

Title	架橋型人工核酸を含むmicroRNA阻害オリゴヌクレオチドの合成と活性評価
Author(s)	荒木, 友
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/92116">https://doi.org/10.18910/92116</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 学位論文

架橋型人工核酸を含む  
microRNA 阻害オリゴヌクレオチドの合成と活性評価

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

荒木 友

## 略語一覽

略語	正式名称
miRNA	microRNA
pri-mRNA	primary miRNA
pre-mRNA	precursor miRNA
Ago2	argonaute protein 2
RISC	miRNA-induced silencing complex
mRNA	messenger RNA
3'UTR	3'-untranslated-region
AMO	anti-miRNA oligonucleotide
MOE	methoxy ethyl
BNA	bridged nucleic acid
LNA	locked nucleic acid
S-cEt	S-constrained 2'-O-ethyl
PS	phosphorothioate
GuNA	guanidine-bridged nucleic acid
ALNA	2'-amino-LNA
miRNA-21	microRNA-21
PEM	post elongation modification
Ac	acetyl
Bz	benzoyl
iPr	isopropyl
Ph	phenyl
DNA	deoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
MS	mass spectrometry
rt	room temperature
TBAF	tetrabutyl ammonium fluoride
TMS	trimethylsilyl
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMAP	<i>N,N</i> -dimethylaminopyridine
BSA	<i>N,O</i> -bis (trimethylsilyl) acetamide

# 目次

序論	3
第一章 グアニジン架橋型核酸 GuNA を導入したオリゴヌクレオチドの研究	10
第一節 miRNA 阻害活性評価系の設計	10
第二節 miRNA 阻害活性における修飾部位の検討	11
第三節 miRNA 阻害活性における Seed 領域修飾部位の網羅的評価	16
第四節 Ago2-miRNA-mRNA の複合体 X 線結晶構造からの考察	19
第五節 miRNA 阻害活性における非 Seed 領域修飾部位の評価	22
小括	26
第二章 2'-N-アシル amino-LNA を導入したオリゴヌクレオチドの研究	27
第一節 Post elongation modification を利用した 2'-N-アシル化体の合成	30
第二節 2'-N-アシル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの物性評価	35
第三節 2'-N-アシル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの miRNA 阻害活性評価	37
小括	40
第三章 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA を導入したオリゴヌクレオチドの研究	41
第一節 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの合成	42
第二節 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの物性評価	44
第三節 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの miRNA 阻害活性評価	45
小括	47
結論	48
謝辞	49
実験の部	50
参考文献	70

## 序論

MicroRNA (miRNA) は配列特異的に転写後遺伝子サイレンシングを誘導する低分子非コード RNA である。<sup>1-6)</sup> これらの調節 RNA は、長い一次転写産物 (pri-miRNA) に転写され、RNase III 酵素の Drosha によって処理されて、ステムループ中間体 (pre-miRNA) になる (Figure 1)。<sup>3, 7, 8)</sup> これらはその後細胞質に輸送され、さらに二本鎖 RNA エンドリボヌクレアーゼである Dicer により処理されて短い二本鎖の成熟 miRNA (長さ 21-24 ヌクレオチド) となる。<sup>3, 9, 10)</sup> miRNA 二本鎖は Argonaute タンパク質 (以下 Ago と記す, PIWI, MID, L2, PAZ, L1, N の 6 つのドメインから構成される) と会合して miRNA 誘導サイレンシング複合体 (miRISC) を形成する。<sup>3, 11-15)</sup> miRNA 二本鎖から一本の RNA 鎖が選択され、miRISC に保持された 1 本鎖 RNA が標的 mRNA を特異的に認識し、遺伝子発現を調節する。

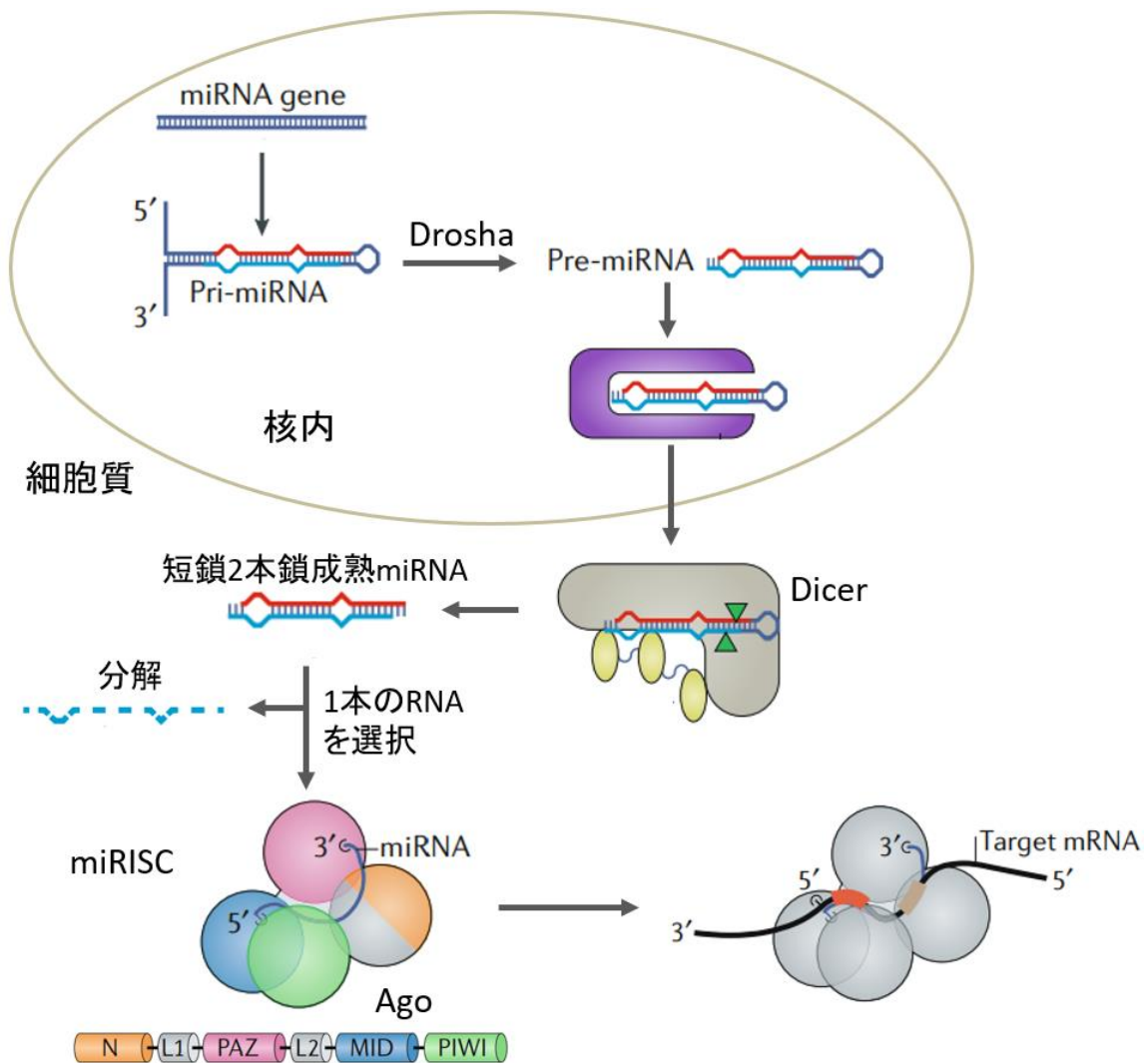


Figure 1. Overview of miRNA biogenesis and its regulation <sup>3)</sup>

MiRNAにおいて、5'側から数えて2番目~8番目の塩基配列（一般的にSeed領域と呼ばれる）が最も重要であり、標的 mRNA の認識は主にSeed領域によって行われる（Figure 2）。Seed領域の塩基配列が完全一致していればそれらのmiRNAはmiRNAファミリーとして位置づけられ同一のmRNA群を制御することが分かっている。一つのmiRNAはその標的配列を有する複数のmRNAを制御することが知られている。通常、標的遺伝子の3'非翻訳領域（3'UTR）に各miRNAのSeed領域と相補的な配列が存在し、Seed領域を介して標的mRNAに不完全に結合し、翻訳開始段階の障害、伸長の障害、脱アデニル化の誘発、標的mRNAの分解、新生ポリペプチドの蛋白質分解等により翻訳を障害する。<sup>3,6)</sup> 近年、発生、細胞周期調節、細胞分化、増殖、ニューロン非対称性、代謝経路、及び免疫応答などの細胞プロセスの調節におけるヒトmiRNAの広範な重要性が報告されている。<sup>16-25)</sup>

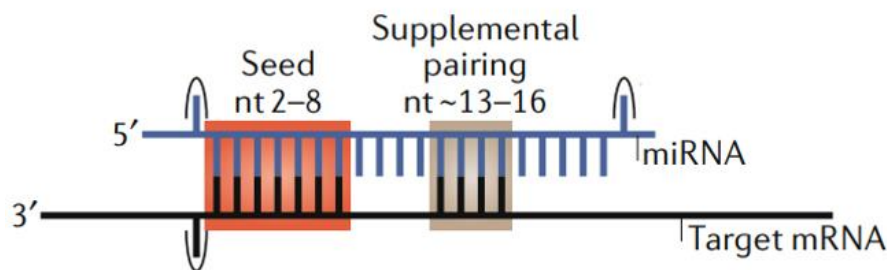
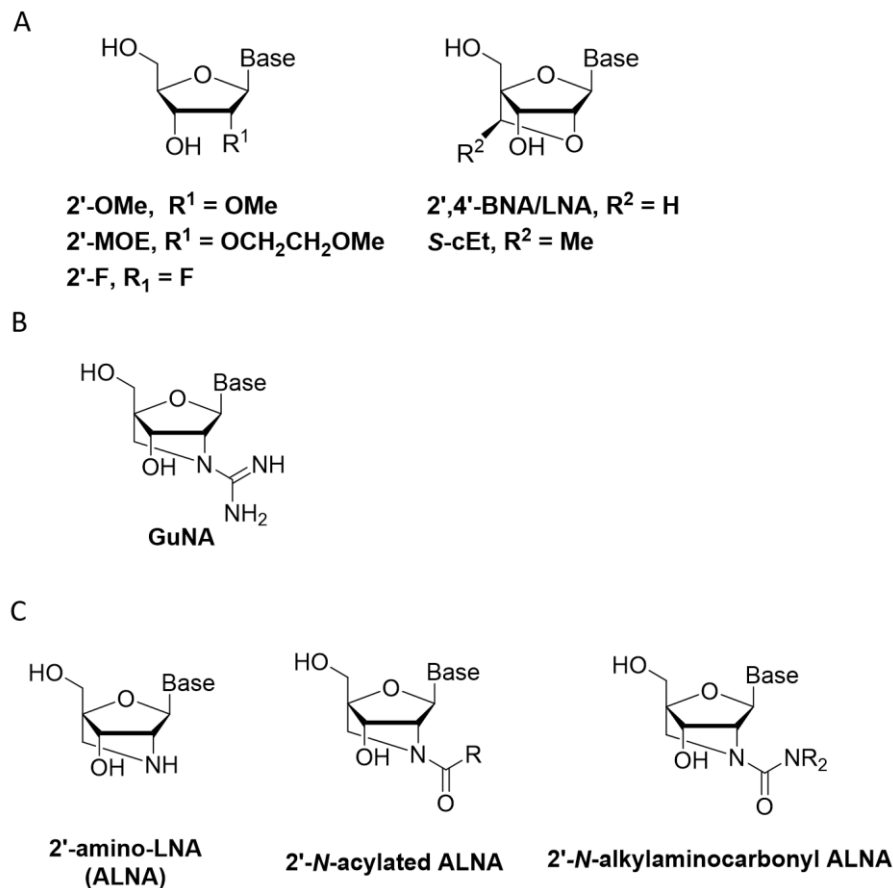


Figure 2. Target mRNA recognition on seed region <sup>3)</sup>

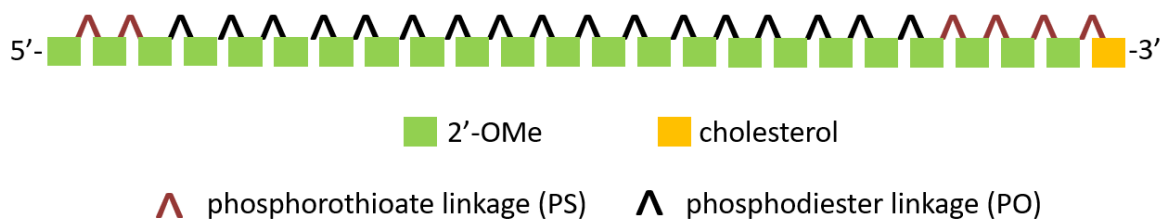
Anti-miRNA オリゴヌクレオチド (AMO) は miRNA の機能を障害するオリゴヌクレオチドであり、miRNA の障害を介して病態に関わる複数の因子を同時に制御できることから、核酸医薬における新規治療分子として注目を集めている。<sup>26-30)</sup> さらに近年では複数の AMO において臨床開発が行われている。<sup>31-32)</sup> miRNA-92 の機能を障害する AMO は、創傷 (MRG-110) を適応症として、第 I 相試験が実施されている。一部の血液がん患者を対象に、miRNA-155 を標的とする AMO の第 I 相試験が実施されている (MRG-106)。<sup>33)</sup> Regulus Therapeutics の薬剤候補化合物 RG-012 は miRNA-21 機能を抑制することでアルポート症候群患者の病態改善を目指しており、現在第 II 相臨床試験を実施中である。<sup>34-36)</sup>

これまでにいくつかの人工核酸による AMO の化学修飾が報告されている。<sup>28)</sup> 2004 年、Meister らと Hutvagner らはそれぞれ、標的 miRNA と完全に逆相補的な 2'-O-メチルオリゴヌクレオチド (2'-OMe) が AMO として機能したことを報告した<sup>37, 38)</sup> (Figure 3A, 2'-OMe)。Krützfeldt らは、miRNA に対して相補的な 2'-OMe 修飾コレステロールコンジュゲート一本鎖 RNA アナログを設計し、これらのオリゴヌクレオチドを「antagomir」と命名した (Figure 4)。<sup>39, 40)</sup> それらはエキソヌクレアーゼによる分解を抑制するために分子の両末端に複数のホスホロチオアート (PS) 結合を有した。Esau らは、2'-メトキシエチル (MOE) と PS で修飾されたオリゴ

ヌクレオチド (Figure 3A, 2'-MOE) について、その AMO 活性を報告した。<sup>41)</sup> 一般的に 2'-MOE 修飾はヌクレアーゼ耐性及び標的 RNA への結合親和性を改善させることが知られている。<sup>42)</sup> Esau らの報告において 2'-MOE 修飾体は 2'-OMe 修飾体よりも高い薬効を示した。また一般的に、2',4'-Bridged Nucleic Acid/Locked Nucleic Acid (Figure 3A, 2',4'-BNA/LNA、以下 LNA と記す) の導入は相補的標的への結合を安定化し、miRNA 阻害活性を増強することが報告されている。<sup>43-44)</sup> Davis らは、DNA、2'-OMe、2'-MOE、LNA に加え、2'-F を用いた AMO を作製した (Figure 3A, 2'-F)。<sup>45, 46)</sup> Lennox 及び Behlke らは miRNA-21 レポーターシステムを用いて異なる AMO を比較評価し、2'-OMe/LNA の組み合わせ (2 つの 2'-OMe と 1 つの LNA の繰り返し) によって修飾された AMO が高い miRNA-21 阻害活性を示すことを報告した。<sup>47)</sup> Elmen らは、DNA/LNA 修飾の 16-mer AMO が *in vivo* でマウスにおいて miRNA-122 を阻害することを報告した。これも反復する 2 つの DNA と 1 つの LNA モチーフから成っていた。<sup>48, 49)</sup> これらの研究の多くは、(1) AMO の全体に同じ化学修飾を施す、(2) 2 つ飛ばしなどの特定のパターンの修飾を施す、(3) 3'側/5'側にまとめて同じ化学修飾を施すといった修飾形式が主であった。一方で、近年では Santaris Pharma が非臨床試験の一環として、7 個の DNA と 8 個の LNA から構成される 15-mer の miRNA-122 AMO において LNA の修飾位置を最適化し、複数の miRNA (miRNA-122、miRNA-19b、miRNA-155) に共通した LNA の好ましい修飾部位があることを見出した。<sup>50)</sup> これらの AMO は、同じく miRNA-122 を標的としていた 2'-OMe-PS-コレステロールキメラ (「antagomir」) よりも有意に高い活性を示した。さらに、Regulus Therapeutics は、アルポート症候群を適応症とした臨床試験で、miRNA-21 に対する S-cEt 修飾 AMO (Figure 3A, S-cEt) を使用しており、その S-cEt に最適化された修飾位置は上記の (1) - (3) の修飾パターンには該当しないものであった。<sup>35)</sup> このような化学修飾の種類や、その修飾位置と AMO 活性との関係を研究することは、AMO の作用機序の理解を深め、より効果の高い AMO の創製に繋がると考えられる。



**Figure 3.** (A) Representative structures of nucleic acid derivatives used in anti-miRNA oligonucleotides. (B) Structure of GuNA. (C) Structure of ALNA, 2'-N-acylated ALNA, and 2'-N-alkylaminocarbonyl ALNA.



**Figure 4.** Representative structures of antagomir.

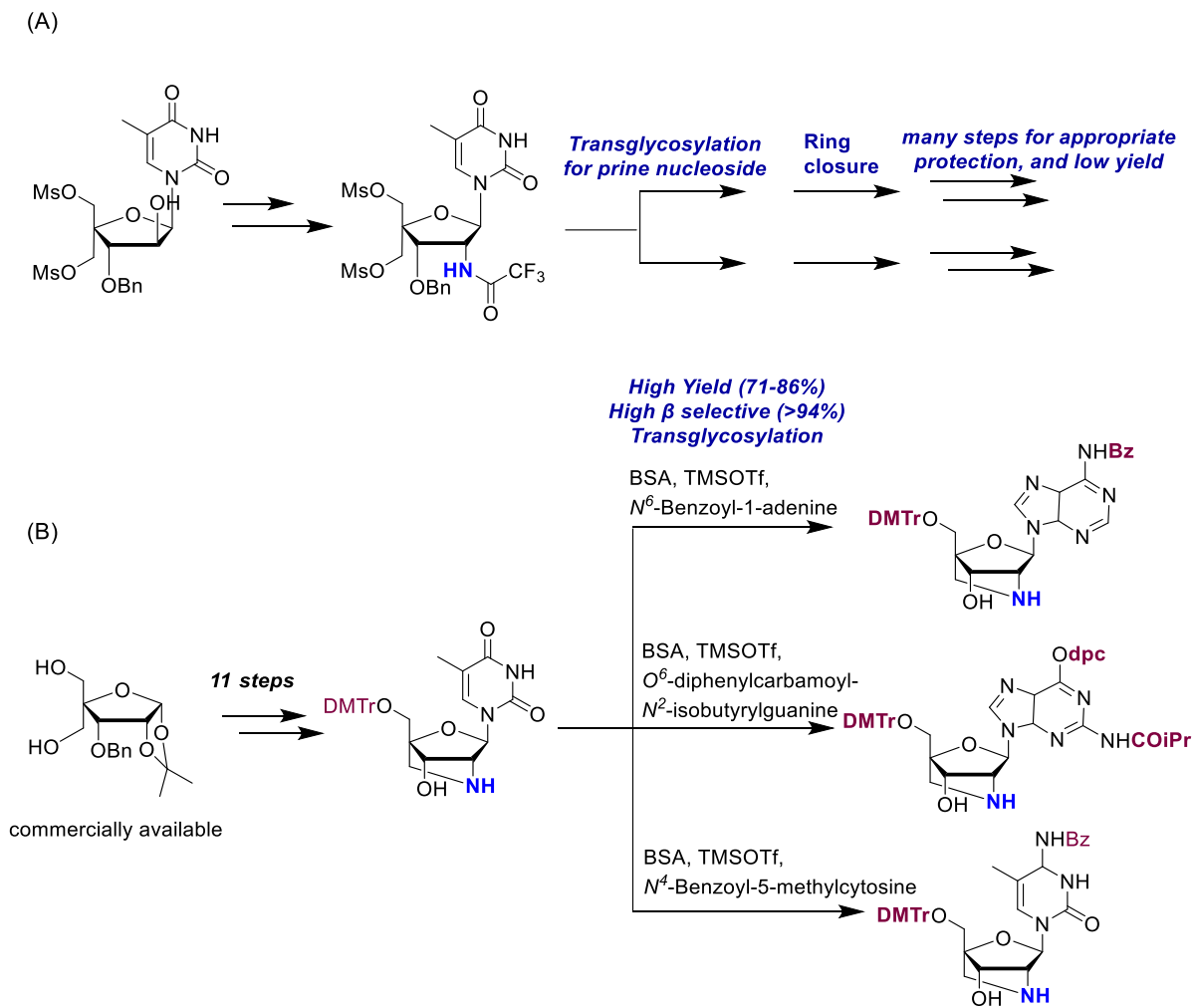
核酸創薬における化学修飾人工核酸の活用は、より実用的で一般的な治療戦略になっている。<sup>51-56)</sup> 特に LNA に代表される 2'位と 4'位との架橋構造と PS 修飾<sup>57)</sup> の組み合わせは、相補的 RNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの親和性を増加させ、ヌクレアーゼ分解に対する耐性を増強させる重要な戦略の一つである。<sup>58-63)</sup> 架橋型核酸の一つである、グアニジン架橋核酸 (GuNA) は、DNA/RNA への高い結合親和性、ヌクレアーゼ耐性の大幅な改善、高い塩基識別能力、及びカチオン性を有することが報告されている (Figure 3B)。<sup>64)</sup> 特にそのカ



チオン性はこれまでに汎用されている修飾核酸とは異なる特徴であり、治療用核酸として応用可能か、注目が集まっている。その他にも、Wengel らにより開発された LNA アナログである 2'-amino-LNA (Figure 3C, ALNA) は強い二本鎖安定化能を示し、3'-エキソヌクレアーゼ活性に耐性を有するだけでなく、2'-アミノ基は核酸合成時の様々な化学反応による修飾の足場として適している。<sup>65-84</sup> 以前の研究では、2'-*N*-アルキル<sup>65,67</sup>、2'-*N*-アシル<sup>66-82</sup>、2'-*N*-アルコキシカルボニル<sup>83</sup> 及び 2'-*N*-アルキルアミノカルボニル<sup>84</sup> などの 2'-*N*-置換 ALNA 誘導体を含有するオリゴヌクレオチドの開発が報告されている。2'-アミノ基上の化学修飾の応用例として、生体試料の分析に利用するために、蛍光色素、スピンドラベル及び放射性同位体などのセンサー分子を 2'-アミノ基に組み込むといった研究が報告されている。<sup>66-70, 74, 75</sup> また、2'-アミノ基に脂肪酸又は糖リガンドを組み込んだ ALNA を含有するオリゴヌクレオチドは、薬物動態学的な改善が期待されるなど、様々な分野での応用が期待される。<sup>72,73, 78-81</sup> しかしながら、上述した既知報告は、GuNA および ALNA 誘導体のチミジンアナログのみから構成されたオリゴヌクレオチドの合成研究および基礎的な物理化学的性質（二本鎖の融解温度等）のプロファイリングが主であり、各種塩基を含む配列で具体的に核酸医薬としての薬理活性を評価した例は限られていた。<sup>85-88</sup> その理由の一つとして、オリゴヌクレオチドの固相合成条件に適した保護基で保護され、アデニン、グアニン等のプリン塩基を有する ALNA 誘導体を合成することが困難であったことが挙げられる。これまでに報告されていた ALNA 誘導体の合成法は、望みの立体を選択的に得るためにリボース環に対する核酸塩基の導入を ALNA の架橋形成前に行っており、合成過程の早期に分岐した多工程で低収率な合成ルートであった (Figure 5)。しかしながら 2018 年、ALNA 中間体のチミジンアナログを合成したのちに、塩基部をプリン及びピリミジンの両方に変換可能なトランスグリコシレーション法が澤本らによって報告された。<sup>89</sup> 澤本らの合成法では得られる生成物の塩基部および 5'位水酸基が予め固相合成に適した保護基で保護されているため、2'位への置換基導入と、3'位のホスホロアミダイト化の 2 工程で各種誘導体のアミダイトが合成できるという利点があった。これにより 2020 年、熊谷らは上記反応を経由してアデニン、グアニン、メチルシトシンを有する GuNA の合成法を報告した。<sup>90</sup> 以上より、これまで核酸医薬の化学修飾として期待される一方で、チミン以外の塩基を有するアミダイト合成が困難であったため応用研究の乏しかった GuNA および ALNA 類縁体について、中間体の合成法が効率化されたことにより各種塩基を含むアミダイトおよびオリゴヌクレオチドを合成することができ、薬理活性評価など核酸医薬としての実用的な研究が可能となると考えられた。本研究では核酸医薬の中でも特に AMO に焦点を当て、ALNA 類縁体の種々の化学修飾のパターンと薬理活性の関連性について研究することとした。

本研究において、第一章では GuNA を含む様々な AMO を合成し、miRNA-21 のレポーターアッセイ系により評価し、GuNA を含有するオリゴヌクレオチドが miRNA-21 の阻害作用を示

すことを初めて明らかにした。さらに AMO をいくつかの領域ごとに分類し、GuNA の導入部位と miRNA 阻害活性との関係を詳細に評価した。また特定の修飾部位が薬効に寄与する理由について、本研究では 2014 年に Schirle らが報告した Ago2-miRNA-122-標的 mRNA の 3 者複合体の X 線結晶構造解析 (4W5O)<sup>91)</sup> を用いて、標的 mRNA を AMO と想定し、リボースの 2' 位の構造を GuNA に改変してモデリングをすることで周辺アミノ酸との相互作用に関する考察を行った。第二章では、第一章で得られた知見を基にアシル基で修飾された ALNA 誘導體 (Figure 3C, 2'-N-acylated ALNA) に注目し、その効率的なオリゴヌクレオチド合成法を開発した。まず初めに 2'-アミノ基をトリフルオロアセチル基で保護した ALNA のホスホロアミダイトを合成しオリゴヌクレオチドに導入した。次に、固相合成後の ALNA 含有オリゴヌクレオチドに対して液相条件で直接的に 2'-N-アシル化を行う伸長後修飾 (Post Elongation Modification, PEM) 法を確立した。PEM 法によって種々のアシル基を導入したオリゴヌクレオチドについては、標的結合親和性、塩基識別能及び 3'-ヌクレアーゼ分解耐性を、2'-N-メチル ALNA 及び ALNA と並べて比較評価した。加えて、アシル化された ALNA を含有する AMO を合成し、2'-位のアシル基の違いと miRNA 阻害活性の関係を評価した。第三章では、2'-N-アルキルアミノカルボニル ALNA (Figure 3C, 2'-N-alkylaminocarbonyl ALNA) に焦点を当て、AMO の化学修飾としての有用性を実証した。2'-N-アルキルアミノカルボニル ALNA のチミン及び 5-メチルシトシンのホスホロアミダイトを合成し、それらを含む種々のオリゴヌクレオチドを合成した。その基本的特性を明らかにするため、標的結合能及び 3'-酵素分解に対する耐性を上述した他の ALNA 誘導體と比較した。さらに、種々の 2'-N-アミノカルボニル ALNA を導入した AMO について 2'-N-アミノカルボニル構造の違いが与える活性差について検証し、2'-N-メチルアミノカルボニル修飾 AMO が高い miRNA 阻害活性を示すことを初めて明らかにした。



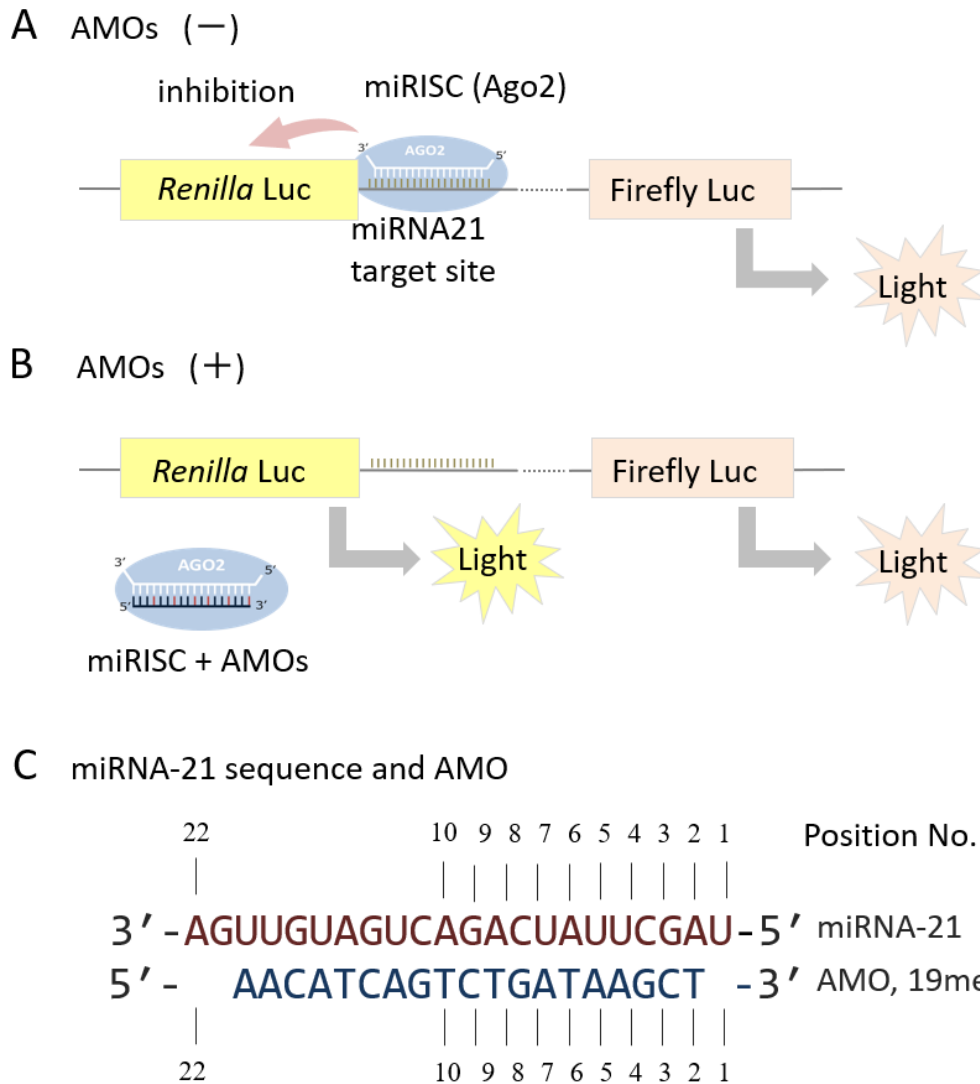
**Figure 5.** (A) Previous synthetic route of 2'-amino LNA derivatives. (B) Transglycosylation Reaction reported by sawamoto et al. BSA = *N,O*-bis (trimethylsilyl) acetamide, TMSOTf = Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate

# 本論

## 第一章 グアニジン架橋型核酸 GuNA を導入したオリゴヌクレオチドの研究

### 第一節 miRNA 阻害活性評価系の設計

今回我々は AMO 活性を評価するための標的 miRNA として、癌や線維症などの様々な疾患との関連が長い間研究されている miRNA-21 を選択した。<sup>91)</sup> 前述の通り、miRNA-21 の阻害剤はアルポート症候群を適応として Phase II 試験が行われている。<sup>34-36)</sup> GuNA を導入した AMO の miRNA 阻害活性を評価するために、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR に miRNA-21 に完全一致の結合配列を有するルシフェラーゼ発現プラスミド (MiCheck miRNA Biosensor Clone, Promega) を用いた。<sup>92)</sup> 内部標準として用いるホタルルシフェラーゼと miRNA 阻害活性を表すウミシイタケルシフェラーゼ活性を、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて測定した。AMO の非存在下では、内因性 miRNA はウミシイタケルシフェラーゼの翻訳を阻害する (Figure 6A)。AMO の存在下では、miRNA 機能の阻害によりウミシイタケルシフェラーゼの翻訳が回復する (Figure 6B)。HEK293 細胞に対して miRNA-21 レポータープラスミドを導入し、24 時間後に、トランスフェクション試薬 (Lipofectamine RNAiMAX) を用いて各 AMO を添加した。AMO を導入して 24 時間後に、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを用いてウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、結果を内部のホタルルシフェラーゼコントロールで標準化した。同様に、トランスフェクション試薬を用いない条件 (以下、gymnosis 条件と記す) で評価する場合は、AMO 添加の 96 時間後にデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。AMO による miRNA-21 機能の阻害率を計算するために、miRNA-21 の標的配列を有していない空のプラスミド (psiCHECK<sup>TM</sup>-2, Promega) を導入した細胞の相対ルシフェラーゼ活性を阻害率 100% と定義し、miRNA-21 の標的配列を有しているプラスミドを導入したのち、AMO を添加しない場合の相対ルシフェラーゼ活性を阻害率 0% と定義した。修飾部位の考察を分かりやすくするために miRNA-21 配列の 5'末端のヌクレオチド位置には 1 から 22 までの番号を付けた (Figure 6C)。AMO の塩基には、相補的な塩基に同じ番号が割り当てられるように、3'末端から順に 1 から 22 まで同様に番号を付けた。

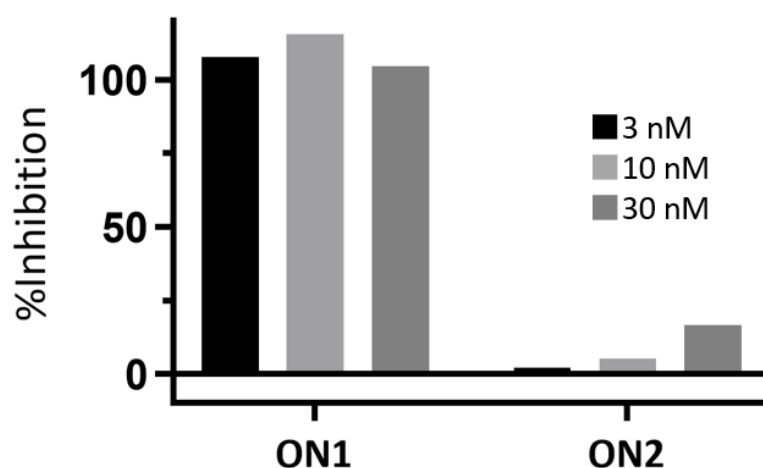


**Figure 6.** Overview of the dual luciferase assay system for the *in vitro* evaluation of activity and the numbering of nucleosides in the AMO sequence. (A) Expression of *Renilla* luciferase is suppressed by endogenous miRNA-21 in the absence of AMOs. (B) AMOs inhibit the function of miRNA-21 and restore the expression of *Renilla* luciferase. (C) The bases in the miRNA and AMO were numbered from 1 to 22, starting from the 3'-end and 5'-end, respectively.

## 第二節 miRNA 阻害活性における修飾部位の検証

まず第二節では、架橋型人工核酸の一種である GuNA が、同じ架橋型人工核酸でありこれまでにいくつかの AMO 修飾の研究がなされている LNA と同様の活性を示すのかを確認する目的で、miRNA - 21 に対して相補的な配列を有する二つの 19-mer AMO (ON1 及び ON2) を設計した。各 AMO は同じ修飾様式の 8 つの LNA 又は GuNA から構成され、この修飾位置は Lennox らにより報告された LNA 修飾 AMO を参考にした。LNA を含む ON1 は Gene Design 社で委託合成し、ON2 は以前我々のグループが報告した GuNA オリゴヌクレオチドの合成ブ

ロトコル<sup>90)</sup>に従って合成した。AMOの阻害活性を、デュアルルシフェラーゼアッセイを用いて評価した (Figure 7)。LNAを含むON1は、3 nMの濃度で内因性 miRNA-21の機能をほぼ完全に阻害することが分かった。一方、GuNAを含むON2は30 nMの濃度で弱い阻害活性を示した。 $T_m$ 値を測定し、両AMOの標的 miRNAへの結合親和性を評価した。その結果、ON1及びON2の $T_m$ 値に有意差は認められなかった (それぞれ76 °C及び72 °C)。化学構造の小さな差は標的 RNAへの結合に大きな影響を及ぼさなかったが、miRNA阻害活性に有意に影響したことは興味深かった。LNAにより最適化されたAMOと同じ置換パターンを用いたGuNA修飾は活性を示さず、好ましい置換パターンはLNAとGuNAの間で異なることを示した。これらの結果から、GuNAのグアニジノ基が、細胞内 miRNAの機能阻害の作用機序に影響していると仮説を立てた。一般に、グアニジノ基は塩基性が高く (pKa 約 12.5)、生理的条件下でプロトン化され、広いpH範囲でその電荷を維持する。グアニジノ基のカチオン性は、細胞膜透過性のような負に荷電したオリゴヌクレオチドの特性を変化させる可能性がある。<sup>93)</sup>したがって本研究の実験においては、細胞内での作用機序に起因する効果に焦点を当てて検証する目的で、それら細胞内移行性の影響を可能な限り排除するために、配列長および配列長に対するグアニジノ基の比率は同等となるように各比較対象の配列を設計した。さらに各AMOの評価は主にトランスフェクション条件にて行うこととした。これらの設計思想の元に、GuNA修飾部位の異なる複数パターンのAMOを合成し、構造活性相関をさらに調べることにした。本章におけるGuNAを含有するオリゴヌクレオチドの合成および、精製は熊谷らが報告した条件に従って実施した。<sup>90)</sup>本章で合成した全てのON配列を一覧にしてTable 1に記す。



Seq No.	Sequence (5' to 3')	Modification of <u>X</u>	$T_m$ (°C)
ON1	<u>A</u> ACAT <u>C</u> AGT <u>C</u> TGATAAG <u>C</u> T	LNA	76
ON2	<u>A</u> ACAT <u>C</u> AGT <u>C</u> TGATAAG <u>C</u> T	GuNA	72

**Figure 7.** Comparison of  $T_m$  values and *in vitro* activity (determined under transfection conditions) of AMOs modified with LNA (**ON1**) and GuNA (**ON2**). Capital letters; DNA, Underline; LNA or GuNA (C denote 5-methylcytosine). All phosphodiester linkages were replaced by PS linkages. All data are shown as the mean values ( $n = 2$ ). To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the empty reporter plasmid as 100% inhibition.

**Table 1.** Oligonucleotides synthesized in this chapter.

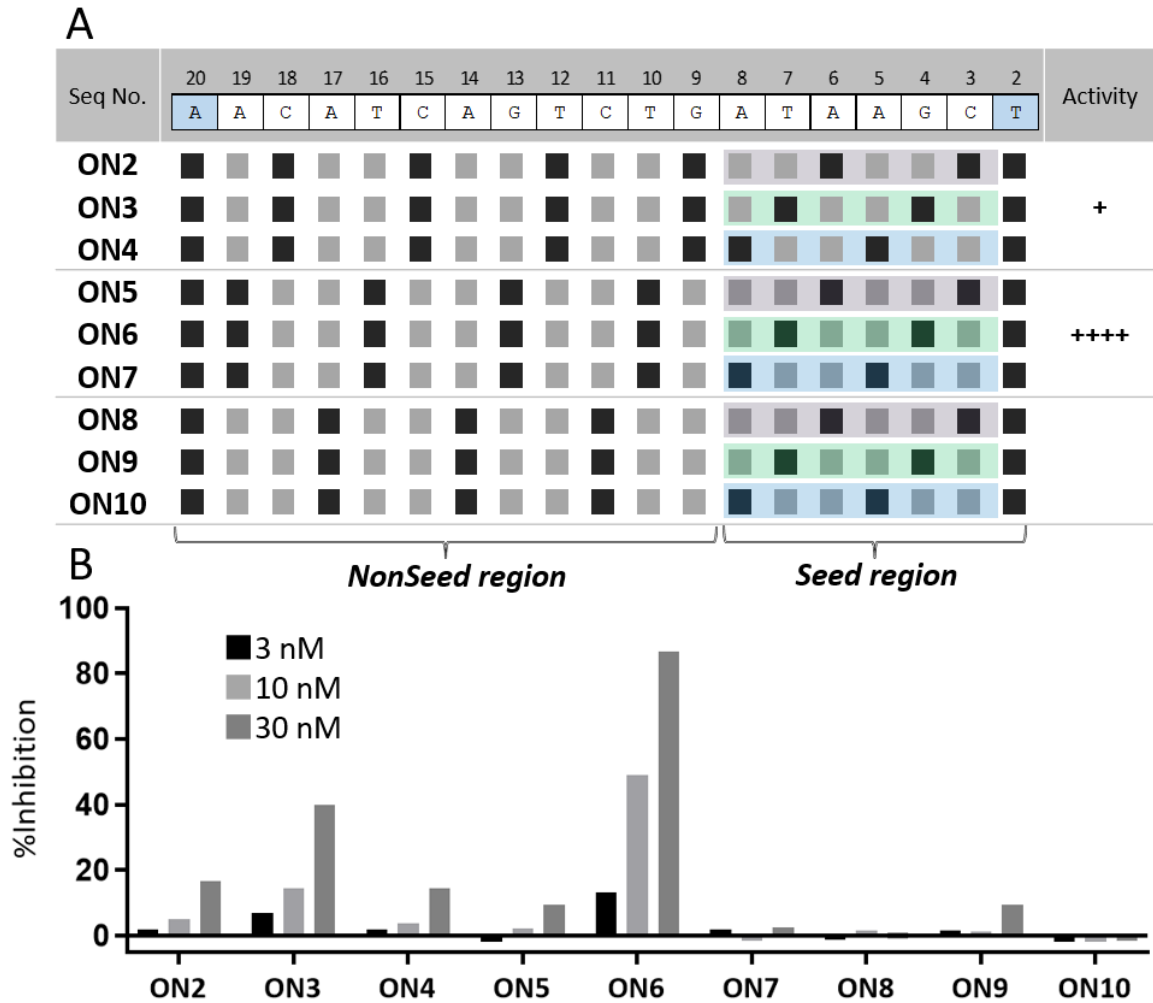
seq No.	Sequence (5' to 3')	Modification of <u>X</u>	MS		HPLC purity (UV area%)	HPLC Retention Time (min)
			Calcd.	Found.		
ON1	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	LNA	6350.1	6352.3	95.9	10.8
ON2	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6678.6	6679.2	100.0	15.4, 15.7
ON3	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6664.5	6662.7	100.0	15.2
ON4	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6664.5	6666.5	98.1	15.1
ON5	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6650.5	6649.9	99.2	15.3, 15.6
ON6	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6635.2	100.0	15.4, 15.7
ON7	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6635.7	100.0	15.1
ON8	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6595.5	6594.5	100.0	15.8
ON9	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6581.4	6580.7	100.0	15.7
ON10	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6581.4	6582.5	100.0	15.8
ON11	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6650.0	100.0	15.4, 15.8, 16.1
ON12	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6650.5	6651.5	100.0	15.5, 15.8, 16.1
ON13	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6650.5	6650.6	95.0	15.2
ON14	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6650.5	6650.0	100.0	15.2, 15.6
ON15	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6637.0	100.0	15.3, 15.7
ON16	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6635.8	98.2	15.2, 15.6
ON17	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6633.9	94.2	15.2, 15.5
ON18	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6635.2	96.1	15.2
ON19	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6636.6	98.8	15.1
ON20	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6637.5	100.0	15.1
ON21	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT	GuNA	6636.5	6635.6	98.5	15.2
ON22	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6965.8	6968.0	95.1	12.8
ON23	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6970.8	6969.4	100.0	16.2, 16.4
ON24	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	7039.8	7038.8	100.0	15.7
ON25	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6979.8	6982.2	93.3	12.9, 13.3
ON26	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6965.8	6968.0	97.5	12.9
ON27	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6979.8	6981.7	94.9	13.0
ON28	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6965.8	6968.8	97.0	12.8
ON29	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6979.8	6981.6	98.1	13.0
ON30	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6979.8	6981.9	97.4	13.0
ON31	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6965.8	6968.3	98.9	13.0, 13.3
ON32	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6979.8	6982.1	98.0	12.8, 13.1
ON33	<u>AA</u> CA <u>T</u> CA <u>G</u> TCTGATA <u>A</u> AGCT <u>A</u>	GuNA	6993.8	6996.3	98.8	12.8, 13.1

Capital letters; DNA, Bold; 2'-MOE, Underline; LNA or GuNA (C denote 5-methylcytosine). All phosphodiester linkages were replaced by PS linkages. ESI-MS produces multi- charged ions, and found molecular weight were obtained by the deconvolution of those peaks. Several GuNA sequences had multiple peaks detected by HPLC analysis, in which case the peaks that had same MS were combined to calculate HPLC purity.

GuNA 含有 AMO の構造活性相関の詳細を検証するにあたり、化学修飾の効果を顕著に受ける部位がどこかを大まかに把握するために、miRNA-21 配列を大きくシード領域 (ポジション



2-8) と非シード領域 (ポジション 9-20) (Figure 8A) の 2 つの領域に分類した。AMO が標的とする miRNA にとって、シード配列は標的 mRNA の認識に主として関与することから特に重要な領域である。<sup>94)</sup> したがって AMO においても、miRNA のシード領域の相補鎖に相当する位置に何らかの特徴を持つ可能性があると考え、上記の分類を行った。シード及び非シード領域における GuNA の位置を 1 つずつシフトさせることによって、3 つのシード修飾デザインと 3 つの非シード修飾デザインを組み合わせると 8 つの AMO を新たに合成した (ON3-ON10)。Figure 8A には Figure 7 で示した ON2 と新たに合成した ON3-ON10 において配列のどの位置が GuNA で修飾されているかを示した (黒い四角が GuNA, 灰色い四角が DNA を表す)。デュアルルシフェラーゼアッセイを用いて合成した AMO の miRNA-21 阻害活性を評価した。各濃度における miRNA-21 の阻害率を Figure 8B に示し、10 nM における阻害率を基に活性の大きさを + の多さで表した結果を Figure 8A の配列情報の横に併記した。以降の Figure についても同様の表記で記す。ON2、ON3 及び ON4 は中等度の阻害活性を示した。これは、非シード領域のポジション 9、12、15、18 及び 20 への GuNA の導入が、ある程度活性の向上に寄与する可能性を示唆した。すべて同じ非シード配列修飾を有する ON2、ON3 及び ON4 の中では、ON3 が良好な阻害活性を示した。ON5、ON6 及び ON7 は、ON2、ON3 及び ON4 とは、異なる非シード領域修飾である。その中で、ON6 が最も高い活性を示した。ON8、ON9 及び ON10 の中では、ON8 と ON10 は活性が無かったが、ON9 はわずかに活性を示した。これらの結果は、シード領域のポジション 2、4 及び 7 への GuNA の導入が阻害活性に対して正の効果をもつことを示唆した。評価した 9 つの AMO の中で ON6 が最高の活性を示し、シード及び非シード領域の修飾の組合せにおける相乗効果の可能性を示唆した。興味深いことに、ON6 の  $T_m$  値は 69 °C であることが判明した。これは ON6 よりも大幅に活性が低い ON2 の  $T_m$  値よりも 3 °C 低かった。このことから、ON2 と ON6 の間の活性の差はそれらの  $T_m$  値と関連しないことが示された。

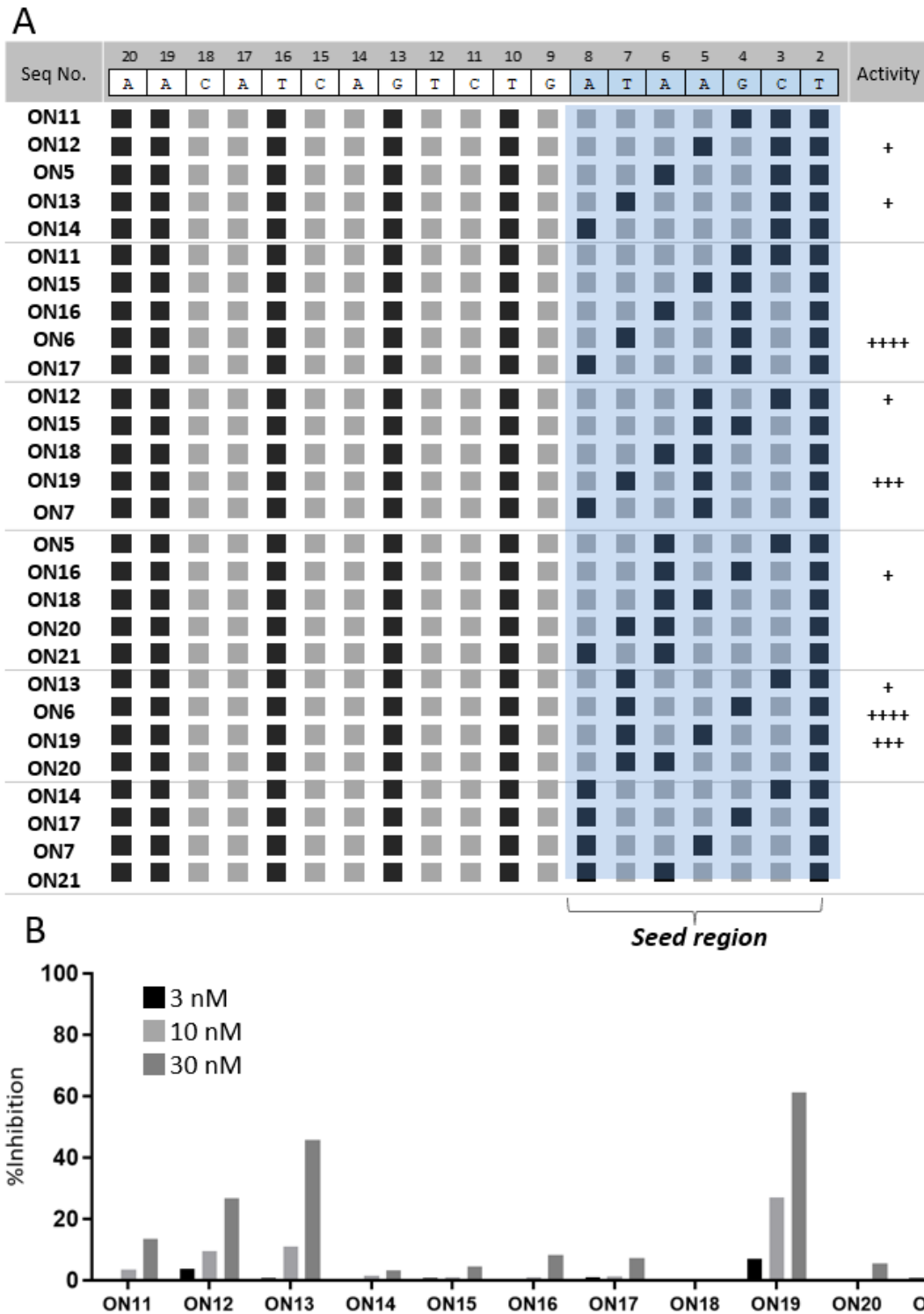


**Figure 8.** Effects of GuNA placement, in the seed and non-seed regions, on the miRNA-inhibitory activity. (A) Schematic representation of AMO sequences and their relative activities under transfection conditions. The activity was expressed based on the inhibition rate (IR) at 10 nM: +++++, IR > 80%, +++++, 80% > IR > 40%, +++, 40% > IR > 20%, ++ 20% > IR > 10%, +, 10% > IR > 8%, -, IR < 8%. ■:GuNA, ■:DNA. (B) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment with ON2 to ON10, under transfection conditions. All data is shown as the mean values (n = 2). To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the reporter plasmid not containing the miRNA-21 target site as 100% inhibition.

### 第三節 miRNA 阻害活性における Seed 領域修飾部位の網羅的評価

第二節の結果より、シード領域における GuNA 修飾位置が活性に大きな影響を与えることが示唆されたため、シード領域に焦点を当てて、より詳細な構造活性相関を検討した。Figure 7A に示すように ON6 に基づいて 12 個の新しい AMO (ON11–21) を設計した。酵素耐性への影響を排除するために AMO の 3'末端の GuNA、及び ON6 の非シード領域の GuNA 位置 (ポジション 10、13、16、19、20) は変化させず、シード領域の 3 つの異なる位置に GuNA を導

入した。12種類の新規配列の修飾位置及び、活性を Figure 8 で前述した **ON5-7** と共に Figure 7A に記し、新たに評価した 12 個の AMO 活性を Figure 7B に示した。なお Figure 7A はシード領域における GuNA の修飾位置を比較しやすいように分類して並べており、Figure 8 と同様の基準で活性の大小を+の多さで表した。ポジション 3 に GuNA を含む AMO (**ON11-14** 及び **ON5**) のうち、**ON12** 及び **ON13** は高い阻害活性を示したが、**ON11** は中程度の活性を示した。ポジション 4 又はポジション 5 が修飾された AMO の中で、**ON6** 及び **ON19** が有効性を示すことを見いだした。ポジション 6 及びポジション 8 に GuNA 修飾を有する配列は有意な *in vitro* 活性を示さなかったが、ポジション 7 に GuNA 修飾を有する配列は **ON20** を除き、全て良好な活性を示した。これらの結果は、ポジション 7 への GuNA の導入が AMO の活性を改善するが、ポジション 6 とポジション 8 での GuNA 修飾が活性に悪影響を与える可能性を示唆した。

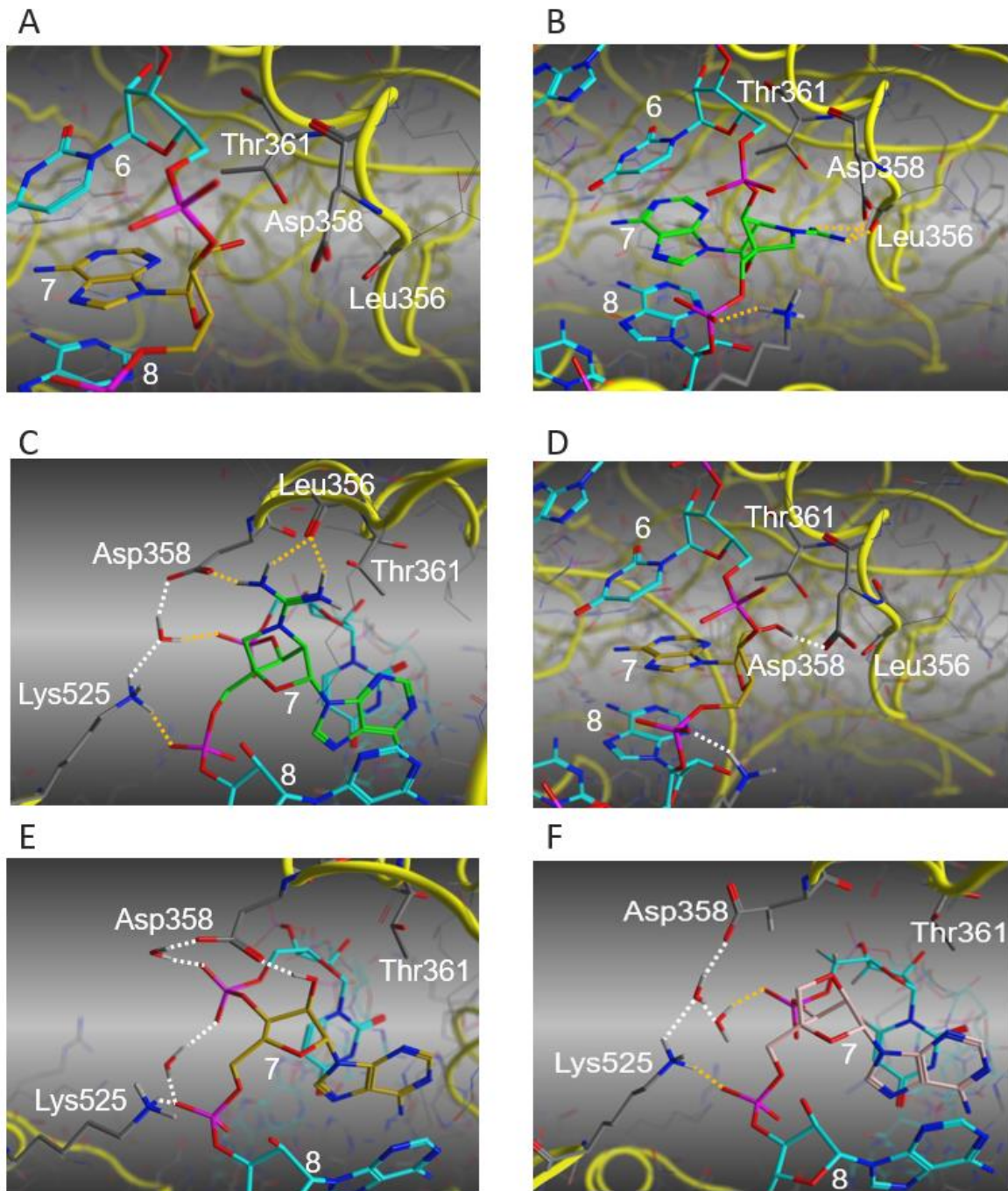


**Figure 7.** A direct comparison of GuNA substitutions in the seed region. (A) Schematic representation of AMO sequences and their relative activities under transfection conditions. See caption in Figure 8A. (B) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment with ON11 to ON21, under transfection conditions. All data is shown as the mean values ( $n = 2$ ). To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the reporter plasmid not containing the miRNA-21 target site as 100% inhibition.

