

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷

C07D 239/54

(11) 공개번호 특2001-0030658

(43) 공개일자 2001년04월16일

(21) 출원번호	10-2000-7003009
(22) 출원일자	2000년03월21일
번역문제출일자	2000년03월21일
(86) 국제출원번호	PCT/EP1998/06002
(86) 국제출원출원일자	1998년09월21일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 사이프러스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴
국내특허 : 오스트레일리아 브라질 캐나다 일본 대한민국 미국	
(30) 우선권주장	19741739.6 1997년09월22일 독일(DE)
(71) 출원인	아벤티스 레제아르히 운트 태하놀로기스 게엠베하 운트 콤파니 카게 독일 데-65929 프랑크푸르트 암 마인
(72) 발명자	미콜카크리스티앙 독일데-65929프랑크푸르트암마인게베슈스슈트라쎄36 빈트하브노르베르트 독일데-65759하테르샤임아카치엔슈트라쎄28 에쉬엔모저알베르트 스위스체하-8700퀴스나흐트베르그슈트라쎄9 쉐러슈티판 독일데-64572뷔텔보른레르헨벡5 퀸케르트게르하르트 독일데-61479글라쉬텐샤우인스랜트32 이병호
(74) 대리인	

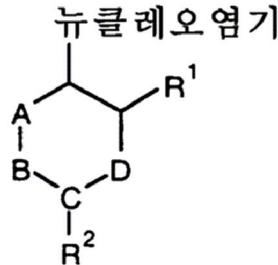
심사첨구 : 없음

(54) 사이클로헥실 및 해태로사이클릴 뉴클레오사이드 유도체, 이의 제조 방법, 및 짹형성 및/또는 시험 시스템에서 유도체와 이의 올리고머 또는 접합체의 용도

요약

본 발명은 화학식 I의 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 유도체의 제조 방법 및 짹형성 및/또는 시험 시스템에서의 이의 용도에 관한 것이다.

화학식 I



상기식에서,

R¹은 NR³R⁴, OR³ 또는 SR³[여기서, R³ 및 R⁴는 서로 독립적으로 동일하거나 상이하며, H 또는 C_nH_{2n+1}(이때, n은 1 내지 12의 정수이다)이다]이고;

R²는 C_mH_{2m}-C(X)-Y[여기서, X는 =O, =S 또는 =N이고, Y는 OR³, NR³R⁴ 또는 SR³(이때, R³ 및 R⁴는 상기와 같다)이거나, m은 1 내지 4의 정수이다]이거나;

R^2 는 $C_mH_{2m}-Z-Y'$ [여기서, Z는 설포닐, 포스포닐, 에테르 또는 아민 그룹이며, 이때, Z가 설포닐 또는 포스포닐 그룹인 경우, Y' 는 H, C_nH_{2n+1} , OR^3 , NR^3R^4 또는 SR^3 (이때, n, R^3 및 R^4 는 상기와 같다)이고, Z가 에테르 또는 아민 그룹인 경우, Y' 는 C_nH_{2n+1} 이고;

A, B 및 D는 서로 독립적으로 동일하거나 상이하며, CR^5R^6 , O, NR^7 또는 S[여기서, R^5 , R^6 , R^7 은 서로 독립적으로 H 또는 C_nH_{2n+1} (이때, n은 상기와 같다)이다]이고;

C는 CR^8 또는 N(여기서, R^8 은 독립적으로 R^5 에서 정의한 바와 같지만, A-B, B-C 또는 C-D는 두개의 동일한 헤テ로원자는 아니다)이며;

뉴클레오염기는 티민, 우라실, 아데닌, 시토신, 구아닌, 이소시토신, 이소구아닌, 크산틴 또는 히포크산틴이다.

대표도

도1

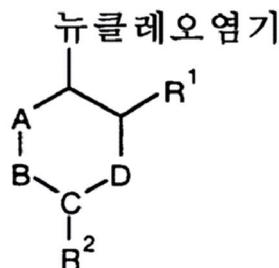
색인어

사이클로헥실, 헤테로사이클릴, 뉴클레오사이드 유도체, 뉴클레오염기, [2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-뉴클레오염기, 거울상이성체, 보호 그룹, 요오도사이클로알칸, 요오도락탐, 하이드로퍼옥사이드, 올리고머, 링커, 생체 분자, 운반체, 짹형성 및/또는 시험 시스템

명세서

본 발명은 화학식 I의 화합물, 이의 제조 방법, 및 짹형성 및/또는 시험 시스템에서의 이의 용도에 관한 것이다.

화학식 I



狎形성 시스템은 비-공유결합성 상호작용의 초분자 시스템이며, 이는 선택성, 안정성 및 가역성에 의해 구별되며, 이의 특성은 바람직하게는 열역학적으로, 즉, 온도, pH 및 농도에 의해 영향을 받는다. DNA 및 RNA는 유전 형질의 운반체로서 근본적인 역할을 수행한다. 상기狎形성 시스템은 예를 들면, 이의 선택성 뿐만 아니라 "분자 접착제"로서의 특성의 결과로서, 상이한 금속 클러스터들을 함께 모아 잠재적으로 신규한 특성들을 갖는 클러스터 집단을 수득하는데 사용할 수 있다[R. L. Letsinger, et al., Nature, 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature, 1996, 382, 609-11].

따라서, 강력하고 열역학적으로 조절가능한狎形성 시스템은 나노 과학기술분야에서의 용도, 신규한 물질, 진단제, 치료제 및 마이크로 전자공학적, 광학적 및 광전자공학적 성분의 제조, 및 예를 들면, (순열 조합적인) 단백질 어셈블리의 합성과 같이 초분자 단위체를 수득하기 위한 조절된 회합에 있어서 더욱더 중요한 역할을 수행하고 있다[문헌 참조: 예를 들면, A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomolekuls(Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504].

그러나, 상기 유형의狎形성 시스템을 제조하는데 있어서, DNA 및 RNA 단위체들은 하기 단점을 갖는다:

a) 두개의 쇄를 함께 유지시키는 힘, 특히 수소 결합 및 적층 효과(stacking effect)는 본질적으로 매우 낮다. 따라서, 상기 이합체는 안정성이 낮다. 이는 소위 전이 곡선 기록 및 전이점 측정에 의해 용이하게 결정할 수 있다. 결과적으로,狎形성 시스템을 제조하기 위해서는, 상대적으로 긴 개별적인 쇄가 필요하며, 이는 초분자 단위체에 대해狎形성 시스템의 부분이 우세해지는 결과를 가지며, 즉 "뉴클레오타이드 충전"이 높아진다.

b) 후그스틴(Hoogsteen)狎形성(이는 와트슨-크릭크狎形성과의 양자택일이 가능하다)으로 인해, 선택성이 감소한다. 따라서, 평행 이합체 또는 비가역적인狎形성 방법이 종종 혼용된다.

c) 당 인산 골격의 높은 유연성으로 인해, 나선형 구조가 형성되며, 결과적으로 초분자 단위체의 공간 배치의 조절이 보다 용이하지 않게 된다.

d) 골격내의 인산이 에스테르 결합의 화학적 불안정성으로 인해 초분자 단위체를 이용하는데 있어서, pH 또는 온도 같은 물리적 조건을 변화시키는 것이 용이하지 않다.

e) 생성물의 뉴클레아제 감수성은 신속한 효소적 분해(이는 간신히 회피할 수 있을 뿐이다)를 초래하며, 따라서 초분자 단위체의 파괴를 초래한다.

f) 초분자 단위체가 생물학적 시스템내에서 사용되는 경우 생물학적 시스템의 유전 물질과의 가능한 간섭(interference)을 배제할 수 없으며, 즉 짹형성 방법의 직교성이 없다.

g) 상대적으로 대량의 올리고뉴클레오타이드의 제조는 예를 들면, 펩타이드 합성과 비교하여, 통상적으로 사용하는 고체상의 낮은 충전 능력으로 인해 어렵다.

h) 비천연 L 거울상이성체 형태의 제조는 적합하게 배열된 당 단위체의 입수 가능성이 낮아 어렵다.

따라서, 예를 들면, 생리학적 매질에서 상보적으로 결합된 2차원 및 3차원적 초분자 구조[예를 들면, 제WO 96/13522호]에서 DNA 또는 RNA 단위체의 사용은 특히 e), f) 및 g) 항목의 측면에서 현실화시키기 매우 어려울 수 있다.

DNA 및 RNA 단위체에 대한 대안은 소위 피라노실-RNA(p-RNA)이다. pRNA는 당 단위로서 리보푸라노오스 대신에 리보피라노오스를 함유하는 올리고뉴클레오타이드이며, 따라서 와트슨-크릭크-짜형성된, 비평행, 가역적으로 "융해하는", 준-선형의 안정한 이합체를 전적으로 형성한다. 부가적으로, 또한 키랄성(chirality)의 반대 개념의 호모키랄 p-RNA 쇄가 있으며, 이는 마찬가지로 조절가능하게 쌍을 형성하지만 형성된 이합체내에서 엄밀하게는 나선형은 아니다. 초분자 단위체의 합성에 있어서 이러한 유용한 특이성은 리보피라노오스 포스페이트 골격의 상대적으로 낮은 유연성 및 쇄 축에 대한 염기 면의 심한 경사도와 관계가 있으며 수득되는 이합체내에서 상기로부터 형성되는 쇄간 염기 적층 경향은 최종적으로 골격 합성에서 2',4'-시스-이치환된 리보피라노오스 환의 도입에 기여할 수 있다. 따라서, p-RNA는 DNA 및 RNA의 기술된 단점의 일부를 해결할 수 있지만, d), e), g) 및 h) 항목에 따른 단점을 해결하지는 못한다.

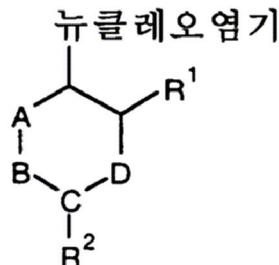
또 다른 대안은 아미드 결합을 사용하는 모노머 단위체들의 결합이며, 즉 올리고머성 펩타이드, 소위 펩타이드 핵산(PNA)의 합성이다.

이들의 개방-쇄 구조로 인해, PNA는 높은 유연성을 가지며 따라서, 이의 구조적 예비 조직화의 측면에서 초분자 시스템의 조절된 합성에 적합하지 못하다.

따라서, 본 발명의 목적은 상기된 단점을 갖지 않는 유용한 화합물을 제조하는 것이다.

따라서, 본 발명의 한 가지 목적은 화학식 I의 화합물이다.

화학식 I



상기식에서,

R^1 은 NR^3R^4 , OR^3 또는 SR^3 [여기서, R^3 및 R^4 는 서로 독립적으로 동일하거나 상이하며, H 또는 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (이때, n은 1 내지 12, 바람직하게는 1 내지 8, 특히 1 내지 4의 정수이다)이다]이며, 바람직하게는 NR^3R^4 또는 OR^3 이며, 보다 바람직하게는 NR^3R^4 , 특히, NH_2 이고;

R^2 는 $\text{C}_m\text{H}_{2m}-\text{C}(X)-\text{Y}$ [여기서, X는 =O, =S 또는 =N이고, Y는 OR^3 , NR^3R^4 또는 SR^3 (이때, R^3 및 R^4 는 상기와 같다)이고, n은 1 내지 4, 바람직하게는 1 내지 3, 특히 1 내지 2의 정수이고; 바람직하게는 X는 NR^3R^4 또는 OR^3 이며, 보다 바람직하게는 NR^3R^4 , 특히 NH_2 이며, Y는 바람직하게는 OR^3 또는 NR^3R^4 이다]이거나;

R^2 는 $\text{C}_m\text{H}_{2m}-\text{Z}-\text{Y}'$ [여기서, Z는 설포닐, 포스포닐, 에테르 또는 아민 그룹이며, 이때, Z가 설포닐 또는 포스포닐 그룹인 경우, Y'는 H, $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, OR^3 , NR^3R^4 또는 SR^3 (이때, n, R^3 및 R^4 는 상기와 같다)이고, Z가 에테르 또는 아민 그룹인 경우, Y'는 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 이다]이고;

A, B 및 D는 서로 독립적으로 동일하거나 상이하며, CR^5R^6 , O, NR^7 또는 S[여기서, R^5 , R^6 및 R^7 은 서로 독립적으로 H 또는 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (이때, n은 상기와 같다)이다]이고;

C는 CR^8 또는 N(여기서, R^8 은 독립적으로 R^5 에서 정의한 바와 같지만, A-B, B-C 또는 C-D는 두개의 동일한 해테로원자는 아니다)이며;

본 발명의 의미내에서, 용어 뉴클레오염기(nucleobase)는 티민, 우라실, 아데닌, 시토신, 구아닌, 이소시토신, 이소구아닌, 크산틴 또는 히포크산틴이며, 바람직하게는, 티민, 아데닌, 시토신 또는 구아닌이다.

