



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월20일  
(11) 등록번호 10-1504640  
(24) 등록일자 2015년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07H 21/04 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2009-7013028  
(22) 출원일자(국제) 2007년12월05일  
심사청구일자 2012년11월14일  
(85) 번역문제출일자 2009년06월23일  
(65) 공개번호 10-2009-0101451  
(43) 공개일자 2009년09월28일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/086559  
(87) 국제공개번호 WO 2008/070749  
국제공개일자 2008년06월12일  
(30) 우선권주장  
11/567,189 2006년12월05일 미국(US)  
11/567,193 2006년12월05일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO2005084367 A1  
WO2004018493 A1  
Genome Research. vol. 15, pp. 1767-1776  
(2005)\*  
WO2002029003 A2  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
레이저젠, 인코퍼레이티드  
미국, 텍사스 77054, 휴스턴, 엘 리오 스트리트  
8052  
(72) 발명자  
리토시, 블라디슬라브 에이.  
미국, 텍사스 77433, 시프레스, 와일드우드 런  
15610  
스투피, 브라이언 피.  
미국, 텍사스 77025, 휴스턴, 버펄로 스피드웨이,  
아파트먼트 1532  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
강명구, 이경민

전체 청구항 수 : 총 37 항

심사관 : 김은영

(54) 발명의 명칭 광절단가능 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드, 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드, 그리고 DNA 염기서열분석에서 이들의 이용 방법

(57) 요약

DNA 염기서열분석(sequencing) 기술과 다른 유형의 DNA 분석에 이용될 수 있는, 본 명세서에 기술된 신규한 뉴클레오티드(nucleotide), 뉴클레오시드(nucleoside), 그리고 이들의 유도체가 제시된다. 한 구체예에서, 보호되지 않은 3'-OH 기를 보유하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드는 링커(linker)를 통하여 비-절단가능 종결 기(non-cleavable terminating group)에 부착된 형광 염료를 보유하도록 핵염기(nucleobase)에서 유도체화된다. 이러한 비-절단가능 형광 기는 DNA 올리고머(oligomer)가 병렬 양식(parallel format)으로 효율적으로 염기서열분석될 수 있도록 하기 위하여, DNA 합성을 종결시키도록 설계된다. 다른 구체예에서, 보호되지 않은 3'-OH 기를 보유하는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드는 링커를 통하여 광절단가능 종결 기(photocleavable terminating group)에 부착된 형광 염료를 보유하도록 핵염기에서 유도체화된다. 이러한 광절단가능 형광 기는 DNA 올리고머가 병렬 양식으로 효율적으로 염기서열분석될 수 있도록 하기 위하여, DNA 합성을 종결시키고 절단되도록 설계된다.

(72) 발명자

**메츠크르, 마이클 엘.**

미국, 텍사스 77054, 휴스턴, 엘 리오 스트리트  
8052

**우, 웨이동**

미국, 텍사스 77096, 휴스턴, 브라운스밸리 닥터  
5499, 아파트먼트 491

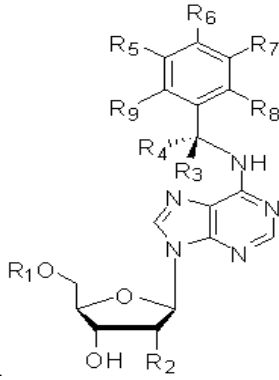
---

**특허청구의 범위**

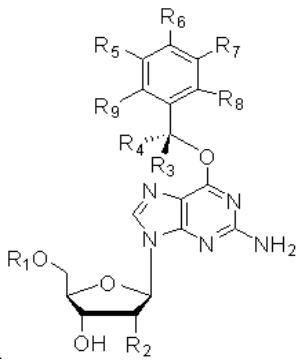
**청구항 1**

하기 화학식으로 구성되는 군에서 선택되는 화합물 또는 이의 염:

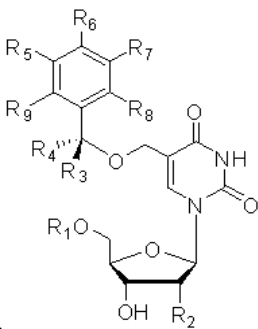
**화학식 I**



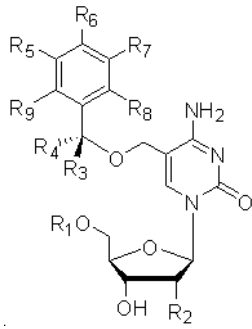
**화학식 II**



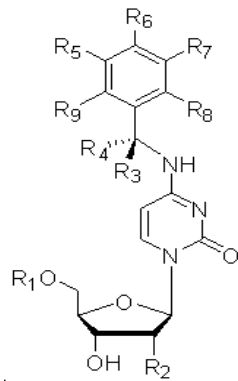
**화학식 III**



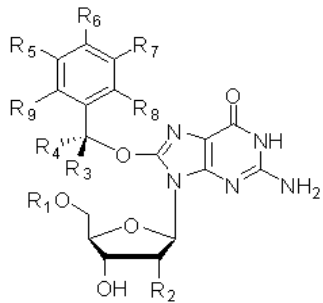
**화학식 IV**



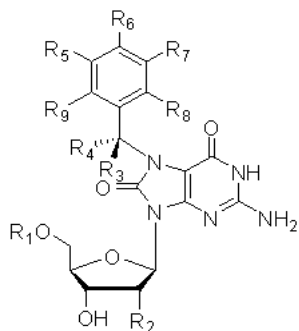
**화학식 V**



**화학식 VI**



**화학식 VII**



R<sub>1</sub> = H, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트 또는 알파-티오투리포스페이트이고,

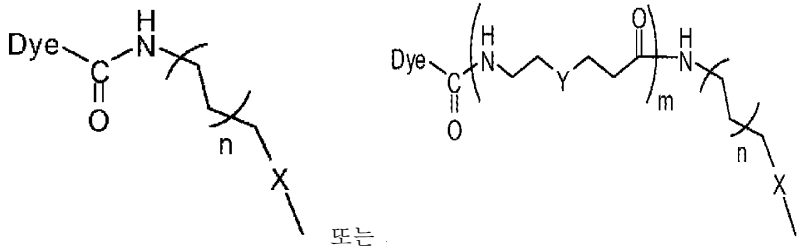
R<sub>2</sub> = H 또는 OH이고,

R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 각각 독립적으로, H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알케닐 또는 폴리에닐,

C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬닐 또는 폴리알킬닐, 페닐, 2-니트로페닐, 또는 2,6-디니트로페닐에서 선택되고,

R<sub>5</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>과 R<sub>9</sub>는 각각 독립적으로, H, OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, CN, 할로겐화합물(halide), C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알케닐 또는 폴리에닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬닐 또는 폴리알킬닐, 페닐, 2-니트로페닐, 또는 2,6-디니트로페닐에서 선택되고,

R<sub>6</sub>은 하기 화학식의 기이고:



X = C≡C이고,

Y = CH<sub>2</sub>이고,

n = 0의 정수이고,

m = 0-1의 정수이고,

염료(Dye) = 형광단이다.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, R<sub>9</sub>는 NO<sub>2</sub>이고, 그리고 R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub> 중에서 최소한 하나는 H인 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 3**

청구항 1에 있어서, R<sub>8</sub>과 R<sub>9</sub>는 NO<sub>2</sub>가 아닌 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 4**

청구항 1에 있어서, R<sub>1</sub>은 H인 것을 특징으로 하는 화합물.

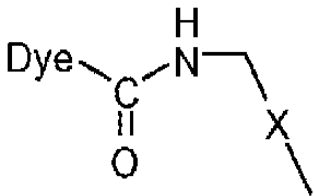
**청구항 5**

청구항 1에 있어서, R<sub>1</sub>은 트리포스페이트인 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 6**

청구항 2 또는 3에 있어서,

R<sub>6</sub>은 하기 화학식의 기이고:



X = C≡C이고,

염료(Dye) = 형광단인 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 7**

청구항 2에 있어서, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 각각 독립적으로, H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 이소프로필, tert-부틸, 페닐, 2-니트로페닐, 2,6-디니트로페닐로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 8**

청구항 7에 있어서, R<sub>3</sub> 또는 R<sub>4</sub>는 -CH<sub>3</sub>, 이소프로필 또는 tert-부틸인 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 9**

청구항 3에 있어서, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub> 중에서 최소한 하나는 -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 이소프로필, tert-부틸, 페닐로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 10**

청구항 2 또는 3에 있어서, 화학식 (I)의 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 11**

청구항 2 또는 3에 있어서, 화학식 (II)의 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 12**

청구항 2 또는 3에 있어서, 화학식 (III)의 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 13**

청구항 2 또는 3에 있어서, 화학식 (IV)의 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 14**

청구항 2 또는 3에 있어서, 화학식 (V)의 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 15**

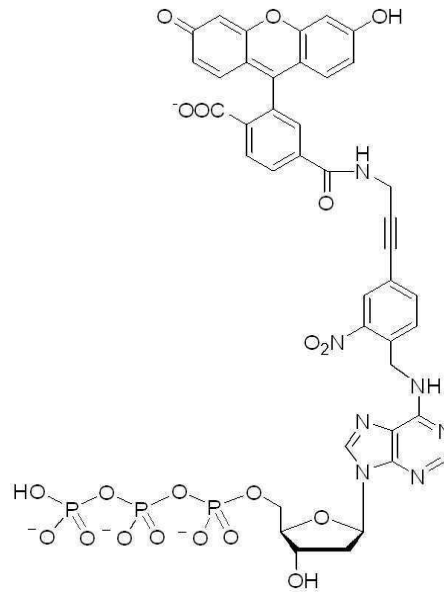
청구항 2 또는 3에 있어서, 화학식 (VI)의 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물.

**청구항 16**

청구항 2 또는 3에 있어서, 화학식 (VII)의 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물.

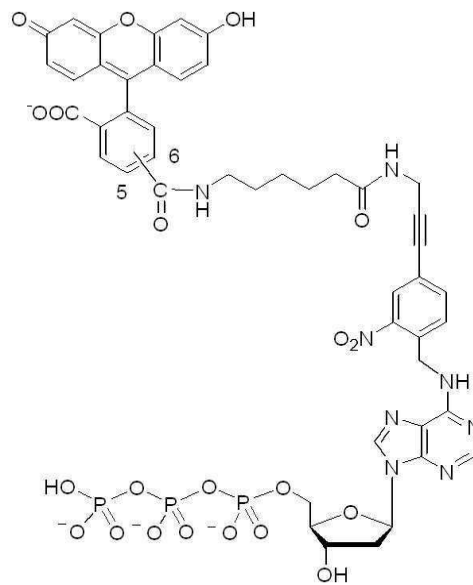
**청구항 17**

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



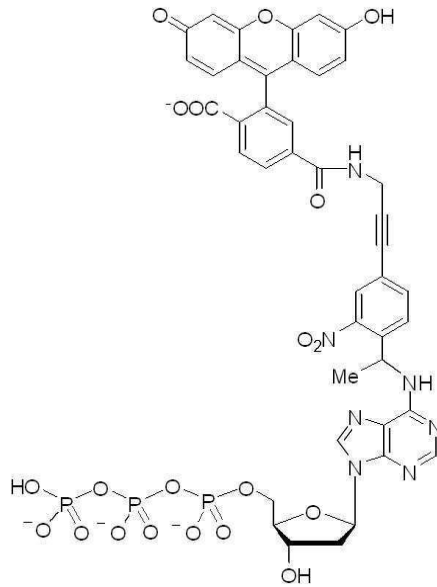
청구항 18

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



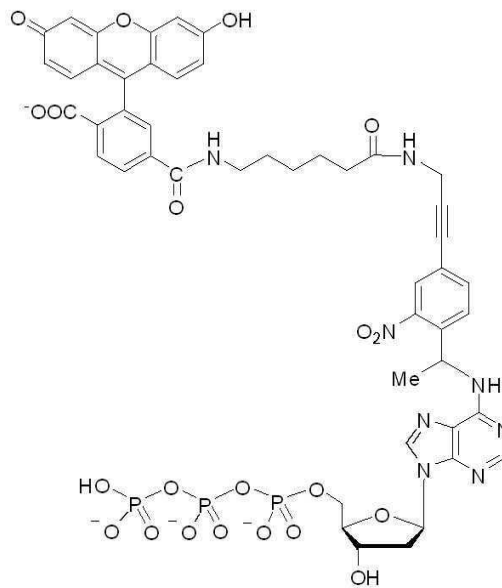
청구항 19

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



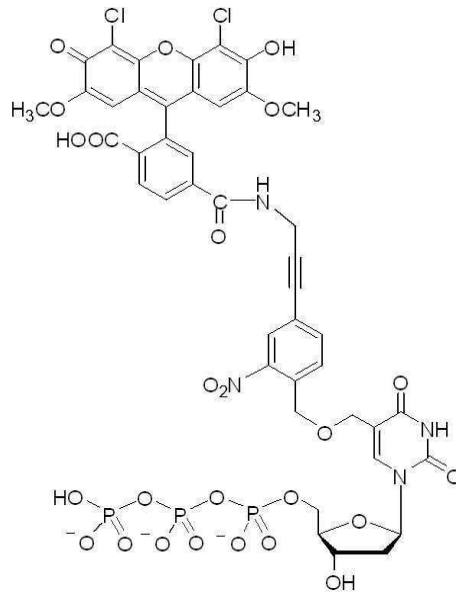
청구항 20

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



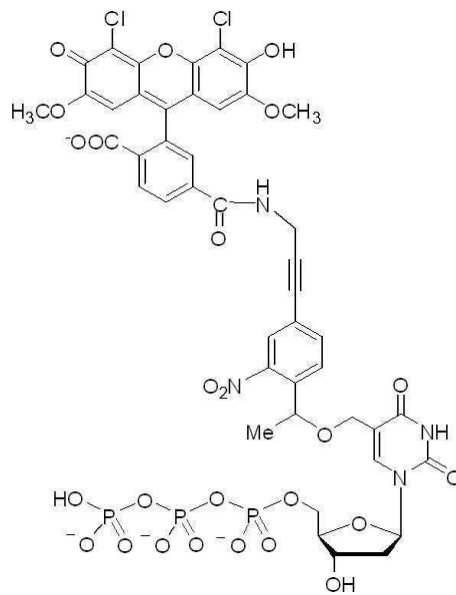
청구항 21

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



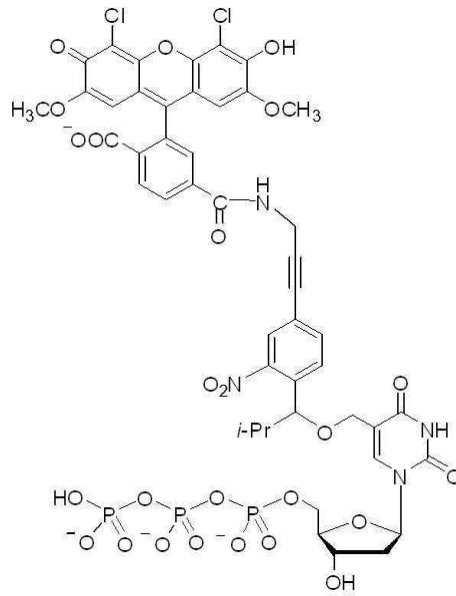
청구항 22

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



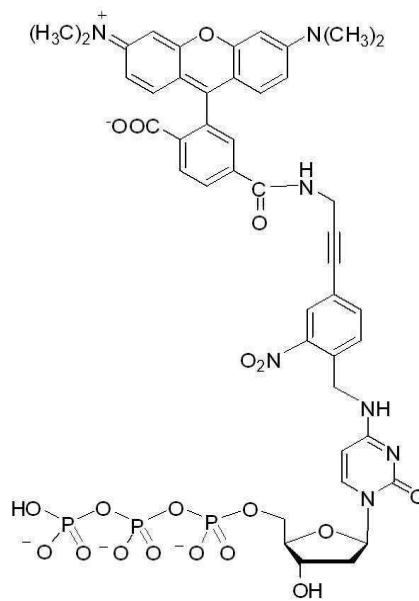
청구항 23

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



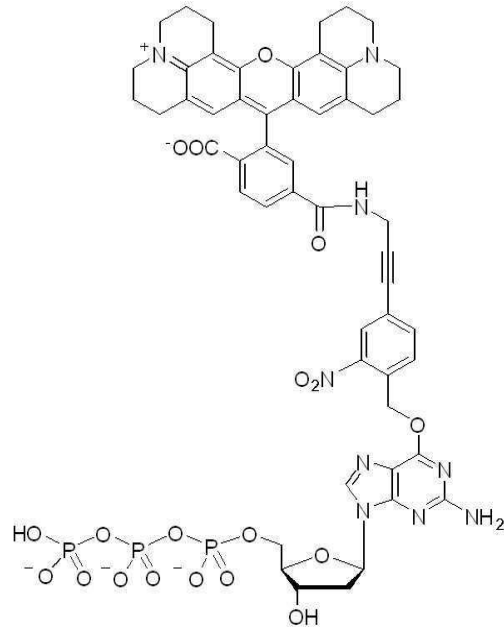
청구항 24

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



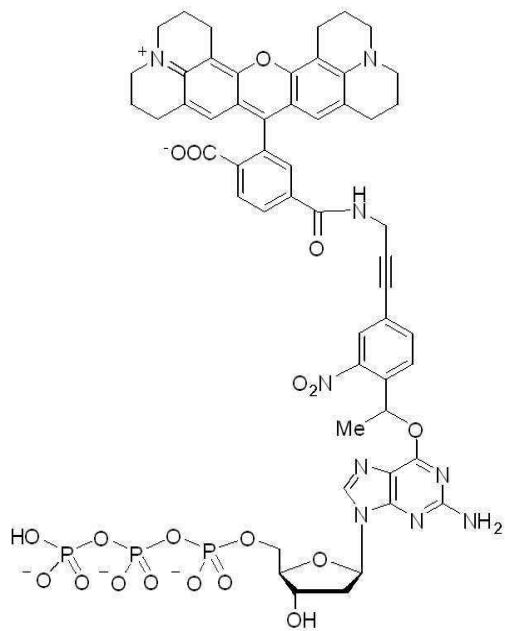
청구항 25

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



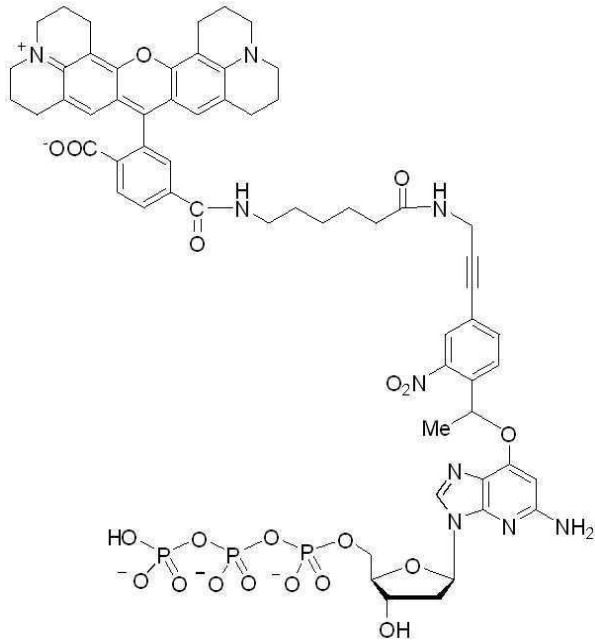
청구항 26

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



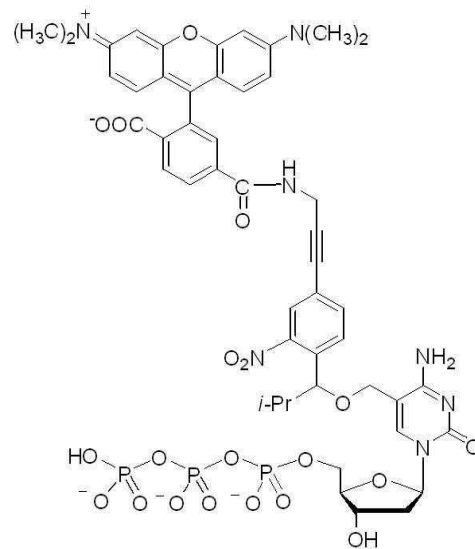
청구항 27

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



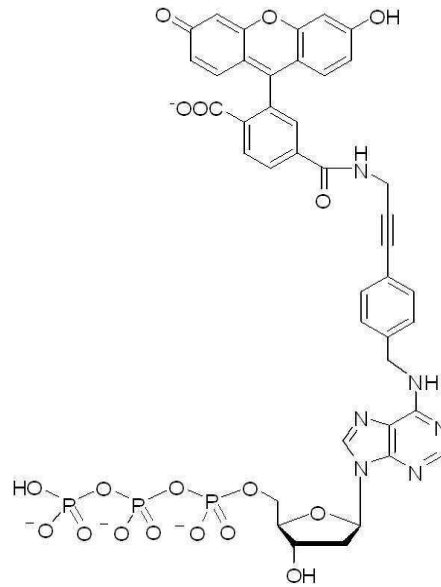
청구항 28

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



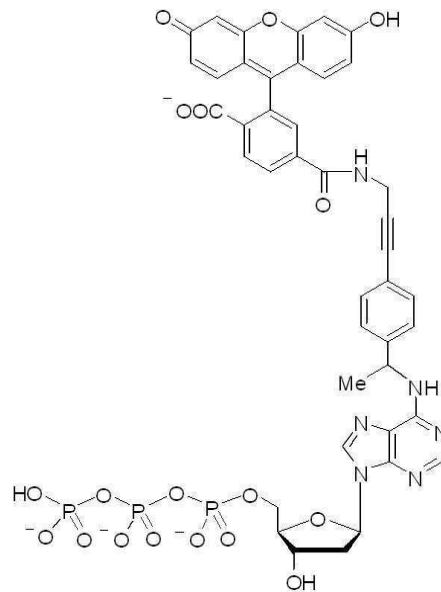
청구항 29

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



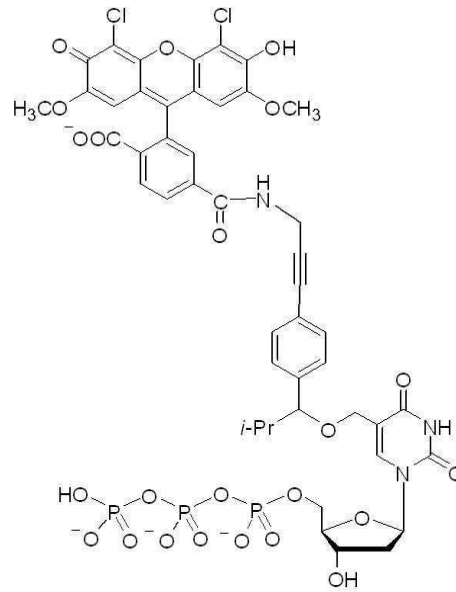
청구항 30

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



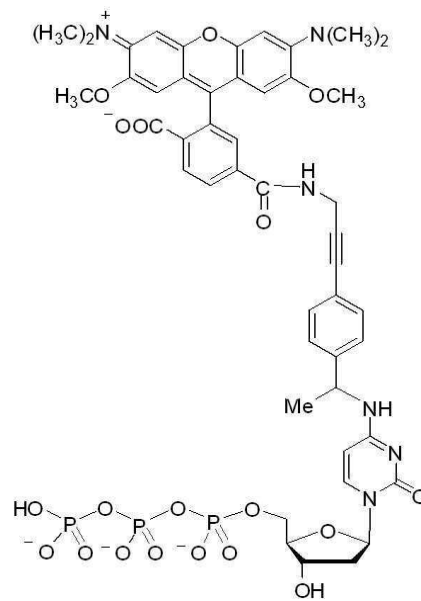
청구항 31

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



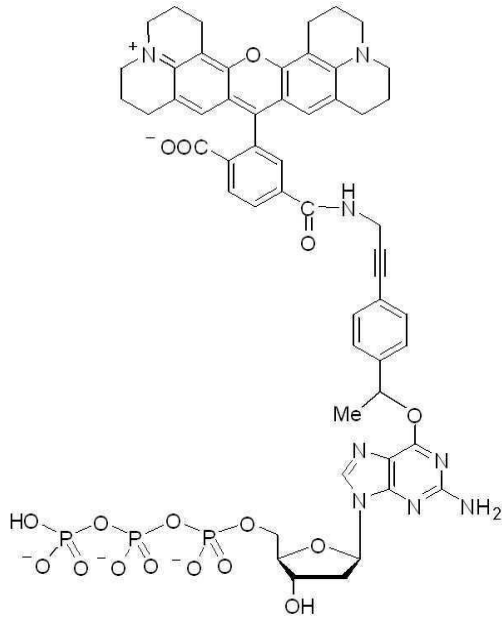
청구항 32

청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



청구항 33

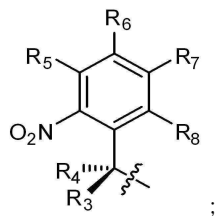
청구항 1에 있어서, 하기 화합물로서 더욱 정의되는 것을 특징으로 하는 화합물:



**청구항 34**

표적 핵산(target nucleic acid)을 염기서열분석하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 프라이머의 5'-말단을 고형 표면에 부착하는 단계;
- (ii) 고형 표면에 부착된 프라이머에 표적 핵산을 혼성화시켜 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 형성하는 단계;
- (iii) 중합효소와 청구항 2에 따른 하나 이상의 화합물을 획득하는 단계, 단서로써 상이한 화학식 I-VII의 화합물은 상이한 형광단을 갖고, 그리고 R<sub>1</sub>은 트리포스페이트 또는 알파-티오투리포스페이트이고;
- (iv) 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 단계 (iii)의 중합효소와 하나 이상의 화합물과 반응시켜 중합효소 반응을 통해 성장하는 프라이머 가닥을 형성하는 단계;
- (v) 성장하는 프라이머 가닥을 영상하여 형광단을 통해 단계 (iv)의 통합된 화합물을 확인하는 단계;
- (vi) 성장하는 프라이머 가닥을 갖는 고형 표면을 광원(light source)에 노출시켜 하기 화학식의 광절단가능 종결 모이어티(photocleavable terminating moiety)를 제거하고, 자연-발생 성분을 포함하는 신장된 프라이머 핵산을 산출하는 단계:

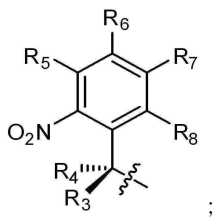


(vii) 표적 핵산 내에서 복수의 염기를 확인하기 위하여 단계 (iv) 내지 (vi)를 1회 이상 반복하는 단계, 여기서 이전 주기의 단계 (vi)의 신장된 프라이머가 차후 주기의 단계 (iv)에서 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체 대신에 반응한다.

**청구항 35**

표적 핵산(target nucleic acid)을 염기서열분석하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 핵산의 5'-말단을 고휘 표면에 부착하는 단계;
- (ii) 고휘 표면에 부착된 핵산에 프라이머를 혼성화시켜 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 형성하는 단계;
- (iii) 중합효소와 청구항 2에 따른 하나 이상의 화합물을 획득하는 단계, 단서로써 상이한 화학식 I-VII의 화합물은 상이한 형광단을 갖고, 그리고 R<sub>1</sub>은 트리포스페이트 또는 알파-티오투리포스페이트이고;
- (iv) 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체를 단계 (iii)의 중합효소와 하나 이상의 화합물과 반응시켜 중합효소 반응을 통해 성장하는 프라이머 가닥을 형성하는 단계;
- (v) 성장하는 프라이머 가닥을 영상하여 형광단을 통해 단계 (iv)의 통합된 화합물을 확인하는 단계;
- (vi) 성장하는 프라이머 가닥을 갖는 고휘 표면을 광원(light source)에 노출시켜 하기 화학식의 광절단가능 종결 모이어티(photocleavable terminating moiety)를 제거하고, 자연-발생 성분을 포함하는 신장된 프라이머 핵산을 산출하는 단계:



- (vii) 표적 핵산 내에서 복수의 염기를 확인하기 위하여 단계 (iv) 내지 (vi)를 1회 이상 반복하는 단계, 여기서 이전 주기의 단계 (vi)의 신장된 프라이머가 차후 주기의 단계 (iv)에서 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체 대신에 반응한다.

**청구항 36**

청구항 36은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합은 자연 뉴클레오타이드 대응물의 통합 효율의 70% 내지 100%로 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 37**

청구항 37은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 36에 있어서, 통합 효율은 85% 내지 100% 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 38**

청구항 38은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 중합효소는 역전사효소(reverse transcriptase), 말단기 전이 효소(terminal transferase), 또는 DNA 중합효소인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 39**

청구항 39은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 광절단가능 종결 모이어티의 85% 내지 100%가 단계 (vi)에서 광원(light source)에 노출에 의해 제거되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 40**

청구항 40은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합 이후에 90% 내지 100%의 효율에서 가닥 성장의 종결이 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 41**

청구항 41은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 맥동 멀티라인 여기 탐지기(pulsed multiline excitation detector)가 단계 (v)에서 영상하는데 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 42**

청구항 42은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 단계 (iv) 이전 또는 이후, 성장하는 프라이머 가닥을 세척하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 43**

청구항 43은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 단계 (iv) 이후, 신장된 프라이머를 세척하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 44**

청구항 44은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 34 또는 35에 있어서, 단계 (iv) 이후, 단계 (iv)에서 반응하지 않은 임의의 프라이머 또는 성장하는 프라이머 가닥을 캡핑(capping)하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 45**

청구항 45은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

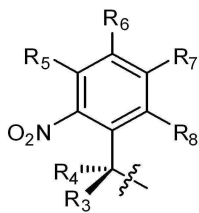
청구항 34 또는 35에 있어서, 복수 표적 핵산을 동시에 염기서열분석하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 46**

청구항 46은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

핵산 분자 내에서 비-자연 발생 성분을 자연-발생 성분으로 전환하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 청구항 2에 따른 화합물을 통합하는 단계;
- (ii) 결과의 핵산을 광원에 노출하여 핵산으로부터 하기 화학식의 광절단가능 중결 모이어티를 제거하는 단계:



**청구항 47**

청구항 47은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 46에 있어서, 복수 핵산 분자 내에 비-자연 발생 성분을 자연-발생 성분으로 동시에 전환시키는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 48**

청구항 48은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 47에 있어서, 복수 핵산 합성을 동시에 종결시키는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 49**

청구항 49은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

핵산 합성을 종결시키는 방법에 있어서, 청구항 1 내지 5, 8, 17 내지 33중 어느 한 항에 따른 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드(nucleotide) 또는 뉴클레오시드(nucleoside)를 중합효소의 환경에 위치시키고, 그리고 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 핵산 분자 내로의 통합을 가능하게 하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 50**

청구항 50은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 49에 있어서, 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 시에 DNA 합성의 종결 효율은 90% 내지 100% 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 51**

청구항 51은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 49에 있어서, 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 효율은 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드와 동일한 염기를 갖는 자연-발생 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 효율과 비교하여 70% 내지 100% 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 52**

청구항 52은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

Sanger 또는 Sanger-타입 염기서열분석(sequencing)을 수행하는 방법에 있어서, 청구항 1 내지 5, 8, 17 내지 33중 어느 한 항에 따른 화합물을 종결 뉴클레오티드 유사체로서 이용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 53**

청구항 53은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

표적 핵산(target nucleic acid)의 서열을 결정하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 표적 핵산을 Sanger 또는 Sanger-타입 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계;
- (ii) 청구항 1 내지 5, 8, 17 내지 33중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 화합물을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계, 단서로써 한 가지 이상의 유형의 염기가 존재하면, 각 염기는 상이한 형광단에 부착되고, 그리고 R<sub>1</sub>은 트리포스페이트 또는 알파-티오텐트리포스페이트이고;
- (iii) 상보성 프라이머와 중합효소를 첨가하는 단계;
- (iv) 중합효소 반응을 수행하여 단계 (ii)의 화합물 중에서 최소한 하나를 성장하는 핵산 가닥 내로 통합하는 단계;
- (v) 형광 염기서열분석 장치로 또는 맥동 멀티라인 여기 형광(pulsed multiline excitation fluorescence)에 의해 Sanger 염기서열분석 반응의 결과를 분석하는 단계.

여기서 단계 (i)-(iii)는 임의의 순서로 수행될 수 있다.

**청구항 54**

청구항 54은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 53에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합 이후에 90% 내지 100%의 효율에서 가닥 성장의 종결이 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 55**

청구항 55은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 53에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합은 중합효소 반응에서 동일한 염기를 갖는 고유 기질(native substrate)의 통합 효율의 70% 내지 100%로 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 56**

청구항 56은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 55에 있어서, 통합 효율은 85% 내지 100% 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 57**

청구항 57은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 53에 있어서, 중합효소는 역전사효소(reverse transcriptase), 말단기 전이 효소(terminal transferase), 또는 DNA 중합효소인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 58**

비-자연 발생 성분을 핵산 내로 통합하는 방법에 있어서, 아래의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

(i) 표적 핵산을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계;

(ii) 청구항 1 내지 5, 8, 17 내지 33중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 화합물을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계, 단서로써 한 가지 이상의 유형의 염기가 존재하면, 각 염기는 상이한 형광단에 부착되고, 그리고 R<sub>1</sub>은 트리포스페이트 또는 알파-티오투리포스페이트이고;

(iii) 중합효소를 첨가하는 단계;

(iv) 중합효소 반응을 수행하여 단계 (ii)의 화합물 중에서 최소한 하나를 성장하는 핵산 가닥 내로 통합하는 단계,

여기서 단계 (i)-(iii)는 임의의 순서로 수행될 수 있다.

**청구항 59**

청구항 59은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 58에 있어서, 단계 (ii)로부터 최소한 하나의 화합물의 통합을 위한 중합효소 연쇄 반응의 결과를 분석하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 60**

청구항 60은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 58에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합 이후에 90% 내지 100%의 효율에서 가닥 성장의 종결이 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 61**

청구항 61은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

청구항 58에 있어서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합은 중합효소 반응에서 동일한 염기를 갖는 고유 기질(native substrate)의 통합 효율의 70% 내지 100%로 진행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 62**

미니-시퀀싱(mini-sequencing) 또는 미니시퀀싱-타입 염기서열분석을 수행하는 방법에 있어서, 청구항 1 내지

5, 8, 17 내지 33중 어느 한 항에 따른 화합물을 미니-시퀀싱 또는 미니시퀀싱-타입 염기서열분석 방법에 추가하는 단계를 포함하고, 단서로써 R<sub>1</sub>은 트리포스페이트 또는 알파-티오텐트리포스페이트인 것을 특징으로 하는 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001]

본 발명은 전반적으로, DNA 염기서열분석(sequencing)과 다른 유형의 DNA 분석을 위한 화합물과 방법에 관계한다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 광절단가능 기(photocleavable group)로 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드, 비-절단가능 기(non-cleavable group)로 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드, 그리고 DNA 염기서열분석과 다른 유형의 분석에서 이들의 이용 방법에 관계한다.

**배경기술**

[0002]

개체군(population)에서 질병과 돌연변이를 분석하고 치료제를 개발하기 위하여, DNA를 신속하게 염기서열분석하는 방법이 요구되고 있다. 인간 서열 변이(sequence variation)의 가장 빈번하게 관찰되는 형태는 단일 뉴클레오티드 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)인데, 이는 대략, 게놈 서열(genomic sequence)의 300개 염기 쌍(base pair)에서 1개 내지 1000개 염기 쌍에서 1개의 비율로 발생한다. 인간 게놈의 전체 서열을 구축한 이후, SNP 지도작성(mapping) 또는 직접적인 연계(direct association)로, 통상적인 질환에 근원적 유전적 관계(underlying genetic link)를 확인하는 작업이 진행되고 있다. 기술 개발은 신속한 고속 처리(rapid high-throughput)에 집중되었고, 저비용 DNA 염기서열분석은 응용 의학(applied medicine)에서 유전 정보(genetic information), 예를 들면, SNP의 이해와 이용을 촉진할 것이다.

[0003]

일반적으로, 10% 내지 15%의 SNP가 특정 아미노산 잔기(amino acid residue)를 변형함으로써 단백질 기능(protein function)에 영향을 주거나, 절단점합 기전(splicing mechanism)을 변화시킴으로써 유전자의 적절한 가공에 영향을 주거나, 또는 조절 기전(regulatory mechanism)을 변화시킴으로써 유전자 또는 단백질의 발현(expression)의 정상 수준에 영향을 준다. 정보를 제공하는 SNP의 확인은 유전 질환(inherited disease)의 더욱 정확한 진단, 위험 감수성(risk susceptibility)의 더욱 우수한 예측, 또는 조직 내에서 특발성 돌연변이(sporadic mutation)의 확인을 결과할 것이다. 개체의 SNP 프로파일의 적용은 예방적 약물 요법(prophylactic drug therapy)으로 질병의 발생 또는 진행을 현저하게 지연시킬 것이다.

[0004]

게다가, 약물 물질대사 유전자(drug metabolizing gene)의 SNP 프로파일은 더욱 안전하고 더욱 효과적인 결과를 제공하는 특정한 약물 섭생(drug regimen)을 처방하는데 이용될 수 있을 것이다. 이들 야심찬 목적을 달성하기 위하여, 게놈 염기서열분석은 개체군의 대다수의 개체군에서 부분적인 염기서열분석의 잠재력을 갖는 전체 유전체 재분석(resequencing) 단계로 이동하게 되는데, 이는 소정의 복합 질환(complex disease)에 대한 SNP 프로파일을 획득하기 위하여 인간 게놈 전역에 분포하는 특이적인 영역 또는 단일 염기쌍을 동시에 염기서열분석하는 단계를 수반할 것이다.

[0005]

대부분의 통상적인 질환의 원인이 되는 서열 변이(sequence variation)는 연관된 유전자 전역에 분산되고 낮은 빈도로 존재하는 복수의 SNP와 연관될 가능성이 높다. 따라서 *de novo* 염기서열분석을 위한 전략을 이용하는 DNA 염기서열분석 기술은 공지된 SNP를 표적하는 기술보다, 이들 드물지만 폭넓게 퍼져있는 변이체(variant)를 탐지하고 및/또는 발견할 가능성이 더욱 높다.

[0006]

전통적으로, DNA 염기서열분석은 "Sanger" 또는 "디데옥시(dideoxy)" 방법에 의해 수행되고 있는데, 이는 DNA 중합효소를 이용한 2',3'-디데옥시뉴클레오티드(dideoxynucleotide, ddNTP)의 통합(incorporation)에 의한 DNA 합성의 사슬 종결(chain termination)을 수반한다(Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467). 이러한 반응은 또한, 자연 2'-데옥시뉴클레오티드(deoxynucleotide, dNTP)를 포함하는데, 이들은 DNA 합성으로 DNA 사슬을 신장시킨다. 적절하게 균형되면, 사슬 신장(chain extension)과 사슬 종결(chain termination) 사이에 경쟁은 일단의 nested DNA 단편을 산출하는데, 이들은 수천 개의 염기에서 균일하게 분포하고 염기쌍이 증가함에 따라 크기가 달라진다. 이들 nested DNA 단편을 개별 크기로 분리하기 위하여 전기영동(electrophoresis)이 이용된다. 염기서열분석 반응에서 dNTP/ddNTP의 비율은 사슬 종결의 빈도를 결정하고, 따라서 종결된 사슬의 길이 분포를 결정한다. 이후, 이들 단편은 DNA의 4가지 염기(즉, A, C, G와 T)에 4가지 상이한 형광단의 사전 부착을 통하여 탐지되는데, 이들 형광단은 적절한 레이저 광원(laser source)으로 조사될 때, 그들의 개별 형광색을 발한다.

현재, Sanger 염기서열분석이 직접적인 PCR 염기서열분석(Gibbs, R. A., Nguyen, P.-N., McBride, L. J., Koepf, S. M., and Caskey, C. T. (1989) Identification of mutations leading to the Lesch-Nyhan syndrome by automated direct DNA sequencing of *in vitro* amplified cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1919-1923) 또는 게놈 염기서열분석(Hunkapiller, T., Kaiser, R. J., Koop, B. F., and Hood, L. (1991) Large-scale and automated DNA sequencing Determination. *Science* 254, 59-67; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. (2001) *Nature* 409, 860-921)에 의한 SNP의 발견을 위한 방법으로 가장 폭넓게 이용되고 있다.

[0007]

다른 유망한 염기서열분석 접근법은 주기 가역성 종결(cyclic reversible termination, CRT)인데, 이는 복수 주형(template)의 동시적(synchronistic) 단일 염기 추가를 탐지하는 주기 방법(cyclic method)이다. 이러한 접근법은 당분야를 진전시키는데 주요한 장애물인 겔 전기영동(gel electrophoresis)의 필요 없이 수행될 수 있다는 점에서 Sanger 방법과 구별된다(Metzker, M.L. (2005) *Genome Rex* 15, 1767-1776). 하지만, Sanger 염기서열분석과 유사하게, 더욱 긴 관독-길이(read-length)는 전체 게놈을 커버하는데 필요한 더욱 적은 염기서열분석 검사로 귀결된다.

[0008]

긴 CRT 관독의 목적을 달성하는 것은 여전히 어려운데, 그 이유는 가역성 종결인자(reversible terminator)가 전형적으로, 상업적으로 가용한 DNA 중합효소에 불량한 기질(substrate)로서 기능하기 때문이다. 가역성 종결인자는 3'-O-차단기(blocking group)와 연결기(linking group)를 통하여 핵염기 부착된 형광 염료로 구성된다. 차단기와 염료 기 둘 모두 차후의 염기 추가에 앞서 제거를 요한다. 이들 뉴클레오티드 변형은 DNA 중합효소에 의해 충분히 관용되지 않는데, 이들은 효소 성능(enzymatic performance)을 향상시키는 다수의 전략에 의해 돌연변이될 수 있다. 탈보호(deprotection) 이후, 핵염기 링커 기는 뒤에 남겨지고, 차후의 CRT 주기로 성장하는 DNA 이중나선(duplex)에서 순차적으로 축적된다. 불량한 효소 동역학(enzyme kinetics)과 순차적으로 변형된 DNA 이중나선은 더욱 긴 관독-길이를 제한하는 것으로 생각된다. 본 발명에서는 부분적으로, 종결과 형광 염료 모이어티(moiety) 둘 모두의 단일 부착을 요하고, 효소 동역학과 탈보호 효율을 개선하는 신규한 가역성 뉴클레오티드 구조를 기술한다. 이들 가역성 종결인자는 다수의 상업적으로 가용한 DNA 중합효소에 의해 효율적으로 통합되는데, 탈보호 단계는 이러한 성장하는 DNA 이중나선을 자연 상태(natural state)로 전환시킨다.

[0009]

CRT 기술의 DNA 염기서열분석 관독-길이는 각 뉴클레오티드 추가 주기(addition cycle)의 전체 효율에 의해 좌우된다. 가령, 최초 출발 물질(starting material)의 50%의 종점(end-point)이 허용되는 신호-대-잡음 비율(signal-to-noise ratio)을 갖는 것으로 판단되면, 관독-길이에 대한 주기 효율(cycle efficiency)의 효과를 산정하기 위하여 아래의 방정식이 적용될 수 있다:  $(RL)^{C_{eff}} = 0.5$ , 여기서 RL은 염기서열분석에서 관독-길이이고  $C_{eff}$ 는 전체 주기 효율(overall cycle efficiency)이다. 다시 말하면, 7개 염기의 관독-길이는 90%의 전체 주기 효율로 달성될 수 있고, 70개 염기는 99%의 주기 효율로 달성될 수 있고, 700개 염기는 99.9%의 주기 효율로 달성될 수 있다. 대형 스트레치(stretch)를 염기서열분석하는 목표를 달성하기 위하여, 이러한 방법은 매우 높은 주기 효율을 제공한다. 그렇지 않으면, 회수율(recovery)이 허용되는 신호 대 잡음 비율 미만으로 떨어질 수 있다. 더욱 높은 통합과 탈보호 효율을 보이는 가역성 종결인자는 더욱 높은 주기 효율을 달성하고, 따라서 더욱 긴 관독-길이를 달성할 것이다.

[0010]

CRT 종결인자가 적절하게 기능하기 위하여, 보호기(protecting group)가 온화한 조건(mild condition) 하에 효율적으로 절단되어야 한다. 보호기의 제거는 일반적으로, 강한 산이나 염기로 처리, 촉매적 또는 화학적 환원, 또는 이들 방법의 조합을 수반한다. 이들 조건은 DNA 중합효소, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드-중폭된 주형(oligonucleotide-primed template), 또는 고형 서포트(solid support)에 반동하여 바람직하지 않은 결과를 유발할 수 있다. 광화학적 보호기의 이용은 엄격한 화학적 처리에 대한 매력적인 대안이며, 비-침해성 방식(non-invasive manner)으로 이용될 수 있다.

[0011]

2-니트로벤질(nitrobenzyl), 벤질옥시카르보닐(benzyloxycarbonyl), 3-니트로페닐(nitrophenyl), 페나실(phenacyl), 3,5-디메톡시벤조일(dimethoxybenzoinyl), 2,4-디니트로벤젠설페닐(dinitrobenzenesulphenyl), 이들의 개별 유도체를 비롯한 다수의 광제거가능 보호기가 펩티드(peptide), 폴리사카라이드(polysaccharide)와 뉴클레오티드의 합성에 이용되고 있다(Pillai, V. N. R. (1980) Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis. *Synthesis*, 1-26). 이들 중에서, 광 민감성 2-니트로벤질 보호기가 디리보뉴클레오시드(diribonucleoside) 합성을 위하여 리보뉴클레오시드의 2'-OH(Ohtsuka, E., Tanaka, S., and Ikehara, M. (1974) Studies on transfer ribonucleic acids and related compounds. IX(1) Ribooligonucleotide synthesis using a photosensitive o-nitrobenzyl protection at the 2'-hydroxyl group. *Nucleic Acids Res.*

1, 1351-1357), 자동화된 리보자임(ribozyme) 합성에서 리보포스포라미디트(ribo-phosphoramidite)의 2'-OH(Chaulk, S. G., and MacMillan, A. M. (1998) Caged RNA: photo-control of a ribozyme. *Nucleic Acids Res.* 26, 3173-3178), Affymetrix 화학에서 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 포스포라미디트(phosphoramidite)의 3'-OH(Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., and Fodor, S. P. A. (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5022-5026), 그리고 DNA 염기서열분석 적용을 위한 3'-OH 기(Metzker, M. L., Raghavachari, R., Richards, S., Jacutin, S. E., Civitello, A., Burgess, K., and Gibbs, R. A. (1994) Termination of DNA synthesis by novel 3'-modified deoxyribonucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* 22, 4259-4267)에 성공적으로 적용되었다. 탈보호 조건(자외선 >300 nm) 하에, 2-니트로벤질 기는 피리미딘(pyrimidine) 또는 퓨린(purine) 염기에 영향을 주지 않으면서 효율적으로 제거될 수 있다(Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., and Fodor, S. P. A. (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5022-5026; Bartholomew, D. G., and Broom, A. D. (1975) One-step Chemical Synthesis of Ribonucleosides bearing a Photolabile Ether Protecting Group. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 38).

[0012] 새로운 염기서열분석 기술을 개발하는 필요성은 비교 유전학(comparative genomics)과 진화론(evolution), 법의학(forensics), 의생태학(epidemiology), 그리고 진단학(diagnostics)과 치료학(therapeutics)을 위한 응용 의학(applied medicine)을 비롯한 다양한 연구 분야에 이르는 적용으로 인하여, 그 어느 때보다 높다. 현재의 염기서열분석 기술은 인간 서열 변이 연구에 폭넓게 적용하기에는 너무 많은 비용이 소요되고, 노동 집중적이며, 시간 소모적이다. 게놈 센터 비용은 1,000개 Q<sub>20</sub> 염기당 달러(dollar)에 기초하여 계산되는데, 일반적으로, 장치(instrumentation) 비용, 인건비, 시약(reagent)과 재료(material) 비용, 그리고 간접비(overhead expense)의 범주로 구분될 수 있다. 현재, 이들 센터는 1,000개 Q<sub>20</sub> 염기당 1 달러 이하로 운영되고 있는데, 이러한 비용의 최소한 50%가 DNA 염기서열분석 장치로부터 발생한다. 신규한 탐지 방법의 개발, 장치의 소형화(miniaturization), 마이크로유체 분리(microfluidic separation) 기술, 그리고 작업(run)당 검사 횟수의 증가는 비용을 감소시키는데 가장 큰 영향을 줄 것이다.

[0013] 이런 이유로, 본 발명의 목적은 고속 처리 염기서열분석 반응물에서 게놈 정보(genomic information)의 효율적인 염기서열분석에 유용한 신규한 화합물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 게놈 정보를 효율적으로 충분히 제공할 수 있는 신규한 시약과 시약의 조합을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 개체에 대한 진단 방법과 표적 요법(targeted therapeutics)을 개발하기 위한 시약의 라이브러리(library)와 어레이(array)를 제공하는 것이다.

[0016] 요약

[0017] 광절단가능 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드

[0018] DNA 염기서열분석 기술에 이용될 수 있는 뉴클레오시드 화합물, 그리고 이들의 포스페이트(phosphate)와 염이 제시된다. 이들 화합물은 선택적으로, 리보뉴클레오시드 트리포스페이트(ribonucleoside triphosphate, NTP)와 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 화합물의 형태로 존재한다. 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 형광 염료로 표지된 광절단가능 기를 보유한다. 광절단가능 보호기를 보유하는 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 핵산 올리고머가 병렬 양식(parallel format)으로 신속하게 염기서열분석될 수 있도록 하기 위하여, DNA 합성을 종결시키고, 이후 효율적으로 절단되도록 설계된다. 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물 상에서 형광 염료로 표지된 이런 절단가능 기의 존재는 DNA의 대형 올리고머의 동시 염기서열분석의 속도와 정확도를 강화시켜 예로써, 신속한 전체 게놈 염기서열분석, 그리고 다형성과 다른 귀중한 유전 정보의 확인을 가능하게 할 수 있다.

[0019] 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 이들의 자연 발생 유도체를 포함하는 다양한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 제시되는데, 이들은 절단가능 기를 보유하고 및/또는 탐지가능 라벨, 예를 들면, 염료를 보유하도록 유도체화될 수 있다.

[0020] 한 구체예에서, 뉴클레오시드의 염기는 2-니트로벤질 기로 공유 부착되고, 이러한 2-니트로벤질 기의 알파 탄소 위치(alpha carbon position)는 본 명세서에 기술된 바와 같이 하나의 알킬 또는 아릴 기로 선택적으로 치환된

다. 2-니트로벤질 기는 종결 특성(termination property)과 광 촉매된 탈보호 속도(light catalyzed deprotection rate)를 강화시키기 위하여 기능체화될 수 있다. 핵염기에 부착된 2-니트로벤질, 또는 알파 탄소 치환된 2-니트로벤질 기의 종결 특성은 리보오스(ribose) 당에서 3'-OH 기가 차단되지 않을 때에도 존재한다. 이들 3'-OH 차단되지 않은 종결인자는 다수의 상업적으로 가용한 DNA 중합효소에 의해 충분히 관용되고, 3'-O-차단된 종결인자에 비하여 핵심적인 이점을 대표한다. 알파 탄소 치환된 2-니트로벤질 기는 또한, 선택된 형광 염료를 보유하도록 유도체화될 수 있다.

[0021] 한 구체예에서, 뉴클레오시드의 염기는 2-니트로벤질 기로 공유 부착되고, 이러한 2-니트로벤질 기는 본 명세서에 기술된 바와 같은 한 가지 이상의 전자 주는 기(electron donating group)와 전자 끄는 기(electron withdrawing group)로 선택적으로 치환된다. 2-니트로벤질 기는 광 촉매된 탈보호 속도를 강화시키기 위하여 기능체화될 수 있다. 2-니트로벤질 기는 또한, 탐지가능 형광 염료를 보유하도록 유도체화될 수 있다.

[0022] 특히, 본 명세서에 기술된 2-니트로벤질 기와 유도체로 변형되고 별개의 형광 염료로 표지된 4가지 뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물의 조합을 이용하는 DNA 염기서열분석 방법이 제시되는데, 이들 방법은 통합된 염기를 확인하고 기초가 되는 DNA 서열을 밝히는데 이용될 수 있다.

[0023] 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드

[0024] 또한, DNA 염기서열분석 기술에 이용될 수 있는 뉴클레오시드 화합물, 그리고 이들의 포스페이트(phosphate)와 염이 제시된다. 이들 화합물은 선택적으로, 리보뉴클레오시드 트리포스페이트(ribonucleoside triphosphate, NTP)와 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP) 화합물의 형태로 존재한다. 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 형광 염료로 표지된 비-절단가능 기를 보유한다. 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 핵산 올리고머가 병렬 양식(parallel format)으로 신속하게 염기서열분석될 수 있도록 하기 위하여, DNA 합성을 종결시키도록 설계된다. 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 이들의 자연 발생 유도체를 포함하는 다양한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 제시되는데, 이들은 탐지가능 라벨, 예를 들면, 염료를 보유하도록 유도체화될 수 있다.

