

核酸医薬への応用を目指した糖部およびリン酸部修飾  
プロドラッグ型核酸の合成と機能評価

大阪薬科大学  
林 淳祐

## 目次

序論 .....	1
1. 核酸医薬の現状.....	1
2. 核酸医薬開発の歴史とその問題を克服する方法論（修飾核酸）.....	4
3. 代表的な修飾核酸とその問題点 .....	4
4. プロドラッグ型修飾オリゴ核酸とその問題点 .....	8
5. 細胞内還元環境で天然型へと変換されるプロドラッグ型オリゴ核酸.....	10
本論 .....	12
第一部 細胞内還元環境に応答する 2'位修飾プロドラッグ型 siRNA の開発 .....	12
第一章 2'- <i>O</i> -methyldithiomethyl (MDTM) 修飾と 2'- <i>O</i> -methyl (Me) 修飾が siRNA 活性に与える影響の比較 .....	12
第一節 異なるトランスフェクション法による siRNA 活性の比較 .....	13
第二節 2'- <i>O</i> -MDTM siRNA の血清中での安定性評価.....	17
小括 .....	20
第二章 遺伝子配列拡張のための 4 種ヌクレオチド中の 2'位に methyldithiomethyl 修飾を施したオリゴ核酸の合成法の確立.....	21
第一節 2'- <i>O</i> -TMBTM phosphoramidite unit の合成.....	23
第二節 2'- <i>O</i> -MDTM オリゴ核酸の合成.....	25
第三節 2'- <i>O</i> -MDTM オリゴ核酸のグルタチオンによる天然型オリゴ核酸への変換反応...	29

第一部 総括.....	31
第二部 細胞内還元環境に応答するリン酸部修飾プロドラッグ型オリゴ核酸の開発 .....	32
第一章 REDUCT の概念を利用したリン酸修飾プロドラッグ型核酸の開発の為にリン酸トリ エステル-オリゴ核酸-スペルミンコンジュゲートの合成と機能評価.....	32
第一節 ホスホロアミダイト法によるオリゴ PTE 核酸の合成検討と核酸分解酵素耐性の評価 .....	33
第二節 3'-蛍光標識化オリゴ PTE 核酸-スペルミンコンジュゲートの合成と細胞膜透過性評 価.....	40
小括 .....	45
第二章 REDUCT の概念を利用したリン酸修飾プロドラッグ型核酸の開発 .....	46
第一節 ホスホロアミダイト法による REDUCT-PTE 核酸の合成.....	47
第二節 REDUCT-PTE 核酸の性質評価.....	50
第三節 ルシフェラーゼアッセイを用いた REDUCT-PTE 核酸のアンチセンス活性.....	53
第二部 総括.....	56
結論 .....	57
論文目録 .....	58
謝辞 .....	59
実験の部 .....	60
引用文献 .....	91

## 略語一覽

Ac: acetyl	HIV: human immunodeficiency virus
Ago 2: argonote 2	HPLC: high performance liquid chromatography
ApoB: apolipoprotein B	<i>i</i> -Bu: isobutyryl
BNA: 2',4'-bridged nucleic acids	LNA: 2',4'-locked nucleic acids
BTT: 5-(benzylthio)-1 <i>H</i> -tetrazole	MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization
Bz: benzoyl	MDTM: methyldithiomethyl
CEM: Ca <sup>2+</sup> enrichment of medium	miRNA: micro RNA
DCI: 4,5-dicyanoimidazole	mRNA: messenger RNA
DCA: dichloroacetic acid	MS: mass spectrometry
DIEA: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine	MTM: methylthiomethyl
DMEM: dulbecco's modified eagle's medium	NF-κB: nuclear factor-kappa B
DMF: dimethylformamide	ON: oligonucleotide
DMTSF: dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate	Pac: phenoxyacetyl
DNA: deoxyribo nucleic acid	PBS: phosphate buffered saline
dT: thymidine	PDE: phosphodiester
DTT: dithiothreitol	PS: phosphorothioate
ETT: 5-ethylthio-1 <i>H</i> -tetrazole	PTE: phosphotriester
FBS: fetal bovine serum	REDUCT-RNA: Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical
GSH: glutathione	Transforming-RNA
HCMV: human cytomegalovirus	RNA: ribo nucleic acid

