



Title	核酸医薬を志向したオリゴヌクレオチドの立体構造検出に関する研究
Author(s)	下山, 敦子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61703
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

核酸医薬を志向したオリゴヌクレオチドの立体構造検出に関する研究

大阪大学大学院薬学研究科
創成薬学専攻 生物有機化学分野

下山 敦子

略語一覽

CD	: circular dichroism
DNA-oligo	: natural DNA oligonucleotides
DNA	: deoxyribonucleic acid
GMP	: good manufacturing practice
HPLC	: high performance liquid chromatography
LNA	: locked nucleic acid
MES	: 2-Morpholinoethanesulfonic Acid
MW	: molecular weight
NMR	: nuclear magnetic resonance
PS-oligo	: phosphorothioate oligonucleotides
SEC	: size exclusion chromatography
T_m	: melting temperature
Tris	: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
5mC	: 5-methylcytosine

目次

序論.....	1
本論.....	6
第一章 オリゴヌクレオチドの高次構造に対するサイズ排除クロマトグラフィーの検出力検討	6
第一節 サイズ排除クロマトグラフィー分析条件の設定	6
第二節 オリゴヌクレオチドのモデル配列デザイン	12
第三節 DNA オリゴを用いた高次構造検出検討	15
第四節 PS オリゴを用いた高次構造検出検討	20
第二章 オリゴヌクレオチド高次構造の多面的評価からみるサイズ排除クロマトグラフィーの検出力	27
第一節 円二色性スペクトル測定による二次構造評価	27
第二節 van't Hoff プロットを応用した高次構造形成評価	30
第三節 熱力学的安定性が異なる高次構造混合物のサイズ排除クロマトグラフィーによる検出	31
結論.....	37
謝辞.....	38
実験の部	39
引用文献	43

序論

近年、創薬研究対象となる分子は、従来の合成低分子化合物から抗体に代表されるたん白質医薬品を経て新たな分子形へと急激にシフトしており、その中でも中分子医薬品に分類される核酸医薬は非常に注目を集めている。中分子医薬品とは、低分子医薬品の特長である化学合成による低コスト製造と、抗体の特長である高い標的特異性の両面を併せ持つ新たな創薬カテゴリーであり、核酸医薬のほかペプチド医薬などがある。核酸医薬品はオリゴヌクレオチドを構成成分とするが配列遺伝子の発現を介さず直接作用を示す分子であり、分子形としてさらに、一本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス、アプタマー、二本鎖オリゴヌクレオチドの siRNA やデコイなどがある [1-4]。核酸医薬における創薬では、オリゴヌクレオチドの塩基配列に由来する特異性を利用して配列設計する、あるいはオリゴヌクレオチド自身の高次構造に起因する特異性を利用できるような配列設計する、など薬理作用コンセプトに応じて共通分子素材であるオリゴヌクレオチドを設計する柔軟で幅広いアプローチが可能となる。一方、薬理活性を示す物質を医薬品として開発していくうえで重要なポイントの一つに、その物質を作用部位へ到達させ、薬効発揮に必要な時間、必要な量を暴露させる薬物動態制御がある。核酸医薬品に天然型オリゴヌクレオチド(以下、DNA オリゴ)を用いる場合、DNA オリゴは投与後に生体内に存在するヌクレアーゼにより迅速な分解を受け期待される薬効発揮が難しいことが知られていることから、ヌクレアーゼへの耐性向上やより活性の高い分子創成を目指したオリゴヌクレオチドの化学修飾研究が非常に精力的に行われている [1-10]。酵素耐性を上げる

修飾型核酸の代表例として、リン酸骨格（リン酸ジエステル結合）中でヌクレオシドとの結合に関与していない酸素原子の一つを硫黄原子に置換したホスホロチオエート型修飾があり、この修飾を導入したオリゴヌクレオチド（以下、PS オリゴ）は特にアンチセンスへの応用例が多く報告されている [5-10]。一方 PS オリゴは、リン酸骨格への硫黄原子導入により疎水性が増し、さらにリン原子が不斉中心となることでエステル結合数 n に対して 2^n のジアステレオマーが生じるなど、物理化学的性質が DNA オリゴと比べて非常に複雑化しており、その分析法の確立は難易度が高い [11, 12]。

医薬品は、臨床試験に供される治験薬も含め、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準（Good Manufacturing Practice, GMP）を遵守して製造及び品質を管理していく必要がある。医薬品製造面から核酸医薬品をとらえた場合、修飾型核酸を含むオリゴヌクレオチドの製造方法を共通プロセスとして確立することができれば一つの製造方法から多品目の製造が可能になる利点がある。この利点は先に述べた柔軟な創薬の利点と相乗的に作用し、スピード面、費用面での効率的な開発が期待できる。一方、品質管理面から核酸医薬品をとらえた場合、塩基配列の順番や長さが異なるものや分解物など、化学構造に由来する不純物だけを想定しても非常に多くの分子を考慮する必要があるといえる。オリゴヌクレオチドの分析方法はイオン交換クロマトグラフィーやイオンペア逆相クロマトグラフィーが代表的であり、これら分析方法を用いることで先に例示したような不純物、あるいは他の類縁物質に相当する分子の分離、同定及び定量に対応する分析法の検討が多く報告されているが [13-19]、低分子医薬品における品質管理と同様に個々の類縁物質や不純物に対して分離、同定、定量を達成する分析系を確立し評価することは現在の分析化学水準では困難であると報告されている [20]。そのため、抗体に代表されるたん白質医薬品で行われている品質

管理の手法のように多面的で相補的な品質確認を行い、さらに有効性、安全性による確認も含めた方法でオリゴヌクレオチドの品質を保証していく形が想定される。

加えて、オリゴヌクレオチドは塩基間の水素結合や陽イオンのリン酸骨格への配位などにより高次構造を形成する化合物であり、二重らせん構造に代表される二本鎖オリゴヌクレオチドや、アプタマー、さらにはグアニンやシトシンを多く含む配列で形成される G-quadruplex [21-24]や i-motif [24-27]など、数多くの高次構造体が知られている。これら構造体は条件により構造配位が変化することとも知られており、すなわち、すべてのオリゴヌクレオチドは測定条件により高次構造が変化する可能性があるにつながる。一方、たん白質医薬品においては、たん白質の高次構造変化や凝集化が有効性および安全性に大きく影響する免疫原性に関係しているのではという議論が盛んに行われおり [28]、高次構造を含めた品質管理が求められている。これら背景から、オリゴヌクレオチドの高次構造を品質としてとらえ管理していく必要性は高いと考えられるが、その評価方法が確立されていないこともあり二本鎖オリゴヌクレオチドやアプタマーなど限定した分子形での認識にとどまっている。オリゴヌクレオチドの高次構造評価には、一般的に円二色性スペクトル [29-34] や NMR [32-38] などが用いられるが、いずれも定性的な分析法である。

サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography、以下 SEC) は、イオン交換クロマトグラフィーやイオンペア逆相クロマトグラフィーと同様に高速液体クロマトグラフィーを用いた分析手法の一つであり、溶質のサイズ、正確にはストークス半径に応じて分離する手法である。サイズが分子量と相關するため SEC ではピークの溶出時間とその分子量との間で相關が得られ、この直線を検量線化して未知ピークの分子量算出も可能となる。また、有機溶媒や

高いカラム温度を必要とせず、また、移動相の塩濃度を低く抑えることも可能であることから、水溶液中で存在している構造を反映した状態で分離できる特長がある。この特長から SEC はたん白質の凝集や分解などの高次構造評価に用いられ、抗体などのたん白質医薬品の品質管理、特に安全性上注意すべき凝集体の管理に必要不可欠な分析方法の一つとなっている [39-41]。一方、たん白質では SEC の検量線から分子量を正確に算出することができないことが知られており、たん白質医薬品の品質管理でも正確な分子量算出を目的としては用いられていない。これは、SEC の溶出時間は実質的には溶質のストークス半径と相関があり、同じたん白質でもあるいは分子量が同じでも、たん白質は球状や棒状、あるいは柔軟性の高い形状などストークス半径が異なる高次構造をとるためである。

近年、Largy らが DNA オリゴの高次構造評価に対する SEC の有用性を、網羅的な検討により報告した [42]。事前にアニーリング処理をした DNA オリゴを対象とした際、各構造に対して最適化した SEC 条件を用いることで構造ごとに検量線が得られたとの報告である。この結果は、DNA オリゴの高次構造の違いがストークス半径の違いとなって SEC により検出されたことを示しており、SEC がオリゴヌクレオチドの高次構造に対する品質管理試験法として有用である可能性が示唆された。しかし、Largy らの方法をそのまま適応すると高次構造ごとに最適な条件を設定する必要があることから品質管理方法としては煩雑であり、また予期しない高次構造は見逃される可能性があるなど解決すべき課題が残る。加えて、化学修飾オリゴヌクレオチドに対する SEC による同様の構造評価はほとんど報告がない。

そこで著者は、核酸医薬品の新たな品質管理手法を志向し、オリゴヌクレオチドの高次構造を品質として管理可能な分析方法の確立を目標とし、本研究に取り組んだ。分析方法として SEC に着目し、DNA オリゴ、PS オリゴに共通する、

構造検出力のある分析方法としての確認を行った（第一章）。初めに、オリゴヌクレオチドの SEC 分析に影響を及ぼす因子を確認し、分析条件を設定した（第一章、第一節）。この SEC 分析条件の高次構造検出力確認に適したオリゴヌクレオチド配列を設計し（第一章、第二節）、DNA オリゴを用いて本 SEC 分析条件の高次構造検出力について確認した（第一章、第三節）。PS オリゴにおいても同様に、本 SEC 条件の高次構造検出力を、DNA オリゴの結果との比較も踏まえて検討した（第一章、第四節）。続いてその結果を踏まえて、二次構造（第二章、第一節）、van't Hoff プロットを応用した高次構造形成（第二章、第二節）を評価検証した。さらに、SEC によって熱力学的安定性が異なる高次構造混合物の検出力について確認することで、SEC のオリゴヌクレオチドの品質管理の手法としての有用性について評価した（第二章、第三節）。

以上の結果から、今回著者が設定した SEC 分析条件を用いることで PS オリゴの一本鎖及び二本鎖を DNA オリゴについては一本鎖、ヘアピン構造および二本鎖をそれぞれ識別できることを示した。加えて本手法を用いることで、製造後のオリゴヌクレオチドは熱力学的安定性の異なる高次構造混合物であること、およびアニーリングにより安定な構造へ収束すること、を確認した。これより、オリゴヌクレオチドを医薬品として開発していくためには高次構造を評価管理していくことが重要であることを示すとともに、その品質管理手法として SEC が有用であることを見出した。本 SEC 条件は品質管理にも適用できると考えられる。

本論文では以上の研究をそれぞれの背景を含めて順に述べる。

本論

第一章 オリゴヌクレオチドの高次構造に対するサイズ排除クロマトグラフィーの検出力検討

第一節 サイズ排除クロマトグラフィー分析条件の設定

本研究は、オリゴヌクレオチドの高次構造に対して検出力があり医薬品の品質管理手法として用いることができる分析方法の確立を目標とし、その分析方法として SEC に着目している。SEC のオリゴヌクレオチドの高次構造検出については DNA オリゴで有用性が報告された [42] ものの品質管理手法として使用するケースを想定した場合には有用性は示しきれておらず、加えて PS オリゴに代表される修飾核酸での有用性は不明瞭である。これら課題に対するアプローチとして、DNA オリゴと PS オリゴで共通して構造検出力が期待できる SEC 分析条件を設定し、分析法としての有用性を確認することとした。本節では、この SEC 分析条件について、分析条件が DNA オリゴ及び PS オリゴの分離に影響する因子を確認し設定した結果を報告する。

SEC 分析では分子ふるいの原理で分離するためアイソクラティック溶離が用いられる。試料は注入後に大量の移動相に希釈されることから、SEC 分析は試料の移動相中での存在状態を反映することとなる。そのため一般的に、SEC 分析において溶出に影響する主な分析条件要因は移動相組成となる。そこで、オリゴヌクレオチドの中性付近での存在状態を模した分析条件とすべく、中性付近に緩衝能を有するリン酸緩衝液、Tris 緩衝液および MES 緩衝液を移動相組成の

候補として選択し、オリゴヌクレオチド溶出への影響を確認した。また、溶質の溶液中での安定性を高めることなどを目的とした NaCl や KCl の添加の影響についても併せて確認した（表 1）。

表 1 分離への影響を確認した SEC の移動相条件

緩衝液	添加塩	添加塩の濃度検討 (mmol/L)	pH
MES	NaCl	500	6.5
リン酸	NaCl, KCl	100, 300, 500	6.5, 7.0, 7.4
Tris	NaCl	500	7.4

