

## Oligodeoxyribonucleotide의 화학적 합성 ; Deoxyribonucleoside의 인산화와 이량체 합성 방법의 개선

李相稷<sup>1</sup> · 宋炳洙 · 金鍾大  
영남대학교 이과대학 화학과  
(1986. 5. 15 접수)

### Chemical Synthesis of Oligodeoxyribonucleotide; Improvement of Deoxyribonucleoside Phosphorylation and Dideoxyribonucleotide Synthesis

Sang Jik Lee<sup>1</sup>, Byung Soo Song, and Jong Dae Kim

Department of Chemistry, Yeungnam University, Gyongsan 632, Korea

(Received May 15, 1986)

**요약.** Base의 아미노기와 5'-산소가 아실 및 dimethoxytrityl기로 각각 보호된 deoxyribonucleoside의 3'-산소를 인산화시약인 *o*-chlorophenylphosphoroditriazole과 반응시켜 인산화중간체를 합성함에 있어서 수득률을 증가시킬 수 있는 반응조건을 조사하였다. 이 과정에 주로 이용하고 있는 디옥산단일용매 보다 디옥산에 소량(5%)의 피리딘을 포함시키면 반응속도가 크게 증가하였으며, 단일용매 사용에서의 단점인 부반응도 일어나지 않았다. 인산화방법이 개선되므로 인산화중간체의 합성을 포함한 몇 단계의 반응을 쉽게 수행하여 모두 보호된 이량체를 합성하는 방법을 개발했다. 이렇게 개선된 방법으로 합성한 5종의 이량체들로부터 Hind III 인식자리를 지닌 십이량체를 합성하였다.

**ABSTRACT.** The study was done with a focus on making the optimum condition on phosphorylation of deoxyribonucleoside with *o*-chlorophenylphosphoroditriazole as a phosphorylating agent. The result showed that the addition of 5 volume % pyridine to the dioxane solution accelerated the rate of reaction to a great extent and turned out to nearly quantitative yields on phosphorylation. On the basis of this improvement of optimum reaction conditions, a more efficient method to synthesize all-protected dideoxyribonucleotide from N,5-O-blocked deoxyribonucleoside was developed. The dodecamer with a Hind III recognition site was readily synthesized from five different dimers which were prepared through the newly improved method.

#### 1. 서 론

DNA의 구조가 밝혀지고 DNA복제, RNA로의 전사 및 RNA로부터 단백질이 합성되는 단계가 알려짐에 따라 유전자의 조성 변환과 재조합에 관한 연구도 활발하게 이루어지게 되었다. 또한, 화학자들은 인위적인 특정서열을 지닌 DNA 소량체(oligodeoxyribonucleotide)를 화학적

으로 합성하였으며, 이 합성된 DNA 소량체는 유전자의 구조 확인, 성질의 규명 및 유전자조각의 연구등에 광범위하게 이용되고 있다. DNA 소량체의 화학적 합성은 아미노기와 히드록시기가 적절히 보호된 deoxyribonucleotide들간의 축합반응을 통하여 이루어진다. 50년대초 Khorrana 등에 의하여 최초의 체계적인 합성방법인 'Phosphodiester법'이 개발된<sup>2</sup> 이래 작용기의 적

결합 보호<sup>3</sup>, 강력한 촉합시약의 개발<sup>4</sup>, 정제방법의 개선<sup>5</sup> 및 합성시간의 단축<sup>6</sup>등에 관한 연구가 이루어지고 있다. 진보된 합성방법으로는 용액 반응에 적합한 'Phosphotriester 법'<sup>7</sup>과 별도의 산화과정이 필요하나 촉합시간이 짧은 'Phosphite triester 법'<sup>8</sup>이 있으며, 이들 방법을 응용한 '고체지지체를 이용한 방법'<sup>9</sup>과 'Phosphoramidite 법'<sup>10</sup> 등이 있다.

'Phosphotriester 법'의 초기에 이용한 deoxyribonucleoside의 인산화에는 phenylphosphorodichloridate 또는 phenyldihydrogen phosphate와 같은 반응성이 큰 두 작용기 인산화시약을 이용하였으나, 낮은 수득률과 정제에 따른 어려움이 있었다<sup>11</sup>. 1970년대 중반에 더 효율적인 인산화시약들이 많이 개발되었다. 그 중 단일 작용기 인산화 시약으로는 phenylphosphoramidochloridate<sup>12</sup>, 2-chlorophenyl-2, 2, 2-trichloroethyl phosphorochloridate<sup>13</sup> 및 4-nitrophenyl phenyl phosphorochloridate<sup>11a</sup>을 들 수 있다. 그 후 염소보다 이탈 능력이 약한 azole 유도체를 두 개 결합시킨 두 작용기 인산화시약인 *p*-chlorophenylphosphoroditriazole과 arylphosphorodibenzotriazole 등이 이용되었다<sup>14</sup>. 이 경우 두 개의 azole이 결합되어 있지만 약한 반응성 때문에 대칭 이량체는 거의 형성되지 않으나 반응성이 약함으로 인하여 과량의 인산화시약을 사용하여야 되는 단점을 지니고 있다. 또한 인산화반응의 효율을 높이기 위하여 methylimidazole과 methylimidazole 등의 촉매를 이용한 방법도 보고되었다<sup>15</sup>.

현재 널리 이용되고 있는 모두 보호된 단량체의 합성은 별도의 촉매없이 인산화시약인 *p*-chlorophenylditriazolylphosphate<sup>14, 16</sup>, *o*-chlorophenyl-0, 0-bis(1-benzotriazolyl)phosphate<sup>17</sup> 및 *o*-chlorophenylethyltriazolylphosphate 등을 사용하여 nucleoside의 3'-산소에 인산기가 결합된 인산화중간체를 만들고 별도의 알코올계와 반응시키는 과정을 거친다<sup>18</sup>. 모두 보호된 단량체를 합성하는 이들 방법들은 낮은 수득률, 까다로운 반응조건등으로 소량체합성과정 중 개선의 여지가 많은 부분이며 현재 많이 연구되고 있는 분

야이다.

