(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월25일
(11) 등록번호 10-2048274
(24) 등록일자 2019년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 19/073 (2006.01) *C07H 19/10* (2006.01)
C07H 19/173 (2006.01) *C07H 19/20* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2014-7009603
(22) 출원일자(국제) 2012년09월13일
심사청구일자 2017년06월21일
(85) 번역문제출일자 2014년04월11일
(65) 공개번호 10-2014-0067113
(43) 공개일자 2014년06월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/055231
(87) 국제공개번호 WO 2013/040257
국제공개일자 2013년03월21일
(30) 우선권주장
61/534,347 2011년09월13일 미국(US)
61/627,211 2011년10월07일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20100041041 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
애질런트 테크놀로지스, 인크.
미국 캘리포니아주 95051 산타 클라라 스티븐스 크릭 불러바드 5301
(72) 발명자
스투피, 브라리언, 필립
미국, 텍사스 77433, 사이프레스, 인디언 체리 포레스트 래인 19814
리, 홍
미국, 위스콘신 53211, 밀워키, 엔. 아드모어 애비뉴 4714
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 34 항 심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 **핵산 시퀀싱을 위하여 5-메톡시, 3'-OH 차단안된, 신속하게 광절단가능한 종료 뉴클레오티드 및 핵산 시퀀싱 방법**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 DNA 및 RNA 시퀀싱 및 분석과 관련된 방법 및 시스템에 이용하기 위한 5-메톡시-치환된 니트로벤질-기반의 광절단가능한 종료 기들로 라벨된 그리고 라벨안된 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드들 및 뉴클레오시드들에 관한 것이다. 이들 화합물은 신속한 뉴클레오티드 혼입 역학, 단일-염기 종료, 높은 뉴클레오티드 선택성, 및 신속한 종료 기 절단을 나타내어, 자연적으로 발생가능한 뉴클레오티드를 초래함으로써 가역적 종료자들로 이용될 수 있다.

(72) 발명자

우, 웨이동

미국, 텍사스 77096, 휴스턴, 잭우드 스트리트 5518

허쉬, 메간, 엔.

미국, 텍사스 77025, 휴스턴, 엔. 펨버턴 써클 드라이브 230

헤르초크, 데이비드

미국, 텍사스 77098, 휴스턴, 밀포드 스트리트 1723

모리스, 신드니, 이.

미국, 텍사스 77086, 휴스턴, 노스 웨스트 파크 드라이브 10146

메츠커, 마이클, 엘.

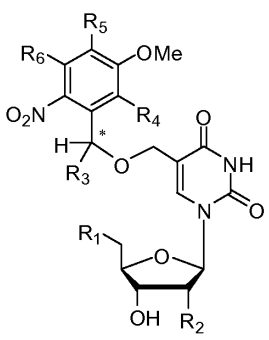
미국, 텍사스 77019, 휴스턴, 맥더피 스트리트 1511

명 세 서

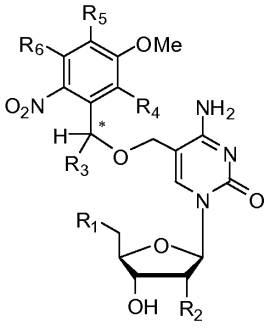
청구범위

청구항 1

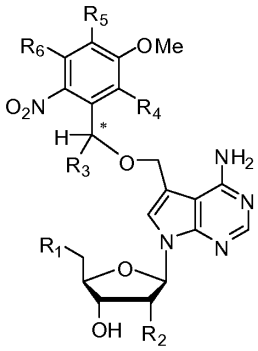
다음 식의 화합물 또는 이의 염, 호변이체, 또는 이의 광학적 이성질체:



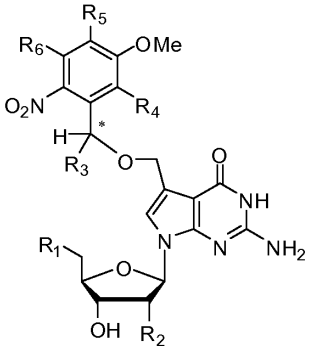
(I),



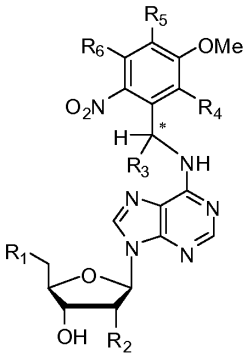
(II),



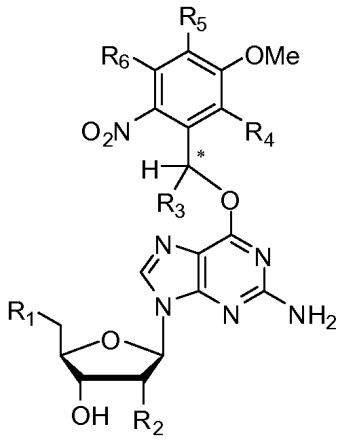
(III),



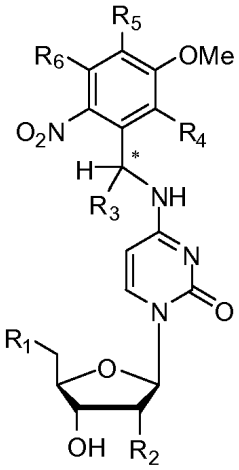
(IV),



(V),



(VI), 또는



(VII),

여기에서:

R_1은 하이드록시, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, α-티오트리포스페이트 또는 폴리포스페이트이고;

R_2는 수소 또는 하이드록시이며;

R_3은 알킬$_{(C\leq 8)}$ 이고;

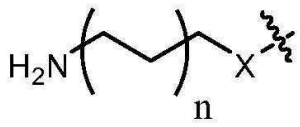
R_4는 수소, 하이드록시, 할로, 아미노, 니트로, 시아노, 아지도 또는 멀캅토; 알킬$_{(C\leq 6)}$, 아실$_{(C\leq 6)}$, 알콕시$_{(C\leq 6)}$, 아실옥시$_{(C\leq 6)}$, 알킬아미노$_{(C\leq 6)}$, 디알킬아미노$_{(C\leq 6)}$, 또는 아미도$_{(C\leq 6)}$; 그리고

R_5는

수소, 하이드록시, 할로, 아미노, 니트로, 시아노, 아지도 또는 멀캅토;

알킬$_{(C\leq6)}$, 알케닐$_{(C\leq6)}$, 알키닐$_{(C\leq6)}$, 아릴$_{(C\leq6)}$, 아랄킬$_{(C\leq8)}$, 아실$_{(C\leq6)}$, 알콕시$_{(C\leq6)}$, 아실옥시$_{(C\leq6)}$, 알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 디알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 또는 아미도$_{(C\leq6)}$;

다음 화학식의 그룹:



이 때

X는 -O-, -S-, 또는 -NH-; 또는

알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 알킨디일$_{(C\leq12)}$, 또는 아렌디일$_{(C\leq12)}$;

n은 0-6의 정수이고;

또는

-링커-리포터이고; 이 때 링커는 다음과 같고:



이 때

X는 -O-, -S-, 또는 -NH-이거나; 또는

알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 또는 알킨디일$_{(C\leq12)}$이며; 그리고

n은 0-6의 정수이고,

상기 리포터는 형광단에 기초한 것이며, 그리고

R_6는 수소이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 화학식 I의 화합물로 추가로 정의되는 화합물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 화학식 II의 화합물로 추가로 정의되는 화합물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 화학식 III의 화합물로 추가로 정의되는 화합물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 화학식 IV의 화합물로 추가로 정의되는 화합물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 화학식 V의 화합물로 추가로 정의되는 화합물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 화학식 VI의 화합물로 추가로 정의되는 화합물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 화학식 VII의 화합물로 추가로 정의되는 화합물.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, 여기에서 R_1은 하이드록시인, 화합물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_1은 트리포스페이트인, 화합물.

청구항 13

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_1은 α-티오트리포스페이트인, 화합물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_3은 *tert*-부틸인, 화합물.

청구항 21

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_4는 수소인, 화합물.

청구항 22

삭제

청구항 23

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_5는 수소인, 화합물.

청구항 24

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_5는 요오드인, 화합물.

청구항 25

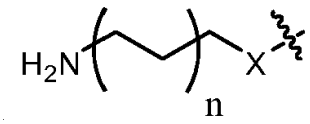
삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_5는 다음 화학식 그룹인, 화합물:



이 때

X는

-O-, -S-, 또는 -NH-이거나; 또는

알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 알킨디일$_{(C\leq12)}$, 또는 아렌디일$_{(C\leq12)}$이며; 그리고

n은 0-6의 정수임.

청구항 28

삭제

청구항 29

청구항 27에 있어서, X는 -C≡C-인, 화합물.

청구항 30

청구항 27에 있어서, n은 0인, 화합물.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

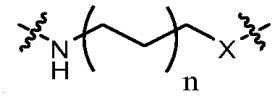
삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, R_5는 -링커-리포터이고, 이 때, 링커는 다음과 같고:



이 때

X는

-O-, -S-, 또는 -NH-이거나; 또는

알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 알킨디일$_{(C\leq12)}$, 또는 아렌디일$_{(C\leq12)}$이며;

n은 0-6의 정수이고, 그리고

상기 리포터는 형광단에 기초한 것인, 화합물.

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

청구항 37에 있어서, X는 -C≡C-인, 화합물.

청구항 41

청구항 37에 있어서, n은 0인, 화합물.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

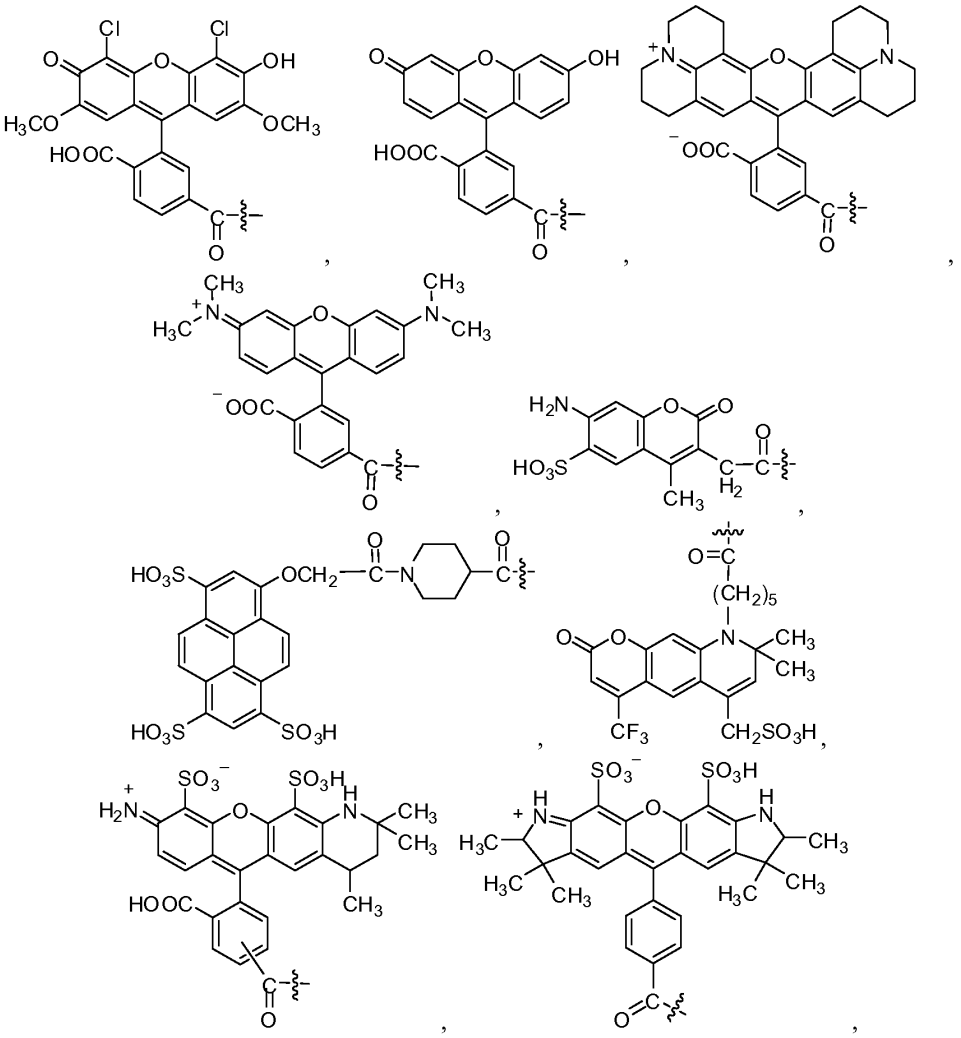
삭제

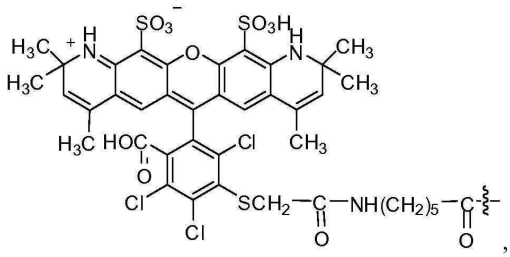
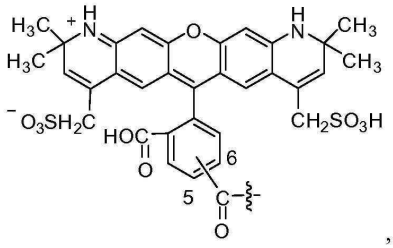
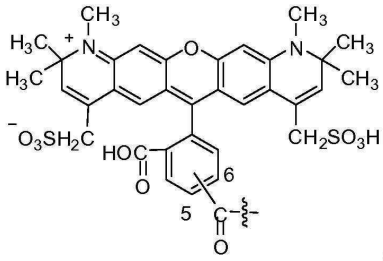
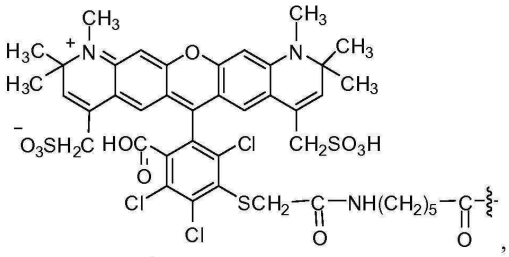
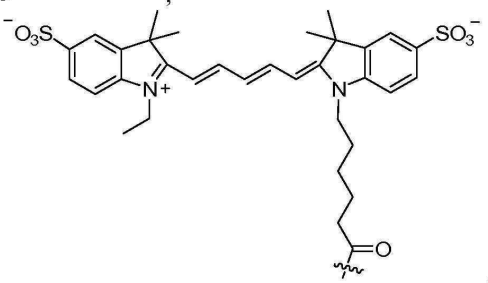
청구항 48

청구항 37에 있어서, 리포터는 염료에 기초되며, 이 때 염료는 잔텐, 플루오레신, 로다민, BODIPY, 시아닌, 쿠마린, 피렌, 프탈로시아닌, 피코빌리프로테인, 또는 스쿠아레인 염료인, 화합물.

청구항 49

청구항 37에 있어서, 리포터는 다음과 같은 화합물:




,

,

,

, 또는

.

청구항 50

삭제

청구항 51

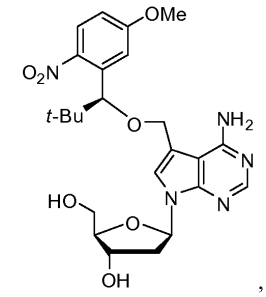
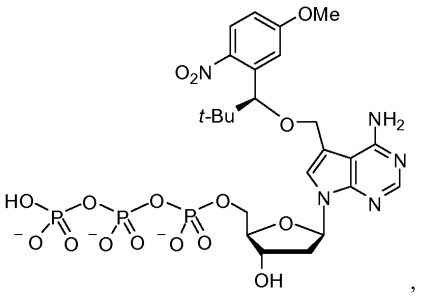
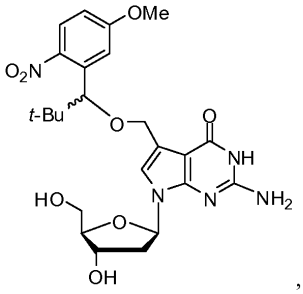
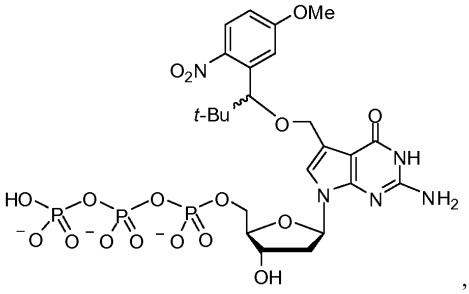
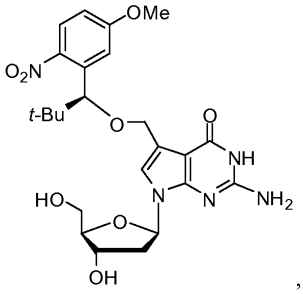
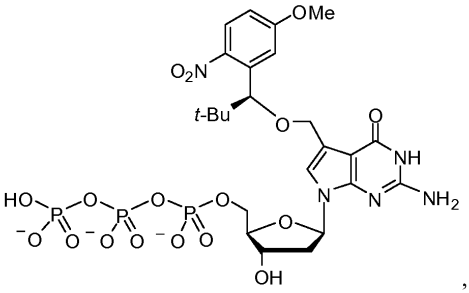
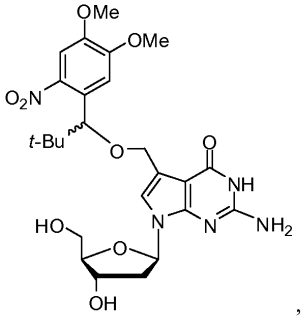
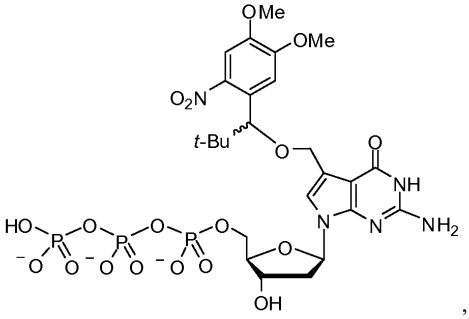
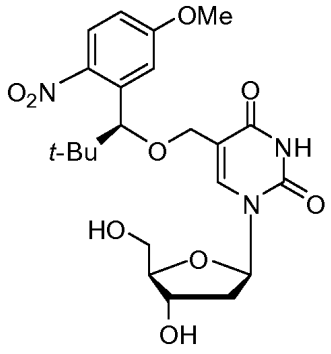
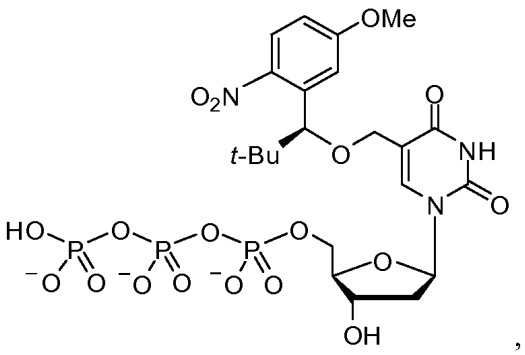
청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, 별표가 된 탄소 원자는 *S* 배치인, 화합물.

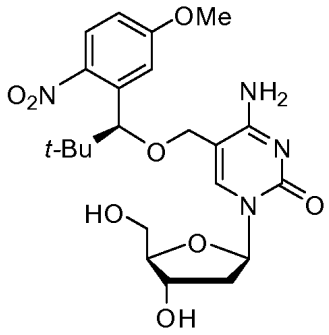
청구항 52

청구항 1 내지 8 중 임의의 한 항에 있어서, 별표가 된 탄소 원자는 *R* 배치인, 화합물.

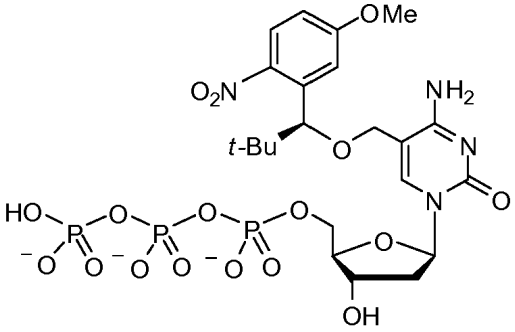
청구항 53

청구항 1에 있어서, 다음과 같이 추가 정의되는, 화합물, 또는 임의의 다음 화학식의 염 또는 양성화된 형태:



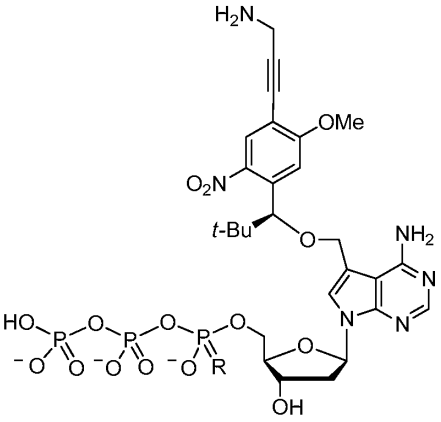
, 또는



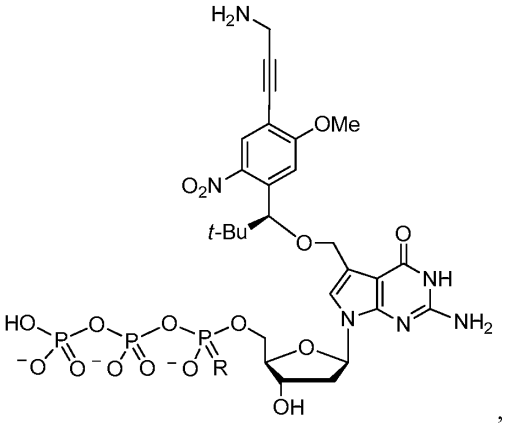
,

청구항 54

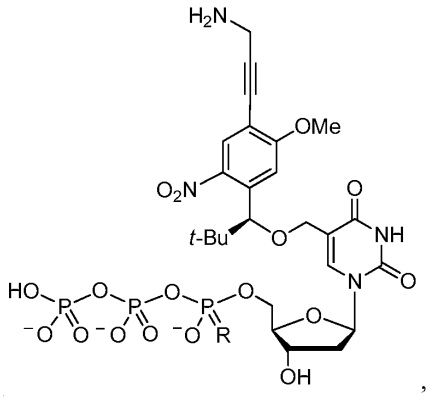
청구항 1에 있어서, 다음과 같이 추가 정의되는, 화합물, 또는 임의의 다음 화학식의 염 또는 양성화된 형태:



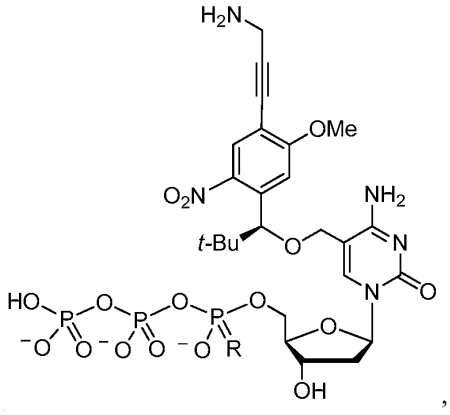
,



,



, 또는

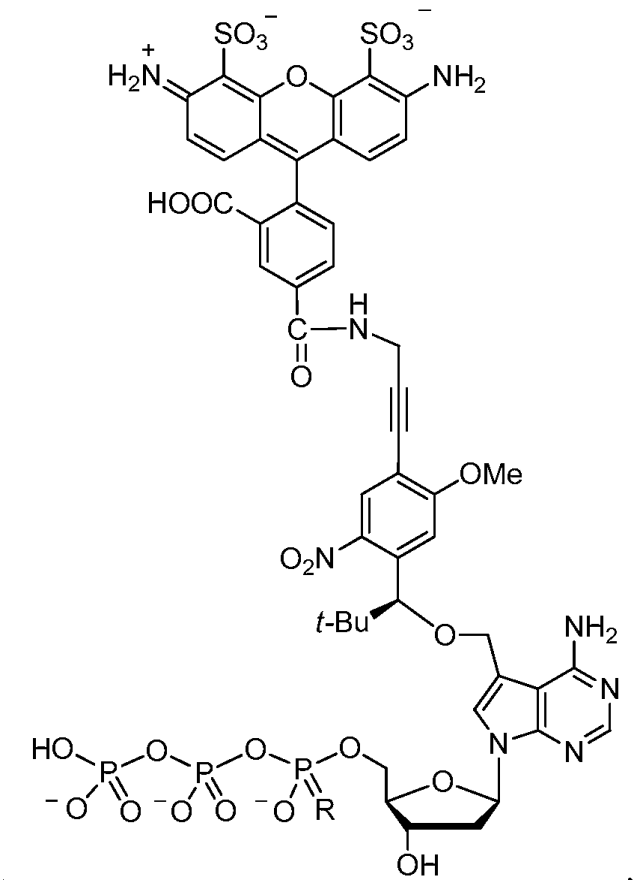


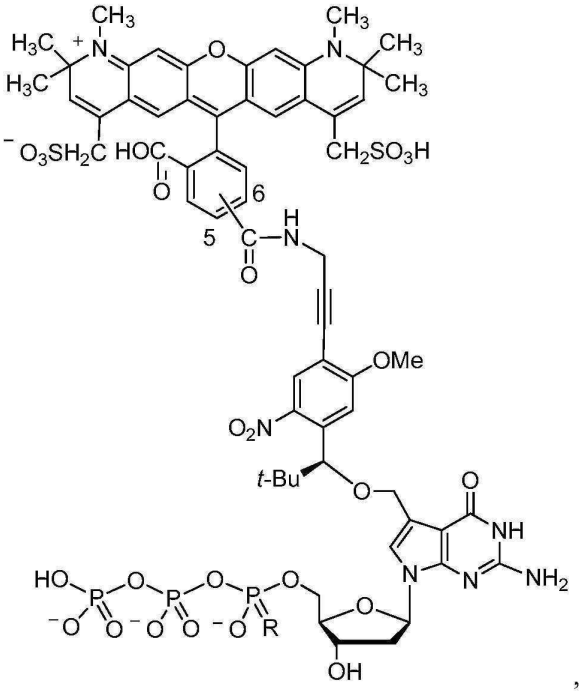
,

여기에서 R은 =O 또는 =S임.

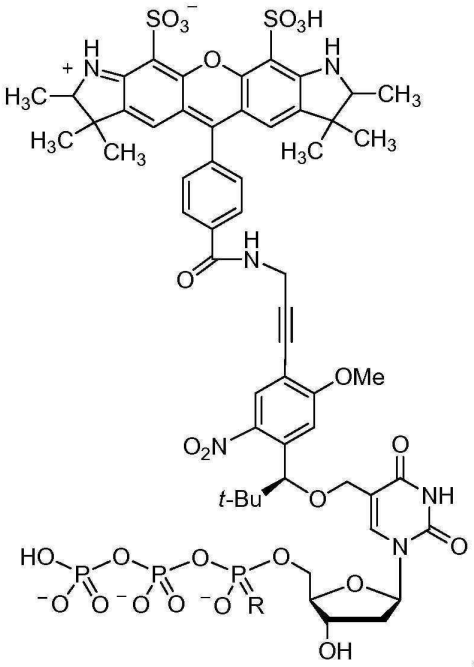
청구항 55

청구항 1에 있어서, 다음과 같이 추가 정의되는 화합물, 또는 임의의 이들 화학식의 염 또는 양성화된 형태:

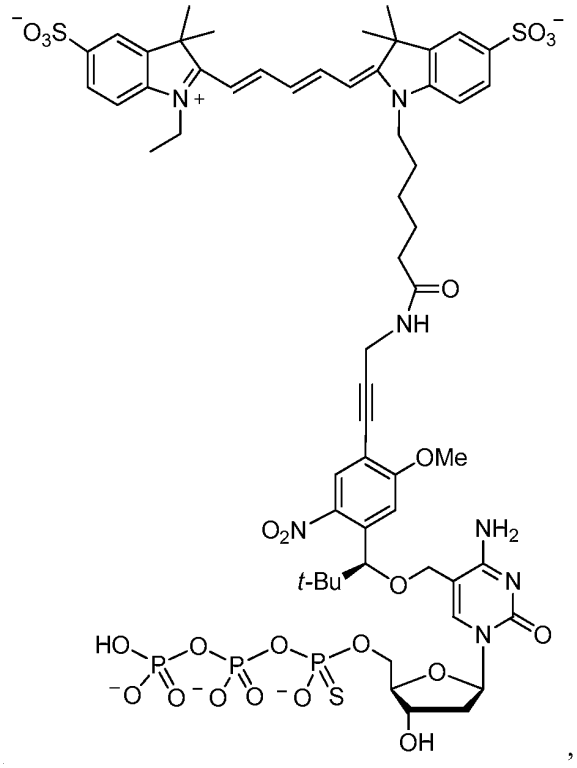




,



, 또는

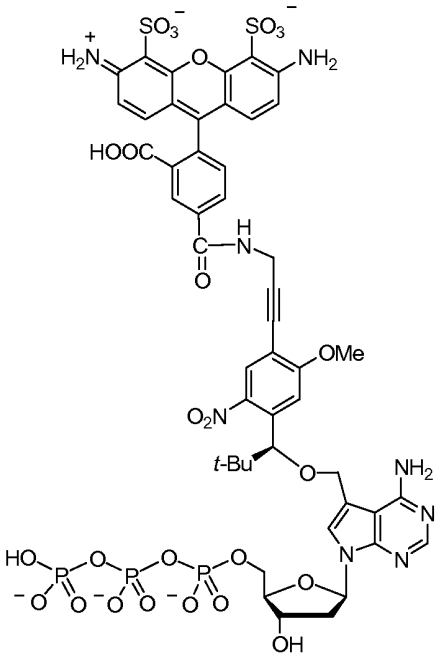
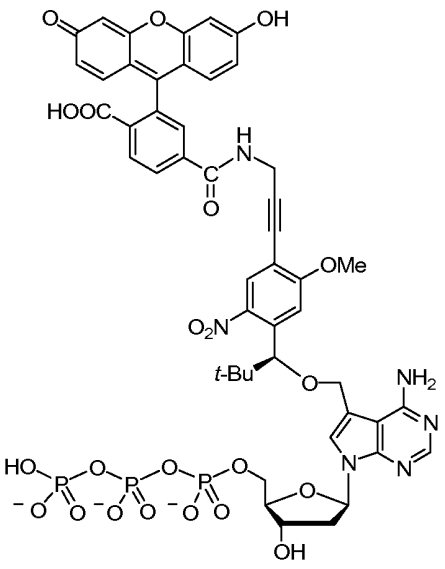
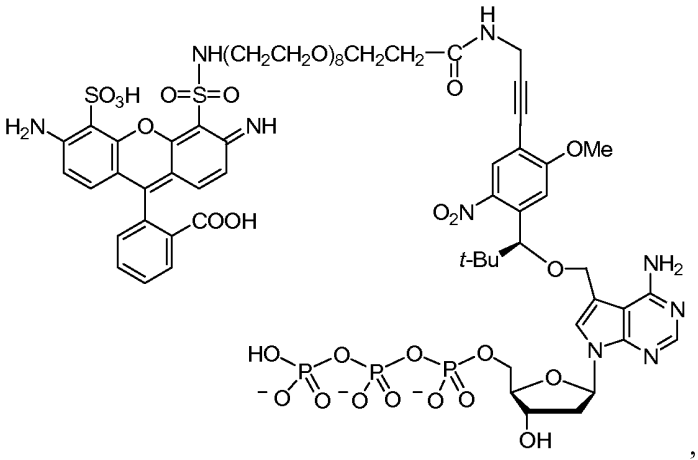


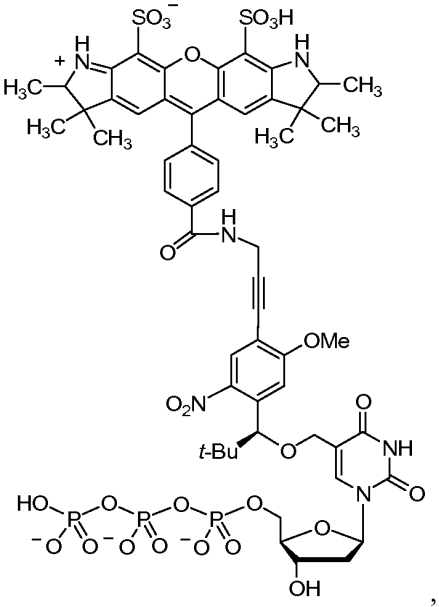
,

이 때 R은 =O 또는 =S임.

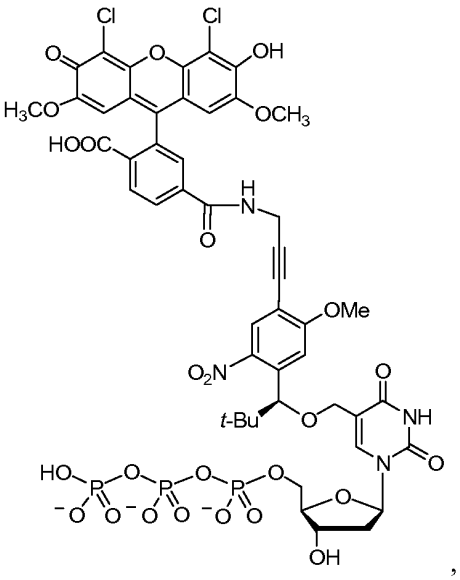
청구항 56

청구항 1에 있어서, 다음과 같이 추가 정의되는 화합물, 또는 임의의 다음 화학식의 염 또는 양성화된 형태:

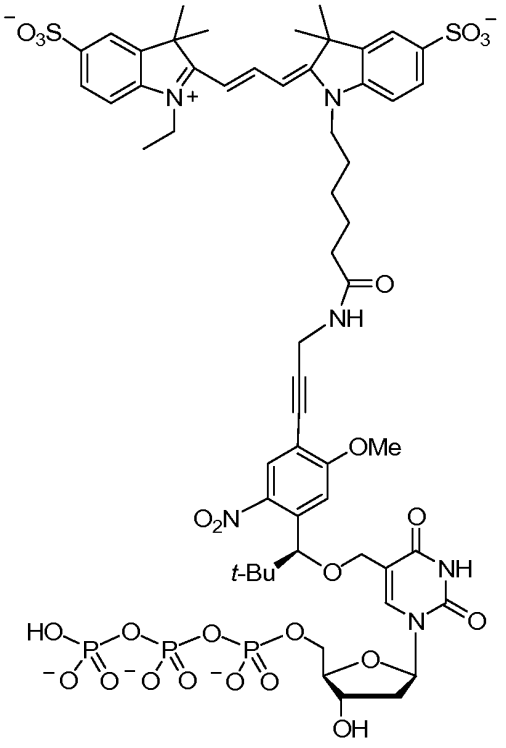

,

,

,



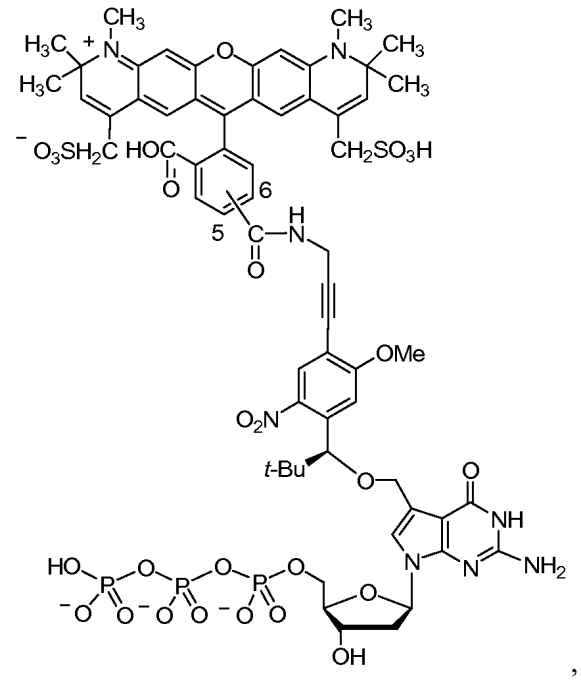
,



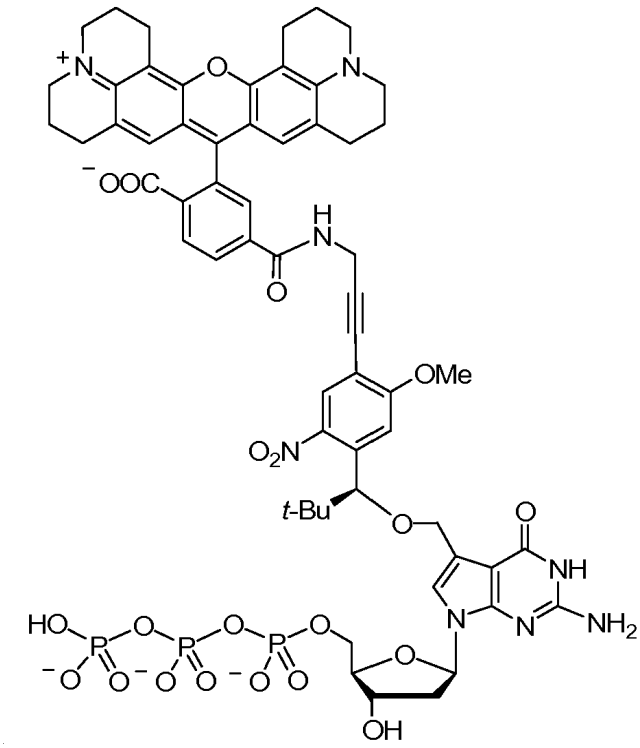
,



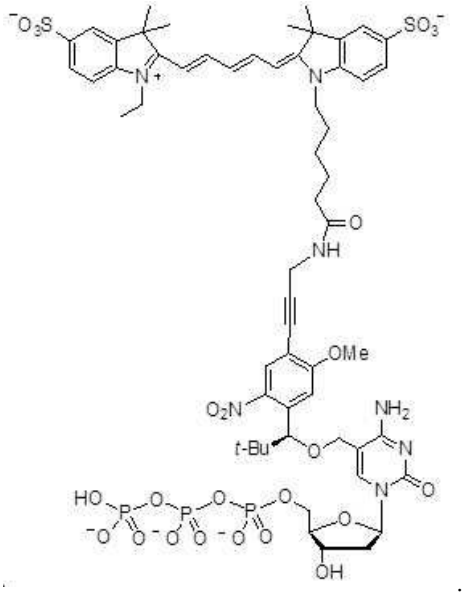
,



,



또는



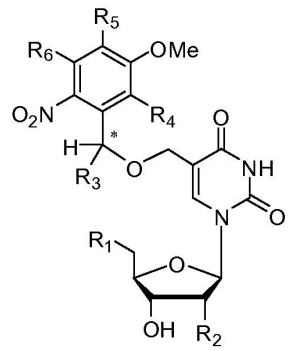
청구항 57

다음의 단계를 포함하는 표적 핵산의 시퀀싱 방법:

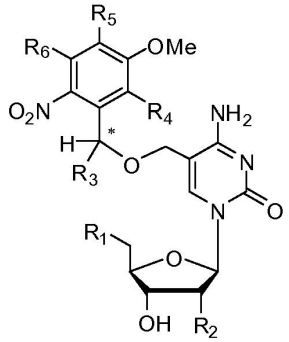
(i) 프라이머 또는 핵산의 5'-단부를 고형 표면에 부착시키는 단계;

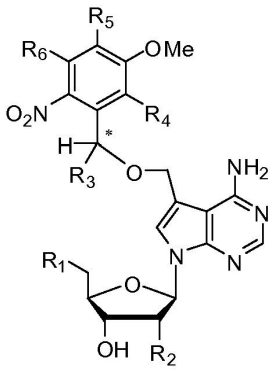
(ii) 고형 표면에 부착된 프라이머에 표적 핵산이 혼성화되거나, 고형 표면에 부착된 핵산에 프라이머가 혼성화되어, 각각 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 형성하는 단계;

(iii) 상이한 하기 화학식 I-VII의 화합물들은 상이한 형광단을 보유한다는 전제하에, 중합효소 및 하기 화학식들로 구성된 그룹에서 선택된 하나 또는 그 이상의 화합물들 또는 이의 염들을 획득하는 단계;

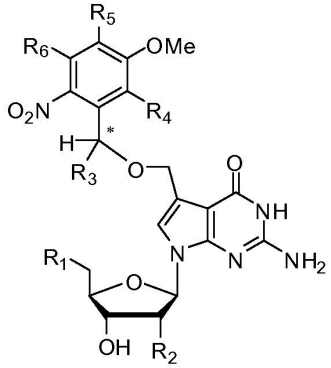


(I),

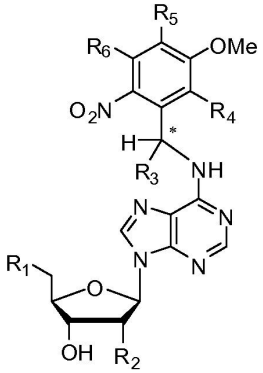




(II),

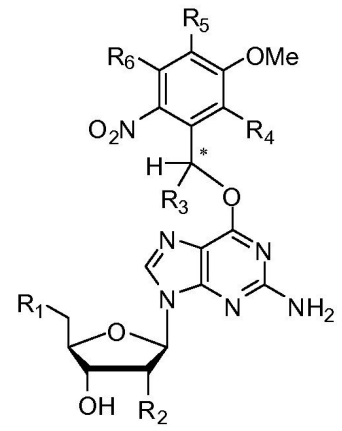


(III),

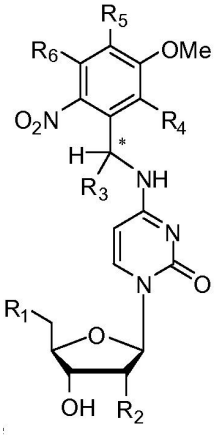


(IV),

(V),



(VI), 또는



(VII),

이 때:

R_1은 트리포스페이트, α-티오트리포스페이트 또는 폴리포스페이트이고;

R_2는 수소 또는 하이드록시이고;

R_3은 알킬$_{(C\leq8)}$ 이고;

R_4는 수소이고;

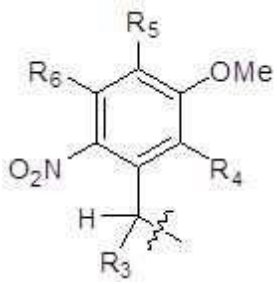
R_5는 -링커-리포터-이고, 여기서 리포터는 형광단에 기초한 것이며; 그리고

R_6는 수소이고;

(iv) 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체가 단계 (iii)의 중합효소 및 하나 또는 그 이상의 화합물들과 반응하여, 중합효소 반응을 통하여 성장하는 프라이머 가닥을 형성하는 단계;

(v) 성장하는 프라이머 가닥을 영상화하여 이의 형광단을 통하여 단계 (iv)의 혼입된 화합물을 확인하는 단계;

(vi) 성장하는 프라이머 가닥을 보유한 고형 표면을 광원에 노출시켜 하기 화학식:



의 광절단가능한 종료 모이어티를 제거하여, 연장된 프라이머를 생성하는 단계, 여기서, R_3, R_4, R_5 및 R_6는 단계 (iii)에서 정의된 바와 같고; 그리고

(vii) 단계 (iv) 내지 (vi)을 1회 또는 그 이상 반복하여 표적 핵산에서 다수의 염기를 확인하는 단계, 여기서 이전 주기의 단계 (vi)의 연장된 프라이머는 후속 주기의 단계(iv)에서 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 대신하여 반응함.

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

청구항 57에 있어서, 단계 (vi)는 디티오트레이톨 (DTT)의 존재하에 실행되는, 방법.

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

청구항 57 또는 67에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물 혼입은 상응하는 천연 뉴클레오티드의 혼입 효과의 70% 내지 100%로 발생되고, 화학식 I의 화합물에 상응하는 천연 뉴클레오티드는 데옥시티미딘 5'-트리포스페이트이고, 화학식 II 및 VII의 화합물에 상응하는 천연 뉴클레오티드는 데옥시시티딘 5'-트리포스페이트이고, 화학식 III 및 V의 화합물에 상응하는 천연 뉴클레오티드는 데옥시아데노신 5'-트리포스페이트이고, 화학식 IV 및 VI의 화합물에 상응하는 천연 뉴클레오티드는 데옥시구아노신 5'-트리포스페이트임을 특징으로 하는, 방법.

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

청구항 57에 있어서, 광절단가능한 종료 모이어티의 85% 내지 100%는 단계 (vi)에서 광원에 노출됨으로써 제거되는, 방법.

청구항 75

청구항 57에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 혼입은 90% 내지 100%의 효과(efficiency)에서 가닥 성장 종료를 수반함을 특징으로 하는 방법.

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **발명의 배경**

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제61/627,211호 및 제61/534,347호(각각 2007년 10월 7일 및 2011년 9월 13일에 출원됨)에 대한 우선권의 이익을 주장하고, 이들의 전체 내용은 각각 본 명세서에 참고문헌으로 수록된다.

[0003] **I. 발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로, DNA 시퀀싱 및 다른 유형의 DNA 분석을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 부분적으로는 신속하게 광화학적으로 절단 가능한 기들을 가진, 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드들과 뉴클레오시드들 및 생의학적 연구에서의 용도를 포함하는 다수의 DNA 시퀀싱 방법들에서 이들의 용도에 관한 것이다.

[0005] **II. 관련 분야의 설명**

[0006] DNA를 빠르게 시퀀싱하기 위한 방법이 집단 및 발전하는 치료법에서의 질환 및 돌연변이를 분석하기 위하여 필요하다(Metzker, 2010, 이는 여기에 참고자료로 편입된다). 흔히 관찰되는 인간 서열 변이의 형태는 단일 뉴클레오티드 다형성(SNPs)인데, 이는 대략 유전체 서열의 300분의 1 내지 1000분의 1 염기쌍에서 발생하고, 구조적

변이체(SVs)가 블록 치환, 삽입(insersion)/결실(deletion), 역위(inversion), 분절 중복(segmental duplication) 및 복제 수 변이체(copy number variants)를 포함한다. 구조적 변이체는 모든 변이 사건의 22% 및 SNPs에서 기인하는 것 보다 더 많은 변이체 염기의 원인이 될 수 있다 (Levy *et al.*, 2007, 이는 본 명세서에 참고문헌으로 수록된다.). 이러한 발견은 마이크로어레이에 기초한 방법을 이용하여 270 개체를 분석한 Scherer, Hurles, 및 동료들의 발견에 부합한다 (Redon *et al.* 2006, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 인간 유전체의 완전한 서열 구성을 위하여, SNP 및 SV 지도화(mapping) 또는 직접 연합(association)에 의하여 통상적인 질환 및 암에 대한 근본적인 유전적 관련을 규명하려고 노력하고 있다. 기법 발전은 빠르고, 고처리량이며(high-throughput), 저비용인 DNA 시퀀싱이 SNPs 및 SVs와 같은 유전 정보의 이해 및 적용되는 의약품에서의 사용을 촉진할 것이라는 것에 주목한다.

[0007] 일반적으로, 10%-내지-15%의 SNPs는 특정 아미노산 잔기를 변형시켜 단백질 기능에 영향을 미치거나, 접합(splicing) 메커니즘을 변화시켜 적절한 유전자의 가공에 영향을 미치거나, 조절 메커니즘을 변화시켜 유전자 또는 단백질의 정상적인 발현 수준에 영향을 미칠 것이다. SVs는 또한 인간 생물학 및 질병에서 중요한 역할을 할 수 있다 (Iafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004; Tuzun *et al.*, 2005; Stranger *et al.*, 2007, 이들은 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 정보를 제공하는 SNPs 및 SVs의 규명이 더욱 정확한 유전병의 진단, 더 우수한 위험 감수성의 예후, 또는 조직에서의 산발적인 돌연변이의 규명을 야기할 것으로 구상된다. 개인의 SNP 및 SV 프로파일의 한 적용은 예방적 약물 요법을 사용한 질환의 발병 또는 진행의 현저한 지연일 것이다. 더욱이, 약물 대사 유전자의 SNP 및 SV 프로파일은 더 안전하고 더욱 효능이 있는 결과를 제공하기 위한 특별한 약물 계획 처방을 위하여 이용될 수 있다. 이러한 의욕적인 목표를 달성하기 위하여, 주어진 복합 질환에 대한 SNP 및 SV 프로파일을 획득하기 위하여 유전체 시퀀싱이 개체군의 대다수의 잠재적인 부분 시퀀싱을 포함하는 서열 재결정 단계로 옮겨갈 것이며, 이는 동시에 특정 영역을 시퀀싱하는 것을 포함할 것이고, 상기 영역은 인간 유전체 전반에 걸쳐 분포된다.

[0008] 대부분의 통상적인 질환의 기초를 이루는 서열 변이는 다중 SNPs, SVs, 및 이의 수많은 조합을 포함할 것으로 보이는데, 이들은 관련 유전자 전체에 분포되고 낮은 빈도로 존재한다. 따라서, *새로운(de novo)* 시퀀싱에 대한 전략을 이용하는 DNA 시퀀싱 기법이, 알려진 SNPs만을 표적으로 하는 기법보다, 드물고 널리 분포된 이러한 변이체를 검출 및/또는 발견할 가능성이 더 높다.

[0009] SNPs, SVs, 단일 뉴클레오티드 변이체들 (SNVs) 및 이의 다수의 조합들의 탐지에 HGS 기술이 어떻게 응용될 수 있는지의 한 가지 예가 암 진단법이다. 이들 분석은 전통적으로 단일 실험적 접근법과 함께 다중 표지들의 분석으로 최근에 진보된 전통적으로 단일-표지, 단일-분석 접근법이었다. 그러나, 각 암은 다수의 유전자들에서 많은 돌연변이들이 동시에 발생되는 다소 유전적으로 복잡하다. 따라서, 전통적인 방법들은 공지의 서열 변이체들의 선택된 일부에만 정보를 제공하면서, 고가의 그리고 시간-소모적인 테스트로 이어진다. NGS 기술에서 최근 진전은 다양한 암 유형과 연합된 많은 의학적으로 작용가능한 유전자 표적들에 초점을 맞춘 표적화된 접근법을 허용하였다(Su *et al.*, 2011; Beadling *et al.* 2012). Cancer Genome Atlas (TCGA) 프로젝트, International Cancer Genome Consortium (ICGC) 프로젝트, 및 Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) 데이터베이스와 같은 시퀀싱 노력들의 최근 성공으로 인하여, 많은 암 유형들에서 이들 유전자 표적들 및 돌연변이들을 포함하는 암에서 치료제의 결과에 관한 지식의 방대한 요약이 있다(Futreal *et al.*, 2004). Pediatric Cancer Genome Project 결과의 일부 추가 작업에서 더 적은 수의 돌연변이와 또다른 병로에서의 우세한 돌연변이에 의해 두드러진 뚜렷한 유전적 프로파일을 가진 것으로 나타났다(Wu *et al.*, 2012; Meldrum *et al.* 2011). 암 진단법에서 현재 최대로 충족되지 않은 요구는 암의 형질변환을 겪고 있는 세포의 제한된 하위 집단에 속하는 희귀한 서열 변이체들을 식별하기 위하여 초기 단계 탐지에 요구되는 정확성 및 민감성을 가진, 신속하고, 고처리량의 기술이다.

[0010] 전통적으로, DNA 시퀀싱은 "생어(Sanger)" 또는 "디데옥시" 방법에 의하여 수행되었는데, 이는 DNA 중합효소를 이용하는 2',3'-디데옥시뉴클레오티드(ddNTPs)의 혼입에 의한 DNA 합성의 사슬 정지를 포함한다(Metzker et al., 2005, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 2005년 이후, 게놈 분석을 위한 자동화된 생어 시퀀싱의 응용으로부터 벗어난 근본적인 전환이 있었다. 차세대 시퀀싱(NGS) 기법의 장점에는 막대한 양의 데이터를 저렴하게 생성할 수 있는 능력이 포함되는데, 일부 경우에서 기구 가동당 백만을 초과하는 짧은 서열 판독이다. 이러한 많은 접근법이 통상적으로 *합성에 의한 시퀀싱(sequencing-by-synthesis,* SBS)으로 지칭되는데, 이는 DNA 시퀀싱의 여러 상이한 기작을 명확하게 설명하지 않는다 (Metzker, 2010; Metzker, 2005, 이들은 본 명세서에 참고문헌으로 수록된다). 이 점에서, DNA 중합효소-의존 전략이 주기적 가역 정지(cyclic reversible termination, CRT), 단일 뉴클레오티드 첨가 (SNA, *예를 들어*, 파이로시퀀싱), 및 실시간 시퀀싱으로 분류된다.

DNA 중합효소가 DNA 연결효소(리가아제)에 의하여 대체되는 접근법이 연결에 의한 시퀀싱(sequencing-by-ligation, SBL)으로 지칭된다. 이들 접근법은 Metzker (2010)에서 설명되어 있고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0011] 시퀀싱 기술은 (a) 주형(template) 준비, (b) 시퀀싱 및 영상화, 그리고 (c) 데이터 분석으로 광범위하게 구분된 다수의 방법들을 포함한다. 특정 프로토콜들의 독특한 조합은 한 기술을 다른 기술과 구별시키고, 각 플렛포옴으로부터 생성된 데이터의 유형을 결정한다. 데이터 출력에서 이러한 차이들은 데이터 질과 비용에 근거하여 플렛포옴들을 비교할 때 도전을 나타낸다. 비록 각 제조업자에 의해 품질 등급 및 정확성 예측이 제공되지만, 한 플렛포옴의 "품질 기초" 가 또다른 플렛포옴의 것과 대등하다는 의견은 없다.

[0012] NGS 반응을 위하여 주형을 준비하는데 이용된 두 가지 방법들은 다음을 포함한다: 단일 DNA 분자들로부터 유래된 클론적으로 증폭된 주형들과 단일 DNA 분자 주형. DNA 중합효소들을 이용하는 시퀀싱 방법들은 주기적 가역 정지 (CRT), 단일-뉴클레오티드 추가 (SNA) 및 실시간 시퀀싱으로 분류된다 (Metzker 2010 참고). DNA 중합효소가 DNA 리가아제에 의해 대체된 접근법인 결찰에 의한 시퀀싱 (SBL)은 NGS 기술에서 또한 이용되어왔었다(예를 들면, Shendure *et al.*, 2005; Valouev *et al.*, 2008 참고). 이러한 시퀀싱 전략과 결합된 영상화 방법들은 생물발광 신호들의 측정에서부터 단일 분자 사건들의 4색 영상화 범위에 이른다. 이들 NGS 플렛포옴에 의해 생성된 방대한 데이터는 데이터 저장, 추적 및 품질 관리 차원에서 정보 기술에 실질적인 요구를 둔다(Pop & Salzberg, 2008 참고).

[0013] 조사되는 게놈으로부터 핵산 재료의 대표적인 비-편향된 원천을 만드는 확실한 방법의 필요성은 중요한 목적을 남겨둔다. 현재 방법들은 일반적으로 무작위로 게놈 DNA를 더 작은 크기로 자르고, 이로부터 단편 주형들 또는 짝-쌍(짝-형성) 주형이 만들어지는 것과 관련된다. NGS 기술들중에 공통적인 주제는 이 주형을 고형 표면 또는 지지대에 부착시키거나 또는 고정시키는 것이다. 공간적으로 떨어져있는 주형 장소의 고정화(immobilization)로 수천 내지 수억개의 시퀀싱 반응들의 동시 실행이 허용된다.

[0014] 클론에 의해 증폭된 방법들은 박테리아성 클로닝보다 명백한 장점들을 제공하지만, 일부 프로토콜은 일반적으로 실행하는 것이 번거롭고, 다량의 게놈 DNA 재료 (3~20 μg)를 요구한다. 단일-분자 주형들의 준비가 좀더 직접적이며, 출발 재료가 덜 요구된다 (<1 μg). 더욱이, 이들 방법은 클론적으로 증폭된 주형에서 서열 변이체들로 가장하는 돌연변이를 만드는 PCR을 요구하지 않는다. AT-풍부한 그리고 GC-풍부한 표적 서열들은 또한 산물 수율에서 증폭 편향을 보일 수 있고, 이는 게놈 정렬 및 어셈블리에서 이들이 충분히 대표하지 못함을 초래한다. RNA-seq와 같은 정량적인 적용 (Wang et al., 2009 참고)은 비-증폭된 주형 출처와 더욱 효과적으로 실행되며, 이는 mRNA 분자들의 대표적인 풍부함을 변경시키지 않는다.

[0015] CRT 방법의 중요한 측면은 가역적 종료자인데, 이는 두 가지 주요 유형들이 있다: 3'-O-차단된 것과 3'-OH 차단안된 것(Metzker, 2010). Sanger 시퀀싱에서 쇄 종료자로 작용하는 ddNTP의 사용은 뉴클레오티드들의 3'-단부에 부착된 가역적 차단 기들의 초기 발달에 대한 기반을 제공하였다 (Metzker *et al.* 1994; Canard & Sarfati, 1994). 차단 기들 가령, 3'-O-알릴-dNTPs (Metzker *et al.*, 1994; 미국 특허 6,664,079; Ju *et al.*, 2006; 미국 특허 7,057,026; 미국 특허 7,345,159; 미국 특허 7,635,578; 미국 특허 7,713,698) 그리고 3'-O-아지도메틸-dNTPs (미국 특허 7,057,026; Guo *et al.*, 2008; Bentley *et al.*, 2008; 미국 특허 7,414,116; 미국 특허 7,541,444; 미국 특허 7,592,435; 미국 특허 7,556,537; 미국 특허 7,771,973)이 CRT에 이용되었다. 3'-O-차단된 종료자들은 핵염기로부터 형광단(fluorophore)을 제거하고, 3'-OH 기를 복원시키기 위하여 2개의 화학적 결합의 절단을 요구한다. 이들 가역적 종료자의 이용에서 단점은 3'-단부에 부착된 차단기는 전형적으로 DNA 중합효소의 혼입에 대항하는 편향을 야기한다는 점이다. DNA 중합효소의 돌연변이 유발은 3'-O-차단된 종료자의 혼입을 용이하게 하는데 흔히 요구된다. 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환들, 삽입들, 및/또는 결손들을 포함하는 부위-지향된 또는 무작위 돌연변이 유발에 의해 다수의 유전공학적으로 조작된 DNA 중합효소들이 만들어져야 하고, 그리고 3'-차단된 뉴클레오티드들이 좀더 효과적으로 혼입되는 목적으로 고-처리량(high-throughput) 스크리닝에 의해 식별되어야 한다.

[0016] 돌연변이 DNA 중합효소들의 큰 라이브러리를 스크리닝함으로써 3'-O-차단된 종료자들을 효과적으로 혼입시키는 변형된 효소의 식별의 곤란함이 3'-차단안된 가역적 종료자들의 발달로 이어졌다. 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드의 염기에 부착된 작은 광절단가능한 기는 효과적인 가역적 종료자로 작용할 수 있고, 야생형 DNA 중합효소들에 의해 효과적으로 혼입될 수 있다는 것이 설명되었다(Wu *et al.*, 2007; Metzker, 2010; Litosh *et al.*, 2011, Gardner *et al.*, 2012; 미국 특허 7,897,737, 7,964,352; 및 8,148,503, 미국 특허 출원 공개 2011/0287427). 예를 들면, 5-히드록시메틸-2'-데옥시우리딘 (HOMedU)은 수많은 박테리오파아지 및 하등 진핵

세포의 게놈에서 자연적으로 발견된다(Gommers-Ampt, 1995, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 이의 히드록시메틸 기는 작은 광절단가능한 종료 기에 부착되기 위한 분자 핸들로 작용할 수 있다. 가역적 종료자들로 기능을 하기 위하여 더 변형될 수 있는 자연적으로 발생가능한 과다변형된 기타 염기들은 5-히드록시메틸-2'-데옥시시티딘 (HOMedC)을 포함하는데, 이는 T2, T4, 및 T6 박테리오파아지 (Wyatt & Cohen, 1953; Gommers-Ampt, 1995) 그리고 동물들의 게놈에서 자연적으로 발견된다(Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010). 피롤로피리미딘 고리 구조 (7-데아자퓨린)는 또한 뉴클레오시드 항생제 (Carrasco & Vzquez, 1984, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 및 tRNA 염기(Limbach, *et al.,* 1994, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다), 그리고 화합물 7-데아자-7-히드록시메틸-2'-데옥시아데노신 (C^7-HOMedA) (Rockhill *et al.*, 1997) 그리고 7-데아자-7-히드록시메틸-2'-데옥시구아노신 (C^7-HOMedG) (McDougall *et al.*, 2001)이 보고되엇다.

[0017] 본 발명의 한 측면은 히드록시메틸 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드들의 핵염기에 부착된 변형된 2-니트로벤질 기의 용도다. 2-니트로톨루엔의 용액 (Wettermark, 1962) 및 이의 유도체들(Wettermark, 1962; Hardwick *et al.*, 1960; Mosher *et al.*, 1960; Sousa & Weinstein, 1962; Weinstein *et al.*, 1966)은 광호변(photochromism), 즉, *aci*-니트로 음이온 중간생성물의 일시적인 형성의 결과로 간주되는 현상의 성질을 나타내는 것으로 보고되었다(Weinstein *et al.*, 1966; Morrison, 1969). 이론에 결부되지 않고, 니트로 기에 의해 광자의 흡착은 α-탄소로부터 수소의 제거(Mosher et al., 1960; Berson & Brown, 1955; De Mayo, 1960), *aci*-니트로 음이온 중간생성물의 형성, 그리고 그 다음 'caged' 효과물질분자의 방출 및 니트로조카르보닐 부산물의 창조(Corrie, 2005)를 초래하는 것으로 일반적으로 인식된다. 이들 초창기 연구들은 벤질의 탄소의 α-치환(Wettermark, 1962) 또는 벤젠 고리의 위치 4가 전자-제공 기로의 치환 (Sousa & Weinstein, 1962; Weinstein *et al,* 1966)은 광호변 효과 속도를 증가시켰다고 제안하였다. 이러한 발견들은 감광성 2-니트로벤질 보호 기들의 발달로 이어졌다(Barltrop *et al.,* 1966; Patchornik, 1968; Patchornik *et al.,* 1970). 광화학적 절단의 속도에 대한 정도가 변경되지만, 그러나, 전형적으로 벤질의 탄소의 치환(Walker *et al.,* 1986; Hasan *et al.*, 1997; Giegrich *et al.*, 1998), 벤질 고리에 부착된 기능기(들) (Wootton & Trentham, 1989; Hasan *et al.*, 1997; Giegrich *et al.*, 1998), 그리고 이탈기 (Walker et al., 1986) 뿐만 아니라 pH (McCray *et al.*, 1980; Walker *et al.*, 1986; Wootton & Trentham, 1989), 용매 (Sousa & Weinstein, 1962; McGall *et al.*, 1997; Giegrich *et al.*, 1998), 그리고 광 강도 (McCray *et al.*, 1980; McGall *et al.*, 1997)를 포함하는 보고된 다수의 인자들에 따라 달라진다. 그러나, 연구되지 않은 한 가지 성질이 입체화학이며, 이것으로 인하여, 2-니트로벤질의 벤질 또는 α-탄소의 치환은 키랄 중심을 초래한다. 뉴클레오티드 합성의 경우에서, 라셈체 α-치환된 2-니트로벤질 알코올의 커플링은 벤질의 탄소에서 절대적 배치(*R* 또는 *S*)만이 상이한 2가지 부분입체이성질체를 초래할 수 있다.

[0018] 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드들의 또다른 분류는 Mitra *et al.* (2003) 및 Turcatti *et al.* (2008)에 의해 설명되었는데, 이는 제 1 뉴클레오티드의 추가 이후 혼입을 중단시키기 위하여 부피가 큰 염료기의 공간적 방해에 의존한다. Wu *et al.* (2007), Litosh *et al.* (2011), 및 Gardner *et al.*, 2012에 의해 설명된 치환된 2-니트로벤질 뉴클레오티드 유사체들은 부피가 큰 치환체들 이를 테면, 형광 염료의 요구 없이 DNA 합성을 종료시킨다고 명시하고 있다. 3'-차단안된 뉴클레오티드들의 추가 분류는 Helicos Biosciences에서 설명되었다. 이들 뉴클레오티드는 DNA 합성의 저해제로 작용하는 제 2 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 유사체를 이용한다(Bowers *et al.*, 2009; 미국 특허 7,476,734). 본 발명의 화합물과 Bowers에서 설명되는 화합물들을 비교하였을 때, 종료 성질에서 상당한 차이가 관찰된다. 예를 들면, Bowers *et al.*는 이-염기 동종중합체 주형을 이용한 전정유상태(pre-steady-state) 역학을 설명하는데, $k_{pol(+2)}$ 속도는 이들의 모든 3'-OH 차단안된 '실질적인' 종료자들에 대해 측정되었다. Bowers *et al.*,는 마이크로몰이하(submicromolar) 뉴클레오티드 농도(가령, 100 내지 250 nM)에서 이들의 종료 실험, 종료 분석을 실행하였다. 대조적으로, 본 발명의 몇 가지 화합물은 0.5 내지 20 분의 시간에 걸쳐 10 μM에서 실행되었다. 화합물 dU.V 및 dU.VI는 모두 제 1 염기 위치에 신속하게 혼입되었으며 (2분까지 100%), 그 다음 그 위치에서 DNA 합성이 종료되었다. 최대 20 분의 항온처리 시간까지 예상된 제 2-염기 위치에서 분명한 신호가 탐지되지 않을 수 있다. 좀더 상세한 내용은 Gardner *et al.*, 2012를 참고한다.

[0019] 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들은 전형적으로 3'-O-차단된 뉴클레오티드들보다 몇 가지 장점들을 가진다. 예를 들면, 많은 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들의 경우, 오직 단일 결합의 절단으로 핵염기로부터 종료기 및 형광단기 모두가 제거된다. 그 다음 이는 다음 CRT 주기를 위한 뉴클레오티드를 복원시키기 위한 좀더 효과적인 전략을 초래한다. 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들의 두 번째 장덤은 이들 화합물중 많은 것들이 좀더 우호적

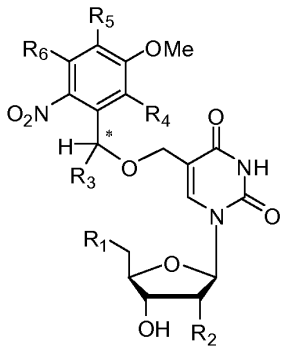
인 효소적 혼입을 보여주고, 일부 경우에는 혼입될 뿐만 아니라 야생형 DNA 중합효소들과 함께 천연 뉴클레오티드일 수 있으며 (Wu *et al.*, 2007; Litosh *et al.*, 2011; Gardner *et al.*, 2012; 미국 특허 7,897,737; 미국 특허 7,964,352; 미국 특허 8,148,503; 미국 특허 출원 공개 2011/0287427), 다른 경우들에서는 이 효과가 관찰되지 않았다(Bowers *et al.*, 2009; 미국 특허 7,476,734). 3'-OH 차단안된 종료자들의 경우 한 가지 도전은 단일 염기 추가 이후 DNA 합성의 종료로 이어지는 염기에 적절한 변형을 창조하는 것이다. 이것은 차단안된 3'-OH 기가 다음에 오는 뉴클레오티드를 혼입시키기 위한 천연 기질이기 때문에 중요하다.

[0020] 차-세대 시퀀싱 (NGS) 기술은 중요한 생물의학적 발견을 촉진시켰지만, 오류율의 감소, 느린 주기 시간의 감축을 포함하는 다수의 이유로 인하여 여전히 화학적 개선이 요구된다. NGS 분석에서 효과적이기 위하여, 가역적 종료자들은 다수의 이상적인 성질들, 예를 들면, 뉴클레오티드 혼입의 신속한 역학, 단일-염기 종료, 높은 뉴클레오티드 선택성, 및/또는 종료 기의 신속한 절단을 포함하는 성질을 나타내는 것이 전형적으로 바람직하다. 따라서, 이러한 도전에 부합되는 새로운 뉴클레오시드들과 뉴클레오티드들을 개발할 필요가 있다.

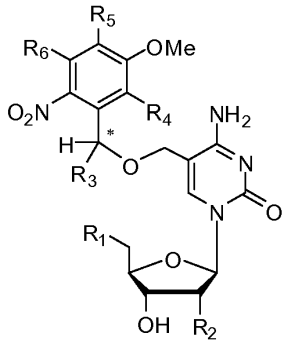
[0021] **발명의 요약**

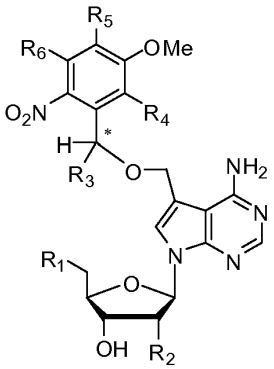
[0022] 일부 양태에서, 본 발명은 높은 처리량의 시퀀싱 반응에서 효율적인 유전체 정보의 시퀀싱에 유용한 신규한 화합물 및 조성물을 제공한다. 또 다른 양태에서, 효율적이고 알맞게 유전체 정보를 제공할 수 있는 시약 및 시약의 조합이 제공된다. 또 다른 양태에서, 본 발명 진단 방법 및 개인에 대하여 표적화된 치료법 개발을 위한 시약의 라이브러리 및 어레이(array)를 제공한다.

