

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁶ C07H 21/00	(45) 공고일자 1999년08월02일
	(11) 등록번호 10-0211552
	(24) 등록일자 1999년05월04일
(21) 출원번호 10-1993-0700317	(65) 공개번호 특1993-0702372
(22) 출원일자 1993년02월03일	(43) 공개일자 1993년09월08일
번역문제출일자 1993년02월03일	
(86) 국제출원번호 PCT/US 91/05531	(87) 국제공개번호 WO 92/02534
(86) 국제출원일자 1991년08월02일	(87) 국제공개일자 1992년02월20일
(81) 지정국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈부르크 네델란드 스웨덴 국내특허 : 오스트레일리아 브라질 캐나다 핀란드 헝가리 일본 대한민국 노르웨이 러시아	
(30) 우선권 주장	582,287 1990년09월13일 미국(US) 582,456 1990년09월13일 미국(US) 582,457 1990년09월13일 미국(US) 682,784 1991년04월09일 미국(US) 562,180 1990년08월03일 미국(US)
(73) 특허권자	사노피 디. 꼬쉬 프랑스75374 파리 퀴 마르보프 32-34
(72) 발명자	웨이스 알렉산더루드빅 미합중국 펜실베니아 19312 베르윈 837 올드스테이트로드 하우셔 프레데릭헤르만 미합중국 텍사스 78258 산안토니오 25315 로스트애로우 카투르베돌라 프라사드벤카타칼라 미합중국 펜실베니아 19341 엑톤 523 섬머크로프트드라이브 엘레키 다니엘쥘쎌 미합중국 펜실베니아 19097 래드노어 141 어퍼컬프로드 카바나프 폴프랜시스쥬니어 미합중국 펜실베니아 19382 웨스트체스터 1845 윈도버드라이브 모스과 패트리시아수잔 미합중국 펜실베니아 19460 포에닉스빌 701 스타스트리트 오아키스 프레드테리 미합중국 뉴욕 14617 로체스터 216 스탠턴레인 목영동, 목선영
(74) 대리인	목영동, 목선영

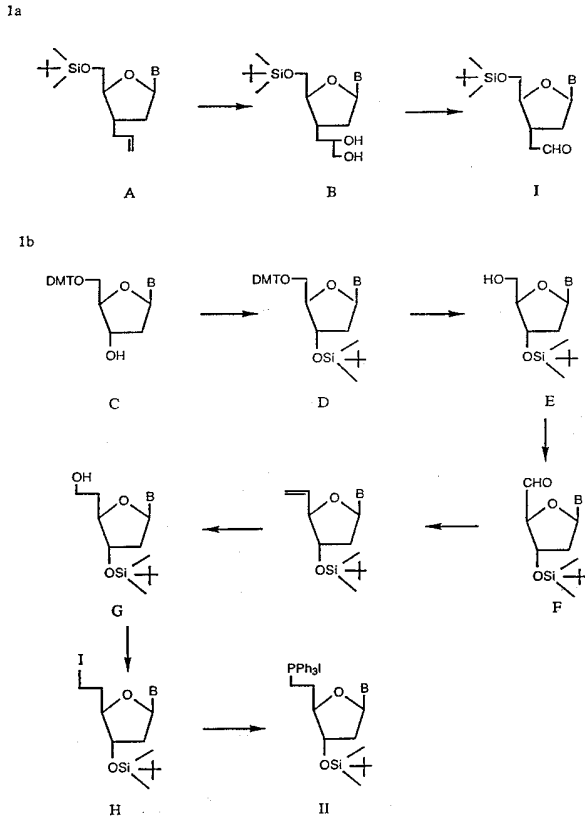
심사관 : 안소영

(54) 유전자 발현 억제용 화합물 및 방법

요약

본 원은 유전자 발현 억제용 화합물, 조성물 및 방법에 관한 것으로, 본원 화합물은 1) 3원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 올리고뉴클레오지드 배열(약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는) 또는 2) 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단 모두)에 디올을 지니는 올리고뉴클레오타이드 배열(약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는)을 포함한다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

유전자 발현 억제용 화합물 및 방법

[발명의 상세한 설명]

본원은 미합중국 출원번호 제 07/562,180호 (1990년 8월 3일자) ; 제 07/582,287호 (1990년 9월 13일자) ; 제 07/582,456호 (1990년 9월 13일자) ; 제 07/582,457호 (1990년 9월 13일자)의 일부 계속 출원이다.

[기술분야]

본원은 유전자발현 억제용 화합물, 조성물 및 방법에 관한다. 본원 화합물은 1) 3원자 인타뉴클레오지드 연쇄를 지니는 올리고뉴클레오지드 배열(약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는) 또는 2) 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단 모두)에 디올을 지니는 올리고뉴클레오타이드 배열(약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는)을 포함한다.

안티센스 화합물 (antisense compound)은 핵산(RNA 또는 DNA)내 뉴클레오티드 배열과 결합(또는 혼성화)하여, 상기 핵산의 기능 또는 합성을 억제하는 화합물을 말한다. 상기 안티센스 화합물은 RNA 및 DNA 양자 모두에 혼성화하는 능력을 지니므로 하여, 전사, RNA 가공 또는 번역 레벨에서의 유전자 발현을 방해할 수 있다.

안티센스 분자들은 게놈 DNA와 혼성화, RNA 폴리머라제의 작용을 직, 간접적으로 억제하는 방법을 통해 특정 유전자의 mRNA로의 전사를 저지도록 고안해 합성할 수 있다. DNA 타겟팅(targeting)의 잇점은 치료 효과를 이루어냄에 있어 단지 소량의 안티센스 화합물들만을 필요로한다는데 있다. 그와는 달리, 안티센스 분자들을 RNA와 혼성화, 전사후 수정(RNA가공) 메커니즘 또는 단백질 합성(번역) 메커니즘을 억제도록 고안해 합성할 수도 있다. 전형적인 타겟 RNA들은 전령 RNA(mRNA), 운반 RNA(tRNA), 리보솜 RNA (rRNA) 등이다. 가공 및 번역 메커니즘 예들은 인트론(intron) 제거용 전-mRNA (pre-mRNA) 접합, mRNA의 5' 말단 캡핑(capping), 혼성화 저지(hybridization arrest) 및 뉴클리아제 매개 mRNA 가수분해를 포함한다.

하지만, 현재, 안티센스 기술의 실질적인 과학 및 치료 분야 응용은 몇몇 기술적 문제로 인해 곤란을 받고 있는 상황에 있다. [Klausner, A., Biotechnology, 8 : 303-304(1990)]. 합성안티센스 분자들은 타겟 세포내에 존재하는 뉴클리아제에 의해 신속히 분해되는 경향을 보여준다. 예컨대, 안티센스 DNA 또는 RNA를 이루는 올리고뉴클레오지드 배열들은 이 핵산의 5' 또는 3' 말단 둘중 그 어느하나에 작용하는 엑소뉴클리아제의 작용을 받아 분해된다. 그뿐만아니라, 엔도뉴클리아제는 개개 뉴클레오지드간 내부 포스포디에스테르 연쇄(linkage)에서 상기 DNA 또는 RNA를 절단할 수 있다. 그같은 절단의 결과는, 투여된 안티센스 화합물들의 유효반감기를 매우 단축시킴으로서, 다량의 투약량 사용(투약량의 빈번한 투여로 이어지는)을

불가피하게 만든다.

또다른 문제는 반자동 DNA 합성기를 이용한 안티센스 DNA 또는 RNA 생산에 막대한 비용이 든다는데 있다. 안티센스 DNA 1g 생산에는 약 \$100,000의 비용이 드는 것으로 최근 추정된바 있다(Armstrong, L., Business Week, March 5, 1990, page 89).

또다른 문제는 체(體) 및 세포내 목적 타겟까지의 안티센스제(ANTISENSE AGENT) 송달과 관련한다. 게놈 DNA를 타겟으로 하는 안티센스제들은 핵에 들어가야만(즉, 세포질막 및 핵막을 투과해 들어가야만) 한다. 하지만, 막투과성(소수성 증대) 증대의 필요성은 혈장(plasma) 및 세포시토졸(cell cytosol)과 같은 체액 구획내 수용성(친수성 증대)의 필요성과 균형을 이루는 선에서 고려되어야만 한다.

또다른 문제는 안티센스제들(체내에 유리상태로 존재하는 것이든, 타겟 핵산들에 혼성화된 것이든간에)의 안정성과 관련한다. 안티센스 DNA와 같은 올리고뉴클레오타이드 배열들은 키랄 포스포러스 중심(chiral phosphorous center) 주위의 입체 재배열에 민감한 영향을 받는다.

안티센스제를 통한 유전자 타겟팅(Gene targeting)은 인체치료의 필연적 차기방법인 것으로 사료된다(Armstrong, supra at 88). 하지만, 질병치료를 위한 상기 안티센스 기술의 성공적 이용은 전술한 문제들의 해결을 요한다.

안정하고, 누클리아제 저항성을 지니며, 생산비가 저렴한 그리고 신체내 핵산 타겟들에 송달되어서는 이 핵산 타겟들과 혼성화할 수 있는 안티센스 화합물들의 한가지 제조방법은 정상 포스페이트-당 골격구조를 수정한 올리고뉴클레오타이드 배열들을 합성하는 것이다.

대략, 두가지 타입의 올리고뉴클레오타이드 배열들(수정된 골격들을 지니는)이 보고되어 있다. 첫 번째 타입은 정상 인터뉴클레오타이드 포스포디에스테르 연쇄의 수정을 포함한다. 두 번째 타입은 포스포디에스테르 연쇄의 비포스페이트(non-phosphate) 인터뉴클레오타이드 연쇄로의 대체를 포함한다[Uhlmann, E. and Peyman, A., Chemical Reviews, 9(4) : 544-584(1990)].

지금까지 보고된 수정된 포스포디에스테르 연쇄들은 포스포로티오에이트들, 알킬포스포디에스테르들, 메틸포스포에이트들 및 알킬포스포아미데이트들이다.

포스포로티오에이트된 포스포디에스테르 연쇄들은 하나 이상의 가교성 산소원자들이 황으로 대체로 포스포디에스테르 결합들을 가리킨다. 하지만, 그러한 연쇄들은 안티센스 화합물용으로는 부적합하다. 상기 키랄 포스포러스 중심 보유는 모노티오에이트들(monothioates)의 입체변화로 귀결된다. 더구나, 모노- 및 디티오에이트들은 양자모두 배열 특이적 혼성화에 관여치 않으므로하여 혈장으로부터 신속히 소거된다. 유리 및 플라스틱에 대한 포스포로티오에이트들의 높은 친화성은 또한 안티센스 화합물들의 합성을 곤란하고, 비효율적이게 한다.

메틸- 및 에틸포스포트리에스테르들을 포스포디에스테르 연쇄된 올리고뉴클레오타이드들을 우수 메탄올 또는 에탄올과 반응시켜 제조하였다[Miller, P. S. et al., J. Am. Chem. Soc., 93 : 6657-6665(1971)].

올리고데옥시리보뉴클레오타이드 에틸포스포트리에스테르들내 트리에스테르 연쇄는 비록 강산 또는 강염기에 의해 가수분해되긴 해도 정상 생리 pH 조건하에서는 안정함을 보여준다. 메틸포스포트리에스테르들은 중성 pH에서 메틸- 및 다른 여타 알킬포스포트리에스테르들보다 다소 덜 안정한 상태(아마도 용매에 의한 트리에스테르 메틸기의 친핵치환에 기인하는 것일 것인)로 존재한다. 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 에틸포스포트리에스테르들은 엑소뉴클리아제들에 의한 가수분해에 완전 저항성을 지니는 듯이 보이고, 그러므로하여 태아송아지혈청(fetal bovine serum) 또는 인간 혈청에 발견된 누클리아제들 또는 에스테라제들에 의해 가수분해되지 아니한다(상기 논문, Uhlmann).

메틸포스포네이트들은 치료적 잠재성과 관련해 불충분한 수(水) 가용성, 키랄 포스포러스 중심들, 고수율 입체 선택 합성 조절불능, 신속 세포질 소거 및 뇨배출을 포함하는 여러가지 증대한 결점들을 지닌다.

올리고데옥시리보뉴클레오타이드 포스포아미데이트들은 질소-인 결합들을 함유하는 인터뉴클레오타이드 결합들을 지닌다. 이들 핵산 유사화합물들은 포스포아마다이트 중간체들을 사용하여 또는 일차(또는 이차) 아민 존재하에서 H-포스포네이트 중간체들을 산화시켜 제조할 수 있다. H-포스포네이트 유사화합물들의 제조와 산화반응은 상용 DNA 합성기에서 용이하게 행할 수 있다.

카보네이트, 아세테이트, 카바메이트 및 디알킬 - 또는 디아릴실릴-유도체들과 같은 비-포스페이트 인터뉴클레오타이드 연쇄를 함유하는 수종의 비-이온성 올리고뉴클레오타이드 배열들이 합성되어 보고된 바 있다.

비록 카보네이트 연쇄가 산가수분해에 대한 저항성을 지닌다해도, 이 카보네이트 연쇄는 염기로 보다 쉽사리 절단되는 때문에 합성 종료 무렵에서의 보호 그룹(protecting group) 제거시 특별한 주의가 필요로 된다. 안정한 이중나선(duplex)이 카복시메틸 인터뉴클레오타이드 연쇄함유 폴리(dA) 유사화합물들과 폴리(U) 유사화합물들간에 관측되긴했어도, 다른 여타 염기들간의 이중나선에 대해서는 연구된바 없다. 따라서, 다른 여타 염기들과의 이중나선 형성 충실도(fidelity)가 카보네이트 연쇄로 인해 교란받게 될지는 어떨지는 알 수 없다.

인터뉴클레오타이드 카바메이트들은 다른 여타 인터뉴클레오타이드 가교결합체들보다 더한 수(水) 가용성을 지니는 것으로 보고되어 있다. 하지만, 카바메이트 연쇄들의 유용성은 티민 카바메이트들이 상보 DNA와 혼성체(hybrid)를 형성치아니하고, 시토신 카바메이트들이 구아닌 올리고머들과 혼성화하지 아니하는 까닭에 제한받게 된다.

카보네이트 연쇄와 마찬가지로 카바메이트 연쇄는 생리조건하에서 안정함을 보인다. 하지만, 카바메이트 연쇄는 카보네이트와는 달리, 염기 가수분해에 안정함(이러한 카바메이트 연쇄를 함유하는 올리고머들의 합성을 간단하게 해주는 특성인)을 보여준다. 상기 카바메이트 연쇄는 누클리아제 가수분해에 대한 저항성을 보인다.

상기 카보네이트 및 아세테이트 연쇄들과 마찬가지로, 상기 카바메이트 연쇄는 상기 포스포디에스테르 인터뉴클레오타이드 결합과는 상이한 외형을 지닌다. 하지만, 분자 모델들은 상기 올리고머가 상보핵산과

수소-결합된 콤플렉스 들은 형성할 수 있는 형태를 취할 수 있도록 허용해야만 함을 암시해 준다. 카바메이트 올리고머들과 상보핵산들에 의해 형성된 이중나선들의 안정성을 둘러싸고 서로 상반된 보고가 있다. 여섯 개의 티미딘 구성단위 함유 카바메이트-연쇄된 올리고머는 $A(pA)_5$ 또는 $dA(pA)_5$ 둘중 그 어느것과도 콤플렉스 들을 형성못하나, 여섯 개의 데옥시시토신 구성단위 함유 카바메이트-연쇄된 올리고머는 $d-(PG)_6$ 및 폴리(dG)와 안정한 콤플렉스들을 형성한다.

디알킬-또는 디페닐실릴올리고머 유사화합물들의 인터뉴클레오지드 연쇄는 정상 포스포디에스테르 인터뉴클레오타이드 결합의 정사면체 기하배치형태와 아주 유사한 형태를 지닌다. 상기 올리고머들은 적절히 보호된 뉴클레오지드-3'-O-디알킬-또는 디페닐실릴 클로라이드 또는 트리플루오로메탄술포닐 유도체를 무수 피리딘내 3'-보호된 뉴클레오지드와 반응시켜 용액중에서 제조케된다. 적절히 보호된 뉴클레오지드-3'-O-디알킬-또는 디페닐실릴 클로라이드 또는 트리플루오르메탄술포닐 유도체는 5'-O-트리틸뉴클레오지드를 디알킬-또는 디페닐디클로로실란과 또는 비스(트리플루오로메탄술포닐)디이소프로필실란과 반응시켜 제조할 수 있다.

상기 디알킬-및 디페닐실릴 연쇄들은 산가수분해에 민감하므로하여, 합성용 보호 그룹 선정에 세심한 주의를 기울여야만 한다. Ogukvue abd / cormier. See. c.g., Ogilvie, K. K. and Cormier, J.F., Tetrahedron Letters, 26(35) : 4159-4162(1985); Cormier J. F. and Ogilvie, K. K., Nucleic Acids Research, 16(10) : 4583-4594(1988)에는 실록산(siloxane) 인터뉴클레오지드 연쇄들을 지니는 뉴클레오지드 다이머들과 핵사머들이 그리고 이들의 제조방법이 기재되어 있다.

비록 카보네이트, 카바메이트 및 실릴 연쇄된 올리고뉴클레오지드 배열들이 안티센스제로서의 매력적인 후보자격을 얻는데 필수불가결한 뉴클리아제 저항성을 지님에도 불구하고, 그들이 이러한 자질을 발휘하는 능력을 보여주었다는 보고는 아직 없었다. 더욱이, 배양기내 세포들에 의한 이들 올리고머들의 피흡수능(被吸收能)도 보고된 바 없다. 이들 올리고머들이 지니는 잠재적 결합으로는 이미 보고된 바 있는 수용액내 저기용성을 들 수 있다. 이들 분자들에 친수성기들을 도입시키면, 아마도 이들의 가용성이 증대될 수 있을지도 모를 것이란 견해에도 불구하고, 생물학적 실험들에 효과적으로 사용될 수 있기에 충분한 정도의 농도를 얻을 수 있을지는 분명치 않은 것처럼 보인다.

본원은 올리고뉴클레오타이드 유사 화합물들, 그 같은 화합물을 포함하는 조성물들, 그 같은 화합물 제조용 중간체들 및 그 같은 신규 올리고뉴클레오타이드 유사화합물(인정하고, 뉴클리아제 저항성을 지니며, 타겟 특이적이고, 지용성인) 합성 방법들을 제공해 준다.

[본원 발명의 요약]

본원은 3원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 올리고뉴클레오지드 배열들(약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어진)을 포함하는 뉴클레오타이드 유사화합물들을 제공해 준다. 그 같은 올리고뉴클레오지드 배열들의 3원자 인터뉴클레오지드 연쇄는 하기 식을 지닌다.

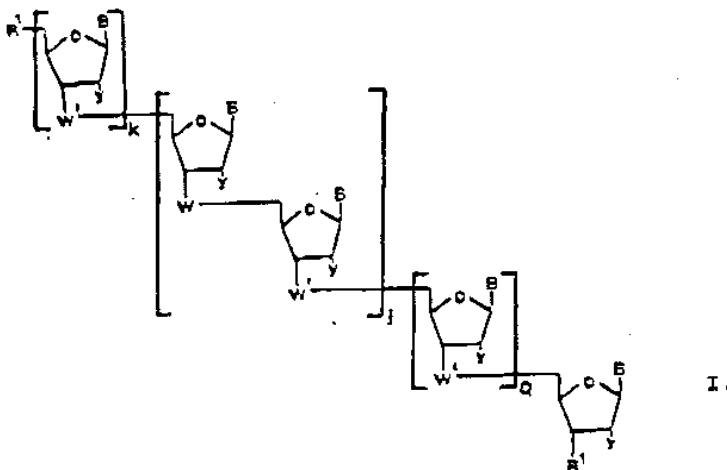
-D-D-D-

식중, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH_2 를, R^6 는 하나의 D가 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 C_1-C_2 알킬을 나타낸다.

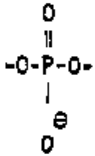
바람직한 구체예에서는, 올리고뉴클레오지드 배열들이 아데닌, 시토신, 구아닌 우라실, 티민 및 이들의 수정체들로 이루어진 그룹가운데 선택된 염기들을 포함한다.

좀더 구체적으로, 본원 화합물들은 하기식 1의 올리고뉴클레오지드 배열들을 포함한다.

