



2-(Atsidometyyli)bentsoyyli- ja  
atsidometyyllisuojaryhmä oligonukleotidien  
syntetiikassa

Annasofia Lantto

Bio-orgaaninen kemia

Pro gradu -tutkielma

Kemian laitos

Turun yliopisto

Joulukuu 2023

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

LANTTO, ANNASOFIA: 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli- ja atsidometyylisuojarahmä oligonukleotidien syntetiikassa

Pro gradu -tutkielma, 41 s, + liitteet 15 s.

Joulukuu 2023

---

Atsidometyyli- ja 2-(atsidometyyli)bentsoyylisuojattuja oligonukleotideja ja näiden analogeja on syntetisoitu fosfotriesteri- ja boranofosfotriesterimenetelmillä. Atsidometyyli, 2-(atsidometyyli)bentsoyyli ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyylioksi]bentsoyyli-ryhmillä on suojattu nukleosidin 2'-, 3'- ja 5'-hydroksyyli-ryhmiä sekä nukleoemästen eksosyklisiä aminoryhmiä. Kyseiset suojaryhmät voidaan irrottaa pelkistykseen perustuvalla Staudingerin reaktiolla, jossa atsidoryhmä pelkistyy aminoryhmäksi ja kolmenarvoinen fosfori P(III) hapettuu viidenarvoiseksi P(V). Samaan reaktioon perustuen fosforamidiittikemia ei sovellu käytettäväksi näiden suojaryhmien kanssa.

Pelkistykseen perustuvilla suojaryhmillä, joiden irrottaminen tapahtuu neutraaleissa olosuhteissa, voidaan korvata perinteisesti käytettyjä asyyli-suojaryhmiä emäsherkkien oligonukleotidien synteeseissä. Oligonukleotideja valmistetaan automatisoidusti kiinteällä kantajalla fosforamidiittikemiaa käyttäen. Kyseinen menetelmä ei kuitenkaan ole kestävä kehityksen mukainen, eikä se sovellu hyvin suuren mittakaavan synteisiin. Viime aikoina on julkaistu menetelmiä, joissa oligonukleotideja syntetisoidaan liuosfaasissa esimerkiksi liukoista saostettavaa kantajaa hyödyntäen. Kyseiset menetelmät pyrkivät vihreämpään kemiaan, kustannustehokkuuteen ja sopivat paremmin prosessiskaalaukseen.

Projektissa syntetisoitiin fosforotioaatteja stereokontrolloidusti P(V)-oksatiafosfolaanisulfidirakenteeseen perustuvalla menetelmällä liukoisella saostettavalla nelihääräisellä kantajalla. 5'-Hydroksyyli-ryhmän suojana käytettiin atsidopohjaista 2-(atsidometyyli)bentsoyyli-ryhmää. Tämän lisäksi tutkittiin 2-(atsidometyyli)bentsoyyli-suojaryhmän irtoamista tymidiinin 5'-OH-ryhmästä.

**Avainsanat:** Oligonukleotidisynteesi, suojaryhmästrategia, AZMB, AZM, oligonukleotidifosforotioaatit

# Sisällysluettelo

<b>1. JOHDANTO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Suojaryhmästrategiat oligonukleotidien synteeseissä</b>	<b>2</b>
<b>1.2. 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-, atsidometyyli- ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyylioksi]-bentsyyli-suojatut nukleosidit</b>	<b>4</b>
<b>1.3. 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-, atsidometyyli- ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyylioksi]-bentsyyli-suojaryhmät oligonukleotidien syntetiikassa</b>	<b>7</b>
1.3.1. 2'-Hydroksyyli­ryhmän suojaaminen	7
1.3.2. 3'-Hydroksyyli­ryhmän suojaaminen	9
1.3.3. Nukleosidien emäsosien suojaaminen	11
1.3.4. Boranofosfotriesterimenetelmä	12
<b>1.4. Fosforotioaattioligonukleotidien synteetit</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Yhteenveto</b>	<b>15</b>
<b>2. Tulokset ja tulosten tarkastelu</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Synteetit</b>	<b>16</b>
2.1.1. 5'-O-2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiinin valmistaminen	16
2.1.2. 5'-O-Atsidometyyli-tymidiinin valmistaminen	17
2.1.3. Ψ -Aktivoitujen 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiinien valmistaminen	20
2.1.4. Oligonukleotidifosforotioaattidimeerin, -trimeerin ja -tetrameerin valmistaminen	21
<b>2.2. Kinetiikkatutkimukset</b>	<b>25</b>
2.2.1. 2-(Asidometyyli)bentsoyyli-suojaryhmän irtoamisen kinetiikka	25
2.2.2. Fosforotioaattien stereokemia	29
<b>2.3. Johtopäätökset</b>	<b>30</b>
<b>3. Kokeelliset menetelmät</b>	<b>31</b>

<b>3.1. Yleiset menetelmät</b>	<b>31</b>
<b>3.2. Synteetit</b>	<b>32</b>
3.2.1. Metyyli-2-bromimetyyllibentsoaatti	32
3.2.2. Metyyli-2-metyyliatsidobentsoaatti	32
3.2.3. 2-Atsidometyyllibentsoehappo	33
3.2.4. 5'-O-2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini	33
3.2.5. 3',5'-Bis-O-tert-butyylidimetyyllisilyyli-tymidiini	34
3.2.6. 3'-O-tert-butyylidimetyyllisilyyli-tymidiini	35
3.2.7. 5'-O-Metyylitiometyyli-3'-O-tert-butyylidimetyyllisilyyli-tymidiini	35
3.2.8. 5'-O-Metyylitiometyyli-tymidiini	36
3.2.9. 5'-O-Metyyliatsidotymidiini	36
3.2.10. (+)-Ψ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini	37
3.2.11. (-)-Ψ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini	38
3.2.12. 5'-T(R <sub>P</sub> )T-3'	38
3.2.13. 5'-T(S <sub>P</sub> )T(R <sub>P</sub> )T-3'	39
3.2.14. 5'-T(S <sub>P</sub> )T(S <sub>P</sub> )T(R <sub>P</sub> )T-3'	39
<b>3.3. Kineettiset menetelmät</b>	<b>40</b>
3.3.1. 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-suojaryhmän irtoamisen kinetiikkatutkimukset	40
3.3.2. Entsyymihydrolyysi	41
<b>4. Viitteet</b>	<b>42</b>
<b>5. Liitteet</b>	<b>49</b>

## Lyhenteet

ABn	4-atsidobentsyyli
AZM	atsidometyyli
AZMB	2-(atsidometyyli)bentsoyyli
AZBn	4-[(atsidometyyli)bentsoyylioksi)bentsyyli
DBU	1,8-diatsabisykloundek-7-eeni
DCA	dikloorietikkahappo
DCM	dikloorimetaani
DIPEA	<i>N,N</i> -di-isopropylietyyliamiini
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DMTr	4,4-dimetoksitriityli
DTT	ditiotreitoli
Et <sub>2</sub> O	dietyylieetteri
<i>i</i> PrOH	isopropanoli
MeCN	asetonitriili
MeOH	metanoli
MePPh <sub>2</sub>	metyylidifenyylifosfiini
MSNT	1-(2-mesityleenisulfonyyli)-3-nitro-1H-1,2,4-triatsoli
NaN <sub>3</sub>	natriumatsidi
NBS	<i>N</i> -bromibutaani-imidi
PE-T	pentaerytritoli-tymidiini
PPh <sub>3</sub>	trifenyylifosfiini
SOCl <sub>2</sub>	tionyylikloridi
svPDE	snake venom fosfodiesteraasi
TBAF	tetrabutyyliammoniumfluoridi

TBDMS	<i>tert</i> -butyylidimetyylisilylieetteri
TBSCl	2,4,6-tri-isopropyylibentseenisulfonylikloridi
TCA	trikloorietikkahappo
TCEP	tris(2-karboksietyyli)fosfiini
TEA	trietyyliamiini
TES	trietyylisilaani
TFA	trifluoroetikkahappo
THF	tetrahydrofuraani
TMGN <sub>3</sub>	tetrametyyliguanidiumatsidi
TMS	trimetyylisilyyli

## 1. JOHDANTO

Terapeuttisten oligonukleotidien käyttö lääkeaineina sekä työkaluina geenien toiminnan tutkimuksissa on viime vuosina yleistynyt.<sup>1,2,3</sup> Kiinnostuksen sekä käytön yleistyminen on kasvattanut kysyntää yhä tehokkaammille sekä vihreämmille oligonukleotidien ja modifioitujen oligonukleotidianalogien synteesimenetelmille. Perinteisesti oligonukleotideja syntetisoidaan automatisoidusti kiinteällä kantajalla fosforamidiittikemiaa hyödyntäen. Synteesisykli koostuu suojaryhmän irrotuksesta, kytkentäreaktiosta, 5'-OH-ryhmän asetyloinnista sekä hapetuksesta.<sup>4</sup> Syklejä toistetaan, kunnes halutun pituinen oligonukleotidiketju on valmis, minkä jälkeen oligonukleotidi irrotetaan kantajasta ammonolyysillä. Samalla myös emäs- sekä fosfaattiosan suojaryhmät irtoavat. Kyseinen menetelmä ei kuitenkaan ole kustannustehokas, eikä se kunnioita vihreän kemian periaatteita. Kyseinen menetelmä ei myöskään sovellu hyvin isomman mittakaavan synteeseihin.<sup>1,5</sup>

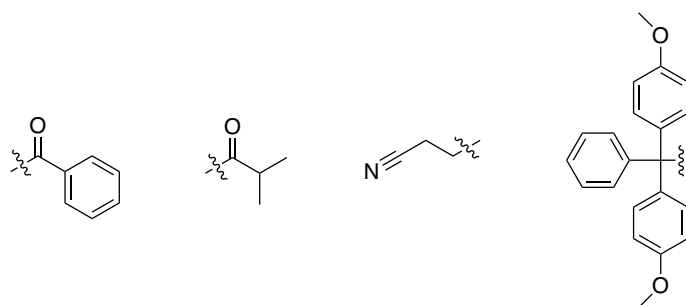
Oligonukleotideja voidaan valmistaa myös liukoisella kantajalla noudattaen vihreän kemian periaatteita, kustannustehokkaammin ja suuremmalla mittakaavalla verrattuna kiinteällä kantajalla suoritettavaan synteesiin. Liukoisen kantajan menetelmät ovat vasta kehitysvaiheessa. Niiden pyrkimyksenä on yhdistää hyödyllisiä ominaisuuksia niin liuos- kuin kiinteäfaasisyntetiikasta.<sup>1</sup> Kyseisessä menetelmässä kaikki synteesisyklin reaktiot toteutetaan homogeenisessä liuoksessa. Tuote voidaan eristää joko saostamalla, uuttamalla tai nanofilterin läpi kalvosuodattamalla. Prosessi ei kuluta yhtä paljon öljypohjaisia pesuliuottimia, eikä se vaadi yhtä paljon kalliita reagensseja tai lähtöaineita kuin synteesi kiinteällä kantajalla. Synteesi onnistuu ilman syntetisaattoria ja mahdollistaa suuremman mittakaavan oligonukleotidivalmistuksen. Menetelmää kehitettäessä tarvitaan uusia käyttökelpoisia suojaryhmästrategioita, koska perinteisesti käytettyä dimetoksitriityyliä irrotettaessa haasteena on sivureaktion tapahtuva depurinaatio sekä triitylikationin irtoamisen reversiibeli luonne.<sup>1,6</sup>

Tutkielman kirjallisuusosassa perehdytään oligonukleotidisynteesien suojaryhmästrategioihin, ja esitellään suojaryhmiä, joiden irrottaminen perustuu pelkistykseen, keskittyen 2-(atsidometyyli)bentsoyyli- (AZMB) sekä atsidometyylisuojaryhmien (AZM) käyttöön synteesissä. Johdannossa esitetään myös lyhyesti oligonukleotidifosforotioaattien stereokontroloituja synteesimenetelmiä. Tutkielman kokeellisessa osassa esitetään enantiopuhtaiden fosforotioaattien synteesimenetelmä, joka perustuu limoneenin P(V)-oksatiafosfolaanisulfidi-rakenteeseen ja atsidometyylibentsoyyli-suojaryhmän käyttöön 5'-hydroksyyli-ryhmässä.

## 1.1. Suojaryhmästrategiat oligonukleotidien synteeseissä

Oligonukleotideja syntetisoidaan fosforamidiitti-, *H*-fosfonaatti-, fosfotriesteri- ja fosfiittitriesterimenetelmillä. Synteeseissä kytkentäreaktio tapahtuu joko P(III)- tai P(V)-kemiaa hyödyntäen. Yleisimmin rakennusyksikköinä käytetään nukleosidi-3'-*O*-(2-syanoetyyli-*N,N*-di-isopropyyli fosforamidiitteja tai 3'-(*H*-fosfonaatteja).<sup>7</sup> Hyökkäävää 5'-hydroksyyliiryhmää lukuunottamatta, muut nukleofiiliset funktionaaliset ryhmät on suojattava. Monomeeristen rakennusyksiköiden 5'-hydroksyyliiryhmä suojataan perinteisesti 4,4'-dimetoksitriitylillä (DMTr). Sytidiinin sekä adeniinin nukleoemäksen aminoryhmät suojataan yleensä bentsoyylillä (Bz), guanosiinin isobutyryyllillä (*i*Bu), ja fosfaatin suojana käytetään syanoetyyliä (CE).<sup>8</sup> Esimerkkinä tehokkaasta P(V)kemiasta, 3'-*O*-aryylifosfodiesterirakennusyksiköiden kytkentään on käytetty aryylisulfonyylikloridia aktivaattorina katalyyttisesti aktiivisen fosfaattisuojaryhmän 4-metoksi-1-oksid-2-pikolyyli-ryhmän läsnä ollessa.<sup>9</sup>

Dimetoksitriityli on happolabiili suojaryhmä, joka irrotetaan esimerkiksi di- ja trikloorietikkahapon (DCA ja TCA) liuoksilla. Syntetisoitaessa oligonukleotideja kiinteällä kantajalla, detrityloinnissa irronnut DMTr-kationi ei yleensä aiheuta ongelmia, sillä se huuhdellaan reaktion aikana pois.<sup>10</sup> Liuosfaasissa suoritettavissa synteeseissä sitä vastoin DMTr:n irtoamisen reversiibeliys tekee reaktiosta huomattavan vaikean. Tämän takia kilpailevana reaktiona tapahtuva depurinaatio muodostuu ongelmaksi. Nukleoemäsosien bentsoyyli- ja isobutyryyli-ryhmät sekä fosfaatin syanoetyyli-ryhmä irtoavat oligonukleotidiketjun ammonolyysissä. Suojaryhmien rakenteet on esitetty kuvassa 1.<sup>8</sup>



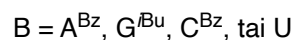
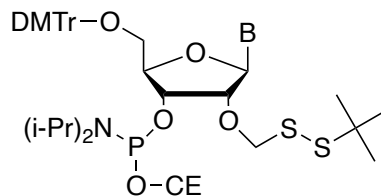
**Kuva 1.** Bentsoyyli-, isobutyryyli-, syanoetyyli- ja DMTr-suojaryhmät.

Ortogonaaliset suojaryhmät on mahdollista irrottaa selektiivisesti sellaisessa olosuhteessa, jossa muut suojaryhmät eivät irtoa,<sup>11</sup> tai joka ei vaikuta oligonukleotidiketjun rakenteeseen<sup>6</sup> tai sen modifioimisen.<sup>12</sup> Kuten 5'-OH suojauksessa yleisimmin käytetty happolabiili 4'4'-



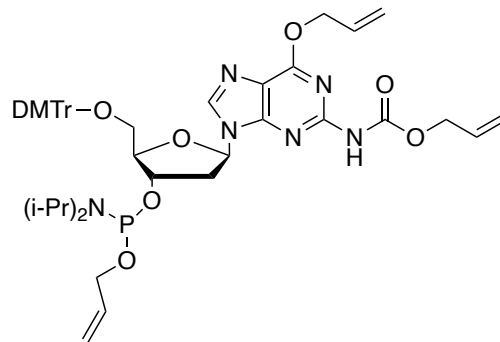
dimetoksitriityli, myös oligoribonukleotidin 2'-OH:n suojaryhmänä tavallisimmin käytetty *tert*-butyylidimetyylisilyyli (TBMS) voidaan irrottaa selektiivisesti, niin että asyyli-ryhmät eivät irtoa. Silyylin poistossa käytetään fluoridi-onia. Suurikokoinen 2'-O-TBDMS-suojaryhmä aiheuttaa steeristä estettä nukleosidirakenteen kytkennälle.<sup>13</sup>

Seuraavaksi tarkastellaan suojaryhmiä, joiden irrotus perustuu pelkistykseen. Vaihtoehtona *tert*-butyylidimetyylisilyyliryhmälle on 2'-OH:n suojauksessa käytetty *tert*-butyyliditiometyyliä (DTM). DTM on mahdollista poistaa olosuhteissa, joissa 5'-OH:ssa, fosfaatissa ja nukleoemästen aminoryhmissä käytettävät standardisuojaoryhmät (DMTr, CE, Bz ja *i*Bu) eivät irtoa. Kuvassa 2 on esitetty 2'-O-DTM-suojattu nukleosidifosforamidiitti. DTM-suojaryhmä voidaan irrottaa homogeenisessa liuoksessa lähes neutraaleissa olosuhteissa käyttämällä 1,4-ditiotreitolia (DTT) tai tris(2-karboksietyyli)fosfiinia (TCEP).<sup>14</sup>



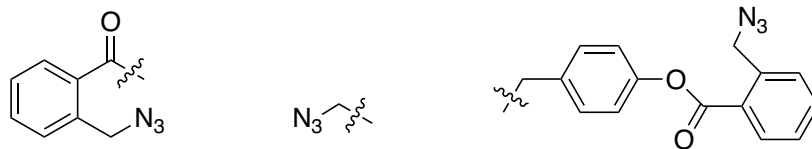
**Kuva 2.** 2'-O-DTM-suojattu fosforamidiittinukleosidi, jonka 5'-OH on suojattu DMTr-suojaryhmällä ja fosfaatti syanoetyylisuojaoryhmällä.<sup>14</sup>

Tavallisimmat nukleoemästen suojaryhmät kuten bentsoyyli, isobutyryyli ja syanoetyyli vaativat voimakkaan emäksiset irrotusolosuhteet. Syntetisoitaessa emäsherkkiä oligonukleotideja, nämä perinteiset suojaryhmät korvataan usein allyyli- (All) ja allyylioksidikarbonyyli (Alloc)-ryhmillä. Kuvassa 3 on esitetty kokonaan suojattu nukleosidifosforamidiitti, jota Hayakawa ja hänen tutkimusryhmänsä käyttivät syntetisoidessaan dimeerisiä fosfodiesteriä kiinteällä kantajalla fosforamidiittikemiaa käyttäen.<sup>15</sup> Allyyli- ja allyylioksidikarbonyyli-suojaryhmät irrotetaan miedoissa olosuhteissa pelkistykseen perustuvalla palladium katalyyttisellä hydrogenolyysillä. Katalyyttinä voidaan käyttää esimerkiksi tris(dibentsylideeniasetoni-dipalladium(0)-kloroformikompleksia [Pd(dpa)<sub>3</sub>-CHCl<sub>3</sub>] trifenyylifosfiinin, muurahaihapon ja butyyliamiinin seoksessa.<sup>15,16</sup> Allyylisuojaoryhmää ja fotolabiilia *o*-nirobentsyylikantajaa on käytetty muun muassa (5*R*)-5,6-dihydro-5-hydroksitymiinin sisältävän emäsherkän oligonukleotidin synteesissä.<sup>17,18</sup>



**Kuva 3.** Kokonaan suojattu nukleosidifosforamidiitti. Guaniiniemäs on suojattu  $O^6$ -asemastaan allyylillä ja  $N^2$ -asemastaan allyylioksidikarbonyyli. Myös fosfaattiosa on suojattu allyylillä.<sup>15</sup>

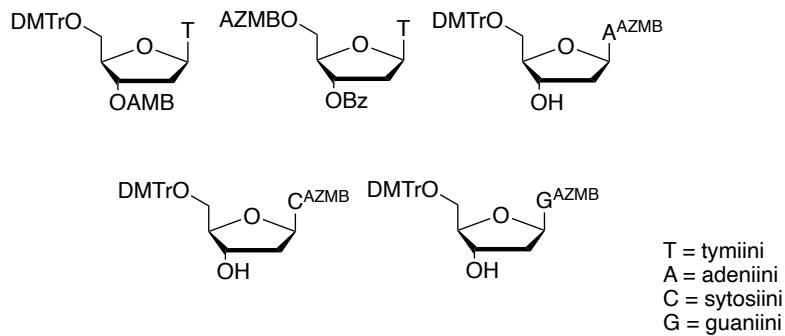
2-(Atsidometyyli)bentsoyyli (AZMB), atsidometyyli (AZM) ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyylioksi]bentsoyyli (AZBn) (Kuva 4) voidaan irrottaa Staudingerin pelkistysreaktiolla neutraaleissa olosuhteissa trialkyyli- tai triaryylifosfiinien läsnäollessa. Atsidometyylibentsoyyliä sekä atsidometyyliä on käytetty 2'-, 3'- ja 5'-hydroksyyliyhmiin sekä nukleoemästen suojaryhminä oligonukleotideja syntetisoitaessa. Tässä projektissa AZMB-suojaryhmää hyödynnettiin 5'-hydroksyyliyhmiin suojauksessa syntetisoitaessa oligonukleotidifosforotioaatteja liukoisella saostettavalla kantajalla.



**Kuva 4.** AZMB-, AZM- ja AZBn-suojaryhmät.

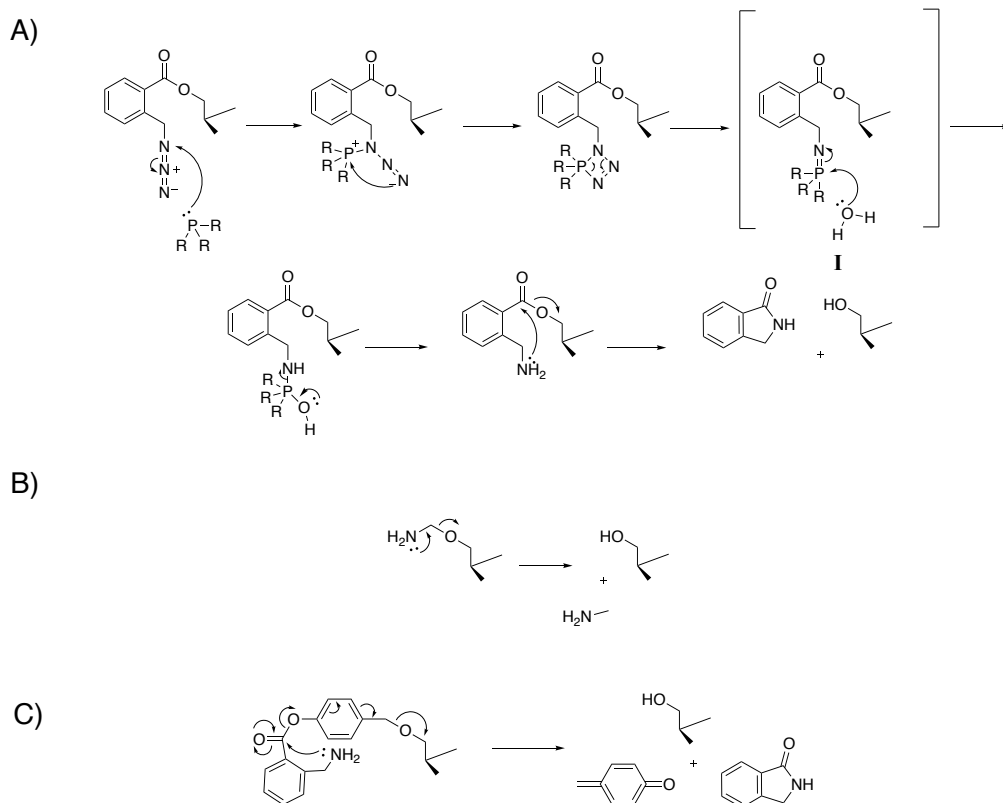
## 1.2. 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-, atsidometyyli- ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyylioksi]-bentsoyyli-suojatut nukleosidit

Sekine on työryhmineen syntetisoinut AZMB-suojattuja nukleosideja kolmivaiheisella synteesillä metyyli-2-metyylibentsoaatista. Metyyliryhmä brominoidaan, minkä jälkeen bromi atsidoidaan tetrametyyliguanidiumiatsidilla (TMGN<sub>3</sub>) hiilitetrakloridin sekä metanolin seoksessa.<sup>19</sup> Atsidointi voidaan suorittaa myös natriumatsidilla<sup>20</sup> tai litiumatsidilla<sup>21</sup> dimetyyliforamidissa. Atsidoinnin jälkeen muodostuneesta atsidometyylibentsoehaposta syntetisoidaan happohalidi tionyylikloridia käyttäen, minkä jälkeen suojaryhmä voidaan liittää nukleosidin emäsosan, 2'-, 3'- tai 5'-OH:n suojaksi (Kuva 5).<sup>19</sup>



**Kuva 5.** AZMB-ryhmällä suojatut nukleosidit. Emäsosista suojattiin eksosykliset aminoryhmät.<sup>19</sup>

2-(Atsidometyyli)bentsosyyli- kuten myös 2-atsidometyyli- ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsosyylioksi]-bentsosyyli voidaan pelkistää vastaaviksi aminojohdoksiksi Staudingerin pelkistysreaktiolla. Mekanistisesti trialkyyli- tai triaryylifosfiini hyökkää nukleofiilinä atsidin typpiin. Syklisaatiossa typpiin hyökätessä intramolekulaarisesti fosforiin muodostuu nelirenkainen fosfatsiini-intermediaatti/transiotioli. Renkaan avautuessa ja molekulaarisen tyypin vapautuessa muodostuu iminofosforaani (**I**, Kaavio 1A), joka hydrolysoituu amiiniksi ja fosfiinioksidiksi.<sup>22</sup> Pelkistyksen jälkeen aminoryhmä hyökkää molekyyllinsisäisesti esterirakenteen karbonyylihiileen, jolloin nukleosidin vapautuessa muodostuu sivutuotteena isoindolinoni (Kaavio 1A). Rengasrakenne muodostuu nopeasti, sillä molekyyllinsisäisen aminoryhmän molekyyllinsisäisen nukleofiilisen hyökkäyksen kautta.<sup>19</sup> 2-Atsidometyyli- ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsosyylioksi]-bentsosyyli-ryhmän  $N_3$  pelkistyy vastaavalla tavalla  $NH_2$ -ryhmäksi, jonka jälkeen suojaryhmä irtoaa Kaaviossa 1B ja 1C esitetyllä tavalla.



**Kaavio 1.** 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-, Atsidometyyli- ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyylioksi]bentsyyli suojarahmän irtoamisen mekanismi.