특히, R^1 이 NH_2 이고 R^2 가 CH_2-COOH , 특히 1-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]티민, 1-[2-아미노-4-카복시메틸)사이클로헥실]우라실, 1-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]시토신, 9-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]아데닌 또는 9-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]구아닌 같은 [2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]뉴클레오염기인 화합물이 바람직하다.

추가로, 본 발명에 따른 화합물이 거울상이성체적으로 순수한 것이 바람직하다.

합성에 있어서, 또한 R^1 에 보호 그룹이 제공되는 경우, 예를 들면, R^1 이 NH_2 인 경우, 3급-부톡시카보닐 그룹(BOC) 또는 9-플루오레닐메톡시카보닐 그룹(FMOC)을 제공하거나, R^1 이 OH인 경우, 에테르 또는 아세틸 보호 그룹을 제공하는 것이 바람직하다. 보호 그룹은 일반적으로 바람직하지 않은 반응으로부터 화합물의 반응성 그룹을 보호하며 용이하게 제거할 수 있는 라디칼을 의미하는 것으로 이해된다. 이러한 유형의 그룹은 예를 들면, 벤질옥시메틸(BOM), BOC, FMOC, 에테르 또는 아세틸 보호 그룹이다.

부가적으로, Y는 또한 활성화제와 반응하여 반응성 중간체, 예를 들면, 혼합 무수물을 제공할 수 있다.

바람직하게는, 본 발명에 따른 화합물은 사이클로헥산 유도체이며, 이는 1번 위치에서, 뉴클레오염기를 가지며, 2번 위치에서 친핵제, 예를 들면, 4번 위치의 반응성 그룹과 반응할 수 있거나 이의 활성화 후 예를 들면, 카보닐 작용기와 반응할 수 있는 질소 원자를 가지며, 따라서, 상기 공정의 반복에 의해 올리고머 구조를 형성할 수 있다. 입체화학적 측면에서, 유도체는 6-원환상의 모든 치환체가 적도 위치를 가지며, 특히 1번 및 2번 위치의 치환체가 적도 위치를 가지며, 특히 뉴클레오염기가 적도 위치를 갖는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 화합물은 예를 들면, 하기 방법에 따라서 제조할 수 있다.

처음에, 씨배치(Seebach)의 TADDOL 3[D. Seebach et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 1788] 같은 키랄, 비-라세미형 촉진제의 존재하에 예를 들면, 1,3-부타디엔 1 및 예를 들면, 3-(2-프로페노일)-1,3-옥사졸리딘-2-온 2 사이의 키랄형성 Diels-Alder 반응을 수행한다(도 1 참조). 예를 들면, 구리 및 염화제일 구리의 존재하에 옥사졸리딘-2-온과 아크릴로일 클로라이드를 반응시켜 3-(2-프로페노일)-1,3-옥사졸리딘-2-온을 제조할 수 있다. 화합물 5는 마그네슘 조각 및 무수 메탄올의 존재하에 예를 들면, 4로부터 제조할 수 있다. 이후, 상기 반응 생성물을 예를 들면, 리튬 알루미늄 수소화물을 사용하여 환원시켜 화합물 6을 수득한다. 아세토니트릴 7은 예를 들면, 메타노일 클로라이드와 반응시켜 메틸 메타노에이트를 수득한 후 시아나이드와 반응시킴으로써, 6으로부터 제조할 수 있다. 반응 생성물의 알칼리 가수분해로 아세트산 유도체를 생성시키며, 이는 암모니아 수용액의 존재하에서 $SOCl_2$ 와 반응시켜 아세트아미드 8을 수득할 수 있는 아세틸 클로라이드를 제공할 수 있다. 이후, 이의 요오도락탐화를 수행하여 요오도락탐 9를 수득한다[S. Knapp et al., Org. Synth. 1991, 70, 101].

이후, 요오도락탐 9를 수소화물의 존재하에 이환계의 파괴가 일어나지 않은 채로 뉴클레오염기에 결합시킬 수 있다.

이를 위해서, 뉴클레오염기의 가능한 반응성 그룹을 예를 들면, BOC, FMOC, 아세틸 등의 적합한 보호 그룹으로 보호시키는 것이 바람직하다. 뉴클레오염기로서 디아미노푸린인 경우에만, 보호 그룹이 불필요하다. 그러나, 뉴클레오염기로서 디아미노푸린의 경우에도 락탐 환을 개환시키는 것은 더 이상 가능하지 않다는 것이 확인되었다. 이와는 별개로, 디아미노푸린은 생체 시스템내에서 어떠한 역할도 수행하지 않는다.

추가로 요오도락탐이 라세미형으로 존재하지는 않지만, 거울상이성체적으로 순수한 형태로 존재하는 경우, 짹형성 시스템으로 의도된, 합성하고자 하는 올리고머는 하나의 입체화학적 시리즈에 속해야만 한다. 라세미 단위체로부터 짹형성 시스템의 합성은 일반적으로 가능하지 않다.

본 발명에 따라서, 결합가능한 피리미딘 단위체, 예를 들면, 티민 단위체는 5-단계 합성 과정에서 요오도락탐 9로부터 개시하여 전 단계에 걸쳐서 27%의 수율로 제조할 수 있다(도 2).

제1 단계에서, 뉴클레오염기의 입체선택성 도입은 치환 반응(13a)에서 수행한 후 티민의 산성 이미드 양성자(13b)를 보호시킨다. 이후, 락탐을 보호 그룹, 예를 들면, Boc 그룹(13c)을 도입시켜 활성화시킨 후, 상기 환을 예를 들면, LiOH(14a)를 사용하여 친핵적으로 개환시킨다. 예를 들면, 존재하는 BOM 보호 그룹을 제거시킨 후, 바람직한 단위체(14b)를 촉매적 수소화를 사용하여 생성시킨다.

거울상형성(R) 단위체 ent-14b는 (R)-요오도락탐 ent-9로부터 유사한 방법에 의해 수득할 수 있다. 마찬가지로, 결합가능한 우라실, 시토신 및 이소시토신도 유사하게 수득할 수 있다.

결합가능한 푸린 단위체, 예를 들면, 아데닌 단위체는 7-단계 합성 방법에서 요오도락탐 9로부터 개시하여 전 단계에 걸쳐서 19%의 수율로 수득할 수 있다(도 3).

예를 들면, (15a)를 보유시키며 N(6)-벤조일화된 아데닌의 (S)-요오도락탐 9으로의 도입 후, 예를 들면, N(6)-포름아미딘아데닌 락탐 15c를 수득하기 위한 재보호를 수행한다. 바람직한 단위체 16을 수득하기 위한 예를 들면, 3급-부톡시카보닐화(15d)를 사용한 락탐의 활성화, 예를 들면, N(6)-아니소일-보호된 락탐(15f)을 수득하기 위한 신규한 재보호 및 LiOH를 사용한 후속적인 락탐 절단이 수행된다.

거울상형성(R) 단위체 ent-16은 (R)-요오도락탐 ent-9로부터 유사한 방법으로 수득할 수 있다. 마찬가지로, 결합가능한 구아닌, 이소구아닌, 크산틴 및 히포크산틴 단위체를 유사하게 수득할 수 있다.

본 발명에 따른 헤테로원자를 함유하는 6-원 환 및 기타 유도체의 제조는 예를 들면, 헤테로-Diels-Alder 반응 또는 적합한 개시 화합물을 사용한 Diels-Alder 반응을 사용하여 유사하게 [원문 그대로] 가능하다.

따라서, 본 발명의 또 다른 목적은 하기 단계를 갖는 본 발명에 따른 화합물의 제조 방법이다:

(a) 바람직하게는 예를 들면, NaH 같은 수소화물의 존재하에 요오도락탐 같은 적합한 요오도사이클로알칸, 바람직하게는 거울상이성체적으로 순수한 요오도사이클로알칸의 보호된 뉴클레오염기와의 결합, 및 요오도락탐의 경우,

(b) 예를 들면, 보호 그룹(예를 들면, BOC 그룹)을 도입시킴에 의한 락탐의 활성화, 및

(c) 예를 들면, 하이드로퍼옥사이드(예를 들면, LiOH)를 사용한 친핵성 개환.

올리고머의 제조를 위해서, 이후 본 발명에 따른 화합물을 바람직하게는 메리필드 펫타이드 합성법에 따른 고체상에서 합성하여 올리고머성 구조를 수득한다. 이러한 방법에서, 필요한 시약은 바람직하게는 초과량으로 부가하고 반응하지 않은 양은 다시 단순한 세척 방법으로 제거한다[R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 1963, 85, 2149]. 일시적인 보호 그룹의 제거 및 예를 들면, 대칭성 무수물 방법에 따른, 보호된 모노머 단위체의 결합으로 이루어지는 반복적인 사이클을 통해 수지상에서 올리고머를 생성시킨다. 합성 말기에서, 말단 보호 그룹을 제거하고, 올리고머를 수지로부터 절단한 후 바람직하게는 크로마토그래피 방법을 사용하여 정제한다. 합성 생성물의 분리된 HPLC 분획들은 분석 HPLC를 사용하여 이의 순도를 측정하고 전기스프레이 질량 분광분석을 사용하여 명확하게 특성화한다.

따라서, 본 발명의 추가적인 목적은 일반적으로 [원문 그대로] 2' → 4'으로 결합되는 본 발명에 따른 화합물 하나 이상을 포함하는 소위 CAN(사이클로헥실뉴클레오올리고아미드)인 올리고머이다.

펫타이드, 단백질, 수용체, 산화환원 중심, 항체, (DNA, RNA 같은) 핵산 부분 같은 문자 종을 기술된 짹 형성 시스템의 도움으로 함께 모으기 위해서는, 일반적으로 적합한 링커가 통합된다. 바람직하게는, 배타적이지는 않지만, 리신이 올리고머성 짹형성 시스템내 임의의 바람직한 위치에 통합될 수 있지만, 매우 바람직하게는 말단에 통합될 수 있다. 이의 유리 아미노 그룹으로 인해, 리신은 매우 많은 결합 가능성을 갖는다. 본 발명에 따른 올리고머내로의 통합은 예를 들면, Boc-리신(Fmoc)을 사용하여 수행하며, Fmoc 그룹은 DMF 중 피페리딘을 사용하여 제거할 수 있다.

따라서, 본 발명은 또한 부가적으로 하나 이상의 링커, 바람직하게는 리신 링커, 특히 말단 리신 링커를 함유하는 올리고머에 관한 것이다.

예를 들면, 아미노-기능화된 올리고머는 또한 바람직하게는, 예를 들면 요오도아세틸석신이미드(A) 또는 비스(하이드록시석신이미딜) 글루타레이트(B) 같은 활성화된 링커와 함께 유도체화될 수 있으며, 이후 이는 생리학적 매질, 특히 수성-완충된 용액에서 임의로 유기 용해제의 부가와 함께 예를 들면, (A)를 통해 펫타이드 또는 단백질의 시스테인-라디칼을 갖는 문자 종의 HS 그룹과 반응하거나, (B)를 통해 화학적으로 안정하고, 공유 결합 형태를 형성하는 문자 종의 아미노 그룹과 바람직하게 반응한다.

따라서, 본 발명은 또한 예를 들면, 요오도아세틸석신이미드 및/또는 비스(하이드록시석신이미딜) 글루타레이트 같은 활성화된 링커와 함께 유도되는 올리고머를 포함한다.