表 2 分析条件検討に用いた配列

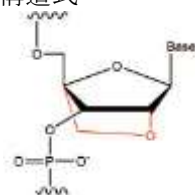
配列名	配列 (5'→3')	分子量
PS-1	G (L) ^a^t^t^g^g^t^a^t^T (L) ^5 (L) ^A (L)	3978.3
PS-2	G (L) ^5 (L) ^a^t^t^g^g^t^a^t^T (L) ^A (L)	3978.3
PS-3	G (L) ^5 (L) ^a^t^g^g^t^a^t^T (L) ^5 (L) ^A (L)	4005.3
PS-4	G (L) ^5 (L) ^a^t^t^g^t^a^t^T (L) ^5 (L) ^A (L)	3980.3
DNA-1	G (L) attggtatT (L) 5 (L) A (L)	3801.5
DNA-2	G (L) 5 (L) attggtatT (L) A (L)	3801.5

天然型核酸：小文字

修飾核酸：G(L): LNA¹型 G、T(L)：LNA 型 T、5(L)：LNA 型 5mC、A(L)：LNA 型 A

^：ホスホロチオエート型結合

¹ LNA の構造式



分析条件におけるオリゴヌクレオチドの分離に影響する因子の確認には、DNA オリゴと PS オリゴを用いた。先述の通り PS オリゴはその構造複雑性から分析が非常に困難であり、得られる SEC クロマトグラムや溶出挙動も複雑となり考察が難しくなる可能性が高い。そのため、同じ配列の DNA オリゴでも同様に分析を行うことで PS オリゴ特有の溶出挙動を特定でき、加えてオリゴヌクレオチドの高次構造の検出力として DNA オリゴの結果も考察することができる考えた。また、配列中には人工核酸 locked nucleic acid (LNA) を一部導入した。LNA は当研究室において開発された、特に優れた二本鎖形成能を有している修飾核酸である [43]。PS オリゴ同様、核酸医薬品に重要な化学修飾となる LNA を導入したオリゴヌクレオチドで SEC の分析条件の影響を確認し、同一 SEC 条件下で構造識別できる分子種の対象範囲の拡大を期待した。なお、オリゴヌクレオチド配列には、構成塩基は同じものの配列順序が異なっている二種類の配列を用いた (表 2、PS-1/PS-2 および DNA-1/DNA-2)。PS-1/PS-2 はいずれも分子量が 3978.3、DNA-1/DNA-2 はいずれも 3801.5 と同一であることから、PS オリゴ同士、DNA オリゴ同士のピークはほぼ同じ時間に溶出すると考えられた。

全ての SEC 分析結果に共通した溶出挙動の傾向として、PS オリゴは DNA オリゴと比べ溶出が遅く、非常にブロードなピークとなった (図 1、PS オリゴ ; 黒、青、DNA オリゴ ; 赤、緑)。また、PS オリゴでのみ、同じ塩基構成でも溶出挙動が大きく変動する結果も確認され、PS-2 では複数のピークが観測された (図 1、PS オリゴ ; 黒、青)。これは PS オリゴの高い疎水性あるいはジASTEレオマー混合物であるという構造特性が溶出挙動に関係したためと推察した。一方、移動相の pH、緩衝液種及び添加塩については、緩衝液種の違いによる影響が PS オリゴで確認された (図 1、D ; Tris pH 7.4、E ; リン酸 pH 7.4)。なお、塩の種類は分離に影響しなかった。図 2A に代表的なクロマトグラムとして、

ピークが複数確認された PS オリゴである PS-2 の NaCl の結果を、図 2B に同じく KCl の結果を示したが、両者は同じクロマトグラムであった。

また、PS-2 では、移動相中の塩濃度が高くなるにつれて溶出が遅いピークの割合が増えた（図 2、黒；100 mmol/L、青；300 mmol/L、赤；500 mmol/L）。これは塩濃度が高くなることで配位する陽イオンの数が増え、結果コンパクトな構造に集約したためではないかと推察した。

しかしながら、移動相の塩濃度を高くすることで溶質の高次構造が集約してしまうということは、分析環境が原因でその品質を見誤ることになるため品質管理の分析としては適さないこと、加えて、高い塩濃度の移動相は塩が析出しやすいため HPLC への負荷が大きく、結果として再現性の低いデータとなりやすいことから、塩濃度は高くしすぎないことが重要であると考えられた。一方、たん白質の SEC による分析において、移動相中の塩濃度が低い場合には試料がカラムに吸着して溶出しないためにピークが回収できず、結果としてピーク面積値が小さくなることがある。オリゴヌクレオチドも電荷を有する分子であることから、たん白質同様に移動相中の塩濃度がピーク回収に影響する可能性が考えられる。そこで、PS-3 及び PS-4 を用い、各塩濃度条件においてサンプル注入量を 10 μ L から 30 μ L で変動させた際の総ピーク面積の変動を確認した。横軸にサンプル注入量 (μ L)、縦軸に総ピーク面積をとってプロットした結果を図 3 に、回帰分析で得られた直線の決定係数を表 3 に示した。その結果、移動相の塩濃度によらず PS オリゴのピーク面積はサンプル注入量が同じであればほぼ同じであり、また、いずれの PS オリゴでもサンプル注入量とピーク面積の間に決定係数 0.999 以上の高い直線関係が示された。これより、塩濃度 100 mmol/L から 500 mmol/L ではオリゴヌクレオチドのピークは十分に回収できると考えられた。

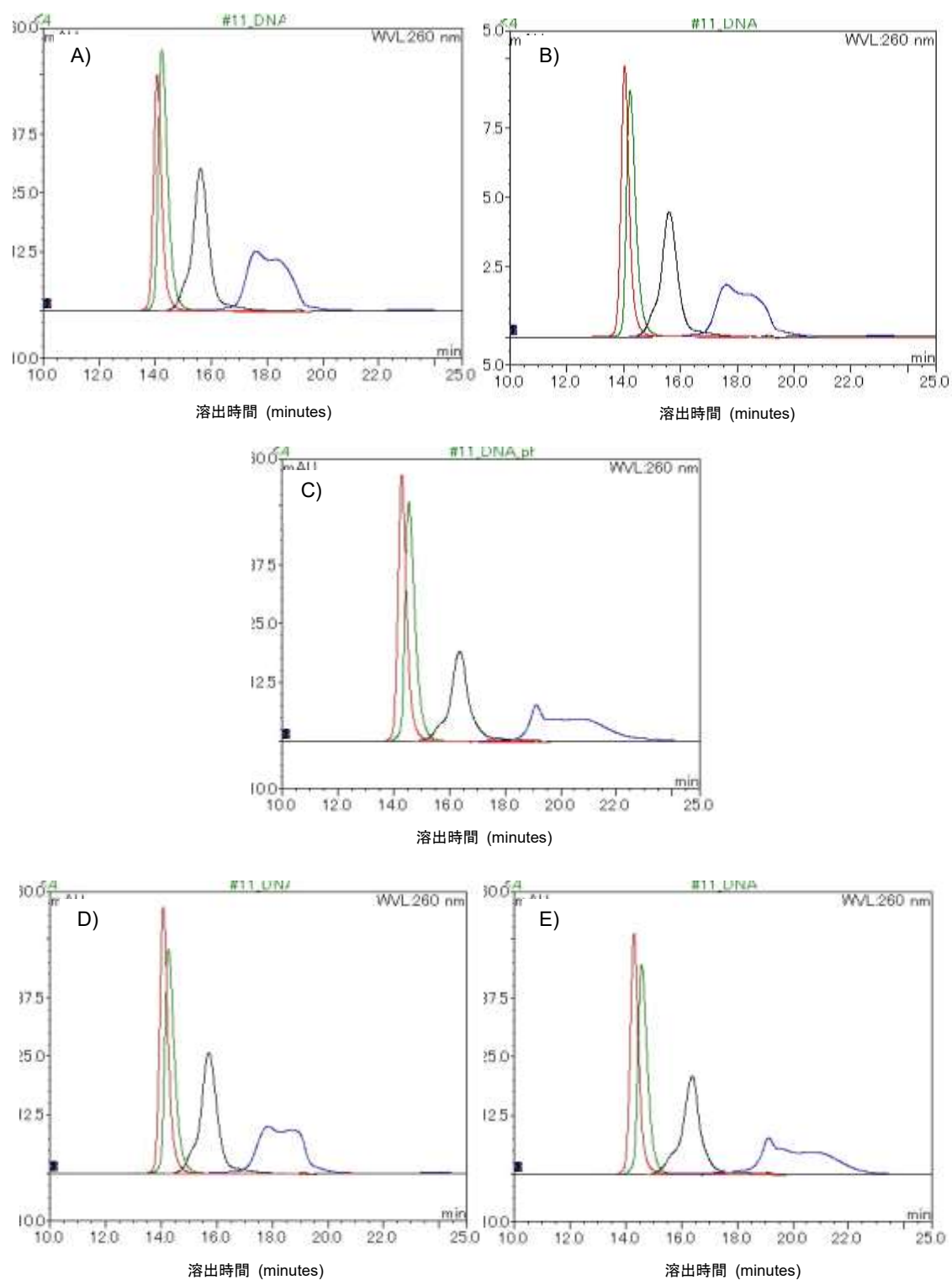


図 1 SEC の移動相緩衝液種類及び pH 検討におけるクロマトグラムの変化

移動相を A; MES pH 6.5、B; リン酸 pH 6.5、C; リン酸 pH 7.0、D; Tris pH 7.4、E; リン酸 pH 7.4 とした際の SEC クロマトグラムを、黒: PS-1、青: PS-2、赤: DNA-1、緑: DNA-2 でそれぞれ示した。オリゴヌクレオチドの配列は表 2 に示した。塩濃度は NaCl 500 mmol/L で行った。

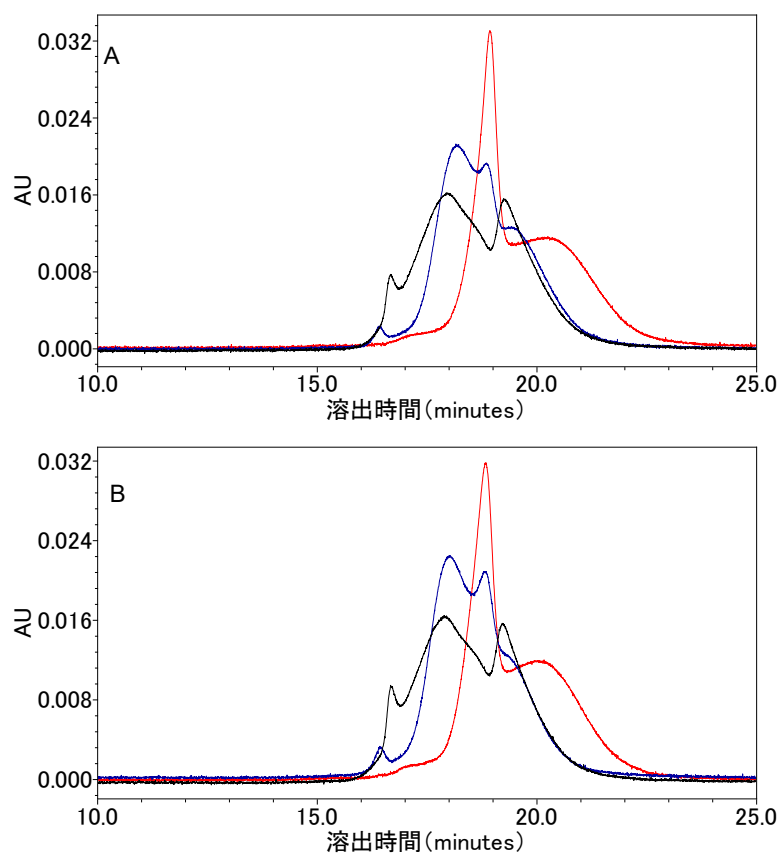


図 2 SEC の移動相組成中の添加塩の種類及び濃度検討における PS オリゴのクロマトグラムの変化
移動相組成の添加塩として、A; NaCl、B; KCl を用いた際のクロマトグラムを示した。分析したオリゴヌクレオチドには PS-2; G(L)⁵(L)^at^tt^gg^ta^tT(L)^aA(L)を用いた。検討した塩濃度結果を、黒：100 mmol/L、青：300 mmol/L、赤：500 mmol/L で示した。いずれもリン酸緩衝液 pH 7.0 で行った。

