



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월02일  
(11) 등록번호 10-1437824  
(24) 등록일자 2014년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07H 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7019765

(22) 출원일자(국제) 2006년03월06일

심사청구일자 2011년03월03일

(85) 번역문제출일자 2007년08월29일

(65) 공개번호 10-2007-0110309

(43) 공개일자 2007년11월16일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/060489

(87) 국제공개번호 WO 2006/094963

국제공개일자 2006년09월14일

(30) 우선권주장

05101674.9 2005년03월04일

유럽특허청(EPO)(EP)

60/660,549 2005년03월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

NURMINEN, E. J. et al., Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 2001, Vol. 11, pages 2159-2165

HAYAKAWA, Y. et al., Journal of the American Chemical Society, 2001, Vol. 123, No. 34, pages 8165-8176

전체 청구항 수 : 총 14 항

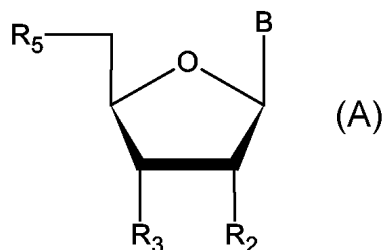
심사관 : 장창국

(54) 발명의 명칭 올리고뉴클레오타이드의 합성

(57) 요약

하기 단계를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법:

a) 하기 화학식 A 를 갖는 히드록실 함유 화합물의 제공 단계:



[식 중,

B 는 헤테로시클릭 염기이고,

i)

R<sub>2</sub> 는 H, 보호된 2'-히드록실기, F, 보호된 아미노기, O-알킬기, O-치환된 알킬, 치환된 알킬아미노 또는 C4'-O2' 메틸렌 연결부이고,

R<sub>3</sub> 는 OR'<sub>3</sub>, NHR'<sub>3</sub>, NR'<sub>3</sub> (식 중, R'<sub>3</sub> 은 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드이고, R<sub>3</sub>, R'<sub>3</sub> 은 독립적으로 아민보호기임) 이고,

(뒷면에 계속)

$R_5$  는 OH 임

또는

ii)

$R_2$  는 H, 보호된 2'-히드록실기, F, 보호된 아미노기, O-알킬기, O-치환된 알킬, 치환된 알킬아미노 또는 C4'-O2' 메틸렌 연결부이고,

$R_3$  는 OH 이고

$R_5$  는  $OR'_5$  이고  $R'_5$  는 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드임

또는

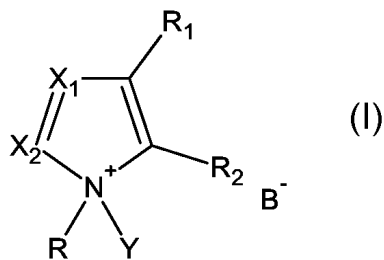
iii)

$R_2$  는 OH 이고

$R_3$  는  $OR'_3$ ,  $NHR''_3$ ,  $NR'''_3$  (식 중,  $R'_3$  은 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드이고,  $R''_3$ ,  $R'''_3$  은 독립적으로 아민 보호기임)이고,

$R_5$  는  $OR'_5$  이고  $R'_5$  는 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드이다],

b) 하기 화학식 I 을 갖는 활성화제 (활성화제 I) 의 존재하에서 포스포틸화제와 상기 화합물을 반응시켜 포스포틸화 화합물을 제조하는 단계:



[식 중,

$R$  = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴이고,

$R_1$ ,  $R_2$  = H 이거나, 또는 함께 5 내지 6-원 고리를 형성하고,

$X_1$ ,  $X_2$  = 독립적으로 N 또는 CH 이고,

$Y$  = H 또는  $Si(R_4)_3$  (식 중,  $R_4$ = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴임) 이고,

$B$  = 탈양성자화 산이다],

c) 상기 포스포틸화 화합물을 단리 없이 화학식 A [식 중,  $R_5$ ,  $R_3$ ,  $R_2$ ,  $B$  는 독립적으로 선택되나, 상기과 동일한 정의를 지님] 를 갖는 제 2 의 화합물과 활성화제 I 과 상이한 활성화제 II 의 존재하에서 반응시키는 단계.

(72) 발명자

**홀펠트 안드레아스**

독일 33790 할레/베스트팔렌 그뤼너 베크 5

**그뢰셀 올라프**

독일 33790 할레/베스트팔렌 암 라이바흐 9

**키르히호프 크리스티네**

독일 33790 할레/베스트팔렌 파르호르슈터 슈트라스 157

**링크 프리츠**

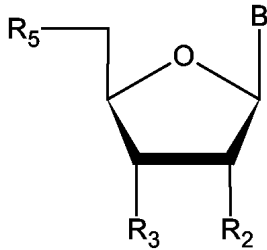
독일 51427 벤스베르크 부헤날레 20

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 단계를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법:

a) 하기 화학식을 갖는 히드록실 함유 화합물의 제공 단계:



[식 중,

B 는 헤테로시클릭 염기이고,

i)

$R_2$  는 H, 보호된 2'-히드록실기, F, 보호된 아미노기, O-알킬기, O-치환된 알킬, 치환된 알킬아미노 또는 C4'-O2' 메틸렌 연결부이고,

$R_3$  는  $OR'_3$ ,  $NHR''_3$ ,  $NR'''_3R''''_3$  (식 중,  $R'_3$  은 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드이고,  $R''_3$ ,  $R'''_3$  은 독립적으로 아민보호기임) 이고,

$R_5$  는 OH 임

또는

ii)

$R_2$  는 H, 보호된 2'-히드록실기, F, 보호된 아미노기, O-알킬기, O-치환된 알킬, 치환된 알킬아미노 또는 C4'-O2' 메틸렌 연결부이고,

$R_3$  는 OH 이고

$R_5$  는  $OR'_5$  이고  $R'_5$  는 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드임

또는

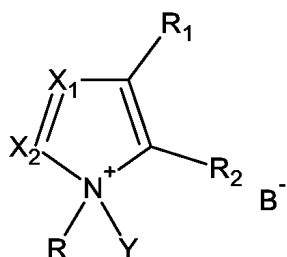
iii)

$R_2$  는 OH 이고

$R_3$  는  $OR'_3$ ,  $NHR''_3$ ,  $NR'''_3R''''_3$  (식 중,  $R'_3$  은 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드이고,  $R''_3$ ,  $R'''_3$  은 독립적으로 아민 보호기임) 이고,

$R_5$  는  $OR'_5$  이고  $R'_5$  는 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오타이드 또는 보호된 올리고뉴클레오타이드이다],

b) 하기 화학식 I 을 갖는 활성화제 (활성화제 I) 의 존재하에서 포스포틸화제와 상기 화합물을 반응시켜 포스포틸화 화합물을 제조하는 단계:



[식 중,

R = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴이고,

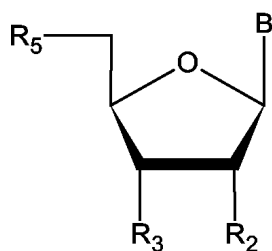
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H 이거나, 또는 함께 5 내지 6-원 고리를 형성하고,

