



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2020년12월03일  
(11) 등록번호 10-2185779  
(24) 등록일자 2020년11월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 19/06 (2006.01) C07H 19/00 (2006.01)  
C07H 19/067 (2006.01) C07H 19/073 (2006.01)  
C07H 19/167 (2006.01) C07H 19/173 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07H 19/06 (2013.01)  
C07H 19/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7004119(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2011년04월12일  
심사청구일자 2019년03월05일
- (85) 번역문제출일자 2019년02월12일
- (65) 공개번호 10-2019-0018750
- (43) 공개일자 2019년02월25일
- (62) 원출원 특허 10-2018-7006712  
원출원일자(국제) 2011년04월12일  
심사청구일자 2018년03월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2011/032143
- (87) 국제공개번호 WO 2011/130289  
국제공개일자 2011년10월20일
- (30) 우선권주장  
61/323,145 2010년04월12일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
US05945527 A\*  
WO2009012418 A2  
US20090098549 A1  
WO1990015065 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
소마로직, 인크.  
미국, 콜로라도 80301, 보울더, 윌더니스 플레이스 2945
- (72) 발명자  
롤로프, 존  
미국, 콜로라도 80303, 보울더, 605 메도우브룩 드라이브  
야너, 네보이사  
미국, 콜로라도 80301, 보울더, 6973 카터 트레일 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 5-위치 변경된 피리미딘 및 그것의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 핵산 화학의 분야에 관련된 것이며, 상세하게는 5-위치 변경된 우리딘뿐만 아니라 그것의 포스포라미디트 및 트리포스페이트 유도체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그것을 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*C07H 19/067* (2013.01)

*C07H 19/073* (2013.01)

*C07H 19/167* (2013.01)

*C07H 19/173* (2013.01)

(72) 발명자

**카터, 제프리 디.**

미국, 콜로라도 80503, 롱몬트, 7318 마운틴 셰르  
만 로드

**파울러, 카트린**

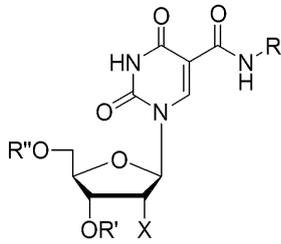
미국, 콜로라도 80305, 보울더, 3340 도버 드라이브

명세서

청구범위

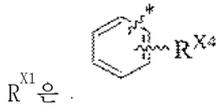
청구항 1

하기의 구조를 가지는 화합물들로부터 선택되는 화합물 또는 그것의 염:



여기에서,

R은  $-(CH_2)_n-R^{X1}$ 로 이루어지는 군으로부터 선택되고;



R<sup>X1</sup>은 . 로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

(\*는  $(CH_2)_n$  연결기에 대한 R<sup>X1</sup>기의 부착 지점을 나타낸다);

R<sup>X4</sup>는 니트릴(CN)이고;

n=0-10이고;

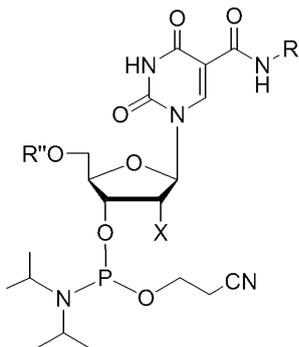
X는 -H, -OH, -OMe, -O-CHCH<sub>2</sub>, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 및 -아지도(azido)로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

R'는 -H, -Ac, -Bz, -P(N<sup>i</sup>Pr)<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN) 및 -SiMe<sub>2</sub>tBu로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 및

R''는 H, DMT(4,4'-dimethoxytrityl) 및 트리포스페이트(-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)<sub>2</sub>)으로 이루어지는 군 또는 그것의 염으로부터 선택된다.

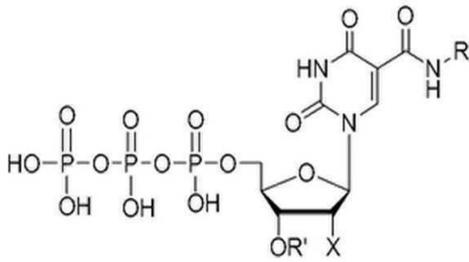
청구항 2

하기의 구조를 갖는 제1항에 따른 화합물 또는 그것의 염:



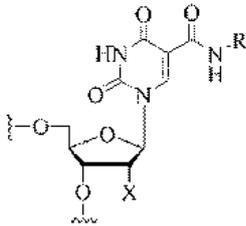
청구항 3

하기의 구조를 갖는 제1항에 따른 화합물 또는 그것의 염:



**청구항 4**

하기의 구조를 갖는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물을 포함하는 변경된 올리고뉴클레오티드:



**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 리보핵산(ribonucleic acid) 또는 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변경된 올리고뉴클레오티드.

**청구항 6**

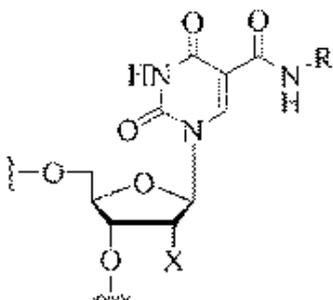
제5항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드는 독립적으로 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 위치에 화학적 치환(chemical substitution)을 포함하는 적어도 하나의 화학적 변경(chemical modification)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 변경된 올리고뉴클레오티드.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 화학적 변경은 독립적으로 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH<sub>2</sub>), 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-에틸(2'-OEt), 2'-O-프로필(2'-OPr), 2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 5-위치 피리미딘 변경(5-position pyrimidine modification), 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변경된 올리고뉴클레오티드.

**청구항 8**

하기의 구조를 갖는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 화합물을 포함하는 변경된 압타머:



**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 압타머는 리보핵산(ribonucleic acid) 또는 디옥시리보핵산(deoxyribonucleic acid)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변경된 압타머.

**청구항 10**

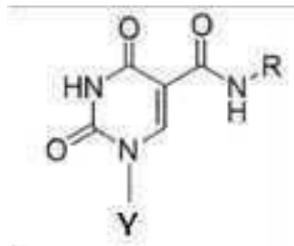
제9항에 있어서, 상기 압타머는 독립적으로 리보오스 위치(ribose position), 디옥시리보오스 위치(deoxyribose position), 포스페이트 위치(phosphate position) 및 염기 위치(base position)로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 위치에 화학적 치환(chemical substitution)을 포함하는 적어도 하나의 화학적 변경(chemical modification)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 변경된 압타머.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 상기 화학적 변경은 독립적으로 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 2'-아미노(2'-NH<sub>2</sub>), 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-OMe), 2'-O-에틸(2'-OEt), 2'-O-프로필(2'-OPr), 2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 5-위치 피리미딘 변경(5-position pyrimidine modification), 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 3' 캡(3' cap) 및 5' 캡(5' cap)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 변경된 압타머.

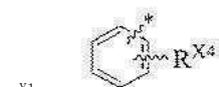
**청구항 12**

하기의 구조를 가지는 화합물들로부터 선택되는 화합물 또는 그것의 염:



여기에서,

R은 -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>X1</sup>로 이루어지는 군으로부터 선택되고;



R<sup>X1</sup>은 \*로 이루어지는 군으로부터 선택되며;

(\*는 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> 연결기에 대한 R<sup>X1</sup>기의 부착 지점을 나타내고, n=0-10이다);

R<sup>X4</sup>는 니트릴(CN)이고; 및

Y는 아라비노스(arabinose), 자일로스(xyloses), 릭소오스(lyxoses), 피라노오스당(pyranose sugars), 푸라노오스당(furanose sugars), 세도헵툴로오스(sedoheptuloses) 및 메틸 리보시드(methyl riboside)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 명세서에는 그 자체가 참조로서 본원에 통합되어 있는 2010년 4월 12일자로 출원된 미국 가출원번호 제 61/323,145호의 이점을 청구한다.

[0001]

[0002] 본 발명은 핵산 화학의 분야에 관련된 것이며, 상세하게는 5-위치 변경된 우리딘(5-position modified uridines) 뿐만 아니라 그것의 포스포라미디트(phosphoramidites) 및 트리포스페이트(triphosphate) 유도체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그것을 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides) 또는 아타머(aptamer)의 일부분으로서 변경된 뉴클레오시드(modified nucleosides)의 용도를 포함한다.

**배경 기술**

[0003] 아래의 서술은 본 개시에 관련된 정보의 요약을 제공하며, 본원에 제공된 어떠한 정보 또는 참고된 문헌들도 본 개시에 대한 선행기술임을 시인하는 것은 아니다.

[0004] 치료제, 진단제로서 및 올리고뉴클레오티드 내로의 삽입(incorporation)을 위한 변경된 뉴클레오시드를 개발하는데 많은 관심이 있어왔다. 예를 들어, AZT, ddI, d4T와 같은 변경된 뉴클레오시드 및 다른 것들이 AIDS를 치료하는데 사용되고 있다. 5-트리플루오로메틸-2'-디옥시우리딘(5'-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine)은 헤르페스성 각막염(herpetic keratitis)에 대하여 활성을 가지며, 5-이오도-1-(2-디옥시-2-플루오로-b-D-아라비노푸라노실)시토신(5-iodo-1-(2-deoxy-2-fluoro-b-D-arabinofuranosyl)cytosine)은 CMV, VZV, HSV-1, HSV-2 and EBV에 대하여 활성을 가진다(A Textbook of Drug Design and Development, Povl Krogsgaard-Larsen and Hans Bundgaard, Eds., Harwood Academic Publishers, 1991, Ch. 15).

[0005] 변경된 뉴클레오시드는 진단 응용제품에서 유용성을 나타낸다. 이 출원에서, 상기 뉴클레오시드는 확인가능한 위치에 DNA 안으로 통합되며, 다양한 진단 방법들이 변경된 뉴클레오시드의 위치를 확인하는데 사용된다. 이 방법들은 방사능표지(radiolabeling), 형광성 표지(fluorescent labeling), 비오틴닐화(biotinylation) 및 가닥 절단(strand cleavage)을 포함한다. 가닥 절단의 예는 우레아 뉴클레오시드(urea nucleoside)를 얻기 위하여 하이드라진(hydrazine)과 뉴클레오시드를 반응시킨 후, 가닥 절단을 야기하기 위하여 피페리딘(piperidine)과 우레아 뉴클레오시드를 반응시키는 것을 포함한다(맥삼-길버트법(Maxam-Gilbert method)).

[0006] 변경된 뉴클레오시드는 또한 올리고뉴클레오티드 안으로 통합된다. 이것들은 올리고뉴클레오티드가 치료제로서 유용할 수 있는 몇 가지 방식이다. 역배열(antisense) 올리고뉴클레오티드는 단백질의 발현을 방지하거나 다양한 세포 기능을 차단하기 위하여 생물체에 있는 어떤 유전적 암호 영역(genetic coding region)과 결합할 수 있다. 게다가, SELEX 과정 또는 지수 농축에 의한 리간드의 체계적 진화(Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)로 알려져 있는 과정은 선택적으로 표적 분자와 결합하는 올리고뉴클레오티드("아타머(aptamers)"로 칭함)를 확인하고 생산할 수 있게 해주는 것이다. SELEX 과정은 참조로서 본원에 통합되어 있는 내용물인 미국 등록특허번호 제5,270,163호에 개시되어 있다.

[0007] SELEX 방법은 사실상 어떤 원하는 결합 친화도 및 선택도의 기준을 달성하기 위하여 후보물질 혼합물로부터의 올리고뉴클레오티드의 선별을 포함한다. 올리고뉴클레오티드의 랜덤 혼합물에서 출발하는 상기 방법은 결합에 유리한 조건 하에서 상기 혼합물과 표적을 접촉시키고, 표적 분자에 결합한(또는 상호작용한) 올리고뉴클레오티드로부터 결합되지 않은 올리고뉴클레오티드를 분리하고, 올리고뉴클레오티드-표적 쌍을 해리시키고, 올리고뉴클레오티드-표적 쌍으로부터 해리된 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 리간드가 풍부한 올리고뉴클레오티드의 혼합물을 얻은 후, 원하는 만큼 많은 사이클을 통하여 결합, 분리, 해리 및 증폭 단계를 반복하는 것을 포함한다.

[0008] 변경된 뉴클레오시드는 SELEX 과정에 사용되거나 SELEX 과정에 의해 확인된 역배열 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), 리보자임(ribozymes) 및 올리고뉴클레오티드 내로 통합될 수 있다. 이 뉴클레오시드들은 엔도뉴클레아제(endonucleases) 및 엑소뉴클레아제(exonucleases)에 대한 올리고뉴클레오티드의 생체 내(in vivo) 및 시험관 내(in vitro) 안정성을 부여할 수 있고, 분자의 전하(charge), 친수성(hydrophilicity) 또는 친유성(lipophilicity)를 변경할 수 있고/있거나 3차원 구조에 차이를 줄 수 있다.

[0009] 앞서 기재된 뉴클레오시드의 변경은 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 5-위치 피리미딘 변경(5-position pyrimidine modification), 8-위치 퓨린 변경(8-position purin modification), 엑소시클릭 아민(exocyclic amines)에서의 변경, 4-티오우리딘(4-thiouridine)의 치환, 5-브로모-우라실(5-bromo-uracil) 또는 5-이오도-우라실(5-iodo-uracil)의 치환, 골격 변경(backbone modification) 및 메틸화(methylation)을 포함한다. 변경은 또한 캡핑(capping)과 같은 3' 및 5' 변경을 포함한다. 본원에 참조로서 통합되어 있는 PCT WO 91/14696는 세포 내로의 삽입을 증가시키기 위하여 역배열 올리고뉴클레오티드를 화학적으로 변경하는 방법을 개시하고 있다.

[0010] 본원에 그 전체가 참조로서 본원에 통합되어 있는 미국 등록특허번호 제5,428,149호, 제5,591,843호, 제

5,633,361호, 제5,719,273호 및 제5,945,527호는 팔라듐 결합 반응(palladium coupling reaction)을 통하여 피리미딘 뉴클레오시드를 변경하는 것을 개시하고 있다. 어떤 구현에서, 친핵체(nucleophile)와 일산화탄소(carbon monoxide)는 피리미딘 고리의 5-위치에 이탈기(leaving group)를 포함하는, 바람직하게는 에스테르 및 아마이드 유도체를 형성하는 피리미딘 뉴클레오시드에 결합된다.

[0011] 엑소뉴클레아제에 의한 분해에 대해 올리고뉴클레오티드가 저항성을 가지도록 하는데 다양한 방법들이 사용되어 왔다. PCT WO 90/15065는 올리고뉴클레오티드의 5' 및 3'-말단에 두 개 또는 그 이상의 포스포라미디트(phosphoramidite), 포스포모노티오네이트(phosphoromonothionate) 및/또는 포스포디티오네이트(phosphorodithionate) 결합을 삽입시킴으로써 엑소뉴클레아제-저항성 올리고뉴클레오티드를 만드는 방법을 개시하고 있다. PCT WO 91/06629는 RNA 또는 DNA를 결합할 수 있는 아세탈(acetal)/케탈(ketal)형 결합을 형성함으로써 치환된 근접한 뉴클레오시드들 사이에 하나 또는 그 이상의 포스포디에스테르 결합(phosphodiester linkage)을 가지는 올리고뉴클레오티드를 개시하고 있다.

