(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C07H 19/04
C07H 11/04
C07H 19/10
C07H 19/20

(11) 공개번호 10-2004-0088520
(43) 공개일자 2004년10월16일

(21) 출원번호 10-2004-7013152
(22) 출원일자 2004년08월23일
번역문 제출일자 2004년08월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/005682
(87) 국제공개번호 WO 2003/072586
(86) 국제출원출원일자 2003년02월24일
(87) 국제공개일자 2003년09월04일

(30) 우선권주장 60/359,124 2002년02월22일 미국(US)
60/362,320 2002년03월07일 미국(US)

(71) 출원인 허니웰 인터내셔널 인코포레이티드
미국 뉴저지 모리스타운 콜롬비아로드 101

(72) 발명자 워너크리스챤
독일, 하노버 30519, 웨스트라쎄 1

너렌쯔프란크
독일, 하노버 30173, 스트레세마날 19

칸쉬크-콘라센안드레아스
독일, 가브센 30826, 스테티너스트라쎄 43

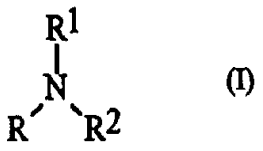
(74) 대리인 특허법인씨엔에스

심사청구 : 없음

(54) 포스피틸레이티드 화합물 제조방법

요약

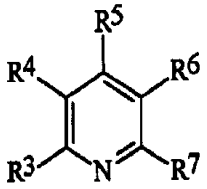
(1)화학식 I의 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체;



(I)

(상기 식에서, R, R ^{1}, 및 R ^{2} 는 독립적으로 C $_{1}$-C $_{10}$ 알킬, C $_{1}$-C $_{10}$ 시클로알킬, C $_{1}$-C $_{10}$ 아릴, C $_{1}$-C $_{10}$ 아랄킬, C $_{1}$-C $_{10}$ 헤테로알킬 혹은 C $_{1}$-C $_{10}$ 헤테로아릴이다.)

(2) 화학식 II의 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체;



(II)

(상기 식에서, R^3, R^4, R^5, R^6 및 R^7 은 독립적으로 수소, C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_{10} 시클로알킬, C_1-C_{10} 아릴, C_1-C_{10} 아랄킬, C_1-C_{10} 헤테로알킬, 또는 C_1-C_{10} 헤테로아릴이며, 그리고 상기 R^3, R^4, R^5, R^6 및 R^7 중 적어도 하나는 수소가 아니다.)

(3) 디아자비시클로 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체;

(4) 쌍성이온 아민 복합체, 및

(5) 이들의 둘 또는 그 이상의 조합;

으로 구성된 그룹으로부터 선택된 포스피틸화 활성제의 존재하에서 히드록실-함유 화합물과 포스피틸레이팅제를 반응시켜 포스피틸레이티드 화합물을 생성하는 단계를 포함하는 포스피틸레이티드 화합물 제조방법이 제공된다.

색인어

포스피틸레이티드 화합물, 아민, 디아자비시클로, 쌍성이온, 산-염기 복합체

명세서

기술분야

관련 출원에 대한 참고문헌

본 출원은 미국 가출원 제 60/359,124(미국 특허 및 상표청에 2002, 2, 22 일자로 제출됨) 및 미국 가출원 제 60/362,320(미국 특허 및 상표청에 2002, 3, 7 일자로 제출됨)의 우선권을 주장한다.

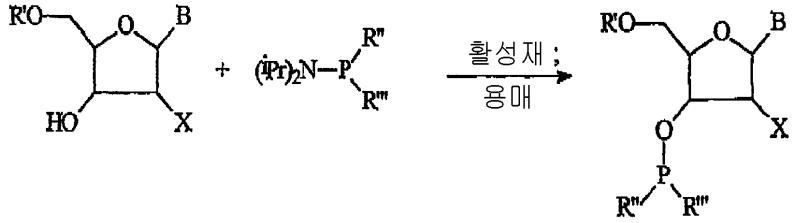
본 발명의 분야

본 발명은 포스피틸레이트화 활성제의 존재하에 히드록실-함유 화합물을 포스피틸레이팅제와 반응시켜 포스피틸레이티드 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

히드록실-함유 화합물과 포스핀제의 반응을 통한 포스피틸레이티드 화합물을 제조하는 것은 일 변형이며 이는 광범위하게 유용한 화합물의 합성시 유용성을 갖는 것으로 발견되었다. 본 출원인들은 예를들어, 이러한 변형은 일반적으로 반응식 1로 나타내어지는 5'-O-보호 뉴클레오시드로부터 3'-O-포스포아미디트의 합성에 유용한 것으로 인지하였다.

반응식 1



상기 식에서, 예를들어, X는 수소, 알콕시, -O-테르트-부틸디메틸 실일(OTBDMS), -O-메톡시 메틸(OMOM), 2'-O-메톡시에틸(2'-O-MOE) 등이며; R'는 DMT, 디메톡시트리틸, 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 유사체 등이며; R''는 메틸 등과 같은 알킬, 혹은 2-시아노에틸 등과 같은 알콕시이며; R'''는 디이소프로필아민 등이며; 그리고 B는 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 또는 우라실로부터 유래된 부(moiety)이다.

반응식 1을 통해 형성된 타입의 포스포아미디트는 올리고뉴클레오타이드를 제조하기위해 유리하게 결합될 수 있다. 참조 예, 미국 특허 제 4,725,677 및 Mellor, Thomas, 'Synthesis of analogues of oligonucleotides', J. Chem Soc., Perkin Trans. 1, 1998, 747-757. 이는 예를들어, 안티센스 드럭(Crooke, S.T. Handbook of Experimental Pharmacology: Antisense Research and Applicatio; Springer-Verlag, Berlin, (1998))을 포함하는 치료 및 진단 적용분야에서 중요성이 증가하고 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드에 필요한 성장을 보충하기위해, 상업적 스케일상에서 뉴클레오시드 포스포아미드의 합성을 개선시키는 것이 요구된 다(Noe, Kaufhold, New Trends in Synthetic Medicinal Chemistry, Wiley-VCh Weinheim, 2000, 261).

그러나, 히드록실-함유 화합물로부터 3'-O-포스포아미디트와 같은 포스피틸레이티드 화합물을 제조하는 통상적인 방법은 여러가지 이유로 불리하다. 다수 통상적인 방법과 관련된 일 결점은 비용적으로 그리고/또는 위험한 활성제/화합물의 사용을 필요로하는 것이다. 예를들어, Beaucage 및 Caruuthers는 Tetrahedron Lett. 1981, 22, 1859에서 1H-테트라졸은 가장 다용도적인 포스피틸레이티드제로 추천하였다. 그러나, 이러한 활성제/제제는 고가이며 위험하다(참조 예, Stull, Fundamentals of Fire and Explosion, AIChE Monograph Series, No. 10, New York, 1977, Vol. 73, 22). 질소-풍부 헤테로시클의 폭발 특성때문에, 이러한 조성물을 취급하기위해서는 특별한 안전 주의가 요구된다. 덜 위험한 화합물, 4,5-디시아노이미다졸은 특정 뉴클레오시드 포스포아미디트의 제조에 유용한 것으로 나타났다. 불행하게도, 이 화합물은 배우 고가이며, 실제로 산업적 공정에 사용과 관련하여 엄청나게 고가인 경향이 있다. 비치환된 피리딘으로부터 유래된 포스피틸화 활성제가 예를들어, Gryaznov, Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 5876; Gryaznov, Letsinger, Nucleic Acids Res. 1992, 20, 1879; Beier, Pfleiderer, Helvettica Chimica Acta, 1999, 82, 879; Sanghvi, et al., Organic Process Research and Development 2000, 4, 175; 및 미국 특허 제 6,274,725(Sanghvi 등)에 개시되어 있다. 그러나, 이러한 염은 독성적이며 고수용해성인 경향이 있다. 따라서, 비용-집약적 폐수처리 장치가 이러한 활성제를 사용하는 시스템에 설치되어 야 한다.

