läsnä ollessa. Reaktio kesti 3 h ja tuotteena muodostui fosfotriesteri **11**. Kytkentää seurattiin HPLC:n avulla. Fosfotriesteri **11** puhdistettiin silikageelikromatograafisesti.



**Kaavio 7.** Fosfotriesterin synteesi. Reagenssit ja olosuhteet: (i) 1,4-dioksaani, pyridiini, N<sub>2</sub>, 25°C, 50 min, (ii) 1,4-dioksaani, pyridiini, NMI, 25°C, 3 h.

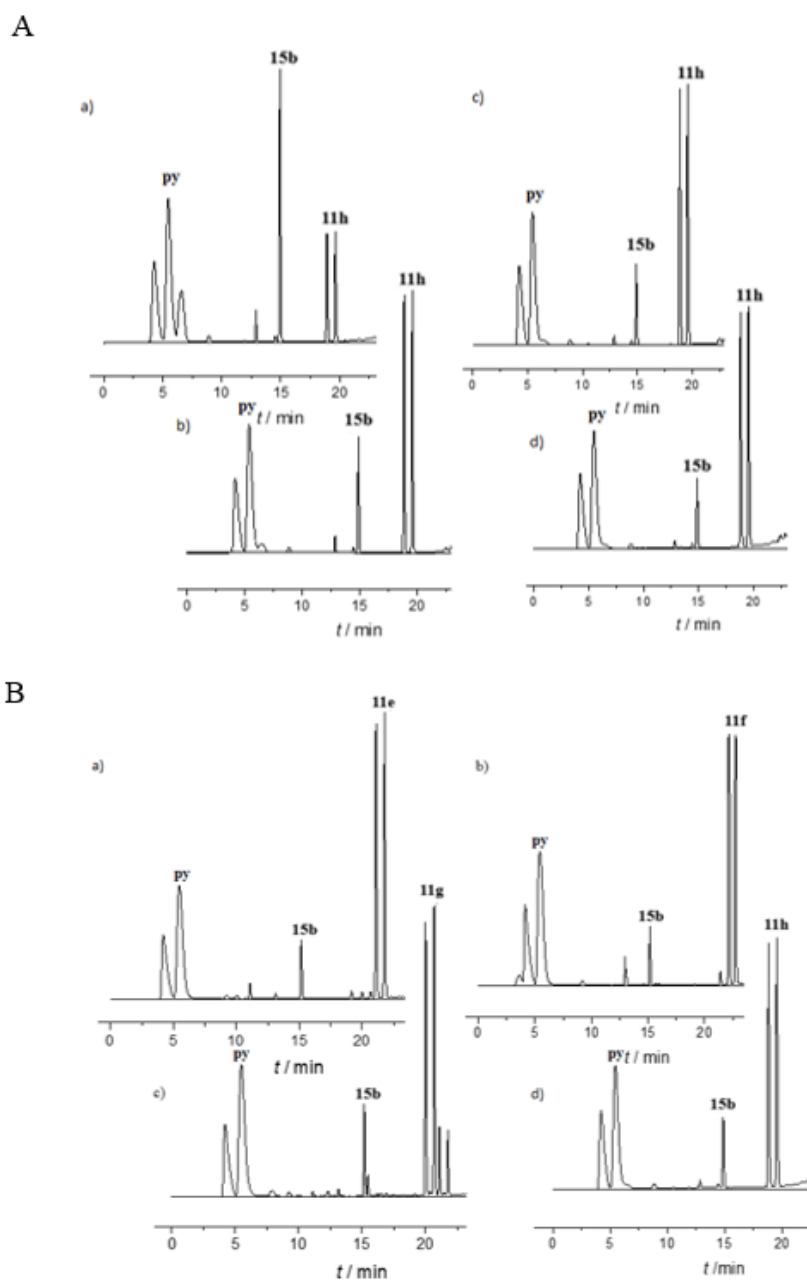
Vertailun vuoksi fosfotriesteri **11h** valmistettiin myös käyttämällä bis(bentsotriatsoli-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaattia (**9**) 5'-O-(2-metoksipropan-2-yyli)-tymidiinin (**14d**) fosforyloinnissa (Kaavio 8). Tämän jälkeen 3'-O-(TBDMS)tymidiini (**15b**) kytkettiin 5'-O-(2-metoksipropan-2-yyli)tymidiinin 3'-O-(betsotriaso-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatti-johdannaisen kanssa dioksaanissa NMI:n läsnä ollessa.



**Kaavio 8.** Fosfotriesterin synteesi, kun aktivaattorina toimii HOBt. Reagenssit ja olosuhteet i) **14d**, 1,4-dioksaani, pyridiini, 30-50 min; ii) **15b**, NMI, 2 h 40 min.

Oxyrna-aktivoitun 5'-O-MIP-tymidiinin (**1d**) kytkentää 3'-O-TBDMS-tymidiinin (**15b**) kanssa, seurattiin HPLC:n avulla. Kuvassa 6A on esitetty HPLC-kromatogrammit kytkennän reaktion eri vaiheissa syntetisoitaessa dimeerinen fosfotriesteri **11h**. Kuvassa 6B on esitetty muodostuneiden dimeeristen fosfotriesterien **11e-h** HPLC-kromatogrammit kytkennän loppuvaiheessa. Keskimääräinen kytkentäaika oli 3 h. Kromatogrammin piikki ( $t_R = 4,8$  min)

on näytteen valmistuksessa tai HPLC-analyysissä hydrolysoitunut väliaine I. Sen lisäksi reaktioliuoksessa on ylimäärin (1,2 ekv.) 3'-*O*-TBDMS-tymidiiniä (**15b**).

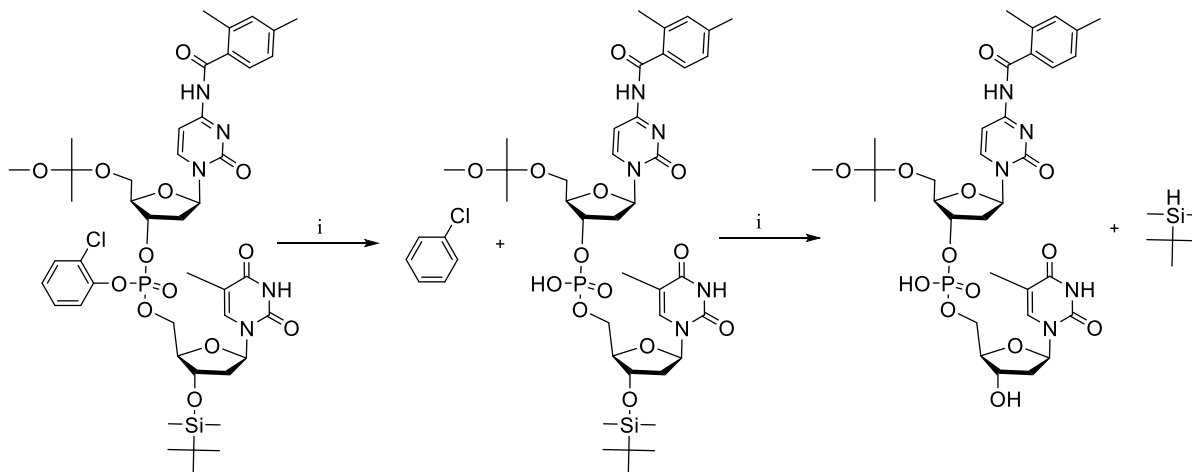


**Kuva 6A.** Tuotteen **11h** muodostumisen HPLC-seuranta a) 4 min b) 45 min c) 2 h d) 2 h 45 min. **6B.** Kunkin kytkennän HPLC-seurannan lopputilanne syntetisoitaessa fosfotriesterit **11e-h**.

### 2.1.3 Dinukleosidifosfotriesterien fosforamidiitti-johdannaisten synteesit

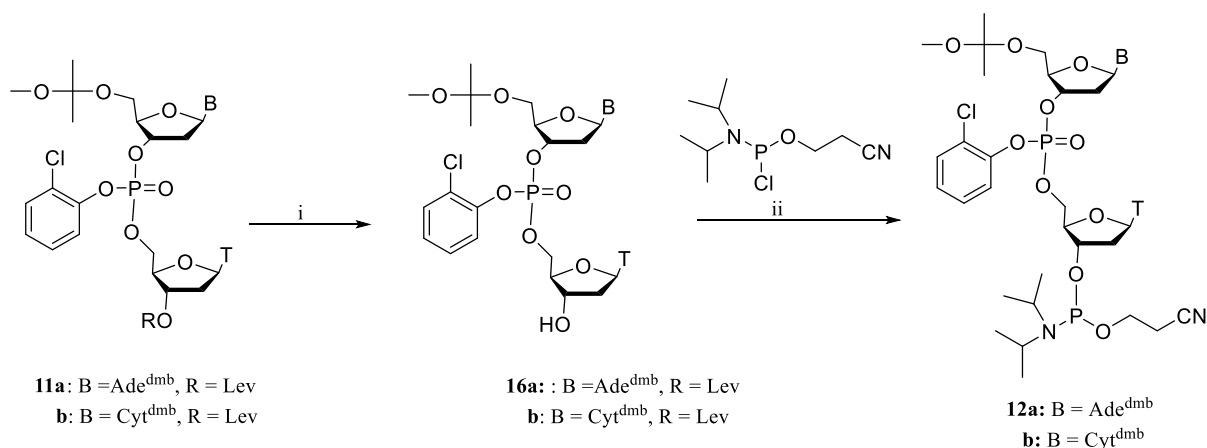
3'-*O*-TBDMS-suojattu fosfotriesteri **11f** yritettiin desilyloida tetrabutyyliammoniumfluoridilla (TBAF, 2 ekv.) etyyliasetaatin ja tetrahydrofuraanin (THF) seoksessa. Reaktiota seurattiin LC-massaspektrometrisesti. Tulosten perusteella havaittiin, että fosfaatin suojaryhmä 2-

kloorifenyyli irtoaa ensin fosfaatista ja vasta tämän jälkeen tapahtuu desilylaatio (Kaavio 9). Desilylaatiota yritettiin myös trietyyliamiini trihydrofluofidi -käsittelyllä (TEA 3HF, 2 ekv.) pyridiinissä, joka johti samaan lopputulokseen.



**Kaavio 9.** 3'-O-TBDMS-suojatun fosfotriesterin **11f** desilylaatio. Reaktio-olosuhteet: i) TBAF, THF tai TEA 3HF, pyridiini

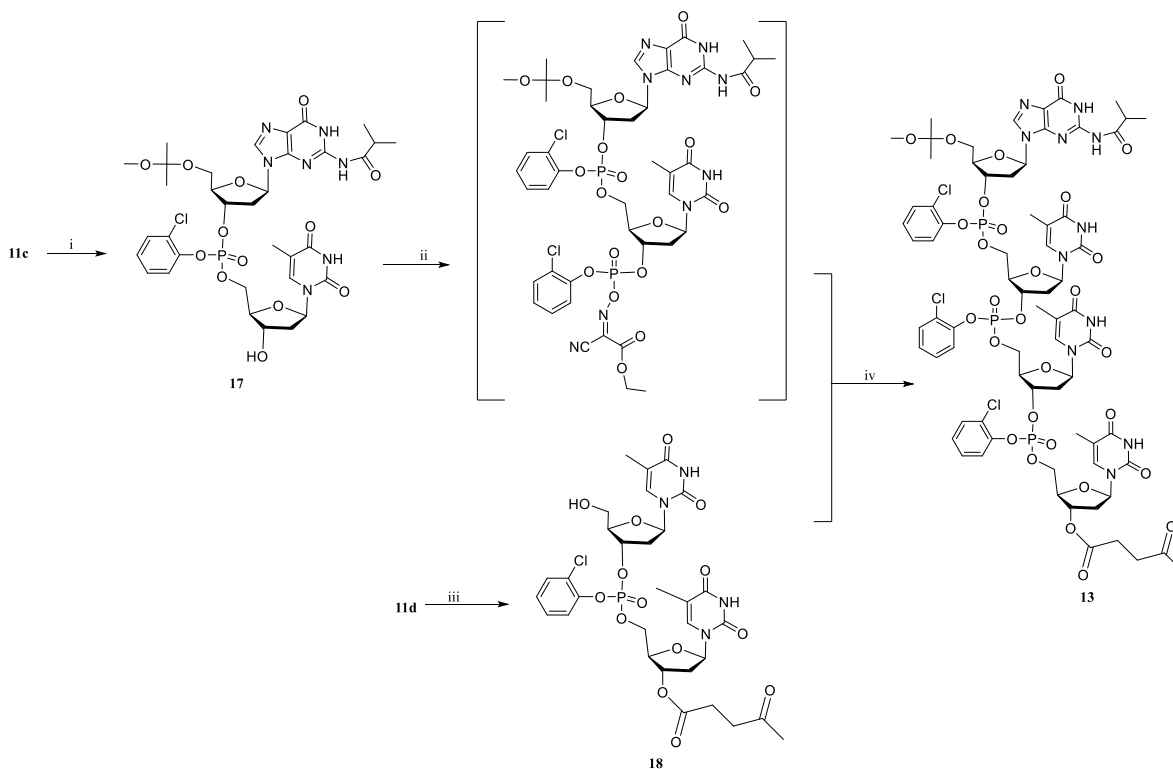
Dinukleosidifosfotriesterin fosforamidiittijohdannaisten **12a** ja **b** synteesi on kuvattu kaaviossa 10. 3'-O-Levulinoyyli-suojattujen fosfotriesterien **11a** (5'-O-MIP-dA<sup>dmb</sup>-T-3'-O-Lev) ja **11b** (5'-O-MIP-dC<sup>dmb</sup>-T-3'-O-Lev) 3'-O-levulinoyyli irrotettiin hydratriinimonohydraattikäsittelyllä (6 ekv.) pyridiinissä ja etikkahapon liuoksessa (4:1) 3 h:ssa, minkä jälkeen reaktio pysäytettiin NaHCO<sub>3</sub>:lla. Yhdisteet (**16a-b**) puhdistettiin silikageelikromatografisesti. 3'-Hydroksyyli-ryhmä fosfityloitiin 1-kloori-1-(2-syanoetoksi)-*N,N*-di-isopropyyli-fosfanamidiitilla (1,2 ekv.) kuivassa DCM:ssä kuivan TEA:n (trietyyliamiini; 1,44 ekv.) läsnä ollessa 3 h:ssa. Muodostuneet fosforamidiitit **12a** ja **12b** puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Fosforamidiitin **12a** saanto oli 66 % ja fosforamidiitin **12b** 68%.



**Kaavio 10.** Dinukleosidifosfotriesterin fosforamidiittijohdannaisten **12a** ja **b** synteesi. Reagenssit ja olosuhteet: i) hydratsiini monohydraatti (6 ekv.), pyridiini/etikkahappo (4:1, v:v), 3h, ii) TEA, DCM, N<sub>2</sub>.

#### 2.1.4 Tetrameerisen fosfotriesterin synteesi

Tetrameerisen fosfotriesterin **13** synteesi on kuvattu kaaviossa 11. 2-Kloorifenyylisuojatun dimeerisen fosfotriesterin **11d** (5'-O-MIP-T-T-3'-O-Lev) 5'-asetaalisuojarahmä (MIP) poistettiin 5 %:lla dikloorietikkahapolla (DCA) dikloorimetaanin (DCM) ja metanolin liuoksessa (2:1, v:v) 2 h:ssa ja 50 min:ssa, minkä jälkeen reaktioliuos neutraloitiin pyridiinillä ja muodostunut tuote **18** puhdistettiin silikageelikromatografisesti. 2-Kloorifenyylisuojatun dimeerisen fosfotriesterin **11c** (5'-O-MIP-dG<sup>ibu</sup>-T-3'-O-Lev) 3'-levulinoyyli poistettiin hydratsiinimonohydraattikäsittelyllä, kuten edellä on kuvattu. Vapautunut 3'-OH fosforyloitiin bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatilla (**10**) dioksaanissa pyridiinin läsnä ollessa 80 min:ssa. Dimeeri **11d** kytkettiin fosforyloidun dimeerin **11c** kanssa 3 h:ssa dioksaanissa pyridiinin ja NMI:n läsnä ollessa. Tetrameerinen fosfotriesteri **13** puhdistettiin silikageelikromatografisesti.

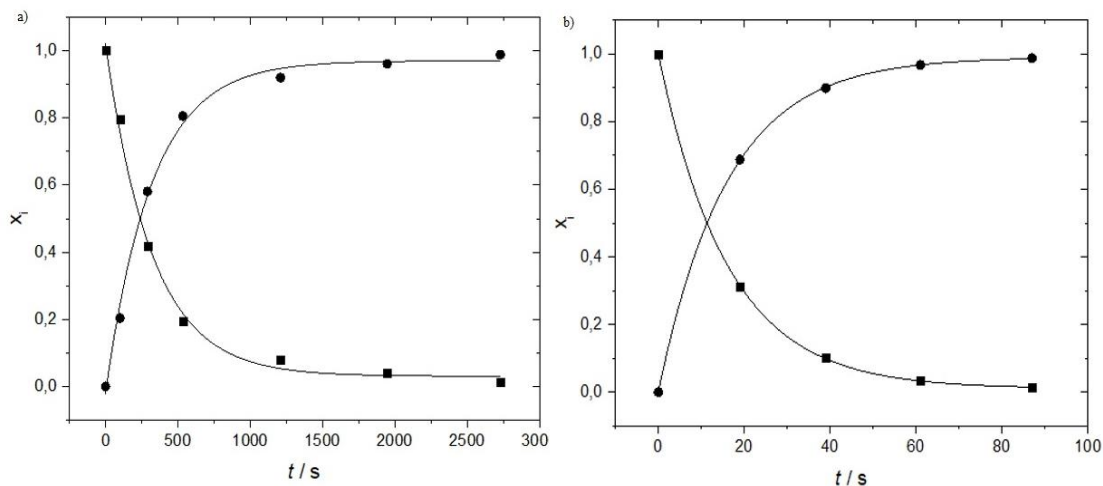


**Kaavio 11.** Teterameerisen fosfotriesterin synteesi. Reagenssit ja olosuhteet: i) hydratsiini monohydraatti, pyridiini/etikkahappo (4:1, v:v), 3h, ii) **10**, 1,4-dioksaani, pyridiini, N<sub>2</sub>, 25°C, 50 min, iii) 5 % DCA, DCM / MeOH (2:1, v:v), 2 h 50 min, iv) 1,4-dioksaani, pyridiini, NMI, N<sub>2</sub>, 25°C, 3 h

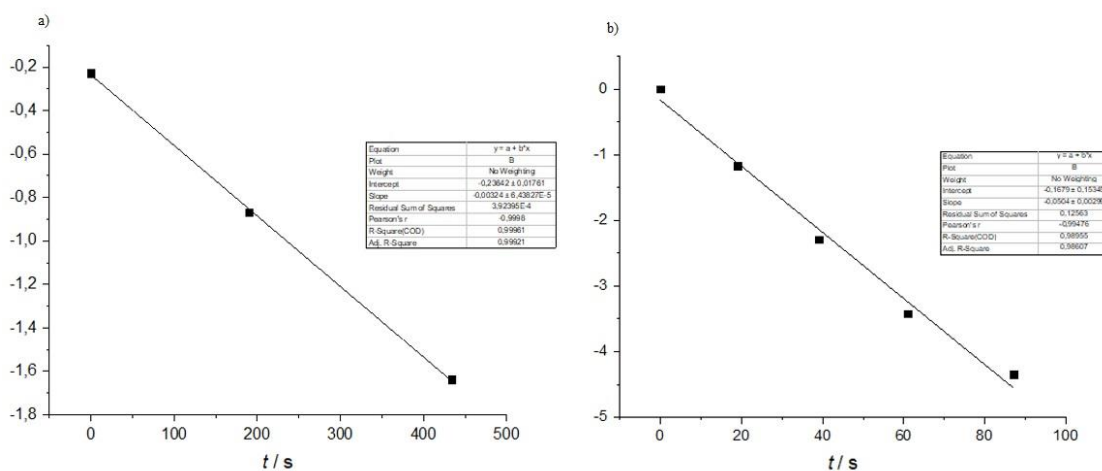
## 2.2 Kinetiikka

### 2.2.1 Kytkennän kineettinen seuranta

Kytkentäreaktiota seurattiin RP-HPLC:llä 25 °C:ssa dioksaanin ja pyridiinin seoksessa, joka sisälsi 1-metyyli-imidatsolia. Mittaukset suoritettiin pseudo 1.-kertaluvun olosuhteissa, jossa 3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)tymidiinin (**15b**) konsentraatio oli 10 kertaa pienempi (0,016 mol L<sup>-1</sup>) kuin bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatin (**10**) tai bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (**9**) konsentraatio (0,18 mol L<sup>-1</sup>). Kuvan 8 tuotejakaumassa on esitetty 3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)tymidiinin (**15b**) häviäminen ja fosfodiesteridiastereomeerin **11h** muodostuminen ajan funktiona. Käytettäessä HOBt-aktivoitua (kuva 9b) fosforylointireagenssia (**9**) kytkentä tapahtui 15 kertaa nopeammin kuin oxyma-aktivoitulla (kuva 9a) fosforylointireagenssilla (**10**), puoliintumisaikojen ollessa 460 s ( $k = 0,00324 \text{ s}^{-1}$ ) ja 14 s ( $k = 0,0504 \text{ s}^{-1}$ ) (Kuva 9).



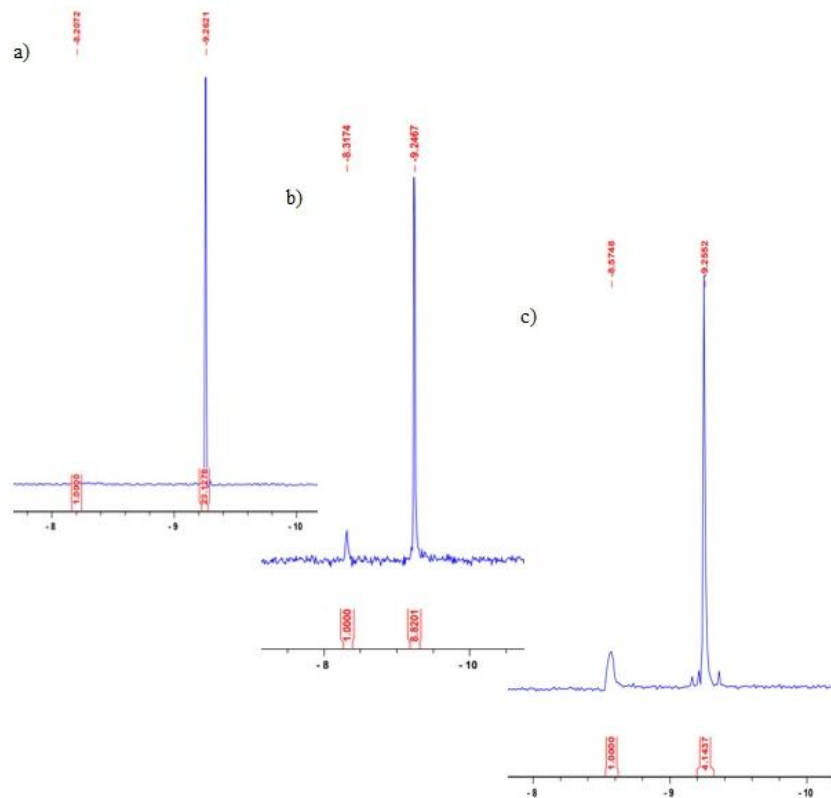
**Kuva 7.** Tuotejakauma 3'-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)tymidiiniin (**15b**) kytkenälle 25 °C:ssa 1,4-dioksaanissa NMI:n läsnäollessa. a) Tuotejakauma, kun fosforylointireagenssina toimi reagenssi **10**. b) Tuotejakauma, kun fosforylointireagenssina toimi fosforylointireagenssi **9**. Merkinnot: (■) 3'-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)tymidiini (**15b**) ja (●) fosfotriesteri **11h**.



