



**TURUN  
YLIOPISTO**

## **Selektiivinen asetalisaatio**

Kemian laitos  
Lääkekehityksen kemia  
Pro gradu -tutkielma  
Turun yliopisto

Aino Eerola

21.05.2026

Turku

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

Pro gradu -tutkielma

**Tutkinto-ohjelma, oppiaine:** Bio-orgaaninen kemia, lääkekehityksen kemia

**Tekijä:** Aino Eerola

**Otsikko:** Selektiivinen asetalisaatio

**Ohjaajat:** Yliopistonlehtori Mikko Ora, professori Pasi Virta

**Sivumäärä:** 34 sivua

**Päivämäärä:** 21.05.2026

Dimetoksitriptyyli (DMTr) on vakiintunut 5'-OH:n suojaryhmänä syntetisoitaessa oligonukleotideja automatisoidusti kiinteällä kantajalla. Happolabiilimpi 2-metoksi-isopropyyli-suojaus (MIP) on varteenotettava vaihtoehto triptyylisuojaryhmälle kehitettäessä kustannustehokkaampia ja vihreämpiä menetelmiä oligonukleotidien valmistamiseksi liuoksessa. Liuosfaasisynteeseissä MIP-suojaryhmän etuna on sen pseudoirreversiibeli irtoaminen, joka tuottaa haihtuvia sivutuotteita asetonia ja metanolia. Lisäksi MIP on happolabiilimpi kuin DMTr, jolloin mahdollisena sivureaktiona muodostuvan depurinaation osuus vähenee.

Pro gradun johdanto-osiossa tarkastellaan nukleosidien ja hiilihydraattien asetalisaatiota ja sen selektiivisyyttä. Uridiinin primäärisen hydroksyyli­ryhmän selektiivistä asetalisaatiota on aikaisemmin tutkittu käyttämällä 2,2-dimetoksi­propania reagenssina ja di-*p*-nitrofenyyli­fosfaattia happokatalyyttinä *N,N*-dimetyyliasetamidissa.

Isopropylideeni ja bentsylideeni ovat kaksi yleisesti käytettyä suojaryhmää hiilihydraattien asetalisaatiossa, jossa happokatalyyttinä käytetään usein *p*-tolueenisulfonihappoa. Hiilihydraattien 2-metoksi-isopropyyli- sekä 1-metoksi-1-sykloheksyyliasetaalien synteeseissä on käytetty katalyyttinä kiraalisia fosforihappoja (CPA) parantamaan reaktion paikkaselektiivisyyttä. Myös zeoliitti-katalyyttejä on tutkittu ksyloosin ja aldehydin välisessä paikkaselektiivisessä asetalisaatiossa.

Projektin kokeellisessa osassa kehitettiin nukleosideille asetalisaatiomenetelmä, jossa nukleosidien 5'-hydroksyyli­ryhmä suojattiin selektiivisesti 2-metoksi-isopropyyllillä pyridiinissä käyttäen 2-metoksi­propeenia ja katalyyttinä *p*-tolueenisulfonihappoa. Suojatut nukleosidit fosfityloitiin fosforamidiiteiksi.

**Avainsanat:** Nukleosidi, hiilihydraatti, asetalisaatio, liuosfaasisynteesi, selektiivisyys

# Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
1.1	Hiilihydraattien asetalisaatio	4
1.2	Nukleosidien asetalisaatio	13
<b>2</b>	<b>Tulokset ja niiden tarkastelu</b>	<b>17</b>
2.1	Nukleoemästen eksosyklisen aminoryhmän bentsoyyli ja isobutyryylisuojaus	17
2.2	Asetalisaatio	18
2.2.1	Asetalisaatio milligrammamittakaavassa	18
2.2.2	Asetalisaatio suuremmassa mittakaavassa	19
2.3	Fosfitylointi	21
2.4	Johtopäätökset	21
<b>3</b>	<b>Materiaalit ja menetelmät</b>	<b>23</b>
3.1	Yleiset menetelmät	23
3.2	Synteesit	23
3.2.1	Eksosyklisen aminoryhmän bentsoyloinnin yleinen synteesikuvaus	23
3.2.2	Eksosyklisen aminoryhmän isobutyryloinnin yleinen synteesikuvaus	25
3.2.3	Asetalisaation yleinen synteesikuvaus.	26
3.2.4	Fosfityloinnin yleinen synteesikuvaus	30
<b>4</b>	<b>Viitteet</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Liitteet</b>	<b>38</b>

## Lyhenteet

CPA = kiraalinen fosforihappo (chiral phosphoric acid)

DCM = dikloorimetaani

DMTr = dimetoksitriityli

DMF = dimetyyliforamidi

HPLC = korkean erotuskyvyn nestekromatografia

HRMS (ESI) = korkean erotuskyvyn massaspektrometri (sähkösumutus-ionisaatio)

IIP = 2-isopropoksyprop-2-yyli

LPOS = oligonukleotidien liuosfaasisynteesi (liquid phase oligonucleotide synthesis)

MIP = 2-metoksi-isopropyyli

MIPPY = 2-metoksi-prop-2-yyli-pyridinium

MS = massaspektrometri

NMR = ydinmagneettinen resonanssi

PG = suojaryhmä (protecting group)

RNA = ribonukleiinihappo

RP-HPLC = käänteisen faasin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

RT = huoneenlämpötila (room temperature)

SPOS = kiinteän faasin oligonukleotidisynteesi (solid phase oligonucleotide synthesis)

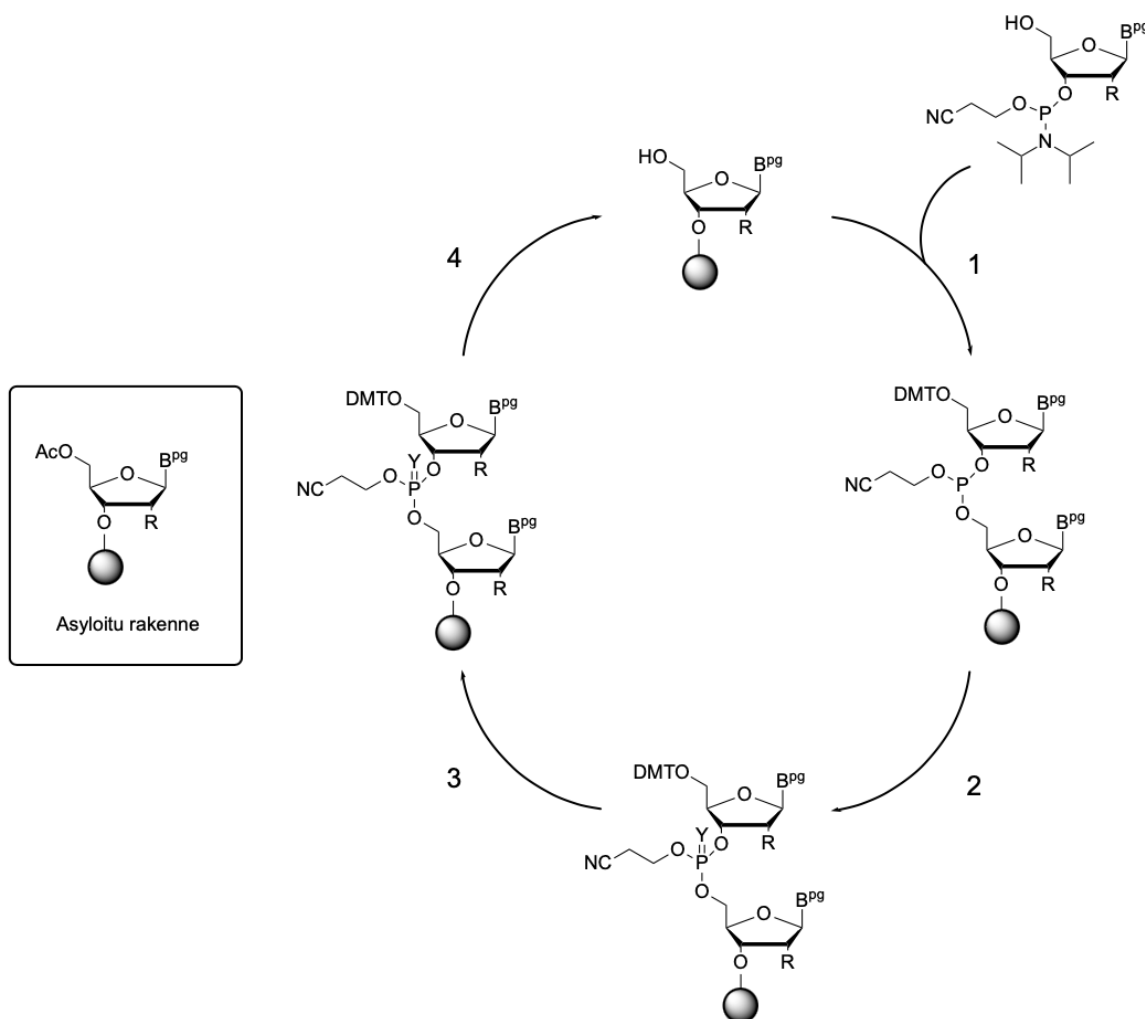
TBDMS = *tert*-butyylidimetyylisilyyli

TEA = trietyyliamiini

TLC = ohutkerroskromatografia (thin layer chromatography)

## 1 Johdanto

Oligonukleotidejä syntetisoidaan tällä hetkellä vallitsevasti automatisoidusti kiinteällä kantajalla (SPOS, solid-phase oligonucleotide synthesis). Synteesisykli koostuu neljästä vaiheesta; detritylaatiosta, kytkentäreaktiosta, hapetuksesta sekä reagoimattoman 5'-hydroksyyli­ryhmän asetyloinnista (Kaavio 1). Lähtöaineina synteesissä käytetään sopivasti suojattuja nukleosidien fosforamidiittijohdannaisia. Detrylaatiossa 5'-hydroksyyli­ryhmän dimetoksitriityyli-suojaryhmä poistetaan. Tämän jälkeen nukleosidifosforamidiitti aktivoidaan ja kytketään kasvavan nukleotidiketjun 5'-hydroksyyli­ryhmään. Syntynyt fosfiitti hapetetaan fosfaatiksi. Lopuksi reagoimattomat 5'-hydroksyyli­ryhmät suojataan asetyyllillä käyttäen reagenssina asetanhydridiä.<sup>1</sup> Oligonukleotidiketju irrotetaan kiinteästä kantajasta ja emäslabiilit suojaryhmät poistetaan ammoniakkin vesiliuoksella.<sup>1</sup>



Kaavio 1. Oligonukleotidin synteesi. 1. kytkentä, 2. hapetus, 3. asylointi, 4. detritylaatio. Muotoiltu lähteestä <sup>1</sup>

Terapeuttisten oligonukleotidien kysynnän kasvaessa myös tarve ympäristöystävällisemmille ja kustannustehokkaammille<sup>1</sup> sekä vaihtoehtoisille suuremman mittakaavan synteesistrategioille on kasvanut.<sup>2</sup> Vaihtoehtona automatisoidun kiinteän kantajan synteesille on liuosfaasisynteesi (LPOS, liquid-phase oligonucleotide synthesis). Etuna liuosfaasisynteesissä on esimerkiksi käytettävien liuottimien ja kalliiden reagenssien pienempi tarvittava ylimäärä.<sup>3</sup> Lisäksi liuosfaasisynteesissä reaktiovaiheita on helpompi seurata ja optimoida, jonka takia pystytään minimoimaan reagenssien käyttöä.<sup>1</sup>

Haasteena liuosfaasisynteesissä on välituotteiden eristäminen ja puhdistaminen. Tämän takia suojarahmästrategiaa sekä kytkentäkemiaa saattaa joutua räätälöimään

liuosfaasisynteesiin soveltuvaksi. Liuosfaasisynteesissä mahdollisia kytkentätapoja ovat esimerkiksi fosforamidiitti-, H-fosfonaatti-, oksidatiivinen H-fosfonaatti- ja fosfotriesterikytkentämenetelmä in situ-aktivointia tai esiaktivoitua monomeeriä käyttäen.<sup>4</sup>

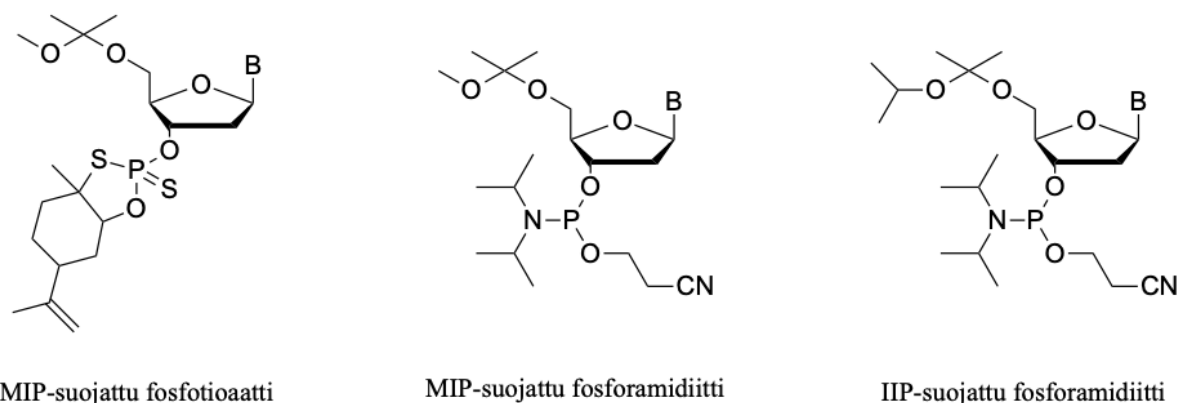
Asetaalit ovat tärkeitä happolabiileja suojaryhmiä nukleiinihappojen kemiassa.<sup>5</sup> Oligonukleotidien synteesissä on välituotteina käytetty esimerkiksi 2',3'-O,O-isopropyylideeni- sekä 2'-O-tetrahydropyranyyli (TPH) suojattuja ribonukleosidejä.<sup>6,7</sup> Myös asetoniasetaaleja (2-metoksi-isopropyyli = MIP ja 2-isopropoksi-prop-2-yyli = IIP) on käytetty oligonukleotidien liuosfaasisynteesissä sekä oligonukleotidifosforotioaattien stereoselektiivisessä liuosfaasisynteesissä (LPOS).<sup>5</sup>

Dimetoksitriptyylin haasteena liuosfaasisynteesissä on detritylaation reversiibelisyys. Lisäksi detritylaatiossa syntyvät dimetoksitriptyyli johdannaiset ovat lipofiilisiä, jotka hankaloittavat kasvavan oligonukleotidiketjun puhdistamista.<sup>8</sup> Dimetoksitriptyylin poistaminen vaatii happamat olosuhteet jonka seurauksena voi tapahtua sivureaktiona myös deaminaatiota. Deaminaatiossa muodostuvat oligonukleotidisivutuotteet ovat vaikeasti havaittavissa, sillä ne ovat monesti rakenteeltaan hyvin samanlaisia kuin halutut lopputuotteet.<sup>4</sup>

MIP- ja IIP-suojaryhmät ovat dimetoksitriptyyliryhmää happolabiilimpia, jolloin voidaan käyttää miedompaa happokäsittelyä suojaryhmien irroituksessa. Tämä vähentää sivureaktiona tapahtuvan depurinaation osuutta. Lisäksi asetaalien irroitus on irreversiibeli reaktio ja reaktiossa muodostuu haihtuvia sivutuotteita (asetoni ja alkoholi). Nämä yhdessä helpottavat oligonukleotidien puhdistusta ja eristystä.<sup>5,8</sup>

Aikaisemmin MIP-suojaryhmää on käytetty syntetisoitaessa kiraalisia limoneenipohjaisia oksatiafosfolaanisulfidirakenteita. Syntetisoituja rakenteita käytettiin edelleen di- tri- ja tetranukleotidifosforotioaattien stereoselektiivisessä valmistuksessa liuosfaasisynteesissä.<sup>9</sup> Syntetisoituja 5'-O-MIP-suojattuja fosforamidiittejä on käytetty esimerkiksi pentameeristen oligonukleotidien valmistuksessa permetyloidulla syklohextriini kantajalla.<sup>2</sup> IIP-suojaryhmää on käytetty esimerkiksi valmistettaessa 5'-O-IIP-suojattuja 2'-deoksiribonukleosidifosforamidiittejä. Nukleosidifosforamidiittiyksiköitä on käytetty di-

, tri-, tetra- ja pentanukleotidien synteessissä liukoisella kantajalla. Kantajana synteessissä toimi liukoinen saostettava nelihaarainen pentaerytritolipohjainen kantaja.<sup>8</sup>



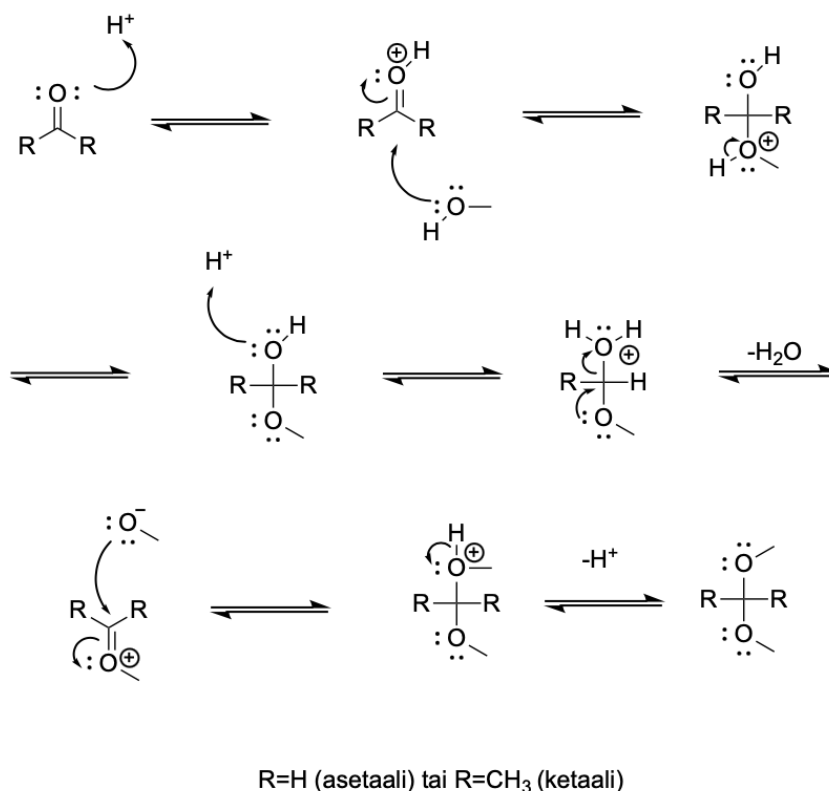
Kuva 1. esimerkkejä asetaalisuojauksen käytöstä

Pro-gradun johdannossa käsitellään hiilihyaattien sekä nukleosidien asetalisaatiota. Kokeellisessa osuudessa on tutkittu nukleosidien 5'-hydroksyyli ryhmän selektiivistä asetalisaatiota 2-metoksipropeenin avulla käyttäen *p*-tolueenisulfonihappoa happokatalyyttinä pyridiinissä.

### 1.1 Hiilihyaattien asetalisaatio

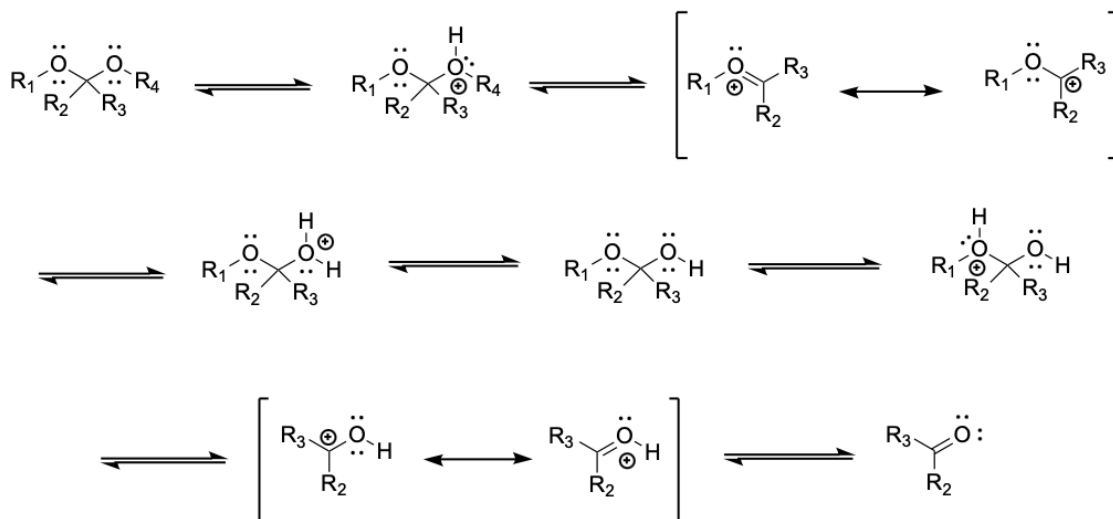
Asetaalit ovat tärkeitä hydroksyyli ryhmien suojaryhmiä nukleinihappojen, hiilihyaattien sekä steroidien kemiassa.<sup>10</sup> Asetaalit pilkkoutuvat happokatalyyttisesti, mutta eivät reagoi herkästi esimerkiksi emäksien ja nukleofiilien kanssa. Asetaaleja käytetäänkin alkoholien, diolien ja karbonyyliyhdisteiden suojaamiseen.<sup>11</sup>

Asetaaleja voidaan valmistaa alkoholin ja aldehydin välisessä reaktiossa happokatalyytin läsnä ollessa. Ketoneista muodostuvia asetaaleja kutsutaan ketaaleiksi.



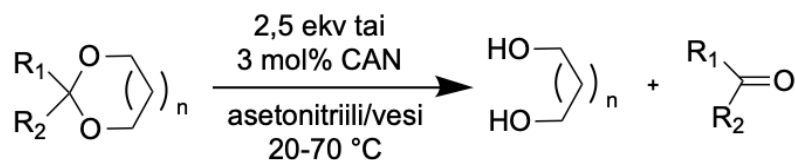
Kaavio 2. Asetalisaation reaktiomekanismi.<sup>12</sup>

Asetaalisuojaryhmät poistetaan tyypillisesti happokatalyyttisellä hydrolyysillä tai alkoholyysillä.<sup>12</sup> Reaktio-olosuhteina on käytetty esimerkiksi 3 % dikloorietikkahappoa määrässä asetonitrilissä tai metanolissa.<sup>13</sup> Syntyvät sivutuotteet (aldehydi, ketoni tai niiden asetaalit alkoholyysissä) voidaan helposti poistaa haihduttamalla tai uuttamalla.<sup>14</sup> Hydrolyysissä muodostuva resonanssin stabiloima oksokarbeniumioni on reaktion nopeutta määrittävä vaihe.<sup>15</sup>



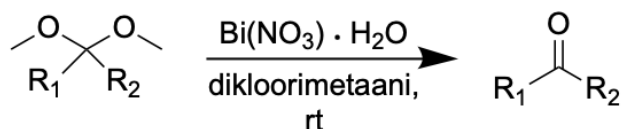
Kaavio 3. Asetaalien happokatalyyttinen hydrolyysi.

Deasetalisaatio voidaan suorittaa myös cerium(IV)ammoniumnitraatilla (CAN) tehokkaasti ja selektiivisesti asetonitriliin ja veden seoksessa. Reaktiossa on käytetty 2,5 ekv tai 3 mol% cerium(IV)ammoniumnitraattia 20-70 °C:ssa. Saannot tässä reaktiossa ovat olleet 60-99 %<sup>16</sup>



Kaavio 4. Asetaalisuojan poisto.

Myös kidevedellistä vismuttinitraattipentahydraattia on käytetty asetaalisuojauksen poistamiseen. Reaktiossa on käytetty liottimena dikloorimetaania ja se on toteutettu huoneenlämpötilassa.<sup>17</sup>

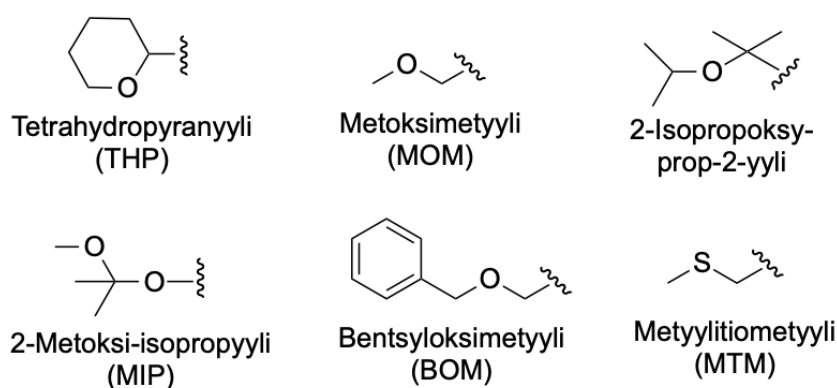


Kaavio 5. asetaalisuojan poisto vismuttinitraattipentahydraatilla

Asetaalisuojaryhmien poistossa on käytetty myös piioksidin pintaan sidottua rikkihappoa ("silikarikkihappo"). Reaktio on toteutettu tolueenissä 60-70 °C:ssa, ja silikarikkihappoa sekä SiO<sub>2</sub> käytettiin 60 % (w/w). Lopputuotteena saatiin vastaavia aldehydejä tai ketoneja 93-98 % saannoilla.<sup>18</sup>

IIP- ja MIP-suojaryhmien deasetalisaation nopeuksia on verrattu keskenään. Suojaryhmät oli liitetty tymidiinin 5'-hydroksyyliin ja niiden poisto tehtiin 6 % muurahaishapolla dikloorimetaanin ja metanolin seoksessa (2:1, v/v). Edellä mainituissa olosuhteissa IIP:n poistaminen oli 15 kertaa nopeampaa kuin MIP-suojaryhmän.<sup>8,9</sup>

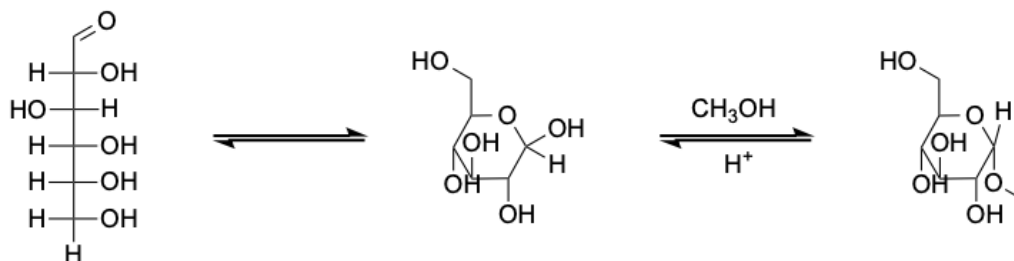
Asetaalien happolabiilisuutta sekä muita ominaisuuksia voidaan muokata helposti erilaisilla alkyyli- ja alkoksiryhmillä. Esimerkiksi 2-alkoksi-prop-2-yyli suojatun tymidiinin suojaryhmän vaihtaminen 2-sykloheksyylioksi-propan-2-yyliin parantaa sen liukoisuutta orgaanisiin liuottimiin. Yksinkertaisin formaldehydipohjainen metoksimetyyli-asetaali (MOM) ei hydrolysoitu helposti hapon läsnäollessa. Asetaldehydi-asetaalien 1-etoksietyyliin (EE) ja tetrahydropyranyyliin (TPH) haasteena puolestaan on se, että ne muodostavat asymmetrisen keskuksen. Asetonipohjaisista asetaaleista 2-metoksi-isopropyyliä (MIP) on otettu käyttöön suojattaessa esimerkiksi oligonukleotidisynteesin välituotteita.<sup>1,10,13</sup>



Kuva 2. Esimerkkejä asetaalisuojaryhmistä, muotoiltu lähteestä<sup>19</sup>

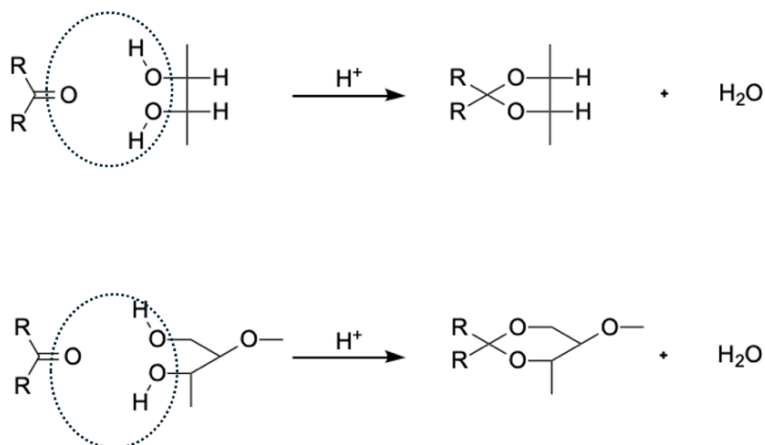
Kaaviossa 6 on esitetty happokatalyyttinen glykosidin muodostuminen. Esimerkissä sisäisenä alkoholina toimii monosakkaridin 5-OH ja tämän jälkeen metanoli reagoi

muodostuneen välituotteen, hemiasetaalin, kanssa muodostaen hemisyklisen asetaalin. Reaktiossa hiilihydraatti liuotetaan alkoholiin ja reaktioseokseen lisätään HCl.<sup>11</sup>



Kaavio 6. Glykosidin muodostuminen, mukailtu lähteestä <sup>11</sup>

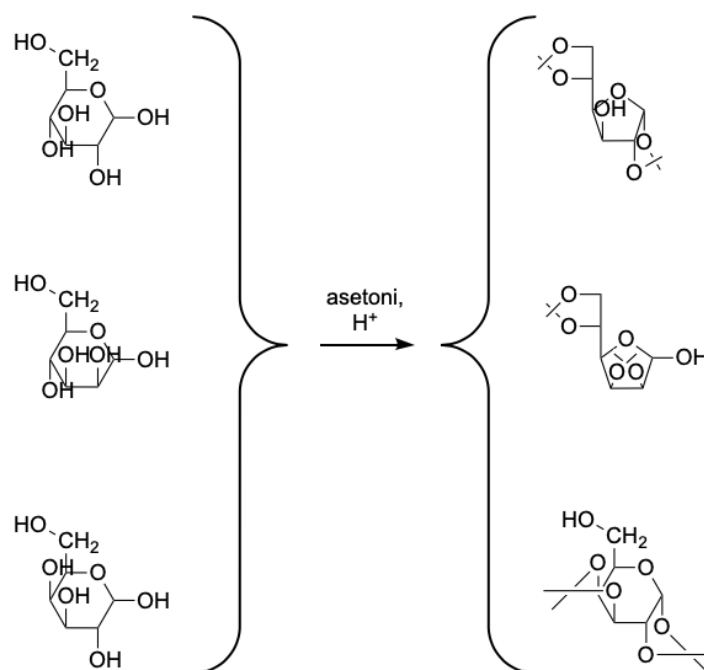
Asetaali- tai ketaalirakennetta käytetään yleisesti myös vikinaalisten hydroksyyliyhymien suojauksessa. Tämän tyyppisessä asetalisaatiossa aldehydi tai ketoni toimii ulkoisena reagenssina. Vikinaalisten hydroksyyliyhymien tapauksessa tuotteena muodostuu syklinen 5- rengas. Asetaali- ja ketaalisuojaus on mahdollista muodostaa myös 4,6-asemissa olevien hydroksyyliyhymien kesken, jolloin muodostuu 6-rengasrakente. Ketonit suosivat 5-renkaan (1,3-dioxolaani) ja aldehydit 6-renkaan muodostumista (1,3-dioksaani) (kaavio 7).<sup>11</sup>



Kaavio 7. Viisi- ja kuusirengasrakenteen muodostuminen. <sup>11</sup>

Kuvassa 3 on esitetty D-gluko-, D-manno- ja D-galaktopyranoosin happokatalyyttinen asetalisaatio asetonissa. Happokatalyyttinä on käytetty esimerkiksi rikkihappoa.<sup>20</sup> Sokerirenkaan hydroksyyliyhymien konfiguraatiolla on tärkeä rooli tuotteen muodostuksessa. Tuotteina muodostuu furanoosi, jos reaktion annetaan saavuttaa

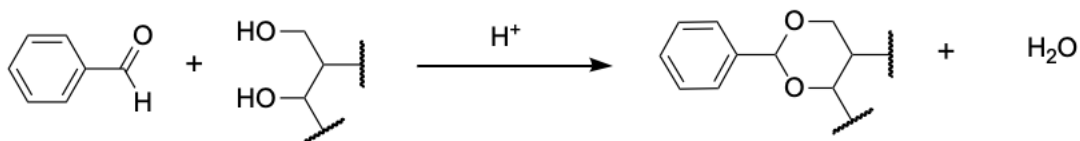
tasapainotila (termodynaaminen kontrolli).<sup>21</sup> Myös bromimetyylisulfoniumbromidia on käytetty katalyyttinä syntetisoitaessa *O*-isopropyylijohdannaisia sokereista. Synteesi suoritettiin huoneenlämpötilassa ja liuottimena käytettiin asetonia tai DMP:tä (2,2-dimetoksipropani). BDMS:n (bromidimetyylisulfoniumbromidi) määrä oli 5 mol% ja saannot vaihtelivat 93-95 %.<sup>22</sup>



Kuva 3. *D*-Gluko-, *D*-manno- ja *D*-galaktopyranoosin happokatalyyttinen asetalisaatio asetonissa.