포스피틸레이티드 화합물 제조를 위한 다수의 통상적인 방법과 관련된 다른 결점은 바람직한 용매로서 디클로로메탄을 사용하는 것이다. 디클로로메탄은 환경적으로 비친화적인 경향이 있으며, 용매로서 디클로메탄을 사용하는 방법과 관련하여 사용시 상대적으로 비용적인 폐수처이 장치가 요구된다.

상술한 결점의 적어도 일부를 회피하는 방법은 고형 지지 합성기상에서 그 결과물인 용액의 즉시 사용을 위하여 예를들어, 미국특허 제 6,340,749 B1(Zhang 등)에 기술된 바와 같은 추가 활성화 단계없이 뉴클레오시드 포스포아미디트를 원위치 제조하는 것이다. 불행하게도, 이러한 방법은 상대적으로 불충분한 경향이 있으며, 이러한 방법을 통해 획득된 포스포아미디트 용액은 불안정하고 보관하기에 부적절한 경향이 있다.

따라서, 본 출원인들은 통상적인 방법과 관련된 결점을 회피하는 새로운 포스피틸레이티드 화합물 제조방법에 대한 필요성을 인지하였다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 통상적인 방법보다 덜 위험하고 덜 비용적인 경향이 있는 광범위하게 다양한 포스피틸레이티드 화합물을 제조하는 효과적인 방법을 제공함으로써 상술한 결점을 극복한다. 특히, 본 출원인들은 상대적으로 입체-장애성 아민 염기로부터 유래된 특정 산-염기 복합체 및 쌍성이온성 복합체가 히드록실-함유 출발물질로부터 포스피틸레이티드 화합물 제조방법에 포스피틸화 활성제로서 크게 유리하게 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 '포스피틸레이티드 화합물'은 히드록 실-함유 화합물과 포스피틸레이팅제의 반응을 통해 형성된 산소-인 결합을 함유하는 화합물을 일반적으로 칭한다. 본 출원인들은 본 발명의 산-염기 및 쌍성이온성 복합체가 통상의 활성제보다 덜 독성적이며 덜 수용해성인 경향이 있슴을 발견하였다.

또한, 본 출원인들은 다수 구체화에서 본 발명의 방법은 적어도 고 수율로 포스피틸레이티드 화합물을 제조할 수 있으며, 통상적으로 사용되는 활성제보다 산-염기 및 쌍성이온성 활성제 복합체가 보다 입제-장애성이며 덜 친핵성인 경향이 있슴에도 불구하고 특정 경우에는 종래 기술 공정을 통해 달성되는 것보다 높은 수율로 포스피틸레이티드 화합물을 제조할 수 있다는 것을 예기치않게 발견하였다. 본 출원인은 특정 이론으로 한정하려는 것은 아니나, 포스피틸레이티드 화합물의 제조에 사용되는 포스피틸레이팅제를 활성화시키는 메카니즘은 활성제에 의해 포스피틸레이팅제상의 잔존기를 친핵적으로 치환시키는 것과 관련된다. 예를들어, Nucleic Acids Res. 1989, 17, 853(Berner 등) 및 Nucleic Acids Res. 1987, 15, 1729(Dahl, B. 등)에는 활성화된 비스-리전트 에이전트을 히드록실-함유 화합물과 반응시키기전에 친핵성 아민에 의해 디이소프로필아민 잔류기를 치환시키는 것으로 비스-리전트 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포아미디트를 (테트라졸과 같은) 보다 덜 입체장애적인 아민 활성제와 활성화시키는 제안 메카니즘에 대해 기술되어 있다.

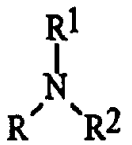
이러한 견지에서 테트라졸 및 피리딘 활성제와 같은 종래 기술의 아민 활성제에 비해 상대적으로, 그리고 다수 경우에는 현저히 보다 입체장애적인 아민을 포 함하는 본 발명의 활성제는 포스피틸레이팅제상의 잔류기를 치환하는데 있어 덜 효과적일 수 있으며 따라서 포스피틸레이티드 화합물을 생성하기위해 이러한 제제를 활성화시키는데 있어 덜 효과적일 수 있다. 그럼에도 불구하고, 상술한 바와 같이, 본 출원인은 본 발명의 현저히 입체-장애적인 활성제가 비치환된 피리딘의 염과 같은 통상적인 활성제만큼 우수하거나 혹은 더 우수한 수율로 포스피틸레이티드 생성물을 제조할 수 있슴을 예기치않게 발견하였다. 이론으로 한정하려는 것은 아니나, 이러한 예기치않은 결과에서 후속적인 조사를 통해 본 발명의 활성제와 관련된 예기치않은 고 수율은 상기 활성제와 특정 히드록실-함유 출발물질 활성부(예, Nucleic Acids Res. 1986, 14, 7391.(Nielsen 등)에 기술된 바와 같은 구아노신 화합물의 락탐 유니트)의 감소된 부반응과 적어도 일부 기인하는 것으로 본 출원인들은 추측한다. 따라서, 본 방법은 통상적인 방법만큼 우수하며 종종 보다 나은 수율로 포스피틸레이티드 화합물을 제조할 수 있으며 한편 또한 이러한 통상적인 방법과 관련된 다수의 결점을 회피할 수 있다.

특정 구체화에 따라, 본 발명의 방법은 하기 화학식 I 혹은 화학식 II의 아민으로부터 유래된 산-염기 복합체, 디아자비시클로 아민 화합물로부터 유래된 산-염기 복합체, 쌍성이온 아민 복합체, 및 이들의 둘 또는 그 이상의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택된 포스피틸화 활성제의 존재하에서 히드록실-함유 화합물과 포스피틸레이팅제를 반응시켜 포스피틸레이티드 화합물을 생성하는 단계를 포함한다.

<u>포스피틸화 활성제</u>

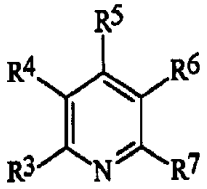
본 명세서에 사용된 용어 '포스피틸화 활성제'는 일반적으로 히드록실-함유 화합물과 포스피틸레이티드제의 반응을 촉진시켜 본 발명에 따른 포스피틸레이티드 화합물을 생성하는 화합물을 칭한다. 본 출원인은 광범위한 범위의 산-염기 복합체 및 쌍성이온 복합체가 포스피틸화 활성제로서 우수한 잇점을 갖도록 사용될 수 있슴을 발견하였다.

본 발명의 산 및 염기의 복합체는 하기 화학식 I 혹은 화학식 II중 적어도 하나의 아민 염기, 혹은 디아자비시클로 아민 염기를 적어도 하나의 산에 도입하여 산-염기 복합체가 형성된다.



(I)

상기 식에서, R, R^1, 및 R^2 는 독립적으로 알킬, 시클로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로알킬 혹은 헤테로아릴이며 각각 약 1-10탄소(C_1-C_{10})를 갖는다.



(II)

상기 식에서, R^3, R^4, R^5, R^6 및 R^7 은 독립적으로 수소, C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_{10} 시클로알킬, C_1-C_{10} 아릴, C_1-C_{10} 아랄킬, C_1-C_{10} 헤테로알킬, 또는 C_1-C_{10} 헤테로아릴이며, 여기서 R^3, R^4, R^5, R^6 및 R^7 중 적어도 하나는 수소가 아니다.

C_{1}-C_{10} 알킬기로서 R, R^{1}, R^{2}, R^{3}, R^{4}, R^{5}, R^{6} 및 R^{7} 은 예를들어, 치환 또는 비치환된 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 테르트-부틸, 네오펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸, 2-에틸헥실, 노닐, 데실 등과 같은 직쇄이거나 혹은 분지부일 수 있다. 이러한 기중 어느 것도 할로겐, 히드록실, 알콕시, 아릴옥시, 알킬, 플루오로알킬, 아릴알킬기 등으로 치환될 수 있다.

C_{1}-C_{10} 시클로알킬로서 R, R^{1}, R^{2}, R^{3}, R^{4}, R^{5}, R^{6} 및 R^{7} 은 예를들어, 치환 또는 비치환된 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 메틸시클로펜틸, 시클로헥실, 메틸시클로헥실, 디메틸시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸 등일 수 있다. 이러한 기중 어느 것도 예를들어, 할로겐, 히드록실, 알콕시, 아릴옥시, 알킬, 플루오로알킬, 아릴알킬기 등으로 치환될 수 있다.

