(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0008369
(43) 공개일자 2021년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7034385
(22) 출원일자(국제) 2019년05월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년11월30일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/062064
(87) 국제공개번호 WO 2019/215333
국제공개일자 2019년11월14일
(30) 우선권주장
62/670,319 2018년05월11일 미국(US)

(71) 출원인
알파 아노메리끄 에스아에스
프랑스, 파리 75006, 뤼 드 르네 140 비스
(72) 발명자
르네르 볼프강
스위스, 보즈베르그 5225, 프로페텐구트 1
(74) 대리인
한인열

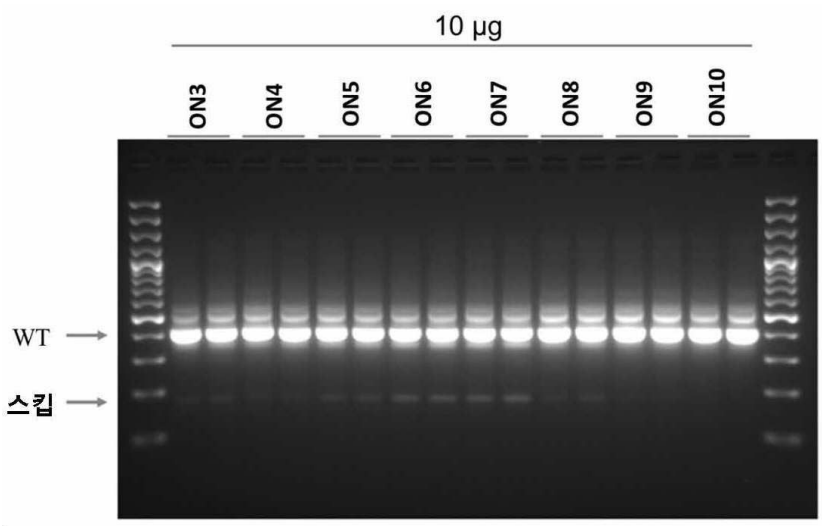
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **7'-5'-알파-아노머-이중고리상 당 뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트**

(57) 요 약

본 발명은 올리고뉴클레오티드 기질기 컨쥬게이트로서, 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA 잔기를 포함하고, 지질기는 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 부착되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트를 제공한다. 또한 본 발명은 올리고뉴클레오티드 기질기 컨쥬게이트를 사용하여 유전자 발현을 조정하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도9a



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 2310/315 (2013.01)
C12N 2310/3231 (2013.01)
C12N 2310/33 (2013.01)
C12N 2310/337 (2013.01)
C12N 2310/3515 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

올리고뉴클레오티드 기질기 컨쥬게이트로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 상기 지질기는 상기 올리고뉴클레오티드에 공유 결합되는, 올리뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 지질기는 링커를 통해 상기 올리고뉴클레오티드에 공유 결합되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 12개 내지 24개의 잔기를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 4

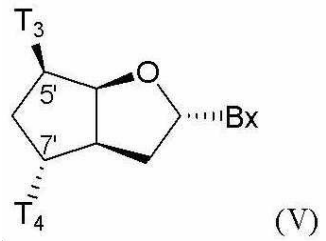
제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 19개의 잔기를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 abc-DNA 잔기는 하기 화학식 (V)을 갖고,



(V)

여기서 화학식 (IV)의 상기 적어도 2개의 abc-DNA 잔기 각각의 경우 독립적으로 T_3 또는 T_4 중 하나는 뉴클레오시드 결합기이고; T_3 및 T_4 중 나머지는 OR_1, OR_2, 5' 말단기, 7' 말단기 또는 뉴클레오시드 결합기이고, 여기서

R_1은 H 또는 하이드록실 보호기이고, R_2는 인 모이어티이고;

Bx는 핵염기인, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 잔기 모두는 abc-DNA 잔기인, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 2개의 abc-DNA 잔기는 포스포디에스테르 결합을 통해 인접한 잔기에 연결되는, 올리고뉴클레오티드

컨쥬게이트.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 잔기 모두는 abc-DNA 잔기이고, 포스포디에스테르 결합을 통해 연결되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지질기는 상기 올리고뉴클레오티드의 말단 잔기에 공유 결합되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합기, 포스포트리에스테르 결합기, 포스포로티오에이트 결합기, 포스포로디티오에이트 결합기, 포스포네이트 결합기, 포스포노티오에이트 결합기, 포스피네이트 결합기, 포스포르티오아미데이트 결합기 및 포스포르아미데이트 결합기로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오시드 결합기를 포함하는 인을 통해 연결된 잔기를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 11

제 2항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 탄화수소 링커 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커인, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 12

제 2항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커, 아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커, 알파-카르복실레이트-아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커 및 알파-카르복실레이트-아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 13

제 2항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커는 절단가능한 작용기를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지질기는 지방산 유래 작용기를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 지방산은 포화 또는 불포화되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 16

제 14항 또는 제 15항에 있어서,

상기 지방산은 4개 내지 28개의 탄소 원자 길이를 갖는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 17

제 14항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지방산 유래 작용기는 카르복실산기를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 18

제 14항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지방산은 표 1 또는 표 2에 제시된 지방산으로부터 선택되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 19

제 14항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지방산은 헥사데칸산인, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 20

제 1항 내지 제 19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 지질기는 티오포스페이트기를 통해 상기 올리고뉴클레오티드에 결합되는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 유전자의 엑손 51번의 일부에 해당하는 프리-mRNA에 결합하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 22

제 21항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 404 및 414 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 23

제 1항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는 표 3에 제공된 서열 중 어느 하나를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 24

제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 상기 DMD 유전자의 엑손 53번의 일부에 해당하는 프리-mRNA에 결합하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 25

제 24항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 표 4에 제공된 서열 중 어느 하나를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 26

제 1항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 상기 DMD 유전자의 엑손 45번의 일부에 해당하는 프리-mRNA에 결합하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 27

제 26항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 표 5에 제공된 서열 중 어느 하나를 포함하는, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트.

청구항 28

제 1항 내지 제 27항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트를 적합한 담체와 조합으로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

유전자의 발현을 변경시키는 방법으로서, 제 1항 내지 제 27항 중 어느 한 항에 따른 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트를 상기 유전자로부터 발현된 RNA와 혼성화시키는 단계에 의하고, 상기 올리고뉴클레오티드는 상기 RNA의 일부와 상보적인 서열을 포함하는, 방법.

청구항 30

듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 또는 벡커 근육 디스트로피 (BMD)에 걸린 대상체 또는 상기 대상체로부터 유래한 세포에서 인간 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑을 유도하는 방법으로서, 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 404 및 414 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트를 제공하는 단계를 포함하고, 상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 상기 대상체 또는 상기 세포에서 상기 엑손의 스킵핑을 유도하며, 상기 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑으로부터 생성된 mRNA는 기능성 디스트로핀 단백질 또는 벡커 대상체의 디스트로핀 단백질을 인코딩하는, 방법.

청구항 31

대상체 또는 상기 대상체로부터 유래한 세포에서 인간 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑을 유도함으로써, 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 또는 벡커 근육 디스트로피 (BMD)을 치료하는 방법으로서, 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 404 및 414 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는, 제 1항 내지 제 23항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트를 포함하는 조성물을 상기 대상체 또는 상기 세포에게 제공하는 단계를 포함하고, 상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 상기 대상체 또는 상기 세포에서 상기 엑손의 스킵핑을 유도하고, 상기 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑으로부터 생성된 mRNA는 기능성 디스트로핀 단백질 또는 벡커 대상체의 디스트로핀 단백질을 인코딩하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트 및 유전자 발현을 조정하는 이들의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 RNA 프로세싱에 영향을 미치고, 단백질 발현을 조정한다. 특정 경우에, 안티센스 화합물은 표적의 변경된 전사 또는 번역을 생성한다. 이러한 발현의 조정은, 예를 들면 표적 mRNA 분해 또는 점령 기반의 억제에 의해 달성될 수 있다. 단일가닥 또는 이중가닥 표적에 강력한 서열-특이적 결합을 나타내면서 화학적 분해에 대해 저항하는 올리고뉴클레오티드 유사체는 잠재적인 치료제로서 유용하다. 화학적으로 변형된 올리고뉴클레오티드는 치료제 용도를 위해 설계되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 abc-DNA 올리고뉴클레오시드를 포함하는, 지질기와 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 바람직하게, abc-DNA 올리고뉴클레오시드는 포스포디에스테르 결합을 통해 연결된다.

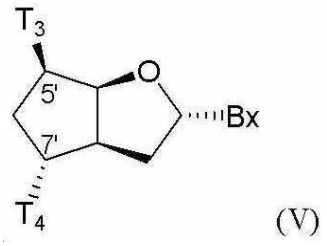
[0004] 본 발명은 올리고뉴클레오티드 기질기 컨쥬게이트로서, 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 지질기는 올리고뉴클레오티드에 공유

결합되는, 올리뉴클레오티드 컨쥬게이트를 제공한다.

[0005] 일 구현예에서, 지질기는 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 공유 결합된다.

[0006] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 12개 내지 24개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 20개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 19개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 15개 내지 19개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 15개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 16개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 17개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 18개의 잔기를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 19개의 잔기를 포함한다.

[0007] 또 다른 구현예에서, abc-DNA 잔기는 하기 화학식 (V)을 갖고,

[0008] 

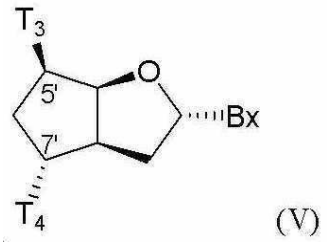
(V)

[0009] 여기서 화학식 (IV)의 적어도 2개의 abc-DNA 잔기 각각의 경우 독립적으로 T_3 또는 T_4 중 하나는 뉴클레오시드 결합기이고; T_3 및 T_4 중 나머지는 OR_1, OR_2, 5' 말단기, 7' 말단기 또는 뉴클레오시드 결합기이고, 여기서

[0010] R_1은 H 또는 하이드록실 보호기이고, R_2는 인 모이어티이고;

[0011] Bx는 핵염기이고, 바람직하게 Bx는 퓨린 염기 또는 피리미딘 염기로부터 선택되고, 더욱 바람직하게 Bx는 우라실, 티민, 시토신, 5-메틸시토신, 아데닌 또는 구아닌으로부터 선택된다.

[0012] 따라서 또 다른 구현예에서, abc-DNA 잔기는 하기 화학식 (V)을 갖고,

[0013] 

(V), 여기서

[0014] (i) T_3은 뉴클레오시드 결합기이고; T_4는 7' 말단기, OR_1 또는 OR_2이고, 바람직하게 T_4는 7' 말단기 또는 OR_1이고; 또는

[0015] (ii) T_3은 5' 말단기, OR_1 또는 OR_2이고, 바람직하게 T_3은 5' 말단기 또는 OR_2이고, T_4는 뉴클레오시드 결합기이고; 또는

[0016] (iii) T_3 및 T_4는 서로 독립적으로 뉴클레오시드 결합기이고, 여기서

[0017] R_1은 H 또는 하이드록실 보호기이고, R_2는 인 모이어티이고;

[0018] Bx는 핵염기이고, 바람직하게 Bx는 퓨린 염기 또는 피리미딘 염기로부터 선택되고, 더욱 바람직하게 Bx는 우라실, 티민, 시토신, 5-메틸시토신, 아데닌 또는 구아닌으로부터 선택된다.

[0019] 또 다른 구현예에서, 모든 잔기는 abc-DNA 잔기이다.

[0020] 또 다른 구현예에서, 적어도 2개의 abc-DNA 잔기는 포스포디에스테르 결합을 통해 인접한 잔기에 연결된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 2개의 abc-DNA 잔기는 포스포디에스테르 결합을 통해 인접한 잔기에 연결되고, 각각의 추가 뉴클레오시드 결합기는 서로 독립적으로 포스포디에스테르 결합기, 포스포트리에스테르 결합기, 포스포로

티오에이트 결합기, 포스포로디티오에이트 결합기, 포스포네이트 결합기, 포스포노티오에이트 결합기, 포스피네이트 결합기, 포스포르티오아미데이트 결합기 및 포스포르아미데이트 결합기로부터 선택된다.

[0021] 또 다른 구현예에서, 모든 잔기는 abc-DNA 잔기이고, 포스포디에스테르 결합을 통해 연결된다. 따라서 또 다른 구현예에서, 각각의 뉴클레오시드 결합기는 포스포디에스테르 결합기이다.

[0022] 또 다른 구현예에서, 지질기는 올리고뉴클레오티드의 말단 잔기에 공유 결합된다.

[0023] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합기, 포스포트리에스테르 결합기, 포스포로티오에이트 결합기, 포스포로디티오에이트 결합기, 포스포네이트 결합기, 포스포노티오에이트 결합기, 포스피네이트 결합기, 포스포르티오아미데이트 결합기 및 포스포르아미데이트 결합기로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오시드 결합기를 포함하는 인을 통해 연결된 잔기를 포함한다.

[0024] 또 다른 구현예에서, 링커는 탄화수소 링커 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커이다.

[0025] 또 다른 구현예에서, 링커는 아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커, 아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커, 알파-카르복실레이트-아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커 및 알파-카르복실레이트-아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0026] 또 다른 구현예에서, 링커는 절단가능한 작용기를 포함한다.

[0027] 또 다른 구현예에서, 지질기는 지방산 유래 작용기를 포함한다.

[0028] 일 구현예에서, 지방산은 포화 또는 불포화된다.

[0029] 또 다른 구현예에서, 지방산은 4개 내지 28개의 탄소 원자 길이를 갖는다.

[0030] 또 다른 구현예에서, 지방산 유래 작용기는 카르복실산기를 포함한다.

[0031] 또 다른 구현예에서, 지방산 유래 작용기는 디카르복실산으로부터 유래한다.

[0032] 또 다른 구현예에서, 지방산은 표 1 또는 표 2에 제시된 지방산으로부터 선택된다.

[0033] 또 다른 구현예에서, 지방산은 헥사데칸산이다.

[0034] 일 구현예에서, 지질기는 티오포스페이트기를 통해 링커에 부착된다.

[0035] 일 구현예에서, 지질기는 티오포스페이트기를 통해 올리고뉴클레오티드에 부착된다.

[0036] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 유전자의 엑손 51번의 일부에 해당하는 프리-mRNA에 결합한다.

[0037] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 404 및 414 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 서열번호 417 또는 서열번호 418의 서열을 포함한다.

[0038] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 표 3에 제공된 서열 중 어느 하나를 포함한다.

[0039] 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 DMD 유전자의 엑손 53번의 일부에 해당하는 프리-mRNA에 결합한다.

[0040] 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 표 4에 제공된 서열 중 어느 하나를 포함한다.

[0041] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 DMD 유전자의 엑손 45번의 일부에 해당하는 프리-mRNA에 결합한다.

[0042] 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 표 5에 제공된 서열 중 어느 하나를 포함한다.

[0043] 본 발명은 또한 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트를 적합한 담체와 조합으로 포함하는 약제학적 조성물로서, 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 지질기는 올리고뉴클레오티드에 공유 결합되는, 약제학적 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명은 또한 유전자의 발현을 변경시키는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트의 혼성화를 허용하는 단계에 의하고, 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 지질기는 RNA의 일부와 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티

드, 유전자로부터 발현된 RNA에 공유 결합하는, 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명은 또한 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 또는 벡커 근육 디스트로피 (BMD)에 걸린 대상체 또는 대상체로부터 유래한 세포에서 인간 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑을 유도하는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트를 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 지질기는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 404 및 414 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 서열번호 417 또는 서열번호 418의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 공유 결합되며, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 대상체 또는 세포에서 엑손의 스킵핑을 유도하고, 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번 스킵핑으로부터 생성된 mRNA는 기능성 디스트로핀 단백질 또는 벡커 대상체의 디스트로핀 단백질을 인코딩하는, 방법을 제공한다.

[0046] 본 발명은 또한 대상체 또는 대상체로부터 유래한 세포에서 인간 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑을 유도함으로써 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 또는 벡커 근육 디스트로피 (BMD)를 치료하는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트를 포함하는 조성물을 대상체 또는 세포에게 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 지질기는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 404 및 414 내지 425로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게 서열번호 417 또는 서열번호 418의 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 공유 결합되고, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 대상체 또는 세포에서 엑손의 스킵핑을 유도하고, 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑으로부터 생성된 mRNA는 기능성 디스트로핀 단백질 또는 벡커 대상체의 디스트로핀 단백질을 인코딩하는, 방법을 제공한다.

[0047] 본 발명은 또한 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 또는 벡커 근육 디스트로피 (BMD)에 걸린 대상체 또는 대상체로부터 유래한 세포에서 인간 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑을 유도하는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트를 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 지질기는 표 3에 제시된 서열 중 어느 하나를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 공유 결합되고, 바람직하게 모든 잔기는 abc-DNA 잔기이며, 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 대상체 또는 세포에서 엑손의 스킵핑을 유도하고, 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번 스킵핑으로부터 생성된 mRNA는 기능성 디스트로핀 단백질 또는 벡커 대상체의 디스트로핀 단백질을 인코딩하는, 방법을 제공한다.

[0048] 본 발명은 또한 대상체 또는 대상체로부터 유래한 세포에서 인간 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번의 스킵핑을 유도함으로써 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 또는 벡커 근육 디스트로피 (BMD)를 치료하는 방법으로서, 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트를 포함하는 조성물을 대상체 또는 세포에게 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하고, 지질기는 표 3에 제시된 서열 중 어느 하나를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 공유 결합되고, 바람직하게 모든 잔기는 abc-DNA 잔기이며, 상기 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트는 대상체 또는 세포에서 엑손의 스킵핑을 유도하고, 디스트로핀 프리-mRNA의 엑손 51번 스킵핑으로부터 생성된 mRNA는 기능성 디스트로핀 단백질 또는 벡커 대상체의 디스트로핀 단백질을 인코딩하는, 방법을 제공한다.

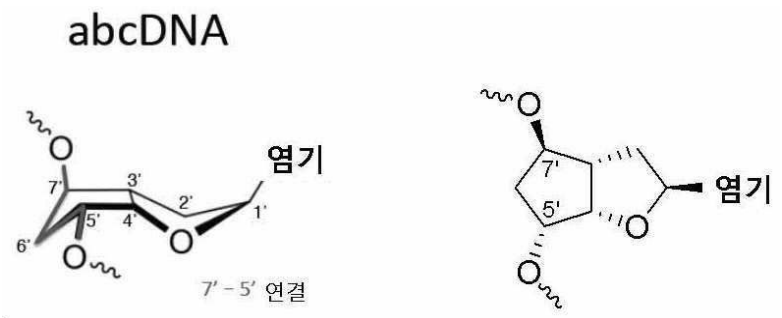
과제의 해결 수단

[0049] 본 발명은 적어도 1개 (하나 이상)의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 뉴클레오시드, 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오시드를 연결하는 포스포디에스테르기 및 링커를 통해 연결된 올리고뉴클레오티드에 연결된 지질기를 포함하는 올리뉴클레오티드 컨쥬게이트를 제공한다. 본 발명은 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 결합을 통해 연결되고, 리간드기와 컨쥬게이션된 abc-DNA 뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

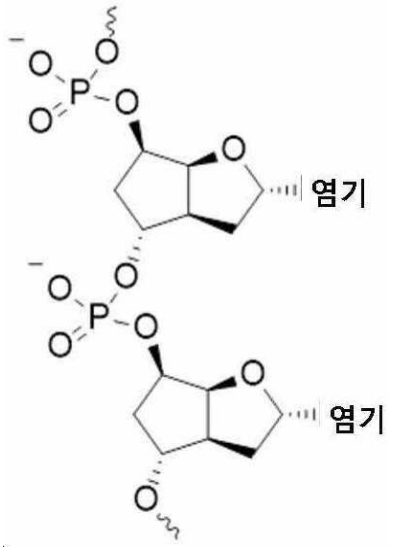
[0050] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 전사, 번역, 스플라이싱 및/또는 분해로 간섭함으로써 및/또는 비-코딩 RNA의 기능을 억제함으로써 유전자 발현을 조정한다.

[0051] **정의**

[0052] 본원에 사용된 바, "알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 뉴클레오시드"는 이중고리상 당 모이어티를 포함하고, 하기에 나타낸 일반 구조를 갖는 뉴클레오시드 유사체를 의미한다.

[0053] 

[0054] 7'-5' 알파 아노머 이중고리 DNA의 구조는 하기에 나타낸다.

[0055] 

[0056] 본원에 사용된 바, "이중고리상 당 모이어티"는 2개의 상호연결된 고리 시스템, 예로 이중고리상 뉴클레오시드를 포함하고, 여기서 당 모이어티는 2'-O-CH(알킬)-4' 또는 2'-O-CH_2-4'기, 잠겨진 핵산 (LNA), 자일로-LNA, 알파-L-LNA, 베타-D-LNA, cEt (2'-O,4'-C 강제된 에틸) LNA, cMOEt (2'-O,4'-C 강제된 메톡시에틸) LNA 또는 에틸렌 가교된 핵산을 갖는다.

[0057] 본원에 사용된 바, "뉴클레오시드"는 당에 공유 결합된 핵염기를 말한다.

[0058] "리보뉴클레오시드"는 리보스에 결합된 염기를 말하고, "데옥시리보뉴클레오시드"는 2'-데옥시리보스에 결합된 염기를 말한다.

[0059] 본원에 사용된 바, "뉴클레오티드"는 뉴클레오시드의 당에 공유 결합된 인 모이어티를 추가로 포함하는 뉴클레오시드를 말한다.

[0060] 본원에 사용된 바, 용어 "잔기"는 올리고머-올리고뉴클레오티드 중합체의 단위를 형성하는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 단량체를 말한다.

[0061] 본원에 사용된 바, "올리고뉴클레오티드"는 단일가닥 또는 이중가닥이지만, 세포 또는 유기체에서 단일가닥 핵산 분자로서 상보적인 핵산에 결합할 수 있는 올리고머이다. 올리고뉴클레오티드는 본원에 정의된 바와 같이 뉴클레오시드 결합기에 의해 서로 연결되는 적어도 2개의 뉴클레오시드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 (예로, 2' 변형을 갖는 뉴클레오티드, 합성 염기 유사체 등) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 이러한 변형된 올리고뉴클레오티드는, 예를 들면 세포 흡수의 증진 및 뉴클레아제의 존재 시 안정성 증가와 같은 성질 때문에 고유의 형태와 비교하여 바람직할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 당해 기술분야에 공지되고, 본원에 기술된 바와 같은 자연 발생 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 모방체를 포함하는 화합물 및 당 및/또는 핵염기 및/또는 뉴클레오시드 결합기가 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0062] 특정 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 10개 뉴클레오티드, 11개 뉴클레오티드, 12개 뉴클레오티드, 13개 뉴클레오티드, 14개 뉴클레오티드, 15개 뉴클레오티드, 16개 뉴클레오티드, 17개 뉴클레오티드, 18개 뉴클

레오티드, 19개 뉴클레오티드, 20개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들면 12개 내지 50개 뉴클레오티드 또는 12개 내지 40개 또는 12개 내지 24개 뉴클레오티드, 예를 들면 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개 및 50개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0063] 본원에 사용된 바, 용어 "올리고머", 예를 들면 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오시드 결합기에 의해 연결된 2개 이상의 단량체 서브유닛을 포함하는 화합물을 말한다. 본 발명의 올리고머는 최대 50개 단량체 서브유닛, 예를 들면 최대 40개 단량체 서브유닛, 예를 들면 최대 30개 단량체 서브유닛, 최대 20개 단량체 서브유닛 또는 최대 15개 단량체 서브유닛의 길이를 갖는다. 올리고머는 5개 내지 40개 단량체 서브유닛. 8개 내지 30개 단량체 서브유닛, 8개 내지 25개 단량체 서브유닛 또는 8개 내지 20개 단량체 서브유닛을 포함할 수 있다.

[0064] 본원에 사용된 바, 용어 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥 형태로의 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 또는 변형된 뉴클레오티드 및 이들의 중합체를 말한다. 용어는 기지의 뉴클레오티드 유사체 또는 변형된 백본 잔기 또는 결합을 포함하는 핵산으로서, 합성적, 자연 발생 및 비자연 발생이며, 기준 핵산과 유사한 결합 성질을 갖으며, 특정 경우에 기준 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는, 핵산을 포괄한다. 이러한 유사체의 예는 이에 한정되지 않지만, 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 포스포로디아미데이트, 메틸포스포네이트. 키랄-메틸 포스포네이트, 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드 및 펩티드-핵산 (PNA)을 포함한다.

[0065] 본 발명은 공유 결합을 통해 지질기와 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 본원에 사용된 바, "지질기"는 임의의 지방산기 또는 지방산 유래 작용기, 임의의 스테로이드 유래 작용기 및 임의의 지용성 비타민기이다. abc-DNA 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트는 *생체내*에서 긴 반감기를 나타낼 수 있다. 지질기는 또한 알부민 및/또는 다른 지방산 수용체 또는 운반체로에 abc-DNA 올리고뉴클레오티드의 결합을 증가시킬 수 있다. 본 발명의 지질기와 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 구조는 지질기가 노출되어 알부민 및/또는 운반체와의 결합을 용이하게 한다. 본 발명의 또 다른 구현예에서, 지질기는 1개 또는 2개의 카르복실산기를 추가로 포함하여, 알부민 및/또는 다른 지방산 수용체 또는 운반체와의 상호작용을 추가로 증가시킨다. 일 구현예에서, 지질기는 지방산 유래 작용기이다. 또 다른 구현예에서, 지질기는 디카르복실산으로부터 유래된 지방산기이다. 지방산은 2개 내지 28개 탄소 원자의 탄화수소 사슬을 갖는 임의의 포화 또는 불포화 지방산을 포함하고, 1개 또는 2개의 카르복실기를 포함할 수 있다. 1개 또는 2개의 지방산 리간드는 본원에 기술된 바와 같이 abc-DNA 올리고뉴클레오티드의 5' 및/또는 7' 말단 상에 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 본 발명에 따라 유용한 지질기는 표 1 및 표 2에 제공된다.

[0066] 본 발명의 지질기는 콜레스테롤, 비타민 E (토코페롤) 또는 담즙산을 포함할 수 있다.

[0067] 본원에 사용된 바, "링커"는 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 지질기에 연결하는 모이어티를 의미한다. 본 발명에 따라 유용한 링커는 탄화수소 및 PEG 링커, 예를 들면 아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커, 알파-카르복실레이트-아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커, 아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커 및 알파-카르복실레이트-아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 링커는 전형적으로 및 바람직하게 올리고뉴클레오티드의 이의 표적에 결합을 감소시키거나, 방해하지 않는다. 링커는 절단가능한 작용기를 포함할 수 있다.

[0068] 본원에 사용된 바, "뉴클레오시드 결합기"는 올리고뉴클레오티드의 abc-DNA 뉴클레오시드를 연결하는 결합기를 의미한다. 본 발명의 뉴클레오시드 결합기는 우선적으로 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 결합 (linkage) 또는 결합이다. 용어 "뉴클레오시드 결합기"는 포스포디에스테르 결합이 아닌 인 결합기, 뿐만 아니라 인이 아닌 결합기를 포함한다.

[0069] 본 발명은 모든 뉴클레오시드간 결합이 포스포디에스테르 결합인 지질기와 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 특정 구현예에서, 지질기 컨쥬게이트된 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오시드간 결합기는 우선적으로 포스포디에스테르 결합이다. 본원에 사용된 바, "우선적으로"는 50% 이상, 예를 들면 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 및 100%의 뉴클레오시드간 결합기가 포스포디에스테르 결합인 것을 의미한다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 1% 이상 및 최대 50%의 포스포로티오에이트 결합을 포함할 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오시드는 우선적으로 abc-DNA 뉴클레오시드이다. 우선적으로, abc-DNA 뉴클레오시드를 언급할 때, 이것은 50% 이상, 예를 들면, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 및 100%의 뉴클레오시드가 abc-DNA 뉴클레오시드임을 의미한다. 예를 들면, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 abc-DNA 뉴클레오시드가 아닌 당을 갖는 1% 이상 및 초대 50% 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명은 인을 통해 연결된 뉴클레오시드간 결합 또는 포스포디에스테르 결합을 포함하는 뉴클레오시드를 제공한다. 또한, 본 발명은 우선적으로 포스포디에스테르 결합을 통해 연결되지만, 포스포트리에스테르 결합기, 포스포로티오에이트 결합기, 포스포로디티오에이트 결합기, 포스포네이트 결합기, 예를 들면 H-포스포네이트 결합기 또는 메틸포스포네이트 결합기, 포스포노티오에이트 결합기, 예를 들면 H-포스포노티오에이트 결합기, 메틸포스포노티오에이트 결합기, 포스피네이트 결합기, 포스포르티오아미데이트 결합기 또는 포스포르아미데이트 결합기로부터 선택되는 "인 포함 뉴클레오시드 결합기"를 포함하는 뉴클레오시드를 제공한다.

[0071] 본원에 사용된 바, 본 발명의 "뉴클레오시드" 또는 "뉴클레오티드"는 본 발명의 올리고머 내로 올리고머 합성을 위한 화학적 또는 비-화학적 방법을 통해 혼입될 수 있는, 자연 발생 또는 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 모방체, 또는 자연 발생 또는 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 모방체를 각각 포괄한다. 본원에 사용된 바, "천연" 또는 "자연 발생"은 천연 기원을 의미한다.

[0072] 용어 "변형된 뉴클레오시드"는 당해 기술분야에 공지되고, 본원에 기술된 바와 같은 뉴클레오시드의 당 및/또는 핵염기가 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 당해 기술분야에 공지되고, 본원에 기술된 바와 같은 뉴클레오티드의 당 및/또는 핵염기 및/또는 뉴클레오시드 결합기 또는 인 모이어티가 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0073] 본원에 사용된 바, "뉴클레오시드 모방체"는 당 및 핵염기를 대체하는데 사용되는 구조를 포함한다. 용어 "뉴클레오티드 모방체"는 당 및 뉴클레오시드 결합기를 대체하는데 사용되는 뉴클레오티드를 포함한다. 뉴클레오티드 모방체의 예는 펩티드 핵산 (PNA) 또는 몰포리노를 포함한다.

[0074] 본 발명의 "뉴클레오시드" 또는 "뉴클레오티드"는 변형의 조합, 예를 들면 하나 이상의 핵염기 변형, 하나 이상의 당 변형 또는 적어도 하나의 핵염기 및 적어도 하나의 당 변형을 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 우선적으로 이중고리상 당을 갖는 뉴클레오시드를 포함한다.

[0076] 그러나, 올리고뉴클레오티드는 단일고리상 또는 삼중고리상 고리 시스템, 삼중고리상 또는 이중고리상 시스템 또는 단일고리상 리보스 또는 데옥시리보스인 당을 갖는 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 당의 변형은 변형된 입체화학적 입체구조, 작용기 중 적어도 하나의 치환 또는 작용기 중 적어도 하나의 결실을 추가로 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 변형된 당은 RNA 및 DNA에서 자연 발생하는 리보실 모이어티의 변형된 버전 (예로, 퓨라노실 모이어티), 테트라하이드로피란, 2'-변형된 당, 3'-변형된 당, 4'-변형된 당, 5'-변형된 당 또는 4'-치환된 당을 포함한다. 적합한 당 변형의 예는 당업자에게 공지되어 있고, 2', 3' 및/또는 4' 치환된 뉴클레오시드 (예로, 4'-S-변형된 뉴클레오시드), 2'-O-변형된 RNA 뉴클레오티드 잔기, 예컨대 2'-O-알킬 또는 2'-O-(치환된) 알킬, 예로 2'-O-메틸, 2'-O-(2-시아노에틸), 2'-O-(2-메톡시)에틸 (2'-MOE), 2'-O-(2-티오메틸)에틸, 2'-O-(할로알콕시) 메틸, 예로 2'-O-(2-클로로에톡시)메틸 (MCEM), 2'-O-(2,2-디클로로에톡시)메틸 (DCEM), 2'-O-알콕시카르보닐, 예로 2'-O-[2-(메톡시카르보닐) 에틸] (MOCE), 2'-O-[2-(N-메틸카바모일)에틸] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-디메틸카바모일)에틸] (DMCE), 예를 들면 2'-O-메틸 변형 또는 2'-O-메톡시에틸 (2'-O-MOE) 또는 기타 변형된 당 모이어티, 예컨대 몰포리노 (PMO), 양이온성 몰포리노 (PMO플러스) 또는 변형된 몰포리노기, 예컨대 PMO-X를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 용어 "PMO-X"는 적어도 하나의 3' 또는 5' 말단 변형, 예컨대 3'-형광성 태그, 3' 소광제 (예로, 3'-카르복시플루오레신, 3'-유전자 도구 블루, 3'-리스아민, 3'-다브실), 3'-친화 태그 및 화학적 결합을 위한 작용기 (예로, 3'-바이오틴, 3'-일차 아민, 3'-디설파이드 아미드, 3'-피리딜디티오), 5'-말단 변형 (5'-일차 아민, 5'-다브실), 3'-아자이드, 3'-알킨, 5'-아자이드, 5'-알킨을 포함하는 변형된 몰포리노기를 말하거나, 국제특허출원 WO2011/150408 및 미국 특허출원 US2012/0065169에 개시된 바와 같다.

[0077] 본원에 사용된 바, 용어 "리보뉴클레오티드"는 천연 및 합성 미변형 및 변형된 리보뉴클레오티드를 포괄한다. 변형은 올리고뉴클레오티드에서 당 모이어티, 염기 모이어티 및/또는 리보뉴클레오티드 사이의 결합에 대한 변화를 포함한다. 본원에 사용된 바, 용어 "리보뉴클레오티드"는 구체적으로 데옥시리보뉴클레오티드를 제외하고, 이는 2' 리보스 고리 위치에 단일한 양성자 기를 보유하는 뉴클레오티드이다.

[0078] 본원에 사용된 바, 용어 "데옥시리보뉴클레오티드"는 천연 및 합성 미변형 및 변형된 데옥시리보뉴클레오티드를 포괄한다. 변형은 올리고뉴클레오티드에서 당 모이어티, 염기 모이어티 및/또는 데옥시리보뉴클레오티드 사이의 결합에 대한 변화를 포함한다. 본원에 사용된 바, 용어 "데옥시리보뉴클레오티드"는 또한 변형된 리보뉴클레오티드, 예로 2'-O-메틸 리보뉴클레오티드, 포스포로티오에이트-변형된 리보뉴클레오티드 잔기 등을 포함한다.

[0079] 본원에 사용된 바, 용어 "PS-NA"는 포스포로티오에이트-변형된 뉴클레오티드 잔기를 말한다. 따라서 용어 "PS-NA"는 포스포로티오에이트-변형된 리보뉴클레오티드 ("PS-RNA") 및 포스포로티오에이트-변형된 데옥시리보뉴클레오티드 ("PS-DNA")를 포괄한다.

[0080] 본원에 사용된 바, "안티센스 가닥"은 표적 RNA의 서열과 상보적인 서열을 갖는 단일가닥 핵산 분자를 말한다.

[0081] 본원에 사용된 바, "센스 가닥"은 안티센스 가닥의 서열과 상보적인 서열을 갖는 단일가닥 핵산 분자를 말한다.

[0082] 또한, 본 발명은 비-뉴클레오시드 화합물에 연결된 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0083] 본 발명은 고체 지지물에 연결된 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 고체 지지물은 비드, 중합체 또는 레진을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0084] 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 지질기에 추가하여 하나 이상의 작용기의, 올리고머의 5' 또는 7' 말단에 또는 올리고머의 임의의 위치에서 공유 결합에 의해 변형된다. 5' 말단기 또는 7' 말단기에 컨쥬게이션될 수 있는 작용기는 캡핑기, 디포스페이트, 트리포스페이트, 올리고머를 추적하기에 적합한 표지, 예컨대 형광성 표지 (예로, 플루오레세인 또는 로다민), 염료, 리포터기, 고체 지지물, 나노입자, 비-뉴클레오시드기, 항체 또는 컨쥬게이트기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, 컨쥬게이트기는 이들이 부착되는 화합물의 하나 이상의 성질을 변형시킨다. 이러한 성질은 뉴클레아제 안정성, 결합 친화도, 약동학, 약력학, 결합, 흡수, 세포 배분, 세포 흡수, 전달, 전하 및 제거를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 컨쥬게이트기는 일상적으로 화학 기술분야에 사용되고, 올리고머와 같은 모체 화합물에 직접적으로 또는 선택적 결합기를 통해 연결된다. 용어 "컨쥬게이트기"는 지질기, 삽입인자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 티오에테르, 폴리에테르, 콜레스테롤, 티오콜레스테롤, 콜산 모이어티, 폴레이트, 지질, 인지질, 바이오틴, 페나진, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아다만탄, 아크리딘, 지질친화성 모이어티, 쿠마린, 쾁티드, 항체, 나노체 및 올리고당, 예를 들면 N-아세틸갈락토사민을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0085] 본원에 사용된 바, "말단"은 올리고머, 핵산 서열 또는 본원에 기술된 화합물 중 어느 하나의 말단 (end) 또는 말단을 말하고, 여기서 정수 (3', 5' 또는 7' 등)은 올리고머, 핵산 서열 또는 화합물의 뉴클레오티드에 포함된 당의 탄소 원자를 지정한다. 본원에 사용된 바, "5' 말단기" 또는 "7' 말단기"는 본원에 제공된 임의의 화합물에 포함된 당의 5' 말단 또는 7' 말단에 각각 위치하는 작용기를 말한다.

[0086] 특정 구현예에서, 올리고머는 본원에 기술된 바와 같은 화학식 (IV), 화학식 (V) 또는 화학식 (VI)의 화합물인 단량체 서브유닛 중 적어도 하나를 포함한다. 일 구현예에서, 올리고머는 적어도 하나의 화학식 (IV), (V) 또는 (VI)의 화합물 및 적어도 하나의 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고머는 적어도 하나의 화학식 (IV), (V) 또는 (VI)의 화합물 및 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오티드를 포함한다.

[0087] "상보적" 또는 "상보성"은 핵산이 전통적인 왓슨-크릭 또는 후그스틴 염기쌍 형성에 의해 또 다른 핵산 서열과 수소 결합을 형성할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 핵산 분자를 기준으로, 핵산 분자의 이의 상보적 서열과의 결합 자유에너지는 핵산의 적절한 기능, 예로 엑손 스킵핑을 진행하는데 충분하다. 핵산 분자의 결합 자유에너지의 결정은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있다 (예로, Turner, et al., CSH Symp. Quant. Biol. LⅡ, pp. 123-133, 1987; Frier, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 9373-9377, 1986; Turner, et al., J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785, 1987 참조). 상보성 백분율은 핵산 분자에서 제 2의 핵산 서열과 수소 결합을 형성할 수 있는 (예로, 왓슨-크릭 염기쌍 형성) 인접한 잔기의 백분율을 나타낸다 (예로, 제 1 올리고뉴클레오티드에서 총 10개 뉴클레오티드 중 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 뉴클레오티드가 10개 뉴클레오티드를 갖는 제 2 핵산 서열과 염기쌍을 형성한 것은 각각 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 및 100% 상보성을 각각 나타냄). 상보성 백분율이 적어도 특정 백분율임을 결정하기 위하여, 핵산 분자에서 제 2의 핵산 서열과 수소 결합을 형성할 수 있는 (예로, 왓슨-크릭 염기쌍 형성) 인접한 잔기의 백분율이 계산되고, 최근접한 전수로 반올림된다 (예로, 제 1 올리고뉴클레오티드에서 총 23개 뉴클레오티드 중 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개 뉴클레오티드가 23개 뉴클레오티드를 갖는 제 2 핵산 서열과 염기쌍을 형성한 것은 각각 52%, 57%, 61%, 65%, 70% 및 74%를 나타내고, 적어도 50%, 50%, 60%, 60%, 70% 및 70% 상보성을 각각 갖음). 본원에 사용된 바, "실질적으로 상보적"은 가닥이 생물학적 조건 하에 혼성화할 수 있는 가닥 사이의 상보성을 말한다. 추가적으로, 2개의 가닥이 생물학적 조건 하에 혼성화할 수 있는지 여부를 이들 뉴클레오티드 서열을 조사함으로써 결정하는 기법은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있다.

[0088] 또한, 본 발명은 왓슨-크릭 염기쌍 규칙을 따르지 않는 RNA 분자에서 2개 뉴클레오티드 사이의 워블 염기쌍 형

성을 제공한다. 4개의 주요 워블 염기쌍은 구아닌-우라실 (G-U), 하이폭산틴-우라실 (I-U), 하이폭산틴-아데닌 (I-A) 및 하이폭산틴-시토신 (I-C)이다. 워블 염기쌍의 열역학적 안정성은 왓슨-크릭 염기쌍의 안정성과 비슷하다.

[0089] 많은 염기에 걸쳐 염기쌍을 형성하는 단일가닥 핵산은 "혼성화하다"로 언급된다. 혼성화는 전형적으로 생물학적으로 적절한 조건 (예로, 세포내: pH 7.2, 140 mM 칼륨 이온; 세포외: pH 7.4, 145 mM 나트륨 이온) 하에 결정된다. 혼성화 조건은 일반적으로 1가의 양이온 및 생물학적으로 허용가능한 완충액을 포함하고, 이가의 양이온, 착물 음이온, 예로 포타슘 글루코네이트로부터의 글루코네이트, 슈크로스와 같은 미하전된 종 및 시료에서 물의 활성을 감소시키는 불활성 중합체, 예로 PEG를 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다. 이러한 조건은 염기쌍을 형성할 수 있는 조건을 포함한다.

[0090] 혼성화는 핵산의 50%가 단일가닥이고, 50%가 이중가닥인 온도, 예로 (용융 온도; Tm)에 의해 측정된다. T_m은 종종 상보적 핵산으로 향하는 안티센스 화합물의 이중체 안정성의 척도로서 사용된다.

[0091] 혼성화 조건은 또한 염기쌍을 형성할 수 있는 조건이다. 다양한 엄격도 조건이 혼성화를 결정하는데 사용될 수 있다 (예로, Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152: 399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152: 507 참조). 엄격한 온도 조건은 보통 적어도 약 30℃, 바람직하게 적어도 약 37℃, 가장 바람직하게는 적어도 약 42℃의 온도를 포함할 것이다. 50개 미만의 염기쌍 길이가 예상되는 하이브리드의 혼성화 온도는 하이브리드의 용융 온도 (Tm)보다 5℃ 내지 10℃ 낮아야 하고, 여기서 Tm은 다음의 공식에 따라 결정된다. 18개 미만의 염기쌍 길이의 하이브리드의 경우, Tm (℃) = 2 (A + T 염기의 수) + 4 (G + C 염기의 수). 18개 내지 49개의 염기쌍 길이의 하이브리드의 경우, Tm (℃) = 81.5 + 16.6 (로그 10 [Na^+]) + 0.41 (G + C%) - (600/N), 여기서 N은 하이브리드에서 염기의 수이고, [Na^+]는 혼성화 완충액에서 나트륨 이온의 농도 (1× SSC의 [Na^+] = 0.165 M).

[0092] 혼성화 조건 상의 유용한 변경은 당업자에게 바로 자명할 것이다. 혼성화 기법은 당업자에게 잘 숙지되어 있으며, 예를 들면 Benton and Davis, Science 196: 180, 1977; Grunstein and Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72: 3961, 1975; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001; Berger and Kimmel, Antisense to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York; 및 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York에 기술된다.

[0093] 본원에 사용된 바, "변경하다"는 발현, 예를 들면 유전자 발현의 증가 또는 감소를 의미한다. 발현의 감소는 10% 이상, 예를 들면 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%의 감소를 의미한다. 또한, 감소는 2배 이상, 예를 들면, 2배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 500배 이상의 감소를 의미한다.

[0094] 발현의 증가는 10% 이상, 예를 들면 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%의 증가를 의미한다. 또한, 증가는 2배 이상, 예를 들면 2배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 500배 이상의 증가를 의미한다.

[0095] 유전자 발현의 증가 또는 감소는 대조군 또는 기준 수준의 발현 수준, 예를 들면 본 발명의 올리고뉴클레오티드 지질기 컨쥬게이트의 부재 시 유전자 발현의 수준과 대비된다.

[0096] 본원에 사용된 바, "표적 RNA"는 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 의해 조정에 착수할 RNA를 말한다.

[0097] 본원에 사용된 바, "표적"은 발현 및 활성이 본 발명의 올리고뉴클레오티드에 의해 조정되는 핵산 서열을 말한다.

[0098] 본원에 사용된 바, "기준"은 표준 또는 대조군을 의미한다. 당업자에게 자명한 바와 같이, 적당한 기준은 한 요소의 효과를 결정하기 위하여 단 하나의 요소가 변화되는 곳이다.

[0099] 본원에 사용된 바, "RNA의 일부"는 이것이 결합하는 올리고뉴클레오티드와 동등한 길이이고, 이것이 결합하는 올리고뉴클레오티드의 서열에 상보적인 서열을 갖는 것을 의미한다.

[0100] 용어 "시험관내"는 이의 기술분야에 인식된 의미를 갖으며, 예로 정제된 시약 또는 추출물, 예로 세포 추출물이 관여하는 것을 의미한다. 용어 "생체내"는 또한 이의 기술분야에 인식된 의미를 갖으며, 살아있는 세포, 예로

불멸화 세포, 일차 세포, 세포주 및/또는 유기체의 세포가 관여하는 것을 의미한다.

[0101] 본원에 사용된 바, "증가" 또는 "증진"은 검정법에서 기준과 비교하여 적어도 5%로 긍정적으로 변경시키는 것을 의미한다. 변경은 검정법에서 기준과 비교하여 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 75% 또는 심지어 100%로 일 수 있다. "엑손 스킵핑을 증진하다"는 엑손 스킵핑의 결과인 특정한 산물의 양을 증가시키는 것을 의미한다.

[0102] 본원에 사용된 바, "감소하다"는 검정법에서 기준과 비교하여 적어도 5%로 부정적으로 변경시키는 것을 의미한다. 변경은 검정법에서 기준과 비교하여 5%, 10%, 25%, 30%, 50%, 75% 또는 심지어 100%로 일 수 있다.

[0103] 본원에 사용된 바, "세포"는 원핵 (예로, 박테리아) 및 진핵 (예로, 포유류 또는 식물) 세포 둘 다를 포함하도록 의미한다. 세포는 체세포 또는 생식계열 기원일 수 있고, 전능성 또는 다능성일 수 있으며, 분열하거나 분열하지 않을 수 있다. 또한, 세포는 생식세포 또는 배아, 줄기 세포 또는 완전 분화 세포로부터 유래될 수 있거나, 이들을 포함할 수 있다. 따라서, 용어 "세포"는 이의 보통의 생물학적 의미를 유지하도록 의미하고, 임의의 유기체, 예컨대 예를 들면 새, 식물 및 예를 들면 인간, 소, 양, 유인원, 원숭이, 개 및 고양이를 포함한 포유류에 존재할 수 있다. 특정 양태 내에서, 용어 "세포"는 구체적으로 인간 세포와 같은 포유류 세포를 말한다.

[0104] 본원에 사용된 바, "동물"은 포유류, 구체적으로 인간을 포함한 다세포성 진핵 유기체를 의미한다. 본 발명의 방법은 일반적으로 본원에서의 올리고뉴클레오티드의 유효량을, 포유류 구체적으로 인간을 포함한 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 치료는 질환 또는 이의 증상으로 고생하거나, 이에 걸리거나, 이에 취약하거나, 이의 위험이 있는 대상체, 구체적으로 인간에게 적합하게 투여될 것이다.

[0105] "약제학적으로 허용가능한 담체"는 본 발명의 핵산 분자를 이의 원하는 활성에 가장 적합한 신체 위치에 효과적인 배분을 허용하는 조성물 또는 제형물을 의미한다.

[0106] 본 발명의 올리고뉴클레오티드 제제는 abc-DNA 뉴클레오시드가 결여된 올리고뉴클레오티드 제제 또는 abc-DNA 뉴클레오시드를 포함하지만 포스페이트 뉴클레오시드간 결합 및 지질기의 조합이 결여된 올리고뉴클레오티드와 비교하여 이러한 제제의 다음의 속성 *시험관내* 효능 (예로, 효능 및 효과의 지속 기간), *생체내* 효능 (예로, 효능, 효과의 지속 기간, 약력학, 약동학, 세포내 흡수, 독성 감소)을 증진시킬 수 있다.

[0107] 본원에 사용된 바, 용어 "약력학"은 약물이 신체에 의해 흡수되고, 분배되고, 대사되고, 제거되는 과정을 말한다.

[0108] 본원에 사용된 바, 용어 "약동학"은 살아있는 유기체에 미치는 약물의 작용 또는 효과를 말한다.

[0109] 본원에 사용된 바, 용어 "안정화"는 선택된 환경 (예로, 세포 또는 유기체)에서 제제의 지속된 증진 상태를 말한다. 증진된 안정성은 이러한 제제의 분해 효소 (예로, 뉴클레아제) 또는 다른 제제에 대한 저항성 증진을 통해 달성될 수 있다.

[0110] 본원에 사용된 바, "변형된 뉴클레오티드"는 뉴클레오시드, 핵염기, 퓨라노스 고리 또는 포스페이트기에 하나 이상의 변형을 갖는 뉴클레오티드를 말한다. 예를 들면, 변형된 뉴클레오티드는 아데노신 모노포스페이트, 구아노신 모노포스페이트, 우리딘 모노포스페이트 및 시티딘 모노포스페이트를 포함하는 리보뉴클레오티드 및 데옥시아데노신 모노포스페이트, 데옥시구아노신 모노포스페이트, 데옥시티민 모노포스페이트 및 데옥시시티딘 모노포스페이트를 포함하는 데옥시리보뉴클레오티드를 제외한다. 변형은 뉴클레오티드를 변형시키는 효소, 예컨대 메틸트랜스퍼라제에 의한 변형으로부터 유도된 자연 발생하는 변형을 포함한다. 또한, 변형된 뉴클레오티드는 합성 또는 비-자연 발생 뉴클레오티드를 포함한다. 뉴클레오티드에서 합성 또는 비-자연 발생하는 변형은 2' 변형, 예로 2'-메톡시에톡시, 2'-플루오로, 2'-알릴, 2'-O-[2-(메틸아미노)-2-옥소에틸], 4'-티오, 4'-CH_2--O-2'-가교, 4'-$(CH_2)_2$--O-2'-가교, 2'-LNA 및 2'-O--(N-메틸카바메이트)를 갖는 변형 또는 염기 유사체를 포함하는 변형을 포함한다. 본 발명에서 기술된 2'-변형된 뉴클레오티드와 연결하여, "아미노"는 변형되거나 미변형될 수 있는 2'-NH_2 또는 2'-O-NH_2를 의미한다. 이러한 변형된 작용기는 예로 Eckstein et al., 미국 특허 5,672,695 및 Matulic-Adamic et al., 미국 특허 6,248,878에 기술되어 있다.

[0111] 본원에 사용된 바, "염기 유사체"는 핵산 이중체 내로 혼입될 수 있는 변형된 뉴클레오티드에서 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치 (또는 핵산 이중체 내로 혼입될 수 있는 뉴클레오티드 당 모이어티 치환에서 동등한 위치)에 위치하는 헤테로고리상 모이어티를 말한다. 염기 유사체는 일반적으로 공통 염기 구아닌 (G), 시토신 (C), 아데닌 (A), 티민 (T) 및 우라실 (U)을 제외하는 퓨린 또는 피리미딘 염기이다. 염기 유사체는 dsRNA에서

다른 염기 또는 염기 유사체와 함께 이중합될 수 있다. 염기 유사체는 본 발명의 화합물 및 방법에 유용한 염기 유사체, 예로 브레너의 미국 특허 5,432,272 및 6,001,983 및 마노하란의 미국 특허출원 20080213891에 개시된 염기 유사체를 포함하고, 이들은 본원에 참고문헌으로 통합된다. 염기의 비제한적인 예는 2,6-디아미노퓨린, 하이폭산틴 (I), 크산틴 (X), 3-β-D-리보퓨라노실-(2,6-디아미노피리미딘) (K), 3-β-D-리보퓨라노실-(1-메틸-피라졸로[4,3-d]피리미딘-5,7(4H,6H)-d-이온) (P), 이소시토신 (이소-C), 이소구아닌 (이소-G), 1-β-D-리보퓨라노실-(5-니트로인돌), 1-β-D-리보퓨라노실-(3-니트로피롤), 5-브로모우라실, 2-아미노퓨린, 4-티오-dT, 7-(2-티에닐)-이미다조[4,5-b]피리딘 (Ds) 및 피롤-2-카르브알데히드 (Pa), 2-아미노-6-(2-티에닐)퓨린 (S), 2-옥소피리딘 (Y), 디플루오로톨릴, 4-플루오로-6-메틸벤즈이미다졸, 4-메틸벤즈이미다졸, 3-메틸 이소카보스티리릴, 5-메틸 이소카보스티리릴 및 3-메틸-7-프로피닐 이소카보스티리릴, 7-아자인돌릴, 6-메틸-7-아자인돌릴, 이미다조피리디닐, 9-메틸-이미다조피리디닐, 피롤로피리지닐, 이소카보스티리릴, 7-프로피닐 이소카보스티리릴, 프로피닐-7-아자인돌릴, 2,4,5-트리메틸페닐, 4-메틸인돌릴, 4,6-디메틸인돌릴, 페닐, 나프탈레닐, 안트라세닐, 펜안트라세닐, 파이레닐, 스틸벤질, 테트라세닐, 펜타세닐 및 이들의 구조 유도체를 포함한다 (Schweitzer et al., J. Org. Chem., 59: 7238-7242 (1994); Berger et al., Nucleic Acids Research, 28(15): 2911-2914 (2000); Moran et al., J. Am. Chem. Soc., 119: 2056-2057 (1997); Morales et al., J. Am. Chem. Soc., 121: 2323-2324 (1999); Guckian et al., J. Am. Chem. Soc., 118: 8182-8183 (1996); Morales et al., J. Am. Chem. Soc., 122(6): 1001-1007 (2000); McMinn et al., J. Am. Chem. Soc., 121: 11585-11586 (1999); Guckian et al., J. Org. Chem., 63: 9652-9656 (1998); Moran et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94: 10506-10511 (1997); Das et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1: 197-206 (2002); Shibata et al., J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1: 1605-1611 (2001); Wu et al., J. Am. Chem. Soc., 122(32): 7621-7632 (2000); O'Neill et al., J. Org. Chem., 67: 5869-5875 (2002); Chaudhuri et al., J. Am. Chem. Soc., 117: 10434-10442 (1995); 및 미국 특허 6,218,108). 염기 유사체는 또한 범용 염기일 수 있다.

[0112] 본원에 사용된 바, "범용 염기"는, 핵산 이중체에 존재할 때 이중 나선 구조 (예로, 포스페이트 백본의 구조)를 변경시키지 않고도 하나 이상의 염기 유형에 대향하여 위치할 수 있는, 변형된 뉴클레오티드에서 뉴클레오티드 당 모이어티의 1' 위치 또는 뉴클레오티드 당 모이어티 치환에서 동등한 위치에 위치하는 헤테로고리상 모이어티를 말한다. 추가적으로, 범용 염기는 표적 핵산에 이중합하는 올리고뉴클레오티드의 능력을 방해하지 않는다. 표적 핵산을 이중합하는 범용 염기를 포함하는 단일가닥 핵산의 능력은 당업자에게 자명한 방법에 의해 검정될 수 있다 (예로, UV 흡광도, 고리상 이색성, 젤 이동, 단일가닥 뉴클레아제 민감성 등). 추가적으로, 이중체 형성이 관찰되는 조건은 이중체 안정성 또는 형성을 결정하도록 변화될 수 있고, 예로 온도는 용융 온도 (Tm)이 핵산 이중체의 안정성과 상관된다. 표적 핵산에 정확하게 상보적인 기준 단일가닥 핵산과 비교하여, 범용 염기를 포함하는 단일가닥 핵산은 상보적 핵산과 형성된 이중체보다 낮은 Tm을 갖는 이중체를 표적 핵산과 형성한다. 그러나, 범용 염기가 단일 미스매칭을 생성하도록 염기로 대체되었던 기준 단일가닥 핵산과 비교하여, 범용 염기를 포함하는 단일가닥 핵산은 잘못 매칭된 염기를 갖는 핵산과 형성된 이중체보다 낮은 Tm을 갖는 이중체를 표적 핵산과 형성한다.

[0113] 일부 범용 염기는 범용 염기 및 모든 염기 구아닌 (G), 시토신 (C), 아데닌 (A), 티민 (T) 및 우라실 (U) 사이의 수소 결합을 염기쌍 형성 조건 하에 형성함으로써 염기쌍을 만들 수 있다. 범용 염기는 단 하나의 단일한 상보적 염기와 염기쌍을 형성하는 염기가 아니다. 이중체에서, 범용 염기는 G, C, A, T 및 U 각각과 함께 수소 결합이 없거나, 하나의 수소 결합 또는 하나 이상의 수소 결합을 이중체의 반대 가닥 상에 이에 대향하여 형성할 수 있다. 바람직하게, 범용 염기는 이중체의 반대 가닥 상에 이에 대향한 염기와 상호작용하지 않는다. 이중체에서, 범용 염기 사이의 염기쌍은 포스페이트 백본의 이중 나선 구조를 변경시키지 않고도 발생한다. 범용 염기는 또한 스태킹 상호작용에 의해 동일한 핵산 가닥 상의 인접한 뉴클레오티드에서 염기와 상호작용할 수 있다. 이러한 스태킹 상호작용은 특히 범용 염기가 이중체의 반대 가닥 상에 이에 대향하여 위치한 염기와 임의의 수소 결합을 형성하지 않는 상황에서 이중체를 안정화시킨다. 범용 결합 뉴클레오티드의 비제한적인 예는 이노신, 1-베타-D-리보퓨라노실-5-니트로인돌 및/또는 1-베타-D-리보퓨라노실-3-니트로피롤 (Quay 등의 미국 특허출원 20070254362; Van Aerschot et al., An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. Nucleic Res. 1995 Nov. 11; 23(21): 4363-70; Loakes et al., 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal base in primers for DNA sequencing and PCR. Nucleic Res. 1995 Jul. 11; 23(13): 2361-6; Loakes and Brown, 5-Nitroindole as a universal base analogue. Nucleic Res. 1994 Oct. 11; 22(20): 4039-43).

[0114] 용어 "입체이성질체"는 동일한 화학적 구성을 갖지만 공간에서 원자 또는 작용기의 배열의 관점으로 상이한 화

합물을 말한다.

[0115] 용어 "부분입체이성질체"는 화합물이 서로 거울상이 아닌 키랄성의 2개 이상의 중심을 갖는 입체이성질체를 말한다. 부분입체이성질체는 상이한 물리적 성질, 예로 용융점, 비등점, 스펙트럼 성질 및 화학적 및 생물학적 반응성을 갖는다. 부분입체이성질체의 혼합물은 전기영동 및 크로마토그래피와 같은 고해상도 분석 절차 하에 분리될 수 있다.

[0116] "광학이성질체"는 서로 겹쳐지지 않는 거울상인 화합물의 2개의 입체이성질체를 말한다.

[0117] 본원에 사용된 입체화학의 정의 및 통례는 일반적으로 S.P. Parker, Ed., *McRaw-Hiff Dictionary of Chemical Terms* (1984), McGraw-Hill Book Company, New York; 및 Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994를 따른다.

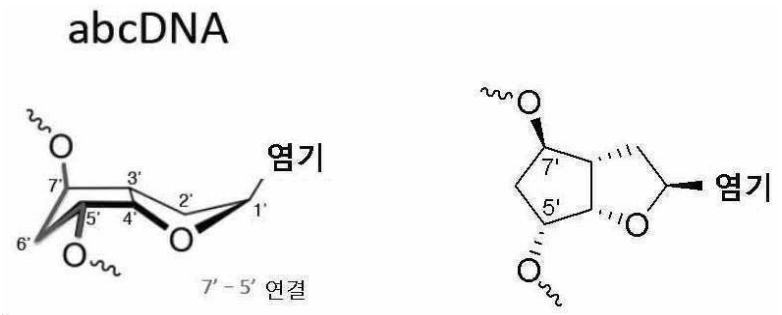
[0118] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 공통적으로 이해되는 의미를 갖는다. 다음의 참고문헌은 본 발명에 사용된 많은 용어의 일반적 정의를 당업자에게 제공하고 있다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (제 2판, 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 제 5판, R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에 사용된 바, 다음의 용어는 달리 특정되지 않는 한, 이들과 관련된 의미를 하기에 갖는다.

[0119] 본 발명은 다음의 본 발명의 상세한 설명 및 여기에 포함된 실시예를 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

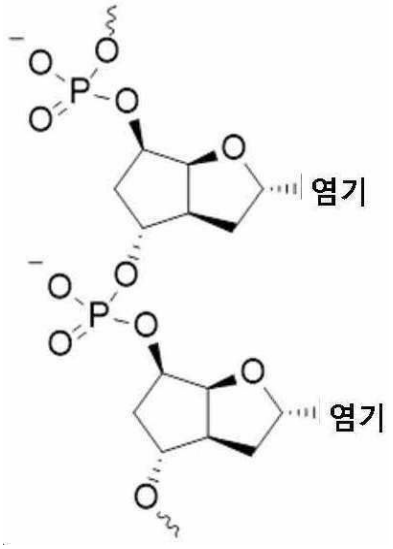
[0120] 본원에 언급된 모든 간행물은 본원에 본 발명의 참고문헌으로 통합되고, 인용된 간행물과 관련하여 방법 및/또는 재료를 기술한다. 본원에 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전의 개시만을 위하여 제공된다. 본원에서 어떠한 것도 본 발명이 선행 발명 덕분에 이러한 간행물을 앞서는 권리가 없음을 인정하는 것으로서 고려되지 않는다. 또한, 본원에 제공된 공개 날짜가 실제 출판 날짜와 상이할 수 있고, 이는 독립적인 검증이 필요할 수 있다.

[0121] **알파 아노머 이중고리상-DNA (abc-DNA) 뉴클레오시드**

[0122] 알파 이중고리상 ("abc") DNA는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (AON)에, 예를 들면 엑손 스킵핑을 유도함으로써 질환을 치료하는데 유용한 이중고리상 당 모이어티를 포함하는 뉴클레오시드 유사체이다. abc-DNA 뉴클레오시드는 하기에 나타낸 일반 구조를 갖는다.