RNAi: RNA interference

RISC: RNA-induced silencing complex

SATE: *S*-acylthioethyl

siRNA: small interfering RNA

SMN: survival motor neuron

SVPDE: snake venom phosphodiesterase

TFA: trifluoroacetic acid

TIPDS: 1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxanediy

TLR: toll-like receptor

TMBTM: 2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl

TOF: time of flight

tRNA: transfer RNA

VEGF: vascular endothelial growth factor

2'-*O*-Me: 2'-*O*-methyl

2'-F: 2'-fluoro

2'-*O*-MOE: 2'-*O*-methoxyethyl

5-Me C: 5-methylcytosine

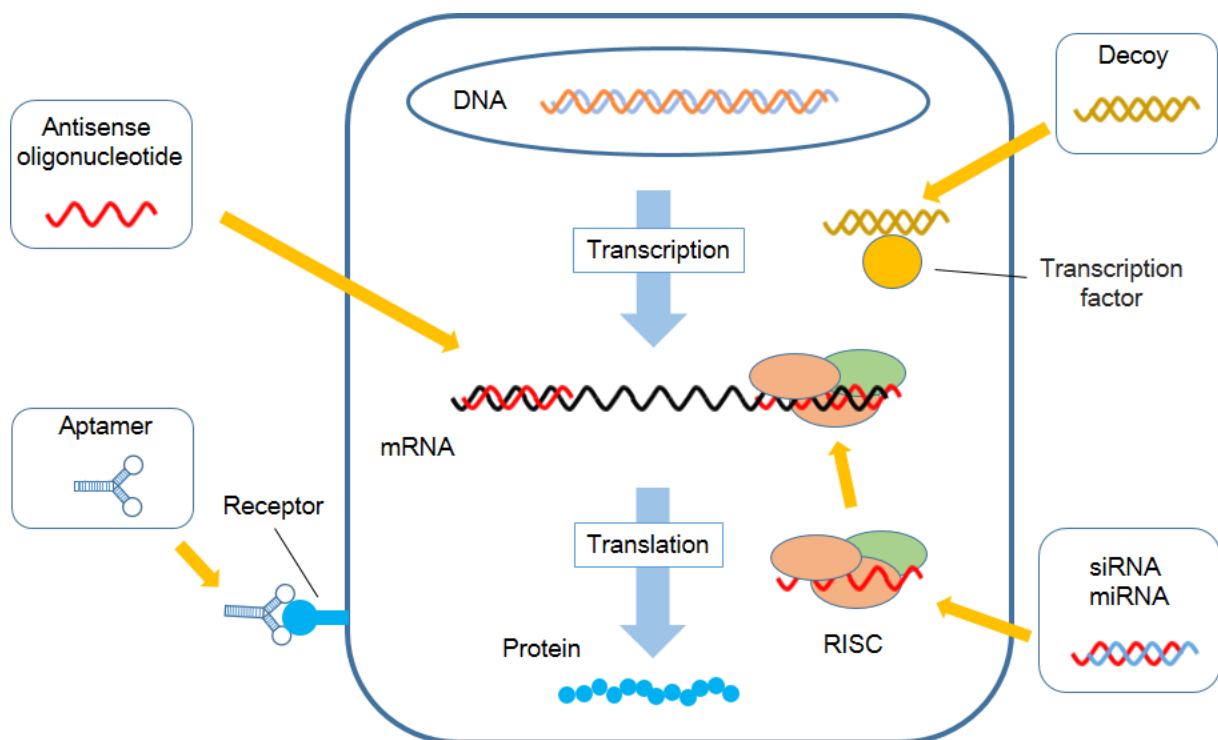
5'-NMP: 5'-nucleoside monophosphate

## 序論

### 1. 核酸医薬の現状

核酸医薬は DNA や RNA 中のヌクレオチドを基本骨格とした医薬であり、生体内で特定分子に対して高い親和性、特異性を有するため、低分子医薬や抗体医薬に代わる医薬として注目されている。核酸医薬は主に生体内のタンパク質または messenger RNA (mRNA) などの核酸分子を標的としてその機能を発現する (Figure 1)。

アプタマー核酸は、主に細胞外のタンパク質やレセプターに作用することでその機能を阻害することを目的に創製される高次構造を有する抗体様の一本鎖オリゴ核酸である。<sup>1)</sup> 2004 年に vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) を標的としたアプタマー核酸である Pegaptanib (商品名: Macugen) が加齢性黄斑変性症に対しての核酸医薬として米国にて承認されており、その後 2008 年に日本でも初の核酸医薬として承認販売がなされた。



**Figure 1.** Image of several type of oligonucleotide therapeutics.

デコイ核酸は転写因子が結合する DNA 領域の塩基配列を人工的に合成した二本鎖の DNA である。デコイ核酸を細胞内に導入することで、転写因子とゲノム DNA 中のプロモーター領域との結合を阻害し、遺伝子発現を抑制することが可能となる。<sup>2)</sup> 近年、炎症に関連した遺伝子制御に関わる転写因子である NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) を標的としたデコイ核酸の臨床研究が国内ベンチャー企業において進められている。