C_{1}-C_{10} 아릴로서 R, R^{1}, R^{2}, R^{3}, R^{4}, R^{5}, R^{6} 및 R^{7} 은 예를들어, 치환 또는 비치환된 페닐, o-톨일, m-톨일, p-톨일, o-자일릴, m-자일릴, p-자일릴, 알파-나프틸, 베타나프틸 등일 수 있다. 이러한 기중 어느 것도 예를들어, 할로겐, 히드록실, 알 콕시, 아릴옥시, 알킬, 플루오로알킬, 아릴알킬기 등으로 치환될 수 있다.

C_{1}-C_{10} 아랄킬로서 R, R^{1}, R^{2}, R^{3}, R^{4}, R^{5}, R^{6} 및 R^{7} 은 예를들어, 치환 또는 비치환된 벤질, 4-메틸벤질, o-메틸벤질, p-메틸벤질, 디페닐메틸, 2-페닐에틸, 2-페닐프로필, 3-페틸프로필 등일 수 있다. 이러한 기중 어느 것도 예를들어, 할로겐, 히드록실, 알콕시, 아릴옥시, 알킬, 플루오로알킬, 아릴알킬기 등으로 치환될 수 있다.

각각 화학식 I 및 II에서 어느 두 인접하는 R, R^{1}, 및 R^{2}, 혹은 R^{3}, R^{4}, R^{5}, R^{6} 및 R^{7} 은 연결되어 방향족, 비-방향족, 혹은 헤테로시클릭 고리를 형성할 수 있다.

본 발명의 방법에 사용되기 적절한 화학식 I의 아민 염기의 예는 디이소프로필에틸아민(즉, Hunig 염기), 트리프로필아민, 트리에틸아민, 트리메틸아민, 디에틸메틸아민, N-메틸모르폴린(NMM) 등과 같은 트리알킬아민; 테트라메틸에틸렌디아민(TMEDA)와 같은 사차 디아민; 폴리아민 및 중합체 결합 알킬아민; 트리페닐아민 등과 같은 트리아릴아민; 트리벤질아민 등과 같은 트리아랄킬아민; 디메틸아닐린과 같은 다른 치환된 아민 등을 포함한다. 화학식 I의 특정 바람직한 아민 염기는 Hunig 염기 등을 포함한다.

본 발명의 방법에 사용되기 적절한 화학식 II의 아민 염기의 예는 디메틸아미노피리딘(DMAP), 4-디메틸아미노피리딘, 및 메틸피리딘을 포함하는 모노알킬피리 딘, 2-피콜린, 3-피콜린, 디메틸피리딘을 포함하는 디알킬피리딘, 2,6-루티딘, 트리메틸피리딘을 포함하는 트리알킬피리딘, 2,4,6-콜리딘, syn-콜리딘, 테트라메틸피리딘을 포함하는 테트라알킬피리딘, 및 펜타메틸피리딘을 포함하는 펜타알킬피리딘과 같은 다른 치환된 피리딘 등을 포함한다. 화학식 II의 특정 바람직한 염기는 2-피콜린, syn-콜리딘 등을 포함한다.

본 발명의 방법에 사용되기 적절한 디아자비시클로 아민 염기의 예는 1,5-디아자비시클로[4.3.0]논-5-엔(DBN); 1,8-디아자비시클로[5.4.0]언덱-7-엔(DBU); 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 등을 포함한다.

광범위한 범위의 어느 산이 하나 또는 그 이상의 본 발명의 염기와 함께 혼합되어 본 발명의 산-염기 복합체를 형성할 수 있다. 적절한 산은 트리플루오로아세트산(TFA), 디클로로아세트산 등과 같은 아세트산 유도체; 메탄 설폰산, 트리플루오로메탄 설폰산, 4-피리딘이우메틸렌 설폰산 등과 같은 설폰산, 비수성 히드로겐 클로라이드, 비수성 히드로겐 브로마이드, 비수성 히드로겐 요오드 등과 같은 비수성 히드로겐 할라이드산; 및 HBF_{4} 를 포함한다. 특정 바람직한 구체화로, 본 발명에 사용되는 산은 트리플루오로아세트산이다.

본 발명의 특정 바람직한 산-염기 복합체는 트리플루오로아세트산과 Hunig 염기; 트리플루오로아세트산과 2-피콜린; 및 트리플루오로아세트산과 syn-콜리딘의 복합체를 포함한다. 특히 바람직한 산-염기 복합체는 트리플루오로아세트산과 Hunig 염기의 복합체이다.

산-염기 복합체를 형성하는 광범위한 범위의 어느 공지 방법이 본 발명에 따라 산-염기 복합체를 제조하는데 사용되기 위해 적응될 수 있다. 예를들어, 특정 구체화로, 본 발명의 산-염기 복합체는 적어도 하나의 염기에 적어도 하나의 산을 도입하여 복합체를 형성함으로써 생성된다.

본 발명의 산 및 염기는 용매의 존재 혹은 부재하에 도입되어 본 발명의 복합체를 형성한다. 용매의 존재하에 이루어지는 구체화에서, 산 및/또는 염기중 하나 또는 두가지 모두는 복합체를 형성하기위해 산과 염기의 접촉전에 우선 용매에 용해되어 산 용액 및/또는 염기 용액을 형성할 수 있다. 본 발명의 산-염기 복합체 형성시 사용되는 용매는 본 발명의 포스피틸레이티드 반응에 사용되는 어느 임의의 용매와 동일하거나 다를 수 있다. 본 발명에 따른 산-염기 복합체를 제조하는데 사용되기에 적절한 용매는 비-극성 및 극성, 비양자성 용매를 포함한다. 적절한 비-극성 및 극성, 비양자성 용매의 예는 메틸 아세테이트, 에틸 아세테이트, 프로필 아세테이트, 이소프로필 아세테이트, n-부틸 아세테이트, 이소부틸 아세테이트 등과 같은 아세테이트; 테트라히드로퓨란(THF), 메틸 테르트-부틸 에테르(MTBE) 등과 같은 에테르; 톨루엔, 클로로벤젠 등과 같은 방향족 용매; 디클로로메탄; 아세토니트릴; N-메틸-2-피롤리돈(NMP

); N,N-디메틸포름아미드(DMF) 및 이들의 둘 또는 그 이상의 조합을 포함한다. 특정 구체화로, 산-염기 복합체의 염기 혹은 상기 복합체 자체는 용매로 작용할 수 있다.

산 및 염기의 적절한 양이 본 발명의 산-염기 복합체를 제조하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 산 및 염기 성분이 약 1:1의 몰비로 복합체내에 존재하도록 충분한 산 및 염기가 사용되어야 한다. 특정 구체화로, 약 0.9 내지 1.5당량의 염기 및 약 0.9 내지 1.5당량의 산이 사용된다. 바람직하게, 약 0.9 내지 1.3당량의 염기 및 약 0.9 내지 1.1당량의 산이 사용되며, 보다 바람직하게 약 1.0 내지 1.3 당량의 염기 및 약 1.0 내지 1.05당량의 산이 사용된다. 특정 바람직한 구체화로, 약 1.3 당량의 염기 및 약 1.05당량의 산이 사용된다. 달리 특정하지 않는한, 모든 당량은 몰 당량이다.

본 발명의 산-염기 복합체는 본 발명의 포스피틸레이티드 반응시 원위치로 형성되거나 혹은 이로부터 개별적으로 형성될 수 있다. 복합체가 원위치에서 형성되는 구체화에서, 상기 복합체는 포스핀 및/또는 히드록실-함유 화합물을 첨가하기전에 반응 혼합물내에 형성될 수 있다. 택일적으로, 상기 복합체는 복합체의 산 및/또는 염기의 후속적인 첨가에 의해 반응 혼합물에 포스핀 및/또는 히드록실-함유 화합물의 도입후 제조될 수 있다.

