

Title	スピロクロプロピレン架橋型人工核酸及びエチニルホスホネート修飾型人工核酸の合成と物性評価
Author(s)	堀場, 昌彦
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72326">https://doi.org/10.18910/72326</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

学位論文

スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸及び  
エチニルホスホネート修飾型人工核酸の合成と物性評価

2019 年

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

堀場 昌彦

## 略語表

A	adenine
Ac	acetyl
ALT	alanine transaminase
aq	aqueous
AST	aspartate transaminase
Bn	benzyl
BSA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)acetoamide
Bu	butyryl
Bz	benzoyl
CPG	controlled pore glass
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone
decomp	decomposition
DIBAL	diisobutylaluminium hydride
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	4-(dimethylamino)pyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMTr	4,4'-dimethoxytrityl
DNA	deoxyribonucleic acid
dppf	1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene
DTT	dithiothreitol
Et	ethyl
ESI	electrospray ionization
FAB	fast atom bombardment
G	guanine
GOT	glutamic oxaloacetic transaminase
GPT	glutamic pyruvic transaminase
<i>Gapdh</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HAA	hexylammonium acetate
HF	hartree-fock
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
<i>i</i>	iso
IR	infrared
LC	liquid chromatography
LRMS	low-resolution mass spectrometry

MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
<sup>m</sup> C	5-methylcytosine
Me	methyl
MS	mass spectrometry
Ms	methanesulfonyl
<i>n</i>	normal
NMR	nuclear magnetic resonance
Pac	phenoxyacetyl
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Ph	phenyl
Pr	propyl
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
quant	quantitative
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
SEM	2-(chloromethoxy)ethyltrimethylsilyl
ss	single-stranded
T	thymine
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TEAA	triethylammonium acetate
temp	temperature
TES	triethylsilyl
<i>tert</i>	tertiary
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
<i>T<sub>m</sub></i>	melting temperature
TMS	trimethylsilyl
U	uracil
UV	ultraviolet

## 目次

序論.....	1
本論	
第1章 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の合成と物性評価	
第1節 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の背景と設計.....	4
第2節 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の合成.....	7
第3節 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の物性評価.....	15
第2章 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の合成と物性評価	
第1節 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の背景と設計.....	20
第2節 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の合成.....	24
第3節 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の物性評価.....	27
結論.....	34
謝辞.....	35
実験の部.....	36
参考文献.....	66

## 序論

タンパク質は生体内で輸送や触媒作用など多様な役割を担い、様々な疾患と密接に関係している。そのようなタンパク質のはたらきを亢進または抑制する目的で古くから低分子医薬が開発されてきた。近年では抗体医薬の研究も活発に行われ、世界の医薬品売り上げ上位を占めるに至っている。しかしながら、昨今の創薬業界では創薬標的の枯渇が問題視されており、新たな標的に作用できる医薬品が求められている。核酸医薬は、これまでに創薬標的とすることが困難であった DNA や RNA に対して相補的な三重鎖または二重鎖を形成することでタンパク質への翻訳を調節することが可能であり、従来技術では治療が不可能な疾患にも適用できることから、次世代の医薬品として期待されている。現在、8 品目の核酸医薬が上市されており、多数の臨床試験も進行している。<sup>1</sup> 特に、RNA を標的とした核酸医薬が盛んに開発されており、上市されている 8 品目の内 6 品目が該当する。このような核酸医薬の発展に対して、天然の核酸の構造に化学修飾を施した人工核酸は薬効を高めるための様々な特性を付与できるため、これまでに多大な貢献をしてきた。化学修飾は核酸の塩基部、糖部、リン酸部にそれぞれ導入可能であり、標的 RNA に対する二重鎖形成能や生体内での安定性の向上を狙った人工核酸が数多く開発されてきた。<sup>2</sup> 中でも、糖部またはリン酸部修飾型核酸は、多くの上市品や治験薬に利用されており、欠かすことのできないものとなっている。

標的 RNA に対する二重鎖形成能を向上させる方法は様々であるが、その一つとして核酸の構造の自由度に着目した設計法がある。一本鎖の核酸は二重鎖と比較して構造の自由度が高いため、二重鎖が形成される過程でエントロピーの損失が起こる。そのため、二重鎖中で存在する構造を模倣しつつ一本鎖の自由度を抑制することは、二重鎖の構造を歪めることなくエントロピーの損失を回避できるため、高い二重鎖形成能を獲得するための有効な手段となる。このような仮説のもと我々の研究室では、架橋型人工核酸 2',4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA)<sup>3</sup> / locked nucleic acid (LNA)<sup>4</sup> を設計し、その開発に成功した (図 1)。核酸の二重鎖構造は、RNA/RNA 二重鎖及び RNA/DNA 二重鎖では A 型二重らせん、DNA/DNA 二重鎖では B 型二重らせん構造を取っていることが知られており、それぞれの構造において糖部のコンホメーションに着目すると、A 型二重らせん中では N 型、B 型二重らせん中では S 型として存在している (図 2)。<sup>5</sup> 2',4'-BNA/LNA は核酸の糖部に導入した架橋構造によってコンホメーションが N 型に固定化されており、標的 RNA に対して高い二重鎖形成能を示す。そのため、核酸医薬への応用が期待されており、実際に 2',4'-BNA/LNA を導入した核酸医薬の臨床試験も進行している。<sup>1a,2c,2e</sup> 一方、2',4'-BNA/LNA は生体内のヌクレアーゼに対する耐性能において若干の向上が見られるものの、依然として低いため改善の余地が残されている。さらに、2',4'-BNA/LNA を導入した核酸医薬は、塩基配列に依存して肝毒性を示す可能性が示唆されている。<sup>6</sup> そのため、2',4'-BNA/LNA に代わる新たな人工核酸の開発が求められている。

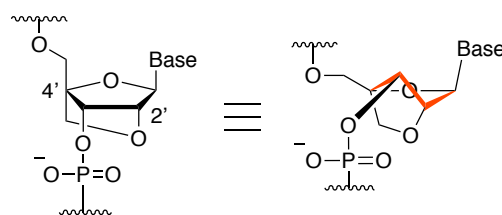


図 1. 2',4'-BNA/LNA の構造

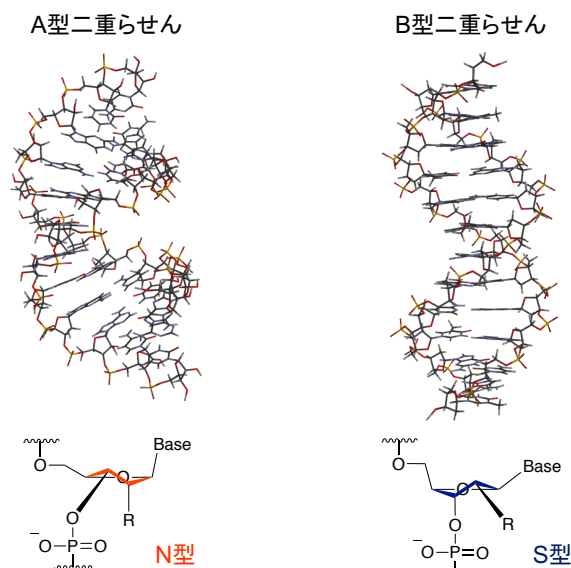


図 2. A 型及び B 型二重らせんにおけるモノマーの糖部コンホメーション

2',4'-BNA/LNA を始めとする糖部修飾型核酸の利用が多く見られる一方で、先述の通りリン酸部修飾型核酸も核酸医薬の開発に欠かせないものとなっている。リン酸部修飾型核酸の中でも phosphorothioate (PS) 修飾は、標的 RNA に対する二重鎖形成能は低いものの、高いヌクレアーゼ耐性能や血中滞留性といった特性を有している (図 3)。<sup>7a,b,c</sup> さらに、核酸医薬の一つであるアンチセンス医薬において、PS 修飾は標的 RNA を分解する酵素である Ribonuclease (RNase) H のはたらきを阻害しないため、アンチセンス医薬で最も利用される人工核酸となっている。<sup>7a,注1</sup> しかしながら PS 修飾は、硫黄原子の高い疎水性に由来するタンパク質への非特異的な結合を引き起こし、肝毒性の原因となることが懸念されている。最近、PS 修飾のみ、または PS 修飾と 2',4'-BNA/LNA を両方導入した一本鎖核酸の内、毒性を示す配列ほど結合するタンパク質の数が多いことが報告されており、毒性とタンパク質結合の関連について示唆されている。<sup>8</sup> また、PS 修飾を n 個導入した核酸医薬は 2<sup>n</sup> 個のジアステレオマーが存在するため、医薬品の製造や品質管理の面からも問題を孕んでいる。近年これらの問題に対して、ジアステレオマーを立体選択的に合成することで、2<sup>n</sup> 個のジアステレオマーの中から低毒性かつ高活性な核酸医薬を探索するという試みがなされている。<sup>7d</sup> しかしながら、ジアステレオマーを作り分けるための合成コストの増加や煩雑なスクリーニングが必要となるなど課題も多い。それにも関わらず、PS 修飾は合成法が確立されていることや、体内動態の理解が

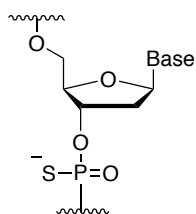


図 3. PS 修飾の構造

注1 RNase H とは、DNA/RNA 二重鎖を認識して RNA 鎖のみを特異的に分解するエンドヌクレアーゼの一種である。RNase H 依存的に作用するアンチセンス医薬では、ヌクレアーゼ耐性能を向上させるために PS 修飾が、標的 RNA に対する二重鎖形成能を高めるために糖部修飾型核酸が主に導入される。その際、PS 修飾はアンチセンス医薬全体に導入可能であるものの、糖部修飾型核酸は RNase H の認識を阻害してしまうため、アンチセンス医薬の両末端に導入される。

進んでいることから、エクソン・スキップ治療や anti-microRNA といった RNase H 非依存的なメカニズムで作用する他の核酸医薬においても利用されているという現状である。<sup>9</sup> そのため、PS 修飾の課題を回避できる新たなリン酸部修飾型核酸を開発することで、核酸医薬をさらに発展させられると考えられる。

以上の背景から、本研究では、2',4'-BNA/LNA と PS 修飾それぞれの問題点に着目し、新たな糖部及びリン酸部修飾型核酸を開発することで、その解決を目指した。

まず第 1 章では、2',4'-BNA/LNA の架橋部にスピロシクロプロパン構造を導入した新規糖部修飾型核酸を設計し、4 種類の核酸塩基を有するモノマーをそれぞれ合成した後、得られたモノマーをオリゴヌクレオチドへと導入した (第 1 章 第 1-2 節)。次に、合成したオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能、ヌクレアーゼ耐性能、肝毒性について評価した (第 1 章 第 3 節)。

第 2 章では、リン酸部の一部をアルキン構造に置き換えたエチニルホスホネートを考案し、まずチミジンのダイマーとして合成した (第 2 章 第 1-2 節)。続いて、エチニルホスホネート導入オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能やヌクレアーゼ耐性能、RNase H 活性について評価した (第 2 章 第 3 節)。



## 本論

### 第1章 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の合成と物性評価

#### 第1節 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の背景と設計

先述の通り、2',4'-BNA/LNA はヌクレアーゼ耐性能が低く、肝毒性を誘発する危険性が高いという問題を抱えている。この問題を改善するため、多くの研究グループによって2',4'-BNA/LNA の類縁体が開発されてきた。<sup>2f,10,11</sup> その中で、2'-O,4'-C-ethylene bridged nucleic acid (ENA)<sup>12</sup> や2'-O,4'-C-propylene bridged nucleic acid (PrNA)<sup>13</sup> などの架橋構造の環サイズを増大させた類縁体の合成が行われ、環サイズと物性の関係について明らかにされてきた (図 4)。これらの知見から、環サイズの増大に伴い、リン酸部周辺の立体障害が増加し、ヌクレアーゼ耐性能が向上することが明らかになった。その一方で、環サイズの増大は標的 RNA に対する二重鎖形成能を低下させることも示され、ヌクレアーゼ耐性能と二重鎖形成能の両立は困難であった。

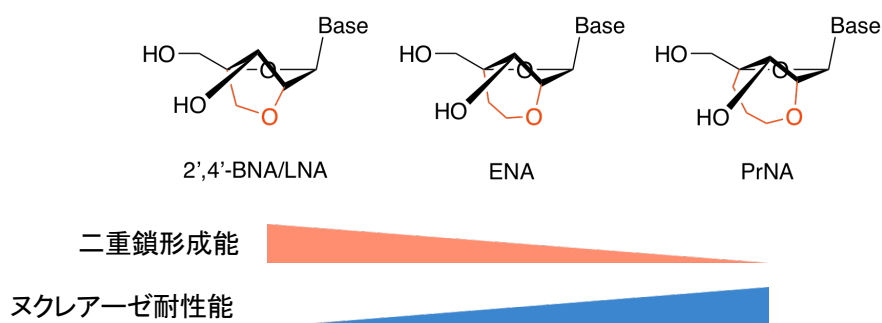


図 4. 架橋構造の環サイズと二重鎖形成能及びヌクレアーゼ耐性能の関係

このような背景の中で、2',4'-BNA/LNA の架橋部にメチル基を導入した 2',4'-constrained 2'-O-ethyl (cEt) が報告された (図 5. 左)。<sup>14</sup> cEt は 2',4'-BNA/LNA と同じ環サイズの架橋構造を有しているため、2',4'-BNA/LNA に匹敵する高い二重鎖形成能を示し、導入したメチル基が立体障害となることによって、ヌクレアーゼ耐性能を向上させた。<sup>14b</sup> すなわち、cEt は従来の架橋型人工核酸では困難であった高い二重鎖形成能とヌクレアーゼ耐性能の両立に成功していた。このような物性に加えて、2',4'-BNA/LNA を導入すると肝毒性を誘発するオリゴヌクレオチドに対して、cEt の立体異性体のうち S-cEt を 2',4'-BNA/LNA と置き換えた場合、肝毒性の危険性が低減することが報告された。<sup>14a</sup> これらの報告は 2',4'-BNA/LNA の架橋部に置換基を導入することが、ヌクレアーゼ耐性能や肝毒性の問題を改善する有効な設計法であることを示すものである。一方、cEt はモノマーの合成段階でメチル基の立体異性体が生じるため、合成や精製が煩雑になるという問題も抱えている。そこで著者は、架橋部への置換基導入の有効性を活かしつつ、合成時の問題も解消できる新規架橋型人工核酸として 2'-O,4'-C-spirocyclopropylene bridged nucleic acid (scpBNA) を設計した (図 5. 右)。scpBNA が有するスピロシクロプロパン構造は、その独特な環ひずみから架橋部のメチレンの結合角 (2'O-6'C-4'C) を拡大させると予想できる。<sup>15</sup> そのため、リン酸部周辺の立体障害が増加するだけでなく、結合角

の拡大に伴う糖部コンホメーション全体の変化によって、二重鎖形成能が変化することを期待した。これらの効果を調べるため、scpBNA のモノマーを合成し、オリゴヌクレオチドへと導入した後、二重鎖形成能及びヌクレアーゼ耐性能について評価することにした。加えて、scpBNA が肝毒性の改善に有効な人工核酸であるか検証することにした。

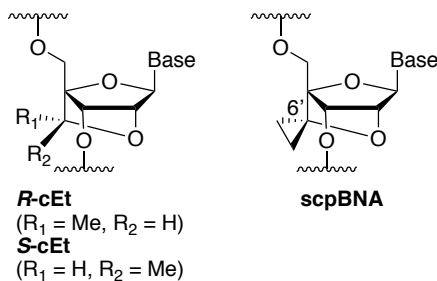


図 5. cEt と scpBNA の構造

実際の合成に先立ち、scpBNA モノマーの最安定構造を計算化学によって算出し、スピロシクロロパン構造導入による糖部コンホメーションへの影響を推定することにした。核酸分子は非常に自由度の高い構造をしており、そのコンホメーションは各結合におけるねじれ角をもとに議論が行われる。それぞれのねじれ角はグリコシル結合を  $\chi$ 、リン酸バックボーンの各結合を  $\alpha$ - $\zeta$ 、フラノース環内の結合を  $v_0$ - $v_4$  と呼ぶ (図 6. a, b)。中でも  $v_0$ - $v_4$  は核酸の糖部コンホメーションを議論する上で不可欠なものである。核酸の糖部フラノース環を構成する 5 つの原子は通常同一平面上にはなく、1 つまたは 2 つの原子が平面から飛び出た構造をとっている。これらフラノース環の様々なコンホメーションは  $v_0$ - $v_4$  から算出される擬回転位相角  $P$  によって系統的に表すことが可能であり、 $0^\circ$  から  $90^\circ$ 、または  $270^\circ$  から  $360^\circ$  の範囲内であれば N 型、 $90^\circ$  から  $270^\circ$  であれば S 型と定義される (図 6. c)。<sup>5</sup> しかしながら擬回転位相角  $P$  は全ての値をとることはなく、 $0^\circ$  から  $36^\circ$  付近と  $144^\circ$  から  $180^\circ$  付近に集中していることが実験的に知られている。また、ねじれ角  $\delta$  は擬回転位相角  $P$  と相関があ

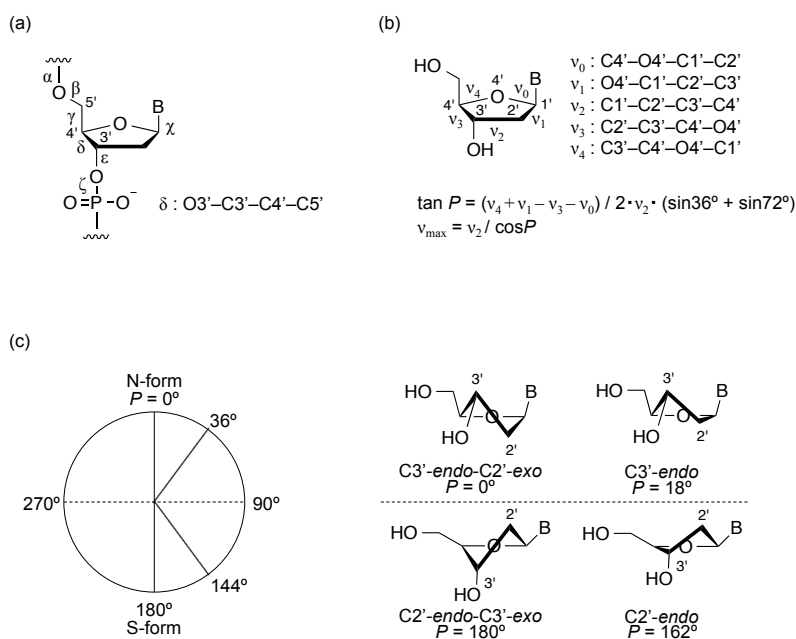


図 6. (a) ねじれ角  $\chi$  及び  $\alpha$ - $\zeta$  (b) ねじれ角  $v_0$ - $v_4$  と擬回転位相角  $P$  及び最大ねじれ角  $v_{\max}$  の算出方法 (c) 糖部フラノース環の擬回転サイクル

り、これら 2 つのパラメーターによって糖部のおおよそのコンホメーションを把握することが可能である。同じくフラノース環内のねじれ角  $\nu_2$  と擬回転位相角  $P$  から算出される最大ねじれ角  $\nu_{\max}$  は、平面からのずれの程度を表しており、値が大きくなるほどその N 性あるいは S 性が増大していることになる。以上を踏まえ、2',4'-BNA/LNA 及び scpBNA モノマーの最安定構造について、糖部コンホメーションを表す各種パラメーターを比較することにした。

実際に、2',4'-BNA/LNA 及び scpBNA モノマーの最安定構造を、非経験的分子軌道法によって算出した (図 7)。注<sup>2</sup> まず、scpBNA の擬回転位相角  $P$  は  $19^\circ$  となり、糖部コンホメーションは N 型をとっていることが確認された。また、その値は 2',4'-BNA/LNA の  $18^\circ$  に近く、一般的な A 型二重らせん中に見られる RNA のコンホメーションとは異なることが予想された。次に、スピロシクロプロパン構造を導入した箇所である架橋部の結合角に着目すると、scpBNA では 2',4'-BNA/LNA と比較して約  $1^\circ$  の拡大が見られた。そのため、scpBNA のモノマー及びオリゴヌクレオチド中においてもその結合角が僅かに拡大していることが予想される。最大ねじれ角  $\nu_{\max}$  については、scpBNA、2',4'-BNA/LNA とともに  $56^\circ$  となった。これらのパラメーターからスピロシクロプロパン構造の特異な環ひずみは、糖部コンホメーション全体に微細な影響を与えていると考えられる。2',4'-BNA/LNA は構造の自由度が低いため、糖部コンホメーションの僅かな変化によっても物性への影響が予想される。この結果を念頭に置き、scpBNA の合成と物性評価を行うことにした。

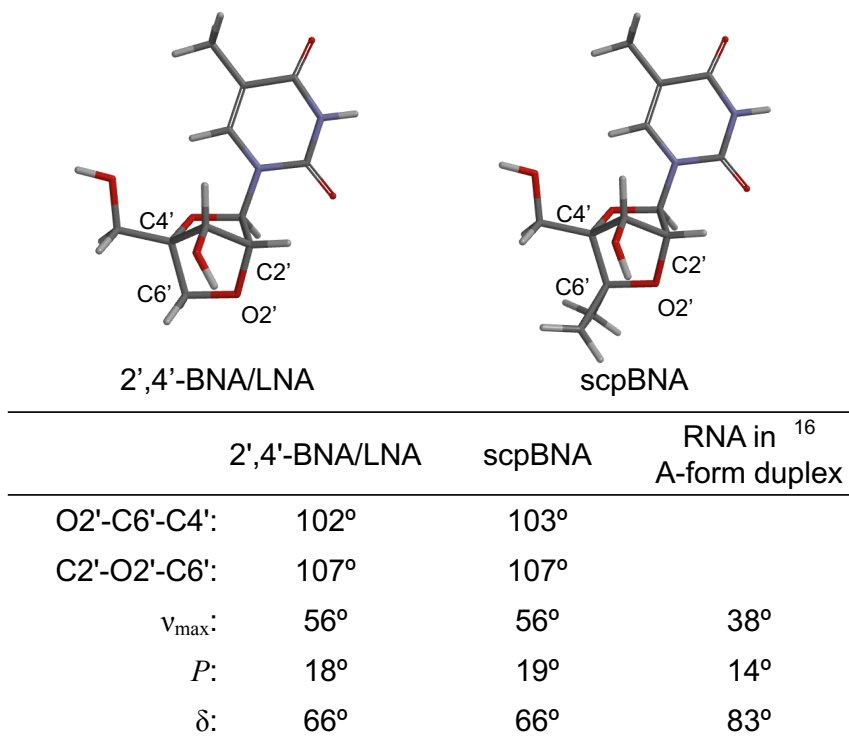
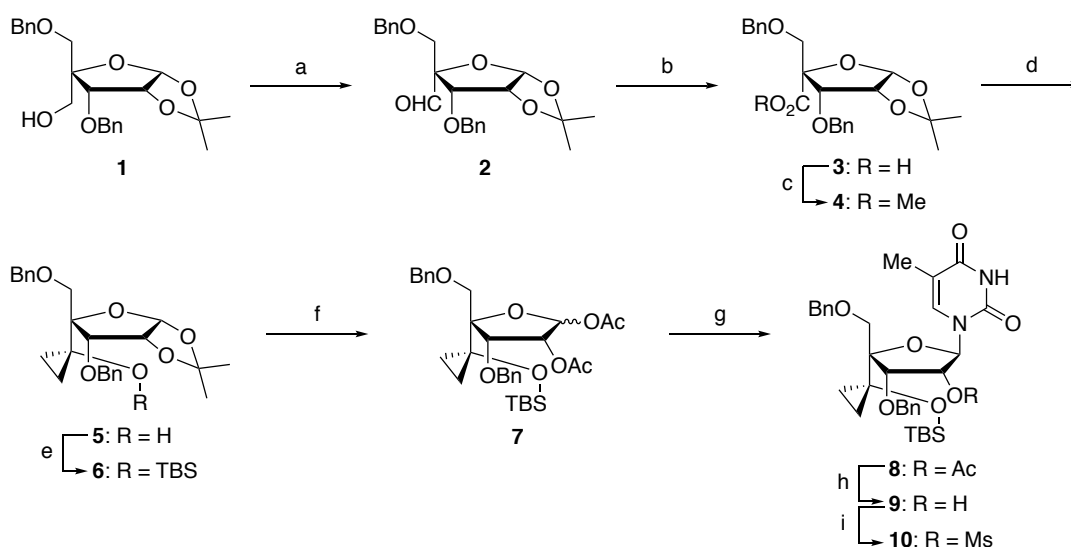


図 7. 非経験的分子軌道法を用いた 2',4'-BNA/LNA 及び scpBNA モノマーの最安定構造比較

注<sup>2</sup> 今回非経験的分子軌道法として、基底関数を 6-31G\*\* に設定した Hartree-Fock (HF) 法によって構造最適化を行い、さらに同条件下で一点計算を行うことで最安定構造を算出した。尚、計算は A 型二重鎖中に見られる配座から始めた。

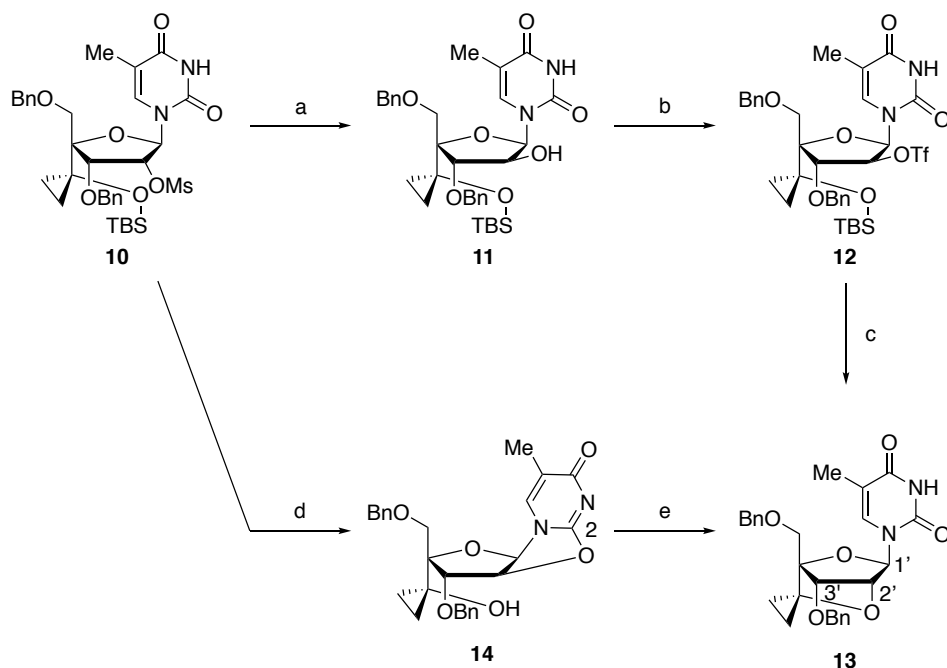
## 第2節 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の合成

核酸医薬は標的とする RNA ごとに塩基配列を設計するため、様々な疾患に適用させるためには4種類の核酸塩基を個々に有する scpBNA を合成することが必須である。まず著者は、保護基の必要がなく、比較的取り扱い容易なチミン塩基を有する scpBNA (scpBNA-T) の合成に着手した。続いて、チミン塩基から簡便に変換することのできるメチルシトシン塩基を有する scpBNA (scpBNA-<sup>m</sup>C) を合成することにした。scpBNA-T のモノマーは既知化合物 **1**<sup>17</sup> を出発原料として合成することとし、9工程で化合物 **10** の合成を行った (スキーム 1)。まず、出発原料 **1** を Dess-Martin 酸化によってアルデヒド **2**<sup>18</sup> とし、続く Pinnick 酸化でカルボン酸 **3** へと誘導した。次にカルボン酸 **3** をヨードメタンで処理し、メチルエステル **4** とした。ここで、本合成の鍵となるシクロプロパン構造の形成を Kulinkovich 反応によって行った。<sup>19</sup> その後、得られた水酸基を TBS 基によって保護した。得られた化合物 **6** を酸性条件でジアセテート **7** へと誘導し、Lewis 酸存在下シリル化した核酸塩基をグリコシル化させる Vorbrüggen 法によってチミン塩基を  $\beta$  選択的に導入した。<sup>20</sup> その後、2'位のアセチル基を脱保護し、生じた水酸基を脱離基へ変換することで架橋形成前駆体 **10** を得た。



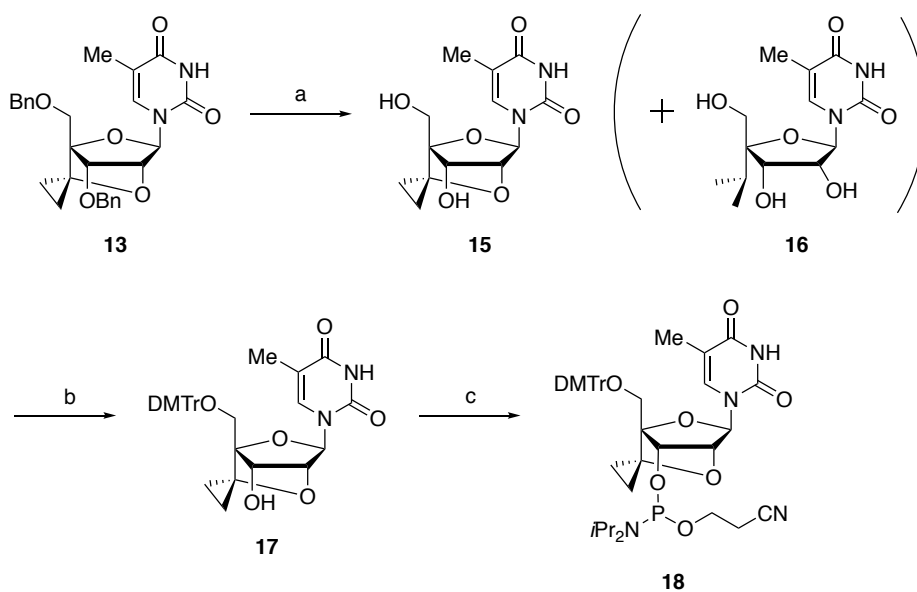
スキーム 1. 反応条件: (a) Dess-Martin periodinane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 40 min, quant.; (b) NaClO<sub>2</sub> aq., NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aq., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aq., MeCN, rt, 1 h, 96%; (c) MeI, NaHCO<sub>3</sub>, DMF, rt, 20 h, 93%; (d) EtMgBr, Ti(O<sup>i</sup>Pr)<sub>4</sub>, THF, rt, 6 h, 55%; (e) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 2 h, 90%; (f) Ac<sub>2</sub>O, TFA, AcOH, rt, 5 h; (g) thymidine, BSA, TMSOTf, MeCN, reflux, 2 h; (h) MeNH<sub>2</sub> aq., THF, rt, 4 h; (i) MsCl, pyridine, rt, 4 h, 72% (4 工程).