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> = 독립적으로 N 또는 CH 이고,

Y = H 또는 Si(R<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (식 중, R<sub>4</sub> = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴임) 이고,

B<sup>-</sup> = 탈양성자화 산이다],

c) 활성화제 I 과 상이한 활성화제 II 의 존재하에서, 하기 화학식을 갖는 제 2 의 화합물과, 단리하지 않고 상기 포스피틸화 화합물을 반응시키는 단계:

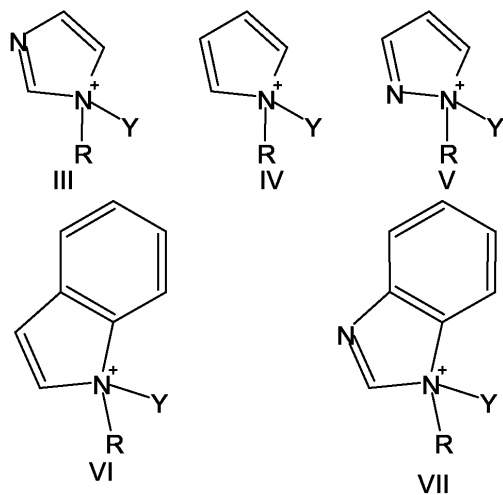


[식 중,

R<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, B 는 독립적으로 선택되나, 상기와 동일한 정의를 지닌다].

## 청구항 2

제 1 항에 있어서, 화학식 I 의 활성화제가 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 화학식을 갖는 방법:



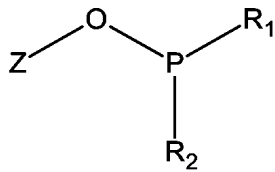
[식 중,

Y 는 제 1 항에서 정의한 바와 같고

R 은 메틸, 페닐 또는 벤질이다].

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 포스포틸화제가 하기 화학식 II 를 갖는 방법:



[식 중, Z 는 이탈기를 나타내고, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub> 는 독립적으로 제 2 차 아미노기이다].

### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 포스포틸화제가 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미다이트인 방법.

### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 탈양성자화 산이 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 메탄 술폰산, 트리플루오르메탄 술폰산, o-클로로페놀레이트로 이루어진 군으로부터 유도되는 방법.

### 청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 반응이 아세톤의 존재하에서 이루어지는 방법.

### 청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 포스포틸화제가 히드록실 함유 화합물 중 히드록실기 1 몰 당 1.0 내지 1.2 몰의 양으로 사용되는 방법.

### 청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 포스포틸화제가 히드록실 함유 화합물 중 히드록실기 1 몰 당 3 내지 5 몰의 양으로 사용되는 방법.

### 청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 중합체성 알코올이 제 1 항의 단계 b) 후에 첨가되는 방법.

### 청구항 10

제 9 항에 있어서, 중합체성 알코올이 폴리비닐 알코올인 방법.

### 청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 탈양성자화 산이 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 메탄 술폰산, 트리플루오르메탄 술폰산 (트리플레이트), o-클로로페놀레이트 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 유도되는 방법.

### 청구항 12

삭제

### 청구항 13

제 11 항에 있어서, 95% (w/w) 이상의 반응 매질이 아세톤인 방법.

#### 청구항 14

제 1 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 합성을 위한 반응 매질 또는 공용매로서의 화학식  $R_x-C(=O)-R_y$  (식 중,  $R_x$  및  $R_y$  는 독립적으로  $C_1-C_6$  알킬이거나, 또는 함께 시클로알킬을 형성함) 을 갖는 케톤이 사용되는 방법.

#### 청구항 15

제 14 항에 있어서, 케톤이 아세톤, 부타논, 펜타논, 헥사논, 시클로헥사논 또는 이의 혼합물인 방법.

### 명세서

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 올리고뉴클레오타이드는 생명 과학의 각종 분야에서 중요한 역할을 하는 주요 화합물이다. 이는 예를 들어 유전자 발현 분석 분야에서 프로브 (probe) 로서, PCR 또는 DNA 시퀀싱 (sequencing)의 프라이머 (primer) 로서 사용되었다.

[0003] 또한, 즉 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 다수의 잠재적인 치료학적 적용이 존재한다.

[0004] 적용부분의 수가 증가하면서, 다량의 올리고뉴클레오타이드가 요구되고, 따라서 개선된 합성법 개발에 대한 지속적인 요구가 존재한다.

[0005] 일반적 개관을 위해서, 예를 들어 문헌 ["Antisense - From Technology to Therapy" Blackwell Science (Oxford, 1997)]을 참고한다.

[0006] 올리고뉴클레오타이드의 합성에서 두드러진 한 가지 유형의 구성 단위는 포스포라미다이트이다; 예를 들어, 문헌[S.L. Beaucage, M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters 1859 (1981) 22] 참고. 이러한 뉴클레오타이드, 테옥시리보뉴클레오타이드 및 상기 두 가지의 유도체의 포스포라미다이트는 시판되고 있다. 일반적인 고체상 합성에서 3'-O-포스포라미다이트가 사용되지만, 기타 합성 공정에서는 5'-O 및 2'-O-포스포라미다이트 또한 사용된다. 이러한 뉴클레오타이드 포스포라미다이트의 제조법에서 한 가지 단계는 (보호된) 뉴클레오타이드의 포스포티탈화이다. 포스포티탈화 후에, 제조된 아미다이트는 통상적으로 비용 집약적인 분리 방법, 예를 들어 크로마토그래피를 이용해 분리된다. 분리 후에, 민감성 (sensitive) 아미다이트는 특정한 조건 (예를 들어, 저온, 방수) 하에서 저장되어야 한다. 저장 동안에, 아미다이트의 품질은 어느 정도로 분해 및 가수분해되어 저하될 수 있다. 이러한 부 반응 둘 모두가 나타날 수 있고 그 결과물이 검출될 수 있다. 가장 통상적으로, 남아있는 3'-, 5'- 또는 2'-O 히드록실기를 포스포티탈화하기 전에, 뉴클레오타이드에 존재하는 히드록실기 및 아미노기 및 기타 작용기를 보호화한다.

[0007] 이어서 상기 포스포라미다이트는 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 히드록실기와 커플링된다. 또한 분리된 아미다이트를 사용하는 것으로 아미다이트 커플링 동안 부분적인 가수분해가 일어날 수 있다.

[0008] 포스포라미다이트는 고가의 화합물이다. 테옥시아미다이트의 대표적인 비용은 g 당 € 40.00 의 범위이다. 상응하는 RNA 구성 단위는 보다 훨씬 고가이다.