#### 第四節 Ago2-miRNA-mRNA の複合体 X 線結晶構造からの考察

第三節の結果より、シード領域のポジション7に GuNA を導入することが、最も AMO 活性の向上に関与している可能性が高いと示唆されたことから、その理由について考察した。AMO が miRNA を阻害するメカニズムには2つの可能性が考えられる: (1) AMO が相補的 pri-miRNA 及び/又は pre-miRNA に結合して成熟 miRNA の形成を阻害するか、(2) AMO は miRISC の形成後に成熟 miRNA に結合してその機能を阻害する (Figure 1)。一般的に、pri-miRNA や pre-miRNA はヌクレアーゼに分解されやすいとされており、Ago タンパクに取り込まれて miRISC の複合体を形成している 1 本鎖 miRNA は、ヌクレアーゼからの分解を回避でき、約 1 週間程度安定に機能を発揮する。<sup>96, 97)</sup> もしも miRISC を直接作用点とせず、「pri-miRNA や pre-miRNA を阻害することで、新たな miRISC の形成を抑制し、結果的に薬効が発揮されている」とするならば、AMO 添加時点で細胞内にすでに存在している miRISC が分解されるまで、miRNA の機能が持続すると予想される。しかしながら本レポーターアッセイ系において、トランスフェクション条件で AMO を添加して 24 時間後にほぼ完全に miRNA 阻害活性を示した AMO が存在するという結果を考慮すると GuNA 修飾 AMO は miRISC 中の 1 本鎖 miRNA を作用点として活性を示す可能性が高いと示唆される。miRISC による標的 mRNA の認識は、Ago2 の MID 及び PIWI ドメインによるシード領域の副溝の認識から始まると言われており、標的 mRNA は miRISC に取り込まれた後に相補的な内因性 miRNA に結合する。<sup>98-102)</sup> 今回、GuNA 修飾 AMO が標的 mRNA と同様のプロセスで miRISC と相互作用していると仮説を立て、AMO 活性に対するポジション7の GuNA 修飾の正の効果をも Ago2-miRNA-標的 mRNA の三者複合体の X 線結晶構造に基づいて考察した。標的 mRNA を AMO に置き換えて、Schirle らにより報告された hAgo2-miRNA-122-標的 RNA 三重複合体の構造 (PDB ID 4W5O、Figure 8A)<sup>91)</sup> に基づき、分子モデリングを行った。最初に、標的 mRNA (AMO に相当) のポジション7のヌクレオチドを GuNA で置換した。次に、歪んだトポロジーと不適切な相互作用を補正するために、得られた複合体に対してエネルギー最小化を行った。モデリング法については、実験セクションで詳述した。ポジション7で、正に荷電したグアニジン基は主鎖 Leu 356 のカルボニル酸素及び側鎖 Asp 358 (Figure 8B、6C) の酸素原子と水素結合を形成した。元の結晶構造 (Figure 8A) では、ポジション7のヌクレオチドと Ago2 のアミノ酸残基との間にこのような相互作用は認められなかった。三者複合体構造では、Asp 358 のカルボキシル基と標的 mRNA のポジション7の 2'位水酸基がエネルギー最小化後に近接していたが、ポジション7のヌクレオチドと Leu 356 の間に相互作用は認められなかった (Figure 8E)。標的 RNA のポジション7における糖部立体配座の影響を評価するため、ポジション7を LNA に置換した三者複合体のエネルギー最小化を実施した (Figure 8F)。LNA の糖部分と隣接アミノ酸の間に直接相互作用は観察さ

れなかった。一方で、GuNA、RNA、及び LNA をそれぞれ含む 3 つのエネルギー最小化複合体は、いずれも 1 つ又は 2 つの水分子 (Figure 8C、6E、6F) を含む水素結合ネットワークを介して、ポジション 6 と 7 の間、及び 7 と 8 の間のリン酸基を介して、Asp 358 及び Lys 525 との間接的な相互作用を示すという点が共通していた。活性と構造安定性との関係は明らかではないが、AMO のポジション 7 に GuNA を導入すると、同じ架橋構造を有する LNA で見られないグアニジンからの新しい水素結合と強い静電相互作用が加えられる可能性が示唆された。これらの点に関して、今後計算予測だけでなく構造生物学的な実験やより詳細な活性との相関解析を行う必要があると考えられる。



**Figure 8.** Analysis of the crystal structure of the hAgo2-miRNA122-target RNA ternary complex. (A) Close-up view of the crystal structure of the hAgo2-miRNA122-target RNA ternary complex (PDB ID 4W50). (B, C) Energy-minimized structure of the ternary complex with a GuNA substituted at position 7 of the target RNA. (D, E) Energy-minimized structure of the hAgo2-miRNA122-target RNA ternary complex. (F) Energy-minimized structure of the ternary complex with LNA substituted at position 7 of the target RNA.

## 第五節 miRNA 阻害活性における非 Seed 領域修飾部位の評価

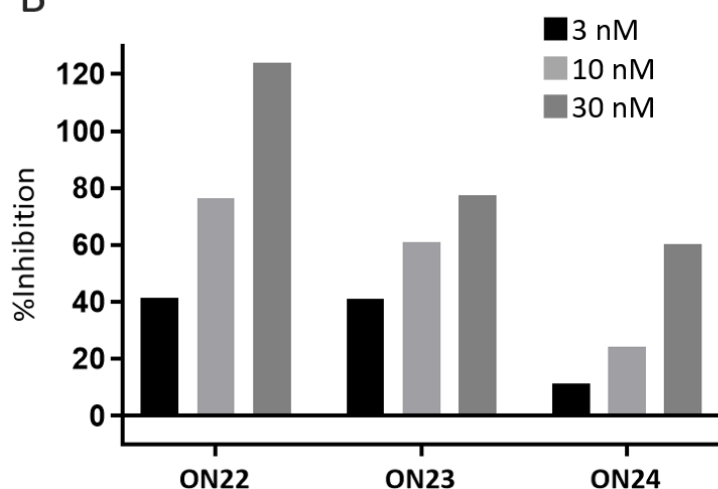
最後に、第三節の結果を基にシード領域をポジション 4 と 7 に固定して非シード領域における GuNA 修飾の効果を検証した。まずは 3' 末端に焦点を当てて評価を行った。三種類の新しい AMO (**ON22**、**ON23**、**ON24**) を **ON6** に基づきデザインし、それらの活性を比較した (Figure 11A、7 B)。これら 3 種類の新しい AMO は 20-mer 配列であり、ポジション 1 にヌクレオシドが付加されていた。**ON22** はポジション 1 に GuNA、ポジション 2 に DNA を有しており、**ON22** のポジション 1 の GuNA が **ON23** では 2'-MOE に置換されている。また、**ON24** では **ON23** のポジション 2 の DNA を GuNA で置換した。これまでのいくつかの報告では、AMO の末端に 2'-MOE を使用することで薬効を改善することが示されていた。<sup>35, 46</sup> 我々の評価の結果、miRNA 阻害活性は、**ON22** > **ON23** > **ON24** の順であった。**ON22** 及び **ON23** の活性を比較した結果、20-mer AMO のポジション 1 における GuNA 修飾は 2'-MOE 修飾よりも適切である可能性が示された。**ON23** と **ON24** の活性を比較した結果、ポジション 2 に GuNA を導入すると AMO の活性が低下することが示された。



A

Seq No.	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Activity	
	A	A	C	A	T	C	A	G	T	C	T	G	A	T	A	A	G	C	T	A		
ON6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	++++
ON22	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	++++
ON23	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	++++
ON24	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	+++

B



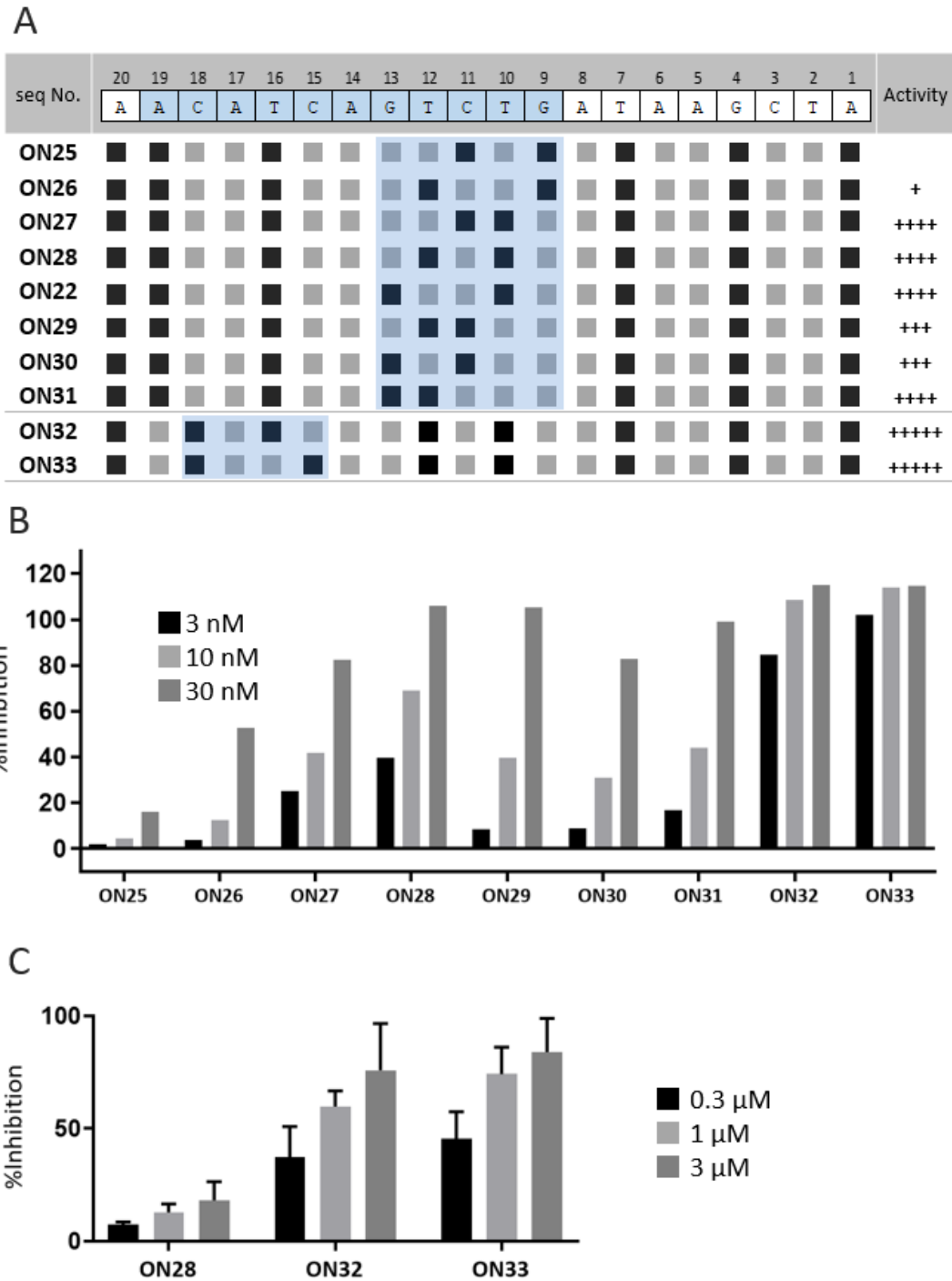
**Figure 11.** Effects of the 3'-end elongation on AMO activity (A) Schematic representation of AMO sequences and their relative activities under transfection conditions. See caption in Figure 8A. ■:GuNA, ■:DNA, □ :2'-MOE. (B) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment with AMO-22 to -24, under transfection conditions. All data are shown as the mean values (n = 2). To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the reporter plasmid not containing the miRNA-21 target site as 100% inhibition.

次に **ON22** 配列を基にしてポジション 9-13 の領域に 2 つの GuNA を導入することにより、新たに 7 つの AMO (**ON25**—**ON31**) を設計した (Figure 12)。結果として、ポジション 10 に GuNA を有す **ON22**、**ON27**、**ON28** が、良好な活性を示した。これらの位置を取り囲む領域は、ヒト Ago2-ガイド RNA-標的 mRNA 三重複合体の結晶構造中で空間が広がっているため GuNA 修飾が拒絶されにくいと予想されたが、ポジション 10 の修飾により活性が大きく向上したことは興味深い結果であった。通常 miRISC が標的 mRNA に結合する初期段階において miRISC が AMO と相補鎖を形成した後に起こる 2 つの過程が報告されている。<sup>3,13</sup>(1) ヒト Ago2 が触媒的に標的 mRNA を切断するエンドヌクレアーゼ活性 (スライサー活性) によってポジション 10 と 11 の間で切断されるプロセス、<sup>3,11,13</sup>(2) 標的 mRNA が切断され結合が弱められると

miRISC から二本鎖が遊離するプロセスである。<sup>3, 13, 103</sup> しかしながら本研究において合成した AMO は全て酵素切断に対して安定な PS 結合を有しているため、(2) は生じない。一方、ヒト Ago による切断過程においてマグネシウムイオンが重要な役割を果たすことが報告されている。<sup>13, 91</sup> ヒト Ago2 のスライサー活性部位はマグネシウムイオンと相互作用する酸性アミノ酸を多く含んでいる。今回のケースでは、GuNA がポジション 10 及び 12 付近に位置すると、グアニジノ基は、本来マグネシウムイオンと相互作用するはずの活性部位の酸性残基と相互作用する可能性が示唆された。

最後に、ON28 を基にした 2 種類の新しい誘導体 (ON32、ON33) を合成した (Figure 12A)。著者らは、トランスフェクション及び gymnosis 条件 (Figure 12B, 8C) 下で、ON28、ON32、及び ON33 の miRNA 阻害活性を評価した。ON32 と ON33 は、gymnosis 条件下でも有意な阻害活性を示した。これらの AMO 活性は ON33 > ON32 > ON28 の順であり、ポジション 15 での GuNA 修飾は 16 位よりも効果的であり、ポジション 18 での修飾はポジション 19 よりも効果的であることを示した。ポジション 13–16 付近は miRISC が標的 mRNA を認識する際、シード領域に次いで標的識別を行う補助的認識部位と報告されている。<sup>104-107</sup> ポジション 15 も、この副次的な標的認識段階において GuNA 特異的相互作用を示す可能性が考えられる。一方、AMO のポジション 18 に位置する核酸と蛋白質との明らかな相互作用は報告されておらず、このような活性の変化が起きる原因は現在のところ不明である。この顕著な違いについては計算予測だけでなく構造生物学的実験を行うなど、今後より詳細な検証が必要である。

以前の研究では、ON1 の置換パターンを 1 つずつ移動させると活性が低下することが報告されているため、ON1 は LNA に対して効果的な修飾パターンを持つが、LNA と同じ架橋型構造を持つ GuNA の場合には、ON2 は活性を示さなかった。本研究における詳細で体系的な構造活性相関解析は、最終的に非常に活性な ON33 を得た。ON33 と ON2 の主な違いは、シード領域 (ON33: ポジション 4、7 vs ON2: ポジション 3、6) とスライサー活性部位周辺の修飾 (ON33: ポジション 10 vs ON2: ポジション 9) であった。特にこれら領域では GuNA のグアニジン構造に由来して生じる相互作用が、活性増加に関わることを示した。



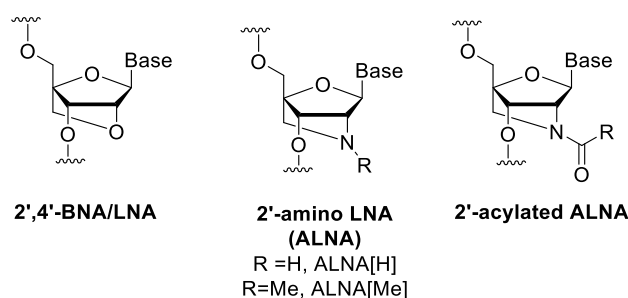
**Figure 12.** A direct comparison of GuNA substitutions in the seed region. (A) Schematic representation of AMO sequences and their relative activities under transfection conditions. See caption in Figure 8A. (B) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment with **ON25** to **ON33**, under transfection conditions. All data are shown as the mean values ( $n = 2$ ). (C) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment with **ON28**, **ON32**, and **ON33**, under gymnotic conditions. All data are shown as the mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the reporter plasmid not containing the miRNA-21 target site as 100% inhibition.

## 小括

以上、GuNA 修飾 AMO が、トランスフェクションおよび *gymnosis* のいずれの条件においても標的 miRNA の機能を有意に阻害することを初めて明らかにした。さらにこれまで AMO の化学修飾研究で注目されていた相補鎖との二本鎖形成能及び酵素分解に対する耐性に加えて、miRISC に AMO が取り込まれる際に、Ago2 タンパクと AMO の 2' 位置換基が相互作用することが AMO の活性に影響する可能性が示唆された。さらなる検証が必要ではあるが、これらの活性向上に繋がる特徴を同定し、それらの特徴を最適化することでより強力な AMO の開発につながることが期待される。これらの特性について、より広範に構造活性相関を調べるために、ALNA 誘導体に着目した。次章では Ago2 との相互作用が期待される ALNA 誘導体を導入した AMO を合成し、その構造と AMO 活性の関連性を調べることにした。

## 第二章 2'-N-アシル amino-LNA を導入したオリゴヌクレオチドの研究

第一章では、グアニジン架橋核酸 (GuNA) からなる AMO が優れた抗 miRNA 活性を有し、修飾位置のわずかな変化が AMO 活性を大きく増強することを報告した。さらに、AMO とタンパク質の相互作用が活性の変化に寄与している可能性が示唆された。本章では、ALNA の 2'-アミノ基にカルボニル基を導入することにより蛋白質と AMO 間の新しい相互作用の形成を期待して、ALNA の 2'-N-アシル誘導体を導入した AMO の開発を行うこととした (Figure 13)。さらに最近の研究では、単純な化学修飾の変換であっても治療用 ASO の薬物動態学的及び生物物理学的特性に有意な影響を及ぼすことが示されていることから<sup>108-110)</sup> 置換基の異なる複数のアシル誘導体を合成することで、2'-アミノ基上の置換基のわずかな差異による miRNA 阻害作用への影響を体系的に評価することを考えた。そのためには、2'-アミノ基上の置換基の種類と核酸塩基 (A, T, G, <sup>m</sup>C) のすべての組み合わせで、それぞれホスホロアミダイトを合成するのではなく、より簡便で効率的な合成戦略が必要であった。



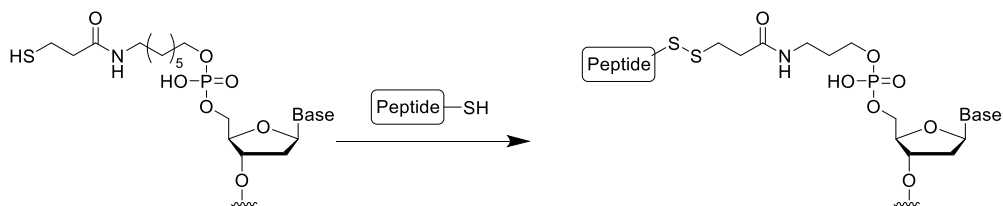
**Figure 13.** Structures of 2',4'-BNA/LNA, ALNA, and 2'-acylated ALNA. Base = nucleobase.

ポスト伸長修飾 (PEM) は、オリゴヌクレオチドの固相合成後に特定部位に化学修飾を適用する方法である。<sup>111-117)</sup> この手法は、固相合成中の化学分解を回避したい場合や、ホスホロアミダイトの物性が悪く固相合成に耐えられない場合、ペプチドや抗体のような大きな修飾物質を導入する場合などにおいて利点がある。最も一般的な PEM は、S-S<sup>114)</sup> 及びアミド結合形成<sup>115-117)</sup> を用いて、オリゴヌクレオチドの末端にペプチド及び脂肪酸を導入することである (Figure 16)。<sup>111-117)</sup> また、銅触媒アジド-アルキン環状付加反応 (CuAAC)、<sup>118-121)</sup> 銅フリーのクリック反応<sup>122, 123)</sup> 及び金属触媒クロスカップリング反応<sup>124-127)</sup>、その他<sup>128, 129)</sup> を用いて合成したオリゴヌクレオチドの PEM が報告されている。Wengel らは、ALNA を含むオリゴヌクレオチドに対する PEM の例として、ALNA の 2'-N-グリシン誘導体のグリシン上のアミノ基におけるアミド化反応と、ALNA の 2'-N-アルキン誘導体のアルキン部位における CuAAC を報告している (Figure 17)。<sup>73-75, 79, 82)</sup> Hari らはアミンの 2'-N-ペンタフルオロフェノキシカルボニル基を有する ALNA 誘導体への求核置換を報告した。<sup>84)</sup> これらの反応は ALNA の 2'-アミノ基に

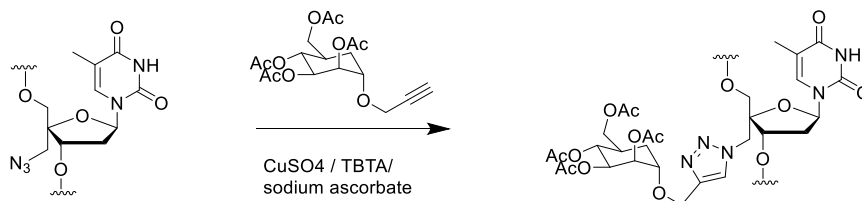
導入された置換基上で行われており、ALNA の 2'-アミノ基に対する直接的 PEM はこれまでに報告されていない。

本研究では、アデニン、チミン、グアニン、及び 5-メチルシトシン核酸塩基を持つ ALNA ホスホロアミダイトの 2'-*N*-トリフルオロアセチル保護体を合成し、オリゴヌクレオチドに導入した。さらに、液相条件での PEM によるオリゴヌクレオチド中の ALNA の 2'-*N*-直接アシル化法を確立し、複数のアシル化された ALNA 含有オリゴヌクレオチドを合成した。これらについて、基本的な特性として標的結合親和性、塩基識別能及び 3'-ヌクレアーゼ分解耐性を調べたのち、2'-アミノ基上の化学修飾の違いが AMO 活性に及ぼす影響について評価した。

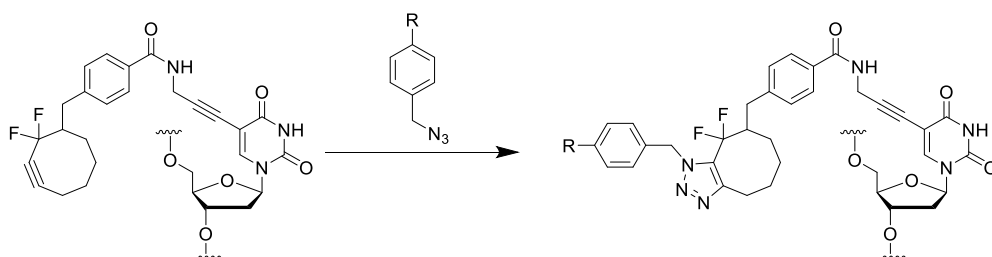
(A) 5'末端 S-S bond formation



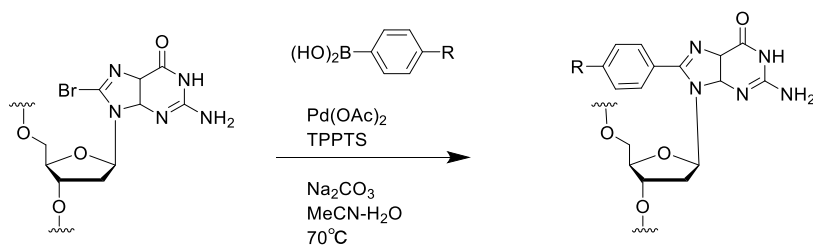
(B) 銅触媒アジド-アルキン環化付加反応 (CuAAC)



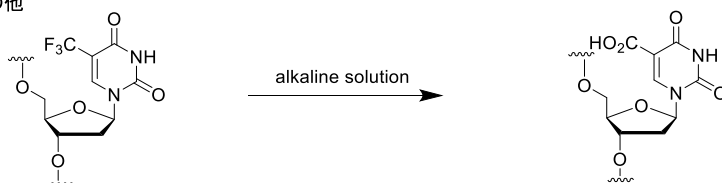
(C) 銅フリークリック反応



(D) 金属触媒クロスカップリング反応

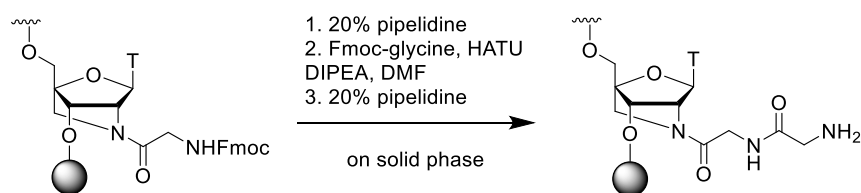


(E) その他

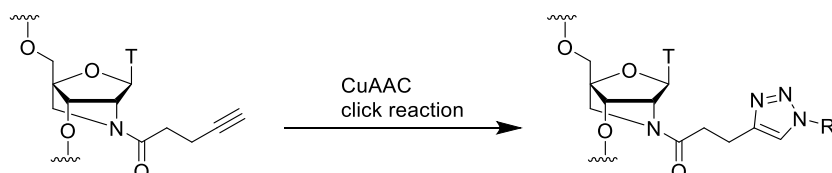


**Figure 14.** Representative PEM reaction. TBTA = tris[(1-benzyl-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine. TPPTS = 3,3',3''-Phosphanetriyltris(benzenesulfonic acid) trisodium salt.

(A) 固相上での縮合反応



(B) 銅触媒アジド-アルキン環化付加反応 (CuAAC)



(C) アミンの求核付加反応

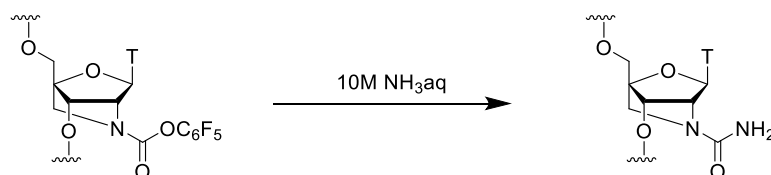


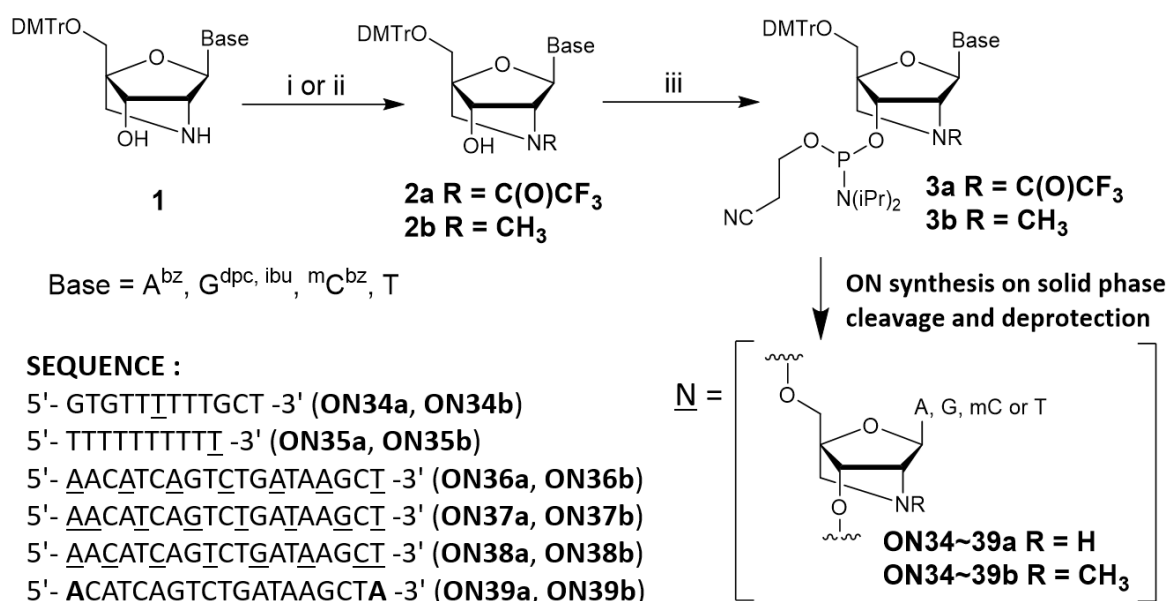
Figure 15. Representative PEM reaction on ALNA derivatives. DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamine.