본 연구에서는 Phosphotriester 법의 용액 반응으로써 소량체 DNA를 쉽게 합성할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 deoxynucleoside의 인산화 방법개선과 모두 보호된 이량체를 쉽게 합성할 수 있는 방법의 조사에 중점을 두었다. 이들 자료를 이용하여 Hind III 인식자리를 지닌 십이량체 (dodecadeoxyribonucleotide, TTT-AAGCTTAAAp)의 합성을 용이하게 수행하였다.

## 2. 실험

### A. 시약 및 기기

아미노기가 보호된 deoxyribonucleoside (N-benzoyldeoxyadenosine, N-benzoyldeoxycytidine, N-isobutyryldeoxyguanosine)과 thymidine (Sigma) 및 이와 관련된 합성물은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며, 피리딘은 *p*-toluenesulfonylchloride를 넣어 증류한 다음 수산화칼륨을 넣고 2시간 환류시켜 재증류한 후 분자체 4A에 넣어 질소기체를 충전하여 두었다가 사용하였고, 디옥산은 나트륨으로 탈수하고 증류한 후 피리딘과 같은 방법으로 보관하였다. 유리기구는 가열건조 후 질소기류하에 보관하였으며, 시약의 칭량은 제습실에서 행하였다. tlc는 실리카겔 (60G 또는 5553, Merck)을 흡착제로, 10% 메탄올/클로로포름을 전개용매로, 65% 과염소산:에탄올(3:2, v/v)을 발색제로 사용하였다. hplc에는 Radial-Pak ODS 관(Waters)과 1.5~5.5% 아세트나이트릴/0.1~0.2M 아세트산암모늄수용액을 용매로 사용하였으며, 280nm의 흡광도로 물질을 검출하였다. 생성물의 확인에는 UV(Hitachi 350)/IR(Perkin Elmer 1320) 분광광도계와 포름산 가수분해 후 염기조성의 정량 및 화학적 방법을 이용하였다.

### B. 정량

미량의 deoxyribonucleotide의 경우 1~5ml의 클로로포름에 녹이고 10 $\mu\text{l}$ 를 취하여 2ml의 메탄올에 다시 녹여 측정할 흡광도를 N-blocked deoxyribonucleosides(dT, dA<sub>Bz</sub>, dC<sub>Bz</sub>, dG<sub>Bz</sub>: 260nm에서 90, 118, 208, 161( $\times 100$  OD); 280

nm에서 60, 200, 78, 119( $\times 100$  OD))와 N, 5'-O-blocked deoxyribonucleosides(DMTrdT, DMTrdA', DMTrdC', DMTrdG' : 260nm에서 87, 127, 204, 146( $\times 100$  OD) ; 280nm에서 73, 205, 92, 114( $\times 100$  OD))의 흡광계수<sup>19</sup>(일부는 수정되었음)와 비교하여 정량하였다.

### C. 활성화된 단량체(monodeoxyribonucleotide)의 합성

(1) 5'-OH nucleotide[N-blocked deoxynucleoside-3'-(2-chlorophenyl, 2-cyanoethyl) phosphate]의 합성 : 0.30g(4.35mmol)의 (1H)-1, 2, 4-triazole을 밀폐여과장치가 부착된 50ml들이 플라스크에 넣고 3ml 디옥산을 가하고 동결건조시키는 과정을 두 번 거친 다음 다시 15ml의 피리딘을 가하고 10°C로 유지시켰다. 여기에 0.515g(2.10mmol)의 *o*-chlorophenylphosphorodichloridate와 0.50g(4.95mmol)의 무수 트리에틸아민을 넣은 다음 10°C에서 2시간 저어주었다. 생성된 트리에틸아민 염산염을 질소압력으로 여과하고 여액이 5ml 되게 동결 농축시킨 다음 디옥산을 가하여 0.25M의 *o*-chlorophenylphosphorodi-1, 2, 4-triazolide(CPPDT)/디옥산 용액이 되게 한 후 0°C가 되게 하였다. 이 용액(인산화시약) 500 $\mu$ l에 별도로 준비한 500 $\mu$ l(0.20M, 0.01mmol)의 N, 5'-O-blocked deoxynucleoside/디옥산 : 피리딘(90 : 10, v/v)용액을 격막을 통하여 가하고 0°C에서 30분 저은 후 tlc(Rf 값 감소)로 인산화 중간체 생성을 확인하였다. 0.0162g(0.20mmol)의 2-cyanoethanol을 가하고 10°C에서 2시간 다시 저은 후 tlc로 모두 보호된 nucleotide 생성을 확인하고 동결건조시켰다. 여기에 별도로 준비한 2% 벤젠술폰산(BSA)/에탄올 : 클로로포름(3 : 2, v/v) 용액(0°C) 8ml를 가하고 0°C에서 10분 저어주었다. 반응물을 분액깔대기에 옮기고 5ml의 5% 중탄산나트륨 수용액으로 극성분출물을 추출 제거하고 5ml의 물로 씻어 주었다. 소량의 무수 황산나트륨으로 유기층을 탈수하고 감압농축한 후 5~10ml의 에틸에테르 : *n*-헥산(1 : 9, v/v)으로 DMTr 유도체를 용출 제거 하였다(수득률 : Tp=91%, Ap=83%, Cp=88%, Gp=82%, 물리적 성질은 앞

보고<sup>20</sup>와 같음).

(2) 모두 보호된 이량체(dideoxyribonucleotide)의 합성 : 0.1mmol의 N, 5'-O-blocked deoxyribonucleoside에 2ml의 디옥산을 가하고 동결건조시킨 다음 500 $\mu$ l의 디옥산-피리딘(90 : 10, v/v)용액을 격막을 통하여 가하였다. (1)항의 앞 부분과 같이 준비한 인산화시약(CPPDT)용액 500 $\mu$ l(0.2M)을 가하고 0°C에서 30분 저어 주었다(tlc 확인). 여기에 120 $\mu$ l의 트리에틸아민-물(3 : 1, v/v)을 가하고 10°C에서 10분 저어 주었다. 진공펌프로 용매를 휘발시킨 다음 2ml의 피리딘을 가하고 다시 감압휘발시켜 수분을 제거하였다. 별도로 준비한 5'-OH function(1항 참고)을 0.1mmol을 합한 다음 다시 2ml의 피리딘으로 수분을 제거하고 2ml의 피리딘을 가하여 녹였다. 0.119g(0.4mmol)의 mesitylenesulfonylnitrotriazole(MSNT)을 급히 가하고 실온에서 2.5시간 저어 주었다. tlc(Rf 값 증가)로 반응정도를 확인한 다음 200 $\mu$ l의 물을 가하여 잔여하는 MSNT를 분해시켰다. 감압농축 후 tlc에 의한 분리를 행하였다(수득률은 Table 1, 물리적 성질은 Table 2 참조).