[0025] 한 구체예에서, 뉴클레오시드의 염기는 벤질 기로 공유 부착되고, 이러한 벤질 기의 알파 탄소 위치(alpha carbon position)는 본 명세서에 기술된 바와 같이 하나의 알킬 또는 아릴 기로 선택적으로 치환된다. 벤질 기는 종결 특성(termination property)을 강화시키기 위하여 기능체화될 수 있다. 핵염기에 부착된 선택적으로 알파 탄소 치환된 벤질 기의 종결 특성은 리보오스(ribose) 당에서 3'-OH 기가 차단되지 않을 때에도 존재한다. 이들 3'-OH 차단되지 않은 종결인자는 다수의 상업적으로 가용한 DNA 중합효소에 의해 충분히 관용되고, 3'-O-차단된 종결인자에 비하여 핵심적인 이점을 대표한다. 이러한 링커 기는 또한, 선택된 형광 염료를 보유하도록 유도체화될 수 있다.

[0026] 특히, 본 명세서에 기술된 비-절단가능 종결기와 유도체로 변형되고 별개의 형광 염료로 표지된 4가지 뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물의 조합을 이용하는 DNA 염기서열분석 방법이 제시되는데, 이들 방법은 통합된 염기를 확인하고 기초가 되는 DNA 서열을 밝히는데 이용될 수 있다.

### 발명의 상세한 설명

[0027] 광절단가능 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드

[0028] 신속한 DNA 염기서열분석 기술에 이용될 수 있는 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물, 그리고 이들의 염, 에스테르와 포스페이트가 제시된다. 이들 화합물은 선택적으로, 리보뉴클레오시드 트리포스페이트(ribonucleoside triphosphate, NTP)와 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)의 형태로 존재한다. 한 구체예에서, 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 형광 염료로 표지된 광절단가능 기를 보유한다. 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 DNA 합성을 종결시키고 신속하게 절단되도록 설계된 광제거가능 보호기를 보유하고, 따라서 이들 단량체는 병렬 양식(parallel format)으로 신속한 염기서열분석에 이용될 수 있다. 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물 상에서 형광 염료로 표지된 이런 신속하게 절단가능 기의 존재는 DNA의 대형 올리고머의 동시 염기서열분석의 속도와 정확도를 강화시켜 예로써, 신속한 전체 게놈 염기서열분석, 그리고 다형성과 다른 귀중한 유전 정보의 확인을 가능하게 할 수 있다.

[0029] 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 이들의 자연 발생 유도체를 포함하는 다양한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 제시되는데, 이들은 절단가능 기를 보유하고 및/또는 탐지가능 라벨, 예를 들면, 염

료를 보유하도록 유도체화될 수 있다.

[0030]

한 구체예에서, 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 이들의 자연 발생 유도체는 광제거가능 보호기, 예를 들면, 2-니트로벤질 기에 공유 부착될 수 있다. 2-니트로벤질 기는 DNA 합성의 종결과 탈보호 속도를 강화시키고, 따라서 DNA 염기서열분석에서 유용성(usefulness)을 증가시키기 위하여 유도체화될 수 있다. 광제거가능 보호기, 예를 들면, 2-니트로벤질 기는 또한, 이러한 광제거가능 보호기에 공유 연쇄(covalent linkage)에 의해 형광 염료로 유도체화될 수 있다.

[0031]

I. 염기서열분석을 위한 광절단가능 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물의 이점

[0032]

DNA 염기서열분석 기술에 유용한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 제시된다. 주기 가역성 종결(cyclic reversible termination, CRT)은 복수 주형(template)의 동시적 단일 염기 추가를 탐지하는 주기 방법이다. 이러한 접근법은 당분야를 진전시키는데 주요한 장애물인 겔 전기영동(gel electrophoresis)과 고도-병렬 양식(highly-parallel format)의 필요 없이 수행될 수 있다는 점에서 Sanger 방법과 구별된다. 하지만, Sanger 염기서열분석과 유사하게, 더욱 긴 관독-길이(read-length)는 전체 게놈을 커버하는데 필요한 더욱 적은 염기서열분석 검사로 귀결된다. CRT 주기는 3 단계, 통합(incorporation), 영상(imaging)과 탈보호(deprotection)를 포함한다. 이러한 절차에서, 주기 효율(cycle efficiency), 주기가산(cycle time)과 민감도(sensitivity)가 중요한 인자이다. 주기 효율은 탈보호와 통합 효율의 산물이고, CRT 관독-길이를 결정한다. CRT 주기가산은 통합, 영상과 탈보호시간의 합이다. 전체 게놈 염기서열분석을 위한 신속한 CRT에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 이용될 수 있는데, 이들은 신속하고 효율적인 탈보호 특성을 나타낼 수 있다. 이들 화합물은 2-니트로벤질에 직접적으로 부착된 형광 염료로 표지되고, 유사한 탈보호 특성을 갖는 형광 가역성 종결인자를 제공할 수 있다. CRT 기술의 관독-길이(read-length)는 탈보호와 통합 효율의 산물인 각 뉴클레오티드 추가 주기(addition cycle)의 전체 효율에 의해 좌우된다. 가령, 최초 출발 물질(starting material)의 50%의 종점(end-point)이 허용되는 신호-대-잡음 비율(signal-to-noise ratio)을 갖는 것으로 판단되면, 관독-길이에 대한 주기 효율의 효과를 산정하기 위하여 아래의 방정식이 적용될 수 있다:  $(RL)^{Ceff} = 0.5$ , 여기서 RL은 염기에서 관독-길이이고 Ceff는 전체 주기 효율(overall cycle efficiency)이다. 다시 말하면, 7개 염기의 관독-길이는 90%의 전체 주기 효율로 달성될 수 있고, 70개 염기는 99%의 주기 효율로 달성될 수 있고, 700개 염기는 99.9%의 주기 효율로 달성될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물의 통합 효율은 유사한 고유 뉴클레오시드의 통합 효율의 대략 70% 내지 대략 100% 범위에서 변한다. 적절하게는, 통합 효율은 대략 85% 내지 대략 100% 범위에서 변한다. 적절하게는, 광절단 효율은 대략 85% 내지 대략 100% 범위에서 변한다. 더 나아가, 핵산 신장의 종결은 본 발명에 따른 화합물의 통합 이후에 대략 90% 내지 대략 100% 범위에서 변한다. 한 구체예에서, 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 최소한 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9%의 주기 효율을 갖는다. 게놈 DNA에 적용될 때, 이들 화합물은 CRT에서, 게놈 DNA로부터 직접적으로 관독하는데 이용될 수 있다. 단편화된 게놈 DNA는 선택된 염색체(chromosome)에 걸쳐 있는 증폭 부위(priming site)를 보유하는 고-밀도 올리고뉴클레오티드 칩(chip)에 혼성화될 수 있다. 각 증폭 서열(priming sequence)은 CRT 방법의 산정된 관독-길이에 의해 분리된다. 염기 추가 사이에, 형광 영상장치(fluorescent imager)는 전체 고-밀도 칩을 동시에 영상하여, 속도와 민감도에서 현저한 향상을 도모할 수 있다. 본 명세서에 기술된 2-니트로벤질 기 또는 이의 유도체에 부착되는 형광단은 uv 조사(irradiation)에 의해 제거되고, 차기의 염기 추가를 위하여 2-니트로벤질 기를 방출한다. 대략 500 CRT 주기 이후에, 완결된 연속 게놈 서열 정보는 참고 인간 게놈(reference human genome)과 비교하여, 개체의 샘플에서 서열 변이의 정도와 유형을 결정할 수 있다.

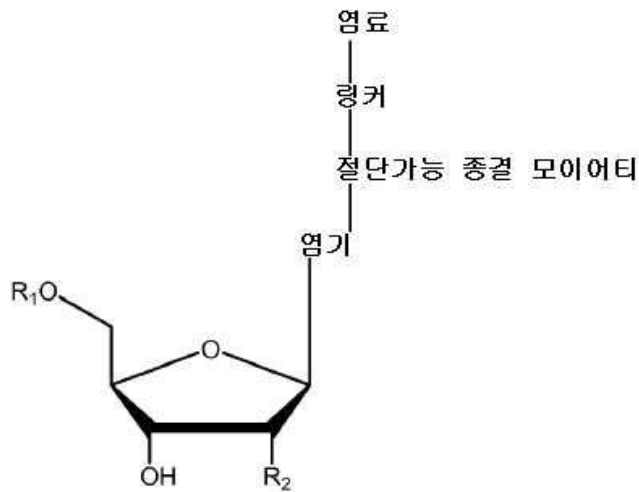
[0033]

II. 광절단가능 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물

[0034]

다양한 뉴클레오시드와 화합물, 그리고 이들의 모노포스페이트, 디포스페이트와 트리포스페이트가 제시된다. 이들 화합물은 DNA 염기서열분석 기술에 유용하다. 한 구체예에서, 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 CRT 반응에서 탐지되고 효율적으로 절단될 수 있는 형광 염료로 표지된 광절단가능 종결 기를 보유한다. 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 차기의 DNA 증합효소 반응 동안, 그들의 개별 자연 뉴클레오시드 모노포스페이트로 전환될 수 있다. 특정 구체예에서, 데옥시리보오스(deoxyribose) 또는 리보오스 당과 염기를 포함하는 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 제시되는데, 여기서 염기는 광절단가능 종결 기, 2-니트로벤질 기에 공유 부착된다. 2-니트로벤질 기는 DNA 합성의 종결과 탈보호의 속도를 증가시키는 기로 치환될 수 있다. 이에 더

하여, 2-니트로벤질 기는 리포터 기(reporter group), 예를 들면, 염료를 부착함으로써 탐지될 수 있다. 염료는 이중기능성 링커에 의해 2-니트로벤질 기에 선택적으로 될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물은 아래의 화학식으로 대표된다:

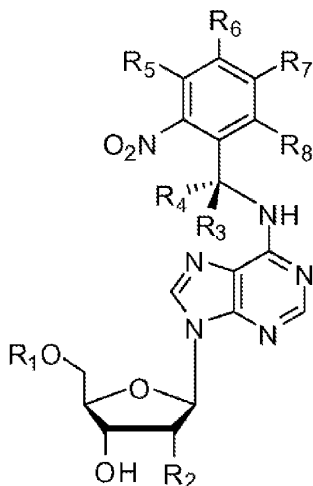


[0035]

[0036]

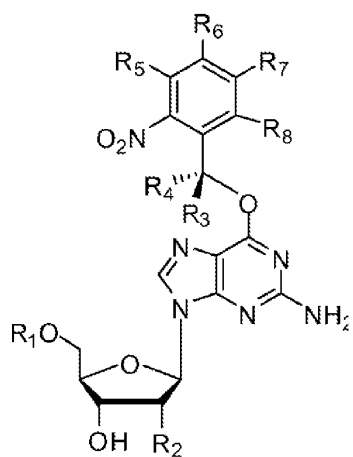
R<sub>1</sub>은 H, 모노포스페이트(monophosphate), 디포스페이트(diphosphate) 또는 트리포스페이트(triphosphate)이고, R<sub>2</sub>는 H 또는 OH이고, 염기는 시토신(cytosine), 우라실(uracil), 티민(thymine), 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 또는 이들의 자연 발생 유도체이고, 절단가능 종결 모이어티(cleavable terminating moiety)는 화합물에 중합효소 종결 특성(polymerase termination property)을 부여하는 기이고, 링커는 이중기능성 기(bifunctional group)이고, 염료는 형광단(fluorophore)이다. 본 발명에 따른 화합물은 DNA 합성 염기서열분석에 유용한 형광(fluorescent), 광불안정성(photolabile) 가역적 종결인자(reversible terminator)로서 설계될 수 있다. 이들 화합물은 수용액(aqueous solution) 내에서 신속하고 효율적인 탈보호 행태(deprotection behavior)와 우수한 형광 특성을 갖도록 변형된 최적화된 가역적 종결인자일 수 있다. 한 구체예에서, 화학식 I-VII의 구조를 갖는 화합물, 이들의 제약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르, 또는 이들의 거울상이성질체(enantiomer), 라세미 혼합물(racemic mixture), 또는 입체이성질체(stereoisomer)가 제시된다:

**화학식 I**



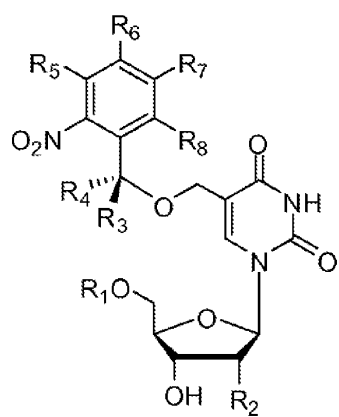
[0037]

화학식 II



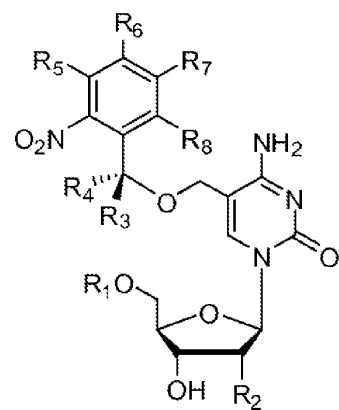
[0038]

화학식 III



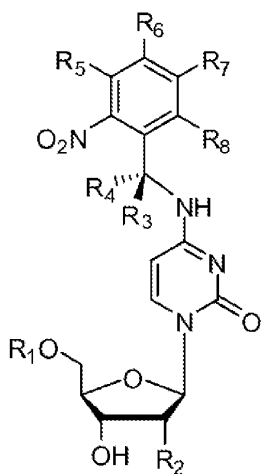
[0039]

화학식 IV



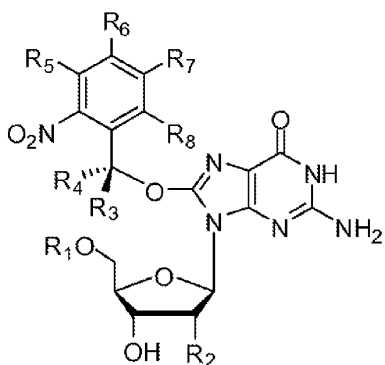
[0040]

화학식 V



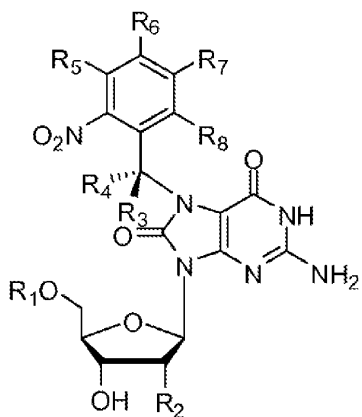
[0041]

화학식 VI



[0042]

화학식 VII

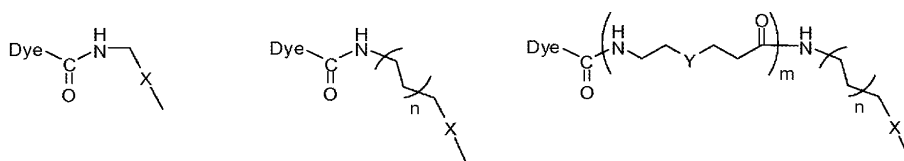


[0043]

[0044]

R<sub>1</sub> = H, 모노포스페이트, 디포스페이트 또는 트리포스페이트, R<sub>2</sub> = H 또는 OH, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 각각 독립적으로, H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알케닐 또는 폴리에닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알키닐 또는 폴리알키닐, 또는 방향족 기(aromatic group), 예를 들면, 페닐, 나프틸, 또는 피리딘 고리에서 선택되고, 단서로써, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub> 중에서 최소한 하나는 H이고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>과 R<sub>8</sub>은 각각 독립적으로, H, OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, CN, 할로겐 화합물(halide), C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알케닐 또는 폴리에닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알키닐 또는 폴리알키닐, 방향족 기, 예를 들면, 페닐, 나프틸, 또는 피리딘 고리, 및/또는 아래 구

조식의 링커 기에서 선택된다:



[0045]

[0046]

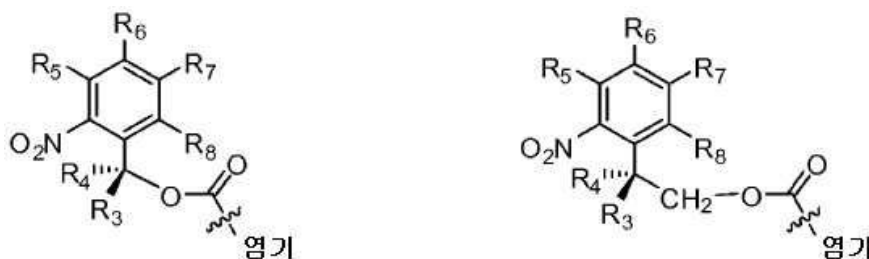
X = CH<sub>2</sub>, CH=CH, C≡C, O, S, 또는 NH, Y = CH<sub>2</sub>, O, 또는 NH, n = 0-12의 정수, m = 0-12의 정수, 염료 = 형광 단. 특정 구체예에서, 유도체화된 2-니트로페닐 고리를 포함하는 본 명세서에 제시된 화합물, 예를 들면, 화학식 I-VII의 화합물에서, DNA 염기서열분석(sequencing) 동안 탈보호(deprotection)의 속도와 2-니트로페닐 기의 제거는 2-니트로페닐 고리의 4-위치에 전자 주는 기(electron donating group), 또는 5-위치에 전자 끄는 기(electron withdrawing group)를 포함함으로써 강화될 수 있다.

[0047]

바람직한 구체예에서, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 이소프로필, tert-부틸, 페닐, 2-니트로페닐과 2,6-디니트로페닐이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 군에서 선택된다. 대안으로, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 알킬과 방향족 기가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 군에서 선택되고, 상기 알킬 또는 방향족 기는 최소한 하나의 헤테로원자를 선택적으로 보유하고, 상기 방향족 기는 선택적으로, 아릴, 예를 들면, 페닐, 또는 다환, 예를 들면, 나프틸 기이다. 특정 구체예에서, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>과 R<sub>8</sub>은 아릴과 다환 기로 구성되는 방향족 기에서 선택된다.

[0048]

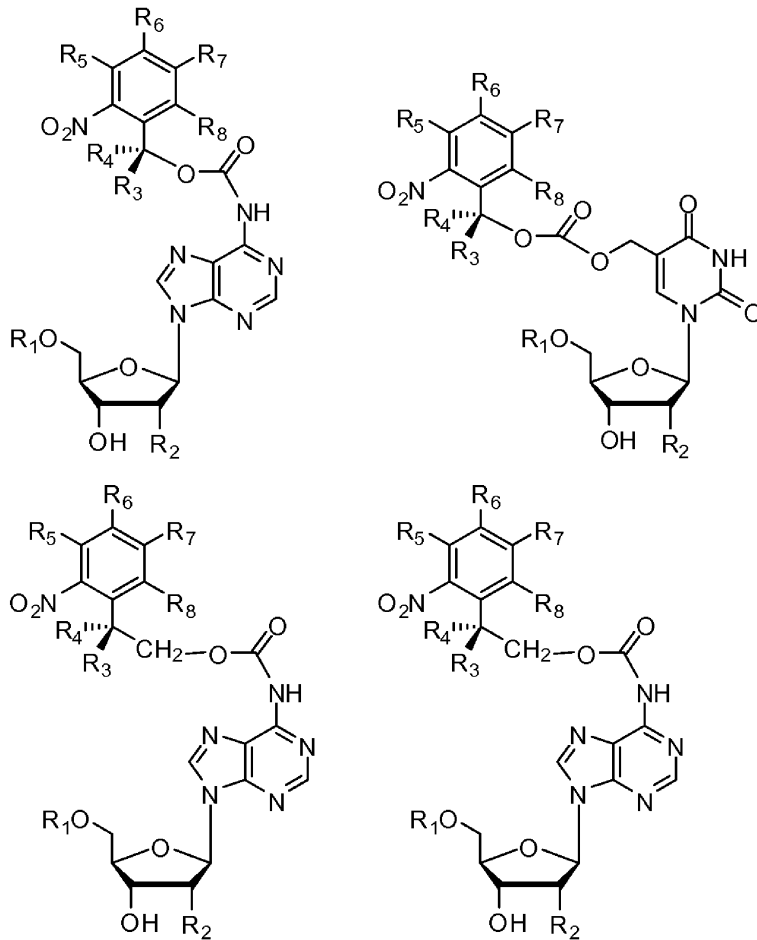
대안으로, 광절단가능 종결 모이어티는 아래의 구조식을 갖는다:



[0049]

[0050]

가령, 이런 광절단가능 종결 모이어티를 보유하는 화합물은 아래의 구조식을 가질 수 있다:



[0051]

[0052]

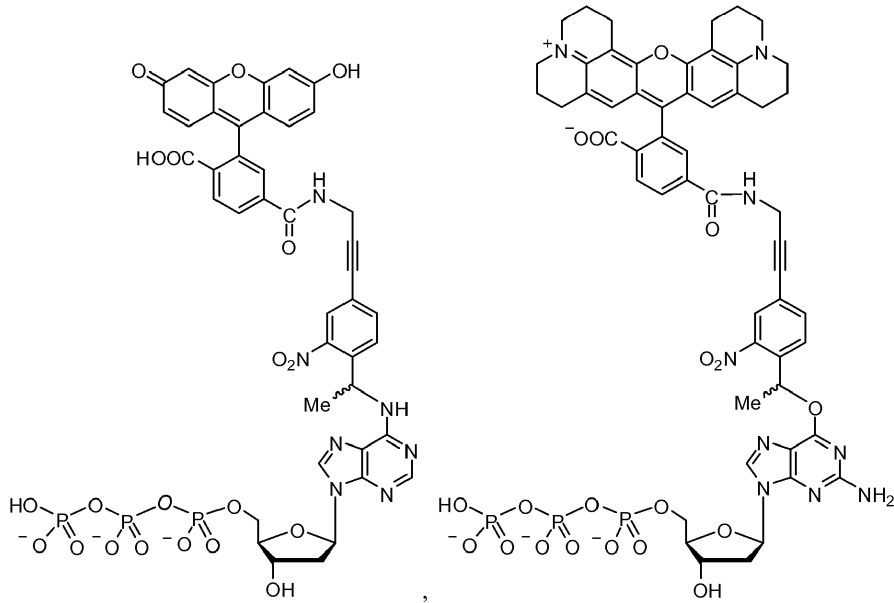
여기서, 절단가능 종결 모이어티는 벤질 아민, 벤질 에테르, 카르바메이트, 카보네이트, 2-(o-니트로페닐)에틸 카르바메이트와 2-(o-니트로페닐)에틸 카보네이트로 구성되는 군에서 선택되는 연쇄(linkage)를 통하여 염기에 부착된다. 이들 구체에는 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0053]

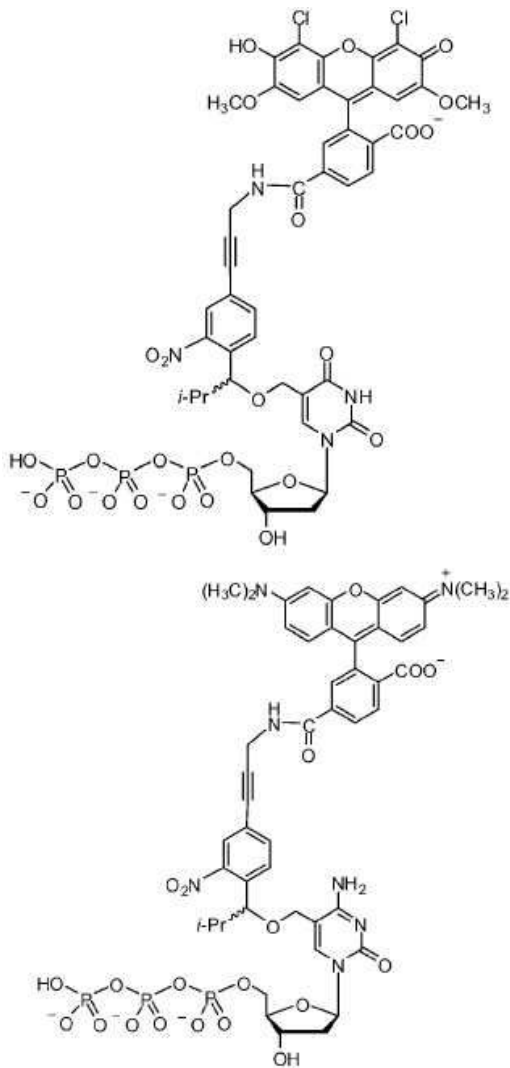
형광 염료(Fluorescent dye)는 특정하게 한정되지 않는다. 가령, 형광단(fluorophore)은 BODIPY, 플루오레세인 (fluorescein), 로다민(rhodamine), 쿠마린(coumarin), 산텐(xanthene), 시아닌(cyanine), 피렌(pyrene), 프탈로시아닌(phthalocyanine), 피코빌리단백질(phycoobiliprotein), 알렉사(alexa), 스쿠아리안 염료(squaraine dye), 에너지 전송 염료(energy transfer dye)를 산출하는 조합(combination), 이들의 유도체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 군에서 선택된다.

[0054]

바람직한 구체예에는 아래의 화합물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다:



[0055]



[0056]

[0057]

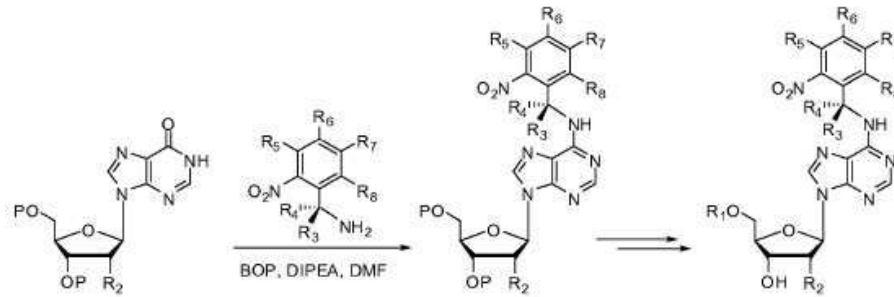
III. 광절단가능 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물의 합성

[0058]

본 명세서에 기술된 화합물은 일반적으로, 당분야에 가용한 방법을 이용하여 본 명세서에 기술된 바와 같이 합성될 수 있다. 가령, 아래의 반응식은 아데노신 화합물의 합성을 대표한다:

[0059]

아데노신 N6-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



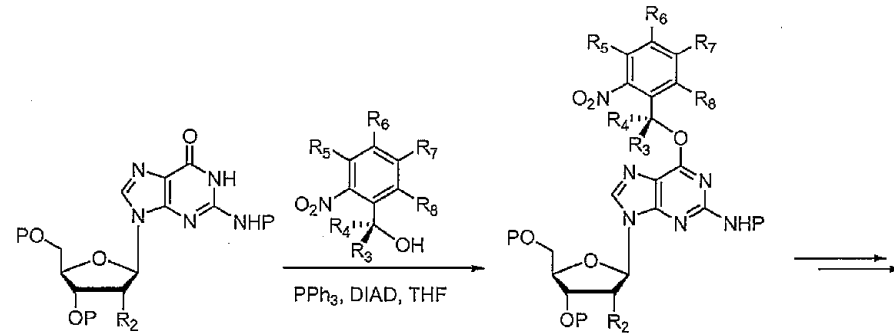
P는 적절한 보호기를 표시한다.  
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 아 기

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0060]

[0061]

구아노신 06-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식

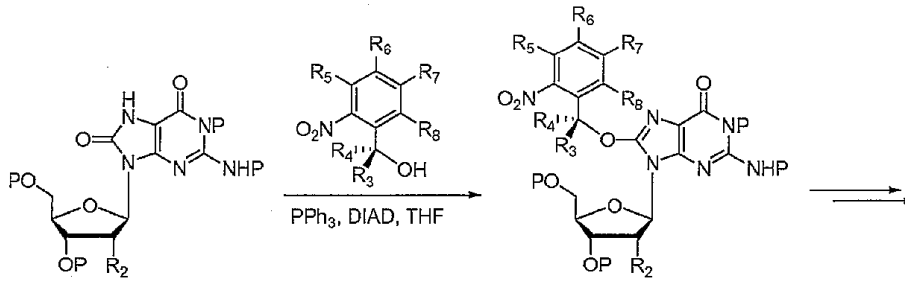


P는 적절한 보호기를 표시한다.  
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 아 기

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

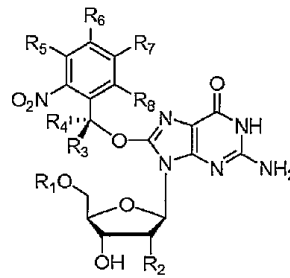
[0062]

[0063] 구아노신 8-옥소-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



P는 적절한 보호기를 표시한다.

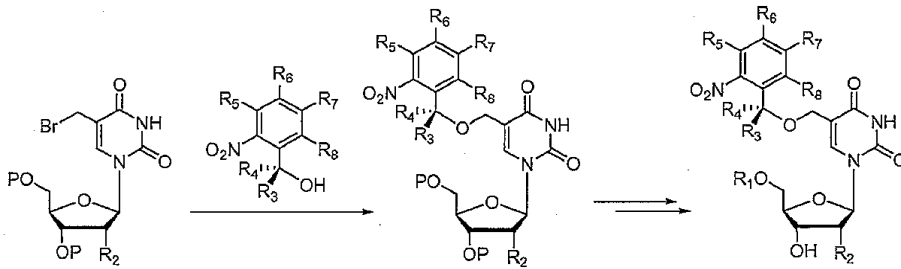
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 OH 기



R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0064]

[0065] 우리딘 5-HOME-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



P는 적절한 보호기를 표시한다.

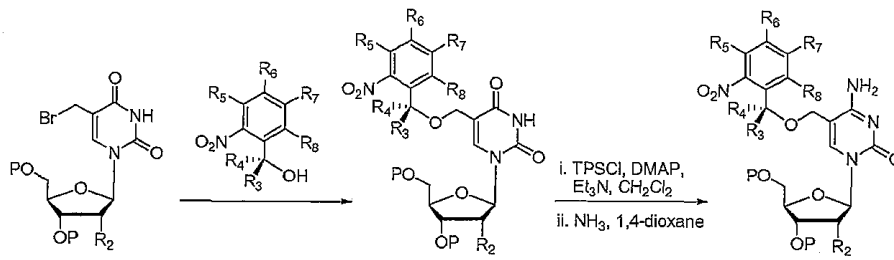
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 OH 기

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

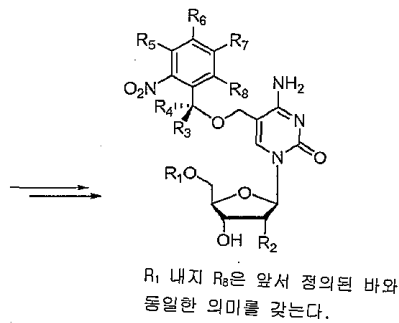
[0066]

[0067]

시티딘 5-HOMe-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



P는 적절한 보호기를 표시한다.  
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 OH 기

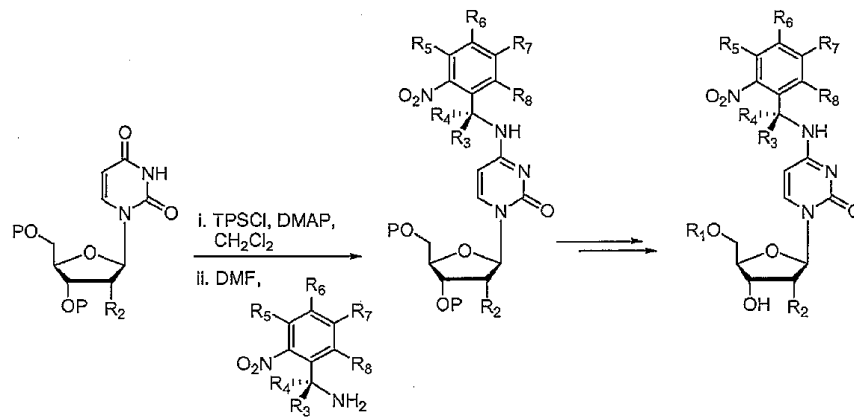


R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0068]

[0069]

시티딘 N4-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



P는 적절한 보호기를 표시한다.  
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 OH 기

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0070]

[0071]

추가 상재는 실시예 섹션에서 제공된다.

[0072]

표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드

[0073]

신속한 DNA 염기서열분석 기술에 이용될 수 있는 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물, 그리고 이들의 염, 에스테르와 포스페이트가 제시된다. 이들 화합물은 선택적으로, 리보뉴클레오시드 트리포스페이트(ribonucleoside triphosphate, NTP)와 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)의 형태로 존재한다. 한 구체예에서, 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 형광 염료로 표지된 비-절단가능성을 보유한다. 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 DNA 합성을 종결시키도록 설계되고, 따라서 이들 단량체는 병렬 양식(parallel format)으로 신속한 염기서열분석에 이용될 수 있다. 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물 상에서 형광 염료로 표지된 이런 기의 존재는 DNA의 대형 올리고머의 동시 염기서열분석의 속도와 정확도를 강화시켜 예로써, 신속한 전체 게놈 염기서열분석, 그리고 다형성과 다른 귀중한 유전 정보의 확인을 가능하게 할 수 있다.

[0074] 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 이들의 자연 발생 유도체를 포함하는 다양한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 제시되는데, 이들은 비-절단가능 종결 모이어티를 보유하고 및/또는 탐지가능 라벨, 예를 들면, 염료를 보유하고 유도체화될 수 있다.

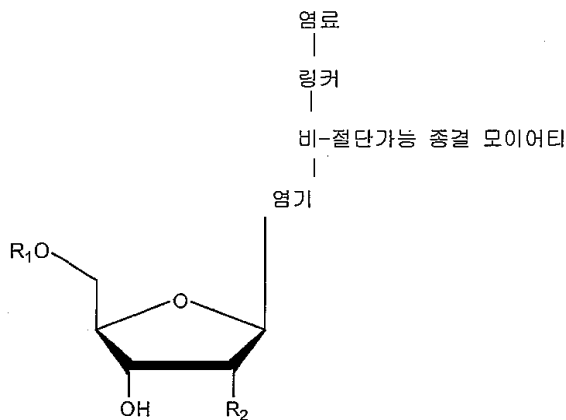
[0075] 한 구체예에서, 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 또는 이들의 자연 발생 유도체는 비-절단가능 종결 모이어티를 통하여 염료에 공유 부착될 수 있다. 이러한 비-절단가능 종결 모이어티는 DNA 합성의 종결을 강화시키고, 따라서 DNA 염기서열분석에서 유용성(usefulness)을 증가시키기 위하여 유도체화될 수 있다.

[0076] I. 염기서열분석을 위한 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물의 이점

[0077] DNA 염기서열분석 기술에 유용한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물이 제시된다. 본 발명에 따른 화합물의 통합 효율은 유사한 고유 뉴클레오시드의 통합 효율의 대략 70% 내지 대략 100% 범위에서 변한다. 적절하게는, 통합 효율은 대략 85% 내지 대략 100% 범위에서 변한다. 더 나아가, 핵산 신장의 종결은 본 발명에 따른 화합물의 통합 이후에 대략 90% 내지 대략 100% 범위에서 변한다. 한 구체예에서, 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 최소한 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 또는 99.9%의 종결 효율을 갖는다.

[0078] II. 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물

[0079] 다양한 뉴클레오시드와 화합물, 그리고 이들의 모노포스페이트, 디포스페이트와 트리포스페이트가 제시된다. 이들 화합물은 염기서열분석 기술에 유용하다. 한 구체예에서, 뉴클레오시드 화합물은 효율적으로 탐지될 수 있는 형광기를 보유한다. 이러한 뉴클레오시드 화합물은 DNA 중합효소 반응 동안, 그들의 개별 트리포스페이트로 전환될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물은 아래의 화학식으로 대표된다:

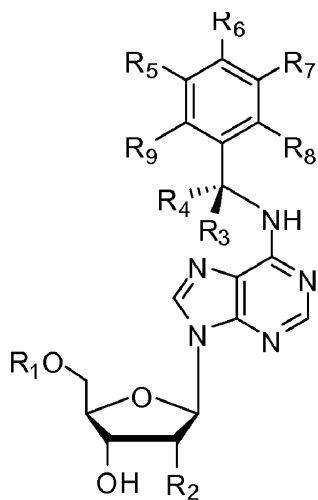


[0080] R<sub>1</sub>은 H, 모노포스페이트(monophosphate), 디포스페이트(diphosphate) 또는 트리포스페이트(triphosphate)이고, R<sub>2</sub>는 H 또는 OH이고, 염기는 시토신(cytosine), 우라실(uracil), 티민(thymine), 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 또는 이들의 자연 발생 유도체이고, 비-절단가능 종결 모이어티(non-cleavable terminating moiety)는 화합물에 중합효소 종결 특성(polymerase termination property)을 부여하는 기이고, 링커는 이중기능성 기(bifunctional group)이고, 염료는 형광단(fluorophore)이다. 본 발명에 따른 화합물은 DNA 합성 염기서열분석에 유용한 형광(fluorescent), 비-불안정정성(non-labile) 비가역적 종결인자(non-reversible terminator)로서 설계될 수 있다.

[0082] 한 구체예에서, 화학식 I-VII의 구조를 갖는 화합물, 이들의 제약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르, 또는 이들의 거울상이성질체(enantiomer), 라세미 혼합물(racemic mixture), 또는 입체이성질체(stereoisomer)가 제시된다:

[0083]

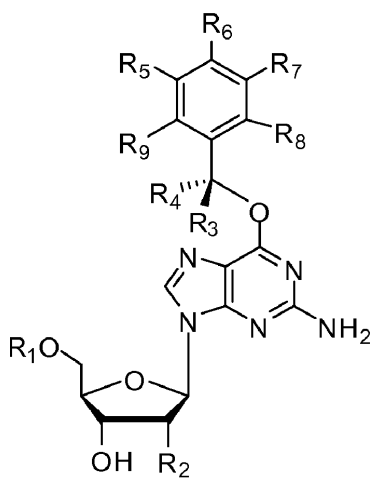
화학식 I



[0084]

[0085]

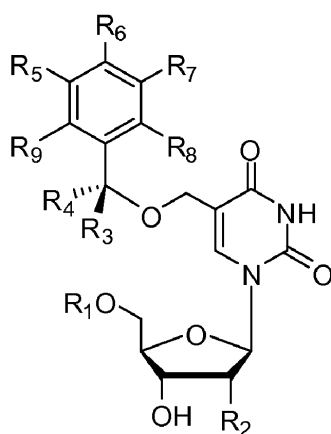
화학식 II



[0086]

[0087]

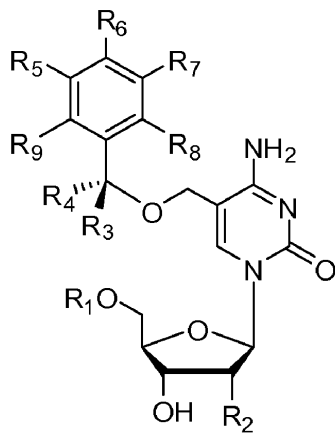
화학식 III



[0088]

[0089]

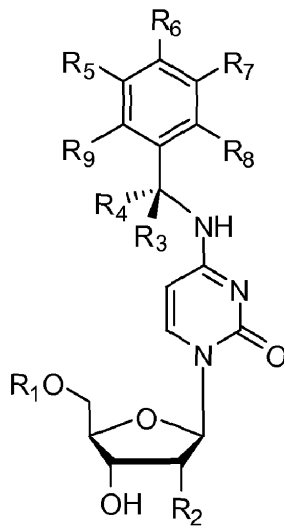
화학식 IV



[0090]

[0091]

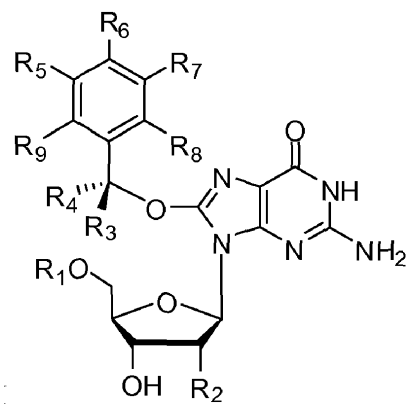
화학식 V



[0092]

[0093]

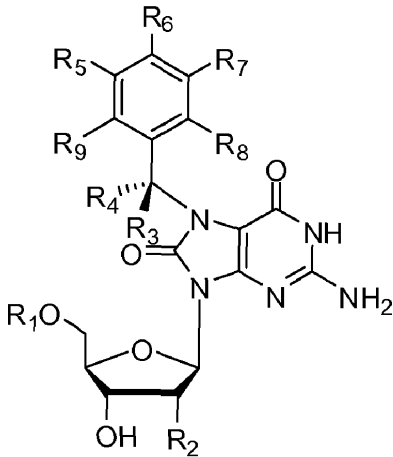
화학식 VI



[0094]

[0095]

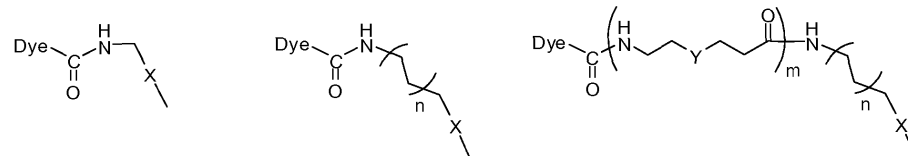
화학식 VII



[0096]

[0097]

R<sub>1</sub> = H, 모노포스페이트, 디포스페이트 또는 트리포스페이트, R<sub>2</sub> = H 또는 OH, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 각각 독립적으로, H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알케닐 또는 폴리에닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알키닐 또는 폴리알키닐, 또는 방향족 기(aromatic group), 예를 들면, 페닐, 나프틸, 또는 피리딘 고리에서 선택되고, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>과 R<sub>7</sub>은 각각 독립적으로, H, OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, CN, 할로겐화합물(halide), C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알킬, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알케닐 또는 폴리에닐, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> 선형 또는 가지형 알키닐 또는 폴리알키닐, 방향족 기, 예를 들면, 페닐, 나프틸, 또는 피리딘 고리, 및/또는 아래 구조식의 링커 기에서 선택되고:



[0098]

[0099]

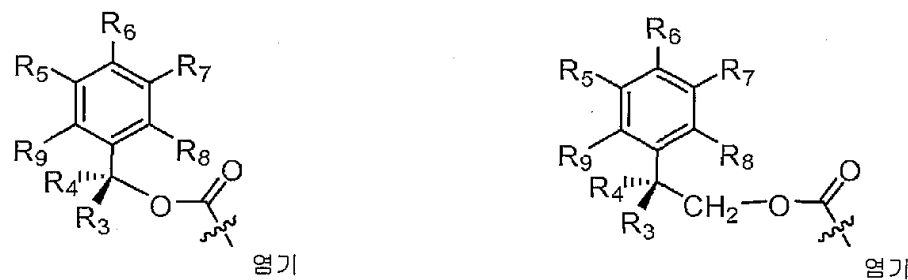
X = CH<sub>2</sub>, CH=CH, C≡C, O, S, 또는 NH, Y = CH<sub>2</sub>, O, 또는 NH, n = 0-12의 정수, m = 0-12의 정수, 염료 = 형광 단; R<sub>8</sub>과 R<sub>9</sub>는 상기 R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>과 R<sub>7</sub>에서 정의된 바와 동일하고, 단서로써 R<sub>8</sub>과 R<sub>9</sub>는 NO<sub>2</sub>가 아니다.

[0100]

바람직한 구체예에서, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 이소프로필, tert-부틸, 페닐, 2-니트로페닐과 2,6-디니트로페닐이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 군에서 선택된다. 대안으로, R<sub>3</sub>과 R<sub>4</sub>는 알킬과 방향족 기가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 군에서 선택되고, 상기 알킬 또는 방향족 기는 최소한 하나의 헤테로원자를 선택적으로 보유하고, 상기 방향족 기는 선택적으로, 아릴, 예를 들면, 페닐, 또는 다환, 예를 들면, 나프틸 기이다. 특정 구체예에서, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>과 R<sub>8</sub>은 아릴과 다환 기로 구성되는 방향족 기에서 선택된다.

[0101]

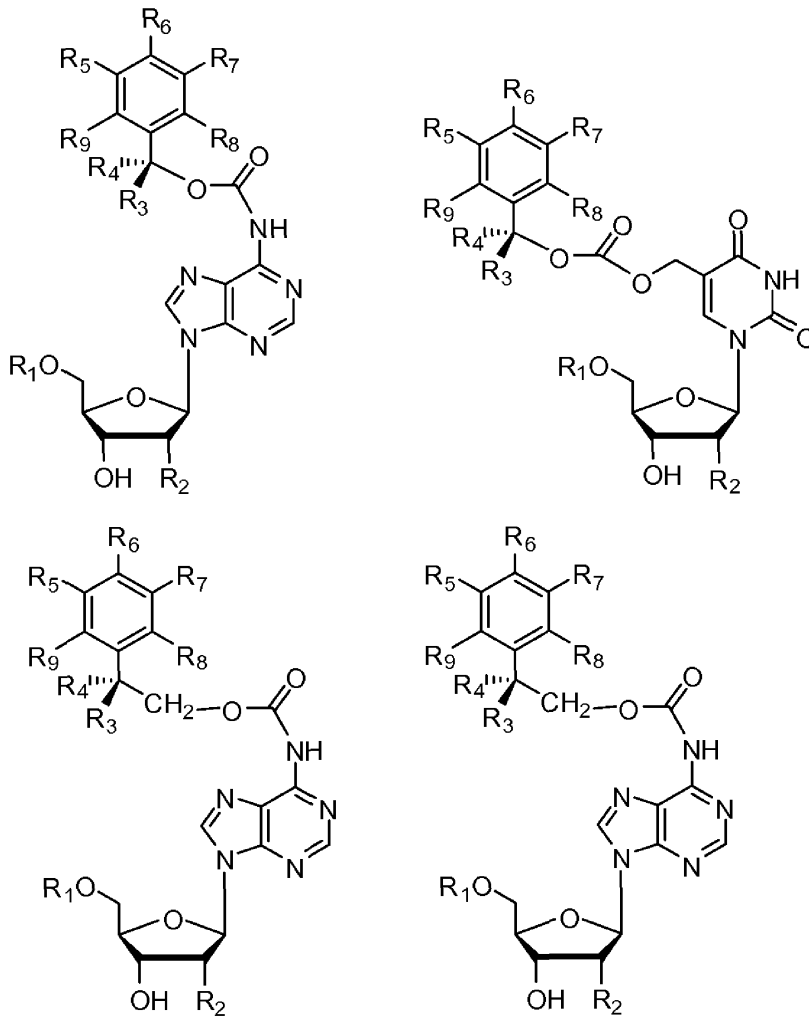
대안으로, 링커는 아래의 구조식을 갖는다:



[0102]

[0103]

가령, 이런 링커를 보유하는 화합물은 아래의 구조식을 가질 수 있다:



[0104]

[0105]

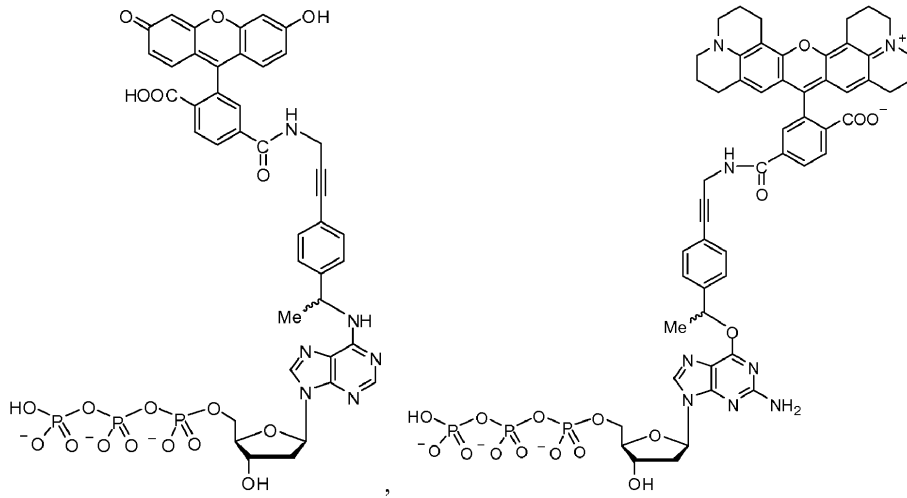
여기서, 비-절단가능 종결 모이어티는 벤질 아민, 벤질 에테르, 카르바메이트, 카보네이트, 2-(*o*-니트로페닐)에틸 카르바메이트와 2-(*o*-니트로페닐)에틸 카보네이트로 구성되는 군에서 선택되는 연쇄(linkage)를 통하여 염기에 부착될 수 있다.

[0106]

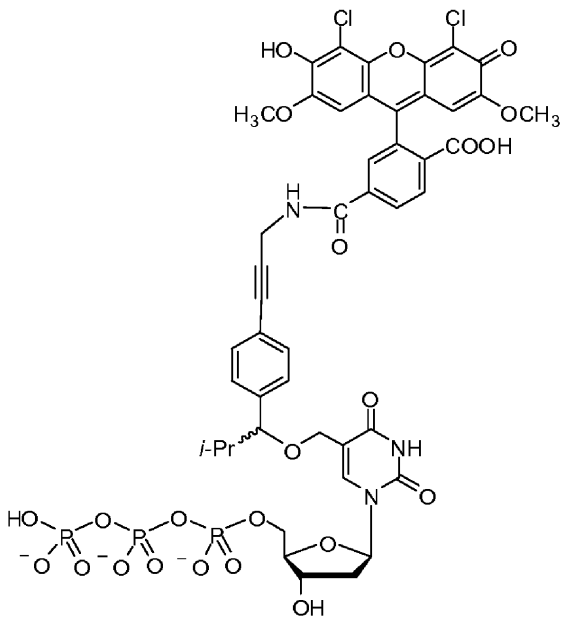
형광 염료(Fluorescent dye)는 특정하게 한정되지 않는다. 가령, 형광단(fluorophore)은 BODIPY, 플루오레세인(fluorescein), 로다민(rhodamine), 쿠마린(coumarin), 산텐(xanthene), 시아닌(cyanine), 피렌(pyrene), 프탈로시아닌(phthalocyanine), 피코빌리단백질(phycoobiliprotein), 알렉사(alexa), 스쿠아리안 염료(squaraine dye), 에너지 전송 염료(energy transfer dye)를 산출하는 조합(combination), 이들의 유도체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 군에서 선택된다.

[0107]

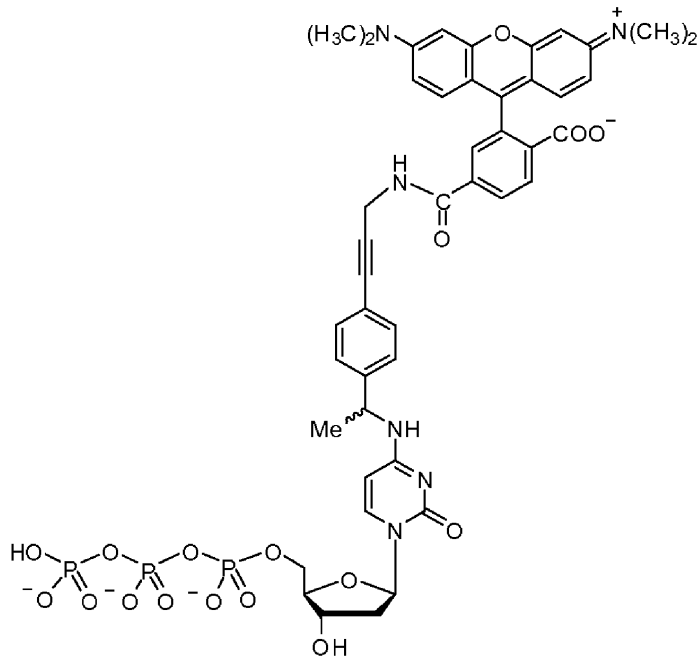
바람직한 구체예에는 아래의 화합물이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다:



[0108]



[0109]



[0110]

[0111]

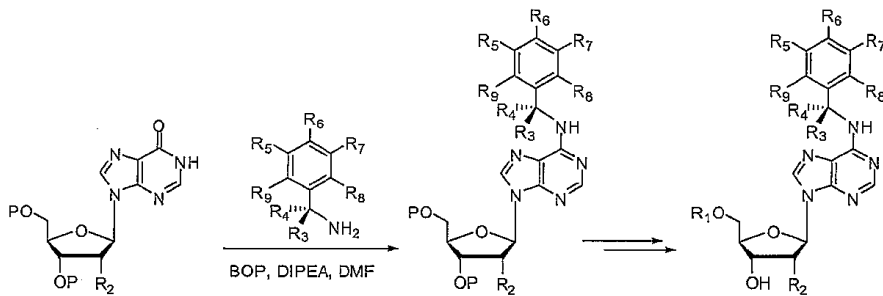
III. 표지된 뉴클레오타이드와 뉴클레오시드 화합물의 합성

[0112]

본 명세서에 기술된 화합물은 일반적으로, 당분야에 가용한 방법을 이용하여 본 명세서에 기술된 바와 같이 합성될 수 있다. 가령, 아래의 반응식은 아데노신 화합물의 합성을 대표한다:

[0113]

아데노신 N6-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



P는 적절한 보호기를 표시한다.