화학식 1



식중, W는 -O-D-O를, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR⁶를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH₂를, R⁶는 하나의 D가 산소 또는 NR⁶일 것을 조건으로 수소 또는 C₁-C₂ 알킬을; 각각의 W¹은 독립하여 W 또는



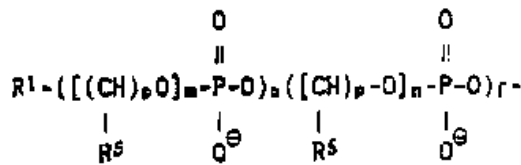
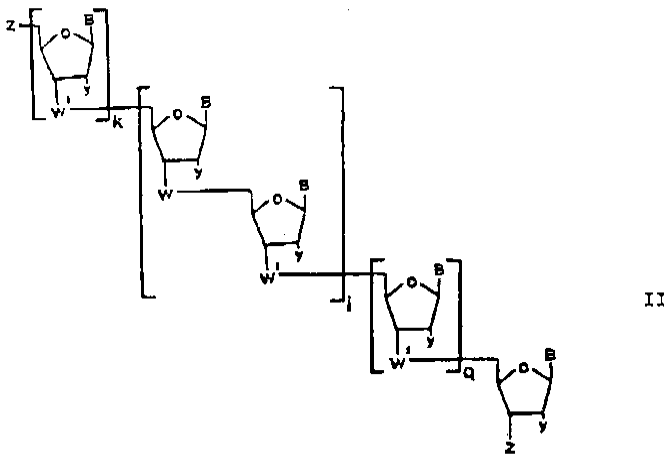
를; 각각의 R¹은 독립하여 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을; 각각의 y는 독립하여 수소 또는 OH를; 각각의 B는 독립하여 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이들의 수정체를; J는 1에서 약 200까지의 정수를; k는 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를; 그리고 q는 j+k+q의 합이 약 4에서 약 200일 것을 조건으로, 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를 나타낸다.

본원 화합물은 임의로 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단)에 다음을 지니는 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 배열들을 포함한다.

바람직한 디올들은 1,2-디올들(글리콜들)이고, 전형적인 글리콜들은 폴리알킬렌글리콜들(바람직스럽기로는 폴리에틸렌글리콜들 또는 폴리프로필렌글리콜들)이며, 바람직한 글리콜들은 테트라에틸렌글리콜 및 헥사에틸렌글리콜이다. 적합한 디올들은 또한 두개의 하이드록실들을 제외한 모든 하이드록실들이 차단된 폴리올리들을 포함할 수도 있다.

본원 화합물이 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단)에 디올을 지니는 올리고 뉴클레오타이드 배열들인 경우, 본원 화합물들은 하기식 II를 지닌다.

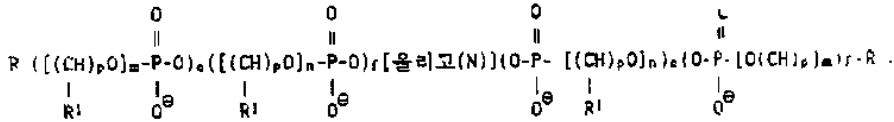
화학식 2



식중, 각각의 Z는 독립하여 R¹ 또는 $\text{R}^1 - \left[\left(\underset{\text{R}^5}{\text{C}} \text{H} \right)_e \text{O} \right]_m - \underset{\text{O}^\ominus}{\text{P}} \left(\text{O} \right)_2 \left[\left(\underset{\text{R}^5}{\text{C}} \text{H} \right)_f \text{O} \right]_n - \underset{\text{O}^\ominus}{\text{P}} \left(\text{O} \right)_2 \text{R}^1 -$ 를; 각각 R¹은 독립하여 OH, SH, NHR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소, 또는 C₁-C₆ 알킬, 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을 각각의 R⁵는 독립하여 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을; W, W¹, Y, B, j, k 및 q는 각각 상기 정의된 바와 같은 것을; e와 f 각각은 독립하여 최소한 e와 f중 하나가 최소한 1일 것을 조건으로 0에서 50을; m과 n 각각은 독립하여 1에서 200을; 그리고 각각의 p는 독립하여 2에서 4를 나타낸다.

바람직한 구체예에서는, j+k+q의 합이 약 9개에서 약 50개(좀더 바람직스럽기로는 약 12개에서 약 25개, 가장 바람직스럽기로는 약 15개에서 약 18개)의 염기들이 된다. 이 구체예에서는, 본원 화합물들이 하기식의 올리고뉴클레오타이드들을 포함한다.

화학식 3



식중, R은 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬, 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을;

R¹은 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을;

올리고(N)은 약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어진 본래의 천연 또는 수정된 올리고뉴클레오타이드 배열을;

e와 f 각각은 독립하여 e와 f중 최소한 하나가 최소한 1일 것을 조건으로 0에서 50을;

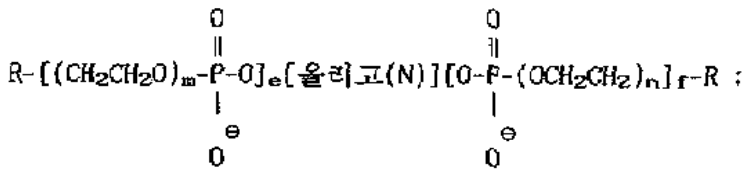
m과 n 각각은 독립하여 1에서 200을; 그리고

각각의 p는 독립하여 2에서 4를 나타낸다.

바람직한 구체예에서는, 상기 올리고뉴클레오타이드가 호모중합체 또는 헤테로중합체 배열이 되어 dA, dc, dG, T의 임의의 컴비네이션을 함유한다.

상기 글리콜이 폴리에틸렌글리콜인 경우, 본원 구체예의 화합물들을 하기 구조식의 올리고뉴클레오타이드들을 포함한다:

화학식 4



식중, R은 Oh, SH, NR²R³를 R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을;

올리고(N)은 약 9개에서 약 50개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 배열을;

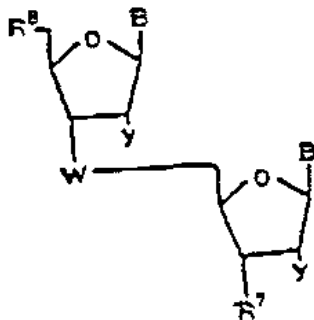
e와 f 각각은 독립하여 e와 f중 최소한 하나가 최소한 1일 것을 조건으로 0에서 50을;

m과 n 각각은 독립하여 m과 n중 최소한 하나가 1에서 200일 것을 조건으로 0에서 200을 나타낸다.

본원 올리고뉴클레오타이드들을 포스포디에스테르, 실릴(silyl)과 같은 공지의 인터뉴클레오지드 연쇄 그룹들 및 다른 여타 잘 알려진 연쇄 그룹들을 포함 (이들이 유효량의 본원 -O-D-O- 연쇄 그룹들 및/또는 디올 종질 그룹들을 함유한다면) 할 수 있다.

본원은 또한 하기식의 뉴클레오지드 다이머들에 관한다;

화학식 5



식중, W는 -O-D-O-를, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH_2 를, R^6 는 하나의 D가 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 C_1-C_2 알킬을; 각각의 B는 독립하여 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이들의 수정체들을; R^7 는 OH, t-부틸디메틸실릴옥시 또는 포스포아미다이트를; 그리고 R^8 은 OH, 어떤 보호그룹 또는 t-부틸디메틸실릴옥시를 나타낸다.

본원은 또한 올리고뉴클레오타이드 배열들을 포함하는 화합물들의 뉴클리아제 분해 억제방법을 제공한다. 이 방법은 화합물의 5'과 3' 들중 어느 한 말단(또는 양말단 모두)에 대한 디올 부착을 포함한다. 상기 디올들은 5' 및 또는 3 말단에 상기 올리고뉴클레오타이드 화합물들을 알콕시트리틸디올시아노포스핀(바람직스럽기로는, 디메톡시트리틸글리콜시아노포스핀 또는 모노메톡시트리틸글리콜시아노포스핀)과 반응시켜 부착시키게 된다.

본원은 또 3원자 인터뉴클레오타이드 연쇄(본원 정의된 상기 구조식 -O-D-O-를 지니는)를 지닌 올리고뉴클레오타이드 배열(약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어진) 제조를 포함하는 본래의 천연 또는 수정된 뉴클레오타이드 화합물들의 뉴클리아제 분해억제 방법을 제공한다.

본원은 또 본원 정의된 3원자 인터뉴클레오타이드 연쇄와 생리학적으로 용인되는 담체를 지닌 올리고뉴클레오타이드 배열(약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어진)을 함유하고 있는 화합물들을 함유하는 조성물들(유전자 발현 억제용으로 유용한)을 제공한다. 상기 화합물은 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단 모두)에 디올을 지닌다. 바람직한 디올들은 폴리에틸렌글리콜들이다.

본원은 또 치료시 필요로되는 유효량의 올리고뉴클레오타이드 배열(본원 정의된 3원자 인터뉴클레오타이드 연쇄를 지니고, 약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는) 포함 화합물을 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 유전자 발현 억제 방법을 제공한다. 상기 화합물들은 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단 모두)에 디올을 지닌다. 바람직한 디올들은 폴리에틸렌글리콜들이다.

[도면의 간단한 설명]

제1(a)도는 뉴클레오타이드 알데하이드(화합물 I) 제조용 합성경로를 보여준다.

제1(b)도는 포스포니움 아이오다이드(iodide) 뉴클레오타이드(화합물 II) 제조용 합성 경로를 보여준다.

제2도는 알데하이드 뉴클레오타이드(제1(a)도)와 포스포니움 아이오다이드 뉴클레오타이드를 이용하는 뉴클레오타이드 다이머(3탄소 인터뉴클레오타이드 연쇄로 연결된) 제조용 합성 경로를 보여준다.

제3도는 티미딘 알데하이드(화합물 I)와 포스포니움 아이오다이드 티미딘(화합물 II)를 이용하는 티미딘 다이머 제조용 합성 경로를 보여준다.

제4도는 3'-C-C-N-5' 형태의 2탄소-1 질소원자 인터뉴클레오타이드 연쇄로 연결되는 뉴클레오타이드 다이머 제조용 합성 경로를 보여준다. 여기에서, 다이머는 알데하이드 (CHO) 함유 뉴클레오타이드와 다관능성아민(amine functionalities)(NH_2) 함유 뉴클레오타이드들의 환원조건하 반응을 통해 합성된다.

제5도는 3'-N-C-C-5' 형태의 2 탄소-1 질소원자 인터뉴클레오타이드 연쇄로 연결되는 뉴클레오타이드 다이머 제조용 합성 경로를 보여준다. 여기에서 다이머는 알데하이드와 다관능성 아민을 지니는 뉴클레오타이드들의 환원조건하 반응을 통해 합성된다.

제6도는 3'-C-C-N-5'의 형태의 2탄소-1 질소원자 인터뉴클레오타이드 연쇄를 연결되는 티미딘 다이머 제조용 합성 경로를 보여준다. 여기에서, 다이머는 알데하이드(CHO) 함유 티미딘과 다관능성 아민(NH_2) 함유 티미딘의 환원 조건하 반응을 통해 합성된다.

제7도는 3'-N-C-C-5' 형태의 2탄소-1 질소원자 인터뉴클레오타이드 연쇄로 연결되는 티미딘 다이머 제조용 합성 경로를 보여준다. 여기에서, 다이머는 알데하이드와 다관능성 아민함유 티미딘들의 환원조건하 반응을 통해 합성된다.

[본원 발명의 상세한 설명]

본원 화합물들은 대개 뉴클리아제 분해에 대한 저항성을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 또는 올리고뉴클레오타이드 배열들이다.

본원에 사용된 뉴클레오타이드는 퓨린 또는 피리미딘 염기와 5탄당(펜토즈)의 컴비네이션을 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 인산에스테르를, 올리고뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 인터뉴클레오타이드 연쇄를 만을 지니는 폴리뉴클레오타이드들(예컨대, 천연 DNA 또는 RNA)를 가리킨다.

전형적인 뉴클레오타이드들은 아데노신(A), 구아노신(G), 시티딘(C), 유리딘(U), 데옥시아데노신(dA), 데옥시구아노신(dG), 데옥시시티딘(dC) 및 티미딘(T)이다.

본원 화합물들은 포스포디에스테르 또는 3원자 인터뉴클레오타이드 연쇄를 지니는 올리고뉴클레오타이드 배열들(약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어진)을 포함한다. 3원자 인터뉴클레오타이드 연쇄(-O-D-O-)는 1) 3 탄소원자들, 2) 2 탄소원자들과 1 산소원자 또는 3) 2 탄소원자들과 1 질소원자를 함유한다.

올리고뉴클레오타이드 배열들은 천연 또는 수정된 뉴클레오타이드들의 배열들이다. 본원에 사용된, 인터뉴클레오타이드 연쇄라는 표현은 하나의 뉴클레오타이드(천연 또는 수정된)의 당성분의 3번 탄소원자와 그같은 뉴클레오타이드에 이웃해 있는 뉴클레오타이드 당성분의 5번 탄소원자 사이에 가교를 형성하는 원자들 및 분자들을 가리킨다. 당성분은 라이보즈 또는 데옥시라이보즈 성분 또는 이들의 유사 화합물 가운데 어느 하나가 될 수 있다. 따라서, 뉴클레오타이드들은 A, C, G, U, dA, dC, dG, T 또는 이들의 수정체들 [예컨대, 5-브로모 또는 5-아이오도우라실, 5-메틸 시토신, 이소시토신(2-아미노-4-옥소피리미딘), 이소구아닌(2-옥

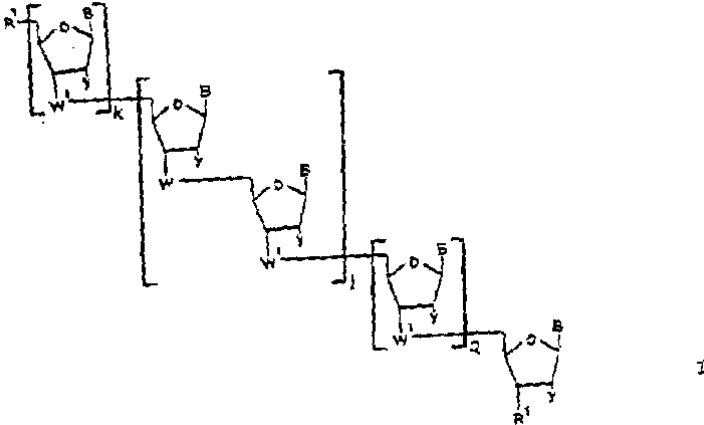
소-6-아미노퓨린), 이노신(6-옥소퓨린), 5-비닐우라실 및 5-비닐시토신과 같은]을 포함한다.
3원자 인터뉴클레오지드 연쇄는 하기 구조식을 지닌다.

-D-D-D-

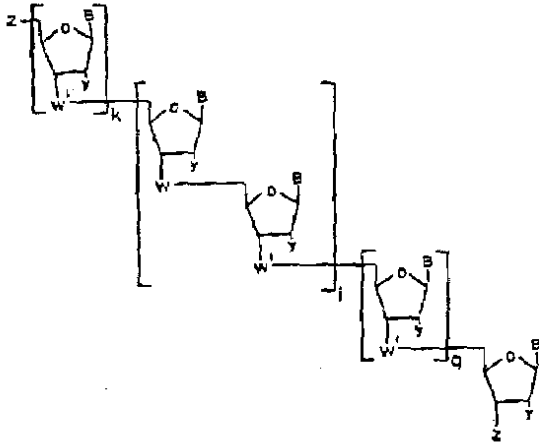
식중, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH_2 , 산소를, R^6 는 하나의 D가 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 C_1-C_2 알킬을 나타낸다.

본원 화합물들은 하기식 I의 올리고뉴클레오지드 배열들을 포함한다;

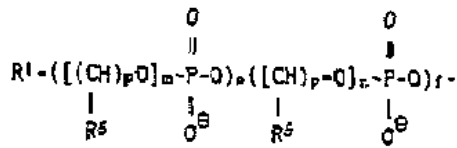
[화학식 1]



[화학식 2]



II



식중, 각각의 Z는 독립하여 R¹ 또는 OH, SH, NHR⁴를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬, 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을 각각의 R⁵는 독립하여 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을; W, W', Y, B, j, k 및 q는 각각 상기 정의된 바와 같은 것을; e와 f 각각은 독립하여 e와 f 중 최소한 하나가 최소한 1일 것을 조건으로 0에서 50을; m과 n 각각은 독립하여 1에서 200을; 그리고 각각의 p는 독립하여 2에서 4를 나타낸다.

바람직한 구체예에서는, m과 n이 독립하여 1에서 6을 나타내고, j+k+q의 합이 약 9에서 약 50이 된다. 좀더 바람직한 구체예에서는, j+k+q의 합이 약 12에서 25(좀더 바람직스럽기로는 약 15에서 약 18)가 된다.

또다른 바람직한 구체예에서는, 본원 화합물들이 양말단중 어느 한 말단 (또는 양말단 모두)에 디올을 지니는 올리고뉴클레오지드 배열들(약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는)을 포함한다. 또다른 바람직한 구체예에서는 본원 화합물들이 본원 (-D-D-D-) 연쇄를 지니는 올리고뉴클레오지드 배열들(약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는)을 포함한다.

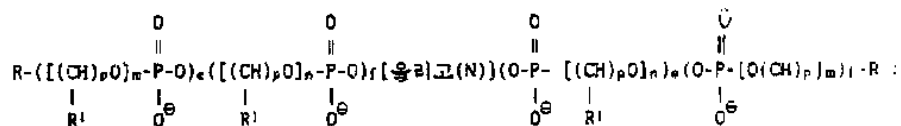
바람직한 디올들은 1,2-디올들로 또한 알려진 이웃한 탄소들에 두개의 하이드록실 그룹들을 함유하는 글리콜들이다. 바람직한 글리콜들은 폴리알킬렌글리콜들이다. 본원에 사용된 알킬렌이라는 용어는 본원에 정의된 바와같이 임의 치환될 수도 있다. 2개에서 4개의 탄소원자들을 지니는 직쇄 및 분기쇄 라디칼들을 가리킨다. 전형적인 라디칼들로는 에틸렌, 프로필렌, 부틸렌등을 들 수 있다. 바람직한 폴리알킬렌글리콜들은 폴리에틸렌글리콜들(좀더 바람직스럽기로는 테트라에틸렌글리콜 및 헥사에틸렌글리콜)이다.

디올들은 포스포디에스테르 연쇄들을 통해 올리고뉴클레오지드의 5 말단과 3 말단들중 어느한 말단에 (또는 양말단 모두에) 부착케 된다. 어느한 특정 구체예에서는 디올들이 올리고뉴클레오지드 배열의 단지 한 말단에만 부착케된다.

말단 다올은 하이드록실 (OH), 술프히드릴(SH), 아미노(NH₂), 알킬아미노(NH-알킬), 디알킬아미노(N[알킬]₂) 및 아마이드(NH[아실])로 이루어지는 그룹가운데 선택된 특정 성분과 결합한다. 본원에 사용된 알킬이란 용어는 본원에 정의된 바와 같이 임의 치환될 수도 있는 1개에서 12개의 탄소원자들을 지니는 직쇄 또는 분기쇄 라디칼들을 가리킨다. 전형적인 알킬- 및 디알킬아미노 라디칼들은 메틸-, 에틸-, 프로필-, 부틸-, 펜틸-, 헥실-, 디메틸-, 디에틸-, 디프로필-, 디부틸, 디펜틸 및 디헥실아민등을 포함한다. 본원에 사용된, NH(아실) 또는 아마이드라는 용어는 말단 O=CNH₂ 그룹을 지니고, 1개에서 12개의 탄소원자들을 갖는 직쇄 또는 분기쇄 라디칼들을 가리킨다. 전형적인 아마이드 라디칼들은 메탄아마이드, 에탄아마이드, 프로판아마이드, 부탄아마이드, 펜탄아마이드, 헥산아마이드, 헵탄아마이드, 옥탄아마이드, 노난아마이드, 데칸아마이드, 운데칸아마이드 및 도데칸아마이드를 포함한다.

어느 한 특정 구체예에서는, 본원 화합물들이 하기식의 올리고뉴클레오타이드들을 포함한다.

화학식 6



식중, R은 OH, SH, NR²R³들, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을;

R¹은 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을;

올리고(N)은 본래의 천연 또는 수정된 올리고뉴클레오타이드 배열(약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어진)을;

e와 f 각각은 독립하여 0에서 50을;

m과 n 각각은 독립하여 1에서 200을; 그리고

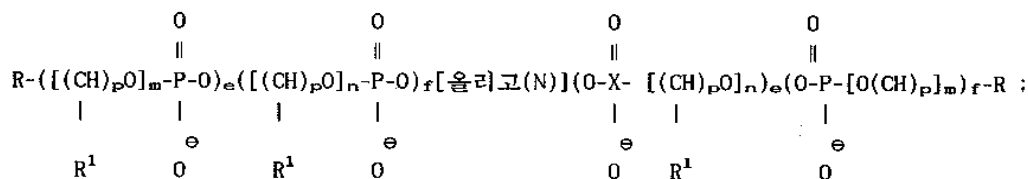
각각의 p는 독립하여 2에서 4를 나타낸다.

