



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월13일

(11) 등록번호 10-2454782

(24) 등록일자 2022년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 19/10 (2006.01) *C07C 323/60* (2006.01)
C07D 207/40 (2006.01) *C07F 7/18* (2006.01)
C07H 19/14 (2006.01) *C09B 23/16* (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)

(52) CPC특허분류
C07H 19/10 (2013.01)
C07C 323/60 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7027925(분할)

(22) 출원일자(국제) 2016년11월04일

심사청구일자 2021년11월02일

(85) 번역문제출일자 2021년08월31일

(65) 공개번호 10-2021-0110755

(43) 공개일자 2021년09월08일

(62) 원출원 특허 10-2018-7015618

원출원일자(국제) 2016년11월04일

심사청구일자 2019년06월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/060435

(87) 국제공개번호 WO 2017/079498

국제공개일자 2017년05월11일

(30) 우선권주장

62/251,884 2015년11월06일 미국(US)

62/327,555 2016년04월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2003511386 A*

US20140234832 A1*

US20150140561 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

퀴아젠 사이언시스, 엘엘씨

미국, 메릴랜드 20874, 저먼타운, 저먼타운 로드 19300

(72) 발명자

마르마, 몽 사노

미국 01760 매사추세츠주 나틱 웨스트레이크 로드 12

올레니크, 저지

미국 02445 매사추세츠주 브루클라인 비콘스필드 로드 48

코부크, 일리아

미국 02494 매사추세츠주 니덤 에이본 서클 51

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 조호정

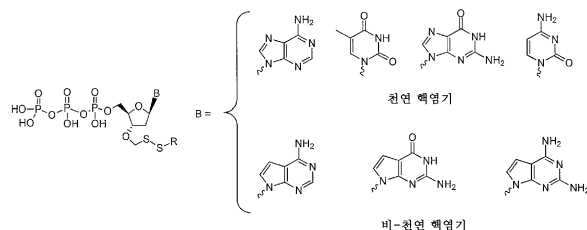
(54) 발명의 명칭 뉴클레오타이드 유사체

(57) 요약

본 발명은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치 및 상기 데옥시뉴클레오시드의 핵염기에 가역적으로 연결된 검출가능한 표지를 포함하는 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 이용하는, 방법, 조성물, 혼합물 및 키트를 제공한다. 이러한 화합물은 합성에 의한 서열분석을 포함하나, 이에 제한

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



되지는 않는 미래의 서열분석 기술에 새로운 가능성을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C07D 207/40 (2013.01)

C07F 7/1804 (2018.08)

C07H 19/14 (2013.01)

C09B 23/16 (2013.01)

C12P 19/34 (2013.01)

C12Q 1/6869 (2018.05)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, DNA 서열에서 표지된 뉴클레오티드를 검출하는 방법:

- a) 프라이머/주형 혼성화 복합체를 형성하도록 하기 위한 핵산 주형과 상기 주형에 혼성화될 수 있는 프라이머, 및 티올-함유 화합물을 포함하는 절단 시약을 제공하는 단계,
- b) DNA 폴리머라제 및 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 상기 프라이머 및 주형에 첨가하여 반응 혼합물을 생성하는 단계로서, 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 핵염기 및 당을 포함하고, 상기 당은 3'-O 상에 절단가능한 보호기를 포함하며, 여기서 상기 절단가능한 보호기는 메틸렌디설피드를 포함하고, 여기서 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 상기 핵염기에 절단가능한 옥시메틸렌디설피드-함유 링커를 통해 부착된 제1 검출가능한 표지를 추가로 포함하는 것인 단계,
- c) 상기 반응 혼합물을 DNA 폴리머라제 촉매된 프라이머 연장 반응을 가능하게 하는 조건에 적용하여 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체를 생성하도록 하는 단계로서, 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트가 혼입된 것인 단계,
- d) 상기 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체에서 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 상기 제1 검출가능한 표지를 검출하는 단계, 및
- e) 상기 절단가능한 보호기 및 상기 검출가능한 표지를 상기 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체로부터 제거하도록 하는 조건 하에서 상기 절단 시약을 도입하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 b) 내지 e)를 적어도 1회 반복하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 단계 b)의 반복 동안에 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 첨가하며, 여기서 상기 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 제2 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 티올-함유 화합물이 시스테인, 시스테인, 디티오-숙신산, 및 디티오프레톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 티올-함유 화합물이 2,3-디메르캅토-1-프로판술폰산 나트륨 염, 디티오부틸아민, 메소-2,5-디메르캅토-N,N',N'-테트라메틸아디프아미드, 2-메르캅토-에탄 술포네이트, 및 N,N'-디메틸, N,N'-비스(메르캅토아세틸)-히드라진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기가 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기와 상이한 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, A, G, C 및 T 또는 U의 유사체를 나타내는 적어도 4종의 상이하게 표지된, 3'-O 메틸렌디설피드 캡핑된 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물의 혼합물을 단계 b)에서 사용하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 검출은 혼입된 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기를 결정할 수 있게 하는 것인 방법.

청구항 9

하기 단계를 포함하는, DNA 서열에서 표지된 뉴클레오타이드를 검출하는 방법:

- a) 프라이머/주형 혼성화 복합체를 형성하도록 하기 위한 핵산 주형과 상기 주형에 혼성화될 수 있는 프라이머, 티올-함유 화합물을 포함하는 절단 시약, 및 절단 스캐빈저제를 제공하는 단계,
- b) DNA 폴리머라제 및 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 상기 프라이머 및 주형에 첨가하여 반응 혼합물을 생성하는 단계로서, 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 핵염기 및 당을 포함하고, 상기 당은 3'-O 상에 절단가능한 보호기를 포함하며, 여기서 상기 절단가능한 보호기는 메틸렌디설피드를 포함하고, 여기서 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 상기 핵염기에 절단가능한 옥시메틸렌디설피드-함유 링커를 통해 부착된 제1 검출가능한 표지를 추가로 포함하는 것인 단계,
- c) 상기 반응 혼합물을 DNA 폴리머라제 촉매된 프라이머 연장 반응을 가능하게 하는 조건에 적용하여 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체를 생성하도록 하는 단계로서, 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트가 혼입된 것인 단계,
- d) 상기 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체에서 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 상기 제1 검출가능한 표지를 검출하는 단계,
- e) 상기 절단가능한 보호기 및 상기 검출가능한 표지를 상기 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체로부터 제거하도록 하는 조건 하에서 상기 절단 시약을 도입하는 단계, 및
- f) 상기 절단 스캐빈저제를 도입하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 단계 b) 내지 f)를 적어도 1회 반복하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 단계 b)의 반복 동안에 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 첨가하며, 여기서 상기 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 제2 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 티올-함유 화합물이 시스테인, 시스테인, 디티오-숙신산, 및 디티오프레틸로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 티올-함유 화합물이 2,3-디메르캅토-1-프로판술포산 나트륨 염, 디티오부틸아민, 메소-2,5-디메르캅토-N,N,N',N'-테트라메틸아디프아미드, 2-메르캅토-에탄 설포네이트, 및 N,N'-디메틸, N,N'-비스(메르캅토아세틸)-히드라진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기가 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기와 상이한 것인 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, A, G, C 및 T 또는 U의 유사체를 나타내는 적어도 4종의 상이하게 표지된, 3'-O 메틸렌디설피드 캡핑된 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물의 혼합물을 단계 b)에서 사용하는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 검출은 혼입된 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기를 결정할 수 있게 하는

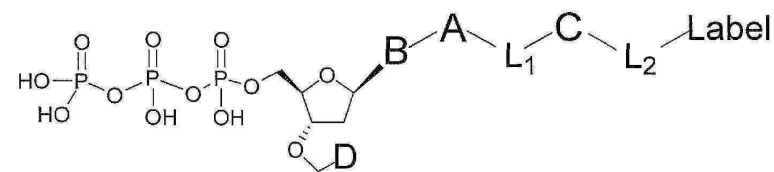
것인 방법.

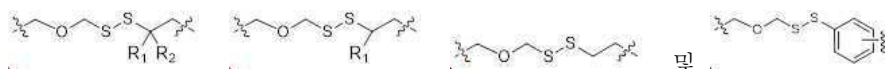
청구항 17

제11항에 있어서, 상기 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 제2 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커를 통해 부착된 제2 검출가능한 표지를 포함하며, 여기서 상기 제2 검출가능한 표지는 상기 제1 검출가능한 표지와 상이한 것인 방법.

청구항 18

1종 이상의 DNA 서열분석 시약, 적어도 1종의 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트, 설명서, 및 티올-함유 화합물을 포함하는 절단 시약을 포함하며, 여기서 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트가 하기 구조식을 갖는 것인 키트:



(여기서 D는 디설피드 알킬, 디설피드 치환된 알킬 기, 디설피드 알릴, 및 디설피드 치환된 알릴 기로 이루어진 군으로부터 선택되고; B는 핵염기이고; A는 부착 기이며, 여기서 상기 부착 기 A는 프로파르길, 히드록시메틸, 엑소시클릭 아민, 프로파르길 아민, 및 프로파르길 히드록실로 이루어진 군으로부터 선택된 화학 기이고; C는 로 이루어진 군으로부터 선택된 절단가능한 부위 코어이고, 여기서 R₁ 및 R₂는 독립적으로 선택된 알킬 기이고; L₁ 및 L₂는 연결 기이고, 여기서 L₁은 -CONH(CH₂)_x-, -CO-O(CH₂)_x-, -CONH-(OCH₂CH₂O)_x-, -CO-O(CH₂CH₂O)_x-, 및 -CO(CH₂)_x-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-10이고; 여기서 L₂는 -CO-, -CONH-, -NHCONH-, -O-, -S-, -C=N-, -N=N-, 알킬, 아릴, 분지형 알킬, 분지형 아릴 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 Label은 형광단 염료, 에너지 전달 염료, 질량-태그, 비오틴, 및 합텐으로 이루어진 군으로부터 선택된 검출가능한 표지임).

청구항 19

제18항에 있어서, 추가로 완충제를 포함하는 것인 키트.

청구항 20

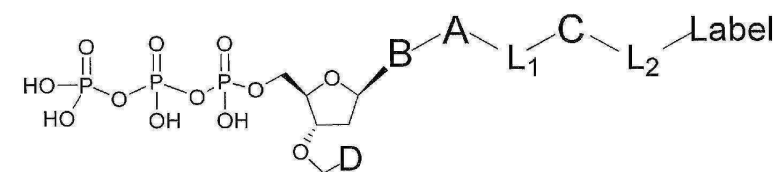
제18항에 있어서, 추가로 절단 스캐빈저를 포함하는 것인 키트.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 1종 이상의 DNA 서열분석 시약이 적어도 1종의 폴리머라제, 적어도 1종의 프라이머, 및 적어도 1종의 주형을 포함하는 것인 키트.

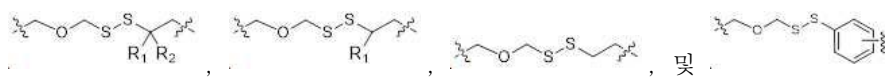
청구항 22

제1항 또는 제9항에 있어서, 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트가 하기 구조식을 갖는 것인 방법:



(여기서 D는 디설피드 알킬, 디설피드 치환된 알킬 기, 디설피드 알릴, 및 디설피드 치환된 알릴 기로 이루어진 군으로부터 선택되고; B는 핵염기이고; A는 부착 기이며, 여기서 상기 부착 기 A는 프로파르길, 히드록시메틸,

엑소시클릭 아민, 프로파르길 아민, 및 프로파르길 히드록실로 이루어진 군으로부터 선택된 화학 기이고; C는



로 이루어진 군으로부터 선택된 절단가능한 부위 코어이고, 여기서 R_1 및 R_2 는 독립적으로 선택된 알킬 기이고; L_1 및 L_2 는 연결 기이고, 여기서 L_1 은 $-\text{CONH}(\text{CH}_2)_x-$, $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2)_x-$, $-\text{CONH}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$, $-\text{CO}-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x-$, 및 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_x-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x 는 0-10이고; 여기서 L_2 는 $-\text{CO}-$, $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCONH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{C}=\text{N}$, $-\text{N}=\text{N}-$, 알킬, 아릴, 분지형 알킬, 분지형 아릴 및 그의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되고; 여기서 Label은 형광단 염료, 에너지 전달 염료, 질량-태그, 비오틴, 및 합텐으로 이루어진 군으로부터 선택된 검출가능한 표지임).

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 11월 6일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/251,884 및 2016년 4월 26일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/327,555를 우선권 주장하며, 이들 특허 가출원은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH 위치 및 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기에 가역적으로 연결된 검출가능한 표지를 포함하는 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 이용하는, 방법, 조성물, 혼합물 및 키트를 제공한다. 이러한 화합물은 합성에 의한 서열분석을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 미래의 서열분석 기술에 새로운 가능성을 제공한다.

배경 기술

[0005] DNA 서열분석은 현대 생명 공학에서 가장 중요한 분석 방법 중 하나이다. 현행 서열분석 기술에 대한 상세한 검토는 문헌 [M. L. Metzker, Nature Reviews 2010, 11, 31] [1], 및 [C. W. Fuller et al., Nature Biotechnology 2009, 27, 1013] [2]에 제공되어 있다.

[0006] 널리 공지된 서열분석 방법은 합성에 의한 서열분석 (SBS) 방법이다. 이 방법에 따르면, 뉴클레오시드 트리포스페이트는 3'-OH-보호기, 특히 에스테르 및 에테르에 의해 가역적으로 차단된다. 에스테르의 예는 알칸산 에스테르 예컨대 아세트, 포스페이트 및 카르보네이트이다. 뉴클레오시드 트리포스페이트는 통상적으로 염기에서 표지를 포함한다.

[0007] 가역적으로 3'-OH-차단된 뉴클레오시드 트리포스페이트를 사용하여 단계적으로 미리 결정된 서열의 폴리뉴클레오타이드를 효소적으로 합성하는 방법은 문헌 [Hiatt and Rose (미국 특허 번호 5,990,300)] [3]에 의해 기재되었다. 이들은 절단가능한 3'-OH-보호기로서 에스테르, 에테르, 카르보네이트, 포스페이트, 포스포르아미드, 카르보네이트, 카르바메이트, 보레이트, 당, 포스포르아미데이트, 페닐설페네이트, 설페이트 및 술폰 외에도 니트레이트를 또한 개시한다. 탈보호는 화학적 또는 효소적 수단에 의해 수행될 수 있다. 니트레이트 기에 대해 개시된 합성 절차도 탈보호 조건도 그리고 효소 혼입 데이터도 없다. 청구된 탈차단 용액은 바람직하게는

2가 양이온 예컨대 Co^{2+} 및 생물학적 완충제, 예컨대 트리스(Tris)를 함유한다. 표지를 함유하는 3'-OH-차단된 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 개시되어 있지 않다.

- [0008] 문헌 [Buzby (US 2007-0117104)] [4]은 3'-히드록실 기에서 가역적으로 보호되고 염기에서 표지를 지니고 있는 SBS를 위한 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 개시하고 있다. 표지는 절단가능한 링커 예컨대 디설피드 링커 또는 광 절단가능한 링커를 통해 연결되어 있다. 링커는 최대 약 25개의 원자로 이루어져 있다. 3'-OH-보호기는 히드록실아민, 알데히드, 알릴아민, 알켄, 알킨, 알콜, 아민, 아릴, 에스테르, 에테르, 카르보니트릴, 포스페이트, 카르보네이트, 카르바메이트, 보레이트, 당, 포스포르아미데이트, 페닐술폴라네이트, 술폰, 및 헤테로사이클 외에도 또한 니트레이트일 수 있다.
- [0009] 핵산 서열분석에서 더 긴 판독 길이 및 더 양호한 정확도를 달성하기 위해 필요한 것은 절단 후 반응성 잔기를 남기지 않는 절단가능한 보호기 및 절단가능한 링커를 가진 뉴클레오타이드 유사체이다 [5].

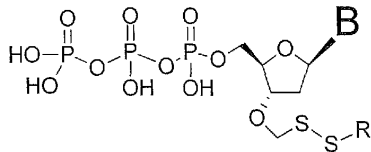
발명의 내용

- [0010] 본 발명은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치 및 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트의 핵염기에 가역적으로 연결된 검출가능한 표지를 포함하는 상기 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트를 이용하는, 방법, 조성물, 혼합물 및 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 메틸렌디설피드를 포함하는 가역성 보호기 및 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커를 가진 뉴클레오타이드 유사체를 고려한다. 이러한 화합물은 합성에 의한 서열분석을 포함하나 이에 제한되지는 않는 미래의 서열분석 기술에 새로운 가능성을 제공한다.
- [0011] 혼합물에 관해서는, 본 발명은 한 실시양태에서 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커 및 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치를 포함하는 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트를 완충제, 폴리머라제, 프라이머, 주형 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 추가적인 서열분석 시약과 혼합하여 고려한다. 키트에 관해서는, 본 발명은 한 실시양태에서 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치를 포함하는 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트를 포함하는 서열분석 시약이 서열분석에서 이러한 시약을 사용하기 위한 (임의로) 설명서와 함께, 별도의 용기에 (또는 혼합물로) 함께 제공되는 서열분석 키트를 고려한다. 본 발명이 키트에서의 서열분석 시약의 수 또는 성질에 의해 제한되는 것을 의도하지 않는다. 한 실시양태에서, 키트는 완충제, 폴리머라제, 프라이머 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 1종 이상의 추가적인 서열분석 시약을 포함한다.
- [0012] 본 발명이 임의의 특정한 폴리머라제에 의해 제한되는 것을 의도하지 않는다. 본 발명은 뉴클레오타이드 유도체의 강화된 혼입으로 조작된 (예를 들어 돌연변이된) 폴리머라제를 고려한다. 예를 들어, 문헌 [Tabor, S. and Richardson, C.C. ((1995) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 92:6339 [6])]은 티. 아쿠아티쿠스(*T. aquaticus*) DNA 폴리머라제에서 페닐알라닌 667을 티로신으로 대체하고 이것이 DNA 폴리머라제에 의한 디데옥시뉴클레오타이드의 식별에 미치는 영향을 기재한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성 (exo-로 명시됨)이 결여된 폴리머라제를 고려한다. 예를 들어, 9° N 폴리머라제의 exo- 변이체는 문헌 [Perler et al., 1998 US 5756334] [7] 및 문헌 [Southworth et al., 1996 Proc. Natl Acad. Sci USA 93:5281] [8]에 의해 기재되어 있다. 또 다른 폴리머라제 예는 Pfu DNA 폴리머라제의 A486Y 변이체이다 (Evans et al., 2000. Nucl. Acids. Res. 28:1059 [9]). 또 다른 예는 Tsp JDF-3 DNA 폴리머라제의 A485T 변이체이다 (Arezi et al., 2002. J. Mol. Biol. 322:719 [10]). 본원에 참조로 포함된, WO 2005/024010 A1은 9° N DNA 폴리머라제 및 모티프 A 영역의 변형에 관한 것이다 [11].
- [0013] 방법에 관해서는, 본 발명은 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커 및 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치를 포함하는 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트를 합성하는 방법, 뿐만 아니라 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치를 포함하는 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트를 이용하는 방법 둘 다를 고려한다.
- [0014] 한 실시양태에서, 본 발명은 (a) 절단가능한 보호기로서 (예를 들어 화학식 $-\text{CH}_2-\text{SS}-\text{R}$ 의) 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O를 가진 뉴클레오타이드 트리포스페이트; 및 (b) 표지가 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커 ($-\text{OCH}_2-\text{SS}-$) (비록 링커가 추가적인 기를 함유할 수 있긴 하지만)를 통해 핵염기에 부착되어 있는, 그의 표지된 유사체에 관한 것이다. 이러한 뉴클레오타이드는 합성에 의한 핵산 서열분석 (SBS) 기술에서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드 (예를 들어 $-\text{CH}_2-\text{SS}-\text{R}$)를 포함하

는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 가진 뉴클레오타이드의 합성, 탈보호 조건 또는 효소 혼입에 관한 것이다.

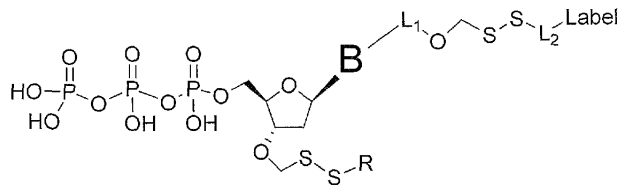
[0015] 한 실시양태에서, 본 발명은 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커 및 절단가능한 보호기로 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하는 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 뉴클레오타이드의 핵염기는 비-천연이다. 한 실시양태에서, 상기 뉴클레오타이드의 비-천연 핵염기는 7-테아자 구아닌, 7-테아자 아데닌, 2-아미노, 7-테아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌을 포함하는 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 메틸렌디설피드를 포함하는 상기 기는 $-CH_2-SS-R$ 이며, 여기서 R은 알킬 및 치환된 알킬 기를 포함하는 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 검출가능한 표지는 (예를 들어 화학식 $-OCH_2-SS-$ 의) 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커를 통해 상기 핵염기에 부착된다. 한 실시양태에서, 상기 검출가능한 표지는 형광 표지이다. 한 실시양태에서, 화학식 $(-CH_2-S-S-R)$ 에서의 R은 알킬 또는 알릴일 수 있다

[0016] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조식에 따른 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트에 관한 것이다:



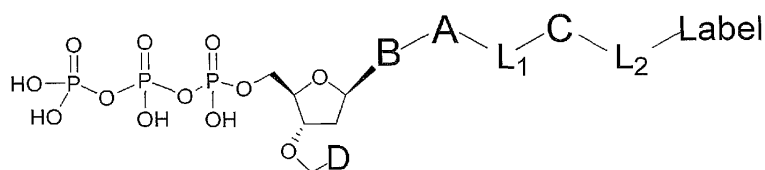
[0017] 여기서 B는 핵염기이고 R은 알킬 및 치환된 알킬 기를 포함하는 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 핵염기는 천연 핵염기 (시토신, 구아닌, 아데닌, 티민 및 우라실)이다. 한 실시양태에서, 상기 핵염기는 7-테아자 구아닌, 7-테아자 아데닌, 2-아미노, 7-테아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌을 포함하는 군으로부터 선택된 비-천연 핵염기이다. 유사체의 경우에, 검출가능한 표지는 핵염기와 상기 검출가능한 표지 사이에 링커 부분을 또한 포함할 수 있다.

[0019] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조식에 따른 표지된 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트에 관한 것이다:



[0020] 여기서 B는 핵염기이고, R은 알킬 및 치환된 알킬 기를 포함하는 군으로부터 선택되고, L₁ 및 L₂는 연결 기이다. 한 실시양태에서, 상기 핵염기는 천연 핵염기 유사체이다. 한 실시양태에서, 상기 핵염기는 7-테아자 구아닌, 7-테아자 아데닌, 2-아미노, 7-테아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌을 포함하는 군으로부터 선택된 비-천연 핵염기 유사체이다. 유사체의 경우에, 검출가능한 표지는 핵염기와 상기 검출가능한 표지 사이에 링커 부분을 또한 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, L₁ 및 L₂는 $-CO-$, $-CONH-$, $-NHCONH-$, $-O-$, $-S-$, $-ON-$, 및 $-N=N-$, 알킬, 아릴, 분지형 알킬, 분지형 아릴 또는 그의 조합물을 포함하는 군으로부터 독립적으로 선택된다. L₂가 "-S-"가 아닌 것이 바람직하다. 한 실시양태에서, 본 발명은 L₁이 염기 상의 아민 또는 염기 상의 히드록실 중 어느 하나인 것으로 고려한다. 한 실시양태에서, 상기 표지는 형광단 염료, 에너지 전달 염료, 질량-태그, 비오틴, 및 합텐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 표지는 검출가능한 표지이다.

[0022] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조식에 따른 표지된 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트에 관한 것이다:

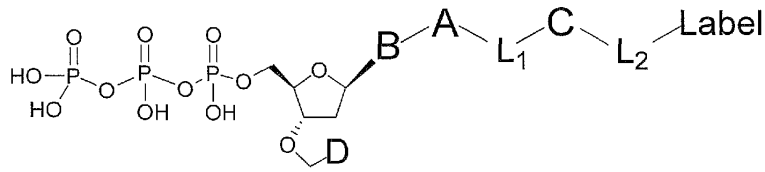


[0023] 여기서 D는 디설피드 알릴, 및 디설피드 치환된 알릴 기로 이루어진 군으로부터 선택되고; B는 핵염기이고; A는

[0024]

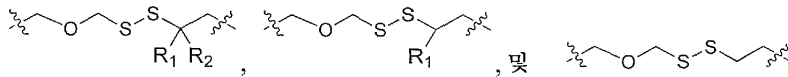
부착 기이고; C는 절단가능한 부위 코어이고; L₁ 및 L₂는 연결 기이고; Label은 표지 (예를 들어 검출가능한 모이어티)이다.

[0025] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조식에 따른 표지된 테옥시뉴클레오시드 트리포스페이트에 관한 것이다:

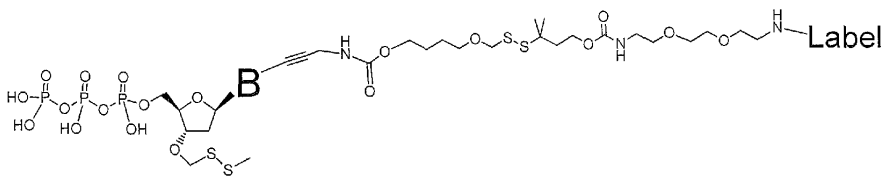


[0026]

[0027] 여기서 D는 아지드, 디설피드 알킬, 디설피드 치환된 알킬 기로 이루어진 군으로부터 선택되고; B는 핵염기이고; A는 부착 기이고; C는 절단가능한 부위 코어이고; L₁ 및 L₂는 연결 기이고; Label은 표지이다. 한 실시양태에서, 상기 핵염기는 7-테아자 구아닌, 7-테아자 아데닌, 2-아미노,7-테아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 비-천연 핵염기 유사체이다. 한 실시양태에서, 상기 부착 기 A는 프로파르길, 히드록시메틸, 엑소시클릭 아민, 프로파르길 아민, 및 프로파르길 히드록실로 이루어진 군으로부터 선택된 화학 기이다. 한 실시양태에서, 상기 절단가능한 부위 코어는

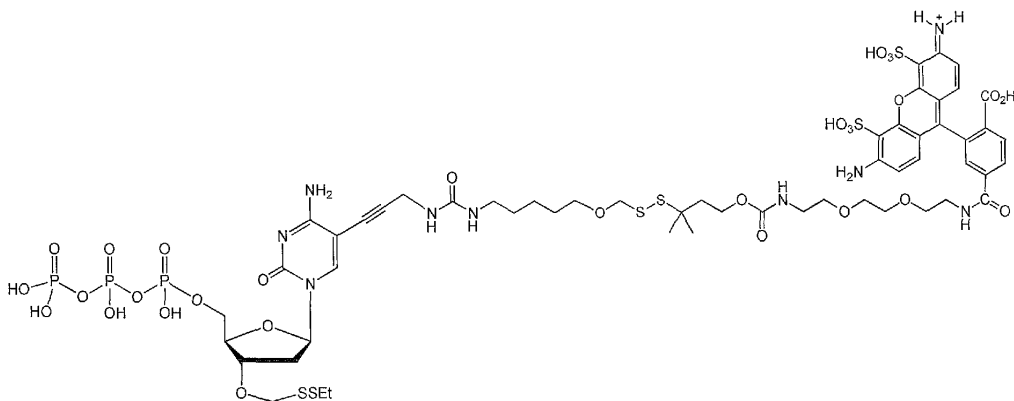


로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 R₁ 및 R₂는 독립적으로 선택된 알킬 기이다. 한 실시양태에서, L₁은 -CONH(CH₂)_x-, -CO-O(CH₂)_x-, -CONH-(OCH₂CH₂O)_x-, -CO-O(CH₂CH₂O)_x-, 및 -CO(CH₂)_x-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-10, 그러나 보다 바람직하게는 1-6이다. 한 실시양태에서, L₂는 -NH-, -(CH₂)_x-NH-, -C(Me)₂(CH₂)_xNH-, -CH(Me)(CH₂)_xNH-, -C(Me)₂(CH₂)_xCO-, -CH(Me)(CH₂)_xCO-, -(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-, -(CH₂)_xCONH(CH₂CH₂O)_y(CH₂)_zNH-, 및 -CONH(CH₂)_x-, -CO(CH₂)_x-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x, y, 및 z는 각각 독립적으로 0-10, 그러나 보다 바람직하게는 1-6으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 표지는 형광단 염료, 에너지 전달 염료, 질량-태그, 비오틴, 및 합텐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 가지며, 여기서 상기 표지는 염료이다:



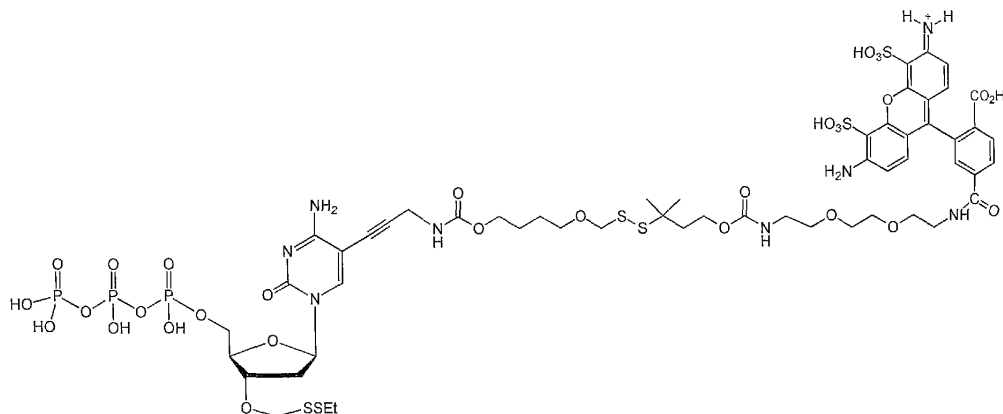
[0028]

[0029] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



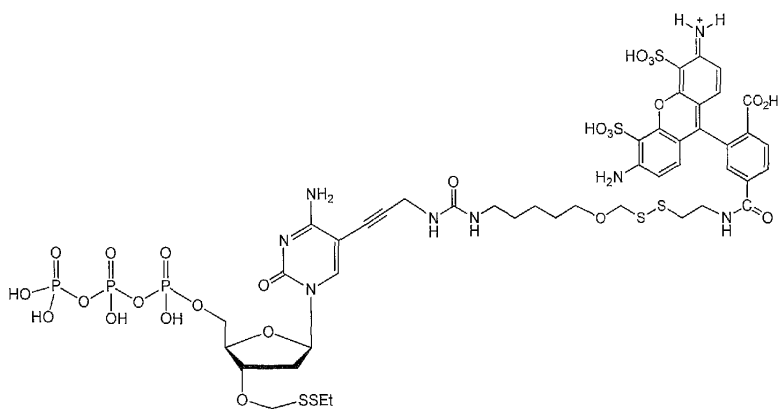
[0030]

[0031] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



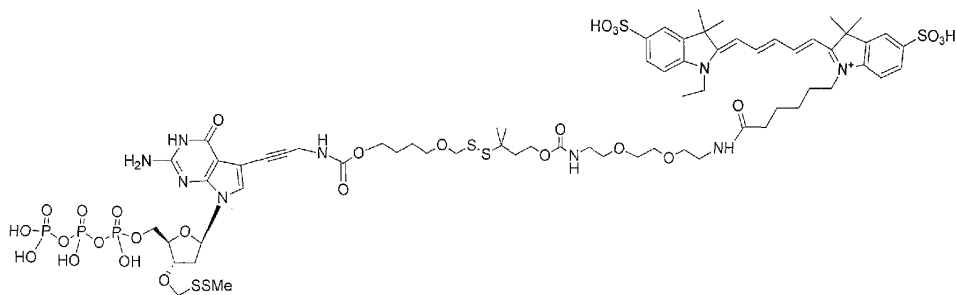
[0032]

[0033] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



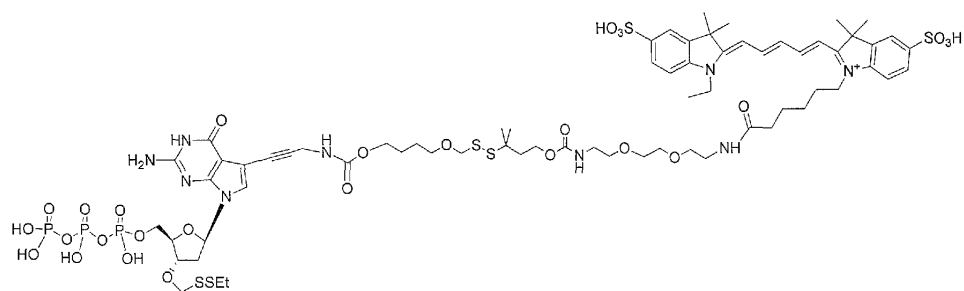
[0034]

[0035] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



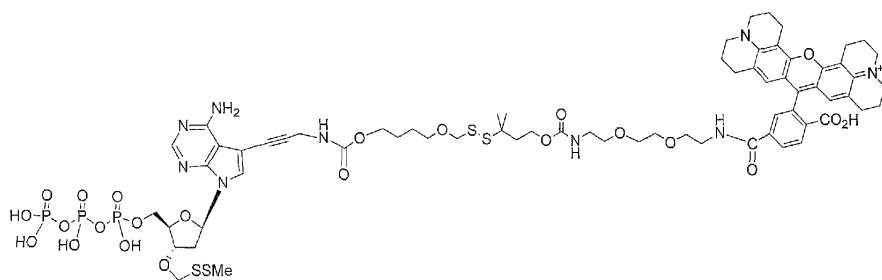
[0036]

[0037] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



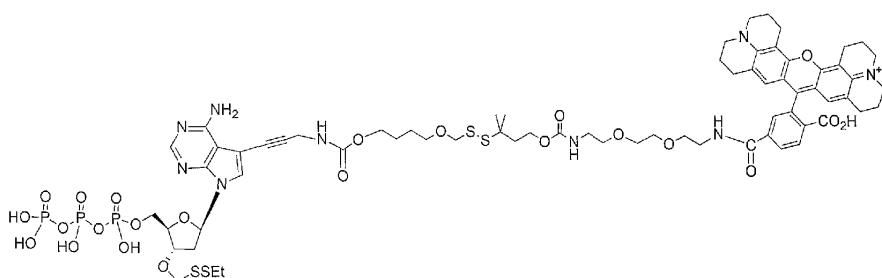
[0038]

[0039] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



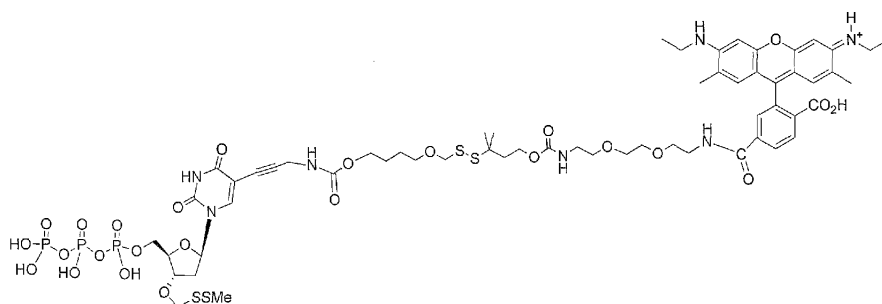
[0040]

[0041] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



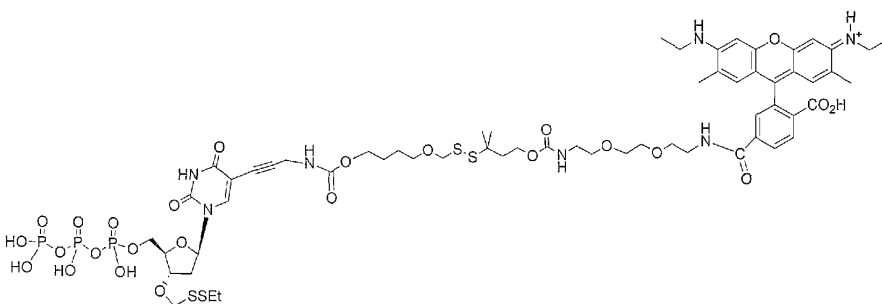
[0042]

[0043] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



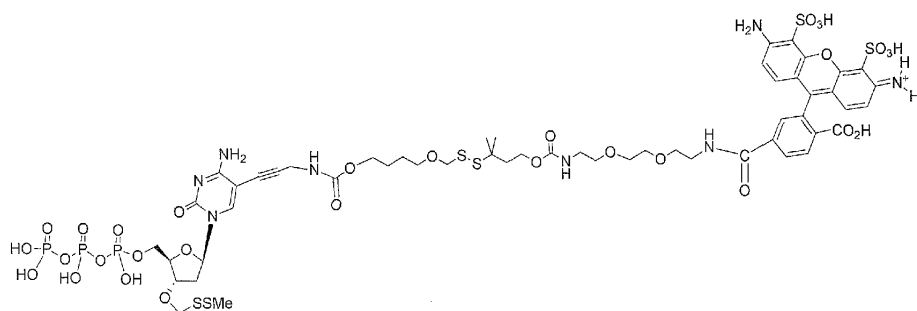
[0044]

[0045] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



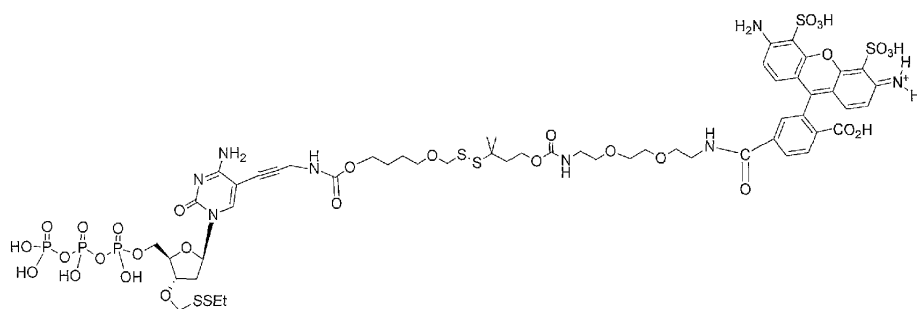
[0046]

[0047] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



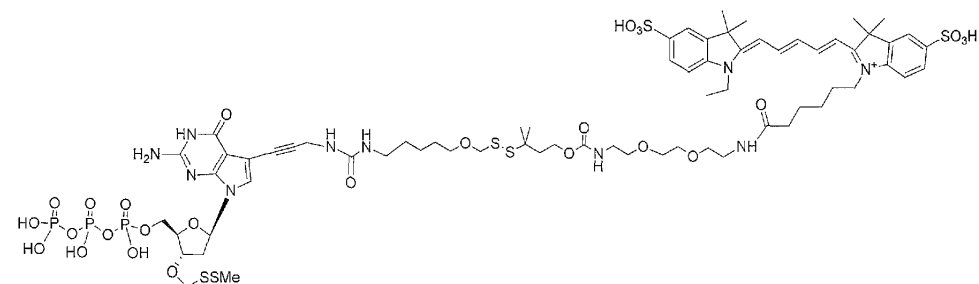
[0048]

[0049] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



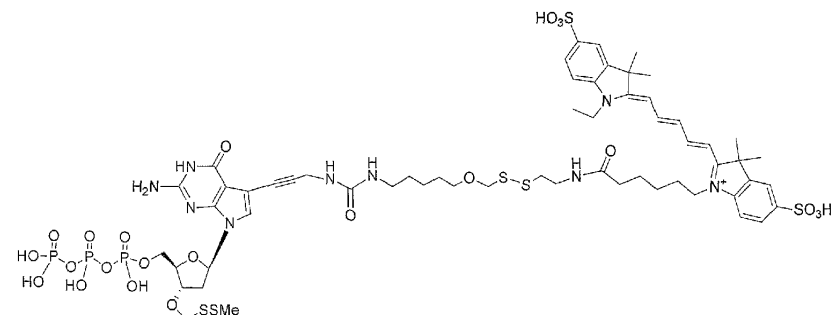
[0050]

[0051] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



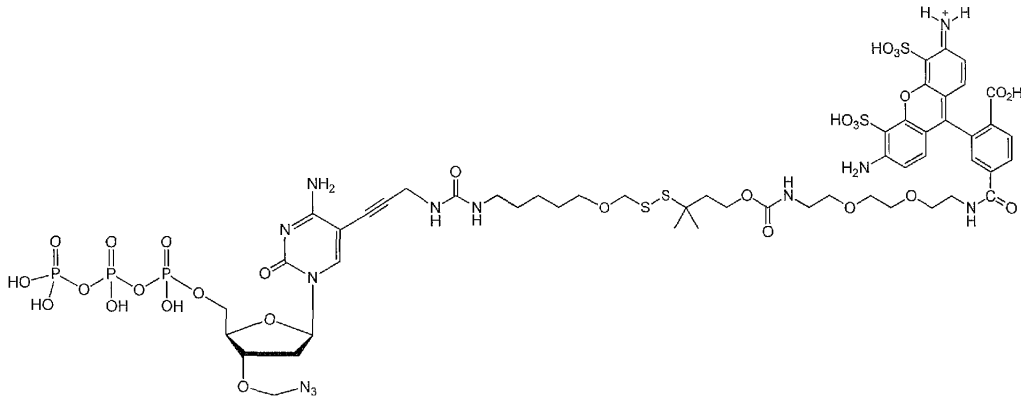
[0052]

[0053] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



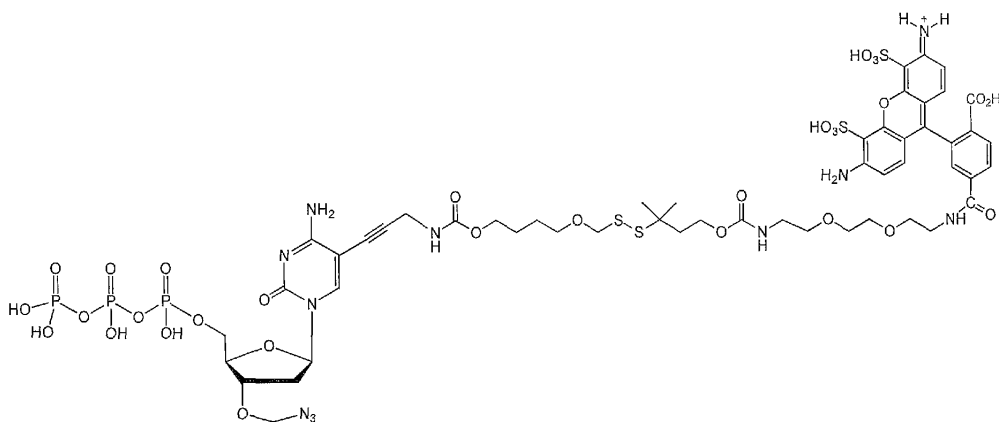
[0054]

[0055] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



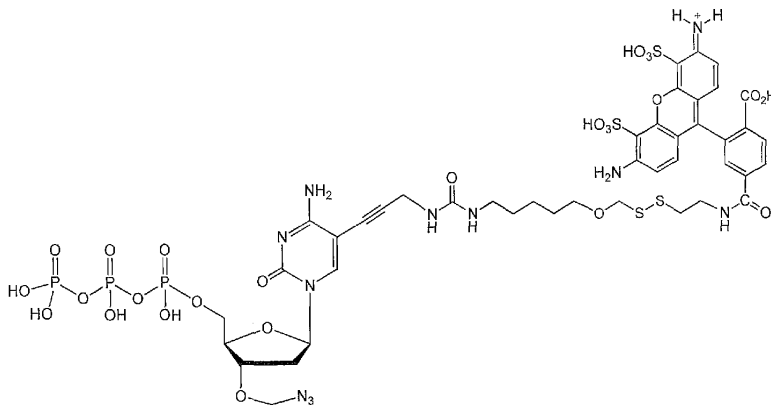
[0056]

[0057] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



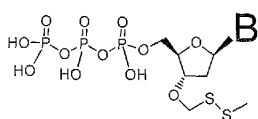
[0058]

[0059] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



[0060]

[0061] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조식에 따른 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트에 관한 것이다:



[0062]

[0063] 여기서 B는 핵염기이다.

[0064]

한 실시양태에서, 본 발명은 1종 이상의 서열분석 시약 (예를 들어 DNA 폴리머라제) 및 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커, 절단가능한 보호기로 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하는 적어도 1종의 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 포함하는 키트에 관한 것이다. 한 실시양태

에서, 상기 핵염기는 천연 핵염기 유사체이다. 한 실시양태에서, 상기 뉴클레오시드의 핵염기는 비-천연이다. 한 실시양태에서, 상기 뉴클레오시드의 비-천연 핵염기는 7-테아자 구아닌, 7-테아자 아데닌, 2-아미노, 7-테아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0065]

본 발명은 혼합물, 즉 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커, 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하는 적어도 1종의 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 1종 이상의 추가적인 시약 (건조 또는 용액으로든)과 혼합하여 또한 고려한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 핵산 주형과 상기 주형에 혼성화된 프라이머, DNA 폴리머라제, 및 핵염기, 표지 및 당, 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커를 포함하는 적어도 1종의 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 반응 혼합물이며, 상기 당은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하며, 여기서 상기 뉴클레오시드는 상기 뉴클레오시드의 핵염기에 공유 결합된 검출가능한 표지를 추가로 포함하는 것인 반응 혼합물에 관한 것이다.

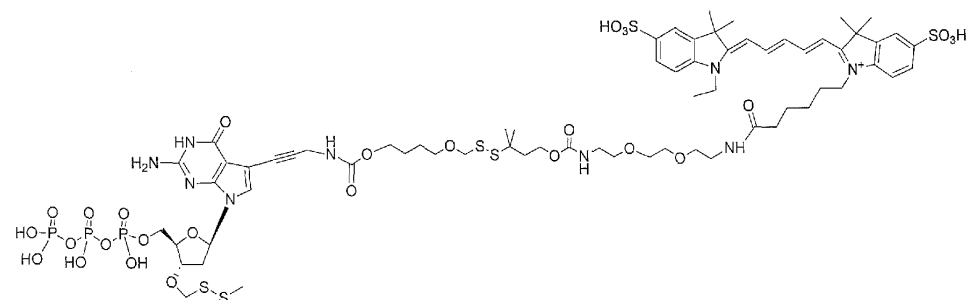
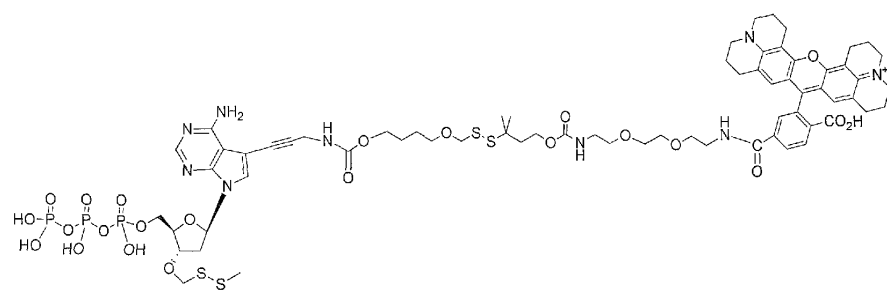
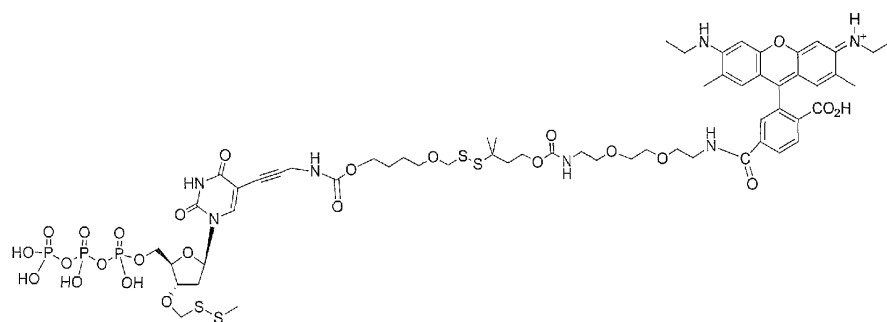
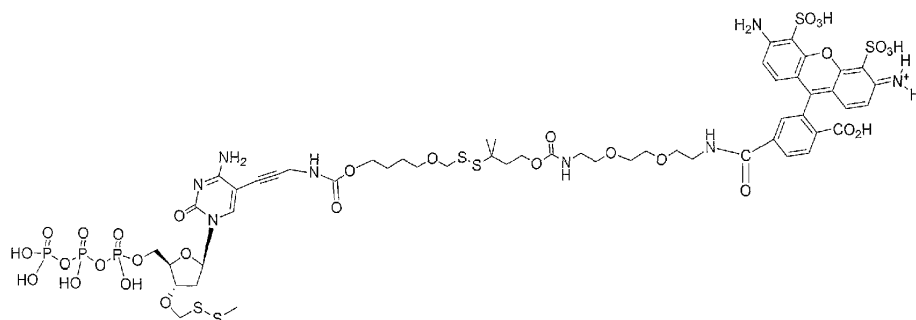
[0066]

한 실시양태에서, 본 발명은 a) 핵산 주형과 상기 주형에 혼성화된 프라이머, DNA 폴리머라제, 및 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커와 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하는 적어도 1종의 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 반응 혼합물을 제공하는 단계, 및 b) 상기 반응 혼합물을 DNA 폴리머라제 촉매된 프라이머 연장 반응을 가능하게 하는 조건에 적용하는 단계를 포함하는, DNA 합성 반응을 수행하는 방법에 관한 것이다. 이는 (표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커와, 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하는) 적어도 1종의 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 결합된 프라이머에 혼입하는 것을 허용한다. 한 실시양태에서, 상기 DNA 폴리머라제 촉매된 프라이머 연장 반응은 서열분석 반응 (예를 들어 SBS)의 부분이다. 한 실시양태에서, 상기 검출가능한 표지는 환원제에 노출시킴으로써 상기 핵염기로부터 제거한다. 본 발명이 한 유형의 환원제에 제한되는 것을 의도하지 않는다. 디설피드 결합을 환원시킬 수 있는 임의의 적합한 환원제를 사용하여 본 발명을 실시할 수 있다. 한 실시양태에서 환원제는 포스핀 [12], 예를 들어, 트리페닐포스핀, 트리부틸포스핀, 트리히드록시메틸 포스핀, 트리히드록시프로필 포스핀, 트리스 카르보에톡시-포스핀 (TCEP) [13, 14]이다. 한 실시양태에서, 상기 환원제는 TCEP이다. 한 실시양태에서, 상기 검출가능한 표지 및 3'-OCH₂-SS-R 기는 티올 기 [15]를 지니고 있는 화합물에 노출시킴으로써 상기 핵염기로부터 제거하여 디티오-기반 링커 및 말단 (보호) 기, 예컨대 시스테인, 시스테인, 디티오-숙신산, 디티오프레일, 2,3-디메르캅토-1-프로판술폰 산 나트륨 염, 디티오부틸아민 [16], 메소-2,5-디메르캅토-N,N,N',N'-테트라메틸아디프아미드, 2-메르캅토-에탄술폰네이트, 및 N,N'-디메틸, N,N'-비스(메르캅토아세틸)-히드라진 [17]을 포함한 (그러나 이에 제한되지는 않는) 티올-함유 화합물의 절단을 수행하도록 한다. 반응은 셀렌올을 포함시킴으로써 추가로 촉매할 수 있다 [18]. 게다가, 수소화붕소, 예컨대 수소화붕소나트륨 [19] 뿐만 아니라 아스코르브산 [20]도 이러한 목적에 또한 사용할 수 있다. 게다가, 디설피드 결합의 절단을 위한 효소적 방법은 디설피드 및 티오리덕타제와 같이 또한 공지되어 있으며, 본 발명의 화합물과 함께 사용될 수 있다 [21].

[0067]

한 실시양태에서, 본 발명은 a) 핵산 주형과 상기 주형에 혼성화된 프라이머를 포함하는 반응 혼합물을 제공하여 프라이머/주형 혼성화 복합체를 형성시키는 단계, b) DNA 폴리머라제, 및 핵염기, 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커와, 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하는, 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 첨가하는 단계, c) 상기 반응 혼합물을 DNA 폴리머라제 촉매된 프라이머 연장 반응을 가능하게 하는 조건에 적용하여 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체를 생성하도록 하는 단계, 및 d) 상기 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체에서 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 상기 제1 검출가능한 표지를 검출하는 단계를 포함하는, DNA 합성을 분석하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 검출은 어떤 유형의 유사체 (A, T, G, C 또는 U)가 혼입되었는지를 결정할 수 있게 한다. 한 실시양태에서, 방법은 e) 상기 절단가능한 보호기 및 임의로 상기 검출가능한 표지를 상기 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체로부터 제거하는 단계, 및 f) 단계 b) 내지 e)를 적어도 1회 반복하는 (그리고 전형적으로 이들 단계를 다수회, 예를 들어 10-200회 반복하는) 단계를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 절단가능한 옥시메틸렌디설피드-함유 링커는 소수성이고 0 초과와 logP 값을 갖는다. 한 실시양태에서, 절단가능한 옥시메틸렌디설피드-함유 링커는 소수성이고 0.1 초과와 logP 값을 갖는다. 한 실시양태에서, 절단가능한 옥시메틸렌디설피드-함유 링커는 소수성이고 1.0 초과와 logP 값을 갖는다. 한 실시양태에서, 방법은 단계 b)의 반복 동안에 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 첨가하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트는 제2 검출가능한 표지를 포함하며, 여기서 상기 제2 검출가능한 표지는 상기 제1 검출가능한 표지와 상이하다. 한 실시양태에서, 상기 제2 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기는 상기 제1 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기와 상이하다. 한 실시양태에서, A, G, C 및 T 또는 U의 유사체를 나타내

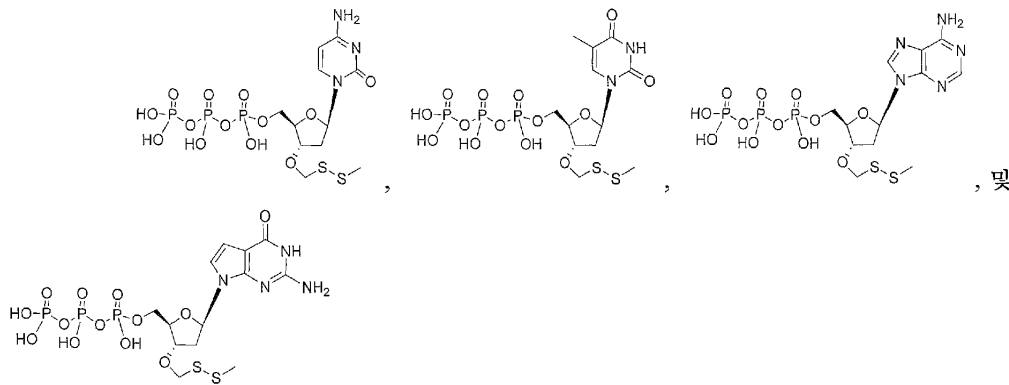
는 적어도 4종의 상이하게 표지된, 3'-0 메틸렌디술피드 캡핑된 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물의 혼합물을 단계 b)에서 사용한다. 한 실시양태에서, 하기 구조식을 갖는, 적어도 4종의 상이하게 표지된, 3'-0 메틸렌디술피드 캡핑된 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물의 상기 혼합물을



[0068]

[0069]

단계 b)에서 사용한다. 한 실시양태에서, 상기 혼합물은 단계 b)에서 또한 사용되는, 미표지된 3'-0 메틸렌디
 솔피드 캡핑된 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 화합물 예컨대 하기 구조식:



를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 단계 e)는 상기 변형된 프라이머/주형 혼성화 복합체를 환원제에 노출시킴으로써 수행한다. 한 실시양태에서, 상기 환원제는 TCEP이다. 한 실시양태에서, 상기 검출가능한 표지는 티올 기를 지니고 있는 화합물에 노출시킴으로써 상기 핵염기로부터 제거하여 디티오-기반 링커 및 말단 (보호) 기, 예컨대 시스테인, 시스테인, 디티오-숙신산, 디티오프레틸, 2,3-디메르캅토-1-프로판술폰산 나트륨 염, 디티오부틸아민, 메소-2,5-디메르캅토-N,N',N'-테트라메틸아디프아미드, 2-메르캅토-에탄 술포네이트, 및 N,N'-디메틸, N,N'-비스(메르캅토아세틸)-히드라진을 포함한 (그러나 이에 제한되지는 않는) 티올-함유 화합물의 절단을 수행하도록 한다.

[0070] 본 발명이 특정한 서열분석 플랫폼에 제한되는 것을 의도하지 않는다. 그러나, 선호되는 기기는 퀴아젠 (QIAGEN)의 진리더(GeneReader) DNA 서열분석 시스템 (GR)이다. 한 실시양태에서, DNA 서열을 합성에 의한 서열분석 (SBS)의 방법에 의해 결정한다. 한 실시양태에서, 서열분석의 각각의 사이클은 8 단계로 이루어진다: 연장 1, 연장 2, 세척 1, 영상화 용액 첨가, 영상화, 세척 2, 절단, 및 세척 3. 영상화 사이클 동안에 수집된 데이터를 분석 소프트웨어로 처리하여 오류율, 처리량 값, 및 적용된 위상 보정 값을 산출한다.

[0071] 동일하거나 유사한 방법이 일반적으로 기타 SBS 플랫폼 (즉 유사한 조건 하에 작동하는 임의의 합성에 의한 서열분석 방법), 뿐만 아니라 특정 SBS 플랫폼, 예컨대 일루미나(Illumina)로부터의 HiSeq 및 miSeq 플랫폼; 로슈 (Roche) 454; 아이온 토렌트(Ion Torrent) PGM 및 프로톤(Proton) 플랫폼; 및 퍼시픽바이오(PacificBio) 플랫폼의 성능을 개선시킬 수 있는 것으로 고려된다.