Sekine työryhmineen on tutkinut AZMB-suojaryhmän irtoamista nukleosidin emäsosasta sekä 3'- ja 5'-hydroksyyliiryhmistä. Käytätäessä trifenyylifosfiinia (PPh<sub>3</sub>) dioksaanin ja veden seoksessa, AZMB-suojaryhmä irtoaa 30 minuutissa. Reaktiossa ei havaittu muodostuvan intermediaatteja. Suojaryhmän irtoamista ei havaita vedetöntä dioksaania käytätäessä,<sup>19</sup> koska iminofosforaani-intermediaatti ei hydrolysoitu vedetömissä olosuhteissa.<sup>22</sup> Neljällä ekvivalentilla metyylidifenyylifosfiinia (MePPh<sub>2</sub>) suojarahmä irtoaa 3'-hydroksyyliiryhmistä 15 minuutissa, 5'-hydroksyyliiryhmistä kahdeksassa minuutissa ja emäsosien eksosyklisistä aminoryhmistä 20 minuutissa. Metyylidifenyylifosfinia käytätäessä havaitaan muodostuvan iminofosforaanivälituote. Käyttämällä neljä ekvivalenttia ammoniumformiaattia Pd/C-katalyytin läsänä ollessa AZMB-suojaryhmä irtoaa 3'-hydroksyyliiryhmistä neljäsä tunnissa ja 5'-hydroksyyliiryhmistä kahdessa tunnissa. Kolmella ekvivalentilla natriumboorihydridiä etanolin ja tetrahydrofuraanin seoksessa suojarahmä irtoaa 5'-hydroksyyliiryhmistä tunnissa 86 % saannolla. AZMB-suojaryhmän irrottamiseen käytätettiin myös tributyylifosfiinia (PBu<sub>3</sub>), mutta metyylidifenyyl- ja trifenyylifosfiini todettiin tehokkaimmiksi reagensseiksi suojarahmän irrottamiseksi.<sup>19</sup>

Oligonukleotidien synteesien lisäksi atsidometyylisubstituoituja nukleosideja käytetään biokemiallisten prosessien ja näiden sovellusten tutkimuksissa. Esimerkiksi DNA:n- ja XNA:n entsyymikatalyyttistä synteesiä on tutkittu polymeeraasien läsnä ollessa esteraasi- ja fosfataasiresistenttiä 3'-*O*-atsidometyyli-suojattua LNA-tymidiinitrifosfaattia käyttäen.<sup>23</sup> 6-Atsidometyyli-suojatusta uridiinista on valmistettu syklopropyyli- ja syklo-oktyynin kanssa napsautus-(klik)-reaktiolla fluoresoivia triatsoleja, jotka on liitetty sellulaariseen DNA:han tai RNA:han antiviraalisuuden tutkimiseksi.<sup>24,25</sup> Myös 3'-*O*-(2-atsidometyyli)suojatusta tymidiinistä on syntetisoitu napsautusreaktiota hyväksikäyttäen triatsoli-linkitettyjä dinukleosidifosforamidiittirakennusyksiköitä, joita on käytetty edelleen oligonukleotidien synteesissä kiinteällä kantajalla.<sup>26</sup>

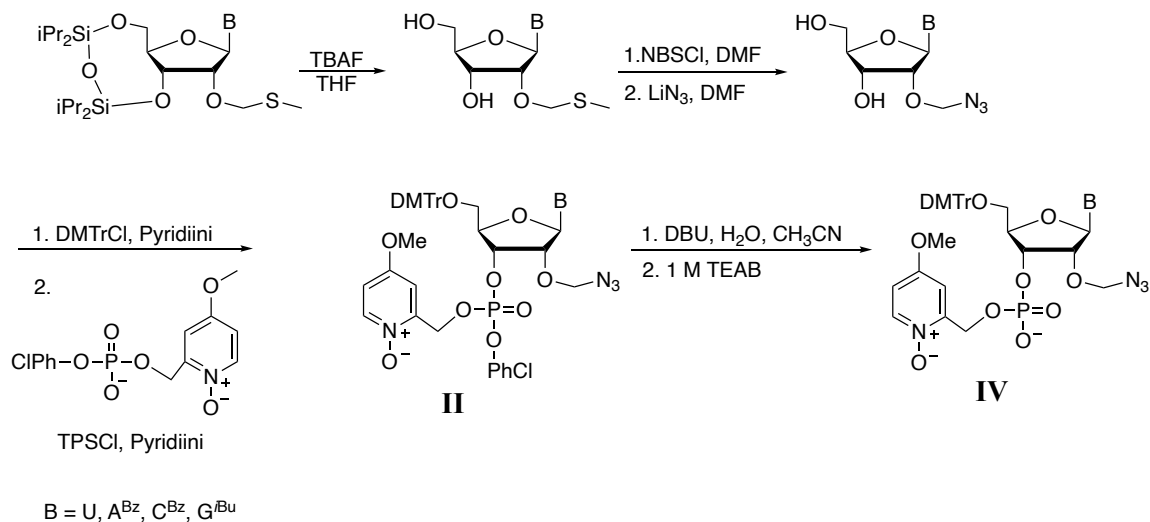
### **1.3. 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-, atsidometyyli- ja 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyylioksi]-bentsyyli-suojaryhmät oligonukleotidien syntetiikassa**

Atsidometyylibentsoyyli- tai atsidometyylisuojaryhmiä sisältäviä oligonukleotideja sekä niiden modifioituja analogeja on syntetisoitu fosfotriesteri- tai boranofosfotriesterimenetelmällä. Fosforamidiittikemian hyödyntäminen ei sovellu käytettäväksi atsidopohjaisten suojaryhmien kanssa, johtuen mahdollisesta Staudingerin reaktiosta.

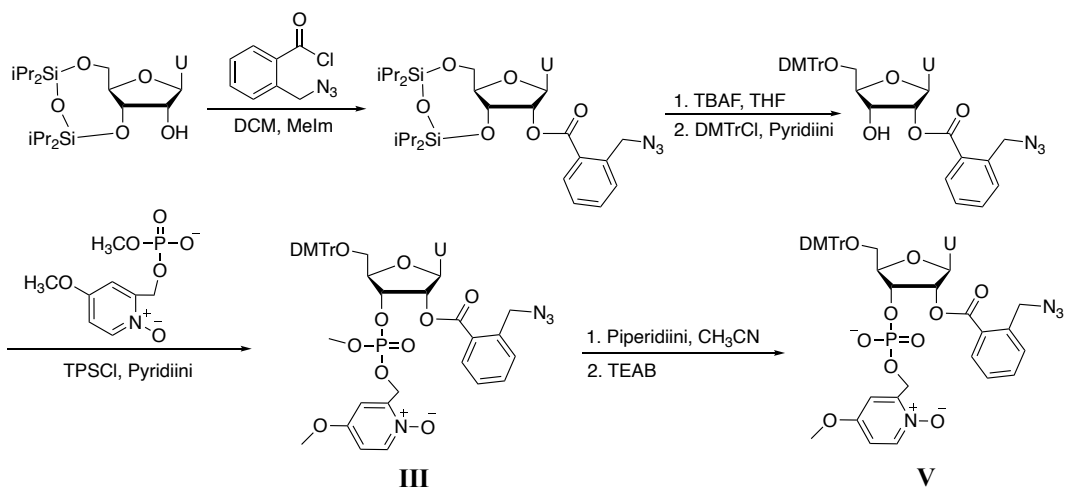
#### **1.3.1. 2'-Hydroksyyli-ryhmän suojaaminen**

Efimov tutkimusryhmineen ovat syntetisoineet oligoribonukleotideja kiinteällä kantajalla käyttäen monomeerisissä rakennusyksiköissä molekyyliinsisäistä katalyyttiä, 4-metoksi-1-oksido-2-pikolyyliä. Fosfotriesterimenetelmässä 2'-hydroksyyli-ryhmä suojattiin joko AZMB- tai AZM-ryhmällä (Kts myös kappale 1.3.3.).<sup>21,27,28</sup> Kaaviossa 2 kuvataan 2'-*O*-AZM-suojatun nukleosidin synteesi. Nukleosidin 2'-metyylitiometyyli-ryhmä muunnetaan atsidometyyli-ryhmäksi sulfuryylikloridilla (tai bromilla) ja sen jälkeisellä litiumatsidikäsittelyllä dimetyyli-formamidissa. Sivureaktiona havaittiin urasiili- sekä sytosiiniemästen C5-hiilen halogenaatio. Käyttämällä 2-nitrobentseenisulfenyylidikloridia (NBS-Cl) kyseistä sivureaktiota ei tapahdu. AZMB-ryhmä liitettiin uridiinin 2'-hydroksyyli-ryhmään 2-(atsidometyyli)bentsoyylikloridilla dikloorimetaanissa 1-metyyliimidatsolin (MeIm) läsnä ollessa (Kaavio 3). 5'-Hydroksyyli-ryhmä trityloidaan, minkä jälkeen 3'-OH fosforyloidaan, kondensointireagenssin (TPS-Cl) läsnä ollessa pyridiinissä (Kaavio 2 ja

3). Muodostuneesta nukleosidifosfotriesteristä **II** irrotetaan 2-kloorifenyylillä DBU:lla ja nukleosidifosfotriesteristä **III** metyyli piperidiinillä, jolloin tuotteina saadaan **IV** ja **V**.<sup>21</sup>



**Kaavio 2.** AZM-suojattujen nukleosidifosfotriestereiden synteesi.<sup>21</sup>



**Kaavio 3.** AZMB-suojattujen uridiinifosfotriestereiden synteesi.<sup>21</sup>

Oligonukleotidit syntetisoitiin kiinteällä kantajalla, johon sidottiin joko 2'-*O*-AZMB- tai 2'-*O*-AZM-nukleosidiyksikkö. Kytkenät suoritettiin asetonitrilin ja pyridiinin (3:1) seoksessa 3'-*O*-4-metoksi-1-oksido-2-pikolyylifosfodiesterirakennusyksiköitä käyttäen kondensaatioreagenssin, 2,4,6-triisopropyylibentseenisulfonyylikloridin (TPS-Cl), läsnä ollessa. AZM-suojattuja rakennusyksiköitä käytettäessä kytkentäajat olivat kaksi minuuttia. 2'-*O*-AZMB-suojaryhmää käytettäessä kytkentäajat olivat viisi minuuttia. Kytkentäreaktioiden jälkeen fosfaateista irrotettiin 4-metoksi-1-oksido-2-pikolyyliryhmät litiumjodidilla

asetonitriililiuoksessa. Myös piperidiiniä ja tiofenolia dioksaanin ja trietyyliamiinin seoksessa on käytetty. Nukleoemästen asyyliuojaryhmät poistettiin ja oligonukleotidi irrotettiin kantajasta ammonolyysillä. AZMB-suojaryhmän todettiin kestävän ammonolyysiolosuhteet viiden tunnin ajan. Ammonolyysin jälkeen 2'-asemastaan yhä suojattu oligonukleotidiketju eristettiin geelifiltterin läpi, minkä jälkeen AZM- ja AZMB-suojaryhmät irrotettiin 0,1 M trifenyylifosfiinilla asetonitriilin ja veden seoksessa (9:1) tai metyyliidifenyylifosfiinilla dioksaanin ja veden seoksessa (4:1). 15-meerisestä uridiinioligomeeristä AZM-suojaryhmän irtoaminen kestää 2h 30 min. AZMB-suojaryhmä irtoaa 3,5 h:ssa etyyliidifenyylifosfiinilla ja 4h:ssa trifenyylifosfiinilla.<sup>21</sup>

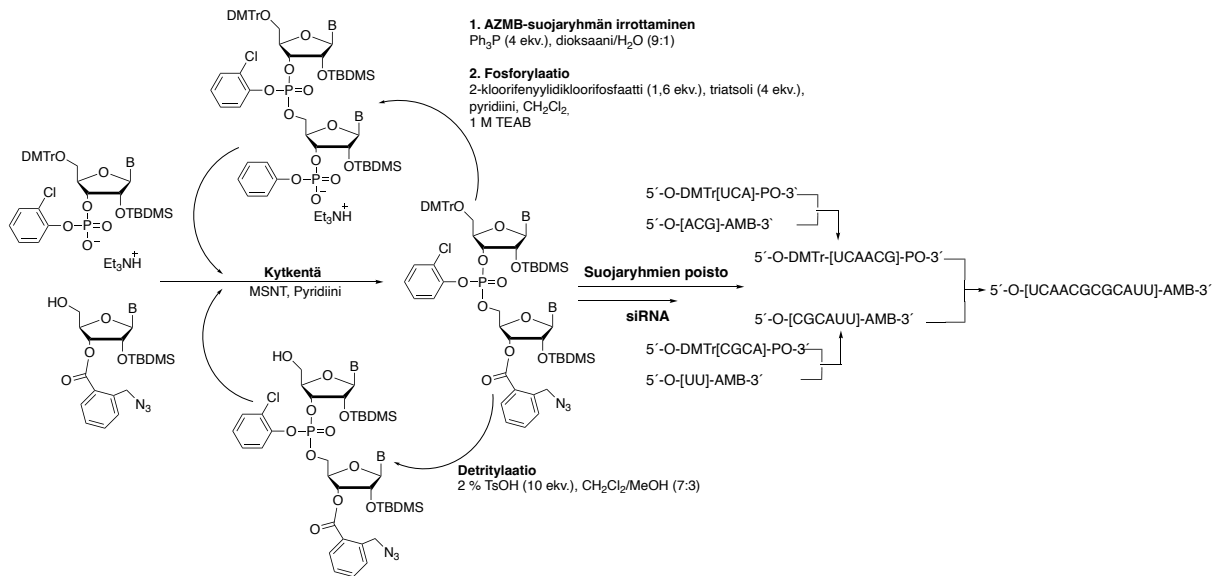
AZM-ryhmä on stabiili ammoniakikäsittelyssä, joka mahdollistaa myös perinteisten asyyliuojaryhmien käytön AZM-suojaryhmän rinnalla. AZMB-suojaryhmä ei kestä ammonolyysikäsitelyä esteriryhmänsä vuoksi, ja näin ollen AZM-suojaryhmän todettiin olevan AZMB-suojaryhmää suositeltavampi vaihtoehto oligonukleotidien valmistuksessa. AZM-suojasta käyttämällä syntetisoitiin 15–22 pitkiä oligonukleotidisekvenssejä sisältäviä RNA-fragmentteja.<sup>21</sup>

2'-O-AZM-suojatuilla RNA-fragmenteilla todettiin olevan parempi nukleasiresistenssi kuin suojaamattomilla oligomeereillä. Entsyymikokeissa käytetyt 2'-O-AZM-suojatut RNA-fragmentit olivat täysin stabiileja olosuhteissa, joissa vastaavat luonnolliset RNA-fragmentit hajoavat RNase- ja RNase T1 –entsyymien läsnä ollessa. Snake venom fosfodiesterasilla AZM-suojatut RNA-fragmentit katkeavat, mutta olivat silti luonnollisia analogejaan stabiilimpia. Stabiiliuden lisäksi yksittäiset AZM-ryhmät RNA-fragmenteissa voisivat toimia prekursorina postsynteettisiä modifikaatioita varten.<sup>21</sup>

### 1.3.2. 3'-Hydroksyyliiryhmän suojaaminen

AZMB-suojaryhmää on käytetty myös 3'-hydroksyyliiryhmän suojauksessa syntetisoitaessa liuoksessa fosfotriesterimenetelmällä siRNA-fragmentteja<sup>29</sup> sekä trinukleotideja.<sup>30,31</sup> Synteesissä käytettävä atsidometyylibentsoylikloridi valmistetaan metyyli-2-metyylibentsoaatista (kts. Kappale 2.1.) ja liitetään 5'-O-DMTr-2'-O-TBDMS-suojatun nukleosidin 3'-hydroksyyliiryhmään metyyliimidatsolin läsnä ollessa dikloorimetaanissa. 3'-O-AZMB-2'-O-TBDMS-suojattu nukleosidi ja 5'-dimetoksitrietyloitu nukleosidi-3'-O-aryylifosfodiesteri kytketään dimeeriksi pyridiinissä käyttäen kondensointireagenssina 1-(2-mesityleenisulfonyyli)-3-nitro-1-*H*-1,2,4-triatsolia (MSNT) (Kaavio 4). AZMB-suojaryhmä

irrotetaan 1,4-dioksaanin ja veden seoksessa (9:1) trifenyylifosfiinilla. Suojan poiston jälkeen 3'-OH fosforyloitiin ja synteesisykliä toistettiin. Di- tri- ja tetrameerisiä nukleotidifosfotriestereitä käytettiin 23-meerisen oligoribonukleotidin syntetisoimisessa (Kaavio 4).<sup>29</sup> DMTr-suojaryhmät poistettiin 5'-asemasta happokäsittelyllä.<sup>29</sup>

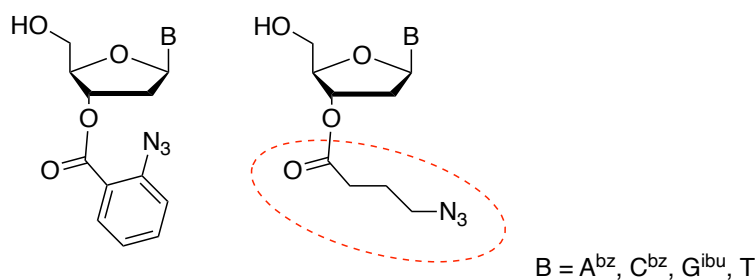


**Kaavio 4.** Oligoribonukleotidien synteesi.<sup>29</sup>

Myös Yagodkin työryhmineen on syntetisoinut vastaavalla menetelmällä trinukleotideja käyttäen 3'-asemassa 2-(atsidometyyli)bentsoyylin lisäksi 4-atsidobutyryyliä. Syntetisoidut trinukleosidifosfaatit fosfityloitiin forforamidiitiksi, ja niitä käytettiin edelleen oligonukleotidien synteesissä ja proteiinimutageneesissä.<sup>30</sup>

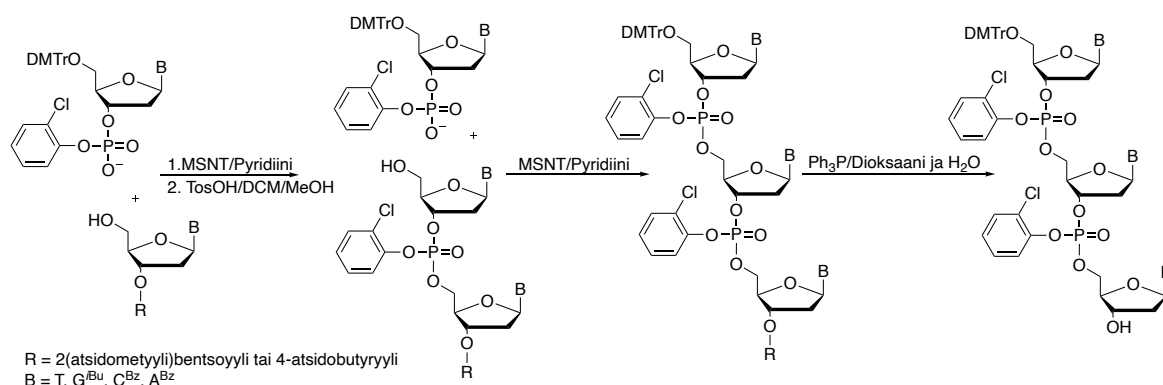
Kuvassa 6 on esitetty Yagodkin ja hänen tutkimusryhmänsä syntetisoimat AZMB- sekä 4-atsidobutyryylisuojarahmällä suojatut nukleosidit.<sup>30</sup> 3'-O-4-atsidobutyryylisuojuattu 5'-O-DMTr-N-asyyli-nukleosidi syntetisoidaan käsittelemällä nukleosidi ensin 4-klooributyryylikloridilla, minkä jälkeen atsidointi tehdään natriumatsidilla. 3'-aseman suojaaminen AZMB-suojaryhmällä tehdään 2-atsidometyylibentsoyylikloridilla.





**Kuva 6.** AZMB- ja atsidobutyryyliryhmällä suojatut nukleosidit. 4-Atsidobutyryylisuojarahmian rakenne on ympäröity kuvassa.<sup>30</sup>

Trinukleosidifosfaatit syntetisoitiin kaaviossa 5 esitetyllä tavalla. Nukleosidifosfodiesterirakennusyksikkö kytetään 3'-suojatun nukleosidin kanssa 1-(2-mesityleenisulfonyyli)-3-nitro-1H-1,2,4-triatsolin (MSNT) läsnä ollessa pyridiinissä. Detritylaation jälkeen kytkentä toistetaan. Atsidobutyryyli irtoaa 7 h:ssa 50–55 °C:ssa trifenyylifosfiinin dioksaanin ja veden seoksessa. Trimeerien saannot olivat atsidobutyryylisuojarahmää käytettäessä 70–80 % ja AZMB-suojarahmää käytettäessä 85–90 %. 3'-Suojarahmien irrottamisen jälkeen trinukleotideista syntetisoitiin 2-syanoetyyli-*N,N,N',N'*-tetraisopropyyli-fosfodiamidiitit käyttäen 5-etyylitio-1*H*-tetratsolin aktivaattorina.<sup>30</sup>



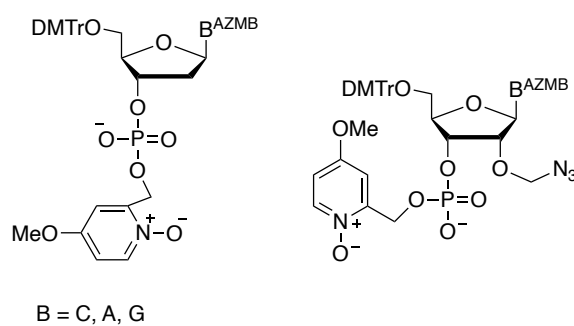
**Kaavio 5.** Fosfotriesteritrimeerien synteisi.<sup>30</sup>

### 1.3.3. Nukleosidien emäsosien suojaaminen

Neutraaleissa olosuhteissa pelkistyksellä poistettava 2-(atsidometyyli)bentsoyyli on vaihtoehto asyylyryhmille nukleoemästen eksosyklisen aminoryhmien suojaamiseen syntetisoitaessa emäsherkkiä oligonukleotideja fosfotriesterimenetelmällä. 2-(atsidometyyli)bentsoyyliä on käytetty niin ribo- kuin deoksiribo-oligonukleotidien valmistuksessa kiinteällä kantajalla.<sup>27</sup> Atsidometyylibentsoylointi tehtiin 2-(atsidometyyli)bentsoyylikloridilla pyridiinissä. Sopivasti suojatun deoksiribonukleosidin ja ribonukleosidin 3'-OH fosforyloitiin 4-metoksi-1-oksido-2-

pikolyylifosfaatilla kondensointireagenssin (TPS-Cl) läsnä ollessa. Kloorifenyyli-ryhmä poistetaan fosfotriesteristä 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-eenillä (DBU) asetonitriilissä, jolloin saadaan kytkennöissä käytettävät nukleosidi-3'-*O*-(4-metoksi-1-oksido-2-pikolyyli)fosfodiesterit (Kuva 7). Oligoribonukleotidin tapauksessa 2'-hydroksyyli-ryhmä suojattiin atsidometyyllillä.

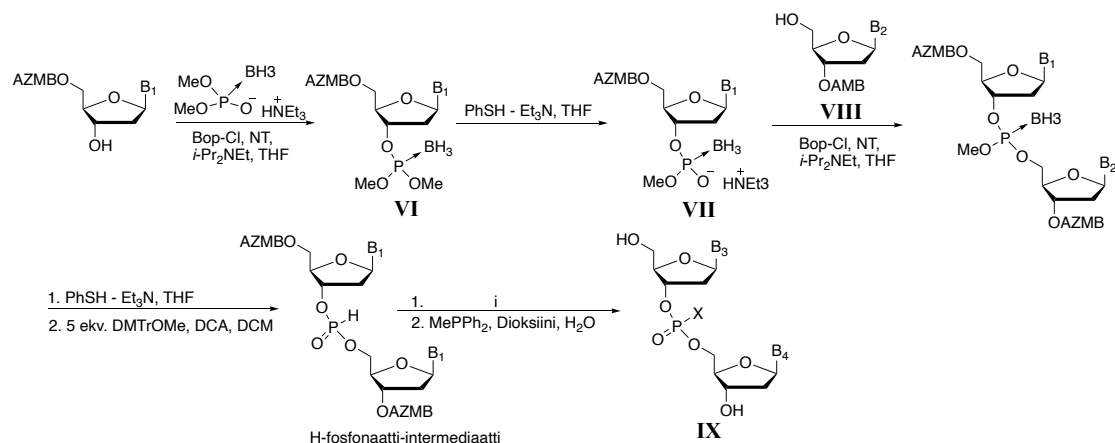
Myös oligonukleotideja syntetisoitaessa kytkennöissä käytettiin TPS-Cl:ää kondensointireagenssina. Fosfaattisuojarahmät irrotettiin litiumjodidilla ja kantaja ammonolyysillä. AZM- ja AZMB-suojaryhmät irtoavat metyyli-difenyyli-fosfiinilla dioksaanin ja veden seoksessa (8:2) kahdessa tunnissa tai vaihtoehtoisesti trifenyli-fosfiinilla asetonitriilin ja veden seoksessa (9:1) viidessä tunnissa.<sup>27</sup>



**Kuva 7.** Emäsosastaan AZMB-suojattu deoksiribonukleosidifosfodiesteri sekä emäsosastaan AZMB- ja 2'-asemastaan AZM-suojattu ribonukleosidifosfodiesteri, joita käytettiin oligoribo- ja oligodeoksiribonukleotidien syntetisoimiseen.<sup>27</sup>

#### 1.3.4. Boranofosfotriesterimenetelmä

Atsidorakenteeseen perustuvia suojarahmia on käytetty myös syntetisoitaessa liuoksessa dideoksiribonukleosidifosfaatteja sekä näiden analogeja boranofosfotriesterimenetelmällä. Synteeseissä 5'- ja 3'-hydroksyyli-ryhmät sekä deoksisytosiinin  $N^4$ , deksiadeniinin  $N^6$ , tymidiinin  $N^3$  ja deoksiguanosiinin  $N^2$  suojattiin AZMB-ryhmällä. Deoksiguanosiinin  $O^6$  suojattiin 4-[(2-atsidometyyli)bentsoyyloksi]bentsyyli (AZBn)-ryhmällä. 5'-Asemastaan sekä emäsosastaan suojattu tymidiiniyksikkö boranofosforyloidaan trietyyliammonium-dimetyyli-boranofosfaatilla. Metyyli poistetaan nukleosidiboranofosfotriesteristä (VI) tiofenoli-trietyyliamiinilla (PhSH-Et<sub>3</sub>N) tetrahydrofuraanissa.<sup>32</sup>, jolloin muodostuu nukleosidiboranofosfodiesteri (VII), joka kytketään kondensaatioreagenssin *N,N'*-bis-(2-okso-3-oksatsolidinyyli)fosfonikloridin (Bop-Cl) sekä 3-nitro-1,2,4-triatsolin (NT) läsnä ollessa AZMB-suojattuun nukleosidiin (VIII) (kaavio 6).<sup>32,33,34</sup>



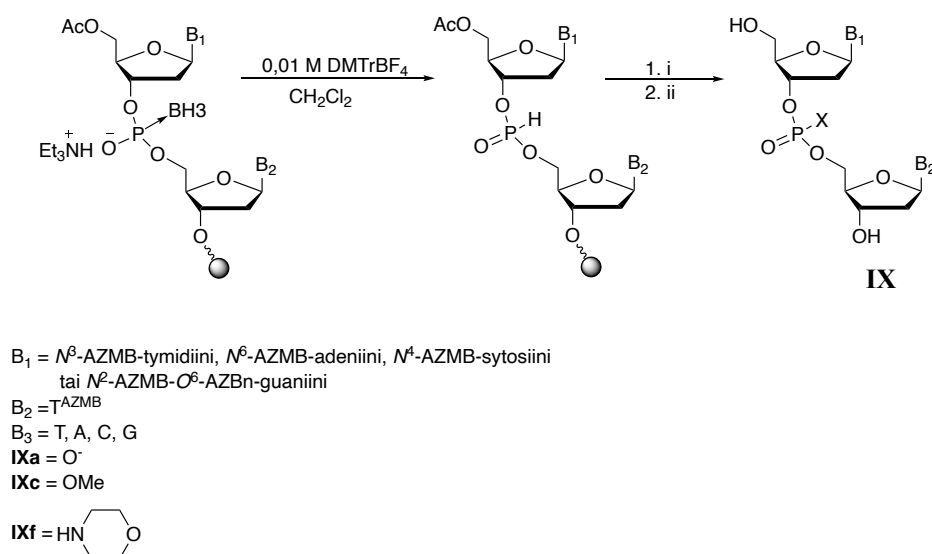
$B_1 = N^3$ -AZMB-tymidiini  
 $B_2 = N^2$ -AZMB-tymidiini,  $N^6$ -AZMB-adeniini,  $N^4$ -AZMB-sytosiini  
 tai  $N^2$ -AZMB- $O^6$ -AZBn-guaaniini  
 $B_3 = T$   
 $B_4 = T, A, C, G$   
 $X = O^-, S^-, N(CH_2CH_2)_2O, OMe, NH_2$

