

이합체성 올리고디옥시리보핵산의 합성

송정섭^{1*}

Synthesis of Dimeric Oligodeoxyribonucleotide

Jeong-Sup Song^{1*}

요 약 생리학적 활성을 가지고 있을 것으로 예측되는 디-아세틸렌 결합으로 연결된 oligodeoxyribonucleotide를 합성하였다. Pd(0)촉매를 사용한 Heck-type C-C 결합반응을 통하여 2'-deoxyuridine의 5-위치에 acetylene 기를 도입하고, 5'-OH를 t-butyltrimethylsilyl로 보호한 후, Glaser oxidative coupling 반응을 이용하여 dimerization을 시켰다.

Abstract Oligodeoxyribonucleotide bearing the di-acetylenic linkage has been prepared. Starting from 5-Iodo-2'-deoxyuridine(1), a four-step sequence, consisting of the Pd(0)-catalyzed Heck-type C-C coupling with acetylenic group, protection of 5'-hydroxy group, generation of acetylenic hydrogen, and Glaser oxidative coupling reaction leads to the dimeric oligodeoxyribonucleotide(5).

Key Words : Oligodeoxyribonucleotide, Heck-type C-C coupling, Glaser oxidative acetylenic coupling

1. 서론

인류의 질병 및 난치병 치료를 위한 oligodeoxyribonucleotides의 화학적 합성은 오래전부터 많은 연구가 되었으며, 최근에는 합성된 oligodeoxyribonucleotides가 DNA sequencing 및 polymerase 연쇄반응의 프라이머로 널리 응용되고 있다.^[1] 특히 unprotected nucleotide, nucleotide, amino acid와 acetylene 유도체와의 결합반응은 그 생성물이 지니는 잠재적인 생리학적 활성 때문에 많은 주목을 받고 있다.

아세틸렌기를 화합물에 도입하는 반응은 일반적으로 iodoarene^[2]이나 iodoalkenes^[3]에 Cu(I) arylacetylene 화합물을 결합시키는 Stephans-Castro 반응이 널리 활용되는데, 반응조건이 격렬하고 cuprous acetylide를 만들기가 까다로워 제한적으로 사용된다. 본 연구에서는 uridine을 기초로 하여 생리학적 활성을 지닐 것으로 예측되는 이합체성 화합물의 합성을 시도하였다. 즉, anti-viral activity를 보여줄 것으로 예측되는 두 개의 아세틸렌 결합으로 연결된 oligonucleotide을 합성하였으며, 전체적인 합성경로는 그림 1과 같다.

2. 실험 방법

실험에 사용된 모든 시약들은 Aldrich chemical co. 를 비롯한 여러 화학회사로부터 구입하여 이용하였고, 반응 용매들은 표준정제방법을 활용하여 정제한 후 사용하였다.^[4] 생성물의 분석 및 확인은 ¹H NMR spectroscopy(Unity-Inova 300MHz; Varian), FT-IR spectroscopy(FT/IR-460 plus; Jasco), 원소분석기 (EA 1108 Elmer CHNS-O)를 사용하였다.

2-1 5-Trimethylsilylethynyl-2'-deoxyuridine (2)의 합성

N₂ 분위기하에서 100 mL 둥근 플라스크에 5-Iodo-2'-deoxyuridine(1) 2 g(5.65 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium 340 mg, CuI 128 mg 을 넣는다. 반응 용매로 dry CH₃CN 30 mL를 더한 다음 (trimethylsilyl)acetylene 1.6 mL(11.3 mmol), Et₃N 1 mL를 더한 후 20°C 에서 20시간 교반시키면 반응용액이 적갈색으로 변한다. TLC (전개용액 CHCl₃ : CH₃OH(v:v) = 5/1)를 이용하여 반응이 완결된 것을 확인한 다음, evaporator로 반응 용매를 제거하고, 남아 있는 반응 혼합물을 소량의 acetone에 녹여 flash column chromatography (230-400mesh. Hexane/Ethyl acetate(v:v) = 1/1)로 흰색의

¹선문대학교 화학과/자연과학연구소

*교신저자: 송정섭(jssong@sunmoon.ac.kr)

5-Trimethylsilylethynyl-2'-deoxyuridine (2)을 분리한다. 수득률 1.56 g (85%). mp 180°C.