[0072] 본 발명이 단지 한 유형의 서열분석에 제한되는 것을 의도하지 않는다. 한 실시양태에서, 상기 테옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 (핵염기, 표지 및 당, 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커를 포함하며, 상기 당은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함함)는 파이로 서열분석에서 사용될 수 있다.

[0073] 한 실시양태에서, 본 발명은 핵염기 및 당을 포함하는 테옥시뉴클레오시드 트리포스페이트이며, 상기 핵염기는 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커를 통해 부착된 검출가능한 표지를 포함하고, 상기 당은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 포함하는 것인 테옥시뉴클레오시드 트리포스페이트에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 뉴클레오시드는 폴리머라제 (또는 일부 다른 서열분석 시약)와의 혼합물로 존재한다. 한 실시양태에서, 상기 뉴클레오시드의 핵염기는 비-천연이다. 한 실시양태에서, 상기 뉴클레오시드의 비-천연 핵염기는 7-데아자 구아닌, 7-데아자 아데닌, 2-아미노, 7-데아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌을 포함하는 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 메틸렌디설피드 기를 포함하는 상기 기는 화학식 $-CH_2-SS-R$ 이며, 여기서 R은 알킬 및 치환된 알킬 기를 포함하는 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 혼합물은 프라이머를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 프라이머는 핵산 주형에 혼성화된다. 한 실시양태에서, 상기 검출가능한 표지는 형광 표지이다. 한 실시양태에서, 상기 핵산 주형은 고정화된다 (예를 들어 웰, 채널 또는 다른 구조물에, 또는 대안적으로 비드 상에).

[0074] 한 실시양태에서, 본 발명은 a) 5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-테옥시뉴클레오시드 및 ii) 메틸티오메틸 공여자를 제공하는 단계로서, 여기서 상기 5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-테옥시뉴클레오시드는 핵염기 및 당을 포함하는 것인 단계; 및 b) 상기 5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-테옥시뉴클레오시드를 3'-O-(메틸티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-테옥시뉴클레오시드를 생성하도록 하는 조건 하에 처리하는 단계를 포함하는, 3'-O-(메틸티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-테옥시뉴클레오시드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 메틸티오메틸 공여자는 DMSO이다. 한 실시양태에서, 상기 조건은 산성 조건을 포함한다. 한

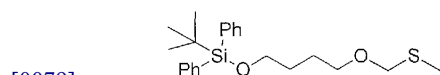
실시양태에서, 상기 5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드는 상기 뉴클레오시드의 핵염기 상에 보호기를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 3'-O-(메틸티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드를 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제한다.

[0075] 한 실시양태에서, 본 발명은 a) i) 3'-O-(메틸티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드, 및 ii) R-SH (여기서 R은 알킬 또는 치환된 알킬을 포함함)를 제공하는 단계; 및 b) 상기 3'-O-(메틸티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드를 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드를 생성하도록 하는 조건 하에 처리하는 단계를 포함하는, 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 R-SH는 에탄티올이다. 한 실시양태에서, 상기 조건은 염기성 조건을 포함한다.

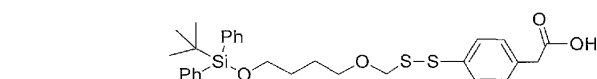
[0076] 한 실시양태에서, 본 발명은 a) 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드를 제공하는 단계; 및 b) 상기 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시뉴클레오시드를 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드를 생성하도록 하는 조건 하에 처리하는 단계를 포함하는, 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드를 제조하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 조건은 상기 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드를 NH_4F 에 노출시키는 것을 포함한다.

[0077] 한 실시양태에서, 본 발명은 a) 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드를 제공하는 단계; 및 b) 상기 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드를 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드의 트리포스페이트를 생성하도록 하는 조건 하에 처리하는 단계를 포함하는, 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드의 트리포스페이트를 제조하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 조건은 상기 3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-2'-데옥시뉴클레오시드를 $(\text{MeO})_3\text{PO}$ 와 POCl_3 및 Bu_3N 에 노출시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 단계 c) 상기 핵염기 보호기의 제거를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 보호기는 N-트리플루오로아세틸-아미노프로파르길 보호기를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 N-트리플루오로아세틸-아미노프로파르길 보호기를 가용매분해에 의해 제거하여 5'-O-(트리포스페이트)-3'-O-(R-치환된-디티오메틸)-5-(아미노프로파르길)-2'-데옥시뉴클레오시드를 생성한다.

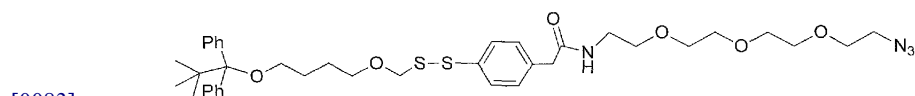
[0078] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



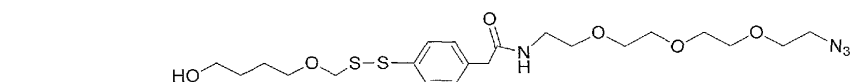
[0080] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



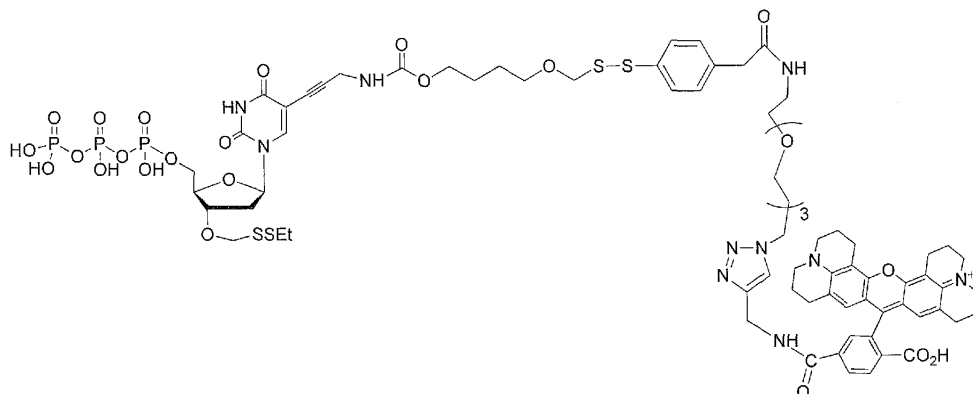
[0082] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



[0084] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:

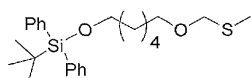


[0086] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



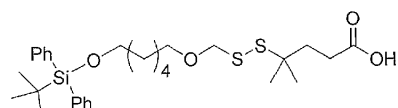
[0087]

[0088] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



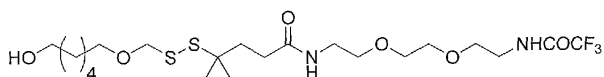
[0089]

[0090] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



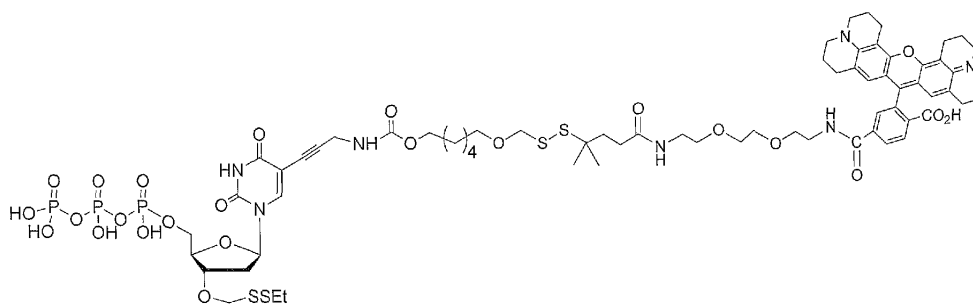
[0091]

[0092] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



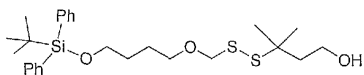
[0093]

[0094] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



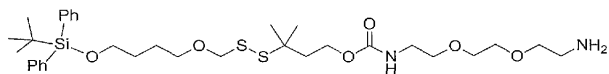
[0095]

[0096] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



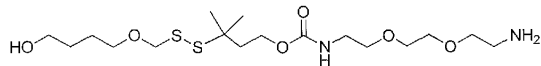
[0097]

[0098] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



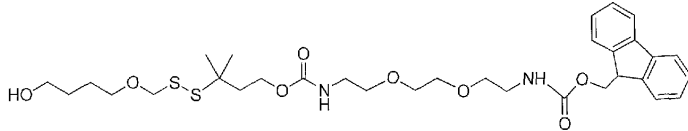
[0099]

[0100] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



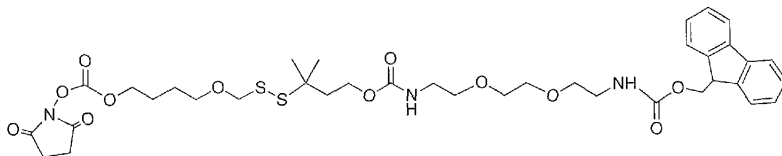
[0101]

[0102] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



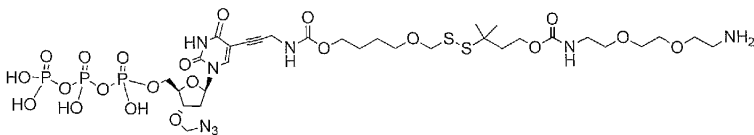
[0103]

[0104] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



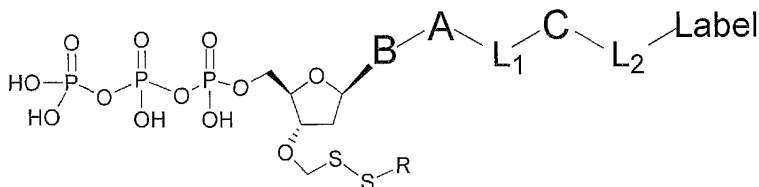
[0105]

[0106] 한 실시양태에서, 본 발명은 구조식이 하기와 같은 것인 화합물에 관한 것이다:



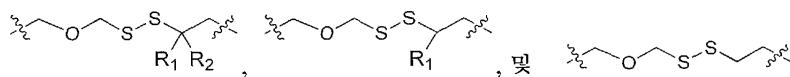
[0107]

[0108] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조식에 따른 표지된 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트에 관한 것이다:

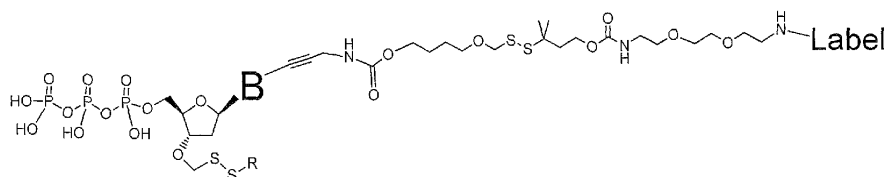


[0109]

[0110] 여기서 R은 알킬, 치환된 알킬 기, 알릴, 치환된 알릴로 이루어진 군으로부터 선택되고; B는 핵염기이고; A는 부착 기이고; C는 절단가능한 부위 코어이고; L₁ 및 L₂는 연결 기이고; Label은 표지이다. 한 실시양태에서, 상기 핵염기는 7-테아자 구아닌, 7-테아자 아데닌, 2-아미노, 7-테아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 비-천연 핵염기 유사체이다. 한 실시양태에서, 상기 부착 기 A는 프로파르길, 히드록시메틸, 엑소시클릭 아민, 프로파르길 아민, 및 프로파르길 히드록실로 이루어진 군으로부터 선택된 화학 기이다. 한 실시양태에서, 상기 절단가능한 부위 코어는

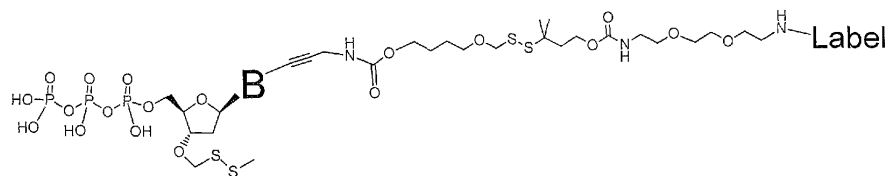


로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 R₁ 및 R₂는 독립적으로 선택된 알킬 기이다. 한 실시양태에서, L₁은 -CONH(CH₂)_x-, -COO(CH₂)_x-, -CO(CH₂)_x-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-10, 그러나 보다 바람직하게는 1-6이다. 한 실시양태에서, L₂는 -NH-, -(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-, -(CH₂)_xOCONH(CH₂)_yO(CH₂)_yO(CH₂)_zNH-, -CONH(CH₂)_x-, -CO(CH₂)_x-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x, y, 및 z는 각각 독립적으로 0-10, 그러나 보다 바람직하게는 1-6으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상기 표지는 형광단 염료, 에너지 전달 염료, 질량-태그, 비오틴, 및 합텐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 화합물은 상기 표지가 염료이고, R이 알킬, 치환된 알킬 기, 알릴, 치환된 알릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 하기 구조식을 갖는다:



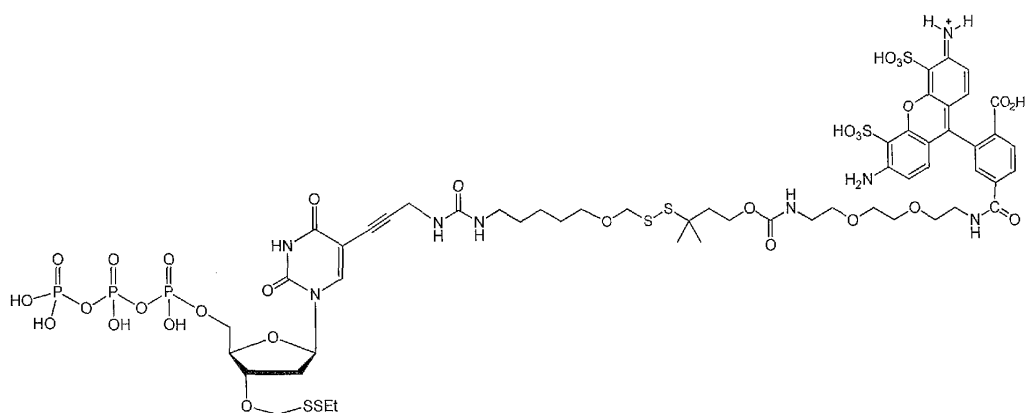
[0111]

[0112] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 가지며, 여기서 상기 표지는 염료이다:



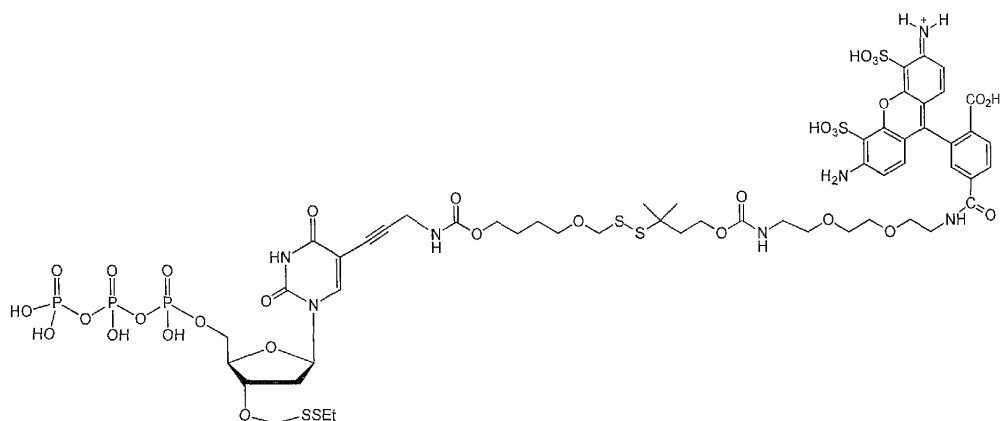
[0113]

[0114] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



[0115]

[0116] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



[0117]

O=P([O-])([O-])OP(=O)([O-])[O-]OP(=O)([O-])[O-]OC[C@H]1O[C@@H](C#CCNC(=O)NCCCCCOSSCCNC(=O)c2ccc(cc2)-c3cc(C(=O)O)c(O)c(S(=O)(=O)c4cc(N)cc5c4Oc6cc(C(=O)O)c(N)cc6[N+](=O)[O-])c5)c3)[C@H](O)[C@H](OSSEI)[C@H]1O

[0119]




[0120]

The diagram shows a chemical structure of a nucleotide derivative. It consists of a triphosphate group (three phosphate units linked together) attached to a five-membered sugar ring (ribose or deoxyribose). The sugar ring has a hydroxyl group (OH) at the 3' position and a variable group 'D' at the 2' position. The sugar ring is linked to a variable linker 'B' at the 5' position. The linker 'B' is connected to a variable linker 'A', which is then connected to a variable linker 'L₁', which is connected to a variable linker 'C', which is finally connected to a variable linker 'L₂' and a 'Label'.

[0121]

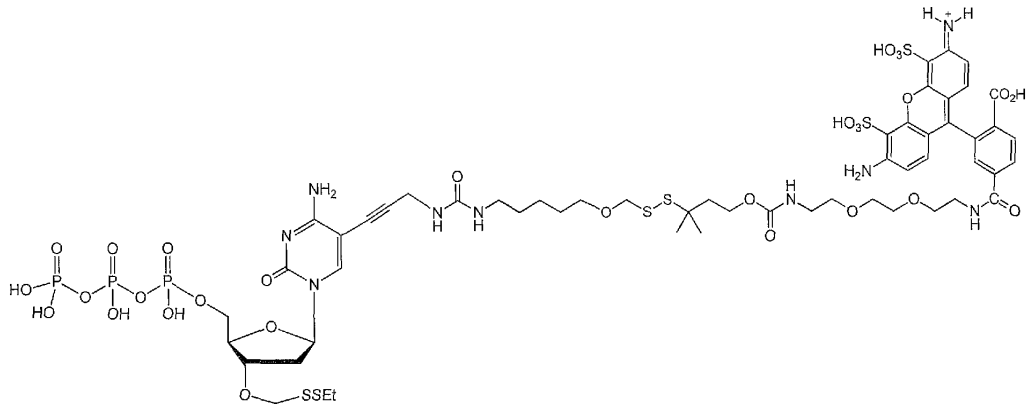
[0122]

$$\begin{array}{c} \text{---} \text{O} \text{---} \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2) \text{---} \\ \text{---} \text{O} \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}(\text{R}_1) \text{---} \\ \text{---} \text{O} \text{---} \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} \text{---} \end{array}, \quad \text{---} \text{O} \text{---} \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} \text{---}, \quad \text{---} \text{O} \text{---} \text{S} \text{---} \text{S} \text{---} \text{---}, \quad \text{및}$$

코어는 , , 및 로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 R₁ 및 R₂는 독립적으로 선택된 알킬 기이다. 한 실시양태에서, L₁은 -CONH(CH₂)_x-, -CO-O(CH₂)_x-, -CONH-(OCH₂CH₂)_x-, -CO-O(CH₂CH₂)_x-, 및 -CO(CH₂)_x-로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 x는 0-100이다. 일부 실시양태에서, x는 0-10, 그러나 보다 바람직하게는 1-6이다. 한 실시양태에서, L₂는

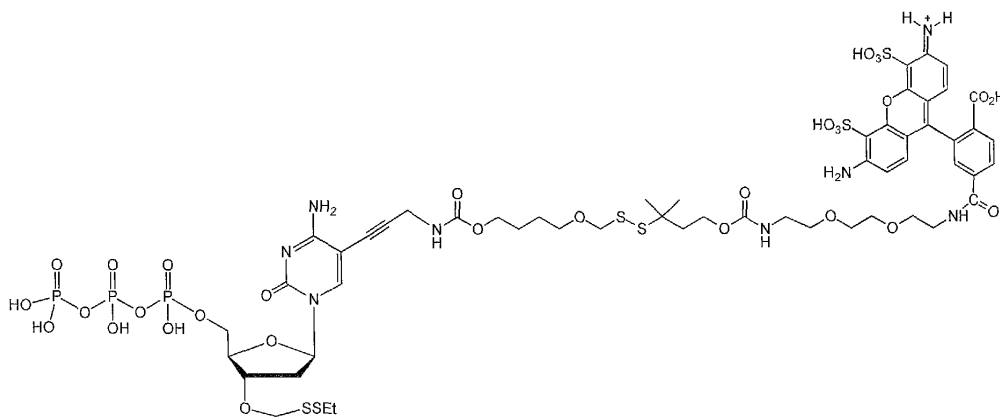
– 21 –

는 형광단 염료, 에너지 전달 염료, 질량-태그, 비오틴, 및 합텐으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오티드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



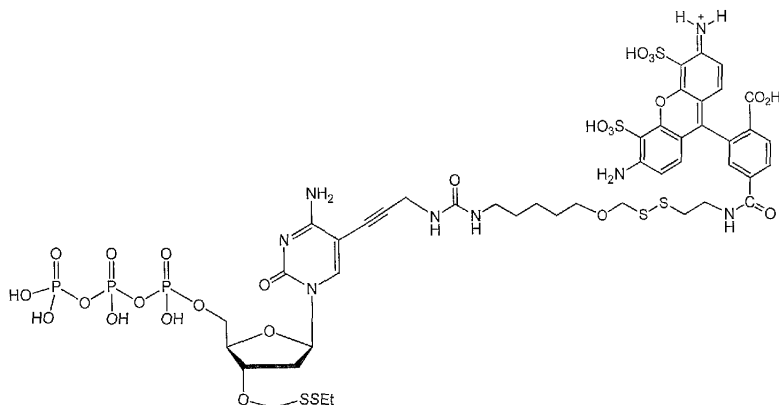
[0123]

[0124] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오티드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0125]

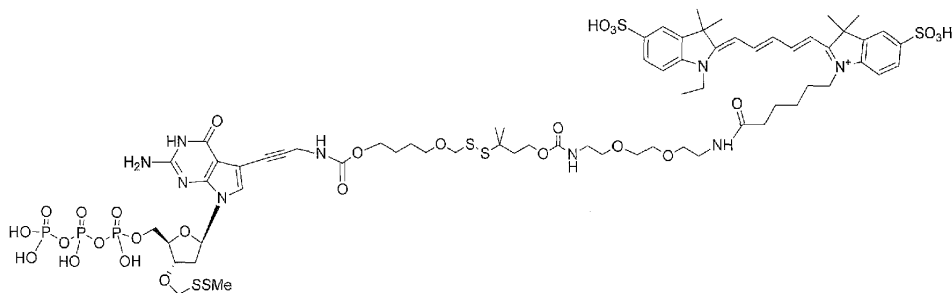
[0126] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오티드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0127]

[0128] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오티드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):

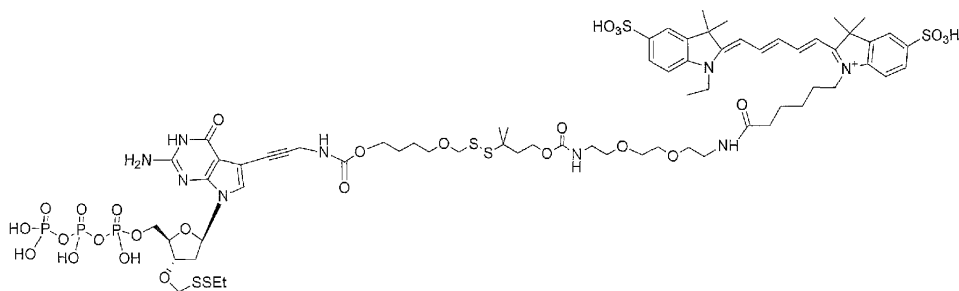
핵염기는 상이할 수 있음):



[0129]

[0130]

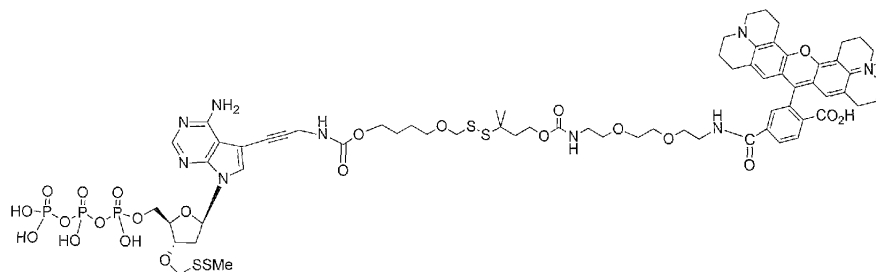
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0131]

[0132]

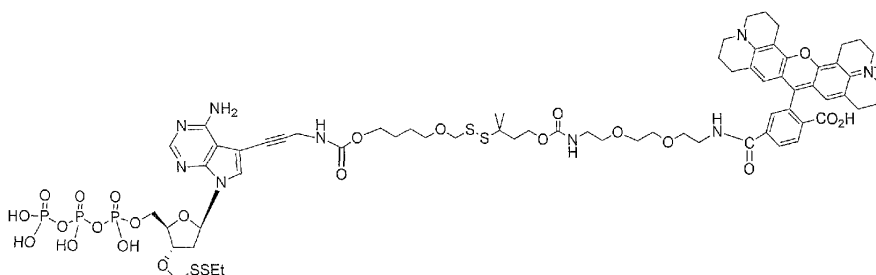
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0133]

[0134]

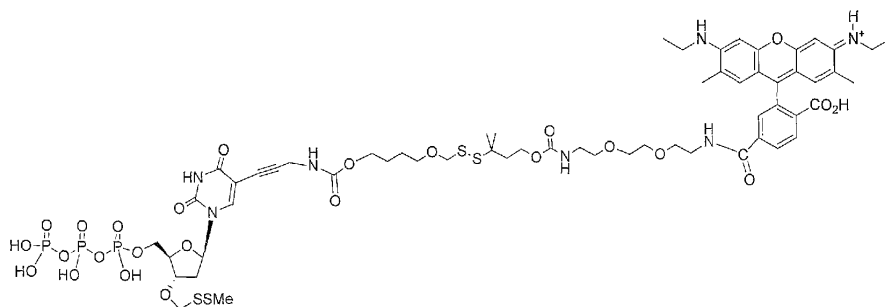
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0135]

[0136]

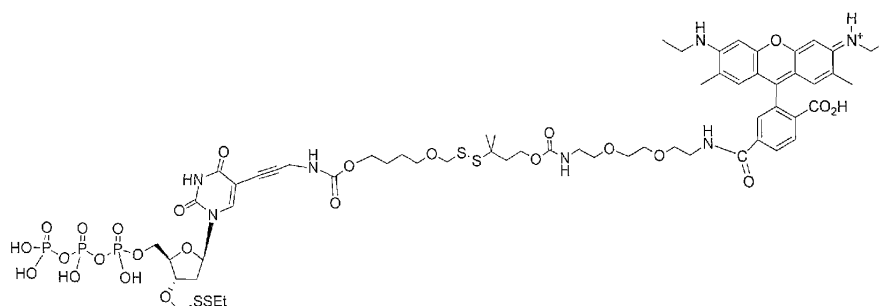
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0137]

[0138]

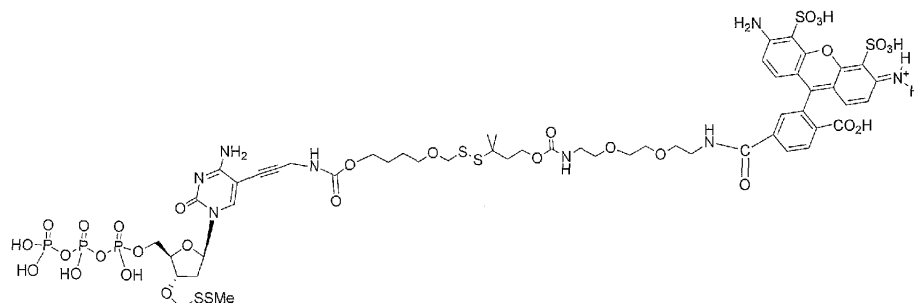
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0139]

[0140]

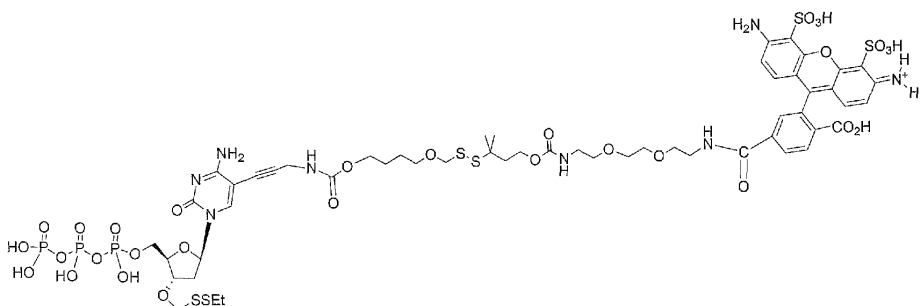
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0141]

[0142]

한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):

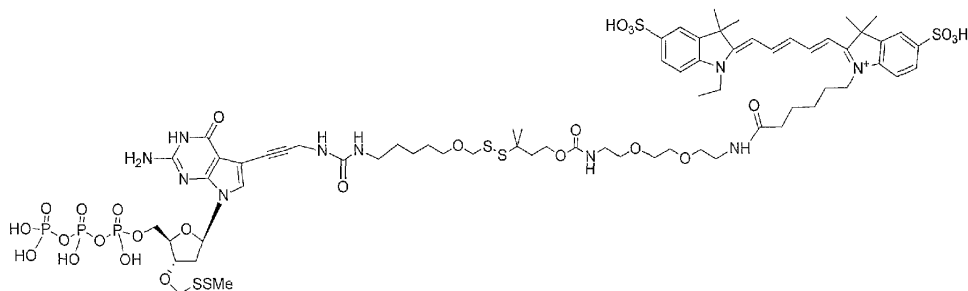


[0143]

[0144]

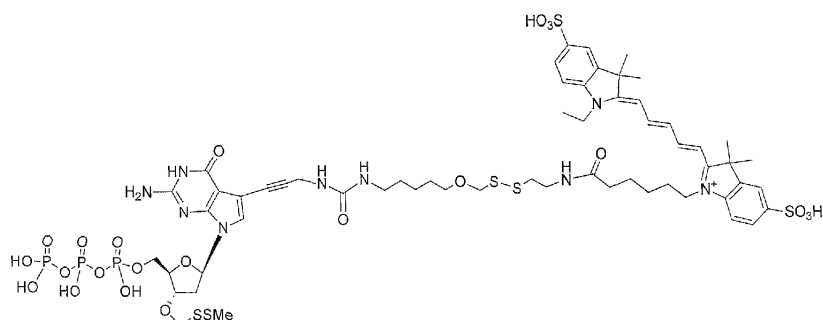
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고,

핵염기는 상이할 수 있음):



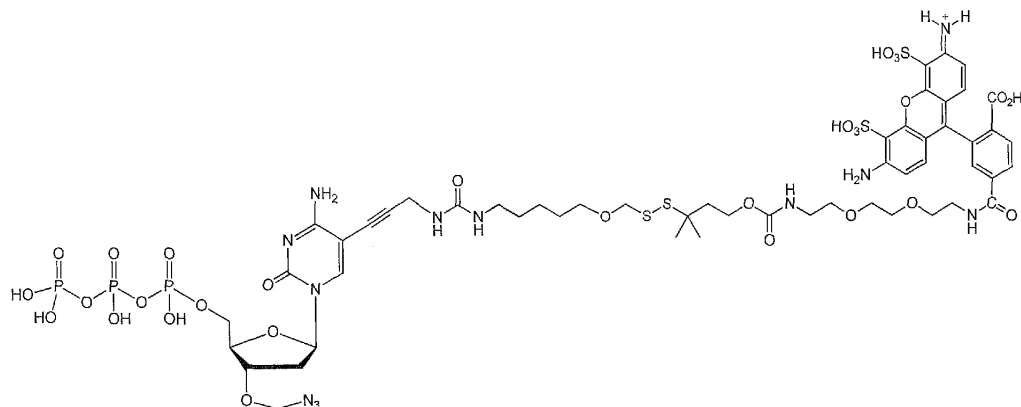
[0145]

[0146] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



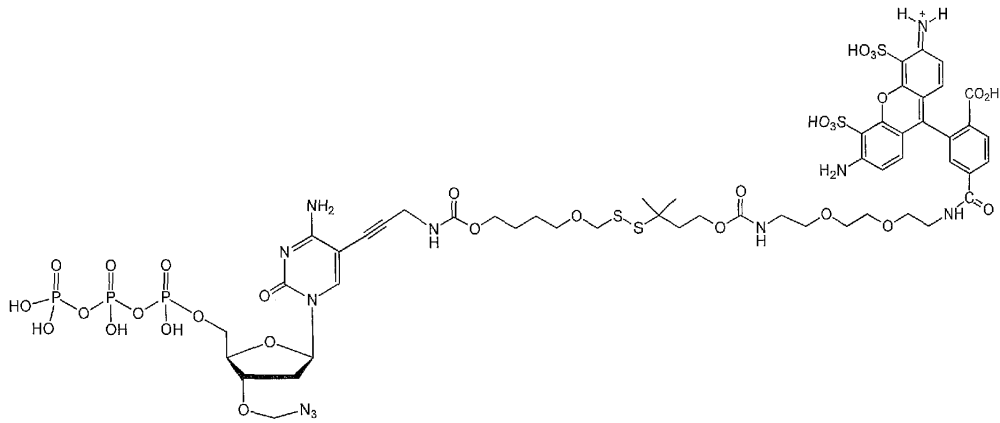
[0147]

[0148] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0149]

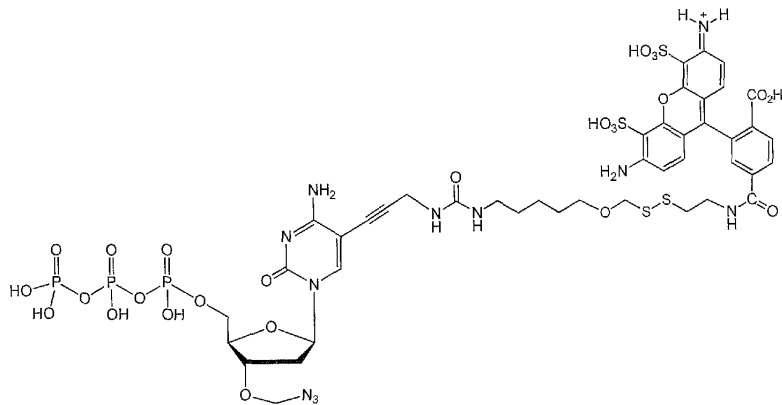
[0150] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0151]

[0152]

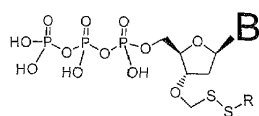
한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (특정한 핵염기 및 표지가 이하에 제시되어 있지만, 다른 유사한 뉴클레오타이드 대응물이 고려되며, 즉 명세서 및 도면에서의 다양한 표지 중 임의의 것이 치환될 수 있고, 핵염기는 상이할 수 있음):



[0153]

[0154]

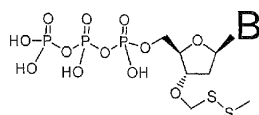
한 실시양태에서, 본 발명은 미표지된 화합물을 고려한다. 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



[0155]

[0156]

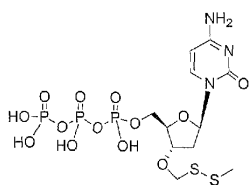
여기서 R은 알킬, 치환된 알킬 기, 알릴, 치환된 알릴로 이루어진 군으로부터 선택되고; B는 핵염기이다. 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다 (다시 B는 핵염기임):



[0157]

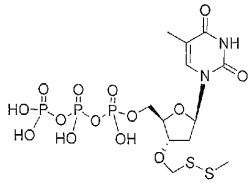
[0158]

한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



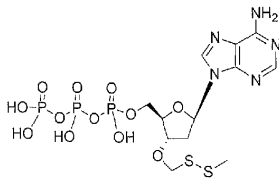
[0159]

[0160] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



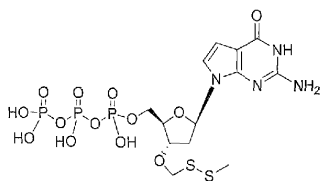
[0161]

[0162] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:



[0163]

[0164] 한 실시양태에서, 화합물은 하기 구조식을 갖는다:

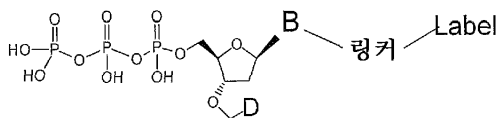


[0165]

[0166] 한 실시양태에서, 상기 핵염기는 7-테아자 구아닌, 7-테아자 아데닌, 2-아미노,7-테아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 비-천연 핵염기 유사체이다.

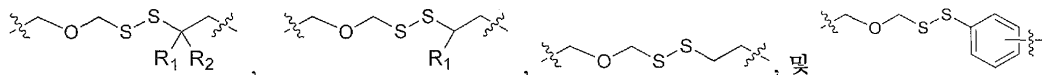
[0167] 한 실시양태에서, 본 발명은 도 43에 제시된 황 공급원으로서 디메틸디설피드 및 DMTSF, 및 중간체로서 3'-(2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 뉴클레오시드를 사용하여 3'-OCH₂-SSMe 뉴클레오타이드 유사체를 합성하는 방법에 관한 것이다.

[0168] 한 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조식에 따른 표지된 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트에 관한 것이다:



[0169]

[0170] 여기서 D는 아지드, 디설피드 알킬, 디설피드 치환된 알킬 기, 디설피드 알릴, 및 디설피드 치환된 알릴 기로 이루어진 군으로부터 선택되고; B는 핵염기이고; Linker는 절단가능한 옥시메틸렌디설피드-함유 부위 코어를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 절단가능한 부위 코어는



로 이루어진 군 으로부터 선택되며, 여기서 R₁ 및 R₂는 독립적으로 선택된 알킬 기이고; Label은 표지이다. 한 실시양태에서, 상기 Linker는 소수성이다. 한 실시양태에서, 상기 Linker는 0 초과 logP 값을 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 Linker는 0.1 초과 logP 값을 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 Linker는 0.5 초과 logP 값을 갖는다. 한 실시양태에서, 상기 Linker는 1.0 초과 logP 값을 갖는다.

[0171]

정의

[0172]

본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어가 이하에서 정의된다. 본원에 정의된 용어는 본 발명과 관련된 관련 기술분야에서 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 같은 의미를 갖는다. 용어 예컨대 단수형은 단수의 실체만을 지칭하고자 하는 것이 아니라, 그의 구체제가 예시를 위해 사용될 수 있는 일반적인 부류를 포함하고자 하는 것이다. 본원에서의 전문 용어는 본 발명의 구체적 실시양태를 기재하기 위해 사용되나,

청구범위에 개요를 서술한 바와 같은 것을 제외하고는, 그의 사용이 본 발명의 범위를 정하지 않는다.

[0173] 본원에 사용된 바와 같이, "수소"는 -H를 의미하고; "히드록시"는 -OH를 의미하고; "옥소"는 =O를 의미하고; "할로"는 독립적으로 -F, -Cl, -Br 또는 -I를 의미하고; "아미노"는 -NH₂ (용어 아미노를 함유하는 기, 예를 들어, 알킬아미노의 정의에 관해서는 이하 참조)를 의미하고; "히드록시아미노"는 -NHOH를 의미하고; "니트로"는 -NO₂를 의미하고; "이미노"는 =NH (용어 이미노를 함유하는 기, 예를 들어, 알킬이미노의 정의에 관해서는 이하 참조)를 의미하고; "시아노"는 -CN을 의미하고; "아지도"는 -N₃을 의미하고; "메르캅토"는 -SH를 의미하고; "티오"는 =S를 의미하고; "술포아미도"는 -NHS(O)₂- (용어 술포아미도를 함유하는 기, 예를 들어, 알킬술포아미도의 정의에 관해서는 이하 참조)를 의미하고; "술포닐"은 -S(O)₂- (용어 술포닐을 함유하는 기, 예를 들어, 알킬술포닐의 정의에 관해서는 이하 참조)를 의미하고; "실릴"은 -SiH₃ (용어 실릴을 함유하는 기(들), 예를 들어, 알킬실릴의 정의에 관해서는 이하 참조)을 의미한다.

[0174] 본원에 사용된 바와 같이, "메틸렌"은 탄소 원자가 두 개의 수소 원자에 결합된 화학 종을 의미한다. -CH₂- 기는 표준 메틸렌 기인 것으로 간주된다. 쇠 또는 고리 내의 메틸렌 기는 그 크기 및 친유성에 기여한다. 이 맥락에서 디데옥시는 또한 메틸렌을 지칭한다. 특히 2,3-디데옥시 화합물은 2,3-메틸렌 (2,3-메틸렌- 글리코시드 =2,3-디데옥시- 글리코시드)과 동일하다.

[0175] 이하의 기의 경우, 하기 삽입 어구로 제시된 첨자는 기를 하기와 같이 추가로 정의한다: "(C_n)"는 기 내의 탄소 원자의 정확한 수 (n)를 정의하고; "(C≤n)"는 기 내에 포함될 수 있는 탄소 원자의 최대 수 (n)를 정의하고; "(C_n-n)"는 기내의 탄소 원자의 최소 수 (n) 및 최대 수 (n') 둘 다를 정의한다. 예를 들어, "알콕시(C≤10)"는 1 내지 10개의 탄소 원자 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10, 또는 거기서 유도가능한 임의의 범위 (예를 들어, 3-10개의 탄소 원자))를 갖는 그러한 알콕시 기를 의미한다. 유사하게, "알킬(C2-10)"은 2 내지 10개의 탄소 원자 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10, 또는 거기서 유도가능한 임의의 범위 (예를 들어, 3-10개의 탄소 원자))를 갖는 그러한 알킬 기를 의미한다.

[0176] "치환된"이라는 수식어 없이 사용될 경우 용어 "알킬"은 부착 점으로서 포화 탄소 원자, 선형 또는 분지형, 시클로, 시클릭 또는 아시클릭 구조를 갖고, 어떠한 탄소-탄소 이중 또는 삼중 결합도 갖지 않고, 탄소 및 수소 이외에 어떠한 다른 원자도 갖지 않는 비방향족 1가 기를 지칭한다. 기, -CH₃ (Me), -CH₂CH₃ (Et), -CH₂CH₂CH₃ (n-Pr), -CH(CH₃)₂ (이소-Pr 또는 i-Pr), -CH(CH₂)₂ (시클로프로필), -CH₂CH₂CH₂CH₃ (n-Bu), -CH(CH₃)CH₂CH₃ (sec-부틸 또는 sec-Bu), -CH₂CH(CH₃)₂ (이소-부틸 또는 i-Bu), -C(CH₃)₃ (tert-부틸 또는 t-Bu), -CH₂C(CH₃)₃ (네오-펜틸), 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헥실메틸은 알킬 기의 비제한적인 예이다. 용어 "치환된 알킬"은 부착 점으로서 포화 탄소 원자, 선형 또는 분지형, 시클로, 시클릭 또는 아시클릭 구조를 갖고, 어떠한 탄소-탄소 이중 또는 삼중 결합도 갖지 않고, N, O, F, Cl, Br, I, Si, P, 및 S로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 적어도 하나의 원자를 가진 비방향족 1가 기를 지칭한다. 하기 기는 치환된 알킬 기의 비제한적인 예이다: -CH₂OH, -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂SH, -CF₃, -CH₂CN, -CH₂C(O)H, -CH₂C(O)OH, -CH₂C(O)OCH₃, -CH₂C(O)NH₂, -CH₂C(O)NHCH₃, -CH₂C(O)CH₃, -CH₂OCH₃, -CH₂OCH₂CF₃, -CH₂OC(O)CH₃, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -CH₂N(CH₃)₂, -CH₂CH₂Cl, -CH₂CH₂OH, -CH₂CF₃, -CH₂CH₂OC(O)CH₃, -CH₂CH₂NHCO₂C(CH₃)₃, 및 -CH₂Si(CH₃)₃이다.

[0177] 용어 "절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커" 및 "절단가능한 옥시메틸렌디설피드-함유 링커"는 링커가 옥시메틸렌디설피드 기를 포함한다는 것을 나타낼 의도이며, 단지 옥시메틸렌디설피드 기에 제한되는 것이 아니라, 오히려 예를 들어 도 25에서의 화합물에서 보이는 바와 같이 그 기 이상을 함유할 수 있는 링커인 것으로 간주된다. 유사하게, 용어 "옥시메틸렌디설피드 부위 코어" 및 "옥시메틸렌디설피드-함유 부위 코어"는 부위 코어가 옥시메틸렌디설피드 기를 포함한다는 것을 나타낼 의도이며, 단지 옥시메틸렌디설피드 기에 제한되는 것이 아니라, 오히려 그 기 이상을 함유할 수 있는 부위 코어인 것으로 간주된다.

[0178] 용어 "핵산"은 일반적으로 그것이 증폭 생성물이든, 합성으로 생성된 것이든, RNA의 역전사의 생성물이든 또는 천연 발생이든, DNA 또는 RNA 둘 다를 지칭한다. 전형적으로 핵산은 단일- 또는 이중-가닥 분자이고 천연 발생 뉴클레오타이드로 구성된다. 이중-가닥 핵산 분자는 3'- 또는 5'-오버행을 가질 수 있으며, 따라서 그의 전장에 걸쳐 완전히 이중 가닥일 필요는 없거나 없는 것으로 추정된다. 더욱이, 핵산은 비-천연 발생 뉴클레오타이드 및 /또는 천연 발생 뉴클레오타이드의 변형으로 구성될 수 있다. 예가 여기에 기재되나, 이에 제한되지는 않는다:

엑소뉴클레아제 분해/폴리머라제 연장의 라이게이션 또는 방지를 각각 허용하는 5' 또는 3' 뉴클레오타이드의 인산화; 공유 결합 및 근접 공유 결합을 위한 아미노, 티올, 알킨, 또는 비오틴일 변형; 형광단 및 소광 물질; 분해를 방지하는 뉴클레오타이드 사이의 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로아미테이트 및 포스포트리에스테르 연결; 메틸화; 및 변형된 염기 또는 뉴클레오시드 예컨대 데옥시-이노신, 5-브로모-dU, 2'-데옥시-우리딘, 2-아미노푸린, 2',3'-디데옥시-시티딘, 5-메틸-dC, 잠금 핵산 (LNA), 이소-dC 및 -dG 염기, 2'-O-메틸 RNA 염기 및 플루오린 변형된 뉴클레오시드.

- [0179] 본원에서 고려된 방법 중 일부에서, 프라이머는 서열분석될 주형의 적어도 일부분에 적어도 부분적으로 상보적이다. 용어 "상보적"은 일반적으로, 적절한 온도 및 이온 완충 조건에서 두 개의 뉴클레오타이드의 염기 사이의 특이적인 쌍형성 (예를 들어 A와 T) 및 유리한 열역학적 안정성을 형성하는 능력을 지칭한다. 이러한 쌍형성은 각각의 뉴클레오타이드의 수소 결합 특성에 의존한다. 이의 가장 기본적인 예는 티민/아데닌과 시토신/구아닌 염기 사이의 수소 결합 쌍이다. 본 발명에서, 표적 핵산의 증폭을 위한 프라이머는 표적 핵산 분자를 가진 그의 전장에 걸쳐 완전히 상보적이거나 "반-상보적" 둘 다일 수 있으며, 여기에 프라이머는 표적 핵산에 대한 혼성화가 최소한 가능하거나 불가능한 추가적인 비-상보적 서열을 함유한다.
- [0180] 용어 "혼성화하다"는 일반적으로, 그의 뉴클레오타이드 서열과 일치하는 상이한 핵산 분자 사이의 염기-쌍형성을 지칭한다. 용어 "혼성화하다" 및 "어닐링"은 교대해서 사용될 수 있다.
- [0181] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 일반적으로, 단일-가닥 DNA 및 길이가 75 미만의 뉴클레오타이드로 전형적으로 설계된 핵산 서열을 지칭한다.
- [0182] 용어 "프라이머"는 일반적으로, 핵산 서열을 어닐링하거나 혼성화할 수 있고 충분한 조건 (완충제, dNTP, 폴리머라제, 1가- 및 2가 염, 온도 등. . . .) 하에 프라이머가 상보적인 핵산의 연장을 허용할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0183] 용어 "주형 핵산", "주형 분자", "표적 핵산", 및 "표적 분자"는 교대해서 사용될 수 있고 그의 서열 정보를 유도하기 위해 서열분석 반응에 의해 임의로 정보를 얻게 될 수 있는 증폭 반응의 대상인 핵산 분자를 지칭한다. 주형 핵산은 고체 표면 상에 고정화될 수 있는, 즉 비드 또는 어레이 상에 고정화될 수 있으며 클론 증폭 방법에 의해 생성된 핵산일 수 있다.
- [0184] 용어 "뉴클레오시드"는 당, 예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스의 C-1' 탄소에 연결된 염기로 이루어진 화합물이다. 뉴클레오시드의 염기 부분은 통상적으로 헤테로시클릭 염기, 예를 들어, 푸린 또는 피리미딘이다.
- [0185] 용어 "뉴클레오타이드"는 단량체 단위로서 또는 폴리뉴클레오타이드 내에, 뉴클레오시드의 포스페이트 에스테르를 지칭한다. "뉴클레오시드 5'-트리포스페이트"는 당 5'-탄소 위치에 부착된 트리포스페이트 에스테르 기를 가진 뉴클레오타이드를 지칭하며, 때때로 "NTP", "dNTP" (2'-데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 또는 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트) 및 "ddNTP" (2',3'-디데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트 또는 디데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트)로서 표시된다. "뉴클레오시드 5'-테트라포스페이트"는 당 5'-탄소 위치에 부착된 테트라포스페이트 에스테르 기를 가진 대안적인 활성화된 뉴클레오타이드를 지칭한다. PA-뉴클레오타이드는 프로파르길 유사체를 지칭한다.
- [0186] 명세서 및/또는 청구범위에서 사용된 바와 같은 용어 "보호기"는 목적하는 반응의 특정 조건 하에 비반응성인 관능기를 가역적으로 만들고 H가 아닌 것으로 이해되는 기로서 통상적인 화학적 의미로 사용된다. 목적하는 반응 후, 보호기를 제거하여 보호된 관능기를 탈보호할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 모든 보호기는 합성되는 상당 비율의 분자를 분해하지 않는 조건 하에 제거가능 (그리고 따라서 불안정)해야 한다. 보호기는 "캡핑기" 또는 "차단기" 또는 "절단가능한 보호기"로도 지칭될 수 있다. 편의상, 보호기에 의해 보호되는 관능기는 또한 보호기의 부분으로서 표시되거나 지칭될 수 있음을 주목하여야 한다. 본원에 기재된 뉴클레오타이드 유도체의 맥락에서, 보호기는 3' 위치에서 사용된다. 본 발명이 서열분석에서 사용된 가역적 말단 뉴클레오타이드 상에 이러한 보호기의 성질 또는 화학적 성질에 의해 제한되는 것을 의도하지 않는다. 여러 가지의 보호기가 이러한 목적을 위해 고려되며, 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 3'-O-아지도메틸 뉴클레오타이드, 3'-O-아미노시 뉴클레오타이드, 3'-O-알릴 뉴클레오타이드; 및 디술피드 뉴클레오타이드, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-디티오메틸 알킬, 3'-O-디티오메틸 아릴, 3'-O-아세틸, 3'-O-카르바제이트, 3'-O-알킬 에테르, 3'-O-알킬 에스테르, 3'-O-알독심 (-O-N=CH-R), 3'-O-케톡심 (-O-N=C(R, R')).
- [0187] 본 발명의 한 실시양태는 보호기의 관능화를 통해 뉴클레오타이드의 3'-OH 관능기 상에 직접 마커를 부착하는 것을 고려한다.

[0188]

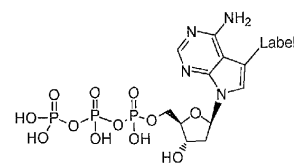
용어 "표지" 또는 "검출가능한 표지"는 그의 가장 넓은 의미에서 검출가능하거나, 그와 회합되어 있는 것을 검출할 수 있게 하는 임의의 모이어티 또는 특성을 지칭한다. 예를 들어, 표지를 포함하는 뉴클레오타이드, 올리고- 또는 폴리뉴클레오타이드가 검출가능하다. 이상적으로, 표지된 올리고- 또는 폴리뉴클레오타이드는, 특히 표지된 뉴클레오타이드가 효소적 수단에 의해 프라이머 및 주형 핵산의 상기 혼성화 복합체에 혼입된 후에 혼성화 복합체의 검출을 가능하게 한다. 표지는 공유적으로 또는 비공유적으로 뉴클레오타이드, 올리고- 또는 폴리뉴클레오타이드에 부착될 수 있다. 다양한 측면에서, 표지는, 대안적으로 또는 조합하여, (i) 검출가능한 신호를 제공하거나; (ii) 제2 표지와 상호 작용하여 제2 표지에 의해 제공된 검출가능한 신호, 예를 들어, FRET를 변형시키거나, (iii) 혼성화, 예를 들어, 듀플렉스 형성을 안정화시키거나; (iv) 포획 기능, 예를 들어, 소수성 친화도, 항체/항원, 이온 착물화를 부여하거나, (v) 물리적 특성, 예컨대 전기 영동 이동도, 소수성, 친수성, 용해도, 또는 크로마토그래피 거동을 변화시킨다. 표지는 그의 구조 및 그의 작동 메카니즘이 상당히 다르다. 표지의 예는 형광 표지, 비-형광 표지, 비색 표지, 화학 발광 표지, 생물 발광 표지, 방사성 표지, 질량-변형기, 항체, 항원, 비오틴, 합텐, 효소 (예를 들어, 퍼옥시다제, 포스페이트 등) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 추가로 예시하기 위해, 형광 표지는 플루오레세인 계열의 염료, 로다민 계열의 염료, 시아닌 계열의 염료, 또는 쿠마린, 옥사진, 보라디아자인다센 또는 그의 임의의 유도체를 포함할 수 있다. 플루오레세인 계열의 염료는, 예를 들어, FAM, HEX, TET, JOE, NAN 및 ZOE를 포함한다. 로다민 계열의 염료는, 예를 들어, 텍사스 레드, ROX, R110, R6G, 및 TAMRA를 포함한다. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, 및 TAMRA는, 예를 들어, 퍼킨-엘머, 인크.(Perkin-Elmer, Inc.) (미국 매사추세츠주 웰슬리)로부터 시판되고 있고, 텍사스 레드, 예를 들어, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) (몰cula 프로브즈, 인크.(Molecular Probes, Inc.)) (뉴욕주 그랜드 아일랜드)로부터 시판되고 있다. 시아닌 계열의 염료는, 예를 들어, CY2, CY3, CY5, CY5.5 및 CY7을 포함하고, 예를 들어, 지이 헬쓰케어 라이프 사이언시즈(GE Healthcare Life Sciences) (미국 뉴저지주 피스카타웨이)로부터 시판되고 있다.

[0189]

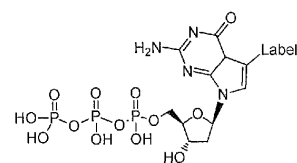
본원에 사용된 바와 같은, 용어 "상이하게 표지된"은, 표지된 뉴클레오타이드 핵염기 상에 상이한 위치에서 발견되는 표지라기 보다는, 상이한 표지인 검출가능한 표지를 지칭한다.

[0190]

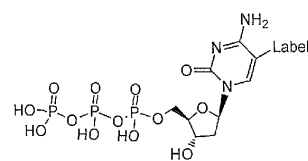
용어 "A, G, C 및 T 또는 U"의 유사체"는 변형된 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트 화합물을 지칭하며, 여기서 상기 데옥시뉴클레오타이드의 핵염기는 상응하는 뉴클레오타이드 데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시시티딘, 및 티미딘 또는데옥시우리딘과 매우 흡사하다. 검출가능한 표지된 데옥시뉴클레오타이드 트리포스



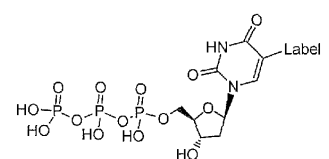
페이트 화합물의 경우에 데옥시아데노신 또는 A의 유사체는 로서 나타내어질 것이지만, 핵염기와 표지 사이에 링커가 존재하는 것이 바람직하다. 검출가능한 표지된 데옥시뉴클레오타이드 트



리포스페이트 화합물의 경우에 데옥시구아노신 또는 G의 유사체는 로서 나타내어질 것이지만, 핵염기와 표지 사이에 링커가 존재하는 것이 바람직하다. 검출가능한 표지된 데옥시뉴클레오타이드 트



리포스페이트 화합물의 경우에 데옥시시티딘 또는 C의 유사체는 로서 나타내어질 것이지만, 핵염기와 표지 사이에 링커가 존재하는 것이 바람직하다. 검출가능한 표지된 데옥시뉴클레오타이드 트리



포스페이트 화합물의 경우에 티미딘 또는 데옥시우리딘 또는 T 또는 U의 유사체는 로서 나타내어질 것이지만, 핵염기와 표지 사이에 링커가 존재하는 것이 바람직하다. 추가적인 핵염기는 7-데

아자 구아닌, 7-데아자 아데닌, 2-아미노, 7-데아자 아데닌, 및 2-아미노 아데닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 비-천연 핵염기를 포함할 수 있다. 유사체의 경우에, 검출가능한 표지는 핵염기와 상기 검출가능한 표지 사이에 링커 부분을 또한 포함할 수 있다.