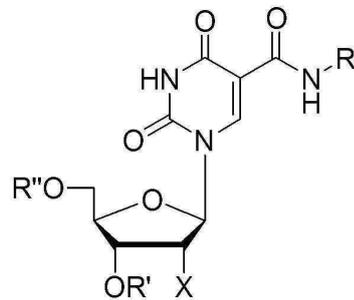
**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0012] 치료적 및 진단적 응용을 위한 그리고 올리고뉴클레오티드에의 봉입(inclusion)을 위한 새로운 뉴클레오시드를 제공하는 것은 이익이 될 것이다. 올리고뉴클레오티드에 삽입될 때, 표적 분자에 대하여 서로 다른 높은 친화력의 결합을 나타내고/나타내거나 자연발생적으로 생기는 뉴클레오시드로부터 제조된 올리고뉴클레오티드보다 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제에 대하여 증가된 저항성을 보이는 새로운 올리고뉴클레오티드를 제공하는 것은 이익이 될 것이다. 그것은 또한 엔도뉴클레아제 및 엑소뉴클레아제 저항성 외에 또는 그것에 더하여 생물학적 활성(biological activity)을 부여하는 변경을 가지는 뉴클레오티드를 제공하는데 유용할 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0013] 본 발명은 하기 일반식의 5-위치 변경된 우리딘을 제공한다:



[0014]

[0015] 여기에서,

[0016] R은  $-(CH_2)_n-R^{X1}$ 로 이루어지는 군으로부터 선택되고;



되고; R<sup>X4</sup> 치환된 페닐 고리(R<sup>X4</sup>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>)이고, 여기에서 R<sup>X4</sup>는 상기에 정의된 것이며; 카르복시산(COOH); 카르복시산 에스테르(COOR<sup>X5</sup>), 여기에서 R<sup>X5</sup>는 분지되거나 선형의 저급 알킬(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>); 및 시클로알킬(cycloalkyl)로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기에서 R<sup>X2</sup> = R<sup>X3</sup> = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>이고, 여기에서 n=0-10이고;

[0024] 여기에서,

[0025] X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 및 -아지도(azido)를 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되고;

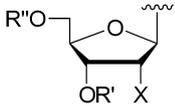
[0026] 여기에서,

[0027] R'는 -H, -Ac, -Bz 및 -SiMe<sub>2</sub>tBu를 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되고;

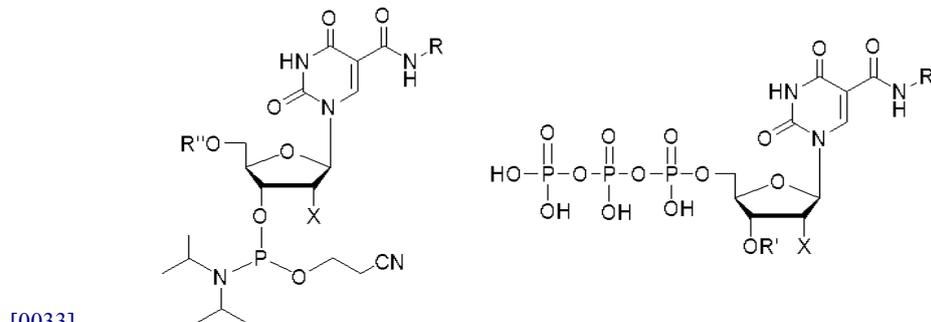
[0028] 여기에서,

[0029] R''는 H, DMT 및 트리포스페이트(-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)<sub>2</sub>) 또는 그것의 염을 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되고;

[0030] 여기에서,

[0031] 는 카르보시클릭 당 유사체(carbocyclic sugaranalogs), α-아노머 당(α-anomeric sugars), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xyloses) 또는 릭소오스(lyxoses)와 같은 에피머 당(epimeric sugars), 피라노오스 당(pyranose sugars), 푸라노오스 당(furanose sugars), 세도헵툴로오스(sedoheptuloses), 아시클릭 유사체(acyclic analogs) 및 메틸 리보사이드(methyl riboside)와 같은 어베이직 뉴클레오사이드 유사체(abasic nucleosideanalogs)로 치환될 수 있다.

[0032] 본 발명은 하기 일반식을 가지는 상기 화합물의 3'-포스포라미디트(3'-phosphoramidite) 및 5'-트리포스페이트 유도체 각각 또는 그것의 염을 포함한다:



[0034] 여기에서, 모든 부분들은 상기에 정의된 것과 같다.

[0035] 본 발명의 화합물은 이와 같은 화합물을 제조하는 표준 합성 또는 효소적 방법을 사용하는 올리고뉴클레오티드 또는 압타머 내로 삽입될 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한 본 발명의 화합물을 생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 생산된 화합물을 제공한다.

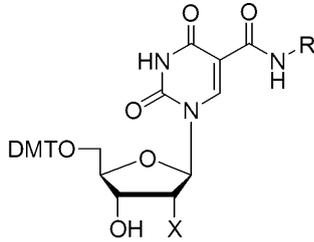
[0037] 일 구현에서, 본 발명은 염기의 존재하에서 트리플루오로에톡시카르보닐(trifluoroethoxycarbonyl)로 5-위치가 변경된 피리미딘과 아민을 함께 반응시키고 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘(C-5 modified aminocarbonylpyrimidine)을 분리하는 것을 포함하는, C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘을 제조하는 방법을 제공한다.

[0038] 다른 구현에서, 본 발명은 염기의 존재하에서 상기 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘과 시아노에틸디이소프로필-클로로포스포라미디트(cyanoethyl diisopropyl-chlorophosphoramidite)를 반응시키고 3'-포스포라미디트(3'-phosphoramidite)를 분리하는 것을 포함하는, C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘(C-5 modified

aminocarbonylpyrimidine)의 3'-포스포라미디트를 제조하는 방법을 제공한다.

[0039] 또 다른 구현에서, 본 발명은

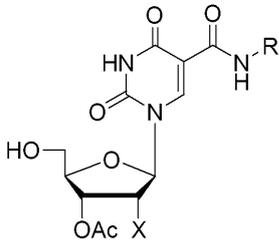
[0040] a) 염기의 존재하에서 하기 일반식을 가지는 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘과 아세트산 무수물(acetic anhydride)을 반응시키고:



[0041]

[0042] 여기에서, R 및 X는 상기에 정의된 것과 같으며,

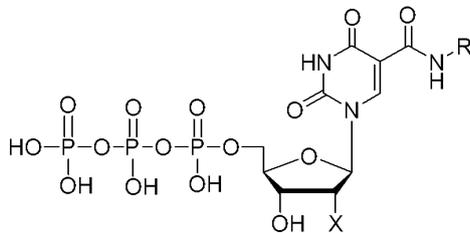
[0043] 이어서 하기 구조의 3'-아세테이트(3'-acetate)를 만들기 위하여 산(acid)을 사용하여 5'-DMT 기를 절단하고:



[0044]

[0045] b) 루트비히-에크슈타인 반응(Ludwig-Eckstein reaction) 후, 단계 a)의 3'-아세테이트에 대한 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)를 수행하고;

[0046] c) 하기의 구조를 가지는 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘의 5'-트리포스페이트 또는 그것의 염을 분리하는 것:



[0047]

[0048] 을 포함하는, C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘의 5'-트리포스페이트를 제조하기 위한 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0049] 본 발명은 치료적 및 진단적 응용에 유익한 새로운 올리고뉴클레오타이드를 제공하며, 또한 엔도뉴클레아제 및 엑소뉴클레아제 저항성 외에 또는 그것에 더하여 생물학적 활성(biological activity)을 부여하는 변경을 가지는 뉴클레오타이드를 제공한다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0050] 참조들은 본 발명의 대표적인 구현들을 상세히 만들어 줄 것이다. 본 발명이 열거된 구현들과 함께 서술되는 동안, 본 발명이 그 구현들로 한정되는 것으로 해석되어서는 안될 것이다. 그와는 반대로, 본 발명은 청구항에 의해 정의된 것과 같은 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변경 및 동등물을 포함한다.

[0051] 당업자들은 본 명세서의 실행에 사용될 수 있고 그 실행 범위 내에 있는, 본원에 설명되어 있는 것들과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질들을 알 수 있을 것이다. 본 발명은 결코 설명된 방법 및 물질들로 한정되지 않는다.

[0052] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 당업자들이 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 비록 본원에 설명된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 기구 및 물질들이 본 발명의 실행 또는 시험에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법, 기구 및 물질들을 지금 설명한다.

[0053] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문서 및 특허 출원들은 본 발명에 관련된 당업자들의 수준을 나타낸다. 본원에 인용된 모든 간행물, 공개된 특허 문서 및 특허 출원들은 개개의 간행물, 공개된 특허 문서 또는 특허 출원이 참조에 의해 통합되어 특별히 개별적으로 표시된다 할지라도, 그와 같은 정도로 참조에 의해 본원에 통합되어 있다.

[0054] 첨부된 청구항을 포함하는 본 명세서에서 사용되는 것으로서, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 달리 내용을 명확히 지시하지 않는 한 복수의 언급 대상(plural references)을 포함하며, "적어도 하나(at least one)" 및 "하나 또는 그 이상(one or more)"과 상호교환적으로 사용된다. 따라서, "아пта머(an aptamer)"에 대한 언급 대상은 aptamer의 혼합물 등을 포함한다.

[0055] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "약(about)"은 절대값과 관련된 항목의 기본함수(basic function)가 변하지 않을 만큼의 절대값의 사소한 변경 또는 차이를 나타낸다.

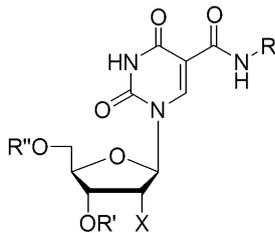
[0056] 복수의 항목을 칭하기 위하여 본원에 사용될 때, 용어 "각(each)"은 적어도 두 개의 항목을 말한다. 복수를 형성하는 모든 항목들이 관련된 부가적 한정을 만족할 필요는 없다.

[0057] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "포함하다(comprises, comprising, includes, including, contains, containing)" 및 그것들의 임의의 변형은 성분 또는 성분들의 목록을 포함하는 과정(process), 방법(method), 제법한정물건(product-by-process) 또는 물질의 구성(composition of matter)이 그 성분들만을 포함하지는 않으나, 그와 같은 과정, 방법, 제법한정물건 또는 물질의 구성에 대하여 명확하게 열거되거나 내재되어 있지 않은 다른 성분들을 포함할 수 있는 비-배타적인 포함을 포함한다.

[0058] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "뉴클레오티드(nucleotide)"는 리보뉴클레오티드(ribonucleotide) 또는 디옥시뉴클레오티드(deoxyribonucleotide) 또는 그것들의 변경된 형태뿐만 아니라 그것들의 유사체도 나타낸다. 뉴클레오티드는 퓨린(예를 들어, 아데닌(adenine), 하이포크산틴(hypoxanthine), 구아닌(guanine) 및 그것들의 유도체 및 유사체들)뿐만 아니라 피리미딘(예를 들어, 시토신(cytosine), 우라실(uracil), 티민(thymine) 및 그것들의 유도체 및 유사체들)도 포함하는 종을 포함한다.

[0060] **화합물(compounds)**

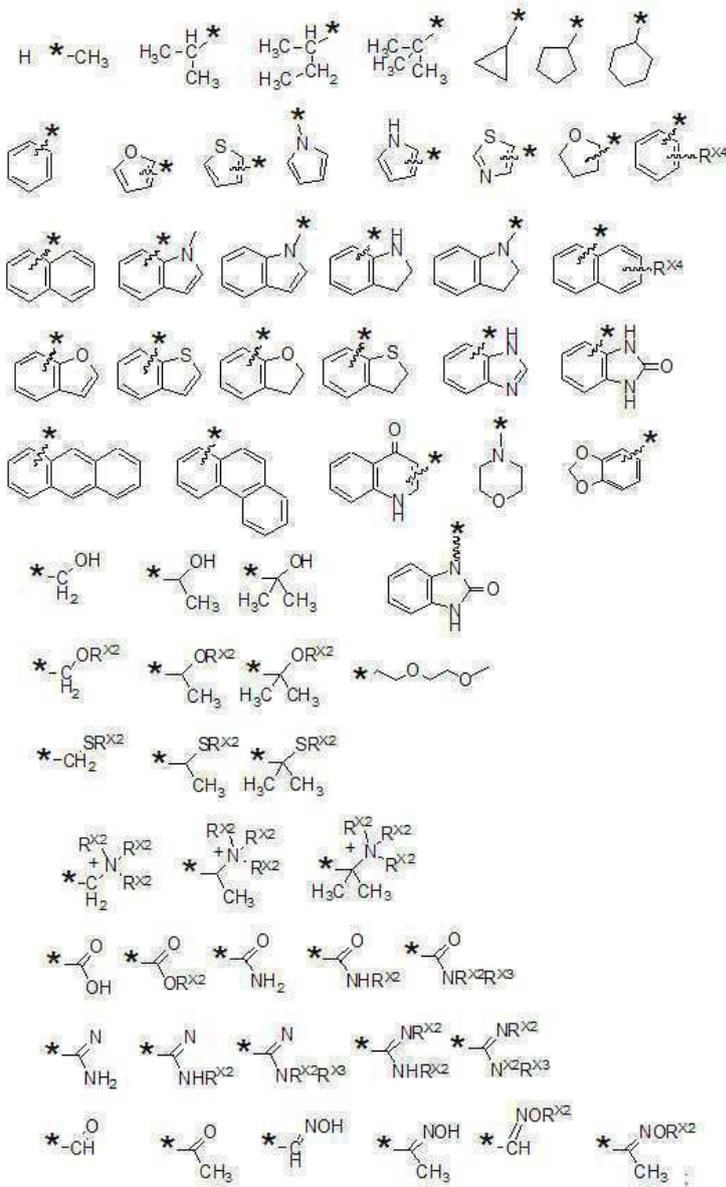
[0061] 일 구현에서, 본 발명은 하기 일반식의 화합물을 제공한다:



[0062] 여기서,  
 [0063]

[0064] R은  $-(CH_2)_n-R^{X1}$  로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0065] R<sup>X1</sup>은



[0066]

[0067] 로 이루어지는 군으로부터 선택되고(\*는 (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> 연결기에 대한 R<sup>X1</sup> 기의 부착 지점을 나타낸다);

[0068] 여기에서,

[0069] R<sup>X4</sup>는 분지되거나 선형의 저급 알킬(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>); 할로젠(halogen)(F, Cl, Br, I); 니트릴(nitrile)(CN); 브론산(boronic acid)(BO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>); 카르복시산(carboxylic acid)(COOH); ; 카르복시산 에스테르(carboxylic acid ester)(COOR<sup>X2</sup>); 1차 아미드(primary amide)(CONH<sub>2</sub>); 2차 아미드(secondary amide)(CONHR<sup>X2</sup>); 3차 아미드(tertiary amide)(CONR<sup>X2</sup>R<sup>X3</sup>); 술폰아미드(sulfonamide)(SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); N-알킬술폰아미드(N-alkylsulfonamide)(SONHR<sup>X2</sup>)로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

[0070] 여기에서,

[0071] R<sup>X2</sup>, R<sup>X3</sup>은 독립적으로 분지되거나 선형의 저급 알킬(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>); 페닐(phenyl)(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)로 이루어지는 군으로부터 선택

되고;  $R^{X4}$  치환된 페닐 고리( $R^{X4}C_6H_4$ )이고, 여기에서  $R^{X4}$ 는 상기에 정의된 것이며; 카르복시산(COOH); 카르복시산 에스테르(COOR<sup>X5</sup>), 여기에서  $R^{X5}$ 는 분지되거나 선형의 저급 알킬(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>); 및 시클로알킬(cycloalkyl)로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기에서  $R^{X2} = R^{X3} = (CH_2)_n$ 이고; 여기에서  $n=0-10$ 이고;

[0072] 여기에서,

[0073] X는 -H, -OH, -OMe, -O-알릴, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 및 -아지도(azido)를 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되고;

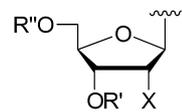
[0074] 여기에서,

[0075] R'는 -H, -Ac, -Bz 및 -SiMe<sub>2</sub>tBu를 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되고;

[0076] 여기에서,

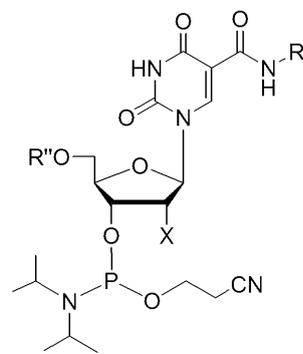
[0077] R''는 H, DMT 및 트리포스페이트(-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)-O-P(O)(OH)<sub>2</sub>) 또는 그것의 염을 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되고;

[0078] 여기에서,



[0079] 는 카르보시클릭 당 유사체(carbocyclic sugaranalogs), α-아노머 당(α-anomeric sugars), 아라비노스(arabinose)와 같은 에피머 당(epimeric sugars), 자일로스(xyloses) 또는 릭소오스(lyxoses), 피라노오스 당(pyranose sugars), 푸라노오스 당(furanose sugars), 세도헵툴로오스(sedoheptuloses), 아시클릭 유사체(acyclic analogs) 및 메틸 리보시드(methyl riboside)와 같은 어베이직 뉴클레오시드 유사체(abasic nucleosideanalogs)로 치환될 수 있다.