유리 N 및 C 말단을 갖는 본 발명에 따른 올리고머는 일반적으로 pH 7에서 수 난용성이다. 테트라머의 경우 100 μmol, 펫타머의 경우 10 μmol, 및 헥사머의 경우 대략 거의 1 μmol의 농도 범위에서 달성된다. 이들은 대략적인 수치로서, 이는 또한 서열에 의존적으로 크기 순서로 초과되거나 적어질 수 있다. 예를 들면, AAATT의 용해도는 1 μM이며, AATAT의 경우 50 μM이다.

N 말단의 하이드록시카복실산 유도체를 사용한 아실화에 의해, 예를 들면, 인산화될 수 있는 하이드록실 기능기를 도입하는 것이 가능하다. 따라서 통상적으로 수득된 인산화된 올리고머는 약 pH 7에서 약 1000배 이상 보다 수용성이다. 상기 용해도는 일반적으로 UV 분광술에 의해 검출된다. 따라서, 본 발명은 또한 인산화된 올리고머에 관한 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 올리고머와 생체 분자의 접합체에 관한 것이다.

본 발명에 따라서, 생체분자는 예를 들면, 펫타이드, 펩토이드 또는 단백질(예를 들면, 수용체, 항체 또는 이의 작용 부분, 또는 효소), 및 DNA 또는 RNA 같은 핵산, 또는 지질, 당단백질, 필라멘트 성분 같은 세포 구성분, 또는 바이러스, 캡시드 같은 바이러스 구성분, 비로이드, 및 예를 들면, 아세테이트 같은 이의 유도체를 의미하는 것으로 이해된다.

항체의 기능 부분은 예를 들면, Fv 단편[Skerra & Pluckthun (1988) Science 240, 1038], 단일쇄 Fv 단편[scFv; Bird et al (1988), Science 242, 423; Huston et al.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879] 또는 Fab 단편[Better et al., (1988) Science 240, 1041]이다. 가역적으로 초분자 어셈블리가 합성되는 경우, 본 발명에 따른 이펙터 문자 및 바람직하게는 펫타이드와의 접합체가 PNA와는 다르게 선택적이며 조절 가능한 짹형성 시스템에서 바람직하며, 예를 들면, 결합, 억제, 생리적 효과의 유도 같은 이의 작용은 개별적인 이펙터 문자의 작용과는 상이하다.

따라서, 예를 들면, 문헌[제WO 96/13613호]은 우선, 시험을 통해 단백질에 결합하는 물질 I을 결정한 후, 제2 단백질에 결합하는 제2 물질 II를 결정하고, 상기 두 단백질의 이합체화를 유도하는 링커를 사용하여 상기 두 물질 I 및 II를 공유 결합적으로 결합시킴으로써 단백질의 다중합체화에 기인하는 생물학적 작용을 유도하는 물질을 확인하는 방법을 기술하고 있다. 이후, 상기 이합체화는 바람직한 생물학적 효과를 나타낸다. 상기 방법은 두개의 물질 I 및 II의 결합이 비-공유 결합적으로 일어나는 경우보다 큰 유연성을 달성할 수 있지만, 본 발명에 따른 올리고머 또는 접합체 같은 시스템에 의해서는 그렇지 않다. 예를 들면, 온도 또는 pH에 의한 이러한 짹형성의 조절 가능성으로 인해, 단백질의 이합체화

방법은 관찰되거나 이의 정도를 조절할 수 있다. 본 발명에 따른 짹형성 시스템은 예를 들면, 문헌[제WO 96/13522호]로부터의 시스템들과 비교하여 뉴클레아제 안정성이 있다는 장점을 가진다.

호모- 또는 헤테로이합체성 아셈블리를 형성시키는데 있어서 펩타이드 "접착제" 단위체를 사용하고자 하는 시도는 예를 들면, 문헌[제WO 94/28173호]에 기술되어 있다.

고정된 서열의 결합 펩타이드(헥사- 또는 헵타펩타이드)는 예를 들면, 단백질 같은 이팩터 단위체를 함께 모아 초분자 단위체를 형성시킨다. 상기 방법은 이러한 결합 방법의 조절 가능성으로 인해 보다 높은 유연성을 달성할 수 있으며, 이는 일반적으로 결합 펩타이드로는 실현시킬 수 없지만, 본 발명의 짹형성 시스템으로는 유리하게 실현시킬 수 있다.

따라서, 본 발명은 또한, 예를 들면, 문헌[제WO 94/28173호, 제 96/13522호, 제 96/13613호, R. L. Letsinger, et al., *Nature*, 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., *Nature*, 1996, 382, 609-11 또는 A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, *Biomolekuls (Pept. Sci.)* 1997, 40, 495-504]에 보다 상세히 기술되어 있고 일반적으로 상기에서 설명된 바와 같은 짹형성 및/또는 시험 시스템에서 본 발명에 따른 화합물, 본 발명에 따른 올리고머 또는 본 발명에 따른 접합체의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 특징 양태는 상기에서 보다 상세히 기술된 바와 같은, 특히 짹형성 및/또는 시험 시스템에서의 용도를 위한 본 발명에 따른 화합물, 본 발명에 따른 올리고머 및/또는 본 발명에 따른 접합체가 이에 고정되는 운반체이다.

본 발명의 의미내에서 용어 "고정되는"이란 선형 구조의 분자(특히, 펩타이드, 펩토이드, 단백질, 선형 올리고- 또는 폴리사카라이드, 헥산 및 이의 유사체, 또는 헤테로환 같은 모노머들, 특히 질소 헤테로환), 또는 비-선형 구조의 분자(축쇄 올리고- 또는 폴리사카라이드 또는 항체 및 Fv 단편, 단일쇄 Fv 단편(scFv) 또는 Fab 단편 같은 이의 기능성 잔기) 같은 두개 이상의 분자 종의 결합에 의한 공유 결합, 유사-공유 결합 또는 초분자 결합의 형성을 의미하는 것으로 이해된다.

적합한 운반체 물질은 예를 들면, 세라믹, 금속, 특히 귀금속, 유리, 플라스틱, 결정성 물질 또는 운반체의 박층, 특히 언급된 물질의 박층, 또는 셀룰로오스 같은 (생)분자 필라멘트, 구조 단백질이다.

요약하면, 본 발명은 통상적인 짹형성 및 시험 시스템과 비교하여 하기 장점들을 갖는다:

본 발명에 따른 올리고머 또는 접합체의 이합체는 DNA, RNA 및 p-RNA의 것보다 현저하게 안정하다. 올리고머성 물질은 화학적으로 및 효소적 분해에 대해 현저하게 안정하며 DNA 또는 RNA와 짹을 형성하지 않으며 단순한 방법으로 상대적으로 대량으로 제조할 수 있다. 두 개의 거울상이성체 모두가 합성적 키랄형성 단계에 의해 용이하게 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 선택적인 "분자 접착제"로서 지금까지 공지된 짹형성 시스템보다 우수하다.

하기 도면 및 실시예는 이를 제한하지 않고 보다 상세히 본 발명을 기술하고자 하는 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 요오도락탐 9의 합성을 도식으로 나타낸다.

도 2는 결합 가능한 티민 단위체의 합성을 도식으로 나타낸다.

도 3은 결합 가능한 아데닌 단위체의 합성을 도식으로 나타낸다.

도 4는 올리고머 ATATA의 가역적인 UV 전이 곡선을 나타낸다.

도 5는 인산화된 Hba-AATAT의 전이 곡선을 나타낸다.

실시예

실시예 1

결합 가능한 티민 단위체의 합성

1-[*(S,S,S)*-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-3-[벤질옥시)메틸]티민(13b)의 제조

1. 방법

65% 농도의 NaH 혼탁액 148mg(4.00mmol)을 보호성 가스로 풀려쉬한 건조한 50mL 뤼벤텔 플라스크에 도입하고, 무수 펜탄 각각 5mL로 2회 세척한 후 DMF 20mL 중에 혼탁시킨다. 3-(벤질옥시)메틸티민 493mg(2.00mmol)을 우선 조금씩 부가하고, 가스 발생이 진정된 후, 530mg(2.00mmol)의 9를 부가한다. 실온에서 약 20분 동안 교반시킨 후, 담황색 반응액이 형성되며, 이를 실온에서 밤새 교반시킨다.

반응액을 포화된 NH₄Cl 수용액 1mL로 처리하고 MeOH로 린스한 환저 플라스크내로 옮긴다. 후속적으로, 상기 용매를 우선 조심스럽게 회전 증발기에서 진공하에 제거한 후, 구형 튜브 종류로 제거한다(70°C/0.5torr). 황색-오렌지색 오일 1.71g을 수득하며, 이를 실리카 겔 60 150g 상에서 MPL 크로마토그래피(CH₂Cl₂/MeOH 30:1)하여 정제한다. 이렇게 수득된 고체를 소량의 Et₂O를 사용하여 절단하고, 여과시킨 후 분쇄하고 오일 펌프 진공에서 건조시킨다. 이는 무색 분말로서 13b(ent-13b, 50%; rac-13: 51%) 405mg(53%)을 수득한다(융점 160 내지 162°C). 분석학적 샘플을 THF/사이클로헥산으로부터 결정화하여 수득한다.

2. 분석학적 데이터

1-[*(S,S,S)*-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-3-[벤질옥시)메틸]티민(13b):

용점: 160 내지 162°C (THF/사이클로헥산); ent-13b: 161 내지 162°C

rac-13b: 186 내지 188°C (THF/사이클로헥산).

TLC: CH₂Cl₂/MeOH 15:1, R_f 0.41.

Spec. 회전: $[\alpha]_{589}^{20} = -43.3$. (c= 1.10, CH₂Cl₂); ent-13b: $[\alpha]_{589}^{20} = + 42.9$. (c= 1.05, CH₂Cl₂).

UV(CH₃CN): λ_{max} 274.2(9623).

IR(KBr): 3447w, 3189w, 3090w, 2949m, 2906m, 1703s, 1652s, 1464s, 1405s, 1357s, 1270s, 1076s.

¹H NMR(300MHz, d₆-DMSO): 1.59(m_c, 3H, H-C(4')), 2H-C(9')); 1.85(m_c, H-C(3')); 1.88(s, CH₃); 2.00–2.14(m, 3H, H'-C(3'), H'-C(4'), H-C(6')); 2.20(br. s, H-C(5')); 2.47(dd, J(H'-C(6'), H-C(6')) = 18.5, J(H'-C(6'), H-C(5')) = 7.5, H'-C(6')); 3.58(br. m, H-C(1')); 4.22(br. m, H-C(2')); 4.60(s, 2H, PhCH₂O); 5.35(m_c, 2H, OCH₂N); 7.22–7.35(m, 5H, Ph); 7.54(s, m, F_s, H-C(6)); 7.99(d, J(H-N(8'), H-C(1')) = 4.6, H-N(8')).

시그널의 할당은 ¹H, ¹H-COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

¹³C-NMR(75MHz, d₆-DMSO): 12.75(CH₃); 17.90(C(3')); 23.82(C(9')); 24.66(C(5')); 27.47(C(4')); 37.15(C(6')); 47.27(C(1')); 55.55(C(2')); 70.45(OCH₂N); 71.06(PhCH₂O); 107.82(C(5)); 127.06, 127.29, 128.03(5C, Ph); 137.40(C(6)); 138.18(C_{ipso}); 151.04(C(2)); 162.67(C(4)); 170.83(C(7')).

시그널의 할당은 ¹H, ¹³C-COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

MS(ESI⁺): 767.8[2M+H], 384.5[M+H].

C₂₁H₂₅N₃O₄에 대한 원소분석:

계산치: C 65.78, H 6.57, N 10.96;

실측치: C 65.68, H 6.64, N 10.84.