[0023] 일부 양태에서, 본 개시는 DNA 시퀀싱에서 사용될 수 있는 신규한 화합물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 다음 화학식의 화합물 또는 이의 염, 호변이체, 또는 이의 광학 이성질체를 공개한다:

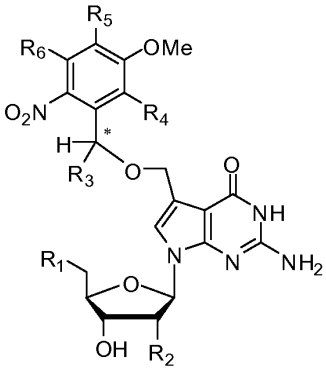


(I),

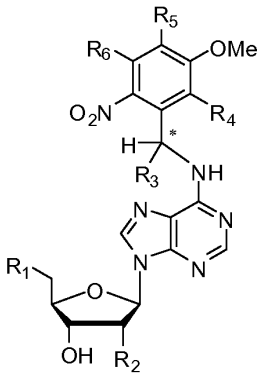




(II),



(III),

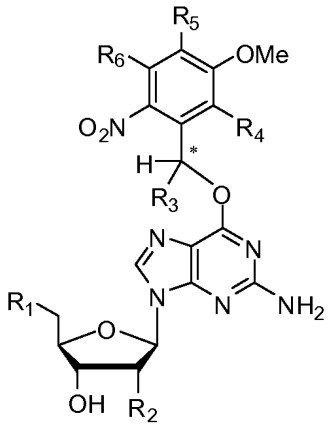
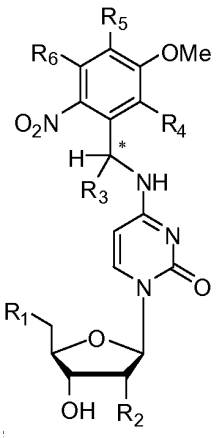


(IV),



(V),

[0024]

[0025]  (VI), 또는  (VII),

[0026] 여기에서:

[0027] R_1은 하이드록시, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트 또는 폴리포스페이트이고;

[0028] R_2는 수소 또는 하이드록시이고;

[0029] R_3은 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

[0030] R_4는 수소, 하이드록시, 할로, 아미노, 니트로, 시아노, 아지도 또는 멀캅토;

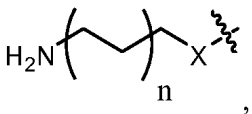
[0031] 알킬$_{(C\leq6)}$, 아실$_{(C\leq6)}$, 알콕시$_{(C\leq6)}$, 아실옥시$_{(C\leq6)}$, 알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 디알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 아미도$_{(C\leq6)}$, 또는 이들기중 임의 기의 치환된 형태이고;

[0032] R_5 및 R_6는 각각 독립적으로

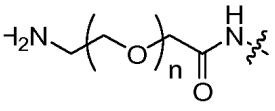
수소, 하이드록시, 할로, 아미노, 니트로, 시아노, 아지도 또는 멀캅토;

[0033] 알킬$_{(C\leq6)}$, 알케닐$_{(C\leq6)}$, 알키닐$_{(C\leq6)}$, 아릴$_{(C\leq6)}$, 아랄킬$_{(C\leq8)}$, 헤테로아릴$_{(C\leq6)}$, 아실$_{(C\leq6)}$, 알콕시$_{(C\leq6)}$, 아실옥시$_{(C\leq6)}$, 알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 디알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 아미도$_{(C\leq6)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태;

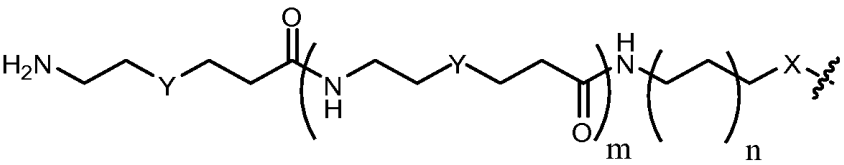
[0034] 다음 식의 기:



,



[0035] , 또는



[0036] 이며,

[0037] 여기에서

[0038] X는 -O-, -S-, 또는 -NH-; 또는 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 알킨디일$_{(C\leq12)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태이고;

[0039] Y는 -O-, -NH-, 알칸디일$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq12)}$이고;

[0040] n은 0-6의 정수이고; 그리고

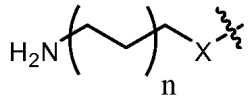
[0041] m은 0-6의 정수이고; 또는

[0042] 링커-리포터이다.

일부 구체예들에서, 이 화합물은 화학식 I, II, III, IV, V, VI 또는 VII의 화합물로 추가 정의된다. 일부 구체예들에서, R_1은 하이드록시, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, α-티오트리포스페이트 또는 폴리포스페이트이다.

[0043] 삭제

[0044] 일부 구체예들에서, R_2는 수소, 하이드록시이다. 일부 구체예들에서, R_3는 알킬$_{(C\leq 8)}$, 예를 들면, 이소프로필 또는 *tert*-부틸을 포함하는 알킬$_{(C3-4)}$이다. 일부 구체예들에서, R_4는 수소, 니트로이다. 일부 구체예들에서, R_5는 수소, 요오드, 또는 예를 들면, 메톡시를 포함하는 알콕시$_{(C\leq 6)}$이다. 일부 구체예들에서, R_5는 다음의 구조식을 가진 기이다:

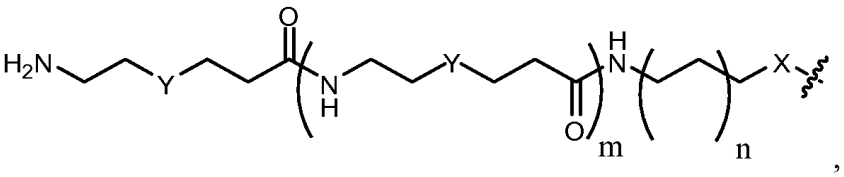
[0045] 

[0046] 여기에서

[0047] X는 -O-, -S-, 또는 -NH-; 또는 알칸디일$_{(C\leq 12)}$, 알켄디일$_{(C\leq 12)}$, 알킨디일$_{(C\leq 12)}$, 아렌디일$_{(C\leq 12)}$, 헤테로아렌디일$_{(C\leq 12)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태이고; 그리고

[0048] n은 0-6의 정수이다.

[0049] 일부 구체예들에서, X는 알킨디일$_{(C2-8)}$, 예를 들면, -C≡C-이다. 일부 구체예들에서, n은 0이다. 일부 구체예들에서, R_5는 다음의 구조식의 기다:

[0050] ,

[0051] 여기에서

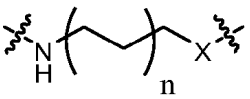
[0052] X는 -O-, -S-, 또는 -NH-; 또는 알칸디일$_{(C\leq 12)}$, 알켄디일$_{(C\leq 12)}$, 알킨디일$_{(C\leq 12)}$, 아렌디일$_{(C\leq 12)}$, 헤테로아렌디일$_{(C\leq 12)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태이며;

[0053] Y는 -O-, -NH-, 알칸디일$_{(C\leq 12)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq 12)}$이고;

[0054] n은 0-6의 정수이고; 그리고

[0055] m은 0-6의 정수이다.

[0056] 일부 구체예들에서, X는 알킨디일$_{(C2-8)}$, 예를 들면, -C≡C-이다. 일부 구체예들에서, Y는 $-CH_2-$이다. 일부 구체예들에서, n은 0이다. 일부 구체예들에서, m은 0이다. 일부 구체예들에서, R_5는 -링커-리포터이다. 일부 구체예들에서, 링커는 다음과 같다:

[0057] 

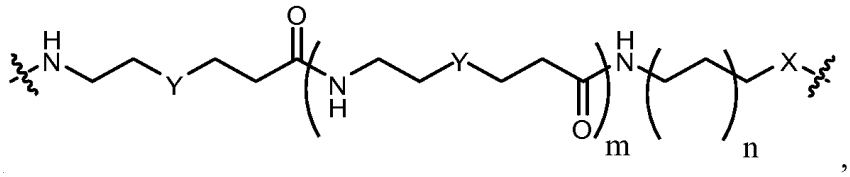
[0058] 여기에서

[0059] X는 -O-, -S-, 또는 -NH-; 또는

[0060] 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 알킨디일$_{(C\leq12)}$, 아렌디일$_{(C\leq12)}$, 헤테로아렌디일$_{(C\leq12)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태이고; 그리고

[0061] n은 0-6의 정수이다.

[0062] 일부 구체예들에서, X는 알킨디일$_{(C2-8)}$, 예를 들면, -C≡C-이다. 일부 구체예들에서, n은 0이다. 일부 구체예들에서, 링커는 다음과 같다:

[0063] ,

[0064] 여기에서

[0065] X는 -O-, -S-, 또는 -NH-; 또는

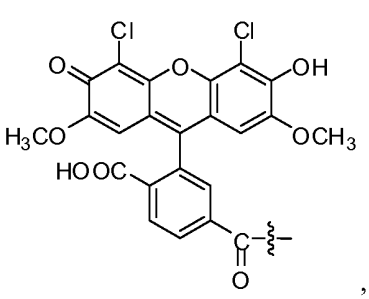
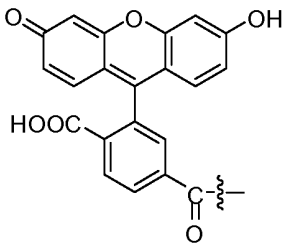
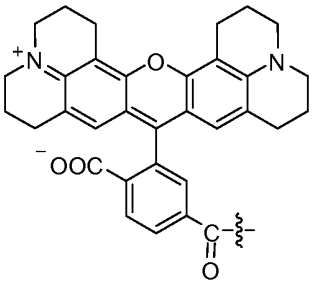
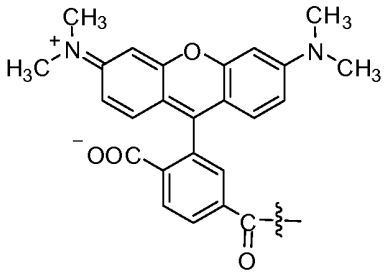
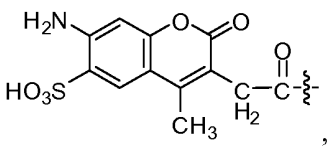
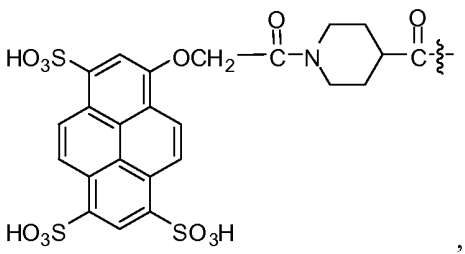
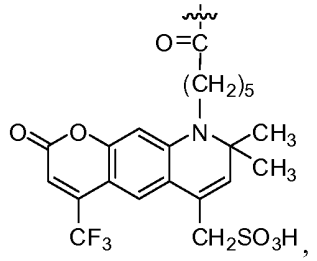
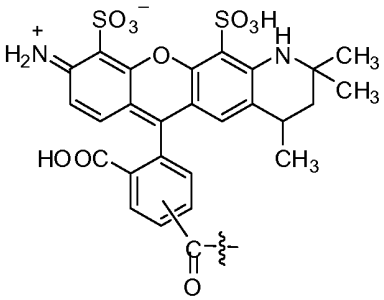
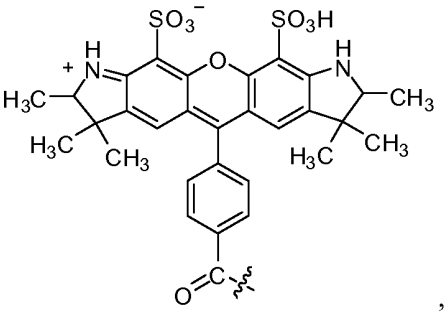
[0066] 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 알킨디일$_{(C\leq12)}$, 아렌디일$_{(C\leq12)}$, 헤테로아렌디일$_{(C\leq12)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태이고;

[0067] Y는 -O-, -NH-, 알칸디일$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq12)}$이고;

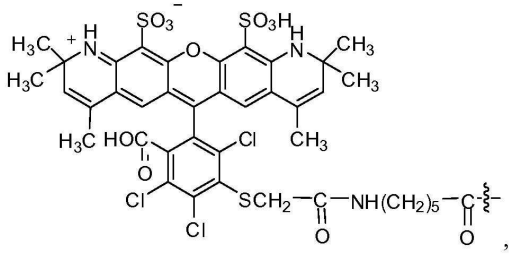
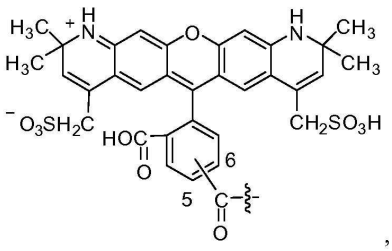
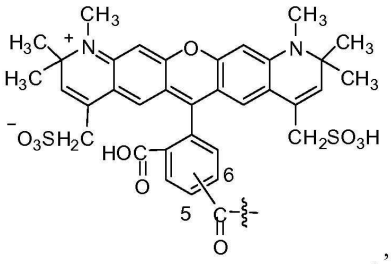
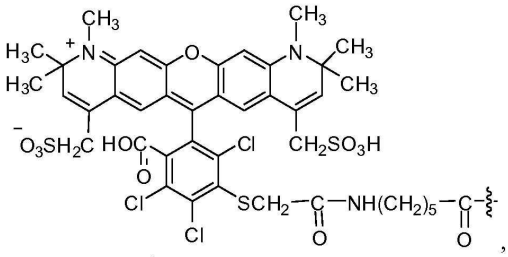
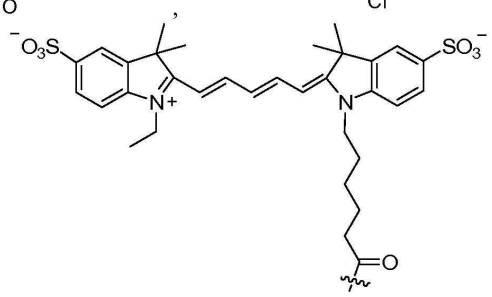
[0068] n은 0-6의 정수이고; 그리고

[0069] m은 0-6의 정수이다.

[0070] 일부 구체예들에서, X는 알킨디일$_{(C2-8)}$, 예를 들면, -C≡C-이다. 일부 구체예들에서, Y는 -CH_2-이다. 일부 구체예들에서, n은 0이다. 일부 구체예들에서, m은 0이다. 일부 구체예들에서, 리포터는 염료에 근거하며, 여기에서 염료는 잔텐, 플루오레세인, 로다민, BODIPY, 시아닌, 쿠마린, 파이렌, 프탈로시아닌, 피코빌리단백질, 또는 스쿠아레인(squaraine) 염료이다. 일부 구체예들에서, 리포터는 다음과 같다:

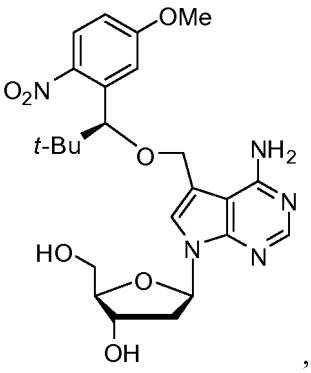
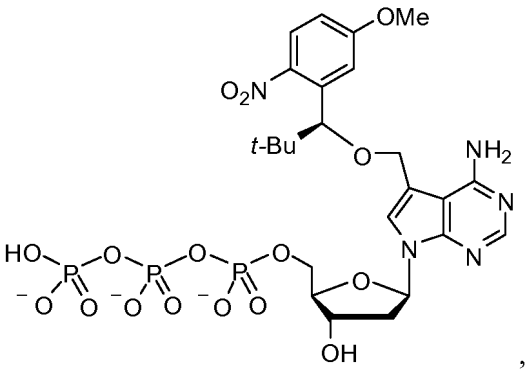

,

,

,

,

,

,

,

,

,

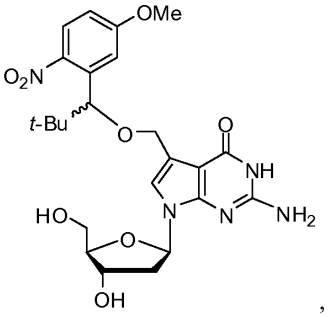
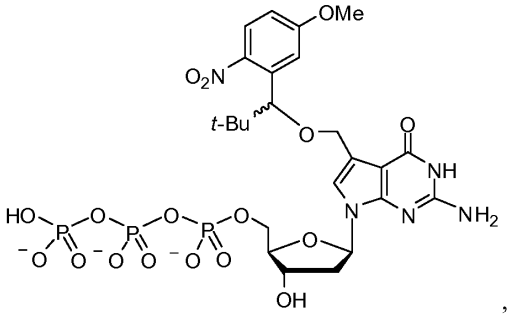
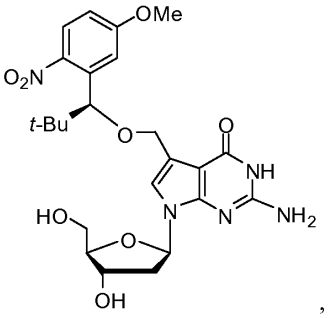
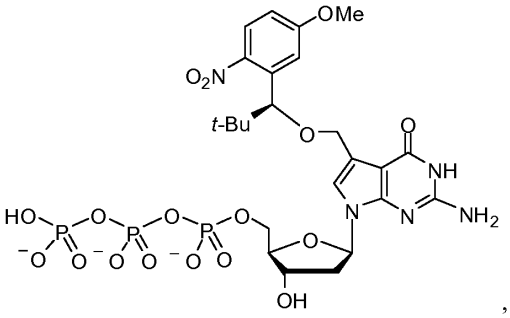
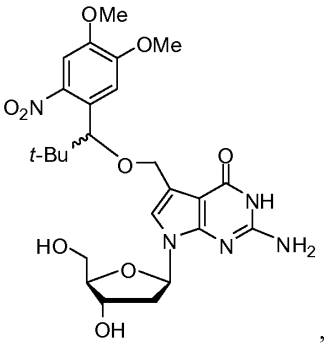
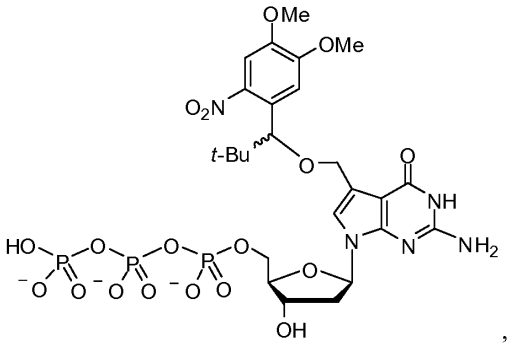
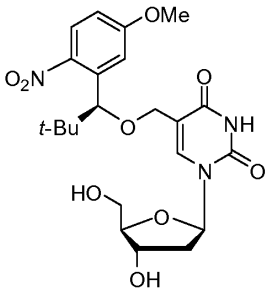
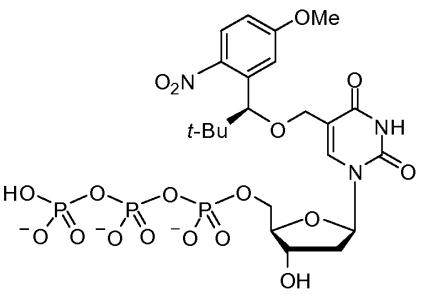
[0071]


,

,

,

, 또는

.

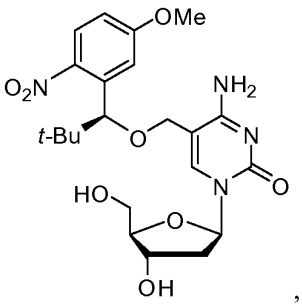
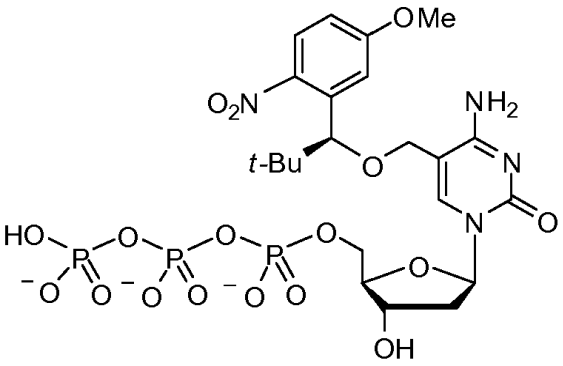
[0072]

[0073] 일부 구체예들에서, R_6는 수소이다. 일부 구체예들에서, 별표가 된 탄소 원자는 *S* 배치(configuration)에 있다. 일부 구체예들에서, 별표가 된 탄소 원자는 *R* 배치에 있다. 일부 구체예들에서, 이 화합물은 다음과 같이 추가 정의된다:

[0074]

,

,


,

,

,

,

,

,

,

,

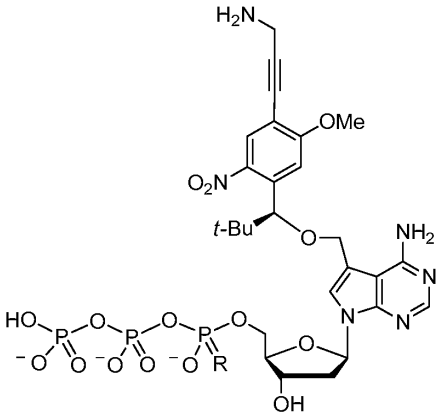
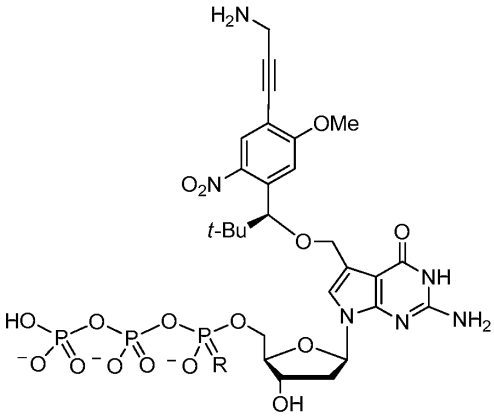
[0075]

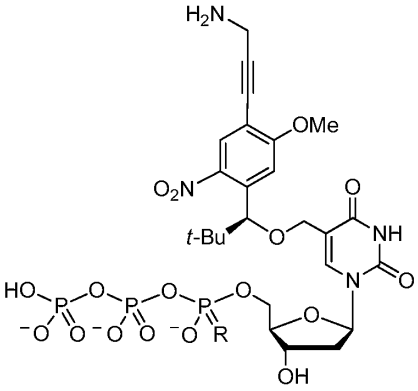
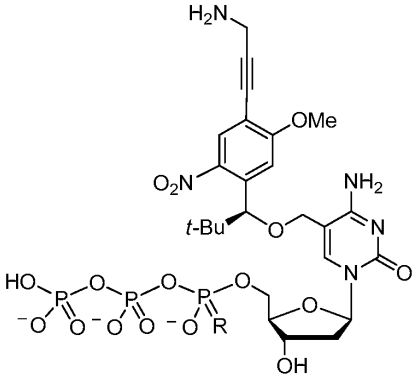

, 또는

,

[0076]

[0077] 또는 이들 화학식중 어느 하나의 염 및/또는 양성자화된 형태다.

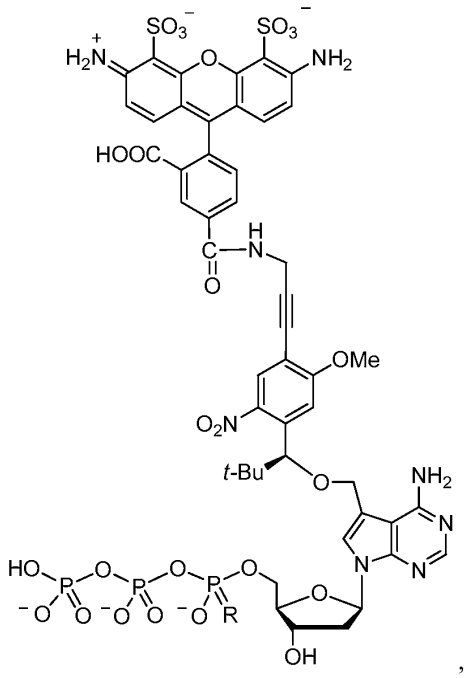
[0078] 일부 구체예들에서, 이 화합물은 다음과 같이 추가 정의된다:

[0079] , ,

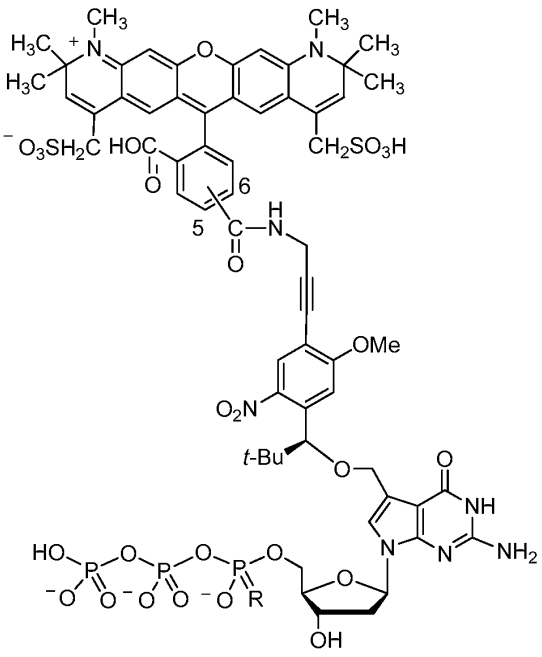
[0080] , 또는 ,

[0081] 또는 이들 화학식중 어느 하나의 염 및/또는 양성자화된 형태이며, 여기에서 R은 =O 또는 =S이다.

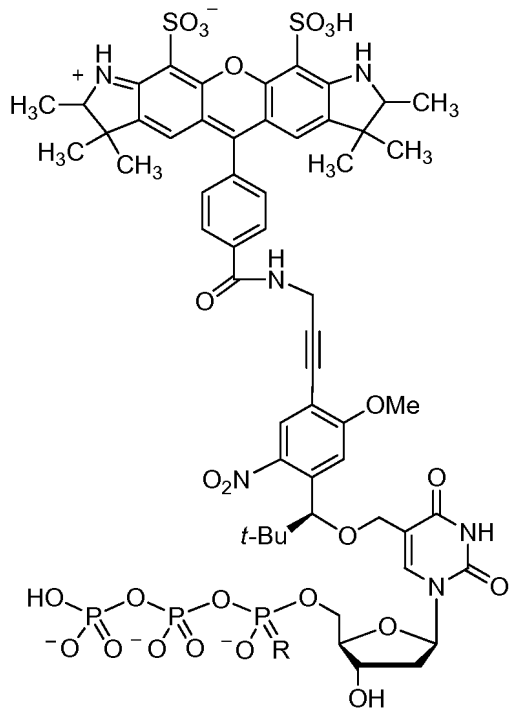
[0082] 일부 구체예들에서, 이 화합물은 더 나아가 다음과 같다:

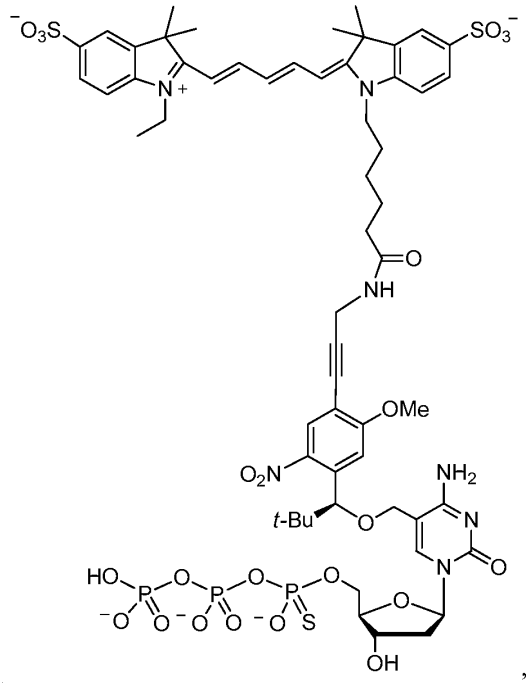


,



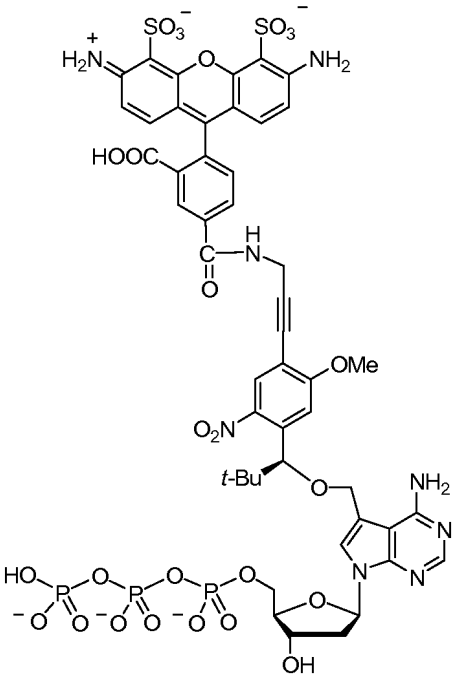
[0083] ,

[0084]  , 또는

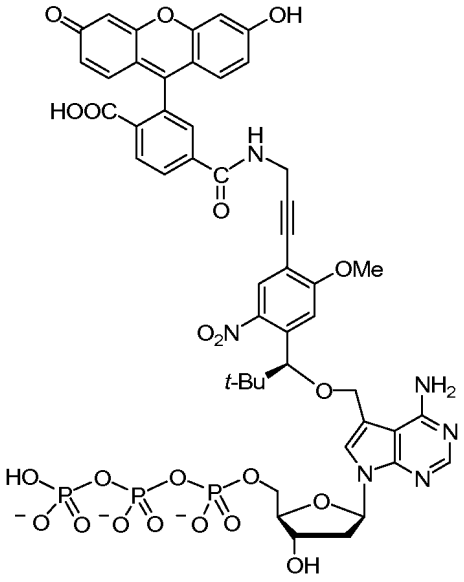
[0085]  ,

[0086] 또는 이들 화학식중 어느 하나의 염 및/또는 양성자화된 형태이며, 여기에서 R은 =O 또는 =S이다.

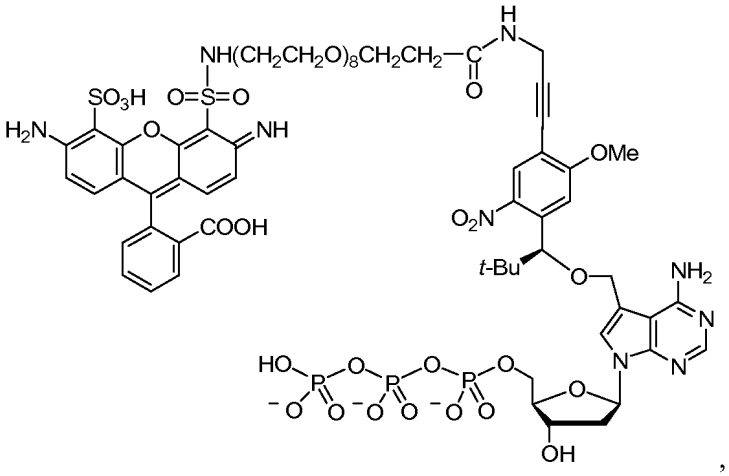
[0087] 일부 구체예들에서, 이 화합물은 다음과 같이 추가 정의된다:



,

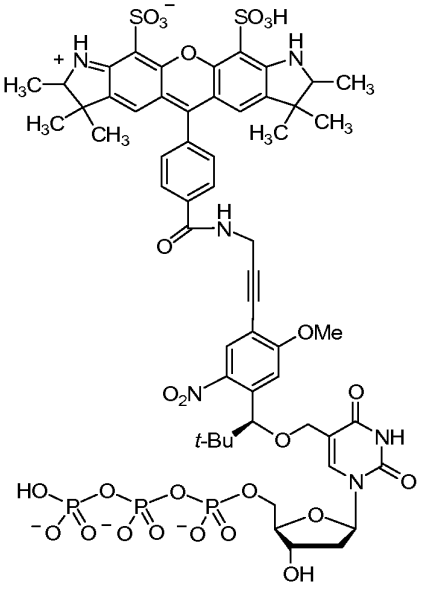


,

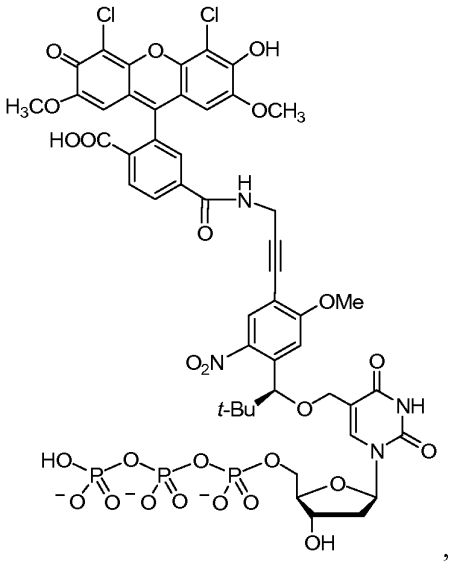


,

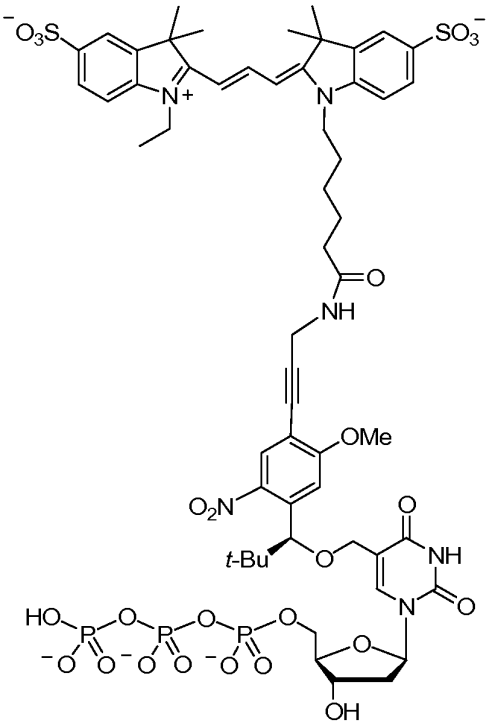
[0088]



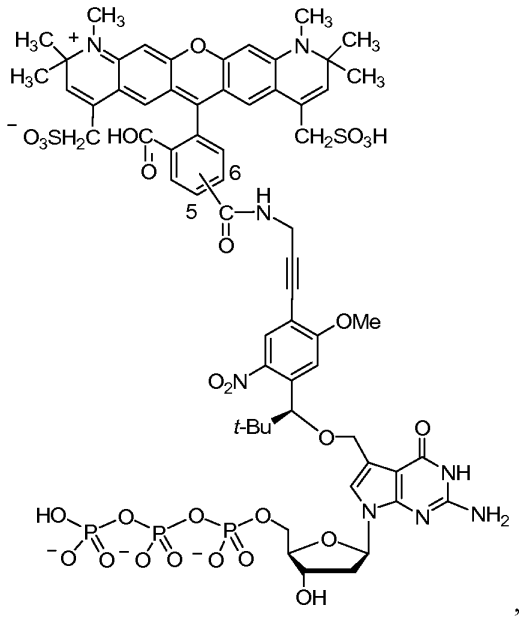
,

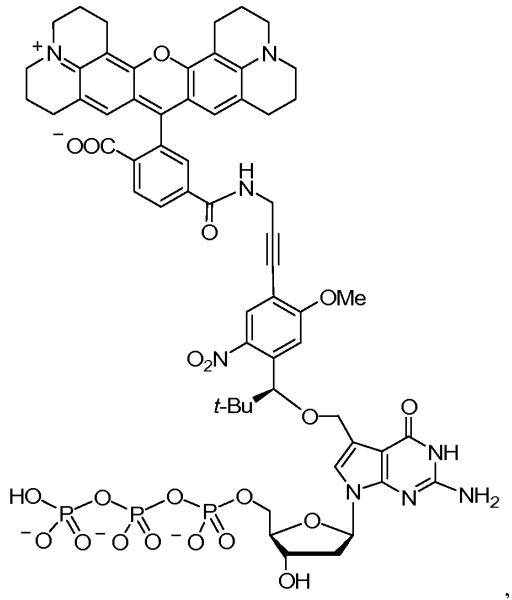


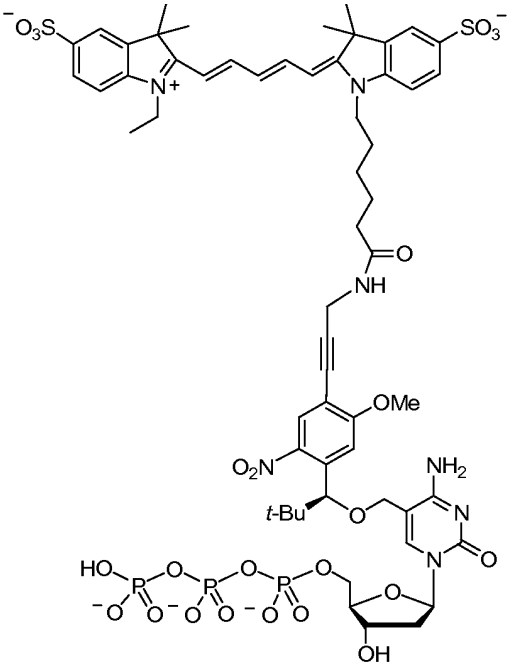
,



[0089] ,

[0090] 
CH3
H3C
+
N
H3C
CH3
O
N
CH3
CH3
−
O3SH2C
HOC
O
CH2SO3H
6
5
C
H
N
O
OMe
O2N
t-Bu
O
O
NH
N
N
NH2
HO
P
O
O
O
P
O
O
O
P
O
O
O
O
O
O
O
OH
,

[0091] , 또는

[0092] .

[0093] 이들 화학식중 어느 하나의 염 및/또는 양성자화된 형태다.

[0094] 본 발명의 또다른 측면에서 다음의 단계들을 포함하는 표적 핵산의 시퀀싱 방법들이 제공된다:

[0095] (i) 프라이머의 5'-단부를 고형 표면에 부착시키고;

[0096] (ii) 고형 표면에 부착된 프라이머에 표적 핵산을 혼성화시켜 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 형성시키고;

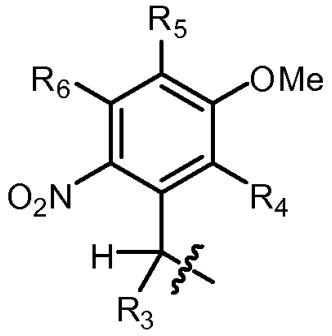
[0097] (iii) 상이한 화학식 I-VII의 화합물들은 상이한 형광단을 보유한다는 전제하에 본 명세서에서 설명된 중합효소 및 하나 또는 그 이상의 화합물을 획득하고;

[0098] (iv) 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체는 단계 (iii)의 중합효소와 하나 또는 그 이상의 화합물과 반응시켜 중합효소 반응을 통하여 성장하는(growing) 프라이머 가닥을 형성하고;

[0099] (v) 성장하는 프라이머 가닥을 영상화하여 이의 형광단을 통하여 단계(iv)의 혼입된 화합물을 식별하고;

[0100] (vi) 성장하는 프라이머 가닥을 가진 고형 표면을 광원에 노출시켜, 단계 (iii)에서 언급된 본 명세서에서 정의된 바의 변수들을 가진 다음 식의 광절단가능한 종료 모이어티를 제거하여 자연적으로 발생되는 성분들을

가진 연장된 프라이머를 만들고:



[0101] ,

[0102] ; 그리고

[0103] (vii) 단계 (iv) 내지 (vi)를 1회 또는 그 이상으로 반복하여 표적 핵산에서 다수의 염기를 확인하고, 이때 앞선 주기의 단계 (vi)의 연장된 프라이머는 후속 주기의 단계 (iv)에서 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체 대신에 반응된다.

[0104] 일부 구체예들에서, 단계 (vi)는 아지드 나트륨 존재하에서 실행된다. 일부 구체예들에서, 아지드 나트륨 농도는 0.1 mM 내지 10 mM, 예를 들면, 약 1 mM. 일부 구체예들에서, 단계 (vi)는 아세트산 나트륨 존재하에 실행된다. 일부 구체예들에서, 아세트산 나트륨 농도는 0.1 mM 내지 10 mM, 예를 들면, 약 1 mM이다.

[0105] 일부 구체예들에서, 단계 (v) 또는 (vi)는 티오우레아 존재하에 실행된다. 일부 구체예들에서, 티오우레아 농도는 10 mM 내지 500 mM, 예를 들면, 약 100 mM이다.

[0106] 일부 구체예들에서, 단계 (vi)는 디티오트레이톨 (DTT) 존재하에 실행된다.

[0107] 또다른 측면에서, 표적 핵산을 시퀀싱하는 다음 단계를 포함하는 방법들이 제공된다:

[0108] (i) 핵산의 5'-단부를 고형 표면에 부착시키고;

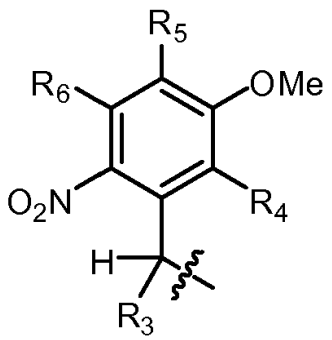
[0109] (ii) 고형 표면에 부착된 핵산에 프라이머를 혼성화시켜 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 형성하고;

[0110] (iii) 상이한 화학식 I-VII의 화합물은 상이한 형광단을 보유한다는 전제하에, 본 명세서에서 기술된 중합효소 및 하나 또는 그 이상의 화합물을 획득하고;

[0111] (iv) 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 단계(iii)의 중합효소 및 하나 또는 그 이상의 화합물과 반응시켜, 중합효소 반응을 통하여 성장하는 프라이머 가닥을 형성하고;

[0112] (v) 성장하는 프라이머 가닥을 영상화하여 단계(iv)의 혼입된 화합물을 이의 형광단을 통하여 식별하고;

[0113] (vi) 성장하는 프라이머 가닥을 가진 고형 표면을 광원에 노출시켜 본 명세서에서 정의된 바의 변수들을 가진 다음 식의 광절단가능한 종료 모이어티를 제거하여 자연적으로 발생되는 성분들을 가진 연장된 프라이머를 만들고: 그리고



[0114] ,

[0115] (vii) 단계 (iv) 내지 (vi)를 1회 또는 그 이상으로 반복하여 표적 핵산에서 다수의 염기를 확인하고, 이때 앞선 주기의 단계 (vi)의 연장된 프라이머는 후속 주기의 단계 (iv)에서 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체 대신에 반응된다.

[0116] 일부 구체예들에서, 단계 (vi)는 아지드 나트륨의 존재하에서 실행된다. 일부 구체예들에서, 단계 (vi)는 디티오트레이톨 (DTT)의 존재하에서 실행된다.

[0117] 일부 구체예들에서, 단계 (iv)에 따라 최소한 하나의 화합물의 혼입은 이의 천연 뉴클레오티드 대응부(counterpart)의 혼입 효과의 약 70% 내지 약 100%에서 발생된다. 일부 구체예들에서, 혼입 효과는 약 85% 내지 약 100%에서 발생된다.

[0118] 일부 구체예들에서, 중합효소는 역 전사효소, 말단 전이효소, 그리고 DNA 중합효소로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예들에서, 광절단가능한 종료 모이어티의 약 85% 내지 약 100%는 단계 (vi)에서 광원에 노출됨으로써 제거된다. 일부 구체예들에서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 혼입은 약 90% 내지 약 100%의 효과에서 가닥 성장 종료를 수반한다.

[0119] 일부 구체예들에서, 펄스된 멀티라인 여기(excitation) 탐지기는 단계 (v)에서 영상화에 이용된다.

[0120] 일부 구체예들에서, 이 방법은 단계 (iv) 또는 단계 (vi) 후 성장하는 프라이머 가닥의 세척을 더 포함한다.

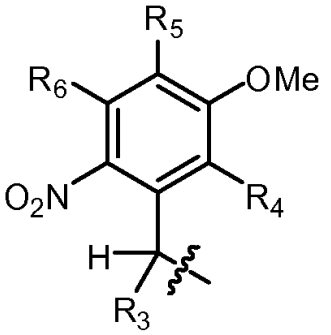
[0121] 일부 구체예들에서, 이 방법은 단계 (iv)에 앞서, 단계 (iv)에서 반응되지 않았던 임의의 프라이머들 또는 성장하는 프라이머 가닥들을 캡핑(capping)하는 것을 더 포함한다.

[0122] 일부 구체예들에서, 이 방법은 다중 표적 핵산들을 동시에(synchronistically) 시퀀싱하는 것을 더 포함한다.

[0123] 본 발명의 또다른 측면에서, 핵산 분자에서 비-자연적으로 발생가능한 성분을 자연적으로 발생되는 성분으로 전환시키는 방법들이 제공되는데, 이 방법은 다음을 포함한다:

[0124] (i) 본 명세서에서 기술된 화합물을 혼입시키고;

[0125] (ii) 생성된 핵산을 광원에 노출시켜, 본 명세서에서 기술된 변수들을 가진 다음의 식의 광절단가능한 종료 모이어티를 핵산으로부터 제거한다:

[0126] 

[0127] 일부 구체예들에서, 이 방법은 다중 핵산 분자들에서 비-자연적으로 발생가능한 성분들을 동시에 자연적으로 발생되는 성분들로 전환시키는 것을 더 포함한다. 일부 구체예들에서, 이 방법은 다중 핵산 합성을 동시에 종료시키는 것을 더 포함한다.

[0128] 또다른 측면에서, 본 발명은 중합효소 환경에서 상기에서 설명된 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 위치시키고, 그리고 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 핵산 분자에 혼입을 허용하는 단계들을 포함하는 핵산 합성 종료 방법들을 제공한다. 일부 구체예들에서, 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 혼입시 DNA 합성 종료 효과는 약 90% 내지 약 100% 범위에 이른다. 일부 구체예들에서, 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 혼입 효과는 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드와 동일한 염기로 자연적으로 발생되는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 혼입 효과와 비교하였을 때 약 70% 내지 약 100% 범위에 이른다.

[0129] 또다른 측면에서, 본 발명은 본 명세서에서 기술된 화합물을 종료 뉴클레오티드 유사체로 이용하는 것을 포함하는 Sanger 또는 Sanger-유형 시퀀싱을 실행하는 방법들을 제공한다.

[0130] 또다른 측면에서, 표적 핵산의 서열을 결정하는, 다음을 포함하는 방법들이 제공된다

[0131] (i) 표적 핵산을 Sanger 또는 Sanger-유형 시퀀싱 장치에 추가하고,

[0132] (ii) 하나 이상 유형의 염기가 존재하고, 각 염기는 상이한 형광단에 부착되어 있다는 단서 조건하에 본 명세서에서 기술된 하나 또는 그 이상의 화합물을 이 시퀀싱 장치에 추가하고;

[0133] (iii) 상보적 프라이머 및 중합효소 효소를 추가하고,

[0134] (iv) 중합효소 반응을 실행하여 단계 (ii)의 최소한 하나의 화합물을 성장하는 핵산 가닥에 혼입시키고, 그리고

[0135] (v) Sanger 시퀀싱 반응의 결과를 형광 시퀀싱 기구 사용으로 또는 펄스된 멀티라인 여기 형광에 의해 분석하고,

[0136] 여기에서 단계 (i)-(iii)는 임의의 순서로 실행될 수 있다.

[0137] 일부 구체예들에서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물은 약 90% 내지 약 100%의 효과에서 가닥 성장을 종료시킨다. 일부 구체예들에서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 혼입은 중합효소 반응에서 동일한 염기를 가진 고유 기질의 혼입 효과의 약 70% 내지 약 100%에서 일어난다. 일부 구체예들에서, 혼입 효과는 약 85% 내지 약 100%에서 일어난다. 일부 구체예들에서, 중합효소는 역 전사효소, 말단 전이효소, 및 DNA 중합효소으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0138] 또다른 측면에서, 본 발명은 비-자연적으로 발생가능한 성분을 핵산으로 혼입시키는 방법을 제공하는데, 이 방법은 다음을 포함한다:

[0139] (i) 표적 핵산을 시퀀싱 장치에 추가하고,

[0140] (ii) 하나 이상 유형의 염기가 존재하고, 각 염기는 상이한 형광단에 부착되어 있다는 단서 조건 하에 본 명세서에서 기술된 하나 또는 그 이상의 화합물을 이 시퀀싱 장치에 추가하고;

[0141] (iii) 중합효소 효소를 추가하고; 그리고

[0142] (iv) 중합효소 반응을 실행하여 단계 (ii)의 최소한 하나의 화합물을 성장하는 핵산 가닥에 혼입시키고,

[0143] 여기에서 단계 (i)-(iii)는 임의의 순서로 실행될 수 있다.

[0144] 일부 구체예들에서, 이 방법은 다음을 더 포함한다:

[0145] (v) 단계 (ii)의 최소한 하나의 화합물의 혼입을 위한 중합효소 쇄 반응의 결과를 분석한다.

[0146] 일부 구체예들에서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 혼입으로 약 90% 내지 약 100%의 효과에서 가닥 성장이 종료된다. 일부 구체예들에서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 혼입은 중합효소 반응에서 동일한 염기와 고유 기질의 혼입 효과의 약 70% 내지 약 100%에서 일어난다.

[0147] 또다른 측면에서, 본 발명은 미니-시퀀싱 또는 미니시퀀싱-유형 시퀀싱 방법에 본 명세서에서 기술된 화합물의 추가를 포함하는 미니-시퀀싱 또는 미니시퀀싱-유형 시퀀싱을 실행하는 방법들을 제공한다.

[0148] 상기에서 설명된 방법들중 임의의 방법의 일부 구체예에서, 이 화합물은 화학식 I, II, III, IV, V, VI, 또는 VII의 화합물과 같이 추가 정의된다.

[0149] 또다른 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는 시스템을 제공한다:

[0150] 다수의 비드들을 포함하는 플로우셀, 여기에서:

[0151] 각 비드는 DNA 분자에 부착되며, 여기에서 본 명세서에서 설명된 화합물은 중합효소를 이용하여 혼입되었고; 그리고

[0152] 이 플오루쎌은 가시광선 및 UV 광에 대해 최소한 부분적으로 투명하고;

[0153] 이 플오루쎌의 영상을 포획하도록 설계된 영상화 장치;

[0154] 최소한 4개의 스펙트럼 필터를 포함하는 필터 휠(filter wheel), 여기에서 필터 휠은 각 필터 사이를 순환하도록 설계되며;

[0155] 플오루쎌로부터 필터 휠 안에 필터를 통하여 영상화 장치까지 빛 경로를 만들도록 설계된 램프; 그리고

[0156] 플오루쎌 상에서 DNA 분자들에게 자외선을 제공하도록 설계된 자외선 원천.

[0157] 일부 구체예들에서, 이 플오루쎌은 미세유동성 플오루쎌이다. 일부 구체예들에서, 이 시스템은 필터 휠과 플오루쎌 사이에 대물렌즈를 더 포함한다. 일부 구체예들에서, 이 시스템은 광 경로를 영상화 장치로 지향되도록 설계된 거울을 더 포함한다.

[0158] 일부 측면들에서, 본 명세서는 암적인 형질변환을 겪는 세포의 한정된 하위집단에 속하는 희귀한 서열 변이체들을 확인하기 위하여 초기 단계 참지를 위한 신속하고, 고-처리량의 정확하고 민감한 암 진단법을 제공한다.

[0159] 본 명세서의 다른 목적들, 특징들 및 장점들은 다음의 상세한 설명으로부터 자명할 것이다. 본 발명의 사상 및 범위 안에서 다양한 변화 및 변경이 상세한 설명으로부터 당업자에게 자명할 것이기 때문에 본 발명의 특정 구체예들을 나타내는 상세한 설명 및 특정 실시예들은 오직 설명을 위한 것이라고 인지해야만 한다. 특정 화합물에 하나의 특정 일반 화학식이 부여되었기 때문에, 또다른 일반 화학식에 속할 수 없다는 뜻은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0160] 다음 도면은 본 명세서의 일부이며, 본 명세서의 특정 측면들을 더 설명하기 위하여 포함된다. 본 발명은 본 명세서에서 제시된 특정 구체예들의 상세한 설명과 함께 이들 도면을 참고하면 더 잘 이해될 수 있다.

도 1 2-니트로벤질 알킬화된 HOMedNTP 유사체들의 구조. "R"은 H, 이소-프로필, 또는 *tert*-부틸이다. "R'"은 H, 4-OMe, 5-OMe, 4,5-디-OMe, 또는 6-NO_2이다. 특정 실시예들을 위한 핵심 참고. "*"은 이 탄소 원자에서 2가지 상이한 입체화학적 배치를 나타낸다. 점선으로된 타원안에 있는 화학식 부분은 UV 광에 노출될 때 절단되는 종료 기능기를 눈에 띄게 강조한 것이다.

도 2 일시적인 산물 (TP)을 DTT로 제거. (A) 1 mM NaN_3 및 (B) 1 mM NaN_3, 50 mM DTT의 존재하에 종료자 중합효소에 의해 혼입된 dU.VI의 UV 광학적 절단 시계열의 형광 겔 영상. 라인: "P" (프라이머)는 1x ThermoPol 완충액에서 BODIPY-FL 라벨된 프라이머-1과 혼성화된 올리고Template-4에 결합된 종료자(Therminator)를 포함한다 (Wu *et al.*, 2007; Litosh *et al.*, 2011), "I" (혼입) 는 라인"P" + 100 nM dU.VI 라인에서 발견되는 것을 포함하며, 시계 라인들은 라인"I"+ 0.70 W/cm^2 365 nm 광에 노출된 열거된 시계 시료에서 발견되는 것을 포함한다. "IP"은 혼입된 산물을 나타내며, "CP"은 절단된 산물을 나타낸다.

도 3 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트의 X-선 결정 구조. Litosh *et al.* (2011)에서 설명된 것과 같이(이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다), 0.50 mm × 0.05 mm × 0.05 mm로 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트의 결정구조 측정이 있었다. *데이터 수집*: CuKα 방사, λ = 1.54178 Å, T = 110 ± 2° K, $2\Theta_{max}$ = 120.0° , 32,513 수집된 반사, 2,913 유니크 (unique) (R_{int} = 0.0517). 최종 *GooF* = 1.091, *R1* = 0.0681, *wR2* = 0.1695, 2,913 반사와 I>2sigma(I) (F^2 상에서 순화)에 근거된 *R* 색인, 290개 매개변수, 43개 규제. Lp 및 적용된 흡수 보정, μ = 0.819 mm^{-1}. 절대 구조 매개변수: 0.05 ± 0.09. X-선 결정구조 데이터: $C_{22}H_{29}NO_7$, M = 419.46. 사방정계, *a* = 6.29, *b* = 15.00, *c* = 22.27 Å (α, β, γ = 90°), V = 2,099.29 Å3, 공간 기 $P2_12_12_1$, *Z* = 4, D_c = 1.327 g/cm^{-3}, *F*(000) = 896.

도 4 DTT는 니트로조 중간생성물 (TP)을 제거한다. Therminator™ 중합효소에 의해 혼입된 dU.VI의 UV 광화학적 절단 실험의 형광 겔 영상. 라인: "P" (프라이머)는 1× ThermoPol 완충액에서 BODIPY-FL 라벨된 프라이머-1과 혼성화된 올리고Template4에 결합된 Therminator™을 포함한다, "I" (혼입)은 라인"P" + 100 nM dU.VI에서 발견되는 것을 포함한다. 요점에서 최종 농도로 열거된 시약 A-G가 추가되었고, 시료들은 10초 동안 0.70 W/cm^2 365 nm 광에 노출되었다. "IP"은 혼입된 산물을 나타내며, "CP"은 절단된 산물을 나타내며, 그리고 "TP"은 일시적인 산물을 나타낸다.

도. 5A & B UV 광화학적 절단 측정을 위한 광학적 셋업. 도 5A는 변형된 0.5 mL Eppendorf 튜브의 절반으로 절단된 구조, PM100 파워 미터, arc 빔을 배열하기 위하여 3-축 평행이동 스테이지를 이용한 1,000 μm 핀홀 카세트를 나타낸다. 도 5B는 10 μL 또는 20 μL의 반응 시료의 중심에 빔을 배열하기 위하여 내부 배열 카드를 가진 시료 홀더와 변형된 변형된 0.5mL Eppendorf 튜브를 나타낸다.

도 6 광화학적 절단 반응의 실시예. UV-유도된 광화학적 절단시에, 종료 2-니트로벤질 유도물질이 방출되어 천연 히드록시메틸 뉴클레오티드를 만든다. 벤질 탄소에 부착된 입체특이적 (*S*)-*tert*-부틸 기와 2니트로벤질

고리 상에 변형된 5-OMe와의 조합은 와 결합된 벤질 탄소에 부착된 광화학적 절단 반응 속도를 실질적으로 증가시켰다. C^7-HOMedG의 경우, 이의 대응하는 부모 유도체보다 10배이상으로 그 속도가 증가되었다.

도 7 α-탄소에서 *tert*-부틸 치환과 5 위치에서 메톡시 치환은 개선된 광화학적 절단 속도와 관련된다. 이 도면은 부모, *(S)-α-tert*-부틸, 그리고 C^7-HOMedA, HOMedC, C^7-HOMedG, 및 HOMedU 뉴클레오시드들에서 알킬화된 (S)-α-tert-부틸-5-OMe 2-니트로벤질 기들을 비교한다. 더 낮은 DT_{50} 값은 더 신속한 광화학적 절단 속도를 나타낸다.

도 8. 플오루쎌에서 형광 비드의 영상화를 위한 시스템의 계략적인 표현을 나타낸다.

도 9 비드 준비 및 고정화 방법의 실시예. 플오루쎌 상에서 비드 시료의 예시적인 준비 단계의 도식적인 설명.

도 10. CRT 주기에서 통합, 형광 영상화 및 광화학적 절단의 단계를 도식적으로 설명한다.

도 11. 3개 CRT 주기에서 타일 영상 및 개별 비드로부터 후속 염기-소집의 설명.

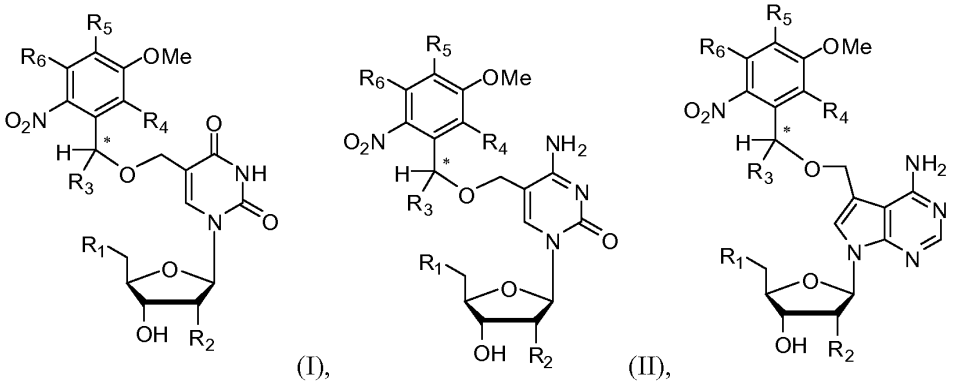
도 12 포괄적인 염료("Fluor")에 부착된 3'-OH 가역적 종료자들의 화학식. 점선으로된 타원안에 포함된 화학식 부분은 UV 광에 노출될 때 절단되는 염료-라벨된 종료 기능기들을 나타낸다.

도 13 무작위 Nick 시퀀싱 (RNS) 방법의 도표. Lightning Terminator™ 는 본 발명의 가역적 종료자들을 포함한다.

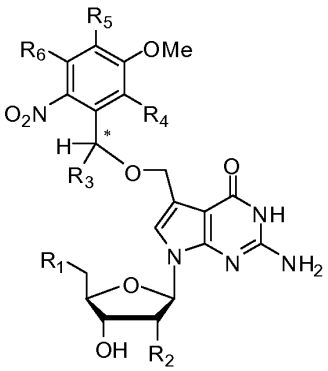
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

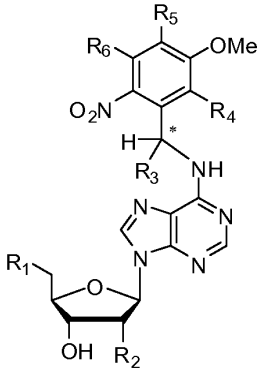
[0161] I. 가역적 종료자들 및 이의 합성 방법들

[0162] 한 측면에서, 본 명세서는 상이한 다양한 DNA 시퀀싱 적용에서 가역적 종료자들로 기능을 하는데 이용될 수 있는 신규한 화합물을 제공한다. 본 명세서에서 제공되는 이 화합물은 가역적 종료자들, 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들, 그리고 *Lightning Terminator™*으로 또한 지칭된다. 일부 구체예들에서, 다음 화학식의 화합물들 또는 이의 염, 호변이체, 또는 이의 광학적 이성질체가 제공된다:


(I),

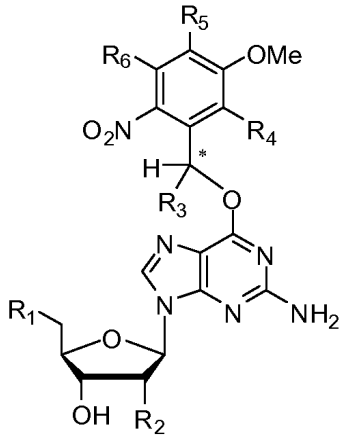
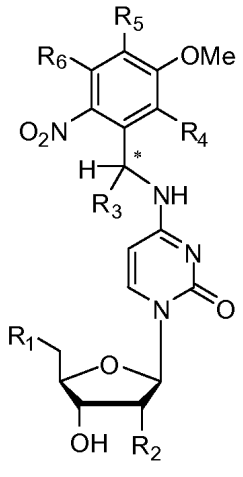
(II),


(III),


(IV),


(V),

[0163]

[0164]  (VI), 또는  (VII),

[0165] 여기에서:

[0166] R_1은 하이드록시, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, α-티오트리포스페이트 또는 폴리포스페이트이고;

[0167] R_2는 수소 또는 하이드록시이고;

[0168] R_3은 알킬$_{(C\leq8)}$ 또는 치환된 알킬$_{(C\leq8)}$이고;

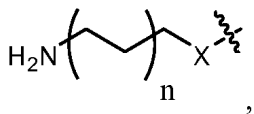
[0169] R_4는 수소, 하이드록시, 할로, 아미노, 니트로, 시아노, 아지도 또는 멀캅토; 알킬$_{(C\leq6)}$, 아실$_{(C\leq6)}$, 알콕시$_{(C\leq6)}$, 아실옥시$_{(C\leq6)}$, 알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 디알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 아미도$_{(C\leq6)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태이고;

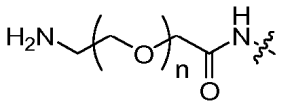
[0170] R_5 및 R_6은 각각 독립적으로 다음과 같다:

[0171] 수소, 하이드록시, 할로, 아미노, 니트로, 시아노, 아지도 또는 멀캅토;

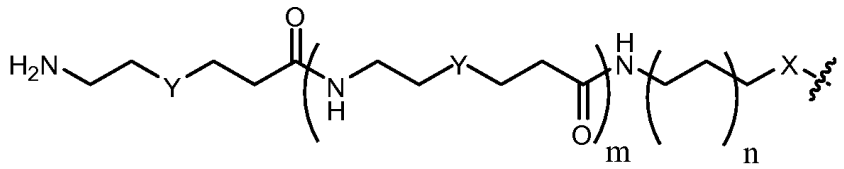
[0172] 알킬$_{(C\leq6)}$, 알케닐$_{(C\leq6)}$, 알키닐$_{(C\leq6)}$, 아릴$_{(C\leq6)}$, 아랄킬$_{(C\leq8)}$, 헤테로아릴$_{(C\leq6)}$, 아실$_{(C\leq6)}$, 알콕시$_{(C\leq6)}$, 아실옥시$_{(C\leq6)}$, 알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 디알킬아미노$_{(C\leq6)}$, 아미도$_{(C\leq6)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태;

[0173] 화학식 기:

,



[0174] , 또는



[0175] ,

[0176] 여기에서

[0177] X는 -O-, -S-, 또는 -NH-; 또는

[0178] 알칸디일$_{(C\leq12)}$, 알켄디일$_{(C\leq12)}$, 알킨디일$_{(C\leq12)}$, 또는 이들기중 임의의 기의 치환된 형태이고;

[0179] Y는 -O-, -NH-, 알칸디일$_{(C\leq12)}$ 또는 치환된 알칸디일$_{(C\leq12)}$이고;

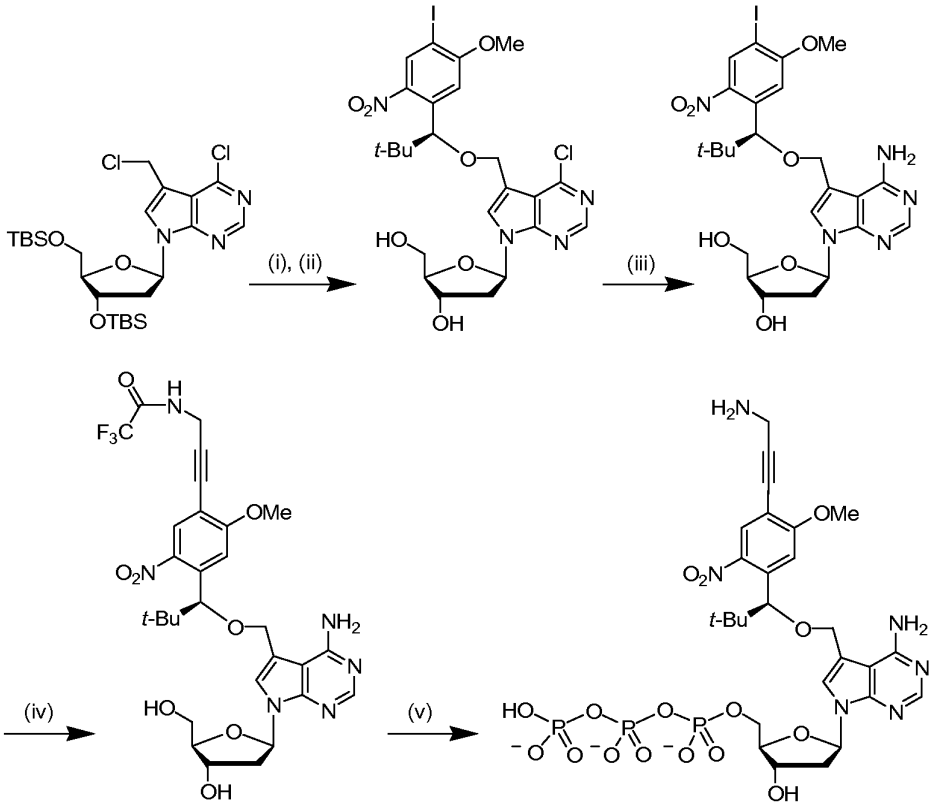
[0180] n은 0-6의 정수이고; 그리고

[0181] m은 0-6의 정수이고; 또는

[0182] -링커-리포터이다.

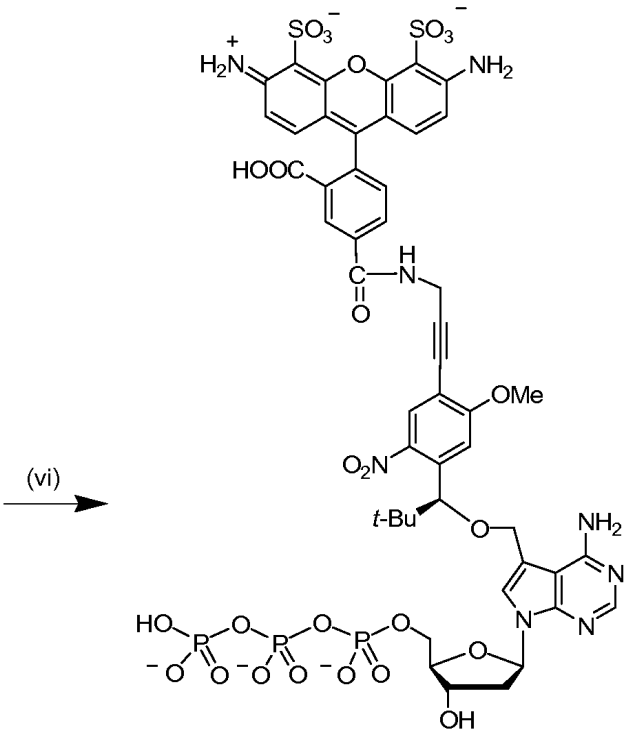
[0183] 염료-라벨된 α-*t*Bu-5-OMe-2-니트로벤질 알킬화된 히드록시메틸 뉴클레오티드들은 다음의 계획 및 절차에 따라 합성될 수 있다.