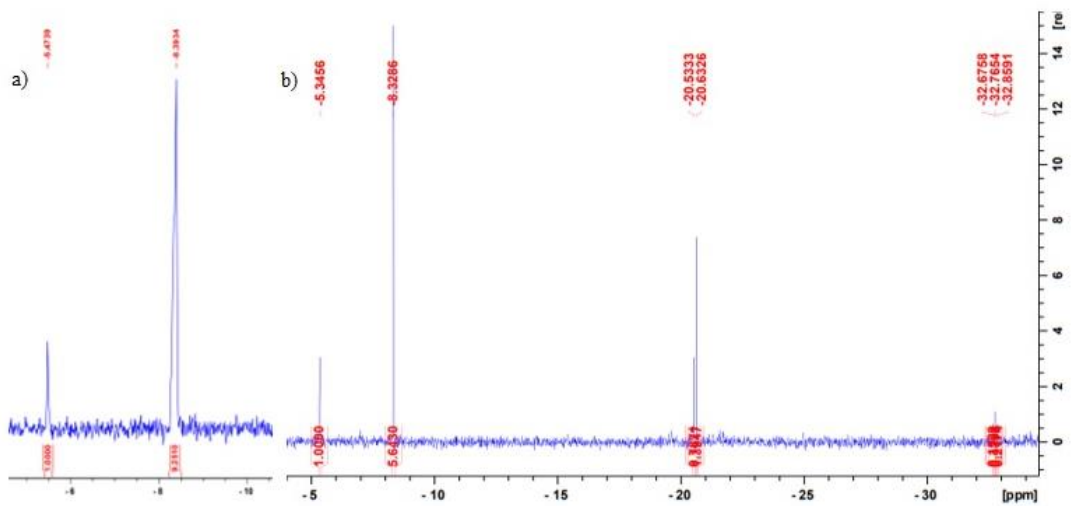
**Kuva 8.** Pseudo 1. kertaluvun nopeusvakio 3'-O-(tert-butyylidimetyylisilyyli)tymidiiniin (**15b**) ja a) 5'-O-2-(metoksi)propan-2-yyli-2'-deoksitymidiniin 3'-[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatin ja b) 5'-O-(2-metoksi)propan-2-yyli-2'-deoksitymidiniin 3'-O-(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatti-johdannaisen kytkenälle 25 °C:ssa.

## 2.2.2 Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatin (**10**) ja bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (**9**) säilyvyys

Fosforylointireagenssina käytettävän bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatin (**10**) (0,2 mol L<sup>-1</sup> kantaliuos) säilyvyyttä tutkittiin -25 °C:ssa <sup>31</sup>P-NMR:n avulla. Mittaukset osoittivat, että kahden kuukauden aikana fosforylointireagenssista oli hajonnut 10 % ja kolmen kuukauden aikana 20 % (kuva 10). Vastaavasti bis(bentsotriatsol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatista (**9**) oli hajonnut 17 päivän aikana 40 % (Kuva 11.).



**Kuva 9.** Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino]-2-kloorifenyylifosfaatin (**10**) säilyvyyttä -25°C lämpötilassa tutkittiin NMR-spektroskopisesti. a) Mittaus suoritettu välittömästi synteesin jälkeen. b) Mittaus suoritettu noin 2 kk synteesin jälkeen. c) Mittaus suoritettu 2,5 kk synteesin jälkeen.



**Kuva 10.** Bis(bentsotriatso-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (**9**) säilyvyyttä -25°C lämpötilassa tutkittiin NMR-spektroskopisesti. a) Mittaus suoritettu välittömästi synteesin jälkeen. b) Mittaus suoritettu 20 päivää myöhemmin.

## 2.3 Johtopäätökset

Oxyrna-reagenssin todettiin soveltuvan aktivointireagenssiksi syntetisoitaessa liuoksessa fosfotriesterimenetelmällä 3'-*O*-(*tert*)-butyylidimetyylisilyyli- ja 3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-asetaali-suojatut dimeeriset fosfotriesterit **11a-h**. Kyseisten fosfotriesterien kokonaissaannot vaihtelivat 51–88 %:n välillä.

3'-*O*-Levulinoyyli-suojatuista dinukleosidifosfotriesteridimeereistä **11a-b** 3'-*O*-levulinoyyliryhmät irrotettiin onnistuneesti hydratsiinilla pyridiinin ja etikkahapon seoksessa ja 3'-OH ryhmä fosfityloitiin 3'-*O*-fosforamidiitti-johdannaisiksi **12a-b**. Fosforamidiittijohdannaisia on mahdollista käyttää rakenneyksikköinä pidempien nukleotidiketjujen valmistuksessa. Keskimääräinen fosfitylointin saanto oli 67 %.

3-*O*-(*tert*)-Butyylidimetyylisilyyliryhmän irrotus fluoridilla ei onnistunut. Tulosten perusteella todellin F<sup>-</sup>-nukleofiilin hyökkäävän fosfotriesterisidoksen fosforiatomiin, mikä johtaa ensin 2-kloorifenolaatin irtoamiseen ja vasta tämän jälkeen silyyliryhmän irtoamiseen.

Tetrameerisen fosfotriesterin (5'-*O*-MIP-dG<sup>ibu</sup>-T-T-T-3'-*O*-Lev; **13**) synteesi ei onnistunut. NMR-spektroskopisen ja massaspektrometrin analyysin perusteella muodostunutta tuotetta ei onnistuttu identifioimaan eikä karakterisoimaan luotettavasti.

Kineettisissä mittauksissa havaittiin, että oxyma 3'-*O*-aryylifosfotriesteri:n **I** kytKentä on 12 kertaa hitaampi, kuin vastaava kytKentä HOBt-aktivoidulla 3'-*O*-aryylifosfotriesterillä. Oxyma-fosforylintireagenssin (**10**) todettiin olevan kuitenkin huomattavasti vastaavaa HOBt-reagenssia (**9**) pysyvämpi.

## 3. Kokeelliset menetelmät

### 3.1 Yleiset menetelmät

Synteesissä käytettiin kaupallisia reagensseja ja liuottimia. Pyridiini, DCM ja dioksaani kuivattiin molekyyliseuloilla. TEA kuivattiin CaH<sub>2</sub>:lla. NMR-spektrit mitattiin Bruker 500 MHz AVANCE-III ja Bruker 400 MHz AVANCE-III NMR-spektrometreillä. Massaspektrit mitattiin Waters Acquity RDa High Resolution ESI TOF -laitteella. Reaktioita seurattiin Shimadzu HPLC:llä (LC-10AT, FCV-10AL, DGU-14A, SPD-10A, SCL-10A) käyttäen C18 kolonnia. Ajoliuoksina käytettiin 50 mM:sta trietyyliammoniumasetaatipuskuria (TEAA) ja 50 mM:sta TEAA-puskuria asetonitrilissä (MeCN). Asetonitriilin pitoisuus nostettiin 5

minuutissa 30 %:sta 40 %:iin, minkä jälkeen pitoisuus nostettiin 100 %:iin 15 minuutin aikana. Virtausnopeus oli 1 ml/min:ssa ja aallonpituutena 260 nm. Oxyma kuivattiin vakuumieksikkaattorissa neljän päivän ajan kuivausaineena P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. HOBt kuivattiin vakuumieksikkaattorissa 55 °C:ssa kuivausaineena P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> kolmen päivän ajan. 5'-O-MIP-nukleosidit (**14**), 3'-O-TBDMS-tymidiini (**15b**) ja 3'-O-levulinoyyli-tymidiini (**15a**) kuivattiin haihduttamalla kuivasta pyridiinistä (2 x 5 ml + 7 ml), jonka jälkeen yhdisteet pidettiin yön yli vakuumieksikkaattorissa (kuivausaineena P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

## 3.2 Synteetit

### 3.2.1 Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatti (10)

Oxyma (11,0 mmol; 1,57 g; 2 ekv.) liuotettiin typpi-ilmakehässä kuivan dioksaanin (21,6 ml) ja pyridiinin (0,89 ml; 2 ekv.) seokseen. Reaktioluokseen lisättiin 2-kloorifenyylifosforodikloridaatti (0,55 mmol, 0,91 ml; 1 ekv.) kuivassa dioksaanissa (4,15 ml). Reaktioluosta sekoitettiin 2 h. Reaktioseos siirrettiin 50 ml:n falcon-putkeen ja sentrifugoitiin 20 min, jolloin pyridiniumkloridisakka saatiin erotettua liuksesta. Bis[(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)]-2-kloorifenyylifosfaatin (**10**) dioksaani/pyridiiniliuos (0,2 M) dekantoiitiin 5 ml:n Falcon-putkiin. Liuos säilytettiin -25 °C:ssa.

### 3.2.2 Bis(bentsotriatso-1-lyyli)-2-kloorifenyylifosfaatti (9)

HOBt (11,0 mmol; 1,49 g; 2ekv.) liuotettiin typpi-ilmakehässä kuivan dioksaanin (21,5 ml) ja kuivan pyridiinin (0,89 ml; 2 ekv.) seokseen. Reaktioluokseen lisättiin 2-kloorifenyylifosforodikloridaattia (0,55 mmol, 0,91 ml; 1 ekv.) kuivassa dioksaanissa (4,15 ml). Reaktioluosta sekoitettiin 2 h ajan. Reaktioseos siirrettiin 50 ml:n Falcon-putkeen ja sentrifugoitiin 20 min, jolloin pyridiniumkloridisakka saatiin erotettua liuksesta. Bis(bentsotriatso-1-lyyli)-2-kloorifenyylifosfaatin (**9**) dioksaani/pyridiiniliuos (0,2 M) dekantoiitiin 5 ml:n falcon-putkiin. Liuos säilytettiin -25 °C:ssa.

### 3.2.3 N<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-3'-O-tert-butyylidimetyylisilyyli-5'-O-(2-metoksipropan-2-yyli)-adenyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (11e)

N<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-O-(2-metoksipropan-2-yyli)adenosiini (**14a**, 0,41 mmol; 0,19 g; 1 ekv.) liuotettiin typpi-ilmakehässä pyridiiniin (200 µl) ja reaktioluokseen lisättiin fosforylointireagenssi **10** (0,47 mmol; 2,36 ml; 1,15 ekv.). Reaktiota sekoitettiin 50 min ja

reaktion etenemistä seurattiin TLC:n avulla eluenttina 5 % MeOH/DCM, jossa 1 % pyridiiniä. Reaktioliuos dekantoitiin 3'-*O*-TBDMS-tymidiiniin (**15b**) (0,49 mmol; 0,17 g; 1,15 ekv.) joukkoon ja reaktioliuokseen lisättiin NMI (2,05 mmol; 163  $\mu$ l; 5 ekv.). Reaktioliuosta sekoitettiin 3 h. Reaktiota seurattiin HPLC:llä ottamalla 5 min, 45 min ja 2 h 40 min näytteet (2  $\mu$ l), joihin lisättiin 200  $\mu$ l pysäytysliuosta (70 % MeCN / 50 mM TEAA). Reaktioliuokseen lisättiin DCM:ää (50 ml) ja orgaaninen faasi pestiin 10 %:lla NaHCO<sub>2</sub>:lla (3x 25 ml), kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös säilytettiin -25 °C:ssa. Raakatuote **11e** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina etyyliasetaatin ja heksaanin seos (9:1 v/v), jossa 1 % pyridiiniä. Synteesin saanto oli 0,30 g (74 %). Tuote **11e** karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  = 9,18 (1H, s, NH), 9,14 (1H, s, NH), 8,52 (1H, d, *J* = 6,3 Hz, H(Ar)), 8,23 (1H, d, *J* = 1,7 Hz, H(Ar)), 7,44-7,38 (3H, m, H(Ar)), 7,28-7,22 (4H + py, m, H(Ar)), 7,17-7,11 (1H, m, H(Ar)), 7,04 (1H, s, H(Ar)), 7,00 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, H(Ar)), 6,41-6,38 (1H, m, H1'), 6,10-6,07 (1H, t, H1''), 5,36-5,26 (1H, m, H3'), 4,40-4,23 (4H, m, H3'' + 2 H5' + H5''), 3,95-3,94 (1H, dd, H5''), 3,56-3,50 (2H, m, 2 H4'), 3,02-2,97 (1H, m, H2'), 2,93 (3H, d, *J* = 5,0, OCH<sub>3</sub>), 2,75-2,66 (1H, m, H2'), 2,36 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 2,26 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 2,07 (5H, m, 2 H2'' + H<sub>2</sub>O), 1,67 (3H, m, Thy CH<sub>3</sub>), 1,15 (6H, d, *J* = 1,9 Hz, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,80 (9H, d, *J* = 0,65 Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0,00 (6H, s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  = 152,4; 150,3; 146,9; 142,7; 141,8; 137,8; 136,5; 133,0; 132,4; 131,4; 129,0; 128,6; 127,3; 126,9; 125,7; 124,3; 122,3; 117,9; 111,0; 100,8; 85,3; 85,1; 84,6; 80,3; 60,9; 48,5; 40,1; 38,6; 25,6; 24,2; 21,0; 19,8; 18,1; 12,1; -5,9; -5,1; <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  = -7.573 and -7.770 ppm. HRMS (ESI): *m/z* laskettu C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>12</sub>PSi<sup>+</sup>: 984,3490 [M+H]<sup>+</sup>; havaittu 984.3505.

### 3.2.4 *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-guanylyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11g**).

Yhdiste **11g** syntetisoitiin kuten edellä on kuvattu. Lähtöaineena käytettiin *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-guanosiinia (**14c**) (0,41 mmol; 0,19 g; 1 ekv.). Reaktion saanto oli 0,21 g (55 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  = 9, 89 (1H, s, NH), 9,22 (1H, s, NH), 7,84-7,83 (1H, s, H8), 7,45-7,14 (5H, m, H6 ja 4 x ArH), 6,16-6,08 (2H, q, 2 H1'), 5,28-5,20 (1H, m, H3'), 4,42-4,19 (4H, m, H3', H4', 2 H5'), 3,96-3,91 (1H, m, H4'), 3,54-3,40 (2H, m, 2 H5''), 2,98-2,95 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 2,87-2,79 (1H, m, H2'), 2,72-2,66 (1H, m, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,64-2,56 (1H, m, H2'), 2,23-2,12 (2H, m, 2 H2''), 1,79-1,76 (3H, dd, Thy CH<sub>3</sub>), 1,20-1,18 (6H, m, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,13-1,11 (6H, m, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,80-

0,79 (9H, d,  $J = 2,0$  Hz, Si(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,01-0,01 (6H, m, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 156,0; 151,0; 149,3; 147,1; 137,9; 137, 6; 136,7; 131,5; 129,3; 127,6; 124,5; 122,4; 121,8; 111,1; 101,0; 86,3; 85,5; 84,5; 84,3; 81,3; 72,0; 71,6; 68,7; 68,1; 61,4; 48,7; 40,5; 40,3; 38,8; 38,6; 25,8; 24,4; 19,0; 18,3; 12,5; 12,3; -4,8; -5,0$ ; <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = -7.070$  and  $-7.410$  ppm. HRMS (ESI):  $m/z$  laskettu C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>13</sub>PSi<sup>+</sup>: 938,3283 [M+H]<sup>+</sup>; havaittu 938.3297.

### 3.2.5 N<sup>4</sup>-Dimethylbenzoyl-3'-O-tert-butyylidimetyylisilyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydilyyli -3', 5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11f)

Yhdiste **11f** syntetisoitiin kuten edellä on kuvattu. Lähtöaineena käytettiin N<sup>4</sup>-dimetyylilbentsoyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydiiniä (**14b**) (0,41 mmol; 0,18 g; 1 ekv.). Saanto oli 0,30 g (76 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 9,05$  (1H, s, NH), 8,96 (1H, s, NH), 8,15 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H(Ar)), 7,43-7,38 (1H, t, H(Ar)), 7,36-7,31 (3H, m, H(Ar)), 7,27-7,20 (4H, m, H(Ar)), 7,16-7,11 (1H, q, H(Ar)), 7,04 (1H, s, H(Ar)), 7,02 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H(Ar)), 6,12-6,06 (2H, m, 2 H1'), 5,11-5,03 (1H, m, H3'), 4,36-4,25 (4H, m, H3' + H5' + 2 H5'), 3,99-3,92 (1H, m, H5'), 3,58-3,44 (2H, m, 2 H4'), 3,04 (3H, d,  $J = 8,7$  Hz, OCH<sub>3</sub>), 2,74-2,65 (1H, m, H2'), 2,32 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 2,30-2,23 (4H, m, H2'), 2,12-2,03 (4H, m, 2 H2'' + H<sub>2</sub>O), 1,88-1,84 (3H, m, Thy CH<sub>3</sub>), 1,68 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,24-1,18 (6H, dd, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,80 (9H, s, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0,00 (6H, s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 136,5; 132,5; 131,3; 129,1; 128,5; 127,4; 126,8; 125,7; 111,0; 100,9; 96,1; 87,5; 85,5; 85,4; 80,3; 80,0; 72,0; 68,7; 60,6; 48,8; 40,3; 40,1; 25,7; 24,2; 20,9; 19,7; 18,1; 12,1; -5,0; -5,1$ ; <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = -7.530$  ja  $-7.814$  ppm. HRMS (ESI):  $m/z$  laskettu C<sub>44</sub>H<sub>59</sub>ClN<sub>5</sub>NaO<sub>13</sub>PSi<sup>+</sup>: 982,3197 [M+Na]<sup>+</sup>; havaittu 982.3207.

### 3.2.6 3'-O-tert-butyylidimetyylisilyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11h)

Yhdiste **11h** syntetisoitiin kuten edellä on kuvattu. Lähtöaineena käytettiin 5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidiiniä (**14d**) (0,41 mmol; 0,12 g; 1 ekv.). Reaktion saanto oli 0,18 g (51 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 9,08$  (2H, s, NH), 7,66-7,38 (2H, m, H(Ar)), 7,35 (1H, d,  $J = 8,2$  Hz, H(Ar)), 7,27-7,21 (4H, m, H(Ar)), 7,18-7,11 (1H, q, H(Ar)), 6,19-6,07 (2H, m, 2 H1'), 5,10-5,03 (1H, m, H3'), 4,36-4,12 (4H, m, H3', H4', 2 H5''), 3,93-3,92 (1H, m, H4'), 3,51-3,42 (2H, m, 2 H5'), 3,04 (3H, d,  $J = 8,9$  Hz, OCH<sub>3</sub>), 2,45-2,35 (1H, m, H2'), 2,26-2,21 (1H, m, H2'), 2,11-2,08 (2H, m, 2 H2''), 1,74

(3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,69 (3H, d,  $J = 3,7$  Hz, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,24-1,21 (6H, q, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,80 (9H, s, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,00 (6H, s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 151,0; 150,3; 136,5; 136,1; 131,3; 129,1; 127,4; 125,6; 124,3; 122,3; 111,0; 100,1; 85,4; 84,5; 80,8; 72,0; 68,6; 61,1; 48,8; 40,1; 38,7; 25,6; 24,3; 18,1; 12,1; -5,0; -5,1$ ; <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = -7.642$  ja  $-7.704$  ppm. HRMS (ESI):  $m/z$  laskettu C<sub>36</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>4</sub>NaO<sub>13</sub>PSi<sup>+</sup>: 865,2618 [M+Na]<sup>+</sup>; havaittu 865.2633.

Yhdiste **11h** syntetisoitiin myös käyttäen fosforylointireagenssina bis(bentsotriaso-1-lyyli)-2-kloorifenyylifosfaattia (**9**). 5'-O-MIP-tymidiini (**14d**) (0,41 mmol; 0,12 g; 1 ekv.) liuotettiin typpi-ilmakehässä pyridiiniin (200  $\mu$ l) ja reaktioliuokseen lisättiin fosforylointireagenssi **8** (0,49 mmol; 2,45 ml; 1,2 ekv.). Reaktiota sekoitettiin 50 min ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:n avulla eluentina 5 % MeOH/DCM, jossa 1 % pyridiiniä.

Reaktioliuos jaettiin kahteen osaan; yhdisteen **11h** syntetisoimiseksi sekä nopeusvakion määrittämiseksi 3'-O-TBDMS-tymidiinin (**15b**) ja 5'-O-(2-metoksipropan-2-yyli)-2'-deoksitymidiini-3'-O-(bentsotriaso-1-lyyli)-2-kloorifenyylifosfaatti-johdannaisen kytkentäreaktiolle (Kts. Kineettiset mittaukset).

Yhdisteen **11h** syntetisoimiseksi noin puolet reaktioliuoksesta (1 ml, 1 ekv.) siirrettiin 3'-O-TBDMS-tymidiinin (**15b**) (0,09 g; 1,2 ekv.) joukkoon ja reaktioliuokseen lisättiin NMI (1,03 mmol; 81,6  $\mu$ l; 5 ekv.). Reaktioliuosta sekoitettiin 3 h. Reaktioliuokseen lisättiin DCM:ää (50 ml) ja orgaaninen faasi pestiin 10 %:lla NaHCO<sub>2</sub>:lla (3x 25 ml), kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös säilytettiin -25 °C:ssa. Raakatuote **11h** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluentina etyyliasetaatin ja heksaanin seos (9:1 v/v), jossa 1 % pyridiiniä. Synteesin saanto oli 0,11 g (91 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 9,09$  (1H, s, 2 NH), 7,43-7,11 (6H + py, m, H(Ar)), 6,19-3,16 (1H, m, H1') 6,12-6,07 (1H, m, H1'), 5,10-5,03 (1H, m, H3'), 4,36-4,12 (4H, m, H3', H4', 2 H5''), 3,99-3,91 (1H, m, H4'), 3,53-3,42 (2H, m, 2 H5'), 3,04 (3H, d,  $J = 9,0$  Hz, OCH<sub>3</sub>), 2,45-2,35 (1H, m, H2'), 2,26-2,21 (1H, m, H2'), 2,11-2,08 (2H, m, 2 H2''), 1,75-1,74 (3H, m, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,69-1,68 (3H, m, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,24-1,21 (6H, m, O<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,80 (9H, s, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0,00 (6H, s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 207,5; 173,0; 171,3; 164,2; 151,1; 146,8; 136,7; 136,4; 131,3; 129,1; 129,0; 129,0; 127,4; 122,3; 111,1; 85,9; 85,4; 85,4; 82,7; 74,2; 74,1; 68,9; 61,9; 61,8; 60,5; 38,6; 38,0; 36,7; 29,4; 28,4; 20,7; 14,1; 12,2; 12,1$ . <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = -7,642$  ja  $-7,704$  ppm.