[0191]

용어 "TCEP" 또는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀"은 생화학 및 분자 생물학 적용에서 빈번히 사용되는 환원제를 지칭한다. 이는 286.65 그램/mol의 분자량을 가진 히드로클로라이드 염 (TCEP-HCl)으로서 종종 제조되어 사용된다. 이는 물에 가용성이고 중성 pH에서 안정화된 용액으로서 이용가능하며 환원제의 제거를 용이하게 하기 위해 아가로스 지지체 상으로 고정화된다. 본 발명이 한 유형의 환원제에 제한되는 것을 의도하지 않는다. 디설피드 결합을 환원시킬 수 있는 임의의 적합한 환원제를 본 발명을 실시하는 데 사용할 수 있다. 한 실시양태에서 환원제는 포스핀 [12], 예를 들어, 트리페닐포스핀, 트리부틸포스핀, 트리히드록시메틸 포스핀, 트리히드록시프로필 포스핀, 트리스 카르보에톡시-포스핀 (TCEP) [13, 14]이다. 본 발명이 TCEP의 사용에 제한되는 것을 의도하지 않는다. 한 실시양태에서, 상기 검출가능한 표지 및 3'-OCH₂-SS-R 기는 티올 기를 지니고 있는 화합물에 노출시킴으로써 상기 핵염기로부터 제거하여 디티오-기반 링커 및 말단 (보호) 기, 예컨대 시스테인, 시스테인아민, 디티오-숙신산, 디티오프탈로, 2,3-디메르캅토-1-프로판술폰산 나트륨 염, 디티오부틸아민, 메소-2,5-디메르캅토-N,N',N'-테트라메틸아디프아미드, 2-메르캅토-에탄 술포네이트, 및 N,N'-디메틸, N,N'-비스 (메르캅토아세틸)-히드라진을 포함한 (그러나 이에 제한되지는 않는) 티올-함유 화합물의 절단을 수행하도록 한다 [17]. 반응은 셀렌올을 포함시킴으로써 추가로 촉매할 수 있다 [18]. 게다가, 수소화붕소, 예컨대 수소화붕소나트륨 [19] 뿐만 아니라 아스코르브산 [20]도 이러한 목적에 또한 사용할 수 있다. 게다가, 디설피드 결합의 절단을 위한 효소적 방법은 디설피드 및 티오리덕타제와 같이 또한 널리 공지되어 있으며, 본 발명의 화합물과 함께 사용될 수 있다 [21].

도면의 간단한 설명

[0192]

명세서에 포함되어 명세서의 일부를 형성하는 첨부된 도면은 본 발명의 몇몇 실시양태를 예시하고, 기재와 함께, 본 발명의 원리를 설명하는 역할을 한다. 도면은 본 발명의 바람직한 실시양태를 단지 예시하기 위한 것이며 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도 1은 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-OH를 가진 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 예를 제시하며, 여기서 R은 알킬 기 예컨대 메틸, 에틸, 이소프로필, t-부틸, n-부틸, 또는 그의 유사체를 나타내며 치환기는 헤테로-원자 예컨대 O, N, S 등을 함유한다.

도 2는 표지가 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커 (-OCH₂-SS-)를 통해 핵염기에 부착되어 있는, 3'-OH 메틸렌디설피드-함유 보호기를 가진 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 표지된 유사체를 제시한다. 유사체는 (좌측 상단으로부터 시계 방향으로) 데옥시아데노신, 티미딘 또는 데옥시우리딘, 데옥시시티딘 및 데옥시구아노신에 관한 것이다.

도 3은 환원제, 예컨대 TCEP로 3'-OH 보호기를 탈보호하는 단계적 메커니즘을 제시한다.

도 4은 절단 반응 생성물인 통상적인 설피드 및 옥시메틸렌 설피드 연결된 표지된 뉴클레오타이드를 제시한다.

도 5는 절단가능한 링커의 스페이서가 프로파르길 에테르 링커를 포함하는 표지된 뉴클레오타이드의 예를 제시한다. 유사체는 (좌측 상단으로부터 시계 방향으로) 데옥시아데노신, 티미딘 또는 데옥시우리딘, 데옥시시티딘 및 데옥시구아노신에 관한 것이다.

도 6은 절단가능한 링커의 스페이서가 프로파르길아민 링커를 포함하는 표지된 뉴클레오타이드의 예를 제시한다. 유사체는 (좌측 상단으로부터 시계 방향으로) 데옥시아데노신, 티미딘 또는 데옥시우리딘, 데옥시시티딘 및 데옥시구아노신에 관한 것이다.

도 7은 절단가능한 링커의 스페이서가 피리미딘의 경우 5-위치에서, 그리고 푸린의 경우 7-데-아자-탄소에서 핵염기에 직접 부착된 메틸렌 $-(CH_2)_n-$ 을 포함하는 표지된 뉴클레오타이드의 예를 제시한다. 이 링커는 메틸렌 ($n=1$) 또는 폴리메틸렌 ($n>1$)일 수 있고 여기서 절단 후, 링커는 핵염기 상에 부착점에서 $-(CH_2)_nOH$ 기를 생성하며, 여기서 L₁ 및 L₂는 스페이서를 나타내고, 치환기 R₁, R₂, R₃ 및 R₄는 앞에서 기재된 바와 같이 절단가능한 링커에 안정성을 제공하는 원자의 군이다. 유사체는 (좌측 상단으로부터 시계 방향으로) 데옥시아데노신, 티미딘 또는 데옥시우리딘, 데옥시시티딘 및 데옥시구아노신에 관한 것이다.

도 8은 미표지된 dT 유사체 (화합물 5)의 합성을 제시한다.

도 9는 3'-O-(에틸디티오메틸)-dCTP (10)의 합성을 제시한다.

도 10은 표지된 dT 중간체에 특이적인 표지된 뉴클레오타이드의 합성 경로를 제시한다.

도 11은 1,4-부탄디올로부터 출발하는 절단가능한 링커 합성을 제시한다.

도 12는 안정화 같은자리-디메틸 기가 절단가능한 링커의 α-탄소에 부착되어 있는, 절단가능한 링커의 또 다른 변이체를 제시한다.

도 13은 디설피드가 같은자리-디메틸 기에 의해 플랭크되고 플렉서블 에틸렌 글리콜 링커 (PEG)에 부착되어 있는 절단가능한 링커의 합성을 제시한다. 링커는 카르바메이트 기 (-NH-C(=O)O-)를 통해 PA-뉴클레오타이드에 부착된다. 이러한 경우에 생성된 뉴클레오타이드 유사체는 화합물 35 (dUTP 유사체)에서와 같을 수 있다.

도 14는 절단가능한 디설피드가 같은자리-디메틸 기에 의해 플랭크되고 링커가 우레아 기 (-NH(C=O)NH-)를 통해 PA-뉴클레오타이드에 부착되어 있는, dATP 유사체에 관한 절단가능한 링커의 합성을 제시한다. 다른 뉴클레오타이드 유사체의 경우 (예를 들어 dCTP, dGTP, dUTP의 유사체의 경우)는 반응 순서의 마지막 단계에서 42를 적절한 PA-유사체로 대체함으로써 유사하게 합성할 수 있다.

도 15는 링커가 우레아 관능기를 통해 PA-뉴클레오타이드에 결합되고 디설피드가 두 개의 탄소 링커에 의해 염료에 연결되어 있는, 절단가능한 링커 화합물 45의 합성을 제시한다. 이러한 경우에 생성된 뉴클레오타이드 유사체는 화합물 49 (dGTP 유사체)에서와 같을 수 있다. 다른 뉴클레오타이드 유사체 (예를 들어 dATP, dUTP, dCTP의 유사체)는 반응 순서의 세번째 단계에서 뉴클레오타이드 46을 적절한 PA-뉴클레오타이드 유사체로 대체함으로써 유사하게 합성할 수 있다.

도 16은 표지된 뉴클레오타이드 50을 65°C에서 10 당량의 TCEP에 노출시킨 경우, 기대 생성물 51과 함께 화합물 52를 포함한 다수의 부산물을 생성하였다는 것을 제시한다.

도 17은 5분 노출 후 분석된, 292 nm (하단) 및 524 nm (상단)에서 추출된, 화합물 50의 TCEP 노출 생성물의 LC-MS 추적적을 제시하며, 여기서 11.08분에서의 피크는 화합물 51, 10.88분에서의 피크는 화합물 52, 그리고 기타 피크는 부산물에 상응한다.

도 18은 15분 노출 후 분석된, 292 nm (하단) 및 524 nm (상단)에서 추출된, 화합물 50의 TCEP 노출 생성물의 LC-MS 추적적을 제시하며, 여기서 11.32분에서의 피크는 화합물 51 그리고 기타 피크는 부산물에 상응한다.

도 19는 동일한 절단 조건 하에, 옥시메틸렌디설피드 연결된 뉴클레오타이드 35가 목적하는 절단 생성물, 화합물 53 및 54를 깔끔하게 생성하였다는 것을 제시한다. 링커의 메틸렌 티올 세그먼트 (-CH₂SH)는 디설피드 기의 절단시 뉴클레오타이드로부터 완전히 제거되었다.

도 20은 5분 노출 후 분석된, 292 nm (하단) 및 524 nm (상단)에서 추출된, 화합물 35의 TCEP 노출 생성물의 LC-MS 추적적을 제시하며, 여기서 11.24분에서의 피크는 화합물 53 그리고 34.70분에서의 피크는 화합물 54에 상응한다.

도 21은 15분 노출 후 분석된, 292 nm (하단) 및 524 nm (상단)에서 추출된, 화합물 35의 TCEP 노출 생성물의 LC-MS 추적적을 제시하며, 여기서 11.25분에서의 피크는 화합물 53 그리고 34.70분에서의 피크는 화합물 54에 상응한다.

도 22는 3'-OCH₂-SS-Et 유사체의 합성 (도 10)과 상이한, 적절한 단계에서 메르캅토에탄올 (EtSH)을 메탄티올 또는 소듐 티오메톡시드로 대체한 3'-OCH₂-SS-Me 유사체의 합성을 제시한다.

도 23은 활성화된 링커 32를 사용하여 PA-뉴클레오타이드 (예를 들어 57)를 적절한 절단가능한 -OCH₂-SS- 링커에, 마지막으로 형광단 염료에 커플링시키는 것을 제시한다.

도 24는 상이한 링커가 달성된 뉴클레오타이드 유사체, 화합물 60 및 61을 제시한다.

도 25는 상이한 형광단 리포팅 기 (여기서 R = Me- 또는 Et-)에 의해 표지된 4-뉴클레오타이드 유사체의 구조식을 제시한다.

도 26은 상이한 형광단 리포팅 기 (여기서 R = Me- 또는 Et- 기)에 의해 표지된 4-뉴클레오타이드 유사체의 구조

식을 제시한다.

도 27은 상이한 형광단 리포팅 기 (여기서 R = Me- 또는 Et- 기)에 의해 표지된 4-뉴클레오타이드 유사체의 구조식을 제시한다.

도 28은 본 발명의 신규한 절단가능한 링커를 포함하는 일반적인 범용 빌딩 블록 구조식을 제시한다. PG = 보호기, L1, L2 - 링커 (지방족, 방향족, 혼합된 극성 직쇄형 또는 분지형). RG = 반응 기. 본 발명의 한 실시양태에서 이러한 빌딩 블록은 링커의 한쪽 말단 상에 Fmoc 보호기 및 다른 한쪽 말단 상에 반응성 NHS 카르보네이트 또는 카르바메이트를 지니고 있다. 이러한 바람직한 조합은 신규한 절단가능한 링커를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드 합성에 특히 유용하다. 보호기는 핵산/뉴클레오타이드의 화학적 성질과 상용성인 조건 하에 제거가 가능해야 하며 반응 기는 선택적이어야 한다. 링커 상의 활성 NHS 기와 아민 말단 뉴클레오타이드의 반응 후에, Fmoc 기는 염기 예컨대 피페리딘 또는 암모니아를 사용하여 쉽게 제거될 수 있으며, 따라서 절단가능한 마커의 부착을 위해 링커의 말단에서 아민 기를 노출시킨다. 여러 가지의 마커를 포함하는 화합물의 라이브러리는 이러한 방식으로 매우 신속하게 구축될 수 있다.

도 29는 본 발명의 신규한 링커를 통해 부착된 절단가능한 마커를 지니고 있는 뉴클레오타이드의 일반 구조식을 제시한다. S = 당 (즉, 리보스, 데옥시리보스), B = 핵염기, R = H 또는 가역적 말단기 (보호기). 바람직한 가역적 말단기는 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 아지도메틸 (-CH₂N₃), 디티오-알킬 (-CH₂-SS-R), 아미노시 (-ONH₂).

도 30은 본 발명의 절단가능한 링커를 통해 부착된 절단가능한 마커를 지니고 있는 뉴클레오타이드의 또 다른 일반 구조식을 제시하며, 여기서 D는 아지드, 디설피드 알킬 및 디설피드 치환된 알킬 기를 포함하는 군으로부터 선택되고, B는 핵염기이고, A는 부착 기이고, C는 절단가능한 부위 코어이고, L₁ 및 L₂는 연결 기이고, Label은 표지이다 (표지를 가진 화합물에서).

도 31은 도 32A-C에서 시험된 화합물 (L-시리즈 (96), B-시리즈 (97), A-시리즈 (98), 및 G-시리즈 (99) 패밀리)의 화학 구조식을 제시한다.

도 32A는 다양한 디설피드 기반 절단가능한 링커를 가진 3'-O-아지도메틸 알렉사488(Alexa488) 표지된 뉴클레오타이드 유사체: L-시리즈 (96), B-시리즈 (97), A-시리즈 (98), 및 G-시리즈 (99) 패밀리의 혼입의 시간 과정을 제시한다.

도 32B는 다양한 디설피드 기반 절단가능한 링커를 가진 3'-O-아지도메틸 알렉사488 표지된 뉴클레오타이드 유사체: L-시리즈 (96), B-시리즈 (97), A-시리즈 (98), 및 G-시리즈 (99) 패밀리에 대한 혼입의 반응 속도를 제시한다.

도 32C는 다양한 디설피드 기반 절단가능한 링커를 가진 3'-O-아지도메틸 알렉사488 표지된 뉴클레오타이드 유사체: L-시리즈 (96), B-시리즈 (97), A-시리즈 (98), 및 G-시리즈 (99) 패밀리에 대한 혼입의 반응 속도 대 뉴클레오타이드의 농도를 제시한다.

도 33은 dA 3'-가역적 말단 뉴클레오타이드: -CH₂-N₃, -CH₂-SS-Et, -CH₂-SS-Me에 대한 혼입 동역학을 제시한다.

도 34는 3종의 상이한 DNA 폴리머라제: T9, J5 및 J8을 사용하는 3'-O-CH₂-SS-Et 말단기를 가진 dC 3'-가역적 말단 뉴클레오타이드의 혼입 동역학을 제시한다.

도 35는 GR 서열분석기 상에서 연장 A 반응에서 사용된 뉴클레오타이드의 최적화된 농도 [nM]를 제시한다.

도 36은 원시 오류율에 의해 측정된 바와 같은 A-시리즈 (98) 뉴클레오타이드의 서열분석 성능을 제시한다.

도 37은 완벽 (무오류) 판독의 백분율에 의해 측정된 바와 같은 A-시리즈 (98) 뉴클레오타이드의 서열분석 성능을 제시한다.

도 38은 여러 가지의 서열분석 측정 기준법(metrics)에 의해 측정된 바와 같은 A-시리즈 (98) 뉴클레오타이드의 서열분석 성능을 제시한다.

도 39는 원시 오류율에 의해 측정된 바와 같은 G-시리즈 (99) 뉴클레오타이드의 서열분석 성능을 제시한다.

도 40은 완벽 (무오류) 판독의 백분율에 의해 측정된 바와 같은 G-시리즈 (99) 뉴클레오타이드의 서열분석 성능을 제시한다.

도 41은 ExtB에서 및 ExtB 및 A 둘 다에서 3'-O-CH₂-SS-Et 뉴클레오티드를 함유하는 서열분석 시행으로부터 다중 바코드의 식별을 제시한다.

도 42는 다양한 절단가능한 링커를 가진 표지된, 가역적 말단 dC의 연장 A 완충제 중 승온에서의 안정성의 비교를 제시한다: B = B-시리즈 (97, 116, 117, 및 118), G = G-시리즈 (99, 103, 104, 및 105), A = A-시리즈 (98, 100, 101, 및 102), 및 SS = L-시리즈 (96, 50, 106, 및 115).

도 43은 화합물 62로부터의 화합물 63-67의 합성을 예시하는 합성 반응식을 제시한다. 합성은 실시예 33, 실시예 34 및 실시예 35에 기재되어 있다.

도 44는 화합물 68로부터의 화합물 69-71 및 119-120의 합성을 예시하는 합성 반응식을 제시한다. 합성은 실시예 36, 실시예 37, 및 실시예 38에 기재되어 있다.

도 45는 상단으로부터 하단으로 dCTP, dTTP, dATP 및 dGTP에 상응하는 4개의 표지된 뉴클레오티드의 완전한 화학 구조식을 제시한다 (A-시리즈, 98, 100, 101, 및 102).

도 46은 상단으로부터 하단으로 dCTP, dTTP, dATP 및 dGTP에 상응하는 4개의 표지된 뉴클레오티드의 완전한 화학 구조식을 제시한다 (G-시리즈, 99, 103, 104, 및 105).

도 47은 상단으로부터 하단으로 dCTP, dTTP, dATP 및 dGTP에 상응하는 4개의 표지된 뉴클레오티드의 완전한 화학 구조식을 제시한다 (L-시리즈, 96, 50, 106, 및 115).

도 48은 상단으로부터 하단으로 dCTP, dTTP, dATP 및 dGTP에 상응하는 4개의 표지된 뉴클레오티드의 완전한 화학 구조식을 제시한다 (B-시리즈: 화합물 97, 116, 117, 및 118).

도 49는 모두 가역적 말단기로서 그의 3' 상에서 -CH₂-SS-Me를 지니고 있는, GR 기기 상에서 서열분석에 사용된 뉴클레오티드 (표지된, 화합물 72, 74, 76, 78 및 미표지된 화합물 120, 126, 132, 138)의 예시적인 농도를 제시한다.

도 50은 모두 -CH₂-SS-Me를 지니고 있는, 신규한 뉴클레오티드 (도 49의 경우에 기재된 바와 같이 표지됨 및 미표지됨)를 사용한 GR 상에서 시행된 서열분석에서 생성된 강도의 예를 제시한다.

도 51은 메틸렌디설피드 메틸을 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O를 가진 뉴클레오티드 트리포스페이트의 일련의 비-링커 예를 제시한다.

도 52는 메틸렌디설피드 메틸을 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O를 가진 상이한 형광단 리포팅 기에 의해 표지된 4-뉴클레오티드 유사체의 구조식을 제시한다.

도 53은 통상의 링커의 NHS 활성화된 형태의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 54는 MeSSdATP의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 55는 MeSSdCTP의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 56은 MeSSdGTP의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 57은 MeSSdTTP의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 58은 MeSSdATP-PA의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 59는 76의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 60은 MeSSdCTP-PA의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 61은 72의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 62는 MeSSdGTP-PA의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 63은 MeSSdGTP-ARA-Cy5의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 64는 MeSSdUTP-PA의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 65는 74의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 66은 3'-OCH₂S-(2,4,6-트리메톡시페닐)메탄-dNTP의 구조식을 제시하는 개략도이다.

도 67은 3'-OCH₂S-(2,4,6-트리메톡시페닐)메탄-dNTP로부터 3'-(OCH₂SSMe)-dNTP의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 68은 3'-(OCH₂SSMe)-dNTP-PA의 합성을 위한 주요 중간체를 제시한다.

도 69는 3'-OCH₂S-(2,4,6-트리메톡시페닐)메탄-dNTP-PA로부터 3'-(OCH₂SSMe)-dNTP-PA의 합성의 한 실시양태를 제시하는 개략도이다.

도 70은 형광 염료의 링커 설치 및 접합을 제시하는 개략도이다.

도 71은 본 발명의 링커 및 말단기를 부착하는 데 사용될 수 있는 히드록시메틸 유도체 핵염기 유도체의 구조식을 제시한다. CL = 본 발명의 절단가능한 링커, R = 가역적 말단기.

도 72는 절단 후의 히드록시메틸 유도체 핵염기 유도체의 구조식을 제시한다.

도 73은 본 발명의 디티오-기반 링커 및 말단기의 절단을 수행하는 데 사용될 수 있는 티올, 관능기를 지니고 있는 화합물의 예를 제시한다: A) - 시스테인, B) - 디티오-숙신산, C) - 시스테인, D) - 디티오트레이톨, E) - 2,3-디메르캅토-1-프로판술포산 나트륨 염, F) - 디티오부틸아민, G) - 메소-2,5-디메르캅토-N,N,N',N'-테트라메틸아디프아미드, H) 2-메르캅토에탄 술포네이트, I) - N,N'-디메틸, N,N'-비스(메르캅토아세틸)-히드라진.

도 74는 링커 및 3'-보호기의 선택적 및 단계적 절단의 예 - 화학 구조 및 반응식을 제시한다.

도 75는 링커의 선택적 및 단계적 절단의 예 - 각각의 단계의 절단과 연관된 크로마토그램을 제시한다.

도 76은 링커의 선택적 및 단계적 절단의 예 - 모든 단계의 선택적 절단 반응에 상응하는 피크로부터 추출된 흡수 스펙트럼을 제시한다.

도 77은 3' 말단 상에 디티오 보호기 및 디티오 기반 링커를 보유하는 뉴클레오타이드에 관한 절단 반응식을 제시한다.

도 78A는 절단 시약: 디티오숙신산, L-시스테인, DTT 및 시스테인과 함께 10분 인큐베이션한 후 RP-HPLC에 의해 분석된 절단 반응 혼합물 및 출발 물질의 크로마토그램을 제시한다.

도 78B는 RP-HPLC에 의해 분석된 바와 같은 반응 혼합물의 조성을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0193] 발명의 설명

[0194] 본 발명은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치 및 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기에 가역적으로 연결된 검출가능한 표지를 포함하는 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 이용하는, 방법, 조성물, 혼합물 및 키트를 제공한다. 이러한 화합물은 합성에 의한 서열분석을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 미래의 서열분석 기술에 새로운 가능성을 제공한다. 본 발명은 물질의 조성물로서 도면 및 명세서의 본문에 제시된 다양한 구조를 고려한다. 이들 조성물은 프라이머 연장 반응을 포함하나 이에 제한되지는 않는 반응에서 사용될 수 있다. 이들 조성물은 혼합물로 존재할 수 있다. 예를 들어, 표지된 뉴클레오타이드 중 하나 이상 (예를 들어 예컨대 도 25에 제시된 것들)이 하나 이상의 미표지된 뉴클레오타이드 (예를 들어 예컨대 도 51에 제시된 것들)와 혼합되어 있을 수 있다 (그리고 혼합물로 사용될 수 있음). 이들은 다른 시약 (예를 들어 완충제, 폴리머라제, 프라이머 등)과 함께 키트로 존재할 수 있다.

[0195] 한 실시양태에서, 본 발명의 표지된 뉴클레오타이드는 합성의 수개의 단계를 필요로 하며 상이한 염기에 여러 가지의 염료를 연결하는 것을 수반한다. 단계별 공정보다는 모듈형 방식으로 링커 및 염기 부착을 수행할 수 있는 것이 바람직하다. 모듈형 접근법은 한쪽 말단 상에 보호기를 그리고 다른 한쪽 말단 상에 활성화된 기를 가진 링커 모이어티를 사전 구축하는 것을 수반한다. 그 다음에 이러한 사전 구축된 링커를 사용하여 프로파르길 아민 뉴클레오타이드에 커플링시킬 수 있으며; 차폐된 아민 기를 탈보호한 다음에, 활성화된 염료를 커플링시킬 수 있다. 이것은 단계별 합성과 비교하여 더 적은 단계 및 더 높은 수율의 이점을 갖는다.

[0196] 한 실시양태에서, 본 발명의 표지된 뉴클레오타이드는 DNA 서열분석에서 사용된다. DNA 서열은 생물학에서 기본

적인 도구이다. 이는 기초 연구, 생물 의학, 진단, 및 법의학 응용에서, 그리고 기초 및 응용 연구의 많은 기타 분야에서 널리 사용되는 방법이다. 새로운 세대의 DNA 서열분석 기술은 생물학에서의 연구가 일상적으로 수행되는 방식을 변화시키고 있다. 이는 정밀 의학, 동반 진단 등의 분야에서 향후 매우 중요한 역할을 할 태세를 갖추고 있다.

- [0197] 합성에 의한 서열분석 (SBS)은 혁신적인 차세대 서열분석 (NGS) 기술로, 여기서 수백만 개의 DNA 분자, 단일 또는 그의 클러스터를 동시에 서열분석할 수 있다. 이 기술의 기본은 DNA 서열분석에서 대량 병행성을 허용하는 고체 표면 상의 DNA 분자의 단일 염기 연장 및 검출을 허용하는 절단가능한 뉴클레오티드 종료자로서 공지된 변형된 뉴클레오티드를 사용하는 것이다 (포괄적인 검토용: Cheng-Yao, Chen, *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, 1 [22]; Fei Chen, et al., *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2013, 11, 34-40 [5]; C.W. Fuller et al., *Nature Biotechnology*, 2009, 27, 1013 [2]; M.L. Metzker, *Nature Reviews*, 2010, 11, 31 [1]) - 이들 모두 본원에 참조로 포함된다.
- [0198] DNA 프라이머에의 혼입 및 후속 검출 후, 화학 반응에 의해 제거될 수 있는, 3'-OH 위치가 절단가능한 보호기에 의해 차단된 변형된 뉴클레오티드가 SBS 화학의 성공의 열쇠이다 (Ju et al., US 7,883,869, 2011 [23]; Ju et al., US 8,088,575, 2012 [24]; Ju et al., US 8,796,432, 2014 [25]; Balasubramanian, US 6,833,246, 2004 [26]; Balasubramanian et al., US 7,785,796 B2, 2010 [27]; Milton et al., US 7,414,116 B2, 2008 [28]; Metzker, M. L., et al., *Nucleic Acids Res*, 1994, 22:4259-4267 [29]; Ju et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 103 (52), 19635, 2006 [30]; Ruparel et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 102 (17), 5932, 2005 [31]; Bergmann et al., US 2015/0140561 A1 [32]; Kwiatkowski, US 2002/0015961 A1 [33]) - 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다.
- [0199] 3'-OH는 보호되지 않으나 염기는, DNA 주형에의 단일 염기 혼입 후 변형 기가 추가 연장을 방지하여 쉘 종료 현상 발생을 강제하도록 하는 방식으로 변형된, 가상 종료자로 공지된 뉴클레오티드 유사체를 개발하려는 시도가 또한 있어 왔다 (Andrew F. Gardner et al., *NucleicAcidsRes* 40(15), 7404-7415 2012 [34], Litosh et al., *Nuc. Acids, Res.*, 2011, vol 39, No. 6, e39 [35], Bowers et al., *Nat. Methods*, 2009, 6, 593 [36]) - 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다.
- [0200] 또한, 2'-OH가 제거가능한 기에 의해 보호되어, 인접한 3'-OH 기가 쉘 연장 반응에 참여하는 것을 방지함으로써, 단일 염기 연장 후 정지시키는, 리보-뉴클레오티드 유사체가 참조로 포함된 문헌 (Zhao et al., US 8,399,188 B2, 2013 [37])에 개시되어 있다.
- [0201] 다른 한편으로는, 존(Zon)은 3'-OH가 제거가능한 기에 의해 차단된 뉴클레오티드 중 하나를 함유하는 디뉴클레오티드 종료자의 사용을 제안하였다 [참조로 포함된 문헌 [(Gerald Zon, US 8,017,338 B2, 2011 [38])]].
- [0202] 이전에는 진리터 서열분석에서 사용하기 위해 표지된 뉴클레오티드에서 형광 염료를 부착하는 데 절단가능한 디설피드 링커 (-SS-)가 사용되었다. 절단 단계 후에 성장하는 DNA 변형에 남겨진 -SH 반흔이 더 긴 판독 길이를 달성하는 것을 제한하는 다수의 부반응을 유발한다고 믿어진다.
- [0203] -SH 잔기는 절단 단계에서 사용되는 TCEP의 존재하에 자유 라디칼 반응을 겪어, 원하지 않는 관능기를 생성할 수 있고, 이는 DNA 분자를 잠재적으로 손상시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다 (Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization by MS, Zhouxi Wang et al., *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(3), 267-275 [39]).
- [0204] -SH 반흔은 3' OH 보호기를 절단하는 플로우-셀 내부의 유입 뉴클레오티드와 또한 상호 작용하여 추가의 쉘 신장을 너무 이르게 유발함으로써 신호 탈-위상화를 유발할 수 있다.
- [0205] -SH의 유해한 부반응의 최종 결과는 서열분석 시행에서 판독 길이 및 증가 된 오류율의 감소이다.
- [0206] **발명의 상세한 설명**
- [0207] 본 발명은 절단가능한 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치 및 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트의 핵염기에 가역적으로 연결된 검출가능한 표지를 포함하는 상기 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 이용하는, 방법, 조성물, 혼합물 및 키트를 제공한다. 이러한 화합물은 합성에 의한 서열분석을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 미래의 서열분석 기술에 새로운 가능성을 제공한다.
- [0208] 본 발명은, 한 실시양태에서 DNA 서열분석 (예를 들어 합성에 의한 서열분석)에서, 표지와 핵염기 사이의 절단

가능한 옥시메틸렌디설피드 링커와, 화학식 $-CH_2-SS-R$ 을 갖는, 보호기로서 메틸렌디설피드를 포함하는 3'-O 기를 포함하는 표지된 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 합성 및 용도를 수반하며, 여기서 R은 알킬 기 예컨대 메틸, 에틸, 이소프로필, t-부틸, n-부틸, 또는 헤테로-원자 예컨대 O, N, S 등을 함유하는 치환기를 가진 그의 유사체를 나타낸다 (도 1 참조). 한 실시양태에서, R 기는 DNA 폴리머라제 효소에 허용되면서, 3'-O 캡핑 기의 안정성 및 절단성을 조정할 수 있는 관능기를 함유할 수 있다.

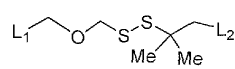
[0209] 또 다른 측면에서, 본 발명은 표지와 핵염기 사이의 절단가능한 옥시메틸렌디설피드 링커와, 메틸렌디설피드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O 위치를 포함하는, 표지된 뉴클레오타이드 트리포스페이트에 관한 것이며, 여기서 핵염기는 DNA 주형의 천연 핵염기와 수소 결합 상호작용에 의해 DNA 듀플렉스를 형성할 수 있고, dG 및 dA의 7-테아자 유사체, 및 2-아미노-dA일 수 있는, 천연, 또는 비-천연 염기일 수 있다. dA 및 dG의 7-테아자 유사체는 7-N 원자가 결여되어 DNA 3차 구조의 형성을 감소시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 뉴클레오타이드는 DNA 주형과 폴리머라제 상호 작용을 강화시킴으로써 DNA 서열분석의 판독 길이를 잠재적으로 개선시킬 수 있을 것으로 예상된다. 2-아미노-dA는 (천연 상태에서는 2 결합이기 보다는) 그의 상보적인 염기와 더 안정적인 3 수소 결합을 형성하는 그의 능력으로 인해 DNA 듀플렉스 안정성을 증가시킬 수 있고, 따라서, 이는 서열분석 시행 동안에 DNA 프라이머 손실 위험을 줄일 수 있는 가능성이 또한 있을 수 있다 (A Jung et al., Mol. Pathol., 2002, 55 (1), 55-57 [40]; 2-아미노-dATP: Igor V. Kutyavin, Biochemistry, 2008, 47(51), 13666-73 [41]).

[0210] 또 다른 실시양태에서, 상기 뉴클레오타이드는 검출가능한 리포터 분자, 예컨대 절단가능한 링커 $-OCH_2SS-$ 를 통해 핵염기에 연결된 형광 염료를 가질 수 있다. $-OCH_2SS-$ 기가 핵염기에 직접 부착되어 있는 표지된 뉴클레오타이드 및 절단가능한 링커로서의 그의 용도는 선행 기술에 공지되어 있지 않다. 통상적인, 널리 사용되는 디설피드 링커 ($-SS-$)와는 달리, 이 부류의 절단가능한 링커 ($-OCH_2SS-$)는 DNA 분자 상에 어떠한 황 혼적도 남기지 않으며, 환원성 절단 후, 생성된 중간체, $-OCH_2-SH$ 의 신속 가수분해에 의해 이를 $-OH$ 기로 깔끔하게 전환시킨다. 이 때문에, 이러한 링커는 통상적인 디설피드 링커에 대한 더 양호한 대안이 될 수 있다. 통상적인 디설피드 기반 링커 ($-SS-$)에서, 생성된 티올 기 ($-SH$)는 하기 도 4에 제시된 바와 같이 환원 시약 예컨대 TCEP에 의해 절단될 경우 부반응을 겪을 수 있다 (참고문헌: Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization by MS, Zhouxi Wang et al., Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(3), 267-275 [39]).

[0211] 또 다른 실시양태에서, 리포터 기는 5-C 위치에서 피리미딘 염기 (dT, dC) 및 천연 염기의 7-N 또는 테-아자 유사체의 7-C에서 푸린 염기 (dA, dG)에 부착될 수 있다.

[0212] 또 다른 실시양태에서, 표지된 뉴클레오타이드의 구조식은 도 5에 제시된 바와 같을 수 있으며, 여기서 절단가능한 링커의 스페이서는 프로파르길 에테르 링커를 포함한다. 프로파르길 에테르를 가진 핵염기는 화학 합성의 선행 기술에 따라 합성될 수 있다. L_1 및 L_2 는 화학적 스페이서를 나타내고, 치환기 R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 절단가능한 링커에 대한 안정성 및 절단성을 조정하는 원자의 기이다. 이들은 수소 원자, 같은자리 디메틸, 또는 임의의 알킬, 페닐, 또는 치환된 알킬 기, 예컨대 메틸, 에틸, n-부틸, 페닐 등일 수 있다. 이들은 또한 탄화수소쇄와 $-O$, $=O$, NH , $-N=N$, 산, 아마이드, 폴리 에틸렌글리콜쇄 (PEG) 등을 함유할 수 있다. 뉴클레오타이드 상의 표지는 형광 염료, 에너지 전달 염료, 방사성 표지, 화학 발광 탐침, 헵탄 및 화학적 또는 물리적 방법에 의해 검출하게 할 수 있는 다른 형태의 표지일 수 있다.

[0213] 또 다른 실시양태에서, 표지된 뉴클레오타이드의 구조식은 도 6에 제시된 바와 같을 수 있다. 절단가능한 링커의 스페이서는 프로파르길아민 링커를 포함한다. 다시, L_1 및 L_2 는 화학적 스페이서를 나타내고, 치환기 R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 앞에서 기재된 바와 같이 링커의 안정성을 제공하고 절단성을 조정하는 원자의 기이다. 이들은 수소 원자, 알킬 기 예컨대 메틸, 에틸 및 다른 치환된 기 또는 그의 염일 수 있다. 절단가능한 디설피드 링커의 α -탄소 상의 같은자리 디알킬 기 (예를 들어 하기 구조식에 따른 같은자리 디메틸 유사체:



)는 표지된 뉴클레오타이드의 모듈형 합성을 가능하게 하는 링커에 더 양호한 안정성을 제공한다. 이는 아마도 디설피드 기반 유기 화합물 중 널리 퍼진 불균형 반응을 방지할 것이다. 이는 또한 표지된 뉴클레오타이드 유사체의 합성 및 정제를 돕는 링커에 더 큰 소수성을 부가한다 [42-44]. 링커에 존재하는 같은자리 관능기는, 아마 입체 효과를 통해, 디설피드 결합을 전자적으로 안정화시키는 역할을 하는 것 뿐만

아니라, 분자간 및 분자내 둘 다에서 발생하는 디설파이드 교환을 방지하는 역할도 하는 것으로도 믿어진다. 시스타민의 존재하에, 종료자 상의 디설파이드 관능기가 디설파이드 교환에 참여하며, 한편, 같은자리 디메틸 기를 구비한 링커는 참여하지 않는다는 것이 입증되어 있다. 도 42에서의 링커 연구는 링커를 같은자리 디메틸 기가 있는 것과 없는 것과 비교한다. 이 연구에서 알 수 있는 바와 같이, 같은자리 디메틸 기가 없는 링커 G 및 L은 시스타민과 신속히 교환되어 생성물의 분해를 야기한다. 예상된 바와 같이, 이 현상은 본 발명에서 선택한 링커 A에서도 유사체 링커 B에서도 관찰되지 않는다. 게다가, 표지된 뉴클레오타이드는 두개의 디설파이드, 분자의 링커 부분 상에 하나와 종료자 상에 하나를 함유하기 때문에, 이러한 안정화 효과는 염료와 종료자 사이에 스크램블링이 발생하는 것을 방지하는 것으로 믿어진다. 이 안정성은 서열분석에서 본 발명의 뉴클레오타이드의 성능에 중요하다.

[0214] 또 다른 실시양태에서, 표지된 뉴클레오타이드의 구조식은 도 7에서와 같을 수 있다. 절단가능한 링커의 스페이서는 피리미딘의 경우 5-위치에서, 그리고 푸린의 경우 7-데-아자-탄소에서 핵염기에 직접 부착된 메틸렌 ($-(CH_2)_n-$)을 포함한다. 이 링커는 메틸렌 ($n=1$) 또는 폴리메틸렌 ($n>1$)일 수 있고 여기서 절단 후, 링커는 핵염기 상에 부착점에서 $-(CH_2)_nOH$ 기를 생성하며, 여기서 L_1 및 L_2 는 스페이서를 나타내고, 치환기 R_1 , R_2 , R_3 및 R_4 는 앞에서 기재된 바와 같이 절단가능한 링커에 안정성을 제공하는 원자의 기이다.

[0215] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 청구된 뉴클레오타이드에 대한 합성 방법에 관한 것이다. 캡핑 기 및 링커는 기재된 선행 기술을 수정하여 합성할 수 있다. 예를 들어, 미표지된 dT 유사체 (화합물 5)를 도 8에 제시된 바와 같이 합성할 수 있다.

[0216] 한 실시양태에서 본 발명은 (a) 절단가능한 보호기로서 (예를 들어 화학식 $-CH_2-SS-R$ 의) 메틸렌디설파이드를 포함하는 기에 의해 캡핑된 3'-O를 가진 뉴클레오시드 트리포스페이트 (도 1 참조); 및 (b) 표지가 절단가능한 옥시메틸렌디설파이드 링커 ($-OCH_2-SS-$)를 통해 핵염기에 부착되어 있는, 그의 표지된 유사체 (도 2 참조)를 수반한다. 이러한 뉴클레오타이드는 합성에 의한 핵산 서열분석 (SBS) 기술에서 사용될 수 있다. 청구된 뉴클레오타이드의 일반적인 합성 방법이 또한 기재되어 있다.

[0217] 한 실시양태에서, 도 1에 제시된 바와 같이, 미표지된 뉴클레오타이드의 일반 구조식은 통상의 구조식 $-CH_2-SS-R$ 을 가진 메틸렌디설파이드를 포함하는 기에 의해 보호된 3'-O 기를 가지며, 여기서 R은 통상의 알킬 또는 치환된 알킬 기 예컨대 $-Me$, $-Et$, $-nBu$, $-tBu$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NMe$ 등일 수 있고, B는 천연 또는 비-천연 핵염기일 수 있다. 비-천연 핵염기의 일부 구체에는 7-데아자 dG 및 dA, 2-아미노-dA 등이다.

[0218] 도 2에서, 표지된 유사체의 일반 구조식은, 검출가능한 리포터 (표지) 예컨대 형광단이 일반 구조식 $-L_1-OCH_2-SS-L_2-$ 을 갖는 절단가능한 링커를 통해 핵염기에 부착되어 있는 것에 더하여, 도 1에서와 같이 메틸렌디설파이드를 포함하는 기에 의해 보호된 3'-O와 함께 제시된다. 각각, L_1 은 절단가능한 링커로부터 핵염기를 분리하는 분자 스페이서를 나타내며, 한편 L_2 는 절단가능한 링커와 표지 사이의 분자 스페이서를 나타낸다. L_1 및 L_2 둘 다는 각각의 화학 실체 예컨대 $-CO-$, $-CONH-$, $-NHCONH-$, $-O-$, $-S-$, $-C=N$, $-N=N-$ 등을 연결하기 위한 적절한 관능기를 가질 수 있다. 표지는 형광단 염료, 에너지 전달 염료, 질량-태그, 비오틴, 합텐 등일 수 있다. 표지는 동시에 여러 개의 염기를 검출하기 위해 상이한 뉴클레오타이드 상에 상이할 수 있거나, 고체 표면 상에 공간적으로 분리된 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 증폭된 클론의 단계적인 검출을 위해 동일할 수 있다.

[0219] 한 실시양태에서, 본 발명은 $-CH_2-SS-R$ 기로 캡핑된 3'-O 및 일반 구조식 $-O-CH_2-SS-$ 를 갖는 절단가능한 링커를 통해 핵염기에 부착된 표지를 갖는 신규한 부류의 뉴클레오타이드에 관한 것이다. 이러한 캡핑 기 및 링커는 TCEP 또는 관련 화학 물질을 사용한 단일 처리에 의해 동시에 깔끔하게 절단될 수 있어 DNA 분자 상에 어떠한 황 흔적도 남기지 않는다.

[0220] 이러한 부류의 뉴클레오타이드는 열 활성형 폴리머라제에 의해 촉매되는 DNA 주형에의 뉴클레오타이드 혼입에 필요한 비교적 높은 온도 ($\sim 65^\circ C$)를 견딜만큼 충분히 안정적일 수 있지만, TCEP 등을 사용한 환원과 같이 DNA와 상용성인 조건 하에 절단될 만큼 충분히 불안정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단은 디티오프레이트에 노출시킴으로써 달성할 수 있다.

[0221] 환원제 예컨대 TCEP에 노출될 경우 뉴클레오타이드는 도 3에 제시된 단계적인 메커니즘을 통해 3'-O 보호기를 탈캡핑하여, 3'-OH 기의 천연 상태를 복구한다. TCEP 및 그의 유사체는 SBS에서의 적용을 위한 전제 조건인 생물

분자에 대해 양성으로 공지되어 있다.

[0222] 한 실시양태에서, 본 발명은 도 28에 제시된, 신규한 절단가능한 링커를 포함하는 일반적인 범용 빌딩 블록 구조에 관한 것이다. PG = 보호기, L1, L2 - 링커 (지방족, 방향족, 혼합된 극성 직쇄형 또는 분지형). RG = 반응 기. 본 발명의 한 실시양태에서 이러한 빌딩 블록은 링커의 한쪽 말단 상에 Fmoc 보호기 및 다른 한쪽 말단 상에 반응성 NHS 카르보네이트 또는 카르바메이트를 지니고 있다. 이러한 바람직한 조합은 신규한 절단가능한 링커를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드 합성에 특히 유용하다. 보호기는 핵산/뉴클레오타이드 화학적 성질과 상용성인 조건 하에 제거가능해야 하며 반응 기는 선택적이어야 한다. 링커 상의 활성 NHS 기와 아민 말단 뉴클레오타이드의 반응 후에, Fmoc 기는 염기 예컨대 피페리딘 또는 암모니아를 사용하여 쉽게 제거될 수 있으며, 따라서 절단가능한 마커의 부착을 위해 링커의 말단에서 아민 기를 노출시킨다. 여러 가지의 마커를 포함하는 화합물의 라이브러리는 이러한 방식으로 매우 신속하게 구축될 수 있다.

[0223] 한 실시양태에서, 본 발명은 도 29에 제시된, 신규한 링커를 통해 부착된 절단가능한 마커를 지니고 있는 뉴클레오타이드의 일반적인 구조식에 관한 것이다. S = 당 (즉, 리보스, 데옥시리보스), B = 핵염기, R = H 또는 가역적으로 중절되는 기 (보호기). 바람직한 가역적 말단기는 다음을 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 아지도메틸 ($-\text{CH}_2\text{N}_3$), 디티오 -알킬 ($-\text{CH}_2\text{-SS-R}$), 아미녹시 ($-\text{ONH}_2$).

[0224] 실시예

[0225] 하기 실시예는 본 발명의 특정 바람직한 실시양태 및 측면을 입증하고 추가로 예시하기 위해 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0226] 실시예 1

[0227] 3'-O-(메틸티오메틸)-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시티미딘 (2)의 합성

[0228] 5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시티미딘 (1) (2.0 g, 5.6 mmol)을 250 mL 환저 플라스크에서 DMSO (10.5 mL), 아세트산 (4.8 mL), 및 아세트산 무수물 (15.4 mL)로 이루어진 혼합물에 용해시키고, 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 그 다음에 혼합물을 기체상 CO_2 의 방출이 멈출 때까지 포화 K_2CO_3 용액을 첨가함으로써 켄칭하였다. 그 다음에 혼합물을 분액 깔대기를 사용하여 EtOAc (3X100 mL)로 추출하였다. 그 다음에, 합해진 유기 추출물을 분배 깔대기에서 NaHCO_3 (2X150 mL)의 포화 용액으로 세척하고, 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 유기 부분을 회전 증발에 의해 농축하였다. 마지막으로 반응 혼합물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc/ 7:3 내지 1:1)에 의해 정제하였다, 도 8 참조. 3'-O-(메틸티오메틸)-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시티미딘 (2)을 75% 수율로 백색 분말로서 수득하였다 (1.75 g, R_f = 0.6, hex:EtOAc/1:1). ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.16 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.28 (m, 1H), 4.62 (m, 2H), 4.46 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.78-3.90 (m, 2H), 2.39 (m, 1H), 2.14, 2.14 (s, 3H), 1.97 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 0.93 (s, 9H), 및 0.13 (s, 3H) ppm.

[0229] 실시예 2

[0230] 3'-O-(에틸디티오메틸)-2'-데옥시티미딘 (4)의 합성

[0231] 고 진공하에 밤새 건조시키고, 20 mL 건조 CH_2Cl_2 에 용해시킨 화합물 2 (1.75 g, 4.08 mmol)에 Et_3N (0.54 mL, 3.87 mmol) 및 5.0 g 분자체-3A를 첨가하고, Ar 분위기 하에 30분 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 플라스크를 빙조 상에 배치하여 온도를 영하가 되게 하고, CH_2Cl_2 (1.8 mL) 중 1.8 당량의 1M SO_2Cl_2 를 서서히 첨가하고, 1.0시간 동안 동일한 온도에서 교반하였다. 그 다음에 빙조를 제거하여 플라스크를 실온으로 되게 하고, 4 mL 건조 DMF 중 포타슘 티오토실레이트 (1.5 g)의 용액을 첨가하고 실온에서 0.5시간 동안 교반하였다.

[0232] 그 다음에 2 당량의 EtSH (0.6 mL)를 첨가하고 추가의 40분 동안 교반하였다. 그 다음에 혼합물을 50 mL CH_2Cl_2 로 희석하고 깔때기에서 셀라이트-S를 통해 여과하였다. 샘플을 적당한 양의 CH_2Cl_2 로 세척하여 생성물이 여과해 내어졌는지를 확인하였다. 그 다음에 CH_2Cl_2 추출물을 농축하고 실리카겔 칼럼 상에서 크로마토그래피 (Hex:EtOAc/1:1 내지 1:3, Hex:EtOAc/1:1 중 R_f = 0.3)에 의해 정제하였다. 그 다음에, 생성된 조 생성물을 20 mL MeOH 중 2.2 g의 NH_4F 로 처리하였다. 36시간 후, 반응물을 20 mL 포화 NaHCO_3 으로 켄칭하고 분배함으로써 CH_2Cl_2 로 추출하였다. CH_2Cl_2 부분을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 크로마토그래피 (Hex:EtOAc/1:1 내지 1:2)에 의

해 정제하였다, 도 8 참조. 정제된 생성물 (4)을 18% 수율로 백색 분말 (0.268 g, $R_f = 0.3$, Hex:EtOAc/1:2)로 수득하였다.

[0233] $CDCl_3$ 중 1H NMR: δ_H 11.25 (1H, S), 7.65 (1H, S), 6.1 (1H, m), 5.17 (1H, m), 4.80 (2H, S), 4.48 (1H, m), 3.96 (1H, m), 3.60 (2H, m), 3.26 (3H, s), 2.80 (2H, m), 2.20 (2H, m) 및 1.14 (3H, m) ppm.

[0234] 실시예 3

[0235] 3'-O-(에틸티오메틸)-2'-데옥시시티딘 (5)의 트리포스페이트의 합성

[0236] 25 mL 플라스크에서, 화합물 4 (0.268 g, 0.769 mmol)에 고무 격막을 구비한, 양성자 스폰지 (210 mg)를 첨가하였다. 샘플을 밤새 동안 고 진공하에 건조시켰다. 그 다음에 물질을 아르곤 분위기 하에 2.6 mL (MeO)₃P에 용해시켰다. 그 다음에 Ar-기체 공급을 구비한 플라스크를, 빙조 상에 배치하여, 교반하여 온도를 영하가 되게 하였다. 그 다음에 1.5 당량의 $POCl_3$ 을 시린지에 의해 한꺼번에 첨가하고 아르곤 분위기 하에 2시간 동안 동일한 온도에서 교반하였다. 그 다음에 빙조를 제거하고 건조 DMF (6 mL) 중 트리부틸암모늄-피로포스페이트 (1.6 g) 및 Bu_3N (1.45 mL)로 이루어진 혼합물을 제조하였다. 전체 혼합물을 한꺼번에 첨가하고 10 분 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 TEAB 완충제 (30 mL, 100 mM)로 희석하고 실온에서 추가의 3시간 동안 교반하였다. 조 생성물을 회전 증발에 의해 농축하고, C18 Prep HPLC (방법: 0 내지 5분 100%A에 뒤이어 72분에 걸쳐 50%B까지 구배, A = 50 mM TEAB 및 B = 아세토니트릴)에 의해 정제하였다. 목적 분획의 동결 건조 후, 반-순수한 생성물을 PL-SAX Prep 칼럼을 사용하여 이온 교환 HPLC (방법: 0 내지 5분 100%A, 그 다음에 70분에 걸쳐 70%B까지 구배, 여기서 A = 물 중 15% 아세토니트릴, B = 15% 아세토니트릴 중 0.85M TEAB 완충제)에 의해 추가로 정제하였다. 상기 기재된 바와 같이 C18 Prep HPLC에 의해 최종 정제를 수행하여, ~ 25% 수율의 화합물 5를 생성하였다, 도 8 참조.

[0237] 실시예 4

[0238] N^4 -벤조일-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-3'-O-(메틸티오메틸)-2'-데옥시시티딘 (7)의 합성

[0239] 3'-O-(에틸티오메틸)-dCTP (10)의 합성을 도 9에 따라 달성하였다. N^4 -벤조일-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시시티딘 (6) (50.0 g, 112.2 mmol)을 2L 환저 플라스크에서 DMSO (210 mL)에 용해시켰다. 여기에 아세트산 (210 mL) 및 아세트산 무수물 (96 mL)을 순차적으로 첨가하고, 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 이 기간 동안에, 생성물로의 완전한 전환이 TLC에 의해 관찰되었다 ($R_f = 0.6$, 생성물의 경우 EtOAc:hex/10:1).

[0240] 혼합물을 2개의 동등한 분획으로 분리하고, 각각을 2000 mL 비이커에 옮기고 CO_2 기체 방출이 멈출 때까지 포화 K_2CO_3 용액을 서서히 첨가함으로써 중화하였다 (pH 8). 그 다음에 혼합물을 분액 깔대기에서 EtOAc로 추출하였다. 그 다음에 유기 부분을 $NaHCO_3$ 의 포화 용액 (2X1L)으로 뒤이어 증류수 (2X1L)로 세척한 다음에, 유기 부분을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다.

[0241] 그 다음에 유기 부분을 회전 증발에 의해 농축하였다. 그 다음에 생성물을 퓨리플래시 칼럼을 사용하여 실리카 겔 플래시-칼럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc/1:4 내지 1:9, 3 칼럼 시행, 15 μm 상, HC 300 g 퓨리플래시 칼럼)에 의해 정제하여 N^4 -벤조일-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-3'-O-(메틸티오메틸)-2'-데옥시시티딘 (7)을 회색 분말로써 60% 수율 (34.0 g, $R_f = 0.6$, EtOAc:hex/9:1)로 수득하였다, 도 9 참조.

[0242] 화합물 7의 1H NMR ($CDCl_3$): δ_H 8.40 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.54 (m, 3H), 6.30 (m, 1H), 4.62 & 4.70 (2Xd, $J = 11.59$ Hz, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.84 & 3.99 (2Xdd, $J = 11.59$ & 2.79 Hz, 2H), 2.72 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 0.99 (s, 9H), 및 0.16 (s, 6H) ppm.

[0243] 실시예 5

[0244] N^4 -벤조일-3'-O-(에틸티오메틸)-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시시티딘 (8)

[0245] 건조 CH_2Cl_2 (35 mL)에 용해시킨 N^4 -벤조일-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-3'-O-(메틸티오메틸)-2'-데옥시시티딘

(7) (2.526 g, 5.0 mmol)에 분자체-3A (10 g)를 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 그 다음에 여기에 Et₃N (5.5 mmol)을 첨가하고, 빙-염-수 조 상에서 20분 동안 교반하였다. 그 다음에 여기에 시린지를 사용하여 CH₂Cl₂ 중 1M SO₂Cl₂ (7.5 mL, 7.5 mmol)를 서서히 첨가하고 N₂-분위기 하에 2시간 동안 동일한 온도에서 교반하였다. 그 다음에 8 mL 건조 DMF 중 벤젠티오술폰산 나트륨 염 (1.6 g, 8.0 mmol)을 첨가하고 실온에서 30분 동안 교반하였다. 마지막으로, EtSH를 첨가하고 (0.74 mL) 실온에서 추가의 50분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트-S를 통해 여과하고, 생성물을 CH₂Cl₂로 세척해 냈다. 생성된 CH₂CH₂ 부분을 농축한 후, 이를 실리카겔 칼럼을 사용하여 플래시 크로마토그래피 (1:1 내지 3:7/Hex:EtOAc)에 의해 정제하여 화합물 8을 54.4% 수율 (1.5 g)로 수득하였다, 도 9 참조. 화합물 8의 ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.40 (m, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.54 (m, 3H), 6.25 (m, 1H), 4.69 & 4.85 (2Xd, *J* = 11.60 Hz, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.84 & 3.99 (2Xdd, *J* = 11.59 & 2.79 Hz, 2H), 2.75 (m, 3H), 2.28 (m, 1H), 1.26 (m, 3H), 0.95 (s, 9H), 및 0.16 (s, 6H) ppm.

[0246] 실시예 6

[0247] N⁴-벤조일-3'-O-(에틸디티오메틸)-2'-데옥시시티딘 (9)

[0248] N⁴-벤조일-3'-O-(에틸디티오메틸)-5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-2'-데옥시시티딘 (8, 1.50 g, 2.72 mmol)을 50 mL THF에 용해시켰다. 그 다음에 THF 중 1M TBAF (3.3 mL)를 질소 분위기 하에 빙냉 온도에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에 반응물을 1 mL MeOH를 첨가함으로써 퀀칭하고, 용매를 10 분 후 회전 증발에 의해 제거하였다. 생성물을 구배 1:1 내지 1:9/Hex:EtOAc를 사용하여 실리카겔 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 9 (0.78 g, 65% 수율, 1:9/Hex:EtOAc 중 R_f = 0.6)를 생성하였다, 도 9 참조. 화합물 9의 ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.41 (m, 1H), 8.0 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.50 (m, 2H), 6.15 (m, 1H), 4.80 & 4.90 (2Xd, *J* = 11.60 Hz, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.00 & 3.85 (2Xdd, *J* = 11.59 & 2.79 Hz, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.65 (m, 1H), 2.40 (m, 1H), 및 1.3 (s, 3H) ppm.

[0249] 마지막으로, 화합물 10의 합성은 화합물 5의 합성에 기재된 표준 합성 프로토콜에 따라 화합물 9로부터 달성하였다 (도 8 참조).

[0250] 실시예 7

[0251] 표지된 뉴클레오타이드의 합성은 도 10 및 도 11에 제시된 합성 경로에 따라 달성할 수 있다. 도 10은 표지된 dT 중간체의 합성에 특이적이고, 다른 유사체를 유사하게 합성할 수 있었다.

[0252] 5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-5-(N-트리플루오로아세틸-아미노프로파르길)-2'-데옥시우리딘 (12)의 합성

[0253] 5'-O-(tert-부틸디메틸실릴)-5-아이오도-2'-데옥시우리딘 (11, 25.0 g, 53.4 mmol)을 2-구-환저 플라스크에서 건조 DMF (200 mL)에 용해시켰다. 반응 플라스크를 Ar-기체 충전 별분으로 플러싱하였다. 그 다음에 여기에 새로이 개봉한, 진공 건조된 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 (0) (6.16 g, 5.27 mmol) 및 CuI (2.316 g, 12.16 mmol)를 첨가하고 아르곤 분위기 하에 10분 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에, N-트리플루오로아세틸-프로파르길아민 (23.99 g, 157.8 mmol, 2.9 당량) 및 Et₃N (14.7 mL, 105.5 mmol)을 순차적으로 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3.0시간 동안 교반하고 반응 완료를 TLC에 의해 확인하였다 (생성물의 경우 EtOAc:Hex/3:2 중 R_f = 0.5).

[0254] 그 다음에 용매를 회전 증발에 의해 제거하였다. 생성된 조 생성물을 500 mL EtOAc에 용해시키고 분액 깔대기에 옮겼다. 그 다음에 유기 부분을 포화 NaHCO₃ (2X400 mL) 및 포화 NaCl (2X400 mL) 용액 각각으로 세척하였다. 그 다음에 EtOAc 부분을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. Na₂SO₄ 염을 여과해 낸 후, 회전 증발기를 사용하여 농축하였다. 그 다음에 이를 3X40 gm 실리카겔에 결합시킨 후 실리카겔 플래시 크로마토그래피 (1:1 Hex:EtOAc 내지 2:3 Hex:EtOAc, 200 gm, 15 um HP 퓨리플래시 칼럼, 3 칼럼 시행)에 의해 정제하여 21.994 g의 12 (83.88% 수율)를 생성하였다, 도 10 참조.

[0255] 화합물 12 중 ¹H NMR (DMF-d₇): δ_H 11.65 (brs, 1H), 10.15 (brs, 1H), 8.15 (brs, 1H, H6), 6.37 (t, *J* = 5.99 Hz, 1H, H1'), 5.42 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.37 (brs, 2H, 프로파르길아민 기의 NH-CH₂의 경우), 4.00

(m, 1H), 3.84-3.97 (m, 2H), 2.30 (m, 1H, H_{2'}), 2.20 (m, 1H, H_{2'}), 0.97 (s, 9H, 3X-CH₃, TBDMS) 및 0.19 (s, 6H, 2X CH₃, TBDMS) ppm.