올리고뉴클레오타이드 배열은 dA, dC, dG, T 또는 이들 유사화합물들의 임의의 조합을 함유하는 호모중합체 또는 헤테로중합체 배열인 것이 바람직하다.

바람직한 구체예에서는, m과 n이 독립하여 1에서 8을(좀더 바람직스럽기로는 m과 n 양자 모두가 4를) 나타낸다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드 배열들은 약 9개에서 약 50개의 염기들을(좀더 바람직스럽기로는 약 12개에서 약 25개의 염기들을, 가장 바람직스럽기로는 약 15개에서 약 18개의 염기들을) 함유한다.

바람직한 구체예에서는, 안티센스 화합물들이 5' 및 3' 양말단 모두에 폴리에틸 알킬렌글리콜을 지니고, 하기 구조식을 갖는다:

화학식 7



식중, R은 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을;

R¹은 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을;

올리고(N)은 본래의 천연 또는 수정된 올리고뉴클레오타이드 배열(약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어진)을;

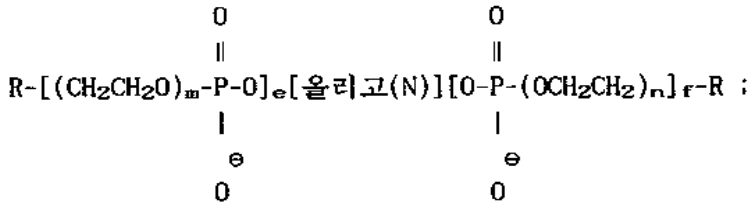
e와 f 각각은 독립하여 0에서 50을;

m과 n 각각은 독립하여 1에서 200을; 그리고

각각의 p는 독립하여 2에서 4를 나타낸다.

글리콜이 폴리에틸렌글리콜인 경우, 본원 구체예의 화합물들은 하기식의 올리고뉴클레오타이드들을 포함한다:

화학식 8



식중, R은 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실일;

올리고(N)은 약 9개에서 약 50개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 배열을; 그리고

e, f, m 및 n은 각기 독립하여 1에서 50을 나타낸다.

바람직한 구체예에서는, 올리고뉴클레오타이드가 호모중합체 또는 헤테로중합체 배열이 되어 dA, dC, dG, T의 임의 콤비네이션을 함유한다.

또다른 바람직한 구체예에서는, 폴리에틸렌글리콜이 테트라에틸렌글리콜(TEG)이고 그리고 m과 n 양자모두가 4(또는 헥사에틸렌글리콜이고 그리고 m과 n 양자모두가 6)가 된다.

본원 화합물은 안티센스제들로 유용하다. 안티센스제들은 타겟 핵산내 상보 뉴클레오타이드 배열과 혼성화, 이 타겟핵산의 번역 또는 전사기능을 억제한다. 상기 타겟 핵산은 RNA 또는 DNA 둘중 어느 하나가 될 수 있다.

본원 안티센스 화합물들은 아데닌(A), 시토닌(C), 구아닌(G), 우라실(U), 티민(T) 및 이들 염기들의 수정체들로 이루어진 그룹가운데 선택된 염기들을 포함하는 호모중합체 또는 헤테로중합체 배열들을 지니고, 약 6개에서 약 200개의 염기들을 지니고 올리고뉴클레오타이드 배열들을 포함한다. 특수한 배열들은 그들의 목적 타겟을 기초로하여 선택된다. 선택된 배열은 타겟핵산과 혼성화한다. 전형적인 타겟들은 MYC 종양유전자, RAS 종양유전자 및 바이러스 핵산들을 포함한다.

본원 화합물들은 하기 방법을 통해 제조될 수 있다.

[A. 3탄소 인터뉴클레오타이드 연쇄를 지니는 화합물들]

3탄소 인터뉴클레오타이드 연쇄로 연결되는 올리고뉴클레오타이드들은 비티히 반응조건(witting condition)하에서 3 위치에 알데하이드를 지니는 뉴클레오타이드와 6' 위치에 다관능성일리드를 지니는 뉴클레오타이드를 반응시켜 합성한다.

상용 화합물들을 이용한 뉴클레오타이드 알데하이드와 포스포니움 아이어다이드 뉴클레오타이드의 합성은 제 1(a)도와 제1(b)도에 각각 도해 설명하였다. 알데하이드(제2도 기원의 화합물 1)는 공지의 3'-알릴-3'-데옥시-5'-0-터트-부틸디메틸실릴-3'-티미딘(화합물 A, 제1도)을 사용해 합성한다. 알릴 화합물을 조산화제(cooxidant)인 촉매량의 오스뮴 테트록사이드(osmium tetroxide)와 N-메틸모플린 옥사이드를 사용 부분선택적으로 산화시킨다. 이렇게 하여 결과된 디올(화합물 B, 제12도)을 소듐퍼아이어다이트로 절단시킴으로서 거의 정량적 수율의 알데하이드를 얻는다.

포스포니움 아이어다이드(화합물 II, 제16도)는 상용 5'-트리틸레이티드된 뉴클레오타이드(화합물 C, 제1(b)도)를 사용해 합성한다. 트리틸레이티드된 뉴클레오타이드 3' 위치를 터트-부틸디메틸실릴 클로라이드를 사용해 실릴레이트화 시킨 뒤, 트리틸 그룹을 산성조건하에서 고효율로 제거한다. 결과한 1차 하이드록실(화합물 E, 제1(b)도)을 스웬 반응조건(Swern condition)하에서 산화시켜, 알데하이드(화합물 F, 제1(b)도)를 얻는다. 조알데하이드(crude aldehyde)를 곧바로 메틸트리페닐 포스포니움 브로마이드로부터 유도된 알리드와 반응시켜 고수율의 4'-비닐-4'-데옥시-3'-터트-부틸디메틸실릴 뉴클레오타이드를 얻는다. 비닐화합물을 부분선택적으로 하이드로 보레이트화시켜 고수율의 1차 알콜(화합물 G, 제1(b)도)을 얻는다. 다음엔, 1차 알콜을 이미다졸존재하에서 트리페닐포스핀-아이어다인을 사용 당해 아이어다이드(화합물 H, 제1(b)도)까지 고수율로 전환시킨다. 끝으로, 아이어다이드를 아세토니트릴내 트리페닐포스핀을 사용 목적 포스포니움 아이어다이드 뉴클레오타이드로 변환시킨다.

염기로서 포타슘-부톡사이드를 이용 포스포니움 아이어다이드 뉴클레오타이드로부터 일리드(ylide)를 제조한 후, 곧바로 알데하이드를 반응시키는 방법을 사용해 고수율의 비티히 생성물(witting product)(화합물 1, 제2도)을 얻는다. 수소와 10% Pd-C(10% 탄소성 팔라듐) 비티히 생성물을 대기압하에서 부분선택적으로 수소화시킴으로서 연쇄의 이중결합을 정량적으로 포화시킨다. 이렇게 포화시킨 화합물(화합물 2, 제2도)을 테트라부틸암모늄 플로라이드를 사용 탈실릴레이트화(desilylate) 시킴으로서 디올(화합물 3, 제2도)을 얻는다. 다음엔 디올의 5'-1차 하이드록실을 디메톡시트리틸 클로라이드를 사용해 부분선택적으로 보호시키고, 결과한 3'-하이드록실(화합물 4, 제2도)을 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필글로로포스포아미다이트를 사용 포스포 아미다이트(화합물 5, 제2도)로 전환시킨다.

트리알킬실릴옥시 보호그룹을 지니는 뉴클레오타이드 다imer들(또는 그 이상의 올리고머들)을 결합시켜 목적길이의 올리고뉴클레오타이드들을 만든다. 사슬연장 반응완결직후 표준방법들을 사용 상기 올리고머들을 탈보호(deprotect)시킨다. 고상합성기에서의 또다른 사슬길이 연장(chain length extension)반응(상기 올리고머들이 포스페이트 연쇄로 연결되는)을 위해, 디메톡시트리틸 클로라이드와, 포스포아미다이트

같은 트리틸화 시약들(tritylating reagents)을 사용 상기 올리고머들의 5'- 및 3'-말단 하이드록실 그룹들을 각각 적절히 관능화시킨다.

[B. 2 탄소-1 산소원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 화합물들]

2 탄소-1 산소원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 올리고뉴클레오타이드 배열들은 3'-실릴레이트화된 5'-톨루엔술포닐 뉴클레오지드와 5'-보호된 뉴클레오지드를 반응시켜 합성한다.

당업계의 숙련된 전문가에 이미 공지된 바있는 표준방법을 이용, 상용 3'-아세틸-뉴클레오지드들로부터 3'-아세틸-5'-알데하이드 뉴클레오지드를 제조한다. 다음엔, 수정한 비티히 반응(modified wittig reaction)을 사용 상기 3'-아세틸-5'-알데하이드 뉴클레오지드를 3'-아세틸-5'-카보메톡시메틸렌 뉴클레오지드로 전환시킨다.

5'-메틸렌축쇄를 알콜(바람직스럽기로 이소프로판올) 내 소동보로 하이드라이드를 이용해 환원시킨 뒤, 알콜(바람직스럽기로 메탄올) 내 소동메톡사이드를 이용 3'-아세틸그룹을 탈보호시킨다. 다음엔, 실릴그룹으로 3'-하이드록실을 보호한다. 바람직한 구체예에서는, 상기 실릴그룹이 t-부틸디메틸실릴그룹이게 된다.

다음엔, 3'-실릴-5'-카보메톡시메틸 뉴클레오지드를 테트라하이드로 푸란(THF) 내 디이소부틸 알루미늄 하이드라이드(DIBAL)를 사용해 또한번 환원시키므로 이 뉴클레오지드의 3'-0-실릴-5'-데옥시-3'-(2-에탄올) 유도체를 얻는다. 5'-에탄올그룹을 피리딘내 p-톨루엔 술포닐 클로라이드를 사용 p-톨루엔술포닐 그룹으로 전환시킨다. 5'-p-톨루엔 술포닐 뉴클레오지드 염기성분의 외환상 아미노그룹(exocyclic amino group)을 당업계 숙련된 전문가에 자명한 공지방법을 사용 임의 보호한다. 아데닌과 시토신의 외환상 아미노그룹용 바람직한 보호그룹은 벤조일성분(benzoyl moiety)이다. 구아닌의 환상 아미노 그룹용 바람직한 보호그룹은 이소부틸성분이다. 구아닌의 0⁶ 위치를 또한 보호시킬 수도 있다.

다음엔, 3'-0-실릴-5'-0-p-톨루엔 술포닐 뉴클레오지드를 5'-보호된 뉴클레오지드와 반응시켜 2 탄소-1 산소원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 3'-0-실릴-5'-보호된 뉴클레오지드 다이머를 만든다. 5'-0-보호그룹은 트리틸 인것이(좀더 바람직스럽기로는 디메톡시트리틸인 것이) 바람직하다. 3'-0-실릴-5'-0-보호된 뉴클레오지드 염기성분의 외환상 아미노그룹들을 임의 보호한다.

뉴클레오지드 다이머들을 포스포아미다이트 고상 합성방법을 통해 연쇄 연장시킬 목적으로 이 뉴클레오지드 다이머들의 3'-탄소원자 위치를 시아노포스핀 시약(바람직스럽기로는 2-시아노에톡시디이소프로필 아미노포스핀)을 사용해 탈보호, 다시 유도체화 시킨다(상기논문, Gait).

트리알킬실릴옥시 보호그룹들을 지니는 뉴클레오지드 다이머들(또는 그 이상의 올리고머들)을 결합시켜 목적길이의 올리고뉴클레오지드들을 만든다. 사슬연장반응 완결적후 표준방법들을 사용 상기 올리고머들을 탈보호 시킨다. 고상 합성기에서의 또다른 연쇄길이 연장반응(상기 올리고머들이 포스페이트 연쇄로 연결되는)을 위해, 디메톡시트리틸 클로라이드와 포스포아미다이트 같은 트리틸화 시약들을 사용 상기 올리고머들의 5'- 및 3'-말단 하이드록실 그룹들을 각각 적절히 관능화 시킨다.

[C. 2 탄소- 1 질소원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 화합물들]

C-C-N 형태의 2 탄소-1 질소원자-인터뉴클레오지드 연쇄로 연결되는 올리고 뉴클레오지드 배열되는 제4도에 예시된 바와같이 알데하이드 함유 뉴클레오지드와 다관능성아민 함유 뉴클레오지드를 환원조건하에 반응시켜 합성한다.

알데하이드와 아민화합물 양자 모두는 상용화합물들을 사용해 제조한다.

알데하이드는 3'-알릴-3'-데옥시-5'-0-터트-부틸 디메틸 실릴티미딘을 사용해 제조한다. 알릴 화합물을 조산화제인 촉매량의 오스뮴테트라옥사이드와 N-메틸 모플린옥사이드를 이용해 부분선택적으로 산화시킴으로서 디올을 얻고 이 디올을 소동 피어어데이트로 산화시켜 거의 정량적 수율의 알데하이드를 얻는다.

아민 화합물은 상용 뉴클레오지드들을 사용해 합성한다. 전형적인 방법에서는, 뉴클레오지드의 1차 하이드록실 그룹을 부분선택적으로 p-톨루엔 술포닐 클로라이드를 사용해 토실레이트 그룹까지 변환시킨 뒤, 아이어다이드까지 전환시킨다. 아이어다이드 중간체의 3'-하이드록실을 터트-부틸디메틸실릴 클로라이드를 사용해 보호시킨 뒤, 여기에 소동아자이드를 반응시켜 아자이드 그룹을 도입시킨다. 관능성 아자이드를 수소 대기하(hydrogen atmosphere) 10% Pd-C를 이용한 환원을 통해 (또는 라니-니켈 환원조건하에서) 필요로 되는 아민까지 효율적으로 전환시킨다.

아민과 알데하이드를 완충조건하 소동시아노보로하이드라이드 존재하에서 결합(환원적 아미네이션) 시킨다. 이때 C-C-N 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 올리고뉴클레오지드 타이머가 고수율로 형성된다. 올리고 뉴클레오지드의 2차 트리플로로아세트산 무수물-트리메틸 아민을 반응시켜 지방족 질소를 보호한다. 테트라부틸 암모늄 보호된 올리고뉴클레오지드를 플로라이드를 사용해 탈실레이트화 시킴으로서 디올을 얻고, 이때 얻어진 디올의 1차 하이드록실 그룹을 디메톡시트리틸 클로라이드를 사용해 선택적으로 보호한다. 나머지 2차 하이드록실을 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필 클로로포스포아미다이트를 반응시켜 필요로 되는 포스포아미다이트로 변환시킨다.

N-C-C 형태의 2 탄소-1 질소원자 인터뉴클레오지드 연쇄로 연결된 올리고뉴클레오지드들은 3' 위치에 알데하이드를 지니는 뉴클레오지드와 5' 위치에 다관능성 아민을 제5도에 예시한 바와같이 환원조건하에서 반응시켜 합성한다.

아민과 알데하이드 성분들은 상용 화합물들을 사용해 합성한다. 아민은 3-아자이드-3-데옥시티미딘(AZT)를 사용해 합성한다. AZT의 일차 하이드록실 그룹을 디메톡시트리틸 클로라이드로 보호시킨 뒤, 결과된 아자이드를 수소대기하 10% Pd-C를 사용(또는 라니니켈을 사용) 필요로 되는 아민까지 부분선택적으로 변환시킨다.

알데하이드는 상용 5'-0-디메톡시트리틸 티미딘을 사용해 합성한다.

트리틸화된 티민을 터트-부틸 디메틸실릴클로라이드로 실레이화 시킨 뒤, 트리틸 그룹을 산성 조건하에서 제거한다. 결과된 일차 하이드록실 그룹을 스벤 반응조건하에서 산화시킴으로서 알데하이드를 얻는다. 이때 알데하이드를 분리시키지 않고 곧바로(카베독시 메틸렌) 트리페닐 포스포란과 반응시켜 불포화 에스테르를 얻는다. 불포화 에스테르를 10% Pd-C를 사용 부분선택적으로 수소화시킴으로서 정량적 수율의 포화 에스테르를 얻는다. 다음엔 이 포화 에스테르를 디이소부틸 알루미늄 하이드라이드(DIBAL-H)를 이용한 매우 선택적인 반응을 통해서 필요로되는 알데하이드로 전환시킨다.

완충된 환원적 아미네이션 조건(buffered reductive amination condition)하 소듐 시아노보로하이드라이드 존재에서 아민과 알데하이드를 결합시키는 방법을 통해 고수율의 N-C-C 인터뉴클레오지드 연쇄를 얻는다. 트리플로로아세트산 무수물과 트리에틸 아민을 사용 올리고뉴클레오지드의 2차 지방족질소를 보호한다.

보호된 다이머(또는 그 이상의 올리고뉴클레오지드 배열)를 탈실릴레이트화 시킨 뒤, 여기서 결과된 하이드록실을 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필-클로로포스포아미다이트를 사용 포스포아미다이트로 전환시킨다.

트리알킬실릴옥시 보호그룹들을 지니는 뉴클레오지드 다이머들(또는 그 이상의 올리고머들)을 결합시켜 목적길이의 올리고뉴클레오지드들을 만든다. 사슬연장반응 완결직후 표준방법들을 사용 상기 올리고머들을 탈실릴레이트화 시킨다. 고상 합성기에서의 또다른 사슬길이 연장반응(상기 올리고머들이 포스페이트 연쇄로 연결되는)을 위해, 디메톡시트리틸클로라이드와 포스포아미다이트같은 트리틸화 시약들을 사용 상기 올리고머의 5'-및-3' 말단 하이드록실-그룹들을 각각 적절히 관능화시킨다.

[D. 양말단중 어느한 말단 (또는 양말단 모두)에 디올을 지니는 화합물들]

필요한 경우, 디올들은 고상포스포 아미다이트법의 수정된 방법을 통해 양말단중 어느 한말단 (또는 양말단 모두)에 부착된다. oligonucleotide synthesis : A practical Approach, ed. by M. J. Gait, pages 35-81, IRL Press, Washington, D. C.(1984).

디올은 고상방법(solid phase method)을 수정한 본 방법에 따라 (디올이 알콕시트리틸 화합물과 반응 트리틸화된 디올을 형성하는), 올리고뉴클레오타이드의 어느 한 말단 (또는 양말단 모두)에 도입된다. 디올은 글리콜 인 것이 (좀더 바람직스럽기로는 폴리알킬렌글리콜인 것이) 바람직하다. 알콕시트리틸 시약은 모노메톡시트리틸 클로라이드 또는 디메톡시 트리틸 클로라이드인 것이 (가장 바람직스럽기로는 디메톡시 트리틸 클로라이드인 것이) 바람직하다. 다음엔, 트리틸화된 디올들이 시아노포스핀 시약과 반응 본원화합물들의 고상 합성시 포스포아미다이트 시약 (차후 디올 포스포아미다이트 시약이라 칭해질)으로서 사용되는 트리틸 디올시아노 포스핀 화합물을 형성한다.

고상합성의 첫단계는 고상지지체 [바람직스럽기로는 제어된 세공유리(CPG) 지지체]에 대한 뉴클레오지드의 부착이다. 뉴클레오지드는 자신의 3'-하이드록실 위치에 존재하는 석시네이트연쇄를 통해 상기 CPG에 바람직하게 부착된다. 고상지지체에 뉴클레오지드를 부착시키는 또다른 방법은 올리고뉴클레오타이드 합성분야의 숙련된 전문가에 자명한 이미 공지된 방법을 들 수 있다. 그와는 달리, 디올을 3' 말단에 도입시키기 위해서는, 첫 번째 뉴클레오지드 첨가전에 디올 포스포아미다이트시약을 고상지지체에 부착시켜야 한다. 디올 포스포아미다이트 시약은 고정지지체에, 뉴클레오지드 부착에 사용된 방법에 유사한 방식으로, 석시네이트 또는 다른 연쇄들을 통해 부착된다. 상기방법의 변법(디올포스포 아미다이트시약 사용을 위한)은 당업계의 숙련된 전문가들에게 자명한 것이 될 수 있을 것이다.

첫 번째 뉴클레오지드 첨가에 앞서, 수개의 디올들이 고상지지체에 부착될 수 있다. 바람직스럽기로는 1개에서 약 50개의 디올들이 사용된다. 디올들을 단지 5' 말단에만 부착시키는 경우엔, 디올들을 고상지지체 상에 부착시킬 필요가 없게 된다.