アンチセンス核酸は標的 mRNA に対して相補的な配列を有する一本鎖オリゴ核酸で、標的 mRNA と水素結合を介して結合することで、transfer RNA (tRNA) の mRNA への結合阻害や RNA 分解酵素である RNase H の働きを介した mRNA の分解により、タンパク質の発現を阻害する。<sup>3)</sup> 近年では DNA から転写直後の pre-mRNA 中のエキソン部位にアンチセンス核酸を結合させることで、スプライシング関連タンパクとの結合を阻害し、成熟 mRNA 中から変異エキソンを取り除く「エキソンスキッピング法」による治療法などが確立されている。<sup>4)</sup> これまでに上市された核酸医薬はアンチセンス核酸が多く、2018 年までにサイトメガロウイルス感染性網膜炎治療薬の Fomivirsen (商品名: Vitravene)、家族性高コレステロール血症治療薬の Mipomersen (商品名: Kynamro)、トランスサイレチン型家族性アミロイドーシスの治療薬の inotersen (商品名: Tegsedi)、エキソンスキッピング法を利用した Duchenne 型筋ジストロフィー症治療薬の Eteplirsen (商品名: Exondys 51) および脊髄性筋萎縮症治療薬の Nusinersen (商品名: Spinraza) などが承認されている。

Small interfering RNA (siRNA) は真核生物に普遍的に存在する遺伝子発現調節機構である RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) を引き起こす二本鎖 RNA である。<sup>5,6)</sup> siRNA を外部から導入し、RNAi を活性化させることで、特定の mRNA を酵素的に分解し遺伝子の発現を抑制することが可能である。2018 年 8 月には世界初の siRNA 医薬としてトランスサイレチン型家族性アミロイドーシスの治療薬である Patisiran (商品名: Onpattro) が承認された。

Micro RNA (miRNA) は標的 mRNA に対してミスマッチ領域を含んだ内在性の非翻訳 RNA (non-coding RNA) である。近年、miRNA と様々な疾患との関連が明らかになっており、過剰発現する miRNA を標的としてその作用発現を阻害する anti-miRNA 医薬や miRNA の発現が低下している病

態に対して miRNA を外部より補充する miRNA 補充療法などが注目されている。<sup>7-9)</sup>

このように核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬では標的にできなかった分子および病態への治療薬として期待されており、2018 年 8 月までに先に示した物も含めて、計 8 種の核酸医薬が上市されている (Table 1)。<sup>10)</sup> 特に 2013 年に Mipomersen が承認されて以降、2018 年までの 5 年間の間に 6 種の新規核酸医薬が承認されており、その注目度は特に高いことが伺える。

**Table 1. Approved oligonucleotide therapeutics.**

Drug	Type	Approval	Target	Modification <sup>a)</sup>
<b>Fomivirsen</b>	antisense	US1998 EU1999	mRNA (HCMV IE2 protein)	PS
<b>Pegaptanib</b>	aptamer	US2004 EU2006 JP2008	VEGF165	PS, 3'-3'dT cap, 2'-O-Me, 2'-F
<b>Mipomersen</b>	antisense	US2013	mRNA (ApoB)	PS, 2'-O-MOE, 5-Me C
<b>Eteplirsen</b>	antisense	US2016	pre-mRNA (exon 51 of dystrophin protein)	PMO
<b>Defibrotide <sup>b)</sup></b>	other	EU2013 US2016	fibroblast growth factor 2	Polydisperse mixture of phosphodiester oligonucleotides
<b>Nusinersen</b>	antisense	US2016 EU2017 JP2017	pre-mRNA (intron7 of SMN2)	PS, 2'-O-MOE, 5-Me C
<b>Inotersen</b>	antisense	EU2018	mRNA (transthyretin)	PS, 2'-O-MOE, 5-Me C or U
<b>Patisiran</b>	siRNA	US2018 EU2018	mRNA (transthyretin)	2'-O-Me, dT overhang

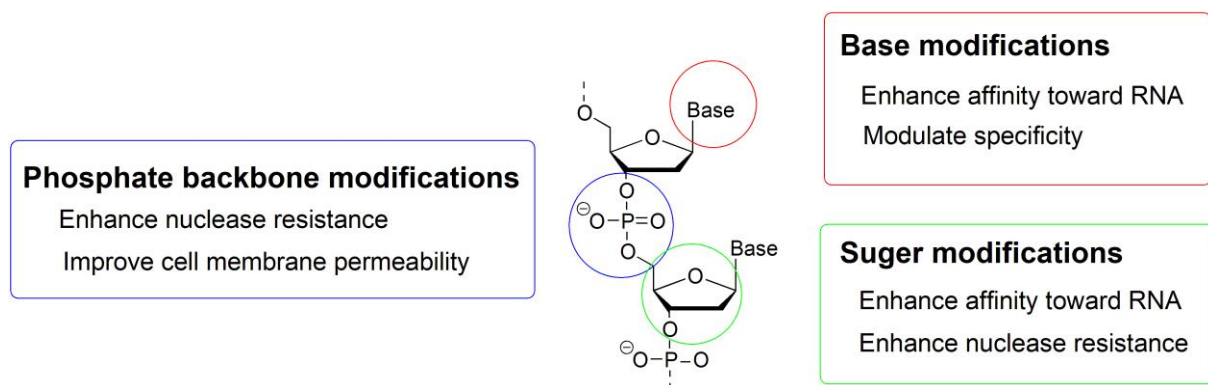
a) PS: phosphorothioate, dT: deoxythymidine, 2'-O-Me: 2'-O-methyl, 2'-F: 2'-fluoro, 2'-O-MOE: 2'-O-methoxyethoxy, 5-Me C or U: 5-methylcytosine or uracil, PMO: phosphomorpholidate; b) the mechanism and target of defibrotide is not completely understood.