前駆体 **10** を水酸化ナトリウムでアラビノ体 **11** とし、2'位水酸基の脱離基への変換、続く TBAF 処理によって化合物 **13** の合成を 3 工程 32%と低収率ながら成功した (スキーム 2)。一方、前駆体 **10** に TBAF を加えると、TBS 基の脱保護と同時に 2 位のカルボニル酸素原子から 2'位への分子内求核置換反応が進行し、化合物 **14** が得られた。その後、**14** を炭酸カリウム存在下加熱処理することで、化合物 **13** へと誘導し、工程数の短縮と収率の大幅な改善に成功した (2 工程 71%)。また、化合物 **13** の <sup>1</sup>H NMR 測定の結果、1', 2', 3'位水素原子のシグナルはシングレットであった。2', 4'-BNA/LNA の 1', 2', 3'位水素原子のシグナルも同様にシングレットになることが分かっている。<sup>3,4</sup> よって、scpBNA は 2', 4'-BNA/LNA と構造が類似しており、分子軌道計算の結果 (図 7) の妥当性が示された。



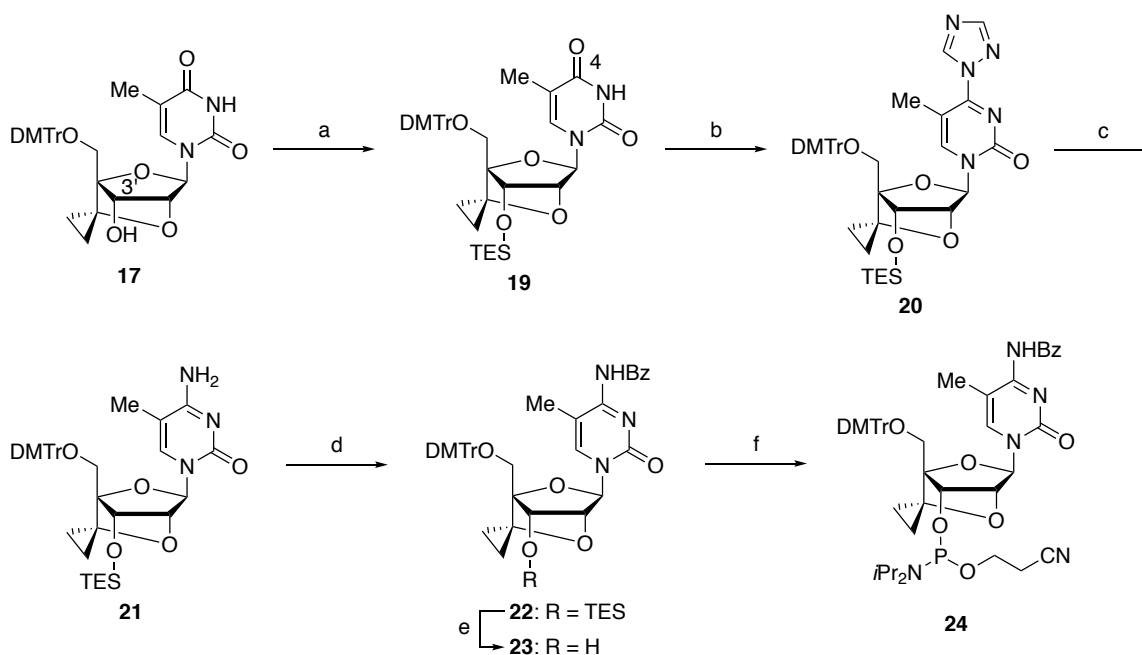
スキーム 2. 反応条件: (a) NaOH aq., THF/EtOH, rt, 12 h; (b) Tf<sub>2</sub>O, pyridine, rt, 12 h; (c) TBAF, THF, rt, 2 h, 32% (3 工程); (d) TBAF, THF, rt, 5 h, 91%; (e) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 90 °C, 20 h, 77%.

その後、化合物 **13** を接触還元によりヌクレオシド **15** とした (スキーム 3)。その際、溶媒としてエタノールを用いると開環体 **16** が多量に得られた。接触還元によるシクロプロパン環の開裂は、以前にも報告されており、化合物 **13** においても同様の反応が起こったと考えられる。<sup>21</sup> そこで、接触還元の反応速度を抑えるために溶媒を酢酸エチルに変更したところ、ヌクレオシド **15** を高収率で合成することが可能になった。最後に、オリゴヌクレオチドへの導入に向けてジメトキシトリチル化、アミダイト化を経て目的とする scpBNA-T アミダイト体 **18** の合成を達成した。



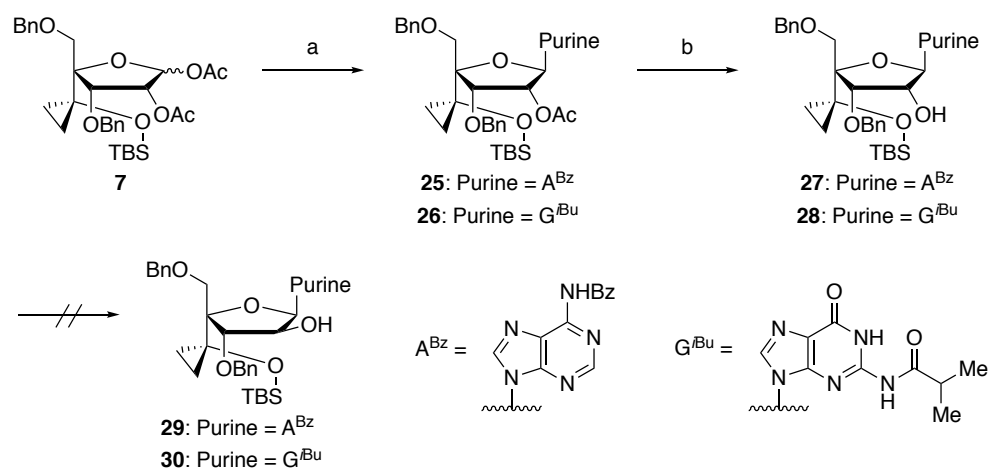
スキーム 3. 反応条件: (a) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, AcOEt, rt, 1 h, **15**: 95%, **16**: 5%; (b) DMTrCl, pyridine, rt, 9 h, 97%; (c) *i*Pr<sub>2</sub>NP(O)(Cl)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, DIPEA, MeCN, rt, 5 h, 87%.

次に、scpBNA-<sup>13</sup>C モノマーに関しても合成を行った (スキーム 4)。まず、scpBNA-T の合成中間体 **17** の 3'位水酸基を TES 基で保護し、塩化ホスホリル存在下 1,2,4-トリアゾールによる 4 位カルボニル基の活性化を行った。<sup>3a,4b,22</sup> その後アンモニア水溶液中で反応させることで、トリアゾール基をアミノ基へと変換した。得られたアミノ基を塩化ベンゾイルによって保護した後、シリル基を脱保護した。最後に化合物 **23** のアミダイト化を行い、目的とする scpBNA-<sup>13</sup>C アミダイト体 **24** の合成を達成した。



スキーム 4. 反応条件: (a) TESCl, pyridine, rt, 2 h, 95%; (b) 1,2,4-triazole, POCl<sub>3</sub>, MeCN, rt, 2 h; (c) NH<sub>3</sub> aq., 1,4-dioxane, rt, 2 h, 98% (2 工程); (d) BzCl, pyridine, rt, 3 h, 83%; (e) TBAF, THF, rt, 10 min, 88%; (f) *i*Pr<sub>2</sub>NP(Cl)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, DIPEA, MeCN, rt, 2 h, 78%.

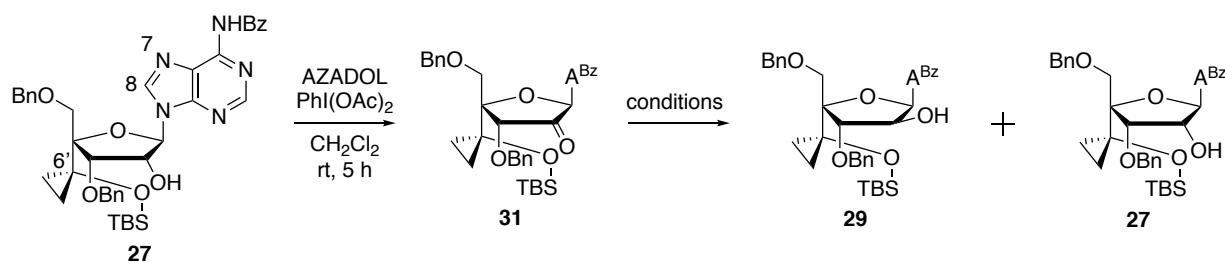
アデニン塩基を有する scpBNA (scpBNA-A) とグアニン塩基を有する scpBNA (scpBNA-G) の合成については、scpBNA-T の合成中間体 **7** から行うことにした (スキーム 5)。まず、チミン塩基同様に Vorbrüggen 法によって、N<sup>6</sup>-ベンゾイルアデニン及び N<sup>2</sup>-イソブチリルグアニンの導入に成功した。続いて、2'位アセチル基を塩基性条件下脱保護し、化合物 **27**、**28** へと誘導した。scpBNA-T の架橋構造は、化合物 **14** から分子内求核置換反応を経由することで、高収率で構築することに成功している。しかしながら本経路は、scpBNA-A, -G には適用できないため、それぞれのアラビノ体 **29**、**30** を経由することにした。まず光延反応や一般的な S<sub>N</sub>2 反応による 2'位水酸基の反転を試みたものの、目的のアラビノ体 **29**、**30** は得られなかった。



スキーム 5. 反応条件: (a) *N*<sup>6</sup>-Benzoyladenine, BSA, TMSOTf, MeCN, 80 °C, 31 h for **25**, 58% or (a) *N*<sup>2</sup>-Isobutyrylguanaine, BSA, TMSOTf, MeCN, 80 °C, 18 h, for **26**, 49%; (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 0 °C, 20 min for **27**, 97% or (b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 0 °C, 1 h for **28**, 98%.

そこで、2'位水酸基の酸化、続く還元反応による水酸基反転について検討することにした (表 1, 2)。まず、化合物 **27** の 2'位水酸基をジアセトキシヨードベンゼン存在下 AZADOL によって酸化し、水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元反応を行った (表 1. entry 1)。<sup>23</sup> その結果、目的のアラビノ体 **29** は得られたものの、立体選択性が低く (**29**:**27**=1:2.6)、立体異性体の分離も困難であった。この結果は、嵩高い TBS 基が 2'位カルボニル基の *Re* 面を覆ってしまい、水素化ホウ素ナトリウムの接近を妨げたためであると考えられる。次に、N-Selectride について検討したところ、還元剤自身の嵩高さによってカルボニル基への接近が不利になったためか脱プリン反応が優先的に進行し、アラビノ体 **29** を得ることはできなかった (表 1. entry 2)。そこで N-Selectride よりも立体障害の小さい DIBAL を用いたところ、0 °C では反応は進行せず、50 °C に昇温すると原料が分解した (表 1. entry 3)。

表 1. アラビノ体 **29** の合成法の検討



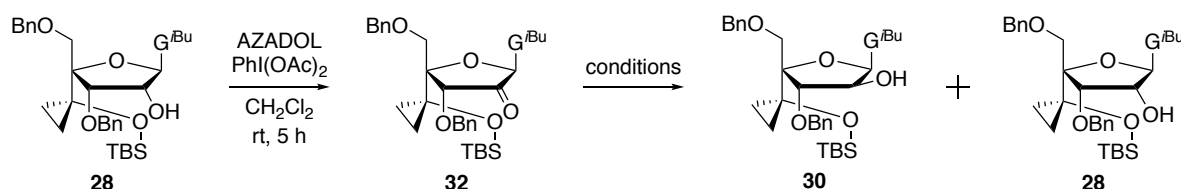
entry	reagent	solvent	temp. (°C)	time (min)	yield (%)	<b>29</b> : <b>27</b> <sup>b</sup>
1	NaBH <sub>4</sub>	EtOH	0	30	71 <sup>a</sup>	1 : 2.6
2	N-Selectride	THF	0	5	depurination <sup>c</sup>	–
3	DIBAL (1 eq.)	THF	0 to 50	30	decomp.	–
4 <sup>d</sup>	DIBAL (5 eq.)	THF	0	30	44 <sup>e</sup>	5 : 1

<sup>a</sup>Yield of a mixture of diastereomers **29** and **27** over 2 steps from the starting material **27**. <sup>b</sup>Determined by the <sup>1</sup>H NMR spectra. <sup>c</sup>*N*<sup>6</sup>-Benzoyladenine was isolated as a major product. <sup>d</sup>After the reduction, DDQ oxidation was conducted because 7*N*-8*C* double bond of the adenine nucleobase was reduced by DIBAL. <sup>e</sup>Yield of a mixture of diastereomers **29** and **27** over 3 steps from the starting material **27**.

この原因として、酸性度の高いアミド基と DIBAL が反応したことが考えられたため、DIBAL を 5 当量用いて 0 °C で反応を行ったところ、アラビノ体 **29** を高立体選択的に得ることに成功した (表 1. entry 4; **29** : **27** = 5 : 1)。この立体選択性について、3'位や 6'位の酸素原子が DIBAL に配位することで、2'位カルボニル基の *Re* 面からの還元が優先したためと考えている。尚、DIBAL によってアデニン塩基の 7 位と 8 位の間の二重結合が還元されたため、DDQ によって再度酸化した。

scpBNA-G モノマーの合成においても AZADOL 酸化を行った後、DIBAL による還元反応を試みたところ、アラビノ体 **30** が優先的に生成し、この場合は立体異性体の分離も可能であった (表 2. entry 1; **30** : **28** = 32% : 10%)。しかしながら、副反応により化合物 **28** の回収は 10%に止まった。一方、水素化ホウ素ナトリウムでは立体選択性は低いものの、化合物 **28** を高収率で回収することが可能であった (表 2. entry 2; **30** : **28** = 30% : 58%)。そのため、scpBNA-G の合成では還元剤として水素化ホウ素ナトリウムを選択した。

表 2. アラビノ体 **30** の合成法の検討

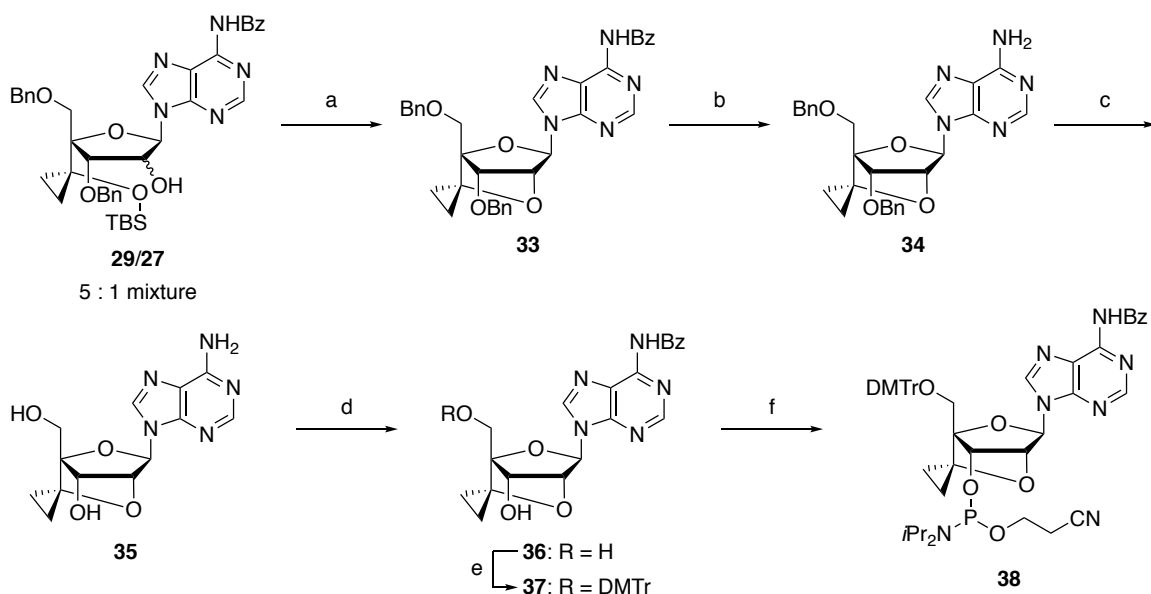


entry	reagent	solvent	temp. (°C)	time (min)	yield <sup>a</sup> ( <b>30</b> )	yield <sup>a</sup> ( <b>28</b> )
1	DIBAL (5 eq.)	THF	0	20	32%	10%
2	NaBH <sub>4</sub>	MeOH/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0	30	30%	58%

<sup>a</sup>Yield over 2 steps from the starting material **28**. Isolated yields are shown.

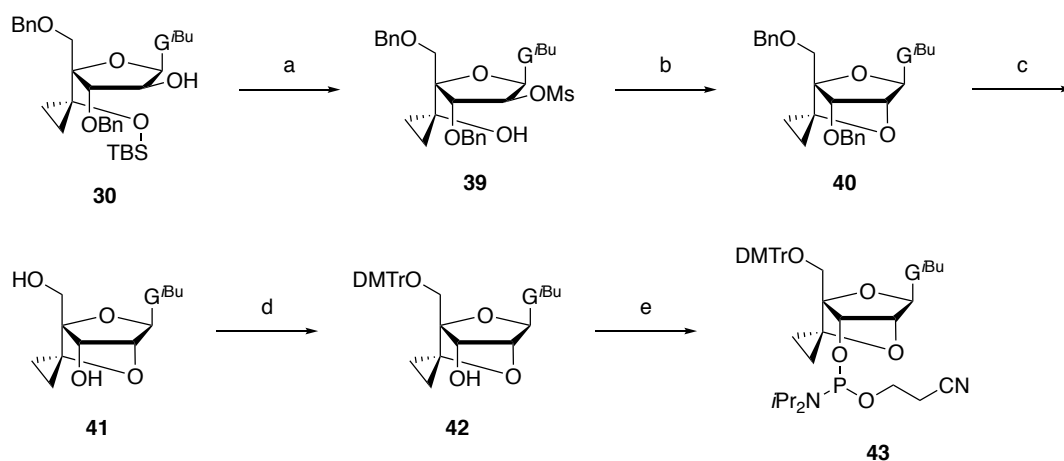
scpBNA-A モノマーの合成では、表 2 の結果得られた **29** と **27** の立体異性体混合物の 2'位水酸基を脱離基へと変換し、TBAF で処理することによって化合物 **33** の合成に 2 工程 76%で成功した (スキーム 6)。続いてベンジル基の脱保護を試みたところ、接触還元の影響が非常に悪く、少量のヌクレオシド体 **36** は得られたものの、大半が原料回収という結果になった。<sup>24</sup> この現象は *N*<sup>6</sup>-ベンゾイルアデノシンでよく見られるものであり、ベンズアミドが接触還元を阻害すると考えられている。そこでベンゾイル基をメチルアミンで脱保護した後、ベンジル基の脱保護を行ったところヌクレオシド体 **35** が効率良く得られた。続いて、アデニンのアミノ基を再度ベンゾイル基で保護し、ジメトキシトリチル化、アミダイト化を行い、scpBNA-A アミダイト体 **38** の合成を達成した。





スキーム 6. 反応条件: (a) (1)  $\text{Tf}_2\text{O}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 14 h; (2) TBAF, THF, rt, 30 min, 76% (2 工程); (b)  $\text{MeNH}_2$  aq., THF, rt, 40 min, 90%; (c)  $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ , EtOH/AcOH, reflux, 6 h, 46%; (d) (1) TMSCl, pyridine, 0 °C, 1 h; then  $\text{BzCl}$ , rt, 3 h; then  $\text{NH}_3$  aq., rt, 1 h, 59%; (e) DMTrCl, pyridine, rt, 1 h, quant.; (f)  $i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , DIPEA, MeCN, rt, 3 h, 85%.

scpBNA-G モノマーの合成では、表 3 で得られたアラビノ体 **30** をトリエチルアミン存在下、メタンスルホニルクロリドで処理し、TBAF によって TBS 基を除去することで化合物 **39** を得た (スキーム 7)。その後、塩基性条件下、分子内求核置換反応により化合物 **40** の合成に成功した (92%)。次にベンジル基を接触還元で脱保護し、ジメトキシトリチル化、アミダイト化を経て scpBNA-G アミダイト体 **43** の合成を達成した。



スキーム 7. 反応条件: (a) (1)  $\text{MsCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 20 min; (2) TBAF, THF, rt, 18 h, 57% (2 工程); (b)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, 80 °C, 22 h, 92%; (c)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ , EtOH, rt, 20 h, 70%; (d) DMTrCl, pyridine, rt, 4 h, quant.; (e)  $i\text{Pr}_2\text{NP}(\text{Cl})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ , DIPEA, MeCN, rt, 3 h, 76%.

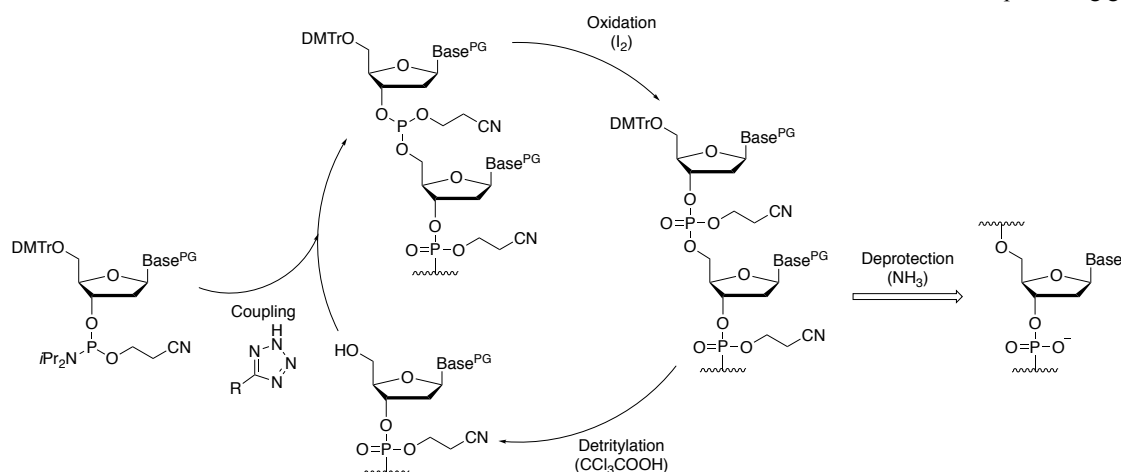
得られたアミダイト体 **18, 24, 38, 43** を、DNA 自動合成機を使用して物性評価用のオリゴヌクレオチド (**ON**) へと導入した (表 3)。注<sup>3</sup> scpBNA のアミダイト体はシクロプロパンが立体障害となり、反応効率が低下することが予想されたが、2',4'-BNA/LNA と同じカップリング時間でオリゴヌクレオチドへの導入に成功した。合成した **ON 1-12** は簡易逆相カラムにて精製し、逆相 HPLC でさらに精製した。精製後の純度は、逆相 HPLC によって 95%以上であることを確認した。その後、MALDI-TOF MS で分子量を測定し、理論値と一致していることを確認した。さらに、オリゴヌクレオチド溶液の 260 nm の紫外光に対する吸光度と各核酸塩基の吸光度係数から濃度を計算し、収率を求めた。

表 3. **ON 1-12** の収率と質量分析

ONs <sup>a</sup>	yield (%)	MALDI-TOF MS		
		calcd. [M-H] <sup>-</sup>	found [M-H] <sup>-</sup>	
5'-d(GCG <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> GCT)-3'	<b>(ON 1)</b>	25.5	3686.4	3686.8
5'-d(GCG <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> GCT)-3'	<b>(ON 2)</b>	11.9	3740.5	3741.0
5'-d(GCG <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> GCT)-3'	<b>(ON 3)</b>	8.3	3794.5	3794.6
5'-d(GCG <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> GCT)-3'	<b>(ON 4)</b>	36.3	3740.5	3740.3
5'-d(GCG <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> GCT)-3'	<b>(ON 5)</b>	41.4	3794.5	3794.6
5'-d(TCA <b>T</b> <u>G</u> <b>A</b> CTG <b>C</b> <u>A</u> <b>G</b> CT)-3'	<b>(ON 6)</b>	16.3	4362.9	4363.6
5'-d(TCA <b>T</b> <u>G</u> <b>A</b> CTG <b>C</b> <u>A</u> <b>G</b> CT)-3'	<b>(ON 7)</b>	22.1	4362.9	4363.3
5'-d(TCA <b>T</b> <u>G</u> <b>A</b> <b><sup>m</sup>C</b> <u>T</u> <b>G</b> <b><sup>m</sup>C</b> <u>A</u> <b>G</b> CT)-3'	<b>(ON 8)</b>	31.6	4390.9	4391.5
5'-d(TCA <b>T</b> <u>G</u> <b>A</b> CTG <b>C</b> <u>A</u> <b>G</b> CT)-3'	<b>(ON 9)</b>	19.6	4362.9	4362.9
5'-d(TCA <b>T</b> <u>G</u> <b>A</b> CTG <b><sup>m</sup>C</b> <u>A</u> <b>G</b> CT)-3'	<b>(ON 10)</b>	7.7	4485.0	4485.4
5'-d(TTT TTT <b>T</b> <u>T</u> <b>T</b> )-3'	<b>(ON 11)</b>	21.9	2728.8	2728.5
5'-d(TTT TTG <b>T</b> <u><sup>m</sup>C</u> <b>T</b> <b>A</b> )-3'	<b>(ON 12)</b>	27.5	3174.1	3173.7

<sup>a</sup>**T** = scpBNA-T, **A** = scpBNA-A, **G** = scpBNA-G, **<sup>m</sup>C** = scpBNA-<sup>m</sup>C. All sequences are phosphodiester linkages.

注<sup>3</sup> DNA 自動合成機は以下に示すサイクルでオリゴヌクレオチドの合成を行っている。まず、5 位置換テトラゾールによってアミダイト体が活性化され、固相に担持されたヌクレオチドの 5'位水酸基からのカップリング反応が引き起こされる。その後、ヨウ素酸化を行うことで 1 塩基分の伸長が完了する。さらに伸長する場合は酸性条件下、脱ジメトキシトリチル化反応を行い、同じサイクルを続ける。合成が終了したオリゴヌクレオチドはアンモニアなどの塩基性水溶液で固相から切り出し、得られた水溶液を加熱処理することで塩基部及びリン酸部の保護基を除去する。 ※ PG = protecting group



### 第3節 スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸の物性評価

最初に、scpBNAの一本鎖RNA (ssRNA) 及びDNA (ssDNA) に対する二重鎖形成能について、融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価した。<sup>注4</sup> まず、scpBNAの導入数や導入箇所が二重鎖形成能に与える影響について、合成した scpBNA-T 導入 ON 1-5 を用いて調べることにした。また、比較対象として天然の ON 13 と 2',4'-BNA/LNA-T 導入 ON 14-18 を用いた (表4)。その結果、ON 1-5 は scpBNA-T の導入数や導入箇所には非依存的に、ON 13 と比較して ssRNA に対して1残基あたり5°Cの  $T_m$  値上昇を示した。ON 14-18 においても 2',4'-BNA/LNA-T 1残基あたり4から5°Cの  $T_m$  値上昇が見られたことから、scpBNA-T は 2',4'-BNA/LNA-T と同等の標的RNAに対する高い二重鎖形成能を有していることが明らかになった。さらに、ssRNA と ssDNA に対する  $T_m$  値の差に着目すると、scpBNA-T 導入 ON 1-3, 5 の方が 2',4'-BNA/LNA-T 導入 ON 14-16, 18 よりも1°C大きく、scpBNA-T は 2',4'-BNA/LNA-T よりも僅かにRNA選択性が高いという傾向が確認された。それに加えて、scpBNA-T の

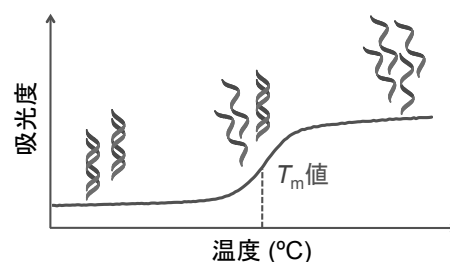
表4. ON 1-5, 13-18 の ssRNA 及び ssDNA に対する二重鎖形成能評価

ONs	$T_m$ ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ ) (°C)		RNA selectivity
	ssRNA	ssDNA	$T_m$ (RNA) - $T_m$ (DNA) (°C)
5'-d(GCG <u>TTTTTT</u> GCT)-3' (ON 13)	48	52	-4
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTTT GCT)-3' (ON 1)</u>	53 (+5)	53 (+1)	+0
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTT GCT)-3' (ON 2)</u>	57 (+5)	52 (+0)	+5
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTT GCT)-3' (ON 3)</u>	62 (+5)	54 (+1)	+8
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTT GCT)-3' (ON 4)</u>	58 (+5)	54 (+1)	+4
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTT GCT)-3' (ON 5)</u>	63 (+5)	55 (+1)	+8
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTTT GCT)-3' (ON 14)</u>	52 (+4)	53 (+1)	-1
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTTT GCT)-3' (ON 15)</u>	57 (+5)	53 (+1)	+4
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTTT GCT)-3' (ON 16)</u>	62 (+5)	55 (+1)	+7
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTTT GCT)-3' (ON 17)</u>	58 (+5)	54 (+1)	+4
5'-d(GCG <u>TT<u>T</u>TTTT GCT)-3' (ON 18)</u>	63 (+5)	56 (+1)	+7

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 4  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min at 260 nm; T = scpBNA-T, T = 2',4'-BNA/LNA-T.

Target sequences: 5'-r(AGC AAAAAA CGC)-3' (ssRNA), 5'-d(AGC AAAAAA CGC)-3' (ssDNA).  
All sequences are phosphodiester linkages.

注4 二重鎖形成能は  $T_m$  値を測定することで評価できる。二重鎖を形成したオリゴヌクレオチドを熱変性により解離させ、50%解離した温度を  $T_m$  値と定義する。オリゴヌクレオチドは二重鎖を形成することで連なった核酸塩基がスタッキング相互作用を引き起こし、全体の吸光度が低下する (淡色効果)。一方、二重鎖が解離して一本鎖になると個々の塩基が自由になり、それぞれに吸光を示すため全体の吸光度が増加する (濃色効果)。そのため熱変性の過程で一定の温度毎に吸光度をプロットすると、右図のようなシグモイド曲線が得られる。このグラフをもとに  $T_m$  値を求める手法が二重鎖形成能を議論する上で一般的に用いられている。



導入数に応じてその選択性が増大することもわかった (ex. **ON 1**: +0 °C, **ON 2**: +5 °C, **ON 3**: +8 °C)。この結果は、独特な環ひずみを有するシクロプロパン構造の導入により、糖部コンホメーションが僅かに変化したことが要因であると考えられる。また、ssDNA と二重鎖を形成した際、架橋構造は B 型二重らせん中の狭いマイナーグループ内に位置するために、嵩高いスピロシクロプロパン構造が周囲の原子と立体反発を引き起こし、最安定な B 型二重らせん構造からねじれてしまうことも要因の一つであると考えられる。<sup>25</sup>

次に、チミン塩基と同様に他の 3 種類の核酸塩基を有する scpBNA においても高い二重鎖形成能が維持されるかどうか、合成した **ON 6–10** を用いて調べた (表 5)。その際、天然の **ON 19** 及び 2',4'-BNA/LNA 導入 **ON 20–24** と比較した。その結果、scpBNA 導入 **ON 6–10** は ssRNA に対して、**ON 19** と比べて  $T_m$  値が 1 残基あたり 5 から 6 °C 上昇していることが明らかになった。この結果と同様に、**ON 20–24** でも 1 残基あたり 5 から 6 °C の  $T_m$  値上昇が見られた。よって、scpBNA は 4 種類の核酸塩基全てにおいて、2',4'-BNA/LNA に匹敵する高い二重鎖形成能を有していることが証明された。また、scpBNA 導入 **ON 6, 8, 10** は 2',4'-BNA/LNA 導入 **ON 20, 22, 24** よりも、ssRNA に対する  $T_m$  値と ssDNA に対する  $T_m$  値の差が 1 °C 大きいという結果が得られた。さらに、scpBNA の導入数に応じた RNA 選択性の増大も確認された (**ON 6–9**: +4–5 °C, **ON 10**: +10 °C)。これらの結果は表 4 で示された scpBNA の RNA 選択性を支持する結果である。以上より、scpBNA は核酸医薬として応用する上で非常に優れた二重鎖形成能を有しており、RNA 選択的に標的を認識する分子であることが明らかになった。

表 5. **ON 6–10, 19–24** の ssRNA 及び ssDNA に対する二重鎖形成能評価

ONs	$T_m$ ( $\Delta T_m/\text{mod.}$ ) (°C)		RNA selectivity
	ssRNA	ssDNA	$T_m$ (RNA) – $T_m$ (DNA) (°C)
5'-d(TCA TGG CTG CAG CT)-3' ( <b>ON 19</b> )	49	50	-1
5'-d(TCA <u>A</u> TGG CTG <u>C</u> AG CT)-3' ( <b>ON 6</b> )	59 (+5)	55 (+3)	+4
5'-d(TCA T <u>G</u> G CT <u>G</u> CAG CT)-3' ( <b>ON 7</b> )	60 (+5)	56 (+3)	+4
5'-d(TCA TGG <u>m</u> CTG <u>m</u> CAG CT)-3' ( <b>ON 8</b> )	61 (+6)	57 (+4)	+4
5'-d(TCA T <u>G</u> G C <u>T</u> G CAG CT)-3' ( <b>ON 9</b> )	60 (+5)	55 (+3)	+5
5'-d(TCA <u>A</u> T <u>G</u> G C <u>T</u> G <u>m</u> CAG CT)-3' ( <b>ON 10</b> )	73 (+6)	63 (+3)	+10
5'-d(TCA <u>A</u> TGG CTG <u>C</u> AG CT)-3' ( <b>ON 20</b> )	59 (+5)	56 (+3)	+3
5'-d(TCA T <u>G</u> G CT <u>G</u> CAG CT)-3' ( <b>ON 21</b> )	61 (+6)	57 (+4)	+4
5'-d(TCA TGG <u>m</u> CTG <u>m</u> CAG CT)-3' ( <b>ON 22</b> )	61 (+6)	58 (+4)	+3
5'-d(TCA T <u>G</u> G C <u>T</u> G CAG CT)-3' ( <b>ON 23</b> )	61 (+6)	56 (+3)	+5
5'-d(TCA <u>A</u> T <u>G</u> G C <u>T</u> G <u>m</u> CAG CT)-3' ( <b>ON 24</b> )	73 (+6)	64 (+4)	+9

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 4  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min at 260 nm: **A** = scpBNA-A, **G** = scpBNA-G, **mC** = scpBNA-<sup>m</sup>C, **T** = scpBNA-T, **A** = 2',4'-BNA/LNA -A, **G** = 2',4'-BNA/LNA -G, **mC** = 2',4'-BNA/LNA -<sup>m</sup>C, **T** = 2',4'-BNA/LNA -T.