고상지지체에 대한 첫 번째 뉴클레오지드 또는 디올(들)의 부착뒤엔 5'-하이드록실 보호그룹(관능화된 트리틸 그룹) 제거하는 단계, 포스포 아미다이트시약 존재하 5'-하이드록실 그룹을 (즉, 5'-트리틸 뉴클레오지드, 3'-포스포 아미다이트) 활성화시키는 단계, 미반응 뉴클레오지드를 캡핑시키는 단계 및 포스포러스 연쇄를 산화시키는 단계들로 이루어지는 일련의 연속적 단계들을 통해 사슬연장반응이 진행된다.

부착된 뉴클레오지드들의 5'-하이드록실 위치에 존재하는 보호그룹은 산(바람직스럽기로는 트리클로로 아세트산)을 사용해 제거한다.

본 방법에 사용될 수 있는 활성화시약들(Activating reagents)은 당업계의 숙련된 전문가에 이미 잘 알려진 것이 될 수 있을 것이다. 바람직한 활성화 시약들은 테트라졸 및 활성화제 골드(activator gold) (Beckman Instr. Inc., Palo Alto, CA)이다.

활성화 단계는 부가된 뉴클레오지드 포스포아미다이트시약 또는 디올 포스포 아미다이트 시약(디올이 폴리뉴클레오 타이드 말단에 부가되는 경우 전통적 합성방법에 이용되는 뉴클레오지드 포스포아미다이트시약을 대신하여 사용되는) 존재하에서 진행한다. 미반응된 채들은 종결시키거나 또는 무수초산 및 N-메틸 이미다졸과 같은 캡핑시약들(capping reagents) 사용해 캡화(capped) 시킨다.

불안정한 3 가 포스포러스 연쇄는 바람직하기로 아이어다인 사용해 올리고뉴클레오타이드의 안정한, 5 가 포스포디에스테르 연쇄로 산화시킨다.

목적 올리고뉴클레오타이드채 조립완결후엔, 포스페이트 보호그룹들을 제거, 채들을 고상지지체로부터 분리시킨 뒤, 전통적 방법들을 사용해 염기보호그룹들을 제거한다(Gaits, 상기 논문 67-70)

당업계의 숙련된 전문가들은 다른 여타 올리고뉴클레오타이드 합성방법이 디올-종결된 안티센스 올리고뉴클레오타이드 생산을 위해 유사방식으로 변형될 수도 있음을 당연히 인식하고 있을 것이다.

본원 화합물들은 유전질환을 지닌(또는 경질된 유전적 발현 메카니즘과 관련한 질병을 지닌) 포유동물 치료에 유용하다. 현재, HIV, 거대세포바이러스, 단순포진, B형간염, 유두종 바이러스 및 피코르나 바이러스와 같은 바이러스성 감염; 폐암, 결장암, 경관암, 유방암 및 난소암; 염증성질환; 및 후천성면역결핍증

과 같은 면체체계 관련 질환, 혈액성이상조직발생질환 및 과다증식질환 치료용 안티센스치료법을 개발하려는 시도가 이루어지고 있다(Armstrong, 상기 논문, 89p; Klausner, 상기 논문, 303, 304p).

유전자 발현억제에 유용한 본원조성물들은 1) 본원정의된 구조식 -D-D-D-의 인타뉴클레오지드 연쇄를 지니고, 임의로 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단 모두)에 디올을 지니며, 약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는 올리고뉴클레오지드 배열 포함 화합물들과 2) 양말단중 어느 한 말단(또는 양말단 모두)에 디올을 지니고, 약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는 올리고뉴클레오지드 배열포함 화합물들 및 생리학적으로 용인되는 담체들을 포함한다.

비경구주사용, 구강투여용(고형 또는 액형으로서), 직장투여용 또는 국소투여용 등으로 사용되는 유전자 발현억제에 유용한 본원조성물들은 하나이상의 비독성이며, 생리학적으로 용인되는 담체들, 보조제들 또는 부형제들(본원에서는 집합적으로 한데 모아 담체들이라 칭해지는)과 함께 자신들의 배합에 사용되는 하나 이상의 본원 화합물들을 포함한다.

조성물들은 인간들 및 동물들에 구강으로, 직장으로, 비경구적으로(정맥내로, 근육내로 또는 피하로), 질내로, 복막내로, 국소적으로(분체형약, 연고, 점적약을 이용한) 투여되든가 또는 구강이나 비강 분무로서 투여될 수 있다.

비경구적 주사용으로 적합한 조성물들은 생리학적으로 용인되는 살균한 수성 또는 비수성용액, 분산액, 현탁액 또는 유상액 및 살균한 주사용액 또는 현탁액으로 재구성되는 살균한 분체를 포함할 수 있다. 적합한 수성 및 비수성 담체, 희석제, 용제 또는 부형제들의 예들은 수(水), 에탄올, 폴리올(프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 글리세롤 등) 그리고 그들의 적절한 혼합물들, 식물성유(올리브유와 같은) 및 주사가능 유기에스테르들(에틸 올리에이트와 같은)을 포함한다. 적절한 유통성은, 예컨대, 레시틴과 같은 피복물 사용을 통해, 계면활성제 사용을 통해, 그리고 분산액이 경우에는 필요한 입자크기를 유지시킴으로서 유지시킬 수 있다.

이들 조성물들은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제들을 함유할 수도 있다. 미생물 작용방지는 예컨대 파라벤, 글로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등과 같은 다양한 항균 및 항진균제를 사용해 담보할 수 있다. 예컨대, 당, 염화나트륨과 같은 등장제를 포함하는 것이 또한 바람직할 수도 있다. 상기 주사형(injectable form) 조성물의 연장흡수는 예컨대, 알루미늄, 모노스티어레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 사용해 이룰 수 있다.

필요하다면, 그리고 좀더 효과적인 분배를 원하는 경우엔, 상기 화합물들을 서방형(slow release) 또는 특정 타겟지향된 배송시스템들(중합체 매트릭스, 리포솜, 및 미세구체와 같은)에 첨할 수도 있을 것이다. 이들 화합물들은 예컨대 세균억류 필터를 통한 여과를 통해 또는 살균한 고형조성물 형태(사용하기 바로전에 살균수, 또는 여타 살균 주사매질에 용해되는)에 있어서는 살균제 첨가를 통해 살균될 수 있을 것이다.

구강 투여용 고형투약량 형태들(solid dosage forms)은, 캡슐, 정제환약, 분체형약제 및 과립형약제들을 포함한다. 그같은 고형투약량 형태들에 있어서는, 상기 활성화합물이 최소한 하나의 불활성 종래부형제(또는 담체) (소듐 시트레이트 또는 디칼슘 폰스레이트와 같은) 또는 (a) 충전제를 또는 중량제들(예컨대, 전분, 락토즈, 슈크로즈, 글루코즈, 만니톨 및 실리신산과 같은), (b) 결합제들(예컨대, 카복실메틸 셀룰로즈, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 슈크로즈 및 아카시아와 같은), (c) 연석제들(예컨대, 글리콜과 같은), (d) 봉해제들(예컨대, 아가-아가, 탄산칼슘, 감자 또는 타파오카 전분, 알긴산, 어떤 콤플렉스 실리케이트 및 탄산나트륨과 같은), (e) 용액제지제들(예컨대, 파라핀과 같은), (f) 흡수가속제들(예컨대, 4차 암모늄 화합물과 같은), (g) 습윤제들(예컨대, 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스티어레이트와 같은), (h) 흡수제들(예컨대, 카올린 및 벤토나이트와 같은), 그리고 (i) 활제들(예컨대, 활크, 칼슘 스티어레이트, 마그네슘 스티어레이트, 고형 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 러일 술페이트 또는 그들의 혼합물과 같은)과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환약의 경우에 있어서는, 상기 투약량 형태들이 완충제들을 또한 포함할 수도 있다.

연질 및 경질-충전젤라틴 캡슐 [고분자량 폴리에틸렌글리콜 뿐아니라 락토즈(즉, 유당) 등을 부형제로 사용하는]에 있어서는 유사타입의 고형조성물들이 충전제로 또한 사용될 수도 있다.

정제, 당의정, 캡슐, 환약 및 과립형약제들과 같은 고형약량형태들은 장피복물들 및 여타 당업계에 잘알려진 바 있는 것들과 같은 피복물들 및 외피(shell)를 지니는 것으로 제조될 수 있다. 이들 고형투약량 형태들은 불투명제들(opacifying agents)을 함유할 수도 있고, 그리고 또 자신들의 활성화합물(또는 화합물들)을 위장관(intestinal tract) 부위에 지연방식을 통해 방출도록 해주는 조성물들을 지닐 수도 있다. 사용될 수 있는 삽입 조성물들(Embedding Compositions)의 예들로는 고분자 물질들 및 왁스들을 들 수 있다.

적절하다고 판단되면, 상기 활성화합물들을 또한 하나이상의 상기 부형제들을 사용해 마이크로캡슐화 형태(micor-encapsulated form)화 할 수도 있을 것이다.

구강투여용 액체투약량 형태들은 생리학적으로 용인되는 유상액, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서(elixir)를 포함한다. 액체투약량 형태들은 활성화합물 뿐아니라, 수(水) 또는 다른여타 용제, 가용화제, 유화제 [예컨대, 에틸알콜, 이소프로필 알콜, 에틸카보네이트, 에틸아세테이트, 벤진알콜, 벤질벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 디메틸포름아마이드, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수배아유, 올리브유, 캐스터유 및 참깨유 등과 같은), 글리세롤, 테트라하이드로 퍼퍼릴 알콜(tetrahydro-furfuryl alcohol), 폴리에틸렌글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르 또는 이들 물질들의 혼합물 등의]와 같은 당업계에 일반적으로 사용되는 불활성 희석제들을 함유할 수도 있다.

그같은 불활성 희석제들 외에, 상기 조성물은 습윤제, 유화제 및 부유제, 감미료, 향미제, 방항제와 같은 보조제들은 또한 포함할 수도 있다.

현탁액들은 활성 화합물들 뿐아니라 예컨대 에톡실화된 이소스테아릴 알콜, 폴리 옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로즈, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 아가-아가 그리고 트라

가칸트 고무(tragacanth), 또는 이들 물질들의 혼합물들 등과 같은 현탁화제(suspending agents)를 함유할 수도 있다.

직장 투여용 조성물들은 상온에선 고형이나, 체온에선 액형화함으로서 직장 또는 질 체강 내에 용해, 활성성분을 방출하는 좌약 [본원 화합물들과 적합한 비자극성 부형제 또는 담체(코아버터, 폴리에틸렌글리콜 또는 좌약용 왁스와 같은)를 혼합해 제조할 수 있는]인 것이 바람직하다.

본원 화합물로 이루어지는 국소투여용 투약량 형태들은 연고, 분말형 약제, 비말형약제 및 흡입제를 포함한다. 활성성분은 살균조건하에서 생리적으로 용인되는 담체 및 임의의 보존제, 완충액 또는 필요로될 수도 있는 장약(propellant)와 혼합된다. 안약용 조제물, 안연고, 분체형약제 및 용액들 또한 본 발생범주 위내 포함 대상으로 고려될 수 있을 것이다.

본원 화합물들은 또한 리포솜(liposome) 형태로 투여될 수 있다. 당 업계에 공지된 바와 같이, 리포솜들은 일반적으로 인지질 또는 다른 여타 지질물질들로부터 유도된다 리포솜들은 단-또는 다-층수화지질결정(mono-or multi-lamellar hydrated liquid crystal) (수정매질에 분산되는)에 의해 형성된다. 리포솜 형성능을 지닌 임의의 비독성이고, 생리학적으로 용인되는 그리고 대사될 수 있는 지질이 사용될 수 있다. 리포솜형태내 본원 조성물들은 본원 리포솜시계나제 억제 화합물들 뿐아니라 안정화제, 보존제, 부형제 등을 함유할 수 있다. 바람직한 지질들은 천연 및 합성의 인지질 및 포스파티딜 콜린(phosphatidyl choline)(레시틴)이다.

리포솜 제조방법은 당업계에 공지된 바 있다[예컨대, Methods in cell Biology, Ed. by prescott, Volume XIV, Academic press, New Ywork, N.Y., P. 33 et seq., (1976) 참조].

본원 조성물내 활성성분의 실제적인 투약량 레벨은 특별한 조성물 및 투약방법의 바람직한 치료감응을 이끌어내기 효과적인 활성성분양을 얻기 위한 방편으로 달라질 수도 있다. 그러므로 선택되는 투약량 레벨은 바람직한 치료효과, 투약경로, 바람직한 치료기간 및 다른여타 인자들에 좌우된다.

숙주에 투여되는 본원 화합물들의 전체 일일 투약량(단일 투약량으로든 또는 여러차례로 나뉘어 투여되는 투약량으로든)은, 예컨대, 체중 1kg 당 약 1나노몰에서 약 5 마이크로몰이 될 수 있을 것이다. 투약량 단위조성들은 일일투약량 제조에 이용될 수 있는 그같은 양 또는 그 양의 약수(約數)량을 함유할 수도 있다.

하지만, 임의의 어떤 특정환자에 대한 특정투약량 레벨은 체중, 전신건강상태 성, 음식물, 시간 및 투약경로, 흡수 및 분비속도, 다른약과의 혼용여부, 치료대상 특정질병의 위중성등을 포함하는 여러가지 인자들에 좌우될 수 있음을 인식해야 한다.

하기 실시예들은 본원 실험의 최상 모드를 더욱 상세히 예시코져 마련한 것인바, 이 실시예들은 어떤식으로든 본원 명세서 및 청구범위를 한정하는 것으로 이해해서는 아니된다.

[실시예 1]

[5'-0'-디메톡시트리틸-3'-0'-t-부틸디메틸실릴 티미딘 제조]

디메톡시트리틸 티미딘(5.0g, 9.2mmol)과 이미다졸(1.2g, 18.4mmol)을 15ml 무수 디메틸 포름아마이드(DMF)에 용해시킨 뒤, 터트-부틸디메틸릴린 클로라이드(1.7g, 11.5mmol)를 부가하였다.

상기 반응혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반한 뒤, 에틸아세테이트로 희석하고, 다시 이를 수(水)로 그리고 뒤이어 포화소듐 클로라이드로 세척한 후에, 소듐 술페이트로 건조시켜, 정량적 수율의 상기 표제화합물을 얻었다.

[실시예 2]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘의 제조]

실시예 1의 방법으로 제조한 5'-0-디메톡시-3'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘(0.7g, 1.1mmol)을 실온에서 1시간 동안 13ml의 메틸렌 클로라이드 용액내에 3% 트리클로로 아세트산으로 처리하였다. 다음엔, 상기 반응 혼합물을 5%(w/v)소듐 비카보네이트 용액으로 중화시켰다. 유기층을 소듐술페이트를 건조시켰다. 상기 표제화합물을 메틸렌 클로라이드내 에틸 아세테이트(0에서 30%의 농도기울기로 존재하는)이용 플래시 크로마토법을 써서 정제하였다. 반응수율은 85%였다.

[실시예 3]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘 4'-알데하이드의 제조]

-78°C의 잘 교반한 건조 메틸렌 클로라이드용액에 옥살릴 클로라이드(oxalyl chloride)(33.0mmol, 2.88ml)를 부가한 후, 여기에, DMSO(3.12ml, 4.4mmol)를 한방울씩 부가하였다. 10분후 CH_2Cl_2 20.00ml 내지 실시예 2의 방법으로 만든 알콜(5.6g, 15.7mmol)을 2분간에 걸쳐 부가한뒤, 45분 동안 교반하였다. 다음엔 Et_3N (8.1ml, 58.1mmol)을 부가한뒤, 45분 동안 더 교반하였다. 그 다음엔, 상기 반응혼합물이 실온이 되도록 한 후에, 이를 수(水)(2×10 ml)로 그리고 뒤이어 브라인(10ml)으로 세척하고, 소듐 술페이트(Na_2SO_4)로 건조시켰다. 이렇게 하여 얻은 조알데하이드(crude aldehyde)를 다음 단계용으로 사용하였다.

[실시예 4] ρ

[5'-비닐-5'-데옥시-3'-t-부틸디메틸실린 데옥시티미딘의 제조]

0°C의 건조 테트라하이드로 퓨란(THF) 내 메틸트리페닐 포스포니움 브로마이드 용액(0.7mmol)에 소듐비스(트레메틸 실릴아마이드)(0.6mmol) 용액을 한방울씩 부가하였다. 30분후, 질소하에서, THF내 당해 4'-알데하이드 용액을 한방울씩 부가 하였다. 상기 반응혼합물을 2시간 동안 교반한 뒤, 이를 에틸아세테이트로 희석하고, 다시 수(水)로 그리고 뒤이어 브라인(brine)으로 세척한 후에, 소듐술페이트(Na_2SO_4)로 건조

시켰다. 20% 에틸 아세테이트-헥산이용 플래시 크로마토법을 써서 상기 표제화합물을 정제하였다. 수율은 55-60%였다.

[실시에 5]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-데옥시-5'-하이드록시메틸 티미딘]

0°C의 무수 THF 3ml내 2M 2-메틸-2-부텐(1.6 당량, 1.5ml, 3mmol) 용액에 1M 보란-테트라 하이드퓨란 콤플렉스 (3ml, 2mmol) 1.6 당량을 질소하에서 천천히 부가하였다.

상기 용액을 10분 동안 교반한 후, 5ml 무수 THF 내 실시예 4의 방법으로 만든 비닐 티미딘(0.7g, 1.9mmol)을 부가하였다. 이 반응혼합물을 45분 동안 교반한 후, 2일 동안 냉장고에 안치시켜 두었다.

워크업(workup)은 2M 소듐 하이드록사이드 3.1 당량과 30% 하이드로겐 퍼옥사이드 3.1 당량을 포함하는 수용액(바람직스럽기로 0°C 수성 소듐 하이드록사이드에 하이드로겐 퍼옥사이드를 한방울씩 부가한 후, 이를 10분 동안 교반한)을 사용해 행하였다. 부가편널(addition funnel)을 통해 상기 용액을 상기 반응 혼합물에 천천히 부가한 후, 1시간 동안 교반하고, 이를 빙조(ice bath)로부터 분리, 에틸 아세테이트로 건조시켰다. 상기 표제 화합물을 헥산내 에틸 아세테이트(20-80%의 농도기울기로 존재하는) 이용 플래시 크로마토 그래피법을 써서 정제하였다. 수율은 62%였다.

[실시에 6]

[5'-아이어도메틸-5'-데옥시-3'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘의 제조]

건조 아세트니트릴(5ml)과 에테르(3.4ml)내 실시예 5의 방법으로 제조한 3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-데옥시-5'-하이드록시 메틸 티미딘 (0.3g, 0.9mmol) 용액에 트리페닐 포스핀(0.7g, 2.8mmol) 3당량, 이미디졸(0.3g, 3.7mmol) 4당량 및 아이어다인(0.5g, 2.8mmol) 2.2당량을 부가하였다. 이 반응혼합물을 45분 동안 교반한 뒤, 용제를 증발시켜 제거하였다. 잔존물에 에틸 아세테이트를 부가한뒤, 이를 수(水)로 그리고 뒤이어 포화 소듐 클로라이드로 세척하고, 소듐 술페이트로 건조시켰다. 상기 표제 화합물을 헥산내 에틸 아세테이트(농도기울기 30-50%로 존재하는) 이용 플래시 크로마토그래피법을 써서 정제하였다. 수율은 90%였다.

[실시에 7]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-데옥시-5'-티미딜메틸 포스포니움 아이어다이드의 제조]

건조 CH₃CN(5ml) 내 실시예 6의 방법으로 제조한 5'-아이어도메틸-5'-데옥시-3'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘(480mg, 1mmol) 교반용액에 트리페닐 포스핀(1.57g, 6mmol)을 부가한뒤, 이 혼합물을 90°C에서 12시간 동안 환류시켰다. 반응물을 냉각시킨 뒤, 용제를 제거하였다. 상기 표제화합물을 CH₂CH₂ 내 5% MeOH 이용 플래시 크로마토 그래피법을 써서 정제하였다. 95-96% 수율의 생성물이 얻어졌다.

[실시에 8]

[5'-t-부틸디메틸실릴-3'-데옥시-3'-(1, 2-디하이드록시-3-프로필)-티미딘의 제조]

부탄올내 오소늄 테트라옥사이드(OsO₄)(4방울, 2.5w/w%)를 0°C의 5.0ml 무수 THF내 4-메틸모폴린-N-옥사이드(53mg, 0.45mmol)와 J. org. chem. 1989, 54:2767-2769에 C.K. Chu 등이 기술한 방법으로 만든 3'-(2-프로페닐)-3'-데옥시-5'-0-t-부틸 디메틸실릴 티미딘 교반 혼합물에 부가하였다. 다음엔, 상기 반응혼합물을 10% 수성 소듐 메타비스술파이트(2.0ml)로 급냉시킨 뒤, 20분 동안 교반하고, 이를 다시 실리카 패드상에서 여과한 후, 에틸 아세테이트(25.0ml)로 희석하였다.