¹H NMR (acetone-d₆): δ 8.35 (s, 1 H, H6), 6.25 (t, 1 H, H1'), 4.51 (q, 1 H, H3'), 3.95 (q, 1 H, H4'), 3.79 (t, 2 H, H5'), 2.28 (m, 2 H, H2'), 0.16 (s, 9 H, trimethyl on silylethynyl).

IR (KBr pellet): ν 2,220 (m) cm⁻¹.

Anal. Calcd for C₁₄H₂₂N₂O₅Si: C 51.51; H 6.79. Found: C 50.98; H 6.56.

2-2 5-Trimethylsilylethynyl-5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyuridine(3)의 합성

N₂ 분위기하에서 50 mL 둥근 플라스크에 5-Trimethylsilylethynyl-2'-deoxyuridine(2) 500 mg(1.54 mmol), *t*-butyldimethylsilyl chloride 400 mg(2.65 mmol), 4-(dimethylamino)pyridine 200 mg(1.64 mmol), Et₃N 400 μL를 넣는다. 반응용매로 dry CH₃CN 20 mL를 더한 다음, 20°C에서 12시간 교반시키면 연녹색으로 변한다. TLC (전개용액 CHCl₃:CH₃OH(v:v) = 5/1)를 이용하여 반응이 완결된 것을 확인한 다음, CH₃OH 2 mL를 가하여 여분의 *t*-butyldimethylsilyl chloride를 분해시키고, evaporator를 사용하여 반응용매를 제거한다. 남아있는 반응 혼합물을 소량의 CHCl₃에 녹여서 flash column(230-400mesh. Hexane/Ethyl acetate(v:v) = 1/1)으로 흰색의 5-trimethylsilylethynyl-5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyuridine (3)을 분리한다.

수득률 483 mg (72%). mp 84°C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.00 (s, 1 H, H6), 6.34 (m, 1 H, H1'), 4.48 (d, 1 H, H3'), 4.13 (m, 1 H, H4'), 3.87 (m, 2 H, H5'), 2.47 (m, 1 H, H2'), 2.09 (m, 1 H, H2'), 0.91 (s, 10 H, 5'-O-*t*-butyl on silyl), 0.21 (s, 9 H, trimethyl on silylethynyl), 0.14 (d, 6 H, 5'-O-dimethyl on silyl).

IR (KBr pellet): ν 2,174 (w) cm⁻¹.

Anal. Calcd for C₂₀H₃₆N₂O₅Si₂: C 54.51; H 8.23. Found: C 54.02; H 8.07.

2-3 5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-5-ethynyl-2'-deoxyuridine(4)의 합성.

N₂ 분위기하에서 50 mL 둥근 플라스크에 5-trimethylsilylethynyl-5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyuridine(3) 320 mg(0.73 mmol)를 넣고 반응용매로 CH₃OH 16 mL, 0.1 N NaOH in CH₃OH 3.9 mL를 더하여 60°C에서 19시간 교반시킨다. TLC (전개용

액: CHCl₃/CH₃OH(v:v) = 5/1)를 이용하여 반응이 완결된 것을 확인한 다음, methanolic HCl을 사용하여 반응 혼합물을 pH 7로 조절한 후 evaporator를 사용하여 반응 용매를 제거한다. 여기에 소량의 CHCl₃을 가한 다음 Celite filtration하여 부산물인 NaCl를 제거한다. 감압하에서 용매를 제거하면 흰색의 고체 5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-5-ethynyl-2'-deoxyuridine (4)를 얻을 수 있다. 수득률 266 mg (99%). mp 178-180°C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.05 (s, 1 H, H6), 6.33 (t, 1 H, H1'), 4.41 (d, 1 H, H3'), 4.07 (s, 1 H, H4'), 3.83 (q, 2 H, H5'), 3.15 (s, 1 H, 5-acetylene), 2.43 (m, 1 H, H2'), 2.00 (m, 1 H, H2''), 0.91 (s, 9 H, 5'-O-*t*-butyl on silyl), 0.11 (d, 6 H, 5'-O-dimethyl on silyl).