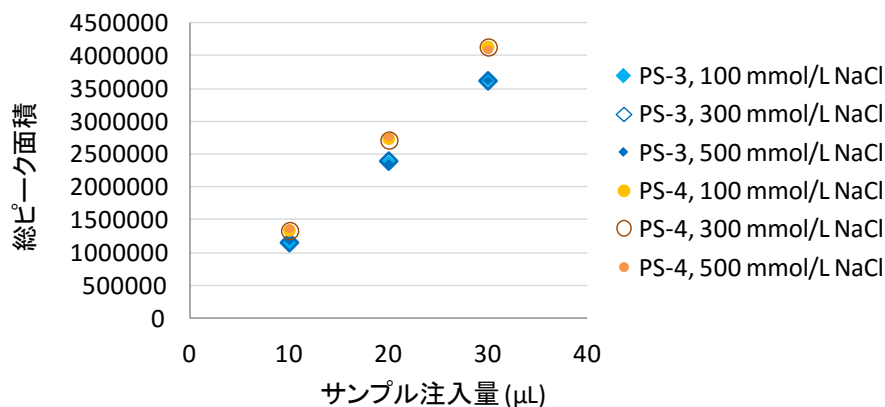


図 3 SEC の移動相組成中の添加 NaCl の濃度と PS オリゴのピーク面積値の依存性
各添加濃度におけるピーク面積と注入量の関係、青◇：PS-3、黄○：PS-4 で示した。オリゴヌクレオチドの配列は表 2 に示した。

以上の結果から、今回の検討範囲では移動相の組成は溶出挙動に大きな影響を与えないと判断し、表 4 の通り設定した。KCl を添加したリン酸緩衝液で高分離が期待できると判断し、添加する塩濃度は、HPLC 測定の再現性が高くなるよう 100 mmol/L を選択した。

表 3 図 3 に示した各プロットの回帰分析から得られた決定係数

塩添加量	PS-3	PS-4
100 mmol/L	1.0000	1.0000
300 mmol/L	1.0000	0.9999
500 mmol/L	0.9996	0.9998

表 4 設定したサイズ排除クロマトグラフィーの分析条件

カラム	Asahi Pak GS-320-HQ
移動相	0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.5
流量	0.5 mL/分
検出	260 nm (UV)
カラム温度	20°C
注入量	50 pmol 相当

第二節 オリゴヌクレオチドのモデル配列デザイン

オリゴヌクレオチドの高次構造の変化を検出する分析方法として、SEC の検出力を検証すべく、10 から 25 mer のオリゴヌクレオチドについて、特定の構造をとる、あるいはとらないようなモデル配列を設計した（表 5）。

まず、高次構造の形成を想定しない一本鎖のグループと相補的な二本鎖を組

むグループを設計、設定した。高次構造をとらないと想定される一本鎖の配列として、10、15、20、25 mer それぞれで 4 種類ずつを設計し、同じ塩基長のホモチミン及びホモアデニン配列を加えて合計で 24 種類を設定した（表 5、グループ 1、シングル）。また、二本鎖として、グループ 1 シングルで設計した配列から相補的に形成される二本鎖を、各塩基長で 2 種類ずつ合計 8 種類設定した。なお、ホモチミンとホモアデニンから形成される二本鎖は安定性が低く、また三本鎖を形成する場合もあることから、今回の二本鎖としての検討には用いなかった。ここで確認された挙動を基に、さらに高次構造を形成すると想定される以下の配列の溶出挙動を確認することで SEC の検出力を評価することとした。

一本鎖オリゴヌクレオチドが高次構造をとる、さらにはその構造が変化する現象の代表例として、a) 同じ配列同士で相補鎖を組んでしまう配列、b) 配列内で折れ曲がり相補鎖を組んでしまう配列、c) グアニン塩基を多く含み高次構造形成が既に報告されている配列があり、加えて、シトシン塩基を多く含む配列では低 pH 条件下での高次構造形成が確認されていることから、今回は a) をグループ 2 自己相補、b) をグループ 3 ヘアピン、c) をグループ 4 G-quadruplex とし、ホモシトシン配列をグループ 5 C ポリマーとして設計、選択した。グループ 4 G-quadruplex に分類されうる配列は数多く報告されているが、その中から 22 mer の配列を選択した。また、G-quadruplex は環境によって高次構造配位の形が変わることも知られていることから、その高次構造配位の分類がハイブリッドに属する配列を 1 種類 [32, 33]、パラレルに属する配列を 2 種類 [34, 35, 42] 選択した。

表 5 設計したオリゴヌクレオチドの配列

Group	Name	Sequence 5'-3'	length	MW	
				PS オリゴ	DNA オリゴ
1 シングル	10S-1	GATCCTGCCG	10	3148.6	3004.0
	10S-1C	CGGCAGGATC	10	3197.7	3053.0
	10S-2	GGTCCGTGAG	10*	3288.7	3084.1
	10S-2C	CTCACGGACC	10	3117.6	2973.0
	10T	TTTTTTTTTT	10*	3124.7	2980.0
	10A	AAAAAAAAAA	10	3214.8	3070.1
	15S-1	GCTCCGTCCACTTGC	15	4704.9	4479.9
	15S-1C	GCAAGTGGACGGAGC	15	4892.1	4667.1
	15S-2	CCGTGAGCCTGACAC	15*	4763.0	4538.0
	15S-2C	GTGTCAGGCTCACGG	15	4834.0	4609.0
	15T	TTTTTTTTTTTTTT	15*	4726.0	4501.0
	15A	AAAAAAAAAAAAAA	15	4861.2	4636.2
	20S-1	GCTCCGTCCACTGGCGATCC	20*	6335.3	6029.9
	20S-1C	GGATCGCCAGTGGACGGAGC	20	6513.4	6208.1
	20S-2	CGCCTTGCCGGATCGCTAGC	20*	6375.3	6070.0
	20S-2C	GCTAGCGATCCGGCAAGGCG	20	6473.4	6168.0
	20T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	20*	6327.4	6022.0
	20A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	20	6507.6	6202.2
	25S-1	GCTGCACTGCTACCGTCCACTTGCG	25*	7955.6	7569.9
	25S-1C	CGCAAGTGGACGGTAGCAGTGCAGC	25	8142.8	7757.1
	25S-2	CGCCTTGCCGGATCGCTCGATGGTC	25*	8011.6	7626.0
	25S-2C	GACCATCGAGCGATCCGGCAAGGCG	25	8087.7	7702.0
	25T	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	25*	7928.7	7543.0
	25A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	25	8154.0	7768.3
2 自己相補	20D	CGCGAAATGCGCATTTTCGCG	20	6423.4	6118.0
	24D	CGCGAAATTGGCGCCAATTTTCGCG	24	7723.4	7353.8
3 ヘアピン	21H	CGCGAAATGACGCATTTTCGCG	21	6752.6	6431.2
	27H	CAATCGGATCGAGCATCGATCCGATTG	27	8702.3	8284.4
4 G-quadruplex	22G-1	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG [32, 33]	22	7304.1	6966.6
	22G-2	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA [34, 35]	22	7329.1	6991.6
	22G-3	TTGGGTTGGGTGTTGGGTTGGGTT [42]	22	7268.0	6930.6
5 C ポリマー	10C	CCCCCCCCC	10	2974.5	2829.8
	15C	CCCCCCCCCCCCCCC	15	4500.7	4275.7
	20C	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	20	6027.0	5721.6
	25C	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	25	7553.2	7167.5

*: アセトニトリル添加による検討で使用

設計した配列には塩基長とその特徴を示す名前を付けた。例えば、高次構造を形成しないと想定されるグループ 1 シングルでつけた名称として「10S-1C」は、10 mer のシングル (S) 1組目の相補配列 (C)、を示す。同様に、グループ 2 自己相補では D (例えば 20D)、グループ 3 ヘアピンでは H (同、21H) とし、同じ塩基長で 3 種類の配列を設定したグループ 4 G-quadruplex では「22G-X (X=1, 2 or 3)」、同一塩基のみで構成された配列ではその塩基名 (T、A および C) を用いた。

上記の通り設計設定したオリゴヌクレオチドを、PS オリゴ、DNA オリゴ両方用いて以下、SEC の検出力確認を行うこととした。一方、複数の修飾によって要因が増加すると結果の取り扱いも複雑化して SEC の検出力の判断が難しくなることが先の検討より想定されたため、以後の検討においては、修飾核酸として LNA は用いないこととした。

第三節 DNA オリゴを用いた高次構造検出検討

先述の通り、SEC の DNA オリゴの高次構造検出については Largy らが有用性を報告している [42]。しかしその有用性は移動相を各高次構造に最適な条件で設定した上での報告のため、品質試験方法への適用を想定した場合、試験回数の拡大に加え想定しない高次構造への検出力が不明であることなどの課題がある。ある一つの分析条件において複数の高次構造の検出力が確認できれば有用性は非常に高くなることから、先に決定した SEC 条件を用いて各構造の DNA オリゴを分析し、SEC の検出力を確認した。検討に用いたオリゴヌクレオチドは第二節で設計した表 5 に示した配列とした。グループ 1 の一部配列を用いた二

本鎖についても検討対象とした。

グループ 1 の代表的なクロマトグラムとして、異なる塩基長のホモチミンを対象として分析した結果を、10T (図 4、A)、15T (図 4、B)、20T (図 4、C) および 25T (図 4、D) に示した。塩基長が長くなるに従い溶出時間が 14 分付近から 12 分付近へと短くなっており、SEC の原理に従って分離していることが示された。二本鎖の代表的なクロマトグラムとして、10S-1/10S-1C (図 5、A)、15S-1/15S-1C (図 5、B)、20S-1/20S-1C (図 5、C) および 25S-1/25S-1C (図 5、D) の相補的二本鎖のクロマトグラムを示した。二本鎖の SEC クロマトグラムにおいても塩基長が長くなるに従い溶出時間が短くなっており、SEC 原理に基づく分離が確認できた。

先の報告で DNA オリゴの高次構造の違いがストークス半径の違いとなって SEC により検出されていることから、今回の SEC 分析結果についても同様な解析を行い、検出力を確認した。すなわち、横軸にピークの溶出時間を、縦軸に分子量の常用対数をそれぞれにとってプロット及び直線性を確認した。ここで、分子量の値はオリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量とした。つまり、二本鎖の場合には、二本のオリゴヌクレオチドの分子量合計の平均値を採用した。これは、プロットから関係性と検出力を確認する際に、分子量のみで二本鎖を識別できたりできなかったりすることを回避するためである。図 6 に、グループ 1 シングル (黒○) および二本鎖 (黒●) の結果をそれぞれプロットし、回帰直線を作成した。グループ 1 シングルでは $r^2=0.965$ 、二本鎖では $r^2=0.999$ と、ともに高い決定係数を示す直線が得られた。また、これら二つの直線はほぼ同じ傾きを有し、プロットも重なることがなかった。これより、本 SEC 条件では DNA オリゴの一本鎖と二本鎖を識別できることが示された。

次に、高次構造を形成すると想定されるグループ 2~5 の結果をプロットし、

先に作成した二本の直線と比較し、SEC でどのように検出されるかを確認した。グループ 2 自己相補 (図 6、青■) は二本鎖 (図 6、黒●) の直線上にプロットされた。これより、自己相補は二本鎖であると SEC により検出できることが示された。一方、グループ 3 ヘアピン (図 6、青□) はシングル (図 6、黒○) よりもさらに右側にシングル及び二本鎖と重ならずプロットされた。これより、ヘアピンは一本鎖と二本鎖それぞれと識別できると判断した。加えて、このヘアピンで直線をひいた場合、一本鎖、二本鎖と同様の傾きを持つ直線が得られることが示唆されたことから、さらにヘアピンとして個別に識別できる可能性が示された。また、一本鎖の直線よりも右側にプロットされたことから、ヘアピン構造は一本鎖よりもコンパクトであると考えられた。グループ 4 G-quadruplex (図 6、青×) はヘアピン同様、シングル及び二本鎖とプロットが重ならなかったことからこれらとは識別できることが示唆されたが傾向がなかったことから、一本鎖と識別し且つ G-quadruplex として同定することは難しいと考えられた。一方、グループ 5 C ポリマー (図 6、青*) はシングル (図 6、黒○) の直線上に、それぞれプロットされた。塩基にシトシンが多く含まれる場合、低 pH 条件下では高次構造を形成することが知られているが、今回の SEC 条件は pH 7.5 であったことから、構造を形成せず一本鎖であったものと推察された。

以上の結果から、今回の SEC 条件では DNA オリゴの一本鎖、二本鎖及びヘアピン構造の識別ができる検出力があると判断した。

ここで、G-quadruplex 形成が確認されている 3 種類の配列はいずれも同じ塩基長 22 mer の配列を用いたが、溶出時間が大きく異なる結果となった (図 7)。G-quadruplex の構造形成にはいくつかの様式が知られているが、本検討においてはその内ハイブリッド型、パラレル型として知られる 2 種類を選択した。ハイブリッド型の 22G-1 (図 7、黒) とパラレル型の 22G-2 (図 7、青) 及び 22G-3 (図