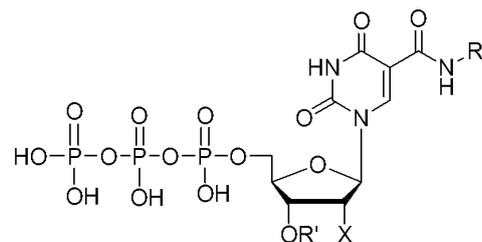
[0080] 다른 구현에서, 본 발명은 하기 일반식의 화합물 또는 그것의 염을 제공한다:



[0081]

[0082] 여기에서, R, R'' 및 X는 상기에 정의된 것과 같다. 이 일반식의 화합물은 화학 합성에 의한 올리고뉴클레오티드 내로의 변경된 뉴클레오시드의 삽입에 유용하다.

[0083] 또 다른 구현에서, 본 발명은 하기 일반식의 화합물 또는 그것의 염을 제공한다:

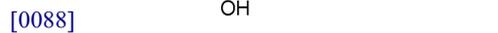


[0084]

[0085] 여기에서, R, R' 및 X는 상기에 정의된 것과 같다. 이 일반식의 화합물은 효소적 합성에 의한 올리고뉴클레오티드 내로의 변경된 뉴클레오시드의 삽입에 유용하다.

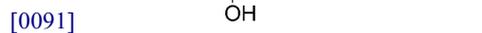
[0086] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "C-5 변경된 카르복시아미드우리딘(C-5 modified carboxyamiduridine)" 또는 "C-5 변경된 아미노카르보닐우리딘(C-5 modified aminocarbonyluridine)"은 상기에 나타낸 (R) 부분들을 포함하나 이로 제한되지는 않는 우리딘의 C-5 위치에 카르복시아미드(-C(O)NH-) 변경을 가지는 우리딘을 말한다. C-5 변경된 카르복시아미드우리딘의 예는 U.S. Pat. Nos. 5,719,273 및 5, 945,527뿐만 아니라, "뉴클레아제 저항성 올리고뉴클레오티드(Nuclease Resistant Oligonucleotides)"라는 제목으로 2010년 12월 14일자로 출원된 미국 가출원번호 61/422,957('957 출원)에 기재되어 있는 것들을 포함한다. 대표적인 C-5 변경된 피리미딘은 5-(N-벤질카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-benzylcarboxyamide)-2'-deoxyuridine)(BndU), 5-(N-벤질카르복시아미드)-2'-O-메틸우리딘(5-(N-benzylcarboxyamide)-2'-O-methyluridine), 5-(N-벤질카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-benzylcarboxyamide)-2'-fluorouridine), 5-(N-이소부틸카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-isobutylcarboxyamide)-2'-deoxyuridine)(iBudU), 5-(N-이소부틸카르복시아미드)-2'-O-메틸우리딘(5-(N-isobutylcarboxyamide)-2'-O-methyluridine), 5-(N-이소부틸카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-isobutylcarboxyamide)-2'-fluorouridine), 5-(N-트립타미노카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-N-tryptaminocarboxyamide)-2'-deoxyuridine)(TrpdU), 5-(N-트립타미노카르복시아미드)-2'-O-메틸우리딘(5-N-tryptaminocarboxyamide)-2'-O-methyluridine), 5-(N-트립타미노카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-tryptaminocarboxyamide)-2'-fluorouridine), 5-(N-[1-(3-트리메틸암모늄)프로필]카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘 클로라이드(5-(N-[1-(3-trimethylammonium)propyl]carboxyamide)-2'-deoxyuridine chloride), 5-(N-나프틸메틸카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-naphthylmethylcarboxyamide)-2'-deoxyuridine)(NapdU), 5-(N-나프틸메틸카르복시아미드)-2'-O-메틸우리딘(5-(N-naphthylmethylcarboxyamide)-2'-O-methyluridine), 5-(N-나프틸메틸카르복시아미드)-2'-플루오로우리딘(5-(N-naphthylmethylcarboxyamide)-2'-fluorouridine) 또는 5-(N-[1-(2,3-디하이드록시프로필)]카르복시아미드)-2'-디옥시우리딘(5-(N-[1-(2,3-dihydroxypropyl)]carboxyamide)-2'-deoxyuridine)을 포함한다.

[0087] 설명만을 목적으로 본원에 기재되어 있는 C-5 변경된 아미노카르보닐우리딘의 특정 예는 하기의 화합물뿐만 아니라 상기 화합물의 5'-트리포스페이트 및 3'-포스포라미드 및 그것의 염, 실시예 1-5에 기재되어 있는 합성을 포함한다:



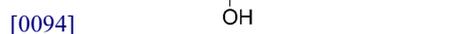
[0089] 5-(4-플루오로벤질아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘

[0090] (5-(4-Fluorobenzylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine),



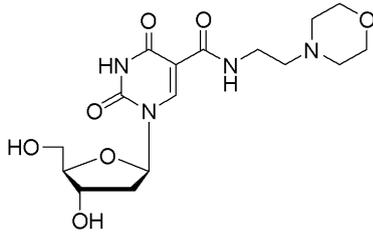
[0092] 5-((R)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘

[0093] (5-((R)-2-Furfurylmethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine),



[0095] 5-((S)-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘

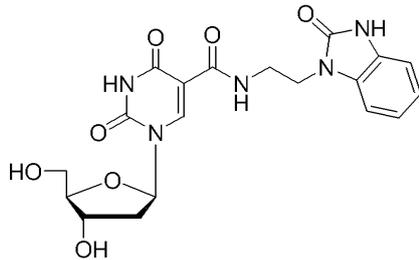
[0096] (5-((S)-2-Furfurylmethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine),



[0097]

[0098] 5-(2-(4-모폴리노)에틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘

[0099] (5-(2-(4-Morpholino)ethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine), 및



[0100]

[0101] 5-(2-(1-(3-아세틸-벤즈이미다졸로닐)에틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘

[0102] (5-(2-(1-(3-Acetyl-benzimidazolonyl))ethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine).

[0103] 본원에 기재된 C-5 변경된 우리딘의 화학적 변경은 또한 2'-위치 당 변경(2'-position sugar modification), 엑소시클릭 아민(exocyclic amines)에서의 변경 및 4-티오우리딘(4-thiouridine)의 치환 등과 단독 또는 임의의 조합으로 함께일 수 있다.

[0105] **염(Salts)**

[0106] 그것은 상기 화합물의 상응하는 염, 예를 들어 약제학적으로 허용가능한 염을 제조하고, 정제하고/하거나 다루는데 편하거나 바람직할 것이다. 약제학적으로 허용가능한 염의 예는 베르게 등에 논의되어 있다(Berge *et al.*, "Pharmaceutically Acceptable Salts" (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

[0107] 예를 들어, 만약 상기 화합물이 음이온성(anionic)이거나, 음이온이 될 수 있는 작용기(functional group)(예를 들어, -COOH는 -COO<sup>-</sup>가 될 수 있음)를 가진다면, 염은 적절한 양이온으로 만들어질 수 있다. 적절한 무기물 양이온의 예는 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>와 같은 알칼리 금속 이온, Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>와 같은 알칼리 토금속 및 Al<sup>3+</sup>과 같은 다른 양이온을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다. 적절한 유기 양이온의 예는 암모늄 이온(즉, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 및 치환된 암모늄 이온(예를 들어, NH<sub>3</sub>R<sup>x+</sup>, NH<sub>2</sub>R<sub>2</sub><sup>x+</sup>, NHR<sub>3</sub><sup>x+</sup>, NR<sub>4</sub><sup>x+</sup>)를 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다. 몇몇의 적절한 치환된 암모늄 이온의 예는 에틸아민(ethylamine), 디에틸아민(diethylamine), 디시클로헥실아민(dicyclohexylamine), 트리에틸아민(triethylamine), 부틸아민(butylamine), 에틸렌디아민(ethylenediamine), 에탄올아민(ethanolamine), 디에탄올아민(diethanolamine), 피페리진(piperazine), 벤질아민(benzylamine), 페닐벤질아민(phenylbenzylamine), 클로린(choline), 메글루민(meglumine), 및 트로메타민(tromethamine)뿐만 아니라, 리신(lysine) 및 아르기닌(arginine)과 같은 아미노산(amino acids)으로부터 유래된 것들이다. 일반적인 4차 암모늄 이온의 예는 N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>이다.

[0108] 만약 상기 화합물이 양이온성(cationic)이거나 양이온이 될 수 있는 작용기(예를 들어, -NH<sub>2</sub>는 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>가 될 수 있음)를 가진다면, 염은 적절한 음이온으로 만들어질 수 있다. 적절한 무기 음이온의 예는 하기의 무기산: 염산(hydrochloric acid), 브롬화수소산(hydrobromic acid), 요오드화 수소산(hydroiodic acid), 황산(sulfuric acid), 아황산(sulfurous acid), 질산(nitric acid), 아질산(nitrous acid), 인산(phosphoric acid) 및 아인산(phosphorous acid)으로부터 유래된 것들을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0109] 적절한 유기 음이온의 예는 하기의 유기산: 2-아세톡시벤조산(2-acetoxybenzoic acid), 아세트산(acetic acid), 아스코르브산(ascorbic acid), 아스파르트산(aspartic acid), 벤조산(benzoic acid), 캄포설폰산(camphorsulfonic acid), 신남산(cinnamic acid), 시트르산(citric acid), 에데트산(edetic acid), 에탄디설폰산(ethanedisulfonic acid), 에탄설폰산(ethanesulfonic acid), 푸마르산(fumaric acid), 글루코헵톤산(glucoheptonic acid), 글루콘산(gluconic acid), 글루탐산(glutamic acid), 글리콜산(glycolic acid), 하이드록시말레산(hydroxymaleic acid), 하이드록시나프탈렌 카르복실산(hydroxynaphthalene carboxylic acid), 이세티온산(isethionic acid), 락트산(lactic acid), 락토바이온산(lactobionic acid), 라우르산(lauric acid), 말레산(maleic acid), 말산(malic acid), 메탄설폰산(methanesulfonic acid), 무스산(mucic acid), 올레산(oleic acid), 옥살산(oxalic acid), 팔미트산(palmitic acid), 파모산(pamoic acid), 판토텐산(pantothenic acid), 페닐아세트산(phenylacetic acid), 페닐설폰산(phenylsulfonic acid), 프로피온산(propionic acid), 피루브산(pyruvic acid), 살리실산(salicylic acid), 스테아르산(stearic acid), 숙신산(succinic acid), 설파닐산(sulfanilic acid), 타르타르산(tartaric acid), 톨루엔설폰산(toluenesulfonic acid) 및 발레르산(valeric acid)으로부터 유래된 것들을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다. 적절한 고분자형(polymeric) 유기 음이온의 예는 하기의 고분자형 산(polymeric acid): 탄닌산(tannic acid), 카르복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose)으로부터 유래된 것들을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0110] 달리 한정하지 않는 한, 특정 화합물에 대한 언급은 또한 그것들의 염 형태를 포함한다.

[0112] **올리고뉴클레오티드(oligonucleotides)의 제조**

[0113] 일 양상에서, 본 발명은 변경된 올리고뉴클레오티드를 제조하기 위하여, 본원에 기재된 변경된 뉴클레오시드를 단독으로 또는 다른 변경된 뉴클레오시드 및/또는 자연발생적으로 생기는 뉴클레오시드와 함께 사용하기 위한 방법을 제공한다. 올리고디옥시뉴클레오시드의 자동화된 합성은 많은 실험실에 있어서 통상적인 일이다(예를 들어, 참조로서 본원에 통합되어 있는 내용인 Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**:3185-3191 참고). 올리고리보뉴클레오시드의 합성 또한 잘 알려져 있다(예를 들어, 참조로서 본원에 통합되어 있는 Scaringe, S. A., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **18**:5433-5441 (1990)를 참조). 상기에 언급한 바와 같이, 포스포라미드트는 화학적 합성에 의한 올리고뉴클레오티드 내로의 변경된 뉴클레오시드의 삽입에 유용하며, 트리포스페이트는 효소적 합성에 의한 올리고뉴클레오티드 내로의 변경된 뉴클레오시드의 삽입에 유용하다(예를 들어, 각각 그 자체가 참조로서 본원에 통합되어 있는 Vaught, J. V., *et al.* (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 4141-4151; Gait, M. J. "Oligonucleotide Synthesis a practical approach" (1984) IRL Press (Oxford, UK); Herdewijn, P. "Oligonucleotide Synthesis" (2005) Humana Press, Totowa, NJ을 참조).

[0114] 본원에 사용된 것으로서, 올리고뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때 용어 "변경하다(modify)", "변경된(modified)", "변경(modification)" 및 그것들의 임의의 변형은 올리고뉴클레오티드의 4개의 구성성분 뉴클레오티드 염기(즉, A, G, T/U 및 C) 중 적어도 하나가 자연발생적으로 생기는 뉴클레오티드의 유사체 또는 에스테르임을 의미한다. 어떤 구현에서, 변경된 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드에 뉴클레아제 저항성을 부여한다. 부가적인 변경은 골격 변경(backbone modification), 메틸화(methylation), 이소염기 이소시티딘(isocytidine) 및 이소구아닌(isoguanidine) 등과 같은 특이한 염기쌍 조합을 포함할 수 있다. 변경은 또한 캡핑(capping)과 같은 3' 및 5' 변경을 포함할 수 있다. 다른 변경은 유사체로 하나 또는 그 이상의 자연발생적으로 생기는 뉴클레오티드의 치환; 예를 들어, 비전하 결합(uncharged linkages)을 가지는 것들(예를 들어, 메틸 포스포네이트(methyl phosphonates), 포스포트리에스테르(phosphotriesters), 포스포아미데이트(phosphoamides), 카바메이트(carbamates) 등), 전하 결합(charged linkages)을 가지는 것들(예를 들어, 포스포로티오에이트(phosphorothioates), 포스포로디티오에이트(phosphorodithioates) 등), 인터칼레이터(intercalator)를 가지는 것들(예를 들어, 아크리딘(acridine), 솔라렌(psoralen) 등), 킬레이터(chelators)를 포함하는 것들(예를 들어, 금속(metals), 방사성 금속(radioactive metals), 붕소(boron), 산화성 금속(oxidative metals) 등), 알킬레이터(alkylators)를 포함하는 것들, 및 변경된 결합(modified linkages)을 가지는 것들(예를 들어, 알파 아노머 핵산(alpha anomeric nucleic acid) 등)과 같은 인터뉴클레오티드(internucleotide) 변경을 포함할 수 있다. 더욱이, 뉴클레오티드의 당에 통상적으로 존재하는 임의의 하이드록실기(hydroxyl group)는 추가적인 뉴클레오티드 또는 고체 지지체에 추가적인 결합을 만들기 위하여 포스포네이트 기(phosphonate group) 또는 포스페이트 기(phosphate group)로 치환되거나; 표준 보호기(standard protecting groups)로 보호되거나; 활성화될 수 있다. 5' 및 3' 말단의 OH 기는 인산화되거나, 아민, 약 1 내지 약 20개의 탄소 원자의 유기 캡핑기 부분, 일 구현에서 약 10 내지 약 80 kDa 범위의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 폴리머, 다른 구현에서 약 20 내지 약 60 kDa 범위의 폴리에틸렌글리콜 폴리머 또는 다른 친수성 또는 소수성의 생물학적 또는 합성 폴리머로 치환될 수 있다.