유기상을 수(水) (5.0ml)로 그리고 뒤이어 브라운으로 세척한 뒤, Na₂SO₄로 건조시켰다. 용제를 증발건조시켜 제거한 후, 상기 표제화합물을 플래시 크로마토법을 써서 정제하였다.

[실시에 9]

[5'-0-t-부틸디메틸실릴-3'-데옥시-티미드-3'-일-아세트알데하이드의 제조]

THF-H₂O[4:1비(ratio), 5.0ml]내 실시예 2에 방법으로 만든 티미딘 디올(200mg, 0.5mmol) 교반용액에 소듐 퍼아이어데이트(214mg, 1mmol)를 부가하였다. 1 시간후, 상기 반응혼합물을 에틸아세테이트(25ml)로 희석하고, 수(水)(2×5ml)로 그리고 뒤이어 브라운으로 세척한 후에, 건조시켰다. 상기 표제화합물을 헥산내 70%에틸 아세테이트 이용 플래시 크로마토 그래피법을 써서 정제하였다.

[실시에 10]

[3 탄소 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 티미딘 다이머 제조]

제3도에 실시예 10a-10e에 해당하는 반응경로를 예시해 두었다.

10a. 질소하, -78°C의 건조 THF(2.0ml)내 실시예 7의 방법으로 만든 포스포니움 아이어다이드 화합물(241 mg, 0.32몰) 교반현탁액에 포타슘테르-부록사이드(0.62ml, THF 내 1.0M, 0.62mmol)를 부가하였다. 20분후, 실시예 9의 방법에 따라 제조한 3'-아세트 알데하이드 화합물(80mg, 0.22몰)을 부가하였다. 60분 후에, 상기 반응혼합물을 에틸 아세테이트(30ml)로 희석하고, 다시 이를 수(水)(2×5ml)로 그리고 뒤이어 브라운(5ml)으로 세척한 후에, Na₂SO₄로 건조시켰다. 용제를 증발시켜 제거한 뒤, 올레핀 생성물(화합물 1)을 헥산내 70% 에틸 아세테이트 이용 플래시 크로마토그래피법을 써서 정제하였다. 수율은 55-60% 범위였다.

10b. 수소 1 기압하 25°C의 메탄올(5.0ml) 내 화합물 1(109mg) 교반용액에 10% Pd-C(20mg)을 부가하였다. 4시간후, 촉매를 셀라이트 패드상에서 여과한 후, 용제를 증발시켜 제거하였다. 이렇게 하여 회수한 화합

물 2를, 다음엔, 핵산내 80% 에틸 아세테이트 이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제하였다.

10c. 테트라부틸 암모늄 플로라이드 약 2.8당량을 0℃의 5.0ml THF 내 화합물 2(350mg) 교반용액에 추가하였다. 3시간후, 용제를 증발건조시켜 제거한 뒤, CH₂Cl₂ 10% 메탄올 이용 플래시 크로마토 그래피법으로 화합물 3을 정제하였다.

10d. 약 0.05당량의 4-디메틸 아미노 피리딘, 1.4당량의 트리에틸아민 및 1.2당량의 4,4'-디메톡시트리틸 클로라이드를 건조 피리딘(4.0ml)내 화합물 3(0.6mmol) 교반용액에 추가하였다. 2시간후, 2.0ml의 수로 상기 반응 혼합물을 급냉시킨 뒤, 2.0ml의 에틸 아세테이트로 희석하였다. 유기상을 분리시킨 뒤 포화브라인으로 세척하고, 건조시켰다. 메틸렌 클로라이드내 5% 메탄올 이용 플래시 크로마토그래피법으로 화합물 4를 정제하였다.

10e. 약 2.0당량의 디이소프로필 에틸아민과 1.0ml의 건조 디클로로메탄(CH₂Cl₂)을 화합물 4(0.5mmol)의 교반용액에 추가하였다. 30분후, 0.75당량의 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필 클로로포스포 아마다이트를 20분간 걸쳐 한방울씩 추가하고, 1시간 동안 더 교반하였다. 다음엔, 용제를 증발건조시켜 한후, 질소 대기하 에틸아세테이트(1% 트리에틸 아민함유) 이용 플래시 크로마토그래피법으로 화합물 5를 정제하였다.

상기 단계 a-d의 반응경로는 3 탄소 모두가 구조식 -CH₂-를 지니는 3 탄소 인터뉴클레오지드 연쇄함유 다이머제조에 사용된다.

탄소들 중 어떤것(또는 모든 탄소들)은 임의로 다음과 같은 제3도에 예시된 반응경로의 수정경로를 통해 하이드록실화 될 수 있다. t-부탄올내 오스뮴 테트라옥사이드 2.5%(w/v)용액 한방울을 0℃의 0.8ml THF내 화합물 1과 4-메틸 모폴린 N-옥사이드(9.1mg) 교반용액에 추가하였다. 반응 혼합물을 24시간 동안 0℃로 유지시킨 뒤, 소듐 메타비술파이트 수성용액으로 급냉시키고, 에틸 아세테이트로 희석한 후에, 수(水)로 그리고 뒤이어 브라인으로 세척하였다. 용제를 증발시켜 제거한 뒤, 얻어진 하이드록실화된 다이머를 에틸아세테이트(용리제) 이용 박층크로마토 그래피법으로 정제하였다. 다음엔 하이드록실화된 다이머가 보 호되고, 5' 및 3' 말단들이 상기 단계 b-d에서와 같은 방법으로 수정된다.

[실시에 11]

[하이드록실화된 3 탄소 인터뉴클레오지드 연쇄제조]

단계 a-d에 의해 생산된 티미딘-다이머포스포 아마다이트 화합물들을 표 1의 올리고뉴클레오지드 배열 제조용 수정된 고상 포스포아미다이트 합성방법에 사용하였다.

올리고 데옥시뉴클레오타이드들은 3' 말단으로부터 5' 말단으로 합성하였다.

[표 1]

배열	참조코드
5' TpTpTpTpTp[TcT]pTpTpTpypypT 3'	1
5' TpTpTpTpTpTpTp[TcT]pTpTpypypT 3'	2
5' TpTpTpTpTpTpTp[TcT]pypT 3'	3
T = 티미딘	
$p = \begin{array}{c} O \\ \\ O-P-O \\ \\ e \\ O \end{array}$	
C = -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	
Y = 테트라에틸렌글리콜	

다음엔, 수정된 포스포아미다이트법에 따라 합성을 진행하였다. 부착된 티미딘의 5'-하이드록실 그룹을

트리클로로 아세트산과 반응시켜 5'-하이드록실 그룹을 탈보호시켰다. 이같은 탈보호 단계실행후엔, 상기 부착된 티미딘을 디메톡시트리틸 테트라에틸렌글리콜 시아노포스핀 포함 포스포아미다이트 시약 및 활성화 화제인 테트라졸과 반응시켰다. 활성화 단계실행후엔, 아세트산 무수물과 N-메틸 이미다졸을 사용, 미반응된 5'-하이드록실 그룹들의 캡핑(capping)을 행하였다.

다음엔, 표준방법에 따라 아이어다인을 사용 포스포러스 연쇄를 산화시켰다. 두 개의 테트라에틸렌글리콜 (TEG)을 함유하는 배열 1과 2에서는, 탈보호, 활성화, 캡핑 및 산화단계들을 상기 기술한 바와같이 반복 실행하였다.

다음엔, 사슬연장반응을 실시예 1-9의 방법으로 만든 3-탄소연쇄된 티미딘 다이머가 활성화단계시 쇠내목적장소에 부가되도록 수정시킨 표준연속 단계들(탈보호, 활성화, 캡핑 및 산화순으로 이루어지는)을 통해 진행시켰다.

사슬의 말단에서, 티미딘 올리고머들을 농축 암모늄 하이드록사이드를 사용 CPG 지지체로부터 제거하였다. 다음엔, 용액을 55°C에서 8 내지 15시간 동안 재차처리, 염기들의 외환상아민들에 존재하는 모든 보호그룹들을 제거하였다.

[실시예 12]

[3'-0-아세틸-5'-카보메톡시메틸-5'-데옥시티미딘의 제조]

약 0.39g의 소듐 보로하이드라이드를 95ml 이소프로판올내 3.17g 3'-0-아세틸-5'-카보메톡시메틸렌-5'-데옥시티미딘 저온(얼음조) 교반 혼합물에 부가하였다. 상기 혼합물을 30분 동안 질소대기하 0°C에서 교반한 뒤, 다음엔 실온에서 4시간 30분 동안 더 교반하였다.

상기 냉각혼합물을 20ml 메탄올로 그리고 뒤이어 30분 동안에 200ml 증류수로 급냉시킨 뒤, 에틸 아세테이트로 여러번 추출하였다. 한데 모든 유기출물들을 브라인으로 처리한 뒤, 무수 마그네슘 술페이트로 건조시켰다. 건조제를 여과시켜 버린 뒤, 용제를 증발시켜, 잔류글래스(residual glass)의 표제화합물 2.7g을 얻었다.

[실시예 13]

[5'-카보메톡시메틸-5'-데옥시티미딘의 제조]

소듐 메톡사이드의 25%(w/v) 메탄올성용액 약 10방울을 건조메탄올(천연 알루미늄상을 통과시킨) 약 300ml내 실시예 12의 방법으로 만든 3'-0-아세틸-6'-카보메톡시메틸-5'-데옥시티미딘(2.22g) 저온 교반용액에 부가하였다. 상기 혼합물을 방조 재보충없이, 질소대기하에서 약 2시간동안 교반하였다.

소량의 양이온 교환수지(BioRad AG 50wx8)를 부가한 뒤, 상기 반응혼합물을 30분 동안 교반하였다. 용제를 감압하에서 제거, 2.1g의 잔류글래스[온(溫)톨루엔으로 처리된 뒤, 냉각후, 여과를 거쳐, 사이클로헥산으로 세척됨으로서 백색고체의 조생성물 1.64g을 생산케 되는]를 얻었다.

표제 화합물을 에틸 아세테이트(용리제) 이용 실리카 겔상의 크로마토그래피법으로써 소량의 출발물질로부터 정제한 뒤, 에틸 아세테이트/헥산으로부터 재정출(recrystallization) 해냄으로서 백색결정들을 얻었다.

[실시예 14]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-(2-하이드록시메틸)-티미딘의 제조]

테트라 하이드로퓨란(THF)내 1M 디이소부틸 알루미늄 하이드라이드 약 19ml를 질소하에서, 40ml 무수 THF내 1.88g 3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-카보메톡시메틸-5'-데옥시티미딘 저온(-40°C에서 -30°C) 교반용액에 부가하였다. 다음엔, 반응온도를 -20°C까지 서서히 올렸다.

상기 혼합물을 약 3.5ml 메탄올로 급냉시킨 뒤, 반응온도를 -10°C까지 올렸다. 36ml THF내 약 18ml 수(水)를 온(溫) 혼합물에 부가한 뒤, 온도를 10°C까지 더 올렸다. 감압을 통해 거개의 THF를 제거한 후, 잔류물을 잔류물 부피의 약 2배 되는 수(水)를 사용해 희석하였다. 수성상을 에틸 아세테이트/클로로포름으로 여러번 추출해내었다. 한데모은 추출물들을 저온 2N 염산으로 그리고 뒤이어 브라인으로 세척한 뒤, 무수마그네슘 술페이트로 건조시키고, 여과하였다. 용제를 여액으로 부터 감압하에서 제거, 상기 표제화합물(약 1.6g)을 얻었다.

[실시예 15]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-(2-아이어드메틸)-5-데옥시티미딘의 제조]

약 1g의 p-톨루엔 술포닐 클로라이드를 25에서 30ml 무수피리딘내 실시예 14의 방법으로 만든 1g의 3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-(2-하이드록시메틸)-5'-데옥시티미딘 용액에 부가한뒤, 이 혼합물을 약 5°C에서 대략 19시간 동안 밀전(密栓)하여 정치시켜 두었다.

약 200ml의 빙수(ice water)에 상기 혼합물을 부가한 후, 에테르로 여러번 추출해내었다. 한데모은 유기 추출물을 저온 2N 염산, 수(水) 그리고 포화 브라인으로 차례대로 세척한 후, 세척한 추출물들을 무수 소듐 술페이트로 건조시키고, 여과하였다. 용제를 여액으로 부터 감압을 통해 제거 잔류글래스의 p-톨루엔 술포닐 유도체 1.24g을 얻었다.

약 0.54g의 p-톨루엔 술포닐 유도체와 0.38g의 소듐 아이어다이드를 3일 동안 55 ml 건조아세톤(분자체, 4A를 통과시킨)에 용해시킨뒤, 최종일엔 0.19g의 소듐 아이어다이드를 더 부가하고 교반하였다.

반응 혼합물을 여과한 뒤, 용제를 증발시켜 조생성물을 얻었다.

조생성물을 헥산내 25% 에틸 아세테이트(용리제) 이용 실리카겔(85g)상의 크로마토 그래피법으로 정제하였다. 용제를 증발시켜 목적 3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-(2-아이어드메틸)-데옥시티미딘 0.4g을 얻었다.

[실시에 16]

[5'-카보메톡시메틸렌-5'-데옥시티미딘의 제조]

메탄올내 25% 소듐 메톡사이드 약 10방울을 건조메탄올(천연 알루미늄상을 동의시킨) 150 ml 내 1.5g 3'-0-아세틸-5'-카보메톡시메틸렌-5'-데옥시티미딘 교반용액에 부가하였다. 혼합물을 질소대기하 실온에서 6시간 더 교반하였다.

소량의 양이온 교환수지(Bio-Rad AG-fow-X8)를 상기 혼합물에 10분 동안 교반하면서 부가하였다. 용제를 감압하에서 제거 백색고체 잔류물 1.3g을 얻었다. 잔류물을 온(溫) 톨루엔을 이용 두번 부순뒤, 이를 열(熱) 에탄올에 넣고, 차례로 여과, 냉각, 건조하여 백색결정 생성물의 표제화합물 0.85g을 얻었다.

[실시에 17]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-(2-하이드록시메틸렌)-5'-데옥시티미딘의 제조]

296mg 5'-카보메톡시메틸렌-5'-데옥시티미딘 용액을 1ml 무수 디메틸 포름아 마이드내 205mg 이미다졸과 227mg t-부틸디메틸실릴 클로라이드 저온(빙수조), 교반용액에 질소대기하에서 한방울씩 부가하였다. 부가완료후, 상기 혼합물을 상기 빙수조로 부터 분리, 주변온도에서 2시간 동안, 다음엔 35°C에서 2시간 동안 더, 그리고 끝으로 40°C에서 30분 동안 교반을 계속하였다.

상기 혼합물을 2ml 메탄올로 그리고 다음엔 이 혼합물의 2-3 배되는 수(水)로 급냉하였다. 수성상을 에틸 아세테이트로 여러번 추출해내었다. 한데 모은 유기 추출물들을 수(水), 포화 비카보네이트 용액, 그리고 브라인으로 차례로 세척한뒤, 무수 마그네슘 술페이트로 건조, 여과하였다. 용제를 여액으로 부터 감압하에서 제거, 0.40g의 3'-t-부틸디메틸실릴-5'-카보메톡시메틸렌-5'-데옥시티미딘을 얻었다.

테트라 하이드로퓨란내 디이소부틸 알루미늄 하이드라이드 1M 용액 4ml를 30°C 이하 온도의 10ml 무수 테트라 하이드로퓨란내 용해된 0.37g 3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-카보메톡시메틸렌-5'-데옥시티미딘 냉각용액(-30°C에서 -35°C의)의 한방울씩 부가하였다. 부가완료 후, 상기 반응혼합물을 내부온도 약 -30°C에서 약 -20°C 범위로 유지시키면서 2시간 동안 더 질소대기하에서 교반하였다.

상기 반응혼합물에 메탄올 약 0.8ml를 부가한 뒤, 테트라하이드로 퓨란(8ml)내 수(水) 4ml 용액을 부가하였다. 감압하에서 거개의 휘발성 테트라 하이드로퓨란을 제거하였다. 수성 잔류물을 이 잔류물의 약 2배 되는 수(水)로 희석한 뒤, 에틸 아세테이트로 여러번 추출해 내었다. 한데모은 유기 추출물들을 저온 1N 염산, 브라인으로 차례로 세척한 뒤, 무수마그네슘 술페이트로 건조하고, 여과시켰다. 여액을 스트립(strip)시켜 잔류 표제화합물 0.267g을 얻었다.

상기 물질중 일부를 50% 에틸 아세테이트/헥산(용리제) 이용 실리카겔상의 크로마토그래피법으로 분석용 순도(analytical purity)까지 정제하였다.

[실시에 18]

[2 탄소-1 산소원자(3'-0-C-C-5') 인터뉴클레오지드 연쇄함유 티미딘 다이머들의 제조]

18a. 0°C의 5'-0-트리틸티미딘 교반용액에 염기와 3'-0-t-부틸의 메틸실릴-5'-(2-아이어도에틸)-5'-데옥시티미딘 각각 동일 몰량을 부가하였다. 이 반응 경과를 박층 크로마토그래피법(TLC)으로 모니터하였다. 반응완료후, 목적 다이머를 분리, 플래시 크로마토그래피법으로 정제하였다.

18b. 약 -5°C의 온도로 유지되는 3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-(2-하이드록시메틸)-5'-데옥시티미딘 교반용액에 염기 2당량을 부가하고, 용제를 증발건조시켜 제거하였다. 잔류물을 DMF에 다시 용해시킨 뒤, 5'-디메톡시트리틸-2', 3'-사이클로티미딘 1당량을 부가하였다. 반응 혼합물을 약 40°C까지 가열한뒤, TLC를 통해 목적다이머형성을 조회하였다. 반응완료후, 목적다이머를 분리, 플래시 크로마토그래피법으로 정제하였다.

[실시에 19]

[실시에 18 다이머의 3' 말단 탈보호(De protection)]

보호된 다이머들의 3'-t-부틸디메틸실릴 보호그룹은 실시에 18 다이머의 THF 용액을 0°C에서 2.8 당량 테트라부틸암모늄 플로라이드로 처리하여 제거하였다. 반응완료(통상 약 3시간)후, 용제를 증발시켜 제거하고, 목적다이머를 분리, 플래시 크로마토그래피법으로 정제하였다.

[실시에 20]

[자동합성 (automated synthesis) 용으로 적합한 관능화된 다이머 단위의 제조]

실시에 19의 다이머 생성물을 디클로로메탄에 용해시킨뒤, 디이소프로필에틸아민 고당량을 부가하였다. 혼합물을 30분 동안 교반한뒤, 약 20분간에 걸쳐 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필 클로로포스포아미다이트 0.75 당량을 한방울씩 부가하였다. 한시간 더 교반을 계속한뒤, 용제를 증발시켜 제거하고, 결과한 관능화된 다이머를 분리, 불활성 대기하 에틸아세테이트이용 플래시 크로마토그래피 컬럼상에서 정제하였다.

[실시에 21]

[5'-t-부틸디메틸실릴-3'-데옥시-3'-1,2-디하이드록시-3-프로필)-티미딘의 제조]

부탄올내 오스뮴 테트라옥사이드(OsO₄) (4 방울, 2.5% w/v)를 0°C의 건조 THF 5.0ml 내 4-메틸모플린-N-옥사이드(53mg, 0.45mmol)와 참고문헌의 방법으로 만든 3'-(2-프로페닐)-3'-데옥시-5'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘 (183mg, 0.5mmol)교반혼합물에 부가하였다. 다음엔, 상기 반응혼합물을 10% 수성 소듐 메티 비스술폰이트(2.0ml)로 급냉시킨후, 20분 동안 교반하고, 실리카패드상에서 여과한 다음에, 에틸 아세테이트

트(25.0ml)로 희석하였다. 유기상을 수(水) (5.0ml)로 그리고 뒤이어 브라인으로 세척한뒤, Na₂SO₄로 건조시켰다. 용제를 증발시켜 제거한후, 플래시 크로마토그래피법으로 표제화합물을 정제하였다.

[실시예 22]

[3'-데옥시-티미드-3-일-아세트알데하이드-5'-0-t-부틸디메틸실릴티미딘의 제조]

소듐 퍼아이어데이트(214mg, 1mmol)를 THF-H₂O(4:1 비, 5.0mmol) 내 실시예 21의 방법으로 만든 티미딘 디올(200mg, 0.5mmol)교반용액에 부가하였다. 1시간후, 반응혼합물을 에틸아세테이트(25.0ml)로 희석하고, 수(水) (2×5.0ml)로 그리고 뒤이어 브라인으로 세한뒤, 건조시켰다. 표제화합물을 헥산내 70% 에틸 아세테이트이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제하였다.