## 2. 核酸医薬開発の歴史とその問題を克服する方法論 (修飾核酸)

オリゴ核酸を医薬へ応用する試みは 1970 年代より行われていたものの、初の成功例は 1998 年に承認されたアンチセンス核酸の Fomivirsen であり、その開発の難しさが伺える。アンチセンス効果の初めての発表は、1974 年に Ts'o らによる tRNA のアンチコドン配列を有するリン酸トリエステル型の 3 mer 核酸が tRNA の mRNA への結合を阻害することで、タンパクの翻訳阻害を引き起こすというものである。<sup>11,12)</sup> その後 1978 年に Zamecnik らによって、ラウス肉腫ウイルスの転写を長鎖 13 mer オリゴ核酸により選択的に阻害可能であるという発表がなされ、オリゴ核酸を用いた遺伝子発現制御に関する研究が大きく注目され始めた。<sup>13)</sup> 一方でオリゴ核酸が血清中で極めて不安定であることから、<sup>14)</sup> 医薬への応用は難しく、この性質を改善する方法論が求められていた。1987 年に Matsukura らは Eckstein により提唱されたオリゴ核酸中のリン酸ジエステル結合を phosphorothioate (PS) 結合へと変更した PS-オリゴ核酸を用いて、<sup>15)</sup> PS-オリゴ核酸がヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus, HIV) の複製をリン酸ジエステル-オリゴ核酸よりも強く阻害することを示した。<sup>16)</sup> PS-オリゴ核酸は血清中で優れた安定性を示すことから、<sup>17)</sup> 本発表を皮切りに PS-オリゴ核酸を用いた創薬研究が広く進められるようになった。<sup>18-21)</sup> その後 1990 年代には PS-オリゴ核酸に代わる様々な修飾核酸の研究がなされるようになった。

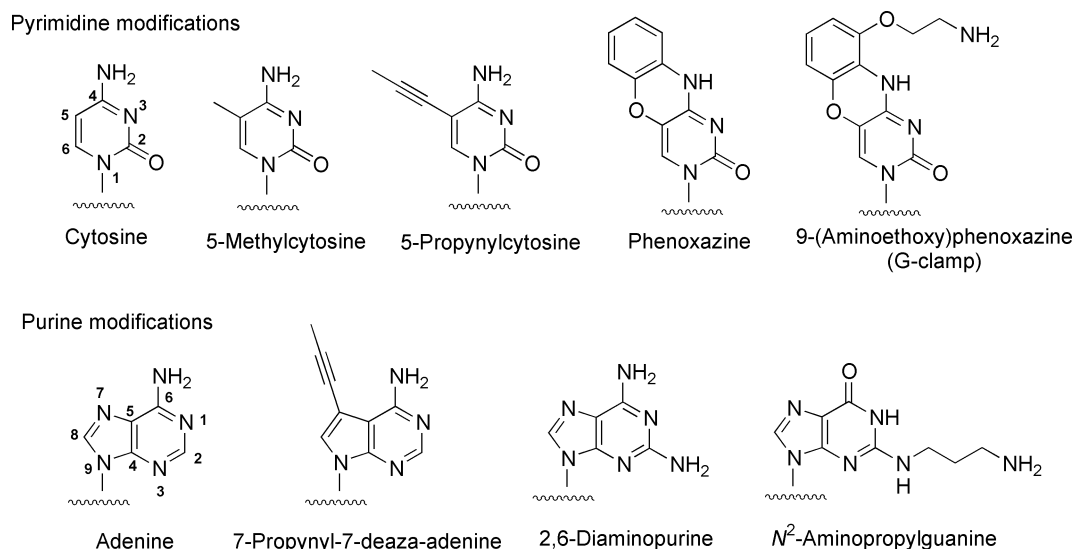
## 3. 代表的な修飾核酸とその問題点



**Figure 2.** Modification sites of oligonucleotide analogs.

これまでに PS-オリゴ核酸に代わる修飾核酸として、血清中での安定性向上などの機能付与を目的として様々な修飾核酸が開発されている。オリゴ核酸の主な修飾部位として核酸塩基部、リン酸部、糖部が挙げられ、その修飾部位に応じて様々な機能を付与することが可能である (**Figure 2**)。