- [0115] 폴리뉴클레오티드는 또한 2'-0-메틸(2'-0-methyl), 2'-0-알릴(2'-0-allyl), 2'-0-에틸(2'-0-ethyl), 2'-0-프로필(2'-0-propyl), 2'-0-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, 2'-플루오로-(2'-fluoro-) 또는 2'-아지도(2'-azido), 카르보시클릭 당 유사체(carbocyclic sugar analogs), α-아노머 당(α-anomeric sugars), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xyloses) 또는 릭소오스(lyxoses)와 같은 에피머 당(epimeric sugars), 피라노오스 당(pyranose sugars), 푸라노오스 당(furanose sugars), 세도헵툴로오스(sedoheptuloses), 아시클릭 유사체(acyclic analogs) 및 메틸 리보시드(methyl riboside)와 같은 어베이직 뉴클레오시드 유사체(abasic nucleosideanalogs)를 포함하는, 당염계에 일반적으로 공지되어 있는 리보오스(ribose) 또는 디옥시리보오스(deoxyribose) 당의 유사 형태(analogous form)를 포함할 수 있다. 상기에 언급한 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 포스포디에스테르 결합은 대안적인 결합기(linking group)으로 치환될 수 있다. 이러한 대안적인 결합기는 구현들을 포함하며, 여기에서 포스페이트는 P(O)S ("티오에이트(thioate)"), P(S)S ("디티오에이트(dithioate)"), (O)NR<sup>x</sup> ("아미데이트(amidate)"), P(O)R<sup>x</sup>, P(O)OR<sup>x</sup>, CO 또는 CH<sub>2</sub> ("포름아세탈(formacetal)")로 치환되며, 여기에서 각각의 R<sup>x</sup> 또는 R<sup>x</sup>'은 독립적으로 H 또는 선택적으로 에테르(-O-) 결합, 아릴(aryl), 알케닐(alkenyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl) 또는 아랄딜(araldyl)을 포함하는 치환 또는 비치환된 알킬(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)이다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 결합이 동일할 필요는 없다. 당, 퓨린 및 피리미딘의 유사 형태의 치환은 예를 들어, 폴리아미드 골격(polyamide backbone)과 같은 대안적인 골격 구조일 수 있으므로 최종 생성물을 설계하는데 유리할 수 있다.
- [0116] 만약 존재한다면, 뉴클레오티드 구조에 대한 변경은 폴리머의 조립(assembly) 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 표지 성분(labeling component)과의 결합에 의해서와 같이 중합 후에 더 변경될 수 있다.
- [0117] 본원에 사용된 것으로서, "핵산(nucleic acid)", "올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)" 및 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 뉴클레오티드의 폴리머를 칭하는데 상호교환적으로 사용되며, DNA, RNA, DNA/RNA 하이브리드 및 이러한 종류의 핵산의 변경, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기에서 임의의 위치에서의 뉴클레오티드 단위에 대한 다양한 전체 또는 부분들의 부착도 포함된다. 용어 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 이중 또는 단일 가닥 분자뿐만 아니라 삼중-나선구조(triple-helical) 분자도 포함한다. 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드는 용어 압타머보다 더 광범위한 용어이므로, 상기 용어 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드는 압타머인 뉴클레오티드의 폴리머를 포함하지만, 상기 용어 핵산, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드는 압타머로 한정되지 않는다.
- [0118] 본원에 사용된 것으로서, 핵산의 변경을 칭할 때 용어 "적어도 하나의 뉴클레오티드(at least one nucleotide)"는 핵산에서 임의의 또는 모든 A, C, T, G 또는 U의 임의의 또는 모든 존재가 변경되거나 변경되지 않을 수 있다는 것을 나타내는, 핵산에서의 하나, 여러 개 또는 모든 뉴클레오티드를 말한다.
- [0119] 다른 양상에서, 본 발명은 압타머와 (하기에 기재되어 있는)소마머(SOMAmers)를 제조하기 위한, 본원에 기재된 변경된 뉴클레오티드를 단독으로 또는 다른 변경된 뉴클레오티드 및/또는 자연발생적으로 생기는 뉴클레오티드와 함께 사용하는 방법을 개시한다. 특정 구현에서, 상기 압타머 및 소마머는 하기에 기재된 것과 같은 일반적인 SELEX 또는 향상된 SELEX 과정을 사용하여 제조된다.
- [0120] 본원에 사용된 것으로서, "핵산 리간드(nucleic acid ligand)", "압타머(aptamer)", "소마머(SOMAmer)" 및 "클론(clone)"은 표적 분자에 바람직한 작용을 하는 비-자연발생적으로 생기는 핵산을 칭하는데 상호교환적으로 사용된다. 바람직한 작용은 표적에 결합하는 것, 표적을 촉매적으로 바꾸는 것, 표적 또는 표적의 기능 활성을 변경하거나 바꾸는 방식으로 표적과 반응하는 것, (자살 억제제(suicide inhibitor)의 경우에서와 같이) 표적에 공유적으로 결합하는 것, 그리고 표적과 다른 분자들 사이의 반응을 용이하게 하는 것을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다. 일 구현에서, 상기 작용은 표적 분자에 특이적인 결합 친화력이고, 그와 같은 표적 분자는 왓슨/크릭 염기쌍 또는 삼중 나선구조 형성과는 관계없는 메카니즘을 통하여 핵산 리간드에 결합하는 폴리뉴클레오티드와는 다른 3차원 화학 구조이며, 여기에서 압타머는 표적 분자에 결합되어 있는 공지의 생리학적 기능을 가지는 핵산이 아니다. 주어진 표적에 대한 압타머는 압타머가 표적의 리간드인 경우, (a) 표적과 후보물질 혼합물을 접촉시키고, 여기에서 후보물질 혼합물에서 다른 핵산에 관련된 표적에 대하여 증가된 친화력을 가지는 핵산이 상기 후보물질 혼합물의 나머지에서 분리될 수 있고, (b) 상기 후보물질 혼합물의 나머지에서 증가된 친화력의 핵산을 분리하고, (c) 리간드가 풍부한 핵산 혼합물을 얻기 위하여 증가된 친화력의 핵산을 증폭하고, 그것에 의하여 표적 분자의 압타머가 확인되는 것을 포함하는 방법에 의하여 핵산의 후보물질 혼합물로부터

확인된 핵산을 포함한다. 친화적 상호작용은 정도의 문제이지만, 이 문맥에서 그것의 표적에 대한 압타머의 "특이적 결합 친화력(specific binding affinity)"은 일반적으로 혼합물 또는 샘플에서 그것이 다른 비-표적, 성분에 결합하는 것보다 더 높은 정도의 친화력으로 그것의 표적에 결합하는 것을 의미한다. "압타머", "소마머" 또는 "핵산 리간드"는 특정 뉴클레오티드 서열을 가지는 핵산 분자의 한 형태 또는 종의 복제체이다. "압타머"는 임의의 적절한 수의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. "압타머"는 둘 이상의 그러한 분자 세트를 말한다. 서로 다른 압타머는 동일하거나 다른 수의 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 압타머는 DNA 또는 RNA일 수 있고, 단일 가닥, 이중 가닥일 수 있고, 또는 이중 가닥 또는 삼중 가닥 영역을 포함할 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 것으로서, "소마머(SOMAmer)" 또는 느린 오프-레이트 변경된 압타머(Slow Off-Rate Modified Aptamer)는 향상된 오프-레이트 특성을 가지는 압타머를 말한다. 소마머는 "향상된 오프-레이트를 가지는 압타머를 만들어내기 위한 방법"이라는 제목의 미국 공개특허번호 제20090004667호에 기재된 향상된 SELEX 방법으로 사용하여 만들어질 수 있다.

[0122] 본원에 사용된 것으로서, "단백질(protein)"은 "펩티드(peptide)", "폴리펩티드(polypeptide)" 또는 "펩티드 단편(peptide fragment)"과 동의어로 사용된다. "정제된(purified)" 폴리펩티드, 단백질, 펩티드 또는 펩티드 단편은 아미노산 서열이 얻어지는 세포, 조직 또는 세포를 포함하지 않는 공급원으로부터의 세포 물질(cellular material) 또는 다른 오염된 단백질을 실질적으로 포함하지 않거나, 화학적으로 합성될 때 화학 전구체 또는 다른 화학물질을 실질적으로 포함하지 않는다.

[0124] **SELEX 방법**

[0125] 용어 "SELEX" 및 "SELEX 과정(SELEX process)"은 일반적으로 (1) 예를 들어, 단백질에 대한 높은 결합력으로 결합하는 바람직한 방식으로 표적 분자와 상호작용하는 핵산의 선별과 (2) 선별된 핵산들의 증폭의 조합을 칭하는데 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 SELEX 과정은 특정 표적 분자 또는 바이오마커에 대한 높은 친화력을 가지는 압타머를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0126] SELEX는 일반적으로 핵산의 후보물질 혼합물을 제조하고, 친화 복합체(affinity complex)를 형성하기 위하여 원하는 표적 분자에 후보물질 혼합물을 결합시키고, 결합하지 않은 후보물질 핵산으로부터 친화 복합체를 분리하고, 상기 친화 복합체로부터 핵산을 분리하고 단리하고, 상기 핵산을 정제하고, 특정 압타머 서열을 확인하는 것을 포함한다. 상기 과정은 선별된 압타머의 친화력을 더 개선하기 위하여 다수의 라운드를 포함할 수 있다. 상기 과정은 상기 과정의 하나 또는 그 이상의 지점에 증폭 단계를 포함할 수 있다(예를 들어, U.S. Patent No. 5,475,096, entitled "Nucleic Acid Ligands."를 참조). 상기 SELEX 과정은 그것의 표적과 공유적으로 결합하는 압타머뿐만 아니라, 그것의 표적과 비공유적으로 결합하는 압타머를 만드는데도 사용될 수 있다(예를 들어, U.S. Patent No. 5,705,337 entitled "Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX."를 참조).

[0127] 상기 SELEX 과정은 압타머에 예를 들어, 향상된 생체 내(*in vivo*) 안정성 또는 향상된 운반 특성과 같은 향상된 특성을 부여하는 변경된 뉴클레오티드를 포함하는 고친화성 압타머를 확인하는데 사용될 수 있다. 이와 같은 변경의 예는 리보오스 및/또는 포스페이트 및/또는 염기 위치(base position)에서의 화학적 치환을 포함한다. 변경된 뉴클레오티드를 포함하는 SELEX 과정에 의해 확인된 압타머들은 피리미딘의 5'- 및 2'-위치에 화학적으로 변경된 뉴클레오티드 유도체를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 설명하고 있는 미국 등록특허번호 제 5,660,985호에 기재되어 있다(U.S. Patent No. 5,660,985, entitled "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides"). 앞의 미국 등록특허번호 제5,580,737호는 2'-아미노(2'-NH<sub>2</sub>), 2'-플루오로(2'-F), 및/또는 2'-O-메틸(2'-OMe)로 변경된 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 포함하는 매우 특이적인 압타머를 개시하고 있다. 또한, 미국 출원공개번호 제20090098549호는 확장된 물리적 및 화학적 특성을 가지는 핵산 라이브러리 및 SELEX 및 광SELEX에서의 그것의 용도를 개시하고 있다(U.S. Patent Application Publication No. 20090098549, entitled "SELEX and PHOTOSELEX").

[0128] SELEX는 또한 원하는 오프-레이트 특성을 가지는 압타머를 확인하는데 사용될 수 있다. 그 자체가 본원에 참조로서 통합되어 있는, "향상된 오프-레이트를 가지는 압타머를 만들기 위한 방법"이라는 제목의 미국 공개특허번호 제20090004557호는 표적 분자에 결합할 수 있는 압타머를 만들기 위한 향상된 SELEX 방법을 개시하고 있다. 그것들 각각의 표적 분자로부터 느린 분해 속도를 가지는 압타머 및 광압타머를 생산하기 위한 방법이 개시되어 있다. 상기 방법은 표적 분자와 후보물질 혼합물을 접촉시키고, 핵산-표적 복합체의 형성이 일어나도록 하고, 느린 오프-레이트 농축 과정(enrichment process)을 수행하는 것을 포함하며, 여기에서 빠른 분해 속도를 가지는 핵산-표적 복합체는 분해되어 재형성되지 않는 반면, 느린 분해 속도를 가지는 복합체는 그대로 유지된다.

추가적으로, 상기 방법은 향상된 오프-레이트 성능을 가지는 압타머를 만들기 위한 후보 핵산 혼합물의 생성에 변경된 뉴클레오티드의 사용을 포함한다(U.S. Patent PublicationNo. 20090098549, entitled "SELEX and PhotoSELEX", U.S. Patent No. 7,855,054 및 U.S. Patent PublicationNo. 20070166740 참조, 각각의 이 출원들은 그 자체가 참조로서 본원에 통합되어 있다).

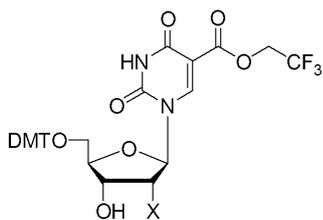
[0129] "표적(target)" 또는 "표적 분자(target molecule)"는 본원에서 핵산이 바람직한 방식으로 작용할 수 있는 임의의 화합물을 말한다. 표적 분자는 아무런 제한 없이, 단백질(protein), 펩티드(peptide), 핵산(nucleic acid), 탄수화물(carbohydrate), 지질(lipid), 다당류(polysaccharide), 당단백질(glycoprotein), 호르몬(hormone), 수용체(receptor), 항원(antigen), 항체(antibody), 바이러스(virus), 병원체(pathogen), 독성 물질(toxic substance), 기질(substrate), 대사물질(metabolite), 전이 상태 유사체(transition state analog), 보조인자(cofactor), 억제제(inhibitor), 약물(drug), 염료(dye), 영양물질(nutrient), 성장인자(growth factor), 세포(cell), 조직(tissue), 임의의 앞서 언급한 것들의 임의의 부분 또는 단편 등일 수 있다. 사실상 임의의 화학적 또는 생물학적 반응기(effector)가 적절한 표적이 될 수 있다. 임의의 크기의 분자들을 표적으로 들 수 있다. 표적은 또한 표적과 핵산 간의 상호작용의 가능성 또는 세기를 증가시키기 위한 어떤 방식으로 변경될 수 있다. 표적은 또한 단백질의 경우에 있어서, 예를 들어 아미노산 서열에서의 경미한 변화, 이황화 결합의 형성(disulfide bond formation), 글리코실화(glycosylation), 지질화(lipidation), 아세틸화(acetylation), 인산화(phosphorylation) 또는 실질적으로 분자의 고유성을 변경하지 않는 표지 성분과의 결합과 같은 임의의 다른 조작 또는 변경과 같은 특정 화합물 또는 분자의 임의의 경미한 변화를 포함할 수 있다. "표적 분자" 또는 "표적"은 압타머에 결합할 수 있는 분자 또는 다분자(multimolecular) 구조의 한 형태 또는 종의 복제 세트이다. "표적 분자" 또는 "표적"은 둘 이상의 그러한 분자 세트를 말한다. 표적이 펩티드인 SELEX 과정의 구현은 미국 등록특허번호 제6,376,190호에 기재되어 있다(U.S. Patent No. 6,376,190, entitled "Modified SELEX Processes Without Purified Protein.").

[0131] **화학적 합성**

[0132] 본 발명에서 제공되는 화합물의 화학적 합성을 위한 방법을 본원에 설명한다. 이것들 및/또는 다른 잘 알려진 방법들은 본 발명에서 제공되는 추가적인 화합물의 합성을 용이하게 하기 위하여 공지된 방식으로 변경되고/되거나 개조될 수 있다.