Target sequences: 5'-r(AGC UGC AGC CAU GA)-3' (ssRNA), 5'-d(AGC TGC AGC CAT GA)-3' (ssDNA). All sequences are phosphodiester linkages.

アンチセンス医薬や siRNA などの RNA を標的とする核酸医薬は、標的 RNA と二重鎖を形成することで下流のタンパク質の発現を調節する。そのため、標的 RNA と完全相補な塩基配列になるように核酸医薬の配列設計を行うものの、ミスマッチ塩基を含む RNA に対しても二重鎖を形成してしまい、副作用を引き起こす場合がある。そこで著者は、**ON 1, 13, 14** についてミスマッチ塩基を含む ssRNA と ssDNA に対する  $T_m$  値を比較し、scpBNA のミスマッチ塩基識別能についても評価した (表 6, 7)。まず、天然の **ON 13** のミスマッチ塩基を含む ssRNA に対する  $T_m$  値は、完全相補 ( $X = A$ ) な ssRNA に対する  $T_m$  値と比べて、5 から 16 °C 低下することが分かっている。<sup>24</sup> この結果が得られた測定条件と同じ条件下、2',4'-BNA/LNA-T 導入 **ON 14** で 5 から 16 °C、scpBNA-T 導入 **ON 1** で 6 から 18 °C の  $T_m$  値の低下が確認された。一方 ssDNA に対しては、ミスマッチ塩基を含む場合と完全相補の場合で、天然の **ON 13** は 11 から 15 °C  $T_m$  値に差が見られている。<sup>24</sup> こちらにおいても同条件下、2',4'-BNA/LNA-T 導入 **ON 14** で 11 から 15 °C、scpBNA-T 導入 **ON 1** で 10 から 15 °C の  $T_m$  値の低下を確認した。以上の結果から、scpBNA は天然や 2',4'-BNA/LNA のミスマッチ塩基識別能を損なうことなく、オリゴヌクレオチドへの導入が可能であることが明らかになった。

表 6. **ON 1, 13, 14** の ssRNA に対するミスマッチ塩基識別能評価

ONs		$T_m$ ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) (°C)			
		$\underline{X} = A$	G	C	U
5'-d(GCG TTTTTT GCT)-3'	<b>(ON 13)</b>	48 <sup>24</sup>	43 (-5) <sup>24</sup>	32 (-16) <sup>24</sup>	43 (-15) <sup>24</sup>
5'-d(GCG <u>T</u> TTTTT GCT)-3'	<b>(ON 1)</b>	53	47 (-6)	35 (-18)	47 (-15)
5'-d(GCG <u>T</u> TTTTT GCT)-3'	<b>(ON 14)</b>	52	47 (-5)	36 (-16)	47 (-13)

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 4  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min at 260 nm;  $\underline{T}$  = scpBNA-T,  $\underline{T}$  = 2',4'-BNA/LNA-T.

Target sequences: 5'-r(AGC AAAXAA CGC)-3'. All sequences are phosphodiester linkages.

表 7. **ON 1, 13, 14** の ssDNA に対するミスマッチ塩基識別能評価

ONs		$T_m$ ( $\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - $T_m$ [match]) (°C)			
		$\underline{X} = A$	G	C	T
5'-d(GCG TTTTTT GCT)-3'	<b>(ON 13)</b>	52 <sup>24</sup>	41 (-11) <sup>24</sup>	37 (-15) <sup>24</sup>	38 (-14) <sup>24</sup>
5'-d(GCG <u>T</u> TTTTT GCT)-3'	<b>(ON 1)</b>	53	43 (-10)	38 (-15)	40 (-13)
5'-d(GCG <u>T</u> TTTTT GCT)-3'	<b>(ON 14)</b>	53	42 (-11)	38 (-15)	41 (-12)

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 4  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min at 260 nm;  $\underline{T}$  = scpBNA-T,  $\underline{T}$  = 2',4'-BNA/LNA-T.

Target sequences: 5'-d(AGC AAAXAA CGC)-3'. All sequences are phosphodiester linkages.

ここまでの物性評価で scpBNA は、二重鎖形成における 2',4'-BNA/LNA の特性を維持していることが証明された。次に、2',4'-BNA/LNA が抱える課題であるヌクレアーゼ耐性能と肝毒性に関する評価を行った。まず、ヌクレアーゼ耐性能について **ON 11** 及び **ON 12** を用いて評価した (図 8)。その際、天然の **ON 25, 27**、2',4'-BNA/LNA 導入 **ON 26, 28** を比較対象として使用し、ヌクレアーゼとしてオリゴヌクレオチドの 3'末端から順番にリン酸ジエステル結合を加水分解する 3'-エキソヌクレアーゼ (CAVP: *Crotalus Admanteus* Venom Phosphodiesterase, Pharmacia Biotech) を用いた。**ON 11, 12, 25-28** をそれぞれ溶解させたサンプル溶液中に CAVP を加えてインキュベートし、一定時間ごと

のオリゴヌクレオチドの残存量を逆相 HPLC により追跡した。最初に、チミン塩基のみで構成された ON 11, 25, 26 についてヌクレアーゼ耐性能評価を行った (図 8. a)。本実験で用いた条件では、天然の ON 25 は 10 分後に全て分解される。また、2',4'-BNA/LNA-T 導入 ON 26 では、10 分後に 10% 程度の残存が見られ、40 分後に完全に分解されるという結果になった。一方で、scpBNA-T 導入 ON 11 では 20 分後に 80%以上の残存が確認され、80 分経過した時点でも 60%程度残存していた。続いて、scpBNA-A や 2',4'-BNA/LNA-A を 3'末端に導入した ON 12 及び ON 28 のヌクレアーゼ耐性能を調べ、天然の ON 27 と比較した (図 8. b)。こちらについては、ON 27 は 40 分後に全て分解され、ON 28 は 80 分後に 10%程度残存するという結果になった。同じ条件下 ON 12 では、80 分後においても 90%以上残存しているという結果であった。これらの結果は、スピロシクロプロパン構造の導入による立体障害の増大が、ヌクレアーゼの認識を阻害したことによると考えられる。以上より、scpBNA は 2',4'-BNA/LNA よりも高いヌクレアーゼ耐性能を獲得したことが明らかになった。

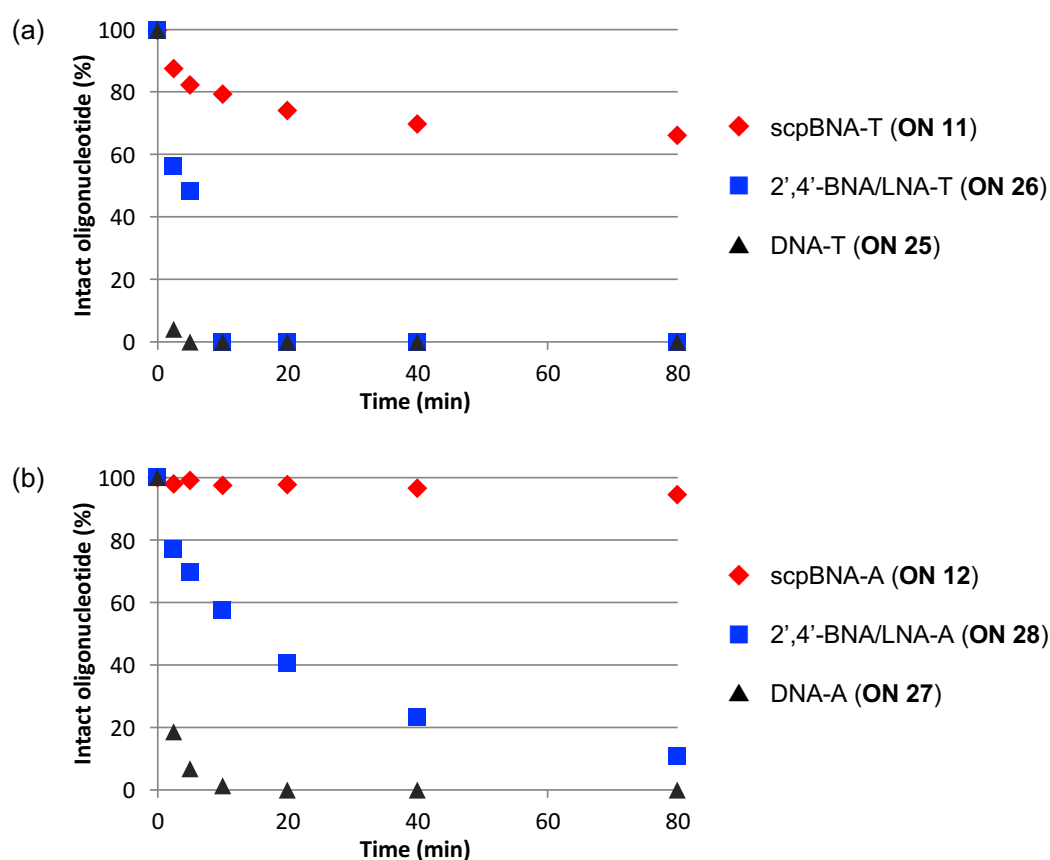


図 8. ON 11, 12, 25–28 のヌクレアーゼ耐性能評価 Conditions: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μg/mL CAVP, 4 μM each oligonucleotide, 37 °C. Sequences: (a) 5'-d(TTT TTT TTT)-3' (ON 11), 5'-d(TTT TTT TTT)-3' (ON 25), 5'-d(TTT TTT TTT)-3' (ON 26); T = scpBNA-T, T = 2',4'-BNA/LNA-T. All sequences are phosphodiester linkages. (b) 5'-d(TTT TTG TTTCT A)-3' (ON 12), 5'-d(TTT TTG TTTCT A)-3' (ON 27), 5'-d(TTT TTG TTTCT A)-3' (ON 28); G = scpBNA-G, CT = scpBNA-CT, A = scpBNA-A, G = 2',4'-BNA/LNA-G, CT = 2',4'-BNA/LNA-CT, A = 2',4'-BNA/LNA-A. All sequences are phosphodiester linkages.

次に scpBNA-T 及び scpBNA-CT を導入したアンチセンス医薬の生体内における肝毒性及び標的 RNA に対する発現抑制効果について評価を行った (表 8、図 9)。本実験ではホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸の脱リン酸化反応を触媒する酵素である PTEN を標的とした配列を用いた (表

9)。この配列に 2',4'-BNA/LNA を導入すると、マウスに投与した際遺伝子発現抑制効果を示すと同時に肝毒性も引き起こすことが報告されている。<sup>14a</sup> そのため、2',4'-BNA/LNA を scpBNA に置き換えることで肝毒性の有無を検証することが可能であると考えた。まず、2',4'-BNA/LNA-T, <sup>13</sup>C 導入 ON 29 と scpBNA-T, <sup>13</sup>C 導入 ON 30 をそれぞれ溶解させた生理食塩水を皮下注射で 6 週令の Balb/c マウス (雄) に単回投与した (投与量 35 mg/kg)。また、生理食塩水投与群も用意した。投与 72 時間後にマウスを屠殺し、摘出した肝臓から RNA を抽出した。その後、逆転写反応により complementary DNA (cDNA) を作製し、得られた cDNA を real-time PCR で増幅した。そして、*Gapdh* mRNA 発現量に対する *Pten* mRNA の相対発現量を定量することで、遺伝子発現抑制効果を評価した。また、肝毒性評価については、マウスの血液サンプルから血清を分離し、得られた血清から肝毒性の指標である AST 値及び ALT 値を測定した。その結果、相対的遺伝子発現量は ON 29 で 25%、ON 30 で 50% となり、scpBNA 導入オリゴヌクレオチドの遺伝子発現抑制効果は 2',4'-BNA/LNA を下回った (図 9. 左)。一方肝毒性評価では、scpBNA に置き換えたことで、2',4'-BNA/LNA 導入オリゴヌクレオチド投与群で見られる AST 値と ALT 値の有意な低減が見られた (図 9. 右)。先述の通り、アンチセンス医薬の肝毒性は細胞内のタンパク質に対する非特異的な結合が原因の一つであると考えられている。今回の結果は、2',4'-BNA/LNA に修飾したスピロシクロプロパン構造の嵩高さによってタンパク質に対する結合が阻害されたことや結合するタンパク質の種類が変化したことが要因として考えられる。以上のことから、scpBNA は標的 RNA に対する発現抑制効果を有しつつ、肝毒性の危険性が低いことが明らかになった。

表 8. ON 29, 30 の標的 RNA に対する二重鎖形成能評価

ONs	$T_m$ (°C)
5'-d( <u>T</u> <sup>m</sup> CA TGG CTG CAG <u>m</u> C <sup>T</sup> )-3' (ON 29)	63
5'-d( <u>T</u> <sup>m</sup> CA TGG CTG CAG <u>m</u> C <sup>T</sup> )-3' (ON 30)	63

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 2  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min at 260 nm; T = 2',4'-BNA/LNA-T, mC = 2',4'-BNA/LNA-<sup>13</sup>C, T = scpBNA-T, mC = scpBNA-<sup>13</sup>C. ON 29 and ON 30 are phosphorothioate linkages.

Target sequence: 5'-r (AGC UGC AGC CAU GA)-3'. Target sequence has phosphodiester linkages.

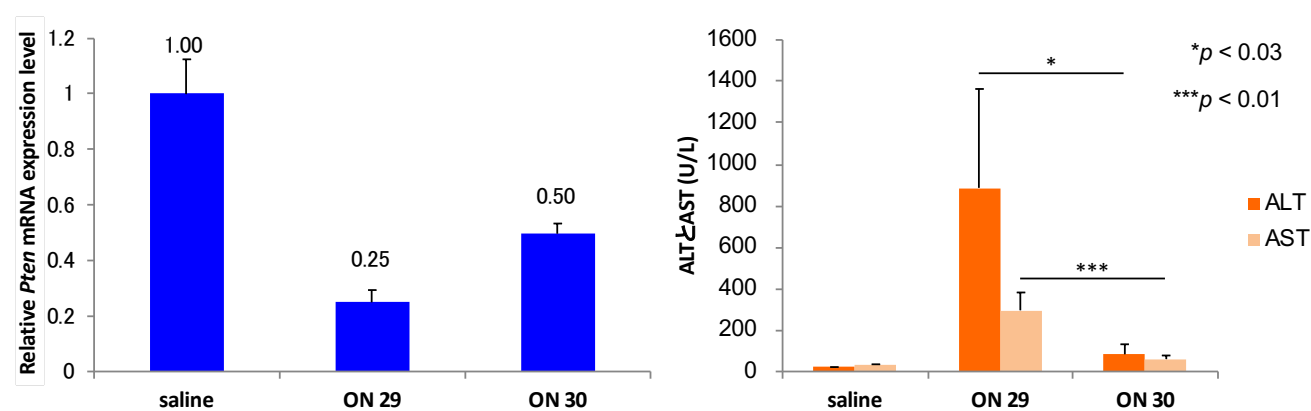


図 9. ON 29, 30 の *in vivo* における標的 RNA 発現抑制効果と肝毒性評価

以上の物性評価の結果より、scpBNA は 2',4'-BNA/LNA の標的 RNA に対する高い二重鎖形成能を維持しつつ、ヌクレアーゼ耐性能の向上と、肝毒性の危険性の低減に成功した人工核酸であることが明らかになった。また、cEt のようにモノマーの合成時に立体異性体が生成することがないため、合成上の利点もある人工核酸である。よって、scpBNA は核酸医薬としての応用が大いに期待できる。さらに、scpBNA を肝毒性発現メカニズムの解明に向けた研究ツールとして用いることで、架橋部の構造や疎水性等のパラメーターと肝毒性の相関についてより詳細に検証することも可能と考えられる。



## 第2章 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の合成と物性評価

### 第1節 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の背景と設計

第1章では2',4'-BNA/LNAの代替となるscpBNAの開発を行ったが、核酸医薬の肝毒性の原因としてPS修飾も問題視されている。また、PS修飾はリン原子上のキラリティーに由来するジアステレオマーが存在するため、 $n$ 個導入によって核酸医薬が $2^n$ 種類の混合物になってしまう。そのため、PS修飾に代わるリン酸部修飾型核酸の開発も必要である。これまで、リン酸部修飾型核酸を設計する際には、リン酸部の3'位、5'位、非架橋の酸素原子を硫黄<sup>26</sup>、窒素<sup>27</sup>、炭素原子<sup>28</sup>に置き換えるという手法がとられてきた(図10)。リン酸部の酸素原子を硫黄原子で置換した人工核酸では、PS修飾

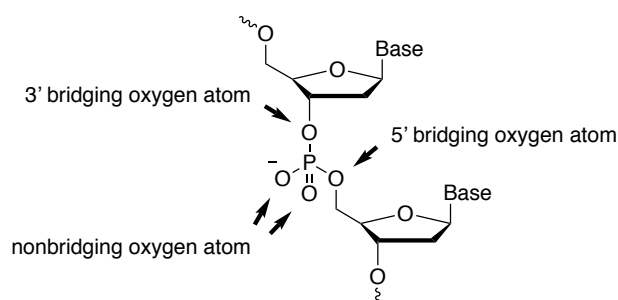


図10. リン酸部修飾型核酸の修飾箇所

のジアステレオマーの問題を回避するため、非架橋酸素原子の両方を置換した人工核酸が開発されている。<sup>26a</sup> しかしながら、PS修飾と同様にタンパク質への結合によって誘発される肝毒性の懸念は拭えない。他にも、5'位酸素原子を硫黄原子に置換することで大幅な活性の低下を引き起こすことも報告されている。<sup>26b</sup> また、リン酸部の酸素原子を窒素原子で置換した人工核酸では、窒素原子が容易にプロトン化を受けるために酸性条件下で分解されやすいことが知られている。<sup>1f,27f</sup> 一方、炭素原子に置換する場合は、硫黄原子や窒素原子への置換における問題点を回避しつつ、安全性や安定性に優れた核酸医薬の開発が期待できる。そのため、それぞれの酸素原子を炭素原子に置換した methylphosphonate (MP)<sup>28a</sup>、3'-MP<sup>28b</sup>、5'-MP<sup>28c,d</sup>、ビス(メチレン)ホスフィネート<sup>28d</sup>などが開発されてきた(図11)。これまでに、MPや3'-MPは高いヌクレアーゼ耐性能を示すことや、3'-MPがPS修

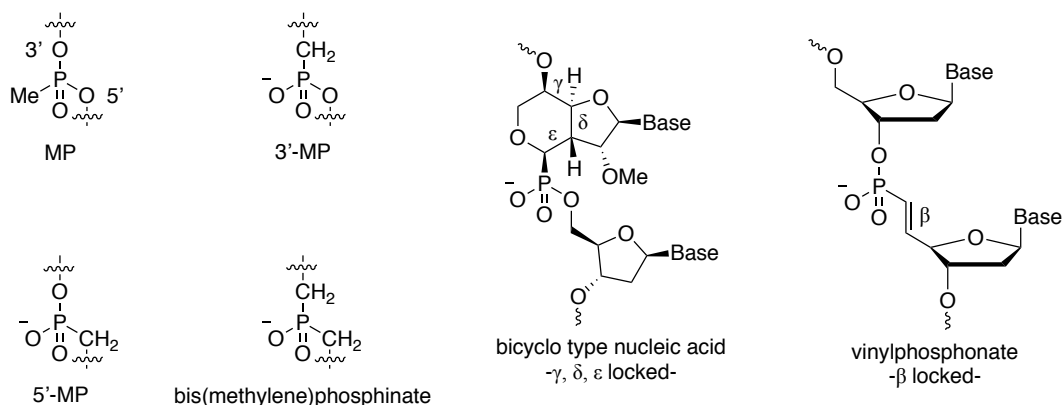


図11. リン酸部の酸素原子を炭素原子に置換した人工核酸

飾オリゴヌクレオチドよりも標的 RNA に対する高い二重鎖形成性能を有していることなど、炭素原子への置換によって優れた特性の獲得に成功している。しかしながら、MP は PS 修飾同様ジアステレオマーが存在することや、5'-MP 及びビス(メチレン)ホスフィネート修飾オリゴヌクレオチドは DNA に対する二重鎖形成性能が低いことなど、課題も多数存在する。<sup>28a,d</sup> 3'-MP のリン酸部の二面角  $\gamma, \delta, \epsilon$  を固定化したビシクロ型人工核酸<sup>29</sup> や 5'-MP の二面角  $\beta$  を固定化したビニルホスホネート<sup>30</sup> なども開発されているものの、天然のオリゴヌクレオチドと同等以下の二重鎖形成性能に留まっている。即ち、リン酸部の酸素原子を炭素原子に置換した人工核酸は核酸医薬への応用が期待できる一方、実用化可能な人工核酸は未だ開発されていない。以上のことから、PS 修飾に代わるリン酸部修飾型核酸の創出を目的に、新たな炭素原子置換型の人工核酸を開発することにした。

今回著者は、DNA に対して二重鎖形成性能の低下を示した 5'-MP とビニルホスホネートの 2 種類のリン酸部修飾型核酸に着目した (図 11)。5'-MP については、DNA/DNA 二重鎖中で導入したメチレン基が塩基部と立体反発を引き起こし、リン酸バックボーン及び糖部のコンホメーションが変化したことが二重鎖形成能低下の原因であると考察されている (図 12. 左)。<sup>28d</sup> 一方、ビニルホスホネートは二重鎖形成能低下の原因について考察されていないものの、5'-MP と同じくメチン基と塩基部の立体反発が起こると予想できる (図 12. 右)。報告されている二重鎖形成能は、5'-MP とビニルホスホネートのどちらも DNA に対してのみであるが、RNA に対しても同様の立体反発が起こると考

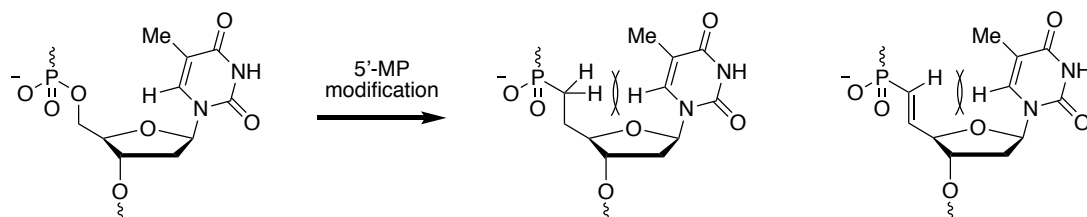


図 12. 5'-MP 修飾が引き起こす塩基部との立体反発とビニルホスホネートで予想される立体反発

えられる。これらの背景から著者は、新規リン酸部修飾型核酸として ethynylphosphonate (EP) 修飾を考案した (図 13. 左)。EP 修飾は、5'-MP やビニルホスホネートとは異なり、塩基部と立体反発を起こす水素原子を有していないため、二重鎖形成能低下を招くようなコンホメーション変化を起こさないと考えられる。また EP 修飾では、リン酸部の二面角  $\beta$  の箇所が直線かつ自由度の低いアルキン構造となっている。二重鎖中における二面角  $\beta$  の角度は、結晶構造から A 型二重らせんと B 型二重らせんのどちらも主に  $180^\circ$  となっていることが明らかにされている。<sup>31</sup> この知見とアルキン構造の特徴から、EP 修飾は二重鎖中のリン酸バックボーンの構造を模倣しつつ、二重鎖形成時のエントロピーの損失を抑制できると考えられる。実際に RNA、ビニルホスホネート、EP 修飾の最安定構造を算出し、塩基部と 3'位の酸素原子を重ね合わせた際のリン酸部の位置について比較した (図 12. 右)。<sup>注5</sup> その結果、RNA(黒色)と比較して、EP 修飾(マゼンタ)のリン酸が近い位置に存在しており、ビニルホスホネートの最安定構造(水色)及び準安定構造(緑色)の方が離れていることが予想

注5 RNA、ビニルホスホネート、EP 修飾のいずれの構造も、計算の簡便化のため亜リン酸の部分をもチル基とした。さらに、ビニルホスホネートと EP 修飾では、A 型二重らせん中の構造を想定するため、糖部が N 型となるように 2'位をメトキシ基とした。また、最安定構造及び準安定構造については、分子力学法によって算出した各安定配座に対し、基底関数を 6-31G\*\*とした HF 法による非経験的分子軌道計算を行うことで算出した。

された。また、ビニルホスホネートはコンホメーションが大きく異なる最安定構造と準安定構造のエネルギー差が 1.31 kJ/mol であるのに対し、EP 修飾ではコンホメーションが大きく異なり、エネルギー差の小さい準安定構造は確認されなかった。そのため、EP 修飾はビニルホスホネートと比較して、より自由度の低い修飾であると考えられる。また、オリゴヌクレオチドの二重鎖形性能は構造

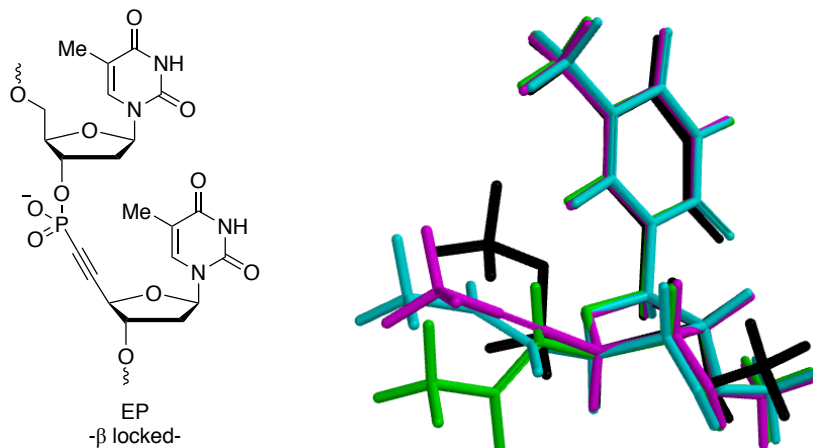


図 13. EP 修飾の構造とビニルホスホネート及び RNA との構造比較

的要因の他に、静電的要因によっても変化する。先述の通り、PS 修飾は二重鎖形成能を低下させることが知られており、硫黄原子の導入によってリン酸部の水和が阻害されることが要因の一つとして考えられている。<sup>32</sup> 一方、EP 修飾はリン酸部の非架橋原子が酸素原子になっているため、水和に影響を与えないと考えられる。5'位の酸素原子については炭素原子に置換しているものの、リン酸部の水和は主に負電荷を有する非架橋酸素原子で起こることも知られている。<sup>33</sup> そのため、5'位の炭素原子への置換によって阻害される水和も少ないと考えられる。実際に、ホスホジエステル、PS 修飾、EP 修飾について、基底関数を 6-31+G\*とした HF 法によって構造を最適化し、さらに同条件下で一点計算を行うことで静電ポテンシャルを算出し比較した (図 14)。その結果、EP 修飾の非架橋酸素原子上の静電ポテンシャルは天然のホスホジエステルと同等の数値を示していたため、分子軌道

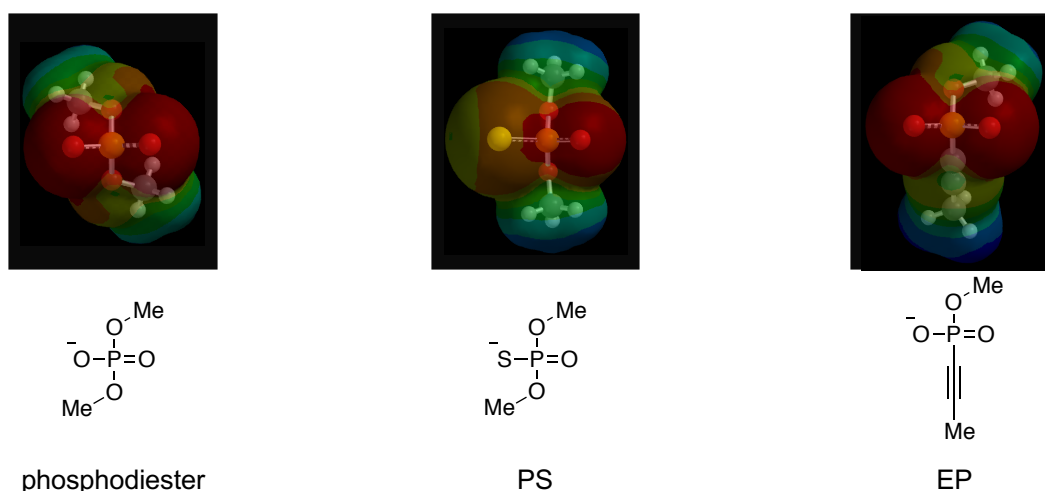


図 14. ホスホジエステル、PS 修飾、EP 修飾の静電ポテンシャル Red cover represents the range having the highest electrostatic potential (-634 kJ/mol) and blue one means the counterpart having the lowest electrostatic potential (-156 kJ/mol) in each molecule.