[0184] **A. 염료 라벨된 7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성**

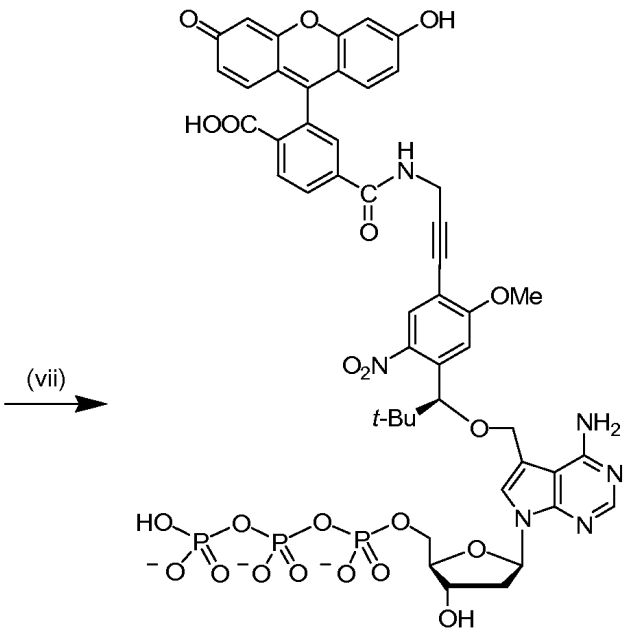


[0185]

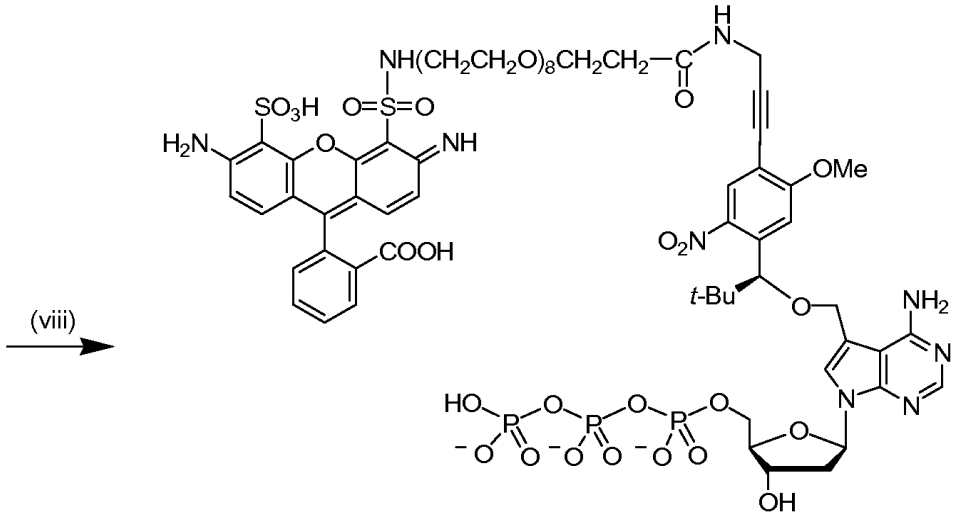
[0186] **계획 2a. 염료 라벨된 7-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃; (ii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온; (iii) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃; (iv) N-프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF; (v) $POCl_3$, $(MeO)_3PO$, 0℃; (n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0187] 

[0188] 계획 2b. (vi) Alexa Fluor 488 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).

[0189] 

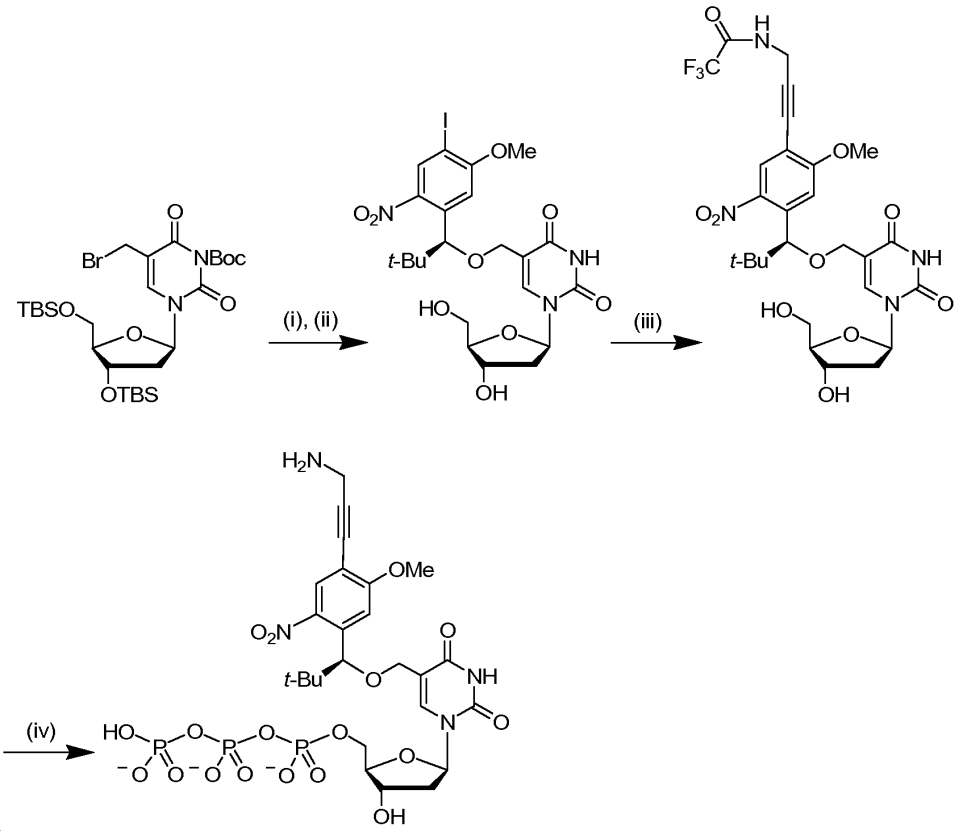
[0190] 계획 2c. (vii) 6-FAM NHS, 0.1 M Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).



[0191]

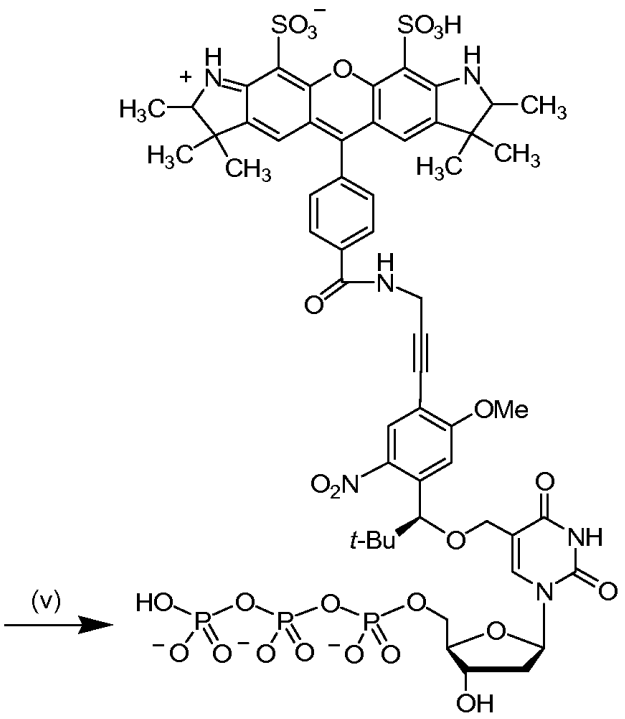
[0192] 계획 2d. (viii) CF488A NHS, 0.1 M Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).

[0193] B. 염료 라벨된 5-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성



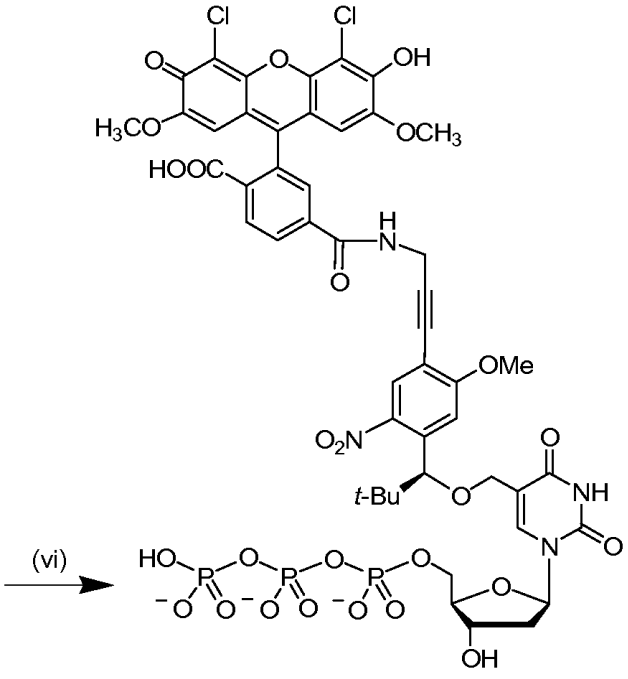
[0194]

[0195] 계획 3a. 염료 라벨된 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성. *시약들과 조건들*: (i) (S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃; (ii) NH_4F, MeOH, 50℃; (iii) N-프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF; (iv) $POCl_3$ 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-$Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$;



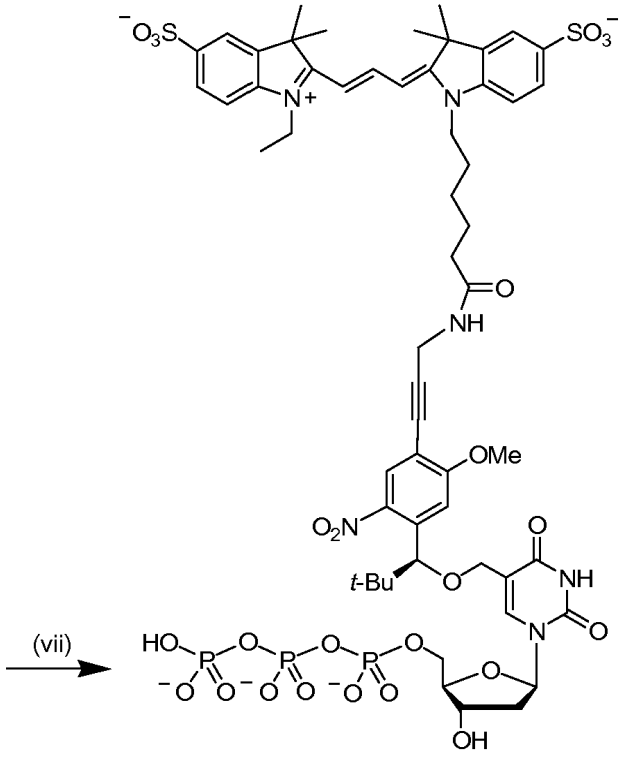
[0196]

[0197] 계획 3b. (v) Alexa Fluor 532 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).



[0198]

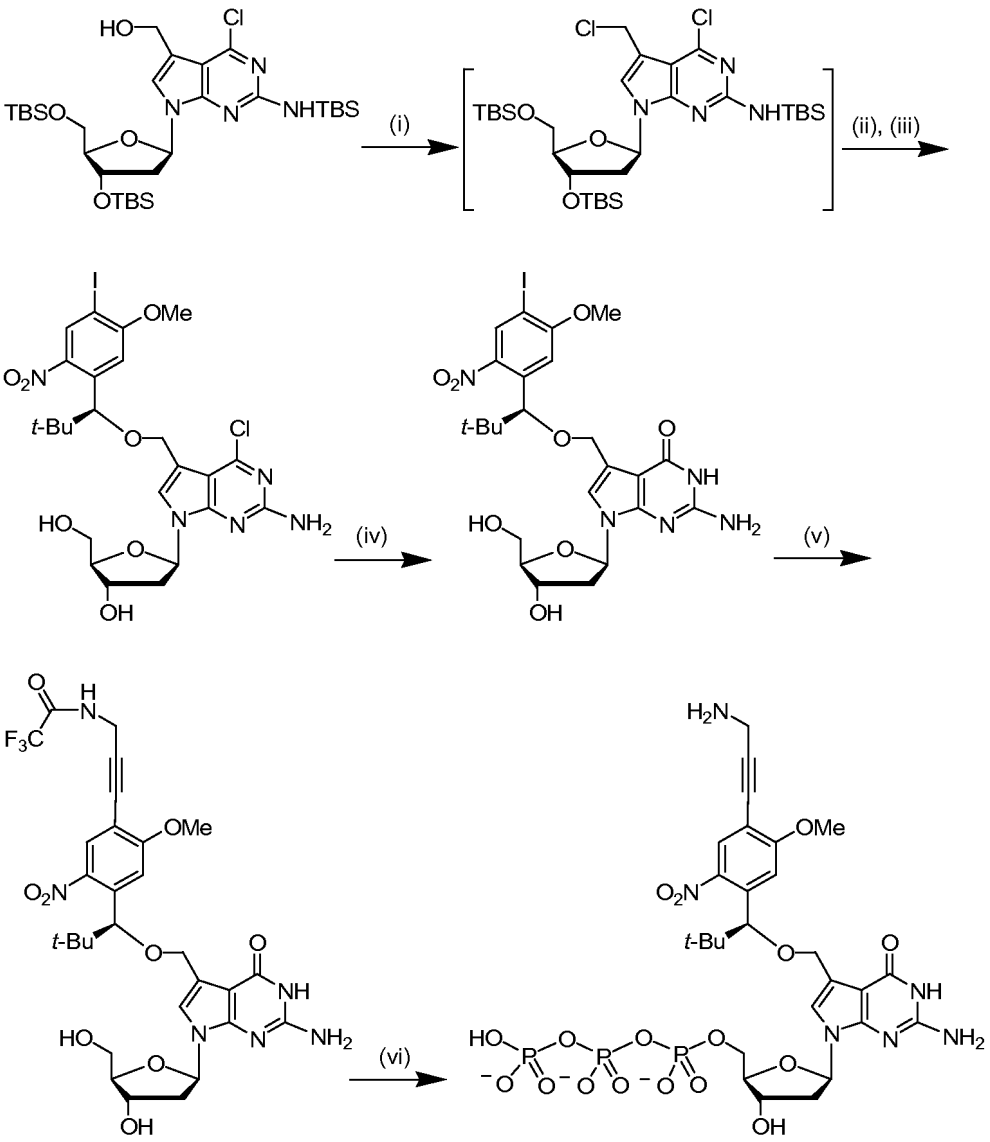
[0199] 계획 3c. (v) 6-JOE NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).



[0200]

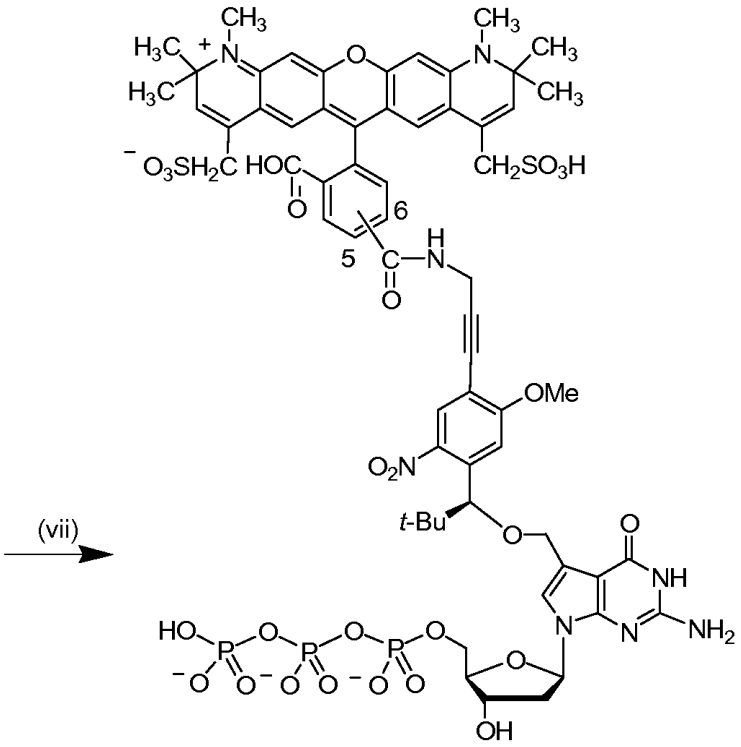
[0201] 계획 3d. (v) Cy3 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).

[0202] C. 염료 라벨된 7-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성



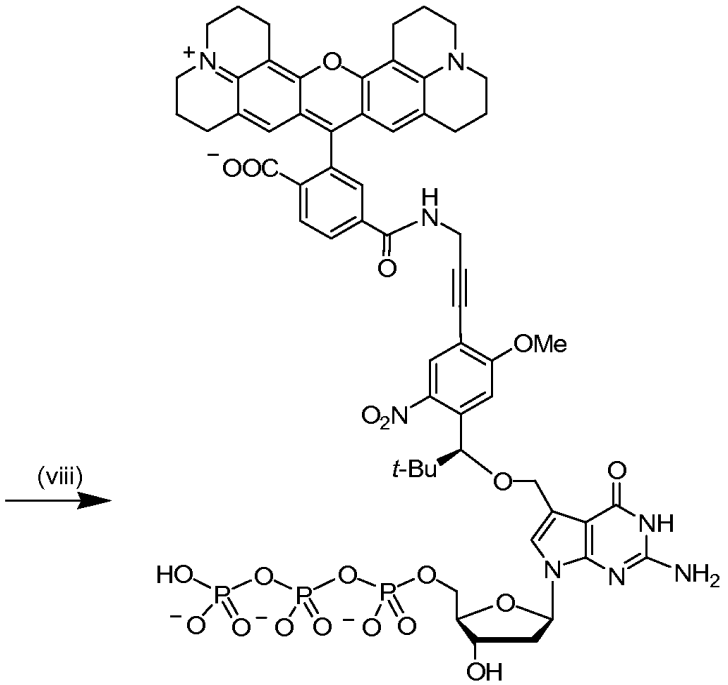
[0203]

[0204] **계획 4a. 염료 라벨된 7-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.** *시약들과 조건들*: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온; (iv) syn-피리딘-2-알독심, 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘, 1,4-디옥산/DMF, 70℃; (v) N-프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF; (vi) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.



[0205]

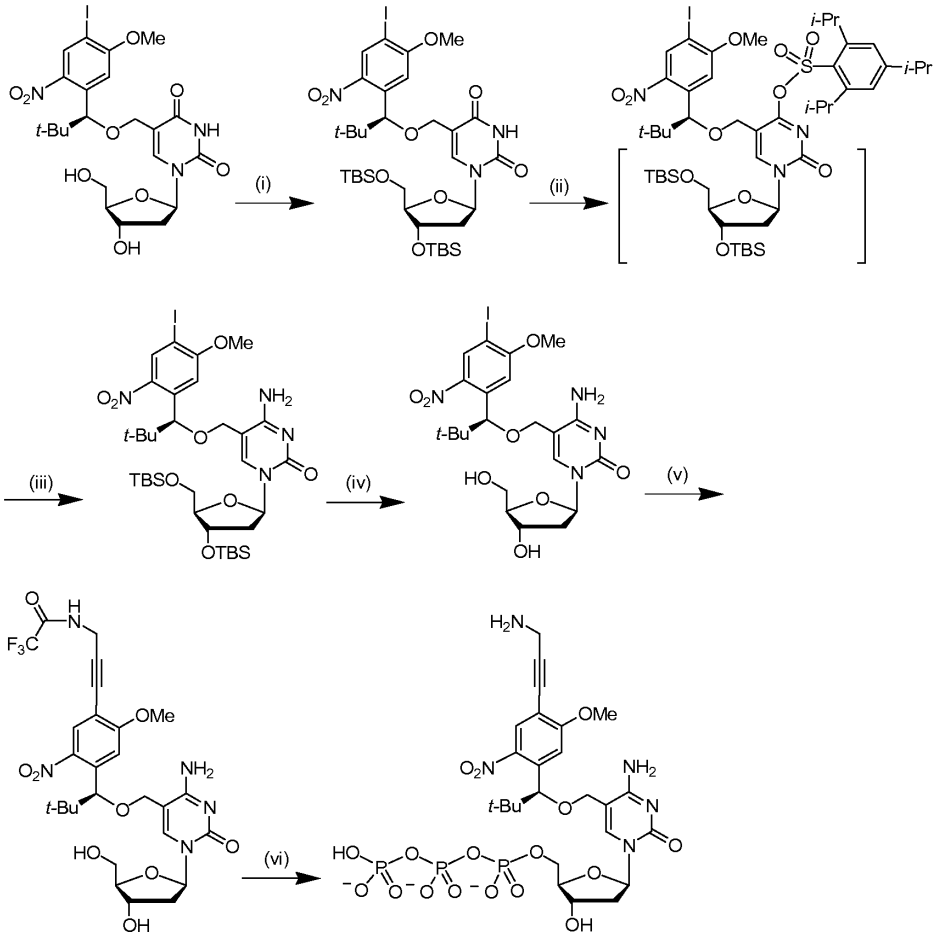
[0206] 계획 4b. (vii) Alexa Fluor 594 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).



[0207]

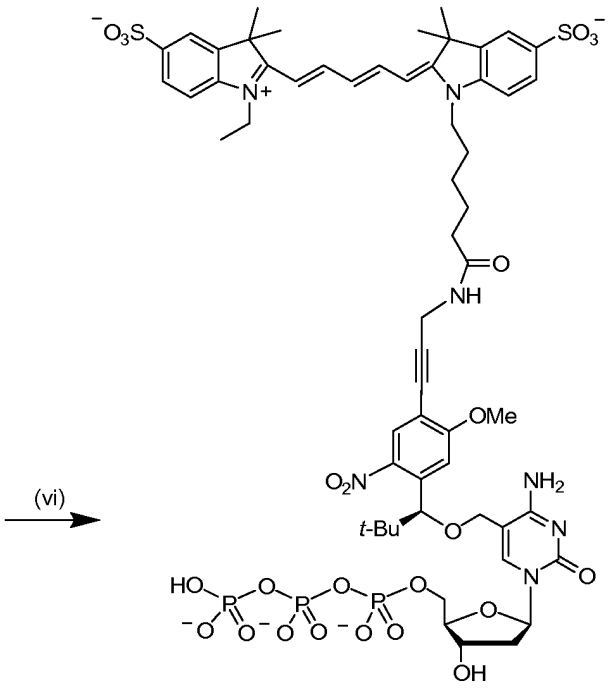
[0208] 계획 4c. (vii) 6-ROX NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).

[0209] D. 염료 라벨된 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성



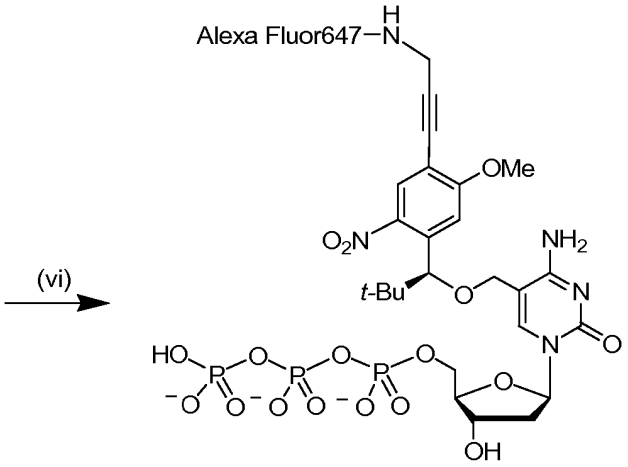
[0210]

[0211] **계획 5a. 염료 라벨된 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성**. *시약들과 조건들*: (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온; (ii) 2,4,6-트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드, DMAP, Et_3N, CH_2Cl_2, 실온; (iii) NH_3, 1,4-디옥산, 90℃; (iv) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 82%; (v) N프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF; (vi) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.



[0212]

[0213] **계획 5b. (vi) Cy5 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).**



[0214]

[0215] **계획 5c. (vi) Alexa Fluor 647 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).**

[0216] 일부 구체예들에서, α-탄소에서 치환된 알킬의 입체화학은 2-니트로베닐 기의 광화학적 절단 성질을 개선시킬 수 있음이 관찰되었다. 일부 구체예들에서, α-탄소에서 입체특이적 기와 2-니트로벤질 고리에 부착된 또다른 화학기의 복합에 의해 더 신속한 광화학적 절단 속도가 생성된다는 것이 관찰되었다. 예를 들면, 도 7 참고.

[0217] 본 명세서의 화합물은 상기에서 설명된 방법들과 하기 실시예 부분에서 설명된 방법을 이용하여 만들어질 수 있다. 예를 들면, 거울상순수(enantiopure) 형태를 포함한, α-tBu-5-OMe-2-니트로벤질 알코올을 만드는 합성에 대한 요약은 실시예 8에서 제공된다. 이들 방법은 당업자에 의해 제공되는 유기 화학의 원리 및 기술에 의해 추가 변형되고, 최적화될 수 있다. 이러한 원리 및 기술들은 예를 들면, March's Advanced Organic Chemistry: Rections, Mechanisms, and Structure (2007)에서 교시되며, 이는 전문이 여기에 참고자료로 편입된다.

[0218] 본 발명의 방법에 이용되는 화합물은 하나 또는 그 이상의 비대칭적으로-치환된 탄소 또는 질소 원자를 포함할 수 있으며, 광학적으로 활성 또는 라세체 형으로 단리될 수 있다. 따라서, 특정 입체화학 또는 이성체 형태가 명시적으로 지정되지 않은 한, 모든 키랄, 부분입체이성질체, 라세체 형, 에피머 형, 그리고 구조의 모든 기하학적 이성질체 형태가 의도된다. 화합물은 라세체 및 라세체 혼합물, 단일 거울상체, 부분입체이성질체 혼합물 그리고 개별 부분입체이성질체로 발생될 수 있다. 일부 구체예들에서, 단일 부분입체이성질체가 획득된다. 본 발명의 화합물의 키랄 중심은 *S* 또는 *R* 배치를 보유할 수 있다. 예를 들면, 본 명세서의 일부 측면들에서, 변형된 5-히드록시메틸 피리미딘 또는 7히드록시메틸-7-데아자퓨린 염기의 벤질 에테르의 α-탄소의 치환 및 이의 입체화학은 3'-OH 차단안된, 염기-변형된 dNTP들의 생물학적 기능 및 반응의 절단 속도에 영향을 준다.

[0219] 본 발명의 화합물은 본 명세서에서 언급된 용도 또는 다른 용도에 있어서 당업계 공지의 화합물보다 더 효과적이며, 독성이 덜하고, 더 오래 작용하고, 더 강력하고, 부작용이 더 적고, 좀더 용이하게 흡수되거나 및/또는 더 나은 약력학적 프로파일(예를 들면, 경구 생체이용성이 더 높거나 및/또는 더 낮은 제거율), 및/또는 다른 유용한 약리학적, 물리학적, 또는 화학적 성질을 가질 수 있는 장점을 보유할 수 있다.

[0220] 본 발명의 화합물을 나타내는데 이용되는 화학식은 몇 가지 있을 수 있는 상이한 호변이체중 하나만을 나타낼 것이다. 예를 들면, 케톤 기들중 많은 유형들은 대응하는 에놀 기와 평형으로 존재한다고 공지되어있다. 유사하게, 이민 기중 많은 유형들은 에나민 기들과 평형하게 존재한다. 주어진 화합물에 대해 어떤 호변이체로 나타내거나, 어느 것이 가장 우세한지에 관계없이, 주어진 화학식의 모든 호변이체들이 의도된다.

[0221] 또한, 본 발명의 화합물을 구성하는 원자들은 이러한 원자의 모든 동위원소 형태를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 동위원소는 동일한 원자수를 보유하지만, 상이한 분자량을 가진 원자들을 포함한다. 일반적인 예로써, 그러나 이에 제한없이, 수소의 동위원소는 삼중수소 및 이중수소를 포함하고, 탄소의 동위원소는 ^{13}C 및 ^{14}C를 포함한다. 유사하게, 본 발명의 화합물의 하나 또는 그 이상의 탄소 원자(들)은 실리콘 원자(들)로 대체될 수 있음도 고려된다. 더욱이, 본 발명의 화합물의 하나 또는 그 이상의 산소 원자(들)은 황 또는 셀레늄원

자(들)로 대체될 수 있다.

[0222] 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 제공되는 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들은 알파-티오포스페이트 기, 바람직하게는 알파-티오트리포스페이트 기를 보유한다. 하기 실시예 8에서 예를 들면, 화합물 **54b, 55b, 59b, 60b, 63b, 64b, 68b,** 및 **69b** 참고. DNA 중합효소들은 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성을 나타내는 것으로 당업계에 잘 알려져있다. 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성의 역할은 프라이머 가닥으로부터 혼입된 뉴클레오티드를 단순히 제거하는 것이다. 많은 상업적으로 이용가능한 DNA 중합효소들은 3'-5' 엑소뉴클레아제 도메인을 삭제 또는 돌연변이시켜, 이 활성을 탐지가능한 수준 아래로 감소시킨다. 그럼에도 불구하고, 일부 DNA 중합효소들의 낮은 활성 수준은 1차 신호의 디페이징(dephasing)으로 인하여 서열 데이터의 질을 떨어뜨릴 수 있다. 일부 구체예들에서, 알파-티오트리포스페이트 기들을 보유하는 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들은 남아있는 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성을 감소, 최소화 및/또는 제거하는데 이용될 수 있다. 이론에 결부되지 않고, 알파-티오트리포스페이트는 엑소뉴클레아제 활성에 저항성이라는 것도 당업계에 잘 공지되어있다. 예를 들면, European Patent EP 0 640 146, Rosenthal and Brenner, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0223] 본 발명의 화합물은 프로드럭(prodrug) 형태로 또한 존재할 수 있다. 프로드럭은 약제의 많은 바람직한 품질(이를 테면, 용해도, 생체이용성, 제조, 등)을 강화시키는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 발명의 일부 방법들에서 이용된 화합물은 바람직한 경우, 프로드럭 형태로 전달될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 화합물의 프로드럭 뿐만 아니라, 프로드럭을 운반하는 방법들을 고려한다. 본 발명에서 이용된 화합물의 프로드럭은 통상적인 조작에서 또는 생체내에서 부모 화합물에 변형이 달라붙도록 화합물에 존재하는 기능기들의 변형에 의해 준비될 수 있다. 따라서, 프로드럭은 예를 들면, 프로드럭이 대상에게 투여되면, 하이드록시, 아미노, 또는 카르복실 산을 각각 형성하도록 절단되는, 하이드록시, 아미노, 또는 카르복시 기가 임의의 기에 결합된 본 명세서에서 설명된 화합물을 포함한다.

[0224] 본 명세서는 신속한 DNA 시퀀싱 기술에 이용될 수 있는 또한 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물 뿐만 아니라 염, 에스테르 및 포스페이트를 더 제공한다. 그러나, 전체적으로 약제학적으로 수용가능하다면, 본 발명의 임의의 염을 형성하는 특정 음이온 또는 양이온은 중요하지 않다는 것을 알게된다. 약제학적으로 수용가능한 염 의 추가적인 예들과 이들의 준비 및 이용 방법들은 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use (2002)에서 제시되며, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 이 화합물은 임의 선택적으로 리보뉴클레오시드 트리포스페이트 (NTPs) 및 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트 (dNTP)의 형태이다. 일부 경우들에서, 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물은 형광 염료와 같은 화학적으로 또는 효소적으로 절단가능한 기로 라벨된 기를 포함한다. 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물은 DNA 합성을 종료하고 뿐만 아니라 신속하게 절단되어, 이들 단량체들이 나란한 형태로 신속한 시퀀싱에 이용되도록 기획된 화학적으로 또는 효소적으로 제거가능한 보호기들을 포함한다. 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물에서 형광 염료로 라벨된 이러한 신속하게 절단가능한 기들의 존재는 예를 들면, 신속하게 전체적인 게놈 시퀀싱을 허용하고, 그리고 다형성 및 기타 중요한 유전적 정보의 확인이 허용되도록 나란하게 큰 올리고머 DNA의 신속하고 정확한 시퀀싱을 강화시킬 수 있다.

[0225] 이들 3'-OH 차단안된 종료자들은 다수의 시판되는 이용가능한 DNA 중합효소들에 의해 내성이 있는데, 이는 3'-O-차단된 종료자들보다 중요한 장점을 제시한다. 본 명세서에서 공개되는 화합물의 벤질 기는 선택된 형광 염료 또는 기타 리포터 기를 포함하도록 또한 유도될 수 있다.

[0226] **II. 가역적 종료자들의 성질**

[0227] 상기에서 논의된 바와 같이, 한 측면에서, 주기적 가역적 종료자 (CRT) 시퀀싱 적용을 위하여 개선된 가역적 종료자들로 이용될 수 있는 신속하게 광화학적 절단 성질들을 가진 신규한 알킬화된 2-니트로벤질 뉴클레오티드들이 제공된다. 이러한 적용들은 Metzker (2005, 2010)에서 설명하고 있으며, 이들 모두 여기에 참고자료로 편입된다. 일부 구체예들에서, 다양한 치환된 2-니트로벤질 기들을 가진 HOMedC 및 HOMedU와 함께, 변형된 7-데아자-7-히드록시메틸-2'-데옥시아데노신 (C^7-HOMedA) (Rockhill *et al.*, 1997) 및 7-데아자-7-히드록시메틸-2'-데옥시구아노신 (C^7-HOMedG) (McDougall *et al.*, 2001)이 제공된다. 도 1 참고. 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 공개된 가역적 종료자들은 뉴클레오티드 혼입의 신속한 역학, 단일-염기 종료, 높은 뉴클레오티드 선택성, 및/또는 종료기의 신속한 절단을 포함하는 다수의 적합한 성질들을 나타낸다.

[0228] C^7-HOMedA 유사체들을 ds1로 표시되는 제1 용리 이성체와 ds2로 표시되는 제 2 용리 이성체와 함께, 단일 부분입체이성질체 뉴클레오티드들로 분리시키기 위하여 크로마토그래피 조건들이 확인되었다. 4-메톡시 (4-OMe) 및 6-니트로 (6-NO_2)의 2-니트로벤질 고리 변형과, α-이소프로필 기의 입체화학의 광화학적 절단 효과를 평가하기

위하여, 3가지 C^7-HOMedA 유사체들 **dA.III.a - dA.III.c**, 뿐만 아니라 부모 **dA.I** (하기 실시예 부분 참고)가 합성되었다. 이들 2-니트로벤질 알킬화된 C^7-HOMedATP 유사체들로 혼입 분석이 실행되었고, 그 다음 아지드 나트륨 용액에서 UV 광화학적 절단 실험을 거치게 되었다(표 1).

표 1

[0229] C^7-HOMedA 유사체들의 광화학적 절단 속도

C^7-HOMedA 유사체	1 mM NaN_3에서 DT_{50}	
	DTT 없음	50 mM DTT
dA.I	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
dA.III.a ds1	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.2
dA.III.a ds2	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1
dA.III.b ds1	7.0 ± 0.3	6.1 ± 0.4
dA.III.b ds2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
dA.III.c ds1	3.4 ± 0.2	3.0 ± 0.2
dA.III.c ds2	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.1

[0230] 모든 경우들에서, **dA.III.a dA.III.c**의 ds2 이성체들은 이들의 ds1 대응부의 것과 비교하였을 때, 각각 2.0×, 6.4×, 및 1.2× 더 신속한 광화학적 절단 속도(가령, 더 낮은 DT_{50} 값)를 나타내었다. 흥미로운 것은 ds1 이성질체들은 부모 **dA.I** 유사체와 비교하였을 때 유사한 (**dA.III.c**) 또는 더 높은 (**dA.III.a** 또는 **dA.III.b**) DT_{50} 값을 나타내었다. 이들 데이터는 치환된 α-이소프로필 기의 입체화학이 중요한 결정인자이며, 4-OMe 치환과 결합되면, **dA.III.b ds2** 유사체는 α-이소프로필 C^7-HOMedA 세트에서 최저의 DT_{50} 값을 만든다는 증거를 제공한다.

[0231] α-*tert*-부틸 유사체 **dU.V**는 단일-염기 종료 및 높은 뉴클레오티드 선택성 (Litosh et al., 2011)과 같은 우수한 CRT 성질을 나타내었다는 것이 기존 작업에서 설명되었다. 이는 부모 **dG.I** 과 함께 4가지 α-*tert*-부틸 C^7-HOMedG 유사체들, **dG.V.a dG.V.d**를 합성함으로써, 다양한 OMe 고리 치환들과 결합된 상이한 α-치환 기를 이용하여 입체특이적 효과를 더 검사하도록 허용하였다(도 1). α-이소프로필-C^7-HOMedATP 유사체들과 일치하게, UV 광화학적 절단 실험들에서, **dG.V.a - dG.V.d**의 ds2 이성체들은 이들의 ds1 대응부와 비교하였을 때, 각각 3.1×, 4.5×, 4.4×, 및 3.0× 더 신속한 속도를 보여주었다는 것이 드러났다, (표 2).

표 2

[0232] C^7-HOMedG 유사체들의 광화학적 절단 속도.

C^7-HOMedG 유사체	1 mM NaN_3 에서 DT_{50}	
	DTT 없음	50 mM DTT
dG.I	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
dG.V.a ds1	11.0 ± 0.4	10.7 ± 0.2
dG.V.a ds2	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.3
dG.V.b ds1	4.9 ± 0.3	4.6 ± 0.3
dG.V.b ds2	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2
dG.V.c ds1	3.5 ± 0.3	3.0 ± 0.1
dG.V.c ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
dG.V.d ds1	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
dG.V.d ds2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1

[0233] 5-OMe ds1 및 ds2 이성질체들은 대응하는 4-OMe 이성질체들과 각각 비교하였을 때, 1.4×배 더 신속한 광화학적

절단 속도를 나타내었다. 비스-치환된 4,5-디-OMe ds1 이성질체는 모노-치환된 4-OMe (2.0×) 또는 5-OMe (1.5×) 이성질체들과 비교하였을 때 더 신속한 절단 속도를 보여주었다. 역으로, 5-OMe ds2 및 4,5-디-OMe ds2 이성질체들은 단지 동일한 DT_{50} 값 0.8 sec를 나타내었다. Hasan *et al.* (1997)는 α치환 기 없이, 이의 대응하는 부모보다 5-OMe-2-니트로벤질 유사체의 경우 단지 1.2×의 속도 증가만을 보고하였다. **dG.V.c**의 ds1 및 ds2 이성질체들과 **dG.V.a**의 비교에서 각각 3.6× 및 4.4×의 더 높은 속도 증가가 나타났으며, 이는 입체특이적 *tert*-부틸 기가 5-OMe 기의 효과를 강화시킴을 암시한다. 4가지-색 CRT 적용과 함께, 링커 구조가 또한 4-위치에 부착되어 염료-라벨된 유사체들을 만들 수 있기 때문에 이 조합은 고리 시스템 유용성에서 우수한 유연성을 제공한다(미국 특허 7,897,737 7,964,352, 및 8,148,503; 미국 특허 출원 공개2011/0287427; Metzker, 2010).

[0234] 이들 α-*tert*-부틸 C^7-HOMedG 유사체들의 입체화학을 결정하기 위하여, (*R/S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 (*1S*)-캠파네이트는 분별 결정화 (Corrie *et al.*, 1992) (도 3)에 의해 이의 거울상 순수(*S*) 알코올로 해리되었다. *(S)*-알코올과 *(S)*-α-*tert*-부틸-2-니트로벤질 알코올 (미국 특허 8,148,503; Litosh *et al.*, 2011)은 각각 C^7HOMedG에 결합되었다(도 1). 이들의 대응하는 트리포스페이트의 RP-HPLC 분석에서 **dG.V.a** 및 **dG.V.c**의 ds2 이성질체 모두 각각 **dG.V** 및 **dG.VI**와 동일한 피크 보존 시간을 보유하는 것으로 나타났고, 따라서 ds2 이성질체들은 모두 -탄소에서 동일한 (*S*) 배치를 보유하는 것으로 결정되었다. 추정에 따르면, **dG.V.a** 및 **dG.V.c**의 대응하는 ds1 이성질체들은 (*R*) 배치를 할당받았다.

[0235] 그 다음 이들 (*S*) 알코올은 남아있는 뉴클레오시드들에 결합되어, 광화학적 절단 속도에서 이탈기의 효과가 검사되었다. 예를 들면, UV 광화학적 절단 실험에서 부모 2-니트로벤질 유사체들에 대한 DT_{50} 값은 **dC.I**의 경우 2.0 sec에서 **dG.I**의 경우 9.2 sec까지 변화되었음이 드러났다 (도 7 및 표3).

표 3

[0236] 가역적 종료자들의 광화학적 절단 속도

뉴클레오티드 유사체	**1 mM NaN_3에서 DT_{50}**	
	DTT 없음	**50 mM DTT**
dA.I	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
dA.V	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2
dA.VI	0.8 ± 0.1[a]	0.8 ± 0.1
dC.I	2.0 ± 0.3	1.6 ± 0.2
dC.V	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2
dC.VI	0.6 ± 0.1[a]	0.6 ± 0.1
dG.I	9.2 ± 0.3	8.1 ± 0.2
dG.V	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2
dG.VI	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
dU.I	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.1
dU.V	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
dU.VI	0.7 ± 0.1[a]	0.7 ± 0.1

[0237] [a]겔 전기영동에 의해 관찰된 일시적인 산물 (TP); DT_{50} 값에서 절단된 산물로 간주됨.

[0238] 벤질의 탄소를 (*S*)-*tert*-부틸로 치환시키면 부모 유사체들과 비교하였을 때1.5× - 3.1× 만큼 절단 속도가 증가되었고, 5-OMe 기로 추가 치환되면 3.0× - 11.5× 만큼 속도가 더 증가되었다. C^7-HOMedG 유사체들과 비교하였을 때, 최대 속도 개선이 관찰되었는데, DT_{50} 값은 9.2에서 0.8 sec로 감소되었다(도 7, 검정 막대). (*S*)-5-OMe-α-*tert*-부틸 가역적 종료자들의 완벽한 세트는 DT_{50} 값이 0.6 내지 0.8 sec의 좀더 좁은 범위를 보여주었다. 이들 데이터는 (*S*)-α-*tert*-부틸 및 5-OMe 기들의 복합 효과는 특정 뉴클레오티드 이탈기들에서 관찰된 절단 속도 변이를 감소시키고, CRT 순환을 위한 표준화된 그리고 더 신속한 절단 조건들을 제공하는 실질적인 용도를 가지는데 중요한 역할을 하는 것으로 암시된다. 뜻밖으로, UV 광에 잠깐 노출시킨 후 (*S*)-5-OMe-α-

tert-부틸-C^7-HOMedA, -HOMedC 및 HOMedU, (단 C^7-HOMedG은 아님)의 혼입 분석으로부터 일시적인 산물들이 관찰되었다,(도 2, 좌측에는 HOMedU 만을 나타냄). 유일한 차이는 금방 혼입된 뉴클레오티드이기 때문에, (*S*)-5-OMe-α-*tert*-부틸-2-니트로벤질 기의 신속한 절단은 성장하는 프라이머 가닥의 3'-말단 뉴클레오티드를 공격하는 좀더 반응성이 있는 2-니트로조케톤 부산물을 생성한다고 가정한다.

[0239] 니트로조 중간생성물을 억제시키는 조건들을 조사하기 위하여, UV 광화학적 절단 실험 동안에 다수의 아미노 및 티올 물질들이 테스트되었다(도 5). 이들중에서, 오직 디티오트레이톨 (DTT) (Cleland, 1964) 만이 일시적인 산물을 제거하였다 (도 2, 우측). 일부 구체예들에서, 효과적인 DTT 농도는 1 mM 내지 1 M이다. 일부 구체예들에서, 효과적인 DTT 농도 5 mM 내지 100 mM이다. 일부 구체예들에서, 효과적인 DTT 농도는 10 mM 내지 50 mM이다. 일부 구체예들에서, 효과적인 DTT 농도는 약 50 mM이다. 일부 구체예들에서, 광화학적 절단 단계는 아지드 나트륨 존재하에서 일어난다. 일부 구체예들에서, 효과적인 아지드 나트륨 농도는 0.1 mM 내지 1 M이다. 일부 구체예들에서, 효과적인 아지드 나트륨 농도는 1 mM 내지 100 mM이다. 일부 구체예들에서, 효과적인 아지드 나트륨 농도는 1 mM 내지 50 mM이다. 일부 구체예들에서, 효과적인 아지드 나트륨 농도는 약 1 mM이다.

[0240] 희귀한 효과들을 테스트하기 위하여, DTT 존재 하에서 모든 화합물에서 UV 광화학적 절단 실험이 반복되었고, 몇 가지 부모 및 ds1 이성질체들의 DT_{50} 값이 감소되었다(표 1, 2, 및 3). Barth *et al.* (2005)은 DTT가 친핵기 추가에 의해 니트로조 기를 공격한다고 제안하였지만, Corrie (2005)에 의한 나중 보고서에서는 니트로조케톤 부산물로부터 생물학적 간섭에 대한 증거가 거의 남아있지 않기 때문에 보호성 티올이 불필요하다고 설명하였다. 본 발명에서 설명되는 실시예에서, DTT는 이러한 바람직하지 않는 반응으로부터 중요한 보호 역할을 한다.

[0241] 5-메톡시 기와 복합된 α-치환된 기의 입체특이적 (*S*) 배치는 신속하게-절단되는 가역적 종료자들을 만드는데 결정적 요인으로 밝혀졌다. 반응성 니트로조케톤 부산물은 DTT 존재하에서 광화학적 절단 동안 효과적으로 제거될 수 있고, CRT 반응의 생물학적 일체성을 유지함에 있어서 적절한 조건을 제공한다.

[0242] **III. 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물 그리고 DNA 시퀀싱에서 이들의 용도**

[0243] 본 발명의 가역적 종료자들은 다음을 포함하는 다양한 접근법에 근거하여 DNA 시퀀싱 방법에 이용될 수 있다:

[0244] -"Sanger" 또는 "디데옥시" 방법, 이 방법은 DNA 중합효소를 이용하여 2',3'-디데옥시뉴클레오티드들 (ddNTPs)의 혼입에 의해 DNA 합성의 쇄 종료와 관련된다. Metzker *et al.*, 2005 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0245] - 합성에 의한 시퀀싱 (SBS), 이것은 전형적으로 시퀀싱 DNA의 상이한 기전을 명확하게 설명하지는 않는다. Metzker, 2010; Metzker 2005, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0246] - DNA 중합효소-의존적 전략, 이는 주기적 가역 정지 (CRT), 단일 뉴클레오티드 추가 (SNA, 이를 테면, 파이로시퀀싱), 및 실시간 시퀀싱으로 또한 분류된다. Metzker, 2010 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0247] - 무작위 Nick 시퀀싱 (RNS) 접근법을 이용한, 단일 분자들 시퀀싱.

[0248] 일부 구체예들에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 표적 핵산의 시퀀싱 방법들을 제공한다:

[0249] (i) 프라이머의 5'-말단을 고형 표면에 부착하는 단계;

[0250] (ii) 표적 핵산을 고형 표면에 부착된 프라이머에 혼성화하는 단계;

[0251] (iii) 본 명세서에서 설명된 임의의 화합물을 첨가하는 단계, 단 한 종류 이상의 염기가 존재할 경우, 각 염기가 상이한 리포터 그룹에 부착됨;

[0252] (iv) 핵산 복제 효소를 혼성화 프라이머/표적 핵산 복합체에 첨가하여 단계 (iii)의 조성물을 성장하는 프라이머 가닥에 혼입하는 단계, 여기서 혼입된 단계 (iii)의 조성물은 약 70% 내지 약 100%의 효율로 중합효소 반응을 정지시킴;

[0253] (v) 고형 표면을 세척하여 혼입되지 않은 성분을 제거하는 단계;

[0254] (vi) 혼입된 리포터 그룹을 검출하여 혼입된 단계 (iii)의 조성물을 식별하는 단계;

[0255] (vii) 연장안된 프라이머들을 영구적으로 캡씌우기 위하여, 임의 선택적으로 하나 또는 그 이상의 화합물을

추가하는 단계;

[0256] (viii) 종료 모이어티의 광화학적 절단을 포함하는 종료 모이어티를 제거하는 단계, 이로써 5-히드록시메틸 피리미딘 또는 7-히드록시메틸-7-데아자퓨린 염기를 가진 연장된 프라이머가 생성되며;

[0257] (ix) 고형 표면을 세척하여 절단된 종료 기를 제거하는 단계; 그리고

[0258] (x) 단계 (iii) 부터 (viii)를 1회 또는 그 이상 반복하여, 표적 핵산에서 다수의 염기를 식별하는 단계.

[0259] 일부 변이에서, 단계 (iii) 및 (iv)의 순서가 뒤바뀐다. 추가 변이에서, 중합효소 및 이 화합물은 동시에 첨가된다. 구체예들에서, 이들은 동일 용액 안에 있다.

[0260] 또다른 측면에서 본 발명은 다음 단계를 포함하는 표적 핵산을 시퀀싱하는 방법을 제공한다:

[0261] (i) 프라이머의 5'-말단을 고형 표면에 부착하는 단계;

[0262] (ii) 고형 표면에 부착된 표적 핵산에 프라이머를 혼성화하는 단계;

[0263] (iii) 본 명세서에서 설명된 임의의 화합물을 첨가하는 단계, 단 한 종류 이상의 염기가 존재할 경우, 각 염기가 상이한 리포터 그룹에 부착됨;

[0264] (iv) 핵산 복제 효소를 혼성화 프라이머/표적 핵산 복합체에 첨가하여 단계 (iii)의 조성물을 성장하는 프라이머 가닥에 혼입하는 단계, 여기서 혼입된 단계 (iii)의 조성물은 약 70% 내지 약 100%의 효율로 중합효소 반응을 정지시킴;

[0265] (v) 고형 표면을 세척하여 혼입되지 않은 성분을 제거하는 단계;

[0266] (vi) 혼입된 리포터 그룹을 검출하여 혼입된 단계 (iii)의 조성물을 식별하는 단계;

[0267] (vii) 연장안된 프라이머들을 영구적으로 캡씌우기 위하여, 임의 선택적으로 하나 또는 그 이상의 화합물을 추가하는 단계;

[0268] (viii) 종료 모이어티의 광화학적 절단을 포함하는 종료 모이어티를 제거하는 단계, 이로써 5-히드록시메틸 피리미딘 또는 7-히드록시메틸-7-데아자퓨린 염기를 가진 연장된 프라이머가 생성되며;

[0269] (ix) 고형 표면을 세척하여 절단된 종료 기를 제거하는 단계; 그리고

[0270] (x) 단계 (iii) 부터 (viii)를 1회 또는 그 이상 반복하여, 표적 핵산에서 다수의 염기를 식별하는 단계.

[0271] 일부 변이에서, 단계 (iii) 및 (iv)의 순서가 뒤바뀐다.

[0272] 일부 구체예에서 화합물은 DNA 중합효소인 핵산 복제 효소에 의하여 혼입된다. 일부 구체예에서 DNA 중합효소는 *Taq* DNA 중합효소, Klenow(엑소-) DNA 중합효소, *Bst* DNA 중합효소, VENT (엑소-) DNA 중합효소(*테르모코쿠스 리토랄리스*(*Thermococcus litoralis*)로부터 복제되고 D141A 및 E143A 돌연변이를 포함하는 DNA 중합효소 A), *Pfu*(엑소-) DNA 중합효소, 및 DEEPVENT™ (엑소-) DNA 중합효소(*파이로코쿠스 종*(*Pyrococcus* species) GB-D로부터 복제되고, D141A 및 E143A 돌연변이를 포함하는 DNA 중합효소 A)로 이루어진 군에서 선택된다. 일부 구체예에서 DNA 중합효소는 AMPLITAQ DNA 중합효소, FS(G46D 및 F667Y 돌연변이를 포함하는 *Taq* DNA 중합효소), THERMOSEQUENASE™ DNA 중합효소(F667Y 돌연변이를 포함하는 *Taq* DNA 중합효소), THERMOSEQUENASE™IIDNA 중합효소(THERMOSEQUENASE™ DNA 중합효소 및 *T. acidophilum* 피로포스파타제의 혼합), THERMINATOR™ DNA 중합효소 (*테르모코쿠스 종*(*Thermococcus* species) 9° N-7로부터 복제되고 D141A, E143A 및 A485L 돌연변이를 포함하는 DNA 중합효소 A), THERMINATOR™ II DNA 중합효소(추가의 Y409V 돌연변이를 포함하는 THERMINATOR™ DNA 중합효소), 및 VENT (엑소-) A488L DNA 중합효소(A488L 돌연변이를 포함하는 VENT (엑소-) DNA 중합효소)로 이루어진 군에서 선택된다.

[0273] 본 명세서의 화합물은 실시예 부분에서 약술된 방법들을 이용하여 만들어질 수 있다. 이들 방법들은 당업자에 의해 적용되는 유기 화학의 원리 및 기술을 이용하여 추가 변형되고, 최적화될 수 있다. 이러한 원리 및 기술들은 예를 들면, Wu *et al.* (2007; Litosh *et al.* (2011); Stupi *et al.* (2012); Gardner *et al.*, 2012; 미국 특허 7,897,737, 7,964,352, 및 8,148,503; 미국 특허 출원 공개 2011/0287427에서 교시되며, 이들은 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0274] 일부 구체예들에서, 시료 성분들은 SNP들을 결정할 수 있다. 이 방법은 정보를 제공하는 SNP들의 고-처리량 식별을 위한 것일 수 있다. SNP들은 게놈 DNA 재료, PCR 증폭된 재료, 또는 클론된 DNA 재료로부터 직접적으로

획득될 수 있으며, 단일 뉴클레오티드 프라이머 연장 방법을 이용하여 분석될 수 있다. 단일 뉴클레오티드 프라이머 연장 방법은 단일 라벨안된 dNTPs, 단일 라벨된 dNTPs, 단일 3'-O-변형된 dNTPs, 단일 염기-변형된 2'-dNTPs, 단일 알파-티오-dNTPs 또는 단일 라벨된 2',3'-디데옥시뉴클레오티드들을 이용하는 것을 포함할 수 있다. 미니-시퀀싱 방법은 단일 라벨안된 dNTPs, 단일 라벨된 dNTPs, 단일 3'-O-변형된 dNTPs, 단일 염기-변형된 2'-dNTPs, 단일 알파-티오-dNTPs 또는 단일 라벨된 2',3'-디데옥시뉴클레오티드들을 이용하여 포함할 수 있다. SNPs는 게놈 DNA 재료, PCR 증폭된 재료, 또는 클론된 DNA 재료들로부터 직접적으로 획득될 수 있다.

[0275] **A. 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물 그리고 CRT에서 이들의 용도**

[0276] 본 발명의 일부 측면들에서, 본 명세서에서 제공되는 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물(가역적 종료자들)은 주기적 가역 정지 (CRT)에 기반을 둔 DNA 시퀀싱 기술에 이용될 수 있다. CRT는 다중 주형의 싱크로니스틱 (synchronistic) 단일 염기 추가를 탐지하는 순환 방법이다. 이 접근법은 Sanger 방법 (Metzker, 2005, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)과 차별되는데, 이 분야를 발전시키는데 있어서 주요 단점이 되는 겔 전기영동이 필요없이 실행될 수 있다. 그러나, Sanger 시퀀싱과 마찬가지로, 더 긴 판독-길이들은 전체 게놈을 담당하는데 요구되는 더 적은 시퀀싱 분석으로 해독된다. CRT 주기는 전형적으로 세 가지 단계, 혼입, 영상화, 그리고 탈보호를 포함한다. 용어 "탈보호"은 "절단"과 동의어로 이용될 수 있으며, 따라서 3가지 단계는 혼입, 영상화, 그리고 절단으로 설명될 수 있다. 이 과정을 위하여, 주기 효과, 주기 시간 및 민감성이 주요 인자들이다. 이 주기 효과는 탈보호 및 혼입 효과의 산물이며, CRT 판독-길이를 결정한다. CRT 주기 시간은 혼입, 영상화, 및 탈보호 시간의 합이다. 전체 게놈 시퀀싱을 위한 신속한 CRT를 위하여, 본 명세서에서 공개된 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물이 이용될 수 있는데, 신속하고 효과적인 탈보호 성질을 나타낼 수 있다. 이들 화합물은 알파 탄소에서 아지도 치환을 보유하는 벤질기에 직접 부착된 형광 염료와 같은 리포터 기들로 라벨되어, 이를 테면, 유사한 탈보호 성질을 가진 형광의 가역적 종료자들을 제공한다. 가역적 종료자들은 전형적으로 상업적으로 이용가능한 DNA 중합효소들과 함께 저조한 기질로 작용하기 때문에 긴 CRT 판독의 목적을 실행하는데 여전히 어려움이 남아있다. 본 발명의 변형된 뉴클레오티드 유사체들을 이용하여 상업적으로 이용가능한 DNA 중합효소들을 가진 천연 뉴클레오티드 만큼 또는 이보다 더 잘 혼입되는 기질을 제공함으로써 이 기술을 개선시킬 수 있다.

[0277] 본 명세서에서 기술된 기들과 같은 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드의 염기에 부착된 광절단가능한 기들은 효과적인 가역적 종료자로 작용할 수 있고, 그리고 야생형 DNA 중합효소들에 의해 효과적으로 혼입될 수 있다. Wu *et al.*, 2007; Metzker, 2010; Litosh *et al.*, 2011; Gardner *et al.*, 2012; 미국 특허 7,897,737, 7,964,352, 및 8,148,503; 미국 특허 출원 공개 2011/0287427, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 예를 들면, 5-히드록시메틸-2'-데옥시우리딘 (HOMedU)는 다수의 박테리오파아지 및 하등 진핵세포들의 게놈에서 자연적으로 발견된다(Gommers-Ampt, 1995, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 이의히드록시메틸 기는 작은 광절단가능한 종료 기에 부착되기 위한 분자 핸들로 기능할 수 있다. 가역적 종료자들로 기능을 하기 위하여 본 명세서에서 기술된 방식으로 더 변형될 수 있는 다른 자연적으로 발생가능한 과다변형된 염기는 5-히드록시메틸-2'-데옥시시티딘 (HOMedC)을 포함하는데, 이는 T2, T4, 및 T6 박테리오파아지의 게놈 (Wyatt & Cohen, 1953; Gommers-Ampt, 1995) 그리고 포유동물의 게놈(Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010)에서 자연적으로 발견된다. 피롤로피리미딘 고리 구조 (7-데아자퓨린) 또한 뉴클레오시드 항생제 (Carrasco & Vzquez, 1984, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 및 tRNA 염기 (Limbach, *et al.*, 1994, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)에서 자연적으로 발견되며, 그리고 화합물 7-데아자-7-히드록시메틸-2'-데옥시아데노신 (C^7-HOMedA) (Rockhill *et al.*, 1997) 및 7-데아자-7-히드록시메틸-2'-데옥시구아노신 (C^7-HOMedG) (McDougall *et al.*, 2001) 또한 가역적 종료자들로 기능을 하기 위하여 본 명세서에서 기술된 방식으로 더 변형될 수 있다.

[0278] 본 명세서에서 기술된 일부 구체예들에서, 광절단가능한 기는 치환된 2-니트로벤질 뉴클레오티드이며, 예를 들면, 365 nm UV 광에 의해 효과적으로 광화학적으로 절단될 수 있다. 미국 특허 출원 공개 2010/0041041, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. >300 nm의 파장을 이용하여 DNA 및 단백질에 손상을 최소화시키는 것으로 일반적으로 인지되는데(Corrie, 2005), 365 nm 이외의 몇 가지 특정 파장들은 340 nm (Kaplan *et al.*, 1978) 및 355 nm (Seo, 2005)이다.

[0279] 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들은 단지 단일 결합의 광절단으로 핵염기로부터 종료 및 형광단 기들을 모두 제거하는 것을 포함하는, 몇 가지 장점들을 가진다. 이는 다시 후속 CRT 주기를 위하여 뉴클레오티드를 더 효과적으로 복원시키는데 이용될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 3'-OH

차단안된 가역적 종료자들의 제 2 장점은 이들 화합물중 많은 것들이 선호적인 효소 혼입을 보여주었고, 그리고 일부 구체예들에서, 야생형 DNA 중합효소들을 가진 천연 뉴클레오티드와 같이 용이하게 혼입될 수 있다는 점이다.

[0280] 3'-OH 차단안된 종료자들에 대한 한 가지 도전은 단일 염기 추가 이후 DNA 합성 종료로 이어지는 염기에 적절한 변형을 만드는 것이다. 차단안된 3'-OH 기가 다음에 오는 뉴클레오티드에 혼입을 위한 천연 기질이기 때문에 이것은 일반적으로 중요하다. 본 명세서에서 기술된 화합물은 이 도전을 해결한다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 가역적 종료자들은 단일 염기 추가 이후 DNA 합성을 종료하게 만든다.

[0281] 일부 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 화합물은 게놈 DNA로부터 직접적 판독을 위하여 CRT에 이용될 수 있다. 단편화된 게놈 DNA는 선택된 염색체에 걸쳐있는 프라이밍 장소를 포함하는 고-밀도 올리고뉴클레오티드에 혼성화될 수 있다. 각 프라이밍 서열은 CRT 방법의 예상 판독-길이 만큼 떨어져 있다. 염기 추가 사이에, 형광 촬영기는 전체 고-밀도 칩을 동시에 영상화할 수 있어, 속도 및 민감성에서 상당한 개선이 이루어진다. 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 알파 탄소 또는 이의 유도물질 상에 아지도 치환을 보유하는 벤질기에 부착된 형광단은 다음 차례의 염기 추가를 위하여 벤질기를 방출하는 특정 화학적 또는 효소적 반응에 의해 제거된다. 또다른 특정 구체예들에서, 본 명세서에서 기술된 알파 탄소 또는 이의 유도물질 상에 아미드 치환을 보유하는 벤질기에 부착된 형광단은 다음 차례의 염기 추가를 위하여 벤질기를 방출하는 특정 화학적 또는 효소적 반응에 의해 제거된다. 대략적으로 500회 CRT 주기 이후, 완전한 그리고 인접한 게놈 서열 정보는 그 다음 참조용 인간 게놈과 비교되어, 개별 시료에서 서열 변형의 정도 및 유형이 결정될 수 있다. 더 높은 혼입 및 탈보호 효과를 나타내는 가역적 종료자들은 전형적으로 더 높은 순환 효율을 얻고, 따라서 더 긴 판독-길이를 얻는다.

[0282] CRT 효과는 화학식: $(RL)^{Ceff} = 0.5$로 정의되며, 여기에서 RL은 염기에서 판독-길이며, *Ceff*는 전체적인 주기 효과다. 환언하면, 7개 염기의 판독-길이는 90%의 전체적인 주기 효과와 함께 획득될 수 있고, 70개 염기는 99%의 주기 효과로 그리고 700개 염기는 99.9%의 주기 효과로 획득될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물 혼입의 효과는 유사한 고유 뉴클레오시드 혼입의 약 70% 내지 약 100% 범위일 수 있다. 바람직하게는, 혼입 효과는 약 85% 내지 약 100%일 것이다. 광화학적 절단 효과는 바람직하게는 약 85% 내지 약 100% 범위일 것이다. 더욱이, 핵산 연장의 종료는 본 발명에 따른 화합물의 혼입시 약 90% 내지 약 100% 범위일 것이다. 한 구체예에서 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 화합물은 최소한 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9%의 순환 효과를 가진다.

[0283] 본 발명의 또다른 측면은 일련의 효소 반응에 의해 가시광으로 비례적으로 전환시키는 무기적 파이로포스페이트(PPi)의 방출을 측정하는 비-전기이동적, 생물발광 방법인, 파이로시퀀싱의 사용에 관한 것이다 (Ronaghi et al., 1998, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). DNA 합성을 종료시키기 위하여 변형된 뉴클레오티드들을 이용하는 다른 시퀀싱 접근법과 달리, 파이로시퀀싱 분석은 제한된 양의 dNTP을 1회 추가하여 DNA 중합효소를 조절한다. 그 다음 DNA 중합효소는 상보적 dNTP의 혼입시 프라이머를 연장시키고, 중단시킨다. 분배 주기에서 그 다음 상보적 dNTP의 추가에 이어서 DNA 합성이 다시 시작된다. 광 피크의 크기 및 강도는 플로우그램(flowgrams)으로 기록되어, 잠재적 DNA 서열이 드러난다. 최대 6개의 뉴클레오티드로 된 동종중합체 반복의 경우, 추가되는 dNTPs 수는 광 신호에 직접적으로 비례된다. 6개 이상의 뉴클레오티드 동종중합체 반복체는 삽입 오류를 야기할 수 있고, 이러한 삽입 오류는 파이로시퀀싱의 가장 흔한 오류다. 본 발명의 변형된 뉴클레오티드 유사체들은 동종중합체 반복, 특히 길이가 6개 이상의 뉴클레오티드를 통하여 정확한 시퀀싱에 의해 이 기술을 개선시킬 수 있다.

[0284] 본 발명의 또다른 측면은 예를 들면, 헤테로접합체 탐지에 적용될 때, Sanger 시퀀싱의 이용에 관계된다. 상당한 진전에도 불구하고, 정확한 헤테로접합체 탐지를 위하여 디데옥시-BigDye 종료자 시퀀싱의 개선이 요구된다. 1차 데이터에서 균일한 피크 높이 분포는 염기-호출 및 헤테로접합체 탐지를 좀더 신뢰성있고, 정확하게 한다고 일반적으로 믿고 있다. Sanger 시퀀싱에서 종료 패턴은 변형된 뉴클레오티드보다는 천연 뉴클레오티드를 선별적으로 혼입시킬 수 있는 DNA 중합 효소에 의한 주로 서열-의존적 편향 혼입으로 인한 것이다. (Metzker *et al.*, 1998, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 이러한 편향 혼입 효과는 염료-프라이머 화학보다는 염료-종료자 화학으로 더 뚜렷해진다. 이는 종료 뉴클레오티드에 부착된 큰 형광 염료 구조의 효과 때문일 수 있는데, 천연 기질의 것보다 최소한 10-배 효소 활성을 낮춘다. 따라서, DNA 중합효소에 의한 염료-라벨된 종료자들 쪽으로의 편향 혼입 효과의 감소는 개선된 헤테로접합체 탐지로 이어진다. 본 발명의 변형된 뉴클레오티드 유사체들은 천연 뉴클레오티드 만큼 또는 이보다 더 잘 혼입됨으로서, 따라서 Sanger 시퀀싱에서 혼입 편

향을 감소시킴으로써 이 기술을 개선시킬 수 있다.

[0285] 본 발명의 또다른 측면은 클론적으로 증폭된 주형과 단일 DNA 분자 주형의 사용에 관한 것이다. NGS 기술의 전-단은 2개의 영역으로 분할될 수 있다: 단일 DNA 분자들로부터 클론에 의하여 증폭된 주형과 단일 DNA 분자 주형. DNA는 프라이머를 고형 표면에 부착시키고, 표적 핵산을 전술한 프라이머에 혼성화시킴으로써 전술한 표면에 고정시킬 수 있거나 (미국 특허 No. 5,770,367; Harris *et al.*, 2008, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 또는 클론에 의해 증폭에 의해 표적 핵산을 전술한 표면에 부착시키고, 프라이머를 전술한 표적 핵산에 혼성화시킴으로써 고정시킬 수 있다(Dressman *et al.*, 2003; Margulies *et al.*, 2005, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)는 것은 당업계에 공지된 사실이다. CRT 방법 또는 파이로시퀀싱 방법으로 개시하기 위하여 DNA 중합 효소 결합을 위하여 본 발명에서 어느 쪽의 고정 배치가 이용될 수 있다.

[0286] 한 측면에서, 본 발명은 큰 DNA 단편 (가령, 0.1 - 0.5 메가염기)로 구성된 단일 주형 분자들의 사용에 관계한다. 일부 구체예들에서, 무작위 Nick 시퀀싱 (RNS)이라고 불리는 어뎁터-프리(adaptor-free) 전략이 이용될 수 있다. (a) PCR 또는 어뎁터 결찰을 위한 요구조건이 없으며, (b) 정확성을 개선시키기 위하여 동일 주형의 여분(redundant)의 시퀀싱, 그리고 (c) 국소화된 새로운(de novo) 어셈블리를 제공하는 단일 분자 주형에 걸친 눈에 띄는 시퀀싱 반응 장소를 포함하는 몇 가지 장점을 보유한다. 예를 들면, PCR 과정은 서열 변이체들로 가장하는 클론적으로 증폭된 주형에서 돌연변이를 만든다. AT-풍부한 그리고 GC-풍부한 표적 서열들은 산물 수율에서 증폭 편향을 나타낼 수 있고, 따라서, 게놈 정렬 및 어셈블리에서 대표로 충분하지 않을 수 있다. 주어진 단일 분자 주형을 위한 시퀀싱 반응의 위치를 알면 복합체 게놈 및 구조적 영역의 위치 할당 및 조직화을 단순화시킬 것이다.

[0287] RNS 접근법에서, 슈가-불특정 뉴클레아제 가령, 비브리오 불리피쿠스(*Vibrio vulnificus*) (*vvn*)로부터 단리된 뉴클레아제는 dsDNA에서 무작위 단일-가닥의 니크를 만들고, ssDNA 및 RNA 모두를 절단시킨다(Hsia *et al.*, 2005 참고). *Vvn* 결합은 DNA의 소수 홈에서 발생되어, 핵염기들의 서열-의존적 인지를 회피한다. 이것은 서열-의존적 편향 없이 무작위 방식으로 DNA 분자를 따라 니킹(nicking)에 유리하다. 니크의 상류 가닥은 RNS 반응을 시작하기 위하여 중합 효소의 프라이밍 부위가 된다. 일부 구체예들에서 작업하는 이 방법의 경우, 중합효소는 상류 가닥을 연장시키면서 하류 가닥을 대체시킬 수 있어야 한다. 이러한 성질을 보유하는 몇 가지 잘 알려진 DNA 중합효소들은 ϕ29 (Soengas *et al.*, 1995 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 및 *Bst* (Aliotta *et al.*, 1996 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 중합효소들을 포함한다. Vent(exo-) (see Gardner et al., 1999, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 및 Therminator™ 중합효소들은 비록 멎기 전까지 50개 염기로 제한될지라도, 또한 가닥 대체 성질을 나타낸다. UV 절단 후, RNS의 후속 과정을 위한 우수한 주형 염기로 작용되는 히드록시메틸 뉴클레오티드들이 만들어진다(도 13). RNS 동안 가닥 대체는 Invader 분석으로 만들어진 것과 유사한 두 갈래로 갈라진 dsDNA (플랩) 구조를 만든다(Lyamichev et al., 1999 참고). 플랩 엔도뉴클레아제 (FEN1)는 도 13에서 나타낸 것과 같이 두 갈래로 갈라진 구조를 절단하여, 뉴클레오티드 갭없이 하류 5'-PO_4 단부 가닥을 만드는 것으로 알려져 있다 (Kaiser *et al.*, 1999). 이는 후속 RNS 과정을 위하여 dsDNA 분자를 복구하는 결찰가능한 기질을 만든다.