*p*-Metoksifenyyl-2,3-*O*-isopropyylidieeni- $\alpha$ -*D*-mannopyranosidiä on syntetisoitu *p*-metoksifenyyl- $\alpha$ -*D*-mannopyranosidistä 2-metoksipropeenin avulla *N,N*-dimetyyliformamidissa. Katalyyttinä reaktiossa käytettiin *p*-tolueenisulfonihappoa 70 °C:ssa. Reaktion saanto oli 93 %.<sup>23</sup>

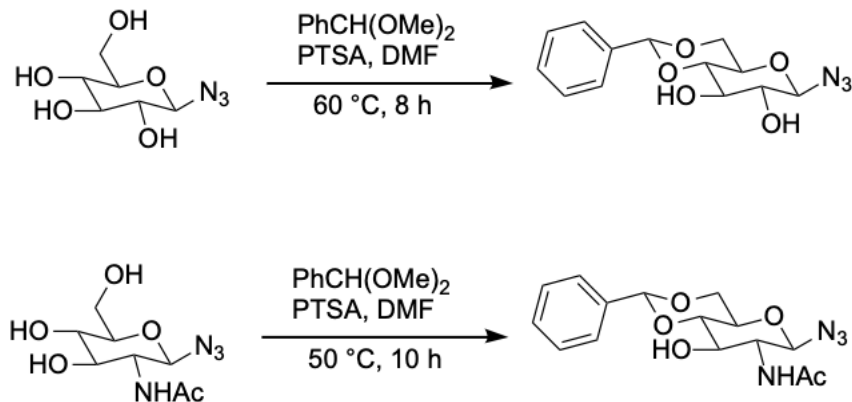
Bentsylideeniasetaali on toinen yleisesti käytetty asetaali, joka muodostuu betsaldehydin reagoidessa diolin kanssa (kaavio 8).<sup>11</sup>



Kaavio 8. Bentsylidieeniryhmän muodostuminen.<sup>11</sup>

Bentsylidieeniryhmä voidaan poistaa selektiivisesti katalyyttisellä vedytyksellä käyttäen palladiumkatalyyttiä olosuhteissa, joissa isopropylidieeniryhmä on pysyvä.<sup>11</sup>

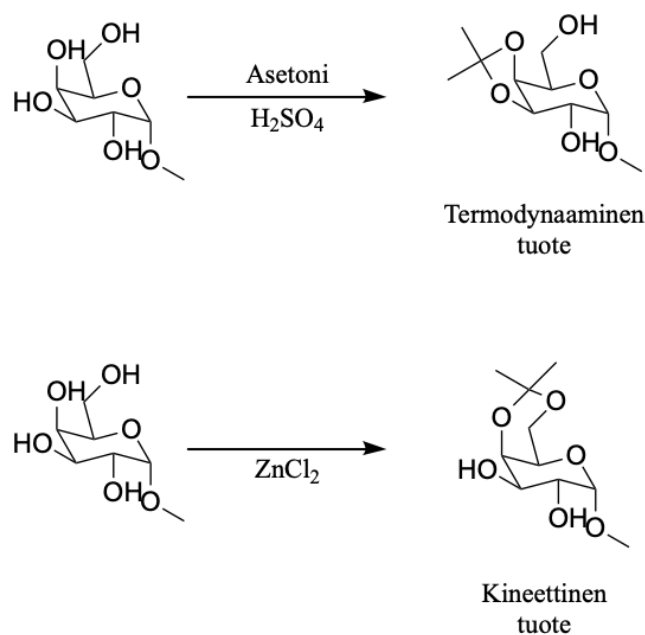
Esimerkiksi D-glukoosi ja *N*-asetyyli-D-glukosamiini on suojattu 4,6-*O*-bentsylidieeniasetaalina DMF:ssä 50–60 °C:ssa. Happokatalyyttinä käytettiin *p*-tolueenisulfonihappoa. Asetalisaatioreagenssinä oli bentsaldehydidimetyyliasetaaali. Reaktioiden saannot olivat 72 % (glukoosi) ja 78 % (*N*-asetyyli-D-glukosamiini).<sup>24</sup>



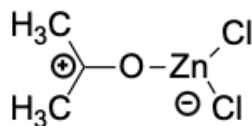
Kaavio 9. Glukoosin ja glukosamiinin asetalisaatio bentsaldehydidimetyyliasetaalilla<sup>24</sup>

Asetaaleja ja ketaaleja voidaan valmistaa myös transasetalisaatiolla. Yleisimmät reagenssit tähän tarkoitukseen ovat 2,2-dimetoksipropaani sekä bentsaldehydidimetyyliasetaaali. Paratolueenisulfonihappoa käytetään reaktiossa yleisesti katalyyttinä. Syntetisoitaessa syklisiä asetaaleja ja ketaaleja, transasetalisaatioissa ja perinteisissä asetalisaatiomenetelmissä muodostuu normaalisti Brønstedin hapon läsnäollessa termodynaamisesti pysyvin tuote.

Käytettäessä Lewisin happona sinkkikloridia saadaan kineettisesti kontrolloitu tuote. Kaaviossa 10 on esitetty esimerkkinä metyyli 3,4-O-isopropyylidieeni- $\alpha$ -D-galaktopyranosidin ja metyyli 4,6-O-isopropyylidieeni- $\alpha$ -D-galaktopyranosidin muodostuminen.<sup>11</sup> 4,6-Ketaalin muodostuminen selitetään primäärisen 6-OH ryhmän suuremmalla reaktiivisuudella steerisesti suuren karbokationin kanssa (kuva 4). Sinkkikloridi ei ole riittävän voimakas happo avataakseen ketaalirengasta sen muodostumisen jälkeen.<sup>11</sup>



Kaavio 10. Termodynaaminen ja kineettinen kontrolli<sup>11</sup>

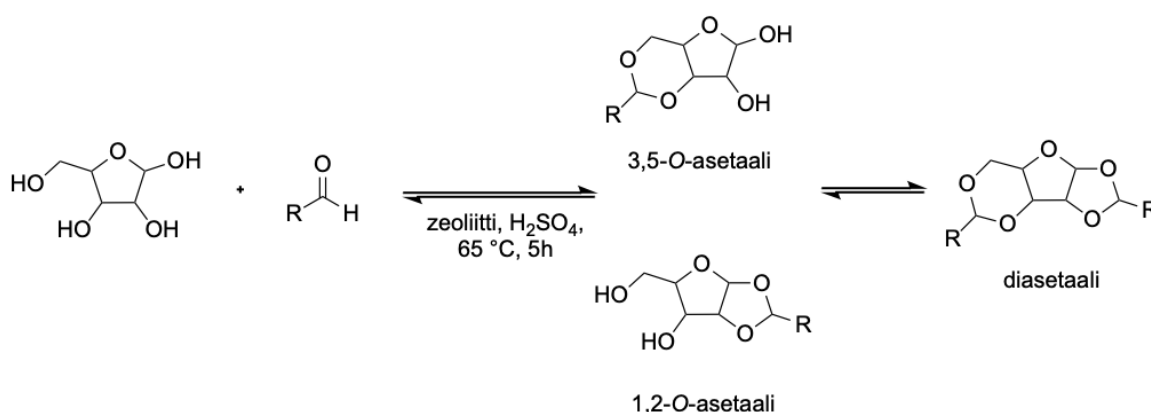


Kuva 4. karbokationi<sup>11</sup>

Transasetalisointeja on käytetty myös kineettisesti kontrolloiduissa reaktioissa. Esimerkiksi 4,6-O-isopropylidieeni- $\alpha$ -D-mannopyranosidin synteesin saanto on 46 %. Tyypillisellä  $\alpha$ -D-mannopyranosidin asetonisoinnilla reaktio muodostuisi myös 2,3-asetaalia sekä 2,3:4,6-asetaalia. Parempi kineettinen kontrolli on saavutettu happokatalyyttisellä reaktiolla metyyli-isopropenyylieetterin kanssa, jossa metyyli- $\alpha$ -D-

mannopyranosidi reagoi *p*-tolueenisulfonihapon sekä metyyli-isopropenyylieetterin kanssa DMF:ssä. Näillä olosuhteilla onnistuttiin valmistamaan 4,6-*O*-isopropyylideeni- $\alpha$ -D-mannopyranosidi jopa 65 % saannolla.<sup>11,25</sup>

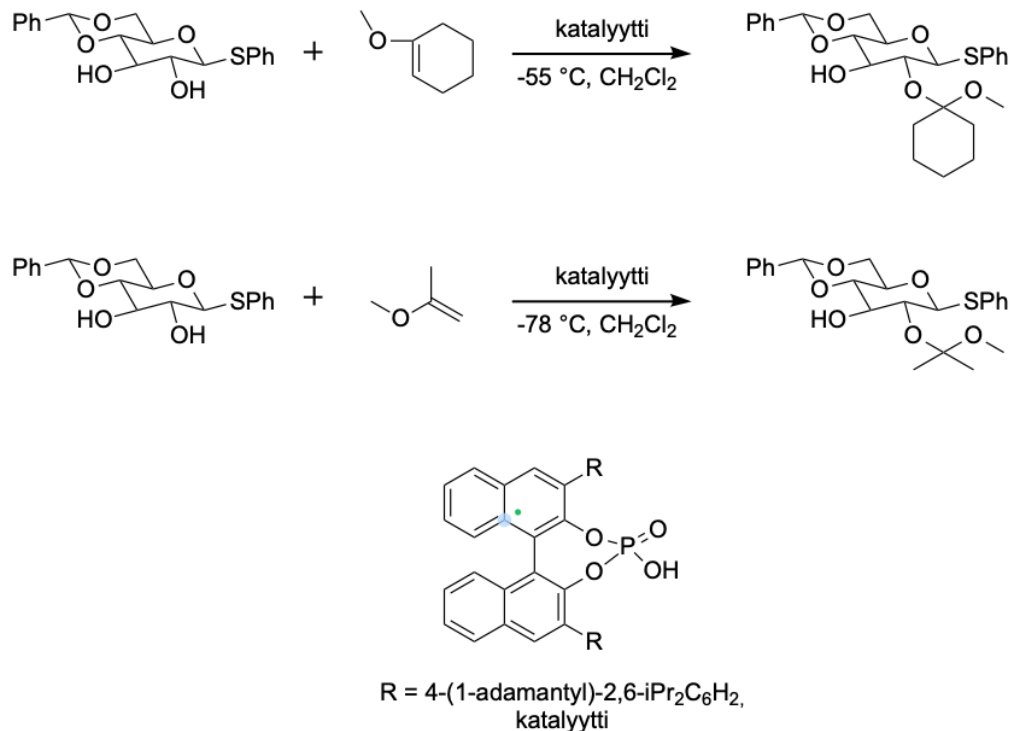
Hydroksyyliyhmiin selektiivinen suojaaminen asetaaliksi on osoittautunut haasteelliseksi, jos hydroksyyliyhmiöt ovat samankaltaisessa ympäristössä steerisesti ja elektronisesti. Primaariset alkoholit ovat steerisesti vähemmän estyneitä verrattuna sekundaarisiiin ja tertiäärisiin alkoholeihin. Tämän takia ne pystyvät reagoimaan selektiivisemmin.<sup>26</sup> Ksyloosin ja dodekanaalin välisessä asetalisaatioissa on käytetty rikkihapon läsnä ollessa erilaisia zeoliitti-katalyyttejä, joiden huokoskokoa vaihdeltiin. Zeoliitti-happokatalyytteillä saatuja tutkimustuloksia verrattiin mineraalihapolla ( $H_2SO_4$ ) saatuihin tuloksiin. Ksyloosin ja dodekanaalin välisessä reaktiossa havaittiin tuotteina syntyvän 2,5-*O*-, 1,3-*O*- sekä diasetaalia. Asetalisaation monoselektiivisyyttä saatiin parannettua, kun käytettiin zeoliitti-katalyyttiä, jossa  $SiO_2/Al_2O_3 = 80$ . Tuotteena muodostui 3,5-*O*-asetaaliksi 68 %, 1,2-*O*-asetaaliksi 5,3 % ja diasetaaliksi 13,5 %.<sup>27</sup>



Kaavio 11. Ksyloosin asetalisaatio.<sup>27</sup>

Hiilihydraattien 2-metoksi-isopropyyli- sekä 1-metoksi-1-sykloheksyyliasetaaleja on syntetisoitu käyttäen katalyyttinä kiraalisia fosforihappoja (CPA), joiden todettiin parantavan merkittävästi reaktion paikkaselektiivisyyttä.<sup>28,29</sup> Nagorny työryhmineen toteutti synteessin siten, että reaktioaika oli 18–24 tuntia ja reaktiolämpötila  $-55$  tai  $-78$   $^\circ\text{C}$ . Reaktiossa käytettiin 2-metoksipropeenia tai 1-metoksisyklohekseeniä (1,2 ekv)

sekä kiraalista fosforihappoa 2–4 mol-%. Asetalisaatiossa saatiin parhaimmillaan 95 % saanto.<sup>29</sup>

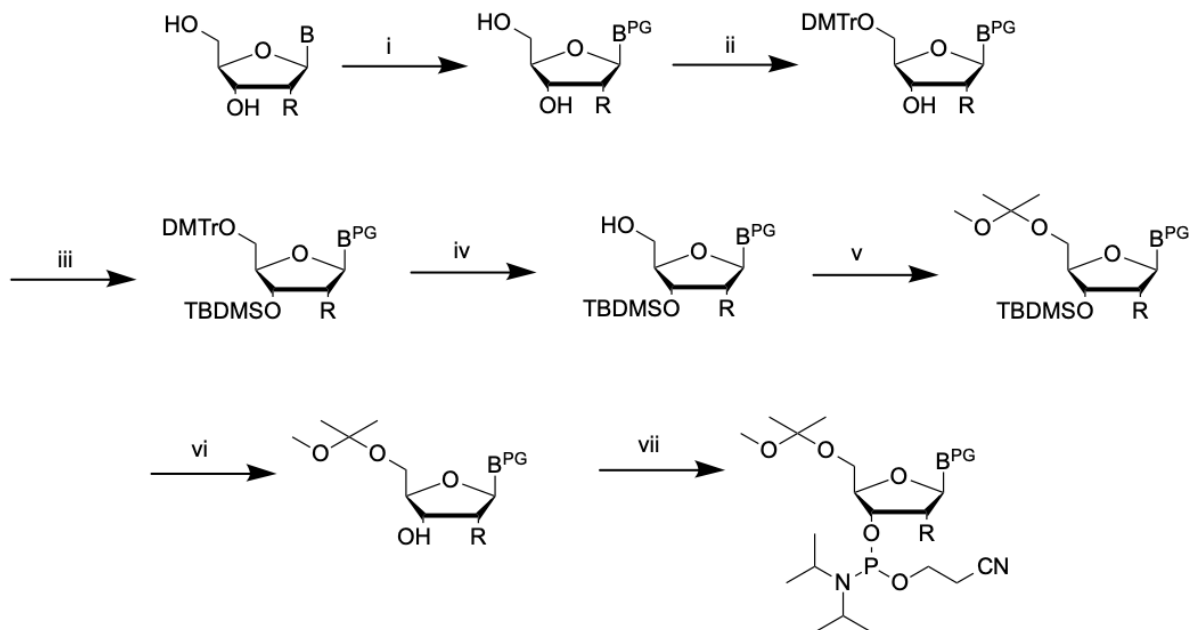


Kaavio 12. CPA:n katalysoima asetalisaatio<sup>29</sup>

## 1.2 Nukleosidien asetalisaatio

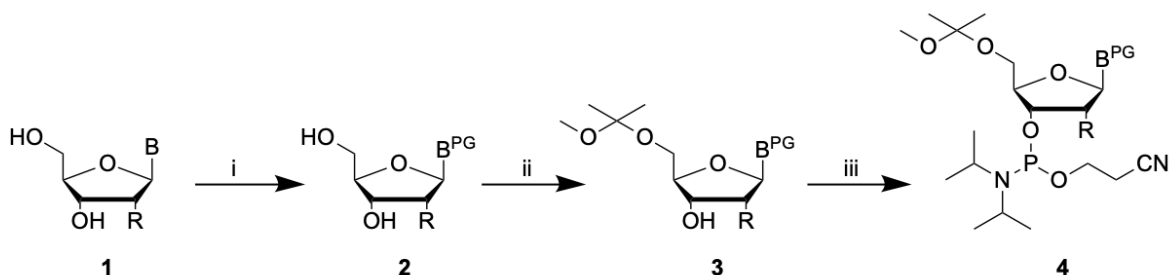
Ensimmäisen kerran uridiinin primäärisen 5'-OH selektiivistä asetalisointia on tutkittu vuonna 1965. Asetalisoinnissa käytettiin 2,2-dimetoksipropania ja di-*p*-nitrofenyylifosfaattia *N,N*-dimetyyliasetamidissa. Reaktiossa saanto jäi kuitenkin huonoksi (46 %). Tuotteena saatiin 5'-O-MIP-uridiinia.<sup>30</sup>

5'-O-MIP suojattujen nukleosidifosforamidiittien synteesi on monivaiheinen sisältäen 3'-OH:n silyloinnin, 5'-OH:n trityloinnin ja silyylin poiston (Kaavio 13)<sup>2</sup> ja tästä syystä se ei ole kovin ympäristöystävällinen. Menetelmä on reagensseja sekä liuottimia kuluttava sisältäen monta välituotteiden silikapylväskromatografista eristämistä.



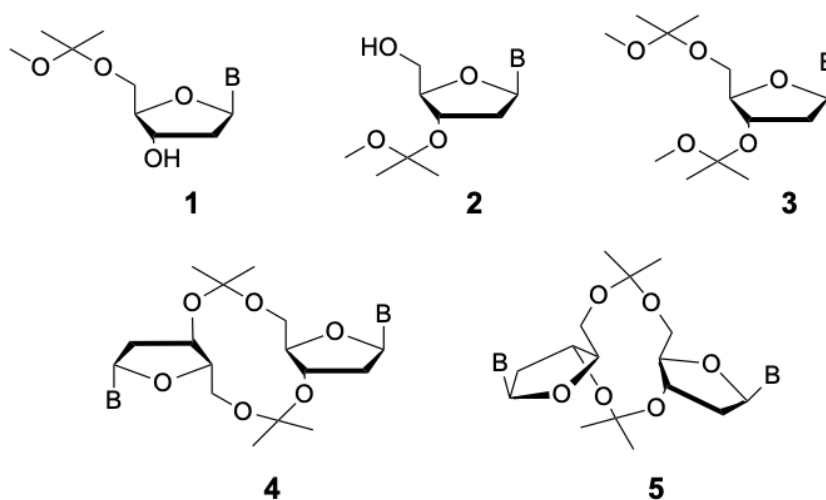
Kaavio 13. 5'-O-MIP suojatun 3'-nukleosidifosforamidiitin monivaiheinen synteesireitti. Reagenssit: i) TMS-Cl, isobutyrylianhydridi tai bentsoyylikloridi, H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH; ii) DMTrCl, pyridiini; iii) TBDMSCl, DMF, Im; iv) DCA, DCM; v) 2-metoksipropeeni, dioksaani; vi) TBAF, THF; vii) 2-syanoetoksi-N,N-di-isopropylikloorifosforamidiitti.

Nukleosidin primäärisen 5'-OH:n asetalisaatio on mahdollista suorittaa selektiivisesti pyridiinissä 2-metoksipropeenilla käytettäessä happokatalyyttinä *p*-tolueenisulfonihappoa (kaavio 14). Saannoksi saadaan 44-77 %. Reaktiolämpötilan alentaminen 25 °C:sta 4 °C:een hidastaa asetalisaatiota, mutta ei vaikuta merkittävästi selektiivisyyteen. Myöskään katalyytin vaihto esimerkiksi pyridiniumtosylaattiin tai pyridiumkloridiin ei paranna reaktion saantoa tai selektiivisyyttä.<sup>5</sup>



Kaavio 14. 5'-O-MIP suojatun 3'-nukleosidifosforamidiitin "one-pot" synteesireitti. Reagenssit: i) TMS-Cl, isobutyryylianhidridi tai bentsoyylikloridi,  $H_2O/NH_4OH$ ; ii) 2-metoksipropeeni,  $pTsOH \cdot H_2O$ , pyridiini; iii) 2-syanoetoksi-N,N-di-isopropyylikloorifosforamidiitti, TEA, DCM

Käytettäessä liuottimena dimetyyliformamidia (DMF) on havaittu syntyvän tuoteseos (Kuva 4), jossa päätuotteina muodostuvat sykliset ditymidiinit (4 ja 5).<sup>5</sup>

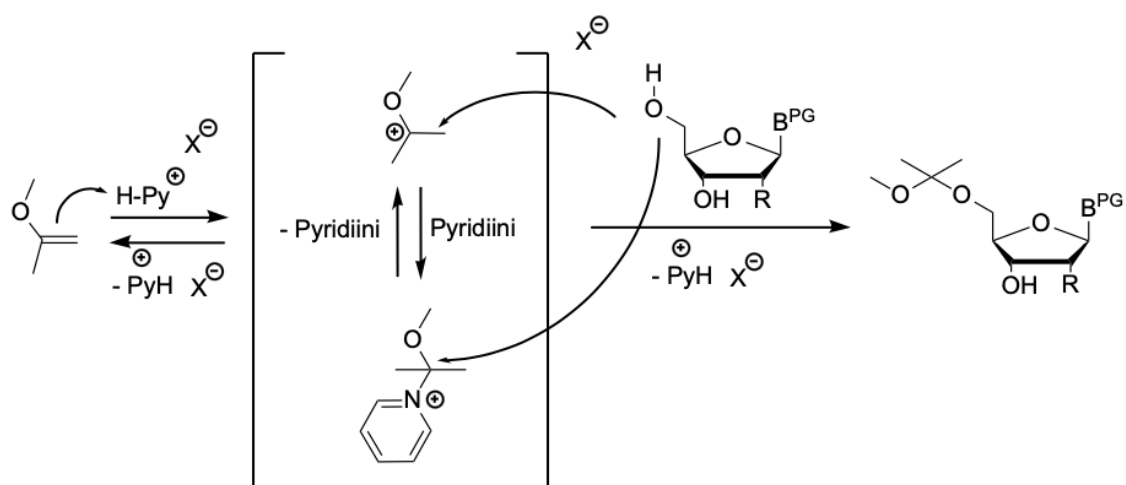


Kuva 5. Tymidiinin asetalisaatioissa syntyvät tuotteet, B=tymidiini, reaktio-olosuhteet: 2-metoksipropeeni (2 ekv),  $pTsOH \cdot H_2O$  (0,1 ekv), DMF, rt, muotoiltu lähteestä<sup>5</sup>

Regioselektiivinen asetalisaatio pyridiinissä primäärisen 5'-hydroksyyliiryhmään 2-metoksipropeenilla happokatalyytin läsnäollessa ei tapahdu perinteisen happokatalyyysi-mekanismin kautta, vaan todennäköisesti reaktiossa muodostuu 2-metoksi-isopropyyliipyridinium-kompleksi (MIPPY).<sup>5</sup> Reaktion ensimmäisenä vaiheena alkoholin ja 2-metoksipropeenin välisessä elektrofiilisessä additiossa tapahtuu kaksoissidoksen protonaatio, jossa muodostuu pysyvä oksokarbenium-kationi. Muodostunut karbokationi reagoi alkoholin kanssa muodostaen asetaalin.

Karbokationin on myös mahdollista reagoida väliaikaisesti pyridiinin kanssa, jolloin muodostuu 2-metoksi-isopropyylipyridinium-kompleksi (MIPPY). Pyridiinin korvautuminen alkoholilla  $S_N1$ -tyyppisessä reaktiossa johtaa asetaalin muodostumiseen. Kaaviossa 5 on esitetty 5'-hydroksyyliyhmän selektiivisen asetalisaation mekanismi sekä muodostuva MIPPY-välituote.<sup>5</sup>

Vastaavanlaisen pyridiinikompleksin on myös ehdotettu osallistuvan myös aldehydiasetaalien selektiiviseen poistamiseen. Menetelmässä käytettiin trietyylisilyylitriplaattiemäsyhdistelmiä.<sup>30</sup>

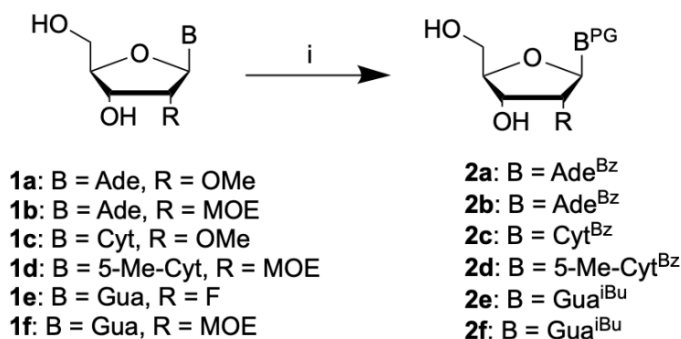


Kaavio 15. 5'-Hydroksyyliyhmän selektiivisen asetalisaation mekanismi sekä MIPPY-välituote, muotoiltu lähteestä.<sup>5</sup>

## 2 Tulokset ja niiden tarkastelu

### 2.1 Nukleoemästen eksosyklisen aminoryhmän bentsoyyli- ja isobutyryylisuojaus

Nukleoemäksen eksosyklisen aminoryhmän suojauksessa käytettiin "transient"-suojaryhmästrategiaa (Kaavio 3). Adenosiinien ja sytidiinien 2'-O-Me- ja 2'-O-MOE-johdannaiset käsiteltiin ensin trimetyylisilyylikloridilla pyridiinissä hydroksyyli-ryhmien silyloimiseksi. 3',5'-O-Bis(trimetyylisilyyli)-suojattujen nukleosidien eksosykliset aminoryhmät bentsoyloitiin bentsoyylikloridilla. Mahdollisesta bis-bentsoyloidusta sivutuotteesta toisen bentsoyyli-ryhmän hydrolysoituminen aikaansaadaan selektiivisesti ammoniakkin vesiliuoksessa 30 min - 2h aikana. Myös trimetyylisilylisuojaryhmät irtoavat näissä olosuhteissa välittömästi. Näin ollen tuotteena muodostuu  $N^6$ -bentsoyylisuojatut 2'-O-metyyli- ja 2'-O-(2-metoksietyyli)adenosiinit (**2a** ja **b**) sekä  $N^4$ -bentsoyloidut 2'-O-metyyli- ja 2'-O-(2-metoksietyyli)sytidiinit (**2c** ja **d**). Silikageelikromatografisen puhdistuksen jälkeen tuotteita saatiin 13 - 94 % kokonaissaannolla.