### 第一節 Post elongation modification を利用した 2'-*N*-アシル化体の合成

まず初めに 4, 4'-ジメトキシトリチル基 (DMTr) で保護した ALNA[H]モノマー **1**<sup>89, 130)</sup> を、ALNA[H]を含むオリゴヌクレオチドの合成のための出発材料として選択した。トリフルオロ酢酸エチルを用いて **A<sup>bz</sup>-1**、**G<sup>dpc, ibu</sup>-1**、**mC<sup>bz</sup>-1** 及び **T-1** を選択的に 2'-*N*-トリフルオロアセチル化し、**A<sup>bz</sup>-2a**、**G<sup>dpc, ibu</sup>-2a**、**mC<sup>bz</sup>-2a** 及び **T-2a** を得た。続いて、**2a** の 3'位の水酸基をホスフィチル化して、対応するホスホロアミダイト **A<sup>bz</sup>-3a**、**G<sup>dpc, ibu</sup>-3a**、**mC<sup>bz</sup>-3a**、**T-3a** を得た。<sup>131)</sup> アシル化体との比較を行うために、デカボランとホルムアルデヒドによる **T-1** の還元的アミノ化により、**A<sup>bz</sup>-2b**、**G<sup>dpc, ibu</sup>-2b**、**mC<sup>bz</sup>-2b** 及び **T-2b** を得た。それに続く標準的なホスフィチル化反応により、ホスホロアミダイト **A<sup>bz</sup>-3b**、**G<sup>dpc, ibu</sup>-3b**、**mC<sup>bz</sup>-3b**、**T-3b** を合成した (Scheme 1)。<sup>132, 133)</sup> オリゴヌクレオチドの合成には 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 (Activator 42<sup>®</sup>) 溶液を用いた。DMTr カチオン測定に基づいて、合成は各カップリングで 90%以上の収率を示した。28% アンモニア水による加熱条件にてオリゴヌクレオチドを固体担体から切り出し、塩基部および 2'-アミノ基上の保護基を脱保護したのち、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) で精製した。オリゴヌクレオチドの純度を RP-HPLC により測定し、それらの組成を質量分析により確認した。合成の詳細については、実験項に記載



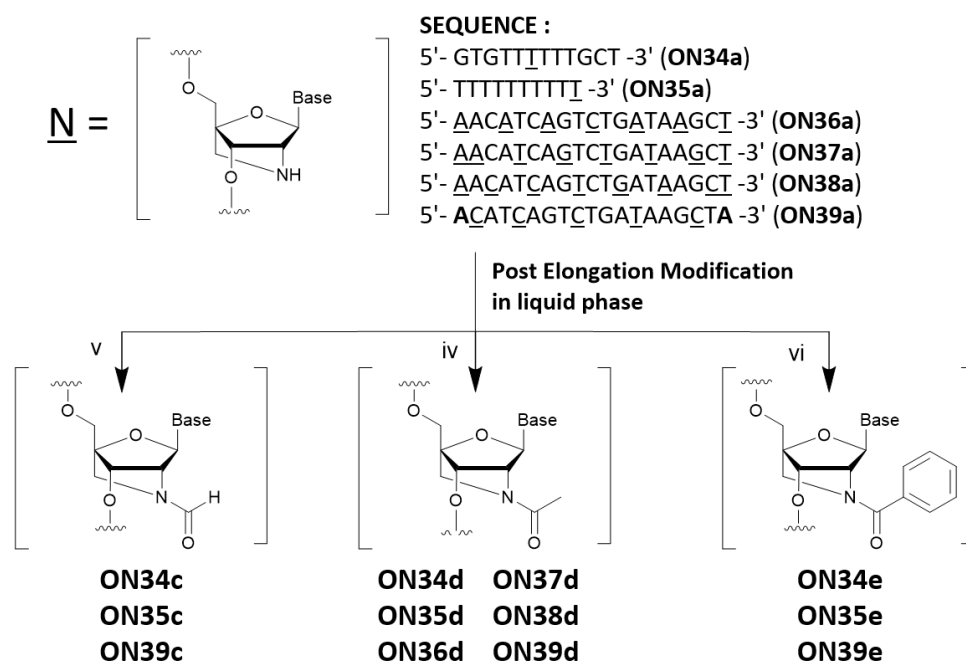
した。合成したオリゴヌクレオチドを Scheme 1 に示す。ON34 及び ON35 はシーケンスの途中又は最後にそれぞれ1つの ALNA-T を含み、a 系列は ALNA[H] を含み、b 系列は ALNA[Me] を含む。ON36–ON39 は、miRNA-21 を標的とする 19-mer AMO である。A、T、G 及び <sup>m</sup>C を有する 5–8 個の ALNA モノマーが各配列に含まれる。ON36–ON39 のバックボーンは PS 結合で修飾した。ON36–ON38 は同じ配列であるが、それぞれ異なる位置に 7 又は 8 個の ALNA モノマーを含んでいる。ON39 は Phase II 試験が行われている miRNA-21 に対する AMO の配列<sup>35)</sup> を参考にしたもので、5 個の ALNA モノマーが含有されており、この配列の両端は 2'-MOE で修飾されていた。



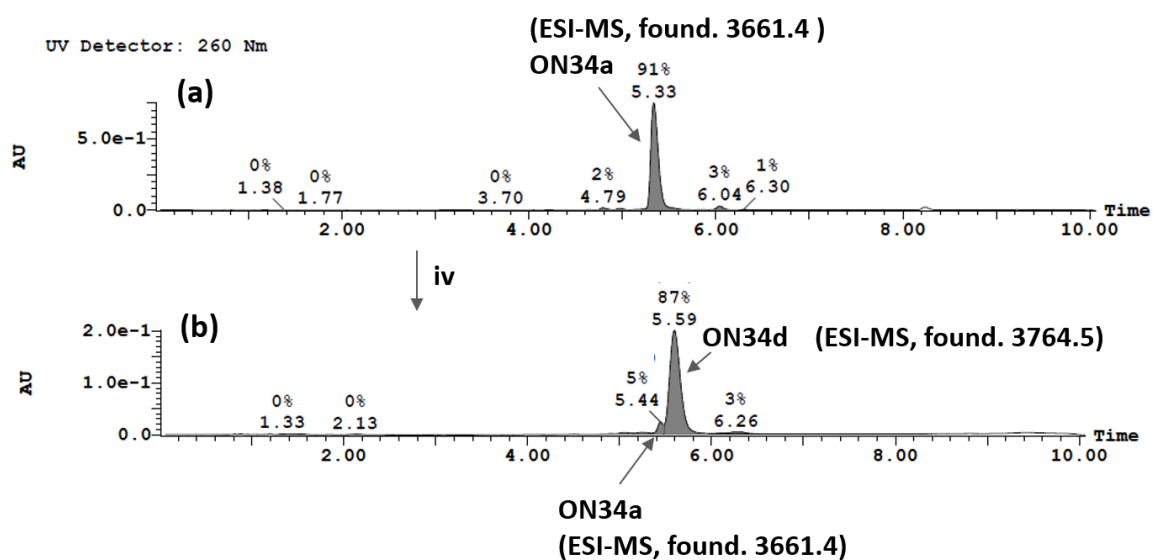
**Scheme 1.** Synthesis of 2'-N-trifluoroacetyl ALNA or ALNA[Me] phosphoramidites and the ON sequences used in this study. Reagents and conditions: (i) ethyl trifluoroacetate, DMAP, MeOH, rt; (ii) formaldehyde, decaboran, THF, rt; (iii) (iPr)<sub>2</sub>NP (Cl) O (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CN, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt. Base = nucleobase. Capital letters: DNA, Bold: 2'-MOE, Underline: ALNA[H] for a series and ALNA[Me] for b series (C denotes 5-methylcytosine). Base = A<sup>bz</sup>: N<sup>6</sup>-Benzoyl-1-adenine, G<sup>dpc</sup>, ibu: O<sup>6</sup>-diphenylcarbamoyl-N<sup>2</sup>-isobutyrylguanine, <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>: N<sup>4</sup>-Benzoyl-5-methylcytosine, T: thymine.

次に ALNA[H]を含むオリゴヌクレオチドの直接的アシル化反応を実施した。異なる立体嵩高性と疎水性を有する3つのアシル誘導体を比較するために、ホルミル、アセチル、及びベンゾイル基をオリゴヌクレオチド中のALNA[H]の2'-アミノ基上に導入した (Scheme 2)。まず、原料として a 系列 (ON34–39a, ALNA[H]) の配列を用い各種 PEM 条件を検討した。得られた ON は c 系列が ALNA[formyl]、d 系列は ALNA[Ac]、e 系列は ALNA[Bz]として定義した。まずはアセチル化を題材に基本的なアシル化条件の検討を実施し、いくつかの試みの後、4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM)<sup>134-136)</sup> の存在下での酢酸との縮合によって、アセチル化を達成し ON34c、ON35c、ON39c を合成し

た (Scheme 2, condition (iv)). *N*-ホルミル化には、加熱なしでアミノ基に選択的にホルミル基を導入できる *N*-ホルミルサッカリンを用いた。<sup>137)</sup> ホルミル化反応は副生成物なしにほぼ定量的に進行し、**ON34c**、**ON35c** 及び **ON39c** が得られた (Scheme 2, condition (v)). アセチル化と同様の方法で安息香酸を用いてベンゾイル化を行った (Scheme 2, condition (vi)). 本検討における PEM 法はいずれも液相反応であるため、反応液の LC/MS 分析により反応過程のモニタリングが可能であった。代表的な反応追跡の LC/MS 分析として **ON34a** を原料としたアセチル化反応の LC/MS チャートを Figure 16 に示す。アセチル化の原料として用いた **ON34a** の反応前の LC/MS チャートを (a) に示し、アシル化反応後 2 時間経過した時点での反応液の LC/MS チャートを (b) に示した。(b) において、5.44 分に溶出されている **ON34a** は痕跡量まで減少しており、5.59 分に溶出される **ON34d** に大部分が変換されていることが確認された。このように反応液をピックアップして反応の終結までをモニタリングした。最終的には原料は完全に消失し PEM を用いたアセチル化、ホルミル化、ベンゾイル化のいずれの場合もゲルろ過精製 (NAP™ カラム、Cytiva) 後、ほぼすべてのオリゴヌクレオチドが 75%以上の単離収率 (PEM の場合は、ALNA[H]含有オリゴヌクレオチド **ON34-39a** を出発原料として収率を計算した) を示した。本章で合成した全ての ON を Table 2 に記す。



**Scheme 2.** Post elongation modification of ALNA. Reagents and conditions: (iv) acetic acid, DMT-MM, MeOH, pH 8.0 phosphate buffer, rt; (v) formyl saccharin, DIPEA, DMF, rt; (vi) benzoic acid, DMT-MM, MeOH, pH 8.0 phosphate buffer, DMF, rt. Base = nucleobase. Capital letters: DNA. Bold: 2'-MOE. Underline: ALNA[formyl] for **c** series, ALNA[Ac] for **d** series, and ALNA[Bz] for the **e** series (C denotes 5-methylcytosine).



**Figure 16.** Representative LC/MS profiles of the PEM reaction: (a) LC/MS analysis chart of **ON34a** after solid-phase synthesis and HPLC purification (Sequence: 5'-GTGTTTTTTGCT-3', Capital letters = DNA, underline T = ALNA[H]). (b) LC/MS chart of reaction mixture of acetylation of **ON34a** after 2 hours. In the reactions, the starting material **ON34a** almost disappeared and converged to the target compound (**ON34d**).

**Table 2.** Oligonucleotides synthesized in this chapter.

Seq No.	Sequence (5' to 3')	Modification of <u>X</u>	Yield (%)	MS		HPLC Purity (UV area%)	HPLC Retention Time (min)
				Calcd.	Found.		
<b>ON34 (DNA)</b>	GTGTTTTTTGCT	-	—	3633.4	3630.9	98.9	9.4
<b>ON34 (LNA)</b>	GTGTT <u>T</u> TTTGCT	LNA	—	3661.4	3661.4	98.5	9.3
<b>ON34a</b>	GTGTT <u>T</u> TTTGCT	ALNA[H]	55*	3660.4	3660.5	100.0	15.2
<b>ON34b</b>	GTGTT <u>T</u> TTTGCT	ALNA[Me]	18*	3674.4	3675.8	100.0	15.3
<b>ON34c</b>	GTGTT <u>T</u> TTTGCT	ALNA[formyl]	95**	3688.4	3687.6	99.1	12.7
<b>ON34d</b>	GTGTT <u>T</u> TTTGCT	ALNA[Ac]	102**	3702.4	3701.6	100.0	15.4
<b>ON34e</b>	GTGTT <u>T</u> TTTGCT	ALNA[Bz]	101**	3764.5	3763.6	97.0	10
<b>ON35 (LNA)</b>	TTTTTTTT <u>T</u>	LNA	—	3008.0	3007.9	93.6	12.2
<b>ON35a</b>	TTTTTTTT <u>T</u>	ALNA[H]	20*	3007.0	3006.2	94.7	12.1
<b>ON35b</b>	TTTTTTTT <u>T</u>	ALNA[Me]	21*	3021.0	3020.7	96.6	12.2
<b>ON35c</b>	TTTTTTTT <u>T</u>	ALNA[formyl]	94**	3035.0	3034.3	93.8	12.3
<b>ON35d</b>	TTTTTTTT <u>T</u>	ALNA[Ac]	97**	3049.0	3048.4	95.1	14.8
<b>ON35e</b>	TTTTTTTT <u>T</u>	ALNA[Bz]	103**	3111.1	3110.5	95.6	12.8
<b>ON36a</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[H]	22*	6288.2	6287.3	97.8	14.9
<b>ON36b</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[Me]	16*	6386.4	6385.4	98.6	15.2
<b>ON36d</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[Ac]	98**	6582.4	6581.5	97.2	15.2
<b>ON37a</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[H]	19*	6301.2	6300.7	98.4	14.8
<b>ON37b</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[Me]	34*	6413.4	6412.8	91.9	15.1
<b>ON37d</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[Ac]	96**	6637.5	6637.6	89.5	15.2
<b>ON38a</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[H]	20*	6343.3	6342.0	97.2	14.8
<b>ON38b</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[Me]	14*	6455.5	6454.6	98.3	15.1
<b>ON38d</b>	<u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u>	ALNA[Ac]	96**	6679.6	6678.8	95.7	15.2
<b>ON39a</b>	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u>	ALNA[H]	22*	6424.4	6424.1	100.0	15.3
<b>ON39b</b>	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u>	ALNA[Me]	14*	6494.5	6492.4	100.0	18.3
<b>ON39c</b>	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u>	ALNA[formyl]	97**	6564.4	6563.7	99.1	15.5
<b>ON39d</b>	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u>	ALNA[Ac]	95**	6634.6	6634.3	100.0	18.2
<b>ON39e</b>	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u>	ALNA[Bz]	99**	6944.9	6939.6	100.0	13.8

Capital letters; DNA, Bold; 2'-MOE, Underline; LNA/ALNA derivatives (C denote 5-methylcytosine). All phosphodiester linkages of **ON36** to **ON39** were replaced by PS linkages. \*Yields of solid phase synthesis. \*\*Yields of PEM reactions calculated from each starting material (**ON34-39a**).

## 第二節 2'-N-アシル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの物性評価

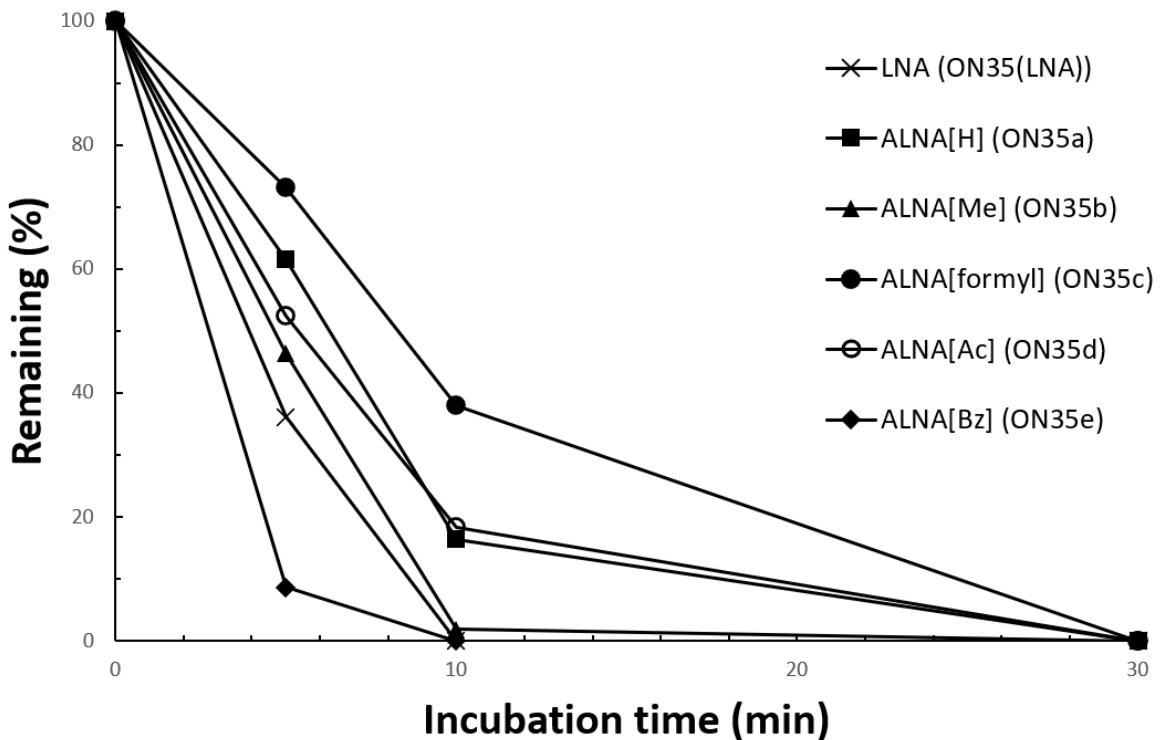
ON34a–ON34e と相補的な 1 本鎖 DNA または RNA (ssDNA 又は ssRNA) 間に形成された二本鎖の熱安定性を融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価し、得られた融解温度  $T_m$  を Table 3 にまとめた。ON34a–ON34e は Table 2 に示すように 12-mer DNA 配列の一箇所 (5'-GTGTTTTTTGCT-3' の下線部) が ALNA 誘導体により修飾されている。ssDNA に対する  $T_m$  値に焦点を当てると ON34 (DNA) が 51 °C であるのに対して、ON34 (LNA)、ON34a、ON34b、ON34e は 52–53 °C と上昇していた。一方で ON34c 及び ON34d は 49 °C、51 °C と低下または維持していた。ssRNA ( $X=A$ ) に対する  $T_m$  値に焦点を当てると、ON34a–ON34e は ON34 (DNA) よりも高い結合親和性 ( $\Delta T_m = +3.0 \sim +5.0$  °C / 修飾箇所) を示した。このことから ON34c、ON34d は RNA 選択性が向上していることが示された。ssRNA ( $X=A$ ) を標的とした場合において、同じ位置を LNA で修飾した ON34 (LNA)、ALNA[H]で修飾した ON34a、ALNA[Me]で修飾した ON34b の  $T_m$  値はそれぞれ 52 °C、53 °C、51 °C であり、ON34a–ON34e とそれらの間で  $T_m$  値にはほとんど差がなかった。このことは ssRNA 標的において、ALNA の 2'-アミノ基におけるアシル基付加が二本鎖形成能に実質的な悪影響を及ぼさないことを示唆した。ベンゾイル修飾 ON34e 及びホルミル修飾 ON34c は他のオリゴヌクレオチドよりも高い塩基識別能 (ミスマッチ塩基対と相補鎖を組みにくく、正確な標的を識別する能力) を示した。具体的には、ssRNA と ON34e の base discrimination values (完全にマッチした二重鎖 ( $X=A$ ) と最も安定なミスマッチ二重鎖 ( $X=G$ ) の間の  $T_m$  の差) は 10 °C であり、ON34 (LNA) よりも 5 °C 高かった。これはチミンがグアニンとの T-G ミスマッチ対を形成する際に ALNA[Bz]-T 及び ALNA[formyl]-T が何らかの不安定化効果を示すことが原因と考えられる。Wengel らは、ALNA[Bz]の 2'-N-ベンゾイル部分が副溝の縁に位置し、RNA との二本鎖の MD シミュレーションで溝のスペースのほぼ半分を占めることを報告した。<sup>66)</sup> 2'-N-ベンゾイル基は、対となるグアニンの 2 位アミノ基と立体的に衝突し、T・G 不安定塩基対を形成すると予想される。2'-N- (ペリレン-3-イル) カルボニル ALNA についても同様の傾向が報告されていることから<sup>70)</sup> これは 2'-アミノ基に芳香族アシル置換基を有する ALNA を含有するオリゴヌクレオチドに共通の特性である可能性がある。一方で、アセチル基よりも立体的に小さいホルミル基において高い塩基識別能を示したことは興味深い。

**Table 3.**  $T_m$  values from UV-melting curves (260 nm), the duplexes formed between **ON34s**, and fully matched/one-base-mismatched ssRNAs or ssDNAs.<sup>a</sup>

Seq. No	$T_m$ ( $\Delta T_m$ /mod.) [°C] toward ssDNA, 5'-AGCAAAAAA CGC -3'	$T_m$ ( $\Delta T_m$ /mod.) [°C] toward ssRNAs, 5'-AGCAAAXAACGC -3'				base discrimination values
		$X = A$	$X = U$	$X = G$	$X = C$	
<b>ON34 (DNA)</b>	51	48	32	42	30	6
<b>ON34 (LNA)</b>	53 (+2)	52 (+4)	38 (+6)	47 (+5)	36 (+6)	5
<b>ON34a</b>	52 (+1)	53 (+5)	38 (+6)	46 (+4)	37 (+7)	7
<b>ON34b</b>	53 (+2)	51 (+3)	37 (+5)	45 (+3)	38 (+8)	6
<b>ON34c</b>	49 (-2)	51 (+3)	37 (+5)	43 (+1)	35 (+5)	8
<b>ON34d</b>	51 (0)	52 (+4)	38 (+6)	46 (+4)	37 (+7)	6
<b>ON34e</b>	53 (+2)	52 (+4)	41 (+9)	42 (0)	38 (+8)	10

<sup>a</sup>N = 3, Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl, and 4  $\mu$ M oligonucleotides. The  $T_m$  values reflect the average of three measurements. ( $\Delta T_m$ /mod.): the change in  $T_m$  value ( $\Delta T_m$ ) per modification compared to the unmodified standard **ON34 (DNA)**. Italic: RNA, Capital letters: DNA, The base discrimination values are defined as subtraction of the  $T_m$  values of the most stable mismatch duplex ( $X = G$ ) from those of the fully matched duplex ( $X = A$ ) in the case of ssRNA.

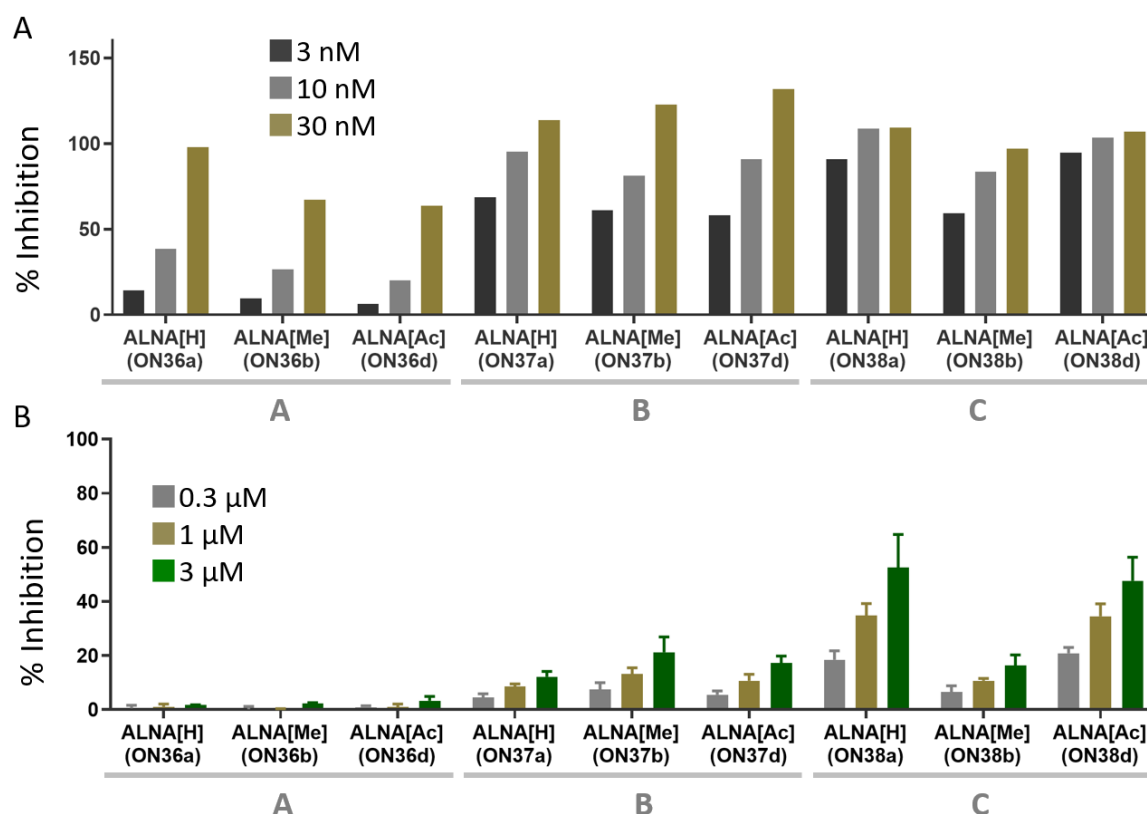
次に、酵素分解に対するアシル化 ALNA 含有 ON の安定性を評価した。3'末端のチミジンを ALNA[H]-T, ALNA[Me]-T, ALNA[formyl]-T, ALNA[Ac]-T, ALNA[Bz]-T で置換した T 10-mer オリゴヌクレオチド (**ON35a–35e**) を、Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で 3'-エキソヌクレアーゼと共に 37 °C でインキュベートし、全長オリゴヌクレオチドの割合を HPLC で分析した。Figure 17 に示すように、**ON35 (LNA)** 及び **ON35b** は 10 分以内にほとんど分解した。一方、**ON35a**、**ON35c** 及び **ON35d** は、反応開始後 10 分でそれぞれ 16%、37% 及び 18% 残存し、酵素安定性が著しく向上した。**ON35e** は 5 分でも容易に分解された。アシル修飾間で比較すると、酵素分解に対する耐性は ALNA[formyl] > ALNA[Ac] > ALNA[Bz] の順であった。これらの結果は、2'位の置換基に起因する立体障害効果によって説明することはできず、むしろ ALNA[Bz] のより高い脂溶性によって説明することができる。それはこれまでの人工核酸における置換基変換においてもいくつか報告されており、脂溶性の高さによって酵素分解に対する感受性が高くなる可能性が示唆される。<sup>108, 138)</sup>



**Figure 17.** Enzymatic degradation of the T 10-mer oligonucleotides with 3'-end modification. The sequence used was 5'-TTTTTTTTTTT-3'. T = LNA-T (cross, **ON35 (LNA)**), ALNA[H]-T (square, **ON35a**), ALNA[Me]-T (triangle, **ON35b**), ALNA[formyl]-T (solid circle, **ON35c**), ALNA[Ac]-T (open circle, **ON35d**), or ALNA[Bz]-T (diamond, **ON35e**). Conditions: 0.1  $\mu$ g SVPDE, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 2.5  $\mu$ M ON at 37 °C (total volume: 200  $\mu$ L).

### 第三節 2'-N-アシル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの miRNA 阻害活性評価

**ON36**, **ON37** と **ON38** は、抗 miRNA-21 活性を第一章で構築した *in vitro* レポーターシステムにて評価した。Table 2 に示すように、**ON36**、**ON37** 及び **ON38** は、同一の配列を有するが、それぞれ異なる修飾パターンを有しており、本試験において、それぞれクラス A、B 及び C に分類した。(Figure 18A)。各オリゴヌクレオチドは 7 個又は 8 個の ALNA を含む (**a** 系列は ALNA[H]、**b** 系列は ALNA[Me]、**d** 系列は ALNA[Ac]を含む)。トランスフェクション条件下で、クラス A (**ON36a**、**ON36b**、**ON36d**) の AMO 活性は中等度であり、より高い活性はクラス B (**ON37a**、**37b**、**ON37d** 及びクラス C (**ON38a**、**ON38b**、**ON38d**) で認められた。本試験で検討した 9 つの AMO のうち、**ON38a** 及び **ON38d** すなわちクラス C の AMO が他よりも高い有効性を示した (Figure 18A)。どちらの AMO もトランスフェクション試薬を用いない *gymnosis* 条件下でも優れた有効性を示した (Figure 18B)。ALNA で修飾した AMO の抗 miRNA 活性は修飾パターンに依存して大きく変化し、同じ修飾パターンの AMO の活性も ALNA の窒素原子上の置換基に依存して変化した。

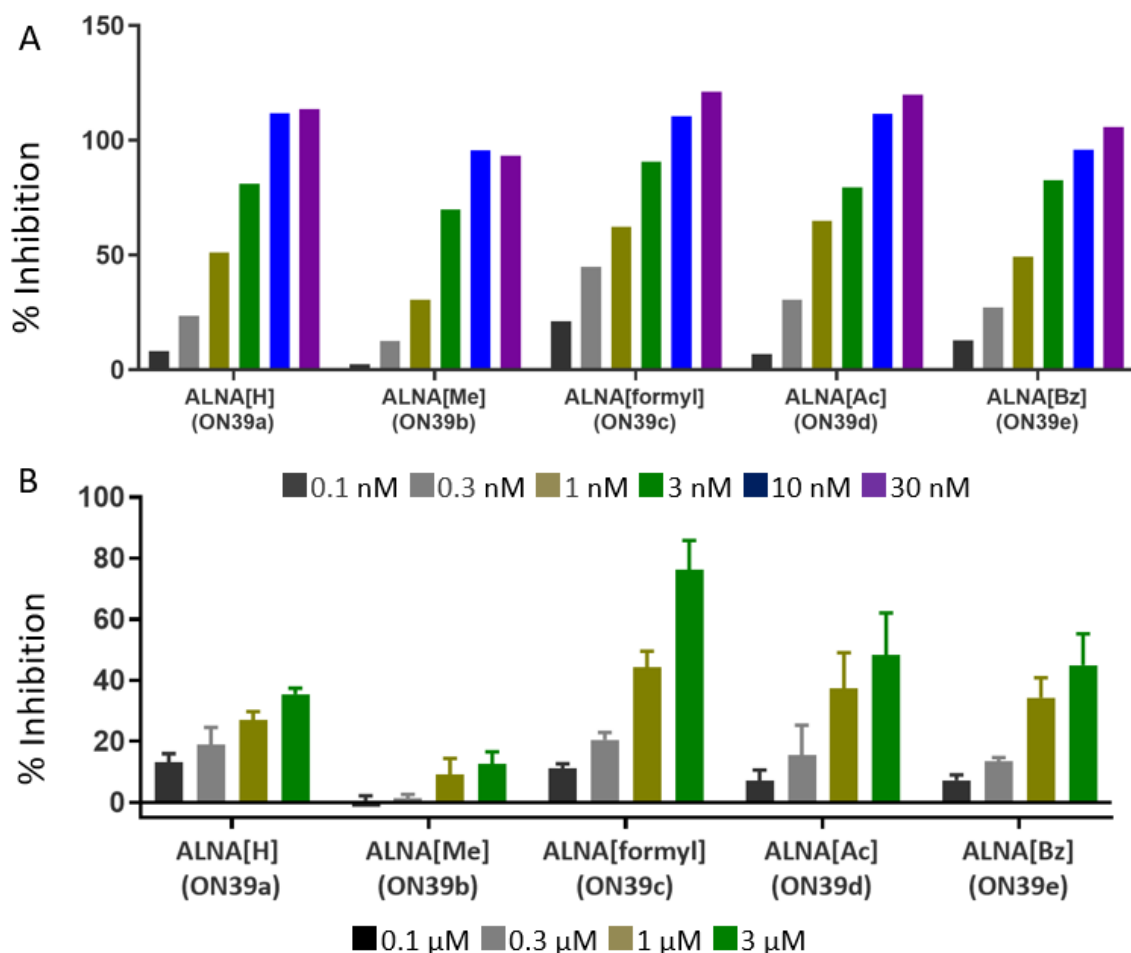


**Figure 18.** Relationship between chemical modification and introduction site on AMO activity (A) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment under transfection conditions. The mean values are shown ( $n = 2$ ). (B) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment in gymnotic conditions. The mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ) are shown. To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the reporter plasmid not containing the miRNA-21 target site as 100% inhibition.