[0288] **B. 중합효소 분석**

[0289] 본 발명의 또다른 측면은 중합효소 분석의 사용에 관계한다. "중합효소 단부 포인트 분석" (Wu et al., 2007, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)을 이용하여 혼입 효과에 대해 천연 및 변형된 뉴클레오티드들이 테스트되었다. 이 분석은 정합된 그리고 부정합된 주형 염기에서 혼입 효과를 검사한다. 혼입 효과는 프라이머-주형 복합체의 절반에 혼입되는 농도(IC_{50})를 결정함으로써 측정된다(IC_{50}). IC_{50}이 결정되는 곡선을 만들기 위하여 화합물 농도를 증가시키면서 적정이 실시되었다.

[0290] 주형 DNA의 서열은 테스트될 화합물에 따라 선택된다. 예를 들면, 주형 서열에서 프라이머 다음의 제 1 의문(interrogation) 염기는 혼입 효과를 측정할 때 화합물의 상보 염기이며, 부정합 식별 성질을 측정할 때 3개의 부정합 염기중 하나이다.

[0291] 어닐링화된 반응에서, DNA 중합효소 (이를 테면, THERMINATOR™ DNA 중합효소, 반응당 0.25 units, New England Biolabs), 1× Thermopol 완충액, 및 공지의 농도의 천연 또는 변형된 뉴클레오티드는 각 10 μL 반응에 추가되며, 10분간 75℃에서 항온처리되며, 얼음에서 냉각되고, 10 μL의 중지 용액 (98% 포름아미드: 10 mM Na_2EDTA, pH = 8.0, 25 mg/ml Blue Dextran)로 중단되었다. 중단된 반응물을 30초간 75℃로 가열하여 DNA를 변성시키고, 다시 얼음위에 둔다. 연장 산물은 ABI 모델 377 DNA 시퀀서를 이용하여 10% Long Ranger (Lonza)

폴리아크릴아미드 겔에서 분석된다. 추가 상세한 내용은 하기 실시예 1에서 제공된다.

[0292] **C. 부정합 식별 및 종료**

[0293] 본 발명의 또다른 측면은 예를 들면, 본 명세서에서 기술된 가역적 종료자들의 사용을 통하여 부정합 혼입에 대항하여 개선된 식별에 관한 것이다. 2-니트로벤질 기의 α-탄소에서 치환은 절단 반응의 속도를 증가시킬 수 있다고 보고되었다 (Reichmanis *et al.*, 1985; Cameron and Frechet, 1991; Hasan *et al.*, 1997, 이들 모두 전문이 여기에 참고자료로 편입된다). 이론에 결부되지 않고, 본 명세서에서 제시된 결과들은 2-니트로벤질 기의 α-탄소에서 치환이 3'-OH 차단안된 뉴클레오티드 트리포스페이트에 있어서 DNA 합성 종료에 영향을 줄 수 있고, 부정합 혼입의 식별을 개선시킬 수 있음을 암시한다. 더욱이, 그리고 하기에서 더 상세하게 논의되는 결과에 근거하여, 2-니트로벤질 기의 α-탄소의 치환 입체 화학은 부정합 식별의 정도 및 절단 반응의 속도에 상당한 영향을 줄 수 있다. 이론에 결부되지 않고, 최소한 2가지 인자들이 단일 혼입 이후 DNA 합성의 종료에 일반적으로 영향을 주는 것으로 밝혀졌다: a) 2-니트로벤질 기의 α-탄소에서의 치환, 그리고 b) 벤질 고리의 2-위치에서 치환.

[0294] **D. UV-절단 속도**

[0295] 본 발명의 또다른 측면은 개선된 UV-절단 속도를 가진 가역적 종료자들을 제공하는 것에 관계된다. 유사체들이 365 nm UV 광으로 프라이머 가닥에 혼입될 때, 종료 치환된 2-니트로베닐 기의 절단은 다음 주기의 혼입이 다시 시작되도록 한다. 이론에 결부되지 않고, 최소한 2가지 인자들이 혼입된 뉴클레오티드 유사체들의 UV-절단 속도에 전형적으로 영향을 주는 것으로 발견된다: a) 2-니트로벤질 기의 α-탄소 치환의 입체-화학, 그리고 b) 벤질 고리에서의 치환.

[0296] **E. 차세대 시퀀싱 (NGS) 기술**

[0297] 본 발명의 또다른 측면은 본 명세서에서 기술된 가역적 종료자들 및 방법들을 차세대 시퀀싱 방법에 적용하는 것에 관계된다. 시퀀싱 기술은 (a) 주형 준비, (b) 시퀀싱 및 영상화, 그리고 (c) 데이터 분석으로 주로 크기 분류되는 다수의 방법들을 포함한다. 특정 프로토콜의 독특한 조합은 한 기술을 다른 기술과 구별되게 하고, 각 플렛포움으로부터 생성된 데이터 유형을 결정한다. 데이터 품질 및 비용에 근거하여 플렛포옴이 비교될 때 데이터 출력에서 이러한 차이는 도전을 제시한다. 비록 품질 득점 및 정확성 예측이 각 제조업자에 의해 제공되지만, 한 플렛포옴으로부터 "품질 염기"가 또다른 플렛포옴의 것에 대등하다는 의견은 없다. 본 명세서에서 기술된 화합물 및 방법들은 조합으로 이용될 수 있고, 하기에서 설명되는 하나 또는 그 이상의 주형에 적용될 수 있다.

[0298] NGS 반응을 위한 주형들을 준비하는데 이용되는 방법들은 다음을 포함한다: 단일 DNA 분자들로부터 기인된 클론적으로 증폭된 주형들, 그리고 단일 DNA 분자 주형들. DNA 중합효소들을 이용하는 시퀀싱 방법들은 주기적 가역 정지 (CRT), 단일-뉴클레오티드 추가 (SNA) 및 실시간 시퀀싱으로 분류된다. DNA 중합효소가 DNA 리가아제에 의해 대체되는 접근법인 결찰 (SBL)에 의한 시퀀싱은 NGS 기술에서 또한 이용되었다. 이를 테면, Shendure *et al.*, 2005 및 Valouev *et al.*, 2008 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 이들 시퀀싱 전략과 함께 영상화 방법들은 단일 분자 사건의 생물발광 신호들의 측정에서 4-색 영상화에 이른다. 일부 구체예들에서, 이러한 조합된 방법들은 NGS 플렛포옴에 의해 생성된 방대한 데이터를 취급할 수 있는 적절한 정보 기술 시스템과 더 조합될 수 있는데, 데이터 저장, 추적 및 품질 관리에 관련된 측면들이 포함된다. Pop & Salzberg, 2008, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0299] **a) 주형 준비**

[0300] 일부 구체예들에서, 본 발명은 가역적 종료자들 및 시퀀싱 방법에 하나 또는 그 이상의 주형들 또는 주형 준비 방법에 적용 및/또는 복합시키는 것에 관계한다. 예를 들면, 일부 구체예들에서, 확고한 주형 준비 방법들이 이용된다. 이들은 조사중인 게놈으로부터 핵산 재료의 대표적, 비-편향된 출처를 만든다. 일부 구체예들에서, 이 방법은 게놈 DNA를 더 작은 크기로 무작위로 절단하고, 이로부터 단편 주형들 또는 쌍을 이루는 짝 주형들이 만들어지는 것을 포함한다. 일부 구체예들에서, NGS 기술과 연합된 실시예의 경우, 주형은 고형 표면 또는 지지대에 부착되거나 또는 고정된다. 공간적으로 떨어져있는 주형 장소의 고정화를 이용하여 수천 내지 수십억개의 시퀀싱 반응이 동시에 실행될 수 있다.

[0301] *클론적으로 증폭된 주형들.* 일부 구체예들에서, 본 발명은 클론적으로 증폭된 주형들 또는 클론적으로 증폭된 주형 준비 방법들의 용도를 포함한다. 예를 들면, 이러한 주형들은 단일 형광 사건을 탐지하도록 기획되지 않은 영상화 시스템들과 함께 이용될 수 있다. 예를 들면, 2가지 공통적인 증폭 방법은 에멀젼 PCR (emPCR이라고

도 함) 및 고형-상 증폭이다. Dressman *et al.*, 2003 및 Fedurco *et al.*, 2006 참고, 이들 모두 전문이 여기에 참고자료로 편입된다. 일부 구체예들에서, emPCR를 이용하여 무-세포 시스템에서 시퀀싱 주형들을 준비할 수 있는데, 이 방법은 박테리아성 클로닝 방법에서 전형적으로 기인되는 문제점-게놈 서열의 임의적인 상실을 회피하는 장점을 가진다. 일부 구체예들에서, 단편 또는 짝-형성(mate-pair) 표적의 라이브러리가 생성되고, 그리고 범용적인 프라이밍 장소를 포함하는 어뎁터는 표적 단부들에 결찰되어, 복합체 게놈들이 공통 PCR 프라이머들과 함께 증폭된다. 예를 들면, 결찰 이후, 이 DNA는 단일 가닥들로 분리되고, 비드당 하나의 DNA 분자를 선호하는 조건하에 비드에 포획된다. Metzker 2010, 도 1a, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 예를 들면, 성공적인 증폭과 emPCR 비드들의 농축 이후, 표준 현미경 슬라이드(Polonator 기구와 함께 이용됨; 이를 테면, Shendure *et al.*, 2005 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)에서 아미노 피복된 유리 표면에 화학적으로 가교된 아크릴아미드 겔에 고정될 수 있고 (Life/APG 고형 및 Polonator 기구들과 함께 이용됨; 이를 테면, Kim *et al.*, 2007, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 또는 개별 PicoTiterPlate (PTP) 웰 (Roche/454 기구와 함께 이용됨; Margulies *et al.*, 2005, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) 또는 IonChip 웰(Ion Torrent 기구와 함께 이용됨; Rothberg *et al.*, 2011, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)에 침착되어 고정될 수 있고, 이때 NGS 화학이 실행될 수 있다. 일부 구체예들에서, 고형-상 증폭을 이용하여 유리 슬라이드 상에 단편 또는 짝-형성 주형들로부터 무작위로 분포된, 클론적으로 증폭된 클러스터들을 만들 수 있다. Metzker 2010, 도 1b, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 일부 구체예들에서, 고-밀도 전방 및 역 프라이머들은 슬라이드에 공유적으로 부착되며, 지지대에서 주형에 대한 프라이머의 비율은 증폭된 클러스트들의 표면 밀도로 특징화된다. 일부 구체예들에서, 고형-상 증폭을 이용하여 10-20 억개의 공간적으로 떨어져있는 주형 클러스터들을 생성시키고(Illumina/Solexa), 범용 시퀀싱 프라이머가 혼성화되는 자유 단부들을 제공하여 NGS 반응이 개시된다. Bentley *et al.*, 2008 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0302] *단일-분자 주형들*. 일부 구체예들에서, 본 발명은 단일-분자 주형들 또는 단일-분자 주형 준비 방법들의 이용을 포함한다. 클론적으로 증폭된 방법들은 박테리아성 클로닝보다 확실한 장점들을 제공하지만, 일부 프로토콜은 실행하는 것이 번거롭고, 다량의 게놈 DNA 재료 (3-20 μg)를 요구한다. 단일-분자 주형들의 준비는 전형적으로 좀더 직접적이며, 출발 재료를 덜 요구한다(<1μg). 일부 구체예들에서, 이들 방법은 PCR을 요구하지 않으며, 이는 클론적으로 증폭된 주형들에서 서열 변이체들로 가장하는 돌연변이를 일반적으로 만든다. AT-풍부한 및 GC-풍부한 표적 서열들은 산물 수율에서 증폭 편향을 또한 나타낼 수 있고, 이는 게놈 정렬 및 어셈블리에서 이들을 충분히 대표하지 못하게 된다. 일부 구체예들에서, RNA-seq와 같은 정량적인 적용이 이용될 수 있다. Wang *et al.*, 2009, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 이러한 적용은 전형적으로 비-증폭된 주형 출처와 함께 좀더 효과적으로 실행되어, mRNA 분자들의 대표적인 풍부함을 변경시키지 않는다. 일부 구체예들에서, 그리고 NGS 반응의 실행에 앞서, 단일 분자 주형들은 최소한 3가지 상이한 접근법 중 하나를 이용하여 고형 지지대상에 보통 고정된다. 일부 구체예들에서 이용될 수 있는 제 1 접근법에서, 공간적으로 분포된 개별 프라이머 분자들은 고형 지지대에 공유적으로 부착된다 (Harris *et al.*, 2008). 예를 들면, 출발 재료를 작은 크기(예를 들면, ~200-250 bp)로 무작위로 단편화시키고, 단편 단부에 공통적인 어뎁터를 추가하여 준비될 수 있는 주형은 고정된 프라이머에 혼성화된다. Metzker 2010, 도. 1c 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 일부 구체예들에서 이용될 수 있는 제 2 접근법에서, 공간적으로 분포된 단일-분자 주형들은 고정된 프라이머로부터 단일-가닥으로된, 단일-분자 주형들을 프라이밍 및 연정시켜, 고형 지지대에 공유적으로 부착된다(Harris *et al.*, 2008). Metzker 2010, 도. 1c 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 일부 구체예들에서, 그 다음 공통의 프라이머는 이 주형에 혼성화된다. Metzker 2010, 도 1d, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 어느 접근법이든 간에, DNA 중합효소는 예를 들면, NGS 반응을 개선시키기 위하여 고정된 프라임된 주형 배치에 결합되는데 이용될 수 있다. 일부 구체예에서 이용될 수 있는 제 3 접근법에서, 공간적으로 분포된 단일 중합효소 분자들은 프라임된 주형 분자가 결합된 고형 지지대에 부착된다(Eid *et al.*, 2009, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)(Metzker 2010, 도 1e 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 일반적으로, 미국 특허 제7,329,492호 및 제6,255,083호, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. 더 큰 DNA 분자들 (최대 수만개의 염기 쌍)이 이 기술에 이용될 수 있는데, 예를 들면, 처음 2가지 접근법과는 달리, 제 3 접근법은 실시간 방법들과 이용될 수 있어, 잠재적으로 더 긴 판독 길이를 만들 수 있다.

[0303] b) 시퀀싱 및 영상화

[0304] 시퀀싱 클론적으로 증폭된 그리고 단일-분자 주형들에는 기본적인 차이가 있다. 일부 구체예들에서 동일한 주형들의 집단을 생산하기 위하여 클론에 의한 증폭이 이용될 수 있는데, 이들 주형은 시퀀싱 반응을 거친다. 영상화될 때, 관찰된 신호는 주어진 주기를 위한 동일한 주형들에 추가되는 뉴클레오티드들 또는 프로브들의 콘센선스이다. 전형적으로, 이는 추가 과정의 효과에서 더 큰 요구를 하는데, 그 이유는 주형 앙상블의 불완전한 연장

이 느린(lagging)-가닥 디페이징(dephasing) (소위 유형 2 디페이징)을 초래하기 때문이다. 다중 뉴클레오티드들 또는 프로브의 추가는 주어진 주기에서 발생될 수 있고, 선두-가닥 디페이징(소위 유형 1 디페이징)을 초래한다. 디페이징의 개념은 Cheeseman에 의해 설명되었다(미국 특허 제5,302,509호, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 신호 디페이징은 형광 노이즈를 증가시켜, 염기-호출 오류 및 더 짧은 판독을 야기한다(Erlich *et al.*, 2008). 디페이징은 단일-분자 주형들의 문제가 아니기 때문에, 주기 효과를 위한 요구는 완화된다. 그러나, 단일 분자들은 임의의 주어진 주기에서 다중 뉴클레오티드 또는 프로브 추가에 민감하다. 여기에서, 일부 구체예들에서, 인접 염료 분자들 사이에 억제(quenching) 효과로 인하여 결손 오류가 일어나는 것이 관찰될 수 있고 또는 어두운(dark) 뉴클레오티드들 또는 프로브들의 혼입으로 인하여 신호가 탐지되지 않을 것이다. 다음 단락들에서, 클론적으로 증폭된 그리고 단일-분자 주형들을 모두 이용하는 시퀀싱 및 영상화 전략이 논의된다. 본 발명의 일부 측면들에서, 본 명세서에서 제공되는 사용 방법, 가역적 종료자들은 예를 들면, CRT, SNA, 및 실시간 시퀀싱을 포함하는 임의의 하나 또는 그 이상의 DNA 중합효소-의존적 전력과 복합되어 이용될 수 있거나 및/또는 적용될 수 있다. 일부 구체예들에서, 본 발명의 화합물 및 이들의 사용 방법은 CRT 방법에 적용될 수 있거나 및/또는 이와 복합되어 이용될 수 있다.

[0305] 단일 DNA 분자들에 대한 형광 신호를 영상화시키는 몇 가지 시판되는 NGS 시스템이 있다(Harris *et al.*, 2008; Eid *et al.*, 2009 참고, 이들 모두는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 개별 DNA 분자들이 광의 회절 한계 (가령, 250 nm)에 근접한 거리만큼 떨어져 있다면, 어레이에서 단일 분자들의 해리는 고감도 CCD 카메라로 100× 확대에서 실행될 수 있다. 확대 및 표면 평도(flatness)에 따라 변화가 있을 수 있으며, 이는 당업자에게 자명할 것이다. 단일 분자들로부터 형광 신호를 탐지하는데 광범위하게 이용되는 한 가지 기술은 전체 내부 반사 형광 (TIRF) 현미경이다 (Axelrod, 1989 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다). 당업계에 공지된 본 발명에서 이용될 수 있는 다른 기술들은 근접장 주사 광학 현미경이다(SNOM; Moyer *et al.*,1993 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다).

[0306] **F. 영상화 시스템**

[0307] 도 8은 클론적으로 증폭된 주형으로부터 유도된 형광 신호들의 영상화를 위한 영상화 시스템 100의 구체예를 설명한다. 시스템 100은 관심 DNA를 포함하는 미크론 비드로 준비된 미세유동성 플오루쎌 50을 영상화하도록 설계된다.

[0308] 다양한 영상화 기술, 이를 테면, 표준 4색 영상화 또는 색맹(color-blind) 펄스-멀티라인 여기(excitation)는 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들과 복합되어 다양한 구체예들에서 이용될 수 있다. 설명된 구체예는 표준 4색 영상화를 위한 것이다.

[0309] 시스템 100은 미세유동성 플오루쎌 50에 고정된 emPCR 증폭된 주형 비드로부터 유도된 형광 신호들을 포획하도록 설계된 영상화 장치 10(이를 테면, 디지털 카메라, 포토쎌, 등).

[0310] 램프 14 (이를 테면, 크세논 램프)는 미세유동성 플오루쎌 50과 영상화 장치 10 사이에 광로(30)을 만든다. 램프 14로부터 광은 필터 휠 16로 이동한다. 설명된 구체예에서, 필터 휠 16이 설치되고, 4색 영상이 포획되도록 4가지 스펙트럼 필터를 포함한다. 필터 휠 16은 각 타일 위치에서 4개 각 스펙트럼 필터 각각 사이에서 스위치되도록 배치되어 영상화 장치 10은 혼입된 3'-OH 차단안된 가역적 종료자들로부터 4색 영상을 포획할 수 있다.

[0311] 램프 14로부터 광의 일부는 필터 휠 16로부터 대물렌즈 18를 통하여 미세유동성 플오루쎌 50로 이동된다. 램프 14의 광 일부는 필터 휠 16에서 영상화 장치 10로 이동된다. 설명된 구체예에서, 광 경로 30는 거울 12을 이용하여 영상화 장치 10로 지향된다. 다른 구체예들에서, 이러한 거울이 필수적일 수 있지만, 여전히 다른 구체예들에서, 2개 또는 그 이상의 거울이 요구될 수 있다.

[0312] 시스템 100은 플오루쎌 50로 UV 광을 제공하도록 설계된 자외선(UV) 광원 20을 또한 포함한다. 일부 구체예들에서 UV 광원 20은 광-방출 다이오드(LED)이거나, 또는 임의의 다른 UV 광원일 수 있다.

[0313] **G. 오존 오염의 최소화**

[0314] 또다른 측면에서, 본 발명은 오존 오염의 영향을 최소화시키는 서열 방법들을 제공한다. 오존 (O_3)은 산소의 동소체이며, 지구상의 생명에게 유해한 그리고 유익한 특징을 모두 가진다. 예를 들면, 오존은 성층권에서 태양의 높은 에너지 방사에 의해 분자 산소 (O_2)를 두 개 원자로 분할시키고, 이는 다시 상이한 O_2 분자들과 결합되어 O_3가 된다. 이 성층권은 태양에 의해 생성되는 유해한 자외선으로부터 지구상에 살아있는 유기체를 보호한다. 지상 수준 또는 또는 대류권에서, 그러나, 오존은 대기 오염물질로 간주된다. 오존은 산업 설비, 전

기 설비, 자동차 배기, 가솔린 증기 및 화학 용매에 의해 생성되는 질소 산화물과 휘발성 유기 화합물에 태양광이 작용하는 스모그 상태에서도 또한 생성된다(EPA, 2011 참고). 오존 수준은 더운 여름동안 증가되며, 오존 손상 효과는 상대습도가 증가함에 따라 증가된다. 대류권의 오존은 곡물 및 산림에 심각한 손상을 야기하고(Hewitt *et al.*, 1990 참고), 동물 및 인간에게서 다수의 호흡기 문제를 일으키며(Fairchild *et al.*, 1959; Bhalla, 1994), 뿐만 아니라 자동차 타이어(Crabtree and Kemp, 1946), 직물 재료에서 발견되는 염료(Salvin and Walker, 1955) 뿐만 아니라 분자 생물학에서 이용되는 형광 염료를 포함하는 많은 소비재에 부작용을 야기한다.

[0315] 화학적 견해에서, 오존은 올레핀 화합물 (가령, 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 화합물)에서 흔히 발견되는 전자쌍을 가진 대부분 반응성인 친전자 물질이다. 오존 화학에 집중된 방대한 연구가 있었고, 이를 오존화라고 한다. 방대한 분량의 2권의 연속 기획 책은 오존 자체의 성질과 유기 물질과 함께 겪는 다수의 반응을 설명한다. 이 책의 제 1권은 올레핀 화합물과 오존 반응을 주로 다루며(Bailey, 1978; Bailey 1982 참고), 이 책의 1권과 2권이 참고자료에 포함된다.

[0316] 염료 및 염료 중간생성물은 문헌에서 잘 공지되어 있으며, 1세기 이상 동안 발견된 현재까지 이용되는 염료들의 대부분 유형들이다(Gordon and Gregory, 1983). 염료는 이들이 어떻게 사용되는지 또는 이들의 화학적 구조에 따라 주로 분류될 수 있다(Gordon, 2009). 후자의 경우, 염료는 (i) 아조, (ii) 안트라퀴논, (iii) 벤조디퓨라논, (iv) 다환식 방향족 카르보닐, (v) 인디고이드, (vi) 폴리메틴 및 관련된 염료 (가령, 시아닌), (vii) 스티릴, (viii) 디- 및 트리아릴 카르보늄 및 관련된 염료 (가령, 플루오레신, 로다민 및 이들의 술폰화된 유도물질), (ix) 프탈로시아닌, (x) 퀴노프탈론, (xi) 황, (xii) 니트로 및 니트로조, 그리고 (xiii) 기타 (가령, 쿠마린 및 BODIPY) (Gregory, 2009)의 일반적 유별로 분류되었다. 전부는 아니지만, 대부분의 염료 및 염료 중간생성물은 다수의 탄소-탄소 이중 결합을 보유하는데, 이것이 오존화에 민감하게 만든다. 1970년대 중반, Lofquist 및 이의 동료들은 대부분의 염료는 오존 분해에 민감하다는 결론을 내렸다(미국 특허 3,822,996; 미국 특허 3,859,045; 미국 특허 3,917,499 참고).

[0317] 염색된 직물에 오존을 노출시키면, 염료 퇴색(이를 테면, 색의 정착 상실)되고, 이는 1955년 처음 보고되었다. Salvin 및 Walker는 "O-페이딩(fading)"이라는 신조어를 만들었는데, 주름진 직물의 서비스 테스트에서, 오존은 몇 가지 푸른 안트라퀴논 염료 (가령, Eastman Blue GLF, Amacel Blue, 및 Interchemical Blue B) 뿐만 아니라 황색 및 적색 안트라퀴논 염료(Salvin, 1955 참고)에 노출될 때 심각한 염료 페이딩을 야기하였다고 밝혔다. 안트라퀴논 염료의 다른 예시들, 이를 테면 C.I. Basic Blue 47 (미국 특허 3,822,996 참고) 및 Disperse Blue 3 (미국 특허 3,859,045)는 O-페이딩에 민감하다고 보고되었다. 높은 습도는 O-페이딩을 강화시키고(미국 특허 3,917,449; 미국 특허 4,737,155; 미국 특허 3,822,996; 미국 특허 4,304,568 참고), 그리고 섬유의 경우 수분은 오존화 반응이 일어나는 재료의 표면에 확산되는데 충분한 운동성을 제공한다고 제시되었다(미국 특허 4,737,155 참고).

[0318] 형광 염료, 이를 테면, 폴리메틴 분류에 속하는 것들은 오존화 반응에 민감하다고 보고된 바 있고, 이는 이들의 형광 신호 강도를 감소시킨다. 예를 들면, Cy3 및 Cy5 염료는 유전자 발현, 유전자형확인(genotyping), 그리고 재-시퀀싱 적용에 광범위하게 이용되었다(Gershon, 2004 참고). Fare 및 동료들은 Cy5 및 이의 술폰화된 유도물질 Alexa Fluor 647은 10 내지 30초 이내에 5 내지 10 ppb의 노출 수준에서 오존 손상 받기 쉽다는 결과를 보여주었다(Fare et al., 2003 참고). Cy3 및 이의 술폰화된 유도물질 Alexa Fluor 555의 경우 더 높은 오존 수준(>100 ppb)에서 형광 강도 수준이 또한 감소되었다. Kadushin 및 Getts는 출발 신호는 1-5분 이내에 ~10%로 감소될 수 있다고 하였다(미국 특허 출원 공개 2004/0110196).

[0319] 항오존화물질로 작용하는 다수의 화학 시약들이 있다. 예를 들면, 파라-페닐디아민, 디하이드로퀴놀린, 티오우레아 (미국 특허 4,737,155; 미국 특허 4,631,066), 포화된 알킬 치환된 티오우레아, 알킬 및 아릴 포스파이트(미국 특허 3,822,996), 에톡실화된 지방족 3기 아민(미국 특허 3,859,045), 치환된 피페리딘 티오우레아 (미국 특허 4,304,568), 치환된 옥사디아진 티오네스 및 치환된 티아진 티오네스 (미국 특허 4,304,568), 아크릴 중합효소, 메타아크릴레이트 또는 에틸아크릴레이트의 공중합체(미국 특허 출원 공개 2004/0110196), 및 폴리티오우레아 (미국 특허 3,917,449)를 포함한다. 본 발명의 경우, 일부 구체예들에서, 시퀀싱 반응에서 형광 염료의 오존 분해를 방지하기 위하여 하나 또는 그 이상의 용액에서 티오우레아가 이용될 수 있다. WO 2012/037394, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다는 NGS 기술을 포함하는 방법과 복합하여 티오우레아의 이용 방법을 제공한다. 일부 구체예들에서, 영상화 및/또는 광화학적 절단 단계는 예를 들면, 상기 본 발명의 요약에서 공개된 농도의 티오우레아 존재하에 실시될 수 있다.

[0320] II. 시료 준비

[0321] NGS 분석을 위하여 관심 DNA를 준비하는 방법은 예를 들면, 클론적으로-증폭된 그리고 비-증폭된 (가령, 단일 분자) 주형들을 포함한다. 일부 구체예들에서, 에멀젼 PCR (emPCR)이 이용될 수 있다. 도 9에서 나타낸 것과 같이, 시료는 다음과 같이 준비될 수 있다. 우선, 게놈 DNA가 단리된다. 그 다음 이 DNA는 더 작은 조작으로 단편화된다. 그 다음 통상의 어뎁터들이 이들 단편의 단부에 결찰된다. 어뎁터-결찰된 DNA 분자들은 단일 가닥들로 분리되고, 비드당 한 개 DNA 분자를 선호하는 조건하에 1 μm 비드상에 포획된다. 오일-수성 유액은 이들 비드-DNA 복합체를 포집하는 개별 수성 방울을 만든다. 이들 방울 안에서 PCR 증폭이 실행되어, 동일한 주형 서열 10^4-10^6 복사체를 포함하는 비드를 만든다. 성공적인 증폭 및 농축 이후, 수만 내지 수억개의 emPCR 비드는 미세유동성 플오루쎌 50에 화학적으로 고정된다. 일부 구체예들에서, 플오루쎌 50은 8개 채널을 포함할 수 있고, 유리로 만들어질 수 있다.

[0322] I. 시스템 작동

[0323] 플오루쎌 50이 비드와 함께 준비되면, 플오루쎌 50은 시퀀싱 시스템 100에 위치시킬 수 있다. 도 10은 CRT 1 주기에서의 전형적인 단계를 설명한다. 단일 DNA 분자는 설명을 목적으로 나타낸 것이며, 당업자는 이 과정은 많은 DNA 분자들에서 실행될 수 있음을 인지할 것이다.

[0324] 우선, 혼입 단계에서, 3'-OH 가역적 종료자들은 상기에서 논의된 바와 같이, DNA 중합효소 (지퍼로 나타냄)를 이용하여 혼입된다.

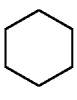
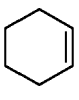
[0325] 그 다음, 형광-라벨된 DNA 분자들이 영상화된다. 램프 14가 활성화되어, 플오루쎌 50로부터 영상화 장치 10까지 광 경로 30가 만들어진다. 영상화 장치 10는 필터 휠 16의 4개 스펙트럼 필터 각각을 통하여 영상을 포획한다. 필터-휠16을 이용하여, 각 스펙트럼 채널은 미세유동성 플오루쎌 50 안에서 형광 신호를 포획하기 위하여 타일을 붙인(tiled) 방식으로 영상화된다. 그 다음 개별 비드의 처리된 형광 강도로부터 염기 호출이 실행된다 (가령, 정제된 푸른 신호는 3'-OH 가역적 종료자가 청색 염료로 라벨되었기 때문에 "A" 염기로 불릴 수 있다). CRT 방법의 판독 길이는 실행된 주기 횟수의 직접적 함수다(Metzker 2010; Metzker, 2005, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다).

[0326] 그 다음 광화학적 절단이 실행될 수 있다. UV 광원 20을 이용하여 플오루쎌 50에 UV 광을 비춘다. UV 광이 종료기 및 형광 기를 광화학적으로 잘라낸다. 이와 같은 방식으로, 변형된 핵산은 이의 고유한 상태로 복원된다.

[0327] 종료 기 및 형광 기들을 씻어내기 위한 세척이 도입된다. 혼입, 영상화, 절단 및 세척 단계는 필요한 만큼의 CRT 주기 동안 실행될 수 있다. 도 11은 3개 주기로부터 4색 타일 영상과 개별 비드로부터 후속 염기-호출을 설명한다.

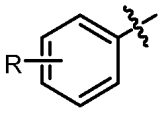
[0328] IV. I. 정의

[0329] 화학적 작용기의 맥락에서 사용될 때, "수소"은 -H를 의미하고; "하이드록시"은 -OH를 의미하고; "옥소"은 =O를 의미하고; "할로"은 독립적으로 -F, -Cl, -Br 또는 -I를 의미하고; "아미노"은 $-NH_2$를 의미하고; "하이드록시아미노"은 -NHOH를 의미하고; "니트로"은 $-NO_2$를 의미하고; 이미노는 =NH를 의미하고 (용어 이미노를 포함하는 작용기(*예를 들어*, 알킬이미노)의 정의에 대하여 하기를 참조하라); "시아노"은 -CN를 의미하고; "이소시아네이트"은 N=C=O를 의미하고; "아지도"은 $-N_3$를 의미하고; 1가 맥락에서 "포스페이트"는 $-OP(O)(OH)_2$ 또는 또는 이의 탈양성자화 형태를 의미하고; 2가 맥락에서 "포스페이트"는 -OP(O)(OH)O- 또는 이의 탈양성자화 형태를 의미하고; "머캅토"는 -SH를 의미하고; 그리고 "티오"는 =S를 의미하고; "술포닐"은 $-S(O)_2-$를 의미하고; 그리고 "설피닐"은 -S(O)-를 의미한다.

[0330] 화학식의 설명에서, 기호 "-"은 단일 결합을 의미하고, "="은 이중 결합을 의미하며, "≡"은 삼중 결합을 의미한다. 기호"----"은 선택적 결합을 나타내고, 존재한다면 단일 또는 이중 결합이다. 기호 "═══"은 단일 결합 또는 이중 결합을 나타낸다. 따라서, 예를 들면, 구조  는 구조 , , ,  및 을 포함한다. 당업자들에 의해 인지되는 바와 같이, 이러한 고리 원자중 하나는 이상의 이중 결합의 일

부를 형성하지 않는다. 기호 "〰"은 결합을 가로질러 수직으로 그려질 때, 작용기의 부착 지점을 나타낸다. 부착 지점은, 독자가 빠르고 명백하게 부착 지점을 식별하도록 돕기 위하여, 전형적으로 단지 더 큰 작용기에 대하여 이러한 방식으로 식별됨이 주목된 다. 기호 "◄"은 작용기가 쐐기의 두꺼운 말단에 부착된 단일 결합이 "페이지 밖(out of the page)"에 있음을 의미한다. 기호 "⁘"은 작용기가 쐐기의 두꺼운 말단에 부착된 단일 결합이 "페이지 안(into the page)"에 있음을 의미한다. 기호 "〰"은 배향이 (*예를 들어*, *R* *또는* *S*), 기하는 (*예를 들어*, *E* 또는 *Z*)인 단일 결합을 의미한다.

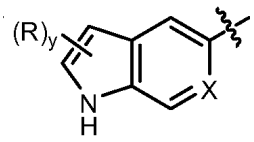
[0331] 본 출원에서 나타낸 구조의 원자에서 임의의 정의되지 않은 원자가는 이 원자에 결합된 수소 원자를 은연중에 나타낸다. 기 "R"이 화학식에서 고리 시스템 상에서, 예를 들면, "유동(floating)"을 나타낸다면:



[0332] ,

[0333] R은 안정한 구조가 형성되는 한 나타나거나, 암시되거나, 또는 명백히 정의된 수소를 포함하는, 임의의 고리 원자에 부착된 임의의 수소 원자를 치환할 수 있다.

[0334] 작용기 "R"이 융합된 고리 시스템상의 "유동 작용기"로 나타날 때, 예를 들어 다음 화학식에서:



[0335] ,

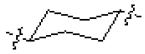
[0336] R은 별로도 명시되지 않으면 융합된 고리 중 어느 하나의 임의의 고리 원자에 부착된 임의의 수소를 치환할 수 있다. 안정한 구조가 형성되는 한, 치환 가능한 수소에는 나타난 수소(*예를 들어*, 질소 상기 화학식에서 질소에 부착된 수소), 암시된 수소(*예를 들어*, 나타나지 않지만 존재하는 것으로 이해되는 상기 화학식의 수소), 명백히 정의된 수소, 그리고 고리 원자의 정체성에 의존하는 선택적인 수소(*예를 들어*, X가 -CH-일 경우, 작용기 X에 부착된 수소)가 포함된다. 나타난 예에서, R은 융합된 고리 시스템의 5-원 또는 6-원 고리 중 어느 하나에 존재할 수 있다. 상기 화학식에서, 소괄호안에 포함된 작용기 "R" 바로 다음의 아래 첨자 "y"은 수치 변수를 나타낸다. 별도로 명시되지 않으면, 이러한 변수는 0, 1, 2, 또는 단지 고리 또는 고리 시스템의 치환 가능한 수소 원자의 최대 개수에 의하여 제한되는 2보다 큰 임의의 정수일 수 있다.

[0337] 하기의 작용기 및 분류에 대하여, 다음의 소괄호 안의 아래 첨자가 작용기를 다음과 같이 추가로 정의한다: "(Cn)"은 작용기에서 탄소 원자의 정확한 개수 (n)을 정의한다. "(C≤n)"은 작용기/분류에 존재할 수 있는 탄소 원자의 최대 개수 (n)를 정의하고, 이러한 것에서 가능한 한 가장 작은 수이다. *예를 들어*, 작용기 "알케닐$_{(C\leq 8)}$"에서 또는 "알켄$_{(C\leq 8)}$ "분류에서 탄소 원자의 최소 개수가 둘로 이해된다. 예를 들어, "알콕시$_{(C\leq 0)}$"은 1 내지 10 개의 탄소 원자(*예를 들어*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10, 또는 그 안의 추론 가능한 임의의 범위(*예를 들어*, 3 내지 10 개의 탄소 원자))를 가지는 알콕시키를 나타낸다. (Cn-n')은 작용기에서 탄소 원자의 최소 개수 (n) 및 최대 개수 (n')을 모두 정의한다. 유사하게, "알킬$_{(C2-10)}$"은 2 내지 10 개의 탄소 원자(*예를 들어*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10, 또는 그 안의 추론 가능한 임의의 범위(*예를 들어*, 3 내지 10 개의 탄소 원자))를 가지는 알킬기를 나타낸다.

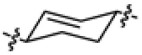
[0338] 용어 "포화된"은 본 명세서에서 사용된 것과 같이 탄소-탄소 이중결합, 및 탄소-탄소 삼중 결합이 없도록 변형된 화합물 또는 기를 의미하나, 단 하기에서 명시된 것은 제외된다. 이 용어는 탄소-이형원자 다중 결합, 예를 들면 탄소 산소 이중 결합 또는 탄소 질소 이중 결합은 배제하지 않는다. 더욱이, 케토-에놀 호변이체 또는 이민/에나민 호변이체의 일부로 발생될 수 있는 탄소-탄소 이중 결합은 배제하지 않는다.

[0339] "치환된" 이란 수식어 없이 이용될 경우 용어 "지방족"은 변형된 화합물/기는 비환식 또는 환식, 비-방향족 탄화수소 화합물 또는 기를 의미한다. 지방족 화합물/기들에서, 탄소 원자들은 직쇄, 분기쇄, 또는 비-방향족 고리 (비환식)으로 서로 결합될 수 있다. 지방족 화합물/기들은 단일 결합(알칸/알킬)에 결합되어 포화될 수 있고, 또는 하나 또는 그 이상의 이중 결합(알켄/알케닐) 또는 하나 또는 그 이상의 삼중 결합 (알킨/알키닐)과

함께 불포화될 수 있다. 용어 "지방족"이 "치환된" 이란 수식어 없이 이용될 때, 단지 탄소 및 수소 원자들만 존재한다. 이 용어가 "치환된" 이란 수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$.에 의해 독립적으로 치환된다.

[0340] "치환된"이란 수식어 없이 이용될 때, 용어 "알킬"은 부착, 선형 또는 분기형, 시클로, 환식, 또는 비환식의 부착점에 탄소 원자가 있는 단가 포화된 지방족 기를 지칭하며, 탄소 및 수소이외의 원자는 없다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 것과 같이 시클로알킬은 알킬의 부분집합입니다. $-CH_3$ (Me), $-CH_2CH_3$ (Et), $-CH_2CH_2CH_3$ (nPr 또는 프로필), $-CH(CH_3)_2$ (iPr, iPr 또는 이소프로필), $-CH(CH_2)_2$ (시클로프로필), $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ (nBu), $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ (*sec*-부틸), $-CH_2CH(CH_3)_2$ (이소부틸), $-C(CH_3)_3$ (*tert*-부틸, *t*-부틸, *t*-Bu 또는 ^{t}-Bu), $-CH_2C(CH_3)_3$ (*네오*-펜틸), 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 및 시클로헥실메틸은 알킬기의 비-제한적 예들이다. "치환된"이란 수식어 없이 이용될 때 용어"알칸디일"은 부착, 선형 또는 분기의, 시클로, 환식 또는 비환식 구조의 부착점에 하나 또는 2개의 포화된 탄소 원자(들)을 가지고, 탄소-탄소 이중 또는 삼중 결합없고, 탄소 및 수소 이외의 원자들은 없는 이가의 포화된 지방족 기를 지칭한다. $-CH_2-$ (메틸렌), $-CH_2CH_2-$, $-CH_2C(CH_3)_2CH_2-$, $-CH_2CH_2CH_2-$, 및  는 알칸디일 기들의 비-제한적 예들이다. 용어 "알킬리덴"이 "치환된"이란 수식어 없이 이용될 때, 이가 기 =CRR'을 지칭하며, 이때 R 및 R'은 독립적으로 수소, 알킬이거나, 또는 R 및 R'은 함께 최소한 2개의 탄소 원자를 보유한 알칸디일을 나타낼 수 있다. 알킬리덴 기들의 비-제한적 예로는 다음을 포함한다: $=CH_2$, $=CH(CH_2CH_3)$, 및 $=C(CH_3)_2$. 이들중 임의의 용어가 "치환된" 이란 수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 독립적으로 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 치환된다. 치환된 알킬 기들의 비-제한적 예들이다: $-CH_2OH$, $-CH_2Cl$, $-CF_3$, $-CH_2CN$, $-CH_2C(O)OH$, $-CH_2C(O)OCH_3$, $-CH_2C(O)NH_2$, $CH_2C(O)CH_3$, $-CH_2OCH_3$, $-CH_2OC(O)CH_3$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2N(CH_3)_2$, 및 $-CH_2CH_2Cl$. 용어 "할로알킬"은 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 할로 기로 치환된 치환된 알킬의 부분집합이며, 탄소 수소 및 할로겐이외의 다른 원자들은 존재하지 않는다. $-CH_2Cl$는 할로알킬의 비-제한적 예이다. "알칸(alkane)"은 화합물 H-R을 지칭하며, 여기에서 R은 알킬이다. 용어 "플로로알킬"은 하나 또는 그 이상의 수소가 플로오르 기로 치환되고, 탄소, 수소 및 플로린을 제외한 다른 원자들이 존재하지 않는 치환된 알킬의 부분집합이다. $-CH_2F$, $-CF_3$, 및 $-CH_2CF_3$ 은 플로오르알킬 기들의 비-제한적인 예들이다. "알칸(alkane)"은 화합물 H-R을 지칭하며, 여기에서 R은 알칸이다.

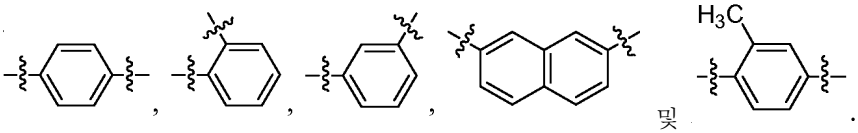
[0341] 용어 "알케닐"은 "치환된"이라는 수식어 없이 사용될 때, 적어도 하나의 비방향족 탄소-탄소 이중 결합이 있고, 탄소-탄소 삼중 결합이 없고, 탄소 및 수소 이외의 원자가 없으며, 부착 지점으로서 비방향족 탄소 원자를 가지는 1가 작용기인 선형 또는 가지형, 사이클로, 환형 또는 비환형 구조를 지칭한다. 알케닐기의 비제한적 예에는 다음이 포함된다: $-CH=CH_2$ (비닐), $-CH=CHCH_3$, $-CH=CHCH_2CH_3$, $-CH_2CH=CH_2$ (알릴), $-CH_2CH=CHCH_3$, 및 $CH=CH-C_6H_5$.

[0342] 용어 "알켄디일"은 "치환된"이라는 수식어 없이 사용될 때, 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합이 있고, 탄소-탄소 삼중 결합이 없고, 탄소 및 수소 이외의 원자가 없으며, 부착 지점으로서 둘의 탄소 원자를 가지는 불포화된 지방족 기인 선형 또는 가지형, 사이클로, 환형 또는 비환형 구조를 지칭하고, 여기서 작용기 -CH=CH-, $-CH=C(CH_3)CH_2-$, $-CH=CHCH_2-$, 및  는 알켄디일 기의 비제한적 예이다. 용어 "치환된" 수식어와 함께 이들 용어가 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 독립적으로 대체되었다. -CH=CHF, -CH=CHCl 및 -CH=CHBr은 치환된 알케닐 기들의 비-제한적 실시예들이다. "알켄(alkene)"은 화합물 H-R을 지칭하며, 여기에서 R은 알케닐이다.

[0343] 용어 "알키닐(alkynyl)"은 "치환된"이라는 수식어 없이 사용될 때, 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합이 있고,

탄소 및 수소 이외의 원자가 없으며, 부착 지점으로서 비방향족 탄소 원자를 가지는 1가 불포화된 지방족 기인 선형 또는 가지형, 사이클로, 환형 또는 비환형 구조를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 알키닐은 하나 또는 그 이상의 비-방향족 탄소-탄소 이중 결합의 존재를 배제한다. -C≡CH, -C≡CCH_3, 및 -CH_2C≡CCH_3은 알키닐 기들의 비-제한적 예시다. 알키닐이 "치환된"수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NH_2, -NO_2, -CO_2H, -CO_2CH_3, -CN, -SH, -OCH_3, -OCH_2CH_3, -C(O)CH_3, NHCH_3, -NHCH_2CH_3, -N(CH_3)$_2$, -C(O)NH_2, -OC(O)CH_3, 또는 -S(O)$_2NH_2$에 의해 독립적으로 대체된다. "알킨(alkyne)"은 화합물 H-R을 지칭하며, 여기에서 R은 알키닐이다.

[0344] 용어 "아릴"은 "치환된"이라는 수식어 없이 사용될 때, 부착 지점으로서 방향족 탄소 원자를 가지는 1가 불포화된 방향족기를 지칭하고, 상기 탄소 원자는 하나 이상의 6-원 방향족 고리 구조(들)의 일부를 형성하며, 여기서 고리 원자는 모두 탄소이고, 이 기는 탄소 및 수소 이외의 원자로 이루어지지 않는다. 하나 이상의 고리가 존재한다면, 이 고리들은 융합되거나 또는 융합되지 않을 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 이 용어는 존재하는 제 1 방향족 고리 또는 임의의 추가 방향족 고리에 부착된 하나 또는 그 이상의 알킬기(탄소수의 제한은 허용)의 존재를 배제하지 않는다. 아릴 기들의 비-제한적 예들은 페닐 (Ph), 메틸페닐, (디메틸)페닐, -$C_6H_4CH_2CH_3$ (에틸페닐), 나프틸, 및 바이페닐로부터 유도된 1가 기를 포함한다. 용어 "아렌디일"은 "치환된"이라는 수식어 없이 사용될 때, 둘의 부착 지점으로서 방향족 탄소 원자를 가지는 2가 작용기를 지칭하고, 상기 탄소 원자는 하나 이상의 6-원 방향족 고리 구조(들)의 일부를 형성하고, 여기서 고리 원자는 모두 탄소이고, 1가 작용기는 탄소 및 수소 이외의 원자로 이루어지지 않는다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 이 용어는 존재하는 제 1 방향족 고리 또는 임의의 추가적인 방향족 고리에 부착된 하나 또는 그 이상의 알킬기(탄소수의 제한 허용)의 존재를 배제하지 않는다. 하나 이상의 고리가 존재한다면, 이 고리는 융합될 수 있거나 융합되지 않을 수 있다. 아렌디일 기들의 비-제한적 예들은 다음을 포함한다:

[0345] 

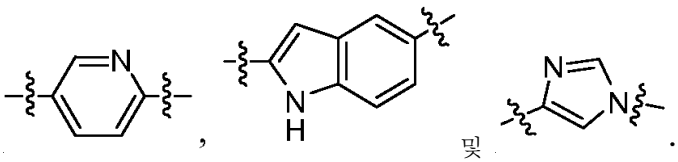
및 .

[0346] 이 용어들이 "치환된"이라는 수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NH_2, -NO_2, -CO_2H, -CO_2CH_3, -CN, -SH, -OCH_3, -OCH_2CH_3, -C(O)CH_3, -NHCH_3, -NHCH_2CH_3, -N(CH_3)$_2$, -C(O)NH_2, -OC(O)CH_3, 또는 -S(O)$_2NH_2$에 의해 독립적으로 대체된다. "아렌"은 화합물 H-R이며, 여기에서 R은 아릴이다.

[0347] 용어 "아랄킬"은 "치환된"이라는 수식어 없이 사용될 때, 1가 작용기 -알칸디일-아릴을 지칭하고, 여기서 용어 알칸디일 및 아릴은 각각 상기 제공된 정의에 부합하는 방식으로 사용된다. 아랄킬의 비제한적 예는: 페닐메틸 (벤질, Bn), 2-페닐-에틸이다. "치환된"이란 수식어와 함께 이용될 때, 알칸디일 및/또는 아릴의 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, -NH_2, -NO_2, -CO_2H, -CO_2CH_3, -CN, -SH, -OCH_3, -OCH_2CH_3, -C(O)CH_3, -NHCH_3, -NHCH_2CH_3, -N(CH_3)$_2$, -C(O)NH_2, -OC(O)CH_3, 또는 -S(O)$_2NH_2$에 의해 독립적으로 치환된다. 치환된 아랄킬의 비-제한적인 예는 다음과 같다: (3-클로로페닐)-메틸, 및 2-클로로-2-페닐-에트-1-일.

[0348] "헤테로아릴"이 "치환된"이라는 수식어없이 이용될 경우 부착지점에서 방향족 탄소 원자 또는 질소 원자를 가진 1가 방향족기를 지칭하며, 전술한 탄소 원자 또는 질소 원자는 하나 또는 그 이상의 방향족 고리 구조의 일부를 형성하고 여기에서 고리 원자의 최소한 하나는 질소, 산소 또는 황이며, 여기에서 헤테로아릴 기는 탄소, 수소, 방향족 질소, 방향족 산소 및 방향족 황이외의 원자로만 구성된다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 이 용어는 방향족 고리 또는 방향족 고리 시스템에 부착된 하나 또는 그 이상의 알킬, 아릴, 및/또는 아랄킬 기들 (탄소 수 제한 허용)의 존재를 배제하지 않는다. 하나 이상의 고리가 존재할 때, 이 고리는 융합될 수 있거나 또는 융합되지 않는다. 헤테로아릴 기들의 비-제한적 예들은 퓨라닐, 이미다졸일, 인돌일, 인다졸일 (Im), 이소옥사졸일, 메틸피리디닐, 옥사졸일, 페닐피리디닐, 피리디닐, 피롤일, 피리미디닐, 피라지닐, 퀴놀일, 퀴나졸일, 퀸옥살리닐, 트리아지닐, 테트라졸일, 티아졸일, 티에닐, 및 트리아졸일을 포함한다. 용어 "*N*-헤테로아릴"은 부착 위치에 질소 원자를 가진 헤테로아릴 기를 지칭한다. "헤테로아렌디일"이 "치환된"이란 수식어 없이 이용될 때, 2개 부착 지점에 2개의 방향족 탄소 원자, 2개의 방향족 질소 원자, 또는 하나의 방향족 탄소 원자 그리고 하나의 방향족 질소 원자를 가진 2가 방향족 기를 지칭하며, 전술한 원자들은 하나 또는 그 이상의 방향족 고리 구조(들)의 일부를 형성하고, 여기에서 최소한 고리 원자들중 하나는 질소, 산소 또는

황이며, 여기에서 2가 기는 탄소, 수소, 방향족 질소, 방향족 산소 및 방향족 황으로만 구성된다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 이 용어는 방향족 고리 또는 방향족 고리 시스템에 부착된 하나 또는 그 이상의 알킬, 아릴, 및/또는 아랄킬 기들 (탄소 수 제한 허용)의 존재를 배제하지 않는다. 하나 이상의 고리가 존재할 때, 이 고리는 융합될 수 있거나 또는 융합되지 않는다. 헤테로아렌디일 기들의 비-제한적 예들은 다음을 포함한다:

[0349] 

[0350] 이 용어들이 "치환된"이라는 수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, -(O)CH3, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 독립적으로 치환되었다.

[0351] "헤테로시클로알킬"이 "치환된"이라는 수식어 없이 이용될 때, 부착 지점으로서 방향족 탄소 원자 또는 질소 원자를 가지는 1가 작용기를 지칭하고, 상기 탄소 원자 또는 질소 원자는 하나 이상의 비-방향족 고리 구조(들)의 일부를 형성하며, 전술한 탄소 원자 또는 질소 원자는 하나 또는 그 이상의 비-방향족 고리 구조의 일부를 형성하고 여기에서 고리 원자들중 최소한 하나는 질소, 산소 또는 황이며, 여기에서 헤테로시클로알킬 기는 탄소, 수소, 질소, 산소 및 황으로만 구성된다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 이 용어는 방향족 고리 또는 방향족 고리 시스템에 부착된 하나 또는 그 이상의 알킬기들 (탄소 수 제한 허용)의 존재를 배제하지 않는다. 하나 이상의 고리가 존재할 때, 이 고리는 융합될 수 있거나 또는 융합되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 이 용어는 생성 기들이 비-방향족으로 남아있다면, 고리 또는 고리 시스템에서 하나 또는 그 이상의 이중 결합의 존재를 배제하지 않는다. 하나 이상의 고리가 존재할 때, 이 고리는 융합될 수 있거나 또는 융합되지 않는다. 헤테로시클로알킬 기들의 비-제한적 예들은 아지리디닐, 아제티디닐, 피롤리디닐, 피페리디닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 몰포리닐, 티오몰포리닐, 테트라히드로퓨라닐, 테트라히드로티오퓨라닐, 테트라히드로피라닐, 피라닐, 옥시라닐 및 옥세타닐을 포함한다. "*N*-헤테로시클로알킬"은 부착지점에 질소 원자를 가진 헤테로시클로알킬 기를 지칭한다. 용어"헤테로시클로알킬"이 "치환된"이란 수식어와 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, $-S(O)_2NH_2$, 또는 $-C(O)OC(CH_3)_3$ (*tert*-부틸옥시카르보닐, BOC)에 의해 독립적으로 치환되었다.

[0352] 용어 "아실"이 "치환된" 이란 수식어 없이 이용될 경우 기 -C(O)R를 지칭하는데, 이때 R은 상기에서 정의된 바와 같이 수소, 알킬, 아릴, 아랄킬 또는 헤테로아릴이다. -CHO, $-C(O)CH_3$ (아세틸, Ac), $-C(O)CH_2CH_3$, $-C(O)CH_2CH_2CH_3$, $-C(O)CH(CH_3)_2$, $-C(O)CH(CH_2)_2$, $-C(O)C_6H_5$, $-C(O)C_6H_4CH_3$, $-C(O)CH_2C_6H_5$, -C(O)(이미다졸일)은 아실 기들의 비-제한적 예들이다. "티오아실"도 유사하게 정의되는데, 단 기 -C(O)R에서 산소가 황 원자로 대체되어, -C(S)R이다. "치환된"이라는 수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자 (카르보닐 또는 티오카르보닐 기에 직접적으로 부착된 수소 원자 포함)는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, -C(O)CH3, -NHCH3, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 독립적으로 대체된다. $-C(O)CH_2CF_3$, $-CO_2H$ (카르복실), $-CO_2CH_3$ (메틸카르복실), $-CO2CH_2CH_3$, $-C(O)NH_2$ (카르바모일), 및 $-CON(CH_3)_2$는 치환된 아실 기들의 비-제한적인 예들이다.

[0353] 용어 "알콕시"이 "치환된"이라는 수식어 없이 이용될 때 기 -OR를 지칭하는데, 이때 R은 상기에서 정의된 것과 같은 알킬이다. 알콕시 기들의 비-제한적 실시예들은 다음을 포함한다: $-OCH_3$ (메톡시), $-OCH_2CH_3$ (에톡시), $-OCH_2CH_2CH_3$, $-OCH(CH_3)_2$ (이소프로폭시), $-O(CH_3)_3$ (*tert*-부톡시),- $OCH(CH_2)_2$, -O-시클로펜틸, 및 -O-시클로헥실. 용어 "알케닐옥시", "알키닐옥시", "아릴옥시", "아랄콕시", "헤테로아릴옥시", "헤테로시클로알콕시", 및 "아실옥시"가 "치환된"이라는 수식어 없이 이용될 때, -OR로 정의된 기를 지칭하며, 이때 R은 알케닐, 알키닐, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬, 및 아실이다. 용어 "알콕시디일"은 이가 기 -O-알칸디일-, -O-알칸디일-O-, 또는 -알칸디일-O-알칸디일-를 지칭한다. 용어 "알킬티오" 및 "아실티오"가 "치환된"이라는 수식어 없이 이용될 때, -SR를 지칭하며, 이때 R은 각각 알킬 및 아실이다. 이들 용어가"치환된"이라는 수식어와 함께

이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, -C(O)CH3, -NHCH3, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 독립적으로 치환된다. 용어 "알코올"은 상기에서 정의된 것과 같이, 알칸에 대응하며, 여기에서 수소 원자들중 최소한 하나는 하이드록시 기로 대체된다.

[0354] 용어 "알킬아미노"가 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용된 경우, -NHR를 지칭하며, 이때 R은 상기에서 정의된 바와 같은 알킬이다. 알킬아미노 기들의 비-제한적인 실시예는 다음을 포함한다: $-NHCH_3$ 및 $-NHCH_2CH_3$. 용어 "디알킬아미노"가 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용될 때, -NRR'을 지칭하며, 이때 R 및 R'은 동일하거나 또는 상이한 알킬 기들이며, 또는 R과 R'은 함께 알칸디일을 나타낼 수 있다. 디알킬아미노 기들의 비-제한적인 예들은 다음을 포함한다: $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_3)(CH_2CH_3)$, 및 *N*-피롤리디닐. 용어들 "알콕시아미노", "알케닐아미노", "알키닐아미노", "아릴아미노", "아랄킬아미노", "헤테로아릴아미노", "헤테로시클로알킬아미노" 및 "알킬술포닐아미노"가 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용될 때, -NHR로 정의된 기들을 나타내며, 이때 R은 알콕시, 알케닐, 알키닐, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬, 및 알킬술포닐을 각각 나타낸다. 아릴아미노 기의 비-제한적인 예는 $-NHC_6H_5$이다. 용어 "아미도" (아실아미노)가 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용될 때, -NHR를 나타내며, 이때 R은 상기에서 정의된 것과 같이 아실을 나타낸다. 아미도 기의 비-제한적 예는 $-NHC(O)CH_3$이다. 용어 "알킬이미노"가 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용될 때, 이가기 =NR를 나타내며, 이때 R은 상기에서 정의된 바와 같은 알킬을 나타낸다. 용어 "알킬아미노디일"은 이가 기 -NH 알칸디일-, -NH-알칸디일-NH-, 또는 -알칸디일-NH-알칸디일-을 나타낸다. 이들 용어중 임의의 것이 "치환된" 이라는 수식어와 함께 이용된 경우, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 독립적으로 치환된다. $-NHC(O)OCH_3$ 및 $-NHC(O)NHCH_3$는 치환된 아미도 기들의 비-제한적인 예가 된다.

[0355] 용어 "알킬포스페이트"가 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용될 때 -OP(O)(OH)(OR)를 나타내며, 이때 R은 상기에서 정의된 바와 같은 알킬이다. 알킬포스페이트 기들의 비-제한적인 예는 다음을 포함한다: -OP(O)(OH)(OMe) 및 -OP(O)(OH)(OEt). 용어 "디알킬포스페이트"가 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용될 때 -OP(O)(OR)(OR')을 나타내며, 이때 R과 R'은 동일하거나 또는 상이한 알킬 기들일 수 있고, 또는 R과 R'은 함께 알칸디일을 나타낸다. 디알킬포스페이트 기들의 비-제한적 예들은 다음을 포함한다: $-OP(O)(OMe)_2$, -OP(O)(OEt)(OMe) 및 $-OP(O)(OEt)_2$. 이들 용어중 임의의 것이 "치환된" 이라는 수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 독립적으로 대체된다.

[0356] 용어 "알킬술포닐" 및 "알킬설피닐"이 "치환된" 이라는 수식어 없이 이용될 때, $-S(O)_2R$ 및 -S(O)R을 각각 나타내고, 이때 R은 상기에서 정의된 바와 같은 알킬이다. 용어 "알케닐술포닐", "알키닐술포닐", "아릴술포닐", "아랄킬술포닐", "헤테로아릴술포닐", 및 "헤테로시클로알킬술포닐"은 유사한 방식으로 정의된다. 이들 용어중 임의의 것이 "치환된" 이라는 수식어와 함께 이용될 때, 하나 또는 그 이상의 수소 원자는 -OH, -F, -Cl, -Br, -I, $-NH_2$, $-NO_2$, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, -CN, -SH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, $-NHCH_3$, $-NHCH_2CH_3$, $-N(CH_3)2$, $-C(O)NH_2$, $-OC(O)CH_3$, 또는 $-S(O)_2NH_2$에 의해 독립적으로 대체된다.

[0357] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "키랄 보조(auxiliary)"는 반응의 입체 선택성에 영향을 줄 수 있는 제거가능한 키랄 기를 지칭한다. 당업자는 이러한 화합물을 잘 알 것이며, 시판되는 것들도 많다.

[0358] 청구항에서 및/또는 명세서에서 "포함하는" 용어와 함께 단수("a" 또는 "an") 는 "하나"을 의미하지만, "하나 또는 그 이상의", "최소한 하나"및 "하나 또는 그 이상의 "의 의미와 일치한다.

[0359] 본 출원을 통하여, 용어 "약(about)"은 장치에 대한 고유한 오류 변화 값을 포함하는데, 이 방법은 연구 대상에서 존재하는 값 또는 변수를 결정하기 위하여 이용된다.

[0360] 용어 "포함하다(comprise)" "보유하다(have)"및 "함유하다(include)"은 열린-말단 연결 동사다. 이들 동사, 포함하다 ("comprises"), 포함하는("comprising"), 보유하다("has"), 보유하는("having"), 함유하다("includes") 및 함유하는("including")중 하나 또는 그 이상의 임의의 형태는 또한 열린-말단을 가진다. 예를 들면, 하나 또는 그 이상의 단계를 "포함하는", "보유하는" 또는 "함유하는" 임의의 방법은 이들 하나 또는

그 이상의 단계 만을 포함하는데 한정되는 것이 아니라 나열안된 다른 단계들을 포함한다.

[0361] 명세서 및/또는 청구범위에서 이용된 용어 "효과적인"은 원하는, 예상된 또는 의도된 결과를 달성하는데 충분하다는 의미다. "효과적인 양", "치료요법적으로 효과적인 양" 또는 "약학적으로 효과적인 양"은 화합물로 환자 또는 대상을 치료하는 내용에서 이용된 경우, 질환을 치료하기 위하여 대상 또는 환자에게 투여될 때 이 화합물의 양은 질환을 치료하는데 충분히 효과적인 양이라는 의미다.

[0362] 화합물에 수식어로 용어 "수화물(hydrate)"이 이용되는 경우, 이 화합물은 화합물의 고형 형태와 연합된 하나 미만의(이를 테면, 반수화물), 하나의(이를 테면 단수화물), 또는 하나이상의(이를 테면 이수화물)을 가진다는 의미다.

[0363] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "IC_{50}"은 획득되는 최대 반응의 50%인 저해 용량을 지칭한다. 이 정량적인 척도는 특정 약물 또는 기타 물질(저해제)가 주어진 생물학적, 생화학적 또는 화학적 과정(또는 과정의 성분, 가령, 효소, 세포, 세포 수용체 또는 미생물)을 절반정도 억제하는데 얼마나 많은 양이 요구되는 가를 나타낸다.

[0364] 제 1 화합물의 "이성질체"는 각 분자가 제 1 화합물과 동일한 원자 구성을 가지지만, 이들 원자의 3차원 배치가 상이한 별개의 화합물이다.

[0365] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "환자" 또는 "대상"은 살아있는 포유동물 유기체, 이를 테면, 사람, 원숭이, 소, 양, 염소, 돼지, 고양이, 마우스, 랫, 기니아 피그 또는 이들의 유전자전이 종을 지칭한다. 특정 구체예에서, 환자 또는 대상은 영장류다. 인간 대상의 비-제한적인 예는 성인, 청소년, 영아 및 태아다.

[0366] 본 명세서에서 기술된 일반적으로 이용된 바와 같이 "약학적으로 수용가능한"이란 온당한 의학적 판단 범위내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 합당한 이익/위험 비율을 가진 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직, 장기 및/또는 체액과 접촉하여 사용하는데 적합한 이들 화합물, 재료, 조성물 및 약형을 말한다.

[0367] "약학적으로 수용가능한 염"은 상기에서 정의된 바와 같이, 약학적으로 수용가능한, 그리고 바람직한 약리학적 활성을 보유한 본 발명의 화합물의 염을 의미한다. 이러한 염은 무기적 산, 이를 테면, 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 및 이와 유사한 것들과 함께 형성된 산 추가 염; 또는 유기산 이를 테면, 1,2-에탄디술폰산, 2-하이드록시에탄술폰산, 2-나프탈렌술폰산, 3-페닐프로피온산, 4,4'-메틸렌비스(3-하이드록시-2-엔-1카르복실 산), 4-메틸바이시클로[2.2.2]옥트-2-엔-1-카르복실 산, 아세트산, 지방족 모도- 및 디카르복실 산, 지방족 유황산, 방향족 유황산, 벤젠술폰산, 벤조산, 캄프로술폰산, 카르본산, 시나민산, 구연산, 시클로펜탄프로피온산, 에탄술폰산, 푸마르산, 글루코헵타논산, 글루콘산, 글루타민산, 글리콜산, 헵타논산, 헥사논산, 하이드록시나프토산, 젖산, 라우릴황산, 말레산, 말론산, 만델산, 메탄술폰산, 뮤콘산, *o*-(4하이드록시벤조일)벤조산, 옥살산, *p*-클로로벤젠술폰산, 페닐-치환된 알카논산, 프로피온산, *p*-톨루센술폰산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 숙신산, 타르타르산, 제3부틸아세트산, 트리메틸아세트산, 및 이와 유사한 것과 함께 형성산 산 추가 염을 포함한다. 약학적으로 수용가능한 염은 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있을 때 형성된 염기 추가 염을 또한 포함한다. 수용가능한 무기 염기는 수산화 나트륨, 탄산 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 알루미늄 및 수산화 칼슘을 포함한다. 수용가능한 유기 염기들은 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, *N*-메틸글루카민 및 이와 유사한 것들을 포함한다. 본 발명의 임의의 염의 일부를 형성하는 특정 음이온 또는 양이온은 전체적으로 이 염이 약리학적으로 수용가능하다면 중요하지 않다는 것을 인지해야 한다. 약학적으로 수용가능한 염 및 이들의 준비 방법 및 사용의 추가 예들은 *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use* (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002)에 제시된다.

[0368] 용어 "약학적으로 수용가능한 운반체"는 본 명세서에서 사용된 것과 같이 화학 물질을 운반 또는 이동시키는 것과 관련된 약학적으로-수용가능한 재료, 조성물 또는 비이클, 이를 테면, 액체 또는 고체 충전물, 희석제, 부형제, 용매 또는 포획 재료를 의미한다.

[0369] 예방("Prevention" 또는 "preventing")은 다음을 포함한다: (1) 이 질환에 대하여 위험에 처한 및/또는 걸릴 가능성이 있지만, 이 질환의 임의의 또는 모든 병리학적 또는 증상을 경험하거나 나타내지 않은 대상 또는 환자에서 질환의 개지를 방지하고, 및/또는 (2) 이 질환에 대하여 위험에 처한 및/또는 걸릴 가능성이 있지만, 이 질환의 임의의 또는 모든 병리학적 또는 증상을 경험하거나 나타내지 않은 대상 또는 환자에서 질환의 병리 또는

증상의 개시를 지연시킨다.