### D. 십이량체(dodecadeoxyribonucleotide)의 합성

(1) 활성화된 사량체 및 육량체의 합성 : Cyanoethyl기와 DMTr기를 제거한 활성화된 deoxyribonucleotide를 각각 0.055mmol과 0.045mmol을 15ml들이 플라스크에 넣은 다음 1ml의 피리딘을 가하고 동결건조시키는 과정을 두 번 거쳤다. 여기에 1ml의 피리딘을 가하여 녹이고 0.59g(0.2mmol)의 MSNT를 가한 다음 tlc로 반응정도를 확인(Rf 값 증가)하면서 10°C에서 2시간 저어 주었다. 100 $\mu$ l의 물을 가하여 MSNT를 분해시킨 다음 동결건조시켰다. 별도의 정제과정없이 DMTr 제거반응 및 정제를 행하였다(물리적 성질과 수득률은 Table 2 참조).

(2) 모두 보호된 십이량체의 합성 : Cyanoethyl기만 제거한 육량체(DMTrdT<sub>p</sub>T<sub>p</sub>T<sub>p</sub>A<sub>p</sub>'A<sub>p</sub>'G<sub>p</sub>') 713 OD(109 $\mu$ mol)와 DMTr만 제거한 육량체(dC<sub>p</sub>'T<sub>p</sub>T<sub>p</sub>A<sub>p</sub>'A<sub>p</sub>'A<sub>p</sub>') 798 OD(10 $\mu$ mol)를 합하고 250 $\mu$ l의 피리딘으로 동결건조시키는 과정을

두 번 거친 다음 250 $\mu$ l의 피리딘을 가하여 다시 녹였다. 10°C로 유지시킨 다음 0.012g(40 $\mu$ mol)의 MSNT를 가하고 tlc로 반응정도를 확인하면서 실온에서 2시간 저어주었다. 15 $\mu$ l의 물을 가하여 MSNT를 분해시킨 다음 일반적인 방법으로 추출, 건조, 농축 후 tlc로 분리하여 UV-정량을 시행(1026 OD, 6.8 $\mu$ mol, 수득률 68%)하였다(확인은 결과 및 고찰 참조).

(3) 보호기의 완전 제거 : DMTr기를 제거한 5 $\mu$ mol의 deoxyribonucleotide를 10ml들이 플라스크에 넣고 1.5ml의 30% 암모니아수 : 피리딘 (9 : 1, v/v)을 가한 다음 마개를 단단히 한 후 50°C에서 6시간 저어 주었다(10% 메탄올/클로로포름 tlc ; Rf 0.00). 진공펌프로 용매를 휘발시키고 2ml의 에틸에테르로 용출시키는 과정을 두 번 거친 다음 5시간 동결 건조하였다.

#### E. 소량체의 조성 분석

Fritz 등의 방법<sup>21</sup>에 따라 합성단계에 수반되는 소량체들의 염기조성을 확인함으로써 십이량체의 서열을 확인하였다. 약 20 OD(280nm)정도의 소량체를 (0.1M TEAB 수용액에 용해시켜서 정량) 2ml들이 시험관에 넣고 감압-농축시킨 다음 10 $\mu$ l의 물과 200 $\mu$ l의 88% 포름산을 넣은 후 마개를 단단히 하였다. 시험관을 170°C의 기름증탕에 30분 동안 방치하여 N-글리코시드결합을 가수분해시켰다. 실온이 되게 한 후 -70°C에서 얼린 다음 동결 건조하였다. 이것을 1.5% 아세트니트릴/0.1M 아세트산암모늄에 녹이고 hplc를 시행하였다(결과 및 고찰 참조).

### 3. 결과 및 고찰

5'-산소가 dimethoxytrityl(DMTr)기로 보호된 4종의 deoxyribonucleoside를 base의 아미노기만 아실로 보호된<sup>22</sup> 3종의 deoxyribonucleoside(dA<sup>Bz</sup>, dC<sup>Bz</sup>, dG<sup>Ibu</sup>)와 thymidine(T)로부터 합성하여<sup>18</sup> 인산화 반응에 이용하였다.

인산화 반응 ; *o*-Chlorophenylphosphoroditriazole(CPPDT)으로써 N, 5'-O-blocked deoxyribonucleoside(DMTrdT, DMTrdA', DMTrdC' 및 DMTrdG')의 3'-산소를 인산화시킴에 있어서 파라염화페닐 치환체 인산화시약을 사용한 Narang

의 방법<sup>18</sup>을 개선하여 쉽게 높은 수득률로 인산화중간체를 합성하였다. 그의 방법에 따라 디옥산 반응용매하에서 합성한 인산화 시약인 *o*-chlorophenylphosphoroditriazole(CPPDT)로 DMTrdT의 3'-산소를 인산화시켜 본 결과 70% 이하의 수득률을 나타내었으며, 이와 같이 수득률이 낮은 가장 큰 원인이 반응계의 산성도 (pH 약 4.5)에 기인한 5'-산소 보호기인 DMTr의 불필요한 이탈임을 알 수 있었다. Deoxyribonucleoside의 인산화과정에서 이와같은 반응계의 산성에 기인한 생성물의 분해를 감소시킬 목적으로 염기성 용매인 피리딘을 소량 가한 결과 수득률이 증가되었을 뿐 아니라 반응시간도 크게 단축되었다. 피리딘의 이와 같은 역할과 최적 반응조건을 조사하기 위하여 몇가지 다른 조건에서 인산화 중간체의 생성정도를 측정하고 각 조건에 따른 차이를 비교하였다. 미리 준비한 0.20M N, 5'-O-blocked deoxyribonucleoside/디옥산 : 피리딘 (100 : 0, 90 : 10 또는 0 : 100, v/v) 용액 100 $\mu$ l를 0~10°C로 하여 0.25M의 CPPDT/디옥산 용액 100 $\mu$ l와 반응시키고 특정 시간마다 10 $\mu$ l를 취하여 2ml의 hplc시행 용매에 녹이고 280nm에서 인산화중간체의 생성정도를 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 일반적으로 이용하는 디옥산용매만 사용한 경우 4종의 nucleoside 모두 반응속도가 늦을 뿐 아니라 되고 수득률도 75% 이하로서 낮음을 알 수 있었다.