[실시예 23]

[5'-0-(P-톨루엔술포닐) 티미딘의 제조]

질소대기하 0℃의 건조피리딘(200ml) 내 티미딘(20g, 82.6mmol) 교반용액에 p-톨루엔술포닐 클로라이드(47.2g, 247.6mmol)을 부가하였다. 3시간뒤 반응혼합물을 빙조에 붓고, 에틸 아세테이트로 추출해내었다. 용제를 증발시켜 제거한 후, 에틸 아세테이트와 메탄올 혼합물로 부터 생성물을 정출(晶出)해냈다. 표제화합물은 결정질 고체로서 70 - 75% 수율로 얻어졌다.

[실시예 24]

[5'-아이어다이드-5'- 데옥시티미딘의 제조]

건조 아세톤(75ml) 내 실시예 23의 방법으로 제조한 티미딘 토실레이토(10.65g, 26.9mmol) 교반용액에 소듐 아이어다이드(10g, 66.7mmol)을 부가한뒤, 이 혼합물을 16시간 동안 환류시켰다. 용제를 증발시켜 제거한뒤, 에틸 아세테이트로 희석하였다. 유기상을 수(水) (2×20ml)로 그리고 뒤이어 브라인(10ml)으로 세척한 후, 소듐 술페이트로 건조시켰다. 표제화합물은 메탄올로 부터 정출된 백색결정질 고체로서 90-95% 수율로 얻어졌다.

[실시예 25]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-아이어도-5'-데옥시티미딘의 제조]

건조 DMF 내 실시예 24의 방법으로 제조한 티미딘 아이어다이드(8.0g, 24.7mmol) 교반용액에 이미다졸(4.2g, 61.7mmol)을 부가하였다. 5분후, 터트-부틸디메틸 실릴클로라이드(4.47g, 24.64mmol)를 부가하고, 이 혼합물을 4시간 동안 교반하였다. 다음엔, 상기 반응혼합물을 에틸 아세테이트(250ml)로 희석한후, 수(水) (2×100ml)로 그리고 뒤이어 브라인(50ml)으로 세척하고, 소듐 술페이트로 건조시켰다. 표제화합물을 헥산내 60% 에틸 아세테이트 이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제 92% 수율로 얻었다.

[실시예 26]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-아자이드-5'-데옥시티미딘의 제조]

건조 DMF(50ml)내 실시예 25의 방법으로 제조한 3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-아이어도-5'-데옥시티미딘(10.8g, 20mmol) 교반용액에 소듐 아자이드(3.9g, 60mmol)를 부가한 뒤, 이 혼합물을 12시간 동안 0℃ 범위로 가열하였다. 다음엔, 이 반응혼합물을 에틸 아세테이트(200ml)로 희석한 뒤, 수(水)(2×50ml)로 그리고 뒤이어 브라인(50ml)으로 세척하고, 소듐 술페이트로 건조하였다. 상기 표제화합물을 헥산내 50% 에틸 아세테이트 이용 플래시 크로마토 그래피법으로 정제 90% 수율로 얻었다.

[실시예 27]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-아미노-5'-데옥시티미딘의 제조]

질소대기하 MeOH내 실시예 26의 방법으로 만든 티미딘 아자이드(5.0g 13.1mmol) 교반용액에 200mg의 10% Pd-C를 부가하였다. 다음엔, 질소가스를 배기시키고, 수소로 치환시켰다. 배기와 치환절차를 두 번 반복한 후, 수소 1 기압하에서 12시간 동안 교반을 계속하였다. 수소를 제거한 뒤, 셀라이트(celite) 패드상에서 촉매를 여과하고, 감압하에서 용제를 제거하였다. 조생성물을 CH₂Cl₂내 5-10% MeOH 이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제, 85-87% 수율의 표제화합물을 얻었다.

[실시예 28]

[3'-아자이드-3'-데옥시-5'-0-디메톡시트리틸티미딘의 제조]

건조 피리딘(foml)내 3'-아자이드-3'-데옥시티미딘(2.67g, 10mmol) 교반용액에 4-디메틸아미노피리딘(61mg, 0.5mmol), 트리에틸아민(1.9ml, 14mmol) 그리고 4,4'-디메톡시트리틸클로라이드(4.1g, 12mmol)를 연속하여 순차적으로 부가하였다. 3시간후, 수(水)(30ml)를 부가한 뒤, 에틸 아세테이트(250ml)로 추출하였다. 유기상을 분리한 후, 브라인(50ml)으로 세척하고, 소듐 술페이트로 건조시켰다. 메틸렌 클로라이드내 5% 메탄올 이용 플래시 크로마토그래피법을 써서 정제하여, 80-85% 수율의 표제화합물을 얻었다.

[실시예 29]

[3'-아미노-3'-데옥시-5'-0-디메톡시트리틸 티미딘의 제조]

아르곤 대기하 MeOH내 실시예 28의 방법으로 만든 티미딘 아자이드(3.99g, 40mmol) 교반용액에 200mg의 10% Pd-C를 부가하였다. 아르곤 가스를 감압하여 제거한 뒤, 수소를 도입시켰다. 이 절차를 두 번 반복한 후, 수소 1 기압하에서 12시간 동안 교반을 계속하였다. 다음엔, 수소를 제거한 뒤, 셀라이트 패드상에서 촉매를 여과하고, 감압하에서 용제를 제거하였다. 조생성물을 메틸렌 클로라이드내 5% MeOH 이용 플래시

크로마토그래피법으로 정제, 90-93% 수율의 표제화합물을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 7.61(s, 1H), 7.60-7.21(m, 1H) 6.83-6.87(m, 3H), 6.85(t, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 3.80(s, 6H), 3.81-3.73(m, 2H), 3.53-3.49(m, 1H), 3.38-3.33(m, 1H), 2.36-2.33(m, 1H), 2.25-2.20(m, 1H), 1.51(s, 3H); IR neat ν_{max} 3020, 2962, 1697, 1605, 1512, 1246, 1030 cm^{-1} .

[실시예 30]

[5'-0'-디메톡시트리틸-3-0'-t-부틸디메틸실릴 티미딘의 제조]

15ml 무수 디메틸 포름아마이드(DMF)에 디메톡시트리틸 티미딘(5.0g, 9.2mmol)과 이미다졸(1.2g, 18.4mmol)을 용해시킨 뒤, tert-부틸 디메틸실릴 클로라이드(1.7g, 11.5mmol)을 추가하였다. 반응혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반한 뒤에, 에틸아세테이트로 희석하고, 수(水)로 그리고 뒤이어 포화 소듐 클로라이드로 세척한 후에, 소듐 술페이트로 건조시켰다. 정량적 수율의 표제화합물을 얻었다.

[실시예 31]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘의 제조]

실시예 30의 방법으로 제조한 5'-0-디메톡시트리틸-3'-0-t-부틸디메틸실릴 티미딘(0.7g, 1.1mmol)을 메틸렌 클로라이드내 트리클로로 아세트산 3% 용액 13ml로 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 다음엔, 상기 반응혼합물을 5%(w/v) 소듐 비카보네이트 용액으로 중화시켰다. 유기층을 소듐 술페이트로 건조시켰다.

메틸렌 클로라이드내 에틸아세테이트(0에서 30%의 농도기울기로 존재하는)이용 플래시 크로마토그래피법을 써서 표제화합물을 정제, 85%의 반응수율을 얻었다.

[실시예 32]

[3'-0-t-부틸디메틸실릴-5'-카베톡시메틸렌-5'-데옥시티미딘의 제조]

잘 교반한 -78°C 의 건조 메틸렌 클로라이드 용액에 옥사릴 클로라이드(33.0mmol)를 추가한뒤, 다음에 DMSO(3.12 ml, 44mmol)를 한방울씩 추가하였다. 10분후, 20.0ml CH_2Cl_2 내 실시예 31의 방법으로 만든 티미딘 알콜(5.6g, 15.7mmol)을 2분간에 걸쳐 한방울씩 추가한뒤, 45분동안 교반을 계속하였다. Et_3N (8.1ml, 58.1mmol)을 추가한뒤, 30분동안 더 교반을 계속하였다. 다음엔, 반응혼합물이 30분간에 걸쳐 -23°C 에 이르도록 하였다. 그 다음엔, 카베톡시 메틸렌 트리페닐 포스포란(10.94g, 31.4mmol)을 추가한후, 실온에서 12시간 동안 이 반응혼합물을 교반하였다. 다음엔, 상기 반응혼합물을 수(水) (2X 125ml)로 그리고 뒤이어 브라인(50ml)으로 희석한후, Na_2SO_4 로 건조시켰다. 조생성물을 20% 에틸 아세테이트-헥산 \Rightarrow 40% 에틸 아세테이트-헥산이용 플래시 크로마토 그래피법으로 정제, 표제화합물의 트란스와 시스 이성질체 양자모두를 3:1의 비로 얻었다. 총수율은 약 72-76%였다.

트란스 화합물의 데이터.

IR (neat) ν_{max} 3205, 3180, 2982, 2964, 1698

1490, 1274 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.04 (s, 1 H), 6.87 (dd, $J = 15.6$ and 5.4

Hz, 1 H), 6.23 (t, $J = 6.7$ Hz, 1 H), 6.03 (dd, $J = 15.6$ and 1.6 Hz, 1 H), 4.33 - 4.28 (m,

1 H), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 4.16 - 4.12 (m, 1 H), 2.28 - 2.19 (m, 1 H), 2.09 - 1.98 (m, 1

H), 1.87 (s, 3 H), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 0.81 (s, 9 H), 0.01 (s, 6 H). Calcd for

$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{N}_2\text{Si}$: C, 56.58; H, 7.60; N, 6.60; Found: C, 56.36; H, 7.30; N, 6.60.

[실시예 33]

[3'-o-t-부틸디메틸실릴-5'-카베톡시메틸-5'-데옥시티미딘의 제조]

질소 대기하 EtOAc 내 실시예 32의 방법으로 만든 불포화 티미딘 에스테르(4.24g, 10mmol) 교반용액에 10% Pd - C200mg을 추가하였다. 감압하여 제거한, 수소를 도입시켰다. 이 절차를 두번 반복한후 수소 1기압하에서 16시간 동안 교반을 계속하였다. 다음엔, 셀라이트 패드상에서 촉매를 여과해낸후, 용제를 감압하에서 제거하였다. 헥산과 에틸 아세테이트 혼합물로부터 생성물을 정출시켰다. 95% 수율의 표제화합물을 얻었다.

IR (neat) ν_{\max} 3180, 2925, 2950, 1696, 1486, 1260, 1240 cm^{-1} $^1\text{H NMR}$ (300

MHz, CDCl_3) δ 7.26 (s, 1 H), 6.81 (t, 6.6 Hz, 1 H), 4.07 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 4.03 -

3.98 (m, 1 H), 3.73 - 7.69 (s, 1 H), 2.51 - 2.32 (m, 2 H), 2.24 - 2.15 (m, 1 H), 1.18 (t,

$J = 7.1$ Hz, 3 H), 0.81 (s, 9 H), 0.01 (s, 6 H) Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{O}_6\text{N}_2\text{Si}$: C, 56.81

: H, 8.03; N, 6.57 Found : C, 55.91; H, 7.74; N, 5.50.

[실시예 34]

[3'-o-t-부틸디메틸실릴-5'-데옥시-티미드-5-일-아세트알데하이드의 제조]

-78°C 의 건조 CH_2Cl_2 60ml 내 실시예 33의 방법으로 제조한 티미딘 에스테르(3.41g, 8mmol) 교반용액에 DiBAC - H(16.4ml, 헥산내 1.0M 용액, 16.4mmol)을 3분간에 걸쳐 한방울씩 추가하였다. 20분뒤, 반응혼합물을 300ml EtoAc로 희석한후, 50ml 포화 소듐 포타슘 타트레이트 용액으로 두번 세척하였다. 유기상을 브라인(25ml)으로 세척한뒤, Na_2SO_4 로 건조하였다. 표제 화합물을 50% - 70% 에틸 아세테이트 - 헥산 이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제, 85-87%의 수율을 얻었다.

[실시예 35]

[3'-C -C-N-5'-인테우클레오지드 연쇄를 지니는 데옥시티미딘 다이머(제3도)의 제조]

[35a]

에탄올 50ml와 수성완충용액 10ml (pH=0.5, NaH_2PO_4 - NaOH) 내 실시예 22의 티미딘 알데하이드(1.38g, 3.6mmol)와 실시예 27의 티미딘아민(1.07g, 3mmol)으로 이루어진 교반용액에 THF 내 NaCNBH_3 용액(12ml, THF 내 1.0M 용액, 12mmol)을 1시간에 걸쳐 5°C 에서 한방울씩 추가하였다. 반응 혼합물을 4시간 더 교반한후, 2.50ml 에틸아세테이트로 희석하였다. 반응 혼합물을 수(水)(2×40ml)로 그리고 뒤이어 브라인(25ml)으로 세척한 후, Na_2SO_4 로 건조시켰다. 화합물 1(제6도)을 처음엔 에틸 아세테이트(용리제)이용 플래시 크로마토그래피법으로, 그리고, 다음엔 5→8% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 이용 플래시 크로마토그래피 법으로 정제, 62-64%의 수율을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.40 (s, 1 H), 7.19 (s, 1 H), 6.18 (t, $J = 6.6$ Hz, 1

H), 6.08 (t, $J = 3.9$ Hz, 1 H), 4.29 - 4.23 (m, 1 H), 4.15 - 3.98 (m, 1 H), 3.91 - 1.85

(m, 1 H), 3.70 - 3.78 (m, 2 H), 2.95 - 2.87 (m, 1 H), 2.84 - 2.66 (m, 3 H), 2.35 - 2.05

(m, 5 H), 1.94 (s, 3 H), 1.93 (s, 3 H), 1.80 - 1.63 (m, 1 H), 1.55 - 1.45 (m, 1 H), 0.93

(s, 9 H), 0.60 (s, 9 H), 0.11 (s, 6H), 0.07 (s, 6 H).

[35b]

화합물 1(제6도) (166mg, 0.23mmol)을 CH_2Cl_2 (5.0ml)내 무수 트리플루오로 아세탈(0.32ml, 2.3mmol)과 트리에틸아민(0.64ml, 4.6mmol)로 이루어지는 교반용액에 추가하였다. 2시간뒤, 반응혼합물을 수성 N_2HCO_3 (5.0ml)로 급냉시킨후, EtOAc(25ml)로 희석하였다. 유기상을 수(水) (2×10ml)로 그리고 뒤이어 브라인(5ml)으로 세척한뒤, Na_2SO_4 로 건조하였다. 화합물 2(제6도)를 CH_2Cl_2 내 7% MeOH이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제, 91-93%의 수율을 얻었다.

[35c]

0°C 의 THF(4.0ml) 내 화합물 2(164mg, 0.2mmol) 교반용액에 테트라부틸 암모늄 플루오라이드(0.8mmol)을 추가하였다. 2시간뒤, 용제를 증발시켜 제거한후, 화합물 3(제6도)을 CH_2Cl_2 내 5% - 8% MeOH이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제, 90%의 수율을 얻었다.

[35d]

건조피리딘(3.0ml)내 화합물 3(151mg, 0.26mmol) 교반용액에 4, 4-디메틸아미노피리딘(1.6mg, 0.0128mmol)과 트리에틸아민(0.057ml, 0.42mmol)을 추가하였다. 5분뒤, 디메톡시트리틸클로라이드(121mg, 0.358mmol)를 추가한후, 교반을 계속하였다. 2시간뒤, 반응혼합물을 에틸 아세테이트(25ml)로 희석한 후, 수(水) (2×10ml)로 그리고 뒤이어 브라인(5ml)으로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하였다. 조생성물을 CH_2Cl_2 내 7% MeOH 이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제, 85 - 87%의 화합물 4(제3도)를 얻었다.

[35e]

화합물 4(150mg, 0.168mmol)에 건조 디이소프로필 에틸아민(0.15ml, 0.67mmol)을 부가한후, 건조 CH_2Cl_2 (0.5ml)를 부가하였다. 다음엔, 플라스크를 교반, 알콜을 용해시킨후, 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포아미다이트(0.056ml, 0.25mmol)를 20초간에 걸쳐 부가하였다. 45분뒤, 반응 혼합물을 CH_3OH (1.0ml)로 급냉시킨후, EtOAc(50ml)로 그리고 뒤이어 Et_3N (1.0ml)로 희석하고, 10%수성

K_2CO_3 (2× 5.0ml)로 그리고 뒤이어 브라인(5.0ml)으로 세척한 후에, Na_2SO_4 로 건조시켰다. 조생성물을 EtOAc 이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제, 70 - 75% 수율의 화합물 5(제6도)를 얻었다.

[실시에 36]

[3'-N-C-C-5'-인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는 데옥시티미딘 다이머(제4도)의 제조]

[36a]

에탄올 50ml와 수성완충용액 10ml(pH=5.5, NaH_2PO_4 -NaOH) 내 실시에 34의 알데하이드(2.29g, 6mmol)와 실시에 29의 아민(2.72g, 5mmol)로 이루어진 교반용액에 THF 내 NaCHBH_3 용액(12ml, THF 내 1.0M 용액, 12mmol)을 1시간에 걸쳐 5°C에서 한방울씩 부가하였다. 반응혼합물을 4시간 더 교반한후 250ml의 에틸아세테이트로 희석하였다. 반응혼합물을 수(水) (2×60ml)로 그리고 뒤이어 브라인으로 세척한 후, NaSO_4 로 건조시켰다. 화합물 1(제7도)을 처음엔 에틸 아세테이트 이용 플래시크로마토그래피법으로, 다음엔 5% MeOH- CH_2Cl_2 이용 플래시크로마토그래피법으로 정제, 72 -74% 수율의 화합물 1(제7도)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (s, 1 H), 7.36 - 7.34 (m, 2 H), 7.29 - 7.15 (m, 8

H), 7.03 (s, 1 H), 6.77 (m, 3 H), 5.20 (t, J = 6.0 Hz, 1 H), 6.08 (t, J = 6.7 Hz, 1 H)

4.01 - 3.97 (m, 2 H), 3.84 - 3.72 (m, 1 H), 3.72 (s, 6 H), 3.71 - 3.63 (m, 1 H), 3.48 -

3.32 (m, 2 H), 3.30 - 3.22 (m, 1 H), 3.48 - 3.32 (m, 2 H), 3.30 - 3.22 (m, 1 H), 2.52

(m, 2 H), 2.27 - 2.14 (s, 3 H), 2.08 - 1.97 (m, 1 H), 1.83 (s, 3 H), 1.67 (s, 1 H), 1.48 (m, 3

H), 1.43 (s, 3 H), 1.22 - 1.15 (m, 1 H), 0.82 (s, 9 H), 0.01 (s, 6 H)

[36b]

CH_2Cl_2 (5.0ml) 내 트리플루오로아세틱 무수물(0.32ml, 2.3mmol)과 트리에틸아민(0.64ml, 4.6mmol)로 이루어진 교반용액에 화합물 1(제7도) (210mg, 0.23mmol)을 부가하였다. 2시간뒤, 반응혼합물을 수성 NaHCO_3 (5.0ml)로 급냉시킨 후, EtOAc(25ml)로 희석하였다. 유기상을 수(水) (2×10ml)로 그리고 뒤이어 브라인 (5ml)으로 세척한 후, Na_2SO_4 로 건조시켰다. 화합물 2(제7도)를 CH_2Cl_2 내 7% MeOH 이용 플래시 크로마토그래피법으로 정제, 89 - 91% 수율의 화합물 2를 얻었다.

[36c]

0°C의 THF(4.0ml)내 화합물 2(180mg, 0.2mmol)교반용액에 테트라부틸 암모늄 플루오라이드(0.4ml, THF 내 1.0M 용액, 0.4mmol)를 부가하였다. 2시간뒤, 용제를 증발시켜 제거한후, CH_2Cl_2 내 5→8% MeOH (극성을 증가시키는)이용 플래시 크로마토그래피법으로 생성물을 정제, 89% 수율의 화합물 3(제7도)을 얻었다.

[36d]

화합물 3(150mg, 0.168mmol)에 건조 디이소프로필 에틸 아민(0.15ml, 0.67mmol)을 부가한뒤, 건조 CH_2Cl_2 (0.5ml)를 부가하였다. 다음엔, 플라스크를 교반, 알콜을 용해시킨후, 2-시아노에틸-N,N-디이소프로필클로로포스포아미다이트(0.056ml, 0.25mmol)를 20초간에 걸쳐 부가하였다. 45분후, 반응혼합물을 CH_3OH (0.1ml)로 급냉시킨뒤, EtOAc(50ml)로 그리고 뒤이어 Et_3N (1.0ml)로 희석하고, 10% 수성

K_2CO_3 (2× 5.0ml)로 그리고 뒤이어 브라인(5.0ml)으로 세척한 후에, Na_2SO_4 로 건조시켰다. EtOAc 이용 플래시 크로마토그래피법으로 생성물을 정제, 70-75% 수율의 화합물 4를 얻었다.