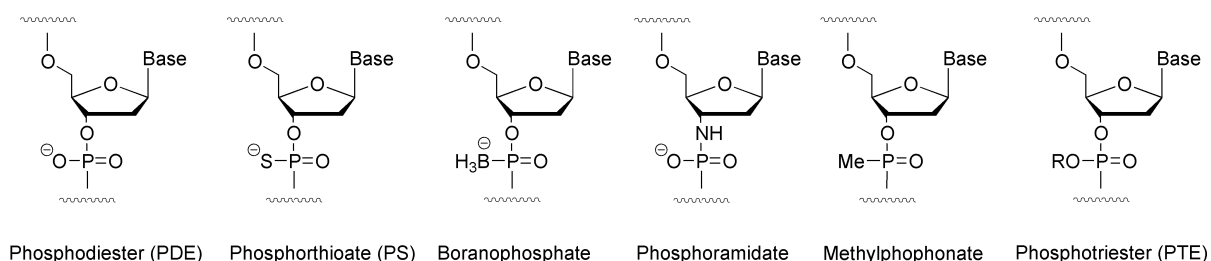
核酸塩基部の修飾は主にターゲットとなる mRNA への親和性および特異性の向上を目的として用いられる (**Figure 3**)。ピリミジン塩基であるシトシンの 5 位をメチル化した 5-methyl cytosine (5-Me C) は、オリゴ核酸中へ導入することで塩基の積み重ねによるスタッキング効果を増強させ、二本鎖の熱安定性を向上させることが出来る。<sup>22)</sup> さらに Toll-like receptor 9 (TLR9) に認識され免疫応答性の原因となる CpG モチーフを含むオリゴ核酸中に 5-Me C を導入することで、オリゴ核酸の免疫原性を減弱することが可能となるため Mipomersen や Nusinersen においても用いられている。<sup>23)</sup> 同様のピリミジン 5 位修飾である 5-propynylcytosine および 5-propynyluridine は 5-メチル基より強くスタッキング効果を増強することで、二本鎖の熱安定性を更に高めることが可能であり、アンチセンス核酸中へ導入することで優れた遺伝子発現抑制効果を示すことが確認されている。<sup>24,25)</sup> 3 環性の塩基修飾核酸である phenoxazine はワトソンクリック型塩基対を形成しながら、環の増加によるスタッキング効果の増大により、二本鎖の熱安定性を高めることのできる修飾核酸である。<sup>26)</sup> Matteucci らはこれらのピリミジン塩基修飾型オリゴ核酸のアンチセンス効果を比較しており、その中で、CG 塩基対を 4 本の水素結合でさらに安定化させることが出来る 9-(aminoethoxy)phenoxazine (G-clamp) が 5-Me C や 5-propynyl C よりも特に強い遺伝子発現抑制効果を示すことを明らかにしている。<sup>27)</sup> またプリン塩基部の修飾核酸としてスタッキング効果を高めることによる二重鎖安定性の増大を目的とした 7-propynyl-7-deaza- adenine or guanine<sup>28)</sup> や通常 2 本の水素結合で塩基対を形成する AT 塩基対を 3 本の水素結合とすることで二重鎖安定性を増大させる 2,6-diaminopurine,<sup>29,30)</sup> グアニン 2 位に塩基性側鎖を有し二重鎖中のリン酸基と静電的相互作用によって二本鎖を安定化させる N<sup>2</sup>-aminopropylguanine<sup>31)</sup> などがある。



**Figure 3.** Structures of various nucleobase-modified nucleic acids.

リン酸部修飾核酸は主に血清中に存在する核酸分解酵素に対する安定性の増大、および負電荷を除去することで脂溶性増大させ細胞内移行性を高めることを目的として用いられる (**Figure 4**)。リン酸部修飾核酸として最も繁用されるものが、先に示した **PS**-オリゴ核酸である。**PS**-オリゴ核酸は血清中での安定性を著しく向上させることが可能であるが、<sup>17)</sup> 硫黄原子がタンパク質と非特異的に相互作用することで毒性が発現することが懸念されている。<sup>32,33)</sup> リン酸基の酸素原子をボラン基に置換した boranophosphate も酵素耐性を有し、RNase H の基質となることが知られており、**PS** オリゴ核酸よりも強いアンチセンス効果、RNAi 効果を示すことから、アンチセンス分子として有用なアナログとして注目されている。<sup>34,35)</sup> リン酸ジエステル結合の 5'側リボースの 3'-酸素原子を窒素原子に置換した phosphoramidate は標的 RNA との高い親和性および高い酵素耐性を有し、<sup>36,37)</sup> オリゴ核酸とタンパク質の非特異的な結合を引き起こさないことから、低毒性の修飾核酸として注目されている。<sup>38,39)</sup> 非荷電性のリン酸部修飾核酸である methylphosphonate は **PS**-オリゴ核酸と同様に高い核酸分解酵素耐性を示すと共に、細胞膜透過能も有することが知られている。<sup>40-42)</sup> リン酸ジエステル結合にアルキル修飾を施した非荷電性修飾核酸である phosphotriester は methylphosphonate と同様に優れた酵素耐性と細胞膜透過性を有する。<sup>11,12,43)</sup> このようにリン酸部修飾核酸は血清中での安定性の向上などの面で非常に