[0256] 실시예 8

[0257] 5'-O-(*tert*-부틸디메틸실릴)-3'-O-(메틸티오메틸)-5-(*N*-트리플루오로아세틸-아미노프로파르길)-2'-데옥시우리딘 (13)의 합성

[0258] 화합물 12 (21.99 g, 44.77 mmol)를 1000 mL 환저 플라스크에서 DMSO (90 mL)에 용해시켰다. 그 다음에 여기에 AcOH (40 mL) 및 아세트산 무수물 (132 mL)을 순차적으로 첨가하고 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 반응 완료를 TLC에 의해 확인하였다 (생성물의 경우 R_f = 0.5; Hex:EtOAc/1:1).

[0259] 그 다음에 반응 혼합물을 2,000 mL 비이커에 옮기고, CO₂ 기체 방출이 멈출 때까지 포화 K₂CO₃에 의해 중화하였다 (~pH 8.0). 그 다음에 혼합물을 분액 깔대기에 옮기고 추출하였다 (2X500 mL CH₂Cl₂). 그 다음에, 합해진 유기 부분을 포화 NaHCO₃ (1X500 mL)로 세척하고 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. Na₂SO₄를 여과해 낸 후, 유기 부분을 회전 증발에 의해 농축하고 실리카겔 플래시 크로마토그래피 (Hex:EtOAc/7:3 내지 1:1)에 의해 정제하여 12.38 g의 화합물 13 (~50% 수율)을 생성하였다, 도 10 참조. TLC: R_f = 0.5; Hex:EtOAc/1:1, 화합물 13의 ¹H NMR (DMSO-d₆): δ H 11.69 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.93 (s, 1H, H₆), 6.07 (m, 1H, H_{1'}), 4.69 (m, 2H), 4.38 (m, 1H), 4.19 (m, 2H), 4.03 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 2.14 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 0.86 (s, 9H) 및 0.08 (s, 6H) ppm.

[0260] 화합물 14, 15 및 16의 합성은 화합물 5 및 10에 대해 기재된 관련 단계의 합성 프로토콜에 따라 달성할 수 있다. 다른 *N*-트리플루오로아세틸-아미노프로파르길 핵염기의 합성은 본원에 참조로 포함된 미국 특허 8,017,338 [38]에서와 같이 기재되었다. 아미노프로파르길 핵염기를 생성하기 위한 *N*-트리플루오로아세틸 기의 제거는 온화한 조건 하에 가용매분해에 의해 초래될 수 있다 [45].

[0261] 다른 한편으로는, 절단가능한 링커 합성은 1,4-부탄디올로부터 출발하여, 도 11에 제시한 바와 같이 달성할 수 있으며 실시예 9에 기재되어 있다.

[0262] 실시예 9

[0263] 4-O-(*tert*-부틸디페닐실릴)-부탄-1-O-(메틸티오메틸), 18의 합성

[0264] 1L 플라스크에서 100 mL 건조 피리딘에 용해시킨 18.3 g 1,4-부탄디올, 17 (18.3 g, 203.13 mmol)을 질소 분위기 하에 빙조 상에서 영하의 온도가 되게 하였다. 여기에 *tert*-부틸디페닐실릴클로라이드 (TBDPSCl, 19.34 g, 70.4 mmol)를 시린지로 서서히 첨가하였다. 반응 플라스크를 빙조를 제거하여 실온까지 가온시키고 실온에서 밤새 동안 교반을 계속하였다. 그 다음에 용매를 회전 증발에 의해 제거하고 실리카겔 칼럼을 사용하여 플래시 크로마토그래피 (7:3 내지 1:1/Hex:EtOAc)에 의해 정제하여 4-O-(*tert*-부틸디페닐실릴)-부탄-1-올 (13.7 g, 59.5% 수율, R_f = 0.7, 1:1/Hex:EtOAc 사용)을 생성하였다, ¹H NMR (CDCl₃): δ H 7.70 (4H, m), 7.40 (4H, m), 3.75 (2H, m), 3.65 (m, 2H), 3.70 (4H, m) 및 1.09 (9H, m) ppm. 생성된 생성물 중에서, 6.07 g (18.5 mmol)을 90 mL 건조 DMSO에 용해시켰다, 도 11 참조. 그 다음에 여기에 아세트산 (15 mL) 및 아세트산 무수물 (50 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하였다. 그 다음에 이를 분액 깔대기에 옮기고 동일한 부피의 EtOAc로 분배함으로써 300 mL 증류수로 세척하였다. 그 다음에 EtOAc 부분을 1,000 mL 비이커에 옮기고 포화 K₂CO₃ 용액으로 중화하였다. 수성 부분을 분배함으로써 제거하고 그 다음에 EtOAc 부분을 증류수 (3X300 mL)로 추가로 세척하고 MgSO₄ 상에서 건조시켰다. 그 다음에 EtOAc 부분을 농축하고 실리카겔 칼럼 상에서 플래시 크로마토그래피 (Hex:EtOAc/97:3 내지 90:10)에 의해 정제하여 4-O-(*tert*-부틸디페닐실릴)-1-O-(메틸티오메틸)-부탄, 18 (5.15 g, 71.7% 수율, 9:1/Hex:EtOAc 중 R_f = 0.8)을 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ H 7.70 (4H, m), 7.40 (6H, m), 4.62 (2H, s), 3.70 (2H, m), 3.50 (2H, m), 2.15 (2H, s), 1.70 (4H, m) 및 1.08 (9H, m) ppm.

[0265] 실시예 10

[0266] 화합물 19의 합성

[0267] 화합물 **18** (2.0 g, 5.15 mmol)을 40 mL 건조 CH_2Cl_2 에 용해시키고, 10 g 분자체-3A 및 0.78 mL Et_3N (5.66 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 30분 동안 실온에서 N_2 기체 하에 교반하였다. 그 다음에 플라스크를 빙조 상에 배치하여 온도를 영하가 되게 하였다. 그 다음에 여기에 7.7 mL의 1M $\text{SO}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 용액 (7.7 mmol)을 서서히 첨가하고 1시간 동안 N_2 하에 교반하였다. 그 다음에 빙조를 제거하고 8 mL DMF 중 벤젠티오술폰산-Na 염 (1.6 g, 8.24 mmol)을 첨가하고 실온에서 30분 동안 교반하였다. 그 다음에 7 mL 건조 DMF 중 4-메르캅토포닐 아세트산 (1.73 g, 10.3 mmol, 2.0 당량)을 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 그 다음에 전체 조 샘플을 셀라이트-S를 통해 여과하고 생성물을 EtOAc에 의해 세척해 냈다. 그 다음에 EtOAc 추출물을 회전 증발에 의해 농축하고 실리카겔 칼럼 (1:1 내지 3:7/Hex:EtOAc) 상에서 정제하여 1.19 g의 화합물 **19**를 43% 수율로 수득하였다, 도 11 참조, $R_f = 0.5$ Hex:EtOAc/3:7. ^1H NMR (CDCl_3): 7.65 (4H, m), 7.55 (2H, m), 7.45 (6H, m), 7.20 (2H, s), 4.80 (2H, m), 3.65 (4H, m), 3.50 (2H, m), 1.60 (4H, m), 및 1.09 (9H, s) ppm.

[0268] 실시예 11

[0269] 화합물 20의 합성

[0270] 20 mL 건조 DMF에 용해시킨 화합물 **19** (0.6 g, 1.11 mmol)를 실온에서 DSC (0.426 g, 1.5 당량) 및 Et_3N (0.23 mL)로 처리하고 질소 분위기 하에 1.5시간 동안 교반하였다. 그 다음에 11-아지도-3,6,9-트리옥사데칸-1-아민 (2.0 당량) 및 Et_3N (2.0 당량)으로 이루어진 혼합물을 5 mL DMF에서 제조하였다. 전체 용액을 반응 혼합물에 한꺼번에 첨가하고 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에 용매를 진공하에 제거하고 구배 0 내지 10% CH_2Cl_2 :MeOH를 사용하여 실리카겔 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 **20**을 36% 수율 (0.297 g, $R_f = 0.8$, 10% MeOH: CH_2Cl_2)로 수득하였다, 도 11 참조. ^1H NMR (MeOH- d_4): δ_{H} 7.70 (4H, m), 7.55 (2H, m), 7.40 (6H, m), 7.45 (2H, m), 4.85 (2H, s), 3.65-3.30 (22H, m), 1.65 (4H, m), 및 1.09 (9H, m) ppm.

[0271] 그 다음에, 생성물 **20** (0.297 g)을 플라스크에서 7 mL 건조 THF에 용해시키고 빙조 상에 배치하여 질소 분위기 하에 영하의 온도가 되게 하였다. 그 다음에 THF 중 0.6 mL 1M TBAF를 적가하고 빙냉 온도에서 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 1 mL MeOH로 켄칭하고 휘발성 물질을 회전 증발에 의해 제거하고 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 165 mg의 생성물 **21**을 수득하였다, 도 11 참조, ^1H NMR (MeOH- d_4): δ_{H} 7.55 (2H, m), 7.25 (2H, m), 4.85 (2H, s), 3.75-3.30 (22H, m) 및 1.50 (4H, m) ppm. 이 생성물을 활성화제로서 CDI를 사용하여 뉴클레오티드에 그리고 클릭 화학을 사용하여 알킬 치환된 염료에 커플링시켜 화합물 **22**를 생성할 수 있다.

[0272] 안정화 같은자리-디메틸 기가 절단가능한 링커의 α -탄소에 부착된 절단가능한 링커의 또 다른 변이체를 도 12에 따라 달성할 수 있다.

[0273] 실시예 12

[0274] 또 다른 측면에서, 절단가능한 링커는 화합물 **30**일 수 있으며, 여기서 디술피드는 같은자리-디메틸 기에 의해 플랭크되고 플렉서블 에틸렌 글리콜 링커 (PEG)에 부착된다. 링커는 카르바메이트 기 ($-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$)를 통해 PA-뉴클레오티드 (예를 들어 화합물 **33**)에 부착된다. 이러한 경우에, 생성된 뉴클레오티드 유사체는 화합물 **35** (dUTP 유사체)에서와 같을 수 있고, 이는 도 13에 따라 합성될 수 있다. 다른 뉴클레오티드 유사체 (예를 들어 dATP, dGTP, dCTP의 유사체)는 반응 순서의 마지막 단계에서 PA-뉴클레오티드 **33**을 적절한 PA-뉴클레오티드 유사체로 대체함으로써 유사하게 합성할 수 있다.

[0275] 실시예 13

[0276] 화합물 28의 합성

[0277] 화합물 **18** (15.53 g, 40 mmol) (화합물 **18**의 합성에 관한 실시예 9 참조)을 환저 플라스크에서 450 mL의 건조 디클로로메탄에 용해시켰다. 분자체 (3Å, 80 g) 및 트리에틸아민 (5.6 mL)을 첨가하고, 반응 혼합물을 질소 분위기 하에 0.5시간 동안 0°C에서 교반하였다. 그 다음에, SO_2Cl_2 (DCM 중 1 M, 64 mL)를 시린지에 의해 서서히 첨가하고 0°C 온도에서 1.0시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 빙수조를 제거하고, 20 mL 무수 DMF 중 포타슘-티오토실레이트 (10.9 g, 48.1 mmol)의 용액을 한꺼번에 첨가하고 실온에서 20분 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 2 L 환저 플라스크에서 20 mL DMF에 용해시킨 3-메르캅토-3-메틸부탄-1-올 (4.4 mL, 36

mmol)에 부었다. 생성된 혼합물을 실온에서 0.5시간 동안 교반하고, 셀라이트를 통해 여과하였다. 생성물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 합해진 유기 추출물을 분액 깔대기에서 증류수로 세척한 후에 조 생성물을 회전 증발에 의해 농축하였다. 이동상으로서 EtOAc:헥산을 사용하여 실리카겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제한 후 생성물 (**28**)을 26% 수율 (5.6 g)로 수득하였다, 도 13 참조. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.67-7.70 (m, 4H), 7.37-7.47 (m, 6H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (t, $J = 6.73$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 6.21$ Hz, 2H), 3.59 (t, $J = 6.55$, 2H), 1.90 (t, $J = 6.95$ Hz, 2H), 1.58-1.77 (m, 4H), 1.34 (s, 6H), 및 1.07 (s, 9H) ppm.

[0278] **실시예 14**

[0279] **화합물 29의 합성**

[0280] 화합물 **28** (5.1 g, 10.36 mmol)을 500 mL 환저 플라스크에서 100 mL 무수 피리딘에 용해시켰다. 이 용액에, 1,1'-카르보닐디이미다졸 (CDI) (3.36 g, 20.7 mmol)을 한번에 첨가하고 반응물을 질소 분위기 하에 실온에서 1.0시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 반응 혼합물을 2,2'-(에틸렌디옥시)비스(에틸아민) (7.6 mL, 51.8 mmol) 및 무수 피리딘 (50 mL)으로 이루어진 용액에 부었다. 혼합물을 실온에서 1.0시간 동안 교반하고, 휘발성 물질을 회전 증발에 의해 제거하였다. 생성된 조 생성물을 MeOH: CH_2Cl_2 /9.5:0.5를 사용하여 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 순수한 화합물 **29** (4.4 g, 65% 수율)를 제공하였다, 도 13 참조. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.63-7.68 (m, 4H), 7.34-7.44 (m, 6H), 4.76 (s, 2H), 4.17 (t, $J = 7.07$ Hz, 2H), 3.65 (t, $J = 6.16$ Hz, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.49-3.51 (m, 6H), 3.31-3.39 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 1.9 (t, $J = 7.06$ Hz, 2H), 1.57-1.73 (m, 4H), 1.31 (s, 6H) 및 1.03 (s, 9H) ppm.

[0281] **실시예 15**

[0282] **화합물 31의 합성**

[0283] 화합물 **29** (0.94 g, 1.42 mmol)를 40 mL 건조 THF에 용해시키고 질소 분위기 하에 0°C에서 THF 중 1M TBAF (1.6 mL, 1.6 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 2.0시간 동안 교반하고, 그 동안 LC-MS는 TBDPS 보호기의 완전한 제거를 확인해 주었다. 회전 증발에 의해 용매를 제거한 후, 생성물을 C18 플래시 칼럼 상에서 플래시 크로마토그래피 (구배: 50분에 걸쳐 0-100%B, 여기서 A = 50 mM TEAB 및 B = 아세토니트릴)에 의해 정제하였다. 목적 분획을 합하고 동결 건조시켜 순수한 화합물 **30** (0.284 g, 47% 수율)을 생성하였다, MS (ES+) (M+H)에 대한 계산치 429.21, 관찰치 m/z 429.18. 그 다음에, 화합물 **30** (0.217 g, 0.51 mmol)을 질소 분위기 하에 13 mL의 건조 아세토니트릴에 용해시켰다. 이 용액에, DIPEA (97.7 μL , 0.56 mmol) 및 Fmoc-NHS 에스테르 (273.6 mg, 0.81 mmol)를 0°C 온도에서 첨가하고 동일한 온도에서 2.0시간 동안 교반하였다. 그 다음에 생성물을, 실리카겔 상에서 플래시 크로마토그래피 ((1:1 내지 1:9/hex:EtOAc 구배))에 의해 정제하여, 반-순수한 생성물을 야기하고, 이를 2-5%/MeOH- CH_2Cl_2 구배를 사용하여 추가로 정제하여 화합물 **31** (0.245 g, 74% 수율)을 수득하였다, 도 13 참조. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.70 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.32 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.35 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.60-3.45 (12H, m), 3.36-3.26 (4H, m), 1.82 (2H, m), 1.60 (4H, m) 및 1.22 (6H, s) ppm.

[0284] **실시예 16**

[0285] **화합물 32의 합성**

[0286] 화합물 **31** (93 mg, 0.143 mmol)을 질소 기체 공급원 및 자기 막대를 구비한 환저 플라스크에서 건조 아세토니트릴 (12.0 mL)에 용해시켰다. 이 용액에, DSC (56 mg, 0.21 mmol) 및 DIPEA (37.4 μL , 0.21 mmol)를 순차적으로 첨가하고, 생성된 혼합물을 5.0시간 동안 실온에서 교반하였다. 추가의 DSC (48 mg, 0.18 mmol) 및 DIPEA (37.4 μL , 0.21 mmol)를 첨가하고 실온에서 15.0시간 동안 교반을 계속하고, 그 동안 TLC는 활성화된 NHS 에스테르로의 완전한 전환을 나타냈다. 헥산-에틸 아세테이트 (3:7 내지 1:9) 구배를 사용하여 실리카겔 플래시 크로마토그래피 정제에 이어서 농후한 오일로서 생성물 **32** (59 mg, 53% 수율)를 수득하고 다음 단계에서 사용하였다, 도 13 참조. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.70 (2H, d, $J = 7.53$ Hz), 7.53 (2H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.33 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.34 (2H, m), 4.28 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.57-3.46 (10H, m), 3.35-3.26 (4H, m), 2.75 (4H, s), 1.74 (4H, m), 1.62 (2H, m) 및 1.23 (6H, s) ppm.

- [0287] **실시예 17**
- [0288] **화합물 34의 합성**
- [0289] 화합물 **33** (10 μmol)의 분취액 (참고문헌 US 2013/0137091 A1에 따라 합성됨)을 15 mL 원심분리관에서 동결 건조시켜 건조시켰다. 그 다음에 이를 1.0 mL의 건조 DMF와 60 μmol DIPEA에 재현탁시켰다. 별도의 관에서, 화합물 **32** (30 μmol , 3 당량)를 3.33 mL 건조 DMF에 용해시키고, 한꺼번에 모두 첨가하였다. 반응물을 손으로 격렬히 진탕함으로써 잘 혼합하고 실온에서 12시간 동안 진탕기 상에 배치하였다. 그 다음에, 피페리딘 (0.33 mL)을 첨가하고 실온에서 30분 동안 진탕을 계속하였다. 그 다음에 생성물을 C18 칼럼을 사용하여 HPLC (구배: 40분에 걸쳐 0-70%B, 여기서 A = 50 mM TEAB 및 B = 아세토니트릴)에 의해 정제하였다. 목적 분획의 동결 건조 후 생성물 **34**를 73.3% 수율 (7.33 μmol)로 수득하였다, 도 13 참조.
- [0290] **실시예 18**
- [0291] **화합물 35의 합성**
- [0292] 화합물 **34** (4.9 μmol)의 분취액을 15 mL 원심분리관에서 1.0 mL 증류수 및 0.5M Na_2HPO_4 (0.49 mL)에 용해시켰다. 별도의 관에서, 10 mg의 5-CR6G-NHS 에스테르 (17.9 μmol)를 0.9 mL의 건조 DMF에 용해시켰다. 그 다음에 이 용액을 반응 혼합물에 모두 한꺼번에 첨가하고 6.0시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 50 mM TEAB (25 mL)로 희석하였다. 생성물을 C18 칼럼을 사용하여 HPLC (구배: 70분에 걸쳐 0-60%B)에 의해 정제하였다. 목적 분획의 동결 건조 후 화합물 **35** (2.15 μmol , 44% 수율, HPLC에 의한 ~ 98% 순도로)를 수득하고, 구조를 MS (ES+)에 의해 확인하였다: (M-H) $\text{C}_{58}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{O}_{25}\text{P}_3\text{S}_2^-$ 에 대한 계산치, 1469.36, 실측치 m/z 1469.67, 도 13 참조.
- [0293] 유사하게, dATP, dCTP 및 dGTP의 유사체를 화합물 **35**에 대해 기재된 유사한 절차에 따라 합성하고, HPLC 및 LC-MS에 의해 특성화하여 전체 세트의 A-시리즈 (**98**, **100**, **101**, 및 **102**, 도 45)을 생성하였다. dATP 유사체의 경우 (M-H) $\text{C}_{66}\text{H}_{83}\text{N}_{12}\text{O}_{23}\text{P}_3\text{S}_2$ 에 대한 계산치, 1,568.4348, 실측치 m/z 1,568.4400; dCTP 유사체의 경우 (M-H) $\text{C}_{52}\text{H}_{65}\text{N}_{11}\text{O}_{30}\text{P}_3\text{S}_4$ 에 대한 계산치, 1,545.2070, 실측치 m/z 1,545.2080 및 dGTP 유사체의 경우 (M-H) $\text{C}_{66}\text{H}_{93}\text{N}_{12}\text{O}_{27}\text{P}_3\text{S}_4$ 에 대한 계산치, 1,706.4369, 실측치 m/z 1,706.4400. 또 다른 측면에서, 본 발명은 절단가능한 디설피드가 같은자리-디메틸 기에 의해 플랭크되고 링커가 우레아 기 ($-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$)를 통해 PA-뉴클레오타이드에 부착되어 있는, dATP 유사체의 경우 화합물 **43**에서와 같이 절단가능한 링커를 가진 뉴클레오타이드를 수반한다. 화합물은 도 14 (dATP 유사체의 경우)에 따라 합성할 수 있다. 다른 뉴클레오타이드 유사체의 경우 (예를 들어 dCTP, dGTP, dUTP의 유사체의 경우)는 반응 순서의 마지막 단계에서 **42**를 적절한 PA-유사체로 대체함으로써 유사하게 합성할 수 있다.
- [0294] **실시예 19**
- [0295] **화합물 37의 합성**
- [0296] 교반 막대를 구비한 1L 환저 플라스크에서, 5-(fmoc-아미노)-1-펜탄올 (**36**, 20 g, 62 mmol)을 실온에서 DMSO (256 mL)에 용해시켰다. 용액에, AcOH (43 mL) 및 Ac_2O (145 mL)를 순차적으로 첨가하였다. 플라스크를 고무 격막으로 폐쇄하고, N_2 하에 배치하고, 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 완료를 TLC에 의해 확인하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 3 L 비이커에 옮기고 플라스크를 물로 세척하였다. 비이커를 빙조에서 냉각하고 반응 혼합물을 30분 동안 50% 포화 K_2CO_3 (400 mL)으로 중화하였다. 혼합물을 분액 깔대기에 옮기고 EtOAc (2x700 mL)로 추출하였다. 그 다음에 유기 상을 50% 포화 K_2CO_3 (2x400 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 중에 농축하였다. 조 오일을 실리카겔 크로마토그래피 (20분에 걸쳐 0 내지 20%B, A = Hex, B = EtOAc)에 의해 정제하였다. 분획을 수집 및 농축하여 화합물 **37** (17.77 g, 75%)을 백색 고체로서 수득하였다, 도 14 참조. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.79 (d, J = 7.33, 2H), 7.63 (d, J = 7.83, 2H), 7.441 (t, J = 7.33, 2H), 7.357 (t, J = 7.58, 2H), 4.803 (bs, 1H), 4.643 (s, 2H), 4.43 (d, J = 6.82, 2H), 4.24 (t, J = 6.82, 1H), 3.54 (t, J = 6.32, 2H), 3.251 (m, 1H), 2.167 (s, 3H), 1.657-1.550 (m, 4H), 및 1.446-1.441 (m, 2H) ppm.
- [0297] **실시예 20**

[0298] 화합물 38의 합성

[0299] 화합물 **37** (2.77 g, 7.2 mmol)을 N₂ 하에 교반 막대 및 격막을 구비한 250 mL 환저 플라스크에서 DCM (60 mL)에 용해시켰다. 플라스크에, 트리에틸아민 (3.0 mL, 21.6 mmol, 3 당량) 및 4Å 분자체 (28 g)를 첨가하였다. 현탁액을 실온에서 10분 동안, 뒤이어 빙조에서 30분 동안 교반하였다. 플라스크에 SO₂Cl₂ (DCM 중 1M 용액, 14.4 mL, 14.4 mmol, 2 당량)를 첨가하고 반응 혼합물을 1시간 동안 빙조에서 교반하였다. 반응 진행을 TLC (1:1 Hex:EtOAc)를 통한 출발 물질의 소멸에 의해 모니터링하였다. 일단 SO₂Cl₂ 활성화가 완료되면, DMF (60 mL) 중 포타슘 티오토실레이트 (2.45 g, 10.8 mmol, 1.5 당량)의 용액을 신속히 첨가하였다. 반응 혼합물을 1시간 동안 실온으로 서서히 가온하였다. 그 다음에 플라스크를 3-메르캅토-3-메틸부탄올(1.8 mL, 14.4 mmol, 2 당량)로 채우고 1시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 40℃에서 진공 중에 농축하였다. FCC (30분에 걸쳐 0 내지 50%B, A = Hex, B = EtOAc)에 의해 정제하여 **38** (482 mg, 14%)을 황색 오일로서 수득하였다, 도 14 참조. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 7.76 (d, *J* = 7.81, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.32, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.32, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.32, 2H), 4.87 (bs, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.40 (d, *J* = 6.84, 2H), 4.21 (t, *J* = 6.84, 1H), 3.78 (t, *J* = 6.84, 2H), 3.57 (t, *J* = 6.35, 2H), 3.20 (m, 2H), 1.88 (t, *J* = 6.84, 2H), 1.64-1.50 (m, 4H), 1.42-1.39 (m, 2H) 및 1.32 (s, 6H) ppm.

[0300] 실시예 21**[0301] 화합물 39의 합성**

[0302] 화합물 **38** (135 mg, 0.275 mmol)을 50 mL 환저 플라스크에서 2시간 동안 진공하에 건조시켰다. 진공을 제거하고 플라스크를 N₂ 하에 배치하였다. 화합물 **38**을 DMF (3.1 mL)에 용해시키고 플라스크를 DIPEA (96 μL, 0.55 mmol, 2 당량)로 채웠다. 용액을 10분 동안 교반한 다음에 DSC (120 mg, 0.468 mmol, 1.7 당량)를 고체로서 1 회 용량으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하고 완료를 TLC (1:1 Hex:EtOAc)를 통해 확인하였다. 그 다음에 반응물을 35℃에서 진공 중에 농축하고 1시간 동안 고 진공하에 추가로 건조시켰다. 조 오일을 실리카겔 상으로 로딩하고 FCC (14분에 걸쳐 0 내지 50%B, A = hex, B = EtOAc)에 의해 정제하였다. 분획을 TLC에 의해 점검하고 농축하여 화합물 **39** (133 mg, 76%)를 시간이 지남에 따라 결정화된 오일로서 수득하였다, 도 14 참조. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 7.78 (d, *J* = 7.58, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.58, 2H), 7.42 (t, *J* = 7.58, 2H), 7.33 (t, *J* = 7.58, 2H), 4.87 (bs, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.48 (t, *J* = 7.07, 2H), 4.44 (d, *J* = 6.82, 2H), 4.24 (t, *J* = 7.07, 1H), 3.58 (t, *J* = 6.32, 2H), 3.22 (m, 2H), 2.83 (s, 4H), 2.08 (m, 2H), 1.649-1.562 (m, 4H), 1.443-1.390 (m, 2H) 및 1.366 (s, 6H) ppm.

[0303] 실시예 22**[0304] 화합물 40의 합성**

[0305] 2,2'-(에틸렌디옥시)비스(에틸아민) (92 μL, 635 μmol, 10 당량) 및 트리에틸아민 (176 μL, 1270 μmol, 20 당량)을 DMF (10 mL)에 용해시켰다. DMF (2.7 mL) 중 6-ROX, NHS 에스테르 (40 mg, 64 μmol, 1 당량)의 별도의 용액을 또한 제조하였다. 6-ROX, NHS 에스테르 용액을 디아민을 함유하는 신속 교반 용액에 적가하였다. 반응물을 2시간 동안 교반하고 진행을 C18 HPLC-MS (10분에 걸쳐 0 내지 100%B, A = 50 mM TEAB, B = MeCN)에 의해 모니터링하였다. 일단 완료되면, 반응물을 제조용 C18-HPLC (50분에 걸쳐 10 내지 100%B, A = 50 mM TEAB, B = MeCN)에 의해 정제하였다. 분획을 합하고 동결 건조시켜 화합물 **40** (20 mg, 48%)을 자주색을 띤 적색 고체로서 수득하였다, 도 14 참조. MS (ES-) (M-H) C₃₉H₄₅N₄O₆에 대한 계산치 664.33, 실측치 m/z 664.56.

[0306] 실시예 23**[0307] 화합물 41의 합성**

[0308] 화합물 **40** (10 mg, 15 μmol)을 DMF (1 mL)에 용해시키고 DIPEA (8 μL, 45 μmol, 3 당량)로 채웠다. 별도로, 화합물 **39** (28 mg, 45 μmol, 3 당량)를 DMF (0.21 mL)에 용해시켰다. 화합물 **39**의 용액을 화합물 **40**을 가진 용액에 신속히 첨가하였다. 반응물을 1.5시간 동안 진탕기 플레이트 상에 배치하였으며, 이때 분석용 C18-HPLC (10분에 걸쳐 0-100%B, A = 50 mM 아세트이트 완충제 pH 5.2, B = MeCN)는 잔류 화합물 **40**을 밝혀냈다. 추가의 화합물 **39** (13 mg, 21 μmol, 1.4 당량)를 첨가하고 반응물을 추가의 1시간 동안 진탕기 플레이트

상에 배치하였다. 추가적인 분석 없이, 피페리딘 (300 μ L)을 첨가하고 10분 동안 반응시켰다. 그 다음에 반응 혼합물을 제조용 C18-HPLC (50분에 걸쳐 10-100%B, A = 50 mM TEAB, B = MeCN)에 직접 주입하였다. 분획을 수집하고 동결 건조시켜 화합물 **41** (4.7 mg, 34%)을 자주색을 띤 적색 고체로서 수득하였다, 도 14 참조. MS (ES⁺) (M+H) C₅₁H₆₈N₅O₉S₂⁺에 대한 계산치 959.45, 실측치 m/z 959.76

[0309] 실시예 24

[0310] 화합물 43의 합성

[0311] 5 mL 샘플 바이알을 아민 **41** (2 mg, 2 μ mol), DSC (0.8 mg, 3 μ mol, 1.5 당량), DIPEA (0.7 μ L, 4 μ mol, 2 당량), 및 *N,N*-디메틸포름아미드 (1.7 mL)로 채웠다. 반응 혼합물을 1시간 동안 진탕기 상에 배치하였다. 반응 진행을 C18-HPLC (10분에 걸쳐 0 내지 100%B, A = 50 mM 아세트이트 완충제 pH 5.2, B = MeCN)에 의해 모니터링하였다. 그 다음에, 0.1 Na₂HPO₄ (3.3 mL) 중 뉴클레오티드 **42** (6 μ mol, 3 당량, 참고문헌 US 2013/0137091 A1)를 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 진탕기 상에 배치하였다. 그 다음에 반응물을 물로 희석하고 제조용 C18-HPLC (70분에 걸쳐 0 내지 60%B, A = 50 mM TEAB, B = MeCN)에 의해 정제하여 표제 화합물 **43** (0.5 μ mol, 25%)을 수득하였다, 도 14 참조. MS (ES⁻) (M-H) C₆₇H₈₇N₁₃O₂₂P₃S₂에 대한 계산치 1581.47, 실측치 m/z 1581.65.

[0312] 실시예 25

[0313] 또 다른 측면에서, 절단가능한 링커는 화합물 **45**일 수 있으며, 여기서 링커가 우레아 관능기를 통해 PA-뉴클레오티드에 결합되고 디설피드가 두 개의 탄소 링커에 의해 염료에 연결되어 있다. 이러한 경우에 생성된 뉴클레오티드 유사체는 도 15에 따라 합성될 수 있는, 화합물 **49** (dGTP 유사체)에서와 같을 수 있다. 다른 뉴클레오티드 유사체 (예를 들어 dATP, dUTP, dCTP의 유사체)는 반응 순서의 세번째 단계에서 뉴클레오티드 **46**을 적절한 PA-뉴클레오티드 유사체로 대체함으로써 유사하게 합성할 수 있다.

[0314] 실시예 26

[0315] 화합물 44의 합성

[0316] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 CH₂Cl₂ 중 **37** (1.00 g, 2.59 mmol), 분자체 및 트리에틸아민 (0.72 mL, 5.18 mmol)으로 채웠다. 반응 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반하고 0°C로 냉각하였다. 숄푸릴 클로라이드 (4.40 mL, 4.40 mmol)를 서서히 첨가하고 생성된 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 헥산 중 20% 에틸 아세테이트를 사용한 TLC 분석은 출발 물질의 소멸을 나타냈고, *N',N'*-디메틸포름아미드 (5 mL) 중 벤젠티오노술폰산 나트륨 염 (648 mg, 3.89 mmol)의 용액을 0°C에서 한번에 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반하였다. 그 다음에, *N*-(트리플루오로아세트아미도)에탄티올 (896 mg, 5.18 mmol)을 한번에 첨가하고 생성된 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 분자체를 여과해 내고 용매를 감압하에 제거하고 잔류물을 0-20% 에틸 아세테이트-헥산 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 표제 화합물 **44** (529 mg, 39%)를 누르스름한 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃), 도 15 참조: δ_H 7.76 (d, *J* = 7.52 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.50 Hz, 2H), 7.40-7.38 (m, 2H), 7.30-7.25 (m, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.42 (d, 2H), 4.21-4.20 (m, 1H), 3.70-3.67 (m, 2H), 3.59-3.55 (m, 2H), 3.17-3.16 (m, 2H) 및 1.64-1.40 (m, 6H) ppm.

[0317] 실시예 27

[0318] 화합물 45의 합성

[0319] 자기 교반 막대를 구비한 25 mL 환저 플라스크를 실온에서 *N,N*-디메틸포름아미드 중 1 mL의 20% 피페리딘 용액, 및 카르바메이트 **44** (100 mg, 0.184 mmol)로 채웠다. 반응 혼합물을 10분 동안 실온에서 교반한 다음에, 아세토니트릴 (5 mL)로 희석하고 0-30% 아세토니트릴-TEAB 완충제 구배를 사용하여 역상 제조용 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물 **45** (11 mg, 20%)를 투명 오일로서 수득하였다, 도 15 참조. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H 4.90 (s, 2H), 3.64-3.60 (m, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.98-2.93 (m, 2H), 2.86-2.82 (m, 2H), 1.66-1.60 (m, 2H), 1.50-1.48 (m, 2H) 및 1.33-1.30 (m, 2H) ppm.

[0320] 실시예 28

[0321] **화합물 47의 합성**

[0322] 5 mL 샘플 바이알을 아민 **45** (0.960 mg, 3.0 μmol), DSC (1.15 mg, 4.5 μmol) 및 트리에틸아민 (60 μL , 6.0 μmol)으로 채우고 실온에서 2시간 동안 진탕하였다. 그 다음에 *N,N*-디메틸포름아미드 중 200 μL 로 3 당량의 뉴클레오티드 **46**으로 이루어진 용액 (참고문헌 US 2013/0137091 A1)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 12시간 동안 진탕기 상에 배치하였다. 그 다음에 반응물을 TEAB 완충제로 희석하고 0-30% 아세토니트릴: 50 mM TEAB 완충제 구배를 사용하여 제조용 역상 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물 **47** (14% 수율로)을 수득하였다, 도 15 참조. MS (ES⁻): (M-H) $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{F}_3\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{S}_2$ 에 대한 계산치, 959.10, 실측치 m/z 959.24.

[0323] **실시예 29**

[0324] **화합물 48의 합성**

[0325] 뉴클레오티드 **47** (1 μmol)을 TEAB 완충제 (200 μL 의 50 mM 수성 용액)에 용해시키고 200 μL 의 수산화암모늄 (30% 수성 용액)으로 실온에서 50분 동안 처리하였다. 그 다음에 반응물을 TEAB 완충제 (1 mL의 1M 용액) 및 증류수 (5 mL)로 희석하였다. 생성된 혼합물을 C18-HPLC, 0-30% 아세토니트릴: 50 mM TEAB 완충제 구배에 의해 정제하여 표제 화합물 **48** (0.40 μmol , 90%)을 수득하였다, 도 15 참조. MS (ES⁻): (M-H) $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}_2$ 에 대한 계산치, 863.12, 실측치 m/z 863.45.

[0326] **실시예 30**

[0327] **화합물 49의 합성**

[0328] 화합물 **48** (0.04 μmol)의 분취액을 3 mL 에펜도르프관에서 0.1 mL 증류수 및 0.5M Na_2HPO_4 (20 μL)에 용해시켰다. 별도의 관에서, 1 mg의 ROX-NHS 에스테르 (0.168 μmol)를 48 μL 의 건조 DMF에 용해시켰다. 그 다음에 이 용액을 반응 혼합물에 모두 한꺼번에 첨가하고 6.0시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 50 mM TEAB (5 mL)로 희석하였다. 생성물을 (0-60% B 구배, A = 50 mM TEAB, B = 아세토니트릴)을 사용하여 C18-HPLC에 의해 정제하였다. 목적 분획의 동결 건조 후 화합물 **49** (0.03 μmol , 30% 수율)를 수득하였다, 도 15 참조. MS (ES⁻) (M-H) $\text{C}_{57}\text{H}_{67}\text{N}_{12}\text{O}_{19}\text{P}_3\text{S}_2$ 에 대한 계산치 1380.33, 실측치 1380.25.

[0329] **통상의 디설파이드 연결된 뉴클레오티드와의 절단 비교**

[0330] 본원에 개시된, 절단가능한 옥시메틸렌디설파이드 (-OCH₂-SS-) 링커를 함유하는 이러한 신규한 부류의 뉴클레오티드를, 통상의 디설파이드 (-SS-) 연결된 뉴클레오티드 (예를 들어 뉴클레오티드 **50**, 미국 특허 출원 2013/0137091 [46]에 기재)와 환원 포스포핀 기반 절단 조건 하에 비교하였다. 이들 두 부류의 뉴클레오티드에서 뚜렷한 차이가 관찰되었다. 표지된 뉴클레오티드 **50**을 65°C에서 10 당량의 TCEP에 노출시킨 경우, 이는 LC-MS에 의해 확인된 기대 생성물 **51**과 함께 화합물 **52**를 포함한 다수의 부산물을 생성하였다 (도 16 및 도 17, 5분 노출). 원하지 않는 부산물의 비율은 시간이 지남에 따라 증가하였다 (도 18, 15분 노출). 동일한 절단 조건 하에, 옥시메틸렌디설파이드 연결된 뉴클레오티드 **35**는 목적하는 절단 생성물, 화합물 **53** 및 **54**를 깔끔하게 생성하였다. 링커의 메틸렌 티올 세그먼트 (-CH₂SH)는 디설파이드 기의 절단시 뉴클레오티드로부터 완전히 제거되었다 (도 20 및 도 21, 5분 노출). 게다가, TCEP에 장기간 노출되면 LC-MS에 의해 밝혀진 바와 같이 추가의 부산물이 생성되지 않았다 (도 22, 15분 노출). 따라서, 이러한 신규한 부류의 뉴클레오티드는 도 4에 제시된 바와 같이 티올 기의 존재에 내재하는 부반응을 제거함으로써 합성에 의한 DNA 서열분석 (SBS)의 사용에서 상당한 이점을 제공할 수 있었다.

[0331] **실시예 31**

[0332] **화합물 57의 합성**

[0333] 또 다른 실시양태에서, 뉴클레오티드의 3'-OH 기는 -CH₂-SS-Et 또는 -CH₂-SS-Me로 캡핑될 수 있고, 형광단 염료는 앞에서 기재된 절단가능한 -OCH₂-SS- 링커 중 하나를 통해 핵염기에 부착된다 (예를 들어 화합물 **35**, **43**, 및 **49**에서와 같이).

[0334] 3'-OCH₂-SS-Et 및 -OCH₂-SS-Me를 가진 PA 뉴클레오티드의 합성은 도 10 및 도 22 각각에 따라 달성될 수 있다.

3'-OCH₂-SS-Et 유사체의 합성 (도 10)과 3'-OCH₂-SS-Me 유사체의 합성의 차이는 도 22에 제시된 바와 같이 적절한 단계에서 메탄티올 또는 소듐 티오메톡시드에 의한 메르캅토에탄올 (EtSH)의 대체이다. -OCH₂-SS-Me 기는 모든 가능한 3'-O-CH₂-SS-R 유사체 중 가장 작은 구조이다. 따라서, 3'-OCH₂-SS-Me 캡핑 기를 가진 뉴클레오타이드 유사체는 환원제 예컨대 TCEP에 의한 절단성 및 효소 혼입 속도의 관점에서 다른 유사체의 것들보다 더 양호하게 수행하여야 한다.

[0335] 그 다음에, 생성된 PA-뉴클레오타이드 (예를 들어 57)를, 활성화된 링커 32를 사용하여 도 23에 제시된 바와 같이 적절한 절단가능한 -OCH₂-SS- 링커에, 그리고 마지막으로 형광단 염료에 커플링시킬 수 있다. 그리고 상이한 염료를 가진 다른 뉴클레오타이드는 적절한 PA-뉴클레오타이드 (예를 들어 dATP, dGTP, dCTP의 PA 유사체)를 및 NHS 활성화된 염료 (알렉사488-NHS, ROX-NHS, Cy5-NHS 에스테르 등)를 사용하여 유사하게 합성하여 상이한 형광단 리포팅 기로 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 달성할 수 있다.

[0336] 실시예 32

[0337] 상이한 링커를 가진 뉴클레오타이드 유사체는 화합물 60 및 61의 합성에서 제시된 바와 같이, 기재된 프로토콜에 따라 달성할 수 있다 (도 24)

[0338] 절단가능한 링커 -OCH₂-SS-를 가지나, α-탄소에서 쇠 길이 및 치환이 상이한, 다양한 세트의 3'-OCH₂-SS-Et 및 3'-OCH₂-SS-Me 뉴클레오타이드를 유사하게 합성할 수 있다. 생성된 부류의 뉴클레오타이드는 도 25, 도 26, 및 도 27에 제시되어 있다. 도 25에 제시된 뉴클레오타이드 중에서, 절단가능한 링커는 플렉서블 에틸렌-글리콜 링커에 부착된 같은자리-디메틸 기를 안정화시킴으로써 플랭크되고 카르바메이트 관능기 (-NH-C(C=O)-O-)를 통해 PA-핵 염기에 부착되며, 한편 도 26에서, 카르바메이트 기는 우레아 기 (-NH-C(C=O)-NH-)에 의해 대체된다. 다른 한편으로는, 도 27에 제시된 뉴클레오타이드 중에서, 디설피드 기는 1급 탄소 쇠에 부착되며, 우레아 관능기에 의해 PA-핵염기에 결합된다.

[0339] 실시예 33

[0340] 화합물 64의 합성:

[0341] 250 mL 환저 플라스크를 화합물 62 (3.0 g, 4.58 mmol), 25 mL 건조 CH₂Cl₂, 3-Å 분자체 (5.0 g) 및 시클로헥센 (0.55 mL, 5.4 mmol)으로 채웠다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 10분 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 플라스크를 빙조 상에 배치하고 SO₂Cl₂ (6.8 mL, CH₂Cl₂ 중 1M, 1.5 당량)를 시린지를 통해 서서히 첨가하고, 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 추가의 0.5 당량의 SO₂Cl₂를 첨가하여 화합물 63으로의 완전한 전환을 보장하였다. 온도를 10°C에 가깝게 유지하면서 진공하에 휘발성 물질을 제거하였다. 생성된 고체를 20 mL의 건조 DMF에 재현탁시키고 질소 분위기 하에 유지하였다.

[0342] 별도의 플라스크에서, (2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 (2.45 g, 11.44 mmol)을 질소 분위기 하에 건조 DMF (30 mL)에 용해시키고, NaH (274.5 mg, 오일 중 60%)로 처리하여 회색 슬러리를 생성하였다. 여기에, 화합물 63을 한꺼번에 첨가하고 질소 분위기 하에 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 깔대기에서 셀라이트®-S (20 g)를 통해 여과하여 생성물을 EtOAc (100 mL)로 용리시켰다. 그 다음에 EtOAc 용액을 증류수 (2X100 mL)로 세척하였다. EtOAc 추출물을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 회전 증발에 의해 농축하고, 플래시 크로마토그래피 (칼럼: 120 g 레디셉Rf골드(RediSepRfGold), 구매: 80% Hex 내지 50 Hex:EtOAc)에 의해 정제하였다. 도 43 참조. 목적 화합물 (64)을 백색 고체 (1.2 g, 32% 수율, R_f: 0.4, Hex:EtOAc/3:2)로서 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ H 8.13 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 6.12 (m, 1H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.31 (m, 3H), 4.00 (m, 1H), 3.82-3.60 (m, 13H), 2.39 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 0.78 (m, 9H), 및 0.01 (m, 6H) ppm.

[0343] 실시예 34

[0344] 화합물 65의 합성:

[0345] 화합물 64 (1.2 g 1.46 mmol)를 밤새 데시케이터에서 P₂O₅와 함께 고 진공하에 건조시키고 자기 교반기를 구비한 100 mL 플라스크에서 30 mL의 무수 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 여기에 디메틸디설피드 (0.657 mL, 7.3 mmol)를 첨가

하고, 반응 플라스크를 빙조 상에 배치하였다. 그 다음에 디메틸(메틸티오)술포늄 테트라플루오로보레이트 (DMTSF, 316 mg, 1.1 당량)를 첨가하고 0℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 250 mL 분액 깔대기에 옮기고 NaHCO₃의 0.1M 수성 용액 50 mL로 중화하고, CH₂Cl₂ (2X 50 mL)로 추출하였다. 도 43 참조. 유기 부분을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 회전 증발에 의해 농축하였다. 조 생성물을 구배 80-50% Hex-EtOAc를 사용하여 실리카겔 칼럼 (80 g 레디셉Rf 골드) 상에서 정제하여 0.82 g의 화합물 **65** (82% 수율, R_F = 0.5, Hex:EtOAc/3:2)를 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ H 8.15 (m, 3H), 7.42 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 6.11 (m, 1H), 4.80-4.65 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.83-3.67 (m, 2H), 2.49 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.90 (m, 1H), 0.78 (m, 9H), 및 0.10 (m, 6H) ppm.

실시예 35

화합물 66의 합성:

자기 교반기를 구비한 환저 플라스크를 화합물 **65** (0.309 g, 0.45 mmol) 및 10.0 mL 건조 CH₂Cl₂ (10.0 mL)로 채우고 질소 분위기 하에 빙조 상에 배치하였다. TBAF (0.72 mL, 0.72 mmol, 1M 용액 중)를 시린지를 통해 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 3시간 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 분액 깔대기에 옮기고 0.5 M NaHCO₃ 용액 (50 mL)으로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (2 X100 mL)로 추출하고 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 생성물 **66**을 구배 7:3 내지 2:3 Hex:EtOAc를 사용하여 40 g 레디셉Rf 칼럼 상에서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 후 76% 수율 (196 mg, R_F = 0.3, Hex:EtOAc/1:1)로 백색 분말로서 수득하였다. 도 43 참조. ¹H NMR (CDCl₃): δ H 8.40 (s, 1H), 8.25 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.52 (m, 2H), 6.21 (m, 1H), 4.90-80 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.05-3.85 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.50 (s, 3H) 및 2.31 (m, 1H) ppm.

생성물 **67**을 표준 트리포스페이트 합성 방법 (세부 사항은 화합물 **5**의 합성 참조 및 도 8 참조)을 통해 화합물 **66**의 인산화 (**67**에 대한 C₁₄H₂₃N₄O₁₃P₃S₂에 대한 LC-MS m/z (M-H) 611.19에 의해 확인됨) 후 수득하였다. 이를 도 13, 도 14 및 도 15에 제시된 화합물에 대해 기재된 절차에 따라 염료 표지된 생성물로 추가로 전환시켰다.

실시예 36

화합물 70의 합성:

화합물 **68** (7.3 g, 13.8 mmol)을 밤새 데시케이터에서 건조시키고 N₂의 분위기 하에 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 건조 500 mL 환저 플라스크에서 무수 DCM (70 mL)에 용해시켰다. 시클로헥센 (1.54 mL, 15.2 mmol, 1.1 당량) 및 건조 3-Å 분자체 (16.6 g)를 반응 혼합물에 첨가하고 생성된 현탁액을 빙수조에서 0℃에서 20분 동안 교반하였다. 그 다음에, SO₂Cl₂ (DCM 중 1 M 용액, 32.7 mL, 2.36 당량)를 첨가하고 생성된 혼합물을 1시간 동안 0℃에서 교반하였다. 반응 진행을 TLC (100% EtOAc)를 통한 출발 물질의 소멸에 의해 모니터링하였다. 일단 SO₂Cl₂ 활성화가 완료되면, DMF (120 mL) 중 (MeO)₃BnSH (7.4 g, 34.5 mmol, 2.5 당량)와 NaH (1.32 g, 33.12 mmol, 광유 중 60%)의 혼합물을 제조하고 한번에 신속히 첨가하였다. 반응물을 실온으로 서서히 가온하고 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 40℃에서 진공 중에 농축하였다. 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (0 내지 60% 에틸 아세테이트 : 헥산 구배 15분에 뒤이어, 60% 에틸 아세테이트 : 헥산으로 45분 동안 용리시킴)에 의해 정제하여 목적 화합물 **70** (4.2 g, 43.7% 수율)을 투명 오일로서 수득하였다. 도 44 참조. ¹H NMR (CDCl₃): δ H 8.72 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 6.03 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.73 (m, 13H), 2.52 (m, 2H), 0.81 (s, 9H) 및 0.002 (d, 6H) ppm.

실시예 37

화합물 71의 합성:

화합물 **70** (2 g, 2.87 mmol)을 N₂의 분위기 하에 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 200 mL 환저 플라스크에서 무수 DCM (38 mL)에 용해시키고 빙수조 상에서 냉각하였다. 이 혼합물에 디메틸디설피드 (1.3 mL, 14.36 mmol, 5 당량)를 첨가한 후, DCM (20 mL) 중 용액으로서 DMTSF (620 mg, 3.15 mmol, 1.1 당량)를, 한번에

첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온으로 서서히 가온한 다음에 추가의 4시간 동안 교반하였다. 반응물을 NaHCO_3 (100 mL)의 포화 수성 용액을 첨가함으로써 켄칭하고, DCM (150 mL x 2) 및 EtOAc (200 mL)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공 중에 농축하였다. 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (0 내지 60% 에틸 아세테이트 : 헥산 구배 15분에 뒤이어, 60% 에틸 아세테이트 : 헥산으로 45분 동안 용리시킴)에 의해 정제하여 목적 화합물 **71** (1 g, 62% 수율)을 백색 분말로서 수득하였다. 도 44 참조. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.69 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.94 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.42 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 0.81 (s, 9H) 및 0.00 (d, 6H) ppm.

[0356] **실시예 38**

[0357] **화합물 72의 합성:**

[0358] 화합물 **71** (562 mg, 1.25 mmol)을 N_2 의 분위기 하에 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 100 mL 환저 플라스크에서 무수 THF (30 mL)에 용해시키고 빙수조 상에서 냉각하였다. 그 다음에 TBAF (THF 중 1 M 용액 1.5 mL, 1.5 당량)를 적가하고 2시간 동안 0°C에서 교반하였다. 반응 진행을 TLC에 의해 모니터링하였다 (100% 에틸 아세테이트 화합물 **72**의 경우 R_f = 0.205, 화합물 **71**의 경우 R_f = 0.627). 반응 완료시 메탄올 (5 mL)을 첨가하고, 반응물을 회전 증발기 상에서 농축하고 잔류물을 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (0 내지 60% 에틸 아세테이트 : 헥산 구배 15분에 뒤이어, 60% 에틸 아세테이트 : 헥산으로 45분 동안 용리시킴)에 의해 정제하여 목적 화합물 **72** (280 mg, 62% 수율)를 백색 분말로서 수득하였다. 도 44 참조. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.69 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.25 (m, 1H), 4.83 (m, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.99 (m, 1H), 2.43 (s, 3H) 및 2.41 (m, 1H) ppm.

[0359] 그 다음에 화합물 **72**를 앞에서 기재된 표준 트리포스페이트 합성에 따라 트리 포스페이트 **73**으로 전환시켰다 (도 8에서의 화합물 5의 합성 참조).

[0360] **실시예 39**

[0361] **화합물 108의 합성:**

[0362] 교반 막대를 구비한 1 L 환저 플라스크를 100 mL의 무수 피리딘 중 1,4-부탄디올 (18.3 g, 203.13 mmol)로 채우고 질소 분위기 하에 0°C로 냉각하였다. 그 다음에 *tert*-부틸디페닐실릴클로라이드 (13.8 mL, 70 mmol)를 시린지를 통해 적가하고, 반응물을 서서히 실온으로 가온하고, 12시간 동안 실온에서 교반을 계속하였다. 휘발성 물질을 회전 증발에 의해 제거하고 잔류물을 80 그램의 실리카겔 상으로 흡수시켰다. 헥산 중 30 내지 50% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 4-O-(*tert*-부틸디페닐실릴)-부탄-1-올, **108** (13.7 g, 59.5% 수율, R_f = 0.7, 1:1/헥산:에틸 아세테이트 사용)을 생성하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.70 (m, 4H), 7.40 (m, 6H), 3.75 (m, 2H), 3.65 (2H, m), 1.70 (m, 4H), 1.09 (m, 9H) ppm. 합성은 도 53에 예시되어 있다.

[0363] **실시예 40**

[0364] **화합물 109의 합성:**

[0365] 자기 교반 막대를 구비한 250 mL 환저 플라스크를 화합물 **108** (6.07 g, 18.5 mmol) 및 90 mL 무수 DMSO로 채웠다. 아세트산 (15 mL) 및 아세트산 무수물 (50 mL)을 순차적으로 첨가하고 반응물을 실온에서 20시간 동안 교반하고, 분액 깔대기에 옮기고 300 mL 증류수와 300 mL의 에틸 아세테이트에 분배하였다. 그 다음에 유기 층을 1 L 비이커에 옮기고 포화 K_2CO_3 수성 용액 (500 mL)을 사용하여 중화하였다. 유기 층을 증류수 (3 x 300 mL)로 세척하고 MgSO_4 상에서 건조시켰다. 휘발성 물질을 감압하에 제거하고 잔류물을 실리카겔 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피 (헥산:에틸 아세테이트 /97:3 내지 90:10)에 의해 정제하여 4-O-(*tert*-부틸디페닐실릴)-1-O-(메틸티오메틸)-부탄, **109** (5.15 g, 71.7% 수율, 9:1/헥산:에틸 아세테이트 중 R_f = 0.8)를 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.70 (m, 4H), 7.40 (m, 6H), 4.62 (s, 2H), 3.70 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 2.15 (s, 2H), 1.70 (m, 4H), 1.08 (m, 9H) ppm. 합성은 도 53에 예시되어 있다.

[0366] 실시예 41**[0367] 화합물 110의 합성:**

[0368] 자기 교반 막대를 구비한 1 L 환저 플라스크를 화합물 **109** (15.5 g, 40 mmol), 무수 디클로로메탄 (450 mL), 3 Å 분자체 (80 g) 및 트리에틸아민 (5.6 mL)으로 채우고 반응물을 질소 분위기 하에 30분 동안 0℃에서 교반하였다. 그 다음에, SO₂Cl₂ (디클로로메탄 중 1 M 용액 64 mL)를 시린지를 통해 서서히 첨가하고 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에 빙조를 제거하고 20 mL 무수 DMF 중 포타슘-티오토실레이트 (10.9 g, 48.1 mmol)의 용액을 한꺼번에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반하고, DMF (20 mL) 중 3-메르캅토-3-메틸부탄-1-올 (4.4 mL, 36 mmol)의 용액을 함유하는 2 L 환저 플라스크에 한꺼번에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 30분 동안 교반한 다음에, 셀라이트-S를 통해 여과하였다. 생성물을 동일한 양의 에틸 아세테이트와 물에 분배하였다. 유기 추출물을 분액 깔대기에서 증류수로 세척한 후에, 조 생성물을 회전 증발에 의해 농축하였다. 에틸 아세테이트 : 헥산 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물 **110** (5.6 g, 26%)을 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 7.67-7.70 (m, 4H), 7.37-7.47 (m, 6H), 4.81 (s, 2H), 3.81 (t, *J* = 6.73 Hz, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.21 Hz, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.55, 2H), 1.90 (t, *J* = 6.95 Hz, 2H), 1.58-1.77 (m, 4H), 1.34 (s, 6H), 및 1.07 (s, 9H) ppm. 합성은 도 53에 예시되어 있다.

[0369] 실시예 42**[0370] 화합물 111의 합성:**

[0371] 자기 교반 막대를 구비한 500 mL 환저 플라스크를 화합물 **110** (5.1 g, 10.36 mmol), 무수 피리딘 (100 mL) 및 1,1'-카르보닐디이미다졸 (CDI) (3.36 g, 20.7 mmol)로 질소 분위기 하에 채웠다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하고 무수 피리딘 (50 mL) 중 2,2'-(에틸렌디옥시)비스(에틸아민) (7.6 mL, 51.8 mmol)의 용액에 부었다. 1시간 동안 교반을 계속하고 휘발성 물질을 회전 증발에 의해 제거하였다. 생성된 조 물질을 (CH₂Cl₂ 중 0-15% 메탄올)을 사용하여 실리카겔 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 **111** (4.4 g, 65% 수율)을 제공하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 7.63-7.68 (m, 4H), 7.34-7.44 (m, 6H), 4.76 (s, 2H), 4.17 (t, *J* = 7.07 Hz, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.16 Hz, 2H), 3.60 (s, 4H), 3.49-3.51 (m, 6H), 3.31-3.39 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 1.9 (t, *J* = 7.06 Hz, 2H), 1.57-1.73 (m, 4H), 1.31 (s, 6H) 및 1.03 (s, 9H) ppm. 합성은 도 53에 예시되어 있다.