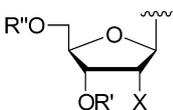
[0133] 도식 1을 참고로 하여, 일 접근법에서, 염기의 존재하에서 트리플루오로에톡시카르보닐로 5-위치에서 변경된 피리미딘과 아민을 반응시키고, 상기 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘을 분리함으로써 본 발명의 C-5 위치 변경된 아미노카르보닐피리미딘을 제조하였다.

[0134] 어떤 구현에서, 상기 트리플루오로에톡시카르보닐피리미딘은 하기 구조:



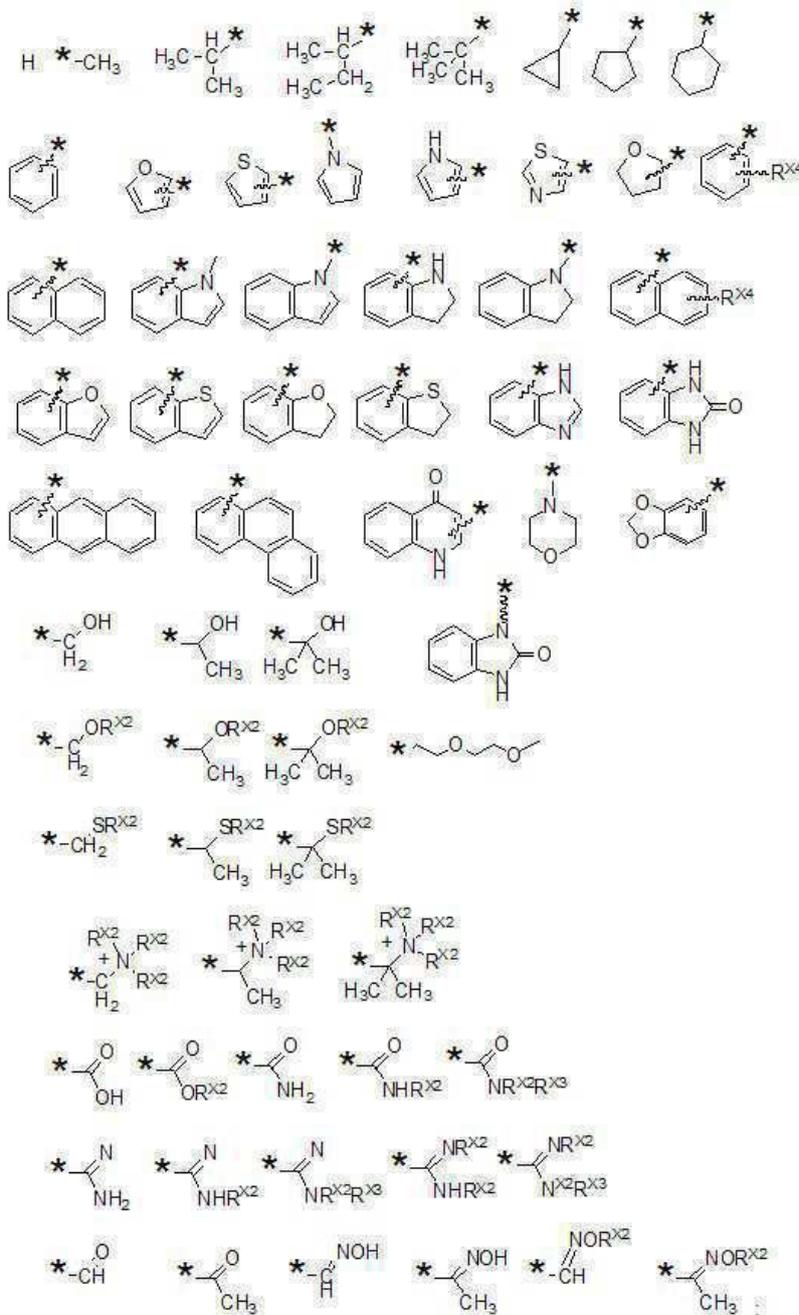
[0135] 를 가지는 화합물을 포함하나 이로 제한되지 않는 화합물의 군으로부터 선택되고, 여기에서

[0138] \*X는 -H, -OH, -OMe, -O-알킬, -F, -OEt, -OPr, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 및 -아지도를 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택되고, 여기에서



[0139] 는 카르보시클릭 당 유사체(carbocyclic sugaranalogs), α-아노머 당(α-anomeric sugars), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xyloses) 또는 릭소오스(lyxoses)와 같은 에피머 당(epimeric sugars), 피라노오스 당(pyranose sugars), 푸라노오스 당(furanose sugars), 세도헵툴로오스(sedoheptuloses), 아시클릭 유사체(acyclic analogs) 및 메틸 리보사이드(methyl riboside)와 같은 어베이직 뉴클레오사이드 유사체(abasic nucleosideanalogs)로 치환될 수 있다. 어떤 구현에서, 상기 아민은 식 RNH<sub>2</sub>의 화합물을 포함하나 이로 제한되

지 않는 군으로부터 선택되고, 여기에서 R은  $-(CH_2)_n-R^{X1}$ 으로 이루어지는 군으로부터 선택되고,  $R^{X1}$ 은



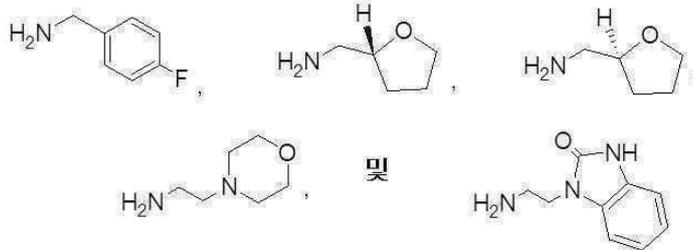
[0140]

[0141] 로 이루어지는 군으로부터 선택되고(\*는  $(CH_2)_n$  연결기에 대한  $R^{X1}$ 기의 부착 지점을 나타낸다); 여기에서,

[0142]  $R^{X4}$ 는 분지되거나 선형의 저급 알킬( $C_1-C_{20}$ ); 할로젠(halogen)(F, Cl, Br, I); 니트릴(nitrile)(CN); 브론산(boronic acid)( $BO_2H_2$ ); 카르복시산(carboxylic acid)(COOH); ; 카르복시산 에스테르(carboxylic acid ester)( $COOR^{X2}$ ); 1차 아미드(primary amide)( $CONH_2$ ); 2차 아미드(secondary amide)( $CONHR^{X2}$ ); 3차 아미드(tertiary amide)( $CONR^{X2}R^{X3}$ ); 술폰아미드(sulfonamide)( $SO_2NH_2$ ); N-알킬술폰아미드(N-alkylsulfonamide)( $SONHR^{X2}$ )로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 여기에서,

[0143]  $R^{X2}$  및  $R^{X3}$ 은 독립적으로 분지되거나 선형의 저급 알킬( $C_1-C_{20}$ ); 페닐(phenyl)( $C_6C_5$ )로 이루어지는 군으로부터 선택되고;  $R^{X4}$  치환된 페닐 고리( $R^{X4}C_6H_4$ )이고, 여기에서  $R^{X4}$ 는 상기에 정의된 것이며; 카르복시산( $COOH$ ); 카르복시산 에스테르( $COOR^{X5}$ ), 여기에서  $R^{X5}$ 는 분지되거나 선형의 저급 알킬( $C_1-C_{20}$ ); 및 시클로알킬(cycloalkyl)로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 여기에서  $R^{X2} = R^{X3} = (CH_2)_n$ 이고, 여기에서  $n=0-10$ 이다.

[0144] 특정 구현에서, 상기 아민은

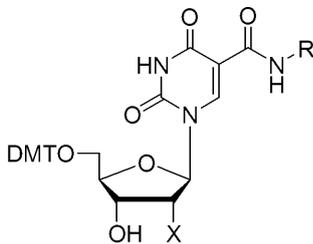


[0145]

[0146] 으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0147] 어떤 구현에서, 상기 염은 트리에틸아민(triethylamine), 디이소프로필아민(diisopropylamine) 등으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 3차 아민(tertiary amine)이다.

[0148] 도식 1을 참고로 하여, 본 발명은 또한 염기의 존재하에서 시아노에틸디이소프로필클로로포스포라미디트(cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidite)와 상기 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘을 반응시키고, 3'-포스포라미디트(3'-phosphoramidite)를 분리하는 것을 포함하는 C-5 변경된 아미노카르보닐 피리미딘의 3'-포스포라미디트의 합성방법을 제공한다. 어떤 구현에서, 상기 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘은 하기의 구조를 가지며:

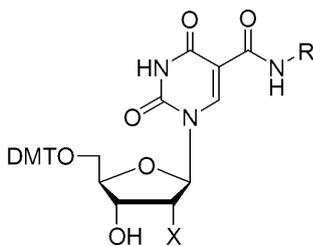


[0149]

[0150] 여기에서, R 및 X는 상기에 정의된 것과 같다. 어떤 구현에서, 상기 염기는 트리에틸아민, 디이소프로필아민 등으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 3차 아민이다.

[0151] 다시 도식 1을 참고로 하여, 본 발명은

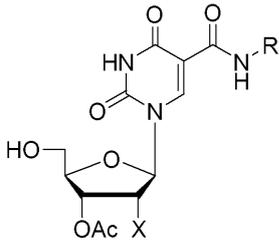
[0152] a) 염기의 존재하에서 하기의 식을 가지는 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘과 아세트산 무수물(acetic anhydride)을 반응시키고,



[0153]

[0154] 여기에서, R 및 X는 상기에 정의된 것과 같으며,

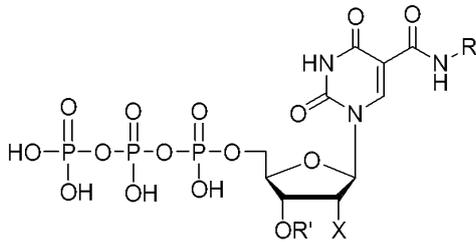
[0155] 이어서 하기 구조의 3'-아세테이트를 만들기 위하여 산(acid)을 이용하여 5'-DMT 기를 절단하고,



[0156]

[0157] b) 루트비히-에크슈타인 반응(Ludwig-Eckstein reaction) 후, 단계 a)의 3'-아세테이트에 대한 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)를 수행하고;

[0158] c) 하기의 구조를 가지는 C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘의 5'-트리포스페이트 또는 그것의 염을 분리하는 것:

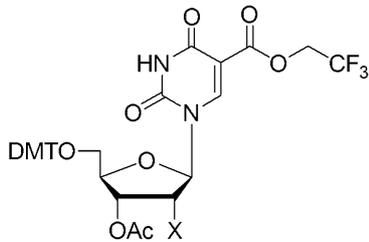


[0159]

[0160] 을 포함하는, C-5 변경된 아미노카르보닐피리미딘의 5'-트리포스페이트의 합성방법을 제공한다.

[0161] 상기 사용된 염기는 3차 아민을 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택된다. 어떤 구현에서, 상기 염기는 피리딘(pyridine)이다. 단계 a에서 사용된 산은 디클로로아세트산(dichloroacetic acid), 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid) 및 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol)을 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택된다.

[0162] 대안적인 접근법에서, 트리플루오로에톡시카르보닐피리미딘은 하기의 구조를 가진다:



[0163]

[0164] 도식 2를 참고로 하여, 이 화합물은 팔라듐 촉매(palladium catalyst)와 염기(base)의 존재하에서 도식 2의 화합물(7)과 일산화탄소(carbon monoxide) 및 트리플루오로에탄올(trifluoroethanol)의 반응에 의해 형성된다. 상기 염기는 트리에틸아민 등으로부터 선택되는 3차 아민을 포함하나 이로 제한되지 않는 군으로부터 선택된다.

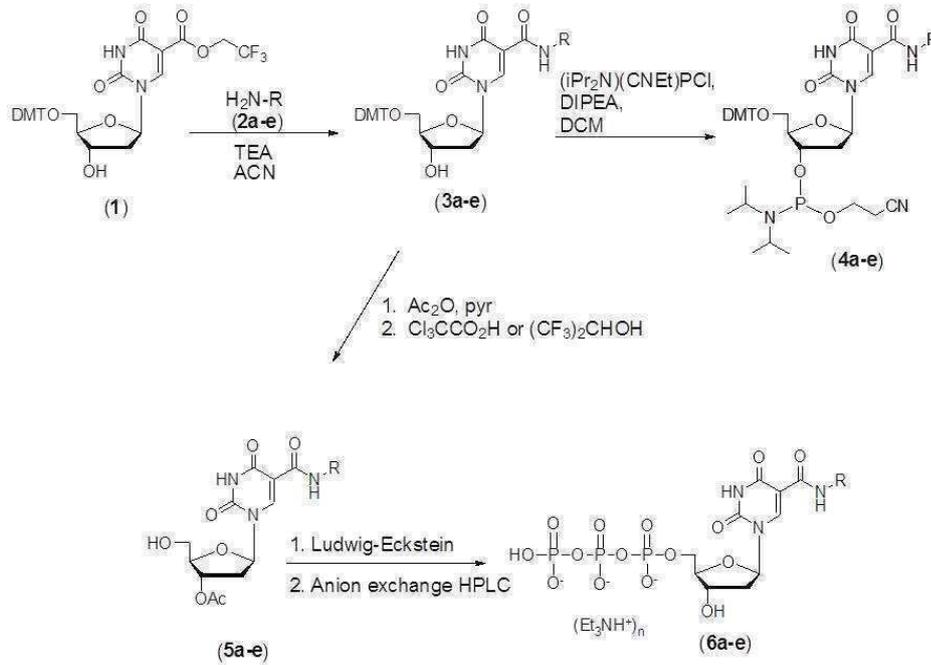
[0165] 본 발명은 상기 기재된 각각의 방법에 의해 제조된 화합물을 포함한다.

[0167] **실시예**

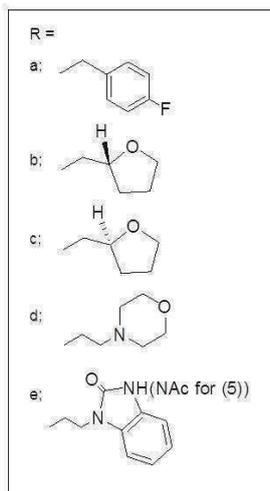
[0168] 하기의 실시예들은 단지 설명을 목적으로 제공되며, 첨부된 청구항에 의해 정의된 것과 같은 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에 기재되어 있는 모든 실시예들은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적인 표준 기술을 사용하여 수행된다. 하기의 실시예들에 기재되어 있는 일반적인 분자 생물학 기술은 샘브룩 등과 같은 표준 실험실 매뉴얼에 기재되어 있는 것과 같이 수행될 수 있다(Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001)).

[0169] 하기의 일반적인 방법들은 실시예 1-3 및 5에 기재되어 있는 변경된 뉴클레오시드를 생산하기 위하여 사용된다. 본원에 사용된 명명법은 마즈다 등에 기재되어 있는 시스템에 기초하고 있다(Matsuda *et al.* *Nucleic Acids Research* 1997, 25:2784-2791).

[0170] 도식 1



[0171]



[0172]

[0174] **실시예 1: 5'-O-DMT-dU-5-카르복사미드(5'-O-DMT-dU-5-Carboxamides)의 합성 (3a-e)**

[0175] 5'-O-디메톡시트리틸-5-(4-플루오로벤질아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘(5'-O-Dimethoxytrityl-5-(4-fluorobenzylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine) (3a).