### 3.2.7 *N*<sup>6</sup>-Dimetyylibentsosyyli-3'-*O*-levulinosyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11a**)

*N*<sup>6</sup>-Dimetyylibentsosyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)adeniini (**14a**; 0,43 mmol, 0,195 g) liuotettiin typpi-ilmakehässä kuivaan pyridiniin (100 µl). Reaktioliuokseen lisättiin fosforyointireagenssi **10** (1,15 ekv. 0,49 mmol; 2,45 ml) ja reaktiota sekoitettiin 50 min. Reaktiota seurattiin TLC:n avulla. Reaktioliuos dekantoitiin kuivan tymidiini-3'-*O*-levulinosyylin (**15a**, 1,2 ekv: 0,51 mmol) joukkoon ja reaktioliuokseen lisättiin NMI (5 ekv. 2,15 mmol; 171 µl). Reaktiota sekoitettiin 3 h. Reaktiota seurattiin HPLC:llä ottamalla 1,5 h; 2,5 h ja 3 h näytteet. Reaktioliuokseen lisättiin DCM:ää (50 ml) ja orgaaninen faasi pestiin 10 %:lla NaHCO<sub>2</sub>:lla (3 x 25 ml), kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös säilyttiin -25 °C:ssa. Raakatuote (**11a**) puhdistettiin kahdesti silikageelikromatografisesti eluenttina 7 % MeOH/DCM, jossa 1 % pyridiiniä. Synteesin saanto oli 0,29 g (74 %). Tuote (**11a**) karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 9,33-9,26 (2H, m, 2 NH), 8,65-8,69 (6H, m, Ar), 7,56-7,49 (3H, m, Ar), 7,42-7,33 (7H, m, Ar), 7,29-7,23 (1H, m, Ar), 7,24-7,12 (2H, d, *J* = 9,85 Hz, Ar), 6,54-6,50 (1H, q, H1'), 6,24-6,20 (1H, t, H1'), 5,49-5,39 (1H, m, H3'), 5,30-5,27 (1H, m, H3'), 4,58-4,43 (3H, m, 2 H5' + H4'), 4,27-4,25 (1H, m, H4'), 3,68-3,56 (2H, m, 2 H5''), 3,16-3,04 (4H, m + d, *J* = 2,6 Hz, H2'' + OCH<sub>3</sub>), 2,88-2,75 (3H, m, H2'' + CH<sub>2</sub>), 2,56-2,52 (2H, dt, CH<sub>2</sub>), 2,48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 2,38 (3H, s, Thy CH<sub>3</sub>), 2,26-2,31 (2H, m, 2 H2'), 1,98-1,96 (3H, m, COCH<sub>3</sub>), 1,78-1,77 (3H, dd, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,27 (6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 207,4; 173,0; 173,0; 173,0; 164,1, 164,0; 152,5; 151,0; 150,3; 146,9; 142,8; 142,7; 141,8; 137,8; 136,5; 136,2; 136,2; 133,0; 132,4; 131,3; 129,1; 129,0; 128,6; 127,4; 127,4; 126,9; 124,3; 122,3; 122,3; 122,3; 111,3; 111,3; 100,7; 85,5; 85,2; 85,1; 84,6; 82,7; 82,7; 82,6; 80,5; 80,4; 80,3; 74,2; 74,1; 69,1; 69,0; 61,0; 60,9; 48,5; 38,5; 38,0; 36,8; 29,4; 28,3; 24,2; 24,1; 21,0; 19,8; 12,1; 12,1. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = -7,544 ja -7,967 ppm. HRMS (ESI): *m/z* laskettu C<sub>44</sub>H<sub>52</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sup>+</sup>: 968,2993 [M+H]<sup>+</sup>; havaittu 968,3072.

### 3.2.8 *N*<sup>4</sup>-Dimetyylibentsosyyli-3'-*O*-levulinosyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydylyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11b**)

Tuote **11b** syntetisoitiin kuten edellä on kuvattu. Lähtöaineina käytettiin *N*<sup>4</sup>-dimetyylibentsosyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydiiniä (**14b**; 0,41 mmol; 0,177 g) ja 3'-*O*-levulinosyyliä (**15a**; 0,49 mmol; 0,167 g). Raakatuote **11b** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina 7 % metanolin ja etyyliasetaatin (EtOAc) seos, jossa 1

% pyridiiniä. Reaktio saanto oli (51 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 9,20 (1H, s, NH), 9,18 (1H, s, NH), 8,59-8,59 (1H, d, *J* = 4 Hz, Ar), 7,55-7,42 (4H, m, Ar), 7,38-7,32 (3H, m, Ar), 7,28-7,23 (1H, q, Ar), 7,12-7,11 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, Ar), 6,23-6,19 (2H, m, 2 H1'), 5,27-5,26 (1H, m, H3'), 5,23-5,17 (1H, m, H3'), 4,54-4,38 (3H, m, H4', 2 H5'), 4,26-4,24 (1H, s, H4'), 3,70-3,56 (2H, m, 2 H5''), 3,17-3,15 (3H, d, *J* = 10 Hz, OCH<sub>3</sub>), 2,85-2,77 (3H, m, H2', CH<sub>2</sub>), 2,56-2,53 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,44 (3H, s, Cyt<sup>Bz</sup> CH<sub>3</sub>), 2,40-2,30 (6H, m + s, H2', 2 H2'', CH<sub>3</sub>-Bz), 2,14 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 1,18 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,35-1,30 (6H, dd, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 207,4; 172,9; 172,9; 164,0; 163,3; 155,3; 150,9; 150,3; 145,2; 145,1; 142,2; 137,7; 136,5; 136,3; 136,2; 132,5; 132,4; 131,3; 129,1; 129,0; 128,5; 127,4; 127,3; 126,8; 124,3; 122,3; 122,2; 122,2; 111,3; 111,2; 100,9; 100,9; 96,1; 87,5; 57,5; 85,6; 85,5; 85,4; 85,2; 85,3; 82,7; 82,6; 82,6; 80,4; 80,4; 80,1; 80,0; 74,2; 69,0; 69,0; 60,7; 60,5; 48,8; 48,8; 40,3; 40,3; 38,0; 36,8; 36,7; 29,4; 28,3; 24,2; 24,1; 20,9; 20,7; 19,7; 14,1; 12,1; 12,1. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = -7,506 ja -7,978 ppm. HRMS (ESI): *m/z* laskettu C<sub>43</sub>H<sub>52</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>15</sub>P<sup>+</sup>: 944,2881 [M+H]<sup>+</sup>; havaittu 944,2998.

### 3.2.9 *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanilyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (11c)

Tuote **11c** syntetisoitiin kuten edellä on kuvattu. Lähtöaineina käytettiin *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanosiinia (**14c**; 0,86 mmol; 0,34 g) ja 3'-*O*-levulinoyyliä (**15a**; 1,12 mmol; 0,38 g). Raakatuote **11c** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina 8 % MeOH/EtOAc seos, jossa 1 % pyridiiniä. Reaktio saanto oli (59 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 12,06 (1H, s, NH), 10,16 (1H, s, NH), 9,83 (1H, s, NH), 7,95 (1H, d, *J* = 3,7 Hz, H8), 7,56-7,24 (10H, m, H(Ar) + py), 6,26-6,21 (2H, m, 2 H1'), 5,40-5,30 (2H, m, 2 H3'), 4,56-4,26 (4H, m, 2 H4', 2 H5''), 3,65-3,52 (2H, m, 2 H5'), 3,08 (3H, d, *J* = 14,4 Hz, OCH<sub>3</sub>), 3,00-2,93 (1H, m, H2'), 2,92-2,66 (4H, m, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>, H2'), 2,56-2,53 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,42-2,31 (2H, m, 2 H2''), 2,14 (3H, d, *J* = 2,1 Hz, COCH<sub>3</sub>), 1,86 (3H, d, *J* = 1,52 Hz, Thy CH<sub>3</sub>), 1,31-1,29 (6H, m, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,24-1,22 (6H, m, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 207,5; 180,8; 173,0; 173,0; 164,7; 155,9; 151,0; 151,0; 150,3; 149,2; 149,1; 149,0; 146,9; 138,5; 137,8; 137,7; 137,0; 136,7; 136,5; 131,4; 129,1; 127,4; 125,7; 124,3; 122,3; 121,7; 121,6; 120,9; 111,2; 100,9; 100,8; 86,1; 85,7; 85,2; 85,2; 85,1; 85,0; 84,3; 84,1; 82,9; 82,8; 82,8; 82,7; 81,2; 81,1; 81,1; 81,0; 74,2; 74,1; 69,0; 69,0; 68,8; 68,7; 61,2; 61,1; 48,6; 48,6; 38,6; 38,4; 38,0; 37,0; 36,8; 36,3; 33,2; 29,4; 28,4; 24,2; 24,2; 24,1;

18,8; 18,8; 12,3; 12,1. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = -7.437 ppm. HRMS (ESI): *m/z* laskettu C<sub>39</sub>H<sub>50</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>15</sub>P<sup>+</sup>: 922,2786 [M+H]<sup>+</sup>; havaittu 922,2771.

### 3.2.10 3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylivosfaatti (11d)

Tuote **11d** syntetisoitiin kuten edellä on kuvattu. Lähtöaineina käytettiin 5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidiiniä (**14d**; 0,86 mmol; 0,257 g) ja 3'-*O*-levulinoyyliä (**15a**; 1,12 mmol; 0,38 g). Raakatuote **11d** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluentina 5 % MeOH/EtOAc seos, jossa 1 % pyridiiniä. Reaktio saanto oli (88 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 9,35(2H, m, 2 NH), 7,55-7,23 (12H, m, 6 H(Ar) + py), 6,31-6,28 (1H, m, H1'), 9,24-6,21 (1H, m, H1'), 5,28-5,17 (2H, m, 2 H3'), 4,52-4,24 (4H, m, 2 H5', 2 H4'), 3,63-3,54 (2H, m, 2 H5''), 3,16 (3H, d, *J* = 7,55 Hz, OCH<sub>3</sub>), 2,78-2,77 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,56-2,47 (3H, m, CH<sub>2</sub>, H2'), 2,39-2,22 (5H, H2', H2'', H<sub>2</sub>O), 2,00-1,96 (3H, m, COCH<sub>3</sub>), 1,87-1,86 (3H, m, Thy CH<sub>3</sub>), 1,79 (3H, s, Thy CH<sub>3</sub>), 1,36-1,33 (6H, m, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 207,5; 1723,0; 172,9; 164,2; 164,2; 151,0; 150,3; 146,8; 146,8; 136,6; 136,3; 136,3; 136,2; 136,0; 131,3; 131,2; 129,1; 129,0; 129,0; 128,7; 127,4; 127,4; 127,3; 125,7; 125,7; 125,6; 124,4; 122,3; 122,3; 122,2; 111,3; 111,3; 111,0; 100,9; 100,9; 85,5; 85,3; 84,9; 84,7; 84,6; 84,6; 84,5; 82,7; 82,7; 82,6; 80,9; 80,8; 80,8; 80,9; 74,4; 74,3; 74,2; 74,1; 73,8; 69,0; 69,0; 61,2; 61,1; 60,5; 48,8; 48,8; 38,7; 38,0; 36,8; 29,4; 28,3; 24,3; 24,3; 20,7; 14,1; 12,2. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = -7,595 ja -7,819 ppm. HRMS (ESI): *m/z* laskettu C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>4</sub>NaO<sub>15</sub>P<sup>+</sup>: 849,2122 [M+Na]<sup>+</sup>; havaittu 849,2142.

### 3.2.11 N<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylivosfaatti (16a)

N<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylivosfaatti (**11a**, 0,35 mmol; 0,338 g) liuotettiin hydratsiinimonohydraatin liuokseen (4,2 ml; 0,5 M; pyridini: etikkahappo, 4:1). Reaktiota sekoitettiin jäähauhteessa 30 min ja huoneenlämmössä 2,5 tuntia. Reaktio pysäytettiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>-liuoksella. Seokseen lisättiin dikloorimetaania, jossa 0,5 % pyridiiniä ja orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:lla ja kylläisellä NaCl:lla. Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös säilytettiin -25 °C:ssa. Tuote **16 a** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluentina 5 % MeOH/DCM, jossa 1 % pyridiiniä. Reaktio saanto oli 0,21 g (70 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):

$\delta = 9,34$  (2H, 2 NH),  $8,36$  (1H, s, H8),  $7,79-7,13$  (14H, m, H(Ar) + py),  $6,54-6,49$  (1H, m, H1'),  $6,24-6,20$  (1H, m, H1'),  $5,47-5,38$  (1H, m, H3'),  $4,54-4,34$  (4H, H3', H4', 2 H5'),  $4,09-4,08$  (1H, m, H4'),  $3,68-3,55$  (2H, m, 2 H5''),  $3,15-3,07$  (1H, m, H2''),  $3,04$  (3H, d,  $J = 4,4$  Hz, OCH<sub>3</sub>),  $2,88-2,77$  (1H, m, H2''),  $2,48$  (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz),  $2,38$  (3H, s, Thy CH<sub>3</sub>),  $1,17-2,12$  (4H, m, 2 H2' + H<sub>2</sub>O),  $1,78$  (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz),  $1,27$  (6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 168,0; 164,2; 164,1; 152,5; 151,0; 150,9; 150,3; 146,9; 146,9; 142,8; 142,6; 141,8; 137,8; 136,5; 136,4; 133,0; 132,4; 131,3; 129,1; 129,0; 128,7; 127,4; 127,3; 126,9; 125,8; 125,7; 124,7; 124,4; 122,3; 122,3; 122,3; 119,2; 111,0; 100,8; 85,4; 85,3; 85,2; 85,1; 85,0; 84,9; 84,9; 84,8; 84,6; 80,3; 80,3; 80,2; 70,9; 70,8; 69,1; 69,1; 69,0; 61,0; 60,9; 48,5; 39,7; 39,7; 38,6; 38,5; 24,2; 24,1; 21,0; 19,8; 12,1; 12,1$ . <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = -7,460$  ja  $-7,786$  ppm. HRMS (ESI):  $m/z$  laskettu C<sub>39</sub>H<sub>46</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>12</sub>P<sup>+</sup>: 871,2572 [M+H]<sup>+</sup>; havaittu 870,2646.

### 3.2.12 N<sup>4</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (16b)

N<sup>4</sup>-Dimetyylibentsoyyli-3'-O-levulinoyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatin (**11b**; 0,14 mmol; 0,130 g) levulinoyyliryhmä irrotettiin hydratsiinikäsittelyllä (1,7 ml; 0,5 M; pyridini: etikkahappo, 4:1) kuten edellä. Tuote N<sup>4</sup>-dimetyylibentsoyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**16b**) puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina 5 % MeOH/DCM, jossa 1 % pyridiiniä. Reaktio saanto oli 0,07 g (63 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 9,22-9,21$  (2H, m, 2 NH),  $8,60-8,59$  (4H, d,  $J = 3,8$  Hz, H(Ar)),  $7,55-7,10$  (10H, m, H(Ar) + py),  $6,22-6,21$  (2H, m, 2H1'),  $5,21-5,16$  (1H, m, H3'),  $4,49-4,39$  (4H, m, H3', H4', 2 H5'),  $4,07$  (1H, s, H4'),  $3,69-3,57$  (2H, m, 2 H5''),  $3,17-3,15$  (3H, d,  $J = 8,65$  Hz, OCH<sub>3</sub>),  $2,84-2,77$  (1H, m, H2'),  $2,44-2,36$  (7H, s + s + m, CH<sub>3</sub>-Bz, Thy CH<sub>3</sub>, H2'),  $2,26-2,24$  (2H, m, 2 H2'' + H<sub>2</sub>O),  $1,78$  (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz),  $1,35-1,31$  (6H, dd, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = 169,9; 164,1; 163,4; 163,4; 155,4; 151,0; 150,3; 146,9; 146,8; 145,2; 145,1; 142,2; 137,7; 137,7; 136,5; 136,4; 136,4; 132,5; 132,4; 131,3; 129,1; 129,0; 128,5; 127,4; 127,3; 126,8; 125,8; 125,7; 125,6; 124,4; 122,3; 122,3; 122,2; 122,2; 111,0; 111,0; 100,9; 100,9; 96,3; 96,2; 87,6; 85,5; 85,5; 85,4; 85,4; 85,3; 84,9; 84,9; 84,8; 80,4; 80,3; 80,2; 80,2; 70,9; 70,8; 69,1; 69,0; 69,0; 60,7; 60,6; 48,8; 48,8; 40,3; 40,3; 40,3; 39,7; 39,6; 24,2; 24,1; 20,9; 19,7$ . <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta = -7,380$  ja  $-7,891$  ppm. HRMS (ESI):  $m/z$  laskettu C<sub>38</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>5</sub>NaO<sub>13</sub>P<sup>+</sup>: 868,2332 [M+Na]<sup>+</sup>; havaittu 868,2379.

3.2.13 *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3'5'-  
tymidiinikloorifenyylifosfaatti (17)

*N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3'5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatin (11c; 0,31 mmol; 0,300 g) levulinoyyli irrotettiin hydratsiinikäsittelyllä (3,76 ml; 0,5 M; pyridini: etikkahappo, 4:1) kuten edellä. Tuote *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3'5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (17) puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina 8 % MeOH/DCM (jossa 1 % pyridiiniä). Reaktion saanto oli 0,24 g (92 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 9,42-9,40 (2H, m, 2 NH), 7,95 (1H, s, H8), 7,56-7,26 (14H, m, H(Ar) + py), 6,26-6,20 (2H, m, 2 H1'), 5,41-5,33 (3H, m, H3'), 4,53-4,45 (2H, m, 2 H5'), 4,42-4,40 (1H, m, H3'), 4,11-4,08 (1H, m, H4'), 3,64-3,52 (3H, m, 2 H5', H4'), 3,09-3,06 (3H, d, *J* = 11,7 Hz, OCH<sub>3</sub>), 2,96-2,91 (1H, m, H2'), 2,83-2,67 (2H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, H2'), 2,30-2,24 (3H, m, 2 H2'' + H<sub>2</sub>O), 1,87-1,86 (3H, m, Thy CH<sub>3</sub>), 1,30-1,29 (6H, d, *J* = 8,6 Hz, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,24-1,22 (6H, m, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 180,8; 180,8; 170,6; 170,5; 170,4; 164,8; 155,9; 151,0; 151,0; 150,3; 149,2; 149,1; 149,0; 146,9; 137,8; 137,7; 137,1; 137,0; 136,5; 131,4; 129,1; 128,5; 127,4; 125,7; 124,4; 122,3; 122,3; 121,6; 121,5; 110,9; 100,9; 100,8; 97,2; 86,0; 85,5; 85,3; 85,2; 85,1; 85,1; 85,0; 85,0; 84,9; 84,3; 84,1; 81,1; 81,0; 81,0; 71,2; 70,8; 70,7; 70,4; 70,3; 69,0; 69,0; 68,6; 61,2; 61,2; 61,0; 55,2; 48,6; 48,6; 39,9; 39,8; 38,6; 36,3; 24,2; 24,2; 24,1; 20,5; 20,5; 20,4; 18,8; 18,8. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = -7,277 ja -7,346 ppm. HRMS (ESI): *m/z* laskettu C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>ClN<sub>7</sub>NaO<sub>13</sub>P<sup>+</sup>: 846,2237 [M+Na]<sup>+</sup>; havaittu 846,2207. Tuotteen todettiin sisältävän n. 20 % tuntematonta epäpuhtautta.

3.2.14 *N*<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-  
tymidiinikloorifenyylifosfaatin 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyylifosforamidiitti)  
(12a)

*N*<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (16a; 0,19 mmol; 0,17 g) liuotettiin kuivaan DCM:ään (1 ml) ja reaktioluokseen lisättiin kuiva TEA (0,28 mmol; 38,4 μl) ja fosfitylointireagenssi 2-syanoetyyli *N,N*-di-isopropyylidikloorifosforamidiitti (0,15 mmol; 36,7 μl). Reaktiota sekoitettiin 3 h. Reaktiota seurattiin TLC:n avulla. Tuote (12a) puhdistettiin välittömästi silikageelikromatografisesti eluenttina 3 % MeOH/EtOAc, joka sisälsi 3 % TEA:a. Tuotefraktiot yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös haihdutettiin kahdesti kuivasta DCM:stä, jossa 1 % kuivaa pyridiiniä. Reaktion saanto oli 0,14 g (66 %). Tuote

karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 9,34 (2H, m, 2 NH), 8,65-8,59 (2H, dd, H(Ar)), 7,53-7,12 (9H, m, H(Ar) + py), 6,53-6,52 (1H, m, H1'), 6,24-6,21 (1H, m, H1'), 5,52-5,46 (1H, m, H3'), 4,61-4,22 (5H, m, H3', 2 H4', 2 H5'), 3,86-3,75 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3,68-3,58 (4H, m, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2 H5'), 3,14-3,04 (4H, m + s, H2', OCH<sub>3</sub>), 2,87-2,78 (1H, m, H2'), 2,71-2,66 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2,48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 2,46-2,24 (5H, m, 2 H2'', Thy CH<sub>3</sub>), 1,78 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,27 (6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,21-1,19 (15H, d, J = 6,6 Hz, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + TEA). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 167,9; 164,1; 164,0; 152,5; 152,4; 150,9; 150,9; 150,3; 150,3; 146,9; 142,7; 142,6; 141,8; 137,8; 136,5; 136,4; 136,4; 133,0; 132,4; 131,3; 129,1; 128,6; 127,4; 127,3; 126,9; 125,7; 124,7; 124,3; 122,2; 119,2; 111,1; 111,1; 100,7; 85,5; 85,2; 85,1; 85,0; 84,6; 83,9; 80,4; 73,2; 68,8; 60,9; 59,1; 58,9; 58,9; 48,5; 43,8; 43,7; 43,6; 43,6; 43,4; 43,2; 38,9; 38,6; 24,6; 24,5; 24,4; 24,3; 24,2; 24,2; 21,0; 20,6; 20,6; 19,8; 12,1; 12,1. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = -148,892; 148,729; 148,694; 148,545; -7,495; -7,481; -7,826 ja -7,914 ppm. HRMS (ESI): *m/z* laskettu C<sub>48</sub>H<sub>63</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>13</sub>P<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1070,3704 [M+H]<sup>+</sup>; havaittu 1070,3718.