IR (KBr pellet): ν 2,175(w) cm⁻¹.

Anal. Calcd for C₁₇H₂₈N₂O₅Si: C 55.41; H 7.66. Found: C 55.87; H 7.35.

2-4 Di-5-ethynyl-bis-5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyuridine(5)의 합성.

N₂ 분위기하에서 100 mL 둥근 플라스크에 5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-5-ethynyl-2'-deoxyuridine(4) 1.778 mg(4.86 mmol), Cu(OAc)₂ · H₂O 1.16 g(5.83 mmol)을 넣는다. 반응용매로 dry pyridine 50 mL를 더하여 50°C에서 16시간 교반시키면 반응용액이 청색으로 변한다. TLC (전개용액 CHCl₃/CH₃OH(v:v) = 5/1)를 이용하여 반응이 완결된 것을 확인한 다음, evaporator를 통하여 반응 용매를 제거하고, 남은 반응 혼합물을 소량의 ethyl acetate에 녹여서 flash column (230-400 mesh SiO₂ 10 cm + Al₂O₃ 3 cm, Hexane/Ethyl acetate(v:v) = 1/1)으로 노랑색의 di-5-ethynyl-bis-5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-2'-deoxyuridine (5)을 분리한다. 수득률 920 mg (52%). mp 146-150°C.

¹H NMR (CDCl₃ + CD₃OD): δ 8.08 (s, 1 H, H6), 6.13 (m, 1 H, H6), 4.26 (m, 1 H, H3'), 3.95 (q, 1 H, H4'), 3.73 (m, 2 H, H5'), 2.29 (m, 1 H, H2'), 1.97 (m, 1 H, H2''), 0.81 (s, 9 H, 5'-O-*t*-butyl on silyl), 0.20 (d, 6 H, 5'-O-dimethyl on silyl).

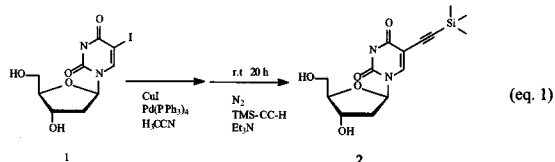
IR (KBr pellet): ν 2,172(w) cm⁻¹.

Anal. Calcd for C₃₄H₅₄N₄O₁₀Si₂: C 55.56; H 7.41. Found: C 56.12; H 7.29.

3. 결과 및 고찰

3-1 5-Trimethylsilylethynyl-2'-deoxyuridine(2)의 합성

Tetrakis(triphenylphosphine)palladium 및 Cu(I)를 촉매 및 조촉매로 사용하여^[6] 5-Iodo-2'-deoxyuridine(1)과 (trimethylsilyl)acetylene을 반응시켜 높은 수득율(85%)로 5-Trimethylsilylethynyl-2'-deoxyuridine(2)을 얻었다. (eq. 1)



촉매인 Pd과 CuI는 소량 사용되었으며 alkynes은 반응물의 2 당량이 사용되었다. 5-Iodo-2'-deoxyuridine의 경우 반응 용매인 acetonitrile에 조금씩 용해되면서 반응이 진행되며, 상온에서 반응이 진행되므로 부반응이 거의 일어나지 않아 생성물의 분리가 용이하였다. 보다 용해도가 좋은 dimethylformamide를 반응 용매로 사용하고, 60°C에서 1시간 동안 반응시킨 경우에는 반응은 빠르지만 용매의 비등점이 높고 부반응에 의한 부산물이 생성되어 원하는 생성물의 분리가 까다로워지며, 특히 iodide의 분해에 의한 것으로 여겨지는 짙은 갈색의 불순물에 의하여 분리된 생성물이 짙은 갈색을 띄게 된다.