[0176] 마즈다 등의 방법에 의해 출발 물질인 5'-O-디메톡시트리틸-5-트리플루오로에톡시카르보닐-2'-디옥시우리딘(5'-O-dimethoxytrityl-5-trifluoroethoxycarbonyl-2'-deoxyuridine) (1)을 제조하였다(Nomura, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*:2784-2791; Ito, T., Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*:2514-2523). (1)의 용액(9.85 g, 15 mmol), 4-플루오로벤질아민(4-fluorobenzylamine)(2a)(2.25 g, 18 mmol, 1.3 eq), 트리에틸아민(triethylamine)(4.2 mL, 30 mmol) 및 무수아세토니트릴(anhydrous acetonitrile)(30 mL)을 불활성 환경하에서 2-24시간 동안 60-70°C에서 가열하였다. (1)의 아미드 (3a)로의 정량적 전환을 박층 크로마토그래피(실리카 겔 60, 5% 메탄올/디클로로메탄) 또는 HPLC로 확인하였다. 반응 혼합물을 진공하에서 농축하고, 잔류물을 1% 트리에틸아민/99% 에틸 아세테이트에 용해시킨 0-3% 메탄올의 용리액을 사용하여 실리카 겔 플래쉬 크로마토그래피(Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. J. *Org. Chem.* **1978**, *43*:2923)로 정제하였다. 순수한 생성물을 포함하는 분획을 화합하고 증류하였다. 미량의 잔류 용액을 무수 아세토니트릴을 사용하여 동시증류(co-evaporation)에 의해 제거한 후, 고진공하에서 건조시켜, 흰색 고체로서 (3a)를 얻었다(6.57 g, 64% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 2.20-2.40 (2H, m), 3.28 (2H,

d,  $J = 4.3$  Hz), 3.76 (6H, s), 4.01 (1 H, dd,  $J = 3.8, 4.2$  Hz), 4.26-4.30 (1 H, m), 4.48 (2H, bd,  $J = 6.1$  Hz), 6.11 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 6.85-7.46 (13H, m), 7.03-7.36 (4 H, m), 8.58 (1 H, s), 9.01 (1H, t,  $J = 6.1$  Hz). MS ( $m/z$ ) calcd for  $C_{38}H_{36}FN_3O_8$ , 681.25; found 680.4  $[M-H]^-$ .

[0177] 5'-*O*-디메톡시트리틸-5-((*R*)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘(5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-((*R*)-2-furfurylmethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine) (3b).

[0178] (*R*)-2-푸르푸릴메틸아민((*R*)-2-furfurylmethylamine)(2b)를 사용하여 (3a)에 대하여 설명한 바와 같이 화합물 (3b)를 제조하고, 흰색 고체로서 분리하였다(9.3 g, 94% 수율). 크로마토그래피를 위한 용리액은 1% 트리에틸아민/4% 메탄올/95% 에틸 아세테이트였다.  $^1H$ -NMR ( $CD_3CN$ ) d 1.51-1.57 (1H, m), 1.84-1.94 (3H, m), 2.18-2.38 (2H, m), 3.25-3.52 (4H, m overlap), 3.66-3.93 (3H, m overlap), 3.78 (6H, s), 3.97-4.02 (1H, m), 4.24-4.29 (1H, m), 6.12 (1 H, t,  $J = 6.5$ ), 6.86-7.47 (13H, m), 8.54 (1H, s), 8.83 (1H, bs). MS ( $m/z$ ) calcd for  $C_{36}H_{39}N_3O_9$ , 657.27; found 656.5  $[M-H]^-$ .

[0179] 5'-*O*-디메톡시트리틸-5-((*S*)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘(5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-((*S*)-2-furfurylmethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine) (3c).

[0180] (*S*)-2-푸르푸릴메틸아민((*S*)-2-furfurylmethylamine)(2c)를 사용하여 (3b)에 대해 설명한 바와 같이 화합물 (3c)를 제조하고, 흰색 고체로서 분리하였다(9.9 g, 99% 수율).  $^1H$ -NMR ( $CD_3CN$ ) d 1.50-1.59 (1H, m), 1.84-1.95 (3H, m), 2.18-2.40 (2H, m), 3.24-3.50 (4H, m overlap), 3.69-3.97 (3H, m overlap), 3.78 (6H, s), 3.98-4.02 (1H, m), 4.25-4.30 (1H, m), 6.14 (1 H, t,  $J = 6.5$ ), 6.87-7.47 (13H, m), 8.54 (1H, s), 8.84 (1H, bs). MS ( $m/z$ ) calcd for  $C_{36}H_{39}N_3O_9$ , 657.27; found 656.5  $[M-H]^-$ .

[0181] 5'-*O*-디메톡시트리틸-5-(2-(4-모폴리노)에틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘(5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-(2-(4-morpholino)ethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine) (3d).

[0182] 2-(4-모폴리노)-에틸아민(2-(4-morpholino)-ethylamine)(2d)를 사용하여 (3a)에 대해 설명한 바와 같이 화합물 (3d)를 제조하고, 흰색 고체로서 분리하였다(8.2 g, 80% 수율). 크로마토그래피를 위한 용리액은 5% 메탄올/2% 트리에틸아민/93% 디클로로메탄이었다.  $^1H$ -NMR ( $CD_3CN$ ) d 2.21-2.39 (2H, m), 2.39-2.41 (4H, m), 2.48 (2H, t,  $J = 6.2$  Hz), 3.27-3.29 (2H, m), 3.41 (2H, dt,  $J = 5.8, 6.2$  Hz), 3.61-3.64 (4H, m), 3.78 (6H, s), 3.98-4.02 (1H, m), 4.25-4.30 (1H, m), 6.10 (1H, t,  $J = 6.4$ ), 6.86-7.47 (13H, m), 8.55 (1H, s), 8.79 (1H, bt,  $J \sim 6$  Hz). MS ( $m/z$ ) calcd for  $C_{37}H_{42}N_4O_9$ , 686.30; found 685.7  $[M-H]^-$ .

[0183] 5'-*O*-디메톡시트리틸-5-(2-(*N*-벤즈이미다졸로닐)에틸아민카르보닐)-2'-디옥시우리딘(5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-(2-(*N*-benzimidazolonyl)ethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine) (3e).

[0184] *N*-벤즈이미다졸로닐-2-에틸아민(*N*-benzimidazolonyl-2-ethylamine)(2e)(CAS RN64928-88-7)을 사용하여 (3a)에 설명한 바와 같이 화합물 (3e)를 제조하였다. 크로마토그래피를 위한 용리액은 2% 메탄올/1% 트리에틸아민/97% 디클로로메탄이었다. 순수한 생성물을 황갈색 고체로서 분리하였다(8.2 g, 74.5% 수율).  $^1H$ -NMR ( $CD_3CN$ ) d 2.20-2.36 (2H, m), 3.27-3.29 (2H, m), 3.60 (2H, q,  $J = 6.5$  Hz), 3.758 (3H, s), 3.762 (3H, s), 3.97 (2H, t,  $J = 6.5$  Hz), 3.98-4.02 (1H, m), 4.27-4.30 (1H, m), 6.09 (1H, t,  $J = 6.5$  Hz), 6.86-7.48 (13H, m), 6.91-7.10 (4H, m), 8.52 (1H, s), 8.76 (1H, t,  $J = 6.1$  Hz). MS ( $m/z$ ) calcd for  $C_{40}H_{39}N_5O_9$ , 733.27; found 732.0  $[M-H]^-$ .

[0186] 실시예 2: 5'-*O*-DMT-뉴클레오시드 CE-포스포라미디트(5'-*O*-DMT-Nucleoside CE-Phosphoramidites)의 합성 (4a-4e)

[0187] 5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-(4-fluorobenzylaminocarbonyl)-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]-2'-deoxyuridine (4a).

[0188] 무수 디클로로메탄(anhydrous dichloromethane)(40mL)에 용해시킨 DMT-보호된 뉴클레오시드(DMT-protected

nuceltoiside)(**3a**)(4.00g, 5.9mmol) 용액을 건조 아르곤 분위기하에서 대략 -10℃로 냉각하였다. 디이소프로필 에틸아민(diisopropylethylamine)(3.1mL, 17.6mmol, 3eq)을 첨가한 후, 2-시아노에틸디이소프로필클로로포스포라미디트(2-cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidite)(1.7mL, 7.7 mmol, 1.3eq)를 한방울 씩 첨가하였다. 상기 용액을 1시간 동안 교반하고, 완료 반응을 박층 크로마토그래피(실리카겔 60, 에틸 아세테이트/헥산)로 확인하였다. 반응 혼합물을 얼음처럼 차가운 2% 소듐 바이카보네이트 용액(200mL)과 에틸 아세테이트(200mL) 사이에서 분획하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조시키고, 여과한 후 농축하였다. 잔류물을 1% 트리에틸아민/99% 에틸 아세테이트의 이동상을 사용하는 실리카 겔 플래쉬 크로마토그래피로 정제 하였다. 순수한 생성물을 포함하는 분획을 회합하고, 진공하에서 증류하였다(<30℃). 미량의 잔류 크로마토그래피 용매를 무수 아세토니트릴을 사용하여 공동증류에 의해 제거하고, 고진공에서 건조하여 흰색 고형 거품(solid foam)으로 (**4a**)를 얻었다(4.10 g, 80% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>CN, two isomers) d 1.02-1.16 (12H, m), 2.27-2.57 (2H, m), 2.51/2.62 (2H, 2t, J = 6.0/6.0 Hz), 3.25-3.37 (2H, m), 3.50-3.79 (4H, m overlap), 3.738 (3H, s), 3.742 (3H, s), 4.13/4.16 (1H, 2q, J = 3.5/3.7 Hz), 4.37-4.43 (1H, m), 4.44-4.47 (2H, m), 6.09/6.10 (1H, 2t, J = 6.4/7.1 Hz), 6.83-7.44 (13H, m), 7.01-7.30 (4H, m), 8.58/8.60 (1H, 2s), 8.98 (1H, b, J~5.5 Hz), 9.24 (1H, bs). <sup>31</sup>P-NMR (CD<sub>3</sub>CN) d 148.01 (s), 148.06 (s). <sup>19</sup>F-NMR (CD<sub>3</sub>CN) d -117.65 (m). MS (m/z) calcd for C<sub>47</sub>H<sub>53</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P, 881.36; found 880.3 [M-H]<sup>-</sup>.

[0189] 5'-O-디메톡시트리틸-5-((R)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-3'-O-[(2-시아노에틸)(N,N-디이소프로필아미노)포스피닐]-2'-디옥시우리딘(5'-O-Dimethoxytrityl-5-((R)-2-furfurylmethylaminocarbonyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)(N,N-diisopropylamino)phosphinyl]-2'-deoxyuridine) (**4b**).

[0190] (**4a**)에 대해 설명한 바와 같이 화합물 (**4b**)를 제조하였다. 부분입체이성질체 포스포라미디트(diastereomeric phosphoramidites)의 1:1 혼합물을 흰색 고형 거품으로 분리하였다(3.15 g, 62% 수율). 크로마토그래피를 위한 용리액은 1% 트리에틸아민/20% 헥산/79% 에틸 아세테이트였다. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>CN, two isomers) d 1.14-1.27 (12H, m), 1.51-1.59 (1H, m), 1.86-1.94 (3H, m), 2.27-2.59 (2H, m), 2.54/2.65 (2H, 2t, J = 6.0/5.7 Hz), 3.27-3.38 (2H, m), 3.44-3.97 (9H, m overlap), 3.782 (3H, s), 3.786 (3H, s), 4.11-4.18 (1H, m), 4.39-4.48 (1H, m), 6.11/6.13 (1H, 2t, J = 5.6/6.1 Hz), 6.96-7.47 (13H, m), 8.58/8.60 (1H, 2s), 8.75 (1 H, bt, J~5.4 Hz), 9.36 (1H, bs). <sup>31</sup>P-NMR (CD<sub>3</sub>CN) d 148.09 (s), 148.13 (s). MS (m/z) calcd for C<sub>45</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P, 857.38; found 856.6 [M-H]<sup>-</sup>.

[0191] 5'-O-디메톡시트리틸-5-((S)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-3'-O-[(2-시아노에틸)(N,N-디이소프로필아미노)포스피닐]-2'-디옥시우리딘(5'-O-Dimethoxytrityl-5-((S)-2-furfurylmethylaminocarbonyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)(N,N-diisopropylamino)phosphinyl]-2'-deoxyuridine) (**4c**).

[0192] (**4b**)에 대해 설명한 바와 같이 화합물 (**4c**)를 제조하였다. 부분입체이성질체 포스포라미디트의 1:1 혼합물을 흰색 고형 거품으로 분리하였다(3.74g, 74% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>CN, two isomers) d 1.14-1.27 (12H, m), 1.51-1.59 (1H, m), 1.86-1.94 (3H, m), 2.28-2.51 (2H, m), 2.53/2.65 (2H, 2t, J = 6.0/6.0 Hz), 3.25-3.41 (2H, m), 3.44-4.14 (9H, m overlap), 3.783 (3H, s), 3.786 (3H, s), 4.12-4.19 (1H, m), 4.40-4.49 (1H, m), 6.11/6.13 (1H, 2t, J = 6.3/6.3 Hz), 6.86-7.48 (13H, m), 8.58/8.60 (1H, 2s), 8.75 (1 H, bt, J~5.4 Hz), 9.36 (1H, bs). <sup>31</sup>P-NMR (CD<sub>3</sub>CN) d 148.09 (s), 148.13 (s). MS (m/z) calcd for C<sub>45</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>P, 857.38; found 856.5 [M-H]<sup>-</sup>.

[0193] 5'-O-디메톡시트리틸-5-(2-(4-모폴리노)에틸아미노카르보닐)-3'-O-[(2-시아노에틸)(N,N-디이소프로필아미노)포스피닐]-2'-디옥시우리딘(5'-O-Dimethoxytrityl-5-(2-(4-morpholino)ethylaminocarbonyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)(N,N-diisopropylamino)phosphinyl]-2'-deoxyuridine) (**4d**).

[0194] 정제에 1% 트리에틸아민/5% 무수 에탄올/94% 에틸 아세테이트의 크로마토그래피 용리액을 사용한 것을 제외하고는, (**4a**)에 대해 설명한 바와 같이 화합물 (**4d**)를 제조하였다. 부분입체이성질체 포스포라미디트의 1:1 혼합물을 흰색의 고형 거품으로 분리하였다(3.9g, 75% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>CN, two isomers) d 1.04-1.19 (12H, m),

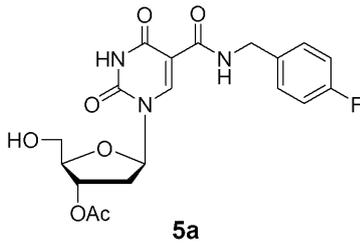
2.28-2.59 (2H, m), 2.43-2.47 (6H, m overlap), 2.53/2.64 (2H, 2t,  $J = 6.2/6.2$  Hz), 3.27-3.76 (8H, m overlap), 3.61-3.65 (4H, m), 3.781 (3H, s), 3.789 (3H, s), 4.12-4.19 (1H, m), 4.39-4.49 (1H, m), 6.11/6.13 (1H, 2t,  $J = 5.2//5.2$ ), 6.86-7.48 (13H, m), 8.58/8.60 (1H, 2s), 8.78 (1H, bt,  $J \sim 5.3$  Hz), 9.78 (1H, bs).  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) d 148.08 (s), 148.11 (s). MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{59}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}$ , 886.4; found 885.7  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

[0195] 5'-*O*-디메틸트리틸-5-(2-(*N*-벤즈이미다졸로닐)에틸아미노카르보닐)-3'-*O*-[(2-시아노에틸)(*N,N*-디이소프로필아미노)포스포닐]-2'-디옥시우리딘(5'-*O*-Dimethoxytrityl-5-(2-(*N*-benzimidazolonyl)ethylaminocarbonyl)-3'-*O*-[(2-cyanoethyl)(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]-2'-deoxyuridine) (4e).