7、赤) の溶出時間に特徴はなく、構造配位との関係性は示せなかった。

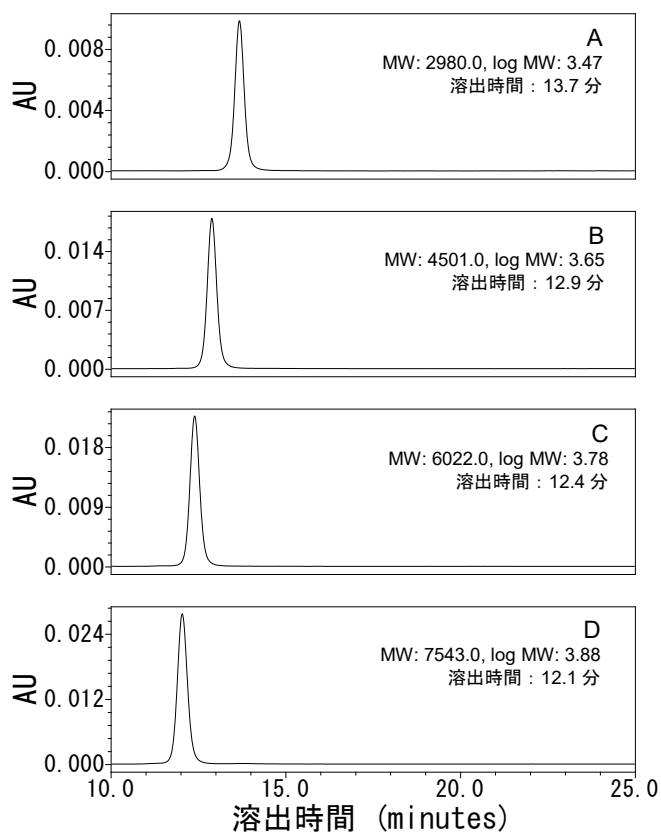


図 4 一本鎖シングルの代表的な SEC クロマトグラム
(DNA オリゴ)

一本鎖 DNA オリゴの代表的な SEC クロマトグラムとして、異なる塩基長のホモチミンの結果を A: 10T, B: 15T, C: 20T, D: 25T で示した。分子量とその常用対数及びピークの溶出時間を併せて記載した。

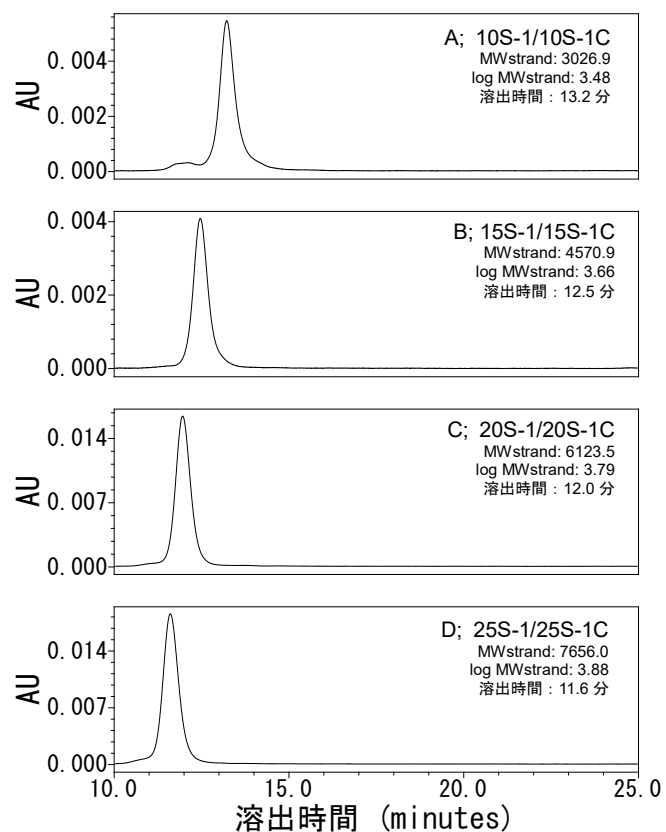


図 5 二本鎖の代表的な SEC クロマトグラム
(DNA オリゴ)

二本鎖 DNA オリゴの代表的な SEC クロマトグラムとして、A: 10S-1/10S-1C, B: 15S-1/15S-1C, C: 20S-1/20S-1C, D: 25S-1/25S-1C の結果を示した。オリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量とその常用対数及び溶出時間を併せて記載した。

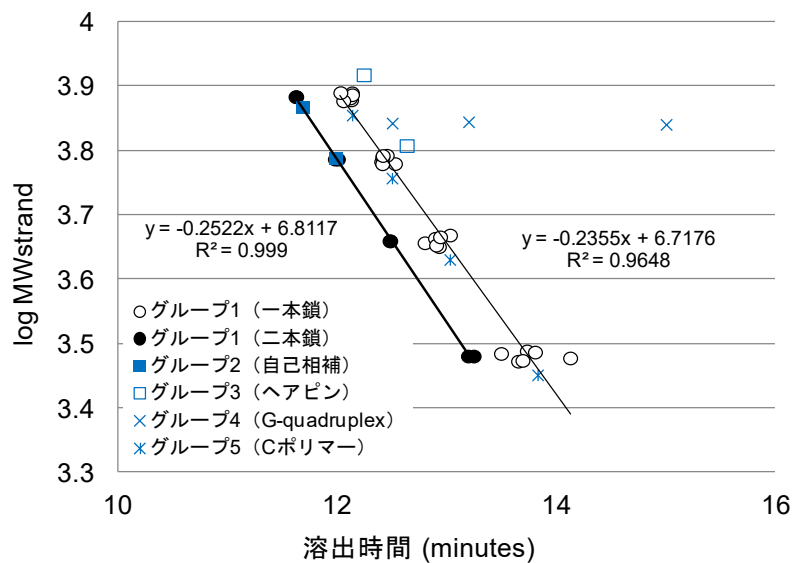


図 6 DNA オリゴにおけるピーク溶出時間とオリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量との関係

表 5 に示した配列の DNA オリゴにつき、SEC 分析により得られたピークの溶出時間を横軸に、分析試料のオリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量の常用対数を縦軸にとりプロットを作成した。グループ 1 シングル（黒○）及びグループ 1 の相補配列から調製した二本鎖（黒●）のプロットに対してそれぞれ直線を作成し、得られた式と決定係数を図中に示した。

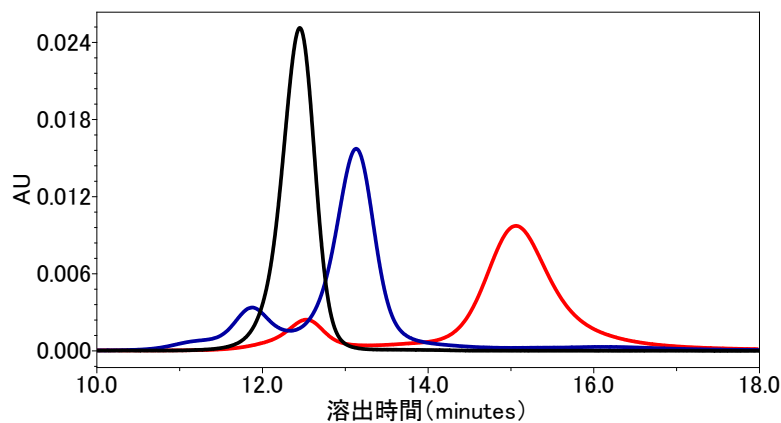


図 7 G-quadruplex の SEC クロマトグラム (DNA オリゴ)

DNA オリゴにおけるグループ 4 G-quadruplex 配列の SEC クロマトグラムを、黒：22G-1; AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG、青：22G-1; TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA、赤：22G-3; TTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT で示した。

第四節 PS オリゴを用いた高次構造検出検討

今回設定した SEC 分析条件を用いることで、DNA オリゴにおいて一本鎖、二本鎖及びヘアピン構造に対しての構造検出力が確認された（第一章、第三節）。そこで、本分析条件の PS オリゴでの構造検出への適用能力を検証することとした。配列は DNA オリゴの検討と同じく第二節で設計した配列を用いた（表 5）。

PS オリゴにおいても、DNA オリゴと同様に塩基長が長くなるに従って溶出時間が短くなる SEC 原理に基づいた分離が確認された。一方、溶出挙動は同一配列の DNA オリゴと異なり、ピークの溶出時間が長く、ブロードな形状となった。PS オリゴの代表的な SEC クロマトグラムとして異なる塩基長のホモチミンである 10T、15T、20T 及び 25T の SEC クロマトグラム結果を図 8 に、PS オリゴを赤クロマトグラム、DNA オリゴを黒クロマトグラムで示した。同じ塩基長での結果を比較すると、例えば配列名 15T は PS オリゴでは 16 分弱に溶出する（図 8、赤点線）が DNA オリゴでは 13 分強（図 8、黒点線）と、溶出時間が大きく異なっており、PS オリゴのほうがブロードなピーク形状を示すことが示された。ここで認められた PS オリゴの DNA オリゴとの溶出挙動の違いは、PS オリゴの高い疎水性あるいはジアステレオマー混合物であるという構造特性に起因すると考えた。また、PS オリゴの二本鎖の代表的な SEC クロマトグラムを図 9 に示したが、PS オリゴ 10 mer では二本のピークが確認された（図 9A、黒）。PS オリゴ 10 mer の二本鎖における T_m 値は 35°C 付近と低く（表 6）、また、確認された二本のピークの溶出時間は構成している一本鎖オリゴヌクレオチドの溶出時間に相当したことから、SEC 分析上では PS オリゴの 10 mer は二本鎖を形成していないと判断した。そのため、以降の PS オリゴの解析においては 10 mer の二本鎖のデータは除外した。

PS オリゴについても DNA オリゴにおける解析（第一章、第三節）と同様、溶出時間を横軸に、オリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量の常用対数を縦軸にとったプロットを作成して高次構造の検出力を確認した。まず、表 5 グループ 1 シングル（図 10、赤△）及び二本鎖（図 10、赤▲）の結果からそれぞれ直線を作成した。二本鎖では決定係数 $r^2=0.996$ の相関の高い直線が得られたのに対し、グループ 1 シングルである一本鎖では $r^2=0.845$ とそれほど高くはなかった。これは、一本鎖 PS オリゴにおいて同一塩基長で溶出時間がバラついたことが原因であった。しかしながら、PS オリゴでも一本鎖と二本鎖のプロットは重ならず、これらの識別はできることと考えられた。

次に、高次構造を形成すると想定されるグループ 2～5 の結果をプロットして検出力を確認した。表 5 グループ 2 自己相補（図 10、青■）は二本鎖（図 10、赤▲）の直線状にプロットされ、DNA オリゴ同様、二本鎖であると SEC により検出できることが示された。しかし、グループ 3 ヘアピン（図 10、青□）、グループ 4 G-quadruplex（図 10、青×）及びグループ 5 C ポリマー（図 10、青*）はいずれも、二本鎖のプロットとは重ならず識別できた一方で、一本鎖のバラツきのなかに含まれたことからそれぞれを一本鎖と識別することはできなかった。以上の結果から、今回の SEC 条件では PS オリゴの一本鎖及び二本鎖の構造識別が可能であると結論付けた。

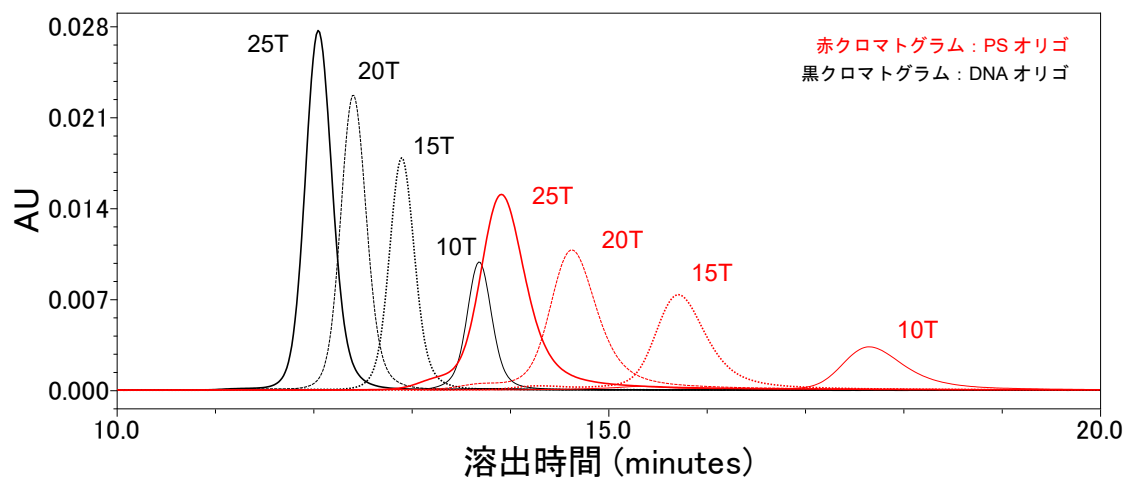


図 8 PS オリゴ及び DNA オリゴの SEC クロマトグラム比較（一本鎖）

ホモチミン配列の PS オリゴを赤クロマトグラムで、DNA オリゴの結果を黒クロマトグラムで示した。ピークの頂点付近に、各ピークの配列名を示した。配列名は表 5 参照。