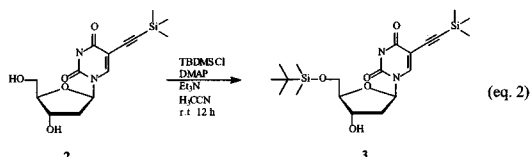
3-2 Protection of 5-Trimethylsilylethynyl-2'-deoxyuridine(2)

Trimethylsilyl group을 hydrogen으로 치환하기에 앞서 deoxynucleoside의 hydroxyl group을 protection하여 다음 단계에서의 부반응을 차단하였다. 5'-hydroxyl group의 protection을 위하여 여러 가지를 사용할 수 있지만, 다음 단계의 반응조건에서도 안정한 *t*-butyldimethylsilyl(TBDMS) group을 선택하였다.

TBDMS-Cl를 이용한 반응은 TMS-Cl의 한 분류에서 나왔으나, TBDMS ether는 TMS ether보다 hydrolysis에 대하여 10⁴배 더 안정하다고 알려져 있다.^[5] TBDMS group의 hydrolytic 안정성은 많은 silicone을 포함하는 분자의 isolation을 위해 매우 유용하게 사용되어진다. 또한 TBDMS-Cl 및 4-Dimethylaminopyridine (DMAP)를 이용한 alcohol protection 반응은 solvent의 종류에 따라서 secondary alcohols의 존재하에 primary alcohol만 선택적으로 보호할 수 있다. 이러한 TBDMS-Cl의 반응특성을 이용하여 primary alcohol의 protection을 진행하였다. 즉, 5-trimethylsilyl-ethynyl-2'-deoxyuridine에는 다음 단계의 반응에 영향을 주는 5'-위치와 3'-위치의 hydroxyl group이 존재하는데, 먼저 primary alcohol인 5'-hydroxyl group을 TBDMS-Cl를 사용하여 선택적으로 protection시켰다.

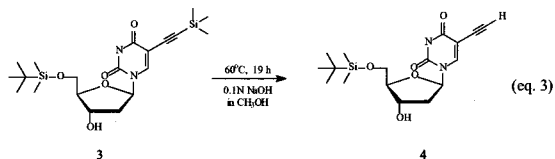
(eq. 2)

일반적으로 5'-hydroxy group의 protection에 널리 사용되는 4,4'-dimethoxy-trityl chloride (DMT-Cl)를 이용한 protection의 경우에는 다음 단계의 반응에서 분해되거나, flash column chromatography시에 deprotection이 일어나는 것을 알 수가 있었다.



3-3 Deprotection of 5-Trimethylsilyl group.

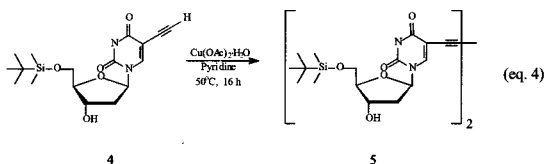
C_{sp}-C_{sp} coupling 반응을 이용하여 Uridine dimer를 만들기 위해서는 protected된 acetylene group에서 TMS group을 제거하여야만 한다. 앞에서 언급한 바와 같이 hydrolysis 조건에 대하여 TBDMS group 보다 TMS group이 더 민감하게 반응하므로 이러한 반응성 차이를 이용하여 쉽게 TMS group을 H로 치환할 수 있었으며^[7], 5'-TBDMS은 전혀 변화가 없음을 생성물의 NMR spectrum을 통하여 확인할 수 있었다. (eq. 3)



즉, 생성물의 ¹H NMR spectrum을 확인해 본 결과, δ 0.21에 나타나는 trimethylsilyl group이 사라지고 대신에 δ 3.15의 위치에 전형적인 acetylenic proton이 보여짐을 알 수 있었으며, δ 0.81 및 δ 0.20에 나타나는 TBDMS group의 위치와 적분값은 상대적으로 변화하지 않았다.

3-4 Dimerization of 5'-O-*t*-butyldimethylsilyl-5-ethynyl-2'-deoxyuridine (4).