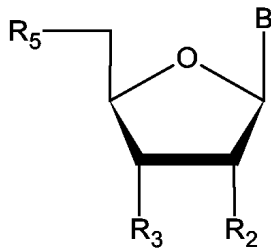
#### 발명의 상세한 설명

[0009] 본 발명의 개요

[0010] 본 발명의 목적은, 선행 기술의 단점을 적어도 일부 극복한 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 한 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 제조 방법을 제공한다:

[0012] a) 하기 화학식을 갖는 히드록실 함유 화합물을 제공하는 단계:



[0013]

[0014] [식 중,

[0015] B 는 헤테로시클릭 염기이고,

[0016] i)

[0017] R<sub>2</sub> 는 H, 보호된 2'-히드록실기, F, 보호된 아미노기, O-알킬기, O-치환된 알킬, 치환된 알킬아미노 또는 C4'-O2' 메틸렌 연결부 (linkage) 이고,

[0018] R<sub>3</sub> 는 OR'<sub>3</sub>, NHR'<sub>3</sub>, NR'<sub>3</sub>R'''<sub>3</sub> (식 중, R'<sub>3</sub> 은 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오티드 또는 보호된 올리고뉴클레오티드이고, R'<sub>3</sub>, R'''<sub>3</sub> 은 독립적으로 아민 보호기임) 이고,

[0019] R<sub>5</sub> 은 OH 임,

[0020] 또는

[0021] ii)

[0022] R<sub>2</sub> 은 H, 보호된 2'-히드록실기, F, 보호된 아미노기, O-알킬기, O-치환된 알킬, 치환된 알킬아미노 또는 C4'-O2' 메틸렌 연결부이고,

[0023] R<sub>3</sub> 은 OH 이고,

[0024] R<sub>5</sub> 는 OR'<sub>5</sub> 이고, R'<sub>5</sub> 는 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오티드 또는 보호된 올리고뉴클레오티드임,

[0025] 또는

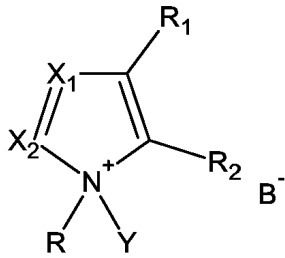
[0026] iii)

[0027] R<sub>2</sub> 는 OH 이고,

[0028] R<sub>3</sub> 은 OR'<sub>3</sub>, NHR'<sub>3</sub>, NR'<sub>3</sub>R'''<sub>3</sub> (식 중, R'<sub>3</sub> 은 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오티드 또는 보호된 올리고뉴클레오티드이고, R'<sub>3</sub>, R'''<sub>3</sub> 는 독립적으로 아민 보호기임) 이고,

[0029] R<sub>5</sub> 는 OR'<sub>5</sub> 이고, R'<sub>5</sub> 는 히드록실 보호기, 보호된 뉴클레오티드 또는 보호된 올리고뉴클레오티드이다],

[0030] b) 하기 화학식 I 를 갖는 활성화제 (활성화제 I) 의 존재하에서, 상기 화합물을 포스포티탈화제와 반응시켜 포스포티탈화 화합물을 제조하는 단계:



[0031]

[0032]

[0033]

[0034]

[0035]

[0036]

[0037]

[0038]

[식 중,

R = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴이고,

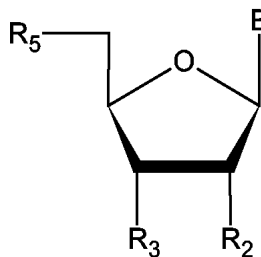
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = H 이거나, 또는 함께 5 내지 6-원 고리를 형성하고,

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> = 독립적으로 N 또는 CH 이고,

Y = H 또는 Si(R<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (식 중, R<sub>4</sub> = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴임) 이고,

B = 탈양성자화 산이다],

c) 테트라졸, 테트라졸의 유도체, 4,5-디시아노이미다졸, 피리딘-트리플루오르아세테이트 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 활성화제 II 의 존재하에서, 하기 화학식을 갖는 제 2 의 화합물과, 단리하지 않고 상기 포스포티화 화합물을 반응시키는 단계:



[0039]

[0040]

[0041]

[0042]

[0043]

[0044]

[식 중,

R<sub>5</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, B 는 독립적으로 선택되나, 상기와 동일한 의미를 가진다].

본 발명에 따르면, 포스포티화 화합물은 바람직하게는 이미다졸의 유도체인 화학식 I 을 갖는 활성화제를 이용함으로써, 뉴클레오시드, 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 히드록실기를 포스포티화하여 제조된다.

정제 또는 단리하지 않고, 제조된 민감성 포스포르아미다이트는 활성화제 I 과 상이한 활성화제 II 의 존재하에서, 뉴클레오시드, 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 히드록실기에 커플링된다. 제조된 포스포르아미다이트를 단리하지 않고, 활성화제 I 로부터 아미다이트를 분리하지 않는다. 바람직하게, 반응은 동일한 반응 용기에서 연속된다. 활성화제 II 는 활성화제 I 의 존재하에서 사용된다.

선행 기술에서의 아미다이트 커플링용 활성화제는 아미다이트 작용기의 활성화에 있어서 높은 반응성을 지닌다. 그러한 포스포티화용 활성화제를 이용함으로써, 또한 어느 정도의 "과잉반응" 이 야기된다 (예를 들어, 3'-3' 부산물). 이러한 점 및 기타 문제점을 극복하기 위해, 활성화제의 반응성을 조정한다. 그 경우에서는, 실질적으로 3'-3' 부산물과 같은 부산물이 없는 아미다이트 수준에서 선택적으로 반응이 멈출 것이다. 이러한 결과만이 (아미다이트의 원위치 (in-situ) 생성) 아미다이트 커플링을 이용하여 개시하는 것으로 인한 전반적인 접근을 지속가능하게 한다.

[0045]

[0046]

활성화제 II 는 커플링 단계의 유도능을 지닌다. 활성화제 II 를 첨가한 후에, 아미다이트는 아미다이트 커플링을 개시할 것이다.

제조된 아미다이트를 활성화하여 단계 c) 의 히드록실 함유 화합물과 반응할 수 있는 (활성화제 I 과는 상이한) 모든 활성화제 (즉, 테트라졸 및 테트라졸 유도체) 를, 활성화제 II 로서 이용하는 것이 가능하다. 바람직한 테트라졸 유도체는 벤질메르캅토테트라졸 및 에틸티오테트라졸 (ETT) 이다. 적합한 화합물은, 비(非)양성자



화 형태의 산의 수소를 가진 질소-함유 헤테로사이클, 피리딘, 피리딘 염 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 질소-함유 헤테로사이클은  $N^0-H$  결합을 가지며, 다시 말해 N 은 양성자화되지 않는다. 이러한 화합물은 산  $H^+B^-$  (식 중,  $B^-$  는 청구항에서 정의된 바와 동일한 의미를 지님) 과 같은 산과 조합함으로써 염으로서 사용될 수 있다. 추가 적합한 활성화제 II 는 피리딘, 바람직하게는 피리디늄 트리플루오로아세테이트이다.

[0047] 바람직한 화합물은 테트라졸, 테트라졸의 유도체, 4,5-디시아노이미다졸, 피리딘 트리플루오로아세테이트 및 그의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 커플링 이후, 전형적으로는 산화 (PO 형성) 또는 황화 (PS 형성) 가 이용된다. PO 형성을 위해서는 퍼옥시드 접근이 바람직하다. 이러한 반응을 임의의 추출 단계 없이 수행하는 것이 가능하다 (요오드 산화는 몇 가지 추출 단계를 필요로 한다).