計算の結果からも水和への影響は小さいと予想できる。よって、EP 修飾は二重鎖の水和を阻害することなくリン酸バックボーンの自由度を抑制した人工核酸として、オリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を向上させると期待できる。

リン酸部修飾型核酸である EP 修飾を核酸医薬へと応用する場合、第 1 章で取り上げてきた高い二重鎖形成能を有する架橋型人工核酸と組み合わせることが可能である。しかしながら、2',4'-BNA/LNA とリン酸部または塩基部に修飾を施した人工核酸を併用した際に、思わぬ二重鎖形成能の低下を招いたという事例も存在する。<sup>34</sup>そのため、二種類の人工核酸を単純に組み合わせるだけでは互いの特性が同時に発揮されるとは限らず、人工核酸同士がマッチするか、それとも mismatches となるか実験的に示すことは意義がある。そこで、EP 修飾と 2',4'-BNA/LNA の両方を有するオリゴヌクレオチドを合成し、併用による二重鎖形成能や構造への影響について検証することにした。実際の合成については EP 修飾の 5'位が炭素原子であるため、オリゴヌクレオチドの合成時にカップリング反応の工程が不可能であると考え、EP 修飾によって繋がったダイマーをアミダイト体として用意することにした。

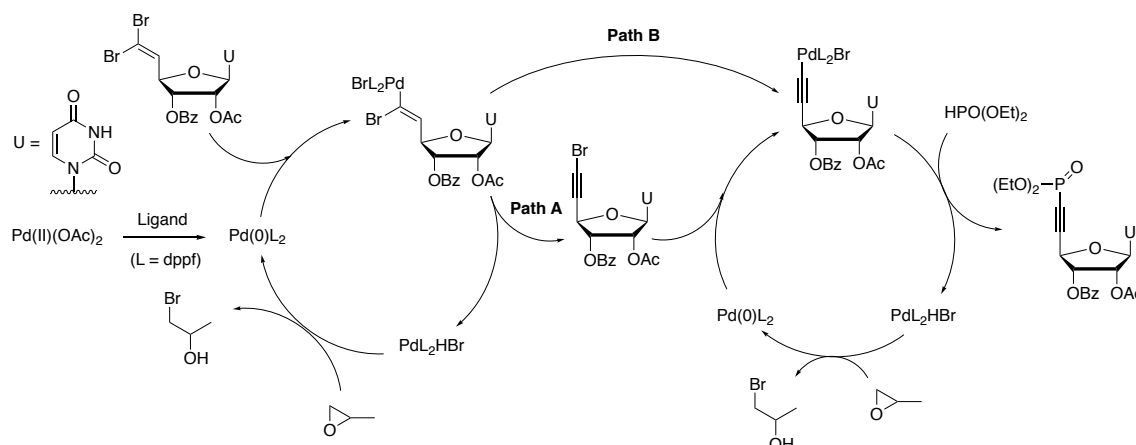
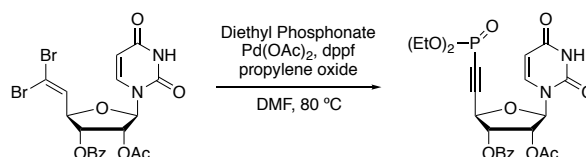
以上を踏まえて、2',4'-BNA/LNA 及び EP 修飾を有するオリゴヌクレオチドを合成し、二重鎖形成能について評価することにした。更に、ヌクレアーゼ耐性能や RNase H 活性についても評価し、PS 修飾の代替として利用可能であるか検討することにした。

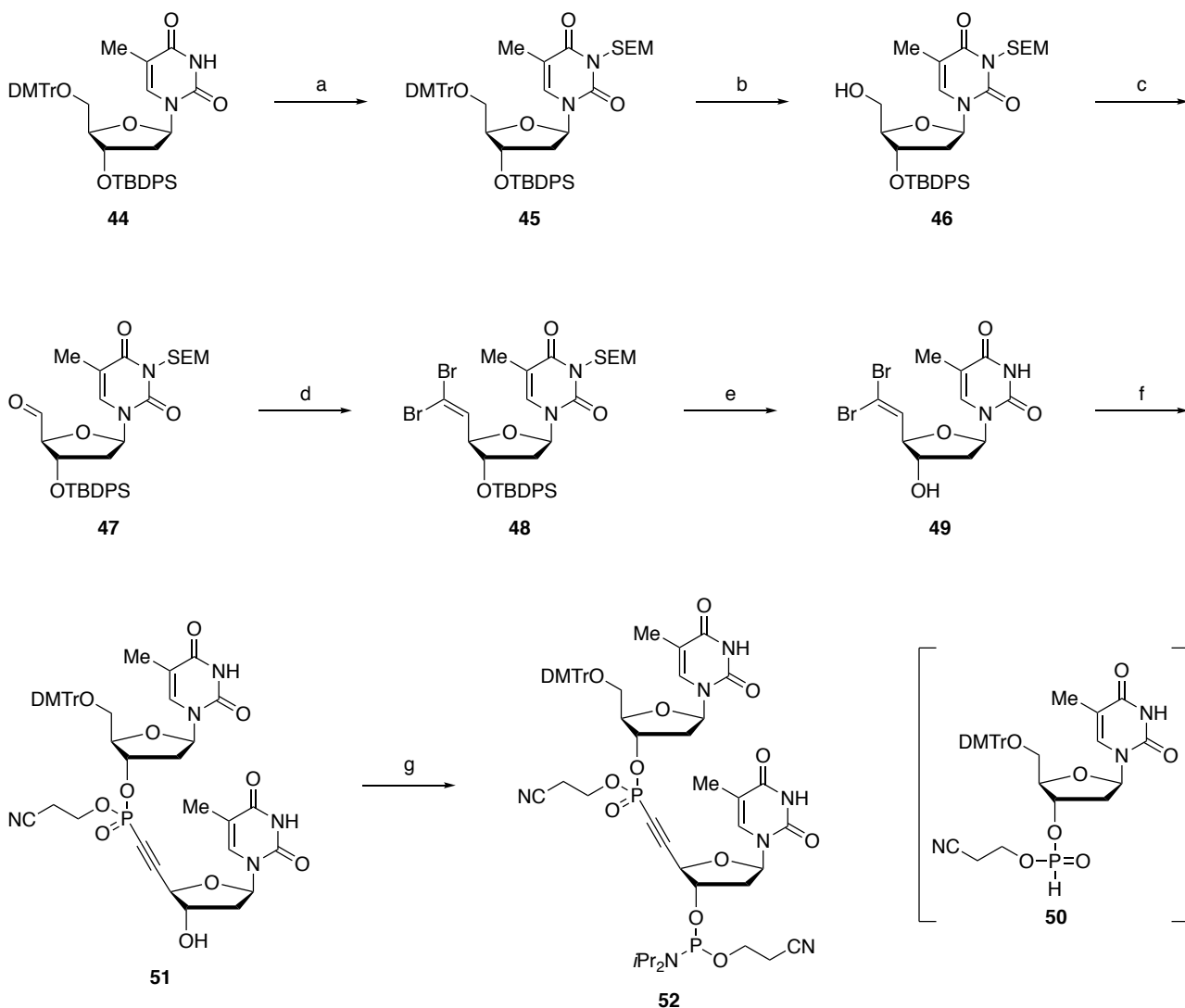
## 第2節 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の合成

エチニルホスホネートの合成法としては、パラジウム触媒を用いたジブロモアルケンと *H*-ホスホネートのクロスカップリング反応が報告されている。<sup>35,注6</sup> さらに、ジブロモアルケンと *H*-ホスホネートをそれぞれ有するチミジン同士のクロスカップリング反応も報告されている。<sup>36</sup> そこで著者はこれらの合成法を参考に、EP 修飾を有するチミジンダイマーのアミダイト体を合成することにした (スキーム 8)。まず、既知化合物 **44**<sup>37</sup> の 3 位を SEM 基<sup>38</sup> で保護し、5'位のジメトキシトリチル基を酸性条件下で脱保護した。続いて、得られた化合物 **46** の 5'位水酸基を Dess-Martin 酸化によってアルデヒド基に変換した後、Corey-Fuchs 反応によって化合物 **48** とした。その後、SEM 基を塩化スズ (IV) によって除去し、TBDPS 基を TBAF で処理することで、クロスカップリング反応の基質となるジブロモアルケン体 **49** を合成した。ここで、触媒として酢酸パラジウム(II)、配位子として dppf を用い、チミジンの *H*-ホスホネート **50** とクロスカップリング反応を行うことで、ダイマー**51** の合成に成功した。最後に、**51** のアミダイト化を行い、アミダイト体 **52** の合成を達成した。

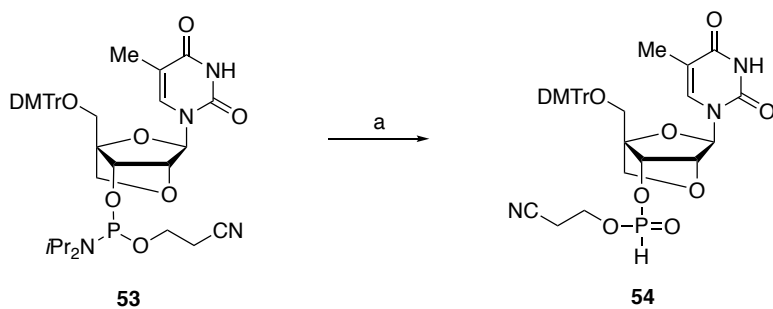
次に、EP 修飾と 2',4'-BNA/LNA の両方を有するダイマーの合成に着手した。まず、既知化合物である 2',4'-BNA/LNA-T のアミダイト体 **53**<sup>3a</sup> を酸性条件下、水と反応させることで 2',4'-BNA/LNA-T の *H*-ホスホネート **54** に変換した (スキーム 9)。次に、**51** の合成時と同じ条件でダイマー**55** を合成した後、アミダイト化を行うことで、アミダイト体 **56** の合成を達成した (スキーム 10)。

注6 右に示すジブロモアルケンと *H*-ホスホネート (ホスホン酸ジエチル) のクロスカップリング反応は以下のような反応機構が提唱されている。<sup>34</sup> まず、ジブロモアルケンにパラジウム触媒が酸化的付加した後、Path A または Path B を経由してアルキニルパラジウム複合体を形成する。その後、*H*-ホスホネートと反応することで、エチニルホスホネートが得られる。

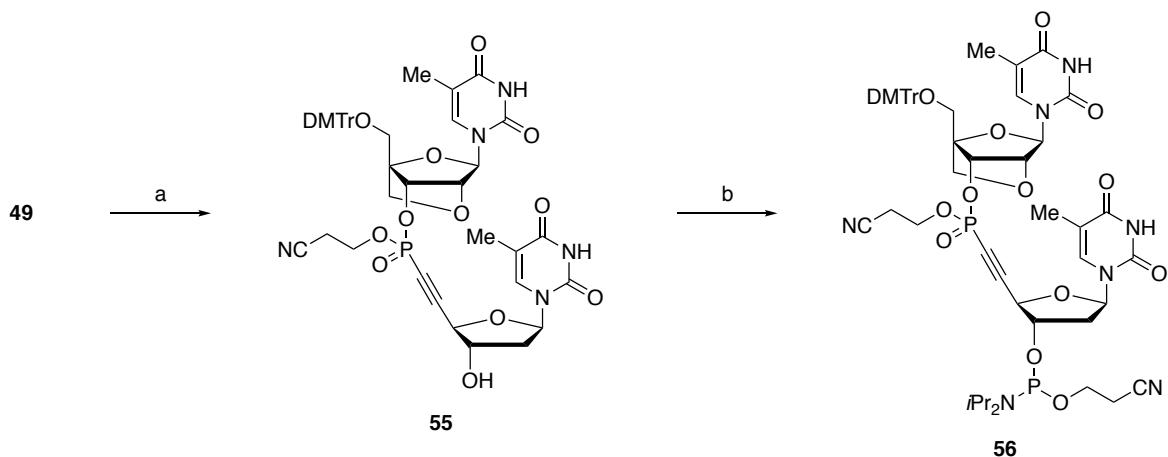




スキーム 8. 反応条件: (a) SEMCl, DBU, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 1 h; (b) TFA, MeOH, rt, 20 h, 59% (2 工程); (c) Dess-Martin periodinane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1 h; (d) CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 20 min, 85% (2 工程); (e) (1) SnCl<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 9 h; (2) TBAF, AcOH, THF, rt, 2 h, 97% (2 steps); (f) **50**, Pd(OAc)<sub>2</sub>, dppf, propylene oxide, DMF, 90 °C microwave, 1 h, 53%; (g) *i*Pr<sub>2</sub>NP(Cl)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, DIPEA, MeCN, rt, 1 h, 46%.



スキーム 9. 反応条件: (a) 1*H*-tetrazole, MeCN/H<sub>2</sub>O, rt, 30 min, quant.



スキーム 10. 反応条件: (a) **54**, Pd(OAc)<sub>2</sub>, dppf, propylene oxide, DMF, 90 °C microwave, 30 min, 41%; (b) *i*Pr<sub>2</sub>NP(Cl)OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, DIPEA, MeCN, rt, 2 h, 66%.

得られたアミダイト体 **52, 56** を、DNA 自動合成機を使用して物性評価用のオリゴヌクレオチドへと導入した (表 9)。合成した **ON 31–46** は、逆相 HPLC によって精製した。精製後の純度は、逆相 HPLC によって 95%以上であることを確認した。その後、MALDI-TOF MS により分子量を測定し、各オリゴヌクレオチドを同定した。収率については、オリゴヌクレオチド溶液の 260 nm の紫外光に対する吸光度と各核酸塩基の吸光度係数から濃度を計算することで求めた。

表 9. **ON 31–46** の収率と質量分析

ONs <sup>a</sup>	yield (%)	MALDI-TOF MS		
		calcd. [M-H] <sup>-</sup>	found [M-H] <sup>-</sup>	
5'-d(GCG <u>Te</u> TTTTT GCT)-3'	<b>(ON 31)</b>	1.5	3626.4	3626.4
5'-d(GCG TTT <u>e</u> TTT GCT)-3'	<b>(ON 32)</b>	1.3	3626.4	3626.4
5'-d(GCG TTTTT <u>e</u> T GCT)-3'	<b>(ON 33)</b>	1.0	3626.4	3626.1
5'-d(GCG <u>TTe</u> TTT GCT)-3'	<b>(ON 34)</b>	1.0	3654.4	3654.1
5'-d(GCG TT <u>Te</u> TTT GCT)-3'	<b>(ON 35)</b>	1.7	3654.4	3655.4
5'-d(GCG TTT <u>eT</u> TT GCT)-3'	<b>(ON 36)</b>	0.7	3654.4	3654.7
5'-d( <u>Te</u> TT ACG CAG TTT)-3'	<b>(ON 37)</b>	1.3	3619.4	3620.0
5'-d(T <u>Te</u> T ACG CAG TTT)-3'	<b>(ON 38)</b>	2.2	3619.4	3618.9
5'-d( <u>Te</u> TT ACG CAG TTT)-3'	<b>(ON 39)</b>	1.6	3647.4	3648.2
5'-d( <u>TeT</u> T ACG CAG TTT)-3'	<b>(ON 40)</b>	1.2	3647.4	3647.3
5'-d( <u>TTe</u> T ACG CAG TTT)-3'	<b>(ON 41)</b>	2.1	3647.4	3647.6
5'-d(TTT TTT TTT <u>e</u> T)-3'	<b>(ON 42)</b>	0.9	2973.0	2972.6
5'-d( <u>gcg</u> <u>Te</u> TTTTTTT <u>gcu</u> )-3'	<b>(ON 43)</b>	0.3	4400.9	4400.8
5'-d( <u>gcg</u> TTT <u>e</u> TTTTT <u>gcu</u> )-3'	<b>(ON 44)</b>	0.2	4400.9	4401.2
5'-d( <u>gcg</u> TTTTT <u>e</u> TTT <u>gcu</u> )-3'	<b>(ON 45)</b>	0.5	4400.9	4401.7
5'-d( <u>gcg</u> TTTTTTT <u>e</u> T <u>gcu</u> )-3'	<b>(ON 46)</b>	0.8	4400.9	4401.1

<sup>a</sup>e = ethynylphosphonate linkage, T = 2',4'-BNA/LNA-T, g = 2'-OMe-G, c = 2'-OMe-C, u = 2'-OMe-U. All sequences are phosphodiester linkages except for ethynylphosphonate linkage.

### 第3節 エチニルホスホネート修飾型人工核酸の物性評価

最初に、EP修飾オリゴヌクレオチドとssRNAまたはssDNAの二重鎖について $T_m$ 測定を行い、天然や2',4'-BNA/LNA導入オリゴヌクレオチドの $T_m$ 値と比較した(表10)。まず、天然のON 13, 49のssRNAに対する $T_m$ 値との差に着目すると、EP修飾ON 31–33, 38は $T_m$ 値が3から4°C低下することが分かった。この結果から、EP修飾を考案した当初の予想に反し、EP修飾によって二重鎖形性能が低下することが分かった。また、EP修飾をオリゴヌクレオチドの5'末端に導入したON 37では、 $T_m$ 値に変化は見られず、末端への修飾は二重鎖形性能への影響が低いことが示唆された。一方、EP修飾と2',4'-BNA/LNAの両方を有する場合には、ON 34, 36, 40において2から9°Cの $T_m$ 値上昇が確認され、ON 35, 41では天然のON 13, 49と同等の $T_m$ 値を示した。これらの結果と、2',4'-BNA/LNA導入ON 14, 47, 48, 50, 51の $T_m$ 値を比較すると、EP修飾に起因する $T_m$ 値の低下分を2',4'-BNA/LNAが補うようにはたらいっていることが分かる。即ち、EP修飾と2',4'-BNA/LNAの二重鎖形性能に与える影響は互いに独立しており、両方の効果が反映されていると考えられる。しかしながらON 39で

表10. ON 13, 14, 31–41, 47–51のssRNA及びssDNAに対する二重鎖形成能評価

ONs	$T_m$ ( $\Delta T_m$ ) (°C)	
	ssRNA	ssDNA
5'-d(GCG TTTTTT GCT)-3' (ON 13)	48	52
5'-d(GCG TeTTTTT GCT)-3' (ON 31)	45 (-3)	48 (-4)
5'-d(GCG TTTTeTTT GCT)-3' (ON 32)	44 (-4)	47 (-5)
5'-d(GCG TTTTTTeT GCT)-3' (ON 33)	45 (-3)	47 (-5)
5'-d(GCG TTTTeTTT GCT)-3' (ON 34)	50 (+2)	49 (-3)
5'-d(GCG TTTTeTTT GCT)-3' (ON 35)	48 (+0)	49 (-3)
5'-d(GCG TTTTeTTT GCT)-3' (ON 36)	50 (+2)	49 (-3)
5'-d(GCG TTTTTT GCT)-3' (ON 47)	53 (+5)	52 (+0)
5'-d(GCG TTTeTTT GCT)-3' (ON 14)	52 (+4)	53 (+1)
5'-d(GCG TTTTTeT GCT)-3' (ON 48)	52 (+4)	53 (+1)
<hr/>		
5'-d(TTT ACG CAG TTT)-3' (ON 49)	33	35
5'-d(TeTT ACG CAG TTT)-3' (ON 37)	33 (+0)	33 (-2)
5'-d(TTeT ACG CAG TTT)-3' (ON 38)	30 (-3)	30 (-5)
5'-d(TeTT ACG CAG TTT)-3' (ON 39)	30 (-3)	31 (-4)
5'-d(TeTT ACG CAG TTT)-3' (ON 40)	42 (+9)	35 (+0)
5'-d(TTeT ACG CAG TTT)-3' (ON 41)	33 (+0)	31 (-4)
5'-d(TTT ACG CAG TTT)-3' (ON 50)	36 (+3)	34 (-1)
5'-d(TTT ACG CAG TTT)-3' (ON 51)	44 (+11)	40 (+5)

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 4  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min at 260 nm; e = ethynylphosphonate linkage, T = 2',4'-BNA/LNA-T.

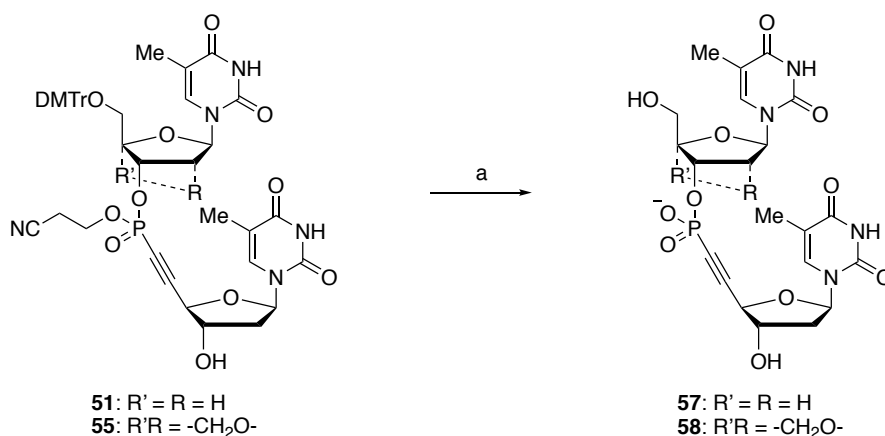
Target sequences: 5'-r(AGC AAAAAA CGC)-3' / 5'-r(AAA CUG CGU AAA)-3' (ssRNA),  
5'-d(AGC AAAAAA CGC)-3' / 5'-r(AAA CTG CGT AAA)-3' (ssDNA).

All sequences are phosphodiester linkages.



は、**ON 33** と比較して $-3^{\circ}\text{C}$  の  $T_m$  値の低下を示した。そのため、EP 修飾と 2',4'-BNA/LNA の両方をオリゴヌクレオチドの末端に有する場合には、2',4'-BNA/LNA の低下した二重鎖形成能を補う効果が得られないことが分かった。ssDNA に対する  $T_m$  値にも ssRNA に対する  $T_m$  値と同様の傾向が見られており、EP 修飾により二重鎖形性能が低下するものの、オリゴヌクレオチドの末端への修飾はその影響が小さく、2',4'-BNA/LNA は **ON 39** を除いて EP 修飾の  $T_m$  値低下を僅かに補っている。以上より、EP 修飾を施したオリゴヌクレオチドは二重鎖形性能が低くなるものの、2',4'-BNA/LNA を導入することで高い二重鎖形性能を示すという傾向が確認された。

核酸の二重鎖形性能は、エンタルピーの側面である塩基部の水素結合やスタッキング効果の強弱、糖部やリン酸部を含めた核酸分子全体で起こる水和と、エントロピーの側面である核酸分子全体の自由度の変化や水和している水分子の増減といった様々な因子によって影響を受ける。先述の通り、5'位の酸素原子は水和への関与が少なく、エチニルホスホネートの非架橋酸素原子の静電ポテンシャルはホスホジエステルと同等の数値を示したことから、EP 修飾によるリン酸部の水和に対する影響は小さいと考えられる。また、二面角  $\beta$  の自由度を三重結合によって抑制しているため、二重鎖形成はエントロピー的に有利になると予想できる。そこで、二重鎖形成が不利になった要因として、EP 修飾による構造的な変化について検証することにした。これまでに、ダイマーの CD スペクトルを測定し、260 から 280 nm のコットンバンドの強度と核酸塩基間のスタッキング効果の強さが相関することが報告されている。<sup>39</sup> この報告を参考に、EP 修飾を有するチミジンダイマーの CD スペクトルを測定し、EP 修飾の構造について検証することにした。まず、クロスカップリング後のダイマー**51** 及び **55** のシアノエチル基とジメトキシトリチル基について、塩基性または酸性条件下でそれぞれ脱保護し、チミジンダイマー**57** 及び **58** を得た (スキーム 11)。その後、得られた **57** と **58** の CD スペクトルを測定し、天然のチミジンダイマー**59** と 2',4'-BNA/LNA を 5'側に有するチミジンダイマー**60** の結果と比較した (図 15)。まず、EP 修飾を有するチミジンダイマー**57** の 260 から 280 nm のコットンバンドに着目すると、**59** の 3 分の 1 程度の強度になっており、EP 修飾によってスタッキング効果の減弱を招くことが明らかになった。二重鎖形成時の熱力学的パラメーターについても算出したところ、ssRNA との二重鎖形成はエンタルピー的に不利になっているという結果が得られた (表 11)。スタッキング効果の強弱はエンタルピー項に現れるため、熱力学的パラメーターの結果は CD スペクトルの結果を支持している。そのため、EP 修飾は核酸塩基間のスタッキングが起こりづ



スキーム 11. 反応条件: (a) (1)  $\text{NH}_4\text{OH}$ , rt, 2 h; (2) TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ , rt, **57**: 48% (2 工程), **58**: 31% (2 工程).

らくなるように、核酸の構造を変化させていると考えられる。ssDNA との二重鎖形成では、エントロピー的に不利になっているという結果が得られたが、二重鎖形成時に放出される水分子の減少が原因として考えられる。一方、**60** では構造の自由度を抑制した 2',4'-BNA/LNA によって核酸塩基のスタッキングが有利となった結果、強い正のコットンバンドが現れている (図 15)。また、2',4'-BNA/LNA は核酸塩基間のスタッキング効果を増強することも知られており、強い正のコットンバンドの一因として考えられる。<sup>40</sup> これらの効果は、EP 修飾と 2',4'-BNA/LNA の両方を有する **58** でも発揮され、**58** のコットンバンドは **59** と同等の強度まで上昇している。以上の結果から、EP 修飾と 2',4'-BNA/LNA の両方を有する **ON 34–36, 40, 41** は、2',4'-BNA/LNA の導入による二重鎖形成時のエントロピー損失の抑制や、核酸塩基間のスタッキング効果の増強という効果によって、高い二重鎖形成性を示したと考えられる。また、2',4'-BNA/LNA の導入によって二重鎖形成能の向上が見られなかった **ON 39** については、これらの効果が得られなかったことが要因であると考えられる。

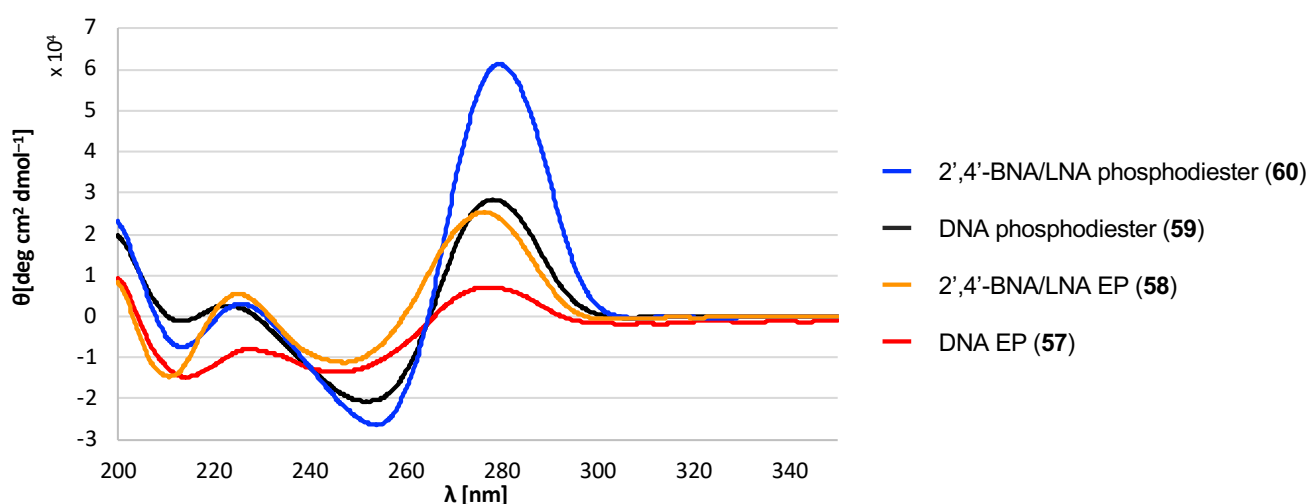


図 15. チミジンダイマー **57–60** の CD スペクトル Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 0.1  $\mu$ M each dimer, 0.5  $^{\circ}$ C/min at 260 nm, 5  $^{\circ}$ C. Sequences: 5' -d (T $\underline{e}$ T) -3' (**57**), 5' -d (T $\underline{e}$ T) -3' (**58**), 5' -d (TT) -3' (**59**), 5' -d (T $\underline{T}$ ) -3' (**60**);  $\underline{e}$  = ethynylphosphonate linkage,  $\underline{T}$  = 2',4'-BNA/LNA-T.

表 11. **ON 13** と **32** の二重鎖形成時の熱力学的パラメーター

duplexes	$\Delta H^{\circ}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^{\circ}$ (cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^{\circ}_{310K}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
<b>ON 13/ssRNA</b>	-98.4 <sup>41</sup>	-282 <sup>41</sup>	-10.9 <sup>41</sup>
<b>ON 32/ssRNA</b>	-95.1	-273	-10.4
<b>ON 13/ssDNA</b>	-84.6 <sup>41</sup>	-235 <sup>41</sup>	-11.6 <sup>41</sup>
<b>ON 32/ssDNA</b>	-94.2	-268	-11.2

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 0.89–10.9 (six data points)  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5  $^{\circ}$ C/min at 260 nm.

Target sequences: 5' -r (AGC AAAAAA CGC) -3' (ssRNA), 5' -d (AGC AAAAAA CGC) -3' (ssDNA).

All sequences are phosphodiester linkages.

続いて、EP 修飾 **ON 42** のヌクレアーゼ耐性能に関して評価し、天然の **ON 52** 及び PS 修飾 **ON 53** と比較した (図 16)。ヌクレアーゼは、3'-エキソヌクレアーゼ (CAVP, Funakoshi) を用い、第 1 章第 3 節と同様の手順で **ON 42, 52, 53** の残存量を逆相 HPLC により追跡した。本実験の条件では、天然

の ON 42 は 10 分後に全て分解される一方で、PS 修飾 ON 53 は 80 分後においても 80%以上の残存が見られた。同条件下 EP 修飾 ON 42 について測定したところ、10 分後で残存量は 50%以下となり、80 分後には 10%程度残存しているという結果が得られた。よって、EP 修飾のヌクレアーゼ耐性能は PS 修飾よりは低いものの、天然のホスホジエステルよりも高いことが明らかになった。PS 修飾の場合は、硫黄原子の導入によってヌクレアーゼの活性中心で起こる金属イオンとの結合が阻害されていると考えられている。<sup>9,42</sup> また、高いヌクレアーゼ耐性能を示す人工核酸の大半は、scpBNA のように嵩高い置換基の導入によって生じる立体障害の寄与が大きい。一方、EP 修飾の場合は、リン酸上の電子密度は天然のホスホジエステルと変化しないことが静電ポテンシャルの計算結果から予想され (図 14)、立体障害となる置換基も有していないため、PS 修飾や scpBNA とは異なる要因によってヌクレアーゼ耐性能が向上していると考えられる。分子軌道計算 (図 13) や EP 修飾ダイマーの CD スペクトル (図 15) の結果は、EP 修飾が天然のホスホジエステルとは異なる構造をとっていることを示唆しており、リン酸部の構造の変化がヌクレアーゼによる認識を妨げている可能性が挙げられる。また、EP 修飾の剛直なアルキン構造は、ヌクレアーゼがオリゴヌクレオチドを分解する際、遷移状態を形成しにくい構造となっていることもヌクレアーゼ耐性能向上の要因として考えられる。

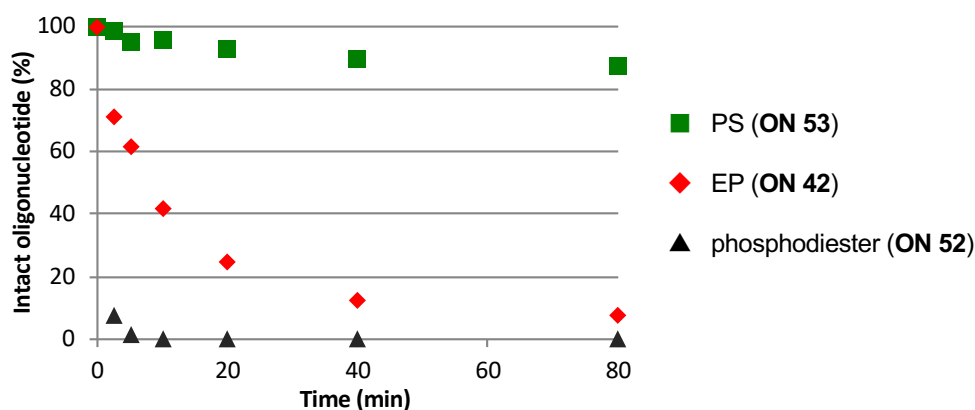


図 16. ON 42, 52, 53 のヌクレアーゼ耐性能 Conditions: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μg/mL CAVP, 4 μM each oligonucleotide, 37 °C. Sequences: 5'-d(TTT TTT TTTeT)-3' (ON 42), 5'-d(TTT TTT TTTT)-3' (ON 52), 5'-d(TTT TTT TTTsT)-3' (ON 53); e = ethynylphosphonate linkage, s = phosphorothioate linkage. All other linkages are phosphodiester linkages.