ALNA を含む AMO (ON36d、ON37d、ON38d) の修飾パターンと活性との関係を探るために、AMO とそれらの相補的 ssRNA 間の二本鎖の熱安定性を融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価した。各二本鎖の融解温度  $T_m$  はそれぞれ 66 °C、70 °C 及び 73 °C であった。最も高い阻害活性を示した ON37d 含有二本鎖の  $T_m$  値は他よりも高く、結合親和性は標的阻害活性とある程度相関することが示唆された。次に、ON39 の活性を評価した。ON39a–ON39e の AMO 活性は、トランスフェクション後 24 時間のルシフェラーゼ活性を測定することにより評価した (Figure 19A)。すべての AMO は用量依存的な阻害活性を示した。本試験で検討した 5 種類の AMO のうち、ALNA[formyl] を有する ON39c は、高用量にて miRNA-21 に対して最も高い阻害作用を示した。また、Figure 18 の結果と同様、ON39a、ON39d は同程度の活性を示した (Figure 19B)。しかし ALNA[Me] 含有の ON39b では 3  $\mu$ M でもほとんど活性を示さなかった。GuNA 修飾 AMO に関する第一章の研究は、miRISC 中の Argonaute 2 の隣接アミノ酸と GuNA



修飾 AMO の 2'-グアニジノ基の相互作用が AMO の阻害活性を増強する可能性を示唆し、本研究においても AMO の活性は ALNA の 2'位の置換基の構造に依存して変化したことから、2'-アミノ置換基と miRISC の間の相互作用が関与する可能性が示唆された。



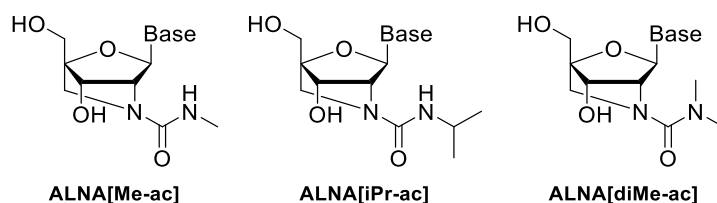
**Figure 19.** Effects of acylated ALNA on AMO activity (A) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment under transfection conditions. The mean values are shown (n = 2). (B) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment under gymnotic conditions. The mean values  $\pm$  standard deviation (n = 3) are shown. To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the reporter plasmid not containing the miRNA-21 target site as 100% inhibition.

## 小括

本章ではトリフルオロアセチル保護 ALNA 誘導体のホスホロアミダイト合成およびオリゴヌクレオチド合成後の PEM によって新規 2'-N-アシル ALNA を含む種々のオリゴヌクレオチドの合成を達成した。これらの化合物の相補鎖親和性、塩基識別能、ヌクレアーゼ耐性と miRNA-21 の阻害活性を評価した。2'-N-アシル修飾 ALNA 及び ALNA[H]は、いずれも miRNA 機能を阻害する有益な化学修飾であることを見出した。さらに、AMO のように置換基構造の変化や AMO の修飾パターンの変化が活性に大きく影響するケースには、構造活性相関の検討に PEM 法が有効であることを示した。次章では、第一章、第二章でも示唆された AMO と Ago2 との新たな相互作用をさらに増強したいと考え、2'-N-アミノカルボニル ALNA に焦点を当てた人工核酸の開発を実施することにした。

### 第三章 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA を導入したオリゴヌクレオチドの研究

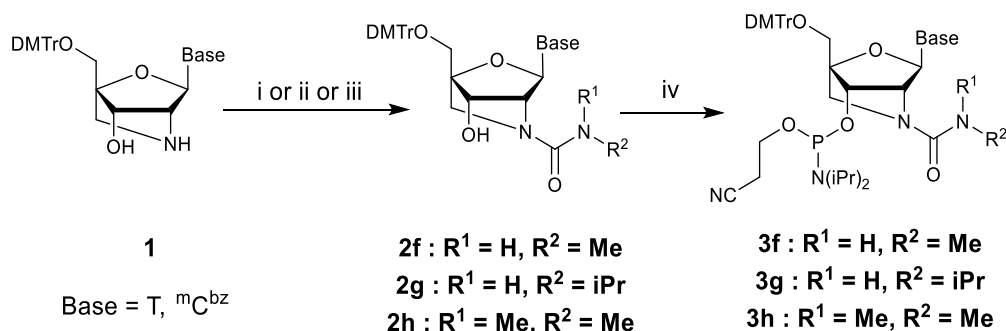
本章では、3種類の2'-N-アミノカルボニル ALNA (Figure 20) に焦点を当て、AMO 活性を評価した。これまでに、ポスト伸長修飾 (PEM) で合成された2'-N-アミノカルボニル ALNA のチミンを含むオリゴヌクレオチド<sup>84)</sup> が一例報告されていたが、本報告はチミン体合成のみに限られており、核酸医薬としての薬効評価等はなされていなかった。また第二章では各種2'-N-アシル ALNA の AMO 修飾としての構造活性相関を簡便に調べるための合成法として PEM によるパラレル合成を用いたが、実際に核酸医薬の医薬品製造を見据えると固相合成の原料である各種アミダイトを問題無く合成できることが重要となる。本研究では2'-N-アミノカルボニル ALNA のチミン及び5-メチルシトシンのホスホアミダイトを初めて合成し、固相合成によってそれらを含む種々のオリゴヌクレオチドを合成した。2'-N-アミノカルボニル修飾体の基本的特性を明らかにするため、標的結合能及び3'-酵素分解に対する耐性を他の ALNA 誘導体と比較した。さらに、2'-N-アミノカルボニル ALNA のいくつかの誘導体間の AMO 活性の差を評価した。



**Figure 20.** 2'-alkylaminocarbonyl amino-LNA derivatives used in this study. Base = nucleobase.

## 第一節 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの合成

2'-N-アミノカルボニル ALNA において立体障害、疎水性及び水素結合能のわずかな差異の影響を評価するために、3つのモノマー ALNA[Me-ac]、ALNA[iPr-ac]、ALNA[diMe-ac]を合成した (Figure 20)。ここで略した置換基はそれぞれ 2'-N-メチルアミノカルボニル、2'-N-イソプロピルアミノカルボニル及び 2'-N-ジメチルアミノカルボニルを示す (Scheme 3)。



**Scheme 3.** Synthesis of urea modified amino-LNA phosphoramidites. Reagents and conditions: (i) methylaminoformyl chloride, DIPEA, THF, DMF; (ii) 2-isocyanatopropane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C; (iii) *N,N*-dimethylcarbamoyl chloride, THF, 60°C; (iv) (iPr)<sub>2</sub>NP (Cl) O (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CN, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt. Base = nucleobase.

ALNA[iPr-ac]を含むオリゴヌクレオチドは、以前の PEM での報告<sup>84)</sup>においても、合成されていなかったものである。第三章におけるホスホロアミダイト合成の出発原料は第二章でも前述した **T-1** と <sup>m</sup>C<sup>Bz</sup>-**1** を用いた。メチルアミノホルミルクロリドの存在下で **T-1** および <sup>m</sup>C<sup>Bz</sup>-**1** の選択的 2'-N-メチルアミノカルボニル化により **T-2f** 及び <sup>m</sup>C<sup>Bz</sup>-**2f** が得られた (以降 **f** 系列は ALNA[Me-ac]を含む)。2-イソシアナトプロパン存在下 2'-N-イソプロピルアミノカルボニル化により **T-2g** 及び <sup>m</sup>C<sup>Bz</sup>-**2g** を得た (以降 **g** 系列は ALNA[Me-ac]を含む)。N,N-ジメチルカルバモイルクロリド存在下で 2'-N-ジメチルアミノカルボニル化を行い、**T-2h** 及び <sup>m</sup>C<sup>Bz</sup>-**2h** が得られた (以降 **h** 系列は ALNA[Me-ac]を含む)。次いで、**T-2f/2g/2h** 及び <sup>m</sup>C<sup>Bz</sup>-**2f/2g/2h** の 3' 位の水酸基を標準的な条件でホスフィチル化し、ホスホロアミダイト **T-3f/3g/3h**、及び <sup>m</sup>C<sup>Bz</sup>-**3f/3g/3h** を得た。各ステップの合成収率を Table 4 にまとめた。

**Table 4.** Yield of 2'-*N*-aminocarbonyl ALNA derivatives.

Modification	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Yield %			
			Base = T		Base = <sup>m</sup> C (Bz)	
			3'-OH	amidite	3'-OH	amidite
ALNA[Me-ac]	H	Me	<b>T-2f</b> : 100	<b>T-3f</b> : 79	<sup>m</sup> <b>C<sup>Bz</sup>-2f</b> : 63	<sup>m</sup> <b>C<sup>Bz</sup>-3f</b> : 75
ALNA[iPr-ac]	H	iPr	<b>T-2g</b> : 100	<b>T-3g</b> : 80	<sup>m</sup> <b>C<sup>Bz</sup>-2g</b> : 83	<sup>m</sup> <b>C<sup>Bz</sup>-3g</b> : 75
ALNA[diMe-ac]	Me	Me	<b>T-2h</b> : 100	<b>T-3h</b> : 67	<sup>m</sup> <b>C<sup>Bz</sup>-2h</b> : 79	<sup>m</sup> <b>C<sup>Bz</sup>-3h</b> : 75

合成したホスホロアミダイトを固相合成に用い、第三章で新たに合成したオリゴヌクレオチドを Table 5 に記載した。合成した配列は第二章で示した **ON34**、**ON35**、**ON39** と同じ配列で有り、同じ下線部の位置に ALNA 誘導体の化学修飾が施されている。これらの化学修飾を第二章と同様の記述方法にて記した (オリゴヌクレオチドにおいても **f** 系列は ALNA[Me-ac]、**g** 系列は ALNA[iPr-ac]、**h** 系列は ALNA[diMe-ac] を意味する)。また第二章と同様にここで記述したすべてのオリゴヌクレオチドの合成に Activator 42<sup>®</sup> 溶液を使用した。DMTr カチオン測定に基づいて、各カップリングは 90% 以上の収率で進行した。オリゴヌクレオチドを担体から切り出し、RT-HPLC 精製を実施した。オリゴヌクレオチドの純度を RP-HPLC 分析により測定し、質量分析により確認した。

**Table 5.** Oligonucleotides synthesized in this chapter.

Seq No.	Sequence (5' to 3')	Modification of <u>X</u>	MS		HPLC Purity (UV area%)	HPLC Retention Time (min)
			Calcd.	Found.		
<b>ON34f</b>	GTGTT <u>TTTT</u> GCT	ALNA [Me-ac]	3717.5	3718.1	98.5	12.6
<b>ON34g</b>	GTGTT <u>TTTT</u> GCT	ALNA [iPr-ac]	3745.5	3746.1	98.0	12.7
<b>ON34h</b>	GTGTT <u>TTTT</u> GCT	ALNA [diMe-ac]	3731.5	3732.1	98.4	12.6
<b>ON35f</b>	TTTTTT <u>TTT</u>	ALNA [Me-ac]	3064.0	3064.0	97.8	12.3
<b>ON35g</b>	TTTTTT <u>TTT</u>	ALNA [iPr-ac]	3092.1	3092.4	98.6	12.6
<b>ON35h</b>	TTTTTT <u>TTT</u>	ALNA [diMe-ac]	3078.1	3078.3	98.0	12.3
<b>ON39f</b>	ACAT <u>C</u> AGT <u>C</u> TGAT <u>AAG</u> <u>C</u> TA	ALNA [Me-ac]	6709.6	6708.7	99.7	15.7
<b>ON39g</b>	ACAT <u>C</u> AGT <u>C</u> TGAT <u>AAG</u> <u>C</u> TA	ALNA [iPr-ac]	6849.9	6849.2	99.4	16.2
<b>ON39h</b>	ACAT <u>C</u> AGT <u>C</u> TGAT <u>AAG</u> <u>C</u> TA	ALNA [diMe-ac]	6779.8	6779.9	99.0	15.8

Capital letters; DNA, Bold; 2'-MOE, Underline; ALNA derivatives (C denote 5-methylcytosine). All phosphodiester linkages of **ON39** were replaced by PS linkages.

## 第二節 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの物性評価

ALNA[Me-ac]、ALNA[iPr-ac]及び ALNA[diMe-ac]を含むオリゴヌクレオチド (**ON34f**、**ON34g**、**ON34h**) と相補的 ssDNA 又は ssRNA により形成された二本鎖の熱安定性を融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価し、得られた融解温度  $T_m$  を Table 6 に示す。**ON34 (DNA)**、**ON34 (LNA)**、**ON34b** の  $T_m$  値は第二章を参照している。ssDNA に対する  $T_m$  値に焦点を当てると **ON34 (DNA)** が 51 °C であるのに対して、**ON34 (LNA)**、**ON34b** は 53 °C と上昇している一方で **ON34f** 及び **ON34h** は 51 °C、50 °C と低下または維持していた。ssRNA ( $X = A$ ) に対する  $T_m$  値に焦点を当てると、**ON34f**、**ON34g**、**ON34h** は **ON34 (DNA)** よりも高い結合親和性 ( $\Delta T_m = +2.0 \sim +3.0$  °C / 修飾箇所) を示した。このことから **ON34f**、**ON34h** は RNA 選択性が向上していることが示された。ssRNA に対する **ON34g** の塩基識別値 (完全マッチした二重鎖 ( $X = A$ ) と最も安定なミスマッチ二重鎖 ( $X = G$ ) の間の  $T_m$  の差) は 9 °C であり、**ON34 (LNA)** や **ON34b** よりもそれぞれ 4 °C または 3 °C 高かった。2'-N-イソプロピルアミノカルボニル基は、対となるグアニンの 2 位アミノ基と立体的に衝突し、T · G 不安定塩基対を形成すると予想される。第二章で示した 2'-N-ベンゾイル-2'-amino-LNA についても同様の傾向が認められており、これらの優れた塩基識別能は、治療用核酸として標的外 RNA への結合を減少させる可能性が示唆される。

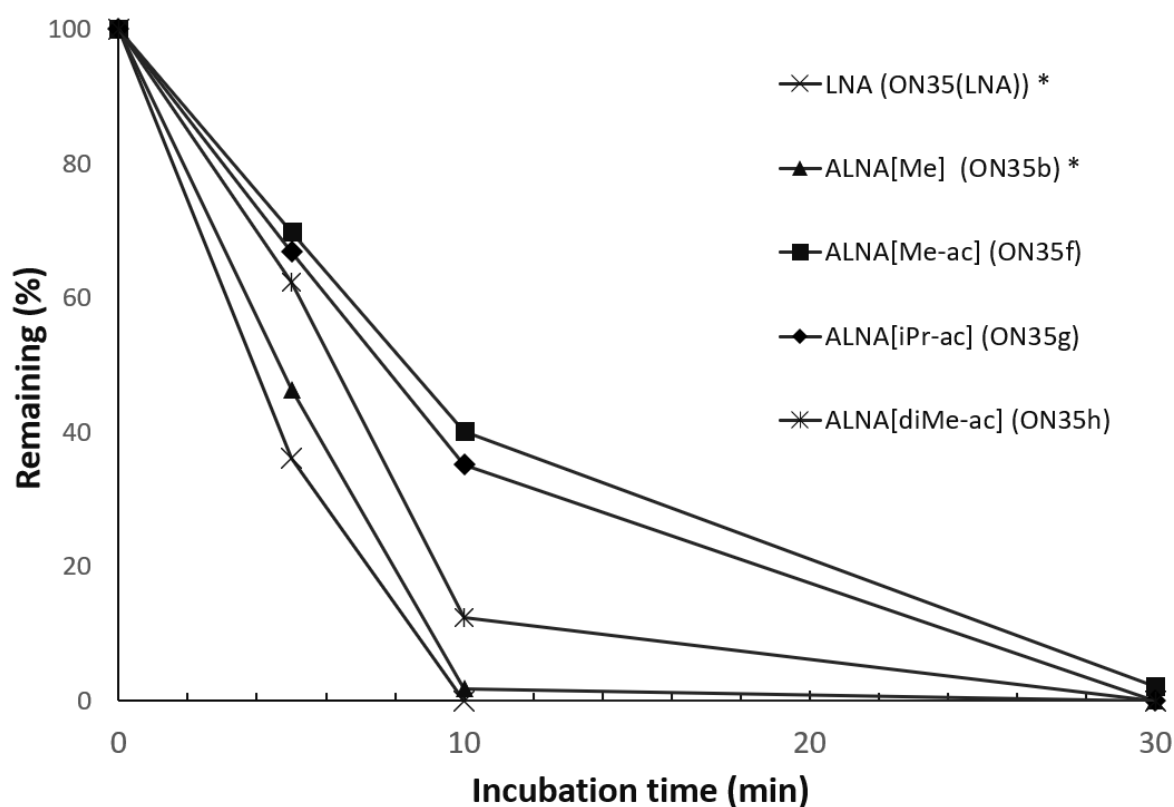
**Table 6.**  $T_m$  values from UV-melting curves (260 nm), the duplexes formed between **ON34s**, and fully matched/one-base-mismatched ssRNAs or ssDNAs <sup>a</sup>

Seq No.	$T_m$ ( $\Delta T_m$ /mod.) [°C] toward ssDNA, 5'-AGCAAAA AA CGC -3'	$T_m$ ( $\Delta T_m$ /mod.) [°C] toward ssRNAs, 5'-AGCAAAXAACGC-3'				base discrimination values
		$X = A$	$X = U$	$X = G$	$X = C$	
<b>ON34 (DNA)</b>	51	48	32	42	30	6
<b>ON34 (LNA)</b>	53 (+2)	52 (+4)	38 (+6)	47 (+5)	36 (+6)	5
<b>ON34b</b>	53 (+2)	51 (+3)	37 (+5)	45 (+3)	38 (+8)	6
<b>ON34f</b>	51 (0)	51 (+3)	38 (+6)	44 (+2)	36 (+6)	7
<b>ON34g</b>	52 (+1)	51 (+3)	38 (+6)	42 (0)	35 (+5)	9
<b>ON34h</b>	50 (-1)	50 (+2)	39 (+7)	42 (0)	35 (+5)	8

<sup>a</sup> N = 3, Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 100 mM NaCl, and 4  $\mu$ M oligonucleotide. The  $T_m$  values reflect the average of three measurements. ( $\Delta T_m$  /mod.): the change in  $T_m$  value ( $\Delta T_m$ ) per modification compared to the unmodified standard, **ON1 (DNA)**. Italic: RNA, Capital letters: DNA. The base discrimination values are defined as subtraction of the  $T_m$  values of the most stable mismatch duplex ( $X = G$ ) from the  $T_m$  values of the fully matched duplex ( $X = A$ ) in the case of ssRNA.

エキソヌクレアーゼ分解に対する 2'-N-アミノカルボニル修飾オリゴヌクレオチドの安定性を評価した。ALNA[Me-ac]-T、ALNA[iPr-ac]-T 及び ALNA[diMe-ac]-T で置換した **ON35** に対

して、第二章と同様に 3'-エキソヌクレアーゼ (SVPDE) を添加した Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中 37 °C でインキュベートし、HPLC を用いて全長オリゴヌクレオチドの量を分析した。2'-N-アミノカルボニル基との比較のため、ON35 (LNA) と ON35b の第二章の結果も Figure 21 にまとめた。ON35f と ON35g は 10 分後も 40% に近い値を維持しており、他の誘導体も含め最良の結果を示した。ON35h は ON35b と同様であったが、LNA よりも優れていた。これらの結果から、ALNA[Me-ac] 及び ALNA[iPr-ac] は酵素耐性を増強させるための有益な化学修飾であることが示された。



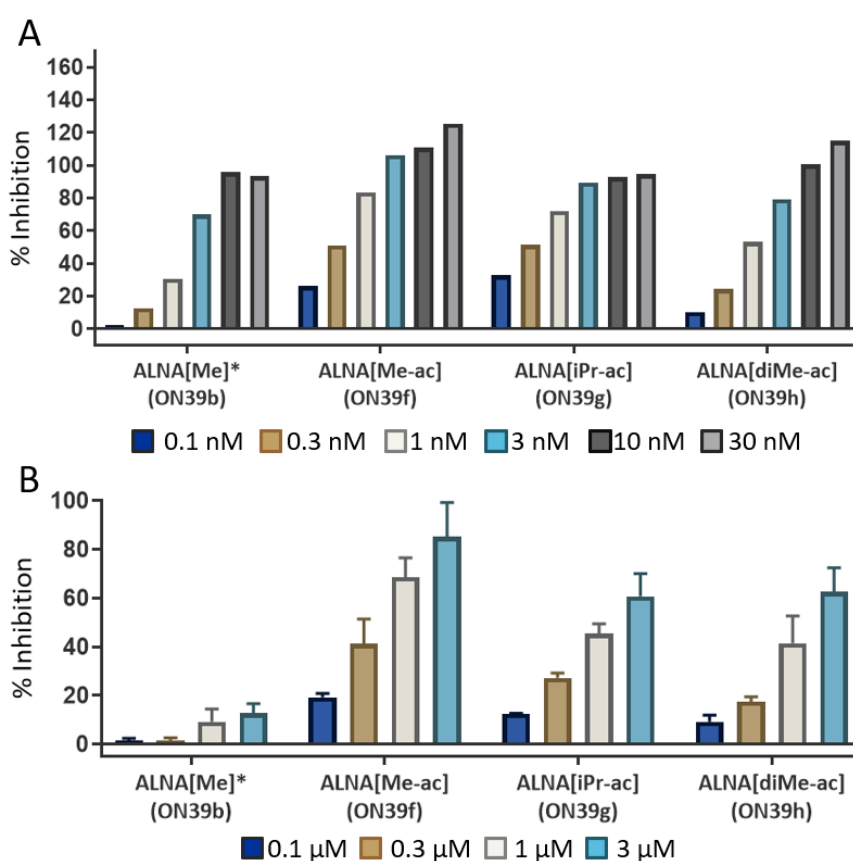
**Figure 21.** Stability of oligonucleotides against SVPDE. Conditions: 0.1  $\mu\text{g}$  SVPDE, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 2.5  $\mu\text{M}$  oligonucleotide at 37 °C (total volume: 200  $\mu\text{L}$ ). The sequence used was 5'-TTTTTTTTTT-3'. T = LNA-T (crosses, ON35 (LNA)), ALNA[Me]-T (triangle, ON35b), ALNA[Ac]-T (circle, ON35d), ALNA[Me-ac]-T (square, ON35f), ALNA[iPr-ac]-T (diamond, ON35g), ALNA[diMe-ac] (asterisk, ON35h).

### 第三節 2'-N-アミノカルボニル amino-LNA 修飾オリゴヌクレオチドの miRNA 阻害活性評価

次に、核酸医薬としての有用性と可能性を検証するために、種々の 2'-N-アミノカルボニル ALNA を含む ON39f–ON39h を第一章、第二章と同じレポーターアッセイにより評価した。第二章で報告した ON39b の結果も比較として Figure 22 にまとめた。合成した化合物の AMO 活性を、トランスフェクション条件下デュアルルシフェラーゼアッセイにより評価した (Figure

22A)。全てのオリゴヌクレオチドは、用量依存的に miRNA-21 阻害活性を示し、ALNA[Me-ac] と ALNA[iPr-ac]が低用量から阻害活性を示し、最も良い結果を示した。さらに、ALNA[Me-ac] と ALNA[iPr-ac]の高い活性は、リポフェクション試薬を使用しない gymnosis 条件にて評価した場合にも維持された (Figure 22B)。 $T_m$  測定により、アミノカルボニル修飾 **ON39f**、**ON39g** 及び **ON39h** の相補 ssRNA との結合親和性を評価した。温度は、それぞれ 68 °C、72 °C及び 68 °C であった。アミノカルボニル誘導体の中で最も高い阻害活性を示した **ON39f** は、最も低い  $T_m$  値を示した。したがって、結合親和性は標的阻害活性と完全には相関しないことが示唆された。全ての AMO は安定な PS 結合を有しているため、酵素耐性が直接影響を受ける可能性は低いと考えられる。第一章や、第二章と同様に、第三章においても ALNA の 2'位のわずかな構造の違いにより活性が大きく変化した。これらの要因について、第一章から第三章の複数の化学修飾を題材にして、miRNA-Ago2-AMO の複合体結晶構造解析を行うなど、今後より詳細な検証が必要である。





**Figure 22.** Effects of modifications on AMO activity. (A) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment under transfection conditions. All data are shown as the mean values ( $n = 3$ ). (B) Inhibition rate of miRNA-21 upon treatment under gymnotic conditions. All data are shown as the mean values  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). To calculate the inhibition rate against miRNA-21 function, we defined the relative luciferase activity of the cells transfected with the miRNA-21 reporter plasmid without AMOs as 0% inhibition, and that of the cells transfected with the reporter plasmid not containing the miRNA-21 target site as 100% inhibition.

## 小括

第三章では、チミン及び5-メチルシトシンの2'-*N*-アルキルアミノカルボニル ALNA ホスホロアミダイトの合成と固相合成による伸長を達成した。2'-*N*-アルキルアミノカルボニル ALNA を含むオリゴヌクレオチドは、高い結合親和性と優れた酵素分解耐性を示した。miRNA-21 阻害活性を評価するデュアルレポーターアッセイは、2'-*N*-メチルアミノカルボニル ALNA が AMO 修飾として有効であることを示唆した。

## 結論

本研究は、核酸医薬の新規クラスとして注目される miRNA 阻害オリゴヌクレオチドにおける化学修飾と薬理活性の関連性について評価し、次のことを解明した。

第一章では、グアニジン架橋型核酸 GuNA に焦点を当て、GuNA 修飾 AMO を始めて合成した。その結果、GuNA 修飾 AMO は同じ架橋型核酸である LNA で最適化された修飾パターンでは活性を示さず、異なる構造活性相関を示すことを明らかにした。一方で、GuNA の導入位置をシード領域、非シード領域に分けて詳細に最適化することにより、非常に高活性な GuNA 修飾 AMO を取得するに至った。また X 線結晶構造解析からのモデリングによって、GuNA を AMO のポジション 7 に導入することで、グアニジン構造と miRISC を構成する Argonaute 2 との新たな相互作用が寄与している可能性を明らかにした。

第二章では、オリゴヌクレオチドの固相合成後の伸長後修飾反応 (PEM) を用いて新規アシル ALNA が導入されたオリゴヌクレオチドの合成に成功した。これらの化合物の基本特性として相補鎖形成能を評価し、ALNA[formyl]の塩基識別能が高いことを明らかにした。またヌクレアーゼ耐性が ALNA[formyl] > ALNA[Ac] > ALNA[Ph]の順で改善した。さらに miRNA-21 の阻害活性を評価した結果、ALNA[formyl]が非常に高い抗 miRNA 活性を示すことを見出した。さらに AMO のように置換基構造の変化や AMO の修飾パターンの変化が活性に大きく影響するケースには、構造活性相関の検討に PEM 法が有効であることを示した。

第三章では、2'-N-アミノカルボニル ALNA のチミンと 5-メチルシトシンのホスホロアミダイトを初めて合成し、それらを含むオリゴヌクレオチドを合成した。2'-N-アミノカルボニル ALNA を含むオリゴヌクレオチドは、いずれも高い結合親和性及び 3'-酵素分解に対する優れた抵抗性を示した。2'-N-イソプロピルアミノカルボニル体は、高い塩基識別能を示すことを明らかにした。さらに、miRNA-21 阻害活性を評価した結果、2'-N-メチルアミノカルボニル体が非常に高い抗 miRNA 活性を示すことを明らかにした。

## 謝辞

本研究の遂行ならびに本稿の執筆にあたり、  
終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました  
大阪大学大学院薬学研究科 小比賀 聡 教授  
に心より御礼を申し上げます。

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 有澤 光弘 教授、ならびに井上 豪 教授  
に深く感謝致します

本研究にあたり、多大な御協力と御助言を頂きました  
田辺三菱製薬株式会社の同僚の皆様に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、活発な議論を頂きま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に感謝致します。

最後に、常日頃より支えて頂きました家族に心より感謝いたします。

## 実験の部

低分子化合物の合成に関しては、以下の 400 MHz NMR スペクトロメータを用いて、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C-NMR 及び <sup>31</sup>P-NMR スペクトルを記録した。化学シフト値は、<sup>1</sup>H NMR では内部テトラメチルシラン (0.00 ppm) 又は残留クロホルム (7.26 ppm) に対する  $\delta$  値 (ppm)、<sup>13</sup>C NMR では内部テトラメチルシラン又はクロホルム-d ( $\delta = 77.0$  ppm)、<sup>31</sup>P NMR では 0.05% 水溶液 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ( $\delta = 0.00$  ppm) として示した。カラムクロマトグラフィーには、シリカゲル (Wakogel<sup>®</sup> 60 N、富士フイルム和光(株)) 又は充填済みシリカゲル (ハイフラッシュ-M、L 又は 3 L、山善) を用いた。反応の進行はガラス板上の分析薄層クロマトグラフィー (TLC) (TLC シリカゲル 60F 254) によりモニターし、UV 又は LC/MS により分析した。すべての新規低分子化合物の高分解能質量スペクトルを Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL を用いて測定することで同定した。