**Kaavio 6.** Dinukleosidifosfodiesterien ja näiden modifioitujen analogien synteesi boranofosfotriesterimenetelmällä. Reagenssit ja olosuhteet: i) **IXa**:  $X = O^-$ ,  $I_2$ , pyridiini/ $H_2O$ ; ii) **IXb**:  $X = S^-$ ,  $S_8$ , pyridiini; iii) **IXc**:  $X = OMe$ , 10 % MeOH/ $N$ -metyyli-imidatsoli- $Et_3N$ - $CCl_4$ ; iv) **IXd**:  $X = N(CH_2CH_2)_2O$ , morfoliini,  $CCl_4$  i) **IXe**:  $X = NH_2$ , 2 %  $I_2$ , satd  $NH_3$ , pyridiini<sup>32,33,34</sup>

Syntetisoiduista dinukleosidiboranofosfaateista syntetisoitiin edelleen *H*-fosfonaatti-intermediaatti dimetoksitrietylikationin läsnä ollessa. Vetyfosfonaatti-intermediaatista saadaan fosfodiesteri hapettamalla jodilla sekä fosforotioaatti sulfuroimalla ja metyylifosfaattianalogi sekä fosforamidaattianalogit oksidatiivisella aminaatiolla (Kaavio 6, i).<sup>33</sup> Dinukleosidifosfaateista irrotetaan AZMB- ja AZBn-suojaryhmät metyyliidifenyylifosfiinilla dioksaanin ja veden seoksessa 20 minuutissa. Menetelmässä boranofosforylointireagenssina käytettävän trietyyliammonium-dimetyyli-boranofosfaatin todettiin reagoivan tymidiinin  $N^3$ -aseman sekä guaniinin  $O^6$ -aseman kanssa, jos niitä ei suojata. AZBn-suojaryhmää irrotettaessa käytetään merkaptoetanolia *scavenger*-reagenssina sivureaktiossa muodostuneen kinonimetidin inaktivoimiseksi,<sup>33</sup> mikä estää kinonin kiinnittymisen guaniiniemäkseen.<sup>35</sup>

Di-, tri- ja tetranukleotidit ja näiden fosforoamidaatti- sekä metyylifosfaattianalogit on valmistettu kiinteää kantajalla vastaavalla tavalla käyttäen boranofosfotriesterimenetelmää. Menetelmässä oligodeoksiribonukleosidiboranofosfaattien emäsosat suojattiin joko AZMB-suojaryhmällä tai aiemmin hydroksyyliyhmiin suojaksi raportoidulla<sup>36</sup> 4-atsidobentsyyllillä (ABn) (Kaavio 7). ABn-suojaryhmä syntetisoitiin ja liitettiin guaniinin  $O^6$ -asemaan (4-atsidofenyylimetanolilla, ja sen irrottamiseen käytettiin samoja olosuhteita kuin AZBn-

suojaryhmän irrottamiseen. Kantajassa kiinniolevaan  $N^3$ -asemastaan AZMB-suojattuun tymidiiniin kytkettiin boranofosfodiesterimonomeeri, jonka fosfaatti on suojattu syanoetyylillä, 5'-asema on asetyloitu ja emäsosa on suojattu AZMB- tai ABn-suojauksella (Kaavio 7). Kytkennän jälkeen fosfaatista poistettiin syanoetyyli DBU:lla. Dinukleosidiboranofosfaatin annettiin reagoida trityylireagenssin kanssa, ja näin muodostunut *H*-fosfonaatti-intermediaatti hapetettiin vastaavaksi dinukleosidifosfaatiksi. 5'-asyylisuojausryhmän sekä AZMB- ja ABn-suojaryhmien irrottamisen jälkeen dinukleosidi irrotettiin kantajasta. Tällä menetelmällä Kawanaka ja hänen tutkimusryhmänsä raportoivat syntetisoineensa di-, tri- ja tetranukleotideja sekä näiden metyylifosfaatti- sekä fosforamidaatti-analogeja (Kaavio 7).<sup>37</sup>



**Kaavio 7.** Dinukleosidifosfaattien ja näiden metyylifosfaatti- sekä fosforamidiitti-DNA analogien synteesi kiinteällä kantajalla.<sup>37</sup> Reagenssit ja olosuhteet: **IXa**: i)  $I_2$ , pyridiini/ $H_2O$  ja ii)  $NH_3$ ; **IXc**: i) 1 % MeOH/*N*-metyyli-imidatsoli- $Et_3$ - $CCl_4$  ja ii) A: 25 mM  $K_2CO_3$ /MeOH; **IXf**: i) = 10 % morfoliini/ $CCl_4$  ja ii)  $NH_3$

#### 1.4. Fosforotioaattioligonukleotidien synteetit

Oligonukleotidien fosfodiesterisidoksen modifioiminen tiofosfodiesterisidokseksi (PS) parantaa oligon solukalvon läpäisykykyä ja entsymaattista pysyvyyttä. Tiofosfodiesterisidos on kiraalinen, ja näin ollen fosforotioaatit esiintyvät  $S_P$ - ja  $R_P$ -diastereomeerinä. Fosforotioaatin stereokemialla on todettu olevan merkittävä vaikutus oligonukleotidin farmakologisiin vaikutuksiin, kuten RNAasi H -aktiivisuuteen.<sup>38,39</sup>

Kuten kappaleessa 1.3.4 todettiin, fosforotioaatteja on syntetisoitu diastereomeerien seoksena boranofosfotriesterimenetelmällä käyttäen AZMB- ja AZBn-suojaryhmiä. Täysin suojatuista

dimeerisestä dinukleosidiboranofosfaatista syntetisoitiin fosforotioaatti vetyfosfonaattivälituotteen kautta sulfuroimalla.<sup>33</sup> Fosforotioaattioligonukleotidien syntetisoiminen liukoisella kantajalla<sup>6,10,40-42</sup> mahdollistaa suuremman mittakaavan synteessin verrattuna perinteiseen kiinteällä kantajalla suoritettavaan synteesiin.<sup>10,43,44</sup> Fosforotioaattien syntetisoimiseksi on kehitetty myös stereokontrolloituja synteesisstrategioita, koska moniin lääketieteellisiin sovelluksiin tarvitaan stereokemiallisesti yhtenäisiä yhdisteitä. Diastereospesifisyyteen perustuvat fosforotioaattioligonukleotidien synteesismenetelmät käsittävät muun muassa *H*-fosfonaattimenetelmän<sup>45</sup> ja kiraalisten dinukleosidifosforotioaattirakennusyksikköjen käytön<sup>46</sup> Myös kiraalisia tri- ja tetrasyklisiä P(III)<sup>47</sup> sekä oksatsafosfolidiini-rakenteeseen perustuvia apuaineita on käytetty.<sup>38,39,48,49,50,51</sup>

Tutkielman kokeellisessa osassa esitetään dimeerisen, trimeerisen ja tertameerisen fosforotioaattinukleotidin stereokontrolloitu synteesismenetelmä liukoisella saostettavalla kantajalla, joka perustuu P(V)-oksatiafosfolaanisulfidirakenteeseen ja AZMB-suojaryhmän käyttöön 5'-hydroksyyliiryhmässä. Synteessissä sovellettiin Knousen kehittämää menetelmää, jossa sitruunan kuoresta eristettyä terpeenää, limoneenia<sup>52</sup> hyödynnetään enantiopuhtaiden oligonukleotidifosforotioaattien valmistamisessa kiinteällä kantajalla käyttäen dimetoksitriityyliä 5'-hydroksyyliiryhmässä.<sup>53</sup> Limoneenista valmistetaan epoksidaation sekä tiolyysin avulla (-)- sekä (+)- $\Psi$ -reagenssit, joilla aktivoidaan oligonukleotidisynteessissä käytettävät 5'-asemastaan suojatut nukleosidit.<sup>54</sup>

## 1.5.Yhteenveto

AZMB-, AZM-, AZBn-, ABn- sekä 4-atsidobutyryylisuojaryhmiä on käytetty onnistuneesti oligodeoksi- sekä oligoribonukleotidien synteeseissä niin 5'-, 3'- ja 2'-hydroksyylien kuin myös emäsosien suojaryhminä. Synteetit on suoritettu fosfotriesteri- ja boranofosfotriesterimenetelmillä niin kiinteällä kantajalla kuin liuoksessakin. AZM-suojaryhmän ja AZMB-ryhmät kestävät hyvin happamia olosuhteita. AZM-suojaryhmä on stabiili myös ammonolyysin aikana. Esitetyt atsidopohjaiset suojaryhmät voidaan irrottaa selektiivisesti neutraaleissa olosuhteissa fosfiiteilla tai fosfiineilla pelkistykseen perustuvassa Staudingerin reaktiossa. Tästä syystä kyseiset suojaryhmät tarjoavat vaihtoehdon perintisille nukleoemästen suojauksessa käytettäville asyyliiryhmille emäsherkkien oligonukleotidien synteessissä. Atsido-substituointi mahdollistaa myös postsynteettisten modifikaatioiden tekemisen syntetisoitavaan oligonukleotidiketjuun.

Boranofosfotriesterimenetelmällä on syntetisoitu myös fosforotioaatteja kiinteällä kantajalla diastereomeerien seoksena käyttäen AZMB- ja AZBn-suojaryhmiä. Liukoisen kantajan käyttö mahdollistaa suurempien mittakaavojen synteetit ja kehitetyt fosforotioaattien stereokontrolloidut synteestistrategiat tarjoavat moniin lääketieteellisiin sovelluksiin ja tutkimuksiin enantiopuhdaita diastereomeerejä.

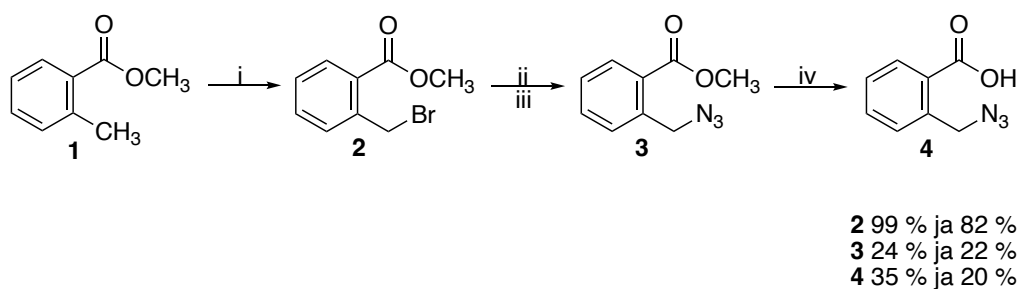
## 2. Tulokset ja tulosten tarkastelu

Projektissa syntetisoitiin 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (**6**) ja 5'-O-atsidometyylitymidiini (**13**), joista **6** aktivoitiin P(V)-kemiaa käyttäen sitruunan kuoresta eristetyistä limoneeneista varmistetuilla kiraalisilla (-)- $\Psi$ - ja (+)- $\Psi$ -reagensseilla. 2-(atsidometyyli)bentsoyyli-suojaryhmän irtoamista seurattiin tymidiinin 5'-asemasta 25 °C:ssa trimetyylifosfiitin, trimetyylifosfiinin ja trifenyylifosfiinin läsnä ollessa. Aktivoiduista AZMB-suojatuista tymidiineistä **16** ja **17** syntetisoitiin oligonukleotidifosforotioaattidimeeri (**21**, T(R<sub>P</sub>)T), -trimeeri (**22**, T(R<sub>P</sub>)T(S<sub>P</sub>)T) sekä -tetrameeri (**23**, T(R<sub>P</sub>)T(S<sub>P</sub>)T(S<sub>P</sub>)T) nelihaarisella pentaerytritoli-pohjaisella saostettavalla liukoisella kantajalla (**18**).

### 2.1. Synteetit

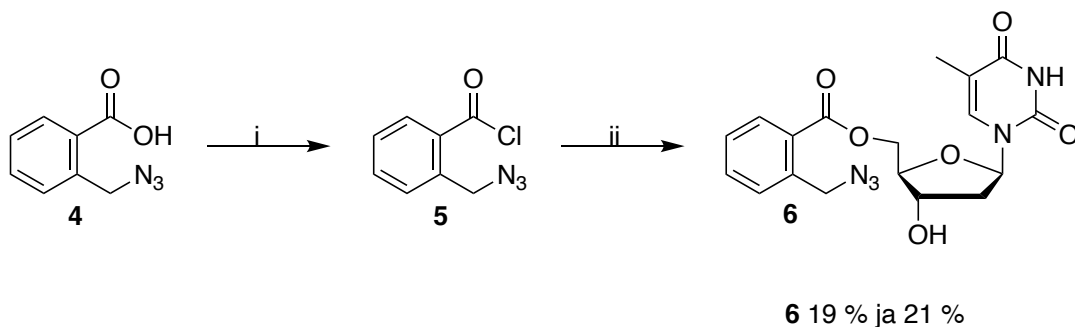
#### 2.1.1. 5'-O-2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiinin valmistaminen

2-Atsidometyylibentsoehapon (**4**) synteesi on esitetty kaaviossa 8. Metyyli-2-metyylibentsoaatti (**1**) brominoitiin *N*-bromisukkinimidillä bentsoyyliperoksidin läsnä ollessa hiilitetrakloridissa (Kaavio 8, i). Metyyli-2-bromimetyylibentsoaatin (**2**) bromi korvattiin atsidoryhmällä substituutioreaktiossa typpi-ilmakehässä käyttäen natriumatsidia dimetyyliformamidissa, sekä litiumkloridia katalyyttinä (Kaavio 8, ii). Tuotteena muodostunut metyyli-2-metyyliatsidobentsoaatti (**3**) valmistettiin myös käyttäen DMF:n sijasta etanolia ja etanolin sekä veden (1:2) seosta (Kaavio 8, iii). Huomionarvoista on, että käytettäessä natriumatsidia metanolissa, atsidointi ei onnistunut. Atsidoinnin jälkeen esteriryhmä hydrolysoitiin natriumhydroksidin metanoliliuoksessa (Kaavio 8, iv), jolloin tuotteena muodostui 2-atsidometyylibentsoehappo (**4**).



**Kaavio 8.** 2-Atsidometyyli-bentsoehapon synteesi. Reagenssit ja olosuhteet: i) NBS, Bentsoyyliperoksidi,  $\text{CCl}_4$ ; ii)  $\text{NaN}_3$ , DMF; (iii) Atsidointi suoritettiin myös käyttäen liuottimena EtOH:a ja EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:2) seosta); iv) NaOH/MeOH

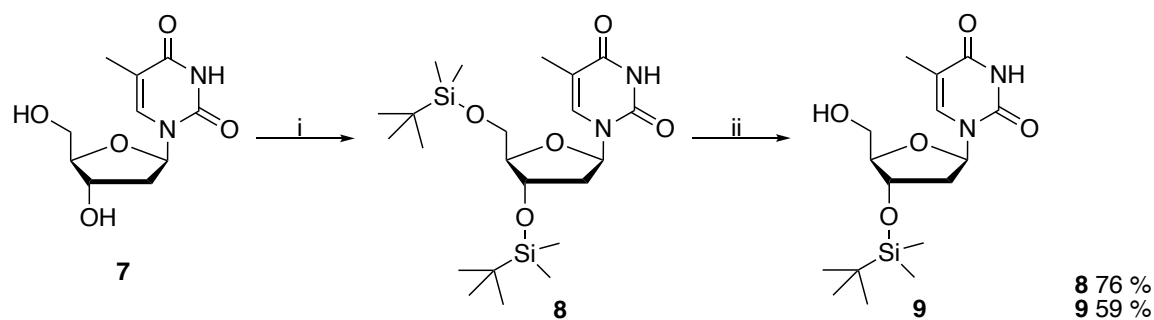
2-Atsidometyyli-bentsoehaposta (**4**) syntetisoitiin happohalidi **5** käyttäen tionyylikloridia dikloorimetäänissa pyridiinin läsnä ollessa (Kaavio 9, i) typpi-ilmakehässä. Happohalidin kloori korvattiin asyyli-substituutiossa tymidiinin 5'-OH-ryhmällä pyridiinissä  $0\text{ }^\circ\text{C}$ :ssa (Kaavio 9, ii). Happohalidi **5** reagoi lähes selektiivisesti tymidiinin 5'-asemaan muodostaen 5'-*O*-AZMB-tymidiinin (**6**) päätuotteena (90 %). 5'-*O*-AZMB-tymidiini (**6**) puhdistettiin silikageelikromatografisesti ja karakterisoitiin NMR-spektroskopisesti.



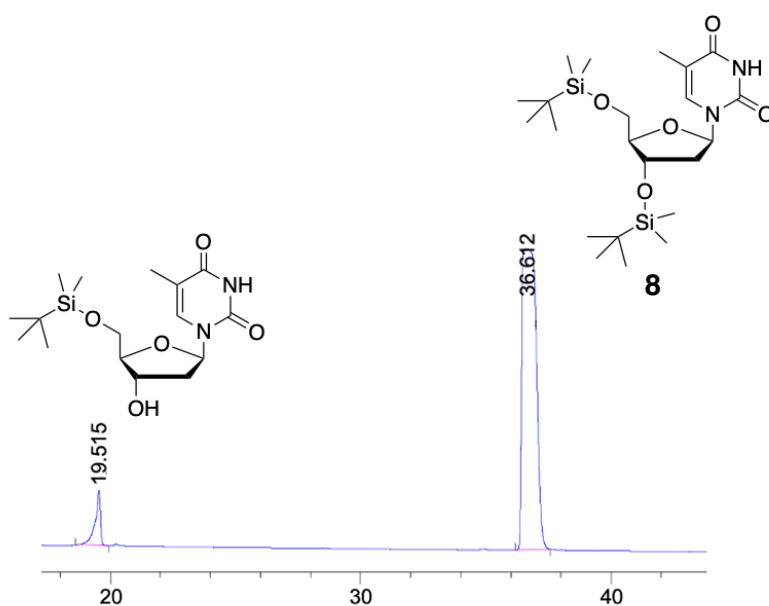
**Kaavio 9.** 5'-*O*-AZMB-tymidiinin (**6**) syntetisoiminen 2-atsidometyyli-bentsoehaposta. Reagenssit ja olosuhteet: i) DCM, pyridiini,  $\text{SOCl}_2$  ii) tymidiini (1,3 ekv.), pyridiini

### 2.1.2. 5'-*O*-Atsidometyyli-tymidiinin valmistaminen

Tymidiinin (**7**) 3'- ja 5'-hydroksyyli-ryhmä suojattiin *tert*-butyylidimetyylisilyylikloridilla (TBDMS-Cl) pyridiinissä (Kaavio 10, i). Reaktio-etenemistä seurattiin LC-MS:lla (Kuva 8). Tuotteena muodostunut 3',5'-bis-*O*-TBDMS-tymidiini (**8**) karakterisoitiin NMR:llä saannon ollessa 76 %. Seuraavassa vaiheessa tuote **8** desilyloitiin selektiivisesti 5'-asemasta suolahapon metanoliliuoksella, jolloin tuotteeksi saatiin 3'-*O*-TBDMS-tymidiini (**9**) (Kaavio 10, ii).



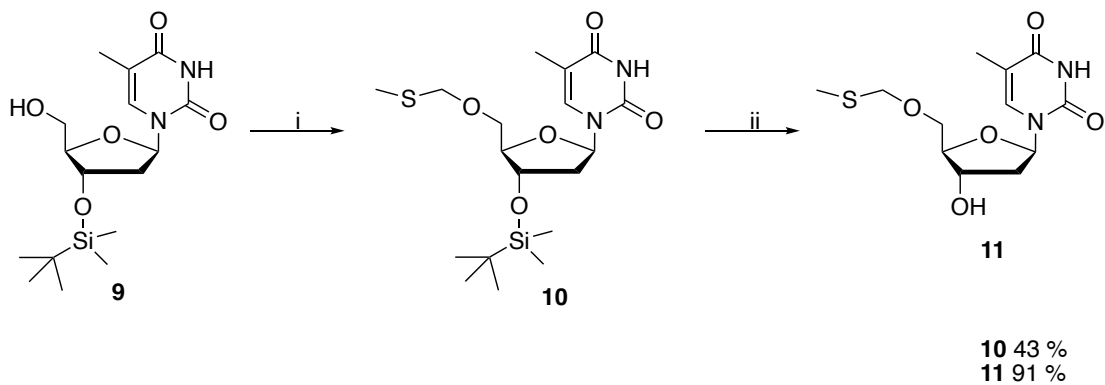
**Kaavio 10.** Tymidiinin (**7**) silylointi- ja yhdisteen **8** selektiivinen desilylointi. Reagenssit ja olosuhteet: i) TBDMS-Cl (2,5 ekv.), pyridiini ii) HCl/MeOH



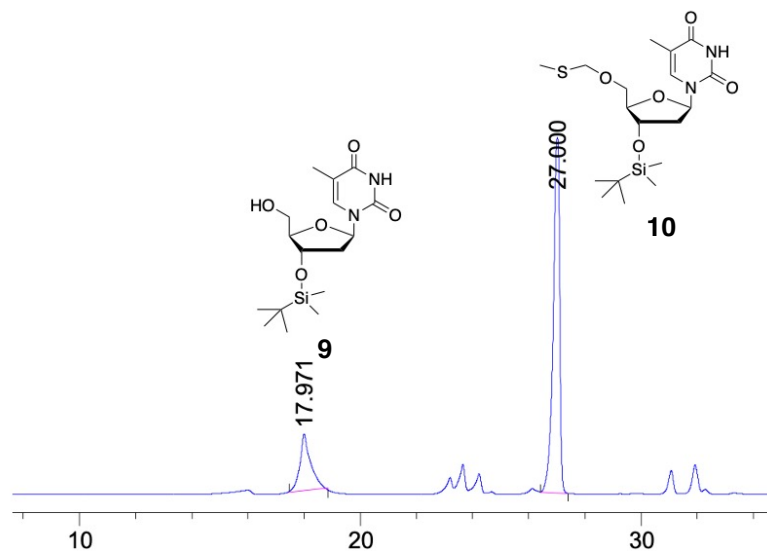
**Kuva 8.** HPLC-kromatogrammi tymidiinin silyloinnista (5 vrk seurantanäyte).

Tuotteen **9** 5'-hydroksyyliiryhmä metyyliometyloitiin etikkahappoanhydridin, etikkahapon ja DMSO:n seoksella (10:3:14) (Kaavio 11, i). Kuvassa 9 on HPLC-kromatogrammi 28 h:n seurantanäytteestä. Metyyliometyloinnin jälkeen tuotteena saatu yhdiste **10** desilyloitiin TBAF:n 1 M THF:n liuoksella, jolloin muodostuu 5'-*O*-metyyliometyyllitymidiini (**11**) (Kaavio 11, ii).



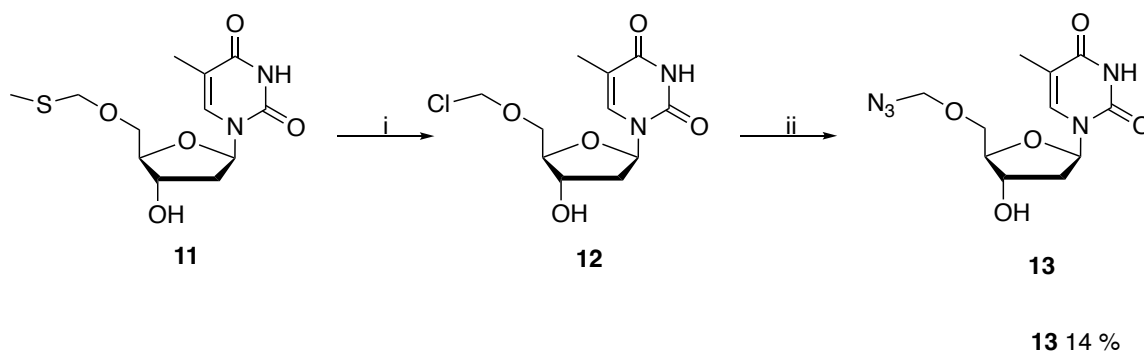


**Kaavio 11.** 3'-*O*-TBDMS-tymidiinin (**9**) 5'-hydroksyyli­ryhmän metyyli­tiometylointi ja sitä seuraava desilylointi. Reagenssit ja olosuhteet: i) Etikkahappoanhydridi, etikkahappo, DMSO ii) TBAF 1 M THF-liuos



**Kuva 9.** HPLC-kromatogrammi 3'-*O*-TBDMS-tymidiinin (**9**) metyyli­tiometyloinnista (28 h seurantanäyte).

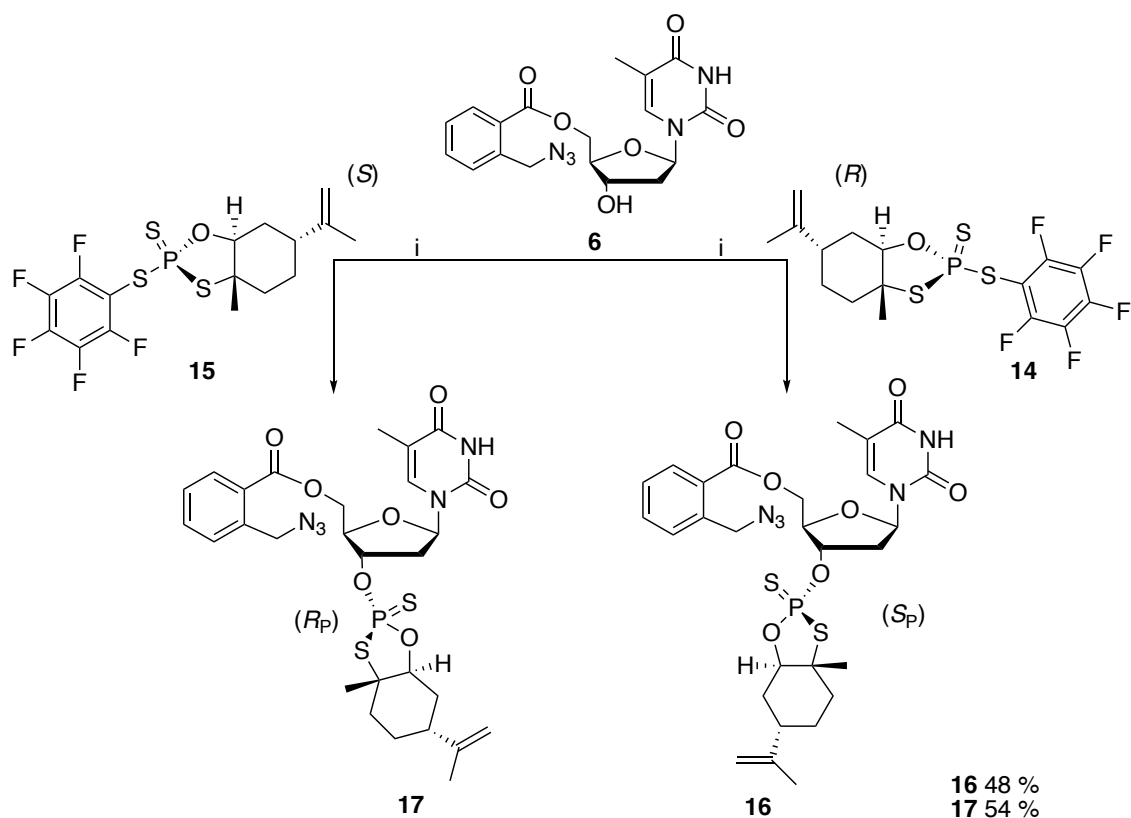
Tuotteen **11** tiometyyli-ryhmä korvattiin kloorilla käyttäen nitro­bentseenisulfonyylikloridia dimetyyli­formamidissa (Kaavio 12, i), jonka jälkeen välituote **12** atsidoitiin (Kaavio 12, ii). Tuotteeksi saatiin 5'-*O*-atsidometyylitymi­diini (**13**).