現在研究されているアンチセンス医薬の作用メカニズムに着目すると、RNase H 依存的なメカニズムと RNase H 非依存的なメカニズムに大別される。RNase H 依存的なメカニズムでは、RNase H が標的 RNA を分解する役割を担うため、RNase H の認識を阻害しないようにアンチセンス医薬を設計することが重要である。一方、RNase H 非依存的に作用するエクソン・スキップ治療のような核酸医薬では、RNase H による分解を避ける必要がある。近年では、RNase H 依存的なメカニズムのアンチセンス医薬に対しても、RNase H の認識を阻害する人工核酸を配列の中央部に導入することで、変異型遺伝子特異的に作用するアンチセンス医薬へと繋げる研究も盛んに行われている。<sup>1c</sup> そこで、EP 修飾をどのようにアンチセンス医薬へと応用できるか見極めるため、RNase H 活性について評価することにした。本評価では、二重鎖形成能を高める糖部修飾型核酸として、2'位にメトキシ基を有する 2'-OMe-G、2'-OMe-C、2'-OMe-U を導入したオリゴヌクレオチドを使用した。まず、各オリゴヌクレオチドの ssRNA に対する  $T_m$  値を測定したところ、上記の二重鎖形成能評価の結果と同様に、

表 12. ON 43–46, 54, 55 の ssRNA に対する二重鎖形成能評価

ONs		$T_m$ ( $\Delta T_m$ ) (°C)
5'-d( <u>gcg</u> TTTTTTTT <u>gcu</u> )-3'	(ON 54)	55
5'-d( <u>gcg</u> <u>sTsTsTsTsTsTsTsTsTsT</u> <u>gcu</u> )-3'	(ON 55)	46 (-9)
5'-d( <u>gcg</u> TeTTTTTTTT <u>gcu</u> )-3'	(ON 43)	54 (-1)
5'-d( <u>gcg</u> TTTTeTTTTT <u>gcu</u> )-3'	(ON 44)	53 (-2)
5'-d( <u>gcg</u> TTTTTeTTT <u>gcu</u> )-3'	(ON 45)	54 (-1)
5'-d( <u>gcg</u> TTTTTTTeT <u>gcu</u> )-3'	(ON 46)	53 (-2)

Conditions: 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, 2  $\mu$ M each oligonucleotide, 0.5 °C/min at 260 nm; e = ethynylphosphonate linkage, s = phosphorothioate linkage, g = 2'-OMe-G, c = 2'-OMe-C, u = 2'-OMe-U. All sequences are phosphodiester linkages except for ethynylphosphonate and phosphorothioate linkages.

Target sequence: 5'-r(AGC AAAAAAAA CGC)-3'. Target sequence has phosphodiester linkages.

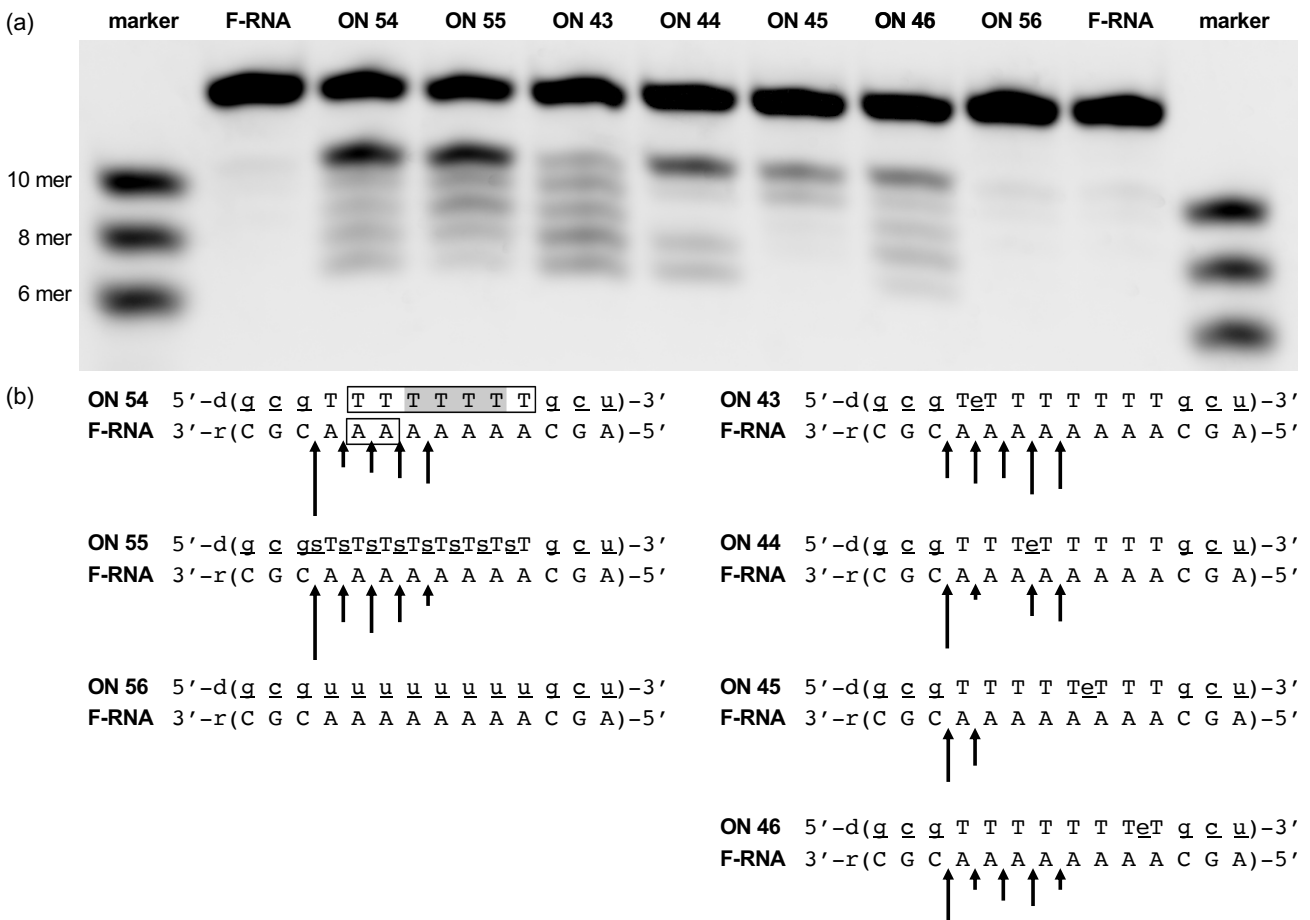


図 17. ON 43–46, 54–56 の ssRNA に対する RNase H 活性評価 (a) フルオレセイン標識 RNA の切断断片 (b) 各 ON の配列とフルオレセイン標識 RNA の切断箇所 Conditions: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 0.1 unit/ $\mu$ L RNase H, 6  $\mu$ M each oligonucleotide, 30  $\mu$ M 5'-end fluorescein labeling RNA, 30 °C. e = ethynylphosphonate linkage, s = phosphorothioate linkage, g = 2'-OMe-G, c = 2'-OMe-C, u = 2'-OMe-U. All other linkages are phosphodiester linkages. The box on the sequence of ON 54 means the nucleotides recognized by RNase H, when F-RNA is degraded at the 5th phosphodiester linkage from 3'-end of F-RNA. The box on the dinucleotide of F-RNA written under ON 54 shows the position of the 5th phosphodiester linkage. The highlight on the tetranucleotides of ON 54 corresponds to the range in which RNase H forms the hydrogen bonds with the phosphodiester linkage of ON 54.

EP 修飾は  $T_m$  値の低下を引き起こした (表 12)。しかしながら、リン酸部に修飾を施していない **ON 54** と EP 修飾 **ON 43-46** の  $T_m$  値の差は 1 から 2°C であり、今回使用した配列では二重鎖形成能に与える影響が小さいことが分かった。また、この配列では PS 修飾 **ON 55** も PS 修飾一つ当たり約 1°C の  $T_m$  値の低下を示した。これらの **ON 43-46, 54, 55** をフルオレセイン標識 RNA (**F-RNA**) 及び RNase H (TAKARA BIO) と混合し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うことで、RNase H 活性と RNA の切断箇所について評価した (図 17)。尚、**F-RNA** のフルオレセインは RNA の 5'末端に導入されており、RNase H 活性を有さない 2'-OMe のみで構成された **ON 56** をネガティブコントロールとして用いた。まず **ON 54, 55** では、**F-RNA** の 3'末端から数えて 3 番目から 7 番目のホスホジエステルが RNase H による切断を受けており、特に 3 番目において切断が顕著であった。一方、EP 修飾 **ON 43-46** は RNase H 活性を保持しているものの、**F-RNA** の切断箇所については **ON 54, 55** と大きく異なることが明らかになった。特に、**ON 44** では **F-RNA** の 3'末端から 5 番目、**ON 55** では 5 番目から 7 番目のホスホジエステルが切断されていないという結果になった。この結果について、DNA/RNA 二重鎖と複合体を形成させた RNase H の結晶構造をもとに考察した (図 18)。RNase H は DNA/RNA 二重鎖を認識する際、DNA 側の 7 残基を足場とし、その範囲内で 5'側の向かいに位置する RNA のリン酸部を分解すると考えられている (図 17. box on **ON 54/F-RNA**, 図 18)。<sup>43</sup> また、RNase H が足場とする 7 残基の中には 6 個のホスホジエステルが存在しており、5'側から 3, 4, 5 番目のホスホジエステルと水素結合を形成していることも知られている (図 17. highlight on **ON 54**, 図 18)。今回 **ON 44** と **ON 45** で消失した **F-RNA** の切断箇所はそれぞれ、RNase H が DNA 側の 7 残基を選択して認識する際に、5'側から 2, 3, 4 番目のホスホジエステルが EP 修飾に置き換わっている場所に相当する。即ち、RNase H と水素結合を形成するホスホジエステルやその近傍に存在するホスホジエステルが EP 修飾に置き換わる場合、標的 RNA の切断が阻害される。EP 修飾の剛直さや構造変化は酵素による認識を阻害する効果があるということがヌクレアーゼ耐性能評価から示唆されて

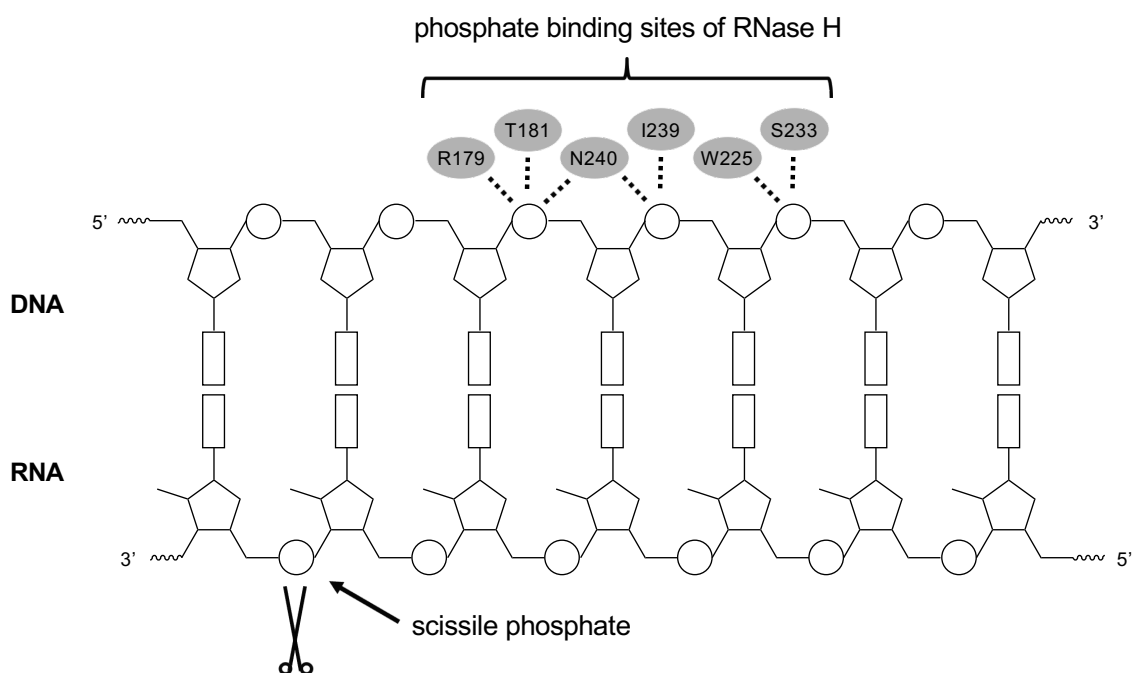


図 18. RNase H が認識する DNA 7 残基中のリン酸部結合部位と RNA 切断箇所の位置関係

おり、RNase H に対しても同様の効果が現れたと考察できる。以上より、EP 修飾は RNase H による RNA の切断箇所を制御しうるリン酸部修飾型核酸であることが明らかになった。

これまでに開発されたリン酸部の 5'位酸素原子を炭素原子に置換した 5'-MP は、塩基部との立体反発によって二重鎖形成能の低下を示すことが報告されており、ビニルホスホネートについても二重鎖形成能が低いことが知られている。著者が開発した EP 修飾は、5'-MP やビニルホスホネートで予想される立体反発を回避するように設計されていたものの、天然の構造との違いによって二重鎖形成能の低下を招いた。しかしながら EP 修飾特有の剛直な直線構造は、立体障害となるような置換基を有していないにも関わらず、ヌクレアーゼ耐性能を向上させるという新たな知見が得られた。さらに、このような EP 修飾の構造は RNase H の認識を阻害するはたらきがあることも分かった。また、低下した二重鎖形成能については、2',4'-BNA/LNA と併用することで補うことも可能である。よって、EP 修飾は RNase H 非依存的なメカニズムで作用するアンチセンス医薬や変異型遺伝子特異的なアンチセンス医薬への応用が期待できる。

## 結論

### 第1章

第1章では、架橋型人工核酸 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA) / locked nucleic acid (LNA) のヌクレアーゼ耐性能の低さと配列依存的な肝毒性の誘発という問題点に着目し、それらの改善を目指して 2'-O,4'-C-spirocyclopropylene bridged nucleic acid (scpBNA) を開発した。また、独特な環ひずみを有するスピロシクロプロパン構造を 2',4'-BNA/LNA に導入し、糖部コンホメーションを変化させることで、二重鎖形成能が変化することを狙った。scpBNA を有するオリゴヌクレオチドについて物性評価を行い、以下のことを見出した。

- scpBNA は、2',4'-BNA/LNA と同等の高い二重鎖形成能を有しており、2',4'-BNA/LNA よりも RNA 選択的に二重鎖を形成する。
- scpBNA は 2',4'-BNA/LNA よりも高いヌクレアーゼ耐性能を示し、嵩高いスピロシクロプロパン構造の導入により安定性が向上する。
- 2',4'-BNA/LNA 導入オリゴヌクレオチドで見られる肝毒性の危険性は、2',4'-BNA/LNA を scpBNA に置き換えることで有意に低下する。

これらの結果から、scpBNA は 2',4'-BNA/LNA よりも優れた物性を有することが明らかになり、核酸医薬へと応用が期待できる人工核酸であることが証明された。

### 第2章

第2章では、phosphorothioate (PS) 修飾が肝毒性の原因として懸念されていることや、PS 修飾オリゴヌクレオチドがジアステレオマー混合物となることから、PS 修飾に代わる新たなリン酸部修飾型核酸として ethynylphosphonate (EP) 修飾を開発した。EP 修飾は、リン酸部に剛直なアルキン構造が含まれており、塩基部と立体反発を起こす置換基を有していないことから、高い二重鎖形成能を示すことを期待した。EP 修飾が実際に核酸医薬へと応用可能であるか見極めるため、二重鎖形成能・ヌクレアーゼ耐性能・ribonuclease (RNase) H 活性について評価し、以下のような知見が得られた。

- EP 修飾はオリゴヌクレオチドへと導入することで二重鎖形成能を低下させる。一方、EP 修飾と 2',4'-BNA/LNA の両方を導入したオリゴヌクレオチドは、高い二重鎖形成能を示す。
- EP 修飾オリゴヌクレオチドのヌクレアーゼ耐性能は、PS 修飾オリゴヌクレオチドよりは低いものの、天然のオリゴヌクレオチドよりは高い。
- EP 修飾によって、RNase H の認識が阻害され、標的 RNA の切断箇所が変化する。

以上より、EP 修飾は架橋型人工核酸との併用によって高い二重鎖形成能を示すと共に、ヌクレアーゼ耐性能を向上させることから、核酸医薬へと応用する上で求められる物性を満たしていることが明らかになった。また、RNase H の認識を阻害することから、RNase H 非依存的なメカニズムで作用するアンチセンス医薬や変異型遺伝子特異的なアンチセンス医薬に応用可能である。

## 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 教授に心から感謝申し上げます。

研究のみならず、学生生活における様々な場面で有益なご助言をいただきました  
大阪大学大学院薬学研究科 山口卓男 講師に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、*in vivo* での評価に多大なご協力をいただきました  
脇玲子 博士に深く感謝致します。

本研究の討論に加わり、多大なるご助言を頂いただきました  
徳島文理大学薬学部 張功幸 教授、  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・薬学部 山本剛史 准教授に深く感謝致します。

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 赤井周司 教授、並びに 大久保忠恭 教授  
に感謝致します。

質量分析スペクトルを測定して頂いた  
大阪大学大学院薬学研究科 質量分析室の皆様へ感謝致します。

本研究を進めるにあたり、ご協力いただきました  
奥田匠 修士、羽瀨貴紀 学士、櫻井耀太 学士、山本知佳 氏をはじめとした  
大阪大学大学院薬学研究科 生物有機化学分野の皆様へ感謝致します。

最後に、著者の大学院生活において、常日頃よりご支援頂きました  
家族、友人に心より感謝申し上げます。



## 実験の部

旋光度は日本分光 DIP-370 型旋光度計、日本分光 P-2200 型旋光度計を用いて測定した。

赤外線吸収 (IR) スペクトルは、日本分光 FT/IR-4200 型分光光度計を用いて測定した。

水素核磁気共鳴 ( $^1\text{H}$  NMR) スペクトルは日本電子 JNM-AL300 型/JNM-ECS300 型 (300 MHz)、日本電子 JNM-ECS400 型 (400 MHz)、日本電子 JNM-ECA500 型 (500 MHz) を用い、テトラメチルシラン (0.00 ppm)、クロロホルム (7.26 ppm)、メタノール (3.30 ppm) を内部標準として測定した。分裂様式は singlet、doublet、triplet、multiplet をそれぞれ s、d、t、m と略した。

炭素核磁気共鳴 ( $^{13}\text{C}$  NMR) スペクトルは日本電子 JNM-AL300 型/JNM-ECS300 型 (75.5 MHz)、日本電子 JNM-ECS400 型 (100.5 MHz)、日本電子 JNM-ECA500 型 (125.7 MHz) を用い、クロロホルム (77.0 ppm)、メタノール (49.0 ppm) を内部標準としてとして測定した。

リン核磁気共鳴 ( $^{31}\text{P}$  NMR) スペクトルは日本電子 JNM-ECS300 型 (121.6 MHz)、日本電子 JNM-ECS400 型 (161.8 MHz)、日本電子 JNM-ECA500 型 (202.5 MHz) を用い、5%リン酸-重水溶液 (0.00 ppm) を外部標準として測定した。

アミダイト体やその合成中間体の質量分析 (MALDI-TOF MS) は日本電子 SpiralTOF JMS-S3000 を用いて測定した。

シリカゲルクロマトグラフィーの吸着剤は富士シリシア化学 PSQ-100B (110  $\mu\text{m}$ )、富士シリシア化学 FL-100D (100  $\mu\text{m}$ )、富士シリシア化学 CHROMATOREX DIOL MB100-40/75 (60  $\mu\text{m}$ ) を用いた。フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーの吸着剤は富士シリシア化学 PSQ-60B (60  $\mu\text{m}$ )、富士シリシア化学 FL-60D (60  $\mu\text{m}$ ) を用いた。分取薄層クロマトグラフィーは EMD millipore PLC Silica gel 60 F254 を用いた。

DNA 合成機は、Gene Design nS-8 Oligonucleotides Synthesizer を用い、0.2  $\mu\text{mol}$  と 1.0  $\mu\text{mol}$  のスケールで行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は SHIMADZU LC-10AT<sub>vp</sub>、SHIMADZU SPD-10A<sub>vp</sub>、SHIMADZU CTO-10<sub>vp</sub> を用いた。HPLC 分析カラムは Waters XTerra MS C18 2.5  $\mu\text{m}$ /Waters XBridge™ Shield RP18 2.5  $\mu\text{m}$ /Waters XBridge™ Oligonucleotide BEH C18 2.5  $\mu\text{m}$  (4.6  $\times$  50 mm) を、分取カラムは Waters XTerra MS C18 2.5  $\mu\text{m}$ /Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu\text{m}$  (10  $\times$  50 mm) を用いて行った。また、分析と分取両方で TSKgel OligoDNA RP 5  $\mu\text{m}$  (4.6  $\times$  150 mm) を用いた。

液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) では、質量分析計として Waters Xevo G2-XS QTof を使用し、カラムとして Waters ACQUITY UPLC BEH® C18 1.7  $\mu\text{m}$  (2.1  $\times$  50 mm) を用いた。

オリゴヌクレオチドの質量分析 (MALDI-TOF MS) は Bruker Daltonics® Autoflex II TOF/TOF または、日本電子 SpiralTOF JMS-S3000 を用いて測定した。

UV 吸収測定は Beckman DU-7400 を用いて行った。

$T_m$  測定は SHIMADZU UV-1650B、SHIMADZU UV-1650C、SHIMADZU UV-1650PC、UV-1800 を用いて行った。

ヌクレアーゼ分解耐性の評価には Waters XBridge™ OST C18 2.5  $\mu\text{g}$  (4.6  $\times$  50 mm)、を用いて行った。

CD スペクトルは、日本分光 J-720W 型円二色性分散計を使用して測定した。

電気泳動の泳動槽はアト-AE-6500 型を用い、蛍光の検出には GE ヘルスケア ImageQuant LAS 4000

を使用した。

水酸化パラジウム炭素は N.E. CHEMCAT 20% Pd カーボン粉末 (含水晶) UR タイプ (Lot No. 217-076621) を用いた。

セライトにはナカライテスク Celite®-545RVS を用いた。

活性炭素には NAKARAI CHEMICALS LTD. Charcoal Activated, powder Charamel 95% (pH 6.7) を用いた。

無水ジクロロメタン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、ピリジンは市販の脱水または超脱水のものをそのまま、もしくはモレキュラーシーブス 3Å または 4 Å を加え、乾燥させたものを用いた。*N,N*-ジイソプロピルエチルアミンは水素化カルシウムから蒸留したものを用いた。トリエチルアミンは水素化カルシウムから蒸留し、水酸化カリウムを加えて乾燥させたものを用いた。それ以外の試薬は市販のものをそのまま用いた。

各種物性評価に用いた標的 DNA 及び RNA、**ON 13–18, 19–30, 47–56** は株式会社ジーンデザインに合成を依頼し、購入した。

### 3,5-Di-*O*-benzyl-4-*C*-formyl-1,2-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-ribose (2)

窒素気流下、**1** (7.38 g, 18.5 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (100 mL) に Dess-Martin ペルヨージナン (9.41 g, 22.2 mmol) を 0 °C で加え、室温で 40 分間攪拌した。反応終了後、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和重曹水を 0 °C で加え、室温で 10 分間攪拌した。溶媒を減圧留去後、ジエチルエーテルを加え、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、**2** (7.61 g, quant.) を無色油状物質として得た。

**2**:  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.34 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 3.61 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 3.67 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.36 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 4.46 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 4.52 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.59 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.60 (dd,  $J = 3.7, 4.6$  Hz, 1H), 4.71 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 5.84 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.21–7.37 (m, 10H), 9.91 (s, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.1, 26.5, 69.1, 72.8, 73.8, 78.3, 79.6, 89.7, 104.8, 114.1, 127.7, 127.8, 128.0, 128.1, 128.4, 128.5, 137.0, 137.5, 200.0; IR (KBr): 2985, 2973, 2866, 1731, 1496, 1213, 1165, 1103, 1020, 739, 699  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{29} +27.1$  (c 1.03, MeOH); HRMS (ESI) Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 421.1622, Found 421.1620.

### 3,5-Di-*O*-benzyl-4-*C*-carboxy-1,2-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-ribose (3)

**2** (7.61 g, 19.1 mmol) のアセトニトリル溶液 (100 mL) に、リン酸二水素ナトリウム水溶液 (0.2 M, 20 mL, 3.8 mmol) と 30 wt.% 過酸化水素水 (2.3 mL, 21 mmol) を加えた。0.75 M 亜塩素酸水溶液 (38 mL, 29 mmol) を 0 °C で 10 分かけて滴下後、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液にチオ硫酸ナトリウムを 0 °C で加え、室温で 10 分攪拌した。溶媒を留去後、酢酸エチルで抽出した。水と飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。その後、溶媒を減圧留去して **3** (7.61 g, 96%) を白色固体として得た。

**3**:  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.34 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 3.72 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 3.77 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 4.30 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.55 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.65 (dd,  $J = 4.4, 4.4$  Hz, 1H), 4.69 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.80 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 5.83 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 7.21–7.40 (m, 10H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.3, 26.4, 71.8, 73.4, 74.0, 78.1, 78.5, 104.9, 114.6, 127.8, 128.0, 128.2, 128.4, 128.6, 128.7, 136.5, 137.4, 170.0; IR (KBr): 3171, 2985, 2937, 2870, 1768, 1497, 1163, 1098, 1020, 740, 698  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +42.3$  (c 1.01, MeOH); HRMS (ESI) Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_7\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 437.1571, Found 437.1570.

### 3,5-Di-*O*-benzyl-1,2-*O*-isopropylidene-4-*C*-methoxycarbonyl- $\alpha$ -D-ribose (4)

窒素気流下、**3** (7.61 g, 18.4 mmol) の無水 *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液 (30 mL) に、重曹 (15.4 g, 184 mmol) とヨウ化メチル (2.9 mL, 47 mmol) を 0 °C で加え、20 時間攪拌した。反応溶液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液と水を加え、ジエチルエーテルで抽出した。水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、**4** (7.35 g, 93%) を白色固体として得た。

**4**:  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.38 (s, 3H), 1.64 (s, 3H), 3.67 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H), 3.75 (s, 1H), 3.82 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.25 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 4.54 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.59 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 4.67 (dd,  $J = 4.1, 5.0$  Hz, 1H), 4.77 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 5.89 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 7.24–7.27 (m, 10H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  26.3, 27.3, 73.0, 73.7, 73.9, 79.4, 80.5, 89.7, 127.7, 127.7, 127.8, 127.9, 128.4, 128.6, 137.7, 169.4; IR (KBr): 2985, 2949, 2869, 1763, 1733, 1497, 1160, 1106, 1028, 738, 698  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{27} +31.5$  (c 1.00, MeOH); HRMS (ESI) Calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 451.1727, Found 451.1732.

### 3,5-Di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-hydroxycyclopropyl)-1,2-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-ribofuranose (5)

窒素気流下、**4** (12.5 g, 29.0 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (290 mL) にオルトチタン酸テトライソプロポキシド (8.6 mL, 29 mmol)、1 M エチルマグネシウムブロミド/テトラヒドロフラン溶液 (145 mL, 145 mmol) を 0 °C で加え、室温で 6 時間攪拌した。反応終了後、塩化アンモニウム水溶液を加え、10 分間攪拌した。溶媒を減圧留去後、セライトろ過を行い、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水と水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 6 : 1) により精製し、**5** (6.80 g, 55%) を黄色ペースト状物質として得た。

**5**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.56–0.68 (m, 3H), 1.16–1.21 (m, 1H), 1.39 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 3.37 (s, 1H), 3.48 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.93 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 4.33 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.43 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.45 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.54 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.84 (dd,  $J = 4.5, 5.7$  Hz, 1H), 5.00 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 5.88 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 7.26–7.39 (m, 10H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64, 11.2, 27.1, 27.9, 56.3, 73.1, 73.8, 75.5, 80.3, 82.0, 89.1, 106.6, 114.6, 127.5, 127.6, 127.8, 128.0, 128.6, 128.8, 137.9, 138.2; IR (KBr): 2935, 2867, 1496, 1454, 1252, 1099, 1027, 741, 699  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{29} +93.5$  (c 1.02, MeOH); HRMS (ESI) Calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 449.1935, Found 449.1939.

### 3,5-Di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxycyclopropyl)-1,2-*O*-isopropylidene- $\alpha$ -D-ribofuranose (6)

窒素気流下、**5** (2.55 g, 5.99 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (50 mL) に 2,6-ルチジン (2.1 mL, 18 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸 *tert*-ブチルジメチルシリル (2.8 mL, 12 mmol) を 0 °C で加え、室温で 2 時間攪拌した。飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 15 : 1  $\rightarrow$  5 : 1) により精製し、**6** (2.92 g, 90%) を黄色油状物質として得た。

**6**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -0.06 (s, 3H), -0.02 (s, 3H), 0.57–0.77 (m, 3H), 0.75 (s, 9H), 1.20–1.25 (m, 1H), 1.34 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 3.46 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.92 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 4.00 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.42 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.52 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.61 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.86 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.95 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 5.87 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 7.19–7.43 (m, 10H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -3.4, -3.2, 7.7, 10.2, 17.8, 25.7, 27.1, 28.5, 57.5, 73.4, 73.8, 76.2, 80.0, 83.3, 90.3, 106.1, 114.5, 126.8, 126.9, 127.6, 127.8, 127.8, 128.5, 138.0, 139.2; IR (KBr): 2929, 2858, 1497, 1455, 1279, 1254, 1106, 1040, 733, 696  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{29} +53.6$  (c 1.01, MeOH); HRMS (ESI) Calcd. for  $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 563.2799, Found 563.2809.

**1-{3,5-Di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclopropyl)-2-*O*-methanesulfonyl- $\beta$ -D-ribosefuranosyl}thymine (10)**

**6** (8.04 g, 14.9 mmol) を酢酸 (17 mL, 0.3 mol) と無水酢酸 (28 mL, 0.30 mol) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (3.2 mL, 45 mmol) を 0 °C で加え、室温で 5 時間攪拌した。飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **7** (9.43 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

窒素気流下、**7** (9.43 g) の無水アセトニトリル溶液 (140 mL) にチミン (5.63 g, 44.6 mmol)、*N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (18 mL, 73 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (4.0 mL, 22 mmol) を室温で加え、80°C で 2 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **8** (8.26 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。**8** の分析のため少量の粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) により精製した。

**8** (8.26 g) のテトラヒドロフラン (150 mL) 溶液に 40 wt.%メチルアミン水溶液 (30 mL, 0.73 mol) を 0 °C で加え、室温で 4 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **9** (7.50 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。**9** の分析のため少量の粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) により精製した。

窒素気流下、**9** (7.50 g) の無水ピリジン溶液 (120 mL) にメタンスルホニルクロリド (1.4 mL, 18 mmol) を 0 °C で加え、室温で 4 時間攪拌した。反応終了後、水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2) により精製し、**10** (7.39 g, 72%, 4 steps) を白色泡状固体として得た。

**7**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -0.07 (s, 3/2H), -0.02 (s, 3/2H), 0.00 (s, 3/2H), 0.04 (s, 3/2H), 0.59–0.83 (m, 4H), 0.75 (s, 9/2H), 0.78 (s, 9/2H), 1.92 (s, 3/2H), 1.98 (s, 3/2H), 2.01 (s, 3/2H), 2.09 (s, 3/2H), 3.44 (d, *J* = 9.9 Hz, 1/2H), 3.57 (d, *J* = 9.9 Hz, 1/2H), 3.91 (d, *J* = 9.9 Hz, 1/2H), 3.94 (d, *J* = 10.2 Hz, 1/2H), 4.30 (d, *J* = 5.1 Hz, 1/2H), 4.40–4.59 (m, 7/2H), 4.67 (d, *J* = 2.4 Hz, 1/2H), 4.71 (d, *J* = 2.4 Hz, 1/2H), 4.88 (d, *J* = 3.9 Hz, 1/2H), 4.92 (d, *J* = 3.6 Hz, 1/2H), 5.44 (t, *J* = 5.1 Hz, 1/2H), 5.57 (d, *J* = 5.7 Hz, 1/2H), 6.20 (d, *J* = 5.1 Hz, 1/2H), 6.39 (d, *J* = 5.1 Hz, 1/2H), 7.26–7.39 (m, 10H); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>NaSi [M+Na]<sup>+</sup>: 607.2698, Found 607.2701.

**8**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -0.01 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.65–0.74 (m, 2H), 0.78 (s, 9H), 0.95–1.03 (m, 2H), 1.56 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 1.97 (s, 3H), 3.63 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.72 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.95 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 5.50 (dd, *J* = 5.1, 8.7 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.26–7.44 (m, 10H), 7.66 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -3.3, -3.0, 7.3, 10.7, 12.3, 18.0, 20.8, 25.8, 58.1, 74.1, 74.4, 75.3, 75.3, 80.9, 84.9, 87.8, 111.6, 127.4, 127.6, 128.0, 128.3, 128.4, 129.0, 136.1, 137.1, 138.7, 150.8, 163.6, 170.8; IR (KBr): 3499, 2955, 2929, 1714, 1683, 1470, 1274, 1233, 1127, 1075, 1036, 733, 699 cm<sup>-1</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> -46.9 (c 0.99, MeOH); HRMS (ESI) Calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>NaSi [M+Na]<sup>+</sup>: 673.2916, Found 673.2917.