어느 적절한 반응 조건이 본 발명의 복합체에 사용될 수 있다. 예를들어, 특정 구체화로, 본 발명의 산 및 염기는 약 0-100℃의 온도에서 혼합된다. 바람직하게, 상기 산 및 염기는 약 10-60℃의 온도에서, 그리고 보다 바람직하게 약 15-40의 온도에서 혼합된다.

B. 쌍성이온 복합체

본 명세서에 사용된 용어 '쌍성이온 복합체'는 일반적으로 이 기술분야에 알려진 바와 같이 동일한 분자(즉, 내부 염) 내에 양이온 및 음이온을 갖는 복합체 이 온을 칭한다. 본 출원인들은 이러한 쌍성이온 복합체가 본 발명에 따른 포스피틸화 활성제로서 사용하기 적절한 것임을 예기치않게 발견하였다.

광범위한 범위의 어느 쌍성이온 화합물/내부 염이 본 발명에 따라 사용하기 적절하다. 적절한 쌍성이온 화합물의 예는 피리딘에탄설폰산 등과 같은 설폰산 화합물을 포함한다.

포스피틸레이팅제

본 발명에서 사용되는 용어, '포스피틸레이팅제(phosphitylating agent)'는 일반적으로 하이드록시기-함유 화합물의 하이드록시기의 산소원자와 포스피틸레이트된 화합물을 형성하기 위한 포스피틸레이팅제의 인원자의 사이에 결합을 형성하기 위한 포스피틸레이션 활성화제의 존재하에서 하이드록시기-함유 화합물과 반응할 수 있는 어떠한 시약 화합물을 의미한다. 어떠한 광범위한 화합물이 본 발명에 따른 포스피틸레이팅제로 사용하기 적합하다. 적합한 화합물로는 예를 들어, 비스-디이소프로필아미노-2-시아노에톡시포스핀과 같은 알콕시-비스(디알킬아미노)포스핀; 디알콕시(디알킬아미노)포스핀; 알콕시-알킬(디알킬아미노)포스핀, 비스(N,N-디이소프로필아미노)-2-메틸트리플루오로아세틸아미노에톡시포스핀; 비스(N,N-디이소프로필아미노)-2-디페닐-메틸실릴에톡시포스핀; (알릴옥시)비스(N,N-디메틸아미노)-포스핀등을 포함하는 비스-치환된 포스핀과 같은 포스핀 뿐만 아니라; 2-시아노에틸-N,N,N',N-테트라이소프로필포스포로디아미디트; 메톡시-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트; 메틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트 등을 포함하는 하이드록시-보호된-N,N,N',N'-포스포르아미디트와 같은 포스포로아미디트 및 5'-O-디메톡시트리틸-2'-디옥시아데노신(N6-벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-2'-(N4-벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-2'-디옥시구아노신(N2-이소부티로일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-티미딘(thymidine)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트등과 같은 3'-O-포스포르아미디트; 및 이들의 둘 이상의 혼합물을 포함한다. 바람직한 포스피틸레이팅제로는 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트, 메톡시-N,N,N'N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-2'-디옥시아데노신(N6-벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-2'-(N4-벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-2'-디옥시구아노신(N2-이소부티롤)-3-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트, 및 5'-O-디메톡시트리틸-티미딘-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트와 같은 하이드록시-보호된-N,N,N',N'-포스포르아미디트를 포함한다. 특히 바람직한 구현에 있어서, 상기 포스피틸레이팅제는 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트이다.

하이드록시기-함유 화합물

본 발명에서 사용되는 용어, '하이드록시기-함유 화합물'은 일반적으로 최소 하나의 하이드록시기를 함유하는 화합물을 칭하는 것이며, 이는 포스피틸레이트된 화합물을 형성하기 위하여 하이드록시기-함유 화합물의 최소 하나의 수산기의 산소원자 및 포스피틸레이팅제의 인원자 사이에 결합을 형성하는 포스피틸레이션 활성화제의 존재하에서 포스피틸레이팅제와 반응할 수 있는 것이다. 일반적으로 포스피틸레이트된 화합물을 형성하기 위하여 하이드록시-함유

화합물의 최소 하나의 하이드록시기의 산소원자와 포스피틸레이팅제의 인원자 사이에 결합을 형성하는 포스피틸레이션 활성화제의 존재하에서 포스피틸레이팅제와 반응할 수 잇는 최소 하나의 하이드록시기를 포함하는 어떠한 화합물이 본 발명에 따른 하이드록시기-함유 화합물로 사용하기 적합하다. 특정 바람직한 구현에 있어서, 본 발명의 하이드록시기 함유 화합물은 링크된 핵산(LNA) 유도체 및 추가의 기 예를 들어, 할로겐 치환체로 치환된 뉴클레오시드; 바이오틴(Biotin)- 또는 플루오르신(Fluorescenin)-링크된 화합물을 포함하는 디텍터(Detector)-함유 뉴클레오시드; 안티센스(antisense) 활성을 증가시키는 리간드를 갖는 이펙터(Effector)-함유 화합물; 뿐만 아니라 이들중 둘 이상으로부터 유도되는 올리고머 구조를 포함하는 DNA 및/또는 RNA 뉴클레오시드를 포함하는 중성 및/또는 비-중성 뉴클레오시드를 포함한다. 적합한 DNA 및 RNA 뉴클레오시드의 예로는 아데노신, 시티딘, 구아노신, 티미딘(Thymidine), 디옥시 아데노신, 디옥시 시티딘 및 디옥시 구아노신의 5'-O-보호된 뉴클레오시드(벤조일, 이소부티릴, tert-부틸페놀시아세틸 'TAC'에 의한 보호와 같은 추가의 N-보호가 있거나 또는 없는); 아데노신, 시티딘, 구아노신 및 우리딘의 5'-O-보호된-2'-보호된 뉴클레오시드(추가의 N-보호된 또는 보호되지 않은)(이 때, 바람직한 2'-보 호기는 t-부틸디메틸실릴, 메톡시메틸(MOM), 메톡시에틸(MOE) 및 메톡시와 같은 알콕시기를 포함한다) 뿐만 아니라, 아데노신, 시티딘, 구아노신, 티미딘, 우리딘, 디옥시 아데노신, 디옥시 시티딘 및 디옥시 구아노신의 3'-O-보호된 뉴클레오시드(추가의 N-보호된 또는 보호되지 않은) 및 이로부터 유도되는 올리고머 구조와 같은 보호된 뉴클레오시드를 포함한다.

반응 용매 및 조건

본 발명의 방법은 배치 또는 연속공정으로 사용하기 위하여 적용될 수 있다. 특정한 구현에 따라서, 본 발명의 포스피틸레이션 방법의 반응 단계는 용매를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 포스피틸레이션 반응에 사용되는 용매는 본 발명의 산-염기 복합체의 형성에 사용되는 어떠한 임의의 용매와 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 본 발명에 따른 포스피틸레이션 반응에 사용하기 적합한 용매로는 비-극성 및 극성, 비양자성 용매를 포함한다. 적합한 비-극성 및 극성, 비양자성 용매의 예로는: 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 프로필 아세테이트, 이소프로필 아세테이트, n-부틸 아세테이트, 이소부틸 아세테이트등과 같은 아세테이트; THF, MTBE 등과 같은 에테르; 톨루엔, 클로로벤젠 등과 같은 방향족 용매; 디클로로메탄; 아세토니트릴; NMP; DMF 및 이들의 둘 이상의 혼합물을 포함한다. 특정한 구현에 있어서, 산-염기 복합체의 염기 또는 복합체 자체가 용매로 작용할 수 있다.

어떠한 적합한 하이드록시-함유 화합물 및 포스피틸레이팅제의 적합한 양이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 특정한 구현에 있어서, 하이드록시-함유가 약 0.9~1.5당량 그리고 포스피틸레이팅제 약 0.9~1.5당량이 사용된다. 바람직하게, 하이드록시-함유 화합물 약 0.9~1.1당량 및 포스피틸레이팅 제 약 0.9~1.3당량이 사용되며, 보다 바람직하게, 하이드록시-함유 화합물 약 0.9~1.1당량 및 포스피틸레이팅 제 약 1.0~1.3당량이 사용된다. 특별히 바람직한 구현에 있어서, 하이드록시-함유 화합물 약 1.0당량 및 포스피틸레이팅 제 약 1.1당량이 사용된다. 달리 명시하지 않는 한, 모든 당량은 몰당량이다.