[0049] 황화 경우에, 황화를 위한 공지된 모든 시약 (즉, PADS, S-테트라, 뷰케이지 (beaucage)) 을 이용하는 것이 가능하다. 바람직한 PS 형성을 위한 시약은 황이다. 제조 비용의 차이로 황을 이용하는 것이 선호된다.

[0050] 한 구현예에서, 반응은 아세톤의 존재하에서 이루어질 수 있다.

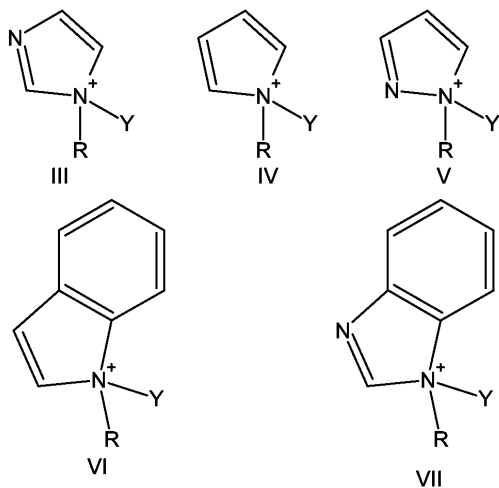
[0051] 포스포닐화제는 히드록실 함유 화합물의 히드록실기와 비교했을 때, 다소 동등물 비로 사용될 수 있다.

[0052] 추가 구현예에서, 상기는 과량, 예를 들어, 히드록실 함유 화합물 중 히드록실기 1 몰당 3 내지 5 몰로 사용될 수 있다.

[0053] 하나의 추가 바람직한 구현예에서, 청구항 제 1 항의 b) 단계 이후에 중합체성 알코올이 첨가된다. 적합한 중합체성 알코올에는 Merck, Darmstadt 의 PVA 145000 으로서 시판되고 있는 폴리비닐알코올 (PVA) 이 포함된다. 입자 크기가 120  $\mu m$  초과인 거대다공성 (macroporous) PVA (80%) 가 바람직하다. 또한 히드록실기 또는 에놀을 형성할 수 있는 기타 화합물을 가진 막이 적합하다.

[0054] 활성화제 I 는 화학량적, 촉매적 (3 내지 50 몰%, 바람직하게는 10 내지 30 몰%) 또는 과량으로 사용될 수 있다.

[0055] 바람직한 구현예에서, 활성화제 I 는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 화학식을 가진다:



[0056]

[0057] [식 중,

[0058] Y 는 H 또는  $Si(R_4)_3$  (식 중,  $R_4$  = 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아르알킬, 헤테로알킬, 헤테로아릴임) 이고,

[0059] B = 탈양성자화 산이고,

[0060] R 은 메틸, 페닐 또는 벤질이다].

[0061] 상기 활성화제의 제조는 예를 들어 문헌 [Hayakawa et al, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 8165-8176] 에 기재되어 있다.

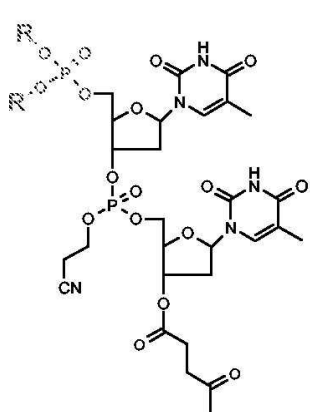
[0062] 한 구현예에서 활성화제는 첨가제와 조합되어 사용된다. 첨가제는 화학식 I 을 가지는 화합물 및 피리딘과 같은 기타 헤테로시클릭 염기의 비양성자와 형태로부터 선택될 수 있다. 활성화제 및 첨가제 사이의 적합한 비율은 1:1 내지 1:10 이다.

[0063] 하나의 바람직한 구현예에서, 활성화제는 "원위치" 공정에 따라 제조될 수 있다. 이 경우 활성화제는 단리되지 않을 것이고, 이는 개선된 반응 결과를 야기한다. 목적 분자의 가수분해 또는 분해가 억제된다.

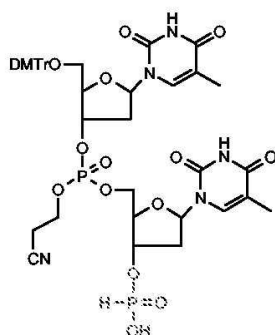
[0064] 올리고뉴클레오타이드의 3'- 및/또는 5'-위치에서의 고 수율 포스포틸화 (디, 트리, 테트라, 펜타, 헥사, 헵타 및 옥타머) 를 위해서는, 활성화제의 원위치 제조 및 첨가제와의 조합이 바람직하다.

[0065] 상기한 바와 같이 포스포틸화는 특히 올리고뉴클레오타이드 및 구성 단위인 포스포르아미다이트의 합성에 유용하다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 히드록실 함유 화합물은, 이로부터 유도된 당 잔기, 예를 들어 뉴클레오시드 또는 올리고머를 포함한다. 이러한 뉴클레오시드는 예를 들어, 임의로 보호기를 포함하는, 아데노신, 시토신, 구아노신 및 우라실, 데스옥시아데노신, 데스옥시구아노신, 데스옥시티미딘, 데스옥시시토신 및 그 유도체이다.

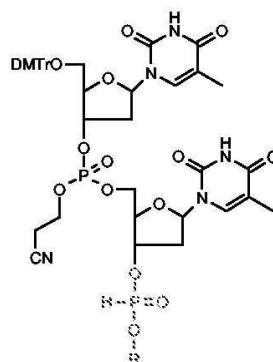
[0066] 이는 보통, 포스포틸화되는 기를 제외하고, 그 헤테로시클릭 작용기 및 그 히드록실 함유기가 적절하게 보호될 것이다. 전형적으로 디메톡시트리틸, 모노메톡시트리틸 또는 t-부틸디메틸-실릴 (TBDMS) 가 5'-OH-기의 보호기로 사용되어, 3'-OH 기가 포스포틸화되도록 한다. 추가 가능한 기는 예를 들어 하기와 같이 포스페이트 에스테르 및 H-포스포네이트이다.



5'-O-위치



3'-O-위치



3'-O-위치

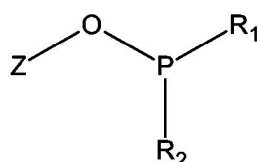
[0067]

[0068] 포스페이트 에스테르 및 포스포디에스테르에 있어서, R 은 알킬, 아릴, 알킬아릴로부터 선택될 수 있다. 페닐이 바람직하다.

[0069] 5', 3' 및 2' 의 추가 히드록실 보호기는 예를 들어 TBDMS 와 같이 당업계에 익히 공지되어 있다.

[0070] 일반적으로, 포스포틸화제는 1-H-테트라졸을 사용한 포스포틸화 반응에서와 동일한 것일 수 있다.