[0123] 

[0124] 7'-5' 알파 아노머 이중고리 DNA의 구조는 하기에 나타낸다.

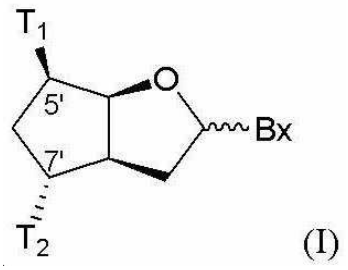
[0125] 

[0126] *7'-5' 알파 아노머 이중고리 DNA의 구조*

[0127] RNA에 대한 높은 선택성을 갖는 것에 추가하여, 7',5'-abc-DNA 변형은 DNA와 비교하여 미스매칭 구별을 개선하였고, 포스포로티오에이트 변형에 적격하며, 완벽한 생체 안정성을 부여하고, 낮은 보체 활성화를 유도하고, 높은 *시험관내* 엑손 스킵핑을 나타낸다.

[0128] 본 발명은 abc-DNA 뉴클레오시드 중 어느 하나를 포함하고, 본원에 개시된 임의의 치환을 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0129] 본 발명은 화학식 (I)의 화합물 적어도 하나를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공하고,

[0130] 

(I)

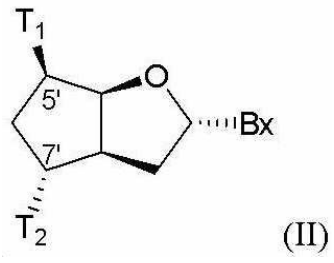
[0131] 여기서 T_1 및 T_2 중 하나는 OR_1 또는 OR_2이고;

[0132] T_1 및 T_2 중 나머지는 OR_1 또는 OR_2이고, 여기서

[0133] R_1은 H 또는 하이드록실 보호기이고, R_2는 인 모이어티이고;

[0134] Bx는 핵염기이다.

[0135] 일 구현예에서, 본 발명의 화학식 (I)의 화합물은 화학식 (Ⅱ)의 화학물이고,

[0136] 

(II)

[0137] 여기서

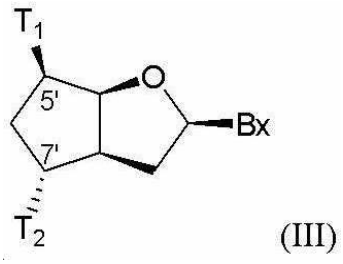
[0138] (i) T_1은 OR_1이고, T_2는 OR_1 또는 OR_2이고; 또는

[0139] (ii) T_1은 OR_1 또는 OR_2이고, T_2는 OR_1이고;

[0140] 바람직하게, T_1은 OR_1 또는 OR_2이고, T_2는 OR_1이다.

[0141] 화학식 (Ⅱ)의 화합물은 1' 말단의 첫 번째 탄소의 키랄 중심에서 Bx의 공간 입체구조가 베타 아노머와 상이한 알파 아노머 또는 알파 아노머 단량체이다.

[0142] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 화학식 (I)의 화합물은 화학식 (Ⅲ)의 화학물이고,

[0143] 

(III)

[0144] 여기서

[0145] (i) T_1은 OR_1이고, T_2는 OR_1 또는 OR_2이고; 또는

[0146] (ii) T_1은 OR_1 또는 OR_2이고, T_2는 OR_1이고;

[0147] 바람직하게, T_1은 OR_1이고, T_2는 OR_1 또는 OR_2이다.

[0148] 화학식 (Ⅲ)의 화합물은 1' 말단의 첫 번째 탄소의 키랄 중심에서 Bx의 공간 입체구조가 알파 아노머와 상이한 베타 아노머 또는 베타 아노머 단량체이다.

[0149] 또 다른 구현예에서, 화학식 (Ⅰ) 또는 (Ⅱ)의 화합물에서, Bx는 퓨린 염기 또는 피리미딘 염기로부터 선택되고, 바람직하게 Bx는 (i) 아데닌 (A), (ii) 시토신 (C), (iii) 5-메틸시토신 (MeC), (iv) 구아닌 (G), (v) 우라실 (U), (vi) 티민 또는 (vii) 2,6-디아미노퓨린 또는 (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi) 또는 (vii)의 유도체로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (Ⅰ), (Ⅱ) 또는 (Ⅲ)의 화합물에서, Bx는 티민, 5-메틸시토신 (MeC), 아데닌 또는 구아닌으로부터 선택된다.

[0150] 본원에 사용된 바, 용어 "핵염기"는 Bx로 약어화되고, 미변형된 또는 자연 발생 핵염기, 뿐만 아니라 변형된 또는 비-자연 발생 핵염기 또는 이의 합성 모방체를 말한다. 핵염기는 핵산의 헤테로고리상 염기와 수소 결합할 수 있는 하나 이상의 원자 또는 원자의 기를 포함하는 헤테로고리상 염기이다.

[0151] 일 구현예에서, 핵염기는 퓨린 염기 또는 피리미딘 염기이고, 바람직하게 상기 퓨린 염기는 퓨린 또는 치환된 퓨린이고, 상기 피리미딘 염기는 피리미딘 또는 치환된 피리미딘이다. 더욱 바람직하게, 핵염기는 (i) 아데닌 (A), (ii) 시토신 (C), (iii) 5-메틸시토신 (MeC), (iv) 구아닌 (G), (v) 우라실 (U) 또는 (vi) 5-메틸우라실 (MeU) 또는 (i), (ii), (iii), (iv), (v) 또는 (vi)의 유도체이다. 용어 "(i), (ii), (iii), (iv), (v) 또는 (vi)의 유도체" 및 "핵염기 유도체"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. (i), (ii), (iii), (iv), (v) 또는 (vi)의 유도체 및 핵염기 유도체는 각각 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들면 Sharma V. K. *et al.*, Med. Chem. Commun., 2014, 5, 1454-1471에 기술되어 있으며, 5-하이드록시틸 시토신, 크산틴, 하이폭산틴, 2-아미노아데닌, 알킬 아데닌 예컨대 6-메틸 아데닌, 2-프로필 아데닌, 알킬 구아닌 예컨대 6-메틸 구아닌, 2-프로필 구아닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 2-티오시토신, 5-할로 우라실, 5-할로 시토신, 알키닐 피리미딘 염기 예컨대 5-프로피닐 ($-C\equiv C-CH_3$) 우라실, 5-프로피닐 ($-C\equiv C-CH_3$) 시토신, 6-아조 우라실, 6-아조 시토신, 6-아조 티민, 슈도-우라실, 4-티오우라실, 8-치환된 퓨린 염기 예컨대 8-할로-, 8-아미노-, 8-티올-, 8-티오알킬-, 8-하이드록실-아데닌 또는 구아닌, 5-치환된 피리미딘 염기 예컨대 5-할로-, 구체적으로 5-브로모-, 5-트리플루오로메틸-우라실 또는 -시토신, 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌, 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자아데닌, 3-데아자구아닌, 3-데아자아데닌, 소수성 염기, 혼합된 염기, 크기-확장된 염기 또는 불소화된 염기를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 특정 구현예에서, 핵염기는 삼중고리상 피리미딘 예컨대 1,3-디아자펜옥사진-2-온, 1,3-디아자페노티아진-2-온 또는 9-(2-아미노에톡시)-1,3-디아자

펜옥사진-2-온 (G-클램프)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 또한 용어 "핵염기 유도체"는 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로고리에 의해 치환되는 핵염기, 예를 들면 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 또는 2-피리돈을 포함한다. 또한, 본 발명의 핵염기는 당업자에게 숙지된 핵염기를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다 (예로, 미국 특허 3,687,808; Swayze *et al.*, The Medicinal Chemistry of Oligonucleotides in Antisence a Drug Technology, Chapter 6, pp. 143-182 (Crooke, S.T., ed., 2008); The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, pp. 858-859; Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, Vol. 30 (6), pp. 613-623; Sanghvi, Y.S., Antisence Research and Applications, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, pp. 273-302).

[0152] 바람직한 핵염기 유도체는 메틸화된 아데닌, 구아닌, 우라실 및 시토신, 바람직하게 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체를 포함하고, 각각의 아미노기, 바람직하게 엑소고리상 아미노기는 아실 보호기 또는 디알킬포름아미디노, 바람직하게 디메틸포름아미디노 (DMF)에 의해 보호되며, 추가로 2-플루오로우라실, 2-플루오로시토신, 5-브로모우라실, 5-요오드우라실, 2,6-디아미노퓨린, 아자시토신과 같은 핵염기 유도체 및 슈도시토신 및 슈도우라실과 같은 피리미딘 유도체를 추가로 포함한다.

[0153] 추가로 바람직한 구현예에서, 상기 핵염기 유도체는 메틸화된 아데닌, 메틸화된 구아닌, 메틸화된 우라실 및 메틸화된 시토신으로부터 및 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체로부터 선택되고, 각각의 아미노기, 바람직하게 엑소고리상 아미노기는 아실 보호기에 의해 보호된다.

[0154] 추가로 바람직한 구현예에서, 상기 핵염기 유도체는 메틸화된 아데닌, 메틸화된 구아닌, 메틸화된 우라실 및 메틸화된 시토신으로부터 및 및 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체로부터 선택되고, 각각의 아미노기, 바람직하게 엑소고리상 아미노기는 아실 보호기 또는 디알킬포름아미디노, 바람직하게 디메틸포름아미디노 (DMF)에 의해 보호된다.

[0155] 추가로 바람직한 구현예에서, 상기 핵염기 유도체는 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체로부터 선택되고, 각각의 아미노기, 바람직하게 엑소고리상 아미노기는 보호기에 의해 보호된다.

[0156] 추가로 바람직한 구현예에서, 상기 핵염기 유도체는 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체이고, 엑소고리상 아미노기는 아실 보호기 또는 디알킬포름아미디노, 바람직하게 디메틸포름아미디노 (DMF)에 의해 보호된다.

[0157] 추가로 매우 바람직한 구현예에서, 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 상기 아실 보호기는 $-C(O)-R_{11}$이고, 여기서 R_{11}은 서로 독립적으로 C_1-C_{10} 알킬, C_6-C_{10} 아릴, C_6-C_{10} 아릴 C_1-C_{10} 알킬렌 또는 C_6-C_{10} 아릴옥시 C_1-C_{10} 알킬렌으로부터 선택되고, 상기 디알킬포름아미디노 보호기는 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$이고, R_{12} 및 R_{13}은 서로 독립적으로 C_1-C_4 알킬로부터 선택된다.

[0158] 추가로 매우 바람직한 구현예에서, 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 상기 아실 보호기는 $-C(O)-R_{14}$이고, 여기서 R_{14}는 서로 독립적으로 C_1-C_4 알킬, 페닐, 할로겐, C_1-C_6 알킬, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_4 알콕시로 치환된 페닐, 벤질, 할로겐, C_1-C_6 알킬, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_4 알콕시로 치환된 벤질 또는 선택적으로 할로겐, C_1-C_6 알킬, C_1-C_4 알콕시로 치환된 페닐옥시 C_1-C_2 알킬렌이고, 상기 디알킬포름아미디노 보호기는 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$이고, R_{12} 및 R_{13}은 서로 독립적으로 C_1-C_4 알킬로부터 선택된다.

[0159] 추가로 매우 바람직한 구현예에서, 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 상기 아실 보호기는 $-C(O)-R_{15}$이고, 여기서 R_{15}는 서로 독립적으로 C_1-C_4 알킬, 페닐, 할로겐, C_1-C_4 알킬, C_5-C_6 고리알킬, C_1-C_4 알콕시로 치환된 페닐, 벤질, 할로겐, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 알콕시로 치환된 벤질 또는 페닐옥시메틸렌 (CH_2-OC_6H_5)으로부터 선택되고, 페닐은 선택적으로 할로겐, C_1-C_4 알킬, C_5-C_6 고리알킬, C_1-C_4 알콕시로 치환되고, 상기 디알킬포름아미디노 보호기는 $=C(H)-NR_{12}R_{13}$이고, R_{12} 및 R_{13}은 서로 독립적으로 C_1-C_4 알킬로부터 선택된다.

[0160] 추가로 매우 바람직한 구현예에서, 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 상기 아실 보호기는 $-C(O)-R_{16}$이고, 여기서 R_{16}은 서로 독립적으로 C_1-C_3 알킬, 페닐, C_1-C_3 알킬, 메톡시

로 치환된 페닐, 벤질, C_1-C_3 알킬, 메톡시로 치환된 벤질 또는 페닐옥시메틸렌 (CH_2-OC_6H_5)으로부터 선택되고, 여기서 C_6H_5는 선택적으로 C_1-C_3 알킬, 메톡시로 치환되고, 상기 디알킬포름아미디노 보호기는 =C(H)-$NR_{12}R_{13}$이고, R_{12} 및 R_{13}은 서로 독립적으로 C_1-C_4 알킬로부터 선택된다.

[0161] 추가로 매우 바람직한 구현예에서, 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 상기 아실 보호기는 -C(O)-R_{17}이고, 여기서 R_{17}은 서로 독립적으로 C_1-C_3 알킬, 페닐, C_1-C_3알킬, 메톡시로 치환된 페닐, 벤질, C_1-C_3 알킬, 메톡시로 치환된 벤질 또는 페닐옥시메틸렌 (CH_2-OC_6H_5)으로부터 선택되고, 여기서 C_6H_5는 선택적으로 C_1-C_3 알킬, 메톡시로 치환되고, 상기 디알킬포름아미디노 보호기는 디메틸포름아미디노 (DMF)이다.

[0162] 추가로 매우 바람직한 구현예에서, 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 상기 아실 보호기는 -C(O)-R_{18}이고, 여기서 R_{18}은 서로 독립적으로 메틸, 이소프로필, 페닐, 벤질 또는 페닐옥시메틸렌 (CH_2-OC_6H_5)으로부터 선택되고, 여기서 C_6H_5는 선택적으로 C_1-C_3 알킬, 메톡시로 치환되고, 상기 디알킬포름아미디노 보호기는 디메틸포름아미디노 (DMF)이다.

[0163] 추가로 매우 바람직한 구현예에서, 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 상기 아실 보호기는 -C(O)-R_{19}이고, 여기서 R_{19}는 서로 독립적으로 메틸, 이소-프로필, 페닐, 벤질 또는 페닐옥시메틸렌 (CH_2-OC_6H_5)으로부터 선택되고, 여기서 C_6H_5는 선택적으로 메틸, 이소프로필로 치환되고, 상기 디알킬포름아미디노 보호기는 디메틸포름아미디노 (DMF)이다.

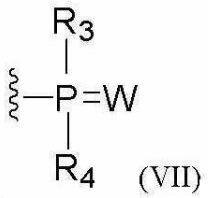
[0164] 본원에 사용된 바, 용어 "디알킬포름아미디노"는 =C(H)-$NR_{12}R_{13}$을 말하고, 여기서 R_{12} 및 R_{13}은 서로 독립적으로 C_1-C_4알킬로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 상기 디알킬포름아미디노는 상기 (i), (ii), (iii) 또는 (iv)의 핵염기 유도체의 상기 엑소고리상 아미노기의 보호기이다. 생성된 화합물은 (*E*)- 또는 (*Z*)-입체구조 둘 중 하나 및 둘 다의 형태일 수 있고, 임의의 비율로 이들의 혼합물은 본 발명의 범위 내에 포함되어야 한다. 바람직한 구현예에서, 본 발명의 화합물은 (*Z*)-입체구조의 디알킬포름아미디노, 바람직하게 디메틸포름아미디노 (DMF)를 포함한다.

[0165] 일 구현예에 따르면, Bx는 우라실, 티민, 시토신, 5-메틸시토신, 아데닌 및 구아닌으로부터 선택된다. 바람직하게, Bx는 티민, 5-메틸시토신, 아데닌 및 구아닌으로부터 선택된다. 일 구현예에 따르면, Bx는 염기 우라실, 티민, 시토신, 5-메틸시토신, 아데닌 및 구아닌 대신에 DNA 또는 RNA 올리고머 내로 혼입될 때 염기쌍을 형성할 수 있는 방향족 헤테로고리상 모이어티이다.

[0166] 본원에 사용된 바, 용어 "인 모이어티"는 독립적으로 각각의 경우에 포스포네이트, 포스파이트 트리에스테르, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스페이트 트리에스테르, 포스페이트 디에스테르, 티오스페이트 에스테르, 디티오포스페이트 에스테르 또는 포스포르아미다이트로부터 유래한 모이어티로부터 선택된다.

[0167] 또 다른 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물에서, 인 모이어티 R_2는 포스페이트 모이어티, 포스포르아미데이트 모이어티 및 포스포르아미다이트 모이어티로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (Ⅱ)의 화합물에서, 인 모이어티 R_2는 포스페이트 모이어티, 포스포르아미데이트 모이어티 및 포스포르아미다이트 모이어티로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (Ⅲ)의 화합물에서, 인 모이어티 R_2는 포스페이트 모이어티, 포스포르아미데이트 모이어티 및 포스포르아미다이트 모이어티로부터 선택된다.

[0168] 본원에 사용된 바, 용어 "인 모이어티"는 P^{III} 또는 P^{V} 원자가 상태의 인 원자를 포함하는 모이어티를 말하고, 이는 화학식 (Ⅶ)으로 나타내며,

[0169] 
(VII)

[0170] W는 O, S 또는 Se를 나타내거나, W는 전자쌍을 나타내거나, W는 BH_2를 나타내고;

[0171] R_3 및 R_4는 서로 독립적으로 H, 할로겐, OH, OR_5, NR_6R_7, SH, SR_8, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, C_1-C_6 아미노알킬이고; R_5는 각각 서로 독립적으로, 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬, C_1-C_6 알콕시; 각각 서로 독립적으로, 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴; 아세틸; 하이드록실 보호기이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_6 알케닐, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴; 아미노 보호기이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐 및 호모피페라진으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; R_8는 티올 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다. W가 O, S 또는 Se를 나타낼 때, 다음으로 인 모이어티는 이의 P^V 원자가 상태이다. W가 전자쌍을 나타낼 때, 다음으로 인 모이어티는 이의 P^{III} 원자가 상태이다. 화학식 (VII)의 모이어티는 임의의 가능한 입체이성질체를 포함한다. 화학식 (VII)으로 나타내는 모이어티에 이의 염이 추가로 포함되고, 염은 무기 염기 또는 아민으로의 처리 시 형성될 수 있고, (서로 독립적으로) R^3 및 R^4인 OH 또는 SH 기와의 반응으로부터 유래한 염일 수 있다. OH 또는 SH 기로의 염 형성을 유도하는 무기 염기 또는 아민은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있고, 트리메틸아민, 디에틸아민, 메틸아민 또는 암모늄 하이드록사이드를 포함한다. 본원에 포함되는 이들 인 모이어티는 적절한 경우 "O^-HB^+"로도 역시 약어화되며, 여기서 HB^+는 형성된 반대 양이온을 말한다.

[0172] 일 구현예에서, "인 모이어티"에서, R_3 및 R_4는 서로 독립적으로 H, OH, OR_5, NR_6R_7, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, C_1-C_6 아미노알킬이고; R_5는 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴; 아세틸; 하이드록실 보호기이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴; 아미노 보호기이고; R_8는 티올 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0173] 본원에 사용된 바, 용어 "인 모이어티"는 포스포네이트, 포스파이트 트리에스테르, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스페이트 트리에스테르, 포스페이트 디에스테르, 티오포스페이트 에스테르, 디티오포스페이트 에스테르 또는 포스포르아미다이트를 포함한다.

[0174] 따라서 일 구현예에서, OR_2는 독립적으로 각각의 경우에 포스포네이트, 포스파이트 트리에스테르, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 포스페이트 트리에스테르, 포스페이트 디에스테르, 티오포스페이트 에스테르, 디티오포스페이트 에스테르 또는 포스포르아미다이트로부터 선택되고, 바람직하게 OR_2는 포스포르아미다이트 또는 포스페이트 트리에스테르이다.

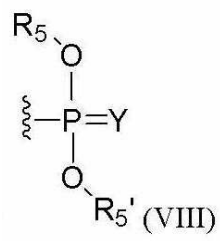
[0175] 일 구현예에서, 인 모이어티는 화학식 (VII)으로 나타내는 포스포네이트로부터 유래하고, 여기서 W는 O이고, R_3은 C_1-C_6알킬, C_1-C_6 알로알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, C_1-C_6 아미노알킬이고, R_4는 OH 또는 O^-HB^+이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (VII)의 인 모이어티는 H-포스포네이트이고, 여기서 W는 O이고, R_3은 수소이고, R_4는 OH 또는 O^-HB^+이고; O^-HB^+는 $HNEt_3^+$이다. 추가의 구현예에서, 화학식 (VII)의 인 모이어티는 알킬-포스포네이트이고, 여기서 W는 O이고, R_3은 알킬이고, R_4는 OH 또는 O^-HB^+이고; O^-HB^+는 $HNEt_3^+$이다. 일 구현예에서, 화학식 (VII)의 인 모이어티는 메틸-포스포네이트이고, 여기서 W는 O이고, R_3은 수소이고, R_4는 OH 또는 O^-HB^+이고; O^-HB^+는$HNEt_3^+$이다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (VII)의 인 모이어티는 포스포노카르복실레이트이고, 여기서 R_3 또는 R_4는 서로 독립적으로 카르복실산이다. 포스포노카르복실레이트는 포

스포노아세트산 또는 포스포노포름산일 수 있다. 추가의 구현예에서, 화학식 (VII)의 인 모이어티는 2-아미노에틸-포스포네이트이다.

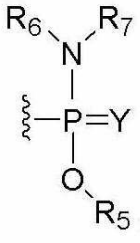
[0176] 또 다른 구현예에서, 화학식 (VII)의 인 모이어티의 R_3 및 R_4는 서로 독립적으로 H, OH, 할로겐, OR_5, NR_6R_7, SH, SR_8, C_1-C_4 알킬, 예를 들면 C_1-C_2 알킬, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_2 할로알킬, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_2 알콕시, C_1-C_4 할로알콕시, C_1-C_2 할로알콕시, C_1-C_4 아미노알킬, C_1-C_2 아미노알킬이고; R_5는 서로 독립적으로, 시아노, 니트로, 할로겐, NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, 예를 들면 C_1-C_3알킬; 서로 독립적으로, 시아노, 니트로, 할로겐, NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_3 알킬렌아릴, C_1-C_3 알킬렌디아릴; 아세틸. 하이드록실 보호기이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_4 알케닐, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_6 알킬, 예를 들면 C_1-C_4 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴; 아미노 보호기이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐 및 호모피페라진으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; R_8는 티올 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0177] 또 다른 구현예에서, 화학식 (VII)의 인 모이어티의 R_3 및 R_4는 독립적으로 각각의 경우에 및 서로 할로겐, 예를 들면 염소 또는 OR_5이고, 여기서 R_5는 하이드록실 보호기이다. 본 발명에 사용되는 추가적인 인 모이어티는 테트라헤드론 리포트 제 309호 (Beaucage and Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223-2311)에 개시되어 있다.

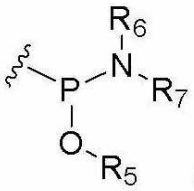
[0178] 본원에 사용된 바, 용어 "인 모이어티"는 P^{III} 또는 P^{V} 원자가 상태의 인 원자를 포함하는 R^2 기를 말하고, 이는 독립적으로 각각의 경우에 화학식 (VIII), 화학식 (IX) 또는 화학식 (X)으로 나타내며,



(VIII)



(IX)

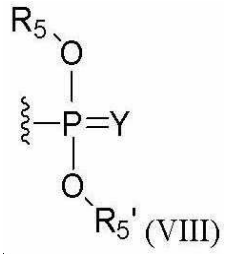


(X)

[0179]

[0180] 여기서 Y는 O, S 또는 Se이고; R_5 및 $R_{5'}$은 각각의 경우에 및 서로 독립적으로 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬, C_1-C_6 알콕시; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴; 하이드록실 보호기이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_6 알케닐, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴, 예를 들면 페닐; 아미노 보호기이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐 및 호모피페라진으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; R_8는 티올 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0181] 일 구현예에서, 인 모이어티 R^2는 화학식 (VIII)으로 나타내며,

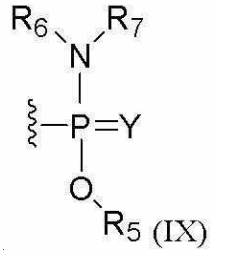
[0182] 

[0183] 여기서 Y는 O, S 또는 Se이고, Y는 O 또는 S이고, Y는 O이고; R_5 및 $R_{5'}$은 각각의 경우에 및 서로 독립적으로, 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬, C_1-C_6 알콕시; 각각 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴; 하이드록실 보호기; P(O)(OR_9)($OR_{9'}$), P(O)OP(O)(OR_9)($OR_{9'}$)이고; R_9 및 $R_{9'}$은 각각의 경우에 및 서로 독립적으로 수소, 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴; 아미노 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0184] 또 다른 구현예에서, 화학식 (VIII)의 R_5 및 $R_{5'}$은 각각의 경우에 및 서로 독립적으로 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_3 알킬, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_2 알콕시; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, 예를 들면 페닐, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴; 하이드록실 보호기이다.

[0185] 또 다른 구현예에서, 화학식 (VIII)의 R_5 및 $R_{5'}$은 서로 독립적으로 C_1-C_4 알킬 또는 아릴, 예를 들면 페닐이다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (VIII)의 R_5 및 $R_{5'}$은 서로 독립적으로 메틸 또는 에틸이다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (VIII)의 R_5 및 $R_{5'}$은 서로 독립적으로 페닐 또는 벤질이다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (VIII)의 R_5 및 $R_{5'}$은 각각의 경우에 및 서로 독립적으로 수소 또는 하이드록실 보호기이다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (VIII)의 R_5 및 $R_{5'}$은 각각의 경우에 및 서로 독립적으로, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐으로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬 또는 C_1-C_6 알콕시; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐으로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴; 또는 하이드록실 보호기이다. 일 구현예에서, 화학식 (VIII)으로 나타낸 인 모이어티 R_2는 본원에서 "포스페이트 모이어티"로 언급된다.

[0186] 일 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (IX)으로 나타내고,

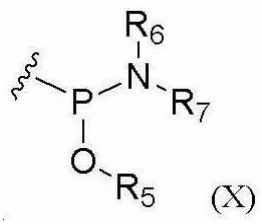
[0187] 

[0188] 여기서 Y는 O, S 또는 Se이고, Y는 O 또는 S이고;

[0189] R_5는 각각의 경우에 및 서로 독립적으로, 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬, C_1-C_6 알콕시; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴; 하이드록실 보호기이고;

[0190] R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_6 알케닐, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴, 예를 들면 페닐; 아미노 보호기이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐 및 호모피페라진으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다. 일 구현예에서, 화학식 (IX)으로 나타내는 인 모이어티 R_2는 본원에서 "포스포르아미데이트 모이어티"로서 언급되거나, 상호교환적으로 "포스포로아미데이트 모이어티"로 사용된다.

[0191] 또 다른구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)로 나타내고,

[0192] 

[0193] 여기서 R_5는 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬, C_1-C_6 알콕시; 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴; 하이드록실 보호기이고;

[0194] R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_6 알케닐, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴, 예를 들면 페닐이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐 및 호모피페라진으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다. 전형적으로 및 바람직하게, 화학식 (X)으로 나타내는 인 모이어티 R_2는 본원에서 "포스포르아미다이트 모이어티"로서 언급되거나, 상호교환적으로 "포스포로아미다이트 모이어티"로 사용된다.

[0195] 또 다른 구현예에서, 화학식 (IX)에서 Y는 O이고; R_5는 각각의 경우에 및 서로 독립적으로 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐으로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬, C_1-C_6 알콕시; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐으로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴; 하이드록실 보호기이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_6 알케닐로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴; 아미노 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0196] 일 구현예에서, 화학식 (X)의 R_5는 각각의 경우에 및 서로 독립적으로 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐으로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬, C_1-C_6 알콕시; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐으로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴; 하이드록실 보호기이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_6 알케닐로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐,

C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴; 아미노 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0197] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 각각의 경우에 독립적으로 포스페이트 모이어티, 포스포르아미데이트 모이어티 및 포스포르아미다이트 모이어티로부터 선택된다.

[0198] 또 다른 구현예에서, R_5은 각각의 경우에 독립적으로 수소, 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알킬, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 알콕시; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴; 하이드록실 보호기이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소, 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_4 알케닐, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_6 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 아릴; 아미노 보호기이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐 및 호모피페라진으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; R_8는 티올 보호기이고; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0199] 또 다른 구현예에서, R_5은 시아노, 염소, 불소 또는 브롬으로 선택적으로 치환된 C_1-C_3 알킬; 각각이 서로 독립적으로 시아노, 염소, 불소, 브롬, C_1-C_2 알콕시, C_1 할로알콕시로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴이다. 또 다른 구현예에서, R_5은 시아노, 염소, 불소 또는 브롬으로 선택적으로 치환된 C_1-C_3 알킬이다. 또 다른 구현예에서, R_5은 시아노로 치환된 C_2 알킬, 예를 들면 -CH_2CH_2-CN이다.

[0200] 또 다른 구현예에서, R_5은 C_1-C_4 알킬, 예를 들면 메틸 또는 에틸; 아릴, 예를 들면 페닐 또는 벤질: 염화물 또는 하이드록실 보호기이다. 또 다른 구현예에서, R_5은 메틸 또는 하이드록실 보호기이다.

[0201] 또 다른 구현예에서, R_5은 시아노, 염소, 불소 또는 브롬으로 선택적으로 치환된 C_1-C_6 알콕시이다.

[0202] 또 다른 구현예에서, R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 수소 또는 C_1-C_3 알킬; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 메틸로 치환된다. 일 구현예에서, R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 C_1-C_3 알킬, 알콕시 또는 아릴이고; 아릴은 시아노, 니트로, 염소, 불소, 브롬으로 선택적으로 치환된 페닐 또는 벤질이다. 또 다른 구현예에서, R_6은 수소이고, R_7은 (i) C_1-C_9 알킬 또는 (ii) 아릴이고, (i) 또는 (ii)는 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, 아릴으로 치환되고, R_7은 C_1-C_3 알킬, 페닐 또는 벤질이다.

[0203] 또 다른 구현예에서, R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 메틸, 에틸, 이소프로필 또는 이소부틸로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 이소부틸이다.

[0204] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_5는 (i) C_1-C_9 알킬; (ii) 아릴, 예를 들면 페닐; 또는 (iii) 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, 아릴로 치환된 (i) 또는 (ii)이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 C_1-C_9 알킬, 예를 들면 이소부틸이다.

[0205] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_5는 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬; 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬, C_1-C_4 할로알콕시, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, NHC(O)C_1-C_3 할로알킬, C_1-C_3 알킬설포닐로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴이고; R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_2-C_6 알케닐, C_3-C_6 고리알킬, C_1-C_3 알콕시로 치환된 C_1-C_9 알킬; 선택적으로 시아노, 니트로, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시로 선택적으로 치환된 페닐이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리디닐, 피페리디닐, 몰포리닐, 피페라지닐

및 호모피페라진으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; 물결선은 OR_2 기의 산소에 부착을 나타낸다.

[0206] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_5는 선택적으로 시아노, 니트로, 염소, 불소, 브롬, -NHC(O)C_1-C_3 알킬, -NHC(O)C_1-C_3 할로알킬로 선택적으로 치환된 C_1-C_9 알킬; 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 염소, 불소, 브롬, C_1-C_4 알콕시, C_1-C_4 할로알킬로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴이다.

[0207] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_5는 선택적으로 시아노, 니트로, 염소, 불소 및 브롬으로 선택적으로 치환된 C_1-C_3 알킬; 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 염소, 불소, 브롬, C_1-C_2 알콕시, C_1 할로알킬로 선택적으로 치환된 아릴, C_1-C_6 알킬렌아릴, C_1-C_6 알킬렌디아릴이다.

[0208] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_5는 C_1-C_3 알킬, 2-시아노에틸, 2,2,2-트리클로로에틸, 2,2,2-트리브로모에틸, -$(CH_2)_n$NHC(O)CF_3, n = 3 내지 6이고; 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 염소, 불소, 브롬, C_1-C_2 알콕시, -CF_3로 선택적으로 치환된 페닐, C_1-C_3알킬렌페닐, 벤질하이드릴이다.

[0209] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_5는 메틸, 에틸, 2-시아노에틸, 예를 들면, 2-시아노에틸 $(CH_2)_2CN$)이다.

[0210] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_6 및 R_7은 서로 독립적으로 C_1-C_3 알킬이거나; 이들에 부착된 질소 원자와 함께 헤테로고리상 고리를 형성하고, 헤테로고리상 고리는 피롤리딘, 피페리딘, 몰포린으로부터 선택되고, 헤테로고리상 고리는 선택적으로 C_1-C_3 알킬로 치환되며; 헤테로고리상 고리는 선택적으로 메틸로 치환된다.

[0211] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_6 은 R_7과 동일하고, R_6 및 R_7은 이소프로필 또는 메틸이다.

[0212] 또 다른 구현예에서, 인 모이어티 R_2는 화학식 (X)으로 나타내고, 여기서 R_5는 메틸, 에틸, 2-시아노에틸이고, R_6은 R_7과 동일하고, R_6 및 R_7은 이소프로필 또는 메틸이다.

[0213] 각각의 알킬 모이어티는 단독으로 또는 알콕시 또는 알킬렌과 같은 더 큰 작용기의 일부로서, 직쇄 또는 분지쇄이고, = C_1-C_6 알킬, 예를 들면 C_1-C_3 알킬일 수 있다. 예로는 메틸, 에틸, *n*-프로필, 프로프-2-일 (이소프로필; 본원에서 상호교환적으로 iPr 또는 Pri로서, 구체적으로 도시된 화학식에서 약어화됨), *n*-부틸, 부트-2-일, 2-메틸-프로프-1-일 또는 2-메틸-프로프-2-일을 포함한다. 알콕시의 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, *n*-부톡시, 세크-부톡시, 터르-부톡시, *n*-펜톡시, 네오-펜톡시, *n*-헥속시를 포함한다. 본원에 기술된 바, 알콕시는 할로알콕시 모이어티를 유도하는 할로겐 원자와 같은 치환기를 추가로 포함할 수 있다.

[0214] 각각의 알킬렌 모이어티는 직쇄 또는 분지쇄이고, 예를 들면 -CH_2-, -CH_2-CH_2-, -CH(CH_3)-, -CH_2-CH_2-CH_2-, -CH(CH_3)-CH_2- 또는 -CH(CH_2CH_3)-이다.

[0215] 각각의 알케닐 모이어티는 단독으로 또는 알케닐옥시 또는 알케닐렌과 같은 더 큰 작용기의 일부로서, 직쇄 또는 분지쇄이고, C_2-C_6 알케닐, 예를 들면 C_2-C_4 알케닐이다. 각각의 모이어티는 (*E*)- 또는 (*Z*)-입체구조일 수 있다. 예는 비닐 및 알릴을 포함한다. 따라서 알케닐 모이어티를 포함하는 본 발명의 화합물은 적용가능한 경우 (*E*)-입체구조의 알케닐 모이어티를 갖는 화합물, (*Z*)-입체구조의 알케닐 모이어티를 갖는 화합물 및 임의의 비율로의 이들의 혼합물 중 하나를 포함할 수 있다.

[0216] 각각의 알키닐 모이어티는 단독으로 또는 알키닐옥시와 같은 더 큰 작용기의 일부로서, 직쇄 또는 분지쇄이고, 예를 들면 C_2-C_6 알키닐 또는 C_2-C_4알키닐이다.

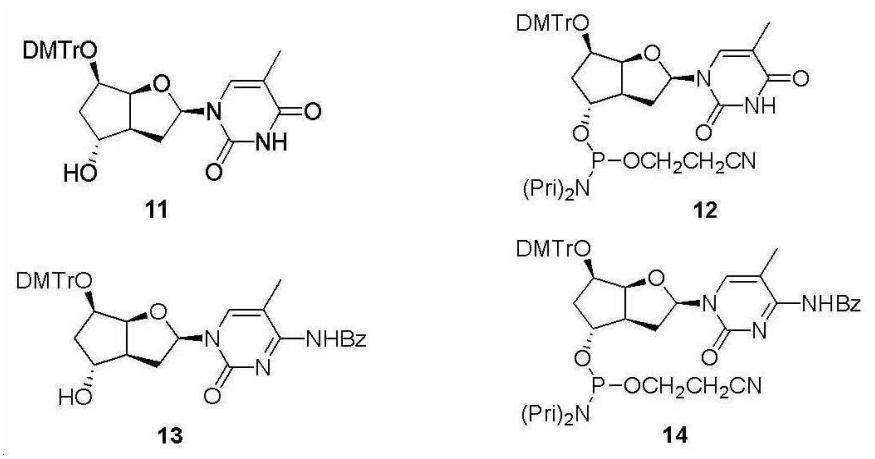
[0217] 할로겐은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드이다.

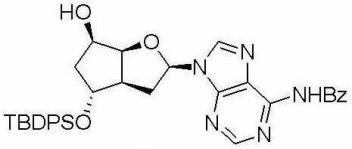
[0218] 각각의 할로알킬 모이어티는 단독으로 또는 할로알콕시와 같은 더 큰 작용기의 일부로서, 동일한 또는 상이한

할로겐 원소 중 하나 이상에 의해 치환된 ㅇ아알킬기이다. 예로는 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 클로로디플루오로메틸 ㅁ및 2,2,2-트리플루오로에틸을 포함한다.

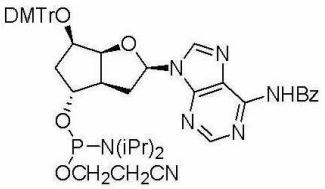
[0219] 또 다른 구현예에서, 화학식 (I) 또는 (Ⅱ)의 화합물은 비-뉴클레오시드 화합물, 예를 들면 고체상에 연결된다.

[0220] 또 다른 구현예에서, 화학식 (I)의 화합물은 다음으로부터 선택된다:

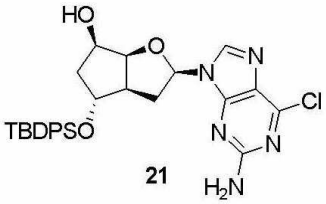
[0221] 



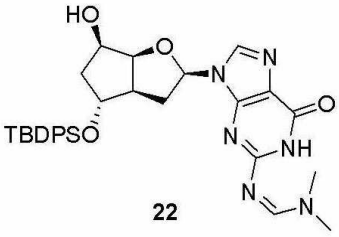
16



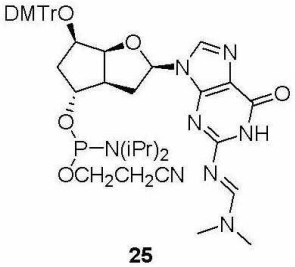
19



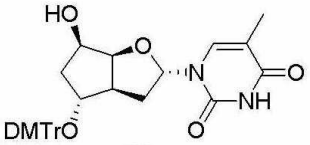
21



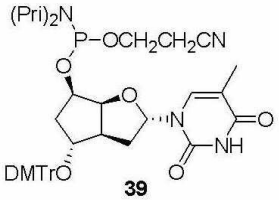
22



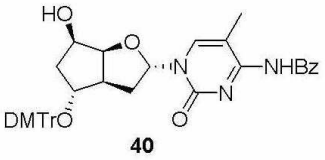
25



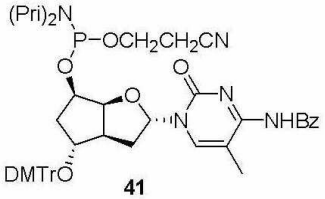
38



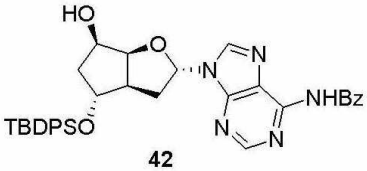
39



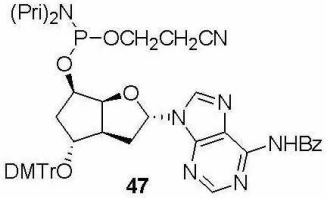
40



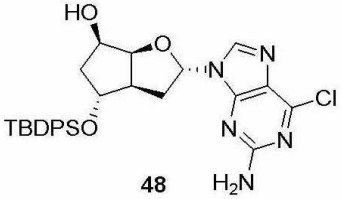
41



42

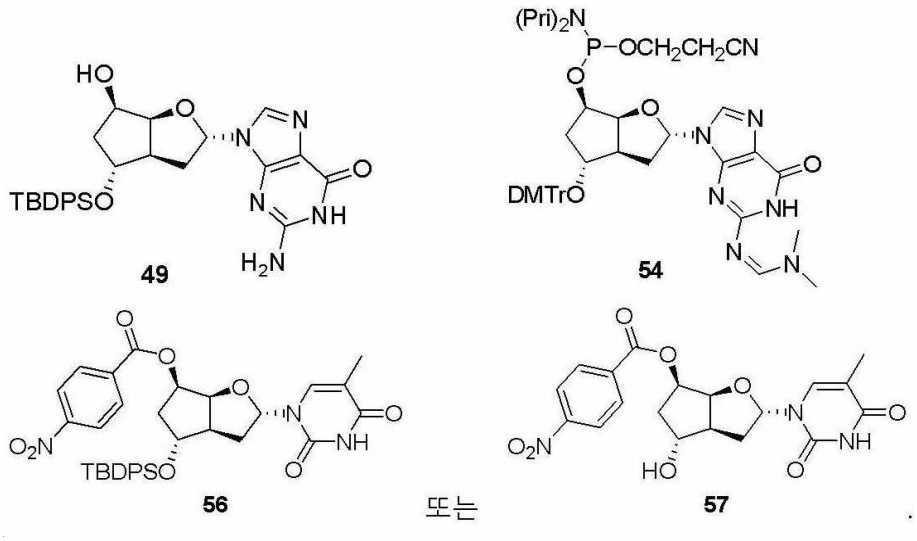


47



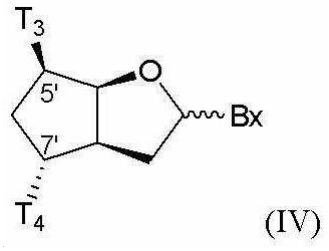
48

[0222]



[0223]

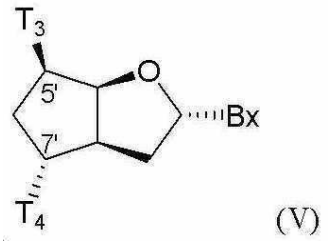
[0224] 본 발명은 화학식 (IV)의 적어도 하나의 화합물을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공하고,



[0225]

[0226] 여기서 화학식 (IV)의 적어도 하나의 화합물 각각의 경우 독립적으로 T_3 또는 T_4 중 하나는 뉴클레오시드 결합기이고; T_3 및 T_4 중 나머지는 OR_1, OR_2, 5' 말단기, 7' 말단기 또는 뉴클레오시드 결합기이고, 여기서 R_1은 H 또는 하이드록실 보호기이고, R_2는 인 모이어티이고; Bx는 핵염기이다.

[0227] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 화학식 (IV)의 적어도 하나의 화합물을 포함하고, 화학식 (IV)의 화합물은 화학식 (V)의 화합물이며,



[0228]

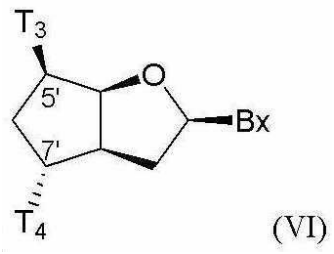
[0229] 여기서

[0230] (i) T_3은 뉴클레오시드 결합기이고; T_4는 7' 말단기, OR_1 또는 OR_2이고, 바람직하게 T_4는 7' 말단기 또는 OR_1이고; 또는

[0231] (ii) T_3은 5' 말단기, OR_1 또는 OR_2이고, 바람직하게 T_3은 5' 말단기 또는 OR_2이고, T_4는 뉴클레오시드 결합기이고; 또는

[0232] (iii) T_3 및 T_4는 서로 독립적으로 뉴클레오시드 결합기이다.

[0233] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 화학식 (IV)의 적어도 하나의 화합물을 포함하고, 화학식 (IV)의 화합물은 화학식 (VI)의 화합물이며,

[0234] 

(VI)

[0235] 여기서

[0236] (i) T_3은 뉴클레오시드 결합기이고; T_4는 7' 말단기, OR_1 또는 OR_2이고, 바람직하게 T_4는 7' 말단기 또는 OR_2이고; 또는

[0237] (ii) T_3은 5' 말단기, OR_1 또는 OR_2이고, 바람직하게 T_3은 5' 말단기 또는 OR_1이고, T_4는 뉴클레오시드 결합기이고; 또는

[0238] (iii) T_3 및 T_4는 서로 독립적으로 뉴클레오시드 결합기이다.

[0239] 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 화학식 (V)의 화합물을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 화학식 (VI)의 화합물을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 화학식 (VI), (V) 또는 (VI)의 적어도 하나의 화합물을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA이다.

[0240] 화학식 (I) 및 (IV) 내에서 Bx 및 본 발명의 화합물의 이중고리상 코아 사이의 결합을 기호화하는 물결선은 핵염기 Bx의 임의의 공간 배향이 화학식 (I) 또는 (IV)에 의해 적용되는 것을 가리킨다. 이것은 화학식 (I) 또는 (IV)가 본 발명의 화합물의 알파 또는 베타 입체구조 또는 알파 및 베타 아노머의 임의의 혼합물을 적용하는 것을 의미한다.

[0241] 본원에 사용된 바, 용어 "아릴"은 모체 방향족 고리 시스템의 단일한 탄소 원자로부터 하나의 수소 원자를 제거함으로써 유래한 6개 내지 14개 탄소 원자 (C_6-C_{14})의 1가 방향족 탄화수소 라디칼, 뿐만 아니라 독립적으로 하나 이상의 치환기, 전형적으로 및 바람직하게 하기에 기술된 1개 또는 2개 치환기로 선택적으로 치환된 상기 아릴을 말한다. 아릴은 포화된, 부분적 불포화 고리에 융합된 방향족 고리 또는 방향족 탄화고리상 또는 헤테로고리상 고리를 포함하는 이중고리상 라디칼을 포함한다. 아릴기는 독립적으로 하나 이상의 치환기, 전형적으로 예를 들면 1개 또는 2개 치환기로 선택적으로 치환되고, 상기 치환기는 각각의 경우에 독립적으로 C_1-C_4 알킬, 할로겐, CF_3, OH, C_1-C_3 알콕시, $NR_{20}R_{21}$, C_6H_5, 할로겐, C_1-C_3 알킬, C_1-C_3 알콕시, $NR_{20}R_{21}$로 치환된 C_6H_5로부터 선택되고, R_{20}, R_{21}은 각각의 경우에 독립적으로 H, C_1-C_3 알킬이다. 전형적인 아릴은 벤젠 (페닐), 치환된 페닐, 나프탈렌, 안트라센, 이페닐, 인데닐, 인다닐, 1,2-디하이드로나프탈렌, 1,2,3,4-테트라하이드로나프틸 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본원에 사용된 바, 용어 "아릴"은 바람직하게 1개 내지 3개 R_{22}로 선택적으로 치환된 페닐을 말하고, 여기서 R_{22}는 독립적으로 각각의 경우에 할로겐, -OH, 선택적으로 1개 또는 2개 OH로 치환된 C_1-C_3 알킬, C_1-C_2 플루오로알킬, C_1-C_2 알콕시, C_1-C_2 알콕시 C_1-C_3 알킬, C_3-C_6 고리알킬, $-NH_2$, $NHCH_3$ 또는 $N(CH_3)_2$이다.

[0242] 본원에 상호교환적으로 사용되는 바, 용어 "아미노의 보호기", "아미노기의 보호기" 또는 "아미노 보호기"는 당해 기술분야에 잘 공지되어 있고, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 제 3판, John Wiley & Sons, 1999; Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, P. G. M. Wuts, 제 5판, John Wiley & Sons, 2014; 및 *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,* S. L. Beaucage *et al.* 개정판 06/2012, 본원에서는 구체적으로 제 2장;에 자세하게 설명된 보호기를 포함한다. 본 발명에 적합한 "아미노 보호기"는, 메틸 카바메이트, 에틸 카바메이트, 9-플루오레닐메틸 카바메이트 (Fmoc), 9-(2-설포)플루오레닐메틸 카바메이트, 2,7-디-*t*-부틸-[9-(10,10-디옥소-10,10,10,10-테트라하이드로티오크산틸)]메틸 카바메이트 (DBD-Tmoc), 4-메톡시펜아실 카바메이트 (Phenoc), 2,2,2-트리클로로에틸 카바메이트 (Troc), 2-트리메틸시릴에틸 카바메이트 (Teoc), 2-페닐에틸 카바메이트 (hZ), 1,1-디메틸-2,2-디브로모에틸 카바메이트 (DB-*t*-BOC), 1,1-디메틸-2,2,2-트리클로로에틸 카바메이트 (TCBOC), 벤질 카바메이트 (Cbz), *p*-메톡시벤질 카바메이트 (Moz) 및 2,4,6-트리메틸벤질 카바메이트, 뿐만 아니라 포름아미드,아세트아미드, 벤즈아미드를 포함하고, 전형적으로

및 바람직하게 각각의 경우에 독립적으로 이들로부터 선택된다.

[0243] 본원에 상호교환적으로 사용되는 바, 용어 "하이드록실의 보호기", "하이드록실기의 보호기" 또는 "하이드록실 보호기"는 당해 기술분야에 잘 공지되어 있고, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 제 3판, John Wiley & Sons, 1999; Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, P. G. M. Wuts, 제 5판, John Wiley & Sons, 2014; 및 *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry,* S. L. Beaucage *et al.* 개정판 06/2012, 본원에서는 구체적으로 제 2장;에 자세하게 설명된 보호기를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 "하이드록실 보호기"는 각각의 경우에 독립적으로, 아세틸, 벤조일, 벤질, β-메톡시에톡시메틸 에테르 (MEM), 디메톡시트리틸, [비스-(4-메톡시페닐)페닐메틸] (DMTr), 메톡시메틸 에테르 (MOM), 메톡시트리틸 [(4-메톡시페닐)디페닐메틸] (MMT), p-메톡시벤질 에테르 (PMB), 메틸티오메틸 에테르, 피발로일 (Piv), 테트라하이드로피라닐 (THP), 테트라하이드로퓨란 (THF), 트리틸 (트리페닐메틸, Tr), 시릴 에테르 예컨대 t-부틸디페닐시릴 (TBDPS), 트리메틸시릴 (TMS), 터르-부틸디메틸시릴 (TBDMS), 트리이소프로필시릴옥시메틸 (TOM) 및 트리이소프로필시릴 (TIPS) 에테르; 메틸 에테르, 에톡시에틸 에테르 (EE)로부터 선택된다.

[0244] 일 구현예에서, 본 발명의 "하이드록실 보호기"는 각각의 경우에 독립적으로, 아세틸, *t*-부틸, *t*-부톡시메틸, 메톡시메틸, 테트라하이드로피라닐, 1-에톡시에틸, 1-(2-클로로에톡시)에틸, 2-트리메틸시릴에틸, *p*-클로로페닐, 2,4-디니트로페닐, 벤질, 벤조일, *p*-페닐벤조일, 2,6-디클로로벤질, 디페닐메틸, p-니트로벤질, 트리페닐메틸 (트리틸), 4,4'-디메톡시트리틸, 트리메틸시릴, 트리에틸시릴, *t*-부틸디메틸시릴 (TBDMS), *t*-부틸디페닐시릴 (TBDPS), 트리페닐시릴, 트리이소프로필시릴, 벤조일포르메이트, 클로로아세틸, 트리클로로아세틸, 트리플루오로아세틸, 피발로일, 9-플루오레닐메틸 카보네이트, 메실레이트, 토실레이트, 트리플레이트, 4-모노메톡시트리틸 (MMTr), 4,4'-디메톡시트리틸, (DMTr) 및 4,4',4"-트리메톡시트리틸 (TMTr), 2-시아노에틸 (CE 또는 Cne), 2-(트리메틸시릴)에틸 (TSE), 2-(2-니트로페닐)에틸, 2-(4-시아노페닐)에틸 2-(4-니트로페닐)에틸 (NPE), 2-(4-니트로페닐설포닐)에틸, 3,5-디클로로페닐, 2,4-디메틸페닐, 2-니트로페닐, 4-니트로페닐, 2,4,6-트리메틸페닐, 2-(2-니트로페닐)에틸, 부틸티오카르보닐, 4,4',4"-트리스(벤조일옥시)트리틸, 디페닐카바모일, 레불리닐, 2-(디브로모메틸)벤조일 (Dbmb), 2-(이소프로필티오메톡시메틸)벤조일 (Ptmt), 9-페닐크산텐-9-일 (픽실) 또는 9-(p-메톡시페닐)크산틴-9-일 (MOX)로부터 선택된다.

[0245] 일부 구현예에서, 하이드록실 보호기는 독립적으로 각각의 경우에, 아세틸, 벤질, *t*-부틸디메틸시릴, *t*-부틸디페닐시릴, 트리틸, 4-모노메톡시트리틸, 4,4'-디메톡시트리틸 (DMTr), 4,4',4-트리메톡시트리틸 (TMTr), 9-페닐크산틴-9-일 (픽실) 및 9-(p-메톡시페닐)크산틴-9-일 (MOX)로부터 선택된다.

[0246] 일부 구현예에서, 하이드록실 보호기는 독립적으로 각각의 경우에, 트리페닐메틸 (트리틸), 4-모노메톡시트리틸, 4,4'-디메톡시트리틸 (DMTr), 4,4',4"-트리메톡시트리틸 (TMTr), 9-페닐크산틴-9-일 (픽실) 및 9-(p-메톡시페닐)크산틴-9-일 (MOX)로부터 선택된다.

[0247] 추가의 구현예에서, 하이드록실 보호기는 독립적으로 각각의 경우에, 트리틸, 4-모노메톡시트리틸 및 4,4'-디메톡시트리틸기로부터 선택된다.

[0248] 또 다른 구현예에서, 하이드록실 보호기는 독립적으로 각각의 경우에, 트리페닐메틸 (트리틸), 4-모노메톡시트리틸, 4,4'-디메톡시트리틸 (DMTr), 4,4',4"-트리메톡시트리틸 (TMTr), 9-페닐크산틴-9-일 (픽실) 및 9-(p-메톡시페닐)크산틴-9-일 (MOX)로부터 선택된다.

[0249] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 하이드록실 보호기는 아세틸, 디메톡시트리틸 (DMTr), 터르-부틸디메틸시릴 (TBDMS), 트리이소프로필시릴옥시메틸 (TOM) 또는 t-부틸디페닐시릴 에테르 (TBDPS)이다. 또 다른 구현예에서, 하이드록실 보호기는 독립적으로 각각의 경우에, 4,4'-디메톡시트리틸 (DMTr) 또는 4-모노메톡시트리틸로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 하이드록실 보호기는 4,4'-디메톡시트리틸 (DMTr)이다.

[0250] 작용기가 선택적으로 치환되도록 언급하는 곳에서, 1개 내지 5개의 치환기, 1개 내지 3개의 치환기 또는 1개 또는 2개의 치환기가 존재할 수 있다. 작용기가 선택적으로 치환되도록 언급하고, 하나 이상의 치환기가 존재하는 곳에서, 하나 이상의 치환기는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0251] **뉴클레오시드간 인 포함 결합기**

[0252] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 우선적으로 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 결합을 포함하고, 예를 들면 50% 이상, 예를 들면 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 및 100%의 뉴클레오시드간 결합기는 포스포디에스테르 결합기이다.

[0253] 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 우선적으로 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 결합에 추가하여, 포스포트리에스테르 결합기, 포스포로티오에이트 결합기, 포스포로디티오에이트 결합기, 포스포네이트 결합기, 포스포노티오에이트 결합기, 포스피네이트 결합기, 포스포르티오아미데이트 결합기 또는 포스포르아미데이트 결합기로부터 선택된 뉴클레오시드 결합기를 포함할 수 있다.

[0254] 용어 "뉴클레오시드 결합기"는 인 결합기 및 인이 아닌 결합기를 포함한다.

[0255] 일 구현예에서, 뉴클레오시드 결합기는 인 결합기이고, 인 결합기는 포스포디에스테르 결합기, 포스포트리에스테르 결합기, 포스포로티오에이트 결합기, 포스포로디티오에이트 결합기, 포스포네이트 결합기 예를 들면 H-포스포네이트 결합기 또는 메틸포스포네이트 결합기, 포스포노티오에이트 결합기 예를 들면 H-포스포노티오에이트 결합기, 메틸 포스포노티오에이트 결합기, 포스피네이트 결합기, 포스포르티오아미데이트 결합기, 포스포르아미데이트 결합기 또는 포스포로디아미데이트 결합기로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 뉴클레오시드 결합기는 인 결합기이고, 인 결합기는 포스포디에스테르 결합기, 포스포트리에스테르 결합기, 포스포로티오에이트 결합기 또는 포스포네이트 결합기로부터 선택되고, 포스포네이트 결합기는 H-포스포네이트 결합기 또는 메틸포스포네이트 결합기이다.

[0256] 또 다른 구현예에서, 뉴클레오시드 결합기는 인 결합기이고, 인 결합기는 포스포디에스테르 결합기이다. 또 다른 구현예에서, 뉴클레오시드 결합기는 인 결합기이고, 인 결합기는 포스포로티오에이트 결합기이다.

[0257] 인 결합기는 알킬 포스포디에스테르 결합기, 알킬렌 포스포디에스테르 결합기, 티오노알킬 포스포디에스테르 결합기 또는 아미노알킬 포스포디에스테르 결합기, 알킬 포스포트리에스테르 결합기, 알킬렌 포스포트리에스테르 결합기, 티오노알킬 포스포트리에스테르 결합기, 아미노알킬 포스포트리에스테르 결합기, 알킬 포스포네이트 결합기, 알킬렌 포스포네이트 결합기, 아미노알킬 포스포네이트 결합기, 티오노알킬 포스포네이트 결합기 또는 키랄 포스포네이트 결합기로부터 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 뉴클레오시드 결합기는 반대이온으로서 $[HB^+]$를 갖는 포스포디에스테르 결합기 -O-P(=O)(OH)O- 또는 -O-P(=O)(O^-)O-, 반대이온으로서 $[HB^+]$를 갖는 포스포로티오에이트 -O-P(=S)(OH)O- 또는 -O-P(=S)(O^-)O-, 메틸포스포네이트 -O-P(=O)(CH_3)O-이다. 인 결합기의 다양한 염, 혼합된 염 및 유리산 형태가 포함된다.

[0258] 뉴클레오시드 결합기는 뉴클레오시드, 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 추가의 뉴클레오시드, 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드와 연결시킬 수 있다.

[0259] 인이 아닌 결합기는 인 원자를 포함하지 않고, 인이 아닌 결합기는 알킬, 아릴, 바람직하게 페닐, 벤질 또는 벤조일, 고리알킬, 알킬렌아릴, 알킬렌디아릴, 알콕시, 알콕시알킬렌, 알킬설포닐, 알킨, 에테르를 포함하고, 각각은 서로 독립적으로 시아노, 니트로, 할로겐, 카르복실, 아미드, 아민, 아미노, 이민, 티올, 설파이드, 설폭사이드, 설폰, 설파메이트, 설포네이트 설폰아미드, 실록산 또는 이들의 혼합물로 선택적으로 치환된다. 인이 아닌 결합기는 아미노 프로필, 긴 사슬 알킬 아민기, 비닐, 아세틸아미드, 아미노메틸, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 티오포름아세틸, 리보아세틸, 메틸렌이미노, 메틸렌하이드라지노 또는 중성 비이온성 뉴클레오시드 결합기, 예컨대 아미드-3 (3'-CH_2-C(=O)-N(H)-5') 또는 아미드-4 (3'-CH_2-N(H)-C(=O)-5')를 포함한다. 인이 아닌 결합기는 알킬, 아릴, 바람직하게 페닐, 벤질 또는 벤조일, 고리알킬, 알킬렌아릴, 알킬렌디아릴, 알콕시, 알콕시알킬렌, 알킬설포닐, 알킨 또는 에테르로부터 선택된 화합물을 포함하고, 여기서 화합물은 C_1-C_9, C_1-C_6 또는 C_1-C_4을 포함한다.

[0260] **지질기**

[0261] 본 발명은 abc-DNA 뉴클레오시드 및 링커를 통해 부착된 지질기를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 구조는 지질기의 탄화수소 사슬, 예를 들면 지방산이 노출되어, 이로써 알부민 및/또는 지방산 수용체 또는 운반체와 탄화수소의 상호작용을 허용하고, 이로써 생체내에서 긴 반감기를 갖는 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 지질기는 올리고뉴클레오티드의 5' 또는 7' 말단에서 링커를 통해 하이록실기에 컨쥬게이션된다.

[0262] 특정 구현예에서, 지질기는 지방산 유래 작용기이다. 특정 구현예에서, 지방산 유래 작용기는 카르복시기를 포함한다. 지방산은 4개 내지 28개 탄소 원자의 탄화수소 사슬을 갖는 임의의 포화 또는 불포화 지방산을 포함하고, 1개 또는 2개의 카르복실산기를 포함할 수 있다. 2개의 카르복실산기를 포함하는 지방산은 디카르복실산이다. 1개 또는 2개의 지방산 리간드가 본원에 기술된 바와 같이 abc-DNA 올리고뉴클레오티드의 5' 또는 7' 말단

상에 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다.

[0263] 특정 구현예에서, 지질기는 지방산 유래 작용기이고, 지방산은 표 1 및 표 2에 제시된 지방산 중 어느 하나이다.