### 第一章第一節の実験

#### オリゴヌクレオチド合成

LNA で修飾された **ON1** は、著者がデザインし Gene Design 社で委託合成した。**ON1** は MALDI-TOF MS 分析によって同定され、RP-HPLC の純度は下記の条件にて測定された。GuNA 修飾オリゴヌクレオチド (**ON2**–**ON33**) は以前に我々のグループが報告したプロトコル<sup>90)</sup> に従って合成した。以前の報告<sup>90)</sup> に従い合成した各種塩基 (**A<sup>bz</sup>**, **T**, **G<sup>dp</sup>**, **ibu**, **mC<sup>bz</sup>**) を有する GuNA 修飾ホスホロアミダイトを、0.1 M のアセトニトリル溶液に調整し、Molecular Sieves Pack 3 A (富士フイルム和光) を用いて脱水した。オリゴヌクレオチドの固相合成は ns-8 II オリゴヌクレオチド合成装置 (Gene Design が製造) を用いて実施し、0.2–1  $\mu$ mol の NittoPhase<sup>®</sup> UnyLinker<sup>™</sup> 50, 80, 200 (Kinovate Life Sciences) または Universal Q SynBase CPG 500/110 を固相担体として使用して伸長を行った。オリゴヌクレオチド伸長のプロトコルは、ns-8 II の既定のプロトコルに従い、アミダイトとのカップリング反応は 8–10 分に設定した。合成はトリチルオフモードで行った。Activator 42<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) をカップリング反応におけるアクチベータとして用いた。固相合成後のカラムを 50% トリエチルアミン / アセトニトリル溶液で 30 分以上処理したのち、溶媒を減圧留去し、1.0 M TBAF / テトラヒドロフラン溶液 1 mL を加え 65°C で 8 時間加熱した。室温に戻して 28% アンモニア水溶液を 1 mL 加えて 65°C、8 時間処理した。溶媒を減圧留去したのち、1.0 M pH 5.0-5.2 のリン酸水溶液 100  $\mu$ L と 5 M の塩化ナトリウム水溶液 100  $\mu$ L とエタノール 750  $\mu$ L を加えた。ボルテックスと簡易遠心分離を行い–20°C の冷凍庫で 2 時間冷却した。4°C、15000 G で 30 分間遠心分離を行い沈殿させた。無色上清をピペットで除いた。冷やした 75% エタノール水溶液を加えて 4°C、15000G で 30 分間遠心分離を行い、上清を除いた。沈殿に 200  $\mu$ L の DMSO を加えてボルテックスを行ったのち pH 8.5 10 mM のリン酸バッファーを 600  $\mu$ L 加えた。これを PVDF の GDX フィルター-13mm で 1 mL のシリンジを用いて濾過した。オリゴヌクレオチドを簡易ゲル濾過カラム (NAP<sup>™</sup>-10, Cytiva) で前処理して分子量 3000 以下の低分子成分を予め除いたのち、それらを逆相高速液体クロマトグラフィー

(HPLC) (Waters XBridge™ Oligonucleotide BEH C18 OBD™ Prep カラム、130Å、2.5µm, 10 mm×50 mm) により精製した。ON2-33の純度を RT-HPLC (Waters XBridge (tm) OST C18 2.5µm, 4.6×50 mm を有する島津製 HPLC システム) によって分析した。移動相はアセトニトリルと 20 mM 酢酸ヘキシルアミン水溶液を用いた。ほとんどのオリゴヌクレオチドの HPLC 純度は 95%以上であったが、いくつかのオリゴヌクレオチドの純度は 93%以上であった。HPLC 分析において、いくつかの場合に複数のピークが観察されたが、一般的に PS 結合を含むオリゴヌクレオチドではホスホロチオエート部のジアステレオマーの影響によりしばしば複数のピークが認められることがある。MS 測定により複数のピークがいずれも目的物であることが確認されている。溶出液を ZQ mass detector (ESI, Waters) によって質量分析して構造を同定した。MS の測定、HPLC 精製、HPLC 分析は下記の条件にて実施した。ON1-33 の MS の検出結果、および HPLC の純度、溶出時間を Table 1 にまとめた。

オリゴヌクレオチド (ON2-ON33) の化学的安定性に関する知見として、脱保護及び固体担体からの除去において、65 °C, 8 時間の THF 中の 1 M TBAF 溶液又は 65 °C, 8 時間の 28%アンモニア水溶液の条件下で安定であった。また、GuNA 修飾オリゴヌクレオチドは pH 5.2 リン酸塩緩衝条件下で安定であるが、より酸性条件 (pH ≤ 4) では分解されることも確認した。測定のために調製した GuNA を含む AMO 水溶液は、冷蔵庫で 1 年間貯蔵しても著しい劣化を示さないことが確認された。

#### LC/MS 分析条件

Waters ZQ mass detector (ESI)

移動相 A:400 mM HFIP/15 mM TEA 水溶液

移動相 B:メタノール

流量:毎分 0.2 mL

グラジエント条件:2.5 分で 20-30%

カラム:Waters XBridge™ BEH C18, 1.7µm (2.1×100 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

#### RP-HPLC 精製条件

移動相 A:20 mmol/L 酢酸ヘキシルアミン水溶液

移動相 B:アセトニトリル

グラジエント条件:40 分で 10-50%

流量:毎分 4 mL

カラム:Waters XBridge™ Oligonucleotide BEH C18 OBD™ Prep カラム、130Å2.5µm (10×50 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

## RP-HPLC 分析条件

### ON1 (Gene Design 社にて委託合成)の場合 :

移動相 A:100 mM HFIP/8 mM TEA 水溶液

移動相 B:メタノール

グラジエント条件:20 分(5-20%)または 20 分(5-30%)

流量:毎分 1 mL

カラム:Waters XBridge™ BEH C18 2.5 $\mu$ m (4.6 $\times$ 75 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

### ON2-ON33 の場合 :

移動相 A:20 mmol/L 酢酸ヘキシルアミン水溶液

移動相 B:アセトニトリル

グラジエント条件: 20 分(5-50%)、22.5 分(10-50%)、または 18 分(10-65%)

流量:毎分 1 mL

カラム:Waters XBridge™ BEH C18 130Å2.5 $\mu$ m (4.6 $\times$ 50 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

## ルシフェラーゼレポーターアッセイ

10% ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、Human embryonic kidney (HEK293) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 細胞を 5% CO<sub>2</sub>、37 °C で培養し、10 cm dish に細胞を播種した (3 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞/ウェル)。翌日、30 uL FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Promega、米国ウィスコンシン州メイディソン) を用いて、細胞に 10 ug の miRNA-21 レポータープラスミドをトランスフェクションした。miRNA-21 レポータープラスミドを導入した細胞を、24 時間後に 96 ウェルプレート (3 $\times$ 10<sup>4</sup> 細胞/100 uL/ウェル) にプレートした。同日、試薬の添付プロトコルに従って Lipofectamine RNAiMAX 試薬 (Thermo Fisher Scientific、米国マサチューセッツ州ウォルサム) を用いて、細胞にトランスフェクション試薬を用いて miRNA-21 AMO を添加した。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を回収し、試薬の添付プロトコルに従って Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて分析した。ウミシイタケルシフェラーゼの活性をホタルルシフェラーゼによって補正し、発光強度を計算した。非トランスフェクション (gymnosis) 実験では、トランスフェクション試薬を用いて miRNA-21 レポータープラスミドを導入した細胞を 96 ウェルプレート (1 $\times$ 10<sup>4</sup> 細胞/100 uL/ウェル) に播種し、トランスフェクション試薬非存在下で miRNA-21 AMO で処理した。処理 96 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を分析

した。各実験は独立して2回又は3回行った。miRNA-21機能に対する阻害率を計算するために、AMO無しのmiRNA-21レポータープラスミドを導入した細胞のルシフェラーゼ活性を0%阻害と定義し、miRNA-21の相補配列を含まない空のpsiCHECK-2プラスミドを導入した細胞のルシフェラーゼ活性を100%阻害と定義した。

## プラスミド

miRNA-21-5p相補配列をpsiCHECK-2プラスミドにクローニングしたmiRNA-21 reporter plasmid (MiCheck miRNA Biosensor Clone, Promega)を用いた。

## 融解温度 ( $T_m$ 値) 測定

融解実験は $T_m$ 分析付属品を備えたJASCO V-730分光計で行った。標的鎖はGene Design社から購入した。標的RNAとオリゴヌクレオチドの等モル量を100 mM塩化ナトリウムを含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し、最終鎖濃度を4  $\mu$ M(測定オリゴヌクレオチドの塩基長が< 19-merの場合)または2  $\mu$ M(測定オリゴヌクレオチドの塩基長が> 19-merの場合)に調製した。試料を95  $^{\circ}$ Cに加熱して変性させ、その後ゆっくりと35  $^{\circ}$ Cに戻してアニールした。30  $^{\circ}$ C–90  $^{\circ}$ Cの温度範囲で、走査速度0.5  $^{\circ}$ C/minで、260 nmにおける融解プロファイルを記録した。生成した二本鎖の $T_m$ 値は融解曲線解析を用いて計算した。3回の独立した実験の平均から中線法または微分法を用いて結果を算出した。

## 分子モデリング

Ago2 錯体 (PDB ID:4W5O)<sup>98)</sup>の結晶構造中のmiRNA-122を修飾した。標的ヌクレオチドの糖部を環化し、GuNA又はLNAでヌクレオチドを置換するために必要な置換基を加えた。次に、置換ヌクレオチドのトポロジー及びAgo2との相互作用モードを最適化するために、構造エネルギーを次のように最小化した:ヌクレオチドから5Å以内のAgo2のヌクレオチド及び残基をエネルギー的に最小化して、ヌクレオチド近傍のAgo2の立体配座を緩和した。置換ヌクレオチドに隣接する残基とRNAの構造エネルギーを最小化した。アミノ酸残基とRNAの間の位置を占めることによりアミノ酸残基とRNAの立体配座の安定化に重要な役割を果たしたので、結晶構造中のいくつかの水分子は除去されなかった。エネルギー最小化モデルを比較するために、修正モデルで最適化されたものに対応する元の結晶構造のmiRNA-122ヌクレオチドとAgo2残基をエネルギー的に最適化した。モデリングはMolecular Operating Environment (MOE)を用いて行った。<sup>139)</sup>

## 第二章の実験

第二章における化合物 **2a** および **3a** では、トリフルオロアセチルアミド基でのロータマーの効果により、<sup>1</sup>H NMR において異なる化学シフトでいくつかのプロトンシグナルが観察された。加えて、一般的にホスホロアミダイト化合物はリン原子の立体化学によりジアステレオマーの混合物として得られる。したがって本章においては **2a**、**3a** 及び **3b** の一部の <sup>1</sup>H NMR シグナル積分値が、1/2 H 又は 2/3 H などのように分数で表されている。なお、<sup>13</sup>C NMR のシグナル数が組成式の炭素数よりも多い理由についてもロータマーおよびジアステレオマーの混合物である影響によるものである。

### 1-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-5-methyl-pyrimidine-2,4-dione (**T-2a**)

澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した化合物 **T-1** (3.00 g, 5.25 mmol) のメタノール (30 mL) 溶液を攪拌後、*N,N*-ジメチルピリジン-4-アミン (640 mg, 5.2 mmol)、トリフルオロ酢酸エチル (1.25 mL, 10.5 mmol) を順次加えた。室温にて 69 時間攪拌したのち減圧濃縮した。メタノールを完全に留去してクロロホルムに置き換えるために再度クロロホルム (5 mL) を加え減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール、100/0 → 97/3 v/v) で精製し、化合物 **T-2a** (3.28 g, 収率 94%) を桃色アモルファスとして得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.15 (1/2H, brs), 8.48 (1/2H, s), 7.64 (1/2H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.59 (1/2H, d, *J* = 1.0 Hz), 7.42–7.47 (2H, m), 7.25–7.36 (13/2H, m), 7.20–7.25 (1/2H, m), 6.83–6.88 (4H, m), 5.59 (1H, d, *J* = 3.1 Hz), 5.16 (1/2H, s), 4.80 (1/2H, s), 4.43–4.46 (1/2H, m), 4.38 (1/2H, d, *J* = 3.6 Hz), 3.78–3.81 (6H, m), 3.70–3.77 (1H, m), 3.57–3.67 (3/2H, m), 3.46–3.55 (3/2H, m), 3.37 (1/2H, brs), 2.54 (1/2H, d, *J* = 3.6 Hz), 1.16 (3H, s); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 171.3, 164.1, 164.0, 158.8, 158.8, 156.8, 156.6, 156.5, 156.2, 150.2, 149.9, 144.3, 144.2, 135.2, 135.2, 135.1, 135.1, 134.6, 134.5, 130.1, 129.2, 128.2, 128.1, 128.1, 127.3, 127.2, 117.4, 117.3, 114.5, 114.5, 113.4, 113.4, 113.2, 110.7, 110.5, 88.5, 87.1, 87.0, 87.0, 86.8, 86.4, 77.2, 70.2, 68.6, 64.4, 63.3, 60.4, 59.1, 58.8, 55.3, 55.3, 52.8, 52.5, 21.1, 14.2, 12.5, 12.5; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>F<sub>3</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 666.2069. Found: 666.2064.

### *N*-[9-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]purin-6-yl]benzamide (**A<sup>bz</sup>-2a**)

**T-2a** の同様の方法を用いて、澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した **A<sup>bz</sup>-1** (200 mg, 0.28 mmol) から白色ガム状固体として化合物 **A<sup>bz</sup>-2a** (178 mg, 収率 81%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.33 (1/2H, s), 9.29 (1/2H, s), 8.58 (1/2H, s), 8.50 (1/2H, s), 8.26 (1H, d, *J* = 4.1 Hz), 7.83 (2H, brt, *J* = 6.6 Hz), 7.46–7.54 (1H, m), 7.37–7.45 (4H, m), 7.21–7.33 (6H, m), 7.11–7.21 (1H, m), 6.80 (4H, dt, *J* = 8.8, 2.0 Hz), 6.04 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 5.37 (1/2H, s), 5.21 (1/2H, s), 5.01 (1/2H, brs), 4.90 (1/2H, brs), 4.67 (1H, brd, *J* = 14.4 Hz), 3.78–3.94 (3/2H, m), 3.74 (6H, t, *J* = 1.7 Hz), 3.72 (1/2H, m), 3.54–3.65 (2H, m); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.9, 158.7, 158.6, 157.3, 156.9, 156.5, 155.7, 152.7, 150.5, 149.2, 144.2, 142.0, 140.7, 140.6, 139.5, 135.4, 135.3, 135.2, 133.0, 130.0, 130.0, 129.2, 128.9, 128.0, 128.0, 127.8, 127.7, 127.1, 123.0, 120.3, 117.4, 114.6, 113.6, 113.3, 113.1, 111.7, 88.1, 86.8, 86.1, 85.4, 77.3, 71.4, 70.0, 64.3, 62.8, 60.5, 59.8, 59.7, 55.2, 53.0, 21.0, 14.2; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 779.2447. Found: 779.2441.



**9-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-2-(2-methylpropanoylamino)purin-6-yl]-*N,N*-diphenylcarbamate (**G<sup>dpc,ibu-2a</sup>**)**

**T-2a** と同様の方法を用いて、澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した **G<sup>dpc,ibu-1</sup>** (200 mg、0.23 mmol) から白色アモルファスとして化合物 **G<sup>dpc,ibu-2a</sup>** (169 mg, 収率 77%) を得た。*N,N*-ジメチルピリジン-4-アミンはグアニンの保護基が除去されているため、本合成には使用しなかった。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.93 (2/3H, s), 8.24 (1/3H, s), 8.07 (1/3H, s), 7.65 (2/3H, s), 7.30–7.50 (10H, m), 7.24–7.29 (7H, m), 7.12–7.23 (2H, m), 6.76–6.82 (4H, m), 5.86 (1/3H, s), 5.72 (2/3H, s), 5.58 (2/3H, s), 5.38 (1/3H, s), 5.09 (1/3H, s), 4.90 (2/3H, s), 3.88–4.03 (2H, m), 3.74 (6H, d, *J* = 2.3 Hz), 3.35–3.56 (2H, m), 2.43–2.68 (1H, m), 1.12–1.22 (6H, m); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 175.3, 175.1, 171.2, 158.6, 156.5, 156.8, 155.9, 155.8, 153.3, 152.8, 151.3, 151.2, 150.3, 150.2, 144.4, 143.8, 143.6, 141.7, 135.5, 135.4, 135.4, 135.3, 130.0, 129.2, 128.0, 127.9, 126.9, 121.4, 120.6, 117.8, 117.6, 117.5, 114.8, 114.7, 113.2, 86.7, 86.4, 86.4, 86.0, 85.6, 84.7, 77.3, 74.6, 73.4, 64.7, 63.5, 60.9, 60.7, 60.4, 55.2, 53.6, 53.5, 36.7, 36.6, 21.0, 20.6, 19.3, 19.2, 19.1, 19.0, 14.2, 14.0; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>51</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>F<sub>3</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 956.3236. Found: 956.3237.

***N*-[1-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-4-yl]benzamide (**<sup>m</sup>C<sup>bz-2a</sup>**)**

**T-2a** と同様の方法を用いて、澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した **<sup>m</sup>C<sup>bz-1</sup>** (150 mg、0.22 mmol) から白色アモルファスとして化合物 **<sup>m</sup>C<sup>bz-2a</sup>** (102 mg, 収率 60%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 13.27 (1H, brs), 8.10–8.29 (2H, m), 7.81 (1/2H, brs), 7.74 (1/2H, brs), 7.43–7.51 (3H, m), 7.30–7.40 (7H, m), 7.13–7.28 (2H, m), 6.80–6.89 (4H, m), 5.57 (1/2H, s), 5.46–5.51 (1/2H, m), 5.01–5.07 (1/2H, m), 4.77–4.83 (1/2H, m), 4.33–4.45 (1H, m), 3.80–4.05 (1H, m), 3.76–3.81 (6H, m), 3.59–3.74 (3/2H, m), 3.56 (1H, brs), 3.30–3.55 (1/2H, m), 1.65–2.03 (3H, m); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 158.9, 158.8, 158.6, 156.6, 147.3, 144.2, 139.4, 135.2, 135.1, 132.7, 132.6, 130.1, 130.1, 129.8, 129.1, 128.2, 128.2, 128.1, 127.8, 127.8, 127.5, 127.3, 127.2, 127.1, 117.4, 117.3, 114.4, 113.5, 113.5, 113.2, 88.7, 88.1, 87.2, 87.1, 87.1, 86.7, 81.5, 77.2, 70.1, 68.3, 64.2, 62.8, 60.5, 58.8, 55.3, 52.5, 52.1, 21.0, 14.2, 13.6; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>F<sub>3</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 769.2491. Found: 769.2480.

**1-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-5-methylpyrimidine-2,4-dione (**T-2b**)**

澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した化合物 **T-1** (1.01 g, 1.77 mmol) のメタノール (5.9 mL)、テトラヒドロフラン (8.9 mL) 混合溶液を攪拌後、37%ホルムアルデヒド溶液 (0.16 mL、2.13 mmol)、デカボラン (87 mg、0.71 mmol) を順次添加した。室温にて 15 時間攪拌した。氷冷下、酢酸エチル (20 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (5 mL)、飽和食塩水 (5 mL) を加え、酢酸エチルで抽出操作を行った。有機層を除去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール 100/0 → 94/6 v/v) で精製し、**T-2b** (914 mg, 収率 85%) を白色アモルファスとして得た。<sup>1</sup>H-NMR

(CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.67 (1H, d, *J* = 1.2 Hz), 7.41–7.51 (2H, m), 7.27–7.37 (6H, m), 7.15–7.25 (1H, m), 6.80–6.88 (4H, m), 5.82 (1H, s), 4.21 (1H, s), 3.79 (6H, s), 3.39–3.46 (3H, m), 3.10 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 2.68 (3H, s), 2.40 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 1.66 (3H, s); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.0, 158.7, 149.9, 144.6, 135.6, 135.5, 135.2, 130.1, 130.1, 130.0, 129.9, 128.1, 128.0, 127.0, 113.4, 113.3, 110.2, 89.2, 88.6, 86.5, 81.8, 77.2, 71.0, 67.6, 59.6, 57.9, 55.3, 55.2, 37.4, 12.5; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 584.2402. Found: 584.2403.

***N*-[9-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]purin-6-yl]benzamide (**A<sup>bz</sup>-2b**)**

**T-2b** と同様の方法を用いて、澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した **A<sup>bz</sup>-1** (5.02 g, 7.33 mmol) から淡黄色アモルファスとして化合物 **A<sup>bz</sup>-2b** (3.89 g, 収率 72%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.34 (1H, brs), 8.72 (1H, s), 8.32 (1H, s), 7.99 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.52–7.58 (1H, m), 7.43–7.50 (4H, m), 7.26–7.37 (6H, m), 7.16–7.24 (1H, m), 6.78–6.86 (4H, m), 6.29 (1H, s), 4.34 (1H, s), 3.76 (6H, s), 3.58–3.69 (1H, m), 3.35–3.54 (2H, m), 3.21 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 2.77 (3H, s), 2.64 (2H, d, *J* = 10.0 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.8, 158.6, 152.6, 150.6, 149.5, 144.6, 140.8, 135.7, 135.6, 133.7, 132.7, 130.1, 128.8, 128.1, 127.9, 127.0, 123.4, 113.3, 113.1, 88.8, 86.4, 81.3, 77.3, 72.2, 67.9, 60.4, 58.2, 55.2, 37.9; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>[M + H]<sup>+</sup>: 697.2780. Found: 697.2770.

**[9-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-2-(2-methylpropanoylamino)purin-6-yl]-*N,N*-diphenylcarbamate (**G<sup>dpc, ibu</sup>-2b**)**

**T-2b** と同様の方法を用いて、澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した **G<sup>dpc, ibu</sup>-1** (1.50 g, 1.74 mmol) から淡黄色アモルファスとして化合物 **G<sup>dpc, ibu</sup>-2b** (1.07 g, 収率 71%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.22 (1H, s), 8.07 (1H, s), 7.40–7.49 (6H, m), 7.30–7.40 (8H, m), 7.25–7.30 (2H, m), 7.16–7.25 (2H, m), 6.79–6.88 (4H, m), 6.18 (1H, s), 4.29 (1H, brs), 3.77 (6H, s), 3.72 (1H, brs), 3.33–3.51 (2H, m), 3.22 (1H, d, *J* = 10.2 Hz), 3.11 (1H, brs), 2.92 (1H, brs), 2.78 (3H, s), 2.60–2.73 (1H, m), 1.24 (6H, dd, *J* = 6.9, 1.7 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 176.0, 158.6, 156.1, 153.5, 151.9, 150.4, 144.6, 142.0, 141.8, 135.7, 135.6, 130.1, 129.3, 129.2, 128.1, 127.9, 126.9, 121.6, 117.8, 113.2, 88.7, 86.3, 81.5, 77.3, 72.7, 67.8, 60.5, 58.2, 55.2, 38.0, 35.6, 19.3, 19.2; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>50</sub>H<sub>48</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 874.3570. Found: 874.3568.

***N*-[1-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-5-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-4-yl]benzamide (**<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2b**)**

**T-2b** と同様の方法を用いて、澤本らの報告<sup>89)</sup>に従って合成した **<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-1** (1.08 g, 1.60 mmol) から淡黄色アモルファスとして化合物 **<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2b** (836 mg, 収率 76%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 13.41 (1H, brs), 8.27–8.35 (2H, m), 7.85 (1H, d, *J* = 0.9 Hz), 7.41–7.53 (5H, m), 7.35–7.41 (4H, m), 7.27–7.35 (2H, m), 7.20–7.27 (1H, m), 6.82–6.90 (4H, m), 5.86 (1H, s), 4.22 (1H, s), 3.80 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.39–3.50 (3H, m), 3.07 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), 2.69 (3H, s), 2.41 (1H, d, *J* = 9.9 Hz), 1.85–1.89 (3H, m); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 159.9, 158.7, 147.5, 144.6, 137.2, 136.6, 135.6, 135.5, 132.4, 130.1, 129.8, 128.6, 128.1, 128.1, 128.0,

127.3, 127.0, 113.3, 111.3, 89.3, 86.5, 82.2, 77.2, 70.8, 67.4, 59.6, 57.9, 55.2, 37.5, 13.6; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub> [M - H]: 689.2970. Found: 689.2978.

**3-[[*(1R,3R,4R,7S)*-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-yl]oxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxypropanenitrile (T-3a)**

化合物 **T-2a** (6.31 g, 9.45 mmol) の溶液とジクロロメタン (32 mL) を混合し、氷冷下で、ジイソプロピルエチルアミン (6.5 mL、38 mmol)、2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホラミド (6.25 mL、28 mmol) を順次滴下した。室温まで昇温し、4.5 時間攪拌した。氷冷下、5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (30 mL) を加え、ジクロロメタン (15 mL×2) で抽出操作を行った。溶媒を除去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル、70/30 → 50/50 v/v) で精製し、**T-3a** (7.59 g, 収率 87%) を白色泡状固体として得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.42 (1H, brs), 7.63–7.67 (1H, m), 7.42–7.48 (2H, m), 7.22–7.37 (7H, m), 6.80–6.90 (4H, m), 5.63–5.68 (1H, m), 5.23–5.26 (1/3H, m), 4.98 (2/3H, brs), 4.52–4.57 (1H, m), 3.78–3.83 (6H, m), 3.55–3.69 (4H, m), 3.35–3.55 (4H, m), 2.50–2.70 (1H, m), 2.37–2.42 (1H, m), 1.54 (3H, s), 1.06–1.15 (6H, m), 0.94–1.05 (6H, m); <sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.5, 149.9, 149.9, 149.3, 149.3; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>F<sub>3</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 868.3293. Found: 868.3302.

***N*-[9-[[*(1R,3R,4R,7S)*-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]purin-6-yl]benzamide (A<sup>bz</sup>-3a)**

**T-3a** と同様の方法を用いて、**A<sup>bz</sup>-2a** (2.16 g, 2.76 mmol) から白色泡状固体として化合物 **A<sup>bz</sup>-3a** (2.31 g, 収率 80%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.98 (1H, brs), 8.84 (1H, m), 8.29–8.35 (1H, m), 8.03 (2H, m), 7.59–7.66 (1H, m), 7.50–7.57 (2H, m), 7.43–7.50 (2H, m), 7.27–7.40 (6H, m), 7.20–7.26 (1H, m), 6.82–6.89 (4H, m), 6.16 (1H, d, *J* = 7.3 Hz), 5.59 (1/2H, s), 5.36 (1/2H, s), 4.58–4.73 (1H, m), 3.84–3.97 (1H, m), 3.77–3.81 (6H, m), 3.67–3.77 (1H, m), 3.34–3.65 (6H, m), 2.35–2.52 (1H, m), 2.25–2.35 (1H, m), 1.03–1.13 (6H, m), 0.88–1.00 (6H, m); <sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.9, 150.6, 150.3, 150.0; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>50</sub>H<sub>53</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>F<sub>3</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 981.3671. Found: 981.3678.

**9-[[*(1R,3R,4R,7S)*-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-2-(2-methylpropano ylamino)purin-6-yl]-*N,N*-diphenylcarbamate (G<sup>dpc,ibu</sup>-3a)**

**T-3a** と同様の方法を用いて、**G<sup>dpc,ibu</sup>-2a** (1.91 g, 1.84 mmol) から白色泡状固体として **G<sup>dpc,ibu</sup>-3a** (1.73 g, 収率 79%) を調製した。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.22–8.26 (1H, m), 8.11 (1/4H, s), 8.00 (1/4H, s), 7.93 (1/4H, s), 7.84 (1/4H, s), 7.40–7.51 (5H, m), 7.30–7.40 (10H, m), 7.25–7.30 (3/2H, m), 7.20–7.25 (3/2H, m), 6.82–6.88 (4H, m), 6.02–6.08 (1H, m), 5.54 (1/4H, m), 5.44 (1/4H, m), 5.24 (1/4H, m), 5.16 (1/4H, m), 4.60–4.67 (1/3H, m), 4.55–4.60 (2/3H, m), 3.85–3.93 (1/2H, m), 3.77–3.81 (6H, m), 3.60–3.75 (3/2H, m), 3.56–3.60 (1H, m), 3.46–3.56 (2H, m), 3.00–3.45 (3H, m), 2.33–2.56 (1H, m), 2.20–2.32 (1H, m), 1.23–1.29

(6H, m), 1.04–1.12 (6H, m), 0.85–0.97 (6H, m);  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 150.9, 150.0, 149.8, 149.6; HRMS (ESI): Calcd. for  $\text{C}_{60}\text{H}_{64}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{F}_3\text{P}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 1158.4460. Found: 1158.4486.

***N*-[1-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-5-(2,2,2-trifluoroacetyl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-4-yl]benzamide ( $^m\text{C}^{\text{bz}}$ -3a)**

**T-3a** と同様の方法を用いて、 $^m\text{C}^{\text{bz}}$ -2a (5.46 g, 6.60 mmol) から白色泡状固体として化合物  $^m\text{C}^{\text{bz}}$ -3a (5.09 g, 収率 77%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.34–13.50 (1H, m), 8.31 (2H, brd,  $J = 7.7$  Hz), 7.78–7.86 (1H, m), 7.40–7.55 (5H, m), 7.25–7.40 (7H, m), 6.83–6.91 (4H, m), 5.68–5.72 (1H, m), 5.00–5.33 (1H, m), 4.54–4.60 (1H, m), 3.77–3.85 (6H, m), 3.55–3.77 (4H, m), 3.40–3.55 (4H, m), 2.46–2.70 (1H, m), 2.34–2.43 (1H, m), 1.74 (3H, s), 1.05–1.15 (6H, m), 0.93–1.05 (6H, m);  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 150.7, 150.1, 149.4; HRMS (ESI): Calcd. for  $\text{C}_{50}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_9\text{F}_3\text{P}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 971.3715. Found: 971.3727.

**3-[[[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-5-methyl-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-yl]oxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxypropanenitrile (T-3b)**

**T-3a** と同様の方法を用いて、**T-2b** (1.65 g, 2.61 mmol) から無色アモルファスとして化合物 **T-3b** (1.62 g, 収率 79%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.10 (1H, s), 7.78 (1/2H, d,  $J = 1.0$  Hz), 7.73 (1/2H, d,  $J = 1.0$  Hz), 7.42–7.47 (2H, m), 7.27–7.36 (6H, m), 7.20–7.25 (1H, m), 6.80–6.88 (4H, m), 5.70 (1H, d,  $J = 4.11$  Hz), 4.30–4.38 (1/2, m), 4.20–4.27 (1/2, m), 3.77–3.82 (6H, m), 3.70–3.75 (1/2H, m), 3.59–3.65 (1H, m), 3.46–3.58 (4H, m), 3.37–3.46 (1H, m), 3.27–3.37 (1H, m), 2.86–2.90 (1H, m), 2.70–2.80 (1H, m), 2.65–2.69 (3H, m), 2.57 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz), 2.36 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz), 1.50–1.59 (3H, m), 0.94–1.30 (12H, m);  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 148.9, 148.6; HRMS (ESI): Calcd. for  $\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_8\text{P}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 786.3626. Found: 786.3636.