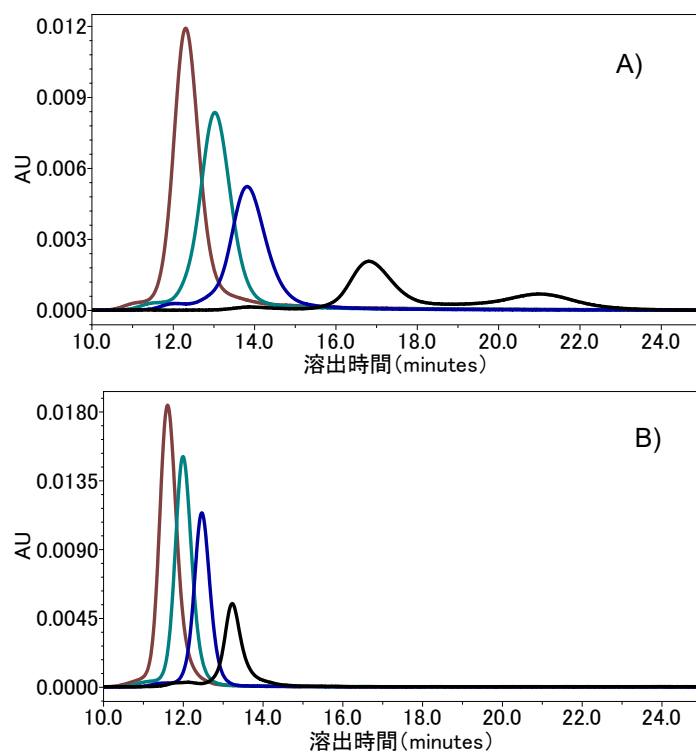


図 9 PS オリゴ及び DNA オリゴの SEC クロマトグラム比較（二本鎖）

A : PS オリゴ、B : DNA オリゴとして、二本鎖の SEC クロマトグラムを示した。いずれも同じ配列の結果である。黒 : 10mer; GATCCTGCCG/CGGCAGGATC、青 : 15mer; CCGTGAGCCTGACAC/GTGTCAGGCTCACGG、緑 : 20mer; CGCCTTGCCGGATCGCTAGC/GCTAGCGATCCGGCAAGGCG、茶 : 25mer; CGCCTTGCCGGATCGCTCGATGGTC/GACCATCGAGCGATCCGGCAAGGCG。

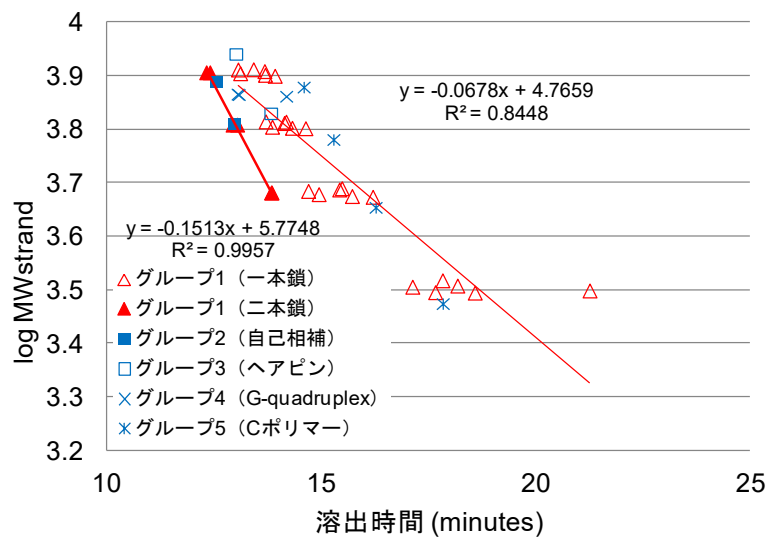


図 10 PS オリゴにおけるピーク溶出時間とオリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量との関係

表 5 に示した配列の PS オリゴにつき、SEC 分析により得られたピークの溶出時間を横軸に、分析試料のオリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量の常用対数を縦軸にとりプロットを作成した。グループ 1 シングル (△) 及びグループ 1 の相補配列から調製した相補的二本鎖 (▲) のプロットに対してそれぞれ直線を作成し、得られた式と決定係数を図中に示した。

表 6 PS オリゴ及び DNA オリゴの 10 mer、15 mer の T_m 値

塩基長	Sequence	T_m (°C)	
		PS オリゴ	DNA オリゴ
10	GATCCTGCCG CGGCAGGATC	34.2	48.8
10	GGTCCGTGAG CTCACGGACC	34.6	48.9
15	GCTCCGTCCACTTGC GCAAGTGGACGGAGC	48.1	N.T.
15	CCGTGAGCCTGACAC GTGTCAGGCTCACGG	49.5	N.T.

N.T.; Not tested

ここで、PS オリゴで認められたピークのブロード化と溶出時間の遅延は PS オリゴの有する高い疎水性に起因し、カラム充填剤との相互作用の効果が強まり分離に大きく影響した、と仮説を立てた。そこで、カラム充填剤との相互作用を減弱させることを目的として移動相中に有機溶媒を添加し、溶出挙動の変動により検証することとした。疎水性の高い溶質の SEC 分析において、移動相中に有機溶媒を加えることは一般的に行われている。今回、有機溶媒としてアセトニトリルを選択し、移動相中に 10%あるいは 40%となるよう添加してクロマトグラムの変動を確認した。

図 11 にアセトニトリル添加による変動の代表的なクロマトグラムとして、ホモチミン 10T の結果を示した。DNA オリゴでは 40%アセトニトリル添加により 13.6 分付近（図 11A 黒クロマトグラム；0% 添加）であった溶出時間が 12.9 分付近に（図 11A 赤クロマトグラム；40%添加）、PS オリゴでは 17.8 分付近（図 11B 黒クロマトグラム；0% 添加）から 13.5 分（図 11B 赤クロマトグラム；40% 添加）へと、ピークの溶出時間が大幅に短くなった。また、ピーク形状については、DNA オリゴではそれほど大きな変化は認められなかったのに対し、PS オリゴでは 40%添加により劇的にシャープとなり、DNA オリゴと似た形状となった。40%添加により PS オリゴでの溶出挙動が大きく変化したことから、表 5 中アタリスクで示したグループ 1 シングルの配列について、0%アセトニトリル添加及び 40%アセトニトリル添加の結果から溶出時間と分子量の関係プロットを作成して直線の変化を確認した（それぞれ、図 12、実線及び点線）。その結果、一本鎖 PS オリゴで確認されていた同じ塩基長での溶出時間のばらつき（図 12、赤△）は 40%アセトニトリル添加により解消され（図 12、赤▲）、直線の傾きも -0.090（図 12、赤△）から -0.220（図 12、赤▲）へ大きく変化した。40%アセトニトリル添加時の直線の傾き（-0.220）は DNA オリゴで得られた傾き（0%添加：

-0.246、40%添加：-0.263）に近くなった。これより 40%アセトニトリル添加により PS オリゴの溶出挙動は DNA オリゴと近くなったことが示唆された。ただし、PS オリゴは DNA オリゴよりも遅く溶出し、プロットが重なることはなかった。以上結果より、PS オリゴで確認されたピークのブロード化、溶出時間のばらつきは、PS オリゴとカラム充填剤との疎水的相互作用に起因するものと結論付けた。

SEC 分析の大きな特徴の一つに、高い塩濃度あるいは有機溶媒を含まない移動相下で分析可能である点がある。これはすなわち溶質が持つ構造を反映させた状態での分析が可能であることを意味しており、この特長ゆえに特にたん白質医薬品の有効性、安全性を保証していく品質管理手法として SEC が多用されている。今回、有機溶媒を添加することで、オリゴヌクレオチドのカラム充填剤との相互作用が減弱できることが示され、PS オリゴの分析への応用の可能性が示唆されたが一方で、有機溶媒使用にあたっては溶質の構造維持への影響を確認しておく必要があると考えられる。

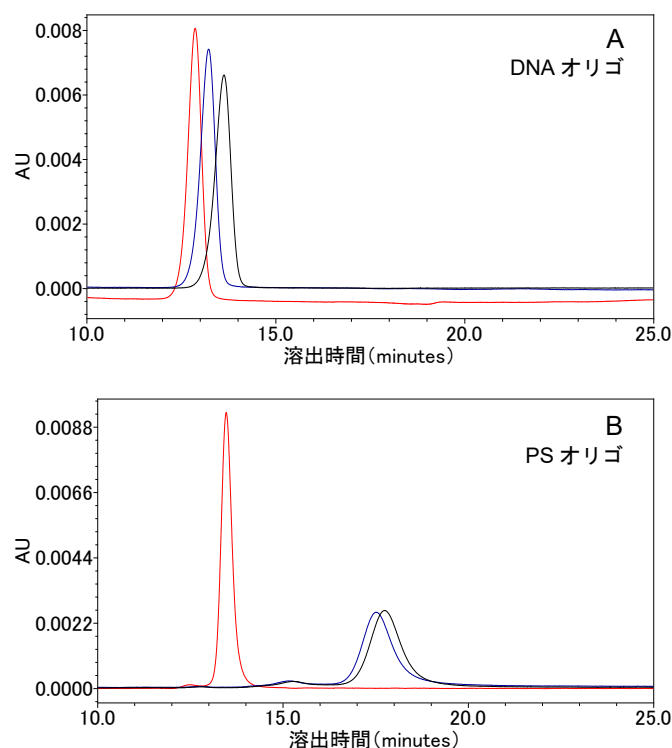


図 11 移動相へのアセトニトリル添加による 10T の SEC クロマトグラム変化
T の 10 mer である 10T について、移動相にアセトニトリルを添加した際のクロマトグラム変化を、0%添加: 黒クロマトグラム、10%添加: 青クロマトグラム、40%添加: 赤クロマトグラムでそれぞれ示した。A に DNA オリゴ、B に PS オリゴの結果を示した。

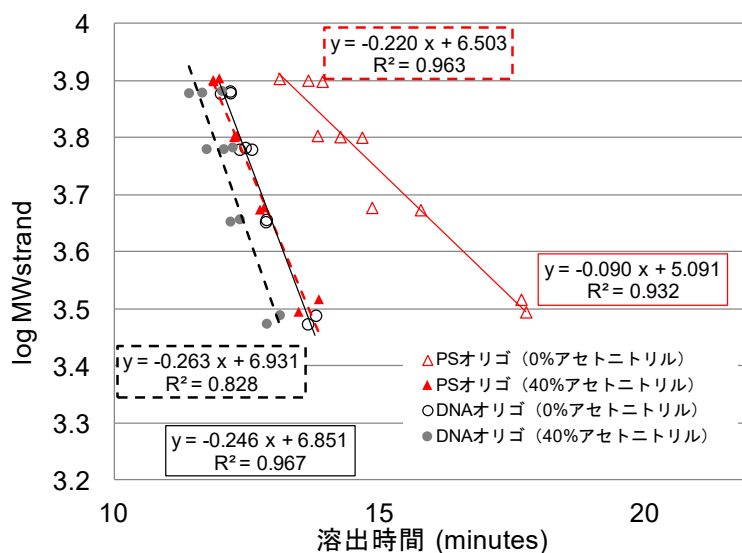


図 12 アセトニトリル添加による SEC 溶出時間と分子量のプロット変化

表 5 に示した一本鎖配列の PS オリゴ及び DNA オリゴについて、移動相中にアセトニトリルを添加した結果から、ピークの溶出時間を横軸に、分析試料のオリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量の常用対数を縦軸にとりプロットを作成した。データには 0%及び 40%アセトニトリル添加を用いた。それぞれのグループで直線を作成し、得られた式と決定係数を図中に示した。黒: DNA オリゴ、赤: PS オリゴの結果を示し、0%添加を白抜きマーカーの実線で、40%添加を塗りつぶしマーカーの点線でそれぞれ示した。

第二章 オリゴヌクレオチド高次構造の多面的評価からみるサイズ排除クロマトグラフィーの検出力

第一章において、DNA オリゴ、PS オリゴに共通して高次構造を評価できる SEC 分析条件を設定し、DNA オリゴでは一本鎖、二本鎖、ヘアピンを、PS オリゴでは一本鎖、二本鎖を、それぞれ識別可能であることを確認した。本章ではその結果について、円二色性スペクトル (CD スペクトル) 測定による二次構造解析 (第一節)、van't Hoff プロットを応用した高次構造形成確認 (第二節) の両面から評価検証した。さらに、高次構造混合物に対して検出力を確認することで、SEC のオリゴヌクレオチド品質評価方法としての有用性について評価した (第三節)。

第一節 円二色性スペクトル測定による二次構造評価

本節では、第一章第二節で設計した配列の DNA オリゴ及び PS オリゴについて、CD スペクトル測定により二次構造を確認し、SEC の検出力結果との関係性について考察する。一般的に、オリゴヌクレオチドの二次構造は CD スペクトル測定や NMR により確認される。先に述べたように、オリゴヌクレオチドの高次構造はその環境下によって構造配位が変わることが知られているため、SEC 結果と比較考察できるよう、CD スペクトル測定は、オリゴヌクレオチドを SEC 移動相で希釈して用い、SEC の分析時カラム温度である 20°C で行った。