표 1: 포화 지방산

부티르산	부탄산	$CH_3(CH_2)_2COOH$	C4:0
발레르산	펜탄산	$CH_3(CH_2)_3COOH$	C5:0
카프로산	헥산산	$CH_3(CH_2)_4COOH$	C6:0
에난트산	헵탄산	$CH_3(CH_2)_5COOH$	C7:0
카프릴산	옥탄산	$CH_3(CH_2)_6COOH$	C8:0
펠라곤산	노난산	$CH_3(CH_2)_7COOH$	C9:0
카프르산	데칸산	$CH_3(CH_2)_8COOH$	C10:0
운데실산	운데칸산	$CH_3(CH_2)_9COOH$	C11:0
라우르산	도데칸산	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	C12:0
트리데실산	트리데칸산	$CH_3(CH_2)_{11}COOH$	C13:0
미리스트산	테트라데칸산	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	C14:0
펜타데실산	펜타데칸산	$CH_3(CH_2)_{13}COOH$	C15:0
팔미트산	헥사데칸산	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	C16:0
마가르산	헵타데칸산	$CH_3(CH_2)_{15}COOH$	C17:0
스테아르산	옥타데칸산	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	C18:0
노나데실산	노나데칸산	$CH_3(CH_2)_{17}COOH$	C19:0
아라키드산	에이코산산	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	C20:0

[0264]

헤네이코실산	헤네이코산산	$CH_3(CH_2)_{19}COOH$	C21:0
베헨산	도코산산	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	C22:0
트리코실산	트리코산산	$CH_3(CH_2)_{21}COOH$	C23:0
리그노세르산	테트라코산산	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	C24:0
펜타코실산	펜타코산산	$CH_3(CH_2)_{23}COOH$	C25:0
세로트산	헥사코산산	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$	C26:0
헵타코실산	헵타코산산	$CH_3(CH_2)_{25}COOH$	C27:0
몬탄산	옥타코산산	$CH_3(CH_2)_{26}COOH$	C28:0

[0265]

표 2: 불포화 지방산

ω-3	α-리놀렌산	C18:3	$\Delta^{9,12,15}$	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	시스
ω-3	스테아리돈산	C18:4	$\Delta^{6,9,12,15}$	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_4COOH$	시스
ω-3	에이코사펜타엔산	C20:5	$\Delta^{5,8,11,14,17}$	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$	시스
ω-3	도코사헥사엔산	C22:6	$\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_2COOH$	시스
ω-6	리놀레산	C18:2	$\Delta^{9,12}$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	시스
ω-6	리놀레라이드산	C18:2		$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	트랜스
ω-6	γ-리놀렌산	C18:3	$\Delta^{6,9,12}$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_4COOH$	시스
ω-6	디호모-γ-리놀렌산	C20:3	$\Delta^{8,11,14}$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_6COOH$	시스
ω-6	아라키돈산	C20:4	$\Delta^{5,8,11,14}$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$	시스
ω-6	도코사테트라엔산	C22:4	$\Delta^{7,10,13,16}$	$CH_3(CH_2)_4CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_5COOH$	시스
ω-7	팔미톨레산	C16:1	Δ^{9}	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	시스
ω-7	박센산	C18:1	Δ^{11}	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$	트랜스
ω-7	파울린산	C20:1	Δ^{13}	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_{11}COOH$	시스

[0266]

ω-9	올레산	C18:1	Δ^9	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	시스
ω-9	엘레이트산	C18:1	Δ^9	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	트랜스
ω-9	곤드산	C20:1	Δ^{11}	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_9COOH$	시스
ω-9	에루크산	C22:1	Δ^{13}	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$	시스
ω-9	네르본산	C24:1	Δ^{15}	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$	시스
ω-9	메아드산	C20:3	$\Delta^{5,8,11}$	$CH_3(CH_2)_7CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_3COOH$	시스

[0267]

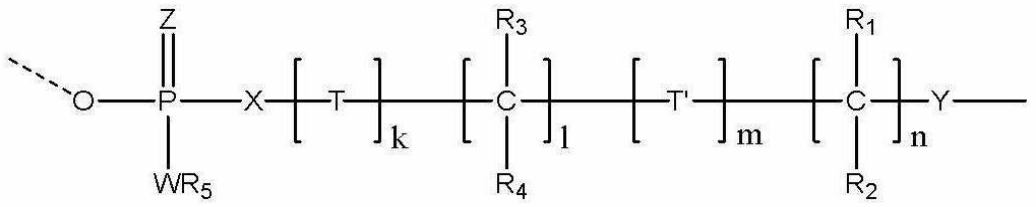
[0268] 본 발명에 따라 유용한 추가적인 지질기는 콜레스테롤, 비타민 E (토코페롤) 및 담즙산을 포함한다.

[0269] 일 구현예에서, 상기 지질기는 8개 내지 24개 탄소 원자의 탄화수소 사슬을 갖는 포화 지방산 유래 작용기이다. 특정 구현예에서, 상기 지질기는 포화 지방산 유래 작용기로서, 상기 지방산은 옥탄산, 데칸산, 도데칸산, 테트라데칸산, 헥사데칸산, 옥타데칸산, 에이코산산, 도코산산 및 테트라코산산으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 상기 지질기는 포화 지방산 유래 작용기로서, 상기 지방산은 헥사데칸산이다. 일 구현예에서, 상기 지방산 유래 작용기는 abc-DNA 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 상에 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 부착된다. 일 구현예에서, 상기 지방산 유래 작용기는 abc-DNA 올리고뉴클레오티드의 7' 말단 상에 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 부착된다.

[0270] 일 구현예에서, 상기 지질기는 8개 내지 24개 탄소 원자의 탄화수소 사슬을 갖는 불포화 지방산 유래 작용기이다. 특정 구현예에서, 상기 지질기는 불포화 지방산 유래 작용기로서, 상기 지방산은 미리스톨레산, 팔미톨레산, 스피엔산, 올레산, 엘라이드산, 박센산, 리놀레산, 리노엘라이드산, α-리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타엔산, 에루크산 및 도코사헥사엔산으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0271] **링커**

[0272] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 링커를 통해 지질기에 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 아미드 결합을 통해 지질기에 연결된다. 탄화수소 링커의 경우, 링커는 2개 내지 20개의 탄소, 예를 들면 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 탄소를 포함한다. 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커의 경우, 링커는 1개 내지 20개의 에틸렌글리콜 서브유닛, 예를 들면 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 에틸렌 글리콜 반복 단위를 포함한다. 링커는 탄화수소 링커 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 링커일 수 있다. 본 발명에 따른 링커로서, abcDNA가 링커의 인 모이어티에 부착되고, 지질기 예를 들면 지방산 유래 작용기가 Y에 부착된 링커는, 예를 들면 하기에 나타낸 구조를 갖을 수 있고,

[0273] 

[0274] 여기서

[0275] Y = NH이면, 다음으로 지방산 유래 작용기는 아미드 결합을 통해 연결되고;

[0276] n = 1이면, R_1은 예를 들면 CO_2H일 수 있고, R_2는 예를 들면 H일 수 있고;

[0277] T'는 $-CH_2-CH_2-O$일 수 있고, m은 에틸렌 글리콜 반복 단위의 수이고;

[0278] T는 디설파이드기와 같은 생체절단가능한 실체일 수 있고, k는 1과 동일하고, 특정 구현예에서,

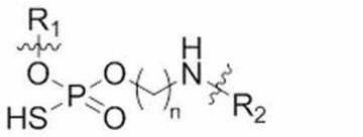
[0279] X는 산소 또는 NH일 수 있고;

[0280] Z는 O 또는 S일 수 있고;

[0281] WR_5는 OH 또는 SH일 수 있다.

[0282] 본 발명에 따라 유용한 링커는 다음을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0283] 아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커:

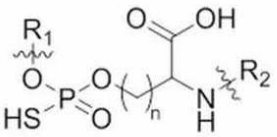


R_1 = 올리고뉴클레오티드
R_2 = 컨쥬게이션된 지질기

[0284]

[0285] 여기서 n은 바람직하게 2 내지 12, 바람직하게 4 내지 10의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 정수이다. 일 구현예에서, n은 6이다.

[0286] 알파-카르복실레이트-아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커:

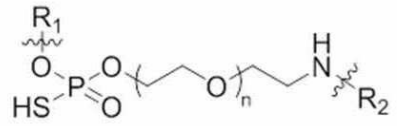


R_1 = 올리고뉴클레오티드
R_2 = 컨쥬게이션된 지질기

[0287]

[0288] 여기서 n은 바람직하게 2 내지 12, 바람직하게 4 내지 10의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 정수이다. 일 구현예에서, n은 6이다.

[0289] 아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커:

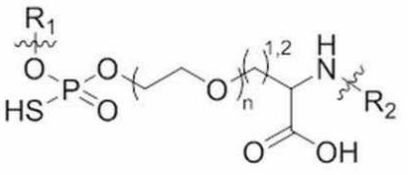


R_1 = 올리고뉴클레오티드
R_2 = 컨쥬게이션된 지질기

[0290]

[0291] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다.

[0292] 및 알파-카르복실레이트-아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커:



R_1 = 올리고뉴클레오티드
R_2 = 컨쥬게이션된 지질기

[0293]

[0294] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다.

[0295] 따라서 일 구현예에서, 상기 링커는 무두 제공된 화학식으로 상기 정의된 바,

[0296] (i) 아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커;

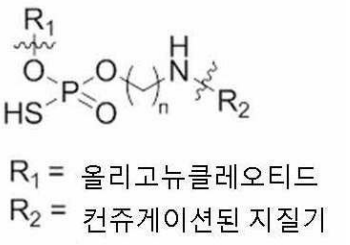
[0297] (ii) 알파-카르복실레이트-아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커;

[0298] (iii) 아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커; 및

[0299] (iv) 알파-카르복실레이트-아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커;

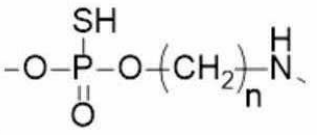
[0300] 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0301] 일 구현예에서, 상기 링커는 하기 화학식의 아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커이고,

[0302] 

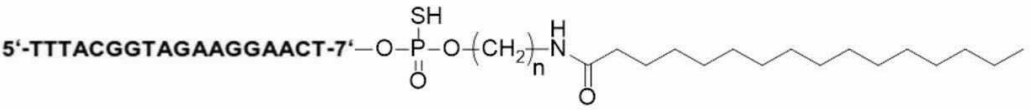
[0303] 여기서 n은 2 내지 12, 바람직하게 4 내지 10의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 정수이다. 일 구현예에서, n은 6이다.

[0304] 따라서, 본 발명은 하기에 제시된 구조를 갖는 아미노 알킬 포스포로티오에이트 링커를 제공하고,

[0305] 

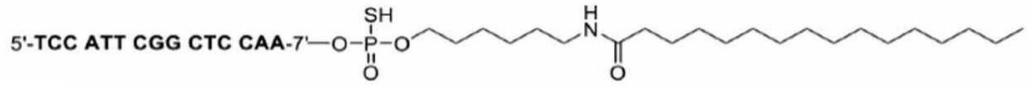
[0306] 여기서 n은 2 내지 12, 바람직하게 4 내지 10의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 정수이다. 일 구현예에서, n은 6이다.

[0307] 아미노 알킬 포스포로티오에이트 링커를 통해 지질기에 연결되고 서열번호 10을 포함하는 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 예는 하기 구조를 갖으며,

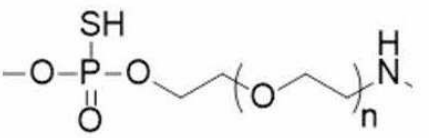
[0308] 

[0309] 여기서 n은 2 내지 12, 바람직하게 4 내지 10의 정수이고, 더욱 바람직하게 n은 6이다. 바람직하게, 서열번호 10의 잔기 모두는 서열번호 418에 해당하는 abc-DNA 잔기이다.

[0310] 아미노 알킬 포스포로티오에이트 링커를 통해 지질기에 연결된 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 또 다른 예 (서열번호 412)는 하기 구조를 갖는다.

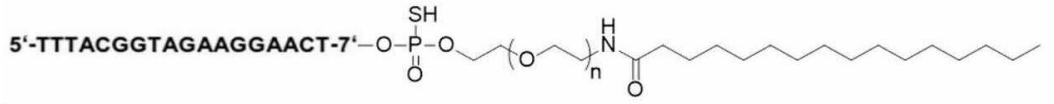
[0311] 

[0312] 또한 본 발명은 하기에 제공된 구조를 갖는 아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커를 제공하고,

[0313] 

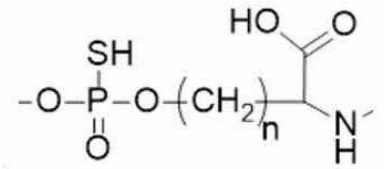
[0314] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다.

[0315] 아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커를 통해 지질기에 연결되고 서열번호 10을 포함하는 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 예는 하기 구조를 갖으며,

[0316] 

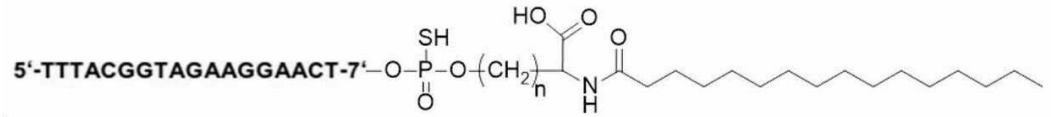
[0317] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다. 바람직하게, 서열번호 10의 잔기 모두는 서열번호 418에 해당하는 abc-DNA 잔기이다.

[0318] 또한 본 발명은 하기에 제공된 구조를 갖는 알파-카르복실레이트-아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커를 제공하고,

[0319] 

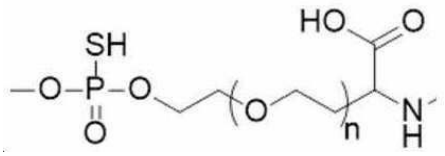
[0320] 여기서 n은 2 내지 12, 바람직하게 4 내지 10의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 정수이다. 일 구현예에서, n은 6이다.

[0321] 알파-카르복실레이트-아미노-알킬-포스포로티오에이트 링커를 통해 지질기에 연결되고 서열번호 10을 포함하는 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 예는 하기 구조를 갖으며,

[0322] 

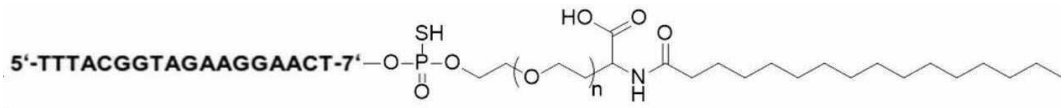
[0323] 여기서 n은 2 내지 12, 바람직하게 4 내지 10의 정수이고, 더욱 바람직하게 n은 6이다. 바람직하게, 서열번호 10의 잔기 모두는 서열번호 418에 해당하는 abc-DNA 잔기이다.

[0324] 또한 본 발명은 하기에 제공된 구조를 갖는 알파-카르복실레이트-아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커를 제공하고,

[0325] 

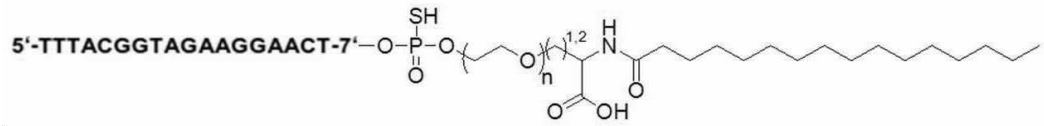
[0326] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다.

[0327] 알파-카르복실레이트-아미노-PEG-포스포로티오에이트 링커를 통해 지질기에 연결되고 서열번호 10을 포함하는 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 예는 하기 구조를 갖으며,

[0328] 

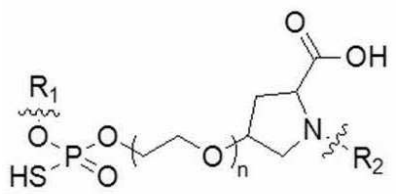
[0329] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다. 바람직하게, 서열번호 10의 잔기 모두는 서열번호 418에 해당하는 abc-DNA 잔기이고,

[0330] 또는 하기 구조를 갖으며,

[0331] 

[0332] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다. 바람직하게, 서열번호 10의 잔기 모두는 서열번호 418에 해당하는 abc-DNA 잔기이다.

[0333] 일 구현예에서, 본 발명은 입체구조적으로 강제적인, 예를 들면 하이드록시프롤린을 기반으로 하는 링커를 제공하고, 예를 들면



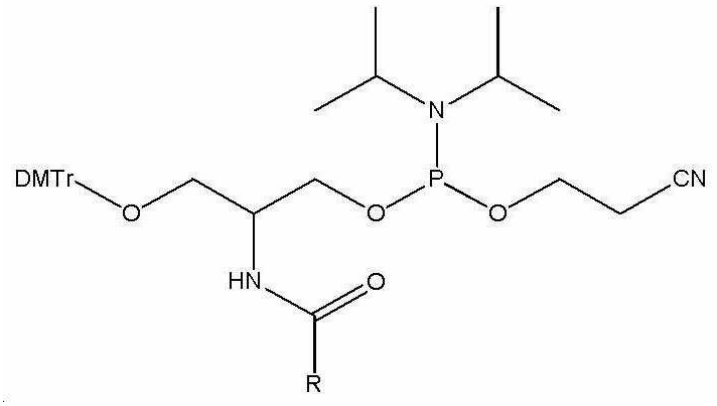
R_1 = 올리고뉴클레오티드
R_2 = 컨쥬게이션된 지질기

[0334]

[0335] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다.

[0336] 링커는 예를 들면 티오포스페이트기를 통해 올리고뉴클레오티드의 5' 및/또는 7' 말단 OH기에 부착될 수 있다. 일 구현예에서, 링커는 예를 들면 티오포스페이트기를 통해 올리고뉴클레오티드의 5' 말단 OH기에 부착될 수 있다. 일 구현예에서, 링커는 예를 들면 티오포스페이트기를 통해 올리고뉴클레오티드의 7' 말단 OH기에 부착될 수 있다. 링커를 올리고뉴클레오티드 에 연결하는데 사용될 수 있는 추가적인 기는 포스페이트기를 포함한다.

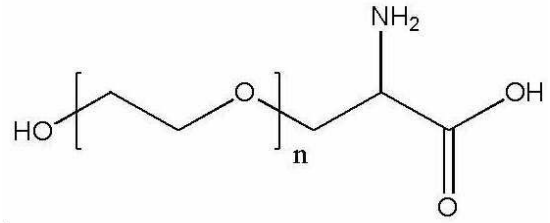
[0337] 일부 구현예에서, 지방산 컨쥬게이션된 포스포르아미다이트는 5' 말단, 7' 말단 또는 5' 및 7' 말단 둘 다에서 abc-DNA에 지방산의 커플링에 사용될 수 있고, abc-DNA에 지방산의 커플링에 사용될 수 있는 포르포르아미다이트의 예는 하기 구조를 갖고,



[0338]

[0339] 여기서 R-CO는 지방산 모이어티이다.

[0340] 일 구현예에서, 링커는 예를 들면 하기 구조를 갖는 알파-카르복실레이트-아미노 링커이고,



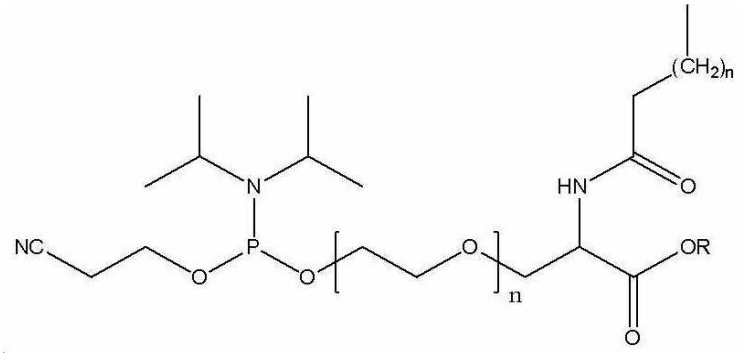
[0341]

[0342] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다.

[0343] 이의 가장 단순한 형태에서, 링커는 2-아미노-6-하이드록시-4-옥타헥탄산이고, 여기서 n = 1이다. 대안적으로, C2에서 입체화학이 세린의 입체화학고 매칭되는 상기 구조를 갖는 링커는 O-(2-하이드록시에틸)-L-세린 링커이다. abcDNA 지방산 컨쥬게이트의 맥락에서, 링커의 하이드록실 작용기는 포스포로티오에이트 결합을 통해 abcDNA에 연결되고, 아미노기는 아미드 결합을 통해 지방산 실체의 카르복실기에 연결된다.

[0344] 또 다른 구현예에서, 지방산 컨쥬게이션된 알파-카르복실레이트-아미노-PEG 포스포르아미다이트 시약은 하기의 구조를 갖고, 여기서 R은 2-클로로트리틸과 같은 적합한 보호기이고, abcDNA-링커-지방산 컨쥬게이트의 고체상

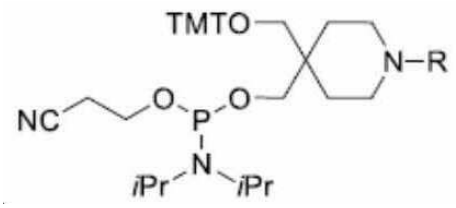
합성의 최종 단계에 사용되며,



[0345]

[0346] 여기서 n은 바람직하게 1 내지 8의 정수이다. 일 구현예에서, n은 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8의 정수이다.

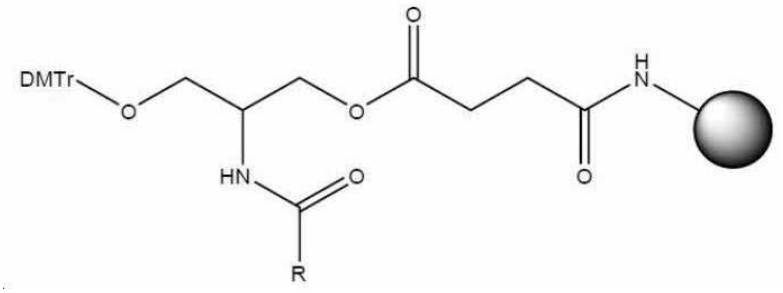
[0347] 다른 구현예에서, abc-DNA에 지방산의 커플링에 사용될 수 있는 포스포르아미다이트는 하기 구조를 갖고 (AM 케미칼, LLC, Oceanside, CA),



[0348]

[0349] 여기서 R은 지방산 모이어티이다.

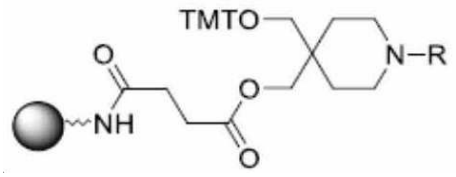
[0350] 일부 구현예에서, 지방산 컨쥬게이션된 고체상 지지물은 5' 말단에서 abc-DNA에 지방산의 커플링에 사용될 수 있다. 지방산의 abc-DNA와 커플링에 사용될 수 있는 고체상 지지물의 예는 하기 구조를 갖고,



[0351]

[0352] 여기서 R-CO는 지방산 모이어티이고, 어두운 원은 고체상 지지물이다.

[0353] 다른 구현예에서, abc-DNA에 지방산의 커플링에 사용될 수 있는 포스포르아미다이트는 하기 구조를 갖고 (AM 케미칼, LLC, Oceanside, CA),



[0354]

[0355] 여기서 R은 지방산 모이어티이고, 어두운 원은 고체상 지지물이다.

[0356] 특정 구현예에서, 링커는 절단가능한 결합, 예를 들면, 디설파이드 결합, 산 절단가능한 하이드라존 결합 또는 프로테아제 절단가능한 모이어티를 포함한다.

[0357] **합성 방법**

[0358] 당해 기술분야에 잘 공지된 합성 방법이 abc-DNA 뉴클레오시드 및 abc-DNA 뉴클레오시드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 합성하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 5' 말단에서 지질기와 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의

경우, 본 발명의 링커는 올리고뉴클레오티드의 합성 및 부착 이전에 고체 지지물에 부착된다. 특정 구현예에서, 지질기가 올리고뉴클레오티드의 7' 말단에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 경우, 컨쥬게이션은 고체상 합성 동안 일어난다. 다른 구현예에서, 지질기가 올리고뉴클레오티드의 7' 말단에 컨쥬게이션되는 올리고뉴클레오티드의 경우, 컨쥬게이션은 합성이 완료된 이후에 일어난다.

[0359] *일반적인 절차*

[0360] 모든 반응은 건조된 유리 용기로 아르곤의 불활성 대기 하에 수행된다. 반응을 위한 무수 용매가 활성화된 알루미나를 통한 여과에 의해 또는 분자체 (4Å)를 거친 보관에 의해 획득된다. 컬럼 크로마토그래피 (CC)가 실리카겔 (실리카플래쉬 P60, 40 내지 63 mm, 60Å) 상에서 수행된다. CC에 사용되는 메탄올은 HPLC 등급이고, CC에 사용된 다른 용매 모두가 전문 등급이며, 사용 전에 증류된다. 박막 크로마토그래피는 실리카겔 플레이트 (Macherey-Nagel, 사전 코팅된 TLC-플레이트 실 G-25 UV254) 상에서 수행된다. 화합물은 UV-광 하에 또는 *p*-아니스알데히드 염색 용액 [*p*-아니스알데히드 (3.7 mL), 빙초산 (3.7 mL), 농축된 황산 (5 mL), 에탄올 (135 mL)]에 담근 다음 히팅건으로 가열함으로써 촬영된다. NMR 스펙트럼은 $CDCl_3$, CD_3OD 또는 CD_3CN 중 어느 하나로 300 또는 400 MHz (^1H), 75 또는 101 MHz (^{13}C) 및 122 MHz (^{31}P)에서 기록된다. 화학적 변위 (δ)가 잔류 저처리된 용매 피크와 대비하여 보고된다 [$CDCl_3$: 7.26 ppm (^1H), 77.16 ppm (^{13}C); CD_3OD: 3.31 ppm (^1H), 49.00 ppm (^{13}C)]. 신호 할당은 APT 및 DEPT 그리고 ^1H, ^1H 및 ^1H, ^{13}C 상관성 실험을 기초로 한다 (COSY, HSQC, HMBC). 고해상도 질량 데이타는 양성 모드에서 전자스프레이 이온화 (이온 포집, ESI^+)에 의해 획득된다.

[0361] *용융 온도*

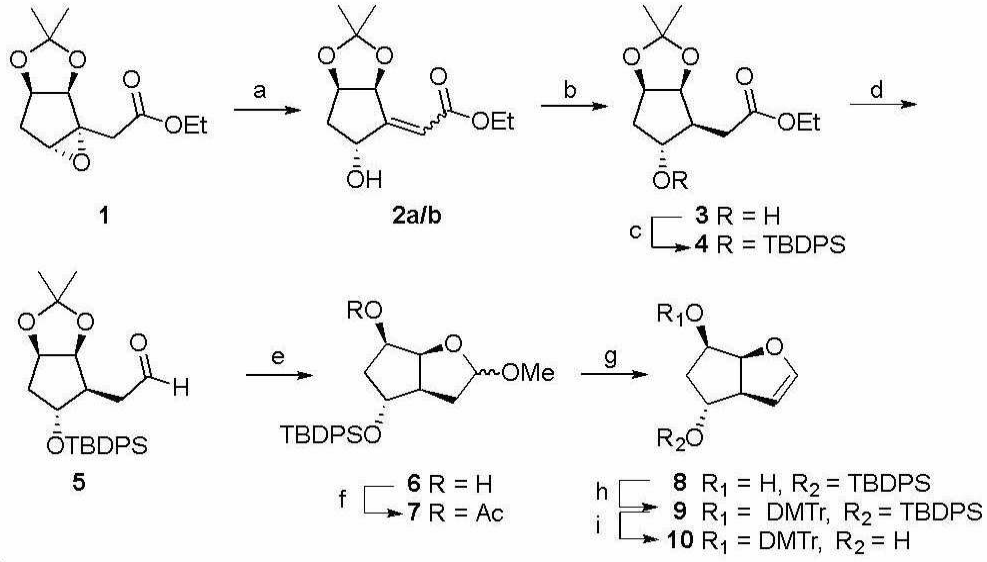
[0362] UV-용융 실험은 배리언 카리 바이오 100 UV/가시광선 분광광도계 상에서 기록된다. 실험은 2 μM 이중체 농도, 10 mM NaH_2PO_4, 0 M 내지 150 mM NaCl (알파 아노머) 또는 0.05 M 내지 1.00 M NaCl (베타 아노머)에서 수행되고, pH 7.0으로 조정된다. 시료는 디메틸폴리실록산 층을 적용하여 증발로부터 보호된다. 흡광도가 260 nm에서 모니터링된다. 모든 실험의 경우, 냉각-가열 순환 주기가 0.5℃/분의 온도 구배로 3회 수행된다. 첫 유도체의 최대 곡선이 배리언 WinUV 소프트웨어로 추출되고, Tm 값은 6개 실험의 평균으로서 보고된다.

[0363] *고리 이색성 분광분석법*

[0364] CD-스펙트럼은 자스코 PFO-350 온도 제어기가 장착된 자스코 J-715 분광편광계 상에서 기록된다. 시료 조건은 UV-용융 실험의 경우와 동일하다. 스펙트럼은 210 nm 내지 320 nm에서 50 nm/분 속도로 기록되고, 온도는 시료로부터 직접 측정된다. 각각의 실험을 위해, 시료와 동일한 염 농도를 포함한 공시료가 기록된다. 보고된 스펙트럼은 이들 스캔의 대략적 평균을 얻어 상응하는 공시료 스펙트럼을 차감함으로써 획득된다.

[0365] *abc-DNA 뉴클레오시드의 합성*

[0366] 후속적인 뉴클레오시드 합성을 위해 고려된 이중고리상 스태폴드 **7** 및 **10**은 이전에 기술된 중간물 **1** (Tarkoy, M.; Bolli, M.; Schweizer, B.; Leumann, C. *Helv. Chim. Acta* 1993, 76, 481)로부터 제작된다 (반응식 1). **1**에서 에폭사이드 고리는 -78℃에서 LiHMDS 매개된 분자내 제거에 의해 효율적으로 개방되고, 불포화 에스테르 **2**를 양호한 수율로 제공한다. 후속적으로 **2**의 니켈-촉매화 $NaBH_4$ 환원이 이중고리상 코아 구조의 볼록 면으로부터 입체특이적으로 진행되어, 유일한 식별가능한 부분입체이성질체로서 에스테르 **3**을 생성한다. 다음으로 **3**에서 하이드록실 작용기가 TBDPS 보호되어, 정량적 수율로 **4**를 제공한다. 중간물 **4**는 DIBAL로 -78℃에서 환원되어, 알데히드 **5**를 유도한다. 다음으로 **5**에서 아세토니드 보호기가 MeCN 및 H_2O의 혼합물에서 $In(OTf)_3$를 촉매로서 사용한 온화한 조건 하에 가수분해되고 (Golden, K. C.; Gregg, B. T.; Quinn, J. F. *Tetrahedron Lett.* 2010, 51, 4010), 생성된 이중고리상 헤미아세탈은 단순히 용매를 MeOH로 변화시킴으로써 메틸 글리코시드 **6**으로 전환된다. 다음으로 화합물 **6**은 아세틸화되어, 보르브루겐 화학에 의해 상응하는 퓨린 뉴클레오시드에 사용되는 보호된 전구체 **7**을 제공한다.

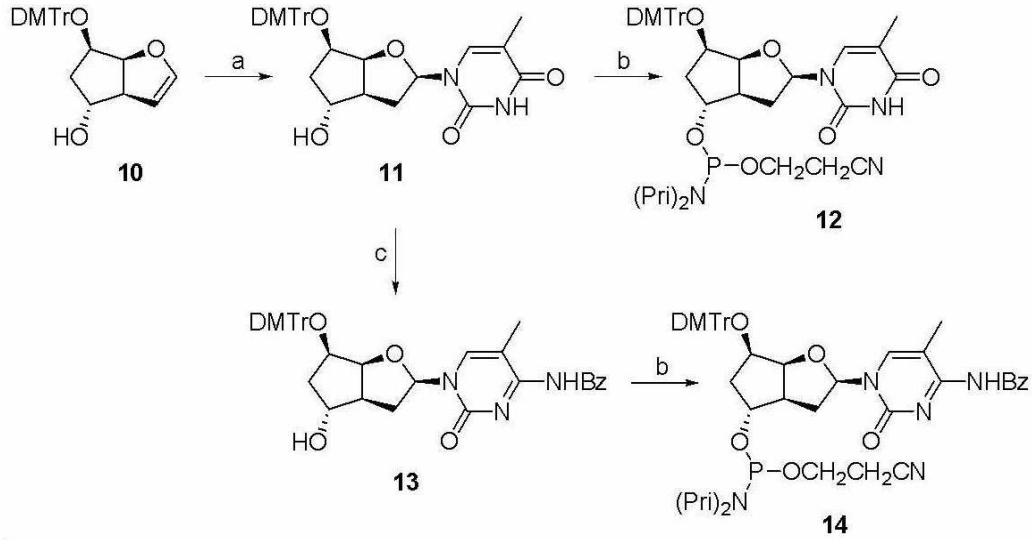


[0367]

[0368] **반응식 1**: (a) LiHMDS, THF, -78℃, 2시간, 74%; (b) $NaBH_4$, $NiCl_2$, EtOH, 0℃ → 실온, 2시간, 0%; (c) BDPSCl, I_2, N-메틸이미다졸, THF, 실온, 3시간, 정량적; (d) DiBAL-H, CH_2Cl_2, -78℃, 90분, 89%; (e) i) $In(OTf)_3$, MeCN/H_2O, 실온, 48시간, ii) MeOH, 6시간, 81%; (f) Ac_2O, DMAP, DCM, 실온, 2시간, 96%; (g) i) TMSOTf, 2,6-루티딘, DCM, 실온, 6분, ii) TBAF, THF, 0℃, 20분, 92%; (h) DMTr-Cl, AgOTf, DCM/루티딘, 실온, 4시간, 93%; (i) TBAF, THF, 실온, 20시간, 정량적.

[0369] 본 발명의 피리미딘 뉴클레오시드의 합성은 상응하는 이중고리상 글리칼에 핵염기의 β-입체선택적 NIS 유도된 부가의 잘 확립된 적용으로 구성된다 (Medvecky, M.; Istrate, A.; Leumann, C. J. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 3556; Dugovic, B.; Leumann, C. J. Journal of Organic Chemistry **2014**, 79, 1271; Lietard, J.; Leumann, C. J. J. Org. Chem. **2012**, 77, 4566). 먼저, 티민 핵염기를 도입하기 위하여, N-요오드숙신이미드 (NIS) 유도된 뉴클레오시드화가 글리탈 **8**의 직접적 전구체 상에서 수행되고, 여기서 R_1은 TMSOTf 단독 처리에 의해 **6**으로부터 쉽게 획득되는 TMS이다. 이러한 접근법은 상응하는 β-뉴클레오시드의 입체선택적 형성을 유도하지만, 표준 크로마토그래피 기법에 의해 분리불가능하여 남는7%의 α-아노머가 상당히 오염된다. β-선택성은 글리탈 **10**와 같이 R_1에서 입체적 크기를 증가시키고, R_2에서 이를 감소시킴으로써 증진될 수 있는 것으로 추론된다. 이것은 C(4)에서 전자친화성 요오드의 초기 α-공격을 선호할 것이다. 이러한 목적으로, 화합물 **6**은 TMSOTf에 이어진 TBAF로의 짧은 처리로 글리칼 **8**로 전환되어, 새로 도입된 TMS 기를 선택적으로 제거한다. 다음으로 중간물 **8**은 마지막으로 TBAF와 함께 TBDPS 보호기가 제거되어 디메톡시트리틸 화합물 **9**로 제조되어 원하는 당 구성성분 **10**을 제공한다.

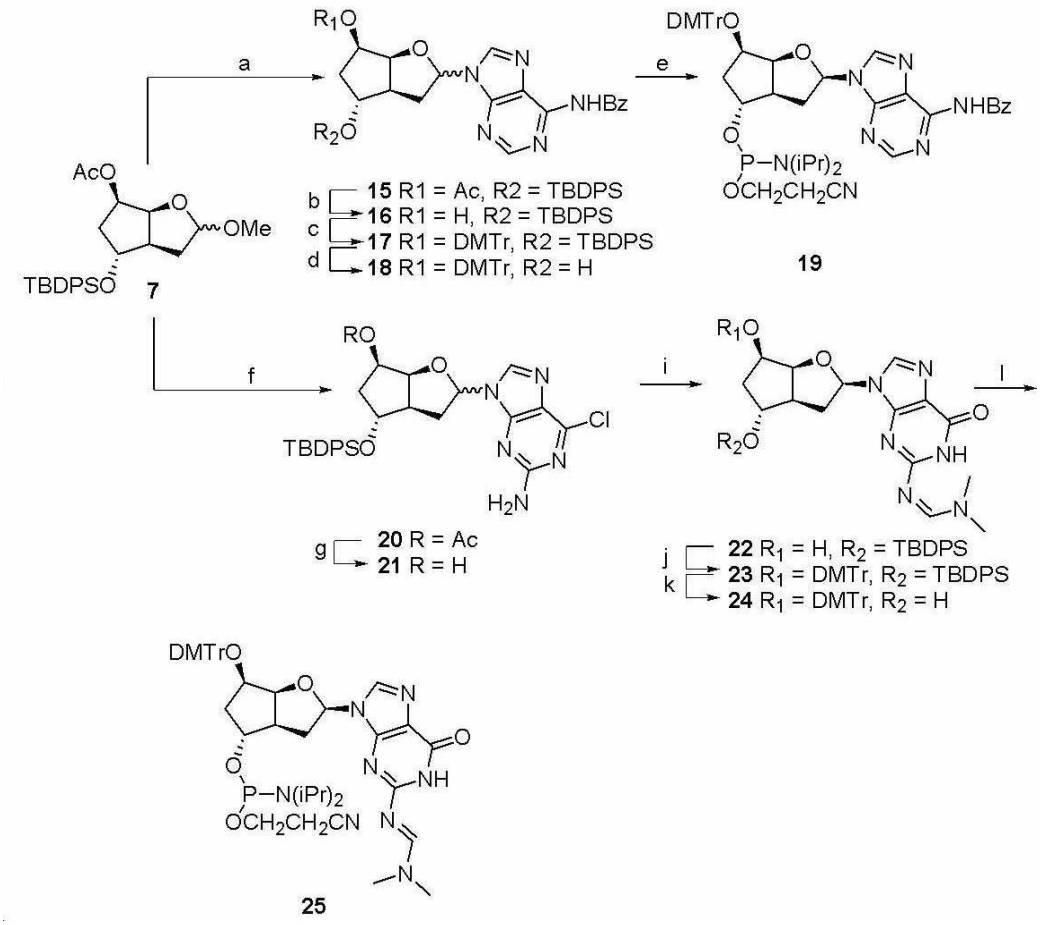
[0370] *제자리* TMS 보호된 글리칼 **10** 상의 NIS-뉴클레오시드화는 요오드화 중간물의 Bu_3SnH의 라디칼 환원으로 진행되고, 단지 미량의 (^{1}H-NMR에 의해 < 2%) α-아노머를 포함하는 DMTr-보호된 티민 유도체 11을 양호한 수율로 제공한다 (반응식 2). 2-시아노에틸 N,N,N'N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트로의 최종 포스파이틸화는 티미딘 포스포르아미다이트 구성 블록 **12**를 생성한다. 5-메틸시토신 뉴클레오시드의 합성이 티민 염기의 전환에 의해 달성된다. 이러한 목적으로, 뉴클레오시드 **11**이 TMS 보호되고, 1,2,4-트리아졸 및 $POCl_3$의 처리에 의해 상응하는 트리아졸리드로 전환된다. 암모니아 및 1,4-디옥산의 혼합물에서 이러한 트리아졸리드의 후속적인 처리는 상응하는 5-메틸시토신 뉴클레오시드를 수득하고, 이는 Bz_2O로 직접 보호되며 3개 단계에 걸쳐 88% 수율로 **13**을 제공한다. 포스포르아미다이트 **14**는 상기에 기술된 바와 같이 포스파이틸화에 의해 획득된다.



[0371]

[0372] **반응식 2**: (a) i) 티민, BSA, NIS, DCM, 실온, 7시간; ii) Bu_3SnH, AIBN, 톨루엔, 70℃, 30분, 73%; (b) 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트, ETT, DCM, 실온, 30분, **12**의 경우 70%, **14**의 경우 75%; (c) i) BSA, 트리아졸, $POCl_3$, Et_3N, CH_3CN, 실온, 5시간, ii) 1,4-디옥산/NH_4OH, 실온, 2시간, iii) Bz_2O, Et_3N, DMF, 실온, 20시간, 88%.

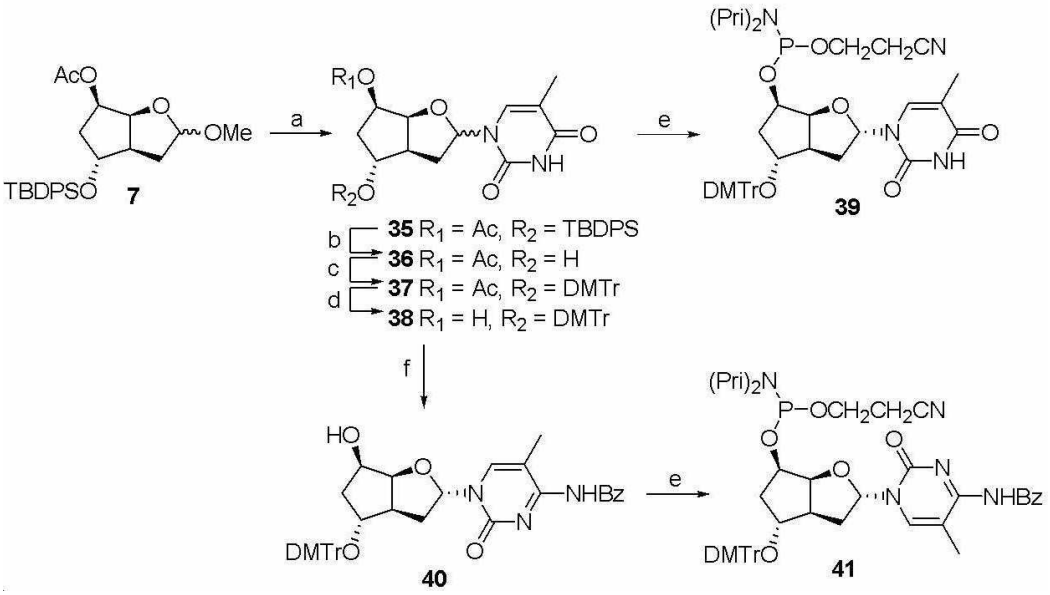
[0373] 고전적인 보르브루겐 뉴클레오시드화는 퓨린 핵염기의 도입에 적용되고, 일반적으로 α-뉴클레오시드가 우세하게 된다. N^6-벤조일아데닌 또는 2-아미노-6-클로로퓨린을 사용한 전구체 **7**의 전환은 분리불가능한 아노머 혼합물 **15** 및 **20**을 각각 4 : 1 및 7 : 3의 α/β 비율로 생성한다 (반응식 3). 아노머의 분리는 탈아세틸화 이후에 가능하고, 순수한 β-아노머 **16** 및 **21**을 생성한다. 이로부터, 아데닌 구성 블록 **19**를 시릴 보호기의 TBAF 매개된 절단 (→ **19**) 및 포스파이틸화 이후의 표준 디메톡시트리틸화 (→ **17**)에 의해 획득한다. 구아닌 구성 블록의 합성은 2-아미노-6-클로로퓨린 핵염기의 전환이 필요하다. 이것은 3-하이드록시프로피오니트릴 및 TBD로 **21**의 처리 및 후속적으로 DMF를 사용한 2-아미노기의 보호에 의해 달성되어, 보호된 구아노신 유도체 **22**를 제공한다. 상기와 동일한 화학적 경로 이후에, 구아닌 구성 블록 **25**가 디메톡시트리틸화 (→ **23**)에 이어진 시릴 보호기의 제거 (→ **24**) 및 포스파이틸화에 의해 달성된다.



[0374]

[0375] **반응식 3:** (a) N^6-벤조일아데닌, BSA, TMSOTf, MeCN, 70℃, 20분, 64%; (b) NaOH, THF/MeOH/H_2O, 0℃, 20분, 69%; (c) DMTr-Cl, 피리딘, 실온, 24시간, 87%; (d) TBAF, THF, 실온, 48시간, 87%; (e) CEP-Cl, DIPEA, THF, 실온, 2시간, 71%; (f) 2-아미노-6-클로로퓨린, BSA, TMSOTf, MeCN, 55℃, 50분, 77%; (g) NaOH, THF/MeOH/H_2O, 0℃, 20분, 85%; (i) i) TBD, 3-하이드록시프로피오니트릴, DCM, 48시간, ii) N,N-디메틸포름아미드 디메틸아세탈, DMF, 55℃, 2시간, 73%; (j) DMTr-Cl, 피리딘, 실온, 18시간, 70%; (k) TBAF, THF, 실온, 7시간, 87%; (l) 2-시아노에틸 N,N,N',N'테트라이소프로필포스포르디아미다이트, ETT, DCM, 실온, 50분, 69%.

[0376] 보호된 당 **7**로부터 시작하여, 본 발명의 4가지 바람직한 포스포르아미다이트 구성 블록의 합성이 개발되었다. TMSOTf를 사용한 당 **7** 및 *제자리* 시릴화된 티민의 혼합물의 처리는 대략 85 : 15의 바람직한 아노머 α/β 비율을 갖는 뉴클레오시드 **35**의 원활한 형성을 유도한다 (^{1}H-NMR에 의해 결정됨) (반응식 4). 5' 위치 상에 DMTr기를 보유하는 티미딘 포스포르아미다이트를 생성하는 화학적 경로는 표준 크로마토그래피에 의한 아노머의 분리를 허용하지 않는다. 따라서, DNA 가닥 내에 극성 역전을 갖는 변형을 도입하기 위하여, DMTr기가 7' 위치 상에 도입된다. 이러한 목적으로, 시릴기 **35**는 TBAF로 짧은 처리 (→ **36**), 이어진 디메톡시트리틸화 (→**37**)에 의해 제거된다. 2개 아노머의 분리는 표준 탈아세틸화 이후에 가능하고, 순수한 α-아노머 **38**을 생성한다. 티미딘 구성 블록 **39**가 마지막으로 5-(에틸티오)-1H-테트라졸의 존재 시 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트를 사용한 포스파이틸화에 의해 획득된다. 또한 중간물 **38**은 *제자리* TMS 보호된 뉴클레오시드 **38**의 상응하는 트리아졸리드로 $POCl_3$ 및 1,2,4-트리아졸을 사용한 전환에 이어서, 암모니아 및 1,4-디옥산의 혼합물로 처리에 의해 5-메틸시토신 뉴클레오시드를 신속하게 제공한다. DMF 중 Bz_2O로의 직접적 보호는 뉴클레오시드 **40**의 효율적인 형성을 유도하고, 불안정 시릴 보호기는 이 과정 동안 절단된다. 상기에 기술된 바와 같은 조건 하에 마지막 포스파이틸화는 5-메틸시티딘 포스포르아미다이트 **41**을 제공한다.

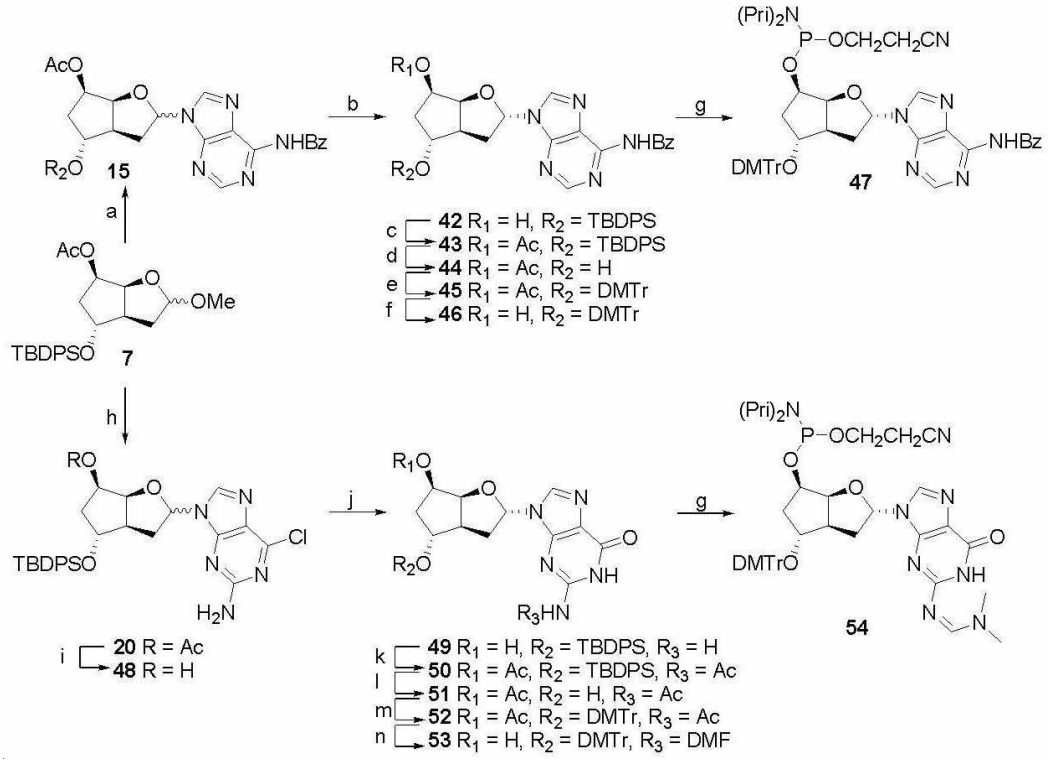


[0377]

[0378] **반응식 4:** (a) 티민, BSA, TMSOTf, MeCN, 실온, 18시간, 82%; (b) TBAF, THF, 2시간, 75%; (c) DMTr-Cl, 피리딘, 실온, 24시간, 96%; (d) K_2CO_3, MeOH, 3시간, 86%; (e) 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트, ETT, DCM, 실온, **39**의 경우 1시간, 81%, **41**의 경우 30분, 80%; (f) i) BSA, 1,2,4-트리아졸, $POCl_3$, Et_3N, MeCN, 실온, 7시간, ii) 1,4-디옥산/NH_4OH, 실온, 3시간, iii) Bz_2O, Et_3N, DMF, 실온, 18시간, 83%.

[0379] 퓨린 핵염기의 경우, 퓨린의 도입이 약간 상승된 온도에서 N^6-벤조일아데닌 또는 2-아미노-6-클로로퓨린 둘 중 하나로의 신속한 뉴클레오시드화에 의해 수행되고, 4 : 1 및 7 : 3의 α/β 비율로 뉴클레오시드 **15** 및 **20**을 각각 생성한다 (반응식 5). 아노머를 분리하기 위하여, 아세틸기가 온화한 조건 하에 제거되어, 순수한 α-아노머 **42** 및 **48**을 제공한다. 아데노신 구성 블록의 형성은 아세틸 보호기의 재도입 (→ **43**), TBAF를 사용한 TBDPS 보호기의 제거 (→ **44**), 이어진 표준 디메톡시트리틸화 (→ **45**)와 함께 계속된다. 아세틸기의 선택적인 탈보호 (→ **46**), 이어진 상기에 기술된 바와 같은 조건 하에 포스파이틸화에 의해 아데닌 구성 블록 **47**을 제공한다.

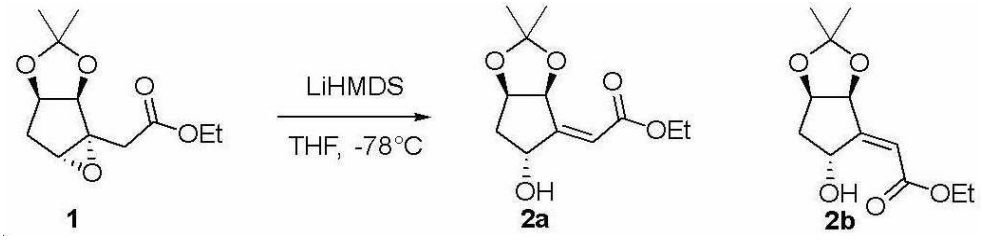
[0380] 구아닌 구성 블록의 경우, 2개 아노머의 분리 이후에, 6-클로로퓨린이 TBD 및 3-하이드록시프로피오니트릴로의 처리에 의해 구아닌 핵염기로 전환되어, 구아노신 뉴클레오시드 **49**를 제공한다. 48시간에 걸친 아세틸화는 5'-하이드록시 및 2-아미노기의 동시적 보호를 허용하여, 보호된 뉴클레오시드 **50**를 제공한다. 상기와 유사하게, DMTr기는 TBAF을 사용한 시릴 보호기의 제거 (→ **51**), 이어지는 디메톡시트리틸화 (→ **52**)에 의해 도입된다. 2개의 아세틸기는 K_2CO_3로의 처리에 의해 제거되고, 생성된 극성 산물은 DMF로 직접 보호되어 구아노신 뉴클레오시드 **53**을 제공한다. 마지막 포스파이틸화는 구성 블록 **54**를 수득한다.



[0381]

[0382] **반응식 5:** (a) N^6-벤조일아데닌, BSA, TMSOTf, MeCN, 70℃, 20분, 64%; (b) NaOH, THF/MeOH/H_2O, 0℃, 20분, 51% α-아노머, 18% β-아노머; (c) Ac_2O, DMAP, DCM, 실온, 18시간, 90%; (d) TBAF, THF, 실온, 3.5시간, 90%; (e) DMTr-Cl, 피리딘, 실온, 24시간, 89%; (f) NaOH, THF/MeOH/H_2O, 0℃, 30분, 94% (g) 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트, ETT, DCM, 실온, **47**의 경우 1시간, 77%, **54**의 경우 50분, 67%; (h) 2-아미노-6-클로로퓨린, BSA, TMSOTf, MeCN, 55℃, 50분, 77%; (i) NaOH, THF/MeOH/H_2O, 0℃, 20분, 85%; (j) TBD, 3-하이드록시프로피오니트릴, DCM, 48시간, 87% (k) Ac_2O, DMAP, DCM, 실온, 48시간, 76%; (l) TBAF, THF, 실온, 4시간, 87%; (m) DMTr-Cl, 피리딘, 실온, 48시간, 99%; (n) i) K_2CO_3, MeOH, 실온, 7시간, ii) N,N-디메틸포름아미드 디메틸아세탈, DMF, 55℃, 2시간, 77%.

[0383] ***에틸 (E 및 Z, 1'R,5'S,7'R)-(7'-하이드록시-3',3'-디메틸-2',4'-디옥사이중고리[3.3.0]옥트-6'-일리덴)아세테이트 (2a/b)***



[0384]

[0385] 건조 THF (100 mL) 중 에폭사이드 **1** (4.46 g, 18.4 mmol) 용액을 -78℃로 냉각한다. 다음으로 LiHMDS (THF 중 1 M, 22.1 mL, 22.1 mmol)가 천천히 첨가된다. 용액을 실온으로 가온하기 이전에 -78℃에서 2시간 동안 교반하고, 1 M 수용성 HCl (22.1 mL)의 첨가에 의해 중화시킨다. 다음으로 혼합물을 EtOAc (100 mL)로 희석하고, THF을 감압 하에 제거한다. 다음으로 혼합물을 0.5 M NaH_2PO_4 (50 mL)로 세척하고, 수용성 상을 EtOAc (2 × 50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 $MgSO_4$ 위에서 건조시키고, 여과하여, 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 3 : 1)에 의해 정제하고, 2개의 이성질체 **2a/b** (3.30 g, 74%)를 연노란색 고체로서 수득한다.

[0386] **2a**의 데이타: R_f = 0.37 (EtoAc/헥산 1 : 1):

[0387] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ6.07 - 5.98 (m, 1H, H-C(2)), 5.59 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-C(5')), 4.94 - 4.81

(m, 1H, H-C(1')), 4.65 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-C(7')), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH_3CH_2), 2.67 (*br*, 1H, O*H*), 2.37 (dd, *J* = 13.5, 7.5 Hz, 1H, H-C(8')), 1.55 - 1.42 (m, 1H, H-C(8')), 1.40, 1.33 (2s, 6H, $(CH_3)_2C$), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3).

[0388] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.75 (C(1)), 161.61 (C(6')), 116.53 (C(2)), 110.69 (C(3')), 76.55 (C(5')), 75.52 (C(1')), 71.63 (C(7')), 60.51 (CH_2CH_3), 37.46 (C(8')), 26.44, 24.11 ($(CH_3)_2C$), 14.27 (CH_2CH_3).

[0389] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{12}H_{19}O_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 243.1227, 측정값 243.1231.

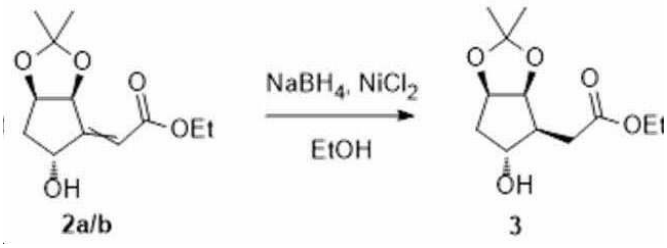
[0390] **2b**의 데이타: R_f = 0.52 (EtoAc/헥산 1 : 1):

[0391] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.15 - 6.05 (m, 1H, H-C(2)), 5.37 - 5.02 (m, 2H, H-C(5'), OH), 4.87 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-C(1')), 4.67 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-C(7')), 4.20 (qd, *J* = 7.1, 0.9 Hz, 2H, CH_3CH_2), 2.55 (dd, *J* = 14.6, 8.1 Hz, 1H, H-C(8')), 1.94 - 1.77 (m, 1H, H-C(8')), 1.39 - 1.25 (m, 9H, $(CH_3)_2C$, CH_2CH_3).

[0392] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 167.91 (C(1)), 167.43 (C(6')), 120.13 (C(2)), 111.75 (C(3')), 81.62 (C(5')), 78.08 (C(1')), 70.85 (C(7')), 61.25 (CH_2CH_3), 36.53 (C(8')), 27.38, 25.45 ($(CH_3)_2C$), 14.19 (CH_2CH_3).

[0393] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{12}H_{19}O_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 243.1227, 측정값 243.1227.

[0394] ***에틸 (1'R,5'S,6'S,7'R)-(7'-하이드록시-3',3'-디메틸-2',4'-디옥사이중고리[3.3.0]옥트-6'-일)아세테이트 (3)***

[0395] 

[0396] 알코올 **2a/b** (12.65 g, 52.2 mmol) 및 EtOH (300 mL) 중 니켈 염화물 헥사하이드레이트 (2.48 g, 10.4 mmol)의 용액에 소듐 보로하이드라이드 (9.88 g, 261 mmol)를 일정량씩 0℃에서 첨가한다. 생성된 어두운 용액을 0℃에서 30분 동안 및 90분 동안 실온에서 교반한다. 다음으로 EtOH를 감압 하에 가만히 제거하고, 생성된 고체를 EtOAc (200 mL)로 희석시키고, 과량의 $NaBH_4$를 물 (100 mL)의 첨가에 의해 켄칭한 다음 실온에서 30분 동안 교반한다. 다음으로 2개의 상을 분리한다. 유기상을 물 (100 mL)로 세척한다. 다음으로 수용성 상을 조합하고, 여과하여, EtOAc (2 × 100 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 $MgSO_4$ 위에서 건조하고, 여과시켜서 농축한다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 2 : 1)에 의해 정제하고, **3** (11.4 g, 90%)을 흰색 고체로서 수득한다.

[0397] **3**의 데이다: R_f = 0.40 (EtOAc/헥산 1 : 1):

[0398] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.65 - 4.52 (m, 2H, H-C(1'), H-C(5')), 4.15 (qd, *J* = 7.1, 1.4 Hz, 2H, CH_3CH_2), 4.05 (ddd, *J* = 10.0, 9.99, 6.2 Hz, 1H, H-C(7')), 2.86 (*br*, s, 1H, OH), 2.65 (qd, *J* = 16.9, 7.1 Hz, 2H, H-C(2)), 2.24 (dd, *J* = 13.7, 6.2 Hz, 1H, H-C(8')), 1.93 (dt, *J* = 12.7, 7.1 Hz, 1H. H-C(6')), 1.56 (ddd, *J* = 13.9, 10.2, 5.5 Hz, 1H, H-C(8')), 1.38 (s, 3H, $(CH_3)_2C$), 1.30 - 1.21 (m, 6H, $(CH_3)_2C$, CH_2CH_3).

[0399] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 174.38 (C(1)), 109.06 (C(3')), 79.65 (C(5')), 77.19 (C(1'), 74.32 (C(7'), 60.80 (CH_2CH_3), 46.66 (C(6')), 40.38 (C(8')), 32.43 (C(2)), 26.00, 23.69 ($(CH_3)_2C$), 14.17 (CH_2CH_3).

[0400] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{12}H_{21}O_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 245.1384, 측정값 245.1388.

[0401] ***에틸 (1'R,5'S,6'S,7'R)-(7'-(터르-부틸디페닐시릴)옥시)-3',3'-디메틸-2',4'-디옥사이중고리[3.3.0]옥트-6'-일)아세테이트 (4)***

[0402] 

3 4

[0403] 알코올 **3** (2.50 g, 10.2 mmol), 건조 THF (60 mL) 중 N-메틸이미다졸 (12.6 g, 153 mmol) 및 요오드 (7.80 g, 30.6 mmol)의 용액에 *터르*-부틸(클로로)디페닐실란 (3.0 mL, 11.2 mmol)을 실온 (rt)에서 일정량씩 첨가한다. 용액을 실온에서 3시간 동안 교반한 다음 THF를 증발시키고, 혼합물을 EtOAc (50 mL)로 희석하며, 10% 수용성 $Na_2O_3S_2$ (2 × 40 mL)로 세척한다. 다음으로 수용성 상을 조합하고, EtOAc (50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 $MgSO_4$ 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 1 : 10)에 의해 정제하고, **4** (5.01 g, 정량적 수율)를 흰색 고체로서 수득한다.