**Kaavio 12.** 5'-Metyylitiometyyli-*O*-tymidiinin (**11**) atsidointireaktio. Reagenssit ja olosuhteet: i) NBS-Cl, DMF ii) NaN<sub>3</sub>

### 2.1.3. $\Psi$ -Aktivoitujen 5'-*O*-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiinien valmistaminen

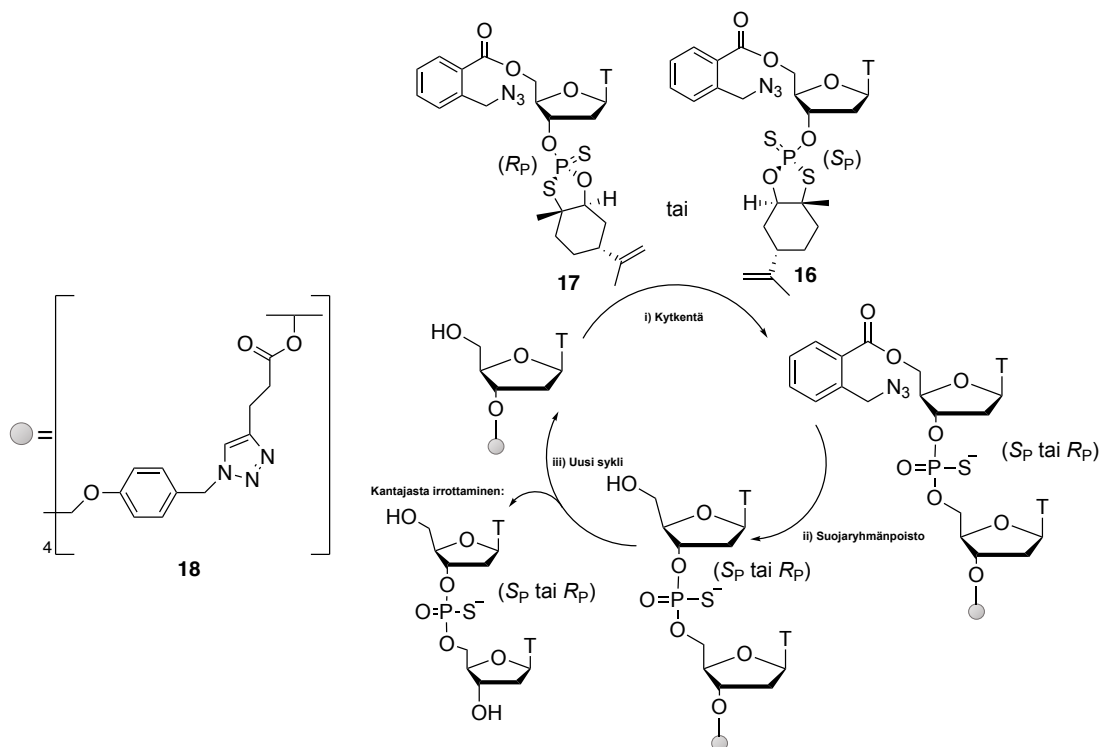
5'-*O*-AZMB-suojattu tymidiini (**6**) aktivoitiin (+)- ja (-)- $\Psi$ -reagensseilla (**14** ja **15**) (Kaavio 13). Projektissa hyödynnettiin aikaisemmin julkaistun menetelmän mukaisesti sitruunan kuoresta eristettyä limoneenia, josta saadaan oksidaatioreaktiolla valmistettua (+)- ja (-)- $\Psi$ -reagenssit **14** ja **15**.<sup>53</sup> Aktivointi tehtiin stereokontrolloidusti DBU-aktivaattorin läsnä ollessa (1,3 ekv; Kaavio 13, i) asetonitriilissa.  $\Psi$ -aktivoitujen yhdisteiden **16** ja **17** synteesireitit on esitettyinä kaaviossa 13. (+)- $\Psi$ -reagenssilla aktivoitaessa reaktion saanto oli 48 % ja (-)- $\Psi$ -reagenssilla 54 %.



**Kaavio 13.** 5'-O-AZMB-tymidiinin aktivoiminen (-)- ja (+)-Ψ -reagensseilla. Reagenssit ja olosuhteet: i) (-)- tai (+)-Ψ -reagenssi (1,3 ekv.), DBU (1,3 ekv.), MeCN, rt, 1 h

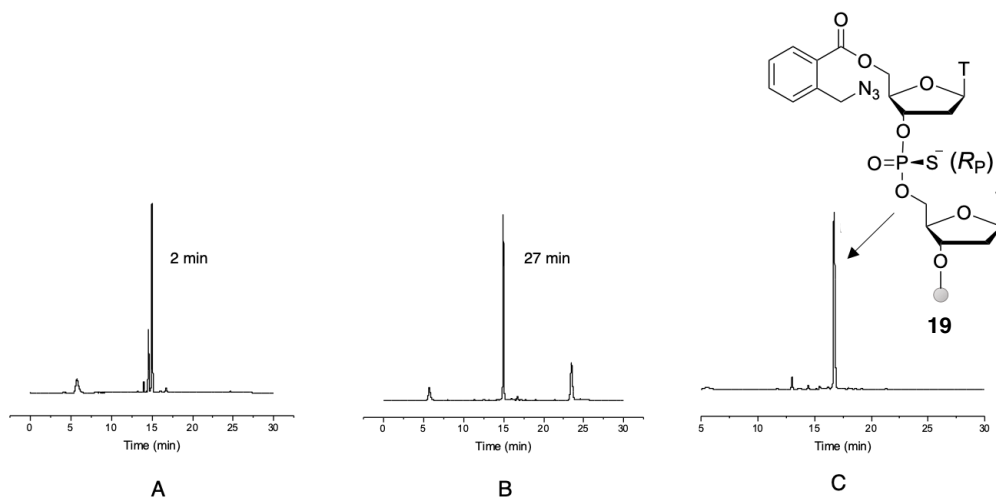
#### 2.1.4. Oligonukleotidifosforotioaattidimeerin, -trimeerin ja -tetrameerin valmistaminen

(+)- ja (-)-Ψ-aktivoituja 5'-O-AZMB-suojattuja tymidiinejä (**16** ja **17**) käytettiin syntetisoitaessa oligonukleotidifosforotioaattidimeeri (**21**), -trimeeri (**22**) sekä -tetrameeri (**23**) nelihaaraisella liukoisella pentaerytritoli-pohjaisella kantajalla (5'-O-tymidiini)<sub>4</sub>PE **18**) (Kaavio 14).



**Kaavio 14.** Synteesisyklin reaktio-olosuhteet ja reagenssit: i) Kytettä, (+/-)-aktivoitu 5'-O-AZMB-tymidiini (6,66 ekv.), DBU (10,8 ekv.), MeCN/DMF (1:1), 25 °C N<sub>2</sub>-ilmakehä, neutralointi DCA:lla, saostus *i*PrOH ii) Suojaryhmänpoisto, Me<sub>3</sub>P 8 (ekv.), MeCN/DMF (1:1) 25 °C, saostus *i*PrOH iii) Kantajasta irrottaminen (tai uusi sykli), NH<sub>3</sub>, 3 h, 55 °C

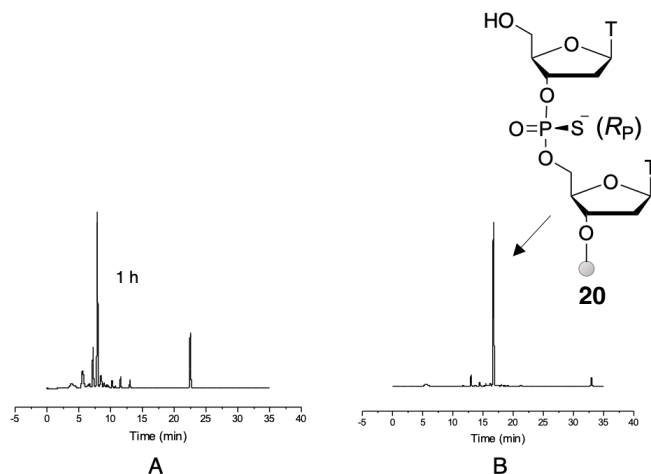
Ensimmäisessä kytkennässä (+)-Ψ-aktivoitu ja 5'-AZMB-suojattu tymidiini (**16**) kytkettiin PE-kantajaan sidotun tymidiinin 5'-hydroksyyliiryhmään (Kaavio 14). Kytännät suoritettiin huoneenlämpötilassa N<sub>2</sub>-ilmakehässä asetonitriliin ja DMF:n (1:1) seoksessa. DBU (10,8 ekv.) toimi emäksenä. Reaktion etenemistä seurattiin RP-HPLC:llä. Dimeerin 5'-O-AZMB-T(*R<sub>P</sub>*)-T-3'-PE (**19**) tapauksessa kytkentä oli edennyt loppuun 30 min aikana (Kuva 10). Tämän jälkeen aktivaattorina käytetty DBU neutraloitiin DCA:lla ja kantajassa kiinni oleva välituote 5'-O-AZMB-T(*R<sub>P</sub>*)-T-3'-PE (**19**) sakkautettiin kylmästä isopropanolista. DBU:n neutralointi tehtiin transesterifikaatioreaktion estämiseksi, joka voi aiheuttaa osittaisen kantajasta irtoamisen. Tämä olisi tapahtunut isopropanolissa tapahtuvan sakkauksen yhteydessä, jos liuos olisi jäänyt emäksiseksi.



**Kuva 10.** HPLC-kromatogrammit 5'-O-AZMB-T(*R<sub>p</sub>*)T-3'-PE:n (**19**) kytkentäreaktion seurannasta 2 min reaktion aloituksesta (A), 27 min reaktion aloituksesta (B) sekä sakasta, joka on saatu neutraloinnin jälkeen ennen suojanpoistoa (C).

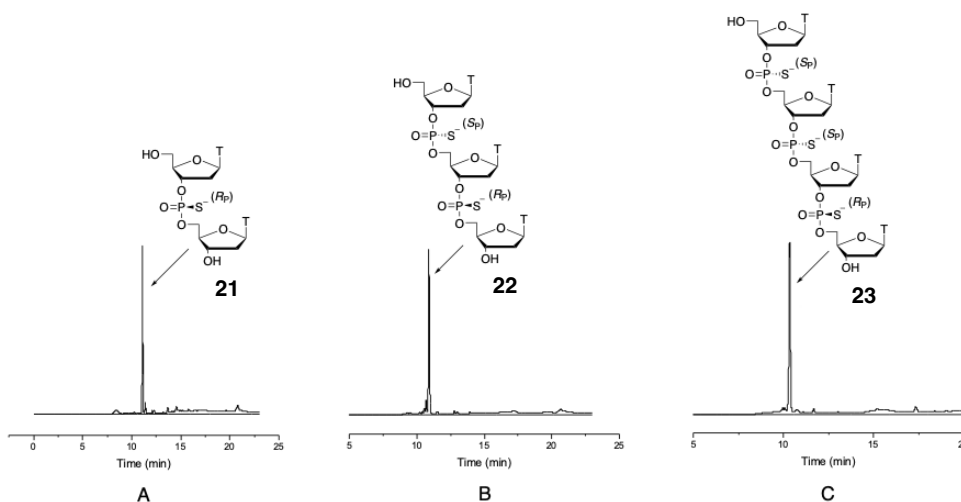
Kytkenän jälkeen kantajassa kiinniolevasta fosforotioaattidimeeristä **19** irrotettiin 5'-asemasta AZMB-suojaryhmä. Suojaryhmän irrottaminen tehtiin trimetyylifosfiinilla (Me<sub>3</sub>P, kaavio 14) huoneenlämpötilassa N<sub>2</sub>-ilmakehässä. Suojaryhmän todettiin irronneen 60 minuutissa. Välituote, 5'-T(*R<sub>p</sub>*)-T-3'-PE (**20**) sakkautettiin kylmästä isopropanolista. Kuvassa 11 on RP-HPLC-kromatogrammi dimeerin suojanpoiston seurannasta sekä suojanpoiston jälkeen sakkautetusta välituotteesta.

Synteesisykli toistettiin fosforotioaattitrimeerin **22** ja tetrameerin **23** syntetisoimiseksi samalla tavalla kuin on kuvattu edellä dimeerin tapauksessa. Trimeerin sekä tetrameerin valmistuksessa kytkennässä käytettiin (-)-Ψ-aktivoitua 5'-O-AZMB-tymidiiniä. Trimeeriä syntetisoitaessa kytkentäaika oli 30 min ja tetrameerin tapauksessa 120 min.



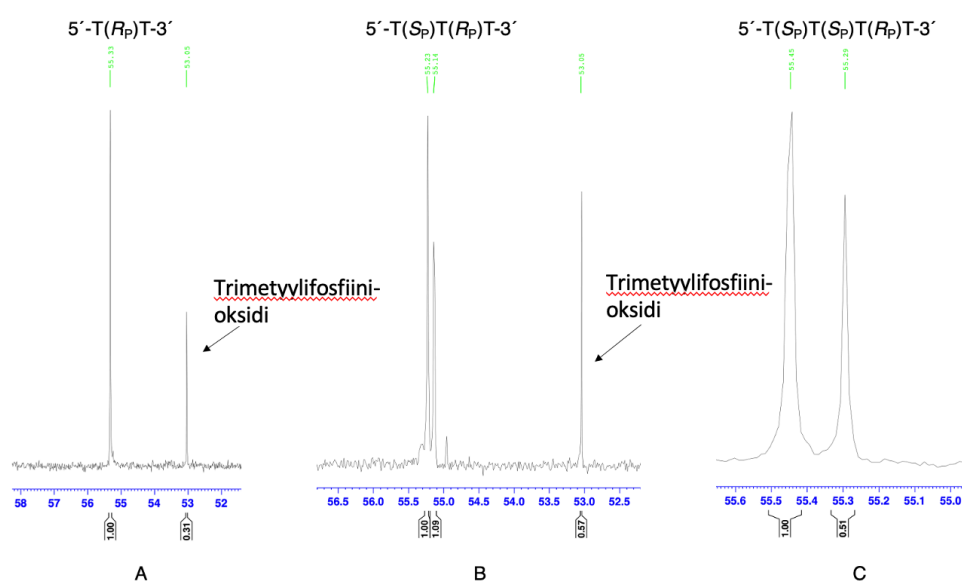
**Kuva 11.** HPLC-kromatogrammit 5'-O-T(*R<sub>P</sub>*)T-3'-PE:n muodostumisesta 1 h suojarahmäänpoistoreaktion aloittamisesta (A) ja sakkautuksen jälkeen (B).

Suojaryhmän irrottamisen jälkeen pieni määrä kantajassa kiinniolevaa fosforotioaattia ammonolysoitiin. Ammonolyysissä fosforotioaatti irrotetaan kantajasta ammoniumhydroksidin vesiliuoksessa (25 %) 55 °C:ssa kolmen tunnin aikana. Saostunut kantaja poistetaan suodatuksella. Kuvassa 12 on HPLC-kromatogrammi ammonolysoidusta dimeeristä (**21**), trimeeristä (**22**) sekä tetrameerista (**23**). Dimeerin ammonolyysin saanto oli 70 % ja kokonaissaanto 36 %. Trimeerin ja tetrameerin ammonolyysisaannot olivat 70 % ja 100 %. Trimeerin kokonaissaanto oli 22 %, ja tetrameerin kokonaissaanto oli 17 %.



**Kuva 12.** HPLC-kromatogrammi kantajasta irrotetusta fosforotioaattidimeeristä 5'-T(*R<sub>P</sub>*)T-3' (**21**), -trimeeristä 5'-T(*S<sub>P</sub>*)T(*R<sub>P</sub>*)T-3 (**22**), ja -tetrameeristä 5'-T(*S<sub>P</sub>*)T(*S<sub>P</sub>*)T(*R<sub>P</sub>*)T-3' (**23**).

Kuvassa 13 on esitetty ammonolysoidun dimeerin **21** ja trimeerin **22**  $^{31}\text{P}$  NMR-spektrit. Dimeerin sekä trimeerin  $^{31}\text{P}$  NMR:istä nähdään, että suojaryhmän poistossa muodostuneesta hapettuneesta trimetyylifosfiinioksidista ei päästä isopropanolisakkautuksella kokonaan eroon. Tästä syystä tetrameeri puhdistettiin RP-nestekromatografisesti. Tetrameerin **23**  $^{31}\text{P}$  NMR on mitattu HPLC-puhdistetusta tuotteesta.

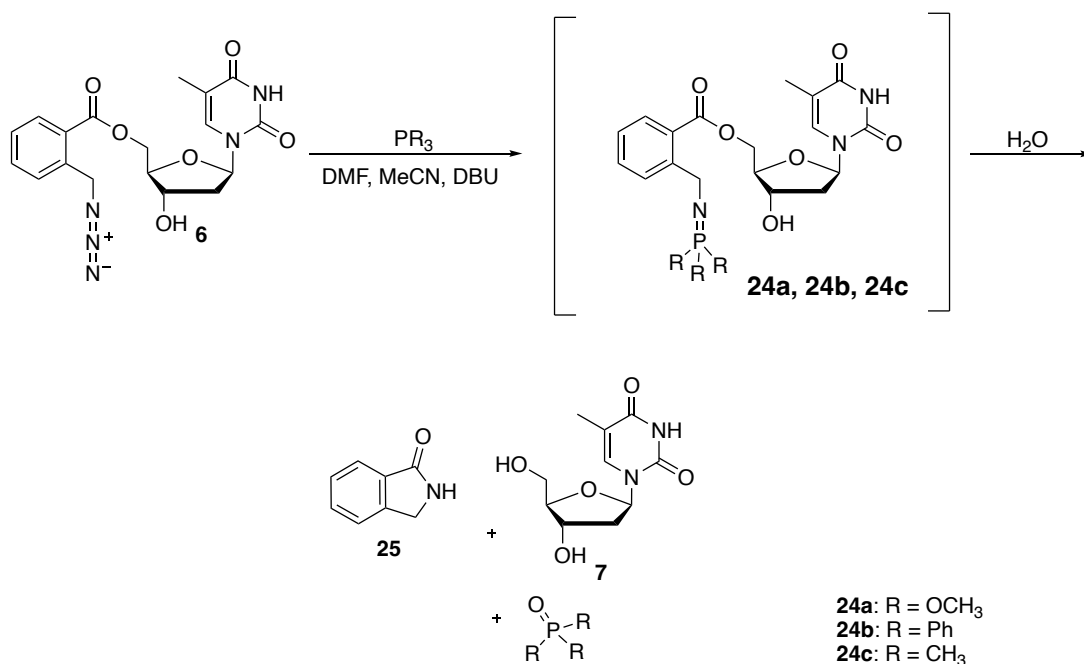


**Kuva 13.** Dimeerin (A), trimeerin (B) ja tetrameerin (C)  $^{31}\text{P}$  NMR-spektrit.

## 2.2. Kinetiikkatutkimukset

### 2.2.1. 2-(Asidometyyli)bentsoyyli-suojaryhmän irtoamisen kinetiikka

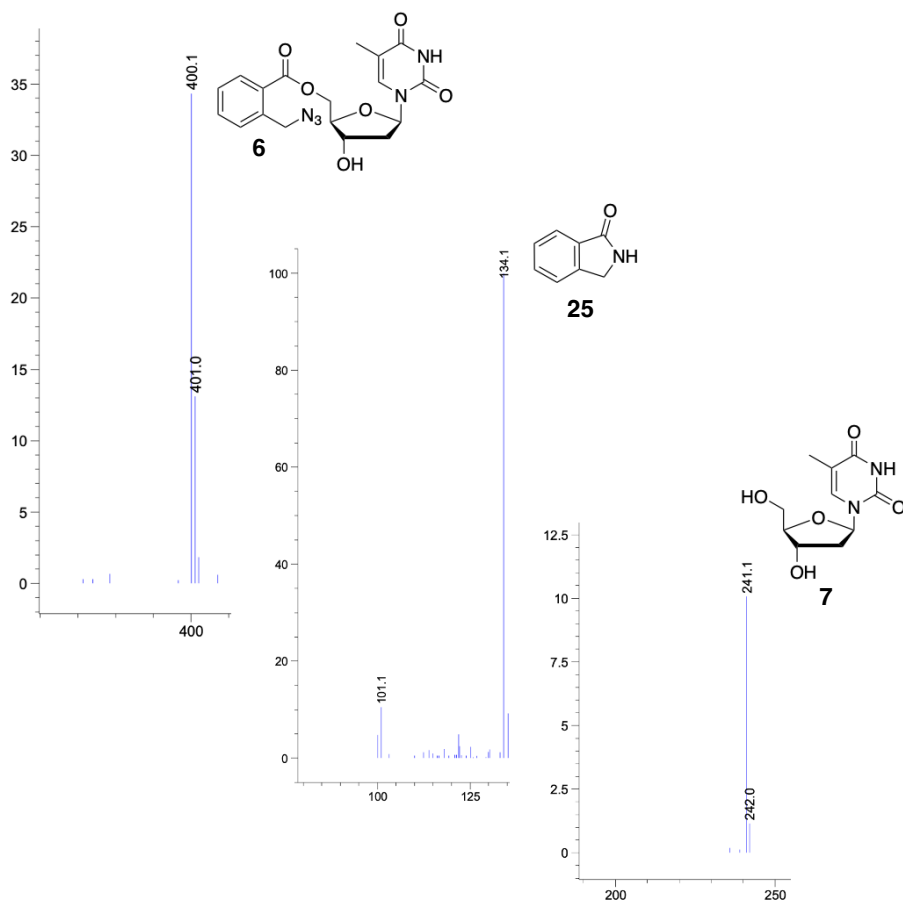
2-(Atsidometyyli)bentsoyylin irtoamista tymidiinin 5'-asemasta seurattiin HPLC-massaspektrometrisesti dimetyyliformamidin, asetonitriilin ja DBU:n seoksessa huoneenlämpötilassa trimetyylifosfiitin, trifenyylifosfiinin tai trimetyylifosfiinin läsnäollessa.



**Kaavio 15.** 2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-suojaryhmän irtoamista tutkittiin trimetyylifosfiitilla (R = OCH<sub>3</sub>), trifenyylifosfiinilla (R = Ph) ja trimetyylifosfiinilla (R = CH<sub>3</sub>).

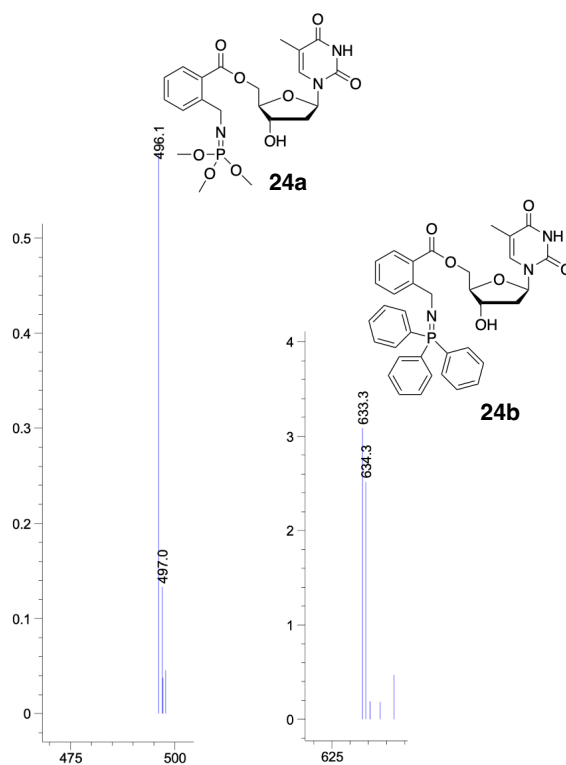
Käytettäessä trimetyylifosfiittia 4 ekv., lähtöaineen, 5'-O-AZMB-tymidiinin (**6**,  $t_R = 16$  min) havaittiin olevan stabiili 24 h:n aikana. Kasvatettaessa trimetyylifosfiitin osuutta 8 ekvivalenttiin suojaryhmän irtoamisen puoliintumisaika on 4 h. Tuotteena havaittiin tymidiini (**7**,  $t_R = 6$  min), intermediaatti **24a** (R = OCH<sub>3</sub>,  $t_R = 13$  min) sekä irronnut suojaryhmä **25** ( $t_R = 10$  min). Kuvassa 14 on esitetty 5'-O-AZMB-tymidiinin (ESI-MS:  $m/z$  400,1 [M-H]<sup>-</sup>), irronneen suojaryhmän (ESI-MS:  $m/z$  134,1 [M+H]<sup>+</sup>) ja tymidiinin (ESI-MS:  $m/z$  241,1 [M-H]<sup>-</sup>) massaspektrit. Intermediaatin **24a** (R = OCH<sub>3</sub>) ((ESI-MS:  $m/z$  496,1 [M-H]<sup>-</sup>) massaspekttri on esitetty kuvassa 15. Suojaryhmän irrottamista seurattiin myös vedessä sekä metanolissa trimetyylifosfiitin läsnä ollessa. Kyseisissä liuottimissa ei havaittu tapahtuvan haluttua Staudingerin reaktiota. Veden läsnä ollessa tapahtuu todennäköisesti hydrolyysi ja metanolin tapauksessa transesterifikaatio.





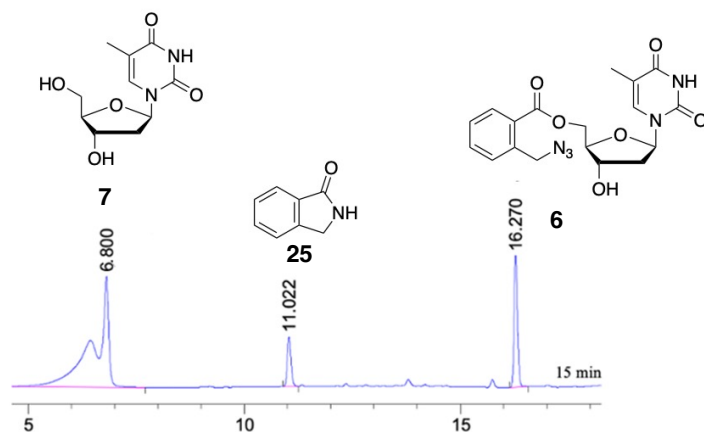
**Kuva 14.** 5'-O-AZMB-tymidiinin (**6**), irronneen suojaryhmän **25** sekä tymidiinin (**7**) massaspektrit.

Suojaryhmän irtoamista tutkittiin myös trifenyylifosfiinin läsnä ollessa (8 ekv.). Reaktion olosuhteet pidettiin muilta osin identtisinä edellä esitettyjen reaktio-olosuhteiden kanssa. Tymidiini ( $t_R = 6$  min), irronnut suojaryhmä ( $t_R = 11$  min) sekä intermediaatti **24b** (R = Ph,  $t_R = 14$  min) havaittiin tuotteina. Intermediaatin **24b** (R = Ph, ESI-MS:  $m/z$  634,3 [M-H]<sup>-</sup>) massaspektri on esitetty kuvassa 15. Suojaryhmän irtoamisen puoliintumisaika oli 42 min, ja kasvatettaessa trifenyylifosfiinin osuutta (12 ekv.) suojarahmän irtoamisen puoliintumisaika lyheni 36 min:iin.

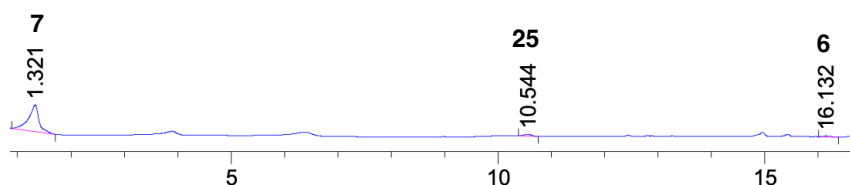


**Kuva 15.** Intermediaattien **24a/b** massaspektrit.

Trimetyylifosfiinilla (4 ekv.) suojaryhmän irtoamisen puoliintumisaika on 3,2 min. Kyseisen fosfiinin herkän hapettumisen takia, reaktio käynnistettiin typpikaapissa DMF:n ja asetonitriliin (1:1) seoksessa DBU:n läsnä ollessa. HPLC-MS-näytteet otettiin ja analysoitiin 15 min ja 30 min kuluttua reaktion aloituksesta (kuva 16). Irronnut suojaryhmä sekä tymidiini havaittiin tuotteina, mutta intermediaattia **24c** (R = CH<sub>3</sub>) ei havaittu. Tymidiinin piikki jakautuu HPLC-kromatogrammissa (kuva 16), mutta molempien piikkien todettiin olevan tymidiiniä massa-analyysin perusteella. 30 min näyte analysoitiin HPLC-MS:llä myös lyhyemmällä RP-kolonnilla (C18; 2,1 x 30 mm), jossa tymidiinin (t<sub>R</sub> = 28 s) todettiin eluoituvan yhtenä piikkinä (kuva 17).