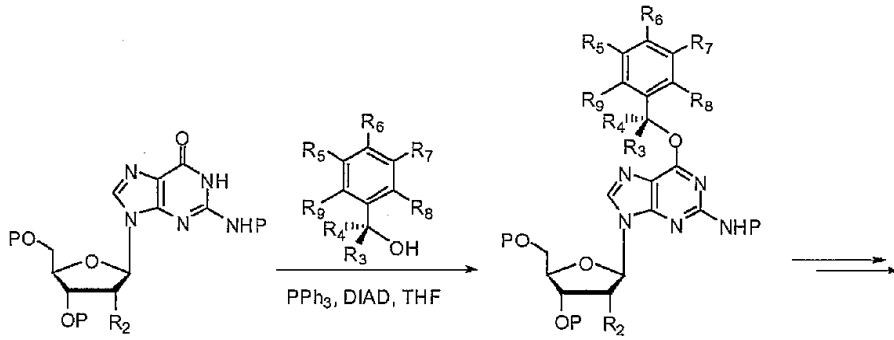
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 OH 기

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>9</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0114]

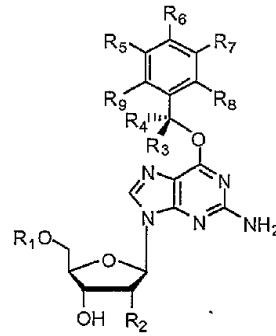
[0115]

구아노신 06-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



P는 적절한 보호기를 표시한다.

R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 OH 기

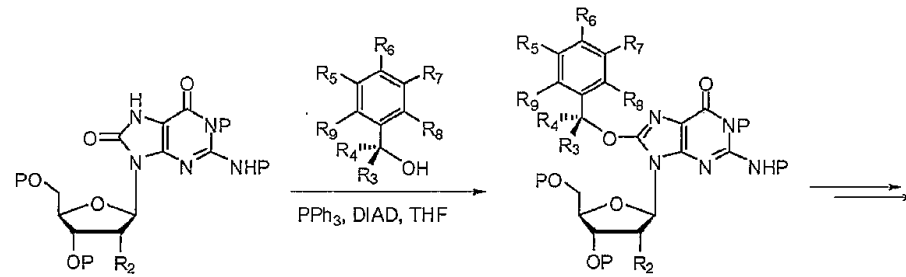


R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0116]

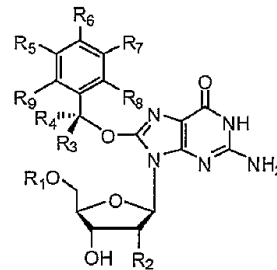
[0117]

구아노신 8-옥소-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식



P는 적절한 보호기를 표시한다.

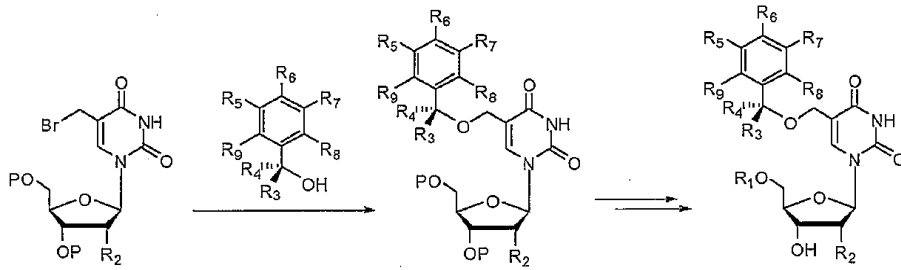
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 OH 기



R<sub>1</sub> 내지 R<sub>8</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0118]

[0119] *우리딘 5-HOMe-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식*



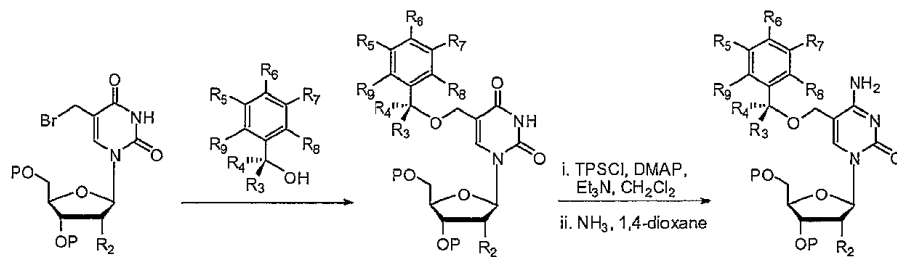
P는 적절한 보호기를 표시한다.

R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 애 기

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>9</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

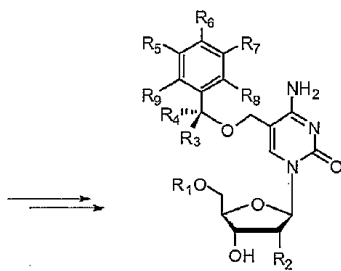
[0120]

[0121] *시티딘 5-HOMe-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식*



P는 적절한 보호기를 표시한다.

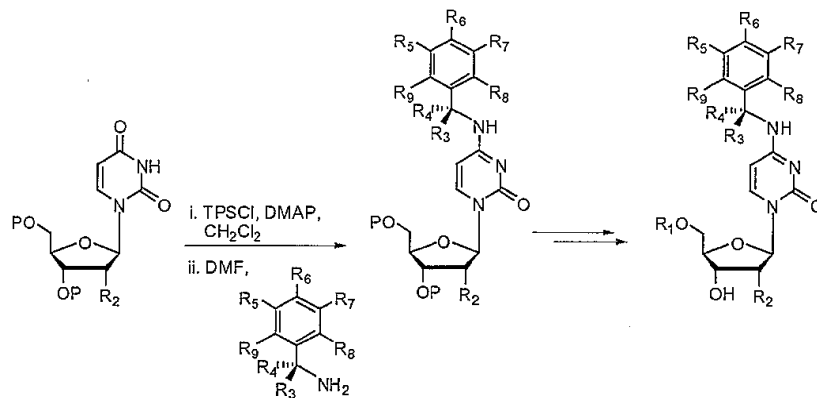
R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 애 기



R<sub>1</sub> 내지 R<sub>9</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0122]

[0123] *시티딘 N4-변형된 화합물의 합성을 위한 반응식*



P는 적절한 보호기를 표시한다.

R<sub>2</sub> = 적절한 보호기를 갖는 H 또는 애 기

R<sub>1</sub> 내지 R<sub>6</sub>은 앞서 정의된 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0124]

[0125] IV. 본 발명에 따른 화합물의 이용 방법

[0126] 본 명세서에 기술된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 DNA 염기서열분석 기술에서 다양한 목적으로 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물과 관련하여 이용되는 중합효소는 고유 중합효소 또는 변형된 중합효소이다. 중합효소에는 Taq DNA 중합효소, Klenow(엑소-) DNA 중합효소, Bst DNA 중합효소, Vent(엑소-) DNA 중합효소, Pfu(엑소-) DNA 중합효소와 DeepVent(엑소-) DNA 중합효소가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 변형된 중합효소에는 TaqFS DNA 중합효소, ThermoSequenase DNA 중합효소, ThermoSequenase II DNA 중합효소, Terminator DNA 중합효소, Terminator II DNA 중합효소와 Vent(엑소-) A488L DNA 중합효소가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 적절하게는, 본 발명에 따른 화합물은 자연-발생 뉴클레오티드의 통합 수준에 필적하거나 근접하는 수준으로 통합되고, 따라서 본 발명에 따른 화합물에 대한 치우침(bias)을 발생시키지 않는다. 더욱 적절하게는, 본 발명에 따른 화합물은 상업적으로 가용한 중합효소와 양립한다.

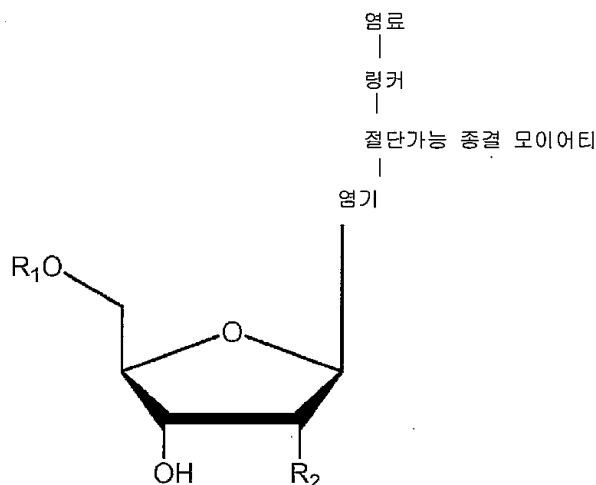
[0127] 광절단가능 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드

[0128] 한 구체예에서, 이들 화합물은 복수 주형의 동시적 단일 염기 추가를 탐지하는 주기 방법인 주기 가역성 종결(cyclic reversible termination, CRT)에 이용될 수 있다. 더욱 긴 관독-길이는 전체 게놈을 커버하는데 필요한 더욱 적은 염기서열분석 검사로 귀결된다. 핵산을 합성하는 방법은 아래의 단계를 포함한다:

[0129] a) 프라이머(primer)의 5'-말단을 고형 표면에 부착하는 단계;

[0130] b) 고형 표면에 부착된 프라이머에 표적 핵산을 혼성화시키는 단계;

[0131] c) 아래의 화학식에 따른 하나 이상의 화합물을 첨가하는 단계:



[0132]

[0133] R<sub>1</sub>은 H, 모노포스페이트(monophosphate), 디포스페이트(diphosphate) 또는 트리포스페이트(triphosphate)이고, R<sub>2</sub>는 H 또는 OH이고, 염기는 시토신(cytosine), 우라실(uracil), 티민(thymine), 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 또는 이들의 자연 발생 유도체이고, 절단가능 종결 모이어티(cleavable terminating moiety)는 화합물에 중합효소 종결 특성(polymerase termination property)을 부여하는 기이고, 링커는 이중기능성 기(bifunctional group)이고, 염료는 형광단(fluorophore)이고;

[0134] d) 혼성화된 프라이머/표적 핵산 복합체에 DNA 중합효소를 첨가하여 이전 단계의 화합물을 성장하는 프라이머가닥 내로 통합하는 단계, 여기서 통합된 화합물은 대략 90% 내지 대략 100%의 효율에서 중합효소 반응을 종결시키고;

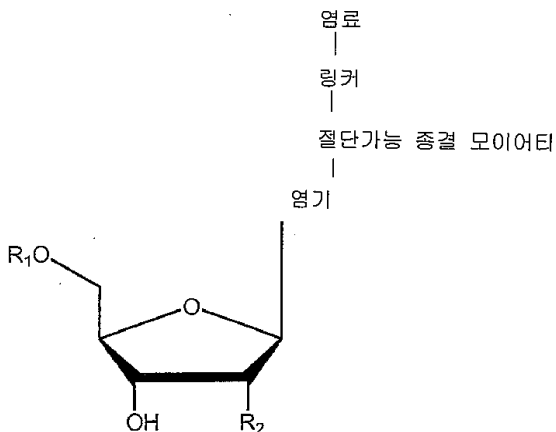
[0135] e) 선택적으로, 고형 표면을 세척하여 통합되지 않은 성분을 제거하는 단계;

[0136] f) 통합된 형광단을 탐지하는 단계, 여기서 탐지기는 선택적으로, 형광 염료(fluorescent dye)를 영상하기 위한 맥동 멀티라인 여기 탐지기(pulsed multiline excitation detector)이고;

[0137] (g) 선택적으로, 한 가지 이상의 화학적 화합물을 첨가하여 신장되지 않은 프라이머를 영구적으로 캡핑

(capping)하는 단계;

- [0138] (h) 고형 서포트를 광원(light source)에 노출시켜 광절단가능 모이어티(photocleavable moiety)를 제거하고, 자연-발생 성분을 포함하는 신장된 프라이머 핵산을 산출하는 단계;
- [0139] (i) 고형 표면을 세척하여 절단된 보호기를 제거하고, 주기 방식(cyclic fashion)으로 상기 단계를 반복하는 단계.
- [0140] 다른 구체예에서, 본 발명에 따른 화합물은 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법에 이용될 수 있는데, 상기 방법은 염기서열분석 기구에 표적 핵산 분자를 첨가하는 단계, 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계, 중합효소와 선택적으로, 자연-발생 핵산 성분을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계, 중합효소 반응을 수행하여 이전 단계의 화합물 중에서 최소한 하나를 성장하는 핵산 가닥 내로 통합하는 단계, 그리고 본 발명에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합을 위한 중합효소 반응의 결과를 분석하는 단계를 포함한다. 이들 단계는 임의의 순서로 반복 수행될 수 있다. 적절하게는, 통합 단계 이후에, 대략 90% 내지 대략 100%의 비율에서 가닥 성장의 종결이 진행된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 화합물의 통합은 유사한 염기의 고유 기질의 통합 비율의 대략 70% 내지 대략 100%에서 진행되고, 따라서 현저한 치우침이 발생하지 않는다. 가령, 통합 비율은 상응하는 뉴클레오티드 염기에 대한 정상 비율의 대략 85% 내지 대략 100%이다. 중요한 구체예는 변형된 뉴클레오티드의 통합으로부터 발생하는 핵산 분자를 *uv* 또는 다른 광원에 노출시켜 상기 핵산으로부터 광절단가능 종결 모이어티를 제거하는 단계를 포함한다. 적절하게는, 광절단 단계의 효율은 *uv* 또는 다른 광원에 노출로부터 대략 85% 내지 대략 100%이다.
- [0141] 본 발명에 따른 방법은 독립적으로 또는 조합으로 실시될 수 있다. 가령, 핵산 분자를 염기서열분석하는 방법은 비-자연 발생 성분을 핵산 분자 내로 통합하는 방법의 일부로서 실시되거나, 또는 본 발명에 따른 화합물의 통합 이후에 핵산 분자 내에 비-자연 발생 성분을 자연-발생 성분으로 전환시키는 독립적인 방법으로 실시될 수 있다.
- [0142] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 방법은 보호되지 않은 3'-OH 뉴클레오티드의 통합 이후에 핵산 합성을 종결시키는 단계를 포함한다. 유리하게는, 보호되지 않은 3'-OH 뉴클레오티드는 더욱 높은 수준에서 중합효소에 의해 통합되어, 자연 뉴클레오티드와 비교하여, 중합효소 반응에서 존재하는 더욱 낮은 수준의 변형된 뉴클레오티드와 더욱 낮은 치우침을 결과한다. 이런 이유로, 바람직한 구체예에는 핵산 합성을 종결시키는 방법이 포함되는데, 상기 방법은 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 중합효소의 환경에 위치시키고 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 핵산 분자 내로 통합을 가능하게 하는 단계를 포함하는데, 여기서 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드는 아래의 화학식에 따른 화합물이다:



- [0143]
- [0144] R<sub>1</sub>은 H, 모노포스페이트(monophosphate), 디포스페이트(diphosphate) 또는 트리포스페이트(triphosphate)이고, R<sub>2</sub>는 H 또는 OH이고, 염기는 시토신(cytosine), 우라실(uracil), 티민(thymine), 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 또는 이들의 자연 발생 유도체이고, 절단가능 종결 모이어티(cleavable terminating moiety)는 화합물에 중합효소 종결 특성(polymerase termination property)을 부여하는 기이고, 링커는 이중기능성 기(bifunctional group)이고, 염료는 형광단(fluorophore)이다. 적절하게는, 상기 방법은 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 이후에, 대략 90% 내지 대략 100% 범위의 종결 효율을 갖는다. 대안으로, 상기 방법은 동일한 염기를 보유하는 자연-발생 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 효율과 비교하여

대략 70% 내지 대략 100%의 범위에서 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 효율을 갖는다.

- [0145] 이러한 뉴클레오티드와 뉴클레오시드 화합물은 CRT에서, 게놈 DNA로부터 직접적으로 판독하는데 이용될 수 있다. 단편화된 게놈 DNA는 선택된 염색체(chromosome)에 걸쳐 있는 증폭 부위(priming site)를 보유하는 고-밀도 올리고뉴클레오티드 칩(chip)에 혼성화될 수 있다. 각 증폭 서열(priming sequence)은 CRT 방법의 산정된 판독-길이에 의해 분리된다. 염기 추가 사이에, 형광 영상장치(fluorescent imager), 예를 들면, 맥동 멀티라인 여기(Pulsed Multiline Excitation, PME) 탐지기는 전체 고-밀도 칩을 동시에 영상하여, 속도와 민감도에서 현저한 향상을 도모할 수 있다. 염기 상에 절단가능 종결 기에 부착되는 형광단은 uv 또는 다른 광 조사(irradiation)에 의해 제거되고, 차기의 염기 추가를 위하여 변형된 뉴클레오티드를 자연 형태로 전환시킨다. 대략 500 CRT 주기 이후에, 완결된 연속 게놈 서열 정보는 참고 인간 게놈(reference human genome)과 비교하여, 개체의 샘플에서 서열 변이의 정도와 유형을 결정할 수 있다. 주기 가역성 종결 방법은 예로써, WO 2003/021212에서 기술된 바와 같이 이용될 수 있다.
- [0146] 한 구체예에서, 중합효소 반응에서 뉴클레오티드 유사체가 DNA의 성장하는 가닥 내로 통합된 이후, 상기 뉴클레오티드 유사체의 실체(identity)를 탐지함으로써 핵산을 염기서열분석하는 방법이 이용되는데, 상기 방법은 아래의 단계를 포함한다:
- [0147] (a) 고품 표면에 핵산의 5' 말단을 부착하는 단계;
- [0148] (b) 고품 표면에 부착된 핵산에 프라이머를 부착하는 단계;
- [0149] (c) 중합효소와 한 가지 이상의 상이한 뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물을 핵산에 첨가하는 단계, 여기서 뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물은 통합되고, 이후 중합효소 반응을 종결시키고, 각 뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물은 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 우라실, 또는 이들의 유사체에서 선택되는 염기와 상기 염기에 부착된 광절단가능 종결 기를 포함하고, 상기 광절단가능 기는 탐지가능 라벨과 데옥시리보오스 또는 리보오스당을 포함하고,
- [0150] (d) 선택적으로, 고품 표면을 세척하여 통합되지 않은 뉴클레오티드 유사체를 제거하는 단계;
- [0151] (e) 종결된 뉴클레오시드 트리포스페이트에 부착된 탐지가능 라벨, 예를 들면, 형광 염료 또는 리포터 분자를 예로써, PME로 탐지하고 확인하는 단계;
- [0152] (f) 선택적으로, 한 가지 이상의 화학적 화합물을 첨가하여, 핵산에 부착된 프라이머 상에서, 또는 한 가지 이상의 뉴클레오티드를 프라이머에 추가함으로써 형성된 프라이머 신장 가닥 상에서 임의의 반응하지 않은 -OH 기를 영구적으로 캡핑(capping)하는 단계;
- [0153] (g) 고품 표면을 광원에 노출시켜 독특한 라벨 또는 리포터 분자를 보유하는 광절단가능 보호기를 제거하고, 여기서 남아있는 통합된 뉴클레오시드 모노포스페이트 단위는 자연, 고유, 또는 변형되지 않은 핵산 분자와 유사하고;
- [0154] (h) 고품 표면을 세척하여 절단된 보호기를 제거하는 단계;
- [0155] (i) 성장하는 프라이머 가닥 내로 확인된 통합된 뉴클레오티드 유사체의 서열을 결정하기 위하여 단계 (c) 내지 (h)를 반복하는 단계.
- [0156] 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드
- [0157] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 방법에는 표적 핵산의 서열을 결정하는 방법이 포함되는데, 상기 방법은 (i) 표적 핵산을 Sanger 또는 Sanger-타입 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계, (ii) 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계, 단서로써, 한 가지 이상의 유형의 염기가 존재하면, 각 염기는 상이한 형광단에 부착되고; (iii) 상보성 프라이머와 중합효소를 첨가하는 단계, (iv) 중합효소 반응을 수행하여 성장하는 핵산 가닥 내로 단계 (ii)의 화합물 중에서 최소한 하나를 통합하는 단계, 그리고 (v) 형광 염기서열분석 장치로 또는 맥동 멀티라인 여기 형광(pulsed multiline excitation fluorescence)에 의해 Sanger 염기서열분석 반응의 결과를 분석하는 단계, 여기서 단계 (i)-(iii)는 임의의 순서로 수행될 수 있다.
- [0158] 바람직한 구체예에서, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합 이후에 대략 90% 내지 대략 100%의 효율

에서 가닥 성장의 종결이 진행된다. 대안으로, 단계 (iv)에 따른 최소한 하나의 화합물의 통합은 중합효소 반응에서 동일한 염기를 보유하는 고유 기질의 통합 효율의 대략 70% 내지 대략 100%, 또는 더욱 바람직하게는, 대략 85% 내지 대략 100%에서 진행된다.

[0159] 본 발명에 따른 방법에는 비-자연발생 성분을 핵산 내로 통합하는 방법 역시 포함되는데, 상기 방법은 아래의 단계를 포함한다: (i) 표적 핵산을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계; (ii) 본 발명에 따른 하나 이상의 화합물을 염기서열분석 기구에 첨가하는 단계, 단서로써, 하나 이상의 유형의 염기가 존재하면, 각 염기는 상이한 형광단에 부착되고; (iii) 중합효소를 첨가하는 단계; 그리고 (iv) 중합효소 반응을 수행하여 성장하는 핵산 가닥 내로 단계 (ii)의 화합물 중에서 최소한 하나를 통합하는 단계, 여기서 단계 (i)-(iii)는 임의의 순서로 수행될 수 있다. 상기 방법은 (v) 단계 (ii)로부터 최소한 하나의 화합물의 통합에 대한 중합효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction)의 결과를 분석하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

[0160] 본 발명의 대안적 구체예는 본 발명에 따른 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드를 중합효소의 환경에 위치시키고 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 핵산 내로 통합을 가능하게 하는 단계를 포함하는, 핵산 합성을 종결시키는 방법이다. 이러한 방법의 바람직한 구체예는 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 이후에, 대략 90% 내지 대략 100% 범위의 종결 효율을 갖는다; 3'-OH 보호되지 않은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 효율은 동일한 염기를 보유하는 자연-발생 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 통합 효율과 비교하여 대략 70% 내지 대략 100% 범위이다.

[0161] Sanger 또는 Sanger-타입 염기서열분석 방법에 본 발명에 따른 화합물의 추가를 포함하는 Sanger 또는 Sanger-타입 염기서열분석을 수행하는 방법 역시 포함된다.

[0162] 미니-시퀀싱(mini-sequencing) 또는 미니시퀀싱-타입 염기서열분석 방법에 본 발명에 따른 화합물의 추가를 포함하는 미니-시퀀싱 또는 미니시퀀싱-타입 염기서열분석을 수행하는 방법은 본 발명의 범위 내에 속한다.

[0163] PME 탐지기

[0164] 상기한 표지된 및/또는 광절단가능 뉴클레오시드와 뉴클레오티드 중에서 하나를 이용하는 구체예에서, 색맹 형광 탐지(color-blind fluorescence detection)를 위한 맥동 멀티라인 여기("PME")가 US 2003/0058440(2003년 3월 27일 공개됨), 또는 WO 2003/021212(2003년 3월 13일 공개됨)에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. 이러한 기술은 정보를 제공하는 SNP의 고속 처리 확인, 유전 질환(inherited disease)의 더욱 정확한 진단, 위험 감수성(risk susceptibility)의 더욱 우수한 예측, 또는 특발성 돌연변이(sporadic mutation)의 확인을 위한 적용으로 형광 탐지를 제공한다. PME 기술은 형광 민감도(fluorescence sensitivity)를 현저하게 증가시키는 2가지 주요한 이점을 갖는다: (1) 계층 검사에서 모든 형광단의 최적 여기(optimal excitation)와 (2) 표준 파장 분해 탐지(standard wavelength resolved detection)보다 훨씬 많은 광을 모으는 "색맹" 탐지. 이러한 기술은 DNA 서열 확인을 위하여 단일 광원 여기와 색 분산(color dispersion)을 특징으로 하는 DNA 염기서열분석 장치와 상당히 구별된다. 상기 기술은 임상적 진단학, 법의학, 그리고 전반적인 염기서열분석 방법학에 이용될 수 있고, 대다수의 개체군에 대한 표지된 서열 변이 검사의 능력(capability), 융통성(flexibility), 그리고 휴대성(portability)을 가질 것이다.

[0165] 한 구체예에서, 고속 처리 DNA 서열 확인에 이용되는 기구와 방법이 이용된다. 한 가지 이상의 형광 화학종(fluorescent species)을 포함하는 샘플을 분석하기 위한 맥동 멀티라인 여기 기구가 이용되는데, 이는 2개 이상의 여기 라인(excitation line)을 방출하도록 배열된 한 가지 이상의 레이저, 각 여기 라인은 상이한 파장을 갖고; 하나 이상의 레이저에 결합되고, 샘플로부터 시간-관련된 형광 방출 신호(time-correlated fluorescence emission signal)를 발생시키는 타이밍 프로그램(timing program)에 따라 2개 이상의 여기 라인을 순차적으로 산출하도록 배열된 타이밍 회로(timing circuit); 샘플로부터 발산하는 시간-관련된 형광 방출 신호를 수집하기 위하여 배치된 비-분산 탐지기(non-dispersive detector); 탐지기에 결합되고, 시간-관련된 형광 방출 신호를 타이밍 프로그램과 연관시켜 샘플의 구성요소를 확인하도록 배열된 분석기를 포함한다.

[0166] 탐지기와 분석기는 일체(integral)일 수 있다. 한 구체예에서, 2개 이상의 여기 라인(excitation line)은 샘플에서 교차하거나, 또는 2개 이상의 여기 라인은 샘플 내에서 교차하지 않도록 배열된다. 2개 이상의 여기 라인은 공축(coaxial)일 수 있다. 한 구체예에서, 기구는 하나 이상의 레이저와 실시간 관계(operative relation)로 존재하고, 2개 이상의 여기 라인의 방사(radiation)가 실질적으로 공직선(colinear) 및/또는 공축(coaxial)이 되도록 배열된 하나 이상의 프리즘(prism)의 어셈블리(assembly)를 더욱 포함한다. 이러한 기구는

복수의 여기 라인, 예를 들면, 각각 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개 또는 그 이상의 여기 파장(excitation wavelength)을 갖는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개 또는 그 이상의 여기 라인을 보유한다. 샘플은 복수의 용기, 예를 들면, 모세관(capillary), 가령, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 최대 20개, 최대 24개, 최대 28개, 최대 36개, 최대 48개, 최대 64개, 최대 96개, 최대 384개 또는 그 이상의 모세관 내에 포함된다. 외피 유동 큐벳(sheath flow cuvette)이 이용될 수 있다.

[0167]

타이밍 프로그램은 각 레이저의 발사(firing) 간에 대략 10 fs 내지 대략 5 s, 대략 1 ms 내지 대략 100 ms, 또는 대략 50 ps 내지 대략 500 ps의 늦춤(delay)을 포함할 수 있다. 하나 이상의 여기 라인이 맥동된다. 맥동 여기 라인은 TTL 로직(logic)에 의해, 또는 기계적 또는 전자적 수단에 의해 제어될 수 있다. 한 구체예에서, 기구는 샘플로부터 형광 방출 신호와 시간-상관되는 일련의 분리된 여기 라인을 산출할 수 있다. 레이저는 독립적으로, 다이오드 레이저(diode laser), 반도체 레이저(semiconductor laser), 가스 레이저(gas laser), 예를 들면, 아르곤 이온(argon ion), 크립톤(krypton), 또는 헬륨-네온(helium-neon) 레이저, 다이오드 레이저(diode laser), 고체 레이저(solid-state laser), 예를 들면, 이온-이득 매질(ion-gain medium), 가령, YAG와 이트륨 바나데이트(yttrium vanadate, YVO4)를 보유하는 네오디미움 레이저(Neodymium laser), 또는 다이오드 여기 고체 레이저(diode pumped solid state laser)를 포함할 수 있다. 하나 이상의 독립된 여기 파장에서 광을 발생시키는 다른 장치 역시 레이저 대신에 이용될 수 있다. 레이저는 최소한 하나의 레이저 빔(laser beam)과 실시 가능 관계(operable relation)로 존재하는 라만 이동기(Raman shifter)를 더욱 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 각 레이저에 의해 제공되는 여기 파장은 각 형광단의 흡수 파장(absorption wavelength)에 광학적으로 대응된다.

[0168]

탐지기는 전하 결합 소자(charged couple device), 광증배관(photomultiplier tube), 실리콘 에발란치 광다이오드(silicon avalanche photodiode) 또는 실리콘 PIN 탐지기를 포함할 수 있다. 적절하게는, 상기 장치의 풋프린트(footprint)는 작다, 예를 들면, 4 ft x 4 ft x 2 ft 이하, 또는 1 ft x 1 ft x 2 ft 이하이고, 1 in x 3 in x 6 in 정도까지 작게 만들어 질 수 있다. 다른 측면에서 샘플 성분을 확인하는 방법이 포함되는데, 상기 방법은 아래의 단계를 포함한다: (a) 샘플 성분, 일차 염료와 이차 염료를 포함하는 샘플을 제조하는 단계; (b) 샘플을 일차 여기 라인과 이차 여기 라인의 빔 경로(beam path)에 위치시키는 단계; (c) 일차 여기 라인과 이차 여기 라인을 순차적으로 발사하는 단계; (d) 시간의 함수로서 샘플로부터 형광 신호를 수집하는 단계; (e) 각 여기 라인의 시간 창문(on-time window)으로 형광을 분류하는 단계, 여기서 샘플 성분이 확인된다. 본 발명의 한 측면에서, 형광 신호는 여기 라인이 샘플에 입사되지 않는 별개의 기간(time period)에서 수집되는데, 이러한 기간은 2개의 여기 라인의 발사 간에 발생한다. 이러한 기술은 “어둠에서 보기(looking in the dark)” 로 알려져 있다.

[0169]

다른 측면에서, 일차 염료의 흡광 최대점(absorption maximum)은 일차 여기 라인의 여기 파장에 실질적으로 상응한다. 이차 염료의 흡광 최대점은 이차 여기 라인의 여기 파장에 실질적으로 상응한다. 또 다른 측면에서, 삼차와 사차 염료, 그리고 삼차와 사차 여기 라인이 존재하는데, 여기서 삼차와 사차 염료의 흡광 최대점은 각각, 삼차와 사차 여기 라인의 여기 파장에 실질적으로 상응한다. 유사하게, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개 또는 그 이상의 염료가 존재할 수 있는데, 여기서 이들 염료의 흡광 최대점은 각각, 5차, 6차, 7차, 8차, 9차, 10차, 11차, 12차, 13차, 14차, 또는 그 이상의 여기 라인의 여기 파장에 실질적으로 상응한다. 이들 염료는 잔텐(zanthene), 플루오레세인, 로다민, BODIPY, 시아닌, 쿠마린, 피렌, 프탈로시아닌, 피코빌리단백질, 알렉사, 스쿠아리안 염료, 또는 다른 적절한 염료일 수 있다.

[0170]

한 구체예에서, 샘플 성분은 SNP의 결정을 가능하게 한다. 상기 방법은 정보를 제공하는 SNP의 고속 처리 확인에 적합하다. SNP는 게놈 DNA 물질로부터, PCR 증폭된 물질, 또는 클론된 DNA 물질로부터 직접적으로 획득되고, 단일 뉴클레오티드 프라이머 신장 방법을 이용하여 평가될 수 있다. 단일 뉴클레오티드 프라이머 신장 방법은 단일 표지되지 않은 dNTP, 단일 표지된 dNTP, 단일 3'-변형된 dNTP, 단일 염기-변형된 3'-dNTP, 단일 알파-티오-dNTP, 또는 단일 표지된 2',3'-디데옥시뉴클레오티드를 이용하는 단계를 포함한다. 미니-시퀀싱 방법은 단일 표지되지 않은 dNTP, 단일 표지된 dNTP, 단일 3'-변형된 dNTP, 단일 염기 변형된 3'-dNTP, 단일 알파-티오-dNTP, 또는 단일 표지된 2',3'-디데옥시뉴클레오티드를 이용하는 단계를 포함한다. SNP는 게놈 DNA 물질로부터, PCR 증폭된 물질, 또는 클론된 DNA 물질로부터 직접적으로 획득될 수 있다. 또한, 핵산을 탐지하는 방법이 구상된다. 핵산은 in situ에서, 또는 다양한 겔(gel)이나 반점(blot)에서 탐지될 수 있고, 핵산을 탐지하는 유사한 방법은 예로써, US 특허 7,125,660에 기술되는데, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다.

**실시예**

[0171] 광절단가능 표지된 뉴클레오티드와 뉴클레오시드

[0172] **실시예 1: dA 화합물**

[0173] **3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 (WW1p108)의 합성**

[0174] **개요.** 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0175] (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 하룻밤; Boc<sub>2</sub>O, DMAP, DMF, 실온, 하룻밤, 83%; (ii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 96%; (iii) TBSCl, 이미다졸, DMF, 83%; (iv) *n*-Bu<sub>4</sub>NOH, NaI, NaOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, 2-니트로벤질 브롬화물, 실온, 91%; (v) SiO<sub>2</sub>, 높은 진공, 70-80°C, 24시간, 91%; (vi) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 23%; (vii) POCl<sub>3</sub>, (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20°C; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 31%.

[0176] *N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (**dA.01**)

[0177] 화합물 **dA.01**은 Furrer, E. and Giese, B. (2003) On the distance-independent hole transfer over long (A · T)<sub>n</sub>-sequences in DNA. Helvetica Chimica Acta, **86**, 3623-3632에 기술된 절차에 따라 합성하였다. 무수성 DMF (25 ml)에 녹인 2'-데옥시아데노신 **dA** (2.5 g, 10 mmol), 이미다졸 (4.5 g, 66 mmol)과 TBSCl (4.82 g, 32 mmol)의 용액은 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 메탄올 (20 ml)을 첨가하고, 혼합물은 20분 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하였다. 잔류물은 무수성 DMF (15 ml)에 용해시키고, 이후 DMAP (3.66 g, 30 mmol)와 Boc<sub>2</sub>O (6.55 g, 30 mmol)를 첨가하였다. 반응물은 실온에서 하룻밤동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하였다. 잔류물은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml)에 용해시키고 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액(각 50 ml)으로 2회 세척하였다. 모아진 수층(aqueous layer)은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml)로 추출하였다. 모아진 유기층(organic layer)은 이후, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피(silica gel 칼럼 chromatography)로 정제하여 *N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **dA.01** (5.66 g, 83%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0178] *N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-2'-데옥시아데노신 (**dA.02**)

[0179] THF (30 ml)에 녹인 Bu<sub>4</sub>NF (7.85 g, 30 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (30 ml)에 녹인 화합물 **dA.01** (6.78 g, 10 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고, 2시간 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하였다. 잔류물은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml)에 용해시키고 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액(각 100 ml)으로 2회 세척하였다. 유기층은 이후, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-2'-데옥시아데노신 **dA.02** (4.34 g, 96%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0180] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.84 (s, 1 H, H-8), 8.20 (s, 1 H, H-2), 6.41 (dd, 1 H, J = 5.6 Hz와 9.2 Hz, H-1'), 4.77 (d, 1 H, H-4'), 4.21 (s, 1 H, H-3'), 3.98 (dd, 1 H, H-5'a), 3.80 (m, 1 H, H-5'b), 3.00 (m, 1 H, H-2'a), 2.36 (m, 1 H, H-2'b), 1.47 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO).

[0181] *N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (**dA.03**)

[0182] 무수성 DMF (5 ml)에 녹인 TBSCl (1.88 g, 12.5 mmol)의 용액을 0°C에서, 무수성 DMF (20 ml)에 녹인 화합물 **dA.02** (4.34 g, 9.6 mmol)와 이미다졸 (1.3 g, 19.2 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2일 동안 교반하였다. 물 (50 ml)을 첨가하고, 혼합물은 에틸 아세테이트 (각 40 ml)로 3회 추출하였다. 모아진 유기층은 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (50 ml)으로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 실리카 겔 칼럼 크로마

토그래피로 정제하여  $N^{\beta}, N^{\beta}$ -비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-5'-*O*-*tert*-부틸-디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **da.03** (4.68 g, 83%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0183]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.84 (s, 1 H, H-8), 8.42 (s, 1 H, H-2), 6.57 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 4.69 (m, 1 H, H-4'), 4.10 (m, 1 H, H-3'), 3.89 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.70 (m, 1 H, H-2'a), 2.58 (m, 1 H, H-2'b), 1.44 (s, 18 H,  $(CH_3)_3CO$ ), 0.91 (s, 9 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.10 (s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ ).

[0184]  $N^{\beta}, N^{\beta}$ -비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-3'-*O*-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 (**da. 04**)

[0185]  $CH_2Cl_2$  (3 ml)에 녹인 화합물 **da.03** (1.13 g, 2 mmol)의 용액은 NaOH (1 M; 3 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NOH (0.94 ml, 4 mmol, 55% 수용액)와 NaI (20 mg, 촉매량)의 용액과 혼합하였다. 혼합물에,  $CH_2Cl_2$  (2 ml)에 녹인 2-니트로벤질 브롬화물 (1.3 g, 6 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하고, 반응 혼합물은 어둠 하에 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 유기층은 분리하고, 수층은  $CH_2Cl_2$  (각 10 ml)로 2회 추출하였다. 모아진 유기층은  $Na_2SO_4$ 에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^{\beta}, N^{\beta}$ -비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-3'-*O*-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 **da.04** (1.28 g, 91%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0186]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.85 (s, 1 H, H-8), 8.43 (s, 1 H, H-2), 8.10 (dd, 1 H, Ph-H), 7.81 (d, 1 H, Ph-H), 7.70 (t, 1 H, Ph-H), 7.51 (t, 1 H, Ph-H), 6.57 (t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 4.98 (dd, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 4.45 (m, 1 H, H-4'), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 3.90 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.73 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b), 1.46 (s, 18 H,  $(CH_3)_3CO$ ), 0.91 (s, 9 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.11 (s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ );

[0187] ToF-MS (ESI): 분자 이온  $C_{33}H_{49}N_6O_5Si$  [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 701.3330이고, 관찰된 질량은 701.3317이었다.

[0188] 5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-3'-*O*-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 (**da.05**)

[0189] 실리카 겔 60(10 g, 100-200 메시(mesh), 감압 하에 24시간 동안 70-80°C로 가열함으로써 활성화됨)을  $CH_2Cl_2$  (50 ml)에 녹인 화합물 **da.04** (1.28 g, 1.8 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 획득된 잔류물은 감압 하에 2일 동안 70-80°C로 가열하고, 메탄올 (각 50 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-3'-*O*-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 **da.05** (0.83 g, 91%)를 백색 거품으로 수득하였다.

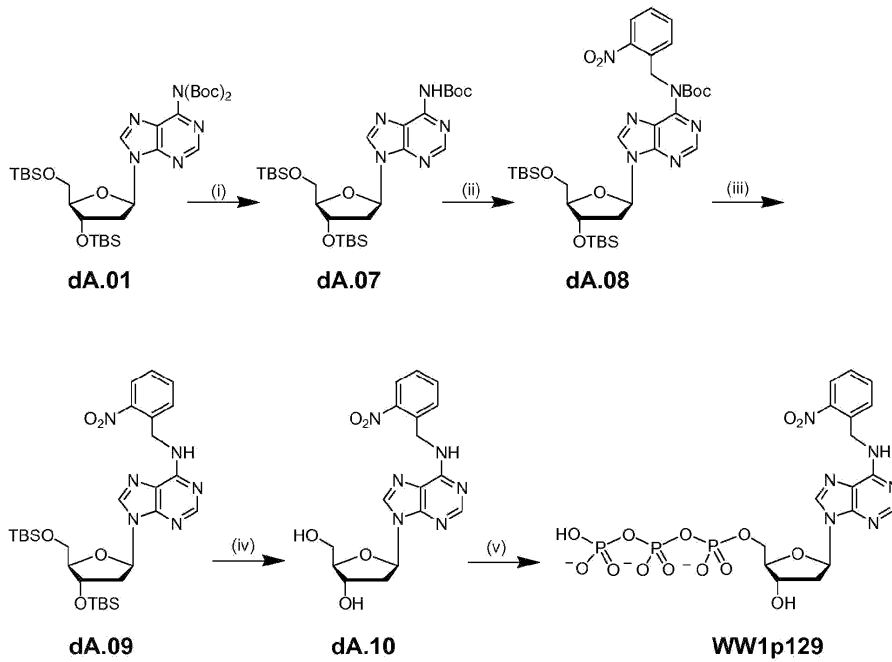
[0190]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.34 (s, 1 H, H-8), 8.15 (s, 1 H, H-2), 8.09 (d, 1 H, Ph-H), 7.81 (d, 1 H, Ph-H), 7.67 (t, 1 H, Ph-H), 7.47 (t, 1 H, Ph-H), 6.50 (t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 6.03 (bs, 2 H, 6-NH<sub>2</sub>), 4.96 (dd, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 4.43 (m, 1 H, H-4'), 4.30 (m, 1 H, H-3'), 3.88 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.71 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b), 0.91 (s, 9 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.10(s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ );

[0191] ToF-MS (ESI): 분자 이온  $C_{23}H_{33}N_6O_5Si$  [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 501.2282이고, 관찰된 질량은 501.1702이다.

- [0192] 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 (**dA.06**)
- [0193] THF (1.2 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (314 mg, 1.2 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (3 ml)에 녹인 화합물 **dA.05** (400 mg, 0.8 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 4시간 동안 교반하였다. 메탄올 (10 ml)을 첨가하여, 이러한 반응 동안 형성된 침전물을 용해시키고, 이후 실리카 겔 60 (1.5 g)을 첨가하였다. 혼합물은 진공에서 증발 건조시키고, 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 **dA.06** (72 mg, 23%)을 백색 거품으로 수득하였다.
- [0194] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.35 (s, 1 H, H-8), 8.13 (s, 1 H, H-2), 8.06 (d, 1 H, Ph-H), 7.79 (m, 2 H, Ph-H), 7.60 (m, 1 H, Ph-H), 7.34 (bs, 2 H, 6-NH<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>O 교체가능), 6.33 (dd, 1 H, *J* = 4.8과 6.8 Hz, H-1'), 5.40 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.92 (s, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 4.36 (m, 1 H, H-4'), 4.12 (m, 1 H, H-3'), 3.59 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.85 (m, 1 H, H-2'a), 2.54 (m, 1 H, H-2'b);
- [0195] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 387.1417이고, 관찰된 질량은 387.1350이었다.
- [0196] 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW1p108**)
- [0197] POCl<sub>3</sub> (26 μl, 0.24 mmol)을 트리메틸포스페이트 (1 ml)에 녹인 화합물 **dA.06** (72 mg, 0.18 mmol)의 용액에 첨가하고, 마이너스 20-30°C에서 2.5시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (2 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (427 mg, 0.9 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (0.2 ml)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (linear gradient)(300 분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 3'-O-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **WW1p108** (38 mg, 31%)을 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.
- [0198] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.50 (s, 1 H, H-8), 8.24 (s, 1 H, H-2), 8.10 (d, 1 H, Ph-H), 7.78 (d, 1 H, Ph-H), 7.62 (m, 1 H, Ph-H), 6.50 (dd, 1 H, *J* = 6.8과 8 Hz, H-1'), 5.03 (dd, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.65 (m, 1 H, H-4'), 4.53 (m, 1 H, H-3'), 4.22 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.80 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b);
- [0199] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -5.54 (d, *J* = 19.4 Hz), -10.85 (d, *J* = 19.4 Hz), -21.31 (t, *J* = 19.4 Hz);
- [0200] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 649.0226이고, 관찰된 질량은 649.0212이었다.
- [0201] 트리포스페이트는 자연 뉴클레오티드(가령, dATP)의 오염이 없는 샘플을 제공하기 위하여 UV 탐지 없이 예비 HPLC를 이용하여 더욱 정제하였다. 트리포스페이트 용액의 농도 결정은 ε<sub>260</sub> = 20,800의 소광 계수 (extinction coefficient)를 이용한 UV/VIS 측정으로 수행하였다.

[0202]

*N*<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-2'-테옥시아데노신 트리포스페이트 (WW1p129)의 합성



[0203]

[0204]

개요. *N*<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0205]

(i) Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, THF, 50°C, 68%; (ii) NaH, DMF, 2-니트로벤질 브롬화물, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 49%; (iii) SiO<sub>2</sub>, 진공, 70-80°C, 87%; (iv) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 43%; (v) POCl<sub>3</sub>, (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20-30°C; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>; 60%.

[0206]

*N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시아데노신 (dA.07)

[0207]

Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (155 mg, 0.7 mmol)를 무수성 THF (35 ml)에 녹인 화합물 dA.01 (2.36 g, 3.5 mmol)의 용액에 첨가하고 50°C에서 하룻밤동안 교반하였다. 용매는 진공에서 제거하고, 정제되지 않은 산물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시아데노신 dA.07 (1.39 g, 68%)을 황색 거품으로 수득하였다.

[0208]

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.74 (s, 1 H, H-8), 8.29 (s, 1 H, H-2), 8.24 (s, 1 H, 6-NHBoc), 6.49 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 4.60 (m, 1 H, H-4'), 4.02 (m, 1 H, H-3'), 3.86 (dd, 1 H, H-5'a), 3.77 (dd, 1 H, H-5'b), 2.62 (m, 1 H, H-2'a), 2.47 (m, 1 H, H-2'b), 1.54 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.90 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.08 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0209]

*N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시아데노신 (dA.08)

[0210]

NaH (5.3 mg, 0.22 mmol, 건성)를 0°C에서, 무수성 DMF (2 ml)에 녹인 화합물 dA.07 (116 mg, 0.2 mmol)의 용액에 첨가하고, 30분 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.5 ml)에 녹인 2-니트로벤질 브롬화물 (43 mg, 0.2 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. DMF는 진공에서

제거하고, 잔류물은 에틸 아세테이트 (20 ml)에 용해시키고, 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (각 10 ml)으로 2회, 그리고 물 (10 ml)로 1회 세척하였다. 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (10 ml)로 추출하고, 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-tert-부틸옥시카르보닐-N<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-3',5'-O-비스-tert-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **dA.08** (70 mg, 49%)을 점성 오일로 수득하였다.

[0211] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.69 (s, 1 H, H-8), 8.38 (s, 1 H, H-2), 8.05 (dd, 1 H, Ph-H), 7.77 (d, 1 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 7.40 (m, 1 H, Ph-H), 6.51 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.63 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.63 (m, 1 H, H-4'), 4.03 (m, 1 H, H-3'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.63 (m, 1 H, H-2'a), 2.46 (m, 1 H, H-2'b), 1.40 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.92 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-);

[0212] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 715.3671이고, 관찰된 질량은 715.3661이었다.

[0213] N<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-3',5'-O-비스-tert-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (**dA.09**)

[0214] 실리카 겔 60 (3.5 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 70-80°C로 가열함으로써 활성화됨)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml)에 녹인 화합물 **dA.08** (325 mg, 0.45 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 감압 하에 2일 동안 70-80°C로 가열하고, 메탄올 (각 20 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-3',5'-O-비스-tert-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **dA.09** (238 mg, 86%)를 황색 거품으로 수득하였다.

[0215] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.37 (s, 1 H, H-8), 8.09 (s, 1 H, H-2), 8.07 (d, 1 H, Ph-H), 7.74 (d, 1 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 7.42 (m, 1 H, Ph-H), 6.57 (t, 1 H, 6-NH), 6.44 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.19 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.61 (m, 1 H, H-4'), 4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.86 (dd, 1 H, H-5'a), 3.76 (dd, 1 H, H-5'b), 2.63 (m, 1 H, H-2'a), 2.43 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Csi), 0.09 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-);

[0216] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 615.3147이고, 관찰된 질량은 615.2288이었다.

[0217] N<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 (**dA.10**)

[0218] THF (1 ml)에 녹인 n-Bu<sub>4</sub>NF (216 mg, 0.83 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (5 ml)에 녹인 화합물 **dA.09** (202 mg, 0.33 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1 g)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 **dA.10** (55 mg, 43%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0219] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.48 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 6-NH), 8.41 (s, 1 H, H-8), 8.16 (s, 1 H, H-2), 8.04 (dd, 1 H, Ph-H), 7.66 (d, 1 H, Ph-H), 7.51 (m, 2 H, Ph-H), 6.35 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'),

5.32 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.17 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.97 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.41 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-3'), 3.60 (m, 1 H, H-5'a), 3.52 (m, 1 H, H-5'b), 2.71 (m, 1 H, H-2'a), 2.28 (m, 1 H, H-2'b);

[0220] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 387.1417이고, 관찰된 질량은 387.1186이었다.

[0221] *N<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (WW1p129)*

[0222] POCl<sub>3</sub> (19 μl, 0.2 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dA.10** (52 mg, 0.13 mmol)의 용액에 첨가하고, 마이너스 20-30°C에서 2.5시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (1.3 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (308 mg, 0.65 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (130 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 *N<sup>6</sup>-(2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 WW1p129* (53 mg, 60%)를 백색의 스펀모양 고체로 수득하였다.

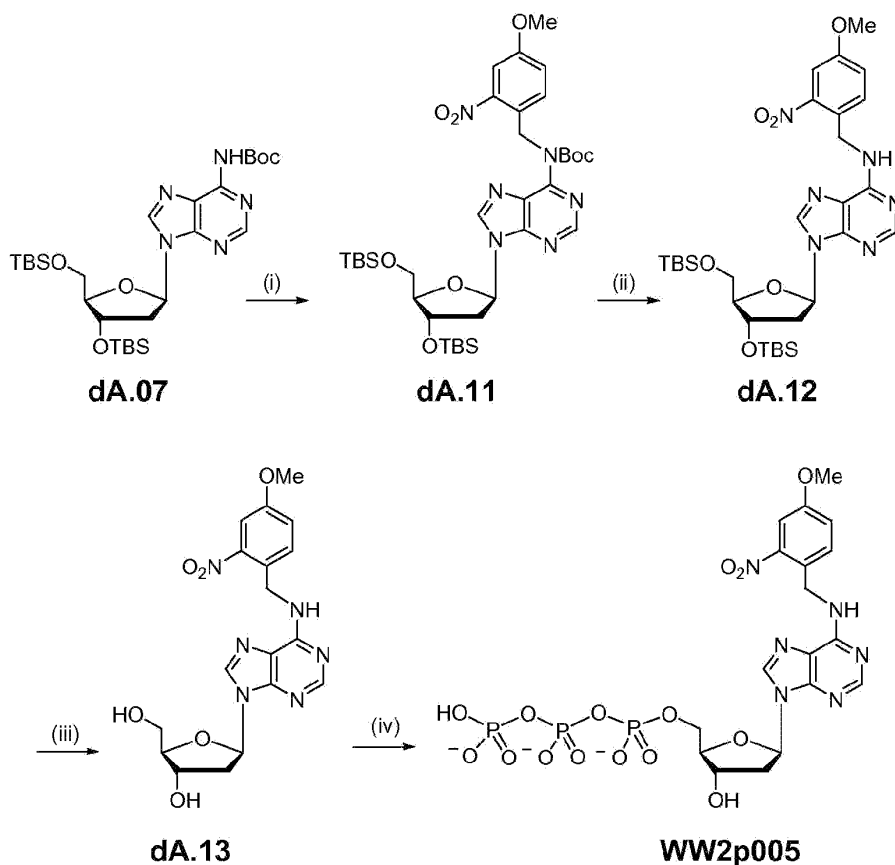
[0223] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.42 (s, 1 H, H-8), 8.13 (s, 1 H, H-2), 8.09 (d, 1 H, Ph-H), 7.55 (m, 2 H, Ph-H), 7.45 (m, 1 H, Ph-H), 6.46 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.05 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.29 (s, 1 H, H-3'), 4.21 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.78 (m, 1 H, H-2'a), 2.59 (m, 1 H, H-2'b);

[0224] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -5.86 (d, J = 16.2 Hz), -10.78 (d, J = 16.2 Hz), -19.22 (t, J = 16.2 Hz);

[0225] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 625.0250이고, 관찰된 질량은 625.0231이었다.

[0226] 트리포스페이트는 자연 뉴클레오티드의 오염이 없는 샘플을 제공하기 위하여 UV 탐지 없이 예비 HPLC를 이용하여 더욱 정제하였다. 트리포스페이트 용액의 농도 결정은 ε<sub>260</sub> = 20,800의 소광 계수 (extinction coefficient)를 이용한 UV/VIS 측정으로 수행하였다.

[0227]  $N^6$ -(4-메톡시-2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 (WW2p005)의 합성



[0228] 개요.  $N^6$ -(4-메톡시-2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0229] (i) NaH, DMF, 4-메톡시-2-니트로벤질 브롬화물, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 64%; (ii) SiO<sub>2</sub>, 높은 진공, 70-80°C, 24시간, 84%; (iii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 99%; (iv) POCl<sub>3</sub>, (MeO)<sub>3</sub>P=O, 마이너스 20-30°C; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>; 40%.

[0231]  $N^6$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^6$ -(4-메톡시-2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (dA.11)

[0232] NaH (26 mg, 1.1 mmol, 건성)를 0°C에서, 무수성 DMF (5 ml)에 녹인 화합물 dA.07 (580 mg, 1.0 mmol)의 용액에 첨가하고 45분 동안 교반하였다. 무수성 DMF (1.0 ml)에 녹인 4-메톡시-2-니트로벤질 브롬화물 (260 mg, 1.05 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 하룻밤동안 교반하였다. DMF는 진공에서 제거하고, 잔류물은 에틸 아세테이트 (50 ml)에 용해시키고 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (각 30 ml)으로 2회 세척하였다. 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (20 ml)로 추출하고, 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^6$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^6$ -(4-메톡시-2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 dA.11 (480 mg, 64%)을 점성 오일로 수득하였다.