[0370] "입체이성질체" 또는 "광학 이성질체"는 주어진 화합물의 이성질체로써, 동일한 원자가 동일한 다른 원자에 결합되지만, 이들 원자의 3차원 배치는 상이하다. "거울상체"는 좌측와 우측 손과 같이 서로 거울상 주어진 화합물의 입체이성질체들이다. "부분입체이성질체"는 거울상체가 아닌 주어진 화합물의 입체이성질체들이다. 키랄 분자들은 입체중심(sterocenter 또는 stereogenic) 중심이라고도 지칭되는 키랄 중심을 포함하는데, 임의의 2개 기들의 상호작용이 입체이성질체를 유도하는 기들을 보유하는 원자가 될 수 있지만, 반드시 그럴 필요는 없다. 유기 화합물에서, 키랄 중심은 전형적으로 탄소, 인 또는 황 원자이지만, 유기 및 무기 화합물에서 입체 중심이 되는 다른 원자들 또한 가능하다. 분자는 다중 입체 중심을 가질 수 있어, 많은 입체이성질체들을 제공할 수 있다. 입체이성질체가 사면체 입체중심(이를 테면, 사면체 탄소)으로 인한 화합물에서, 이론적으로 가능한 입체이성질체의 전체 수는 2n을 초과할 수 없고, 이때 n은 사면체 입체중심의 수이다. 대칭을 가진 분자들은 흔히 입체이성질체의 최대 가능한 수보다는 더 적다. 50:50 혼합물의 거울상체는 라셈체 혼합물이라고 한다. 대안으로, 거울상체의 혼합물은 한 개의 거울상체가 50% 이상의 양으로 존재하도록 거울상적으로 풍부할 수 있다. 전형적으로, 거울상체 및/또는 부분입체이성질체는 당분야에 공지된 기술을 이용하여 해리 또는 분리될 수 있다. 정의되지 않은 임의의 입체중심 또는 키랄 축의 경우, 입체중심 또는 키랄 축은 이의 *R* 형태, *S* 형태, 또는 라셈체와 비-라셈체 혼합물을 포함하는, *R*과 *S* 형태의 혼합물로 존재할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "다른 입체이성질체들이 실질적으로 없는"이란 이 조성물은 또다른 입체 이성질체를 ≤15%, 좀더 바람직하게는 ≤10%, 더더욱 바람직하게는 ≤5%, 또는 가장 바람직하게는 ≤1%으로 포함한다는 의미다.

[0371] "치료(Treatment)" 또는 "치료하는(treating)"은 (1) 이 질환의 병리 또는 증상을 경험한 또는 나타내는 환자 또는 대장에서 이 질환을 억제 (이를 테면, 이 병리 및/또는 증상의 더 이상의 진선을 억제), (2) 이 질환의 병리 또는 증상을 경험한 또는 나타내는 환자 또는 대장에서 이 질환을 개선 (이를 테면, 병리 및/또는 증상을 역전), 및/또는 (3) 이 질환의 병리 또는 증상을 경험한 또는 나타내는 환자 또는 대장에서 이 질환에서 임의의 측정가능한 감소를 달성하는 것을 포함한다.

[0372] 본 명세서에서 사용된 용어 "뉴클레오티드 염기", "뉴클레오염기" 또는 단순히 "염기"는 핵산에서 흔히 발견되는 유형의, 치환되거나 치환되지 않은 질소-보유 모(parent) 헤테로방향족 고리, 뿐만 아니라 천연이거나, 치환되거나, 변형되거나, 또는 이의 처리된(engineered) 변이체 또는 유사체를 지칭한다. 전형적인 구체예에서, 뉴클레오염기는 적절하게 상보적인 뉴클레오염기와 함께 왓슨-크릭(Watson-Crick) 및/또는 후그스틴(Hoogsteen) 수소 결합을 형성할 수 있다. 대표적인 뉴클레오염기에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지 않는다:

[0373] 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 아데닌 (A), 에테노아데닌, N^6-Δ^2-이소펜테닐아데닌 (6iA), N^6-Δ^2-이소펜테닐-2-메틸티오아데닌 (2ms6iA), N^6-메틸아데닌, 구아닌 (G), 이소구아닌, N^2-디메틸구아닌 (dmG), 7-메틸구아닌 (7mG), 2-티오피리미딘, 6-티오구아닌 (6sG), 하이포잔틴 및 O^6-메틸구아닌과 같은 퓨린;

[0374] 7-데아자아데닌 (7-데아자-A), 7-데아자구아닌 (7-데아자-G), 7-데아자-7-하이드록시메틸아데닌, 7-데아자-7-아미노메틸아데닌 및 7-데아자-7-하이드록시메틸구아닌과 같은 7-데아자-퓨린;

[0375] 사이토신 (C), 5-프로피닐사이토신, 이소사이토신, 5-하이드록실메틸사이토신 (HOMeC), 5-아미노메틸-사이토신, 타이민 (T), 4-티오타이민 (4sT), 5,6-디하이드로타이민, O^4-메틸타이민, 우라실 (U), 4-티오우라실 (4sU), 5-하이드록실메틸우라실 (HOMeU), 5-아미노메틸-우라실, 및 5,6-디하이드로우라실 (디하이드로우라실; D)과 같은 피리미딘;

[0376] 니트로인돌 및 4-메틸인돌과 같은 인돌; 니트로피롤과 같은 피롤; 네뷸라린; 염기(Y); 등.

[0377] 추가적인 대표적인 뉴클레오염기는 본 명세서에 참고문헌으로 수록되는 Lehninger, 2005, 그리고 여기에 인용되는 참고문헌에서 찾을 수 있다.

[0378] 본 명세서에서 사용된 용어 "뉴클레오사이드"는 전형적으로 리보오스 또는 데옥시리보오스인 5탄당에 결합된 뉴클레오염기로 구성된 글리코실아민을 지칭한다. 이의 예에는 다음이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다: 사이티딘, 2'-데옥시사이티딘, 5-하이드록실메틸사이티딘, 2'-데옥시-5-하이드록실메틸사이티딘, 5-아미노메틸사이티딘, 2'-데옥시-5-아미노메틸사이티딘, 유리딘, 2'-데옥시유리딘, 5-하이드록실메틸유리딘, 2'-데옥시-5-하이드록실메틸유리딘, 5-아미노메틸유리딘, 2'-데옥시-5-아미노메틸유리딘, 아데노신, 2'-데옥시아데노신, 7-데아자-7-하이드록시메틸아데노신, 2'-데옥시-7-데아자-7-하이드록시메틸아데노신, 7-데아자-7-아미노-메틸아데노신, 2'-데옥시-7-데아자-7-아미노-메틸아데노신, 구아노신, 2'-데옥시구아노신, 7-데아자-7-하이드록시메틸 구

아노신, 2'-데옥시-7-데아자-7-하이드록시메틸, 7-데아자-7-아미노메틸 구아노신, 2'-데옥시-7-데아자-7-아미노메틸 구아노신, 타이미딘, 및 2'-데옥시타이미딘.

[0379] "뉴클레오티드"는 사슬에서 뉴클레오사이드의 5탄당에 결합된 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 포스페이트기를 가지는 뉴클레오사이드로 구성된다.

[0380] 용어 "디페이징(dephasing)"는 성장하는 프라이머들이 임의의 주어진 주기에서 동시성으로 이동될 때, CRT, SNA, 및 SBL 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는, 단계별 추가 방법과 함께 일어나는 현상이다. 가닥의 래깅(lagging) 또는 유형 2 디페이징 (예를 들면, 예상된 주기로부터 n - 1)은 불완전한 연장으로 초래되며, 가닥의 주도(leading) 또는 유형 1 디페이징 (예를 들면, n + 1)은 동일한 주형들 집단에서 다중 뉴클레오티드 또는 프로브의 추가로 발생된다.

[0381] 용어 "어두운(dark) 뉴클레오티드" 또는 "어두운 프로브"는 형광 라벨을 함유하지 않은 뉴클레오티드 또는 프로브를 지칭한다. 앞선 주기로부터 이의 절단 및 캐리-오버(carry-over)에 의해 또는 현재 주기에서 이의 염료-라벨된 대응부로부터 즉석 가수분해에 의해 생성될 수 있다.

[0382] 별도로 명시되지 않으면, "링커"는 둘의 다른 작용기 사이의 공유적으로 결합된 분자 가교로 작용하는 하나 이상의 2가 작용기(링킹 멤버)를 지칭한다. 링커는 하나 이상의 링킹 멤버 및 하나 이상의 유형의 링킹 멤버를 포함할 수 있다. 대표적인 링킹 멤버 다음이 포함된다: -C(O)NH-, -C(O)O-, -NH-, -S-, -S(O)$_n$- (여기서 n은 0, 1 또는 2), -O-, -OP(O)(OH)O-, -OP(O)(O$^-$)O-, 알칸디일, 알켄디일, 알킨디일, 아렌디일, 헤테로아렌디일, 또는 이들의 조합. 일부 링커는 펜던트 측쇄 또는 펜던트 작용기 (또는 두 가지 모두)를 가진다. 이러한 펜던트 부분의 예는 친수도 변형제(hydroophilicity modifier), 예를 들어 -SO$_3$H 또는 -SO$_3^-$와 같은 가용화 작용기이다. 일부 구체예에서, 링커는 리포터를 화학적으로, 또는 효소적으로 반응성인 작용기와 같은 또 다른 부분(*예를 들어*, 분해 가능한 또는 분해 불가능한 정지 부분)에 연결할 수 있다. 다른 구체예에서, 링커는 리포터를 생물학적 및 비생물학적 성분, 예를 들어, 뉴클레오염기, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오티드에 연결한다. 또 다른 구체예에서, 링커는 화학적으로 반응성인 작용기를 뉴클레오염기, 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오티드에 연결한다. 리포터에 결합된 링커에 의하여 형성된 부분은 -L-리포터로 표시될 수 있다. 연결될 분자 및 가닥 합성 방법이 수행될 조건과 같은 요인에 따라, 링커가 안정성, 길이, FRET 효율, 특정한 화학적 및/또는 온도 파라미터에 대한 저항성과 같은 특성을 최적화하기 위하여 길이 및 조성이 변할 수 있고, 결과적인 접합(conjugate)이 중합 반응 최적화에 유용하도록 표지를 뉴클레오티드에 실시 가능하게 연결을 위한 입체-선택성 또는 크기가 충분할 수 있다. 링커는 표준 화학 기법을 이용하여 사용될 수 있고, 표지를 뉴클레오티드에 부착하기 위한 아민 링커(예를 들어, Hobbs 및 Trainor, 미국 특허 제5,151,507호 참조, 이는 본 명세서에 참고문헌으로 수록된다); 표지를 뉴클레오티드에 실시 가능하게 연결하기 위한, 전형적으로 일차 또는 이차 아민을 포함하는 링커; 및 뉴클레오티드 염기에 첨가된 고정된 탄화수소 팔(예를 들어, Service, 1998을 참조, 이는 본 명세서에 참고문헌으로 수록된다)을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 리포터를 염기 분자에 부착하기 위한 일부 대표적인 연결 방법론이 미국 특허 제4,439,356호 및 제5,188,934호; 유럽 특허 출원 제87310256.0호; 국제 출원 PCT/US90/05565 및 Barone *et al.*, 2001에 제공되며, 이들 각각은 본 명세서에 그 전체가 참고문헌으로 수록된다.

[0383] "절단 가능한 링커"는 반응 또는 조건의 결과에 의하여 파괴될 수 있는 하나 이상의 분열 가능한 작용기를 가지는 링커이다. 용어 "절단 가능한 작용기"는 *예를 들어*, 형광(fluorogenic 또는 fluorescent) 부분과 같은 일부의 방출을 허용하는 부분을 지칭한다. 이러한 분해는 전형적으로 화학적으로, 광화학적으로 또는 효소적으로 조정된다. 대표적인 효소적으로 분열 가능한 작용기에는 포스페이트, 또는 펩타이드 결합을 통하여 부착된 기들이 포함된다.

[0384] 본 명세서에서 사용된 용어 "IC$_{50}$"은 프라이머-주형 복합체상의 뉴클레오티드 유사체의 혼입이 동일한 몰 수의 기질 및 생성물을 산출하는 뉴클레오티드 유사체의 농도를 지칭하지만 이에 국한되지 않고 및/또는 화합물이 절반의 프라이머-주형 복합체에 혼입되는 농도를 결정하여 측정되는 혼입 효율로 정의될 수 있지만 이에 국한되지 않는다.

[0385] 본 명세서에서 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드"는 2 내지 200 개의 공유적으로 연결된 뉴클레오티드의 DNA 절편을 지칭한다.

[0386] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "리포터"는 직간접적으로 탐지가능한 신호를 생성시킬 수 있는 화학적

모이어티를 지칭한다. 리포터들의 예로는 화학적발광 또는 생물발광 수단을 통하여 신호를 만들 수 있는 형광 염료 기들, 방사능활성 라벨 또는 기들이 포함된다. 예시적인 형광 염료 기들은 잔텐, 플루오레신, 로다민, BODIPY, 시아닌, 쿠마린, 피렌, 프탈로시아닌, 피코빌리프로테인, ALEXA FLUOR® 350, ALEXA FLUOR® 405, ALEXA FLUOR® 430, ALEXA FLUOR® 488, ALEXA FLUOR® 514, ALEXA FLUOR® 532, ALEXA FLUOR® 546, ALEXA FLUOR® 555, ALEXA FLUOR® 568, ALEXA FLUOR® 568, ALEXA FLUOR® 594, ALEXA FLUOR® 610, ALEXA FLUOR® 633, ALEXA FLUOR® 647, ALEXA FLUOR® 660, ALEXA FLUOR® 680, ALEXA FLUOR® 700, ALEXA FLUOR® 750, 및 스쿠아레인 염료를 포함한다. 본 발명의 일부 구체예들에서 이용될 수 있는 추가적인 형광 염료 기들의 예들은 명세서를 통하여 공개되며, Haugland, 2005 및 미국 특허 제4,439,356호 & 제5,188,934호에 공개되며, 이들 각각은 여기에 참고자료로 편입된다. 본 발명의 일부 구체예들에서 리포터로 이용될 수 있는 방사능활성 라벨의 예로는 ^{35}S, ^{3}H, ^{32}P, 또는 ^{33}P와 같은 당업계에 공지된 것들이다. 본 발명의 일부 구체예들에서 이용될 수 있고, 화학적발광 또는 생물 발광 수단으로 기능을 하는 리포터들의 예는 Nieman, 1989; Given & Schowen, 1989; Orosz *et al.*, 1996; 그리고 Hastings, 1983에서 설명되며, 이들 각각은 여기에 참고자료로 편입된다.

[0387] 본 명세서에서 사용된 용어 "주형"은 DNA 합성(혼입)을 위한 상보적 가닥으로서 제공되는 올리고뉴클레오티드 또는 범용 프라이머가 결합할 수 있는 공지의 영역과 전형적으로 서열화되는 미지의 부분인 표적 서열로 구성된 재조합 DNA 분자를 지칭한다.

[0388] 용어 "단편 주형들"은 게놈 DNA를 무작위로 <1kb의 작은 크기로 절단하고, 단편의 각 단부에 어뎁터를 결찰시켜 준비된 단편의 라이브러리를 지칭한다. 주형들은 일반적으로 짝-형성 라이브러리에 필요한 것보다 적은 DNA를 요구한다.

[0389] 용어 "짝-형성(mate-pair) 주형들"이란 주어진 크기(예를 들면 2 kb 또는 5kb 또는 10 kb 또는 20 kb 또는 임의의 다른 원하는 크기를 포함)를 위하여 선택된 단편화된 DNA를 고리화시키고, 서로 이미 거리를 두고 있는 단편을 근접하도록 가져옮으로써 준비된 게놈 라이브러리를 지칭한다. 이들 원들을 선형 DNA 단편으로 절단하면, 짝-형성 주형들이 만들어진다.

[0390] 본 명세서에서 사용된 용어 "프라이머"는 DNA 합성(혼입)을 개시하기 위하여 사용되는 주형 가닥(보통 공지의 서열) 상의 상보적 서열에 하이브리드화되는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다.

[0391] 본 명세서에서 과학적 또는 기술적 의미로 사용될 때, 용어 "혼입"은 중합효소에 의하여 주형 가닥과의 상보적 염기-쌍 및 프라이머 가닥에 대한 공유 결합을 형성하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체를 지칭한다. 프라이머-주형 복합체는 초기 프라이머 가닥으로부터 연장된 하나 이상의 염기이다.

[0392] 본 명세서에서 사용된 용어 "절단"은 광분해, 화학적 분해, 효소적 분해 등에 의한 정지 그룹의 제거를 지칭한다.

[0393] 본 명세서에서 사용된 용어 "혼입 사이클"은 중합효소에 의한 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 혼입, 상기 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 검출 및 식별, 그리고 뉴클레오티드 유사체일 경우, 종료기의 절단, 그리고 뉴클레오티드 유사체 상에 원래 존재하는 경우, 전술한 유사체로부터 형광 염료 기의 혼입을 지칭한다.

[0394] 본 명세서에서 사용된 용어 "오혼입(misincorporation)"은 중합효소에 의하여 주형 가닥과의 비상보적 염기-쌍 및 프라이머 가닥에 대한 공유 결합을 형성하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체를 지칭한다. 프라이머-주형 복합체는 초기 프라이머 가닥으로부터 연장된 하나 이상의 염기이다.

[0395] 본 명세서에서 사용된 용어 "분별(discrimination)"은 중합효소에 의한 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 오혼입 대 혼입에 대한 IC_{50} 농도 차이를 지칭한다.

[0396] 본 명세서에서 사용된 용어 "종료"는 중합효소에 의하여 주형 가닥과의 상보적 또는 비상보적 염기-쌍 및 프라이머에 대한 공유 결합을 형성하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 혼입을 지칭한다. 프라이머-주형 복합체는 주어진 임의의 혼입 사이클에 대하여 초기 프라이머 가닥 또는 성장하는 프라이머로부터 연장된 단지 하나의 염기이다.

[0397] 용어 "종료 모이어티" 및 "종료 기"는 동의어이며, 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드에 부착되어 뉴클레오시드의 최소한 일부 (가령, 슈가 또는 핵염기) 또는 뉴클레오티드 (가령, 슈가, 핵염기, 또는 포스페이트 기)가 이 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드에 실질적인 종료 성질을 부여하는 작은 화학기(이를 테면, 링커 또는 링커/염료와 같은 임의의 변형을 배제하고 <500 달톤)를 지칭한다. 일부 구체예들에

서, 종료 모이어티는 링커 및/또는 염료에 부착되는 링커로 더 변형된다. 바람직한 구체예들에서, 이러한 변형된 종료기의 종료 성질은 실질적으로 변경되지 않는다.

[0398] 본 명세서에서 사용된 용어 "DT_{50}"은 프라이머-주형 복합체에 혼입된 염기 유사체의50%를 분해하기 위하여 필요한 시간을 지칭한다.

[0399] 본 명세서에서 사용된 용어 "유사체"는 "주어진 화합물"로 그 구조에 동일한 기본 탄소 골격 및 탄소 작용성을 포함하지 않지만, 예를 들어 탄소를 헤테로원자로 치환하는 것과 같이 하나 이상의 적절한 대용을 혼입하여 주어진 화합물을 모방할 수 있는 물질인 것으로 이해된다.

[0400] 상기 정의는 본 명세서에 참고문헌으로 수록된 참고문헌의 임의의 상충되는 정의에 우선한다. 그러나 특정 용어가 정의된다는 사실이 정의되지 않은 임의의 용어가 명확하지 않음을 나타내는 것으로 간주되어서는 안된다. 오히려, 사용된 모든 용어가 당업자가 본 발명의 범위 및 실시를 이하할 수 있도록 하는 관점에서 본 발명을 설명하는 것으로 생각된다.

[0401] **V. 실시예**

[0402] 다음의 실시예들은 본 발명의 바람직한 구체예를 증명하기 위하여 포함된다. 당업자는 발명자에 의하여 발견된 대표적 기법을 따르는, 실시예에 개시된 기법이 발명의 실시에서 잘 기능하고, 따라서 실시를 위한 바람직한 양식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 이해해야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시에 비추어 개시된 특정 구체예에 많은 변형이 가해질 수 있고, 여전히 본 발명의 사상 및 범위에서 벗어나지 않고 같거나 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.

[0403] **실시예 1 - 방법 및 재료**

[0404] **시약 및 재료.** 다른 언급이 없는 한, 모든 시약들은 시판되는 출처로부터 구입하고, 받은 것을 사용하였다.

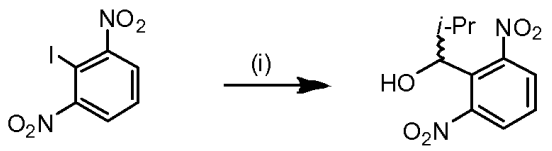
[0405] **분광기 및 분석 기구.** ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, 및 ^{31}PNMR 스펙트럼은 Wu *et al*. (2007)(이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)에서 이미 설명된 바와 같이, Bruker DPX 400 분광계에서 기록되었다. 질량 스펙트럼 분석은 Mass Spectrometry Laboratory at the MD Anderson Cancer Center (Houston, TX) 및 Core Mass Spectrometry Facility, Rice University (Houston, TX)에서 제공되었다. X-선 결정학은 X-선 Diffraction Laboratory, Texas A&M University (College Station, TX)에서 실행되었다. UV/Vis는 Beckman DU-800 분광광도계를 이용하여 측정되었다. 음이온 교환 크로마토그래피는 분당 4.5 mL의 유속으로 240분간에 걸쳐 25% 아세토니트릴에서 75% 트리에틸암모늄 중탄산염(TEAB, 0.1 M) 내지 25% 아세토니트릴에서 75% TEAB(1.5M)의 농도 기울기로, Q Sepharose FF 컬럼(2.5 x 20 cm)에서 실행되었다. 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)는 128 용매 모듈 및 166 UV 탐지기 또는 168 광다이오드 어레이 UV/Vis 탐지기가 구비된 Beckman System Gold를 이용하여 실행되었다. 뉴클레오시드들 및 뉴클레오티드 유사체들의 경우 RP-HPLC는 4.6 mm x 250 mm Aquapore OD-300 C18 컬럼을 이용하여, 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA), pH 7.0를 포함하는 완충액 A와 100 mM TEAA, pH 7.0, 70% 아세토니트릴 (v/v)을 포함하는 완충액 B를 이용하여 실행되었다.

[0406] **실시예 2 - α-치환된 2-니트로벤질 알코올의 합성**

[0407] (*R/S*)-1-(2-니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올: (*R/S*)-1-(2-니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올의 합성은 이미 보고되었다. Litosh *et al*. (2011), 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0408] (*R/S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올: (*R/S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성은 이미 보고되었다. Litosh *et al*. (2011), 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다.

[0409] (*R/S*)-1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올:



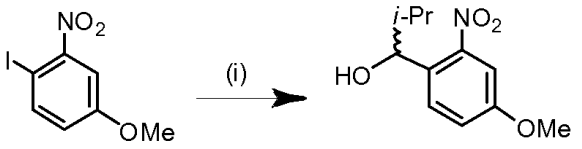
1-iodo-2,6-dinitrobenzene **(*R/S*)- 1-(2,6-dinitrophenyl)-2-methyl-1-propanol**

[0410]

[0411] **계획 S1. (*R/S*)-1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올의 합성.** 시약들과 조건들: (i) PhMgBr, THF, -50℃; i-PrCHO, -50℃ 내지 실온, 30%.

[0412] 질소 대기하에서 50℃에서 무수 THF(18ml)에서 1-요오드-2,6-디니트로벤젠의 용액에(Smith and Ho, 1990)-이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다-(1.55 g, 5.27 mmol)에 페닐마그네슘 브롬화물 (THF에서 2M, 3.2 mL, 6.4 mmol)은 이 온도가 -45℃을 초과하지 않도록 점적으로 첨가되었다. 추가가 완료되면, 혼합물은 -50℃에서 5분간 교반되며, 이소부티알데히드 (0.96mL, 11mmol)를 추가한다. 혼합물은 점진적으로 실온으로 따뜻하게 하고, 포화된 NH_4Cl 용액 (10 mL)으로 진정시키고, 그 다음 물(50 mL)로 희석시켰다. 이 혼합물은 CH_2Cl_2 (100 mL)으로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 염수 (50 mL)로 세척되며, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 황색 오일의 (*R/S*)-1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올 (0.375 g, 30%)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.82 (d, 2 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 7.59 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 4.83 (dd, 1 H, *J* = 9.2 및 7.6 Hz, Ph-CH), 2.87 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, OH), 2.19 (m, 1 H, CH), 1.12 (d, 3 H, J = 6.4 Hz, CH_3), 0.76 (d, 3 H, J = 6.8 Hz, CH_3).

[0413] **(*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올**



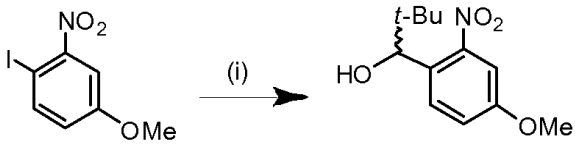
4-iodo-3-nitroanisole **(*R/S*)- 1-(4-methoxy-2-nitrophenyl)-2-methyl-1-propanol**

[0414]

[0415] **계획 S2. (*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올의 합성.** 시약들과 조건들의: (i) PhMgCl, THF, 마이너스 40℃; i-PrCHO, 마이너스 40℃ 내지 실온, 67%.

[0416] 질소 대기하에 마이너스 40℃에서 무수 THF (20mL)에서 4-요오드-3-니트로아니솔 (2.79 g, 10.0 mmol)의 용액에 페닐마그네슘 클로라이드 (THF에서 2M, 6.0 mL, 12 mmol)를 이 온도가 마이너스 35℃을 초과하지 않는 속도로 점적되었다. 추가가 완료될 때, 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 5분간 교반되었고, 이소부티알데히드 (1.8 mL, 20 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 점진적으로 실온으로 따뜻해지고, 포화된 NH_4Cl 용액 (5.0 mL)으로 진정되었으며, CH_2Cl_2 (100 mL)으로 희석되었고, 물(100 mL)로 세척되었다. 유기상은 분리되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (50 mL)으로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 염수 (40 mL)로 세척되었으며, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 밝은 황색 오일로 된 (*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올 (1.5 g, 67%)이 수득되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.61 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-H), 7.34 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 7.15 (dd, 1 H, *J* = 8.8 및 2.8 Hz, Ph-H), 4.92 (dd, 1H, *J* = 5.6 및 3.2 Hz, Ph-CH), 2.46 (br s, 1 H, OH), 2.00 (m, 1 H, CH), 0.97 (d, 3 H, *J*= 6.4 Hz, CH3), 0.86 (d, 3 H, *J* = 6.8 Hz, CH_3).

[0417] *(R/S)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올*



4-iodo-3-nitroanisole **(*R/S*)- 1-(4-methoxy-2-nitrophenyl)-2,2-dimethyl-1-propanol**

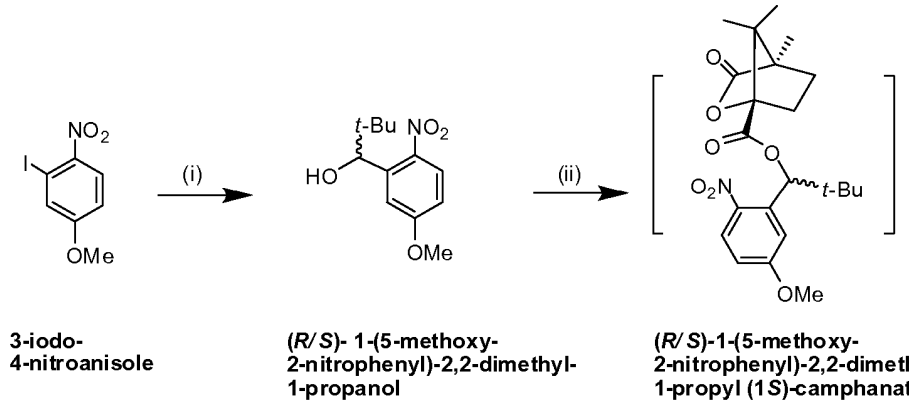
[0418]

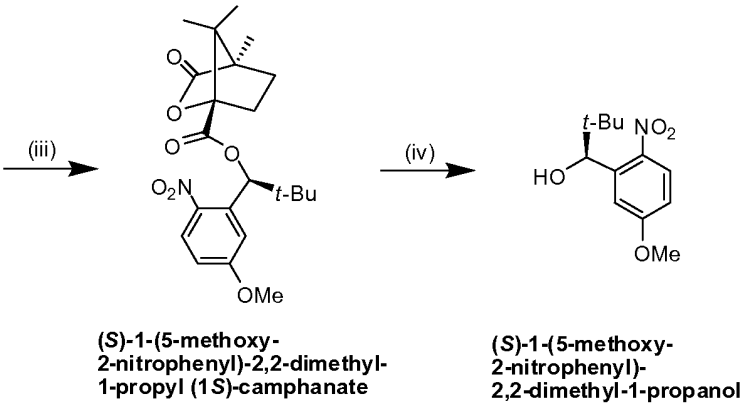
[0419] **계획 S3. (*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성.** 시약들과 조건들: (i) PhMgCl,

THF, 마이너스 40℃; (CH3)3CCHO, 마이너스 40℃ 내지 실온, 74%.

[0420] 질소 대기하에 마이너스 40℃에서 무수 THF (10mL)에서 4-요오드-3-니트로아니솔 (2.38 g, 8.50 mmol)의 용액에 페닐마그네슘 클로라이드 (THF에서 2M, 4.7 mL, 9.4 mmol)는 이 온도가 마이너스 35℃을 넘지않는 속도로 점적되었다. 추가가 완료될 때, 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 1시간 동안 교반되었고, 트리메틸아세타알데히드 (1.13 mL, 10.2mmol)를 추가하였다. 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 2시간 동안 교반되었고, 그 다음 실온에서 1시간 교반되었다. 이 반응은 염수 (100 mL)로 퀸칭되었고, 이 혼합물은 CH_2Cl_2 (40 mL)로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 라셈체 (*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (1.52 g, 74%)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.67 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.22 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, Ph-H), 7.12 (dd, 1 H, *J* = 8.8 및 2.8 Hz, Ph-H), 5.27 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, Ph-CH), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 2.01 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, OH), 0.86 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0421] *(R/S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 및 (S)-1-(5-메톡시-2-니트로-페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올*





[0422]

[0423] **계획 S4. (*R/S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 및 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성.** 시약들과 조건들: (i) PhMgCl, 무수 THF, 마이너스 40℃; (CH3)3CCHO, 마이너스 40℃ 내지 실온, 88%; (ii) (1*S*)-캠파닌산 클로라이드, DMAP, CH_2Cl_2, 실온; (iii) 에틸 아세테이트/헥산 43%로부터 분별 결정화; (iv) K_2CO_3, MeOH, 역류, 99%.

[0424] 질소 대기하에 마이너스 40℃에서 무수 THF (10mL)에서 3-요오드-4-니트로아니솔 (2.79 g, 10.0 mmol) 용액에 페닐마그네슘 클로라이드 (2 M in THF, 4.2 mL, 8.3 mmol)를 이 온도가 마이너스 35℃을 넘지않는 속도로 점적되었다. 추가가 완료될 때, 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 2시간 동안 교반되었고, 트리메틸아세타알데히드 (1.1 mL, 10mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 2시간 동안 교반되었고, 그 다음 1시간 동안 실온에서 교반되었다. 이 반응은 염수 (100 mL)로 퀸칭되었고, 이 혼합물은 CH_2Cl_2 (40 mL) 로 3차례 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토

그래피에 의해 정제되어 라셈체 (*R/S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (1.76 g, 88%)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.89 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.27 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.84 (dd, 1 H, *J* = 8.8 및 2.8 Hz, Ph-H), 5.62 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, PhCH), 3.89 (s, 3 H, OCH_3), 2.08 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0425] 무수 CH_2Cl_2 (10mL)에서 라셈체 (*R/S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (1.75 g, 7.3 mmol) 및 DMAP (2.92 g, 23.9 mmol)의 용액에 (1S)-캠파닌 클로라이드(2.6 g, 12 mmol) (Corrie *et al.*, 1992-이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다)가 추가되었고, 이 혼합물은 질소 대기하에서 실온에서 하룻밤 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (50 mL)으로 희석되었고, 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (50 mL)으로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 (*R/S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트 (2.5 g, 85%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물). 캠파네이트는 에틸 아세테이트 (30 mL)에 용해되었으며, 이어서 교반과 함께 헥산 (120 mL)이 추가되었다. 2시간에 걸쳐 용액으로부터 바늘-결정이 점차 형성되었다. 결정들은 여과에 의해 수득되어, 순수 단일 부분입체이성질체 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1S)-캠파네이트가 수득되었다. 여과액은 진공에서 농축되며, 결정화 과정은 2차례 반복되어, 추가 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1S)-캠파네이트 (총 1.08 g, 43%)를 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.04 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.27 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.88 (dd, 1 H, *J* = 2.8 및 8.8 Hz, PhH), 6.81 (3, 1 H, Ph-CH), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 2.36 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 2 H, CH_2), 1.66 (m, 1 H, CH), 1.12 (s, 3 H, CH3), 1.06 (s, 3 H, CH3), 1.02 (s, 3 H, CH3), 0.95 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

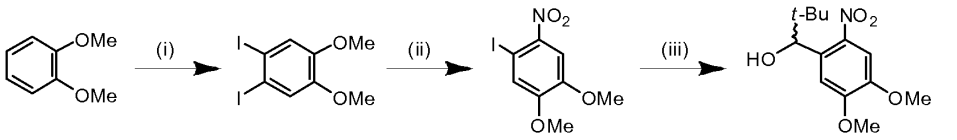
[0426] X-선 결정학 데이터을 획득하는 방법: 결정학 측정은 Litosh *et al* (2011)-이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다-에서 설명되는 것과 같이, 0.50 mm × 0.05 mm × 0.05 mm 크기로 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1S)-캠파네이트의 결정에서 이루어졌다. 도 3 참고.

[0427] 데이터 수집: CuKα 방사선, λ = 1.54178 Å, T = 110 ± 2° K, 2Θmax = 120.0o, 32,513 수집된 반사, 2,913 유니크 (R_{int} = 0.0517). 최종 *GooF* = 1.091, *R1* = 0.0681, *wR2* = 0.1695, I>2시그마(I) (F^2에서 정밀화)를 가지는 2,913 반사에 기초하는 *R* 지수, 290 파라미터, 43 제약. Lp 및 흡수 수정이 적용됨, μ = 0.819mm^{-1}. 절대 구조 파라미터: 0.05 ± 0.09.

[0428] *X-선 결정학 데이터*: $C_{22}H_{29}NO_7$, *M* = 419.46. 사방정계, *a* = 6.29, *b*= 15.00, *c* = 22.27 Å (α, β, γ = 90°), *V* = 2,099.29 Å3, 공간 기 $P2_12_12_1$, Z = 4, D_c = 1.327 g/cm^{-3}, *F*(000) = 896.

[0429] 메탄올 안(MeOH, 25 mL)에 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1S)-캠파네이트 (590 mg, 1.4 mmol) 및 K_2CO_3 (389 mg, 2.8 mmol)의 혼합물은 1시간동안 가열되어 역류되고, 그 다음 냉각되고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2 (50 mL)로 희석되었다. 유기 상은 염수 (50 mL)로 세척되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 거울상순수 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (333 mg, 99%)를 획득하였다. ^{1}H NMR은 라셈체 알코올의 것과 동일하였다.

[0430] *(R/S)-1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올*



1,2-dimethoxy-benzene | 4,5-diiodo-1,2-dimethoxy-benzene | 4-iodo-5-nitro-1,2-dimethoxy-benzene | (*R/S*)- 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)-2,2-dimethyl-1-propanol

[0431]

[0432] **계획 S5. (*R/S*)-1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성.** 시약들과 조건들: (i) ICl,

CH_3COOH, 100℃, 62%; (ii) HNO_3, CH_3COOH, 실온, 75%; (iii) PhMgCl, THF, 마이너스 40℃; $(CH_3)_3CCHO$, 마이너스 40℃ 내지 실온, 20%.

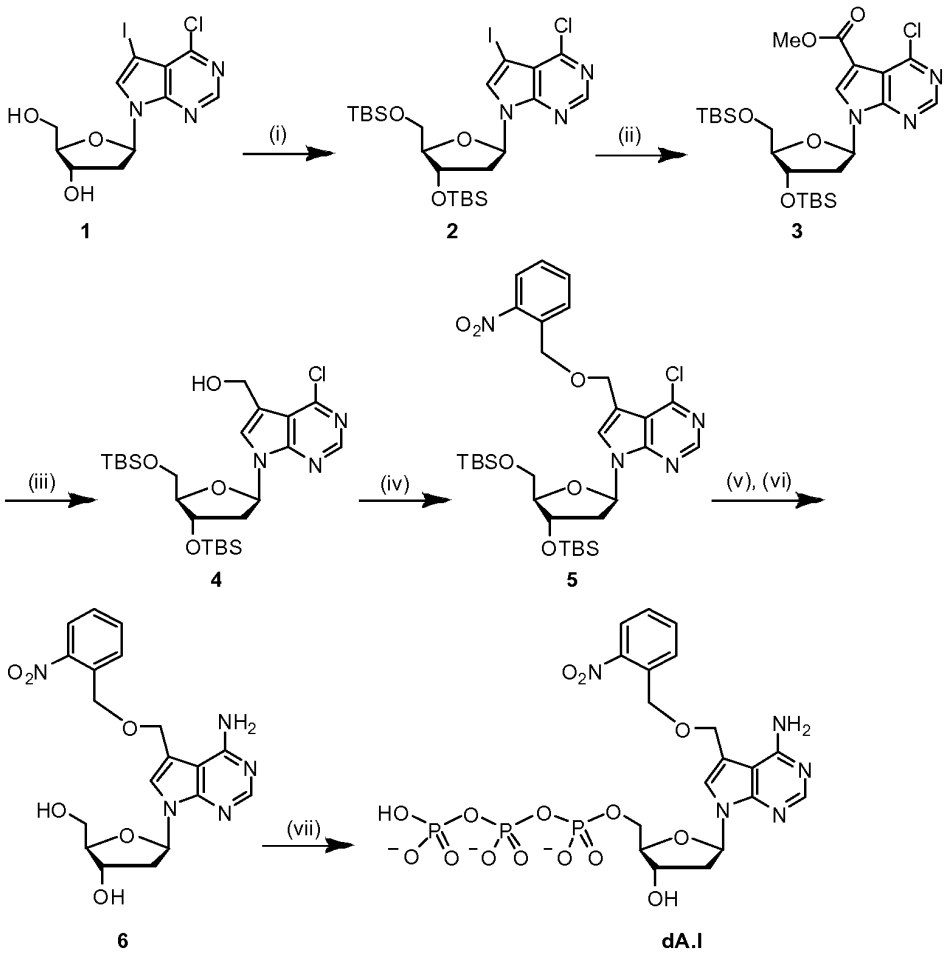
[0433] 1,2-디메톡시벤젠 (5.0 g, 36 mmol)은 아세트산 (10 mL)에 용해되었고, 이 용액은 얼음물 조에서 냉각되었고, 이어서 염화 요오드(8.7 g, 54 mmol)가 한방울씩 추가되었다. 10 분 후, 반응 혼합물은 2시간 동안 100℃로 가열되었고, 그 다음 실온으로 냉각되었다. 용액으로부터 침전된 바늘 결정들은 여과되었고, 아세트산 (5.0 mL)으로 3회 세척되었다. 이 결정들은 높은 진공하에서 하룻밤 동안 건조되어 4,5-디요오드-1,2-디메톡시벤젠 (8.8g, 62%)이 획득되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.28 (s, 2 H, Ph-H), 3.85 (s, 6 H, OCH_3).

[0434] 4,5-디요오드-1,2-디메톡시벤젠 (8.8 g, 23 mmol)은 아세트산 (300 mL)에 추가되었고, 이 혼합물은 100℃로 가열되어 고체를 용해시켰다. 그 다음 맑은 혼합물은 실온으로 냉각되었고, 질산(68-70%, 120 mL)이 한 방울씩 추가되었다. 반응 혼합물은 실온에서 하룻밤 동안 교반되었고, 그 다음 얼음-물(200 mL)에 부었다. 이 혼합물은 CH_2Cl_2 (100 mL)로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (200mL), 염수 (100 mL)로 세척되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 수율 4-요오드-5-니트로-1,2-디메톡시벤젠 (5.25 g, 75%)을 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (s, 1 H, Ph-H), 7.38 (s, 1 H, Ph-H), 3.98 (s, 3 H, OCH_3), 3.92 (s, 3 H, OCH_3).

[0435] 질소 대기하에 마이너스 40℃에서 무수 THF (10mL)에서 4-요오드-5-니트로-1,2-디메톡시벤젠 (4.6 g, 15 mmol) 용액에 페닐마그네슘 클로라이드 (2 M in THF, 7.5 mL, 15 mmol)는 이 온도가 마이너스 35℃을 넘지않는 속도로 한방울씩 첨가되었다. 추가가 완료될 때, 이 혼합물은 2시간 동안 마이너스 40℃에서 교반되었고, 트리메틸 아세타알데히드 (2.0 mL, 18 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 두 시간 동안 교반되었고, 그 다음 한 시간 동안 실온에서 교반되었다. 반응은 염수 (100 mL)로 퀀칭되었고, 이 혼합물은 CH_2Cl_2 (40 mL)로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 라셈체 (*R/S*)-1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (0.8 g, 20%)를 얻었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.41 (1, 1 H, Ph-H), 7.21 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (s, 1 H, PhCH), 3.95 (s, 3 H, OCH_3), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 0.90 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0436] **실시예 3 - 7-HOMe-7-데아자-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 유사체들의 합성**

[0437] 7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트



[0438]

[0439] **계획 S6. 7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 87%; (ii) CO, $PdCl_2[PhCN]_2$, MeOH/1,4-디옥산, 50℃, 98%; (iii) $LiBH_4$, MeOH, THF, 역류, 45%; (iv) 2-니트로벤질 브롬화물, *n*-Bu_4NBr, CH_2Cl_2/aq. NaOH, 실온, 50%; (v) *n*-Bu_4NF, THF, 0℃ 내지 실온; (vi) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃, 두 단계 동안 91% ; (vii) $POCl_3$, $(MeO)_3PO$, 마이너스 40℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0440] 화합물 **1** (Seela *et al.* (2005), 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다), (0.79 g, 2.0 mmol)은 무수 피리딘 (2.0 mL)으로부터 3회 증발되었고, 무수 DMF (4.0 mL)에 용해되었다. *tert*-부틸디메틸실일 클로라이드 (0.90 g, 6.0 mmol) 및 이미다졸 (0.82g, 12 mmol)이 추가되었고, 이 혼합물은 실온에서 16시간 동안 교반되었다. 반응물은 진공에서 농축되며 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 백색 포말(foam)의 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-6-클로로-7-요오드-7-데아자퓨린 **2** (1.08 g, 87%)이 획득되었다. *^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 8.61 (s, 1 H, H-2), 7.81 (s, 1 H, H-8), 6.74 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 4.56 (m, 1 H, H-4'), 4.01 (m, 1 H, H-3'), 3.87 (dd, 1 H, H-5'a), 3.79 (dd, 1 H, H-5'b), 2.39 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.96 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.91 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.18 (2s, 6 H, $(CH_3)_2CSi$), 0.15 (s, 6 H, $(CH_3)_2CSi$).

[0441] 무수 1,4-디옥산 (42mL) 및 무수 MeOH (42 mL)에서 화합물 **2** (1.55 g, 2.48 mmol)의 용액에 트리에틸아민 (0.87 mL)이 추가되었다. CO 대기하에 10분간 교반 후, 비스(벤조니트릴)디클로로팔라듐(II) (0.05g, 0.13 mmol)이 추가되었고, 반응물은 CO 대기하에서 50℃에서 48시간 동안 교반되었다. 그 다음 이 혼합물은 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 점성 오일 형태의 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-6-클로로-7-메톡시카르보닐-7-데아자퓨린 **3** (1.36 g, 98%)이 획득되었

다. ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.69 (s, 1 H, H-2), 8.31 (s, 1 H, H-8), 6.77 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 4.58 (m, 1 H, H-4'), 4.06 (m, 1 H, H-3'), 3.90 (s, 3 H, CH3O), 3.87 (dd, 1 H, H-5'a), 3.81 (dd, 1 H, H-5'b), 2.42 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.93 (s, 18 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.13 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$), 0.12 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$).

[0442] 무수 THF (4.0 mL)에서 화합물 **3**(0.28 g, 0.50 mmol)의 용액에 수소화붕소 리튬 (44 mg, 2.0 mmol)이 추가되었고, 이어서 MeOH (0.1 mL)이 추가되었다. 반응 혼합물은 실온에서 10분간 교반되었고, 그 다음 45분간 가열되어 역류되었다. 실온으로 냉각시, 이 혼합물은 CH_2Cl_2 (20mL) 및 물(2.0 mL)로 희석되었다. 유기층이 분리되었고, 염수 (5.0mL)로 2회 세척되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 백색 포말로 된 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-6-클로로-7-히드록시메틸-7-데아자퓨린 **4** (0.12 g, 45%)가 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.62 (s, 1 H, H-8), 7.61 (s, 1 H, H-2), 6.75 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및7.2 Hz, H-1'), 4.96 (AB d, 1 H, *J* = 11.6 Hz, 7-CH_2a), 4.91 (AB d, 1 H, *J* = 11.6 Hz, 7-CH_2b), 4.57 (m, 1 H, H-4'), 4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.80 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.44 (m, 1 H, H-2'a), 2.04 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (2 s, 18 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.11 (2 s, 12 H, $(CH_3)_2Si$).

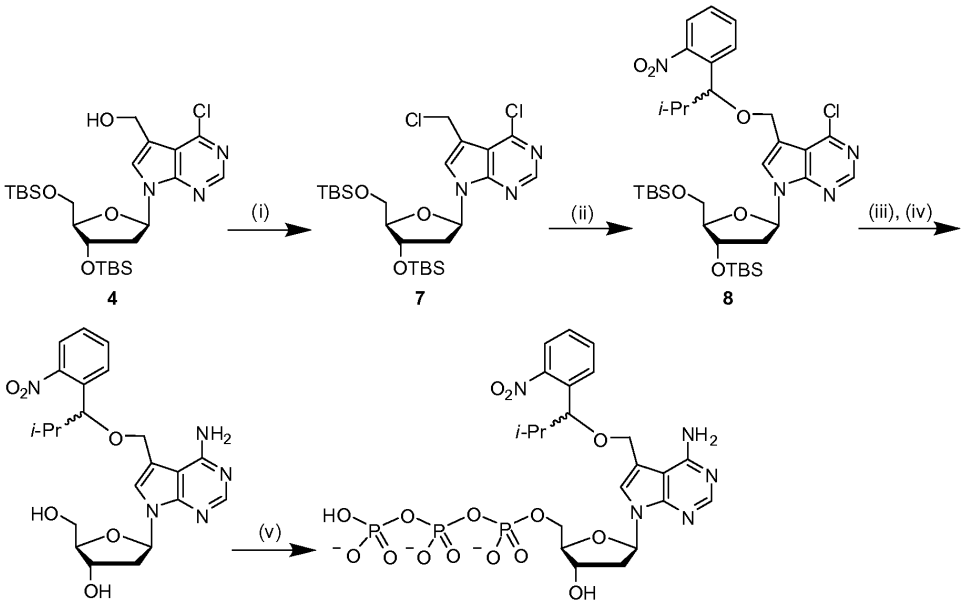
[0443] CH_2Cl_2 (2.0 mL)에서 화합물 **4** (30 mg, 0.057 mmol)의 용액에, n-Bu_4NBr (9 mg, 0.029 mmol), 2-니트로벤질 브롬화물 (37 mg, 0.17 mmol) 및 NaOH 용액 (1M, 2.0 mL)이 추가되었다. 반응 혼합물은 어두운 상태에서 48시간 동안 실온에서 활발하게 교반되었다. 유기층이 분리되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 점성 오일로 된 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-6-클로로-7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자퓨린 **5** (19 mg, 50%)가 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.63 (s, 1 H, H-2), 8.06 (dd, 1 H, *J* = 8.4 및 1.2 Hz, Ph-H), 7.84 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 7.64 (s, 1 H, H-8), 7.62 (m, 1 H, Ph-H), 7.43 (t, 1 H, Ph-H), 6.75 (dd, 1 H, *J* = 7.2 및 6.0 Hz, H-1'), 5.03 (s, 2 H, $PhCH_2$), 4.95 (AB d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2a), 4.88 (AB d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2b), 4.59 (m, 1 H, H-4'), 4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.80 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.48 (m, 1 H, H-2'a), 2.37 (m, 1 H, H-2'b), 0.92 (2 s, 18 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.11 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$), 0.10 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$).

[0444] THF (1.0 mL)에서 n-Bu_4NF (17 mg, 0.054 mmol) 용액은 0℃에서 화합물 5 (18 mg, 0.028 mmol)의 THF (1.0 mL) 용액을 추가되었다. 반응 혼합물은 점진적으로 실온까지 따뜻해지고, 2시간 동안 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며, 1,4-디옥산 (2.0 mL)에 용해되었고, NH_3의 MeOH 용액 (7 M, 4.0 mL)이 이어서 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 이동되었고, 16시간 동안 100℃에서 교반되었고, 그 다음 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 백색 포말로 된 7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **6** (10 mg, 91%)이 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)*: δ 8.08 (s, 1 H, H-2), 8.06 (m, 1 H, Ph-H), 7.75 (m, 2 H, Ph-H), 7.58 (m, 1 H, Ph-H), 7.42 (s, 1 H, H-8), 6.64 (bs, 2 H, D_2O 교환가능한, 6-NH_2), 6.48 (dd, 1 H, *J* = 2.0 및 6.0 Hz, H-1'), 5.25 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.08 (t, 1 H, *J* = 5.6 Hz, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.90 (s, 2 H, $PhCH_2$), 4.75 (AB dd, 2 H, 7-CH_2), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 3.81 (m, 1 H, H-4'), 3.54 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.47 (m, 1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b).

[0445] 화합물 **6** (6 mg, 0.014mmol)은 질소 대기하에서 마이너스 40℃에서 4시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.25 mL)에서 $POCl_3$ (2.6 μL, 0.028 mmol) 및 프로톤 스폰지 (6 mg, 0.028 mmol)로 인산화되었다. 무수 DMF (0.28 mL)에서 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (66 mg, 0.14 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (28 μL)의 용액이 추가되었다. 교반 30분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 1.0 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 물 (2.0 mL)에 용해되었고,

여과되었고, RP-HPLC (상기 참고)를 이용하여 정제되어 수율 7-(2-니트로-벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **dA.I**가 획득되었다. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{19}H_{23}N_5O_{15}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 654.0403이었고, 관찰된 질량은 654.0397이었다.

[0446] *7-[1-(2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트*



[0447]

[0448] **계획 S7. 7-[1-(2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) TsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 실온, 39%; (ii) 라셈체 (R/S)-1-(2-니트로페닐)-2-메틸-프로판올, 순수(neat), 105℃, 54%; (iii) n-Bu_4NF, THF, 0℃ 내지 실온; (iv) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃, 2단계의 경우 76%; (v) $POCl_3$, $(MeO)_3PO$, 마이너스 40℃ 내지 0℃; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-$Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0449] 무수 CH_2Cl_2 (12 mL)에서 화합물 **4** (0.26 g, 0.49 mmol)의 용액에 4-디메틸아미노피리딘 (DMAP; 0.15 g, 1.2 mmol) 및 토실 클로라이드 (0.11 g, 0.58 mmol)가 첨가되었다. 반응 혼합물은 실온에서 18시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 점성 오일로 된 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-6-클로로-7-클로로메틸-7-데아자퓨린 **7** (0.103 g, 39%)이 획득되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.64 (s, 1 H, H-2), 7.72 (s, 1 H, H-8), 6.73 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 4.95 (AB d, *J* = 12.4 Hz, 7-CH_2a), 4.91 (AB d, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2b), 4.58 (m, 1 H, H-3'), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.82 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.41 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.95 (s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.93 (s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.12 (s, 6 H, $(CH_3)_2$Si), 0.11 (s, 6 H, $(CH_3)_2$Si).

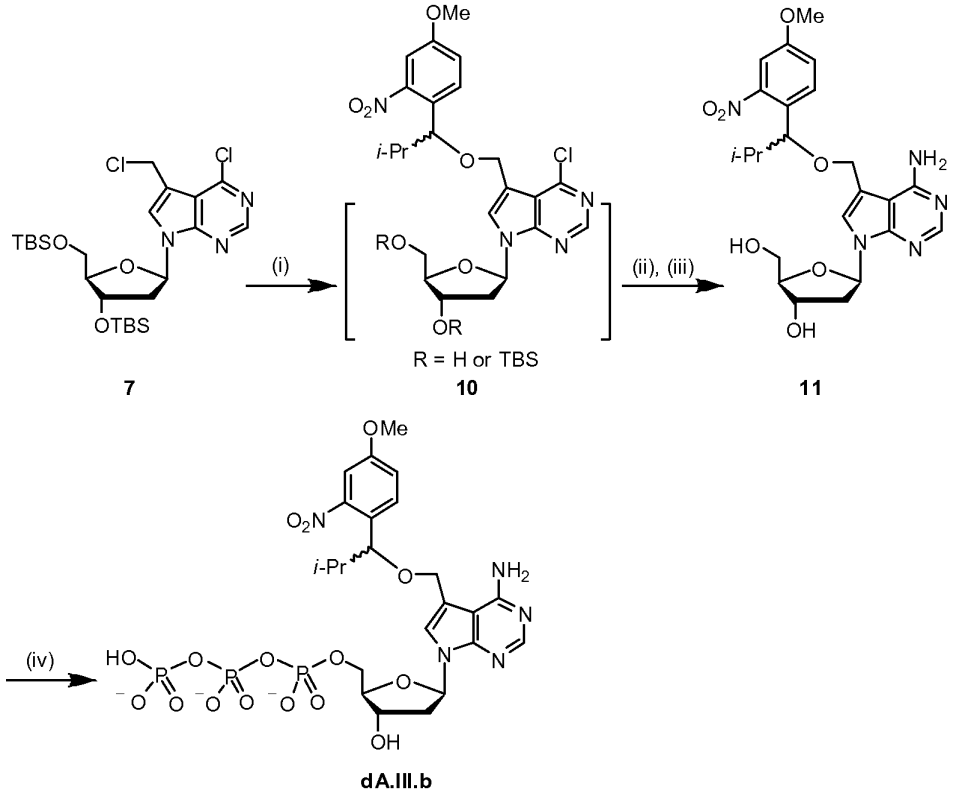
[0450] 화합물 **7** (54 mg, 0.10 mmol) 및 라셈체 (R/S)-1-(2-니트로페닐)-2-메틸-프로판올 (191 mg, 0.98 mmol)은 무수 CH_2Cl_2 (10 mL)에 용해되었다. 이 용매는 진공에서 베거되었고, 잔유물은 질소 대기하에서 1시간 동안 가열되었고, 최소량의 에틸 아세테이트에 용해되었고, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-6-클로로-7-[1-(2-니트로-페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 **8** (38 mg, 54%)이 획득되었다. 부분입체이성질체의 *^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 8.60 및 8.59 (2 s, 1 H, H-2), 7.83 (m, 1 H, Ph-H), 7.79 (m, 1 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 7.48 및 7.47 (2 s, 1 H, H-8), 7.38 (m, 1 H, Ph-H), 6.70 (m, 1 H, H-1'), 4.81 (m, 1 H, Ph-CH), 4.70 (m, 1H, 7-CH_2a), 4.58 (m, 2 H, 7-CH_2b 및 H-3'), 3.99 (m, 1 H, H-4'), 3.78 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.48 (m, 1 H, H-2'a), 2.35 (m, 1 H, H-2'b), 1.96 (m, 1 H, CH), 0.98 및 0.96 (2 d, 3 H, CH_3), 0.93 (2 s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.89 (2s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.82 및 0.78 (2 d, 3 H, CH_3), 0.12 (2 s, 6

H, $(CH_3)_2Si$), 0.08 및 0.07 (2 s, 3 H, $(CH_3)_2Si$), 0.06 및 0.05 (2 s, 3 H, $(CH_3)_2Si$).

[0451] n-Bu_4NF (44 mg, 0.14 mmol)의 THF (2.0 mL) 용액은 0℃에서 화합물 **8** (38 mg, 0.05 mmol)의 THF (2.0 mL)의 용액에 추가되었다. 반응물은 점진적으로 실온으로 따뜻해지고, 2시간 동안 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며, 1,4-디옥산 (4.0 mL)에 용해되며, NH_3의 MeOH 용액 (7 M, 8.0 mL)이 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 이동되었으며, 100℃에서 24시간 동안 교반되었으며, 실온으로 냉각되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 1:1 혼합물의 2개의 부분입체이성질체로 7-[1-(2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **9** (19 mg, 76%)가 획득되었다. 부분입체이성질체의 ^{1}*H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 8.06 및 8.04 (2 s, 1H, H-2), 7.90 (m, 1 H, Ph-H), 7.67 (m, 2 H, Ph-H), 7.56 (m, 2 H, Ph-H), 7.19 및 7.16 (2 s, 1 H, H-8), 6.63 (bs, 2 H, D_2O 교환가능한, 6-NH_2), 6.39 (m, 1 H, H-1'), 5.23 (m, 1H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.00 (m, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.72 (2 d, 1 H, Ph-CH), 4.45 (s, 2 H, 7-CH_2), 4.30 (m, 1 H, H-3'), 3.77 (m, 1 H, H-4'), 3.49 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.40 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b), 1.94 (m, 1 H, CH), 0.87 (m, 3H, CH_3), 0.74 (m, 3 H, CH_3).

[0452] 화합물 **9** (19 mg, 0.041 mmol)는 질소 대기하에서 마이너스 40℃에서 5시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.4 mL)에서 $POCl_3$ (16 μL, 0.16 mmol) 및 프로톤 스폰지 (18 mg, 0.082 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (97 mg, 0.20 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (40 μL)의 무수 DMF (0.40 mL) 용액이 추가되었다. 교반 30분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 물 (5.0 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물은 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[1-(2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **dA.III.a**가 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었으며, 이들은 RP-HPLC를 이용하여 분리되어 단일 부분입체이성질체 **dA.III.a ds1** 및 **dA.III.a ds2**가 획득되었다. 모든 경우들에서, RP-HPLC에서 부분입체이성질체 1 (ds1)는 부분입체이성질체 2 (ds2)보다 더 빨리 용히되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{22}H_{29}N_5O_{15}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 696.0873이었고, 관찰된 질량은 696.0864이었다.

[0453] *7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트*



7 10 11 dA.III.b

[0454]

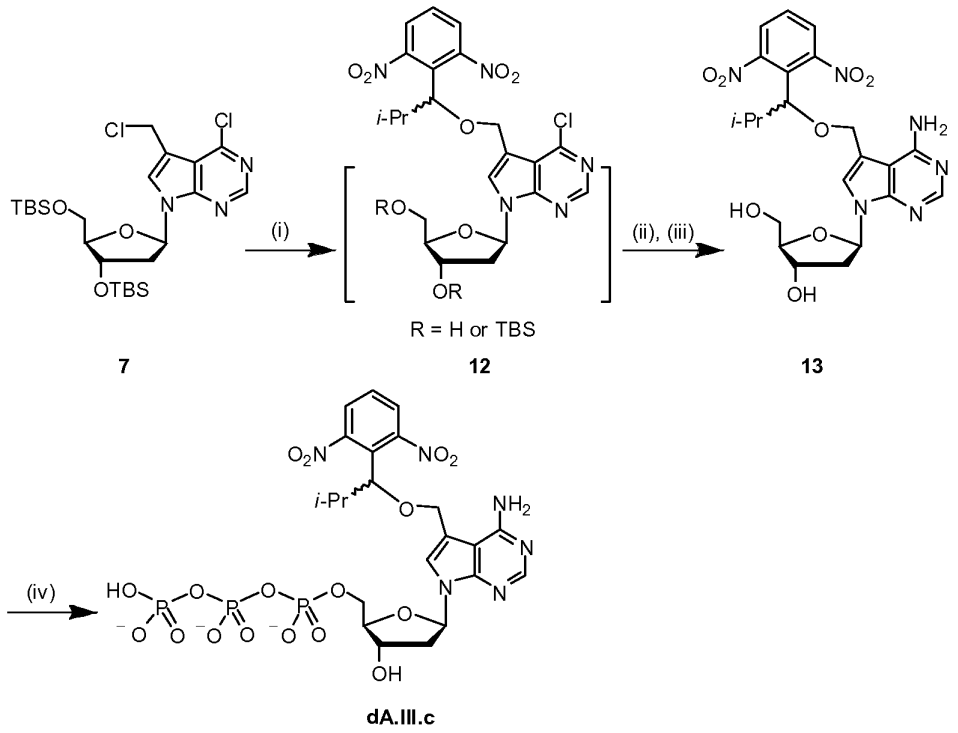
[0455] **계획 S8. 7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) 라셈체 (R/S)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올, 108℃; (ii) n-Bu_4NF, THF, 0℃ 내지 실온; (iii) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃, 3단계에서 32%; (iv) $POCl_3$, $(MeO)_3PO$, 0℃; (n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0456] 화합물 **7** (103 mg, 0.19 mmol) 및 라셈체 (*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올 (428 mg, 1.9 mmol)는 무수 CH_2Cl_2 (3.0 mL)에 용해되었다. 이 용매는 진공에서 제거되었고, 잔유물은 질소 대기하에서 108℃에서 30분간 가열되었고, 실온으로 냉각되었고, 최소량의 에틸 아세테이트에 용해되었고, 그리고 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 6-클로로-7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 2'-데옥시리보뉴클레오시드들 **10**가 획득되었다. 이 시료는 THF (8.0 mL)에 용해되었고, 0℃로 냉각되었고, 그 다음 n-Bu_4NF (68 mg, 0.22 mmol)의 THF (2.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 실온으로 점진적으로 따뜻해졌고, 30분간 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며, 1,4-디옥산 (8.0 mL)에 용해되었고, NH_3의 MeOH (7 N, 24 mL)가 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고, 100℃에서 16시간 동안 교반된 후, 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **11** (30 mg, 3단계의 경우 32%)이 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 ^{1}*H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 8.06 및 8.05 (2 s, 1 H, H-2), 7.57 및 7.54 (2 d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-H), 7.47 및 7.44 (2 d, 1 H, J = 2.6 Hz, Ph-H), 7.33 및 7.27 (2 dd, *J* = 8.8 및 2.6 Hz, 1 H, Ph-H), 7.18 및 7.15 (2 s, 1 H, H-8), 6.63 (bs, 2 H, D_2O 교환가능한, 6-NH_2), 6.43 (m, 1 H, H-1'), 5.24 (m, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.03 (m, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.55 (m, 2 H, Ph-CH, 7-CH_2a), 4.30 (m, 2 H, 7-CH_2b 및 H-3'), 3.86 및 3.84 (2 s, 3 H, MeO), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.48 (m, 2 H, H-5'), 2.45 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b), 1.93 (m, 1 H, $CH(CH_3)_2$), 0.88 (m, 3 H, CH_3), 0.74 및 0.71 (2 d, *J* = 6.8 Hz, 3 H, CH_3).

[0457] 화합물 **11** (28 mg, 0.06 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 2시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (11 μL, 0.12 mmol) 및 프로톤 스폰지 (25 mg, 0.12 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-n-부틸암모늄 파이로포

스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (10 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **dA.III.b**가 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었고, 이들은 RP-HPLC를 이용하여 분리되어 단일 부분입체이성질체 **dA.III.b ds1** 및 **dA.III.b ds2**가 획득되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{23}H_{31}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 726.0979이었고, 관찰된 질량은 726.0984이었다.

[0458] *7-[1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트*



[0459]

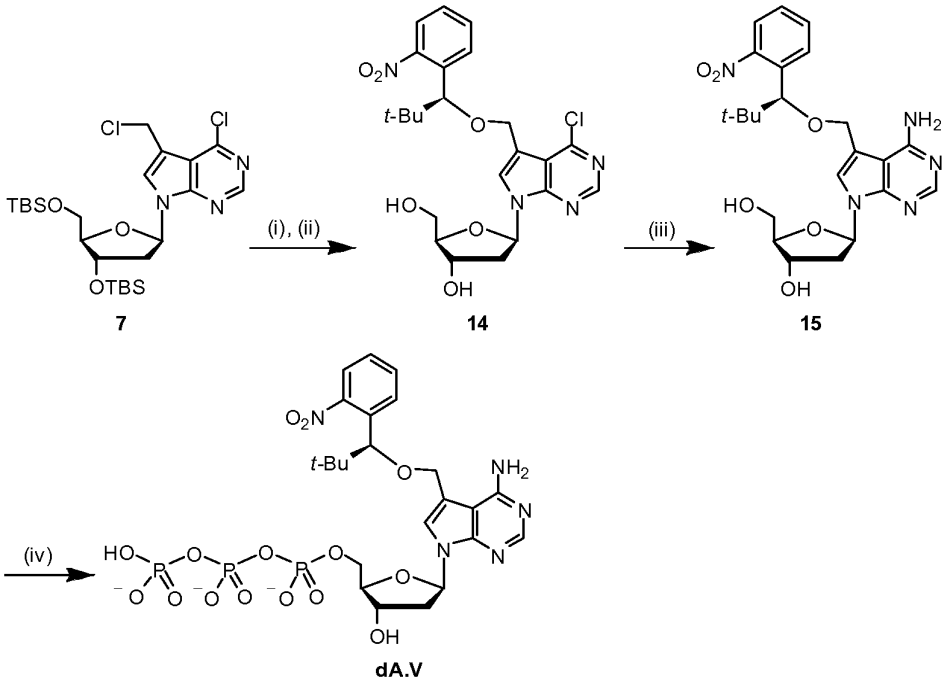
[0460] **계획 S9. 7-[1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시-아데노신-5'-트리포스페이트의 합성**. 시약들과 조건들: (i) 라셈체 (R/S)-1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올, 108℃; (ii) n-Bu_4NF, THF, 0℃ 내지 실온; (iii) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃, 3단계의 경우 38%; (iv) $POCl_3$, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0461] 화합물 **7** (109 mg, 0.20 mmol) 및 라셈체 (*R/S*)-1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-1-프로판올 (448 mg, 1.9 mmol)는 무수 CH_2Cl_2 (10 mL)에 용해되었다. 이 용매는 진공에서 제거되었고, 잔유물은 질소 대기하에서 30분 동안 108℃에서 가열되었고, 그 다음 최소량의 에틸 아세테이트에 용해되었고, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 6-클로로-7-[1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린-2'-데옥시리보-뉴클레오시드들 **12**가 획득되었다. 이 시료는 THF (5.0 mL)에 용해되었고, 0℃로 냉각되었고, n-Bu_4NF (31 mg, 0.10 mmol)의 THF (2.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 점진적으로 실온으로 따뜻해졌고, 2시간 동안 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며, 1,4-디옥산 (4.0 mL)에 용해되었고, NH_3 의 MeOH (7 N, 18 mL)가 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고, 100℃에서 36시간 동안 교반되었고, 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **13** (38 mg, 3단계의 경우 38%)이 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 ^{1}*H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 8.17 (m, 1 H, Ph-H), 8.07 및 8.06 (2 s, 1 H, H-2), 7.85 (m, 1 H, Ph-H), 7.69 (m, 1 H, Ph-H), 7.20 및 7.18 (2 s, 1 H, H-8), 6.57 (bs, 2 H, D_2O 교환가능한, 6-NH_2), 6.46 (m, 1 H, H-1'), 5.26 (d, *J* = 3.6 Hz, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.01 (m, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.60 (m, 2 H, Ph-CH 및 7-CH_2a), 4.29 (m, 1 H, 7-CH_2b), 4.13 (m, 1 H, H-3'),

3.80 (m, 1 H, H-4'), 3.51 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.49 (m, 1 H, $CH(CH_3)_3$), 2.16 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.91 (m, 3 H, CH_3), 0.65 (m, 3 H, CH_3). ToF-MS (ESI): 분자 이온 $C_{22}H_{27}N_6O_8$ $[M+H]^+$의 경우 계산된 질량은 503.1890이었고, 관찰된 질량은 503.2029이엇다.

[0462] 화합물 **13** (30 mg, 0.06 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 4시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.4 mL)에서 $POCl_3$ (17 μL, 0.18 mmol) 및 프로톤 스폰지 (26 mg, 0.12 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (285 mg, 0.6 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (120 μL)의 무수 DMF (1.2 mL) 용액이 추가되었다. 교반 30분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (10 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[1-(2,6-디니트로페닐)-2-메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **dA.III.c**는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었으며, 이들은 RP-HPLC를 이용하여 분리되어 단일 부분입체이성질체 **dA.III.c ds1** 및 **dA.III.c ds2**이 획득되었다. *HRMS (ESI)*: 이온 $C_{22}H_{28}N_6O_{17}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 741.0724이었고, 관찰된 질량은 741.0731이었다.