그러나 소량(5%)의 피리딘을 포함한 디옥산을 반응용매로 사용한 경우, DMTrG'를 제외한 3종의 nucleoside는 0°C에서 40분 반응시키면 95% 인산화중간체가 생성되었음을 알 수 있었다. 이와 같이 소량의 피리딘을 포함한 반응계가 디옥산만 사용한 경우보다 반응속도가 크게 증가되었음은 피리딘이 nucleoside의 3'-산소에 결합된 수소와의 수소결합 또는 이와 유사한 결합을 형성함으로써 산소의 O-H결합간의 극성을 증가시켜서 산소의 친핵성 공격 능력을 증가시켰기 때문이며, 최고 수득률이 크게 증가되었음은 피리딘에 의하여 반응계의 산성도가 감소(pH 약 4.5에서 6.5로)되어 DMTr기의 이

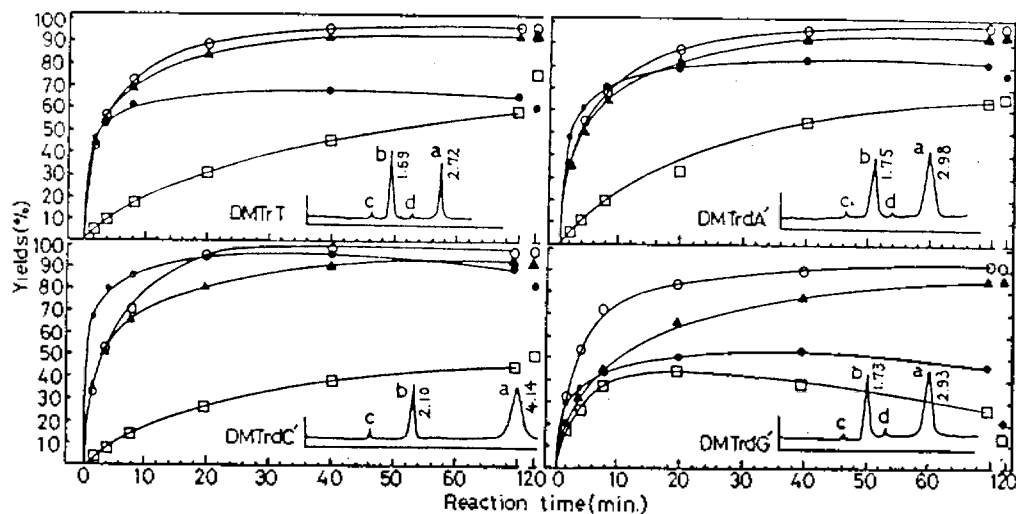


Fig. 1. Yields vs time profiles of N,5'-O-blocked deoxyribonucleoside phosphorylation in various combinations of reaction temperature and medium;  $\square$ — $10^{\circ}\text{C}$ -dioxane,  $\blacktriangle$ — $10^{\circ}\text{C}$ -5% pyridine/dioxane,  $\circ$ — $0^{\circ}\text{C}$ -5% pyridine/dioxane,  $\bullet$ — $0^{\circ}\text{C}$ -50% pyridine/dioxane. Yields were quantified with hplc (Radial Pak ODS, 280nm, 2ml/min., 55%  $\text{CH}_3\text{CN}/0.2\text{M}$  aq  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , a, b, c and d represent N,5'-O-blocked deoxyribonucleoside, product, CPPDT, and solvent respectively).

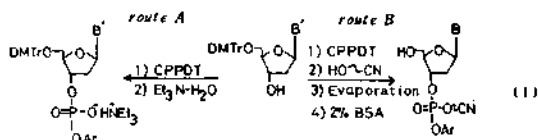
탈을 감소시켰기 때문이라 생각된다. 이와 같은 피리딘의 역할은 다른 인산화 시약을 이용한 반응에서의 보고된 촉매인 1-methylimidazole<sup>23</sup>, 1-ethyl-2-methyl-5-chloroimidazole<sup>24</sup>, 및 4-N, N-dimethylaminopyridine<sup>25</sup>의 결결인 인산기보호로 이용한 시야노에틸기의 이탈과 같은 생성물의 분해를 일으키지 않음을 알 수 있었다. 한편 과량의 50%의 피리딘을 포함시키면 초기 반응속도는 증가하였으나 DMTrC'를 제외한 경우 120분 후 수득률은 5% 피리딘을 포함했을 때보다 15% 이상 감소됨을 알 수 있다. 가장 불안정하다고 알려진 guanosine의 경우의 경우 22%로 감소폭이 가장 크게 나타났다. 이와같은 현상은 3'-산소가 인(P)에 공격할 경우 triazole이 쉽게 이탈되어야 하는데, 과량의 피리딘이 이탈체로서 능력이 그리 크지 않은 triazole의 이탈을 저해시키게 되며, 이로 인한 반응시간 지연으로 인하여 base의 변형과 같은 부반응을 유발한다는 Broka 등의 제안과<sup>26</sup> 일치한다고 생각된다. 또 피리딘이 인산화 시약과의 약한 결합을 하여 nucleoside의 산소 공격시 입체장애 요인으로 작용함도 관제할 것이라 추정할 수 있다. 한편 CPPDT/더옥산용액에 먼저 넣고 10분

정도 방치한 후 반응에 이용하면 반응속도가 급격히 감소된다는 사실과 5% 피리딘/더옥산용액의  $0^{\circ}\text{C}$  반응이  $10^{\circ}\text{C}$ 보다 초기 반응속도가 오히려 증가되며  $10^{\circ}\text{C}$  반응의 수득률이 시간이 지남에 따라  $0^{\circ}\text{C}$  반응과 비슷하게(회복)됨을 알 수 있었다. 이는 관련물질의 안정도등이 관여할 것으로 생각되며, 본 연구에서는 최적반응조건 확립에 목적을 두고 있기 때문에 이에 대한 종합적인 연구는 하지 않았다.