Kaavio 16. Reagenssit: i) TMSCl, pyridiini, bentsoyylikloridi (**1a-d**) tai isobutyrylianhidridi (**1e** ja **1f**), H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>OH

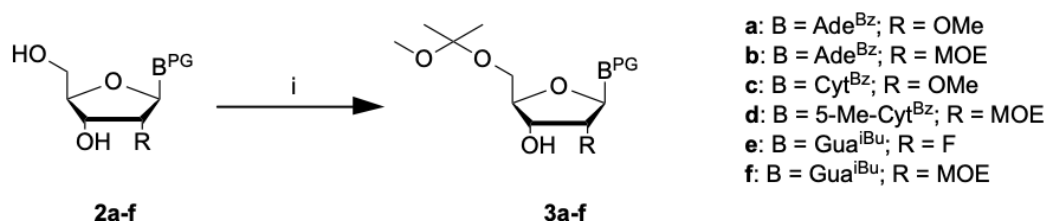
Vastaavasti "transient"-suojaryhmästrategiaa käytettiin myös isobutyryyli-suojattujen nukleosidien valmistuksessa (Kaavio 3). Guanosiinin 2'-fluori- ja 2'-O-(2-metoksietyyli)-johdannaiset käsiteltiin ensin trimetyylisilyylikloridilla pyridiinissä hydroksyyli-ryhmien silyloimiseksi. 3',5'-O-Bis(trimetyylisilyyli)-suojattujen nukleosidien eksosykliset aminoryhmät isobutyryloitiin isobutyrylianhidridillä. Trimetyylisilylisuojaryhmät poistettiin ammoniakkin vesiliuoksessa. Tuotteena muodostuneet  $N^2$ -bentsoyloidut 2'-fluori- ja 2'-O-(2-metoksietyyli)guanosiinit (**2e** ja **f**)

puhdistettiin silikageelikromatografisesti ja saostamalla (**2e**) kokonaissaannolla 78 – 85 %.

## 2.2 Asetalisaatio

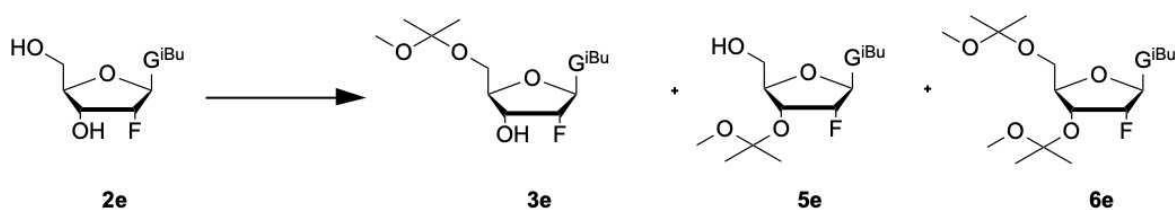
### 2.2.1 Asetalisaatio milligrammamittakaavassa

Emässuojattujen nukleosidien primäärisen 5'-hydroksyyli-ryhmän asetalisaatiota tutkittiin pyridiinissä *p*-toleenisulfonihapon läsnäollessa milligramman (0,12 mmol:n) mittakaavassa (Kaavio 10). *N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-2'-*O*-metyyliadenosiinin (**3a**), *N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-2'-*O*-metoksietyyliadenosiinin (**3b**), *N*<sup>4</sup>-bentsoyyli-2'-*O*-metyylisytidiinin (**3c**), *N*<sup>4</sup>-bentsoyyli-2'-*O*-(2-metoksietyyli)sytidiinin (**3d**), *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-2'-fluoriguanosiinin (**3e**) sekä *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-2'-metoksietyyliguanosiinin (**3f**) asetalisoinnissa käytettiin para-tolueenisulfonihappoa happokatalyyttinä (0,1 ekv). 2-Metoksipropeenin määrä vaihteli 2.0 - 4.0 ekvivalentin välillä. Liuottimena käytettiin kuivaa pyridiiniä. Reaktioita seurattiin HPLC:llä ottaen reaktionäytteet 1 min, 24 h ja 48 h kuluttua reaktion käynnistämisen jälkeen.

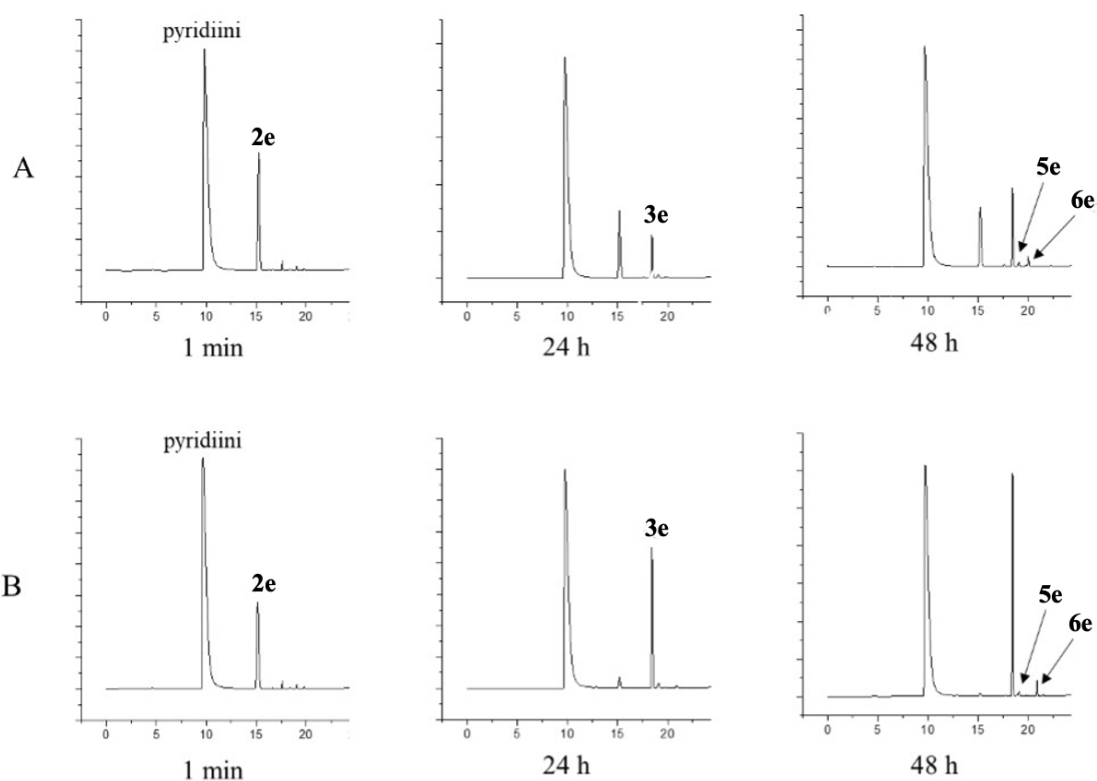


Kaavio 17. Emässuojattujen nukleosidien asetalisaatio. i) 2-metoksipropeeni, *pTsOH*·*H*<sub>2</sub>*O*, pyridiini

Kuvassa 5 on esitetty *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-2'-fluori-2'-deoksiguanosiinin asetalisaation seurannasta RP-HPLC kromatogrammit. 2-Metoksipropeenia käytettiin kaksi ekvivalenttia (Kuva 5A) ja neljä ekvivalenttia (Kuva 5B). Käytettäessä 2 ekvivalenttia 2-metoksipropeenia asetalisaation havaittiin tapahtuvan huomattavasti hitaammin kuin 4:n ekvivalentin tapauksessa. Sivutuotteina muodostui vain hyvin vähän (< 5 %) 3'-*O*- ja bis-3',5'-*O*-(2-metoksiprop-2-yyli)-sivutuotetta.



Kaavio 18. *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-2'-fluori-2'-deoksiguanosiinin asetalisaatio.

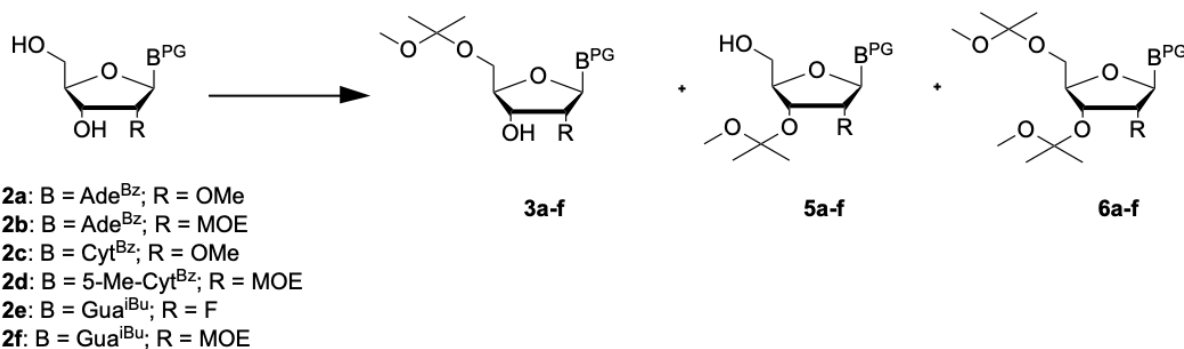


Kuva 5. Asetalisaatio *N*<sup>2</sup>-isobutyryyli-2'-fluori-2'-deoksiguanosiinille käytettäessä 2- (A) ja 4- (B) ekvivalenttia 2-metoksipropeenia.

### 2.2.2 Asetalisaatio suuremmassa mittakaavassa

Nukleosidien **2a-f** 5'-OH ryhmä asetaloitiin 2-metoksipropeenilla (2-4 ekv.) pyridiinissä happokatalyytin (*p*TsOH · H<sub>2</sub>O, 0,1 ekv.) läsnäollessa. Synteeseissä käytettiin 0,18 – 0,75 g nukleosidia lähtöaineena. Raakatuotteet puhdistettiin silikapylväskromatografisesti. Tuotteena muodostui 5'-MIP-asetalisoidut nukleosidit **3a-f** 39–90 %.

Asetalisaatiossa syntyi sivutuotteina 3'-O- (**5a-f**) ja bis-3',5'-O-(2-metoksiprop-2-yyli) (**6a-f**) suojattuja nukleosidejä. Taulukossa 1 on esitetty RP-HPLC-kromatogrammeista lasketut tuotteiden prosentuaaliset osuudet.



Kaavio 19. Nukleosidien asetalisaatiossa muodostuvat reaktiotuotteet.

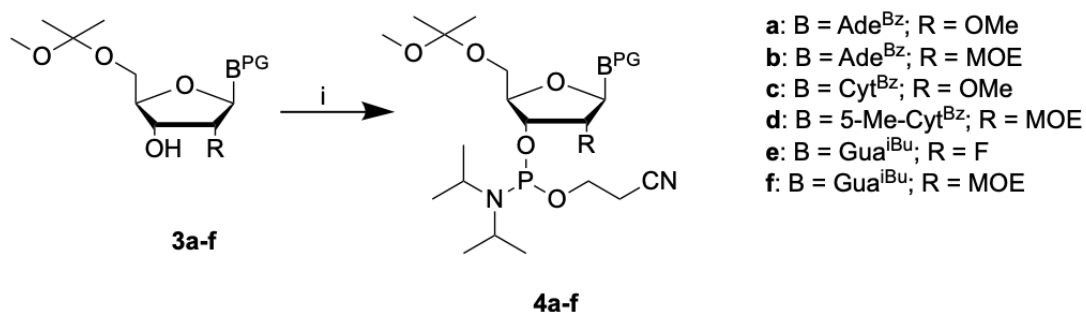
Taulukko 1. Selektiivisen asetalisaation reaktio-olosuhteet.

Lähtöaine	2-metoksipropeeni (ekv)	liuotin	yhdisteiden prosenttimäärät (%)			
			2a-f	3a-f	5a-f	6a-f
<b>N<sup>6</sup>-Bentsoyyli-2'-O-metyyliadenosiini (a)</b>	2	pyridiini	0	83	0	17
<b>N<sup>6</sup>-Bentsoyyli-2'-O-(2-metoksietyyli)adenosiini (b)</b>	2	pyridiini	0	85	3	12
<b>N<sup>4</sup>-Bentsoyyli-2'-O-metyylisytidiini (c)</b>	3	pyridiini	1	61	2	36
<b>N<sup>4</sup>-Bentsoyyli-2'-O-(2-metoksietyyli)sytidiini (d)</b>	2	pyridiini	4	70	5	20
<b>N<sup>2</sup>-isobutyryyli-2'-fluoriguanosiini (e)</b>	4	pyridiini	13	82	3	2
<b>N<sup>2</sup>-isobutyryyli-2'-(2-metoksietyyli)guanosiini (f)</b>	2	pyridiini	5	80	3	12

Happokatalyyttinä oli pTsOH · H<sub>2</sub>O (0,1 ekv).

## 2.3 Fosfitylointi

5'-MIP-asetalisoidut nukleosidit **3a-f** fosfityloitiin typpi-ilmakehässä 2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyylikloorifosforamidiitilla dikloorimetaanssa trietyyliamiinin läsnä ollessa. Silikageelikromatografisen puhdistuksen jälkeen tuotteiden saannot olivat 44–81 % (Taulukko 2).



Kaavio 20. Fosfitylointi, (i) 2-syanoetoksi-*N,N*-di-isopropyylikloorifosforamidiitti, TEA, 3-5 h, rt.

Taulukko 2. Synteesireitin vaiheiden saantoprosentit.

	Tuotteiden 2a-f saanto (%)	Tuotteiden 3a-f saanto (%)	Tuotteiden 4a-f saanto (%)
<b>a</b>	94	77	81
<b>b</b>	90	71	74
<b>c</b>	67	39	76
<b>d</b>	13	58	71
<b>e</b>	85	69	44
<b>f</b>	39	90	64

## 2.4 Johtopäätökset

Tutkimusprojektissa onnistuttiin syntetisoimaan selektiivisesti 5'-*O*-(2-metoksiprop-2-yyli) suojatut fosforamidiittinukleosidit (**4a-f**). Kaikki halutut tuotteet onnistuttiin karakterisoimaan luotettavasti NMR-spektroskopisesti ja massaspektrometrisesti.

Myös sivutuotteina syntynyt bis-3'-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)nukleosidit eristettiin sekä karakterisoitiin. Asetalisoidun tuotteen **3c** saanto jäi oletettua alhaisemmaksi (61 %). Tämä johtui todennäköisesti liian vähäisestä 2-metoksi-propeenin määrästä.

Esitely synteesireitti on huomattavasti ympäristöystävällisempi sekä kustannustehokkaampi verrattuna aikaisempaan seitsemänvaiheiseen menetelmään. Aikaisemmassa seitsemänvaiheisessa synteesireitissä kokonaissaannoksi saatiin parhaimmillaan 52 % kun taas uudella synteesireitillä 59 %. Paremman kokonaissaannon lisäksi lyhyemmässä synteesireitissä on vähemmän välituotteiden puhdistuksia mikä puolestaan vähentää käytettävää liuotinmäärää.

Jatkossa asetalisaation toimivuutta kannattaa tutkia vieläkin suuremmissa mittakaavassa. Raportoitu synteesimenetelmä tekee 5'-O-MIP-asetaaaleista käyttökelpoisen suojaryhmän kehitettäessä nukleosidien ja oligonukleotidien kustannustehokkaampia ja ympäristöystävällisempiä synteesimenetelmiä liuoksessa.

### 3 Materiaalit ja menetelmät

#### 3.1 Yleiset menetelmät

Tuotteet karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti (Bruker Biospin GmbH 500Hz) ja massaspektrometrisesti (Waters RDa tai HESI-Q-Orbitrap). Pyridiini ja metanoli kuivattiin molekyyliseuloilla (4 Å). Happokatalyytti kuivattiin kuivassa pyridiinissä 4 Å:n molekyyliseulojen kanssa. Lähtöaineina käytetyt nukleosidit kuivattiin haihduttamalla alipaineessa kolme kertaa kuivasta pyridiinistä ja yön yli vakuumieksikkaattorissa fosforipentoksidin läsnäollessa. Trietyyliamiini kuivattiin kalsiumhydridillä. Synteetit suoritettiin typpi-ilmakehässä. Reaktioita seurattiin TLC-kromatografisesti sekä HPLC:llä (Shimadzu). Nestekromatografisissa seurannoissa käytiin Thermo ODS Hypersil C18 kolonnilla (4,6 x 250 mm, 5 µm, virtausnopeus 1 ml/min, detektointi aallonpituudella 260 nm) ja ajoliuksina 50 mM trietyyliammoniumasetaatipuskuri (TEAA) sekä 50 mM TEAA asetonitrilissä. Asetonitriliin pitoisuus nostettiin 10 minuutissa 10 %:sta 27 %:iin, minkä jälkeen pitoisuus nostettiin 10 min aikana 100 %.

#### 3.2 Synteetit

##### 3.2.1 Eksosyklisen aminoryhmän bentsoyloinnin yleinen synteetikuvauk

Nukleosidi kuivattiin koevaporoimalla kolme kertaa kuivasta pyridiinistä ja vakuumieksikkaattorissa yön yli. Nukleosidi liuotettiin kuivaan pyridiiniin ja reaktioliuokseen lisättiin trimetyylikloorisilanaa (8 ekv) typpi-ilmakehässä. Reaktiota sekoitettiin kahden tunnin ajan, minkä jälkeen reaktioliuokseen lisättiin bentsoylylikloridi (5 ekv) ja sekoitusta jatkettiin yön yli (n. 15 h). Reaktioseos siirrettiin jäävesihauteeseen ja reaktioliuokseen lisättiin vettä (1,7 ml/mmol nukleosidiä kohden) ja 10 min kuluttua 25 % NH<sub>4</sub>OH (3,4 ml/mmol nukleosidiä kohden). Reaktioliuosta sekoitettiin 30 min ja liuos haihdutettiin alipaineessa pyöröhaihduttajalla. Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti.

##### **N<sup>6</sup>-Bentsoyyl-2'-O-metyyliadenosiini (2a).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin 2'-O-metyyliadenosiinia (1,5 g, 3,9 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuksena EtOAc/MeOH (93:7, v/v). Tuote oli valkoista

kiinteää ainetta (1,46 g, saanto 94 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  11,19 (1H, s, NH); 8,71 (1H, s, H2); 8,70 (1H, s, H8); (8,06-8,05 (2H, m, Bz); 7,63-7,60 (1H, m, Bz); 7,55-7,52 (2H, m, Bz); 6,15 (1H, s, H1'); 5,27 (2H, m, 3'-OH ja 5'-OH); 4,44-4,42 (1H, m, H2'); 4,39-4,37 (1H, m, H3'); 4,02-4,00 (1H, m, H4'); 3,70 (1H, dd,  $J = 12,0$  ja  $3,9$  Hz, H5'); 3,60 (1H, dd,  $J = 12,0$  ja  $3,8$  Hz, H5''); 3,35 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  166,1 (C=O); 151,8 (C2, C4, C6); 142,5 (C8); 134,2 (Bz); 132,1 (Bz); 128,5 (Bz); 128,4 (Bz); 125,9 (C5); 86,3 (C4'); 85,6 (C1'); 82,6 (C2'); 68,7 (C3'); 61,2 (C5'); 57,6 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI):  $m/z$  [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> 386.1459, löydetty 386.1457.

#### **N<sup>6</sup>-Bentsoyyli-2'-O-(2-metoksietyyli)adenosiini (2b).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin 2'-O-metoksietyyliadenosiinia (1,5 g, 3,5 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena EtOAc/MeOH (90:10, v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (1,79 g, saanto 90 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9,19 (1H, s, NH); 8,76 (1H, s, H2); 8,06 (1H, s, H8); 8,02-8,00 (2H, m, Bz); 7,62-7,59 (1H, m, Bz); 7,53-7,50 (2H, m, Bz); 6,12 (1H, d,  $J = 11,5$  ja  $4$  Hz, 5'-OH); 5,94 (1H, d,  $J = 7,7$  Hz, H1'); 4,80 (1H, dd,  $J = 7,7$  ja  $7,5$  Hz, H2'); 4,53 (1H, d,  $J = 4,4$  Hz, H3'); 4,36 (1H, m, H4'); 4,12 (1H, s, 3'-OH); 3,98-3,96 (1H, m, H5'); 3,78-3,76 (1H, m, H5''); 3,75-3,72 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,58-3,49 (2H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,42-3,39 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,36 (3H, s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  164,7 (C=O); 152,2 (C2); 150,8 (C4); 150,5 (C6); 143,5 (C8); 133,5; 133,1; 129,0; 128,0 (Bz); 124,9 (C5); 89,8 (C1'); 88,2 (C4'); 81,9 (C2'); 71,6 (MOE CH<sub>2</sub>); 70,3 (C3'); 69,7 (MOE CH<sub>2</sub>); 63,5 (C5'); 59,1 (OCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI):  $m/z$  [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> 430.1721, löydetty 430.1736.

#### **N<sup>4</sup>-Bentsoyyli-2'-O-metyylisytidiini (2c).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin 2'-O-metyylisytidiini (1,5 g, 5,8 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH (85:15 v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (1,41 g, saanto 67 %).  $^1\text{H}$  NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  11,30 (1H, s, NH); 8,55 (1H, d,  $J = 7,5$  Hz, H6); 8,01 (2H, m, Bz); 7,62 (1H, m, Bz); 7,51 (2H, m, Bz); 7,34 (1H, d,  $J = 7,3$  Hz, H5); 5,89 (1H, d,  $J = 2,5$  Hz, H1'); 5,19 (1H, m, 3'-OH); 4,10 (1H, t,  $J = 5,0$  Hz, H3'); 3,92 (1H, m, 5'-OH); 3,78 (2H, m, H5' ja H5''); 3,48 (3H, s, OMe); 3,17 (1H, s, H2').  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  168,0 (CO); 163,4 (C4); 154,8 (C2); 145,5 (C6); 133,6; 133,2; 133,1;

129,7; 128,9; 128,9 (Bz); 96,55 (C1'); 88,37 (C2'); 84,09 (C3'); 84,68 (C3'); 67,94 (C4'); 59,90 (C5'); 58,28 (OMe). HRMS (ESI):  $m/z$  [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> 362,1347, löydetty 362,1337.

#### **N<sup>4</sup>-Bentsoyyli-2'-O-(2-metoksietyyli)-5-metyylisytydiini (2d).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin 2'-O-metoksietyyli-5-metyyliisytidiini (1,5 g, 4,8 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH (85:15 v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,27 g, saanto 13 %). <sup>1</sup>H NMR δ<sub>H</sub> (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 9,23 (1H, s, NH); 8,04 (1H, s, H6); 8,03 (2H, m, Bz); 7,50 (1H, m, Bz); 7,44 (2H, m, Bz); 7,22 (1H, m, H5); 5,82 (1H, d, J = 3,55 Hz, H1'); 5,17 (1H, s, 5'-OH); 4,94 (1H, s, 3'-OH); 4,04 (1H, s, H3'); 3,85 (2H, m, H2' ja H4'); 3,67 (3H, m, H5' ja MOE CH<sub>2</sub>); 3,53 (1H, m, J = 30 Hz, H5''); 3,40 (2H, t, J=9,75 Hz, MOE CH<sub>2</sub>); 3,16 (3H, s, OMe). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 171,5 (CO); 163,4 (C4); 155,1 (C2); 139,5 (C6); 135,6; 132,3; 128,9; 128,7; 128,3; 127,9 (Bz); 111,52 (C1'); 88,16 (C2'); 84,72 (C4'); 82,68 (C3'); 71,6; 68,3 (OCH<sub>2</sub>); 60,34 (C5'); 58,57 (OMe). HRMS (ESI):  $m/z$  [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> 420,1765, löydetty 420,1773.

### 3.2.2 Eksosyklisen aminoryhmän isobutyryloinnin yleinen synteesikuvaus

Nukleosidi kuivattiin koevaporoimalla kolme kertaa kuivasta pyridiinistä ja vakuuieksikaattorissa yön yli. Nukleosidi liuotettiin kuivaan pyridiiniin. ja reaktioluokseen lisättiin trimetyylikloorisilaania (8 ekv) typpi-ilmakehässä. Reaktiota sekoitettiin kahden tunnin ajan, minkä jälkeen reaktioluokseen lisättiin isobutyrylianhydriä (5 ekv) ja sekoitusta jatkettiin yön yli (n. 15 h). Reaktioseos siirrettiin jää-vesihauteeseen ja reaktioluokseen lisättiin vettä (1,7 ml/mmol nukleosidiä kohden) ja 10 min kuluttua 25 % NH<sub>4</sub>OH (3,4 ml/mmol nukleosidiä kohden). Reaktioluosta sekoitettiin 30 min ja liuos haihdutettiin alipaineessa pyöröhaiduttajalla. Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti.

#### **N<sup>2</sup>-Isobutyryyli-2'-fluosiguanosiini (2e).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin 2'-fluosiguanosiini (1,5 g, 5,3 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena

EtOAc/MeOH (85:15, v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (1,51 g, saanto 85 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  12,03 (2H, s, 2xNH); 8,26 (1H, s, H8); 6,12 (1H, dd,  $J = 16,2$  ja  $2,5$ , H1'); 5,72 (1H, s, OH); 5,36-5,24 (1H, m, H2'); 5,20 (1H, s, OH); 4,44-4,38 (1H, m, H3'); 3,97-3,95 (1H, m, H4'); 3,77-3,75 (1H, m, H5'); 3,62-3,60 (1H, m, H5''); 2,78 (1H, m, CH); 1,13 (3H, s, iBu CH<sub>3</sub>); 1,11 (3H, s, iBU CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  180,3 (iBu C=O); 154,9 (C6); 148,4 (C4); 148,2 (C2); 137,3 (C8); 120,3 (C5); 93,8 (C2'); 853 (C1'); 83,8 (C4'); 67,9 (C3'); 59,9 (C5'); 34,8 (iBu CH); 18,9; 18,9 (iBU CH<sub>3</sub>).  $^{19}\text{F}$  NMR (471 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  - 203.79. HRMS (ESI):  $m/z$  [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> 356.1365, löydetty 356.1374.

### **N<sup>2</sup>-Isobutyryyli-2'-metoksietyyliguanosiini (2f).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin 2'-metoksietyyliguanosiini (2,0 g, 5,9 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena EtOAc/MeOH (85:15 v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (1,82 g, saanto 78 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  12,12 (1H, s, NH); 9,18 (1H, s, NH); 7,87 (1H, s, H8); 5,79 (1H, d,  $J = 7,06$  Hz, H1'); 5,23 (1H, s, OH); 4,50 (1H, m, H2'); 4,41 (1H, m, H2'); 4,18 (2H, m, H4' ja OH); 3,86 (1H, m, H5'); 3,70 (2H, m, H5'' ja MOE CH<sub>2</sub>); 3,56 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,45 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,36 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,27 (3H, s, MOE CH<sub>3</sub>); 2,70 (1H, s, iBu CH); 1,19 (6H, m, iBu 2xCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  179,1 (iBu CO); 155,3 (C6); 147,8 (C4); 147,4 (C2); 139,2 (C8); 122,24(C5); 88,3 (C1'); 86,9 (C4'); 82,3 (C2'); 71,6 (MOE CH<sub>2</sub>); 70,4 (C3'); 69,9 (MOE CH<sub>2</sub>); 62,9 (C5'); 58,9 (MOE CH<sub>3</sub>); 36,3 (iBu CH); 19,0; 19,0 (iBu CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI):  $m/z$  [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> 412,1827, löydetty 412,1840.

### 3.2.3 Asetalisaation yleinen synteesikuvaus.

Nukleosidi (1,0 ekv) kuivattiin vakuumiekkikaattorissa yön yli. Nukleosidi liuotettiin kuivaan pyridiiniin (0,55 tao 0,28 l/mol) ja reaktioluokseen lisättiin happokatalyytti (pTsOH · H<sub>2</sub>O, 0,1 ekv) sekä 2-metoksipropeeni (2-3 ekv). Reaktiota sekoitettiin n. 24 h. Reaktioseokseen lisättiin dikloorimetaania ja reaktioseos siirrettiin erotussuppiloon. Orgaanista faasia pestiin NaHCO<sub>3</sub> (5-10 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla,

suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin silikypylvaskromatografisesti.