본 발명에 참고문헌으로 편입된 어떠한 개시물에 개시된 조건을 포함하는, 어떠한 적합한 반응 조건이 본 발명의 포스피틸레이션 반응에 사용될 수 있다. 특정한 구현에 있어서, 상기 포스피틸레이션 반응은 약 0~100℃의 온도에서 수행된다. 바람직하게, 포스피틸레이션 반응은 약 0~40℃, 보다 바람직하게는 약 20℃의 온도에서 수행된다.

본 발명의 방법에 의해 제조되는 포스피틸레이트된 화합물은 이 기술분야에 알려진 적합한 방법으로 정제될 수 있다. 예를 들어, 수성 세척, 건조, 감압하에서의 농축, 크로마토그래피, 증류, 결정화, 침전 등이 사용될 수 있다.

특정 바람직한 구현에 따라서, 본 발명의 출원인은 3'-O-포스포르아미디트와 같은 상대적으로-고도의 순수한 포스피틸레이트된 화합물을 용액내에서 포스피틸레 이트된 화합물을 침전시켜 얻어질 수 있음을 발견하였다. 특정한 바람직한 구현에 있어서, 본 발명의 침전 방법은 침전되는 포스피틸레이트된 화합물 및 용매를 포함하는 화합물 용액을 제공하는 단계 및 포스피틸레이트된 화합물의 침전을 위한 침전용매와 상기 화합물 용액을 접촉시키는 단계를 포함한다.

어떠한 광범위한 적합한 용매가 본 발명에 따른 화합물 용액에서 사용될 수 있다. 적합한 화합물 용액 용매의 예로는: 톨루엔, 자일렌, 메틸아세테이트, 에틸아세테이트, 프로필아세테이트, 부틸아세테이트, 이들의 둘 이상의 혼합물을 포함한다. 바람직한 화합물 용액 용매로는 톨루엔 등을 포함한다.

상기 화합물 용액은 본 발명에 따른 어떠한 광범위한 방법으로 제공될 수 있다. 특정한 바람직한 구현에 있어서, 상기 화합물 용액은 본 발명의 포스피틸레이션 반응의 생성물로서 제공된다. 이러한 용액은 포스피틸레이션 반응으로부터 바로 얻어질 수 있거나 또는 반응생성물의 정제 및 이러한 정제된 생성물의 용매화에 의해 제공될 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 반응이 아닌 공급원에 의해 얻어지는 포스피틸레이트된 화합물은 본 발명에 따른 화합물 용액을 제공하기 위하여 화합물 용액 용매에 용해될 수 있다.

어떠한 적합한 침전 용매가 페트롤늄 에테르, 펜탄, 헥산, 이소헥산, 헵탄, 이소옥탄등과 같은 알칸 및 이들의 둘 이상

의 혼합물을 포함하는 본 발명에 따른 포스피틸레이트된 화합물의 침전에 사용될 수 있다. 바람직한 침전 용매로는 페트롤늄 에테르, 헥산, 이들의 둘 이상의 혼합물 등을 포함한다.

특정한 바람직한 구현에 있어서, 하나 이상의 첨가제를 침전 용매에 첨가하여, 본 발명의 방법에서 침전물의 구조에 영향을 미칠 수 있다. 적합한 첨가제의 예로는 트리에틸아민등을 포함한다. 어떠한 적합한 양의 첨가제가 본 발명에 따른 침전 용매에 첨가될 수 있다. 특정한 바람직한 구현에 있어서, 침전 용매 및 첨가제의 전체 중량을 기준으로, 첨가제가 약 0~10중량%로 사용되며, 바람직하게는 약 0~5중량%가 사용된다.

화합물 용액 대 침전 용액/첨가제의 어떠한 적합한 비율이 본 발명의 방법에 따라 사용될 수 있다. 특정한 바람직한 구현에 있어서, 상기 화합물 용액은 침전 용매 또는 침전용매 및 첨가제(존재하는 경우)가 약 5~25중량 당량, 바람직하게는 약 20~25중량당량으로 첨가된다.

침전은 어떠한 적합한 조건하에서 적합한 실험용 장치를 사용하여 진행될 수 있다. 바람직하게, 침전은 질소, 아르곤 등과 같은 비활성 가스 분위기 하에서 진행된다. 어떠한 적합한 온도 예를 들어, 약 -20~40℃의 온도에서 사용될 수 있다. 바람직하게, 침전은 약 0~30℃, 보다 바람직하게는 약 5~25℃의 온도에서 수행된다. 어떠한 적합한 용기기 침전을 위해 사용될 수 있다. 특정 바람직한 구현에 있 어서, 스테인레스강 용기가 사용된다.

자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성

이 기술분야에 알려진 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 상기 개시된 배치 및/또는 연속공정 뿐만 아니라, 상기 개시된 바와 같이, 배치 및/또는 연속공정 뿐만 아니라, 예를 들어, 본 발명에 참고문헌으로 편입된, Oxford University Press(1984, ISBN 0-904147-74-6)의 Applied BioSystems User's Manual for Models 392 and 394 DNA/RNA Synthesizers; Section 6 Chemistry for Automated DNA/RNA Synthesis(March 1994) and M.J. Gait, 'Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach', IRL Press에 개시된 자동화된 올리고뉴클레오타이드 합성을 사용하여 본 발명에 따라 유도되는 뉴클레오시드 및/또는 올리고머를 포함하는 하이드록시-함유 화합물로부터 합성될 수 있다. 이러한 구현에 있어서, 뉴클로레오사이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드 하이드록시-함유 화합물을 고형분 지지체에 고정하고 올리고뉴클레오타이드를 형성하기 위하여 포스피틸레이션 활성화제의 존재하에서 뉴클레오시드 포스피틸레이팅제와 함께 자동화된 DNA 합성기내에서 반응시킨다. 포스피틸레이션 반응의 특정한 수 및 시퀀스는 다른 길이를 포함하는 올리고머뉴클레오타이드 및 본 발명에 따른 뉴클레오시드의 시퀀스가 생성되도록 수행될 수 있다.

어떠한 적합한 고형분 지지체 물질이 본 발명에서의 사용을 위해 적용될 수 있다. 적합한 고형분 지지체 물질의 예로는 조절된-공극 유리('CPG'), 폴리스티렌, 실리카, 셀룰로오스 종이 및 이들의 둘 이상의 조합을 포함한다. 바람직한 종류의 고형분 지지체 물질로는 조절된-공극 유리, 폴리스티렌 및 이들의 조합을 포함한다.

본 발명에 사용되는 고형분 지지체는 어떠한 적합한 크기의 공극을 가질 수 있다. 이 기술분야에 알려진 바와 같이, 공극크기의 선택은 제조되는 올리고머의 크기 및 사용되는 뉴클레오타이드 합성 방법에 따라서 최소한으로 결정된다. 본 발명의 가르침의 견지에 있어서, 이 기술분야의 기술자는 광범위한 적용에 사용하기 위하여 적합한 공극 크기의 고형분 지지체 물질을 선택할 수 있을 것이다.

다양한 고형분-지지체 고정된 뉴클레오시드가 상업적으로 이용가능하다. 예를 들어, CPG에 고정된 다수의 n-보호된 디옥시뉴클레오시드(1000옹스트롬 CPG 상에 0.2마이크로 몰 벤조일-보호된 디옥시시토신 포함)가 Applied Biosystems(ABI)로부터 이용가능하다.

광범위한 자동화된 DNA/RNA 합성기(Synthesizer)가 본 발명에서의 사용을 위하여 적용될 수 있다. 적합한 DNA 합성기의 예로는 Applied Biosystems의 Model Nos. 3900, 380, 380B, 392 및 394, Expedite 8800, 8905, 8909, Gene Assembler, OligoPilot, OligoPilot Ⅱ, AKTAoligopiolt 10 및 AKTAoligopilot 100 뿐만 아니라, Beckmann Oligo 1000 및 1000M, MWG Biotech Oligo 2000, PolyPlex GeneMachine, Illumina Oligator, MerMade Ⅰ and Ⅱ, Imntelligent BioInstruments Primer Station 960, Proligo Polygen Syntower 등을 포함한다. 바람직한 종류의 합성기로는 Model 394등을 포함한다.