***N*-[9-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino) phosphanyl]oxy-5-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]purin-6-yl]benzamide ( $\text{A}^{\text{bz}}$ -3b)**

**T-3b** と同様の方法を用いて、 $\text{A}^{\text{bz}}$ -2b (3.89 g, 5.56 mmol) から黄色ガム状固体として化合物  $\text{A}^{\text{bz}}$ -3b (4.48 g, 収率 90%) を得た。 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.03 (1H, m), 8.82 (1H, m), 8.42 (1/2H, s), 8.37 (1/2H, s), 8.04 (2H, m), 7.58–7.64 (1H, m), 7.50–7.57 (2H, m), 7.44–7.50 (2H, m), 7.26–7.40 (7H, m), 6.81–6.89 (4H, m), 6.20 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz), 4.38 (1/2H, d,  $J = 10.3$  Hz), 4.29 (1/2H, d,  $J = 7.7$  Hz), 3.96 (1/2H, s), 3.86 (1/2H, s), 3.78–3.81 (6H, m), 3.61–3.75 (1H, m), 3.37–3.55 (5H, m), 2.94–3.11 (2H, m), 2.75–2.83 (3H, m), 2.47 (1H, t,  $J = 6.4$  Hz), 2.31 (1H, t,  $J = 6.2$  Hz), 1.03–1.14 (6H, m), 0.82–0.96 (6H, m);  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 148.9; HRMS (ESI): Calcd. for  $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_7\text{P}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 897.3859. Found: 897.3855.

**[9-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-5-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-2-(2-methylpropanoylamino)purin-6-yl] *N,N*-diphenylcarbamate ( $\text{G}^{\text{dpc, ibu}}$ -3b)**

**T-3b** と同様の方法を用いて、**G<sup>dpc, ibu</sup>-2b** (1.98 g, 2.11 mmol) から無色アモルファスとして化合物 **G<sup>dpc, ibu</sup>-3b** (1.67 g, 収率 73%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.33 (1/2H, s), 8.27 (1/2H, s), 7.99 (1/2H, s), 7.92 (1/2H, s), 7.41–7.52 (6H, m), 7.27–7.40 (11H, m), 7.20–7.24 (2H, m), 6.81–6.87 (4H, m), 6.10 (1/2H, s), 6.07 (1/2H, s), 4.30 (1/2H, d, *J* = 9.8 Hz), 4.22 (1/2H, d, *J* = 7.7 Hz), 3.93 (1/2H, s), 3.84 (1/2H, s), 3.71–3.79 (6H, m), 3.60–3.70 (1H, m), 3.34–3.52 (5H, m), 3.15–3.33 (1H, brs), 2.93–3.10 (2H, m), 2.74–2.78 (3H, m), 2.47 (1H, t, *J* = 6.4 Hz), 2.31 (1H, t, *J* = 6.4 Hz), 1.23–1.31 (6H, m), 1.04–1.09 (6H, m), 0.80–0.95 (6H, m); <sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 149.2, 148.4; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>59</sub>H<sub>67</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 1076.4805. Found: 1076.4812.

***N*-[1-[(1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-5-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-yl]-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-4-yl]benzamide (**<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-3b**)**

**T-3b** と同様の方法を用いて、**<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2b** (1.38 g, 1.87 mmol) から黄色アモルファスとして化合物 **<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-3b** (1.24 g, 収率 75%) を得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 13.42 (1H, brs), 8.32 (2H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.97 (1/2H, s), 7.93 (1/2H, s), 7.40–7.54 (5H, m), 7.23–7.40 (7H, m), 6.82–6.89 (4H, m), 5.76 (2H, d, *J* = 6.2 Hz), 4.37 (1H, d, *J* = 9.8 Hz), 4.27 (1H, d, *J* = 7.2 Hz), 3.79–3.82 (6H, m), 3.67–3.75 (1H, m), 3.40–3.65 (5H, m), 3.30–3.40 (1H, m), 2.90 (1H, t, *J* = 9.3 Hz), 2.65–2.80 (4H, m), 2.57 (2H, t, *J* = 6.2 Hz), 2.35 (2H, t, *J* = 6.4 Hz), 1.69–1.77 (3H, m), 0.95–1.31 (12H, m); <sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 149.0, 148.7; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>49</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>P [M - H]<sup>-</sup>: 887.3903. Found: 887.3901.

### ON34(DNA) および ON34(LNA) の合成

第二章で比較対象として評価した **ON34(DNA)** および **ON34(LNA)** は Gene Design 社で委託合成を行った。MALDI-TOF MS によって同定され、HPLC 分析は下記の条件にて実施された。

### ON34-39a および ON34-39b の合成

第二章の実験項にて上述した各種塩基(A<sup>bz</sup>, T, G<sup>dpc, ibu</sup>, <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>)を有する 2'-*N*-TFA 保護 ALNA のホスホロアミダイトおよび 2'-メチル ALNA のホスホロアミダイトを 0.1 M のアセトニトリル溶液に調整し、Molecular Sieves Pack 3 A (富士フイルム和光) を用いて脱水した。オリゴヌクレオチドの固相合成は ns-8 II オリゴヌクレオチド合成装置 (Gene Design が製造) を用いて実施し、1–2 μmol の NittoPhase® UnyLinker™ 200 (Kinovate Life Sciences) を固相担体として使用して伸長を行った。オリゴヌクレオチド伸長のプロトコルは、ns-8 II の既定のプロトコルに従い、アミダイトとのカップリング反応は 10 分に設定した。合成はトリチルオフモードで行った。Activator 42® (Sigma-Aldrich) をカップリング反応におけるアクチベータとして用いた。得られたオリゴヌクレオチドを 28% アンモニア水溶液で 65 °C、8 時間処理することにより固体担体から切り出した。

### オリゴヌクレオチド (ON34-39a, ON34-39b) の精製及び同定

オリゴヌクレオチドを簡易ゲル濾過カラム (NAP<sup>TM</sup>-10, Cytiva)で前処理して分子量 3000 以下の低分子成分を予め除いたのち、それらを逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (Waters XBridge<sup>TM</sup> Oligonucleotide BEH C18 OBD<sup>TM</sup> Prep カラム、130Å、2.5µm, 10 mm×50 mm) により精製した。ON34-39a、ON34-39b の純度を RT-HPLC (Waters XBridge (tm) OST C18 2.5µm, 4.6×50 mm を有する島津製 HPLC システム) によって分析した。移動相はアセトニトリルと 20 mM 酢酸ヘキシルアミン水溶液を用いた。溶出液を Xevo G2-XS System (Q-Tof, Waters) または ZQ mass detector (ESI, Waters) によって質量分析して構造を同定した。MS の測定、HPLC 精製、HPLC 分析は下記の条件にて実施した。ON34-39a、ON34-39b の MS の検出結果、および HPLC の純度、溶出時間を Table 2 にまとめた。

#### ON34-39c の合成(オリゴヌクレオチドのホルミル化の一般手順)

1 mM ON34a 水溶液 (50 µL, 55 nmol) に対して 1 M ホルミルサッカリン/DMF 溶液 100 µL 及び 3 M ジイソプロピルエチルアミン/DMF 溶液 33 µL を順番に添加した。室温にて 1 時間攪拌後、減圧濃縮した。簡易ゲル濾過カラム (NAP<sup>TM</sup>-10, Cytiva) を用いて精製を行い、HPLC 精製なしに 54 nmol ホルミル修飾オリゴヌクレオチド ON34c を得た。ON35c、ON39c についても ON35a、ON39a を原料にして同様の条件で合成した。オリゴヌクレオチドの純度は十分に高かった (>90%)。全ての修飾オリゴヌクレオチドの総収率を 260 nm での UV 吸収 (OD 260) から計算した。ON 溶液を Xevo G2-XS System (Q-Tof, Waters) または ZQ mass detector (ESI, Waters) によって質量分析して構造を同定した。MS の測定、HPLC 精製、HPLC 分析は下記の条件にて実施した。ON34、ON35c、39c の収率、MS の検出結果、および HPLC の純度、溶出時間を Table 2 にまとめた。

#### ON34-39d の合成 (オリゴヌクレオチドのアセチル化の一般的手順)

1 mM の ON34a 水溶液 (50 µL, 55 nmol) に対して 1 M DMT-MM のメタノール溶液 10 µL、及び 1 M 酢酸の pH 8.0 リン酸緩衝液 20 µL を順番に添加した。反応混合物を室温で終夜攪拌した後、減圧下で濃縮した。HPLC による精製を行わずに簡易ゲル濾過カラム (NAP<sup>TM</sup>-10, Cytiva) を用いて精製を行い、HPLC 精製なしに 55 nmol アセチル修飾オリゴヌクレオチド ON34d を得た。ON35-39d についても ON35-39a を原料にして同様の条件で合成した。オリゴヌクレオチドの純度は十分に高かった (>90%)。全ての修飾オリゴヌクレオチドの総収率を 260 nm での UV 吸収 (OD 260) から計算した。ON 溶液を Xevo G2-XS System (Q-Tof, Waters) または ZQ mass detector (ESI, Waters) によって質量分析して構造を同定した。MS の測定、HPLC 精製、HPLC 分析は下記の条件にて実施した。ON34-39d の収率、MS の検出結果、および HPLC の純度、溶出時間を Table 2 にまとめた。

#### ON34-39d の合成 (オリゴヌクレオチドのベンゾイル化の一般手順)

1 mM の ON34a 水溶液 (50 µL, 55 nmol) を、1 M DMT-MM メタノール溶液 10 µL、及びの 0.5 M 安息香酸の pH 8.0 リン酸緩衝液/DMF (1:1) 混合溶液 40 µL を順番に添加した。反応混合物を室温で

終夜攪拌した後、減圧下で濃縮した。簡易ゲル濾過カラム (NAP<sup>TM</sup>-10, Cytiva) を用いて精製を行い、HPLC 精製なしに 53 nmol ベンゾイル修飾オリゴヌクレオチド **ON34e** を得た。**ON35e**、**ON39e** についても **ON35a**、**ON39a** を原料にして同様の条件で合成した。オリゴヌクレオチドの純度は十分に高かった (RP-HPLC 分析で >90%)。全ての修飾オリゴヌクレオチドの総収率を 260 nm での UV 吸収から計算した。ON 溶液を Xevo G2-XS System (Q-ToF, Waters) または ZQ mass detector (ESI, Waters) によって質量分析して構造を同定した。MS の測定、HPLC 精製、HPLC 分析は下記の条件にて実施した。**ON34**、**ON35e**、**39d** の収率、MS の検出結果、および HPLC の純度、溶出時間を Table 2 にまとめた。

### LC/MS 分析条件

Waters ZQ mass detector (ESI)

移動相 A:400 mM HFIP/15 mM TEA 水溶液

移動相 B:メタノール

流量:毎分 0.2 mL

グラジエント条件:2.5 分で 20–30%

カラム:Waters XBridge<sup>TM</sup> BEH C18, 1.7 $\mu$ m (2.1 $\times$ 100 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

### RP-HPLC 精製条件

移動相 A:20 mmol/L 酢酸ヘキシルアミン水溶液

移動相 B:アセトニトリル

グラジエント条件:40 分で 10–50%

流量:毎分 4 mL

カラム:Waters XBridge<sup>TM</sup> Oligonucleotide BEH C18 OBD<sup>TM</sup> Prep カラム、130Å2.5 $\mu$ m (10 $\times$ 50 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

### RP-HPLC 分析条件

**ON34(DNA)**と **ON34(LNA)** (Gene Design 社で委託合成) :

移動相 A:100 mM HFIP/8 mM TEA 水溶液

移動相 B:メタノール

グラジエント条件:20 分(5-20%)

流量:毎分 1 mL

カラム:Waters XBridge<sup>TM</sup> BEH C18 2.5 $\mu$ m (4.6 $\times$ 75 mm)

カラムオーブンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光度計 (測定波長:260 nm)

第二章で合成したオリゴヌクレオチド:

移動相 A:20 mmol/L 酢酸ヘキシルアミン水溶液

移動相 B:アセトニトリル

グラジエント条件: 20 分(5–50%)、22.5 分(10–50%)、または 18 分(10–65%)

流量:毎分 1 mL

カラム:Waters XBridge™ BEH C18 130Å2.5µm (4.6×50 mm)

カラムオーブンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光度計 (測定波長:260 nm)

### 融解温度 ( $T_m$ 値) 測定

UV 融解実験は、JASCO V-730 又は  $T_m$  分析付属品を装備した ShimadzuUV-1650 分光計を用いて実施した。等モル量の標的 RNA 又は DNA 鎖及び各種オリゴヌクレオチドを、2µM 又は 4µM の最終鎖濃度となるように、100 mM NaCl を含む pH 7.2 の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に溶解した。試料を 95 °C で加熱し、続いて室温まで冷却した。走査速度 0.5 °C/分で 10 °C から 90 °C まで 260 nm で融解プロファイルを記録した。 $T_m$  値 (形成した二本鎖の半解離温度) は、融解曲線から微分法を用いて算出した。

### ヌクレアーゼ耐性評価

SVPDE 0.1µg を 10 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、試料溶液を調製した。評価するオリゴヌクレオチドを 0.5 nmol 添加した試料溶液を 37 °C でインキュベートし、各反応液を規定時間後、等量の 15 mmol/L EDTA (pH 8.0) と混合してヌクレアーゼを失活させ、逆相 HPLC で分析して残存するオリゴヌクレオチド量を算出した。各試料中の全長オリゴヌクレオチドの割合を算出し、分解曲線をプロットした。

### ルシフェラーゼレポーター分析

第一章の実験と同様にして測定した。

### プラスミド

第一章の実験と同様の試薬を使用した。



### 第三章の実験

#### **(1R,3R,4R,7S)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-N-methyl-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (T-2f)**

化合物 **T-1** (15.1 g, 26.4 mmol)、DMF (10 mL)、*N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (7.7 mL, 44 mmol) の THF (100 mL) 溶液にメチルアミノホルミルクロリド (2.5 mg, 26.8 mmol) の THF (10 mL) 溶液を氷水浴下に加え、氷水浴下のまま 30 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、酢酸エチル (100 mL) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣を *i*PrOH で研和し、薄茶色アモルファス (16.6 g, 収率 100%) の化合物 **T-2f** を得た。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.24 (brs, 1H), 7.66 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 7.44–7.48 (m, 2H), 7.28–7.36 (m, 6H), 7.21–7.25 (m, 1H), 6.84 (dd, *J* = 9.0, 1.8 Hz, 4H), 5.46 (s, 1H), 5.24 (brd, *J* = 4.1 Hz, 1H), 4.32–4.37 (brs, 1H), 4.27–4.32 (brs, 1H), 4.25–4.28 (brd, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.42–3.52 (m, 4H), 2.77 (d, *J* = 4.6 Hz, 3H), 1.65 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.1, 158.7, 158.5, 151.2, 144.5, 135.5, 135.3, 134.8, 130.2, 130.1, 128.1, 128.0, 127.1, 113.3, 110.7, 88.5, 86.8, 86.6, 77.3, 69.8, 68.4, 62.3, 59.4, 55.2, 52.1, 27.4, 22.9, 20.6, 12.5; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M - H]: 627.2460. Found: 627.2455.

#### **(1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-N-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2f)**

化合物 <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-1 (150 mg, 0.22 mmol) 及びトリエチルアミン (33 μL, 0.24 mmol) の THF (1.0 mL) 溶液にメチルミノホルミルクロリド (22 mg, 0.23 mmol) の THF (1.2 mL) 溶液を氷水浴下に加え、室温で 1 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、酢酸エチル (5 mL) で抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル, 50/50 → 0/100 v/v) で精製し、白色アモルファスとして化合物 <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2f を得た (102 mg, 収率 63%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.47 (brs, 1H), 8.27 (brs, 2H), 7.77 (brs, 1H), 7.40–7.50 (m, 5H), 7.26–7.40 (m, 6H), 7.17–7.25 (m, 1H), 6.80–6.90 (m, 4H), 5.47 (s, 1H), 5.33 (brs, 1H), 4.87 (brs, 1H), 4.20–4.40 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.40–3.60 (m, 4H), 2.70 (brs, 3H), 1.80 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 158.7, 158.7, 158.3, 144.5, 135.4, 135.3, 132.6, 130.1, 129.9, 128.1, 128.0, 127.1, 113.3, 88.6, 86.7, 77.3, 70.0, 62.0, 59.2, 55.2, 52.1, 27.4, 13.6; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> [M - H]: 730.2882. Found: 730.2877.

#### **(1R,3R,4R,7S)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-N-isopropyl-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (T-2g)**

化合物 **T-1** (1.50 g, 2.6 mmol) のジクロロメタン (26 mL) 溶液に氷水浴下で 2-イソシアナトプロパン (0.27 mL, 2.7 mmol) を加え、1 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) 及び酢酸エチル (10 mL) を加え、酢酸エチル (10 mL×2) で抽出した。有機層を飽和食塩水 (10 mL) で洗

浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル 50/50→0/100 v/v) で精製し、淡黄色アモルファスとして化合物 **T-2g** を得た (1.90 g, 収率 100%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.41 (brs, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.46 (d, 2H, *J*=7.7 Hz), 7.32–7.37 (m, 4H), 7.25–7.31 (m, 2H), 7.18–7.24 (m, 1H), 6.83 (dd, *J* = 1.2, 8.9 Hz, 4H), 5.49 (s, 1H), 4.93 (brd, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.48 (s, 1H), 4.29 (s, 1H), 3.85–3.92 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.40–3.55 (m, 4H), 1.00–1.15 (m, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164.7, 158.7, 157.4, 150.5, 144.5, 135.5, 135.4, 134.9, 130.2, 130.1, 128.1, 128.0, 127.0, 113.3, 110.4, 88.5, 86.7, 77.3, 70.0, 68.4, 62.2, 59.6, 55.2, 52.1, 42.7, 23.2, 22.9, 12.6; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 655.2773. Found: 655.2770.

**(1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-*N*-isopropyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2g)**

化合物 <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-1 (1.30 g, 1.7 mmol) のジクロロメタン (17 mL) 溶液に氷水浴下で2-イソシアナトプロパン (0.17 mL, 1.7 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) 及び酢酸エチル (10 mL) を加え、酢酸エチル (10 mL×2) で抽出した。有機層を飽和食塩水 (10 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル 70/30 → 30/70 v/v) で精製し、淡黄色アモルファスとして化合物 <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2g を得た (1.17 g, 収率 83%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.49 (brs, 1H), 8.27 (brd, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.40–7.53 (m, 5H), 7.21–7.38 (m, 6H), 7.16 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.79–6.87 (m, 4H), 5.44–5.49 (m, 1H), 5.20 (brd, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.57 (brs, 1H), 4.29 (brd, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.82–3.96 (m, 1H), 3.76–3.80 (m, 6H), 3.40–3.56 (m, 4H), 1.82 (s, 3H), 1.09–1.16 (m, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 158.7, 158.7, 158.6, 157.4, 147.4, 144.5, 139.5, 135.5, 135.4, 132.6, 130.1, 129.9, 129.2, 128.2, 128.1, 128.1, 127.8, 127.8, 127.1, 127.0, 113.4, 113.2, 88.6, 86.7, 86.6, 81.4, 77.3, 70.3, 61.8, 59.2, 55.3, 52.2, 42.9, 23.2, 23.1, 13.7; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 758.2195. Found: 758.3192.

**(1R,3R,4R,7S)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-*N,N*-dimethyl-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (**T-2h**)**

化合物 **T-1** (1.51 g, 2.6 mmol)、DMF (1 mL)、*N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (483 μL, 2.8 mmol) の THF (26 mL) 溶液に *N,N*-ジメチルカルバモイルクロリド (255 μL, 2.8 mmol) を氷水浴下で加え、室温で4時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) 及び酢酸エチル (10 mL) を加え、酢酸エチル (10 mL×2) で抽出した。有機層を塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル 50/50 → 0/100 v/v) で精製し、化合物 **T-2h** を淡黄色アモルファスとして得た (1.71 g, 収率 100%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.01 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.33–7.38 (m, 4H), 7.26–7.33 (m, 2H), 7.15–7.25 (m, 1H), 6.80–6.86 (m, 4H), 5.63 (s, 1H), 4.63 (brs, 2H), 4.34 (brs, 1H), 3.76–3.79 (m, 6H), 3.30–3.55 (m, 4H), 2.86–2.91 (m, 6H), 1.64 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164.5, 164.2, 158.6, 158.6, 150.2, 144.5, 135.6, 135.4, 135.0, 130.1, 130.1, 129.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.0,

113.3, 113.1, 110.1, 88.8, 87.6, 86.6, 77.3, 69.8, 64.1, 59.4, 55.3, 55.2, 38.3, 38.2, 12.6; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 641.2617. Found: 641.2611.

**(1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-hydroxy-*N,N*-dimethyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2h)**

化合物 <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-1 (1.30 g, 1.7 mmol) の THF (17 mL) 溶液に *N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (317 μL, 1.8 mmol)、*N,N*-ジメチルカルバモイルクロリド (168 μL, 1.8 mmol) を氷水浴下に加え、60 °Cにて2時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) 及び酢酸エチル (10 mL) を加え、酢酸エチル (10 mL×2) で抽出した。有機層を飽和食塩水 (10 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル 70/30 → 30/70 v/v) で精製し、化合物 <sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2h を淡黄色アモルファスとして得た (1.02 mg, 収率 79%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.37 (brs, 1H), 8.27 (brd, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.46–7.51 (m, 3H), 7.34–7.43 (m, 6H), 7.27–7.34 (m, 2H), 7.20–7.26 (m, 1H), 6.83–6.88 (m, 4H), 5.66 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.52 (s, 2H), 3.46 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.29 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.88 (s, 6H), 1.81 ppm (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164.1, 158.7, 158.7, 144.5, 136.2, 135.5, 135.4, 132.4, 130.1, 129.9, 128.1, 128.1, 128.0, 127.1, 113.3, 111.4, 89.0, 87.7, 86.7, 77.3, 70.0, 64.1, 59.3, 55.2, 54.7, 38.0, 13.6; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> [M - H]<sup>-</sup>: 744.3039. Found: 744.3028.

**(1R,3R,4R,7S)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-*N*-methyl-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (T-3f)**

化合物 **T-2f** (6.0 g, 9.5 mmol)、*N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (6.6 mL, 38.2 mmol) のジクロロメタン (48 mL) 溶液に氷水浴下で2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホアミダイト (4.3 mL, 19.1 mmol) を加え、室温で17時間攪拌した。氷水浴下でエタノール (10 mL)、H<sub>2</sub>O (50 mL)、クロロホルム (50 mL) を加えた。混合物を抽出し、有機層を減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール、100/0 → 95/5 v/v) で精製し、灰白色アモルファスとして化合物 **T-3f** を得た (6.3 g, 収率 79%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.63–7.71 (m, 1H), 7.40–7.51 (m, 2H), 7.24–7.36 (m, 7H), 6.82–6.88 (m, 4H), 5.50–5.54 (m, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.44 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 3.78–3.83 (m, 6H), 3.60–3.78 (m, 1H), 3.44–3.62 (m, 6H), 3.35–3.43 (m, 1H), 2.77–2.86 (m, 3H), 2.43 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.54–1.69 (m, 3H), 1.08–1.17 (m, 6H), 0.95–1.06 (m, 6H); <sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149.3, 147.4; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P [M - H]<sup>-</sup>: 827.3539. Found: 827.3536.

**(1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-*N*-methyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane 5-carboxamide (<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-3f)**

化合物  ${}^m\text{C}^{\text{bz}}\text{-2f}$  (980 mg, 1.3 mmol) のアセトニトリル (5.0 mL) 溶液にジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド (276 mg, 1.6 mmol) 及び 2-シアノエチル  $N,N,N',N'$ -テトライソプロピルホスホロジアミダイト (600  $\mu\text{L}$ , 1.9 mmol) を加え、室温にて 13 時間攪拌した。混合物に  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL) 及び酢酸エチル (20 mL) を加えた。酢酸エチル (10 mL) で抽出操作を行った。有機層を減圧下で濃縮し、得られた残渣を NH シリカゲルクロマトグラフィー ( $n$ -ヘキサン/酢酸エチル、25/75  $\rightarrow$  0/100 v/v) で精製し、化合物  ${}^m\text{C}^{\text{bz}}\text{-3f}$  を白色アモルファス (960 mg, 収率 75%) として得た。

${}^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13.51–13.56 (m, 1H), 8.32 (brd,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.50–7.57 (m, 1H), 7.40–7.50 (m, 4H), 7.25–7.39 (m, 7H), 6.83–6.89 (m, 4H), 5.55–5.57 (m, 1H), 4.95–5.15 (brs, 1H), 4.35–4.54 (m, 2H), 3.79–3.83 (m, 6H), 3.55–3.67 (m, 2H), 3.44–3.55 (m, 5H), 3.37–3.44 (m, 1H), 2.83–2.88 (m, 3H), 2.53–2.58 (m, 1H), 2.38 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 1.78–1.81 (m, 3H), 1.07–1.15 (m, 6H), 0.95–1.07 (m, 6H);  ${}^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  149.5, 149.1; HRMS (ESI): Calcd. for  $\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_9\text{P}$  [M - H]: 932.4106. Found: 932.4121.

**(1R,3R,4R,7S)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-*N*-isopropyl-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (T-3g)**

化合物 **T-2g** (10.9 g, 16.5 mmol) のジクロロメタン (82 mL) 溶液に *N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (11.4 mL, 65.9 mmol)、2-シアノエチル  $N,N$ -ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (7.4 mL, 33.0 mmol) を氷水浴下で加え、室温で 3 時間攪拌した。混合物にジクロロメタン (60 mL) を加えて希釈したのち、エタノール (2.9 mL)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 50 mL を氷水浴中で加えた。調製後、有機層を飽和食塩水 (50 mL) で洗浄し、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー ( $n$ -ヘキサン/酢酸エチル、30/70  $\rightarrow$  10/90 v/v) で精製し、化合物 **T-3g** を白色アモルファスとして得た (11.4 g, 収率 80%)。  ${}^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.15 (brs, 1H), 7.64–7.66 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 7.24–7.36 (m, 6H), 6.81–6.87 (m, 4H), 5.50–5.53 (m, 1H), 4.93 (brs, 1H), 4.42 (m, 2H), 3.94–4.01 (m, 1H), 3.80 (m, 6H), 3.37–3.63 (m, 8H), 2.50–2.60 (m, 1H), 2.40 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 1.59 (s, 3H), 0.95–1.20 (m, 18H);  ${}^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  149.2, 149.0; HRMS (ESI): Calcd. for  $\text{C}_{45}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_9\text{P}$  [M - H]: 855.3852. Found: 855.3849.

**(1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-*N*-isopropyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane 5-carboxamide ( ${}^m\text{C}^{\text{bz}}\text{-3g}$ )**

化合物  ${}^m\text{C}^{\text{bz}}\text{-2g}$  (1.2 g, 1.4 mmol) のジクロロメタン (6.9 mL) 溶液に *N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (954  $\mu\text{L}$ , 5.5 mmol)、2-シアノエチル  $N,N$ -ジイソプロピルクロロホスホロジアミダイト (920  $\mu\text{L}$ , 4.1 mmol) を氷水浴下で加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液にジクロロメタン (10 mL) を加え希釈したのち、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) を加え抽出した。有機層を飽和食塩水 (5 mL) で洗浄後、減圧濃縮した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー ( $n$ -ヘキサン/酢酸エチ

ル、70/30 → 30/70 v/v) で精製し、白色アモルファスとして化合物 **<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-3g** を得た (1.0 g, 収率 75.0%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.52 (br d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.32 (brd, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.82 (s, 1H), 7.50–7.55 (m, 1H), 7.42–7.48 (m, 4H), 7.27–7.37 (m, 7H), 6.83–6.89 (m, 4H), 5.57 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 5.01 (brs, 1H), 4.35–4.50 (m, 2H), 3.95–4.03 (m, 1H), 3.78–3.85 (m, 6H), 3.73–3.80 (m, 1H), 3.47–3.70 (m, 5H), 3.36–3.48 (m, 2H), 2.56 (q, *J* = 5.5 Hz, 1H), 2.38 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 1.80 (dd, *J* = 2.4, 1.0 Hz, 3H), 0.95–1.25 (m, 18H); <sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149.4; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>52</sub>H<sub>63</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>P [M - H]<sup>-</sup>: 960.4419. Found: 960.4438.

**(1R,3R,4R,7S)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-*N,N*-dimethyl-3-(5-methyl-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane-5-carboxamide (T-3h)**

化合物 **T-2h** (1.8 g, 2.7 mmol) のジクロロメタンの溶液 (13 mL) *N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (1.9 mL, 10.9 mmol)、2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (1.8 mL, 8.1 mmol) を氷水浴下に加え、室温で2時間攪拌した。反応液にジクロロメタン 10 mL を加え希釈したのち、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 5 mL を加え抽出した。有機層を飽和食塩水 (5 mL) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。残留物を逆相クロマトグラフィー (A:10 mM 炭酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル, 40/60 → 35/65 v/v) により精製し、白色アモルファスとして化合物 **T-3h** を得た (1.6 g, 収率 67%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.06 (brs, 1H), 7.74–7.78 (m, 1H), 7.43–7.48 (m, 2H), 7.27–7.37 (m, 7H), 6.81–6.88 (m, 4H), 5.68 (s, 1H), 4.48–4.59 (m, 1H), 4.25–4.40 (m, 1H), 3.77–3.85 (m, 6H), 3.35–3.77 (m, 7H), 3.12–3.20 (m, 1H), 2.89–2.95 (m, 6H), 2.35–2.56 (m, 2H), 1.57–1.61 (m, 3H), 1.05–1.15 (m, 6H), 0.86–1.00 (m, 6H); <sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 148.6, 148.3; HRMS (ESI): Calcd. for C<sub>44</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P [M - H]<sup>-</sup>: 841.3695. Found: 841.3692.