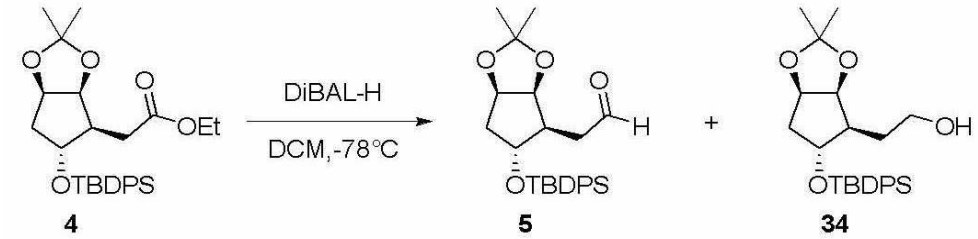
[0404] **4**의 데이타: R_f = 0.87 (DCM/MeOH 10 : 1):

[0405] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ7.77 - 7.59 (m, 4H, H-arom), 7.51 - 7.32 (m, 6H, H-arom), 4.61 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-C(5')), 4.49 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-C(1')), 4.15 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH_3CH_2), 3.96 (dd, *J* = 15.5, 9.5 Hz, 1H, H-C(7')), 2.64 - 2.32 (m, 2H, H-C(2)), 2.15 (tt, *J* = 9.0, 4.3 Hz, 1H, H-C(6')), 1.83 (dd, *J* = 12.7, 5.2 Hz, 1H, H-C(8')), 1.61 - 1.45 (m, 1H, H-C(8')), 1.27 (td, *J* = 7.1, 1.9 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.18 (s, 6H, $(CH_3)_2C$), 1.09, 1.08 (2s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si)

[0406] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ173.07 (C(1')), 135.87, 135.85 (CH-arom), 134.08, 133.73 (C-arom), 129.80, 129.75, 127.67, 127.58 (CH-arom), 108.82 (C(3')), 77.92 (C(5')), 76.96 (C(1')), 74.93 (C(7')), 60.24 (CH_2CH_3), 47.27 (C(6')), 40.27 (C(8')), 31.10 (C(2)), 27.04 ($(CH_3)_3$-C-Si), 25.86 (($CH_3)_2$C), 23.83 (($CH_3)_2$C), 19.23 ($(CH_3)_3$-C-Si), 14.24 (CH_2-CH_3).

[0407] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{28}H_{39}O_5Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 483.2561, 측정값 483.2562.

[0408] ***(1'R,5'S,6'S,7'R)-(7'-(터르-부틸디페닐시릴)옥시)-3',3'-디메틸-2',4'-디옥사이중고리[3.3.0]옥트-6'-일)아세트알데히드 (5)***

[0409] 

4 5 34

[0410] 건조 DCM (120 mL) 중 에스테르 (8.56 g, 16.3 mmol) 용액을 -78℃로 냉각한 다음 DiBAL-H (고리헥산 중 1 M, 18 mL, 18 mmol)을 천천히 첨가한다. 용액을 추가로 -78℃에서 90분 동안 교반한 다음 실온으로 가온한다. 반응을 0.5 M 수용성 NaH_2PO_4 (100 mL)의 첨가에 의해 켄칭한다. 유기상을 분리하고, 수용성 상을 추가로 DCM (2 × 100 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 $MgSO_4$ 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 2 : 10 내지 2 : 1)에 의해 정제하고, 알데히드 **5** (6.36 g, 89%) 및 알코올 **34** (0.637 g, 9%)

을 수득한다.

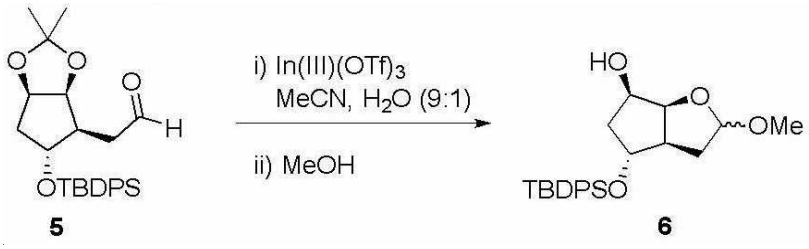
[0411] **5**의 데이타: R_f = 0.65 (EtOAc/헥산 2 : 1):

[0412] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ9.72 (s, 1H, H-C(1)), 7.65 (td, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 4H, H-arom), 7.47 - 7.33 (m, 6H, H-arom), 4.57 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-C(5')), 4.51 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-C(1')), 3.99 (td, *J* = 10.0, 5.9 Hz, 1H, H-C(7')), 2.58 - 2.43 (m, 2H, H-C(2)), 2.20 - 2.08 (m, 1H, H-C(6')), 1.87 (dd, *J* = 13.5, 5.9 Hz, 1H, H-C(8')), 1.53 (ddd, *J* = 13.5, 10.1, 5.5 Hz, 1H, H-C(8')), 1.16 (d, *J* = 3.5 Hz, 6H, $((CH_3)_2C)$, 1.05 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0413] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ201.87 (C(1)), 135.93, 135.90 (CH-arom), 133.96, 133.73 (C-arom), 129.96, 129.89, 127.79, 127.68 (CH-arom), 108.89 (C(3')), 77.76 (C(5')), 77.17 (C(1')), 74.96 (C(7'), 45.44 (C(6')), 41.31 (C(2)), 40.16 (C(8')), 27.08 $(CH_3)_3$-C-Si), 25.87 $((CH_3)_2C)$, 23.79$((CH_3)_2C)$, 19.25 $(CH_3)_3$-C-Si).

[0414] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{26}H_{35}O_4Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 439.2299, 측정값 439.2297.

[0415] ***(3aR,4R,6R,6aS)-4-((터르-부틸디페닐시릴)옥시)-2-메톡시헥사하이드로-2H-고리펜타[b]퓨란-6-올 (6)***

[0416] 

[0417] MeCN (170 mL) 및 H_2O (19 mL) 중 알데히드 **5** (13.73 g, 31.31 mmol) 용액에 인듐(Ⅲ) 트리플루오로메탄설포네이트 (703 mg, 1.25 mmol)를 첨가하였다. 용액을 추가로 48시간 동안 교반한 다음 용매를 감압 하에 제거하고, 톨루엔으로 공동증발시킨다. 잔류물을 건조 MeOH에 용해시키고, 6시간 동안 교반한다. 용매의 증발 이후에, 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 3 : 10)에 의해 정제하고, 아노머 비율 α/β ≈ 4 : 1의 혼합물 **6** (10.50 g, 81%)을 무색 오일로서 수득한다.

[0418] **6**의 데이타: R_f = 0.53 (EtOAc/헥산 1 : 1):

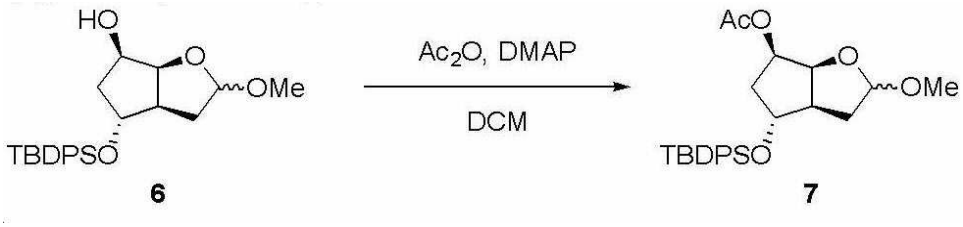
[0419] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ7.63 (dd, *J* = 7.1, 0.6 Hz, 4H, H-arom), 7.46 - 7.34 (m, 6H, H-arom), 4.98 (d, *J* = 4.8 Hz, 0.8H, H-C(2)), 4.91 (dd, *J* = 5.9, 1.3 Hz, 0.2 H, H-C(2)), 4.63 - 4.54 (m, 1H, H-C(6a)), 4.53 - 4.37 (m, 1H, H-C(6)), 4.09 (m, 0.2 H, H-C(4)), 3.92 (*br*, 0.8 H, H-C(4)), 3.29, 3.27 (2s, 3 H, MeO), 2.79 (dd, *J* = 17.0, 8.2 Hz, 0.8H, H-C(3a)), 2.64 - 2.51 (m, 0.2 H, H-C(3a)), 2.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, O*H*), 2.10 - 1.80 (m, 2.4 H, H-C(3), H-C(5)), 1.65 (ddd, *J* = 13.2, 9.1, 4.4 Hz, 0.8 H, H-C(5)), 1.44 - 1.34 (m, 0.2 H, H-C(3)), 1.22 (ddd, *J* = 13.2, 8.1, 4.9 Hz, 0.8 H, H-C(3)), 1.05 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0420] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ135.78, 135.74 (CH-arom), 133.96, 133.84 (C-arom), 129.78, 127.72 (CH-arom), 107.21, 106.50 (C(2)), 85.37, 81.76 (C(6a)), 78.11, 77.19 (C(4)), 73.03, 72.44 (C(6)), 55.30, 54.46 (MeO), 50.91, 49.67 (C(3a)), 41.13, 40.29 (C(3)), 38.16, 37.98 (C(5)), 26.96, 26.92 $(CH_3)_3$-C-Si), 19.07 $(CH_3)_3$-C-Si).

[0421] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{26}H_{35}O_4Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 435.1962, 측정값 435.1950.

[0422] ***(3aR,4R,6R,6aS)-4-((터르-부틸디페닐시릴)옥시)-2-메톡시헥사하이드로-2H-고리펜타[b]퓨란-6-일 아세테이트***

(7)



[0423]

[0424] 건조 DCM (100 mL) 중 당 **6** (3.35 g, 8.12 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (1.29 g, 10.6 mmol) 용액에 아세트산 무수물 (3.8 mL, 41 mmol)을 실온에서 첨가한다. 2시간 동안 교반한 이후, 반응을 포화 $NaHCO_3$ (10 mL)의 느린 첨가에 의해 켄칭한다. 다음으로 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)으로 희석하고, DCM (3 × 50 mL)으로 세척한다. 조합된 유기상을 $MgSO_4$, 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 1 : 2)에 의해 희석하고, 아노머 비율 ≈ 4 : 1의 혼합물 **7** (3.53 g, 96%)을 무색의 오일로서 수득한다.

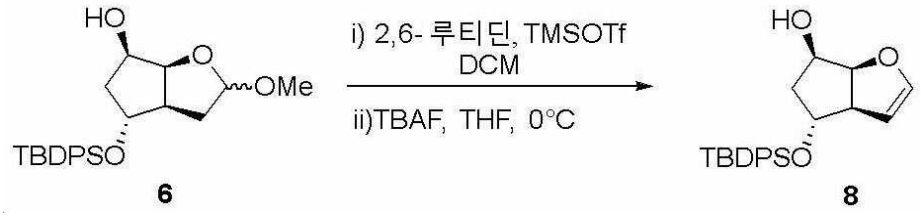
[0425] **7**의 데이타: R_f = 0.42 (EtOAc/헥산 1:2):

[0426] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.70 - 7.59 (m, 4H, H-arom), 7.48 - 7.34 (m, 6H, H-arom), 5.41 (dt, *J* = 11.0, 5.6 Hz, 0.8H, H-C(6)), 5.28 (ddd, *J* = 11.7, 6.6, 5.2 Hz, 0.2H, H-C(6)), 4.99 (d, *J* = 4.8 Hz, 0.8H, H-C(2)), 4.89 - 4.81(m, 0.4H, H-C(2), H-C(6a)), 4.76 - 4.69 (m, 0.8H, H-C(6a)), 4.11 (d, *J* = 5.1 Hz, 0.2H, H-C(4)), 3.90 (d, *J* = 4.0 Hz, 0.8H, H-C(4)), 3.27, 3.24 (2s, 3H, *Me*O), 2.81 (dd, *J* = 16.6, 7.6 Hz, 0.8H, H-C(3a)), 2.60 (dd, *J* = 10.1, 7.0 Hz, 0.2H, H-C(3a)), 2.30 - 2.18 (m, 0.2 H, H-C(5)), 2.12, 2.10 (2s, *J* = 4.7 Hz, 3H, *Me*CO_2), 2.07 - 1.82 (m, 2.8H, H-C(5), H-C(3)), 1.24 (ddd, *J* = 12.9, 7.6, 3.7 Hz, 1H, H-C(3)), 1.07 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0427] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.75, 170.66 (Me*C*O_2), 135.77, 135.73, 135.72 (CH-arom), 133.75, 133.65 (C-arom), 129.82, 129.74, 127.76, 127.75, 127.71 (CH-arom), 106.19, 106.15 (C(2)), 83.17, 79.80 (C(6a)), 77.49, 76.46 (C(4)), 75.64, 74.41 (C(6)), 54.34, 54.25 (*Me*O), 51.48, 50.17 (C(3a)), 38.05, 37.98 (C(3)), 36.96, 36.21 (C(5)), 26.95, 26.90 (CH_3)$_3$-C-Si), 21.09, 21.04 (*Me*CO_2), 19.04 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0428] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{26}H_{34}O_5NaSi$ ($[M + Na]^+$) 계산값 477.2068, 측정값 477.2063.

[0429] ***(3aR,4R,6R,6aS)-4-((터르-부틸디페닐시릴)옥시)-3a,5,6,6a-테트라하이드로-4H-고리펜타[b]퓨란-6-올*** *(8)*



[0430]

[0431] 건조 DCM (35 mL) 중의 당 **6** (2.08 g, 5.04 mmol)에 2,6-루티딘 (2.95 mL, 25.2 mmol)을 0℃에서 첨가한다. 0℃에서 20분 동안 교반한 이후에, TMSOTf (2.73 mL, 15.1 mmol)를 적가한 다음 용액을 실온으로 가온하고, 추가 60분 동안 교반한다, 다음으로 반응을 포화 $NaHCO_3$ (40 mL)의 첨가에 의해 켄칭한다. 유기상을 분리하고, 수용성 상을 DCM (3 × 30 mL)로 추가로 추출한다. 조합된 유기상을 $MgSO_4$ 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0432] 생성된 산물을 건조 THF (35 mL)에서 재용해하고, 0℃로 냉각시키고, TBAF (TMS 중 1 M, 5.6 mL, 5.6 mmol)을 첨가한다. 용액을 10분 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석하고, DCM (4 × 40 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 $MgSO_4$ 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 1 : 4)에 의해 정제하고, 글리칼 **8** (1.76 g, 92%)을 수득한다.

[0433] 8의 데이타: R_f = 0.49 (EtOAc/헥산 1 : 2):

[0434] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.66 (m, 4H, H-arom), 7.42 (m, 6H, H-arom), 6.22 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-C(2)), 4.91 (dd, *J* = 8.2, 5.3 Hz, 1H, H-C(3)), 4.70 (dt, *J* = 11.1, 5.6 Hz, 1H, H-C(6)), 4.56 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-C(6a)), 3.97 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-C(4)), 3.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-C(3a)), 2.30 (*br*, 1H, O*H*), 2.03 (dd, *J* = 12.6, 5.4 Hz, 1H, H-C(5)), 1.51 (ddd, *J* = 12.7, 11.2, 4.2 Hz, 1H, H-C(5)), 1.08 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0435] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 146.24 (C(2)), 135.72, 135.69 (CH-arom), 134.03, 133.74 (C-arom), 129.80, 129.78, 127.73 (CH-arom), 101.84 (C(3)), 84.59 (C(6a)), 76.79(C(4)), 74.10 (C(6)), 55.56 (C(3a)), 39.38 (C(5)), 26.93 (CH_3)$_3$-C-Si), 19.08 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0436] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{23}H_{29}O_3Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 381.1880, 측정값 381.1893.

[0437] ***(((3aR,4R,6R,6aS)-6-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-3a,5,6,6a-테트라하이드로-4H-고리펜타[b]퓨란-4-일)옥시)(터르-부틸)디페닐실란 (9)***



8 9

[0438]

[0439] 건조 DCM (15 mL) 및 건조 2,6-루티딘 (15 mL) 중의 글리칼 8 (1.34 g, 3.52 mmol) 및 DMTr-Cl (1.43 g, 4.23 mmol)의 용액에 은 트리플레이트 (1.13 g, 4.40 mmol)를 일정량씩 첨가하여 진한 적색 현탁액을 생성한다. 실온에서 2시간 동안 교반한 이후에, DMTr-Cl (239 mg, 0.705 mmol)의 추가 분량을 첨가한다. 현탁액을 축로 2시간 동안 교반한 다음 여과시킨다. 유기층을 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 세척하고, 수용성 상을 DCM (3 × 30 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 1 : 7, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 보호된 글리칼 9 (2.24, 93%)을 흰색 거품으로서 수득한다.

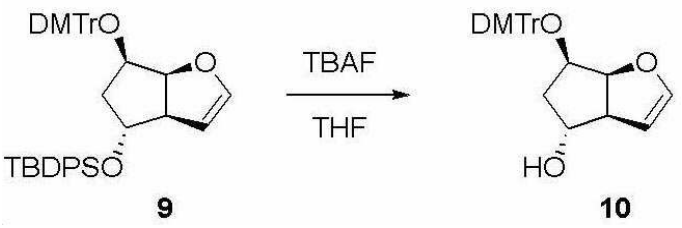
[0440] 9의 데이타: R_f = 0.59 (EtOAc/헥산 1 : 2):

[0441] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.76 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-arom), 7.69 - 7.60 (m, *J* = 9.3, 5.9, 4.6 Hz, 8H, H-arom), 7.56 - 7.39 (m, 8H, H-arom), 7.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-arom), 7.00 - 6.93 (m, 4H, H-arom), 6.47 - 6.37 (m, 1H, H-C(2)), 4.67 - 4.58 (m, 1H, H-C(6)), 4.58 - 4.50 (m, 2H, H-C(3), H-C(6a)), 3.86, 3.85 (2s, 6H, *Me*O), 3.82 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-C(4)), 3.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-C(3a)), 1.67 (td, *J* = 12.4, 4.2 Hz, 1H, H-C(5)), 1.28 (dd, *J* = 12.7, 5.4 Hz, 1H, H-C(5)), 1.11 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0442] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.67 (MeO-*C*-arom), 147.61 (C(2)), 146.26, 137.36, 137.21 (C-arom), 135.81, 135.78 (CH-arom), 134.17, 134.04 (C-arom), 130.48, 129.83, 129.81, 128.37, 127.98, 127.76, 127.73, 126.79, 113.32, 113.28 (CH-arom), 100.29 (C(3)), 86.96 (*C*(Ph)$_3$), 84.95 (C(6a)), 76.17 (C(6)), 76.07(C(4)), 55.26 (*Me*O-DMTr), 55.11 (C(3a)), 37.32 (C(5)), 27.04 (CH_3)$_3$-C-Si), 19.21 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0443] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{44}H_{46}O_5NaSi$ ($[M + Na]^+$) 계산값 705.3007, 측정값 705.3021.

[0444] ***(3aS,4R,6R,6aS)-6-(비스(4-메톡시페닐)(페닐)메톡시)-3a,5,6,6a-테트라하이드로-4H-고리펜타[b]퓨란-4-올 (10)***



9 10

[0445]

[0446] 건조 THF (20 mL) 중의 글리칼 **9** (2.23 g, 3.27 mmol)에 TBAF (THF 중 1 M, 20 mL, 20 mmol)을 실온에서 첨가한다. 용액을 20시간 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 희석하고, DCM (3 × 80 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 0.5% MeOH, +0.5% Et_3N)로 정제하고, 흰색 거품으로 **10** (1.45 g, 정량적)을 수득한다.

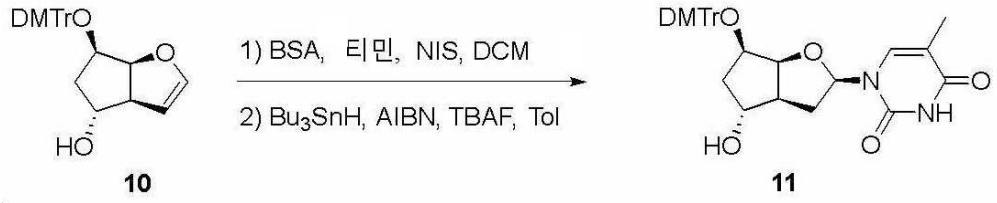
[0447] **10**의 데이타: R_f = 0.44 (EtOAc/헥산 1 : 1):

[0448] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53 - 7.46 (m, 2H, H-arom), 7.43 - 7.35 (m, 4H, H-arom), 7.21 (dd, *J* = 10.7, 5.3 Hz, 2 H, H-arom), 7.16 - 7.08 (m, 1H, H-arom), 6.80 - 6.71 (m, 4H, H-arom), 6.30 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-C(2)), 4.68 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-C(3)), 4.29 - 4.14 (m, 2H, H-C(6), H-C(6a)), 3.71 (s, 6H, *Me*O), 3.65 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-C(4)), 2.87 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-C(3a)), 1.59 (ddd, *J* = 13.2, 11.6, 4.3 Hz, 1H, H-C(5)), 1.05 - 0.95 (m, 2H, H-C(5), O*H*).

[0449] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.54 (MeO-*C*-arom), 147.64 (C(2)), 145.82, 137.12, 137.08 (C-arom), 130.26, 128.29, 127.81, 126.71, 113.13 (CH-arom), 100.17 (C(3)), 86.75 (*C*(Ph)$_3$), 84.42 C(6a)), 75.54 (C(6)), 74.59 (C(4)), 55.22 (*Me*O-DMTr), 54.25 (C(3a)), 37.56 (C(5)).

[0450] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{30}H_{27}O_5$ ([M + H]$^+$) 계산값 467.1853, 측정값 467.1844.

[0451] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 티민(11)***



10 11

[0452]

[0453] 건조 DCM (45 mL) 중 글리칼 **10** (1.45 g, 3.27 mmol) 용액에 BSA (2.0 mL, 8.18 mmol)를 0℃에서 적가한 다음 용액을 실온으로 가온시킨다. 45분 동안 교반한 이후에, 티민 (595 mg, 4.91 mmol)을 첨가하고, 반응을 실온에서 60분 동안 추가로 교반한다. 다음으로 혼합물을 0℃로 냉각시키고, N-요오드숙신이미드 (875 mg, 3.92 mmol)를 첨가한다. 0℃에서 3시간 및 실온에서 4시간 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 EtOAc (100 mL)로 희석시키고, 후속적으로 $Na_2S_2O_3$ (100 mL)의 10% 수용성 용액 및 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 세척한다. 수용성 상은 조합하여 DCM (3 × 50 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0454] 미정제 산물을 건조 톨루엔 (45 mL)에 용해시킨 다음 Bu_3SnH (1.32 mL, 4.91 mmol) 및 아조이소부티로니트릴 (AIBN, 53 mg, 0.33 mmol)을 실온에서 첨가한다. 70℃에서 30분 동안 가열한 이후에, 혼합물을 실온으로 냉각시키고, TBAF을 첨가한다 (THF 중 1 M, 6.5 mL, 6.5 mmol). 용액을 25분 동안 추가로 교반하고, 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 희석하고 DCM (4 × 70 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **11** (1.45 g, 2개의 단계를 거친 73%)를 수득한다.

[0455] **11**의 데이타: R_f = 0.29 (DCM 중 6% MeOH):

[0456] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.37 (br, 1H, H-N(3)), 7.83 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-C(6)), 7.58 - 7.52 (m, 2H, H-arom), 7.48 - 7.41 (m, 4H, H-arom), 7.28 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-arom), 7.21 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-arom), 6.84 (dd, *J* = 8.9, 1.2 Hz, 4H, H-arom), 5.91 (dd, *J* = 8.0, 5.5 Hz, 1H, H-C(1')), 4.25 (dt, *J* = 10.8, 6.0 Hz, 1H, H-C(5')), 4.13 - 4.08 (m, 1H, H-C(4')), 3.86 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, H-C(7'), 3.79 (s, 6H, *Me*O), 2.70 (ddd, *J* = 12.8, 10.2, 5.5 Hz, 1H, H-C(2')), 2.61 (dd, *J* = 16.9, 8.2 Hz, 1H, H-C(3')), 1.84 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H, *Me*-C(5)), 1.80 (br, 1H, O*H*), 1.60 (ddd, *J* = 14.2, 10.5, 4.2 Hz, 1H, H-C(6')), 1.33 (dt, *J* = 12.9, 8.0 Hz, 1H, H-C(2')), 1.14 (dd, *J* = 13.7, 6.1 Hz, 1H, H-C(6')).

[0457] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.17 (C(4)), 158.64 (MeO-*C*-arom), 150.47 (C(2)), 145.65, 136.85, 136.71 (C-arom), 135.52 (C(6)), 130.20, 128.12, 127.91, 126.90, 113.22, 113.21 (CH-arom), 110.69 (C(5)), 87.21 (*C*$(Ph)_3$), 86.57 (C(1')), 82.02 (C(4')), 74.19 (C(5')), 74.13 (C(7')), 55.25 (*Me*O-DMTr), 49.40 (C(3')), 38.51 (C(6')), 37.64 (C(2')), 12.58 (*Me*-C(5)).

[0458] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{33}H_{34}O_7N_2Na$ ($[M + Na]^+$) 계산값 593.2258, 측정값 593.2250.

[0459] ***(3'R,5'R,7'R)-1-{7'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실}티민 (12)***



11 12

[0460]

[0461] 건조 DCM (10 mL) 중 뉴클레오시드 **11** (232 mg, 0.406 mmol) 및 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (90 mg, 0.69 mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (0.26 mL, 0.81 mmol)를 실온에서 적가한다. 30분 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 DCM (50 mL)으로 희석하고, 포화 $NaHCO_3$ (2 × 30 mL) 및 포화 NaCl (30 mL)로 세척한다. 수용성 상을 조합하고, DCM (50 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 1.8% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **12** (219 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 70%)를 수득한다.

[0462] **11**의 데이타: R_f = 0.68 (DCM 중 6% MeOH):

[0463] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.93 (*br*, 1H, H-N(3)), 7.85 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-C(6)), 7.65 - 7.52 (m, 2H, H-arom), 7.52 - 7.40 (m, 4H, H-arom), 7.40 - 7.21 (m, 3H, H-arom), 6.96 - 6.81 (m, 4H, H-arom), 6.00, 5.94 (2dd, *J* = 8.3, 5.2 Hz, 1H, H-C(1')), 4.29 - 4.17 (m, 1H, H-C(5')), 4.12 - 3.89 (m, 2H, H-C(4'), H-C(7')), 3.85, 3.84 (2s, 6H, *Me*O), 3.81 - 3.63 (m, 2H, OCH_2CH_2CN), 3.56 - 3.41 (m, 2H, $(Me_2CH)_2N$), 2.88 - 2.69 (m, 2H, H-C(3'), H-C(2')), 2.61, 2.56 (dt, *J* = 12,9 6.3 Hz, 2H, OCH_2CH_2CN), 1.92, 1.82 (2d, *J* = 0.8 Hz, 3H, *Me*-C(5)), 1.75 - 1.56 (m, 1H, H-C(6')), 1.52 - 1.36 (m, 2H, H-C(6'), H-C(2')), 1.22 - 1.01 (m, 12H, $(MeCH)_2N$).

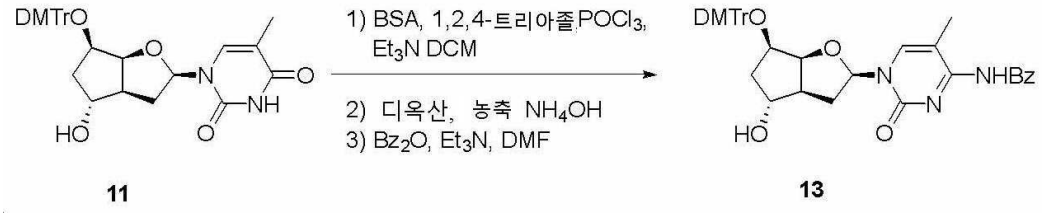
[0464] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.86 (C(4)), 158.66, 158.64 (MeO-*C*-arom), 150.29, 150.27 (C(2)), 145.58, 145.52, 136.76, 136.71, 136.69, 136.60 (C-arom), 135.49, 135.35 (C(6)), 130.21, 130.16, 128.17, 128.13, 127.88, 126.91, 126.89 (CH-arom), 117.49 (OCH_2CH_2CN), 113.18 (CH-arom), 110.74 (C(5)), 87.27, 87.25 (*C*$(Ph)_3$), 86.58, 86.45 (C(1')), 81.79, 81.68 (C(4')), 76.02 , 75.50 ($J_{C,P}$ = 16.5, 15.7 Hz, C(7')), 74.22 (C(5')), 58.26, 58.06, 57.87 (OCH_2CH_2CN), 55.26, 55.22 (*Me*O-DMTr), 48.85, 48.62 ($J_{C,P}$ = 2.6, 5.0 Hz, C(3')), 43.10, 43.04 ($J_{C,P}$ = 12.3, 12.4 Hz $(Me_2CH)_2N$), 37.78 ($J_{C,P}$ = 5.3 Hz C(6')), 37.62,

37.48 (C(2')), 37.41 ($J_{C,P}$ = 3.6 Hz C(6')), 24.57, 24.53, 24.50, 24.46, 24.44, 24.39, 24.37 ($Me_2CH)_2N$), 20.35, 20.25 ($J_{C,P}$ = 7.1, 7.0 Hz, OCH_2CH_2CN), 12.58, 12.41 (7s, *Me*-C(5)).

[0465] ^{31}P NMR (122 MHz, $CDCl_3$) δ 147.32, 146.98.

[0466] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{42}H_{52}O_8N_4P$ ($[M + H]^+$) 계산값 771.3517, 측정값 771.3512.

[0467] ***(3'S,5'R,7'R)-N⁴-벤조일-1-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실}-5-메틸시토신 (13)***



11 13

[0468]

[0469] 건조 MeCN (5 mL) 중의 뉴클레오시드 **11** (302 mg, 0.530 mmol) 용액에 BSA (0.31 mL, 1.27 mmol)를 0℃에서 적가한 다음, 용액을 실온에서 밤새 교반한다. 또 다른 플라스크에서, 건조 MeCN (50 mL) 중의 1,2,4-트리아졸 현탁액 (1.28 g, 18.55 mmol)을 0℃로 냉각시키고, $POCl_3$ (0.40 mL, 4.2 mmol) 및 Et_3N (2.96 mL, 21.2 mmol)을 첨가한다. 현탁액을 0℃에서 30분 동안 교반한 다음 시릴화된 화합물 **11**의 미리 준비된 용액을 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 5시간 동안 추가로 교반한다. 반응을 포화 $NaHCO_3$ (10 mL)의 첨가로 켄칭하고, MeCN을 감압 하에 제거하고, 생성된 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (35 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 40 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0470] 다음으로 미정제 산물을 1,4-디옥산 (10 mL)및 농축된 NH_4OH (10 mL)의 혼합물에 용해시킨다. 실온에서 2시간 동안 교반한 이후에, 혼합물을 진공으로 절반의 부피로 감소시키고, 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석하여 DCM (4 × 30 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0471] 다음으로 미정제 산물을 건조 DMF (13 mL)에 용해시키고, Et_3N (90 μL, 0.64 mmol)에 이어서 Bz_2O (300 mg, 1.33 mmol)를 실온에서 첨가하고, 용액을 밤새 교반한다. 생성된 갈색 용액을 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)를 가만히 첨가하여 켄칭하고, DCM (4 × 50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (헥산/EtOAc 1 : 2, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **13** (315 mg, 88%)을 수득한다.

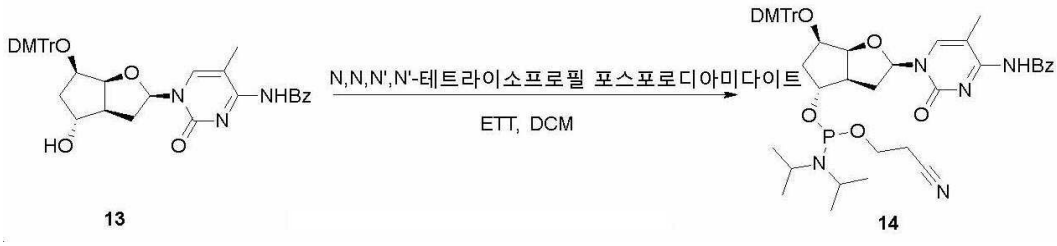
[0472] **13**의 데이타: R_f = 0.57 (DCM 중 4% MeOH):

[0473] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 13.39 (*br*, 1H, N*H*), 8.46 - 8.26 (m, 2H, H-arom), 8.13 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H, C(6)), 7.61 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-arom), 7.58 - 7.43 (m, 7H, H-arom), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-arom), 7.30 - 7.23 (m, 1H, H-arom), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, H-arom), 5.96 (dd, *J* = 7.5, 5.8 Hz, 1H, H-C(1')), 4.38 - 4.25 (m, 1H, H-C(5')), 4.22 - 4.12 (m, 1H, H-C(4')), 3.90 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-C(7')), 3.83 (s, 6H, *Me*O), 2.82 (ddd, *J* = 13.3, 10.2, 5.7 Hz, 1H, H-C(2')), 2.66 (dd, *J* = 17.0, 8.1 Hz, 1H, H-C(3')), 2.08 (s, 3H, *Me*-C(5)), 1.77 (*br*, 1H, O*H*), 1.71 - 1.57 (m, 1H, H-C(6')), 1.49 - 1.36 (m, 1H, H-C(2')), 1.21 (dd, *J* = 13.7, 6.2 Hz, 1H, H-C(6')).

[0474] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 179.56 (CONH), 160.01 (C(4)), 158.70 (MeO-*C*-arom), 147.96 (C(2)), 145.65 (C-arom), 137.26 (C(6)), 136.99, 136.83, 136.71 (C-arom), 132.41, 130.22, 129.89, 128.16, 128.14, 127.95, 126.94, 113.25 (CH-arom), 111.57 (C(5)), 87.34 (*C*$(Ph)_3$), 87.32 (C(1')), 82.57 (C(4')), 74.30 (C(5')), 74.16 (C(7')), 55.27 (*Me*O-DMTr), 49.56 (C(3')), 38.52 (C(6')), 38.00 (C(2')), 13.63 (*Me*-C(5)).

[0475] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{40}H_{40}O_7N_3$ ($[M + H]^+$) 계산값 674.2861, 측정값 674.2862.

[0476] ***(3'R,5'R,7'R)-N^4-벤조일-1-{7'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실}-5-메틸시토신 (14)***

[0477] 

[0478] 건조 DCM (10 mL) 중의 뉴클레오시드 **13** (276 mg, 0.409 mmol) 및 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (69 mg, 0.53 mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N,-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (0.20 mL, 0.61 mmol)를 실온에서 적가한다. 60분 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 DCM (50 mL)로 희석하고, 포화 $NaHCO_3$ (2 × 30 mL) 및 포화 NaCl (30 mL)로 세척한다. 수용성 상을 조합하고, DCM (50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 2 : 3, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **14** (268 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 75%)를 수득한다.

[0479] **14**의 데이타: R_f = 0.77 (DCM 중 5% MeOH):

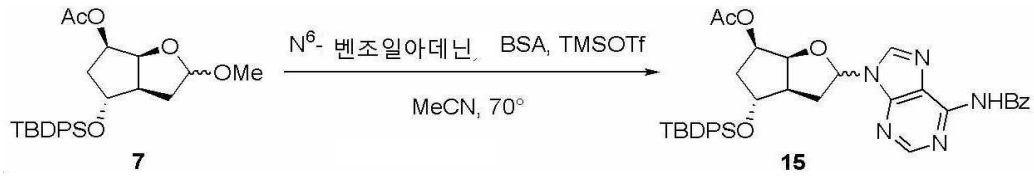
[0480] ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 13.32 (s, 1H, N*H*), 8.41 - 8.28 (m, 2H, H-arom), 8.13 - 8.04 (m, 1H, C(6)), 7.61 - 7.51 (m, 3H, H-arom), 7.51 - 7.40 (m, 6H, H-arom), 7.37 - 7.29 (m, 2H, H-arom), 7.29 - 7.20 (m, 1H, H-arom), 6.92 - 6.82 (m, 4H, H-arom), 6.07 - 5.87 (m, 1H, H-C(1')), 4.24 (dq, *J* = 11.7, 5.8 Hz, 1H, H-C(5')), 4.13 - 4.00 (m, 1H, H-C(4')), 3.94 (ddd, *J* = 14.5, 10.5, 2.8 Hz, 1H, H-C(7')), 3.83, 3.82 (2s, 6H, *Me*O), 3.69 (m, 2H, OCH_2CH_2CN), 3.53 - 3.40 (m, 2H, $(Me_2CH)_2N$), 2.91 - 2.70 (m, 2H, H-C(2'), H-C(3')), 2.57, 2.53 (2t, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH_2CH_2CN), 2.08, 1.99 (2d, *J* = 0.6 Hz, 3H, *Me*-C(5)), 1.72 - 1.56 (m, 1H, H-C(6')), 1.54 - 1.36 (m, 2H, H-C(2'), H-C(6')), 1.10 (m, 12H, $(MeCH)_2N$).

[0481] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 179.54 (CONH), 159.98 (C(4)), 158.69 (MeO-*C*-arom), 147.90 (C(2)), 145.58, 145.54 (C-arom), 137.30, 136.93 (C(6)), 136.81, 136.80, 136.73, 136.70, 136.67, 136.60 (C-arom), 132.37, 132.35, 130.22, 130.17, 129.89, 128.17, 128.15, 128.11, 127.93, 126.94 (CH-arom), 117.49 (OCH_2CH_2CN), 113.23 (CH-arom), 111.60 (C(5)), 87.36, 87.35 ($C(Ph)_3$), 87.33, 87.25 (C(1')), 82.33, 82.25 (C(4')), 76.05, 75.52 ($J_{C,P}$ = 16.4, 15.6 Hz, C(7')), 74.32 (C(5')), 58.18, 57.98 ($J_{C,P}$ = 19.5 Hz OCH_2CH_2CN), 55.28, 55.24 (*Me*O-DMTr), 48.93, 48.72 ($J_{C,P}$ = 2.7, 4.9 Hz, C(3')), 43.11, 43.05 ($J_{C,P}$ = 12.4 Hz $(Me_2CH)_2N$), 38.02, 37.88 (C(2')), 37.74, 37.40 ($J_{C,P}$ = 5.3, 3.4 Hz, C(6')), 24.58, 24.54, 24.50, 24.47, 24.40, 24.38 (6s, $Me_2CH)_2N$), 20.36, 20.26 ($J_{C,P}$ = 7.1 Hz, OCH_2CH_2CN), 13.66, 13.49 (*Me*-C(5)).

[0482] ^{31}P NMR (122 MHz, $CDCl_3$) δ 147.37, 147.07.

[0483] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{49}H_{57}O_8N_5P$ ($[M + H]^+$) 계산값 874.3939, 측정값 874.3937.

[0484] ***(3'R,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{5'-O-아세틸-7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-α,β-D-리보퓨라노실} 아데닌 (15)***

[0485] 

[0486] 건조 MeCN (40 mL) 중의 당 **7** (1.86 g, 4.10 mmol) 및 N^6-벤조일아데닌 (1.96 g, 8.20 mmol) 현탁액에 BSA (4.00 mL, 16.4 mmol)를 실온에서 첨가한다. 25분 동안 교반한 이후에, 현탁액이 투명한 용액이 된 다음 70℃로 가열된다. TMSOTf (1.48 mL, 8.20 mmol)을 적가하고, 용액을 70℃에서 20분 동안 추가로 교반한다. 다음으로 용액을 실온으로 냉각시키고, 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)의 첨가로 켄칭하고, (4 × 50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 아노머 비율 α/β ≈ 4 : 1의 **15** (1.74 g, 64%)의 혼합물을 수득한다.

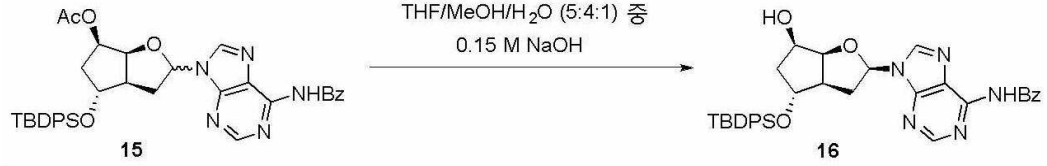
[0487] **15**의 데이터: R_f = 0.33 (EtOAc/헥산 4 : 1):

[0488] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.33 (*br*, 1H, N*H*), 8.68 (d, *J* = 5.4 Hz, 0.8H, H-C(2)), 8.64 (d, *J* = 5.6 Hz, 0.2H, H-C(2)), 8.10 (d, *J* = 1.5 Hz, 0.2H. H-C(8)), 7.99 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-arom), 7.95 (s, 0.8H, H-C(8)), 7.63 (t, *J* = 8.7 Hz, 4H, H-arom), 7.55 (dd, *J* = 13.0, 6.4 Hz, 1H, H-arom), 7.50 - 7.34 (m, 8H, H-arom), 6.20 (dd, *J* = 6.3, 2.5 Hz, 0.8H, H-C(1')), 6.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 0.2H, H-C(1')), 5.43 - 5.32 (m, 1H, H-C(5')), 5.03 - 4.97 (m, 0.8H, H-C(4')), 4.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 0.2H, H-C(4')), 4.14 (*br*, 0.2H, H-C(7')), 4.08 (d, *J* = 3.7 Hz, 0.8H, H-C(7')), 3.02 (dd, *J* = 16.1, 6.6 Hz, 0.8H, H-C(3')), 2.83 (dd, *J* = 16.9, 7.7 Hz, 0.2H, H-C(3')), 2.59 - 2.39 (m, 1H, H-C(2')), 2.18 - 2.11 (m, 1H, H-C(6')), 2.07 (d, *J* = 1.6 Hz, 2.4H, *Me*CO_2), 2.02 (d, *J* = 1.9 Hz, 0.6H, *Me*CO_2), 2.01 - 1.92 (m, 1H, H-C(6')), 1.91 - 1.80 (m, 1H, H-C(3')), 1.07 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0489] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.57, 170.49 (MeCO_2), 164.82 (*C*ONH), 152.50 (C(2)), 151.27 (C(4)), 149.56 (C(6)), 141.37, 141.06 (C(8)), 135.72, 135.68, 135.66 (CH-arom), 133.67, 133.57, 133.24, 133.22 (C-arom), 132.73, 130.03, 129.98, 128.80, 128.78, 127.92, 127.86, 127.85 (CH-arom), 123.61 (C(5)), 87.19, 86.17 (C(1')), 83.22, 80.96 (C(4'), 76.50, 76.04 (C(7')), 74.38 (C(5')), 51.07 (C(3')), 37.29, 37.15, 36.80, 36.60 (C(2'), C(6')), 26.89 (*C*H_3)$_3$-C-Si), 20.97, 20.90 (*Me*CO_2), 19.01 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0490] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{37}H_{40}O_5N_5Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 662.2793, 측정값 662.2787.

[0491] ***(3'R,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-β-D-리보퓨라노실}아데닌 (16)***

[0492] 

[0493] 뉴클레오시드 **15** (1.74 g, 2.64 mmol)를 0℃에서 THF/메탄올/H_2O (5 : 4: 1, 80 mL) 중 0.15 M NaOH에 용해시킨다. 반응을 20분 동안 교반하고, NH_4Cl (1.06 g)의 첨가에 의해 켄칭한다. 다음으로 용매를 감압 하에 제거하고, 생성물을 CC (DCM 중 5% 이소프로판올)에 의해 정제하고, **16** (287 mg, 18%) 및 이의 상응하는 α 아노머 (836 mg, 51%) 흰색 거품을 수득한다.

[0494] **16**의 데이터: R_f = 0.44 (DCM 중 6% MeOH):

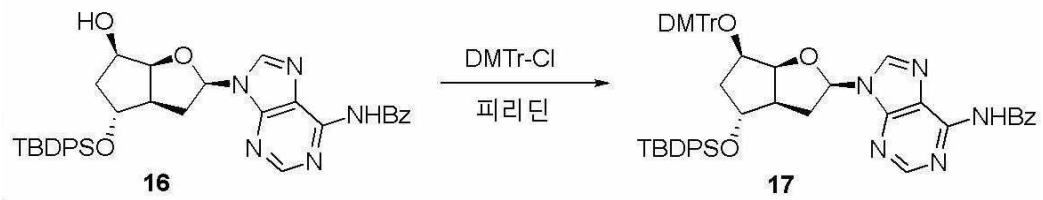
[0495] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.70 (s, 1H, H-C(2)), 8.09 - 7.98 (m, 2H, H-arom), 7.97 (s, 1H, H-C(8)), 7.63 (ddd, *J* = 7.4, 5.7, 1.5 Hz, 4H, H-arom), 7.59 - 7.55 (m, 1H, H-arom), 7.51 (m, 2H, H-arom), 7.44

- 7.33 (m, 6H, H-arom), 6.02 (dd, *J* = 9.4, 5.5 Hz, 1H, H-C(1')), 4.57 (dd, *J* = 8.1, 5.0 Hz, 1H, H-C(4')), 4.43 (dd, *J* = 11.8, 5.3 Hz, 1H, H-C(5')), 4.26 (*br*, 1H, H-C(7')), 2.78 (q, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-C(3')), 2.32 - 1.80 (m, 5H, H-C(2'), H-C(6'), O*H*), 1.06 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0496] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.85 (*C*ONH), 152.56 (C(2)), 151.17 (C(4)), 149.86 (C(6)), 141.25 (C(8)), 135.68 (CH-arom), 133.87, 133.39 (C-arom), 132.78, 129.92, 128.78, 128.01, 127.78 (CH-arom), 123.51 (C(5)), 87.65 (C(1')), 82.91 (C(4')), 76.66 (C(7')), 72.54 (C(5')), 50.44 (C(3')), 41.42 (C(6')), 36.17 (C(2')), 26.89 (CH_3)$_3$-C-Si), 19.03 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0497] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{35}H_{38}O_4N_5Si$ ([M + H]$^+$) 계산값 620.2688, 측정값 620.2671.

[0498] ***(3'R,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 아데닌 (17)***

[0499] 

[0500] 건조 피리딘 (6 mL) 중의 뉴클레오시드 **16** (307 mg, 0.495 mmol) 용액에 DMTr-Cl (503 mg, 1.49 mmol)를 실온에서 첨가한다. 용액을 1일 동안 교반한 다음, 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 70 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 1.5% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **17** (395 mg, 87%)를 수득한다.

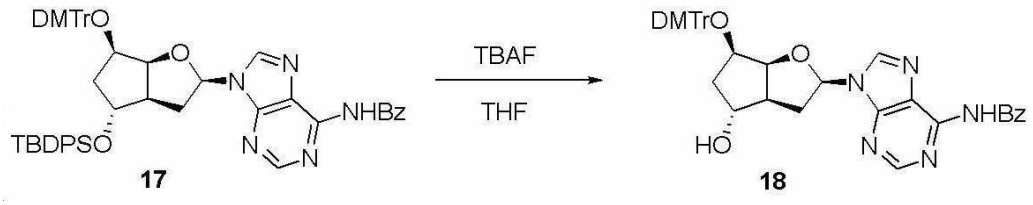
[0501] **17**의 데이타: R_f = 0.65 (DCM 중 5% MeOH):

[0502] ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.64 (s, 1H, H-C(2)), 8.61 (s, 1H, H-C(8)), 8.08 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-arom), 7.68 - 7.17 (m, 22H, H-arom), 6.86 - 6.75 (m, 4H, H-arom), 6.14 (dd, *J* = 7.4, 6.3 Hz, 1H, H-C(1')), 4.48 - 4.31 (m, 1H, H-C(5')), 4.28 - 4.15 (m, 1H, H-C(4')), 3.88 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-C(7')), 3.75, 3.74 (2s, 6H, *Me*O), 2.67 (dd, *J* = 16.6, 6.7 Hz, 1H, H-C(3')), 2.47 (ddd, *J* = 13.3, 10.2, 6.1 Hz, 1H, H-C(2')), 2.15 - 1.94 (m, 1H, H-C(6')), 1.71 (ddd, *J* = 13.0, 11.3, 4.4 Hz, 1H, H-C(2')), 1.11 (dd, *J* = 12.2, 4.9 Hz, 1H, H-C(6')), 0.95 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0503] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.69 (*C*ONH), 158.61, 158.60 (MeO-*C*-arom), 152.42 (C(2)), 151.27 (C(4)), 149.41 (C(6)), 145.81 (C-arom), 141.25 (C(8)), 137.00, 136.85 (C-arom), 135.60, 135.57 (CH-arom), 133.80, 133.69, 133.43 (C-arom), 132.70, 130.28, 130.25, 129.85, 129.81, 128.84, 128.18, 127.89, 127.71, 127.65, 126.78 (CH-arom), 123.52 (C(5)), 113.22, 113.19 (CH-arom), 87.09 (*C*(Ph)$_3$), 86.41 (C(1')), 83.52 (C(4')), 76.05 (C(7')), 74.78 (C(5')), 55.20 (*Me*O-DMTr), 50.43 (C(3')), 38.10 (C(2'), C(6')), 26.84 (CH_3)$_3$-C-Si), 19.00 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0504] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{56}H_{56}O_6N_5Si$ ([M + H]$^+$) 계산값 922.3994, 측정값 922.3953.

[0505] ***(3'S,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 아데닌 (18)***



17 18

[0506]

[0507] 건조 THF (9 mL) 중의 뉴클레오시드 **17** (376 mg, 0.408 mmol) 용액에 TBAF (THF 중 1 M, 1.22 mL, 1.22 mmol)을 실온에서 첨가한다. 용액을 2일 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (25 mL)로 희석시키고, DCM (4 × 25 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 4% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **18** (242 mg, 87%)을 수득한다.

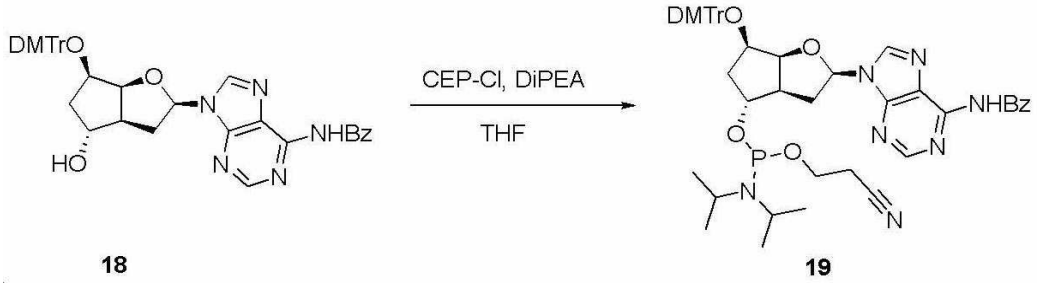
[0508] **18**의 데이터: R_f = 0.33 (DCM 중 5% MeOH):

[0509] ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ 9.35 (*br*, 1H, N*H*), 8.67 (s, 1H, C(2)), 8.46 (s, 1H, C(8)), 8.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-arom), 7.54 (m, 5H, H-arom), 7.35 (m, 4H, H-arom), 7.30 - 7.17 (m, 3H, H-arom), 6.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H, H-arom), 6.09 (dd, *J* = 7.8, 6.2 Hz, 1H, H-C(1')), 4.12 (dt, *J* = 11.2, 5.8 Hz, 1H, C(5')), 3.87 - 3.79 (m, 2H, C(4'), C(7')), 3.75 (s, 6H, *Me*O), 2.83 - 2.64 (m, 2H, C(2'), O*H*), 2.58 - 2.46 (m, 1H, C(3')), 2.21 (dd, *J* = 13.9, 7.1 Hz, 1H, C(2')), 1.92 - 1.82 (m, 1H, C(6')), 1.29 - 1.17 (m, 1H, C(6')).

[0510] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.03 (*C*ONH), 158.57 (MeO-*C*-arom), 152.40 (C(2)), 151.23 (C(4)), 149.52 (C(6)), 145.68 (C-arom), 141.49 (C(8)), 136.86, 136.84, 133.77 (C-arom), 132.77, 130.22, 128.81, 128.16, 128.02, 127.89, 126.84 (CH-arom), 123.40 (C(5)), 113.19 (CH-arom), 87.06 (*C*$(Ph)_3$), 86.74 (C(1')), 83.58 (C(4')), 74.62 (C(5')), 74.38 (C(8')), 55.25 (*Me*O-DMTr), 49.77 (C(3')), 38.55, 38.32 (C(6'), C(2')).

[0511] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{40}H_{38}O_6N_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 684.2817, 측정값 684.2830.

[0512] ***(3'R,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{7'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 아데닌 (19)***



18 19

[0513]

[0514] 건조 THF (8 mL) 중의 뉴클레오시드 **18** (173 mg, 0.253 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (0.18 mL, 1.0 mmol)에 N,N-디이소프로필클로로포스포르아미다이트 (0.11 mL, 0.50 mmol)를 실온에서 첨가한다. 용액을 2시간 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (40 mL)로 희석시키고, DCM (4 × 40 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **19** (177 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 71%)를 수득한다

[0515] **19**의 데이터: R_f = 0.38, 0.44 (EtOAc):

[0516] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.05 (*br*, 1H, N*H*), 8.70, 8.70 (2s, 1H, H-C(2)), 8.47, 8.46(2s, 1H, H-C(8)), 7.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-arom), 7.57 - 7.50 (m, 1H, H-arom), 7.49 - 7.41 (m, 4H, H-arom), 7.39 - 7.31 (m, 4H, H-arom), 7.24 - 7.17 (m, 5.4 Hz, 2H, H-arom), 7.13 (dt, *J* = 12.5, 6.2 Hz, 1H, H-arom),

6.83 - 6.70 (m, 4H, H-arom), 6.14 - 5.97 (m, 1H, H-C(1')), 4.14 (ddd, *J* = 11.1, 7.8, 3.4 Hz, 1H, H-C(5')), 3.91 - 3.74 (m, 2H, H-(4'), H-C(7')), 3.71, 3.70 (2s, 6H, *Me*O), 3.65 - 3.50 (m, 2H, OC*H*$_2$CH$_2$CN), 3.37 (ddq, *J* = 13.9, 10.2, 6.8 Hz, 2H, (Me$_2$C*H*)$_2$N), 2.90 - 2.76 (m, 1H, H-C(2')), 2.75 - 2.60 (m, 1H, H-C(3')), 2.47, 2.42 (2t, *J* = 6.3 Hz, 2H, OCH$_2$C*H*$_2$CN), 2.11 (dt, *J* = 12.7, 6.1 Hz, 1H, H-C(2')), 1.73 (ddt, *J* = 13.6, 10.4, 5.1 Hz, 1H, H-C(6')), 1.39 (ddd, *J* = 50.2, 13.4, 6.2 Hz, 1H, H-C(6')), 1.10 - 0.89 (m, 12H, (*Me*$_2$CH)$_2$N).

[0517] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl$_3$) δ 164.66 (*C*ONH), 158.57 (MeO-*C*-arom), 152.46 (C(2)), 151.32, 151.26 (C(4)), 149.45, 149.43 (C(6)), 145.60, 145.59 (C-arom), 141.52, 141.47 (C(8)), 136.88, 136.83, 136.81, 133.78 (C-arom), 132.75, 132.73, 130.22, 130.21, 130.19, 130.17, 128.87, 128.17, 127.87, 126.82, 126.80 (CH-arom), 123.59 (C(5)), 117.53, 117.50 (OCH$_2$CH$_2$*C*N), 113.17 (CH-arom), 87.10, 87.07 (*C*(Ph)$_3$), 86.72, 86.68 (C(1')), 83.36, 83.25 (C(4')), 76.55, 75.81 ($J_{C,P}$ = 16.9, 15.7 Hz, C(7')), 74.63, 74.60 (C(5')), 58.24, 57.86 ($J_{C,P}$ = 19.1, 19.2 Hz OCH$_2$CH$_2$CN), 55.25, 55.21 (*Me*O-DMTr), 49.29, 49.08 ($J_{C,P}$ = 2.6, 4.7 Hz, C(3')), 43.12, 43.00 ($J_{C,P}$ = 2.4, 2.3 Hz (Me$_2$C*H*)$_2$N), 38.27, 38.23 (C(2')), 37.41, 37.22 ($J_{C,P}$ = 5.3, 3.5 Hz, C(6')) 24.56, 24.53, 24.49, 24.47, 24.43, 24.41, 24.36, 24.33 (8s, *Me*$_2$CH)$_2$N), 20.36, 20.25 ($J_{C,P}$ = 7.2, 7.0 Hz, OCH$_2$*C*H$_2$CN).

[0518] ^{31}P NMR (122 MHz, CDCl$_3$) δ 147.64, 146.87.

[0519] ESI$^+$-HRMS *m/z* C$_{49}$H$_{55}$O$_7$N$_7$ ([M + H]$^+$) 계산값 884.3895, 측정값 884.3898.

[0520] ***(3'R,5'R,7'R)-2-아미노-6-클로로-9-{5'-O-아세틸-7'-[(티르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-α,β-D-리보퓨라노실} 퓨린 (20)***



[0521]

[0522] 건조 MeCN (20 mL) 중의 당 **7** (1.75 g, 3.85 mmol) 및 2-아미노-6-클로로퓨린 (1.05 g, 6.17 mmol) 용액에 BSA (3.80 mL, 15.4 mmol)을 실온에서 첨가한다. 현탁액을 55℃로 가열하고, 30분 동안 교반한다. 다음으로 TMSOTf (1.05 mL, 5.78 mmol)를 적가하고, 용액을 55℃에서 50분 동안 추가로 교반한다. 용액을 실온으로 냉각시키고, 포화 NaHCO$_3$ (10 mL)의 첨가에 의해 켄칭하고, EtOAc (50mL)로 희석하고, SiO$_2$의 짧은 패드를 통해 여과시킨다. SiO$_2$를 추가의 EtOAc로 세척한다. 다음으로 혼합물을 포화 NaHCO$_3$ (2 × 80 mL)로 세척하고, 수용성 상을 조합하여 tOAc (3 × 50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2.5% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 고체로서 아노머 비율 α/β ≈ 7 : 3의 **20** (1.77 g, 77%) 혼합물을 수득한다.

[0523] **20**의 데이타: R$_f$ = 0.54 (EtOAc/헥산 5 : 1):

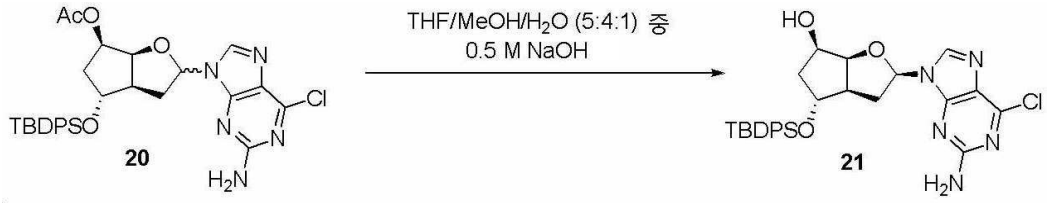
[0524] ^{1}H NMR (300 MHz, CDCl$_3$) δ 7.86 (s, 0.3H, H-C(8)), 7.69 (s, 0.7H, H-C(8)), 7.68 - 7.60 (m, 4H, H-arom), 7.47 - 7.34 (m, 6H, H-arom), 6.04 (dd, *J* = 6.9, 3.0 Hz, 0.7H, H-C(1')), 5.87 (dd, *J* = 8.0, 6.2 Hz, 0.3H, H-C(1')), 5.37 (dt, *J* = 14.2, 4.6 Hz, 1H, H-C(5')), 5.16 (*br*, 2H, N*H*$_2$), 4.91 (dd, *J* = 6.5, 5.1 Hz,0.7H, H-C(4')), 4.79 (dd, *J* = 6.9, 5.2 Hz, 0.3H, H-C(4')), 4.13 (*br*, 0.3H, H-C(7')), 4.06 (d, *J* = 4.0 Hz, 0.7H, H-C(7')), 2.95 (dd, *J* = 16.3, 6.6 Hz, 0.7H, H-C(3')), 2.81 (dd, *J* = 17.0, 7.4 Hz, 0.3H, H-C(3')), 2.49 - 2.30 (m, 1H, H-C(2')), 2.14 (dd, *J* = 13.1, 6.7 Hz, 1H, H-C(6')), 2.08 (s, 2.1H,

MeCO_2), 2.02 (s, 0.9H, *Me*CO_2), 2.02 - 1.91 (m, 1H, H-C(6')), 1.80 (td, *J* = 13.4, 6.8 Hz, 1H, H-C(2')), 1.07, 1.06 (2s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0525] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.55, 170.44 (Me*C*O_2), 158.98, 158.91 (C(2)), 153.18, 152.95 (C(4)), 151.40, 151.34 (C(6)), 140.38, 140.14 (C(8)), 135.73, 135.70 (CH-arom), 133.78, 133.62, 133.24, 133.17 (C-arom), 130.03, 130.00, 127.88, 127.86 (CH-arom), 125.65, 125.57 (C(5)), 86.59, 85.74 (C(1')), 82.93, 80.99 (C(4')), 76.57, 76.14 (C(7')), 74.34, 74.32 (C(5')), 51.15, 51.10 (C(3')), 37.19, 36.99 (C(6')), 36.70, 36.25 (C(2')), 26.87 (*C*H_3)$_3$-C-Si), 20.95, 20.86 (*Me*CO_2), 19.00 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0526] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{30}H_{35}O_4N_5ClSi$ ([M + H]$^+$) 계산값 592.2141, 측정값 592.2158.

[0527] ***(3'R,5'R,7'R)-2-아미노-6-클로로-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-β-D-리보퓨라노실} 퓨린 (22b)***

[0528] 

[0529] 뉴클레오시드 **20** (1.78 g, 3.01 mmol)를 0℃에서 THF/메탄올/H_2O (5:4:1, 15 mL) 중의 0.5 M NaOH에 용해시킨다. 반응을 0℃에서 20분 동안 교반하고, NH_4Cl (484 mg)의 첨가에 의해 켄칭한다. 다음으로 현탁액을 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 희석시키고, DCM (4 × 75 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3% MeOH)에 의해 정제하고, **21** (428 mg, 25%) 및 이의 상응하는 α 아노머 (992 mg, 60%)를 흰색 거품으로서 수득한다.