1-[(S,S,S)-8-아자-8-(3급-부톡시카보닐)비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-3-[(벤질옥시)메틸]티민(13c)의 제조

1. 방법

13b 7.18g(18.7mmol)을 250 l 환저 플라스크내에 용해시키고, NEt₃ 2.59ml(18.7mmol, 1 당량) 및 Boc₂O 8.00ml(37.4mmol, 2 당량)을 연속적으로 처리한다. 후속적으로, DMAP 2.28g(18.7mmol, 1 당량)을 스파츌라를 사용하여 부가하고 황색 반응 용액을 실온에서 약 4시간 동안 교반시킨다. NEt₃ 3.89ml(28.1mmol, 1.5 당량), Boc₂O 12.0ml(56.1mmol, 3 당량) 및 DMAP 3.43g(28.1mmol, 1.5 당량)을 다시 연속적으로 부가한다. 수분 제거와 함께 밤새 교반시킨 후, 소량의 출발 물질이 TLC 측정(실리카겔 60; CH₂Cl₂/MeOH 15:1)에 따르면 여전히 존재한다. 따라서, Boc₂O 각각 2.00ml(9.35mmol)을 4시간 간격으로 다시 부가한다. 상기 혼합물을 다시 수분을 제거하면서 밤새 교반시키고 용매 및 시약을 후속적으로 회전 증발기에서 진공하에 제거한다. 상기로부터 오일성 황색 고체 19.5g을 수득하며, 이를 실리카겔 60 275g 상에서 크로마토그래피(AcOEt/n-부탄 2:1)한다. 담황색 고체 8.50g을 수득한다. THF 50 ml 및 사이클로헥산 100ml로부터의 재결정화로 무색의 소량의 결정으로서 13c(ent-13c: 87%; rac-13c: 85%) 7.81g(86%)을 수득한다(융점: 124 내지 126°C).

2. 분석학적 데이터

1-[(S,S,S)-8-아자-8-(3급-부톡시카보닐)비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-3-[(벤질옥시)메틸]티민(18c):

용점: 124 내지 126°C (THF/사이클로헥산); ent-13c: 123 내지 125°C

rac-13c: 125 내지 127°C (THF/사이클로헥산).

TLC: AcOEt/n-헵坦 2:1, R_f 0.13.

Spec. 회전: $[\alpha]_{589}^{20} = -10.3$. (c= 1.37, CH₂Cl₂); ent-13c: $[\alpha]_{589}^{20} = + 10.6$. (c= 1.20, CH₂Cl₂).

UV(CH₃CN): λ_{max} 273.6(10200).

IR(KBr): 3447w, 2934w, 1744s, 1701m, 1663s, 1448m, 1363m, 1260s, 1153m, 1078m.

¹H NMR(300MHz, CDCl₃): 1.49(s, 9H, C(CH₃)₃); 1.52–1.63, 1.74–2.13(2m, 6H, 2H-C(3'), 2H-C(4'), 2H-C(9')); 1.88(s, CH₃-C(5)); 2.33(br. s, H-C(5')); 2.38(d, J(H-C(6'), H'-C(6')) = 18.2, H-C(6'));

2.70(dd, $J(H'-C(6'))$, H-C(6')) = 18.2, $J(H'-C(6'))$, H-C(5')) = 6.7, H-C(6')); 4.27(m, H-C(1')); 4.40(m, H-C(2')); 4.65(s, 2H, PhCH₂O); 5.45(m, 2H OCH₂N); 7.14-7.32(m, 6H, H-C(6), Ph).

시그날의 할당은 ¹H, ¹H-COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

¹³C-NMR(50MHz, CDCl₃): 13.39(CH₃-C(5)); 19.63(C(3')); 24.90(C(9')); 25.37(C(5')); 27.39(C(4')); 27.84(C(CH₃)₃); 41.03(C(6')); 53.36(C(1')); 57.71(C(2')); 70.80(OCH₂N); 72.25(PhCH₂O); 89.97(C(CH₃)₃); 109.73(C(5)); 127.55; 128.20(5C, Ph); 137.17(C(6)); 138.16(C_{ipso}); 151.19, 152.15(O₂CN, C(2)); 163.30(C(4)); 170.45(C(7')).

시그날의 할당은 ¹H, ¹³C-COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

MS(ESI⁺): 501.7[M+H], 384.5[M+H-Boc].

C₂₆H₃₃N₃O₆(483.56)에 대한 원소분석:

계산치: C 64.58, H 6.88, N 8.69;

실측치: C 64.45, H 6.91, N 8.59.

3-[(벤질옥시)메틸]-1-[(S,S,S)-2-(3급-부톡시카보닐)아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]티민(14a)의 제조

1. 방법

13c 7.81g(16.2mmol)을 500mL 환자 플라스크 중 THF 225mL에 용해시키고, 물 50mL로 처리한 후 빙욕으로 0°C까지 냉각시킨다. 30% 농도의 과산화수소 7.33g(64.8mmol)에 이어서 LiOH 일수화물을 1.36g(32.3mmol)의 수용액을 부가하au, 용액이 혼탁해진다. 빙욕을 제거하고 반응 혼합물을 45분 동안 교반시킨다. 반응 용액을 1.5M Na₂SO₃ 수용액 25mL 및 NaHCO₃ 포화 용액 75mL로 처리한다. 후속적으로, THF를 회전 증발기에서 진공하에서 대부분 제거한다. 용액을 물 350mL에 넣고 소량의 2N 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH > 12로 조절한다. 우유빛 혼탁액을 매회 CH₂Cl₂ 350mL로 3회 추출하고 유기상을 혼합한 후 MgSO₄를 사용하여 건조시킨다. 회전 증발기에서 진공하에서 용매를 제거한 후, 순수하지 않는 13b 2.00g을 수득하며, 이를 THF 30mL 및 사이클로헥산 60mL로부터 재결정화시킨다. 결과적으로 13b(ent-13b: 27%; rac-13b: 30%) 1.55g(25%)이 수득될 수 있다. 염기성 수성상을 조심스럽게 반 농축된 염산을 사용하여 pH 1 내지 2로 조절하고 매회 AcOEt 350mL로 3회 추출한다. Na₂SO₄를 사용하여 건조시킨 후, 회전 증발기에서 진공하에서 용매를 제거한 후, Et₂O 50mL로 절단시키고, 여과한 후 오일 펌프 진공하에서 건조시켜 미분된 결정 고체로서 14a(ent-14a: 60%; rac-14a: 65%) 5.09g(63%)를 수득한다(융점: 89 내지 91°C).

2. 분석학적 데이터

3-[(벤질옥시)메틸]-1-[(S,S,S)-2-(3급-부톡시카보닐)아미노-4-(카복시-메틸)사이클로헥실]티민(14a):

융점: 89 내지 91°C(Et₂O로 절단한 후); ent-14a: 90 내지 92°C

rac-14a: 168 내지 170°C(THF/사이클로헥산).

TLC: CH₂Cl₂/MeOH 15:1, R_f 0.37.

Spec. 회전: $[\alpha]_{589}^{20} = -24.0$. (c= 0.99, MeOH); ent-14a: $[\alpha]_{589}^{20} = +23.9$. (c= 1.05, MeOH).

UV(CH₃CN): λ_{max} 273.2(10890).

IR(KBr): 3373m, 2974m, 2932m, 1706s, 1691s, 1664s, 1647s, 1534m, 1469m, 1452m, 1365m, 1290m, 1255m, 1175m.

¹H NMR(300MHz, d₆-DMSO): 0.88-1.30(m, 2H, H-C(4) H-C(6')); 1.19(s, 9H, C(CH₃)₃); 1.66-2.00(m, 5H, 2H-C(3), H'-C(4), H-C(5), H'-C(6)); 1.80(s, CH₃-C(5')); 2.16(m, 2H, CH₂COOH); 3.79(m, H-C(1)); 4.27(m, H-C(2)); 4.58(s, 2H, PhCH₂O); 5.34(s, 2H, OCH₂N); 6.86(d, J(H-N, H-C(1)) = 9.6, NH); 7.23-7.37(m, 5H, Ph); 7.68(br. s, H-C(6')); 12.09(br. s, CH₂COOH).

시그날의 할당은 ¹H, ¹H-COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

¹³C-NMR(50MHz, CDCl₃): 13.09(CH₃-C(5)); 28.11(C(CH₃)₃); 30.13(C(3)); 31.07(C(4); 33.38(C(5)); 39.23(C(6)); 40.18(CH₂COOH); 51.38(C(1)); 58.19(C(2)); 70.83(OCH₂N); 72.17(PhCH₂O); 80.05(C(CH₃)₃); 110.06(C(5')); 127.62, 127.69, 128.27(5C, Ph); 135.46(C(6')); 138.00(C_{ipso}); 152.72, 155.43(O₂CN, C(2')); 163.20(C(4')); 176.30(CH₂COOH).

시그날의 할당은 ^1H , ^{13}C -COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

MS(ESI $^+$): 519.7[M+HH₂O]

$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$ (501.58)에 대한 원소분석:

계산치: C 62.26, H 7.03, N 8.38;

실측치: C 62.00, H 6.96, N 8.17.

1-[(S,S,S)-2-(3급-부톡시카보닐)아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]티민(14b)의 제조

1. 방법

Pd-C 300mg을 500m ℓ 3목 플라스크 중 무수 THF 60m ℓ 에 혼탁시키고 상기 혼합물을 45분 동안 수소로 포화 시킨다. 후속적으로, THF 30m ℓ 중 14a 2.01g(4.00mmol)의 용액을 부가하고 반응 혼합물을 강력하게 수소 대기하에서 90분 동안 교반시킨다(TLC 측정; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1).

상기 촉매를 세라이트를 통해 여과시키고 용매를 회전 증발기에서 진공하에서 제거한다. 무색 발포체 1.96g이 수득되며, 이를 무수MeOH 90m ℓ 중에 용해시키고 NaOMe 454mg(8.40mmol)로 처리한다. 상기 혼합물을 실온에서 밤새 교반시키면서 수분을 제거한다. 포화 NH₄Cl 용액 6m ℓ 로 처리하고 용매를 회전 증발 기에서 진공하에서 대부분 제거시킨다. 잔사를 물 50m ℓ 에 끓고, 수성상의 pH를 2N 염산을 사용하여 1 내지 2로 조절하고 수성상을 매회 AcOEt 50m ℓ 를 사용하여 추출한다. Na_2SO_4 를 사용하여 건조시킨 후, 용매를 회전 증발기에서 진공하에서 제거하고, 수득되는 발포체는 Et₂O 20m ℓ 로 절단시킨다. 침전물을 여과하고 오일 펌프 진공에서 건조시킨 후, 14b(ent-14b: 90%; rac-14b: 88%) 1.43g(94%)를 무색 고체로서 수득한다(융점 231 내지 233°C). 분석학적 샘플을 MeOH/물로부터 결정화시켜 수득한다.

2. 분석학적 데이터

1-[(S,S,S)-2-(3급-부톡시카보닐)아미노)-4-(카복시메틸)사이클로헥실]티민 (14b):

융점: 235 내지 237°C(MeOH/H₂O); 가스 발생; ent-14b: 234 내지 237°C

rac-14b: 231 내지 233°C(MeOH/H₂O); 가스 발생 및 분해

TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5:1, R_f 0.38.

Spec. 회전: $[\alpha]_{589}^{20} = -21.9$. (c= 0.57, MeOH); ent-14b: $[\alpha]_{589}^{20} = +21.2$. (c= 0.53, MeOH).

UV(H₂O): λ_{max} 272.4(11450).

IR(KBr): 3374s, 3187w, 2978w, 2935w, 1702s, 1648s, 1522s, 1394w, 1366w, 1282s, 1254m, 1170m.

^1H NMR(300MHz, d₆-DMSO): 0.85-1.38(m, 2H, H-C(4) H-C(6)); 1.27(s, 9H, C(CH₃)₃); 1.62-2.00(m, 5H, 2H-C(3), H'-C(4), H-C(5), H'-C(6)); 1.73(s, CH₃-C(5')); 2.15(m, 2H, CH₂COOH); 3.75(m, H-C(1)); 4.19(m, H-C(2)); 6.77(d, J(H-N, H-C(1)) = 9.6, NH); 7.56(s, H-C(6')); 11.09(s, H-N(3')); 12.08(br. s, CH₂COOH).

6.00 내지 10.0ppm 영역에서, 다수의 작은 시그날이 검출될 수 있으며, 이는 NMR 샘플을 80°C까지 가열하면 사라진다.