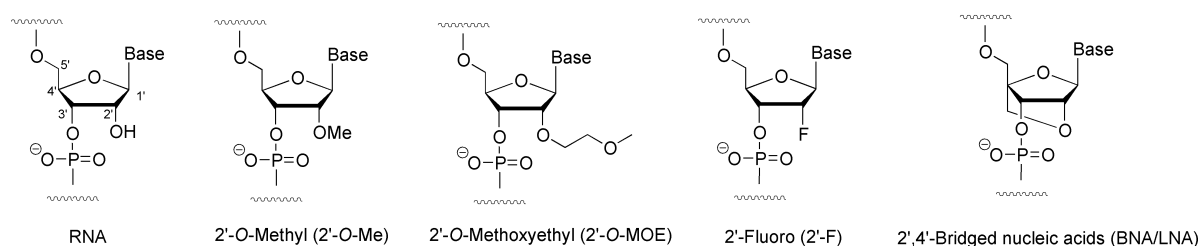
有用であるが、リン原子上に不斉中心を有するため、一部の修飾核酸では標的 RNA との親和性が低下することなどが問題とされている。<sup>44)</sup>



**Figure 4.** Structures of various phosphate-backbone modified nucleic acids.

糖部修飾核酸は主にターゲット RNA との親和性向上および分解酵素耐性の向上を目的として用いられる (**Figure 5**)。RNA はリボース 2'位に水酸基を有し、水酸基からのリン酸ジエステル結合への求核的攻撃による隣接基関与で加水分解を受けやすく DNA に比べ不安定である。<sup>45)</sup> そこで RNA の安定性を高めることを目的として主にリボースの 2'位に修飾を施した修飾核酸が多く報告されている。2'-O-Methyl (2'-O-Me) は天然の RNA 鎖中에서도見られる修飾核酸であり、低い毒性で RNA の酵素耐性を向上させることが可能である。<sup>46)</sup> また 2'-O-Me 修飾を導入した siRNA は TLR の基質として認識されにくくなるため、<sup>47,48)</sup> siRNA による免疫反応を抑制することが可能である。本修飾は 2018 年 8 月に FDA に承認された世界初の siRNA 医薬である Patisiran においても用いられている。2'-O-Methoxyethyl (2'-O-MOE) は MOE 側鎖が水分子を捉えることで側鎖の水和を促し、近傍に存在するリン酸ジエステル結合の水分子による攻撃を阻害することで、2'-O-Me よりも優れた酵素耐性を付与することが可能となる。<sup>49)</sup> さらに標的 RNA との結合親和性を向上させることも可能であることから、<sup>50-52)</sup> 2013 年に承認された Mipomersen にも用いられている。2'-Fluoro (2'-F) はリボースの 2'-水酸基を水酸基とほぼ同じ大きさのフッ素原子に置換した修飾核酸であり、置換による酵素耐性の向上、および糖部のコンホメーションを RNA/RNA 二本鎖形成時に近づけることで標的 RNA との親和性を向上させることが可能である。<sup>53,54)</sup> 2',4'-Bridged or locked nucleic acids (BNA/LNA) は糖部の 2'位炭素と 4'位炭素をメチレン架橋したもので、糖部のコンホメーションを予め RNA/RNA 二本鎖形成時の配座に固定化するこ

とで、相補鎖との結合能が飛躍的に向上することが知られている。<sup>55,56)</sup> 一方で 2'-O-Me や 2'-O-MOE 修飾に代表されるリボース 2'位に修飾基を導入したオリゴ核酸は、その置換基がアンチセンス効果発揮する際に重要となる RNase H や RNAi の過程における RNA-induced silencing complex (RISC) の形成時に重要なタンパクである Argonote 2 (Ago 2) に認識されにくくなることから活性の低下を引き起こし、その導入箇所が限定されるという問題がある。<sup>57-59)</sup>