**Kuva 16.** HPLC-kromatogrammi suojarahmän irtoamisesta trimetyylifosfiinilla (15 min näyte).

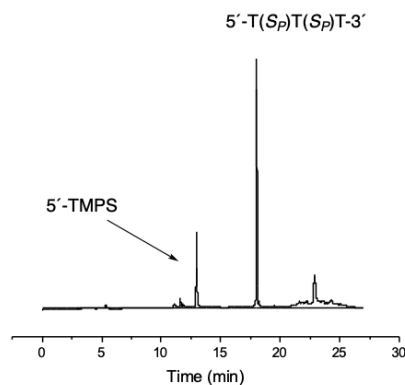


**Kuva 17.** HPLC-kromatogrammi, suojarahmän irtoamisesta trimetyylifosfiinilla (30 min näyte).

Tymidiini eluoituu yhtenä piikkinä.

### 2.2.2. Fosforotioaattien stereokemia

Projektissa syntetisoidun tetrameerisen oligonukleotidifosforotioaattien stereokemia varmennettiin Snake venom fosfodiesteri-entsyymillä. Tämän lisäksi syntetisoitujen fosforotioaattien  $^{31}\text{P}$  NMR siirtymiä verrattiin toisiinsa. Snake venom fosfodiesteri-entsyymän (svPDE) tiedetään pilkkovan ainoastaan  $R_P$ -diastereomeerisiä 3',5'-tiofosfodiesterisidoksia.<sup>55</sup> Snake venom fosfodiesteri-entsyymän todettiin pilkkovan selektiivisesti  $R_P$ -fosfodiesterisidoksen (Kuva 18).



**Kuva 18.** Tetrameerisen fosforotioaatin **23** HPLC-kromatogrammi entsyymihydrolyysistä (21 h näyte).

### 2.3. Johtopäätökset

Projektissa suojattiin tymidiinin 5'-hydroksyyli-ryhmä atsidometyylibentsoyyl- tai atsidometyyli-ryhmillä. AZMB-suojaryhmä saatiin liitettyä tymidiinin 5'-asemaan 90 %:n selektiivisyydellä. AZMB- sekä AZM-suojaryhmän irtoaminen perustuu Staudingerin pelkistysreaktioon. AZMB-suojaryhmän irtoamisen kinetiikkaa tutkittiin DMF:n, MeCN:n ja DBU:n seoksessa trimetyylifosfiitin, trifenyylifosfiinin tai trimetyylifosfiinin läsnä ollessa. Trimetyylifosfiinia käytettäessä suojaryhmä irtoaa 30 minuutissa.

Syntetisoitu 5'-O-AZMB-tymidiini **6** aktivoitiin (+)- ja (-)- $\Psi$ -reagensseilla, ja näin aktivoituja 5'-O-AZMB-tymidiini rakennusyksikköjä (**16** ja **17**) käytettiin enantiopuhtaiden fosforotioaattien **21**, **22** ja **23** syntetisoimiseen liukoisella saostettavalla kantajalla (**18**). AZMB-suojaryhmä irrottamiseen käytettiin trimetyylifosfiinia. Kantajaan sidotut fosforotioaatit eristettiin sakkauttamalla kylmästä isopropanolista, ja synteesisyklin viimeisessä vaiheessa fosforotioaatti irrotettiin kantajasta ammonolyysillä. Onnistuneesti syntetisoidut fosforotioaattidimeeri T(*R<sub>p</sub>*)T (**21**), -trimeeri 5'-T(*R<sub>p</sub>*)T(*S<sub>p</sub>*)T-3' (**22**), sekä -tetrameeri 5'-T(*R<sub>p</sub>*)T(*S<sub>p</sub>*)T(*S<sub>p</sub>*)T-3' (**23**) karakterisoitiin massaspektrometrisesti sekä NMR:llä. Enantiopuhtaudesta varmistuttiin hydrolysoimalla *R<sub>p</sub>*-tiofosfodiesterisidos Snake venomfosfodiesteri-entsyymillä. Fosforotioaattien <sup>31</sup>P NMR-spektreistä voidaan päätellä, että suojaryhmän irtoamisessa muodostuvasta hapettuneesta fosfiinista, trimetyylifosfiinin oksidista ei päästä kokonaan eroon isopropanolisakkautuksella. Tästä syystä tetrameeri **23** (T4) päätettiin puhdistaa RP-HPLC:llä. Lisäämällä sakkautuskertoja suojaryhmän poiston jälkeen, trimetyylifosfiinioksidin määrä saadaan pienemmäksi.

### 3. Kokeelliset menetelmät

#### 3.1. Yleiset menetelmät

Synteesissä käytettiin kaupallisia reagensseja ja liuottimia. MeCN kuivattiin 3 Å:n molekyylliseuloilla, ja DCM sekä DMF kuivattiin 4 Å:n molekyylliseuloilla. DBU kuivattiin CaH<sub>2</sub>-jauheella, ja kiinteät reagenssit kuivattiin vakuumiyksikkäattorissa fosforipentoksidia kuivausaineena käyttäen. NMR-spektrit mitattiin Bruker Avance 500 tai 600 MHz –laitteistolla. Massaspektrit mitattiin Bruker ESI-micrQTOF massaspektrometrillä, Agilent 6120 ES-API-HPLC-MS kvadrupolimassaspektrometrillä tai Waters RDa HRMS-massaspektrometrillä. HPLC-MS analyysissä käytettiin ODS Hypersil C-18 kolonnia (150 mm x 4,6 mm). Injektio tilavuus oli 50 µl, detektioaallonpituus 260 nm ja virtausnopeus 0,95 ml/min. Ajoliuksena käytettiin veden ja asetonitriilin seosta. Synteesiseurannoissa asetonitriilin pitoisuus oli 10 % ensimmäisen kolmen minuutin aikana, minkä jälkeen pitoisuutta kasvatettiin 80 %:iin 27 minuutin aikana. Suojaryhmän irtoamisen kinetiikkaa tutkittaessa asetonitriilin pitoisuus oli 5 % ensimmäisen kahden minuutin ajan, minkä jälkeen pitoisuus kasvatettiin 50 %:iin 13 minuutin aikana ja edelleen 90 %:iin seuraavan 2 minuutin aikana. Fosforotioaattien kytkentä- ja suojanpoistoreaktioita seurattiin Shimadzun HPLC-laitteella (LC-10AT, FCV-10AL, DGU-14A, SPD-10A) käyttäen Thermo Fischer Scientific ODS HYPERSIL kolonnia (5 µm; 250 mm x 4,6 mm). Ajoliuksina käytettiin trietyyliammoniumasetaatia ja asetonitriiliä (A-ajoliuos: H<sub>2</sub>O, 50 mM TEAA ja B-ajoliuos: 70 % MeCN, 30 % H<sub>2</sub>O ja 50 mM TEAA). Injektio tilavuus oli 15 µl. Gradientissa B-ajoliuksen pitoisuus nostettiin ensimmäisen 25 minuutin aikana 40 %:sta 100 %:iin, minkä jälkeen B-ajoliuksen pitoisuutta pidettiin 5 minuuttia 100 %:ssa. Ammonolyysissä käytettiin samaa laitteistoa ja samoja ajoliuksia A sekä B. Injektio tilavuus oli 10 µl ja detektioaallonpituus 260 nm. Gradientissa B-ajoliuksen pitoisuus pidettiin ensimmäiset 2 min 7 %:ssa, minkä jälkeen sen pitoisuus nostettiin 13 min:ssa 70 %:iin. Semipreparatiiviset puhdistukset tehtiin Shimadzun HPLC:llä. Kolonnina käytettiin semipreparatiivista kolonnia, jonka sisähalkaisija oli 10 mm. Detektioaallonpituus oli 260 nm ja virtausnopeus 3 ml/min. HPLC-puhdistuksissa oli käytössä samat ajoliukset A ja B. Gradientissa B-ajoliuksen pitoisuus oli 17 % ensimmäiset 2 minuuttia. Pitoisuus nostettiin tämän jälkeen 12 minuutissa 30 %:iin, ja tämän jälkeen 4 minuutissa 60 %:iin. Snake venomfosfodiesteriä käytettäessä fosforotioaatin hydrolyysiä seurattiin Shimadzun HPLC:llä ja käytössä oli samat ajoliukset A ja B. Gradientissa B-ajoliuksen pitoisuus oli 2 % ensimmäiset 2 minuuttia. Tämän jälkeen pitoisuus nostettiin 30 %:iin 12 minuutissa, ja

seuraavan 5 minuutin aikana 100 %:iin. Detektioaallonpituus oli 260 nm ja virtausnopeus 0,95 ml/min. Sentrifugin parametrit olivat 5000 rpm, 4 °C ja 20 min.

## 3.2. Synteetit

### 3.2.1. Metyyli-2-bromimetylibentsoaatti

Metyyli-2-metylibentsoaatti (**1**) (1 ekv., 6,65 mmol, 1 g) haihdutettiin hiilitetrakloridista ja kuivattiin eksikkaattorissa yön yli. Yhdiste **1** liuotettiin hiilitetrakloridiin (23 ml) ja reaktioluokseen lisättiin NBS (1,1 ekv., 7,32 mmol, 1,30 g) ja bentsoyyliperoksidi (0,02 ekv., 0,133 mmol, 32,2 mg). Reaktioluosta sekoitettiin ja refluksoitettiin 4 h 80 °C:ssa. Reaktion etenemistä seurattiin ohutlevykromatografisesti, käyttäen ajoliuoksena etyyliasetaatin ja heksaanin seosta (5:95). Reaktioliuoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi, minkä jälkeen se suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Tuote kuivattiin vakuumieksikkaattorissa. Tuotteen **2** saanto oli 1,52 g (99 %).  $R_f = 0,21$ . Reaktio toistettiin identtisesti, jolloin tuotteen **2** saanto oli 1,25 g (82 %).

### 3.2.2. Metyyli-2-metyyliatsidobentsoaatti

Yhdiste **2** (5,45 mmol, 1,25 g) liuotettiin DMF:ään (4,5 ml) ja reaktioluokseen lisättiin natriumatsidia (1,8 ekv., 11,9 mmol, 0,78 g) sekä katalyyttinen määrä litiumkloridia  $N_2$ -ilmakehässä. Reaktioluosta sekoitettiin yön yli, minkä jälkeen liuoksen lämpötila nostettiin 120 °C:een ja reaktion sekoitusta jatkettiin 2 h. Lämmitys poistettiin ja sekoitusta jatkettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Reaktioliuos haihdutettiin alipaineessa. Haihdutusjäännökseen lisättiin vettä (20 ml) ja vesifaasia uutettiin dietyylieetterillä (3 x 20 ml). Orgaanista faasia pestiin vedellä (2 x 20 ml), minkä jälkeen orgaaninen faasi kuivattiin  $Na_2SO_4$ :lla, suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen ajoliuoksena dikloorimetaania. Tuotteen **3** saanto oli 307 mg (24 %). Tuote karakterisoitiin  $^1H$  NMR:llä (Liite 1).  $R_f = 0,59$ . ESI-MS  $m/z$  löydetty 214,0552  $[M+Na]^+$ , laskettu 214,1798.  $^1H$  NMR  $\delta_H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,05 (1H, d,  $J = 7,88$  Hz, Bz); 7,58 (1H, t,  $J = 8,22$  Hz, Bz); 7,53 (1H, d,  $J = 8,22$  Hz, Bz); 7,43 (1H, t,  $J = 7,59$  Hz, Bz); 4,85 (2H, s,  $CH_2N_3$ ); 3,95 (3H, s,  $CH_3$ ).

Atsidointi toistettiin projektin aikana seuraavasti. Yhdiste **2** (6,63 mmol, 1,52 g) liuotettiin etanoliin (15 ml), ja liuos suodatettiin. Liuos jaettiin kahteen eri keittopulloon. Toiseen lisättiin etanolin ja veden (1:2, v/v) seosta (10 ml) ja toiseen lisättiin etanolia (10 ml). Molempiin reaktioluoksiin lisättiin natriumatsidia (0,2 g), ja liuoksien sekoitusta jatkettiin 14 vrk. Tämän jälkeen liukset yhdistettiin ja haihdutettiin alipaineessa. Haihdutusjäännökseen lisättiin vettä

(20 ml), ja sitä uutettiin dietyylieetterillä (3 x 20 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla. Orgaaninen liuos suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen ajoliuoksena DCM:ää. Tuotteen **3** saanto oli 229 mg (22 %) ja se karakterisoitiin NMR:llä (Liite 2). <sup>1</sup>H NMR δ<sub>H</sub> (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,06 (1H, d, *J* = 8,05 Hz, Bz); 7,58 (1H, t, *J* = 7,76, Bz); 7,52 (1H, d, *J* = 7,81 Hz, Bz); 7,43 (1H, t, *J* = 7,46, Bz); 4,84 (2H, s, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 3,95 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

### 3.2.3. 2-Atsidometyyllibentsoehappo

Yhdiste **3** (1,60 mmol, 307 mg) liuotettiin 2 M:een natriumhydroksidin metanoli -liuokseen (25 ml) ja reaktioliuosta sekoitettiin 2 h huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen reaktioliuos uutettiin dikloorimetaanilla (3 x 20 ml). Vesifaasiin lisättiin 2 M:sta HCl-liuosta (20 ml) kunnes liuoksesta tuli selvästi hapan (pH = 1). Vesifaasia pestiin dikloorimetaanilla (4 x 20 ml) ja orgaaniset faasit yhdistettiin. Orgaaniset faasit kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin alipaineessa. Tuotteen **4** saanto oli 74 mg (35 %). Tuote karakterisoitiin <sup>1</sup>H ja <sup>13</sup>C NMR:llä (Liitteet 3 ja 4). <sup>1</sup>H NMR δ<sub>H</sub> (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,20 (1H, d, *J* = 8,36 Hz, Bz); 7,66 (1H, t, *J* = 7,80 Hz, Bz); 7,59 (1H, d, *J* = 7,76 Hz, Bz); 7,49 (1H, t, *J* = 7,98 Hz, Bz); 4,92 (2H, s, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>) <sup>13</sup>C NMR δ<sub>C</sub> (126 Hz, CDCl<sub>3</sub>): 172,3 (COOH); 138,3 (C1); 133,8 (C2); 132,2 (C3); 129,8 (C6); 128,2 (C4 ja C5); 53,1 CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

Synteesi toistettiin. Lähtöaineena käytettiin metyyli-2-metyyliatsidobentsoaattia (**3**) (229 mg 1,19 mmol). Tuotteen **4** saanto oli 60 mg (20 %). Tuote karakterisoitiin <sup>1</sup>H NMR:llä (Liite 5). <sup>1</sup>H NMR δ<sub>H</sub> (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,20 (1H, d, *J* = 8,18 Hz, Bz); 7,66 (1H, t, *J* = 8,26 Hz, Bz); 7,59 (1H, d, *J* = 11,99 Hz, Bz); 7,49 (1H, t, *J* = 7,94 Hz, Bz); 4,92 (2H, s, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>).

### 3.2.4. 5'-O-2-(Atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini

Yhdiste **4** (1 ekv., 0,746 mmol, 132 mg) liuotettiin dikloorimetaaniin (3 ml) ja reaktioliuokseen lisättiin pyridiini (60 μl) ja tionyylikloridi (1,2 ekv., 0,895 mmol, 65 μl) typpikaapissa. Reaktioliuosta sekoitettiin 2 h 50 min ja reaktiota seurattiin TLC:llä käyttäen ajoliuoksena metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:9). 2-Atsidometyyllibentsoyylikloridin (**5**) muodostuminen havaittiin TLC:llä (R<sub>f</sub> = 0,86). Reaktioseos lisättiin pisaroittain kuivaan pyridiiniin (5 ml) liuotettun tymidiinin joukkoon (1,3 ekv., 0,23 g kuivattu haihduttamalla kuivasta pyridiinistä (3 x 5 ml) N<sub>2</sub>-ilmakehässä jäävesihauteessa. Reaktioliuosta sekoitettiin 1 h. Reaktiota seurattiin TLC:llä käyttäen ajoliuoksena metanolin ja dikloorimetaanin seosta

(1:9). Sekoitusta jatkettiin yön yli. Reaktioliuokseen lisättiin katalyyttinen määrä DMAP:a ja liuosta sekoitettiin 2 h. Reaktioliuos haihdutettiin alipaineessa, ja siihen lisättiin dikloorimetaania (30 ml). Orgaanista faasia pestiin 5 %:lla NaHCO<sub>3</sub>-liuoksella (3 x 20 ml) ja vesifaasia uutettiin DCM:llä (4 x 30 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin, kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>:lla ja suodatettiin alipaineessa. Orgaaninen liuos haihdutettiin, ja muodostunut raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin 5 %:sta MeOH-DCM-liuosta. Tuotteen **6** saanto oli 57,9 mg (19 %). Tuote karakterisoitiin <sup>1</sup>H ja <sup>13</sup>C NMR:llä (Liitteet 6 ja 7). R<sub>f</sub> = 0,46. <sup>1</sup>H NMR δ<sub>H</sub> (500 MHz, DMSO): 11,98 (1H, s, NH); 8,02 (1H, d, *J* = 8,21 Hz, Bz H6); 7,73 (1H, t, *J* = 7,86 Hz, Bz H3); 7,64 (1H, d, *J* = 7,86 Hz, Bz H4); 7,59 (1H, t, *J* = 7,65 Hz, Bz H5); 7,47 (1H, H6); 6,28 (1H, dd, *J* = 7,32 ja 13,28 Hz, H1'); 5,57 (1H, d, *J* = 4,03 Hz, 3'-OH); 4,84 (2H, s, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 4,55-4,60 (1H, m, H5''); 4,48-4,53 (1H, m, H5'); 4,41-4,46 (1H, m, H3'); 4,10-4,14 (1H, m, H4'); 2,32 (1H, d, *J* = 6,45 Hz, H2''); 2,23 (1H, d, *J* = 5,34 Hz, H2'); 1,67 (3H, s, Me) <sup>13</sup>C NMR δ<sub>C</sub> (126 Hz, DMSO): 166,5 (COOH); 164,1 (C4); 150,9 (C2); 136,9 (C6); 133,4 (Bz C1); 131,2 (Bz C2); 130,9 (Bz C6); 129,5 (Bz C4); 129,1 (Bz C5); 110,5 (C5); 84,5 (C1'); 84,0 (C4'); 70,7 (C3'); 65,3 (C5'); 52,3 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 39,0 (C2'); 12,2 (CH<sub>3</sub>).

Yhdiste **6** syntetisoitiin myös kaupallisesta 2-atsidometyyli-bentsoehaposta (1 ekv., 4,2 mmol, 750 mg). Reaktio toistettiin kuten edellä on kuvattu. Tuotteen **6** saanto oli 21 %. <sup>1</sup>H NMR (Liite 8) δ<sub>H</sub> (500 MHz, DMSO): 11,30 (1H, s, NH); 8,95 (1H, d, *J* = 7,89 Hz, Bz H6); 7,67 (1H, t, *J* = 7,57 Hz ja *J* = 15,35 Hz, Bz H3); 7,57 (1H, d, *J* = 7,70 Hz, Bz H4); 7,52 (1H, t, *J* = 7,89 Hz ja *J* = 16,90 Hz, Bz H5); 7,41 (1H, H6); 6,22 (1H, t, *J* = 6,72 Hz ja *J* = 13,76 Hz, H1'); 5,49 (1H, d, *J* = 4,50 Hz, 3'-OH); 4,78 (2H, s, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 4,52 (1H, dd, *J* = 3,20 Hz ja *J* = 15,49 Hz, H5''); 4,44 (1H, dd, *J* = 6,20 Hz ja *J* = 18,20 Hz, H5'); 4,38 (1H, m, *J* = 9,68 Hz, H3'); 4,10 (1H, m, *J* = 24,7 Hz, H4'); 2,241 (1H, m, *J* = 34,40 Hz, H2''); 2,16 (1H, m, *J* = 31,62 Hz, H2'); 1,62 (3H, s, Me).

### 3.2.5. 3',5'-Bis-*O*-*tert*-butyyli-dimetyylisilyyli-tymidiini

Yhdiste **7** (20,6 mmol, 5 g) liuotettiin pyridiiniin (46 ml) ja reaktioliuokseen lisättiin TBDMS-Cl (2,5 ekv. 51,6 mmol, 7,8 g). Reaktioliuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 5 vrk. Reaktio-etenemistä seurattiin TLC:llä, jonka ajoliuoksena käytettiin heksaanin ja etyyliasetaatin seosta (1:1). Reaktioliuokseen lisättiin jäävettä (46 ml), ja se haihdutettiin kuiviin. Haihdutusjäännös liuotettiin etyyliasetaattiin (230 ml) ja sitä pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:lla (3 x 125 ml) sekä kylläisellä NaOH:lla (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla ja haihdutettiin kuiviin.



Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin etyyliasetaatin ja heksaanin seosta (1:1). Tuotteen **8** saanto oli 7,4 g (76 %). Tuote karakterisoitiin NMR:llä ja massaspektrometrisesti (Liitteet 9 ja 10). ESI-MS  $m/z$  471,25  $[M+H]^+$  havaittu, 470,2632 laskettu.  $^1\text{H}$  NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,27 (1H, s, NH); 7,35 (1H, d,  $J = 1,01$  Hz, H6); 6,21 (1H, dd,  $J = 6,89$  ja 13,80 Hz, H1'); 4,29 (1H, m, H4'); 3,82 (1H, q,  $J = 2,45$  ja 4,82 Hz, H3'); 3,75 (1H, dd,  $J = 2,67$  ja 11,02 Hz, H5''); 3,64 (1H, dd,  $J = 2,36$  ja 11,09 Hz, H5'); 2,13 (1H, m, H2''); 1,88 (1H, m, H2'); 1,80 (3H, d,  $J = 0,90$  Hz, Me); 0,815 (9H, s, *tert*-but 3 x Me); 0,780 (9H, s, *tert*-but 3 x Me); -0,001 (6H, d,  $J = 1,16$  Hz 2 x Me); -0,035 (6H, d,  $J = 3,67$  Hz, 2 x Me)  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta_{\text{C}}$  (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163,5 (C4); 150,1 (C2); 135,4 (C6); 110,8 (C5); 87,8 (C1'); 84,8 (C4'); 72,2 (C3'); 63,0 (C5'); 41,3 (C2'); 25,9 (3 x  $\text{CH}_3$ ); 25,7 (3 x  $\text{CH}_3$ ); 18,4 (C); 18,0 (C); 12,5 ( $\text{CH}_3$ ); -4,6 ( $\text{CH}_3$ ); -4,8 ( $\text{CH}_3$ ); -5,3 ( $\text{CH}_3$ ); -5,4 ( $\text{CH}_3$ ).

### 3.2.6. 3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-tymidiini

Yhdiste **8** liuotettiin metanoliin (360 ml) ja liuos jäädytettiin  $-10$  °C:een suola/jäävesihauteessa. Asetyylikloridi (0,2 ekv. 3,96 mmol, 283  $\mu\text{l}$ ) lisättiin reaktioliuokseen hitaasti. Liuoksen lämpötila nostettiin  $0$  °C:een, ja sitä sekoitettiin 3,5 h. Reaktiota seurattiin TLC:llä käyttäen ajoliuoksena etyyliasetaatin ja heksaanin (1:1) seosta. Liuokseen lisättiin kylläistä  $\text{NaHCO}_3$  (150 ml) ja sitä sekoitettiin 15 min. Reaktioliuokseen pestiin vielä  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 100 ml), vedellä (100 ml) ja  $\text{NaCl}$ :lla (100 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ :lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin etyyliasetaatin ja heksaanin (1:1) seosta. Tuotteen **9** saanto oli 3,3 g (59 %). Tuote karakterisoitiin NMR:lla (liitteet 11 ja 12).  $^1\text{H}$  NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,27 (1H, s, NH); 7,37 (1H, d,  $J = 1,23$  Hz, H6); 6,14 (1H, t,  $J = 7,00$  ja 13,59 Hz, H1'); 4,51 (1H, m, H4'); 3,94 (2H, m, H5' ja H5''); 3,78 (1H, m, OH); 2,39 (2H, m, H2' ja H2''); 2,24 (1H, m, H3'); 1,94 (3H, d,  $J = 1,28$  Hz,  $\text{CH}_3$ ); 0,92 (9H, t,  $J = 2,66$  ja 5,71 Hz, 3 x  $\text{CH}_3$ ); 0,113 (6H, t,  $J = 2,15$  ja 5,84 Hz, 2 x  $\text{CH}_3$ )  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta_{\text{C}}$  (126 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ): 163,3 (C4); 150,2 (C2); 137,0 (C6); 111,0 (C5); 87,5 (C1'); 87,1 (C4'); 71,6 (C3'); 62,1 (C5'); 40,4 (C2'); 25,7 (3 x  $\text{CH}_3$ ); 17,9 (C); 12,5 ( $\text{CH}_3$ ); -4,6 ja -4,8 (2 x  $\text{CH}_3$ ).

### 3.2.7. 5'-*O*-Metyylitiometyyli-3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-tymidiini

Yhdiste **9** (1 ekv. 4,71 mmol, 1,68 g) liuotettiin etikkahappoanhydridin (10 ml) ja DMSO:n (15 ml) seokseen. Reaktioseosta sekoitettiin 26 h ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä. Ajoliuoksena käytettiin metanolin ja dikloorimetaanin seosta (8:92). Reaktioliuokseen lisättiin

10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:n vesiliuos (140 ml) ja vesifaasia uutettiin dietyylieetterillä (4 x 50 ml). Orgaaniset faasit kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin 5 % ja 10 % metanolin ja dikloorimetaanin seosta. Tuotteen **10** saanto oli 1,70 g (43 %) ja se karakterisoitiin NMR:llä (liitteet 13 ja 14). ESI-MS *m/z* havaittu 417,20 [M+H]<sup>+</sup> 416,1801 laskettu, <sup>1</sup>H NMR δ<sub>H</sub> (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,56 (1H, s, NH); 7,44 (1H, s, H6); 6,22 (1H, t, *J* = 6,50 ja 12,76 Hz, H1'); 4,30 (1H, m, H4'); 3,93 (1H, d, *J* = 3,17 Hz, H3'); 3,66 (2H, m, H5' ja H5''); 2,62 (2H, dd, *J* = 11,54 ja 21,90 Hz, S-CH<sub>2</sub>-O); 2,18 (1H, m, H2'), 2,08 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2,01 (1H, m, H2''); 1,84 (3H, s, S-CH<sub>3</sub>); 0,81 (9H, s, 3 x CH<sub>3</sub>); 0,0007 (6H, s, 2 x CH<sub>3</sub>) <sup>13</sup>C NMR δ<sub>C</sub> (126 Hz, CDCl<sub>3</sub>): 163,6 (C4); 150,2 (C2); 135,7 (C6); 110,7 (C5); 86,0 (C1'); 84,9 (C4'); 76,0 (S-CH<sub>2</sub>-O); 71,9 (C3'); 67,3 (C5'); 41,2 (C2'); 25,7 (3 x CH<sub>3</sub>); 17,9 (C); 14,3 (CH<sub>3</sub>-S); 12,7 (CH<sub>3</sub>); -4,6 (CH<sub>3</sub>); -4,84 (CH<sub>3</sub>). Synteesi toistettiin yhdisteelle **9** (1 ekv. 4,57 mmol, 1,63 g).