[0372] 실시예 43**[0373] 화합물 113의 합성:**

[0374] 자기 교반 막대를 구비한 50 mL 환저 플라스크를 질소 분위기 하에 0℃에서 화합물 **111** (0.94 g, 1.42 mmol), 무수 THF (40 mL) 및 TBAF (THF 중 1 M 용액 1.6 mL, 1.6 mmol)로 채웠다. 반응 혼합물을 0℃에서 2.0시간 동안 교반하고, 그 동안 LC-MS는 TBDPS 보호기의 완전한 제거를 나타냈다. 회전 증발기 상에서 휘발성 물질을 제거한 후, 생성물을 실리카겔 상에서 플래시 크로마토그래피 (디클로로메탄 중 0-5% 메탄올 구배)에 의해 정제하여, 순수한 화합물 **112** (0.284 g, 47% 수율)를 수득하였다, MS (ES+) (M+H)에 대한 계산치 429.21, 관찰치 m/z 429.18.

[0375] 그 다음에, 화합물 **112** (0.217 g, 0.51 mmol)를 질소 분위기 하에 무수 아세트니트릴 (13 mL)에 용해시키고 0℃로 냉각하였다. DIPEA (97.7 μL, 0.56 mmol) 및 Fmoc-NHS 에스테르 (273.6 mg, 0.81 mmol)를 첨가하고 반응물을 2시간 동안 0℃에서 교반하였다. 헥산 중 50 내지 90% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여, 실리카겔 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 반-순수한 생성물을 생성하고, 이를 CH₂Cl₂ 중 2-5% 메탄올 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피를 통해 추가로 정제하여 화합물 **113** (0.245 g, 74% 수율)을 제공하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 7.70 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.59 (2H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.32 (2H, m), 7.24 (2H, m), 4.69 (2H, s), 4.35 (2H, m), 4.16 (1H, m), 4.09 (2H, m), 3.60-3.45 (12H, m), 3.36-3.26 (4H, m), 1.82 (2H, m), 1.60 (4H, m) 및 1.22 (6H, s) ppm. 합성은 도 53에 예시되어 있다.

[0376] 실시예 44**[0377] 화합물 114의 합성:**

[0378] 자기 교반 막대를 구비한 50 mL 환저 플라스크를 화합물 **7** (170 mg, 0.26 mmol), 무수 아세트니트릴 (15 mL), DSC (100 mg, 0.39 mmol) 및 DIPEA (68 μ L, 0.39 mmol)로 채웠다. 반응 혼합물을 3시간 동안 실온에서 교반하고 추가의 DSC (100 mg, 0.39 mmol) 및 DIPEA (68 μ L, 0.39 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 12시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 진행을 TLC에 의해 추적 관찰하였다 (출발 물질의 경우 R_f = 0.4, 생성물 R_f = 0.8, 9:1/에틸 아세테이트: 헥산 중). 휘발성 물질을 회전 증발에 의해 제거하고, 남은 잔류물을 헥산-에틸 아세테이트 구배를 사용하여 3-연속 실리카겔 칼럼을 통해 정제하여 화합물 **114** (121 mg, 59% 수율)를 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 7.81 (m, 2H), 7.63 (m, 2H), 7.42 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.43 (m, 2H), 4.37 (t, J = 7.65 Hz, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.18 (m, 2H), 3.67-3.55 (m, 10H), 3.39 (m, 4H), 2.84 (s, 4H), 1.88 (m, 4H), 1.73 (m, 4H), 및 1.32 (s, 6H) ppm. 합성은 도 53에 예시되어 있다.

[0379] **실시예 45**

[0380] **화합물 117의 합성:**

[0381] 자기 교반 막대를 구비한 500 mL 환저 플라스크를 화합물 **68** (7.3 g, 13.8 mmol, 밤새 테시케이터에서 미리 건조시킴), 무수 디클로로메탄 (70 mL), 시클로헥센 (1.54 mL, 15.2 mmol) 및 3-Å 분자체 (16.6 g)로 채우고 생성된 현탁액을 질소 분위기 하에 0°C에서 20분 동안 교반하였다. 그 다음에, SO_2Cl_2 (디클로로메탄 중 1 M 용액, 32.7 mL, 2.36 당량)를 첨가하고 생성된 혼합물을 1시간 동안 0°C에서 교반하였다. 반응 진행을 TLC (100% 에틸 아세테이트)를 통해 출발 물질의 소멸에 대해 모니터링하였다. 일단 SO_2Cl_2 활성화가 완료되면, DMF (120 mL) 중 $(\text{MeO})_3\text{BnSH}$ (7.4 g, 34.5 mmol, 2.5 당량)와 NaH (1.32 g, 33.12 mmol, 광유 중 60%)의 혼합물을 제조하고 한번에 신속히 첨가하였다. 반응물을 실온으로 서서히 가온하고 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 40°C에서 진공 중에 농축하였다. 헥산 중 0 내지 60% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 목적 화합물 **70** (4.2 g, 43.7% 수율)을 투명 오일로서 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.72 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.94 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 6.03 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.73 (m, 13H), 2.52 (m, 2H), 0.81 (s, 9H) 및 0.002 (d, 6H) ppm. 합성은 도 54에 예시되어 있다.

[0382] **실시예 46**

[0383] **화합물 71의 합성:**

[0384] 자기 교반 막대를 구비한 200 mL 환저 플라스크를 N_2 의 분위기 하에 화합물 **117** (2.0 g, 2.87 mmol) 및 디클로로메탄 (38 mL)으로 채우고 빙수조 상에서 냉각하였다. 이 혼합물에 디메틸디설피드 (1.3 mL, 14.36 mmol, 5 당량)를 첨가한 후, DMTSF (620 mg, 3.15 mmol, 1.1 당량)를 디클로로메탄 (20 mL) 중 용액으로서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온으로 서서히 가온하고 추가의 4시간 동안 교반하였다. 그 다음에 반응물을 NaHCO_3 (100 mL)의 포화 수성 용액을 첨가함으로써 켄칭하고, 디클로로메탄 (150 mL x 2) 및 에틸 아세테이트 (200 mL)로 추출하고 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공 중에 농축하였다. 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (헥산 중 0 내지 60% 에틸 아세테이트 구배로 용리시킴)에 의해 정제하여 목적 화합물 **71** (1.0 g, 62%)을 백색 분말로서 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.69 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.94 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 7.42 (m, 2H), 6.41 (m, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.77 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 0.81 (s, 9H) 및 0.00 (d, 6H) ppm. 합성은 도 54에 예시되어 있다.

[0385] **실시예 47**

[0386] **화합물 119의 합성:**

[0387] 화합물 **71** (562 mg, 1.25 mmol)을 N_2 의 분위기 하에 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 환저 플라스크에서 무수 THF (30 mL)에 용해시키고 빙수조 상에서 냉각하였다. 그 다음에 TBAF (THF 중 1 M 용액 1.5 mL, 1.5 당량)를 적가하고 2시간 동안 0°C에서 교반하였다. 반응 진행을 TLC에 의해 모니터링하였다 (100% 에틸 아세테이트 화합물 **119**의 경우 R_f = 0.2, 화합물 **71**의 경우 R_f = 0.6). 반응 완료시 메탄올 (5 mL)을 첨가하고, 반응물을 회전 증발기 상에서 농축하고 잔류물을 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (0 내지 60% 에틸 아세테이트 : 헥산 구배 15분에 뒤이어, 헥산 중 60% 에틸 아세테이트로 45분 동안 용리시킴)에 의해 정제하여 목적 화합물 **119**

(280 mg, 62% 수율)를 백색 분말로서 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.69 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.53 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.25 (m, 1H), 4.83 (m, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 2.99 (m, 1H), 2.43 (s, 3H) 및 2.41 (m, 1H) ppm.

[0388] 그 다음에 화합물 **119**를, 탈보호는 10% NH_4OH 로 실온에서 5시간 동안 처리함으로써 수행하여 -SSMe 절단을 최소화한 것을 제외하고는, 표준 트리포스페이트 합성 방법 (이하 참조)을 사용하여, 트리포스페이트 **120**으로 전환시켰다. 수율 25%; HRMS-ES $^+$: $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}_3\text{S}_2$ 에 대한 계산치, 582.976, 관찰치 m/z 582.975. 합성은 도 54에 예시되어 있다.

[0389] 실시예 48

[0390] 화합물 123의 합성:

[0391] 화합물 **121** (2.5 g, 4.94 mmol)을 밤새 데시케이터에서 건조시키고 N_2 의 분위기 하에 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 건조 환저 플라스크에서 무수 디클로로메탄 (25 mL)에 용해시켰다. 시클로헥센 (0.55 mL, 1.1 당량) 및 건조 3-Å 분자체 (6.0 g)를 반응 혼합물에 첨가하고 생성된 현탁액을 실온에서 20분 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 플라스크를 빙-염-수 조 상에 배치하여 온도를 영하가 되게 하고 SO_2Cl_2 (7.4 mL, 디클로로메탄 중 1 M 용액)를 시린지로써 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 1시간 동안 0°C에서 교반한 후 0.5 당량의 SO_2Cl_2 를 첨가하여 반응이 완료되도록 하였다. 반응 진행을 TLC를 통해 출발 물질의 소멸에 의해 모니터링하였다. 그 다음에, DMF (40 mL) 중 $(\text{MeO})_3\text{BnSH}$ (2.65 g, 12.35 mmol, 2.5 당량) 및 NaH (0.472 g, 11.85 mmol, 광유 중 60%)의 현탁액을 별도의 플라스크에서 제조하였다. 반응 혼합물을 합하여 실온으로 서서히 가온하고 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 유리 소결된 깔때기를 통해 여과하여 MS를 제거하고, 여액을 50 mM NaH_2PO_4 수성 용액 (50 mL)을 첨가함으로써 켄칭하고 디클로로메탄으로 추출하였다. 합해진 유기물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공 중에 농축하였다. 헥산:에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 목적 화합물 **123** (1.4 g, 42.2% 수율)을 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.29 (m, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.48 (m, 1H), 7.38 (m, 2H), 6.15 (m, 1H), 5.99 (m, 2H), 4.55 (m, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.69 (m, 9H), 2.52 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 0.80 (m, 9H) 및 0.01 (m, 6H) ppm. 합성은 도 55에 예시되어 있다.

[0392] 실시예 49

[0393] 화합물 124의 합성:

[0394] 화합물 **123** (1.4 g, 2.08 mmol)을 N_2 의 분위기 하에 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 200 mL 환저 플라스크에서 무수 디클로로메탄 (42 mL)에 용해시키고 0°C에서 냉각하였다. 이 혼합물에 디메틸디술피드 (0.93 mL, 10.4 mmol, 5 당량)를 첨가한 후, DMTSF (450 mg, 2.28 mmol, 1.1 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 2시간 동안 0°C에서 교반하였다. 반응물을 50 mM NaHCO_3 (100 mL)을 첨가함으로써 켄칭하고, 디클로로메탄 (100 mL x 2)으로 추출하고 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공 중에 농축하였다. 생성물을 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (디클로로메탄 중 0 내지 30% 에틸 아세테이트 구배로 용리시킴)에 의해 정제하여 목적 화합물 **124** (0.93 g, 83.1%)를 백색 분말로서 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.48 (m, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.37 (m, 2H), 6.00 (m, 1H), 4.73 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 2.44 (m, 1H), 2.33 (m, 3H), 2.25 (m, 1H), 0.76 (m, 9H) 및 0.01 (m, 6H) ppm. 합성은 도 55에 예시되어 있다.

[0395] 실시예 50

[0396] 화합물 125의 합성:

[0397] 화합물 **124** (930 mg, 1.73 mmol)를 N_2 의 분위기 하에 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 100 mL 환저 플라스크에서 무수 THF (52 mL)에 용해시키고 빙수조 상에서 0°C로 냉각하였다. 그 다음에 TBAF (THF 중 1 M 용액 3.5 mL, 1.5 당량)를 적가하고 4시간 동안 0°C에서 교반하였다. 반응 완료시 메탄올 (5 mL)을 첨가하여 반응물을

켄칭하고, 휘발성 물질을 감압하에 제거하고, 잔류물을 실리카겔 상에서 칼럼 크로마토그래피 (헥산 중 0 내지 75% 에틸 아세테이트 구배)에 의해 정제하여 목적 화합물 **125** (425 mg, 58% 수율)를 백색 분말로서 수득하였다. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.24 (m, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.51-7.42 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 6.09 (m, 1H), 4.80 (m, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.17 (m, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.40 (m, 3H) 및 2.41 (m, 1H) ppm. 합성은 도 55에 예시되어 있다.

[0398] 실시예 51

[0399] 화합물 126의 합성:

[0400] 그 다음에 화합물 **125**를 표준 트리포스페이트 합성 절차 (이하 참조)를 사용하여 트리포스페이트 **126**으로 전환시켰다; 최종 탈보호 단계는 10% NH_4OH 로 실온에서 2시간 동안 처리함으로써 수행하여 -SSMe 절단을 최소화하였다. 30% 수율, HR MS-ES $^+$: $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{P}_3\text{S}_2$ 에 대한 계산치, 558.965; 관찰치 m/z 558.964. 합성은 도 55에 예시되어 있다.

[0401] 실시예 52

[0402] 화합물 130의 합성:

[0403] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 **127** (2.0 g, 2.8 mmol)로 채우고 12시간 동안 고 진공하에 P_2O_5 상에서 데시케이터 상에서 건조시켰다. 디클로로메탄 (40 mL)을 N_2 하에 첨가하고 생성된 용액을 15분 동안 염-빙 조 상에서 냉각하였다. 시클로헥센 (0.34 mL, 3.4 mmol)을 첨가한 후, SO_2Cl_2 (3.4 mL, 디클로로메탄 중 1 M 용액, 3.4 mmol)를 적가하였다. 생성된 혼합물을 30분 동안 교반하고, 반응 진행을 TLC에 의해 모니터링하였다 (에틸 아세테이트 : 헥산 / 1:1, **127** R_f = 0.5, **128** R_f = 0.15, $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 분해된 생성물의 경우). 추가의 SO_2Cl_2 (3.1 mL, 디클로로메탄 중 1 M 용액, 3.1 mmol)를 적가하고 반응 혼합물을 또 다른 40분 동안 교반하여 화합물 **128**로의 완전한 전환을 보장하였다. 그 다음에 이 혼합물을 0°C에서 고 진공하에 농축하였다.

[0404] 그 다음에 무수 디클로로메탄 (40 mL)을 N_2 하에 잔류물에 첨가하고 혼합물을 모든 고체가 용해될 때까지 0°C에서 교반하였다. DMF (8 mL) 중 포타슘 *p*-톨루엔티오술포네이트 (0.96 g, 425 mmol)의 용액을 서서히 첨가하고 생성된 반응 혼합물을 1시간 동안 0°C에서 교반하였다. 혼합물을 먼저 감압 하에 0°C에서, 그 다음에 실온에서 농축하였다. 잔류물을 헥산 중 0 내지 100% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 칼럼 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 **130**을 크림 고체로서 수득하였다 (1.1 g, 51%; TLC R_f : 0.35, 에틸 아세테이트 : 헥산 2:1). MS (ES) m/z : 733 [$\text{M}+1^+$]. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 8.02 (br.s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.88 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.45 (m, 4H), 7.38 (m, 6H), 7.27 (m, 2H), 6.01 (t, $J=6.6$ Hz 1H), 5.46 & 5.38 (AB, $J_{\text{AB}}=12.1$ Hz, 2H), 4.97 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.74 (dd, $J=12.5$, 2.8 Hz, 1H), 3.55 (dd, $J=12.5$, 2.9 Hz, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.17 (m, 1H), 1.26 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.25 (d, $J=6.9$ Hz, 3H) ppm. 합성은 도 56에 예시되어 있다.

[0405] 실시예 53

[0406] 화합물 131의 합성:

[0407] 빙수조 상에서 냉각한 디클로로메탄 (무수, 40 mL) 중 **130** (1.1 g 1.5 mmol)의 용액에 N_2 하에 디메틸디술피드 (0.66 mL, 7.5 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 15분 동안 교반하고 NaSMe (0.23 g, 3.3 mmol)를 한번에 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 4시간 동안 0°C에서 교반하고, 반응 진행을 TLC에 의해 모니터링하였다 (에틸 아세테이트:헥산 /2:1, **130** R_f = 0.35, **131** R_f = 0.45). 혼합물을 셀라이트-S를 통해 여과하고 감압 하에 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 칼럼 (헥산 중 에틸 아세테이트 (0 ~ 100%)로 용리시킴) 상에서 정제하여 화합물 **131**을 백색 고체 (0.68 g, 75%; TLC R_f : 0.45, 에틸 아세테이트 /헥산 /2:1)로서 수득하였다. MS (ES) m/z : 625 [$\text{M}+1^+$]. ^1H NMR (CDCl_3): δ_{H} 8.02 (s, 1H), 8.00 (br. s, 1H), 7.45 (m, 4H), 7.39 (m, 4H), 7.28 (m, 2H), 6.24 (t, $J=6.2$ Hz, 1H), 5.05 (m, 1H), 4.99 & 4.94 (AB, $J_{\text{AB}}=11.4$ Hz, 2H), 4.27 (m, 1H), 3.99 (dd, $J=12.5$, 2.3 Hz, 1H), 3.86 (dd, $J=12.5$, 2.3 Hz, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.52 (s, 3H),

2.50 (m, 1H), 1.30 (d, $J=6.6$ Hz, 3H) 및 1.29 (m, 3H) ppm. 합성은 도 56에 예시되어 있다.

[0408] 실시예 54

[0409] 화합물 132의 합성:

[0410] 그 다음에 화합물 131을 표준 방법 섹션에 기재된 표준 트리포스페이트 합성 방법을 통해 트리포스페이트 132로 전환시켰다. 25% 수율; HRMS-ES⁺: C₁₂H₂₀N₅O₁₃P₃S₂에 대한 계산치, 598.971, 관찰치 m/z 598.970. 합성은 도 56에 예시되어 있다.

[0411] 실시예 55

[0412] 화합물 134의 합성:

[0413] 화합물 133 (4.47 g, 10.7 mmol) 및 (2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 (TPM-SH)을 2시간 동안 고 진공하에 건조시킨 다음에 12시간 동안 P₂O₅와 함께 데시케이터에 배치하였다. 화합물 133을 무수 CH₂Cl₂ (50.0 mL)에 용해시키고 시클로헥센 (10 mL, 96.6 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 -10℃에서 15분 동안 교반하였다. 그 다음에 CH₂Cl₂ 중 1 M SO₂Cl₂의 새로 제조된 용액 (25 mL, 26.75 mmol)을 첨가 깔대기를 통해 적가하고, 생성된 혼합물을 -10℃에서 1시간 동안 교반하였다. 조 온도를 10℃로 유지하면서 휘발성 물질을 진공 중에 제거하였다. 그 다음에 잔류물을 무수 DMF (52 mL)에 용해시키고 질소 분위기 하에 유지하였다.

[0414] 별도의 플라스크에서, (2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 (4 g, 18.7 mmol)을 질소 분위기 하에 무수 DMF (48 mL)에 용해시키고 0℃로 냉각하였다. 그 다음에 NaH (1.1 g, 26.8 mmol, 광유 중 60%)를 첨가하고 생성된 회색 슬러리를 0℃에서 15분 동안 교반하였다. 이를 전자의 용액에 한번에 첨가하고 반응물을 1시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 분액 깔대기에서 분배하였다 (150 : 300 mL/ 염수 : 에틸 아세테이트). 그 다음에 유기 층을 염수 (2x150 mL)로 세척하였다. 수성 층을 역-추출하였다 (4 x 50 mL 에틸 아세테이트). 합해진 유기 층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 제거하고 생성물을 실리카겔 칼럼 상에서 플래시 크로마토그래피 (칼럼: 120 g 레디셉Rf골드-ISCO, 구배 헥산 중 0-100% 에틸 아세테이트)에 의해 정제하였다. 목적 화합물 134를 백색 고체로서 22% 수율 (1.35 g)로 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.17 (s, 1H), 7.39 (d, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.12 (s, 2H), 4.71 (dd, 2H), 4.43 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 3.83 (m, 9H), 3.74(dd, 1H), 2.74 (ddd, 1H), 2.34 (ddd, 1H), 1.93 (m, 2H) 1.53 (s, 3H), 0.93 (m, 9H), 0.11(m, 6H) ppm. LCMS (ESI) [M-H⁺] 관찰치 581, R_f = 0.59 (4:6/헥산- 에틸 아세테이트). 그리고 화합물 135를 또한 부산물로서 22.5% 수율 (1.13 g)로 단리하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.55 (s, 1H), 7.41 (m, 1H), 6.12 (M, 3H), 4.76 (dd, 2H), 4.47 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.82 (m, 9H), 3.75(m, 1H), 2.29 (m, 2H), 2.04 (s, 3H) 및 1.91 (m, 2H) ppm. LCMS (ESI) [M-H⁺] 관찰치 467. 합성은 도 57에 예시되어 있다.

[0415] 실시예 56

[0416] 화합물 136의 합성:

[0417] 100 mL 환저 플라스크에서의 화합물 134 (3.6 g, 6.2 mmol)를 2시간 동안 고 진공하에 건조시킨 다음에 12시간 동안 P₂O₅와 함께 진공 데시케이터에 배치하였다. 무수 CH₂Cl₂ (96 mL) 및 디메틸디설포이드 (2.8 mL, 30.9 mmol)를 첨가하고, 반응물을 0℃로 냉각하였다. 그 다음에 디메틸(메틸티오)술포늄 테트라플루오로보레이트 (DMTSF, 1.34 g, 6.82 mmol)를 첨가하고 반응물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 250 mL 분액 깔대기에 옮기고 NaHCO₃의 0.1 M 수성 용액 90 mL로 중화하고, 에틸 아세테이트 (2 x 200 mL)로 추출하였다. 합해진 유기 층을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고 회전 증발기 상에서 농축하였다. 잔류물을 헥산 중 30-50% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 칼럼 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 목적 화합물 136을 백색 고체 (2.1 g, 77% 수율)로서 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 7.99 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 6.29(dd, 1H), 4.87 (dd, 2H), 4.49 (m, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.88 (m, 2H), 3.5 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.45 (dd, 1H), 2.04 (dd, 1H) 및 1.54 (s, 2H), 0.93 (m, 9H) 및 0.13 (m, 6H) ppm. LCMS (ESI)

[M-H]⁺ 관찰치 447.0. 합성은 도 57에 예시되어 있다.

[0418] 실시예 57

[0419] 화합물 137의 합성:

[0420] 2시간 동안 고 진공하에 건조시킨 100 mL 환저 플라스크에서의 화합물 **136** (2.16 g, 4.8 mmol)을, 무수 THF (40 mL)에 용해시킨 후 아세트산 (1.2 mL) 및 THF 중 TBAF (6.7 mL의 1 M 용액, 6.72 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 그리고 그 다음에 실온에서 추가의 2시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 진공 중에 제거하고 잔류물을 디클로로메탄 중 0-8% 메탄올 구배를 사용하여 40 g 레디셉Rf 골드 칼럼 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 목적 화합물 **137**을 백색 고체 (1.45 g, 90% 수율)로서 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.12 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 6.11(t, 1H), 4.87 (dd, 2H), 4.57 (m, 1H), 4.14 (q, 1H), 3.94 (dd, 1H), 3.83 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.4(m, 2H), 1.93 (s, 3H) ppm; LCMS (ESI) [M-H]⁺ 관찰치 333. 합성은 도 57에 예시되어 있다.

[0421] 실시예 58

[0422] 화합물 138의 합성:

[0423] 생성물 **138**은 표준 트리포스페이트 합성 방법 (이하 참조)을 사용하여 화합물 **137**의 인산화 후에 수득하였다. 40% 수율, HR LC-MS: C₁₂H₂₁N₂O₁₄P₃S₂에 대한 계산치, 573.965; 관찰치 m/z 573.964. 합성은 도 57에 예시되어 있다.

[0424] 실시예 59

[0425] 화합물 141의 합성:

[0426] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 화합물 **139** (2.23 g, 3.55 mmol), CH₂Cl₂ (20 mL), 3-Å 분자체 (3.5 g) 및 시클로헥센 (0.60 mL)으로 채웠다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 20분 동안 교반하였다. 반응물을 0℃로 냉각하고 SO₂Cl₂ (5.4 mL, CH₂Cl₂ 중 1 M, 1.5 당량)를 시린지를 통해 서서히 첨가하였다. 반응물을 0℃에서 1.5시간 동안 교반하고 추가의 1.8 mL의 SO₂Cl₂ (디클로로메탄 중 1 M 용액)를 첨가하고 0℃에서 40분 동안 교반을 계속하여 화합물 **140**으로의 완전한 전환을 보장하였다. 조 온도를 10℃에 가깝게 유지하면서 휘발성 물질을 감압하에 제거하였다. 생성된 고체를 20 mL의 무수 DMF에 재현탁시키고 질소 분위기 하에 유지하였다.

[0427] 별도의 플라스크에서, (2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 (1.98 g, 9.25 mmol)을 무수 DMF (15 mL)에 용해시키고 NaH (247 mg, 광유 중 60%, 6.17 mM)로 처리하여 암회색 슬러리를 생성하였다. 그 다음에, 화합물 **140** 용액을 한번에 첨가하고 반응물을 1시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 증류수 (150 mL)와 에틸 아세테이트 (150 mL)에 분배하였다. 유기 층을 증류수 (2 x 150 mL)로 추가로 세척하고 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 휘발성 물질을 감압하에 제거하고 잔류물을 헥산 중 80 내지 100% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 칼럼 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 목적 화합물 **141**을 백색 고체 (798 mg, 28%)로서 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.33 (s, 1H), 7.57 (m, 1H), 6.53 (m, 2H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.44 (m, 1H), 4.32 (m, 2H), 3.97 (m, 1H), 3.80-3.60 (m, 11H), 3.10 (m, 6H), 2.36 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 0.80 (m, 9H) 및 0.01 (m, 6H) ppm. LC-MS에 의해 추가로 확인함: (M-H)에 대한 관찰치 m/z 795.25. 합성은 도 58에 예시되어 있다.

[0428] 실시예 60

[0429] 화합물 142의 합성:

[0430] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 화합물 **141** (0.779 gm, 0.98 mmol, 12시간 동안 P₂O₅ 상에서 진공 건조시킴) 및 건조 THF (20.0 mL)로 채우고, 질소 분위기 하에 0℃로 냉각하였다. TBAF (1.17 mL, THF 중 1M 용액, 1.17 mmol)를 시린지를 통해 서서히 첨가하고 반응 혼합물을 0℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 추가의 TBAF (1 mL, THF 중 1M 용액, 1 mmol)를 첨가하고 0℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 그 다음에 반응 혼합물을 분액 깔대기에 옮기고 메탄올 (5 mL)을 첨가함으로써 킨칭하고, 증류수 (100 mL)를 첨가하고

반응물을 에틸 아세테이트 (2 x 100 mL)로 추출하였다. 유기물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 진공 중에 농축하였다. 헥산 중 80-100% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 상에서 잔류물을 칼럼 크로마토그래피하여 화합물 **142**를 백색 분말 (525 mg, 79%)로서 수득하였다. ^1H NMR (메탄올- d_4): δ_{H} 8.33 (s, 1H), 7.19 (m, 1H), 6.06(m, 2H), 6.03 (m, 1H), 4.72 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.75 (m, 9H), 3.16 (m, 6H), 2.80 (m, 1H) 및 2.28 (m, 1H) ppm; LC-MS: M-H 관찰치 m/z 680.0. 합성은 도 58에 예시되어 있다.

[0431] 실시예 61

[0432] 화합물 143의 합성:

[0433] 표준 방법 섹션에 기재된 표준 트리포스페이트 합성 절차를 통해 화합물 **142**로부터 화합물 **143**을 합성하였다. 수율 65%, LRMS-ES $^-$: $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_3\text{S}$ -에 대한 계산치, 768.09; 관찰치 m/z 768.54 (M-H). 합성은 도 58에 예시되어 있다.

[0434] 실시예 62

[0435] 화합물 144의 합성:

[0436] 50 mL 코니칼 튜브(conical tube)를 화합물 **143** (HPLC 등급 수 중 5.25 mM 용액 3.80 mL, 20 μmol) 및 pH 4.65 아세테이트 완충제 (4.75 mL)로 채우고, pH 4.65 아세테이트 완충제 중의 새로 제조된 DMTSF (80 mM) 용액 9.0 mL과 신속히 배합하였다. 생성된 혼합물을 2시간 동안 실온에서 진탕하고 NaHCO_3 의 포화 수성 용액 (2 mL)을 첨가함으로써 켄칭하였다. 생성물을 제조용 HPLC (칼럼: 30x250mm C_{18} 선파이어(Sunfire), 방법: 0 내지 2.0분 100% A, 뒤이어 70분에 걸쳐 50%B, 유량: 25 mL/분, A = 50 mM TEAB, B = 아세토니트릴) 상에서 즉시 정제하였다. 적절한 분획을 동결 건조시키고 HPLC 등급 수에 용해시킨 후에 합하여 23.4 μmol 의 화합물 **144** (73% 수율)를 제공하였다. LRMS-ES $^-$: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{P}_3\text{S}_2$ -에 대한 계산치, 634.00, m/z 관찰치 634.42, (M-H)의 경우. 합성은 도 58에 예시되어 있다.

[0437] 화합물 **144**를 표준 방법 섹션에 기재된 절차에 따라 염료 표지된 생성물 (**76**)로 전환시켰다 (도 59). 화합물 **146**을 두 단계로 75% 수율로 수득하였다, LRMS-ES $^+$: $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{19}\text{P}_3\text{S}_4$ 에 대한 계산치, 1090.20, m/z 관찰치 1090.24, (M+H)의 경우. **146**으로부터 화합물 **76**을 50-70% 수율로 수득하였다, HRMS-ES $^-$: $\text{C}_{67}\text{H}_{86}\text{N}_9\text{O}_{23}\text{P}_3\text{S}_4$ 에 대한 계산치, 1605.393; 관찰치 m/z 1605.380, (M-H)의 경우.

[0438] 실시예 63

[0439] 화합물 150의 합성:

[0440] 250 mL 환저 플라스크를 화합물 **148** (3.0 g, 4.58 mmol), 25 mL 건조 CH_2Cl_2 , 3-Å 분자체 (5.0 g) 및 시클로헥센 (0.55 mL, 5.4 mmol)으로 채웠다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 10분 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 플라스크를 빙조 상에 배치하고, SO_2Cl_2 (6.8 mL, CH_2Cl_2 중 1M, 1.5 당량)를 시린지를 통해 서서히 첨가하고, 반응물을 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 추가의 0.5 당량의 SO_2Cl_2 를 첨가하여 화합물 **149**로의 완전한 전환을 보장하였다. 온도를 10°C에 가깝게 유지하면서 진공하에 휘발성 물질을 제거하였다. 생성된 고체를 20 mL의 건조 DMF에 재현탁시키고 질소 분위기 하에 유지하였다.

[0441] 별도의 플라스크에서, (2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 (2.45 g, 11.44 mmol)을 질소 분위기 하에 건조 DMF (30 mL)에 용해시키고, NaH (274.5 mg, 실리콘 오일 중 60%)로 처리하여 회색 슬러리를 생성하였다. 여기에, 화합물 **149**를 한꺼번에 첨가하고 반응물을 질소 분위기 하에 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 셀라이트®-S를 통해 여과하고 에틸 아세테이트 (100 mL)로 세척하였다. 에틸 아세테이트 용액을 증류수 (2 x 100 mL)로 세척하고, 유기 추출물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 진공 중에 농축하고 헥산 중 20 내지 50% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 칼럼 상에서 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 목적 화합물 **150**을 백색 고체 (1.2 g, 32% 수율, R_f : 0.4, 헥산:에틸 아세테이트 /3:2)로서 수득하였다. ^1H

NMR (CDCl₃): δ_H 8.13 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 6.12 (m, 1H), 6.00 (s, 2H), 4.62 (m, 2H), 4.31 (m, 3H), 4.00 (m, 1H), 3.82-3.60 (m, 13H), 2.39 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 0.78 (m, 9H), 및 0.01 (m, 6H) ppm. 합성은 도 60에 예시되어 있다.

[0442] 실시예 64

[0443] 화합물 151의 합성:

[0444] 화합물 150 (1.2 g 1.46 mmol)을 밤새 데시케이터에서 P₂O₅와 함께 고 진공하에 건조시키고 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 플라스크에서 30 mL의 무수 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 여기에 디메틸디술포드 (0.657 mL, 7.3 mmol)를 첨가하고, 반응 플라스크를 빙조 상에 배치하였다. 그 다음에 디메틸(메틸티오)술포늄 테트라플루오로보레이트 (DMTSF, 316 mg, 1.1 당량)를 첨가하고 0°C에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 250 mL 분액 깔대기에 옮기고 50 mL의 NaHCO₃의 0.1M 수성 용액으로 중화하고, CH₂Cl₂ (2 x 50 mL)로 추출하였다. 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키 회전 증발에 의해 농축하였다. 조 생성물을 헥산 중 80-50% 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 실리카겔 칼럼 상에서 정제하여 0.82 g의 화합물 151 (82% 수율, R_f = 0.5, 헥산:에틸 아세테이트 /3:2)를 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.15 (m, 3H), 7.42 (m, 1H), 7.35 (m, 2H), 6.11 (m, 1H), 4.80-4.65 (m, 2H), 4.34 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.10 (m, 1H), 3.83-3.67 (m, 2H), 2.49 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.90 (m, 1H), 0.78 (m, 9H), 및 0.10 (m, 6H) ppm. 합성은 도 60에 예시되어 있다.

[0445] 실시예 65

[0446] 화합물 152의 합성:

[0447] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 화합물 151 (0.309 g, 0.45 mmol), 및 10.0 mL 건조 THF (10.0 mL)로 채우고 질소 분위기 하에 빙조 상에 배치하였다. TBAF (0.72 mL, THF 중 1 M 용액, 0.72 mmol)를 시린지를 통해 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 3시간 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 분액 깔대기에 옮기고 NaHCO₃의 0.5 M 수성 용액 (50 mL)으로 켄칭하였다. 그 다음에, 생성된 혼합물을 에틸 아세테이트 (2 x 100 mL)로 추출하고 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 생성물 152를 구매 7:3 내지 2:3 헥산:에틸 아세테이트를 사용하여 실리카겔 칼럼 상에서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 후 76% 수율 (196 mg, R_f = 0.3, 헥산:에틸 아세테이트 /1:1)로 백색 분말로서 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃): δ_H 8.40 (s, 1H), 8.25 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.52 (m, 2H), 6.21 (m, 1H), 4.90-80 (m, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.40 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.05-3.85 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.50 (s, 3H) 및 2.31 (m, 1H) ppm. 합성은 도 60에 예시되어 있다.

[0448] 실시예 66

[0449] 화합물 153의 합성:

[0450] 생성물 153을 표준 트리포스페이트 합성 방법 (이하 참조)을 사용하여 화합물 152의 인산화 후 30% 수율로 수득하였다 (LC-MS: C₁₄H₂₃N₄O₁₃P₃S₂에 대한 계산치, 610.98; 관찰치 m/z 611.11 (M-H)). 이를 표준 방법 섹션에 기재된 절차에 따라 염색 표지된 생성물 (72)로 추가로 전환시켰다 (도 61). 화합물 155는 두 단계로 49% 수율로 수득하였고, 화합물 72는 60-85% 수율로 수득하였다, HRMS-ES⁻: C₅₃H₆₈N₈O₃₀P₃S₆에 대한 계산치, 1581.156 (M-H); 실측치 m/z 1582.160.

[0451] 실시예 67

[0452] 화합물 159 & 160의 합성:

[0453] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 화합물 157 (2.04 g, 2.39 mmol)로 채우고 12시간에 걸쳐 고 진공 상에서 건조시켰다. 반응 용기를 아르곤으로 플러싱한 후에, 13 mL 무수 CH₂Cl₂ 및 시클로헥산 (0.30 mL, 2.86 mmol)을 순차적으로 첨가하였다. 그 다음에 반응 플라스크를 빙-수-염 조 상에 배치하고 10분 동안 교반하여 혼합물을 0°C 미만으로 되게 하였다. SO₂Cl₂ (4.0 mL, CH₂Cl₂ 중 1M, 4.0 mmol)를 2분에 걸쳐 시린지를 통해 적가하고, 반응 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 추가의 0.8 당량의 SO₂Cl₂ (2.0 mL, 2.0 mmol)를 1

분에 걸쳐 적가하고 반응물을 0℃에서 추가의 ½시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 조 온도를 ~ 10℃로 유지하면서 진공 중에 휘발성 물질을 제거하였다. 생성된 고체를 15 mL의 건조 DMF에 재현탁시키고 아르곤 분위기 하에 유지하였다.

[0454] 별도의 100 mL 플라스크에서, (2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 (TMPM-SH, 1.27 g, 6.0 mmol, 밤새 진공 건조시킴)을 아르곤 분위기 하에 건조 DMF (16 mL)에 용해시키고 NaH (195 mg, 오일 중 60%, 4.88 mmol)로 처리하여 회색 슬러리 TMPMT-SNa 염을 생성하였다. 혼합물을 기체 형성이 진정될 때까지 교반하였다 (대략 10 분). 여기에, TMPMT-SNa 염을 한꺼번에 첨가하고 혼합물을 TLC (미세-후처리: 디클로로메탄 /물; 용매: 헥산: 에틸 아세테이트/1:1)가 완전한 전환을 확인해 줄 때까지 (1 h) 아르곤 분위기 하에 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 여과 깔대기에서 셀라이트®-S (10 g)를 통해 여과하고 생성물을 디클로로메탄 (100 mL)으로 용리시켰다. 그 다음에 디클로로메탄 용액을 물 (3x100 mL)로 세척하였다. 수성 층을 3x100 mL 디클로로메탄으로 추출하였다. 합해진 디클로로메탄 추출물을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 회전 증발에 의해 농축하였다. 그 다음에 이를 플래시 크로마토그래피 (칼럼: 100 g, 구배: 25% - 50% 헥산:에틸 아세테이트 5 CV, 그 다음에 50% EE 10 CV)에 의해 정제하였다.

[0455] 목적 화합물 **160**을 백색 발포체 (1.22 g, 51% 수율)로서 수득하였다. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ_H 10.63 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.3-7.5 (m, 8H), 7.20-7.3 (m, 2H), 6.40 (m, 1H), 6.15 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.50 (dd, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.81 (m, 11H), 3.3 (m, 4H), 2.7 (m, 1H), 1.05 (m, 8H), 0.8 (m, 9H) 및 0.11 (m, 6H) ppm. LCMS: 1019.371 Da. 합성은 도 62에 예시되어 있다.

[0456] 추가적으로, TBDMS-탈보호 생성물 **159**를 부산물로서 25% 수율 (0.48 g)로 수득하였다. R_f = 0.2/헥산: 에틸 아세테이트 /1:1. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ_H 10.63 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.3-7.5 (m, 8H), 7.20-7.3 (m, 2H), 6.40 (m, 1H), 6.15 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.50 (dd, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.81 (m, 11H), 3.5 (m, 1H), 3.3 (m, 4H), 2.7 (m, 1H), 및 1.04 (m, 8H) ppm. LCMS: 905.286 Da.

[0457] 실시예 68

[0458] 화합물 161의 합성:

[0459] 자기 교반 막대 및 고무 격막을 구비한 100 mL 환저 플라스크를 화합물 **160** (0.36 g, 0.35 mmol)으로 채우고 고 진공 상에서 12시간 동안 건조시켰다. 아르곤으로 플러싱한 후, 7 mL 건조 디클로로메탄 및 디메틸디실피드 (0.16 mL, 1.76 mmol)를 첨가하였다. 반응 플라스크를 빙조 상에 배치하고 10분 동안 교반하여 혼합물을 0℃가 되게 하였다. 그 다음에 디메틸(메틸티오)술폰늄 테트라플루오로보레이트 (DMTSP, 80 mg, 0.4 mmol)를 첨가하고 반응물을 0℃에서 TLC (미세-후처리: 디클로로메탄 /물; 용매: 헥산: 에틸 아세테이트/1:1)까지 교반하였다. 반응 혼합물을 250 mL 분액 깔대기에 옮기고, NaHCO₃의 0.1 M 수성 용액 50 mL로 중화하고 CH₂Cl₂ (3 x 50 mL)로 추출하였다. 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고 회전 증발에 의해 농축하였다. 조 생성물을 실리카겔 칼럼 (칼럼: 25 g, 구배: 10% - 50% 헥산:에틸 아세테이트 3 CV, 그 다음에 50% 에틸 아세테이트 5 CV) 상에서 정제하였다. 목적 화합물 **161**을 황색 발포체 (0.23 g, 74% 수율)로서 수득하였다. 합성은 도 62에 예시되어 있다.

[0460] 실시예 69

[0461] 화합물 162의 합성:

[0462] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 화합물 **161** (0.18 g, 0.20 mmol)로 채우고, 7.0 mL 건조 THF에 용해시키고 아르곤 분위기 하에 빙조 상에 배치하였다. 혼합물을 10분 동안 교반하여 혼합물이 0℃가 되게 하고 0.28 mL 아세트산을 첨가하였다. TBAF (THF 중 1 M, 0.47 mL, 0.47 mmol)를 1분에 걸쳐 시린지를 통해 적가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 0.5시간 동안 그리고 그 다음에 실온에서 1시간 동안 교반하였다. TLC (헥산:에틸 아세테이트/1:1)는 여전히 출발 물질을 나타냈다. 추가의 TBAF (THF 중 1 M, 0.47 mL, 0.47 mmol)를 1분에 걸쳐 시린지를 통해 적가하고 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 혼합물을 2 mL 메탄올로 켄칭하고 실온에서 10분 동안 교반하였다. 용매를 회전 증발에 의해 제거하고, 조 생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (칼럼: 10 g, 헥산: 에틸 아세테이트/ 1:1 내지 100%, 2 CV에 걸쳐, 그 다음에 100% 에틸 아세테이트, 20 CV에 걸쳐)에 의해 정제하여 화합물 **162**를 백색 발포체 (96 mg, 62%)로서

수득하였다. 합성은 도 62에 예시되어 있다.

[0463] 실시예 70

[0464] 화합물 163의 합성:

[0465] 탈보호 단계에서 AMA 또는 메탄올 암모니아를 수산화암모늄 대신에 사용한 것을 제외하고, 표준 트리포스페이트 합성 방법 (이하 참조)을 사용하여 화합물 162의 인산화 후에 화합물 163을 수득하였다. 이를 이하의 표준 절차에 따라 염료 표지된 생성물 78로 추가로 전환시켰다. 화합물 78을 화합물 165로부터 97% 수율로 수득하였다. HRMS-ES⁻ 계산치 $C_{67}H_{96}N_9O_{27}P_3S_6$ (M-H) 1743.395, 실측치 1743.390. 합성은 도 62에 예시되어 있다.

[0466] 실시예 71

[0467] 화합물 169의 합성:

[0468] 100 mL 환저 플라스크를 화합물 167 (3.120 g, 5.66 mmol), 30.0 mL 건조 CH_2Cl_2 , 3-Å 분자체 (5.0 g) 및 시클로헥산 (0.70 mL, 6.9 mmol)으로 채웠다. 생성된 혼합물을 질소 분위기 하에 실온에서 10분 동안 교반하였다. 그 다음에 반응 플라스크를 빙조 상에 배치하였다. 여기에, SO_2Cl_2 (8.5 mL, CH_2Cl_2 중 1M, 1.5 당량)를 시린지를 통해 서서히 첨가하고, 0°C에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음에, 추가의 4.0 mL의 1 M SO_2Cl_2 를 첨가하고 40분 동안 교반하여 화합물 168로의 완전한 전환을 보장하였다. 온도를 10°C에 가깝게 유지하면서 진공하에 휘발성 물질을 제거하였다. 생성된 고체를 20 mL의 건조 DMF에 재현탁시키고 질소 분위기 하에 유지하였다.

[0469] 별도의 플라스크에서, (2,4,6-트리메톡시페닐)메탄티올 (3.028 g, 14.15 mmol)을 질소 분위기 하에 건조 DMF (40 mL)에 용해시키고, NaH (566 mg, 오일 중 60%, 14.15 mM)로 처리하여 회색 슬러리를 생성하였다. 여기에, 화합물 168 용액을 한꺼번에 첨가하고 질소 분위기 하에 2.5시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 셀라이트®-S (20 g)를 통해 여과하고 에틸 아세테이트 (200 mL)로 세척하였다. 그 다음에 에틸 아세테이트 용액을 증류수 (3 x 200 mL)로 세척하고 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 회전 증발에 의해 농축하고, 120 g 레디셉Rf골드 (구배: 헥산:에틸 아세테이트 (7:3 내지 3:7)) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 목적 화합물 (169)을 백색 고체 (1.43 g, 35.5% 수율, R_f : 0.5, 헥산:에틸 아세테이트 /1:1)로서 수득하였다.

1H NMR ($CDCl_3$): δ_H 7.98 (m, 1H), 6.09 (m, 1H), 6.00 (m, 2H), 4.67-4.51 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.22 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 3.80-3.60 (m, 11H), 2.31 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 0.80 (m, 9H) 및 0.01 (m, 6H) ppm. 합성은 도 64에 예시되어 있다.

[0470] 실시예 72

[0471] 화합물 170의 합성:

[0472] 화합물 169 (1.43 g 1.99 mmol)를 12시간 동안 P_2O_5 상에서 고 진공하에 건조시키고 질소 기체 공급원 및 자기 교반 막대를 구비한 플라스크에서 무수 CH_2Cl_2 (25 mL)에 용해시켰다. 여기에 디메틸디설파이드 (0.89 mL, 9.88 mmol)를 첨가하고, 반응 플라스크를 빙조 상에서 교반하였다. 그 다음에 디메틸(메틸티오)술포늄 테트라플루오로보레이트 (DMTSF, 430 mg, 2.19 mmol)를 첨가하고 0°C에서 1.0시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 500 mL 분액 깔대기에 옮기고 $NaHCO_3$ 의 50 mM 수성 용액 100 mL로 켄칭하고, CH_2Cl_2 (2X 150 mL)로 추출하였다. 유기 부분을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고 회전 증발에 의해 농축하였다. 조 생성물을 헥산-에틸 아세테이트 (8:2 내지 3:7) 구배를 사용하여 실리카겔 칼럼 (80 g 레디셉Rf 골드) 상에서 정제하여 0.622 gm의 화합물 170 (54% 수율, R_f = 0.6, 헥산:에틸 아세테이트/1:1)을 수득하였다. 1H NMR ($CDCl_3$): δ_H 7.99 (brs, 1H, NH), 7.98 (s, 1H), 6.12 (m, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.19 (m, 2H), 4.06 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.60 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.88 (m, 1H), 0.78 (m, 9H), 및 0.10 (m, 6H) ppm. 합성은 도 64에 예시되어 있다.

[0473] 실시예 73

[0474] 화합물 171의 합성:

[0475] 자기 교반 막대를 구비한 100 mL 환저 플라스크를 화합물 170 (0.623 g, 1.06 mmol, 12시간 동안 P_2O_5 상에서

진공 건조시킴) 및 무수 THF (20.0 mL)로 채우고 질소 분위기 하에 빙조 상에 배치하였다. TBAF (1.27 mL, THF 중 1 M 용액, 1.27 mmol)를 시린지를 통해 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 1.5시간 동안 교반하고, 추가의 THF 중 1 M TBAF 용액 0.9 mL를 첨가하고 0°C에서 총 4시간 교반하였다. 그 다음에 반응 혼합물을 분액 깔대기에 옮기고 0.5 M NaHCO₃ 용액 (50 mL)으로 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 에틸 아세테이트 (2 X100 mL)로 추출하고 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 헥산 중 7:3 내지 3:7 에틸 아세테이트 구배를 사용하여 80 g 레디셉Rf 칼럼 상에서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 후에 생성물 **171**을 백색 분말로서 63% 수율 (311 mg)로 수득하였다. ¹H NMR (메탄올-d₄): δ_H 8.16 (s, 1H), 6.06 (m, 1H), 4.79 (m, 2H), 4.69 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 3.63 (m, 2H), 2.36 (m, 3H), 2.32 (m, 1H), 및 2.08 (m, 1H) ppm, LRMS-ES⁻: M-H 관찰치 m/z 468.0 Da. 합성은 도 64에 예시되어 있다.

[0476] **실시예 74**

[0477] **화합물 172의 합성:**

[0478] 표준 트리포스페이트 합성 방법을 통해 사용하는 화합물 **171**의 인산화 후 생성물 **172**를 58% 수율로 수득하였다. LRMS 계산치 C₁₄H₂₁N₃O₁₄P₃S₂⁻ (M-H), 611.97, 실측치 612.15. 화합물 **171**을 표준 방법 섹션에 기재된 표준 절차 (이하 참조)에 따라 염료 표지된 생성물 (**74**)로 추가로 정교화하였다 (도 65). 화합물 **174**를 두 단계로 74% 수율로 수득하였다, HRMS-ES⁻ 계산치 C₃₂H₅₅N₅O₂₁P₃S₄⁻ (M-H) 1066.15, 실측치 1066.42. 화합물 **74**를 62% 수율로 수득하였다, HRMS-ES⁻ 계산치 C₅₉H₈₀N₇O₂₅P₃S₄⁻ (M-H), 1507.330, 실측치 1507.325.

[0479] **실시예 75**

[0480] **트리포스페이트 합성의 표준 방법:**

[0481] P₂O₅ 상에서 고 진공하에 미리 건조시킨 뉴클레오시드 (160 μmol) 및 양성자 스폰지 (1.5 당량)를 N₂-분위기 하에 25 mL 배-형상 플라스크에서 트리메틸포스페이트 (0.8 mL)에 용해시키고 모든 고체가 완전히 용해될 때까지 20분 동안 교반하였다. 그 다음에 플라스크를 빙수조 상에 배치하여 반응물을 (-5 내지 0°C)가 되게 하였다. 그 다음에, POCl₃ (1.5 당량)을 시린지를 통해 한번에 첨가하고 반응물을 1시간 동안 교반하였다.

[0482] n-부틸암모늄-피로포스페이트 (0.36 g), n-Bu₃N (0.36 mL) 및 무수 DMF (1.3 mL)의 혼합물을 15 mL 코니칼 튜브에서 제조하여 농후한 슬러리를 생성하였다. 일단 완전히 용해되면, 이를 격렬하게 교반하는 혼합물에 한꺼번에 신속히 첨가하고 실온에서 15분 동안 교반하였다.

[0483] 그 다음에 반응 혼합물을 250 mL 환적 플라스크에서 100 mL의 0.1 M TEAB 완충제에 붓고 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 그 다음에 이를 25 mL까지 진공 중에서 농축하고 실온에서 8시간 동안 25 mL의 수산화암모늄 (28-30% NH₃ 함량)으로 처리하였다. 감압하에 대부분의 휘발성 물질을 제거한 후, 조 반응물을 0.1M TEAB 완충제 (30 mL)에 재현탁시키고 C18 제조용 - HPLC (30x250mm, C18 선파이어 칼럼, 방법: 0 내지 2분 100%A, 뒤이어 70분에 걸쳐 50%B, 유량 25 mL/분; A = 50 mM TEAB, B = ACN)에 의해 정제하였다. 목적 분획을 동결 건조시키고, HPLC 등급 수 (20 mL)에 용해시킨 후 합하였다. 이러한 반-순수한 생성물을 PL-SAX Prep 칼럼 상에서 이온 교환 HPLC (방법: 0 내지 5분 100%A, 그 다음에 70분에 걸쳐 70%B까지 선형 구배, 여기서 A = 물 중 15% 아세토니트릴, B = 15% 아세토니트릴 중 0.85 M TEAB 완충제)에 의해 추가로 정제하였다. 상기 기재된 바와 같이 C18 Prep HPLC에 의해 최종 정제를 수행하였다. 동결 건조 후에 뉴클레오시드 트리포스페이트를 20 - 65% 수율로 수득하였다.

[0484] **실시예 76**

[0485] **DMTSF를 사용하여 3'-OCH₂S-(2,4,6-트리메톡시페닐)메탄-dNTP를 3'-(OCH₂SSMe)-dNTP로 전환시키는 표준 방법:**

[0486] 50 mL 코니칼 튜브를 3'-OCH₂S-(2,4,6-트리메톡시페닐)메탄-dNTP (HPLC 등급 수 중 5.25 mM 용액 3.80 mL, 20 μmol) 및 pH=4.65 아세테이트 완충제 (5.20 mL)로 채우고, 9.0 mL의 DMTSF (pH=4.65 아세테이트 완충제 중 80 mM 용액)와 신속히 배합하였다. 생성된 혼합물을 2시간 동안 실온에서 진탕하고 반응물을 2.0 mL의 포화 NaHCO₃ 용액에 의해 켄칭하고, 30X250mm C18 선파이어 칼럼 상에서 prep-HPLC (방법: 0 내지 2.0분 100% A, 뒤

이어 70분에 걸쳐 50%B까지 선형 구배, 유량: 25 mL/분, A = 50 mM TEAB, B = 아세트오니트릴)에 의해 즉시 정제하였다. 목적 분획을 동결 건조시키고 HPLC 등급 수에 용해시킨 후에 합하여 뉴클레오티드에 따라 50-75% 수율의 3'-(OCH₂SSMe)-dNTP를 생성하였다. 3'-OCH₂S-(2,4,6-트리메톡시페닐)메탄-dNTP의 구조 예는 도 66에 예시되어 있다.

[0487] 실시예 77

[0488] NHS 활성화된 링커의 집합을 위한 표준 방법:

[0489] HPLC 등급 수 (2 mL)에 용해시킨 MeSSdNTP-PA (10 μ mol)를 Na₂HPO₄의 새로 제조된 0.5 M 수성 용액 (1 mL)으로 희석하였다. 코니칼 튜브에서, NHS-활성화된 링커 (NHS-A-Fmoc, 114, 35 mg, 2.5 당량)을 무수 DMF (2.0 mL)에 용해시켰다. 그 다음에 이를 MeSSdNTP-PA/ Na₂HPO₄ 용액에 한꺼번에 첨가하고 실온에서 8시간 동안 교반하였다.

[0490] 그 다음에 반응물을 0.1 M TEAB 완충제 (2.0 mL)로 희석하고 피페리딘 (0.6 mL)으로 처리하였다. 혼합물을 1시간 동안 실온에서 교반하고, 0.1 M TEAB (10 mL)로 추가로 희석하고 30X250mm C18 선파이어 칼럼 상에서 prep HPLC (방법: 0 내지 2.0분 100%A, 뒤이어 70분에 걸쳐 50%B까지 선형 구배, 유량: 25 mL/분, A = 50 mM TEAB, B = 아세트오니트릴)에 의해 신속히 정제하였다. 목적 분획을 동결 건조시키고 HPLC 등급 수에 용해시킨 후에 합하여 45-75% 수율의 MeSSdNTP-A-NH₂를 생성하였다.

[0491] 실시예 78

[0492] NHS 염료로 표지화하기 위한 표준 방법:

[0493] 2.0 mL의 HPLC 등급 수 중의 MeSSdNTP-A-NH₂ (4.55 μ mol)를 15 mL 코니칼 튜브에서 Na₂HPO₄ (0.8 mL의 0.5 M 수성 용액)로 희석하고, 1.4 mL의 무수 DMF 중 NHS-활성화된 염료 (2.5 당량)와 배합하였다. 반응 혼합물을 실온에서 8시간 동안 교반하고, 0.1 M TEAB 완충제 (40 mL)로 희석하고 30X250 mm C18 선파이어 칼럼 상에서 prep-HPLC (방법: 0 내지 5분 100%A, 뒤이어 70분에 걸쳐 50%B까지 선형 구배, 유량 25 mL/분)에 의해 정제하였다. 목적 분획을 동결 건조시키고 HPLC 등급 수에 용해시킨 후에 합하여 50-80% 수율의 표지된 생성물을 생성하였다.

[0494] 실시예 79

[0495] 핵염기에 절단가능한 링커 및 마커의 부착

[0496] 절단가능한 링커를 부착하는 데 사용되는 바람직한 모이어티 중 하나는 프로파르길 기반 또는 알릴 기반이다. 절단가능한 링커 및 염료를 부착하는 다른 수단이 또한 고려된다. 특히, 염료 절단 후 거의 없거나 전혀 없는 잔류 링커로 인한 염기 모이어티에의 부착이 특히 바람직하다. 전하를 지니지 않는 절단 후 잔류 링커로 인한 염기에의 부착이 또한 바람직하다. 이들 특징은 뉴클레오티드가 표지/염료의 절단 후 효소에 의해 핵산의 성장 가닥에 효율적으로 혼입되는 것을 보장하는 데 중요하다. 본 발명에 의해 고려되는 한 특정한 실시양태는 절단가능한 염료를 부착시키는 데 히드록시메틸 변형된 염기 모이어티의 사용을 포함한다. 이러한 화합물의 예가 도 71에 제시되어 있다. 도 72는 염료 및 3'-O 보호기의 절단 후 히드록시메틸 유도체의 구조식을 제시한다.

[0497] 실시예 80

[0498] 절단가능한 링커 및 3'-O 보호기의 절단

[0499] 여러 가지의 절단제를 사용하여 본 발명의 링커 및 보호기를 절단할 수 있다. 예를 들어, 여러 가지의 티올을 지니고 있는 화합물을 문헌 ("Thiol-Disulfide Interchange", Singh, R., and Whitesides, G.M., Sulfur-Containing Functional Groups; Supplement S, Patai, S., Eds., J. Wiley and Sons, Ltd., 1993. p633-658,) [15]에 기재된 바와 같이 사용할 수 있다. 특히 환원된 티올 기 pKa를 가진 화합물, 예를 들어 디티오부틸아민, DTBA를 사용하여 지방 및 효율적인 절단 수율을 달성할 수 있다 (Lukesh et al., J. Am. Chem. Soc., 2012, 134 (9), pp 4057-4059 [16]). 본 발명의 절단을 수행하는 데 사용될 수 있는 티올 보유 화합물의 예가 도 73에 제시되어 있다.