[실시에 37]

[3'-N-C-C-5'-인터뉴클레오지드 연쇄함유 데옥시티미딘올리고머들의 합성]

상기 a-d의 단계들에 의해 생산된 티미딘-다이머 포스포아미다이트 화합물들을 표 2에 올리고뉴클레오지드 배열 제조용 수정된 고상(solid phase) 포스포아미다이트 합성 절차에 사용하였다.

[표 2]

배열	참조 코드
5' TpTpTpTpTpTpTp[TnT]pT 3'	4
5' TpTpTpTpTp[TnT]pTpTpT 3'	5
5' [TnT]pTpTpTpTpTpTpT 3'	6

T = 티미딘

$$P = -O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{P}-O-$$

$$\quad \quad \quad |$$

$$\quad \quad \quad O^{\ominus}$$

n = 3' - N - C - C - 5'

올리고데옥시 뉴클레오타이드 배열들은 3' 말단으로부터 5' 말단으로 합성하였다. 첫 번째 단계에서는 5'-디메톡시트리틸 데옥시티미딘을 3'-숙시네이트 연쇄를 통해 CPG 지지체에 부착시켰다. 부착된 티미딘의 5'-0-디메톡시트리틸 그룹을 트리클로로아세트산과 반응시켜 5'-하이드록실 그룹을 탈보호시켰다.

연쇄연장반응을 실시해 30-37의 방법으로 만든 -N-C-C-연쇄된 티미딘 다이머가 활성화 단계시 쇠내 목적 장소에 부가되도록 수정시킨 표준 연속단계들(탈보호, 활성화, 캡핑 및 산화순으로 이어지는)을 통해 진행시켰다.

사슬의 말단에서, 티미딘 올리고머들을 농축 양모늄 하이드록사이드를 사용해 지지체로부터 제거하였다. 다음엔, 용액은 55°C에서 8 내지 15동안 재차처리, 염기들의 외환상아민들에 존재하는 모든 보호그룹들을 제거하였다.

[실시예 38]

[테트라에틸렌글리콜-종결된 항-RAS 종양유전자 DNA의 제조]

38a. 디메톡시트리틸테트라에틸렌글리콜(DMTTEG)의 제조

과량의 테트라에틸렌 글리콜 TEG(약 100ml)를 둥근 바닥 플라스크내에서 허니그염기(Hunig's base) 약 7 ml(5.1g, 40mmol)와 혼합하였다. 상기 TEG 혼합물에 약 3.08g(10mmol)의 디메톡시트리틸 클로라이드(DMTC1)을 부가한 뒤, 이 DMTC1-TEG 혼합물을 실온(약 25°C)에서 약 8시간에서 12시간 동안 계속하여 일정하게 교반함으로써 DMTTEG를 얻었다.

38b. 디메톡시트리틸테트라에틸렌-글리콜시아노포스핀(DMTTEGCP)의 제조.

단계(2)로부터 얻은 6g의 DMTTEG를 20ml의 건조 디클로로메탄과 혼합하였다. 이 혼합물에 약 6.2ml의 허니그염기를 부가한 후, 클로로포스핀 혼합물을 한방울씩 부가 DMTTEGCP를 얻었다. 클로로포스핀 혼합물은 5ml의 건조 디클로로메탄에 1.67g의 2-시아노 에틸 N,N-디이소프로필클로로포스포아미다이트를 용해시켜 만들었다.

38c. TEG-종결된 항-RAS 종양유전자 DNA의 제조

표 3의 올리고데옥시 뉴클레오타이드들을 수정된 고상 포스포아미다이트 방법에 따라 제조하였다(GAIT, 상기논문). 올리고데옥시뉴클레오타이드들은 3' 말단으로부터 5' 말단으로 합성하였다.

[표 3]

배열	참조 코드
5' X GGA GCT GGT GGC GTA X (A) 3'	7
5' XX GGA GCT GGT GGC GTA XX (A) 3'	8
5' X CCT CGA CCA CCG CAT X (A) 3'	9
5' XX CCT CGA CCA CCG CAT XX (A) 3'	10
5' CCT CGA CCA CCG CAT 3'	11

X는 TEG이고, A, C, G 그리고 T는 각각 데옥시뉴클레오타이드, 즉, 아데닐산, 시티딜산, 구아니딜산, 티미딜산을 나타낸다.

뉴클레오타이드 아데노신(7, 8, 9, 10) 또는 티미딘(11)을 숙시네이트 연쇄를 이용 CPG 고정지지체에 부착시켰다(GAIT, 상기논문). 11의 합성은 표준고상 포스포아미다이트법에 따라 진행하였다. 배열 7, 8, 9 및 10의 합성은 수정된 포스포아미다이트법에 따라 진행하였다. 부착된 아데노신 뉴클레오타이드의 5' 하이드록실 그룹을 트리클로로아세트산과 반응시켜 5'-하이드록실 그룹을 탈보호시켰다. 이같은 탈보호 단계 실행후엔, 상기 부착된 아데노신 뉴클레오타이드를 상기 단계 a 및 b의 방법으로 만든 DMTTEGCP 포함 포스포아미다이트 시약 및 활성화제인 테트라졸과 반응시켰다. 활성화 단계 실행후엔, 무수아세트산과 N-메틸이미다졸을 사용, 미반응된 5'-하이드록실 그룹들의 캡핑(capping)을 행하였다. 다음엔, 표준방법에 따라 아이어다인을 사용 포스포러스 연쇄를 산화시켰다.

두 개의 TEG 잔기들을 함유하는 배열 8과 9에서는, 탄보호, 활성화, 캡핑 및 산화단계들을 상기 기술한 바와같이 반복실행하였다. 연쇄연장반응을 목적 뉴클레오타이드 포스포아미다이트 시약이 활성화 단계시 DMTTEGCP를 대체도록 수정시킨 상기 연속단계들(탈보호, 활성화, 캡핑 및 산화순으로 이어지는)을 통해 진행시켰다. 마지막 목적 뉴클레오타이드를 부착시킨 후엔, 하나 또는 두 개의 TEG 잔기들을 TEG의 3' 말단 부착시 사용한 방법과 유사한 방법을 사용 5' 말단에 부착시켰다.

사슬의 말단에서, DNA 사슬을 농축 암모늄 하이드록사이드를 사용 CPG 지지체로부터 제거하였다. 다음엔, 용액을 55°C에서 8 내지 15시간 동안 재차처리, 염기들의 외환상 아민들에 존재하는 모든 보호그룹들을 제거하였다.

[실시에 39]

[핵사에틸렌글리콜(HEG)-종결된 항-RAS 종양유전자 DNA의 제조]

핵사에틸렌글리콜(HEG) 종결된 항-RAS 종양유전자 DNA를 실시에 38의 방법에 따라 제조하였다. HEG를 DMTCI로 처리 DMTHEG를 얻었다. 다음엔, 이 DMTHEGCP를 실시에 38(c)의 수정된 고상 포스포아미다이트 합성방법에 사용, HEG-종결된 항-RAS 종양유전자 DNA를 얻었다. 이들 올리고뉴클레오타이드의 배열은 하기 표 4와 같았다.

[표 4]

배열
5' X GGA GCT GGT GGC GTA X (A) 3'
5' XX GGA GCT GGT GGC GTA XX (A) 3'
5' X CCT CGA CCA CCG CAT X (A) 3'
5' XX CCT CGA CCA CCG CAT XX (A) 3'
5' CCT CGA CCA CCG CAT 3'

X는 HEG이고, A, C, G 그리고 T는 각각 데옥시뉴클레오타이드들, 즉, 아데닐산, 시티딜산, 구아닐산 및 티미딜산을 나타낸다.

[실시에 40]

[TGE-중결된 항-RAS 종양유전자 DNA의 뉴클리아제 저항성]

표 4의 올리고뉴클레오타이드들을 수(水)에 용해시켰다. 다음엔, 260nm에서의 샘플 흡광도를 측정(주변온도의 Perkin Elmer Lambda 4C 분광광도계상에서)하고, 계산된 흡광계수(extinction coefficient)를 이용 DNA 농도를 측정하였다[method of Cantor and Warsaw, CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd. ed. Vol. 1, CRT Press Page 589(1975)].

올리고뉴클레오타이드들을, RPMI 1640:20 mM N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산), pH 7.4; 및 10% 태아 송아지 혈청(FCS)(GIBCO Laboratories, Grand Island, NY)를 함유하는 세포 배양 배지에서, 전체 사슬농도 6 또는 7 μ m로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 항온배양하였다. FCS는 사용하기 전에 30분동안 56 $^{\circ}$ C로 가열 불활성화시켰다.

다음엔, 샘플들을 얼음에 안치시킨 뒤, 24:1의 클로포름 : 이소아밀 알콜로 5회 추출, 탈단백시켰다. 샘플들을 -20 $^{\circ}$ C로 동결저장 또는 냉장된(4 $^{\circ}$ C) WISP(waters) HPLC 자동 인젝터에 곧바로 주입하였다.

올리고뉴클레오타이드 가수분해 양을 모화합물의 소멸 양을 측정 정량적으로 측정해내었다. 올리고뉴클레오타이드들(반응 혼합물로부터 얻어진)을 고정파장디렉터(260nm)와 레코딩 인테그레이터(recording integrator)를 장착한 LKB Ultrachrome GTi dual pump 크로마토그래피 시스템상에서 완충액 A(1mM EDTA ; 15m 소듐포스페이트, pH 8.5)내 평형 균화된 GenPak FAX(Waters) 음이온 교환 칼럼을 이용 분리하였다. 칼럼 온도는 Waters 칼럼 오븐을 사용 60 $^{\circ}$ C로 유지시켰다. 50마이크로리터의 시료 주입량을 사용하였다. 올리고뉴클레오타이드들을 60분간에 걸쳐 완충 B(0.5M NaCl 함유 완충액 A)선 농도기울기 0%에서 100%를 이용 용리시켰다. 완충액 유속은 분당 1ml였다.

태아 송아지 혈청-관련된 엑소뉴클리아제 존재항온 배양(2시간) 뒤, 화합물 7 또는 10의 분해는 전혀 볼 수 없었다(표 5, 주피크의 분해 %를 참조할 것). 유사항온 배양기간동안, 9는 87.0%, 8은 82.1% 각각 잔류하였다. 그에 비해, 올리고머 11은 동일 항온 배양기간후 단지 24.7% 만이 잔류하였다.

[표 5]

샘플	면적 - 주피크	면적 - 주피크	주피크의
ID	/0.0 분	/2.0 시간	분해 %
7	0.2325	0.3663	0.0
9	0.3744	0.3258	13.0
8	0.2164	0.1777	17.9
10	0.3642	0.3697	0.0
11	1.2861	0.3177	75.3

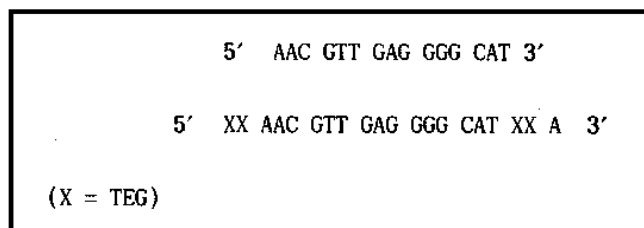
모두 네 개의 TEG-올리고머들이 FCS-관련된 엑소뉴클리아제 가수분해 저항성을 지녔다. 비스-디 TEG-올리고머들(7 및 10)은 완전한 가수분해 저항성을 지니는 듯이 보였다. TEG-유도된 올리고데옥시뉴클레오타이드들은 엑소뉴클리아제 가수분해 저항성과 관련 비수정된 화합물들보다 상당히 더 뛰어난 저항을 보여주었다.

[실시에 41]

[인간 종양 세포(Human Tumor Cell Lines) 내의 단백질 발현 및 성장과 말초혈액 임파세포의 PHA 자극을 억제하는 TEG-안티센스올리고머들의 능력]

이 분야의 전문가들(Heikkila, R. et al., Nature, 328:445-449, 1987)은 c-myc 종양유전자의 개시 코돈 지역(initiation codon region)에 관한 비수정된 안티센스 올리고뉴클레오타이드들이 PHA 자극된 말초혈액임파세포(PBL) 내 c-myc 단백질 발현을 억제, 이 세포의 세포사이클(cell cycle) 중 S-상(S-phase)로의 진입을 차단할 수 있음을 실증한 바 있다. c-myc에 관한 안티센스 DNA는 또한 시험관내에서 HL-60인간 적혈백혈병 세포(erythroleukemia cell)의 성장을 억제하였다(Wickstrom, E. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:1028-1032, 1998). 표 6에 보여진 배열들을 실시에 41a와 41b의 방법으로 제조하고 평가하였다.

[표 6]



41a. PHA 자극된 PBL의 세포 사이클중 S-단계로의 진입에 대한 수정된(TEG로) C-MYC 안티센스 DNA와 비수정된 C-MYC 안티센스 DNA의 영향비교.

인간의 PBL을 표 6의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 배열 존재 또는 부재에서 48시간동안 PHA로 자극하였다. 표준 유동 혈구 계산법(standard flow cytometric technique)을 이용 세포 사이클중 S-단계로 진입한 각 처리구내 세포집단%를 비처리구와 비교하여 결정하였다. 표 7은 이 결과를 보여준다.

[표 7]

올리고뉴클레오타이드	농도 (μM)	대조구 S - 단계 %
무 (無)		100
5' AAC GTT GAG GGG CAT 3'	30	75 \pm 6
	60	9 \pm 10
5' XX AAC GTT GAG GGG CAT XX A 3'	30	80 \pm 4
	60	< 6

상기 데이터는 3' 말단과 5' 말단의 TEG 존재가 안티센스 DNA의 억제효과를 변화시키지는 못함을 보여준다.

41b. MOLT-4 인간 T-세포백혈병 세포내 C-MYC 단백질 발현에 대한 수정된(TEG로) C-MYC 안티센스 DNA와 비-수정된 C-MYC 안티센스 DNA의 영향비교.

지수적으로 비동시 성장(Asynchronous growing)하는 Molt-4 세포들을 $60\mu\text{M}$ c-myc에 관한 안티센스 DNA 존재 또는 부재하에서 8시간동안 배양하였다. 다음엔, 세포들을 S-메티오닌 존재에서 45분동안 항온배양한 뒤, c-myc 항체 이용 방사선 면역침전법을 사용 c-myc 단백질의 함량을 정량적으로 측정하였다. 이 결과를 표 8에 실었다.

[표 8]

올리고뉴클레오타이드	농도 (μM)	감소 % C-MYC 단백질
무 (無)		0
5' AAC GTT GAG GGG CAT 3'	60	61.0 \pm 2.6
5 XX AAC GTT GAG GGG CAT XX A 3'	60	67.9 \pm 0.7

안티센스 DNA 함유 TEG는 비수정된 안티센스 DNA보다 좀더 강력한 효능을 발휘하였다.

41c. 수정된(TEG로) C-MYC 안티센스 DNA와 비수정된 C-MYC 안티센스 DNA의 시험관내 인간 CCRF-CEM T-세포 백혈병 세포성장의 성장억제효과 비교.

지수적으로 비동시 성장하는 CCRF-CEM 세포들을 안티센스 DNA의 존재 또는 부재에서 48시간 동안 배양한

후, 각 처리구내 세포수를 결정하였다. 다음엔, 세포성장을 50%까지 억제하는데 필요로되는 안티센스 DNA의 농도를 결정하였다(IC). 표 5의 수정된 안티센스 DNA와 비수정된 안티센스 DNA는 40 μ m의 대략 동당량(IC) 농도를 보여주었다.

이들 데이터는 안티센스 DNA의 3' 말단과 5' 말단의 TEG 존재가 타겟 핵산과 혼성화, 이 타겟 핵산 기능을 억제하는 이 안티센스 DNA의 능력에 아무런 영향도 미치지 아니한다는 사실을 보여준다.

[실시에 42]

[부가적인 엑소뉴클리아제 안정 올리고뉴클레오타이드들]

표 9의 엑소뉴클리아제 안정 올리고뉴클레오타이드들은 실시예 38의 방법으로 제조하였다.

[표 9]

5'	XX A-ACG-TTG-ACG-CCC-ATX-XA	3'
	XX GGC-DGC-CTC-DGT-CCC-GGC-CCX-XA	
	XX GCG GCG GAG TTA GCG GCG GCG GGX XA	
	XX GGG-GAG-GAG-GGA-GGG-GAG-GGA-XXA	
	XX GCG-GAG-TTG-GGT-GCG-GAG-DGT-XXA	
	AAG GTT GAG GGG CAT XXA	
X	AA-CGT-TGA-GGG-GCA-TTX-A	
XX	TTC-GCT-TAC-CAG-AGT=XXA	
XX	GCG-GGA-GGC-TGC-TGC-AXA	
XX	GGA-GGC-TGC-TGC-AGC-XXA	
XX	CAA-CTT-CAT-AGG-TGA-TTG-CTC-XXA	
AL	CAC-TCC-TTT-ACC-AAG-XXA	
AL	GAA-CGA-TTT-CCT-CAC-XXA	
XX	CTC-ACT-GCC-GCG-CAT-XXA	
XX	GGG-TCT-TGC-GGC-CAT-XXA	
XX	CTC-GAC-CCG-TTC-CAT-XXA	
XX	TGT-AAC-TGC-TAT-AAA-XXA	
XX	CTT-CCT-CCT-CTT-TAA-XXA	
XX	TAC-TTC-CCT-ATA-TTC-XXA	
XX	TAC-TGA-CCT-ATA-TTT-XXA	
XX	TTT-ATA-TTC-ACT-CAT-XXA	
XX	TGG-GGA-GGG-TGG-GCA-GGG-TGG-GGA-AGG-XXA	
XX	CTT-ATA-TTC-CGT-CAT-XXA	
XX	TAA-CCG-CTA-TTC-TCC-XXA	
XX	CCT-CTT-ATC-CGC-AAT-XXA	
XX	TTG-CTC-TCC-TCT-CTC-XXA	
XX	CTG-TCT-CCT-CTC-CTT-XXA	
XX	ATC-TAC-TGG-CTC-CAT-XXA	
XX	TAC-CTC-GGT-CAT-CTA-XXA	
XX	ACA-DCC-AAT-TCT-GAA-ATG-GAX-A	
XX	GGT-AAA-GTC-TTA-ACC-CAC-AXX-A	
XX	TAC-GGG-GAG-TTC-CAA-XXA	
X	는 TEG	

본원 취지 및 범주를 벗어남 없이 많은 수정된 방법들이 본원을 토대로하여 이루어질 수 있으리란 것은 당업계 숙련된 전문가들에게 자명한 것으로 사료된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기식의 3원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 지니는, 약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오지드 배열을 포함하는 화합물:



식중, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH_2 를, R^6 는 하나의 D만이 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 C_1-C_2 알킬을 나타낸다.

청구항 2

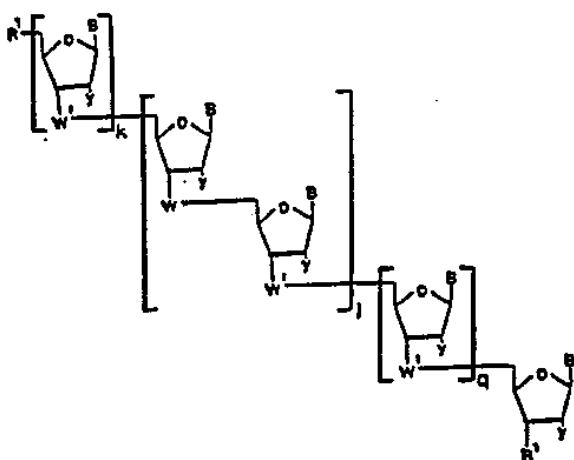
제1항에 있어서, 양말단중 어느 한 말단 또는 양말단 모두에 디올을 지니는 화합물.

청구항 3

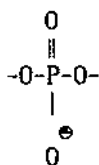
제1항에 있어서, 디올이 테트라에틸렌글리콜 또는 헥사에틸렌글리콜인 화합물.