[0463] *7-[(S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트*



[0464]

[0465] **계획 S10. 7-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) (S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃; (ii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온; 2 단계에서 75%; (iii) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃, 93%; (iv) $POCl_3$, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

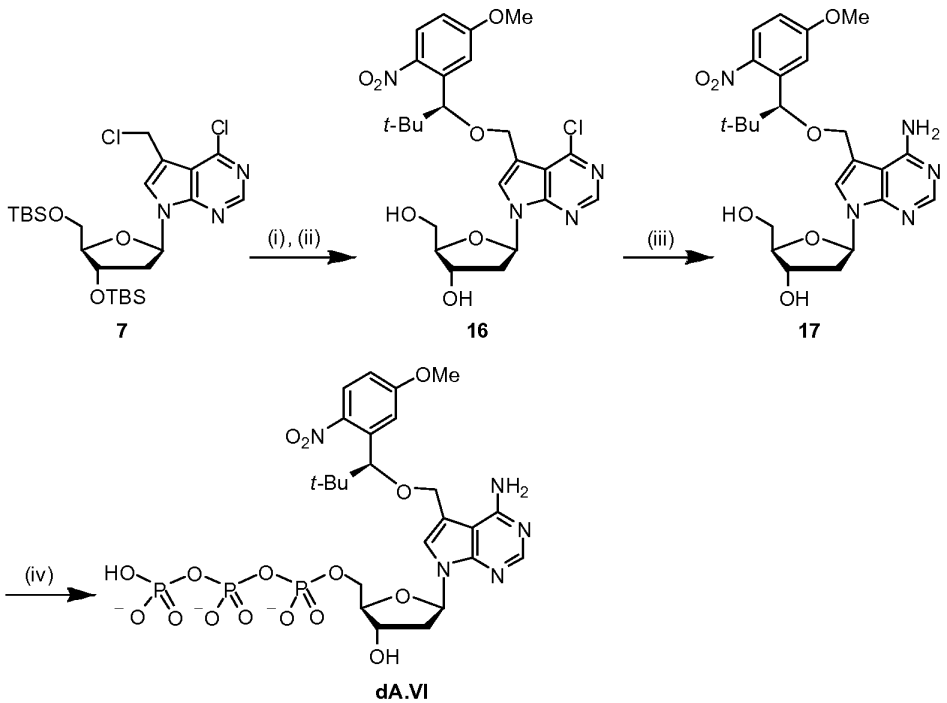
[0466] 화합물 7 (130 mg, 0.24 mmol) 및 (S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (290 mg, 1.4 mmol)은 질소 대기하에서 110℃에서 45분간 가열되었다. 반응 혼합물은 실온으로 냉각되었고, THF (10 mL)에 용해되었고, *n*-Bu_4NF (189 mg, 0.60 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 2시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 염수 (30 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (20 mL)으로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[(S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 **14** (90 mg, 75%)가 획득되었다. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.51 (s, 1 H, H-2), 7.68 (m, 2 H, Ph-H),

7.45 (t, 1 H, J = 7.2 Hz, Ph-H), 7.38 (s, 1 H, H-8), 7.29 (t, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ph-H), 6.39 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 8.0 Hz, H-1'), 4.97 (s, 1 H, Ph-CH), 4.70 (m, 3 H, 7-CH_2 및 H-3'), 4.16 (m, 1 H, H-4'), 3.83 (m, 2 H, H-5'), 2.80 (m, 1 H, H-2'a), 2.35 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0467] 화합물 **14** (90 mg, 0.18 mmol)는 1,4-디옥산 (8.0 mL)에 용해되었고, NH_3의 MeOH (7 N, 16 mL)가 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고 100℃에서 24시간 동안 교반되었고, 실온으로 냉각되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **15** (80 mg, 93%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 8.09 (s, 1 H, H-2), 7.91 (dd, 1 H, *J* = 1.2 및 8.0 Hz, Ph-H), 7.71 (m, 2 H, Ph-H), 7.58 (m, 1 H, Ph-H), 7.24 (s, 1 H, H-8), 6.68 (bs, 2 H, D_2O 교환가능한, 6-NH_2), 6.46 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 8.0 Hz, H-1'), 5.27 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.06 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.87 (s, 1 H, Ph-CH), 4.65 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH_2a), 4.49 (m, 1 H, H-3'), 4.36 (d, 1 H, 7-CH_2b), 3.80 (m, 1 H, H-4'), 3.49 (m, 2 H, H-5'), 2.45 (m, 1 H, H-2'a), 2.17 (m, 1 H, H-2'b), 0.75 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0468] 화합물 **15** (25 mg, 0.053 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 4.5시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (22 μL, 0.24 mmol) 및 프로톤 스폰지 (23 mg, 0.11 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **dA.V**가 획득되었고, 이는 RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{23}H_{31}N_5O_{15}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 710.1029이었고, 관찰된 질량은 710.1032이었다.

[0469] *7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트*



7 16 17 dA.VI

[0470]

[0471] **계획 S11. 7-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) (S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃; (ii) n-Bu_4NF, THF, 실온; 2단계동안에서 78%; (iii) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃, 74%; (iv) $POCl_3$,

$(MeO)_3PO$, 0℃; (n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

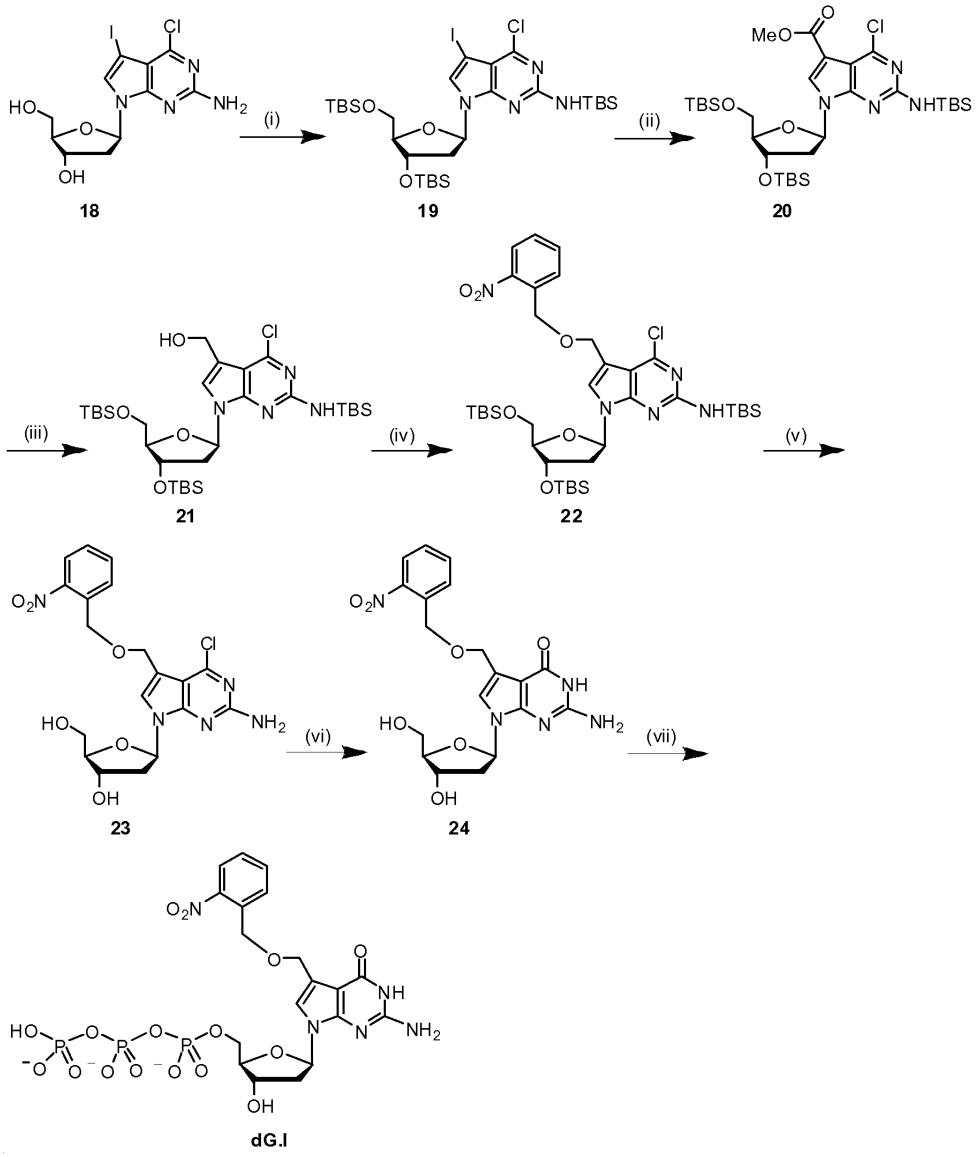
[0472] 화합물 **7** (165 mg, 0.30 mmol)과 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (330 mg, 1.4 mmol)는 질소 대기하에서 110℃에서 45분간 가열되었다. 반응 혼합물은 실온으로 냉각되었고, THF (10 mL)에 용해되었고, n-Bu_4NF (236 mg, 0.75 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 2시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (40 mL)에 용해되었고, 염수 (50 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (40 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 **16** (122 mg, 78%)이 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.55 (s, 1 H, H-2), 7.79 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.35 (s, 1 H, H-8), 7.15 (d, 1 H, *J* = 3.2 Hz, Ph-H), 6.68 (dd, 1 H, *J* = 3.2 및 9.2 Hz, Ph-H), 6.33 (dd, 1 H, *J* = 5.6 and 8.8 Hz, H-1'), 5.26 (s, 1 H, Ph-CH), 4.85 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, 7-CH_2a), 4.75 (m, 1 H, H-3'), 4.70 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, 7-CH_2b), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.95 (m, 1 H, H-5'a), 3.83 (s, 3 H, OCH_3), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.86 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 0.83 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0473] 화합물 **16** (120 mg, 0.23 mmol)은 1,4-디옥산 (10 mL)에 용해되었고, NH_3의 MeOH (7 N, 10 mL)가 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고, 그리고 100℃에서 24시간 동안 교반되었고, 그 다음 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **17** (87 mg, 74%)이 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$)*: δ 8.06 (s, 1 H, H-2), 7.97 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.22 (s, 1 H, H-8), 7.08 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 7.05 (dd, 1 H, *J* = 2.8 및 9.2 Hz, Ph-H), 6.66 (bs, 2 H, D_2O 교환가능한, 6-NH_2), 6.42 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 8.0 Hz, H-1'), 5.25 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.15 (s, 1 H, Ph-CH), 5.03 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.64 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH_2a), 4.43 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH_2b), 4.30 (m, 1 H, H-3'), 3.84 (s, 3 H, OCH_3), 3.77 (m, 1 H, H-4'), 3.45 (m, 2 H, H-5'), 2.43 (m, 1 H, H-2'a), 2.14 (m, 1 H, H-2'b), 0.75 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0474] 화합물 **17** (21 mg, 0.042 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 7.5시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (40 μL, 0.43 mmol) 및 프로톤 스폰지 (18 mg, 0.084 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-n-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-n-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에서 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **dA.VI**이 획득되었고, 이는 RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{24}H_{33}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 740.1135이었고, 관찰된 질량은 740.1156이었다.

[0475] **실시예 4 - 7-HOMe-7-데아자-2'-데옥시구아노신 트리포스페이트 유사체들**

[0476] *7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트*



[0477]

[0478] **계획 S12. 7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트.** 시약들과 조건들: (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 60%; (ii) CO, $PdCl_2[PhCN]_2$, MeOH/1,4-디옥산, 50℃, 91%; (iii) $LiBH_4$, MeOH, THF, 역류, 54%; (iv) 2-니트로벤질 브롬화물, n-Bu_4NBr, CH_2Cl_2/aq. NaOH, 실온, 48%; (v) n-Bu_4NF, THF, 0 ° C 내지 실온, 95%; (vi) DABCO, H_2O, 역류, 30%; (vii) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0479] 화합물 **18** (Seela and Peng, 2005, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) (1.35 g, 3.29 mmol)은 무수 피리딘 (3.0 mL)으로부터 3회 증발되었고, 그 다음 무수 DMF (6.0 mL)에 용해되었다. *tert*-부틸디메틸실일 클로라이드 (5.95 g, 39.5 mmol) 및 이미다졸 (5.37 g, 78.9 mmol)이 추가되었고, 추가 *tert*-부틸디메틸실일 클로라이드 (2.97 g, 19.7 mmol) 및 이미다졸 (2.69 g, 39.4 mmol)이 6시간마다 추가되었면서 이 혼합물은 50℃에서 48 시간 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 진공에서 농축되며 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 백색 포말의 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-2-(*tert*-부틸디메틸실일)아미노-6-클로로-7-요오드-7-데아자퓨린 **19** (1.48 g, 60% 수율)가 획득도었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 7.35 (s, 1 H, H-8), 6.53 (t, 1 H, *J* = 6.0 Hz, H-1'), 4.70 (s, 1 H, 2-NH), 4.47 (m, 1 H, H-3'), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.78 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.23 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.98 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.95 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.90 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.29 (2 s, 6 H, $(CH_3)_2Si$), 0.13 (2 s, 6 H, $(CH_3)_2Si$),

0.09 (s, 6 H,$(CH_3)_2Si$).

[0480] 화합물 **19** (720 mg, 0.96 mmol)의 용액은 무수 1,4-디옥산 (30 mL)에 용해되었다. 무수 MeOH (30 mL) 및 트리에틸아민 (0.58 mL)이 추가되었고, 그리고 이 혼합물은 CO 대기하에 10분간 교반되었고, 비스(벤조니트릴)디클로로팔라듐(II) (20 mg, 0.05 mmol)이 추가되었다. 반응물은 58℃에서 24시간 동안 CO 대기하에 교반되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 점성 오일로 된 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-2-(*tert*-부틸디메틸실일)아미노-6-클로로-7-메톡시카르보닐-7-데아자퓨린 **20** (600 mg, 91%)이 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 7.92 (s, 1 H, H-8), 6.57 (dd, 1 H, *J* = 8.0 및 6.0 Hz, H-1'), 4.78 (s, 1 H, 2-NH), 4.49 (m, 1 H, H-3'), 4.02 (m, 1 H, H-4'), 3.85 (s, 3 H, CH3), 3.81 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.25 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.98 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.93 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.92 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.31 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$), 0.13 (2 s, 6 H, $(CH_3)_2Si$), 0.11 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$).

[0481] 화합물 **20** (1.11 g, 1.63 mmol)의 무수 THF (56 mL) 용액에 수소화붕소 리튬 (143 mg, 6.5 mmol)이 추가되었고, MeOH (0.94 mL)이 추가되었다. 반응 혼합물은 1시간 동안 역류되도록 가열되었다. 실온으로 냉각시, 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (700 mL)으로 희석되었고, 물 (70 mL)로 퀀칭되었다. 유기상은 분리되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 점성 오일로 된 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-2-(*tert*-부틸디메틸실일)아미노-6-클로로-7-히드록시메틸-7-데아자퓨린 **21** (0.58 g, 54%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 7.16 (s, 1 H, H-8), 6.56 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 4.79 (AB d, *J* = 13.6 Hz, 7-CH_2a), 4.75 (AB d, J = 13.6 Hz, 7-CH_2b), 4.70 (s, 1 H, 2-NH), 4.50 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.76 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.23 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.98 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.94 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.92 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.30 (s, 3 H, $(CH_3)_2Si$), 0.29 (s, 3 H, $(CH_3)_2Si$), 0.11 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$), 0.10 (s, 6 H, $(CH_3)_2Si$).

[0482] 화합물 **21** (150 mg, 0.23 mmol)의 CH_2Cl_2 (3.0 mL) 용액에 n-Bu_4NBr (37 mg, 0.12 mmol), 2-니트로벤질 브롬화물 (148 mg, 0.68 mmol) 및 NaOH 용액 (1 M, 3.0 mL)가 추가되었다. 반응 혼합물은 어두운 상태에서 2일간 실온에서 활발하게 교반되었다. 유기상은 분리되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 점성 오일로 된 9-[β-D-3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-2'-데옥시리보푸라노실]-2-(*tert*-부틸디메틸실일)아미노-6-클로로-7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자퓨린 **22** (87 mg, 48%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 8.06 (dd, 1H, *J* = 8.0 및 1.2 Hz, Ph-H), 7.87 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ph-H), 7.61 (dt, 1 H, *J* = 7.6 및 1.2 Hz, Ph-H), 7.43 (m, 1 H, Ph-H), 7.20 (s, 1 H, H-8), 6.56 (dd, 1 H, *J* = 7.6 및 6.0 Hz, H-1'), 4.99 (s, 2 H, $PhCH_2$), 4.83 (AB d, 1 H, *J* = 11.4 Hz, 7-CH_2a), 4.75 (AB d, 1 H, *J* = 11.4 Hz, 7-CH_2b), 4.67 (s, 1 H, 2-NH), 4.50 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.77 (m, 2 H, H-5'a 및 H-5'b), 2.25 (m, 2 H, H-2'a 및 H-2'b), 0.98 (s, 9 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.92 (s, 18 H, $(CH_3)_3CSi$), 0.30 (s, 3 H, $(CH_3)_2Si$), 0.29 (s, 3 H, $(CH_3)_2Si$), 0.09 (m, 12 H, $(CH_3)_2Si$).

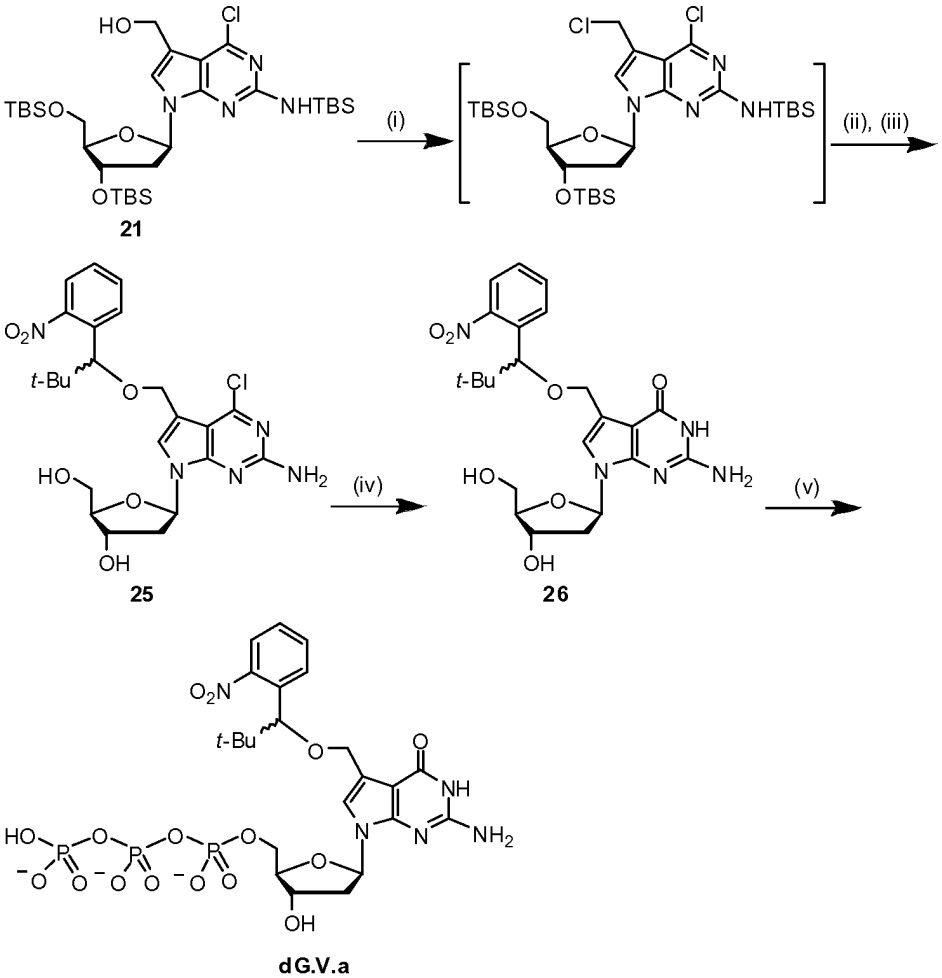
[0483] 0℃에서 n-Bu_4NF (123 mg, 0.39 mmol)의 THF (2.0 mL) 용액을 화합물 **22** (105 mg, 0.13 mmol)의 THF (3.0 mL) 용액에 한 방울씩 첨가하였다. 반응 혼합물은 0℃에서 1시간 동안 교반시켰고, 그 다음 실온에서 2시간 동안 교반시켰다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 황색 포말로 된 2-아미노-6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시-리보푸라노실]-7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자퓨린 **23** (57 mg, 95%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ, 8.02 (m, 1 H, Ph-H), 7.74 (m, 2 H, Ph-H), 7.55 (m, 1 H, Ph-H), 7.41 (s, 1 H, H-8), 6.73 (s, 2 H, D_2O 교환가능한, NH_2), 6.41 (dd, 1 H, *J* = 8.4 및 6.0 Hz, H-1'), 5.26 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 4.91 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.88 (s, 2 H, Ph-CH_2), 4.66 (dd, 2 H, *J* = 11.6 Hz, 7-CH_2), 4.31 (m, 1 H, H-3'), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.50 (m, 2 H, H-5'), 2.38 (m,

1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b).

[0484] 화합물 **23** (38 mg, 0.085 mmol) 및 1,4-디아자바이시클로[2.2.2]옥탄(11 mg, 0.1 mmol)의 물 (4.0 mL) 혼합물은 질소 대기하에서 4시간 동안 역류되도록 가열되었다. 물 진공에서 제거되었고, 잔유물은 MeOH (3.0 mL)로부터 3회 증발되었고, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **24** (11 mg, 30%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 10.4 (s, 1 H, D_2O 교환가능한, N-H), 8.03 (dd, 1 H, *J* = 8.4 및 0.8 Hz, Ph-H), 7.83 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 7.73 (m, 1 H, Ph-H), 7.55 (m, 1 H, Ph-H), 6.92 (s, 1 H, H-8), 6.28 (m, 1 H, H-1'), 6.26 (bs, 2 H, D_2O 교환가능한, NH_2), 5.21 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 4.89 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.88 (s, 2 H, Ph-CH_2), 4.60 (dd, 2 H, 7-CH_2), 4.28 (m, 1 H, H-3'), 3.74 (m, 1 H, H-4'), 3.48 (m, 2 H, H-5'), 2.32 (m, 1 H, H-2'a), 2.08 (m, 1 H, H-2'b).

[0485] 화합물 **24** (11 mg, 0.025 mmol)는 질소 대기하에서 0℃에서 2시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.3 mL)에서 $POCl_3$ (15 μL, 0.05 mmol) 및 프로톤 스폰지 (11 mg, 0.05 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (118 mg, 0.25 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (50 μL)의 무수 DMF (0.5 mL) 용액이 추가되었다. 교반 30분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 5.0 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-(2-니트로벤질옥시)메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.I**가 획득되었고, 이는 RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{19}H_{23}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 670.0353이었고, 관찰된 질량은 670.0344이었다.

[0486] *7-[1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트*



[0487]

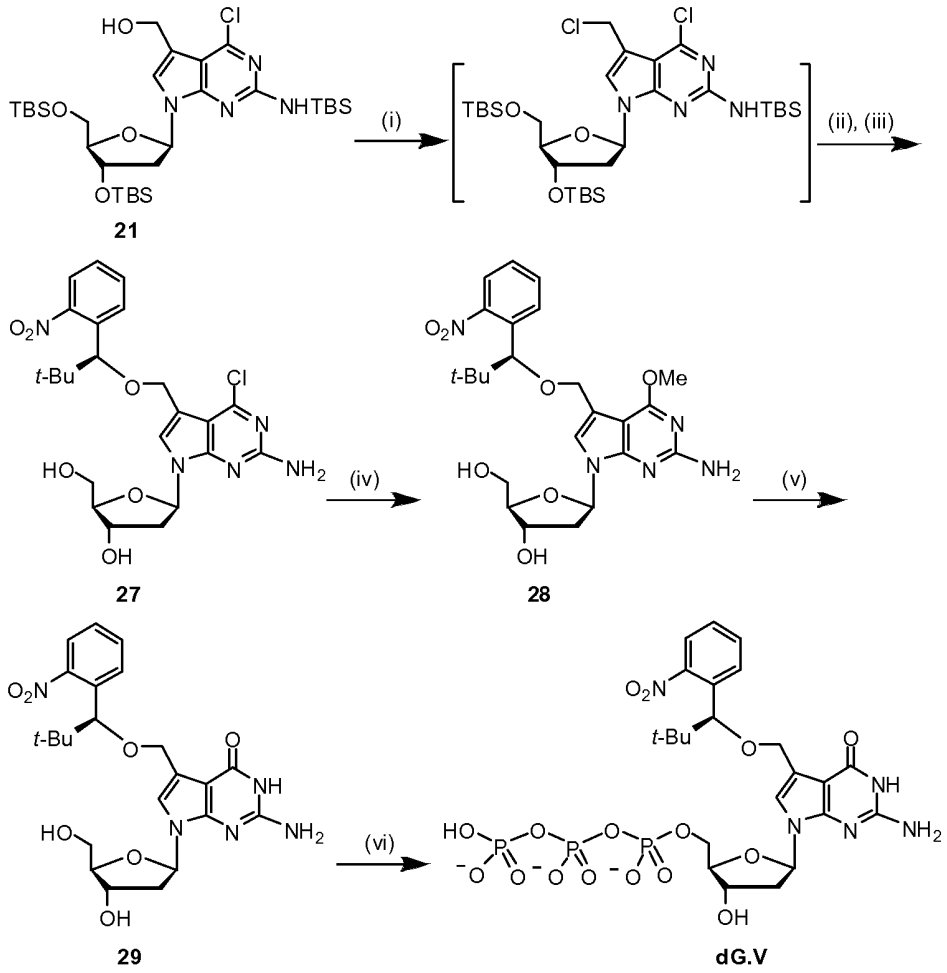
[0488] **계획 S13. 7-[1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시-구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) 라셈체 (R/S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) n-Bu_4NF, THF, 실온, 3단계에서 26%; (iv) syn-피리딘-2-알독심, 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘, 1,4-디옥산/DMF, 70℃, 70%; (v) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0489] DMAP (148 mg, 1.2 mmol) 및 MsCl (71 μL, 0.9 mmol)이 질소 대기하에 0℃에서 화합물 21 (200 mg, 0.30 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 0℃에서 10분간 교반되었고, CH_2Cl_2 (15 mL)로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (용적 비율 80/20/0.5)으로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 잔유물은 라셈체 (*R/S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (500 mg, 2.4 mmol)과 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 115℃ 45분간 가열되었고, 실온으로 냉각되었고 그 다음 THF (10 mL)에 용해되었고, n-Bu_4NF (283 mg, 0.90 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (25 mL)에 용해되었고, 염수 (25 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (25 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시] 메틸-7-데아자퓨린 **25** (40 mg, 3단계에서 26%)는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다.

[0490] 화합물 **25** (40 mg, 0.08 mmol)의 1,4-디옥산 (1.0 mL) 및 DMF (2.0 mL) 용액에 syn-피리미딘-2-알독심 (180 mg, 1.5 mmol) 및 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘 (211 μL, 1.68 mmol)이 추가되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 70℃에서 하룻밤 동안 가열되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (20 mL)으로 희석되었고, 순차적으로 아세트산 용액 (0.1 M, 30 mL), 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (30 mL), 및 염수 (30 mL)로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **26** (27 mg, 70%)이 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 ^1H *NMR (400 MHz, MeOH-d_4)* : δ 7.79 (m, 1 H, Ph-H), 7.73 (m, 1 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 7.39 (m, 1 H, Ph-H), 6.87 및 6.86 (2 s, 1 H, H-8), 6.30 (m, 1 H, H-1'), 4.99 및 4.97 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.63-4.36 (m, 3 H, 7-CH_2 및 H-3'), 3.91 (m, 1 H, H-4'), 3.69 (m, 2 H, H-5'), 2.48 (m, 1 H, H-2'a), 2.20 (m, 1 H, H-2'b), 0.79 및 0.77 (2 s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0491] 화합물 **26** (25 mg, 0.05 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 3.5시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (20 μL, 0.21 mmol) 및 프로톤 스폰지 (21 mg, 0.1 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-n-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-n-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.V.a**가 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었으며, 이들은 RP-HPLC를 이용하여 분리되어 단일 부분입체이성질체 **dG.V.a ds1** 및 **dG.V.a ds2**가 획득되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{23}H_{31}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 726.0979이었고, 관찰된 질량은 726.0992이었다.

[0492] *7-[(S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트*



[0493]

[0494] **계획 S14. 7-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시-구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) (S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) n-Bu_4NF, THF, 실온, 3단계에서 35% ; (iv) NaOMe, MeOH, 역류, 74%; (v) 1,4-디옥산, 2 M NaOH, 역류, 33%; (vi) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0495] DMAP (224 mg, 1.8 mmol) 및 MsCl (107 μL, 1.4 mmol)가 0℃ 질소 대기하에서 화합물 **21** (300 mg, 0.46 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (10 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 0℃에서 10분간 교반되었고, CH_2Cl_2 (20 mL)로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (용적 비율 80/20/0.5)로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 잔유물은 (*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (520 mg, 2.5 mmol)와 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 115℃ 45분간 가열되었고, 실온으로 냉각되었고 그 다음 THF (20 mL)에 용해되었고, n-Bu_4NF (491 mg, 1.6 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 염수 (30 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (20 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[(S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 **27** (81 mg, 3단계에서 35%)가 획득되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, MeOH-d_4): δ 7.79 (m, 2 H, Ph-H), 7.60 (dt, 1 H, J = 1.2 및 8.0 Hz, Ph-H), 7.46 (dt, 1 H, J = 1.2 및 8.0 Hz, Ph-H), 7.27 (s, 1 H, H-8), 6.47 (dd, 1 H, J = 6.4 및 8.0 Hz, H-1'), 4.98 (s, 1 H, Ph-CH), 4.71 (d, 1 H, J = 12.4 Hz, 7-CH_2 a), 4.50 (m, 1 H, H-

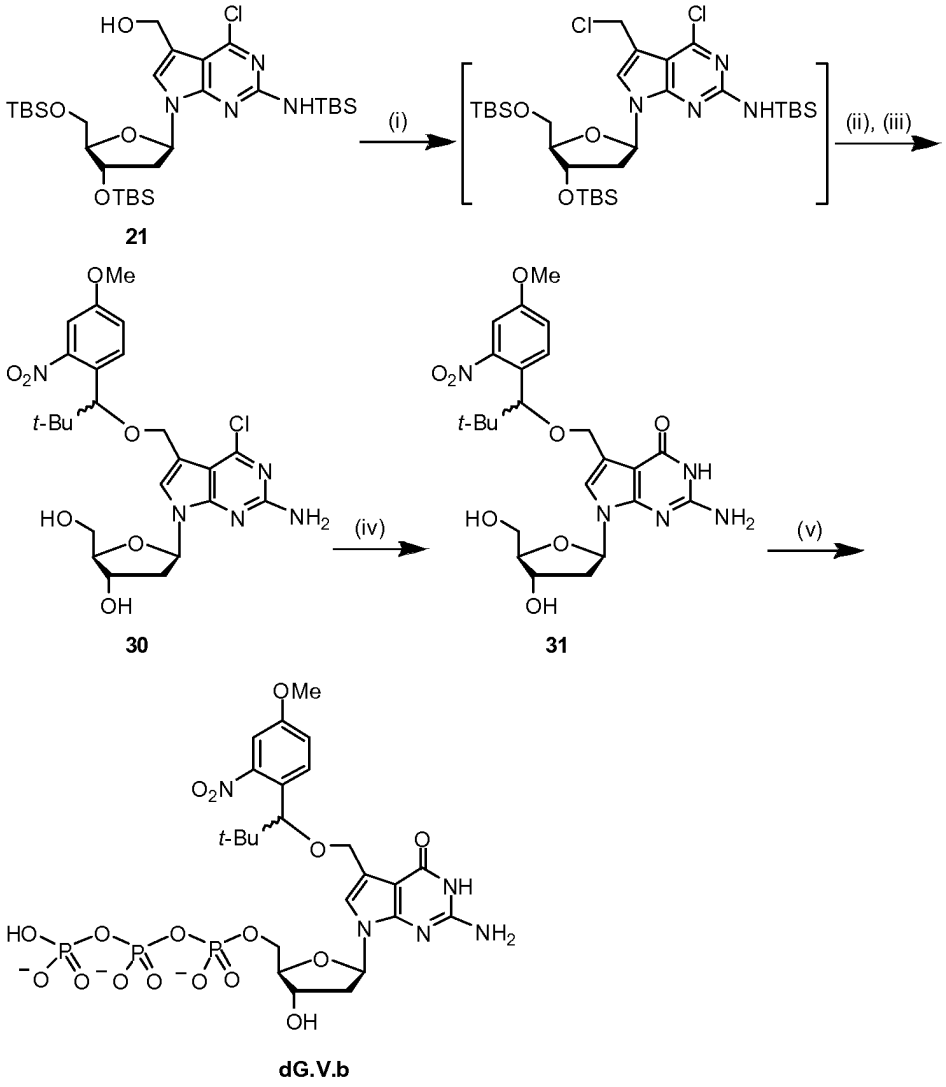
3'), 4.47 (d, 1 H, *J* = 12.4 Hz, 7-CH_2 b), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.73 (m, 2 H, H-5'), 2.59 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 0.80 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0496] 화합물 **27** (104 mg, 0.21 mmol)은 메톡시드 나트륨의 MeOH (0.5 M, 10 mL) 용액에 용해되었고, 이 혼합물은 질소 대기하에서 1시간 동안 역류되도록 가열되었다. 반응 혼합물은 실온으로 냉각되었고, 아세트산으로 중화되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-메톡시-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 **28** (75 mg, 74%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 7.74 (m, 2 H, Ph-H), 7.52 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 7.36 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 6.71 (s, 1 H, H-8), 6.47 (dd, 1 H, *J* = 5.6 및 9.6 Hz, H-1'), 5.04 (s, 1 H, Ph-CH), 4.71 (m, 1 H, H-3'), 4.47 (dd, 2 H, *J* = 12 Hz, 7-CH_2), 4.15 (m, 1 H, H-4'), 3.94 (s, 3 H, OCH_3), 3.76 (m, 2 H, H-5'), 3.01 (m, 1 H, H-2'a), 2.19 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0497] 화합물 **28** (70 mg, 0.14 mmol)은 1,4-디옥산 (6.0 mL) 에 용해되었고, 수산화나트륨 (2 M, 12 mL)의 수성 용액이 추가되었다. 이 혼합물은 질소대기 하에서 4일간 역류되도록 가열되었고, 실온으로 냉각되었고, 희석 염산 (1 M)으로 중화되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 MeOH (5.0 mL)로부터 3회 증발되었고, 그 다음 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **29** (22 mg, 33%)가 획득되었다. 출발 재료 **28** (42 mg, 60%) 또한 반응으로부터 회수되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 11.02 (br s, 1 H, NH), 7.69 (m, 2 H, Ph-H), 7.52 (t, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ph-H), 7.33 (t, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ph-H), 6.66 (s, 1 H, H-8), 6.13 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 6.03 (br s, 2 H, 6-NH_2), 4.92 (s, 1 H, Ph-CH), 4.77 (m, 1 H, H-3'), 4.57 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH_2 a), 4.12 (m, 1 H, H-4'), 3.05 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH_2 b), 3.75 (m, 2 H, H-5'), 2.87 (m, 1 H, H-2'a), 2.29 (m, 1 H, H-2'b), 0.76 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0498] 화합물 **29** (16 mg, 0.033 mmol)는 질소 대기하에서 0℃에서 4시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (17 μL, 0.18 mmol) 및 프로톤 스폰지 (14 mg, 0.066 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (0.1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.V**가 획득되었고, RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. **dG.V**의 유지 시간은 동일한 조건(데이터 나타내지 않음)에서 RP-HPLC 분석에 의하면 **dG.V.a ds2** 의 것과 동일하였다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{23}H_{31}N_5O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 726.0979이었고, 관찰된 질량은 726.0986이었다.

[0499] *7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트*



[0500]

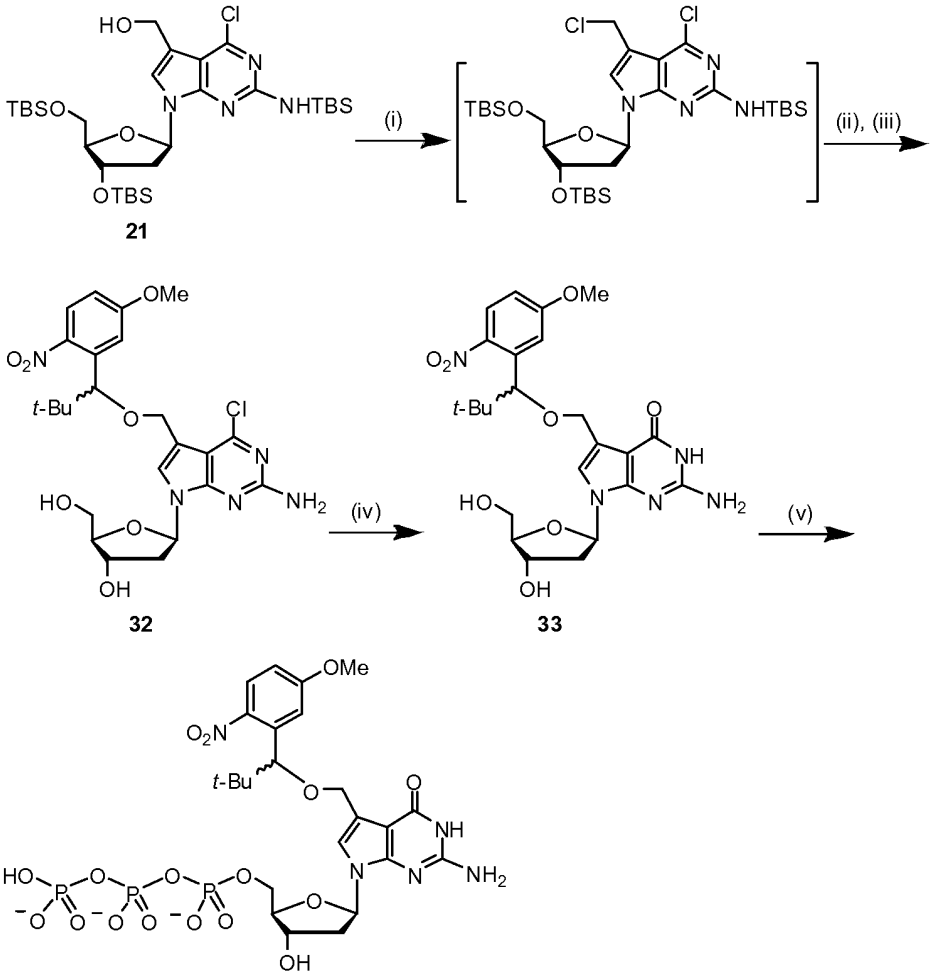
[0501] **계획 S15. 7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) 라셈체 (*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 3단계의 경우 21%; (iv) syn-피리딘-2-알독심, 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘, 1,4-디옥산/DMF, 70℃, 59%; (v) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-$Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0502] DMAP (346 mg, 2.8 mmol) 및 MsCl (165 μL, 2.1 mmol)는 질소 대기하에 0℃에서 화합물 **21** (470 mg, 0.72 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 0℃에서 10분간 교반되었고, CH_2Cl_2 (20 mL)로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (용적 비율 80/20/0.5)로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 잔유물은 라셈체 (*R/S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (1.6 g, 6.69 mmol)과 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에서 45분간 115℃로 가열되었고, 실온으로 냉각되었고, THF (20 mL)에 용해되었고, *n*-Bu_4NF (788 mg, 2.5 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 염수 (30 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (20 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[(S)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]-메틸-7-데아자퓨린 **30** (80 mg, 3단계의 경우 21%)가 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다.

[0503] 화합물 **30** (80 mg, 0.15 mmol)의 1,4-디옥산 (1.0 mL) 및 DMF (2.0 mL) 용액에 syn-피리미딘-2-알독심 (366 mg, 3.0 mmol) 및 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘 (414 μL, 3.3 mmol)이 추가되었고, 이 혼합물은 질소 대기하에서 70℃에서 하룻밤 동안 가열되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (20 mL)로 희석되었고, 순차적으로 아세트산 (0.1 M, 30 mL), 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (30 mL), 및 염수 (30 mL)로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[(*S*)-1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시-구아노신 31 (45 mg, 59%)가 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 경우 ^{1}*H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)* : δ 10.31 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH), 7.63 및 7.62 (2 d, 1 H, *J* = 2,8 Hz, Ph-H), 7.41 및 7.40 (2 d, 1 H, *J* = 2,8 Hz, Ph-H), 7.27 (m, 1 H, Ph-H), 6.98 및 6.96 (2 s, 1 H, H-8), 6.28 (m, 1 H, H-1'), 6.22 (br s, 2 H, D_2O 교환가능한, NH_2), 5.22 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 4.88 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.73 및 4.71 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.47-4.24 (m, 3 H, 7-CH_2 및 H-3'), 3.85 및 3.83 (2 s, 3 H, OCH_3), 3.74 (m, 1 H, H-4'), 3.48 (m, 2 H, H-5'), 2.28 (m, 1 H, H-2'a), 2.06 (m, 1 H, H-2'b), 0.80 및 0.78 (2 s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0504] 화합물 **31** (25 mg, 0.048 mmol)은 은 질소 대기하에서 0℃에서 3.5시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (15 μL, 0.18 mmol) 및 프로톤 스폰지 (21 mg, 0.10 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에서 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[1-(4-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.V.b**는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었고, 이들은 RP-HPLC를 이용하여 분리되어 단일 부분입체이성질체 **dG.V.b ds1** 및 **dG.V.b ds2**가 획득되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{24}H_{33}N_5O_{17}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 756.1084이었고, 관찰된 질량은 756.1101이었다.

[0505] *7-[1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트*



dG.V.c

[0506]

[0507] **계획 S16. 7-[1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) 라셈체 (R/S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 3단계에서 24%; (iv) syn-피리딘-2-알독심, 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘, 1,4-디옥산/DMF, 70℃, 57%; (v) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

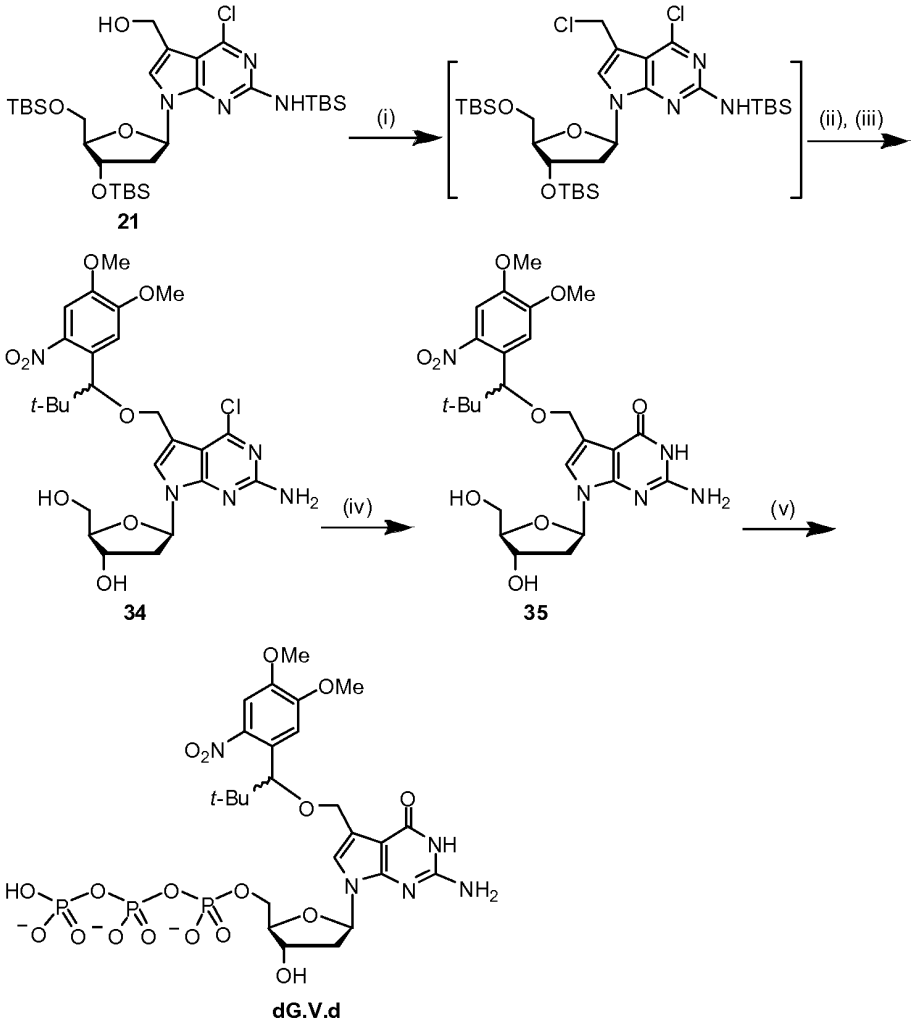
[0508] DMAP (302 mg, 2.5 mmol) 및 MsCl (145 μL, 1.9 mmol)는 0℃에서 질소 대기하에 화합물 **21** (410 mg, 0.62 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 0℃에서 10분간 교반되었고, CH_2Cl_2 (20 mL)로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (용적 비율 80/20/0.5)로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 그리고 잔유물은 라셈체 (*R/S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (800 mg, 2.2 mmol)과 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 115℃에서 45분간 가열되었고, 실온으로 냉각되었고, THF (10 mL)에 용해되었고, *n*-Bu_4NF (683 mg, 3.3 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 염수 (30 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (20 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 **32** (80 mg, 3단계의 경우 24%)는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 7.86 및 7.83 (2 d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-H), 7.19 및 7.17 (2 d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.91 및 6.90 (2 s, 1 H, H-8), 6.80 및 6.75 (2 dd, 1 H, *J* = .8 및 8.8 Hz,

Ph-H), 6.17 (m, 1 H, H-1'), 5.23 및 5.21 (2 s, 1 H, Ph-CH), 5.01 및 5.00 (2 br s, 2 H, NH_2), 4.73 (m, 1 H, H-3'), 4.65-4.49 (m, 2 H, 7-CH_2), 4.14 (m, 1 H, H-4'), 3.84 (m, 5 H, H-5' 및 OCH_3), 2.78 (m, 1 H, H-2'a), 2.33 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 및 0.81 (2 s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0509] 화합물 **32** (80 mg, 0.15 mmol)의 1,4-디옥산 (1.0 mL) 및 DMF (2.0 mL) 용액에, syn-피리미딘-2-알독심 (360 mg, 3.0 mmol) 및 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘 (414 μL, 3.3 mmol)이 추가되었고, 이 혼합물은 질소 대기하에서 70℃에서 하룻밤 동안 가열되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (20 mL)로 세척되었고, 순차적으로 아세트산 (0.1 M, 30 mL), 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (30 mL), 및 염수 (30 mL)로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **33** (43 mg, 57%)은 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 ^{1}*H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 10.34 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH), 7.92 및 7.89 (2 d, 1 H, *J* = 8,8 Hz, Ph-H), 7.15 (m, 1 H, Ph-H), 6.95 (m, 1 H, Ph-H), 6.82 및 6.81 (2 s, 1 H, H-8), 6.22 (m, 3 H, 2 H D_2O 교환가능한, H-1' 및 NH_2), 5.19 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.12 및 5.10 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.84 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.47-4.31 (m, 2 H, 7-CH_2), 4.24 (m, 1 H, H-3'), 3.85 및 3.83 (2 s, 3 H, OCH_3), 3.71 (m, 1 H, H-4'), 3.44 (m, 2 H, H-5'), 2.24 (m, 1 H, H-2'a), 2.01 (m, 1 H, H-2'b), 0.76 및 0.74 (2 s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0510] 화합물 **33** (20 mg, 0.04 mmol) 은 질소 대기하에서 0℃에서 6시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.30 mL)에서 $POCl_3$ (25 μL, 0.27 mmol) 및 프로톤 스폰지 (16 mg, 0.08 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.V.c**는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었고, 이들은 RP-HPLC를 이용하여 분리되어 단일 부분입체이성질체 **dG.V.c ds1** 및 **dG.V.c ds2**가 획득되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{24}H_{33}N_5O_{17}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 756.1084이었고, 관찰된 질량은 756.1088이었다.

[0511] *7-[1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트*



dG.V.d

[0512]

[0513] **계획 S17. 7-[1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들; (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) 라셈체 (*R/S*)-1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 3단계의 경우 23% ; (iv) syn-피리딘-2-알독심, 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘, 디옥산/DMF, 70℃, 68%; (v) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

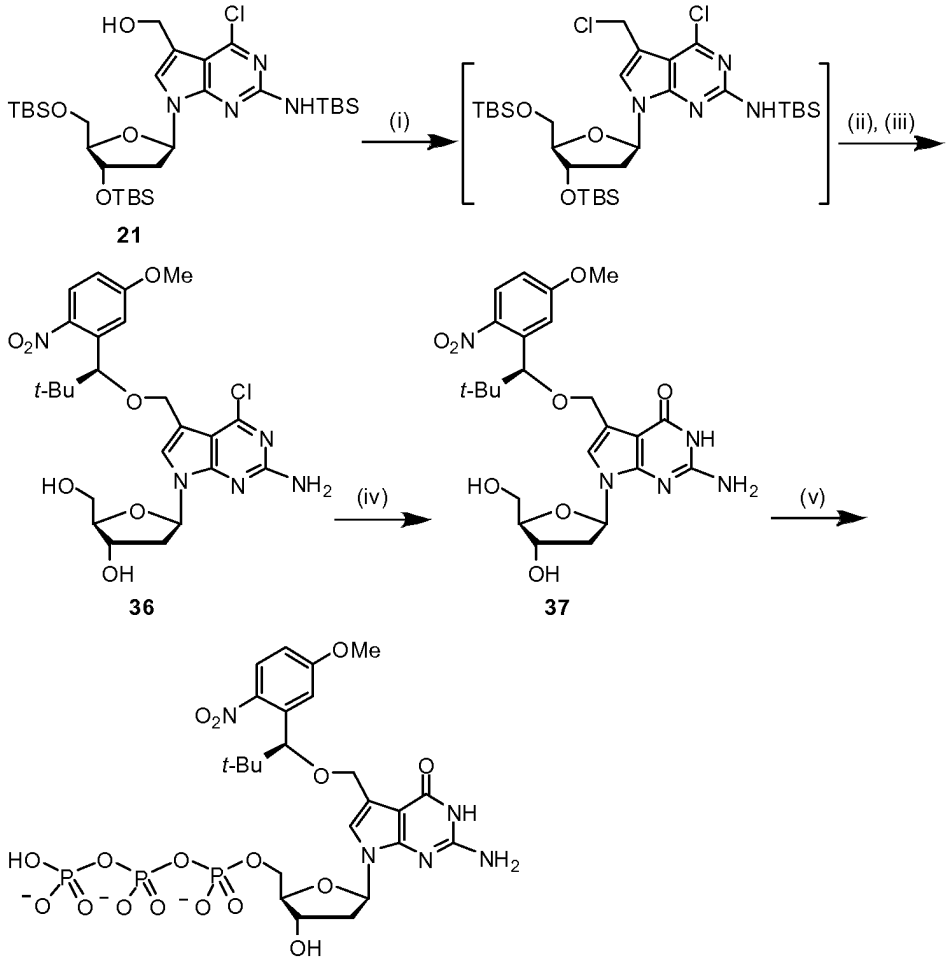
[0514] DMAP (273 mg, 2.2 mmol) 및 MsCl (130 μL, 1.7 mmol)는 0℃에서, 질소 대기하에 화합물 **21** (370 mg, 0.56 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 0℃에서 30분 동안 교반되었고 CH_2Cl_2 (25 mL)로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (용적 비율 80/20/0.5)로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 잔유물은 라셈체 (*R/S*)-1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (800 mg, 3.0 mmol)과 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에서 115℃에서 45분간 가열되었고, 실온으로 냉각되었고, 그리고 THF (10 mL)에 용해되었고, *n*-Bu_4NF (530 mg, 1.7 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 2시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (40 mL)에 용해되었고, 염수 (50 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (40 mL)으로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며 그리고 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자퓨린 34 (70 mg, 3단계의 경우 23%)는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 7.42 및 7.39 (2 s, 1 H, Ph-H), 7.15 및 7.13 (2 s, 1 H, Ph-H), 6.89 및 6.84 (2 s, 1 H, H-8), 6.12 (m, 1 H, H-1'), 5.22 및 5.16 (2 s, 1 H,

Ph-CH), 5.10 및 5.08 (2 bs, 2 H, NH_2), 4.71-4.41 (m, 3 H, H-3'및 7-CH_2), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.94 (4 s, 7 H, OCH_3 X 2 및 H-5'a), 3. 78 (m, 1 H, H-5'b), 2.90 (m, 1 H, H-2'a), 2.25 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 및 0.80 (2 s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0515] 화합물 **34** (65 mg, 0.11 mmol)의 1,4-디옥산 (1.0 mL) 및 DMF (2.0 mL) 용액에 syn-피리미딘-2-알독심 (292 mg, 2.4 mmol) 및 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘 (330 μL, 2.6 mmol)가 추가되었고, 이 혼합물은 질소 대기하에서 70℃에서 하룻밤 동안 가열되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (40 mL)로 희석되었고, 순차적으로 아세트산 (0.1 M, 50 mL), 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (50 mL), 및 염수 (50 mL)로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **35** (42 mg, 68%)는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었다. 부분입체이성질체의 *^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 10.33 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH), 7.47 및 7.44 (2 s, 1 H, Ph-H), 7.16 및7.15 (2 s, 1 H, Ph-H), 6.83 및 6.82 (2 s, 1 H, H-8), 6.22 (m, 3 H, 2 H D_2O 교환가능한, NH_2 및 H-1'), 5.18 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.06 및 5.04 (2 s, 1 H, Ph-CH), 4.83 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.44-4.23 (m, 3 H, 7-CH_2 및 H-3'), 3.82 (4 s, 6 H, OCH_3 X 2), 3.70 (m, 1 H, H-4'), 3.42 (m, 2 H, H-5'), 2.22 (m, 1 H, H-2'a), 2.01 (m, 1 H, H-2'b), 0.77 및 0.75 (2 s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0516] 화합물 **35** (40 mg, 0.073 mmol)는 은 질소 대기하에서 0℃에서 2시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (14 μL, 0.15 mmol) 및 프로톤 스폰지 (31 mg, 0.15 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에서 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[1-(4,5-디메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.V.d**는 1:1 혼합물의 2개 부분입체이성질체로 획득되었고, 이들은 RP-HPLC를 이용하여 분리되어 단일 부분입체이성질체 **dG.V.d ds1** 및 **dG.V.d ds2**이 획득되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{25}H_{35}N_5O_{18}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 786.1190이었고, 관찰된 질량은 786.1206이었다.

[0517] *7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트*



dG.VI

[0518]

[0519] **계획 S18. 7-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자- 2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) (S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 3단계의 경우 27%; (iv) syn-피리딘-2-알독심, 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘, 1,4-디옥산/DMF, 70℃, 76%; (v) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-$Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0520] DMAP (224 mg, 1.8 mmol) 및 MsCl (106 μL, 1.4 mmol)는 질소 대기하에 0℃에서 화합물 **21** (300 mg, 0.46 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 용액에 첨가되었다. 반응물은 0℃에서 10분간 교반되었고, CH_2Cl_2 (20 mL)로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (용적 비율 80/20/0.5)로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 그리고 잔유물은 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (500 mg, 2.1 mmol)과 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 45분간 115℃에서 가열되었고, 실온으로 냉각되었고 THF (10 mL)에 용해되었고, *n*-Bu_4NF (507 mg, 1.6 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 염수 (30 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (20 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-클로로-9-[β-D-2'-데옥시리보푸라노실]-7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]-메틸-7 데아자퓨린 **36** (67 mg, 3단계의 경우 27%)가 획득되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.82 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz, Ph-H), 7.16 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.90 (s, 1 H, H-8), 6.72 (dd, 1 H, *J* = 8.8 및 2.8 Hz, Ph-H), 6.12 (dd, 1 H, *J* = 9.2 및 6.0 Hz, H-1'), 5.22 (s, 1 H, Ph-CH), 5.15 (br s, 2 H, NH_2), 4.69-

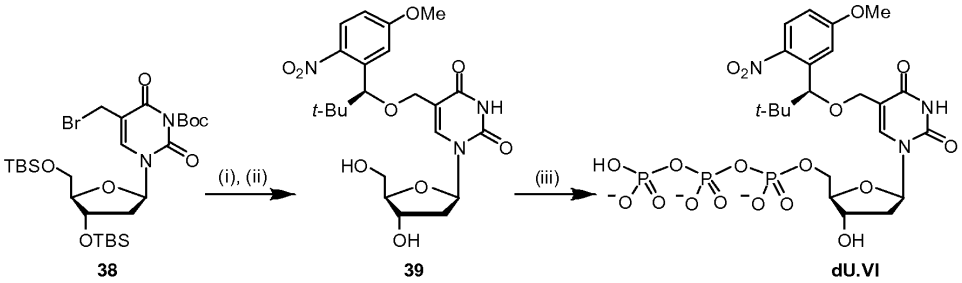
4.55 (m, 3 H, H-3'및 7-CH_2), 4.11 (m, 1 H, H-4'), 3.92 (m, 1 H, H-5'a), 3.82 (s, 3 H, OCH_3), 3. 73 (m, 1 H, H-5'b), 2.81 (m, 1 H, H-2'a), 2.21 (m, 1 H, H-2'b), 0.82 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0521] 화합물 **36** (65 mg, 0.12 mmol)의 1,4-디옥산 (1.0 mL) 및 DMF (2.0 mL) 용액에 syn-피리미딘-2-알독심 (292 mg, 2.4 mmol) 및 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘 (331 μL, 2.6 mmol)이 추가되었고, 이 혼합물은 질소 대기하에 70℃에서 하룻밤 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (20 mL)으로 희석되었고, 아세트산 (0.1 M, 30 mL), 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (30 mL), 및 염수 (30 mL)로 순차적으로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **37** (48 mg, 76%)이 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 10.37 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH), 7.95 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.18 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 7.03 (dd, 1 H, *J* = 9.2 및 2.8 Hz, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, H-8), 6.23 (m, 3 H, 2 H D_2O 교환가능한, NH_2 및 H-1'), 5.20 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.13 (s, 1 H, Ph-CH), 4.84 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.48 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2a), 4.32 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2b), 4.27 (m, 1 H, H-3'), 3.88 (s, 3 H, OCH_3), 3.73 (m, 1 H, H-4'), 3.46 (m, 2 H, H-5'), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 0.77 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0522] 화합물 **37** (10 mg, 0.02 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 6.5시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.3 mL)에서 $POCl_3$ (26 μL, 0.26 mmol) 및 프로톤 스폰지 (8 mg, 0.04 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (10 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 7-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.VI**가 획득되었으며, 이는 RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. **dG.VI**의 유지 시간은 동일한 조건(데이터 나타내지 않음)에서 RP-HPLC 분석에 의하면 **dG.V.c ds2**의 것과 동일하였다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{24}H_{33}N_5O_{17}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 756.1084이었고, 관찰된 질량은 756.1101이었다.

[0523] **실시예 5 - 5-HOMe-2'-데옥시우리딘 트리포스페이트 유사체의 합성**

[0524] *5-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트*



[0525]

[0526] **계획 S19. 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) (S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃; (ii) NH_4F, MeOH, 50℃, 2단계에서 56%; (iii) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-$Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

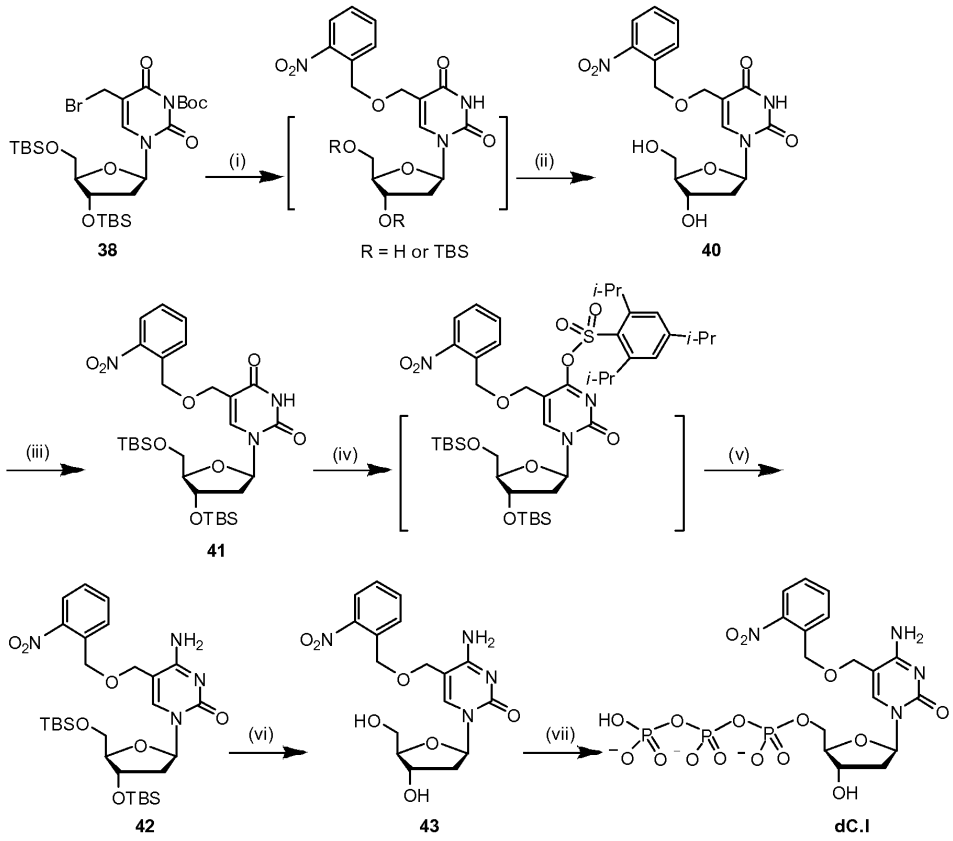
[0527] 화합물 **38** (Litosh *et al.*, 2011, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) (315 mg, 0.49 mmol) 및 (*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (490 mg, 2.1 mmol)는 질소 대기하에 110℃에서 45분간 가열되었다. 이 혼합물은 실온으로 냉각되었고, MeOH (10 mL)에 용해되었고, NH_4F (400 mg, 11 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 50℃에서 12시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2 (50 mL)에 용해되었고, 염수 (50

mL)로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘 **39** (130 mg, 56%)가 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 9.14 (br s, 1 H, NH), 7.90 (d, 1 H, *J* = 9.2 Hz, Ph-H), 7.67 (s, 1 H, H-6), 7.17 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.84 (dd, 1 H, *J* = 9.2 및 2.8 Hz, Ph-H), 6.18 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.22 (s, 1 H, Ph-CH), 4.56 (m, 1 H, H-3'), 4.24 (d, 1 H, *J* = 12.4 Hz, 5-CH_2a), 4.15 (d, 1 H, *J* = 12.4 Hz, 5-CH_2b), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.90 (m, 1 H, H-5'a), 3.88 (s, 3 H, OCH_3), 3.81 (m, 1 H, H-5'b), 2.35 (m, 2 H, H-2), 0.83 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0528] 화합물 **39** (30 mg, 0.065 mmol)는 은 질소 대기하에서 0℃에서 1시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (9 μL, 0.097 mmol) 및 프로톤 스폰지 (28 mg, 0.13 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (147 mg, 0.32 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (64 μL)의 무수 DMF (0.64 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (10 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 **dU.VI**가 획득되었고, 이는 RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{22}H_{31}N_3O_{18}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 718.0815이었고, 관찰된 질량은 718.0824이었다.

[0529] **실시예 6 - 5-HOMe-2'-데옥시시티딘 트리포스페이트 유사체들의 합성**

[0530] *5-(2-니트로벤질옥시)메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트*



[0531]

[0532] **계획 S20. 5-(2-니트로벤질옥시)메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성**. 시약들과 조건들: (i) 2-니트로벤질 알코올, 110℃; (ii) n-Bu_4NF, THF, 실온, 2단계의 경우 53%; (iii) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 80%; (iv) 2,4,6-트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드, DMAP, Et_3N, CH_2Cl_2, 실온; (v) NH_3, 1,4-디옥산, 90℃, 2단계의 경우 69%; (vi) *n*Bu_4NF, THF, 실온, 96%; (vii) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃;

(n-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, n-Bu_3N, DMF; 1 M HNEt3HCO3.

[0533] 화합물 **38** (300 mg, 0.46 mmol) 및 2-니트로벤질 알코올 (500 mg, 3.3 mmol)은 질소 대기하에서 110℃에서 45분간 가열되었다. 이 혼합물은 실온으로 냉각되었고, THF (20 mL)에 용해되었고, n-Bu_4NF (362 mg, 1.2 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-(2-니트로벤질옥시)메틸-2'-데옥시우리딘 40 (Litosh *et al.*, 2011, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) (95 mg, 53%)가 획득되었다. *^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 8.45 (br s, 1 H, NH), 8.05 (s, 1 H, H-6), 8.02 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Ph-H), 7.80 (d, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 7.69 (t, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 7.43 (t, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 6.21 (t, 1 H, J = 6.0 Hz, H-1'), 4.94 (dd, J = 14.4 Hz, 2 H, Ph-CH_2), 4.66 (m, 1 H, H-3'), 4.35 (s, 2 H, 5-CH_2), 3.95 (m, 3 H, H-4'및 H-5'), 2.42 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b).

[0534] 화합물 **40** (Litosh *et al.*, 2011, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) (70 mg, 0.18 mmol)의 무수 DMF (2.0 mL) 용액에 TBSCl (60 mg, 0.40 mmol) 및 이미다졸 (54 mg, 0.80 mmol)이 추가되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에서 실온에서 하룻밤 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (30 mL)로 세척되었다. 유기 상 및 수성 상들이 분리되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (20 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4로 건조되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-5-(2-니트로벤질옥시)-메틸-2'-데옥시우리딘 **41** (90 mg, 80%)가 획득되었다. *^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 8.04 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Ph-H), 7.98 (br s, 1 H, NH), 7.80 (d, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 7.74 (s, 1 H, H-6), 7.64 (q, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 7.44 (t, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 6.21 (q, 1 H, J = 6.0 Hz, H-1'), 4.95 (s, 2 H, Ph-CH_2), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.34 (dd, 2 H, J = 11.6 Hz, 5-CH_2), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.79 (m, 2 H, H-5'), 2.29 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 0.89 (2 s, 18 H, $C(CH_3)_3$), 0.08 (4 s, 12 H, CH_3).

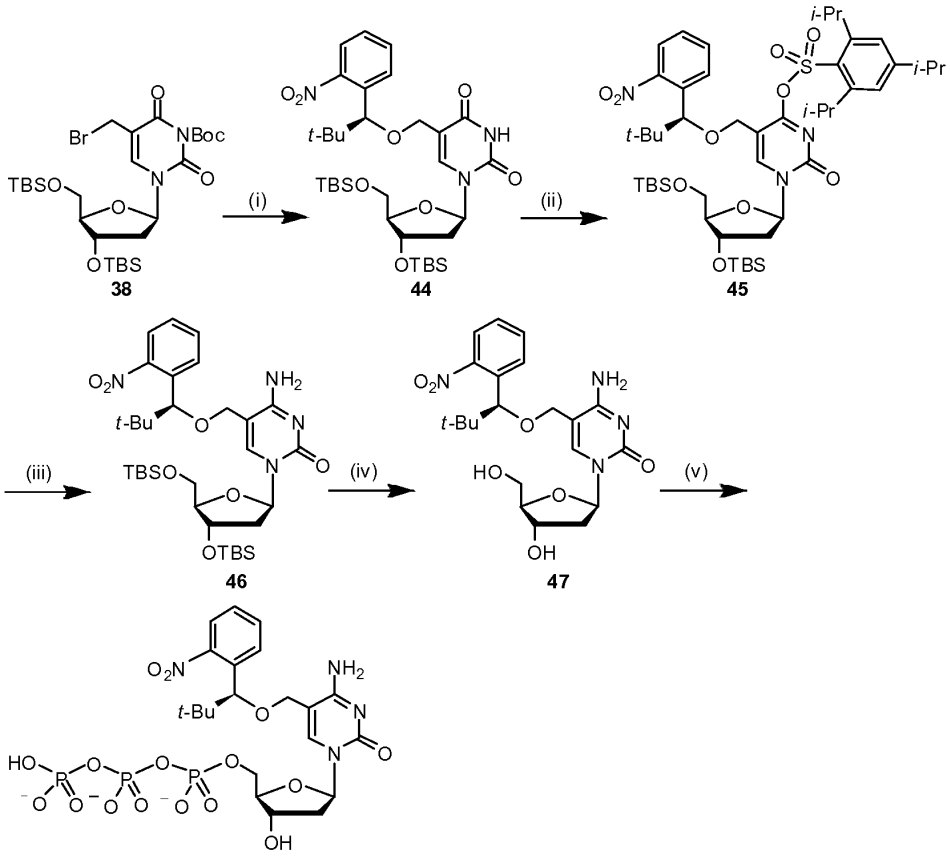
[0535] 2,4,6-트리이소프로필 벤젠술포닐 클로라이드 (176 mg, 0.59 mmol)가 화합물 **41** (85 mg, 0.14 mmol), DMAP (19 mg, 0.16 mmol), 및트리에틸아민 (0.18 mL, 1.3 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 실온에서 하룻밤동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 NH_3 의 1,4-디옥산 (0.5 M, 15 mL) 용액에 용해되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고, 90℃에서 하룻밤 동안 가열되었다. 이 혼합물은 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2 (30 mL)에 용해되었고, 염수 (30 mL)로 세척되었다. 유기 상 및 수성 상은 분리되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (30 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-5-(2-니트로벤질옥시)메틸-2'-데옥시시티딘 **42** (60 mg, 2단계 동안 69%)가 획득되었다. ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Ph-H), 7.81 (s, 1 H, H-6), 7.65 (m, 2 H, Ph-H), 7.64 (q, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 7.49 (m, 1 H, Ph-H), 6.29 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.75 (br s, 1 H, NH_2), 4.85 (dd, 2 H, J = 13.6 Hz, Ph-CH_2), 4.41 (s, 2 H, 5-CH_2), 4.34 (m, 1 H, H-3'), 3.95 (m, 1 H, H-4'), 3.89 (dd, 1 H, J = 2.8 Hz, H-5'a), 3.76 (dd, 1 H, J = 2.8 Hz, H-5'b), 2.46 (m, 1 H, H-2'a), 1.98 (m, 1 H, H-2'b), 0.92 및 0.89 (2 s, 18 H, $C(CH_3)_3$), 0.11-0.08 (4 s, 12 H, CH_3).