**9:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.03 (s, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.68–0.79 (m, 3H), 0.81 (s, 9H), 0.94–0.98 (m, 1H), 1.60 (s, 3H), 2.86 (d,  $J=12.0$  Hz, 1H), 3.60 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 4.02 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 4.21 (d,  $J=5.4$  Hz, 1H), 4.51–4.60 (m, 3H), 4.69 (d,  $J=11.7$  Hz, 1H), 5.20 (d,  $J=10.8$  Hz, 1H), 5.83 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H), 7.32–7.42 (m, 10H), 7.59 (d,  $J=1.5$  Hz, 1H), 8.38 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  –3.2, –2.9, 7.4, 10.8, 12.3, 18.1, 25.9, 58.2, 74.1, 74.5, 74.7, 75.8, 82.7, 86.8, 87.8, 111.4, 127.9, 128.0, 128.2, 128.5, 128.7, 129.0, 136.1, 137.1, 137.9, 151.1, 163.5; IR (KBr): 3422, 2955, 2929, 1699, 1470, 1277, 1254, 1129, 1087, 1036, 751, 698  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$  –45.1 (c 1.00, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 631.2810, Found 631.2814.

**10:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  –0.01 (s, 3H), 0.04 (s, 3H), 0.58–1.02 (m, 4H), 0.78 (s, 9H), 1.56 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 3.63 (d,  $J=9.9$  Hz, 1H), 4.03 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 4.37 (d,  $J=4.8$  Hz, 1H), 4.63 (d,  $J=11.7$  Hz, 1H), 4.71 (d,  $J=11.4$  Hz, 1H), 4.78 (d,  $J=10.8$  Hz, 1H), 4.94 (d,  $J=11.1$  Hz, 1H), 5.58 (dd,  $J=4.8, 8.7$  Hz, 1H), 6.23 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H), 7.26–7.41 (m, 10H), 7.60 (s, 1H), 8.13 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  –3.4, –3.1, 7.1, 10.6, 12.2, 17.9, 25.7, 38.2, 57.9, 73.9, 74.0, 75.1, 77.2, 81.0, 84.5, 87.6, 111.9, 127.4, 127.5, 127.9, 128.2, 128.4, 128.9, 135.3, 136.7, 138.3, 150.6, 163.2; IR (KBr): 3414, 2926, 1696, 1454, 1363, 1127, 1072, 1038, 748, 698  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{31}$  –48.2 (c 0.96, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_9\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 709.2586, Found 709.2582.

### 1-(3,5-Di-*O*-benzyl-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene- $\beta$ -*D*-ribofuranosyl)thymine (**13**)

**10** (3.19 g, 4.64 mmol) のテトラヒドロフラン/エタノール溶液 (150 mL, 3 : 2) に 4 M 水酸化ナトリウム水溶液 (60 mL, 0.23 mol) を 0 °C で加え、室温で 12 時間攪拌した。反応終了後、塩酸を加え、溶媒を減圧留去した。酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **11** (2.71 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。**11** の分析のため少量の粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1.7 : 1) により精製した。

窒素気流下、**11** (2.71 g) の無水ピリジン溶液 (50 mL) にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (3.7 mL, 22 mmol) を 0 °C で加え、室温で 12 時間攪拌した。さらにトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (0.73 mL, 4.4 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。水を加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **12** (4.12 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

**12** (4.12 g) のテトラヒドロフラン溶液 (250 mL) に 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (14 mL, 14 mmol) を 0 °C で加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2) により精製し、**13** (710 mg, 32%, 3 steps) を白色泡状固体として得た。

**11:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  –0.06 (s, 3H), 0.00 (s, 3H), 0.57–0.91 (m, 4H), 0.74 (s, 9H), 1.80 (d,  $J=0.9$  Hz, 1H), 3.81 (d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 4.15 (d,  $J=10.1$  Hz, 1H), 4.15 (s, 1H), 4.22 (dd,  $J=3.5, 9.7$  Hz, 1H), 4.63 (d,  $J=11.5$  Hz, 1H), 4.67 (d,  $J=11.9$  Hz, 1H), 4.72 (d,  $J=11.9$  Hz, 1H), 4.76 (d,  $J=11.4$  Hz, 1H), 4.96 (d,  $J=11.9$  Hz, 1H), 6.03 (d,  $J=3.2$  Hz, 1H), 7.26–7.44 (m, 11H), 8.13 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  –3.4, –3.2, 7.9, 10.9, 12.6, 17.8, 25.6, 58.1, 73.2, 74.3, 74.4, 74.5, 86.9, 87.2, 87.4, 108.8, 127.0, 127.5, 128.2,

128.4, 129.0, 129.0, 135.6, 137.4, 137.9, 149.9, 163.5; IR (KBr): 2954, 1703, 1669, 1472, 1286, 1254, 1097, 1042, 738, 696  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{30} +36.3$  (c 1.00, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 631.2810, Found 631.2813.

**12:**  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.04 (s, 3H), 0.07 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H), 0.66–0.88 (m, 13H), 1.25 (s, 3H), 3.50 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.62 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.45 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.56 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 4.60 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 4.64 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.75 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 5.58 (t,  $J = 3.9$  Hz, 1H), 6.49 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H), 7.29–7.41 (m, 10H), 7.46 (d,  $J = 0.6$  Hz, 1H), 8.08 (s, 1H).

**13:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.65–0.76 (m, 2H), 0.91–1.01 (m, 2H), 1.62 (s, 3 H), 3.50 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 3.63 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 4.04 (s, 1H), 4.51–4.59 (m, 4H), 4.70 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 7.26–7.39 (m, 10H), 7.51 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 8.33 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.3, 9.9, 12.4, 64.1, 68.4, 72.2, 74.0, 77.1, 87.1, 87.6, 110.3, 127.7, 127.8, 127.8, 128.2, 128.6, 128.7, 128.7, 135.1, 137.3, 137.5, 150.0, 164.1; IR (KBr): 3512, 3031, 1693, 1455, 1269, 1108, 1054, 761, 738, 699  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +55.3$  (c 1.00, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 499.1840, Found 499.1829.

#### **2,2'-Anhydro-1-{3,5-di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-hydroxycyclopropyl)- $\beta$ -D-arabinopentofuranosyl}thymine (14)**

窒素気流下、**10** (459 mg, 668  $\mu\text{mol}$ ) の無水テトラヒドロフラン溶液 (25 mL) に 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (0.67 mL, 0.67 mmol) を 0 °C で加え、室温で 5 時間攪拌した。反応終了後、水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , クロロホルム : メタノール = 50 : 1  $\rightarrow$  20 : 1) により精製し、**14** (290 mg, 91%) を白色固体として得た。

**14:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.65–0.75 (m, 4H), 1.92 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H), 3.24 (s, 1H), 3.31 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 3.60 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.24 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.33 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 4.59–4.63 (m, 2H), 4.85 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 5.36 (dd,  $J = 2.1, 6.0$  Hz, 1H), 6.15 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 7.08–7.12 (m, 3H), 7.26–7.40 (m, 8H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.0, 10.8, 14.2, 56.5, 70.9, 73.3, 73.8, 85.9, 87.0, 89.7, 90.8, 118.9, 128.0, 128.1, 128.1, 128.5, 128.7, 129.0, 130.2, 136.1, 136.9, 159.6, 172.6; IR (KBr): 3330, 3069, 2923, 1665, 1633, 1556, 1487, 1128, 1087, 736, 700  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -2.24$  (c 1.00, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 477.2020, Found 477.2024.

#### **1-(3,5-Di-*O*-benzyl-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene- $\beta$ -D-ribosefuranosyl)thymine (13)**

**14** (1.62 g, 3.40 mmol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液 (35 mL) に、炭酸カリウム (1.41 g, 10.2 mmol) を 0 °C で加え、90 °C で 20 時間攪拌した。反応終了後、水を加え、ジエチルエーテルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) により精製し、**13** (1.23 g, 77%) を白色固体として得た。

#### **1-(2-*O*,4-*C*-Spirocyclopropylene- $\beta$ -D-ribosefuranosyl)thymine (15)**

水素気流下、**13** (2.58 g, 5.46 mmol) の酢酸エチル溶液 (50 mL) に 20% 水酸化パラジウムカーボン

(1.24 g) を加え、室温で 1 時間攪拌した。ひだ折りろ紙でろ過後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 5) により精製し、**15** (1.53 g, 95%) と **16** (70 mg, 5%) をそれぞれ白色泡状固体として得た。

**15**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.70–0.92 (m, 4H), 1.89 (d, *J* = 0.6 Hz, 3H), 3.56 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.74 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 4.19 (s, 1H), 4.32 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5.1, 9.9, 12.6, 56.8, 68.7, 71.9, 81.0, 88.1, 89.9, 110.7, 137.0, 151.9, 166.5; IR (KBr): 3479, 3076, 1695, 1472, 1269, 1105, 1041 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +25.2 (c 1.01, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 319.0901, Found 319.0882.

**16**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.96–1.01 (m, 6H), 1.89 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H), 2.29–2.41 (m, 1H), 3.65 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 3.73 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.15 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.53 (dd, *J* = 5.1, 8.1 Hz, 1H), 5.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 12.5, 17.4, 18.9, 32.3, 63.6, 74.1, 75.6, 88.5, 92.0, 111.8, 138.9, 153.2, 166.4; IR (KBr): 3375, 2968, 1692, 1474, 1279, 1114, 1087 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>30</sup> -25.7 (c 1.04, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 323.1214, Found 323.1212.

#### **1-[5-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribofuranosyl]thymine (17)**

窒素気流下、**15** (873 mg, 2.95 mmol) の無水ピリジン溶液 (60 mL) に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (1.50 g, 4.42 mmol) を 0 °C で加え、室温で 9 時間攪拌した。水を加え、ジクロロメタンで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.5% トリエチルアミン含有 *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1 → 1 : 5) により精製し、**17** (1.72 g, 97%) を白色泡状固体として得た。

**17**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.48–0.54 (m, 1H), 0.74–0.96 (m, 3H), 1.73 (s, 3H), 2.18 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.16 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.33 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 0.9 Hz, 6H), 4.30 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.43 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.22–7.35 (m, 7H), 7.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 8.39 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.3, 9.6, 12.7, 55.3, 58.0, 68.0, 72.6, 79.7, 86.8, 87.0, 88.0, 110.6, 113.4, 127.2, 128.1, 128.2, 130.1, 130.2, 134.8, 135.2, 135.4, 144.4, 150.1, 158.8, 164.3; IR (KBr): 3430, 2933, 1696, 1509, 1254, 1177, 1053, 829, 757 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> -16.2 (c 1.00, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 621.2207, Found 621.2208.

#### **1-[3-*O*-{2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino}-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribofuranosyl]thymine (18)**

窒素気流下、**17** (192 mg, 321 μmol) の無水アセトニトリル溶液 (4 mL) に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.17 mL, 0.96 mmol)、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルホスホクロリダート (0.11 mL, 0.48 mmol) を 0 °C で加え、室温で 5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.5% トリエチルアミン含有 *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) により精製し、**18** (222 mg, 87%) を白色泡状固体として得た。

**18**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.40–0.44 (m, 1H), 0.71–0.87 (m, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.12 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.67 (s, 3/2H), 1.68 (s, 3/2H), 2.37–2.41 (m, 1H), 2.53–2.63 (m, 1H), 3.15–3.30 (m, 2H), 3.49–3.57 (m, 3H), 3.63–3.73 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H),



4.36 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1/2H), 4.41 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1/2H), 4.60 (s, 1/2H), 4.63 (s, 1/2H), 5.77 (s, 1H), 6.82–6.87 (m, 4H), 7.24–7.35 (m, 7H), 7.43–7.45 (m, 2H), 7.70 (s, 1/2H), 7.73 (s, 1/2H), 8.21 (s, 1H);  $^{31}\text{P}$  NMR (161.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.6; LRMS (FAB)  $m/z = 799$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ); HRMS (FAB) Calcd. for  $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{O}_9\text{N}_4\text{P}$  799.3472, Found 799.3475.

**1-{5-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-3-*O*-triethylsilyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl}thymine (19).**

アルゴン気流下、**17** (167 mg, 279  $\mu\text{mol}$ ) の無水ピリジン溶液 (2 mL) にクロトリエチルシラン (0.24 mL, 1.4 mmol) を 0 °C で加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を 0 °C で加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、**19** (188 mg, 95%) を黄色泡状固体として得た。

**19**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.36–0.64 (m, 8H), 0.74–0.87 (m, 11H), 1.71 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H), 3.11 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 3.15 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 4.34 (s, 1H), 4.36 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 6.83 (dd,  $J = 2.1, 9.0$  Hz, 4H), 7.22–7.34 (m, 7H), 7.44 (dd,  $J = 1.5, 8.4$  Hz, 2H), 7.78 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 8.25 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.9, 5.1, 6.7, 9.9, 12.8, 55.4, 57.9, 68.4, 72.5, 79.6, 86.8, 87.5, 88.5, 110.5, 113.4, 113.4, 127.2, 128.1, 128.2, 130.1, 130.2, 135.0, 135.4, 135.5, 144.4, 150.0, 158.8, 164.2; IR (KBr): 3166, 3036, 2954, 2876, 1691, 1509, 1254, 1177, 1054, 835, 734  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -13.6$  (c 1.01, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8\text{NaSi}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ : 735.3072, Found 735.3058.

**1-{5-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-3-*O*-triethylsilyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl}-5-methylcytosine (21).**

アルゴン気流下、**19** (969 mg, 1.36 mmol) とトリエチルアミン (2.8 mL, 20 mmol)、1,2,4-トリアゾール (1.39 g, 20.1 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (15 mL) に、塩化ホスホリル (0.38 mL, 4.1 mmol) を 0 °C で滴下した。室温で 2 時間攪拌した後、反応溶液に飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **20** (1.06 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

**20** (1.06 g) の 1,4-ジオキササン溶液 (10 mL) に、28 wt.% アンモニア水溶液 (1.3 mL, 19 mmol) を 0 °C で加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , クロロホルム : メタノール = 30 : 1) で精製し、**21** (958 mg, 98%, 2 steps) を白色泡状固体として得た。

**20**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.37–0.63 (m, 8H), 0.80–0.85 (m, 11H), 2.22 (s, 3H), 3.16 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 3.19 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 4.33 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 5.89 (s, 1H), 6.85 (dd,  $J = 3.3, 9.0$  Hz, 4H), 7.23–7.36 (m, 7H), 7.46 (dd,  $J = 1.2, 8.1$  Hz, 2H), 8.13 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 9.32 (s, 1H).

**21**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.34–0.64 (m, 8H), 0.74–0.85 (m, 11H), 1.76 (s, 3H), 3.13 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 3.15 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 3.80 (s, 6H), 4.33 (s, 1H), 4.47 (s, 1H), 5.81 (s, 1H), 6.84 (dd,  $J = 2.7, 9.3$  Hz, 4H), 7.22–7.36 (m, 7H), 7.46 (dd,  $J = 1.5, 8.4$  Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 8.20 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.9, 5.1, 6.7, 9.8, 13.5, 55.4, 58.0, 68.3, 72.3, 79.6, 86.7, 88.0, 88.1, 102.4, 113.3, 113.4, 127.2, 128.1, 128.2,

130.1, 130.3, 135.4, 135.6, 137.6, 144.5, 156.2, 158.8, 166.3; IR (KBr): 3351, 3085, 2954, 2876, 1661, 1607, 1509, 1253, 1177, 1045, 832, 738  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{28}$   $-0.4$  (c 1.00, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{40}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_7\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 734.3232, Found 734.3238.

***N*<sup>4</sup>-Benzoyl-1-{5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-3-*O*-triethylsilyl- $\beta$ -D-ribosefuranosyl}-5-methylcytosine (22).**

アルゴン気流下、**21** (902 mg, 1.27 mmol) の無水ピリジン溶液 (13 mL) に塩化ベンゾイル (0.22 mL, 1.9 mmol) を 0 °C で加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) で精製し、**22** (861 mg, 83%) を黄色泡状固体として得た。

**22**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.40–0.60 (m, 8H), 0.79–0.87 (m, 11H), 1.91 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H), 3.14 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 3.16 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 4.36 (s, 1H), 4.42 (s, 1H), 5.77 (s, 1H), 6.83–6.87 (m, 4H), 7.26–7.36 (m, 7H), 7.42–7.54 (m, 5H), 7.96 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 8.33 (dd,  $J = 1.8, 8.4$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.9, 5.1, 6.7, 9.9, 13.9, 55.4, 57.8, 68.4, 72.3, 79.4, 86.8, 87.8, 88.6, 111.6, 113.4, 113.4, 127.2, 128.1, 128.2, 128.3, 130.0, 130.1, 130.2, 132.6, 135.3, 135.4, 136.2, 137.3, 144.5, 147.7, 158.9, 160.0, 179.7; IR (KBr): 3071, 2954, 2875, 1703, 1570, 1509, 1251, 1176, 1051, 832, 735  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $+47.4$  (c 1.00,  $\text{CHCl}_3$ ); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_8\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 838.3494, Found 838.3497.

***N*<sup>4</sup>-Benzoyl-1-{5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene- $\beta$ -D-ribosefuranosyl}-5-methylcytosine (23).**

**22** (701 mg, 859  $\mu\text{mol}$ ) のテトラヒドロフラン溶液 (8 mL) に 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (2.6 mL, 2.6 mmol) を 0 °C 加え、室温で 10 分間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) により精製し、**23** (528 mg, 88%) を白色泡状固体として得た。

**23**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.51–0.54 (m, 1H), 0.75–0.94 (m, 3H), 1.92 (s, 3H), 2.03 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 3.18 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 3.34 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 4.32 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H), 4.48 (s, 1H), 5.82 (s, 1H), 6.86 (d,  $J = 8.7$  Hz, 4H), 7.26–7.56 (m, 12H), 7.83 (s, 1H), 8.32 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.3, 9.7, 13.9, 55.4, 57.9, 67.9, 72.6, 79.5, 87.0, 87.1, 88.2, 111.8, 113.5, 127.3, 128.1, 128.2, 128.3, 130.0, 130.2, 130.2, 132.6, 135.3, 135.4, 136.0, 137.2, 144.4, 147.7, 158.8, 159.9, 179.7; IR (KBr): 3068, 2955, 2836, 1702, 1568, 1508, 1251, 1176, 1047, 834, 714  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$   $+34.5$  (c 0.99, MeOH); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{41}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 724.2639, Found 724.2624.

***N*<sup>4</sup>-Benzoyl-1-[3-*O*-{2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino}-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene- $\beta$ -D-ribosefuranosyl]-5-methylcytosine (24).**

アルゴン気流下、**23** (528 mg, 752  $\mu\text{mol}$ ) の無水アセトニトリル溶液 (7 mL) に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.39 mL, 2.2 mmol)、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルホスホロクロリダート (0.25 mL, 1.1 mmol) を 0 °C で加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチル

で抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, 0.5% トリエチルアミン含有 *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、**24** (529 mg, 78%) を白色泡状固体として得た。

**24**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.39–0.43 (m, 1H), 0.71–0.88 (m, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.86 (s, 3/2H), 1.88 (s, 3/2H), 2.36–2.40 (m, 1H), 2.52–2.57 (m, 1H), 3.17–3.31 (m, 2H), 3.49–3.57 (m, 3H), 3.64–3.77 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.40 (d, *J* = 6.6 Hz, 1/2H), 4.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 1/2H), 4.65 (s, 1/2H), 4.69 (s, 1/2H), 5.82 (s, 1H), 6.82–6.89 (m, 4H), 7.25–7.52 (m, 12H), 7.88 (s, 1/2H), 7.91 (s, 1/2H), 8.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H); <sup>31</sup>P NMR (121.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148.8, 148.9; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>50</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>NaP [M+Na]<sup>+</sup>: 924.3708, Found 924.3722.

### 9-{2-*O*-Acetyl-3,5-di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxycyclopropyl)-β-*D*-ribosefuranosyl}-*N*<sup>6</sup>-benzoyladenine (**25**).

粗成績体 **7** をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10 : 1 → 7 : 1) により精製した後、窒素気流下、**7** (49.0 mg, 83.8 μmol) の無水アセトニトリル溶液 (1.5 mL) に *N*<sup>6</sup>-ベンゾイルアデニン (28 mg, 0.12 mmol)、*N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (60 μL, 0.24 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (60 μL, 0.32 μmol) を 0 °C で加え、80 °C で 31 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム : 酢酸エチル = 7 : 1) により精製し、**25** (37 mg, 58%) を白色泡状固体として得た。

**25**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.00 (s, 6H), 0.65–0.88 (m, 3H), 0.75 (s, 9H), 1.08–1.11 (m, 1H), 1.90 (s, 3H), 3.59 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.01 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.45–4.62 (m, 3H), 4.85 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 5.90 (dd, *J* = 4.8, 8.4 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.30–7.61 (m, 13H), 8.02 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.51 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.99 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -3.4, -3.0, 7.2, 10.7, 18.0, 20.9, 25.8, 58.1, 73.8, 74.0, 75.3, 81.3, 84.7, 88.9, 123.0, 127.5, 127.6, 128.0, 128.3, 128.4, 128.4, 129.0, 132.9, 133.7, 137.1, 138.6, 141.8, 149.4, 152.6, 152.9, 164.8, 170.4; IR (KBr): 3062, 3029, 2952, 2930, 2858, 1747, 1609, 1454, 1240, 1072, 836, 700 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>27</sup> -48.1 (c 1.02, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>NaSi [M+Na]<sup>+</sup>: 786.3294, Found: 786.3296.

### 9-{2-*O*-Acetyl-3,5-di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxycyclopropyl)-β-*D*-ribosefuranosyl}-*N*<sup>2</sup>-isobutyrylguanine (**26**).

窒素気流下、**7** (77 mg, 0.13 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1.5 mL) に *N*<sup>2</sup>-イソブチリルグアニン (41 mg, 0.19 mmol)、*N,O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (97 μL, 0.40 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (48 μL, 0.26 mmol) を 0 °C で加え、80 °C で 18 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体を分取薄層クロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル : メタノール = 10 : 2 : 1) により精製し、**26** (48 mg, 49%) を白色泡状固体として得た。

**26:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.00 (s, 3H), 0.01 (s, 3H), 0.63–0.79 (m, 12H), 0.99–1.03 (m, 1H), 1.27 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H), 1.93 (s, 3H), 2.53–2.56 (m, 1H), 3.53 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 3.98 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H), 4.45 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.54 (d,  $J = 11.5$  Hz, 1H), 4.54 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H), 4.80 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 5.00 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 5.82 (dd,  $J = 4.5, 8.5$  Hz, 1H), 6.00 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.31–7.45 (m, 10H), 7.97 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 11.9 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -3.4, -3.0, 7.2, 10.6, 18.0, 19.1, 20.7, 25.8, 36.7, 58.0, 73.7, 74.0, 75.3, 77.0, 81.1, 84.2, 88.5, 121.0, 127.7, 128.3, 128.4, 128.4, 128.9, 137.1, 137.5, 138.7, 147.4, 148.8, 155.6, 170.2, 178.0; IR (KBr): 2930, 2858, 1678, 1607, 1254, 1073  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{29} -33.6$  (c 1.10,  $\text{CHCl}_3$ ); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_8\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 768.3399, Found: 768.3398.

***N*<sup>6</sup>-Benzoyl-9-{3,5-di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclopropyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl}adenine (27).**

**25** (2.20 g, 2.88 mmol) のメタノール溶液 (40 mL) に炭酸カリウム (795 mg, 5.75 mmol) を 0 °C で加え、20 分間攪拌した。反応終了後、水を 0 °C で加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2) により精製し、**27** (2.05 g, 99%) を白色泡状固体として得た。

**27:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.03 (s, 6H), 0.69–0.84 (m, 3H), 0.79 (s, 9H), 1.06–1.09 (m, 1H), 3.17 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 3.57 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 4.01 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 4.27 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 4.51 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 4.58 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 4.80 (d,  $J = 12.0$  Hz, 1H), 4.97 (m, 1H), 5.24 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H), 5.99 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.37–7.39 (m, 10H), 7.49–7.63 (m, 3H), 8.02 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.98 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -3.3, -3.0, 7.3, 10.7, 18.0, 25.8, 58.2, 74.1, 75.8, 76.9, 83.1, 88.0, 88.3, 122.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.7, 128.9, 128.9, 132.8, 133.8, 137.0, 137.9, 141.6, 149.4, 152.5, 152.7, 164.8; IR (KBr): 3328, 3030, 2929, 1615, 1455, 1256, 1069, 836, 730  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -62.5$  (c 1.02,  $\text{CHCl}_3$ ); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_6\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 744.3188, Found: 744.3186.

**9-{3,5-Di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclopropyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl}-*N*<sup>2</sup>-isobutyrylguanine (28).**

**26** (48 mg, 64  $\mu\text{mol}$ ) のメタノール溶液 (1.5 mL) に炭酸カリウム (27 mg, 0.20 mmol) を 0 °C で加え、1 時間攪拌した。反応終了後、水を 0 °C で加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 2) により精製し、**28** (44 mg, 98%) を白色泡状固体として得た。

**28:**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.00 (s, 3H), 0.03 (s, 3H), 0.68–1.02 (m, 12H), 1.23 (d,  $J = 2.1$  Hz, 3H), 1.26 (d,  $J = 2.1$  Hz, 3H), 2.50–2.55 (m, 1H), 3.03 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 3.52 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 3.98 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 4.24 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 4.49 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 4.56 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 4.77 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 4.86 (m, 1H), 5.22 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 5.57 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.31–7.43 (m, 10H), 8.00 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 11.9 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -3.3, -2.9, 7.4, 10.7, 18.0, 18.9, 19.1, 25.8, 36.6, 58.0, 74.0, 74.1, 75.9, 76.9, 83.2, 87.9, 88.3, 121.0, 128.1, 128.3, 128.5, 128.6, 128.9, 137.1, 137.3, 138.0, 147.4, 148.5, 155.7,

178.2; IR (KBr): 2931, 2857, 1682, 1606, 1255, 1074  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{29} -42.3$  (c 0.94,  $\text{CHCl}_3$ ); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_7\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 726.3294, Found: 726.3293.

***N*<sup>6</sup>-Benzoyl-9-{3,5-di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclopropyl)- $\beta$ -D-arabinopentofuranosyl}adenine (29).**

**27** (22.0 g, 30.5 mmol) のジクロロメタン溶液 (300 mL) にジアセトキシヨードベンゼン (11.3 g, 35.1 mmol)、2-ヒドロキシ-2-アザアダマンタン (233 mg, 1.50 mmol) を 0 °C で加え、室温で 5 時間攪拌した。反応終了後、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **31** (26.7 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

窒素気流下、**31** (26.7 g) の無水テトラヒドロフラン溶液 (300 mL) に 1 M ジイソブチルアルミニウムヒドリド/ヘキサン溶液 (153 mL, 153 mmol) を 0 °C で加え、30 分間攪拌した。反応終了後、飽和酒石酸カリウムナトリウム水溶液を 0 °C で注意深く加え、室温で 1 時間攪拌した。酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体 (21.3 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

粗成績体 (21.3 g) のジクロロメタン溶液 (300 mL) に 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-*p*-ベンゾキノン (7.60 g, 33.5 mmol) を 0 °C で加え、室温で 30 分間攪拌した。反応終了後、沈殿物をひだ折りろ紙でろ過し、ろ液中の不純物を活性炭で除去した。使用した活性炭素をろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) により精製し、**29/27** の立体異性体混合物 (9.10 g, 44%, **29** : **27** = 5 : 1, 3 steps) を得た。**29** の分析のため立体異性体混合物 (100 mg) の無水ピリジン溶液 (3 mL) にメタンスルホニルクロリド (1.8  $\mu\text{L}$ , 24  $\mu\text{mol}$ ) を 0 °C で加え、室温で 30 分間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2  $\rightarrow$  1 : 3) により精製した。その結果 **27** のみ選択的にメシル化が進行し、**29** を白色泡状固体として得た。

**29**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -0.05 (s, 3H), -0.02 (s, 3H), 0.61–1.04 (m, 4H), 0.73 (s, 9H), 3.75 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 1H), 4.17 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.28 (dd,  $J$  = 3.3, 11.4 Hz, 1H), 4.61 (d,  $J$  = 11.7 Hz, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.85 (d,  $J$  = 11.7 Hz, 1H), 5.50 (d,  $J$  = 11.7 Hz, 1H), 6.41 (d,  $J$  = 3.0 Hz, 1H), 7.29–7.42 (m, 10H), 7.50–7.63 (m, 3H), 8.02 (dd,  $J$  = 1.5, 7.2 Hz, 2H), 8.35 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 9.03 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -3.4, -3.1, 8.0, 11.0, 17.9, 25.7, 58.0, 73.5, 74.0, 74.3, 74.8, 86.8, 87.2, 122.5, 127.1, 127.6, 128.0, 128.3, 128.5, 128.8, 128.9, 129.1, 132.7, 133.9, 135.7, 138.0, 142.9, 149.3, 151.6, 152.5, 164.9; IR (KBr): 2950, 2929, 2855, 1612, 1455, 1254, 1101, 706, 510  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{28} -16.1$  (c 1.04,  $\text{CHCl}_3$ ); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_6\text{NaSi}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 744.3188, Found: 744.3198.

**9-{3,5-Di-*O*-benzyl-4-*C*-(1-*tert*-butyldimethylsilyloxy)cyclopropyl)- $\beta$ -D-arabinopentofuranosyl}-*N*<sup>2</sup>-isobutyrylguanine (30).**

**28** (1.62 g, 2.30 mmol) のジクロロメタン溶液 (30 mL) にジアセトキシヨードベンゼン (1.08 g, 3.35 mmol)、2-ヒドロキシ-2-アザアダマンタン (17 mg, 0.11 mmol) を 0 °C で加え、室温で 5 時間攪拌し

た。反応終了後、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた **32** (1.94 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

**32** (1.94 g) のメタノール/ジクロロメタン溶液 (30 mL, 1 : 2) に水素化ホウ素ナトリウム (119 mg, 3.14 mmol) を 0 °C で加え、30 分間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1 → 1 : 1) により精製し、**30** (492 mg, 30%, 2 steps) を白色泡状固体として得た。

**30**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.03 (s, 3H), 0.00 (s, 3H), 0.65–0.93 (m, 4H), 0.73 (s, 9H), 1.21 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 1.24 (d, *J* = 5.1 Hz, 3H), 2.43–2.57 (m, 1H), 3.73 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.14 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.21 (s, 1H), 4.31 (dd, *J* = 3.0, 11.4 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.70 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.76 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.81 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 5.99 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.29–7.43 (m, 10H), 7.89 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 11.8 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -3.4, -3.0, 8.2, 10.8, 17.9, 18.9, 18.9, 25.7, 36.4, 57.8, 73.6, 73.8, 74.3, 75.0, 87.4, 87.4, 87.5, 120.5, 127.0, 127.5, 128.3, 128.5, 128.8, 129.0, 136.1, 138.2, 138.5, 147.2, 147.4, 155.4, 178.3; IR (KBr): 2928, 2856, 1683, 1609, 1254, 1102 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>29</sup> -0.67 (c 1.05, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>NaSi [M+Na]<sup>+</sup>: 726.3294, Found: 726.3293.

#### **N<sup>6</sup>-Benzoyl-9-(3,5-di-*O*-benzyl-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl)adenine (33).**

窒素気流下、**29** の立体異性体混合物 (9.00 g, 12.5 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (150 mL) に 4-ジメチルアミノピリジン (4.58 g, 37.5 mmol)、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (2.7 mL, 16 mmol) を 0 °C で加え、室温で 14 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体 (11.2 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

粗成績体 (11.2 g) のテトラヒドロフラン溶液 (120 mL) に 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (38 mL, 38 mmol) を 0 °C で加え、室温で 30 分間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1 → 1 : 3) により精製し、**33** (5.60 g, 76%, 2 steps) を白色泡状固体として得た。

**33**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.74–0.79 (m, 1H), 0.85–1.03 (m, 3H), 3.56 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.38 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.58 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.82 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 7.24–7.38 (m, 10H), 7.52–7.63 (m, 3H), 8.03 (dd, *J* = 1.2, 6.9 Hz, 2H), 8.26 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.93 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.8, 10.0, 64.5, 69.1, 72.4, 74.0, 79.2, 86.7, 87.4, 123.7, 127.6, 127.7, 128.0, 128.1, 128.5, 128.7, 129.0, 132.9, 133.6, 137.4, 137.4, 141.1, 149.6, 151.0, 152.8, 164.8; IR (KBr): 3062, 2929, 1610, 1580, 1454, 1248, 1048, 1030, 700 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> -5.4 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 612.2217, Found: 612.2218.