이량체의 합성; Deoxynucleoside의 인산화반응에 대한 대부분의 보고는 인산화중간체의 수득률을 증가하기 위하여 과량의 인산화시약을 사용하고 있다.<sup>27</sup> 이 경우 촉합반응에 직접 이용할 활성화된 단량체인 phosphodiester nucleotide를 만들기 전에 과량 사용한 인산화시약을 완전히 제거하여야 한다. 완전 제거가 이루어지지 않으면 과량의 인산화시약에 의하여 5'-OH nucleotide의 불필요한 소모가 일어난다. 이러한 이유때문에 이미 보고된 방법에서는 인산화중간체로부터 과량의 인산화시약 제거가 용이한 모두 보호된 단량체의 합성단계를 거친 다음 phosphodiester nucleotide를 만들고 있다.<sup>18</sup>

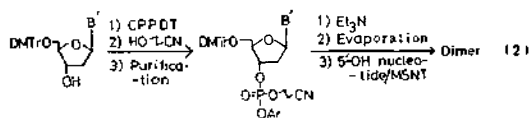
본 연구에서는, 5% 피리딘/더옥산을 반응용

매로 할 경우 deoxyribonucleoside에 대하여 1.1 배물 과량의 인산화시약만 가하여도 거의 정량적으로 인산화 중간체가 얻어짐에 따라 모두 보호된 단량체의 합성과정을 거친 다음 활성화된 단량체를 합성하는 기존의 방법을 거치지 않고 단일용기내에서 인산화중간체에 트리에틸아민 : 물(3 : 1, v/v)만 가하여 축합반응에 바로 이용할 수 있는 diester nucleotide를 쉽게 만들 수 있었다(식 1, 경로 A). 그 결과를 Table 1에 나타내었으며, 4종의 deoxyribonucleoside 모두 85% 이상의 최고수득률을 얻을 수 있었다.

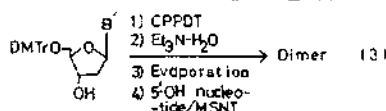


축합반응에 직접 이용할 수 있는 활성화된 단량체인 5'-OH nucleotide도 단일용기 내에서 간편한 방법으로 합성하였다. 앞에 논의한 방법에 의해 합성한 인산화 중간체에 1.9 배물의 2-시아노에탄올을 가하여 인산화 중간체를 완전히 반응시켜 모두 보호된 단량체를 만들고 과량으로 사용한 2-시아노에탄올과 용매를 감압 휘발시킨 다음 별도의 정제과정없이 2% BSA 용액을 가하여 DMTr기를 제거하였다. 그 결과 5'-OH nucleotide를 90% 이상의 수득률로 얻을 수 있었다(식 1, 경로 B, Table 1).

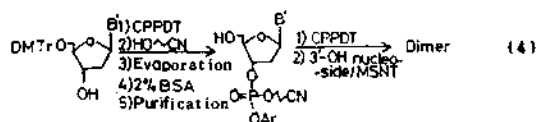
활성화된 단량체를 간편하게 합성할 수 있으므로 모두 보호된 이량체까지도 더 쉽게 합성할 수 있는 방법을 고안할 수 있었다. 이량체합성에 주로 이용하고 있는 방법은 부분적으로 보호된 deoxyribonucleoside에 인산화 시약을 가하고 일정 시간 후 2-시아노에탄올을 가하여 모두 보호된 단량체를 만든 후 정제 과정을 거친 다음 5'-OH nucleotide를 축합시약과 함께 가하는 과정을 거친다. 이량체합성의 새로운 방법과 비교하기 위하여 이 과정을 경로 C(식 2)라 칭하였으며, Fig. 2의 단계 i, ii, iii, viii을 거친다.



다음은 활성화된 단량체를 직접 합성하는 경로 A를 이용하여 이량체를 합성하는 방법으로 경로 A에 의해 합성한 phosphodiester nucleotide에 같은 물비의 5'-OH nucleotide를 과량의 MSNT로 축합시켜 이량체를 합성하는 과정을 거친다. 이 과정을 경로 D(식 3)라 칭하였으며, Fig. 2의 단계 i, v, viii을 거친다.



다음은 앞의 경로와는 근본적으로 달리 이량체를 합성하는 방법으로서 경로 B를 거쳐 합성한 5'-OH의 5'-산소에 인산기를 도입시켜서(실험난의 인산화 중간체합성 참고) 이인산유도체를 만들고 이를 축합시약(MSNT)을 사용하여 N, 5'-O-blocked deoxyribonucleoside(I)와 축합시켜 이량체를 합성



하는 단축된 경로(경로 E, 식 4)이며, Fig. 2의 단계 i, vi, vii, ix를 거친다.

DMTrdT<sub>2</sub>T<sub>2</sub> 이량체 합성의 경우를 예로하여 경로 C, D 및 E의 효율성을 비교하면 다음과 같다. 경로 D의 경우 경로 C와는 달리 모두 보호된 단량체(III) 합성 단계를 거치지 않으므로 2-시아노에탄올을 사용하는 단계를 줄일 수 있었다. 특히 모두 보호된 단량체 합성 후 수반되는 손실을 줄일 수 있으므로 경로 C보다 10% 이상의 수득률을 증가(86%)시킬 수 있었다. 경로

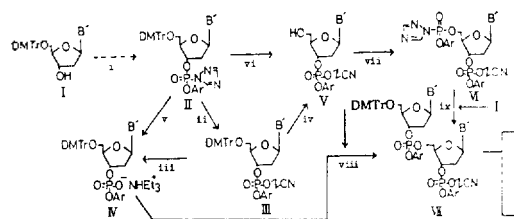


Fig. 2. Synthetic routes of all-protected dideoxyribonucleotides. B' is thymine(T), N-benzoyladenine(A'), N-benzoylcytine(C') or Nisobutyrylguanine(G'). DMTr and Ar are abbreviations for di-*p*-methoxytrityl and *o*-chlorophenyl respectively.