3.2.15 *N*<sup>4</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydylyyl-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatin 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylyfosforamidiitti) (**12b**)

*N*<sup>4</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**16b**; 0,14 mmol; 0,12 g) 2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylikloorifosforamidiitilla (0,16 mmol; 36,7 μl) TEA:n läsnä ollessa (0,20 mmol, 27,5 μl) kuten edellä. Reaktio saanto oli 0,97 g (68 %) Tuote **12b** karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 9,12-8,97 (2H, s, 2 NH), 8,49-8,48 (3H, d, *J* = 4,28 Hz, H(Ar)), 7,42-6,00 (12H, m, H(Ar) + py), 6,12-6,09 (1H, m, 2 H1'), 5,11-5,05 (1H, m, H3'), 4,51-4,27 (4H, m, H(Ar), H3', 2 H4'), 4,15-4,01 (1H, m, H5'), 3,78-3,64 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 3,58-3,45 (4H, m, H5', 2 H5'', N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,31-3,22 (N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,06-3,04 (3H, d, *J* = 6,92 Hz, OCH<sub>3</sub>), 2,75-2,54 (4H, m, 2 H2', CH<sub>2</sub>CN), 2,33-2,10 (10H, m, CH<sub>3</sub>-Bz, 2 H2'', Thy CH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O), 1,68 (3H, s, CH<sub>3</sub>-Bz), 1,24-1,10 (29H, m, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + TEA). <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ = 169,9; 164,1; 163,4; 155,4; 150,9; 150,3; 145,2; 145,1; 142,2; 137,7; 136,5; 132,5; 132,4; 131,3; 129,0; 128,5; 127,4; 127,3; 126,8; 124,3; 122,3; 122,2; 119,2; 111,1; 100,9; 100,9; 96,2; 87,5; 85,7; 85,5; 80,0; 73,2; 73,0; 68,7; 60,7; 60,6; 59,2; 59,1; 59,0; 58,9; 53,1; 48,8; 46,2; 43,8; 43,7; 43,7; 43,6; 43,4; 40,3; 38,8; 24,5; 24,4; 24,4; 24,4; 24,2; 24,1; 20,9; 20,6; 20,6; 19,7; 12,1; 12,1. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ =

148,702; 148,682; 148,568; 148,545; -7,483; -7,557; -7,851 ja -7,925 ppm. HRMS (ESI):  $m/z$  laskettu  $C_{47}H_{62}ClN_7NaO_{14}P_2^+$ : 1068,3416  $[M+Na]^+$ ; havaittu 1068,3408.

### 3.2.16 3'-O-Levulinoyyli-tymidylyyli-3', 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (18)

3'-O-Levulinoyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11d**; 0,54 mmol; 0,450 g) liuotettiin 5 %:een dikloorietikkahapon (DCA) DCM:MeOH-seokseen (2:1, v:v, 5,44 ml). Reaktiota seurattiin TLC:n avulla. Reaktioliuos neutraloitiin pyridiinillä. Reaktioaika oli 3 h. Raakatuote **18** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina 8 % MeOH/EtOAc. Tuotteena saatu 3'-O-levulinoyyli-tymidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**18**) kuivattiin  $NaSO_4$ :lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Saanto oli 0,24 g (58 %). Tuote karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti.  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3CN$ ):  $\delta$  = 9,30-9,25 (1H, m, 2 NH), 7,55-7,23 (5H, m, H(Ar)), 6,23-6,22 (2H, m, 2 H1'), 5,28-5,22 (2H, m, 2 H3'), 4,51-4,43 (2H, m, 2 H5'), 4,23-4,14 (1H, 2 s, 2 H4'), 3,76-3,69 (2H, m, 2 H5''), 2,79 (2H, s,  $CH_2$ ), 2,56-2,27 (6H, s + m,  $CH_2$ , 2 H2', 2 H2''), 2,15 (3H, s,  $CHOCH_3$ ), 1,85 (3H, s, Thy  $CH_3$ ), 1,79 (3H, s, Thy  $CH_3$ ).  $^{13}C$ -NMR (126 MHz,  $CD_3CN$ ):  $\delta$  = 207,5; 173,0; 171,3; 164,2; 151,1; 146,8; 146,8; 136,7; 136,4; 131,3; 129,1; 129,0; 129,0; 127,4; 122,3; 111,4; 111,1; 85,9; 85,9; 85,6; 85,4; 85,4; 82,7; 82,6; 80,4; 74,2; 74,1; 69,0; 68,9; 61,9; 61,8; 60,5; 38,6; 38,0; 36,7; 29,4; 28,4; 20,7; 14,1; 12,2; 12,1; 12,1.  $^{31}P$  NMR (202 MHz,  $CD_3CN$ ):  $\delta$  = -7,595 ja -7,819 ppm. HRMS (ESI):  $m/z$  laskettu  $C_{31}H_{36}ClN_4NaO_{14}P^+$ : 777,1546  $[M+Na]^+$ ; havaittu 777,1519.

### 3.2.17 N<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-O-levulinoyyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli) suojatun GTTT-tetrameerin kloorifenyylifosfotriesteri (13)

N<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-O-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**17**; 0,77 mmol; 0,18 g; 1 ekv.) liuotettiin typpi-ilmakehässä pyridiiniin (50  $\mu$ l) ja reaktioliuokseen lisättiin fosforylointireagenssi **10** (0,26 mmol; 1,32 ml; 1,20 ekv.). Reaktiota sekoitettiin 80 min ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:n avulla eluenttina 8 % MeOH/DCM, jossa 1 % pyridiiniä. Reaktioliuos dekantoitiin 3'-O-levulinoyyli-tymidylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatin (**18**; 0,27 mmol; 0,20 g; 1,20 ekv.) joukkoon ja reaktioliuokseen lisättiin NMI (1,10 mmol; 88  $\mu$ l; 5 ekv.). Reaktioliuosta sekoitettiin 5,5 h. Reaktiota seurattiin HPLC:llä. Reaktioliuokseen lisättiin DCM:ää, jossa 0,5 % pyridiiniä (50 ml) ja orgaanista faasia pestiin kylläisellä  $NaHCO_2$ :lla (3x 25 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös säilytettiin -25 °C:ssa. Raakatuote **13** puhdistettiin silikageelikromatografisesti eluenttina 10 %:nen metanolin ja etyyliasettiin liuos, jossa 1 % pyridiiniä. Massaspektrometrinen analyysin perusteella tuotteena muodostui yhdiste: 1772,3372 [M+Na]<sup>+</sup>; havaittu =1772,3306, jota ei onnistuttu identifioimaan eikä karakterisoimaan NMR-spektroskopisesti luotettavasti (katso liite 43).

### 3.3 Kineettiset menetelmät

3'-*O*-(*tert*-Butyylidimetyylisilyyli)tymidiinin (**15b**) kytkeä Oxyma- ja HOBt-aktivoitujen nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfotriesterien kanssa 1,4-dioksaanin, pyridiinin ja NMI:n läsnäollessa 25 °C:ssa seurattiin RP-HPLC:lla (C18 kolonni 250 x 2,4 mm, 5 µm, virtausnopeus 1 ml / min ja λ = 260 nm). Olosuhteet olivat samat kuin synteesissä, mutta 3'-*O*-(*tert*-butyylidimetyylisilyyli)tymidiinin (**15b**; 14,7 mmol L<sup>-1</sup>) konsentraatio oli 0,1-kertainen Oxyma- ja HOBt-aktivoitujen nukleosidi-3'-*O*-aryylifosfotriesterien konsentraatioihin (150 mmol L<sup>-1</sup>) verrattuna. Näytteitä (30 µL) otettiin reaktioliuoksesta sopivin aikaväleihin ja laimennettiin puskuriliuoksella (50 mM TEAA-puskuri / 70 % MeCN (100 µL)). Tuotteet identifioitiin massaspektrometrisesti.

#### 3.3.1 Oxyma-aktivoitu kytkeä

3'-*O*-(*tert*-Butyylidimetyylisilyyli)tymidiini (**15b**; 0,0215 mmol; 0,000731 g; 0,1 ekv.) kytkettiin 5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-2'-deoksitymidiini-3'-*O*-(1-syano-2-etoksi-2-oksoetylideeni)amino)-2-kloorifenyylifosfaatti johdannaisen (0,205 mmol; 1 ekv.) kanssa dioksaanissa pyridiinin ja NMI:n (1,025 mmol; 81,6 µl; 5 ekv.) läsnä ollessa. Reaktiota seurattiin HPLC:llä ottamalla näytteet reaktioliuoksesta sopivin väliajoin (0 min, 3 min 10 s, 7 min 14 s, 18 min 30 s, 30 min 48 s, 43 min 50 s, 1 h 5 min 2 s, 1 h 28 min 25 s, 1 h 58 min 15 s ja 2 h 59 min 34 s).

#### 3.3.2 HOBt-aktivoitu kytkeä

3'-*O*-(*tert*-Butyylidimetyylisilyyli)tymidiini (**15b**; 0,0205 mmol; 0,00731 g; 0,1 ekv.) kytkettiin 5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-2'-deoksitymidiini 3'-*O*-(betsotriasol-1-yyli)-2-kloorifenyylifosfaatti-johdannaisen (0,205 mmol; 1 ekv.) kanssa dioksaanissa pyridiinin ja NMI:n (1,025 mmol; 81,6 µl; 5 ekv.) läsnä ollessa. Reaktiota seurattiin HPLC:llä ottamalla reaktioliuoksesta näytteitä sopivin väliajoin (0 s, 20 s, 42 s, 68 s, 1 min 33 s, 2 min, 2 min 28 s, 3 min 25 s, 4 min 11 s, 6 min 6 s, 10 min 8 s, 19 min 25 s, 30 min 5 s).

## 4. Viitteet

- 1 Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside Phosphoramidites-A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)90461-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90461-7).
- 2 Andrews, B. I.; Antia, F. D.; Brueggemeier, S. B.; Diorazio, L. J.; Koenig, S. G.; Kopach, M. E.; Lee, H.; Olbrich, M.; Watson, A. L. Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 49–61. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02291>.
- 3 Moumné, L.; Marie, A. C.; Crouvezier, N. Oligonucleotide Therapeutics: From Discovery and Development to Patentability. *Pharmaceutics* **2022**, *14*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020260>.
- 4 Abramova, T. Frontiers and Approaches to Chemical Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides. *Molecules* **2013**, *18*, 1063–1075. <https://doi.org/10.3390/molecules18011063>.
- 5 Lönnberg, H. Synthesis of Oligonucleotides on a Soluble Support. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1368–1387. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.134>.
- 6 Vroom, E. d.; Broxterman, H. J. G.; Sliedregt, L. A. J. M.; Marel, G. A. van der; Broom, J. H. van. Synthesis of Cyclic Oligonucleotides by a Modified Phosphotriester Approach. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4607–4620. <https://doi.org/10.1093/nar/16.10.4607>.
- 7 Rao, M. V.; Reese, C. B. Synthesis of Cyclic Oligonucleotides via the Filtration Approach. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *12*, 8221–8239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/17.20.8221>.
- 8 Huang, Y.; Knouse, K. W.; Qiu, S.; Hao, W.; Padial, N. M.; Vantourout, J. C.; Zheng, B.; Mercer, S. E.; Lopez-Ogalla, J.; Narayan, R.; Olson, R. E.; Blackmond, D. G.; Eastgate, M. D.; Schmidt, M. A.; McDonald, I. M.; Baran, P. S. A P(V) Platform for Oligonucleotide Synthesis. *Science (80-. )*. **2021**, *373*, 1265–1270. <https://doi.org/10.1126/science.abi9727>.
- 9 Rosenqvist, P.; Saari, V.; Pajuniemi, E.; Gimenez Molina, A.; Ora, M.; Horvath, A.; Virta, P. Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support. *J. Org. Chem.* **2023**, *88*, 10156–10163. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.3c01006>.
- 10 Knouse, K. W.; deGruyter, J. N.; Schmidt, M. A.; Zheng, B.; Vantourout, J. C.; Kingston, C.; Mercer, S. E.; McDonald, I. M.; Olson, R. E.; Zhu, Y.; Hang, C.; Zhu, J.; Yuan, C.; Wang, Q.; Park, P.; Eastgate, M. D.; Baran, P. S. Unlocking P(V): Reagents for Chiral Phosphorothioate Synthesis. *Science (80-. )*. **2018**, *361*, 1234–1238. <https://doi.org/10.1126/science.aau3369>.
- 11 Reese, C. B.; Pei-Zhuo, Z. Phosphotriester Approach to the Synthesis of Oligonucleotides: A Reappraisal. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, No. 19, 2291–2301. <https://doi.org/10.1039/P19930002291>.

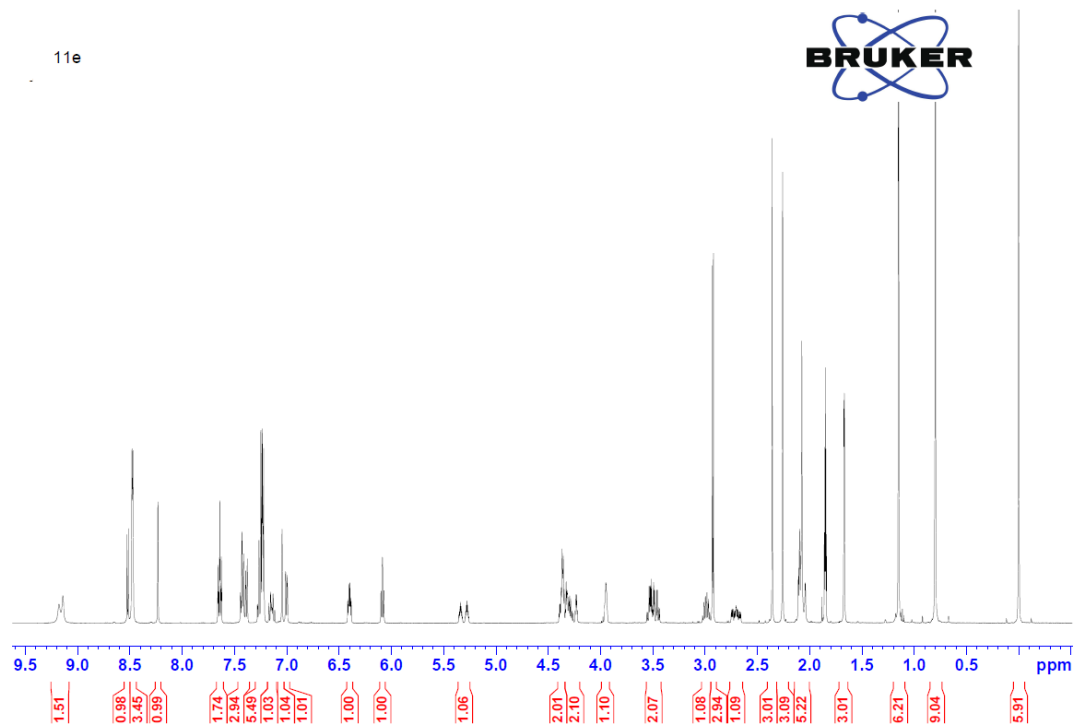
- 12 Michelson, A. M.; Todd, A. R. Synthesis of a Dithymidine Dinucleotide Containing a 3':5'-Internucleotidic Linkage. *Nucleotides* **1955**, 2206, 2632–2638. <https://doi.org/10.1039/JR9550002632>.
- 13 Reese, C. B. Oligo- and Poly-Nucleotides: 50 Years of Chemical Synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3851–3868. <https://doi.org/10.1039/b510458k>.
- 14 Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. A Convenient Method for Stepwise Synthesis of Oligothymidylate Derivatives in Large-Acale Quantities. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 405, 4801–4803. <https://doi.org/10.1021/ja00994a048>.
- 15 Eckstein, F.; Rizk, I. Synthesis of Oligonucleotides by Use of Phosphoric Triesters. *Angew. Chem. internat. Ed.* **1967**, 6, 695–696. <https://doi.org/10.1002/anie.196706951>.
- 16 V.A.Erimov; Buryakova, A. A.; Dubey, I. Y.; Plushin, N. N.; Chakhmakhcheva, O. O.; Ovhinnikov, Y. A. Application of New Catalytic Phosphate Protecting Groups for the Highly Efficient Phosphotriester Oligonucleotide Synthesis. *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14, 6525–6540. <https://doi.org/10.1093/nar/14.16.6525>.
- 17 Reese, C. B.; Saffhill, R. Oligonucleotide Synthesis via Phosphotriester Intermediates: The Phenyl-Protecting Group. *Chem. Commun.* **1968**, No. I, 767–768. <https://doi.org/10.1039/C19680000767>.
- 18 Catlin, J. C.; Cramer, F. Deoxy Oligonucleotide Synthesis via the Triester Method. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 245–250. <https://doi.org/10.1021/jo00942a011>.
- 19 Chattopadhyaya, J. B.; Reese, C. B. Chemical Synthesis of a Tridecanucleoside Dodecaphosphate Sequence of SV40 DNA. *Nucleic Acid Res.* **1980**, 8, 2039–2054. <https://doi.org/10.1093/nar/8.9.2039>.
- 20 England, T. E.; Neilson, T. Oligoribonucleotide Synthesis. IX. Synthesis of Sequences Corresponding to the Dihydrouridine Loop Neck Region Common in Several Transfer RNA Molecules. *Can. J. Chem.* **1976**, 54, 1714–1721. <https://doi.org/10.1139/v76-244>.
- 21 Reese, C. B. The Chemical Synthesis of Oligo- and Poly-Nucleotides: A Personal Commentary. *Tetrahedron* **2002**, 58, 8893–8920. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)01084-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01084-0).
- 22 van Boom, J. H.; Burgers, P. M. J.; van Deursen, P. H.; Arentzen, R.; Reese, C. B. Internucleotide Cleavage during Unblocking in Oligonucleotide Synthesis by the Phosphotriester Approach. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 3785–3788. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)92009-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)92009-X).
- 23 Reese, C. B.; Titmas, R. C.; Yau, L. Oximate Ion Promoted Unblocking of Oligonucleotide Phosphotriester Intermediates. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 2727–2730. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91588-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91588-6).
- 24 Reese, C. B.; Yau, L. Reaction between 4-Nitrobenzaldoximate Ion and Phosphotriesters. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 4443–4446. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95248-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95248-7).

- 25 Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. 1-Methyl-2-(2-Hydroxyphenyl)Imidazole: A Catalytic Phosphate Protecting Group in Deoxyoligonucleotide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *2*, 278–279. <https://doi.org/10.1021/ja00287a065>.
- 26 Warren, C. D.; Jeanloz, R. W. Chemical Synthesis of Dolichyl Phosphate and Dolichyl Glycosyl Phosphates and Pyrophosphates and “Dolicholic Intermediates.” *Methods Enzymol.* **1978**, *50*, 122–137. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(78\)50010-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(78)50010-4).
- 27 Jacob, T. M.; Khorana, H. G. Studies on Polynucleotides. XXXVII.1 The Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides.2 Further Examination of the Approach Involving Stepwise Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 368–374. <https://doi.org/10.1021/ja01080a038>.
- 28 Smith, M.; Moffatt, J. G.; Khorana, H. G. Carbodiimides.VIII . Observations on the Reactions of Carbodiimides with Acids and Some New Applications in the Synthesis of Phosphoric Acid Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6204–6212. <https://doi.org/10.1021/ja01556a015>.
- 29 Katagiri, N.; Itakura, K.; Narang, S. A. The Use of Arylsulfonyltriazoles for the Synthesis of Oligonucleotides by the Triester Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7332–7337. <https://doi.org/10.1021/ja00858a021>.
- 30 Berlin, Y. A.; Chakhmakhcheva, O. G.; Efimov, V. A.; Kolosov, M. N.; Korobko, V. G. Arenesulfonyl Imidazolides, New Reagents for Polynucleotide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 1353–1354. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95940-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95940-4).
- 31 Stawinski, J.; Hozumi, T.; Narang, S. A. Arylsulfonyltetrazoles as Highly Efficient Condensing Reagents for Polynucleotide Synthesis. *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 670–672. <https://doi.org/10.1139/v76-096>.
- 32 Jones, S. S.; Rayner, B.; Reese, C. B.; Ubasawa, A.; Ubasawa, M. Synthesis of the 3' -Terminal Decaribonucleoside Nonaphosphate of Yeast Alanine Transfer Ribonucleic Acid. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *36*, 3075–3085.
- 33 Bonora, G. M.; Scremin, C. L.; Colonna, F. P.; Garbesi, A. HELP (High Efficiency Liquid Phase) New Oligonucleotide Synthesis on Soluble Polymeric Support. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3155–3159. <https://doi.org/10.1093/nar/18.11.3155>.
- 34 Kungurtsev, V.; Virta, P.; Lönnberg, H. Synthesis of Short Oligodeoxyribonucleotides by Phosphotriester Chemistry on a Precipitative Tetrapodal Support. *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 35, 7886–7890. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301352>.
- 35 Colonna, F. O.; Scremin, C. L.; Bonora, G. M. Large Scale H.E.L.P. Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides by the Hydroxybenzotriazole Phosphotriester Approach. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3251–3254. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79736-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79736-X).
- 36 Kungurtsev, V.; Laakkonen, J.; Molina, A. G.; Virta, P. Solution-Phase Synthesis of Short Oligo-2'-Deoxyribonucleotides by Using Clustered Nucleosides as a Soluble Support. *European J.*

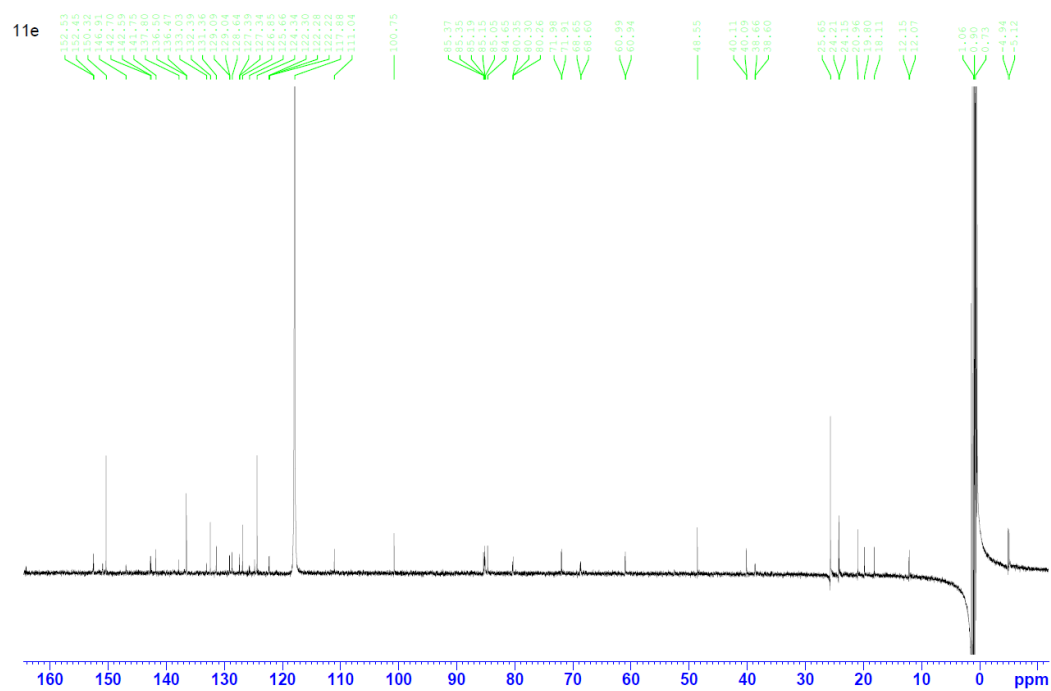
- Org. Chem.* **2013**, No. 29, 6687–6693. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300864>.
- 37 Kungurtsev, V.; Lönnberg, H.; Virta, P. Synthesis of Protected 2'-O-Deoxyribonucleotides on a Precipitative Soluble Support: A Useful Procedure for the Preparation of Trimer Phosphoramidites. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 105428–105432. <https://doi.org/10.1039/c6ra22316h>.
- 38 Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15*, 9394–9403. <https://doi.org/10.1002/chem.200900614>.
- 39 van der Marel, G.; van Boeckel, C. A. A.; G. Wille; van Boom, J. H. A New Approach to the Synthesis of Phosphotriester Intermediates of Nucleosides and Nucleic Acids. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3887–3890. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91336-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91336-X).
- 40 Marugg, J. E.; Tromp, M.; Jhurani, P.; Hoyng, C. F.; Van Der Marel, G. A.; Van Boom, J. H. Synthesis of DNA Fragments by the Hydroxybenzotriazole Phosphotriester Approach. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 73–78. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(84\)85104-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(84)85104-2).
- 41 Marugg, J. E.; Piel, N.; Mclaughlin, L. W.; Tromp, M.; Veeneman, G. H.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. Polymer Supported DNA Synthesis Using Hydroxybenzotriazole Activated Pbsphotriester Intermediates. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 8639–8651. <https://doi.org/10.1093/nar/12.22.8639>.
- 42 Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. Explosive Properties of 1-Hydroxybenzotriazoles. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *126*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.05.044>.
- 43 Manne, S. R.; Sharma, A.; Sazonovas, A.; El-faham, A.; Torre, B. G. De; Albericio, F. Understanding OxymaPure as a Peptide Coupling Additive: A Guide to New Oxyma Derivatives. **2022**. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06342>.