[0071] 바람직한 구현예에서, 이는 하기 화학식을 가진다:



[0072]

[0073] [식 중,

[0074] Z 는 이탈기, 예를 들어,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CN}$ , 파라- $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{2-5}\text{N}(\text{H})\text{COCF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{CH}_3$ , 또는  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{COCF}_3$  를 나타내고,

[0075]  $\text{R}_1$  및  $\text{R}_2$  는 독립적으로 2차 아미노기  $\text{N}(\text{R}_3)_2$  (식 중,  $\text{R}_3$  는 1 내지 약 6 개의 탄소를 갖는 알킬이거나; 또는  $\text{R}_3$

는 4 내지 7 개의 원자를 포함하고, 질소, 황 및 산소로부터 선택되는 3 개 이하의 헤테로원자를 갖는 헤테로시클로알킬 또는 헤테로시클로알케닐 고리임) 이다].

- [0076] 통상적인 포스포티올화제는 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미다이트이다.
- [0077] 기타 바람직한 포스포티올화 시약은 참고문헌으로 포함되어 있는 문헌 [N. Ok 등, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8307 ~ 8317]에 기재된 바와 같은 옥사자포스포리딘 유도체이다. 이러한 포스포티올화제는 올리고뉴클레오타이드의 합성이 이루어지도록 하고, 여기서 뉴클레오타이드간 결합은 입체 선택적 방식으로 포스포르티오에이트로 전환될 수 있다. 이러한 부분입체선택적으로 합성된 뉴클레오타이드간 포스포르티오에이트 연결부는 안티센스 약물 또는 면역자극 약물로서의 포스포르티오에이트 용도와 관련하여 전도유망한 영향을 끼친다.
- [0078] 도 1 은 본 발명에 따른 반응식을 나타낸다.
- [0079] 적합한 탈양성자화된 산 B<sup>-</sup>의 예는 트리플루오로아세테이트, 트리플레이트, 디클로로아세테이트, 메실, 토실, o-클로로페놀레이트이다. pKa 4.5 미만의 산이 바람직하다. 바람직하게 이는 친핵성이 낮다.
- [0080] 한 구현예에서, 반응은 분자체의 존재하에서 실시되어 반응 매질을 건조시킨다. 일반적으로 물은 제외되거나, 또는 반응 동안 매체를 건조시킴으로써 고정되어야 한다.
- [0081] 본 발명의 활성화제 I 를 포스포티올화제와 조합하고, 이후에 히드록실 성분을 첨가하는 것이 가능하다. 활성화제 I 와 히드록실 함유 화합물을 조합하고, 포스포티올화제를 이후에 첨가하는 것 또한 가능하다.
- [0082] 첨가제를 사용하는 경우에 활성화제는 포스포티올화제를 첨가하기 전에 히드록실 성분과 혼합된다.
- [0083] 활성화제의 "원위치" 발생을 위해서는, 제어된 반응 온도하에서 첨가제를 첨가한 후에 선택된 산을 첨가하는 것이 바람직하다.
- [0084] 포스포티올화제는 선택된 산의 첨가 전 또는 그후에 첨가할 수 있다.
- [0085] 산 및 포스포티올화제의 첨가에 있어서, 뉴클레오시드 성분은 마지막에 또는 초기에 첨가할 수 있다.
- [0086] 바람직한 구현예에서, 활성화제의 대응 염기, 히드록실 함유 화합물, 및 포스포티올화제를 조합하고, 산을 첨가하여 반응을 시작한다.
- [0087] 이어서 포스포티올화 화합물 (포스포르아미다이트) 은 활성화제 II 의 존재하에서 뉴클레오시드, 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 히드록실기에 커플링된다.
- [0088] 상기에서 기술한 대로 화합물을 반응한 후, 제조된 트리에스테르를 산화한다. 산화는 예를 들어 안정한 포스페이트 또는 티오포스페이트 결합을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0089] 본원에서 사용시, 올리고뉴클레오타이드는 또한 RNA 및 DNA 형태의 올리고뉴클레오시드, 올리고뉴클레오타이드 유사체 (analog), 개질된 올리고뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 모방체 (mimetic) 등도 포함한다. 일반적으로, 이러한 화합물은 연결된 단량체성 서브유닛 (subunit) 의 골격을 포함하며, 여기서 각각 연결된 단량체성 서브유닛은 직접 또는 간접적으로 헤테로시클릭 염기 부분에 부착한다. 단량체성 서브유닛을 잇는 연결부, 단량체성 서브유닛 및 헤테로시클릭 염기 부분은 구조 내에서 가변적일 수 있어 생성 화합물의 다수의 모티브를 제공한다.
- [0090] 본 발명은 화학식 X<sub>n</sub> (식 중, 각 X 는 A, dA, C, dC, G, dG, U, dT 로부터 선택되며, n = 2 내지 30, 바람직하게는 2 내지 12, 더욱 바람직하게는 2 내지 8 또는 2 내지 6 임) 의 보호기를 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 및 이의 유도체의 합성에 특히 유용하다. 당업계에서 공지된 개질은 헤테로시클릭 염기, 당 또는 단량체성 서브유닛을 잇는 연결부의 개질이다. 뉴클레오타이드간의 연결부의 변형은 예를 들어 본원에서 참조 문헌으로 삽입된 WO 2004/011474 의 11 페이지 하부에 기술되어 있다.
- [0091] 전형적인 유도체는 포스포르티오에이트, 포스포로디티오에이트, 메틸 및 알킬 포스포네이트 및 포스포노아세토 유도체이다.
- [0092] 추가의 전형적인 개질은 당 부분이다. 리보오스는 상이한 당으로 치환되거나, 이의 하나 이상의 위치가 F, O-알킬, S-알킬, N-알킬과 같은 다른기로 치환된다. 바람직한 구현예는 2'-메틸 및 2'-메톡시에톡시이다. 이러한 모든 개질은 당업계에 공지되어 있다.
- [0093] 헤테로시클릭 염기 부분과 관련하여, 당업계에서 사용되는 다수의 기타 합성 염기, 예를 들어 5-메틸-시토신,

5-히드록시-메틸-시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 구아닌 및 아데닌의 6- 또는 2-알킬 유도체, 2-티오우라실이 있다. 이러한 개질 역시 WO 2004/011474 의 21 페이지에서부터 기재되어 있다.

[0094] 합성에 사용할 때, 보통 이러한 염기는 보호기, 예를 들어 N-6-벤질아데닌, N-4-벤질시토신 또는 N-2-이소부틸릴 구아닌을 가진다. 일반적으로, 추가적인 반응에서 반응하지 않아야 하는 모든 반응기, 특히 당의 히드록실기는 보호되어야 한다.

[0095] 올리고뉴클레오타이드 합성에 관련된 구현예에서, 반응매질 또는 기타 용매에 대한 공용매로서 사용될 수 있는 알데히드 또는 케톤의 존재하에서 반응을 실시하는 것이 유용하다.