Table 1. Yields of the activated monodeoxyribonucleotides and the all-protected dideoxyribonucleotides in various reaction routes

Routes <sup>a</sup>	"I"	Compounds mole ratio(M) <sup>b</sup>			"C"	Products <sup>c</sup>	Yield (%) <sup>d</sup>
		"IV"	"V"	"VI"			
A (i, v)	0.1				0.1	DMTrdT-CP	>90
A	0.1				0.1	DMTrdA-CP	>90
A	0.1				0.1	DMTrdC-CP	87
A	0.1				0.1	DMTrdG-CP	85
B (i, vi)	0.1				0.14	dT≠CE	>90
B	0.1				0.14	dA≠CE	>90
B	0.1				0.14	dC≠CE	>90
B	0.1				0.14	dG≠CE	>90
C (i, ii, iii, viii)		0.1	0.1		0.11	DMTrdT≠T≠CE	73
C (i, v, viii)		0.1	0.1		0.11	DMTrdT≠T≠CE	86(75)
E (i, vi, vii, ix)	0.1			0.1	0.11	DMTrdT≠T≠CE	35
E	0.15			0.1	0.11	DMTrdT≠T≠CE	47
E	0.2			0.1	0.11	DMTrdT≠T≠CE	55
D		0.1	0.1		0.11	DMTrdT≠A≠CE	81(74)
D		0.1	0.1		0.11	DMTrdA≠G≠CE	65(51)
D		0.1	0.1		0.11	DMTrdC≠T≠CE	76(68)
D		0.1	0.1		0.11	DMTrdA≠A≠CE	72(64)

<sup>a,b</sup> Abbreviated letters refer to Fig.2. and C is CPPCT. <sup>c</sup>Abbreviations are as suggested by IUPAC-IBU.<sup>30</sup> - ; phosphodiester linkage, ≠; phosphotriester linkage, CP; chlorophenyl, CE; 2-cyanoethyl group, DMTr; di-*p*-methoxytrityl group. <sup>d</sup>Yields are quantified with hplc(some conditions were as those of Fig.1) and values in parenthesis are isolated ones.

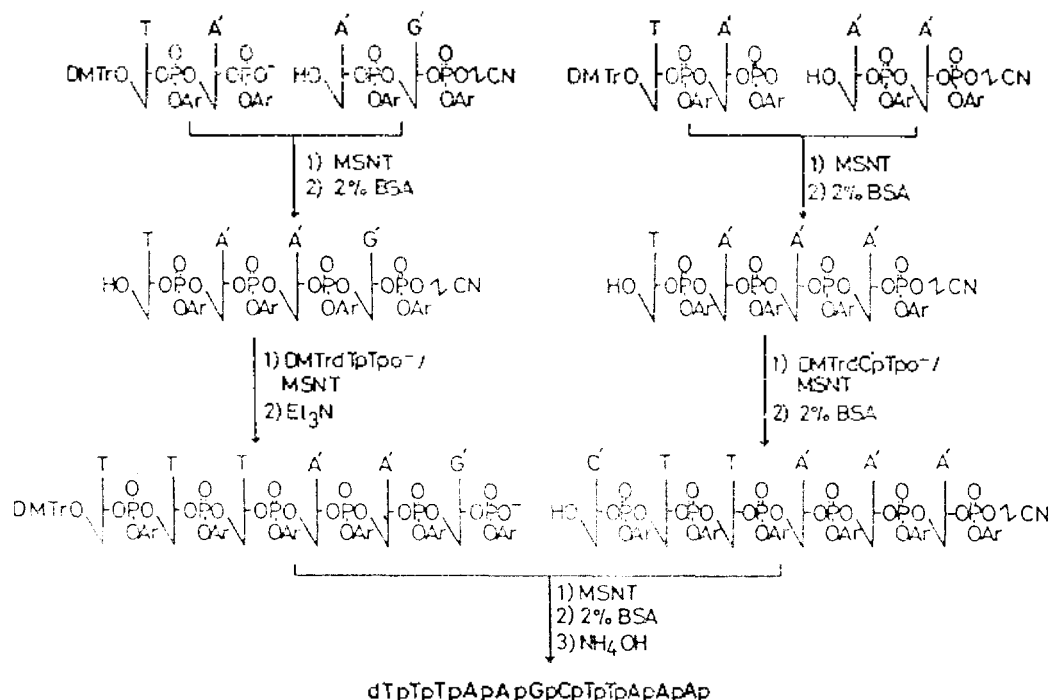


Fig.3. Synthetic routes of dodecadeoxyribonucleotide.

E에서 출발물질인 deoxynucleoside (I)를 최종 단계인 축합반응에 직접 이용할 수 있으므로 이량체합성까지의 단계를 크게 줄일 수 있었다. 그러나 이인산유도체(6)의 5'-P에 친핵공격하는 단계에서의 입체장애와 triazole의 약한 이탈능력 등으로 인하여 deoxynucleoside (I)의 3'-산소의 친핵공격이 잘 안되는 결점이 있다. 두 반응물을 같은 몰비로 반응하여도 이량체가 35% 정도 밖에 생성되지 않을 뿐 아니라 deoxynucleoside(I)를 이인산유도체보다 2배물 과량 사용한 경우에도 55%정도 밖에 생성되지 않았다. 또한 반응물(deoxynucleoside, I)과 생성물(이량체, VII)간의 크로마토그래피적인 성질이 비슷함으로 분리에도 많은 어려움이 있다.

이량체를 쉽게 합성하는 보고된 방법 중 Reese 등의 방법<sup>28</sup>은 인산화 시약으로 arylphosphorodichloride를 사용하여 nucleoside의 3'-산소를 인산화하고 이를 축합하여 5'-OH nucleotide와 반응시키는 과정을 거친다. 그러나 인산화시약의 반응성이 너무 세므로 대칭 이량체의 생성과

van Boom 등이 보고한 바와 같은 축합시약에 의한 5'-산소의 술폰화때문에 이용되지 않고 있다. 이 외에도 N,5'-O-blocked deoxyribonucleoside로부터 이량체를 직접 합성하는 방법도 보고되고 있으나<sup>28</sup> nucleoside의 인산화과정의 어려움때문에 현재 이용되지 않고 있다.<sup>29</sup> 따라서 이량체 합성방법 중 단일용기내에서 합성이 가능하고 정제 단계도 줄일 수 있는 경로 D가 더 효율적인 방법으로 나타났다. 따라서 본 연구는 이 방법(경로 D)을 수종의 이량체 합성에 이용하였다.