[0196] 정제에 1% 트리에틸아민/10% 무수 메탄올/89% 에틸 아세테이트의 크로마토그래피 용리액을 사용한 것을 제외하고는, (4a)에 대해 설명한 바와 같이 화합물 (4e)를 제조하였다. 부분입체이성질체 포스포라미디트의 1:1 혼합물을 흰색의 고형 거품으로 분리하였다(1.6g, 31% 수율).  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , two isomers) d 1.03-1.18 (12H, m), 2.27-2.57 (2H, m), 2.52/2.63 (2H, 2t,  $J = 6.0/6.0$ ), 3.27-3.37 (2H, m), 3.49-3.80 (6H, m overlap), 3.732 (3H, s), 3.735/3.738 (3H, 2s), 4.00 (2H, bt,  $J \sim 6.0$  Hz), 4.12-4.18 (1H, m), 4.30-4.47 (1H, m), 6.08/6.10 (1H, 2t,  $J = 6.3/6.3$  Hz), 6.85-7.48 (13H, m), 6.93-7.09 (4H, m), 8.57/8.60 (1H, 2s), 8.82/8.83 (1H, 2bt,  $J \sim 4.3/4.3$  Hz), 9.48 (1H, bs).  $^{31}\text{P}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) d 148.07 (s), 148.10 (s).

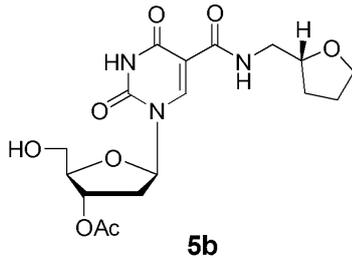
[0198] 실시예 3: 3'-*O*-아세틸-뉴클레오시드(3'-*O*-Acetyl-Nucleosides)의 합성 (5a-5e)

[0199] 5-(4-플루오로벤질아미노카르보닐)-3'-*O*-아세틸-2'-디옥시우리딘(5-(4-Fluorobenzylaminocarbonyl)-3'-*O*-acetyl-2'-deoxyuridine) (5a).



[0200] 무수 피리딘(anhydrous pyridine)(30mL) 및 아세트산 무수물(acetic anhydride)(3mL) 용액에 뉴클레오시드 (3a)(3.00g, 4.4mmol)을 용해하였다. 상기 용액을 밤새 교반하고, 진공하에서 농축하여 3'-*O*-아세틸-뉴클레오시드를 얻었다. 잔류 용액을 무수 톨루엔(anhydrous toluene)(10mL)을 사용하여 공동증류에 의해 제거하였다. 잔류물을 무수 디클로로메탄(anhydrous dichloromethane)(10mL)에 용해시키고, 디클로로메탄(dichloromethane)(58mL)에 용해시킨 3% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)로 처리하였다. 생성물이 결정화되는 시간 동안 붉은 용액을 밤새 교반하였다. 슬러리를  $-20^\circ\text{C}$ 로 냉각하고, 여과한 후 디에틸 에테르로 세척하였다. 잔류물을 진공하에서 건조시켜 회색을 띤 백색의 고체로서 (5a)를 얻었다(1.10g, 59% 수율).  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) d 2.07 (3H, s), 2.33-2.38 (1H, m), 2.50-2.52 (1H, m), 3.63-3.64 (2H, m), 4.10 (1H, bdd,  $J = 3.1, 5.1$  Hz), 4.46 (2H, d,  $J = 6.0$  Hz), 5.19-5.26 (2H, m overlap), 6.15 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz), 7.15 (2H, tt,  $J = 2.2, 9.0$  Hz), 7.31-7.38 (2H, m), 8.79 (1H, s), 9.14 (1H, bt,  $J = 6.1$  Hz), 11.95 (1H, bs).  $^{19}\text{F}$ -NMR ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) d -116.02 (tt,  $J = 5.5, 9.0$  Hz). MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_7$ , 421.13; found 419.8  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

[0202] 5-((*R*)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-3'-*O*-아세틸-2'-디옥시우리딘(5-((*R*)-2-Furfurylmethylaminocarbonyl)-3'-*O*-acetyl-2'-deoxyuridine) (5b).



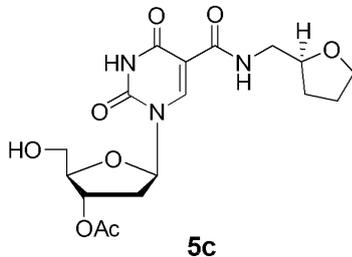
[0203]

[0204]

(5a)에 대해 설명한 방법에 의해 화합물 (5b)를 제조하고, 디클로로메탄과 에틸 아세테이트의 혼합물로부터 침전에 의해 흰색 고체로서 분리하였다(1.27g, 73% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.57-2.02 (4H, m), 2.12 (3H, s), 2.46-2.50 (2H, m), 3.03 (1H, bs), 3.43-3.64 (2H, m), 3.75-3.97 (2H, m), 3.78-4.10 (3H, m), 4.20-4.21 (1H, m), 5.40-5.42 (1H, m), 6.35 (1H, dd, *J* = 6.5, 7.7 Hz), 8.91 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 9.17 (1H, s), 9.44 (1H, bs). MS (*m/z*) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, 397.15; found 396.1 [M-H]<sup>-</sup>.

[0205]

5-((S)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-3'-O-아세틸-2'-디옥시우리딘(5-((S)-2-Furfurylmethylaminocarbonyl)-3'-O-acetyl-2'-deoxyuridine) (5c).



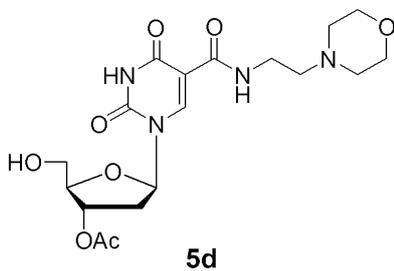
[0206]

[0207]

(5a)에 대해 설명한 방법에 의해 (4c)로부터 화합물 (5c)를 제조하고, 디클로로메탄과 디에틸 에테르의 혼합물로부터 침전에 의해 약간 오렌지색의 고체로서 분리하였다(1.35g, 77% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.57-2.03 (4H, m), 2.12 (3H, s), 2.47-2.51 (2H, m), 2.98 (1H, bs), 3.40-3.68 (2H, m), 3.78-3.95 (2H, m), 3.90-4.12 (3H, m), 4.20-4.21 (1H, m), 5.39-5.42 (1H, m), 6.33 (1H, dd, *J* = 6.7, 7.4 Hz), 8.90 (1H, t, *J* = 5.5 Hz), 9.15 (1H, s), 9.37 (1H, bs). MS (*m/z*) calcd for C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, 397.15; found 395.9 [M-H]<sup>-</sup>.

[0208]

5-(2-(4-모폴리노)에틸아미노카르보닐)-3'-O-아세틸-2'-디옥시우리딘(5-(2-(4-Morpholino)ethylaminocarbonyl)-3'-O-acetyl-2'-deoxyuridine) (5d).



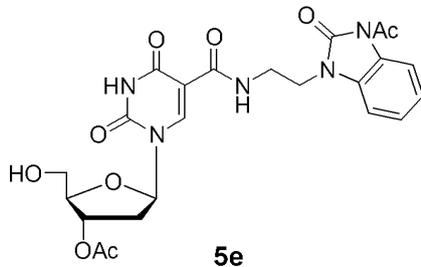
[0209]

[0210]

무수 피리딘(10mL)과 아세트산 무수물(1mL) 용액에 뉴클레오시드 (3d)(1.00g, 1.37mmol)을 용해하였다. 상기 용액을 밤새 교반하고, 진공하에서 농축시켜 3'-O-아세틸-뉴클레오시드를 얻었다. 잔류 용액을 무수 톨루엔(10mL)을 사용하여 공동증류에 의해 제거하였다. 잔류물을 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol)(20mL)(Leonard, N. J. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36:7833)에 용해하고, 3시간 동안 대략 50°C에서 가열하였다. DMT 기의 완전한 절단을 박층 크로마토그래피에 의해 확인하였다. 붉은 용액 혼합물을 잘 교반된 메탄올(200mL)을 부어 키팅하였다. 그 결과 생성된 노란색 용액을 진공하에서 농축하고, 잔류물을 뜨거운 에틸 아세테이트(20mL)에 용해시켰다. 생성물을 냉각하여 결정화시키고, 그 결과 생성된 슬러리를 -20°C에서 숙성한 후, 여과하고 에틸 아세테이트로 세척하였다. 3'-O-아세틸-뉴클레오시드 (5d)를 흰색 고체로

서 분리하였다(0.46g, 79% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d6) δ 2.07 (3H, s), 2.32-2.45 (7H, m overlap), 2.49-2.52 (1H, m), 3.33-3.40 (2H, m), 3.57 (4H, t, *J* = 4.5 Hz), 3.60-3.63 (2H, m), 4.09 (1H, bdd, *J* = 3.2, 5.2 Hz), 5.17-5.25 (2H, m), 6.14 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 8.74 (1H, s), 8.89 (1H, bt, *J* = 5.4 Hz), 11.90 (1H, bs). MS (*m/z*) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>, 426.18; found 425.0 [M-H]<sup>-</sup>.

[0211] 5-(2-(1-(3-아세틸-벤즈이미다졸로닐)에틸아미노카르보닐)-3'-*O*-아세틸-2'-디옥시우리딘(5-(2-(1-(3-Acetyl-benzimidazolonyl))ethylaminocarbonyl)-3'-*O*-acetyl-2'-deoxyuridine) (5e).



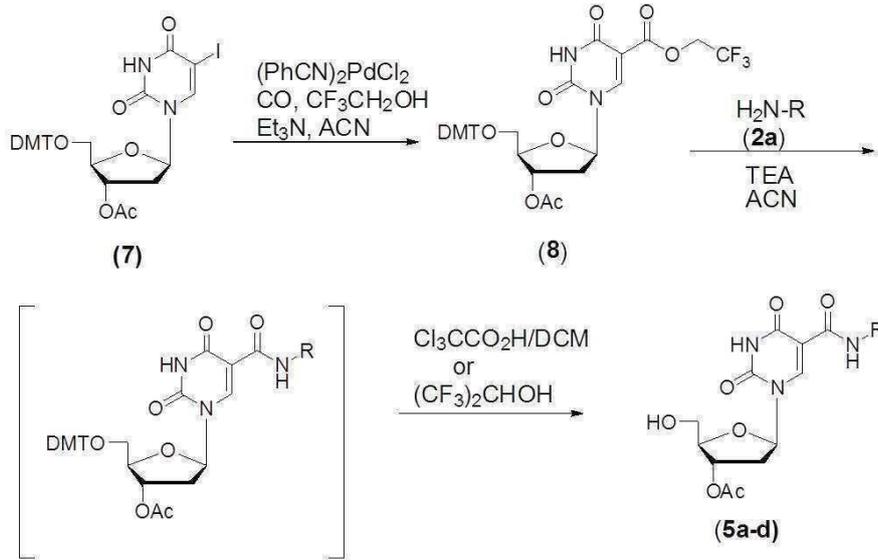
[0212]

[0213] DMT-절단 반응물을 메탄올 내로 부을 때 생성물을 직접 결정화시키는 것을 제외하고는, (5d)에 대해 설명한 바와 같이 화합물 (5e)를 제조하였다. 여과에 의해 디아세틸 뉴클레오시드(diacetyl nucleoside)(5e)를 흰색 고체로서 분리하였다(0.55g, 78% 수율). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d6) δ 2.07 (3H, s), 2.30-2.37 (1H, m), 2.49-2.52 (1H, m), 2.63 (3H, s) 3.33 (1H, bs), 3.55-3.64 (4H, m overlap), 3.99 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 4.09 (1H, bdd, *J* = 2.3, 5.2 Hz), 5.15-5.25 (2H, m), 6.13 (1H, dd, *J* = 6.3, 7.6 Hz), 7.11 (1H, ddd, *J* = 1.2, 7.6, 7.9 Hz), 7.22 (1H, ddd, *J* = 1.2, 7.6, 7.9 Hz), 7.33 (1H, dd, *J* = 0.8, 7.9 Hz), 8.02 (1H, dd, *J* = 0.8, 8.0 Hz), 8.05 (1H, bs), 8.83 (1H, bt), 8.71 (1H, s), 11.87 (1H, bs). MS (*m/z*) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>, 515.17; found 513.9 [M-H]<sup>-</sup>.

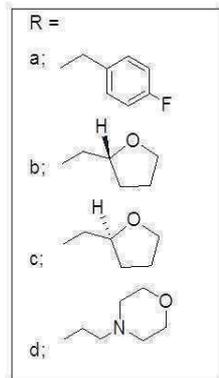
[0215] **실시예 4: 3'-*O*-아세틸-뉴클레오시드(3'-*O*-Acetyl-Nucleosides)의 대안적인 합성 (5a-5d)**

[0216] 출발 물질인 3'-*O*-아세틸-5'-*O*-디메톡시트리틸-5-이오도-2'-디옥시우리딘(3'-*O*-acetyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-5-iodo-2'-deoxyuridine) (7)로부터 대안적인 경로(도식 2)에 의해 3'-*O*-아세틸-뉴클레오시드 (5a-d)를 또한 합성하였다(Vaught, J. D., Bock, C., Carter, J., Fitzwater, T., Otis, M., Schneider, D., Rolando, J., Waugh, S., Wilcox, S. K., Eaton, B. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4141-4151). 간단하게는, 도식 2를 참고하여, 요오드화물(iodide)의 팔라듐(II)-촉매된 리플루오로에톡시카르보닐화에 의해 활성화된 에스테르 중간물질 (8)을 얻었다. 아민 (2a-d)(1.3 eq., 트리에틸아민 (3 eq), 아세토니트릴, 60-70°C, 2-24 시간)를 사용하여 (8)을 축합한 후, 5'-*O*-DMT-보호기를 절단하여(3% 트리클로로아세트산/디클로로메탄 또는 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올, 상온), 중간물질 (3a-d)(도식 1)를 통하여 생성된 생성물과 동일한 (5a-d)를 얻었다.

[0217] 도식 2



[0218]



[0219]

[0221] 3'-*O*-아세틸-5'-*O*-디메톡시트리틸-5-(2,2,2-트리플루오로에톡시카르보닐)-2'-디옥시우리딘(3'-*O*-Acetyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-5-(2,2,2-trifluoroethoxycarbonyl)-2'-deoxyuridine) (8).

[0222] 500mL의 후벽형 유리 압력 반응기(heavy-walled glass pressure reactor)를 아르곤으로 채우고, 3'-*O*-아세틸-5'-*O*-디메톡시트리틸-5-이오도-2'-디옥시우리딘(3'-*O*-acetyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-5-iodo-2'-deoxyuridine) (7)(15.9g, 22.8mmol), 무수 아세토니트릴(anhydrous acetonitrile)(200mL), 트리에틸아민(triethylamine)(7.6mL, 54.7mmol) 및 2,2,2-트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol)(16.4mL, 228mmol)을 채웠다. 그 결과 생성된 용액을 세계 교반하고, 2분간 100mmHg 미만의 배출에 의해 탈가스시켰다. 플라스크를 아르곤으로 채우고, 비스(벤조니트릴)디클로로팔라듐(bis(benzonitrile)dichloropalladium)(II)를 첨가하였다. 그 결과 생성된 노란색 용액을 다시 탈가스시킨 후, 가스 매니폴드(gas manifold)로부터 일산화탄소(carbon monoxide)(99.9%)를 채웠다(독성 가스에 유의). 반응 혼합물을 세계 교반하고 12시간 동안 60-65℃에서 가열하는 동안, 1-10 psi의 CO 압력을 유지하였다. 검은색의 침전물을 제거하기 위하여 냉각된 반응 혼합물을 여과하고(독성 가스에 유의), 진공하에서 농축하였다. 오렌지색 잔류물을 디클로로메탄(120mL)과 10% 소듐 바이카보네이트(80mL)로 분획하였다. 유기층을 물(40mL)로 세척하고, 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 농축하여 오렌지색 거품(17g)을 얻었다. 이 조 생성물은 무색의 고형 거품으로서 (8)(12.7g, 80% 수율)을 얻기 위하여 있는 그대로 사용될 수 있거나, 30% 헥산/1% 트리에틸아민/69% 에틸 아세테이트의 용리액을 사용하여 실리카 겔 플래쉬 크로마토그래피에 의해 더 정제될 수 있다. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ 2.03 (3H, s), 2.37-2.56 (2H, m), 3.36-3.38 (2H, m), 3.78 (6H, s), 4.15-4.19 (1H, m), 4.37-4.55 (2H, m), 5.21-5.26 (1H, m), 6.09 (1H, t, *J* = 6.1 Hz), 6.84-7.46 (13H, m), 8.53 (1H, s). <sup>19</sup>F-NMR (CD<sub>3</sub>CN) δ -74.07 (t, *J* = 8.8 Hz). MS (*m/z*) calcd for C<sub>35</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>, 698.21; found 697.4 [M-H]<sup>-</sup>.