[0096] 적합한 화합물은 에놀을 형성할 수 있는 것이다. 전형적인 화합물은 화학식  $R_1R_2C=O$  (식 중,  $R_1$  및  $R_2$  는 독립적으로 H 이거나 또는 단독으로 시클릭 구조를 형성할 수 있는 1 내지 20 개의 탄소 원자로 이루어지거나, 또는  $R_1$  및  $R_2$  가 함께 시클릭 시스템을 형성하는 것으로, 여기서  $R_1$  및  $R_2$  둘 모두가 H 인 것은 아님) 을 가진다. 매우 바람직한 케톤은 아세톤이다. 아세톤의 존재로 인해, 포스포티화 공정 중 유리되는 디이소프로필아민 (DIPA) 과 같은 아민의 임의량의 활성이 중지된다. 이는 유사한 결과 (분해가 없는) 를 수반하면서, 더 짧은 그리고 더 긴 올리고뉴클레오타이드의 포스포티화에 사용될 수 있다. 예를 들어 아민의 존재하에서 에놀레이트를 형성할 수 있는 한, 화학식  $R_x-C(=O)-R_y$  (식 중,  $R_x$  및  $R_y$  는 독립적으로  $C_1-C_6$  알킬이거나, 또는 함께 시클로알킬을 형성함) 을 가지는 기타 케톤 화합물이 또한 사용될 수 있고, 이는  $\alpha$ -위치에  $CH_2$ -기를 가진다.

[0097] 본 발명은 하기 비제한적 실시예로 추가 설명된다.

## 실시예

### [0098] 실시예 1

[0099] 메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 을 이용한 5'-O-DMTr-T-3'-O-포스포르아미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-T-T-3'-O-Lev 시아노에틸 포스페이트 트리에스테르의 합성

[0100] 5.0 g 의 5'-O-DMTr-T-3'-OH (9.2 mmol, 1.0 당량) 및 2.34 g 의 MIT (11.9 mmol, 1.3 당량) 를 100 ml 의 디클로로메탄 중에 용해하고, 3 g 의 분자체 3Å 를 첨가하고 혼합물을 10 분 동안 교반했다. 3.8 ml 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라-이소프로필포스포르디아미다이트 (11.9 mmol, 1.3 당량) 를 첨가했다. 2 시간 후에 5'-O-DMTr-T-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완결되었다. 3.28 g 의 5'-OH-T-3'-O-Lev (9.64 mmol, 1.05 당량) 및 51 ml 의 테트라졸 용액 (0.45 M, 22.95 mmol, 2.5 당량) 을 첨가하고, 밤새 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를, 4.57 g 의  $I_2$ , 140 ml 의 THF, 35 ml 의 피리딘 및 4 ml 의  $H_2O$  를 첨가함으로써 산화시켰다. 반응은 10 분 후에 완결되었다. 반응 혼합물을 증발시켜, 300 ml 의 디클로로메탄 중에 용해하고, 200 ml 의 티오황산나트륨 포화 용액으로 추출한 후, 200 ml 의 탄산수소나트륨 포화 용액으로 추출했다. 배합된 수성층을 30 ml 의 디클로로메탄으로 추출하고, 배합된 유기층을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 증발시켰다. 수율 9.0 g (무색 포말): 98%; 순도 (HPLC 로 측정): 84%.

### [0101] 실시예 2

[0102] 메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 을 이용한 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-T-3'-O-Lev 시아노에틸 포스페이트 트리에스테르의 합성

[0103] 108 mg 의 MIT (0.56 mmol, 1.5 당량) 및 224 mg 의 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-OH (0.37 mmol, 1.0 당량) 를 9 ml 의 디클로로메탄 중에 용해하고, 300 mg 의 분자체 3Å 를 첨가했다. 140  $\mu$ l 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라-이소프로필포스포르-디아미다이트 (0.44 mmol, 1.2 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 30 분 후에 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완료되었다. 혼합물을 여과하고, 125 mg 의 5'-OH-T-3'-O-Lev (0.37 mmol, 1.0 당량) 및 2 ml 의 테트라졸 용액 (0.45 M, 0.9 mmol, 2.4 당량) 을 첨가하고, 밤새 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 10 ml 의 산화 용액 (254 mg 의  $I_2$ , 7.8 ml 의 THF, 1.9 ml 의 피리딘 및 222  $\mu$ l 의  $H_2O$ ) 을 첨가함으로써 산화시켰다. 30 분 후에 반응이 완결되었다. 수율 (HPLC 로 측정): 66%.

**[0104] 실시예 3**

**[0105]** 메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 를 이용한 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포로티오에이트 트리에스테르의 합성

**[0106]** 2.57 g 의 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-OH (6.0 mmol, 1.0 당량) 및 1.76 g 의 MIT (9.0 mmol, 1.5 당량) 를 6 ml 의 아세톤 및 6 ml 의 아세토니트릴 중에 용해하고, 3.0 g 분자체 3Å 를 첨가했다. 2.46 ml 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르-디아미다이트 (7.74 mmol, 1.3 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 30 분 후에, 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 형성이 완료되었다. 상기 용액을 여과시키고, 2.48 g 의 5'-OH-G<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (5.7 mmol, 0.95 당량) 및 2.3 g 의 벤질메르캅토테트라졸 (12.0 mmol, 2.0 당량) 의 20 ml 의 디클로로메탄 및 20 ml 의 아세토니트릴 중의 용액에 첨가하고, 30 분 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 함유하는 용액을 여과하고, 14 g 의 중합체-결합된 테트라티오네이트 (25.2 mmol, 4.2 당량) 을 첨가함으로써 황화시켰다. 16 시간 후에 반응이 완료되었다. 수율 (HPLC 로 측정): 84%.

**[0107] 실시예 4**

**[0108]** 메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 를 이용한 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포로티오에이트 트리에스테르의 합성

**[0109]** 10 g 의 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-OH (15.8 mmol, 1.0 당량) 및 7.75 g 의 MIT (39.5 mmol, 2.5 당량) 를 30 ml 의 디클로로메탄 및 30 ml 의 아세토니트릴 중에 용해하고, 10 g 의 분자체 3Å 를 첨가하고, 혼합물을 30 분 동안 교반했다. 9.0 ml 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (28.4 mmol, 1.8 당량) 를 15 ml 의 디클로로메탄 및 15 ml 의 아세토니트릴 중에 용해했다. 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-OH 및 MIT 의 용액을 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트의 교반된 용액에 첨가했다. 30 분 후에 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 형성이 완료되었다. 상기 용액을 여과하고, 5.43 g 의 5'-OH-C<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev (12.6 mmol, 0.8 당량) 및 7.6 g 의 벤질메르캅토테트라졸 (39.5 mmol, 2.5 당량) 의 90 ml 의 디메틸포름아미드 및 450 ml 의 아세토니트릴 중의 용액에 첨가하고 10 분 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 함유하는 용액을 여과하고, 50 g 의 중합체-결합된 테트라티오네이트 (90 mmol, 5.7 당량) 을 첨가함으로써 황화시켰다. 16 시간 후에 반응이 완료되었다. 수율 (HPLC 로 측정): 80%.