소량체 합성 : 앞에서 논의한 경로 D의 방법으로 합성한 5종의 이량체를 출발물질로하여 이량체와 육량체 단위 축합반응을 혼합하여 Hind III 인식자리를 지닌 십이량체를 합성하였다 (Fig.3와 Table 2). 합성과정에서의 DMTr과 시아노에틸기의 선택제거와 축합과정은 앞 보고에서와 같이 시행하였다.<sup>20</sup>

Guanine base를 포함하지 않은 deoxynucleotide 간의 축합반응에서 tlc-UV 로써 반응정도를

Table 2. Spectral and chromatographic properties of protected oligodeoxyribonucleotides

Compounds <sup>a</sup>	$\lambda_{max}^{CH_3OH}$ <sup>b</sup>	$\lambda_{min}^{CH_3OH}$ <sup>b</sup>	$\epsilon_{280}/\epsilon_{260}$	Hplc <sup>d</sup> (min.)	Tlc <sup>e</sup> (Rf)	Isolated yields <sup>f</sup> (%)
DMTrdT $\mp$ T $\mp$ CE	265, 237	251	0.75(0.75) <sup>c</sup>	1.78	0.60	
DMTrdT $\mp$ A $\mp$ CE	276, 234	254	1.10(1.37)	1.86	0.58	
DMTrdA $\mp$ G $\mp$ CE	281, 277, 234	266, 256	1.14(1.13)	2.12	0.50, 0.44	
DMTrdC $\mp$ T $\mp$ CE	260, 237, 304	247, 292	0.45(0.52)	1.72	0.61	
DMTrdA $\mp$ A $\mp$ CE	281, 234	257	1.55(1.68)	1.90	0.59	
dA $\mp$ G $\mp$ CE	281, 274, 260	256	1.13(1.14)		0.31, 0.37	>90
dA $\mp$ A $\mp$ CE	281, 275	258	1.32(1.69)		0.46	>90
DMTrdT $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ G $\mp$ CE	275, 256	252	1.14(1.22)	2.18	0.31, 0.38	73
DMTrdT $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ CE	280~275	256	1.40(1.52)	1.93	0.46	78
dT $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ G $\mp$ CE	281sh, 276, 261	250	1.14(1.19)		0.24, 0.31	>90
dT $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ CE	276~281	248	1.41(1.49)		0.24	>90
DMTrdT $\mp$ T $\mp$ T $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ G $\mp$ CE	274, 262sh	245	1.01(1.09)	2.04	0.30, 0.37	>70
DMTrdC $\mp$ T $\mp$ T $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ CE	273, 260sh	248	1.00(1.13)	1.83	0.44	75
dC $\mp$ T $\mp$ T $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ A $\mp$ CE	281sh, 273, 266	253	0.98(1.08)		0.41	>90
all prot. 12mer	272, 261, 256	267, 240	0.94(1.07)	1.80	~0.31	68

<sup>a</sup> Abbreviations refer to the Table 1. <sup>b</sup> All the positive peaks are regarded as a maximum peak. <sup>c</sup> The values in parenthesis are calculated ones. <sup>d</sup> Hplc was carried out using Radial Pak-ODS column and CH<sub>3</sub>OH eluent with a flow rate of 2ml/min., The eluate was detected with a UV-detector at 280nm. <sup>e</sup> The solvent and adsorbent used for tlc were 10% CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> and silica-gel 5553 respectively. <sup>f</sup> The yields shown are those for individual steps.



Table 3. Base composition of intermediate nucleotides and dodecamer

Compounds	Observed peak areas <sup>a</sup>				Corrected relative peak areas <sup>b</sup>				Tlc <sup>c</sup> (Rf)
	T	A	C	G	T	A	C	G	
dApGp		2360		892		1.00(1)		0.96(1)	0.74
dTpApApGp	2322	5340		1062	1.03(1)	2.00(2)		1.01(1)	0.61
dTpApApAp	1874	6934			0.96(1)	3.00(3)			0.74
dTpTpTpApApGp	3521	3462		647	3.08(3)	2.00(2)		0.95(1)	0.26
dCpTpTpApApAp	1181	2163	269		1.94(2)	3.00(3)	1.05(1)		0.51
Dodecamer	1704	2530	190	193	5.10(5)	5.00(5)	1.06(1)	0.97(1)	0.20

<sup>a</sup> Hplc was carried out using Radial Rak-0DS and 1.5% acetonitrile/0.1M aq. NH<sub>4</sub>OAc(1ml/min., 280nm, C, G, T, A=5.39, 9.30, 10.12, 15.32min.). <sup>b</sup> Correction factors of T, A, C, and G and 1.645, 1.947, 0.692, and 0.767 respectively. Parentheses are theoretical ratios of bases. <sup>c</sup> The solvent and absorbent used for tlc were *n*-propanol : conc-NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O(55 : 10 : 35, v/v) and avicel.

측정한 결과, 2시간 정도 반응에서 별다른 부 반응없이 완결됨을 알 수 있었다. 그러나 처리 과정에서 생성물이 용액탈수제로 사용한 황산나트륨에의 흡착과 tlc 분리 후 용출(10% 메탄올/클로로포름)시키는 과정에서의 분해등에 의해 10% 이상의 손실이 수반되었다. 후자, 즉 용출과정의 손실은 용매를 적당히 선택하면 일부 줄일 수 있었다. 일반적으로 관 크로마토그래피로 측정생성물을 분리(이동상은 메탄올-클로로포름, 고정상은 실리카겔)하고 있으나, 이 과정에서 인산의 보호로 이용한 시아노에틸기의 불필요한 이탈이 수반된다고 하였다. tlc에 의한 생성물의 분리 후 짧은 관 크로마토그래피로 유출시키는 과정에서도 시아노에틸기가 이탈됨을 관측할 수 있었다. 이와 같은 용출과정에서의 손실을 줄이기 위하여 10% 메탄올/클로로포름 대신 유출속도가 빠른 10% 피리딘/클로로포름으로 행한 결과 분리에 따른 손실을 줄일 수 있음을 실리카겔에 잔여하는 DMTr-nucleotide의 양으로 알 수 있었다. 십이량체 합성과정에서의 각 물질들의 tlc 반점에서 서열이 증가함에 따라 일정한 경향으로 Rf 값이 감소됨을 알 수 있다.