시그날의 할당은 ^1H , ^1H -COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

^{13}C -NMR(75.5MHz, d₆-DMSO): 12.03(CH₃-C(5')); 27.90(C(CH₃)₃); 29.16(C(3)); 30.72(C(4); 32.72(C(5)); 38.06(C(6)); 40.30(CH₂COOH); 49.71(C(1)); 57.05(C(2)); 77.51(C(CH₃)₃); 107.65(C(5')); 138.32(C(6')); 151.28, 154.79(O₂CN, C(2')); 163.60(C(4')); 173.35(CH₂COOH).

시그날의 할당은 ^1H , ^{13}C -COSY 스펙트럼의 도움으로 수행한다.

MS(ESI $^+$): 382.3[M+H]

$\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6$ (381.43)에 대한 원소분석:

계산치: C 56.68, H 7.13, N 11.02;

실측치: C 56.45, H 7.16, N 10.80.

실시예 2

결합 가능한 아데닌 단위체의 합성

9-[(S,S,S)-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-6-N-벤조일아데닌(15a)의 제조

1. 방법

500mℓ 2목 환자 플라스크에 무수 DMF 180mℓ 및 NaH 혼탁액 2.25g(60mmol)을 충전한다. 6-N-벤조일아데닌 7.18g(30mmol)을 조금씩 부가하고 [원문 그대로] 가스 발생이 진정될 때까지 상기 혼합물을 공급한다. 15분 후, 요오도락탐 9.7.95g(30mmol)을 부가하고 상기 용액을 어두운 곳에서 22시간 동안 교반시킨다. 이후, 상기 용액을 0℃로 냉각시키고 1M 수성 HCl(24mℓ)를 부가하여 중화시킨다. 상기 용매를 감압(0.3mbar, 옥 온도 60℃) 하에서 제거시킨다. 생성되는 잔사를 MeOH 100mℓ에 용해시키고 실리카겔 15g에 예비 흡수시킨다. CH₂Cl₂/MeOH(12:1)를 사용하는 7 x 15cm 실리카겔상에서의 크로마토그래피로 황색 오일 17g을 수득하며, 이를 MeOH 15mℓ에서 재결정화하여 [원문 그대로] 추가 반응을 위해 충분히 순수한 무색 고체의 15a 8.2g(22mmol, 73%)을 수득한다. 분석학적 샘플은 MeOH/Et₂O로부터의 결정화에 의해 수득한다.

2. 분석학적 데이터

융점: 269 내지 271℃(분해)

TLC: CH₂Cl₂/MeOH 10:1, R_f 0.28

[a]_D²⁰ [원문 그대로] +35.9. (c 1.03, MeOH)

UV(MeOH): I_{max} [원문 그대로] 280(20329).

IR: 3500~3000s, 2938m, 1685m, 1654s, 1610s, 1542w, 1508m, 1490m, 1458s, 1400m, 1341m, 1286s, 1254s, 1168w, 1098m, 799w, 713m, 643w.

¹H NMR(300MHz, d₆-DMSO): 1.53~1.72(m, 3H); 2.08~2.32(m, 5H); 2.48~2.58(m, 1H); 4.27(br. m, 1H, H-C(1')); 4.63(br. m, 1H, H-C(2')); 7.52~7.58(m, 2H, Ph); 7.62~7.68(m, 1H, Ph); 8.04~8.08(m, 2H, Ph); 8.14(d, J(H-N(8')), H(C(1'))=4.3Hz, H-N(8')); 8.70, 8.75(2s, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 11.18(s, 1H, H-NC(6)).

¹³C-NMR(75MHz, d₆-DMSO): 18.89, 24.21, 27.27(C(3')), C(4'), C(9')); 25.15(C(5')); 36.95(C(6')); 47.44(C(1')); 54.21(C(2')); 125.32(C(5)); 128.34, 132.28, 133.34(Ph); 143.05(C(8)); 150.17(C(4)); 151.12(C(2)); 152.59(C(6)); 165.49(Bz-C=O); 171.39(락탐 C=O).

MS(ESI⁺): 377[M+H]⁺(100%)

C₂₀H₂₀N₆O₂에 대한 원소분석:

계산치: C 63.83, H 5.32, N 22.34;

실측치: C 63.90, H 5.45, N 22.1.

9-[(S,S,S)-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]아데닌 (15b)의 제조

1. 방법

500mℓ 환자 플라스크에 벤조일-A 락탐 15a 8.2g(22mmol) 및 무수 메탄올 250mℓ를 충전한다. 상기 혼탁액을 15a가 완전히 용해될 때까지 가열한다. 이후, MeOH 5.5ℓ 중 NaOMe 1.62g의 용액을 부가하고 상기 혼합물을 실온에서 19시간 동안 교반시킨다. 생성되는 혼탁액을 여과시키고 침전물을 Et₂O로 세척한다.

여액을 이온 교환 수지(Amberlite IR-120, H⁺ 형태)를 부가하여 중화시킨다. 상기 수지를 여과시키고 용매를 감압하에 제거한다. 잔사를 MeOH 4mℓ에 용해시키고 Et₂O 30mℓ를 부가하여 침전시킨다. 상기 침전물을 여과하고 혼합한 침전물을 진공하에 건조시켜 15b(21mmol, 97%) 5.8g을 수득하며, 이는 추가의 반응을 위해 충분히 순수하다. 분석학적 샘플은 MeOH/H₂O로부터 결정화시켜 수득한다.

2. 분석학적 데이터

융점: 300 내지 302℃(분해)

TLC: MeOH, R_f 0.35

[a]_D²⁰ [원문 그대로] +42.8. (c 0.40, MeOH)

UV(MeOH): I_{max} [원문 그대로] 260(16374).

IR: 3367s, 3179s, 3101m, 2926m, 2864w, 1651s, 1600s, 1563m, 1470m, 1337m, 1296m, 1258m, 1229m, 1166w, 1107w, 1005w, 802w, 724w, 668w.

¹H NMR(300MHz, d₆-DMSO): 1.48~1.67(m, 3H); 2.04~2.24(m, 5H); 2.46~2.54(m, 1H); 4.20(br. m, 1H, H-C(1')); 4.46(br. m, 1H, H-C(2')); 7.26(s, 2H, NH₂); 8.06(d, J(H-N(8')), H(C(1')) = 4.3Hz, H-N(8')); 8.14, 8.35(2s, 2H, H-C(2); H-C-(8)).

¹³C-NMR(75MHz, d₆-DMSO): 18.94, 24.15, 27.36(C(3')), C(4'), C(9')); 25.20(C(5')); 37.03(C(6')).

47.47(C(1')); 53.85(C(2')); 118.75(C(5)); 139.18(C(8)); 149.70(C(4)); 152.15(C(2)); 156.03(C(6)); 178.91(락탐[원문 그대로] C=0).

MS(ESI⁺): 273[M+H](100%)

C₁₃H₁₆N₆O × H₂O에 대한 원소분석:

계산치: C 53.78, H 6.25, N 28.95;

실측치: C 53.65, H 6.24, N 29.12.

9-[(S,S,S)-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-6-N-디메틸아미노메틸리덴아데닌 (15c)의 제조

1. 방법

500mℓ 환저 플라스크에 A 락탐 15b 5.58g(20mmol), 무수 DMF 200mℓ 및 디메틸포름아미드 디에틸 아세탈 17.1mℓ(100mmol)를 충전한다. 상기 혼합물을 80℃에서 3시간 동안 가열한다. 생성되는 투명한 용액을 감압(0.4mbar, 옥 온도 60℃)하에 농축시켜 조 15c 6.9g을 수득하며, 이를 추가의 정제없이 사용한다.

2. 분석학적 데이터

TLC(Al₂O₃): CH₂Cl₂/MeOH 20:1, R_f 0.75

¹H NMR(300MHz, CDCl₃): 1.58–1.79(m, 2H); 1.89–1.93(m, 1H); 2.16–2.28(m, 2H); 2.38–2.51(m, 3H); 2.69–2.78(m, 1H); 3.23, 3.28(2s, 6H, CH₃); 4.38(br. m, 1H, H-C(1')); 4.68(br. m, 1H, H-C(2')); 6.62(d, J(H-N(8'), H-C(1')) = 4.3Hz, H-N(8')); 8.13, 8.54(2s, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 8.97(s, 1H, 포름아미딘 H).

MS(ESI⁺): 328[M+H](100%)

9-[(S,S,S)-8-N-3급-부톡시카보닐-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-6-N-디메틸아미노메틸리덴아데닌 (15d)의 제조

1. 방법

250mℓ 환저 플라스크에 조 아미딘 A 락탐 15c 6.9g(20mmol) 및 무수 CH₂Cl₂ 100mℓ를 충전한다. 트리에틸 아민 2.8mℓ(20mmol)를 교반과 함께 부가하고, 이어서 Boc₂O 8.7g(40mmol) 및 DMAP 2.44g(20mmol)을 부가한다. 상기 용액을 실온에서 16시간 동안 모든 출발 물질들이 소비될 때까지 교반시킨다. 용매를 감압 하에서 제거하고 생성되는 잔사를 크로마토그래피(7 x 16cm 실리카 겔, 용출제 CH₂Cl₂/MeOH 20:1)로 정제하여 황색 고체 8.2g을 수득하며, 이를 100mℓ 환저 플라스크로 옮긴다. 이후, Et₂O 50mℓ를 부가하고 상기 혼합물을 여과하고 침전물을 Et₂O로 처리한 후 초음파로 1회 분쇄시킨다. 실온으로 냉각시킨 후, 상기 혼합물을 여과하고 침전물을 Et₂O로 처리하고 다시 한번 초음파로 분쇄시킨다. 여과를 통해 [원문 그대로] 담황색 고체의 15d 6.66g(78%)을 수득하며, 이는 추가의 반응을 위해 충분히 순수하다.

2. 분석학적 데이터

TLC: CH₂Cl₂/MeOH 10:1, R_f 0.66

¹H NMR(300MHz, CDCl₃): 1.54(s, 9H, 3급-Bu); 1.84–2.36(m, 7H); 2.44(d, 1H, J=18.5Hz); 2.77(dd, J=7.0, 18.5Hz, 1H); 3.14, 3.20(2s, 6H, 포름아디민 CH₃); 4.80(br. m, 1H, H-C(1')); 5.23(br. m, 1H, H-C(2')); 8.04, 8.48(2s, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 8.87(s, 1H, 포름아미딘 H).

MS(ESI⁺): 428[M+H](100%)

9-[(S,S,S)-8-N-3급-부톡시카보닐-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]아데닌 (15e)의 제조

1. 방법

250mℓ 환저 플라스크에 아미딘 A 락탐 15d 6.64g(15.5mmol) 및 무수 CH₂Cl₂ 150mℓ를 충전한다. 이후, p-톨루엔설폰산 하이드라지드 11.55g(62.0mmol)을 부가하고 TsOH 1.47g(7.75mmol)을 부가한다. 상기 용액을 실온에서 44시간 동안 교반시킨다. CH₂Cl₂ 150mℓ를 부가한 후, 상기 용액을 물로 3회 세척하고 2M NaOH를 부가하여 pH를 > 12로 조절한다. 상기 혼합한 세척 용액을 CH₂Cl₂ 100mℓ를 사용하여 추출하고 혼합한 유기상을 MgSO₄ 상에서 건조시킨다. 여과 후, 용매를 감압하에 제거하고 생성되는 잔사를 크로마토그래피(5.2 x 20cm 실리카 겔, 용출액: CHCl₃/MeOH 30:1)로 정제하여 15e 4.96g(86%)을 수득하며, 이는 추가의 반응을 위해 충분히 순수하다. 분석학적 샘플은 THF/사이클로헥산으로부터 결정화하여 수득한다.

2. 분석학적 데이터

융점: 211℃(가스 발생) 300 내지 302℃(분해)

TLC: CH₂Cl₂/MeOH, R_f 0.23

$[a]^{20}_D$ [원문 그대로] +80.6° (c 1.32, CH_2Cl_2)

UV(MeCN/H₂O 1:9): λ_{\max} [원문 그대로] 260(14136).

IR: 3406m, 3328m, 3206m, 2941w, 1756s, 1724s, 1701m, 1668s, 1645s, 1597s, 1570m, 1479m, 1414w, 1304m, 1273s, 1251s, 1228m, 1145s, 1034w, 996w, 853w, 760w.