***N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-*prop*-2-yyli)-2'-*O*-metyyliadenosiini (3a).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. *N*<sup>6</sup>-bentsoyyli-2'-*O*-metyyliadenosiini (0,46 g, 1,20 mmol), 2-metoksi-*prop*eeni (0,24 ml, 2,40 mmol) ja *p*-tolueenisulfonihappo (*p*TsOH · H<sub>2</sub>O; 24 mg, 0,12 mmol) liuotettiin pyridiiniin (2,2 ml). Raakatuote puhdistettiin silikypylvaskromatografisesti käyttäen ajoliuoksena DCM/MeOH/Pyridiini (95:4:1, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (388 mg, saanto 71 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,17 (1H, s, NH); 8,77 (1H, s, H<sub>2</sub>); 8,50 (1H, s, H<sub>8</sub>); 8,01 (2H, d, *J* = 7,6 Hz, Bz); 7,60-7,57 (1H, m, Bz); 7,51-7,48 (2H, m, Bz); 6,28 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H<sub>1'</sub>); 4,50-4,47 (1H, m, H<sub>3'</sub>); 4,21-4,19 (1H, m, H<sub>4'</sub>); 4,14-4,13 (1H, m, H<sub>2'</sub>); 3,83 (1H, dd, *J* = 11,1 ja 2,5 Hz, H<sub>5'</sub>); 3,67 (1H, dd, *J* = 11,0 ja 3,0 Hz, H<sub>5''</sub>); 3,60 (3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>); 3,19 (3H, s, MIP OCH<sub>3</sub>); 3,05 (1H, d, *J* = 6,9 Hz, 3'-OH); 1,41 (3H, s, MIP CH<sub>3</sub>); 1,40 (3H, s, MIP CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164,8 (C=O); 152,8 (C<sub>2</sub>); 151,5 (C<sub>4</sub>); 149,6 (C<sub>6</sub>); 141,5 (C<sub>8</sub>); 133,7; 132,9; 128,9; 128,0 (Bz); 123,5 (C<sub>5</sub>); 100,6 (C<sub>5'</sub>-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 86,6 (C<sub>1'</sub>); 84,4 (C<sub>2'</sub>); 83,8 (C<sub>4'</sub>); 69,3 (C<sub>3'</sub>); 59,5 (C<sub>5'</sub>); 58,9 (2'-OCH<sub>3</sub>); 48,8 (MIP OCH<sub>3</sub>); 24,5; 24,5 (MIP CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> laskettu C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>6</sub><sup>+</sup> 480,1854, löydetty 480,1857.

***N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-*prop*-2-yyli)-2'-*O*-(2-metoksietyyli)adenosiini (3b).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. *N*<sup>6</sup>-bentsoyyli-2'-*O*-metoksietyyliadenosiini (0,39 g, 0,90 mmol), 2-metoksi-*prop*eeni (0,18 ml, 1,80 mmol) ja *p*-tolueenisulfonihappo (*p*TsOH · H<sub>2</sub>O; 18 mg, 0,09 mmol) liuotettiin pyridiiniin (1,6 ml). Raakatuote puhdistettiin silikypylvaskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH/Pyridiini (95:4:1, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (348 mg, saanto 77 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9,25 (1H, s, NH); 8,79 (1H, s, H<sub>2</sub>); 8,48 (1H, s, H<sub>8</sub>); 8,03 (2H, d, *J* = 7,4 Hz, Bz); 7,61-7,58 (1H, m, Bz); 7,52-7,49 (2H, m, Bz); 6,28-6,27 (1H, m, H<sub>1'</sub>); 4,46-4,45 (2H, m, H<sub>4'</sub> ja H<sub>3'</sub>); 4,29-4,27 (1H, m, H<sub>2'</sub>); 4,01-3,98 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,87 (1H, s, 3'-OH); 3,81 (1H, dd, *J* = 11,0 ja 2,7, H<sub>5'</sub>); 3,78-3,73 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,68 (1H, dd, *J* = 11,0 ja 3,2 Hz, H<sub>5''</sub>); 3,64-3,60 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,53-3,49 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,37 (3H, s, MOE CH<sub>3</sub>); 3,20 (3H, s, MIP OCH<sub>3</sub>); 1,41 (6H, s, MIP 2x CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164,9 (C=O); 152,7 (C<sub>2</sub>); 151,8 (C<sub>4</sub>); 149,6 (C<sub>6</sub>); 141,8 (C<sub>8</sub>); 133,7; 132,8; 128,9; 128,0 (Bz); 123,6 (C<sub>5</sub>); 100,5 (C<sub>5'</sub>-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 87,2 (C<sub>1'</sub>);

84,0 (C2'); 83,4 (C4'); 71,8 (MOE CH<sub>2</sub>); 70,5 (C3'); 69,8 (MOE CH<sub>2</sub>); 60,1 (C5'); 59,1 (MOE OCH<sub>3</sub>); 48,8 (MIP OCH<sub>3</sub>); 24,5 (MIP 2xCH<sub>3</sub>). HRMS (ESI):  $m/z$  [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> 502,2296, löydetty 502,2293.

#### ***N*<sup>4</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-metyylisytidiini (3c).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena *N*<sup>4</sup>-bentsoyyli-2'-*O*-metyylisytidiini (0,5 g, 1,4 mmol), 2-metoksi-propeeni (0,4 ml, 4,2 mmol) ja *p*-tolueenisulfonihappo (*p*TsOH · H<sub>2</sub>O; 27 mg, 0,13 mmol) liuotettiin pyridiiniin (2,5 ml). Raakatuote puhdistettiin silikapylvaskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH/Pyridiini (94:5:1 v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (232 mg, saanto 39 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,73 (1H, s, NH); 8,63 (1H, d, *J* = 7,4 Hz, H<sub>6</sub>); 7,84 (2H d, *J* = 7,5 Hz, Bz); 7,55 (1H, m, Bz); 7,45 (3H, m, H<sub>5</sub> ja Bz); 5,97 (1H, s, H<sub>1</sub>'); 4,19 (1H, s, H<sub>3</sub>'); 4,03 (1H, m, H<sub>4</sub>'); 3,85 (1H, m, H<sub>5</sub>'); 3,72 (1H, d, *J* = 5,0 Hz, H<sub>2</sub>'); 3,68 (3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>); 3,66 (1H, m, H<sub>5</sub>''); 3,18 (3H, s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,61 (1H, s, 3'-OH); 1,38 ja 1,37 (6H, 2 x s, MIP CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 162,4 (C<sub>2</sub>); 144,2 (C<sub>6</sub>); 133,3; 129,1; 127,5 (Bz); 100,4 (C<sub>1</sub>'); 88,2 (C<sub>1</sub>'); 83,8 (C<sub>2</sub>'); 83,0 (C<sub>4</sub>'); 67,4 (C<sub>3</sub>'); 58,8 (2'-OCH<sub>3</sub>); 57,7 (C<sub>5</sub>'); 48,8 (MIP OCH<sub>3</sub>); 24,5 (MIP CH<sub>3</sub>); 24,4 (MIP CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI):  $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup> laskettu C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub><sup>+</sup>:lle 456,1741, löydetty 456,1739.

#### ***N*<sup>4</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-(2-metoksietyyli)-5-metyylisytidiini (3d).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. *N*<sup>4</sup>-bentsoyyli-2'-*O*-metoksietyyli-5-metyylisytidiini (0,18 g, 0,44 mmol), 2-metoksi-propeeni (0,087 ml, 0,88 mmol) ja *p*-tolueenisulfonihappo (*p*TsOH · H<sub>2</sub>O; 8,6 mg, 0,044 mmol) liuotettiin pyridiiniin (0,80 ml). Raakatuote puhdistettiin silikapylvaskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH/Pyridiini (94:5:1 v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (91 mg, saanto 58 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13,38 (1H, s, NH); 8,34 (2H, d, *J* = 7,24 Hz, Bz); 7,87 (1H, s, H<sub>6</sub>); 7,54 (1H, m, Bz); 7,46 (2H, m, Bz); 6,02 (1H, d, *J* = 2,59 Hz, H<sub>1</sub>'); 4,27 (1H, m, H<sub>3</sub>'); 4,17 (1H, m, H<sub>4</sub>'); 4,11 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,98 (1H, m, H<sub>2</sub>'); 3,86 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,79 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,72 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,63 (1H, m, H<sub>5</sub>'); 3,56 (1H, m, H<sub>5</sub>''); 3,41 (3H, s, MOE OCH<sub>3</sub>); 3,28 (3H, s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,14 (3H, m, 5-Me); 1,48 ja 1,47 (6H, 2 x s, MIP 2xCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 136,8 (C<sub>6</sub>); 132,5; 129,9; 128,1 (Bz); 111,4 (MIP C); 100,5 (C<sub>5</sub>); 88,2 (C<sub>1</sub>'); 83,3 (C<sub>4</sub>'); 83,1

(C2'); 71,7 (C5'); 70,3 (MOE CH<sub>2</sub>); 68,7 (C3'); 59,2 (MOE CH<sub>2</sub>); 59,0 (MOE CH<sub>3</sub>); 48,8 (MIP OCH<sub>3</sub>); 24,6; 24,5 (MIP CH<sub>3</sub>); 13,6 (C5-CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> 492,2340, löydetty 492,2351.

### ***N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksi-*prop*-2-yyli)-2'-fluoriguanosiini (3e).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-2'-fluoriguanosiini (0,50 g, 1,40 mmol), 2-metoksi-*propeeni* (0,56 ml, 5,63 mmol) ja *p*-tolueenisulfonihappo (*p*TsOH · H<sub>2</sub>O 28 mg, 0,14 mmol) liuotettiin pyridiini (5,1 ml). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH/Pyridiini (89:10:1, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (420 mg, saanto 69 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12,47 (1H, s, NH); 10,91 (1H, s, NH); 8,04 (1H, s, H<sub>8</sub>); 5,88 (1H, d, *J* = 17,4 Hz, H1'); 5,17-5,06 (1H, m, H2'); 4,72-4,65 (1H, m, H3'); 4,22 (1H, m, H4'); 3,77 (1H, dd, *J* = 9,8 ja 0,0 Hz, H5'); 3,62 (1H, dd, *J* = 1,1 ja 3,8 Hz, H5''); 3,12 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 2,95-2,90 (1H, m, CH); 1,33 (3H, s, MIP CH<sub>3</sub>); 1,32 (3H, s, MIP CH<sub>3</sub>); 1,28 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, *i*Bu CH<sub>3</sub>); 1,23 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, *i*Bu CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 180,4; 156,0 (C=O); 148,5 (C2); 148,3 (C4); 137,8 (C8); 120,8 (C5); 100,5 (C5'-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 94,2 (C2'); 86,9 (C1'); 82,4 (C4'); 69,1 (C3'); 59,6 (C5'); 48,6 (OCH<sub>3</sub>); 36,2 (CH); 24,3; 24,2 (MIP CH<sub>3</sub>); 19,1; 19,0 (*i*Bu CH<sub>3</sub>). <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -203,34. HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> 428,1940, löydetty 428,1936.

### ***N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksi-*prop*-2-yyli)-2'-(2-metoksietyyli)guanosiini (3f).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-2'-metoksietyyli-*guanosiini* (0,75 g, 1,8 mmol), 2-metoksi-*propeeni* (0,36 ml, 3,6 mmol) ja *p*-tolueenisulfonihappo (*p*TsOH · H<sub>2</sub>O; 36 mg, 0,18 mmol) liuotettiin pyridiiniin (3,3 ml). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH/Pyridiini (93:6:1, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,80 g, saanto 90 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12,18 (1H, s, NH); 10,00 (1H, s, NH); 8,08 (1H, s, H<sub>8</sub>); 5,96 (1H, d, *J* = 4,7 Hz, H1'); 4,43 (1H, m, H3'); 4,35 (1H, m, H2'); 4,25 (1H, m, H4'); 3,88 (1H, s, OH); 3,83 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,78 (1H, dd, *J* = 10,89 ja 3,19 Hz, H5'); 3,63 (2H, m, MOE CH<sub>2</sub> ja H5''); 3,53 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,44 (1H, m, MOE CH<sub>2</sub>); 3,35 (3H, s, MOE CH<sub>3</sub>); 3,19 (3H, s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,76 (1H, m, *i*Bu CH); 1,39 (6H, s,

MIP 2xCH<sub>3</sub>); 1,26 (6H, m, iBu CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 179,2 (iBu CO); 155,7 (C1); 148,3 (C3); 148,0 (C5); 137,4 (C8); 121,4 (C6); 100,5 (MIP CO); 86,5 (C1'); 84,1 (C4'); 83,5 (C2'); 71,8; 70,2 (MIP CH<sub>2</sub>); 70,1 (C3'); 60,5 (C5'); 59,0 (MOE CH<sub>3</sub>); 48,7 (MIP OCH<sub>3</sub>); 36,3 (iBu CH); 24,4; 24,3 (MIP CH<sub>3</sub>); 19,0; 19,0 (iBu CH<sub>3</sub>). HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> 484,2401, löydetty 484.2389.

### 3.2.4 Fosfityloinnin yleinen synteesikuvaus

5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-nukleosidi (**3a-f**) kuivattiin vakuumeiksiikkaattorissa fosforipentoksidin kanssa. Lähtöaine liuotettiin kuivaan dikloorimetaaniin ja trietyyliamiiniin typpi-ilmakehässä. Reaktioseokseen lisättiin *N,N*-diisopropyylikloorifosforamidiitti. Reaktiota sekoitettiin noin 3-5 tuntia. Reaktio-etenemistä seurattiin TLC-kromatografisesti. Puhdistettiin silikapylväskromatografisesti.

#### ***N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-O-metyyliadenosiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyyli)fosforamidiitti (**4a**).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin *N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-O-metyyliadenosiini (0,21 g, 0,47 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena EtOAc/DCM/Et<sub>3</sub>N (49:49:2, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,25 g, saanto 81 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 9,74 (1H, s, NH); 8,64 (1H, s, H2); 8,47 ja 8,45 (1H, s, H8); 8,00-7,98 (2H, m, Bz); 7,62-7,59 (1H, m, Bz); 7,52-7,49 (2H, m, Bz); 6,19 (1H, d, *J* = 5,0 Hz, H1'); 4,70-4,65 (1H, m, H3'); 4,51 ja 4,47 (1H, dd, *J* = 4,8 Hz, H2'); 4,38-4,28 (1H, m, H4'); 3,93-3,57 (6H, m, amidiitti 2xCH, CNE, CH<sub>2</sub>, H5' ja H5''); 3,48 ja 3,44 (3H, s, 2'-OCH<sub>3</sub>); 3,13 ja 3,01 (3H, 2 x s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,72-2,66 (2H, m, CNE CH<sub>2</sub>); 1,34-1,30 (6H, 2 x s, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 1,23-1,19 (12H, m, amidiitti 4xCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 166,6 (Bz C=O); 153,0 (C2); 153,0 (C4); 150,9 (C6); 143,0 (C8); 142,9; 134,9; 133,5; 129,6; 129,1 (Bz); 125,6; 125,5 (C5); 119,6; 119,5 (CN); 101,2; 101,1 (C5'-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 87,5; 85,3 (C1'); 84,7; 84,7; 84,3; 84,3 (C2'); 83,8; 83,8; 83,7; 83,6 (C4'); 72,6; 72,5; 71,9; 71,8 (C3'); 61,1; 61,0 (C5'); 59,9; 59,7; 59,3; 59,1 (CNE CH<sub>2</sub>); 59,0; 59,0; 58,7; 58,7 (MIP OCH<sub>3</sub>); 49,1; 49,0 (2'-OCH<sub>3</sub>); 44,2; 44,1; 44,0; 25,0; 24,9; 24,9; 24,8 (amidiitti 4xCH<sub>3</sub>); 24,8; 24,7; 24,6; 24,6 (MIP 2xCH<sub>3</sub>); 21,0; 21,0; 21,0; 21,0

(CNE CH<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 150,07, 149,60. HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>P<sup>+</sup> 658,3113, löydetty 658,3115.

***N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-(2-metoksietyyli)adenosiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyli)fosforamidiitti (4b).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin *N*<sup>6</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-metoksietyyliadenosiini (0,18 g, 0,36 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena EtOAc/DCM/Et<sub>3</sub>N (49:49:2, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,25 g, saanto 74 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 9,67 (1H, s, NH); 8,66 (1H, s, H<sub>2</sub>); 8,47 ja 8,45 (1H, s, H<sub>8</sub>); 8,01-7,99 (2H, m, Bz); 7,64-7,60 (1H, m, Bz); 7,54-7,51 (2H, m, Bz); 6,19-6,18 (1H, m, H<sub>1</sub>' ); 4,71-4,62 (2H, m, H<sub>3</sub>' ja H<sub>4</sub>' ); 4,37 ja 4,27 (1H, m, H<sub>2</sub>' ); 3,95-3,43 (10H, m, MOE 2xCH<sub>2</sub>, amidiitti 2xCH, H<sub>5</sub>' , H<sub>5</sub>'', CNE CH<sub>2</sub>); 3,21 ja 3,19 (3H, 2 x s, MOE OCH<sub>3</sub>); 3,13 ja 3,10 (3H, 2 x s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,70 ja 2,66 (2h, m, CNE CH<sub>2</sub>); 1,35-1,30 (6H, 3 x s, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 1,24-1,19 (12H, m, amidiitti 4xCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 166,6 (Bz C=O); 153,1; 153,0 (C<sub>2</sub>); 152,7 (C<sub>4</sub>); 150,9 (C<sub>6</sub>); 143,; 142,9 (C<sub>8</sub>); 134,9; 133,5; 129,6; 129,1 (Bz); 125,6; 125,5 (C<sub>5</sub>); 119,6; 119,5 (CN); 101,1 (C<sub>5</sub>'-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 87,8; 87,5 (C<sub>1</sub>' ); 84,7; 84,7; 84,3; 84,3 (C<sub>2</sub>' ); 82,5; 82,4; 82,4 (C<sub>4</sub>' ); 72,7; 72,6; 72,6 (MOE CH<sub>2</sub>); 72,0; 71,8 (C<sub>3</sub>' ); 71,0; 71,0; 71,7; 70,7 (MOE CH<sub>2</sub>); 61,1; 61,0 (C<sub>5</sub>' ); 59,9; 59,7 (CNE CH<sub>2</sub>); 59,2; 59,1; 59,0 (MOE OCH<sub>3</sub>); 48,0; 49,0 (MIP OCH<sub>3</sub>); 44,1; 44,0; 44,0; 43,9 (amidiitti 2xCH); 25,1; 25,0; 24,9; 24,9; 24,9; 24,8; 24,7; 24,6; 24,6 (amidiitti 4xCH<sub>3</sub>, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 21,0; 21,0 (CNE CH<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 149,73; 149,35. HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>33</sub>H<sub>49</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>P<sup>+</sup> 702,3375, löydetty 702,3377.

***N*<sup>4</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-metyylisytidiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyli)fosforamidiitti (4c).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin *N*<sup>4</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-metyylisytidiini (0,23 g, 0,51 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena EtOAc/DCM/Et<sub>3</sub>N (49:49:2, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,25 g, saanto 76 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 9,30 (1H, s, NH); 8,57 (1H, m, H<sub>6</sub>); 8,00 (2H, d, *J* = 7,32 Hz, Bz); 7,66 (1H, m, Bz); 7,55 (2H, m, Bz); 7,41 (1H, s, H<sub>5</sub>); 5,98 (1H, dd, *J* = 1,98 ja 6,91 Hz, H<sub>1</sub>' ); 4,42-4,32 (1H, m, H<sub>3</sub>' ); 4,30-4,23 (1H, m, H<sub>4</sub>' ); 3,94 (1H, m, H<sub>2</sub>' ); 3,98-3,63 (6H, m, amidiitti

2xCH, CNE CH<sub>2</sub>, H5' ja H5''); 3,61 ja 3,58 (3H, 2 x s, OMe); 3,25 ja 3,23 (3H, 2 x s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,67 (2H, m, CNE CH<sub>2</sub>); 1,44-1,41 (6H, 4 x s, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 1,21-1,20 (12H, m, amidiitti 4xCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 163,3 (Bz CO); 155,1 (C2); 145,3 (C6); 133,5; 129,2; 128,7 (Bz); 119,2; 119,1 (CN); 100,8 (5'-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 96,5 (C5); 89,8; 89,4 (C1'); 84,0; 83,5 (C2'); 82,7; 82,7; 82,4; 82,3 (C4'); 70,4; 70,2; 70,1; 70,0 (C3'); 59,1; 59,0; 58,9; 58,8; 58,6 (amidiitti CH<sub>2</sub> ja C5'); 58,3 (amidiitti CH); 48,9 (MIP CH<sub>3</sub>); 43,7; 43,7; 43,6; 43,6 (amidiitti CH ja MIP CH<sub>3</sub>); 24,6; 24,5; 24,5; 24,5; 24,4; 24,4 (amidiitti CH<sub>3</sub>); 24,3; 24,2 (MIP CH<sub>3</sub>); 20,6 (CNE CH<sub>2</sub>). <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 149,70; 149,29. HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>P<sup>+</sup> 634,3000, löydetty 634,3002.

***N*<sup>4</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-(2-metoksietyyli)-5-metyylisytidiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyyli)fosforamidiitti (4d).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin *N*<sup>4</sup>-Bentsoyyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-*O*-metoksietyyli-5-metyylisytidiini (0,11 g, 0,23 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena EtOAc/DCM/Et<sub>3</sub>N (49:49:2, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,091 g, saanto 58 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 12,93 (1H, s, NH); 8,31 (2H, m, Bz); 7,88 (1H, m, H<sub>6</sub>); 7,60 (1H, m, Bz); 7,50 (2H, m, Bz); 6,00 (1H, m, H1'); 4,41 (1H, m, H3'); 4,29 (1H, m, H4'); 4,20 (1H, m, H2'); 3,97-3,58 (8H, m, amidiitti 2xCH, MOE 2xCH<sub>2</sub>, H5' ja H5''); 3,52 (2H, CNE CH<sub>2</sub>); 3,32-3,29 (3H, 2 x s, MOE CH<sub>3</sub>); 3,26 ja 3,24 (3H, 2 x s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,69 (2H, m, CNE CH<sub>2</sub>); 2,13 (3H, s, 5-Me); 1,45-1,43 (6H, 2 x s, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 1,24-1,20 (12H, m, amidiitti 4xCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 179,8 (Bz CO); 161,0 (C4); 148,6 (C2); 138,4 (Bz); 137,8 (C6); 133,1; 130,2; 128,8 (Bz); 119,3; 119,2 (CN); 111,7 (C5); 101,0 (5'-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 88,2; 87,9 (C1'); 83,8; 83,8; 83,4; 83,4 (C4'); 82,3; 82,3; 81,8; 81,7 (C2'); 72,4 (C5'); 71,7; 71,7; 71,0; 70,9; 70,4; 70,1 (C3'); 60,3; 60,2; 59,44; 59,2; 58,7; 58,7; 58,5 (MOE CH<sub>3</sub>); 48,9 (MIP CH<sub>3</sub>); 43,7; 43,6; 43,6; 43,5; 43,5 (amidiitti CH); 24,6; 24,6; 24,5; 24,5; 24,5; 24,5; 24,4; 24,4 (amidiitti CH<sub>3</sub> ja MIP CH<sub>3</sub>); 20,6; 20,6 (CNE CH<sub>2</sub>); 13,21 (C5-CH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 149,48; 148,92. HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>33</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P<sup>+</sup> 692,3419, löydetty 692,3423.

***N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-fluoriguanosiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyli)fosforamidiitti (4e).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-fluosiguanosiini (0,33 g, 0,77 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena DCM/MeOH/Et<sub>3</sub>N (94:4:2, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,38 g, saanto 78 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 7,99 ja 7,98 (1H, s, H8); 6,13-6,09 (1H, m, H1'); 5,47-5,34 (1H, m, H2'); 4,73-4,62 (1H, m, H3'); 4,29-4,24 (1H, m, H4'); 3,89-3,58 (6H, m, CNE CH<sub>2</sub>, amidiitti 2xCH, H5' ja H5''); 3,13 ja 3,11 (3H, 2 x s, OCH<sub>3</sub>); 2,77-2,70 (1H, m, iBu CH); 2,70-2,64 (2H, m, CNE CH<sub>2</sub>); 1,35-1,32 (6H, 4 x s, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 1,20-1,17 (18H, m, amidiitti 4xCH<sub>3</sub> ja iBU 2xCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 181,0; 180,9 (iBu C=O); 156,3 (C6); 149,3; 149,3 (C4); 149,3; 149,2 (C2); 138,1; 138,0 (C8); 122,1; 122,1 (C5); 119,5 (CN); 101,2; 101,2 (C5'-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 94,9; 94,3; 93,4; 92,7 (C2'); 87,7; 87,7; 87,5; 87,4 (C1'); 83,3; 83,2; 82,8; 82,7 (C4'); 71,4; 71,3; 71,3; 71,2 (C3'); 60,3; 60,0 (C5'); 59,6; 59,5; 59,4; 59,3 (CNE CH<sub>2</sub>); 49,1; 49,0 (OCH<sub>3</sub>); 44,2; 44,2; 44,1; 44,1 (amidiitti 2xCH); 36,6; 36,6 (iBu CH); 24,9; 24,9; 24,8; 24,8; 24,8; 24,7; 24,6; 24,5 (amidiitti 4xCH<sub>3</sub>, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 21,0; 21,0; 20,9; 19,8 (CNE CH<sub>2</sub>); 19,2; 19,2; 19,2 (iBu 2xCH<sub>3</sub>). <sup>19</sup>F NMR (471 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ -202,61; -202,64; -203,2; -203,2. <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 150,40; 150,34; 149,94; 149,90. HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>P<sup>+</sup> 628,3018, löydetty 628,3021.

***N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-(2-metoksietyyli)guanosiini-3'-(2-syanoetyyli-*N,N*-diisopropyli)fosforamidiitti (4f).**

Synteesi suoritettiin kuten yllä on mainittu. Lähtöaineena käytettiin *N*<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-*O*-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-metoksietyyliguanosiini (0,49 g, 1,0 mmol). Raakatuote puhdistettiin silikapylväskromatografisesti ajoliuoksena EtOAc/DCM/Et<sub>3</sub>N (49:49:2, v/v/v). Tuote oli valkoista kiinteää ainetta (0,45 g, saanto 64 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 7,96 (1H, d, *J* = 9,19 Hz, H8); 5,83 (1H, t, *J* = 5,7 Hz, H1'); 4,46 (2H, m, H2' ja H3'); 4,20 (1H, m, H4'); 3,86-3,45 (8H, m, MOE 2xCH<sub>2</sub>, CNE CH<sub>2</sub>, H5' ja H5''); 3,35 (2H, m, CNE CH<sub>2</sub>); 3,13 ja 3,12 (3H, 2 x s, MOE CH<sub>3</sub>); 3,07 ja 3,05 (3H, 2 x s, MIP OCH<sub>3</sub>); 2,70-2,56 (3H, m, iBu CH ja CNE CH<sub>2</sub>); 1,29-1,25 (6H, 4 x s, MIP 2xCH<sub>3</sub>); 1,11 (18H, m, amidiitti 4xCH<sub>3</sub> ja iBU 2xCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 180,6; 180,6 (iBu C=O); 156,0 (C6); 149,4; 149,4; 148,9; 148,9 (C2, C4); 137,6; 137,6 (C8); 121,6; 121,5 (C5); 119,3; 119,2 (CN); 100,8; 100,8 (C5'-OC(OMe)Me<sub>2</sub>); 86,4; 86,4

(C1'); 84,4; 84,4; 84,1; 84,03 (C4'); 82,1; 82,1; 81,8; 81,78 (C2'); 72,4; 72,3 (CNE CH<sub>2</sub>); 71,5; 71,4 (H3'); 70,5; 70,5; 70,2; 60,9; 60,7 (MOE CH<sub>2</sub>); 59,5; 59,4 (C5'); 58,7; 58,6; 58,57 (MOE CH<sub>3</sub>); 48,7; 48,6 (MIP CH<sub>3</sub>); 43,7; 43,6; 43,6; 43,5 (amidiitti CH); 36,2; 36,17 (iBu CH); 24,7-24,2 (amidiitti 4xCH<sub>3</sub> ja MIP 2xCH<sub>3</sub>); 20,7; 20,6; 20,6 (CNE CH<sub>2</sub>); 18,9; 18,78 (iBu 2xCH<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 149,75; 149,46. HRMS (ESI): *m/z* [M + H]<sup>+</sup> laskettu C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>P<sup>+</sup> 684,3480, löydetty 684,3484.