어떠한 적합한 양의 고형분-지지된 하이드록시-함유 화합물 및 포스피틸레이팅제가 본 발명의 자동화된 방법에 따라 사용될 수 있다. 특정 바람직한 구현에 있어서, 과량의, 바람직하게는 50배 과량의 포스피틸레이팅제가 각각의 반응에 사용된다.

실시예

이하 본 발명을 다음 실시예를 통하여 설명하고자 하며, 이로써 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

실시예 1-11

이 실시예는 본 발명에 따른 몇몇 활성화제의 존재하에서 일부 보호된 뉴클레오시드 시약과 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미디트로의 포스피틸레이션을 설명하고자 한다.

본 발명에 따른 산-염기 활성화제의 존재하에서 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미디트를 이용한 보호된 뉴클레오시드 시약을 반응시키 는 단계를 포함하는 11개의 포스피틸레이션 반응(1-11)이 수행되며, 각각의 생성물 수득율을 이하, 일반적인 방법(General Procedure)에 개시된 바와 같이 계산하였다. 11개의 각각의 반응에서의 보호된 뉴클레오시드, 활성화 염기, 활성화 산, 용매 및 수득율의 다양한 조합이 표 1에 열거된다.

일반적인 방법: 활성화 염기(1.1~1.2당량)를 용매에 첨가하고, 활성화 산 0.95~1.1당량을 상온에서 연속적으로 첨가하여 활성화 용액을 제조하였다. 약 1당량의 보호된 뉴클레오시드를 분리된 용기에서 용매 10당량에 용해한 다음 감압하에서 용매 약 3당량을 증류제거한다. 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미디트 약 1~1.2당량을 상온에서 뉴클레오시드 혼합물에 첨가하고 상기 제조된 활성화 용액을 상온에서 격렬한 교반과 함께 뉴클레오시드 혼합물에 첨가한다. 12시간 후에, 반응 혼합물을 톨루엔으로 희석하고 물로 세척한다. 유기층을 분리하고 소디움 술페이트로 필요에 따라 건조하고 감압하에서 농축한다. 그 후, 원하는 아디미트의 수득율을 HPLC 기술을 사용하여 계산하며, 즉, 결과 생성물 혼합물은 적합한 용리액을 사용하는 HPLC로 수행되며, HPLC 피크의 면적을 사용하여 혼합물에서의 생성물 %수득율을 측정한다.

[표 1]

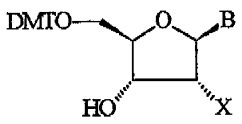
실시예	뉴클레오시드	염기	산	용매	수득율 %
1	Bz-DMT-dA	2-피콜린	TFA	메틸아세테이트	95
2	Bz-DMT-dA	Syn-콜리딘	TFA	메틸아세테이트	89
3	Bz-DMT-dA	Hunig 염기	TFA	메틸아세테이트	98
4	Bz-DMT-dC	2-피콜린	TFA	이소부틸아세테이트	91
5	Bz-DMT-dC	Syn-콜리딘	TFA	이소부틸아세테이트	95
6	Bz-DMT-dC	Hunig 염기	TFA	이소부틸아세테이트	92
7	i-Bu-DMT-dG	2-피콜린	TFA	THF	67
8	i-Bu-DMT-dG	Hunig 염기	TFA	THF	92
9	DMT-T	2-피콜린	TFA	THF	94
10	DMT-T	Syn-콜리딘	TFA	THF	95
11	DMT-T	Hunig 염기	TFA	THF	96

DMT = 디메톡시트리틸; Bz=벤조일; iBu= 이소부티로일

실시예 12-18

이 실시예는 본 발명에 따른 Hunig 염기-TFA 활성화제의 존재하에서 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미디트를 이용한 일부 보호된 뉴클레오시드 시약의 포스피틸레이션을 설명하고자 한다.

화학식 III(이하)의 7개의 뉴클레오시드 시약을 실시예 1~11의 일반적인 방법에 따라서 Hunig 염기-TFA 활성화제의 존재하에서 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미디트와 반응시켰으며, 생성물 수득율은 두 개의 방법:(1)결과 생성물 혼합물은 적합한 용리액을 사용하여 HPLC 컬럼으로 수행하였으며, HPLC 피크이하의 면적을 사용하여 혼합물에서의 생성물 %수득율을 측정하는 방법; 또는 (2)결과 생성물을 메틸아세테이트/톨루엔 혼합물(정제되는 특정한 생성물에 따른 농도)을 사용한 짧은 실리카겔 컬럼에서 정제하는 방법 중 하나에 의해 계산되었다. 적합한 생성물 분율은 감압하에서 바람직한 아미디트의 약 50%의 용액이 얻어질때까지의 용매를 농축한다. 이 용액은 약 5~25당량의 페트롤늄 에테르를 첨가하여 생성물을 침전시키고, 여과하고 이를 페트롤늄 에테르로 세척한다. 그 후 생성물을 건조, 칭량하고 수득율을 계산하였다.



(III)

상기 식에서, B는 N6-벤조일-아데노신(A(Bz)), N4-벤조일-시티신(C(Bz)), N2-이소부티로일-구아닌(G(iBu)), 티민(T), 우라실(U)로부터 유도되는 부분이며, X는 수소, OTBDMS 또는 메톡시(OMe)이다. 특정한 X 및 B는 각 뉴클레오시드에 따라서 다양화되며, 각 반응의 경우에 % 수득율은 표 2에 나타낸 바와 같다.

[표 2]

실시예	X	B	수득율 %
12	OTBDMS	A(Bz)	92-HPLC
13	OTBDMS	C(Bz)	93-HPLC
14	OMe	C(Bz)	96-HPLC
15	H	G(iBu)	94-HPLC
16	OTBDMS	G(iBu)	92-HPLC
17	H	T	80-분리된
18	OTBDMS	U	85-HPLC

실시예 19

이 실시예는 본 발명에 따른 디이소프로필에틸 암모늄 트리플루오로아세테이트 및 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르-디아미디트를 이용한 N6-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-디옥시 아데노신(Bz-DMT-dA)의 포스피틸레 이션을 설명하는 것이다.

디이소프로필에틸아민 6.4g(49.4mmol)을 반응 용기에서 20ml의 건조 THF에 용해한다. 트리플루오로아세트산 4.9g(43.6mmol)을 상온에서 THF 혼합물에 첨가하여 다음 반응 단계에서의 사용을 위한 활성화제 용액을 제조한다.

Bz-DMT-dA 30g(45mmol)을 반응 용기에서 건조 THF 185ml에 용해한 다음 THF 50ml를 감압하에서 증류제거하여 반응 혼합물을 형성한다. 상온에서 반응 혼합물에 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미디트 14.7g(47.2mmol)을 첨가한다. 상기 제조된 활성화제 용액을 상온에서 격렬한 교반과 함께 반응 혼합물에 첨가한다. 12시간 후에, 상기 반응 혼합물을 80ml의 톨루엔으로 희석하고 물 50ml로 세척한다. 유기층을 감압하에서 분리하고 농축한다. 결과 생성물을 메틸아세테이트/톨루엔(80/20)을 사용하여 짧은 실리카겔 컬럼으로 정제한다. 적합한 생성물 분율을 감압하에서 5'-O-디메톡시트리틸-2'-디옥시 아데노신-(N6-벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트(PAm-Bz-DMT-dA)의 약 50% 용액이 얻어질 때까지 용매를 농축한다. 약 50%의 용액이 격렬한 교반(약 500-600rpm)과 함께 상온에서 500ml 헥산을 함유하는 기계적 교반기가 장착된 1-L 스테인레스 강 반응기에 첨가된다. 3시간 후에 결과 침전물을 여과하고, 50ml의 헥산으로 세척하고 건조하여 32g(83%)의 Pam-Bz-DMT-dA를 얻었다.