¹H NMR(300MHz, CDCl_3): 1.62(s, 9H, 3-*Bu*); 1.81–1.89(m, 3H); 2.19–2.37(m, 4H); 2.54(d, *J*=18.5Hz, 1H); 2.86(dd, *J*=7.0, 18.5Hz, 1H); 4.86(br. m, 1H, H-C(1')); 5.28(br. m, 1H, H-C(2')); 5.64(s, 2H, NH₂); 8.06, 8.38(2s, 2H, H-C(2); H-C(8)).

¹³C-NMR(75MHz, d_6 -DMSO): 19.93, 25.45, 27.23(C(3'), C(4'), C(9')); 25.97(C(5')); 28.01(C(CH₃)₃)); 40.24(C(6')); 52.65(C(1')); 53.68(C(2')); 84.12(C(CH₃)₃)); 119.82(C(5)); 139.20(C(8)); 150.59(C(4)); 152.58(C(2)); 155.55(C(6)); 158.46(Boc-C=O); 171.14(락탐[원문 그대로] C=O).

MS(ESI⁺): 373[M+H]⁺ (100%)

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3$ 에 대한 원소분석:

계산치: C 58.05, H 6.50, N 22.57;

실측치: C 58.13, H 6.51, N 22.85.

9-[(S,S,S)-8-N-3급-부톡시카보닐-8-아자비사이클로[3.3.1]노난-7-온-2-일]-6-N-p-메톡시벤조일아데닌(15f)의 제조

1. 방법

100mℓ 2목 환저 플라스크에 Boc-A 락탐[원문 그대로] 15e 4.96g(13.3mmol) 및 무수 CH_2Cl_2 60mℓ를 충전시킨다. 이후, 무수 피리딘 5.35mℓ(66.5mmol)를 부가하고, DMAP 1.59g(1.3mmol)을 부가한다. 0°C로 냉각시킨 후, 4-메톡시벤조일 클로라이드 5.4mℓ(39.9mmol)를 적가하고 상기 혼합물을 0°C에서 15분 동안 교반시킨다. 빙욕을 제거하고 반응 혼합물을 실온에서 22시간 동안 교반시킨다. 반응 혼합물을 다시 한번 0°C로 냉각시키고 MeOH 35mℓ를 적가한다. 0°C에서 30분 후, MeOH 중 NH₃ 포화용액 80mℓ를 적가한다. 백색 침전물이 형성되며, 이는 용액의 부가를 완결한 후 용해시킨다. 30분 후, 빙욕을 제거하고 반응물을 실온에서 추가로 2시간 동안 교반시킨다. 이후, 감압하에서 용매를 제거하고 생성되는 잔사를 CH_2Cl_2 200mℓ에 용해시킨다. 상기 용액을 후속적으로 NaHCO₃ 포화용액 150mℓ 및 시트르산 수용액(20%, 2 x 100mℓ)을 사용하여 세척하고 [원문 그대로] MgSO₄ 상에서 세척하고, 여과하고 진공하에서 농축시킨다. 생성되는 잔사를 크로마토그래피(5.2 x 18cm 실리카 젤; 용출제: EtOAc/MeOH 40:3)로 정제하여 15f 5.93g(88%)을 수득한다.

2. 분석학적 데이터

융점: 110 내지 112°C(분해)

TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1, *R_f* 0.44

$[a]^{20}_D$ [원문 그대로] +58.3° (c 1.32, CH_2Cl_2)

UV(MeOH): λ_{\max} [원문 그대로] 288(30459).

IR: 3600–3050m, 2940m, 1757s, 1707m, 1671m, 1604m, 1577m, 1506s, 1458m, 1402m, 1342m, 1251s, 1168m, 1145s, 1100m, 1024m, 893w, 848m, 794w, 761m, 644w.

¹H NMR(300MHz, CDCl_3): 1.63(s, 9H, 3-*Bu*); 1.84–1.91(m, 3H); 2.24–2.40(m, 4H); 2.55(d, *J*=18.5Hz, 1H); 2.88(dd, *J*=7.0, 18.5Hz, 1H); 3.92(s, 3H, OMe); 4.95(br. m, 1H, H-C(1')); 5.28(br. m, 1H, H-C(2')); 7.01–7.04(m, 2H, PMBz-H); 8.01–8.04(m, 2H, PMBz-H); 8.26, 8.81(2s, 2H, H-C(2); H-C(8)); 8.91(s, 1H, H-NC(6)).

¹³C-NMR(75MHz, CDCl_3): 19.95, 25.55, 27.24, (C(3'), C(4'), C(9')); 25.95(C(5')); 28.06(C(CH₃)₃)); 40.28(C(6')); 52.61(C(1')); 53.99(C(2')); 55.54(OMe); 84.27(C(CH₃)₃)); 114.08(PMBz); 123.12(C(5)); 126.24(PMBz); 130.03(PMBz); 141.58(C(8)); 149.87(C(4)); 152.00(C(2)); 152.31(C(6)); 152.54, 163.31, 164.02(PMBz, PMBz-C=O); 171.14(락탐 C=O).

MS(ESI⁺): 507[M+H]⁺ (100%)

$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_5$ 에 대한 원소분석:

계산치: C 61.66, H 5.93, N 16.60;

실측치: C 61.75, H 6.01, N 16.69.

9-[(S,S,S)-2-(3급-부톡시카보닐)아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-6-N-p-메톡시벤조일아데닌 (16)의 제조

1. 방법

500m^l 2목 환저 플라스크에 PMBzBoc-A 락탐 15f 5.25g(10.36mmol) 및 THF 200m^l를 충전시킨다. 0°C로 냉각시킨 후, H₂O 50m^l 중 LiOH x H₂O 2.17g 용액(51.8mmol)을 20분 동안 적가한다. 이후, MeOH 30m^l를 부가하고, 빙욕을 제거하고 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반시킨다. 이후, pH가 7에 이를 때까지 이온 교환 수지(Amberlite, IR-120, H⁺ 형태)를 부가한다. 상기 수지를 여과시켜 제거하고 용액을 강 압하에 100m^l의 부피로 농축시킨다. 이후, H₂O 200m^l를 부가하고 1M 수성 HCl를 부가하여 pH를 2로 조절 한다. 상기 용액을 EtOAc(3 x 200m^l)로 추출하고 혼합한 유기 추출액을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과한 후 진공하에서 농축시킨다. 생성되는 잔사를 뜨거운 MeOH 25m^l 중에 용해시킨다. 이후, 생성물을 H₂O 10m^l를 부가하여 침전시킨다. 상기 침전물을 여과시키고, H₂O로 세척하고 P₄₀₁₀ 상에서 건조시켜 16 1.95g을 수득한다. 모액 및 세척액으로부터 추가의 0.57g을 수득하여 전체 46%를 수득하는 것이 가능하다.

2. 분석학적 데이터

융점: 238 내지 239°C

TLC: CH₂Cl₂/MeOH 10:1, R_f 0.39

[*a*]_D²⁰ [원문 그대로] +19.9。 (c 0.55, MeOH)

UV(MeCN/H₂O): I_{max} [원문 그대로] 290(22722).

IR: 3368m, 2939w, 1710m, 1683s, 1608s, 1577m, 1528m, 1507m, 1458m, 1306m, 1250s, 1175s, 1030w, 842w, 761w.

¹H NMR(300MHz, d₆-DMSO): 1.08(s, 9H, 3급-Bu); 1.09-1.40(m, 2H); 1.80-2.35(m, 7H); 3.86(s, 3H, OMe); 4.07, 4.36(2br. m, 2H, H-C(1') H-(2')); 6.87(br. s, 1H, NHBOC); 7.06-7.09(m, 2H, PMBz-H); 8.00-8.05(m, 2H, PMBz-H); 8.42, 8.86(2s, 2H, H-C(2); H-C(8)); 10.88(s, 1H, H-NC(6)).

¹³C-NMR(75MHz, CDCl₃): 27.73(C(CH₃)₃); 30.35, 30.46, 37.95(C(3')), C(5'), (6'); 32.89(C(4')); 40.32(CH₂CO₂H); 51.30(C(2')); 55.38(OMe); 77.45(C(CH₃)₃); 113.55(PMBz); 125.24(C(5)); 125.63(PMBz); 131.41(PMBz); 143.48(C(8)); 150.03(C(4)); 150.69(C(2)); 152.38(C(6)); 154.53, 162.38, 164.77(PMBz, PMBz-C=O, Boc-C=O); 173.36(CO₂H).

MS(ESI⁺): 525[M+H]⁺(100%)

C₂₆H₃₂N₆O₅에 대한 원소분석:

계산치: C 59.53, H 6.15, N 16.02;

실측치: C 59.35, H 6.32, N 15.89.

실시예 3

서열 ATATA를 갖는 올리고머의 합성

사용되는 중합체성 운반체는 폴리옥시에틸렌(POE)/폴리스티렌 공중합체(Tentagel S HMB, 0.23mmol/g)이며, 이는 수용액 및 유기 용매 모두에서 뛰어난 팽창 특성을 갖는다. 상기 중합체의 아미노에틸 작용기는 하이드록시메틸벤조일(HMB) 링커와 함께 유도체화되며; 제1 A 단위체를 사용한 충전은 20시간의 공정 동안 DCM 중 대칭적인 무수물 방법(DIC 2.5 당량 및 DMAP 2.5 당량의 부가)에 따라서 5배 초과량을 사용하여 수행된다.

올리고머 쇄의 단계적인 신장은, 일시적인 Boc 보호 그룹의 제거 및 Boc-보호된 모노머 단위체의 결합으로 이루어지는 반복적인 사이클을 사용하여 수행한다. 합성 말기에, N-말단 Boc 보호 그룹을 50% TFA/DCM을 사용하여 제거하고, 올리고머를 2N HCl/MeOH를 사용하여 HMB 링커로부터 절단시키고 추가의 형질전환 실험을 위해서 HPLC로 정제한다.

표준 결합 사이클은 표에서 기술된다: 아미노 작용기의 Boc 보호 그룹은 50% TFA/DCM(30분)을 사용하여 제거한 후, 상기 수지를 DCM으로 세척하고 1M DIEA/DMF를 사용하여 중화시킨 후 아민이 없어질 때까지 DMF로 세척한다. 결합은 각각 DMF 중 HATU(3 당량)을 사용한 모노머 단위체(3 당량)의 예비활성화 후에 1M DIEA/DMF(6 당량) 및 2M 루티딘/DMF(12 당량)을 부가하여 수행한다. 결합 시간은 실온에서 3시간이다. 결합 사이클을 완결한 후, 반응하지 않은 아미노 작용기는 피리딘(10 당량)을 부가하면서 아세트산 무수물(20 당량)을 사용하여 차단한다. HPLC를 사용하여 반응을 모니터링하기 위해서, 각각의 결합 단계 이후에, 약간의 수지 비드를 제거한 후 이를 50% TFA/DCM으로 처리하여 Boc 보호 그룹을 제거시킨다. 이후, 각각의 올리고머를 2N NaOH/MeOH(15분, RT)를 사용하여 제거하며, 제거 용액은 HCl을 사용하여 중화시키고 RP-HPLC로 분석한다.

합성을 완결한 후, HMB 수지로부터 Boc-탈보호된 올리고머의 제거를 통상적인 방법으로, 2N

NaOH/MeOH(15분, RT)를 사용하여 수행한다. (A^{PMBz})-함유 올리고머에서 p-메톡시벤조일 보호 그룹의 제거는 제거 용액을 55°C에서 2.5시간 동안 유지시킴으로써 달성된다. 정제는 HCl을 사용하여 제거 용액을 중화시킨 후 RP-HPLC에 의해 수행한다. 합성 생성물의 분리된 HPLC 분획을 분석 HPLC를 사용하여 이의 순도에 대해 조사하고, 전자스프레이(ESI) 질량 분광법을 사용하여 명확히 특성화하며, 가역적인 UV 전이 곡선(도 4)을 265nm(5mM 트리스/HCl 중 CATATA = 27.9 μM; pH 7.0)에서 기록하며, 이로 인해 짹형성 시스템으로서의 적합성이 증명된다.