Acetylene group의 dimerization을 통한 di-5-ethynyl-bis-5'-O-*t*-butyl-dimethylsilyl-2'-deoxyuridine (5)의 합성은 Glaser oxidative coupling 반응을 이용하였다.^[8] (eq. 4)



즉, 염기성 조건하에서 Cu(II)에 의하여 acetylene의 proton이 제거되면서 coupling이 일어나 dialkyne이 생성되게 된다. 생성물 분리시 청색의 Cu(II)이온이 제거하기 위하여 flash column chromatography에 alumina를 첨가하여 사용하였으며, 생성물의 ^1H NMR spectrum을 살펴보면 δ 3.15의 위치에 나타나던 acetylenic proton이 사라진 것을 알 수 있었으며, 반응용매로 DMF를 사용하면 반응물의 아세틸렌 기와 이웃하는 C=O가 반응하여 furan 고리를 만들게 되어 dimerization이 진행되지 않았다.

4. 결론

생리학적 활성을 가지고 있을 것으로 예측되는 디아세틸렌 결합으로 연결된 올리고디옥시리보핵산 화합물을 5-Iodo-2'-deoxyuridine을 출발물질로 하여 32%의 전체 수율로 합성하였다. 전체합성경로는 그림 1에서와 같이 2'-deoxyuridine의 5-위치에 acetylene 기를 도입하고 5'-OH를 t-butyldimethylsilyl로 보호한 후, Glaser oxidative coupling 반응을 이용하여 dimerization을 시켰다. Dimerized uridine을 합성하는 또 다른 경로로는 그림 2에서와 같이 먼저 acetylene의 silyl group을 hydrogen으로 치환하고, oxidative coupling시키는 방법을 시도하였다.

먼저 5'-hydroxy group의 protection이 되어 있지 않은 상태에서 부반응을 최소화하기 위하여 trimethylsilyl group의 deprotecting reagent로 잘 알려져 있는 tetrabutylammonium fluoride (TBAF)를 사용하여 화합물 2와 상온에서 15시간 동안 반응시켰다. 반응 결과 trimethylsilyl group이 쉽게 hydrogen으로 치환되었으나, 부산물인 tetrabutylammonium salt의 여러가지 용매에 대한 용해도 및 silica gel (reversed phase 포함)과의 흡착성이 생성물 7과 비슷하여 분리가 되질 않았으며, 이들 salt가 지니는 hygroscopic한 성질 때문에 5'-hydroxy group의 protection반응에 영향을 주어 원하는 화합물을 합성할 수 없었다.

참고 문헌

[1] (a) Crockett, G. C. "The chemical synthesis of DNA," *Aldrichimica Acta*, **16**, pp 47-55, 1983. (b) Uhlmann, E; Peyman, A, "Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle" *Chem Rev.*, **90**, pp 543-583, 1990. (c) Minakawa, N.; Kojima, N.; Hikishima, S.; Sasaki, T.; Kiyosue, A.; Atsumi, N.; Ueno, Y.; Matsuda, A.

"New base pairing motifs. The synthesis and thermal stability of oligodeoxynucleotides containing imidazopyridopyrimidine nucleosides with the ability to form four hydrogen bonds," *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, pp 9970-9982, 2003. (d) Minakawa, N.; Ono, Y.; Matsuda, A. "A versatile modification of on-column oligodeoxynucleotides using a copper-catalyzed oxidative acetylenic coupling reaction," *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, pp 11545-11552, 2003. (e) Barr, P. J.; Robins, M. J.; Santi, D. V, "Reaction of 5-ethynyl-2'-deoxyuridylate with thiols and thymidylate synthetase," *Biochemistry*, **22**, pp 1696-1703, 1983.

[2] Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. "A convenient synthesis of acetylenes: Catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoalkenes, and bromopyridines," *Tetrahedron Lett.*, **16**, pp 4467-4470, 1975.

[3] Burdon, J.; Coe, P. L.; March, C. R.; Tatlow, J. C. "Reaction of organocopper compounds with halogeno-olefins," *Chem. Comm.*, pp 1259-1260, 1967.

[4] Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed.; Pergamon Press: New York, 1994.