### 3.2.8. 5'-O-Metyylitiometyyli-tymidiini

Yhdiste **10** (1 ekv. 4,08 mmol, 1,7 g) liuotettiin 1 M:een TBAF:n liuokseen (1,5 ekv., 6,1 mmol, 6,12 ml). Reaktioliuosta sekoitettiin 2 h, minkä jälkeen tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:9). Tuotteen **11** saanto oli 1,13 g (91 %). Tuote karakterisoitiin NMR:llä (Liitteet 15 ja 16). <sup>1</sup>H NMR δ<sub>H</sub> (500 MHz, DMSO): 11,37 (1H, s, NH); 7,59 (1H, s, H6); 6,24 (1H, t, *J* = 6,94 ja 13,99 Hz, H1'); 5,40 (1H, d, *J* = 6,94 Hz, H4'); 4,78 (2H, t, *J* = 12,41 ja 24,02 Hz, S-CH<sub>2</sub>); 4,28 (1H, s, OH); 3,96 (1H, d, *J* = 4,01 Hz, H3'); 3,74 (1H, dd, *J* = 4,10 ja 10,79 Hz, H5''); 3,67 (1H, dd, *J* = 4,79 ja 9,70 Hz, H5'); 2,56 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2,16 (2H, m, H2' ja H2''); 1,84 (3H, s, S-CH<sub>3</sub>) <sup>13</sup>C NMR δ<sub>C</sub> (126 Hz, DMSO): 164,1 (C4); 150,9 (C2); 136,2 (C6); 110,0 (C5); 85,5 (C1'); 84,3 (C4'); 75,3 (S-CH<sub>2</sub>-O); 71,2 (C3'); 68,3 (C5'); 39,4 (C2'); 13,9 (S-CH<sub>3</sub>); 12,7 (CH<sub>3</sub>).

### 3.2.9. 5'-O-Metyyliatsidotymidiini

Yhdiste **11** (1 ekv., 0,429 mmol, 130 mg) liuotettiin DMF:ään (8 ml) ja liuokseen lisättiin NBS-Cl (1,6 ekv., 0,688 mmol, 152 mg). Liuosta sekoitettiin 5 min ja reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä. Ajoliuoksena käytettiin metanolin ja dikloorimetaanin seosta (1:9). Väliuotteen **12** muodostumisen havaitsemisen jälkeen reaktioliuos siirrettiin jäähauteeseen, ja reaktioliuokseen lisättiin NaN<sub>3</sub> (5 ekv., 2,15 mmol, 139 mg) ja sekoitusta jatkettiin 5 min. Reaktioliuos puhdistettiin silikageelikromatografisesti kahdesti. Tuotteen **13** saanto oli 19 mg (14 %) ja se

karakterisoitiin NMR:lla (liitteet 17 ja 18).  $^1\text{H}$  NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, DMSO): 11,30 (1H, s, NH); 7,50 (1H, s, H6); 6,19 (1H, t,  $J = 6,88$  ja  $14,01$  Hz H1'); 5,38 (1H, d,  $J = 4,27$  Hz, H4'); 4,84 (2H, m, H5' ja H5''); 4,23 (1H, m, OH); 3,80 (1H, m, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 3,72 (1H, m, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 2,50 (1H, s, H3'); 2,12 (2H, m, H2' ja H2''); 1,79 (3H, s, CH<sub>3</sub>)  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta_{\text{C}}$  (126 Hz, DMSO): 164,1 (C4); 150,9 (C2); 136,2 (C6); 110,0 (C5); 85,2 (C1'); 84,3 (C4'); 83,0 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 71,0 (C3'); 69,7 (C5'); 39,3 (C2'); 12,6 (CH<sub>3</sub>).

### 3.2.10. (+)- $\Psi$ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini

(+)- $\Psi$ -Reagenssi (**14**) (1,3 ekv. 0,584 mmol, 260 mg) liuotettiin asetonitriiliin (4,15 ml) ja reaktioliuokseen pipetoitiin yhdiste **6** (1 ekv. 0,448 mmol, 180 mg). Reaktioliuos jäädytettiin jäävesihauteessa sekoittaen. Reaktioliuokseen lisättiin DBU (1,3 ekv. 87  $\mu\text{l}$ ) ja jäähaude poistettiin. Reaktio etenemistä seurattiin TLC:llä käyttäen ajoliuoksena etyyliasetaattia. Reaktio eteni loppuun yhden tunnin aikana. Tuote eluoiitiin 2,5 cm paksuisen silikakerroksen läpi lasisinterissä. Tuotefraktiot yhdistettiin ja orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:lla (50 ml) ja vedellä (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO<sub>4</sub>:lla ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Tuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti käyttäen ajoliuoksena heksaanin ja etyyliasetaatin seosta (1:3). Tuotteen **16** saanto oli 139 mg (48 %). Tuote karakterisoitiin NMR:llä (Liitteet 19–21). ESI-HRMS  $m/z$  648,1722 [M-H]<sup>-</sup> havaittu;  $m/z$  648,1710 [M-H]<sup>-</sup> laskettu.  $^1\text{H}$  NMR  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,99 (1H, d,  $J = 8,18$  Hz, NH); 7,96 (1H, s, H6); 7,60 (1H, dd,  $J = 7,66$  ja  $J = 15,42$  Hz, Bz); 7,54 (1H, d,  $J = 7,78$  Hz, Bz); 7,42 (1H, t,  $J = 8,05$  ja  $J = 15,84$  Hz, Bz); 7,12 (1H, d,  $J = 1,12$  Hz, Bz); 6,36 (1H, td  $J = 6,17$  ja  $J = 14$  Hz, H1'); 5,06 (1H, s, H4'); 4,90 (1H, s, H3'); 4,82 (2H, q,  $J = 14,67$  ja  $J = 23,47$  Hz, H5' ja H5''); 4,62 (2H, m, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 4,49 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,62 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,29 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,14 (1H, td,  $J = 5,70$  ja  $15,90$  ja  $28,48$  Hz, CH); 1,98 (2H, m, H2' ja H2''); 1,89 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 1,80 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1,76 (1H, m, CH); 1,71 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1,64 (3H, d,  $J = 1,03$  Hz, CH<sub>3</sub>)  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta_{\text{C}}$  (126 Hz, CDCl<sub>3</sub>): 165,9 (COOH); 162,8 (C4); 149,8 (C2); 144,8 (C=C); 137,9 (Bz C6); 134,5 (C6); 133,3 (Bz, Cl); 130,6 (Bz, C2); 130,2 (Bz, C5); 128,3 (Bz, C3); 127,9 (Bz, C4); 112,0 (C5); 111,7 (C=C); 86,3 (C1'); 84,8 (C4'); 82,7 (CH); 66,0 (C5'); 63,7 (C3'); 52,9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 38,8 (C); 33,7 (C2'); 33,7 (CH); 27,7; 27,6 ja 23,4 (CH<sub>2</sub>); 22,7; 21,7 ja 12,1 (CH<sub>3</sub>)  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_{\text{P}} = 101,81$  ppm.

### 3.2.11. (-)-Ψ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini

(-)-Ψ-Reagenssi (**15**) (1,3 ekv. 0,559 mmol, 249 mg) liuotettiin asetonitriiliin (4 ml), ja reaktioliuokseen lisättiin yhdiste **6** (1 ekv. 0,429 mmol, 172 mg). Reaktioliuos jäädytettiin jäähauteessa sekoittaen. Reaktioliuokseen lisättiin DBU (1,3 ekv. 87  $\mu$ l) ja jäähaude poistettiin. Reaktion etenemistä seurattiin TLC:lla käyttäen ajoliuoksena etyyliasetaatia. Reaktio eteni loppuun yhden tunnin aikana. Tuote eluoiitiin 2,5 cm paksuisen silikakerroksen läpi lasisinterissä. Tuotefraktiot yhdistettiin ja orgaanista faasia pestiin kylläisellä NaHCO<sub>3</sub>:lla (50 ml) ja tislattulla vedellä (50 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin MgSO<sub>4</sub>:lla ja haihdutettiin kuiviin alipaineessa. Raakatuote puhdistettiin silikageelikromatografisesti. Ajoliuoksena käytettiin heksaanin ja etyyliasetaatin seosta (1:3). Tuotteen **17** saanto oli 152 mg (54 %). Tuote karakterisoitiin NMR:llä (Liitteet 22–24). ESI-HRMS m/z 648,1709 [M-H]<sup>-</sup> havaittu; m/z 648,1710 [M-H]<sup>-</sup> laskettu. <sup>1</sup>H NMR  $\delta_H$  (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,27 (1H, s, NH); 7,97 (1H, d, *J* = 8,02 Hz, H6); 7,65 (1H, t, *J* = 7,42 ja 14,85 Hz, Bz); 7,53 (1H, d, *J* = 7,57 Hz, Bz); 7,42 (1H, t, *J* = 8,00 ja 15,93 Hz, Bz); 7,17 (1H, s, Bz); 6,36 (1H, td, *J* = 2,00 ja 6,16 Hz, H1'); 5,06 (1H, s, H4'); 4,91 (1H, s, H3'); 4,82 (2H, q, *J* = 14,68 ja 22, 21 Hz, H5' ja H5''); 4,60 (2H, m, H2' ja H2''); 4,48 (2H, m, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 2,61 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,30 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 2,14 (1H, m, CH); 1,98 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 1,89 (2H, m, CH<sub>2</sub>); 1,80 (3H, s, Me); 1,76 (1H, CH); 1,70 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1,64 (3H, s, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR  $\delta_C$  (126 Hz, CDCl<sub>3</sub>): 165,9 (COOH); 163,1 (C4); 149,7 (C2); 144,7 (C=C); 137,9 (Bz); 134,5 (C6); 133,3 (Bz); 130,6 (Bz); 130,2 (Bz); 128,3 (Bz); 127,9 (Bz); 112,7 (Bz); 111,6 (C=C); 86,2 (C1'); 84,7 (C4'); 82,6 (CH); 66,1 (C5'); 63,8 (C3'); 52,9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 38,9 (C); 33,7 (C2'); 33,6 (CH); 27,8; 27,7 ja 23,4 (CH<sub>2</sub>); 22,7; 21,7 ja 12,2 (CH<sub>3</sub>) <sup>31</sup>P NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta_P$  = 101,95 ppm.

### 3.2.12. 5'-T(R<sub>p</sub>)T-3'

Yhdiste **16** (6,66 ekv., 0,108 mmol, 70 mg) liuotettiin asetonitriiliin (260  $\mu$ l) ja yhdiste **18** (1 ekv., 16,2  $\mu$ mol, 31,6 mg) liuotettiin DMF:ään (260  $\mu$ l). Yhdiste **16** lisättiin asetonitriilissä DMF:ään liuotetun yhdisteen **18** joukkoon typpi-ilmakehässä. Reaktioliuokseen lisättiin DBU (10,8 ekv., 0,175 mmol, 26  $\mu$ l). Reaktio eteni loppuun 30 min:ssa. Reaktioliuos siirrettiin vetokaappiin ja reaktioliuokseen lisättiin DCA (1,05 ekv. suhteessa DBU:hun, 0,184 mmol, 15  $\mu$ l). Reaktioliuos sakkautettiin kylmästä isopropanolista (12 ml), ja se sentrifugoitiin. Tuote **19** kuivattiin eksikkaattorissa. Sakka liuotettiin asetonitriiliin (201  $\mu$ l) ja DMF:n (201  $\mu$ l) seokseen. Reaktioliuokseen lisättiin trimetyylifosfiini (8 ekv., 0,128 mmol, 130  $\mu$ l). Reaktio eteni loppuun

60 min:ssa. Reaktioliuos sakkautettiin kylmästä isopropanolista (12 ml), ja se sentrifugoitiin. Sakka kuivattiin eksikkaattorissa. Suojaryhmän poistamisen jälkeen kantajassa kiinnioleva yhdiste **20** (0,664  $\mu$ mol, 3 mg) punnittiin eppendorfiin ja sen joukkoon pipetoitiin ammoniakkia (1,2 ml). Reaktioliuosta pidettiin 55 °C 3 h. Ammoniakki haihdutettiin alipaineessa ja haihdutusjäännös suodatettiin lasisintterillä. Suodos siirrettiin mittapulloon, joka täytettiin MilliQ:lla merkkiin. Ammonolyysin saanto oli 70 %. Spektrofotometrillä mitatun absorbanssin avulla tuotteen **21** kokonaissaannoksi määritettiin 35 %. Yhdiste karakterisoitiin  $^{31}\text{P}$  NMR:llä (Liite 25). ESI-HRMS  $m/z$  561,1008  $[\text{M}-\text{H}]^-$  havaittu;  $m/z$  561,1062  $[\text{M}-\text{H}]^-$  laskettu  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{P}} = 55,33$  ppm.

### 3.2.13. 5'-T(S<sub>P</sub>)T(R<sub>P</sub>)T-3'

Yhdiste **17** (6,66 ekv., 50,5  $\mu$ mol, 32,7 mg) liuotettiin asetonitriiliin (122  $\mu$ l) ja yhdiste **20** (1 ekv., 7,58  $\mu$ mol, 24,5 mg) liuotettiin DMF:ään (122  $\mu$ l). Yhdiste **17** lisättiin asetonitriilissä yhdisteen **20** DMF-liuokseen  $\text{N}_2$ -ilmakehässä. Reaktioliuokseen lisättiin DBU (10,8 ekv., 82  $\mu$ mol, 13  $\mu$ l). Reaktio eteni loppuun 30 min:ssa. Reaktioliuos siirrettiin vetokaappiin ja siihen lisättiin DCA (1,05 ekv. suhteessa DBU:hun, 0,86  $\mu$ mol, 7  $\mu$ l). Reaktioliuos sakkautettiin kylmästä isopropanolista (6,5 ml) ja se sentrifugoitiin. Sakka kuivattiin eksikkaattorissa. Sakka liuotettiin asetonitriiliin (90  $\mu$ l) ja DMF:n (90  $\mu$ l) seokseen. Reaktioliuokseen lisättiin trimetyylifosfiini (8 ekv., 0,128 mmol, 59  $\mu$ l). Reaktio eteni loppuun 60 min:ssa. Reaktioliuos sakkautettiin kylmästä isopropanolista (12 ml) ja sakka kuivattiin eksikkaattorissa. Yhdiste punnittiin eppendorfiin ja sen joukkoon lisättiin ammoniakkia (1,2 ml). Reaktioliuosta pidettiin 55 °C:ssa 3 h. Ammoniakki haihdutettiin alipaineessa ja haihdutusjäännös suodatettiin lasisintterillä. Suodos siirrettiin mittapulloon, joka täytettiin MilliQ:lla merkkiin. Ammonolyysin saanto oli 70 %. Spektrofotometrillä mitatun absorbanssin avulla tuotteen **22** kokonaissaannoksi määritettiin 22 %. Yhdiste karakterisoitiin  $^{31}\text{P}$  NMR:llä (Liite 26). ESI-HRMS  $m/z$  881,129  $[\text{M}-\text{H}]^-$  havaittu; 881,127  $[\text{M}-\text{H}]^-$  laskettu.  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{P}} = 55,23$  ja 55,14 ppm.

### 3.2.14. 5'-T(S<sub>P</sub>)T(S<sub>P</sub>)T(R<sub>P</sub>)T-3'

Yhdiste **17** (6,66 ekv., 25,9  $\mu$ mol, 16,8 mg) liuotettiin asetonitriiliin (70  $\mu$ l) ja kantajaan sidottu trimeeri **22** (1 ekv., 3,90  $\mu$ mol, 17,6 mg) liuotettiin DMF:ään (70  $\mu$ l)  $\text{N}_2$ -ilmakehässä. Liuokset yhdistettiin. Reaktioliuokseen lisättiin DBU (10,8 ekv., 42,1  $\mu$ mol, 7  $\mu$ l). Reaktio eteni loppuun 120 min:ssa. Reaktioliuos siirrettiin vetokaappiin ja siihen lisättiin DCA (1,05 ekv. suhteessa

DBU:hun, 44,2  $\mu$ mol, 4  $\mu$ l). Reaktioliuos sakkautettiin kylmästä isopropanolista (4 ml), ja se sentrifugoitiin. Sakka kuivattiin eksikkaattorissa. Sakka liuotettiin asetonitriiliin (35  $\mu$ l) ja DMF:n (35  $\mu$ l) seokseen. Reaktioliuokseen lisättiin trimetyylifosfiini (8 ekv., 23  $\mu$ mol, 24  $\mu$ l). Reaktio eteni loppuun 180 min:ssa. Reaktioliuos sakkautettiin kylmästä isopropanolista (3 ml). Sakka kuivattiin eksikkaattorissa. Yhdiste (2,3  $\mu$ mol, 18,2 mg) punnittiin eppendorfiin ja sen joukkoon lisättiin ammoniakkaa (1,2 ml). Reaktioliuosta pidettiin 55 °C:ssa 3 h. Ammoniakki haihdutettiin alipaineessa ja haihdutusjäännös suodatettiin lasisintterillä. Suodos siirrettiin mittapulloon, joka täytettiin MilliQ:lla merkkiin. Ammonolyysin saanto oli 100 %. Spektrofotometrillä mitatun absorbanssin avulla tuotteen **23** kokonaissaannoksi määritettiin 17 %. Yhdiste karakterisoiitiin NMR:llä sekä HRMS:lla (liitteet 27–29).  $^{31}\text{P}$  NMR (202 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta_{\text{P}} = 55,45$  ppm ja  $55,29$  ppm  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 7,70 (3H, d,  $J = 16,70$  Hz, H6); 7,58 (1H, s, H6); 6,23 (3H, q,  $J = 8,56$  ja  $15,90$  Hz, H1'); 6,14 (1H, t,  $J = 6,17$  ja  $13,59$  Hz, H1'); 5,01 (3H, m, H3'); 4,897 (1H, m, H3'); 4,51 (1H, m, H4'); 4,35 (2H, m, H4'); 4,16 (1H, m, H4'); 4,11 (6H, m, 5' ja 5''); 3,75 (2H, m, 5' ja 5''); 3,00 (2H, m, OH); 2,46 (4H, m, 2 x H2' ja 2 x H2''), 2,28 (4H, m, 2 x H2' ja 2 x H2''); 1,79 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 1,30 (3H, m,  $\text{CH}_3$ ); 1,10 (3H, m,  $\text{CH}_3$ ); 0,89 (3H, m,  $\text{CH}_3$ )  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 166,3, 166,2 ja 166,2 (C4); 151,5, 151,4, 151,4 ja 151,3 (C2); 137,3; 137,2; 137,1 ja 137,1 (C6); 111,7; 111,6; 111,5 ja 111,3 (C5); 85,6; 85,5; 85,5 ja 85,4 (C4'); 85,1; 85,1; 85,0 ja 84,9 (C1'); 76,6; 76,3; 75,3 ja 75,3 (C3'); 70,8; 65,0; 65,0 ja 61,0 (C5'); 39,0; 38,0; 37,7 ja 22,9 (C2'); 11,7; 11,7; 11,6 ja 11,5 ( $\text{CH}_3$ ).

### 3.3. Kineettiset menetelmät

#### 3.3.1. 2-(Atsidometyyli)bentsooyli-suojaryhmän irtoamisen kinetiikkatutkimukset

Suojaryhmän irtoamista tymidiinin 5'-asemasta tutkittiin fosfiitin ja fosfiinien läsnäollessa ja reaktioita seurattiin Agilent 6120 ES-API HPLC-MS kvadropolimassaspektrometrillä.

*Testi 1.*  $(\text{MeO})_3\text{P}=\text{O}$  (4 ekv.): 5'-O-AZMB-tymidiini (**6**) (2,5 mg, 1 ekv.) liuotettiin DMF:n (16  $\mu$ l) ja MeCN:n (16  $\mu$ l) seokseen ja reaktioliuokseen lisättiin DBU (9,3  $\mu$ l, 1 ekv.) ja trimetyylifosfiitti (1 M, 25  $\mu$ l, 4 ekv.). Reaktion etenemistä seurattiin TLC:llä (ajoliuos 10 % MeOH/DMC) ja HPLC-MS:llä (ajoliuos  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{HCOOH}$ ). TLC:n näytteet (5  $\mu$ l) laimennettiin MeCN:ään (20  $\mu$ l). HPLC-MS-näytteet (2  $\mu$ l) laimennettiin DMF/MeCN (1:1) -liuokseen (100  $\mu$ l). Näytteet otettiin 15 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 23 h ja 26 h kohdalla.

*Testi 2. (MeO)<sub>3</sub>P=O (8 ekv.): 5'-O-AZMB-tymidiini (6) (2 mg, 1 ekv.) liuotettiin DMF:n (16 ml) ja MeCN:n (16 ml) seokseen ja reaktioliuokseen lisättiin DBU (7,5 ml, 1 ekv.) ja trimetyylifosfiitti (1 M, 50 ml, 8 ekv.). TLC näytteet (5 ml) laimennettiin MeCN:ään (20 ml). HPLC-MS-näytteet (2 ml) laimennettiin DMF/MeCN (1:1) -liuokseen (100 ml). Näytteet otettiin 15 min, 60 min, 160 min, 4 h, 22 h ja 46 h kohdalla.*

*Testi 3. Ph<sub>3</sub>P:lla (8 ekv.): 5'-O-AZMB-tymidiini (6) (2 mg, 1 ekv.) liuotettiin DMF:n (16 ml) ja MeCN:n (16 ml) seokseen ja reaktioliuokseen lisättiin DBU (7,5 ml, 1 ekv.) ja trifenyylifosfiini (40 ml, 8 ekv.). Reaktiota seurattiin HPLC-MS:lla. Näytteet (2 ml) laimennettiin DMF/MeCN (1:1) -liuokseen (100 ml). Näytteitä otettiin 15 min, 1 h, 2 h, 4 h ja 23 h kohdalla.*

*Testi 4. Ph<sub>3</sub>P (12 ekv.): 5'-O-AZMB-tymidiini (6) (2 mg, 1 ekv.) liuotettiin DMF:n (16 ml) ja MeCN:n (16 ml) seokseen ja reaktioliuokseen lisättiin DBU (7,5 ml, 1 ekv.) ja trifenyylifosfiini (60 ml, 12 ekv.). Reaktiota seurattiin HPLC-MS:lla. Näytteet (2 ml) laimennettiin DMF/MeCN (1:1) -liuokseen (100 ml). Näytteitä otettiin 15 min, 60 min, 110 min ja 3 h kohdalla.*

*Testi 5. (Me)<sub>3</sub>P (4 ekv.): Trimetyylifosfiini (100 ml, 1 M) liuotettiin DMF:n (182 ml) ja MeCN:n (181 ml) seokseen. Näin saatu (Me)<sub>3</sub>P-liuos, (93 ml, 0,216 M) lisättiin 5'-O-AZMB-tymidiini (6) (2 mg, 1 ekv.) ja DBU:n (7,5 ml, 1 ekv.) seokseen. Reaktio käynnistettiin typpi-ilmakehässä. Reaktiota seurattiin HPLC-MS:llä, ja näytteet (2 ml) laimennettiin DMF/MeCN (1:1) -liuokseen (100 ml) typpi-ilmakehässä. Näytteitä otettiin 15 min ja 30 min kohdalla.*

### 3.3.2. Entsyymihydrolyysi

Fosforotioaatin **23** entsyymihydrolyysiä seurattiin 37 °C:ssa 0,1 M:ssa TRIS-HCl puskurissa (234 ml, pH 8), jonka magnesiumionin konsentraatio säädettiin 15 mM:ksi 1 M:lla MgCl<sub>2</sub>:lla (4,5 ml). Eppendorf-putkessa olevaan reaktioliuokseen lisättiin 1 ml fosforotioaattitetrameeria **23**, jolloin sen konsentraatio lopullisessa reaktioliuoksessa oli 100 mM. Snake venom fosfodiesteri-entsyymiä (svPDE) lisättiin reaktioliuokseen 60 ml. Reaktioliuoksesta otettiin 50 ml:n näytteitä 100 ml:aan pysäytysliuosta (50 mM TEAA MeCN:n ja H<sub>2</sub>O:n seoksessa (70/30)). Näytteet suodatettiin (RC4, 0,2 µm) ja niistä injektoidiin 10 ml HPLC- analysointiin.