表 2 で示した配列各グループの代表的な CD スペクトルの結果として、グループ 1 シングルから 20 mer 前後の配列の結果を図 13 A, B に、グループ 2 自己相補の結果を図 13 C, D に、グループ 3 ヘアピンの結果を図 13 E, F に、グループ 4 G-quadruplex の結果を図 13 G, H に、それぞれ A, C, E, G に DNA オリゴを、B,

D, F, H に PS オリゴの結果を並べて示した。

その結果、いずれの配列についても、同一配列の場合 DNA オリゴ (図 13、A, C, E, G) と PS オリゴ (図 13、B, D, F, H) は同じ CD スペクトルパターンを示した。これより、DNA オリゴと PS オリゴは SEC 分析条件下で同じ二次構造を有していることが示された。

一方、オリゴヌクレオチドに特徴的な CD スペクトルパターンが、グループ 2 自己相補 (図 13、C, D) とグループ 4 G-quadruplex (図 13 G, H) で確認された。前者ではいずれの配列においても、B 型 DNA 構造で特徴的な 250 nm 付近に負の、280 nm 付近に正の極大が確認された。後者で得られた CD スペクトルは、各配列ですでに報告されているスペクトルパターンとそれぞれ一致した。すなわち、22G-1 配列は K^+ イオン存在下ではハイブリッド型 G-quadruplex を優位に形成すると報告されており [32, 33]、そこで得られる CD スペクトルパターンと一致した (図 13 G, H、黒)。22G-2 及び 22G-3 配列は平行型と報告されており [34, 35, 42]、いずれも平行型に特徴的な CD スペクトルと一致した (図 13 G, H、青及び赤)。加えて、一本鎖、ヘアピンでは B 型 DNA に似た CD スペクトルの特徴を示したが、極大の強度が小さく極大波長も若干ずれたことから、B 型 DNA 二次構造に近い構造をとっている可能性が示唆された。つまり、今回の SEC 分析時には、一本鎖、二本鎖、ヘアピン構造を形成すると想定するオリゴヌクレオチドは、いずれも CD スペクトル上では B 型 DNA 構造あるいはそれに近い構造として観測され、G-quadruplex は配列から想定される構造を反映した CD スペクトルを与えることが確認された。SEC では DNA オリゴにおいても完全な識別が難しかった G-quadruplex は CD では構造確認が可能であったのに対し、SEC で検出された一本鎖、二本鎖、ヘアピン構造の識別は CD では達成できなかった。

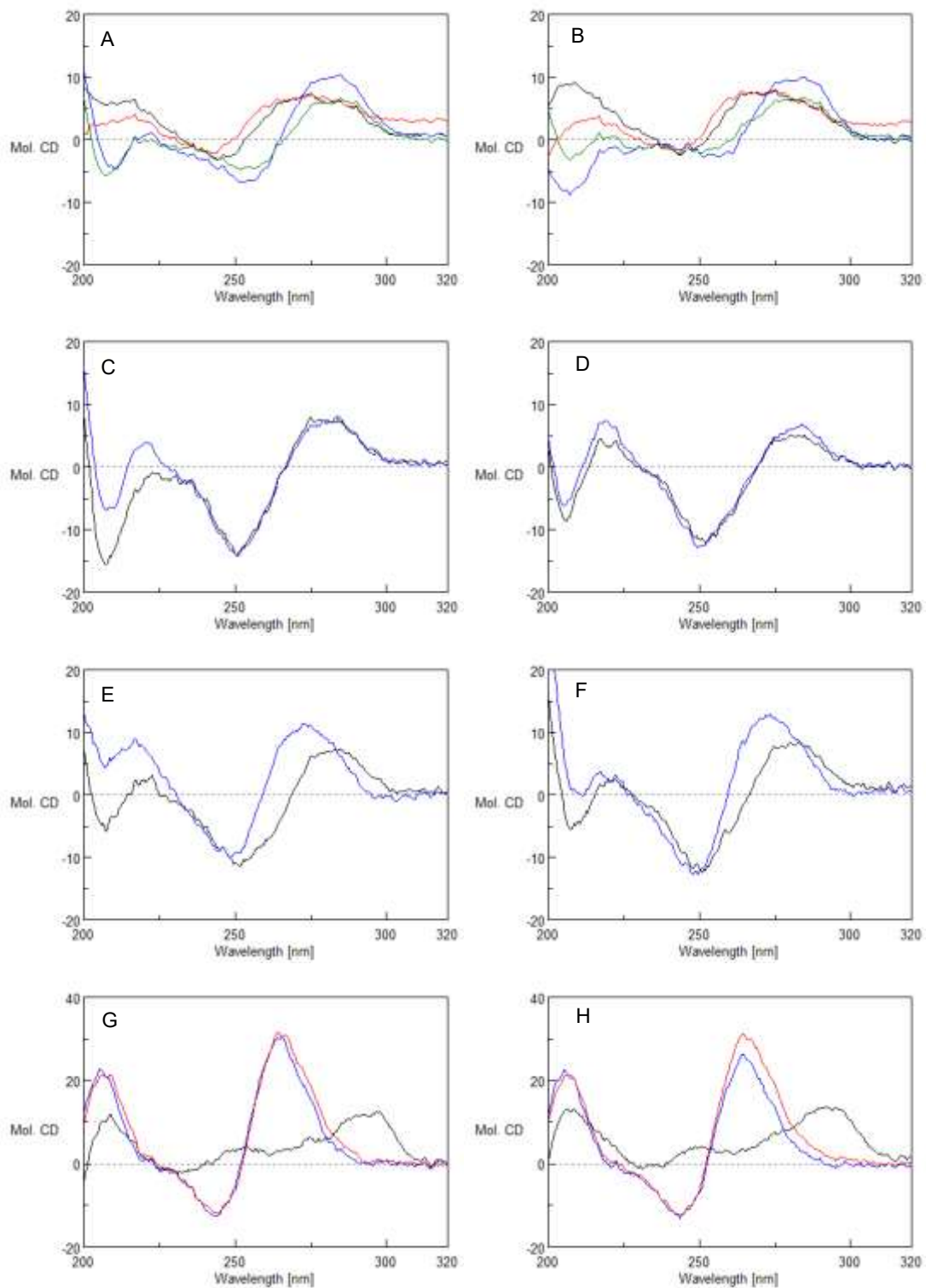


図 13 オリゴヌクレオチドの CD スペクトル

A, B: 一本鎖 (赤; 15S-2C, 黒; 20S-1C, 緑; 20S-2, 青; 25S-1)、C, D: 自己相補 (黒; 20D, 青; 24D)、E, F: ヘアピン (黒; 21H, 青; 27H)、G, H: G-quadruplex (黒; 22G-1, 青; 22G-2, 赤; 22G-3) の CD スペクトル。A, C, E, G: DNA オリゴ、B, D, F, H: PS オリゴ。試料は SEC 分析で用いた移動相に溶解させ、SEC 分析温度の 20°C で行った際の CD スペクトルを示す。配列は表 5 参照。

第二節 van't Hoff プロットを応用した高次構造形成評価

第二章第一節で示した通り、CD スペクトルにより SEC 分析条件下において G-quadruplex がその特徴的な二次構造を有していることが確認された一方、SEC で識別できた一本鎖、自己相補により形成された二本鎖、ヘアピンは B 型 DNA に近いと確認され、各々の識別には至らなかった。さらに SEC においても、PS オリゴでは一本鎖とヘアピン構造は識別に至っていない。加えて、今回設計したヘアピンは一つあるいは三つのミスマッチで自己相補的な二本鎖を形成する可能性がある。そこで、配列設計時の想定通りに構造体が形成されているか、すなわち、同一配列の分子間で相補的二本鎖（自己相補）が、あるいは、同一分子内での相補鎖（ヘアピン）が形成されているかについて、 T_m 値のオリゴヌクレオチドの濃度依存性により検証した。 T_m 値が濃度依存的に高くなる場合には分子間での、依存性がない場合には分子内での相互作用である。この検証を、オリゴヌクレオチド濃度の自然対数を横軸に、縦軸に T_m 値 (K) の逆数をとった、van't Hoff プロット [44] を応用して実施した。分子間で二本鎖を形成させている場合には T_m 値は濃度依存的に高くなることからこのプロットは負の傾きをもち、同一分子内で相補鎖を形成している場合 T_m 値は濃度に関係なく一定となるためこのプロットの傾きは 0 に近くなる。

表 5 に示したグループ 2 自己相補及びグループ 3 ヘアピンについて、得られた T_m 値結果から先に示した軸での van't Hoff プロットを作成した (図 14)。DNA オリゴ、PS オリゴいずれにおいても、グループ 2 自己相補では傾きが生じた (DNA オリゴ : 図 14、黒■及び黒□、PS オリゴ : 図 14、赤■及び赤□) のに対し、グループ 3 ヘアピンはほぼ傾きが生じず 0 に近くなった (図 14、DNA オリゴ ; 黒◆及び黒◇、PS オリゴ ; 赤◆及び赤◇)。これより、当初の設計通りグ

グループ 2 自己相補は分子間で、グループ 3 ヘアピンは分子内で、それぞれ二本鎖を形成していることが示された。

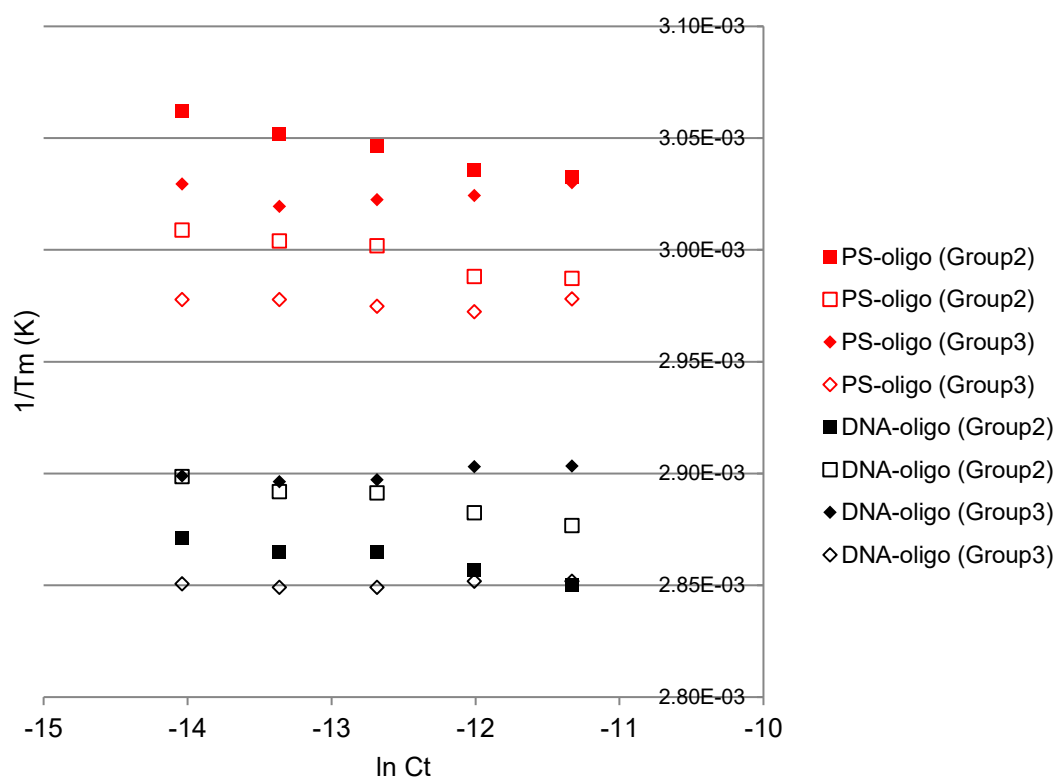


図 14 van't Hoff プロット

表 5 中グループ 2 自己相補及びグループ 3 ヘアピンの両試料を用い、オリゴヌクレオチド濃度を変化させた際の T_m 値の変動をプロットにより確認した。PS オリゴの結果を赤で、DNA オリゴの結果を黒で示し、用いた配列は表 5 に示した。

第三節 熱力学的安定性が異なる高次構造混合物のサイズ排除クロマトグラフィーによる検出

オリゴヌクレオチドの高次構造はアニーリングにより最も安定な構造へ収束する。これまで論じた SEC 結果は全て、オリゴヌクレオチドを分析前にアニー

リングし、安定な構造に収束させた後の試料の結果を用いたものである。一方、製造後のオリゴヌクレオチドの高次構造は、その製造工程中の環境下で形成された高次構造の混合物である可能性がある。例えば、自己相補配列であれば、一本鎖、自己相補で形成された二本鎖、ヘアピン構造、の各構造をとる可能性が考えられる。この場合、その製造工程環境などによってその混合物の構成割合が変動する可能性、及びそれが原因で有効性あるいは安全性に影響を及ぼすことも考えられる。そこで、構造状態の確認と、その検出に対する SEC 検出力について評価した。方法としては、これまでサンプル調製の一環として実施したオリゴヌクレオチドの測定前アニーリングを有りあるいは無しとし、クロマトグラム変化するかを確認することとした。分析には表 5 のグループ 2 自己相補、グループ 3 ヘアピンを用いた。