## 4 Viitteet

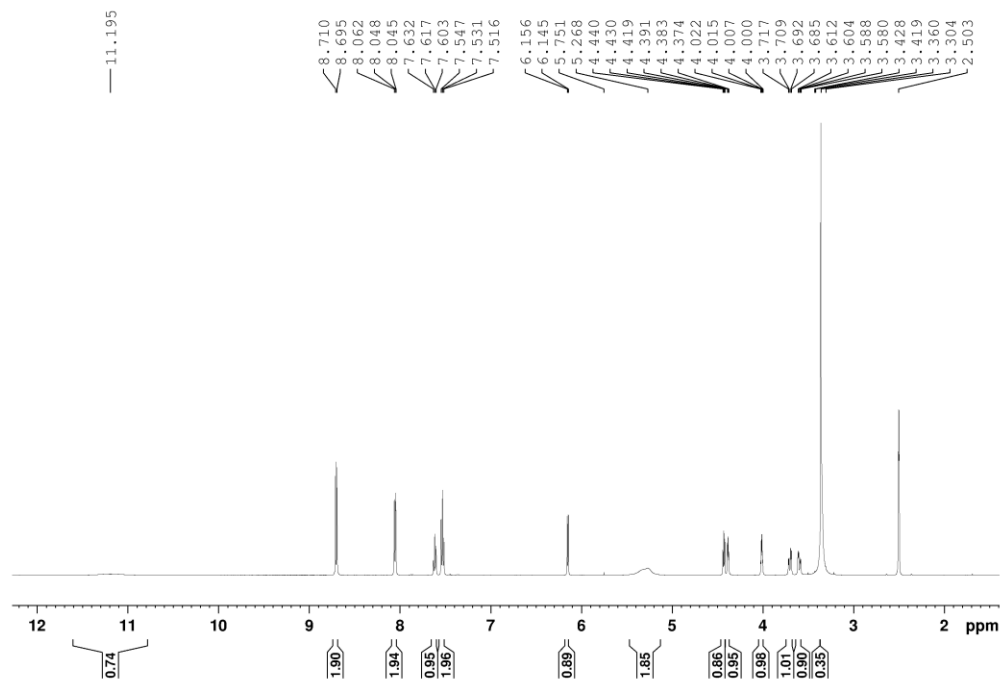
1. Andrews, B. I., Antia, F. D., Brueggemeier, S. B., Diorazio, L. J., Koenig, S. G., Kopach, M. E., Lee, H., Olbrich, M., Watson, A. L., Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 49–61.
2. Molina, A., Kungurtsev, V., Virta, P., Lönnberg, H. Acetylated and Methylated  $\beta$ -Cyclodextrins as Viable Soluble Supports for the Synthesis of Short 2'-Oligodeoxyribonucleotides in Solution. *Molecules* **2012**, *17*, 12102–12120.
3. Molina, A. G., Sanghvi, Y. S. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2019**, *77*, 1-17.
4. Virta, P. From liquid-phase synthesis to chemical ligation: preparation of oligonucleotides and their backbone analogs in solution. *Nucleic Acids Res.* **2025**, *53*, 20.
5. Saari, V., Eerola, A., Ora, M., Molina, G. A., Horvath, A., Sanghvi, Y. S., Virta, P., Selective Acetalization in Pyridine: A Sustainable 5'-O-(2-Methoxypropyl) Protecting Group in the Synthesis of Nucleic Acid Analogs. *Org. Lett.* **2025**, *27*, 8251–8256.
6. Hampton, A., Nucleotides. II.<sup>1</sup> A New Procedure for the Conversion of Ribonucleosides to 2',3'-O-Isopropylidene Derivatives<sup>2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3640–3645.
7. Reese, C. B. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851–3868.
8. Liang, Z., Rosenqvist, P., Pajuniemi, E., Ora, M., Heinonen, P., Virta, P., Oivanen, M., 5'-O-(2-Isopropoxyprop-2-yl)-protected Phosphoramidite Building Blocks in the Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *European J. Org. Chem.* **2023**, *26*.
9. Rosenqvist, P., Saari, V., Pajuniemi, E., Molina, A. G., 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.
10. Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. **2015**, Wiley, Fifth edition.
11. Petursson, S. Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1297–1303.
12. Patrick, G. L. *Organic Chemistry*, **2003**, CRC Press, Second edition.
13. Liang, Z., Koivikko, H., Oivanen, M., Heinonen, P. Tuning the stability of alkoxyisopropyl protection groups. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 746–751.
14. Liang, Z., Rosenqvist, P., Pajuniemi, E., Ora, M., Heinonen, P., Virta, P., Oivanen, M., 5'-O-(2-Isopropoxyprop-2-yl)-protected Phosphoramidite Building Blocks in the Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *European J. Org. Chem.* **2023**, *26*.
15. Liu, B., Thayumanavan, S., Substituent Effects on the pH Sensitivity of Acetals and Ketals and Their Correlation with Encapsulation Stability in Polymeric Nanogels. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2306–2317.

16. Ates, A., Gautier, A., Leroy, B., Plancher, J.-M., Quesnel, Y., Vanherck, J.-C., Marko, I., Mild and chemoselective catalytic deprotection of ketals and acetals using cerium(IV) ammonium nitrate. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 8989–8999.
17. Eash, K. J., Pulia, M. S., Wieland, L. C., Mohan, R. S. A Simple Chemoselective Method for the Deprotection of Acetals and Ketals Using Bismuth Nitrate Pentahydrate. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8399–8401.
18. Mirjalili, B. F., Zolfigol, M. A., Bamoniri, A. Deprotection of Acetals and Ketals by Silica Sulfuric Acid and Wet SiO<sub>2</sub>. *Molecules*, **2002**, *7*, 751–755.
19. Schelhaas, M., Waldmann, H. Protecting Group Strategies in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2056–2083.
20. Percival, E. G. V., Structural Carbohydrate Chemistry, **1962**, *J Garnet Miller Ltd.*
21. Gelas, J., Horton, D., Acetonation of carbohydrates under kinetic control by use of 2-alkoxypropenes. *Heterocycles* 1981, *16*.
22. Khan, A. T., Musawwer Khan, M. A simple and convenient synthetic protocol for O-isopropylideneation of sugars using bromodimethylsulfonium bromide (BDMS) as a catalyst. *Carbohydr. Res.* **2012**, *345*, 154–159.
23. Jiang, R., Zong, G., Liang, X., Jin, S., Zhang, J., Wang, D. Direct 2,3-O-Isopropylideneation of  $\alpha$ -D-Mannopyranosides and the Preparation of 3,6-Branched Mannose Trisaccharides. *Molecules* **2014**, *19*, 6683-6693.
24. Chen, A., Okafor, I. S., Garcia, C., Wang, G. Synthesis and self-assembling properties of 4,6-O-benzylidene acetal protected D-glucose and D-glucosamine  $\beta$ -1,2,3-triazole derivatives. *Carbohydr. Res.* 2018, *461*, 60–75.
25. Petursson, S., Webber, J. M. Regioselective monoalkylations of the vicinal cis-diol group in mannopyranosides using diaryldiazoalkanes-tin(II) chloride. *Carbohydr. Res.* **1982**, *103*, 41–52.
26. Streeby, X. S., Obike, J. C., Townsend, S. D. A Hitchhiker's Guide to Problem Selection in Carbohydrate Synthesis. *ACS Cent. Sci.* **2023**, *9*, 1285–1296.
27. Sun, S., Li, Z. J., Lin, Y., Rolland, M., Nelis, T., Jin, S., Zheng, S., Raffy, B. N., Bi, W. H., Amstad, E., Luterbacher, J. S. Size-Selective Functionalization of Sugars and Polyols Using Zeolites for Renewable Surfactant Production. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, *64*.
28. Wang, S., Zhelavskiy, O., Lee, J., Argüelles, A. J., Khomutnyk, Y. Y., Mensah, E., Guo, H., Hourani, R., Zimmerman, P. M., Nagorny, P. Studies of Catalyst-Controlled Regioselective Acetalization and Its Application to Single-Pot Synthesis of Differentially Protected Saccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 18592–18604.
29. Mensah, E., Camasso, N., Kaplan, W., Nagorny, P. Chiral Phosphoric Acid Directed Regioselective Acetalization of Carbohydrate-Derived 1,2-Diols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12932–12936.

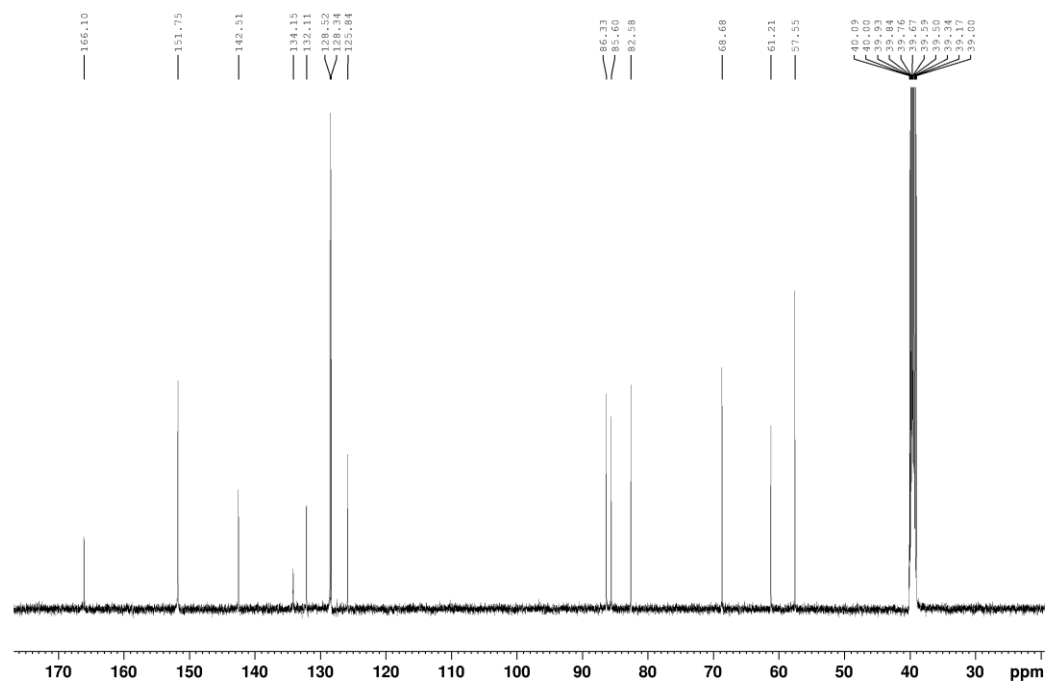
30. Hampton, A. Direct Conversion of a Nucleoside to an Acid-Labile 5'-O-Alkoxyalkyl Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4654–4655.
31. Fujioka, H., Okitsu, T., Sawama, Y., Murata, N., Li, R., & Kita, Y. Reaction of the Acetals with TESOTf–Base Combination; Speculation of the Intermediates and Efficient Mixed Acetal Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5930–5938.

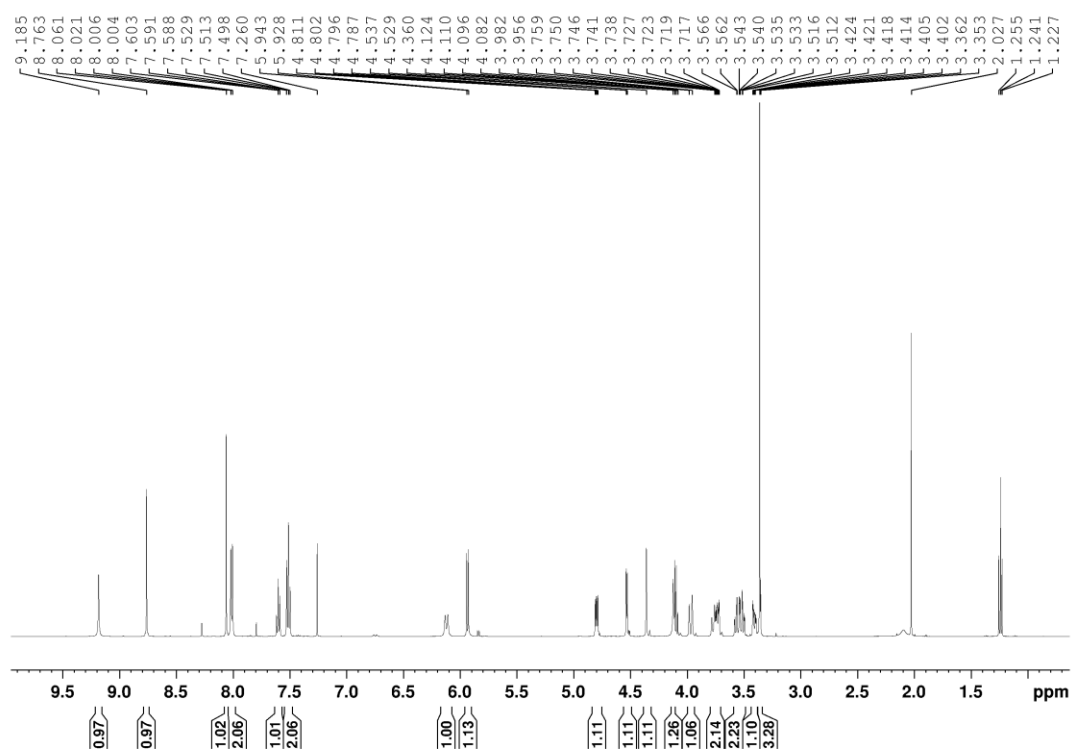
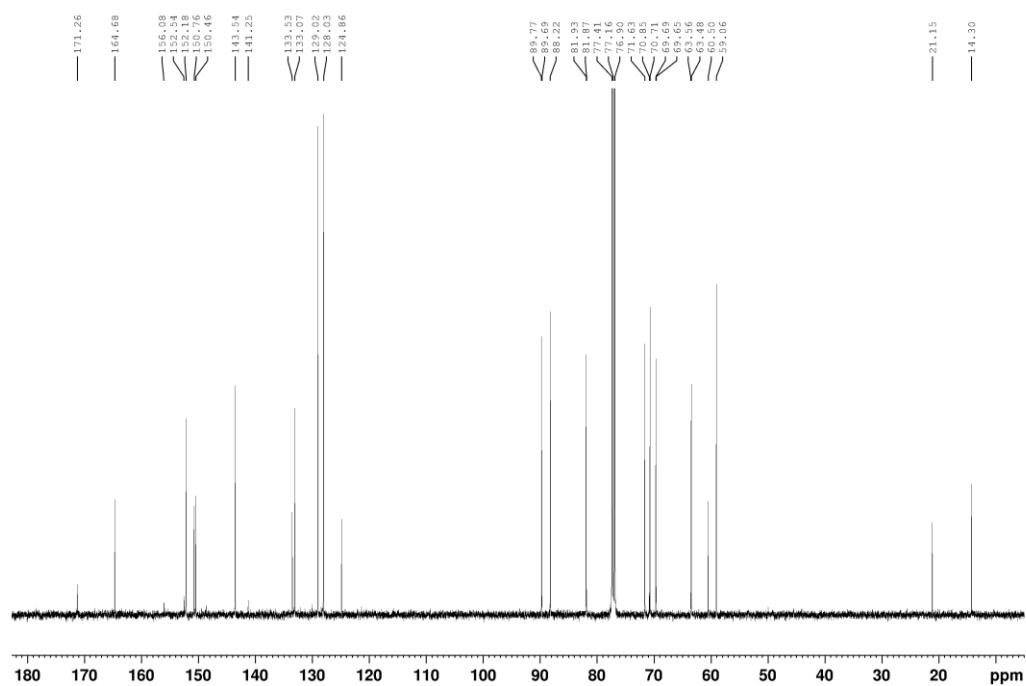
## 5 Liiteet

Liite 1. Yhdisteen **2a**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

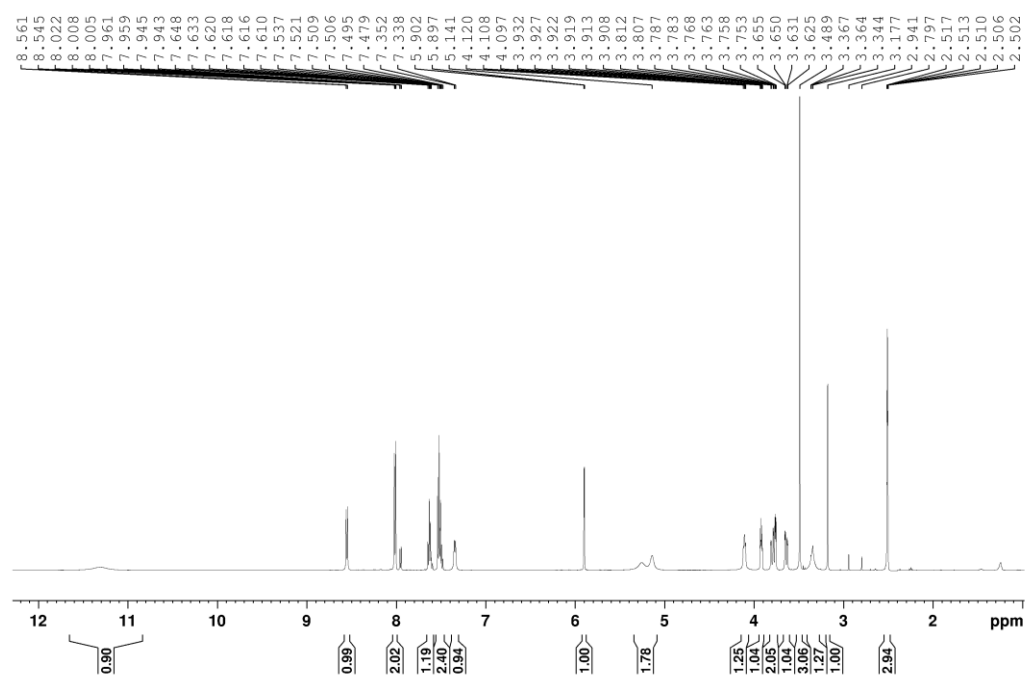


Liite 2. Yhdisteen **2a**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

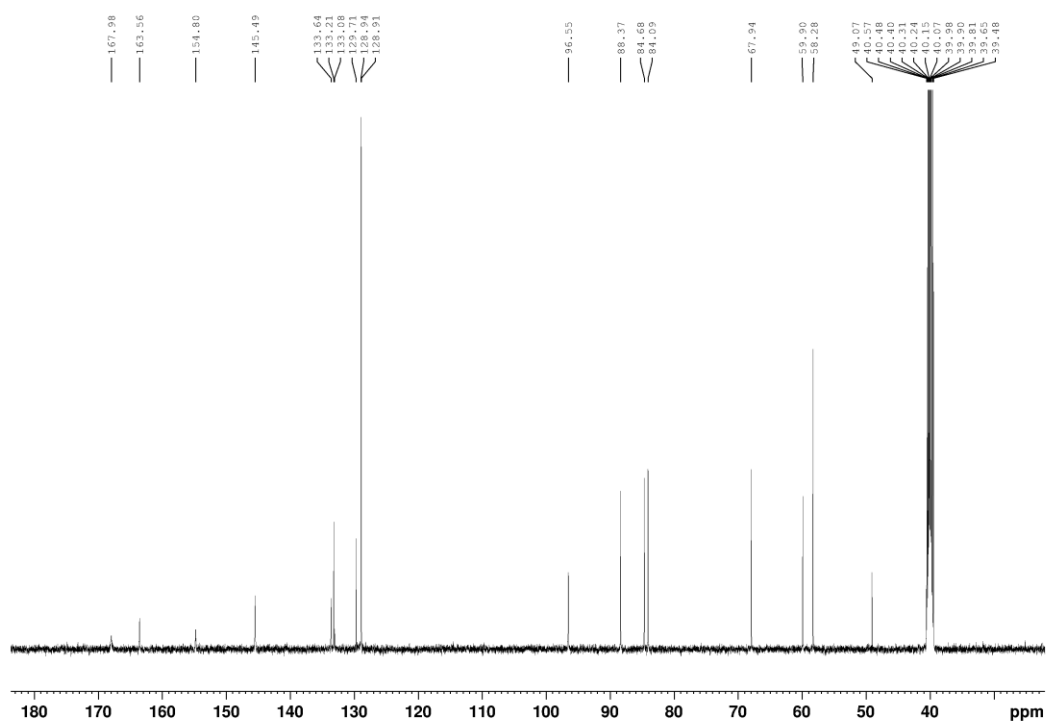


**Liite 3.** Yhdisteen **2b**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**Liite 4.** Yhdisteen **2b**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

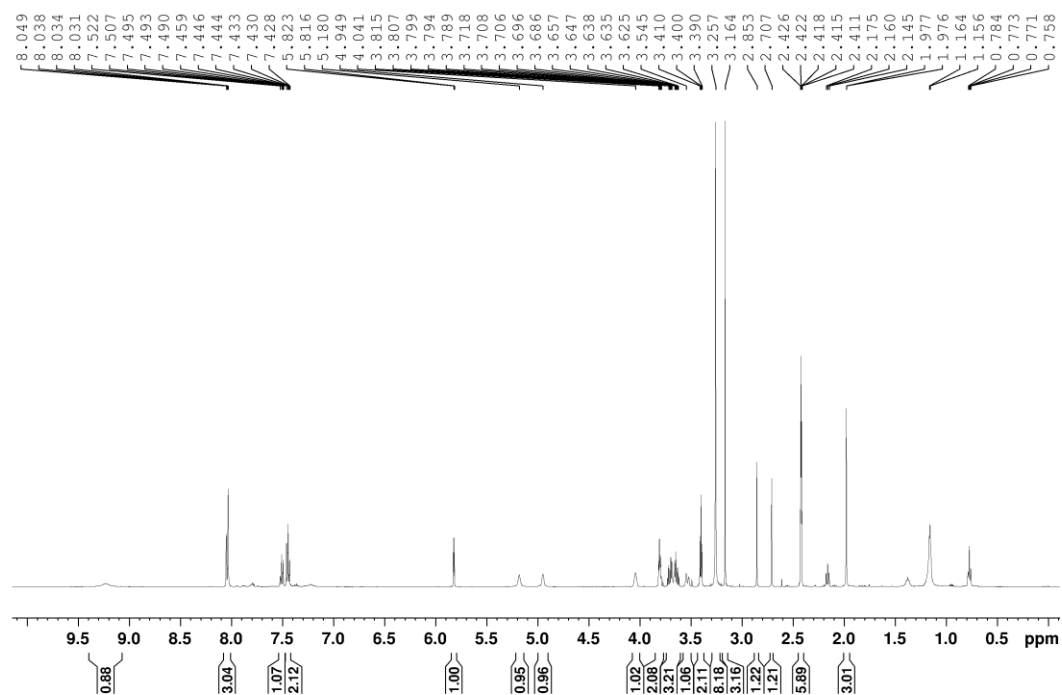
**Liite 5.** Yhdisteen **2c**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



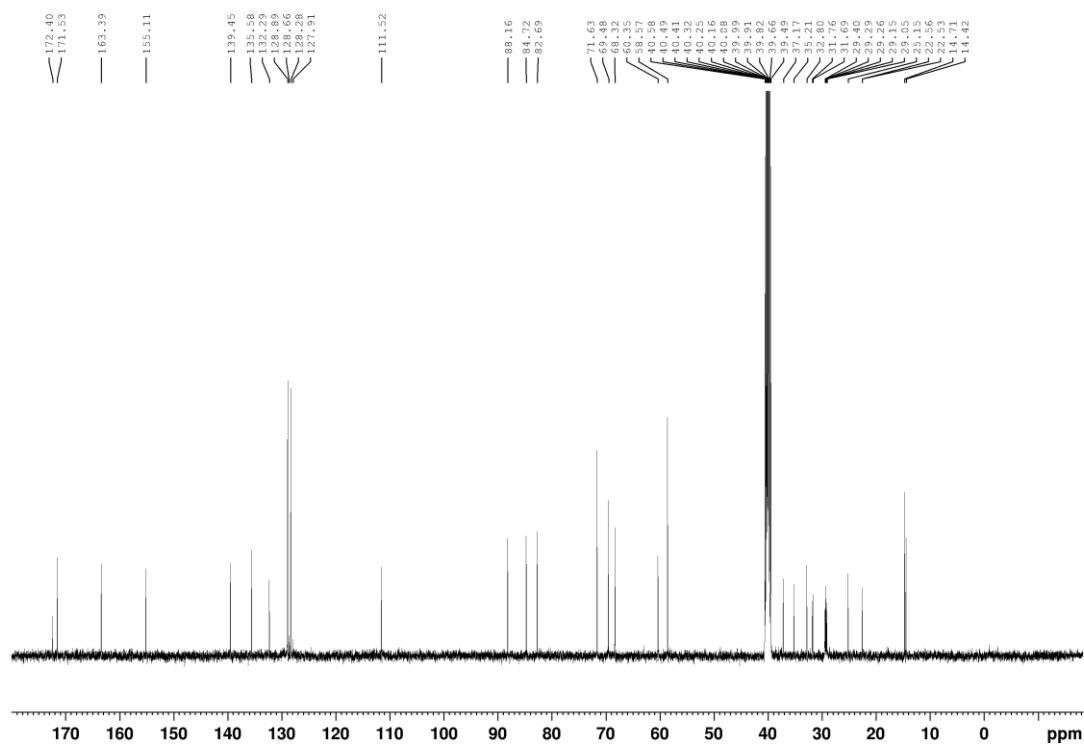
**Liite 6.** Yhdisteen **2c**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz, DMSO- $d_6$ )

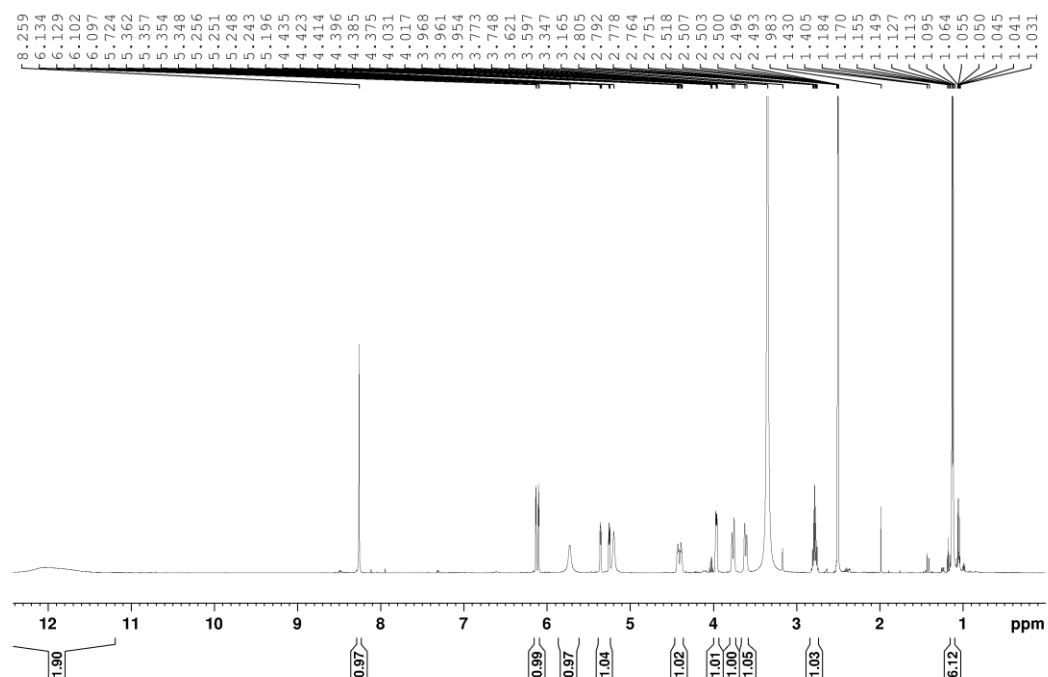
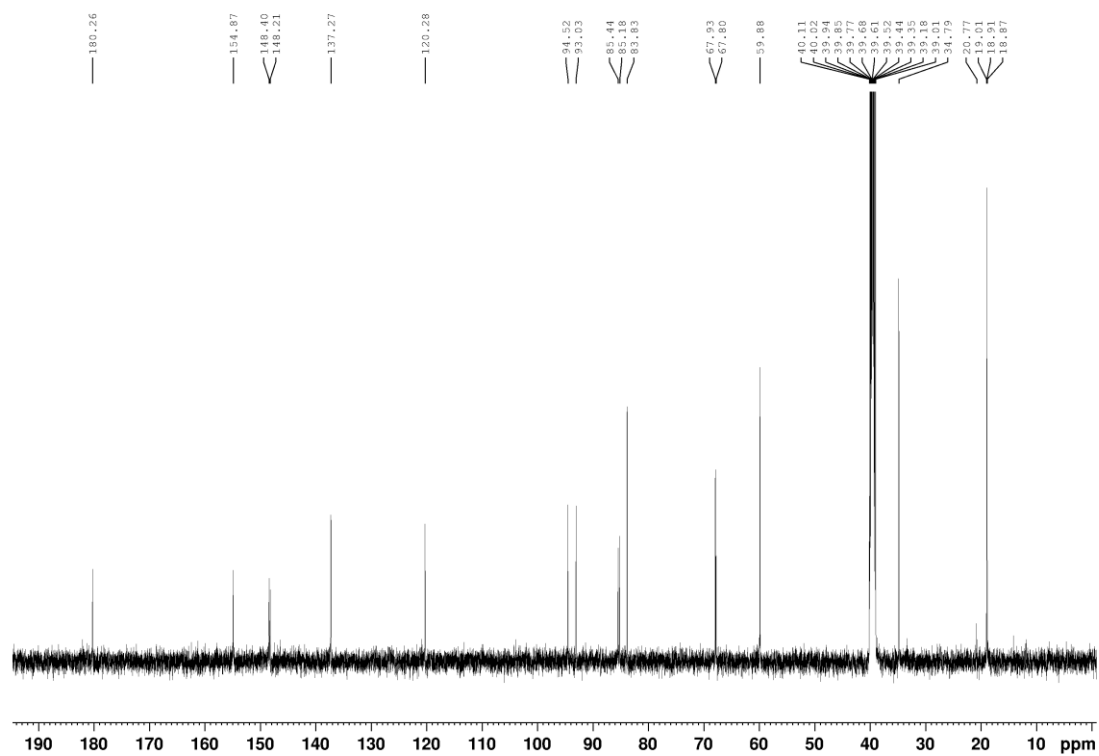


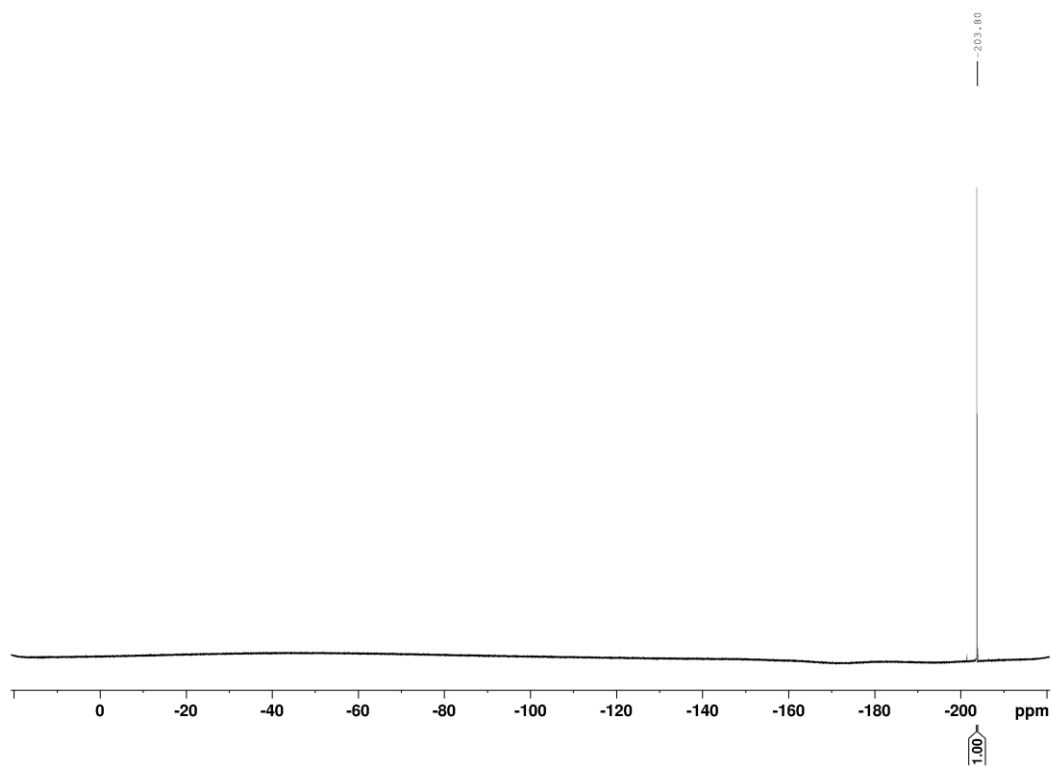
**Liite 7.** Yhdisteen **2d**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz, DMSO- $d_6$ )