#### **9-(3,5-Di-*O*-benzyl-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl)adenine (34).**

**33** (5.60 g, 9.50 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (100 mL) に 40 wt.% メチルアミン水溶液 (16 mL, 0.19 mol) を 0 °C で加え、室温で 40 分間攪拌した。反応終了後、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食

塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1 → 100% 酢酸エチル) により精製し、**34** (4.15 g, 90%) を白色泡状固体として得た。

**34**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.71–0.78 (m, 1H), 0.85–1.04 (m, 3H), 3.56 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.36 (s, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.57 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.66 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.80 (s, 1H), 5.58 (s, 2H), 6.15 (s, 1H), 7.23–7.39 (m, 10H), 8.00 (s, 1H), 8.33 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.8, 9.9, 64.7, 69.0, 72.3, 73.9, 79.2, 86.5, 87.1, 120.1, 127.6, 127.7, 128.0, 128.5, 128.6, 137.4, 137.5, 138.4, 149.0, 153.2, 155.7; IR (KBr): 3317, 3149, 3031, 2871, 1651, 1599, 1471, 1298, 1041, 739, 698 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> –0.3 (c 1.02, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 508.1955, Found: 508.1954.

### 9-(2-*O*,4-*C*-Spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl)adenine (**35**).

**34** (450 mg, 927 μmol) のエタノール/酢酸溶液 (31 mL, 100 : 3) に 20% 水酸化パラジウムカーボン (98 mg)、ギ酸アンモニウム (3.50 g, 55.6 mmol) を室温に加え、4 時間加熱還流した。その後、水酸化パラジウムカーボン (98 mg) を室温に加え、2 時間加熱還流した。反応溶液をひだ折りろ紙でろ過後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム : メタノール = 10 : 1) により精製し、**35** (130 mg, 46%) を白色泡状固体として得た。

**35**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.69–1.00 (m, 4H), 3.63 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.80 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 5.57 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.33 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5.5, 10.0, 57.3, 69.1, 73.0, 81.2, 87.3, 89.6, 120.4, 139.8, 149.6, 153.9, 157.3; IR (KBr): 3345, 3198, 1653, 1602, 1043, 653 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>30</sup> –49.4 (c 0.96, CH<sub>3</sub>OH); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 306.1197, Found: 306.1197.

### *N*<sup>6</sup>-Benzoyl-9-(2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl)adenine (**36**).

窒素気流下、**35** (1.17 g, 3.83 mmol) の無水ピリジン溶液 (40 mL) にクロロトリメチルシラン (0.97 mL, 7.7 mmol) を 0 °C で加え、1 時間攪拌した。その後、塩化ベンゾイル (1.3 mL, 11 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。さらに、28 wt.% アンモニア水溶液 (18 mL, 0.27 mol) を 0 °C で加え、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム : メタノール = 30 : 1 → 10 : 1) により精製し、**36** (925 mg, 59%) を白色泡状固体として得た。

**36**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.80–0.97 (m, 4H), 3.65 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.81 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.51 (s, 1H), 4.68 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 7.55–7.69 (m, 3H), 8.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.60 (s, 1H), 8.73 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5.5, 10.1, 57.3, 69.2, 73.1, 81.1, 87.6, 89.8, 125.4, 129.5, 129.8, 133.9, 134.9, 143.1, 151.1, 152.5, 153.3, 168.1; IR (KBr): 3321, 1615, 1458, 1259, 1043 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> –48.1 (c 0.34, CH<sub>3</sub>OH); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 432.1278, Found: 432.1280.

### *N*<sup>6</sup>-Benzoyl-9-{5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl}adenine (**37**).

窒素気流下、**36** (925 mg, 2.26 mmol) の無水ピリジン溶液 (20 mL) に 4,4'-ジメトキシクロリド (1.15

g, 3.39 mmol) を 0 °C で加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1 → 100% 酢酸エチル) により精製し、**37** (1.68 g, quant.) を白色泡状固体として得た。

**37**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.57–0.65 (m, 1H), 0.89–1.02 (m, 3H), 2.60 (s, 1H), 3.23 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 4.49 (s, 1H), 4.72 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H), 7.20–7.64 (m, 12H), 8.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 9.10 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.8, 9.7, 55.4, 59.0, 68.5, 74.2, 79.8, 86.2, 86.9, 87.5, 113.4, 113.4, 123.7, 127.2, 128.0, 128.1, 128.2, 129.0, 130.0, 130.1, 133.0, 133.6, 135.1, 135.5, 140.6, 144.3, 149.6, 151.0, 152.9, 158.7, 158.7, 164.8; IR (KBr): 3271, 3058, 3004, 2836, 1609, 1509, 1455, 1251, 1033, 751 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> -44.4 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 734.2585, Found: 734.2581.

***N*<sup>6</sup>-Benzoyl-9-[3-*O*-{2-cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino}-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl]adenine (**38**).**

窒素気流下、**37** (800 mg, 1.12 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (7 mL) に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.59 mL, 3.4 mmol)、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルホスホクロリダート (0.38 mL, 1.7 mmol) を 0 °C で加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 2) により精製し、**38** (864 mg, 85%) を白色泡状固体として得た。

**38**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.42–0.54 (m, 1H), 0.77–1.04 (m, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.97 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.10 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 2.34 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.44 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.17 (d, *J* = 10.5 Hz, 1/2H), 3.20 (d, *J* = 10.2 Hz, 1/2H), 3.42–3.75 (m, 5H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.54 (d, *J* = 6.9 Hz, 1/2H), 4.57 (d, *J* = 8.4 Hz, 1/2H), 4.91 (s, 1/2H), 4.93 (s, 1/2H), 6.30 (s, 1/2H), 6.31 (s, 1/2H), 6.82–6.86 (m, 4H), 7.19–7.37 (m, 7H), 7.45–7.48 (m, 2H), 7.52–7.65 (m, 3H), 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2/2H), 8.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2/2H), 8.38 (s, 1/2H), 8.41 (s, 1/2H), 8.82 (s, 1/2H), 8.83 (s, 1/2H), 9.10 (s, 1/2H), 9.11 (s, 1/2H); <sup>31</sup>P NMR (121.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 148.9, 148.9; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>50</sub>H<sub>54</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>NaP [M+Na]<sup>+</sup>: 934.3664, Found: 934.3657.

**9-(3,5-Di-*O*-benzyl-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl)-*N*<sup>2</sup>-isobutyrylguanine (**40**).**

窒素気流下、**30** (1.84 g, 2.61 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (30 mL) にトリエチルアミン (5.5 mL, 39 mmol)、メタンスルホニルクロリド (2.0 mL, 26 mmol) を 0 °C で加え、室温で 20 分間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体 (2.58 g) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

粗成績体 (2.58 g) のテトラヒドロフラン溶液 (52 mL) に 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (7.8 mL, 7.8 mmol) を 0 °C で加え、室温で 18 時間攪拌した。反応終了後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫



酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1 → 1 : 2) により精製し、**39** (997 mg, 57%, 2 steps) を白色泡状固体として得た。

**39** (915 mg, 1.37 mmol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液 (20 mL) に、炭酸カリウム (580 mg, 4.20 mmol) を室温に加え、80 °C で 22 時間攪拌した。反応終了後、水を加え、ジエチルエーテルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 3) により精製し、**40** (720 mg, 92%) を白色固体として得た。

**39**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.66–0.88 (m, 4H), 1.25 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 1.27 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 2.57–2.66 (m, 1H), 2.59 (s, 3H), 3.59 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.90 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 4.64 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 5.02 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.60 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.30 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.30–7.39 (m, 10H), 8.03 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 12.0 (s, 1H); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>NaS [M+Na]<sup>+</sup>: 690.2204, Found: 690.2200.

**40**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.71–1.02 (m, 4H), 1.27 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 1.29 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H), 2.55–2.69 (m, 1H), 3.53 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 3.63 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.45 (s, 1H), 4.53–4.62 (m, 4H), 5.92 (s, 1H), 7.22–7.38 (m, 10H), 7.82 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 12.0 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.7, 10.0, 19.1, 36.4, 64.5, 69.0, 72.3, 73.9, 77.5, 78.8, 86.2, 87.1, 121.6, 127.6, 127.6, 128.0, 128.1, 128.5, 128.6, 136.2, 137.3, 137.3, 147.3, 147.9, 155.7, 179.1; IR (KBr): 3152, 3031, 2936, 2875, 1680, 1610, 1558, 1405, 1155, 1048, 737 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>29</sup> 1.89 (c 1.06, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 594.2323, Found: 594.2324.

#### ***N*<sup>2</sup>-Isobutyryl-9-(2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl)guanine (41).**

水素気流下、**40** (600 mg, 1.05 mmol) のエタノール溶液 (10 mL) に 20% 水酸化パラジウムカーボン (200 mg) を加え、室温で 20 時間攪拌した。ひだ折りろ紙でろ過後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム : メタノール = 15 : 1 → 10 : 1) により精製し、**41** (289 mg, 70%) を白色泡状固体として得た。

**41**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 0.76–1.04 (m, 4H), 1.22 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.22 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 2.63–2.77 (m, 1H), 3.62 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.54 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 8.14 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5.5, 10.0, 19.3, 37.0, 57.3, 69.1, 72.9, 81.2, 87.3, 89.6, 121.5, 138.4, 149.4, 149.8, 157.3, 181.7; IR (KBr): 3306, 3201, 2977, 2938, 1687, 1609, 1561, 1404, 1044 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>30</sup> -41.3 (c 1.10, CH<sub>3</sub>OH); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 414.1384, Found: 414.1380.

#### **9-{5-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene-β-*D*-ribosefuranosyl}-*N*<sup>2</sup>-isobutyrylguanine (42).**

窒素気流下、**41** (210 mg, 537 μmol) の無水ピリジン溶液 (8 mL) に 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (283 mg, 835 μmol) を 0 °C で加え、室温で 4 時間攪拌した。水を加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム : メタノール = 50 : 1 → 20 : 1) によ

り精製し、**42** (371 mg, quant.) を黄色泡状固体として得た。

**42**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.55–0.63 (m, 1H), 0.81–0.85 (m, 2H), 1.03–0.95 (m, 1H), 1.22 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.23 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 2.67–2.76 (m, 1H), 3.17 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 3.52 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1H), 3.62 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.53 (s, 1H), 4.54 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 6.77 (d,  $J = 9.0$  Hz, 4H), 7.12–7.32 (m, 7H), 7.41 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.91 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 12.1 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.8, 9.7, 19.0, 19.1, 36.4, 55.3, 59.3, 68.7, 74.0, 79.9, 86.2, 86.8, 87.3, 113.3, 113.4, 121.4, 127.1, 128.1, 128.1, 130.1, 130.1, 135.2, 135.6, 136.8, 144.4, 147.5, 147.9, 155.8, 158.7, 179.3; IR (KBr): 3131, 2978, 1685, 1607, 1509, 1254, 506  $\text{cm}^{-1}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{29} -52.0$  (c 1.04,  $\text{CHCl}_3$ ); HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_8\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 716.2691, Found: 716.2695.

### 9-[3-*O*-(2-Cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino)-5-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2-*O*,4-*C*-spirocyclopropylene- $\beta$ -*D*-ribosefuranosyl]-*N*<sup>2</sup>-isobutyrylguanine (**43**).

窒素気流下、**42** (215 mg, 31.0  $\mu\text{mol}$ ) の無水アセトニトリル溶液 (3 mL) に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.17 mL, 0.98 mmol)、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルホスホクロリダート (0.17 mL, 0.76 mmol) を 0  $^\circ\text{C}$  で加え、室温で 3 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{SiO}_2$ , *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 3) により精製し、**43** (211 mg, 76%) を白色泡状固体として得た。

**43**:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.43–0.53 (m, 1H), 0.79–0.84 (m, 3H), 0.90 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 0.90 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 1.07 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H), 1.08 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.26 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.26 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 2.44–2.63 (m, 3H), 3.09 (d,  $J = 10.8$  Hz, 1/2H), 3.15 (d,  $J = 11.1$  Hz, 1/2H), 3.35–3.72 (m, 5H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.36 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1/2H), 4.52 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1/2H), 4.91 (s, 1/2H), 5.00 (s, 1/2H), 5.99 (s, 1H), 6.81–6.85 (m, 4H), 7.21–7.36 (m, 7H), 7.45 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2/2H), 7.45 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2/2H), 8.00 (s, 1/2H), 8.02 (s, 1/2H), 8.59 (s, 1/2H), 8.64 (s, 1/2H), 12.0 (s, 1/2H), 12.0 (s, 1/2H);  $^{31}\text{P}$  NMR (121.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  145.2, 146.9; HRMS (MALDI) Calcd. for  $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{N}_7\text{O}_9\text{NaP}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 916.3769, Found: 916.3775.

### オリゴヌクレオチドの合成と精製及び純度確認

オリゴ合成はアミダイト体 **18**, **24**, **38**, **43** と市販の dA (Bz)、dG (*i*Bu)、dC (Bz)、dT のアミダイト体 0.1 M の無水アセトニトリル溶液として調整し、GeneDesign nS-8 Oligonucleotides Synthesizer を用いて通常のホスホロアミダイト法に従って行った。合成スケールは **ON 1–10** で 0.2  $\mu\text{mol}$ 、**ON 11, 12** で 1.0  $\mu\text{mol}$  とし、トリチルオン条件で行った。活性化剤には、**ON 1–5, 11** で 0.25M 5-[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]-1*H*-テトラゾール/アセトニトリル溶液を用い、**ON 6–10, 12** で 0.25 M 5-エチルチオ-1*H*-テトラゾール/アセトニトリル溶液を用いた。縮合時間は、0.2  $\mu\text{mol}$  スケールでアミダイト体 **18**, **24**, **38**, **43** を 8 分間、天然のアミダイト体を 32 秒間とし、1.0  $\mu\text{mol}$  スケールでアミダイト体 **18**, **24**, **38**, **43** を 10 分間、天然のアミダイト体を 40 秒間とした。合成完了後、28 wt.% アンモニア水溶液で室温下、1.5 時間処理してカラム担体からの切り出しを行い、引き続き 55  $^\circ\text{C}$  で一晩静置することで塩基部及びリン酸ジエステル部の脱保護を行った。続いて **ON 1–10** を簡易逆相カラム Waters Sep-Pak<sup>®</sup> Plus C<sub>18</sub> Cartridges、**ON 11, 12** を Waters Sep-Pak<sup>®</sup> Plus C<sub>18</sub> Environmental Cartridges に

より精製し、さらに逆相 HPLC にて精製を行った。精製後の純度については、逆相 HPLC によって 95%以上であることを確認した。以下に HPLC 測定条件を示す。

共通条件

移動相	A 液: 0.1M トリエチルアミン/酢酸 (TEAA) バッファー (pH 7.0) B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1:1
流速	分析: 1.0 mL/分 分取: 3.0 mL/分
カラム温度	50 °C
検出	UV (260 nm)

#### ON 1-5, 11

グラジエント	アセトニトリル濃度 6-12% (30 分)
カラム	分析: Waters XTerra MS C <sub>18</sub> 2.5 μm (4.6 × 50 mm) 分取: Waters XTerra MS C <sub>18</sub> 2.5 μm (10 × 50 mm)

#### ON 6-10, 12

グラジエント	アセトニトリル濃度 6-12% (20 分) (ON 9) アセトニトリル濃度 8-16% (20 分) (ON 6-8, 10, 12)
カラム	分析: Waters XBridge™ Shield RP <sub>18</sub> 2.5 μm (4.6 × 50 mm) 分取: Waters XBridge™ OST C <sub>18</sub> 2.5 μm (10 × 50 mm)

#### オリゴヌクレオチドの組成確認と定量

合成したオリゴヌクレオチドの組成は MALDI-TOF MS を用いて確認した。3-ヒドロキシピコリン酸水溶液 (10 mg/mL) とクエン酸二アンモニウム水溶液 (1.0 mg/mL) を 1:1 の割合で混合したマトリックス (1 μL) を測定プレート上で乾燥させ、乾燥したマトリックス上に水に溶解した ON 1-12 (50 μM, 1 μL) を載せて乾燥させた後に測定を行った。分子量の測定はネガティブリフレクターモードで行い、オリゴチミジル酸 (7 mer、15 mer 及び 23 mer) を外部標準として用いた。また、合成したオリゴヌクレオチドの定量は吸光度測定器を用いて 260 nm の紫外外部吸収を測定することで行った。

### 第 1 章 第 3 節の実験

#### 融解温度 ( $T_m$ ) 測定

ON 1-5, 13-18 の  $T_m$  測定では、各オリゴヌクレオチド (終濃度 4 μM) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM)、リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.2) のサンプル溶液 (130 μL) を調整した。ON 6-10, 19-24 の  $T_m$  測定では、各オリゴヌクレオチド (終濃度 4 μM) と塩化ナトリウム (終濃度 10 mM)、リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.2) のサンプル溶液 (130 μL) を調整した。ON 29, 30 の  $T_m$  測定では、各オリゴヌクレオチド (終濃度 2 μM) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM)、リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.2) のサンプル溶液 (130 μL) を調整した。ON 1-10, 13-24 のサンプル溶液を沸騰水中に浴し、室温までゆっくり冷却した後、窒素気流下、測定溶液を 5 °C まで冷却し測定を開始した。0.5 °C/分 の速度で 90

°C まで昇温し、0.5 °C 間隔で 260 nm における吸光度をプロットした。ON 29, 30 のサンプル溶液は、10 °C まで冷却した後、測定を開始し、95 °C まで昇温した。T<sub>m</sub> 値は中線法により算出し、独立した 3 回の測定における平均値とした。

#### ヌクレアーゼ分解耐性評価

ON 11, 25, 26 のヌクレアーゼ耐性能評価では、各オリゴヌクレオチド (終濃度 4 μM) と塩化マグネシウム (終濃度 10 mM)、トリス-塩酸緩衝液 (50 mM, pH 8.0)、3'-エキソヌクレアーゼ (CAVP; 1 μg/mL) のサンプル溶液 (140 μL) を調整し、37 °C で静置した。ON 12, 27, 28 のヌクレアーゼ耐性能評価では、サンプル溶液 (130 μL) に調整した。反応開始から 2.5、5、10、20、40、80 分後に反応液から 20 μL ずつ取り、90 °C 下で 2.5 分間静置させることでヌクレアーゼを失活させ、原料オリゴヌクレオチドの残量を逆相 HPLC により定量した。以下に HPLC 測定条件を示す。

移動相	A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0) B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1
グラジエント	アセトニトリル濃度 6–12% (20 分)
カラム	分析: Waters XBridge™ OST C <sub>18</sub> 2.5 μm (4.6 × 50 mm)
流速	分析: 1.0 mL/分
カラム温度	50 °C
検出	UV (260 nm)

#### 単回投与実験

以下すべての動物実験は「大阪大学動物実験規定」を遵守して実施された。被験動物として 5 週令のマウス Balb/c (雄) (日本 SLC), 20 mg/匹を購入し、1 週間馴化させた。6 週令のマウスに対して、生理食塩水 (大塚) に溶解したオリゴヌクレオチド 35 mg/kg もしくは生理食塩水を全用量 200 μL にて皮下投与した (投与群につき N=4)。72 時間後、マウスをイソフルラン麻酔下にて解剖し、下大静脈より採血した。その後、PBS にて心臓還流により肝臓内脱血を行い、肝臓を摘出した。肝臓表面を PBS で洗浄した後、細切して一部を RNA later® Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, AM7021) 下、4 °C 保存し、残りは液体窒素で瞬間凍結させた後、-80 °C で保存した。

#### マウス肝臓からの total RNA 抽出

RNA later® 下で保存しておいた肝臓切片を一部取り出し、QuickGene RNA tissue kit SII (wako, RT-S2) の LRT (2-mercaptoethanol) 500 μL を添加し、ステンレス球 1 粒を加え、ホモジナイズした (TAITEC, μL-12, speed: 2000 r/min、3 分)。その後、12000 rpm、室温にて 3 分間遠心し、上清 385 μL を回収した。キットの SRT を 175 μL 添加し、ボルテックスにて 15 秒混合させ、スピンドウンした。その後、特級エタノール (wako) 140 μL を添加し、ボルテックスにて 1 分混合させ、スピンドウンした。全量を RNA 自動抽出器 (QuickGene-800, wako) にセットし、total RNA を抽出した。

#### 逆転写反応

Total RNA 2 μg に対し逆転写反応を行った。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, 4368813) を使い、メーカーのプロトコルに従って cDNA を作製した。

### Real-time quantitative PCR

30 倍希釈した cDNA 溶液を用いて、標的遺伝子 *Pten* に対する real-time PCR を行った。*Pten* の発現量解析は、ハウスキーピング遺伝子 *Gapdh* の発現量に対する相対発現量として評価した。反応には、TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 4352042) 及び、TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific, *Pten*: Mm00477208\_m1, *Gapdh*: Mm99999915\_g1) を用い、メーカーのプロトコルに従って反応を行った。

### 統計処理

遺伝子発現抑制評価試験及び血液生化学的検査は、各群 4 匹で行い、有意差の評価については学生 t 検定を用いて行った。

### 血液生化学的検査 (AST、ALT 値の測定)

下大静脈から採血した血液サンプルから血清を分離した。血液凝固促進剤及び血清分離剤の入ったチューブ (BD、365967) に血液を添加し、5000 rpm、4°C 下にて 20 分遠心した。血清を回収し、以降の血液検査に使用した。肝毒性の指標 AST 値及び ALT 値をアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼキット (富士ドライケムスライド GOT/AST-PIII, Fujifilm, 477-03331) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼキット (富士ドライケムスライド GPT/ALT-PIII, Fujifilm, 474-03341) を用いて算出した。血清 10 µL を富士ドライケムスライドに点着し、測定器富士ドライケム 7000V「Z」を用いて、AST 値及び ALT 値を測定した。1000 V/L の値を超えるサンプルについては、PBS にて血清を 10 倍希釈し、測定した。

**3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-3-(2-trimethylsilylethoxymethyl)thymidine (46).**

窒素気流下、**44** (6.96 g, 8.89 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (70 mL) に 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (2.6 mL, 17 mmol)、2-(クロロメトキシ)エチルトリメチルシラン (1.5 mL, 8.5 mmol) を  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加えた。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 40 分間攪拌した後、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (2.6 mL, 17 mmol)、2-(クロロメトキシ)エチルトリメチルシラン (1.5 mL, 8.5 mmol) を  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加えた。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 20 分間攪拌した後、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (2.6 mL, 17 mmol)、2-(クロロメトキシ)エチルトリメチルシラン (1.5 mL, 8.5 mmol) を  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加えた。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 10 分間攪拌した後、飽和重曹水を  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体 **45** (9.89 g) は精製せず、次の反応に用いた。

**45** (9.89 g) のメタノール溶液 (2 mL) にトリフルオロ酢酸 (0.68 mL, 8.9 mmol) を  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加えた。室温で 2 時間攪拌した後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン溶液 : 酢酸エチル = 17 : 3 → 1 : 3) により精製し、**46** (3.22 g, 59%, 2 steps) を白色泡状固体として得た。

**45**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.00 (s, 9H), 0.95–1.00 (m, 2H), 1.03 (s, 9H), 1.39 (s, 3H), 2.05 (ddd,  $J = 5.8, 8.6, 13.4$  Hz, 1H), 2.37 (ddd,  $J = 2.4, 5.8, 13.1$  Hz, 1H), 2.88 (dd,  $J = 2.4, 10.0$  Hz, 1H), 3.22 (dd,  $J = 2.4, 10.3$  Hz, 1H), 3.65–3.71 (m, 2H), 3.77 (s, 6H), 4.06–4.07 (m, 1H), 4.51–4.53 (m, 1H), 5.37 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 5.41 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 6.53 (dd,  $J = 5.8, 8.2$  Hz, 1H), 6.71–6.76 (m, 4H), 7.10–7.61 (m, 20H)

**46**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -0.01 (s, 9H), 0.93–0.99 (m, 2H), 1.09 (s, 9H), 1.84–1.88 (m, 4H), 2.15 (ddd,  $J = 6.2, 7.9, 13.7$  Hz, 1H), 2.30 (ddd,  $J = 3.1, 5.9, 13.4$  Hz, 1H), 3.25 (ddd,  $J = 3.1, 6.2, 12.0$  Hz, 1H), 3.60–3.69 (m, 3H), 3.96–3.99 (m, 1H), 4.41–4.45 (m, 1H), 5.36 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 5.39 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H), 6.26 (dd,  $J = 6.2, 7.6$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.37–7.47 (m, 6H), 7.62–7.67 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -1.3, 13.4, 18.2, 19.1, 27.0, 40.5, 62.2, 67.6, 70.3, 73.1, 87.5, 87.7, 110.4, 128.0, 130.2, 130.3, 133.2, 133.4, 135.5, 135.8, 135.9, 151.1, 163.5; IR (KBr): 3481, 2952, 1708, 1670, 1469, 1249, 1099, 836, 703 cm<sup>-1</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +30.7 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>NaSi<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 633.2787, Found 633.2776.

**6'-Dibromo-(5'-deoxy-5'-methylidene)-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-3-(2-trimethylsilylethoxymethyl)thymidine (48).**

**46** (600 mg, 982  $\mu$ mol) のジクロロメタン溶液 (10 mL) に Dess-Martin ペルヨージナン (500 mg, 1.20 mmol) を  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液と飽和重曹水を  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加え、室温で 10 分間攪拌した。酢酸エチルで抽出後、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体 **47** (633 mg) は精製せず、直ちに次の反応に用いた。

窒素気流下、四臭化炭素 (1.31 g, 3.95 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) にトリフェニルホスフィン (2.07 g, 7.89 mmol) を  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加え、攪拌した。30 分後、赤色の反応溶液に粗成績体 **47** (633

mg) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) を 0 °C で加えた。0 °C で 20 分間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、セライトろ過を行い、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水と水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン溶液 : 酢酸エチル = 9 : 1 → 3 : 1) により精製し、**48** (639 mg, 85%, 2 steps) を白色泡状固体として得た。

**47**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.00 (s, 9H), 0.95–1.00 (m, 2H), 1.11 (s, 9H), 1.71 (ddd, *J* = 5.2, 8.9, 13.7 Hz, 1H), 1.95 (s, 3H), 2.42 (dd, *J* = 5.5, 13.4 Hz, 1H), 3.65–3.70 (m, 2H), 4.51 (s, 1H), 4.59–4.61 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 6.59 (dd, *J* = 5.5, 9.3 Hz, 1H), 7.42–7.49 (m, 7H), 7.63–7.70 (m, 4H), 9.12 (s, 1H).

**48**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -0.01 (s, 9H), 0.93–0.98 (m, 2H), 1.09 (s, 9H), 1.82–1.91 (m, 4H), 2.38 (ddd, *J* = 4.1, 6.5, 13.7 Hz, 1H), 3.62–3.68 (m, 2H), 4.24 (ddd, *J* = 3.8, 3.8, 6.2 Hz, 1H), 4.65 (dd, *J* = 3.8, 8.6 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.22 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 6.5, 6.5 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.37–7.48 (m, 6H), 7.63–7.66 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -1.3, 13.5, 18.3, 19.1, 26.9, 40.3, 67.6, 70.3, 75.9, 86.1, 86.5, 96.0, 110.6, 128.1, 128.1, 130.3, 132.7, 133.0, 134.0, 134.9, 135.9, 135.9, 150.8, 163.3; IR (KBr): 2953, 1711, 1671, 1465, 1249, 1112, 830, 702 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +17.8 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>NaSi<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 785.1048, Found 785.1044.

#### 6'-Dibromo-(5'-deoxy-5'-methylidene)thymidine (**49**).

窒素気流下、**48** (224 mg, 293 μmol) の無水ジクロロメタン溶液 (3 mL) に 1M 塩化スズ(IV)/ジクロロメタン溶液 (0.30 mL, 0.30 mmol) を 0 °C で加えた。室温で 7 時間攪拌した後、1M 塩化スズ(IV)/ジクロロメタン溶液 (30 μL, 30 μmol) を 0 °C で加え、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、飽和重曹水を加え、酢酸エチルで抽出後、飽和食塩水と水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体 (264 mg) は精製せず、次の反応に用いた。

粗成績体 (264 mg) と 酢酸 (50 μL, 0.88 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (3 mL) に 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド/テトラヒドロフラン溶液 (0.59 mL, 0.59 mmol) を室温で加え、2 時間攪拌した。反応終了後、水を加え、酢酸エチルで抽出し、水と飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン溶液 : 酢酸エチル = 1 : 3) により精製し、**49** (113 mg, 97%, 2 steps) を白色固体として得た。

**49**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 1.90 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H), 2.23–2.40 (m, 2H), 4.35 (ddd, *J* = 3.7, 3.7, 5.9 Hz, 1H), 4.53 (dd, *J* = 3.2, 8.7 Hz, 1H), 6.21 (dd, *J* = 6.9, 6.9 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 12.4, 39.8, 75.6, 87.4, 87.7, 94.5, 111.9, 137.9, 138.2, 152.2, 166.4; IR (KBr): 3348, 1719, 1655, 1273 cm<sup>-1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +45.1 (c 1.04, DMSO); HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>NaBr<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 416.9056, Found 416.9069.

#### 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidinyl

#### 2-cyanoethylphosphono-[3'(O)→5'(C)]-(5'-deoxy-5'-methylidene)thymidine (**51**).

マイクロウェーブバイアル中、酢酸パラジウム(II) (136 mg, 606 μmol) と 1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン (672 mg, 1.21 mmol) を脱酸素 *N,N*-ジメチルホルムアミド (20 mL) に溶解させ、

室温で攪拌した。1時間後、反応溶液に **49** (1.20 g, 3.03 mmol)、*H*-ホスホネート **50** (3.01 g, 4.55 mmol)、プロピレンオキシド (2.2 mL, 30 mmol)、脱酸素 *N,N*-ジメチルホルムアミド (3 mL) を加えた。マイクロ波照射下、90 °C で1時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, 100% クロロホルム → クロロホルム : メタノール = 9 : 1) により精製し、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, *n*-ヘキサン溶液 : 酢酸エチル = 1 : 1 → 100% 酢酸エチル → 酢酸エチル : メタノール = 9 : 1) により精製し、**51** (1.45 g, 53%) を白色固体として得た。

**51**: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.40 (s, 3/2H), 1.43 (d, *J* = 1.2 Hz, 3/2H), 1.92 (s, 3/2H), 1.94 (s, 3/2H), 2.31–2.35 (m, 1H), 2.45–2.51 (m, 2H), 2.72–2.81 (m, 5/2H), 2.90 (dd, *J* = 4.6, 13.8 Hz, 1/2H), 3.38–3.42 (m, 1H), 3.52–3.54 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 4.16 (d, *J* = 3.5 Hz, 1/2H), 4.26–4.35 (m, 3H), 4.41 (d, *J* = 3.5 Hz, 1/2H), 4.68–4.78 (m, 2H), 5.23–5.29 (m, 1H), 6.35–6.47 (m, 2H), 6.83–6.85 (m, 4H), 7.23–7.36 (m, 10H), 7.56 (s, 1/2H), 7.61 (s, 1/2H), 9.50 (s, 1/2H), 9.53 (s, 1/2H), 9.70 (s, 1/2H), 9.98 (s, 1/2H); <sup>31</sup>P NMR (202.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -9.3, -9.0; HRMS (MALDI) Calcd. for C<sub>45</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>NaP [M+Na]<sup>+</sup>: 918.2722, Found 918.2726.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidinyl 2-cyanoethylphosphono-[3'(O)→5'(C)]-3'-O-[2-cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino]-(5'-deoxy-5'-methylidene)thymidine (52).**

窒素気流下、**51** (1.39 g, 1.55 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (15 mL) に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.85 mL, 4.9 mmol)、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルホスホクロリダート (0.52 mL, 2.3 mmol) を 0 °C で加え、室温で1時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (diol, *n*-ヘキサン溶液 : 酢酸エチル = 1 : 3) により精製し、**52** (789 mg, 46%) を白色泡状固体として得た。

**52**: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.18–1.21 (m, 12H), 1.39 (s, 3/2H), 1.39 (s, 3/2H), 1.93–1.94 (m, 3H), 1.94 (s, 3/2H), 2.35–2.80 (m, 8H), 3.39–3.90 (m, 12H), 4.21–4.35 (m, 3H), 4.79–4.96 (m, 2H), 5.28–5.32 (m, 1H), 6.34–6.39 (m, 1H), 6.47 (dd, *J* = 5.2, 8.9 Hz, 1H), 6.84 (d, 4H), 7.23–7.38 (m, 10H), 7.55 (d, *J* = 1.4 Hz, 1/2H), 7.57 (s, 1/2H), 8.43 (s, 2H); <sup>31</sup>P NMR (202.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -8.7, -8.6, -8.5, 149.4, 149.5, 150.6, 150.6; HRMS (FAB) Calcd. for C<sub>54</sub>H<sub>63</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>NaP<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1118.3806, Found 1118.3805.