グループ 2 自己相補について、アニーリングなし及びありで SEC の分析を行った結果、アニーリングなしでは、DNA オリゴ（図 15、黒クロマトグラム、点線）、PS オリゴ（図 15、赤クロマトグラム、点線）のいずれにおいても二つのピークが検出された（図 15、点線）。一方、アニーリングありでは、DNA オリゴ（図 15、黒クロマトグラム、実線）、PS オリゴ（図 15、赤クロマトグラム、実線）のいずれにおいても、二本あったピークうち溶出時間が短いピークに収束した。先の検討にこれら二本のピークの溶出時間を当てはめると、溶出時間が短いピークは二本鎖であり（DNA オリゴ；図 16 青■、PS オリゴ：図 17 青■）、長いピークは DNA オリゴではヘアピン（図 16 青□）、PS オリゴは一本鎖と識別された（図 17 青□）。グループ 3 ヘアピンでは DNA オリゴのみアニーリング前後でクロマトグラムの変化が確認でき（図 18、黒）、二つのピークが溶出時間の長いピークに収束した（図 18 黒点線が黒実線へ）。DNA オリゴで確認された二つのピークのうち溶出時間の短いピークは二本鎖（図 16、緑■）、収束した

ピークはヘアピンのピークであること（図 16、緑□）は直線の当てはめから確認できており、SEC を用いることで自己相補と同様に構造変化を検出することができた。ただし、PS オリゴでは、アニーリング前後でクロマトグラムが変化しなかった（図 18、赤）。第一章の検討から SEC では PS オリゴの一本鎖と二本鎖との識別は達成されており、アニーリング前に DNA と同様二本鎖とヘアピン構造の混合物であれば二本のピークとして検出されるが、一本のピークであったこと、第二章第二節の検討から PS オリゴでもヘアピン構造をとることが示されていることから、PS オリゴでは製造後の段階から熱力学的に安定なヘアピン構造が主構成成分である可能性があると考察した。

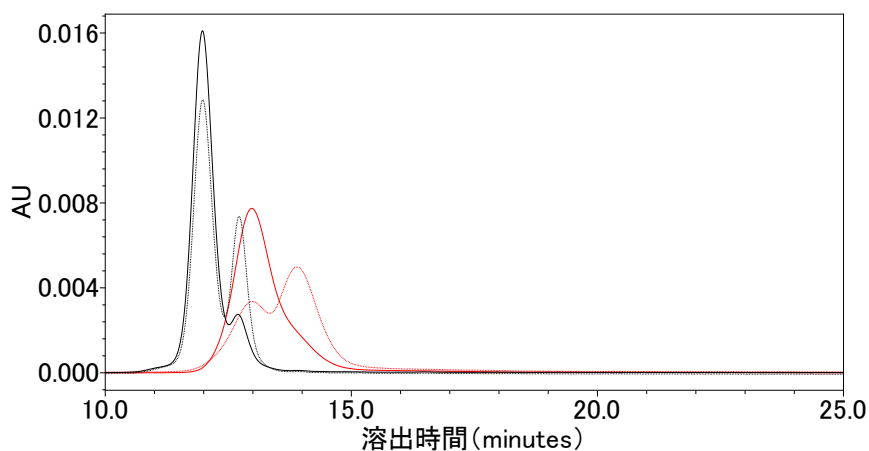


図 15 グループ 2 自己相補配列 20D におけるアニーリング処理の影響
PS オリゴを赤クロマトグラム、DNA オリゴを黒クロマトグラムで示し、アニーリングなしを点線で、アニーリングありを実線でそれぞれ示した。配列: CGCGAAATGCGCATTTGCG

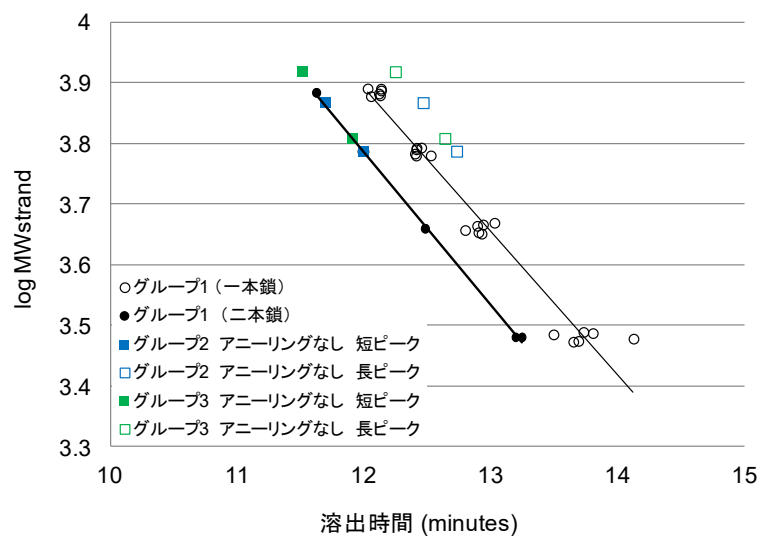


図 16 DNA オリゴにおけるアニールなしで確認されたピークのあてはめ

図 6 に示した DNA オリゴの一本鎖 (黒○) 及び二本鎖 (黒●) のプロット及び直線上へ、アニールなしで確認されたピーク (グループ 2: 青■、青□、グループ 3: 緑■、緑□) をプロットすることで作成した。

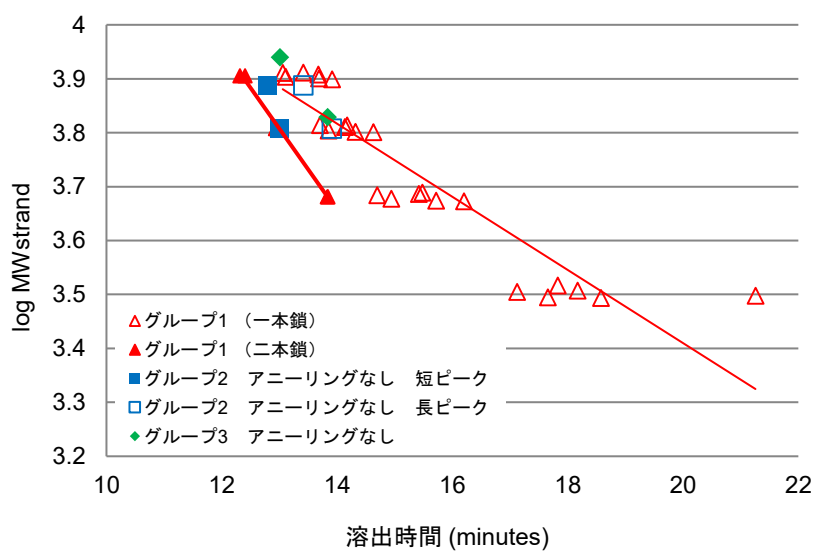


図 17 PS オリゴにおけるアニールなしで確認されたピークのあてはめ

図 8 に示した PS オリゴの一本鎖 (赤△) 及び二本鎖 (赤▲) のプロット及び直線上へ、アニールなしで確認されたピーク (グループ 2: 青■、青□、グループ 3: 緑◆) をプロットすることで作成した。

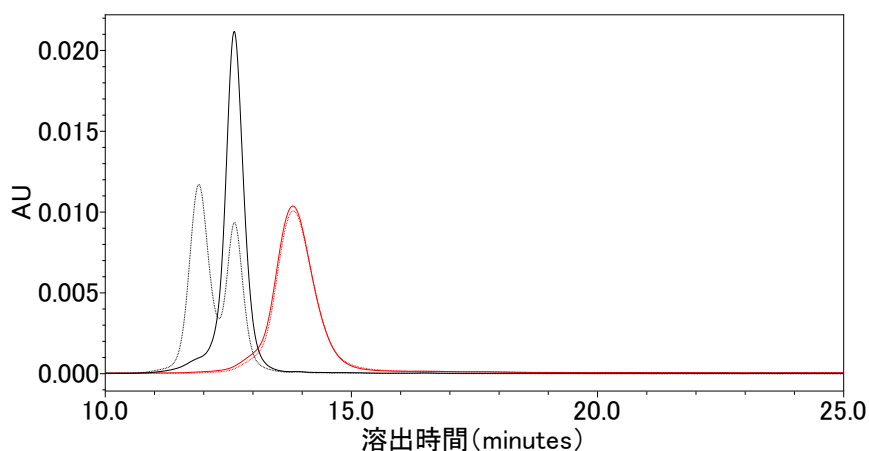


図 18 表 5 グループ 3 ヘアピン配列 21H におけるアニーリング処理の影響
PS オリゴを赤クロマトグラム、DNA オリゴを黒クロマトグラムで示し、アニーリングなしを点線で、アニーリングありを実線でそれぞれ示した。配列は表 5 に示した。

以上の結果から、製造後のオリゴヌクレオチドは高次構造の混合物であること、アニーリングにより安定な構造へ収束すること、及びそれらを今回設定した SEC 分析条件により検出できることが検証された。

核酸医薬品を志向したオリゴヌクレオチドの品質管理において、二本鎖オリゴヌクレオチドやアプタマーなど高次構造形成が有効性に直結する分子形ではその構造について形成の有無や程度などを有効性や安全性と関連付けて品質として評価し、管理する必要があると考えられてきた。今回の結果から、これらに加え、高次構造形成が作用機序に直接関係しないあるいは高次構造を形成しにくいとされてきたアンチセンスなどの一本鎖オリゴヌクレオチドにおいても、製造工程含め複数の準安定な高次構造を形成する可能性があり、これらが有効性や安全性にもたらす影響を評価していく必要があることが示された。また、本結果は、比較的短い一本鎖オリゴヌクレオチドがアニーリング操作の前後で高次構造を変化させることを示したばかりでなく、SEC 分析により鋭敏にこれ

らの構造変化を検出できることを確認したものである。これより、今後の核酸医薬を志向したオリゴヌクレオチドの品質管理手法として SEC が有用であると結論付けた。

結論

本研究は、核酸医薬の品質管理手法を志向し、オリゴヌクレオチドの高次構造を品質として管理可能な分析方法の確立を目標として行った。分析方法としてサイズ排除クロマトグラフィーに着目し、DNA オリゴ、PS オリゴに共通する構造検出力のある分析方法として確認を行った。その結果、以下の結果を得た。

- 1) SEC 分析において、オリゴヌクレオチドの溶出挙動は移動相の組成に影響されること、その影響度合いは DNA オリゴと PS オリゴでは異なることを見出した。また、PS オリゴは DNA オリゴに比べて溶出が遅くブロードなピークとして検出された。これは PS オリゴの高い疎水性という物性に起因するものであることを検証した。
- 2) 今回 DNA オリゴおよび PS オリゴの高次構造が検出できる共通の SEC 条件を設定した。この SEC 分析条件では PS オリゴの一本鎖と二本鎖を識別できた。一方、DNA オリゴではこれに加えてヘアピン構造の識別も可能であった。PS オリゴで検出力が低かったのは、PS オリゴの持つ疎水性の影響であることを検証した。
- 3) 今回設定した SEC 条件を用いることにより、製造後のオリゴヌクレオチドが熱力学的安定性の異なる高次構造混合物であること、および、アニーリングにより安定な構造へ収束すること、が検出可能と見出した。
- 4) 今回の研究を通じ、医薬品としてオリゴヌクレオチドを開発する際、高次構造についても品質特性として管理していくことが重要であること、その手法として SEC が有用であることを見出した。

謝辞

本研究の遂行に際し、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました
大阪大学大学院 薬学研究科 小比賀 聡 教授に心から感謝いたします。

本研究にあたり、さまざまな場面で有益なご協力とご助言をいただきました
大阪大谷大学 薬学部 藤坂 朱紀 助教に心より感謝いたします。

本研究を進める上で有用なご助言をいただきました
アステラス製薬株式会社 物性研究所 三村 尚志 所長、
同物性研究所 分析第4研究室 若澤 龍佳 室長に心から感謝いたします。

本論文の審査をしていただきました
大阪大学大学院 薬学研究科 大久保 忠恭 教授、
ならびに高木 達也 教授に感謝いたします。

本研究に際し、非常に多くのご支援をいただきました
アステラス製薬株式会社 物性研究所 分析第4研究室 小島 辰也氏、
大阪大学大学院 薬学研究科 生物有機化学分野の皆様感謝いたします。