[0500] 본 발명의 디티오 말단기 및 링커를 절단하기에 적합한 또 다른 부류의 화합물은 포스핀이다 (Harpp et al., J. Am. Chem. Soc. 1968 90 (15) 4181-4182 [12], Burns et al., J. Org. Chem. 1991, 56, 2648-2650 [13], Getz et al., Analytical Biochemistry 273, 73-80 (1999) [14]). 본 발명의 디티오 기반 보호기 및 링커를 절단하

는 데 유용한 포스핀의 예는 다음을 포함한다: 트리페닐포스핀, 트리부틸포스핀, 트리스-히드록시메틸-포스핀 (THMP), 트리스-히드록시프로필-포스핀 (THPP), 트리스-카르보에톡시-포스핀 (TCEP). 특정 경우에 링커 또는 3'-보호기 중 어느 하나를 선택적으로 절단할 수 있는 것이 바람직할 수 있다. 이는 절단 시약의 선택 뿐만 아니라 보호기 및 링커를 설계함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 3'-아지도메틸 에테르 보호기 및 디설피드 링커 보유 뉴클레오티드의 조합을 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 이 경우에, 디설피드 브릿지의 선택적 절단은 티올 기반 절단 시약을 사용하여 완수할 수 있고 3'-아지도메틸 에테르 보호기의 제거는 포스핀 예컨대 TCEP를 사용함으로써 달성될 수 있다. 이러한 절차의 예는 도 74, 도 75, 및 도 76에 예시되어 있다. 도 74는 실시되는 화학 반응의 반응식 및 형성된 화합물의 구조를 제시하고; 도 75는 각각의 단계에서 수집된 HPLC 크로마토그램을 제시하고 도 76은 각각의 피크로부터 추출된 흡수 스펙트럼을 제시한다. 단계 A) 표시된, 3'-O-보호된 뉴클레오티드는 하나의 피크 (1) 및 뉴클레오티드 (280 nm; 프로파르길 화합물에 대한 최대치가 280-290 nm로 이동됨을 주목) 및 염료 (575 nm) 둘 다에서 흡수를 나타낸다. 단계 B) DTT 처리는 염료 (575 nm)의 흡수 피크를 가지며 더 서서히 이동하는 (보다 소수성) 피크 2를 생성하고 (278 nm) 흡수를 가지며 보다 친수성 특성으로 인해 보다 신속히 이동하는 피크 3을 생성한다. 단계 C) TCEP를 사용한 추가적인 처리는 3'-OH 보호기의 손실과 일치하는 훨씬 더 낮은 체류 시간에서 염료 없이 그리고 278에서 흡수 최대치를 갖는 피크 4를 생성한다. 절단된 염료는 추가적인 피크 (5, 6)로 분리되나 두 피크 모두 동일한 흡수성을 갖는다.

[0501]

절단의 또 다른 예는 도 77 및 도 78에 제시되어 있다. 도 77은 3' 말단 상에 디티오 기반 보호기 및 디티오 기반 링커를 지니고 있는 뉴클레오티드를 사용하는 절단 반응식을 제시한다. 이 도면은 절단 반응은 한 단계 또는 2 단계 공정으로서 수행될 수 있음을 제시한다. 도 78은 여러 가지의 절단제: 디티오숙신산, L-시스테인, DTT 및 시스테아민을 사용하여 수행된 절단 실험의 결과를 제시한다. 도 78 (A)는 절단제: 디티오숙신산, L-시스테인, DTT 및 시스테아민과 함께 인큐베이션한 후 반응 혼합물 및 출발 물질에 대해 생성된 RP-HPLC 크로마토그램을 제시한다. 도 78 (B)는 L-시스테인, DTT 및 시스테아민의 경우에 링커 및 3'-보호기 둘 다의 완전한 절단, 및 디티오숙신산의 경우에 3'-O-보호기의 선택적 절단을 나타내는 반응 혼합물의 동정된 조성을 제시한다. 이는 보호기, 링커의 구조, 및 절단제의 성질 (즉, 다양한 입체 장애의 정도 및 SH 기의 pKa)를 선택함으로써 선택성이 달성될 수 있음을 나타낸다. 이들에 더하여, 여러 가지의 적합한 절단제 예컨대 비스(2-메르캅토에틸)술폰 (BMS) 및 N,N'-디메틸-N,N'-비스(메르캅토아세틸)히드라진 (DMH)가 사용될 수 있다 (Singh et al., Bioorg. Chem., 22, 109-115 (1994) [17]. 반응은 셀렌올을 포함시킴으로써 추가로 촉매될 수 있다 (Singh et al. Anal Biochem. 1995 Nov 20;232(1):86-91 [18]). 수소화붕소, 예컨대 수소화붕소나트륨 (Stahl et al., Anal. Chem., 1957, 29 (1), pp 154-155 [19]) 뿐만 아니라 아스코르브산 (Nardai et al., J. Biol. Chem. 276, 8825-8828 (2001) [20])도 이러한 목적에 또한 사용할 수 있다. 게다가, 디설피드 및 티오리덕타제와 같은 디설피드 결합의 절단을 위한 효소적 방법이 또한 널리 공지되어 있고 본 발명의 화합물과 함께 사용될 수 있다 (Holmgren et al., Methods in Enzymology, Volume 252, 1995, Pages 199-208 [21]).

[0502]

실시에 81

[0503]

스캐빈저

[0504]

사용되는 전달제에 따라서, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 절단 반응이 완료된 후 과량의 절단제를 제거할 스캐빈저제를 선택할 필요가 있다. 예를 들어, 티올 보유 절단제의 경우, 자유 SH 기와 반응할 수 있는 스캐빈저가 사용될 수 있다. 예를 들어, 알킬화제 예컨대 아이오도아세트아미드 또는 말레이미드 유도체를 사용할 수 있다 (본원에 참조로 포함된, 미국 특허 번호 8,623,598 [47]). 수소화붕소의 경우, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 케톤 보유 화합물, 예를 들어 레불린산 또는 유사한 화합물을 사용할 수 있었다. 마지막으로, 비반응성 중에 대해 과량의 절단제를 산화시키는 산화 시약, 예를 들어 퍼아이오테이트를 또한 사용할 수 있었다 (Molecules 2007, 12(3), 694-702 [48]).

[0505]

실시에 82

[0506]

모듈형 합성

[0507]

본 발명의 표시된 뉴클레오티드는 합성의 수개의 단계를 필요로 하며 상이한 염기에 여러 가지의 염료를 연결하는 것을 수반한다. 단계별 공정보다는 모듈형 방식으로 링커 및 염기 부착을 수행할 수 있는 것이 바람직하다. 모듈형 접근법은 한쪽 말단 상에 보호기를 그리고 다른 한쪽 말단 상에 활성화된 기를 가진 링커 모이어티를 사전 구축하는 것을 수반한다. 그 다음에 이러한 사전 구축된 링커를 사용하여 프로파르길아민 뉴클레오티드에 커플링시킬 수 있으며, 차폐된 아민 기를 탈보호한 다음에, 활성화된 염료를 커플링시킬 수 있다. 이것은 단계별 합성과 비교하여 더 적은 단계 및 더 높은 수율의 이점을 갖는다. 예를 들어, 도 13에서의 화합물 32는 활

성화된 반응성 기 (디숙신이미딜 카르보네이트) 및 차폐된/보호된 아민 (Fmoc)을 가진 절단가능한 관능기를 포함하는, 미리 활성화된 링커의 예이다. 프로파르길아민 뉴클레오타이드 상에 자유 아민에 커플링 후 보호기는 예를 들어 염기 (수성 암모니아, 피페리딘)로 처리하여 편리상 제거할 수 있고 활성화된 (NHS) 염료 분자에 커플링시킬 수 있다.

[0508] 실시예 83

[0509] 본 발명의 링커를 시험하여 그의 소수성을 측정하였다. n-옥탄올과 물 로그 사이의 그의 분배 계수의 대수 $\log(c_{\text{옥탄올}}/c_{\text{물}})$ 인 화합물의 logP 값은 화합물의 친수성 (또는 그의 결여)의 널리 확립된 척도이다 [49]. 낮은 친수성 그리고 따라서 높은 logP 값은 불량한 흡수 또는 투과를 유발한다. 이 경우에, logP 값은 예측적인 소프트웨어를 사용하여 계산하였고, 이하의 표는 결과를 나타내는데, 이는 링커 (예컨대 도 25에서의 것들)는 소수성 링커이며, 한편 일부 상업적으로 사용되는 링커는 친수성임을 나타내는 것이다.

링커	분자식	LogP			
		오시리스*	캠드로우	폴린에스피.**	마빈스케치
레거시	C8H16N2O2S2	0.60	0.49	-0.14	-0.76
신규	C22H43N3O8S2	2.57	2.09	1.30	0.71
ILMN PEG11	C43H74N6O18	-1.80	-1.80	-2.37	-1.30
ILMN PEG23	C63H114N6O28	-2.74	-3.60	-4.34	-1.77

[0510]

[0511] 비록 본 발명이 이들 바람직한 실시양태에 관해서 기재되었지만, 다른 실시양태들이 동일한 결과를 달성할 수 있다. 본 발명의 변형 및 수정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게는 자명할 것이며, 첨부된 청구범위에서 모든 이러한 수정 및 등가물을 포함하도록 의도된다. 상기 인용된 모든 출원, 특허 및 간행물, 및 상응하는 출원의 전체 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0512] 참고문헌:

- [0513] 1. Metzker, M. L. (2010) "Sequencing Technologies - the Next Generation," *Nat. Rev. Genet.* 11(1), 31-46.
- [0514] 2. Fuller, C. W. *et al.* (2009) "The Challenges of Sequencing by Synthesis," *Nat. Biotechnol.* 27(11), 1013-1023.
- [0515] 3. Hiatt, A. C. and Rose, F. "Enzyme Catalyzed Template-Independent Creation of Phosphodiester Bonds Using Protected Nucleotides," 미국 특허 5,990,300, 출원 08/300,484, 출원일 9/2/1994. (허여일 11/23/1999).
- [0516] 4. Buzby, P. R. "Nucleotide Analogs," 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007-0117104 A1, 출원 11/295,406, 출원일 12/5/2005. (공개일 5/24/2007).
- [0517] 5. Chen, F. *et al.* (2013) "The History and Advances of Reversible Terminators Used in New Generations of Sequencing Technology," *Genomics Proteomics Bioinformatics* 11(1), 34-40.
- [0518] 6. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1995) "A Single Residue in DNA Polymerases of the Escherichia coli DNA Polymerase I Family Is Critical for Distinguishing between Deoxy- and Dideoxyribonucleotides," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(14), 6339-6343.
- [0519] 7. Perler, F. B. and Southworth, M. W. "Thermostable Dna Polymerase from 9on-7 and and Method for Producing the Same," 미국 특허 5,756,334, 출원 08/271,364, 출원일 7/6/1994. (허여일 5/26/1998).
- [0520] 8. Southworth, M. W. *et al.* (1996) "Cloning of Thermostable DNA Polymerases from Hyperthermophilic Marine Archaea with Emphasis on Thermococcus Sp. 9 Degrees N-7 and Mutations Affecting 3'-5' Exonuclease Activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(11), 5281-5285.
- [0521] 9. Evans, S. J. *et al.* (2000) "Improving Dideoxynucleotide-Triphosphate Utilisation by the Hyper-Thermophilic DNA Polymerase from the Archaeon Pyrococcus Furiosus," *Nucleic Acids Res.* 28(5), 1059-1066.
- [0522] 10. Arezi, B. *et al.* (2002) "Efficient and High Fidelity Incorporation of Dye-Terminators by a Novel

Archaeal DNA Polymerase Mutant," *J. Mol. Biol.* 322(4), 719-729.

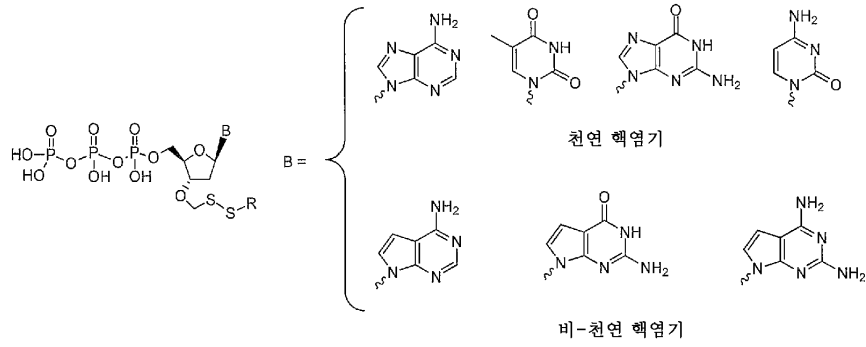
- [0523] 11. Smith, G. P. *et al.* "Modified Polymerases for Improved Incorporation of Nucleotide Analogues," WIPO PCT 특허 공개 번호 WO/2005/024010, 출원 PCT/GB2004/003891, 출원일 9/10/2004. (공개일 3/17/2005).
- [0524] 12. Harpp, D. N. *et al.* (1968) "Organic Sulfur Chemistry. I. The Disulfide-Phosphine Reaction. Desulfurization with Tris(Diethylamino)Phosphine," *J. Am. Chem. Soc.* 90(15), 4181-4182.
- [0525] 13. Burns, J. A. *et al.* (1991) "Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine," *J. Org. Chem.* 56(8), 2648-2650.
- [0526] 14. Getz, E. B. *et al.* (1999) "A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry," *Anal. Biochem.* 273(1), 73-80.
- [0527] 15. Singh, R. and Whitesides, G. M. (1993) "Thiol-Disulfide Interchange," in *Sulfur-Containing Functional Groups* (Supplement, S. and Patai, S., Eds.), pp 633-658, J. Wiley and Sons, Ltd.
- [0528] 16. Lukesh, J. C. *et al.* (2012) "A Potent, Versatile Disulfide-Reducing Agent from Aspartic Acid," *J. Am. Chem. Soc.* 134(9), 4057-4059.
- [0529] 17. Singh, R. and Whitesides, G. M. (1994) "Reagents for Rapid Reduction of Native Disulfide Bonds in Proteins," *Bioorg. Chem.* 22, 109-115.
- [0530] 18. Singh, R. and Kats, L. (1995) "Catalysis of Reduction of Disulfide by Selenol," *Anal. Biochem.* 232(1), 86-91.
- [0531] 19. Stahl, C. R. and Siggia, S. (1957) "Determination of Organic Disulfides by Reduction with Sodium Borohydride," *Anal. Chem.* 29(1), 154-155.
- [0532] 20. Nardai, G. *et al.* (2001) "Protein-Disulfide Isomerase- and Protein Thiol-Dependent Dehydroascorbate Reduction and Ascorbate Accumulation in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum," *J. Biol. Chem.* 276(12), 8825-8828.
- [0533] 21. Holmgren, A. and Bjornstedt, M. (1995) "[21] Thioredoxin and Thioredoxin Reductase," in *Methods in Enzymology*, pp 199-208, Academic Press.
- [0534] 22. Chen, C.-Y. (2014) "DNA Polymerases Drive DNA Sequencing-by-Synthesis Technologies: Both Past and Present," *Frontiers in Microbiology* 5.
- [0535] 23. Ju, J. *et al.* "Four-Color Dna Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators," 미국 특허 7,883,869, 출원 12/312,903, 출원일 7/9/2009. (허여일 2/8/2011).
- [0536] 24. Ju, J. *et al.* "Massive Parallel Method for Decoding DNA and RNA," 미국 특허 8,088,575, 출원 12/804,284, 출원일 7/19/2010. (허여일 1/3/2012).
- [0537] 25. Ju, J. *et al.* "Chemically Cleavable 3'-O-Allyl-Dntp-Allyl-Fluorophore Fluorescent Nucleotide Analogues and Related Methods," 미국 특허 8,796,432, 출원 12/084,457, 출원일 4/30/2008. (허여일 8/5/2014).
- [0538] 26. Balasubramanian, S. "Polynucleotide Sequencing," 미국 특허 6,833,246, 출원 10/113,221, 출원일 3/29/2002. (허여일 12/21/2004).
- [0539] 27. Balasubramanian, S. *et al.* "Labelled Nucleotides," 미국 특허 7,785,796, 출원 12/460,741, 출원일 7/23/2009. (허여일 8/31/2010).
- [0540] 28. Milton, J. *et al.* "Labelled Nucleotides," 미국 특허 7,414,116, 출원 10/525,399, 출원일 2/23/2005. (허여일 8/19/2008).
- [0541] 29. Metzker, M. L. *et al.* (1994) "Termination of DNA Synthesis by Novel 3'-Modified-Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphates," *Nucleic Acids Res.* 22(20), 4259-4267.

- [0542] 30. Ju, J. *et al.* (2006) "Four-Color DNA Sequencing by Synthesis Using Cleavable Fluorescent Nucleotide Reversible Terminators," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(52), 19635-19640.
- [0543] 31. Ruparel, H. *et al.* (2005) "Design and Synthesis of a 3'-O-Allyl Photocleavable Fluorescent Nucleotide as a Reversible Terminator for DNA Sequencing by Synthesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(17), 5932-5937.
- [0544] 32. Bergmann, F. *et al.* "Compound for Sequencing by Synthesis," 미국 특허 출원 공개 번호 US 2015-0140561 A1, 출원 14/542,980, 출원일 11/17/2014. (공개일 5/21/2015).
- [0545] 33. Kwiatkowski, M. "Compounds for Protecting Hydroxyls and Methods for Their Use," 미국 특허 출원 공개 번호 US 2002-0015961 A1, 출원 09/952,719, 출원일 9/12/2001. (공개일 2/7/2002).
- [0546] 34. Gardner, A. F. *et al.* (2012) "Rapid Incorporation Kinetics and Improved Fidelity of a Novel Class of 3'-Oh Unblocked Reversible Terminators," *Nucleic Acids Res.* 40(15), 7404-7415.
- [0547] 35. Litosh, V. A. *et al.* (2011) "Improved Nucleotide Selectivity and Termination of 3'-Oh Unblocked Reversible Terminators by Molecular Tuning of 2-Nitrobenzyl Alkylated Homed Triphosphates," *Nucleic Acids Res.* 39(6), e39-e39.
- [0548] 36. Bowers, J. *et al.* (2009) "Virtual Terminator Nucleotides for Next Generation DNA Sequencing," *Nat. Meth.* 6(8), 593-595.
- [0549] 37. Zhao, C. *et al.* "Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing," 미국 특허 8,399,188, 출원 12/442,925, 출원일 12/23/2009. (허여일 3/19/2013).
- [0550] 38. Zon, G. "Reversible Di-Nucleotide Terminator Sequencing," 미국 특허 8,017,338, 출원 12/275,161, 출원일 11/20/2008. (허여일 9/13/2011).
- [0551] 39. Wang, Z. *et al.* (2010) "Desulfurization of Cysteine-Containing Peptides Resulting from Sample Preparation for Protein Characterization by MS," *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24(3), 267-275.
- [0552] 40. Jung, A. *et al.* (2002) "7-Deaza-2'-Deoxyguanosine Allows PCR and Sequencing Reactions from CpG Islands," *Mol. Pathol.* 55(1), 55-57.
- [0553] 41. Kutyavin, I. V. (2008) "Use of Base-Modified Duplex-Stabilizing Deoxynucleoside 5'-Triphosphates to Enhance the Hybridization Properties of Primers and Probes in Detection Polymerase Chain Reaction," *Biochemistry* 47(51), 13666-13673.
- [0554] 42. Semenyuk, A. *et al.* (2006) "Synthesis of RNA Using 2'-O-Dtm Protection," *J. Am. Chem. Soc.* 128(38), 12356-12357.
- [0555] 43. Semenyuk, A. and Kwiatkowski, M. (2007) "A Base-Stable Dithiomethyl Linker for Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides," *Tetrahedron Lett.* 48(3), 469-472.
- [0556] 44. Semenyuk, A. (2006) "Novel Methods for Synthesis of High Quality Oligonucleotides," Uppsala University.
- [0557] 45. Bellamy, A. J. *et al.* (2007) "The Use of Trifluoroacetyl as an N- and O-Protecting Group During the Synthesis of Energetic Compounds Containing Nitramine and/or Nitrate Ester Groups," *Propellants Explos. Pyrotech.* 32(1), 20-31.
- [0558] 46. Gordon, S. and Olejnik, J. "Methods and Compositions for Incorporating Nucleotides," 미국 특허 출원 공개 번호 US 2013-0137091 A1, 출원 13/305,415, 출원일 11/28/2011. (공개일 5/30/2013).
- [0559] 47. Olejnik, J. *et al.* "Methods and Compositions for Inhibiting Undesired Cleaving of Labels," 미국 특허 8,623,598, 출원 12/405,866, 출원일 3/17/2009. (허여일 1/7/2014).
- [0560] 48. Montazerzohori, M. *et al.* (2007) "Fast and Highly Efficient Solid State Oxidation of Thiols," *Molecules* 12(3), 694.
- [0561] 49. Clark, D. E. (1999) "Rapid Calculation of Polar Molecular Surface Area and Its Application to the

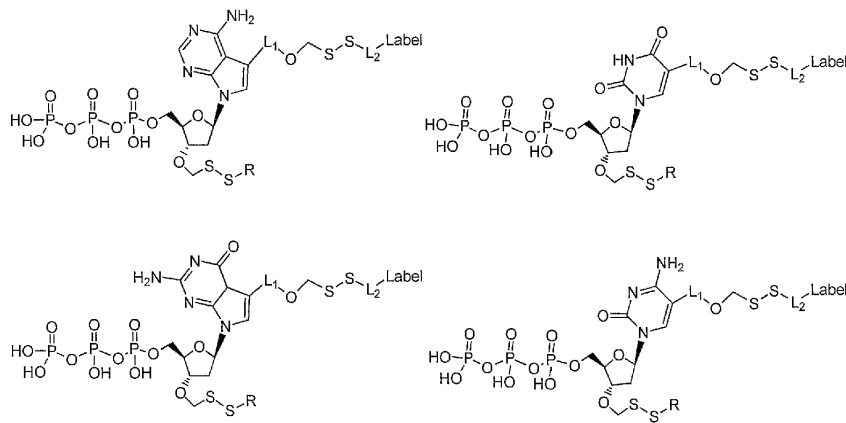
Prediction of Transport Phenomena. 2. Prediction of Blood-Brain Barrier Penetration," *J. Pharm. Sci.* 88(8), 815-821.