- [0224] **실시예 5 : 뉴클레오시드 5'-O-트리포스페이트(Nucleoside 5'-O-Triphosphates)의 합성**
- [0225] 5-(4-플루오로벤질아민카르보닐)-2'-디옥시우리딘-5'-O-트리포스페이트 (트리스-트리에틸암모늄 염)(5-(4-Fluorobenzylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine-5'-O-triphosphate (tris-triethylammonium salt)) (6a).
- [0226] 500 $\mu$ mol-스케일(5x)에서 루드비히 및 에크슈타인 방법에 의해 3'-O-아세틸-뉴클레오시드(3'-O-acetyl-nucleoside) (5a)로부터 트리포스페이트 (6a)를 합성하였다(Ludwig, J. and Eckstein, F. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*:631). 암모니아 분해(ammonolysis) 및 증류 후, 조 트리포스페이트 생성물을 하기의 일반적인 방법에 기재된 것과 같이 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다.
- [0227] **뉴클레오시드 트리포스페이트의 음이온 교환 HPLC 정제를 위한 일반적인 방법**
- [0228] 278nm에서의 검출과 함께 분취형 HPLC 시스템(preparative HPLC system)에 설치된 소스 Q 레진(Source Q resin)(GE Healthcare)으로 채워진 HPLC 컬럼을 사용하는 음이온 교환 크로마토그래피를 통하여 뉴클레오시드 트리포스페이트를 정제하였다. 선형의 용리 기울기(linear elution gradient)는 용리하는 동안 낮은 버퍼 B의 내용물부터 높은 버퍼 B로 주위온도에서 전개하는 기울기를 가지는 두 개의 버퍼(버퍼 A: 10mM 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴, 버퍼 B: 1M 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴)를 사용하였다. 바람직한 생성물은 전형적으로 컬럼으로부터 용리하기 위한 최종 물질이며, 대략 10 내지 12분의 체류 시간에 걸쳐 넓은 피크로서 관찰된다(초기 용리 생성물은 다양한 반응 부산물을 포함하며, 가장 최상위에 뉴클레오시드 디포스페이트가 존재한다). 몇몇의 분획들이 생성물을 용리하는 동안 수집되었다. 분획을 워터스 시메트리 컬럼(Waters Symmetry column, PN:WAT054215)이 장착된 워터스 2795 HPLC에서 역상 HPLC(reversed phase HPLC)로 분석하였다. 분획들을 포함하는 순수한 생성물(전형적으로 <90%)을 Genevac VC 3000D 증발기에서 증발시켜 무색에서 밝은 갈색의 레진을 얻었다. 분획들을 탈이온화된 물에서 재구성하고, 최종 분석을 위하여 모았다. 278nm에서 휴렛 팩커드 8452A 다이오드 어레이 분광 광도계(Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer)를 사용하는 분석에 의해 생성물의 정량을 수행하였다. 생성물의 수율을 방정식  $A = \epsilon CL$ 을 통하여 계산하였으며, 여기에서 A는 UV 흡광도(absorbance)이고,  $\epsilon$ 는 예상 흡광 계수(estimated extinction coefficient)이고, L은 경로길이(path length)(1cm)이다.
- [0229] 조 생성물 (6a)를 대략 5mL의 버퍼 A(표 1: prep-HPLC 조건 1)에 용해하였다. 각각의 정제 주입은 12mL/분으로 50분의 용리에서 0%-100% 버퍼 B의 이동상 기울기를 가지는 리소스 Q(Resource Q) 6mL 컬럼(GE Healthcare product code: 17-1179-01) 설비가 있는 486 검출기가 장착된 워터스 625 HPLC(Waters 625 HPLC) 내로 주입된 대략 1mL의 이 용액의 여과된 엘리컷으로 이루어진다. (6a)[ $\epsilon_{est.} 13,700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ]에 대하여 분리된 정제 생성물은 130 $\mu$ mol(26% 수율)이었다.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d 1.15 (27H, t,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 2.32-2.37 (2H, m), 3.07 (18H, q,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 4.06-4.17 (3H, m overlap), 4.42 (2H, bd,  $J \sim 0.7 \text{ Hz}$ ), 4.49-4.53 (1H, m), 4.70 (>7H, bs, HOD), 6.12 (1H, t,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ), 6.96-7.26 (4H, m), 8.45 (1H, s).  $^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d -116.18 (m).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d -10.58 (d,  $J = 20 \text{ Hz}$ ), -11.45 (d,  $J = 20 \text{ Hz}$ ), -23.29 (t,  $J = 20 \text{ Hz}$ ). MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_{15}\text{P}_3$ , 619.02; found 618.0 [M-H] $^-$ .

**표 1**

prep-HPLC 조건 1

[0230]

이동상	A: 10 mM 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴 B: 1 M 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴
컬럼	리소스 Q 6 mL
HPLC 시스템	워터스 625 HPLC/486 검출기
기울기 (이동상에서 버퍼B의 %)	0%-100%
실행 시간/흐름 속도	12 mL/분으로 50 분

- [0231] 5-((R)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘-5'-O-트리포스페이트 (트리스-트리에틸암모늄 염)(5-((R)-2-Furfurylmethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine-5'-O-triphosphate (tris-triethylammonium salt))

(6b). (6a)에 대하여 설명한 바와 같이 3'-O-아세틸-뉴클레오시드 (5b)로부터 트리포스페이트 (6b)를 합성하였다. 조 생성물 (6b)를 196mL의 소스 15Q 레진(Source 15Q resin, GE Healthcare product code: 17-0947005)로 채운 워터스 AP-5 컬럼(Waters AP-5 column, Waters PN:WAT023331, 50mm x 100mm)을 사용하는 워터스 2489 검출기(Waters 2489 detector)가 장착된 워터스 2767 분취형 시스템(Waters 2767 preparatory system)에 단일 주입하여 정제하였다. 상기에서와 동일한 버퍼를 사용하였으나, 용리 기울기는 50mL/분에 90분 용리에서 25% 내지 80% 버퍼 B로 변경하였다(표 2: prep-HPLC 조건 2). 잔류 불순물을 제거하기 위하여 C18 HPLC 컬럼에서 2차 정제를 수행하였다(표 4: prep-HPLC 조건 4). (6b) [ $\epsilon_{\text{est. } 10,200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}}$ ] 에 대하여 분리된 정제 생성물은 325 $\mu\text{mol}$ (65% 수율)이었다.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d 1.17 (27H, t,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 1.49-1.63 (1H, m), 1.77-2.02 (3H, m), 2.34-2.39 (2H, m), 2.85-3.83 (5H, m overlap), 3.08 (18H, q,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 4.01-4.19 (3H, m overlap), 4.52-4.56 (1H, m), 4.70 (>7H, bs, HOD), 6.15 (1H, t,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ), 8.48 (1H, s).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d -10.50 (d,  $J = 20 \text{ Hz}$ ), -11.51 (d,  $J = 20 \text{ Hz}$ ), -23.25 (t,  $J = 20 \text{ Hz}$ ). MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_{16}\text{P}_3$ , 595.04; found 594.1 [ $\text{M-H}^-$ ].

표 2

prep-HPLC 조건 2

이동상	A: 10 mM 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴 B: 1 M 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴
컬럼	리소스 Q 6 mL
HPLC 시스템	워터스 625HPLC/486 검출기
기울기 (이동상에서 버퍼B의 %)	15%-60%
실행 시간/흐름 속도	12 mL/분으로 50 분

5-((S)-2-푸르푸릴메틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘-5'-O-트리포스페이트 (트리스-트리에틸암모늄 염)(5-((S)-2-Furfurylmethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine-5'-O-triphosphate (tris-triethylammonium salt)) (6c). (6a)에 대해 설명한 바와 같이 3'-O-아세틸-뉴클레오시드 (5c)로부터 트리포스페이트 (6c)를 합성하였다. 조 생성물 (6c)를 196mL의 소스 15Q 레진(Source 15Q resin, GE Healthcare product code: 17-0947005)로 채운 워터스 AP-5 컬럼(Waters AP-5 column, Waters PN:WAT023331, 50mm x 100mm)을 사용하는 워터스 2489 검출기(Waters 2489 detector)가 장착된 워터스 2767 분취형 시스템(Waters 2767 preparatory system)에 단일 주입하여 정제하였다. 상기에서와 동일한 버퍼를 사용하였으나, 용리 기울기는 50mL/분에 90분 용리에서 25% 내지 80% 버퍼 B로 변경하였다(표 2: prep-HPLC 조건 2). 잔류 불순물을 제거하기 위하여 C18 HPLC 컬럼에서 2차 정제를 수행하였다(표 4: prep-HPLC 조건 4). (6c) [ $\epsilon_{\text{est. } 10,200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}}$ ] 에 대하여 분리된 정제 생성물은 255 $\mu\text{mol}$ (51% 수율)이었다.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d 1.17 (27H, t,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 1.49-1.63 (1H, m), 1.78-2.01 (3H, m), 2.34-2.39 (2H, m), 2.85-3.82 (5H, m overlap), 3.09 (18H, q,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 4.01-4.19 (3H, m overlap), 4.52-4.56 (1H, m), 4.70 (>7H, bs, HOD), 6.15 (1H, t,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ ), 8.48 (1H, s).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d -10.60 (d,  $J = 20 \text{ Hz}$ ), -11.42 (d,  $J = 20 \text{ Hz}$ ), -23.25 (t,  $J = 20 \text{ Hz}$ ). MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_{16}\text{P}_3$ , 595.04; found 594.1 [ $\text{M-H}^-$ ]. 5-(2-(4-모폴리노)에틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘-5'-O-트리포스페이트 (비스-트리에틸암모늄 염)(5-(2-(4-Morpholino)ethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine-5'-O-triphosphate (bis-triethylammonium salt)) (6d).

(6a)에 대해 설명한 바와 같이 3'-O-아세틸-뉴클레오시드 (5d)로부터 트리포스페이트 (6d)를 합성하였다. 조 생성물 (6d)를 (6a)에서 사용한 것과 동일한 기구 및 버퍼를 사용하지만, 기울기는 생성물의 향상된 해상도를 위하여 50분 용리 동안 버퍼 B를 15% 내지 60%로 실행하는 것으로 변경하여 정제하였다(표 3: prep-HPLC 조건 3). (6d) [ $\epsilon_{\text{est. } 10,200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}}$ ] 에 대하여 분리된 정제 생성물은 54 $\mu\text{mol}$ (11% 수율)이었다.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) d 1.17 (18H, t,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 2.37-2.41 (2H, m), 2.91-2.98 (2H, m), 3.09 (12H, q,  $J = 7.3 \text{ Hz}$ ), 3.20-3.27

(4H, m), 3.87-3.90 (4H, m), 3.63-3.68 (2H, m), 4.10-4.18 (3H, m overlap), 4.56-4.60 (1H, m), 4.70 (>7H, bs, HOD), 6.15 (1H, bt,  $J = 6.3$  Hz), 8.48 (1H, s).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -9.99 (d,  $J = 21$  Hz), -11.90 (d,  $J = 20$  Hz), -23.19 (t,  $J = 20$  Hz). MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{P}_3$ , 624.06; found 623.1  $[\text{M-H}]^-$ .

표 3

prep-HPLC 조건 3

이동상	A: 10 mM 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴 B: 1 M 트리에틸암모늄 바이카보네이트/10% 아세토니트릴
컬럼	소스 Q 196 mL가 장착된 워터스 AP-5
HPLC 시스템	워터스 22767 HPLC/2489 검출기
기울기 (이동상에서 버퍼B의 %)	25-80%
실행 시간/흐름 속도	50 mL/분으로 90분

표 4

prep-HPLC 조건 4

이동상	A: 100 mM 트리에틸암모늄 B: 아세토니트릴
컬럼	워터스 노바팩 C18, 19mm x 300mm
HPLC 시스템	워터스 625 HPLC/486 검출기
기울기 (이동상에서 버퍼B의 %)	10-25%
실행 시간/흐름 속도	8.5 mL/분으로 30분

5-(2-(N-벤즈이미다졸로닐)에틸아미노카르보닐)-2'-디옥시우리딘-5'-O-트리포스페이트 (비스-트리에틸암모늄 염)(5-(2-(N-Benzimidazolonyl)ethylaminocarbonyl)-2'-deoxyuridine-5'-O-triphosphate (bis-triethylammonium salt)) (6e). (6a)에 대해 설명한 바와 같이 3'-O-아세틸-뉴클레오시드 (5e)로부터 트리포스페이트 (6e)를 합성하였다. 조 생성물 (6e)를 (6a)에서 사용한 것과 동일한 기구 및 버퍼를 사용하지만, 기울기는 생성물의 향상된 해상도를 위하여 50분 용리 동안 버퍼 B를 15% 내지 60%로 실행하는 것으로 변경하여 정제하였다(표 3: prep-HPLC 조건 3). (6e) [ $\epsilon_{\text{est.}} 10,200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ]에 대하여 분리된 정제 생성물은 101  $\mu\text{mol}$  (20% 수율)이었다.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.17 (18H, t,  $J = 7.3$  Hz), 2.17-2.36 (2H, m), 3.09 (12H, q,  $J = 7.3$  Hz), 3.60-3.73 (2H, m), 4.01 (2H, t,  $J = 5.4$  Hz), 4.03-4.15 (3H, m), 4.45-4.50 (1H, m), 4.70 (>7H, bs, HOD), 6.04 (1H, t,  $J = 6.6$  Hz), 6.95-7.12 (4H, m), 8.02 (1H, s).  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  -10.35 (d,  $J = 20$  Hz), -11.40 (d,  $J = 20$  Hz), -23.23 (t,  $J = 20$  Hz). MS ( $m/z$ ) calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_{16}\text{P}_3$ , 671.04; found 670.1  $[\text{M-H}]^-$ . 앞서 언급한 구현 및 실시예들은 단지 예일 뿐이다. 어떠한 특정 구현, 예 또는 특정 구현 또는 예의 요소들도 임의의 청구항의 중요하고, 필요하거나 필수적인 요소 또는 특징으로 이해되어서는 안된다. 게다가, 본원에 기재되어 있는 어떠한 요소도 "필수적" 또는 "중요"한 것으로 표현되지 않는 한 첨부된 청구항의 실행에 필수적인 것이 아니다. 다양한 개조, 변경, 치환 및 다른 변형들이 첨부된 청구항에 의해 정의되어 있는 본 발명의 범위를 벗어나는 일 없이 개시된 구현들에 대해 이루어질 수 있다. 실시예를 포함하는 명세서는 제한적인 방식보다는 예시적인 방식으로 간주되며, 모든 그러한 변경 및 치환들은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 따라서, 본 발명의 범위는 상기에 주어진 실시예들에 의해서가 아닌 첨부된 청구항 및 그것들의 법적 동등물에 의해 결정되어야만 한다. 예를 들어, 임의의 방법 및 과정 청구항에 인용된 단계들은 임의의 실현 가능한 순서로 수행될 수 있으며, 임의의 구현, 실시예 또는 청구항에 존재하는 순서로 한정되지 않는다.