[0233] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.68 (s, 1 H, H-8), 8.37 (s, 1 H, H-2), 7.66 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, Ph-H), 7.55 (d, 1 H, *J* = 2.7 Hz, Ph-H), 7.10 (dd, 1 H, *J* = 2.7과 8.7 Hz, Ph-H), 6.51 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.55 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.63 (m, 1 H, H-4'), 4.03 (m, 1 H, H-3'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.84 (s, 3

H, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.63 (m, 1 H, H-2'a), 2.44 (m, 1 H, H-2'b), 1.41 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.92 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-);

[0234] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온 C<sub>35</sub>H<sub>57</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 745.3776이고, 관찰된 질량은 745.3782 이었다.

[0235] N<sup>6</sup>-(4-메톡시-2-니트로벤질)-3',5'-O-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (**da.12**)

[0236] 실리카 겔 60 (5 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 70-80°C로 가열함으로써 활성화됨)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml)에 녹인 화합물 **da.11** (530 mg, 0.71 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 감압 하에 2일 동안 70-80°C로 가열하고, 메탄올 (각 20 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-(4-메톡시-2-니트로벤질)-3',5'-O-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **da.12** (385 mg, 84%)를 황색 거품으로 수득하였다.

[0237] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.37 (s, 1 H, H-8), 8.08 (s, 1 H, H-2), 7.66 (d, 1 H, J = 8.5 Hz, Ph-H), 7.57 (m, 1 H, J = 2.7 Hz Ph-H), 7.09 (dd, 1 H, J = 2.7과 8.7 Hz Ph-H), 6.52 (t, 1 H, 6-NH), 6.43 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.07 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.60 (m, 1 H, H-4'), 4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.85 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.76 (dd, 1 H, H-5'b), 2.62 (m, 1 H, H-2'a), 2.43 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.09 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-);

[0238] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온 C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 645.3252이고, 관찰된 질량은 645.3248 이었다.

[0239] N<sup>6</sup>-(4-메톡시-2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 (**da.13**)

[0240] THF (2 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (353 mg, 1.35 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (5 ml)에 녹인 화합물 **da.12** (350 mg, 0.54 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 4시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1.5 g)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-(4-메톡시-2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신 **da.13** (225 mg, 99%)을 황색 거품으로 수득하였다.

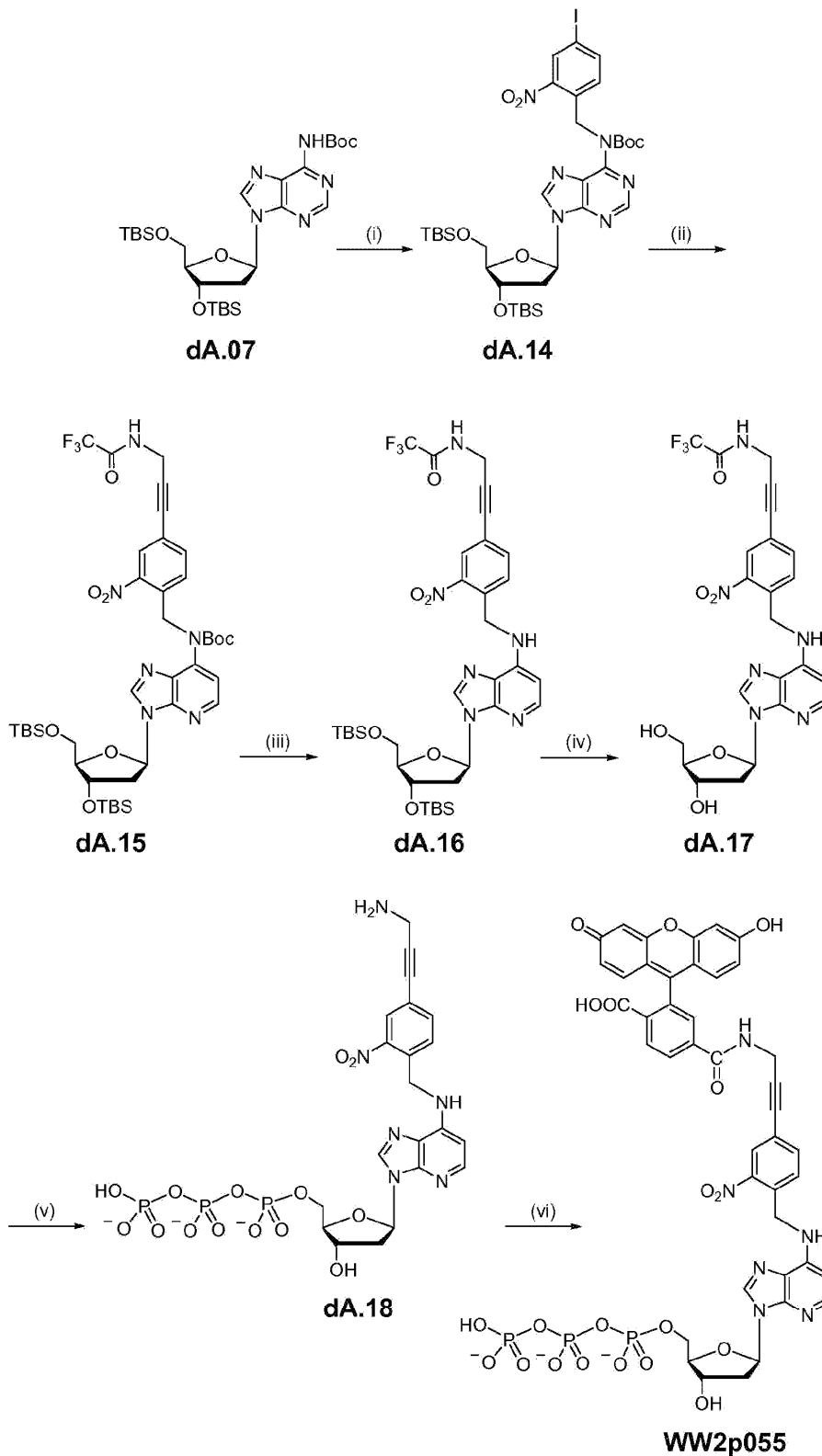
[0241] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.40 (bs, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 6-NH), 8.39 (s, 1 H, H-8), 8.15 (s, 1 H, H-2), 7.54 (d, 1 H, J = 2.7 Hz, Ph-H), 7.44 (d, 1 H, J = 8.2 Hz, Ph-H), 7.24 (d, 1 H, J = 2.7과 8.7 Hz, Ph-H), 6.33 (t, 1 H, J = 6.7 Hz, H-1'), 5.32 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.17 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.88 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.40 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-3'), 3.81 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 3.60 (m, 1 H, H-5'a), 3.52 (m, 1 H, H-5'b), 2.70 (m, 1 H, H-2'a), 2.26 (m, 1 H, H-2'b);

[0242] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온 C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 417.1523이고, 관찰된 질량은 417.1458이었다.

- [0243]  $N^6$ -(4-메톡시-2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (WW2p005)
- [0244] POCl<sub>3</sub> (19  $\mu$ l, 0.2 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **da.13** (42 mg, 0.1 mmol)의 용액에 첨가하고 마이너스 20-30°C에서 3시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (1 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (100  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜  $N^6$ -(4-메톡시-2-니트로벤질)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **WW2p005** (28 mg, 40%)를 백색의 스푼모양 고체로 수득하였다.
- [0245] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.41 (s, 1 H, H-8), 8.17 (s, 1 H, H-2), 7.64 (d, 1 H, *J* = 2.7 Hz, Ph-H), 7.47 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, Ph-H), 7.15 (d, 1 H, *J* = 2.7과 8.7 Hz, Ph-H), 6.46 (t, 1 H, *J* = 6.7 Hz, H-1'), 4.97 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.29 (s, 1 H, H-3'), 4.20 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 3.84 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.80 (m, 1 H, H-2'a), 2.60 (m, 1 H, H-2'b);
- [0246] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -5.97 (d, *J* = 19.9 Hz), -11.07 (d, *J* = 19.3 Hz), -21.76 (t, *J* = 19.3 Hz);
- [0247] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 677.0175이고, 관찰된 질량은 677.0197이었다.
- [0248] 트리포스페이트는 자연 뉴클레오티드의 오염이 없는 샘플을 제공하기 위하여 UV 탐지 없이 예비 HPLC를 이용하여 더욱 정제하였다. 트리포스페이트 용액의 농도 결정은  $\epsilon_{260} = 20,800$ 의 소광 계수 (extinction coefficient)를 이용한 UV/VIS 측정으로 수행하였다.

[0249]

6-FAM 표지된  $N^{\beta}$ -[4-(3-아미노-1-프로필)-2-니트로벤질]-2'-테옥시아데노신 트리포스페이트 (WW2p055)의 합성



[0250]

[0251]

[0252]

개요. 6-FAM 표지된  $N^{\beta}$ -[4-(3-아미노-1-프로필)-2-니트로벤질]-2'-테옥시아데노신 트리포스페이트의 합성.

[0253]

(i) NaH, DMF, 4-요오도-2-니트로벤질 브롬화물, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 61%; (ii) PdC<sub>12</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

CuI, Et<sub>3</sub>N, THF, 환류(reflux), 94%; (iii) SiO<sub>2</sub>, 진공, 70-80°C, 82%; (iv) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 33%; (v) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지(proton sponge), (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20-30°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 2 분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; 72 %; (vi) 6-FAM-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/NaCO<sub>3</sub>, pH 9.2.

[0254] *N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>6</sup>-(4-요오도-2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (dA.14)

[0255] NaH (40 mg, 1.66 mmol, 건성)를 0°C에서, 무수성 DMF (10 ml)에 녹인 화합물 dA.07 (875 mg, 1.51 mmol)의 용액에 첨가하고 45분 동안 교반하였다. 무수성 DMF (2 ml)에 녹인 4-요오도-2-니트로벤질 브롬화물 (516 mg, 1.51 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 4시간 동안 교반하였다. DMF는 진공에서 제거하고, 잔류물은 에틸 아세테이트 (50 ml)에 용해시키고, 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (30 ml)으로 세척하고, 물 (각 30 ml)로 2회 세척하였다. 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (20 ml)로 추출하고, 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>6</sup>-(4-요오도-2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 dA.14 (777 mg, 61 %)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0256] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.66 (s, 1 H, H-8), 8.38 (s, 1 H, H-2), 8.34 (d, 1 H, *J* = 1.1 Hz, Ph-H), 7.85 (dd, 1 H, *J* = 1.1과 8.3 Hz, Ph-H), 7.50 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, Ph-H), 6.50 (t, 1 H, *J* = 6.3 Hz, H-1'), 5.54 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.63 (m, 1 H, H-3'), 4.03 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.62 (m, 1 H, H-2'a), 2.46 (m, 1 H, H-2'b), 1.41 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.92 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0257] *N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>6</sup>-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (dA.15)

[0258] N<sub>2</sub> 대기 하에, 무수성 THF (7.5 ml)에 녹인 화합물 dA.14 (730 mg, 0.87 mmol), *N*-프로파르길트리플루오로아세트아미드 (183 mg, 1.2 mmol), CuI (33 mg, 0.17 mmol), 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 염화물 (61 mg, 0.087 mmol)과 Et<sub>3</sub>N (1.6 ml, 11.57 mmol)의 혼합물은 어둠에서 6시간 동안 환류시켰다. 혼합물은 진공에서 농축하고, 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>6</sup>-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 dA.15 (706 mg, 94%)를 황색 거품으로 수득하였다.

[0259] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.67 (s, 1 H, H-8), 8.39 (s, 1 H, H-2), 8.06 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, Ph-H), 7.73 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 7.56 (dd, 1 H, *J* = 1.5와 8.2 Hz, Ph-H), 7.28 (br s, 1 H, NH), 6.51 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.59 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.63 (m, 1 H, H-3'), 4.37 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.03 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.63 (m, 1 H, H-2'a), 2.48 (m, 1 H, H-2'b), 1.40 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.92 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (2 s, 12 H, ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-).

[0260] *N*<sup>6</sup>-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시

아데노신 (dA.16)

[0261] 실리카 겔 60 (3.5 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 70-80°C로 가열함으로써 활성화됨)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml)에 녹인 화합물 dA.15 (507 mg, 0.59 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 감압 하에 42시간 동안 70-80°C로 가열하고, 메탄올 (각 20 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-O-비스-tert-부틸디메틸-실릴-2'-데옥시아데노신 dA.16 (366 mg, 82%)을 황색 거품으로 수득하였다.

[0262] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.35 (s, 1 H, H-8), 8.12 (s, 1 H, H-2), 8.05 (d, 1 H, J = 1.3 Hz, Ph-H), 7.66 (d, 1 H, J = 8.0 Hz, Ph-H), 7.48 (dd, 1 H, J = 1.3과 8.0 Hz, Ph-H), 7.20 (bs, 1 H, NH), 6.54 (t, 1 H, NH), 6.44 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.16 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.61 (m, 1 H, H-4'), 4.39 (d, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.00 (m, 1 H, H-3'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.78 (m, 1 H, H-5'b), 2.62 (m, 1 H, H-2'a), 2.44 (m, 1 H, H-2'b), 1.40 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.09 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-).

[0263] N<sup>6</sup>-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시아데노신 (dA.17)

[0264] THF (2 ml)에 녹인 n-Bu<sub>4</sub>NF (282 mg, 1.08 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (5 ml)에 녹인 화합물 dA.16 (330 mg, 0.43 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. 메탄올 (5 ml)과 실리카 겔 60 (2 g)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시아데노신 dA.17 (75 mg, 33%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0265] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.08 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.50 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.42 (s, 1 H, H-8), 8.16 (s, 1 H, H-2), 8.06 (d, 1 H, J = 1.6 Hz, Ph-H), 7.71 (dd, 1 H, J = 1.6과 8.1 Hz, Ph-H), 7.51 (m, 1 H, Ph-H), 6.35 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 5.30 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.13 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.96 (br s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.41 (m, 1 H, H-4'), 4.29 (d, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (m, 1 H, H-3'), 3.60 (m, 1 H, H-5'a), 3.51 (m, 1 H, H-5'b), 2.72 (m, 1 H, H-2'a), 2.27 (m, 1 H, H-2'b).

[0266] N<sup>6</sup>-[4-(3-아미노-1-프로필)-2-니트로벤질]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (dA.18)

[0267] POCl<sub>3</sub> (8.5 μl, 0.09 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 dA.17 (32 mg, 0.06 mmol)과 양자 스핀지 (19 mg, 0.09 mmol)의 용액에 첨가하고, 마이너스 20-30°C에서 2시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (0.6 ml)에 녹인 비스-트리-n-부틸암모늄 피로포스페이트 (142 mg, 0.3 mmol)와 트리-n-부틸아민 (60 μl)의 용액을 첨가하였다. 2분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 5 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서 농축된 암모늄 수산화물 (10 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 획득된 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 dA.18 (31 mg, 72%)을 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

[0268]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  8.47 (s, 1 H, H-8), 8.23 (s, 1 H, Ph-H), 8.20 (s, 1 H, H-2), 7.65 (d, 1 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 7.57 (d, 1 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 6.52 (t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 5.14 (br s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.31 (s, 1 H, H-4'), 4.21 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 3.60 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.82 (m, 1 H, H-2'a), 2.62 (m, 1 H, H-2'b);

[0269]  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  -5.43 (d,  $J = 15.4$  Hz), -10.46 (d,  $J = 15.6$  Hz), -18.85 (t,  $J = 15.6$  Hz);

[0270] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_3$   $[\text{M-H}]^-$ 의 경우에, 계산된 질량은 678.0516이고, 관찰된 질량은 678.0857이었다.

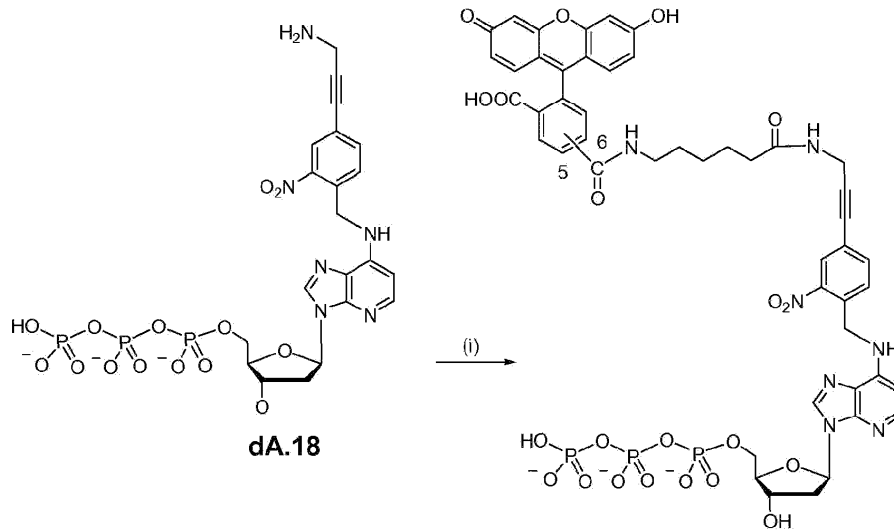
[0271] 6-FAM 표지된  $N^6$ -[4-(3-아미노-1-프로필)-2-니트로벤질]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW2p055**)

[0272] 무수성 DMSO (70  $\mu\text{l}$ )에 녹인 6-FAM-SE (6.7 mg, 0.014 mmol)의 용액을  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  완충액 (0.1 M, pH 9.2; 3 ml)에 녹인 트리포스페이트 **dA.18** (4.4  $\mu\text{mol}$ )의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-FAM 표지된 트리포스페이트 **WW2p055** (2.6 mg, 49%)를 수득하였다. 이동상(mobile phase: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-20% B, 이후 20분 동안 20-90% B의 선형 구배로 용출(elution)을 수행하였다. **WW2p055**의 농도는 6-FAM 염료의 소광 계수 (즉, 494 nm에서 68,000)를 이용한 흡수 분광법(adsorption spectroscopy)으로 산정하였다.

[0273]  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  -5.87 (d,  $J = 19.8$  Hz), -11.01 (d,  $J = 19.1$  Hz), -21.76 (t,  $J = 19.8$  Hz);

[0274] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온  $\text{C}_{41}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{20}\text{P}_3$   $[\text{M+H}]^+$ 의 경우에, 계산된 질량은 1038.1150이고, 관찰된 질량은 1138.1281이었다.

[0275] 5(6)-SFX 표지된  $N^6$ -[4-(3-아미노-1-프로필)-2-니트로벤질]-2' 데옥시아데노신 트리포스페이트 (**WW2p052**)의 합성



**WW2p052**

[0276]

[0277] **개요.** 5(6)-SFX 표지된  $N^6$ -[4-(3-아미노-1-프로필)-2-니트로벤질]-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트의 합성.

[0278]

(i) 5(6)-SFX, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/NaCO<sub>3</sub>, pH 9.2.

[0279]

5(6)-SFX 표지된  $N^6$ -[4-(3-아미노-1-프로필)-2-니트로벤질]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW2p052**)

[0280]

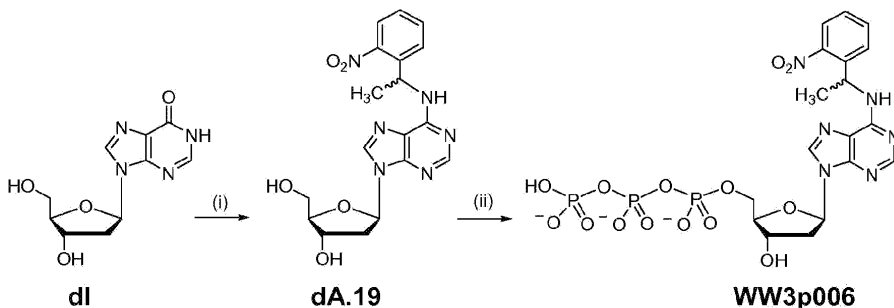
무수성 DMSO (30  $\mu$ l)에 녹인 5(6)-SFX (1.5 mg, 2.55  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 0.8 ml)에 녹인 트리포스페이트 **dA.18** (0.54  $\mu$ mol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 5(6)-SFX 표지된 트리포스페이트 **WW2p052**를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA.

[0281]

20분 동안 5-20% B, 이후 20분 동안 20-90% B의 선형 구배로 용출을 수행하였다. **WW2p052**의 농도는 6-FAM 염료의 소광 계수 (즉, 494 nm에서 68,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0282]

$N^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 (**WW3p006**)의 합성



[0283]

[0284] **개요.**  $N^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트의 합성

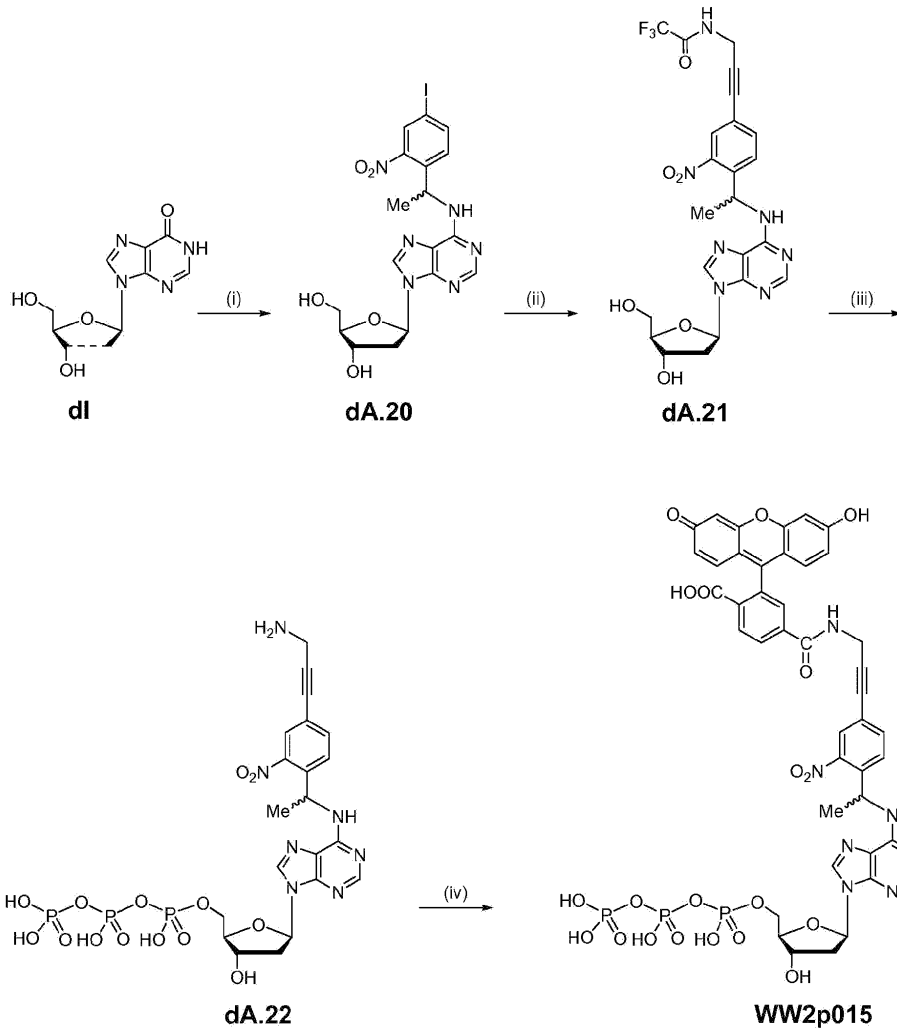
[0285]

(i) 1-(2-니트로페닐)에틸아민, BOP, DIPEA, DMF, 실온, 하룻밤, 42%; (ii) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간.

- [0286]  $N^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 (**dA.19**)
- [0287] 무수성 DMF (1 ml)에 녹인 2'-데옥시아데노신 (100 mg, 0.4 mmol)과 벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (BOP, 210 mg, 0.48 mmol)의 현탁액에, *N,N*-디이소프로필에틸아민 (100  $\mu$ l, 0.6 mmol)을 첨가하고, 이후 DMF (1 ml)에 녹인 1-(2-니트로페닐)에틸아민 (250 mg, 1.51 mmol)의 용액을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 64시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1 g, 60-200 메시)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 **dA.19** (67 mg, 42%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 백색 거품으로 수득하였다.
- [0288] 부분입체이성질체에 대한  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.68 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.42 (br s, 1 H, H-8), 8.16과 8.06 (2 s, 1 H, H-2), 7.88 (m, 2 H, Ph-H), 7.69 (m, 1 H, Ph-H), 7.46 (m, 1 H, Ph-H), 6.34 (m, 1 H, H-1'), 5.79 (m, 1 H, Ph-CH), 5.32 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.16 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.42 (m, 1 H, H-3'), 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.61 (m, 1 H, H-5'a), 3.53 (m, 1 H, H-5'b), 2.71 (m, 2 H, H-2'a), 2.25 (m, 1 H, H-2'b), 1.68 (d, 3 H,  $J$  = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>)
- [0289]  $N^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW3p006**)
- [0290] 화합물 **dA.19** (30 mg, 0.075 mmol)와 양자 스펜지 (32 mg, 0.15 mmol)는 무수성 피리딘 (2 ml)으로부터 3회 증발시키고 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 용해시켰다. POCl<sub>3</sub> (10.5  $\mu$ l, 0.11 mmol)을 첨가하고, 혼합물은 0°C에서 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.75 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (178 mg, 0.38 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (75  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고 여과하고, 용액의 일부는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여  $N^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **WW3p006** (부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50%, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배로 용출을 수행하였다.
- [0291] 부분입체이성질체에 대한  $^1H$  NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.47 (s, 1 H, H-8), 8.12 (2 s, 1 H, H-2), 8.02 (d, 1 H,  $J$  = 8.2 Hz, Ph-H), 7.78 (d, 1 H,  $J$  = 7.8 Hz, Ph-H), 7.67 (t, 1 H,  $J$  = 7.6 Hz, Ph-H), 7.49 (t, 1 H,  $J$  = 8.1 Hz, Ph-H), 6.49 (t, 1 H,  $J$  = 6.4 Hz, H-1'), 5.89 (bs, 1 H, Ph-CH), 4.29 (m, 1 H, H-4'), 4.23 - 4.15 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.81 (m, 1 H, H-2'a), 2.58 (m, 1 H, H-2'b), 1.74 (d, 3 H,  $J$  = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>);
- [0292] 부분입체이성질체에 대한  $^{31}P$  NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -5.65 (m), -10.52 (d,  $J$  = 19.6 Hz), -21.32 (m);
- [0293] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 661.0226이고, 관찰된 질량은 661.0492이었다.

[0294]

6-FAM 표지된  $N^{\beta}$ -[1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸]-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 (WW3p015)의 합성



[0295]

[0296]

개요. 6-FAM 표지된  $N^{\beta}$ -[1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸]-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트의 합성.

[0297]

(i) 1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸아민, BOP, DIPEA, DMF, 실온, 65%; (ii) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(0), CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수성 DMF, 4.5 h, 94%; (iii) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; (iv) 6-FAM-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간.

[0298]

$N^{\beta}$ -[1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 (dA.20)

[0299]

무수성 DMF (1.5 ml)에 녹인 2'-데옥시아데노신 (150 mg, 0.6 mmol)과 벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (BOP, 379 mg, 0.86 mmol)의 현탁액에, *N,N*-디이소프로필에틸아민 (186  $\mu$ l, 1.1 mmol)을 첨가하고, 이후 무수성 DMF (0.5 ml)에 녹인 1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸아민 (460 mg, 1.57 mmol)의 용액을 첨가하였다. 혼합물은 질소 대기 하에 48시간 동안 교반하였다. DMF는 진공에서 제거하고, 정제되지 않은 산물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^{\beta}$ -[1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 dA.20 (204 mg, 65%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을

백색 거품으로 수득하였다.

[0300] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.72 (br m, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, NH), 8.42 (br s, 1 H, H-8), 8.20 (s, 1 H, H-2), 8.06 (m, 2 H, Ph-H), 7.65 (m, 1 H, Ph-H), 6.34 (m, 1 H, H-1'), 5.70 (br s, 1 H, PhCH), 5.32 (br s, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 3'-OH), 5.15 (br m, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 5'-OH), 4.42 (m, 1 H, H-4'), 3.88 (m, 1 H, H-3'), 3.61 (m, 1 H, H-5'a), 3.53 (m, 1 H, H-5'b), 2.71 (m, 1 H, H-2'a), 2.25 (m, 1 H, H-2'b), 1.65 (d, 3 H,  $J = 6.9$  Hz,  $\text{CH}_3$ );

[0301] 부분입체이성질체에 대한  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  153.39 (CH), 151.94 (C), 150.65 (C), 143.44 (CH), 141.82 (C), 141.40 (C), 133.77/133.69 (CH), 130.55/130.52 (CH), 121.37 (C), 92.09 (C), 91.87 (C), 89.97 (CH), 87.21 (CH), 73.18/73.15 (CH), 65.78/65.76 ( $\text{CH}_2$ ), 47.12 (CH), 41.62 ( $\text{CH}_2$ ), 37.14/37.10 ( $\text{CH}_3$ );

[0302]  $\text{ES-MS (ESI)}$ :  $m/e$  525  $[\text{M-H}]^-$ .

[0303]  $N^6$ -{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신 (**da.21**)

[0304] 무수성 DMF (1.5 ml)에 녹인 화합물 **da.20** (108 mg, 0.21 mmol), *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드 (127 mg, 0.84 mmol), CuI (11 mg, 0.06 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (33 mg, 0.03 mmol)과  $\text{Et}_3\text{N}$  (80  $\mu\text{l}$ , 0.56 mmol)의 용액은 실온에서 4시간 30분 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^6$ -{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신 **da.21** (106 mg, 94%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0305] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  10.10 (br m, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, NH), 8.71 (br m, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, NH), 8.43 (br s, 1 H, H-8), 8.15와 8.06 (2 s, 1 H, H-2), 7.93 (s, 1 H, Ph-H), 7.86 (m, 1 H, Ph-H), 7.75 (m, 1 H, Ph-H), 6.35 (br m, 1 H, H-1'), 5.73 (br m, 1 H, Ph-CH), 5.31 (br s, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 3'-OH), 5.15 (br m, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 5'-OH), 4.40 (m, 1 H, H-4'), 4.31 (d, 2 H,  $J = 5.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.88 (m, 1 H, H-3'), 3.62 (m, 1 H, H-5'a), 3.51 (m, 1 H, H-5'b), 2.71 (m, 1 H, H-2'a), 2.25 (m, 1 H, H-2'b), 1.67 (d, 3 H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ );

[0306] 부분입체이성질체에 대한  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  157.85/157.48 (C), 152.26 (CH), 149.50 (C), 140.27 (C), 136.04 (CH), 128.02 (CH), 127.07 (CH), 122.56 (C), 120.25 (C), 117.81 (C), 114.96 (C), 88.85 (CH), 86.08 (CH), 85.81 (C), 80.67 (C), 72.07/72.04 (CH), 62.66/62.63 ( $\text{CH}_2$ ), 48.30 (CH), 40.47 ( $\text{CH}_2$ ), 29.46 ( $\text{CH}_2$ ), 24.26 ( $\text{CH}_3$ );

[0307]  $N^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**da.22**)

[0308] 화합물 **da.21** (44 mg, 0.08 mmol)과 양자 스펜지 (34 mg, 0.16 mmol)는 무수성 피리딘 (2 ml)으로부터 3회 증발시키고 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 용해시켰다.  $\text{POCl}_3$  (11  $\mu\text{l}$ , 0.12 mmol)을 첨가하고, 혼합물은 0°C에서

2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.8 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (190 mg, 0.4 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (80  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고 여과하고, 용액의 일부는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여  $N^6$ -{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트를 얻었다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. 이후,  $N^6$ -{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트는 실온에서 1시간 동안, 농축된 암모늄 수산화물 (1 ml, 27%)으로 처리하여  $N^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **dA.22** (부분입체 이성질체의 1:1 혼합물)를 수득하였다.

[0309] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.45 (s, 1 H, H-8), 8.08 (2 s, 1 H, H-2), 7.95 (s, 1 H, Ph-H), 7.65 (m, 1 H, Ph-H), 7.53 (m, 1 H, Ph-H), 6.45 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.80 (br s, 1 H, Ph-CH), 4.28 (s, 1 H, H-4'), 4.18 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 3.64 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.78 (m, 1 H, H-2'a), 2.57 (m, 1 H, H-2'b), 1.69 (d, 3 H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>);

[0310] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -5.29 (d, *J* = 20.1 Hz), -10.45 (d, *J* = 19.1 Hz), -21.08 (t, *J* = 19.6 Hz);

[0311] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 692.0672이고, 관찰된 질량은 692.0757 이었다.

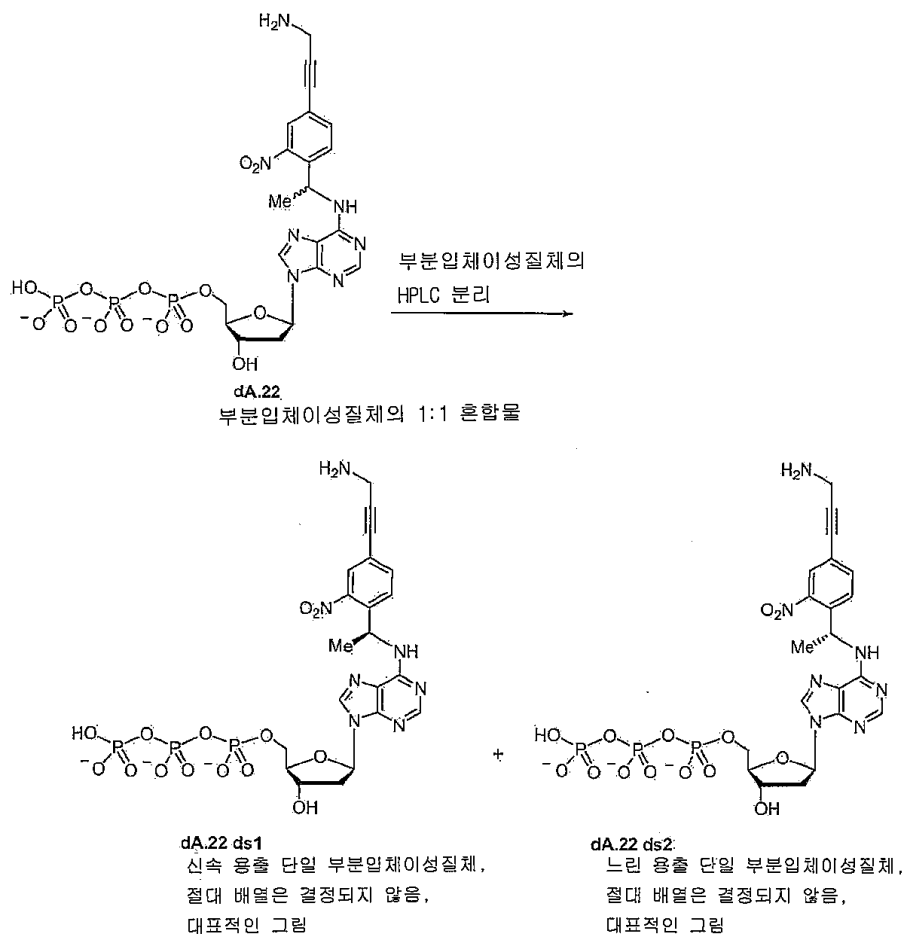
[0312] 6-FAM 표지된  $N^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW3p015**)

[0313] 무수성 DMSO (30  $\mu$ l)에 녹인 6-FAM-SE (1.5 mg, 3.15  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 100  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dA.22** (0.34  $\mu$ mol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-FAM 표지된 트리포스페이트 **WW3p015**를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW3p015**의 농도는 6-FAM 염료의 소광 계수 (즉, 494 nm에서 68,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0314] 부분입체이성질체  $N^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-에틸}-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**dA.22 dS1**과 **dA.22 ds2**)의 분리

[0315] **dA.22**의 2가지 부분입체이성질체의 분리는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 수행하여  $N^6$ -{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 **dA.22 dS1** (단일 부분입체이성질체, 절대 배열(absolute configuration)은 결정되지 않음)과  $N^6$ -{(S 또는 R)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 **dA.22 dS2** (단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아

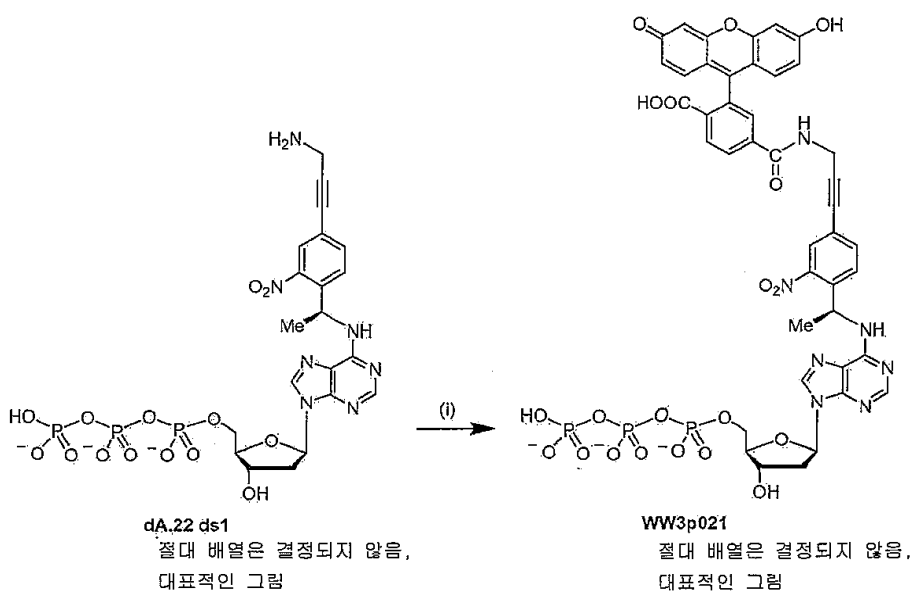
세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 50분 동안 5-25% B, 이후 30분 동안 25-50% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다.



[0316]

[0317]

6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체 *N*<sup>β</sup>-{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (WW3p021)의 합성



[0318]

[0319]

개요. 6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체 *N*<sup>β</sup>-{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-

2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0320]

(i) 6-FAM-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간.

[0321]

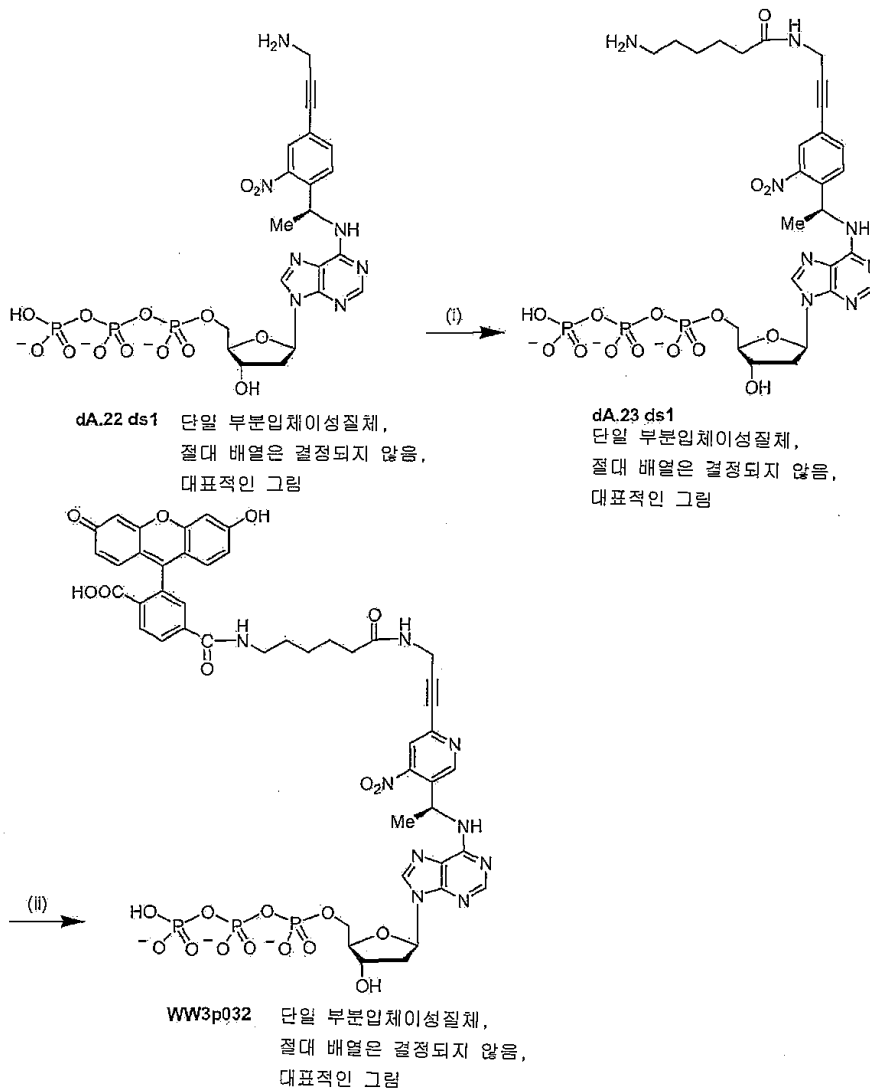
6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체 N<sup>6</sup>-{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (WW3p021)

[0322]

무수성 DMSO (15 μl)에 녹인 6-FAM-SE (0.75 mg, 1.57 μmol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 150 μl)에 녹인 트리포스페이트 dA.22 ds1 (0.26 μmol, 단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체 트리포스페이트 WW3p021을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. WW3p021의 농도는 6-FAM 염료의 소광 계수 (즉, 494 nm에서 68,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0323]

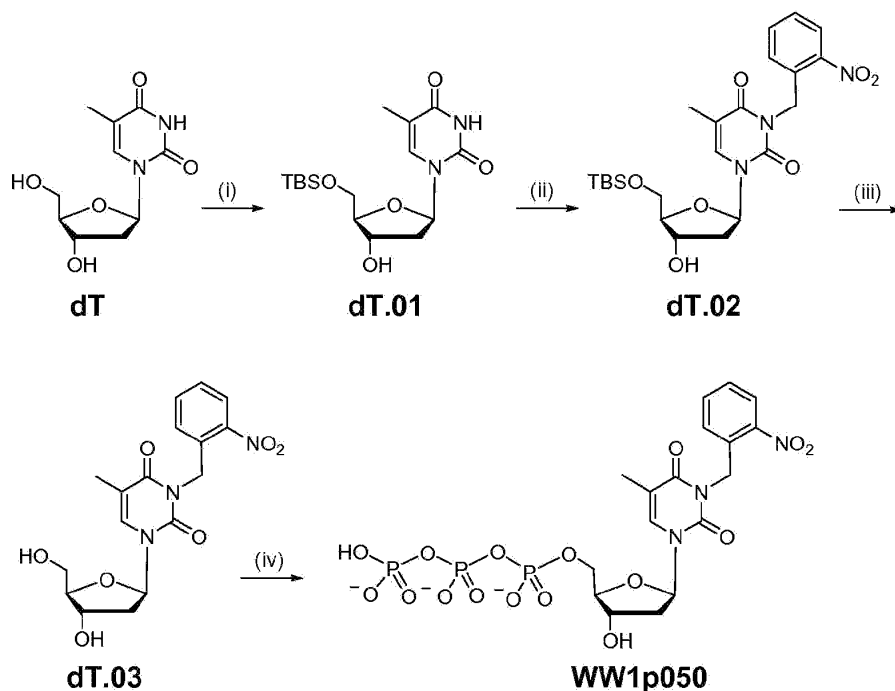
6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체 N<sup>6</sup>-{(R 또는 S)-1-(4-[3-(6-아미노카프로일)아미노-1-프로피닐]-2-니트로페닐]에틸)-2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (WW3p032)의 합성



[0324]

- [0325] **개요.** 6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체  $N^{\beta}$ -{(R 또는 S)-1-{4-[3-(6-아미노카프로일)아미노-1-프로피닐]-2-니트로페닐}에틸}-2'-테옥시아데노신 트리포스페이트의 합성.
- [0326] (i) 6-N-(트리플루오로아세틸)아미노카프로산 N-숙신이미딜 에스테르, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; (ii) 6-FAM-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간.
- [0327]  $N^{\beta}$ -{(R 또는 S)-1-{4-[3-(6-아미노카프로일)아미노-1-프로피닐]-2-니트로페닐}에틸}-2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (단일 부분입체이성질체 **dA.23 ds1**)
- [0328] 무수성 DMSO (10  $\mu$ l)에 녹인 6-N-(트리플루오로아세틸)아미노카프로산 N-숙신이미딜 에스테르 (0.5 mg, 1.54  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 200  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dA.22 ds1** (0.25  $\mu$ mol, 단일 부분입체이성질체, 절대 배율은 결정되지 않음)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. NH<sub>4</sub>OH (500  $\mu$ l, 25% aq)를 첨가하고, 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 트리포스페이트 **dA.23 ds1** (단일 부분입체이성질체, 절대 배율은 결정되지 않음)을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다.
- [0329] 6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체  $N^{\beta}$ -{(R 또는 S)-1-{4-[3-(6-아미노카프로일)아미노-1-프로피닐]-2-니트로페닐}에틸}-2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW3p032**)의 합성
- [0330] 무수성 DMSO (10  $\mu$ l)에 6-FAM-SE (0.5 mg, 1.05  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 200  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dA.23 ds1** (0.196  $\mu$ mol, 단일 부분입체이성질체, 절대 배율은 결정되지 않음)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-FAM 표지된 단일 부분입체이성질체 트리포스페이트 **WW3p032**를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW3p032**의 농도는 6-FAM 염료의 소광 계수 (즉, 494 nm에서 68,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.
- [0331] **실시예 2: dT 화합물**

[0332]  $N^3$ -(2-니트로벤질)-티미딘-5'-트리포스페이트 (WW1P050)의 합성



[0333]

[0334] **개요.**  $N^3$ -(2-니트로벤질)-티미딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0335] (i) TBSCl, 이미다졸, 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 실온, 하룻밤, 58%; (ii) 2-니트로벤질 브롬화물,  $n\text{-Bu}_4\text{NOH}$ , NaI, NaOH (1 M),  $\text{CHCl}_3$ , 실온, 하룻밤, 37%; (iii)  $n\text{-Bu}_4\text{NF}$ , THF, 25°C, 45분, 80%; (iv)  $\text{POCl}_3$ , 양자 스펀지,  $(\text{MeO})_3\text{PO}$ , 0°C, 6시간;  $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $n\text{-Bu}_3\text{N}$ , DMF, 5분; 1 M  $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ , 1시간, 56%.

[0336] 5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-티미딘 (dT.01)

[0337] 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml)에 녹인 티미딘 dT (2.85 g, 11.76 mmol), 이미다졸 (2.44 g, 35.80 mmol)과 TBSCl (1.77 g, 11.76 mmol)의 용액은  $\text{N}_2$  대기 하에 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 반응 혼합물은 이후, 진공에서 점성 오일로 농축하고, 이후 에틸 에테르 (60 ml)와 물 (60 ml)을 첨가하였다. 유기층은 분리하고 물 (각 20 ml)로 2회 세척하고, 모아진 수층은 에틸 에테르 (20 ml)로 추출하였다. 모아진 유기층은  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-티미딘 dT.01 (3.44 g, 82%)을 백색 고체로 수득하였다.

[0338]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.35 (br s, 1 H, H-3), 7.53 (d, 1 H,  $J = 1.2$  Hz, H-6), 6.39 (dd, 1 H,  $J = 8.3, 5.6$  Hz, H-1'), 4.45 (m, 1 H, H-4'), 4.07 (m, 1 H, H-3'), 3.87 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.99 (br. s, 1 H, 3'-OH), 2.38 (m, 1 H, H-2'b), 2.09 (m, 1 H, H-2'b), 1.91 (d, 3 H,  $J = 1.2$  Hz, 5-Me), 0.92 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.11 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0339]  $N^3$ -(2-니트로벤질)-5'-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-티미딘 (dT.02)

[0340] 화합물 dT.01 (660 mg, 1.85 mmol), 테트라부틸암모늄 수산화물 (0.5 ml),  $\text{CHCl}_3$  (5 ml)에 담긴 나트륨 요오드화물 (55 mg)과 NaOH (1 M; 5 ml)의 활발하게 교반된 혼합물에,  $\text{CHCl}_3$  (5 ml)에 녹인 2-니트로벤질 브롬화물

(400 mg, 1.85 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하고 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 유기층은 분리하고, 수층은 클로로포름 (각 5 ml)으로 2회 추출하였다. 모아진 유기층은 물 (5 ml), 염수 (5 ml)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시켰다. 상기 용매는 진공에서 증발시키고, 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>3</sup>-(2-니트로벤질)-5'-O-tert-부틸디메틸실릴-티미딘 **dT.02** (562 mg, 58%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0341] <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.98 (dd, 1 H, J = 7.2, 1.2 Hz, Ph-H), 7.60 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, H-6), 7.49 (dt, 1 H, J = 7.6, 1.2 Hz, Ph-H), 7.36 (dt, 1 H, J = 8.1, 1.4 Hz, Ph-H), 7.16 (dd, 1 H, J = 7.8, 1.1 Hz, Ph-H), 6.31 (dd, 1 H, J = 8.2, 5.7 Hz, H-1'), 5.50 (d, 1 H, J = 16.2 Hz, PhCH<sub>2</sub>), 5.44 (d, 1 H, J = 16.2 Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.40 (m, 1 H, H-4'), 3.97 (q, 1 H, J = 2.4 Hz, H-3'), 3.82 (dq, 2 H, J = 11.4, 2.4 Hz, H-5'a와 H-5'b), 2.98 (s, 1 H, 3'-OH), 2.29 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 1.93 (d, 3 H, J = 1.2 Hz, 5-Me), 0.90 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.09 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>)Si), 0.08 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>)Si).

[0342] N<sup>3</sup>-(2-니트로벤질)-티미딘 (**dT.03**)

[0343] n-Bu<sub>4</sub>NF (THF에서 1.0 M, 1.125 ml, 1.125 mmol)의 용액을 THF (3.75 ml)에 녹인 화합물 **dT.02** (369 mg, 0.75 mmol)의 용액에 방울방울 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온에서 45분 동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>3</sup>-(2-니트로벤질)-티미딘 **dT.03** (225 mg, 80%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0344] <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.01 (dd, 1 H, J = 8.2, 1.3 Hz, Ph-H), 7.51 (m, 2 H, H-6과 Ph-H), 7.40 (m, 1 H, Ph-H), 7.21 (dd, 1 H, J = 7.8, 0.9 Hz, Ph-H), 6.21 (t, 1 H, J = 6.7 Hz, H-1'), 5.49 (dd, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 4.53 (m, 1 H, H-4'), 3.97 (m, 1 H, H-3'), 3.78 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.30 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b), 1.94 (s, 3 H, 5-CH<sub>3</sub>).

[0345] N<sup>3</sup>-(2-니트로벤질)-티미딘-5'-트리포스페이트 (**WW1p050**)

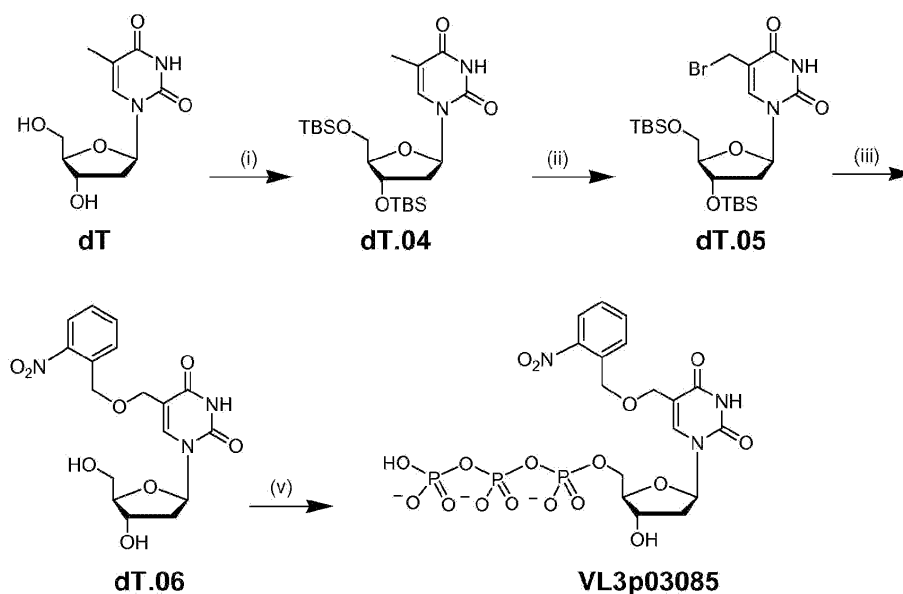
[0346] POCl<sub>3</sub> (30 μl, 0.33 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dT.03** (38 mg, 0.11 mmol)과 양자 스핀지 (32 mg, 0.15 mmol)의 용액에 첨가하고 6시간 교반하였다. 무수성 DMF (1 ml)에 녹인 비스-트리-n-부틸암모늄 피로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol)와 트리-n-부틸아민 (100 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반 후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 용액에 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 획득된 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (240분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 N<sup>3</sup>-(2-니트로벤질)-티미딘-5'-트리포스페이트 **WW1p050** (38 mg, 56%)을 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

[0347] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.15 (d, 1 H, J = 8.2 Hz, Ph-H), 7.82 (s, 1 H, H-6), 7.64 (t, 1 H, J = 7.6 Hz, Ph-H), 7.54 (t, 1 H, J = 7.6 Hz, Ph-H), 7.24 (d, 1 H, J = 7.8 Hz, Ph-H), 6.35 (t, 1 H, J = 6.7 Hz, H-1'), 5.47 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.64 (m, 1 H, H-4'), 4.25 (m, 3 H, H-3', H-5'a와 H-5'b), 2.40 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b), 1.98 (s, 3 H, 5-CH<sub>3</sub>);

[0348]  $^{31}\text{P}$  NMR (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -6.12 (d,  $J$  = 15.6 Hz), -11.21 (d,  $J$  = 15.4 Hz), -19.565 (d,  $J$  = 15.6 Hz);

[0349] ToF-MS (ESI): 분자 이온  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{P}_3\text{Na}$   $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ 의 경우에, 계산된 질량은 637.9954이고, 관찰된 질량은 637.9802이었다.