도면

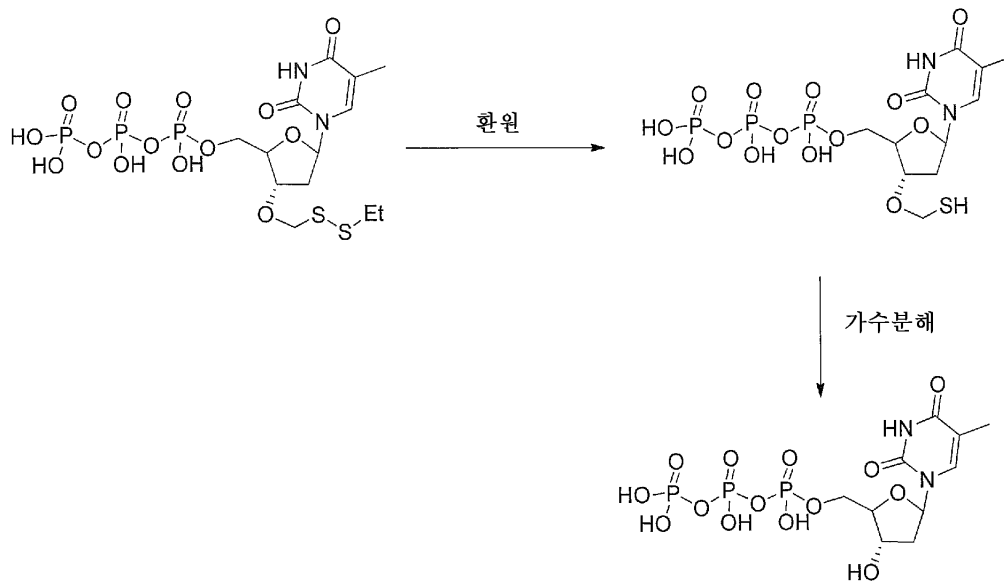
도면1



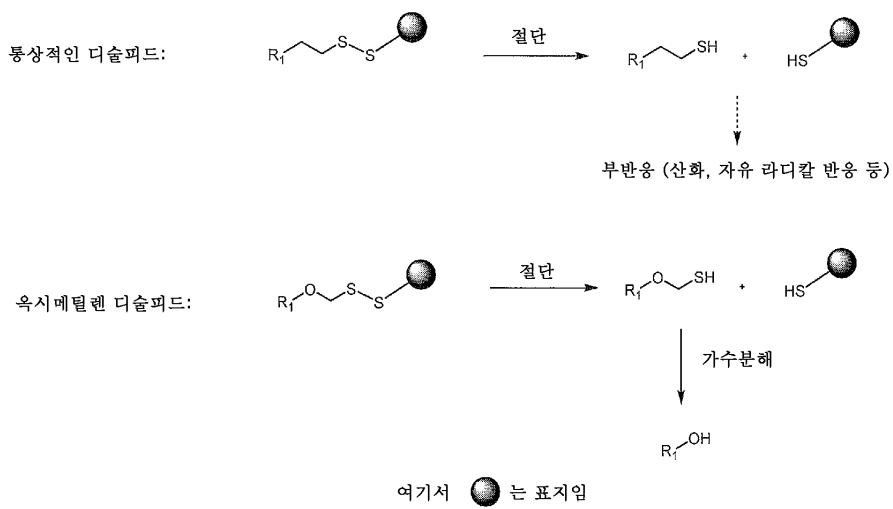
도면2



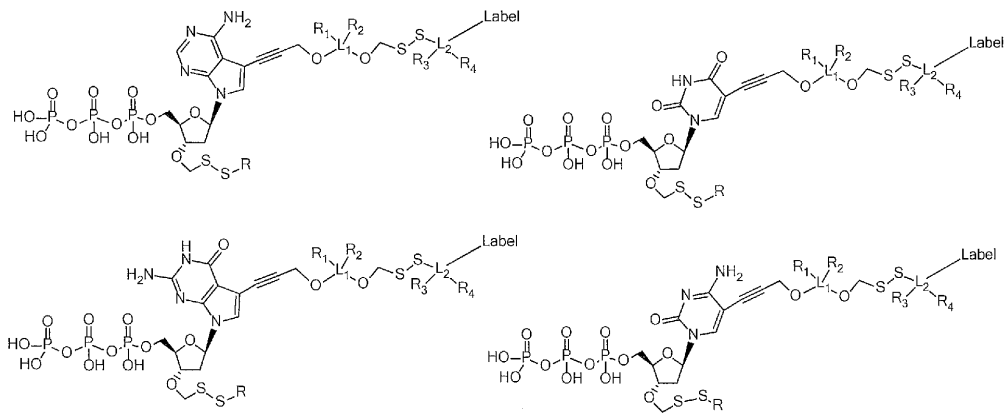
도면3



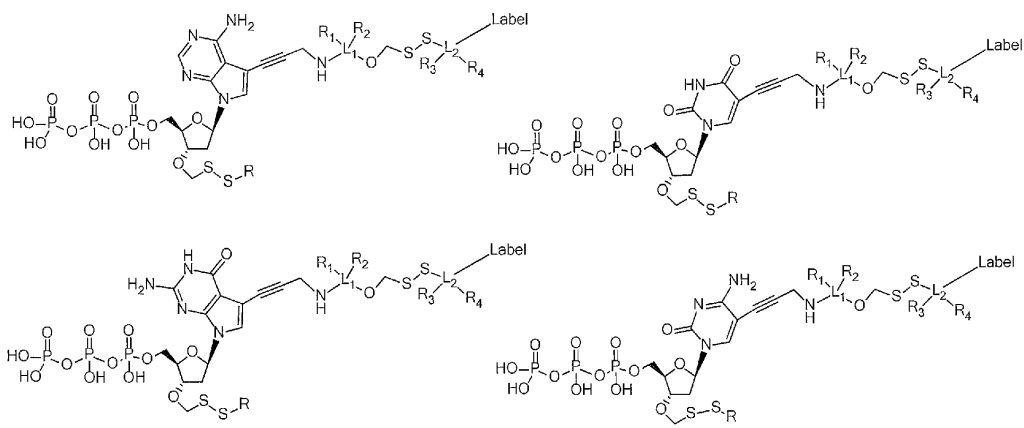
도면4



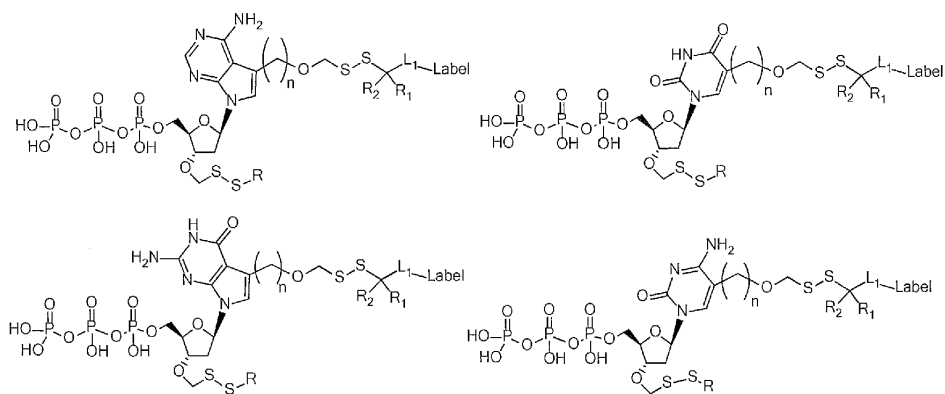
도면5



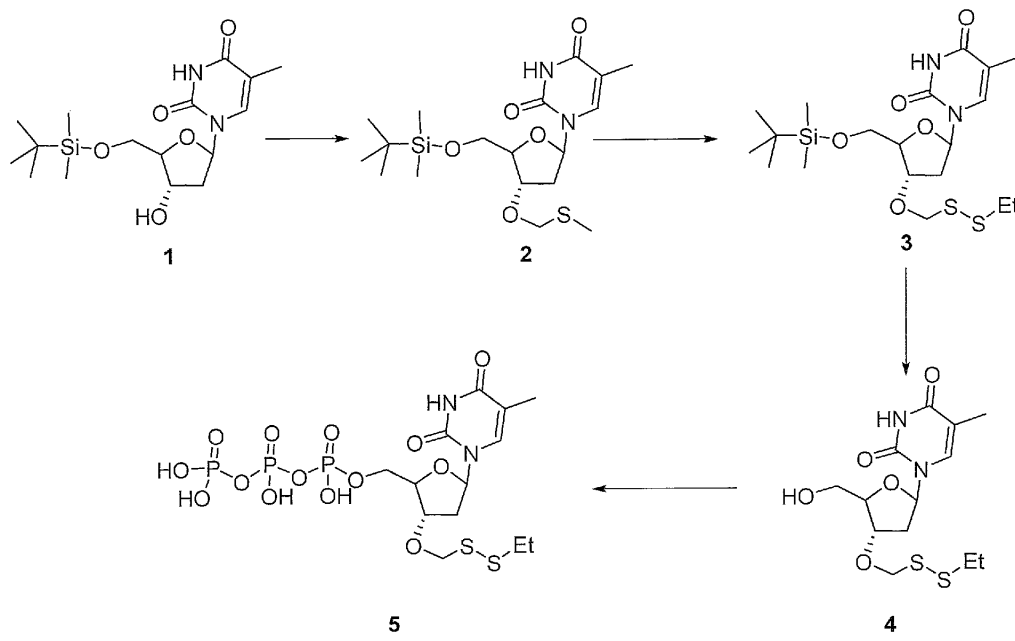
도면6



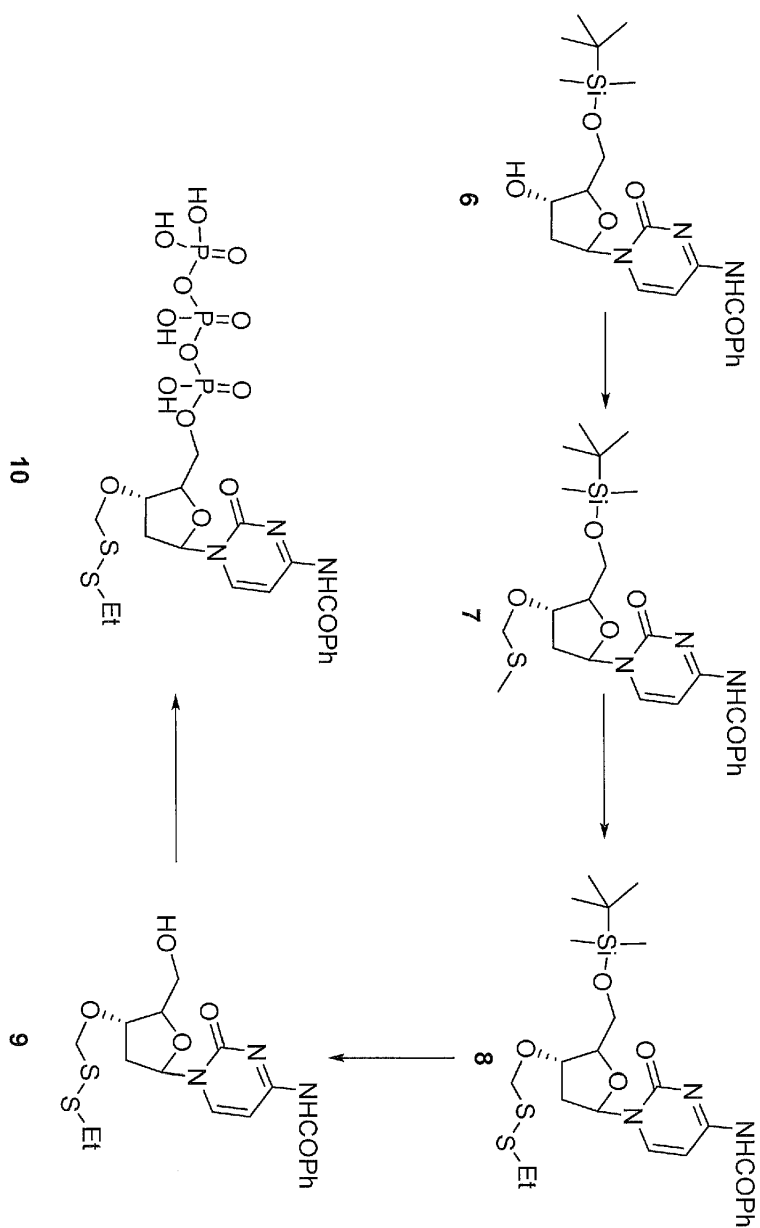
도면7



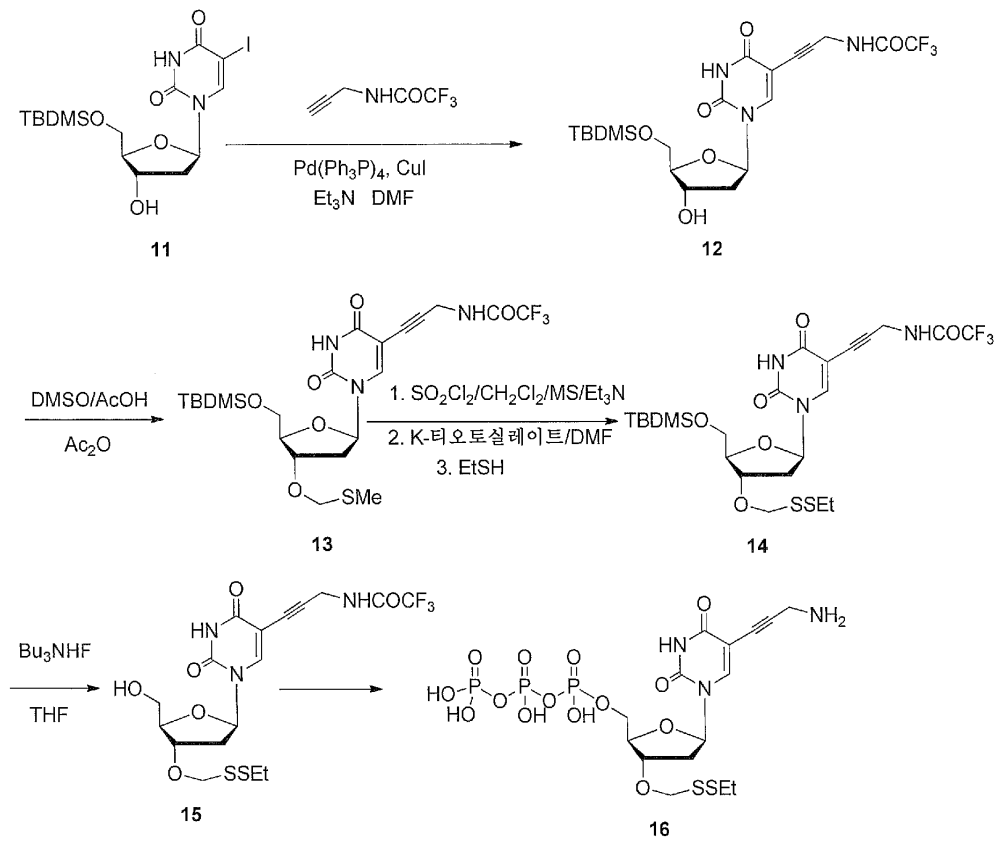
도면8



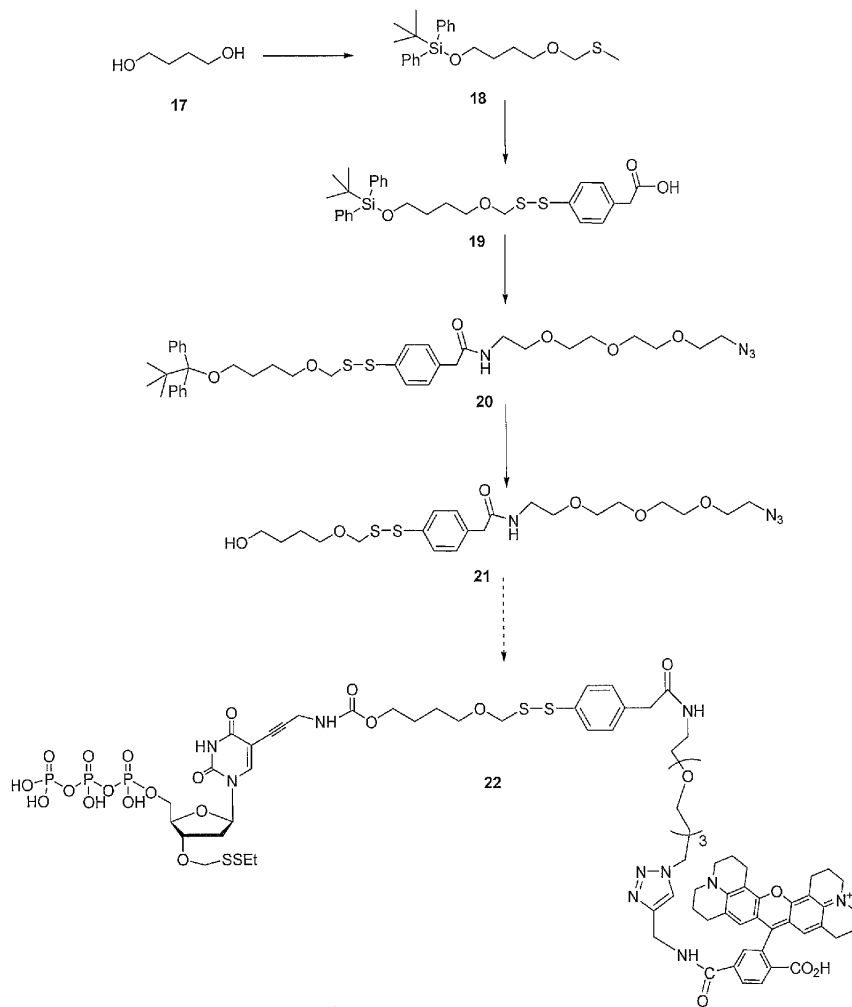
도면9



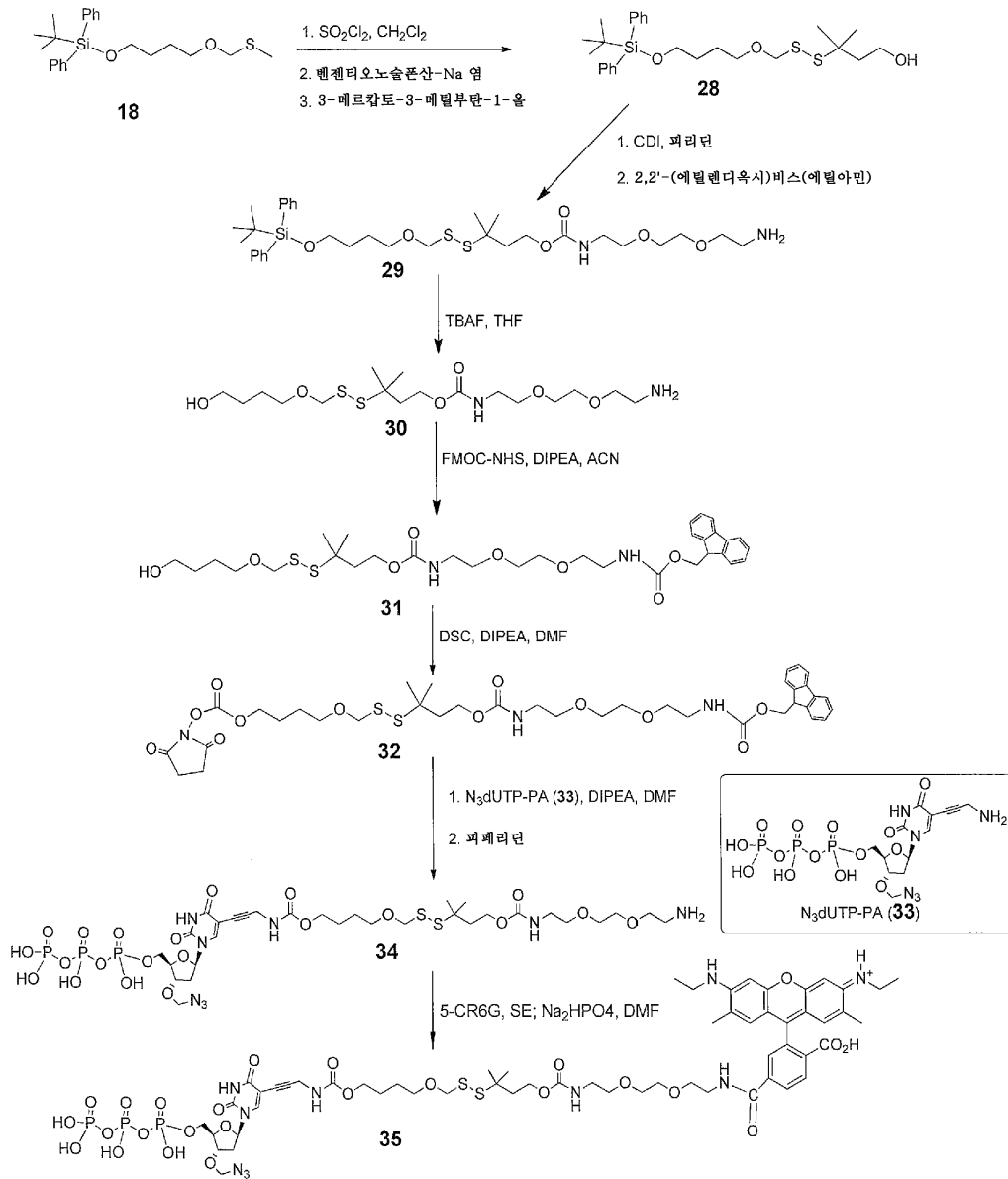
도면10



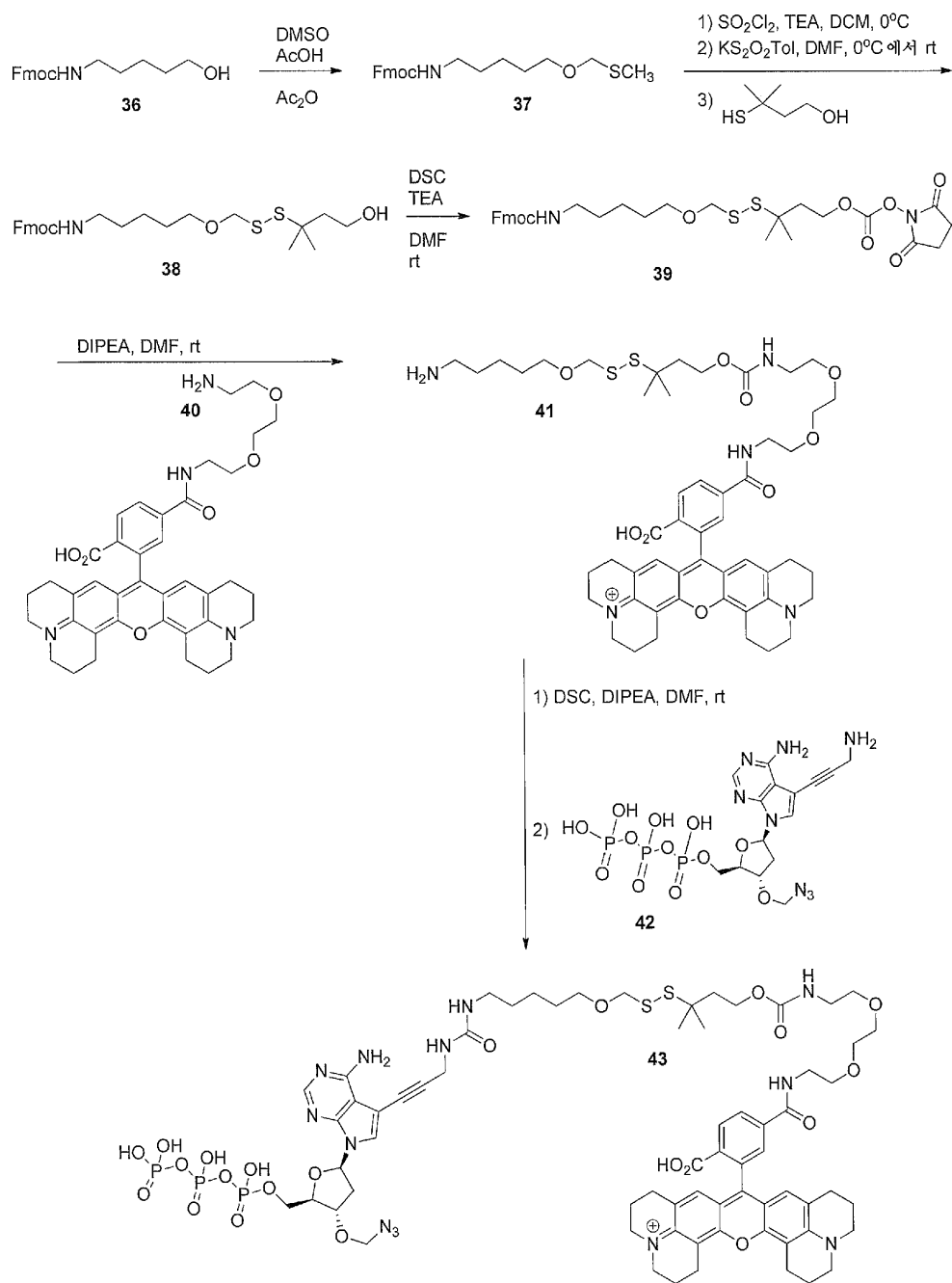
도면11



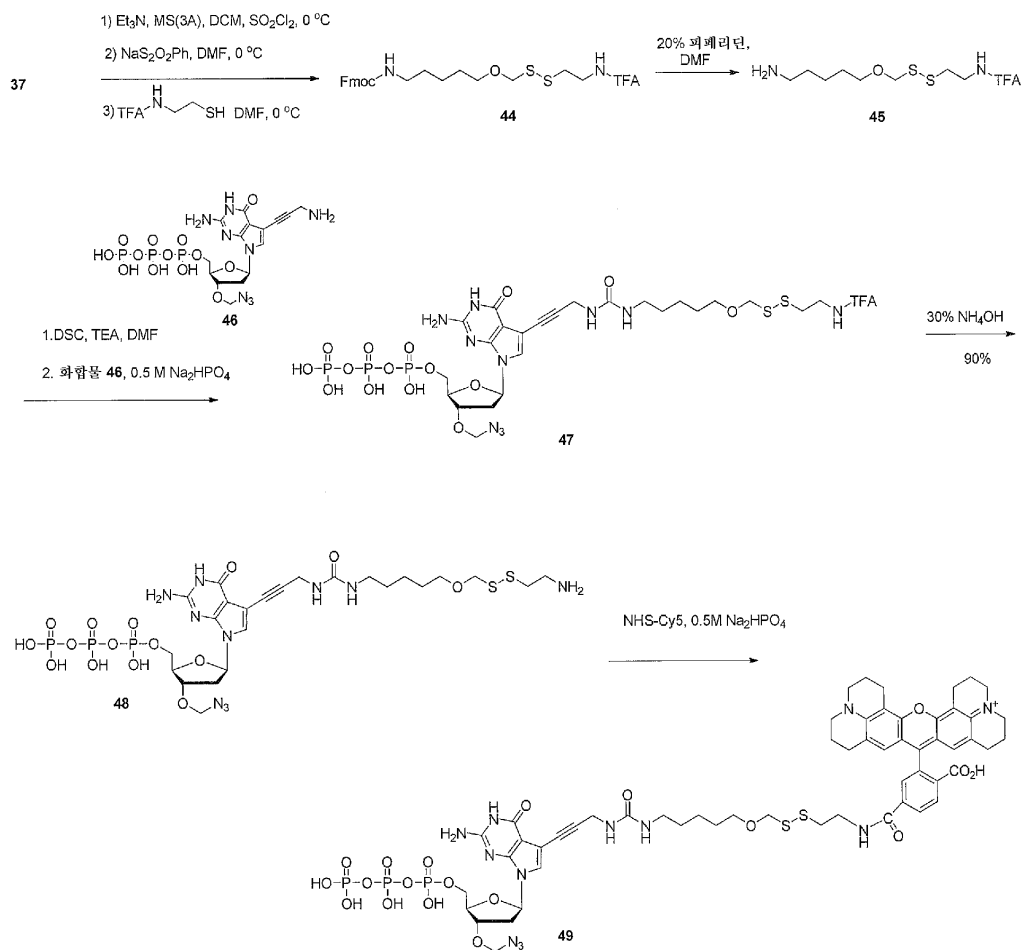
도면13



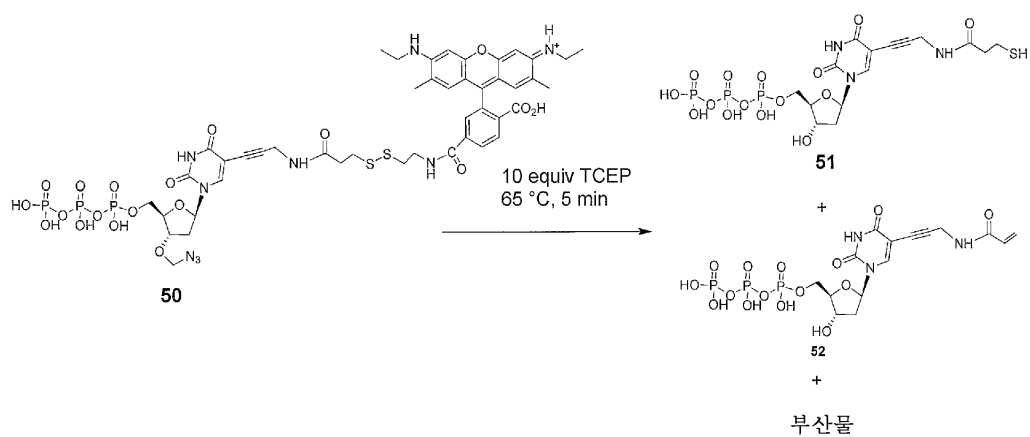
도면14



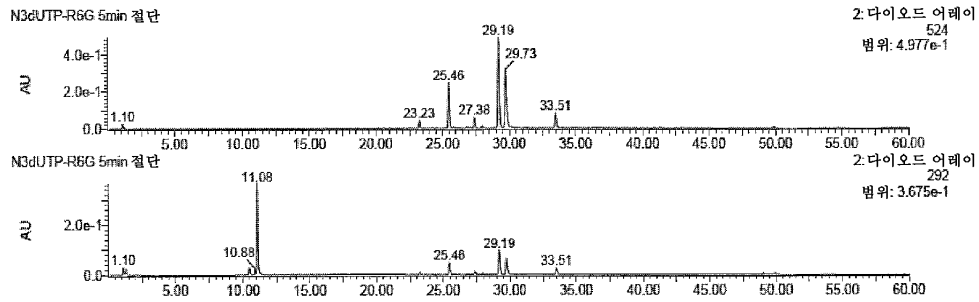
도면15



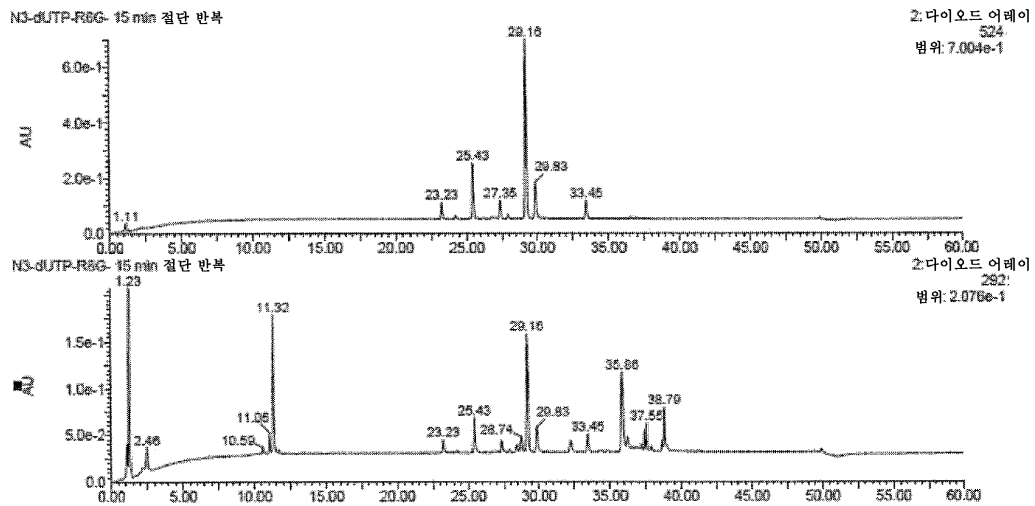
도면16



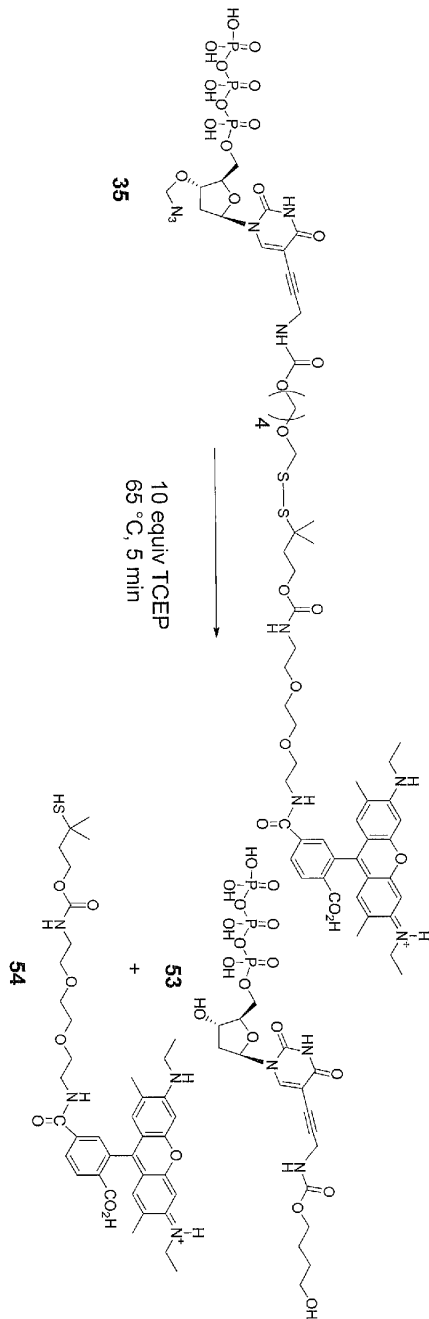
도면17



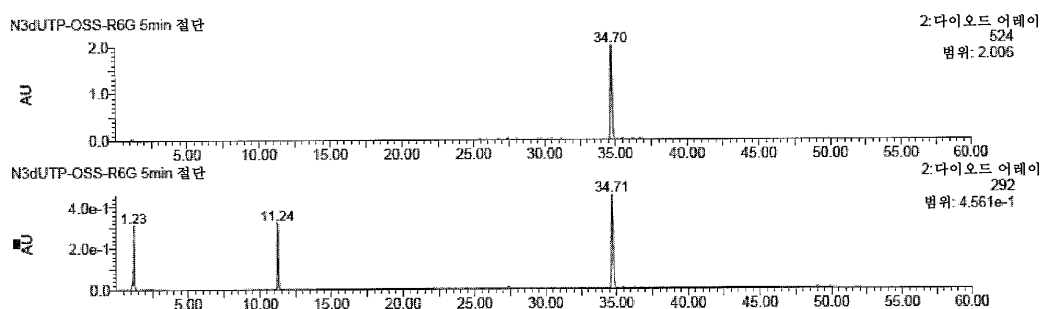
도면18



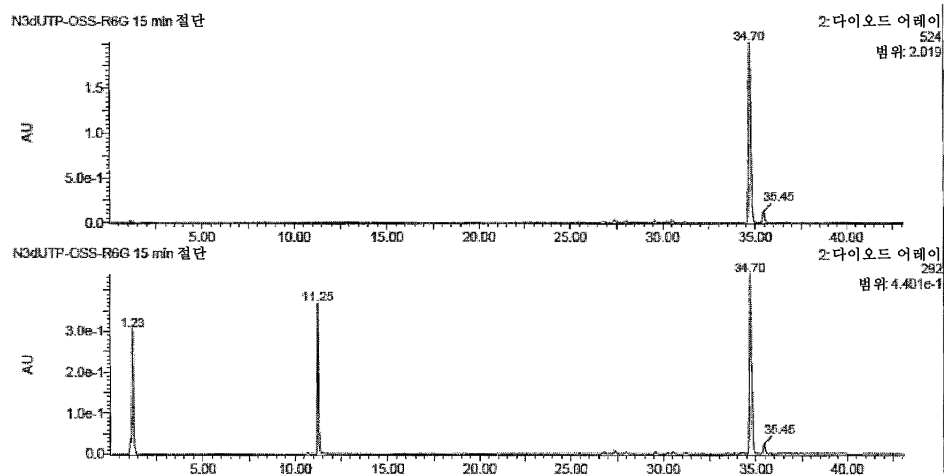
도면19



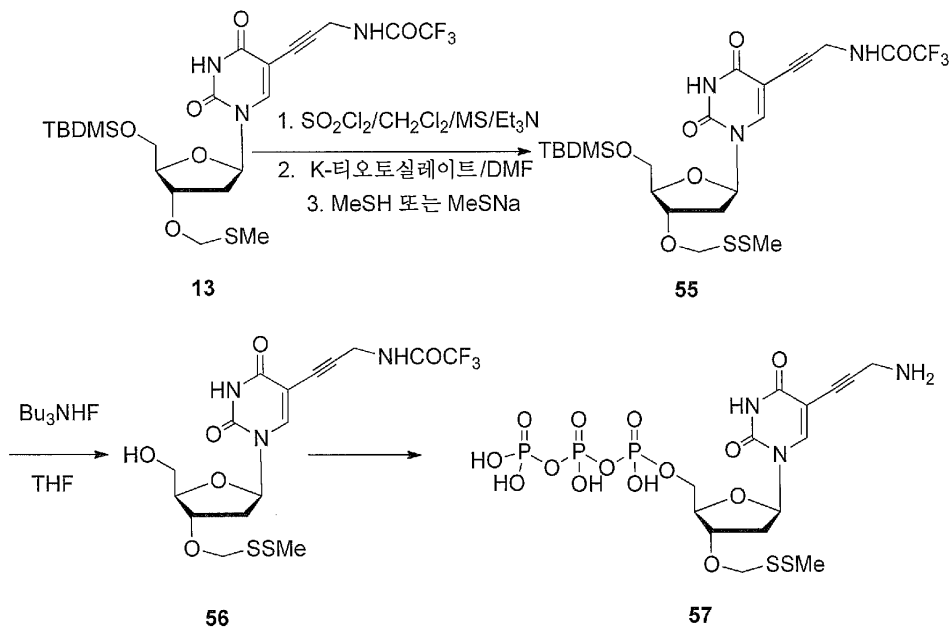
도면20



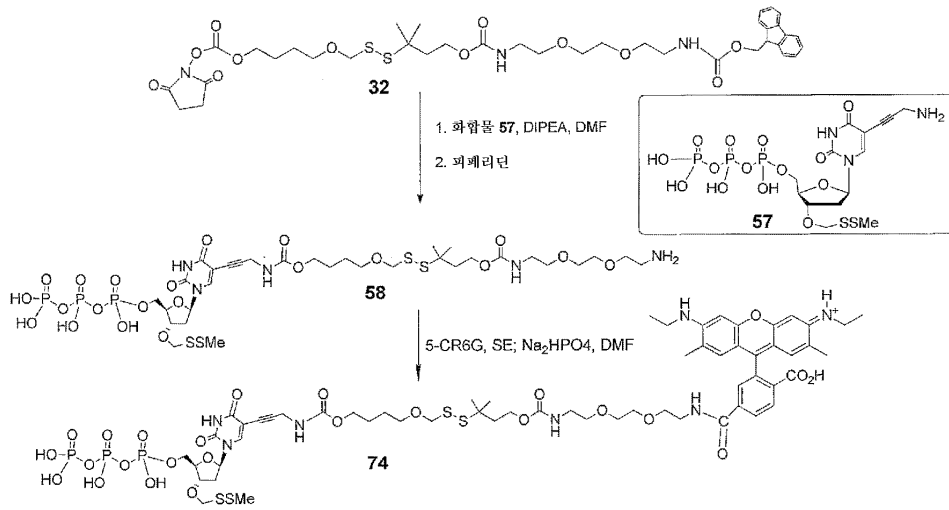
도면21



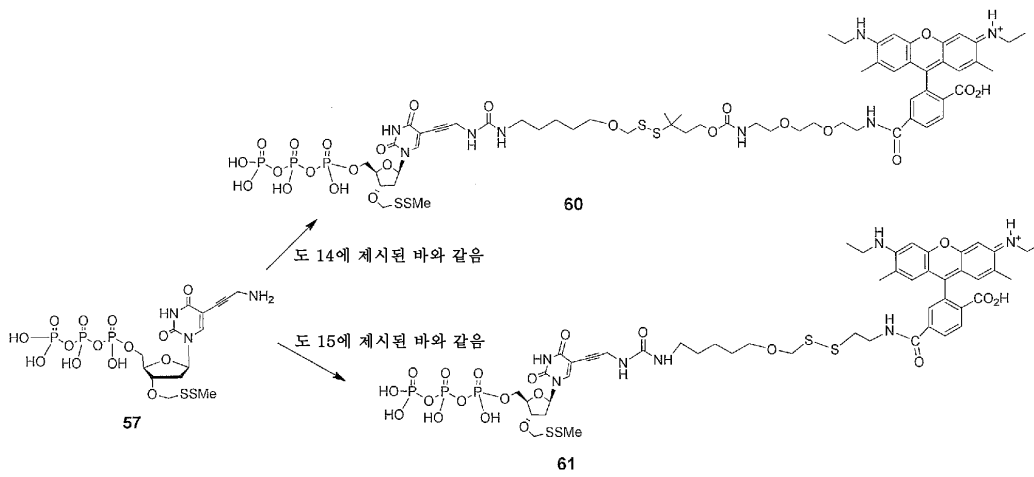
도면22



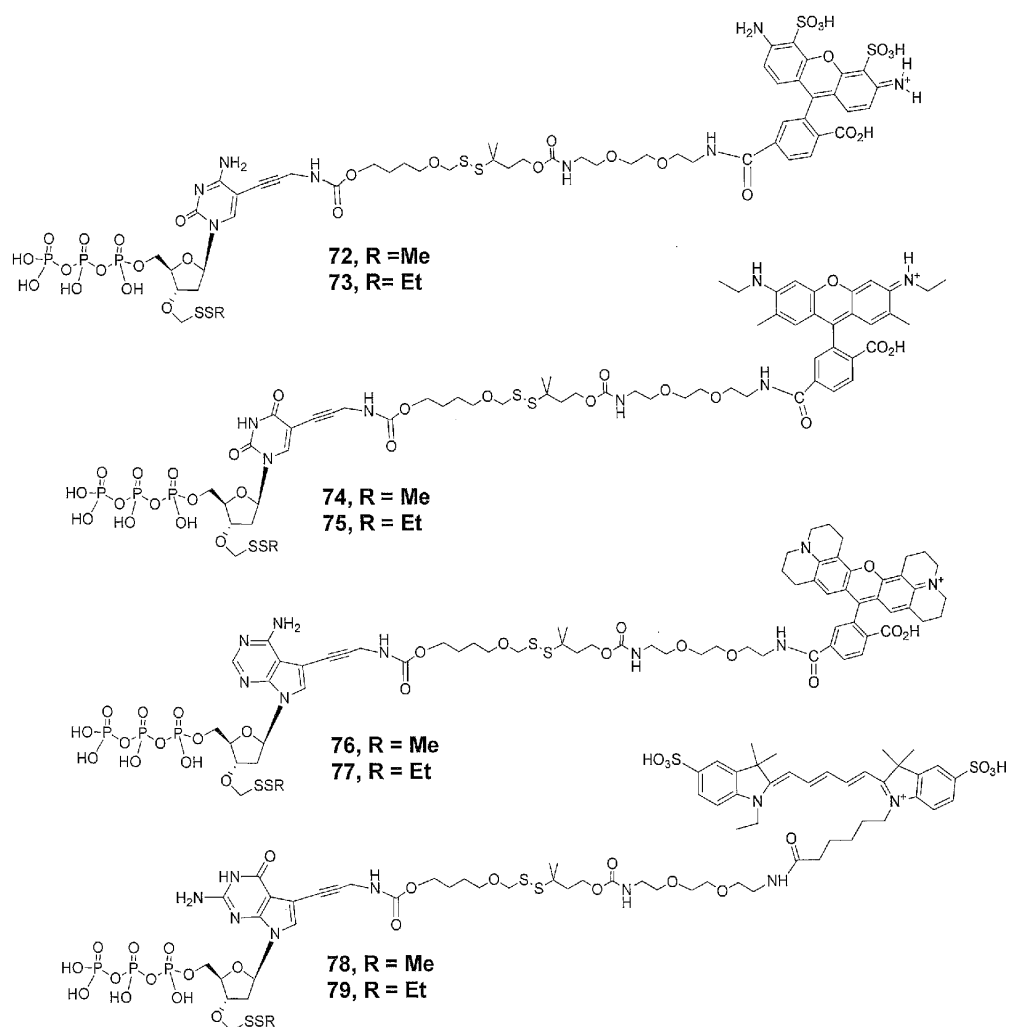
도면23



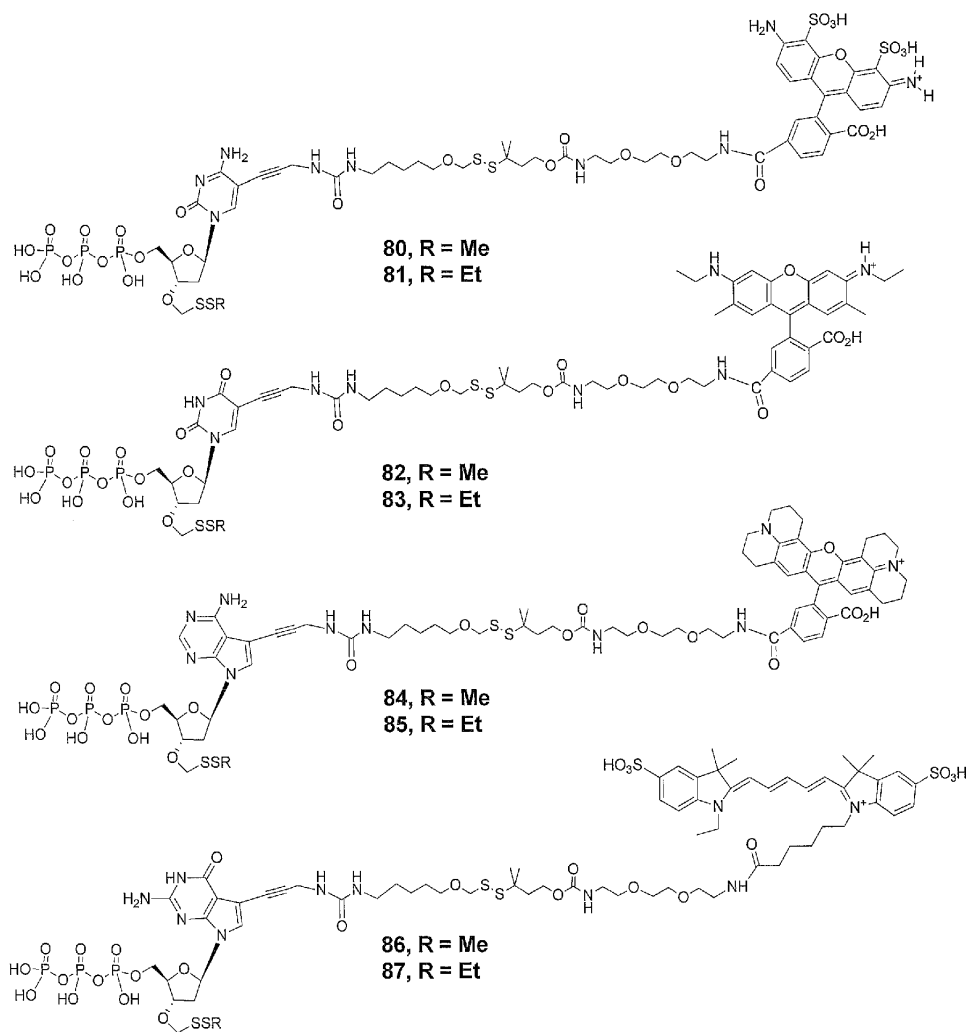
도면24



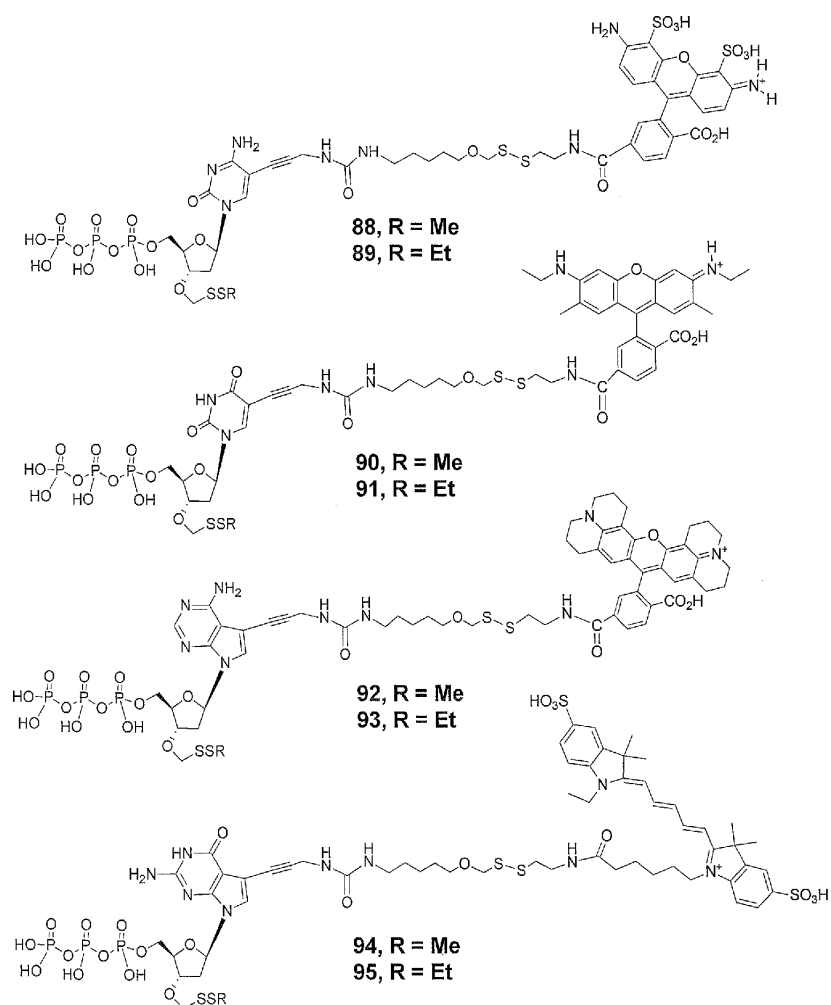
도면25



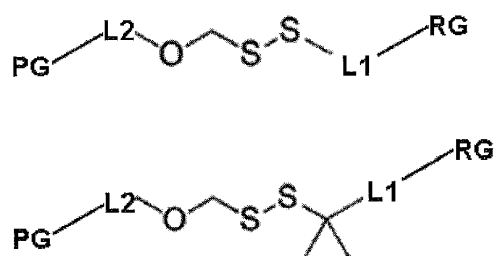
도면26



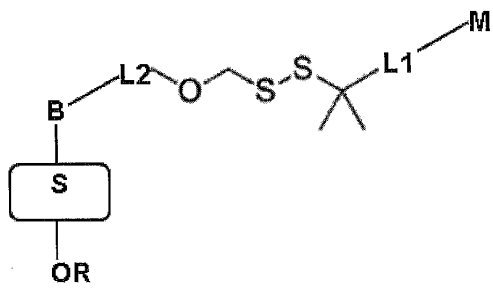
도면27



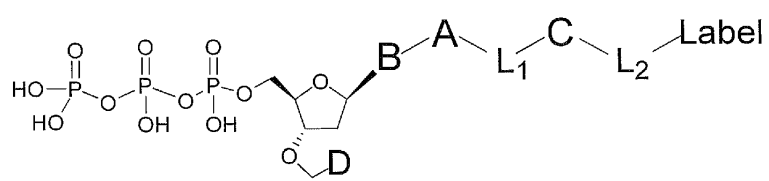
도면28



도면29

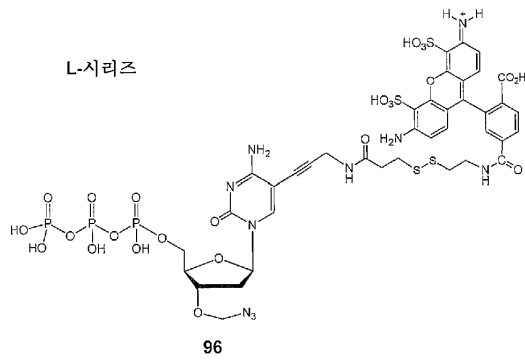


도면30

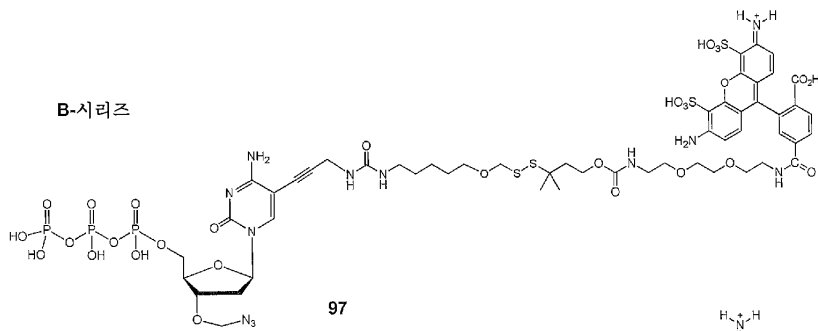


도면31

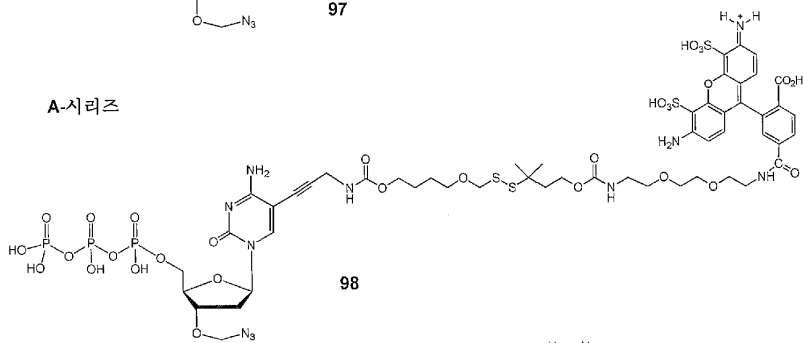
L-시리즈



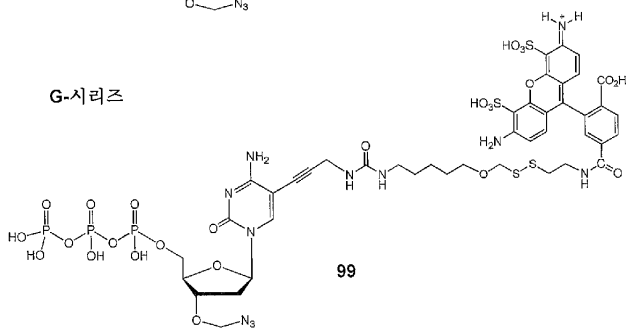
B-시리즈



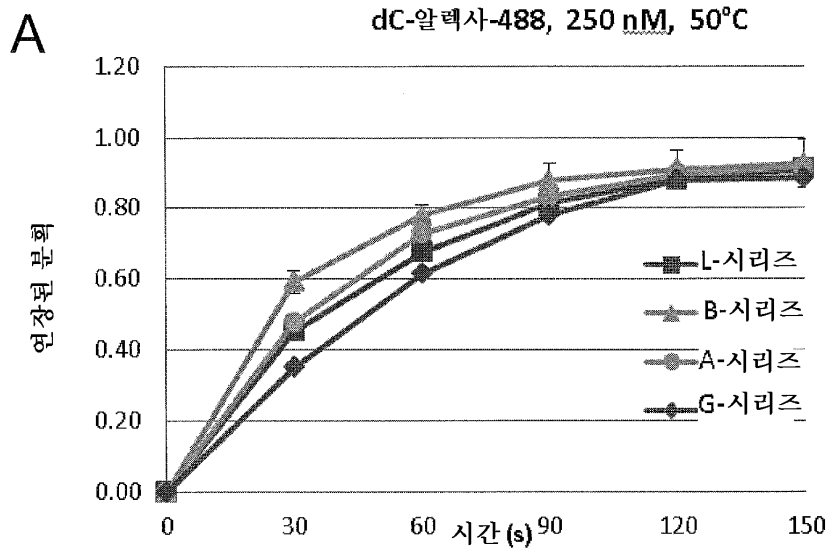
A-시리즈



G-시리즈



도면32



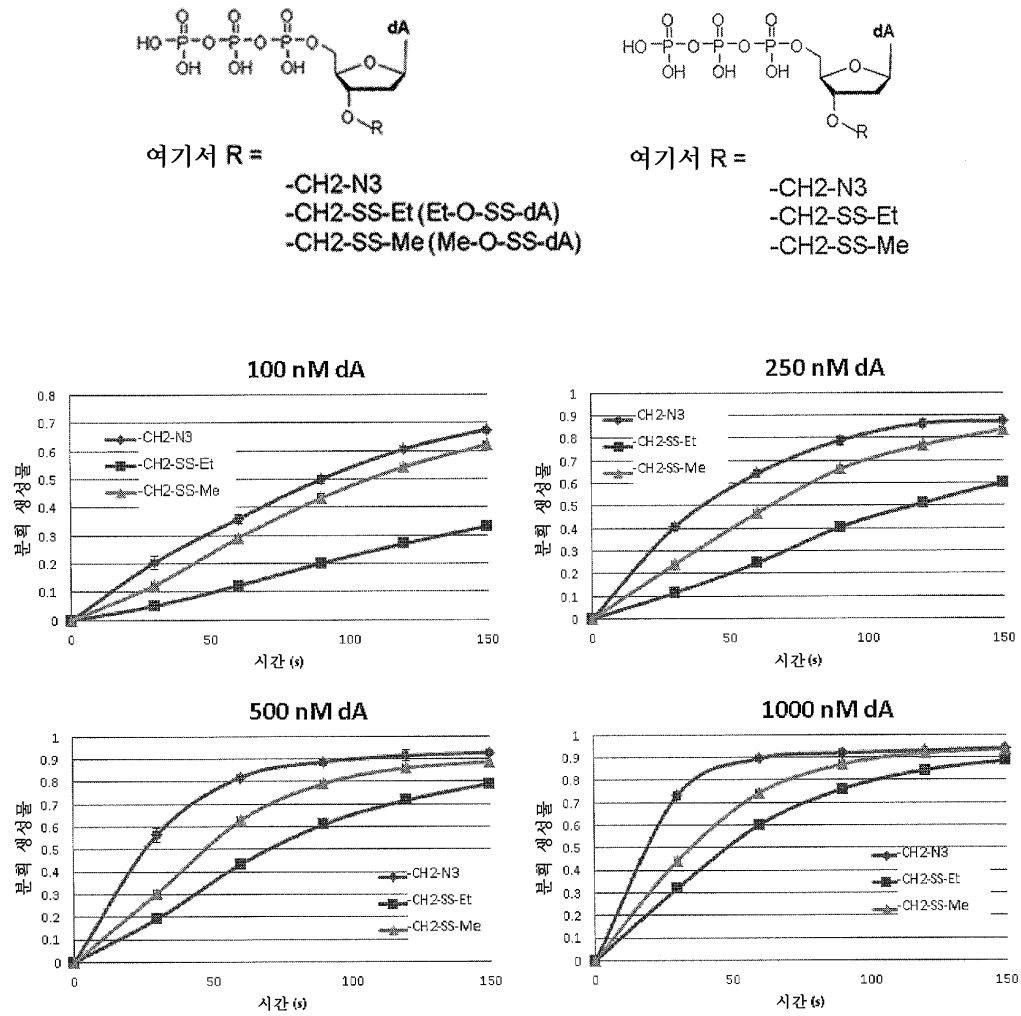
B 250 nM

	평균 속도 s^{-1}
dC-알렉사-488 L-시리즈	0.021
dC-알렉사-488 B-시리즈	0.032
dC-알렉사-488 A-시리즈	0.024
dC-알렉사-488 G-시리즈	0.015

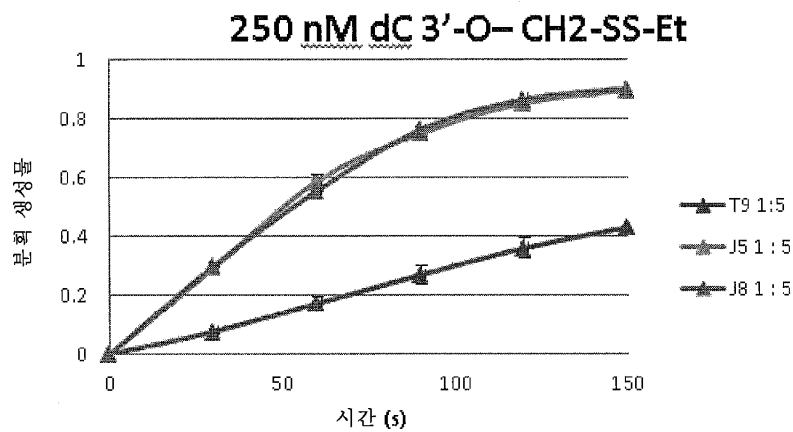
C

	속도 s^{-1}		
	125nM	250nM	500nM
dC-알렉사-488 B-시리즈	0.0021	0.003	0.0051
dC-알렉사-488 A-시리즈	0.0015	0.0021	0.0024
dC-알렉사-488 L-시리즈	0.0009	0.0015	0.0035
dC-알렉사-488 G-시리즈	0.0013	0.0022	0.0033

도면33



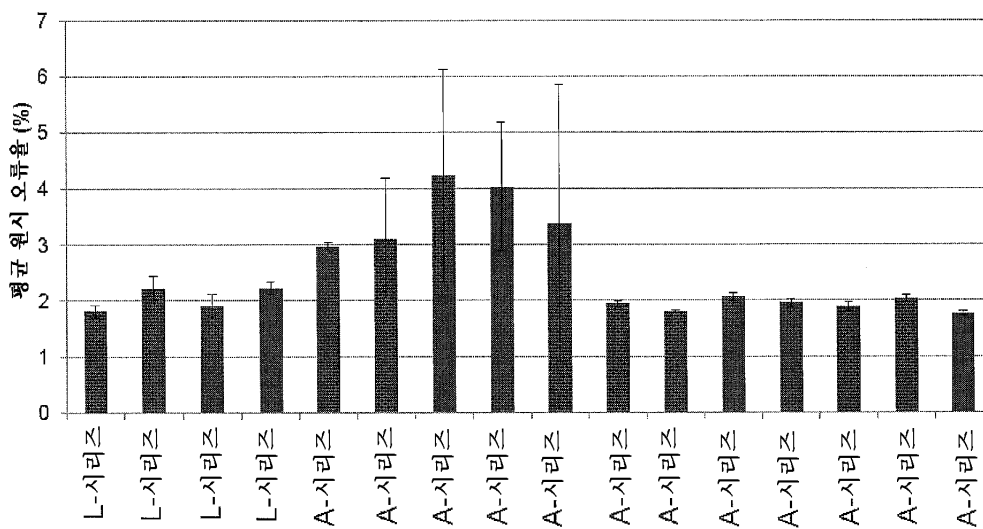
도면34



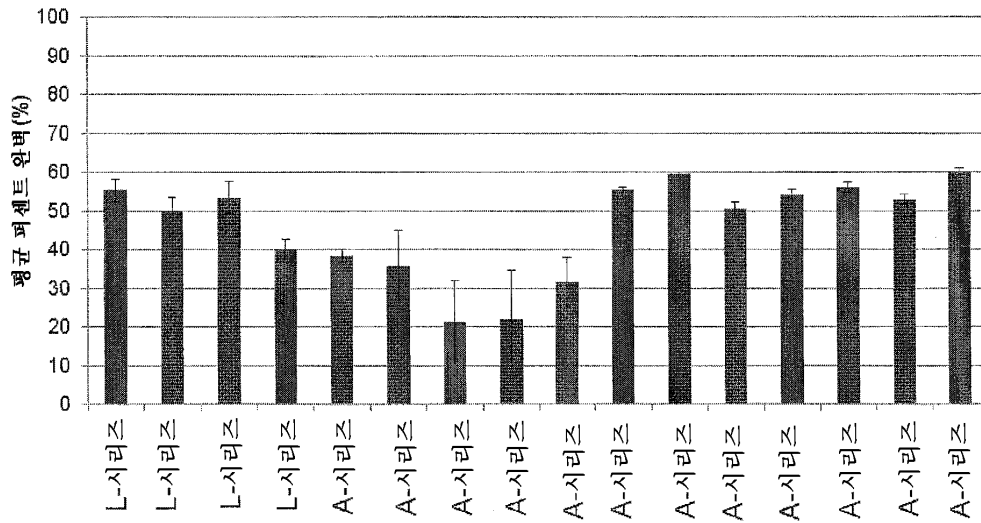
도면35

	L-시리즈 (96)	G-시리즈 (99)	A-시리즈 (98)
표지된 C	400	250	180
표지된 T	30	22.5	90
표지된 A	100	150	120
표지된 G	100	80	120
미표지된 C	2000	2000	2000
미표지된 T	2000	2000	2000
미표지된 A	1000	1000	1000
미표지된 G	500	500	500

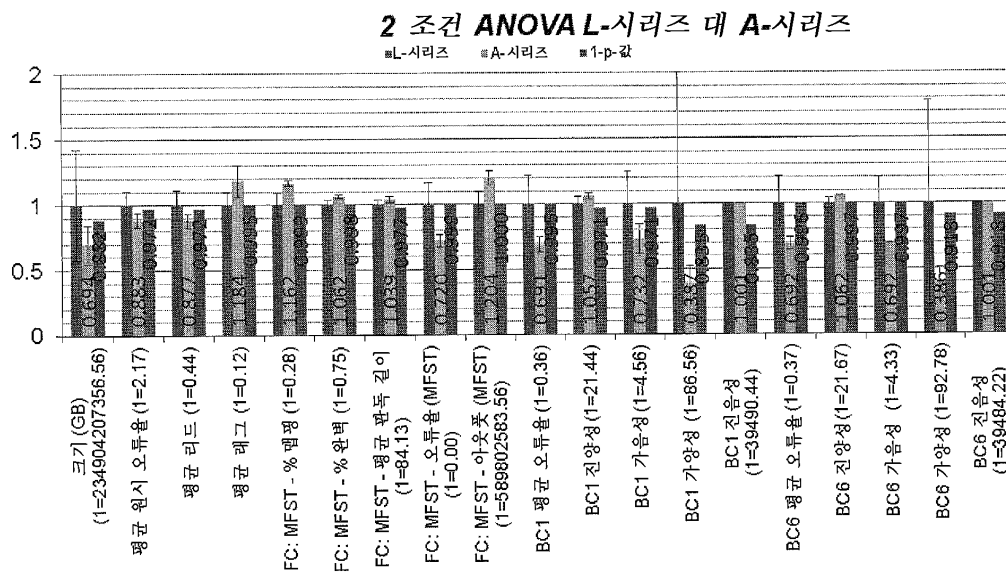
도면36



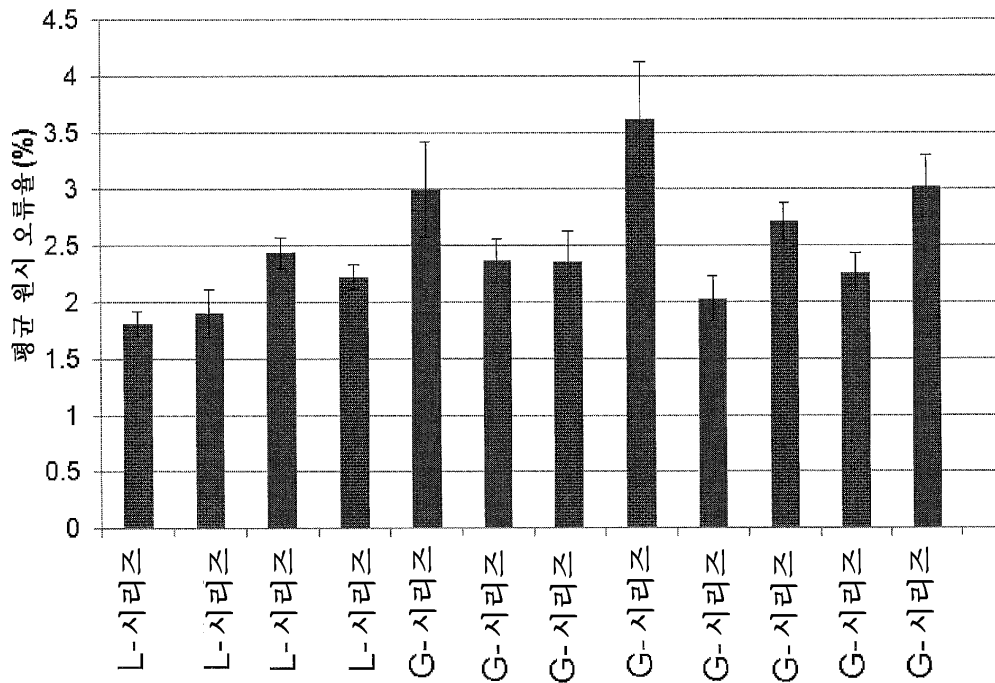
도면37



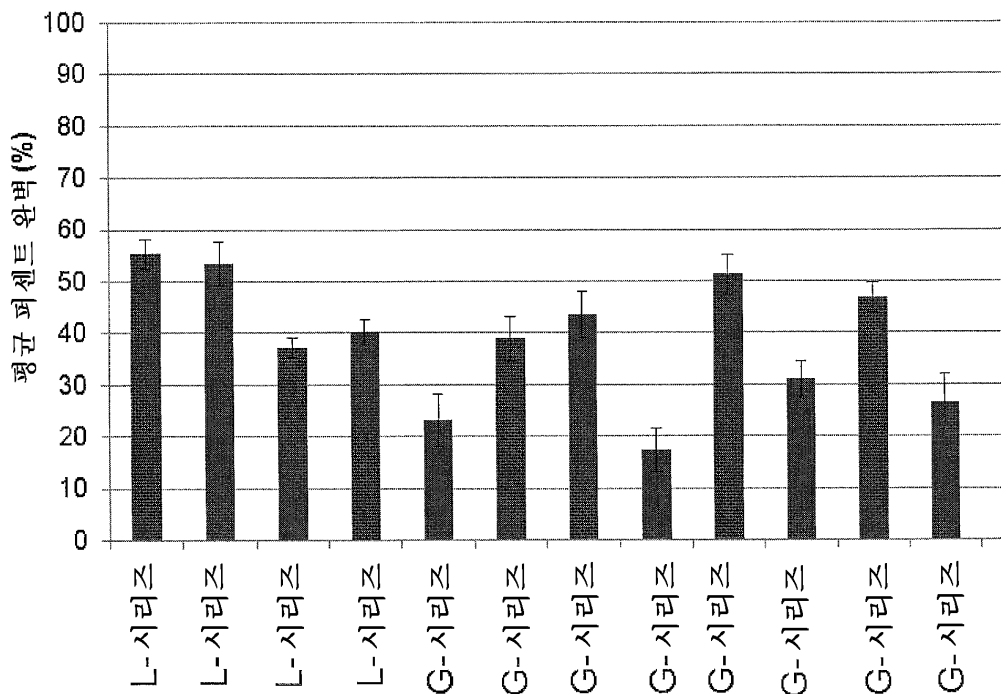
도면38



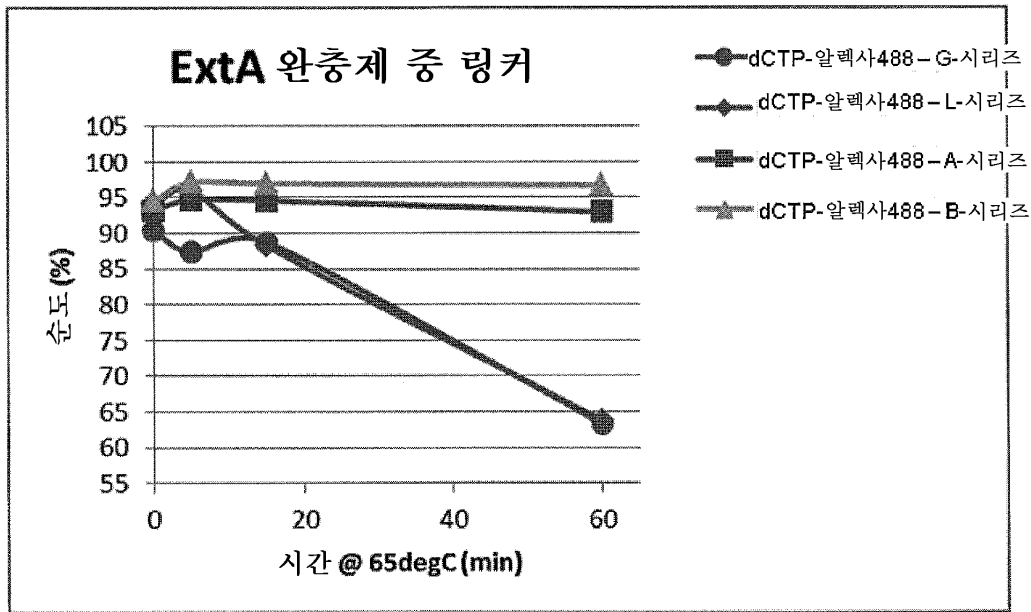
도면39



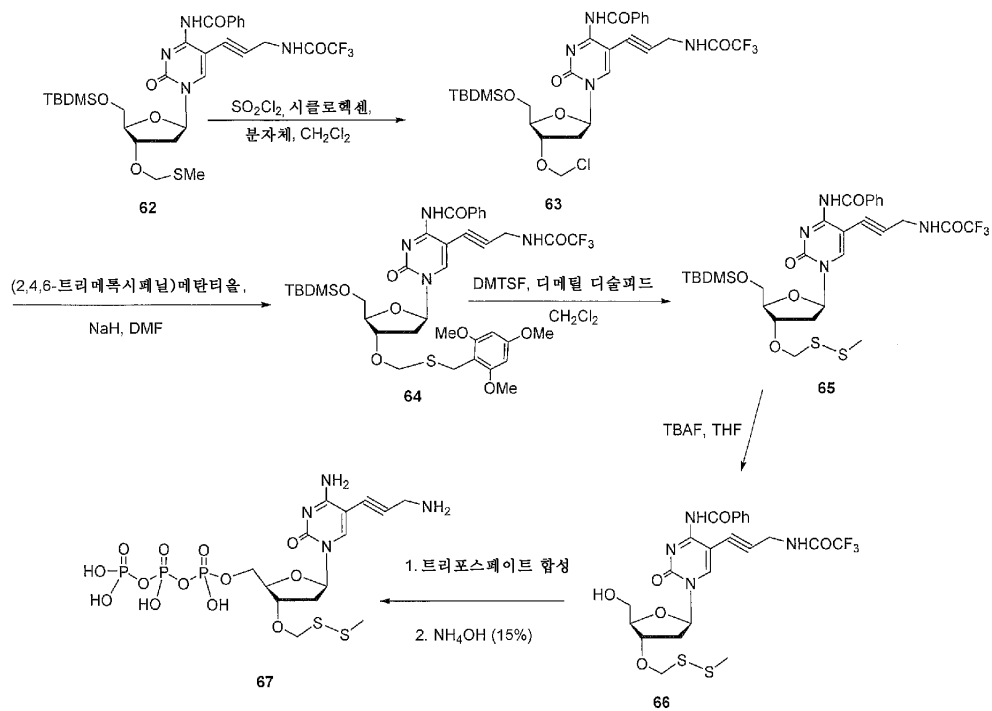
도면40



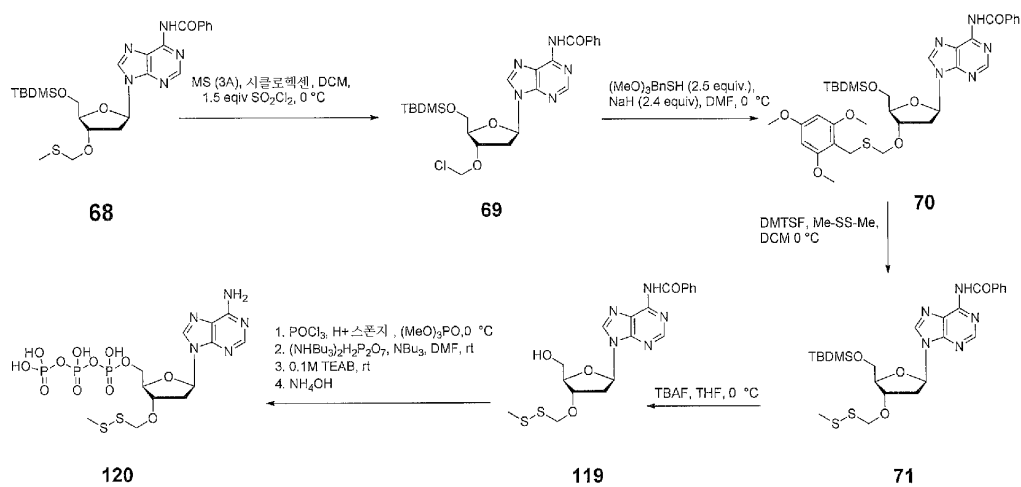
도면42



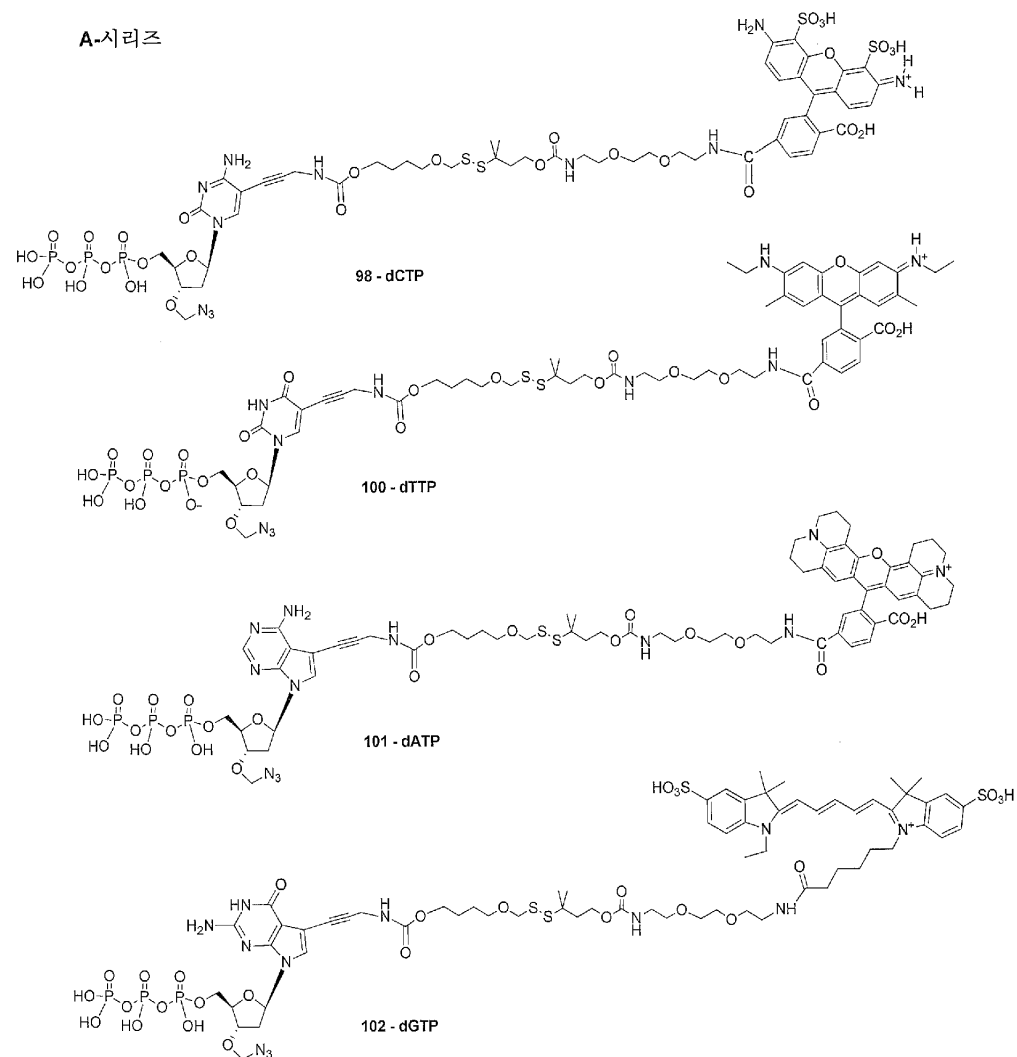
도면43



도면44

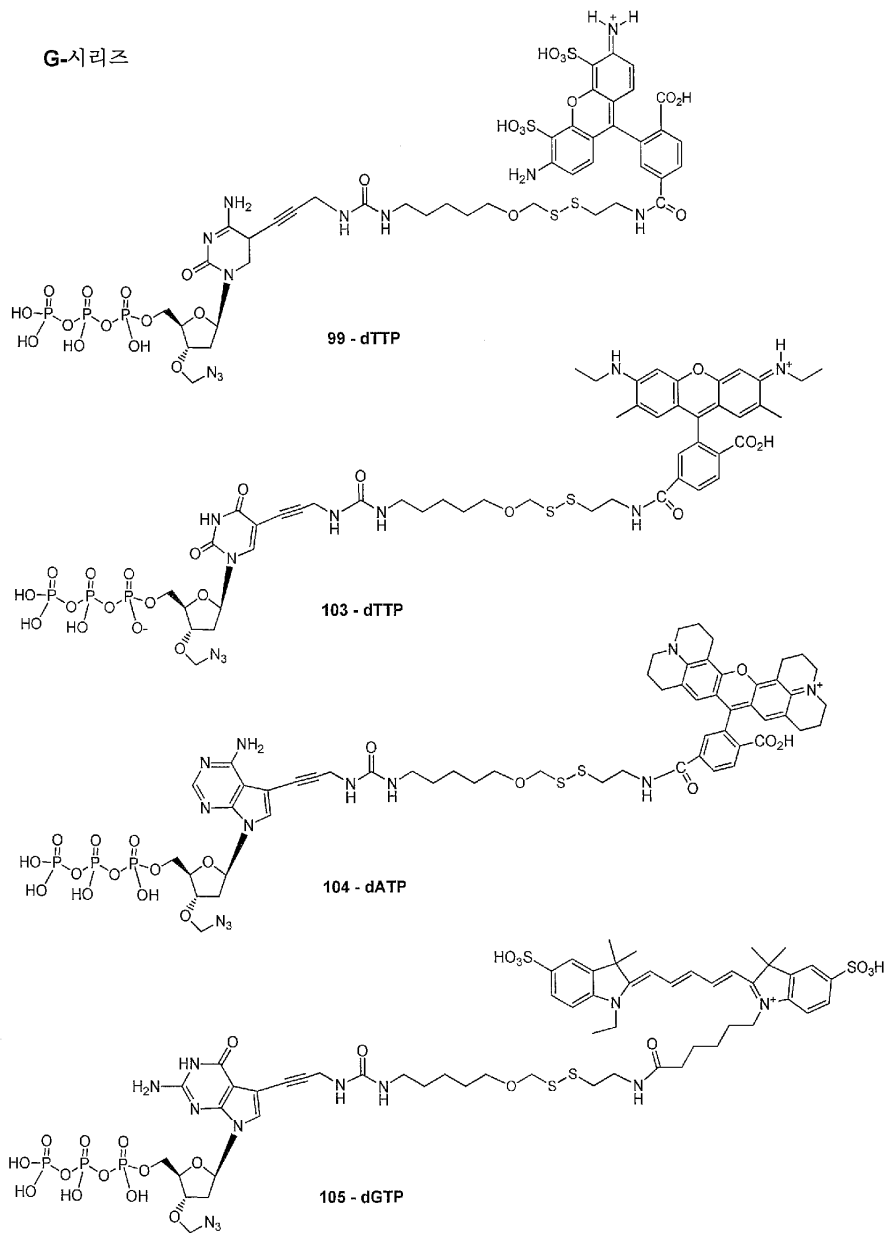


도면45

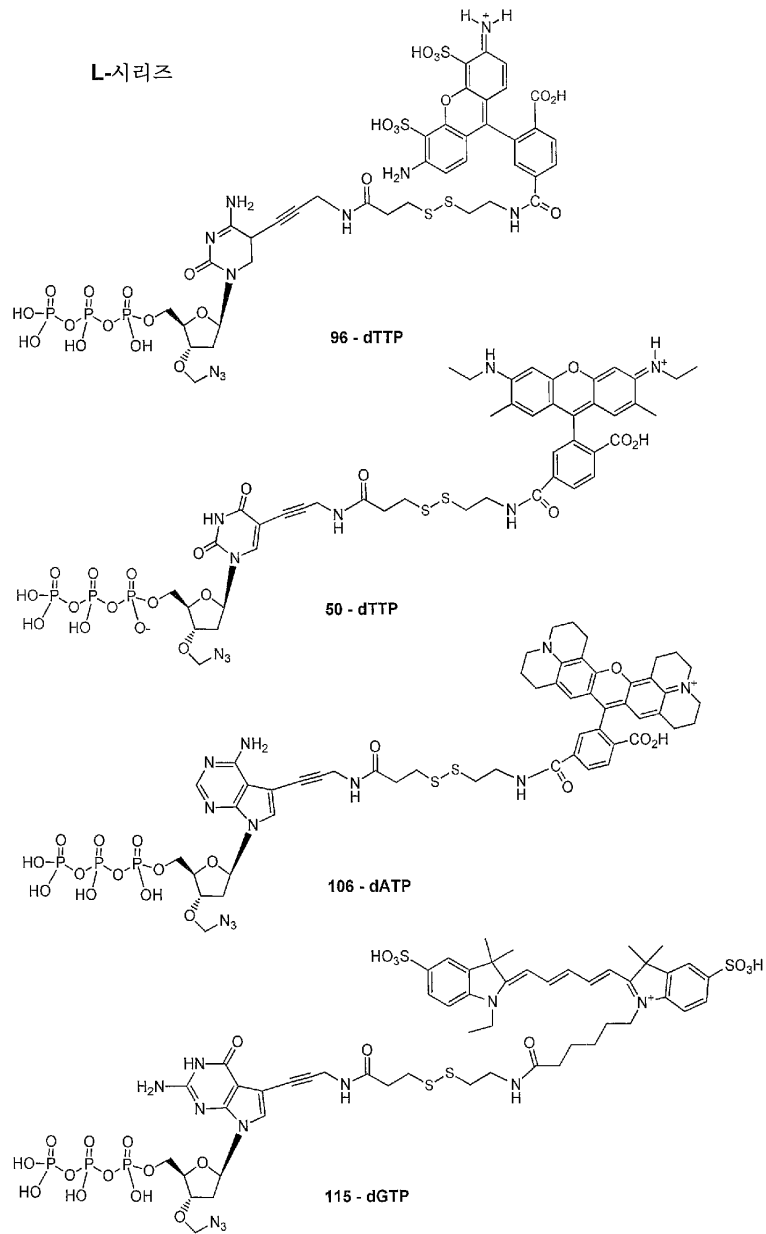


도면46

G-시리즈

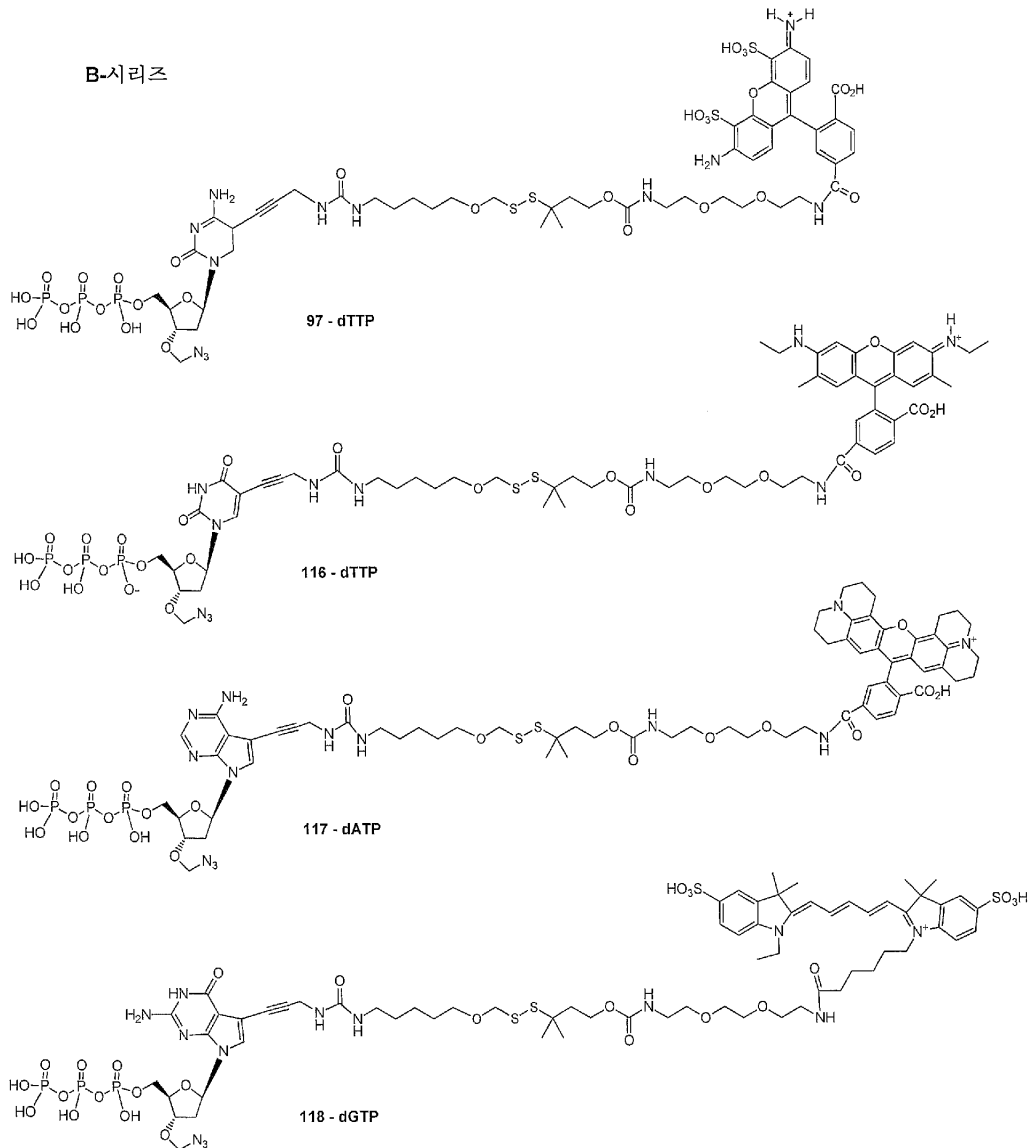


도면47



도면48

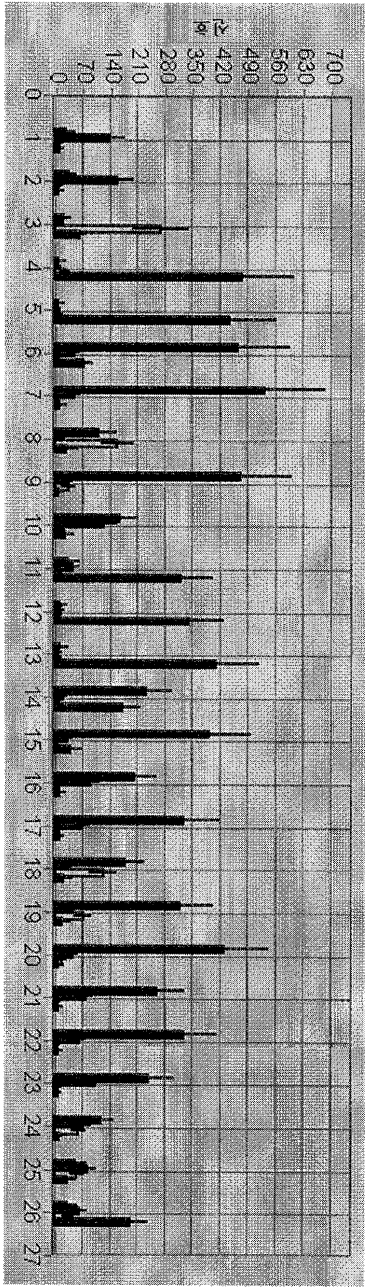
B-시리즈



도면49

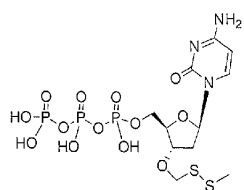
	농도 [nM]	화합물 번호
표지된 C	180	72
표지된 T	270	74
표지된 A	360	76
표지된 G	120	78
미표지된 C	2000	126
미표지된 T	2000	138
미표지된 A	1000	73
미표지된 G	500	132