[0536] 화합물 **42** (55 mg, 0.09 mmol)의 THF (10 mL) 용액에 n-Bu_4NF (63 mg, 0.20 mmol)이 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-(2-니트로벤질옥시)메틸-2'-데옥시시티딘 **43** (34 mg, 96%)이 획득되었다. *^1H NMR (400 MHz, $DMSO$-d_6)*: δ 8.05 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, Ph-H), 7.89 (s, 1 H, H-6), 7.74 (m, 2 H, Ph-H), 7.55 (m, 1 H, Ph-H), 7.39 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH_2), 6.74 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH_2), 6.12 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.21 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 4.99 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.81 (s, 2 H, Ph-CH_2), 4.30 (dd, 2 H, J = 11.6 Hz, 5-CH_2), 4.20 (m, 1 H, H-3'), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 3.55

(m, 2 H, H-5'), 2.11 (m, 1 H, H-2'a), 1.95 (m, 1 H, H-2'b).

[0537] 화합물 **43** (32 mg, 0.081 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 3시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (30 μL, 0.32 mmol) 및 프로톤 스폰지 (35 mg, 0.16 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 5-(2-니트로벤질옥시)메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 **dC.I**가 획득되었고, 이는 RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{17}H_{22}N_4O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 631.0244이었고, 관찰된 질량은 631.0258이었다.

[0538] *5-[(S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트*



[0539]

[0540] **계획 S21. 5-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) (*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃, 21%; (ii) 2,4,6-트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드, DMAP, Et_3N, CH_2Cl_2, 실온, 31%; (iii) NH_3, 1,4-디옥산, 90℃, 91%; (iv) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 82%; (v) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0541] 화합물 **38** (Litosh *et al.*, 2011, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) (520 mg, 0.80 mmol) 및 (*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (580 mg, 2.8 mmol)는 질소 대기하에 110℃에서 1시간 동안 가열되었다. 이 혼합물은 실온으로 냉각되었고, 최소량의 에틸 아세테이트에 용해되었고, 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸시메틸실일)-5-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘 44 (115 mg, 21%)가 획득되었다. (3' 또는 5')-O-(*tert*-부틸시메틸실일)-5-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘 (78 mg, 17%) 및 5-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘 (16 mg, 4%) 또한 이 반응으로부터 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 8.97 (s, 1

H, NH), 7.76 (d, 2 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 7.60 (m, 2 H, Ph-H 및 H-6), 7.41 (s, 1 H, Ph-H), 6.29 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 7.6 Hz, H-1'), 4.97 (s 1 H, Ph-CH), 4.42 (m, 1 H, H-3'), 4.28 (AB d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 5-CH_2a), 4.06 (AB d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 5-CH_2b), 3.92 (m, 1 H, H-4'), 3.76 (m, 2 H, H-5'), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 0.95 (s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.90 (s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.83 (s, 9 H, $(CH_3)_3$C), 0.12 (s, 3 H, CH_3Si), 0.09 (s, 3 H, CH_3Si), 0.07 (s, 3 H, CH_3Si), 0.06 (s, 3 H, CH_3Si).

[0542] 2,4,6-트리이소프로필 벤젠술포닐 클로라이드 (61 mg, 0.20 mmol)는 화합물 **44** (110 mg, 0.16 mmol), DMAP (20 mg, 0.17 mmol), 및 트리에틸아민 (63 μL, 0.45 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (3.0 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 실온에서 36시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸시메틸실일)-5-[(S)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-O^4-(2,4,6-트리이소프로필벤젠술포닐)-2'-데옥시우리딘 45 (47 mg, 31%)가 획득되었다. ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.08 (s, 1 H, H-6), 7.80 (dd, 1 H, *J* = 1.2 및 8.0 Hz, Ph-H), 7.78 (dd, 1 H, *J* = 1.6 및 8.0 Hz, Ph-H), 7.67 (m, 1 H, Ph-H), 7.46 (m, 1 H, Ph-H), 7.20 (s, 2 H, Ph-H), 6.09 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 4.98 (s, 1 H, Ph-CH), 4.35 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (AB d, 1 H, *J* = 11.6 Hz, 5-CH_2a), 4.11 (AB d, 1 H, *J* = 11.6 Hz, 5-CH_2b), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.79 (dd, 1 H, *J* = 3.6 및 11.6 Hz, H-5'a), 3.74 (dd, 1 H, *J* = 11.6 및 3.6 Hz, H-5'b), 2.90 (m, 1 H, CH), 2.50 (m, 2 H, H-2'), 1.98 (m, 2 H, CH), 1.31 - 1.22 (m, 18 H, $(CH_3)_2$CH x 3), 0.88 (2 s, 18 H, $(CH_3)_3$CSi x 2), 0.87 (s, 9 H, $(CH_3)_3$C), 0.07 (s, 6 H, $(CH_3)_2$Si), 0.06 (s, 6 H, $(CH_3)_2$Si).

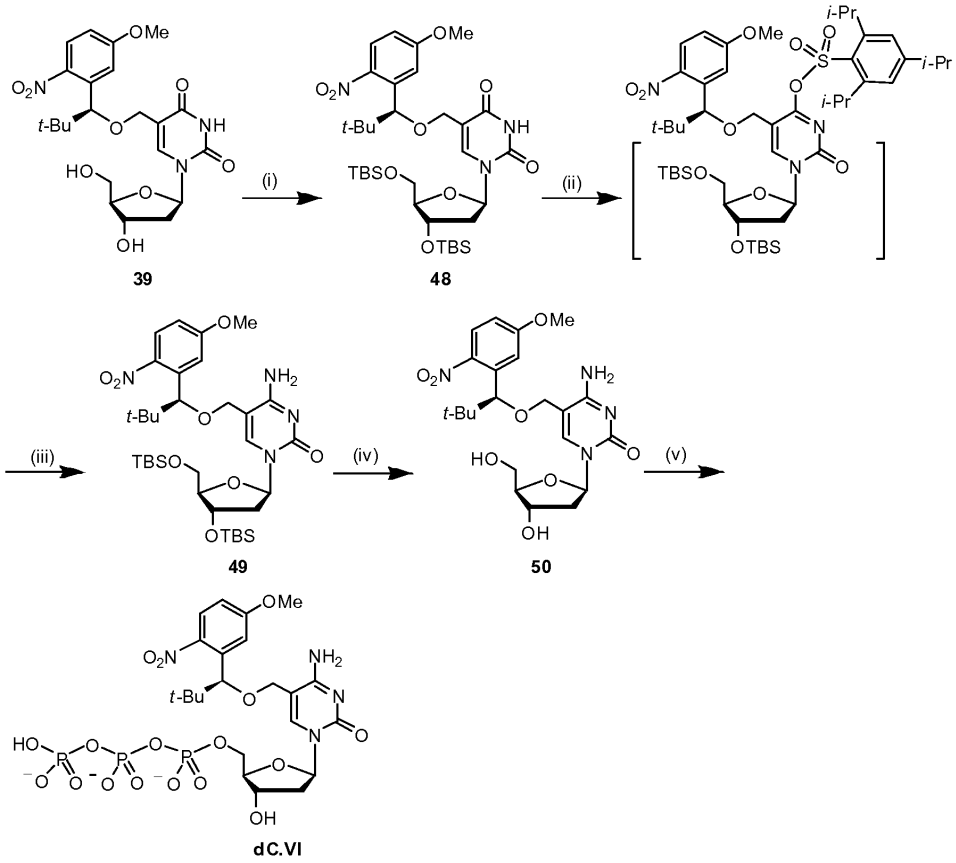
[0543] NH_3 의 1,4-디옥산 (0.5 M, 2.0 mL) 용액은 화합물 **45** (47 mg, 0.05 mmol)의 무수 1,4-디옥산 (2.0 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고 90℃에서 10시간 동안 가열되었다. 이 혼합물은 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되며 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-5-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]-메틸-2'-데옥시시티딘 **46** (31 mg, 91%)가 획득되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.67 (m, 3 H, Ph-H), 7.53 (s, 1 H, H-6), 7.45 (m, 1 H, Ph-H), 6.30 (t, 1 H, *J* = 6.6 Hz, H-1'), 5.72 (br s, 2 H, NH_2), 4.88 (s, 1 H, Ph-CH), 4.32 (m, 1 H, H-3'), 4.28 (AB d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 5-CH_2a), 4.08 (AB d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 5-CH_2b), 3.87 (m, 1 H, H-4'), 3.74 (dd, 1 H, *J* = 3.6 및 14.8 Hz, H-5'a), 3.66 (dd, 1 H, *J* = 3.6 및 11.3 Hz, H-5'b), 2.41 (m, 1 H, H-2'a), 2.03 (m, 1 H, H-2'b), 0.90 (s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.87 (s, 9 H, $(CH_3)_3$CSi), 0.83 (s, 9 H, C$(CH_3)_3$), 0.09 (2 s, 6 H, $(CH_3)_2$Si), 0.06 (2 s, 6 H, $(CH_3)_2$Si).

[0544] *n*-Bu_4NF (28 mg, 0.09 mmol)의 THF (1.0 mL) 용액은 화합물 **46** (20 mg, 0.03 mmol)의 THF (2.0 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 30분간 교반되었고, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘 **47** (11 mg, 82%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD)*: δ 7.87 (s, 1 H, H-6), 7.82 (dd, 1 H, *J* = 1.2 및 8.4 Hz, Ph-H), 7.76 (dd, 1 H, *J* = 1.6 및 8.0 Hz, Ph-H), 7.68 (m, 1 H, Ph-H), 7.51 (m, 1 H, Ph-H), 6.23 (t, 1 H, *J* = 6.6 Hz, H-1'), 4.94 (s, 1 H, Ph-CH), 4.44 (AB d, 1 H, *J* = 13.2 Hz, 5-CH_2a), 4.34 (m, 1 H, H-3'), 4.11 (AB d, 1 H, *J* = 13.2 Hz, 5-CH_2b), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.71 (dd, 1 H, *J* = 3.2 및 12.0 Hz, H-5'a), 3.63 (dd, 1 H, *J* = 4.0 및 12.0 Hz, H-5'b), 2.35 (m, 1 H, H-2'a), 2.14 (m, 1 H, H-2'b), 0.80 (s, 9 H, C$(CH_3)_3$).

[0545] 화합물 **47** (11 mg, 0.025 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 3시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.3 mL)에서 $POCl_3$ (7 μL, 0.075 mmol) 및 프로톤 스폰지 (11 mg, 0.05 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (59 mg, 0.125 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (30 μL)의 무수 DMF (0.25 mL) 용액이 추가되었다. 교반 5분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 5.0 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그 다음 동결건조되었다. 잔유물은 물 (5.0 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어

5-[(*S*)-1-(2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 **dC.V**가 획득되었고, RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{21}H_{30}N_4O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 687.0870이었고, 관찰된 질량은 687.0873이었다.

[0546] *5-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트*



[0547]

[0548] **계획 S22. 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 70%; (ii) 2,4,6-트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드, DMAP, Et_3N, CH_2Cl_2, 실온; (iii) NH_3, 1,4-디옥산, 90℃, 2단계에서 65%; (iv) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 82%; (v) $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$.

[0549] 화합물 39 (235 mg, 0.49 mmol)의 무수 DMF (3.0 mL) 용액에 TBSCl (320 mg, 0.8 mmol) 및 이미다졸 (109 mg, 1.6 mmol)이 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 6시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 그리고 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (50 mL)으로 세척되었다. 유기 상 및 수성 상은 분리되었고, 그리고 수성 상은 CH_2Cl_2 (30mL)으로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4로 건조되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘 **48** (245 mg, 70%)에 의해 정제되었다. *^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)*: δ 8.00 (br s, 1 H, NH), 7.88 (d, *J* = 9.2 Hz, 1 H, Ph-H), 7.60 (s, 1 H, H-6), 7.22 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.84 (dd, 1 H, *J* = 2.8 및 8.0 Hz, Ph-H), 6.25 (dd, 1 H, *J* = 5.6 및 8.0 Hz, H-1'), 5.23 (s, 1 H, Ph-CH), 4.40 (m, 1 H, H-3'), 4.26(d, 1 H, *J* = 12 Hz, 5-CH_2a), 4.11 (d, 1 H, *J* = 12 Hz,5-CH_2b), 3.89 (m, 4 H, OCH_3 및 H-4'), 3.78 (m, 2 H, H-5'), 2.27 (m, 1 H, H-2'a), 2.04 (m, 1 H, H-2'b), 0.90 및 88 (2 s, 18 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.84 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 0.08 (3 s, 12 H, CH_3).

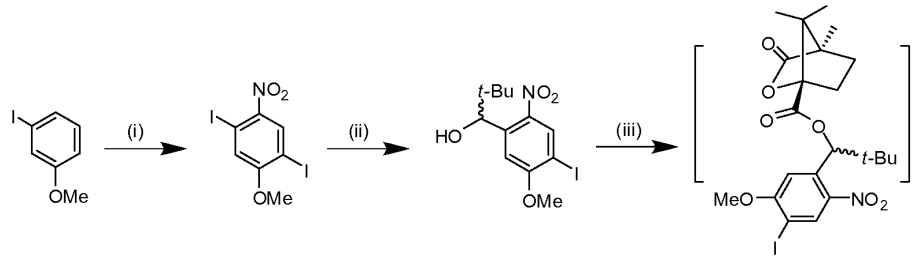
[0550] 2,4,6-트리이소프로필 벤젠술포닐 클로라이드 (363 mg, 1.2 mmol)는 화합물 **48** (170 mg, 0.24 mmol), DMAP (32 mg, 0.26 mmol), 및 트리에틸아민 (0.34 mL, 2.4 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (8.0 mL) 용액에 첨가되었다. 이 혼합물

은 질소 대기하에 실온에서 하룻밤동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 NH_3 의 1,4-디옥산 (0.5 M, 20 mL) 용액에 용해되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고, 90℃에서 하룻밤 동안 가열되었다. 이 혼합물은 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2 (20 mL)에 용해되었고, 그리고 염수 (50 mL)로 세척되었다. 유기 상 및 수성 상은 분리되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2 (30 mL)로 3회 세척되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-5-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘 **49** (110 mg, 2단계의 경우 65%)이 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 7.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, Ph-H), 7.50 (br s, 1 H, NH_2), 7.38 (s, 1 H, H-6), 7.08 (dd, 1 H, *J* = 2.8 및 8.8 Hz, Ph-H), 7.04 (d, 1 H, *J* = 2.8 Hz, Ph-H), 6.80 (br s, 1 H, NH_2), 6.13 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.09 (s, 1 H, Ph-CH), 4.31 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 5-CH_2a), 4.08 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 5-CH_2b), 3.87(s, 3 H, OCH_3), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 3.64 (m, 2 H, H-5'), 3.76 (dd, 1 H, *J* = 2.8 Hz, H-5'b), 2.10 (m, 1 H, H-2'a), 2.00 (m, 1 H, H-2'b), 0.87 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 0.78 및 0.76 (2 s, 18 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.07, 0.06, -0.01, 및 -0.04 (4 s, 12 H, $SiCH_3$).

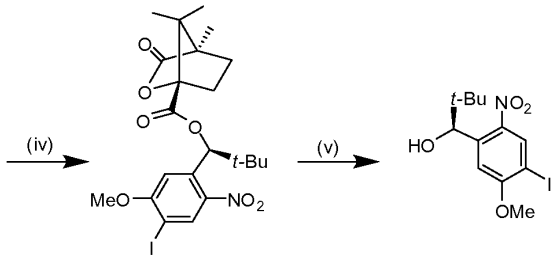
[0551] 화합물 **49** (130 mg, 0.18 mmol)의 THF (10 mL) 용액에 *n*-Bu_4NF (141 mg, 0.44 mmol)가 첨가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-[(S)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘 **50** (72 mg, 82%)이 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)*: δ 7.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, Ph-H), 7.65 (s, 1 H, H-6), 7.42 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH_2a), 7.06 (m, 2 H, Ph-H), 6.72 (br s, 1 H, D_2O 교환가능한, NH_2b), 6.11 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.17 (d, 1 H, D_2O 교환가능한, 3'-OH), 5.12 (s, 1 H, Ph-CH), 4.78 (t, 1 H, D_2O 교환가능한, 5'-OH), 4.25 (d, 1 H, *J* = 12.4 Hz, 5-CH_2a), 4.15 (m, 1 H, H-3'), 4.05 (d, 1 H, J = 12.4 Hz, 5-CH_2b), 3.87(s, 3 H, OCH_3), 3.72 (m, 1 H, H-4'), 3.44 (m, 2 H, H-5'), 3.76 (dd, 1 H, J = 2.8 Hz, H-5'b), 2.08 (m, 1 H, H-2'a), 1.95 (m, 1 H, H-2'b), 0.77 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0552] 화합물 **50** (20 mg, 0.043 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 6시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.3 mL)에서 $POCl_3$ (24 μL, 0.26 mmol) 및 프로톤 스폰지 (19 mg, 0.086 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고, 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 20% 수성 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되어 5-[(*S*)-1-(5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 **dC.VI**가 획득되었고, 이는 RP-HPLC를 이용하여 추가 정제되었다. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{22}H_{32}N_4O_{17}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 719.0975이었고, 관찰된 질량은 719.0983이었다.

[0553] **실시예 7 -(*R/S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 및 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성**



3-iodoanisole | 3,6-diiodo-4-nitroanisole | (*R*/*S*)- 1-(4-iodo-5-methoxy-2-nitrophenyl)-2,2-dimethyl-1-propanol | (*R*/*S*)-1-(4-iodo-5-methoxy-2-nitrophenyl)-2,2-dimethyl-1-propyl (1*S*)-camphanate



(*S*)-1-(4-iodo-5-methoxy-2-nitrophenyl)-2,2-dimethyl-1-propyl (1*S*)-camphanate | (*S*)-1-(4-iodo-5-methoxy-2-nitrophenyl)-2,2-dimethyl-1-propanol

[0554]

[0555] **계획 S23. (*R*/*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 및 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성.** (i) $NaNO_2$, CH_3COOH, HNO_3, 실온; I_2, 60 ℃, 2단계에서 25%(80% 순도); (ii) PhMgCl, $(CH_3)_3CCHO$, THF, 마이너스 40℃ 내지 실온, 72%; (iii) (1*S*)-캠파닌산 클로라이드, DMAP, CH_2Cl_2, 실온, 80%; (iii) 에탄올, 63%로부터 분별 결정화; (iv) K_2CO_3, MeOH, 역류.

[0556] 질산 (68-70%, 125 mL)은 실온에서 얼음 아세트산 (125 ml)과 혼합하였고, $NaNO_2$ (400 mg, 5.8 mmol) 및 3-요오드아니솔 (10 g, 42.7 mmol)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 24시간 동안 교반된 뒤, I_2(10.8 g, 42.7 mmol)가 추가되었고, 이 혼합물은 60℃에서 하룻밤 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 얼음-물 (500 ml)에 붓고, CH_2Cl_2 (100 ml)로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (500 ml)로 중화되었고, $Na_2S_2O_3$ (20%, 100 ml)의 수성 용액으로 세척되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 그리고 진공에서 농축되었다. 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 정제안된 3,6-디요오드-4-니트로아니솔 (5.4 g)이 획득되며, 이는 하나의 미지의 부산물 (20%)과 혼합되었고, 추가 정제없이 다음 단계에 이용된다. ^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.42 (s, 1 H, Ph-H), 7.33 (s, 1 H, Ph-H), 3.97 (s, 3 H, OCH_3).

[0557] 마이너스 40℃에서 질소 대기하에서 정제안된 3,6-디요오드-4-니트로아니솔 (770 mg, 80% 순도, 1.52 mmol)의 무수 THF (10 mL) 용액에 페닐마그네슘 클로라이드 (THF에서 2M, 0.46 mL, 0.92 mmol) 이 온도가 마이너스 35℃을 넘지않는 속도로 점적되었다. 추가가 완료될 때, 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 2시간 동안 교반되었고, 트리메틸아세타알데히드 (0.22 mL, 1.97 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 마이너스 30℃에서 2시간 동안 교반되었고, 그리고 그 다음 실온에서 1시간 동안 교반되었다. 반응은 염수 (1.0 mL)로 퀸칭되었고, CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석되었고, 이 용액은 CH_3COOH (0.1 N, 50 ml) 및 염수 (50 ml)로 순차적으로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 라셈체 (R/S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (399 mg, 72%)이 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH_3), 2.12 (d, 1 H, J = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9H,$C(CH_3)_3$).

[0558] 라셈체 (*R*/*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (395 mg, 1.1 mmol) 및 DMAP (263 mg, 2.16 mmol)의 무수 CH_2Cl_2 (5.0 mL) 용액에 (1*S*)-캠파닌 클로라이드 (Corrie *et al.*, 1992, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) (350 mg, 1.62 mmol)이 추가되었고, 이 혼합물은 질소 대기하에 실온에서 하룻밤

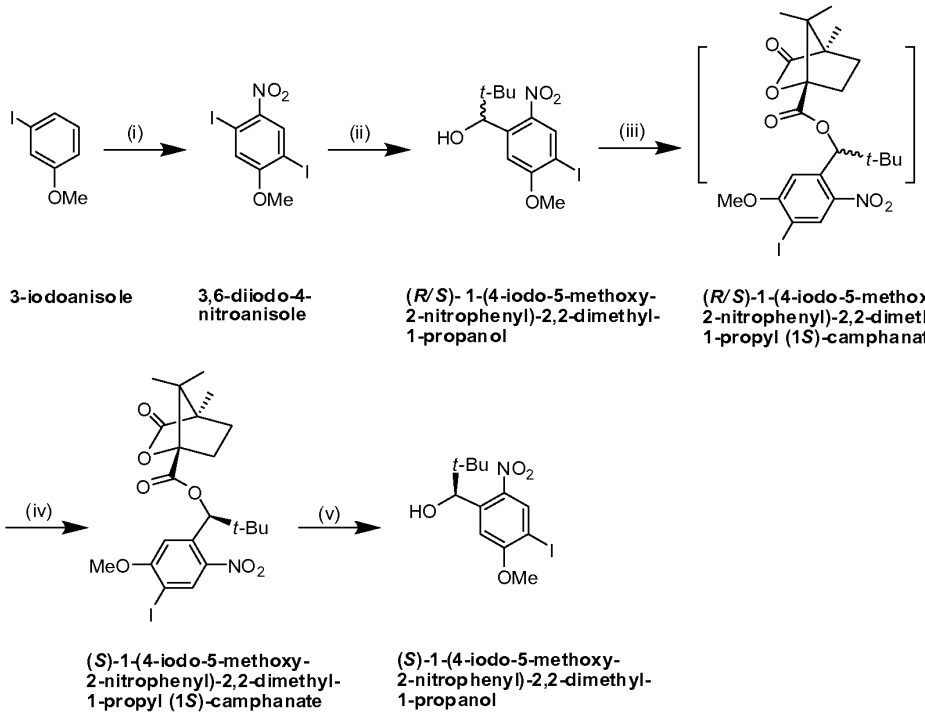
동안 교반되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (50 mL)으로 희석되었고, 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (50 mL)으로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 (*R/S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1S)-캠파네이트 (490 mg, 80%, 1:1 혼합물의 부분입체이성질체)가 획득되었다.

[0559] (*R/S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)캠파네이트 (3.4 g)는 끓는 에탄올 (150 ml)에 용해되었고, 이 용액은 따뜻한 오일조에 유지시키고, 서서히 실온으로 냉각되었고, 하룻밤 동안 방치되었다. 바늘 결정이 점진적으로 형성되었고, 여과에 의해 수집되면, 순수한 단일 부분입체이성질체 (*R*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트 (870 mg, 51%)가 획득되었다. 남아있는 모액은 진공에서 농축되며, 잔유물은 끓는 에탄올 (150 ml)에 다시 용해되었고, 이 용액은 신속하게 실온으로 냉각되었고, 그리고 바늘 결정들은 2시간 안에 형성되었다. 결정들이 여과에 의해 수집되면 순수 단일 부분입체이성질체 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트가 획득되었다. 결정화 과정이 2회 반복되어, 추가적으로 순수 (*S*)-부분입체이성질체 (총 1.07 g, 63 %)가 획득되었다. (*R*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트의 ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.94 (s, 1 H, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, Ph-CH), 3.93 (s, 3 H, OCH_3), 2.42 (m, 1 H, CH), 2.11 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 1 H, CH_2), 1.75 (m, 1 H, CH_2), 1.11 (s, 3 H, CH_3), 1.05 (s, 3 H, CH_3), 0.97 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 0.86 (s, 3 H, CH_3). (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트의 ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.95 (s, 1 H, Ph-H), 6.80 (s, 1 H, Ph-CH), 3.96 (s, 3 H, OCH_3), 2.37 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 2 H, CH_2), 1.66 (m, 1 H, CH), 1.14 (s, 3 H, CH_3), 1.07 (s, 3 H, CH_3), 1.06 (s, 3 H, CH_3), 0.98 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0560] (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트 (1.1 g, 2.0 mmol) 및 K_2CO_3 (552 mg, 4.0 mmol)의 메탄올 (50 mL) 혼합물은 1시간 동안 역류되도록 가열되었고, 그 다음 냉각되었고, 진공에서 농축되며, 그리고 CH_2Cl_2 (50 mL)로 희석되었다. 유기 상은 염수 (50 mL)로 세척되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 거울상순수(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (720 mg, 98%)이 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH_3), 2.12 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9H,$C(CH_3)_3$).

[0561] **실시예 8 - 염료-라벨된 tBu-5-OMe-2-니트로벤질 알킬화된 히드록시메틸 뉴클레오티드들 합성**

[0562] *(R/S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 및 (S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성*



[0563]

[0564] **계획 S24. (*R/S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 및 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올의 합성.** (i) $NaNO_2$, CH_3COOH, HNO_3, 실온; I_2, 60 ℃, 2단계에서 25%(80% 순수); (ii) PhMgCl, $(CH_3)_3CCHO$, THF, 마이너스 40℃ 내지 실온, 72%; (iii) (1*S*)-캠파닌산 클로라이드, DMAP, CH_2Cl_2, 실온, 80%; (iii) 에탄올, 63%로부터 분별 결정화; (iv) K_2CO_3, MeOH, 역류, 98%.

[0565] 질산 (68-70%, 125 mL)은 실온에서 얼음 아세트산 (125 ml)과 혼합하였고, $NaNO_2$ (400 mg, 5.8 mmol) 및 3-요오드아니솔 (10 g, 42.7 mmol)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 24시간 동안 교반된 뒤, I_2(10.8 g, 42.7 mmol)가 추가되었고, 이 혼합물은 60℃에서 하룻밤 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 얼음-물 (500 ml)에 붓고, CH_2Cl_2 (100 ml)로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (500 ml)로 중화되었고, $Na_2S_2O_3$ (20%, 100 ml)의 수성 용액으로 세척되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 그리고 진공에서 농축되었다. 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 정제안된 3,6-디요오드-4-니트로아니솔 (5.4 g)이 획득되었고, 이는 하나의 미지의 부산물 (20%)과 혼합되며, 추가 정제없이 다음 단계에 이용된다. ^{1}*HNMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.42 (s, 1 H, Ph-H), 7.33 (s, 1 H, Ph-H), 3.97 (s, 3 H, OCH_3).

[0566] 마이너스 40℃에서 질소 대기하에서 정제안된 3,6-디요오드-4-니트로아니솔 (770 mg, 80% 순도, 1.52 mmol)의 무수 THF (10 mL) 용액에 페닐마그네슘 클로라이드 (THF에서 2M, 0.46 mL, 0.92 mmol) 이 온도가 마이너스 35℃을 넘지않는 속도로 점적되었다. 추가가 완료될 때, 이 혼합물은 마이너스 40℃에서 2시간 동안 교반되었고, 트리메틸아세타알데히드 (0.22 mL, 1.97 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 마이너스 30℃에서 2시간 동안 교반되었고, 그리고 그 다음 실온에서 1시간 동안 교반되었다. 반응은 염수 (1.0 mL)로 퀀칭되었고, CH_2Cl_2 (100 mL)로 희석되었고, 이 용액은 CH_3COOH (0.1 N, 50 ml) 및 염수 (50 ml)로 순차적으로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 라셈체 (R/S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (399 mg, 72%)이 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH_3), 2.12 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9H,$C(CH_3)_3$).

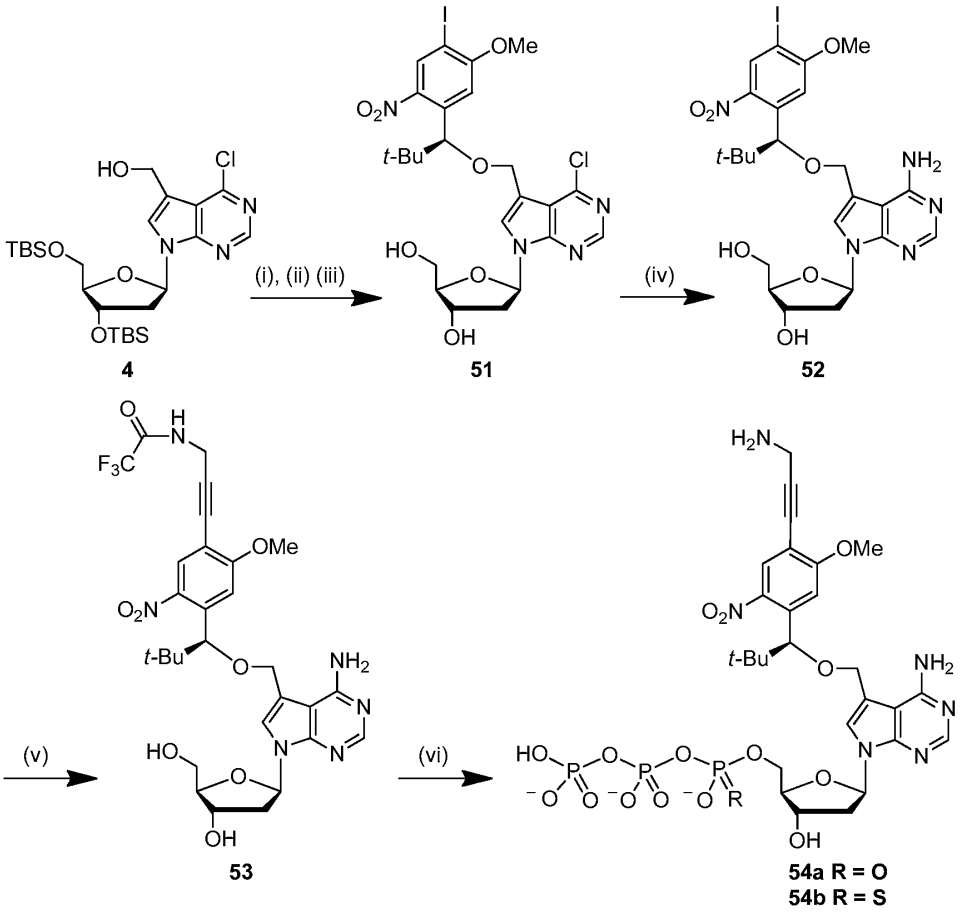
[0567] 라셈체 (*R/S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (395 mg, 1.1 mmol) 및 DMAP (263 mg, 2.16 mmol)의 무수 CH_2Cl_2(5.0 mL) 용액에 (1*S*)-캠파닌 클로라이드 (Corrie *et al.*, 1992, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다) (350 mg, 1.62 mmol)가 추가되었고, 이 혼합물은 질소 대기에서 실온에서 하룻밤

동안 교반되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2(50 mL)으로 희석되었고, 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (50 mL)으로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 (*R/S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트 (490 mg, 80%, 1:1 혼합물의 부분입체이성질체)가 획득되었다.

[0568] (*R/S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)캠파네이트 (3.4 g)는 끓는 에탄올 (150 ml)에 용해되었고, 이 용액은 따뜻한 오일조에 유지시키고, 서서히 실온으로 냉각되었고, 하룻밤 동안 방치되었다. 바늘 결정이 점진적으로 형성되었고, 여과에 의해 수집되면, 순수한 단일 부분입체이성질체 (*R*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트 (870 mg, 51%)가 획득되었다. 남아있는 모액은 진공에서 농축되며, 잔유물은 끓는 에탄올 (150 ml)에 다시 용해되었고, 이 용액은 신속하게 실온으로 냉각되었고, 그리고 바늘 결정들은 2시간 안에 형성되었다. 결정들이 여과에 의해 수집되면 순수 단일 부분입체이성질체 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트가 획득되었다. 결정화 과정이 2회 반복되어, 추가적으로 순수 (*S*)-부분입체이성질체 (총 1.07 g, 63 %)가 획득되었다. (*R*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트의 ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.94 (s, 1 H, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, Ph-CH), 3.93 (s, 3 H, OCH_3), 2.42 (m, 1 H, CH), 2.11 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 1 H, CH_2), 1.75 (m, 1 H, CH_2), 1.11 (s, 3 H, CH_3), 1.05 (s, 3 H, CH_3), 0.97 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 0.86 (s, 3 H, CH_3). (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트의 ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.48 (s, 1 H, Ph-H), 6.95 (s, 1 H, Ph-H), 6.80 (s, 1 H, Ph-CH), 3.96 (s, 3 H, OCH_3), 2.37 (m, 1 H, CH), 1.92 (m, 2 H, CH_2), 1.66 (m, 1 H, CH), 1.14 (s, 3 H, CH_3), 1.07 (s, 3 H, CH_3), 1.06 (s, 3 H, CH_3), 0.98 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

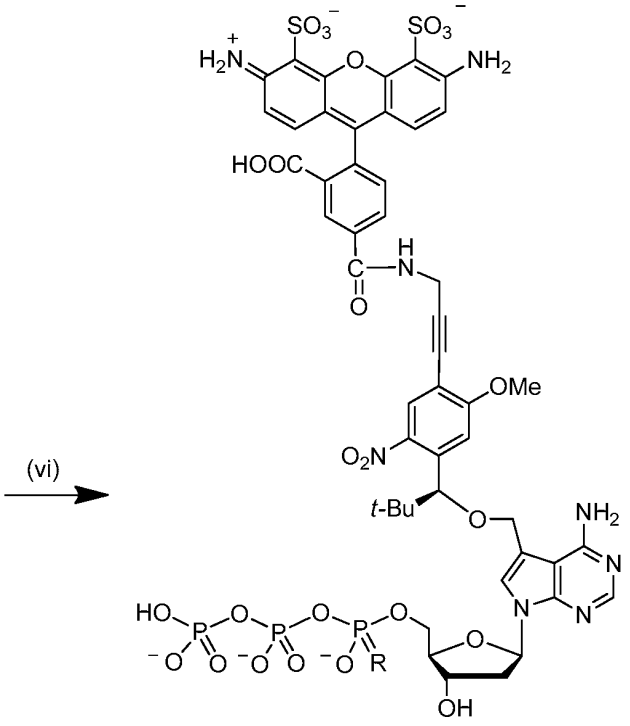
[0569] (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로필 (1*S*)-캠파네이트 (1.1 g, 2.0 mmol) 및 K_2CO_3 (552 mg, 4.0 mmol)의 메탄올 (50 mL) 혼합물은 1시간 동안 역류되도록 가열되었고, 그 다음 냉각되었고, 진공에서 농축되며, 그리고 CH_2Cl_2(50 mL)로 희석되었다. 유기 상은 염수 (50 mL)로 세척되었고, Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 거울상순수(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (720 mg, 98%)이 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 5.60 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, PhCH), 3.98 (s, 3 H, OCH_3), 2.12 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, OH), 0.89 (s, 9H,$C(CH_3)_3$).

[0570] *염료 라벨된 7-{(S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 및 5'-α-티오트리포스페이트의 합성*



[0571]

[0572] **계획 S25a. 염료 라벨된 7-{(S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 및 5'-α-티오트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, (ii) (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃; (iii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온; 3단계에서 29%; (iv) NH_3, 1,4-디옥산/MeOH, 100℃, 80%; (v) N-프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF, 98%; (vi) For 54a: $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH. 54b의 경우: $PSCl_3$, 2,4,6-콜리딘, $(EtO)_3PO$, 0℃ 내지 실온; ((*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH.



55a R = O
55b R = S

[0573]

[0574] **계획 S25b. (vi) Alexa Fluor 488 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).**

[0575] DMAP (463 mg, 3.80 mmol) 및 MsCl (177 μL, 2.28 mmol)는 질소 대기하에 0℃에서 화합물 **4** (400 mg, 0.76 mmol)의 무수 CH_2Cl_2(5.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 0℃에서 10분간 교반되었고, 실온에서 3시간 동안 교반되었다. 그 다음 반응물은 CH_2Cl_2(20 mL)로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (용적 비율 80/20/0.5)로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 잔유물은 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (500 mg, 1.37 mmol)과 함께 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 115℃에서 45 분간 가열되었고, 실온으로 냉각되었고 그리고 THF (10 mL)에 용해되었다. *n*-Bu_4NF (526 mg, 1.67 mmol)가 추가되었고, 이 혼합물은 실온에서 12시간 동안 교반되었고, 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2(50 mL)에 용해되었고, 염수 (50 mL)로 세척되었고, 그리고 수성 상은 CH_2Cl_2(20 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 6-클로로-9-(β-D-2'-데옥시리보푸라노실)-7-[(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]-메틸-7-데아자퓨린 **51** (135 mg, 3단계에서 29%)이 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.56 (s, 1 H, H-2), 8.21 (s, 1 H, Ph-H), 7.34 (s, 1 H, H-8), 7.02 (s, 1 H, Ph-H), 6.35 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 8.8 Hz, H-1'), 5.20 (s, 1 H, Ph-CH), 4.76 (dd, 2 H, *J* = 12.4 및 36.4 Hz, 7-CH_2), 4.74 (m, 1 H, H-3'), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.96 (m, 1 H, H-5'a), 3.92 (s, 3 H, OCH_3), 3.80 (m, 1 H, H-5'b), 2.85 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 0.83 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0576] 화합물 **51** (135 mg, 0.22 mmol)은 1,4-디옥산 (10 mL)에 용해되었고, NH_3 의 MeOH (7 N, 20 mL)가 추가되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고 그리고 100℃에서 24시간 동안 교반되었고, 그 다음 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **52** (110 mg, 80%)이 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.24 (s, 1 H, H-2), 8.22 (s, 1H, Ph-H), 6.96 (s, 1 H, Ph-H), 6.79 (s, 1 H, H-8), 6.14 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 7.6 Hz, H-1'), 5.21 (s, 1 H, Ph-CH), 4.74 (m, 1 H, H-3'), 4.56 (dd, 2H, *J* = 13.2 및 24.8 Hz, 7-CH_2), 4.17 (m, 1 H, H-4'), 3.93 (m, 1H, H-5'a), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.79 (m, 1H, H-5'b),

2.96 (m, 1 H, H-2'a), 2.21 (m, 1 H, H-2'b), 0.83 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0577] 화합물 **52** (183 mg, 0.29 mmol), N-프로파르길트리플루오로아세틸아미드 (435 mg, 2.9 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (66 mg, 0.057 mmol), CuI (21 mg, 0.11 mmol), 및 Et_3N (170 μL, 1.22 mmol)의 무수 DMF (4.0 mL) 용액은 50℃에서 24시간 동안 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며 그리고 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-{(*S*)-1-[5-메톡시-4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신 **53** (185 mg, 98%)이 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, MeOH-d$_4$)*: δ 8.06 (s, 1 H, H-2), 7.89 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, H-8), 7.15 (s, 1 H, Ph-H), 6.37 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 7.6 Hz, H-1'), 5.23 (s, 1 H, Ph-CH), 4.68 (d, 1 H, *J* = 12.8 Hz, 7-CH_2a), 4.49 (m, 1 H, H-3'), 4.34 (s, 2H, CH_2), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 3.70 (m, 2 H, H-5'), 2.59 (m, 1 H, H-2'a), 2.2.8 (m, 1 H, H-2'b), 0.85 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0578] 화합물 **53** (52 mg, 0.08 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 3시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.5 mL)에서 $POCl_3$ (14 μL, 0.15 mmol) 및 프로톤 스폰지 (34 mg, 0.16 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용하여 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고, 농축된 수산화암모늄 (10 mL, 27%)으로 실온에서 1시간 처리되어 7-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **54a**가 획득되었다, PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{27}H_{36}N_6O_{16}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 793.1401, 관찰된 질량은 793.1426이었다.

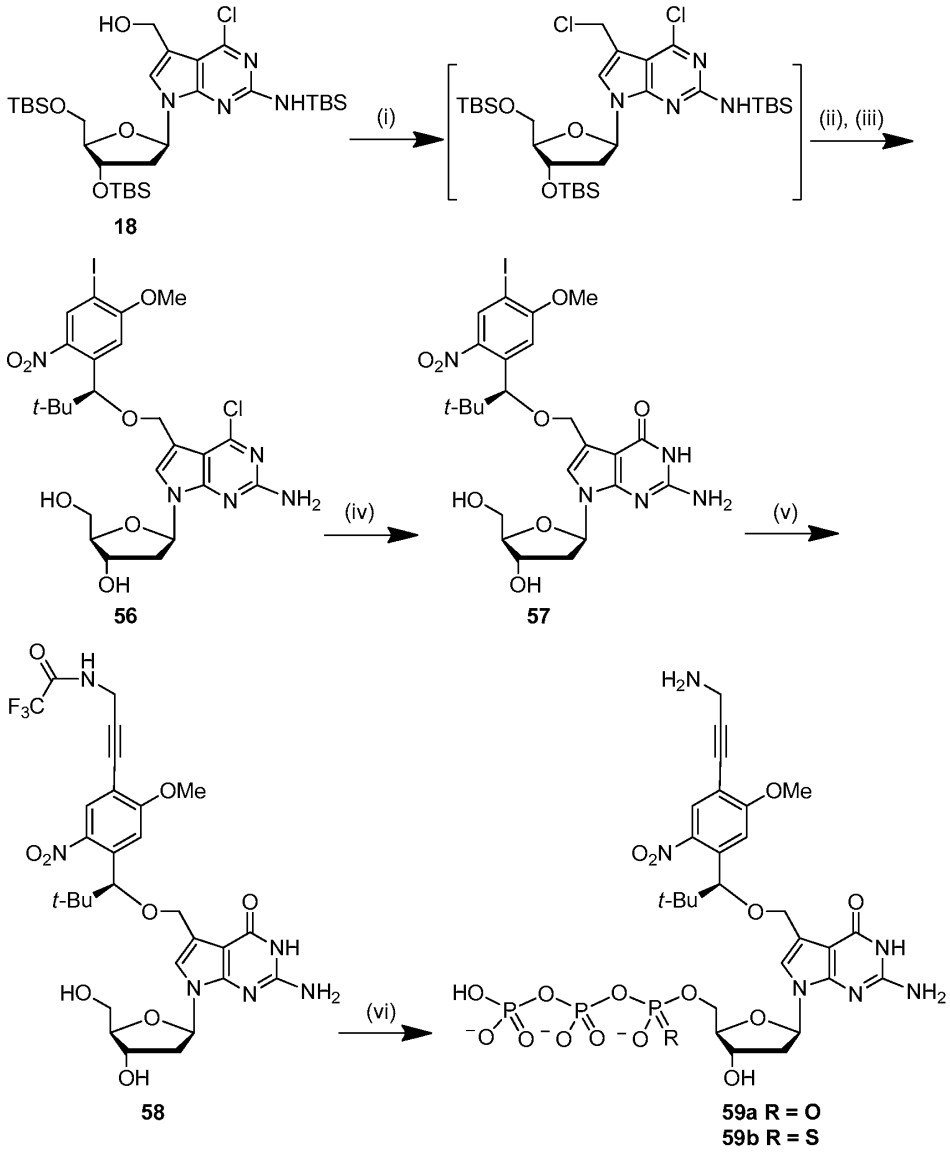
[0579] 화합물 **53** (91 mg, 0.14 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 1시간 동안 $PSCl_3$ (14 μL, 0.14 mmol) 및 2,4,6-콜리딘 (34 mg, 0.28 mmol)의 트리에틸포스페이트 (1.0 mL)로 티오포스포릴화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (332 mg, 0.7 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (140 μL)의 무수 DMF (1.4 mL) 용액이 추가되었다. 교반 2분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 용액 (TEAB, 1 M, pH 7.5; 20 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 티오트리포스페이트를 함유하는 분획물들이 복합되었고 그리고 동결건조되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고, 실온에서 1시간 동안 농축된 수산화 암모늄 (10 mL, 27%)으로 처리되어 7-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시아데노신-5'-α-티오트리포스페이트 **54b**가 획득되었고, 이것은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{27}H_{36}N_6O_{15}P_3S$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 809.1172이었고, 관찰된 질량은 809.1155이었다.

[0580] Alexa Fluor 488 NHS (5 mg, 7.8 μmol)의 무수 DMSO (200 μL) 용액은 트리포스페이트 **54a** (1.6 μmol)의 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.4 mL) 용액에 첨가되었다. 이 혼합물은 어두운 상태에서 1시간 동안 실온에 방치되었다. 이 혼합물은 우선 Dionex DNApac PA200 컬럼 (250 x 4 mm)에서 음이온 교환 HPLC에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 트리포스페이트 **55a**를 함유하는 분획물이 복합되었고 작은 용적으로 농축되었고, 그리고 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0581] Alexa Fluor 488 NHS (5 mg, 7.8 μmol)의 무수 DMSO (200 μL) 용액은 티오트리포스페이트 **54b** (4.1 μmol)의

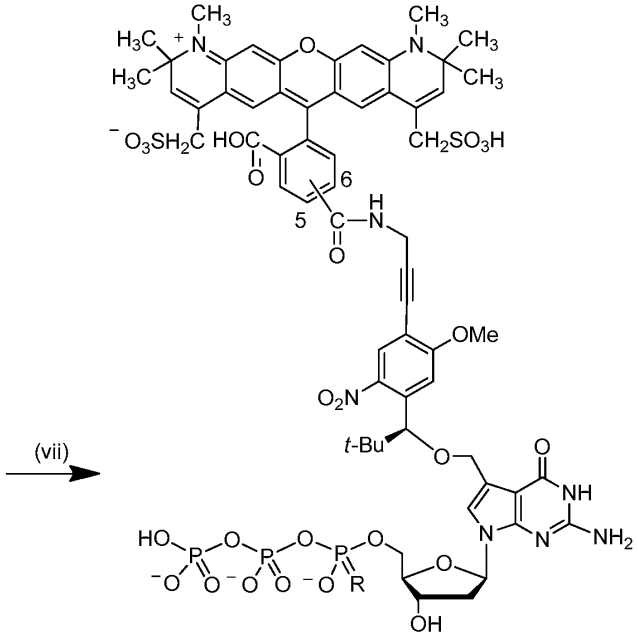
$NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 1.0 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 어두운 상태에서 1시간 동안 실온에 방치되었다. 이 혼합물은 우선 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 10 cm)을 이용하여 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 티오트리포스페이트 **55b**를 함유하는 분획물은 복합되었고 그리고 동결건조되었고, 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0582] *염료 라벨된 7-{(S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트및 5'-α-티오트리포스페이트의 합성*



[0583]

[0584] **계획 S26a. 염료 라벨된 7-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 및 5'-α-티오트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) MsCl, DMAP, CH_2Cl_2, 0℃; (ii) (S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 115℃; (iii) *n*-Bu_4NF, THF, 실온; 3단계에서 18%; (iv) syn-피리딘-2-알독심, 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘, 1,4-디옥산/DMF, 70℃, 72%; (v) N-프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF, 96%; (vi) For 59a: $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-$Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH. 59b의 경우: $PSCl_3$, 2,4,6-콜리딘, $(EtO)_3PO$, 0℃ 내지 실온; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-$Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH.



[0585]

[0586] **계획 S26b. (vii) Alexa Fluor 594 NHS, 0.1 M Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).**

[0587] DMAP (502 mg, 4.1 mmol) 및 MsCl (238 μL, 3.1 mmol)은 질소하에 0℃에서 화합물 **18** (680 mg, 1.0 mmol)의 무수 CH_2Cl_2(6.0 mL) 용액에 추가되었다. 반응물은 0℃에서 10 분간 교반되었고, 그리고 그 다음 CH_2Cl_2(20 mL)으로 희석되었다. 이 용액은 짧은 실리카 겔 플러그 (2 x 3 cm)에 제공되었고, 헥산/에틸 아세테이트/트리에틸아민 용매 시스템 (80 mL, 용적 비율 80/20/0.5)로 신속하게 용리되었다. 용리제는 진공에서 농축되며, 잔유물은 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (500 mg, 2.1 mmol)과 혼합되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 115℃에서 45분간 가열되었고, 실온으로 냉각되었고 그리고 THF (10 mL)에 용해되었다. *n*-Bu_4NF (1.07 g, 3.40 mmol)가 추가되었고, 이 혼합물은 실온에서 12시간 동안 교반되었고, 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 CH_2Cl_2 (50 mL)에 용해되었고, 염수 (50 mL)로 세척되었고, 그리고 수성 상은 CH_2Cl_2(20 mL)로 2회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 2-아미노-6-클로로-9-(β-D-2'-데옥시리보푸라노실)-7-[(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]-메틸-7-데아자퓨린 **56** (125 mg, 3단계에서 18%)가 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.24 (s, 1 H, Ph-H), 7.04 (s, 1 H, Ph-H), 6.91 (s, 1 H, H-8), 6.17 (dd, 1 H, *J* = 6.0 및 8.4 Hz, H-1'), 5.18 (s, 1 H, Ph-CH), 5.11 (br s, 2 H, NH_2), 4.71 (m, 1 H, H-3'), 4.59 (dd, 2 H, *J* = 12.4 및 24.4 Hz, 7-CH_2), 4.13 (m, 1 H, H-4'), 3.96 (s, 3 H, OCH_3), 3.88 (m, 1 H, H-5'a), 3. 79 (m, 1 H, H-5'b), 2.76 (m, 1 H, H-2'a), 2.32 (m, 1 H, H-2'b), 0.81 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0588] 화합물 **56** (100 mg, 0.16 mmol)의 1,4-디옥산 (1.5 mL) 및 DMF (3.0 mL) 용액에 syn-피리미딘-2-알독심 (389 mg, 3.2 mmol) 및 1,1,3,3-테트라메틸 구아니딘 (439 μL, 3.5 mmol)이 추가되었고, 이 혼합물은 70℃에서 질소 대기하에 하룻밤 동안 가열되었다. 반응 혼합물은 CH_2Cl_2 (20 mL)으로 희석되었고, 아세트산 용액 (0.1 M, 50 mL), 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (50 mL), 및 염수 (50 mL)로 순차적으로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-[(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **57** (70 mg, 72%)가 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, MeOH-d$_4$)*: δ 8.20 (s, 1 H, Ph-H), 7.17 (s, 1 H, Ph-H), 6.82 (s, 1 H, H-8), 6.18 (m, 1 H, H-1'), 5.23 (s, 1 H, Ph-CH), 4.71 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2a), 4.52 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2b), 4.43 (m, 1 H, H-3'), 3.97 (s, 3 H, OCH_3), 3.91 (m, 1 H, H-4'), 3.71 (m, 2 H, H-5'), 2.49 (m, 1 H, H-

2'a), 2.19 (m, 1 H, H-2'b), 0.85 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0589] 화합물 **57** (50 mg, 0.08 mmol), N-프로파르길트리플루오로아세틸아미드 (117 mg, 0.8 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (18 mg, 0.02 mmol), CuI (5.9 mg, 0.03 mmol), 및 Et_3N (48 μL, 0.34 mmol)의 무수 DMF (3.0 mL) 용액은 50 ℃에서 12시간 동안 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 7-{(*S*)-1-[5-메톡시-4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신 **58** (50 mg, 96%)이 획득되었다. ^1H *NMR (400 MHz, MeOH-d_4)*: δ 7.87 (s, 1 H, Ph-H), 7.26 (s, 1 H, Ph-H), 6.84 (s, 1 H, H-8), 6.20 (m, 1 H, H-1'), 5.25 (s, 1 H, Ph-CH), 4.67 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2a), 4.54 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 7-CH_2b), 4.43 (m, 1 H, H-3'), 4.33 (s, 2 H, CH_2), 3.95 (s, 3 H, OCH_3), 3.89 (m, 1 H, H-4'), 3.70 (m, 2 H, H-5'), 2.46 (m, 1 H, H-2'a), 2.18 (m, 1 H, H-2'b), 0.86 (s, 9 H, $(CH_3)_3$).

[0590] 화합물 **58** (52 mg, 0.08 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 4시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (27 μL, 0.3 mmol) 및 프로톤 스폰지 (33 mg, 0.16 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (TEAB 1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되었고. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고, 그리고 실온에서 1시간 동안 농축된 수산화 암모늄 (10 mL, 27%)으로 처리되어 7-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **59a**가 획득되었고, 이것은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 × 4.6 mm)에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{27}H_{36}N_6O_{17}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 809.1350이었고, 관찰된 질량은 809.1360이었다.

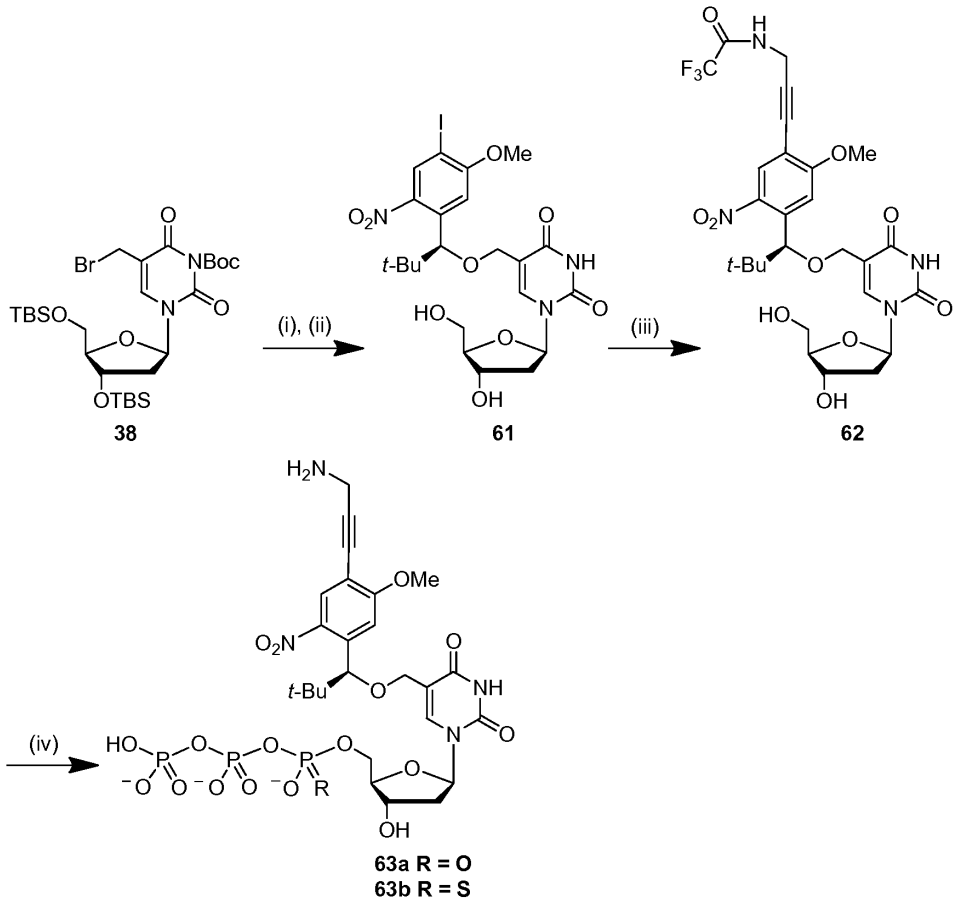
[0591] 화합물 **59** (50 mg, 0.075 mmol)는 질소 대기하에서 실온에서 2.5시간 동안 $PSCl_3$ (9 μL, 0.09 mmol) 및 2,4,6-콜리딘 (18 mg, 0.15 mmol)의 트리에틸포스페이트 (0.5 mL)로 티오포스포릴화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 2분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 용액 (TEAB, 1 M, pH 7.5; 20 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 티오트리포스페이트를 함유하는 분획물은 복합되었고 그리고 동결건조되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고, 실온에서 1시간 동안 농축된 수산화 암모늄 (10 mL, 27%)으로 처리되어 7-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-7-데아자-2'-데옥시구아노신-5'-α-티오 트리포스페이트 **59b**가 획득되었고, PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 × 4.6 mm)에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{27}H_{36}N_6O_{16}P_3S$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 825.1121이었고, 관찰된 질량은 825.1103이었다.

[0592] Alexa Fluor 594 NHS (4.2 mg, 5.2 μmol)의 무수 DMSO (170 μL) 용액은 트리포스페이트 **59a** (2.2 μmol)의 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.5 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 어두운 곳에서 한 시간 동안 방치되었다. 이 혼합물은 우선 Dionex DNApac PA200 컬럼 (250 x 4 mm)에서 음이온 교환 HPLC에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 트리포스페이트 60a를 함유하는 분획물은 복합되었고 작은 용적으로 농축되었고, 그리고 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 × 4.6 mm)에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0593] Alexa Fluor 594 NHS (5 mg, 6.2 μmol)의 무수 DMSO (200 μL) 용액은 티오트리포스페이트 **59b** (4.45 μmol)

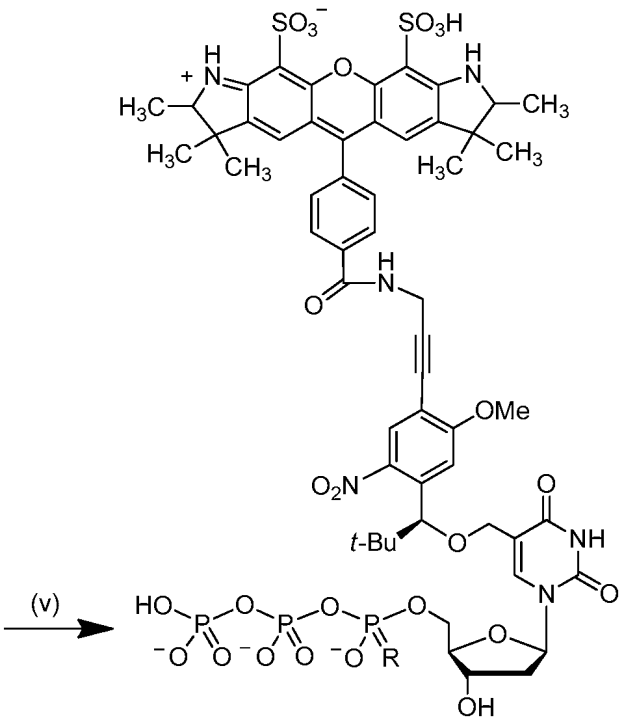
의 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.78 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 어두운 곳에서 한 시간 동안 방치되었다. 이 혼합물은 우선 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 10 cm)을 이용하여 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 티오트리포스페이트 60b를 함유하는 분획물은 복합되었고 작은 용적으로 농축되었고, 그리고 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0594] *염료 라벨된 5-{(S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 및 5'-α-티오트리포스페이트의 합성*



[0595]

[0596] **계획 S27a. 염료 라벨된 5-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) (S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올, 110℃; (ii) NH_4F, MeOH, 50℃, 2단계에서 28%; (iii) N-프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF, 90%; (iv) 63a의 경우: $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, $n\text{-}Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH. 63b의 경우: $PSCl_3$, 2,6-루티딘, $(EtO)_3PO$, 0℃ 내지 실온; $(n\text{-}Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, $n\text{-}Bu_3N$, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH.



[0597]

[0598] **계획 S27b. (v) Alexa Fluor 532 NHS, 0.1 M $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (pH 9.2).**

[0599] 화합물 **38** (350 mg, 0.54 mmol) 및 (*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-1-프로판올 (720 mg, 1.97 mmol)는 질소 대기하에서 110℃에서 45분간 가열되었다. 이 혼합물은 실온으로 냉각되었고, MeOH (10 mL)에 용해되었고, NH_4F (400 mg, 11.1 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 50 ℃에서 12시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2(50 mL)에 용해되었고, 염수 (50 mL)로 세척되었다. 유기 상은 Na_2SO_4에서 건조되며, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-[(S)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘 **61** (90 mg, 28%)가 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, CDCl$_3$)*: δ 8.34 (s, 1 H, Ph-H), 7.65 (s, 1 H, H-6), 7.12 (s, 1 H, Ph-H), 6.17 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 5.18 (s, 1 H, Ph-CH), 4.59 (m, 1 H, H-3'), 4.27 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 5-CH_2a), 4.15 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 5-CH_2b), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.97 (s, 3 H, OCH_3), 3.95 (m, 1 H, H-5'a), 3.82 (m, 1 H, H-5'b), 2.34 (m, 2 H, H-2), 0.84 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0600] 화합물 **61** (80 mg, 0.13 mmol), N-프로파르길트리플루오로아세틸아미드 (196 mg, 1.30 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (30 mg, 0.026 mmol), CuI (9.9 mg, 0.052 mmol), 및 Et_3N (80 μL)의 무수 DMF (3.0 mL) 용액은 50℃에서 12시간 동안 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-{(*S*)-1-[5-메톡시-4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시우리딘 **62** (75 mg, 90%)가 획득되었다. ^{1}*H NMR (400 MHz, MeOD-d$_4$)*: δ 8.11 (s, 1 H, H-6), 8.08 (s, 1 H, Ph-H), 7.36 (s, 1 H, Ph-H), 6.27 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.33 (s, 1 H, Ph-CH), 4.47 (m, 1 H, H-3'), 4.44 (s, 2 H, 5-CH_2), 4.32 (d, 2 H, *J* = 2.0 Hz, CH_2), 4.08 (s, 3 H, OCH_3), 3.99 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.79 (m, 1 H, H-5'b), 2.30 (m, 2 H, H-2), 0.93 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0601] 화합물 **62** (40 mg, 0.064 mmol)는 질소 대기하에서 0℃에서 4시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (21 μL, 0.22 mmol) 및 프로톤 스폰지 (27 mg, 0.13 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다.

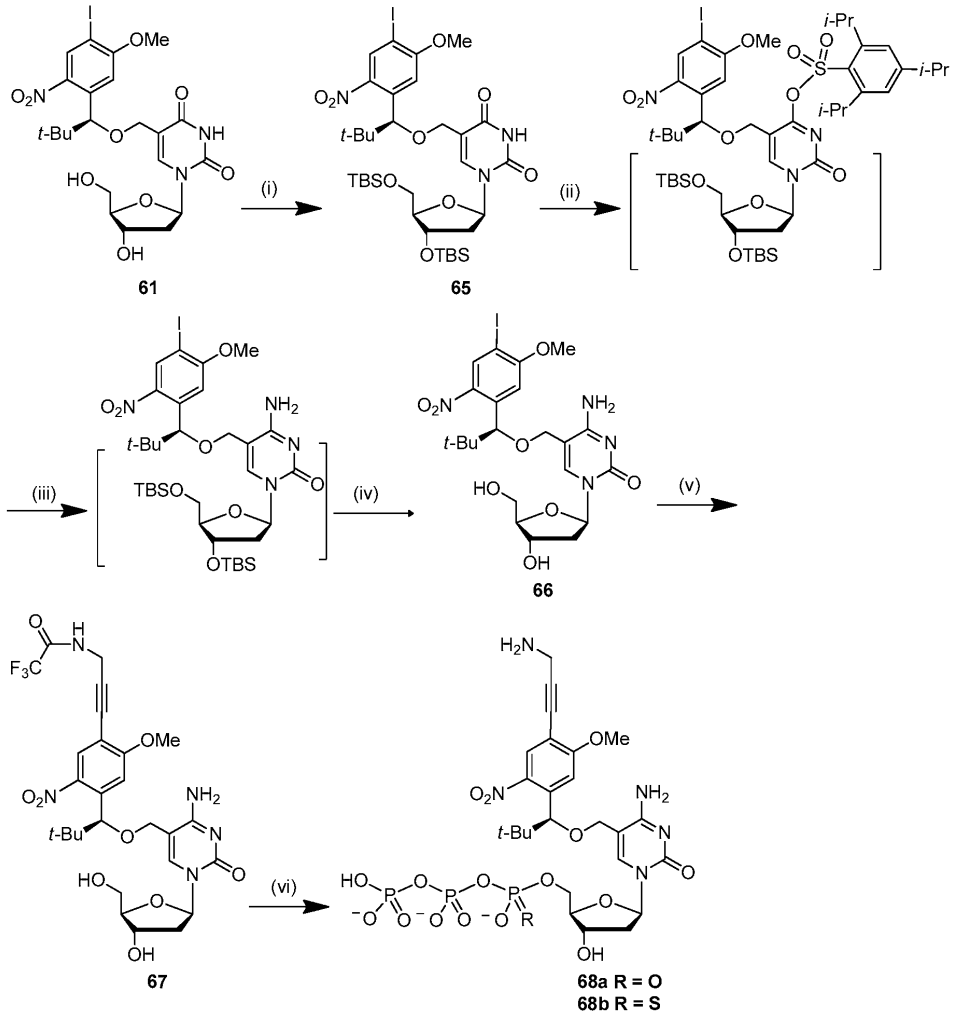
교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (TEAB 1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고 실온에서 1시간 동안 농축된 수산화 암모늄 (10 mL, 27%)으로 처리되어 5-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 **63a**가 획득되었고, 이는 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0602] 화합물 **62** (130 mg, 0.21 mmol)는 질소 대기하에서 실온에서 1시간 동안 $PSCl_3$ (26 μL, 0.25 mmol) 및 2,6-루티딘 (89 mg, 0.84 mmol)의 트리에틸포스페이트 (0.6 mL)로 티오포스포릴화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (474 mg, 1.0 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (200 μL)의 무수 DMF (2.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 2분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 용액 (TEAB, 1 M, pH 7.5; 20 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 티오트리포스페이트를 함유하는 분획물은 복합되었고 그리고 동결건조되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고, 실온에서 1시간 동안 농축된 수산화 암모늄 (10 mL, 27%)으로 처리되었고, 5-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시우리딘-5'-α-티오트리포스페이트 **63b**가 획득되었고, PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{25}H_{34}N_4O_{17}P_3S$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 787.0853이었고, 관찰된 질량은 787.0884이었다.

[0603] Alexa Fluor 532 NHS (2 mg, 2.76 μmol)의 무수 DMSO (80 μL) 용액은 트리포스페이트 **62a** (1.07 μmol)의 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.3 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 어두운 곳에서 한 시간 동안 방치되었다. 이 혼합물은 우선 음이온 교환 HPLC on a Dionex DNApac PA200 컬럼 (250 x 4 mm)에서 음이온 교환 HPLC에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 트리포스페이트 **63a**를 함유하는 분획물이 복합되었고 작은 용적으로 농축되었고, 그리고 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

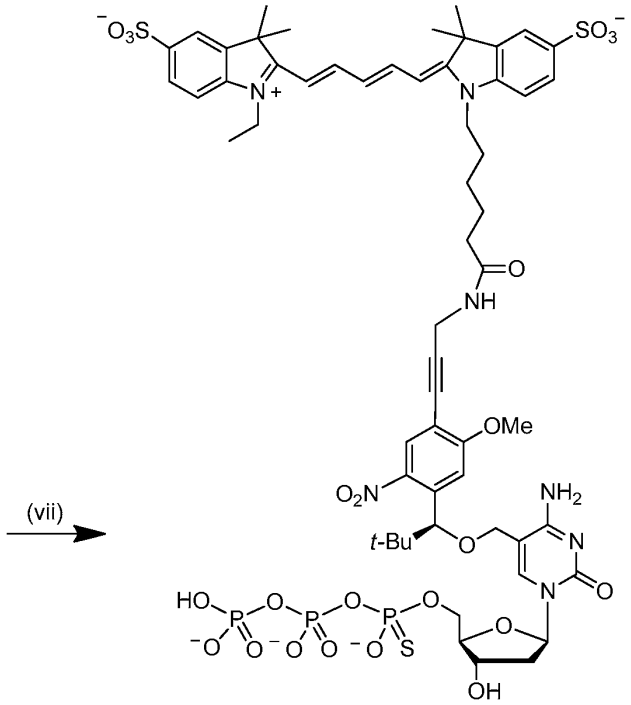
[0604] Alexa Fluor 532 NHS (2.5 mg, 3.45 μmol)의 무수 DMSO (100 μL) 용액은 티오트리포스페이트 **62b** (1.03 μmol)의 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.15 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 어두운 곳에서 한 시간 동안 방치되었다. 이 혼합물은 우선 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 10 cm)을 이용하여 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 티오트리포스페이트 **63b**를 함유하는 분획물이 복합되었고 그리고 동결건조되었고, 그리고 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0605] *염료 라벨된 5-{(S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 및 5'-α-티오트리포스페이트의 합성*



[0606]

[0607] **계획 S28a. 염료 라벨된 5-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성.** 시약들과 조건들: (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 96%; (ii) 2,4,6-트리이소프로필벤젠술포닐 클로라이드, DMAP, Et_3N, CH_2Cl_2, 실온; (iii) NH_3, 1,4-디옥산, 90℃; (iv) *n*-Bu_4NF, THF, 실온, 3단계에서 83%; (v) N-프로파르길트리플루오로아세타아미드, $Pd(PPh_3)_4(0)$, CuI, Et_3N, DMF, 91%; (vi) 68a의 경우: $POCl_3$, 프로톤 스폰지, $(MeO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH. 68b의 경우: $PSCl_3$, 2,6-루티딘, $(EtO)_3PO$, 0℃; (*n*-$Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$, *n*-Bu_3N, DMF; 1 M $HNEt_3HCO_3$; NH_4OH.