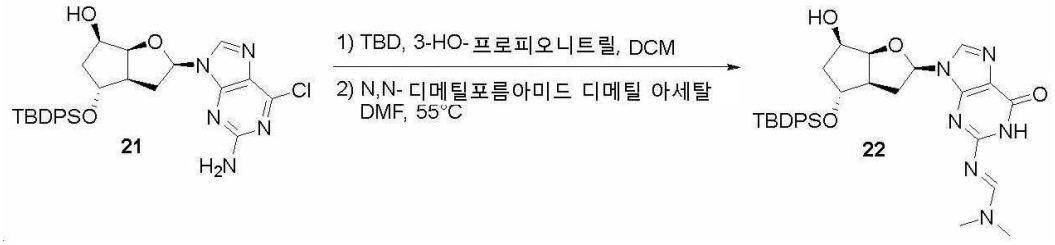
[0530] 21의 데이타: R_f = 0.43 (DCM 중 5% MeOH):

[0531] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71 (s, 1H, H-C(8)), 7.68 - 7.60 (m, 4H, H-arom), 7.44 - 7.33 (m, 6H, H-arom), 5.85 (dd, *J* = 9.3, 5.8 Hz, 1H, H-C(1')), 5.33 (*br*, 2H, N*H*$_2$), 4.62 (dd, *J* = 8.4, 4.9 Hz, 1H, H-C(4')), 4.44 (dd, *J* = 10.7, 5.3 Hz, 1H, H-C(5')), 4.40 - 4.15 (m, 2H, H-C(7'), O*H*), 2.79 (q, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-C(3')), 2.22 (dd, *J* = 15.2, 9.3 Hz, 1H, H-C(6')), 2.11 - 2.02 (m, 1H, H-C(6')), 2.02 - 1.85 (m, 2H, H-C(2')), 1.06 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0532] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.73 (C(2)), 152.78 (C(4)), 151.94 (C(6)), 140.70 (C(8)), 135.70 (CH-arom), 133.91, 133.48 (C-arom), 129.90, 127.78 (CH-arom), 125.97 (C(5)), 87.96 (C(1')), 82.88 (C(5')), 76.85 (C(7')), 72.36 (C(5')), 50.41 (C(3')), 41.96 (C(6')), 35.73 (C(2')), 26.90 (*C*H_3)$_3$-C-Si), 19.02 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0533] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{28}H_{33}O_3N_5ClSi$ ([M + H]$^+$) 계산값 550.2036, 측정값 550.2015.

[0534] ***(3'R,5'R,7'R)-N^2-(N,N-디메틸포름아미디노)-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-β-D-리보퓨라노실} 구아닌 (22)***



[0535]

[0536] 건조 DCM (15 mL) 중의 **21** (380 mg, 0.645 mmol) 및 3-하이드록시프로피오니트릴 (0.22 mL, 3.23 mmol) 용액에 1,5,7-트리아자이중고리[4.4.0]덱-5-엔 (400 mg, 2.87 mmol)을 0℃에서 첨가한다. 용액을 0℃에서 3시간 동안, 다음으로 실온에서 2일 동안 교반한다. 반응을 실리카의 첨가에 의해 정지시킨다. 용매의 증발 이후에, SiO_2 분말을 여과시키고, MeOH로 세척하고, 용매를 증발시켜 갈색 거품을 수득한다.

[0537] 미정제 산물을 건조 DMF (5 mL)에 용해시키고, N,N-디메틸포름아미드 디메틸 아세탈 (0.43 mL, 3.2 mmol)을 첨가한다. 용액을 55℃에서 2시간 동안 교반한 다음 용매를 감압 하에 제거한다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 6% MeOH)에 의해 정제하고, 노란색을 띤 거품으로서 **23** (274 mg, 73%)을 수득한다.

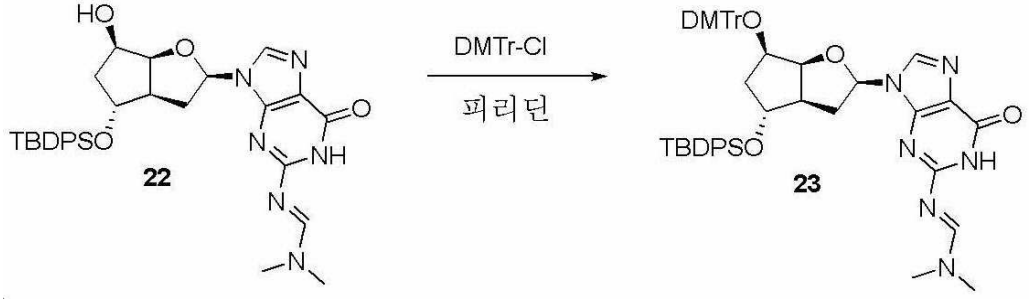
[0538] **22**의 데이타: R_f = 0.45 (DCM 중 12% MeOH):

[0539] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.52 (s, 1H, N*H*), 8.46 (s, 1H, NC*H*N(CH_3)$_2$), 7.63 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 4H, H-arom), 7.50 (s, 1H, H-C(8)), 7.44 - 7.30 (m, 6H, H-arom), 5.83 (dd, *J* = 9.3, 6.0 Hz, 1H, H-C(1')), 4.61 (dd, *J* = 8.7, 5.0 Hz, 1H, H-C(4')), 4.43 - 4.32 (m, 1H, H-C(5')), 4.29 (dd, *J* = 7.0, 4.8 Hz, 1H, H-C(7')), 3.95 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, O*H*), 2.98 (s, 6H, NCHN(C*H*$_3$)$_2$), 2.79 (dd, *J* = 18.0, 7.0 Hz, 1H, H-C(3')), 2.20 (dt, *J* = 12.8, 5.4 Hz, 1H, H-C(6')), 2.09 - 1.88 (m, 3H, H-C(6'), H-C(2')), 1.05 (s, 9H, (CH_3)$_3$-*C*-Si)).

[0540] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.73 (C(2)), 157.79 (C(6)), 156.91 (N*C*HN(CH_3)$_2$), 149.84 (C(4)), 137.00 (C(8)), 135.70, 135.67 (CH-arom), 133.78, 133.60 (C-arom), 129.93, 129.86, 127.78, 127.72 (CH-arom), 121.61 (C(5)), 88.04 (C(1')), 82.21 (C(4')), 77.49 (C(7')), 71.94 (C(5')), 50.13 (C(3')), 42.23 (C(6')), 41.20 (NCHN(*C*H$_3$)$_2$), 35.50 (C(2')), 34.97 (NCHN(*C*H$_3$)$_2$), 26.87 (*C*H$_3$-C-Si), 19.02 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0541] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{31}H_{38}O_4N_6Si$ ([M + H]$^+$) 계산값 586.2718, 측정값 586.2703.

[0542] ***(3'R,5'R,7'R)-N^2-(N,N-디메틸포름아미디노)-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 구아닌 (23)***



[0543]

[0544] 건조 피리딘 (2 mL) 중 **22** (139 mg, 0.237 mmol) 용액에 DMTr-Cl (240 mg, 0.708 mmol)을 실온에서 3시간에 걸쳐 6회 분량으로 첨가한다. 밤새 교반한 이후, 주황색 용액을 포화 $NaHCO_3$ (20 mL)로 희석하고, DCM (3 × 20 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 4% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제제하고, 노란색을 띤 거품으로서 **23** (148 mg, 70%)을 수득한다.

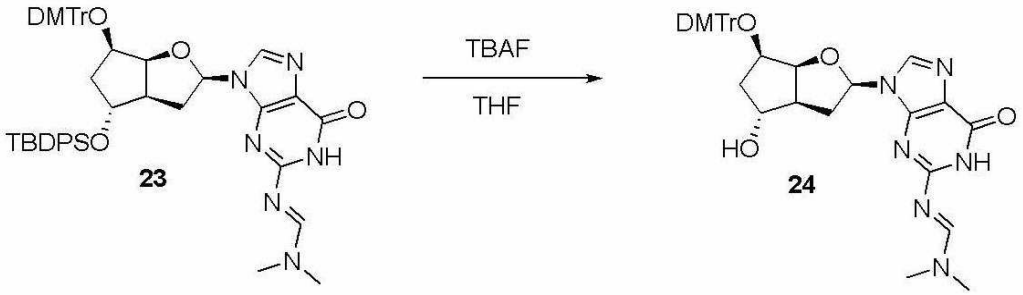
[0545] **23**의 데이타: R_f = 0.52 (DCM 중 10% MeOH):

[0546] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.49 (s, 1H, N*H*), 8.38 (s, 1H, NC*H*N$(CH_3)_2$), 7.80 (s, 1H, C(8)), 7.50 - 7.43 (m, 2H, H-arom), 7.42 - 7.27 (m, 10H, H-arom), 7.26 - 7.15 (m, 6H, H-arom), 7.14 - 7.08 (m, 1H, H-arom), 6.77 - 6.68 (m, 4H, H-arom), 5.78 (dd, *J* = 8.2, 5.9 Hz, 1H, H-C(1')), 4.25 (dt, *J* = 11.0, 5.6 Hz, 1H, H-C(5')), 4.14 - 4.03 (m, 1H, H-C(4')), 3.70 - 3.64 (m, 7H, *Me*O, H-C(7')), 3.00 (s, 3H, NCHN$(CH_3)_2$), 2.97 (s, 3H, NCHN$(CH_3)_2$), 2.43 (dd, *J* = 16.7, 7.5 Hz, 1H, H-C(3')), 2.24 (ddd, *J* = 13.3, 10.1, 5.8 Hz, 1H, H-C(2')), 1.62 (td, *J* = 13.1, 4.3 Hz, 1H, H-C(6')), 1.43 (dt, *J* = 13.5, 8.0 Hz, 1H, H-C(2')), 0.99 (dd, *J* = 13.3, 6.2 Hz, 1H), 0.86 (s, 9H, $(CH_3)_3$-*C*-Si)).

[0547] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.51, 158.49 (MeO-*C*-arom), 158.04 (C(2)), 157.91 (C(6)), 156.60 (N*C*HN$(CH_3)_2$), 149.76 (C(4)), 145.83, 137.12, 136.94 (C-arom), 136.01 (C(8)), 135.60, 135.59 (CH-arom), 133.81, 133.47 (C-arom), 130.32, 130.26, 129.77, 128.24, 127.82, 127.65, 127.62, 126.67 (CH-arom), 120.65 (C(5)), 113.13, 113.09 (CH-arom), 86.82 (*C*$(Ph)_3$), 85.01 (C(1')), 82.26 (C(4')), 76.14 (C(7')), 74.61 (C(5')), 55.19 (*Me*O-DMTr), 50.18 (C(3')), 41.29 (NCHN$(CH_3)_2$), 38.01 (C(6')), 37.76 (C(2')), 35.14 (NCHN$(CH_3)_2$) 26.81 87 $(CH_3)_3$-C-Si), 19.01 $(CH_3)_3$-*C*-Si).

[0548] ESI^{+}-HRMS *m/z* $C_{52}H_{57}O_6N_6Si$ ($[M + H]^{+}$) 계산값 889.4103, 측정값 889.4128.

[0549] ***(3'S,5'R,7'R)-N^{2}-(N,N-디메틸포름아미디노)-9-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 구아닌 (24)***



[0550]

[0551] 건조 THF (2 mL) 중 **23** (243 mg, 0.273 mmol) 용액에 TBAF (THF 중 1 M, 1.65 mL, 1.63 mmol)를 실온에서 첨가한다. 용액을 7시간 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석하고, DCM (4 × 30 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 7% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 미량의 TBAF를 여전히 포함하는 흰색 거품으로서 **24** (155 mg, 87%)를 수득한다.

[0552] **24**의 데이타: R_f = 0.44 (DCM 중 10% MeOH):

[0553] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.55 (s, 1H, N*H*), 8.45 (s, 1H, NC*H*N$(CH_3)_2$), 8.00 (s, 1H, H-C(8)), 7.60 - 7.50 (m, 2H, H-arom), 7.49 - 7.39 (m, 4H, H-arom), 7.31 - 7.23 (m, 2H, H-arom), 7.21 - 7.12 (m, 1H, H-arom), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H, H-arom), 5.93 (dd, *J* = 7.5, 6.1 Hz, 1H, H-C(1')), 4.26 (dt, *J* = 11.1, 5.8 Hz, 1H, H-C(5')), 4.07 - 3.98 (m, 1H, H-C(4')), 3.91 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, H-C(7')), 3.77 (s, 6H, *Me*O), 3.14 (s, 3H, NCHN$(CH_3)_2$), 3.04 (s, 3H, NCHN$(CH_3)_2$), 2.73 (ddd, *J* = 13.3, 10.1, 6.0 Hz, 1H, H-C(2')), 2.63 - 2.48 (m, 1H, H-C(3')), 2.12 (*br*, 1H, O*H*), 1.95 - 1.82 (m, 2H, H-C(6'), H-C(2')), 1.14 (dd, *J* = 13.4, 6.1 Hz, 1H, H-C(6')).

[0554] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.52 (MeO-*C*-arom), 158.12 (C(2)), 157.88 (C(6)), 156.65 (N*C*HN$(CH_3)_2$), 149.78 (C(4)), 145.69, 137.02, 136.99 (C-arom), 136.07 (C(8)), 130.26, 128.26, 127.82, 126.74 (CH-arom), 120.53 (C(5)), 113.12 (CH-arom), 86.81 (*C*$(Ph)_3$), 85.35 (C(1')), 82.64 (C(4')), 74.61 (C(7')), 74.48 (C(5')), 55.23 (*Me*O-DMTr), 49.63 (C(3')), 41.37 (NCHN$(CH_3)_2$), 38.55 (C(6')), 38.23 (C(2')), 35.14

$(NCHN(CH_3)_2)$.

[0555] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{36}H_{39}O_6N_6$ ($[M + H]^+$) 계산값 651.2926, 측정값 651.2912.

[0556] ***(3'R,5'R,7'R)-N²-(N,N-디메틸포름아미디노)-9-{7'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 구아닌 (25)***



[0557]

[0558] 건조 DCM (10 mL) 중의 뉴클레오시드 **24** (143 mg, 0.220 mmol) 및 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (43 mg, 0.33 mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (0.12 mL, 0.38 mmol)를 실온에서 적가한다. 50분 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (20 mL)로 희석하고, DCM (3 × 20 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3.5% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **25** (130 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 69%)를 수득한다.

[0559] **25**의 데이타: R_f = 0.60 (DCM 중 10% MeOH):

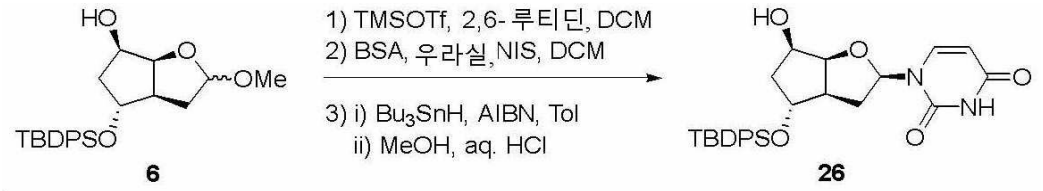
[0560] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.54, 9.47 (2s, 1H, N*H*), 8.54, 8.52 (2s, 1H, NC*H*N$(CH_3)_2$), 8.02. 8.00 (2s, 1H, H-C(8)), 7.58 - 7.49 (m, 2H, H-arom), 7.46 - 7.36 (m, 4H, H-arom), 7.25 (dd, *J* = 11.0, 3.5 Hz, 2H, H-arom), 7.21 - 7.13 (m, 1H, H-arom), 6.80 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 4H, H-arom), 6.00 - 5.82 (m, 1H, H-C(1')), 4.16 (dd, *J* = 10.7, 5.4 Hz, 1H, H-C(5')), 4.00 - 3.82 (m, 2H, H-C(4'), H-C(7')), 3.77, 3.77 (2s, 6H, *Me*O), 3.62 (dt, *J* = 12.2, 6.1 Hz, 2H, OC*H*$_2$CH$_2$CN), 3.51 - 3.33 (m, 2H, ($Me_2CH)_2$N), 3.15, 3.14 (2s, 3H, NCHN(C*H*$_3$)$_2$), 3.07 (s, 3H, NCHN(C*H*$_3$)$_2$), 2.85 - 2.61 (m, 2H, C(2'), C(3')), 2.59 - 2.44 (m, 2H, OCH$_2$C*H*$_2$CN), 2.00 - 1.79 (m, 2H, H-(C2'), H-C(6')), 1.53 - 1.26 (m, 1H, H-C(6')), 1.10, 1.01 (2t, *J* = 6.4 Hz, 12H, (Me_2CH)$_2$N).

[0561] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.50 (MeO-*C*-arom), 158.04, 158.00 (C(2)), 157.93 (C(6)), 156.61, 156.60 (N*C*HN$(CH_3)_2$), 149.73, 149.72 (C(4)), 145.62, 145.62, 136.97, 136.94 (C-arom), 136.14 (C(8)), 130.27, 130.24, 130.22, 128.26, 127.81, 126.73 (CH-arom), 120.81, 120.76 (C(5)), 117.67, 117.56 (OCH$_2$CH$_2$*C*N), 113.10 (CH-arom), 86.88, 86.85 (*C*(Ph)$_3$), 85.58, 85.37 (C(1')), 82.41, 82.07 (C(4')), 77.08, 76.01 ($J_{C,P}$ = 37.0, 15.1 Hz, C(7')), 74.52, 74.46 (C(5')), 58.19, 57.74 ($J_{C,P}$ = 18.9, 19.0 Hz O*C*H$_2$CH$_2$CN), 55.25, 55.21 (*Me*O-DMTr), 49.10, 48.83 ($J_{C,P}$ = 2.2, 4.8 Hz, C(3')), 43.12, 43.00 (($Me_2CH)_2$N), 41.34, 41.33 (NCHN(*C*H$_3$)$_2$), 38.48, 38.41 (C(2')), 37.23, 36.92 ($J_{C,P}$ = 5.7, 3.3 Hz C(6')), 35.17 (($Me_2CH)_2$N), 24.56, 24.53, 24.48, 24.47, 24.43, 25.36, 24.35 (7s, Me_2CH)$_2$N), 20.39, 20.28 ($J_{C,P}$ = 7.1, 6.9 Hz, OCH$_2$*C*H$_2$CN).

[0562] ^{31}P NMR (122 MHz, $CDCl_3$) δ 147.69, 146.37.

[0563] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{45}H_{56}O_7N_8P$ ($[M + H]^+$) 계산값 851.4004, 측정값 851.4018.

[0564] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-β-D-리보퓨라노실} 우라실 (26)***



[0565]

[0566] 건조 DCM (13 mL) 중 당 **6** (669 mg, 1.62 mmol) 용액에 2,6-루티딘 (0.94 mL, 8.10 mmol)을 0℃에서 첨가한다. 0℃에서 20분 동안 교반한 이후에, TMSOTf (0.89 mL, 4.86 mmol)를 적가한 다음 용액을 실온으로 가온시키고, 추가 3시간 동안 교반한다. 다음으로 반응을 포화 $NaHCO_3$ (20 mL)의 첨가에 의해 켄칭한다. 유기상을 분리하고, 수용성 상을 DCM (2 × 20 mL)으로 추가로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0567] 미정제 산물을 건조 DCM (12 mL)에 용해시킨 다음 우라실 (545 mg, 4.86 mmol) 및 BSA (1.8 mL , 7.29 mmol)을 실온에서 첨가한다. 실온에서 60분 동안 교반한 이후에, 생성된 미세한 현탁액을 0℃로 냉각시키고, N-요오드숙신이미드 (578 mg, 2.52 mmol)을 첨가한다. 0℃에서 30분 동안 및 실온에서 4시간 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 EtOAc (50 mL)로 희석하고, 후속적으로 $Na_2S_2O_3$ (30 mL)의 10% 수용성 용액 및 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 세척한다. 수용성 상을 조합하고, DCM (2 × 20 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0568] 미정제 산물을 건조 톨루엔 (15 mL)에 용해시킨 다음 Bu_3SnH (0.65 mL, 2.43 mmol) 및 아조이소부티로니트릴 (AIBN, 13 mg, 0.081 mmol)을 실온에서 첨가한다. 95℃에서 2시간 동안 가열한 이후에, 혼합물을 실온으로 냉각시키고, MeOH (7 mL) 및 HCl (물 중 1 M, 1.6 mL, 1.6 mmol)을 첨가한다. 용액을 15분 동안 추가로 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 4 : 1)에 의해 정제ㅎ고, 흰색 거품으로서 **26** (490 mg, 3개의 단계를 거쳐 61%)를 수득한다.

[0569] **26**의 데이타: R_f = 0.15 (EtOAc/헥산 2 : 1):

[0570] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.95 (br, 1H, H-N(3)), 7.69 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H, H-arom), 7.54 - 7.39 (m, 7H, H-C(6), H-arom), 5.98 (dd, *J* = 9.3, 5.6 Hz, 1H, H-C(1')), 5.71 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-C(5)), 4.51 (dd, *J* = 13.7, 6.3 Hz, 2H, H-C(4'), H-C(5')), 4.14 (br, 1H, H-C(7')), 3.25 (br, 1H, O*H*), 2.74 (dd, *J* = 17.1, 8.7 Hz, 1H, H-C(3')), 2.26 - 1.87 (m, 3H, H-C(2'), H-C(6')), 1.49 - 1.19 (m, 1H, H-C(2')), 1.12 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0571] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 163.65 (C(4)), 150.46 (C(2)), 139.85 (C(6)), 135.69, 135.66 (CH-arom), 133.71, 133.42 (C-arom), 129.98, 129.93, 127.85, 127.81 (CH-arom), 102.84 (C(5)), 86.17 (C(1')), 81.83 (C(4')), 76.94 (C(7')), 72.45 (C(5')), 50.09 (C(3')), 40.93 (C(6')), 35.83 (C(2')), 26.91 (CH_3)$_3$-C-Si), 19.03 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0572] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{27}H_{32}O_5N_2NaSi$ ([M + Na]$^+$) 계산값 515.1973, 측정값 515.1963.

[0573] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 우라실 (27)***



[0574]

[0575] 건조 피리딘 (7 mL) 중 뉴클레오시드 **26** (438 mg, 0.889 mmol) 용액에 DMTr-Cl (1.20 g, 3.55 mmol)를 실온에

서 첨가한다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음, 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 40 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 1.5% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 추출하고, 노란색 거품으로서 **27** (601 mg, 80%)을 수득한다.

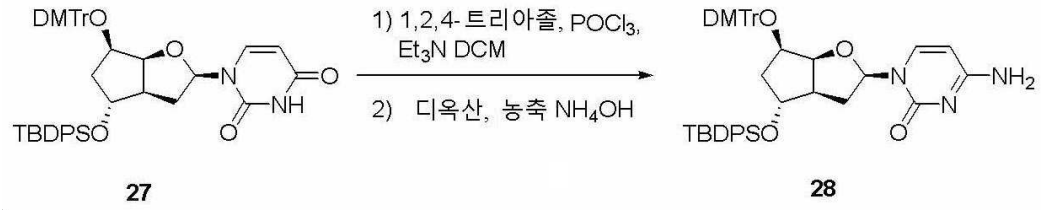
[0576] **27**의 데이타: R_f = 0.48 (EtOAc/헥산 2 : 1):

[0577] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.26 (br, 1H, H-N(3)), 7.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-C(6)), 7.40 - 7.08 (m, 19H, H-arom), 6.69 (dd, *J* = 8.8, 4.9 Hz, 4H, H-arom), 5.70 (dd, *J* = 7.8, 5.8 Hz, 1H, H-C(1')), 5.49 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H-C(5)), 4.24 - 4.11 (m, 1H, H-C(5')), 4.05 - 3.95 (m, 1H, H-C(4')), 3.65 (d, *J* = 1.7 Hz, 6H, *Me*O), 3.62 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, H-C(7')), 2.41 (dd, *J* = 17.2, 8.5 Hz, 1H, H-C(3')), 2.24 (ddd, *J* = 13.5, 10.2, 5.7 Hz, 1H, H-C(2')), 1.39 - 1.24 (m, 1H, H-C(6')), 1.04 (dd, *J* = 13.1, 5.7 Hz, 1H, H-C(6')), 0.89 (dt, *J* = 13.8, 8.3 Hz, 1H, H-C(2')), 0.81 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0578] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 163.58 (C(4)), 158.66 (MeO-*C*-arom), 150.38 (C(2)), 145.61 (C-arom), 139.92 (C(6)), 136.71, 136.56(C-arom), 135.61, 135.55 (CH-arom), 133.55, 133.41 (C-arom), 130.30, 129.92, 129.84, 128.16, 127.90, 127.74, 127.67, 126.90, 113.19, 113.15 (CH-arom), 102.12 (C(5)), 87.41 ($C(Ph)_3$), 86.80 (C(1')), 82.32 (C4')), 75.54 (C(7')), 74.41 (C(5')), 55.23 (*Me*O-DMTr), 50.05 (C(3')), 38.49 (C(6')), 37.53 (C(2')), 26.81 ($CH_3)_3$-C-Si), 18.99 ($(CH_3)_3$-*C*-Si).

[0579] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{48}H_{50}O_7N_2NaSi$ ($[M + Na]^+$) 계산값 817.3279, 측정값 817.3286.

[0580] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 시토신 (28)***



27 **28**

[0581]

[0582] 건조 MeCN (70 mL) 중 1,2,4-트리아졸 (1.83g, 26.5 mmol) 현탁액에 $POCl_3$ (0.57 mL, 6.05 mmol)에 이어서 Et_3N (4.2 mL, 30.2 mmol)를 0℃에서 첨가한다. 현탁액을 0℃에서 30분 동안 교반한 다음, 건조 MeCN (4 mL) 중 뉴클레오시드 **27** (601 mg, 0.756 mmol) 용액을 0℃에서 첨가한다. 실온에서 4시간의 교반 이후에, 반응을 포화 $NaHCO_3$ (20 mL)의 첨가에 의해 켄칭하고, MeCN를 감압 하에 제거하고, 생성된 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석시키며, DCM (3 × 60 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0583] 미정제 산물을 1,4-디옥산 (18 mL) 및 농축된 NH_4OH (18 mL)의 혼합물에 용해시킨다. 실온에서 3시간 동안 교반한 이후에, 혼합물을 진공으로 절반의 부피로 감소시키고, 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석하여, DCM (3 × 30 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 5% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **28** (520 mg, 87%)을 수득한다.

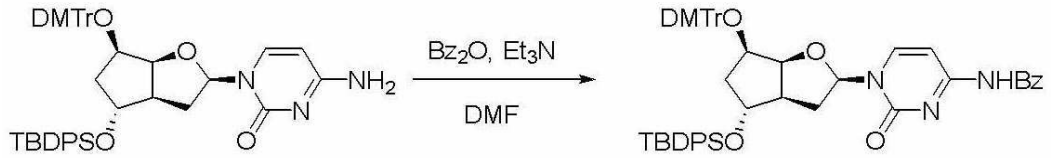
[0584] **28**의 데이타: R_f = 0.41 (DCM 중 10% MeOH):

[0585] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H,H-C(6)), 7.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-arom), 7.38 - 7.08 (m, 17H, H-arom), 6.73 (dd, *J* = 8.7, 4.7 Hz, 4H, H-arom), 5.73 (t, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-C(5), H-C(1')), 4.32 - 4.16 (m, 1H, H-C(5')), 4.03 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-C(4')), 3.66 (d, *J* = 0.9 Hz, 6H, *Me*O), 3.61 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H-C(7')), 2.50 - 2.33 (m, 2H, H-C(2'), H-C(3')), 1.47 - 1.28 (m, 1H, H-C(6')), 1.03 (dd, *J* = 12.9, 5.6 Hz, 1H, H-C(6')), 0.92 - 0.75 (m, 10H, H-C(2'), $(CH_3)_3$-C-Si).

[0586] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 165.78 (C(4)), 158.59 (MeO-*C*-arom), 155.94 (C(2)), 145.88 (C-arom), 140.68 (C(6)), 136.93, 136.78 (C-arom), 135.59, 135.53 (CH-arom), 133.60, 133.54 (C-arom), 130.31, 129.86, 129.77, 128.15, 127.88, 127.71, 127.64, 126.79, 113.18, 113.14 (CH-arom), 94.53 (C(5)), 87.55 (*C*$(Ph)_3$), 87.22 (C(1')), 82.23 (C(4')), 75.76 (C(7')), 74.68 (C(5')), 55.21 (*Me*O-DMTr), 50.18 (C(3')), 38.25 (C(6')), 38.08 (C(2')), 26.83 (CH_3)$_3$-C-Si), 19.00 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0587] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{48}H_{52}O_6N_3Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 794.3620, 측정값 794.3649.

[0588] ***(3'S,5'R,7'R)- N^4-벤조일-1-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 시토신 (29)***



28 29

[0589]

[0590] 건조 DMF (15 mL) 중 뉴클레오시드 **28** (519 mg, 0.653 mmol) 용액에 Et_3N (110 μL, 0.784 mmol)에 이어서 Bz_2O (370 mg, 1633 mmol)을 실온에서 첨가하고, 용액을 밤새 교반한다. 다음으로 용액을 포화 $NaHCO_3$ (60 mL)을 가만히 첨가하여 켄칭하고, DCM (3 × 70 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (헥산/EtOAc 2 : 3, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 검품으로서 **29** (580 mg, 99%)를 수득한다.

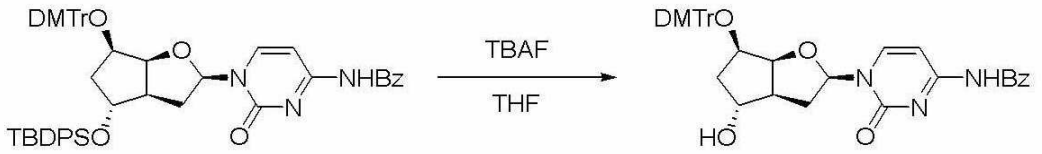
[0591] 29의 데이타: R_f = 0.51 (EtOAc):

[0592] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.61 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-C(6)), 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-arom), 7.49 - 7.13 (m, 24H, H-arom, H-C(5)), 6.77 (dd, *J* = 8.5, 4.4 Hz, 4H, H-arom), 5.73 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H-C(1')), 4.39 - 4.20 (m, 1H, H-C(5')), 4.05 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-C(4')), 3.70 (s, 6H, *Me*O), 3.63 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-C(7')), 2.72 - 2.55 (m, 1H, H-C(2')), 2.48 (dd, *J* = 16.0, 8.4 Hz, 1H, H-C(3')), 1.42 - 1.29 (m, 1H, H-C(6')), 1.19 - 1.11 (m, 1H, H-C(6')), 1.07 - 0.96 (m, 1H, H-C(2')), 0.85 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0593] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.64 (CONH), 162.25 (C(4)), 158.70 (MeO-*C*-arom), 154.84 (C(2)), 145.71 (C-arom), 144.84 (C(6)), 136.74, 136.67 (C-arom), 135.59, 135.51 (CH-arom), 133.52, 133.42, 133.24 (C-arom), 133.11, 130.30, 129.92, 129.85, 129.02, 128.12, 127.97, 127.76, 127.68, 127.61, 126.94, 113.25, 113.22(CH-arom), 96.22 (C(5)), 89.07 (*C*$(Ph)_3$), 87.53 (C(1')), 83.46 (C(4')), 75.59 (C(7')), 74.71 (C(5')), 55.24 (*Me*O-DMTr), 50.35 (C(3')), 38.61 (C(6')), 38.15 (C(2')), 26.82 (CH_3)$_3$-C-Si), 19.00 (CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0594] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{55}H_{56}O_7N_3Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 898.3882, 측정값 898.3898.

[0595] ***(3'S,5'R,7'R)-- N^4-벤조일-1-{-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 시토신 (30)***



29 30

[0596]

[0597] 건조 THF (14 mL) 중 **29** (580 mg, 0.648 mmol) 용액에 TBAF (THF 중 1 M, 3.25 mL, 3.25 mmol)을 실온에서 첨가한다. 용액을 1일 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 40 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **30** (366 mg, 85%)을 수득한다.

[0598] **30**의 데이터: R_f = 0.31 (DCM 중 5% MeOH):

[0599] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.90 (br, 1H, N*H*), 8.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-C(6)), 7.82 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-arom), 7.55 - 7.31 (m, 10H, H-arom, H-C(5)), 7.28 - 7.09 (m, 3H, H-arom), 6.76 (dd, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 4H, H-arom), 5.73 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-C(1')), 4.28 - 4.13 (m, 1H, H-C(5')), 3.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-C(4')), 3.75 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-C(7')), 3.70 (s, 6H, *Me*O), 2.86 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H, H-C-(2')), 2.54 (dd, *J* = 17.4, 7.4 Hz, 1H, H-C(3')), 1.68 - 1.55 (m, 1H, H-C(6')), 1.45 - 1.13 (m, 3H, H-C(2'), H-C(6'), O*H*).

[0600] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.63 (CONH), 162.34 (C(4)), 158.65 (MeO-*C*-arom), 155.00 (C(2)), 145.62 (C-arom), 145.11 (C(6)), 136.72, 136.64, 133.16 (C-arom), 130.25, 129.02, 128.12, 127.93, 127.61, 126.95, 113.20 (CH-arom), 96.24 (C(5)), 89.20 (*C*$(Ph)_3$), 87.48 (C(1')), 83.40 (C(4')), 74.50, (C(5')) 73.90 (C(7')), 55.25 (*Me*O-DMTr), 50.05 (C(3')), 38.90 (C(6')), 38.40 (C(2')).

[0601] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{39}H_{38}O_7N_3$ ($[M + H]^+$) 계산값 660.2704, 측정값 660.2707.

[0602] ***(3'S,5'R,7'R)- N^4-벤조일-1-{7'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 시토신 (31)***



30 31

[0603]

[0604] 건조 DCM (3 mL) 중 뉴클레오시드 **30** (67 mg, 0.101 mmol) 및 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (22 mg, 0.17 mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (65 μL, 0.20 mmol)를 실온에서 첨가한다. 40분 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 DCM (20 mL)로 희석시키고, 포화 $NaHCO_3$ (2 × 15 mL) 및 포화 NaCl (15 mL)로 세척한다. 수용성 상을 조합하고, DCM (20 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **31** (75 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 86%)을 수득한다.

[0605] **31**의 데이터: R_f = 0.67 (DCM 중 4% MeOH):

[0606] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.88 (s, 1H, N*H*), 8.79 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-C(6)), 7.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-arom), 7.67 - 7.40 (m, 10H, H-arom, H-C(5)), 7.39 - 7.22 (m, 3H, H-arom), 6.93 - 6.79 (m, 4H, H-arom), 5.97 - 5.77 (m, 1H, H-C(1')), 4.22 (dt, *J* = 14.5, 5.6 Hz, 1H, H-(5')), 3.98 - 3.84 (m, 2H, H-C(4'), H-C(7')), 3.82 (s, 6H, *Me*O), 3.66 (ddd, *J* = 16.8, 13.5, 6.7 Hz, 2H, O*C*$H_2$$CH_2$CN), 3.53 - 3.37 (m,

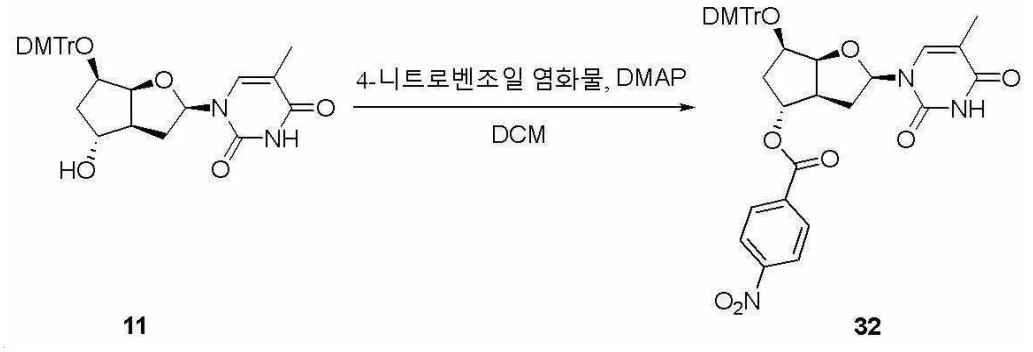
2H, $(Me_2CH)_2N$), 3.14 - 2.93 (m, 1H, H-C(2')), 2.84 - 2.66 (m, 1H, H-C(3')), 2.53 (dt, J = 12.4, 6.3 Hz, 2H, OCH_2CH_2CN), 1.83 - 1.56 (m, 2H, H-C(6')), 1.46 (td, J = 14.1, 7.0 Hz, 1H, H-C(2')), 1.18 - 0.97 (m, 12H, $(Me_2CH)_2N$).

[0607] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 166.70 (CONH), 162.32, 162.28 (C(4)), 158.68 (MeO-*C*-arom), 154.93 (C(2)), 145.53 (C-arom), 144.95, 144.89 (C(6)), 136.69, 136.63, 136.56, 136.52, 133.24 (C-arom), 133.10, 130.24, 130.20, 129.01, 128.10, 127.94, 127.60, 126.96 (CH-arom), 117.53 (OCH_2CH_2CN), 113.20 (CH-arom), 96.24 (C(5)), 89.15, 89.10 ($C(Ph)_3$), 87.55, 87.54 (C(1')), 83.11, 83.04 (C(4')), 75.93, 75.37 ($J_{C,P}$ = 16.7, 15.5 Hz, C(7')), 74.48 (C(5')), 58.25, 57.99 ($J_{C,P}$ = 17.9, 18.1 Hz OCH_2CH_2CN), 55.27, 55.24 (*MeO*-DMTr), 49.27, 49.03 ($J_{C,P}$ = 3.1, 4.8 Hz, C(3')), 43.15, 42.98 ($(Me_2CH)_2N$), 38.89, 38.80 (C(2')), 37.44, 37.24 ($J_{C,P}$ = 5.2, 3.2 Hz, C(6')), 24.58, 24.54, 24.48, 24.45, 24.35 (5s, $Me_2CH)_2N$), 20.33, 20.24 ($J_{C,P}$ = 5.8, 5.7 Hz, OCH_2CH_2CN).

[0608] ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 147.19, 146.94.

[0609] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{48}H_{55}O_8N_5P$ ($[M + H]^+$) 계산값 860.3783, 측정값 860.3791.

[0610] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-(4-니트로벤조일)-5'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 티민 (32)***



11 **32**

[0611]

[0612] 건조 DCM (8 mL) 중 뉴클레오시드 **11** (100 mg, 0.175 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (26 mg, 0.21 mmol) 용액에 4-니트로벤조일 염화물 (59 mg, 0.315 mmol)을 실온에서 첨가한다. 6시간 동안 교반한 이후에, 반응을 포화 $NaHCO_3$ (5 mL)의 첨가에 의해 켄칭한다. 다음으로 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (15 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 15 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2.5% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 미량의 Et_3N를 포함하는 **32** (98 mg, 78%)를 수득한다.

[0613] **32**의 데이타: R_f = 0.42 (DCM 중 5% MeOH):

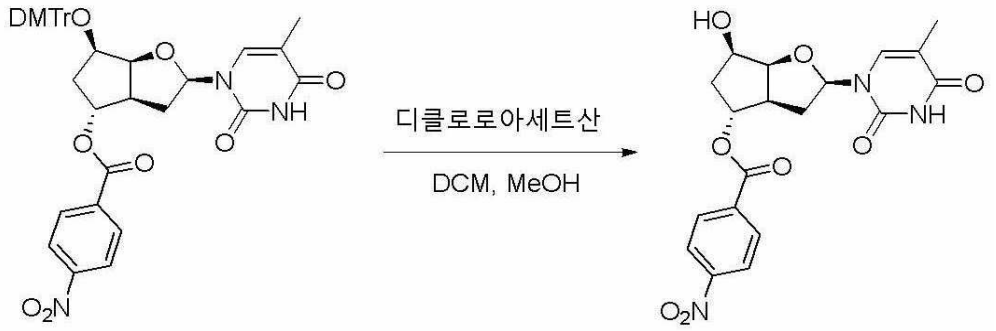
[0614] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.26 (t, J = 7.3 Hz, 3H, H-arom, HN(3)), 8.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-arom), 7.72 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H-C(6)), 7.55 (d, J = 6.9 Hz, 2H, H-arom), 7.44 (dd, J = 8.8, 6.6 Hz, 4H, H-arom), 7.35 - 7.18 (m, 3H, H-arom), 6.83 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 4H, H-arom), 6.01 (dd, J = 8.2, 5.2 Hz, 1H, H-C(1')), 4.96 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H-C(7')), 4.33 - 4.24 (m, 1H, H-C(4')), 4.24 - 4.13 (m, 1H, H-C(5')), 3.78 (d, J = 0.9 Hz, 6H, *MeO*), 2.92 - 2.72 (m, 2H, H-C(3'), H-C(2')), 1.81 (d, J = 0.6 Hz, 3H, *Me*-C(5)), 1.79 - 1.62 (m, 2H, H-C(6')), 1.22 (d, J = 5.9 Hz, 1H, H-C(2')).

[0615] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.05, 163.84 (C(4), CO_2R), 158.81 (MeO-*C*-arom), 150.64, 150.52 (O_2N-*C*-arom, C(2)), 145.29, 136.43, 136.34 (C-arom), 135.18 (C(6)), 130.62, 130.20, 130.17, 128.16, 128.01, 127.15,

123.58, 113.30, 113.27 (C-arom), 111.17 (C(5)), 87.53 (*C*(Ph)$_3$), 86.29 (C(1')), 81.59 (C(4')), 78.65 (C(7')), 74.16 (C(5')), 55.26 (*Me*O-DMTr), 47.07 (C(3')), 37.35 (C(2')), 35.71 (C(6')), 12.51 (*Me*-C(5)).

[0616] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{40}H_{37}O_{10}N_3Na$ ([M + Na]$^+$) 계산값 742.2371, 측정값 742.2375

[0617] ***((3'S,5'R,7'R)-1-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-(4-니트로벤조일)-β-D-리보퓨라노실} 티민 (33)***



32 33

[0618]

[0619] 건조 DCM (1 mL) 및 MeOH (0.4 mL)의 혼합물 중 **32** (60 mg, 0.083 mmol) 용액에 디클로로아세트산 (0.2 mL)을 실온에서 첨가한다. 3시간 동안 교반한 이후에, 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (15 mL)로 희석시킨 다음, DCM (3 × 10 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 5% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **33** (29 mg, 84%)을 수득한다. X-선 분석에 적합한 결정을 H_2O/MeOH 혼합물에서의 재결정화에 의해 획득한다.

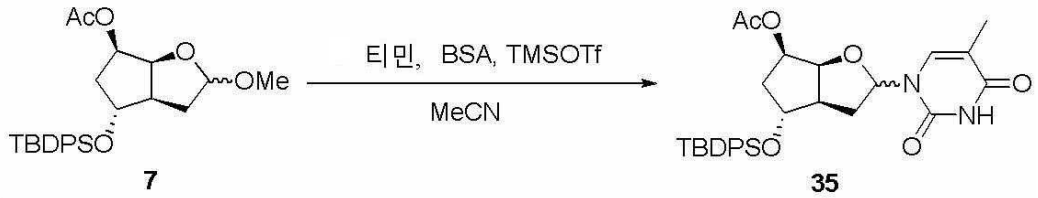
[0620] **33**의 데이타: R_f = 0.18 (DCM 중 5% MeOH):

[0621] ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.33 (s, 1H, H-N(3)), 8.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-arom), 8.27 - 8.13 (m, 2H, H-arom), 7.78 (s, 1H, H-C(6)), 5.96 (dd, *J* = 9.3, 5.6 Hz, 1H, H-C(1')), 5.18 (t, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-C(7')), 5.12 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, O*H*), 4.33 (dd, *J* = 7.3, 4.7 Hz, 1H, H-C(4')), 4.27 (td, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H, H-C(5')), 2.90 (dd, *J* = 17.2, 8.5 Hz, 1H, H-C(3')), 2.58 - 2.46 (m, 1H, H-C(2')), 2.30 (ddd, *J* = 13.8, 8.8, 5.3 Hz, 1H, H-C(6')), 2.03 (dd, *J* = 9.6, 4.2 Hz, 1H, H-C(6')), 1.92 - 1.76 (m, 4H, H-C(2'), *Me*-C(5)).

[0622] ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.33, 164.23 (C(4), *C*O_2R), 150.91, 150.75 (O_2N-*C*-arom, C(2)), 136.79 (C-arom), 135.69 (C(6)), 131.20, 124.32 (CH-arom), 109.89 (C(5)), 85.31 (C(1')), 81.48 (C(4')), 80.07 (C(7')), 71.72 (C(5')), 47.18 (C(3')), 37.77 (C(6')), 35.48 (C(2')), 12.66 12.58 (*Me*-C(5)).

[0623] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{19}H_{20}O_8N_3$ ([M + H]$^+$) 계산값 418.1245, 측정값 418.1242.

[0624] ***(3'R,5'R,7'R)-1-{5'-O-아세틸-7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-α,β-D-리보퓨라노실} 티민 (35)***



7 35

[0625]

[0626] 건조 MeCN (12 mL) 중 당 **7** (933 mg, 2.05 mmol) 및 티민 (372 mg, 3.08 mmol) 용액에 BSA (1.5 mL, 6.15 mmol)를 실온에서 적가한다. 50분 동안 교반한 이후에, 용액을 0℃로 냉각시키고, TMSOTf (0.45 mL, 2.5 mmol)을 적가한다. 0℃에서 3시간 동안 및 실온에서 15시간 동안 추가로 교반한 이후에, 반응 혼합물을 포화

$NaHCO_3$ (100 mL)로 희석시키고, DCM (4 × 40 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2.5% 이소프로판올)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 아노머 비율 α/β ≈ 85 : 15의 혼합물 **35** (924 mg, 82%)를 수득한다.

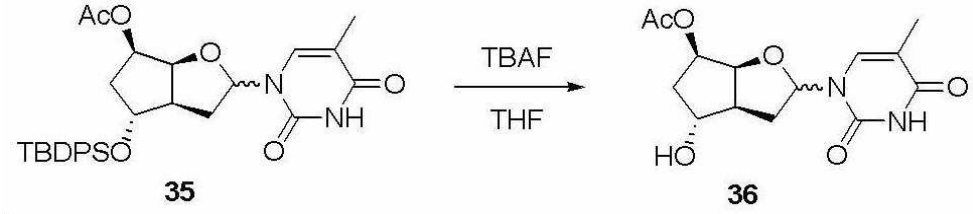
[0627] **35**의 데이타: R_f = 0.56 (DCM 중 7% MeOH):

[0628] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.14 (*br*, 1H, H-N(3)), 7.53 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 4H, H-arom), 7.39 - 7.23 (m, 6H, H-arom), 7.09 (d, *J* = 1.0 Hz, 0.15 H, H-C(6)), 6.87 (d, *J* = 1.0 Hz, 0.85 H, H-C(6)), 5.83 (t, *J* = 6.2 Hz, 0.85 H, H-C(1')), 5.80 - 5.70 (m, 0.15H, H-C(1')), 5.36 - 5.04 (m, 1H, H-C(5')), 4.89 (dd, *J* = 6.3, 5.2 Hz, 1H, H-C(4')), 4.62 (dd, *J* = 7.1, 5.6 Hz, 0.15H, H-C(4')), 4.01 - 3.85 (m, 1H, H-C(7')), 2.76 - 2.55 (m, 1H, H-C(3')), 2.09 - 1.91 (m, 4H, H-C(6'), *Me*CO_2), 1.90 - 1.58 (m, 6H, H-C(6'), H-C(2'), *Me*-C(5)), 0.96 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0629] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.70 (MeCO_2), 163.87 (C(4)), 150.29 (C(2)), 135.69, 135.67 (CH-arom), 134.99 (C(6)), 133.58, 133.18 (C-arom), 130.03, 127.87 (CH-arom), 111.05 (C(5)), 87.56 (C(1')), 82.85 (C(4')), 76.50 (C(7')), 74.76 (C(5')), 50.72 (C(3')), 37.79 (C(6')), 36.94 (C(2')), 26.88 ((CH_3)$_3$-C-Si), 20.95 (*Me*CO_2), 19.01 ((CH_3)$_3$-*C*-Si), 12.63 (*Me*-C(5)).

[0630] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{30}H_{37}O_6N_2Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 549.2415, 측정값 549.2401.

[0631] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{5'-O-아세틸-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-α,β-D-리보퓨라노실} 티민 (36)***

[0632] 

[0633] 건조 THF (10 mL) 중 뉴클레오시드 **35** (924 mg, 1.68 mmol) 용액에 TBAF (THF 중 1 M, 3.4 mL, 3.4 mmol)을 실온에서 첨가한다. 실온에서 2시간 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (80 mL)로 희석시키고, EtOAc (3 × 80 mL) 및 DCM (2 × 80 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 5% MeOH)에 의해 정제하고, **36** (391 mg, 75%)의 아노머 혼합물을 수득한다.

[0634] **36**의 데이타: R_f = 0.24 (DCM 중 7% MeOH):

[0635] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.66 (*br*, 0.15H, H-N(3)), 9.63 (*br*, 0.85H, H-N(3)), 7.27 (d, *J* = 1.0 Hz, 0.15H, H-C(6)), 7.06 (d, *J* = 1.0 Hz, 0.85H, H-C(6)), 6.00 (t, *J* = 6.1 Hz, 0.85H, H-C(1')), 5.91 (dd, *J* = 8.8, 5.5 Hz, 0.15H, H-C(1')), 5.26 - 5.10 (m, 1H, H-C(5')), 4.92 (dd, *J* = 6.5, 5.3 Hz, 0.85H, H-C(4')), 4.65 (dd, *J* = 6.9, 5.7 Hz, 0.15H, H-C(4')), 4.19 - 4.03 (m, 1H, H-C(7')), 2.91 - 2.72 (m, 2H, H-C(3'), O*H*), 2.64 (ddd, *J* = 13.3, 9.8, 5.5 Hz, 0.15H, H-C(2')), 2.25 - 2.15 (m, 1.70H, H-C(2')), 2.05 (s, 0.45H, *Me*CO_2), 2.04 (s, 2.55H, *Me*CO_2), 2.03 - 1.89 (m, 2H, H-C(6')), 1.88 (d, *J* = 0.7 Hz, 0.45H, *Me*-C(5)), 1.85 (d, *J* = 0.6 Hz, 2.55H, *Me*-C(5)), 1.42 - 1.28 (m, 0.15H, H-C(2')).

[0636] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.87 (MeCO_2), 164.26 (C(4)), 150.66 (C(2)), 135.54 (C(6)), 111.22 (C(5)), 87.97 (C(1')), 82.97 (C(4')), 75.08 (C(7')), 74.52 (C(5')), 50.07 (C(3')), 37.81 (C(2')), 37.23 (C(6')), 21.02 (*Me*CO_2), 12.67 (*Me*-C(5)).

[0637] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{14}H_{19}O_6N_2$ ($[M + H]^+$) 계산값 311.1238, 측정값 311.1234.

[0638] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{5'-O-아세틸-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α,β-D-리보퓨라노실} 티민 (37)***



[0639]

[0640] 건조 피리딘 (7 mL) 중 뉴클레오시드 **36** (364 mg, 1.17 mmol) 용액에 DMTr-Cl (1.19 g, 3.51 mmol)을 실온에서 첨가한다. 용액을 1일 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 2 : 1, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 노란색 거품으로서 아노머 혼합물 **37** (690 mg, 96%)을 수득한다.

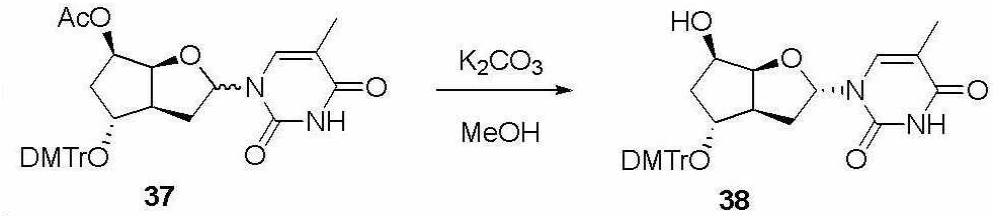
[0641] 37의 데이타: R_f = 0.70 (DCM 중 8% MeOH):

[0642] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.17 (*br*, 0.85H, H-N(3)), 8.56 (*br*, 0.15H, H-N(3)), 7.38 - 7.32 (m, 2H, H-arom), 7.29 - 7.15 (m, 7H, H-arom), 6.82 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-C(6)), 6.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 4H, H-arom), 5.86 (t, *J* = 6.0 Hz, 0.85H, H-C(1')), 5.71 (dd, *J* = 8.9, 5.4 Hz, 0.15H, H-C(1')), 5.25 (dd, *J* = 10.2, 5.6 Hz, 0.15H, H-C(5')), 5.21 - 5.11 (m, 0.85H, H-(C5')), 4.78 (dd, *J* = 6.7, 4.8 Hz, 0.85H, H-C(4')), 4.49 (dd, *J* = 7.1, 5.3 Hz, 0.15H, H-C(4')), 3.84 (*br*, 1H, H-C(7')), 3,72, 3.71 (2s, 6H, *Me*O), 2.34 - 2.23 (m, 1H, H-C(3')), 2.01, 1.99 (2s, 3H, *Me*CO_2), 1.82 (d, *J* = 0.5 Hz, *Me*-C(5)), 1.80 - 1.56 (m, 4H, H-C(2'), H-C(6')).

[0643] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.69 (Me*C*O_2), 163.91 (C(4)), 158.82 (MeO-*C*-arom), 150.33 (C(2)), 145.34, 136.64, 136.58 (C-arom), 135.00 (C(6)), 130.25, 128.39, 128.07, 127.15, 113.41 (CH-arom), 111.04 (C(5)), 87.70 (*C*$(Ph)_3$), 87.31 (C(1')), 83.15 (C(4')), 77.16 (C(7')), 74.96 (C(5')), 55.37 (*Me*O-DMTr), 49.12 (C(3')), 37.55 (C(2')), 36.82 (C(6')), 21.07 (*Me*CO_2), 12.66 (*Me*-C(5)).

[0644] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{35}H_{36}O_8N_2$ ($[M + H]^+$) 계산값 612.2466, 측정값 612.2453.

[0645] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 티민 (38)***



[0646]

[0647] 건조 MeOH (10 mL) 중 뉴클레오시드 **37** (690 mg, 1.12 mmol) 용액에 K_2CO_3 (467 mg, 3.36 mmol)를 실온에서 첨가한다. 용액을 3시간 동안 교반한 다음, 포화 NaCl (60 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 60 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (Et_2O 중 3% 이소프로판올, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 고체로서 α-아노머 **38** (550 mg, 86%)을 수득한다.

[0648] 38의 데이타: R_f = 0.39 (DCM 중 5% MeOH):

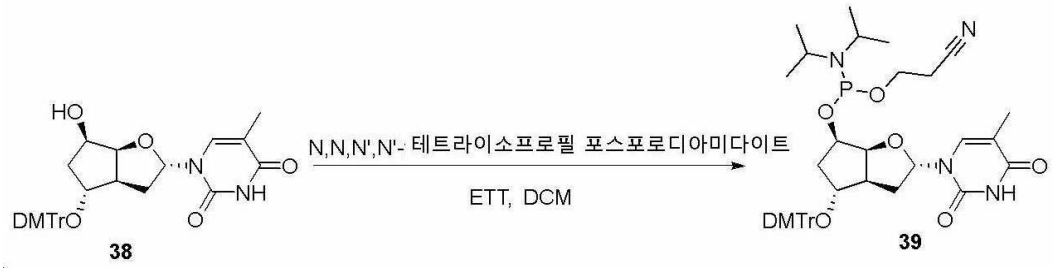
[0649] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.37 (*br*, s, 1H, H-N(3)), 7.39 - 7.31 (m, 2H, H-arom), 7.25 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H-arom), 7.20 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-arom), 7.16 - 7.08 (m, 1H, H-arom), 6.78 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-C(6)), 6.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H, H-arom), 5.91 (dd, *J* = 6.5, 4.9 Hz, 1H, H-C(1')), 4.57 (dd, *J* = 7.2,

4.4 Hz, 1H, H-C(4')), 4.35 - 4.18 (m, 1H, H-C(5')), 3.86 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H-C(7')), 3.69 (s, 6H, *Me*O), 2.53 (*br*, 1H, O*H*), 2.22 (dd, *J* = 15.3, 6.3 Hz, 1H, H-C(3')), 1.85 - 1.69 (m, 5H, *Me*-C(5), H-C(2'), H-C(6')), 1.66 - 1.49 (m, 2H, H-C(2'), H-C(6')).

[0650] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 163.98 (C(4)), 158.67 (MeO-*C*-arom), 150.47 (C(2)), 145.48 , 136.80, 136.75 (C-arom), 134.94 (C(6)), 130.19, 130.18, 128.35, 127.97, 127.01, 113.31 (CH-arom), 111.04 (C(5)), 87.82 (*C*(Ph)$_3$), 87.05 (C(1')), 85.74 (C(4')), 78.26 (C(7')), 73.33 (C(5')), 55.31 (*Me*O-DMTr), 48.81 (C(3')), 40.21 (C(6')), 37.68 (C(2')), 12.65 (*Me*-C(5)).

[0651] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{33}H_{35}O_7N_2$ ($[M + H]^+$) 계산값 571.2439, 측정값 571.2421.

[0652] ***(3'S,5'R,7'R)-1-{5'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-β-D-리보퓨라노실} 티민 (39)***



[0653]

[0654] 건조 DCM (7 mL) 중 뉴클레오시드 **38** (200 mg, 0.350 mmol) 및 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (59 mg, 0.46 mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (0.17 mL, 0.53 mmol)를 실온에서 적가한다. 1시간 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 DCM (50 mL)으로 희석하고, 포화 $NaHCO_3$ (2 × 25 mL) 및 포화 NaCl (25 mL)로 세척한다. 수용성 상을 조합하고, DCM (30 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 고체로서 **39** (220 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 81%)를 수득한다.

[0655] 39의 데이타: R_f = 0.44 (DCM 중 4% MeOH):

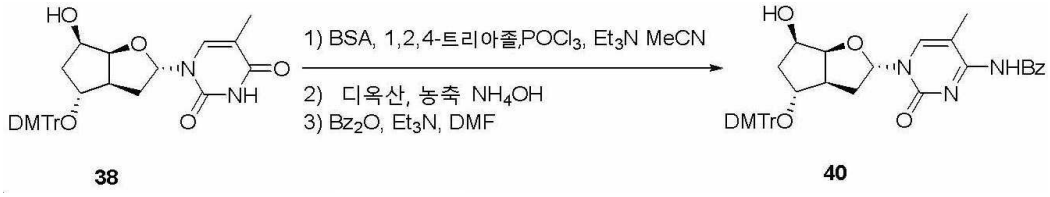
[0656] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.03 (*br*, 1H, H-N(3)), 7.36 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-arom), 7.30 - 7.07 (m, 7H, H-arom), 6.84 (s, 1H, H-C(6)), 6.80 - 6.69 (m, 4H, H-arom), 5.95, 5.88 (2dd, *J* = 6.6, 4.8 Hz, 1H, H-C(1')), 4.70, 4.61 (2dd, *J* = 7.3, 4.3 Hz, 1H, H-C(4')), 4.41 - 4.20 (m, 1H, H-C(5')), 3.94 - 3.82 (m, 1H, H-C(7')), 3.81 - 3.62 (m, 8H, *Me*O, OC*H*$_2$CH$_2$CN), 3.59 - 3.40 (m, 2H, (Me$_2$C*H*)$_2$N), 2.61 - 2.46 (m, 2H, OCH$_2$C*H*$_2$CN), 2.28 (ddd, *J* = 14.1, 13.2, 7.3 Hz, 1H, H-C(3')), 1.91 - 1.73 (m, 5H, *Me*-C(5), H-C(6'), H-C(2')), 1.72 - 1.46 (m, 2H, H-C(6'), H-C(2')), 1.16 - 1.00 (m, 12H, (*Me*$_2$CH)$_2$N).

[0657] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.01, 163.98 (C(4)), 158.70 (MeO-*C*-arom), 150.39, 150.17 (C(2)), 145.52, 136.84, 136.78 (C-arom), 135.44, 135.39 (C(6)), 130.21, 128.36, 128.32, 128.00, 127.03 (CH-arom), 118.02, 117.76 (OCH$_2$CH$_2$*C*N), 113.32 (CH-arom), 110.91, 110.59 (C(5)), 88.31, 88.06 (*C*(Ph)$_3$), 87.11, 87.06 (C(1')), 85.44, 85.39 ($J_{C,P}$ = 4.6, 3.1 Hz, C(4')), 78.25, 78.13 (C(7')), 74.70, 74.34 ($J_{C,P}$ = 13.5, 18.5 Hz, C(5')), 58.73, 58.47($J_{C,P}$ = 18.9, 20.1 Hz, (O*C*H$_2$CH$_2$CN)), 55.35, 55.32 (*Me*O-DMTr), 48.80, 48.64 (C(3')), 43.22, 43.06 ($J_{C,P}$ = 12.4, 11.0 Hz (Me$_2$C*H*)$_2$N), 39.68, 39.63 (C(6')), 38.06, 37.93 (C(2')), 24.81, 24.74, 24.71, 24.68, 24.65, 24.59 (6s, *Me*$_2$CH)$_2$N), 20.37, 20.35 ($J_{C,P}$ = 7.1, 6.8 Hz, OCH$_2$*C*H$_2$CN), 12.66 (*Me*-C(5)).

[0658] ^{31}P NMR (122 MHz, $CDCl_3$) δ 148.18, 147.80.

[0659] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{42}H_{52}O_8N_4P$ ($[M + H]^+$) 계산값 771.3517, 측정값 771.3517.

[0660] ***(3'S,5'R,7'R)-N^4-벤조일-1-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실}-5-메틸시토신 (40)***



38 40

[0661]

[0662] 건조 MeCN (5 mL) 중 뉴클레오시드 **38** (268 mg, 0.470 mmol) 용액에 BSA (0.28 mL, 1.13 mmol)를 0℃에서 적가한 다음 용액을 실온에서 밤새 교반한다. 또 다른 플라스크에서, MeCN (50 mL) 중 1,2,4-트리아졸 (1.14 g, 16.5 mmol) 현탁액을 0℃로 냉각시키고, $POCl_3$ (0.35 mL, 3.8 mmol)에 이어서 Et_3N (2.62 mL, 18.8 mmol)를 첨가한다. 현탁액을 0℃에서 30분 동안 교반한 다음, 시릴화된 화합물 **38**의 미리 준비된 용액을 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 7시간 동안 추가로 교반한다. 반응을 포화 $NaHCO_3$ (10 mL)의 첨가에 의해 켄칭하고, MeCN을 감압 하에 제거하며, 생성된 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석하여 DCM (3 × 30 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0663] 다음으로 미정제 산물을 1,4-디옥산 (10 mL) 및 농축된 NH_4OH (10 mL)의 혼합물에 용해시킨다. 실온에서 3시간 동안 교반한 이후에, 혼합물을 진공으로 절반의 부피로 감소시키고, 포화 $NaHCO_3$ (25 mL)로 희석하여 DCM (4 × 30 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다.