## 5. Liitteet

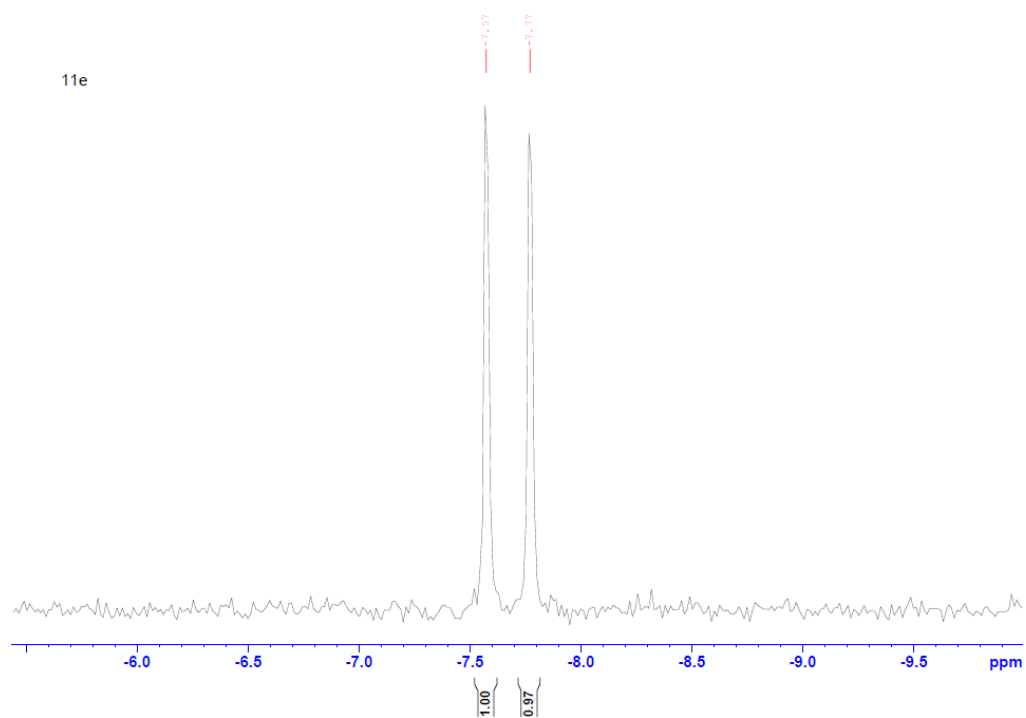
**Liite 1.** *N*<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11e**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



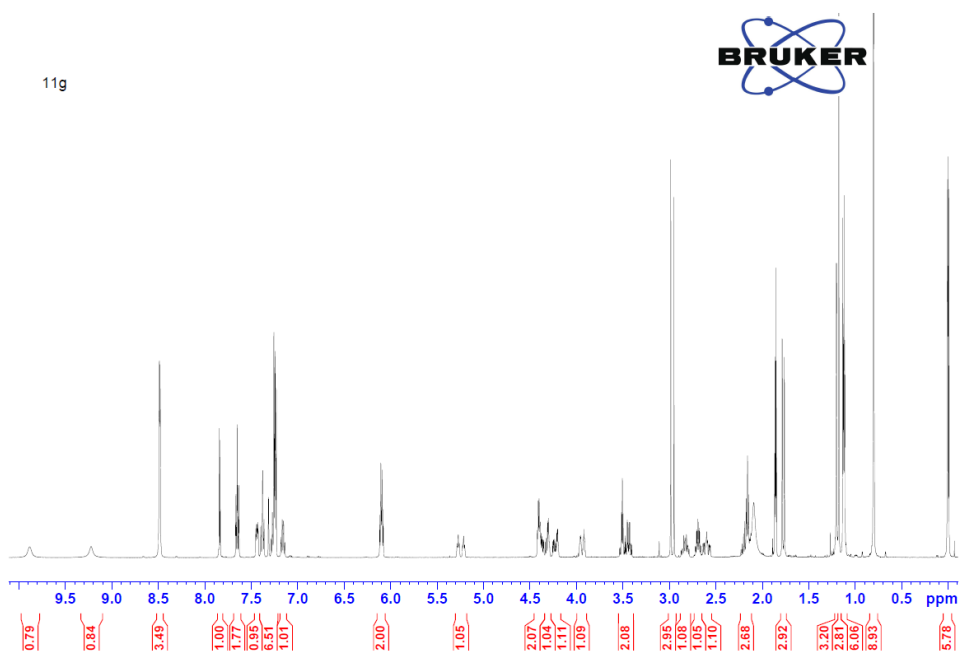
**Liite 2.** *N*<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11e**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)



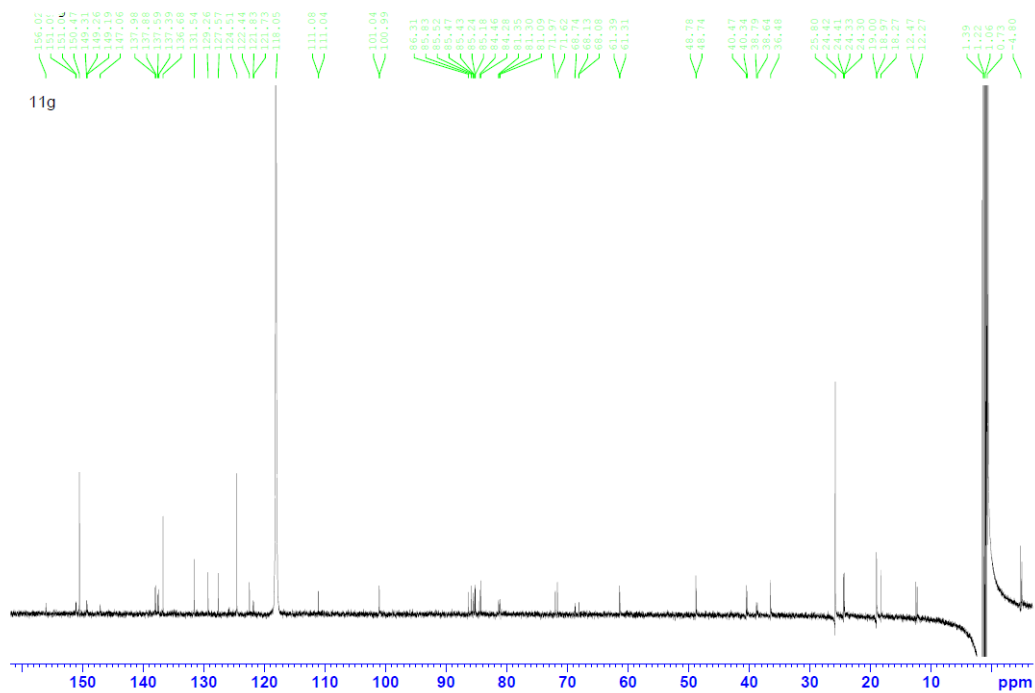
**Liite 3.**  $N^6$ -Dimetyylibentsoyyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11e**)  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 202 MHz)



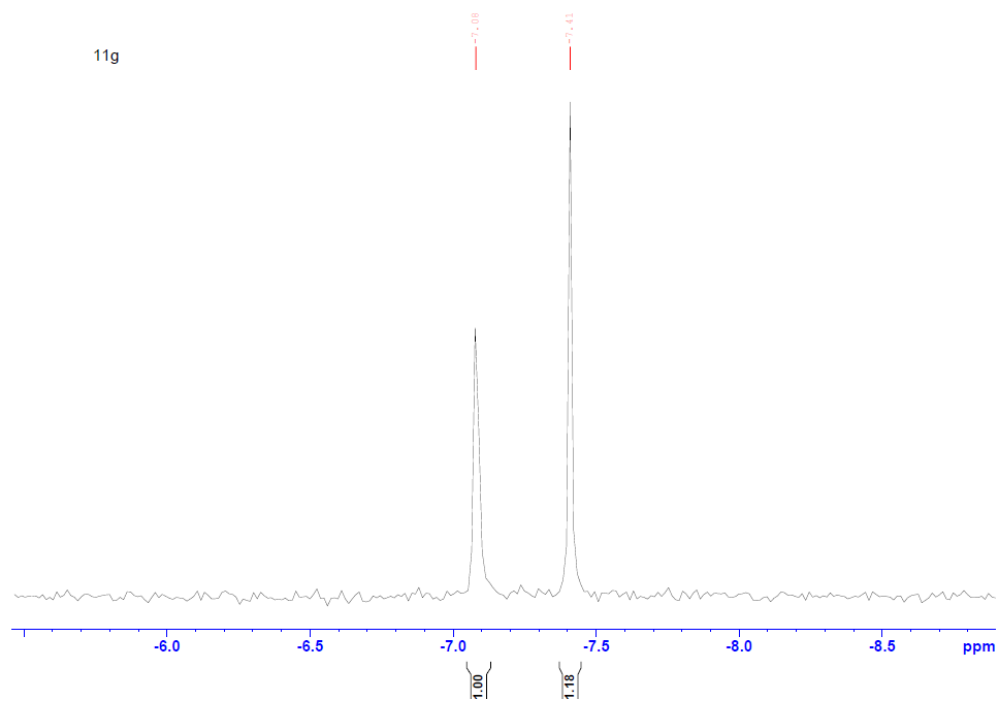
**Liite 4.**  $N^2$ -Isobutyryyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11g**)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz)



**Liite 5.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-guanylyyli-3'5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11g**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)

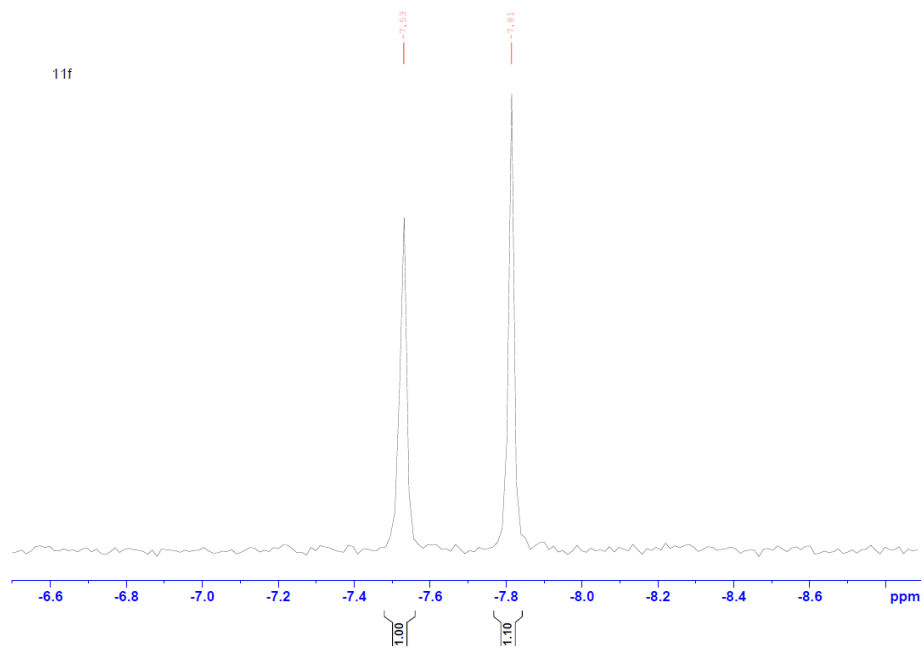


**Liite 6.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-guanylyyli-3'5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11g**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)

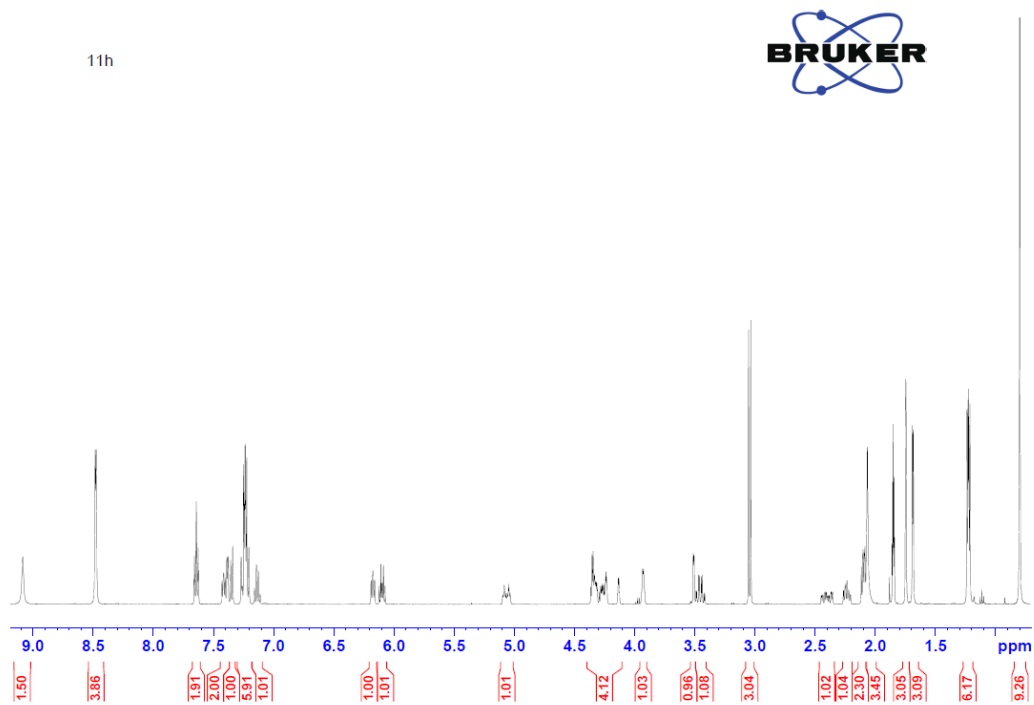




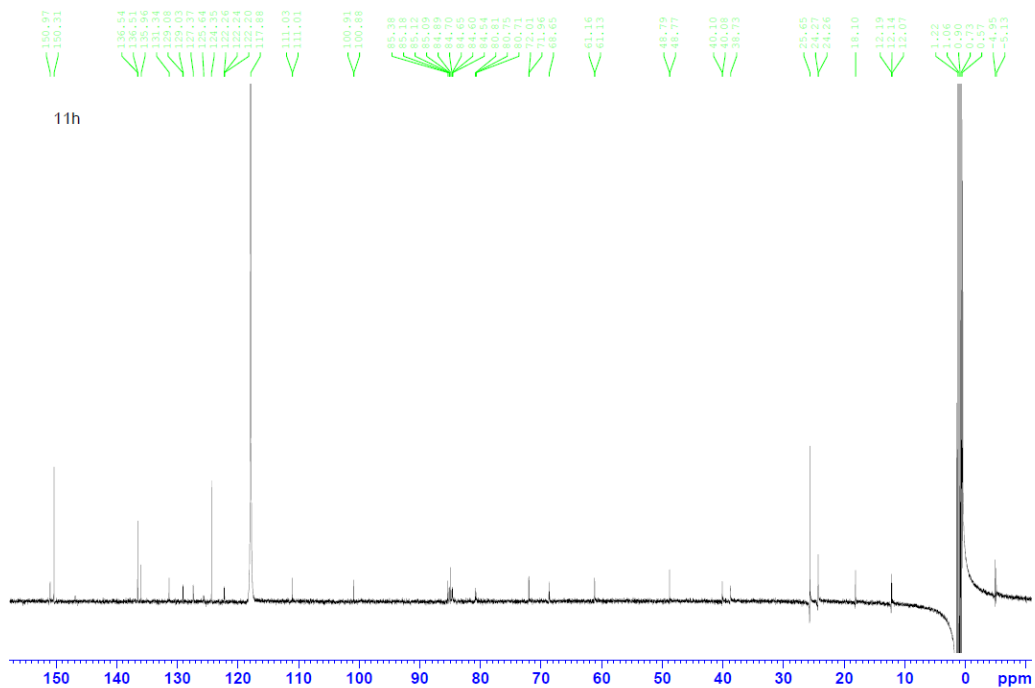
**Liite 9.** *N*<sup>4</sup>-Dimethylbenzoyl-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydylyyli -3' 5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11f**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)



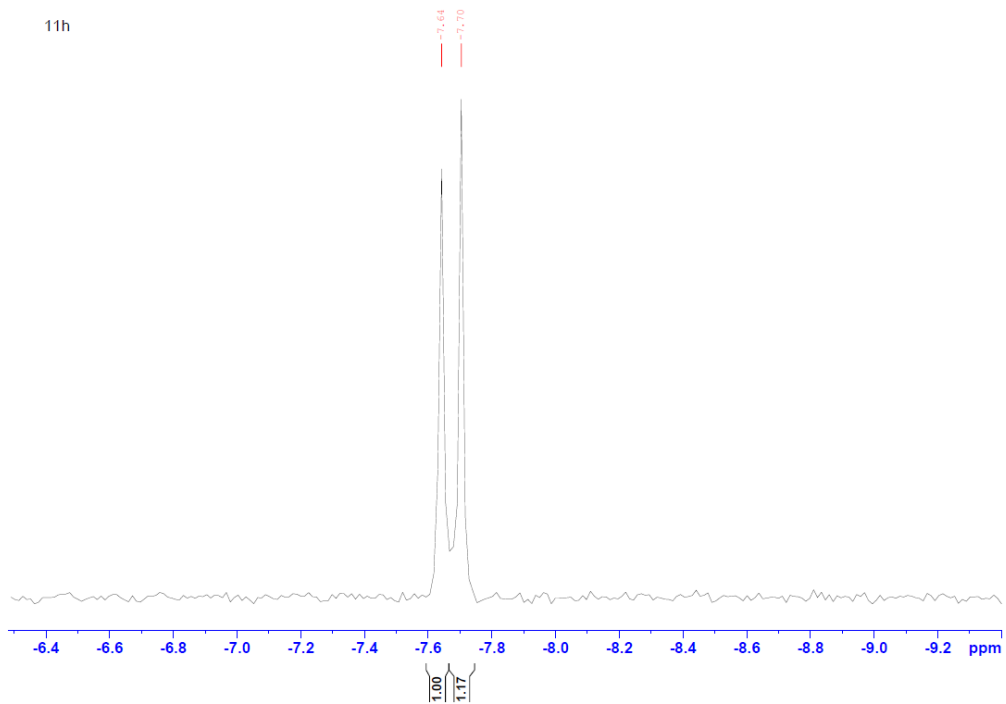
**Liite 10.** 3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11h**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



**Liite 11.** 3'-*O-tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11h**)  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 126 MHz)