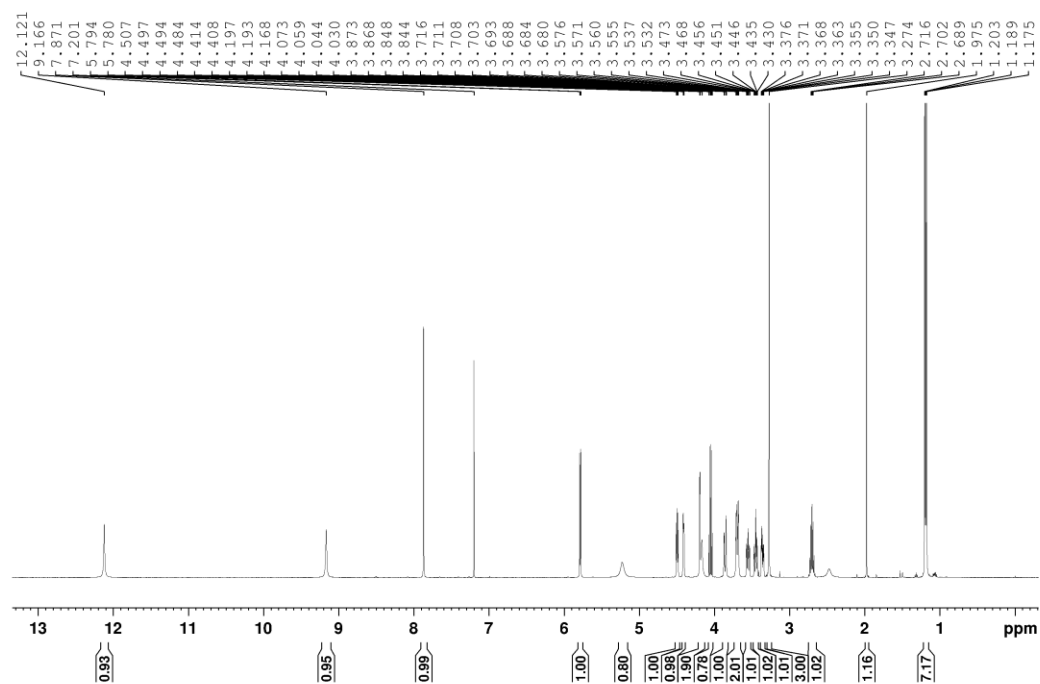
**Liite 8.** Yhdisteen **2d**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz, DMSO- $d_6$ )



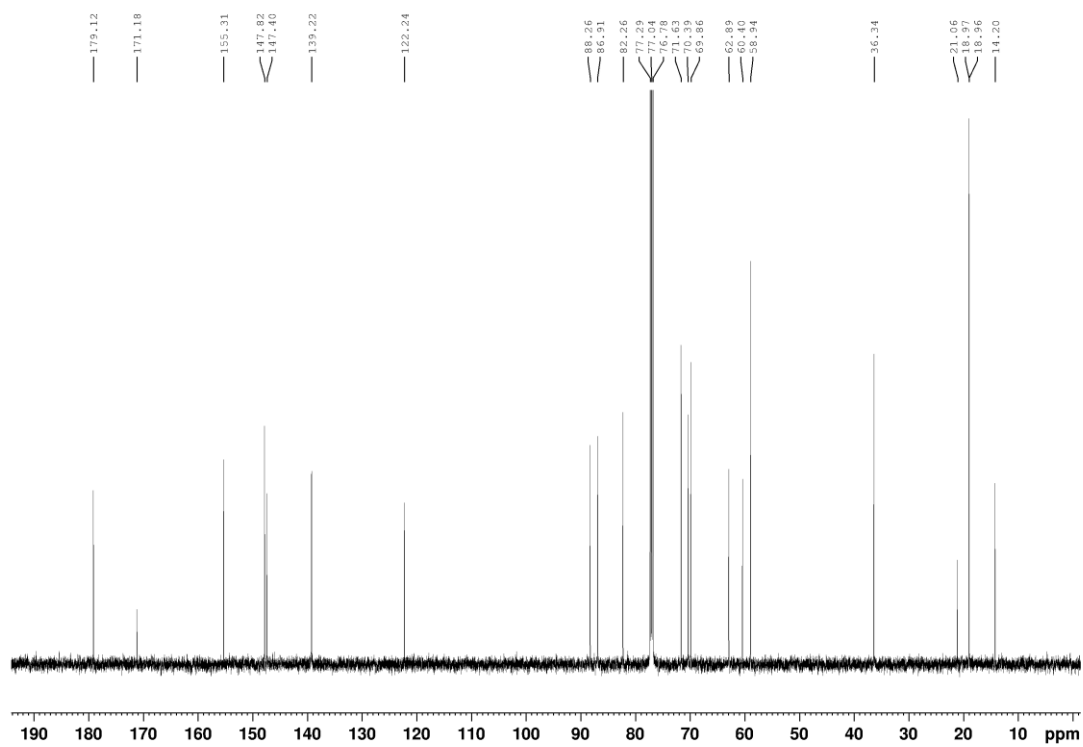
**Liite 9.** Yhdisteen **2e**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**Liite 10.** Yhdisteen **2e**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz, DMSO- $d_6$ )

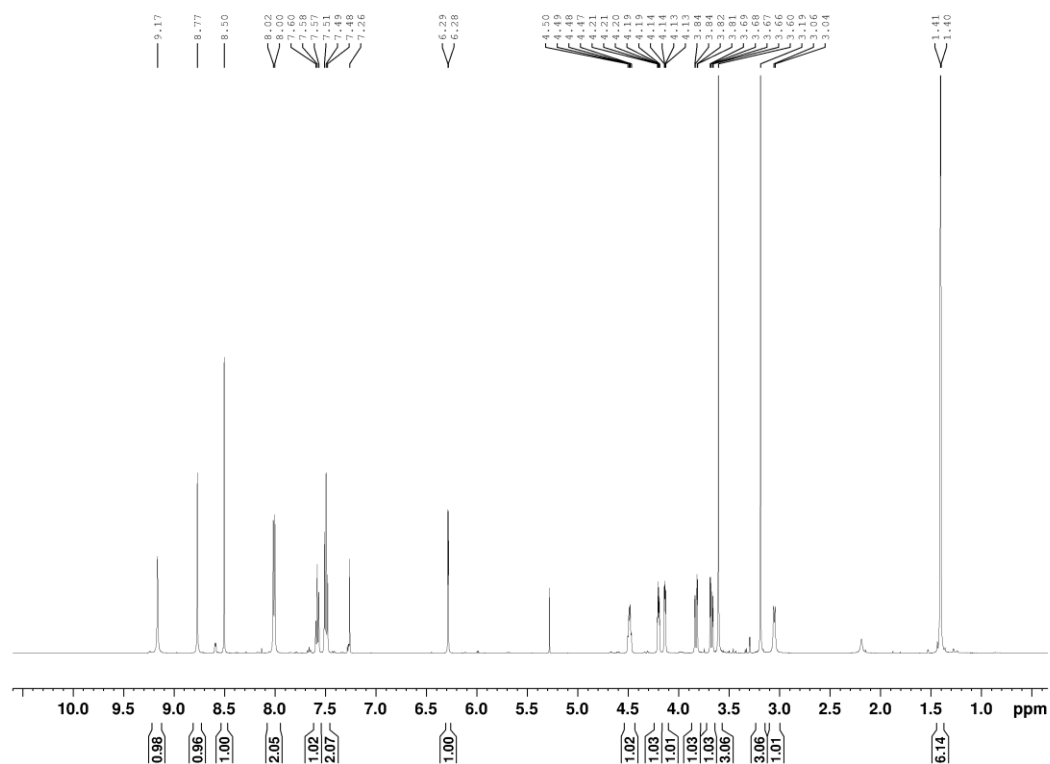
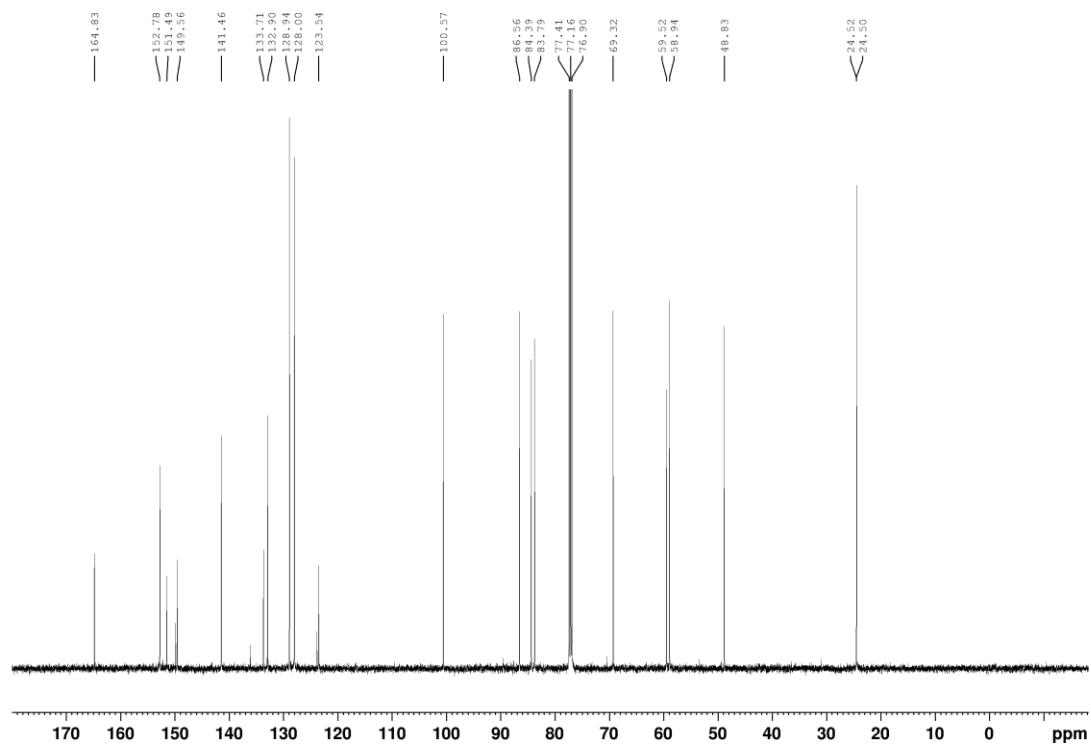
**Liite 10.** Yhdisteen **2e**  $^{19}\text{F}$  NMR spektri (471 MHz, DMSO- $d_6$ )

**Liite 11.** Yhdisteen **2f**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

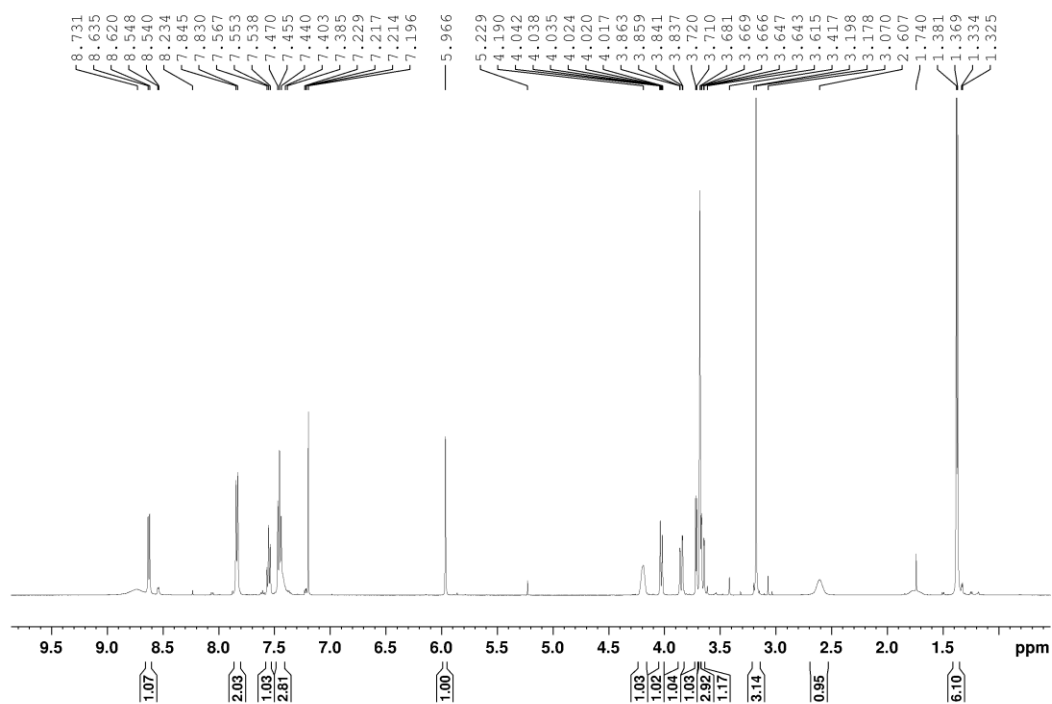
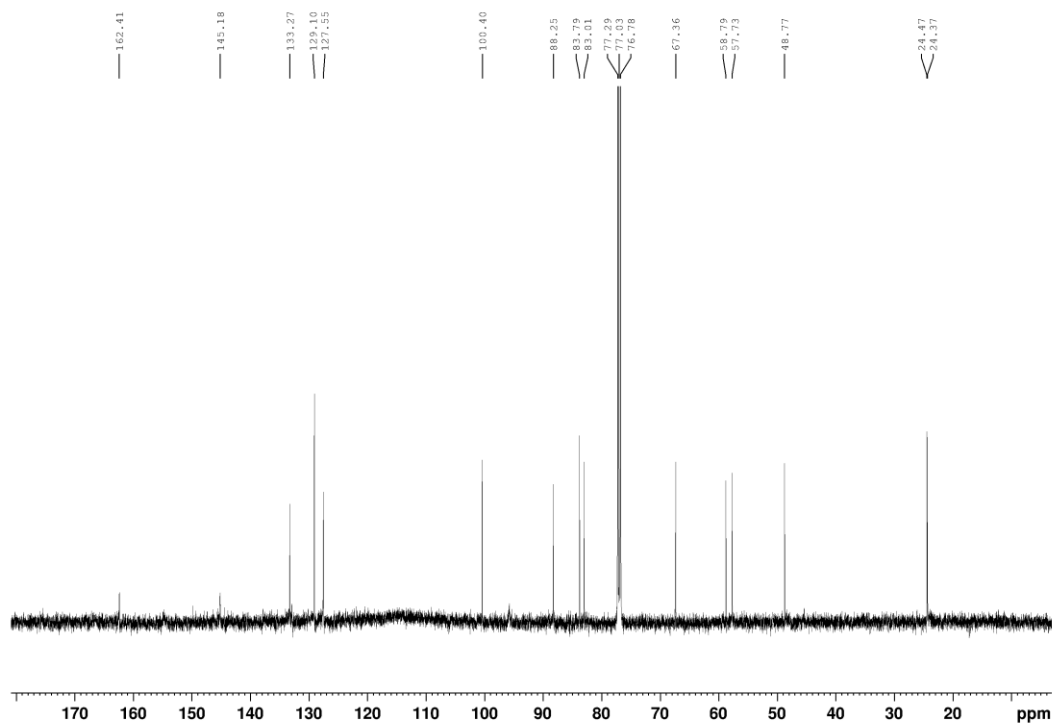


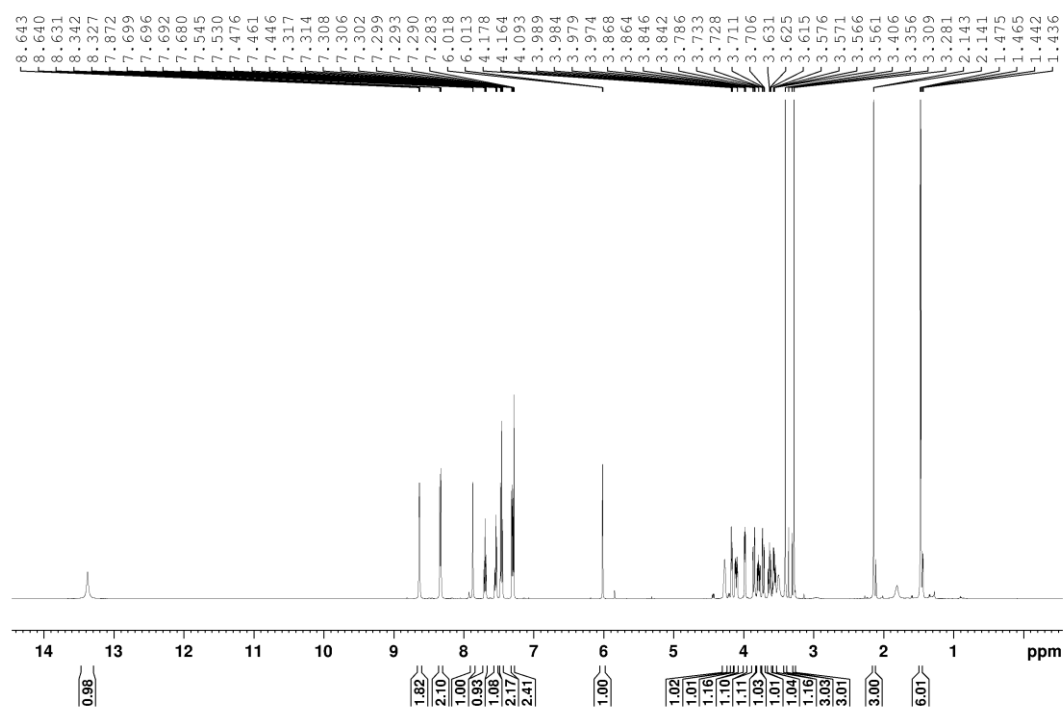
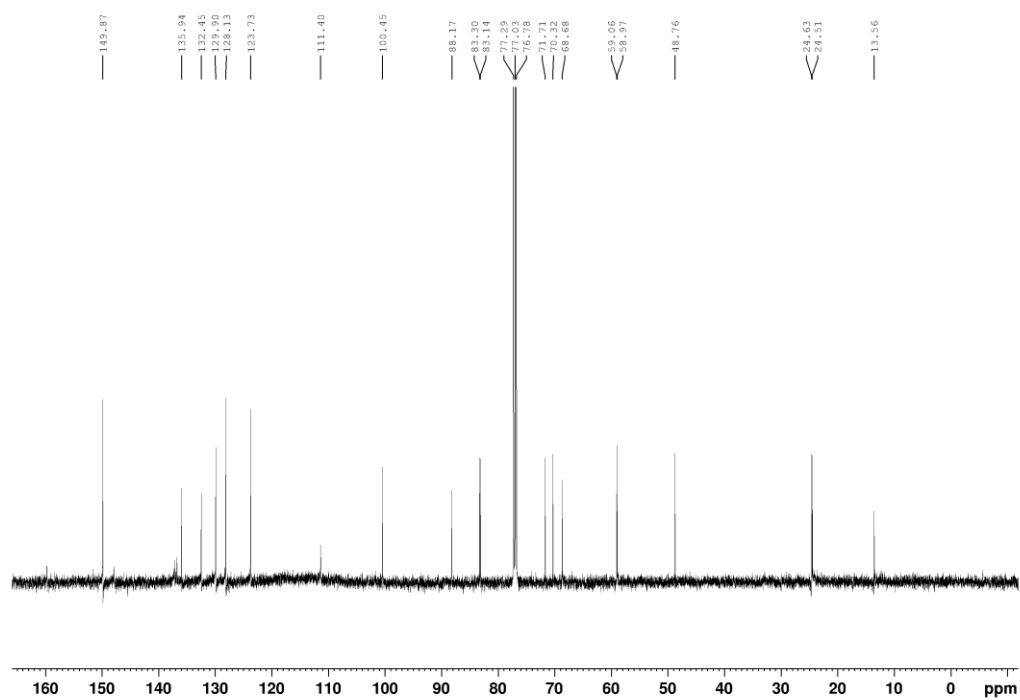
**Liite 12.** Yhdisteen **2f**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

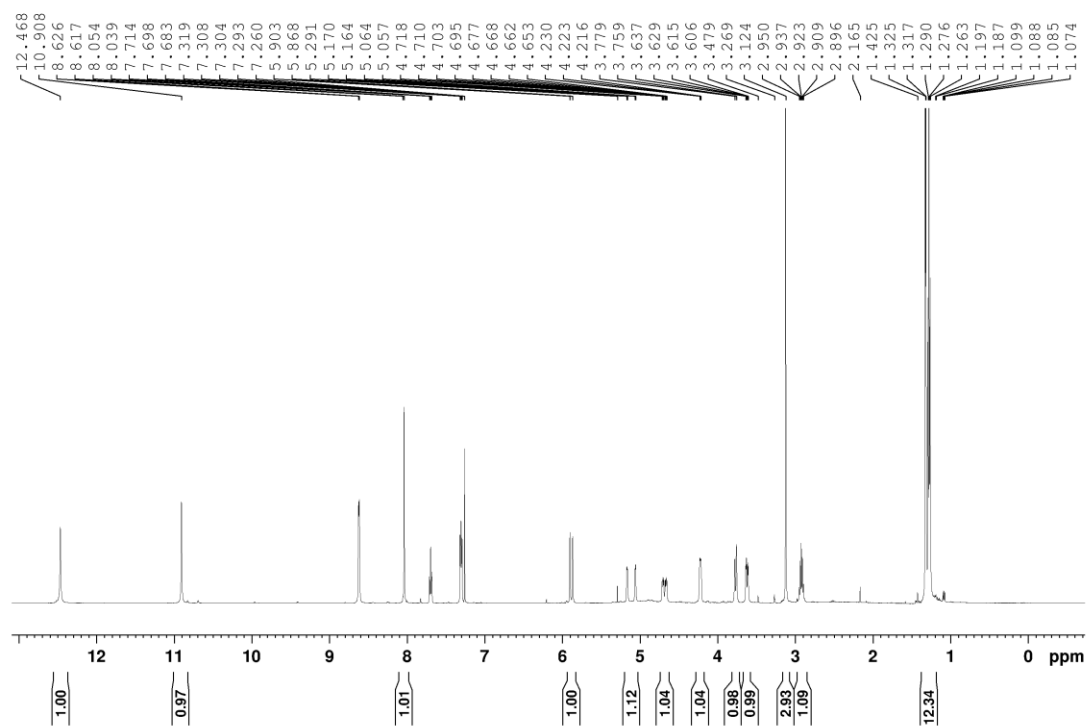
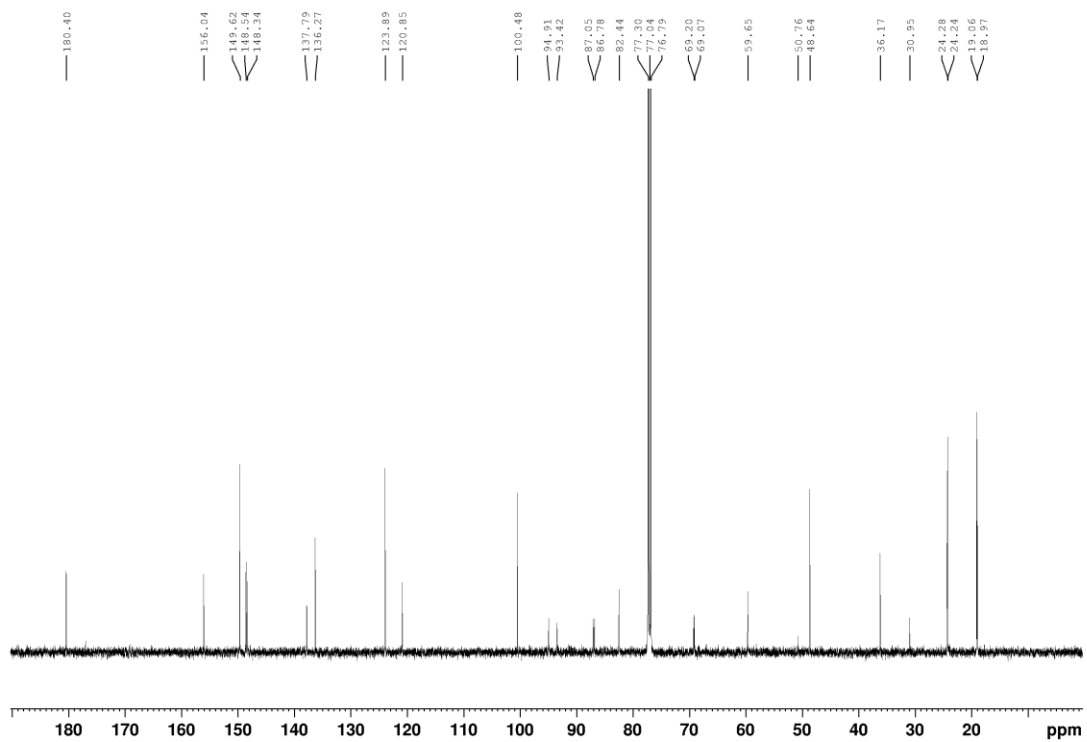


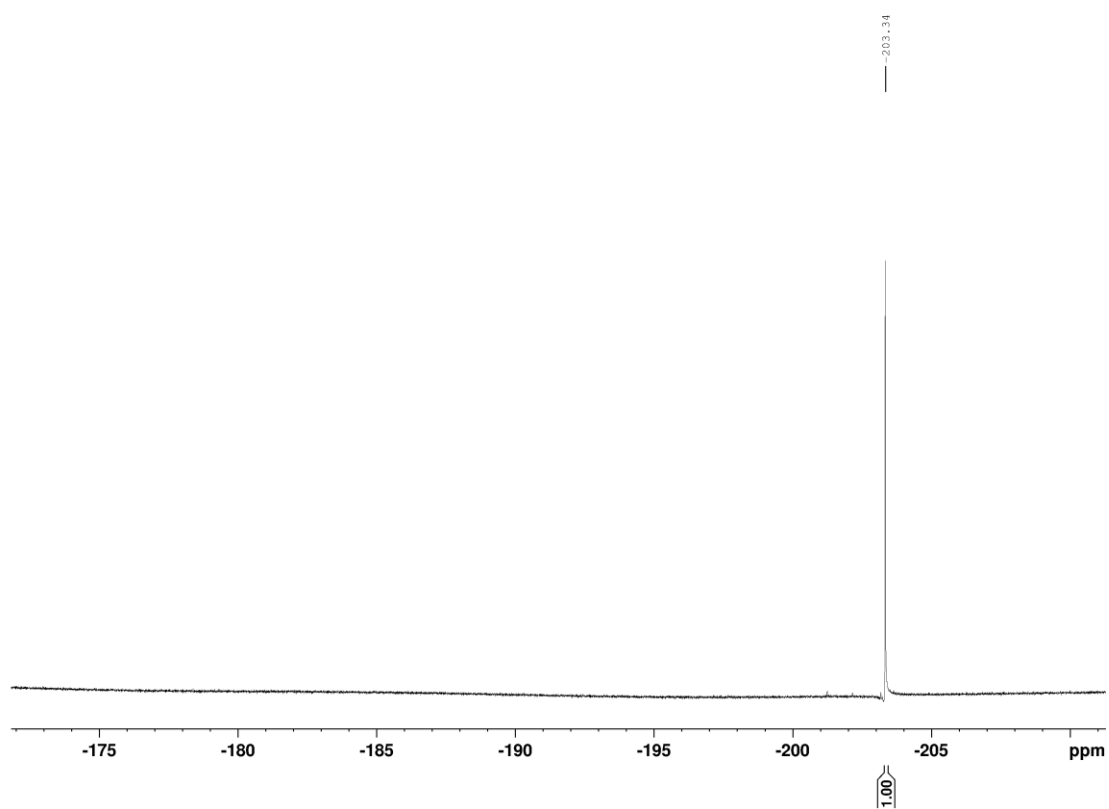
**Liite 13.** Yhdisteen **3a**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**Liite 14.** Yhdisteen **3a**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