[0664] 다음으로 미정제 산물을 건조 DMF (10 mL)에 용해시킨다. Et_3N (80 μL, 0.56 mmol)에 이어서 Bz_2O (266 mg, 1.18 mmol)를 실온에서 첨가하고, 용액을 밤새 교반한다. 생성된 갈색을 띤 용액을 포화 $NaHCO_3$ (40 mL)를 가만히 첨가하여 켄칭하고, DCM (4 × 40 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 1 : 1, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **40** (263 mg, 83%)을 수득한다.

[0665] 40의 데이타: R_f = 0.53 (EtOAc/헥산 3 : 1):

[0666] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 13.11 (*br*, 1H, N*H*), 8.30 - 8.10 (m, 2H, H-arom), 7.47 - 7.29 (m, 5H, H-arom), 7.28 - 7.06 (m, 7H, H-arom), 7.00 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, H-C(6)), 6.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, H-arom), 5.89 (dd, *J* = 6.3, 4.6 Hz, 1H, H-C(1')), 4.61 (dd, *J* = 7.2, 4.5 Hz, 1H, H-C(4')), 4.33 - 4.20 (m, 1H, H-C(5')), 3.87 (*br*, 1H, H-C(7')), 3.69 (s, 6H, *Me*O), 2.32 - 2.13 (m, 2H, H-C(3'), O*H*), 1.99 (s, 3H, *Me*-C(5)), 1.87 - 1.73 (m, 2H, H-C(2'), H-C(6')), 1.66 - 1.47 (m, 2H, H-C(2'), H-C(6')).

[0667] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 179.61 (*C*ONH), 159.76 (C(4)), 158.74 (MeO-*C*-arom), 147.87 (C(2)), 145.47 (C-arom), 137.17 (C(6)), 136.77, 136.68, 136.03 (C-arom), 132.55, 130.21, 129.98, 128.34, 128.21, 128.03, 127.07, 113.35 (CH-arom), 111.81 (C(5)), 88.74 (*C*$(Ph)_3$), 87.13 (C(1')), 86.12 (C(4')), 78.17 (C(7')), 73.31 (C(5')), 55.35 (*Me*O-DMTr), 48.63 (C(3')), 40.35 (C(6')), 38.06 (C(2')), 13.78 (*Me*-C(5)).

[0668] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{40}H_{40}O_7N_3$ ($[M + H]^+$) 계산값 674.2861, 측정값 674.2877.

[0669] ***(3'S,5'R,7'R)-N4-벤조일-1-{5'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실}-5-메틸시토신 (41)***



40 41

[0670]

[0671] 건조 DCM (8 mL) 중 뉴클레오시드 **40** (250 mg, 0.371 mmol) 및 5-(에틸티티오)-1H-테트라졸 (73 mg, 0.56 mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N,N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (0.20 mL, 0.63 mmol)를 실온에서 적가한다. 30분 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 DCM (30 mL)으로 희석시키고, 포화 $NaHCO_3$ (2 × 20 mL) 및 포화 NaCl (20 mL)로 세척한다. 수용성 상을 조합하고, DCM (20 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 1 : 1, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **41** (260 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 80%)을 수득한다.

[0672] 41의 데이타: R_f = 0.57 (EtOAc/헥산 1 : 1):

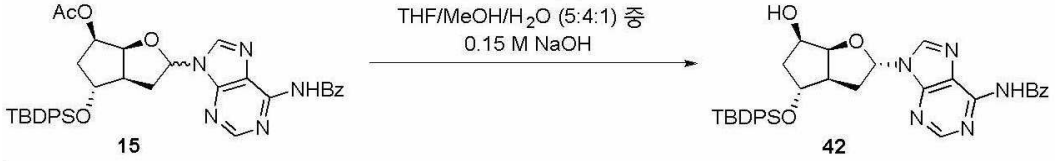
[0673] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 13.26 (*br*, 1H, N*H*), 8.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-arom), 7.58 - 7.39 (m, 5H, H-arom), 7.38 - 7.14 (m, 8H, H-arom, H-C(6)), 6.88 - 6.77 (m, 4H, H-arom), 6.01, 5.96 (2dd, *J* = 6.3, 4.6 Hz, 1H, H-C(1')), 4.82, 4.74 (2dd, *J* = 7.3, 4.3 Hz, 1H, H-C(4')), 4.42 (td, *J* = 10.6, 6.0 Hz, 1H, H-C(5')), 3.97 (*br*, 1H, H-C(7')), 3.91 - 3.68 (m, 8H, *Me*O, OC*H*$_2$CH$_2$CN), 3.59 (dtd, *J* = 16.7, 6.7, 3.4 Hz, 2H, (Me$_2$C*H*)$_2$N)), 2.62 (dt, *J* = 15.5, 6.4 Hz, 2H, OCH$_2$C*H*$_2$CN), 2.49 - 2.23 (m, 1H, H-C(3')), 2.11, 2.09 (2d, *J* = 0.5 Hz, 3H, *Me*-C(5)), 2.00 - 1.82 (m, 2H, H-C(6'), H-C(2')), 1.82 - 1.55 (m, 2H, H-C(6'), H-C(2')), 1.17 (dd, *J* = 16.3, 6.8 Hz, 12H, (*Me*$_2$CH)$_2$N).

[0674] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 179.60 (*C*ONH), 159.97 (C(4)), 158.76 (MeO-*C*-arom), 147.81, 147.70 (C(2)), 145.54 (C-arom), 137.34, 136.83 (C(6)), 136.77, 136.72, 136.65, 136.55 (C-arom), 132.45, 130.22, 130.20, 129.96, 128.34, 128.31, 128.18, 128.00, 127.04 (CH-arom), 117.89, 117.71 (OCH$_2$CH$_2$*C*N), 113.35 (CH-arom), 111.60, 111.36 (C(5)), 89.24, 89.01 (*C*(Ph)$_3$), 87.16, 87.12 (C(1')), 85.78, 85.62 ($J_{C,P}$ = 4.3, 3.2 Hz, C(4')), 78.20, 77.98 (C(7')), 74.68, 74.37 ($J_{C,P}$ = 13.4, 18.2 Hz, C(5')), 58.70, 58.44 ($J_{C,P}$ = 18.5, 20.0 Hz, (O*C*H$_2$CH$_2$CN)), 55.36, 55.33 (*Me*O-DMTr), 48.65, 48.44 (C(3')), 43.27, 43.14 ($J_{C,P}$ = 12.4, 12.3 Hz (Me$_2$C*H*)$_2$N), 39.87, 39.64 ($J_{C,P}$ = 3.4, 3.7 Hz (C(6')), 38.30, 38.22 (C(2')), 24.80, 24.72, 24.70, 24.67, 24.63 (*Me*$_2$CH)$_2$N), 20.39, 20.37 ($J_{C,P}$ = 7.2, 6.8 Hz, OCH$_2$*C*H$_2$CN), 13.72 (*Me*-C(5)).

[0675] ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 148.18, 147.96.

[0676] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{49}H_{57}O_8N_5P$ ([M + H]$^+$) 계산값 874.3939, 측정값 874.3946.

[0677] ***(3'R,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-β-D-리보퓨라노실}아데닌 (42)***



15 42

[0678]

[0679] 뉴클레오시드 **15** (1.74 g, 2.64 mmol)를 0℃에서 THF/메탄올/H_2O (5:4:1, 80 mL) 중 0.15 M NaOH에 용해시킨다. 반응을 20분 동안 교반하고, NH_4Cl (1.06 g)의 첨가에 의해 켄칭한다. 다음으로 용매를 감압 하에 제거하고, 생성물을 CC (DCM 중 5% 이소프로판올)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **42** (α-아노머, 836 mg, 51%) 및

16 (β-아노머, 287 mg, 18%)를 수득한다.

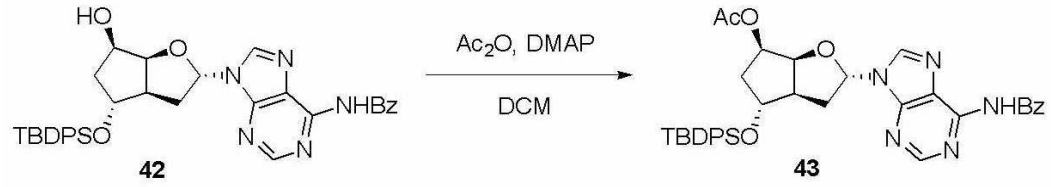
[0680] 42의 데이타: R_f = 0.35 (DCM 중 5% MeOH):

[0681] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.34 (s, 1H, N*H*), 8.71 (s, 1H, H-C(2)), 8.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-arom)), 7.92 (s, 1H, H-C(8)), 7.68 - 7.58 (m, 4H, H-arom), 7.58 - 7.31 (m, 9H, H-arom), 6.23 (dd, *J* = 6.7, 2.4 Hz, 1H, H-C(1')), 4.74 (dd, *J* = 6.6, 4.9 Hz, 1H, H-C(4')), 4.49 (dt, *J* = 12.5, 6.3 Hz, 1H, H-C(5')), 4.10 (*br*, 1H, H-C(7')), 3.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, O*H*), 2.92 (dd, *J* = 15.4, 7.3 Hz, 1H, H-C(3')), 2.52 - 2.35 (m, 1H, H-C(2')), 2.10 - 1.97 (m, 1H, H-C(6')), 1.94 - 1.77 (m, 2H, H-C(2'), H-C(6')), 1.06 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0682] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.98 (*C*ONH), 152.65 (C(2)), 151.31 (C(4)), 149.69 (C(6)), 140.93 (C(8)), 135.74 (CH-arom), 133.82, 133.68, 133.39 (C-arom), 132.77, 130.02, 129.98, 128.76, 128.06, 127.87, 127.85 (CH-arom), 123.38 (C(5)), 87.16 (C(1')), 85.35 (C(4')), 77.40 (C(7')), 72.79 (C(5')), 50.63 (C(3')), 40.86 (C(6')), 37.25 (C(2')), 26.94 ((CH_3)$_3$-C-Si), 19.05 ((CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0683] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{35}H_{38}O_4N_5Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 620.2688, 측정값 620.2671.

[0684] ***(3'R,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{5'-O-아세틸-7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-α-D-리보퓨라노실} 아데닌 (43)***

[0685] 

42 43

[0686] 건조 DCM (50 mL) 중 뉴클레오시드 **42** (1.09 g, 1.75 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (321 mg, 2.63 mmol) 용액에 아세트산 무수물 (0.83 mL, 8.8 mmol)을 0℃에서 첨가한다. 밤새 교반한 이후에, 반응을 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)의 첨가에 의해 켄칭한다. 상을 분리하고, 수용성 상을 DCM (2 × 80 mL)로 추가로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2.5% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **43** (1.04 g, 90%)를 수득한다.

[0687] 43의 데이타: R_f = 0.33 (EtOAc/헥산 4 : 1):

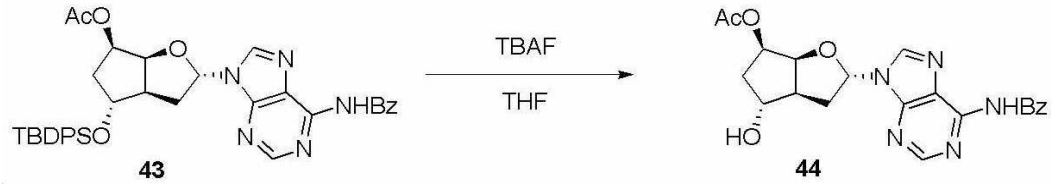
[0688] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.99 (*br*, 1H, N*H*), 8.73 (s, 1H, H-C(2)), 8.09 - 7.99 (m, 2H, H-arom), 7.98 (s, 1H, H-C(8)), 7.70 - 7.58 (m, 5H, H-arom), 7.57 - 7.48 (m, 2H, H-arom), 7.47 - 7.34 (m, 6H, H-arom), 6.22 (dd, *J* = 6.8, 3.2 Hz, 1H, H-C(1')), 5.45 - 5.35 (m, 1H, H-C(5')), 5.01 (dd, *J* = 6.7, 5.0 Hz, 1H, H-C(4')), 4.09 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-C(7')), 3.02 (dt, *J* = 9.5, 6.5 Hz, 1H, H-C(3')), 2.55 (ddd, *J* = 13.5, 10.0, 3.2 Hz, 1H, H-C(2')), 2.15 (dd, *J* = 13.2, 6.2 Hz, 1H, H-C(6')), 2.09 (s, 3H, *Me*CO_2), 2.01 (dt, *J* = 8.0, 3.5 Hz, 1H, H-C(2')), 1.88 (dt, *J* = 13.6, 5.3 Hz, 1H, H-C(6')), 1.08 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0689] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.61 (Me*C*O_2), 164.75 (*C*ONH), 152.67 (C(2)), 151.37 (C(4)), 149.64 (C(6)), 141.41 (C(8)), 135.85 (CH-arom), 133.71, 133.38 (C-arom), 132.91, 130.15, 130.10, 128.99, 128.02, 127.99, 127.97 (CH-arom), 123.64 (C(5)), 87.37 (C(1')), 83.37 (C(4')), 76.63 (C(7')), 74.51 (C(5')), 51.19 (C(3')), 37.44 (C(2')), 37.32 (C(6')), 27.01 ((CH_3)$_3$-C-Si), 21.08 (*Me*CO_2), 19.14 ((CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0690] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{37}H_{40}O_5N_5Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 662.2793, 측정값 662.2787.

[0691] ***(3'S,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{5'-O-아세틸-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-α-D-리보퓨라노실} 아데***

닌 (44)

[0692] 

[0693] 건조 THF (50 mL) 중 뉴클레오시드 **43** (990 mg, 1.50 mmol)을 TBAF (THF 중 1 M, 3.0 mL, 3.0 mmol)를 실온에서 첨가한다. 실온에서 3.5시간 동안 교반한 이후에, 용액을 EtOAc (30 mL)로 희석하고, THF를 감압 하에 제거한다. 다음으로 반응물을 포화 $NaHCO_3$ (50 mL)로 희석시키고, DCM (4 × 50 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 6% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 미량의 TBAF를 포함하는 **44** (570 mg, 90%)를 수득한다.

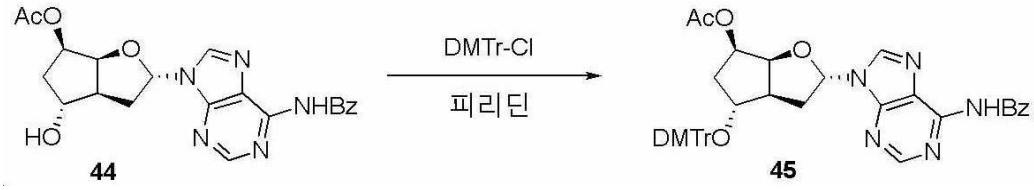
[0694] **44**의 데이터: R_f = 0.33 (DCM 중 10% MeOH):

[0695] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.60 (*br*, 1H, N*H*), 8.67 (s, 1H, H-C(2)), 8.09 (s, 1H, H-C(8)), 7.96 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-arom), 7.51 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-arom), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-arom), 6.33 (dd, *J* = 6.7, 3.1 Hz, 1H, H-C(1')), 5.25 (ddd, *J* = 9.7, 6.4, 5.3 Hz, 1H, H-C(5')), 4.92 (dd, *J* = 6.4, 5.4 Hz, 1H, H-C(1')), 4.14 (*br*, 2H, H-C(7'), O*H*), 3.06 (dd, *J* = 16.0, 6.6 Hz, 1H, H-C(3')), 2.87 (ddd, *J* = 13.2, 9.9, 3.0 Hz, 1H, H-C(2')), 2.26 - 2.17 (m, 1H, H-C2')), 2.10 - 1.98 (m, 5H, H-C(6'), *Me*CO_2).

[0696] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.64 (Me*C*O_2), 165.27 (*C*ONH), 152.49 (C(2)), 151.26 (C(4)), 149.58 (C(6)), 141.64 (C(8)), 133.60 (C-arom), 132.82, 128.76, 128.06 (CH-arom), 123.30 (C(5)), 87.30 (C(1')), 83.17 (C(4')), 74.67 (C(7')), 74.20 (C(5')), 50.41 (C(3')), 37.43 (C(2')), 36.92 (C(6')), 20.96 (*Me*CO_2).

[0697] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{21}H_{22}O_5N_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 424.1615, 측정값 424.1623.

[0698] ***(3'S,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{5'-O-아세틸-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'- O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실} 아데닌 (45)***

[0699] 

[0700] 건조 피리딘 (16 mL) 중 뉴클레오시드 **44** (570 mg, 1.35 mmol) 용액에 DMTr-Cl (1.37 g, 4.04 mmol)를 실온에서 첨가한다. 용액을 1일 동안 교반한 다음, 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 80 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 노란색 거품으로서 **45** (876 mg, 89%)를 수득한다.

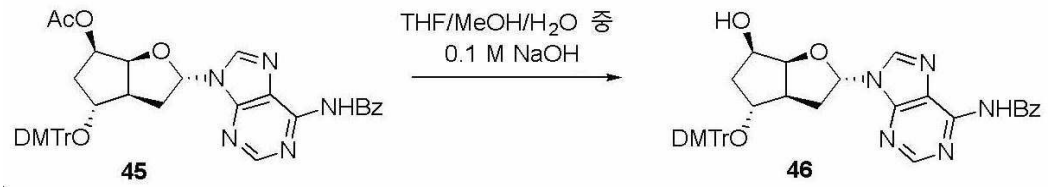
[0701] **45**의 데이터: R_f = 0.81 (DCM 중 5% MeOH):

[0702] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.42 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H, N*H*), 8.73 (s, 1H, H-C(2)), 8.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-arom), 7.93 (s, 1H, H-C(8)), 7.66 - 7.55 (m, 1H, H-arom), 7.55 - 7.45 (m, 4H, H-arom), 7.45 - 7.22 (m, 7H, H-arom), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, H-arom), 6.25 (dd, *J* = 6.6, 2.4 Hz, 1H, H-C(1')), 5.47 - 5.33 (m, 1H, H-C(5')), 4.89 (dd, *J* = 6.7, 4.9 Hz, 1H, H-C(4')), 4.02 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-C(7')), 3.79 (s, 6H, *Me*O), 2.58 (dd, *J* = 16.0, 6.9 Hz, 1H, H-C(3')), 2.38 (ddd, *J* = 12.7, 10.0, 2.4 Hz, 1H, H-C(2')), 2.11 (s, 3H, *Me*CO_2), 2.09 - 1.87 (m, 3H, H-C(2'), H-C(6')).

[0703] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 170.40 ($MeCO_2$), 164.84 (*C*ONH), 158.66 (MeO-*C*-arom), 152.45 (C(2)), 151.22 (C(4)), 149.51 (C(6)), 145.23 (C-arom), 141.23 (C(8)), 136.51, 133.65 (C-arom), 132.68, 130.12, 128.75, 128.33, 127.95, 127.90, 127.03 (CH-arom), 123.55 (C(5)), 113.27 (CH-arom), 87.19 ($C(Ph)_3$), 87.12 (C(1')), 83.25 (C(4')), 77.16 (C(7')), 74.41 (C(5')), 55.23 (*Me*O-DMTr), 49.23 (C(3')), 37.61 (C(2')), 36.22 (C(6')), 20.98 ($MeCO_2$).

[0704] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{42}H_{40}O_7N_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 726.2922, 측정값 726.2905.

[0705] ***(3'S,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'- O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실} 아데닌 (46)***

[0706] 

[0707] 뉴클레오시드 **45** (870 mg, 1.20 mmol)를 THF/메탄올/H_2O (5:4:1, 50 mL) 중 0.1 M NaOH에 0℃에서 용해시킨다. 반응을 0℃에서 30분 동안 교반한 다음, NH_4Cl (321 mg)의 첨가에 의해 켄칭한다. 용액을 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)로 희석시키고, DCM (4 × 80 mL)로.추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **46** (777 mg, 94%)를 수득한다.

[0708] **46**의 데이타: R_f = 0.26 (DCM 중 5% MeOH):

[0709] ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.39 (s, 1H, N*H*), 8.61 (s, 1H, H-C(2)), 7.93 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-arom), 7.75 (s, 1H, H-C(8)), 7.46 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-arom), 7.40 - 7.31 (m, 4H, H-arom), 7.29 - 7.16 (m, 6H, H-arom), 7.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-arom), 6.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, H-arom), 6.12 (dd, *J* = 6.5, 1.9 Hz, 1H, H-C(1')), 4.53 (dd, *J* = 7.5, 4.5 Hz, 1H, H-C(4')), 4.32 (*br*, 1H, H-C(5')), 3.90 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-C(7')), 3.66, 3.65 (2s, 6H, *Me*O), 3.31 (*br*, 1H, O*H*), 2.36 (dd, *J* = 16.5, 8.1 Hz, 1H, H-C(3')), 2.04 (ddd, *J* = 12.0, 9.9, 2.0 Hz, 1H, H-C(2')), 1.92 - 1.69 (m, 3H, H-C(2'), H-C(6')).

[0710] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.92 (*C*ONH), 158.64 (MeO-*C*-arom), 152.60 (C(2)), 151.28 (C(4)), 149.61 (C(6)), 145.44 (C-arom), 140.71 (C(8)), 136.77, 133.65 (C-arom), 132.72, 130.15, 130.12, 128.73, 128.39, 128.04, 127.96, 127.02 (CH-arom), 123.27 (C(5)), 113.28 (CH-arom), 87.11 (C(1')), 87.01 ($C(Ph)_3$), 85.60 (C(4')), 78.16 (C(7')), 72.72 (C(5')), 55.28 (*Me*O-DMTr), 48.89 (C(3')), 39.93 (C(6')), 37.55 (C(2')).

[0711] ESI^+-HRMS *m/z* $C_{40}H_{38}O_6N_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 684.2817, 측정값 684.2800.

[0712] ***(3'S,5'R,7'R)-N^6-벤조일-9-{5'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실} 아데닌 (47)***

[0713] 

[0714] 건조 DCM (7 mL) 중 뉴클레오시드 **46** (199 mg, 0.290 mmol) 및 5-(에틸티티오)-1H-테트라졸 (57 mg, 0.44

mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (0.16 mL, 0.49 mmol)를 실온에서 적가한다. 60분 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (20 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 20 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **47** (197 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 77%)을 수득한다.

[0715] **47**의 데이터: R_f = 0.75 (DCM 중 5% MeOH):

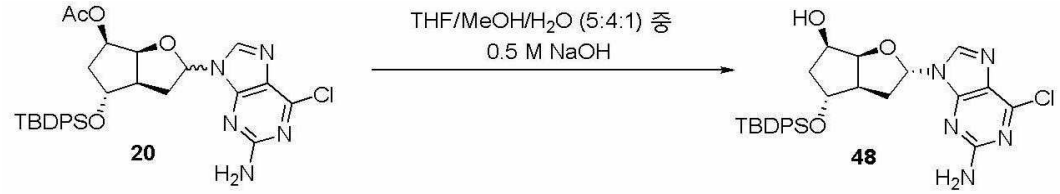
[0716] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.98 (*br*, 1H, N*H*), 8.68, 8.67 (2s, 1H, C(2)), 7.94 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-arom), 7.90, 7.84 (2s, 1H, C(8)), 7.56 - 7.49 (m, 1H, H-arom), 7.48 - 7.34 (m, 4H, H-arom), 7.30 - 7.10 (m, 7H, H-arom), 6.80 - 6.69 (m, 4H, Harom), 6.21, 6.15 (2dd, *J* = 6.8, 2.2 Hz, 1H, H-C(1')), 4.69, 4.59 (2dd, *J* = 7.3, 4.5 Hz, 1H, H-C(4')), 4.44 (tt, *J* = 12.3, 6.3 Hz, 1H, H-C(5')), 3.90 (dd, *J* = 9.0, 3.8 Hz, 1H, H-C(5')), 3.82 - 3.63 (m, 8H, *Me*O, OC*H*$_2$CH$_2$CN), 3.59 - 3.43 (m, 2H, (Me$_2$C*H*)$_2$N), 2.61 - 2.49 (m, 2H, OCH$_2$C*H*$_2$CN), 2.47 - 2.07 (m, 2H, H-C(3'), H-C(2')), 1.98 - 1.66 (m, 3H, H-C(2'), H-C(6')), 1.15 - 1.03 (m, 12H, (*Me*$_2$CH)$_2$N).

[0717] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 164.67 (*C*ONH), 158.77 (MeO-*C*-arom), 152.58 (C(2)), 151.34, 151.29 (C(4)), 149.46 (C(6)), 145.55, 145.54 (C-arom), 141.58, 141.50 (C(8)), 136.87, 136.85, 136.84, 133.85 (C-arom), 132.85, 130.26, 130.23, 130.20, 128.97, 128.47, 128.43, 128.02, 127.96, 127.08 (CH-arom), 123.62, 123.58 (C(5)), 117.91, 117.70 (OCH$_2$CH$_2$*C*N), 113.37 (CH-arom), 87.80, 87.67 (C(1')), 87.20, 87.14 (*C*(Ph)$_3$), 85.29, 85.22 ($J_{C,P}$ = 4.2, 3.1 Hz, C(4')), 78.16, 77.96 (C(7')), 74.28, 73.98 ($J_{C,P}$ = 14.8, 18.4 Hz, C(5')), 58.80, 58.61 ($J_{C,P}$ = 16.2, 17.3 Hz O*C*H$_2$CH$_2$CN), 55.37, 55.35 (*Me*O-DMTr), 49.02, 48.91 (C(3')), 43.29, 43.16 ($J_{C,P}$ = 8.9, 9.0 Hz, ((Me$_2$*C*H)$_2$N), 39.09 (C(6')), 37.99, 37.95 (C(2')), 24.82, 24.77, 24.74, 24.70, 24.64 ((*Me*$_2$CH)$_2$N), 20.43, 20.42 ($J_{C,P}$ = 1.4, 1.9 Hz, OCH$_2$*C*H$_2$CN).

[0718] ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 148.14, 148.11.

[0719] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{45}H_{56}O_7N_8P$ ([M + H]$^+$) 계산값 884.3895, 측정값 884.3904.

[0720] ***(3'R,5'R,7'R)-2-아미노-6-클로로-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-α-D-리보퓨라노실} 퓨린 (48)***

[0721] 

[0722] 뉴클레오시드 **20** (1.78 g, 3.01 mmol)을 THF/메탄올/H_2O (5:4:1, 15 mL) 중 0.5 M NaOH에 0℃에서 용해시킨다. 반응을 0℃에서 20분 동안 교반하고, NH_4Cl (484 mg)의 첨가에 의해 켄칭한다. 다음으로 현탁액을 포화 $NaHCO_3$ (100 mL)을 희석시키고, DCM (4 × 75 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **48** (α-아노머, 992 mg, 60%) 및 **21** (β-아노머, 428 mg, 25%)을 수득한다.

[0723] **48**의 데이터: R_f = 0.34 (DCM 중 5% MeOH):

[0724] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.71 - 7.60 (m, 5H, H-arom, H-(C(8)), 7.49 - 7.34 (m, 6H, H-arom), 6.08 (dd, *J* = 6.9, 2.6 Hz, 1H, H-C(1')), 5.26 (s, 2H, N*H*$_2$), 4.70 (dd, *J* = 7.5, 4.8 Hz, 1H, H-C(4')), 4.47 (dt, *J* = 10.0, 5.1 Hz, 1H, H-C(5')), 4.11 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H, H-C(7')), 2.87 (dd, *J* = 16.5, 7.7 Hz, 1H, H-C(3')), 2.57 (*br*, 1H, O*H*), 2.27 (ddd, *J* = 14.0, 9.9, 2.6 Hz, 1H, H-C(2')), 2.10 - 2.01 (m, 1H, H-

C(6')), 1.92 - 1.76 (m, 2H, H-C(2'), H-C(6')), 1.06 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0725] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 159.09 (C(2)), 153.05 (C(4)), 151.46 (C(6)), 139.91 (C(8)), 135.71 (CH-arom), 133.96, 133.27 (C-arom), 130.00, 129.96, 127.86, 127.83 (CH-arom), 125.52 (C(5)), 86.46 (C(1')), 84.92 (C(4')), 77.40 (C(7')), 72.63 (C(5')), 50.55 (C(3')), 40.92 (C(6')), 36.78 (C(2')), 26.88 ((CH_3)$_3$-C-Si), 19.01 ((CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0726] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{28}H_{33}O_3N_5ClSi$ ($[M + H]^+$) 계산값 550.2036, 측정값 550.2019.

[0727] ***(3'R,5'R,7'R)-9-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-α-D-리보퓨라노실} 구아닌 (49)***

[0728] 

[0729] 건조 DCM (15 mL) 중 뉴클레오시드 **48** (610 mg, 1.03 mmol) 용액에 3-하이드록시프로피오니트릴 (0.28 mL, 4.12 mmol)에 이어서 1,5,7-트리아자이중고리[4.4.0]덱-5-엔 (287 mg, 2.06 mmol)을 실온에서 첨가한다. 실온에서 4시간의 교반 이후에, 3-하이드록시프로피오니트릴 (0.28 mL, 3.23 mmol)에 이어진 1,5,7-트리아자이중고리[4.4.0]덱-5-엔 (287 mg, 2.06 mmol)의 제 2 분량을 첨가한다. 반응을 2일 동안 추가로 교반한 다음, CC (DCM 중 10% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **49** (500 mg, 87%)를 수득한다.

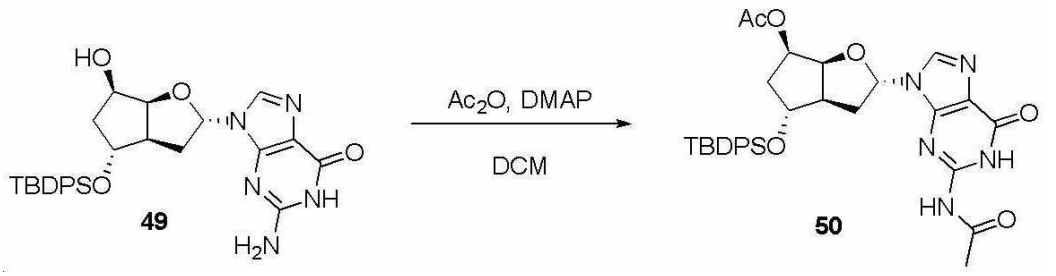
[0730] **49**의 데이타: R_f = 0.30 (DCM 중 10% MeOH):

[0731] ^{1}H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.73 - 7.61 (m, 5H, H-arom, H-C(8)), 7.53 - 7.32 (m, 6H, H-arom), 6.06 (dd, *J* = 6.9, 3.7 Hz, 1H, H-C(1')), 4.74 (dd, *J* = 7.0, 4.6 Hz, 1H, H-C(4')), 4.46 - 4.36 (m, 1H, H-C(5')), 4.11 (*br*, 1H, H-C(7')), 2.91 (dd, *J* = 16.2, 6.6 Hz, 1H, H-C(3')), 2.31 (ddd, *J* = 13.8, 10.0, 3.7 Hz, 1H, H-C(2')), 1.98 - 1.78 (m, 3H, H-C(2'), H-C(3')), 1.07 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0732] ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 159.30 (C(2)), 155.14 (C(6)), 152.38 (C(4)), 137.28 (C(8)), 136.93, 136.88 (CH-arom), 135.13, 134.78 (C-arom), 131.07, 131.06, 128.91, 128.89 (CH-arom), 117.98 (C(5)), 87.72 (C(1')), 86.25 (C(4')), 79.21, (C(7')) 73.87 (C(5')), 52.13 (C(3')), 41.44 (C(6')), 38.35 (C(2')), 27.42 ((CH_3)$_3$-C-Si), 19.82 ((CH_3)$_3$-*C*-Si)).

[0733] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{28}H_{34}O_4N_5Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 532.2386, 측정값 532.2367.

[0734] ***(3'R,5'R,7'R)-N2-아세틸-9-{5'-O-아세틸-7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-α-D-리보퓨라노실} 구아닌 (50)***

[0735] 

[0736] 건조 DCM (15 mL) 중 뉴클레오시드 **49** (500 mg, 0.940 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (276 mg, 2.4 mmol) 용액에 아세트산 무수물 (1.0 mL, 10.3 mmol)을 실온에서 첨가한다. 2일 동안 교반한 이후에, 반응을 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)의 첨가에 의해 켄칭한다. 다음으로 반응물을 DCM (3 × 30 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상

을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 5% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **50** (441 mg, 76%)을 수득한다.

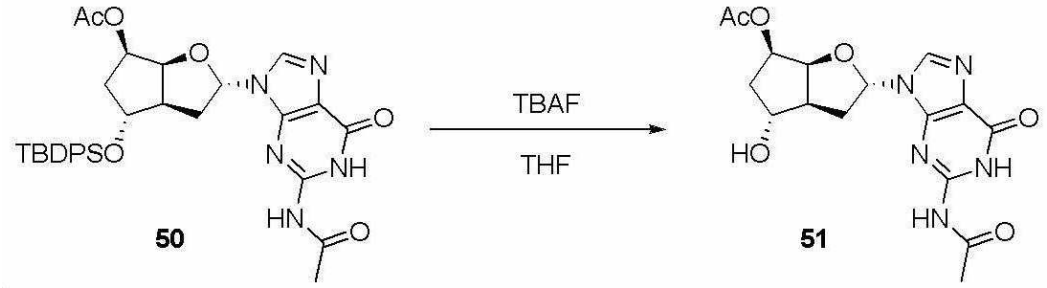
[0737] **50**의 데이타: R_f = 0.62 (DCM 중 10% MeOH):

[0738] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 12.11 (*br*, 1H, N*H*-C(4)), 9.94 (*br*, 1H, H-N(1)), 7.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 5H, H-arom, H-C(8)), 7.46 - 7.31 (m, 6H, H-arom), 6.03 (dd, *J* = 6.7, 2.7 Hz, 1H, H-C(1')), 5.31 (dt, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 1H, H-(C5')), 4.99 - 4.81 (m, 1H, H-C(4')), 4.02 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-C(7')), 2.88 (dd, *J* = 16.0, 6.6 Hz, 1H, H-C(3')), 2.44 - 2.20 (m, 4H, *Me*CONH, H-C(2')), 2.12 - 1.73 (m, 6H, *Me*CO_2, H-C(6'), H-C(2')), 1.04 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0739] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 172.73 (Me*C*ONH), 170.46 (Me*C*O_2), 155.87 (C(6)), 148.09 (C(4)), 147.47 (C(2)), 137.13 (C(8)), 135.74 (CH-arom), 133.62, 133.29 (C-arom), 130.13, 130.09, 127.96, 127.93 (CH-arom), 121.54 (C(5)), 86.47 (C(1')), 82.81 (C(4')), 76.60 (C(7')), 74.37 (C(5')), 51.23 (C(3')), 37.04, 37.01, (C(2'), C(6')) 26.92 ((*C*H_3)$_3$-C-Si), 24.46 (*Me*CONH), 21.00 (*Me*CO_2), 19.05 ((CH$_3$)$_3$-*C*-Si).

[0740] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{32}H_{38}O_6N_5Si$ ($[M + H]^+$) 계산값 616.2586, 측정값 616.2580.

[0741] ***(3'S,5'R,7'R)- N^2-아세틸-9-{5'-O-아세틸-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-α-D-리보퓨라노실} 구아닌 (51)***



[0742]

[0743] 건조 THF (5 mL) 중 뉴클레오시드 **50** (440 mg, 0.714 mmol) 용액에 TBAF (THF 중 1 M, 1.1 mL, 1.1 mmol)을 실온에서 첨가한다. 용액을 실온에서 4시간 동안 교반한 다음, 직접적으로 CC (DCM 중 13% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **51** (235 mg, 87%)을 수득한다. X-선 분석에 적합한 결정을 H_2O/MeOH의 혼합물로부터 재결정화에 의해 획득한다.

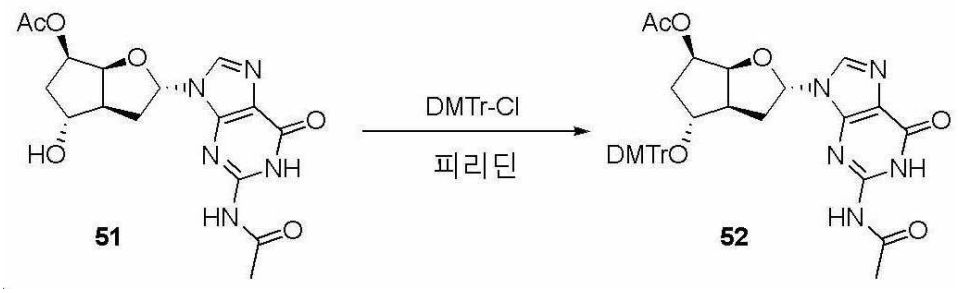
[0744] **51**의 데이타: R_f = 0.25 (DCM 중 13% MeOH):

[0745] ^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.03 (s, 1H, H-C(8)), 6.28 (dd, *J* = 7.0, 3.8 Hz, 1H, H-C(1')), 5.21 (ddd, *J* = 9.2, 6.8, 5.1 Hz, 1H, H-C(5')), 4.98 (dd, *J* = 6.7, 5.0 Hz, 1H, H-(4')), 4.13 - 4.05 (m, 1H, H-C(7')), 3.17 - 3.05 (m, 1H, H-C(3')), 2.86 (ddd, *J* = 13.8, 10.0, 3.8 Hz, 1H, H-C(2')), 2.39 - 2.27 (m, 1H, H-C(2')), 2.24 (s, 3H, *Me*CONH), 2.16 - 2.00 (m, 5H, *Me*CO_2, H-C(6')).

[0746] ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 174.95 (Me*C*ONH), 172.32 (Me*C*O_2), 157.50 (C(6)), 149.96 (C(4)), 149.38 (C(2)), 139.66 (C(8)), 121.76 (C(5)), 88.23 (C(1')), 84.23 (C(4')), 75.83 (C(5'), C(7')), 51.65 (C(3')), 38.04, 37.93 (C(2'), C(6')), 23.83 (*Me*CONH), 20.71 (*Me*CO_2).

[0747] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{16}H_{20}O_6N_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 378.1408, 측정값 378.1419.

[0748] ***(3'S,5'R,7'R)- N^2-아세틸-9-{5'-O-아세틸-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'- O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실} 구아닌 (52)***



[0749]

[0750] 건조 피리딘 (10 mL) 중 뉴클레오시드 **51** (186 mg, 0.492 mmol) 용액에 DMTr-Cl (501 mg, 1.48 mmol)를 실온에서 첨가한다. 용액을 2일 동안 교반한 다음 포화 $NaHCO_3$ (40 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 30 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 노란색 거품으로서 **52** (333 mg, 99%)를 수득한다.

[0751] **52**의 데이타: R_f = 0.56 (DCM 중 10% MeOH):

[0752] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 12.05 (*br*, 1H, N*H*-C(4)), 9.90 (*br*, 1H, H-N(1)), 7.40 (s, 1H, H-C(8)), 7.38 - 7.31 (m, 2H, H-arom), 7.28 - 7.08 (m, 7H, H-arom), 6.75 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 4H, H-arom), 5.95 - 5.85 (m, 1H, H-C(1')), 5.30 - 5.10 (m, 1H, H-C(5')), 4.70 - 4.58 (m, 1H, H-C(4')), 3.81 (*br*, 1H, H-C(7')), 3.68, 3.68 (2s, 6H, *Me*O), 2.25 - 2.07 (m, 5H, *Me*CONH, H-C(3'), H-C(2')), 1.96 - 1.79 (m, 5H, $MeCO_2$, H-C(2'), H-C(6')), 1.74 - 1.59 (m, 1H, H-C(6')).

[0753] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 172.65 (Me*C*ONH), 170.42 (Me*C*O_2), 158.73, 158.70 (MeO-*C*-arom), 155.86 (C(6)), 147.96 (C(4)), 147.43 (C(2)), 145.31 (C-arom), 137.17 (C(8)), 136.69, 136.44 (C-arom), 130.32, 130.21, 128.29, 128.05, 127.09 (CH-arom), 121.53 (C(5)), 113.38, 113.35 (CH-arom), 87.25 (*C*$(Ph)_3$), 86.73 (C(1')), 82.77 (C(4')), 77.19 (C(7')), 74.37 (C(5')), 55.38 (*Me*O-DMTr), 49.28 (C(3')), 37.25 (C(2')), 36.06 (C(6')), 24.40 (*Me*CONH), 21.01 (*Me*CO_2).

[0754] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{37}H_{38}O_8N_5$ ($[M + H]^+$) 계산값 680.2715, 측정값 680.2718

[0755] ***(3'S,5'R,7'R)-N2-(N,N-디메틸포름아미디노)-9-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실} 구아닌 (53)***



[0756]

[0757] 건조 MeOH (10 mL) 중 뉴클레오시드 **52** (333 mg, 0.490 mmol) 용액에 K_2CO_3 (305 mg, 2.20 mmol)를 실온에서 첨가한다. 현탁액을 실온에서 7시간 동안 교반한 다음 NH_4Cl (78 mg, 1.46 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 작은 SiO_2 패드를 통해 여과시킨다. SiO_2를 추가 MeOH로 세척한 다음 용매를 증발시킨다.

[0758] 미정제 산물을 건조 DMF (10 mL)에 용해시키고, N,N-디메틸포름아미드 디메틸 아세탈 (0.33 mL, 2.5 mmol)을 첨가한다. 용액을 55℃에서 2시간 동안 교반한 다음 용매를 감압 하에 제거한다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 7% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 미량의 Et_3N을 포함하는 **53** (245 mg, 77%)를 수득한다,

[0759] **53**의 데이타: R_f = 0.32 (DCM 중 12% MeOH):

[0760] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.75 (*br*, 1H, H-N(1)), 8.25 (s, 1H, NC*H*N(CH_3)$_2$), 7.37 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-arom), 7.29 - 7.08 (m, 8H, H-arom, H-C(8)), 6.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H, H-arom), 6.03 (dd, *J* = 6.7, 2.8 Hz, 1H, H-C(1')), 4.57 (dd, *J* = 7.5, 4.6 Hz, 1H, H-C(4')), 4.37 - 4.26 (m, 1H, H-C(5')), 3.89 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-C(7')), 3.67, 3.67 (2s, 6H, *Me*O), 3.24 (*br*, 1H, O*H*), 2.94 (s, 3H, NCHN(C*H*$_3$)$_2$), 2.87 (s, 3H, NCHN(C*H*$_3$)$_2$), 2.35 (dd, *J* = 15.9, 7.6 Hz, 1H, H-C(3')), 1.94 - 1.68 (m, 4H, H-C(2'), H-C(6')).

[0761] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.61 (MeO-*C*-arom), 158.28 (C(2)), 157.92 (N*C*HN(CH_3)$_2$), 156.69 (C(6)), 149.90 (C(4)), 145.52, 136.86, 136.77 (C-arom), 135.50 (C(8)), 130.15, 128.32, 127.92, 126.95 (CH-arom), 120.27 (C(5)), 113.24 (CH-arom), 86.92 (*C*(Ph)$_3$), 85.57 (C(1')), 85.12 (C(4')), 78.31 (C(7')), 72.69 (C(5')), 55.28 (*Me*O-DMTr), 49.28 (C(3')), 41.38 (NCHN(*C*H$_3$)$_2$), 39.77 (C(6')), 37.58 (C(2')), 35.04 (NCHN(*C*H$_3$)$_2$).

[0762] ESI^{+}-HRMS *m/z* $C_{36}H_{39}O_6N_6$ ([M + H]$^{+}$) 계산값 651.2926, 측정값 651.2921.

[0763] ***(3'S,5'R,7'R)-N^{2}-(N,N-디메틸포름아미디노)-9-{5'-O-[(2-시아노에톡시)-디이소프로필아미노포스파닐]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-O-[(4,4'-디메톡시트리페닐)메틸]-α-D-리보퓨라노실} 구아닌 (54)***

[0764] 

[0765] 건조 DCM (15 mL) 중 뉴클레오시드 **53** (245 mg, 0.377 mmol) 및 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (74 mg, 0.57 mmol) 용액에 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (0.20 mL, 0.64 mmol)를 실온에서 적가한다. 50분 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (25 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 25 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 3% MeOH, +0.5% Et_3N)에 의해 정제하고, 흰색 거품으로서 **54** (212 mg, 2개 이성질체의 혼합물, 67%)를 수득한다.

[0766] **54**의 데이타: R_f = 0.42 (DCM 중 7% MeOH):

[0767] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.35 (*br*, 1H, H-N(1)), 8.51, 8.49 (2s, 1H, NC*H*N(CH_3)$_2$), 7.41 - 7.10 (m, 10H, H-arom, H-C(8)), 6.83 - 6.70 (m, 4H, H-arom), 6.15 - 6.00 (m, 1H, H-C(1')), 4.64 - 4.36 (m, 2H, H-C(4'), H-C(5')), 3.90 - 3.82 (m, 1H, H-C(7')), 3.80 - 3.62 (m, 8H, *Me*O, OC*H*$_2$CH$_2$CN), 3.59 - 3.43 (m, 2H, (Me$_2$C*H*)$_2$N), 3.04, 3.02 (2s, 6H, NCHN(C*H*$_3$)$_2$), 2.67 - 2.48 (m, 2H, OCH$_2$C*H*$_2$CN), 2.32 (ddd, *J* = 24.1, 15.1, 6.7 Hz, 1H, H-C(3')), 2.02 - 1.63 (m, 4H, H-C(2'), H-C(6')), 1.14 - 1.03 (m, 12H, (*Me*$_2$CH)$_2$N).

[0768] ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 158.76 (MeO-*C*-arom), 158.17, 158.12 (C(2)), 158.03 (N*C*HN(CH_3)$_2$), 156.66, 156.59 (C(6)), 149.85, 149.79 (C(4)), 145.51, 145.49 , 136.84, 136.77, 136.73, 136.71 (C-arom), 135.76, 135.59 (C(8)), 130.24, 130.20, 128.41, 128.33, 128.02, 127.10, 127.08 (CH-arom), 120.74, 120.70 (C(5)), 117.98, 117.72 (OCH$_2$CH$_2$*C*N), 113.34 (CH-arom), 87.16, 87.10 (*C*(Ph)$_3$), 86.00, 85.72 (C(1')), 84.13, 84.10 ($J_{C,P}$ = 3.6, 2.5 Hz, C(4')), 78.02, 77.67 (C(7')), 74.15, 73.74 ($J_{C,P}$ = 15.3, 18.7 Hz, C(5')), 58.90, 58.67 ($J_{C,P}$ = 18.7, 19.7 Hz OC*H*$_2$CH$_2$CN), 55.38, 55.36 (*Me*O-DMTr), 49.20, 49.09 (C(3')), 43.20, 43.15 ($J_{C,P}$ = 12.4, 12.6 Hz, ((Me$_2$*C*H)$_2$N), 41.42, 41.38 (NCHN(*C*H$_3$)$_2$), 38.68, 38.65

(C(6')), 37.97, 37.84 (C(2')), 35.25 (NCHN(CH_3)$_2$), 24.83, 24.75, 24.68, 24.60, 24.53 ((Me_2CH)$_2$N), 20.35, 20.28 (OCH_2CH_2CN).

[0769] ^{31}P NMR (121 MHz, $CDCl_3$) δ 148.21, 148.01.

[0770] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{45}H_{56}O_7N_8P$ ([M + H]$^+$) 계산값 851.4004, 측정값 851.4013.

[0771] ***(3aR,4R,6R,6aS)-4-((터르-부틸디페닐시릴)옥시)-2-메톡시헥사하이드로-2H-고리펜타[b]퓨란-6-일 (4-니트로벤조에이트) (55)***

[0772] 

6 55

[0773] 건조 DCM (10 mL) 중 당 **6** (195 mg, 0.437 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (70 mg, 0.568 mmol) 용액에 4-니트로벤조일 염화물 (158 mg, 0.850 mmol)을 실온에서 첨가한다. 밤새 교반한 이후에, 반응을 포화 $NaHCO_3$ (3 mL)을 천천히 첨가하여 켄칭한다. 다음으로 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (15 mL)로 희석시키고, DCM (3 × 15 mL)으로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (EtOAc/헥산 1 : 5)에 의해 정제하고, 흰색 고체로서 아노머 비율 α/β ≈ 4 : 1의 **55** (260 mg, 98%)를 수득한다.

[0774] **55**의 데이타: R_f = 0.62 (EtOAc/헥산 1 : 2):

[0775] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.33 - 8.17 (m, 4H, H-arom), 7.72 - 7.61 (m, 4H, H-arom), 7.51 - 7.32 (m, 6H, H-arom), 5.65 - 5.47 (m, 1H, H-C(6)), 4.97 (dd, *J* = 9.2, 5.6 Hz, 1H, H-C(2)), 4.87 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H-C(6a)), 4.18 (d, *J* = 5.0 Hz, 0.2H, H-C(4)), 3.98 (d, *J* = 3.5 Hz, 0.8H, H-C(4)), 3.21 (d, *J* = 15.1 Hz, 3H, *Me*O), 2.88 (dd, *J* = 16.6, 7.9 Hz, 0.8H, H-C(3a)), 2.75 - 2.62 (m, 0.2H, H-C(3a)), 2.49 - 2.34 (m, 0.2H, H-C(5)), 2.24 - 1.83 (m, 2.8H, H-(5), H-C(3)), 1.28 (ddd, *J* = 13.0, 7.9, 4.9 Hz, 1H, H-C(3)), 1.09 (s, 9H, (CH_3)$_3$-C-Si).

[0776] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.46, 164.41 (CO_2R), 150.63 (O_2N-*C*-arom), 135.87, 135.82 (CH-arom), 134.07, 133.75, 133.69 (CH-arom), 130.98, 130.89, 129.98, 129.96, 129.91, 127.89, 127.87, 127.85, 123.59 (CH-arom), 106.49, 106.39 (C(2)), 83.21, 79.87 (C(6a)), 76.54 (C(4)), 76.09 (C(6)), 54.55, 54.47 (*Me*O), 51.69, 50.30 (C(3a), 38.07 (C(3)), 37.17, 36.65 (C(5)), 27.04, 26.99 90 ((CH_3)$_3$-C-Si), 19.14 ((CH_3)$_3$-*C*-Si).

[0777] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{31}H_{35}O_7NaSi$ ([M + Na]$^+$) 계산값 584.2075, 측정값 584.2085.

[0778] ***(3'R,5'R,7'R)-1-{7'-[(터르-부틸디페닐시릴)옥시]-2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-5'-O-(4-니트로벤조에이트)-α,β-D-리보퓨라노실} 티민 (56)***

[0779] 

55 56

[0780] 건조 MeCN (3 mL) 중 당 **55** (260 mg, 0.463 mmol) 및 티민 (84 mg, 0.695 mmol) 용액에 BSA (0.34 mL, 1.4 mmol)를 실온에서 적가한다. 실온에서 30분 동안 교반한 이후에, 용액을 0℃로 냉각시키고, TMSOTf (0.10 mL,

1.3 mmol)를 적가한다. 0℃에서 2시간 동안 및 실온에서 18시간 동안 추가로 교반한 이후에, 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (30 mL)로 희석시키고, DCM (4 × 40 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 2% MeOH)에 의해 정제하고, 흰색 고체로서 아노머 비율 α/β ≈ 88 : 12의 혼합물 **56** (240 mg, 79%)을 수득한다.

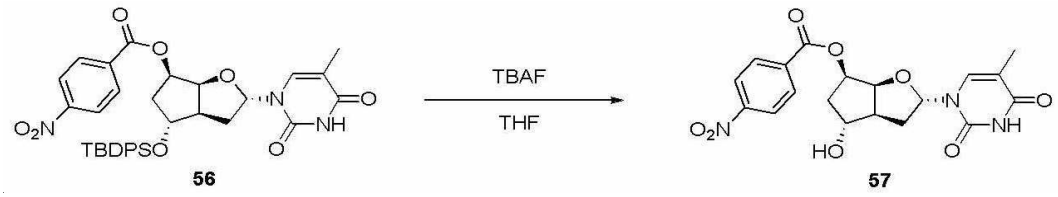
[0781] **56**의 데이타: R_f = 0.56 (DCM + 3% MeOH):

[0782] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.38 (*br*, 1H, (s, 1H, H-N(3)), 8.32 - 8.23 (m, 2H, H-arom), 8.22 - 8.11 (m, 2H, H-arom), 7.65 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 4H, H-arom), 7.50 - 7.36 (m, 6H, H-arom), 6.95 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-C(6)), 5.96 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-C(1')), 5.55 (dt, *J* = 9.9, 6.0 Hz, 1H, H-C(5')), 5.13 (dd, *J* = 6.4, 5.4 Hz, 1H, H-C(4')), 4.20 - 4.05 (m, 1H, H-C(7')), 2.94 - 2.78 (m, 1H, H-C(3')), 2.22 (dd, *J* = 13.3, 6.4 Hz, 1H, H-C(6')), 2.09 - 1.73 (m, 6H, H-C(6'), H-C(2'), *Me*-C(5)), 1.09 (s, 9H, $(CH_3)_3$-C-Si).

[0783] ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.32, 163.79 (C(4), CO_2R), 150.65, 150.39 (O_2N-*C*-arom, C(2)), 135.70, 135.68 (CH-arom), 135.13 (C-arom), 134.83 (C(6)), 133.46, 133.10 (C-arom), 130.91, 130.73, 130.11, 127.93, 123.60 (CH-arom), 111.30 (C(5)), 87.26 (C(1')), 82.44 (C(4')), 76.40 (C(7')), 76.07 (C(5')), 50.76 (C(3')), 37.94 (C(6')), 36.68 (C(2')), 26.89 ((CH_3)$_3$-C-Si), 19.03 ((CH_3)$_3$-*C*-Si), 12.62 (*Me*-C(5)).

[0784] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{35}H_{37}O_8N_3NaSi$ ($[M + Na]^+$) 계산값 678.2242, 측정값 678.2254.

[0785] ***(3'R,5'R,7'R)-1-{2',3'-디데옥시-3',5'-에타노-7'-하이드록시-5'-O-(4-니트로벤조일)-α,β-D-리보퓨라노실} 티민 (57)***

[0786] 

56 57

[0787] 건조 THF (2 mL) 중 뉴클레오시드 **56** (220 mg, 0.335 mmol) 용액에 TBAF (THF 중 1 M, 0.84 mL, 0.84 mmol)를 실온에서 첨가한다. 실온에서 4시간 동안 교반한 이후에, 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (20 mL)로 희석시키고, EtOAc (3 × 20 mL) 및 DCM (2 × 80 mL)로 추출한다. 조합된 유기상을 MgSO4 위에서 건조시키고, 여과하여 증발시킨다. 미정제 산물을 CC (DCM 중 5% MeOH)에 의해 정제하고, 아노머 혼합물 **57** (101 mg, 72%)을 수득한다. X-선 분석에 적합한 결정을 EtOAc에서 재결정화에 의해 획득한다.

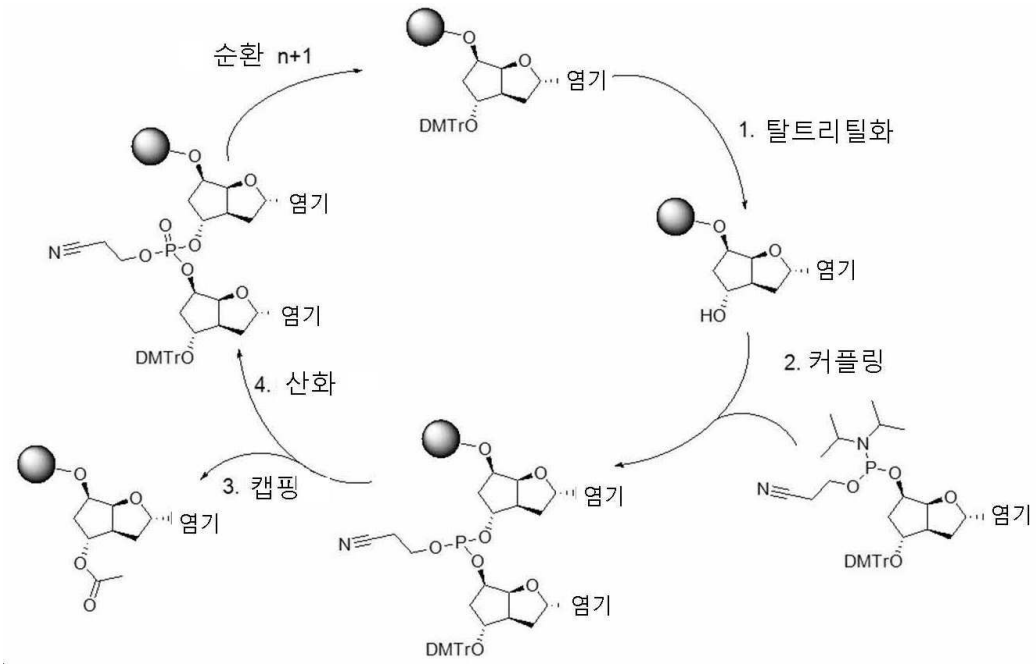
[0788] **57**의 데이타: R_f = 0.50 (DCM +7% MeOH):

[0789] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.96 (*br*, 1H, H-N(3)), 8.34 - 8.17 (m, 4H, H-arom), 7.07 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-C(6)), 6.11 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-C(1')), 5.57 - 5.45 (m, 1H, H-C(5')), 5.15 (dd, *J* = 6.6, 5.4 Hz, 1H, H-C(4')), 4.38 - 4.23 (m, 1H, H-C(7')), 2.96 (dd, *J* = 13.5, 6.9 Hz, 1H, H-C(3')), 2.26 (ddd, *J* = 13.1, 10.3, 5.4 Hz, 4H, H-C(2'), H-C(6')), 1.91 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, *Me*-C(5)).

[0790] ESI$^+$-HRMS *m/z* $C_{19}H_{19}O_8N_3Na$ ($[M + Na]^+$) 계산값 440.1064, 측정값 440.1072.

[0791] **알파 아노머 올리고뉴클레오티드 합성, 탈보호 및 정제 방법**

[0792] 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 적어도 2개의 알파 아노머 이중고리-DNA (abc-DNA) 잔기를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 당해 기술분야에 잘 공지되고, 본원에 하기 기술된 방법에 따라 합성기, 예를 들면 파마시아-유전자-어셈블러-플러스 DNA 합성기 상에서 합성될 수 있다. 본 발명의 abc-DNA 올리고뉴클레오티드의 합성 단계는 하기에 나타낸다.



[0793]

[0794] 올리고뉴클레오티드 합성은 유전자 에셈블러 제조사가 추천하는 프로토콜에 따라, 파마시아-유전자-에셈블러-플러스 DNA 합성기 상에서 1.3 μmol 규모로 수행된다. 천연 DNA 포스포르아미다이트 (dT, dC4bz, dG2DMF, dA6Bz) 및 고체 지지물 (글렌 유니서포트 500)을 글렌 리서치사로부터 구입한다. 천연 DNA 포스포르아미다이트를 MeCN 중 0.1 M 용액으로 준비하고, 4분 단계를 사용하여 커플링시킨다. abc-DNA 포스포르아미다이트를 1,2-디클로로에탄 중 0.1 M 용액으로 준비하고, 5-(에틸티오)-1H-테트라졸 (MeCN 중 0.25 M)을 결합제로서 사용한 연장된 12분 단계를 사용하여 커플링시킨다. 변형된 뉴클레오시드의 탈트리틸화는 디클로로에탄 중 5% 디클로로아세트산 용액으로 수행된다. 산화는 MeCN/물/콜리딘 (32 : 3 : 15) 중 0.01 M 요오드 용액으로 1분의 반응 동안 수행된다. 황산화는 MeCN/피리딘 (1 : 1) 중 0.2 M 페닐아세틸 디설파이드 용액으로 3.5분의 반응 시간 동안 수행된다. 캡핑은 표준 조건으로 수행된다. 고체 지지물로부터의 절단 및 올리고뉴클레오티드의 탈보호는 농축된 암모니아로 55℃에서 16시간 동안 처리하여 달성된다. 원심분리 이후에, 상청액을 수집하고, 비드를 H_2O (0.5 mL ×2로 추가로 세척하고, 생성된 용액을 증발시켜 건조시킨다. 미정제 올리고뉴클레오티드를 이온 교환 HPLC (디오넥스 - DNAPac PA200)에 의해 정제한다. H_2O, pH 8.0 중 25 mM 트리즈마의 완충 용액을 이동상 "A"로서 사용하고, H_2O, pH 8.0 중 25 mM 트리즈마, 1.25 M NaCl을 이동상 "B"로서 사용한다. 포스포로티오에이트 가닥의 경우, H_2O, pH 12.0 중 10 mM NaOH의 완충 용액을 이동상 "A"로서 사용하고, H_2O, pH 12.0 중 10 mM NaOH, 2.50 M NaCl을 이동상 "B"로서 사용한다. 다음으로 정제된 올리고뉴클레오티드를 Sep-pak C-18 카트리지로 탈염시킨다. 농도는 나노드롭 분광광도계로 260 nm에서 흡광도를 측정하고, 상응하는 천연 DNA 올리고뉴클레오티드의 소멸 계수를 사용함으로써 결정된다. 올리고뉴클레오티드의 특성화는 ESI^- 질량 분광분석법 또는 LC-MS에 의해 수행된다.

[0795] **약제학적 조성물**

[0796] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 올리고뉴클레오티드 시료는 적합하게 제형화되고, 충분한 분량의 시료가 세포에 진입하도록 하는 임의의 수단에 의해 세포의 환경 내로 도입되어, 효과 예를 들면 엑손 스킵핑을 유도할 수 있다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 알부민 상에 미리 로딩되고, 올리고뉴클레오티드-알부민 복합체로서 투여된다. 올리고뉴클레오티드를 위한 많은 제형물이 당해 기술분야에 공지되어 있고, 올리고뉴클레오티드가 표적 세포에 진입하여 작용할 수 있는 한 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 제제는 포스페이트 완충된 식염수 용액, 리포좀, 미셀 구조 및 캡시드와 같은 완충 용액에서 제형화될 수 있다. 양이온성 지질을 갖는 올리고뉴클레오티드 제제의 제형물은 세포 내로 올리고뉴클레오티드 제제의 형질감염을 용이하게 하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 리포펙틴과 같은 양이온성 지질 (미국 특허 5,705,188), 양이온성 글리세롤 유도체 및 폴리라이신과 같은 다중양이온성 분자 (공개된 PCT 국제출원 WO 97/30731)가 사용될 수 있다. 적합한 지질은 올리고펙타민, 리포펙타민 (라이프 테크놀로지사), NC388 (리보자임 제약사, Boulder, Colo.) 또는 FuGene 6 (로슈사)을 포함

하고, 이들 모두는 제조사의 지침에 따라 사용될 수 있다.