**[0110] 실시예 5**

**[0111]** 메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 를 이용한 5'-O-DMTr-dA<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-dA<sup>Bz</sup>-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포로티오에이트 트리에스테르의 합성

**[0112]** 5.0 g 의 5'-O-DMTr-dA<sup>Bz</sup>-3'-OH (5.8 mmol, 1.0 당량) 및 1.8 g 의 MIT (9.2 mmol, 1.6 당량) 을 50 ml 의 아세톤 및 50 ml 의 아세토니트릴 중에 용해시키고, 2.5 g 의 분자체 3Å 를 첨가하고, 혼합물을 15 분 동안 교반했다. 3.0 ml 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (9.5 mmol, 1.6 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 1 시간 후에 5'-O-DMTr-dA<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 형성이 완료되었다. 상기 용액을 여과하고, 2.22 g 의 5'-OH-G<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (5.1 mmol, 0.94 당량) 및 2.9 g 의 벤질-메르캅토-테트라졸 (15.1 mmol, 2.6 당량) 의 25 ml 의 디클로로메탄 및 25 ml 의 아세토니트릴 중의 용액에 첨가하고, 40 분 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 함유한 용액을 여과하고, 2 g 의 중합체-결합된 테트라티오네이트 (3.6 mmol, 3.9 당량) 을 첨가함으로써 황화시켰다. 16 시간 후에 반응이 완료되었다. 수율 (HPLC 로 측정): 71%.

**[0113] 실시예 6**

**[0114]** 메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 을 이용한 5'-O-DMTr-T-3'-O-포스포라미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-T-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포로티오에이트 트리에스테르의 합성

**[0115]** 5.0 g 의 5'-O-DMTr-T-3'-OH (9.2 mmol, 1.0 당량) 및 2.7 g 의 MIT (13.5 mmol, 1.5 당량) 을 50 ml 의 아세



톤 및 50 ml 의 아세트니트릴 중에 용해하고, 2.5 g 의 분자체 3Å 를 첨가하고, 혼합물을 15 분 동안 교반했다. 3.0 ml 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (9.5 mmol, 1.03 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 1 시간 후에 5'-O-DMTr-T-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완료되었다. 상기 용액을 여과하고, 4.44 g 의 5'-OH-G<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (10.2 mmol, 1.1 당량) 및 5.3 g 의 벤질-메르캅토-테트라졸 (27.6 mmol, 1.6 당량) 의 50 ml 의 디클로로메탄 및 50 ml 의 아세트니트릴 중의 용액에 첨가하고, 2 시간 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 함유한 용액을 여과하고, 30 g 의 중합체-결합된 테트라티오네이트 (54 mmol, 5.9 당량) 를 첨가함으로써 황화시켰다. 16 시간 후에 반응이 완료되었다. 수율 (HPLC 로 측정): 90%.

#### [0116] 실시예 7

메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 를 이용한 5'-O-DMTr-T-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-T-dC<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포로티오에이트 트리에스테르의 합성

100 mg 의 5'-O-DMTr-T-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-OH (0.10 mmol, 1.0 당량) 및 24.4 mg 의 MIT (0.11 mmol, 1.1 당량) 을 10 ml 의 디클로로메탄 중에 용해하고, 200 mg 의 분자체 4Å 를 첨가했다. 32  $\mu$ l 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르-디아미다이트 (0.10 mmol, 1.0 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 24 시간 후에 5'-O-DMTr-T-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완료되었다. 82 mg 의 5'-OH-dC<sup>Bz</sup>-3'-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev (0.09 mmol, 0.9 당량) 및 366  $\mu$ l 의 테트라졸 용액 (0.45 M, 0.16 mmol, 1.6 당량) 을 첨가하고 45 시간 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 72 시간 내에 400 mg 의 중합체-결합된 테트라티오네이트를 첨가함으로써 황화시켰다. 수율 (HPLC 로 측정): 58%.

#### [0119] 실시예 8

메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 를 이용한 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-P(S)-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-dG<sup>iBu</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포로티오에이트 트리에스테르의 합성

100 mg 의 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-P(S)-dG<sup>iBu</sup>-3'-OH (0.09 mmol, 1.0 당량) 및 17.8 mg 의 MIT (0.09 mmol, 1.0 당량) 를 10 ml 의 디클로로메탄 중에 용해하고, 200 mg 의 분자체 4Å 를 첨가했다. 28  $\mu$ l 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르-디아미다이트 (0.09 mmol, 1.0 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 3 시간 후에, 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-P(S)-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완료되었다. 40 mg 의 5'-OH-dC<sup>Bz</sup>-3'-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev (0.04 mmol, 0.5 당량) 및 0.9 ml 의 에틸티오테트라졸 용액 (0.25 M, 0.23 mmol, 2.5 당량) 을 첨가하고 2 시간 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 72 시간 내에 200 mg 의 중합체-결합된 테트라티오네이트를 첨가함으로써 황화시켰다. 수율 30 mg (14.1  $\mu$ mol, 백색 결정): 16 %; 순도 (HPLC 로 측정): 67%.

#### [0122] 실시예 9

벤질-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (BIT) 를 이용한 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-T-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포로티오에이트 트리에스테르의 합성

100 mg 의 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-OH (0.09 mmol, 1.0 당량) 및 46 mg 의 BIT (0.17 mmol, 1.9 당량) 를 5 ml 의 아세톤 및 5 ml 의 아세트니트릴 중에 용해하고, 500 mg 의 분자체 3Å 를 첨가했다. 58  $\mu$ l 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필-포스포르디아미다이트 (0.14 mmol, 1.5 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 1 시간 후에 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-P(S)-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완료되었다. 41.3 mg 의 5'-OH-dA<sup>Bz</sup>-3'-P(S)-T-3'-O-Lev (0.05 mmol, 0.55 당량) 및 43.7 mg 의 벤질메르캅토테트라졸 (0.23 mmol, 2.5 당량) 을 첨가하고 1.5 시간 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 72 시간 내에 500 mg 의 중합체-결합된 테트라티오네이트를 첨가함으로써 황화시켰다. 수율 (HPLC 로 측정): 70%.

[0125] **실시예 10**

[0126] 메틸-이미다졸륨-트리플루오로아세테이트 (MIT) 을 이용한 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-P(O)-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 원위치 제조를 통한, 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-dG<sup>iBu</sup>-dG<sup>iBu</sup>-T-dG<sup>iBu</sup>-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스페이트 트리에스테르의 합성

[0127] 200 mg 의 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-P(O)-dG<sup>iBu</sup>-3'-OH (0.18 mmol, 1.0 당량) 및 56 mg 의 MIT (0.27 mmol, 1.5 당량) 를 5 ml 의 아세톤 중에 용해하고, 300 mg 의 분자체를 첨가했다. 128  $\mu$ l 의 2-시아노에틸 N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미다이트 (BisPhos) (0.4 mmol, 2.2 당량) 를 교반된 용액에 첨가했다. 15 분 후에 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-3'-P(O)-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 형성이 완료되었다. 156 mg 의 5'-OH-dG<sup>iBu</sup>-T-dG<sup>iBu</sup>-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev (0.09 mmol, 1.0 당량) 및 87 mg 의 벤질메르캅토테트라졸 (0.46 mmol, 5.0 당량) 를 첨가하고, 20 분 동안 교반했다. 생성된 포스파이트 트리에스테르를 3.7 ml 의 산화 용액 (94 mg 의 I<sub>2</sub>, 2.9 ml 의 THF, 0.7 ml 의 피리딘 및 82  $\mu$ l 의 H<sub>2</sub>O) 을 첨가함으로써 산화시켰다. 30 분 후에 반응이 완료되었다. 수율 (HPLC 로 측정): 51%.