[5] (a) Ogilvie, K. K.; Schiffman, A. L.; Penny, C. L. "The synthesis of oligoribonucleotides. III. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry. VIII," *Can. J. Chem.*, **57**, 2230, 1979. (b) Farras, J.; Serra, C.; Vilarrasa, J. "Cleavage of *tert*-butyldimethylsilyl ethers by chloride ion," *Tetrahedron Lett.*, **39**, 327, 1998. (c) Chaudhary, S. K.; Hernandez, O. "4-Dimethylaminopyridine: An efficient and selective catalyst for the silylation of alcohols," *Tetrahedron Lett.*, **20**, 99, 1979.

[6] Fenwick A. E. "The synthesis of 2,2-bis(trifluoromethyl)benzopyran derivatives: A new route to an important class of potassium channel activators," *Tetrahedron Lett.*, **34**, pp 1815-1818, 1993.

[7] Alzeer, J.; Vasella, A. "Synthesis of a monosaccharide-derived octamer," *Helv. Chim. Acta*, **78**, 1219, 1995.

[8] Brown, A. B.; Whitlock Jr., H. W. "Inversion topologies of [n.8](2,1,4)cyclophanes: tethering effects on host-cavity stereodynamics," *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3640, 1989.

[9] Wu, T.; Ogilvie, K. K. "A study on the alkylsilyl groups in oligoribonucleotide synthesis," *J. Org. Chem.*, **55**, 4717, 1990.

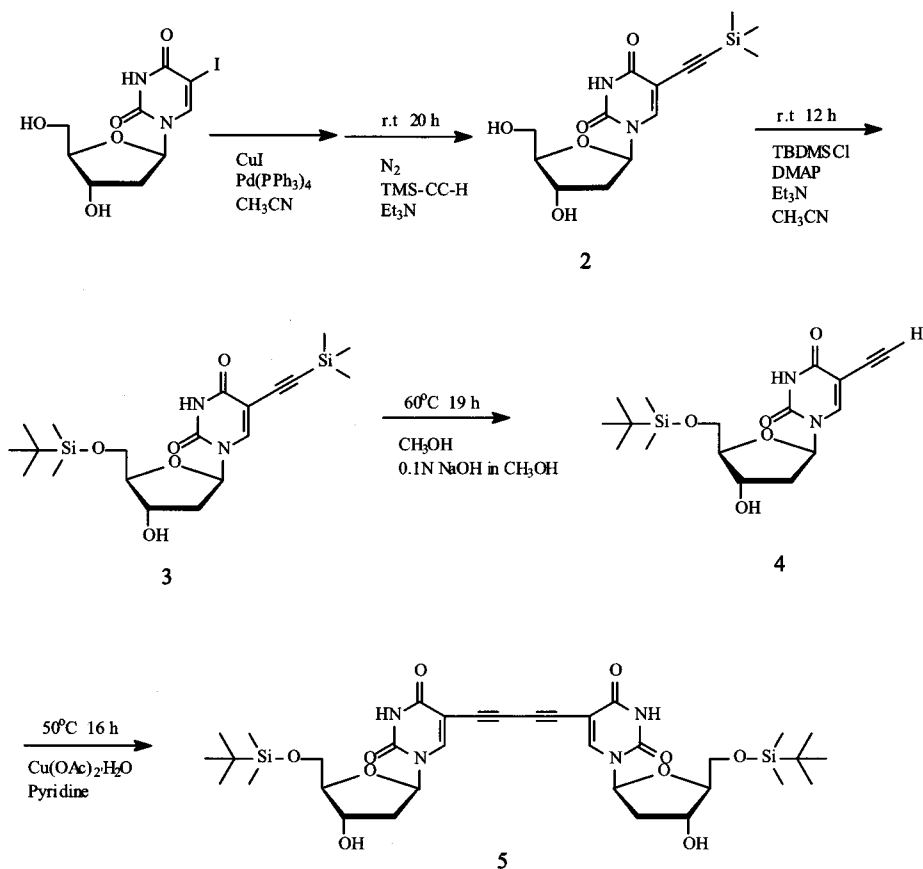


그림 1. 이합체성 올리고디옥시리보핵산의 합성경로(I)