#### 4. Viitteet

1. Virta, P. More versatile synthesis of oligonucleotides. *Science*, 2021, vol. 373, 1196-1197 doi:10.1126/science.abk3478.
2. Xiong, H., Veedu, R. N. & Diermeier, S. D. Molecular Sciences Recent Advances in Oligonucleotide Therapeutics in Oncology. *Int. J. Mol. Sci*, 2021, vol. 22, 3295 doi:10.3390/ijms22073295.
3. Sharma, V. K., Sharma, R. K., Singh, S. K. Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials. *Medchemcomm*, 2014, vol. 5, 1454, doi:10.1039/c4md00184b.
4. Beaucage, S. L., Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites-A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1981, vol. 22, 1859–1862
5. Andrews, B. I., Antia, F. D., Bruggemeier, S. B., Diorazio, L. J., Koenig, S. G., Kopach M E., Olbrich, M., Watson A. L. Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem.*, 2021, vol. 86, 49-61
6. Lönnberg, H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein Journal of Organic Chem.*, 2017, vol. 13, 1368–1387
7. Roy, S. & Caruthers, M., Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries. *Molecules*, 2013, vol. 18, 14268–14284
8. Semenyuk, A. Novel methods for synthesis of high quality oligonucleotides. *Digital Comprehensive Summaries Of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*, 2006
9. Efimov, V. A., Buryakova, A. A., Dubeym Y. I., Polushin, N. N., Chakhmakhcheva, O. G., Yua, O., Application of new catalytic phosphate protect groups for the highly efficient phosphorister oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1968, vol. 26, 6526-6540



10. Creusen, G., Akintayo, C. O., Schumann, K., Walther, Scalable One-Pot-Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis for Model Network Hydrogels. *J. Am. Chem.* 2020, *vol. 142*, 16610-16621
11. Virta, P., Solid-phase synthesis of base-sensitive oligonucleotides. *Arkivoc*, 2009, *vol. 3*, 54–83
12. Lindstrom, U. M., Kool, E. T., An orthogonal oligonucleotide protecting group strategy that enables assembly of repetitive or highly structured DNAs. *Nucleic Acids Res.* 2002 *vol. 30*, e101
13. Bogdan, F. M., Chow, C. S., The Synthesis of Allyl-and Ailyoxycarbonyl-Protected RNA Phosphoramidites. Useful Reagents for Solid-Phase Synthesis of RNAs with Base-Labile Modifications. *Tetrahedron Letters*, 1998, *vol. 39*, 1897–1900
14. Semenyuk, A., Földesi, A., Johansson, T., Estmer-Nilsson, C., Blomgren, P., Brännvall, M., Kirsebom, L. A., Kwiatkowski, M., Synthesis of RNA Using 2'-O-DTM Protection. *J. Am. Chem. Soc.* 2006 *vol. 128*, 12356-12357, doi:10.1021/ja0636587..
15. Hayakawa, Y., Hirose, M., Ryoji N., O-Allyl Protection of Guanine and Thymine Residues in Oligodeoxyribonucleotides. *J. Chem. Soc.* 1993, *vol. 58*, 5551-5555
16. Hayakawa, Y., Wakabayashi, S., Kato, H., Noyori, R., The Allylic Protection Method in Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis. An Efficient Preparation of Solid-Anchored DNA Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, *vol. 112*, 1691-1696
17. Greenberg, M. M., Photochemical Cleavage of Oligonucleotides From Solid Phase Supports. *Tetrahedron Lett.* 1993, *vol. 34*, 251–253.
18. Matray, T., Greenberg, M. M., Site-Specific Incorporation of the Alkaline Labile, Oxidative Stress Product (5R)-5,6-Dihydro-5-hydroxythymidine in an Oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, *vol. 116*, 6931-6932

19. Wada, T., Ohkubo, A., Mochizuki, A., Sekine, M., 2-(Azidomethyl)benzoyl as a new protecting group in nucleosides. *Tetrahedron Lett.* 2001, *vol. 42*, 1069–1072
20. Matsuda, H., Hashimoto, M., Okuno, T., NOVEL PREPARATION OF (2-AZIDOMETHYL)BENZOIC ACID AND AN APPLICATION AS A PROTECTIVE GROUP. *Synth Commun* 2002, *vol. 32*, 3347–3355.
21. Efimov, V. A., Aralov, A. V., Klykov, V. N., Chakhmakhcheva, O. G., Synthesis Of RNA by the Rapid Phosphotriester Method Using Azido-Based 2'-O-Protecting Groups. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 2009, *vol. 28*, 846-865 doi:10.1080/15257770903170286.
22. Bräse, S., Gil, C., Knepper, K., Zimmermann, V., Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005, *vol 44*, 5188-5240, doi:10.1002/anie.200400657
23. Sabat, N., Katkevica, D., Pajuste, Karlis., Flamme, Marie., Stämpfli, A., Katkevics, M., Hanlon, S., Bisagni, S., Püntener, K., Sladojevich, F., Hollenstein, M.,/ Towards the controlled enzymatic synthesis of LNA containing oligonucleotides. *Front. Chem.* 2023, *vol. 11*, 1-10.
24. Reyes, Y., Mebel, A., Wnuk, S. F., 6-azido and 6-azidomethyl uracil nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2023, *vol. 19*, 1-19 doi:10.1080/15257770.2023.2271023.
25. Zhang, Y., Kleiner, R. E., A Metabolic Engineering Approach to Incorporate Modified Pyrimidine Nucleosides into Cellular RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, *vol. 141*, 3347–3351
26. Varizhuk, A. M., Kaluzhny, D., Novikov, R. A., Chizhov, A. O., Sminorv, I. P., Chuvilin, A. N., Tatarinova, O. N., Fisunov, G. Y., Pozmogova, G. E., Florentiev, V. L., Synthesis of Triazole-Linked Oligonucleotides with High Affinity to DNA Complements and an Analysis of Their Compatibility with Biosystems. 2013, *vol. 78*, 5964-5969, doi:10.1021/jo400651k.
27. Efimov, V. A., Aralov, A. V., Grachev, S. A., Chakhmakhcheva, O. G., N-azidomethylbenzoyl blocking group in the phosphotriester synthesis of oligoribonucleotides. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010 *vol. 36*, 628–633

28. Efimov, V. A., Aralov, A. V., Fedunin, S. V., Klykov, V. N. & Chakhmakhcheva, O. G., An azidomethyl protective group in the synthesis of oligoribonucleotides by the phosphotriester method. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009, vol. 35, 250–253
29. Huang, J., Xi, Z., Chemical synthesis of bioactive siRNA in solution phase by using 2-(azidomethyl)benzoyl as 3'-hydroxyl group protecting group. *Tetrahedron Lett*, 2012, vol. 53, 3654–3657
30. Yagodkin, A., Azhayev, A., Roivainen, J., Antopolksy, M., Kayushin, A., Korosteleva, M., Miroshnikov, A., Randolph, J., Mackie, H., Improved Synthesis of Trinucleotide Phosphoramidites and Generation of Randomized Oligonucleotide Libraries. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2007, vol. 26, 473–497
31. Janczyk, M., Appel, B., Springstube, D., Fritz, H.-J., Müller, S., A new and convenient approach for the preparation of  $\beta$ -cyanoethyl protected trinucleotide phosphoramidites. *Org. Biomol. Chem.* 2012, vol. 10, 1510-1513
32. Wada, T., Shimizu, M., Oka, N., Saigo, K., A new boranophosphorylation reaction for the synthesis of deoxyribonucleoside boranophosphates. *Tetrahedron Lett* 2002, vol. 43, 4137–4140
33. Kawanaka, T., Shimizu, M. & Wada, T., Synthesis of dinucleoside phosphates and their analogs by the boranophosphotriester method using azido-based protecting groups. *Tetrahedron Lett.*, 2007, vol. 48, 1973-1976, doi:10.1016/j.tetlet.2007.01.064.
34. Shimizu, M., Wada, T., Oka, N., Saigo, K., A Novel Method for the Synthesis of Dinucleoside Boranophosphates by a Boranophosphotriester Method. *J. Org. Chem.* 2004, vol. 69, 5261-5268 doi:10.1021/jo0493875.
35. Lewis, M. A., Graff Yoerg, D., Bolton, J. L., Thompson, J. A., Alkylation of 2'-Deoxynucleosides and DNA by Quinone Methides Derived from 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol. *Chem. Res. Toxicol.* 1996, vol. 9, 1368-1374
36. Fukase, K., Hashida, M., Kusumoto, S., APPLICATION OF 4-AZIDOBENZYL GROUP TO PROTECTION OF HYDROXYL FUNCTIONS. *Tetrahedron Lett* 1991, vol. 32, 3557–3558.

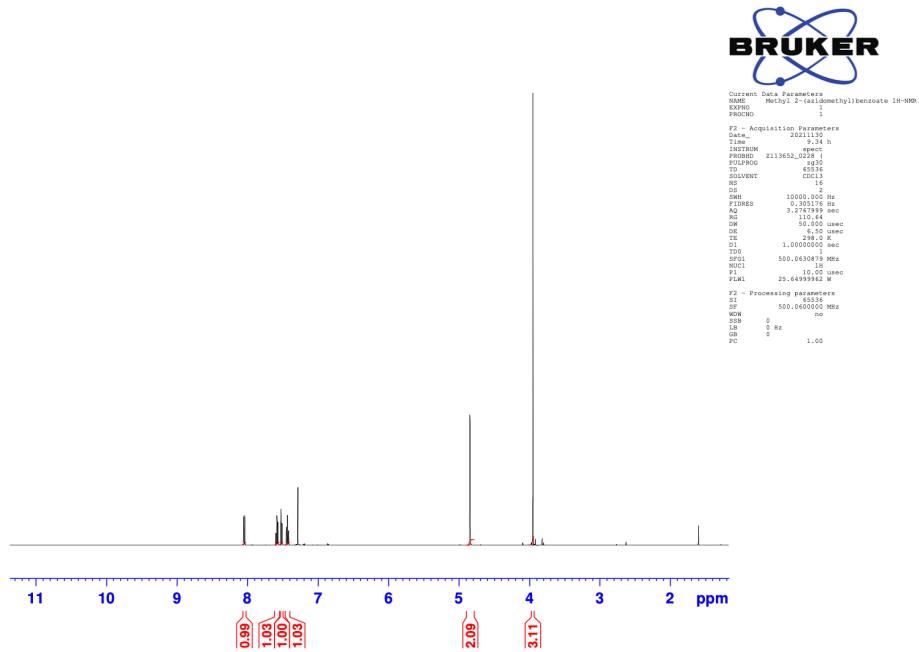
37. Kawanaka, T., Shimizu, M., Shintani, N., Wada, T., Solid-phase synthesis of backbone-modified DNA analogs by the boranophosphotriester method using new protecting groups for nucleobases. 2008, *vol. 18*, 3783-3786, doi:10.1016/j.bmcl.2008.05.053.
38. Iwamoto, N., Butler, D. C. D., Svrzikapa, N., Mohapatra, S., Zlatev, I., Sah, D. W. Y., Standley, S. M., Lu, G., Apponi L. H., Frank-Kamenetsky, M., Jingxin Zhang, J., Vargeese, C., Verdine, G. L, Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 2017, *vol. 35*, 845–851
39. Wan, W. B., Migawa, T., Vasquez, G., Murray, H. M., Nichols, J. G., Gaus, H., Berdeja, A., Lee, S., Hart, C. E., Lima, W. F., Swayze, E. E., Seth, P. P., Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* 2014, *vol. 42*, 13456–13468
40. Zhou, X., Kiesman, W. F., Yan, W., Jiang, H., Antia, F. D., Yang, J., Fillon, Y. A., Xiao, L., Shi, X., Development of Kilogram-Scale Convergent Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* 2022, *vol. 87*, 2087-2110
41. Bonora, G. M., Rossin, R., Zaramella, S., Cole, D. L., Eleuteri, A., Ravikumar, V. T., A Liquid-Phase Process Suitable for Large-Scale Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *Org. Process. Res. Dev.* 2000, *vol. 4*, 225–231
42. Bonora, G. M., Zaramella, S., Ravikumar, V., Large-scale Solution Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides: A Comparison of the Phosphoro-amidite and Phosphotriester Dimeric Approaches. *Croat. Chem. Acta*, 2001, *vol. 74*, 779-786.
43. Ballico, M., Drioli, S., Morvan, F., Xodo, L. & Bonora, G. M., Triple, MPEG-Conjugated, Helix-Forming Oligonucleotides (TRIPEGXs): Liquid-Phase Synthesis of Natural and Chimeric ‘All-Purine’ Sequences Linked to High Molecular Weight Poly(ethylene glycols). 2001, *vol. 12*, 719-725 doi:10.1021/bc010034b.
44. Lscremin, C., Bonora, G. M., Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on Polyethylene Glycol Support. *Tetradedron Letters.* 1993, *vol. 34*, 4663-4666.

45. Almer, H., Stawinski, J. & Stromberg, R. Synthesis of Stereochemically Homogeneous Oligoribonucleoside All-Rp-Phosphorothioates by Combining H-Phosphonate Chemistry and Enzymatic Digestion. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, vol. 4, 1459-1460
46. Wozniak, L. A., Góra, M., Bukowiecka-Matusiak, M., Mourgues, S., Pratviel, G., Meunier, B., Stec, W. J., The P-Stereocontrolled Synthesis of PO/PS-Chimeric Oligonucleotides by Incorporation of Dinucleoside Phosphorothioates Bearing an O-4-Nitrophenyl Phosphorothioate Protecting Group. *Eur. J. Org. Chem.* 2005, vol. 14, 2924-2930  
doi:10.1002/ejoc.200400910.
47. Akamuri, S., Liu, D., Eltepu, L., Reboton, L. J., Preston, R., Bradshaw, C. W., Identification of a Tricyclic P<sup>III</sup> Chiral Auxiliary for Solid-Supported Synthesis of Stereopure Phosphorothioate-Containing Oligonucleotides. *ChemBioChem*, 2020, vol. 21, 1298-1303  
doi:10.1002/cbic.201900631:experimental.
48. Nukaga, Y., Yamada, K., Ogata, T., Oka, N., Wada, T., Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligoribonucleotides Using 2'-O-(2-Cyanoethoxymethyl)-nucleoside 3'-O-Oxazaphospholidine Monomers. *J. Org. Chem.* 2012, vol. 77, 7913-7922,  
doi:10.1021/jo301052v.
49. Oka, N., Wada, T., Saigo, K., Diastereocontrolled Synthesis of Dinucleoside Phosphorothioates Using a Novel Class of Activators, Dialkyl(cyanomethyl)ammonium Tetrafluoroborates. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, vol. 124, 4962-4963, doi:10.1021/ja017275e.
50. Iyer, R. P., Yu, D., Ho, N.-H., Tan, W., Agrawal, S., A Novel Nucleoside Phosphoramidite Synthone Derived from 1R, 2S-Ephedrine. *Tetrahedron Asymmetry*, 1995, vol. 6, 1051-1054
51. Iwamoto, N., Oka, N., Sato, T., Wada, T., Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Oligonucleoside H-Phosphonates by an Oxazaphospholidine Approach, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, vol. 48, 496-499, doi:10.1002/anie.200804408.

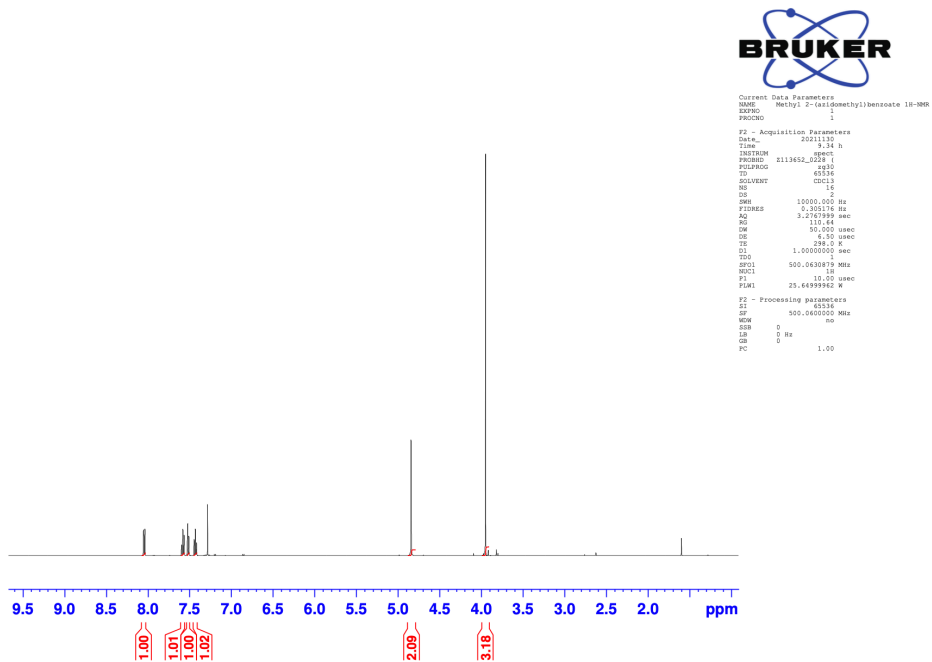
52. Rosenqvist, P., Saari, V., Pajuniemi, E., Molina, A. G., Ora, M., Horvath, A., Virta, P., Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support. *J. Org. Chem* 2023, vol. 88, 10156–10163
53. Knouse, K. W., deGruyter, J. N., Schmidt, M. A., Zheng, Bin., Vantourout, J. C., Kingston, C., Merver, 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*, 2018, vol. 361, 1234-1238
54. Huang, Y., Knouse, W. K., Qiu, S., Hao, W., Padial, N. M., Vantourout, J. C., Zheng, B., Mercer, S. E., Lopez-Ogalla, J., Narayan, R., Olson, R. E., Blackmond, D. G., Eastgate, M. D., Schmidt, M. A., McDonald, I. M., Baran, P. S., A P(V) platform for oligonucleotide synthesis. *Science*, 2021, vol. 373, 1265-1270
55. Eckstein, F., Nucleoside Phosphorothioates, *Ann. Rev. Biochem.* 1985, vol. 54, 367-402

## 5. Liitteet

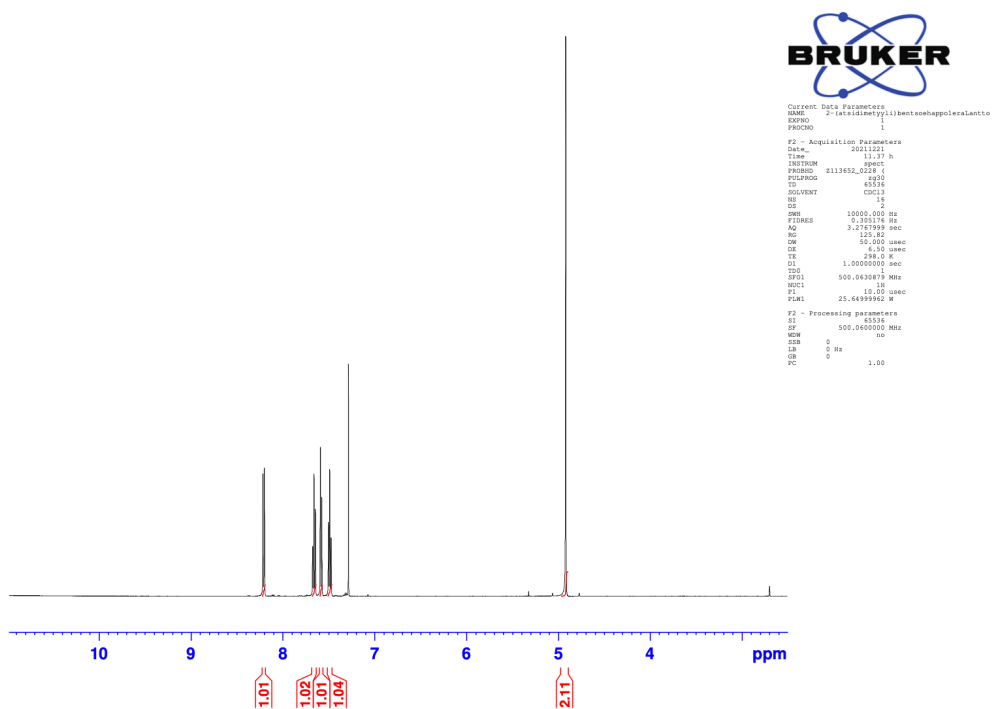
### Liite 1. Metyyli-2-metyyliatsidobentsoaatti (3) $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



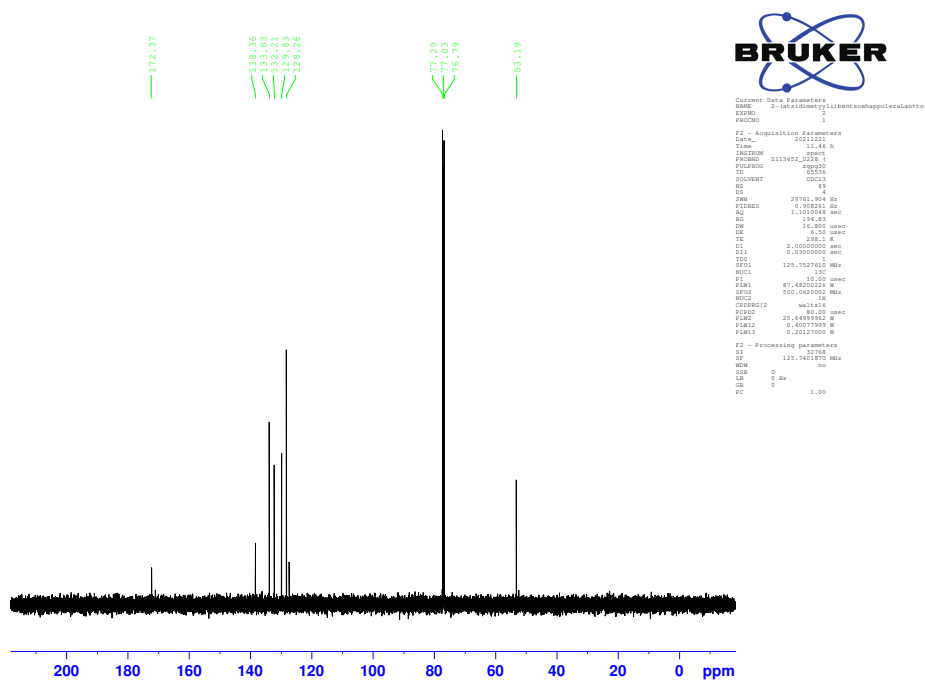
### Liite 2. Metyyli-2-metyyliatsidobentsoaatti (3) $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



**Liite 3. 2-Atsidometyylibentsoehappo (4) <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**

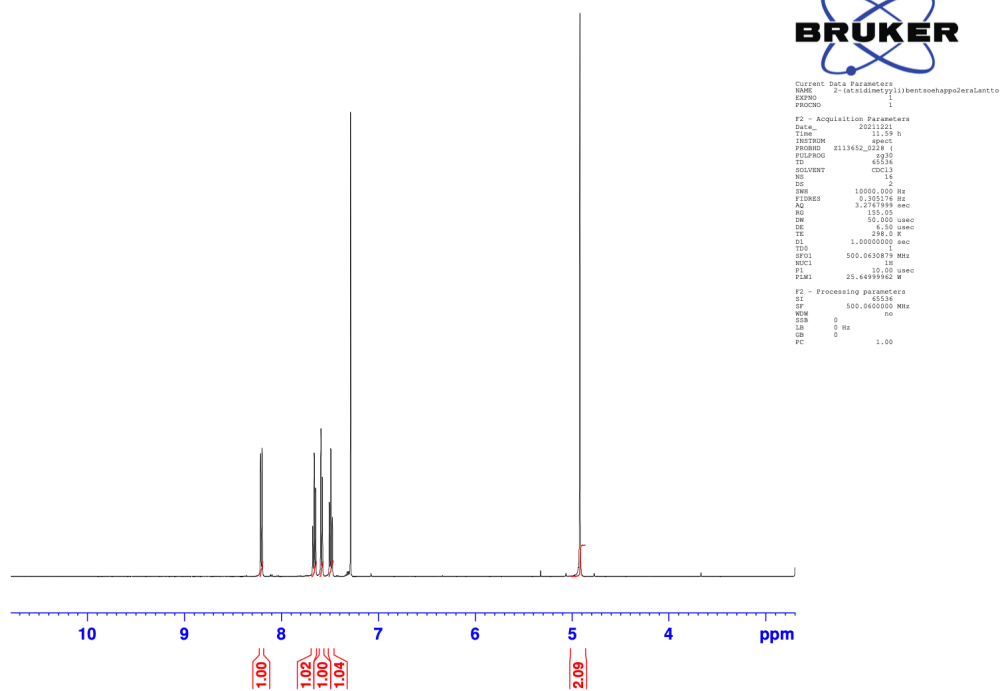


**Liite 4. 2-Atsidometyylibentsoehappo (4) <sup>13</sup>C-NMR (DMSO, 126 Hz)**

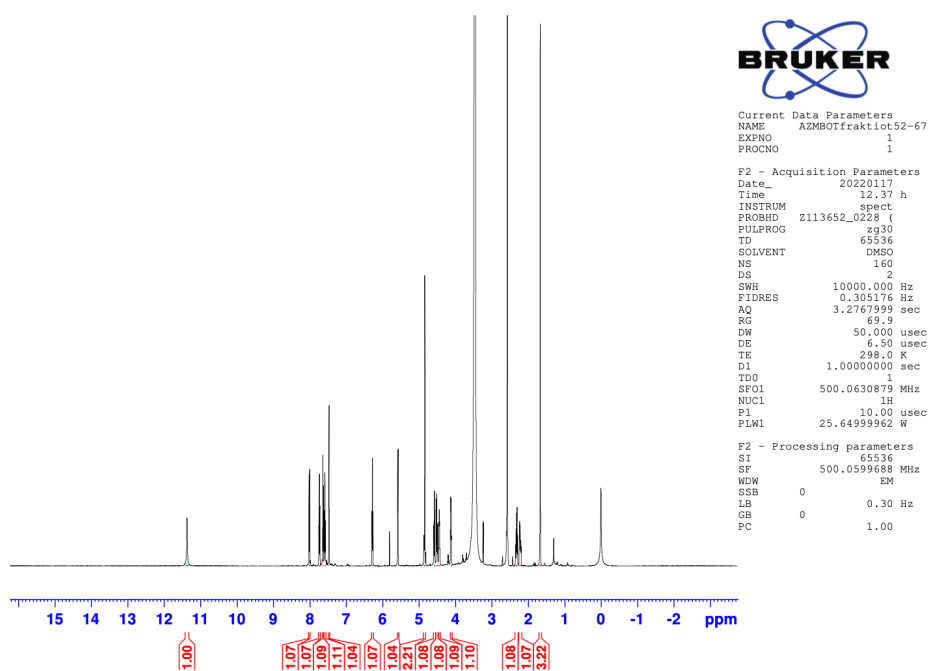




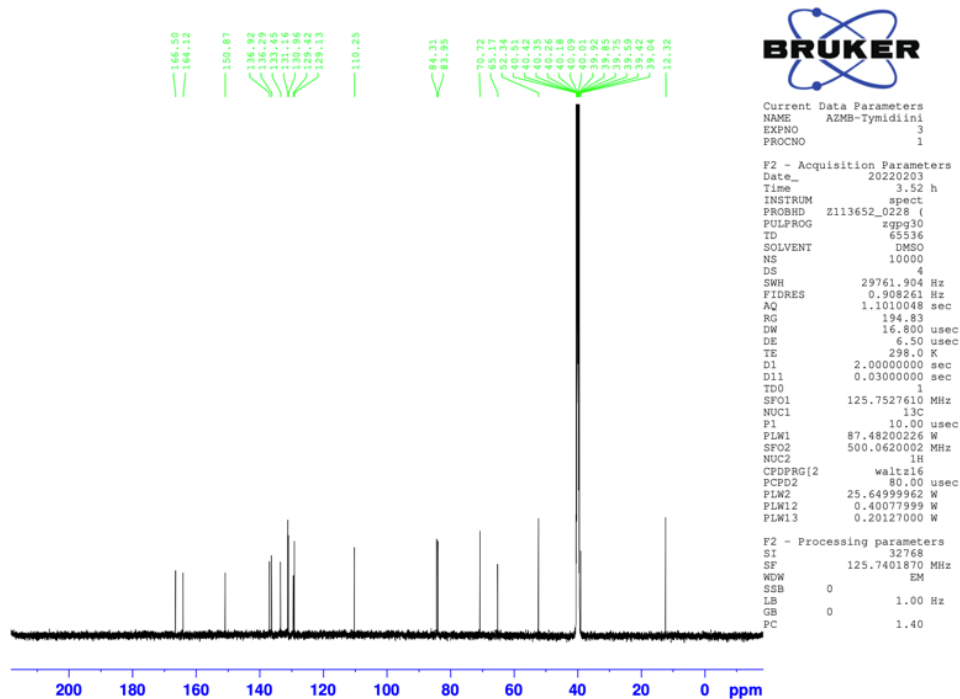
**Liite 5. 2-Atsidometyylibentsoehappo (4) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**



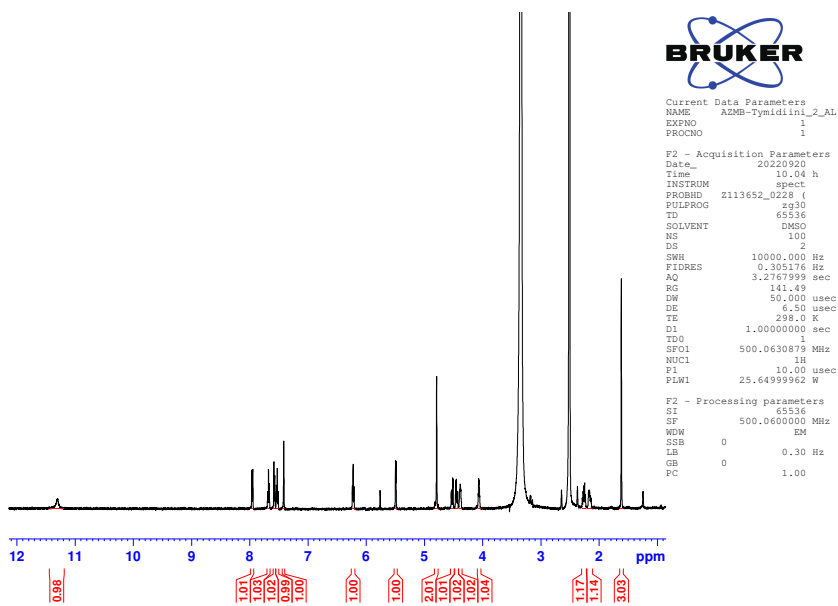
**Liite 6. 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (6) <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 500 MHz)**



**Liite 7.** 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (**6**) <sup>13</sup>C NMR (DMSO, 126 MHz)

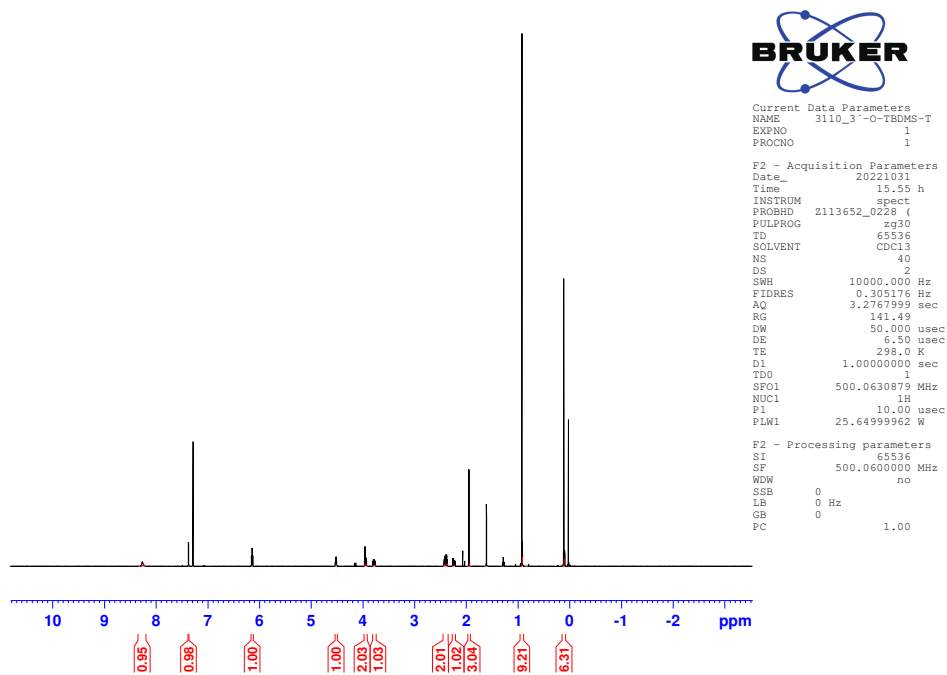


**Liite 8.** 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (**6**) <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 500 MHz)