[0797] 이러한 조성물은 전형적으로 핵산 분자 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 본원에 사용된 바, 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 약제학적 투여에 적격한 식염수, 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 보조 활성 화합물도 역시 조성물 내로 혼입될 수 있다.

[0798] 약제학적 조성물은 이의 의도된 경로의 투여에 적격하도록 제형화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예로 정맥내, 피부내, 피내, 경구, 비강내, 경피 (국소적), 점막내, 경막내, 뇌실내, 복강내 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피부내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음의 성분을 포함할 수 있다: 주사용 물, 식염수 용액, 고정된 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 벤조일 알코올 또는 미틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 소듐 비설파이트와 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이팅제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충액; 및 염화나트륨 또는 덱스트로스와 같은 긴장성 조정제. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산 또는 염기로 조정될 수 있다. 비경구 조제물은 유리 또는 플라스틱으로 제작된 앰플, 일회용 주사기 또는 다회용 용량 바이알에 동봉될 수 있다.

[0799] 주사가능한 용도에 적합한 약제학적 조성물은 무균 수용성 용액 (물 용해성) 또는 분산제 및 무균 주사가능한 용액 또는 분산제의 즉석 조제를 위한 무균 분말을 포함한다. 정맥내 투여에 적합한 담체는 생리학적 식염수, 균증식억제 물, 크레모포 EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J.) 또는 포스페이트 완충된 식염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 반드시 무균이어야 하고, 용이한 주사 능력이 존재할 정도로 유체이어야 한다. 이것은 제조 및 보관 조건 하에 안정해야 하고, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대항하여 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들면 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들면 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산제의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티머로잘 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 조성물에는 등장제 예를 들면 당, 만니톨, 소르비톨과 같은 폴리알코올 및 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함함으로써 유도될 수 있다.

[0800] 무균 주사가능한 용액은 활성 화합물을 적절한 용매에서 필요한 양으로 필요한 경우 상기 열거된 성분의 하나 또는 조합으로 혼입하고, 이어서 여과 멸균화에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산제는 활성 화합물을 무균 운반체 내로 혼입함으로써 제조되고, 이는 기본 분산 매질 및 상기 열거된 성분으로부터의 필요한 기타 성분을 포함한다. 무균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 이의 미리 멸균 여과된 용액으로부터의 활성 성분의 분말에 더하여 임의의 추가적인 원하는 성분을 수득하는 진공 건조화 및 동결 건조화이다.

[0801] 경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료제 투여의 목적으로, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 정제, 트로키 또는 캡슐, 예로 젤라틴 캡슐의 형태로 사용된다. 경구 조성물은 또한 구강 세척제로서 사용되는 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 약제학적으로 적합한 결합제 및/또는 아쥬반트 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐 및 트로키 등은 다음 중 임의의 성분 또는 유사한 특성의 화합물을 포함할 수 있다: 미세결정 셀룰로우스, 검 트라가칸스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 전분 또는 락토우스와 같은 부형제; 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분과 같은 붕해제; 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로트와 같은 활택제; 콜로이드성 이산화 실리콘과 같은 글리던트; 슈크로스 또는 사카린과 같은 감미제; 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향과 같은 향미제.

[0802] 흡입에 의한 투여의 경우, 화합물은 압박된 용기로부터의 에어로졸 분사, 적합한 추진제, 예로 이산화탄소와 같은 기체를 포함하는 분사기 또는 분무기의 형태로 전달될 수 있다. 이러한 방법은 미국 특허 6,468,798에 기술된 방법을 포함한다.

[0803] 또한 전신 투여는 경점막 또는 경피적 수단에 의할 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 투과될 장벽에 적절한 침투제가 투여에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면 경점막 투여를 위한 세제, 담즙산 및 퓨시드산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 코 스프레이 또는 좌약의 사용을 통해 달성될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 당해 기술분야에 일반적으로 공지된 바와 같이 연고, 고약, 젤 또는 크림으로 제형화된다.

[0804] 또한 본 발명은 건조 분말 전달 방법을 제공한다.

[0805] 또한 화합물은 직장 전달을 위한 좌약 (예로, 코코아 버터 및 다른 글리세라이드와 같은 통상적인 좌약 베이스를 갖음) 또는 관장약의 형태로 제조될 수 있다.

[0806] 또한, 화합물은 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용한 형질감염 또는 감염에 의해 투여될 수 있고, 이는 McCaffrey et al. (2002), Nature, 418(6893), 38-9 (유체역학 형질감염); Xia et al. (2002), Nature Biotechnol., 20(10), 1006-10 (바이러스-매개된 전달); 또는 Putnam (1996), Am. J. Health Syst. Pharm. 53(2), 151-160, 잘못된 표기 Am. J. Health Syst. Pharm. 53(3), 325 (1996)에 기술된 방법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0807] 또한 화합물은 DNA 백신과 같은 핵산 제제의 투여에 적합한 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 이들 방법은 유전자 총, 바이오 주사기 및 피부 패치, 뿐만 아니라 미국 특허 6,194,389에 개시된 미세입자 DNA 백신 기술학과 같은 무-바늘 방법 및 미국 특허 6,168,587에 개시된 바와 같은 분말 형태의 백신으로의 포유류 경피적 무-바늘 백신접종을 포함한다. 추가적으로, 비강내 전달은 특히 Hamajima et al. (1998), Clin. Immunol. Immunopathol., 88(2), 205-10에 기술된 바와 같이 가능하다. 또한 리포좀 (예로, 미국 특허 6,472,375에 기술된 바와 같음) 및 미세피막화도 사용될 수 있다. 생분해성 표적화가능한 미세입자 전달 시스템도 역시 사용될 수 있다 (예로, 미국 특허 6,471,996에 기술된 바와 같음).

[0808] 일 구현예에서, 활성 화합물은 방출이 제어되는 제형물과 같은, 신체로부터 신속한 제거에 대항하여 화합물을 보호할 담체로 제조되고, 이는 이식물 및 미세피막화된 전달 시스템을 포함한다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성 생체적격한 중합체가 사용될 수 있다. 또한 물질을 알자사 및 노바 제약사로부터 구입할 수 있다. 또한 리포좀 현탁액 (바이러스성 항원에 대한 단일클론 항체로 감염된 세포를 표적하는 리포좀을 포함함)은 약제학적으로 허용가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 예를 들면 미국 특허 4,522,811에 기술된 바와 같이, 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0809] 이러한 화합물의 독성 및 치료 효능은, 예로 LD_{50} (집단 중 50%의 치사 용량) 및 ED_{50} (집단 중 50%의 치료적 유효 용량)을 결정하기 위해, 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 및 치료 효과 사이의 용량 비율이 치료 인덱스이고, 비율 LD_{50}/ED_{50}로서 표현될 수 있다. 높은 치료 인덱스를 나타내는 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있는 한편, 감염되지 않은 세포에 대한 잠재적인 손상을 최소화하고, 이로써 부작용을 감소시키기 위하여 이러한 화합물이 침범된 조직 부위에 표적하는 전달 시스템을 설계하도록 주의를 기울여야 한다.

[0810] 세포 배양 검정법 및 동물 연구로부터 획득된 데이타는 인간에게 사용되는 용량 범위를 제형화하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 용량은 바람직하게 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED_{50}를 포함하는 순환하는 농도 범위 내에 속한다. 용량은 채용된 용량 형태 및 이용된 투여 경로에 의존하여 이러한 범위 내에서 변할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용된 임의의 화합물의 경우, 치료적 유효 용량은 처음에 세포 배양 검정법으로부터 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양물에서 결정된 바와 같이 IC_{50} (예로, 증상의 최대 절반 억제를 달성하는 테스트 화합물의 농도)을 포함하는 순환하는 혈장 농도 범위를 달성하도록 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에게 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장의 수준은, 예를 들면 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0811] 본원에 정의된 바와 같이, 핵산 분자의 치료적 유효량 (예로, 유효 용량)은 선택된 핵산에 의존한다. 예를 들면, 대략 1 pg 내지 1000 mg 범위의 단일 용량의 양이 투여될 수 있고, 일부 구현예에서, 10, 30, 100 또는 1000 pg, 또는 10, 30, 100 또는 1000 ng, 또는 10, 30, 100 또는 1000 μg, 또는 10, 30, 100 또는 1000 mg이 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 1 g 내지 5 g의 조성물이 투여될 수 있다. 조성물은 매일 1회 이상부터 매주 1회 이상까지, 2일마다 1회 또는 매월 1회 이상을 포함하여 투여될 수 있다. 당업자라면 질환 또는 장애의 중증도, 이전의 치료, 대상체의 일반 건강 및/또는 연령 및 기타 기존 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는 특정 요인이 대상체를 효과적으로 치료하는데 요구되는 용량 및 시간대에 영향을 미칠 수 있는 점을 이해할 것이다. 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오티드의 치료적 유효량으로 대상체의 치료는 단일한 치료를 포함할 수 있고, 바람직하게는 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0812] 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드의 용량은 5 mg/kg/주 내지 500 mg/kg/주, 예를 들면 5

mg/kg/주, 10 mg/kg/주, 15 mg/kg/주, 20 mg/kg/주, 25 mg/kg/주, 30 mg/kg/주, 35 mg/kg/주, 40 mg/kg/주, 45 mg/kg/주, 50 mg/kg/주, 55 mg/kg/주, 60 mg/kg/주, 65 mg/kg/주, 70 mg/kg/주, 75 mg/kg/주, 80 mg/kg/주, 85 mg/kg/주, 90 mg/kg/주, 95 mg/kg/주, 100 mg/kg/주, 150 mg/kg/주, 200 mg/kg/주, 250 mg/kg/주, 300 mg/kg/주, 350 mg/kg/주, 400 mg/kg/주, 450 mg/kg/주 및 500 mg/kg/주의 범위이다. 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드의 용량은 10 mg/kg/주 내지 200 mg/kg/주, 20 mg/kg/주 내지 150 mg/kg/주 또는 25 mg/kg/주 내지 100 mg/kg/주의 범위이다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 매주 1회 2주 내지 6개월의 기간 동안, 예를 들면 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 26주, 6개월, 8개월, 10개월 또는 1년 이상 동안 투여된다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 매주 2회 투여된다. 다른 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 격주로 투여된다. 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 정맥내 투여된다.

[0813] 올리고뉴클레오티드 제제를 세포의 환경 내로 도입하는 방법이 세포의 유형 및 이의 환경 조성에 의존할 것임을 이해할 수 있다. 예를 들면, 세포가 액체 내에서 발견될 때, 하나의 바람직한 제형물은 리포펙타민과 같은 액체 제형물을 갖고, 올리고뉴클레오티드 제제는 세포의 액체 환경에 직접 첨가될 수 있다. 또한 액체 제형물은 동물에게, 예컨대 정맥내, 근육내 또는 복강내 주사에 의해 또는 경구로 또는 흡입 또는 당해 기술분야에 공지된 다른 방법에 의해 투여될 수 있다. 제형물이 포유류와 같은 동물, 보다 구체적으로 인간에게 투여에 적합할 때, 제형물은 또한 약제학적으로 허용가능하다. 올리고뉴클레오티드를 투여하기 위한 약제학적으로 허용가능한 제형물은 공지되어 있고, 사용될 수 있다. 일부 경우에, 올리고뉴클레오티드 제제를 완충액 또는 식염수 용액에서 제형화하고, 제형화된 올리고뉴클레오티드 제제를 난자를 사용한 연구와 같이 세포 내로 직접 주사하는 것이 바람직할 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 직접 주사도 또한 시행될 수 있다.

[0814] 적합한 양의 올리고뉴클레오티드 제제가 도입되어야 하고, 이들 양은 표준 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 전형적으로, 세포 환경에서 개별 올리고뉴클레오티드 제제 종의 유효 농도는 약 50 나노몰 이하, 10 나노몰 이하, 또는 약 1 나모몰 이하의 농도가 사용될 수 있는 조성물일 것이다. 또 다른 구현예에서, 약 200 피코몰 이하의 농도 및 심지어 약 50 피코몰 이하, 약 20 피코몰 이하, 약 10 피코몰 이하 또는 약 5 피코몰 이하의 농도를 사용하는 방법이 많은 상황에서 사용될 수 있다.

[0815] 본 방법은, 단 올리고뉴클레오티드 제제 조성물이 세포에 진입하여 충분한 양의 올리고뉴클레오티드 제제가 이의 효과를 발휘하도록 제형화되면, 세포가 살 수 있는 임의의 세포외 기질에 올리고뉴클레오티드 제제 조성물을 첨가하여 수행될 수 있다. 예를 들면, 방법은 액체 배양물 또는 세포 성장 배지와 같은 액체, 조직 이식물 또는 포유류와 같은 동물, 특히 인간을 포함한 전체 유기체에 존재하는 세포로 사용하는데 순응적이다.

[0816] 올리고뉴클레오티드 제제는 약학적 유효량의 올리고뉴클레오티드 제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있다. 약학적 또는 치료적 유효량은 의도된 약학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생성하는데 효과적인 올리고뉴클레오티드 제제의 양을 말한다. 용어 "약학적 유효량" 및 "치료적 유효량" 또는 단순하게 "유효량"은 의도된 약학적, 치료적 또는 예방적 결과를 생성하는데 효과적인 올리고뉴클레오티드의 양을 말한다. 예를 들면, 질환 또는 장애와 관련된 측정가능한 파라미터가 적어도 20% 감소할 때 주어진 임상 치료가 효과적인 것으로 고려하면, 해당 질환 또는 장애의 치료를 위한 약물의 치료적 유효량은 해당 파라미터가 적어도 20% 감소의 효과를 발휘하는데 필요한 양이다.

[0817] 본 발명의 적합하게 제형화된 약제학적 조성물은 당해 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해, 예컨대 정맥내, 근육내, 복강내, 피하, 경피, 기도 (에어로졸), 직장, 질 및 국소 (볼 및 설하를 포함함) 투여를 포함하는 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 정맥내 또는 복강내 주입 또는 주사에 의해 투여된다.

[0818] 일반적으로, 올리고뉴클레오티드의 적합한 용량 단위는 매일 수여자의 체중 킬로그램 당 0.001 내지 0.25 mg의 범위, 또는 매일 체중 킬로그램 당 0.01 내지 20 μg의 범위, 또는 매일 체중 킬로그램 당 0.01 내지 10 μg의 범위, 또는 매일 체중 킬로그램 당 0.10 내지 5 μg의 범위, 또는 매일 체중 킬로그램 당 0.1 내지 2.5 μg의 범위일 것이다. 특정 구현예에서, 용량은 매일 0.1 mg/kg 체중 내지 매일 5 mg/kg 체중의 범위, 예를 들면 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 및 5 mg/kg 체중이다. 올리고뉴클레오티드를 포함하는 약제학적 조성물은 매일 1회 투여될 수 있다. 그러나, 치료제는 하루에 걸쳐 적절한 간격으로 투여되는 2회, 3회, 4회, 5회 또는 6회 이상의 하위-용량을 포함하는 용량 단위로 투약될 수도 있다. 해당 경우에, 각각의 하위-용량에 포함되는 올리고뉴클레오티드는 총 매일 용량 단위를 달성하기 위하여 상응하게 더 적어져야 한다. 또한, 용량 단위는 수일 동안 단일 용량을 위해, 예로 수일 기간 동안 올리고뉴클레오티드의 지속적이고

일관된 방출을 제공하는 통상적인 서방성 제형물을 사용하여 조제될 수 있다. 서방성 제형물은 당해 기술분야에 잘 공지되어 있다. 이러한 구현예에서, 용량 단위는 상응하는 다수의 매일 용량을 포함한다. 제형물과 상관없이, 약제학적 조성물은 예를 들면 치료되는 동물 또는 인간에서 엑손 스킵핑을 유발하거나, 표적 유전자의 발현을 억제하도록 활성이 충분한 정량으로 올리고뉴클레오티드를 포함해야 한다. 조성물은 다수의 올리고뉴클레오티드 단위의 합계가 다함께 충분한 용량을 포함하는 방식으로 조제될 수 있다.

[0819] 데이타가 세포 배양 검정법 및 동물 연구로부터 획득되어 인간에게 적합한 용량 범위를 제형화할 수 있다. 본 발명의 조성물의 용량은 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED_{50}를 포함하는 순환하는 농도 범위 (공지된 방법에 의해 결정됨) 내에 속한다. 용량은 채용된 용량 형태 및 이용된 투여 경로에 의존하여 이러한 범위 내에서 변할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용된 임의의 화합물의 경우, 치료적 유효 용량은 처음에 세포 배양 검정법으로부터 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양물에서 결정된 바와 같이 IC_{50} (예로, 증상의 최대 절반 억제를 달성하는 테스트 화합물의 농도)을 포함하는 화합물의 순환하는 혈장 농도 범위를 달성하도록 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에게 유용한 용량을 더욱 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장에서 올리고뉴클레오티드의 수준은 표준 방법에 의해, 예를 들면 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0820] 약제학적 조성물은 투여를 위한 지침과 함께 키트, 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

[0821] **치료 방법**

[0822] 본 발명은 표적 RNA의 발현 및/또는 이러한 표적 RNA의 존재에 의해 전체적 또는 부분적 유발성 질환 또는 장애의 위험이 있는 (또는 이에 취약한) 대상체를 치료하는 예방 및 치료 방법 둘 다를 제공한다.

[0823] 본원에 사용된 바 "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 장애, 질환 또는 장애의 증상, 또는 질환 또는 장애로 향하는 성향을 갖는 환자에게, 질환 또는 장애, 질환 또는 장애의 증상, 또는 질환으로 향하는 성향을 치료하거나, 치유하거나, 완화하거나, 경감시키거나, 변경하거나, 교정하거나, 개선하거나, 향상시키거나, 영향을 미칠 목적을 갖고, 치료제 (예로, 올리고뉴클레오티드 제제 또는 이를 인코딩하는 벡터 또는 트랜스유전자)의 적용 또는 투여, 또는 환자로부터 단리된 조직 또는 세포주로 치료제의 적용 또는 투여로서 정의된다.

[0824] 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서 상기에 기술된 바와 같은 질환 또는 장애를 예방하는 방법으로서, 대상체에게 치료제 (예로, 올리고뉴클레오티드 제제 또는 이를 인코딩하는 벡터 또는 트랜스유전자)를 투여하는 것에 의하는, 방법을 제공한다. 질환의 위험이 있는 대상체는, 예를 들면 본원에 기술된 바와 같은 임의의 진단 또는 예후 판정 검정법 또는 이의 조합에 의해 식별될 수 있다. 예방제의 투여는, 예로 대상체에서 바이러스성 입자의 검출 또는 질환 또는 장애의 증상 특징의 발현 이전에 일어날 수 있어, 질환 또는 장애가 예방되거나, 대안적으로 이의 진행이 지연된다.

[0825] 본 발명의 또 다른 양태는 치료적으로 대상체를 처치하는 방법에 관한 것이고, 예로 질환 또는 장애의 증상 발병을 변경시킨다. 이들 방법은 *시험관내*에서 (예로, 올리고뉴클레오티드 제제와 함께 세포를 배양함으로써), 또는 대안적으로 *생체내*에서 (예로, 올리고뉴클레오티드 제제를 대상체에게 투여함으로써) 수행될 수 있다.

[0826] 치료의 예방 및 처치 방법 둘 다와 관련하여, 이러한 치료는 약리게놈학의 분야로부터 획득된 지식을 기초로 하여, 구체적으로 재단되거나 변형될 수 있다. 본원에 사용된 바, "약리게놈학"은 임상 개발 및 마켓의 약물에 게놈 기술학, 예컨대 유전자 서열 결정, 통계 유전학 및 유전자 발현 분석의 응용을 말한다. 보다 구체적으로, 용어는 환자의 유전자가 남성 또는 여성의 약물에 대한 반응 (예로, 환자의 "약물 반응 표현형" 또는 "약물 반응 유전형")을 결정하는 방식의 연구를 말한다. 약리게놈학은 임상의 또는 내과의가 치료로부터 가장 유익을 얻을 환자에게 예방적 또는 치료적 처치를 집중하고, 독성 약물-관련 부작용을 겪을 환자의 치료를 피하도록 한다.

[0827] 치료제는 적절한 동물 모델에서 시험될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 올리고뉴클레오티드 제제 (또는 이를 인코딩하는 발현 벡터 또는 트랜스유전자)는 동물 모델에서 제제를 사용한 치료의 효능, 독성 또는 부작용을 결정하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 치료제는 동물 모델에서 이러한 제제의 작용 메커니즘을 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 제제는 동물 모델에서 이러한 제제를 사용한 치료의 효능, 독성 또는 부작용을 결정하는데 사용될 수 있다. 대안적으로, 제제는 동물 모델에서 이러한 제제의 작용 메커니즘을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0828] 또한, abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 치료 효과는 근육 기능, 악력, 호흡 기능, MRI에 의한 심장 기능, 근육 생리학을 평가함으로써 결정된다. 또한 보체 활성화 및 혈액 응고는 올리고뉴클레오티드의

부정적인 역효과를 조사하도록 결정된다.

[0829] **질환**

[0830] 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 mRNA 또는 비-코딩 RNA의 비정상 수준을 기초로 하는 질환의 치료 또는 예방을 위해, 유전자 발현을 전사, 번역, 스플라이싱 및/또는 분해를 간섭함으로써 및/또는 비-코딩 RNA의 기능을 억제함으로써 조정하는데 유용하다. 대상체는 본 발명의 세포의 투여에 이후에, 질환의 하나 이상의 증상이 감소하거나 제거되면 질환에 대해 치료된 것으로 언급된다.

[0831] 본 발명의 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드는 표적 RNA의 수준 또는 활성을 조정할 수 있다. 표적 RNA의 수준 또는 활성은 당해 기술분야에 현재 공지되어 있거나 나중에 개발되는 임의의 적합한 방법에 의해 결정될 수 있다. 표적 RNA 및또는 표적 RNA의 발현을 측정하는데 사용된 방법이 표적 RNA의 특성에 의존할 수 있는 것으로 이해될 수 있다. 예를 들면, 표적 RNA가 단백질을 인코딩하면, 용어 "발현"은 단백질 또는 표적 RNA로부터 유래한 RNA/전사체를 말할 수 있다. 이러한 경우에, 표적 RNA의 발현은 표적 RNA에 상응하는 RNA 양을 측정함으로써 또는 단백질 산물의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 단백질은 단백질 검정법으로, 예컨대 염색 또는 면역블롯팅에 의해, 또는 단백질이 측정될 수 있는 반응을 촉매화하면 반응 속도를 측정함으로써 측정될 수 있다. 이러한 방법 모두는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 사용될 수 있다. 표적 RNA가 측정되는 곳에서, 당해 기술분야에 인식되어 있는 임의의 RNA 수준을 검출하는 방법이 사용될 수 있다 (예로, RT-PCR, 노던 블롯팅 등). 임의의 상기 측정은 세포, 세포 추출물, 조직, 조직 추출물 또는 임의의 다른 적합한 출처 재료 상에서 이루어질 수 있다.

[0832] 본 발명의 abc-DNA 지질 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드는 마이크로RNA의 발현 또는 mRNA 발현을 조정하는 다른 비-코딩 RNA를 조정하는데 사용된다.

[0833] 마이크로RNA는 유전자 발현의 전사후 조절을 안내하는 작은 비-코딩 RNA이고, 대략 20개 내지 25개 뉴클레오티드의 길이이다. 이들은 메신저 RNA의 3' 번역되지 않는 영역에 대한 서열-특이적 혼성화를 통해 다수 표적 유전자의 발현을 조절한다. 이들 마이크로RNA는 번역을 차단할 수 있거나, 이들은 표적 메신저 RNA의 직접적인 분해를 유도할 수 있다.

[0834] 관심있는 miRNA에 결합하는 본 발명의 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드는 합성된다. 이들 올리고뉴클레오티드는 miRNA에 결합하여 이들의 표적 mRNA에 대한 miRNA의 결합을 방해하도록 설계된다. abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드는 상기 예에서 기술된 바와 같이 *시험관내* 및 *생체내* miRNA 결합을 조정하는데 사용된다.

[0835] 긴 비-코딩 RNA (lncRNA)는 단백질을 인코딩하지 않는 (또는 > 100개 아미노산 오픈 리딩 프레임이 결여됨) 200개 이상의 뉴클레오티드 길이를 갖는 크고 다양한 부류의 전사된 RNA 분자이다. lncRNA는 유전자 발현의 중요한 조절인자이고, 세포 및 발생 과정에서 광범위한 기능을 갖는 것으로 생각된다. lncRNA는 다양한 범위의 메커니즘을 통하여 유전자 억제 및 유전자 활성화 둘 다를 수행할 수 있다. lncRNA의 입증된 기능으로 이들이 유전자 발현의 마스터 조절인자이고, 종종 크로마틴 구조를 조정함으로서 후생유전적 메커니즘을 통해 영향을 주는 것을 제시하고 있다.

[0836] 관심 있는 표적 lncRNA에 상보적인 본 발명의 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드는 합성된다. 핵에서, 이들은 표적화 lncRNA와 혼성화하여 헤테로이중체를 형성한다.

[0837] 본 발명은 듀첸 근육 디스트로피, 척수 근육 위축증 (SMN2 유전자에서 엑손 7번 포함), 근육 긴장성 디스트로피 (CAG_n을 갖는 표적 CUGexp-DMPK 전사체), 헌팅턴병 (CAG 삼중체 확장을 표적하는 대립유전자 선택적 및 비-선택적 접근), 근위축 측삭 경화증 (여러 원인 유전자를 갖는 유전적으로 불균질한 장애) 및 폼페병 (모든 백인 환자 중 절반 이상에서 발견되는 표적 스플라이스 돌연변이 c.-32 IVS1-13T>G)를 포함하나 이에 한정되지 않는 질환의 치료 또는 예방을 제공한다.

[0838] **서열**

[0839] 본 발명은 우선적으로 포스페이트 뉴클레오시드간 결합, 하나 이상의 링커 및 지질기를 갖는 임의의 abc-DNA 올리고뉴클레오티드를 제공한다. 서열은 임의의 표적에 대해 설계될 수 있다. 본 발명의 예시적인 abc-DNA 올리고뉴클레오티드의 서열은 하기에 제공된다.

[0840] 특정 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 10개 뉴클레오티드, 11개 뉴클레오티드, 12개 뉴클레오티드, 13개 뉴클

레오티드, 14개 뉴클레오티드, 15개 뉴클레오티드, 16개 뉴클레오티드, 17개 뉴클레오티드, 18개 뉴클레오티드, 19개 뉴클레오티드, 20개 뉴클레오티드 이상의 길이, 예를 들면 21개 내지 50개 뉴클레오티드, 예를 들면, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49개 및 50개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 14개 뉴클레오티드, 15개 뉴클레오티드, 16개 뉴클레오티드, 17개 뉴클레오티드, 18개 뉴클레오티드 또는 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 15개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 16개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 17개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 18개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 올리고뉴클레오티드는 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0841] *DMD 표적화 올리고뉴클레오티드*

[0842] 듀첸 근육 디스트로피 (DMD)는 3,500명의 신생 남아 중 1명을 침범하는 한편, 벡커 근육 디스트로피 (BMD)는 20,000명 중 1명을 침범한다. DMD 및 BMD 둘 다는 X 염색체 상에 위치하는 디스트로핀을 코딩하는 DMD 유전자의 돌연변이에 의해 유발된다. DMD 환자는 진행성 근육 약화로 고생하고, 13세 이전에 휠체어에 고정되며, 종종 수명 30세 이전에 죽는다. 일반적으로 BMD는 더 경미하고, 환자가 종종 40세 이상까지 걸음을 유지하며, DMD 환자와 비교하여 기대 수명이 더 길다.

[0843] 디스트로핀은 디스트로핀-당단백질 복합체 (DGC)의 필수 구성성분이다. 무엇보다도, DGC는 근육 섬유의 막 안정성을 유지시킨다. DMD 유전자의 프레임 변위 돌연변이는 근육 세포에서 디스트로핀 결핍을 유도하고, 이는 다른 DGC 단백질의 수준 감소로 동반되고, DMD 환자에서 발견되는 심각한 표현형을 유발시킨다. 리딩 프레임을 그대로 유지하는 DMD 유전자의 돌연변이는 더 작지만 부분적 기능성 디스트로핀을 생성하며, 덜 심각한 DMD 환자와 관련되어 있다. 듀첸 근육 디스트로피 (DMD) 환자에서, DMD 유전자의 프레임 변위 돌연변이는 프레임을 벗어난 mRNA를 생성하도록 유도하며, 절단된, 비-기능성 디스트로핀 단백질을 생성한다. 이러한 프레임이 맞는 성숙한 mRNA는 여전히 부분적 기능성인 프레임이 맞는 디스트로핀 단백질을 인코딩하고, 더 경미한 벡커 근육 디스트로피 (BMD) 표현형을 생성한다.

[0844] 특정 구현예에서 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 DMD 유전자의 부분, 예를 들면 엑손 51번, 엑손 53번 및 엑손 45번에 상보적이다.

[0845] **엑손 51번**

[0846] DMD 유전자의 엑손 51번의 서열 (서열번호 401)은 하기에 나타낸다.

[0847] ttttctttt tcttctttt tccttttgc aaaaacccaa aatattttag CTCCTACTCA GACTGTTACT CTGGTGACAC AACCTGTGGT TACTAAGGAA ACTGCCATCT CCAAACTAGA AATGCCATCT TCCTTGATGT TGGAGGTACC TGCTCTGGCA GATTTCAACC GGGCTTGGAC AGAACTTACC GACTGGCTTT CTCTGCTTGA TCAAGTTATA AAATCACAGA GGGTGATGGT GGGTGACCTT GAGGATATCA ACGAGATGAT CATCAAGCAG AAGgtatgag aaaaaatgat aaaagttggc agaagttttt ctttaaaatg aag

[0848] 강조된 부분의 해당하는 전사체 서열은

[0849] 5' CC AAA CTA GAA ATG CCA TCT TCC TTG ATG T 3' (서열번호 402)이다.

[0850] 본 발명에 따라 유용한 DMD 유전자의 엑손 51번에 상보적인 올리고뉴클레오티드는

[0851] 5' GG TTT GAT CTT TAC GGT AGA AGG AAC TAC A 7' (서열번호 403) 및 표 3에 제공된 올리고뉴클레오티드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

표 3 - 엑손 51 번

서열 (5′ 내지 7′)	서열번호
GGTTTGATCTTTACGGTA	1
GTTTGATCTTTACGGTAG	2
TTTGATCTTTACGGTAGA	3
TTGATCTTTACGGTAGAA	4
TGATCTTTACGGTAGAAG	5
GATCTTTACGGTAGAAGG	6
ATCTTTACGGTAGAAGGA	7
TCTTTACGGTAGAAGGAA	8
CTTTACGGTAGAAGGAAC	9
TTTACGGTAGAAGGAACT	10
TTACGGTAGAAGGAACTA	11
TACGGTAGAAGGAACTAC	12
ACGGTAGAAGGAACTACA	13
GGTTTGATCTTTACGGT	14
GTTTGATCTTTACGGTA	15
TTTGATCTTTACGGTAG	16
TTGATCTTTACGGTAGA	17
TGATCTTTACGGTAGAA	18
GATCTTTACGGTAGAAG	19
ATCTTTACGGTAGAAGG	20
TCTTTACGGTAGAAGGA	21
CTTTACGGTAGAAGGAA	22
TTTACGGTAGAAGGAAC	23
TTACGGTAGAAGGAACT	24
TACGGTAGAAGGAACTA	25
ACGGTAGAAGGAACTAC	26
CGGTAGAAGGAACTACA	27
GGTTTGATCTTTACGG	28
GTTTGATCTTTACGGT	29
TTTGATCTTTACGGTA	30
TTGATCTTTACGGTAG	31

[0852]

TGATCTTTACGGTAGA	32
GATCTTTACGGTAGAA	33
ATCTTTACGGTAGAAG	34
TCTTTACGGTAGAAGG	35
CTTTACGGTAGAAGGA	36
TTTACGGTAGAAGGAA	37
TTACGGTAGAAGGAAC	38
TACGGTAGAAGGAACT	39
ACGGTAGAAGGAACTA	40
CGGTAGAAGGAACTAC	41
GGTAGAAGGAACTACA	42
GGTTTGATCTTTACG	43
GTTTGATCTTTACGG	44
TTTGATCTTTACGGT	45
TTGATCTTTACGGTA	46
TGATCTTTACGGTAG	47
GATCTTTACGGTAGA	48
ATCTTTACGGTAGAA	49
TCTTTACGGTAGAAG	50
CTTTACGGTAGAAGG	51
TTTACGGTAGAAGGA	52
TTACGGTAGAAGGAA	53
TACGGTAGAAGGAAC	54
ACGGTAGAAGGAACT	55
CGGTAGAAGGAACTA	56
GGTAGAAGGAACTAC	57
GTAGAAGGAACTACA	58
GGTTTGATCTTTAC	59
GTTTGATCTTTACG	60
TTTGATCTTTACGG	61
TTGATCTTTACGGT	62
TGATCTTTACGGTA	63
GATCTTTACGGTAG	64
ATCTTTACGGTAGA	65

[0853]

TCTTTACGGTAGAA	66
CTTTACGGTAGAAG	67
TTTACGGTAGAAGG	68
TTACGGTAGAAGGA	69
TACGGTAGAAGGAA	70
ACGGTAGAAGGAAC	71
CGGTAGAAGGAACT	72
GGTAGAAGGAACTA	73
GTAGAAGGAACTAC	74
TAGAAGGAACTACA	75

[0854]

[0855] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 20개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 20개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0856] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 19-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열 5' CTTTACGGTAGAAGGAACT 7' (서열번호 404; 19-머)를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 404의 서열로 구성된다.

[0857] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 5의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 5의 서열로 구성된다.

[0858] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 14 내지 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 14 내지 27으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 24의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 22의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 23의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 24의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 22, 서열번호 23 또는 서열번호 24의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 22의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 23의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 24의 서열로 구성된다.

[0859] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 28 내지 42로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 28 내지 42로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38 또는 서열번호 39의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 36의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 37의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 38의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 39의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 36, 서열번호 37, 서열번호 38 또는 서열번호 39의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 36의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 37의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 38의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 39의 서열로 구성된다.

[0860] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리

고뉴클레오티드는 15-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 43 내지 58로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 43 내지 58로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54 또는 서열번호 55의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 51의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 52의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 53의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 54의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 55의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 51, 서열번호 52, 서열번호 53, 서열번호 54 또는 서열번호 55의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 51의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 52의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 53의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 54의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 55의 서열로 구성된다.

[0861] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 59 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 59 내지 75로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69 또는 서열번호 70의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 67의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 68의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 69의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 70의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 69 또는 서열번호 70의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 67의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 68의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 69의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 70의 서열로 구성된다.

[0862] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 67 내지 70 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 67 내지 70 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 모든 잔기가 abc-DNA 잔기인, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 67 내지 70 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55, 67 내지 70 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 모든 잔기가 abc-DNA 잔기인, 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 모든 잔기가 abc-DNA 잔기인, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 4, 5, 22 내지 24, 36 내지 39, 51 내지 55 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 모든 잔기가 abc-DNA 잔기인, 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 417 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 417의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 418의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 417 및 서열번호 404로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 417의 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 418의 서열로 구성된다.

[0863] **엑손 53번**

[0864] DMD 유전자의 엑손 53번의 서열 (서열번호 405)은 하기에 나타낸다.

[0865] **엑손 53 번**

```
   1 cctccagact agcatttact actatatatt tatttttcct tttattctag TTGAAAGAAT TCAGAATCAG TGGGATGAAG TACAAGAACA CCTTCAGAAC
 101 CGGAGGCAAC AGTTGAATGA AATGTTAAAG GATTCAACAC AATGGCTGGA AGCTAAGGAA GAAGCTGAGC AGGTCTTAGG ACAGGCCAGA GCCAAGCTTG
 201 AGTCATGGAA GGAGGGTCCC TATACAGTAG ATGCAATCCA AAAGAAAATC ACAGAAACCA AGgttagtat caaagatacc tttttaaaat aaaatactgg
 301 ttacatttga ta
```

[0866] 강조된 부분의 해당하는 전사체 서열은

[0867] 5' GTA CAA GAA CAC CTT CAG AAC CGG AGG CAA CAG TTG AAT GAA ATG TTA A (서열번호 406)이다.

[0868] 본 발명에 따라 유용한 DMD 유전자의 엑손 53번에 상보적인 올리고뉴클레오티드는

[0869] 5' CAT GTT CTT GTG GAA GTC TTG GCC TCC GTT GTC AAC TTA CTT TAC AAT 7' (서열번호 407) 및 표 4에 제공된 올리고뉴클레오티드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

표 4 - 엑손 53 번

서열 (5′ 내지 7′)	서열번호
CATGTTCTTGTGGAAGTC	76
ATGTTCTTGTGGAAGTCT	77
TGTTCTTGTGGAAGTCTT	78
GTTCTTGTGGAAGTCTTG	79
TTCTTGTGGAAGTCTTGG	80
TCTTGTGGAAGTCTTGGC	81
CTTGTGGAAGTCTTGGCC	82
TTGTGGAAGTCTTGGCCT	83

[0870]

TGTGGAAGTCTTGGCCTC	84
GTGGAAGTCTTGGCCTCC	85
TGGAAGTCTTGGCCTCCG	86
GGAAGTCTTGGCCTCCGT	87
GAAGTCTTGGCCTCCGTT	88
AAGTCTTGGCCTCCGTTG	89
AGTCTTGGCCTCCGTTGT	90
GTCTTGGCCTCCGTTGTC	91
TCTTGGCCTCCGTTGTCA	92
CTTGGCCTCCGTTGTCAA	93
TTGGCCTCCGTTGTCAAC	94
TGGCCTCCGTTGTCAACT	95
GGCCTCCGTTGTCAACTT	96
GCCTCCGTTGTCAACTTA	97
CCTCCGTTGTCAACTTAC	98
CTCCGTTGTCAACTTACT	99
TCCGTTGTCAACTTACTT	100
CCGTTGTCAACTTACTTT	101
CGTTGTCAACTTACTTTA	102
GTTGTCAACTTACTTTAC	103
TTGTCAACTTACTTTACA	104
TGTCAACTTACTTTACAA	105
GTCAACTTACTTTACAAT	106
CATGTTCTTGTGGAAGT	107
ATGTTCTTGTGGAAGTC	108
TGTTCTTGTGGAAGTCT	109
GTTCTTGTGGAAGTCTT	110
TTCTTGTGGAAGTCTTG	111
TCTTGTGGAAGTCTTGG	112
CTTGTGGAAGTCTTGGC	113
TTGTGGAAGTCTTGGCC	114
TGTGGAAGTCTTGGCCT	115
GTGGAAGTCTTGGCCTC	116
TGGAAGTCTTGGCCTCC	117

[0871]

GGAAGTCTTGGCCTCCG	118
GAAGTCTTGGCCTCCGT	119
AAGTCTTGGCCTCCGTT	120
AGTCTTGGCCTCCGTTG	121
GTCTTGGCCTCCGTTGT	122
TCTTGGCCTCCGTTGTC	123
CTTGGCCTCCGTTGTCA	124
TTGGCCTCCGTTGTCAA	125
TGGCCTCCGTTGTCAAC	126
GGCCTCCGTTGTCAACT	127
GCCTCCGTTGTCAACTT	128
CCTCCGTTGTCAACTTA	129
CTCCGTTGTCAACTTAC	130
TCCGTTGTCAACTTACT	131
CCGTTGTCAACTTACTT	132
CGTTGTCAACTTACTTT	133
GTTGTCAACTTACTTTA	134
TTGTCAACTTACTTTAC	135
TGTCAACTTACTTTACA	136
GTCAACTTACTTTACAA	137
TCAACTTACTTTACAAT	138
CATGTTCTTGTGGAAG	139
ATGTTCTTGTGGAAGT	140
TGTTCTTGTGGAAGTC	141
GTTCTTGTGGAAGTCT	142
TTCTTGTGGAAGTCTT	143
TCTTGTGGAAGTCTTG	144
CTTGTGGAAGTCTTGG	145
TTGTGGAAGTCTTGGC	146
TGTGGAAGTCTTGGCC	147
GTGGAAGTCTTGGCCT	148
TGGAAGTCTTGGCCTC	149
GGAAGTCTTGGCCTCC	150
GAAGTCTTGGCCTCCG	151

[0872]

AAGTCTTGGCCTCCGT	152
AGTCTTGGCCTCCGTT	153
GTCTTGGCCTCCGTTG	154
TCTTGGCCTCCGTTGT	155
CTTGGCCTCCGTTGTC	156
TTGGCCTCCGTTGTCA	157
TGGCCTCCGTTGTCAA	158
GGCCTCCGTTGTCAAC	159
GCCTCCGTTGTCAACT	160
CCTCCGTTGTCAACTT	161
CTCCGTTGTCAACTTA	162
TCCGTTGTCAACTTAC	163
CCGTTGTCAACTTACT	164
CGTTGTCAACTTACTT	165
GTTGTCAACTTACTTT	166
TTGTCAACTTACTTTA	167
TGTCAACTTACTTTAC	168
GTCAACTTACTTTACA	169
TCAACTTACTTTACAA	170
CAACTTACTTTACAAT	171
CATGTTCTTGTGGAA	172
ATGTTCTTGTGGAAG	173
TGTTCTTGTGGAAGT	174
GTTCTTGTGGAAGTC	175
TTCTTGTGGAAGTCT	176
TCTTGTGGAAGTCTT	177
CTTGTGGAAGTCTTG	178
TTGTGGAAGTCTTGG	179
TGTGGAAGTCTTGGC	180
GTGGAAGTCTTGGCC	181
TGGAAGTCTTGGCCT	182
GGAAGTCTTGGCCTC	183
GAAGTCTTGGCCTCC	184
AAGTCTTGGCCTCCG	185

[0873]

AGTCTTGGCCTCCGT	186
GTCTTGGCCTCCGTT	187
TCTTGGCCTCCGTTG	188
CTTGGCCTCCGTTGT	189
TTGGCCTCCGTTGTC	190
TGGCCTCCGTTGTCA	191
GGCCTCCGTTGTCAA	192
GCCTCCGTTGTCAAC	193
CCTCCGTTGTCAACT	194
CTCCGTTGTCAACTT	195
TCCGTTGTCAACTTA	196
CCGTTGTCAACTTAC	197
CGTTGTCAACTTACT	198
GTTGTCAACTTACTT	199
TTGTCAACTTACTTT	200
TGTCAACTTACTTTA	201
GTCAACTTACTTTAC	202
TCAACTTACTTTACA	203
CAACTTACTTTACAA	204
AACTTACTTTACAAT	205
CATGTTCTTGTGGA	206
ATGTTCTTGTGGAA	207
TGTTCTTGTGGAAG	208
GTTCTTGTGGAAGT	209
TTCTTGTGGAAGTC	210
TCTTGTGGAAGTCT	211
CTTGTGGAAGTCTT	212
TTGTGGAAGTCTTG	213
TGTGGAAGTCTTGG	214
GTGGAAGTCTTGGC	215
TGGAAGTCTTGGCC	216
GGAAGTCTTGGCCT	217
GAAGTCTTGGCCTC	218
AAGTCTTGGCCTCC	219

[0874]

AGTCTTGGCCTCCG	220
GTCTTGGCCTCCGT	221
TCTTGGCCTCCGTT	222
CTTGGCCTCCGTTG	223
TTGGCCTCCGTTGT	224
TGGCCTCCGTTGTC	225
GGCCTCCGTTGTCA	226
GCCTCCGTTGTCAA	227
CCTCCGTTGTCAAC	228
CTCCGTTGTCAACT	229
TCCGTTGTCAACTT	230
CCGTTGTCAACTTA	231
CGTTGTCAACTTAC	232
GTTGTCAACTTACT	233
TTGTCAACTTACTT	234
TGTCAACTTACTTT	235
GTCAACTTACTTTA	236
TCAACTTACTTTAC	237
CAACTTACTTTACA	238
AACTTACTTTACAA	239
ACTTACTTTACAAT	240

[0875]

[0876] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 20개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0877] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 106으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 106으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0878] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 107 내지 138로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 107 내지 138로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0879] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 139 내지 171로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 139 내지 171로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0880] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 172 내지 205로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 172 내지 205로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0881] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 76 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 206 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 206 내지 240으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0882] **엑손 45번**

[0883] DMD 유전자의 엑손 45번의 서열 (서열번호 408)은 하기에 나타낸다.

[0884] **엑손 45 번**

```
   1 taaaaagaca tggggcttca tttttgtttt gccttttgg tatcttacag GAACTCCAGG ATGGCATTGG GCAGCGGCAA ACTGTTGTCA GAACATTGAA
 101 TGCAACTGGG GAAGAAATAA TTCAGCAATC CTCAAAAACA GATGCCAGTA TTCTACAGGA AAAATTGGGA AGCCTGAATC TGCGGTGGCA GGAGGTCTGC
 201 AAACAGCTGT CAGACAGAAA AAAGAGgtag ggcgacagat ctaataggaa tgaaaacatt ttagcagact ttttaa
```

[0885] 강조된 부분의 해당하는 전사체 서열은

[0886] 5' GG TATCTTACAG GAACTCCAGG ATGGCATTGG GCAGCGGCAA ACTGT 3' (서열번호 409)이다.

[0887] 본 발명에 따라 유용한 DMD 유전자의 엑손 45번에 상보적인 올리고뉴클레오티드는

[0888] 5' CC ATAGAATGTC CTTGAGGTCC TACCGTAACC CGTCGCCGTT TGACA 7' (서열번호 410) 및 표 5에 제시된 올리고뉴클레오티드 중 어느 하나를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

표 5 - 엑손 45 번

서열 (5′ 내지 7′)	서열번호
CCATAGAATGTCCTTGAG	241
CATAGAATGTCCTTGAGG	242
ATAGAATGTCCTTGAGGT	243
TAGAATGTCCTTGAGGTC	244
AGAATGTCCTTGAGGTCC	245
GAATGTCCTTGAGGTCCT	246
AATGTCCTTGAGGTCCTA	247
ATGTCCTTGAGGTCCTAC	248
TGTCCTTGAGGTCCTACC	249
GTCCTTGAGGTCCTACCG	250
TCCTTGAGGTCCTACCGT	251
CCTTGAGGTCCTACCGTA	252
CTTGAGGTCCTACCGTAA	253
TTGAGGTCCTACCGTAAC	254
TGAGGTCCTACCGTAACC	255
GAGGTCCTACCGTAACCC	256
AGGTCCTACCGTAACCCG	257
GGTCCTACCGTAACCCGT	258
GTCCTACCGTAACCCGTC	259
TCCTACCGTAACCCGTCG	260
CCTACCGTAACCCGTCGC	261
CTACCGTAACCCGTCGCC	262
TACCGTAACCCGTCGCCG	263
ACCGTAACCCGTCGCCGT	264
CCGTAACCCGTCGCCGTT	265
CGTAACCCGTCGCCGTTT	266
GTAACCCGTCGCCGTTTG	267
TAACCCGTCGCCGTTTGA	268
AACCCGTCGCCGTTTGAC	269

[0889]

ACCCGTCGCCGTTTGACA	270
CCATAGAATGTCCTTGA	271
CATAGAATGTCCTTGAG	272
ATAGAATGTCCTTGAGG	273
TAGAATGTCCTTGAGGT	274
AGAATGTCCTTGAGGTC	275
GAATGTCCTTGAGGTCC	276
AATGTCCTTGAGGTCCT	277
ATGTCCTTGAGGTCCTA	278
TGTCCTTGAGGTCCTAC	279
GTCCTTGAGGTCCTACC	280
TCCTTGAGGTCCTACCG	281
CCTTGAGGTCCTACCGT	282
CTTGAGGTCCTACCGTA	283
TTGAGGTCCTACCGTAA	284
TGAGGTCCTACCGTAAC	285
GAGGTCCTACCGTAACC	286
AGGTCCTACCGTAACCC	287
GGTCCTACCGTAACCCG	288
GTCCTACCGTAACCCGT	289
TCCTACCGTAACCCGTC	290
CCTACCGTAACCCGTCG	291
CTACCGTAACCCGTCGC	292
TACCGTAACCCGTCGCC	293
ACCGTAACCCGTCGCCG	294
CCGTAACCCGTCGCCGT	295
CGTAACCCGTCGCCGTT	296
GTAACCCGTCGCCGTTT	297
TAACCCGTCGCCGTTTG	298
AACCCGTCGCCGTTTGA	299
ACCCGTCGCCGTTTGAC	300
CCCGTCGCCGTTTGACA	301
CCATAGAATGTCCTTG	302
CATAGAATGTCCTTGA	303

[0890]

ATAGAATGTCCTTGAG	304
TAGAATGTCCTTGAGG	305
AGAATGTCCTTGAGGT	306
GAATGTCCTTGAGGTC	307
AATGTCCTTGAGGTCC	308
ATGTCCTTGAGGTCCT	309
TGTCCTTGAGGTCCTA	310
GTCCTTGAGGTCCTAC	311
TCCTTGAGGTCCTACC	312
CCTTGAGGTCCTACCG	313
CTTGAGGTCCTACCGT	314
TTGAGGTCCTACCGTA	315
TGAGGTCCTACCGTAA	316
GAGGTCCTACCGTAAC	317
AGGTCCTACCGTAACC	318
GGTCCTACCGTAACCC	319
GTCCTACCGTAACCCG	320
TCCTACCGTAACCCGT	321
CCTACCGTAACCCGTC	322
CTACCGTAACCCGTCG	323
TACCGTAACCCGTCGC	324
ACCGTAACCCGTCGCC	325
CCGTAACCCGTCGCCG	326
CGTAACCCGTCGCCGT	327
GTAACCCGTCGCCGTT	328
TAACCCGTCGCCGTTT	329
AACCCGTCGCCGTTTG	330
ACCCGTCGCCGTTTGA	331
CCCGTCGCCGTTTGAC	332
CCGTCGCCGTTTGACA	333
CCATAGAATGTCCTT	334
CATAGAATGTCCTTG	335
ATAGAATGTCCTTGA	336
TAGAATGTCCTTGAG	337

[0891]

AGAATGTCCTTGAGG	338
GAATGTCCTTGAGGT	339
AATGTCCTTGAGGTC	340
ATGTCCTTGAGGTCC	341
TGTCCTTGAGGTCCT	342
GTCCTTGAGGTCCTA	343
TCCTTGAGGTCCTAC	344
CCTTGAGGTCCTACC	345
CTTGAGGTCCTACCG	346
TTGAGGTCCTACCGT	347
TGAGGTCCTACCGTA	348
GAGGTCCTACCGTAA	349
AGGTCCTACCGTAAC	350
GGTCCTACCGTAACC	351
GTCCTACCGTAACCC	352
TCCTACCGTAACCCG	353
CCTACCGTAACCCGT	354
CTACCGTAACCCGTC	355
TACCGTAACCCGTCG	356
ACCGTAACCCGTCGC	357
CCGTAACCCGTCGCC	358
CGTAACCCGTCGCCG	359
GTAACCCGTCGCCGT	360
TAACCCGTCGCCGTT	361
AACCCGTCGCCGTTT	362
ACCCGTCGCCGTTTG	363
CCCGTCGCCGTTTGA	364
CCGTCGCCGTTTGAC	365
CGTCGCCGTTTGACA	366
CCATAGAATGTCCT	367
CATAGAATGTCCTT	368
ATAGAATGTCCTTG	369
TAGAATGTCCTTGA	370
AGAATGTCCTTGAG	371

[0892]

GAATGTCCTTGAGG	372
AATGTCCTTGAGGT	373
ATGTCCTTGAGGTC	374
TGTCCTTGAGGTCC	375
GTCCTTGAGGTCCT	376
TCCTTGAGGTCCTA	377
CCTTGAGGTCCTAC	378
CTTGAGGTCCTACC	379
TTGAGGTCCTACCG	380
TGAGGTCCTACCGT	381
GAGGTCCTACCGTA	382
AGGTCCTACCGTAA	383
GGTCCTACCGTAAC	384
GTCCTACCGTAACC	385
TCCTACCGTAACCC	386
CCTACCGTAACCCG	387
CTACCGTAACCCGT	388
TACCGTAACCCGTC	389
ACCGTAACCCGTCG	390
CCGTAACCCGTCGC	391
CGTAACCCGTCGCC	392
GTAACCCGTCGCCG	393
TAACCCGTCGCCGT	394
AACCCGTCGCCGTT	395
ACCCGTCGCCGTTT	396
CCCGTCGCCGTTTG	397
CCGTCGCCGTTTGA	398
CGTCGCCGTTTGAC	399
GTCGCCGTTTGACA	400

[0893]

[0894] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 20개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 내지 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 19개 뉴클레오티드의 길이를 갖는다.

[0895] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 18-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 270으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 270으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0896] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 17개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기

올리고뉴클레오티드는 17-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 271 내지 301로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 271 내지 301로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0897] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 16-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 302 내지 333으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 302 내지 333으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0898] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 15-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 334 내지 366으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 334 내지 366으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0899] 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 241 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14개 뉴클레오티드의 길이를 갖는, 서열을 포함한다. 이러한 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 14-머이다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 367 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 367 내지 400으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열로 구성된다.

[0900] 또한 본 발명은 척수 근육 위축증에서 인트론 스플라이싱 사일렌서 N1 (ISS-N1)에 상보적인 올리고뉴클레오티드, 예를 들면 TCACTTTCATAATGCTGG (서열번호 411)을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0901] 도 1a는 액체 크로마토그래피 - 질량 분광광도법 (LS-MS)에 의한 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 산성 안정성의 평가를 나타낸다. 처리되지 않은 ON1의 LS-MS 크로마토그램.

도 1b는 처리되지 않은 ON1의 LS-MS 단편화 양상을 나타낸다.

도 1c는 산성 조건에서 24시간 동안 처리된 ON1의 LS-MS 크로마토그램을 나타낸다.

도 1d는 산성 조건에서 24시간 동안 처리된 ON1의 LS-MS 단편화 양상을 나타낸다.

도 2a는 LS-MS에 의한 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 열 안정성의 평가를 나타낸다. 처리되지 않은 ON1의 LS-MS 크로마토그램.

도 2b는 처리되지 않은 ON1의 LS-MS 단편화 양상을 나타낸다.

도 2c는 95℃에서 60분 동안 가열된 ON1의 LS-MS 크로마토그램을 나타낸다.

도 2d는 95℃에서 60분 동안 가열된 ON1의 LS-MS 단편화 양상을 나타낸다.

도 3은 20% 변성 PAGE에 의한 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 생체 안정성의 평가를 나타낸다. 마우스 혈청에서 배양된 ON1 및 이의 상응하는 천연 올리고뉴클레오티드의 PAGE.

도 4는 상이한 알부민 당량으로 배양된 ON1의 이동성 변위 검정법을 나타낸다.

도 5는 상이한 알부민 당량으로 배양된 복합되지 않은 ON1의 비교를 나타낸다. 한외여과 실험에 의해 획득된 값이다.

도 6은 상이한 마우스 혈청 부피로 배양된 ON1의 이동성 변위 검정법을 나타낸다.

도 7은 ON1 용액에 존재하는 나노입자의 세기를 나타낸다.

도 8은 네스트 RT-PCR에 의해 검출되는, C2C12 세포에서 마우스 엑손 23번 스킵핑 효율에 대한 아가로스 젤을 나타낸다.

도 9a는 네스트 RT-PCR에 의해 검출되는, KM155 세포에서 인간 엑손 51번 스킵핑 효율에 대한 아가로스 젤을 나타낸다.

도 9b는 네스트 RT-PCR에 의해 검출되는, KM155 세포에서 인간 엑손 51번 스킵핑 효율에 대한 아가로스 젤을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0902] 본 발명의 실행은 달리 명시되지 않는 한, 당해 기술분야에 속하는 화학, 분자생물학, 미생물학, 재조합 DNA, 유전학, 면역학, 세포생물학, 세포 배양 및 트랜스유전자 생물학의 통상적인 기법을 채용한다. 예로, Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, 제 2판 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning, 제 3판. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Ausubel et al., 1992, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 정기 업데이트 포함); Glover, 1985, DNA Cloning (IRL Press, Oxford); Anand, 1992; Guthrie and Fink, 1991; Harlow and Lane, 1988, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Jakoby and Pastan, 1979; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); 논문, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vol. 154 및 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, Essential Immunology, 제 6판, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986); Westerfield, M., The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), (제 4판, Univ. of Oregon Press, Eugene, 2000) 참조.

[0903] 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공통적으로 이해될 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 방법 및 재료와 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 하기에 설명된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 이들의 전문이 참고문헌으로 통합된다. 모순되는 경우, 정의를 포함하여 본 명세서가 통제할 것이다.

[0904] 재료, 방법 및 예시는 단지 설명적이고, 본원에 기술된 본 발명의 다양한 구현예를 제한하려고 의도되지 않는다.

[0905] **실시예**

[0906] **실시예 1**

[0907] **상보적 병렬 RNA로 향하는 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 친화도**

[0908] 상보적 병렬 RNA로 향하는 친화도는 UV 용융 실험에 의해 여러 알파 아노머 올리고뉴클레오티드에 대해 평가되었다 (표 1).

[0909] 용융 온도는 53.3℃ 내지 77.0℃의 범위를 갖고, 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 이들의 RNA 상보체에 대한 양호한 친화도를 보여준다.

표 1. 상보적 병렬 RNA와 이중체 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 UV-용융 곡선 (260 nm)으로부터 *Tm* 데이타

엔트리	서열번호	서열 [a]	병렬 RNA 대비 T_m(℃)
ON1 [b,c]	412	5′-(**tccattcggctccaa***palm)-7′	76.2
ON2 [b,c]	413	5′-(**t*c*c*a*t*t*c*g*g*c*t*c*c*a***a**)-7′	77.0
ON3 [d]	414	5′-(**gatctttacggtagaagg**)-7′	72.5
ON4 [d]	415	5′-(**atctttacggtagaagga**)-7′	70.2
ON5 [d]	416	5′-(**tctttacggtagaaggaa**)-7′	69.1
ON6 [d]	417	5′-(**ctttacggtagaaggaac**)-7′	68.7
ON7 [d]	418	5′-(**tttacggtagaaggaact**)-7′	69.3
ON8 [d]	419	5′-(**ttacggtagaaggaacta**)-7′	70.8
ON9 [d]	420	5′-(**tacggtagaaggaactac**)-7′	71.0
ON10 [d]	421	5′-(**aactagttcaatatttta**)-7′	53.3
ON11 [d]	422	5′-(**ctagttcaatattttagt**)-7′	54.7
ON12 [d]	423	5′-(**agttcaatattttagtgt**)-7′	57.4
ON13 [d]	424	5′-(**ttcaatattttagtgtct**)-7′	54.7
ON14 [d]	425	5′-(**caatattttagtgtctcc**)-7′	60.4

[a] **a**, **g**, **t**, **c** 는 각각 abc-DNA 변형된 아데닌, 구아닌, 티민 및 메틸시토신에 해당하고, *는 포스포로티오에이트 결합을 나타내고, palm 은 알킬 링커를 통해 올리고뉴클레오티드에 컨쥬게이션된 팔미트산에 해당한다.

[b] 총 가닥 농도. 10 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, pH 7.0 중 2 μM

[c] 미변형된 이중체, DNA/RNA 의 *Tm*: 67.4℃

[d] 총 가닥 농도. 10 mM NaH_2PO_4, 75 mM NaCl, pH 7.0 중 2 μM

[0910]

[0911] **실시예 2**

[0912] **산성 조건에서 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 안정성**

[0913] ON1의 산성 안정성은 ON1을 아세테이트 완충 용액 (0.1 M, pH = 4.5)으로 10 μM로 희석시키고, 생성된 용액을 37℃에서 24시간 동안 배양함으로써 평가되었다. 처리되지 않은 ON1을 기준으로서 사용하였다. ON1의 특성을 LC-MS에 의해 측정하였다. 처리되지 않은 ON1의 크로마토그램과 단편화 양상 (도 1a 및 도 1b) 및 산성 조건에서 24시간 동안 처리된 ON1의 크로마토그램과 단편화 양상 (도 1c 및 도 1d) 사이의 차이를 전혀 관찰할 수 없었다. 실험은 직면할 수 있는 산성 조건에서, 예를 들면 세포의 리소좀 구획에서 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 안정성을 입증한다.

[0914] **실시예 3**

[0915] **알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 열 안정성**

[0916] ON1의 열 안정성은 ON1을 PBS 용액 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH = 7.4)으로

10 μM로 희석시키고, 생성된 용액을 95℃에서 60분 동안 배양함으로써 평가되었다. 처리되지 않은 ON1을 기준으로서 사용하였다. ON1의 특성을 LC-MS에 의해 측정하였다. 처리되지 않은 ON1의 크로마토그램과 단편화 양상 (도 2a 및 도 2b) 및 95℃에서 가열된 ON1의 크로마토그램과 단편화 양상 (도 2c 및 도 2d) 사이의 차이를 전혀 관찰할 수 없었다. 실험은 수용성 용액에서 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 화학적 안정성을 입증한다.

[0917] **실시예 4**

[0918] **알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 생체안정성**

[0919] ON1 및 이의 상응하는 천연 올리고뉴클레오티드를 H_2O 및 마우스 혈청 (시그마사)의 1 : 1 혼합물에서 10 μM로 희석시켰다. 반응을 20 μL 규모로 수행하였고, 37℃에서 배양하였다. 대조군 반응을 올리고뉴클레오티드를 37℃에서 H_2O 중 10 μM로 24시간 동안 배양함으로써 수행하였다. 반응을 특정한 시간 (1시간, 2시간, 4시간 및 24시간)에 포름아미드 (20 μL)의 첨가에 의해 정지시켰다. 생성된 혼합물을 -20℃에 보관하였고, 이후에 90℃에서 5분 동안 열 변성한 다음 20% 변성 PAGE에 의해 분석하였다 (도 3). 표준 프로토콜에 따라 스테인-올 용액으로 촬영하였다. 실험의 결과는 4시간 이후에 이미 천연 DNA 가닥의 완전한 소화를 보여주고, ON1은 심지어 24시간 이후에도 완벽히 안정하게 남는다.