[0350] 5-(2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (VL3p03085)의 합성



[0351]

[0352] 개요. 5-(2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0353] (i) TBSCl, 이미다졸, 무수성 DMF, 실온, 하룻밤, 90%; (ii) NBS, 벤조일 과산화물,  $\text{CCl}_4$ , 환류, 1시간, 44%; (iii) 2-니트로벤질 알코올, 110-115 $^\circ\text{C}$ , 10분, 35%; (iv)  $\text{POCl}_3$ , 양자 스핀지,  $(\text{MeO})_3\text{PO}$ , 0 $^\circ\text{C}$ , 2시간; (*n*- $\text{Bu}_3\text{NH}$ ) $_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , *n*- $\text{Bu}_3\text{N}$ , DMF; 1 M  $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ , 1시간, 22%.

[0354] 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-티미딘 (**dT.04**)

[0355] 무수성 DMF (11 ml)에 녹인 티미딘 (5.00 g, 20.64 mmol)과 이미다졸 (9.0 g, 132.1 mmol)의 용액에, DMF (11 ml)에 녹인 TBSCl (9.96 g, 66.05 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하고, 혼합물은  $\text{N}_2$  대기 하에 실온에서 하룻밤 동안 교반하였다. 혼합물을 물 (100 ml)로 희석한 이후, 형성된 침전물은 여과하고 에틸 에테르 (125 ml)에 용해시켰다. 에테르 용액은 물 (각 25 ml)로 2회, 그리고 염수 (25 ml)로 1회 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 에서 건조시키고, 감압 하에 밀랍 고체로 농축하였는데, 이는 헥산/에틸 에테르 (10:1)로부터 재결정화시켜 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-티민 **dT.04** (10.64 g, 90%)를 수득하였다.

[0356]  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.51 (br s, 1 H, H-3), 7.48 (d, 1 H,  $J$  = 1.2 Hz, H-6), 6.34 (dd, 1 H,  $J$  = 5.8과 8.0 Hz, H-1'), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 3.93 (m, 2 H, H-4'), 3.87 (dd, 1 H,  $J$  = 2.6과 11.4 Hz, H-5'a), 3.76 (dd, 1 H,  $J$  = 2.6과 11.4 Hz, H-5'b), 2.17 (m, 1 H, H-2'a), 2.01 (m, 1 H, H-2'b), 1.92 (d, 3 H,  $J$  = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.93 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.88 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.11 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0.08

(s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0357] 5-브로모메틸-3',5'-O-비스-tert-부틸디메틸실릴-2'-데옥시우리딘 (dT.05)

[0358] CCl<sub>4</sub> (100 ml)에 녹인 화합물 dT.04 (4.63 g, 9.83 mmol), *N*-브로모숙신이미드 (3.68 g, 20.68 mmol)와 벤조일 과산화물 (0.10 g, 75% 수용액)의 용액은 1시간 동안 환류시켰다. 혼합물은 여과하고, 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-브로모메틸-3',5'-O-비스-tert-부틸디메틸실릴-2'-데옥시우리딘 dT.05 (2.40 g, 44%)를 수득하였다.

[0359] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.16 (br s, 1 H, H-3), 7.89 (s, 1 H, H-6), 6.30 (dd, 1 H, *J* = 5.8과 7.7 Hz, H-1'), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.29 (d, 1 H, *J* = 10.6 Hz, CH<sub>2</sub>Br), 4.23 (d, 1 H, *J* = 10.6 Hz, CH<sub>2</sub>Br), 3.98 (m, 2 H, H-4'), 3.89 (dd, 1 H, *J* = 2.6과 11.4 Hz, H-5'b), 3.78 (dd, 1 H, *J* = 2.6과 11.4 Hz, H-5'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.01 (m, 1 H, H-2'b), 0.95(s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.91 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.15 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.09(s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0360] 5-(2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘 (dT.06)

[0361] 화합물 dT.05 (238 mg, 0.43 mmol)와 2-니트로벤질 알코올 (331 mg, 2.17 mmol)은 N<sub>2</sub> 대기 하에 110-115°C에서 10분 동안 순수(neat)하게 가열하였다. 혼합물은 실온으로 냉각하고, 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 5-(2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘 dT.06 (60 mg, 35%)을 수득하였다.

[0362] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11.41 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, Ph-H), 7.96 (s, 1 H, H-6), 7.78 (m, 2 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 6.17 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 5.25 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.00 (t, 1 H, *J* = 5.0 Hz, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.48 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.24 (m, 1 H, H-3'), 4.23 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (m, 1 H, H-4'), 3.57 (m, 2 H, H-5'), 2.11 (m, 2 H, H-2');

[0363] <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 163.38 (C), 147.18 (C), 139.53 (CH), 134.80 (C), 133.81 (C), 132.87 (CH), 128.53 (CH), 127.63 (CH), 123.75 (CH), 110.24 (C), 87.16 (CH), 82.83 (CH), 70.41 (CH), 68.26 (CH<sub>2</sub>), 64.73 (CH<sub>2</sub>), 61.05 (CH<sub>2</sub>), 39.58 (CH<sub>2</sub>);

[0364] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 394.1250이고, 관찰된 질량은 394.1286이었다.

[0365] 5-(2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (VL3p03085)

[0366] POCl<sub>3</sub> (22 μl, 0.24 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 dT.06 (48 mg, 0.12 mmol)과 양자 스펜지 (39 mg, 0.18 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (1.2 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (285 mg, 0.6 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (120 μl)의 용액을 첨가하였다. 2분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 5-(2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 VL3p03085 (16 mg, 22%)를 백색의 습털모양 고체로 수득

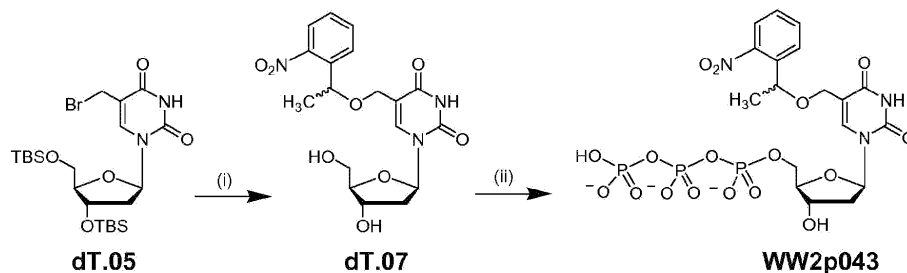
하였다.

[0367]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.01 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1 H, Ph-H), 7.78 (s, 1 H, H-6), 7.65 (m, 2 H, Ph-H), 7.52 (m, 1 H, Ph-H), 6.26 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1 H, H-1'), 4.93 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 4.57 (m, 1 H, H-3'), 4.41 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 4.21 (m, 3 H, H-4'와 H-5'), 2.34 (m, 2 H, H-2');

[0368]  $^{31}\text{P NMR}$  (162 Hz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -5.58 (d,  $J = 18.5$  Hz), -10.91 (d,  $J = 18.5$  Hz), -20.80 (br);

[0369]  $\text{TOF-MS (ESI)}$ : 분자 이온  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_3$   $[\text{M-H}]^-$ 의 경우에, 계산된 질량은 632.0084이고, 관찰된 질량은 631.9779 이었다.

[0370] 5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (WW2p043)의 합성



[0371]

[0372] 개요. 5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0373] (i) 1-(2-니트로페닐)에탄올 (1.25 g, 7.50 mmol), 110-115°C, 10분, 8%; (ii)  $\text{POCl}_3$ , 양자 스펀지,  $(\text{MeO})_3\text{PO}$ , 0°C, 3시간;  $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $n\text{-Bu}_3\text{N}$ , DMF; 1 M  $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ , 1시간, 55%.

[0374] 5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 (dT.07)

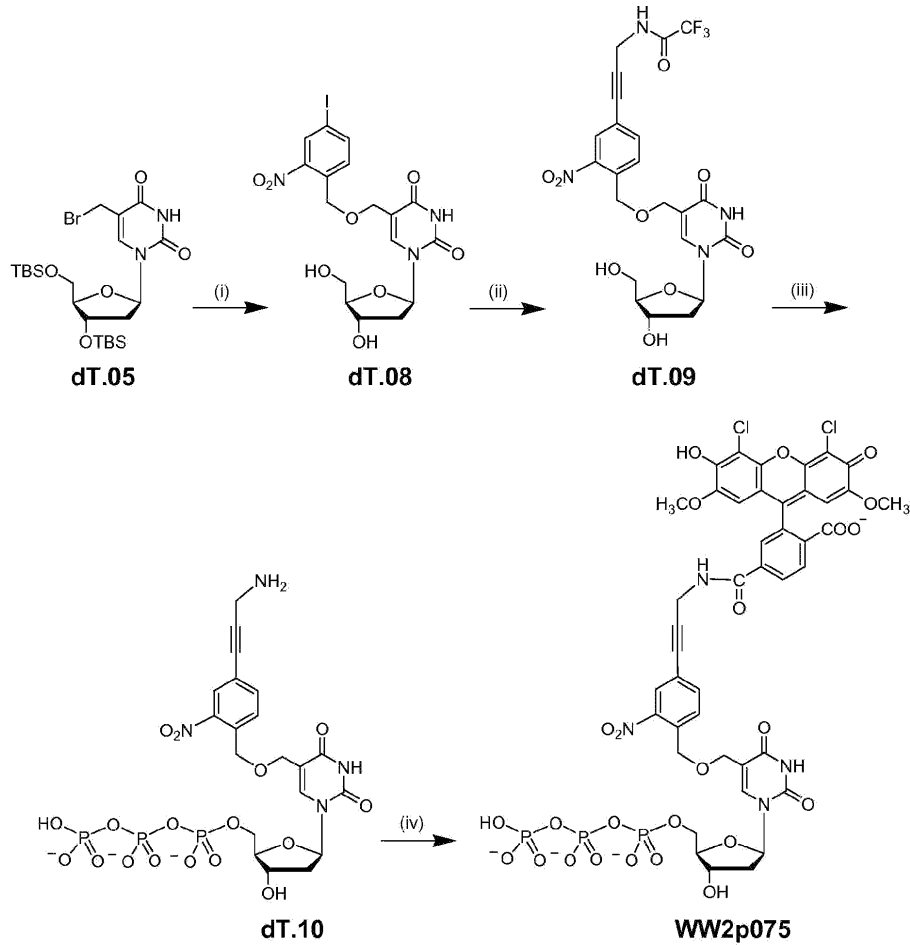
[0375] 화합물 dT.05 (0.81 g, 1.5 mmol)와 1-(2-니트로페닐)에탄올 (1.25 g, 7.50 mmol)은  $\text{N}_2$  대기 하에 110-115°C에서 10분 동안 순수하게 가열하였다. 혼합물은 실온으로 냉각하고, 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 dT.07 (48 mg, 8%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다.

[0376]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) 부분입체이성질체에 대한:  $\delta$  11.36과 11.35 (2 br s, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, NH), 7.95 (m, 1 H, Ph-H), 7.87 (m, 1 H, Ph-H), 7.76 (m, 2 H, H-6과 Ph-H), 7.54 (m, 1 H, Ph-H), 6.14 (m, 1 H, H-1'), 5.25 (d, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 3'-OH), 5.00 (m, 2 H, 특히 1 H  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 5'-OH와 CH), 4.24 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.57 (m, 2 H, H-5'), 2.08 (m, 2 H, H-2'), 1.43 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ );

[0377]  $\text{TOF-MS (ESI)}$ : 분자 이온  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_8$   $[\text{M+H}]^+$ 의 경우에, 계산된 질량은 408.1407이고, 관찰된 질량은 408.1446이었

다.

- [0378] 5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (WW2p043)
- [0379] POCl<sub>3</sub> (15  $\mu$ l, 0.17 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dT.07** (34 mg, 0.08 mmol)과 양자 스펜지 (27 mg, 0.12 mmol)의 용액에 첨가하고 3시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.8 ml)에 녹인 트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (197 mg, 0.4 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (100  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5, 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 **WW2p043** (32 mg, 55%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 백색의 스푼모양 고체로 수득하였다.
- [0380] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  7.93 (m, 1 H, Ph-H), 7.71 - 7.61 (m, 3 H, H-6과 Ph-H), 7.49 (m, 1 H, Ph-H), 6.18과 6.12 (2 t,  $J$  = 6.6 Hz, 1 H, H-1'), 5.13 (m, 1 H, CH), 4.53 (m, 1 H, H-3'), 4.39 (m, 1 H, H-4'), 4.20 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>와 H-5'), 2.28 (m, 2 H, H-2'), 1.54 (d, 3 H,  $J$  = 6.3 Hz, CH<sub>3</sub>);
- [0381] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -7.98 (br), -12.64 (br), -23.33 (br);
- [0382] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 670.0216이고, 관찰된 질량은 670.0176이었다.
- [0383] 6-JOE 표지된 5-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (WW2p075)의 합성



[0384]

[0385]

**개요.** 6-JOE 표지된 5-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질-옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성. (i) 4-요오도-2-니트로벤질 알코올, 순수(neat), 110-115°C, 10분, 10%; (ii) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(O), CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수성 DMF, 4시간, 50%; (iii) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 4시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; 31%; (iv) 6-JOE-SE, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (pH 9.2), 1시간.

[0386]

5-(4-요오도-2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘 (**dT.08**)

[0387]

화합물 **dT.05** (0.59 g, 1.06 mmol)와 4-요오도-2-니트로벤질 알코올 (1.09 g, 3.9 mmol)은 N<sub>2</sub> 대기 하에 110-115°C에서 10분 동안 순수하게 가열하였다. 혼합물은 실온으로 냉각하고, 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 5-(4-요오도-2-니트로벤질옥시메틸)-2'-데옥시우리딘 **dT.08** (52 mg, 10%)을 저융점 고체로 수득하였다.

[0388]

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.42 (s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, N-H), 8.34 (d, 1 H, *J* = 1.7 Hz, Ph-H), 8.09 (dd, 1 H, *J* = 1.7과 8.2 Hz, Ph-H), 7.96 (s, 1 H, H-6), 7.56 (d, 1 H, *J* = 8.2, Ph-H), 6.16 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 5.25 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.02 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.77 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.20 (m, 1 H, H-3'), 4.22 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (m, 1 H, H-4'), 3.57 (m, 2 H, H-5'), 2.11 (m, 2 H, H-2').

[0389]

5-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 (**dT.09**)

[0390] 무수성 DMF (1.2 ml)에 녹인 화합물 **dT.08** (51 mg, 0.1 mmol), *N*-프로파르길트리플루오로아세틸아마이드 (45 mg, 0.3 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (12 mg, 0.01 mmol), CuI (4 mg, 0.02 mmol)와 Et<sub>3</sub>N (28 μl, 0.2 mmol)의 용액은 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 **dT.09** (27 mg, 50%)를 밀랍 고체로 수득하였다.

[0391] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11.44 (s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, N3-H), 10.44 (1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, N-H (COCF<sub>3</sub>)), 8.06 (s, 1 H, Ph-H), 7.97 (s, 1 H, H-6), 7.79 (s, 2 H, Ph-H), 6.16 (t, *J* = 6.8 Hz, 1 H, H-1'), 5.25 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.02 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.83 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.30 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.23 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>와 H-3'), 3.79 (m, 1 H, H-4'a), 3.57 (m, 2 H, H-5'), 2.10 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b);

[0392] ES+ MS (ESI): 543 [M+H]<sup>+</sup>; ES- MS (ESI): 541 [M+H]<sup>+</sup>

[0393] 5-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (**dT.10**)

[0394] POCl<sub>3</sub> (8 μl, 88 μmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dT.09** (24 mg, 44 μmol)와 양자 스펠지 (14 mg, 66 μmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 추가의 POCl<sub>3</sub> (8 μl, 88 μmol)을 첨가하고 추가로 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.5 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (104 mg, 0.22 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (50 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서, 농축된 암모늄 수산화물 (5 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 **dT.10** (10 mg, 31%)을 백색의 스펠모양 고체로 수득하였다.

[0395] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.10 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, Ph-H), 7.75 (m, 2 H, H-6과 Ph-H), 7.65 (m, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 6.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 1 H, H-1'), 4.95 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.58 (m, 1 H, H-3'), 4.43 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.22 (m, 3 H, H-4'와 H-5'), 3.64 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.33 (m, 2 H, H-2');

[0396] <sup>31</sup>P NMR (162 Hz, D<sub>2</sub>O): δ -6.51 (d, *J* = 15.0 Hz), -11.56 (d, *J* = 15.6 Hz), -19.82 (t, *J* = 15.0 Hz);

[0397] TOF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>17</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 707.0169이고, 관찰된 질량은 707.0321이었다.

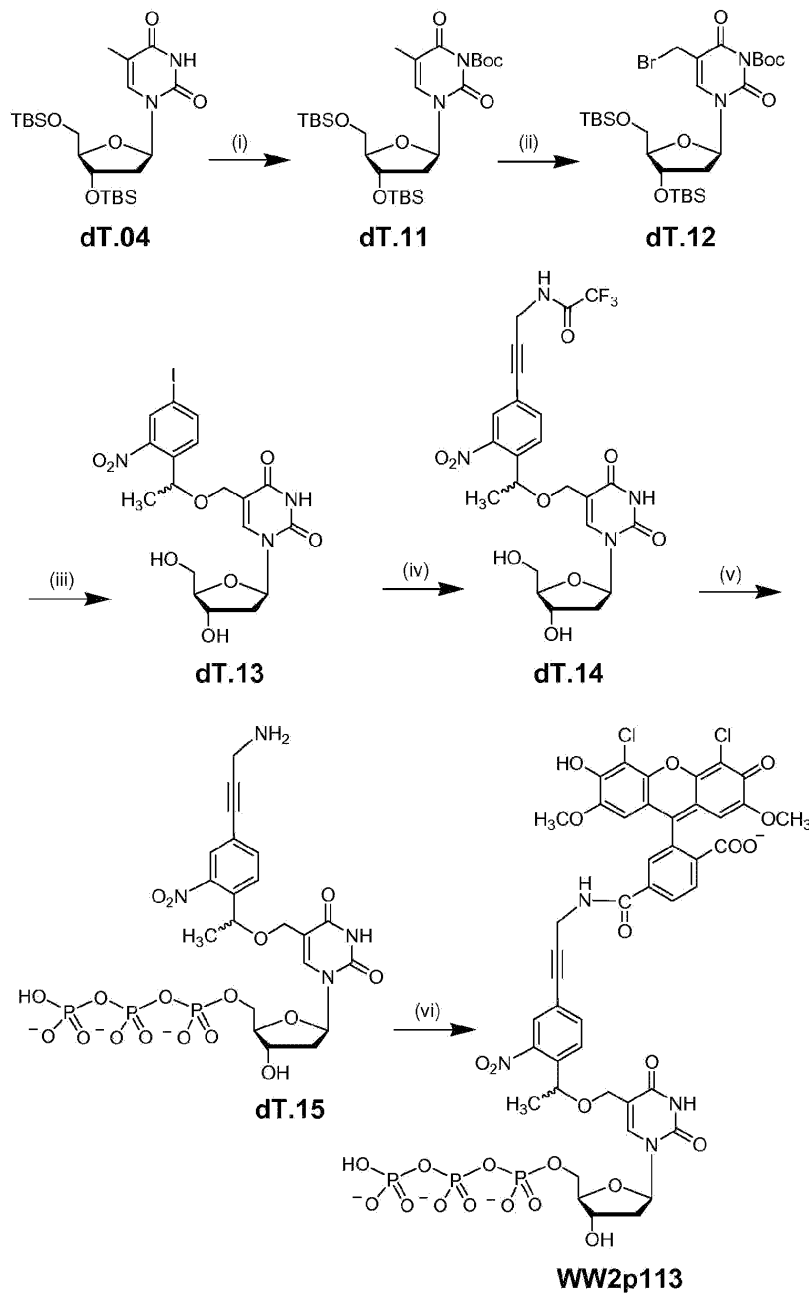
[0398] 6-JOE 표지된 5-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (**WW2p075**)

[0399]

무수성 DMSO (50  $\mu$ l)에 녹인 6-JOE-SE (1.25 mg, 2  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2, 0.5 ml)에 녹인 트리포스페이트 **dT.10** (1.4  $\mu$ mol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-JOE 표지된 트리포스페이트 **WW2p075**를 획득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-38% B, 이후 10분 동안 38-90% B의 선형 구배로 용출을 수행하였다. **WW2p075**의 농도는 6-JOE 염료의 소광 계수 (즉, 520 nm에서 75,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0400]

6-JOE 표지된 5-(1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸옥시-메틸)-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (**WW2p113**)의 합성.



[0401]

[0402]

개요. 6-JOE 표지된 5-(1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸옥시-메틸)-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0403] (i) Boc<sub>2</sub>O, DMAP, 무수성 DMF, 실온, 16시간, 78%; (ii) NBS, 벤조일 과산화물, CCl<sub>4</sub>, 환류, 1시간, 43%; (iii) 1-(4-요오도-2-니트로페닐)에탄올, 순수, 95°C, 50분, 13%; (iv) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0), CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수성 DMF, 4시간, 76%; (v) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; 31%; (vi) 6-JOE-SE, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (pH 9.2), 1시간.

[0404] *N*<sup>3</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-티미딘 (**dT.11**)

[0405] 무수성 DMF (45 ml)에 녹인 화합물 **dt.04** (2.43 g, 5.15 mmol)와 DMAP (1.39 g, 11.34 mmol)의 용액에, DMF (9 ml)에 녹인 디-*tert*-부틸디카보네이트 (2.47 g, 11.34 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 N<sub>2</sub> 대기 하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고, 결정성 잔류물은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 ml)에 용해시키고, 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (10 ml)으로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하였다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>3</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-티미딘 **dt.11** (2.30 g, 78%)을 백색 고체로 수득하였다.

[0406] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.50 (d, 1 H, *J* = 1.1 Hz, H-6), 6.34 (dd, 1 H, *J* = 5.8과 7.9 Hz, H-1'), 4.42 (m, 1 H, H-3'), 3.95 (m, 2 H, H-4'), 3.87 (dd, 1 H, *J* = 2.5와 11.4 Hz, H-5'a), 3.76 (dd, 1 H, *J* = 2.5와 11.4 Hz, H-5'b), 2.17 (m, 1 H, H-2'a), 2.01 (m, 1 H, H-2'b), 1.92 (d, 3 H, *J* = 1.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.60 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCON), 0.93 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.88 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.11 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.08 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0407] *N*<sup>3</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-5-브로모메틸-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시우리딘 (**dt.12**)

[0408] CCl<sub>4</sub> (10 ml)에 녹인 화합물 **dt.11** (570 mg, 1.00 mmol), *N*-브로모숙신이미드 (0.37 g, 2.10 mmol)와 벤조일 과산화물 (10 mg, 75% 수용액)의 용액은 1시간 동안 환류시켰다. 혼합물은 여과하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>3</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-5-브로모메틸-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시우리딘 **dt.12** (281 mg, 43%)를 밀랍 고체로 수득하였다.

[0409] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.89 (s, 1 H, H-6), 6.27 (dd, 1 H, *J* = 5.7과 7.7 Hz, H-1'), 4.39 (m, 1 H, H-3'), 4.27 (d, 1 H, *J* = 10.6 Hz, CH<sub>2</sub>Br), 4.20 (d, 1 H, *J* = 10.6 Hz, CH<sub>2</sub>Br), 3.98 (m, 2 H, H-4'), 3.89 (dd, 1 H, *J* = 2.5와 11.4, Hz, H-5'b), 3.78 (dd, 1 H, *J* = 2.6과 11.4 Hz, H-5'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.04 (m, 1 H, H-2'b), 1.61 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCON), 0.95 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.89 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.14 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.07 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si);

[0410] <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 159.21 (C), 147.99 (C), 147.32 (C), 138.46 (CH), 111.30 (C), 88.34 (CH), 87.22 (C), 86.00 (CH), 72.28 (CH), 63.04 (CH<sub>2</sub>), 41.93 (CH<sub>2</sub>), 27.42 (CH<sub>3</sub>), 25.99 (CH<sub>3</sub>), 25.71 (CH<sub>3</sub>), 25.65 (CH<sub>3</sub>), 24.91 (CH<sub>2</sub>), 18.47 (C), 17.97 (C), -3.58 (CH<sub>3</sub>), -4.65 (CH<sub>3</sub>), -4.86 (CH<sub>3</sub>), -5.32 (CH<sub>3</sub>).

[0411] 5-[1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 (**dt.13**)

[0412] 화합물 **dT.12** (323 mg, 0.50 mmol)와 1-(4-요오도-2-니트로페닐)에탄올 (293 mg, 2.23 mmol)은 N<sub>2</sub> 대기 하에 95-97°C에서 50분 동안 순수하게 가열하였다. 혼합물은 실온으로 냉각하고, 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 5-[1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 **dT.13** (34 mg, 13%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0413] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 8.26 (t, 1 H, J = 1.7 Hz, H-6), 8.05 (dd, 1 H, J = 1.6, 8.3 Hz, Ph-H), 8.02 (d, 1 H, J = 10.6 Hz, Ph-H), 7.60 (dd, 1 H, J = 1.1, 8.3 Hz, Ph-H), 6.26 (m, 1 H, H-1'), 5.03 (m, 1 H, PhCH), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.10 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.94 (m, 1 H, H-4'), 3.80 (m, 1 H, H-5'a), 3.74 (m, 1 H, H-5'b), 2.30 (m, 1 H, H-2'a), 2.20 (m, 1 H, H-2'b), 1.50 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>).

[0414] 5-{1-(4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐)에틸옥시메틸}-2'-데옥시우리딘 (**dT.14**)

[0415] 무수성 DMF (1.5 ml)에 녹인 화합물 **dT.13** (52 mg, 0.1 mmol), N-프로파르길트리플루오로아세틸아마이드 (44 mg, 0.29 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (12 mg, 0.01 mmol), CuI (4 mg, 0.02 mmol)와 Et<sub>3</sub>N (27 μl, 0.2 mmol)의 용액은 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-[1-(4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 **dT.14** (41 mg, 76%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 밀랍 고체로 수득하였다.

[0416] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 11.36, 11.35(2 s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 10.11 (t, 1 H, J = 5.6 Hz, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 7.98 (s, 1 H, H-6), 7.88 (d, 1 H, J = 8.1 Hz, Ph-H), 7.78 (m, 2 H, Ph-H), 6.14 (t, J = 7.0 Hz, 1 H, H-1'), 5.25 (m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.01 (m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.98 (m, 1 H, PhCH), 4.33 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.24 (m, 1 H, H-3'), 4.00 (m, 1 H, H-5'a), 3.94 (m, 1 H, H-5'b), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.57 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.08 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b), 1.41 (d, J = 8.1 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>);

[0417] ES<sup>+</sup>MS (ESI): 579 [M+Na]<sup>+</sup>.

[0418] 5-{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸옥시메틸}-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (**dT.15**)

[0419] POCl<sub>3</sub> (10 μl, 0.11 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dT.14** (30 mg, 0.054 mmol)와 양자 스펠지 (17 mg, 0.08 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 추가의 POCl<sub>3</sub> (2.5 μl, 0.03 mmol)을 첨가하고 추가로 1시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.54 ml)에 녹인 비스-트리-n-부틸암모늄 피로포스페이트 (128 mg, 0.27 mmol)와 트리-n-부틸아민 (60 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서, 농축된 암모늄 수산화물 (5 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (30분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 **dT.15** (16 mg, 40%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 백색의 스펠모양 고체로 수득하였다.

[0420] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.01 (m, 1 H, Ph-H), 7.74 - 7.55 (m, 3 H, H-6과 Ph-H), 6.18과 6.12 (2 t,  $J = 6.4$  Hz, 1 H, H-1'), 5.11 (m, 1 H, PhCH), 4.53 (m, 1 H, H-3'), 4.37 (m, 1 H, H-4'), 4.20 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ 와 H-5'), 3.65 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 2.35 (m, 1 H, H-2'a), 2.25 (m, 1 H, H-2'b), 1.54 (d, 3 H,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{CH}_3$ );

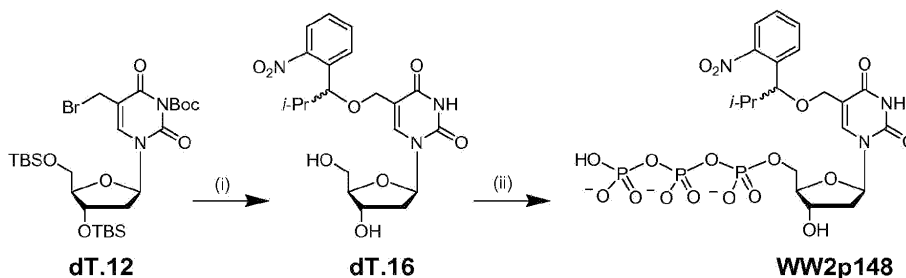
[0421] 부분입체이성질체에 대한  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -5.87 (d,  $J = 19.8$  Hz), -11.18과 -11.30 (2 d,  $J = 19.4$  Hz), -21.62 (t,  $J = 19.6$  Hz);

[0422] ToF-MS (ESI): 분자 이온  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{P}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 의 경우에, 계산된 질량은 723.0482이고, 관찰된 질량은 723.0497이었다.

[0423] 6-JOE 표지된 5-[1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸옥시메틸]-2'-데옥시-우리딘-5'-트리포스페이트 (WW2p113)

[0424] 무수성 DMSO (30  $\mu\text{l}$ )에 녹인 6-JOE-SE (0.75 mg, 1.2  $\mu\text{mol}$ )의 용액을  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  완충액 (0.1 M, pH 9.2; 200  $\mu\text{l}$ )에 녹인 트리포스페이트 dT.15 (0.56  $\mu\text{mol}$ )의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300  $\text{C}_{18}$  칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-JOE 표지된 트리포스페이트 WW2p113을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM TEAA; B, 물/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배로 용출을 수행하였다. WW2p113의 농도는 6-JOE 염료의 소광 계수 (즉, 520 nm에서 75,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0425] 5-[1-(2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (WW2p148)의 합성



[0426]

[0427] 개요. 5-[1-(2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0428] (i) 1-(2-니트로페닐)-2-메틸프로판올, 100-110 $^\circ\text{C}$ , 35분, 14%; (ii)  $\text{POCl}_3$ , 양자 스펀지,  $(\text{MeO})_3\text{PO}$ , 0 $^\circ\text{C}$ , 3시간;  $(n\text{-Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $n\text{-Bu}_3\text{N}$ , DMF; 1 M  $\text{HNEt}_3\text{HCO}_3$ , 1시간.

[0429] 5-[1-(2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 (dT.16)

[0430] 화합물 dT.12 (0.316 g, 0.486 mmol)와 1-(2-니트로페닐)-2-메틸프로판올 (0.706 g, 3.62 mmol)은 질소 대기 하에 100-110 $^\circ\text{C}$ 에서 35분 동안 순수하게 가열하였다. 혼합물은 실온으로 냉각하고, 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 5-[1-(2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 dT.16 (30 mg, 14%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다.

[0431] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  11.33과 11.34 (2 br s, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, NH), 7.95 (m, 1 H, Ph-H), 7.83 (m, 1 H, Ph-H), 7.72 (m, 1 H, Ph-H), 7.68 (m, 1 H, H-6), 7.54 (m, 1 H, Ph-H), 6.14 (m, 1 H, H-1'), 5.26 (d, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 3'-OH), 4.97 (m, 1 H, 1 H  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 5'-OH), 4.66 (m, 1 H, CH), 4.22 (m, 1 H, H-3'), 3.98 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.55 (m, 2 H, H-5'), 2.08 (m, 2 H, H-2'), 1.72 (m, 1 H, CH), 0.85 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.80 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ );

[0432] 부분입체이성질체에 대한  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.04 (C), 152.20/151.09 (C), 141.19/141.04 (CH), 139.28 (C), 138.05 (C), 134.08 (CH), 130.57/130.51 (CH), 129.60 (CH), 125.25/125.19 (CH), 112.62/112.43 (C), 89.12 (CH)/86.64 (CH), 82.72/82.40 (CH), 72.45 (CH), 65.78/65.61 ( $\text{CH}_2$ ), 63.01 ( $\text{CH}_2$ ), 41.50/41.45 ( $\text{CH}_2$ ), 36.21 (CH), 26.68 (CH), 19.85/19.80 ( $\text{CH}_3$ ), 18.20/18.14 ( $\text{CH}_3$ );

[0433] 5-[1-(2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (WW2p148)

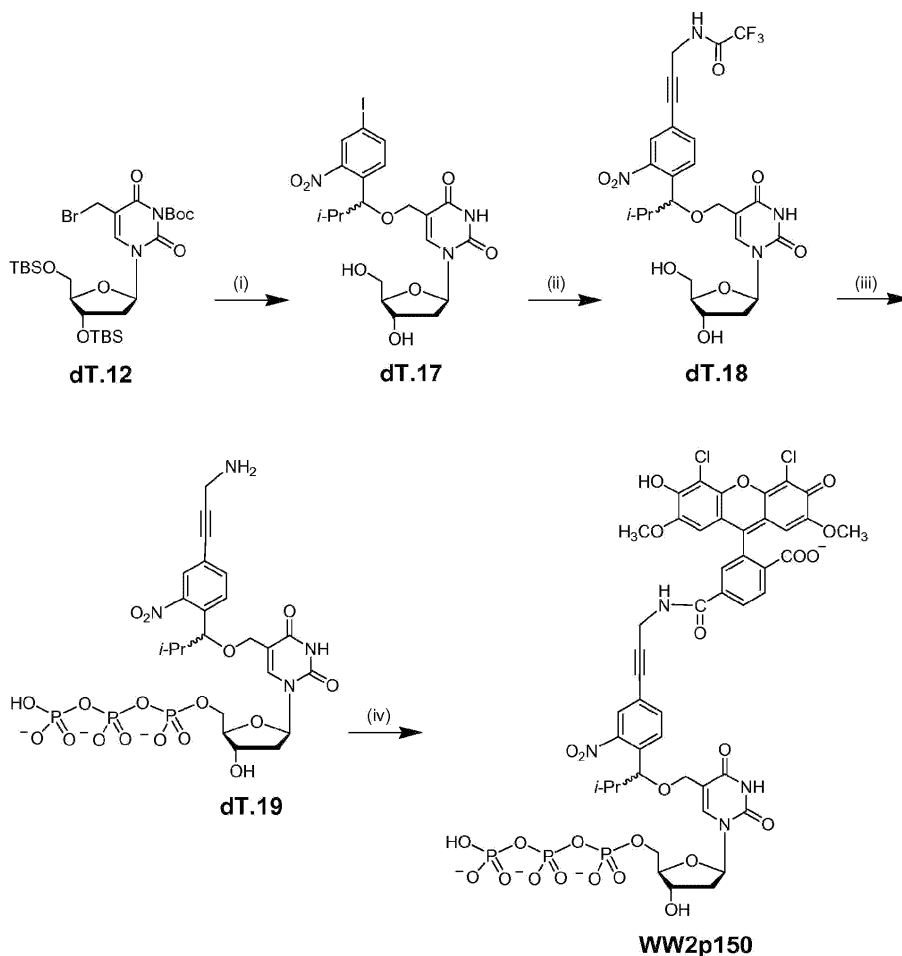
[0434]  $\text{POCl}_3$  (13  $\mu\text{l}$ , 0.17 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dt.16** (30 mg, 0.07 mmol)과 양자 스펜지 (30 mg, 0.14 mmol)의 용액에 첨가하고 3시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.7 ml)에 녹인 트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (166 mg, 0.35 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (70  $\mu\text{l}$ )의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 용액의 일부는 4.5 ml/min의 유속에서  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 의 선형 구배 (240분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 5-[1-(2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 **WW2p148** (부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

[0435] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.93 (m, 1 H, Ph-H), 7.74-7.64 (m, 3 H, H-6과 Ph-H), 7.52 (m, 1 H, Ph-H), 6.19과 6.13 (2 t,  $J = 6.6$  Hz, 1 H, H-1'), 4.55 (m, 1 H, H-3'), 4.40 (m, 1 H, H-4'), 4.21 (m, 4 H,  $\text{CH}_2$ 와 H-5'), 2.38 - 2.22 (m, 2 H, H-2'), 1.99 (m, 1 H, CH), 1.01 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.78 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).

[0436] 부분입체이성질체에 대한  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -5.26 (d,  $J = 20.1$  Hz), -10.66과 -10.72 (2 d,  $J = 19.6$  Hz), -21.17 (t,  $J = 19.6$  Hz).

[0437] *ToF-MS* (ESI): 분자 이온  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{17}\text{P}_3$  [M-H]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 674.0553이고, 관찰된 질량은 674.0470이었다.

[0438] 6-JOE 표지된 5-{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (WW2p150)의 합성



[0439]

[0440]

**개요.** 6-JOE 표지된 5-{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2-(메틸)프로필옥시메틸}-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0441]

(i) 1-(4-요오도-2-니트로페닐)-2-메틸프로판올, 순수, 108℃, 45분, 18%; (ii) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(0), CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수형 DMF, 4.5시간, 99%; (iii) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펜지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0℃, 3시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; (iv) 6-JOE-SE, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (pH 9.2), 1시간.

[0442]

5-[1-(4-요오도-2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 (**dT.17**)

[0443]

화합물 **dT.12** (400 mg, 0.615 mmol)와 1-(4-요오도-2-니트로페닐)-2-메틸에탄올 (800 mg, 2.49 mmol)은 질소 대기 하에 108℃에서 45분 동안 순수하게 가열하였다. 혼합물은 실온으로 냉각하고, 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 5-[1-(4-요오도-2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 **dT.17** (64 mg, 18%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0444]

부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 8.22 (m, 1 H, H-6), 8.02 (m, 2 H, Ph-H), 7.49 (m, 1 H, Ph-H), 6.22 (m, 1 H, H-1'), 4.69 (m, 1 H, CH), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.10 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.92 (m, 1 H, H-4'), 3.75 (m, 2 H, H-5'a), 2.17 (m, 1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b), 1.90 (m, 1 H, CH), 0.92 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>), 0.85 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>);

[0445] 부분입체이성질체에 대한  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  165.11 (C), 152.16/151.18 (C), 143.12 (CH), 141.44/141.32 (CH), 137.91/137.88 (C), 133.83/133.77 (CH), 132.37/132.33 (CH), 130.80/129.67 (C), 112.40/112.24 (C), 92.75 (C), 89.12 (CH)/86.90 (CH), 82.43/82.18 (CH), 72.39/72.37 (CH), 65.83/65.70 ( $\text{CH}_2$ ), 62.96 ( $\text{CH}_2$ ), 41.56/41.49 ( $\text{CH}_2$ ), 36.01 (CH), 27.83/26.37 (CH), 19.82/19.78 ( $\text{CH}_3$ ), 17.91/17.88 ( $\text{CH}_3$ );

[0446] 5-{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2-(메틸)]프로필옥시메틸}-2'-데옥시우리딘 (dT. 18)

[0447] 무수성 DMF (1.5 ml)에 녹인 화합물 dT.17 (60 mg, 0.107 mmol), *N*-프로파르길-트리플루오로아세틸아마이드 (48.5 mg, 0.321 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (12.4 mg, 0.01 mmol), CuI (4 mg, 0.02 mmol)와  $\text{Et}_3\text{N}$  (30  $\mu\text{l}$ , 0.214 mmol)의 용액은 실온에서 4.5시간 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-[1-(4-{3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐}-2-니트로페닐)-2-(메틸)프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 dT.18 (62 mg, 99%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0448] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11.36, 11.35(2 s, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능,  $\text{N}^3\text{-H}$ ), 10.11 (t, 1 H,  $J = 5.3$  Hz,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, NHTFA), 7.99 (m, 1 H, H-6), 7.86 (m, 1 H, Ph-H), 7.75 (m, 1 H, Ph-H), 7.65 (m, 1 H, Ph-H), 6.12 (m, 1 H, H-1'), 5.26 (m, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 3'-OH), 4.97 (m, 1 H,  $\text{D}_2\text{O}$  교체가능, 5'-OH), 4.62 (m, 1 H, CH), 4.31 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 4.30 (m, 1 H, H-3'), 3.98 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.55 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.08 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b), 1.77 (m, 1 H, CH), 0.82 (m, 6 H, 2  $\text{CH}_3$ );

[0449] 5-{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2-(메틸)프로필옥시메틸}-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (dT. 19)

[0450]  $\text{POCl}_3$  (8  $\mu\text{l}$ , 0.09 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.3 ml)에 녹인 화합물 dT.18 (34 mg, 0.06 mmol)과 양자 스펜지 (26 mg, 0.12 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 추가의  $\text{POCl}_3$  (4  $\mu\text{l}$ , 0.045 mmol)을 첨가하고 추가로 1시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.6 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (142 mg, 0.3 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (60  $\mu\text{l}$ )의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서, 농축된 암모늄 수산화물 (5 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 용액의 일부는 4.5 ml/min의 유속에서  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 의 선형 구배 (240분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 dT.19 (부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

[0451] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.06과 8.04 (2 s, 1 H, Ph-H), 7.78 (m, 1 H, Ph-H), 7.69 - 7.59 (m, 2 H, H-6과 Ph-H), 6.13 (m, 1 H, H-1'), 4.55 (m, 1 H, H-3'), 4.46과 4.34 (2 d, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 4.20 (m, 3 H, H-4'와 H-5'), 3.87과 3.83 (2 s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 2.40 - 2.20 (m, 2 H, H-2'), 1.99 (m, 1 H, CH), 1.02 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.79 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ );



[0458] **개요.** 6-JOE 표지된 5- $\{(R \text{ 또는 } S)\text{-}1\text{-}[4\text{-}(3\text{-아미노-1-프로피닐})\text{-}2\text{-니트로페닐}]\text{-}2\text{-}(메틸)프로필옥시메틸}\text{-}2'\text{-데옥시우리딘-}5'\text{-트리포스페이트}$ 의 합성. (i) (S 또는 R)-1-(4-요오도-2-니트로페닐)-2-메틸프로판올, 순수, 108 °C, 45분, 20%; (ii) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0), CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수성 DMF, 4.5시간, 81%; (iii) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펜지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 2시간; (iv) 6-JOE-SE, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (pH 9.2), 1시간.

[0459] 5- $[(R \text{ 또는 } S)\text{-}1\text{-}(4\text{-요오도-}2\text{-니트로페닐})\text{-}2\text{-}(메틸)프로필옥시메틸}]\text{-}2'\text{-데옥시우리딘}$  (**dT.20**)

[0460] 화합물 **dT.12** (143 mg, 0.22 mmol)와 광학-순도(enantio-pure) (S 또는 R)-1-(4-요오도-2-니트로페닐)-2-메틸프로판올 (282 mg, 0.88 mmol, 절대 배율은 결정되지 않음)은 질소 대기 하에 108°C에서 45분 동안 순수하게 가열하였다. 혼합물은 실온으로 냉각하고, 에틸 아세테이트에 용해시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 5- $[(R \text{ 또는 } S)\text{-}1\text{-}(4\text{-요오도-}2\text{-니트로페닐})\text{-}2\text{-}(메틸)프로필옥시메틸}]\text{-}2'\text{-데옥시우리딘}$  **dT.20** (25 mg, 20%, 절대 배율은 결정되지 않음)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0461] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>) δ 8.22 (d, 1 H, J = 1.8 Hz, H-6), 8.01 (m, 2 H, Ph-H), 7.50 (d, 1 H, J = 8.3 Hz, Ph-H), 6.25 (t, 1 H, J = 7.2 Hz, H-1'), 4.69 (d, 1 H, J = 5.8 Hz, PhCH), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.10 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.92 (m, 1 H, H-4'), 3.75 (m, 2 H, H-5'a), 2.17 (m, 1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b), 1.90(m, 1 H, CH), 0.92 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>), 0.85 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>);

[0462] 5- $\{(R \text{ 또는 } S)\text{-}1\text{-}[4\text{-}(3\text{-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐})\text{-}2\text{-니트로페닐}]\text{-}2\text{-}(메틸)\text{-}프로필옥시메틸}\text{-}2'\text{-데옥시우리딘}$  (**dT. 21**)

[0463] 무수성 DMF (1.5 ml)에 녹인 화합물 **dT.20** (24 mg, 0.043 mmol), *N*-프로파르길-트리플루오로아세틸아마이드 (28 mg, 0.186 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (7.2 mg, 0.006 mmol), CuI (2.4 mg, 0.012 mmol)와 Et<sub>3</sub>N (17 μl, 0.124 mmol)의 용액은 실온에서 4.5시간 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5- $\{(R \text{ 또는 } S)\text{-}1\text{-}[4\text{-}(3\text{-트리플루오로-아세트아미도-1-프로피닐})\text{-}2\text{-니트로페닐}]\text{-}2\text{-}(메틸)프로필옥시메틸}\text{-}2'\text{-데옥시우리딘}$  **dT.21** (19.8 mg, 81%, 절대 배율은 결정되지 않음)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0464] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 8.01 (br s, 1 H, H-6), 7.95 (d, 1 H, J = 1.2 Hz, Ph-H), 7.72 (m, 2 H, Ph-H), 6.25 (t, 1 H, J = 6.7 Hz, H-1'), 4.74 (d, 1 H, J = 5.8 Hz, PhCH), 4.38 (m, 1 H, H-3'), 4.34 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 4.05 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.55 , 3.93 (m, 1 H, H-4'), 3.77 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.15 (m, 2 H, H-2'a와 H-2'b), 1.90 (m, 1 H, CH), 0.92 (m, 6 H, 2 x CH<sub>3</sub>);

[0465] 5-  $\{(R \text{ 또는 } S)\text{-}1\text{-}[4\text{-}(3\text{-아미노-1-프로피닐})\text{-}2\text{-니트로페닐}]\text{-}2\text{-}(메틸)\text{-}프로필옥시메틸}\text{-}2'\text{-데옥시우리딘-}5'\text{-트리포스페이트}$  (**dT.22**)

[0466] POCl<sub>3</sub> (6 μl, 0.06 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.3 ml)에 녹인 화합물 **dT.21** (18 mg, 0.03 mmol)과 양자 스펜지 (13 mg, 0.06 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.3 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (73 mg, 0.15 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (30 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 5 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (5 ml)에 용해시키고, 여과하고, 용액의 일부는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 5- $\{(R \text{ 또는 } S)\text{-}1\text{-}[4\text{-}(3\text{-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐})\text{-}2\text{-니트로페닐}]\text{-}2\text{-}(메틸)프로필옥시메틸}\text{-}2'\text{-데옥시우리딘-}5'\text{-트리포스페이트}$ 를 얻었다.

이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. 정제된 트리포스페이트는 이후, 실온에서 2시간 동안, 농축된 암모늄 수산화물 (27%; 0.5 ml)로 처리하여 5-((R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2-(메틸)-프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (**dT.22**, 절대 배열은 결정되지 않음)를 수득하였다.

[0467] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.01 (s, 1 H, Ph-H), 7.76 (d, 1 H, J = 6.9 Hz, Ph-H), 7.62 (m, 2 H, H-6과 Ph-H), 6.17 (t, 1 H, J = 6.4 Hz, H-1'), 4.55 (m, 1 H, H-3'), 4.39와 4.29 (2 d, 2 H, J = 6.4 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.17 (m, 3 H, H-4'와 H-5'), 3.74 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.28 (m, 2 H, H-2'), 2.00 (m, 1 H, CH), 0.79 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>);

[0468] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -5.40 (d, J = 19.4 Hz), -10.75 (d, J = 19.4 Hz), -21.23 (t, J = 19.4 Hz).

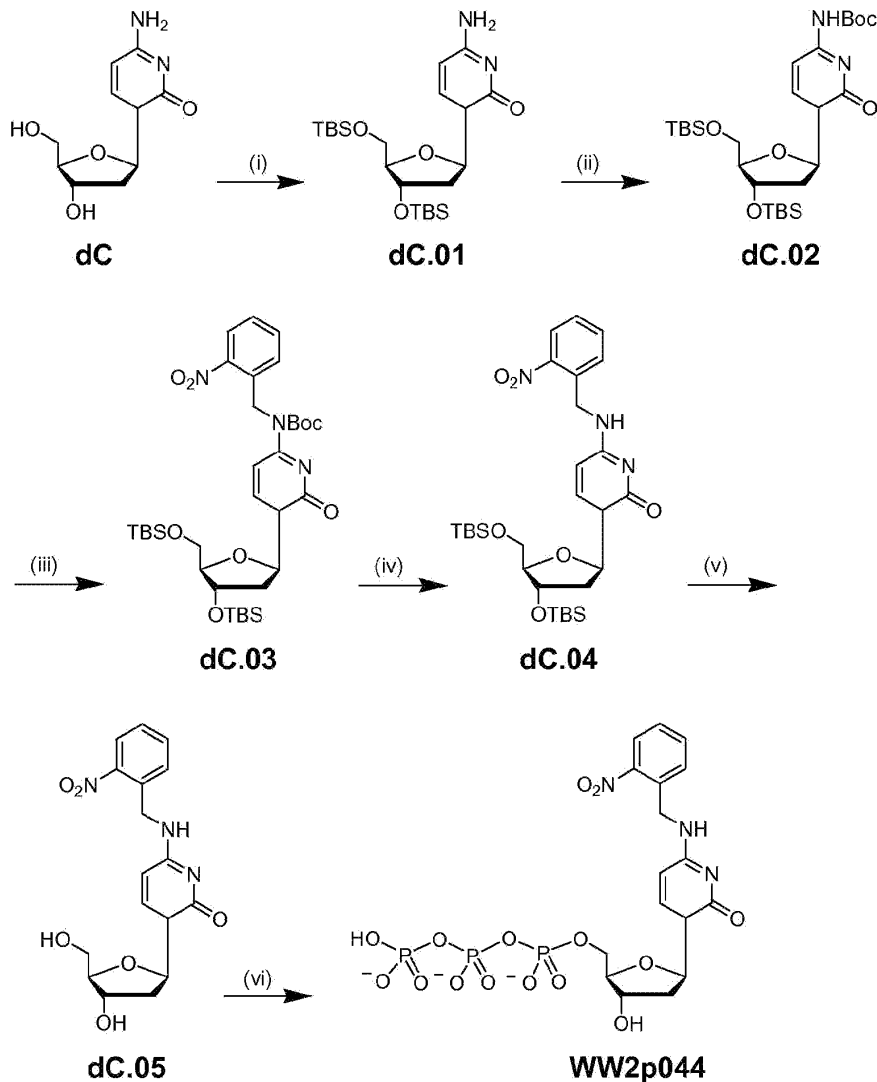
[0469] 6-JOE 표지된 5-((R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]-2-(메틸)-프로필옥시메틸]-2'-데옥시우리딘-5'-트리포스페이트 (**WW3p024**)

[0470] 무수성 DMSO (25 μl)에 녹인 6-JOE-SE (0.625 mg, 1 μmol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 180 μl)에 녹인 트리포스페이트 **dT.22** (0.31 μmol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-JOE 표지된 트리포스페이트 **WW3p024**를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM TEAA; B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW3p024**의 농도는 6-JOE 염료의 소광 계수 (즉, 520 nm에서 75,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0471] 실시예 3: dC 화합물

[0472]

*N*<sup>4</sup>-(2-니트로벤질)-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (WW2p044)의 합성



[0473]

[0474]

개요. *N*<sup>4</sup>-(2-니트로벤질)-2'-데옥시시티딘 트리포스페이트의 합성.

[0475]

(i) TBSCl, 이미다졸, 무수성 DMF, 실온, 하룻밤, 84%; (ii) Boc<sub>2</sub>O, DMAP, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 실온, 하룻밤, 56%; (iii) 2-니트로벤질 브롬화물, NaH, 무수성 DMF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 하룻밤, 37%; (iv) SiO<sub>2</sub>, 진공, 70-80°C, 48시간, 79%; (v) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 2시간, 59%; (vi) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간, 52%.