실시예 20

이 실시예는 본 발명에 따라서 디이소프로필에틸 암모늄 트리플루오로아세테이트 및 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포르디아미디트를 이용한 N4-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-디옥시시티딘(Bz-DMT-dC)의 포스피틸레이션을 설명하고자 한다.

디이소프로필에틸아민 22.4g(173mmol)을 반응 용기에서 30ml의 건조 THF에 용해한다. 트리플루오로아세트산 18.4g(164mmol)을 상온에서 THF 혼합물에 가하여 다음 반응 단계에서의 사용을 위한 활성화제 용액을 제조한다.

Bz-DMT-dC 103g(158.3mmol)을 반응 용기에서 450ml의 건조 톨루엔에 용해한 다음 톨루엔 100ml를 감압하에서 증류제거하여 반응 혼합물을 제조한다. 상온에서 반응 혼합물에 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포

르디아미디트 51.4g(170.5mmol)을 첨가한다. 상기 제조된 활성화제 용액을 격렬한 교반과 함께 상온에서 반응혼합물에 첨가한다. 12시간 후에, 반응 혼합물을 수성 암모늄 아세테이트 용액 100ml로 2회 세척한다. 유기 층을 분리하고 감압하에서 농축한다. 결과 생성물을 메틸아세테이트/톨루엔/트리에틸아민(100/30/2)를 사용하여 짧은 실리카 겔 컬럼에서 정제한다. 적합한 생성물 분율을 감압하에서 톨루엔에 용해된 5'-O-디메톡시트리틸-2'-디옥시시티딘-(N4-벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포르아미디트(PAm-Bz-DMT-dC)의 약 50% 용매가 얻어질 때까지 농축한 다. 기계적 교반기가 장착된 3-L의 스테인레스 강 반응기를 사용하여, 이 용액을 5℃에서 격렬한 교반(500~600rpm)으로 1880ml의 헥산에 용해된 트리에틸아민 19g의 용액에 첨가한다. 3시간 후에, 결과 침전물을 여과하고 100ml의 헥산으로 세척하고 건조하여 112g(85%)의 PAm-Bz-DMT-dC를 얻는다.

비교예 1-3

피리딘-TFA 활성화제의 존재하에서 2-시아노에틸-N,N,N',N'- 테트라이소프로필포스포르디아미디트와 보호된 뉴클레오시드 시약을 반응시키는 단계를 포함하는 비교 포스피틸레이션 반응(C1-C3)을 수행하였으며, 상기 실시예 12~18에 개시된 일반적인 방법에 따라 각각의 생성물의 수득율을 계산한다. 3개의 반응에서 각각 보호된 뉴클레오시드, 용매, 및 수득율의 다양한 조합을 표 3에 열거한다. 표 3에서의 수득율로부터 설명되는 바와 같이(표 1 및 2의 것과 비교하여) 본 발명의 방법과 관련된 수득율이 우수하였으며, 대부분의 구현에서, 치환되지 않은 피리딘의 상당히 입체장체가 덜한 염을 포함하는 통상적인 활성화제를 사용한 비교 반응과 관련된 것 보다 우수하다.

[표 3]

실시예	뉴클레오시드	용매	수득율%
C1	Bz-DMT-dA	메틸아세테이트	90-분리됨
C2	Bz-DMT-dC	이소부틸아세테이트	90-분리된
C3	DMT-T	THF	95-분리됨

실시예 21

이 실시예는 본 발명에 따른 자동화된 합성 기술을 사용한 두개의 올리고뉴클레오타이드 시퀀스(5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 및 (5'-TTTTTTTTTT-3')의 제조를 설명하는 것이다.

ABI 394 DNA 합성기에는 CPG(1000옹스트롬)(ABI로부터)에 0.2 마이크로몰의 벤조일-보호된 디옥시시토신을 포함하는 4개의 합성 컬럼이 장착되었다. 합성기에는 추가로 4개의 바틀이 장착되었으며, 각각은 4개의 3'-O-포스포르아미디트(각각 dC, dA, dG 및 T를 기초로 함)중 하나를 포함하며 반응에서 뉴클레오시드 포스피틸레이팅제의 공급원으로서 작용한다. 합성기에는 다음 용액의 공급원이 추가로 장착되었다:

활성화제 용액: 0.1M Hunig 염기/TFA 복합체(43.0그램의 아세토니트릴(Honeywell Burdick and Jackson)에 용해된 TFA 8.9그램과 디이소프로필에틸아민(Aldrich Biotech) 8.9그램을 혼합하여 제조됨)

탈블록(deblock) -T : 디클로로메탄에 용해된 3%의 트리클로로아세트산;

A 캡 : 10% 아세트산 무수물/ 10% 피리딘/ 80% THF;

B 캡 : 10% N-메틸이미다졸/ 80% THF; 및

산화 T: 0.02M 아이오딘/ 2% 물/ 20% 피리딘/ 78% THF

상기 뉴클레오시드 포스피틸레이션제는 원하는 올리고뉴클레오타이드 'fos- 21'(5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 및 'CT10'(5'-TTTTTTTTTT-3')을 달성하기 위하여 커플링 강 50-배 과량으로 연속하여 반응되었다. HPLC 분석은 PDA 검출기가 장착된 Agilent 110 시리즈 HPLC를 사용하여 수행되었다. LC 3D 소프트웨어용 Agilent ChemStation을 사용하여 데이터를 수집하고 분석하였다. 사용된 HPLC 컬럼은 Dionex DNAPak 100(4X250mm) 컬럼이었다.1.0ml/min의 흐름속도로 1차(linear) 용리액을 사용하였다. 이동상은: B, 10mM NaClO4, 10mM Tris-Cl pH, 8.3; D, 300mM NaClO4, 10mM Tris pH, 8.3이었다. 용리액 프로그램은 다음과 같다:

올리고뉴클레오타이드 HPLC 분석 용리액 프로그램 -45분

시간(min)	%B	%D
0	100	0
5	75	25
30	40	60
35	0	100
40	100	0

올리고뉴클레오타이드는 물에서 ml 당 50mg의 농도로 분석을 위해 제조되었다. OD260 피크 조질 DNA 수득율 값은 농도를 계산하기 위하여 사용되었다. 30ml의 샘플을 주입하였다. 각 올리고뉴클레오타이드의 4개의 샘플을 시험하였다. 평균 수득율이 fos-21의 경우에 약 42.7% 그리고 CT-10의 경우에 약 85.2%인 것으로 측정되었다.

비교예 4

이 예는 자동화된 합성에서의 테트라졸 및 피리딘-TFA 활성화제를 사용하여 두개의 올리고뉴클레오타이드 시퀀스(5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 및 (5'-TTTTTTTTTT-3')의 합성을 설명하고자 한다.

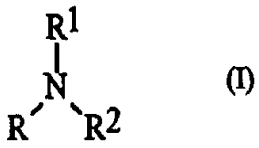
올리고뉴클레오타이드 시퀀스 (5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 및 (5'-TTTTTTTTTT-3')를 통상적인 활성화제 용액을 사용한 것을 제외하고 실시예 22에 개시된 바와 같이 각각을 합성하고 시험하였다. 일 실험에 있어서, (5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 및 (5'-TTTTTTTTTT-3') 모두는 활성화제로서 Honeywell Burdick and Jackson, Inc사의 테트라졸을 사용하여 제조되었다. 다른 실험에 있어서, (5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3') 및 (5'-TTTTTTTTTT-3')는 모두 미국 특허 제 6,274,725호에 개시된 피리딘-TFA 활성화제를 사용하여 제조되었다.

활성화제로서 테트라졸을 사용하는 (5'-ACGATGATGTTCTCGGGCTTC-3')의 평균 수득율은 66.5%였으며, 피리딘-TFA를 사용한 경우에는 58.1%였다. 활성화제로서 테트라졸을 사용한 (5'-TTTTTTTTTT-3')의 평균 수득율은 87.3%였으며, 피리딘-TFA를 사용한 경우에는 86.0%였다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

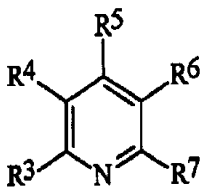
(1)화학식 I의 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체;



(I)

(상기 식에서, R, R^1, 및 R^2 는 독립적으로 C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_{10} 시클로알킬, C_1-C_{10} 아릴, C_1-C_{10} 아랄킬, C_1-C_{10} 헤테로알킬 혹은 C_1-C_{10} 헤테로아릴이다.)