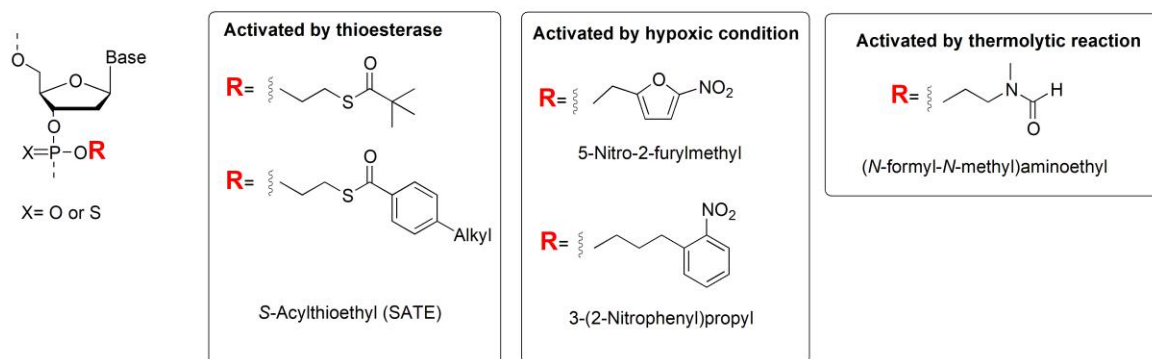


**Figure 5.** Structures of various ribose ring-modified nucleic acids.

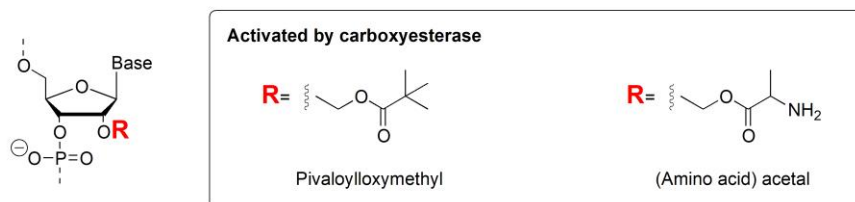
#### 4. プロドラッグ型修飾オリゴ核酸とその問題点

このように核酸分解酵素耐性の向上や細胞膜透過性の向上などを目的として、様々な修飾核酸が開発されており、特にリン酸部および糖部修飾核酸は核酸分解酵素耐性を飛躍的に向上させることが可能であることから、アンチセンス核酸や siRNA 創薬において数多く用いられている。一方で、先に示したように、リン酸部修飾核酸ではリン原子の不斉による標的 RNA との親和性の低下、糖部修飾核酸では修飾基による活性の低下など、これらの修飾核酸のみでは解消できない問題点も存在する。そこで、これらの問題を解消する手法としてオリゴ核酸に生分解性の保護基を導入し、生体内での反応によって天然型オリゴ核酸へと変換されるプロドラッグ型オリゴ核酸が注目されている (**Figure 6**)。

### Phosphate backbone-modified prodrug-type oligonucleotides



### Ribose ring-modified prodrug-type oligonucleotides



**Figure 6.** Structures of various prodrug-type oligonucleotides.

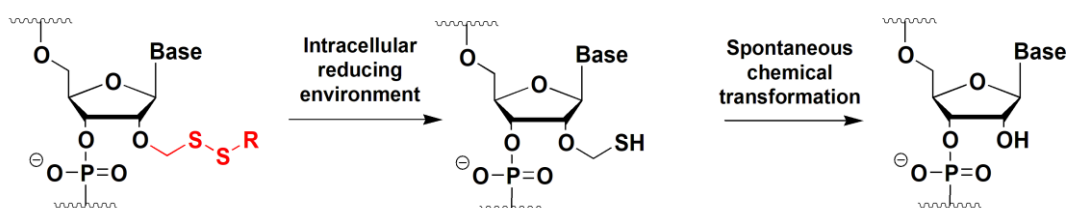
プロドラッグ型オリゴ核酸は作用発現の場である細胞内において天然型へと変換されることで、通常の修飾核酸で問題となる不斉リン原子の発生に伴う親和性の低下や、RNase H や Ago 2 に認識されにくくなることで生じる活性の低下を引き起こさず、酵素耐性および細胞膜透過性などの機能付与が可能である。Imbach らは 1995 年頃より、細胞内チオエステラーゼによって天然型オリゴ核酸へと変換されるリン酸部修飾型オリゴ核酸を設計し、その機能評価を行っている。<sup>60-64)</sup> Imbach らは当時モノヌクレオチド型プロドラッグとして報告されていた S-acylthioethyl (SATE) 基をオリゴ核酸中に導入することで、オリゴ核酸の血清中での安定性と細胞膜透過性を向上させることが可能であることを報告している。<sup>65)</sup> また SATE 修飾を施した siRNA が *in vivo* においても優れた遺伝子抑制効果を示すことが明らかになっており、<sup>66)</sup> リン酸部修飾プロドラッグ型オリゴ核酸が重要な創薬シーズとして注目されることとなった。近年においては、低酸素状態におけるニトロ基の還元反応により天然型オリゴ核酸へと変換される 5-nitro-2-furylmethyl 基、<sup>67)</sup> 3-(2-nitrophenyl)propyl 基<sup>68)</sup>を導入したプロドラッグ型オ