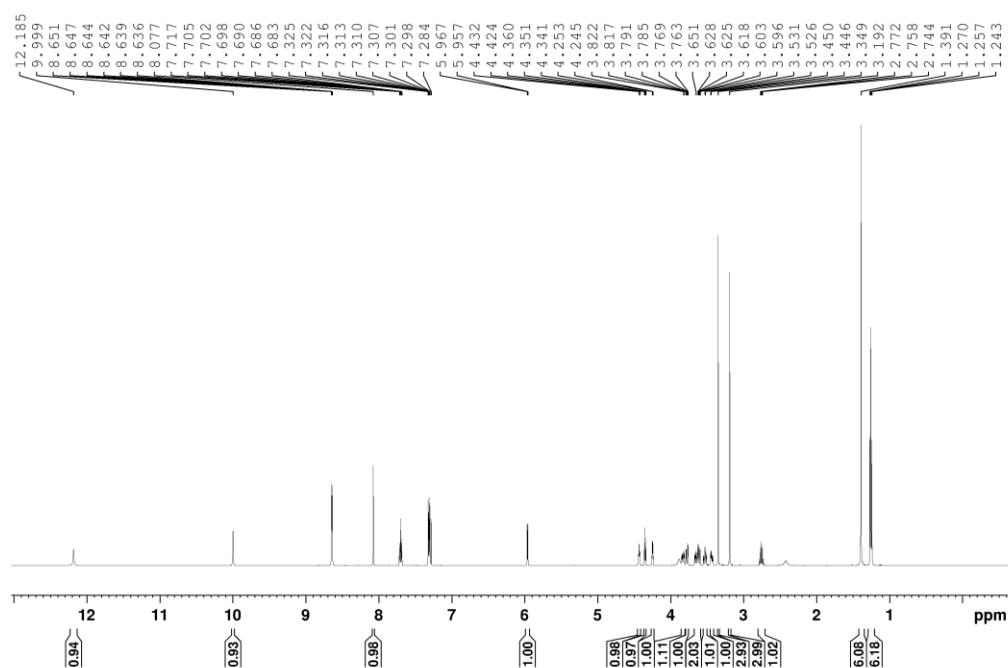
**Liite 17.** Yhdisteen **3c**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**Liite 18.** Yhdisteen **3c**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

**Liite 19.** Yhdisteen **3d**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**Liite 20.** Yhdisteen **3d**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

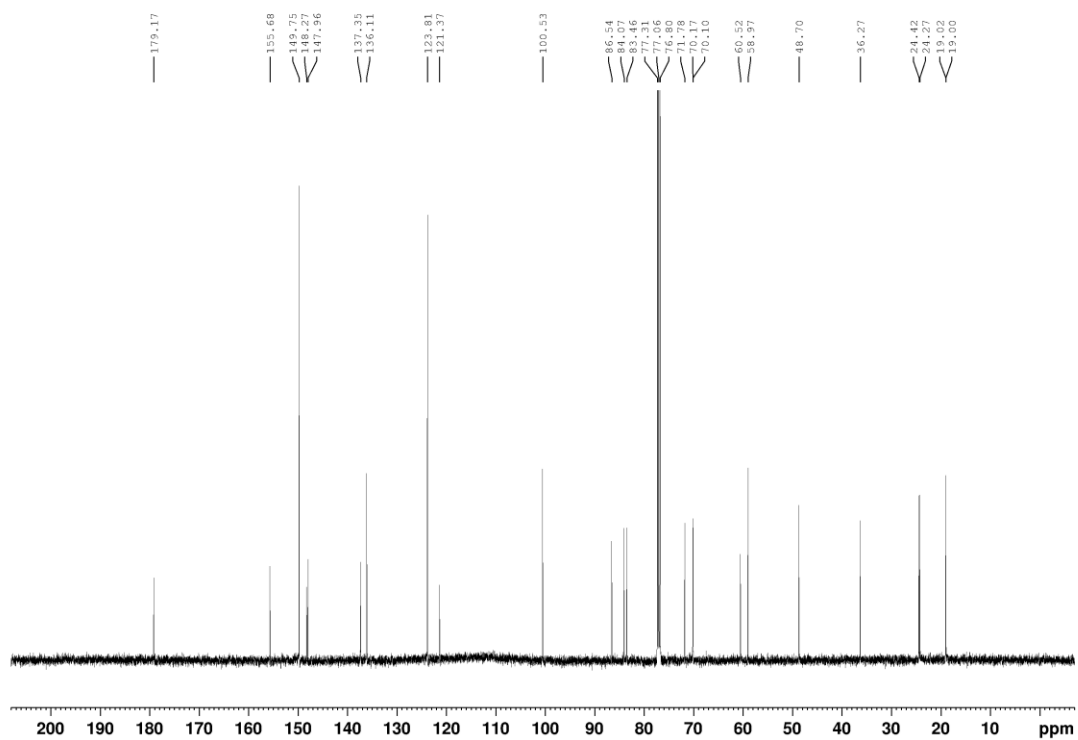
**Liite 21.** Yhdisteen **3e**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**Liite 22.** Yhdisteen **3e**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

**Liite 23.** Yhdisteen **3e**  $^{19}\text{F}$  NMR spektri (471 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

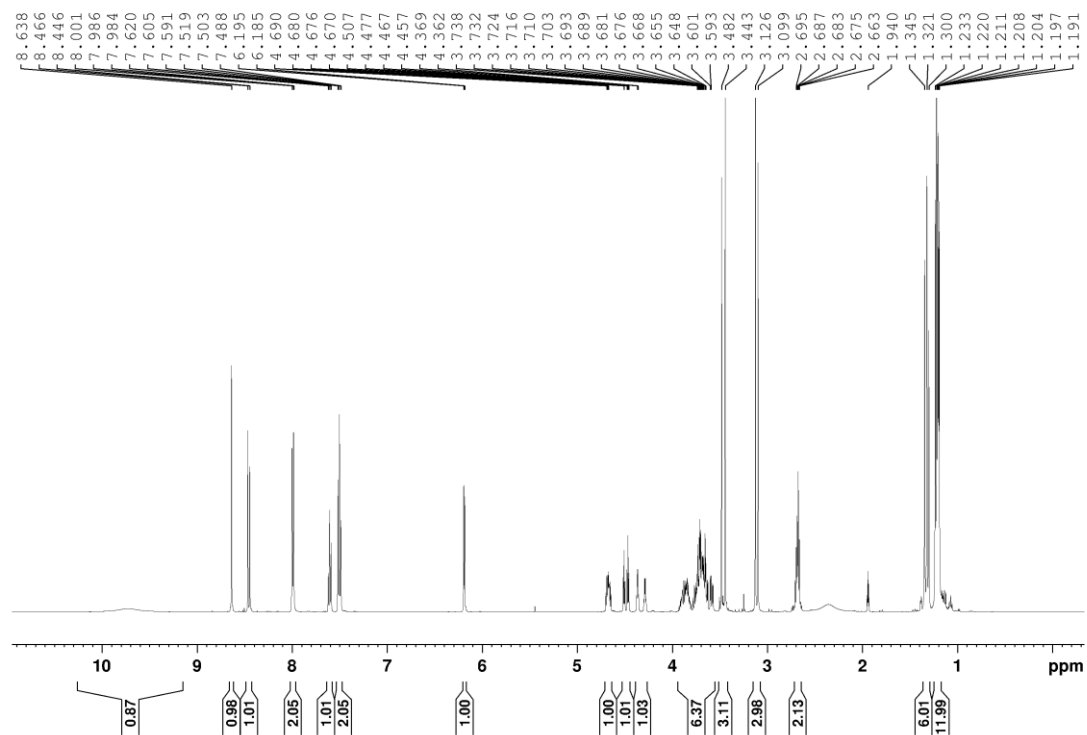
**Liite 24.** Yhdisteen **3f**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



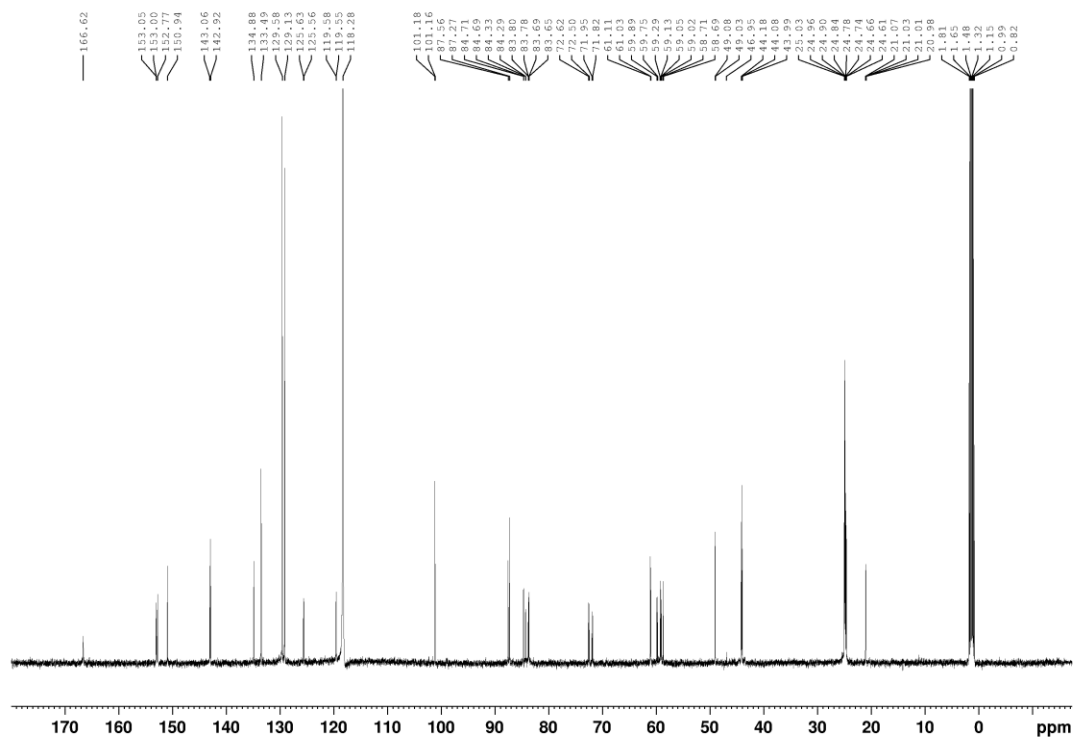
**Liite 25.** Yhdisteen **3f**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

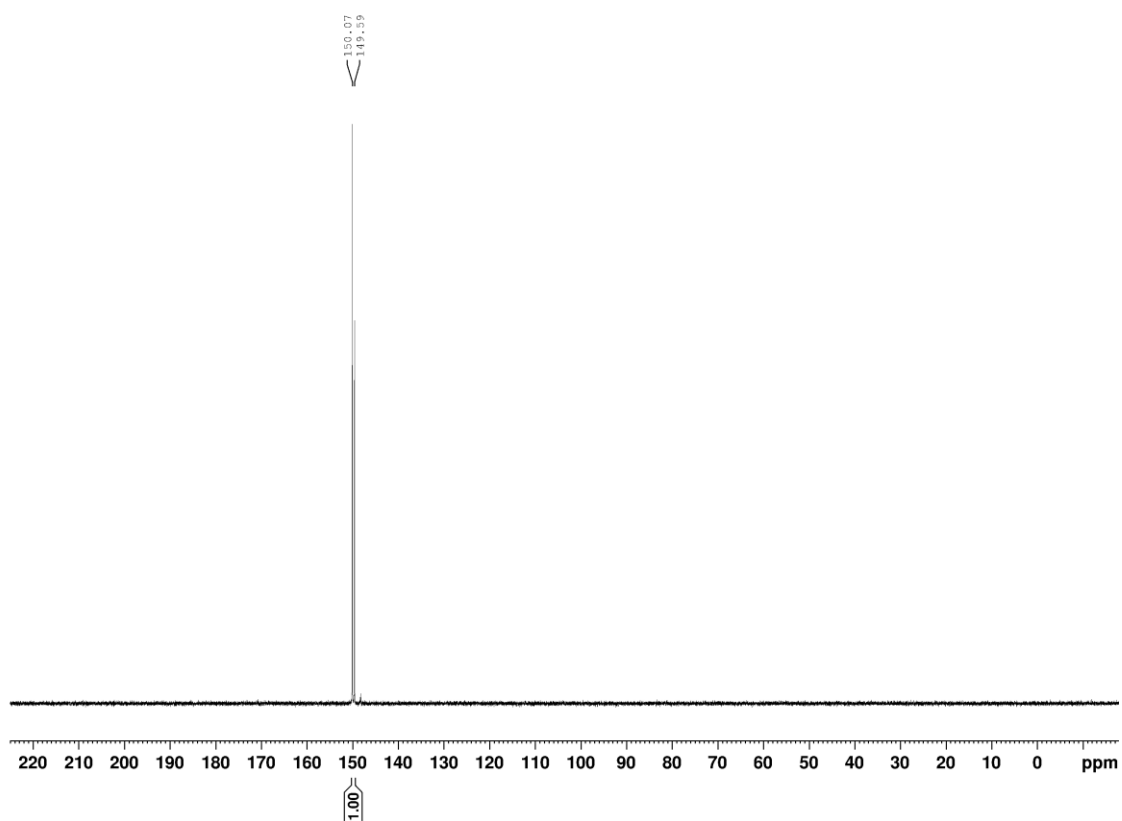


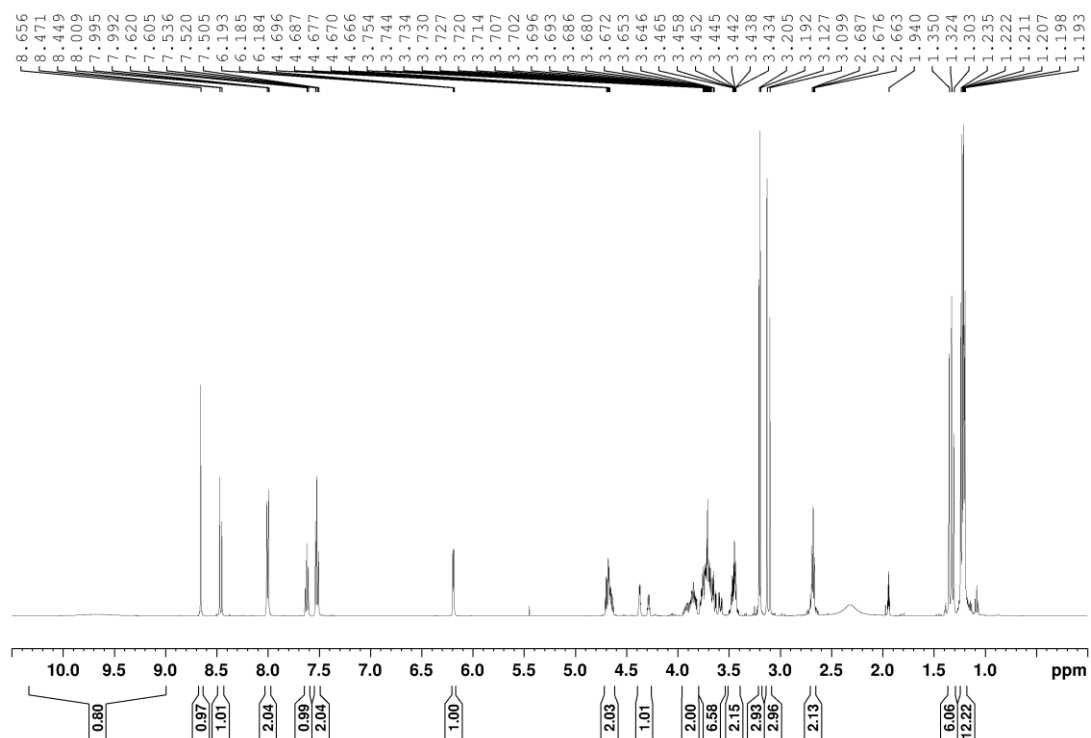
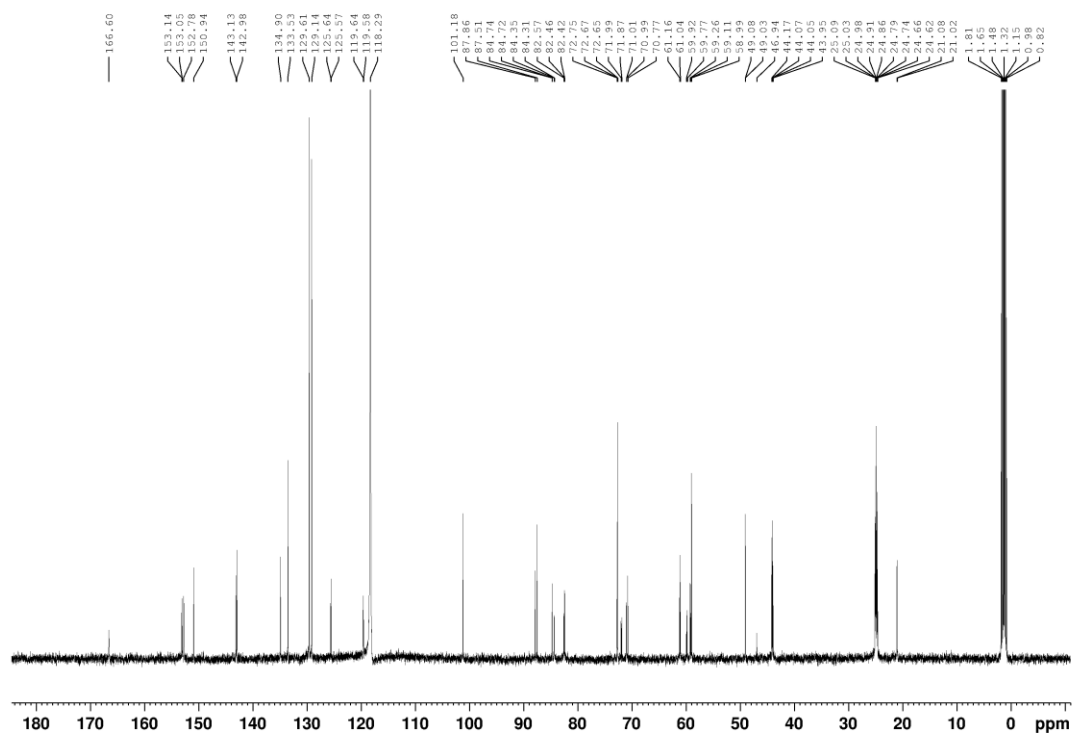
**Liite 26.** Yhdisteen **4a**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

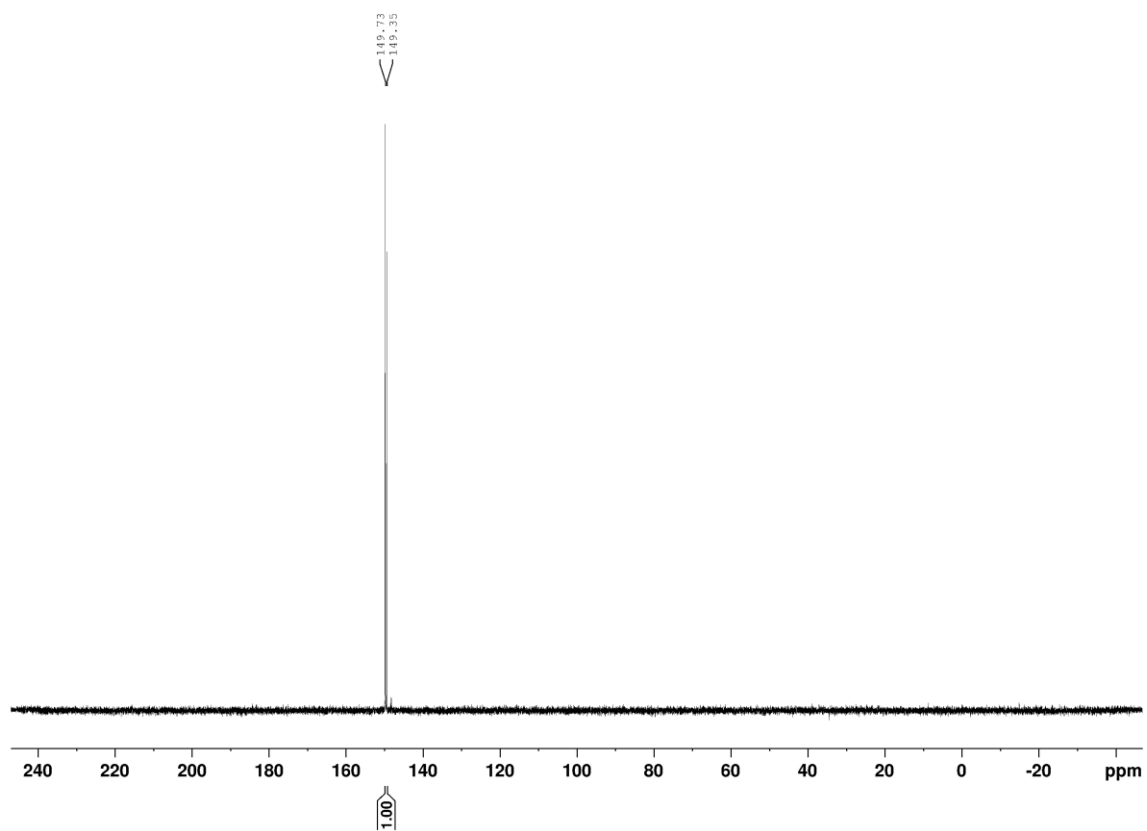


**Liite 26.** Yhdisteen **4a**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

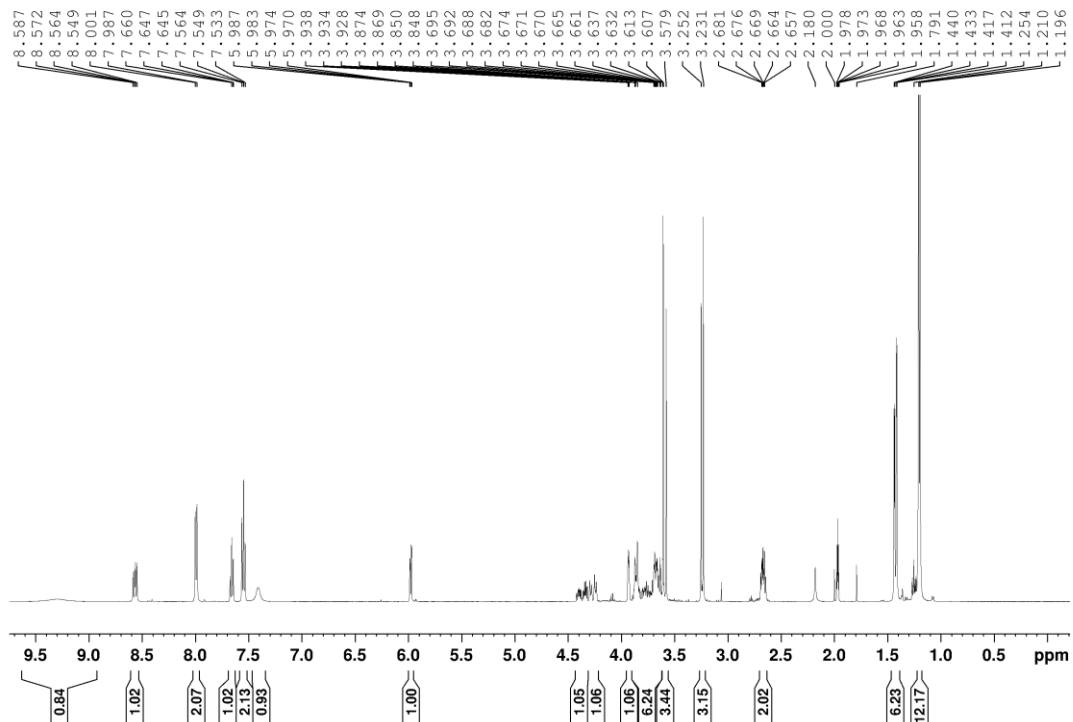


**Liite 27.** Yhdisteen **4a**  $^{31}\text{P}$  NMR spektri (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

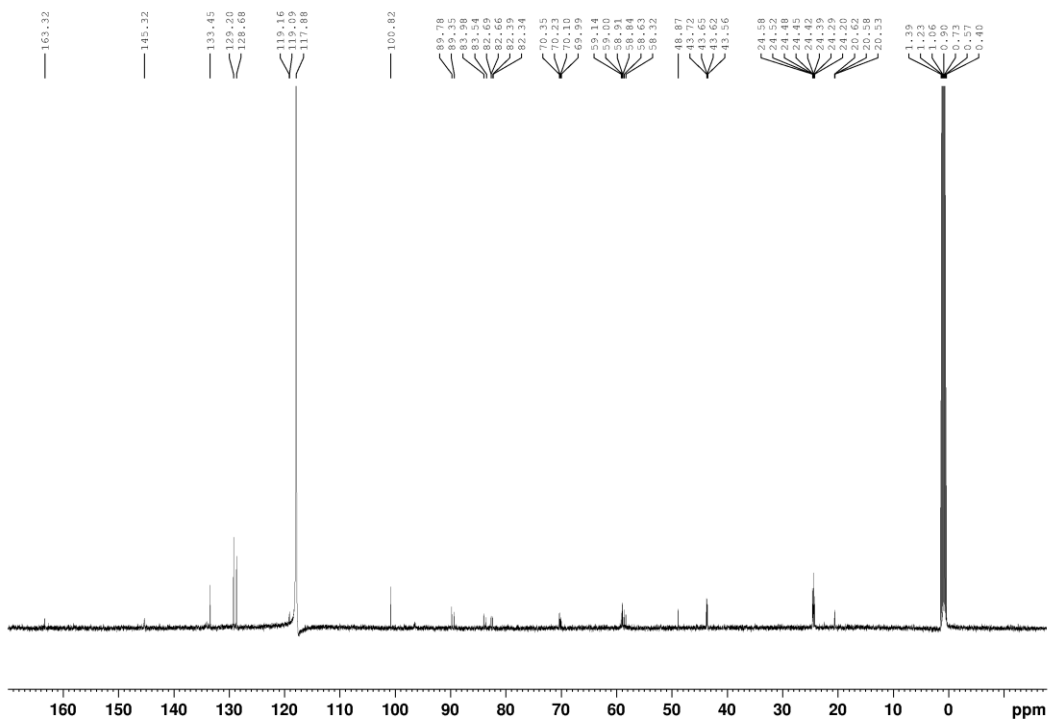
**Liite 28.** Yhdisteen **4b**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )**Liite 29.** Yhdisteen **4b**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

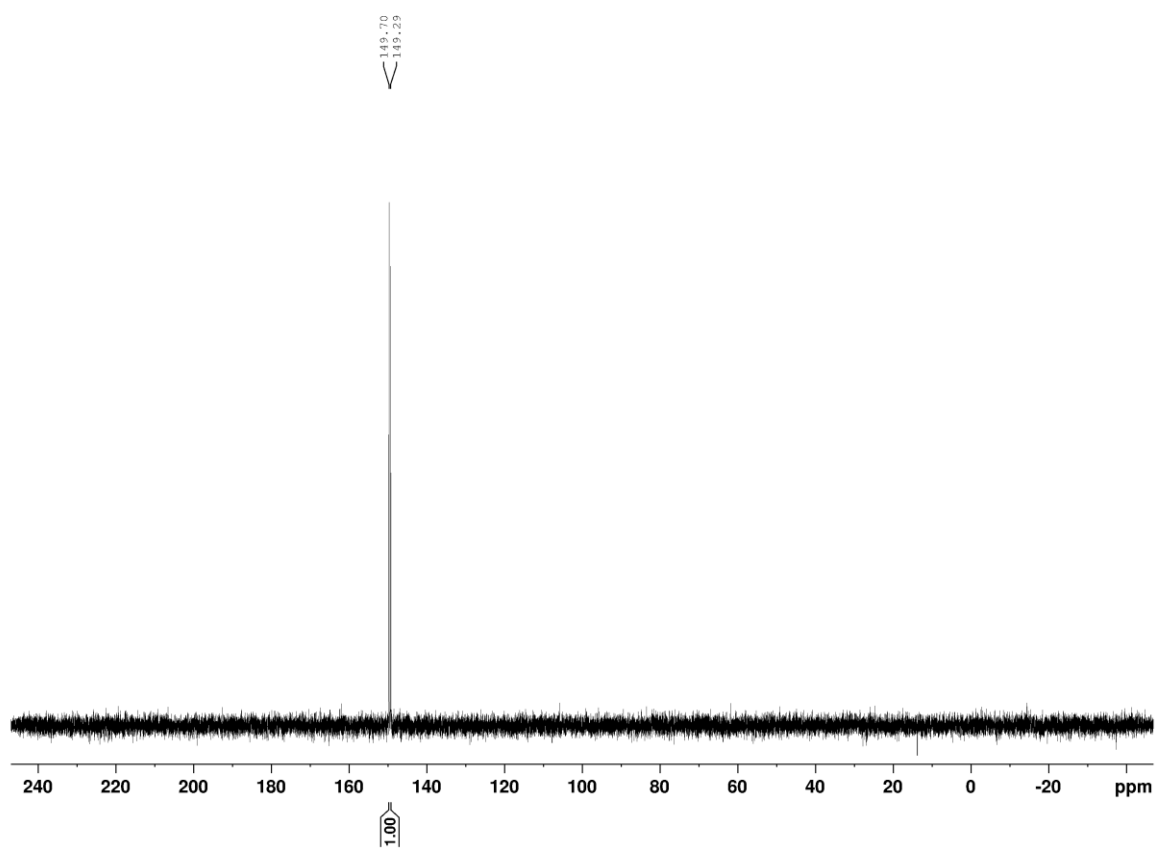
**Liite 30.** Yhdisteen **4b**  $^{31}\text{P}$  NMR spektri (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