**5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O,4'-C-methylene-5-methyluridine-3'-O-(2-cyanoethyl) H-phosphonate (54)**

**53** (100 mg, 129 μmol) のアセトニトリル/水 (7 : 1) 溶液 (1.6 mL) に 1*H*-テトラゾール (18 mg, 0.26 mmol) を 0 °C で加え、室温で30分間攪拌した。反応終了後、飽和食塩水を加え、ジクロロメタンで抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、**54** (100 mg, quant.) を白色泡状個体として得た。

**54**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.55 (s, 3/2H), 1.65 (s, 3/2H), 2.40–2.61 (m, 1H), 2.74 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.34 (d, *J* = 11.5 Hz, 1/2H), 3.45 (d, *J* = 11.0 Hz, 1/2H), 3.69 (d, *J* = 11.0 Hz, 1/2H), 3.75 (d, *J* = 11.0 Hz, 1/2H), 3.68–3.91 (m, 8H), 4.01–4.12 (m, 1H), 4.26–4.34 (m, 1H), 4.72 (s, 1/2H), 4.74 (s, 1/2H), 5.00 (d, *J* = 6.4 Hz), 5.03 (d, *J* = 6.9 Hz, 1/2H), 5.69 (s, 1/2H), 5.70 (s, 1/2H), 6.72 (d, *J* = 738 Hz, 1H), 6.86–6.89 (m, 4H), 6.96 (d, *J* = 739 Hz, 1/2H), 7.26–7.62 (m, 9H), 7.63 (s, 1/2H), 7.63 (s, 1/2H), 8.65 (s, 1/2H), 8.69 (s, 1/2); <sup>31</sup>P NMR



(121.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.09, 7.46; HRMS (FAB) Calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>P [M]<sup>+</sup>: 689.2138, Found 689.2139.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O,4'-C-methylene-5-methyluridinyl 2-cyanoethylphosphono-[3'(O)→5'(C)]-(5'-deoxy-5'-methylidine)-thymidine (55).**

マイクロウェーブバイアル中、酢酸パラジウム(II) (2 mg, 9 μmol) と 1,1'-ビス(ジフェニルホスフィノ)フェロセン(11 mg, 20 μmol) を脱酸素 *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) に溶解させ、室温で攪拌した。1 時間後、反応溶液に **49** (20 mg, 51 μmol)、*H*-ホスホネート **54** (52 mg, 76 μmol)、プロピレンオキシド (37 μL, 0.51 mmol)、脱酸素 *N,N*-ジメチルホルムアミド (0.5 mL) を加えた。マイクロ波照射下、90 °C で 30 分間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム : メタノール = 20 : 1 → 10 : 1) により精製し、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (SiO<sub>2</sub>, クロロホルム : メタノール = 20 : 1) により精製し、**55** (19 mg, 41%) を白色固体として得た。

**55**: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.60 (s, 3/2H), 1.69 (s, 3/2H), 1.87 (s, 3/2H), 1.87 (s, 3/2H), 2.31–2.34 (m, 1H), 2.50–2.75 (m, 3H), 3.45–3.66 (m, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.83–4.37 (m, 4H), 4.63–4.76 (m, 3H), 4.89–5.02 (m, 2H), 5.64 (s, 1/2H), 5.67 (s, 1/2H), 6.32–6.39 (m, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.25–7.32 (m, 8H), 7.41–7.43 (m, 2H), 7.60 (s, 1/2H), 7.63 (s, 1/2H), 9.95 (s, 1/2H), 9.98 (s, 1/2H), 10.4 (s, 1/2H), 10.4 (s, 1/2H); <sup>31</sup>P NMR (121.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -10.0, -8.5; HRMS (FAB) Calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub>P [M]<sup>+</sup>: 923.2779, Found 923.2777.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-O,4'-C-methylene-5-methyluridinyl 2-cyanoethylphosphono-[3'(O)→5'(C)]-3'-O-[2-cyanoethoxy(diisopropylamino)phosphino]-(5'-deoxy-5'-methylidine)-thymidine (56).**

窒素気流下、**55** (20 mg, 22 μmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) に *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (12 μL, 69 μmol)、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルホスホクロリダート (8 μL, 0.04 mmol) を室温で加えた。室温で 1 時間攪拌した後、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (12 μL, 69 μmol)、2-シアノエチル-*N,N*-ジイソプロピルホスホクロリダート (8 μL, 0.04 μmol) を室温で加え、1 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (diol, クロロホルム : メタノール = 50 : 1) により 2 回精製し、*n*-ヘキサンでトリチレーションを行い、**56** (16 mg, 66%) を白色泡状固体として得た。

**56**: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.18–1.20 (m, 12H), 1.58 (s, 3/4H), 1.59 (s, 3/4H), 1.67 (s, 3/4H), 1.69 (s, 3/4H), 1.88–1.90 (m, 3H), 2.36–2.81 (m, 6H), 3.45–4.36 (m, 16H), 4.76–5.02 (m, 4H), 5.66 (s, 1/4H), 5.67 (s, 1/4H), 5.71 (s, 1/2H), 6.21–6.37 (m, 1H), 6.85–6.88 (m, 4H), 7.20–7.35 (m, 8H), 7.41–7.46 (m, 2H), 7.59 (s, 1H), 8.97 (s, 2H); <sup>31</sup>P NMR (121.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -9.8, -9.2, -8.6, -8.6, 149.1, 149.3, 150.4, 150.6; HRMS (FAB) Calcd. for C<sub>55</sub>H<sub>64</sub>N<sub>7</sub>O<sub>15</sub>P<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1124.3936, Found 1124.3937.

### オリゴヌクレオチドの合成と精製及び純度確認

オリゴ合成はアミダイト体 **52**, **56** を 0.1 M の無水テトラヒドロフラン溶液、市販の dA (Pac)、dG (*iPr*-Pac)、dC (Ac)、dT、2',4'-BNA/LNA-T、2'-OMe rG (*iBu*)、2'-OMe rC (Ac)、2'-OMe rU のアミダイト体を 0.1 M の無水アセトニトリル溶液として調整し、GeneDesign nS-8 Oligonucleotides Synthesizer を用

いて通常のホスホロアミダイト法に従って行った。合成スケールは 1.0  $\mu\text{mol}$  とし、**ON 31–42** はトリチルオフ条件、**ON 43–46** はトリチルオン条件で行った。活性化剤には、0.25 M 5-エチルチオ-1*H*-テトラゾール/アセトニトリル溶液を用いた。縮合時間は、アミダイト体 **52, 55** を 2 分間、2',4'-BNA/LNA 及び 2'-OMe のアミダイト体を 10 分間、天然のアミダイト体を 40 秒間とした。合成完了後、**ON 31–41** は 28 wt.% アンモニア水溶液で室温下、2 時間処理してカラム担体からの切り出しと塩基部及びリン酸ジエステル部の脱保護を行った。**ON 42–46** は 28 wt.% アンモニア水溶液/40 wt.% メチルアミン水溶液 (1 : 1) で室温下、5 分間処理してカラム担体からの切り出しを行い、引き続き 65 °C 下 1 時間静置することで塩基部及びリン酸ジエステル部を脱保護した。**ON 43–46** については、逆相 HPLC にて精製を行い、Waters Sep-Pak® Plus C<sub>18</sub> Cartridges 上で脱トリチルを行なった後、35% メタノール水溶液で溶出した。最後に、**ON 31–46** を逆相 HPLC で精製した。精製後の純度については、逆相 HPLC によって 95%以上であることを確認した。以下に HPLC 測定条件を示す。

#### 共通条件

カラム	分析: Waters XBridge™ Oligonucleotide BEH C <sub>18</sub> 2.5 $\mu\text{m}$ (4.6 × 50 mm) 分取: Waters XBridge™ OST C <sub>18</sub> 2.5 $\mu\text{m}$ (10 × 50 mm)
流速	分析: 1.0 mL/分 分取: 4.5 mL/分
検出	UV (260 nm)

#### **ON 31, 33, 34, 36–38, 40, 41**

移動相	A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0) B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1
グラジエント	分析: アセトニトリル濃度 6–12% (30 分) 分取 1 回目: アセトニトリル濃度 6–12% (30 分) 2 回目: アセトニトリル濃度 6–10% (30 分)
カラム温度	50 °C

#### **ON 32, 42**

移動相	A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0) B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1
グラジエント	アセトニトリル濃度 6–12% (30 分)
カラム温度	50 °C

#### **ON 43–46 (脱トリチル前)**

移動相	A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0) B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1
グラジエント	アセトニトリル濃度 5–45% (30 分)
カラム温度	50 °C

#### **ON 43–45 (脱トリチル後)**

移動相	分析 A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0) B 液: 0.1M TEAA バッファー : メタノール = 1 : 1
	分取 1, 3 回目 A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0)

B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1  
 分取 2 回目 A 液: 0.1M ヘキシルアミン/酢酸 (HAA) バッファー (pH 7.0)  
 B 液: 0.1M HAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1  
 グラジエント 分析: アセトニトリル濃度 8-14% (30 分)  
 分取 1 回目: アセトニトリル濃度 6-12% (30 分)  
 2 回目: アセトニトリル濃度 20-40% (30 分)  
 3 回目: アセトニトリル濃度 8-12% (20 分)  
 カラム 分析, 分取 3 回目: TSKgel OligoDNA RP 5  $\mu$ m (4.6  $\times$  150 mm)  
 カラム温度 1, 3 回目: 50  $^{\circ}$ C  
 2 回目: 65  $^{\circ}$ C

#### ON 46 (脱トリチル後)

移動相 分析 A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0)  
 B 液: 0.1M TEAA バッファー : メタノール = 1 : 1  
 分取 1, 2 回目 A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0)  
 B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1  
 分取 3 回目 A 液: 0.1M ヘキシルアミン/酢酸 (HAA) バッファー (pH 7.0)  
 B 液: 0.1M HAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1  
 グラジエント 分析: メタノール濃度 12-30% (30 分)  
 分取 1 回目: アセトニトリル濃度 6-12% (30 分)  
 2 回目: アセトニトリル濃度 8-9% (30 分)  
 3 回目: アセトニトリル濃度 20-40% (30 分)  
 カラム温度 50  $^{\circ}$ C

#### オリゴヌクレオチドの組成確認と定量

合成したオリゴヌクレオチドの組成は MALDI-TOF MS を用いて確認した。3-ヒドロキシピコリン酸水溶液 (10 mg/mL) とクエン酸二アンモニウム水溶液 (1.0 mg/mL) を 1:1 の割合で混合したマトリックス (1  $\mu$ L) を測定プレート上で乾燥させ、乾燥したマトリックス上に水に溶解した **ON 31-46** (50-100  $\mu$ M, 1  $\mu$ L) を載せて乾燥させた後に測定を行った。分子量の測定はネガティブリフレクターモードで行い、オリゴチミジル酸 (7 mer, 9 mer, 11 mer, 13 mer) を **ON 31-42** の外部標準として用いた。**ON 43-46** の外部標準はオリゴチミジル酸 (13 mer, 17 mer, 21 mer, 23 mer) を用いた。合成したオリゴヌクレオチドの定量は吸光度測定器を用いて 260 nm の紫外部吸収を測定することで行った。

#### 第 2 章 第 3 節の実験

##### 融解温度 ( $T_m$ ) 測定

各オリゴヌクレオチド (終濃度 4  $\mu$ M) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM)、リン酸緩衝液 (10 mM,

pH 7.2) のサンプル溶液 (130  $\mu$ L) を沸騰水中に浴し、室温までゆっくり冷却した後、窒素気流下、測定溶液を 5 $^{\circ}$ C まで冷却し測定を開始した。0.5 $^{\circ}$ C/分 の速度で 90 $^{\circ}$ C まで昇温し、0.5 $^{\circ}$ C 間隔で 260 nm における吸光度をプロットした。 $T_m$  値は中線法により算出し、独立した 3 回の測定における平均値とした。

### チミジンダイマー (57, 58) の合成

51 (1 mg, 1.12  $\mu$ mol), 55 (1 mg, 1.08  $\mu$ mol) をそれぞれ 28 wt.% アンモニア水溶液に溶解し、室温で 2 時間振盪させた。アンモニアを減圧留去した後、メタノール (10 mL) と TEAA バッファー (0.1 M, pH 7.0, 5 mL) で流した Waters Sep-Pak<sup>®</sup> Plus C<sub>18</sub> Environmental Cartridges の逆相カラムにチャージし、0.5% トリフルオロ酢酸水溶液を流した。逆相カラムを TEAA バッファー (0.1 M, pH 7.0, 10 mL) で再度流した後、35% メタノール水溶液で 57, 58 の粗成績体を溶出させた。溶媒を減圧留去し、逆相 HPLC で精製及び純度確認を行った。57, 58 の組成については LC/MS を用いて確認した。また、57, 58 の定量は、吸光度測定器を用いて 260 nm の紫外部吸収を測定することで行った。その結果、57 の収率は 48%、58 の収率は 31% となった。以下に HPLC 条件を示す。

移動相	A 液: 0.1M トリエチルアミン/酢酸 (TEAA) バッファー (pH 7.0) B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1
グラジエント	分析: アセトニトリル濃度 3-9% (15 分) 分取: アセトニトリル濃度 3-9% (15 分) (56) 分取: アセトニトリル濃度 3-9% (30 分) (57)
カラム	分析: Waters XBridge <sup>™</sup> Oligonucleotide BEH C <sub>18</sub> 2.5 $\mu$ m (4.6 $\times$ 50 mm) 分取: Waters XBridge <sup>™</sup> OST C <sub>18</sub> 2.5 $\mu$ m (10 $\times$ 50 mm)
流速	分析: 1.0 mL/分 分取: 4.5 mL/分
カラム温度	50 $^{\circ}$ C
検出	UV (260 nm)

56: HRMS (ESI) Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>P [M-H]<sup>-</sup>: 539.1185, Found 539.1630.

57: HRMS (ESI) Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>P [M-H]<sup>-</sup>: 567.1134, Found 567.0810.

### CD スペクトル測定

各チミジンダイマー (終濃度 100  $\mu$ M) と塩化ナトリウム (終濃度 100 mM)、リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.2) のサンプル溶液 (360  $\mu$ L) をセル長 0.1 cm の蓋付き円筒型石英セルに入れ、窒素気流下、5 $^{\circ}$ C で 8 回積算した。測定波長幅は 0.2 nm、レスポンスは 4 秒、走査速度は 50 nm/min に設定した。CD 値から分子楕円率 $[\theta]$ への変換は測定装置に付属する標準解析ソフトウェアを用いた。

### 熱力学的パラメーターの算出

塩化ナトリウム (終濃度 100 mM)、リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.2) に対して、各オリゴヌクレオチドを終濃度 0.89, 1.47, 2.43, 4.00  $\mu$ M としたサンプル溶液を 130  $\mu$ L、6.60, 10.9  $\mu$ M としたサンプル溶液を 50  $\mu$ L 調整した。各サンプル溶液の  $T_m$  値を上記の手順で算出した。各濃度における  $T_m$  値 (表

13) から van't Hoff プロット (図 18) をとり、以下に示す計算式から  $\Delta G$ 、 $\Delta H$ 、 $\Delta S$  の値を算出した。

$$1/T_m = R/\Delta H \times \ln C_t + (\Delta S - R \times \ln 4) \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

R は気体定数、Ct は総オリゴヌクレオチド濃度

表 13. ON 32 の各濃度における ssRNA 及び ssDNA との二重鎖の  $T_m$  値

duplexes	Oligonucleotide concentration ( $\mu\text{M}$ )					
	0.89	1.47	2.43	4.00	6.60	10.9
ON 32/ssRNA	41.2	42.6	43.8	44.2	45.5	46.8
ON 32/ssDNA	44.2	45.7	46.6	47.2	48.7	49.8

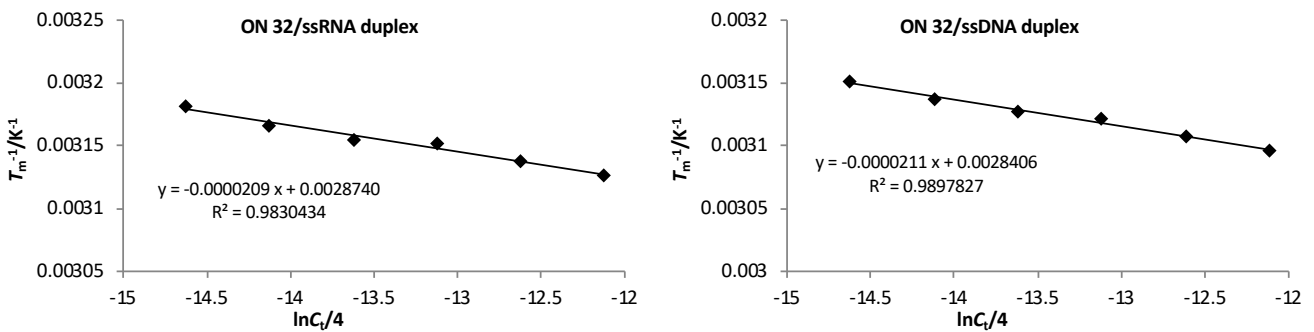


図 19. van't Hoff プロット

### ヌクレアーゼ分解耐性評価

各オリゴヌクレオチド (終濃度 4  $\mu\text{M}$ ) と塩化マグネシウム (終濃度 10 mM)、トリス-塩酸緩衝液 (50 mM, pH 8.0)、3'-エキソヌクレアーゼ (CAVP; 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) のサンプル溶液 (130  $\mu\text{L}$ ) を調整し、37  $^{\circ}\text{C}$  で静置した。反応開始から 2.5、5、10、20、40、80 分後に反応液から 20  $\mu\text{L}$  ずつ取り、90  $^{\circ}\text{C}$  下で 2.5 分間静置させることでヌクレアーゼを失活させ、原料オリゴヌクレオチドの残量を逆相 HPLC により定量した。以下に HPLC 測定条件を示す。尚、PS 修飾を有する ON 53 は約 1 : 1 のジアステレオマー混合物として用いた。

- 移動相 A 液: 0.1M TEAA バッファー (pH 7.0)  
B 液: 0.1M TEAA バッファー : アセトニトリル = 1 : 1
- グラジエント アセトニトリル濃度 6–12% (20 分)
- カラム 分析: Waters XBridge™ OST C<sub>18</sub> 2.5  $\mu\text{m}$  (4.6  $\times$  50 mm)
- 流速 分析: 1.0 mL/分
- カラム温度 50  $^{\circ}\text{C}$
- 検出 UV (260 nm)

### RNase H 活性評価

各オリゴヌクレオチド (30  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{L}$ )、フルオレセイン標識 RNA (300  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$ )、塩化マグネシウム (100 mM, 0.3  $\mu\text{L}$ )、塩化カリウム (300 mM, 2.5  $\mu\text{L}$ )、ジチオトレイトール (100 mM, 1  $\mu\text{L}$ )、トリス-塩

酸緩衝液 (500 mM, pH 8.0, 1  $\mu$ L)、ジエチルピロカーボネート処理水 (0.2  $\mu$ L) を混合したサンプル溶液 (8  $\mu$ L) を 70  $^{\circ}$ C の水浴中で静置し、室温までゆっくり冷却した。各サンプル溶液に RNase H (TAKARA BIO; 0.5 unit/ $\mu$ L, 2  $\mu$ L) を加え、37  $^{\circ}$ C 下で 40 分間反応させた後、ホルムアミド (28  $\mu$ L) とエチレンジアミン四酢酸 (100 mM, 2  $\mu$ L) の混合溶液を加えて RNase H を失活させた。それぞれのサンプル溶液から 1  $\mu$ L 取り、尿素 (4.9 M, 5  $\mu$ L) 及びローディングバッファー 6 倍濃縮 (1  $\mu$ L) と混合し、泳動用サンプル溶液を調整した。電気泳動のゲルには 20% ポリアクリルアミドゲル、泳動バッファーにはトリス-ほう酸-エチレンジアミン四酢酸緩衝原液 10 倍濃縮 (pH 8.3) を 10 倍希釈して使用し、変性剤として尿素 (7.0 M) を混合した。調整した泳動用サンプル溶液 (6  $\mu$ L) を各 well にアプライした後、泳動条件を 150 V に設定し、180 分間泳動を行った。フルオレセイン標識 RNA と切断後の断片の蛍光について、Cy3 モードで 30 秒間露光することで検出した。

## 参考文献

- 1) (a) 横田隆徳, 内藤瑞, 小比賀聡, 鳥居慎一, 関島良樹, 君嶋貴正, 國枝泰希, 西山伸宏, 和田郁人, 永田哲也, 小泉誠, 吉田徳幸, 牛田享宏, 小倉正恒, 中内雅也, 田中智洋 *最新医学* **2018**, *73*, 732–864. (b) 小比賀聡 *現代化学* **2018**, *572*, 50–55. (c) Khvorova, A.; Watts, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 238–248.
- 2) (a) Swayze, E. E.; Bhat, B. The Medicinal Chemistry of Oligonucleotides. In *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*, 2nd ed.; Crooke, S. T., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2008; pp 143–182. (b) Prakash, T. P. *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1616–1640. (c) Yamamoto, T.; Narukawa, K.; Nakatani, M.; Obika, S. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 339–365. (d) Deleavey, G. F.; Damha, M. J. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 937–954. (e) Bennett, C. F.; Swayze, E. E. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 259–293. (f) Wan, W. B.; Seth, P. P. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645–9667.
- 3) (a) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, K.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735–8738. (b) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401–5404.
- 4) (a) Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **1998**, 455–456. (b) Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- 5) Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205–8212.
- 6) Swayze, E. E.; Siwkowski, A. M.; Wancewicz, E. V.; Migawa, M. T.; Wyrzykiewicz, T. K.; Hung, G.; Monia, B. P.; Bennett, C. F. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 687–700.
- 7) (a) Stein, C. A.; Subasinghe, C.; Shinozuka, K.; Cohen, J. S. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3209–3221. (b) Srinivasan, S. K.; Tewary, H. K.; Iversen, P. L. *Antisense Res. Dev.* **1995**, *5*, 131–139. (c) Geary, R. S.; Yu, R. Z.; Watanabe, T.; Henry, S. P.; Hardee, G. E.; Chappell, A.; Matson, J.; Sasmor, H.; Cummins, L.; Levin, A. A. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 1419–1428. (d) Iwamoto, N.; Butler, D. C. D.; Svrzikapa, N.; Mohapatra, S.; Zlatev, I.; Sah, D. W. Y.; Meena, Standley, S. M.; Lu, G.; Apponi, L. H.; Frank-Kamenetsky, M.; Zhang, J. J.; Vargeese, C.; Verdine, G. L. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 845–851.
- 8) Kakiuchi-Kiyota, S.; Whiteley, L. O.; Ryan, A. M.; Mathialagan, N. *Nucleic Acid Ther.* **2016**, *26*, 93–101.
- 9) Eckstein, F. *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24*, 374–387.
- 10) For selected reviews on bridged nucleic acids, see: (a) Kaur, H.; Babu, B. R.; Maiti, S. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4672–4697. (b) Obika, S.; Rahman, S. M. A.; Fujisaka, A.; Kawada, Y.; Baba, T.; Imanishi, T. *Heterocycles* **2010**, *81*, 1347–1382. (c) Zhou, C.; Chattopadhyaya, J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3808–3832.
- 11) (a) Osawa, T.; Obika, S.; Hari, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9481–9484. (b) Mitsuoka, Y.; Aoyama, H.; Kugimiya, A.; Fujimura, Y.; Yamamoto, T.; Waki, R.; Wada, F.; Tahara, S.; Sawamura, M.; Noda, M.; Hari, Y.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6531–6538. (c) Mitsuoka, Y.; Yamamoto, T.; Kugimiya, A.;

- Waki, R.; Wada, F.; Tahara, S.; Sawamura, M.; Noda, M.; Fujimura, Y.; Kato, Y.; Hari, Y.; Obika, S. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 12–24. (d) Osawa, T.; Sawamura, M.; Wada, F.; Yamamoto, T.; Obika, S.; Hari, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3955–3963. (e) Horie, N.; Kumagai, S.; Kotobuki, Y.; Yamaguchi, T.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 6531–6536.
- 12) Morita, K.; Hasegawa, C.; Kaneko, M.; Tsutsumi, S.; Sone, J.; Ishikawa, T.; Imanishi, T.; Koizumi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 73–76.
- 13) Morita, K.; Takagi, M.; Hasegawa, C.; Kaneko, M.; Tsutsumi, S.; Sone, J.; Ishikawa, T.; Imanishi, T.; Koizumi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2211–2226.
- 14) (a) Seth, P. P.; Siwkowski, A.; Allerson, C. R.; Vasquez, G.; Lee, S.; Prakash, T. P.; Wancewicz, E. V.; Witchell, D.; Swayze, E. E. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 10–13. (b) Seth, P. P.; Vasquez, G.; Allerson, C. R.; Berdeja, A.; Gaus, H.; Kinberger, G. A.; Prakash, T. P.; Migawa, M. T.; Bhat, B.; Swayze, E. E. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1569–1581. (c) Pallan, P. S.; Allerson, C. R.; Berdeja, A.; Seth, P. P.; Swayze, E. E.; Prakash, T. P.; Egli, M. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8195–8197.
- 15) Wessjohann, L. A.; Brandt, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1625–1647.
- 16) Arnott, S.; Hukins, D. W. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *47*, 1504–1510.
- 17) Waga, T.; Nishizaki, T.; Miyakawa, I.; Ohru, H.; Meguro, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57*, 1433–1438.
- 18) Ohru, H.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Sakata, S.; Kodama, E.; Yoshimura, K.; Matsuoka, M.; Shigeta, S.; Mitsuya, H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4516–4525.
- 19) Kulinkovich, O. G.; Sviridov, S. V.; Vasilevski, D. A. *Synthesis* **1991**, 234.
- 20) Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Org. React.* **2000**, *55*, 1–630.
- 21) Gröger, C.; Musso, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15*, 373–374.
- 22) Obika, S.; Uneda, T.; Sugimoto, T.; Nanbu, D.; Minami, T.; Doi, T.; Imanishi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1001–1011. (b) Koshkin, A. A. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5962–5972.
- 23) (a) Kim, B. T.; Kim, S. K.; Lee, S. J.; Hwang, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 243–248. (b) Fonvielle, M.; Chemama, M.; Lecerf, M.; Villet, R.; Busca, P.; Bouhss, A.; Quelquejeu, M. E.; Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5115–5119.
- 24) Mitsuoka, Y.; Kodama, T.; Ohnishi, R.; Hari, Y.; Imanishi, T.; Obika, S. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1225–1238.
- 25) Mitsuoka, Y.; Fujimura, Y.; Waki, R.; Kugimiya, A.; Yamamoto, T.; Hari, Y.; Obika, S. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5640–5643.
- 26) (a) Ghosh, M. K.; Ghosh, K.; Dahl, O.; Cohen, J. S. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5761–5766. (b) Islam, M. A.; Waki, R.; Fujisaka, A.; Ito, K. R.; Obika, S. *Drug Discov. Ther.* **2016**, *10*, 263–270. (c) Bentley, J.; Brazier, J. A.; Fisher, J.; Cosstick, R. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3698–3702.



- 27) (a) Peyrottes, S.; Vasseur, J.-J.; Imbach, J.-L.; Rayner, B. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1841–1848. (b) Laurent, A.; Naval, M.; Debart, F.; Vasseur, J.-J.; Rayner, B. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4151–4159. (c) Gryaznov, S.; Chen, J.-K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3143–3144. (d) Heidenreich, O.; Gryaznov, S.; Nerenberg, M. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 776–780. (e) Faria, M.; Spiller, D. G.; Dubertret, C.; Nelson, J. S.; White, M. R. H.; Scherman, D.; Helene, C.; Giovannangeli, C. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 40–44. (f) Bannwarth, W. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1517–1527. (g) Gryaznov, S. M.; Letsinger, R. L.; *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3403–3409.
- 28) (a) Reynolds, M. A.; Hogrefe, R. I.; Jaeger, J. A.; Schwartz, D. A.; Riley, T. A.; Marvin, W. B.; Daily, W. J.; Vaghefi, M. M.; Beck, T. A.; Knowles, S. K.; Klem, R. E.; Arnold, L. J., Jr. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4584–4591. (b) An, H.; Wang, T.; Maier, M. A.; Manoharan, M.; Ross, B. S.; Cook, P. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2789–2801. (c) Bohringert, M. P.; Graff, D.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2723–2726. (d) Hutter, D.; Blaettler, M. O.; Benner, S. A. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 2777–2806.
- 29) Salinas, J. C.; Yu, J.; Østergaard, M.; Seth, P. P.; Hanessian, S. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5296–5299.
- 30) Zhao, Z.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6239–6242.
- 31) Schneider, B.; Neidle, S.; Berman, H. M. *Biopoly.* **1997**, *42*, 113–124.
- 32) Boczkowska, M.; Guga, P.; Stec, W. J. *Biochemistry* **2002**, *41*, 12483–12487.
- 33) Schneider, B.; Patel, K.; Berman, H. M. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 2422–2434.
- 34) (a) Seth, P. P.; Allerson, C. R.; Siwkowski, A.; Vasquez, G.; Berdeja, A.; Migawa, M. T.; Gaus, H.; Prakash, T. P.; Bhat, B.; Swayze, E. E. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8309–8318. (b) Sharma, V. K.; Singh, S. K.; Krishnamurthy, P. M.; Alterman, J. F.; Haraszti, R. A.; Khvorova, A.; Prasad, A. K.; Watts, J. K. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8906–8909. (c) Kumar, P.; El-Sagheer, A. H.; Truong, L.; Brown, T. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 8910–8913. (d) Hara, T.; Kodama, T.; Takegaki, T.; Morihiro, K.; Ito, K. R.; Obika, S. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 25–36.
- 35) Meurillon, M.; Gallier, F.; Peyrottes, S.; Périgaud, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6039–6046.
- 36) Lera, M.; Hayes, C. J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3873–3875.
- 37) Abbas, S.; Bertram, R. D.; Hayes, C. J. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3365–3367.
- 38) Chandra, T.; Broderick, W. E.; Broderick, J. B. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2010**, *29*, 132–143.
- 39) (a) Kondo, N. S.; Holmes, H. M.; Stempel, L. M.; Ts'o, P. O. P. *Biochemistry* **1970**, *9*, 3479–3498. (b) Zhou, C.; Plashkevych, O.; Chattopadhyaya, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3248–3265.
- 40) McTigue, P. M.; Peterson, R. J.; Kahn, J. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5388–5405.
- 41) Morihiro, K.; Kodama, T.; Kentefu, Moai, T.; Veedu, R. V.; Obika, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5074–5078.
- 42) Brautigam, C. A.; Steitz, T. A. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 363–377.
- 43) Nowotny, M.; Gaidamakov, S. A.; Ghirlando, R.; Cerritelli, S. M.; Crouch, R. J.; Yang, W. *Mol. Cell* **2007**, *28*, 264–276.