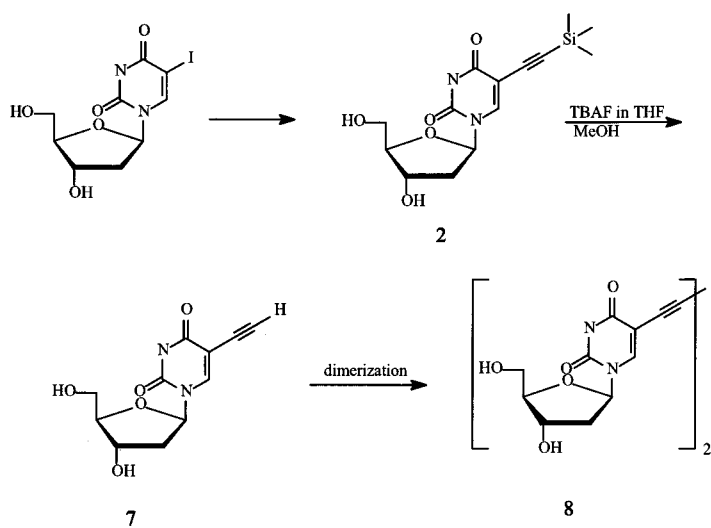


그림 2. 이합체성 올리고디옥시리보핵산의 합성경로(II)

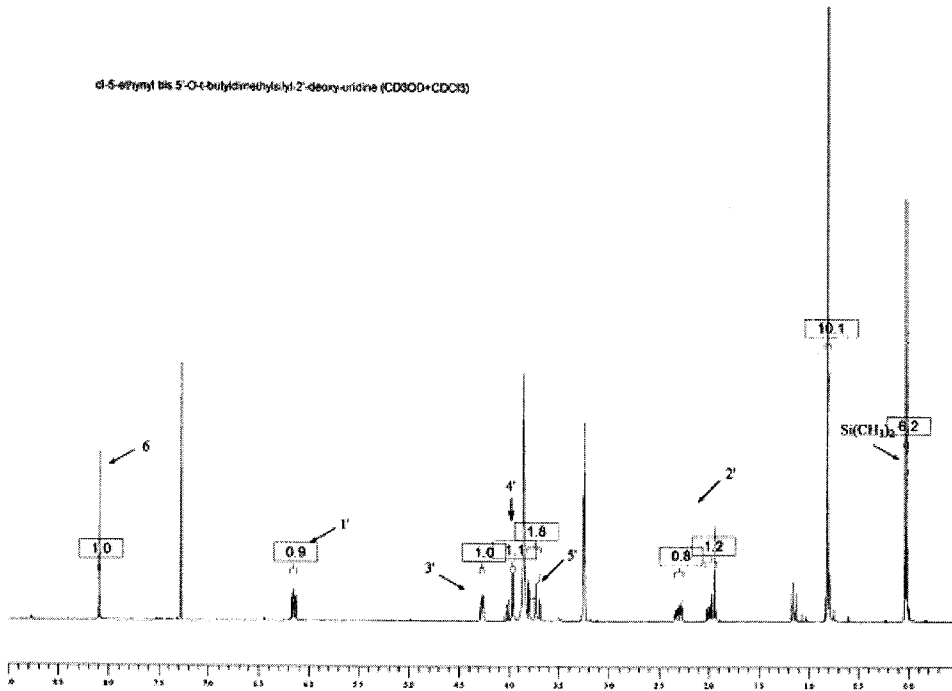
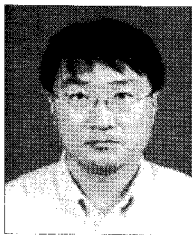


그림 3. Di-5-ethynyl-bis-5'-O-t-butylidimethylsilyl-2'-deoxyuridine(5)의 ¹H NMR 스펙트럼.

송 정 섭(Jeong-Sup Song)

[정회원]



- 1983년 2월 : 서울대학교 화학교육과 (이학사)
- 1984년 8월 : 한국과학기술원 화학과 (이학석사)
- 1990년 12월 : 펜실바니아주립대학교 화학과(이학박사)
- 1995년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 화학과 부교수

<관심분야>

유기합성법, 유기금속촉매, 유기전자재료