**Liite 31.** Yhdisteen **4c**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

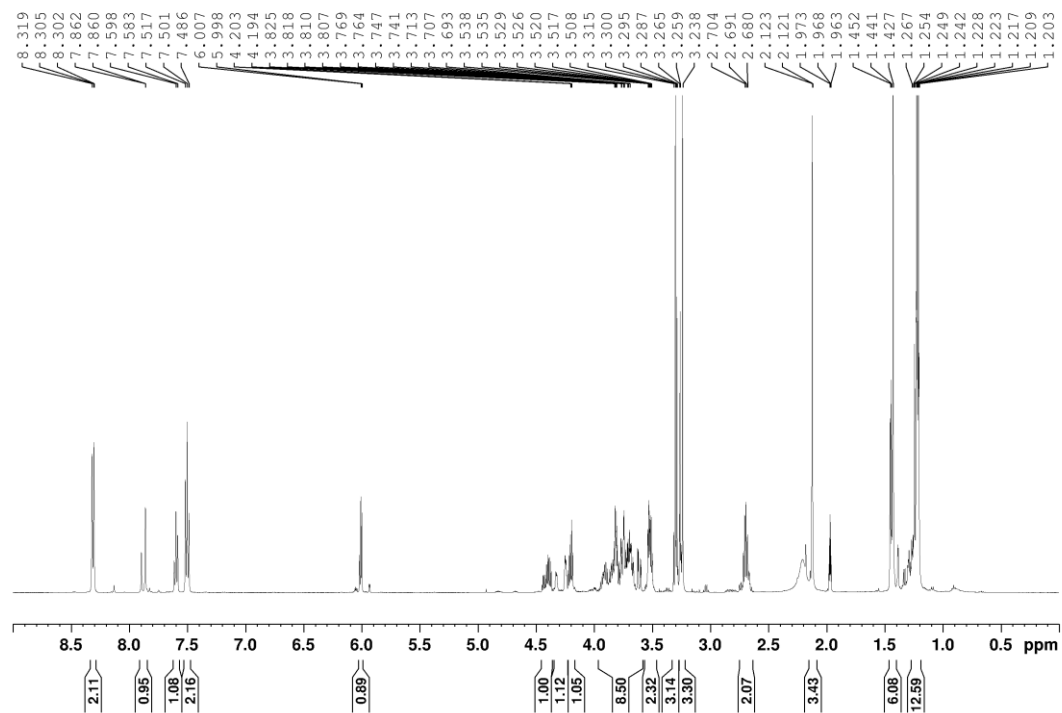


**Liite 32.** Yhdisteen **4c**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

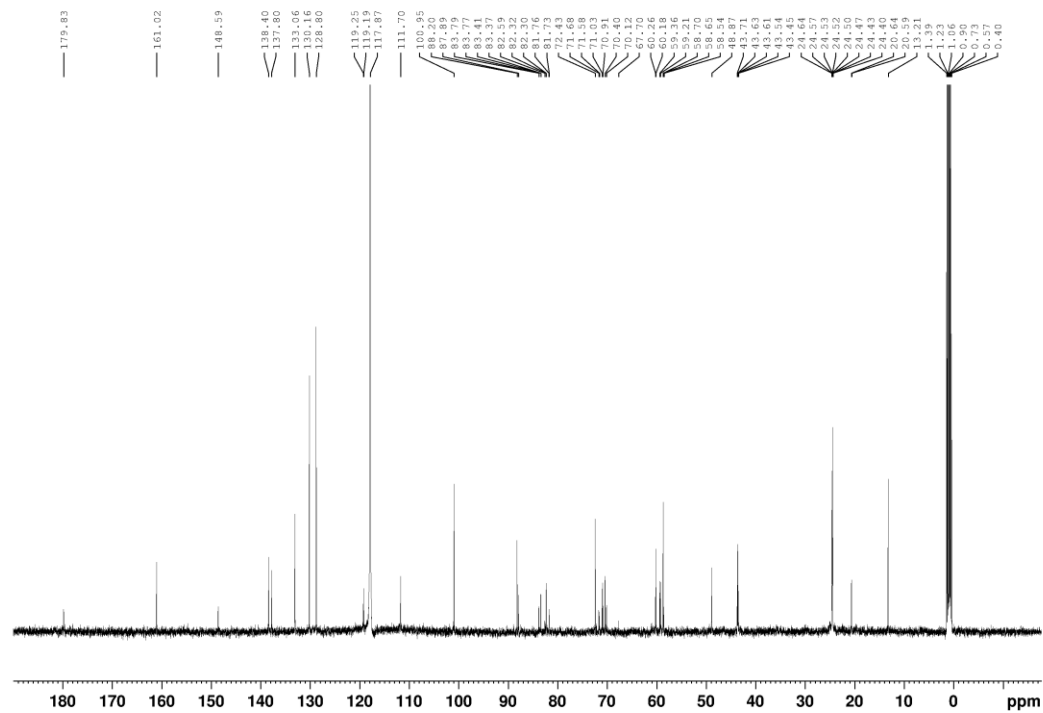


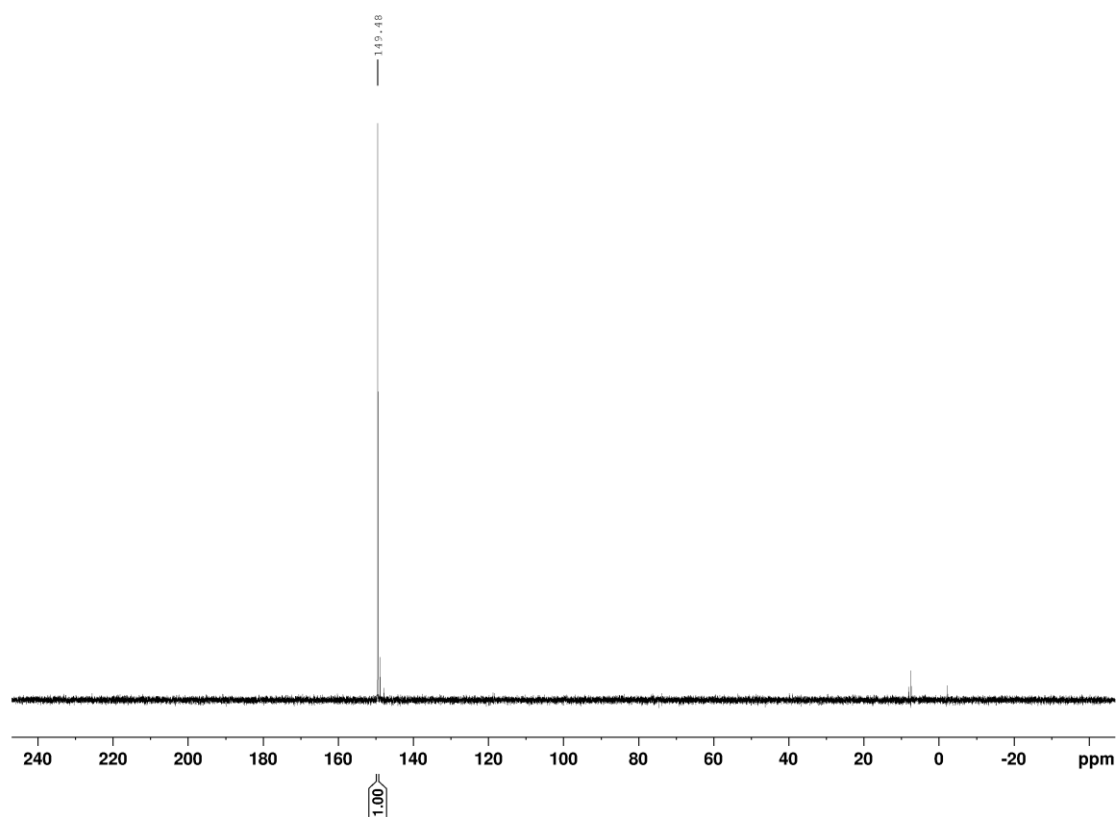
**Liite 33.** Yhdisteen **4c**  $^{31}\text{P}$  NMR spektri (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

**Liite 34.** Yhdisteen **4d**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

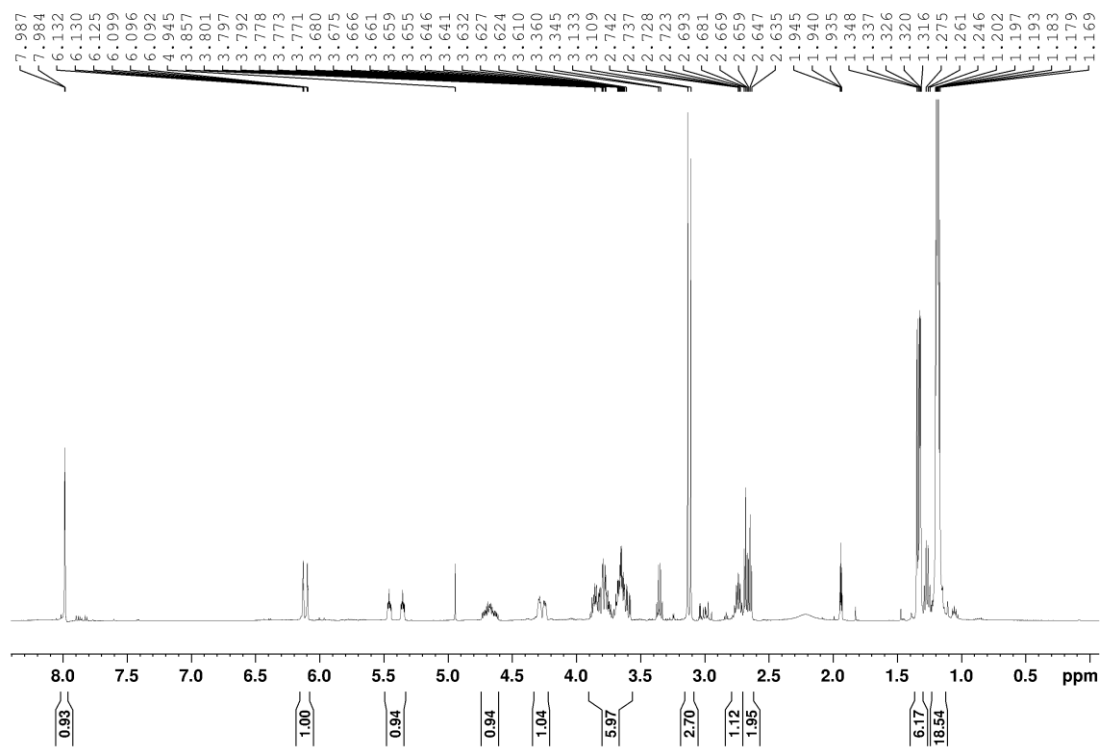


**Liite 35.** Yhdisteen **4d**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

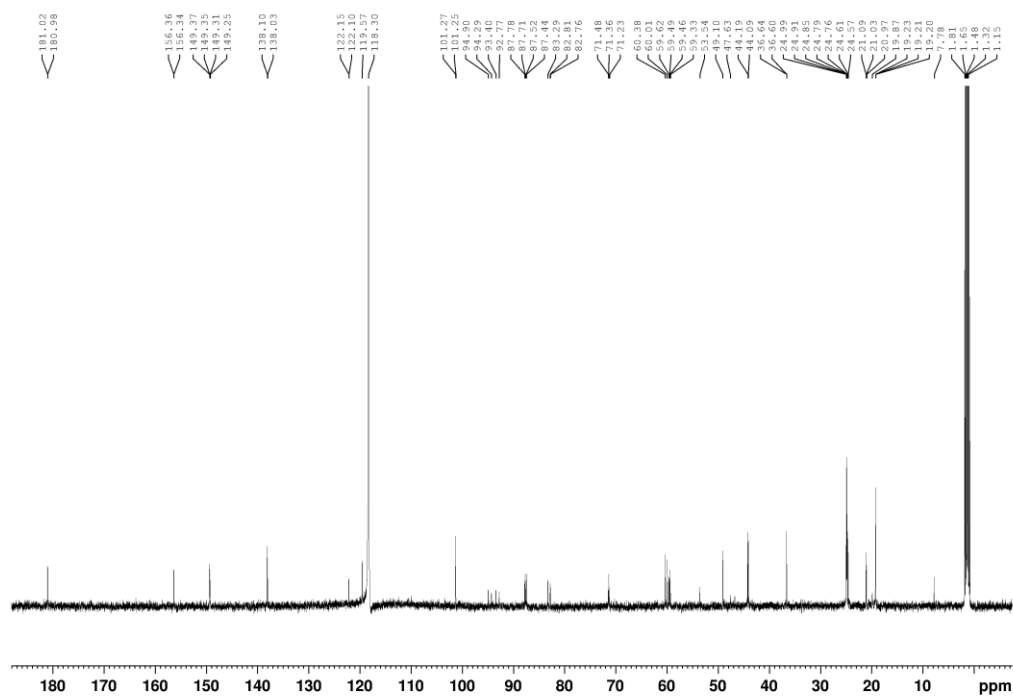


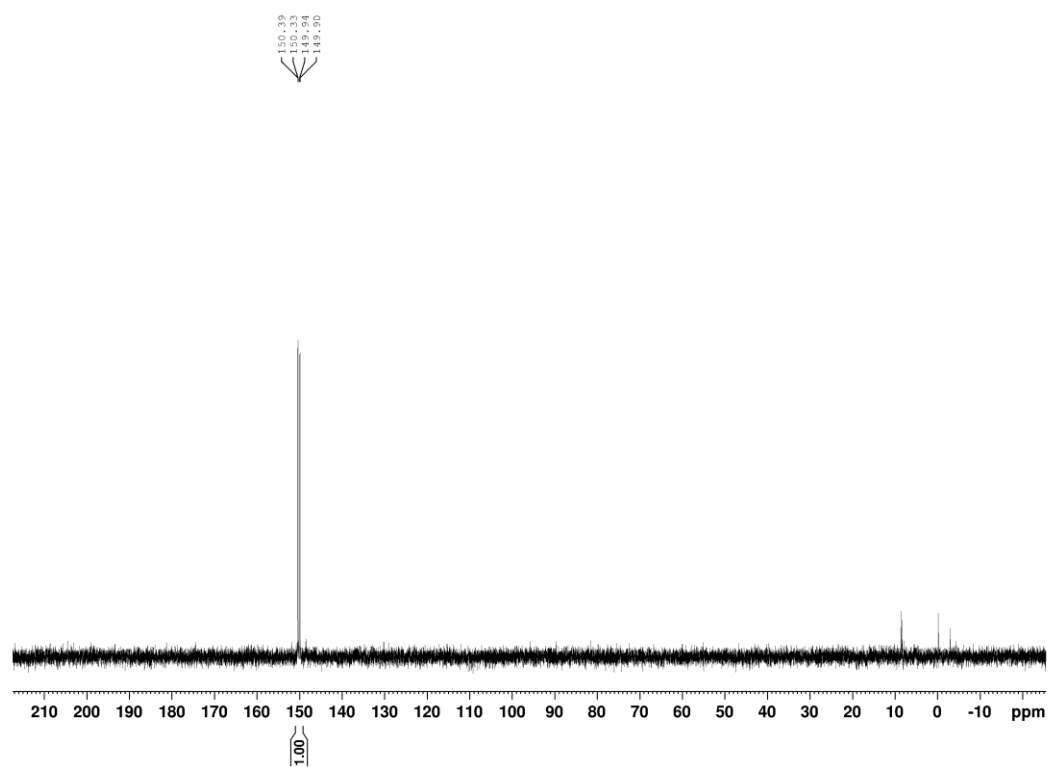
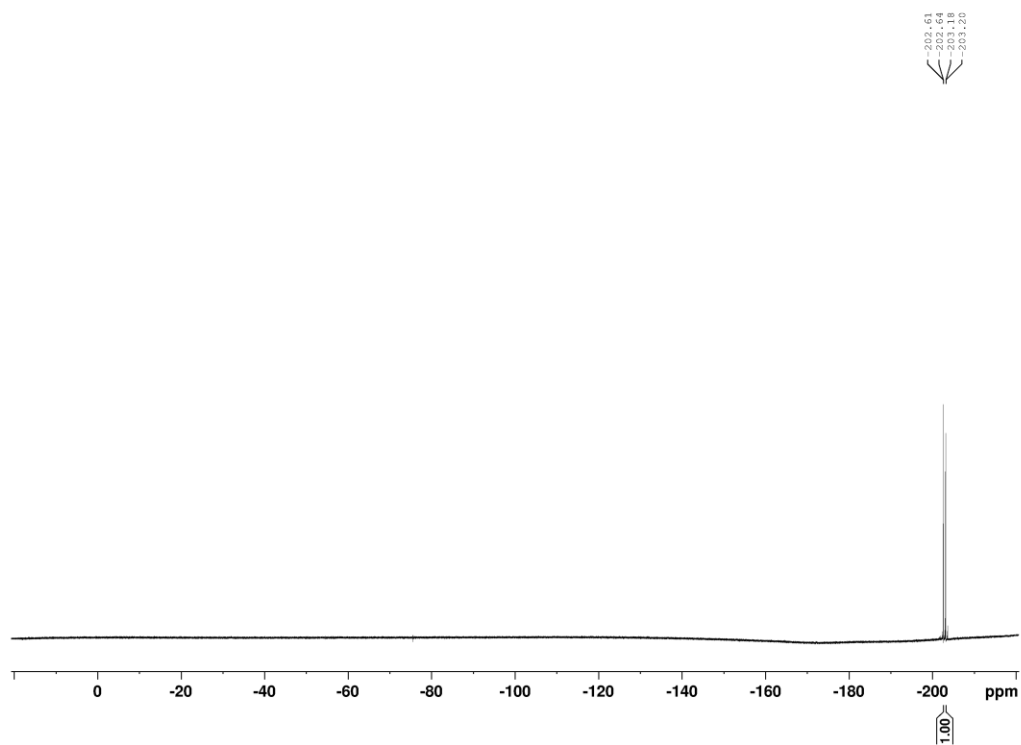
**Liite 36.** Yhdisteen **4d**  $^{31}\text{P}$  NMR spektri (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

**Liite 37.** Yhdisteen **4e**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

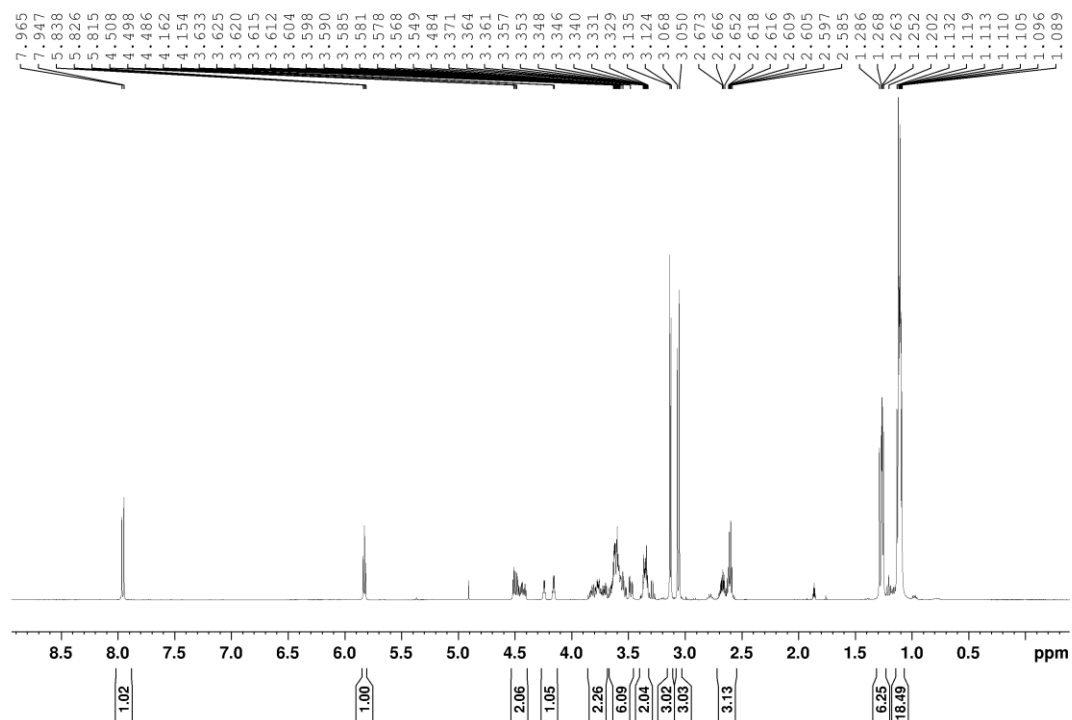


**Liite 38.** Yhdisteen **4e**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

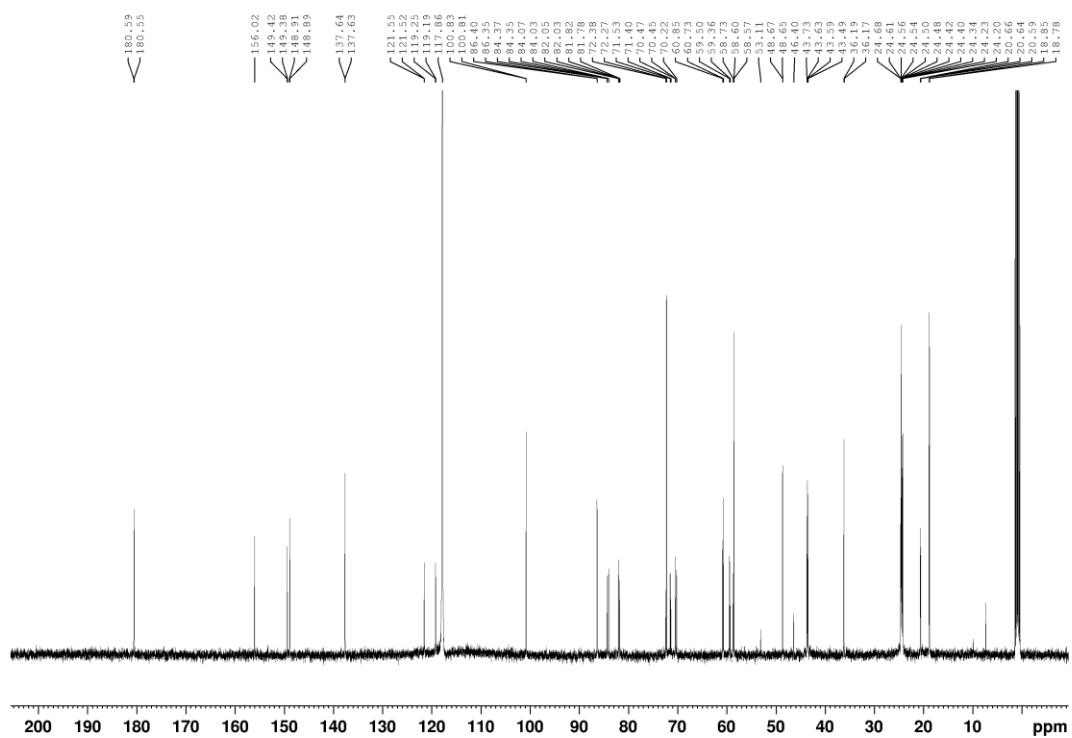


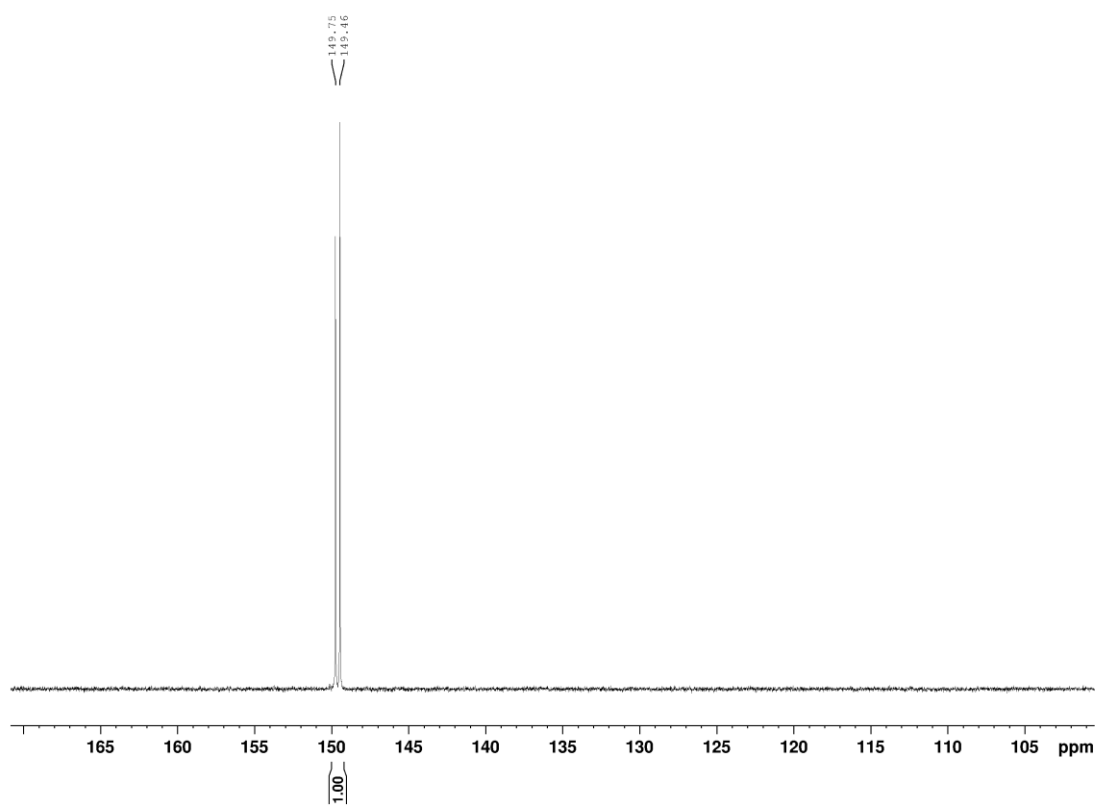
**Liite 39.** Yhdisteen **4e**  $^{31}\text{P}$  NMR spektri (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )**Liite 40.** Yhdisteen **4e**  $^{19}\text{F}$  NMR spektri (471 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

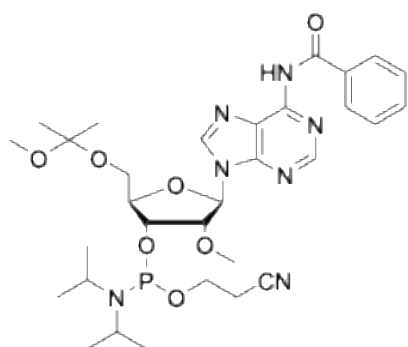
**Liite 41.** Yhdisteen **4f**  $^1\text{H}$  NMR spektri (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



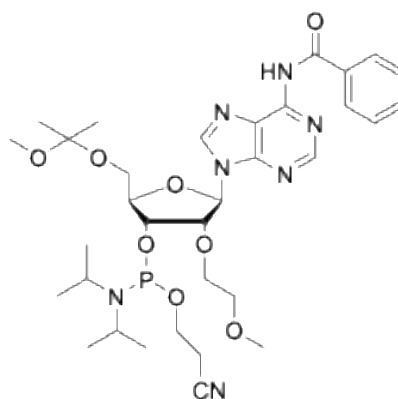
**Liite 42.** Yhdisteen **4f**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



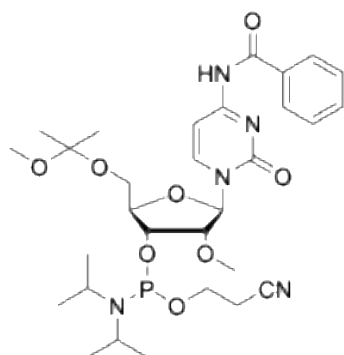
**Liite 43.** Yhdisteen **4f**  $^{31}\text{P}$  NMR spektri (202 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



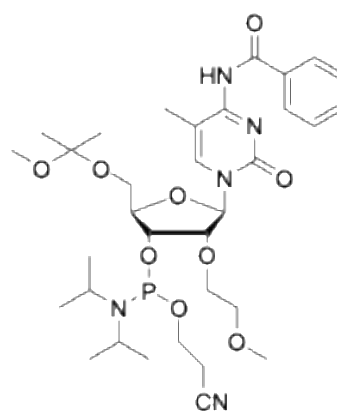
**N<sup>6</sup>-Bentsoyyl-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-O-metyyliadenosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-diiisopropyyli)fosforamidiiitti (4a)**



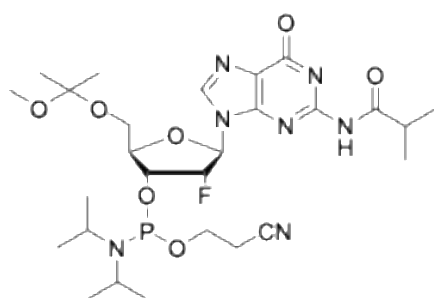
**N<sup>6</sup>-Bentsoyyl-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-O-metyylietyyliadenosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-diiisopropyyli)fosforamidiiitti (4b)**



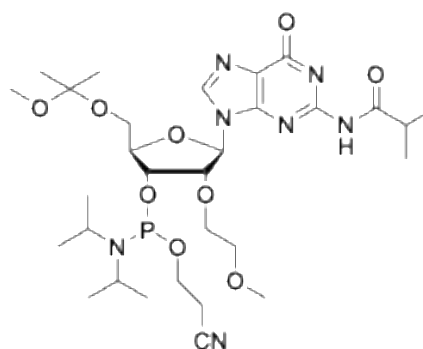
**N<sup>4</sup>-Bentsoyyl-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-O-metyylisytidiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-diiisopropyyli)fosforamidiiitti (4c)**



**N<sup>4</sup>-Bentsoyyl-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-O-metoksietyyli-5-metyylisytidiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-diiisopropyyli)fosforamidiiitti (4d)**



**N<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-fluosiguanosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-diiisopropyyli)fosforamidiiitti (4e)**



**N<sup>2</sup>-Isobutyryyli-5'-O-(2-metoksi-prop-2-yyli)-2'-metoksietyyliguanosiini-3'-(2-syanoetyyli-N,N-diiisopropyyli)fosforamidiiitti (4f)**

**Liite 44.** Lopputuotteiden rakennekaavat.