(2) 화학식 II의 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체;



(II)

(상기 식에서, R^3, R^4, R^5, R^6 및 R^7 은 독립적으로 수소, C_1-C_{10} 알킬, C_1-C_{10} 시클로알킬, C_1-C_{10} 아릴, C_1-C_{10} 아랄킬, C_1-C_{10} 헤테로알킬, 또는 C_1-C_{10} 헤테로아릴이며, 그리고 상기 R^3, R^4, R^5, R^6 및 R^7 중 적어도 하나는 수소가 아니다.)

(3) 디아자비시클로 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체;

(4) 쌍성이온 아민 복합체; 및

(5) 이들의 둘 또는 그 이상의 조합;

으로 구성된 그룹으로부터 선택된 포스피틸화 활성제의 존재하에서 히드록실-함유 화합물과 포스피틸레이팅제를 반응시켜 포스피틸레이티드 화합물을 생성하는 단계를 포함하는 포스피틸레이티드 화합물 제조방법.

청구항 2.
제 1항에 있어서, 상기 포스피틸화 활성제는 화학식 I의 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.
제 2항에 있어서, 상기 화학식 I의 아민 염기는 디이소프로필에틸아민, 트리프로필아민, 트리에틸아민, 트리메틸아민, 디에틸메틸아민, NMM, TMEDA, 트리벤질아민, 및 이들의 둘 또는 그 이상의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.
제 3항에 있어서, 상기 화학식 I의 아민 염기는 디이소프로필에틸아민인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.
제 2항에 있어서, 상기 포스피틸화 활성제는 나아가 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 메탄 설폰산, 트리플루오로메탄 설폰산, 4-피리딘이우메틸렌 설폰산, 비수성 히드로겐 클로라이드, 비수성 히드로겐 브로마이드, 비수성 히드로겐 요오드; 및 HBF_4 으로 구성된 그룹으로부터 선택된 산으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.
제 4항에 있어서, 상기 산-염기 복합체는 나아가 트리플루오로아세트산으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.
제 1항에 있어서, 상기 포스피틸화 활성제는 화학식 II의 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.
제 7항에 있어서, 상기 화학식 II의 아민 염기는 디메틸아닐린, DMAP, 4-디메틸아미노피리디움, 메틸피리딘, 2-피콜린, 3-피콜린, 디메틸피리딘, 2,6-루티딘, 트리메틸피리딘, 2,4,6-콜리딘, syn-콜리딘, 테트라메틸피리딘, 펜타메틸피리딘, 및 이들의 둘 또는 그 이상의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.
제 8항에 있어서, 상기 화학식 II의 아민 염기는 2-피콜린 혹은 syn-콜리딘인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.
제 8항에 있어서, 상기 포스피틸화 활성제는 나아가 트리플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 메탄 설폰산, 트리플루오로메탄 설폰산, 4-피리딘이우메틸렌 설폰산, 비수성 히드로겐 클로라이드, 비수성 히드로겐 브로마이드, 비수성 히드로겐 요오드; 및 HBF_4 으로 구성된 그룹으로부터 선택된 산으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.
제 9항에 있어서, 상기 산-염기 복합체는 나아가 트리플루오로아세트산으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.
제 1항에 있어서, 상기 포스피틸화 활성제는 DBU, DBN, 1,1,3,3-테트라메틸구아니딘 및 이들의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택된 디아자비시클로 아민 염기로부터 유래된 산-염기 복합체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.
제 1항에 있어서, 상기 포스피틸화 활성제는 쌍성이온 아민 복합체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.
제 13항에 있어서, 상기 쌍성이온 아민 복합체는 피리딘에탄설폰산을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.
제 1항에 있어서, 상기 히드록실-함유 화합물은 뉴클레오시드 혹은 이로부터 유래된 올리고머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.
제 15항에 있어서, 상기 뉴클레오시드는 5'-O-보호 뉴클레오시드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.
제 1항에 있어서, 상기 포스피틸레이팅제는 비스-디이소프로필아미노-2-시아노에톡시포스핀; 디알콕시(디알킬아미노)포스핀; 알콕시-알킬(디알킬아미노)포스핀, 비스(N,N-디이소프로필아미노)-2-메틸트리플루오로아세틸아미노에톡시포스핀; 비스(N,N-디이소프로필아미노)-2-디페닐-메틸실일에톡시포스핀; (알릴옥시)비스(N,N-디메닐아미노)-포스핀; 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아민디트; 메톡시-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트; 메틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트; 및 이들의 둘 또는 그 이상의 혼합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18.
제 17항에 있어서, 상기 포스피틸레이팅제는 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트 및 메톡시-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트로 구성된 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.
제 18항에 있어서, 상기 포스피틸레이팅제는 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.
제 1항에 있어서, 포스피틸레이티드된 화합물을 침전 용매내에 침전시키는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21.
제 20항에 있어서, 상기 침전 단계는 포스피틸레이티드된 화합물과 용매를 포함하는 화합물 용액을 제공하고 그리고 상기 화합물 용액을 침전 용매와 접촉시켜 포스피틸레이티드된 화합물을 침전시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.
제 21항에 있어서, 상기 침전 용매는 석유 에테르를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.
트리플루오로아세트산-디이소프로필에틸아민 복합체의 존재하에서 5'-O-보호-뉴클레오시드를 포스피틸레이팅제와 반응시켜 3'-O-포스포아미디트를 형성하는 단계를 포함하는 포스피틸레이티드 화합물을 제조하는 방법.

청구항 24.
제 23항에 있어서, 상기 포스피틸레이팅제는 2-시아노에틸-N,N,N',N'-테트라이소프로필포스포로디아미디트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.
제 24항에 있어서, 상기 5'-O-보호-뉴클레오시드는 N^6-벤조일-5-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-데옥시아데노신, N^4-벤조일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-데옥시시티딘, N^2-이소부티로일-5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-2'-데옥시구아노신, 및 5'-O-(4,4'-디메톡시트리틸)-티미딘으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

제 23항에 있어서, 상기 3'-O-포스포아미디트는 5'-O-디메톡시트리틸-2'-데옥시아데노신(N ^{6} -벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-2'-(N ^{4} -벤조일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포아미디트, 5'-O-디메톡시트리틸-2'-데옥시구아노신(N ^{2} -이소부티로일)-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포아미디트, 및 5'-O-디메톡시트리틸-티미딘-3'-N,N-디이소프로필아미노-O-(2-시아노에틸)포스포아미디트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.
제 23항에 있어서, 상기 3'-O-포스포아미디트는 침전 용매에서 상기 3'-O-포스포아미디트의 침전을 통해 정제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.
제 23항에 따라 제조된 포스피틸레이티드 화합물.

청구항 29.
트리플루오로아세트산-디이소프로필에틸아민 복합체의 존재하에서 5'-O-보호-뉴클레오시드로부터 유래된 올리고머와 3'-O-포스포아미디트를 반응시켜 포스피틸레이티드 올리고머 화합물을 형성하는 단계를 포함하는 포스피틸레이티드 화합물 제조방법.

청구항 30.
제 29항에 있어서, 상기 반응은 자동 DNA 합성기에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31.
제 29항에 따라 제조된 포스피틸레이티드 올리고머 화합물.

청구항 32.
포스피틸레이티드 화합물 및 용매를 포함하는 화합물 용액을 제공하고 상기 화합물 용액을 침전 용매와 접촉시켜 정제된 포스피틸레이티드 화합물을 침전시키는 단계를 포함하는 포스피틸레이티드 화합물 정제방법.

청구항 33.
제 32항에 있어서, 상기 침전 용매는 석유 에테르를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.
제 33항에 있어서, 상기 접촉 단계는 약 5-25℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.
제 34항에 있어서, 상기 접촉 단계는 스테인리스강 용기내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.