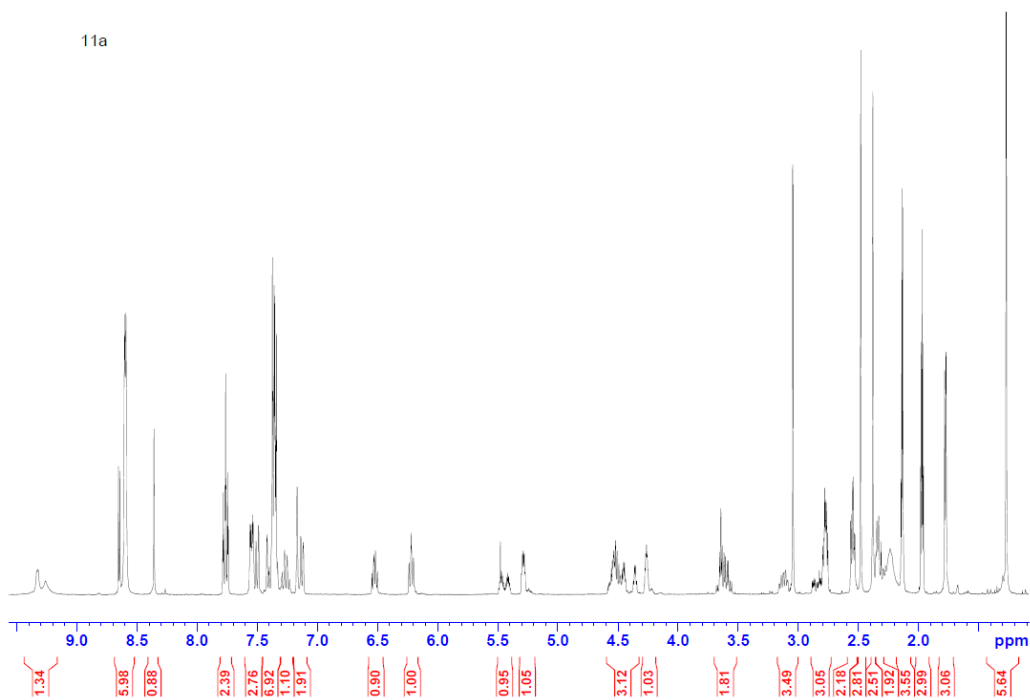


**Liite 12.** 3'-*O-tert*-butyylidimetyylisilyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11h**)  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 202 MHz)



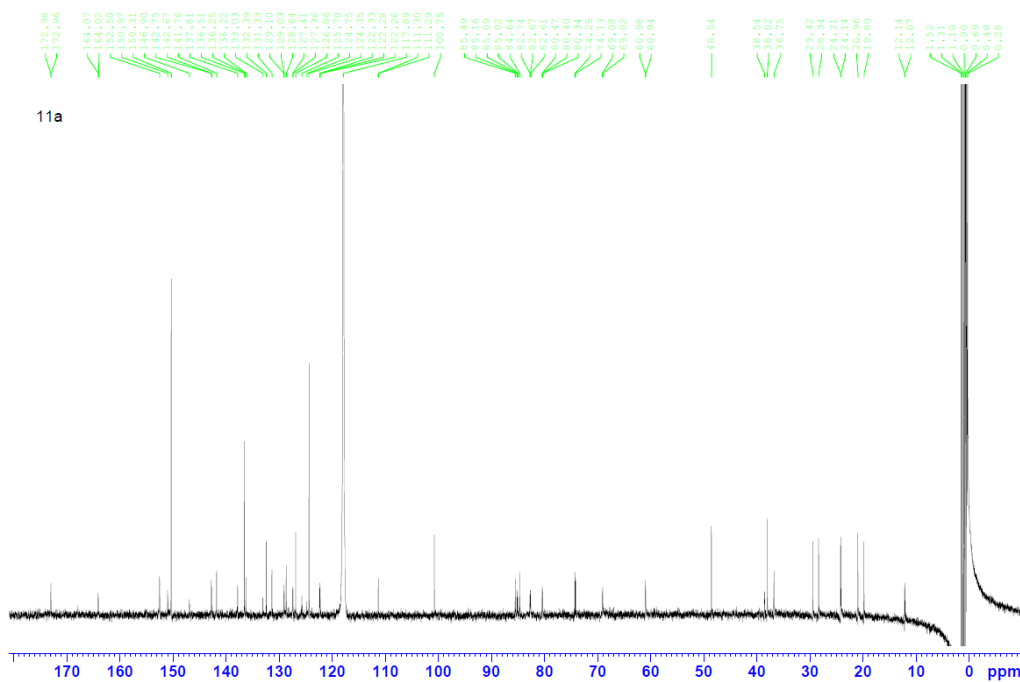
**Liite 13.** *N*<sup>6</sup>-Dimetyyli-bentsooyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-propan-2-yyli)-adenylyyli-3'-tymidiinikloorifenylyl-fosfaatti (**11a**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)

5'



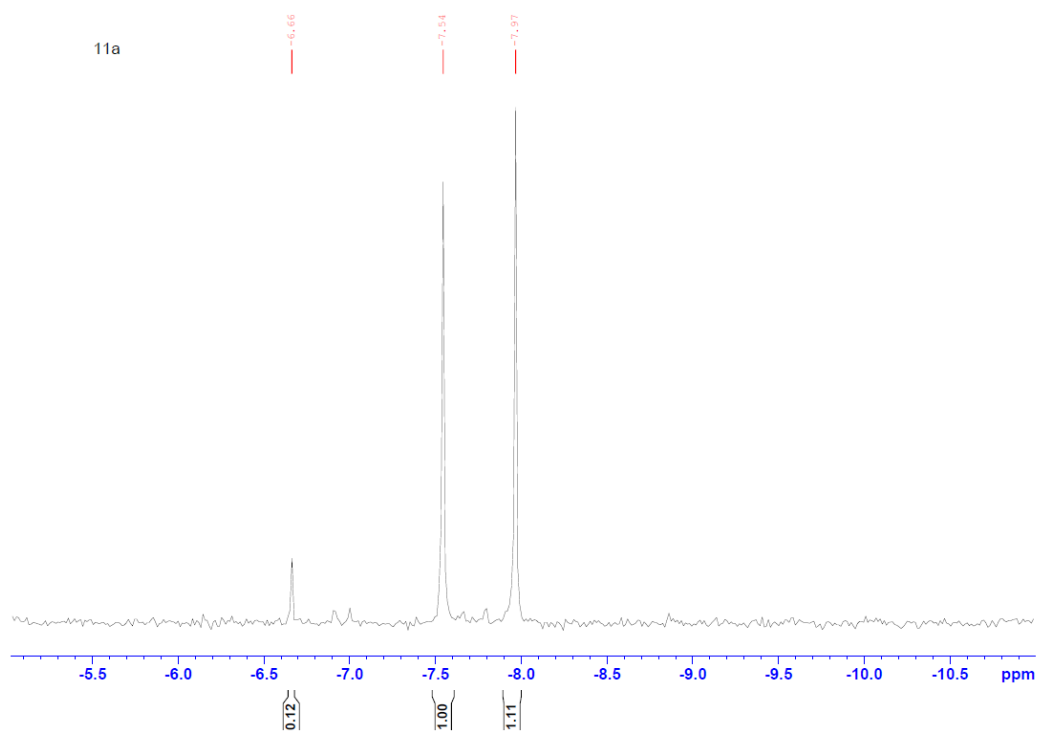
**Liite 14.** *N*<sup>6</sup>-Dimetyyli-bentsooyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-propan-2-yyli)-adenylyyli-3'-tymidiinikloorifenylyl-fosfaatti (**11a**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)

5'



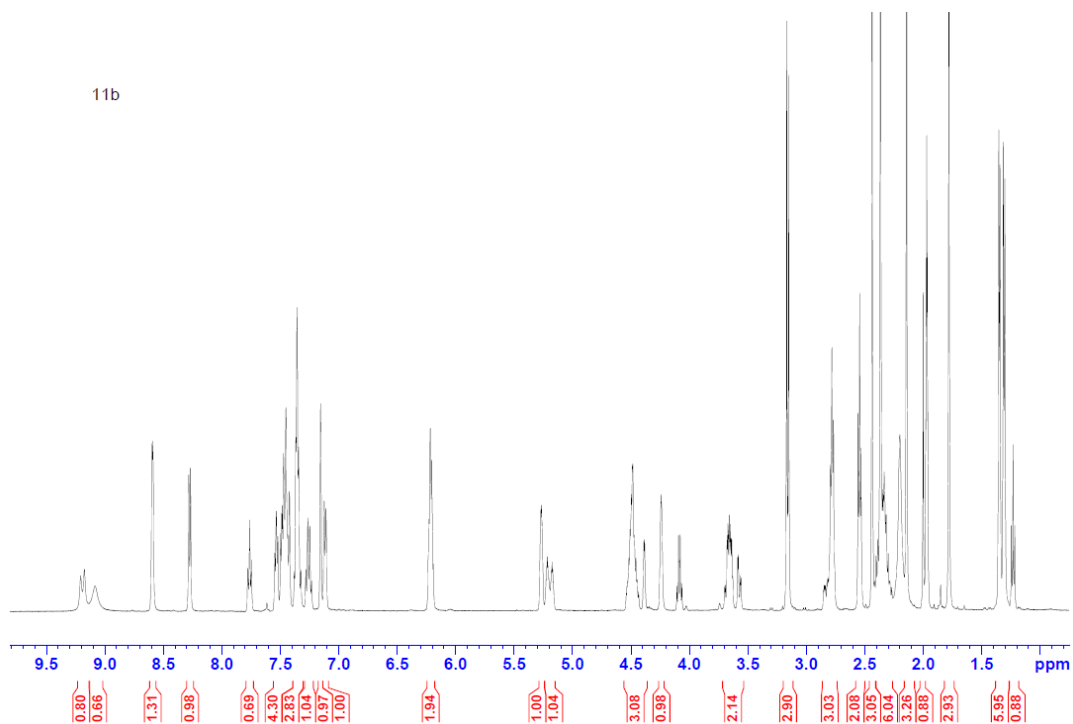
**Liite 15.**  $N^6$ -Dimetyylibentsoyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11a**)  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 202 MHz)

5'-



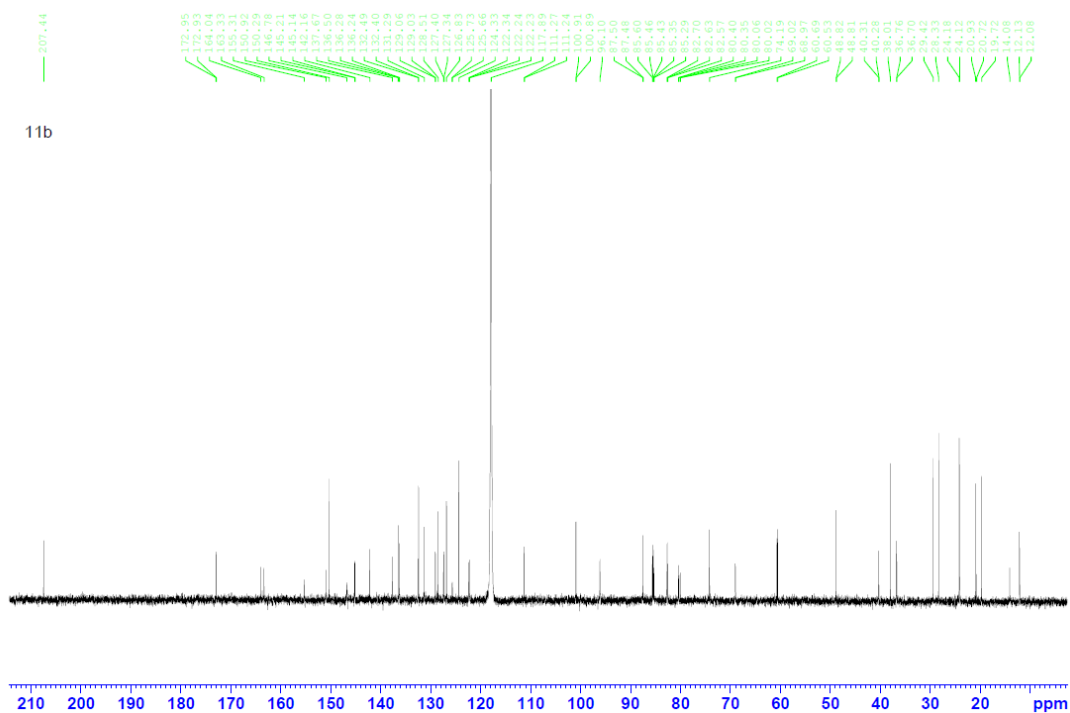
**Liite 16.**  $N^4$ -Dimethylbenzoyl-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydilyyli-3'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11b**)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz)

5'-



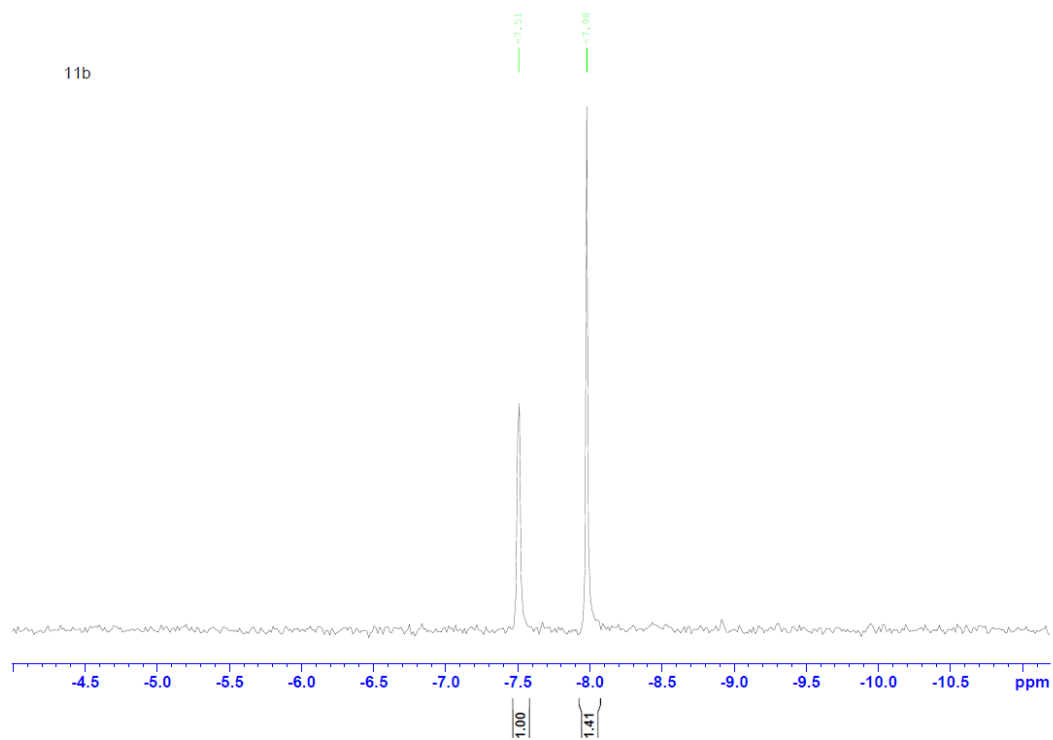
**Liite 17.** *N*<sup>4</sup>-Dimethylbenzoyl-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydilyyli-3'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11b**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)

5'

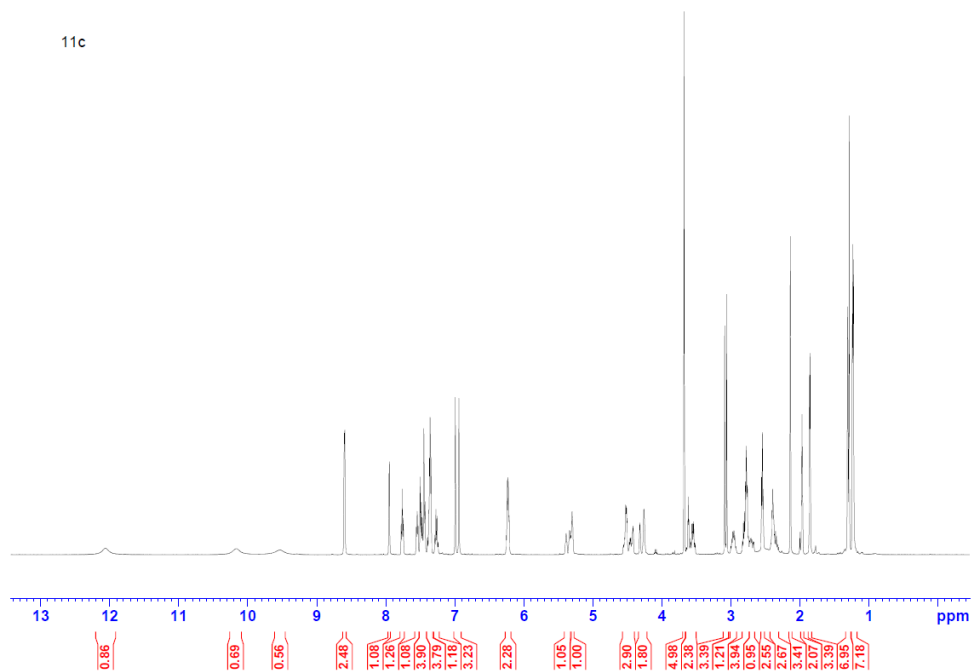


**Liite 18.** *N*<sup>4</sup>-Dimethylbenzoyl-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydilyyli-3'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11b**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)

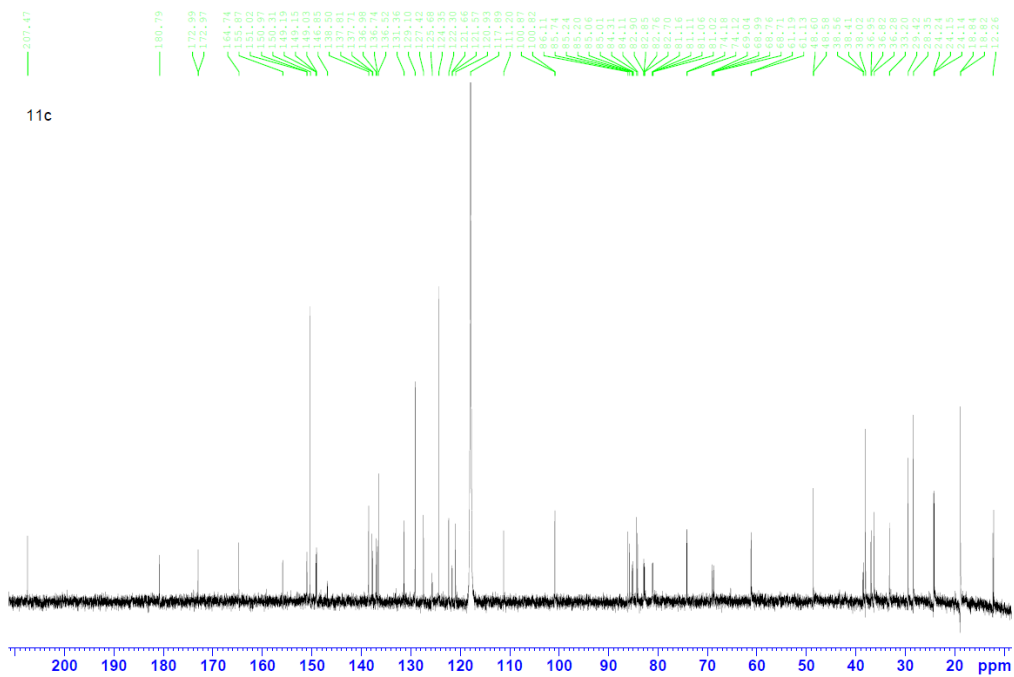
5'



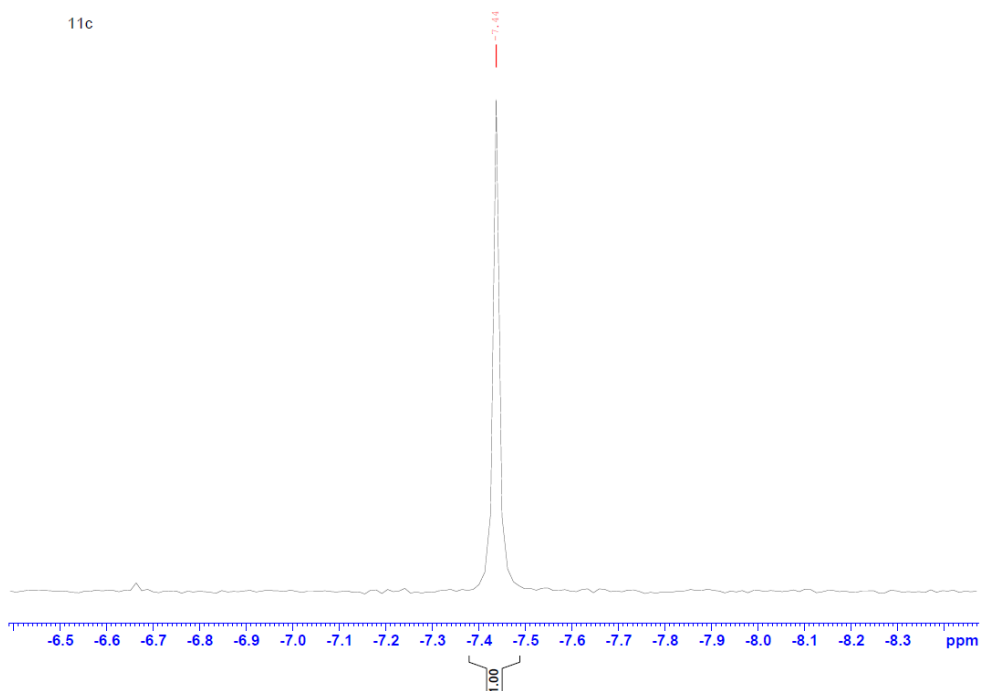
**Liite 19.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-guanylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11c**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



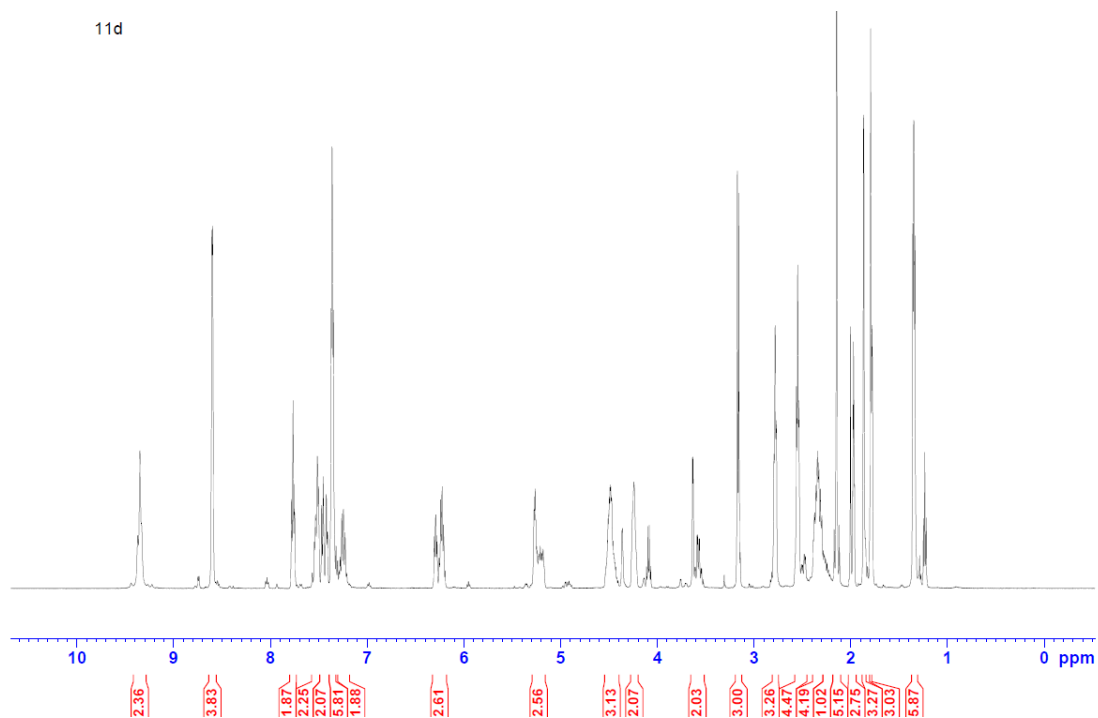
**Liite 20.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-guanylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11c**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)