[0476]

3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 (**dC.01**)

[0477]

2'-데옥시시티딘 **dC** (2.85 g, 12.54 mmol), 이미다졸 (6.49 g, 95.31 mmol)과 TBSCl (7.18 g, 47.65 mmol)은 무수성 DMF (27 ml)에 첨가하고 N<sub>2</sub> 대기 하에 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 메탄올 (20 ml)을 첨가하고, 혼합물은 30분 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하였다. 이후, 에틸 아세테이트 (60 ml)와 물 (60 ml)을 첨가하였다. 유기층은 분리하고 물 (20 ml)로 2회 세척하고, 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (20 ml)로 추출하였다. 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 **dC.01** (4.79 g, 84%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0478]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.95 (d, 1 H,  $J = 7.4$  Hz, H-6), 6.26 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz, H-1'), 5.69 (d, 1 H,  $J = 7.4$  Hz, H-5), 4.37 (m, 1 H, H-3'), 3.90 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.76 (m, 1 H, H-5'b), 2.40 (m, 1 H, H-2'a), 2.08 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.87 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.10 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0.05 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0479]  $N^{\#}$ -*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 (**dC.02**)

[0480] 질소 대기 하에, 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml)에 녹인 디-*tert*-부틸디카보네이트 (0.34 g, 1.58 mmol)의 용액을 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml)에 녹인 화합물 **dC.01** (0.5 g, 1.10 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.15 ml, 1.10 mmol)과 DMAP (0.13 g, 1.10 mmol)의 용액에 천천히 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 하룻밤동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^{\#}$ -*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 **dC.02** (0.34 g, 56%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0481]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.30 (d, 1 H,  $J = 7.4$  Hz H-6), 7.47 (bs, 1 H, NH), 7.14 (d, 1 H,  $J = 7.4$  Hz, H-5), 6.25 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz, H-1'), 4.38 (m, 1 H, H-3'), 3.95 (m, 2H, H-4'와 H-5'a), 3.78 (m, 1 H, H-5'), 2.50 (m, 1 H, H-2'a), 2.10 (m, 1 H, H-2'b), 1.51 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 0.93 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.88 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.11 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0.06 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0482]  $N^{\#}$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^{\#}$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 (**dC.03**)

[0483] NaH (32 mg, 1.26 mmol, 건성)를 0°C에서, 무수성 DMF (6 ml)에 녹인 화합물 **dC.02** (540 mg, 0.97 mmol)의 용액에 첨가하고 질소 대기 하에 30분 동안 교반하였다. 무수성 DMF (1.5 ml)에 녹인 2-니트로벤질 브롬화물 (313 mg, 1.45 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 하룻밤동안 교반하였다. 에틸 아세테이트 (60 ml)의 첨가후, 혼합물은 포화된  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액 (40 ml)으로 3회 세척하고, 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (40 ml)로 추출하였다. 모아진 유기층은  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^{\#}$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^{\#}$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 **dC.03** (250 mg, 37%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0484]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.29 (d, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, H-6), 8.05 (d, 1 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.53 (t, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, Ph-H), 7.38 (t, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, Ph-H), 7.28 (m, 2 H, Ph-H와 H-5), 6.26 (t, 1 H,  $J = 5.6$  Hz, H-1'), 5.60 (q, 2 H, Ph- $\text{CH}_2$ ), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.80 (m, 1 H, H-5'b), 2.51 (m, 1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b), 1.28 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 0.95 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.88 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.14 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0.07 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0485]  $N^{\#}$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 (**dC.04**)

[0486] 실리카 겔 60 (2.5 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 50-60°C로 가열함으로써 활성화됨)을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml)에 녹인 화합물 **dC.03** (250 mg, 0.36 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 감압 하에 48시간 동안 60-70°C로 가열하고, MeOH (30 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하

였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 **dC.04** (0.185 g, 79%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0487]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.02 (d, 1 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.92 (d, 1 H,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 7.79 (d, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, Ph-H), 7.57 (t, 1 H,  $J = 7.3$  Hz, Ph-H), 7.41 (t, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, Ph-H), 6.38 (bs, 1 H, NH), 6.26 (t, 1 H,  $J = 5.2$  Hz, H-1'), 5.68 (d, 1 H,  $J = 7.2$  Hz, H-5), 4.92 (m, 2 H, Ph- $CH_2$ ), 4.36 (m, 1 H, H-3'), 3.88 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.75 (m, 1 H, H-5'b), 2.39 (m, 1 H, H-2'a), 2.07 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 9 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.87 (s, 9 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.09 (s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ ), 0.05 (s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ ).

[0488]  $N^4$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시시티딘 (**dC.05**)

[0489] THF (1.4 ml)에 녹인 *n*-NBu<sub>4</sub>F (190 mg, 0.73 mmol)의 용액을 질소 대기 하에 0°C에서, THF (3.4 ml)에 녹인 화합물 **dC.04** (170 mg, 0.29 mmol)의 용액에 방울방울 첨가하였다. 반응 혼합물은 2시간 동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시시티딘 **dC.05** (62 mg, 59%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0490]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  8.23 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.07 (d, 1 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.83 (d, 1 H,  $J = 7.4$  Hz, H-6), 7.74 (t, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, Ph-H), 7.54 (m, 2 H, Ph-H), 6.13 (t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 5.91 (d, 1 H,  $J = 7.4$  Hz, H-5), 5.19 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 4.97 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.78 (m, 2 H, Ph- $CH_2$ ), 4.19 (m, 1 H, H-3'), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 3.55 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.09 (m, 1 H, H-2'a), 1.93 (m, 1 H, H-2'b);

[0491]  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  165.71, 158.51, 149.70, 141.75, 135.09, 134.73, 131.30, 129.43, 125.94, 96.75, 88.83, 87.57, 72.03, 62.78, 42.71, 42.00.

[0492]  $N^4$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (**WW2p044**)

[0493]  $POCl_3$  (17  $\mu$ l, 0.2 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dC.05** (36 mg, 0.1 mmol)와 양자 스펀지 (32 mg, 0.15 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 추가의  $POCl_3$  (9  $\mu$ l, 0.1 mmol)을 첨가하고 추가로 1시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (1 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (100  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서  $NH_4HCO_3$ 의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 **WW2p044** (34 mg, 52%)를 백색의 스펀지모양 고체로 수득하였다.

[0494]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  8.12 (d, 1 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.83 (d, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, H-6), 7.69 (t, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, Ph-H), 7.60 (d, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, Ph-H), 7.53 (t, 1 H,  $J = 8.0$ 과 7.6 Hz, Ph-H), 6.29 (t,

1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 6.15 (d, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, H-5), 4.85 (bs, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.58 (m, 1 H, H-3'), 4.21 (m, 3 H, H-4', H-5'a와 H-5'b), 2.38 (m, 1 H, H-2'a), 2.28 (m, 1 H, H-2'b);

[0495]

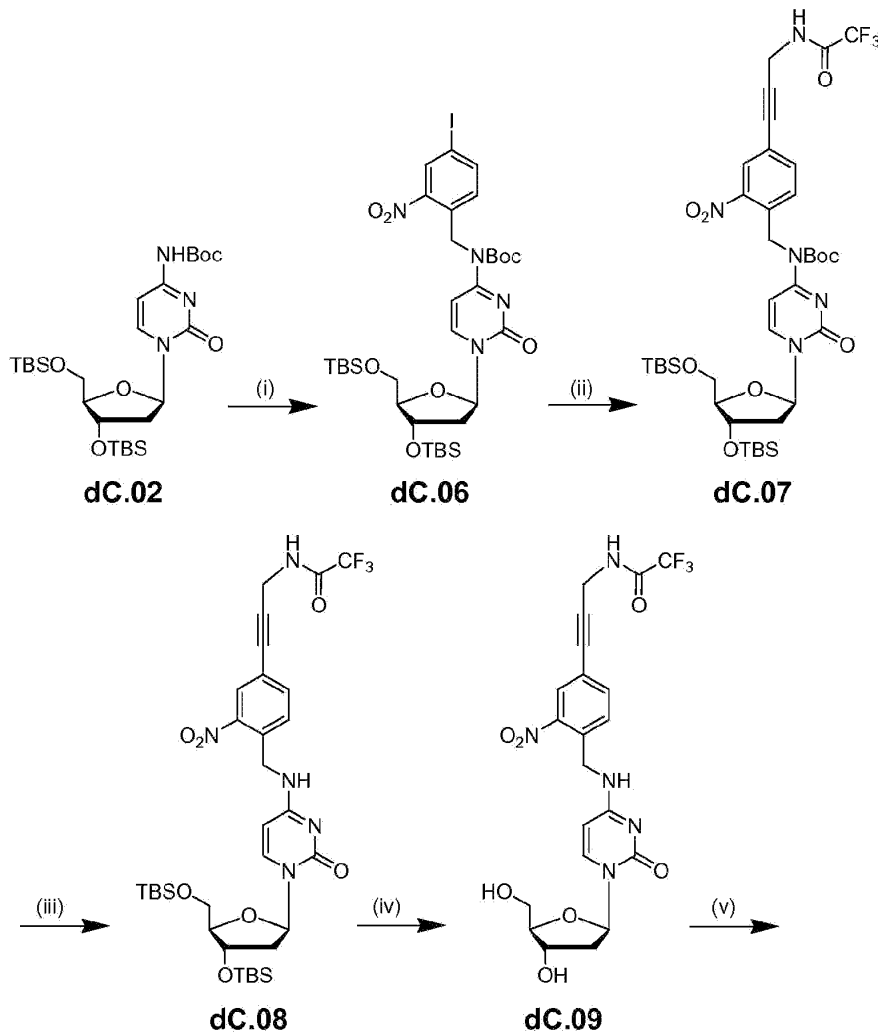
<sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -5.61 (d,  $J = 15.9$  Hz), -10.60 (d,  $J = 15.4$  Hz), -19.26 (br);

[0496]

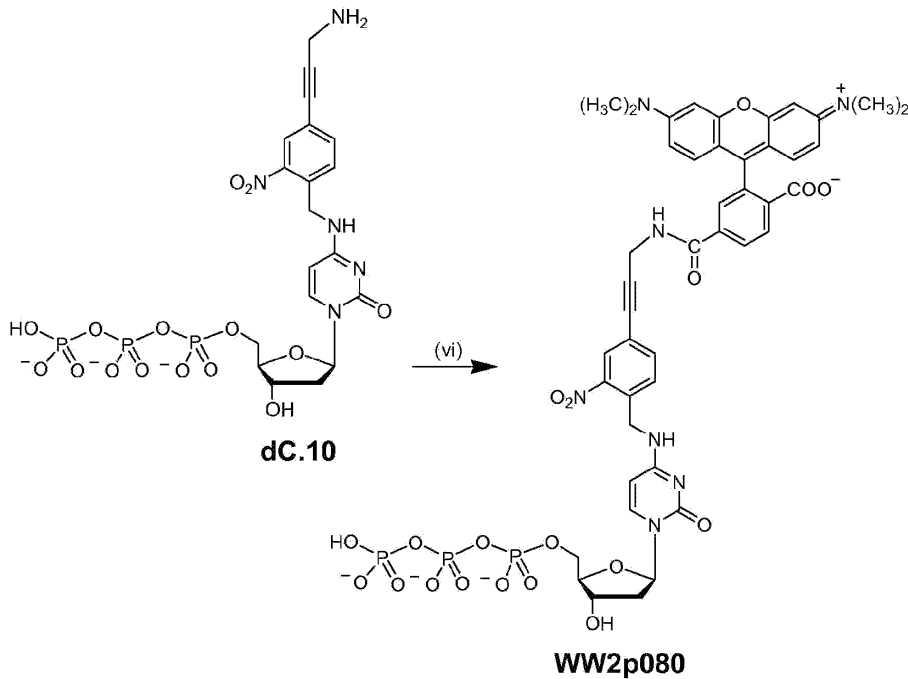
ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 625.0114이고, 관찰된 질량은 624.9993이었다.

[0497]

N<sup>4</sup>-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (WW2p080)의 합성과 염료 표지 (labeling)



[0498]



[0499]

[0500] **개요.** 6-TAMRA 표지된 *N*<sup>4</sup>-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성.

2'-데옥시시티딘-5'-트리포스

[0501]

(i) 4-요오도-2-니트로벤질 브롬화물, *n*-Bu<sub>4</sub>NBr, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1 M NaOH, 실온, 4시간, 45%; (ii) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, PdC<sub>12</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, THF, 환류, 3시간, 82%; (iii) SiO<sub>2</sub>, 진공, 70-80°C, 48시간, 81%; (iv) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 2시간, 이후 실온 하룻밤, 39%; (v) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; 39%; (vi) 6-TAMRA-SE, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (pH 9.2), 1시간.

[0502]

*N*<sup>4</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>4</sup>-(4-요오도-2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 (**dC. 06**)

[0503]

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 ml)에 녹인 4-요오도-2-니트로벤질 브롬화물 (461 mg, 1.35 mmol)의 용액을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 ml)와 NaOH (1 M; 4.5 ml)에 녹인 화합물 **dC.02** (250 mg, 0.45 mmol)와 *n*-Bu<sub>4</sub>NBr (145 mg, 0.45 mmol)의 혼합물에 방울방울 첨가하였다. 반응물은 실온에서 4시간 동안 활발하게 교반하였다. 유기층은 분리하고, 수층은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (각 4 ml)로 2회 추출하였다. 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>4</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>4</sup>-(4-요오도-2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 **dC.06** (167 mg, 45%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0504]

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.37 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz, Ph-H), 8.30 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz, H-6), 7.82 (dd, 1 H, *J* = 1.8 Hz와 8.3 Hz, Ph-H), 7.26 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz, H-5), 6.99 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz, Ph-H), 6.24 (dd, 1 H, *J* = 6.3과 5.0 Hz, H-1'), 5.52 (q, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 3.96 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.80 (m, 1 H, H-5'b), 2.51 (m, 1 H, H-2'a), 2.14 (m, 1 H, H-2'b), 1.34 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.95 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.89 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.14 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>)Si), 0.13 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>)Si), 0.08 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>)Si), 0.07 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>) Si).

- [0505]  $N^4$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^4$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 (**dC.07**)
- [0506] 질소 대기 하에, 무수성 THF (3 ml)에 녹인 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 이염화물 (41 mg, 0.058 mmol)의 용액을 무수성 THF (7 ml)에 녹인 화합물 **dC.06** (315 mg, 0.39mmol), CuI (15 mg, 0.078 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.73 ml, 5.2 mmol)과 *N*-프로파르길트리플루오로아세트아미드 (82 mg, 0.54 mmol)의 혼합물에 빠르게 첨가하였다. 반응 혼합물은 2시간 동안 환류시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^4$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 **dC.07** (268 mg, 82%)을 백색 거품으로 수득하였다.
- [0507] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.33 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz, H-6), 8.03 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, Ph-H), 7.61 (bs, 1 H, NH), 7.50 (dd, 1 H, *J* = 1.5 Hz와 8.2 Hz, Ph-H), 7.32 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz, H-5), 7.18 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 6.24 (t, 1 H, *J* = 6.0 Hz, H-1'), 5.56 (q, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 4.42 (m, 1 H, H-3'), 4.35 (d, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.97 (m, 2 H, H-5'a와 H-4'), 3.80 (m, 1 H, H-5'b), 2.50 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 1.31 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.96 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.89 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.15 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>)Si), 0.14 (s, 3 H, (CH<sub>3</sub>)Si), 0.07 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
- [0508]  $N^4$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 (**dC. 08**)
- [0509] 실리카 겔 60 (3.1 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 50-60°C로 가열함으로써 활성화됨)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 ml)에 녹인 화합물 **dC.07** (305 mg, 0.36 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 감압 하에 24시간 동안 60-70°C로 가열하고, MeOH (30 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시시티딘 **dC.08** (219 mg, 81%)을 백색 거품으로 수득하였다.
- [0510] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.25 (bs, 1 H, N-H), 7.94 (d, 1 H, *J* = 7.4 Hz, H-6), 7.84 (s, 1 H, Ph-H), 7.62 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz, Ph-H), 7.41 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz, Ph-H), 6.25 (m, 2 H, N-H와 H-1'), 5.67 (d, 1 H, *J* = 7.3 Hz, H-5'), 4.83 (m, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.38 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>와 H-3'), 3.90 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.75 (m, 1 H, H-5'b), 2.36 (m, 1 H, H-2'a), 2.05 (m, 1 H, H-2'b), 0.90 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.87 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.08 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.05 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
- [0511]  $N^4$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시시티딘 (**dC. 09**)
- [0512] THF (2.5 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (94 mg, 0.36 mmol)의 용액을 N<sub>2</sub> 대기 하에 0°C에서, THF (1 ml)에 녹인 화합물 **dC.08** (200 mg, 0.27 mmol)의 용액에 방울방울 첨가하였다. 반응 혼합물은 0°C에서 2시간 동안, 이후 실온에서 하룻밤동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시시티딘 **dC.09** (54 mg, 39%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0513]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.12 (t, 1 H, N-H), 8.26 (t, 1 H, N-H), 8.08 (s, 1 H, Ph-H), 7.84 (d, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 7.78 (d, 1 H,  $J = 8.1$  Hz, Ph-H), 7.50 (d, 1 H,  $J = 8.1$  Hz, Ph-H), 6.13 (t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 5.91 (d, 1 H,  $J = 7.4$  Hz, H-5), 5.20 (d, 1 H, 3'-OH), 5.10 (t, 1 H, 5'-OH), 4.77 (d, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.35 (m, 1 H, H-3'), 4.31 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.80 (m, 1 H, H-4'), 3.55 (m, 2H, H-5'), 2.10 (m, 1 H, H-2'a), 1.92 (m, 1 H, H-2'b).

[0514]  $N^4$ -[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-테옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (dC.10)

[0515] POCl<sub>3</sub> (18  $\mu\text{l}$ , 0.2 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 dC.09 (49 mg, 0.1 mmol)와 양자 스펜지 (32 mg, 0.15 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (1 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (100  $\mu\text{l}$ )의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서, 농축된 암모늄 수산화물 (5 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 dC.10 (28 mg, 39%)을 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

[0516]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.22 (s, 1 H, Ph-H), 7.88 (d, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, H-6), 7.74 (d, 1 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.59 (d, 1 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 6.33 (t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 6.18 (d, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, H-5), 4.61 (m, 1 H, H-3'), 4.24 (m, 3 H, H-4', H-5'), 3.63 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.42 (m, 1 H, H-2'a), 2.29 (m, 1 H, H-2'b);

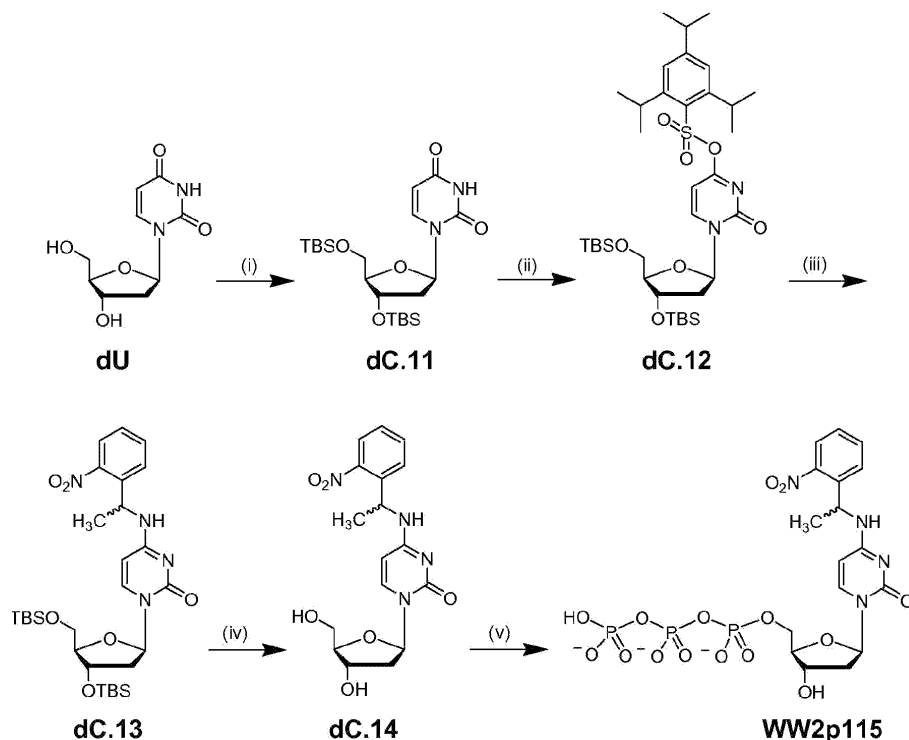
[0517]  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -5.88 (d,  $J = 15.6$  Hz), -10.69 (d,  $J = 15.6$  Hz), -19.25 (t,  $J = 15.6$  Hz);

[0518] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 676.0223이고, 관찰된 질량은 676.0563이었다.

[0519] 6-TAMRA 표지된  $N^4$ -[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-테옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (WW2p080)

[0520] 무수성 DMSO (30  $\mu\text{l}$ )에 녹인 6-TAMRA-SE (0.75 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ )의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 0.3 ml)에 녹인 트리포스페이트 dC.10 (1.6  $\mu\text{mol}$ )의 용액에 첨가하고 실온에서 30분 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-TAMRA 표지된 트리포스페이트 WW2p080을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. WW2p080의 농도는 6-TAMRA 염료의 소광 계수 (즉, 555 nm에서 65,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0521]  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-테옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (WW2p115)의 합성



[0522]

[0523] **개요.**  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-테옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0524] (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 3시간, 92%; (ii) TPSCl, DMAP,  $CH_2Cl_2$ , 실온, 88%; (iii) 1-(2-니트로페닐)에틸아민 **dC.13c**, DMF, 90°C, 1.5시간, 39%; (iv) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 2시간, 이후 실온, 1시간, 90%; (v) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간.

[0525] 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시우리딘 (**dC.11**)

[0526] 질소 대기 하에, 무수성 DMF (25 ml)에 녹인 2'-테옥시우리딘 **dU** (2.5 g, 10.95 mmol), TBSCl (7.26 g, 48.2 mmol)와 이미다졸 (6.56 g, 96.4 mmol)의 혼합물은 0°C에서 2시간 동안 교반하고, 이후 1시간 동안 실온으로 데웠다. 반응 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시우리딘 **dC.11** (4.62 g, 92%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0527] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.48 (s, 1 H, NH), 7.80 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, H-6), 6.19 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.59 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, H-5), 4.31 (m, 1 H, H-3'), 3.81 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.65 (m, 1 H, H-5'b), 2.21 (m, 1 H, H-2'a), 1.97 (m, 1 H, H-2'b), 0.81 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.79 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.00 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), -0.02 (2s, 각각 3 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0528]  $O^4$ -(2,4,6-트리이소프로필벤젠설포닐)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시우리딘 (**dC.12**)

[0529] 2,4,6-트리이소프로필벤젠설포닐 염화물 (660 mg, 2.19 mmol)을 질소 대기 하에, 무수성  $CH_2Cl_2$  (6 ml)에 녹인 화합물 **dC.11** (500 mg, 1.09 mmol), DMAP (6.7 mg, 촉매량)와 Et<sub>3</sub>N (0.62 ml, 4.38 mmol)의 용액에

첨가하였다. 반응 혼합물은 실온에서 하룻밤동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $O^4$ -(2,4,6-트리아이소프로필벤젠설폰닐)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시우리딘 **dC.12** (690 mg, 88%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0530]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.46 (d, 1 H,  $J = 7.3$  Hz, H-6), 7.20 (s, 2 H, Ph-H), 6.08 (dd, 1 H,  $J = 4.3$  Hz, H-1'), 6.01 (d, 1 H,  $J = 7.3$  Hz, H-5), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (m, 2 H, CH), 3.94 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.76 (m, 1 H, H-5'b), 2.91 (m, 1 H, CH), 2.48 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b), 1.31 (d, 6 H,  $CH_3$ ), 1.26 (dd, 12 H,  $CH_3$ ), 0.91 (s, 9 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.86 (s, 9 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.10과 0.09 (2 s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ ), 0.04 (s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ ).

[0531]  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시시티딘 (**dC.13**)

[0532] 무수성 DMF (3 ml)에 녹인 화합물 **dC.12** (410 mg, 0.56 mmol)와 1-(2-니트로페닐)에틸아민 **dC.13c** (470 mg, 2.82 mmol)의 용액은 1.5시간 동안 90°C로 가열하고, 이후 진공에서 농축하였다. 잔류물은  $CH_2Cl_2$  (50 ml)에 용해시키고, 포화된  $NH_4Cl$  용액 (30 ml), 물 (30 ml)과 포화된  $NaHCO_3$  용액 (30 ml)으로 세척하였다. 유기층은  $Na_2SO_4$ 로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시시티딘 **dC.13** (130 mg, 39%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0533] 부분입체이성질체에 대한  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.97 (m, 1 H, Ph-H), 7.89 (d, 1 H,  $J = 7.1$  Hz, H-6), 7.65 (m, 2 H, Ph-H), 7.41 (m, 1 H, Ph-H), 6.19 (m, 1 H, H-1'), 5.91 (m, 1 H, H-5), 5.37 (m, 1 H, Ph-CH), 4.34 (m, 1 H, H-3'), 3.86 (m, 2 H, H-4'와 H-5'a), 3.72 (m, 1 H, H-5'b), 2.05 (m, 1 H, H-2'a), 1.83 (m, 1 H, H-2'b), 1.59 (bs, 3 H,  $CH_3$ ), 0.86 (s, 12 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.03 (s, 12 H,  $(CH_3)_2Si$ ).

[0534]  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-테옥시시티딘 (**dC.14**)

[0535] THF (3 ml)에 녹인  $n-Bu_4NF$  (142 mg, 0.54 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (2 ml)에 녹인 화합물 **dC.13** (130 mg, 0.22 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 0°C에서 2시간 동안, 이후 실온에서 1시간 동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-테옥시시티딘 **dC.14** (80 mg, 90%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 백색 분말로 수득하였다.

[0536] 부분입체이성질체에 대한  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  7.95 (m, 2 H, Ph-H와 H-5), 7.65 (m, 2 H, Ph-H), 7.45 (m, 1 H, Ph-H), 6.22 (m, 1 H, H-1'), 5.97 (m, 1 H, H-5), 5.74 (m, 1 H, Ph-CH), 4.34 (m, 1 H, H-3'), 3.93 (m, 1 H, H-4'), 3.75 (m, 2 H, H-5'), 2.32 (m, 1 H, H-2'a), 2.09 (m, 1 H, H-2'b), 1.59 (m, 3 H,  $CH_3$ ).

[0537]  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-테옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (**WW2p115**)

[0538]  $POCl_3$  (14  $\mu$ l, 0.15 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dC.14** (28 mg, 0.08 mmol)와 양자 스펜지 (23 mg, 0.11 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.8 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (180 mg, 0.38 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (80  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분

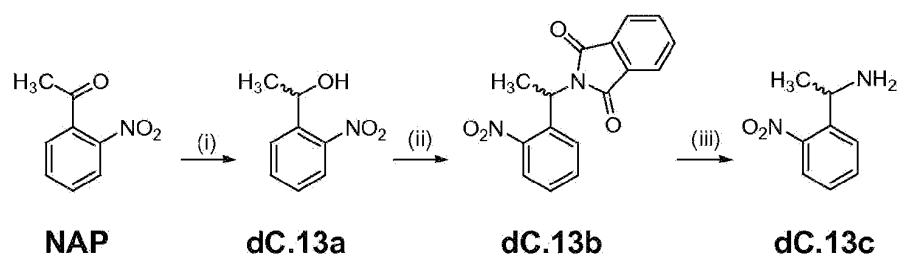
간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 **WW2p115** (24 mg, 47%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

[0539] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.98 (m, 1 H, Ph-H), 7.80 (m, 1 H, H-6), 7.66 (m, 2 H, Ph-H), 7.49 (m, 1 H, Ph-H), 6.24 (m, 1 H, H-1'), 6.11 (m, 1 H, H-5), 5.60 (m, 1 H, Ph-CH), 4.55 (m, 1 H, H-3'), 4.19 (m, 3 H, H-4'와 H-5'), 2.35 (m, 1 H, H-2'a), 2.24 (m, 1 H, H-2'b), 1.59 (d, 3 H, J = 6.7 Hz, CH<sub>3</sub>);

[0540] 부분입체이성질체에 대한 <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -6.00 (d, J = 14.1 Hz), -10.82 (d, J = 15.6 Hz), -19.36 (t, J = 15.9 Hz);

[0541] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 639.0271이고, 관찰된 질량은 639.0332이었다.

[0542] 1-(2-니트로페닐)에틸아민 (dC.13c)의 합성



[0543] **dC.13c**에 대한 개요. 1-(2-니트로페닐)에틸아민의 합성.

[0545] (i) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 디옥산, 실온, 1시간, 92%; (ii) 프탈리미드, DIAD, Ph<sub>3</sub>P, THF, 0°C, 3시간, 99%; (iii) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, 환류, 1시간, 80%.

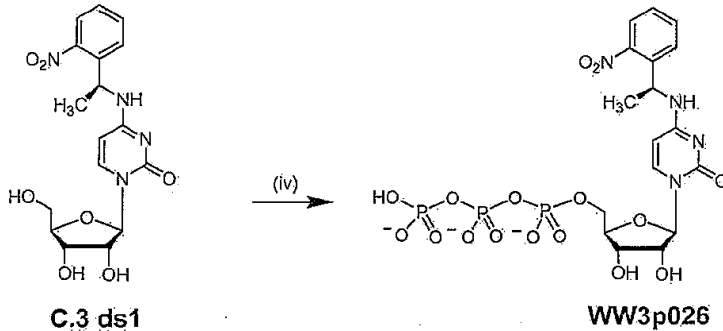
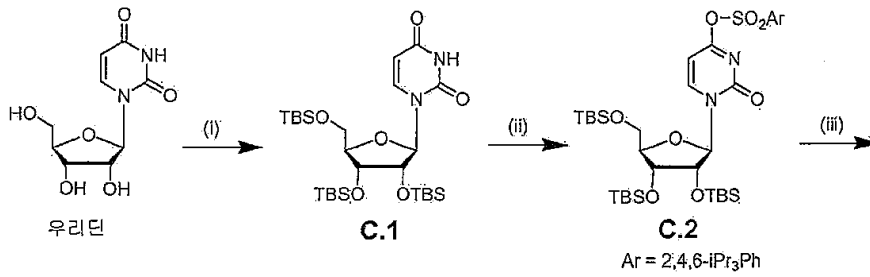
[0546] 1-(2-니트로페닐)에탄올 (dC.13a)

[0547] NaBH<sub>4</sub> (3.24 g, 85.60 mmol)를 메탄올 (34 ml)과 디옥산 (22 ml)의 혼합물에 녹인 2'-니트로아세트페논 **NAP** (3.74 g, 22.65 mmol)의 용액에 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 에틸아세테이트 (100 ml)로 희석하고 물 (25 ml)로 세척하였다. 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축하여 1-(2-니트로페닐)에탄올 **dC.13a** (3.49 g, 92%)를 백색 분말로 수득하였다.

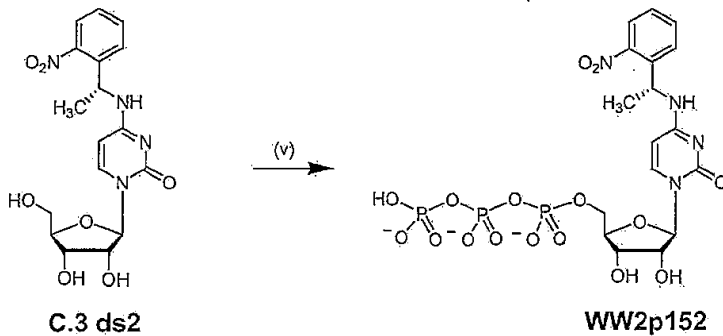
[0548] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.89 (d, 1 H, J = 8.1 Hz, Ph-H), 7.83 (d, 1 H, J = 7.4 Hz, Ph-H), 7.65 (t, 1 H, J = 7.4 Hz, Ph-H), 7.42 (t, 1 H, J = 8.1 Hz, Ph-H), 5.41 (q, 1 H, J = 6.0 Hz, Ph-CH), 2.48 (s, 1 H, OH), 1.57 (d, 3 H, J = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>).

- [0549] *N*-[1-(2-니트로페닐)에틸]프탈리미드 (**dC.13b**)
- [0550] 프탈리미드 (660 mg, 4.5 mmol)를 THF (12 ml)에 녹인 화합물 **dC.13a** (750 mg, 4.5 mmol)와 Ph<sub>3</sub>P (1.41 g, 5.4 mmol)의 용액에 첨가하였다. 현탁액은 0℃로 냉각하고 10분 동안 교반하고, 이후 디이소프로필 아조디카르복실레이트 (1.1 ml, 5.4 mmol)를 방울방울 첨가하였다. 0℃에서 3시간 동안 교반한 이후, 반응 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*-[1-(2-니트로페닐)에틸]프탈리미드 **dC.13b** (1.33 g, 99%)를 갈색 오일로 수득하였다.
- [0551] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.93 (d, 1 H, *J* = 7.9 Hz, Ph-H), 7.81 (m, 3 H, Ph-H), 7.71 (m, 2 H, Ph-H), 7.61 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 7.44 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 6.08 (q, 1 H, *J* = 7.2 Hz, Ph-CH), 1.97 (d, 3 H, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>).
- [0552] 1-(2-니트로페닐)에틸아민 (**dC.13c**)
- [0553] 화합물 **dC.13b** (1.33 g, 4.5 mmol)는 50℃로 가열한 직후에 에탄올 (21 ml)에 용해시키고, 이후 실온으로 냉각하였다. 히드라진 (0.55 ml, 11.22 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물은 1시간 동안 환류시키고, 이후 얼음으로 냉각시켰다. 디에틸 에테르 (40 ml)를 첨가하여 화합물을 침전시키고, 이는 여과로 분리하고 디에틸 에테르 (각 40 ml)로 2회 세척하였다. 모아진 여과액은 물 (각 40 ml)로 2회 세척하고, 이후 염수 (40 ml)로 세척하였다. 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고 진공에서 농축하여 1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸아민 **dC.13c** (600 mg, 80%)를 갈색 오일로 수득하였다.
- [0554] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.78 (m, 2 H, Ph-H), 7.61 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 7.37 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 4.59 (q, 1 H, *J* = 6.4 Hz, Ph-CH), 1.45 (d, 3 H, *J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>).

[0555] *N*-[1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘-5'-트리포스페이트 (WW2p152와 WW3p026)의 합성



**C.3 ds1**  
신속 용출 단일 부분입체이성질체,  
절대 배열은 결정되지 않음,  
대표적인 그림



**C.3 ds2**  
느린 용출 단일 부분입체이성질체,  
절대 배열은 결정되지 않음,  
대표적인 그림

[0556]

[0557]

**개요.** *N*-[1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘-5'-트리포스페이트의 합성. (i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 60시간, 95%; (ii) TPSCl, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 실온, 하룻밤, 80%; (iii) 1-(2-니트로페닐)에틸아민, DMF, 90°C, 45분; *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 2시간; 2개의 부분입체이성질체에 대하여 60%; (iv) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNET<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간.

[0558]

2',3',5'-*O*-트리스-*tert*-부틸디메틸실릴-우리딘 (C.1)

[0559]

TBSCl (995 mg, 6.6 mmol)을 질소 대기 하에 0°C에서, 무수성 DMF (5 ml)에 녹인 우리딘 (244 mg, 1 mmol)과 이미다졸 (898 mg, 13.2 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 데우고 60시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트 (30 ml)를 첨가하고, 혼합물은 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (각 20 ml)으로 2회, 그리고 물 (20 ml)로 1회 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 2',3',5'-*O*-트리스-*tert*-부틸디메틸실릴-우리딘 C.1 (558 mg, 95%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0560]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.79 (s, 1 H, NH), 8.03 (d, 1 H,  $J = 8.2$  Hz, H-6), 5.87 (d, 1 H,  $J = 3.5$  Hz, H-1'), 5.68 (d, 1 H,  $J = 8.2$  Hz, H-5), 4.08 (m, 3 H, H-2', H-3'과 H-4'), 3.99 (d, 1 H,  $J = 11.6$  Hz, H-5'a), 3.77 (d, 1 H,  $J = 11.6$  Hz, H-5'b), 0.95 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.91과 0.90 (2 s, 18 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.09 (5 s, 18 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0561]  $O^4$ -(2,4,6-트리아이소프로필-벤젠설포닐)-2',3',5'-*O*-트리스-*tert*-부틸디메틸실릴-우리딘 (C.2)

[0562] 2,4,6-트리아이소프로필벤젠설포닐 염화물 (557 mg, 1.84 mmol)을 질소 대기 하에, 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml)에 녹인 화합물 C.1 (540 mg, 0.92 mmol), DMAP (12 mg, 촉매량)와  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.5 ml, 3.68 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 하룻밤동안 교반하고,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml)를 첨가하고, 포화된  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액 (15 ml)으로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 에서 건조시키고, 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $O^4$ -(2,4,6-트리아이소프로필-벤젠설포닐)-2',3',5'-*O*-트리스-*tert*-부틸디메틸실릴-우리딘 C.2 (629 mg, 80%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0563]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.62 (d, 1 H,  $J = 7.3$  Hz, H-6), 7.20 (s, 2 H, Ph-H), 5.99 (d, 1 H,  $J = 7.3$  Hz, H-5), 5.68 (d, 1 H,  $J = 1.0$  Hz, H-1'), 4.23 (m, 2 H, CH), 4.09 (m, 3 H, H-2', H-3'과 H-4'), 4.00 (m, 1 H, H-5'a), 3.78 (1 H, d,  $J = 11.8$  Hz, H-5'b), 2.90 (m, 1 H, CH), 1.31 (d, 6 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.26 (dd, 12 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.94 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.88 (2 s, 18 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.17 - 0.05 (6 s, 18 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0564]  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘 (단일 부분입체이성질체 C.3 ds1과 C.3 ds2)

[0565] 무수성 DMF (4 ml)에 녹인 화합물 C.2 (476 mg, 0.56 mmol)와 1-(2-니트로페닐)에틸아민 dC. 13c (498 mg, 3 mmol)의 용액은 90°C에서 45분 동안 가열하였다. 에틸 아세테이트 (40 ml)를 첨가하고, 혼합물은 포화된  $\text{NH}_4\text{Cl}$  용액 (20 ml)과 물 (20 ml)로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시키고, 농축하였다. 2개의 부분입체이성질체는 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 분리하여  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2',3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-시티딘 단일 부분입체이성질체 ds1 (신속 용출, 290 mg)과 ds2 (느린 용출, 203 mg)를 수득하였다. 양쪽 단일 부분입체이성질체는 추가 정제 없이 다음 단계에 이용하였다.

[0566]  $N^4$ -[(R 또는 S)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘 (단일 부분입체이성질체 C.3 ds1)

[0567] THF (3 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (235 mg, 0.9 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (4 ml)에 녹인  $N^4$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2',3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-시티딘 단일 부분입체이성질체 ds1 (264 mg)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1 g)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^4$ -[(R 또는 S)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘 단일 부분입체이성질체 C.3 ds1 (65 mg, 2 단계에서 ca. 30%, 절대 배율은 결정되지 않음)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0568]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8.39 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 7.92 (dd, 1 H,  $J = 1.1$ 과 8.1 Hz, Ph-H), 7.82 (d, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 7.70 (dt, 1 H,  $J = 1.1$ 과 7.5 Hz, Ph-H), 7.64 (dd, 1 H,  $J = 1.2$ 와 7.5 Hz, Ph-H), 7.49 (dt, 1 H,  $J = 1.3$ 과 7.5 Hz, Ph-H), 1 H, Ph-H), 5.80 (d, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, H-5), 5.65 (d, 1 H,  $J = 3.4$  Hz, H-1'), 5.50 (m, 1 H, Ph-CH), 5.30 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.02 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O

교체가능, 5'-OH), 4.96 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 2'-OH), 3.90 (m, 2 H, H-2'와 H-3'), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.59 (m, 1 H, H-5'a), 3.50 (m, 1 H, H-5'b), 1.48 (d, 3 H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>).

[0569] *N*<sup>4</sup>-[(*S* 또는 *R*)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘 (단일 부분입체이성질체 **C.3 ds2**)

[0570] THF (2 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (167 mg, 0.64 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (3 ml)에 녹인 *N*<sup>4</sup>-[1-(2-니트로페닐)에틸]-2',3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-시티딘 단일 부분입체이성질체 ds2 (188 mg)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 1시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1 g)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>4</sup>-[(*S* 또는 *R*)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘 단일 부분입체이성질체 **C.3 ds2** (67 mg, 2단계에서 ca. 30%, 절대 배율은 결정되지 않음)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0571] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.38 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 7.92 (dd, 1 H, *J* = 1.1과 8.1 Hz, Ph-H), 7.80 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz, H-6), 7.72 (dt, 1 H, *J* = 1.0과 7.5 Hz, Ph-H), 7.63 (dd, 1 H, *J* = 1.1과 7.5 Hz, Ph-H), 7.49 (dt, 1 H, *J* = 1.3과 7.5 Hz, Ph-H), 5.79 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz, H-5), 5.68 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz, H-1'), 5.51 (m, 1 H, Ph-CH), 5.20 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.01 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.93 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 2'-OH), 3.87 (m, 2 H, H-2'와 H-3'), 3.78 (m, 1 H, H-4'), 3.59 (m, 1 H, H-5'a), 3.50 (m, 1 H, H-5'a), 1.49 (d, 3 H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>).

[0572] *N*<sup>4</sup>-[(*R* 또는 *S*)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘-5'-트리포스페이트 단일 부분입체이성질체 (**WW3p 026**)

[0573] POCl<sub>3</sub> (14 μl, 0.15 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **C.3 ds1** (29 mg, 0.074 mmol)과 양자 스펜지 (32 mg, 0.15 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.74 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (175 mg, 0.37 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (74 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 용액의 일부는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 *N*<sup>4</sup>-[(*R* 또는 *S*)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘-5'-트리포스페이트 단일 부분입체이성질체 **WW3p026** (절대 배율은 결정되지 않음)을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다.

[0574] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.0 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz, Ph-H), 7.92 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, H-6), 7.70 (m, 2 H, Ph-H), 7.50 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 6.14 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 5.92 (d, 1 H, *J* = 4.1 Hz, H-1'), 5.61 (q, 1 H, *J* = 6.8 Hz, Ph-CH), 4.33 - 4.21 (m, 3 H, H-2', H-3'과 H-4'), 4.01 (m, 2 H, H-5'), 1.60 (d, 3 H, *J* = 6.8 Hz, CH<sub>3</sub>);

[0575] *N*<sup>4</sup>-[(*S* 또는 *R*)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘-5'-트리포스페이트 단일 부분입체이성질체 (**WW2p152**)

[0576] POCl<sub>3</sub> (11 μl, 0.12 mmol)을 0°C에서, 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **C.3 ds2** (31 mg, 0.08 mmol)와 양자 스펜지 (26 mg, 0.12 mmol)의 용액에 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.8 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (190 mg, 0.4 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (80 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온

에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 의 선형 구배 (240분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜  $N^{\pm}$  [(S 또는 R)-1-(2-니트로페닐)에틸]-시티딘-5'-트리포스페이트 단일 부분입체이성질체 **WW2p152** (26 mg, 47%, 절대 배율은 결정되지 않음)를 백색의 습털모양 고체로 수득하였다.

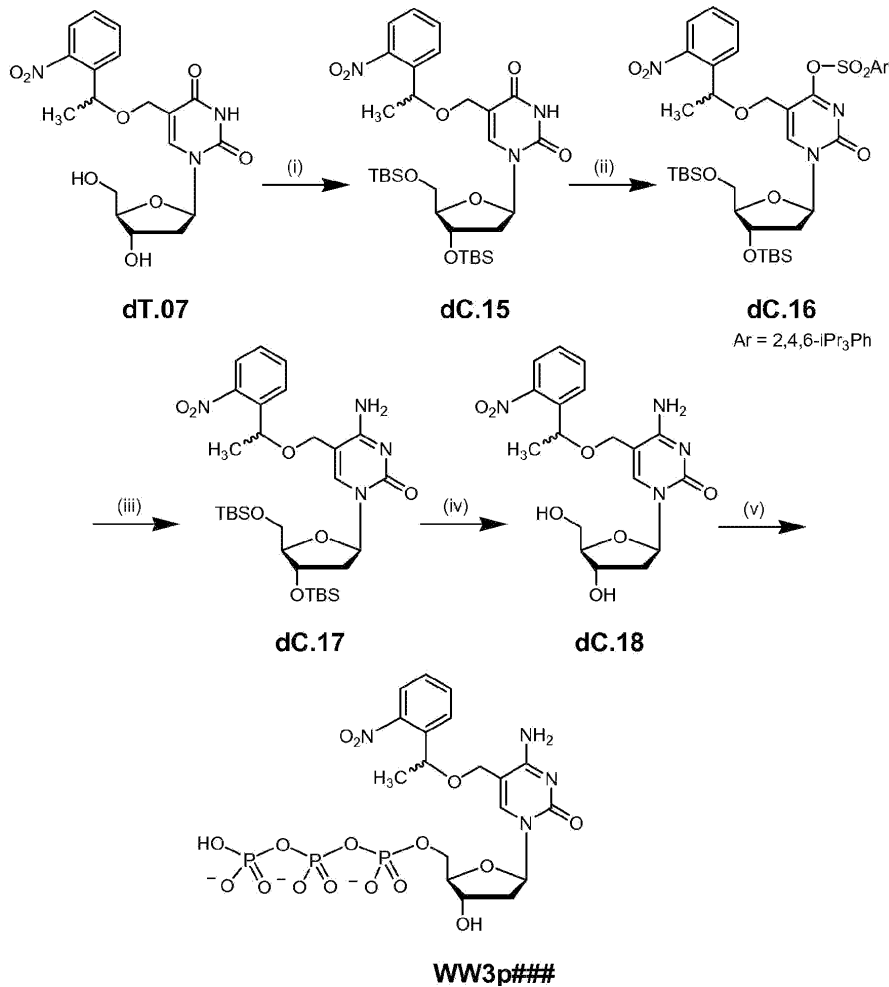
[0577]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  7.99 (d, 1 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 7.82 (d, 1 H,  $J = 7.6$  Hz, H-6), 7.68 (m, 2 H, Ph-H), 7.50 (t, 1 H,  $J = 7.8$  Hz, Ph-H), 6.12 (d, 1 H,  $J = 7.5$  Hz, H-5), 5.91 (d, 1 H,  $J = 4.4$  Hz, H-1'), 5.60 (q, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, Ph-CH), 4.26 (m, 5 H, H-2', H-3', H-4'와 H-5'), 1.60 (d, 3 H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ );

[0578]  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  -5.18(d,  $J = 19.8$  Hz), -10.46 (d,  $J = 19.1$  Hz), -20.98 (t,  $J = 19.6\text{Hz}$ );

[0579] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{P}_3\text{Na}$   $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ 의 경우에, 계산된 질량은 653.0063이고, 관찰된 질량은 652.9975이었다.

[0580]

5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트 (WW3p###)의 합성



[0581]

[0582]

개요. 5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시시티딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0583]

(i) TBSCl, 이미다졸, DMF, 실온, 24시간, 42%; (ii) TPSCl, DMAP, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 실온, 48시간, 56%; (iii) NH<sub>3</sub>, 1,4-디옥산, 80°C, 2시간, 56%; (iv) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 실온; (v) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간.

[0584]

3',5'-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 (dC.15)

[0585]

무수성 DMF (0.5 ml)에 녹인 TBSCl (114 mg, 0.76 mmol)의 용액을 무수성 DMF (1 ml)에 녹인 화합물 dT.07 (97 mg, 0.24 mmol)과 이미다졸 (103 mg, 1.52 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 질소 대기 하에 실온에서 24시간 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 3',5'-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 dC.15 (64 mg, 42%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 수득하였다.

[0586]

부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.39와 9.33 (2 br s, 1 H, NH), 7.92 (m, 2 H, Ph-H), 7.70 (m, 2 H, H-6과 Ph-H), 7.42 (m, 1 H, Ph-H), 6.29 (m, 1 H, H-1'), 5.11 (m, 1 H, Ph-CH), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.04 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.96 (m, 1 H, H-4'), 3.80 (m, 2 H, H-5'), 2.38 (m, 1 H, H-2'a), 2.04 (m, 1 H, H-2'b), 1.55 (m, 3 H, CH<sub>3</sub>), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si);

[0587] 부분입체이성질체에 대한  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  162.89/162.76 (C), 150.15 (C), 148.40 (C), 139.21/139.17 (C), 138.94/138.68 (CH), 133.86/133.76 (CH), 128.22/128.19 (CH), 128.17/128.07 (CH), 124.23 (CH), 111.30/111.22 (C), 87.97/87.94 (CH), 85.43/85.37 (CH), 73.46/73.43 (CH), 72.34/72.28 (CH), 63.92/63.77 ( $\text{CH}_2$ ), 63.07 ( $\text{CH}_2$ ), 41.27/41.17 ( $\text{CH}_2$ ), 25.97/25.93 ( $\text{CH}_3$ ), 23.69/23.57 ( $\text{CH}_3$ ), 18.43/18.41 (C), -4.64/-4.82 ( $\text{CH}_3$ ), -5.37/-5.40 ( $\text{CH}_3$ ).

[0588] ES+ MS (ESI): 658 [M+Na] $^+$ ;

[0589]  $O^4$ -(2,4,6-트리아소프로필벤젠설포닐)-3',5'-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 (**dC.16**)

[0590] 2,4,6-트리아소프로필벤젠설포닐 염화물 (61 mg, 0.20 mmol)의 용액을 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml)에 녹인 **dC.15** (64 mg, 0.10 mmol)와 DMAP (6 mg, 0.05 mmol)의 용액에 첨가하고, 이후  $\text{Et}_3\text{N}$  (63  $\mu\text{l}$ , 0.45 mmol)을 첨가하였다. 혼합물은 질소 대기 하에 실온에서 48시간 교반하고, 이후 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $O^4$ -(2,4,6-트리아소프로필벤젠설포닐)-3',5'-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시우리딘 **dC.16** (50 mg, 56%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다.

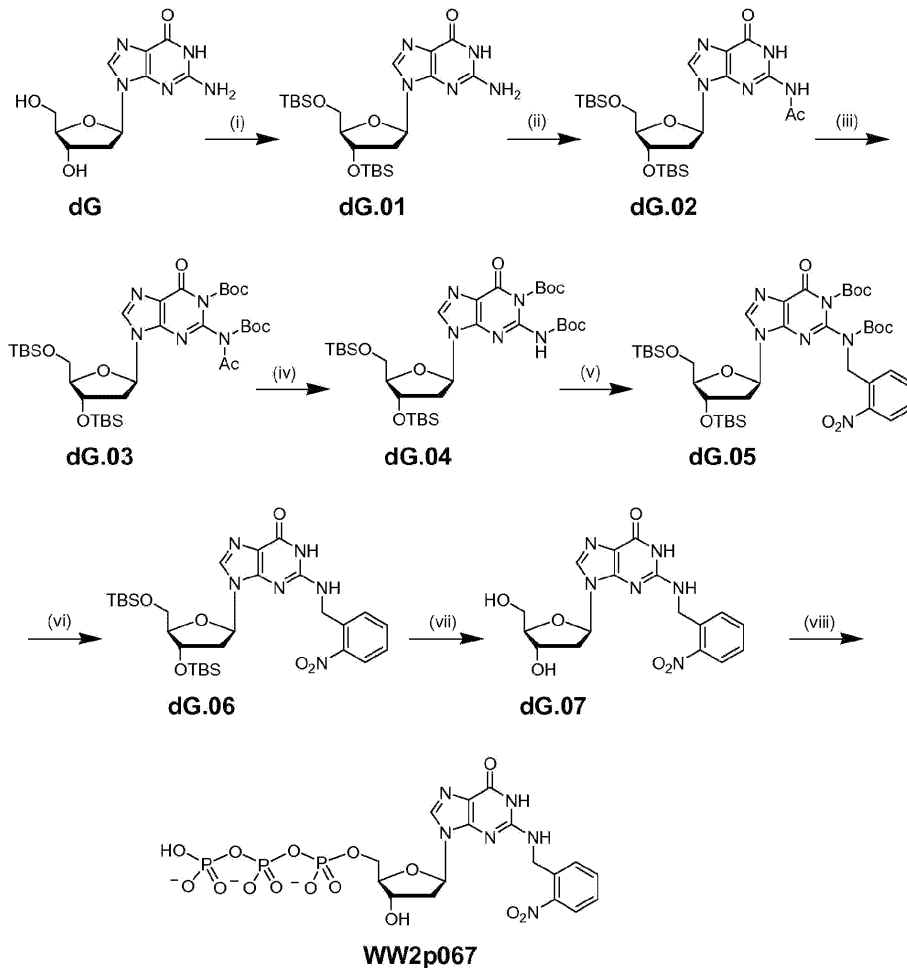
[0591] 부분입체이성질체에 대한  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.33과 8.28 (2 s, 1 H, Ph-H), 7.90 (m, 3 H, Ph-H), 7.67 (m, 2 H, H-6과 Ph-H), 7.44 (m, 1 H, Ph-H), 6.27 (m, 1 H, H-1'), 5.11 (m, 1 H, Ph-CH), 4.40 (m, 1 H, H-3'), 4.06 (m, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.79 (m, 2 H, H-5'), 2.38 (m, 1 H, H-2'a), 2.04 (m, 1 H, H-2'b), 1.54 (m, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60 (m, 3 H, CH), 0.91 (s, 18 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.80 (m, 18 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.09 (s, 12 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ );

[0592] 3',5'-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시시티딘 (**dC.17**)

[0593]  $\text{NH}_3$  (1 ml, 디옥산에서 0.5 M)의 용액을 무수성 1,4-디옥산 (1 ml)에 녹인 화합물 **dC.16** (48 mg, 0.05 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 80°C에서 2시간 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 3',5'-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-5-[1-(2-니트로페닐)에틸옥시메틸]-2'-데옥시시티딘 **dC.18** (25 mg, 58%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다.