[0608]

[0609] **계획 S28b. (vii) Cy5 NHS, 0.1 M $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 완충액 (pH 9.2).**

[0610] 화합물 **61** (295 mg, 0.49 mmol)의 무수 DMF (5.0 mL) 용액에 TBSCl (185 mg, 1.23 mmol) 및 이미다졸 (160 mg, 2.35 mmol)이 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 12시간 동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, CH_2Cl_2(50 mL)에 용해되었다. 용액은 포화된 $NaHCO_3$ 용액 (50 mL)로 세척되었고, 수성 상은 CH_2Cl_2(30 mL)으로 3회 추출되었다. 복합된 유기 상은 Na_2SO_4로 건조되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제되어 3',5'-*O*-비스-(*tert*-부틸디메틸실일)-5-[(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시우리딘 **65** (400 mg, 96%)가 획득되었다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.32 (s, 1 H, Ph-H), 7.64 (s, 1 H, H-6), 7.12 (s, 1 H, Ph-H), 6.12 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 5.20 (s, 1 H, Ph-CH), 4.60 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 5-CH_2a), 4.14 (d, 1 H, *J* = 12.0 Hz, 5-CH_2b), 4.02 (m, 1 H, H-4'), 3.97 (s, 3 H, OCH_3), 3.94 (m, 1 H, H-5'a), 3.83 (m, 1 H, H-5'b), 2.34 (m, 2 H, H-2), 0.90 및 88 (2 s, 18 H, $SiC(CH_3)_3$), 0.84 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 0.08 (3 s, 12 H, CH_3).

[0611] 2,4,6-트리이소프로필 벤젠술포닐 클로라이드 (581 mg, 1.92 mmol)은 화합물 **65** (400 mg, 0.48 mmol), DMAP (64 mg, 0.53 mmol), 및 트리에틸아민 (0.60 mL, 4.32 mmol)의 무수 CH_2Cl_2(15 mL)의 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 질소 대기하에 실온에서 하룻밤동안 교반되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 NH_3 의 1,4-디옥산 (0.5 M, 20 mL) 용액에 용해되었다. 이 혼합물은 밀봉된 튜브로 옮겨졌고 90℃에서 하룻밤 동안 가열되었다. 그 다음 반응물은 실온으로 냉각되었고, 진공에서 농축되며, 잔유물은 THF (8.0 mL)에 용해되었고, *n*-Bu_4NF (333 mg, 1.06 mmol)가 추가되었다. 이 혼합물은 실온에서 4시간 교반되었고, 진공에서 농축되며, 그리고 이 잔유물은 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어 5-[(*S*)-1-(4-요오드-5-메톡시-2-니트로페닐)-2,2-디메틸-프로필옥시]메틸-2'-데옥시시티딘 **66** (240 mg, 총 3단계에서 83%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-d_4)*: δ 8.33 (s, 1 H, Ph-H), 7.91 (s, 1 H, H-6), 7.10 (s, 1 H, Ph-H), 6.16 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.19 (s, 1 H, Ph-CH), 4.41 (d, 1 H, *J* = 12.4 Hz, 5-CH_2a), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 4.26 (d, 1 H, *J* = 12.4 Hz, 5-CH_2b), 3.97(s, 3 H, OCH_3), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.70 (m, 2 H, H-5'), 2.34 (m, 1 H, H-2'a), 2.17 (m, 1 H, H-2'b), 0.84 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0612] 화합물 66 (245 mg, 0.4 mmol), N-프로파르길트리플루오로아세틸아미드 (603 mg, 4.0 mmol), 테트라키스(트리

페닐포스핀)-팔라듐(0) (92 mg, 0.8 mmol), CuI (30 mg, 0.16 mmol), 및 Et_3N (240 μL, 1.7 mmol)의 무수 DMF (5.0 mL) 용액은 50℃에서 12시간 동안 교반되었다. 이 혼합물은 진공에서 농축되며 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제되어, 5-{(*S*)-1-[5-메톡시-4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시시티딘 **67** (230 mg, 91%)가 획득되었다. *^{1}H NMR (400 MHz, MeOD-d_4)*: δ 7.98 (s, 1 H, Ph-H), 7.92 (s, 1 H, H-6), 7.19 (s, 1 H, Ph-H), 6.15 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.21 (s, 1 H, Ph-CH), 4.41 (d, 1 H, J = 13.2 Hz, 5-CH_2a), 4.33 (m, 3 H, H-3'및 CH_2), 4.27 (d, 1 H, *J* = 13.2 Hz, 5-CH_2b), 3.96 (s, 3 H, OCH_3), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.72 (m, 2 H, H-5'), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b), 0.84 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$).

[0613] 화합물 **67** (45 mg, 0.072 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 4시간 동안 트리메틸포스페이트 (0.35 mL)에서 $POCl_3$ (15 μL, 0.16 mmol) 및 프로톤 스폰지 (31 mg, 0.14 mmol)로 인산화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (237 mg, 0.50 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (100 μL)의 무수 DMF (1.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 10분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 완충액 (TEAB, 1 M, pH 7.5; 10 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 트리포스페이트를 함유하는 분획물 복합되었고 그리고 동결건조되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고 그리고 실온에서 1시간 동안 농축된 수산화 암모늄 (10 mL, 27%)으로 처리하면 5-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 68a이 획득되며, 이것은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 × 4.6 mm)에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴. *HRMS (ESI)*: 분자 이온 $C_{25}H_{35}N_5O_{17}P_3$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 770.1241이었고, 관찰된 질량은 770.1234이었다.

[0614] 화합물 **67** (118 mg, 0.19 mmol)은 질소 대기하에서 0℃에서 1시간 동안 $PSCl_3$ (24 μL, 0.23 mmol) 및 2,6-루티딘 (80 mg, 0.75 mmol)의 트리에틸포스페이트 (0.5 mL)로 티오포스포릴화되었다. 비스-트리-*n*-부틸암모늄 파이로포스페이트 (474 mg, 1.0 mmol) 및 트리-*n*-부틸아민 (200 μL)의 무수 DMF (2.0 mL) 용액이 추가되었다. 교반 2분 후, 트리에틸암모늄 중탄산염 용액 (TEAB, 1 M, pH 7.5; 20 mL)이 추가되었다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반되었고 그리고 그 다음 진공에서 농축되었다. 잔유물은 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴 (20 mL)에 용해되었고, 여과되었고, 그리고 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 티오트리포스페이트를 함유하는 분획물이 복합되었고 그리고 동결건조되었다. 잔유물은 물 (10 mL)에 용해되었고 실온에서 1시간 동안 농축된 수산화 암모늄 (10 mL, 27%)으로 처리되어 5-{(*S*)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-5-메톡시-2-니트로페닐]-2,2-디메틸-프로필옥시}메틸-2'-데옥시시티딘-5'-α-티오트리포스페이트 **68b**가 획득되었고, PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 × 4.6 mm)에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴. HRMS (ESI): 분자 이온 $C_{25}H_{35}N_5O_{16}P_3S$ $[M-H]^-$의 경우, 계산된 질량은 786.1012이었고, 관찰된 질량은 786.0983이었다.

[0615] Cy5 NHS (5 mg, 6.3 μmol)의 무수 DMSO (200 μL) 용액이 트리포스페이트 **68a** (1.59 μmol)의 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.35 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 어두운 곳에서 한 시간 동안 방치되었다. 염료 라벨된 트리포스페이트는 Dionex DNApac PA200 컬럼 (250 × 4 mm)에서 음이온 교환 HPLC에 의해 우선 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 트리포스페이트 **69a**를 함유하는 분획물이 복합되었고 작은 용적으로 농축되었고, 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7 μm, 250 x 4.6 mm)상에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0616] Cy5 NHS (5 mg, 6.3 μmol)의 무수 DMSO (200 μL) 용액은 티오트리포스페이트 **68b** (2.96 μmol)의 $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.53 mL) 용액에 추가되었다. 이 혼합물은 어두운 곳에서 한 시간 동안 방치되었다. 염료 라벨된 티오트리포스페이트는 Q Sepharose FF 컬럼 (2.5 × 10 cm)을 이용하여 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 우선 정제되었다. 이동 상: A, 75% 0.1 M TEAB/25% 아세토니트릴; B, 75% 1.5 M

TEAB/25% 아세토니트릴. 염료 라벨된 티오트리포스페이트 **69b**를 함유하는 분획물이 복합되었고 그리고 동결건조되었고, 그리고 이 산물은 PerkinElmer Aquapore OD-300 컬럼 (7㎛, 250 x 4.6 mm)에서 역상 HPLC에 의해 추가 정제되었다. 이동 상: A, 0.1 M TEAB; B, 아세토니트릴.

[0617] **실시예 9 - UV 광절단 연구**

[0618] UV 광절단 속도는 광 강도를 포함하는 다수의 실험적 인자들에 의존된다는 것이 밝혀졌다. McCray *et al.* (1980) 및 McGall *et al.* (1997), 이들 각각은 전문이 여기에 참고자료로 편입된다. 본 명세서에서 기술된 뉴클레오티드 유사체들 간에 광화학적 절단 속도를 비교하기 위하여, 하기에서 볼 수 있는 것과 같이 시료에 0.70 ± 0.01 W/cm^{2}의 광 강도를 매일 제공하기 위한 프로토콜이 개발되었다. 본 연구에 이용된 사용자-맞춤 고안된 UV 디프로텍터(deprotector)는 Wu *et al.* (2007)-이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다-에서 이미 설명되었고, 하기에서 시행된 프로토콜이 설명된다.

[0619] UV 디프로텍터 셋업: 파워 공급은 제조업자가 설명하는 것과 같이 램프 및 순환 조의 파워 공급에 앞서 약 30 분 전에 켰다. IR 액체 필터는 9℃로 냉각되었다. 광 강도는 모델 PM100 파워 미터(Thorlabs), 1000 ㎛ 핀홀(Edmund Optics), 절반이 잘린 변형된 0.5 mL Eppendorf 튜브 및 3-축 수작업 평행이동 스테이지(Newport)를 이용하여 측정되었다, 도 5 참고. 절반이 절단된 Eppendorf 튜브는 핀홀과 파워 미터 탐지기 헤드 전방에 위치되어 빛이 반응 용액을 통과할 때 빛의 기하학적 형태 변형이 설명되었다. 평행 이동 스테이지를 이용하여 아크 빔으로부터 최대 강도로 튜브/핀홀/탐지 장치를 배열하였다.

[0620] *0.7W/cm^{2}로 강도 조정*: 램프 출력을 안정화시키기 위하여, 램프는 강도 측정에 앞서 한 시간 동안 방치되었다. 그 다음 측정된 파워는 파워 공급으로부터 전류를 증가시켜 조정되었다. 0.70 W/cm^{2}의 강도(I)를 얻기 위하여, 측정된 파워 (P)는 다음 식에 따라 ~5.5 mW로 조정되었다:

[0621] $$I = \frac{P}{\pi \times r^2}$$

[0622] 이때 R은 핀홀의 반경이다. 파워 판독은 5분간 기록되었고(1초 간격), 강도 판독으로 전환되었으며, 이는 6주간 0.68 ± 0.01 내지 0.72 ± 0.02 W/cm^2 사이 범위를 가졌다.

[0623] *0.5 mL 튜브 홀더와 빔 배열*: 변형된 Eppendorf 튜브, 핀 홀 그리고 파워 미터는 UV 디프로텍터로부터 제거되었고, 회전 시료 홀더는 높이가 67.18 ± 0.25 mm되도록 장착되었다. 빔은 0.5 mL Eppendorf 튜브를 시료 홀더에 배치시켜 집중되었고, 이 튜브는 내부 배열 카드로 변형되어, 10 μL 및 20 μL의 용적 높이를 위한 기준 라인이 제공되었다. 도 5. 기준 라인은 주어진 반응 용적에 대해 빔이 집중될 수 있도록 하였다. 빔 배열은 후면 반사경에 의해 생성된 램프의 수은 아크 영상을 관찰함으로써 추가 실증되었다. 제 2 배열 카드는 영상을 보기위하여 회전하는 시료 홀더 안에 배치시켰고, 반사경을 이용하여 적절하게 배열될 때 아크 갭상에 역상 아크 영상을 만들 것이다. 이 단계는 아크 핫스팟이 중첩되지 않게 하는데, 이러한 중첩은 ~5.5 mW의 파워 출력을 유지하는 동안 과열을 야기할 수 있다. 회전하는 시료 홀더의 속도는 Nova-Strobe DA Plus 스트로스코프(Monarch Instrument)를 이용하여 적절한 조절 나사로 모터의 토크를 조정함으로써 1,200 ~ 1,350 rmp 범위 안에서 조정되었다.

[0624] 광화학적 절단 분석: 뉴클레오티드 유사체들은 10㎛L 반응물을 이용하여, PEP 분석에서 설명된 것과 같이, 100 nM의 최종 농도에서 혼입되었다. Litosh *et al.* (2011) 참고, 이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다. BODIPY-FL 라벨된 프라이머-1과 각각 혼성화된 올리고주형-2, 올리고주형-5, 및 올리고주형-4가 각각 는 각각 C^7-HOMedA, C^7-HOMedG, 및 HOMedU 유사체들에 이용되었다. BODIPY-FL 라벨된 프라이머-3과 혼성화된 올리고주형-8은 HOMedC 유사체들을 분석하는데 이용되었다. 혼입된 반응물은 1 mM 아지드 나트륨 용액; 1 mM 아지드 나트륨, 50 mM DTT 용액; 또는 시약 C-G (도 4의 key 참고)로 퀀칭되었고, 우리의 UV 디프로텍터를 이용하여 다양한 시점에 대하여 365 nm 자외선 (UV) 광에 노출되었고, 그리고 그 다음 얼음위에 두었다. 10 μL의 중단 용액(98% 탈이온화된 포름아미드; 10 mM Na_2EDTA, pH 8.0; 25 mg/mL Blue Dextran, MW 2,000,000)이 추가되었고, 그리고 시료들은 AB 모델 377 DNA 서열화기를 이용하여 분석되었다. 절단 분석은 Litosh *et al.* (2011)-이는 본 명세서에서 참고문헌으로 수록된다-에서 설명된 것과 같이, DT_{50} 값 ± 1SD를 산출하기 위하여 3중 실행되었다.

[0625] * * * * * * * * * * * * * * * * *

[0626] 본 명세서에 개시되고 청구된 모든 방법이 본 개시에 비추어 부적절한 실험을 하지 않고 수행되고 달성될 수 있다. 비록 본 발명의 조성물 및 방법이 특정 구체예에 관하여 설명되기는 하지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위에서 벗어나지 않고 본 명세서에 설명된 방법 및 방법의 단계들 또는 일련의 단계들에 변형이 적용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 더욱 구체적으로, 화학적으로 그리고 생리학적으로 관련된 특정 물질이 본 명세서에 기재된 물질을 대체하여 동일하거나 유사한 결과가 획득될 수 있음이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체 및 변형은 첨부한 청구범위에 의하여 정의되는 본 발명의 사상, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

[0627] **참고문헌**

[0628] 다음의 참고문헌들 및 부록에 나열된 것은, 이들이 본 명세서에 제시된 것을 보충하는 대표적인 절차 또는 다른 세부사항을 제공하는 정도까지, 본 명세서에 명확하게 참고문헌으로 수록된다.

[0629] 미국 특허 3,822,996

[0630] 미국 특허 3,859,045

[0631] 미국 특허 3,917,499

[0632] 미국 특허 4,737,155

[0633] 미국 특허 4,304,568

[0634] 미국 특허 4,631,066

[0635] 미국 특허 4,737,155

[0636] 미국 특허 4,439,356

[0637] 미국 특허 5,151,507

[0638] 미국 특허 5,188,934

[0639] 미국 특허 5,302,509

[0640] 미국 특허 5,770,367

[0641] 미국 특허 6,664,079

[0642] 미국 특허 7,057,026

[0643] 미국 특허 7,345,159

[0644] 미국 특허 7,414,116

[0645] 미국 특허 7,476,734

[0646] 미국 특허 7,541,444

[0647] 미국 특허 7,556,537

[0648] 미국 특허 7,592,435

[0649] 미국 특허 7,635,578

[0650] 미국 특허 7,713,698

[0651] 미국 특허 7,771,973

[0652] 미국 특허 7,897,737

[0653] 미국 특허 7,964,352

[0654] 미국 특허 8,148,503

[0655] 미국 특허 출원 공개 2004/0110196

[0656] 미국 특허 출원 공개 2006/0160081

[0657] 미국 특허 출원 공개 2010/0041041

[0658] WO 2012/037394

Aliotta *et al.*, *Genet Anal. Biomol Eng.,* 12:185-95, 1996.

Axelrod, *Methods Cell Biol.,* 30:245-70, 1989.

Bailey, *Ozonation in organic chemistry* Vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1978

Bailey, *Ozonation in organic chemistry* Vol. 2, Academic Press, Inc., New York, 1982

Barltrop *et al.*, *Chem. Commun.,* 822-23, 1966.

Barone *et al.*, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 20:1141-45, 2001.

Barth *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.,* 119:4149-59, 1997.

Beadling *et al.*, *J. Mol. Diagn.,* 13:504-13, 2012.

Bentley *et al.*, *Nature*, 456:53-59, 2008.

Berson & Brown, *J. Amer. Chem. Soc.,* 77:447-50, 1955.

Bhalla, *Toxicology Letters*, 73:91-101, 1994

Bowers *et al.*, *Nature Methods*, 6:593-95, 2009.

Cameron and Frechet, *J. Am. Chem. Soc.,* 113:4303-13, 1991.

Canard & Sarfati, *Gene,* 148:1-6, 1994.

Carrasco & Vázquez, *Med. Res. Rev.*, 4:471-512, 1984.

Cleland, *Biochemistry*, 3:480-82, 1964.

Corrie *et al.*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1015-19, 1992.

Corrie, in *Dynamics studies in biology,* Goeldner and Givens (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 1-28, 2005.

Crabtree and Kemp, *Indus. Eng. Chem.*, 38:278-296, 1946

De Mayo, in *Advances in Organic Chemistry,* Raphael *et al.* (Eds.), Interscience, NY, 2:367-425, 1960.

Dressman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 100:8817-8822, 2003.

Eid *et al.*, *Science,* 323:133-138, 2009.

EPA (2011) http://www.epa.gov/oar/oaqps/gooduphigh/bad.html#6. Last updated on Thursday, July 21, 2011.

European Patent Appln. 87310256.0

European Patent EP 0 640 146

Fairchild et al., *Science*, 130:861-862, 1959

Fare *et al.*, *Anal. Chem.*, 75:4672-4675, 2003.

[0659] Futreal *et al.*, *Nature Rev. Cancer,* 4:177-83, 2004.

Gardner *et al.*, *Nucleic Acids Res.,* 27:2545-53, 1999.

Gardner *et al.*, *Nucleic Acids Res.,* 40:7404-15, 2012.

Gershon, *Nature Methods*, 1:263-270, 2004.

Giegrich *et al.*, *Nucleosides Nucleotides*, 17:1987-1996, 1998.

Givens & Schowen, In *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*, J. W. Birks, Ed.; VCH: New York, pp 125-47, 1989.

Gommers-Ampt *et al.*, *FASEB J.*, 9:1034-42, 1995.

Gordon and Gregory, *Organic Chemistry of Colour*, Springer-Verlag, New York, 1983

Gregory, *Encyclopedia of Chemical Technology* (Kirk, R. E., and Othmer, D. F., eds) pp. 1-66, 2009

Guo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:9145-50, 2008.

Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use, Stahl & Wermuth (Eds.), Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002.

Hardwick *et al.*, *Trans. Farad. Soc.,* 56:44-50, 1960.

Harris *et al.*, *Science,* 320:106-109, 2008.

Hasan *et al.*, *Tetrahedron,* 53:4247-64, 1997.

Hastings, *J. Mol. Evol.* 19:309–21, 1983.

Haugland, In *The handbook. A guide of fluorescent probes and labeling technologies*, Invitrogen, 2005.

Hewitt et al., *Nature*, 344:56-58, 1990

Hsia *et al.*, *Current Opinion in Structural Biology,* 15:126-134, 2005.

Iafrate *et al.*, *Nature Genet.,* 36:949-51, 2004.

Ito *et al.*, *Nature*, 466:1129-33, 2010.

Ju *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 103:19635-40, 2006.

Kaiser *et al.*, *J. Biol. Chem.,* 274:21387-394, 1999.

Kriaucionis & Heintz, *Science*, 324:929-30, 2009.

Lehninger, In: *Principles of Biochemistry*, 273-305, W.H. Freeman and Co., NY, 2005.

Levy *et al.*, *PLoS Biol.,* 5:e254, 2007.

Limbach, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 22:2183-2196, 1994.

Litosh *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 39:e39.

Lyamichev *et al.*, *Nature Biotechnol.,* 17:292-296, 1999.

March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 2007.

Margulies et al, *Nature,* 437:376-80, 2005.

[0660] McCray *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7237-41, 1980.

McDougall *et al.*, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 20:501-6, 2001.

McGall *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, *119*:5081-90, 1997.

Meldrum *et al. Clin. Biochem. Rev.,* 32:177-95, 2011.

Metzker *et al.*, *Biotechniques,* 25:446-462, 1998.

Metzker *et al.*, *Nucleic Acids Res.,* 22:4259-67, 1994.

Metzker, *Genome Res.*, 15:1767-76, 2005.

Metzker, *Nature Rev. Genet.*, 11:31-46, 2010.

Mitra *et al., Anal. Biochem*., 320:55-65, 2003.

Morrison, In: *The chemistry of nitro and nitroso groups,* Feuer (Ed.), Interscience publishers, NY, 165-213, 1969.

Mosher *et al.*, *J. Chem. Phys.* 32:1888-89, 1960.

Moyer *et al.*, *Laser Focus World*, 29(10), 1993.

Nieman, In *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*, J. W. Birks, Ed.; VCH: New York, pp 99-123, 1989.

Orosz *et al.*, *Crit. Rev. Anal. Chem*., 26:1-27. 1996.

Patchornik *et al*., *J. Am. Chem. Soc.,* 92:6333-35, 1970.

Patchornik, In: *Pharmacology of hormonal polypeptides and proteins* (Back *et al.* (Eds.), Plenum Press, NY, 11-16, 1968.

PCT Appl. PCT/US90/05565.

Ramanathan *et al.*, *Anal. Biochem*., 330:227-241, 2004.

Redon *et al.*, *Nature,* 444:444-454, 2006.

Reichmanis *et al.*, *J. Polymer Sci.,* 23:1-8, 1985.

Rockhill *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:10065-68, 1997.

Ronaghi *et al.*, *Science,* 281:363-365, 1998.

Salvin and Walker, *Textile Research Journal*, 25:571-581, 1955

Sebat *et al.*, *Science,* 305:525-528, 2004.

Seela and Peng, In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,* Beaucage *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., 1.10.1, 2005.

Seo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102:5926-5931, 2005.

Service, *Science,* 282:1020-1021, 1998.

Smith and Ho, *J. Org. Chem.,* 55:2543, 1990.

Soengas *et al*., *J. Mol. Biol.,* 253:517-29, 1995

Sousa & Weinstein, *J. Org. Chem.,* 27:3155-59, 1962.

[0661] Staudiner & Meyer, *Helv. Chim. Acta,* 2:635, 1919.

Stranger *et al.*, *Science,* 315:848-853, 2007.

Stupi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51:1724-1727, 2012.

Su *et al.*, *J. Mol Diagn.,* 13:74-84, 2011.

Tahiliani *et al.*, *Science*, 324:930-35, 2009.

Turcatti *et al., Nucleic Acids Res*., 36:e25, 2008.

Tuzun *et al.*, *Nature Genet.,* 37:727-32, 2005.

Walker *et al*., *Biochemistry,* 25:1799-1805, 1986.

Weinstein *et al.*, *J. Org. Chem.,* 31:1983-1985, 1966.

Wettermark, *Nature*, 194:677, 1962.

Wootton & Trentham, In: *Photochemical probes in biochemistry (NATO Science Series C),* Nielsen (Ed)., Kluwer Academic Publishers, Ann Arbor, 272:277-296, 1989.

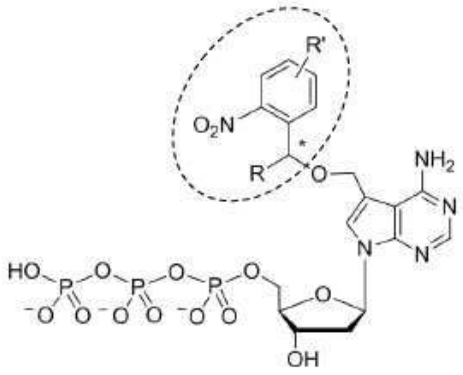
Wu *et al.*, *Nature Genet.,* 44:251–253, 2012.

Wu *et al.*, *Nucleic Acids Res.,* 35:6339–6349, 2007.

[0662] Wyatt & Cohen, *Biochem. J.*, 55:774–782, 1953.

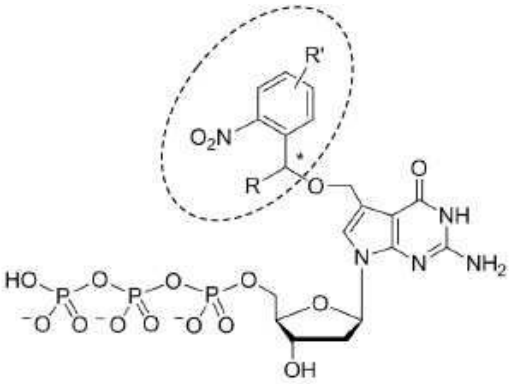
도면

도면1



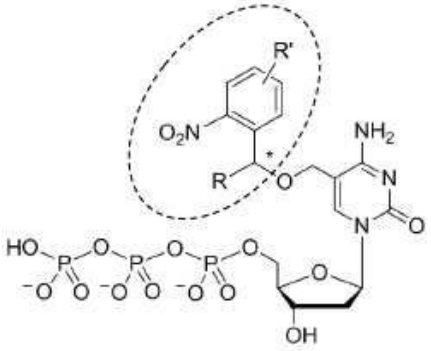
LT-dA

C^7-HOMedA	R	R'
dA.I	H	H
dA.III	iPr*	H
4-OMe-dA.III	iPr*	4-OMe
6-NO_2-dA.III	iPr*	6-NO_2
(*S*)-dA.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dA.V	(*S*)-tBu	5-OMe



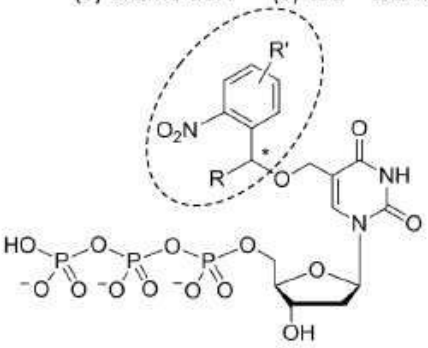
LT-dG

C^7-HOMedG	R	R'
dG.I	H	H
dG.V	tBu*	H
4-OMe-dG.V	tBu*	4-OMe
5-OMe-dG.V	tBu*	5-OMe
4,5-diOMe-dG.V	tBu*	4-OMe,5-OMe
(*S*)-dG.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dG.V	(*S*)-tBu	5-OMe



LT-dC

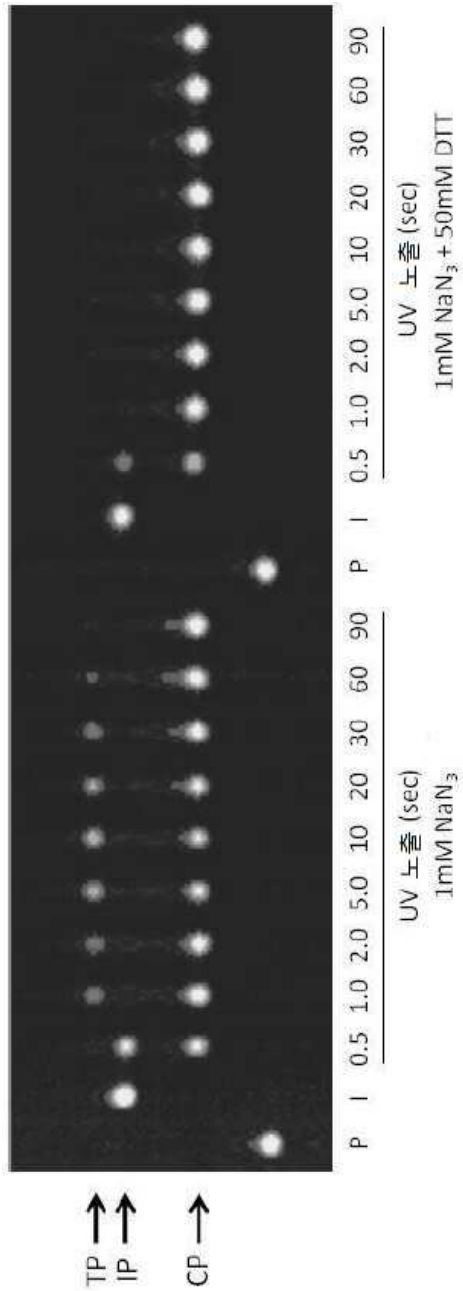
HOMedC	R	R'
dC.I	H	H
(*S*)-dC.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dC.V	(*S*)-tBu	5-OMe



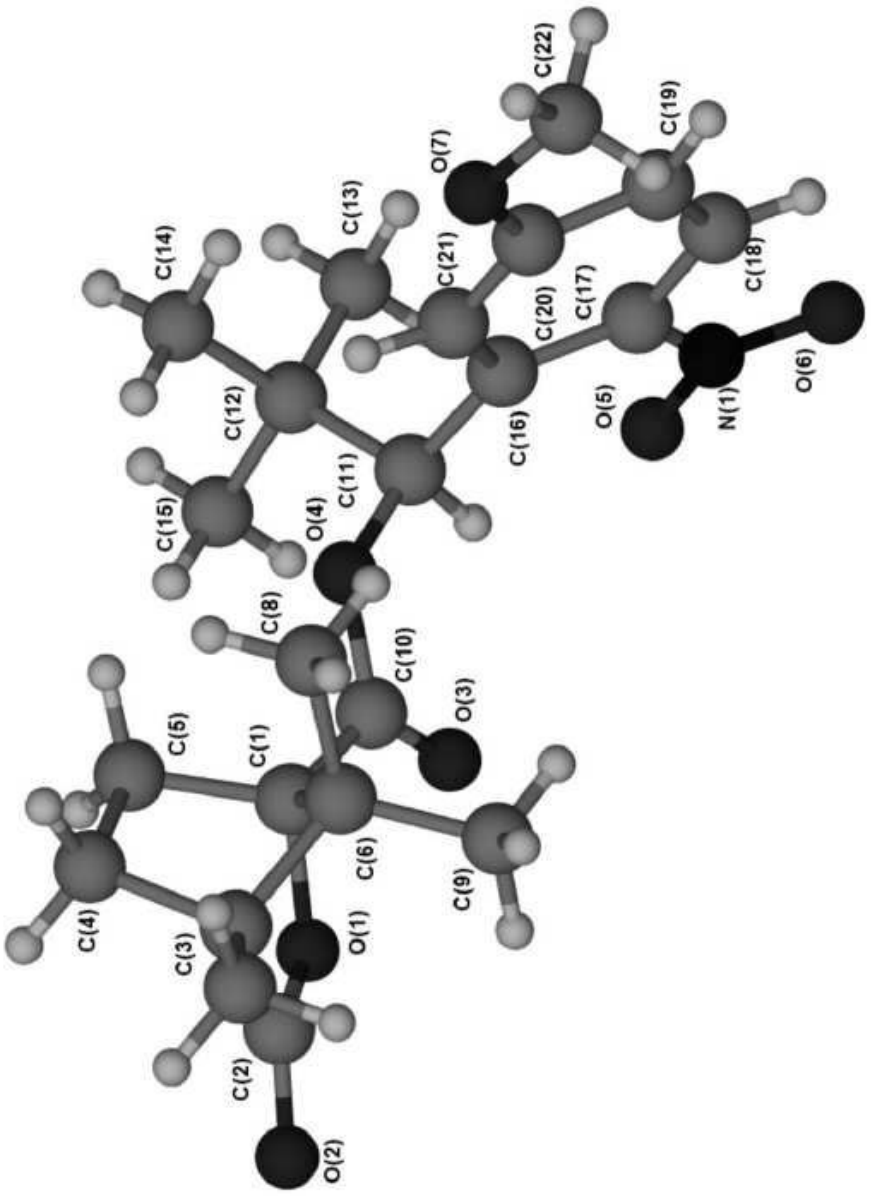
LT-dU

HOMedU	R	R'
dU.I	H	H
(*S*)-dU.V	(*S*)-tBu	H
(*S*)-5-OMe-dU.V	(*S*)-tBu	5-OMe

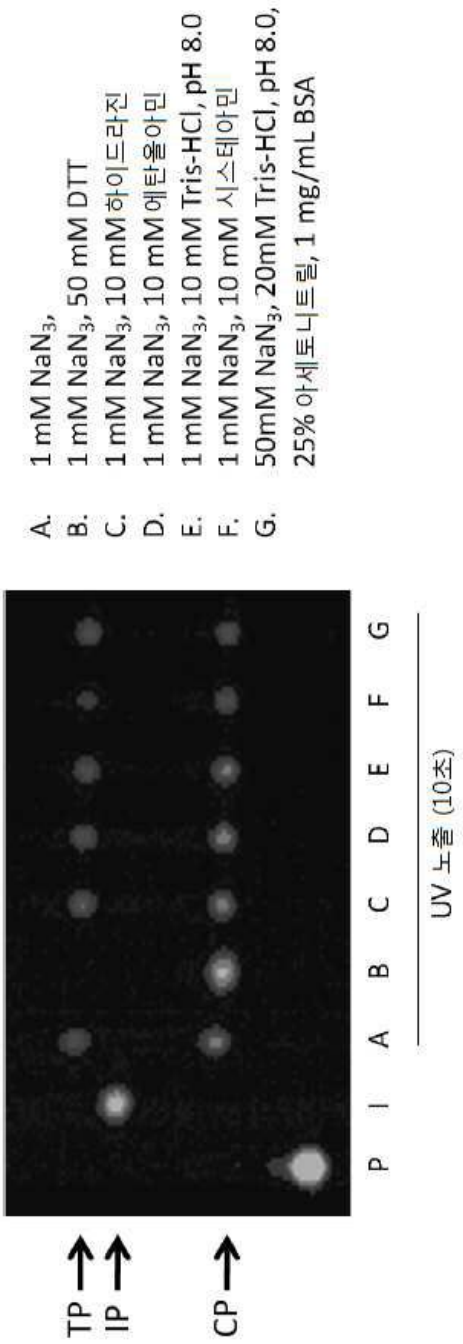
도면2


TP
IP
CP
P I 0.5 1.0 2.0 5.0 10 20 30 60 90
UV 노출 (sec)
1mM NaN_3
P I 0.5 1.0 2.0 5.0 10 20 30 60 90
UV 노출 (sec)
1mM NaN_3 + 50mM DTT

도면3

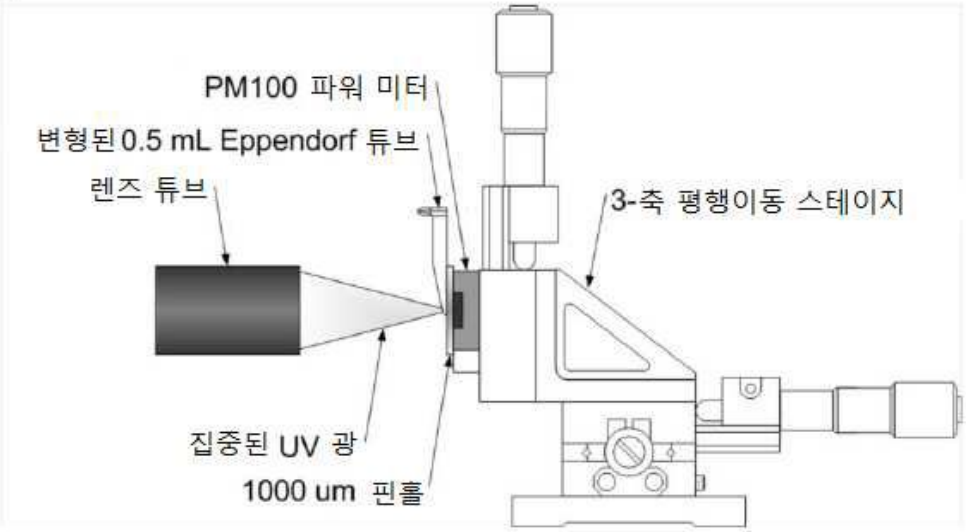

C(22)
C(19)
O(7)
C(13)
C(14)
C(21)
C(18)
C(20)
C(17)
O(6)
O(5)
N(1)
C(12)
C(16)
C(11)
C(15)
O(4)
C(8)
C(10)
O(3)
C(5)
C(1)
C(6)
C(9)
C(4)
C(3)
O(1)
C(2)
O(2)

도면4


A. 1 mM NaN_3,
B. 1 mM NaN_3, 50 mM DTT
C. 1 mM NaN_3, 10 mM 하이드라진
D. 1 mM NaN_3, 10 mM 에탄올아민
E. 1 mM NaN_3, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
F. 1 mM NaN_3, 10 mM 시스테아민
G. 50mM NaN_3, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 25% 아세토니트릴, 1 mg/mL BSA
TP
IP
CP
P I A B C D E F G
UV 노출 (10초)

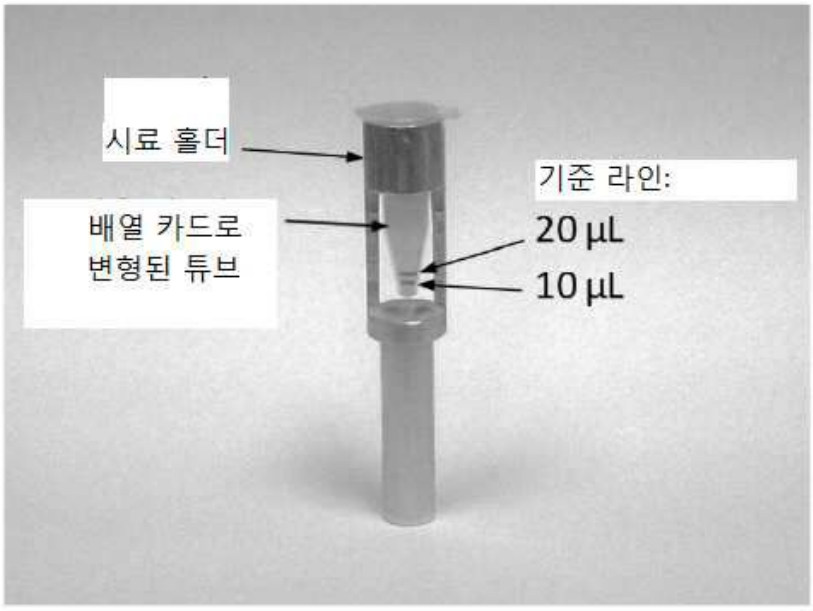
도면5a

A.

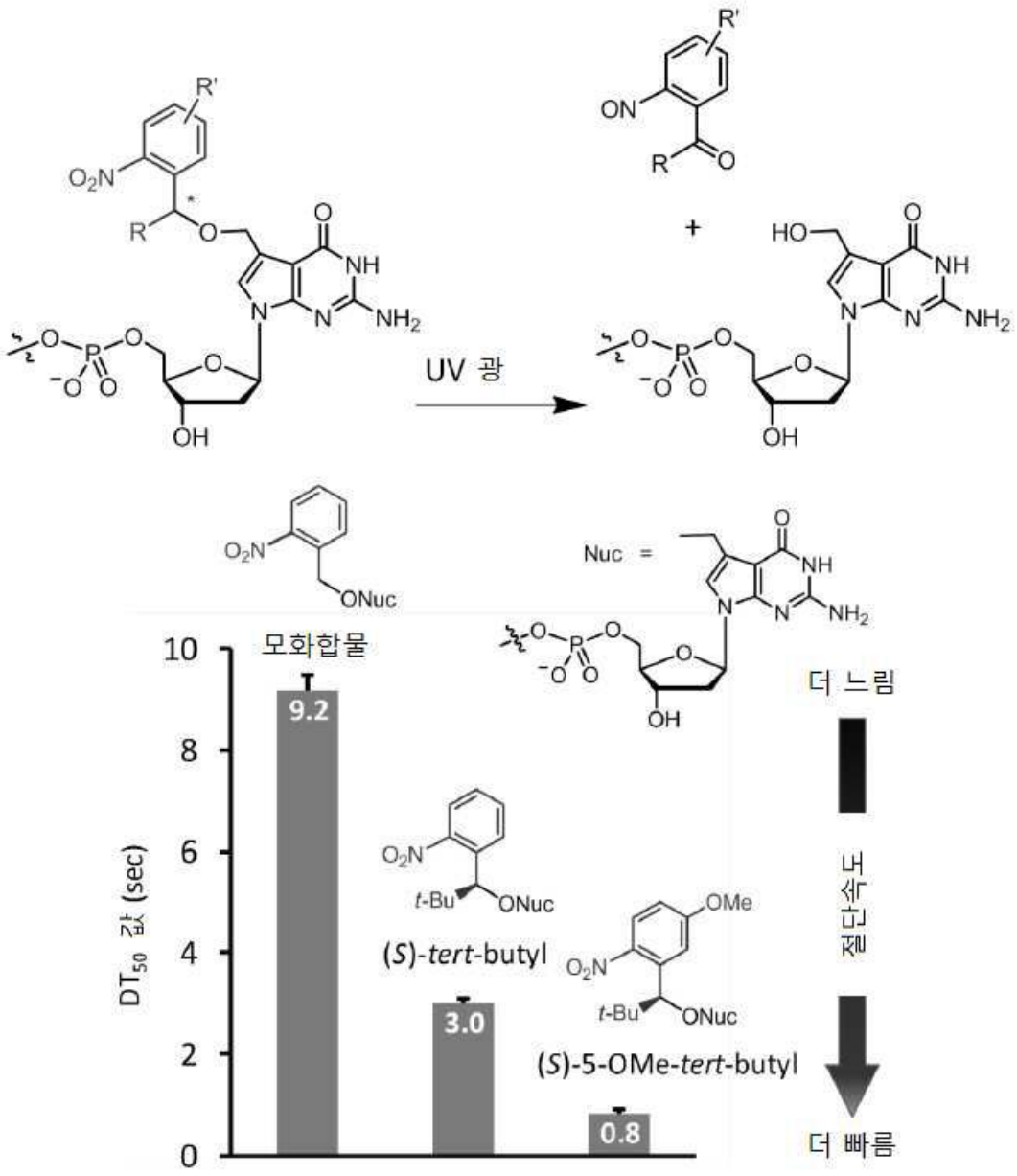

PM100 파워 미터
변형된 0.5 mL Eppendorf 튜브
렌즈 튜브
3-축 평행이동 스테이지
집중된 UV 광
1000 um 핀홀

도면5b

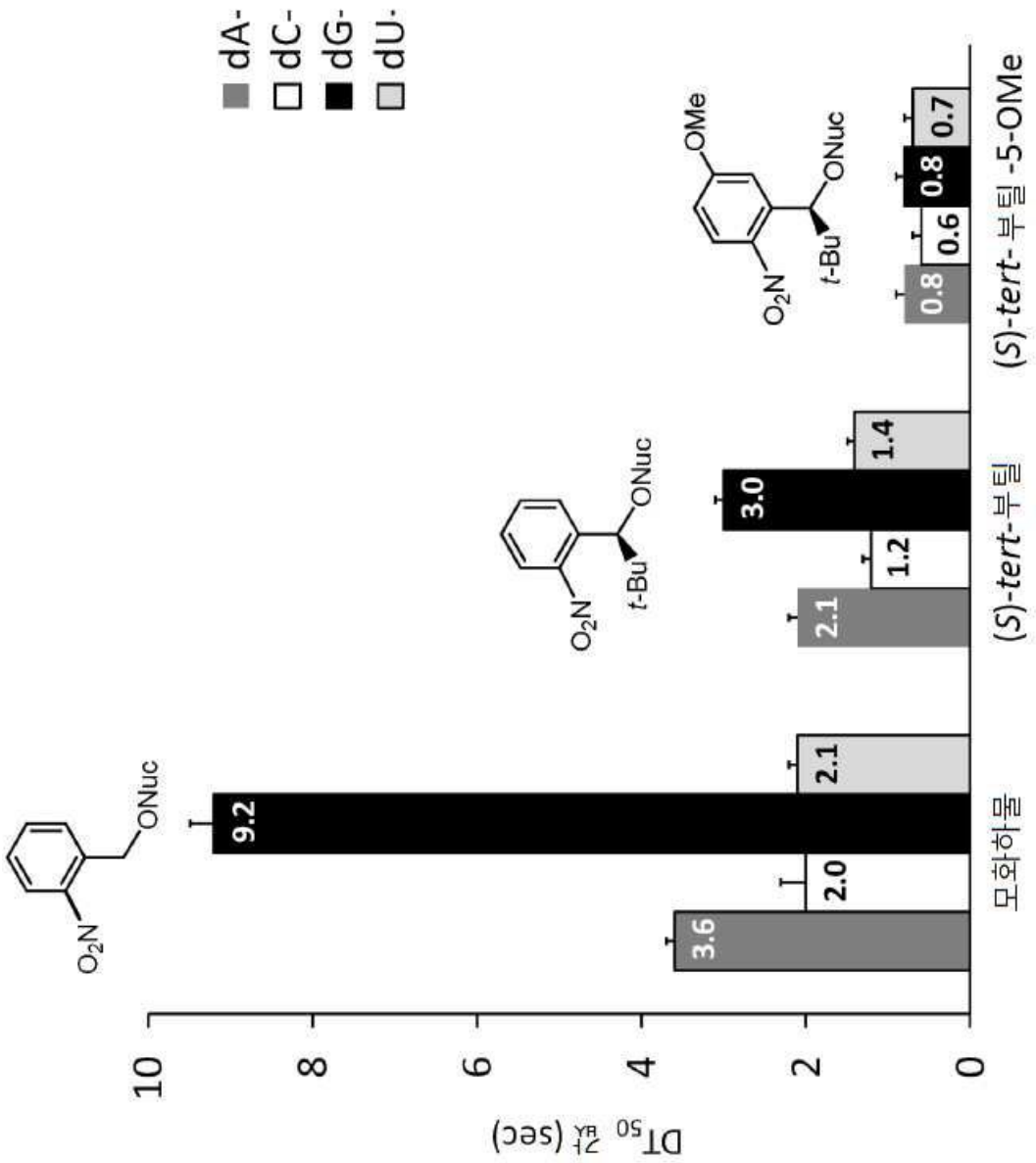
B.


시료 홀더
배열 카드로
변형된 튜브
기준 라인:
20 µL
10 µL

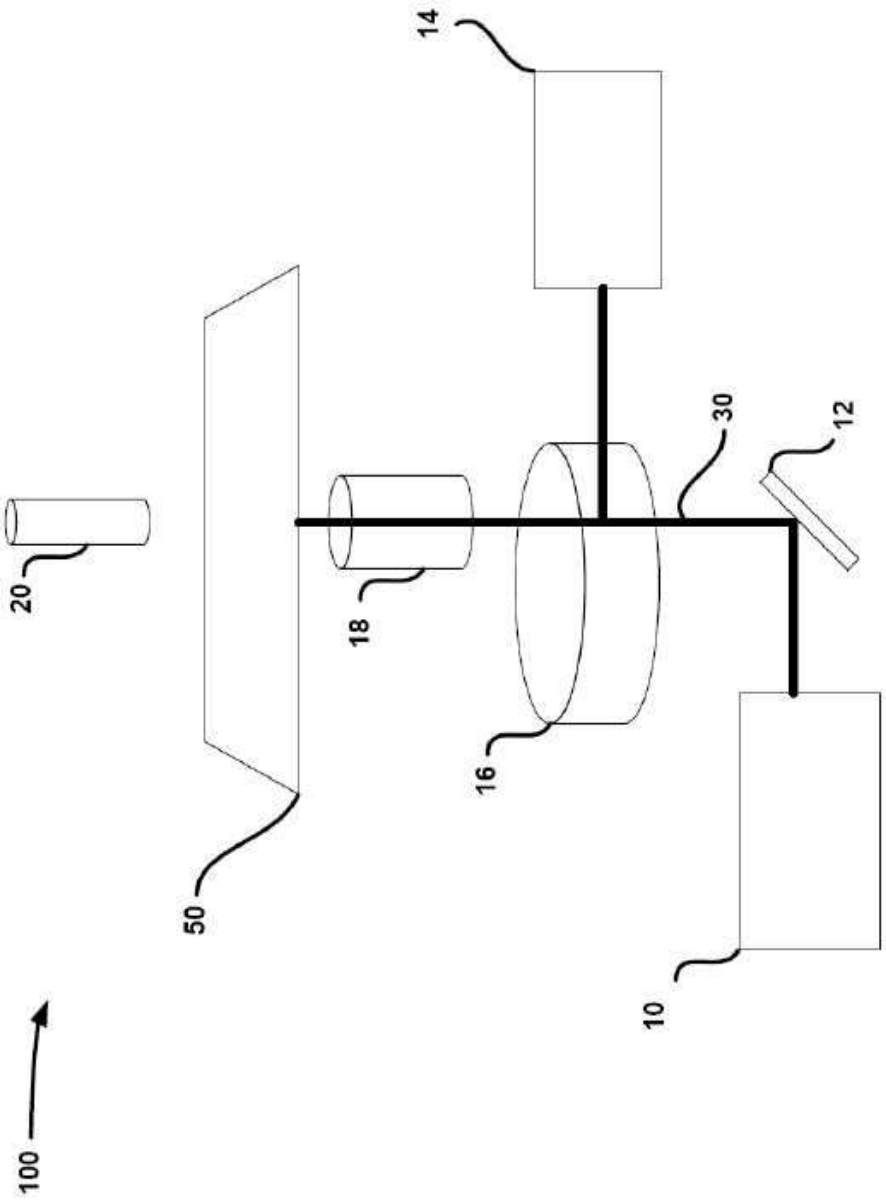
도면6


UV 광
Nuc =
ONuc
모화합물
9.2
(S)-tert-butyl
3.0
(S)-5-OMe-tert-butyl
0.8
DT50 값 (sec)
10
8
6
4
2
0
더 느림
절단속도
더 빠름

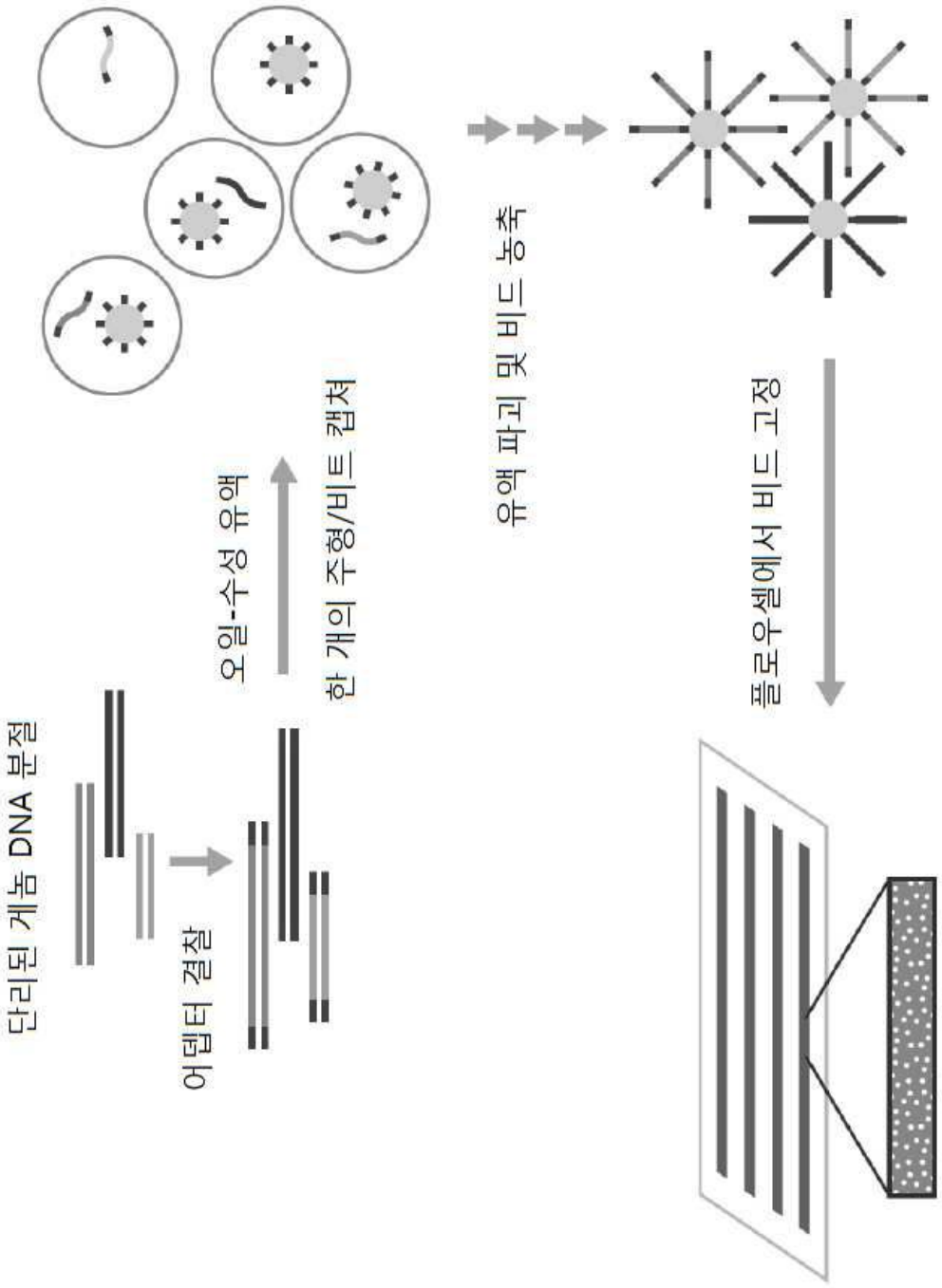
도면7


dA-
dC-
dG-
dU-
DT50 2h UV (sec)
0
2
4
6
8
10
9.2
2.0
3.6
2.1
3.0
1.2
2.1
1.4
0.8
0.6
0.8
0.7
O2N
ONuc
t-Bu
OMe
모화하물
(S)-tert-부틸
(S)-tert-부틸 -5-OMe

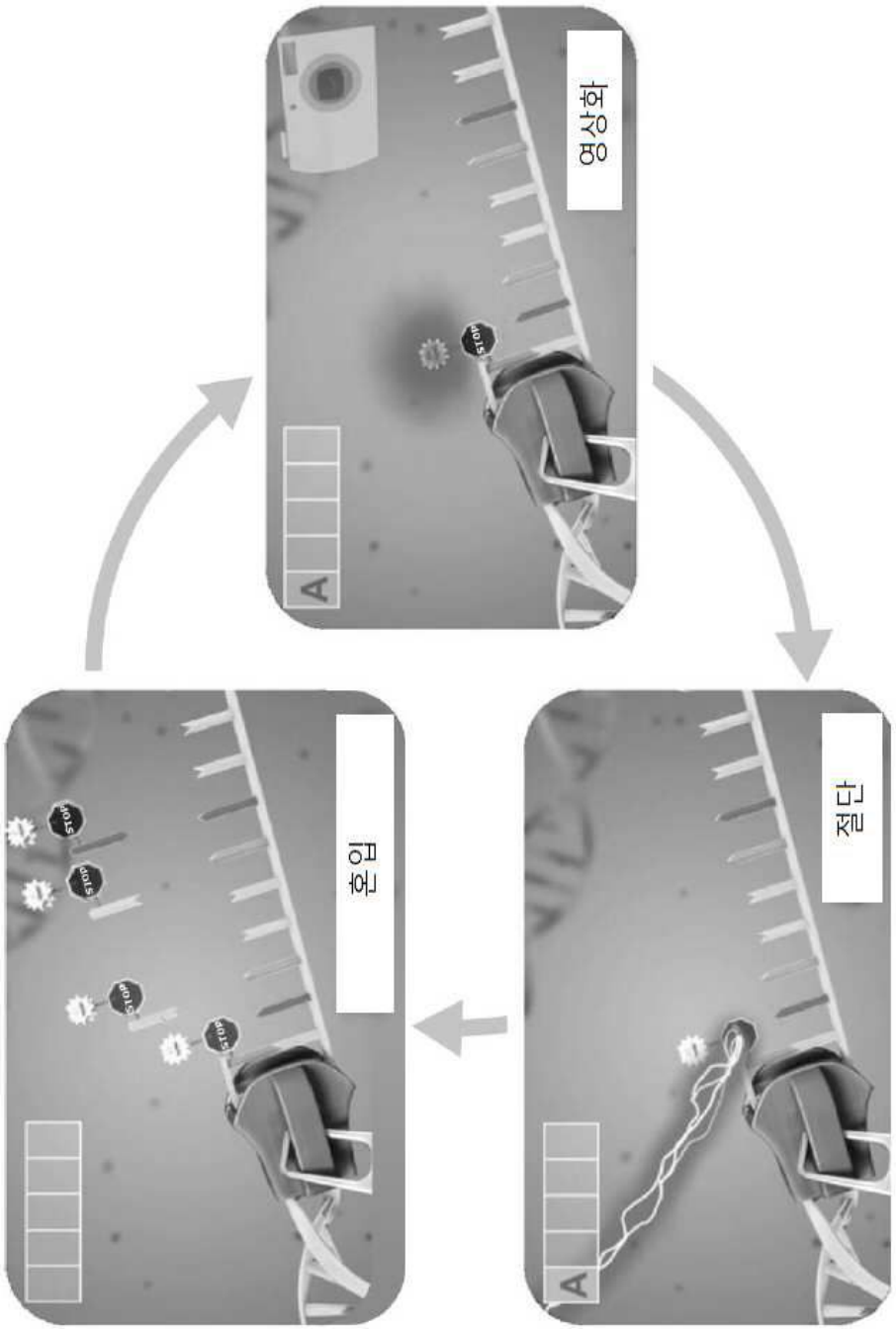
도면8



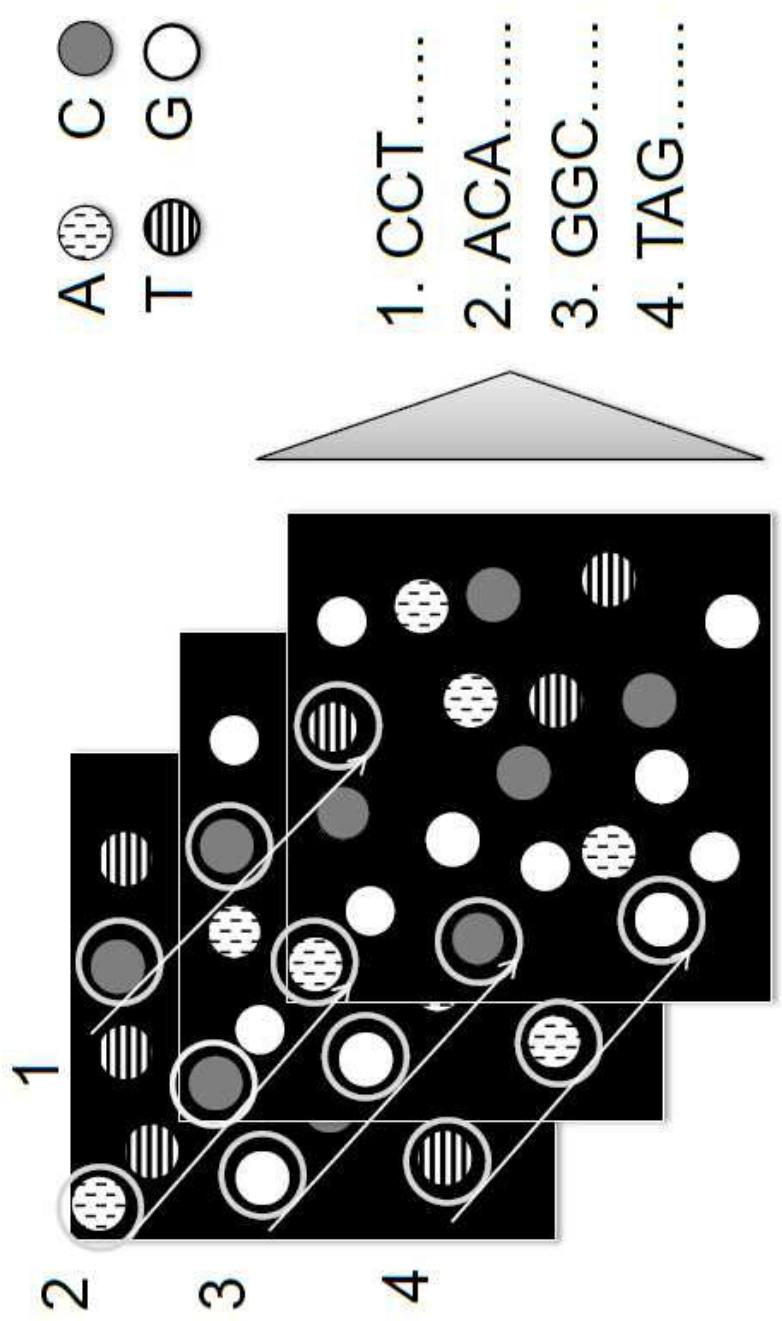
도면9



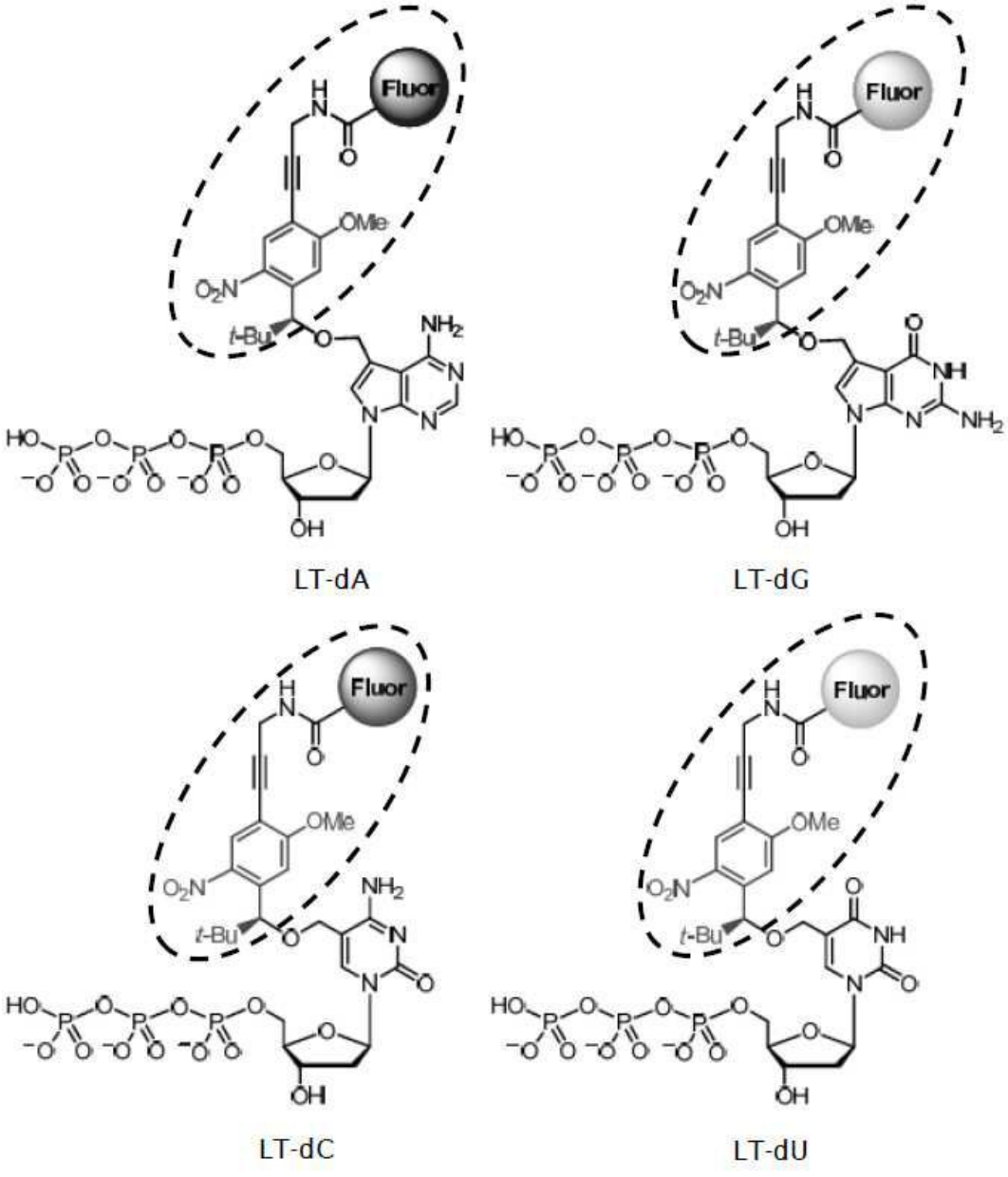
도면10



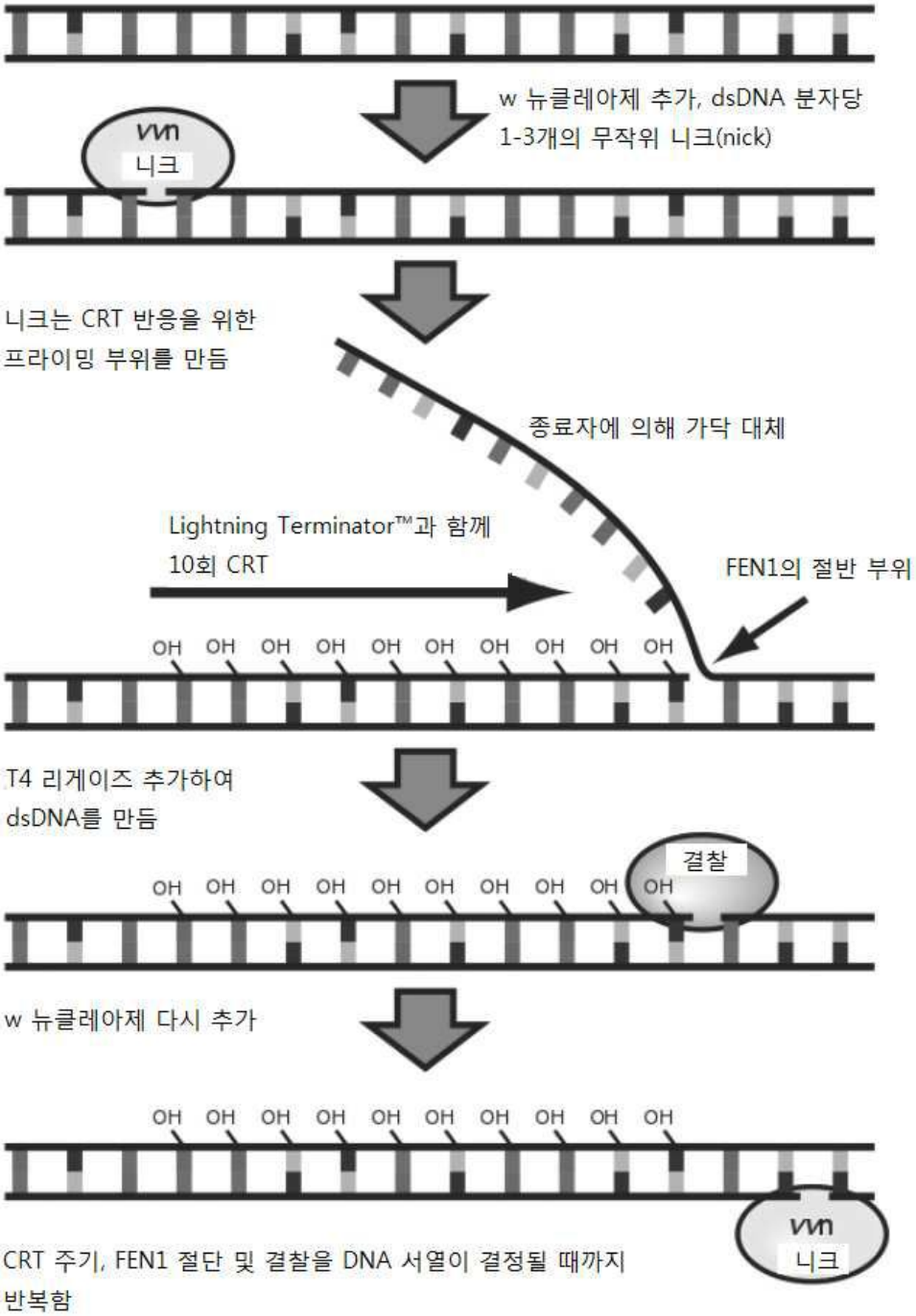
도면11



도면12



도면13


w 뉴클레아제 추가, dsDNA 분자당
1-3개의 무작위 니크(nick)
니크
니크는 CRT 반응을 위한
프라이밍 부위를 만듦
종료자에 의해 가닥 대체
Lightning Terminator™과 함께
10회 CRT
FEN1의 절반 부위
OH
T4 리게이즈 추가하여
dsDNA를 만듦
결찰
w 뉴클레아제 다시 추가
CRT 주기, FEN1 절단 및 결찰을 DNA 서열이 결정될 때까지
반복함