십이량체의 염기서열은, 효소로서 phosphodiester결합을 일부 절단하고 절단된 deoxynucleotide혼합물을 두 상 분리시켜 얻은 반점을 해석하는 방법<sup>31</sup>과 20% 아크릴아미드를 이용한 전기영동 후 이동 정도로서 확인하는 방법<sup>32</sup>이 주로 이용되고 있다.

본 연구에서는 소량체 합성경로에 해당하는

모든 소량체들이 구비되어 있으므로 각 계열에 해당하는 소량체들의 염기조성의 변화로써 서열을 확인하였다. 포름산으로 당과 염기간의 N-glycoside 결합을 가수분해하고<sup>20</sup> 절단된 염기를 hplc로 분리한 후 상대적인 흡광도를 보고된 환산계수로<sup>32</sup> 환산하여 염기조성을 얻었으며, 이를 소량체의 이론적인 염기조성비와 비교하여 서열을 결정하였다. 그 결과를 Table 3에 나타내었다. adenine을 기준으로 한 측정치가 염기의 조성으로부터 얻은 조성비와 전반적으로 일치함을 알 수 있다. Avicel 흡착제에 의한 tlc 결과에서도 서열이 증가함에 따라 Rf 값이 일정하게 감소되었음을 알 수 있었다.

#### 참 고 문 헌

1. H. Buchi and H.G. Khorana, *J. Mol. Biol.*, **72**, 251 (1972); R.H. Scheller and R.E. Dickerson, *Science*, **196**, 177 (1977); R. Crea, A. Kraszewski, T. Hirise, and K. Itakura, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 5765 (1978).
2. H.G. Khorana, G.M. Tener, J.G. Moffatt, and E.H. Pol, *Chem. and Ind.*, 1523 (1956).
3. J.F.M. de Rooij, G.W. Hazeleger, P.H. van Deursen, J. Serdijn, and J.H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **98**, 537 (1979); Y. Stabinsky, R.T. Sakata, and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett*; **23**, 275 (1982).
4. J. Stawinski, T. Hozumi, and S.A. Narang, *Can. J. Chem.*, **54**, 670 (1976).
5. R. Crea, T. Hirose and K. Itakura, *Tetrahe-*

- dron Lett.*, 395 (1979).
6. T. Hirose, R. Crea, and K. Itakura, *ibid.*, 2449 (1978).
  7. J.C. Catlin and F. Cramer, *J. Org. Chem.*, **38**, 245 (1973); C.B. Reese, *Tetrahedron Lett.*, 3143 (1978); R.L. Letsinger and K.K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3350 (1969).
  8. R.L. Letsinger and W.B. Lunsford, *ibid.*, **98**, 3655 (1976).
  9. R.L. Letsinger and V. Mahadevan, *ibid.*, **87**, 3526 (1965); R.T. Pon and K.K. Ogilvie, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 713 (1984); M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3185 (1981); E. Ohtsuka, H. Takashima, and M. Itakura, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3081 (1982); H. Koster, A. Stumpe, and A. Wolter, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 747 (1983); K. Miyoshi, K. Itakura, *ibid.*, 3635 (1979).
  10. A. Jager and J. Engels, *ibid.*, **25**, 1437 (1984); S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, *ibid.*, **22**, 1859 (1981); B.C. Frochler and M.D. Matteucci, *ibid.*, **24**, 3171 (1983); S.I. Beaucage, *ibid.*, **25**, 375 (1984).
  11. R. Arentzen and C.B. Reese, *J.C.S. Perkin I*, 445 (1977). T.E. England and T. Neilson, *Can. J. Chem.*, **54**, 1714 (1976).
  12. W.S. Zielinski and Z. Lesnikowski, *Synthesis*, 185 (1976).
  13. J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, and P.H. van Deursen, *Tetrahedron Lett.*, 869 (1976).
  14. K. Itakura, N. Katakiri, S.A. Narang, C.P. Bahl, K.J. Marians, and R. Wu, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4592 (1975).
  15. E. Ohtsuka, M. Ikehara, and D. Soll, *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6553 (1982).
  16. N. Katagiri, K. Itakura, and S.A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7332 (1975).
  17. G. van der Marel, C.A.A. van Boeckel, M.G. Wille, and J.H. van Boom, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 3887 (1981); J.E. Marugg, L.W. McLaughlin, N. Piel, M. Tromp, G.A. van der Marel, and J.H. van Boom, *ibid.*, **24**, 3989 (1983).
  18. S.A. Narang, R. Brousseau, H.H. Hsiung, and J.J. Michniewicz, *Methods Enzymol.*, **65**, 610 (1980).
  19. H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch and H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3821 (1963); K. Itakura, *et al.*, *ibid.*, **97**, 7327 (1975); E. L. Brown, *et al.*, *Methods Enzymol.*, **68**, 109 (1979).
  20. 宋炳洙, 李相稷, 金鍾大, **30**, 90 (1986).
  21. H.G. Gassen and A. Lang, "Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments", P. 206~210, Verlag Chemie, Germany, 1982.
  22. H. G. Khorana, *Pure Appl. Chem.*, **17**, 349 (1968).
  23. A. Myles, W. Hutzenlaub, G. Reitz, and W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.*, **108**, 2857 (1975).
  24. J.H. van Boom *et al.*, *Chem. Commun.*, 869 (1971).
  25. G. Hofle, W. Steglich, and H. Vorbruggen, *Angew. Chem. Intl. Ed.*, **17**, 569 (1978).
  26. C. Broka, T. Hozuim, R. Arentzen, and K. Itakura, *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5461 (1980).
  27. V. Kohi, H. Blocker, and H. Koster, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 501 (1980).
  28. C.B. Reese and R. Saffhill, *Chem. Comm.*, 767 (1968).
  29. J.H. van Boom. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1047 (1977).
  30. IUPAC-IBU, *Biochemistry*, **9**, 4022 (1970).
  31. R.L. Letsinger and K.K. Ogilvie, *Tetrahedron Lett.*, **89**, 4801 (1969).
  32. D. Rickwood and B.D. Hames, "Gel Electrophoresis of Nucleic Acids", P.44, IRL press, England, 1982.
  33. S.A. Narang, O.S. Bhanot, S.K. Dheer, J. Goodchild, and J.J. Michniewicz, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **41**, 1248 (1970).