[0128] **실시예 11**

[0129] 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-T-3'-O-Lev 시아노에틸 포스페이트 트리에스테르의 합성

[0130] 200 g (312 mmol) 의 DMTr-dG<sup>iBu</sup>-3'-OH 및 80 g (408 mmol) 의 MIT 를 400 mL 의 디클로로메탄 및 400 mL 의 아세톤 중에 용해했다. 200 g 의 분자체 및 89 mL (1.25 mol) 의 NMI (N-메틸-이미다졸) 을 첨가했다. 15°C 에서 109 mL (344 mmol) 의 BisPhos 를 교반된 용액에 첨가했다. 10 분 후에 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 형성이 완료되었고, 용액을 추가 30 분 동안 교반하도록 했다. 88.4 g (260 mmol) 의 5'-OH-T-3'-O-Lev 및 83.4 g (624 mmol) 의 ETT 를 600 mL 의 아세톤 및 600 mL 의 디클로로메탄으로 용해했다. 100 g 의 분자체 및 86 mL (1.08 mol) 의 NMI 을 첨가했다. 상기 교반된 용액에 800 mL 의 포스포라미다이트 용액을 첨가했다. 10 분 후에 반응이 완료되었고, 46 mL 의 부탄 퍼옥시드 용액 (Curox M400) 을 (얼음조) 냉각된 혼합물에 첨가했다. 5 분 후에 반응이 완료되었다. 전환 (HPLC 로 측정): 100%.

[0131] **실시예 12**

[0132] 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-T-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포리토에이트 트리에스테르의 합성

[0133] 1.0 g (1.56 mmol) 의 DMTr-dG<sup>iBu</sup>-3'-OH 및 368 mg (1.88 mmol) 의 MIT 를 3 mL 의 디클로로메탄 및 3 mL 의 아세톤 중에 용해했다. 1 g 의 분자체 및 154  $\mu$ l (1.25 mol) 의 NMI 를 첨가했다. 15°C 에서, 594  $\mu$ l (1.87 mmol) 의 BisPhos 를 교반된 용액에 첨가했다. 10 분 후에 5'-O-DMTr-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-포스포라미다이트의 형성이 완료되었고, 용액을 추가 30 분 동안 교반하도록 했다. 438 mg (1.29 mmol) 의 5'-OH-T-3'-O-Lev 및 396 mg (3.07 mmol) 의 ETT 를 5 mL 의 아세톤 및 5 mL 의 디클로로메탄으로 용해했다. 1 g 의 분자체 및 248 mL (3.61 mol) 의 NMI 을 첨가했다. 상기 교반된 용액에 5.5 mL 의 포스포라미다이트 용액을 첨가했다. 10 분 후에 반응이 완료되었고,

[0134] A) 25 mg (7.8 mmol) 의 황 (S<sub>8</sub>) 및 2.5 mg 의 Na<sub>2</sub>Sx9H<sub>2</sub>O 를 첨가했다. 10 분 후에 반응이 완료되었다. 전환 (HPLC 로 측정): 100%

[0135] B) 25 mg (7.8 mmol) 의 황 (S<sub>8</sub>) 을 첨가했다. 3 시간 후에 반응이 완료되었다. 전환 99%.

[0136] **실시예 13**

[0137] 5'-O-DMTr-T-dC<sup>Bz</sup>-dG<sup>iBu</sup>-T-T-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스포리토에이트 트리에스테르의 합성

[0138] 5.0 g (4.9 mmol) 의 DMTr-T-dC<sup>Bz</sup>-3'-OH 및 2.4 g (12.3 mmol) 의 MIT 를 10 mL 의 디클로로메탄 및 10 mL 의 아세톤 중에 용해했다. 8 g 의 분자체 및 980  $\mu$ l (12.3 mol) 의 NMI 을 첨가했다. 15°C 에서, 3.13 mL

(9.85 mmol) 의 BisPhos 를 교반한 용액에 첨가했다. 10 분 후에 5'-O-DMTr-T-dC<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완료되었고, 상기 용액을 추가 30 분 동안 교반하도록 했다. 100 mL 의 헵탄을 첨가하고, 경사 분리 (decanting) 하고, 10 mL 의 디클로로메탄 및 10 mL 의 아세톤을 생성 잔류물에 첨가했다. 4.44 g (2.79 mmol) 의 5'-OH-dG<sup>iBu</sup>-T-T-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev 및 1.05 g (8.06 mmol) 의 ETT 를 15 mL 의 아세톤 및 15 mL 의 디클로로메탄으로 용해했다. 5 g 의 분자체 및 640  $\mu$ l (8.06 mmol) 의 NMI 를 첨가했다. 상기 교반한 용액에 20 mL 의 포스포르아미다이트 용액을 첨가했다. 10 분 후에 반응이 완료되었고, 930 mg (3.09 mmol) 의 PADS 를 첨가했다. 10 분 후에 반응이 완료되었다. 전환 (HPLC 로 측정) 92%.

[0139] **실시예 14**

[0140] 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-3'-O-Lev 시아노에틸 포스페이트 트리에스테르의 합성

[0141] 860 mg (0.45 mmol) 의 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-3'-OH 및 133 mg (0.67 mmol) 의 MIT 를 3 mL 의 디클로로메탄 및 3 mL 의 아세톤 중에 용해했다. 800 mg 의 분자체 및 55  $\mu$ l (69 mmol) 의 NMI 를 첨가했다. 214  $\mu$ l (0.65 mmol) 의 BisPhos 를 교반한 용액에 첨가했다. 10 분 후에 5'-O-DMTr-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-dC<sup>Bz</sup>-dA<sup>Bz</sup>-3'-O-포스포르아미다이트의 형성이 완료되었고, 용액을 추가 20 분 동안 교반하도록 했다. 30 mL 의 헵탄을 첨가하고, 경사 분리하고, 5 mL 의 디클로로메탄 및 5 mL 의 아세톤을 생성된 잔류물에 첨가했다. 545 mg (0.3 mmol) 의 5'-OH-dG<sup>iBu</sup>-T-T-dG<sup>iBu</sup>-3'-O-Lev 및 117 mg (0.9 mmol) 의 ETT 를 3 mL 의 아세톤, 3 mL 의 디클로로메탄 및 0.3 mL 의 DMF 으로 용해했다. 1 g 의 분자체 및 70  $\mu$ l (0.9 mmol) 의 NMI 을 첨가했다. 상기 교반된 용액에, 8 mL 의 포스포르아미다이트 용액을 첨가했다. 30 분 후에 반응이 완결되고, 70  $\mu$ l 부타논 퍼옥시드 용액 (Curox M400) 을 혼합물에 첨가했다. 반응은 10 분 후에 완료되었다. 전환 (HPLC 로 측정): 80%.



도면

도면1