도면50



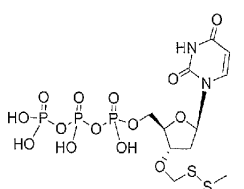
도면51

C



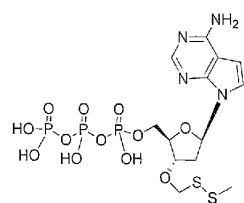
126

T



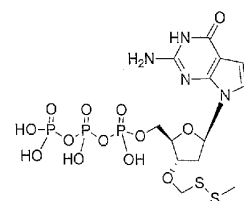
138

A



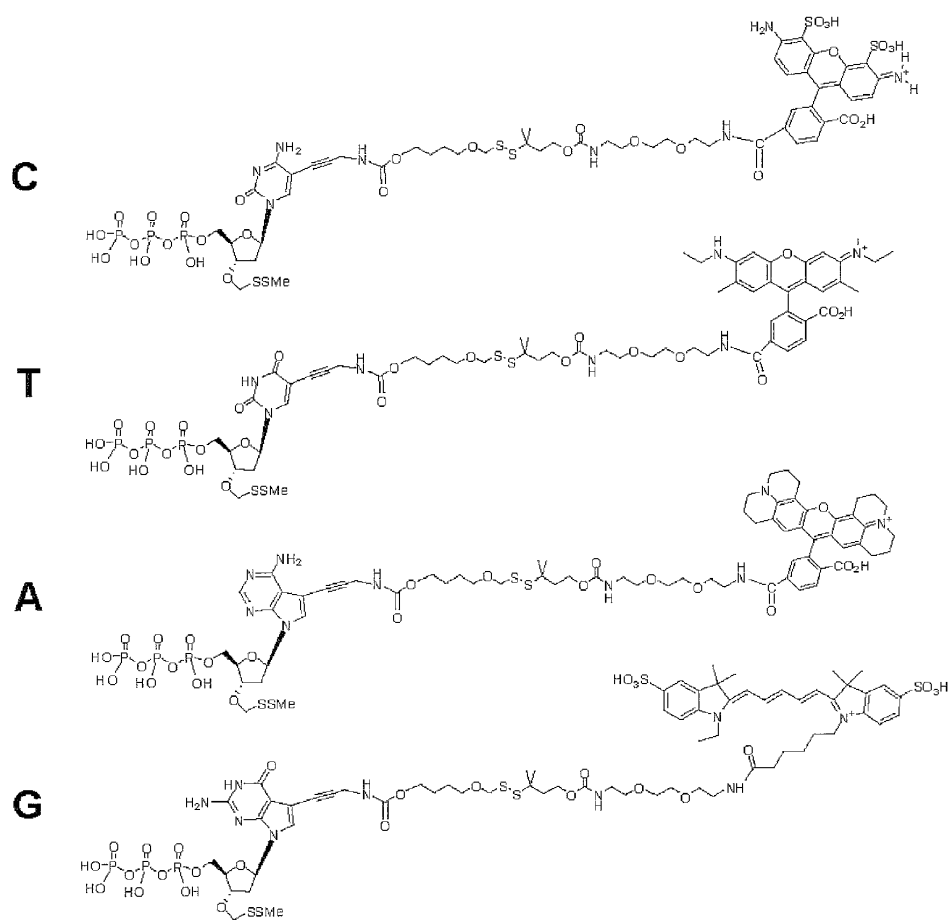
120

G

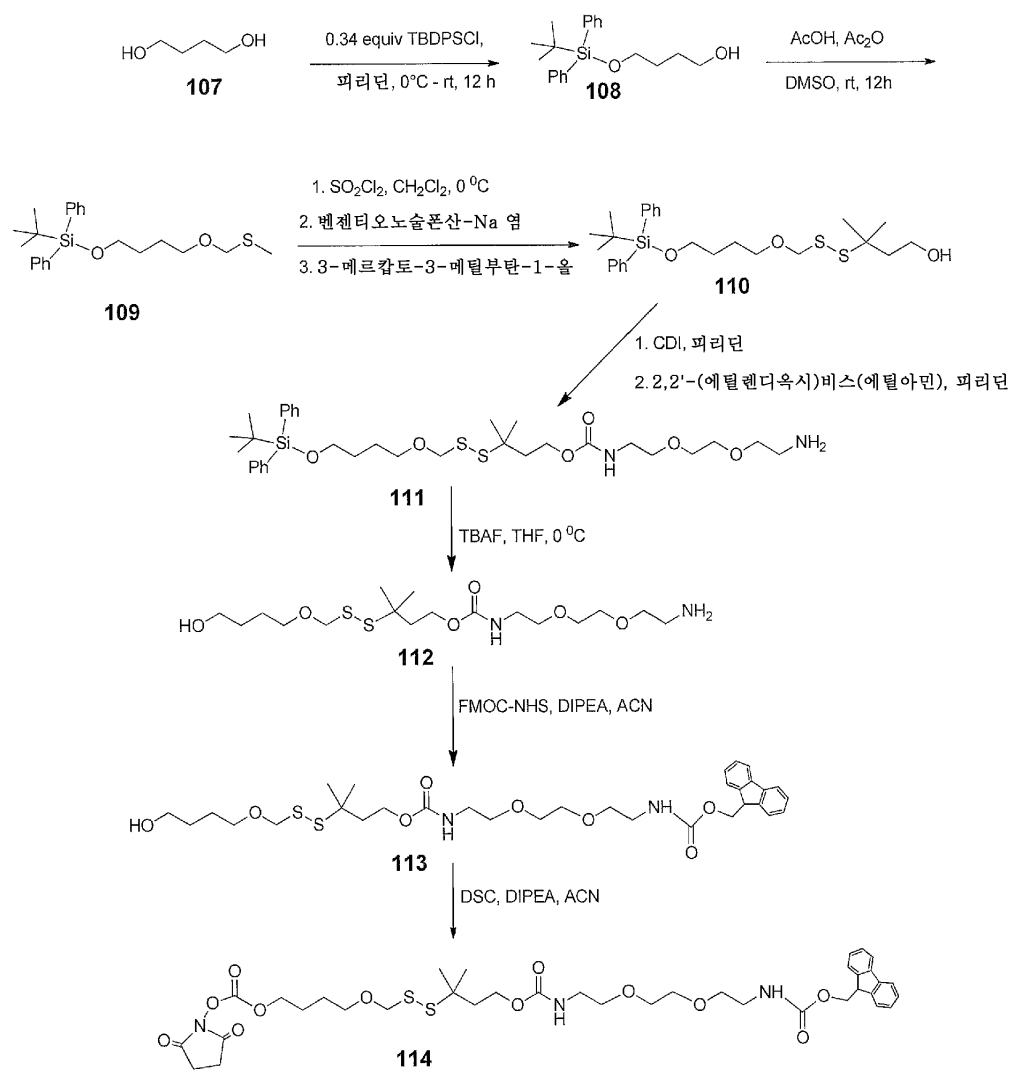


132

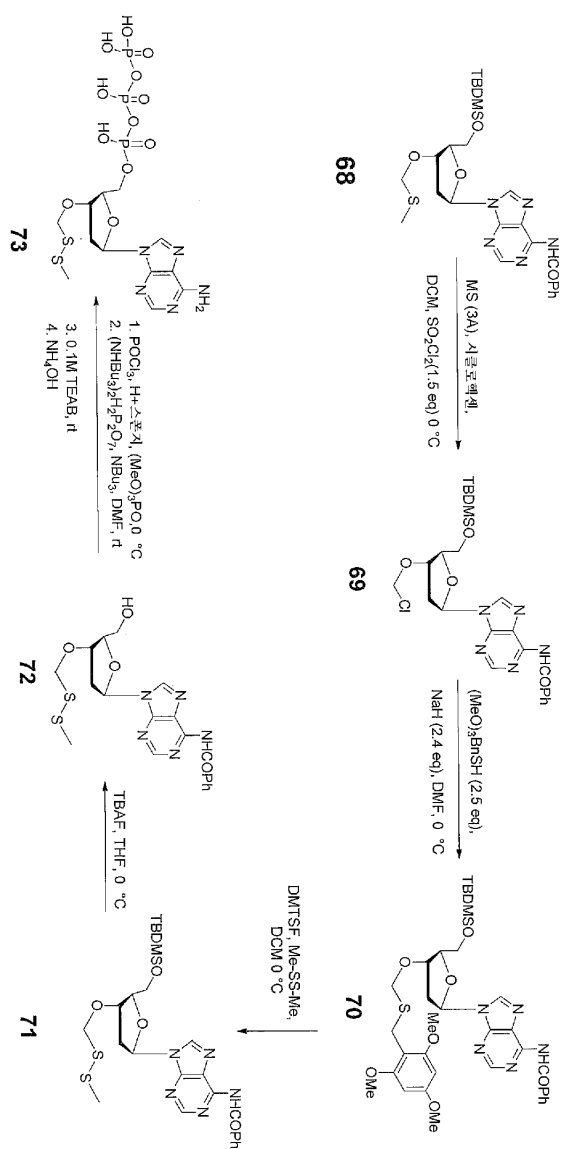
도면52



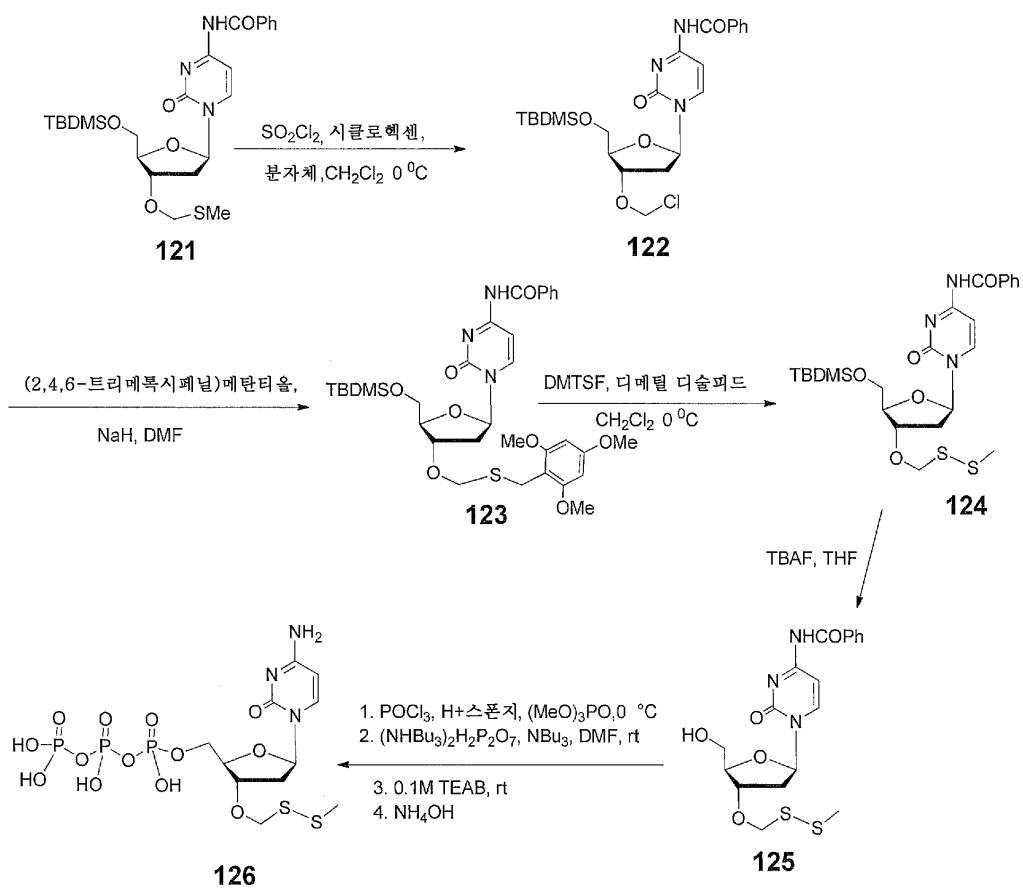
도면53



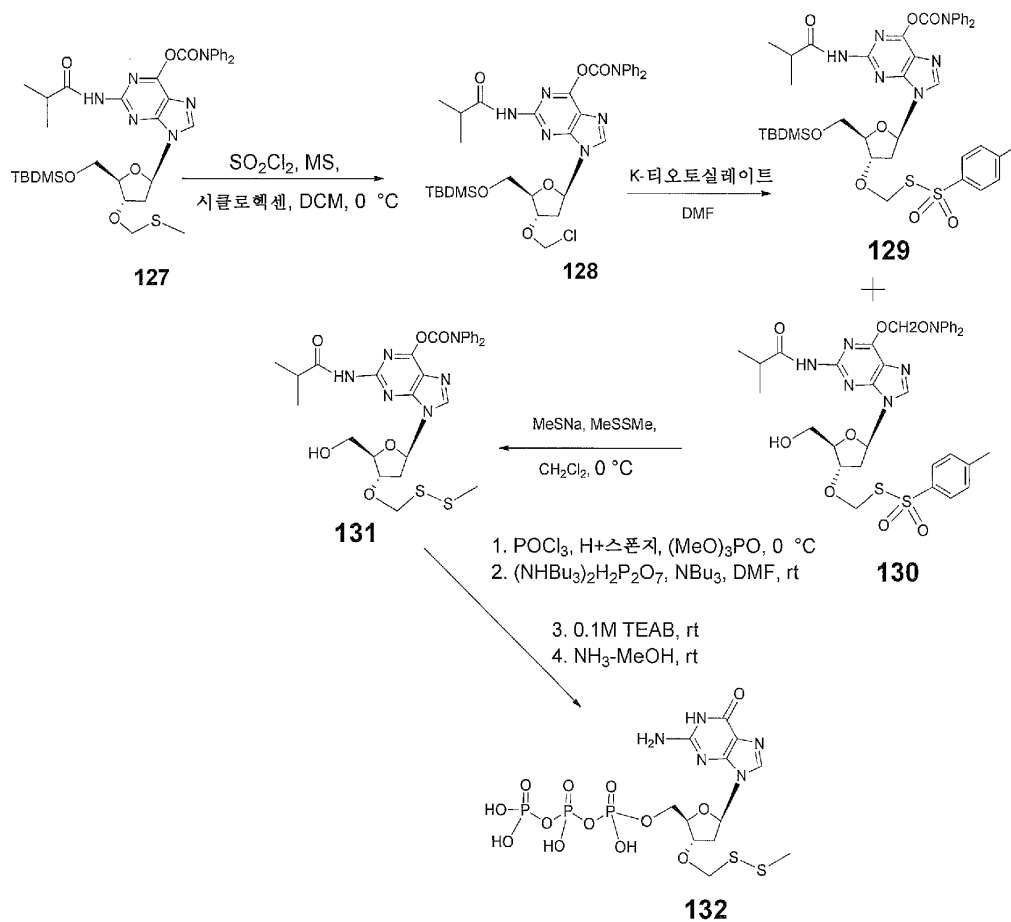
도면54



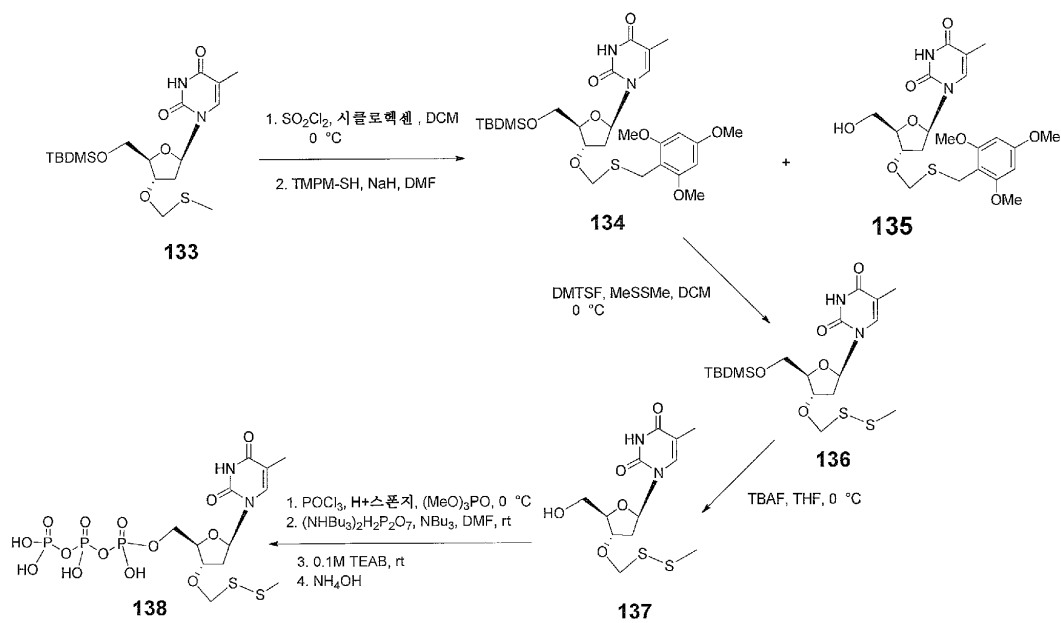
도면55



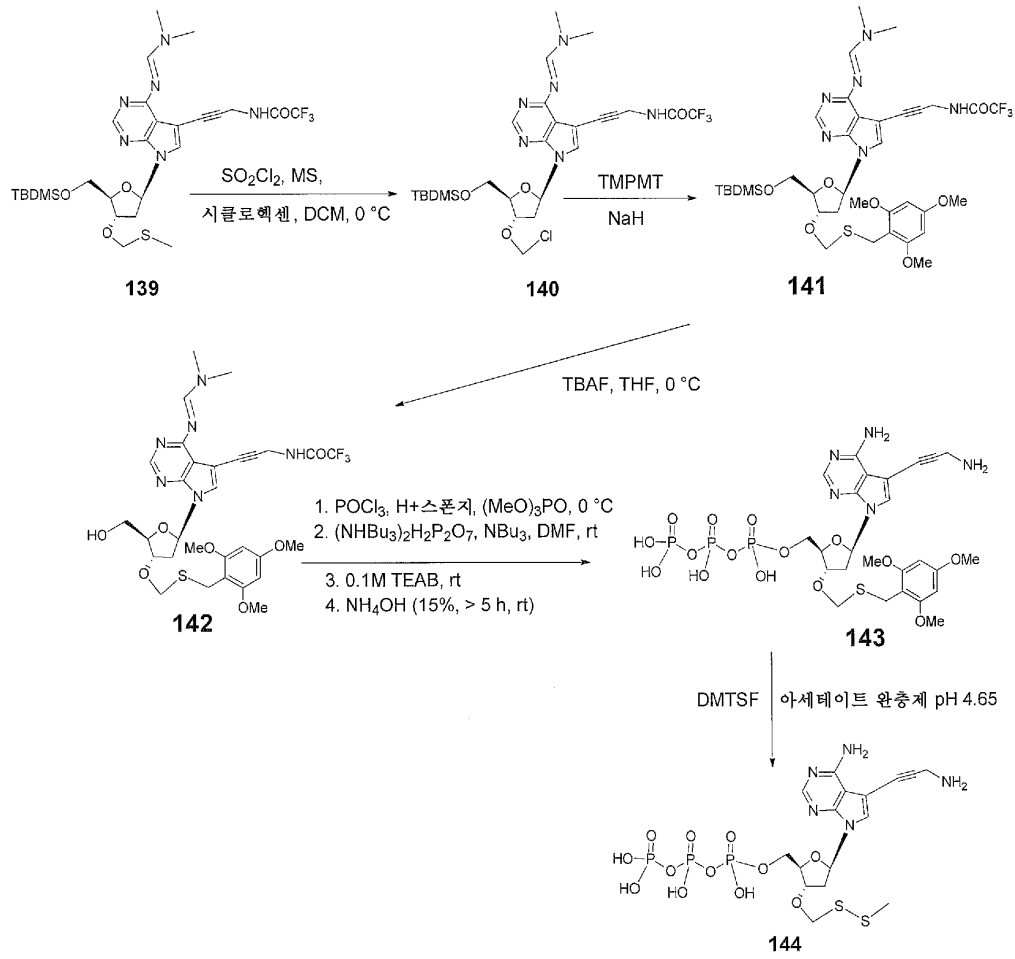
도면56



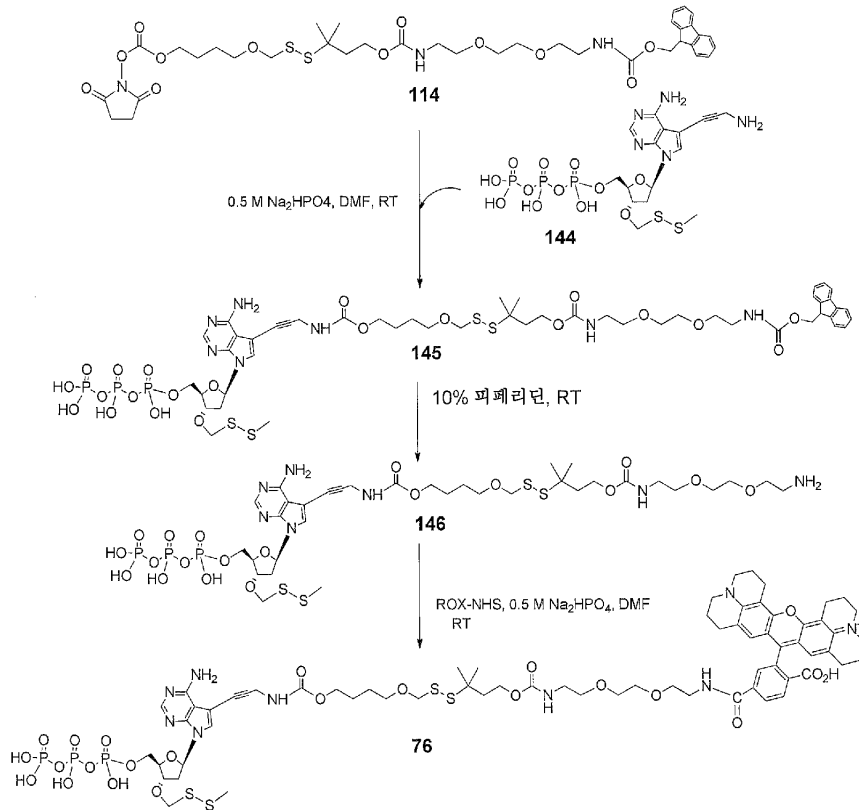
도면57



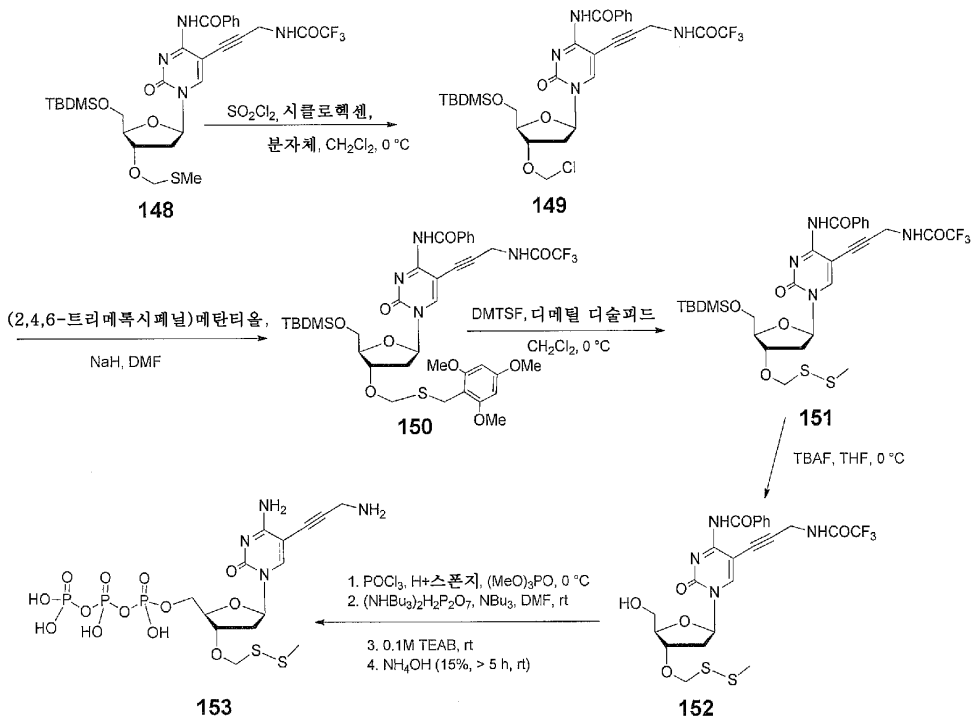
도면58



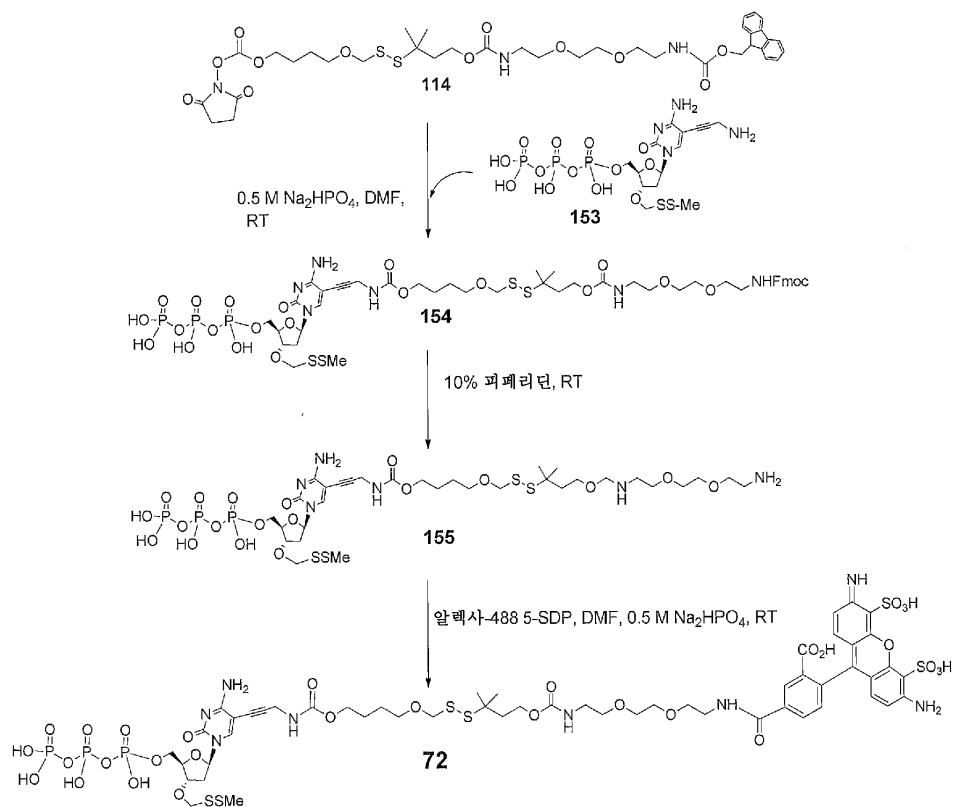
도면59



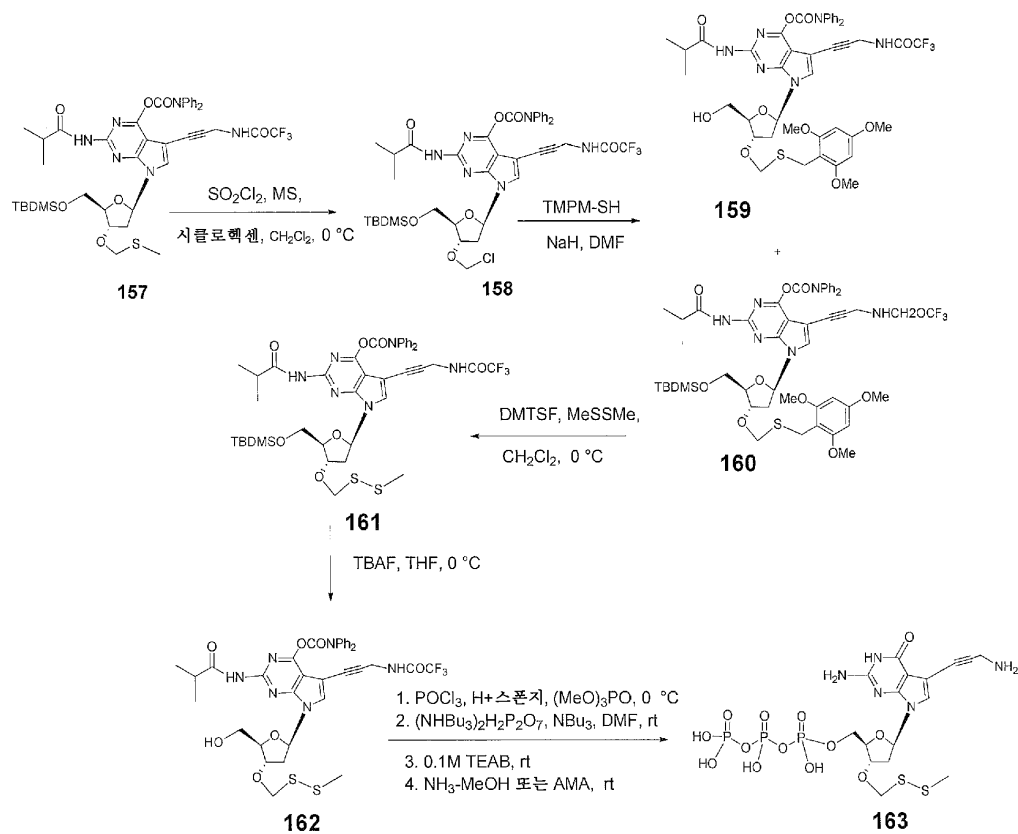
도면60



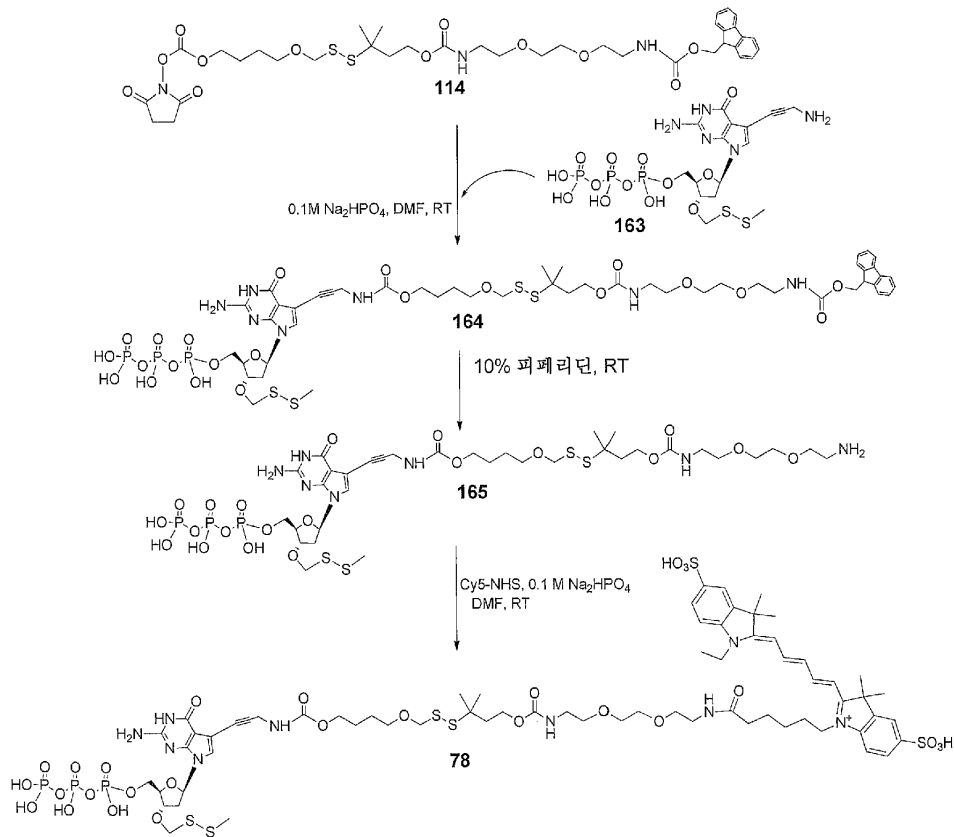
도면61



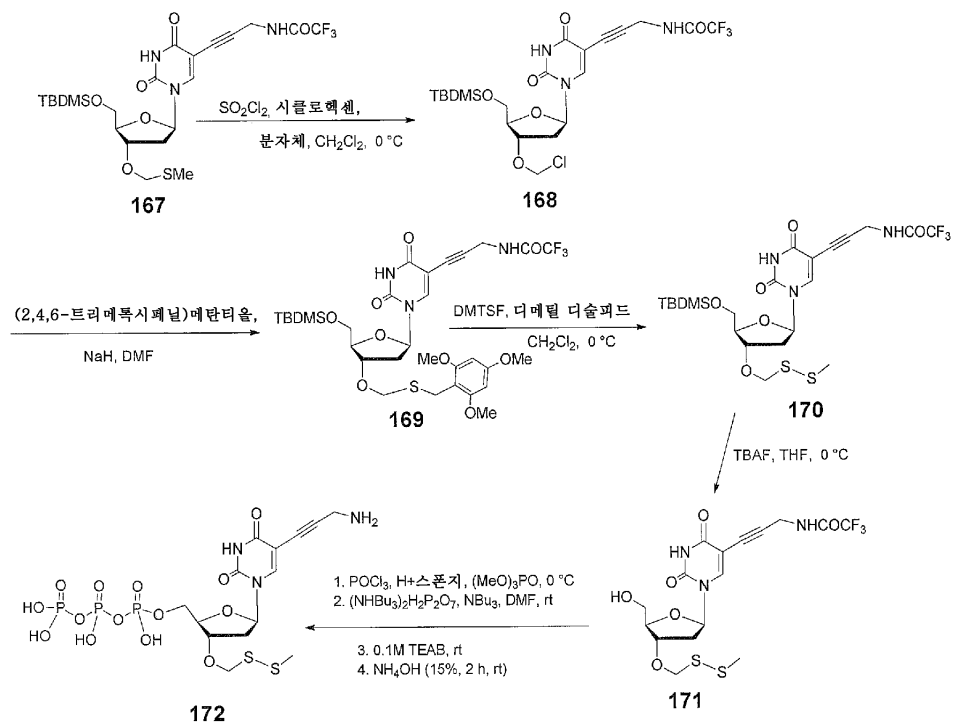
도면62



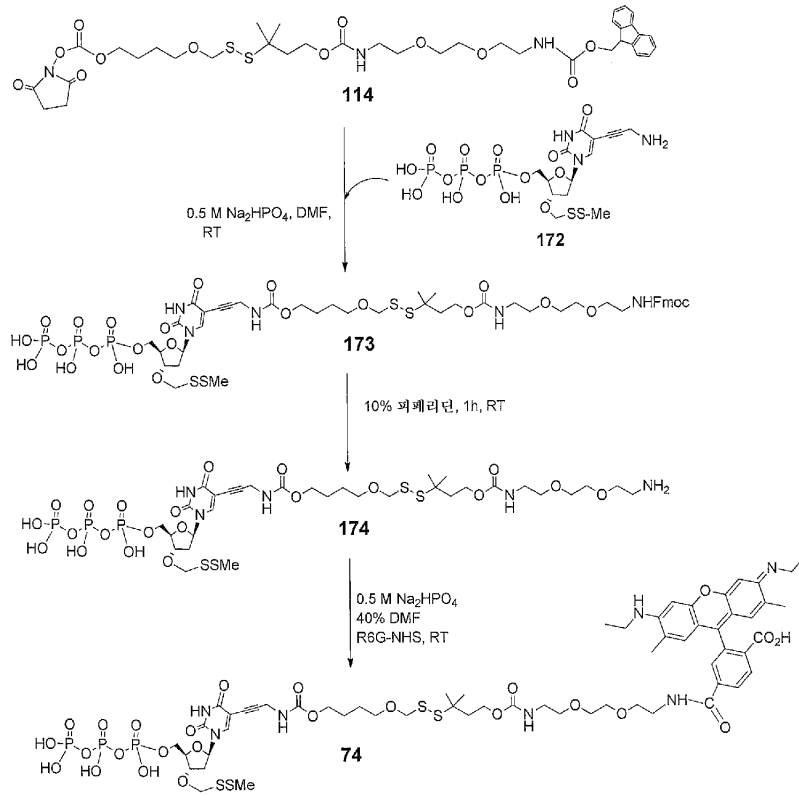
도면63



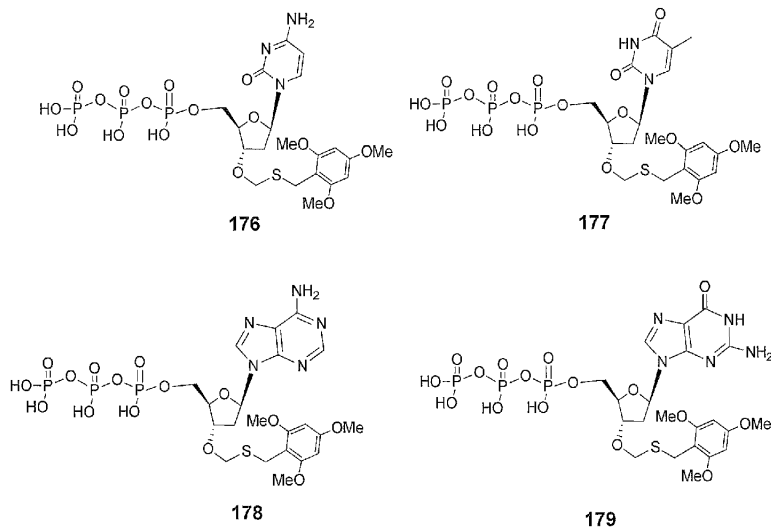
도면64



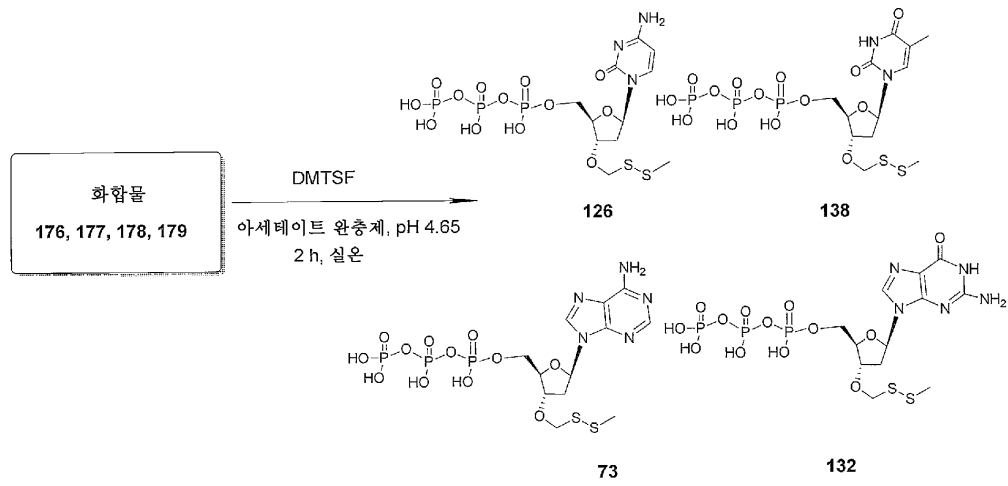
도면65



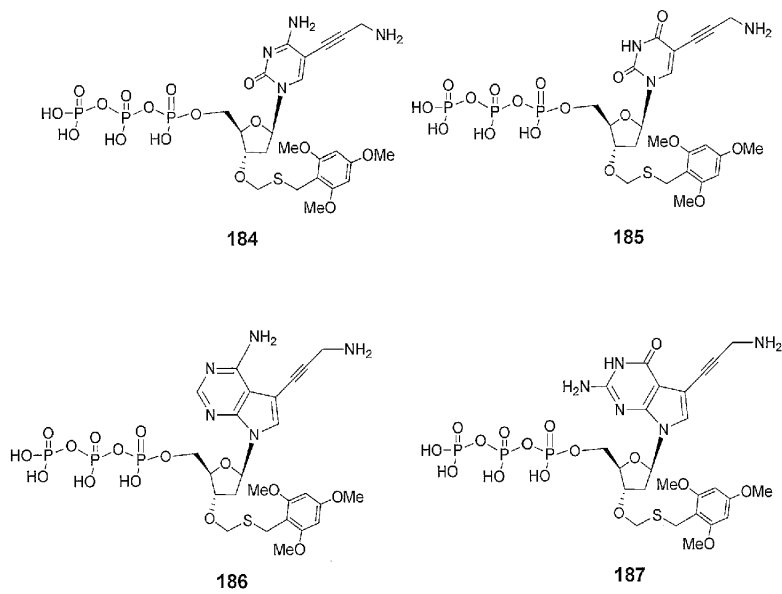
도면66



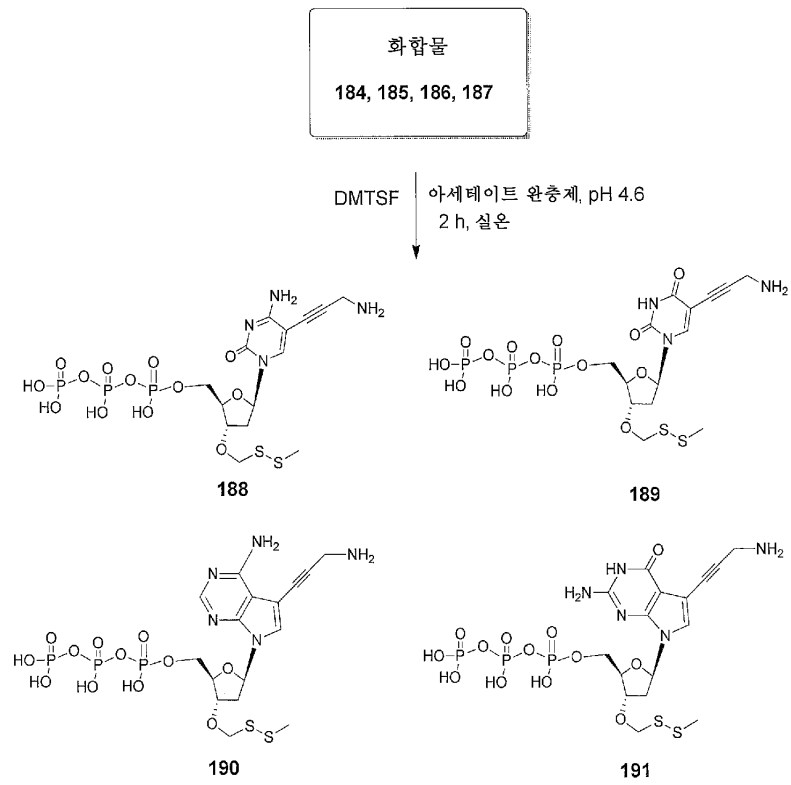
도면67



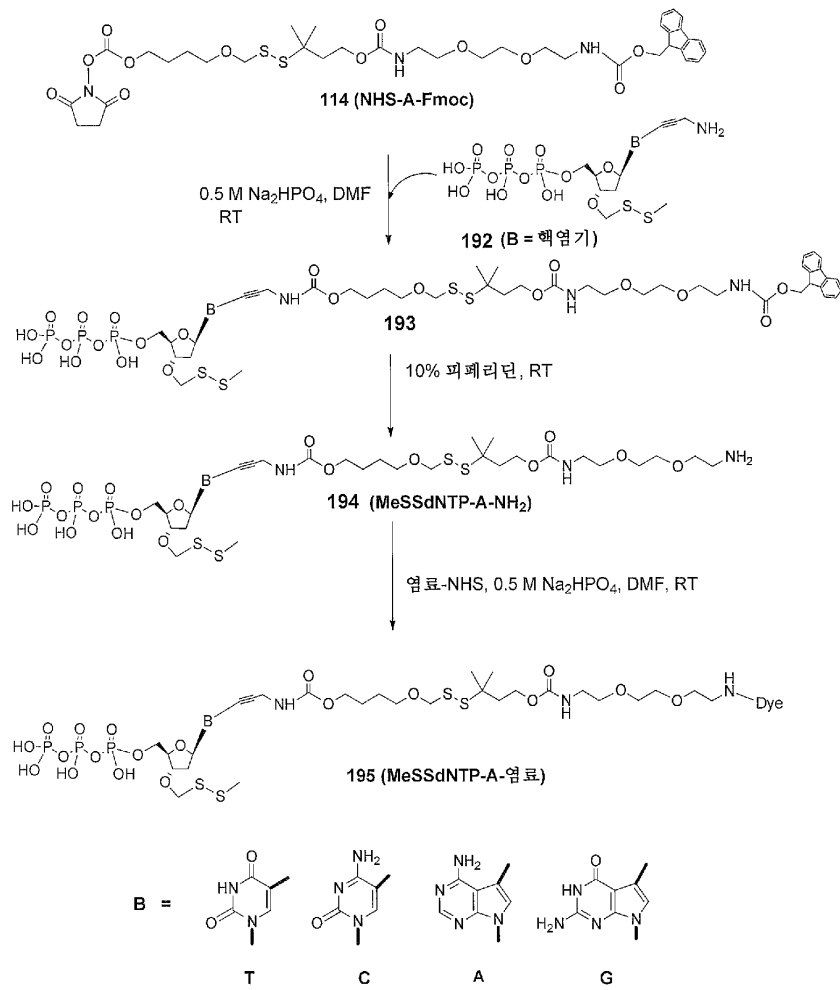
도면68



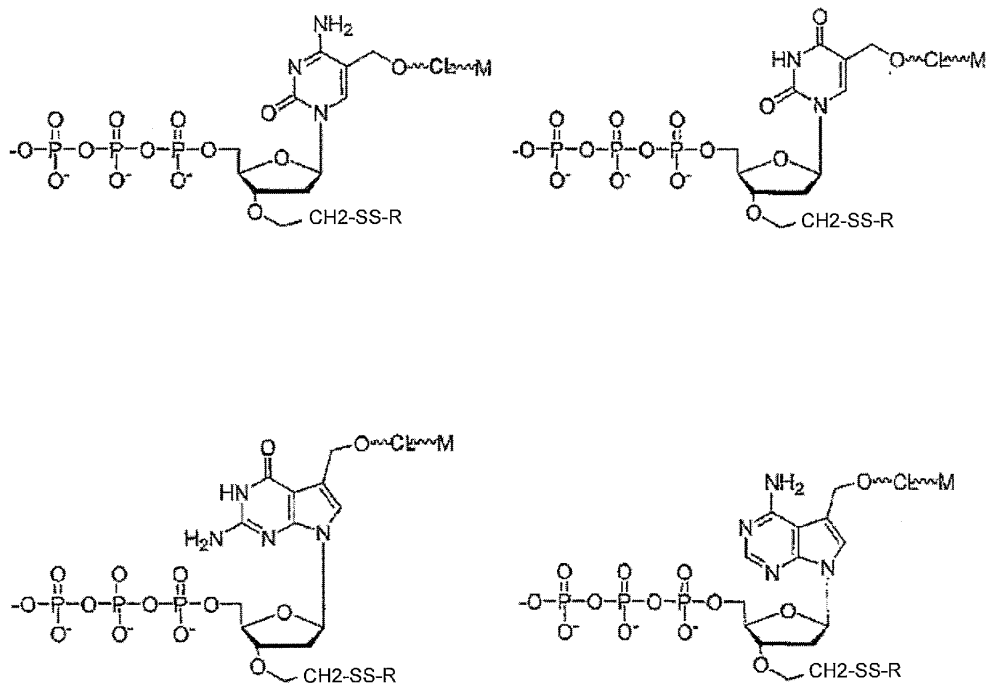
도면69



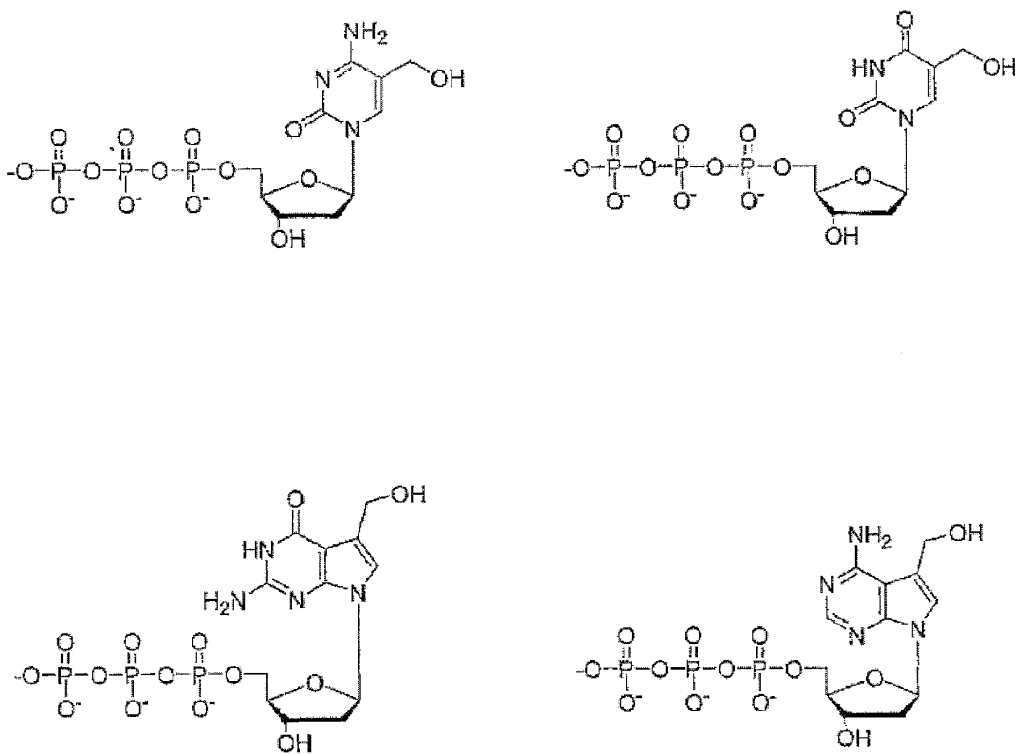
도면70



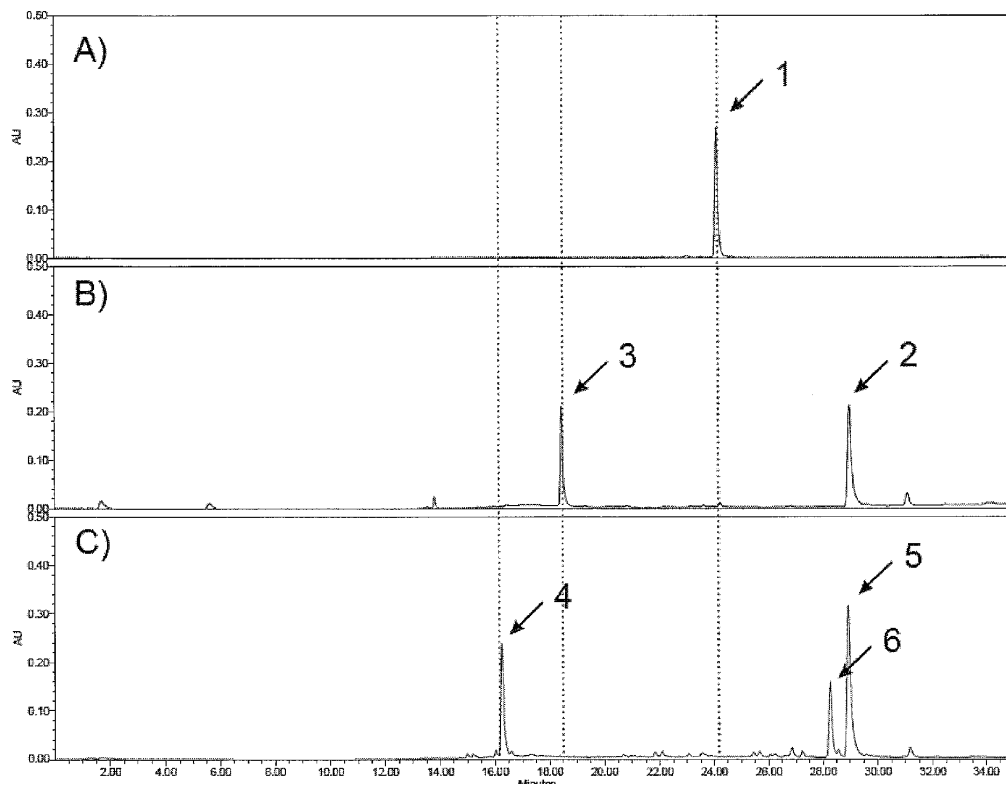
도면71



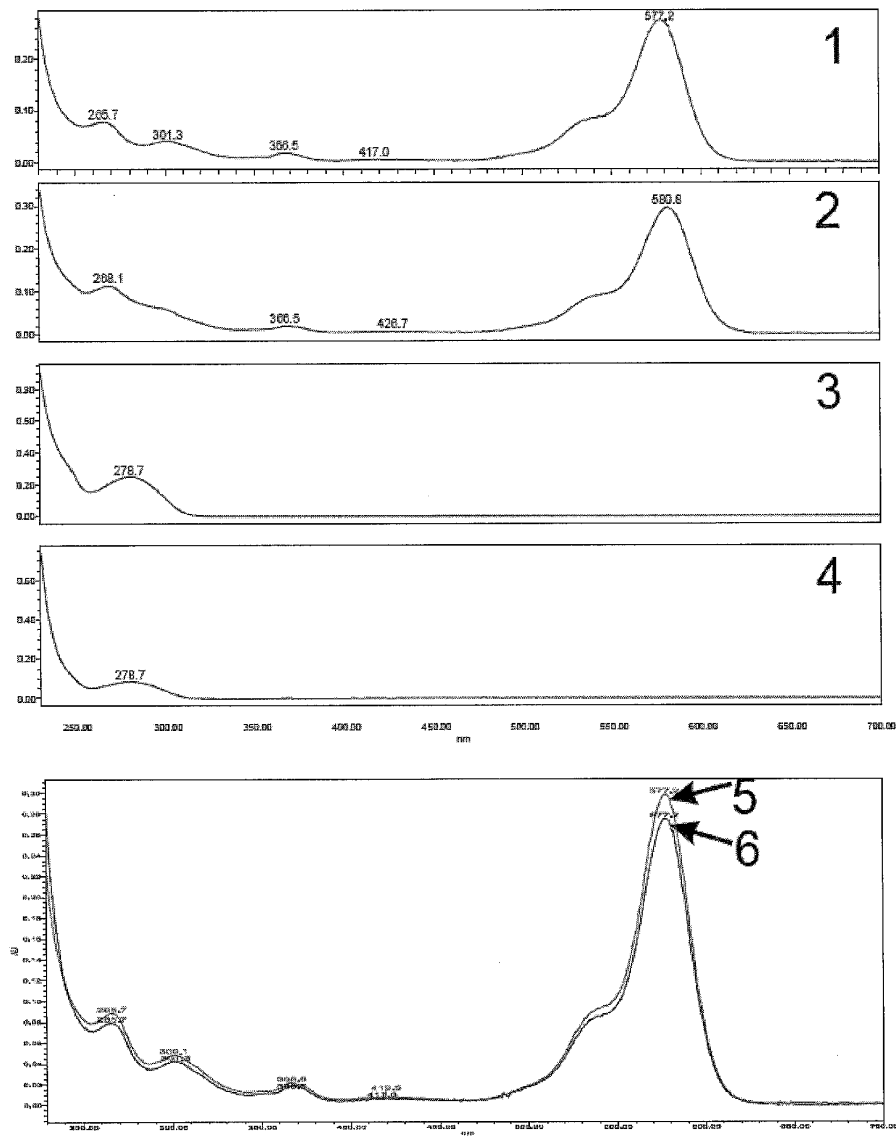
도면72



도면75



도면76

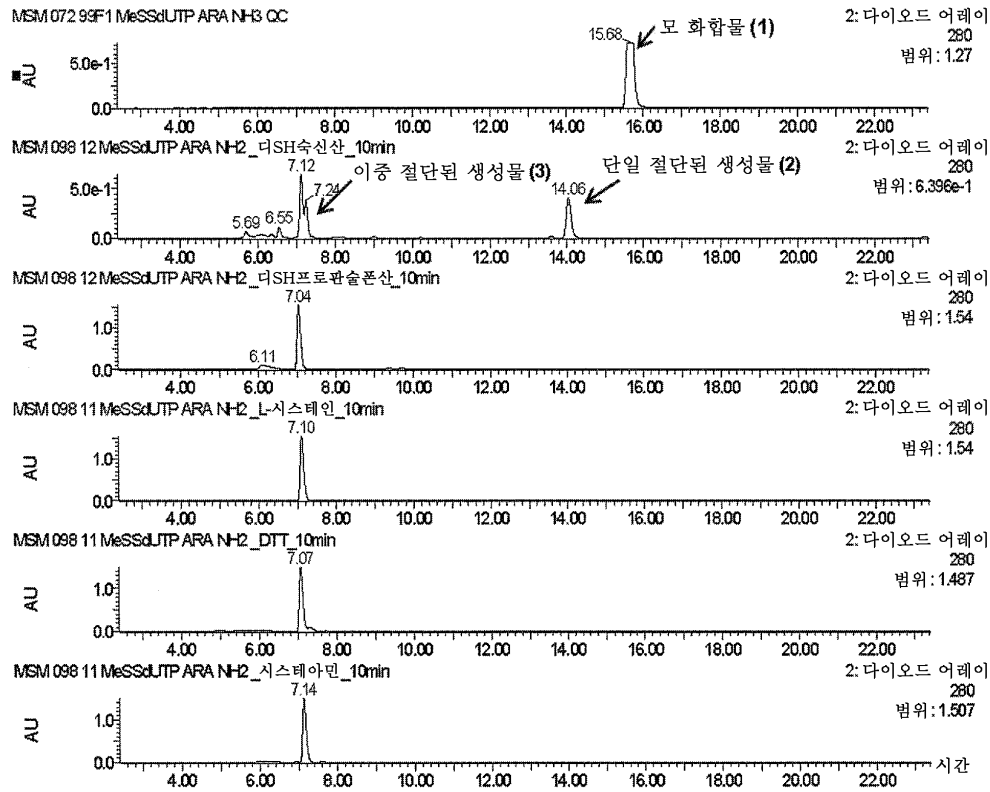


도면77



도면78

A)



B)

절단제	반응 조건	시간 & 온도	화합물 1 [%]	화합물 2 [%]	화합물 3 [%]
디티오-숙신산	뉴클레오타이드-0.5 mM, 절단제 - 20 mM, 완충제: 200 mM TE, pH 8.5	10 min @ 65°C	0	~50	~50
L-시스테인			0	0	100
DTT			0	0	100
시스테인아민			0	0	100