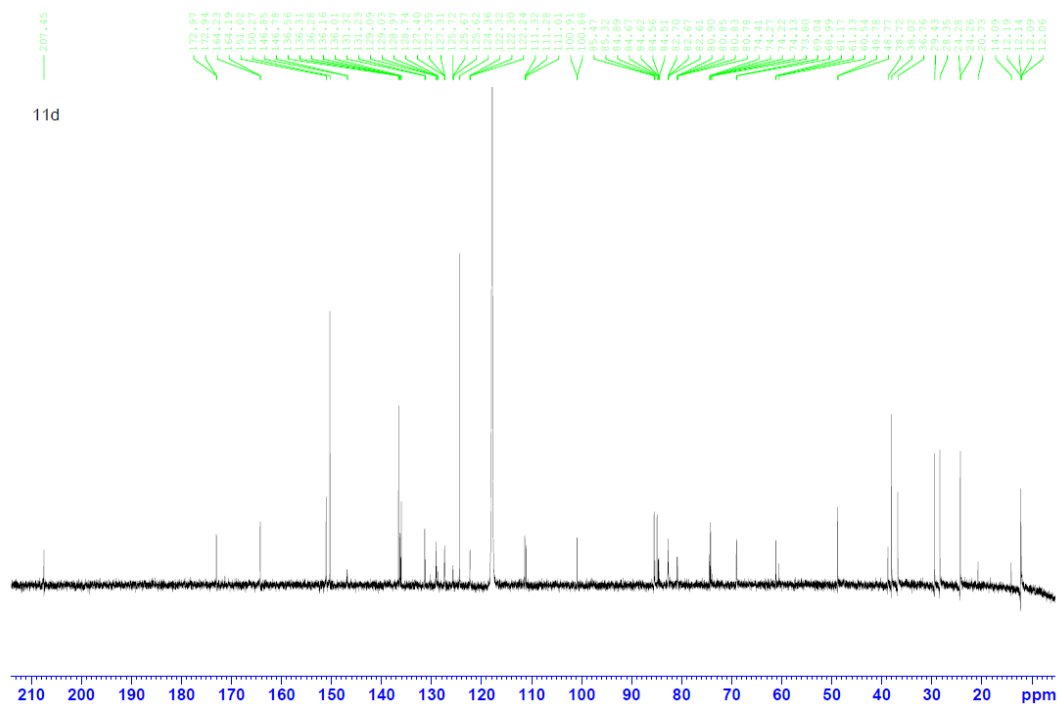
**Liite 21.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11c**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)



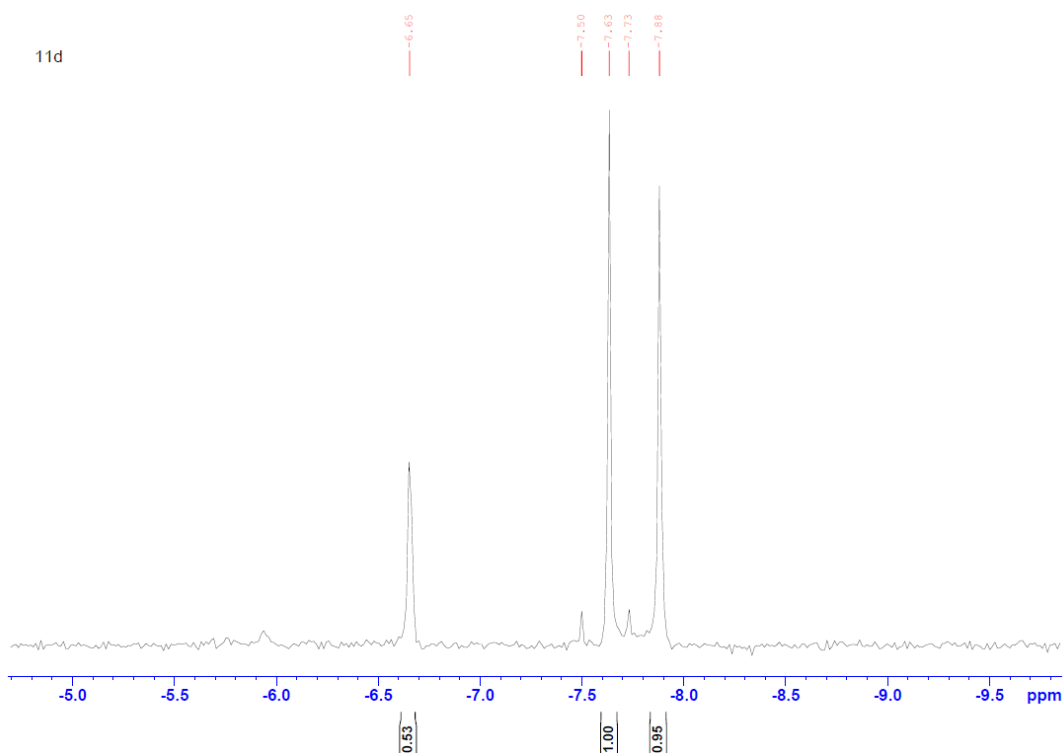
**Liite 22.** 3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-tymidilyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenylyfosfaatti (**11d**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



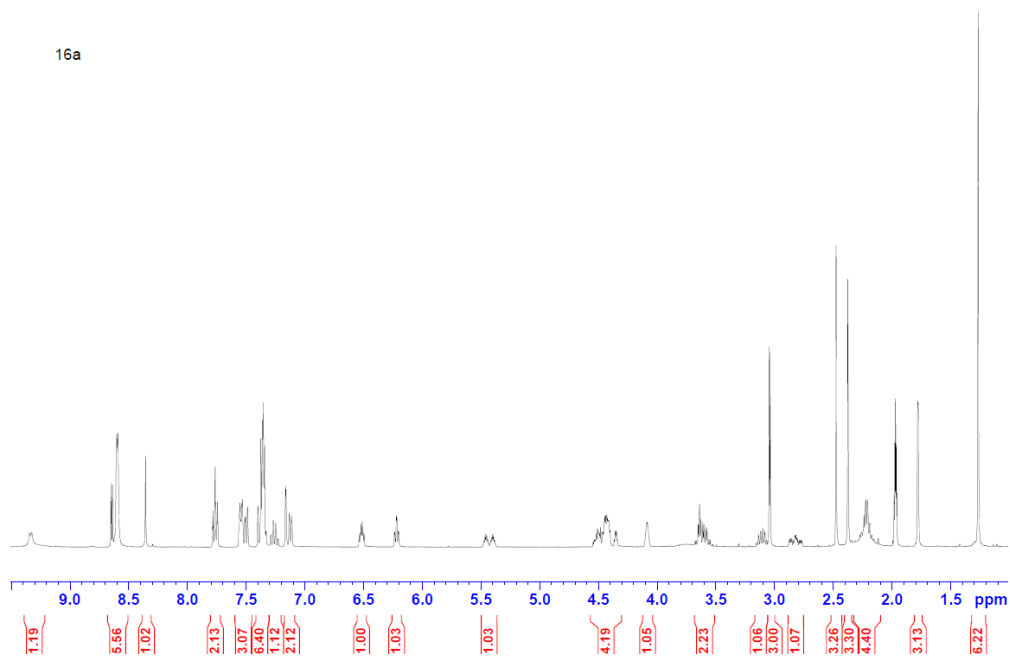
**Liite 23.** 3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11d**)  $^{13}\text{C}$  NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)



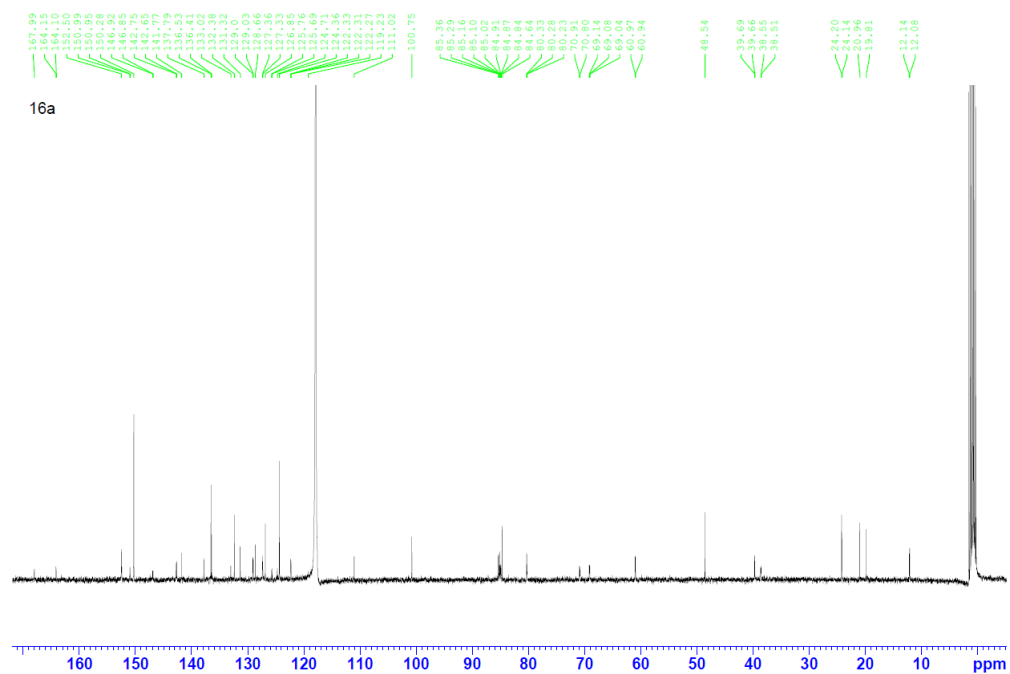
**Liite 24.** 3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**11d**)  $^{31}\text{P}$  NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)



**Liite 25.** *N*<sup>6</sup>-Dimetyyliibentsooyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (**16a**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)

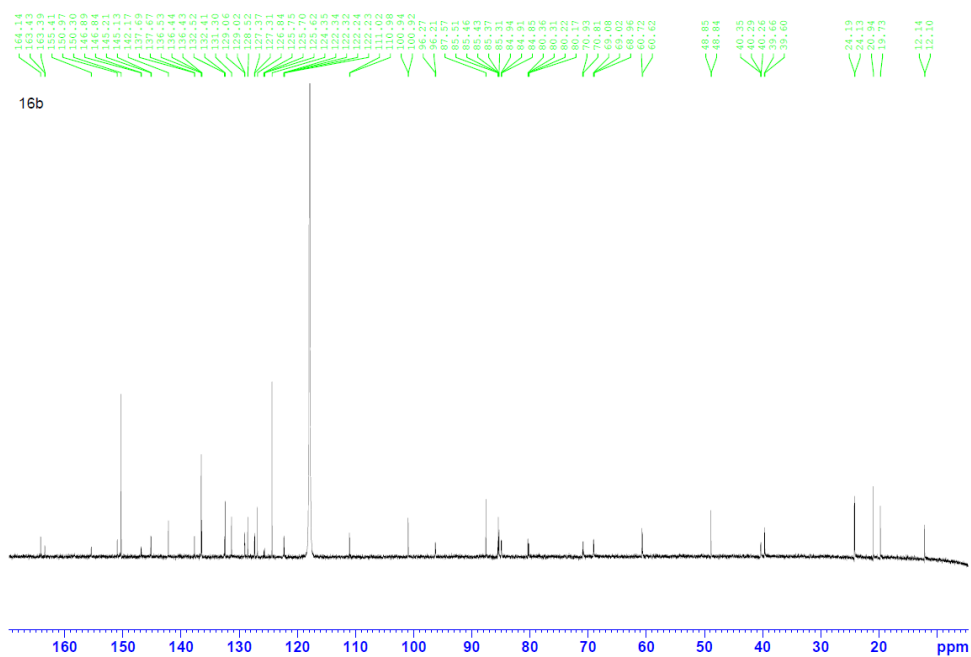


**Liite 26.** *N*<sup>6</sup>-Dimetyyliibentsooyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenylylifosfaatti (**16a**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)

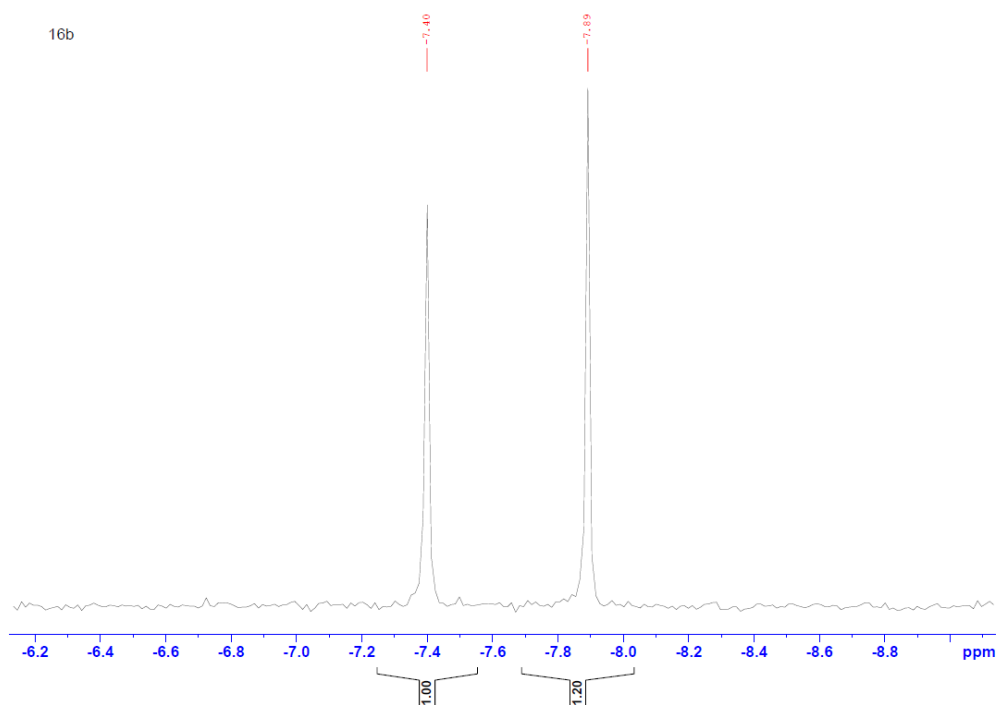




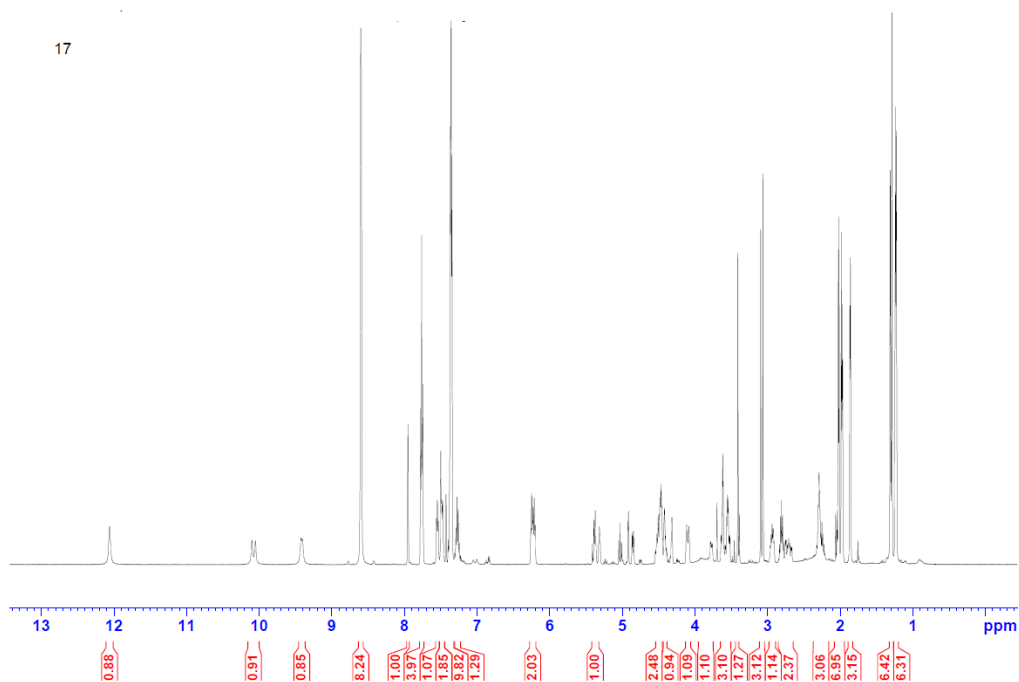
**Liite 29.** *N*<sup>4</sup>-Dimetyyli-*bentsooyli*-5'-*O*-(2-metoksi-*propan*-2-*yyli*)-*sytidyllyli*-3' 5'-*tymidiinikloorifenyylifosfaatti* (**16b**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)



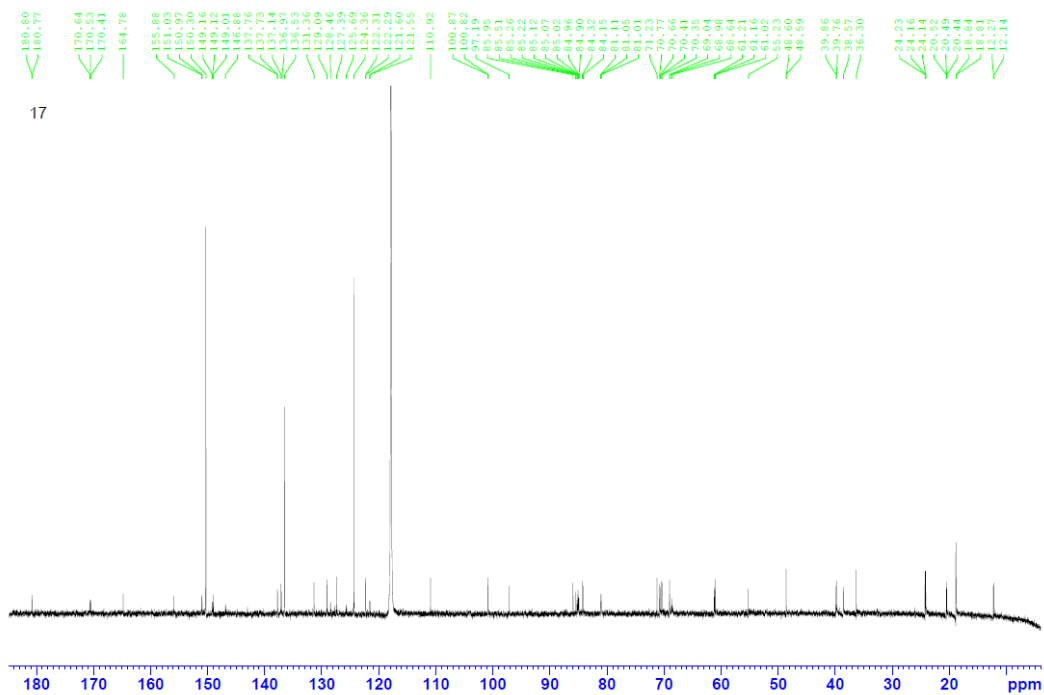
**Liite 30.** *N*<sup>4</sup>-Dimetyyli-*bentsooyli*-5'-*O*-(2-metoksi-*propan*-2-*yyli*)-*sytidyllyli*-3' 5'-*tymidiinikloorifenyylifosfaatti* (**16b**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)



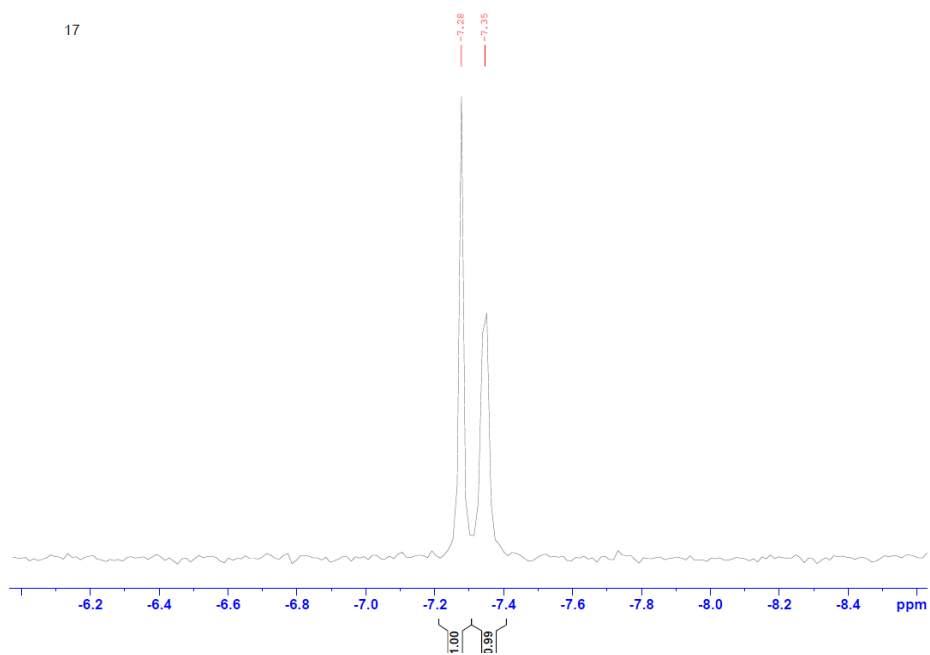
**Liite 31.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (17) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