最後に、著者の大学院生活を常日頃からご支援いただきました
家族、友人に心から感謝いたします。

実験の部

試料

オリゴヌクレオチドはジーンデザイン（大阪）にて HPLC グレードで製造、精製されたものを用いた。

その他試薬は市販品を用い、水は超純水製造装置で調製した水を使用した。

器具及び機器

天秤はザルトリウス製 BP610 を、pH メータは東亜 DKK 製 HM-30R を、超純水製造装置はミリポア製 Integral 5 A10 あるいは Advantage A10 をそれぞれ用いた。

HPLC は Waters 製 Alliance 2695（検出器 2996）システム、H-Class システムあるいは Thermo Fisher Scientific 製 Ultimate 3000 システムを用いた。直線性の確認では Waters Alliance システムを、SEC 分析条件の確認では Dionex Ultimate 3000 システムでを、それ以外の HPLC 分析は H-Class を用いた。オリゴヌクレオチドの定量は日本分光製 V-650 の分光光度計を用いた。円二色性スペクトル分析は日本分光製 J-1500 の円二色性分散計を用いた。試料の調製、希釈には Gilson 製マイクロピペット（2, 10, 100, 200, 1000 μL ）を容量に応じて使用した。いずれも校正あるいは点検などが実施されたものを用いた。

T_m 値測定は SHIMADZU 製 UV-1800 分光光度計を用いた。

カラムは昭和電工製 Asahipak GS-230-HQ（7.5 mmID×300 mm）を用いた。水浴は TAITEC 製 Thermo Minder SH-10N を用いた。

HPLC 測定用試料調製

オリゴヌクレオチドは水で約 100 $\mu\text{mol/L}$ になるよう溶解し、ストック液とした。

ストック液は -20°C にて凍結保存し、随時融解して使用した。

SEC の分析条件の確認及び直線性検討では、このストック液をさらに水で 10 倍に希釈したものを試料溶液とした。そのほかの分析では、ストック液を移動相

(0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.5) で 10 $\mu\text{mol/L}$ となるよう希釈した。アニーリングなしの分析では、この溶液そのままを試料溶液とした。そのほかの分析では、この溶液を 90°C に設定した水浴で 2 分間加温し、室温で空冷後冷蔵あるいはオートサンプラー内で冷蔵保管されたものを試料溶液とした。

オリゴヌクレオチドの定量

オリゴヌクレオチドのストック液を水で 50 倍に希釈してブラックセル 10mm QS に入れ、分光光度計で 260 nm の吸光度を測定し、以下の式に従いストック液のオリゴヌクレオチド濃度を算出した。ベースラインは先に水で補正した。

$$\text{核酸濃度 } (\mu\text{mol/mL}) = A_{260} \times (\text{希釈係数}) / E$$

希釈係数 : 50

E : オリゴヌクレオチドの吸光係数; A の数 $\times 15.2$ + G の数 $\times 11.5$ +
C の数 $\times 7.4$ + T の数 $\times 8.7$

HPLC 分析

SEC 分析条件検討では、各移動相を流量 0.5 mL/分、検出波長 260 nm、カラム温度 30°C 、オートサンプラー温度 5°C 、試料溶液注入量 10 μL 、測定時間 30 分で HPLC 分析を行った。直線性の検討ではカラム温度を 50°C とし、試料溶液注入量を 10, 20, 30 μL で直線性を確認した。

そのほかの SEC 分析では、移動相 0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.5、流量 0.5 mL/分、検出波長 260 nm、カラム温度 20°C、オートサンプラー温度 5°C、試料溶液注入量 5 μ L、測定時間 30 分で行った。0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.5 は、0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸水素二ナトリウム溶液と 0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウム溶液を pH 7.5 となるよう混合し、調製した。HPLC 移動相として用いる場合、0.2 μ m のフィルターでろ過した。第一章第四節の移動相にアセトニトリルを添加した実験では、10%アセトニトリル移動相をアセトニトリル—0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.5 (10:90, v/v) で、40%アセトニトリル移動相をアセトニトリル—0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.5 (40:60, v/v) で調製した。

HPLC 結果解析

Thermo Fisher Scientific 製 Ultimate 3000 を用いた分析ではクロマトグラフィーデータシステム Chromeleon を、Waters 製 HPLC を用いた分析ではクロマトグラフィーソフトウェア Empower 3 をそれぞれ使い、HPLC で得られたピークの溶出時間、ピーク面積について解析した。

SEC 解析

SEC 分析で得られたピークの溶出時間と、測定試料のオリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量の常用対数について、相関を確認するプロットをそれぞれ横軸、縦軸にとって作成した。オリゴヌクレオチド鎖あたりの分子量には、一本鎖はその配列から算出される分子量を、二本鎖では二つのオリゴヌクレオチドの平均値をそれぞれ採用した。

CD スペクトル分析

オリゴヌクレオチドのストック液を SEC 移動相と同様に調製した 0.1 mol/L KCl, 0.05 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.5 で 10 倍に希釈し、セルスペーサー 1 mm の角型 CD 石英セルを用いて CD スペクトルを測定した。分析モードを温度波長スキャンで CD レンジを 200 mdeg/1.0 dOD、レスポンスを 1 sec、バンド幅を 1.0 nm、スキャンを 200~350 nm あるいは 200~320 nm、0.5 nm/ポイント、積算 4 回で実施した。

T_m 値測定

オリゴヌクレオチド濃度を 4 μ mol/L となるよう、0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L リン酸緩衝液, pH 7.2 で溶解し試料溶液を調製した。試料溶液を 95°C で変性させたのち室温までゆっくりと冷まし、窒素気流下、サンプル溶液を 5°C まで冷却した。この試料溶液を、毎分 0.5°C の割合で 100°C まで昇温、いずれも 0.5°C 間隔で 260 nm における吸光度測定した。 T_m 値はすべて中線法で算出し、3 回の独立した測定結果の平均値とした。

引用文献

1. Opalinska, J. B., Gewirtz, A. M. Nucleic-acid therapeutics: Basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 503–514 (2002).
2. Kole, R., Krainer, A. R., Altman, S. RNA therapeutics: Beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 125–140 (2012).
3. Burnett, J. C., Rossi, J. J. RNA-Based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem. Biol.* **19**, 60–71 (2012).
4. Lundin, K. E., Gissberg, O., Smith, C. I. E. Oligonucleotide therapies: the past and the present. *Hum. Gene Ther.* **26**, 475–485 (2015).
5. Kawasaki, A. M., Casper, M. D., Freier, S. M., Lesnik, E. A., Zounes, M. C., Cummins, L. L., Gonzalez, C., Cook, P. D. Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J. Med. Chem.* **36**, 831–841 (1993).
6. Dias, N. & Stein, C. A. Minireview Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 347–355 (2002).
7. Mansoor, M., Melendez, A. J. Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regul. Syst. Biol.* **2**, 275–295 (2008).
8. Bennett, C. F., Swayze, E. E. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 259–293 (2010).
9. Watts, J., Corey, D. Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic. *J. Pathol.* **226**, 365–379 (2012).

10. Potaczek, D. P., Garn, H., Unger, S. D., Renz, H. Antisense molecules: a new class of drugs. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 1334–1346 (2016).
11. Wilk, A., Stec, W. J. Analysis of oligo(deoxynucleoside phosphorothioate)s and their diastereomeric composition. *Nucleic Acids Res.* **23**, 530–534 (1995).
12. Frederiksen, J. K., Piccirilli, J. A. Separation of RNA phosphorothioate oligonucleotides by HPLC. *Methods in enzymology* **468**, 289–309 (2009).
13. Bergot, B. J., Egan, W. Separation of synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides from their oxygenated (phosphodiester) defect species by strong-anion-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **599**, 35–42 (1992).
14. Yang, X., Hodge, R. P., Luxon, B. A., Shope, R., Gorenstein, D. G. Separation of synthetic oligonucleotide dithioates from monothiophosphate impurities by anion-exchange chromatography on a mono-Q column. *Anal Biochem* **306**, 92–99 (2002).
15. Cook, K., Thayer, J. Advantages of ion-exchange chromatography for oligonucleotide analysis. *Bioanalysis* **3**, 1109–1120 (2011).
16. Li, S., Lu, D.-D., Zhang, Y.-L., Wang, S.-Q. An improved ion-pair reversed phase LC method for analysis of major impurities of phosphorothioate oligonucleotide Cantide. *Chromatographia* **72**, 215–223 (2010).
17. Studzińska, S., Buszewski, B. Evaluation of ultrahigh-performance liquid chromatography columns for the analysis of unmodified and antisense oligonucleotides. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 7127–7136 (2014).
18. Gong, L. Comparing ion-pairing reagents and counter anions for ion-pair reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis of synthetic oligonucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **29**, 2402–2410 (2015).

19. Smith, M., Beck, T. Quantitation of a low level coeluting impurity present in a modified oligonucleotide by both LC-MS and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **118**, 34–40 (2016).
20. 大阪大学大学院薬学研究科、革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業（厚生労働省）課題名：核酸医薬の臨床有効性、安全性の評価方法 核酸医薬の開発における留意点と課題について（中間報告）、2015
21. Yang, D., Okamoto, K., Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Med Chem.* **2**, 619–646 (2010).
22. Keniry, M. A. Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers* **56**, 123–146 (2000).
23. Collie, G. W., Parkinson, G. N. The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5867–5892 (2011).
24. Phan, A. T., Mergny, J.-L. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4618–4625 (2002).
25. Guéron, M., Leroy, J. L. The i-motif in nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 326–331 (2000).
26. Day, H. A., Pavlou, P., Waller, Z. A. E. i-Motif DNA: structure, stability and targeting with ligands. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 4407–4418 (2014).
27. Mergny, J. L., Lacroix, L. Kinetics and thermodynamics of i-DNA formation: phosphodiester versus modified oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4797–4803 (1998).
28. Barker, M.P; Reynolds, H.M.; Lumicisi, B.; Bryson, C.J. Immunogenicity of protein therapeutics. The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself* **1**, 314-322 (2010).
29. Clark, C. L., Cecil, P. K., Singh, D., Gray, D. M. CD, absorption and thermodynamic analysis of repeating dinucleotide DNA, RNA and hybrid duplexes

- [d/r(AC)]₁₂[d/r(GT/U)]₁₂ and the influence of phosphorothioate substitution. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4098–4105 (1997).
30. Kanehara, H., Mizuguchi, M., Tajima, K., Kanaori, K., Makino, K. Spectroscopic evidence for the formation of four-stranded solution structure of oligodeoxycytidine phosphorothioate. *Biochemistry* **36**, 1790–1797 (1997).
 31. Patil, S. D., Rhodes, D. G. Influence of divalent cations on the conformation of phosphorothioate oligodeoxynucleotides: a circular dichroism study. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2439–2445 (2000).
 32. Miller, M. C., Buscaglia, R., Chaires, J. B., Lane, A. N., Trent, J. O. Hydration is a major determinant of the G-quadruplex stability and conformation of the human telomere 3' sequence of d(AG 3(TTAG3)3). *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17105–17107 (2010).
 33. Ambrus, A. A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R. A., Yang, D. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2723–2735 (2006).
 34. Dash, J., Shirude, P. S., Hsu, S. T. D., Balasubramanian, S. Diarylethynyl amides that recognize the parallel conformation of genomic promoter DNA G-quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15950–15956 (2008).
 35. Ambrus, A. A., Chen, D., Dai, J., Jones, R. A., Yang, D. Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human c-MYC promoter. Implications for G-quadruplex stabilization. *Biochemistry* **44**, 2048–2058 (2005).
 36. Adrian, M., Heddi, B., Phan, A. T., NMR spectroscopy of G-quadruplexes. *Methods* **57**, 11–24 (2012).
 37. Babinský, M., Fiala, R., Kejnovská, I., Bednářová, K., Marek, R., Sagi, J., Sklenář, V., Vorlíčková, M. Loss of loop adenines alters human telomere d[AG₃(TTAG₃)₃] quadruplex folding. *Nucleic Acids Res.* **42**, 14031–14041 (2014).

38. Phan, A. T., Guéron, M., Leroy, J. L. The solution structure and internal motions of a fragment of the cytidine-rich strand of the human telomere. *J. Mol. Biol.* **299**, 123–144 (2000).
39. Hong, P., Koza, S., Bouvier, E. S. P. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **35**, 2923–2950 (2012).
40. Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L., Guilleme, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101**, 161–173 (2014).
41. Wakankar, A., Chen, Y., Gokarn, Y., Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs* **3**, 161–172 (2011).
42. Largy, E., Mergny, J. L. Shape matters: size-exclusion HPLC for the study of nucleic acid structural polymorphism. *Nucleic Acids Res.* **42**, e149 (2014).
43. Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K., In, Y., Ishida, T., Imanishi, T., Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C_{3'}-endo sugar puckering. *Tetrahedron Lett.* **38**, 8735-8738 (1997).
44. Borer, P. N., Dengler, B., Tinoco Jr., I., Stability of ribonucleic acid double-stranded helices. *J. Mol. Biol.* **86**, 843-853 (1974).