[0920] **실시예 5**

[0921] **지질기와 컨쥬게이션된 알파 아노머 올리고뉴클레오티드의 알부민에 대한 결합**

[0922] 알부민에 ON1의 결합을 이동성 변위 검정법에 의해 평가하였다 (도 4). 테스트 용액을 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 및 1.5 알부민 당량 (마우스 혈청으로부터의 알부민, 동결건조된 분말, ≥ 96% (시스마 알드리치사)) 을 포함하는 PBS 용액 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH=7.4) 중 ON1을 40 μM로 37℃에서 1시간 이상 동안 배양함으로써 준비하였다. 10 μL의 각각의 시료를 고유의 10% PAGE (40 V, 170분, 7℃에서 전개함)에 의해 분석하였다. 표준 프로토콜에 따라 스테인-올 용액으로 촬영하였다. 하부 밴드는 복합되지 않은 ON1의 존재를 나타내고, 상부 밴드는 알부민과의 복합체에서 ON1의 존재를 나타낸다. 실험은 ON1이 ≥ 0.3 당량의 알부민 농도에서 알부민에 효율적으로 결합할 수 있는 것을 입증한다.

[0923] ON1의 알부민 결합의 정량화를 한외여과 실험에 의해 평가하였다 (도 5). 간략하게, 테스트 용액을 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 및 0.7 알부민 당량 (마우스 혈청으로부터의 알부민, 동결건조된 분말, ≥ 96% (시스마 알드리치사))을 포함하는 PBS 용액 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH = 7.4)중 ON1을 55 μM로 37℃에서 1시간 이상 동안 배양함으로써 준비하였다. 다음으로 용액을 스핀 컬럼 (아미콘-울트라 0.5 원심분리 필터 유닛 (시그마 알드리치사)로 여과하였다. 복합되지 않은 ON1의 백분율을 여과물에서 ON1의 흡광도를 나노드롭 분광광도계로 측정하고, 0 당량 알부민을 갖는 용액을 기준으로서 취함으로써 계산하였다. 실험의 결과는 0.3 당량 알부민에서 단지 14%의 올리고뉴클레오티드가 용액에 복합되지 않고 남은 것을 보여준다.

[0924] 마우스 혈청 (시그마 알드리치사)에서 알부민에 ON1의 결합을 이동성 변위 검정법에 의해 평가하였다 (도 6). 테스트 용액을 부피로 25% 글리세롤 및 0%, 1.25%, 5.0%, 12.5% 및 25.0%의 마우스 혈청을 포함하는 PBS 용액 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH = 7.4) 중 ON1을 40 μM로 37℃에서 1시간 이상 동안 배양함으로써 준비하였다. 대조군 용액을 25% 글리세롤 및 80 μM 마우스 알부민을 포함하는 PBS 용액 중 ON1을 40 μM로 37℃에서 1시간 동안 배양함으로써 준비하였다. 10 μL의 각각의 시료를 고유의 15% PAGE (60 V, 260분)에 의해 분석하였다. 표준 프로토콜에 따라 스테인-올 용액으로 촬영하였다. 하부 밴드는 복합되지 않은 ON1의 존재를 나타내고, 상부 밴드는 알부민과의 복합체에서 ON1의 존재를 나타낸다. 실험 결과는 ON1이 혈청에서 알부민에 효율적으로 결합할 수 있는 것을 입증한다.

[0925] **실시예 6**

[0926] **응집물의 존재 및 용해**

[0927] 응집물의 형성 및 용해를 제타사이저 나노 ZS로 분석하였다 (도 7). ON1을 PBS 용액 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH = 7.4)에 7.5 mg/mL의 농도로 용해시켰다. 나노입자의 초기 존재가 기록되었다 (0분). 다음으로 용액을 95℃로 가열하였고, 나노입자의 존재를 가열 10분, 20분 및 30분 이후에 기록하였다. 다음으로 용액을 실온에서 24시간 동안 방치한 다음 나노입자의 존재를 다시 기록하였다. 처음에,

강한 신호는 1000 nm 주변의 크기를 갖는 입자에 대해 측정되었다. 용액을 가열하는 것은 신호를 사라지게 할 것이다. 실험의 결과는 지질친화성 모이어티에 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드가 수용성 용액에서 응집물을 형성할 것임을 입증한다. 그러나, 95℃에서 적어도 20분 동안 용액을 가열하는 것은 응집물의 분산을 보장할 것이다. 응집물은 실온에서 24시간 동안 방치한 이후에 재출현하지 않을 것이다.

[0928] **실시예 7**

[0929] **엑손 스킵핑 효율의 결정**

[0930] 엑손 스킵핑은 하나 이상의 엑손이 성숙한 mRNA로부터 배제되도록 유도하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 용도가 관여한다. 엑손 스킵핑의 사용하여, 하나 이상의 엑손이 성숙한 mRNA로부터 배제되도록 유도하여, 프레이맞는 성숙한 mRNA를 생성한다. 엑손의 스킵핑은 하나 또는 둘 다의 스플라이스 부위 또는 내부 엑손 서열을 표적하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 결합에 의해 유도될 수 있다. 스플라이스 부위 둘 다가 스플라이소좀(spliceosome) 복합체에 의해 인식될 때 엑손이 mRNA에 단지 포함될 것이기 때문에, 스플라이스 부위는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 명백한 표적이다.

[0931] 본 발명의 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드가 관심 있는 유전자의 프리-mRNA의 엑손 스킵핑을 유도하는지 여부를 결정하기 위여, 세포를 일정 기간 동안 주어진 엑손(들)을 표적하는 올리고뉴클레오티드 컨쥬게이트오 배양한다. 특정 구현예에서, 세포를 리포펙타민으로 형질감염시킨다. 엑손 스킵핑은 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR) 또는 DNA 서열 결정법을 사용하여 검출된다. 총 RNA를 세포로부터 추출하고, RT-PCR을 표적화 엑손을 교차하여 수행하고, RT-PCR 산물의 크기를 젤 전기영동을 통해 평가한다. 엑손 스킵핑이 일어나면, 산물은 표적화 엑손을 포함하지 않을 것이고, 이러한 산물의 크기는 표적화 엑손을 포함하는 산물과 비교하여 예측가능하게 더 작은 크기일 것이다. 유사하게, 표적화 엑손을 교차하여 성숙한 mRNA를 서열 결정하여, 표적화 엑손 서열이 성숙한 mRNA에 부재하는지 여부를 결정할 수 있다.

[0932] 본 발명의 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 효과를 추가로 결정하기 위하여, 디스트로핀 회복은 근육 생검으로부터 채취한 시료의 웨스턴 블롯에 의해 확인되고, 디스트로핀 양성 근육 섬유%는 현미경 관찰에 의해 결정된다.

[0933] 특이적 엑손의 표적화 스킵핑에 의해, DMD 표현형을 더 경미한 BMD 표현형으로 전환할 수 있다. 엑손 스킵핑은 분화된 인간 근육모세포, DMD 환자 또는 건강한 환자로부터 유래한 근육 세포를, 본 실시예에서 설명된 바와 같이 DMD 유전자의 프리-mRNA에 결합하는 안티센스 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드와 함께 배양함으로써 검출된다. 대안적으로, 또한 본 실시예에 설명된 바와 같이, 세포는 MDX 마우스, DMD의 마우스 모델로부터 유래한다. 정상 세포의 엑손 스킵핑의 수준을 DMD 세포의 엑손 스킵핑 수준과 비교하는 것에 더불어, DMD 환자 또는 MDX 마우스로부터 유래한 세포의 엑손 스킵핑 수준을 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 부재 시 엑손 스킵핑 수준과 비교한다. 특정 구현예에서, 관심 있는 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 활성은 에티플러센 또는 드리사퍼센의 투여 이후에 엑손 스킵핑 수준과 비교된다.

[0934] 본 실시예에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 농도는 260 nm에서 희석된 분량의 흡광도를 측정함으로써 추정되었다. 다음으로 안티센스 올리고뉴클레오티드 (AON)의 특정된 양이 하기에 설명된 바와 같이 *시험관내* 검정법에서 이들의 엑손 스킵핑을 유도하는 능력에 대해 시험되었다.

[0935] 간략하게, 실험은 마우스 대조군 불멸화된 근육모세포 배양 (C2C12) 또는 인간 대조군 불멸화된 근육모세포 배양 (KM155)에서 시행되었다. 세포를 표준 배양 기법을 사용하여 근육 튜브 내에서 증식시키고, 분화시켰다. 세포를 형질감염 시약으로서 마우스 세포 배양용 리포펙타민 및 인간 세포 배양용 올리고펙타민을 사용하여 AON으로 형질전환시켰다. 2'-OMe-포스포로디티오에이트 (2OMePS) 백본 및 스크램블 (비-기능성) 2OMePS AON을 갖는 상보적인 AON을 양성 및 음성 대조군으로서 각각 사용하였다.

[0936] 24시간 이후에, 총 RNA가 추출되었고, 분자적 분석이 시행되었다. 2개 단계 (네스트) PCR 반응을 사용한 역전사효소 증폭 (RT-PCR)을 착수하여 디스트로핀 프리-mRNA의 표적화 영역 또는 유도된 엑손 재배열을 연구하였다.

[0937] 엑손 23번의 스킵핑 유도를 목표로 하여 AON을 분석하기 위해, RT-PCR을 엑손 23번에 걸친 영역 상에서 시행하였다. cDNA 합성 이후에, 첫 번째 PCR을 마우스 엑손 21번 및 26번 (영역 21 내지 26)에서 특이적 프라이머를 사용하여 수행하고, 두 번째 PCR을 마우스 엑손 22번 및 24번 (영역 22 내지 24)에서 특이적 프라이머를 사용하여 수행하였다.

[0938] 엑손 51번의 스킵핑 유도를 목표로 하는 AON을 분석하기 위해, RT-PCR을 엑손 51번에 걸친 영역 상에서 시행하

였다. cDNA 합성 이후에, 첫 번째 PCR을 마우스 엑손 48번 및 53번 (영역 48 내지 53)에서 특이적 프라이머를 사용하여 수행하고, 두 번째 PCR을 마우스 엑손 49번 및 52번 (영역 49 내지 52)에서 특이적 프라이머를 사용하여 수행하였다.

[0939] 스킵되지 않은 및 스킵된 산물의 예상된 산물 크기가 계산되었다. 반응 산물의 세기는 크기 표준을 포함하는 아가로스 젤 상에서 추정되었다. 본원에서는 더 작거나 엑손이 스킵된 산물이 더 큰 산물보다 더욱 효율적으로 증폭되어 스킵이 과다 평가되는 경향이 있기 때문에, 잠재적인 편차가 고려되어야 한다. 엑손 스킵핑 산물을 나타내는 밴드를 마우스 세포 (도 8) 또는 인간 세포에서 측정할 수 있다 (도 9a 및 도 9b). 실험의 결과는 알파 아노머 올리고뉴클레오티드가 *시험관내*에서 유전자 발현을 조정하는 능력을 입증한다. 본 발명의 컨쥬게이트의 엑손 스킵핑 능력은 근육 디스트로피의 mdx 마우스 모델로 *생체내*에서 검증되었다. 본원에서, mdx23 마우스가 서열번호 412를 포함하는 서열을 갖는 본 발명의 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드의 매주 정맥내 주사 (50 mg/kg/주)를 12회 투여받았다. 치료 이후에, 횡격막 및 장딴지의 조직을 분리하여 엑손 스킵핑을 결정하였다.

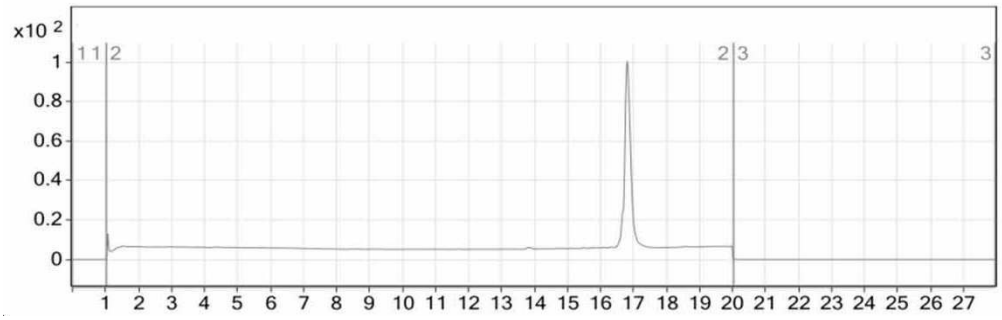
[0940] **실시예 8**

[0941] **hDMDdel52/mdx 마우스 모델에서 엑손 스킵핑**

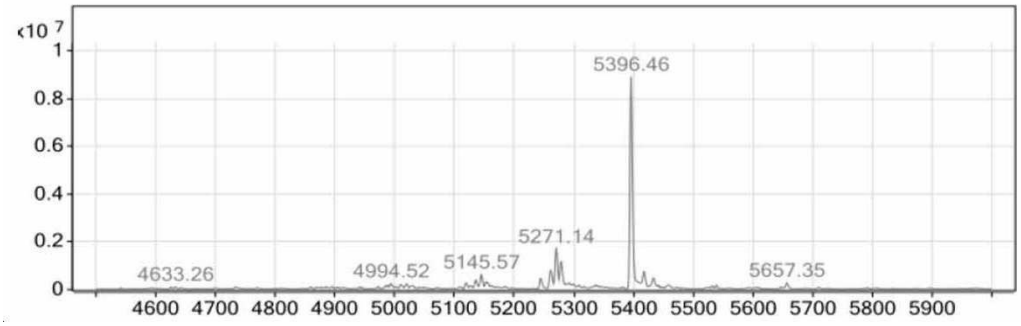
[0942] 엑손 스킵핑 효율이 근육 디스트로피의 hDMDdel52/mdx 마우스 모델에서 결정된다. 마우스는 서열번호 418을 포함하는 서열을 갖는 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드, 상응하는 포스포로디아미데이트 몰포리노 올리고머 (PMO) 또는 식염수의 정맥내 주사를 투여받는다. 마우스는 올리고뉴클레오티드의 매주 주사 (50 mg/kg/주)를 12회 투여받는다. 치료 이후에, 다음의 조직: 심장, 횡격막, 앞정강이, 장딴지, 사두, 삼두, 뇌, 간 및 신장이 분리되고, 엑손 스킵핑이 결정된다. 특정 구현예에서, 마우스를 abc-DNA 지질기 컨쥬게이션된 올리고뉴클레오티드 대신에 에티플러센 또는 드리사퍼센으로 처리한다. 엑손 스킵핑은 RT-PCR, 웨스턴 블롯, 면역형광 및/또는 디지탈 PCR에 의해 결정된다.

도면

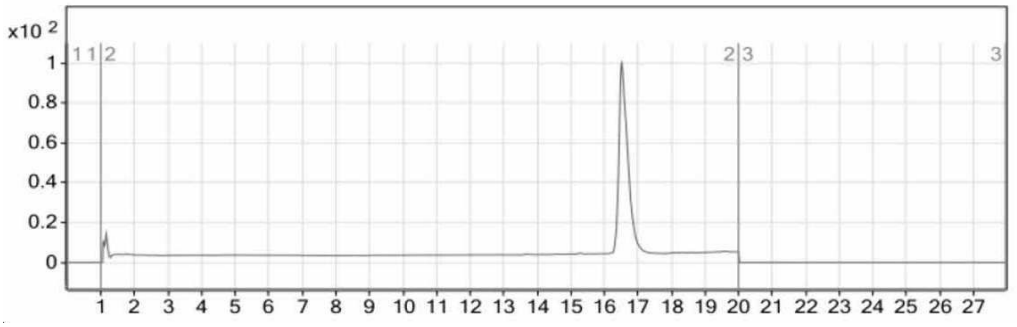
도면1a



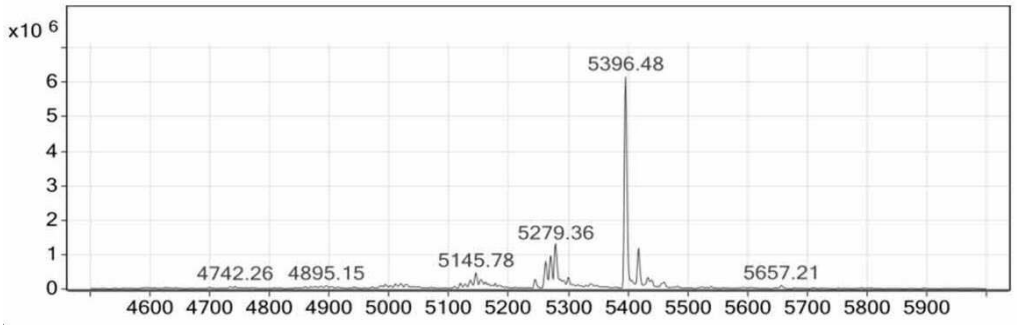
도면1b



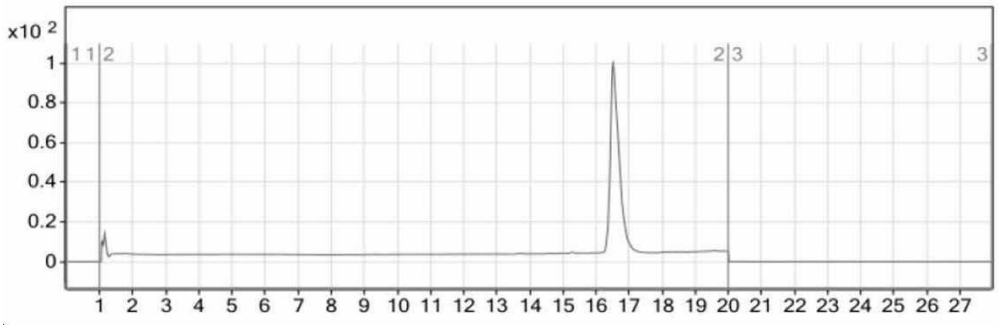
도면1c



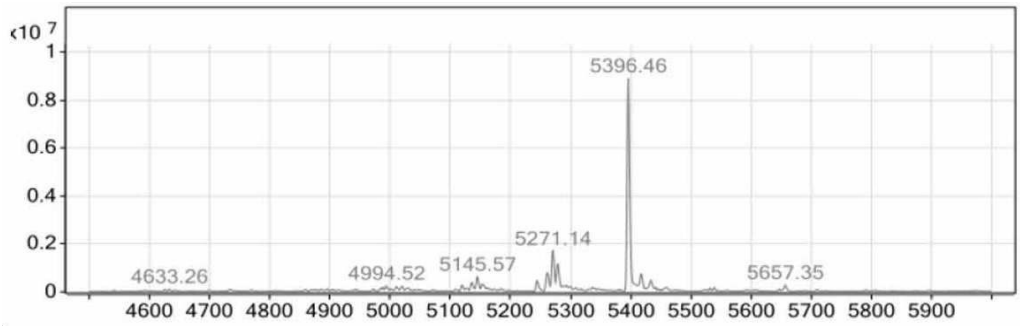
도면1d



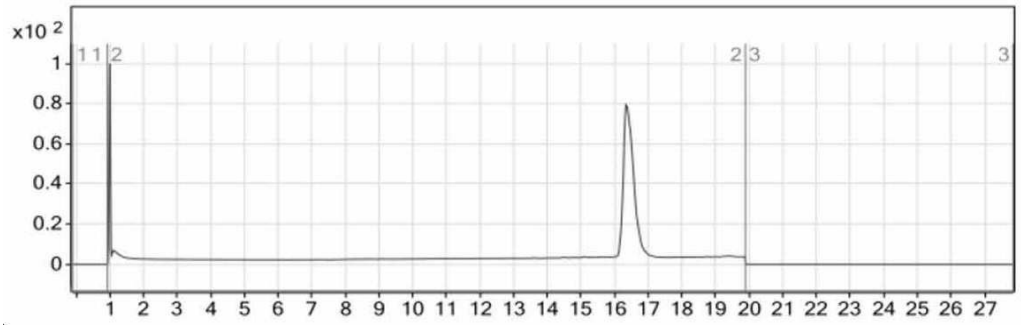
도면2a



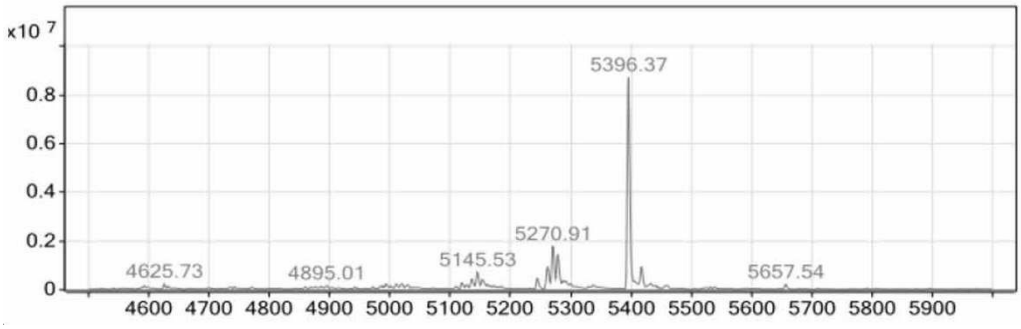
도면2b



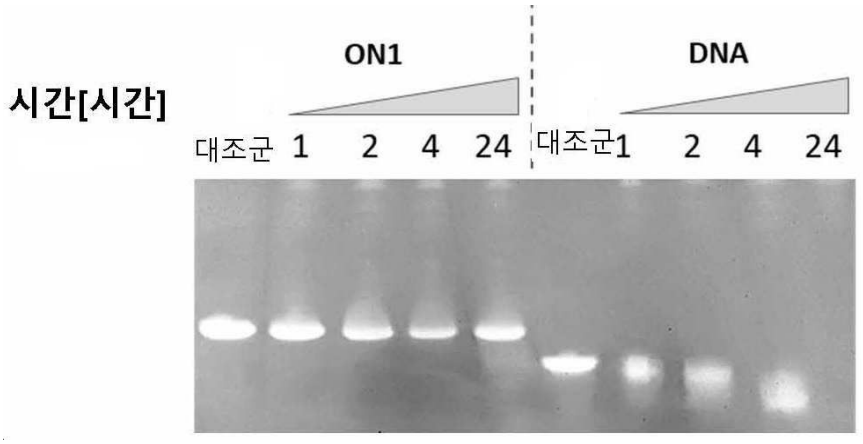
도면2c



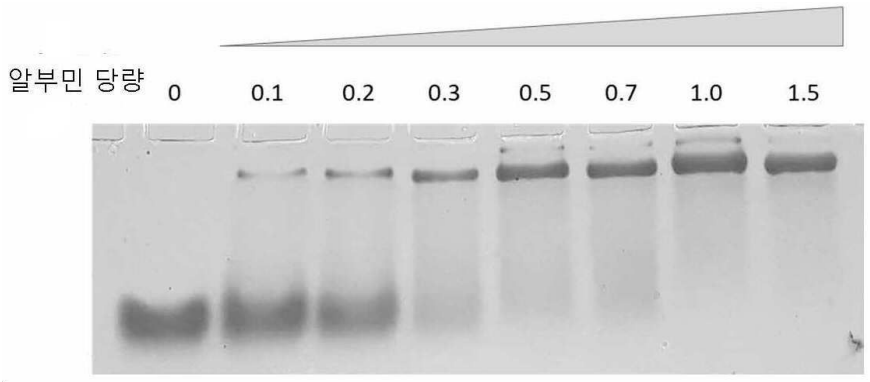
도면2d



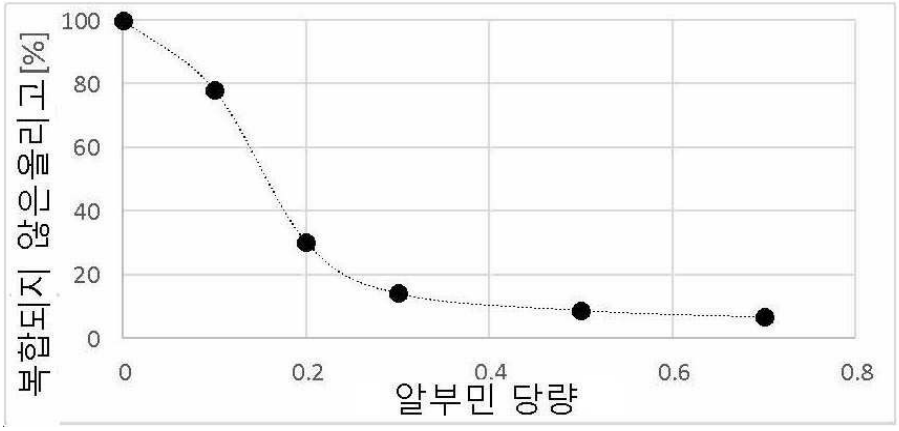
도면3



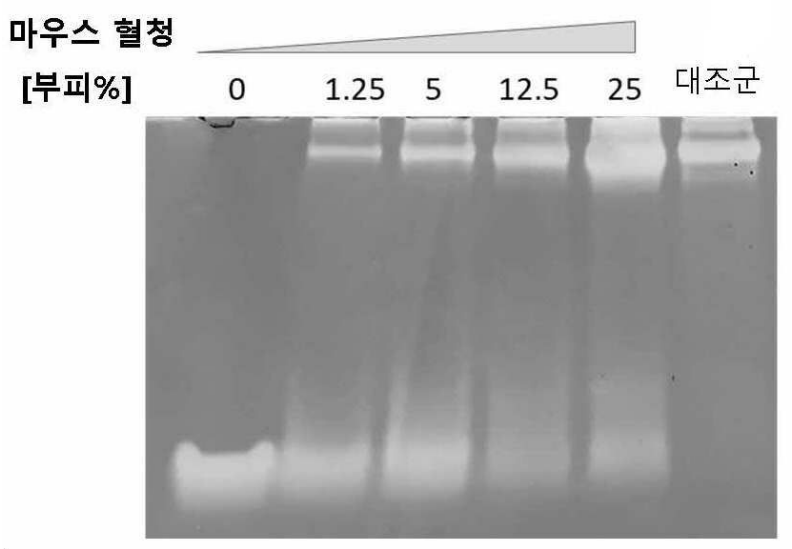
도면4



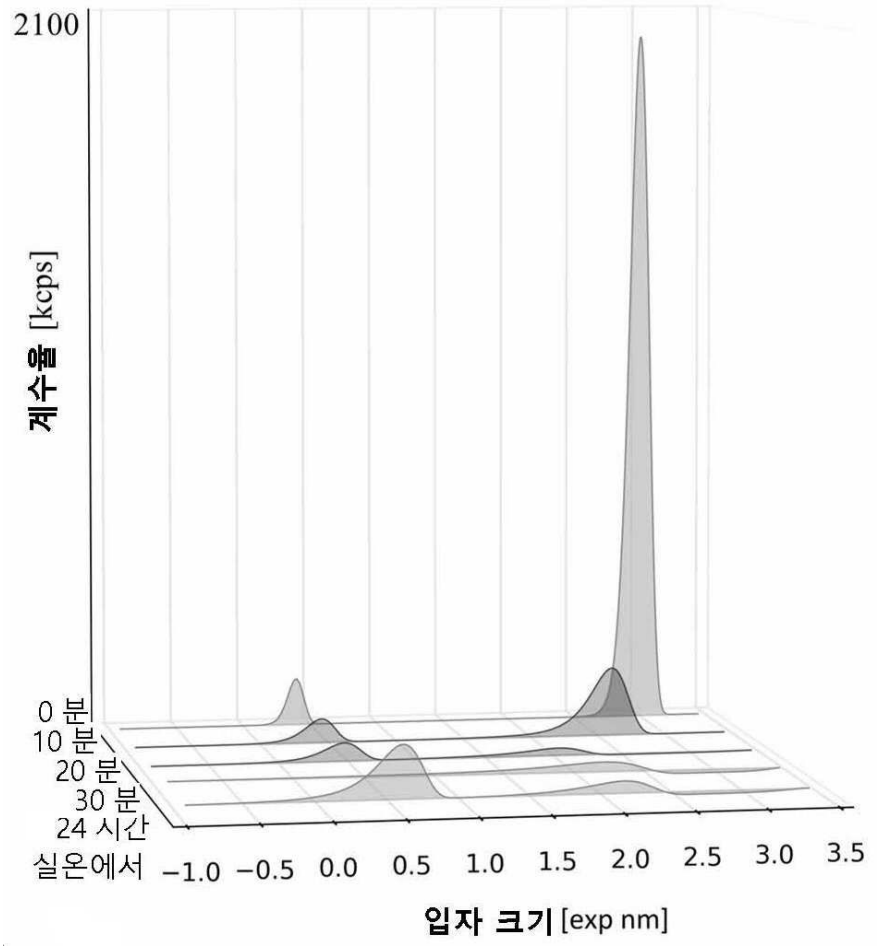
도면5


복합되지 않은 올리고 [%]
100
80
60
40
20
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
알부민 당량

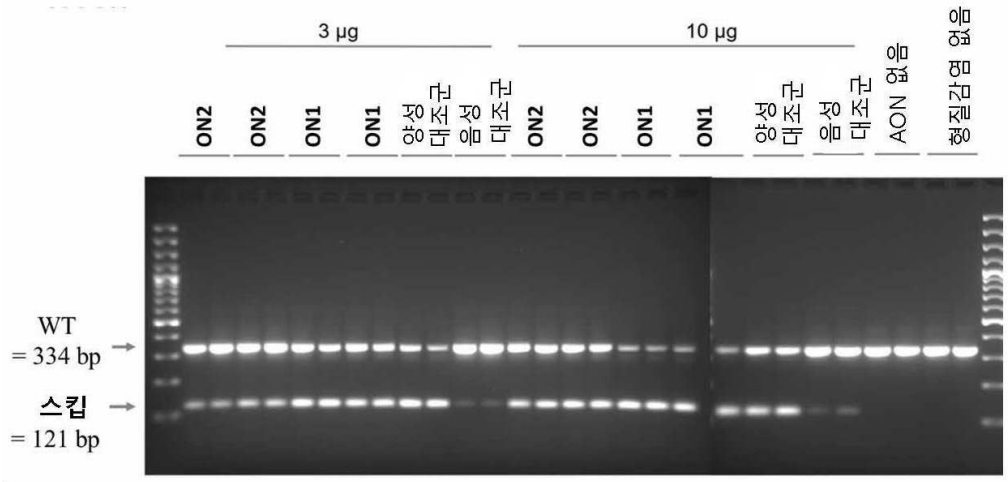
도면6


마우스 혈청
[부피%]
0
1.25
5
12.5
25
대조군

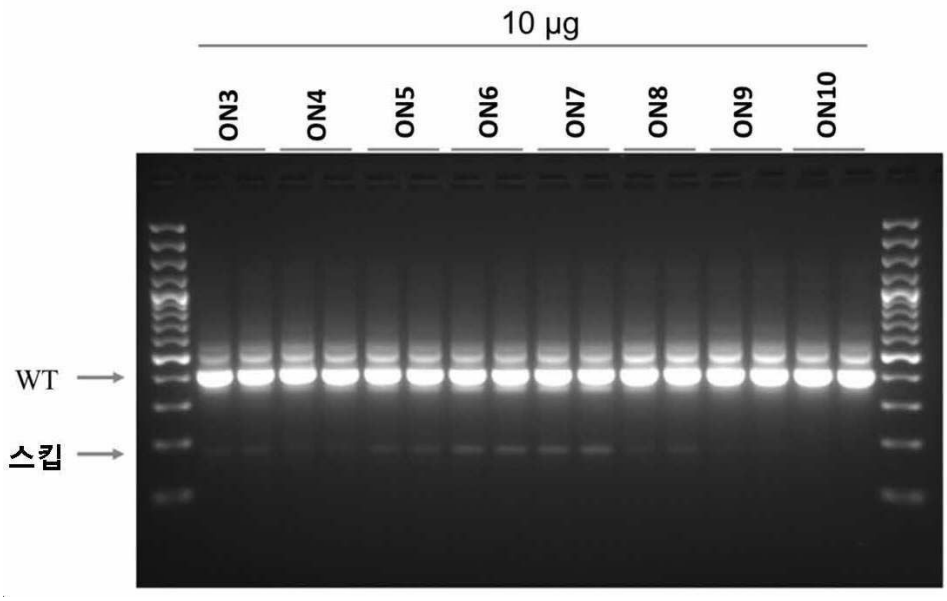
도면7


2100
계수율 [kcps]
0 분
10 분
20 분
30 분
24 시간
실온에서
−1.0
−0.5
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
입자 크기 [exp nm]

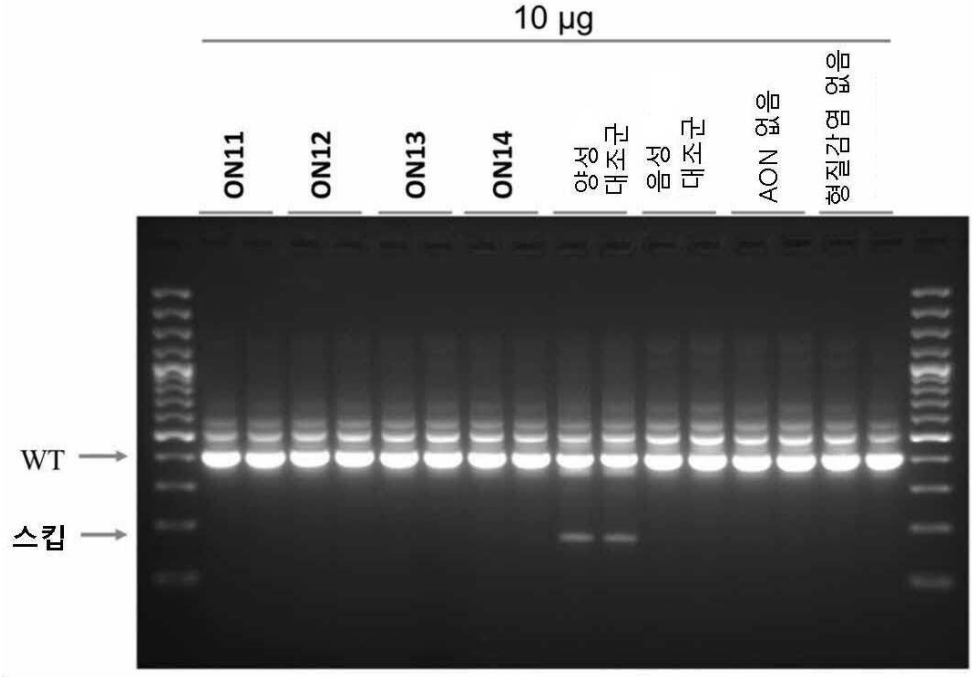
도면8


3 μg
10 μg
ON2
ON2
ON1
ON1
양성 대조군
음성 대조군
ON2
ON2
ON1
ON1
양성 대조군
음성 대조군
AON 없음
형질감염 없음
WT
= 334 bp
스킵
= 121 bp

도면9a



도면9b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Alpha Anomeric SAS

<120> OLIGONUCLEOTIDES CONJUGATES COMPRISING
7'-5'-ALPHA-ANOMERIC-BICYCLIC SUGAR NUCLEOSIDES

<130> P5757PC00

<150> US 62/670,319

<151> 2018-05-11

<160> 425

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

ggtttgatct ttacggta 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

gtttgatctt tacggtag 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

tttgatcttt acggtaga 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

ttgatcttta cggtagaa 18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

tgatctttac ggtagaag 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

gatctttacg gtagaagg 18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

atctttacgg tagaagga 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

tctttacggt agaaggaa 18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

ctttacggta gaaggaac 18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

tttacggtag aaggaact 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

ttacggtaga aggaacta 18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

tacggtagaa ggaactac 18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

acggtagaag gaactaca 18

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

ggtttgatct ttacggt 17

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

gtttgatctt tacggta 17

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

tttgatcttt acggtag 17

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

ttgatcttta cggtaga 17

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

tgatctttac ggtagaa 17

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

gatctttacg gtagaag 17

<210> 20

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

atctttacgg tagaagg 17

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

tctttacggt agaagga 17

<210> 22

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 22

ctttacggta gaaggaa 17

<210> 23

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

tttacggtag aaggaac 17

<210> 24

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

ttacggtaga aggaact 17

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

tacggtagaa ggaacta 17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

acggtagaag gaactac 17

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

cggtagaagg aactaca 17

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

ggtttgatct ttacgg 16

<210> 29

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 29

gtttgatctt tacggt 16

<210> 30

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 30

tttgatcttt acggta 16

<210> 31

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

ttgatcttta cggtag 16

<210> 32

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 32

tgatctttac ggtaga 16

<210> 33

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 33

gatctttacg gtagaa 16

<210> 34

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 34

atctttacgg tagaag 16

<210> 35

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 35

tctttacggt agaagg 16

<210> 36

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 36

ctttacggta gaagga 16

<210> 37

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 37

tttacggtag aaggaa 16

<210> 38

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 38

ttacggtaga aggaac 16

<210> 39

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 39

tacggtagaa ggaact 16

<210> 40

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 40

acggtagaag gaacta 16

<210> 41

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 41

cggtagaagg aactac 16

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 42

ggtagaagga actaca 16

<210> 43

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 43

ggtttgatct ttacg 15

<210> 44

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 44

gtttgatctt tacgg 15

<210> 45

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 45

tttgatcttt acggt 15

<210> 46

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 46

ttgatcttta cggta 15

<210> 47

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 47

tgatctttac ggtag 15

<210> 48

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 48

gatctttacg gtaga 15

<210> 49

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 49

atctttacgg tagaa 15

<210> 50

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 50

tctttacggt agaag 15

<210> 51

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 51

ctttacggta gaagg 15

<210> 52

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 52

tttacggtag aagga 15

<210> 53

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 53

ttacggtaga aggaa 15

<210> 54

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 54

tacggtagaa ggaac 15

<210> 55

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 55

acggtagaag gaact 15

<210> 56

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 56

cggtagaagg aacta 15

<210> 57

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 57

ggtagaagga actac 15

<210> 58

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 58

gtagaaggaa ctaca 15

<210> 59

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 59

ggtttgatct ttac 14

<210> 60

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 60

gtttgatctt tacg 14

<210> 61

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 61

tttgatcttt acgg 14

<210> 62

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 62

ttgatcttta cggt 14

<210> 63

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 63

tgatctttac ggta 14

<210> 64

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 64

gatctttacg gtag 14

<210> 65

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 65

atctttacgg taga 14

<210> 66

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 66

tctttacggt agaa 14

<210> 67

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 67

ctttacggta gaag 14

<210> 68

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 68

tttacggtag aagg 14

<210> 69

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 69

ttacggtaga agga 14

<210> 70

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 70

tacggtagaa ggaa 14

<210> 71

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 71

acggtagaag gaac 14

<210> 72

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 72

cggtagaagg aact 14

<210> 73

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 73

ggtagaagga acta 14

<210> 74

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 74

gtagaaggaa ctac 14

<210> 75

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 75

tagaaggaac taca 14

<210> 76

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 76

catgttcttg tggaagtc 18

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 77

atgttcttgt ggaagtct 18

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 78

tgttcttgtg gaagtctt 18

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 79

gttcttgtgg aagtcttg 18

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 80

ttcttgtgga agtcttgg 18

<210> 81

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 81

tcttgtggaa gtcttggc 18

<210> 82

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 82

cttgtggaag tcttggcc 18

<210> 83

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 83

ttgtggaagt cttggcct 18

<210> 84

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 84

tgtggaagtc ttggcctc 18

<210> 85

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 85

gtggaagtct tggcctcc 18

<210> 86

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 86

tggaagtctt ggcctccg 18

<210> 87

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 87

ggaagtcttg gcctccgt 18

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 88

gaagtcttgg cctccgtt 18

<210> 89

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 89

aagtcttggc ctccgttg 18

<210> 90

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 90

agtcttggcc tccgttgt 18

<210> 91

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 91

gtcttggcct ccgttgtc 18

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 92

tcttggcctc cgttgtca 18

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 93

cttggcctcc gttgtcaa 18

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 94

ttggcctccg ttgtcaac 18

<210> 95

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 95

tggcctccgt tgtcaact 18

<210> 96

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 96

ggcctccgtt gtcaactt 18

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 97

gcctccgttg tcaactta 18

<210> 98

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 98

cctccgttgt caacttac 18

<210> 99

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 99

ctccgttgtc aacttact 18

<210> 100

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 100

tccgttgtca acttactt 18

<210> 101

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 101

ccgttgtcaa cttacttt 18

<210> 102

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 102

cgttgtcaac ttacttta 18

<210> 103

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 103

gttgtcaact tactttac 18

<210> 104

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 104

ttgtcaactt actttaca 18

<210> 105

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 105

tgtcaactta ctttacaa 18

<210> 106

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 106

gtcaacttac tttacaat 18

<210> 107

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 107

catgttcttg tggaagt 17

<210> 108

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 108

atgttcttgt ggaagtc 17

<210> 109

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 109

tgttcttgtg gaagtct 17

<210> 110

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 110

gttcttgtgg aagtctt 17

<210> 111

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 111

ttcttgtgga agtcttg 17

<210> 112

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 112

tcttgtggaa gtcttgg 17

<210> 113

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 113

cttgtggaag tcttggc 17

<210> 114

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 114

ttgtggaagt cttggcc 17

<210> 115

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 115

tgtggaagtc ttggcct 17

<210> 116

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 116

gtggaagtct tggcctc 17

<210> 117

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 117

tggaagtctt ggcctcc 17

<210> 118

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 118

ggaagtcttg gcctccg 17

<210> 119

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 119

gaagtcttgg cctccgt 17

<210> 120

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 120

aagtcttggc ctccgtt 17

<210> 121

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 121

agtcttggcc tccgttg 17

<210> 122

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 122

gtcttggcct ccgttgt 17

<210> 123

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 123

tcttggcctc cgttgtc 17

<210> 124

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 124

cttggcctcc gttgtca 17

<210> 125

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 125

ttggcctccg ttgtcaa 17

<210> 126

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 126

tggcctccgt tgtcaac 17

<210> 127

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 127

ggcctccgtt gtcaact 17

<210> 128

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 128

gcctccgttg tcaactt 17

<210> 129

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 129

cctccgttgt caactta 17

<210> 130

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 130

ctccgttgtc aacttac 17

<210> 131

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 131

tccgttgtca acttact 17

<210> 132

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 132

ccgttgtcaa cttactt 17

<210> 133

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 133

cgttgtcaac ttacttt 17

<210> 134

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 134

gttgtcaact tacttta 17

<210> 135

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 135

ttgtcaactt actttac 17

<210> 136

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 136

tgtcaactta ctttaca 17

<210> 137

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 137

gtcaacttac tttacaa 17

<210> 138

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 138

tcaacttact ttacaat 17

<210> 139

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 139

catgttcttg tggaag 16

<210> 140

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 140

atgttcttgt ggaagt 16

<210> 141

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 141

tgttcttgtg gaagtc 16

<210> 142

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 142

gttcttgtgg aagtct 16

<210> 143

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 143

ttcttgtgga agtctt 16

<210> 144

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 144

tcttgtggaa gtcttg 16

<210> 145

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 145

cttgtggaag tcttgg 16

<210> 146

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 146

ttgtggaagt cttggc 16

<210> 147

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 147

tgtggaagtc ttggcc 16

<210> 148

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 148

gtggaagtct tggcct 16

<210> 149

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 149

tggaagtctt ggcctc 16

<210> 150

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 150

ggaagtcttg gcctcc 16

<210> 151

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 151

gaagtcttgg cctccg 16

<210> 152

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 152

aagtcttggc ctccgt 16

<210> 153

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 153

agtcttggcc tccgtt 16

<210> 154

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 154

gtcttggcct ccgttg 16

<210> 155

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 155

tcttggcctc cgttgt 16

<210> 156

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 156

cttggcctcc gttgtc 16

<210> 157

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 157

ttggcctccg ttgtca 16

<210> 158

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 158

tggcctccgt tgtcaa 16

<210> 159

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 159

ggcctccgtt gtcaac 16

<210> 160

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 160

gcctccgttg tcaact 16

<210> 161

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 161

cctccgttgt caactt 16

<210> 162

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 162

ctccgttgtc aactta 16

<210> 163

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 163

tccgttgtca acttac 16

<210> 164

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 164

ccgttgtcaa cttact 16

<210> 165

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 165

cgttgtcaac ttactt 16

<210> 166

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 166

gttgtcaact tacttt 16

<210> 167

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 167

ttgtcaactt acttta 16

<210> 168

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 168

tgtcaactta ctttac 16

<210> 169

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 169

gtcaacttac tttaca 16

<210> 170

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 170

tcaacttact ttacaa 16

<210> 171

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 171

caacttactt tacaat 16

<210> 172

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 172

catgttcttg tggaa 15

<210> 173

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 173

atgttcttgt ggaag 15

<210> 174

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 174

tgttcttgtg gaagt 15

<210> 175

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 175

gttcttgtgg aagtc 15

<210> 176

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 176

ttcttgtgga agtct 15

<210> 177

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 177

tcttgtggaa gtctt 15

<210> 178

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 178

cttgtggaag tcttg 15

<210> 179

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 179

ttgtggaagt cttgg 15

<210> 180

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 180

tgtggaagtc ttggc 15

<210> 181

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 181

gtggaagtct tggcc 15

<210> 182

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 182

tggaagtctt ggcct 15

<210> 183

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 183

ggaagtcttg gcctc 15

<210> 184

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 184

gaagtcttgg cctcc 15

<210> 185

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 185

aagtcttggc ctccg 15

<210> 186

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 186

agtcttggcc tccgt 15

<210> 187

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 187

gtcttggcct ccgtt 15

<210> 188

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 188

tcttggcctc cgttg 15

<210> 189

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 189

cttggcctcc gttgt 15

<210> 190

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 190

ttggcctccg ttgtc 15

<210> 191

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 191

tggcctccgt tgtca 15

<210> 192

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 192

ggcctccgtt gtcaa 15

<210> 193

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 193

gcctccgttg tcaac 15

<210> 194

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 194

cctccgttgt caact 15

<210> 195

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 195

ctccgttgtc aactt 15

<210> 196

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 196

tccgttgtca actta 15

<210> 197

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 197

ccgttgtcaa cttac 15

<210> 198

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 198

cgttgtcaac ttact 15

<210> 199

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 199

gttgtcaact tactt 15

<210> 200

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 200

ttgtcaactt acttt 15

<210> 201

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 201

tgtcaactta cttta 15

<210> 202

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 202

gtcaacttac tttac 15

<210> 203

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 203

tcaacttact ttaca 15

<210> 204

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 204

caacttactt tacaa 15

<210> 205

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 205

aacttacttt acaat 15

<210> 206

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 206

catgttcttg tgga 14

<210> 207

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 207

atgttcttgt ggaa 14

<210> 208

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 208

tgttcttgtg gaag 14

<210> 209

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 209

gttcttgtgg aagt 14

<210> 210

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 210

ttcttgtgga agtc 14

<210> 211

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 211

tcttgtggaa gtct 14

<210> 212

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 212

cttgtggaag tctt 14

<210> 213

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 213

ttgtggaagt cttg 14

<210> 214

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 214

tgtggaagtc ttgg 14

<210> 215

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 215

gtggaagtct tggc 14

<210> 216

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 216

tggaagtctt ggcc 14

<210> 217

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 217

ggaagtcttg gcct 14

<210> 218

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 218

gaagtcttgg cctc 14

<210> 219

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 219

aagtcttggc ctcc 14

<210> 220

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 220

agtcttggcc tccg 14

<210> 221

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 221

gtcttggcct ccgt 14

<210> 222

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 222

tcttggcctc cgtt 14

<210> 223

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 223

cttggcctcc gttg 14

<210> 224

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 224

ttggcctccg ttgt 14

<210> 225

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 225

tggcctccgt tgtc 14

<210> 226

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 226

ggcctccgtt gtca 14

<210> 227

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 227

gcctccgttg tcaa 14

<210> 228

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 228

cctccgttgt caac 14

<210> 229

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 229

ctccgttgtc aact 14

<210> 230

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 230

tccgttgtca actt 14

<210> 231

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 231

ccgttgtcaa ctta 14

<210> 232

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 232

cgttgtcaac ttac 14

<210> 233

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 233

gttgtcaact tact 14

<210> 234

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 234

ttgtcaactt actt 14

<210> 235

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 235

tgtcaactta cttt 14

<210> 236

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 236

gtcaacttac ttta 14

<210> 237

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 237

tcaacttact ttac 14

<210> 238

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 238

caacttactt taca 14

<210> 239

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 239

aacttacttt acaa 14

<210> 240

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 240

acttacttta caat 14

<210> 241

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 241

ccatagaatg tccttgag 18

<210> 242

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 242

catagaatgt ccttgagg 18

<210> 243

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 243

atagaatgtc cttgaggt 18

<210> 244

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 244

tagaatgtcc ttgaggtc 18

<210> 245

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 245

agaatgtcct tgaggtcc 18

<210> 246

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 246

gaatgtcctt gaggtcct 18

<210> 247

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 247

aatgtccttg aggtccta 18

<210> 248

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 248

atgtccttga ggtcctac 18

<210> 249

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 249

tgtccttgag gtcctacc 18

<210> 250

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 250

gtccttgagg tcctaccg 18

<210> 251

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 251

tccttgaggt cctaccgt 18

<210> 252

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 252

ccttgaggtc ctaccgta 18

<210> 253

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 253

cttgaggtcc taccgtaa 18

<210> 254

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 254

ttgaggtcct accgtaac 18

<210> 255

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 255

tgaggtccta ccgtaacc 18

<210> 256

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 256

gaggtcctac cgtaaccc 18

<210> 257

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 257

aggtcctacc gtaacccg 18

<210> 258

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 258

ggtcctaccg taacccgt 18

<210> 259

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 259

gtcctaccgt aacccgtc 18

<210> 260

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 260

tcctaccgta acccgtcg 18

<210> 261

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 261

cctaccgtaa cccgtcgc 18

<210> 262

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 262

ctaccgtaac ccgtcgcc 18

<210> 263

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 263

taccgtaacc cgtcgccg 18

<210> 264

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 264

accgtaaccc gtcgccgt 18

<210> 265

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 265

ccgtaacccg tcgccgtt 18

<210> 266

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 266

cgtaacccgt cgccgttt 18

<210> 267

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 267

gtaacccgtc gccgtttg 18

<210> 268

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 268

taacccgtcg ccgtttga 18

<210> 269

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 269

aacccgtcgc cgtttgac 18

<210> 270

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 270

acccgtcgcc gtttgaca 18

<210> 271

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 271

ccatagaatg tccttga 17

<210> 272

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 272

catagaatgt ccttgag 17

<210> 273

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 273

atagaatgtc cttgagg 17

<210> 274

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 274

tagaatgtcc ttgaggt 17

<210> 275

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 275

agaatgtcct tgaggtc 17

<210> 276

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 276

gaatgtcctt gaggtcc 17

<210> 277

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 277

taatgtcctt gaggtcct 18

<210> 278

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 278

atgtccttga ggtccta 17

<210> 279

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 279

tgtccttgag gtcctac 17

<210> 280

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 280

gtccttgagg tcctacc 17

<210> 281

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 281

tccttgaggt cctaccg 17

<210> 282

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 282

ccttgaggtc ctaccgt 17

<210> 283

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 283

cttgaggtcc taccgta 17

<210> 284

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 284

ttgaggtcct accgtaa 17

<210> 285

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 285

tgaggtccta ccgtaac 17

<210> 286

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 286

gaggtcctac cgtaacc 17

<210> 287

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 287

aggtcctacc gtaaccc 17

<210> 288

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 288

ggtcctaccg taacccg 17

<210> 289

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 289

gtcctaccgt aacccgt 17

<210> 290

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 290

tcctaccgta acccgtc 17

<210> 291

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 291

cctaccgtaa cccgtcg 17

<210> 292

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 292

ctaccgtaac ccgtcgc 17

<210> 293

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 293

taccgtaacc cgtcgcc 17

<210> 294

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 294

accgtaaccc gtcgccg 17

<210> 295

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 295

ccgtaacccg tcgccgt 17

<210> 296

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 296

cgtaacccgt cgccgtt 17

<210> 297

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 297

gtaacccgtc gccgttt 17

<210> 298

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 298

taacccgtcg ccgtttg 17

<210> 299

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 299

aacccgtcgc cgtttga 17

<210> 300

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 300

acccgtcgcc gtttgac 17

<210> 301

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 301

cccgtcgccg tttgaca 17

<210> 302

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 302

ccatagaatg tccttg 16

<210> 303

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 303

catagaatgt ccttga 16

<210> 304

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 304

atagaatgtc cttgag 16

<210> 305

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 305

tagaatgtcc ttgagg 16

<210> 306

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 306

agaatgtcct tgaggt 16

<210> 307

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 307

gaatgtcctt gaggtc 16

<210> 308

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 308

aatgtccttg aggtcc 16

<210> 309

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 309

atgtccttga ggtcct 16

<210> 310

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 310

tgtccttgag gtccta 16

<210> 311

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 311

gtccttgagg tcctac 16

<210> 312

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 312

tccttgaggt cctacc 16

<210> 313

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 313

ccttgaggtc ctaccg 16

<210> 314

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 314

cttgaggtcc taccgt 16

<210> 315

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 315

ttgaggtcct accgta 16

<210> 316

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 316

tgaggtccta ccgtaa 16

<210> 317

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 317

gaggtcctac cgtaac 16

<210> 318

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 318

aggtcctacc gtaacc 16

<210> 319

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 319

ggtcctaccg taaccc 16

<210> 320

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 320

gtcctaccgt aacccg 16

<210> 321

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 321

tcctaccgta acccgt 16

<210> 322

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 322

cctaccgtaa cccgtc 16

<210> 323

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 323

ctaccgtaac ccgtcg 16

<210> 324

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 324

taccgtaacc cgtcgc 16

<210> 325

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 325

accgtaaccc gtcgcc 16

<210> 326

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 326

ccgtaacccg tcgccg 16

<210> 327

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 327

cgtaacccgt cgccgt 16

<210> 328

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 328

gtaacccgtc gccgtt 16

<210> 329

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 329

taacccgtcg ccgttt 16

<210> 330

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 330

aacccgtcgc cgtttg 16

<210> 331

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 331

acccgtcgcc gtttga 16

<210> 332

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 332

cccgtcgccg tttgac 16

<210> 333

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 333

ccgtcgccgt ttgaca 16

<210> 334

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 334

ccatagaatg tcctt 15

<210> 335

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 335

catagaatgt ccttg 15

<210> 336

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 336

atagaatgtc cttga 15

<210> 337

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 337

tagaatgtcc ttgag 15

<210> 338

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 338

agaatgtcct tgagg 15

<210> 339

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 339

gaatgtcctt gaggt 15

<210> 340

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 340

aatgtccttg aggtc 15

<210> 341

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 341

atgtccttga ggtcc 15

<210> 342

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 342

tgtccttgag gtcct 15

<210> 343

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 343

gtccttgagg tccta 15

<210> 344

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 344

tccttgaggt cctac 15

<210> 345

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 345

ccttgaggtc ctacc 15

<210> 346

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 346

cttgaggtcc taccg 15

<210> 347

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 347

ttgaggtcct accgt 15

<210> 348

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 348

tgaggtccta ccgta 15

<210> 349

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 349

gaggtcctac cgtaa 15

<210> 350

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 350

aggtcctacc gtaac 15

<210> 351

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 351

ggtcctaccg taacc 15

<210> 352

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 352

gtcctaccgt aaccc 15

<210> 353

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 353

tcctaccgta acccg 15

<210> 354

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 354

cctaccgtaa cccgt 15

<210> 355

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 355

ctaccgtaac ccgtc 15

<210> 356

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 356

taccgtaacc cgtcg 15

<210> 357

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 357

accgtaaccc gtcgc 15

<210> 358

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 358

ccgtaacccg tcgcc 15

<210> 359

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 359

cgtaacccgt cgccg 15

<210> 360

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 360

gtaacccgtc gccgt 15

<210> 361

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 361

taacccgtcg ccgtt 15

<210> 362

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 362

aacccgtcgc cgttt 15

<210> 363

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 363

acccgtcgcc gtttg 15

<210> 364

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 364

cccgtcgccg tttga 15

<210> 365

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 365

ccgtcgccgt ttgac 15

<210> 366

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 366

cgtcgccgtt tgaca 15

<210> 367

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 367

ccatagaatg tcct 14

<210> 368

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 368

catagaatgt cctt 14

<210> 369

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 369

atagaatgtc cttg 14

<210> 370

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 370

tagaatgtcc ttga 14

<210> 371

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 371

agaatgtcct tgag 14

<210> 372

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 372

gaatgtcctt gagg 14

<210> 373

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 373

aatgtccttg aggt 14

<210> 374

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 374

atgtccttga ggtc 14

<210> 375

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 375

tgtccttgag gtcc 14

<210> 376

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 376

gtccttgagg tcct 14

<210> 377

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 377

tccttgaggt ccta 14

<210> 378

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 378

ccttgaggtc ctac 14

<210> 379

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 379

cttgaggtcc tacc 14

<210> 380

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 380

ttgaggtcct accg 14

<210> 381

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 381

tgaggtccta ccgt 14

<210> 382

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 382

gaggtcctac cgta 14

<210> 383

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 383

aggtcctacc gtaa 14

<210> 384

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 384

ggtcctaccg taac 14

<210> 385

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 385

gtcctaccgt aacc 14

<210> 386

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 386

tcctaccgta accc 14

<210> 387

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 387

cctaccgtaa cccg 14

<210> 388

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 388

ctaccgtaac ccgt 14

<210> 389

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 389

taccgtaacc cgtc 14

<210> 390

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 390

accgtaaccc gtcg 14

<210> 391

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 391

ccgtaacccg tcgc 14

<210> 392

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 392

cgtaacccgt cgcc 14

<210> 393

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 393

gtaacccgtc gccg 14

<210> 394

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 394

taacccgtcg ccgt 14

<210> 395

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 395

aacccgtcgc cgtt 14

<210> 396

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 396

acccgtcgcc gttt 14

<210> 397

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 397

cccgtcgccg tttg 14

<210> 398

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 398

ccgtcgccgt ttga 14

<210> 399

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 399

cgtcgccgtt tgac 14

<210> 400

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 400

gtcgccgttt gaca 14

<210> 401

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 401

ttttttcttt tcttcttttt tccttttttgc aaaaacccaa aatattttag ctcctactca 60

gactgttact ctggtgacac aacctgtggt tactaaggaa actgccatct ccaaactaga 120

aatgccatct tccttgatgt tggaggtacc tgctctggca gatttcaacc gggcttggac 180

agaacttacc gactggcttt ctctgcttga tcaagttata aaatcacaga gggtgatggt 240

gggtgacctt gaggatatca acgagatgat catcaagcag aaggtatgag aaaaaatgat 300

aaaagttggc agaagttttt ctttaaaatg aag 333

<210> 402

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 402

ccaaactaga aatgccatct tccttgatgt 30

<210> 403

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 403

ggtttgatct ttacggtaga aggaactaca 30

<210> 404

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 404

ctttacggta gaaggaact 19

<210> 405

<211> 312

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 405

cctccagact agcatttact actatatatt tatttttcct tttattctag ttgaaagaat 60

tcagaatcag tgggatgaag tacaagaaca ccttcagaac cggaggcaac agttgaatga 120

aatgttaaag gattcaacac aatggctgga agctaaggaa gaagctgagc aggtcttagg 180

acaggccaga gccaagcttg agtcatggaa ggagggtccc tatacagtag atgcaatcca 240

aaagaaaatc acagaaacca aggttagtat caaagatacc tttttaaaat aaaatactgg 300

ttacatttga ta 312

<210> 406

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 406

gtacaagaac accttcagaa ccggaggcaa cagttgaatg aaatgttaa 49

<210> 407

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 407

catgttcttg tggaagtctt ggcctccgtt gtcaacttac tttacaat 48

<210> 408

<211> 276

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 408

taaaaagaca tggggcttca tttttgtttt gccttttttgg tatcttacag gaactccagg 60

atggcattgg gcagcggcaa actgttgtca gaacattgaa tgcaactggg gaagaaataa 120

ttcagcaatc ctcaaaaaca gatgccagta ttctacagga aaaattggga agcctgaatc 180

tgcggtggca ggaggtctgc aaacagctgt cagacagaaa aaagaggtag ggcgacagat 240

ctaataggaa tgaaaacatt ttagcagact ttttaa 276

<210> 409

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 409

ggtatcttac aggaactcca ggatggcatt gggcagcggc aaactgt 47

<210> 410

<

211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 410

ccatagaatg tccttgaggt cctaccgtaa cccgtcgccg tttgaca 47

<210> 411

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 411

tcactttcat aatgctgg 18

<210> 412

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine, thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 412

tccattcggc tccaa 15

<210> 413

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine, thymine and methylcytosine, respectively.

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(15)

<223> Phosphorothioate internucleotide linkage group at the 7' end of the nucleotide.

<400> 413

tccattcggc tccaa 15

<210> 414

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine, thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 414

gatctttacg gtagaagg 18

<210> 415

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,
thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 415

atctttacgg tagaagga 18

<210> 416

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,

thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 416

tctttacggt agaaggaa 18

<210> 417

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,
thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 417

ctttacggta gaaggaac 18

<210> 418

<

211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,
thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 418

tttacggtag aaggaact 18

<210> 419

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,

thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 419

ttacggtaga aggaacta 18

<210> 420

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,
thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 420

tacggtagaa ggaactac 18

<210> 421

<

211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,
thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 421

aactagttca atatttta 18

<210> 422

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,

thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 422

ctagttcaat attttagt 18

<210> 423

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,
thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 423

agttcaatat tttagtgt 18

<210> 424

<

211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,

thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 424

ttcaatattt tagtgtct 18

<210> 425

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(18)

<223> a, g, t, c corresponds to abc-DNA modified adenine, guanine,

thymine and methylcytosine, respectively.

<400> 425

caatatttta gtgtctcc 18