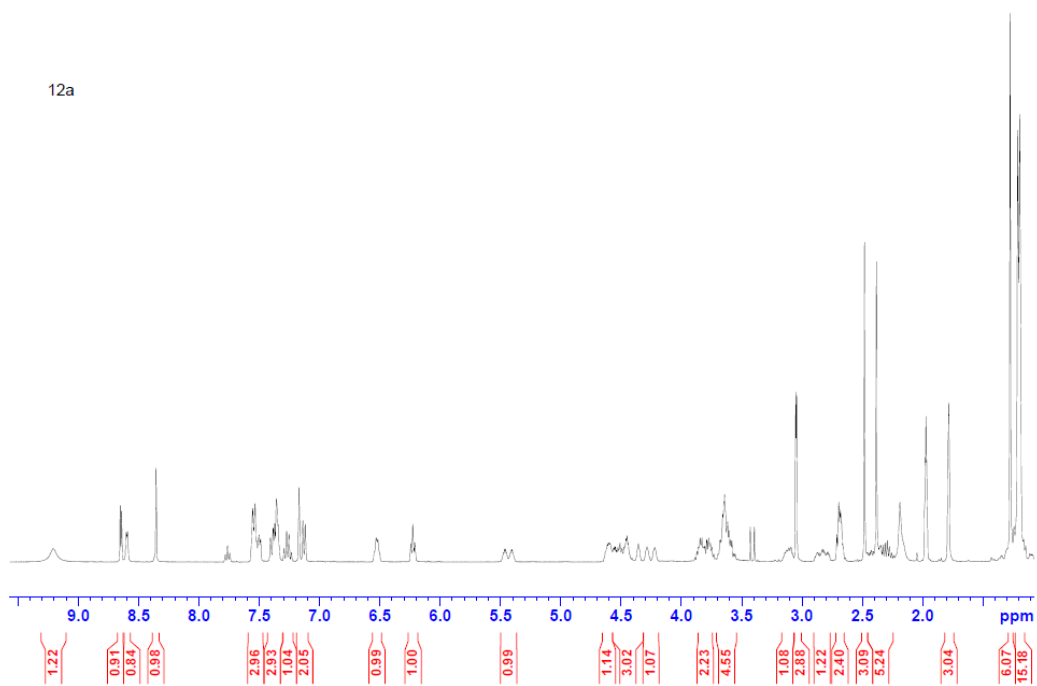
**Liite 32.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (17) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)



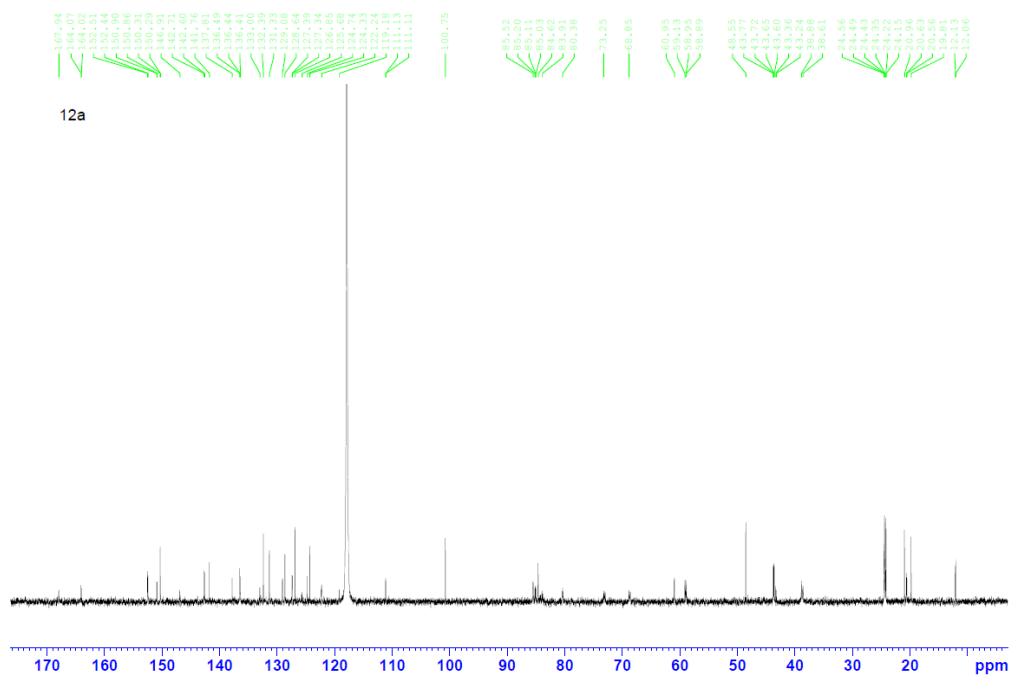
**Liite 33.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-guanylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenylylfosfaatti (**17**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)



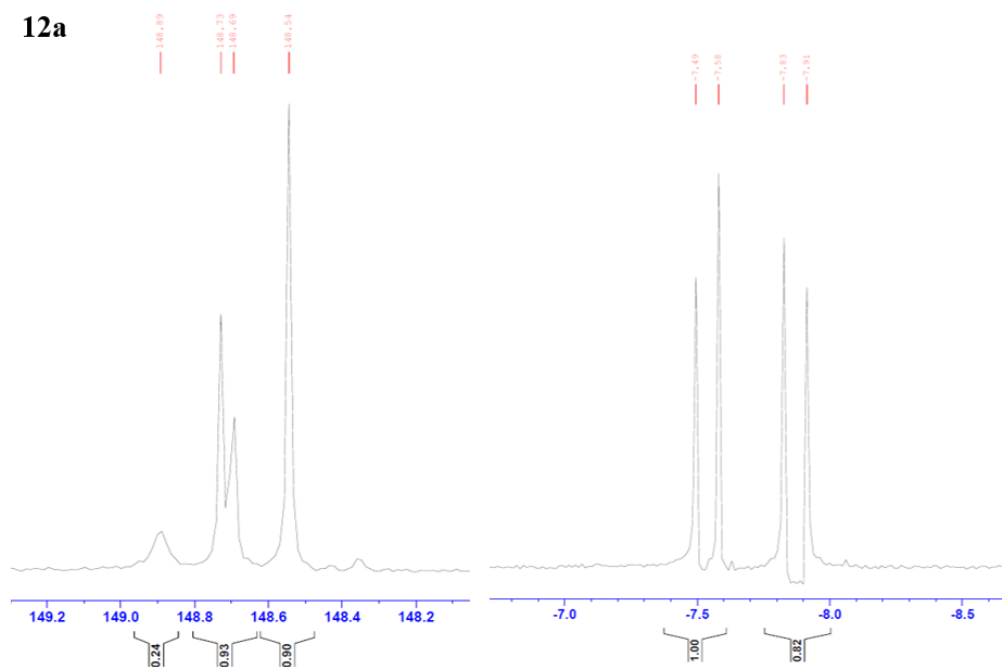
**Liite 34.** *N*<sup>6</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenylylfosfaatti 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylylfosforamidiitti) (**12a**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



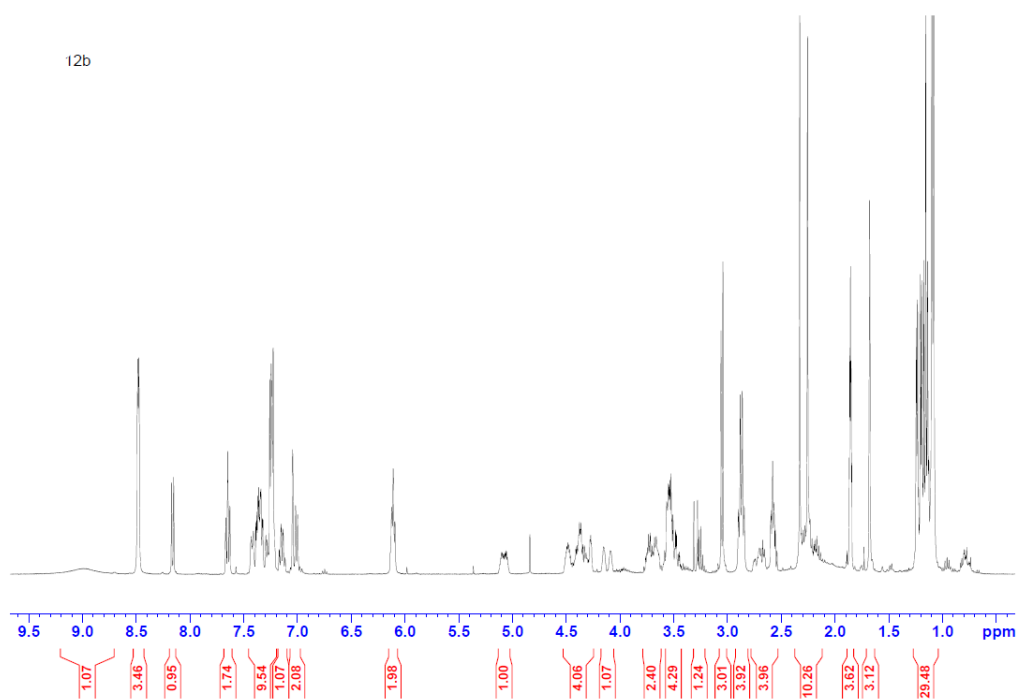
**Liite 35.** *N*<sup>6</sup>-Dimetylibentsooyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylylifosforamidiitti) (**12a**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)



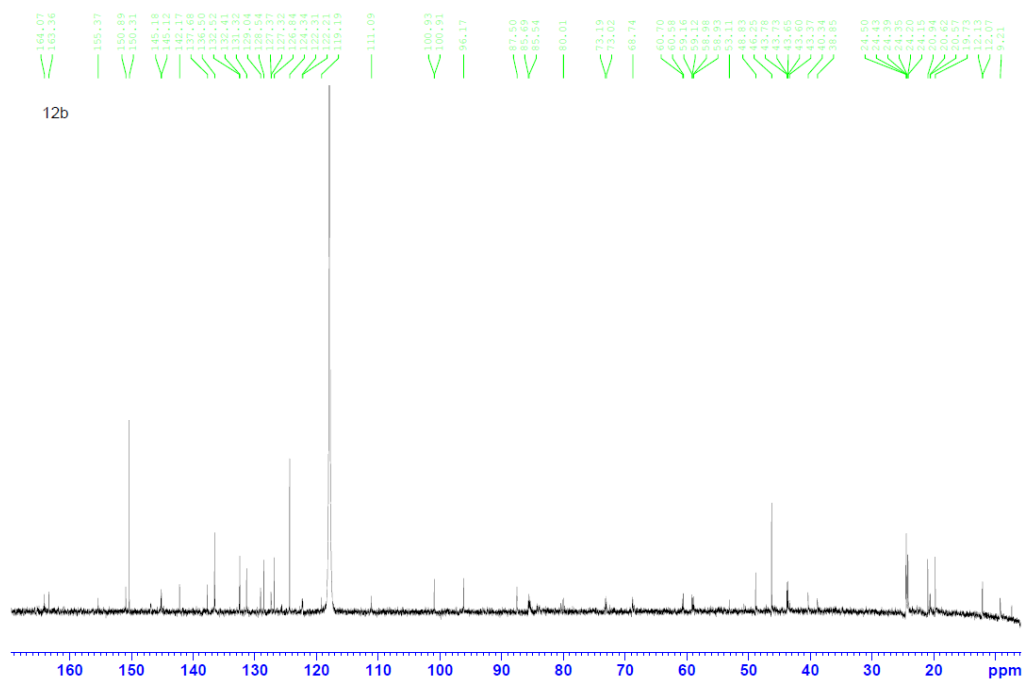
**Liite 36.** *N*<sup>6</sup>-Dimetylibentsooyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-adenylyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylylifosforamidiitti) (**12a**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)



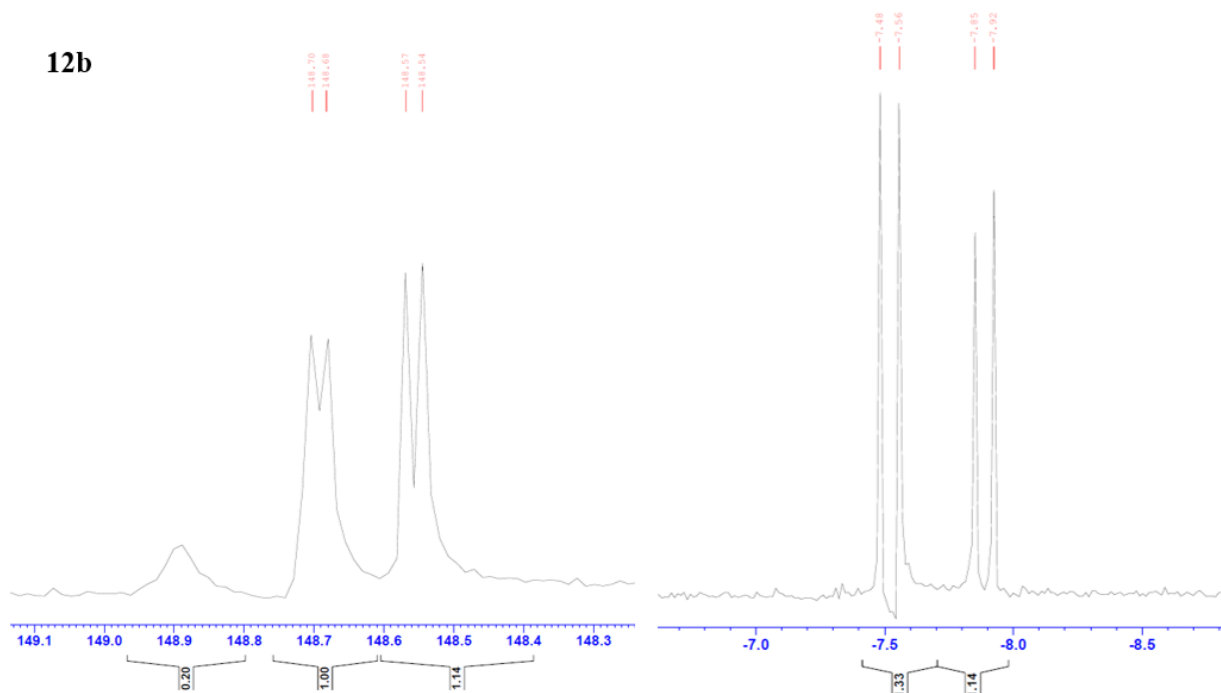
**Liite 37.** *N*<sup>4</sup>-Dimetyylibentsooyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydyllyl-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylyl)fosforamidiitti (**12b**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



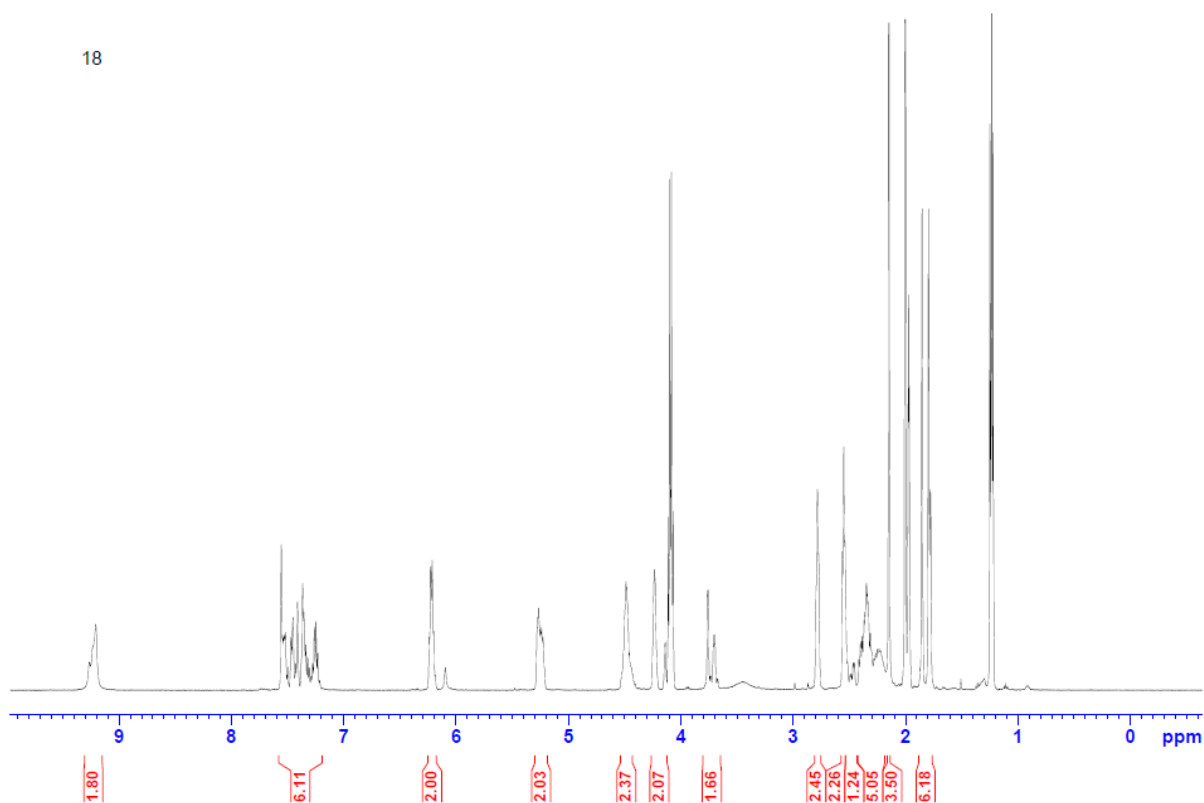
**Liite 38.** *N*<sup>4</sup>-Dimetyylibentsooyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydyllyl-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylyl)fosforamidiitti (**12b**) <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>CN, 126 MHz)



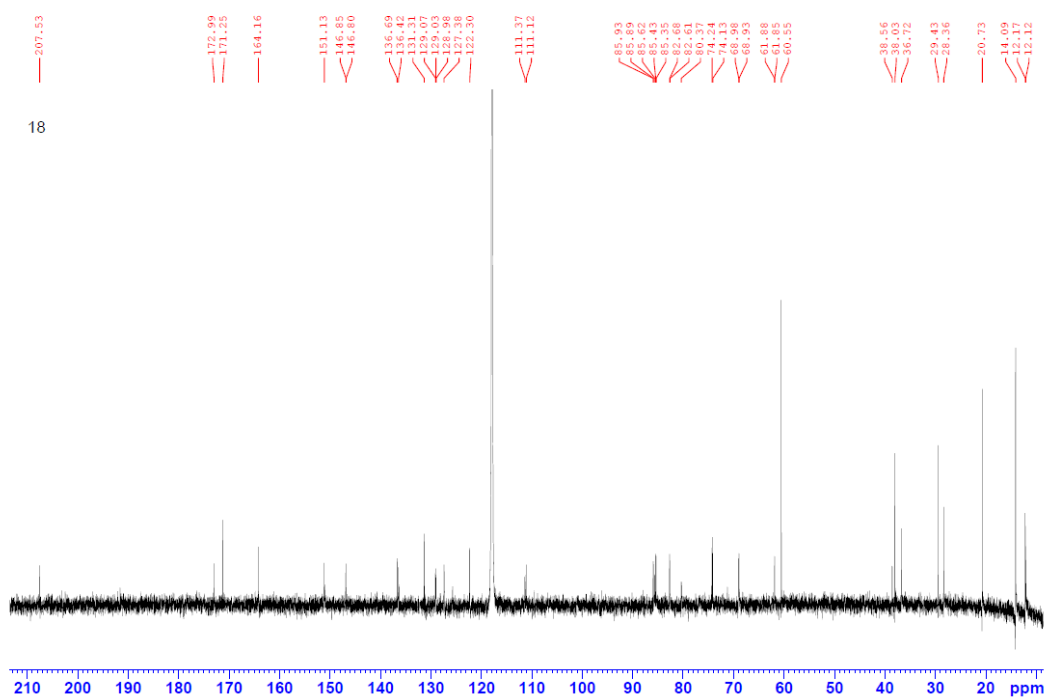
**Liite 39.** *N*<sup>4</sup>-Dimetyylibentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksiopropan-2-yyli)-sytydilyyli-3',5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti 3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropylylifosforamidiitti) (**12b**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)



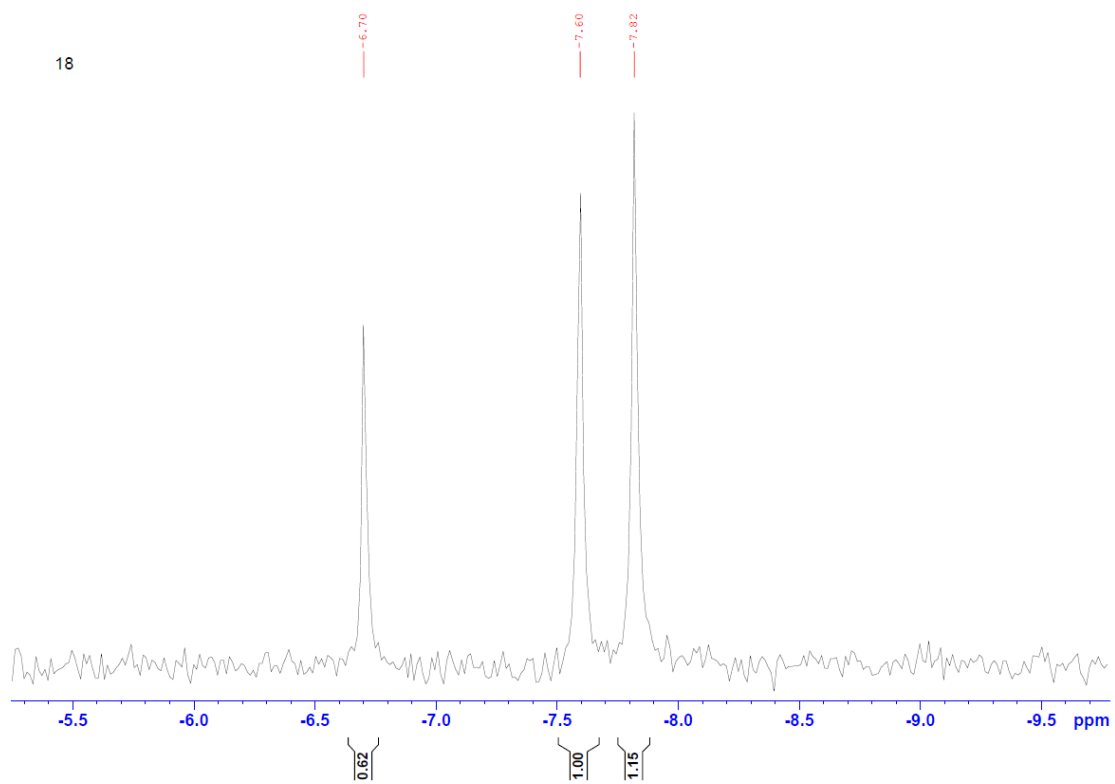
**Liite 40.** 3'-*O*-levulinoyyli-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**18**) <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>CN, 500 MHz)



Liite 41. 3'-O-levulinoyyli-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**18**)  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 126 MHz)



Liite 42. 3'-O-levulinoyyli-tymidylyyli-3' 5'-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**18**)  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 202 MHz)





**Liite 45.** *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-3'-*O*-levulinoyyli-5'-*O*-(2-metoksipropan-2-yyli)-GTTT-tymidiinikloorifenyylifosfaatti (**13**) <sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 202 MHz)