청구항 4

하기식의 올리고뉴클레오지드 배열을 포함하는 화합물:



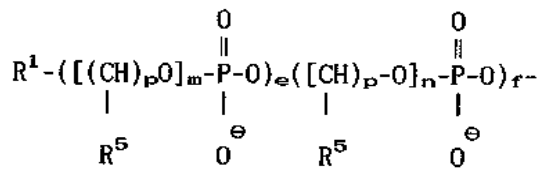
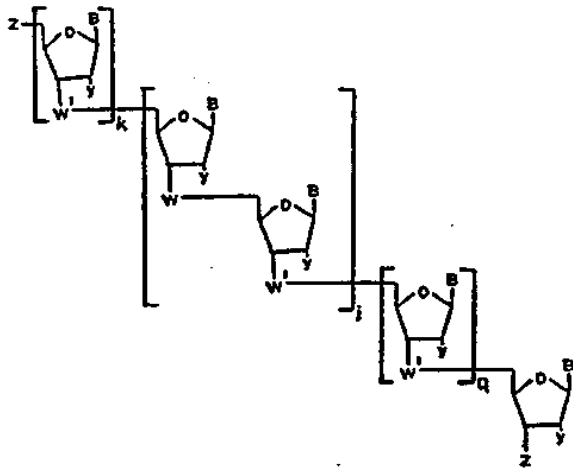
식중, W는 $-D-O-D-$ 를, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH_2 를, R^6 는 하나의 D만이 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 C_1-C_2 알킬을; 각각의 W^1 은 독립하여



W 또는 R^1 를; 각각의 R^1 은 독립하여 OH, SH, NR^2R^3 를, R^2 와 R^3 는 독립하여 수소 또는 C_1-C_6 알킬 또는 NHR^4 를, R^4 는 C_1-C_{12} 알킬을; 각각의 y는 독립하여 수소 또는 OH를; 각각의 B는 독립하여 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이들의 수정체를; j는 1에서 약 200까지의 정수를; k는 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를; 그리고 q는 $j+k+q$ 의 합이 약 4에서 약 200일 것을 조건으로, 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를 나타낸다.

청구항 5

약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는 하기식의 올리고뉴클레오타이드 배열을 포함하는 화합물.



식중, 각각의 Z는 독립하여 R¹ 또는 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}- \\ | \\ \text{O}^- \end{array}$ 를; W는 -D-D-D-를, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR⁶를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH₂를, R⁶는 하나의 D만이

산소 또는 NR⁶일 것을 조건으로 수소 또는 C₁-C₂ 알킬을; 각각의 W¹은 독립하여 W 또는 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}- \\ | \\ \text{O}^- \end{array}$ 를; 각각의 R¹은 독립하여 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을; 각각의 R⁵는 독립하여 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을; 각각의 y는 독립하여 수소 또는 아를; 각각의 B는 독립하여 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이들의 수정체를; e와 f 각각은 독립하여 최소한 e와 f중 하나가 최소한 1일 것을 조건으로 0에서 50을; j는 1에서 약 200까지의 정수를; k는 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를; 그리고 m과 n 각각은 독립하여 1에서 200을; 그리고 각각의 p는 독립하여 2에서 4를 나타낸다. q는 j+k+q의 합이 약 4에서 약 200일 것을 조건으로, 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를 나타낸다.

청구항 6

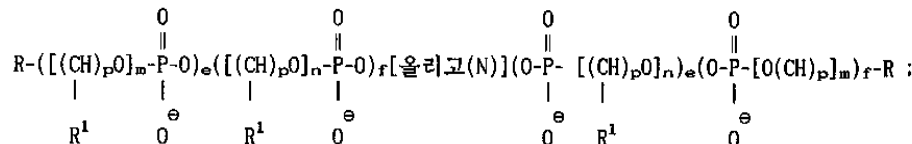
양말단중 어느 한 말단 또는 양말단 모두에 폴리알킬렌글리콜 라디칼을 지니는 약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는 올리고뉴클레오타이드 배열을 포함하는 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, 폴리알킬렌글리콜 라디칼이 헥사에틸렌글리콜 또는 테트라에틸렌글리콜인 화합물.

청구항 8

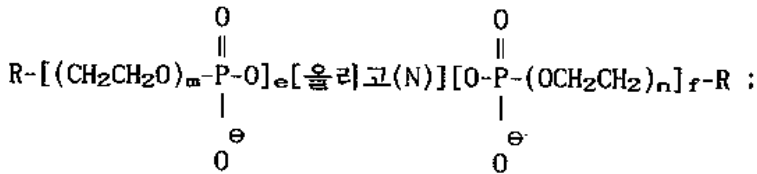
하기식의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물.



식중 R은 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을; R¹은 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을; 올리고(N)은 약 9개에서 약 200개의 염기들로 이루어진 본래의 또는 수정된 올리고뉴클레오타이드 배열을; e와 f 각각은 독립하여 e와 f중 최소한 하나가 최소한 1일 것을 조건으로 0에서 50을; m과 n 각각은 독립하여 1에서 200을; 그리고 각각의 p는 독립하여 2에서 4를 나타낸다.

청구항 9

하기식의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 화합물.



식중, R은 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을; 올리고(N)은 약 9개에서 약 50개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 배열을; e와 f 각각은 독립하여 e와 f중 최소한 하나가 최소한 1일 것을 조건으로 0에서 50을; m과 n 각각은 독립하여 m과 n중 최소한 하나가 1에서 200일 것을 조건으로 0에서 200을 나타낸다.

청구항 10

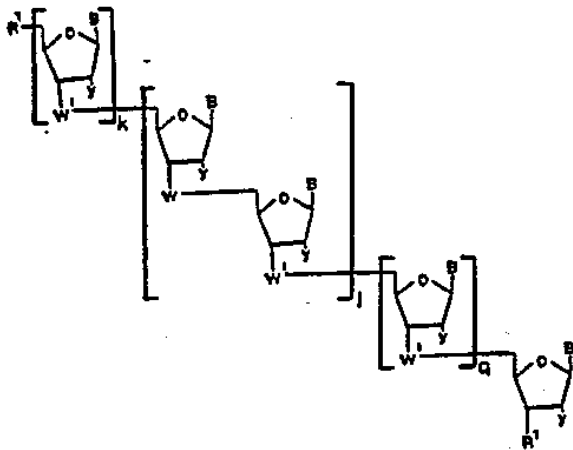
하기식의 3원자 인터뉴클레오타이드 연쇄를 지닌 약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오타이드 배열을 제조하는 단계를 포함하는 화합물들의 뉴클리아제 분해 억제 방법.



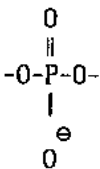
식중 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR⁶를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH₂를, R⁶는 하나의 D만이 산소 또는 NR⁶일 것을 조건으로 수소 또는 C₁-C₁₂ 알킬을 나타낸다.

청구항 11

제10항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드 배열이 하기식을 지니는 방법.



식중, W는 -D-D-D-를, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR⁶를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH₂를, R⁶는 하나의 D만이 산소 또는 NR⁶일 것을 조건으로 수소 또는 C₁-C₂ 알킬을; 각각의 W¹은 독립하여



를; 각각의 R¹은 독립하여 OH, SH, NR²R³를, R²와 R³는 독립하여 수소 또는 C₁-C₆ 알킬 또는 NHR⁴를, R⁴는 C₁-C₁₂ 아실을; 각각의 y는 독립하여 수소 또는 OH를; 각각의 B는 독립하여 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이들의 수정체를; j는 1에서 약 200까지의 정수를; k는 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를; 그리고 q는 j+k+q의 합이 약 4에서 약 200일 것을 조건으로, 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를 나타낸다.

청구항 12

상기 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 배열의 양말단중 어느 한 말단 또는 양말단 모두에 대한 폴리알킬렌글리콜 라디칼 부착을 포함하는 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드를 안정화시키는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 트리틸디올시아노포스핀이 상기 화합물의 5' 말단 보호용으로 사용되는 방법.

청구항 14

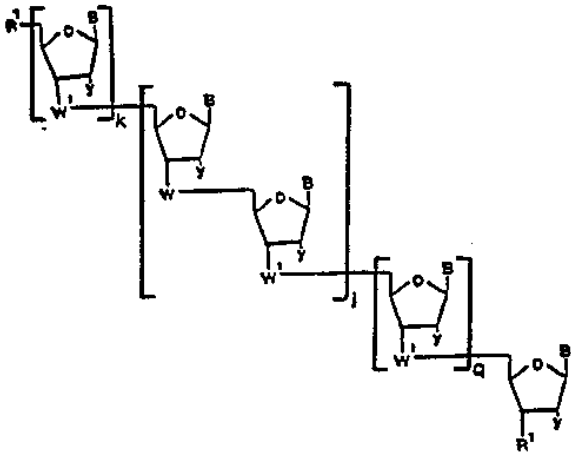
포스페이트를 함유하지 아니하는 하기식의 3원자 인터뉴클레오지드 연쇄를 약 6개에서 약 200개의 염기들로 이루어지는 올리고뉴클레오지드 배열을 포함하는 화합물 및 생리학적으로 용인되는 담체를 포함하는 유전자 발현 억제용으로 유용한 조성물.



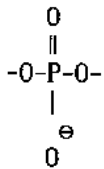
식중, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH_2 를, R^6 는 하나의 D만이 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 C_1-C_2 알킬을 나타낸다.

청구항 15

제14항에 있어서, 올리고뉴클레오지드 배열이 하기식을 지니는 조성물.



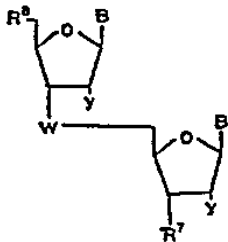
식중, W는 $-D-D-D-$ 를, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는 NH_2 를, R^6 는 하나의 D만이 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 C_1-C_2 알킬을; 각각의 W^1 은 독립하여



를; 각각의 R^1 은 독립하여 OH, SH, NR^2R^3 를, R^2 와 R^3 는 독립하여 수소 또는 C_1-C_6 알킬 또는 NHR^4 를, R^4 는 C_1-C_{12} 아실을; 각각의 y는 독립하여 수소 또는 OH를; 각각의 B는 독립하여 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이들의 수정체를; j는 1에서 약 200까지의 정수를; k는 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를; 그리고 q는 $j+k+q$ 의 합이 약 4에서 약 200일 것을 조건으로, 0 또는 1에서 약 197까지의 정수를 나타낸다.

청구항 16

하기식의 뉴클레오지드 다이머(dimer)를 포함하는 화합물.

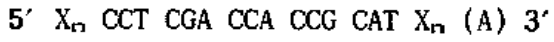


식중, W는 $-D-D-D-$ 를, 각각의 D는 독립하여 CHR, 산소 또는 NR^6 를, R은 독립하여 수소, OH, SH 또는

NH_2 를, R^6 는 하나의 D만이 산소 또는 NR^6 일 것을 조건으로 수소 또는 $\text{C}_1\text{-C}_2$ 알킬을; 각각의 B는 독립하여 아데닌, 시토닌, 구아닌, 티민, 우라실 또는 이들의 수정체들을; R^7 은 OH , t-부틸디메틸실릴옥시 또는 포스포아미다이트를; 그리고 R^8 은 OH , 어떤 보호그룹 또는 t-부틸디메틸실릴옥시를 나타낸다.

청구항 17

하기식의 화합물.



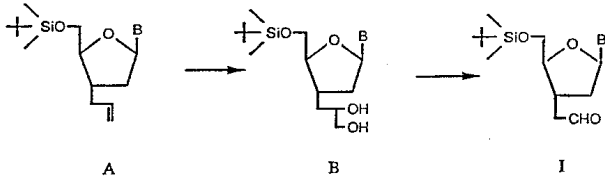
식중, X는 테트라에틸렌글리콜; 그리고 n은 1 또는

2.

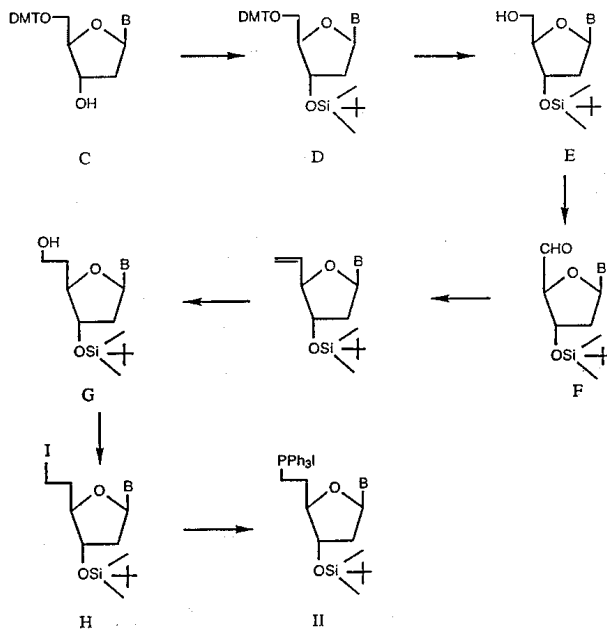
도면

도면1

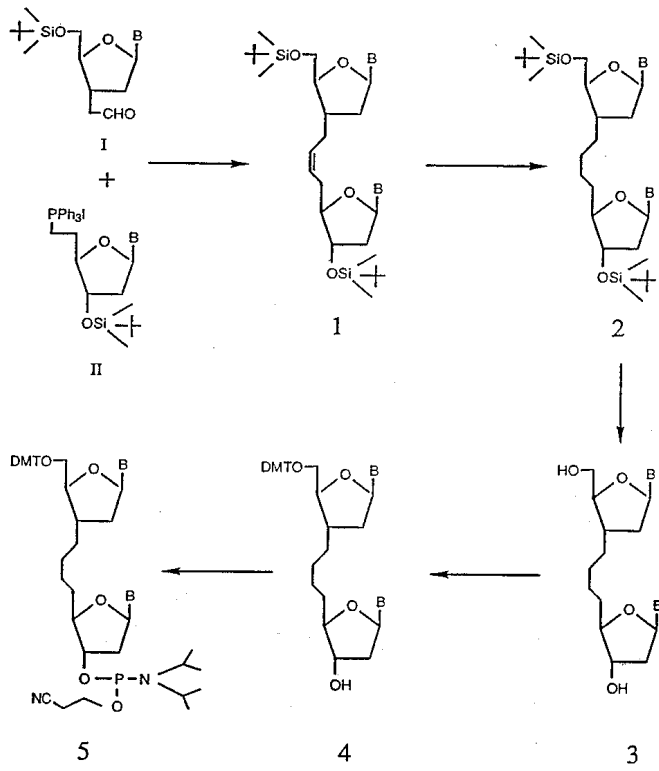
1a



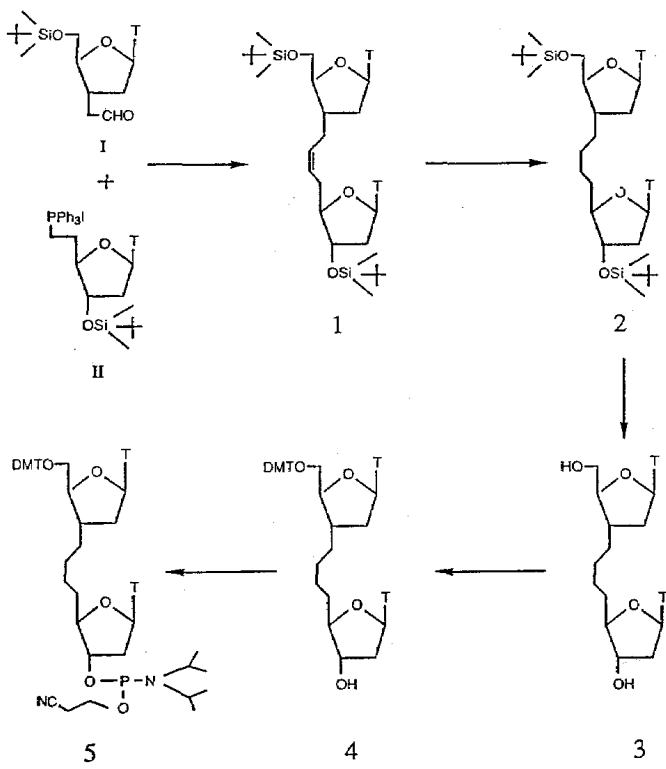
1b



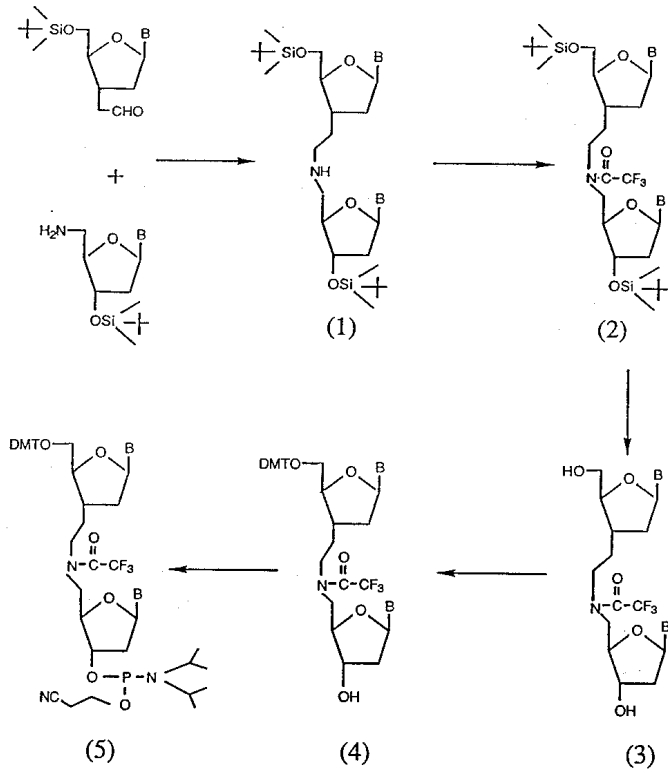
도면2



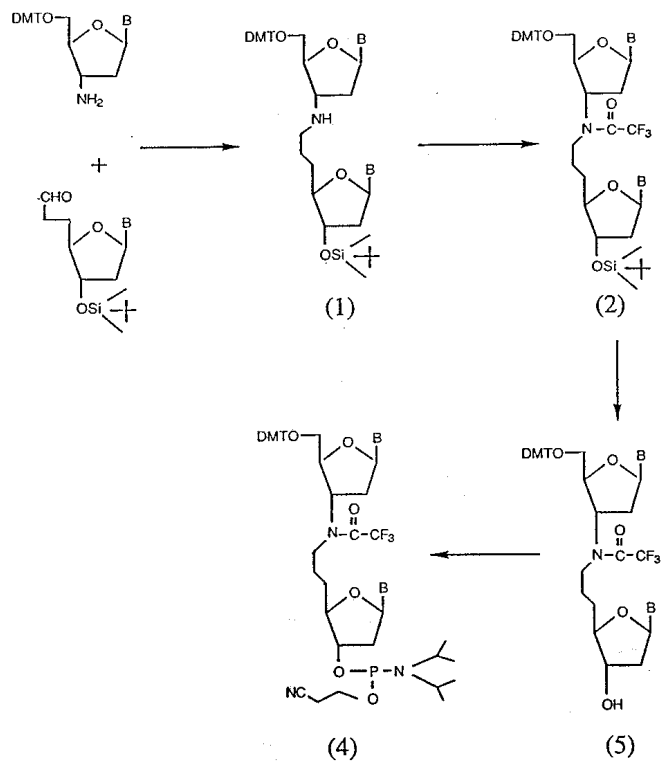
도면3



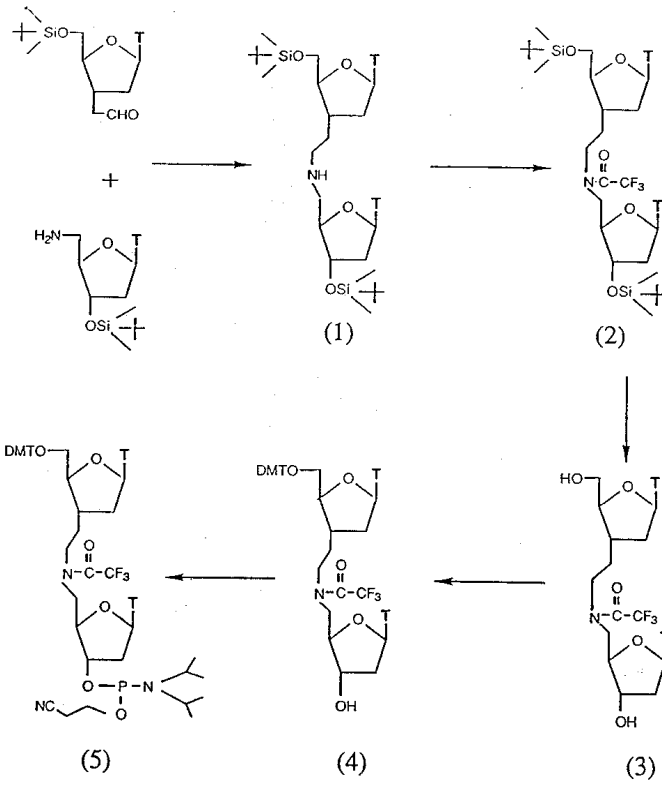
도면4



도면5



도면6



도면7