ATATA:

분자량 계산치 = 1361.0 ($M+H$) 실측치 = 1362.0

tR = 14.1분(30분 동안 물 중 0.1% 농도의 TFA 중 10 내지 40% 아세토니트릴)

최대 흡광도: 263nm

결합의 도표:

과정	시약/용매	부피	시간
1. 탈차단	50% TFA/DCM	150μl	1 x 5분 1 x 25분
2. 세척	DCM	150μl	5 x (지속적인 흐름)
3. 중화	1M DIEA/DMF	75μl	1 x (지속적인 흐름)
4. 세척	DMF	150μl	5 x (지속적인 흐름)
5. 결합	단위체/HATU/DMF 1M DIEA/DMF 2M 루티딘/DMF	80μl 12μl 12μl	180분(진탕)
6. 세척	DMF	150μl	3 x (지속적인 흐름)
7. HPLC를 사용한 분석 방법: 2N NaOH/MeOH(15분, RT)를 사용한 샘플 제거			
8. 차단	Ac ₂ O피리딘/DCM	10μl 10μl 100μl	20분(진탕)
9. 세척	DCM	150μl	5 x (지속적인 흐름)

실시예 4

호모이합체성 펩타이드의 가역적인 형성

실시예 3과 유사하게, 서열 AATAT를 고체상에서 합성하며, Boc-리신(Fmoc) 단위체를 짹형성 부분에 결합 시킨다. Fmoc 그룹을 DMF 중 40% 피페리딘을 사용하여 제거하고, 고체상을 DMF를 사용하여 세척한 후 DMF 중 요오도아세트산(20 당량) 및 DIC(20 당량)를 사용하여 처리한다. 실온에서 15시간 후, 상기 용액을 여과하고, 상기 수지를 DMF로 세척한 후 DMF 중 펩타이드 CYSKVG(50 당량)로 처리한다. 실온에서 15시간 동안 방지한 후, 상기 용액을 여과하고 수지를 DMF 및 MeOH로 세척한다. MeOH와 함께 2M 수성 NaOH(1:1)을 사용하여 수지로부터 제거하고 제거 용액을 55°C에서 2.5시간 동안 가열한다. 냉각시킨 후, 2M 염산으로 중화시키고 생성물을 RP-HPLC(30분 동안 물 중 0.1% 농도의 TFA 중 10 내지 40% 아세토니트릴)을 사용하여 분리한다. 생성물 분획($V = 3ml$)을 진공하에 아세토니트릴 분획으로부터 분리하여 수용액 500μl로 농축시킨다. 상기 용액을 SepPak Plus C18 카트리지(제조원: Waters)를 사용하여 탈염시키고, 수용액 1ml로 조절한다. 올리고머의 농도는 $c = 140 \mu mol/l$ (265nm에서 $E = 1.004$ 로부터, 70°C에서 측정함)이다.

10 μmol 용액의 UV 전이 곡선은, 실온 이하에서 상기 물질이 균질한 호모이합체로서 존재하지만, 40°C 이상에서는 어떠한 호모이합체도 검출할 수 없음을 나타낸다. 이러한 평형은 가역적이며, 호모이합체의 분획은 온도 및 농도의 선택에 의해 조절될 수 있다.

실시예 5

자가-상보적인 CNA 올리고머의 열역학적 데이터의 요약

서열	염기 쌍	푸린-푸린적 총	푸린-피리미딘 적총	T _m (1 μm)[°C]	T _m (10 μm)[°C]	△G(298K)[kcal/mol]	△H[Kcal/mol]	△S[cal/moIK]
ATATA	4	3	0	20.9	32.3	-7.52	-36	-95
AATAT	4	2	2	27.4	40.5	-8.47	-33	-82
AAATT	4	1	4	35.0		-9.78	-49	-130
TTAAA	4	0	2	10.0		-6.6+0.5	-33	-90
ATATAT	6	3	0	22.5				
ATAT	4	2	0		-2°	-4.3	-24	-65

실시예 6

정의된 펩타이드 또는 펩타이드 라이브러리와의 접합

CNA 상에서의 정의된 펩타이드 및 펩타이드 라이브러리의 접합은 동일한 실험 조건하에서 수행한다. CNA Ac-CNA(AATAT)-Lys-OH (1)와 펩타이드 H-Cys-Ser-Lys-Val-Gly-OH (3)의 접합은 하기에서 기술된다.

6.1 리신의 ϵ -아미노 작용기 상에서의 (1)의 요오도아세틸화

1(0.69 μmol)을 0.1M 중탄산 용액 800 μl 에 용해시키고 빛을 차단하고 2시간 동안 디메틸 셀록사이드 400 μl 중에서 N-석신이미딜 요오도아세테이트(102 μmol , 28.9mg) 150 당량과 함께 진탕시킨다. 생성물 Ac-CNA(AATAT)-Lys(N^{ϵ} -요오도아세틸)-OH (2)를 예비 RP-HPLC를 사용하여 직접적으로 정제하고 RP-C18 카트리지 상에서 탈염시킨다.

분석학적 RP-HPLC: $R_t = 17.93\text{분}$

ESI-MS: M_r (계산치) = 1699.7, M_r (실측치) = 1699.4

6.2 2의 H-Cys-Ser-Lys-Val-Gly-OH 3으로의 접합

0.5M 포스페이트 완충액, 20mM EDTA pH 6.0 30 μl 중의 3의 용액(127nmol, 83 μg , 약 70% 함량)을 물/디메틸포름아미드(1:1) 20 μl 중 2의 용액(106nmol)에 부가하고 상기 혼합물을 빛을 차단하고 교반시킨다. 1시간 후, 펩타이드는 진정 완전히 반응하지만, CNA는 단지 약 50% 정도만 반응한다. 다시 완충액 중 동일량의 펩타이드를 부가하고 빛을 차단하고 1시간 동안 교반시키면, 2는 완전하게 반응한다. CNA-펩타이드 접합체를 RP-HPLC를 사용하여 직접적으로 정제하고 RP-C18 카트리지 상에서 탈염시킨다.

분석학적 RP-HPLC: $R_t = 16.93\text{분}$

ESI-MS: M_r (계산치) = 2227.6, M_r (실측치) = 2227.4

실시예 7

인산화에 의한 용해도의 개선

7.1 CNA 인산화에 대한 일반 방법

7.1.1 DMT-보호된 4-하이드록시부티르산(Hba)의 AATAT-HMB 수지에 대한 결합

최종 Boc 보호 그룹을 제거한 후, DMF 중 1M DIPEA 용액 5 $\text{m}\ell$ 를 사용하여 프릿(frit)과 함께 5 $\text{m}\ell$ 플라스틱 주사기내에서, 수지의 0.15mmol/g의 코팅(0.015mmol)을 갖는 AATAT-HMB 수지 100mg을 중화시키고, DMF로 4회 세척한다. DMT-Hba(M = 406.48) 0.15mmol(61mg) 및 HATU(M = 380.2) 0.15mmol(57mg)을 NMP 2 $\text{m}\ell$ 에 용해시키고 진탕시킨다. 10분 후, DIPEA(DMF 중 1M 용액 900 μl) 0.9mmol을 부가하고 진탕시킨다. 결합 용액을 수지에 부가하고 수지를 함유하는 주사기를 4시간 동안 주사기의 단축을 따라 회전(약 0.5 회전/초)시켜 양호하게 혼합을 제공한다. 상기 용액을 주사기로부터 제거하고 수지를 DMF 4 $\text{m}\ell$ 를 사용하여 4회 및 DCM 4 $\text{m}\ell$ 를 사용하여 2회 세척한다.

7.1.2 탈트리틸화

상기 수지를 매회 2분씩 DCM 중 6% DCA 4 $\text{m}\ell$ 를 사용하여 5회, DCM을 사용하여 4회 및 무수 아세토니트릴(ACN)을 사용하여 3회 탈트리틸화시킨다. 상기 수지를 데시케이터에서 밤새 P_2O_5 상에서 건조시킨다.

7.1.3 포스피탈화 및 산화

상기 수지는 무수 ACN 중 0.5M 피리디늄 하이드로클로라이드 2 $\text{m}\ell$ 을 사용하여 아르곤하에서 팽창시킨다. 비스(2-시아노에틸) N,N-디이소프로필아미노포스포르아마이드(M = 271.3) 10 당량(0.15mmol, 41mg)을 부가하고 상기 혼합물을 20분 동안 회전시킨다. 상기 수지를 무수 ACN 4 $\text{m}\ell$ 로 4회 세척하고 대칸 중 6M t-BuOOH 0.5 $\text{m}\ell$ 및 ACN 1 $\text{m}\ell$ 를 사용하여 30분 동안 산화시킨다. 이후, 무수 ACN으로 4회 세척한다.

7.1.4 시아노에틸 보호 그룹의 제거

상기 수자를 피리딘 중 DBU 2M 용액 4 $\text{m}\ell$ 를 사용하여 처리하고 15시간 동안 회전시킨다. 이후, 이를 ACN으로 6회 세척한다.

7.1.5 수지로부터의 제거 및 pMBz 탈보호

물 중 2M NaOH 2 $\text{m}\ell$ 를 사용하여, 10분 동안 수지로부터 물질을 제거시킨다. 추가의 수산화나트륨 용액 2 $\text{m}\ell$ 를 사용하여 세척하고 생성되는 용액을 55°C에서 3시간 동안 유지시킨다. 2M HCl로 중화시킨 후, 상기 화합물을 RP-HPLC(용출액 물/0.1% TFA를 갖는 아세토니트릴)상에서 정제한다.

7.1.6

최종적으로, 이미 기술한 바와 같이 SEP PAK 카트리지(RP) 상에서 상기 물질을 탈염시키고 실온에서 감압하에 농축 건조시킨다.

H_2PO_3 -Hba-AATAT의 질량 스펙트럼 ($M_{\text{exact}} = 1526.7$).

명백히, 상기 분자 이온은 Na 클러스터와 함께 단독 및 이중으로 하전된다.

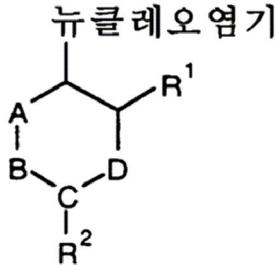
전이 곡선은 도 5에 나타낸다. T_m 값은 45.4°C이다. 비교를 위해서, AATAT(45μm)의 T_m 값은 49.4°C이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 화합물

화학식 1



상기식에서,

R^1 은 $\text{NR}^{3,4}$, OR^3 또는 SR^3 [여기서, R^3 및 R^4 는 서로 독립적으로 동일하거나 상이하며, H 또는 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (이때, n은 1 내지 12의 정수이다)이다]이고;

R^2 는 $\text{C}_m\text{H}_{2m}-\text{C}(X)-\text{Y}$ [여기서, X는 =O, =S 또는 =N이고, Y는 OR^3 , $\text{NR}^{3,4}$ 또는 SR^3 (이때, R^3 및 R^4 는 상기와 같다)이거나, X는 $\text{NR}^{3,4}$ 또는 OR^3 , 바람직하게는 $\text{NR}^{3,4}$, 특히 NH_2 이며 m은 1 내지 4의 정수이다]이거나;

R^3 는 $\text{C}_n\text{H}_{2n}-\text{Z}-\text{Y}'$ [여기서, Z는 살포닐, 포스포닐, 에테르 또는 아민 그룹이며, 이때, Z가 살포닐 또는 포스포닐 그룹인 경우, Y' 는 H, $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, OR^3 , $\text{NR}^{3,4}$ 또는 SR^3 (이때, n, R^3 및 R^4 는 상기와 같다)이고, Z가 에테르 또는 아민 그룹인 경우, Y' 는 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ 이다]이고;

A, B 및 D는 서로 독립적으로 동일하거나 상이하며, $\text{CR}^{5,6}$, O, NR^7 또는 S[여기서, R^5 , R^6 , R^7 은 서로 독립적으로 H 또는 $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (이때, n은 상기와 같다)이다]이고;

C는 CR^8 또는 N(여기서, R^8 은 독립적으로 R^5 에서 정의한 바와 같지만, A-B, B-C 또는 C-D는 두개의 동일한 해태로원자는 아니다)이며;

뉴클레오염기는 티민, 우라실, 아데닌, 시토신, 구아닌, 이소시토신, 이소구아닌, 크산틴 또는 히포크산틴이다.