**(1R,3R,4R,7S)-3-(4-benzamido-5-methyl-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-1-[[bis(4-methoxyphenyl)phenylmethoxy]methyl]-7-[2-cyanoethoxy-(diisopropylamino)phosphanyl]oxy-*N,N*-dimethyl-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptane 5-carboxamide (<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-3h)**

化合物 **<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-2h** (1.0 g, 1.3 mmol) のジクロロメタン (6.6 mL) 溶液に、氷水浴下で *N*-エチル-*N*-イソプロピルプロパン-2-アミン (910 μL, 5.3 mmol) 及び 2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (880 μL, 3.9 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。反応液にジクロロメタン 10 mL を加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 10 mL で抽出した。有機層を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル, 70/30 → 30/70 v/v) で精製し、黄色アモルファスとして化合物 **<sup>m</sup>C<sup>bz</sup>-3h** を得た (937 mg, 収率 75%)。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.43 (brs, 1H), 8.32 (brd, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.40–7.54 (m, 6H), 7.25–7.40 (m, 7H), 6.85 (m, 4H), 5.74 (s, 1H), 4.62 (s, 1H), 4.29 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.80–3.84 (m, 6H), 3.70–3.77 (m, 2H), 3.37–3.55 (m, 3H), 3.52–3.70 (m, 3H), 3.18 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 2.95 (s, 6H), 2.53 (td, *J* = 6.0, 2.3 Hz, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.10

(d,  $J = 6.7$  Hz, 6H), 0.98 (d,  $J = 6.7$  Hz, 6H);  $^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  148.8; HRMS (ESI): Calcd. for  $\text{C}_{51}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{O}_9\text{P}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 946.4263. Found: 946.4280.

### 2'-N-アルキルアミノカルボニル ALNA ホスホロアミダイトを用いた ON34f~ON39h の合成

第三章の実験項にて上述した各種 2'-N-アミノカルボニル ALNA のホスホロアミダイトを 0.1 M のアセトニトリル溶液に調整し、Molecular Sieves Pack 3 A (富士フィルム和光) を用いて脱水した。オリゴヌクレオチドの固相合成は ns-8 II オリゴヌクレオチド合成装置 (Gene Design が製造) を用いて実施し、1–2 $\mu\text{mol}$  の NittoPhase<sup>®</sup> UnyLinker<sup>™</sup> 200 (Kinovate Life Sciences) を固相担体として使用して伸長を行った。オリゴヌクレオチド伸長のプロトコルは、ns-8 II の既定のプロトコルに従い、アミダイトとのカップリング反応は 10 分に設定した。合成はトリチルオフモードで行った。Activator 42<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) をカップリング反応におけるアクチベータとして用いた。得られたオリゴヌクレオチドを 28% アンモニア水溶液で 65 °C、8 時間処理することにより固体担体から切り出した。

### オリゴヌクレオチド (ON34f–ON39h) の精製及び同定

オリゴヌクレオチドを簡易ゲル濾過カラム (NAP<sup>™</sup>-10, Cytiva) で前処理して分子量 3000 以下の低分子成分を予め除いたのち、それらを逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (Waters XBridge<sup>™</sup> Oligonucleotide BEH C18 OBD<sup>™</sup> Prep カラム、130Å、2.5 $\mu\text{m}$ , 10 mm $\times$ 50 mm) により精製した。ON34f~ON39h の純度を RT-HPLC (Waters XBridge<sup>™</sup> OST C18 2.5 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 50 mm を有する島津製 HPLC システム) によって分析した。移動相はアセトニトリルと 20 mM 酢酸ヘキシルアミン水溶液を用いた。溶出液を ZQ mass detector (ESI, Waters) によって質量分析して構造を同定した。MS の測定、HPLC 精製、HPLC 分析は下記の条件にて実施した。ON34f–ON39h の MS の検出結果、および HPLC の純度、溶出時間を Table 5 にまとめた。

### LC/MS 分析条件

Waters ZQ mass detector (ESI)

移動相 A: 400 mM HFIP/15 mM TEA 水溶液

移動相 B: メタノール

流量: 毎分 0.2 mL

グラジエント条件: 2.5 分で 20–30%

カラム: Waters XBridge<sup>™</sup> BEH C18, 1.7 $\mu\text{m}$  (2.1 $\times$ 100 mm)

カラムオープンの温度: 60 °C

検出器: 紫外吸光度計 (測定波長: 260 nm)

### RP-HPLC 精製条件

移動相 A:20 mmol/L 酢酸ヘキシルアミン水溶液

移動相 B:アセトニトリル

グラジエント条件:40 分で 10–50%

流量:毎分 4 mL

カラム:Waters XBridge™ Oligonucleotide BEH C18 OBD™ Prep カラム、130Å2.5µm (10×50 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

### **RP-HPLC 分析条件**

第三章で合成したオリゴヌクレオチド:

移動相 A:20 mmol/L 酢酸ヘキシルアミン水溶液

移動相 B:アセトニトリル

グラジエント条件: 20 分(5–50%)、22.5 分(10–50%)、または 18 分(10–65%)

流量:毎分 1 mL

カラム:Waters XBridge™ BEH C18 130Å2.5µm (4.6×50 mm)

カラムオープンの温度:60 °C

検出器:紫外吸光光度計 (測定波長:260 nm)

### **融解温度 ( $T_m$ 値) 測定**

第二章の実験と同様にして測定した。

### **ヌクレアーゼ耐性評価**

第二章の実験と同様にして測定した。

### **ルシフェラーゼレポーター分析**

第一章の実験と同様にして測定した。

### **プラスミド**

第一章の実験と同様の試薬を使用した。

## 参考文献

- 1) Bartel, D. P. *Cell*. 2009, *136*, 215–233.
- 2) Bartel, D. P. *Cell*. 2018, *173*, 20–51.
- 3) Gebert, L. F. R.; MacRae, I. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019, *20*, 21–37.
- 4) Ha, M.; Kim, V. N. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014, *15*, 509–524.
- 5) Guo, H.; Ingolia, N. T.; Weissman, J. S.; Bartel, D. P. *Nature*. 2010, *466*, 835–840.
- 6) Krol, J.; Loedige, I.; Filipowicz, W. *Nat. Rev. Genet.* 2010, *11*, 597–610.
- 7) Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Ra<sup>o</sup>dmark, O.; Kim, S.; Kim, V. N. *Nature*. 2003, *425*, 415–419.
- 8) Ma, H.; Wu, Y.; Choi, J.; Wu, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013, *110*, 20687–20692.
- 9) Zhang, H.; Kolb, F. A.; Jaskiewicz, L.; Westhof, E.; Filipowicz, W. *Cell*. 2004, *118*, 57–68.
- 10) Park, J. E.; Heo, I.; Tian, Y.; Simanshu, D. K.; Chang, H.; Jee, D.; Patel, D. J.; Kim, V. N. *Nature*. 2011, *475*, 201–205.
- 11) Meister G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T. *Mol. Cell*. 2004, *15*, 185–197.
- 12) Su, H.; Trombly, M. I.; Chen, J.; Wang, X. *Genes Dev.* 2009, *23*, 304–317.
- 13) Jo, M. H.; Shin, S.; Jung, S. R.; Kim, E.; Song, J. J.; Hohng, S. *Mol. Cell*. 2015, *59*, 117–124.
- 14) Kobayashi, H.; Tomari, Y. *Biochim. Biophys. Acta*. 2016, *1859*, 71–81.
- 15) Sheu-Gruttadauria, J.; Pawlica, P.; Klum, S. M.; Wang, S.; Yario, T. A.; Schirle Oakdale, N. T.; Steitz, J. A.; MacRae, I. J. *Mol. Cell*. 2019, *75*, 1243–1255.e7.
- 16) Ebert, M. S.; Sharp, P. A. *Cell*. 2012, *149*, 515–524.
- 17) Thum T.; Catalucci D.; Bauersachs J. *Cardiovasc Res*. 2008, *79*, 562–570.
- 18) Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J. *Nat Rev Cancer*. 2006, *6*, 259–269.
- 19) Wiemer, E. A. *Eur J Cancer*. 2007, *43*, 1529–1544.
- 20) Croce, C. M. *Nat. Rev. Genet.* 2009, *10*, 704–714.
- 21) Croce, C. M.; Rupaimoole, R.; Slack, F. J. *MicroRNA Nat. Rev. Drug Discov.* 2017, *16*, 203–221.
- 22) Nelson, P. T.; Wang, W. X.; Rajeev, B. W. *Brain Pathol.* 2008, *18*, 130–138.
- 23) Wilfred, B. R.; Wang, W. X.; Nelson, P. T. *Mol Genet Metab.* 2007, *91*, 209–217.
- 24) Lindsay, M. A. *Trends Immunol.* 2008, *29*, 343–351.
- 25) Xiao, C.; Rajewsky, K. *Cell*. 2009, *136*, 26–36.
- 26) Li, Z.; Rana, T. M.; *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2014, *13*, 622–638.
- 27) Soifer, H. S.; Rossi, J. J.; Sætrom, P. *Mol. Ther.* 2007, *15*, 2070–2079.
- 28) Lennox, K. A.; Behlke, M. A. *Gene Ther.*, 2011, *18*, 1111–1120.
- 29) Stenvang, J.; Silahatoglu, A. N.; Lindow, M.; Elmen, J.; Kauppinen, S. *Cancer Biol.*, 2008, *18*, 89–102.
- 30) Hogan, D. J.; Vincent, T. M.; Fish, S.; Marcusson, E. G.; Bhat, B.; Chau, B. N. Zisoulis, D. G.;



- PLOS ONE.*, 2014, 9, e100951.
- 31) Hanna, J.; Hossain, G. S.; Kocerha, J. *Front. Genet.* 2019, 10, 478.
  - 32) Bajan S.; Hutvagner G. *Cells.* 2020, 9, 137.
  - 33) Seto, A. G.; Beatty, X.; Lynch, J. M.; Hermreck, M.; Tetzlaff, M.; Duvic, M.; Jackson, A. L. *Br. J. Haematol.* 2018, 183, 428–444.
  - 34) Chau, B. N.; Xin, C.; Hartner, J.; Ren, S.; Castano, A. P.; Linn, G.; Li, J.; Tran, P. T.; Kaimal, V.; Huang, X.; Chang, A. N.; Li, S.; Kalra, A.; Grafals, M.; Portilla, D.; Mackenna, D. A.; Orkin, S. H.; Duffield, J. S. *Sci Transl Med.* 2012, 4, 121ra18.
  - 35) Duffield, J.; Bhat, B.; MacKenna, D. U.S. Patent 9,688,986, June 27, 2017.
  - 36) Gomez, I. G.; MacKenna, D. A.; Johnson, B. G.; Kaimal, V.; Roach, A. M.; Ren, S.; Nakagawa, N.; Xin, C.; Newitt, R.; Pandya, S.; Xia, T.; Liu, X.; Borza, D-B.; Grafals, M.; Shankland, S. J.; Himmelfarb, J.; Portilla, D.; Liu, S.; Chau, B. N.; Duffield, J. S. *J. Clin. Invest.*, 2015, 125, 141–156.
  - 37) Meister, G.; Landthaler, M.; Dorsett, Y.; Tuschl, T. *RNA.* 2004, 10, 544–550.
  - 38) Hutvagner, G.; Simard, M. J.; Mello, C. C.; Zamore, P. D. *PLoS Biol.* 2004, 2, 465–475.
  - 39) Krützfeldt, J.; Rajewsky, N.; Braich, R.; Rajeev, K. G.; Tuschl, T.; Manoharan, M.; Stoffel, M. *Nature.* 2005, 438, 685–689.
  - 40) Krützfeldt, J.; Kuwajima, S.; Braich, R.; Rajeev, K. G.; Pena, J.; Tuschl, T.; Manoharan, M.; Stoffel, M. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, 2885–2892.
  - 41) Esau, C.; Kang, X.; Peralta, E.; Hanson, E.; Marcusson, E. G.; Ravichandran, L. V.; Sun, Y.; Koo, S.; Perera, R. J.; Jain, R.; Dean, N. M.; Freier, S. M.; Bennett, C. F.; Lollo, B.; Griffey, R. *J Biol Chem.* 2004, 279, 52361–52365.
  - 42) Teplova, M.; Minasov, G.; Tereshko, V.; Inamati, G. B.; Cook, P. D.; Manoharan, M.; Egli, M. *Nat. Struct. Biol.* 1999, 6, 535–539.
  - 43) Orom, U. A.; Kauppinen, S.; Lund, A. H. *Gene.* 2006, 372, 137–141.
  - 44) Petersen, M.; Wengel, J. *Trends Biotechnol.* 2003, 21, 74–81.
  - 45) Davis, S.; Lollo, B.; Freier, S.; Esau, C. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 2294–2304.
  - 46) Davis, S.; Propp, S.; Freier, S. M.; Jones, L. E.; Serra, M. J.; Kinberger, G.; Bhat, B.; Swayze, E. E.; Bennett, C. F.; Esau, C. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 70–77.
  - 47) Lennox, K. A.; Behlke, M. A. *Pharm. Res.* 2010, 27, 1788–1799.
  - 48) Elmén, J.; Lindow, M.; Silahtaroglu, A.; Bak, M.; Christensen, M.; Lind-Thomsen, A.; Hedtjärn, M.; Hansen, J. B.; Hansen, H. F.; Straarup, E. M.; McCullagh, K.; Kearney, P.; Kauppinen, S. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, 1153–1162.
  - 49) Elmén, J.; Lindow, M.; Schütz, S.; Lawrence, M.; Petri, A.; Obad, S.; Lindholm, M.; Hedtjärn, M.; Hansen, H. F.; Berger, U.; Gullans, S.; Kearney, P.; Sarnow, P.; Straarup, E. M.; Kauppinen, S. *Nature.* 2008, 452, 896–899.
  - 50) Elmén, J.; Kearney, P.; Kauppinen, S. P. U.S. Patent 8,163,708, April 24, 2012.

- 51) Yamamoto, T.; Nakatani, M.; Narukawa, K.; Obika, S. *Future Med. Chem.*, 2011, 3, 339–365.
- 52) Deleavey, G. F.; Damha, M. J. *Chem. Biol.*, 2012, 19, 937–954.
- 53) Lundin, K. E.; Gissberg, O.; Smith, C. I. E. *Gene Ther.*, 2015, 26, 475–485.
- 54) Kole R, Krainer AR, Altman S. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;11:125-140.
- 55) Khvorova, A.; Watts, J. K. *Nat. Biotechnol.*, 2017, 35, 238–248.
- 56) Roberts, T. C.; Langer, R.; Wood, M. J. A. *Nature Rev.*, 2020, 19, 673–694.
- 57) Micklefield, J. *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, 1157–1179.
- 58) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 5401–5404.
- 59) Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455–456.
- 60) Braasch, D. A.; Corey, D. R. *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1–7.
- 61) Kurreck, J.; Wyszko, E.; Gillen, C.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 1911–1918.
- 62) Vester, B.; Wengel, J. *Biochemistry*, 2004, 43, 13233–13241.
- 63) Wan, W. B.; Seth, P. P. *J. Med. Chem.*, 2016, 59, 9645–9667.
- 64) Shrestha, A. R.; Kotobuki, Y.; Hari, Y.; Obika, S. *Chem. Commun.* 2014, 50, 575–577.
- 65) Singh, S. K.; Kumar, R.; Wengel, J. *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035–10039.
- 66) Sørensen, M. D.; Petersen, M.; Wengel, J. *Chem. Commun.*, 2003, 17, 2130–2131.
- 67) Hrdlicka, P. J.; Babu, B. R.; Sørensen, M. D.; Wengel, J. *Chem. Commun.*, 2004, 13, 1478–1479.
- 68) Babu, B.; Hrdlicka, P.; McKenzie, C. J.; Wengel, J. *Chem. Commun.*, 2005, 13, 1705–1707.
- 69) Hrdlicka, P. J.; Babu, B. R.; Sørensen, M. D.; Harrit, N.; Wengel, J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 13293–13299.
- 70) Astakhova, I. V.; Korshum, V. A.; Jahn, K.; Kjems, J.; Wengel, J. *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19, 1995–2007.
- 71) Umemoto, T.; Wengel, J.; Madsen, A. S. *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 1793–1797.
- 72) Johannsen, M. W.; Crispino, L.; Wamberg, M. C.; Kalra, N.; Wengel, J. *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 243–252.
- 73) Astakhova, I. K.; Hansen, L. H.; Vester, B.; Wengel, J. *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 4240–4249.
- 74) Jørgensen, A. S.; Gupta, P.; Wengel, J. Astakhova, I. K. *Chem. Commun.*, 2013, 49, 10751–10753.
- 75) Astakhova, I. K.; Wengel, J. *Acc. Chem. Res.*, 2014, 47, 1768–1777.
- 76) Lou, C.; Vester, B.; Wengel, J. *Chem. Commun.*, 2015, 51, 4024–4027.
- 77) Geny, S.; Moreno, P. M. D.; Krzywkowski, T.; Gissberg, O.; Andersen, N. K.; Isse, A. J.; El-Madani, A. M.; Lou, C.; Pabon, Y. V.; Anderson, B. A.; Zaghloul, E. M.; Zain, R.; Hrdlicka, P. J.; Jørgensen, P. T.; Nilsson, M.; Lundin, K. E.; Pedersen, E. B.; Wengel, J.; Smith, C. I. E.; *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44, 2007–2019.
- 78) Ries, A.; Kumar, R.; Lou, C.; Kosbar, T.; Vengut-Climent, E.; Jørgensen, P. T.; Morales, J. C.;

- Wengel, J. *J. Org. Chem.*, 2016, *81*, 10845–10856.
- 79) Kumar, R.; Ries, A.; Wengel, J. *Molecules*, 2017, *22*, 852.
- 80) Hvam, M. L.; Cai, Y.; Dagnes-Hansen, F.; Nielsen, J. S.; Wengel, J.; Kjems, J.; Howard, K. A. *Mol. Ther.*, 2017, *25*, 1710–1717.
- 81) Lou, C.; Samuelson, S. V.; Christensen, N. J.; Vester, B.; Wengel, J. *Bioconjugate Chem.*, 2017, *28*, 1214–1220.
- 82) Ejlersen, M.; Christensen, N. J.; Sørensen, K. K.; Jensen, K. J.; Wengel, J.; Lou, C. *Bioconjugate Chem.*, 2018, *29*, 1025–1029.
- 83) Osawa, T.; Yamashita, S.; Nakanishi, A.; Ito, Y.; Hari, Y.; *Heterocycles*, 2019, *99*, 502–520.
- 84) Yamashita, S.; Nishida, K.; Osawa, T.; Nakanishi, A.; Ito, Y.; Hari, Y. *Molecules*, 2020, *25*, 346.
- 85) Hernandez, F. J.; Kalra, N.; Wengel, J.; Vester, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, *19*, 6585–6587.
- 86) Zaghoul, E. M.; Madsen, A. S.; Moreno, P. M. D.; Oprea, I. I.; El-Andaloussi, S.; Bestas, B.; Gupta, P.; Pedersen, E. B.; Lundin, K. E.; Wengel, J.; Smith, C. I. E. *Nucleic Acids Res.*, 2011, *39*, 1142–1154.
- 87) Bestas, B.; Moreno, P. M. D.; Blomberg, K. E.; Mohammad, D. K.; Saleh, A. F.; Sutlu, T.; Nordin, J. Z.; Guterstam, P.; Gustafsson, M. O.; Kharazi, S.; Piątosza, B.; Roberts, T. C.; Behlke, M. A.; Wood, M. J. A.; Gait, M. J.; Lundin, K. E.; Andaloussi, S. El.; Månsson, R.; Berglöf, A.; Wengel, J.; Smith, C.I. E. *J. Clin. Invest.*, 2014, *124*, 4067–4081.
- 88) Zaghoul, E. M.; Gissberg, O.; Moreno, P. M. D.; Siggens, L.; Hallbrink, M.; Jørgensen, A. S.; Ekwall, K.; Zain, R.; Wengel, J.; Lundin, K. E.; Smith, C. I. E. *Nucleic Acids Res.*, 2017, *45*, 5153–5169.
- 89) Sawamoto, H.; Arai, Y.; Yamakoshi, S.; Obika, S.; Kawanishi, E. *Org. Lett.* 2018, *20*, 1928–1931.
- 90) Kumagai, S.; Sawamoto, H.; Takegawa-araki, T.; Arai, Y.; Yamakoshi, S.; Yamada, K.; Ohta, T.; Kawanishi, E.; Horie, N.; Yamaguchi, T.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.* 2020, *18*, 9461–9472.
- 91) Schirle, N. T.; Sheu-Gruttadauria, J.; MacRae, I. J. *Science*. 2014, *346* (6209) , 608–613.
- 92) Kumarswamy, R.; Volkmann, I.; Thum, T. *RNA Biology.*, 2011, *8*, 706–713.
- 93) Fukuoka, M.; Yoshida, M.; Eda, A.; Takahashi, M.; Hohjoh, H. *PLOS ONE.*, 2014, *9*, e103130.
- 94) Ohmichi, T.; Kuwahara, M.; Sasaki, N.; Hasegawa, M.; Nishikata, T.; Sawai, H.; Sugimoto, N. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2005, *44*, 6682–6685.
- 95) Obad, S.; dos Santos C. O.; Petri, A.; Heidenblad, M.; Broom, O.; Ruse, C.; Fu, C.; Lindow, M.; Stenvang, J.; Staarup, E. M.; Hansen, H. F.; Koch, T.; Pappin, D.; Hannon, G. J.; Kauppinen, S. *Nat Genet.* 2011, *43*, 371–378.
- 96) Hogan, D. J.; Vincent, T. M.; Fish, S.; Marcusson, E. G.; Bhat, B.; Chau, B. N.; Zisoulis, D. G. *PLoS ONE*. 2014, *9*, e100951.
- 97) Winter, J.; Diederichs, S. *RNA Biol.* 2011, *8*, 1149–1157.
- 98) Smibert, P.; Yang, J. S.; Azzam, G.; Liu, J. L.; Lai, E. C. *Nat Struct Mol Biol.* 2013, *20*, 789–795.

- 99) Chandradoss, S. D.; Schirle, N. T.; Szczepaniak, M.; MacRae, I. J.; Joo, C. *Cell*. 2015, *162*, 96–107.
- 100) Klum, S. M.; Chandradoss, S. D.; Schirle, N. T.; Joo, C.; MacRae, I. J. *EMBO J*. 2018, *37*, 75–88.
- 101) Kim, D.; Sung, Y. M.; Park, J.; Kim, S.; Kim, J.; Park, J.; Ha, H.; Bae, J. Y.; Kim, S.; Baek, D. *Nat. Genet.* 2016, *48*, 1517–1526.
- 102) Schirle, N. T.; Sheu-Gruttadauria, J.; Chandradoss, S. D.; Joo, C.; MacRae, I. J. *eLife*. 2015, *4*
- 103) De, N.; Young, L.; Lau, P. w.; Meisner, N., C., Morrissey, D., V.; MacRae, I. J. *Mol. Cell*. 2013, *50*, 344–355.
- 104) Helwak, A.; Kudla, G.; Dudnakova, T.; Tollervey, D. *Cell*. 2013, *153*, 654–665.
- 105) Moore, M. J.; Scheel, T. K. H.; Luna, J. M.; Park, C. Y.; Fak, J. J.; Nishiuchi, E.; Rice, C. M.; Darnell, R. B. *Nat. Commun.* 2015, *6*, 8864.
- 106) Grimson, A.; Farh, K. KH.; Johnston, W. K.; Garrett-Engele, P.; Lim, L. P.; Bartel, D. P. *Mol. Cell*. 2007, *27*, 91–105.
- 107) Broughton, J. P.; Lovci, M. T.; Huang, J. L.; Yeo, G. W.; Pasquinelli, A. E. *Mol. Cell*. 2016, *64*, 320–333.
- 108) Yamamoto, T.; Yahara, A.; Waki, R.; Yasuhara, H.; Wada, F.; Harada-Shiba, M.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.*, 2015, *13*, 3757–3765.
- 109) 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.
- 110) Seth, P. P.; Vasquez, G.; Allerson, C. A.; 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.
- 111) Weisbrod, S. H.; Marx, A.; *Chem. Commun.*, 2008, 5675–5685.
- 112) Mäkilä, J.; Jadhav, S.; Kiviniemi, A.; Käkälä, M.; Liljenbäck, H.; Poijärvi-Virta, P.; Laitala-Leinonen, T.; Lönnberg, H.; Roivainen, A.; Virta, P.; *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, *22*, 6806–6813.
- 113) Ämmälä, C.; Drury III, W. J.; Knerr, L.; Ahlstedt, I.; Stillemark-Billton, P.; Wennberg-Huldt, C.; Andersson, E. M.; Valeur, E.; Jansson-Löfmark, R.; Janzén, D.; Sundström, L.; Meuller, J.; Claesson, J.; Andersson, P.; Johansson, C.; Lee, R. G.; Prakash, T. P.; Seth, P. P.; Monia, B. P.; Andersson, S. *Sci. Adv.*, 2018, *4*, eaat3386.
- 114) Prakash, T. P.; Mullick, A. E.; Lee, R. G.; Yu, J.; Yeh, S. T.; Low, A.; Chappell, A. E.; Østergaard, M. E.; Murray, S.; Gaus, H. J.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acids Res.*, 2019, *47*, 6029–6044.
- 115) Chappell, A.E.; Gaus, H. J.; Berdeja, A.; Gupta, R.; Jo, M.; Prakash, T. P.; Oestergaard, M.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Nucleic Acid Res.*, 2020, *48*, 4382–4395.
- 116) Dovgan, I.; Koniev, O.; Kolodych, S.; Wanger, A.; *Bioconjugate Chem.*, 2019, *30*, 2483–2501.
- 117) Kiviniemi, A.; Virta, P.; Lönnberg, H.; *Bioconjugate Chem.*, 2008, *19*, 1726–1734.
- 118) Gramlich, P. M. E.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T. *Angew. Chem.*, 2008, *47*, 3442–3444.

- 119) Berndl, S.; Herzig, N.; Kele, P.; Lachmann, D.; Li, X.; Wolfbeis, O. S.; Wagenknecht, H. A. *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 558–564.
- 120) El-Sagheerab, A. H.; Brown, T. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 1388–1405.
- 121) Astakhova, K.; Wengel, J. *Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 1112–1122.
- 122) Gutmiedl, K.; Wirges, C. T.; Ehmke, V.; Carell, T.; *Org. Lett.*, 2009, 11, 2405–2408.
- 123) Dai, C.; Wang, L.; Sheng, J.; Peng, H.; Draganov, A. B.; Huang, Z.; Wang, B. *Chem. Commun.*, 2011, 47, 3598–3600.
- 124) Lercher, L.; McGouran, J. F.; Kessler, B. M.; Schofield, C. J.; Davis, B. G.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 10553–10558.
- 125) Krause, A.; Hertl, A.; Muttach, F.; Jäschke, A.; *Chem. Eur. J.*, 2014, 20, 16613–16619.
- 126) Shaughnessy, K. H. *Molecules*, 2015, 20, 9419–9454.
- 127) Defrancq, E.; Messaoudi, S. *ChemBioChem*, 2017, 18, 426–431.
- 128) Akabane-Nakata, M.; Obika, S.; Hari, Y.; *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12, 9011–9015.
- 129) Ito, Y.; Matsuo, M.; Yamamoto, K.; Yamashita, W.; Osawa, T.; Hari, Y. *Tetrahedron*, 2018, 74, 6854–6860.
- 130) Madsen, A. S.; Jørgensen, A. S.; Jensen, T. B.; Wengel, J. *J. Org. Chem.*, 2012, 77, 10718–10728.
- 131) Phosphoramidite of TFA-protected ALNA[H] with thymine (T-3a) , had been synthesized in a reference 65. That with adenine, guanine, 5-methylcytosine were synthesized in this study for the first time.
- 132) Phosphoramidites of ALNA[Me] with thymine 5-methylcytosine had been synthesized in a reference 133, that of adenine, guanine are new compounds in this study.
- 133) Rosenbohm, C.; Christensen, S. M.; Sørensen, M. D.; Pedersen, D. S.; Larsen, L-E.; Wengel, J.; Koch, T. *Org. Biomol. Chem.*, 2003, 1, 655–663.
- 134) Gartner, Z. J.; Kanan, M. W.; Liu, D. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, 41, 1796–1800.
- 135) Li, X.; Gartner, Z. J.; Tse, B. N.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 5090–5092.
- 136) Gemma, E.; Hulme, A. N.; Jahnke, A.; Jin, L.; Lyon, M.; Müller, R. M.; Uhrin, D. *Chem. Commun.*, 2007, 26, 2686–2688.
- 137) Cochet, T.; Bellosta, V.; Greiner, A.; Roche, D.; Cossy, J. *SYNLETT*, 2011, 13, 1920–1922.
- 138) Rahman, S. M. A.; Seki, S.; Obika, S.; Yoshikawa, H.; Miyashita, K.; Imanishi, T. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 4886–4896.
- 139) Molecular Operating Environment (MOE) , 2020.09, Chemical Computing Group. <https://www.chemcomp.com/> (accessed Dec 10, 2020).