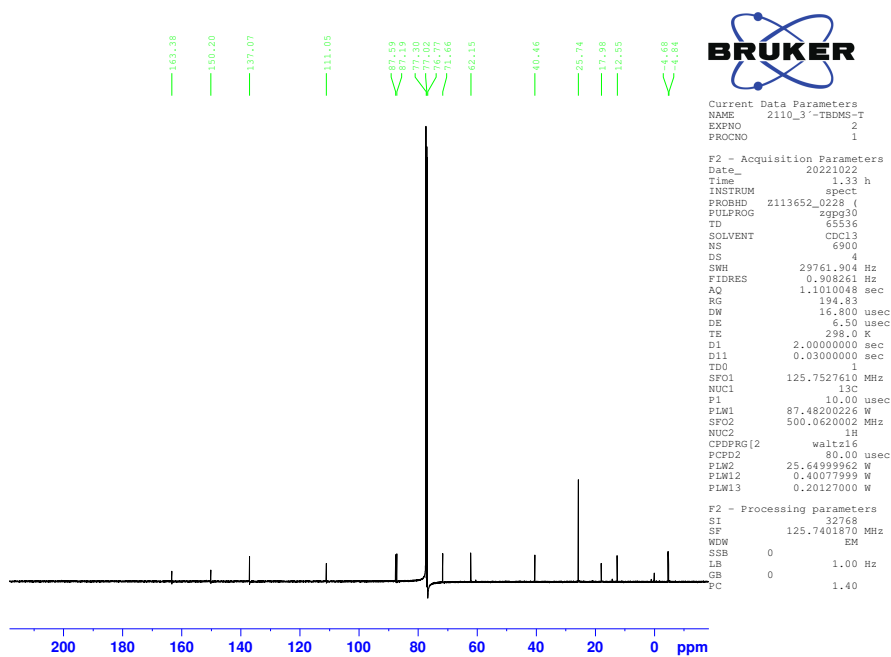




**Liite 11.** 3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-tymidiini (**9**) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

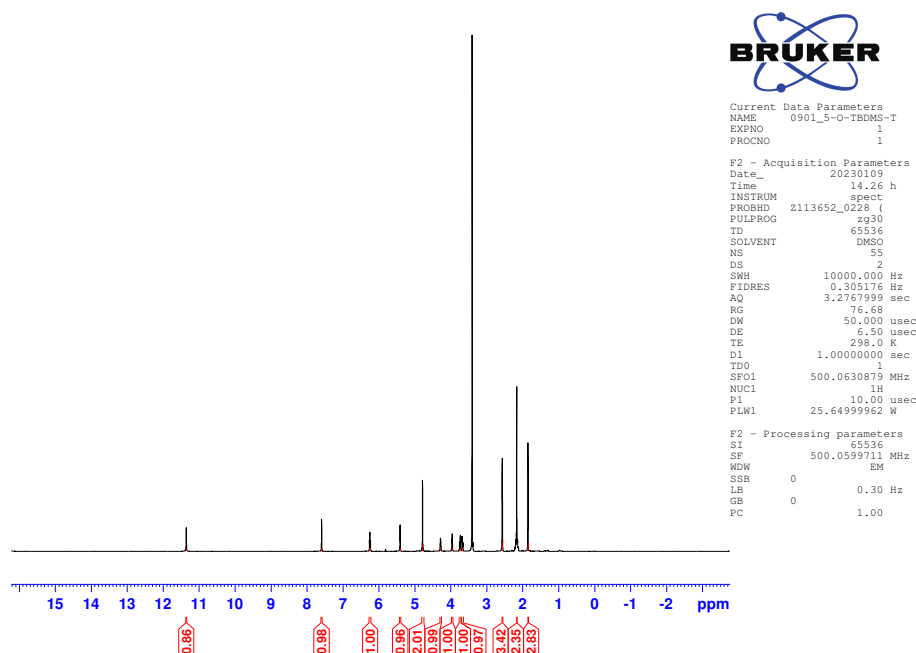


**Liite 12.** 3'-*O*-*tert*-butyylidimetyylisilyyli-tymidiini (**9**) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz)

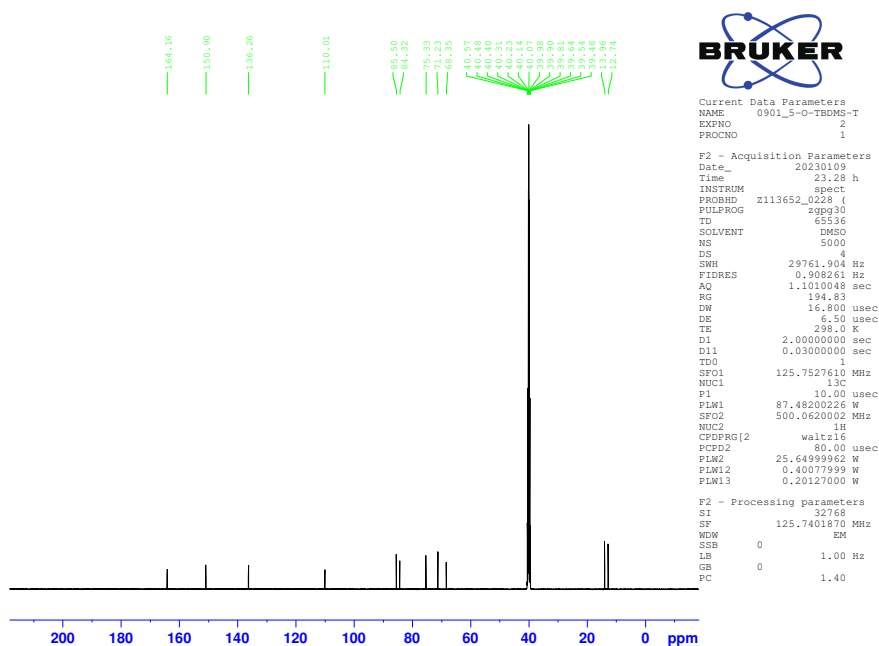




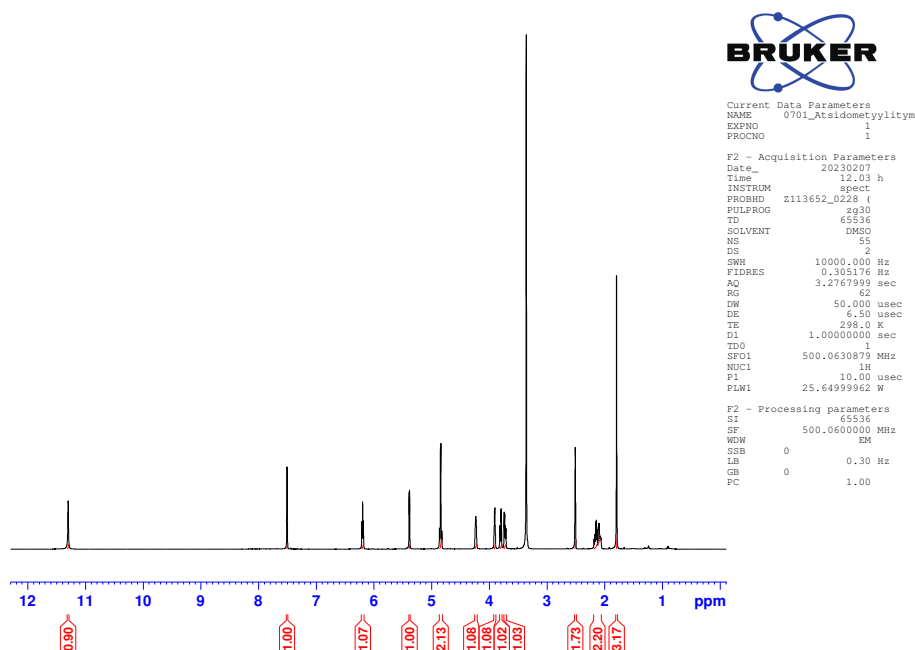
**Liite 15. 5'-*O*-metyylitiometyyli-tymidiini (11) <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 500 MHz)**



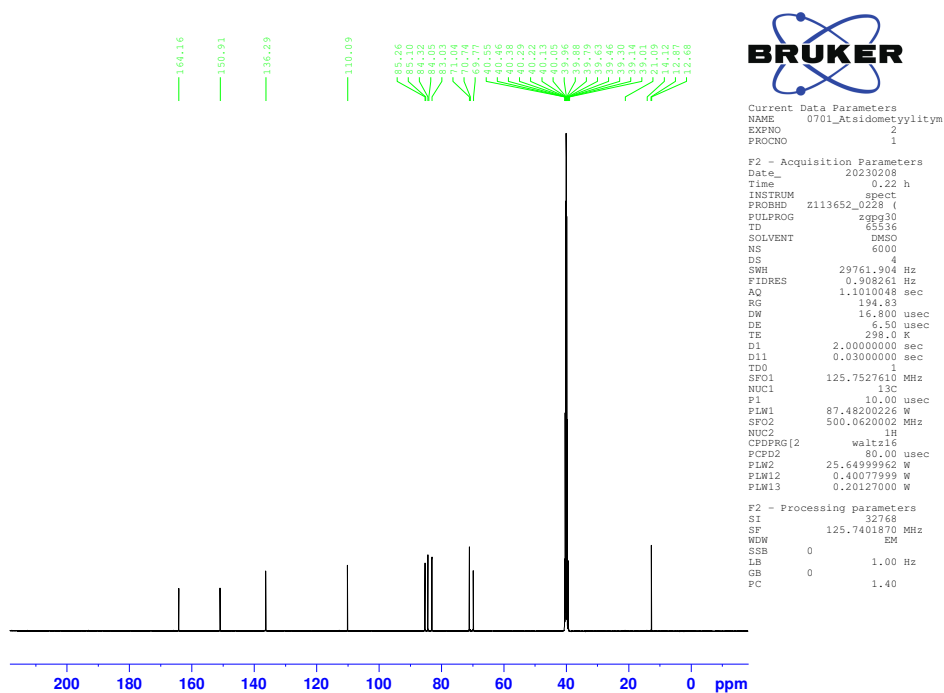
**Liite 16. 5'-*O*-metyylitiometyyli-tymidiini (11) <sup>13</sup>C NMR (DMSO, 126 MHz)**



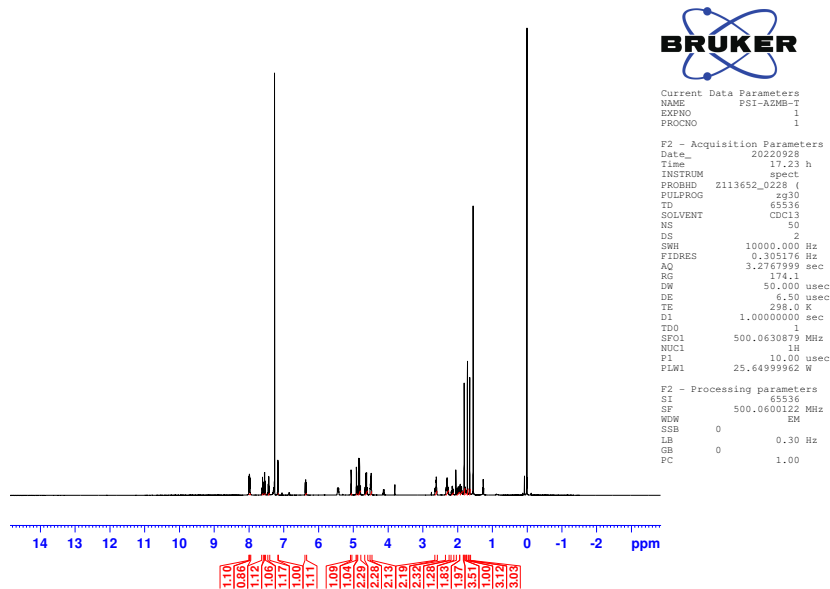
Liite 17. 5'-*O*-metyyliatsiditymidiini (13) <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 500 MHz)



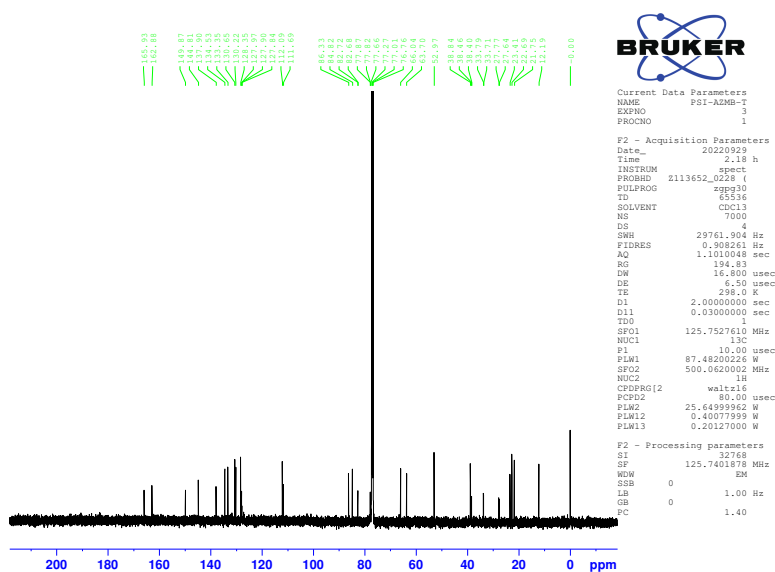
Liite 18. 5'-*O*-metyyliatsiditymidiini (13) <sup>13</sup>C NMR (DMSO, 126 MHz)



**Liite 19. (+)-Ψ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (16) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**

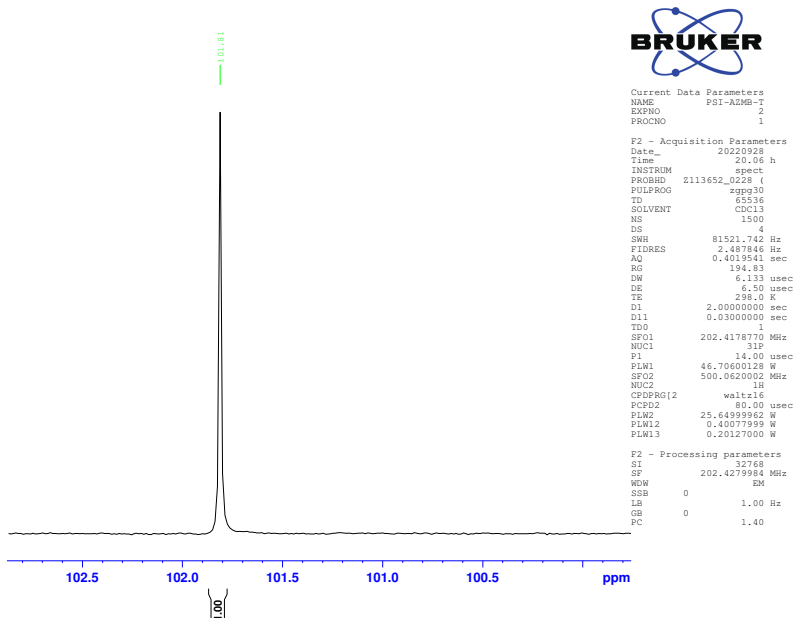


**Liite 20. (+)-Ψ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (16) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz)**

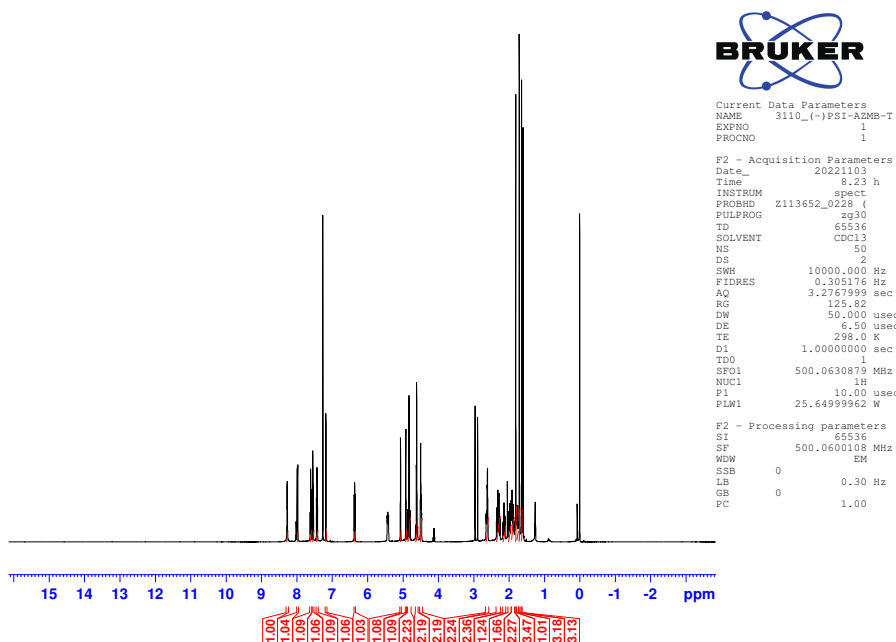




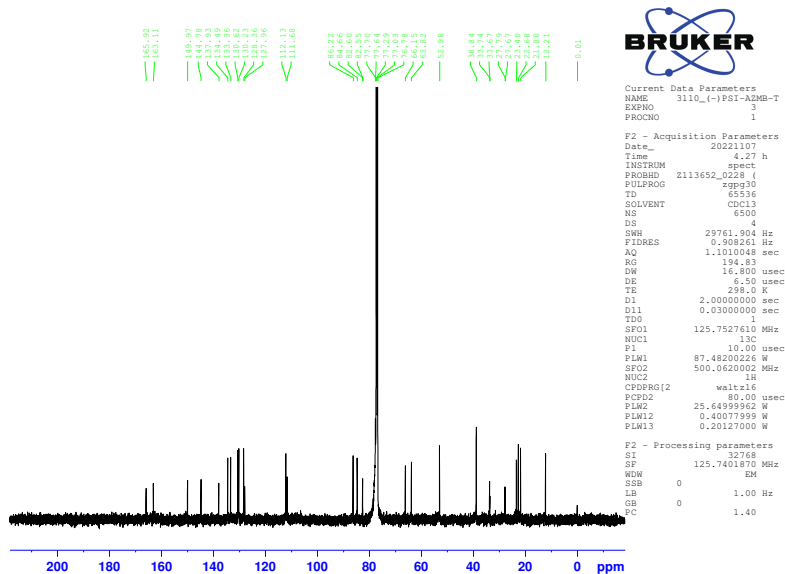
**Liite 21.** (+)- $\Psi$  Aktivoitu 5'-O-2(atsidometyylibentsoyyli)-tymidiini (**16**)  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 202 MHz)



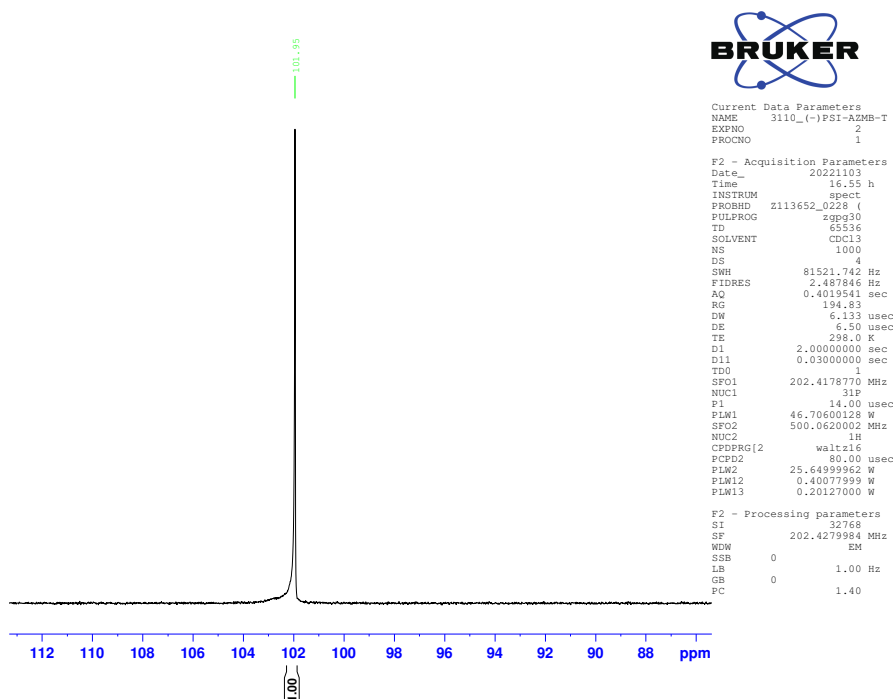
**Liite 22.** (-)- $\Psi$  Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (**17**)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



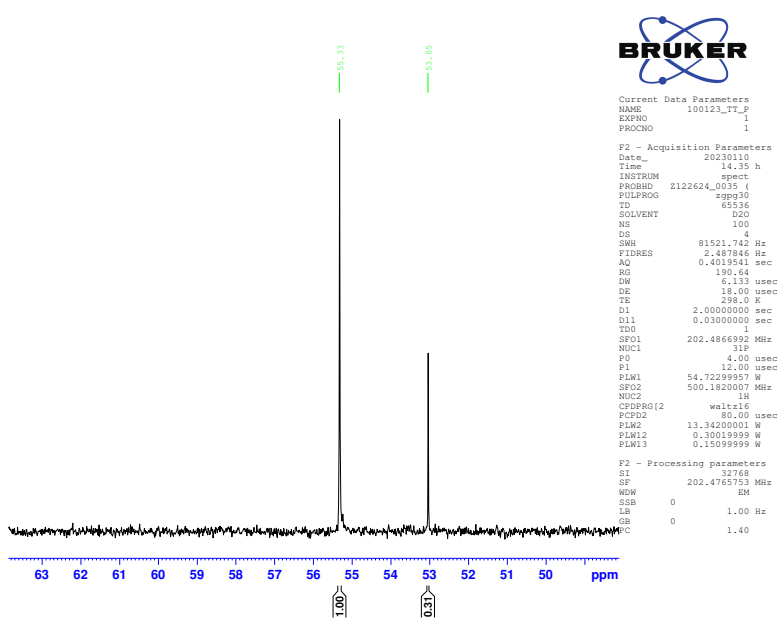
**Liite 23. (-)-Ψ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyllibentsoyyli)-tymidiini (17) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 126 MHz)**



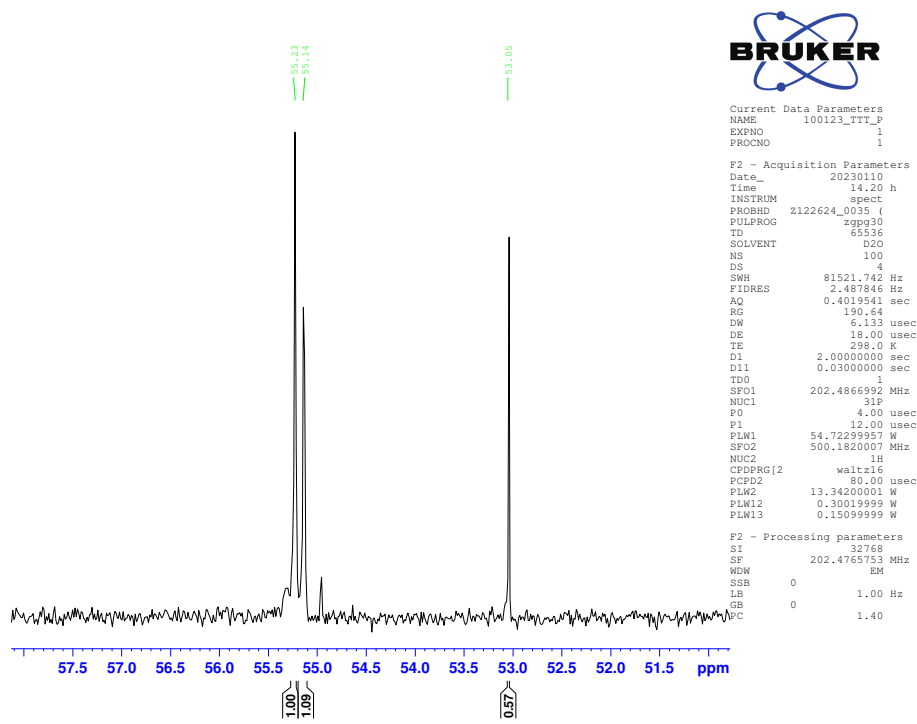
**Liite 24. (-)-Ψ Aktivoitu 5'-O-2-(atsidometyyli)bentsoyyli-tymidiini (17) <sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>, 202 MHz)**



**Liite 25. 5'-T(R<sub>p</sub>)T-3' (21) <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O, 202 MHz)**

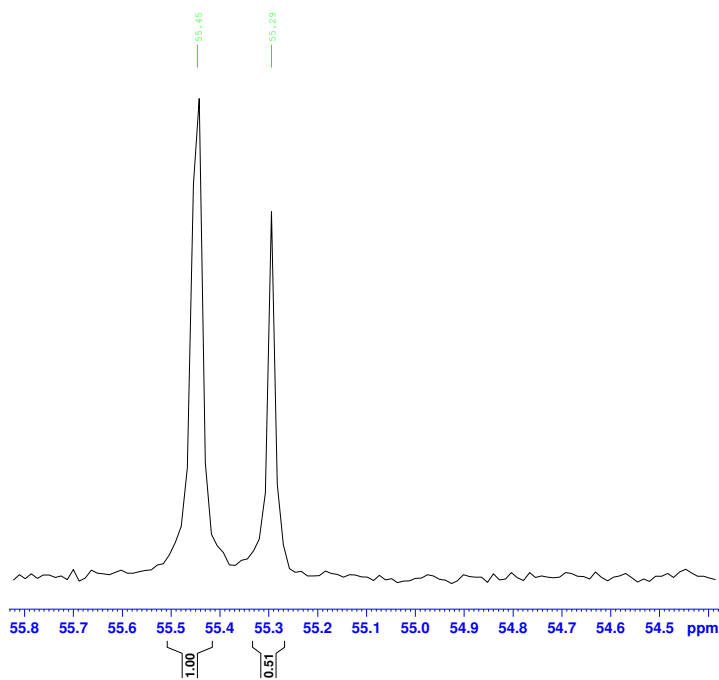


**Liite 26. 5'-T(R<sub>p</sub>)T(S<sub>p</sub>)T-3' (22) <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O, 202 MHz)**





**Liite 29.** 5'-T(R<sub>p</sub>)T(S<sub>p</sub>)T(SP)T-3' (**23**) <sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O, 202 MHz)



```

Current Data Parameters
NAME      1701_TTTT
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20230117
Time     20.07 h
INSTRUM  spect
PROBHD   z113652_0228 (
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  D2O
NS       1500
DS       4
SWH      81521.742 Hz
FIDRES   2.487846 Hz
AQ       0.4019541 sec
RG       194.83
DW       6.133 usec
DE       6.50 usec
TE       298.0 K
D1       2.0000000 sec
D11      0.0300000 sec
TD0      1
SFO1     202.4178770 MHz
NUC1     31P
P1       14.00 usec
PLW1     46.70600128 W
SFO2     500.0620002 MHz
NUC2     1H
CPDPRG2  waltz16
PCPD2    80.00 usec
PLW2     25.64999962 W
PLW12    0.40077999 W
PLW13    0.20127000 W

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       202.4273994 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
    
```