청구항 2

제1항에 있어서, R^1 이 $\text{NR}^{3,4}$ 또는 OR^3 이고, R^2 가 $\text{C}_m\text{H}_{2m}-\text{C}(X)-\text{Y}$ (여기서, X는 $\text{NR}^{3,4}$ 또는 OR^3 이고 Y는 OR^3 또는 $\text{NR}^{3,4}$ 이다)인 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R^1 이 NH_2 이고 R^2 가 CH_2-COOH 인 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, [2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-뉴클레오염기로부터 선택되는 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 1-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-티민, 1-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-우라실, 1-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-시토신, 9-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-아데닌 또는 9-[2-아미노-4-(카복시메틸)사이클로헥실]-구아닌으로부터 선택되는 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 거울상이성체적으로 순수한 화합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, R¹ 및/또는 뉴클레오염기에 보호 그룹이 제공되는 화합물.

청구항 8

제7항에 있어서, 보호 그룹이 BOC, BOM, FMOC, 에테르 또는 아세탈 보호 그룹으로부터 선택되는 화합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오염기가 적도상으로 배열되는 화합물.

청구항 10

요오도사이클로알칸이 보호된 뉴클레오염기에 결합됨을 특징으로 하는 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 요오도사이클로알칸이 요오도락탐인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 이전 단계로부터의 락탐을 활성화시키고, 락탐 환을 친핵적으로 개환시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 요오도사이클로알칸이 거울상이성체적으로 순수한 형태로 존재하는 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 수소화물의 존재하에 요오도사이클로알칸이 보호된 뉴클레오염기에 결합되는 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 락탐이 보호 그룹의 도입에 의해 활성화되는 방법.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 락탐 환이 단계 (c)에 따라 하이드로퍼록사이드에 의해 친핵적으로 개환되는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 올리고머.

청구항 18

제17항에 있어서, 부가적으로 하나 이상의 링커를 함유하는 올리고머.

청구항 19

제18항에 있어서, 링커가 리신 링커인 올리고머.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화된 링커로 유도되는 올리고머.

청구항 21

제20항에 있어서, 활성화된 링커가 요오도아세틸석신이미드 및/또는 비스(하이드록시석신이미딜) 글루타레이트인 올리고머.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 인산화된 올리고머.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 올리고머 및 생체 분자를 포함하는 접합체.

청구항 24

제23항에 있어서, 생체 분자가 펩타이드, 펩토이드, 단백질, 세포 성분, 필라멘트 성분, 또는 핵산 및 이의 유도체인 접합체.

청구항 25

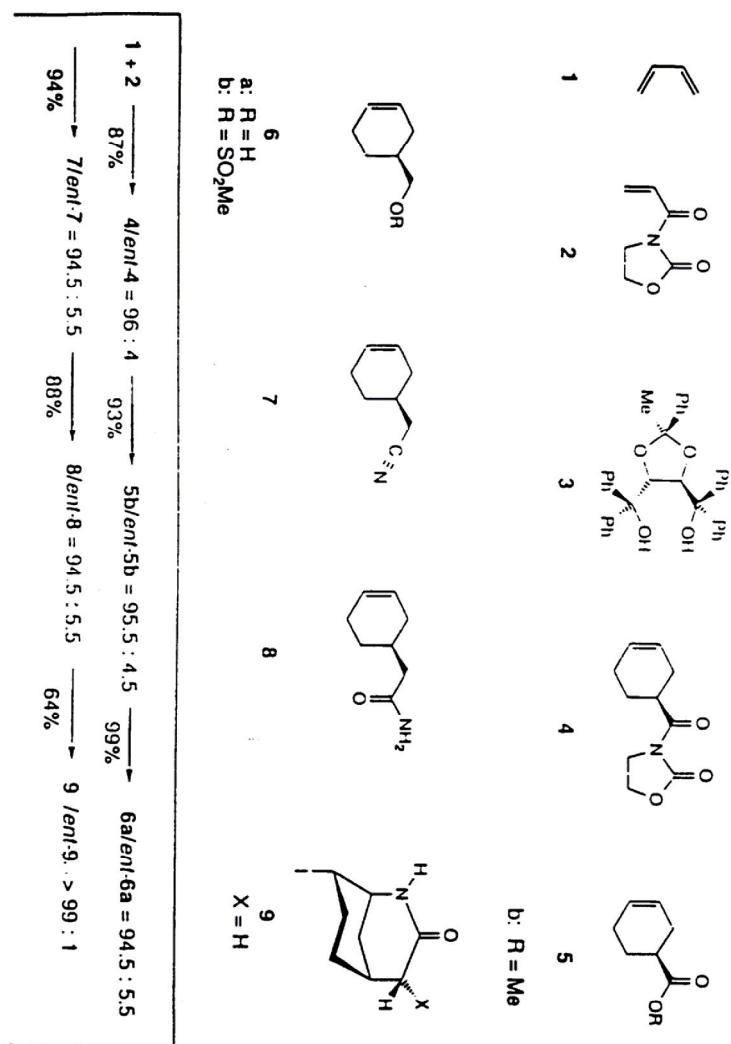
제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 화합물 하나 이상, 제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 올리고머 하나 이상 및/또는 제23항 또는 제24항에 따른 접합체 하나 이상을 고정시킨 운반체.

청구항 26

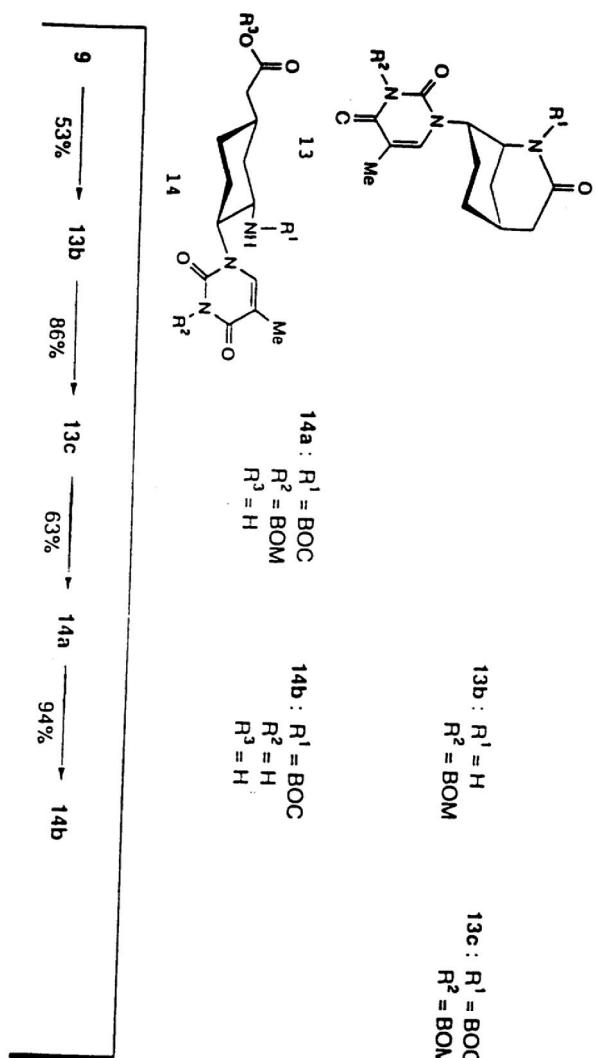
짝형성 및/또는 시험 시스템에 있어서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 올리고머, 제23항 또는 제24항에 따른 접합체 및/또는 제25항에 따른 운반체의 용도.

도면

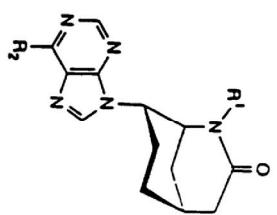
도면1



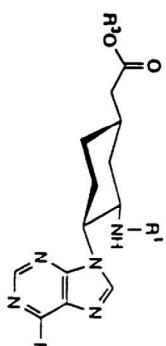
도면2



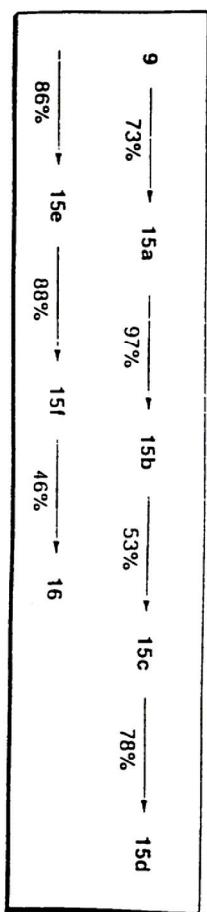
도면3



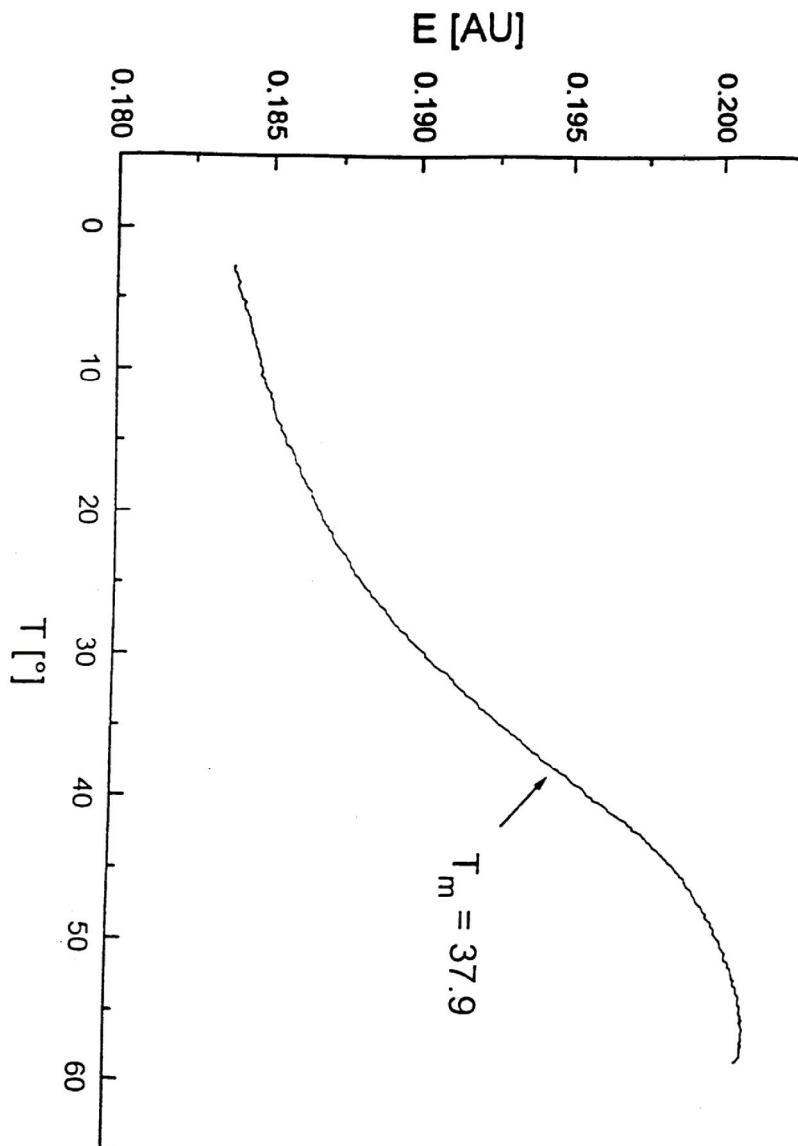
15

15a : R¹ = H; R² = HN-CO-Ph15b : R¹ = H; R² = NH₂15c : R¹ = H; R² = N=C-(NM₂)₂15d : R¹ = Boc; R² = N=C-(NM₂)₂15e : R¹ = Boc; R² = NH₂15f : R¹ = Boc; R² = NH-CO-C₆H₄-OMe

16

 $R^1 = \text{Boc}; R^2 = \text{NH-CO-C}_6\text{H}_4\text{-OMe}; R^3 = \text{H}$ 

도면4



도면5