[0594] 실시예 4: dG 화합물

[0595]  $N^2$ -(2-니트로벤질)-2'-테옥시구아니딘-5'-트리포스페이트 (WW2p067)의 합성



[0596]

[0597] 개요.  $N^2$ -(2-니트로벤질)-2'-테옥시구아니딘-5'-트리포스페이트의 합성.

[0598]

(i) TBSCl, 이미다졸, 무수성 DMF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 하룻밤, 96%; (ii) Ac<sub>2</sub>O, 무수성 피리딘, 실온, 100°C, 72%; (iii) Boc<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 환류, 2시간, 54%; (iv) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 95%; (v) 2-니트로벤질브롬화물, NaH, DMF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 1시간, 91%; (vi) SiO<sub>2</sub>, 진공, 70-80°C, 48시간, 97%; (vii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 1시간, 이후 실온, 2시간, 83%; (viii) POCl<sub>3</sub>, (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20-30°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간, 62%.

[0599] 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아노신 (dG.01)

[0600]

2'-테옥시구아노신 dG (0.89 g, 3.30 mmol), 이미다졸 (2.0 g, 29.32 mmol)과 TBSCl (2.34 g, 15.55 mmol)은 N<sub>2</sub> 대기 하에 0°C에서 무수성 DMF (8 ml)에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 하룻밤동안 교반하였다. 혼합물은 이후, 진공에서 농축하고, CHCl<sub>3</sub> (8 ml)과 MeOH (8 ml)의 혼합물로 처리하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아노신 dG.01 (1.57 g, 96%)을 백색 분말로 수득하였다.

[0601]

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.60 (br s, 1 H, H-1), 7.88 (s, 1 H, H-8), 6.47 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 6.10

(t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 4.48 (m, 1 H, H-3'), 3.80 (m, 1 H, H-4'), 3.70 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.64 (m, 1 H, H-2'a), 2.18 (m, 1 H, H-2'b), 0.89 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.86 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.11 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0.03 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0602]  $N^2$ -아세틸-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아노신 (**dG.02**)

[0603] 아세트산 무수물 (1.22 ml, 12.92 mmol)을 실온에서, 무수성 피리딘 (10 ml)에 녹인 화합물 **dG.01** (0.51 g, 1.03 mmol)의 용액에 천천히 첨가하고 100°C에서 3시간 동안 교반하였다. 반응물은 진공에서 농축하고, 무수성 에탄올 (15 ml)로 3회 동시-증발(co-evaporation)시키고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^2$ -아세틸-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아노신 **dG.02** (0.34 g, 56%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0604]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  12.03 (s, 1 H, NH), 11.70 (s, 1 H, NH), 8.20 (s, 1 H, H-8), 6.19 (t, 1 H,  $J = 6.2$  Hz, H-1'), 4.51 (m, 1 H, H-3'), 3.84 (m, 1 H, H-4'), 3.68 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.71 (m, 1 H, H-2'a), 2.17 (m, 1 H, H-2'b), 0.89 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.86 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.11 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0.04 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0605]  $N^1, N^2$ -비스-*tert*-부틸옥시-카르보닐- $N^2$ -아세틸-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아니딘 (**dG.03**)

[0606] 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (27 ml)에 녹인 디-*tert*-부틸디카보네이트 (8.75 g, 40 mmol)의 용액을  $\text{N}_2$  대기 하에, 무수성  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml)에 녹인 화합물 **dG.02** (1.85 g, 3.44 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (12.17 ml, 15.48 mmol)과 DMAP (1.72 g, 14.10 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 2시간 동안 환류시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^1, N^2$ -비스-*tert*-부틸옥시-카르보닐- $N^2$ -아세틸-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아니딘 **dG.03** (1.37 g, 54%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0607]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.25 (s, 1 H, H-8), 6.43 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 4.59 (m, 1 H, H-3'), 3.99 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (m, 1 H, H-5'a), 3.87 (m, 1 H, H-5'b), 2.60 (a, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.52 (m, 1 H, H-2'a), 2.41 (m, 1 H, H-2'b), 1.71 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 1.36 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 0.92 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.91 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.10 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), 0.09 (s, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

[0608]  $N^1, N^2$ -비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아니딘 (**dG.04**)

[0609] 화합물 **dG.03** (1.31 g, 1.78 mmol)은 실온에서 30분 동안, MeOH (20.5 ml)에 녹인  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.23 g, 8.90 mmol)으로 처리하였다. 반응물은 진공에서 농축하고, 에틸 아세테이트 (50 ml)에 용해시키고, 물 (10 ml)로 2회 세척하였다. 유기층은  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 건조시키고 진공에서 농축하여  $N^1, N^2$ -비스-*tert*-부틸옥시카르보닐-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시구아니딘 **dG.04** (1.18 g, 95%)를 백색 거품으로 수득하였다.

[0610]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  9.82 (bs, 1 H, N-H), 8.24 (s, 1 H, H-8), 6.27 (t, 1 H,  $J = 6.6$  Hz, H-1'), 4.71 (m, 1 H, H-3'), 3.82 (m, 1 H, H-4'), 3.79 (m, 1 H, H-5'a), 3.73 (m, 1 H, H-5'b), 2.95 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 1.66 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 1.48 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 0.89 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.83 (s, 9 H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.11 (2 S, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ), -0.01 (2 S, 6 H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

- [0611]  $N^1, N^2$ -비스-*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^2$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시구아니딘 (**dG.05**)
- [0612] NaH (22 mg, 0.93 mmol, 건성)를 0°C에서, 무수성 DMF (6 ml)에 녹인 화합물 **dG.04** (500 mg, 0.72 mmol)의 용액에 첨가하고 N<sub>2</sub> 대기 하에 30분 동안 교반하였다. 무수성 DMF (3 ml)에 녹인 2-니트로벤질 브롬화물 (202 mg, 0.94 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 반응물은 0°C에서 1시간 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하였다. 에틸 아세테이트 (50 ml)를 첨가하고, 혼합물은 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (20 ml)로 2회 세척하였다. 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (20 ml)로 추출하고, 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^1, N^2$ -비스-*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^2$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시구아니딘 **dG.05** (543 mg, 91%)를 백색 거품으로 수득하였다.
- [0613]  $^1H$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.12 (s, 1 H, H-8), 8.06 (m, 1 H, Ph-H), 7.68 (m, 1 H, Ph-H), 7.56 (m, 1 H, Ph-H), 7.38 (m, 1 H, Ph-H), 6.41 (6, *J* = 6.2 Hz, 1 H, H-2'), 5.49 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.56 (m, 1 H, H-3'), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.80 (m, 2 H, H-5'), 2.52 (m, 1 H, H-2'a), 2.39 (m, 1 H, H-2'b), 1.54 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 1.45 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.92 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
- [0614]  $N^2$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시구아니딘 (**dG.06**)
- [0615] 실리카 겔 60 (4.5 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 50-60°C로 가열함으로써 활성화됨)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml)에 녹인 화합물 **dG.05** (450 mg, 0.54 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 감압 하에 48시간 동안 60-70°C로 가열하고, MeOH (50 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^2$ -(2-니트로벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시구아니딘 **dG.06** (333 mg, 97%)을 백색 거품으로 수득하였다.
- [0616]  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.85 (s, 1 H, N-H), 8.05 (m, 1 H, Ph-H), 7.85 (s, 1 H, H-8), 7.69 (m, 1 H, Ph-H), 7.62 (m, 1 H, Ph-H), 7.54 (m, 1 H, Ph-H), 7.10 (t, 1 H, NH), 6.07 (t, 1 H, *J* = , H-1'), 4.78 (m, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.40 (m, 1 H, H-3'), 3.79 (m, 1 H, H-4'), 3.62 (m, 2 H, H-5'), 2.60 (m, 1 H, H-2'a), 2.15 (m, 1 H, H-2'b), 0.86 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.85 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.06 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.01 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
- [0617]  $N^2$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아니딘 (**dG.07**)
- [0618] THF (6 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (393 mg, 1.5 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (12 ml)에 녹인 화합물 **dG.06** (313 mg, 0.5 mmol)의 용액에 방울방울 첨가하였다. 반응 혼합물은 0°C에서 1시간 동안 교반하고, 이후 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $N^2$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아니딘 **dG.07** (165 mg, 83%)을 황색 거품으로 수득하였다.
- [0619]  $^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.82 (s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, N-H), 8.06 (m, 1 H, Ph-H), 7.90 (s, 1 H, H-8), 7.72 (m, 1 H, Ph-H), 7.64 (m, 1 H, Ph-H), 7.55 (m, 1 H, Ph-H), 7.06 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, N-H),

6.08 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 5.23 (d, 1 H,  $D_2O$  교체가능, 3'-OH), 4.80 (t, 3 H, 이들 중에서 1 H  $D_2O$  교체가능, 5'-OH와 Ph-CH<sub>2</sub>), 4.25 (m, 1 H, H-3'), 3.77 (m, 1 H, H-4'), 3.42 (m, 2 H, H-5'), 2.45 (m, 1 H, H-2'a), 2.12 (m, 1 H, H-2'b).

[0620]  $N^2$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아니딘-5'-트리포스페이트 (WW2p067)

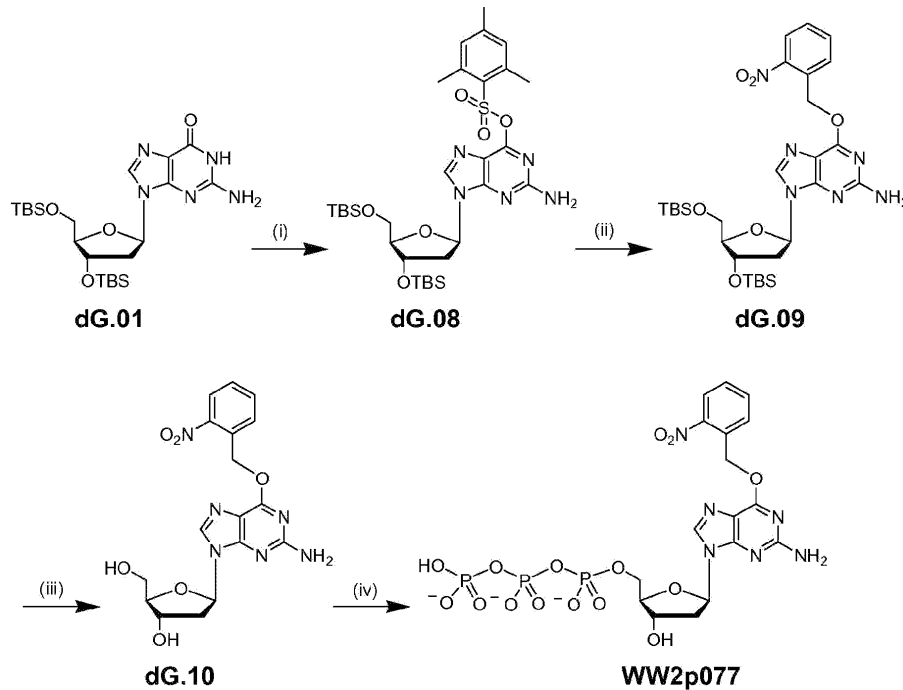
[0621] POCl<sub>3</sub> (17  $\mu$ l, 0.18 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 dG.07 (50 mg, 0.12 mmol)의 용액에 방울방울 첨가하고 마이너스 20-30°C에서 2시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (1.2 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (205 mg, 0.6 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (120  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (30분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜  $N^2$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아니딘-5'-트리포스페이트 WW2p067 (52 mg, 62%)을 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

[0622] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.08 (d, 1 H, Ph-H), 8.04 (s, 1 H, H-8), 7.68 (m, 2 H, Ph-H), 7.51 (t, 1 H, Ph-H), 6.27 (t, 1 H,  $J = 6.8$  Hz, H-1'), 4.63 (m, 1 H, H-3'), 4.21 (m, 1 H, H-4'), 4.10 (m, 2 H, H-5'), 2.66 (m, 1 H, H-2'a), 2.41 (m, 1 H, H-2'b);

[0623] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -6.48 (d,  $J = 15.7$  Hz), -11.40 (d,  $J = 15.2$  Hz), -19.94 (br);

[0624] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 663.0019이고, 관찰된 질량은 663.0143이었다.

[0625]  $O^6$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW2p077)의 합성



[0626]

[0627] 개요.  $O^6$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0628]

(i) 2-메시틸렌-설포닐 염화물, Et<sub>3</sub>N, DMAP, 무수성 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, HMPA, 실온, 하룻밤, 98%; (ii) 2-니트로벤질 알코올, DABCO, DBU, 분자체, 무수성 1,2-DME, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 24시간, 77%; (iii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 실온, 1.5시간, 94%; (iv) POCl<sub>3</sub>, (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20-30°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간, 35%.

[0629]

$O^6$ -(2-메시틸렌설포닐)-3',5'-비스-*O*-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시구아노신 (dG.08)

[0630]

2-메시틸렌설포닐 염화물 (510 mg, 2.34 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.56 ml, 4.0 mmol)과 DMAP (27 mg, 0.197 mmol)를 헥사메틸포스포라이드 (1.5 ml)와 무수성 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 ml)의 혼합물에 녹인 화합물 dG.01 (500 mg, 1.0 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응물은 실온에서 하룻밤동안 교반하고, 이후 에틸 에테르 (25 ml)로 희석하였다. 에테르 용액은 NaHCO<sub>3</sub> (각 10 ml)의 포화된 용액으로 2회 세척하고, 이후 염수 (10 ml)로 세척하였다. 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고 진공에서 농축하여 반-고체를 얻었는데, 이는 에틸 에테르 (2 ml)에 용해시키고 헥산 (40 ml)으로 점진적으로 희석하였다. 침전물은 여과로 회수하여  $O^6$ -(2-메시틸렌설포닐)-3',5'-비스-*O*-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시구아노신 dG.08 (737 mg, 98%)을 수득하였다.

[0631]

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.98 (s, 1 H, H-8), 6.98 (s, 2 H, Ph-H), 6.28 (t, 1 H, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 4.84 (br s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.57 (m, 1 H, H-3'), 3.97 (m, 1 H, H-4'), 3.78 (dd, 1 H, *J* = 2.9와 11.0 Hz, H-5'a), 3.75 (dd, 1 H, *J* = 2.9와 11.0 Hz, H-5'b), 2.75 (s, 6 H, CH<sub>3</sub>), 2.53 (m, 1 H, H-2'a), 2.34 (m, 1 H, H-2'b), 2.31 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.90 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.09 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.06 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0632]  $O^6$ -(2-니트로벤질)-3',5'-비스-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시구아노신 (dG.09)

[0633] DABCO (139 mg, 1.24 mmol)와 2-니트로벤질 알코올 (474 mg, 3.10 mmol)을 0°C에서, 무수성 1,2-DME (6.2 ml)에 녹인 화합물 dG.08 (420 mg, 0.62 mmol)과 4 Å 분자체 (200 mg)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 데우고 30분 동안 교반하였다. DBU (139  $\mu$ l, 0.93 mmol)를 첨가하고, 반응물은 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트 (100 ml)를 첨가하고, 유기층은 물 (20 ml)과 염수 (20 ml)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -(2-니트로벤질)-3',5'-비스-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시구아노신 dG.09 (300 mg, 77%)를 수득하였다.

[0634] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.09 (dd, 1 H, *J* = 1.1과 8.2 Hz, Ph-H), 7.94 (s, 1 H, H-8), 7.86 (d, 1 H, *J* = 7.7 Hz, Ph-H), 7.60 (dt, 1 H, *J* = 1.1과 7.7 Hz, Ph-H), 7.45 (dt, 1 H, *J* = 1.0과 8.2 Hz, Ph-H), 6.32 (t, 1 H, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 5.94 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.89 (s, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 4.59 (m, 1 H, H-3'), 3.98 (m, 1 H, H-4'), 3.81 (dd, 1 H, *J* = 2.9과 11.0 Hz, H-5'a), 3.75 (dd, 1 H, *J* = 2.9와 11.0 Hz, H-5'b), 2.58 (m, 1 H, H-2'a), 2.37 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.08 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0635]  $O^6$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아노신 (dG.10)

[0636] THF (4 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (252 mg, 0.80 mmol)의 용액을 실온에서, THF (4 ml)에 녹인 화합물 dG.09 (200 mg, 0.32 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 1.5시간 동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아노신 dG.10 (119 mg, 94%)을 수득하였다.

[0637] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8.16 (dd, 1 H, *J* = 1.0과 8.2, Hz, Ph-H), 8.13 (s, 1 H, H-8), 7.79 (m, 2 H, Ph-H), 7.63 (m, 1 H, Ph-H), 6.49 (br s, 2 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH<sub>2</sub>), 6.22 (dd, 1 H, *J* = 6.1과 7.7 Hz, H-1'), 5.87 (s, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 5.28 (br, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.99 (br, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 4.35 (m, 1 H, H-3'), 3.82 (m, 1 H, H-4'), 3.55 (m, 1 H, H-5'b), 3.52 (m, 1 H, H-5'a), 2.58 (m, 1 H, H-2'a), 2.23 (m, 1 H, H-2'b).

[0638]  $O^6$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW2p077)

[0639] POCl<sub>3</sub> (14  $\mu$ l, 0.1 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 dG.10 (43 mg, 0.1 mmol)의 용액에 방울방울 첨가하고 마이너스 20-30°C에서 2시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (1.0 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (100  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (30분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜  $O^6$ -(2-니트로벤질)-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 WW2p077 (24 mg, 35%)을 백색의 솜털모양 고체로 수득하였다.

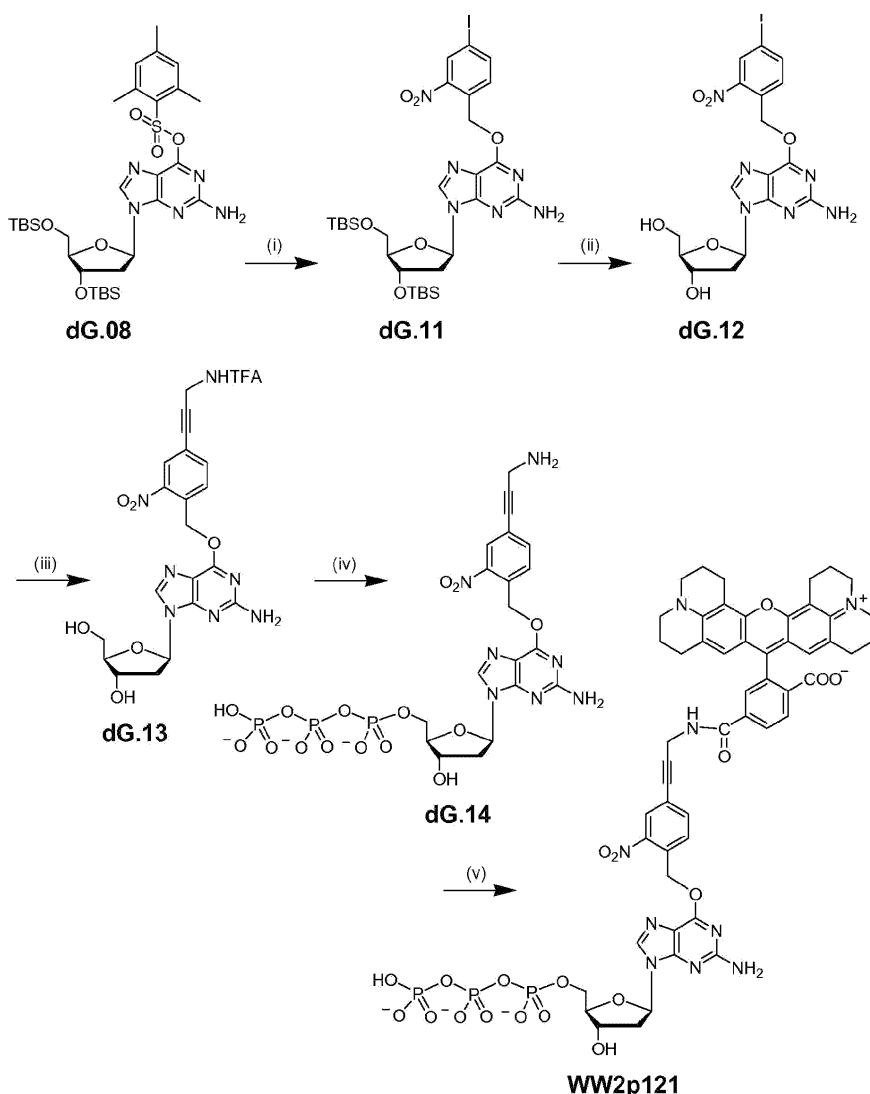
[0640] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.21 (s, 1 H, H-8), 8.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, Ph-H), 7.83 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz, Ph-H), 7.74 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz, Ph-H), 7.51 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, Ph-H), 6.35 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz,

H-1'), 5.86 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.28 (m, 1 H, H-4'), 4.23 (m, 2 H, H-5'), 2.82 (m, 1 H, H-2'a), 2.57 (m, 1 H, H-2'b);

[0641] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -6.48 (br), -10.96 (br), -21.83 (br);

[0642] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 663.0019이고, 관찰된 질량은 663.0228이었다.

[0643] 6-ROX 표지된 0<sup>6</sup>-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW2p121)의 합성.



[0644]

[0645] 개요. 6-ROX 표지된 0<sup>6</sup>-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0646] (i) 4-요오도-2-니트로벤질 알코올, DABCO, DBU, 4Å 분자체, 무수성 1,2-DME, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 24시간, 77%; (ii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 실온, 1.5시간, 62%; (iii) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수성 DMF, 4시간, 42%; (iv) POCl<sub>3</sub>, 양자 스펀지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 0°C, 1시간; (*n*-

Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; (v) 6-ROX-SE, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (pH 9.2), 1시간.

[0647]  $O^6$ -(4-요오도-2-니트로벤질)-3',5'-비스-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2-테옥시구아노신 (**dG.11**)

[0648] DABCO (90 mg, 0.80 mmol)와 4-요오도-2-니트로벤질 알코올 (555 mg, 2.00 mmol)을 0°C에서, 무수성 1,2-DME (4 ml)에 녹인 화합물 **dG.08** (270 mg, 0.40 mmol)과 4Å 분자체 (129 mg)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 데우고 30분 동안 교반하였다. DBU (91 μl, 0.60 mmol)를 첨가하고, 반응물은 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트 (70 ml)를 첨가하고, 유기 용액은 물 (10 ml)과 염수 (10 ml)로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -(4-요오도-2-니트로벤질)-3',5'-비스-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2-테옥시구아노신 **dG.11** (233 mg, 77%)을 수득하였다.

[0649] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.40 (d, 1 H, *J* = 1.7 Hz, Ph-H), 7.94 (s, 1 H, H-8), 7.86 (dd, 1 H, *J* = 1.7과 8.3 Hz, Ph-H), 7.60 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, Ph-H), 6.31 (t, 1 H, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 5.86 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 4.87 (s, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 4.59 (m, 1 H, H-3'), 3.98 (m, 2 H, H-4'), 3.82 (dd, AB, 1 H, *J* = 4.2와 11.2 Hz, H-5'a), 3.75 (dd, 1 H, *J* = 4.2와 11.2 Hz, H-5'b), 2.57 (m, 1 H, H-2'a), 2.37 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.10 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.08 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0650]  $O^6$ -(4-요오도-2-니트로벤질)-2-테옥시구아노신 (**dG.12**)

[0651] THF (2 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (291 mg, 0.924 mmol)의 용액을 실온에서, THF (4 ml)에 녹인 화합물 **dG.11** (233 mg, 0.31 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 1.5시간 동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -(4-요오도-2-니트로벤질)-2-테옥시구아노신 **dG.12** (101 mg, 62%)를 수득하였다.

[0652] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.43 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz, Ph-H), 8.16 (dd, 1 H, *J* = 1.8과 8.2 Hz, Ph-H), 8.13 (s, 1 H, H-8), 7.52 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 6.48 (br s, 2 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH<sub>2</sub>), 6.22 (dd, 1 H, *J* = 6.2와 7.7 Hz, H-1'), 5.79 (s, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 5.27 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.97 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 4.35 (m, 1 H, H-3'), 3.82 (m, 1 H, H-4'), 3.52 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.58 (m, 1 H, H-2'a), 2.22 (m, 1 H, H-2'b).

[0653]  $O^6$ -[4-(3-트리플루오로아세틸아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-테옥시구아노신 (**dG.13**)

[0654] 무수성 DMF (1.4 ml)에 녹인 화합물 **dG.12** (95 mg, 0.18 mmol), *N*-프로파르길트리플루오로아세틸아미드 (82 mg, 0.53 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (21 mg, 0.018 mmol), CuI (7 mg, 0.036 mmol)와 Et<sub>3</sub>N (51 μl, 0.36 mmol)의 용액은 실온에서 4시간 동안 교반하였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml), 메탄올 (1 ml)과 NaHCO<sub>3</sub> (84 mg, 1 mmol)을 첨가하고, 혼합물은 20분 동안 교반하고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피와 예비 HPLC로 정제하여  $O^6$ -[4-(3-트리플루오로아세틸아미도-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-테옥시구아노신 **dG.13** (42 mg, 42%)을 수득하였다.

[0655] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.11 (br 1 H, NH), 8.16 (d, 1 H, *J* = 1.7 Hz, Ph-H), 8.13 (s, 1 H, H-8), 7.86 (dd, 1 H, *J* = 1.7과 8.2 Hz, Ph-H), 7.75 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 6.50 (br s, 2 H, D<sub>2</sub>O 교체가능,

NH<sub>2</sub>), 6.22 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.87 (s, 2 H, PhCH<sub>2</sub>), 5.27 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.97 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 4.35 (m, 1 H, H-3'), 4.33 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (m, 2 H, H-4'), 3.55 (m, 1 H, H-5'b), 3.51 (m, 1 H, H-5'a), 2.58 (m, 1 H, H-2'a), 2.23 (m, 1 H, H-2'b).

[0656]  $O^6$ -[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (**dG.14**)

[0657] 화합물 **dG.13** (33 mg, 0.06 mmol)과 양자 스펀지 (26 mg, 0.12 mmol)는 무수성 피리딘 (3 ml)으로부터 3회 증발시키고 트리메틸포스페이트 (0.3 ml)에 용해시켰다. POCl<sub>3</sub> (8 μl, 0.09 mmol)을 첨가하고, 혼합물은 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.6 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (142 mg, 0.3 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (60 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서, 농축된 암모늄 수산화물 (5 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여  $O^6$ -[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.14**를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다.

[0658] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 8.28 (s, H-8), 8.26 (s, 1 H, Ph-H), 7.80 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 7.63 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 6.38 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.88 (br s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.29 (m, 3 H, H-4', H-5'), 3.67 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.80 (m, 1 H, H-2'a), 2.56 (m, 1 H, H-2'b);

[0659] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -5.85 (d, *J* = 19.4 Hz), -10.98 (d, *J* = 19.4 Hz), -21.78 (t, *J* = 19.4 Hz);

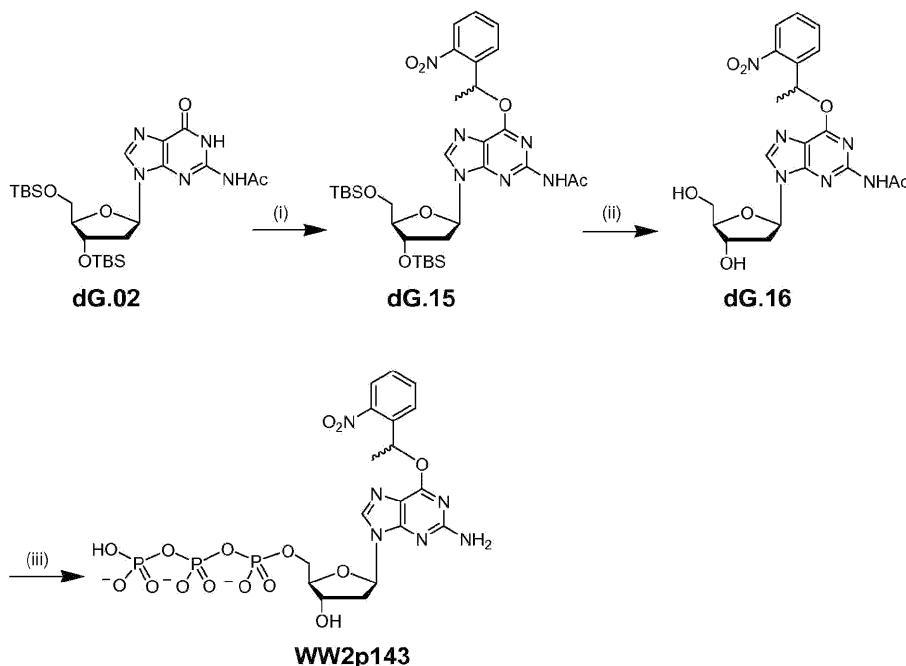
[0660] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>7</sub>O<sub>15</sub>P<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 718.0441이고, 관찰된 질량은 718.0600이었다.

[0661] 6-ROX 표지된  $O^6$ -[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로벤질]-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (**WW2p121**)

[0662] 무수성 DMSO (12 μl)에 녹인 6-ROX-SE (0.3 mg, 0.47 μmol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 0.6 ml)에 녹인 트리포스페이트 **dG.14** (0.36 μmol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-ROX 표지된 트리포스페이트 **WW2p121**을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM TEAA; B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW2p121**의 농도는 6-ROX 염료의 소광 계수 (즉, 575 nm에서 82,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0663]

$O^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW2p143)의 합성



[0664]

[0665]

개요.  $O^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0666]

(i) 1-(2-니트로페닐)에탄올,  $PPh_3$ , DIAD, 무수성 THF, 실온, 6시간, 74%; (ii)  $n-Bu_4NF$ , THF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 4시간, 64%; (iii)  $POCl_3$ , 양자 스펀지,  $(MeO)_3PO$ , 0°C, 2시간;  $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$ ,  $n-Bu_3N$ , DMF, 5분; 1 M  $HNEt_3HCO_3$ , 1시간;  $NH_4OH$ , 60 °C, 3시간.

[0667]

$O^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]- $N^2$ -아세틸-3',5'-비스-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시구아노신 (dG.15)

[0668]

무수성 THF (2 ml)에 녹인 화합물 dG.02 (108 mg, 0.2 mmol), 1-(2-니트로페닐)에탄올 (33 mg, 0.23 mmol)과  $PPh_3$  (79 mg, 0.3 mmol)의 용액은 디이소프로필 아조디카복실레이트 (DIAD, 59  $\mu$ l, 0.3 mmol)로 처리하고 6시간 실온에서 교반하였다. 혼합물은  $CH_2Cl_2$  (20 ml)로 희석하고, 포화된  $NH_4Cl$  용액 (10 ml)으로 1회 세척하고,  $Na_2SO_4$ 에서 건조시키고, 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]- $N^2$ -아세틸-3',5'-비스-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시구아노신 dG.15 (102 mg, 74%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물) 황색 거품으로 수득하였다.

[0669]

부분입체이성질체에 대한  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.13과 8.12 (2 s, 1 H, H-8). 7.89 (d, 1 H,  $J$  = 8.0 Hz, Ph-H), 7.83 (m, 1 H, Ph-H), 7.74 (br s, 1 H, NH), 7.57 (t, 1 H,  $J$  = 7.2 Hz, Ph-H), 7.40 (t, 1 H,  $J$  = 8.0 Hz, Ph-H), 6.69 (m, 1 H, PhCH), 6.36 (t, 1 H,  $J$  = 6.3 Hz, H-1'), 4.56 (m, 1 H, H-3'), 3.98 (m, 1 H, H-4'), 3.82 (m, 1 H, H-5'a), 3.76 (m, 1 H, H-5'b), 2.50 (m, 1 H, H-2'a), 2.41 (m, 4 H, H-2'b와  $CH_3CO$ ), 1.88 (2 d,  $J$  = 6.5 Hz,  $CH_3$ ), 0.91 (s, 18 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.10 (s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ ), 0.09 (s, 6 H,  $(CH_3)_2Si$ ).

[0670]

$O^6$ -[1-(2-니트로페닐)에틸]- $N^2$ -아세틸-2'-데옥시구아노신 (dG.16)

[0671] THF (2 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (95mg, 0.36 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (5 ml)에 녹인 화합물 **dG.15** (100 mg, 0.15 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 4시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 (500 mg, 60-200 메시)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발시켰다. 잔류물은 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 *O*<sup>6</sup>-[1-(2-니트로페닐)에틸]-*N*<sup>2</sup>-아세틸-2'-테옥시구아노신 **dG.16** (43 mg, 64%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다.

[0672] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.19와 10.18 (2 s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.43 (2 s, 1 H, H-8), 8.04 (d, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 7.79 - 7.74 (m, 2 H, Ph-H), 7.56 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz, Ph-H), 6.84 (m, 1 H, PhCH), 6.26 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 5.29 (2 d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.88 (m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 4.39 (m, 1 H, H-3'), 3.82 (m, 1 H, H-4'), 3.56 (m, 1 H, H-5'b), 3.51 (m, 1 H, H-5'a), 2.56 (m, 1 H, H-2'a), 2.23 (m, 1 H, H-2'b), 2.12 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>CO), 1.79 (2 d, *J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>);

[0673] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub> [M-H]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 457.1472이고, 관찰된 질량은 457.1392이었다.

[0674] *O*<sup>6</sup>-[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-테옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (**WW2p143**)

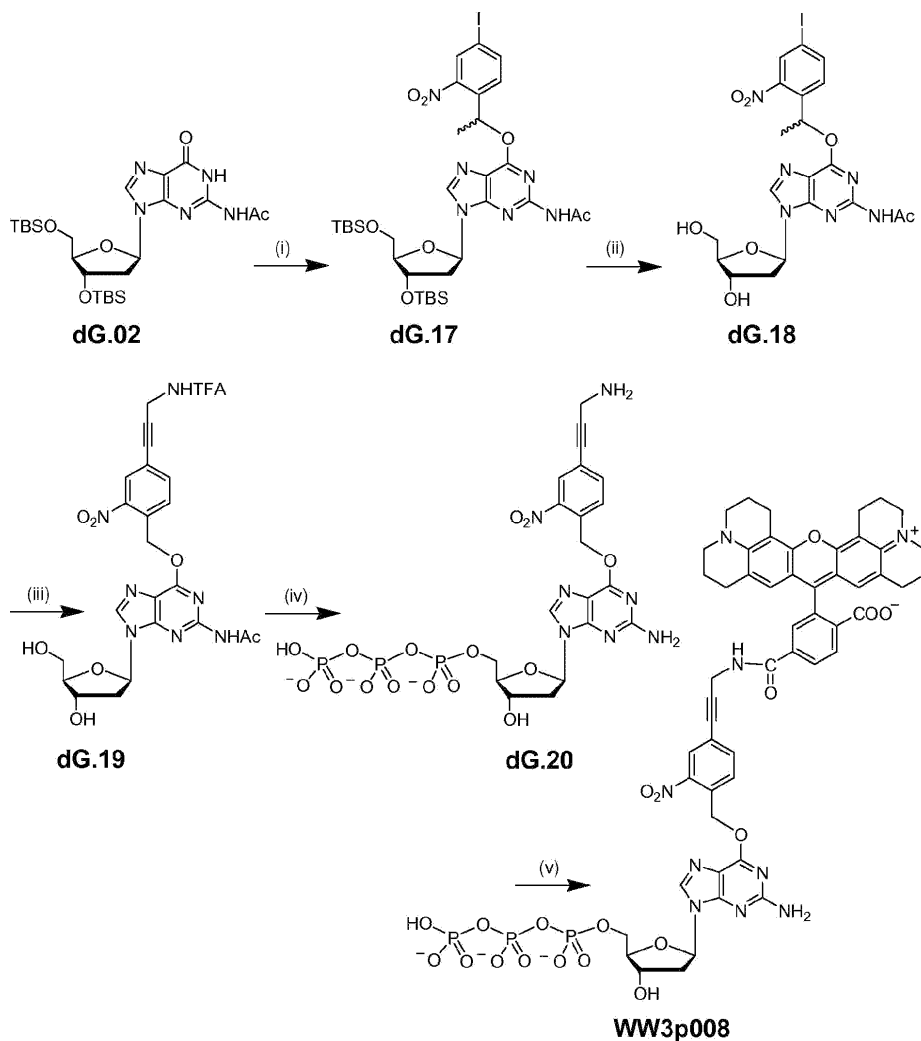
[0675] 화합물 **dG.16** (25 mg, 0.055 mmol)과 양자 스펀지 (23 mg, 0.11 mmol)는 무수성 피리딘 (2 ml)으로부터 3회 증발시키고 트리메틸포스페이트 (0.3 ml)에 용해시켰다. POC<sub>1</sub><sub>3</sub> (8 μl, 0.08 mmol)을 첨가하고, 혼합물은 0°C에서 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.55 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (130 mg, 0.28 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (55 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 용액의 일부는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 *O*<sup>6</sup>-[1-(2-니트로페닐)에틸]-*N*<sup>2</sup>-아세틸-2'-테옥시구아노신-5'-트리포스페이트를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 40분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. 정제된 트리포스페이트는 이후, 60°C에서 3시간 동안 농축된 암모늄 수산화물 (2 ml, 27%)로 처리하였다. 앞서 기술된 바와 같이 역상 HPLC를 이용한 정제를 수행하여 *O*<sup>6</sup>-[1-(2-니트로페닐)에틸]-2'-테옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **WW2p143** (부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다.

[0676] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): 8.26과 8.25 (2 s, 1 H, H-8), 8.02 (d, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 7.88 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz, Ph-H), 7.72 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz, Ph-H), 7.53 (t, 1 H, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 6.71 (m, 1 H, PhCH), 6.34 (t, 1 H, *J* = 6.8 Hz, H-1'), 4.25-4.16 (m, 3 H, H-4'와 H-5'), 2.80 (m, 1 H, H-2'a), 2.51 (m, 1 H, H-2'b), 1.86 (d, 1 H, *J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>);

[0677] 부분입체이성질체에 대한 <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -5.18 (d, *J* = 20.4 Hz), -10.25 (d, *J* = 19.3 Hz), -21.07 (t, *J* = 19.8 Hz);

[0678] ToF-MS (ESI): 분자 이온  $C_{18}H_{22}N_6O_{15}P_3$   $[M-H]^-$ 의 경우에, 계산된 질량은 655.0356이고, 관찰된 질량은 655.0430 이었다.

[0679] 6-ROX 표지된  $O^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-테옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW3p008)의 합성



[0680]

[0681] 개요. 6-ROX 표지된  $O^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-테옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0682] (i) 1-(4-요오도-2-니트로페닐)에탄올,  $PPh_3$ , DIAD, 무수성 THF, 실온, 하룻밤, 76%; (ii)  $n-Bu_4NF$ , THF,  $0^\circ C$ , 이후 실온으로 점진적으로 데움, 2시간, 52%; (iii)  $N$ -프로파르길트리플루오로아세트아마이드,  $Pd(PPh_3)_4$ , CuI,  $Et_3N$ , 무수성 DMF, 4시간, 96%; (iv)  $POCl_3$ , 양자 스펀지,  $(MeO)_3PO$ ,  $0^\circ C$ , 2시간;  $(n-Bu_3NH)_2H_2P_2O_7$ ,  $n-Bu_3N$ , DMF, 5분; 1 M  $HNEt_3HCO_3$ , 1시간;  $NH_4OH$ ,  $60^\circ C$ , 6시간; (v) 6-ROX-SE, 0.1 M  $Na_2CO_3/NaHCO_3$  완충액 (pH 9.2), 1 시간.

[0683]  $O^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}- $N^9$ -아세틸-3',5'-비스- $O$ -(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-테옥시구아노신 (dG.17)

[0684] 무수성 THF (2 ml)에 녹인 화합물 **dG.02** (146 mg, 0.27 mmol), 1-(4-요오도-2-니트로페닐)에탄올 (79 mg, 0.27 mmol)과 PPh<sub>3</sub> (106 mg, 0.4 mmol)의 용액은 디이소프로필 아조디카르복실레이트 (DIAD, 79  $\mu$ l, 0.4 mmol)로 처리하고 실온에서 하룻밤동안 교반하였다. 혼합물은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml)로 희석하고, 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (10 ml)으로 1회 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -[1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸]- $N^2$ -아세틸-3',5'-비스-*O*-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시구아노신 **dG.17** (168 mg, 76%, 부분입체 이성질체의 1:1 혼합물)을 황색 거품으로 수득하였다.

[0685] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.20 (s, 1 H, Ph-H), 8.13과 8.12 (2 s, 1 H, H-8), 7.87 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 7.73 (brs, 1 H, NH), 7.55 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz, Ph-H), 6.62 (m, 1 H, PhCH), 6.35 (t, 1 H, *J* = 6.5 Hz, H-1'), 4.56 (m, 1 H, H-3'), 3.98 (m, 1 H, H-4'), 3.82 (m, 1 H, H-5'a), 3.77 (m, 1 H, H-5'b), 2.50 (m, 1 H, H-2'a), 2.41 (m, 4 H, H-2'b와 CH<sub>3</sub>CO), 1.85 (d, *J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.09 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0686]  $O^6$ -[1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸]- $N^2$ -아세틸-2'-데옥시구아노신 (**dG.18**)

[0687] THF (1.5 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (125 mg, 0.48 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (2 ml)에 녹인 화합물 **dG.17** (155 mg, 0.19 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1 g, 60-200 메시)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -[1-(4-요오도-2-니트로페닐)에틸]- $N^2$ -아세틸-2'-데옥시구아노신 **dG.18** (58 mg, 52%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0688] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.21과 10.20 (2 s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.43 (2 s, 1 H, H-8), 8.34 (2 s, Ph-H), 8.08 (2 d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, Ph-H), 7.54 (2 d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, Ph-H), 6.75 (m, 1 H, PhCH), 6.27 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.30 (m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.89 (m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 4.39 (m, 1 H, H-3'), 3.82 (m, 1 H, H-4'), 3.56 (m, 1 H, H-5'b), 3.50 (m, 1 H, H-5'a), 2.60 (m, 1 H, H-2'a), 2.22 (m, 1 H, H-2'b), 2.12 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>CO), 1.75 (2 d, *J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>).

[0689]  $O^6$ -{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}- $N^2$ -아세틸-2'-데옥시구아노신 (**dG.19**)

[0690] 화합물 **dG.18** (58 mg, 0.1 mmol), *N*-프로파르길 트리플루오로아세트아미드 (45 mg, 0.3 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (11.5 mg, 0.01 mmol), 구리(I) 요오드화물 (3.8 mg, 0.02 mmol)과 트리에틸아민 (27  $\mu$ l, 0.19 mmol)의 용액은 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 메탄올 (1 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml)과 나트륨 바이카보네이트 (80 mg, 0.95 mmol)를 첨가하고, 혼합물은 추가로 30분 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축하고 실리카 겔에서 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $O^6$ -{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}- $N^2$ -아세틸-2'-데옥시구아노신 **dG.19** (58 mg, 96%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 수득하였다.

[0691] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  10.21과 10.20 (2 s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 10.08 (br, 1 H, NHCOCF<sub>3</sub>), 8.43 (2 s, 1 H, H-8), 8.06 (s, 1 H, Ph-H), 7.77 (m, 2 H, Ph-H), 6.78 (m, 1 H, PhCH), 6.28 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.29 (2 d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.89 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 4.39 (m, 1 H, H-3'), 3.82 (m, 1 H, H-4'), 3.56 (m, 1 H, H-5'b), 3.50 (m, 1 H, H-5'a), 2.60 (m, 1 H, H-2'a), 2.22 (m, 1 H, H-2'b), 2.12 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>CO), 1.75 (2 d, *J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>).

능, 3'-OH), 4.39 (m, 1 H, H-3'), 4.29 (d, 2 H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (m, 2 H, H-4'), 3.50 (m, 1 H, H-5'a), 3.44 (m, 1 H, H-5'b), 2.67 (m, 1 H, H-2'a), 2.23 (m, 1 H, H-2'b), 2.11 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.78 (d, 3 H, *J* = 6.4 Hz, CH<sub>3</sub>);

[0692]  $O^6$ -{1-[4-(3-아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (**dG.20**)

[0693] 화합물 **dG.19** (44 mg, 0.07 mmol)와 양자 스펀지 (30 mg, 0.14 mmol)는 무수성 피리딘 (3 ml)으로부터 3회 증발시키고 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 용해했다. POCl<sub>3</sub> (10 μl, 0.11 mmol)을 첨가하고, 혼합물은 0℃에서 3시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (0.7 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (166 mg, 0.35 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (70 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 용액의 일부는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여  $O^6$ -{1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}- $N^2$ -아세틸-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. 정제된 트리포스페이트는 이후, 60℃에서 6시간 동안 농축된 암모늄 수산화물 (2 ml, 27%)로 처리하여  $O^6$ -{1-[4-(3-아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 **dG.20** (부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 수득하였다.

[0694] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): 8.21과 8.20 (2 s, 1 H, H-8), 7.85와 7.75 (2 s, 1 H, Ph-H), 7.64 (m, 1 H, Ph-H), 7.45 (m, 1 H, Ph-H), 6.53 (m, 1 H, PhCH), 6.28 (m, 1 H, H-1'), 4.23 - 4.12 (m, 3 H, H-4'와 H-5'), 3.97 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.70 (m, 1 H, H-2'a), 2.50 (m, 1 H, H-2'b), 1.74 (m, 1 H, CH<sub>3</sub>);

[0695] 부분입체이성질체에 대한 <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O): δ -5.53 (d, *J* = 20.1 Hz), -10.50 (d, *J* = 19.3 Hz), -21.29 (t, *J* = 19.8 Hz);

[0696] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>P<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 708.0622이고, 관찰된 질량은 708.0609이었다.

[0697] 6-ROX 표지된  $O^6$ -{1-[4-(3-아미도-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (**WW3p008**)

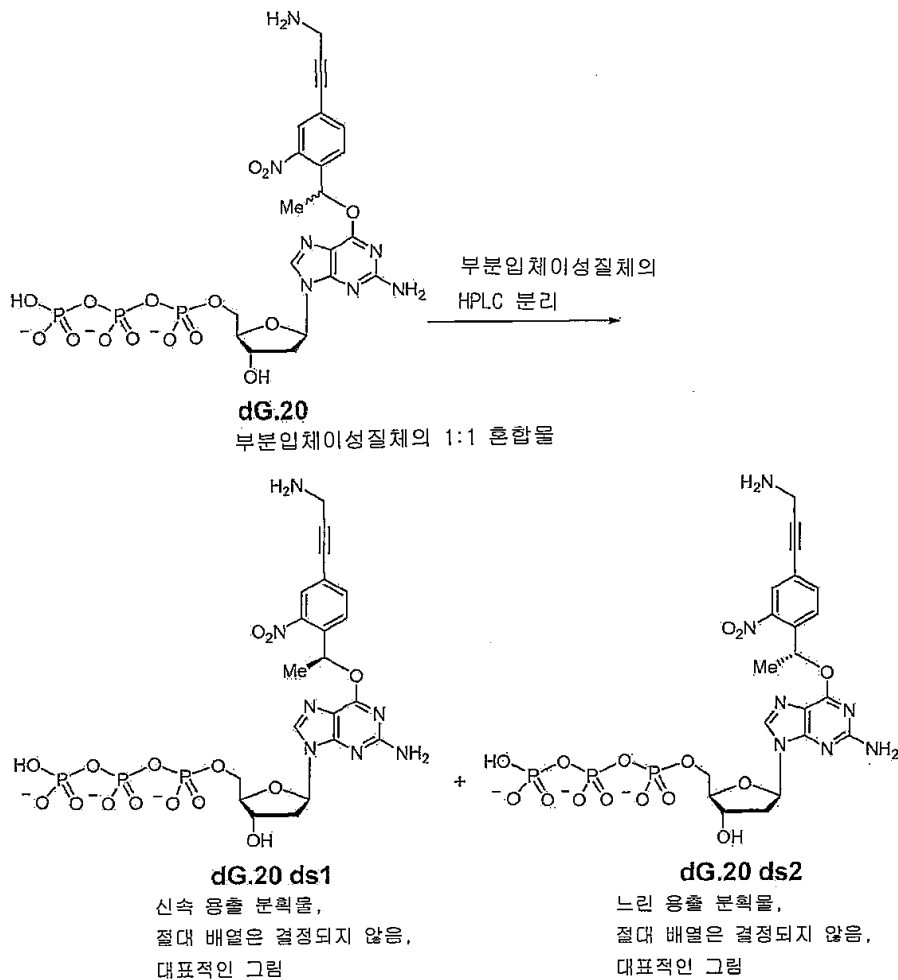
[0698] 무수성 DMSO (120 μl)에 녹인 6-ROX-SE (3 mg, 4.7 μmol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 0.3 ml)에 녹인 트리포스페이트 **dG.20** (1.45 μmol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-ROX 표지된 트리포스페이트 **WW3p008**을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM TEAA; B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW3p008**의 농도는 6-ROX 염료의 소광 계수 (즉, 575 nm에서 82,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0699]

$O^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (dG.20 ds1과 dG.20 ds2)의 2개의 부분입체이성질체의 분리

[0700]

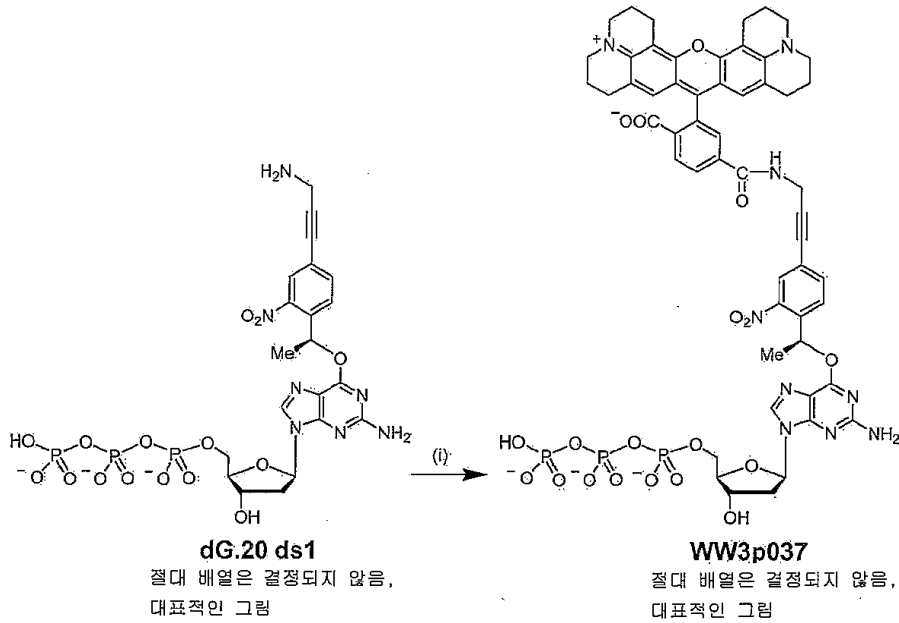
dG.20의 2개의 부분입체이성질체의 분리는 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 수행하여  $O^6$ -{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신 트리포스페이트 dG.20 ds1 (단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)과  $O^6$ -{(S 또는 R)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신 트리포스페이트 dG.20 ds2 (단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)를 획득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물 /CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 70분 동안 5-25%, 이후 30분 동안 25-50%의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다.



[0701]

[0702]

6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $O^6$ -{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW3p037)의 합성.



[0703]

[0704]

개요. 6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $\hat{O}^6$ -{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0705]

(i) 6-ROX-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간.

[0706]

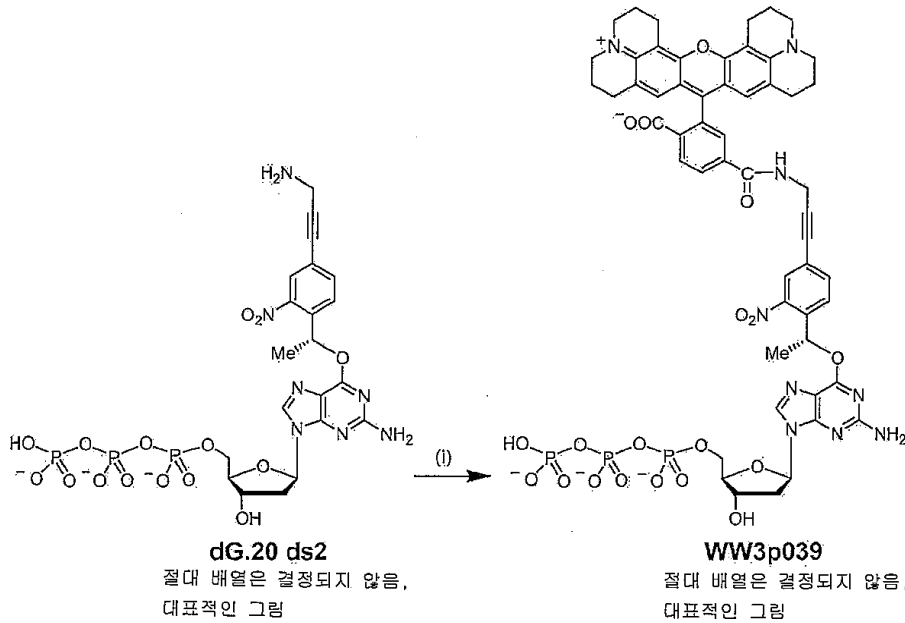
6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $\hat{O}^6$ -{(R 또는 S)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW3p037).

[0707]

무수성 DMSO (120  $\mu$ l)에 녹인 6-ROX-SE (1.5 mg, 2.38  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 150  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 dG.20 ds1 (0.67  $\mu$ mol, 단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체 트리포스페이트 WW3p037을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 50-90% B 20분 동안의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. WW3p037의 농도는 6-ROX 염료의 소광 계수 (즉, 575 nm에서 82,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0708]

6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $\hat{O}^6$ -{(S 또는 R)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW3p039)의 합성



[0709]

[0710]

**개요.** 6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $O^6$ -{(S 또는 R)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트의 합성.

[0711]

(i) 6-ROX-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간.

[0712]

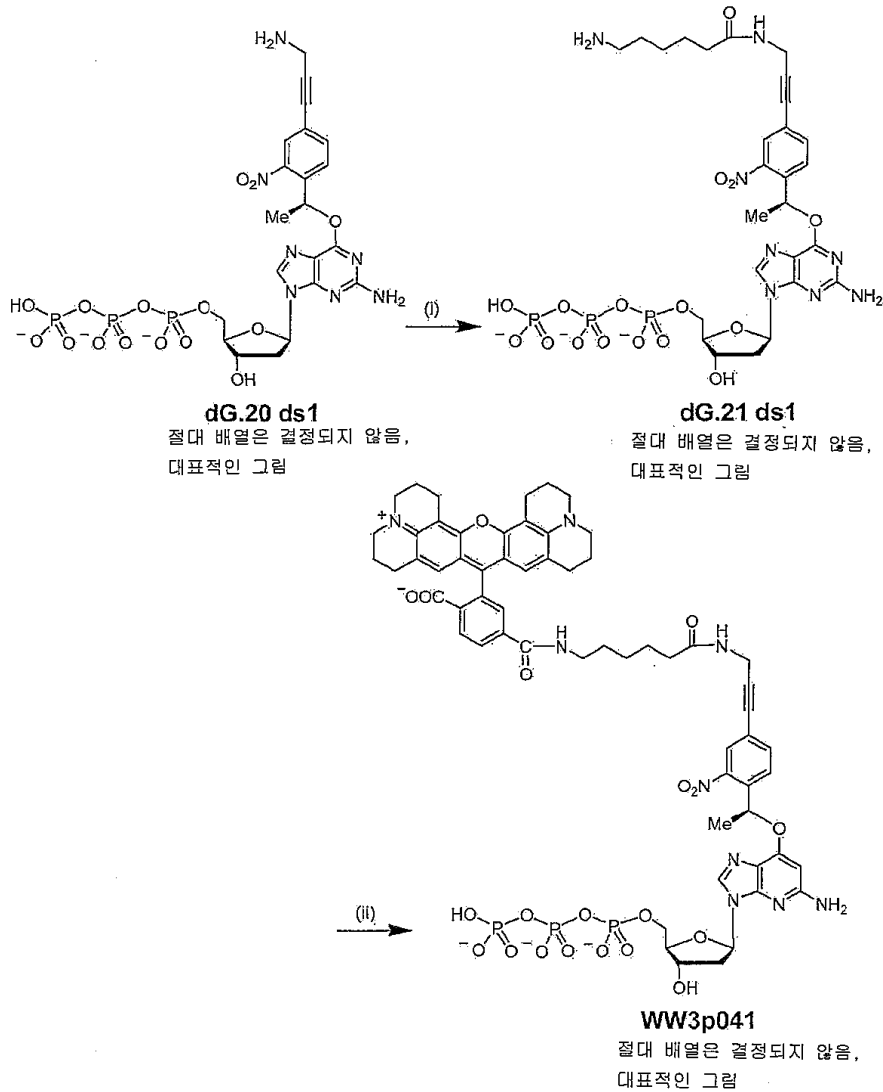
6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $O^6$ -{(S 또는 R)-1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)-2-니트로페닐]에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (**WW3p039**)

[0713]

무수성 DMSO (200  $\mu$ l)에 녹인 6-ROX-SE (2.5 mg, 3.96  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 150  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dG.20 ds2** (0.97  $\mu$ mol, 단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체 트리포스페이트 **WW3p039**를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 50-90% B 20분 동안의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW3p039**의 농도는 6-ROX 염료의 소광 계수 (즉, 575 nm에서 82,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0714]

6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $O^6$ -{(R 또는 S)-1-(4-[3-(6-아미노-카프로일)아미노-1-프로피닐]-2-니트로페닐]에틸)-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (**WW3p041**)의 합성



[0715]

[0716] **개요.** 6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $O^6$ -{(R 또는 S)-1-{4-[3-(6-아미노카프로일)아미노-1-프로피닐]-2-니트로페닐}에틸}-2'-데옥시구아노신 트리포스페이트의 합성.

[0717] (i) 6-N-(트리플루오로아세틸)아미노카프로산 N-숙신이미딜 에스테르, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; (ii) 6-ROX-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간.

[0718]  $O^6$ -{(R 또는 S)-1-{4-[3-(6-아미노카프로일)아미노-1-프로피닐]-2-니트로페닐}에틸}-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (단일 부분입체이성질체 **dG.21 ds1**)

[0719] 무수성 DMSO (20  $\mu$ l)에 녹인 6-N-(트리플루오로아세틸)아미노카프로산 N-숙신이미딜 에스테르 (1.0 mg, 3.08  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 200  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dG.20 ds1** (0.89  $\mu$ mol, 단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 농축된 암모늄 수산화물 (25% aq., 0.5 ml)을 첨가하고, 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 트리포스페이트 **dG.21 ds1** (단일 부분입체이성질체, 절대 배열은 결정되지 않음)을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 10분 동안 50-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다.

- [0720] 6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체  $O^6$ -{(R 또는 S)-1-(4-[3-(6-아미노-카프로일)아미노-1-프로피닐-2-니트로페닐]에틸)-2'-데옥시구아노신-5'-트리포스페이트 (WW3p041)의 합성
- [0721] 무수성 DMSO (120  $\mu$ l)에 녹인 6-ROX-SE (1.5 mg, 2.34  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 200  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dG.21 ds1** (0.59  $\mu$ mol, 단일 부분입체이성질체, 절대 배율은 결정되지 않음)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-ROX 표지된 단일 부분입체이성질체 트리포스페이트 **WW3p041**을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-50% B, 이후 50-90% B 20분 동안의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW3p041**의 농도는 6-ROX 염료의 소광 계수 (즉, 575 nm에서 82,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.
- [0722] **실시예 5 - 중합효소 종점(PEP) 분석법:**
- [0723] 자연 뉴클레오티드 대응물과 비교하여 뉴클레오티드 유사체를 종결시키는 상대적 통합 효율을 산정하기 위하여 정량적 Sanger-기초된 분석법이 빈번하게 이용되고 있다. 이들 분석법은 유용하긴 하지만, 자연 뉴클레오티드의 부재에서 변형된 뉴클레오티드 유사체를 분석할 수 있는 능력이 없다. 이들 2가지 단점은 정량적 중합효소 종점 (PEP) 분석법을 결과하였는데, 이는 다수의 충분히 특성화되고 상업적으로 가용한 중합효소와 대비하여 다수의 변형된 뉴클레오티드를 선별하기 위하여 고속 처리 방식으로 이용된다. 이후, 특이적인 DNA 중합효소로 선도 화합물(lead compound)의 확인은 추가적인 동역학 연구를 위하여 우선될 수 있다. PEP 분석법은 과량의 프라이머/주형 복합체(즉, 상기 복합체는 적정(titration)의 시작 시점에 중합효소와 완전히 결합된다)에서 중합효소 농도로 설계되고, 따라서 뉴클레오티드 결합에 대한 반응과 뉴클레틸 커플링(nucleotyl coupling) 단계를 제한한다. 이후, 겔 전기영동(gel electrophoresis)으로 염료-표지된 프라이머의 신장을 관찰하기 위하여, 제한된 양의 원하는 뉴클레오티드가 적절한 농도 범위(일반적으로, 3 크기 자릿수(order of magnitude))에서 적정된다. 종점 농도(end-point concentration)는 반-로그 플롯(semi-log plot)으로부터 결정되는데, 여기서 기질(substrate)과 산물(product)의 몰수(number of mole)는 동등하고, IC<sub>50</sub>(즉, 50%에서 통합 농도) 수치로 불린다.
- [0724] 본 연구에서 평가된 모든 중합효소의 경우에, 40 nM의 올리고-주형(oligo-template)(5'-TACGGAGCA-GTACTGGCCGTCGTTTACA, 통합 염기는 밑줄과 굵은 글씨체로 표시된다)은 80°C에서 30초 동안, 57°C에서 30초 동안 1xThermoPol 완충액 (20 mM 트리스-HCl, pH 8.8; 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 0.1% Triton X-100, New England BioLabs)에서 5 nM BODIPY-FL 표지된 프라이머 (5'-TTGTAACGACGGCCAGT)에 어닐링(annealing)하고, 이후 4°C로 냉각한다. 이러한 프라이머/주형 복합체는 DNA 중합효소, 뉴클레오티드 유사체와 ThermoPol 완충액의 첨가로 절반(즉, 이의 최종 농도는 10  $\mu$ l의 부피에서 2.5 nM이다)으로 희석한다. 이는 뉴클레오티드 적정을 위한 IC<sub>50</sub> 수치의 하한선(lower limit)을 1.25 nM (즉, [프라이머] = [프라이머+1])으로 정의한다. 중합효소 반응물은 적절한 온도에서 10분 동안 항온처리하고, 이후 4°C로 냉각하고 10  $\mu$ l의 중단 용액(stop solution)(98% 탈이온화된 포름아마이드; 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0; 25 mg/ml Blue Dextran, MW 2,000,000)으로 급랭시킨다. 중단된 반응물은 30초 동안 90°C로 가열되고, 이후 얼음 위에 위치시킨다. 신장 산물은 AB 모형 377 DNA 서열분석기를 이용하여 10% Long Ranger (Cambrex) 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에서 분석하고, 정량적 데이터(quantitative data)는 화합물 농도와 대비하여 산물 형성(product formation)의 선형-로그 플롯(linear-log plot)으로 표시한다. 이들 PEP 분석법은 IC<sub>50</sub> 수치  $\pm$  표준편차(standard deviation)를 계산하기 위하여, 각 DNA 중합효소/뉴클레오티드 유사체 조합에 대하여 삼중으로 수행한다.
- [0725] 8가지 상업적으로 가용한, 3'-엑소뉴클레아제 결합 (3'-옥소-) DNA 중합효소에 대한 활성 단위(activity unit)의 수는 1.25 nM의 PEP IC<sub>50</sub> 한계에 도달할 목적으로, 2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 (dATP, 0.1 nM 내지 100 nM의 농도 범위)로 적정에 의해 최초 결정한다(데이터 제시되지 않음). 일반적으로, Taq, Thermanator와 Thermanator II를 제외하고, 단위의 수가 증가하면 이러한 한계를 향한 dATP에 대한 IC<sub>50</sub> 수치가 감소하였다.

이들 효소의 경우에, 효소 농도가 증가함에 따라 dATP에 대한 IC<sub>50</sub> 수치가 증가하였는데, 이는 추가로 조사하지 않고 증가하는 효소 농도와 가인산분해(phosphorolysis)의 직접적인 상관관계에 기인하는 것으로 추정하였다. 이들 사례에서, dATP에 대한 가장 낮은 IC<sub>50</sub> 수치를 제공하는 활성 단위들이 차후 PEP 분석평가를 위한 단위의 수로서 이용되었다.

[0726] 변형된 뉴클레오티드 적정:

[0727] WW1p129와 ddATP는 이후, 0.1 nM 내지 100 nM, 1 nM 내지 1 μM, 10 nM 내지 10 μM, 또는 100 nM 내지 100 μM의 농도 범위에서 이들 8개의 DNA 중합효소(앞서 정의된 단위 활성)로 PEP 분석법에 의해 적정하였다(표 1 참조). UV-광 민감성 화합물은 dATP로의 전환을 최소화시키기 위하여 항상 낮은 광 조건(light condition)에서 사용하였다. 이들 데이터는 *TaqFS*를 제외한 모든 사례에서, WW1p129가 ddATP보다 더욱 효율적으로(즉, 더욱 낮은 IC<sub>50</sub> 수치) 통합된다는 것을 증명한다.

**표 1**

**8개의 상이한 DNA 중합효소를 이용한, WW1p129에 대한 PEP 분석 결과의 요약**

DNA polymerase	IC <sub>50</sub> values		
	dATP	WW1p129	ddATP
<i>Bst</i> : 65°C	1.2 ± 0.1 nM	21 ± 3 nM	<b>0.37 ± 0.03 μM</b>
Klenow(3'-exo-): 37°C	1.6 ± 0.1 nM	4.3 ± 0.2 nM	29 ± 5 nM
<i>Taq</i> : 68°C	5.5 ± 0.5 nM	<b>2.1 ± 0.2 μm</b>	<b>12.6 ± 0.9 μm</b>
<i>TaqFS</i> : 68°C	5.3 ± 0.1 nM	<b>0.89 ± 0.06 μm</b>	3.3 ± 0.1 nM
Therminator: 75°C	2.3 ± 0.3 nM	3.1 ± 0.4 nM	9.7 ± 1.1 nM
Therminator II: 75°C	4.4 ± 0.6 nM	7.8 ± 0.7 nM	<b>0.23 ± 0.03 μM</b>
Vent(3'-exo-): 72°C	1.6 ± 0.2 nM	2.1 ± 0.2 nM	<b>0.55 ± 0.04 μM</b>
DeepVent(3'-exo-): 72°C	2.8 ± 0.2 nM	11.0 ± 0.6 nM	<b>3.4 ± 0.4 μM</b>

[0728] 또한, 다수의 광절단가능 종결 뉴클레오티드를 이용하고, *Bst* 중합효소와 Therminator DNA 중합효소를 이용하여 PEP 분석평가를 수행하였는데(표 2), 이는 이들 화합물이 효율적으로 통합된다는 것을 증명한다. 표 2에서 데이터는 본 발명에 따른 화합물이 우수한 기질임을 암시한다.

**표 2**

**Bst와 Therminator 중합효소로 IC<sub>50</sub> 수치의 비교**

화합물	Bst	Therminator
WW1p129	39 ± 9 nm	2.5 ± 0.4 nm
VL3p03085	138 ± 38 nm	1.1 ± 0.1 nm
WW2p044	57 ± 11 nm	1.8 ± 0.2 nm
WW2p077	3.8 ± 0.2 마이크로몰	6.9 ± 0.5 nm
WW2p050	n/a	4.4 ± 0.6 nm
WW2p075	n/a	3.8 ± 1.1 nm
WW2p080	n/a	3.0 ± 0.6 nm
WW2p0121	n/a	6.3 ± 0.4 nm

[0731]

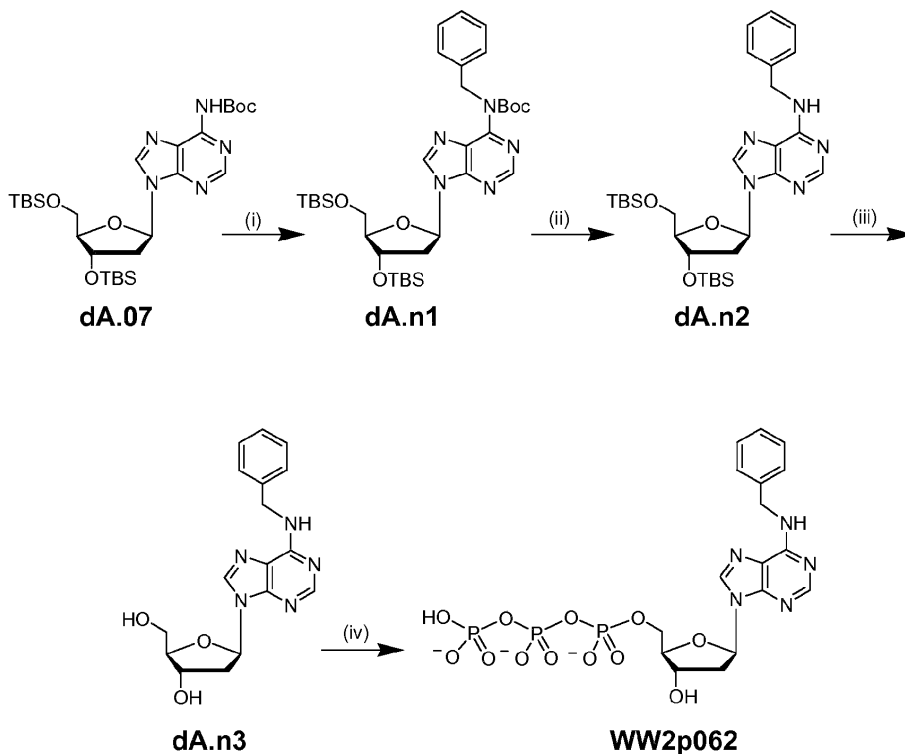
표지된 뉴클레오타이드와 뉴클레오시드

[0732]

실시예 1: dA 화합물

[0733]

*N*<sup>6</sup>-벤질-2'-테옥시아데노신 트리포스페이트 (WW2p062)의 합성



[0734]

[0735]

개요. *N*<sup>6</sup>-벤질-2'-테옥시아데노신 5'-트리포스페이트의 합성.

[0736]

(i) NaH, DMF, 벤질 브롬화물, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 86%; (ii) SiO<sub>2</sub>, 진공, 70-80°C, 95%; (iii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 99%; (iv) POCl<sub>3</sub>, (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20-30°C; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>; 32%.

[0737]

*N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>6</sup>-벤질-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시아데노신 (*dA.n1*)

[0738]

NaH (18 mg, 0.75 mmol, 건성)를 0°C에서, 무수성 DMF (5 ml)에 녹인 화합물 **dA.07** (400 mg, 0.58 mmol)의 용액에 첨가하고 30분 동안 교반하였다. 무수성 DMF (2.5 ml)에 녹인 벤질 브롬화물 (149 mg, 0.87 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. DMF는 진공에서 제거하고, 잔류물은 에틸 아세테이트 (60 ml)에 용해시키고, 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (각 40 ml)으로 2회, 그리고 물 (40 ml)로 1회 세척하였다. 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (10 ml)로 추출하고, 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>6</sup>-*tert*-부틸옥시카르보닐-*N*<sup>6</sup>-벤질-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시아데노신 **dA.n1** (398 mg, 86%)을 점성 오일로 수득하였다.

[0739]

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.72 (s, 1 H, H-8), 8.32 (s, 1 H, H-2), 7.39 (m, 2 H, Ph-H), 7.25 (m, 2 H,

Ph-H), 7.18 (m, 1 H, Ph-H), 6.49 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 5.28 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.62 (m, 1 H, H-3'), 4.01 (m, 1 H, H-4'), 3.85 (dd, 1 H,  $J = 4.4$ 와 11.2 Hz, H-5'a), 3.77 (dd, 1 H,  $J = 3.4$ 와 11.2 Hz, H-5'b), 2.61 (m, 1 H, H-2'a), 2.43 (m, 1 H, H-2'b), 1.65 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.96 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.08 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

[0740] *N*<sup>6</sup>-벤질-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시아데노신 (**dA.n2**)

[0741] 실리카 겔 60 (3.76 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 70-80°C로 가열함으로써 활성화됨)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml)에 녹인 화합물 **dA.n1** (376 mg, 0.56 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 감압 하에 2일 동안 70-80°C로 가열하고, 메탄올 (각 30 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>6</sup>-벤질-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-테옥시아데노신 **dA.n2** (305 mg, 95%)를 황색 거품으로 수득하였다.

[0742] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.41 (s, 1 H, H-8), 8.07 (s, 1 H, H-2), 7.38 (m, 2 H, Ph-H), 7.33 (m, 2 H, Ph-H), 7.28 (m, 1 H, Ph-H), 6.45 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 6.12 (br s, 1 H, 6-NH), 4.87 (br s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.62 (m, 1 H, H-3'), 4.01 (m, 1 H, H-4'), 3.87 (dd, 1 H,  $J = 4.2$ 와 11.2 Hz, H-5'a), 3.77 (dd, 1 H,  $J = 3.2$ 와 11.2 Hz, H-5'b), 2.64 (m, 1 H, H-2'a), 2.44 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.09 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-).

[0743] *N*<sup>6</sup>-벤질-2'-테옥시아데노신 (**dA.n3**)

[0744] THF (2.5 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (335 mg, 1.28 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (6 ml)에 녹인 화합물 **dA.n2** (292 mg, 0.51 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1 g)을 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 *N*<sup>6</sup>-벤질-2'-테옥시아데노신 **dA.n3** (173 mg, 99%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0745] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.30 (s, 1 H, H-8), 8.25 (s, 1 H, H-2), 7.36 (m, 2 H, Ph-H), 7.31 (m, 2 H, Ph-H), 7.24 (m, 1 H, Ph-H), 6.42 (dd, 1 H,  $J = 6.0$ 과 7.9 Hz, H-1'), 4.81 (br s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.57 (m, 1 H, H-3'), 4.06 (m, 1 H, H-4'), 3.83 (m, 1 H,  $J = 2.9$ 와 12.3 Hz, H-5'a), 3.73 (dd, 1 H,  $J = 3.3$ 과 12.3 Hz, H-5'b), 2.79 (m, 1 H, H-2'a), 2.40 (m, 1 H, H-2'b).

[0746] *N*<sup>6</sup>-벤질-2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW2p062**)

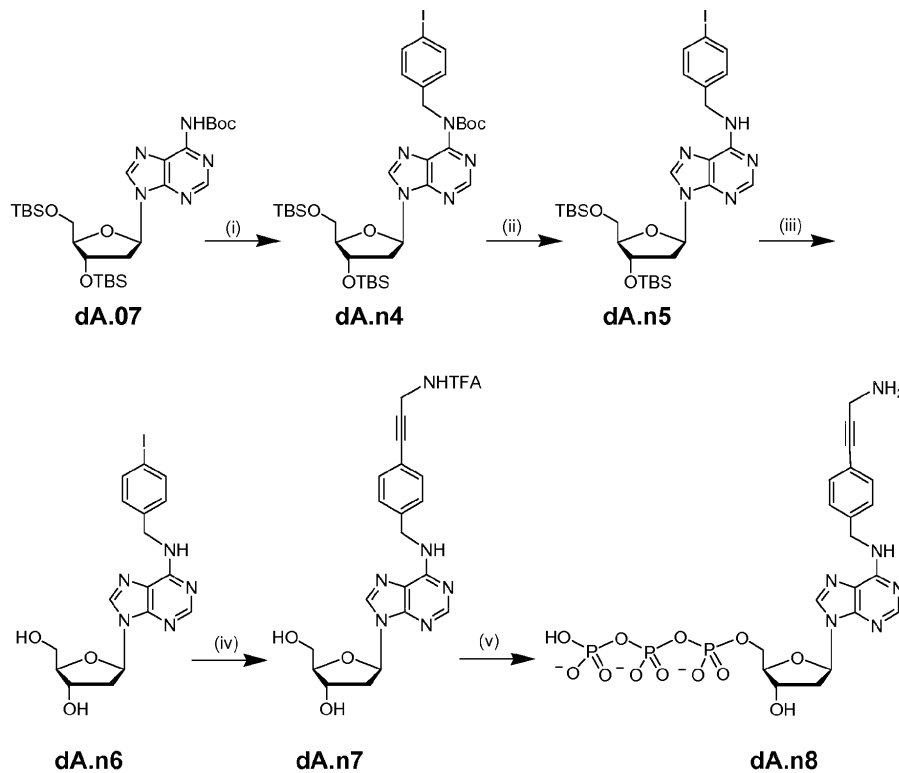
[0747] POCl<sub>3</sub> (22 μl, 0.24 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dA.10a** (42 mg, 0.12 mmol)의 용액에 첨가하고 마이너스 20-30°C에서 2시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (1.2 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (285 mg, 0.6 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (120 μl)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 *N*<sup>6</sup>-벤질-2'-테옥시아데노신-5'-트리포스페이트 **WW2p062** (24 mg, 32%)를 백색의 스펀모양 고체로 수득하였다.

[0748]  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  8.43 (s, 1 H, H-8), 8.20 (s, 1 H, H-2), 7.39 - 7.30 (m, 5 H, Ph-H), 6.50 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 4.85 (s, 2 H, Ph- $\text{CH}_2$ ), 4.31 (s, 1 H, H-4'), 4.22 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 2.82 (m, 1 H, H-2'a), 2.62 (m, 1 H, H-2'b);

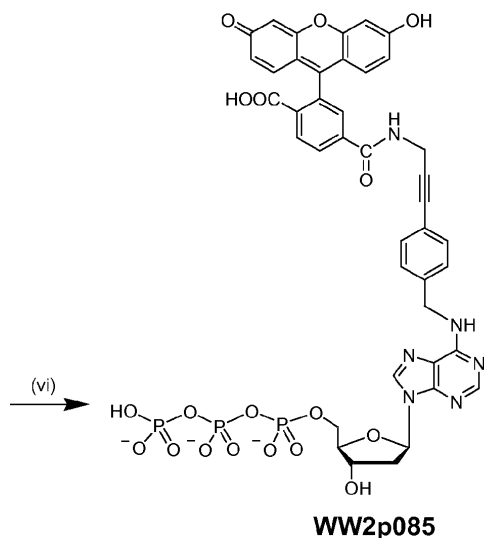
[0749]  $^{31}\text{P NMR}$  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  -5.72 (d,  $J = 15.9$  Hz), -10.78 (d,  $J = 15.4$  Hz), -19.16 (t,  $J = 14.9$  Hz);

[0750] *ToF-MS (ESI)*: 분자 이온  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}_3\text{Na}$   $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$ 의 경우에, 계산된 질량은 602.0219이고, 관찰된 질량은 602.0363이었다.

[0751] 6-FAM 표지된  $N^6$ -[4-(3-아미노-1-프로필)벤질]-2'-테옥시아데노신 트리포스페이트 (WW2p085)의 합성



[0752]



[0753]

[0754]

**개요.** 6-FAM 표지된  $N^6$ -[4-(3-아미노-1-프로필)벤질]-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트의 합성.

[0755]

(i) NaH, DMF, 4-요오도벤질 브롬화물, 0°C. 이후 실온으로 점진적으로 데움, 99%; (ii) SiO<sub>2</sub>, 진공, 70-80°C, 99%; (iii) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 98%; (iv) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(0), CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수성 DMF, 4.5시간, 94%; (v) POC<sub>3</sub>, 양자 스펜지, (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20-30°C, 2시간; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF, 5분; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>, 1시간; NH<sub>4</sub>OH, 1시간; 84 %; (vi) 6-FAM-SE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2.

[0756]

$N^6$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^6$ -(4-요오도벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (**da.n4**)

[0757]

NaH (23 mg, 0.94 mmol, 건성)를 0°C에서, 무수성 DMF (6.5 ml)에 녹인 화합물 **da.07** (500 mg, 0.72 mmol)의 용액에 첨가하고 30분 동안 교반하였다. 무수성 DMF (2.5 ml)에 녹인 4-요오도벤질 브롬화물 (322 mg, 1.08 mmol)의 용액을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. DMF는 진공에서 제거하고, 잔류물은 에틸 아세테이트 (60 ml)에 용해시키고, 포화된 NH<sub>4</sub>Cl 용액 (각 40 ml)으로 2회, 그리고 물 (40 ml)로 1회 세척하였다. 모아진 수층은 에틸 아세테이트 (10 ml)로 추출하고, 모아진 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^6$ -*tert*-부틸옥시카르보닐- $N^6$ -(4-요오도벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **da.n4** (565 mg, 99%)를 점성 오일로 수득하였다.

[0758]

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.71 (s, 1 H, H-8), 8.33 (s, 1 H, H-2), 7.58 (d, 2 H, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 7.17 (d, 2 H, *J* = 8.2 Hz, Ph-H), 6.49 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 5.20 (s, 2 H, Ph-CH<sub>2</sub>), 4.62 (m, 1 H, H-3'), 4.02 (m, 1 H, H-3'), 3.86 (dd, 1 H, *J* = 4.2와 11.2 Hz, H-5'a), 3.78 (dd, 1 H, *J* = 3.2와 11.2 Hz, H-5'b), 2.63 (m, 1 H, H-2'a), 2.45 (m, 1 H, H-2'b), 1.42 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 0.92 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.08 (2 s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-).

[0759]

$N^6$ -(4-요오도벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (**da.n5**)

[0760]

실리카 겔 60 (6.00 g, 100-200 메시, 감압 하에 24시간 동안 70-80°C로 가열함으로써 활성화됨)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml)에 녹인 화합물 **da.n4** (565 mg, 0.71 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물

은 감압 하에 2일 동안 70-80°C로 가열하고, 메탄올 (각 30 ml)로 3회 세척하고, buchi 깔때기를 이용하여 여과하였다. 모아진 여과액은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^6$ -(4-요오도벤질)-3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **dA.n5** (489 mg, 99%)를 황색 거품으로 수득하였다.

[0761]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.38 (s, 1 H, H-8), 8.06 (s, 1 H, H-2), 7.63 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 7.11 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 6.45 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 6.34 (t, 1 H, 6-NH), 4.81 (br s, 2 H, Ph- $CH_2$ ), 4.61 (m, 1 H, H-3'), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 3.85 (dd, 1 H,  $J = 4.2$ 와 11.2 Hz, H-5'a), 3.76 (dd, 1 H,  $J = 3.2$ 와 11.2 Hz, H-5'b), 2.64 (m, 1 H, H-2'a), 2.44 (m, 1 H, H-2'b), 0.91 (s, 18 H,  $(CH_3)_3CSi$ ), 0.09 (2 s, 12 H,  $(CH_3)_2Si$ ).

[0762]  $N^6$ -(4-요오도벤질)-2'-데옥시아데노신 (**dA.n6**)

[0763] THF (1.0 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (282 mg, 1.08 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (1.2 ml)에 녹인 화합물 **dA.n5** (300 mg, 0.43 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 2시간 동안 교반하였다. 실리카 겔 60 (1 g) 첨가하고, 혼합물은 진공에서 증발 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^6$ -(4-요오도벤질)-2'-데옥시아데노신 **dA.n6** (266 mg, 98%)을 백색 거품으로 수득하였다.

[0764]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  8.48 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 6-NH), 8.40 (s, 1 H, H-8), 8.27 (s, 1 H, H-2), 7.68 (d, 2 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 7.17 (d, 2 H,  $J = 8.0$  Hz, Ph-H), 6.39 (t, 1 H,  $J = 6.4$  Hz, H-1'), 5.34 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.22 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.68 (br s, 2 H, Ph- $CH_2$ ), 4.44 (m, 1 H, H-4'), 3.91 (m, 1 H, H-3'), 3.64 (m, 1 H, H-5'a), 3.55 (m, 1 H, H-5'b), 2.76 (m, 1 H, H-2'a), 2.31 (m, 1 H, H-2'b).

[0765]  $N^6$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-벤질]-2'-데옥시아데노신 (**dA.n7**)

[0766] 무수성 DMF (2.1 ml)에 녹인 화합물 **dA.n6** (266 mg, 0.57 mmol), *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드 (260 mg, 1.72 mmol), CuI (22 mg, 0.11 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (65 mg, 0.06 mmol)과 Et<sub>3</sub>N (160  $\mu$ l, 1.14 mmol)의 용액은 실온에서 4.5시간 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여  $N^6$ -[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)-벤질]-2'-데옥시아데노신 **dA.n7** (268 mg, 94%)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0767]  $^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  10.05 (br m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.46 (br m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.37 (s, 1 H, H-8), 8.19 (s, 1 H, H-2), 7.37 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 7.32 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 6.35 (dd, 1 H,  $J = 6.4$ 와 7.5 Hz, H-1'), 5.31 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.19 (t, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.70 (br s, 2 H, Ph- $CH_2$ ), 4.41 (m, 1 H, H-3'), 4.26 (d, 2 H,  $J = 4.3$  Hz,  $CH_2$ ) 3.88 (m, 1 H, H-4'), 3.61 (m, 1 H, H-5'a), 3.53 (m, 1 H, H-5'b), 2.73 (m, 1 H, H-2'a), 2.25 (m, 1 H, H-2'b).

[0768]  $N^6$ -[4-(3-아미노-1-프로필)벤질]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**dA.n8**)

[0769] POCl<sub>3</sub> (16  $\mu$ l, 0.17 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 **dA.n7** (56 mg, 0.11 mmol)와 양자 스피어 (37 mg, 0.17 mmol)의 용액에 첨가하고 마이너스 20-30°C에서 2시간 동안 교반하였다. 무수성 DMF (1.1

ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (261 mg, 0.55 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (110  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서, 농축된 암모늄 수산화물 (10 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 획득된 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 **dA.n8** (63 mg, 84%)을 백색의 스펀모양 고체로 수득하였다.

[0770] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.41 (s, 1 H, H-8), 8.19 (s, 1 H, H-2), 7.38 - 7.26 (m, 4 H, Ph-H), 6.47 (dd, 1 H, *J* = 5.5와 6.6 Hz, H-1'), 4.30 (s, 1 H, H-4'), 4.21 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 3.63 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.79 (m, 1 H, H-2'a), 2.60 (m, 1 H, H-2'b).

[0771] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -5.80 (d, *J* = 20.1 Hz), -10.94 (d, *J* = 19.3 Hz), -21.59 (t, *J* = 19.3 Hz);

[0772] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 655.0485이고, 관찰된 질량은 655.0758이었다.

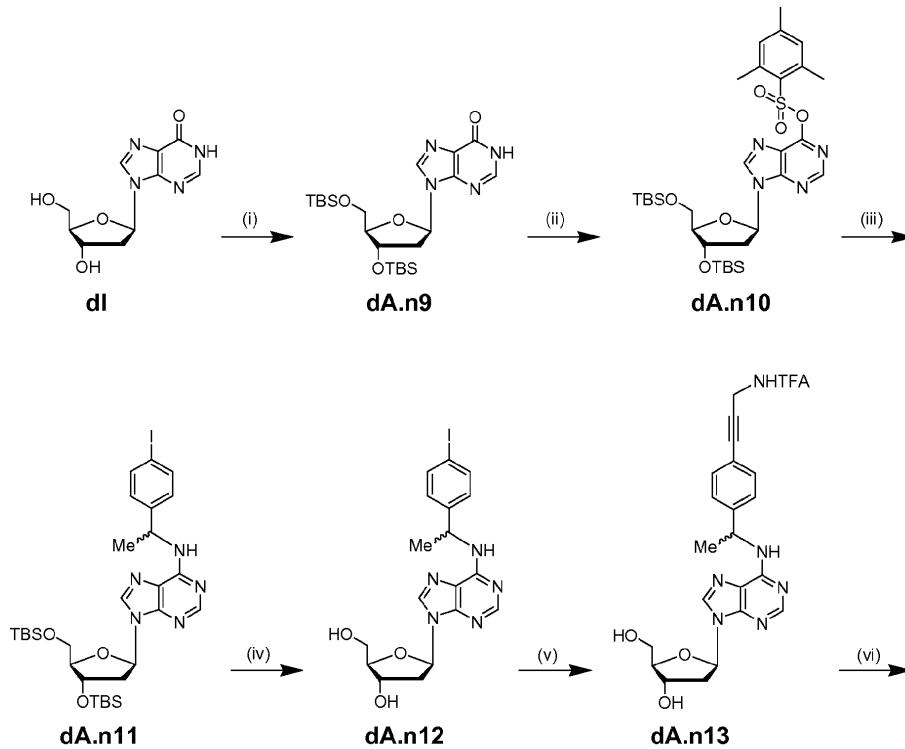
[0773] 6-FAM 표지된 N<sup>6</sup>-[4-(3-아미노-1-프로필)벤질]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW2p085**)

[0774] 무수성 DMSO (70  $\mu$ l)에 녹인 6-FAM-SE (3.5 mg, 7.35  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 600  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dA.18a** (3.5  $\mu$ mol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-FAM 표지된 트리포스페이트 **WW2p085**를 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-20% B, 이후 20분 동안 20-90% B의 선형 구배로 용출을 수행하였다. **WW2p085**의 농도는 6-FAM 염료의 소광 계수 (즉, 494 nm에서 68,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

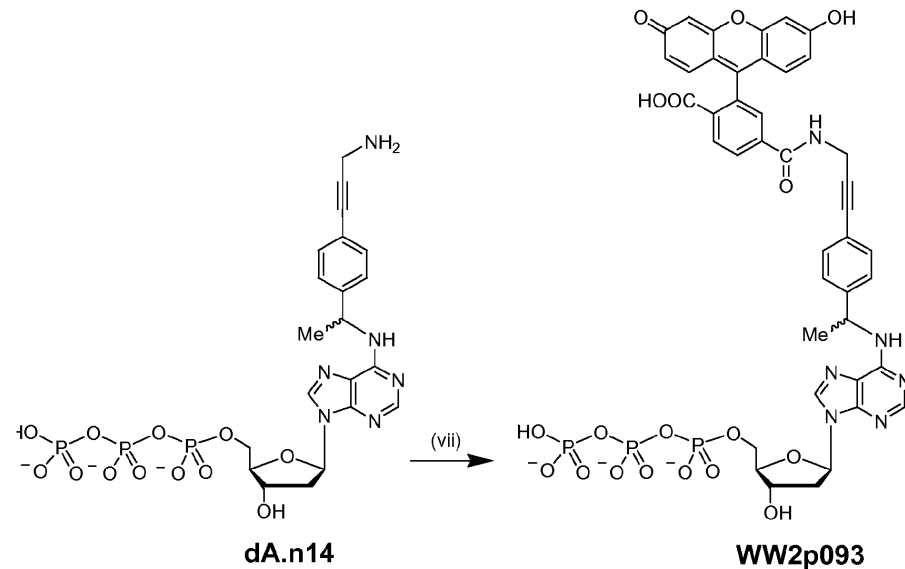
[0775] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>41</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>의 경우에, 계산된 질량은 993.1299이고, 관찰된 질량은 993.1520이었다.

[0776]

6-FAM 표지된  $N^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트 (WW2p093)의 합성



[0777]



[0778]

[0779]

개요. 6-FAM 표지된  $N^6$ -{1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)페닐]에틸}-2'-데옥시아데노신 트리포스페이트의 합성.

[0780]

(i) TBSCl, 이미다졸, 무수성 DMF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 12시간, 83%; (ii) 2-메시틸렌설포닐 염화물, Et<sub>3</sub>N, DMAP, 무수성 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 실온, 1.5시간, 20%; (iii) 1-(4-요오도페닐)에틸아민, 분자체, 무수성 1,4-디옥산, 50°C, 18시간, 88%; (iv) *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, 0°C, 이후 실온으로 점진적으로 데움, 93%; (v) *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(0), CuI, Et<sub>3</sub>N, 무수성 DMF, 4.5시간, 86%; (vi) POCl<sub>3</sub>, (MeO)<sub>3</sub>PO, 마이너스 20-30°C; (*n*-Bu<sub>3</sub>NH)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, *n*-Bu<sub>3</sub>N, DMF; 1 M HNEt<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>; 86% (vii) 6-FAMSE, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.2, 1시간.

- [0781] 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시이노신 (**dA.n9**)<sup>1</sup>
- [0782] TBSCl (1.91 g, 12.67 mmol)의 용액을 질소 대기 하에 0°C에서, 무수성 DMF (3 ml)에 녹인 2'-데옥시이노신 (1.00 g, 3.96 mmol)과 이미다졸 (1.73 g, 25.34 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 12시간 동안 교반하였다. 이후, 혼합물은 진공에서 농축하고, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml)에 용해시키고, 물 (50 ml)로 2회 세척하고, 무수성 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 3',5'-*O*-비스-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시이노신 **dA.n9** (1.58 g, 83%)를 백색 분말로 수득하였다(1: 정확한 절차는 Kiselyov, A. S.; Steinbrecher, T.; Harvey, R. G. (1995) "Synthesis of the Fjord-region *cis*- and *trans*-Amino Triol Derivatives of the carcinogenic Hydrocarbon Benzo[*g*]chrysene and Utilization for the Synthesis of a Deoxyadenosine Adduct Linked to the N6-Amino Group" *J. Org. Chem.*, **60**: 6129-6134에서 확인할 수 있다).
- [0783] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12.37 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.25 (s, 1 H, H-8), 8.04 (d, 1 H, *J* = 3.6 Hz, H-2), 6.29 (t, 1 H, *J* = 6.6Hz, H-1'), 4.59 (m, 1 H, H-3'), 3.84 (m, 1 H, H-4'), 3.74 (m, 1 H, H-5'a), 3.66 (m, 1 H, H-5'b), 2.76 (m, 1 H, H-2'a), 2.30 (m, 1 H, H-2'b), 0.89 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.85 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.11 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.02 (2 s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
- [0784] <sup>6</sup>O-(2-메시틸렌설포닐)-3',5'-비스-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시이노신 (**dA.n10**)<sup>1</sup>
- [0785] 2-메시틸렌설포닐 염화물 (0.70 g, 2.12 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.42 ml, 3.07 mmol)과 DMAP (16 mg, 0.13 mmol)를 무수성 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml)에 녹인 **dA.n9** (1.02 g, 2.12 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온에서 1.5시간 동안 교반하고, 이후 에틸 에테르 (50 ml)로 희석하였다. 에테르 용액은 NaHCO<sub>3</sub>의 포화된 용액 (각 25 ml)으로 2회 세척하고, 이후 염수 (25 ml)로 세척하였다. 유기층은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 건조시키고, 진공에서 농축하고, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 <sup>6</sup>O-(2-메시틸렌설포닐)-3',5'-비스-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시이노신 **dA.n10** (279 mg, 20%)을 수득하였다.
- [0786] <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.55 (s, 1 H, H-8), 8.38 (s, 1 H, H-2), 6.99 (s, 2 H, Ph-H), 6.48(t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 4.61 (m, 1 H, H-3'), 4.03 (m, 1 H, H-4'), 3.85 (m, 1 H, H-5'a), 3.76 (m, 1 H, H-5'b), 2.77 (s, 6 H, CH<sub>3</sub>), 2.61 (m, 1 H, H-2'a), 2.43 (m, 1 H, H-2'b), 2.32 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 0.91 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.89 (s, 9 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.09 (s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.08 (2 s, 6 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
- [0787] <sup>6</sup>N-[1-(4-요오도페닐)에틸]-3'5'-비스-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 (**dA. n11**)
- [0788] 무수성 1,4-디옥산 (1 ml)에 녹인 1-(4-요오도페닐)에틸아민 (312 mg, 1.26 mmol)의 용액을 질소 대기 하에 실온에서, 분자체 (4Å, 8-12 메시, 0.75 g)를 포함하는 무수성 1,4-디옥산 (2 ml)에 녹인 **dA.n10** (279 mg, 0.42 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물은 이후, 50°C에서 18시간 동안 교반하였다. 상기 용액은 진공에서 제거하고, 정제되지 않은 산물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 <sup>6</sup>N-[1-(4-요오도페닐)에틸]-3',5'-비스-*O*-*tert*-부틸디메틸실릴-2'-데옥시아데노신 **dA.n11** (263 mg, 88%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 백색 거품으로 수득하였다.
- [0789] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.32 (s, 1 H, H-8), 8.08 (s, 1 H, H-2), 7.61 (m, 2 H, Ph-H), 7.15 (m, 2 H, Ph-H), 6.42 (t, 1 H, *J* = 6.4 Hz, H-1'), 6.20 (br m, 1 H, NH), 5.50 (br s, 1 H,

Ph-CH), 4.59 (m, 1 H, H-3'), 3.99 (m, 1 H, H-4'), 3.85 (m, 1 H, H-5'a), 3.77 (m, 1 H, H-5'b), 2.60 (m, 1 H, H-2'a), 2.42 (m, 1 H, H-2'b), 1.59 (d, 3 H,  $J = 7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0.90 (s, 18 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.08 (s, 12 H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si);

[0790] 부분입체이성질체에 대한 <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 153.78 (C), 151.94 (CH), 143.78/143.71 (C), 138.36 (CH), 137.57 (CH), 128.17/128.16 (CH), 119.99 (C), 92.41 (C), 87.81/87.79 (CH), 84.28 (CH), 71.78/71.74 (CH), 62.72/62.68 (CH<sub>2</sub>), 49.40 (br, CH), 41.31 (CH<sub>2</sub>), 25.96 (CH<sub>3</sub>), 25.75 (CH<sub>3</sub>), 22.64 (CH<sub>3</sub>), 18.41 (C), 17.99 (C), -4.66 (CH<sub>3</sub>), -4.82 (CH<sub>3</sub>), -5.39 (CH<sub>3</sub>), -5.48 (CH<sub>3</sub>).

[0791] N<sup>6</sup>-[1-(4-요오도페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 (dA.n12)

[0792] THF (3 ml)에 녹인 *n*-Bu<sub>4</sub>NF (409 mg, 1.30 mmol)의 용액을 0°C에서, THF (5 ml)에 녹인 화합물 dA.n11 (263 mg, 0.37 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온으로 점진적으로 데우고 30분 동안 교반하고, 이후 진공에서 농축 건조시켰다. 잔류물은 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-[1-(4-요오도페닐)에틸]-2'-데옥시아데노신 dA.n12 (164 mg, 93%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 밀랍 고체로 수득하였다.

[0793] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.35 (s, 1 H, H-8), 8.32 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.13 (s, 1 H, H-2), 7.62 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 7.22 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 6.32 (m, 1 H, H-1'), 5.41 (br, 1 H, Ph-CH), 5.31 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.19 (m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.35 (m, 1 H, H-4'), 3.85 (m, 1 H, H-4'), 3.58 (m, 1 H, H-5'a), 3.48 (m, 1 H, H-5'b), 2.68 (m, 1 H, H-2'a), 2.22 (m, 1 H, H-2'b), 1.49 (d, 3 H,  $J = 7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>).

[0794] N<sup>6</sup>-[1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)페닐]에틸]-2'-데옥시아데노신 (dA.n13)

[0795] 무수성 DMF (2.2 ml)에 녹인 화합물 dA.n12 (70 mg, 0.145 mmol), *N*-프로파르길트리플루오로아세트아마이드 (66 mg, 0.44 mmol), CuI (5.5 mg, 0.03 mmol), 테트라키스(트리페닐포스핀)-팔라듐(0) (17 mg, 0.015 mmol)과 Et<sub>3</sub>N (41 μl, 0.29 mmol)의 용액은 실온에서 5.5시간 동안 교반하였다. 혼합물은 진공에서 농축하고 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 N<sup>6</sup>-[1-[4-(3-트리플루오로아세트아미도-1-프로피닐)페닐]에틸]-2'-데옥시아데노신 dA.n13 (63 mg, 86%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)을 밀랍 고체로 수득하였다.

[0796] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 10.05 (t, 1 H,  $J = 5.4$  Hz, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.36 (s, 1 H, H-8), 8.34 (br s, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, NH), 8.15 (s, 1 H, H-2), 7.43 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 7.36 (d, 2 H,  $J = 8.2$  Hz, Ph-H), 6.33 (dd, 1 H,  $J = 6.4$ 와 7.5, Hz, H-1'), 5.49 (br, 1 H, Ph-CH), 5.30 (d, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 3'-OH), 5.10 (m, 1 H, D<sub>2</sub>O 교체가능, 5'-OH), 4.39 (m, 1 H, H-3'), 4.25 (d, 2 H,  $J = 5.4$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3.87 (m, 1 H, H-3'), 3.59 (m, 1 H, H-5'a), 3.51 (m, 1 H, H-5'b), 2.72 (m, 1 H, H-2'a), 2.24 (m, 1 H, H-2'b), 1.52 (d, 3 H,  $J = 7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>);

[0797] N<sup>6</sup>-[1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)페닐]에틸]-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (dA.n14)

[0798] POCl<sub>3</sub> (14 μl, 0.15 mmol)을 트리메틸포스페이트 (0.5 ml)에 녹인 화합물 dA.n14 (51 mg, 0.1 mmol)와 양자 스

편지 (32 mg, 0.15 mmol)의 용액에 첨가하고 마이너스 20-30°C에서 2시간 동안 유지시켰다. 무수성 DMF (1.0 ml)에 녹인 비스-트리-*n*-부틸암모늄 피로포스페이트 (237 mg, 0.5 mmol)와 트리-*n*-부틸아민 (100  $\mu$ l)의 용액을 첨가하였다. 5분간 교반후, 트리에틸암모늄 바이카보네이트 완충액 (1 M, pH 7.5; 10 ml)을 첨가하였다. 반응물은 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이후 0°C에서, 농축된 암모늄 수산화물 (10 ml, 27%)을 방울방울 첨가하였다. 혼합물은 실온에서 추가로 1시간 동안 교반하고, 이후 동결 건조시켰다. 획득된 잔류물은 물 (10 ml)에 용해시키고, 여과하고, 4.5 ml/min의 유속에서 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>의 선형 구배 (300분에서 50 mM 내지 500 mM)를 갖는 Q Sepharose FF 칼럼 (2.5 x 20 cm)을 이용한 음이온 교환 크로마토그래피로 정제하였다. 트리포스페이트를 포함하는 분획물은 모으고 동결 건조시켜 트리포스페이트 **dA.n14** (60 mg, 86%, 부분입체이성질체의 1:1 혼합물)를 백색의 스펀모양 고체로 수득하였다.

[0799] 부분입체이성질체에 대한 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  8.41 (s, 1 H, H-8), 8.14 (2 s, 1 H, H-2), 7.38 (m, 4 H, Ph-H), 6.46 (m, 1 H, H-1'), 5.32 (br, 1 H, Ph-CH), 4.30 (s, 1 H, H-3'), 4.20 (m, 2 H, H-5'a와 H-5'b), 3.61 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 2.78 (m, 1 H, H-2'a), 2.59 (m, 1 H, H-2'b), 1.60 (d, 3 H, *J* = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>);

[0800] <sup>31</sup>P NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  -6.02 (d, *J* = 19.4 Hz), -11.19 (d, *J* = 19.4 Hz), -21.77 (t, *J* = 19.4 Hz);

[0801] ToF-MS (ESI): 분자 이온 C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub>Na [M-2H+Na]<sup>-</sup>의 경우에, 계산된 질량은 669.0641이고, 관찰된 질량은 669.0960이었다.

[0802] 6-FAM 표지된 N<sup>6</sup>-(1-[4-(3-아미노-1-프로피닐)페닐]에틸)-2'-데옥시아데노신-5'-트리포스페이트 (**WW2p093**)

[0803] 무수성 DMSO (70  $\mu$ l)에 녹인 6-FAM-SE (3.5 mg, 7.4  $\mu$ mol)의 용액을 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 완충액 (0.1 M, pH 9.2; 600  $\mu$ l)에 녹인 트리포스페이트 **dA.n14** (4.1  $\mu$ mol)의 용액에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다. 반응물은 Perkin Elmer OD-300 C<sub>18</sub> 칼럼 (4.6 x 250 mm)을 이용한 역상 HPLC로 정제하여 6-FAM 표지된 트리포스페이트 **WW2p093**을 수득하였다. 이동상: A, 물 (pH 7.0)에 담긴 100 mM 트리에틸암모늄 아세테이트 (TEAA); B, 물/CH<sub>3</sub>CN (30:70)에 담긴 100 mM TEAA. 20분 동안 5-20% B, 이후 20분 동안 20-90% B의 선형 구배를 이용하여 HPLC 정제를 달성하였다. **WW2p093**의 농도는 6-FAM 염료의 소광 계수 (즉, 494 nm에서 68,000)를 이용한 흡수 분광법으로 산정하였다.

[0804] 본 명세서에서 인용된 모든 특허와 특허 출원은 참조로서 편입된다. 특정의 변형과 개선은 본 명세서를 읽은 이후에, 당업자에게 명백할 것이다. 이와 같은 모든 변형과 개선은 간결함과 가독성을 위하여 본 명세서에 생략되지만 아래의 특허청구범위에 의해 적절하게 포섭된다.

## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> LITOSH, VLADISLAV  
STUPI, BRIAN P.  
METZKER, MICHAEL L.  
WU, WEIDONG

<120> PHOTOCLEAVABLE LABELED NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDES AND LABELED

NUCLEOTIDES AND NUCLEOSIDES AND METHODS FOR THEIR USE IN DNA SEQUENCING

<130> LSGN:003WO

<140> PCT/US2007/086559

<141> 2007-12-05

<150> 11/567,189

<151> 2006-12-05

<150> 11/567,193

<151> 2006-12-05

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 1

tacggagcag tactggccgt cgttttaca

29

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 2

ttgtaaaacg acggccagt

19