リゴ核酸や中性 pH において体温程度の加熱によって天然型オリゴ核酸へと変換される (*N*-folmyl-*N*-methyl)-aminoethyl 基<sup>69)</sup>を導入したプロドラッグ型オリゴ核酸などが報告されている。また RNA の糖部 2'-水酸基を修飾したプロドラッグ型オリゴ核酸として生体内のカルボキシエステラーゼによって天然型オリゴ核酸へと変換される pivaloyloxymethyl 基<sup>70)</sup> や(amino acid) acetal 基<sup>71)</sup>を導入したものが報告されている。Debart らは pivaloyloxymethyl 基を導入したプロドラッグ型 siRNA は配列中すべてに修飾基を導入した場合でも天然 siRNA と同様の遺伝子発現抑制作用を示すこと報告しており、<sup>70)</sup> 糖部修飾プロドラッグ型オリゴ核酸も創薬シーズとして有用なアナログであることが伺える。

一方でエステラーゼは細胞内だけでなく血液中など生体内において普遍的に存在する酵素であるため、<sup>72)</sup> 標的細胞内への送達前に天然型オリゴ核酸へと変換され、十分な生体内安定性を確保できない可能性がある。更にエステラーゼなどを用いた酵素反応は基質認識が厳密な場合があり、その機能拡張のための誘導化が困難となることが問題となりうる。

## 5. 細胞内還元環境で天然型へと変換されるプロドラッグ型オリゴ核酸

筆者の所属する研究室ではより実用的な修飾 siRNA の開発を目指し、酵素反応を利用せず生体内において天然型 siRNA へと変換されるプロドラッグ型オリゴ核酸の開発に取り組んできた。グルタチオン (GSH) は活性酸素などを除去する還元性を有するトリペプチドであり、血漿中では約 2  $\mu$ M 程度で存在するのに対して、細胞内では 0.5-10 mM と 1000 倍程度の濃度差で存在する。<sup>73,74)</sup> 先行研究では、この細胞内外の GSH の濃度差に着目し、GSH による細胞内還元環境により天然型へと変換されるプロドラッグ型 RNA “Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming (REDUCT)-RNA” を新たなプロドラッグ型オリゴ核酸として開発し、その有用性評価を行って来た。本分子は、RNA の糖部 2'位にジスルフィド結合を含む 2'-*O*-(*S*-alkyldithiomethyl) 基を導入することでグルタチオンによる還元反応により、ジスルフィド結合の切断が引き起こされ、不安定中間体であるチオヘミアセタールが自発的にチオホルムアルデヒドとして脱離することで天然型 RNA へと変換される (Figure 7)。



**Figure 7.** Conversion of REDUCT-RNA into natural RNA.

先行研究ではオリゴ核酸中の uridine 2'位に methylthiomethyl (MTM) 基を導入した REDUCT-RNA が細胞内 GSH と同程度の GSH 濃度にて天然型 RNA へと変換されることが、配列の一部に導入することでオリゴ核酸の血清中での安定性が飛躍的に向上することを明らかにしている。<sup>75)</sup> さらに siRNA 中の配列に同様の修飾を施した 2'-O-MDTM-siRNA は *in vitro* において天然型 siRNA と同等以上の遺伝子発現抑制作用を示すことを明らかにしてきた。<sup>76)</sup>

これらの知見を基に筆者は、本分子が siRNA 創薬において極めて重要な分子と考え、まず① 2'-O-MDTM 修飾と 2'-O-Me 修飾が siRNA 活性に与える影響の比較を行うことで、本分子の更なる有用性を示した後、②標的遺伝子配列拡張のための 4 種ヌクレオチドの 2'位に MDTM 修飾を施したオリゴ核酸の合成法の確立を行った。本論文ではそれらの検討の詳細に加え、これらの検討から得られた知見を基に、③REDUCT の概念を利用した新規リン酸部修飾プロドラッグ型オリゴ核酸の開発も行ったので、この詳細に関しても述べる。

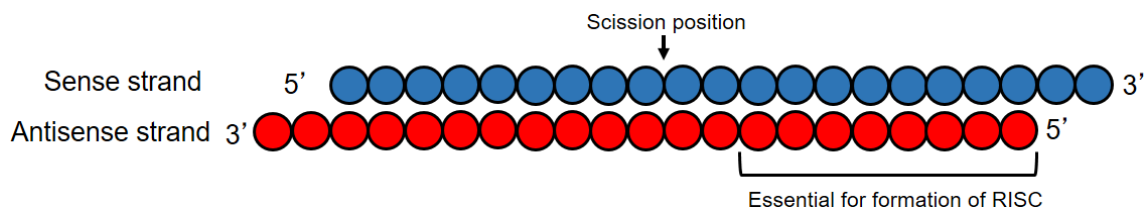


## 本論

### 第一部 細胞内還元環境に応答する 2'位修飾プロドラッグ型 siRNA の開発

#### 第一章 2'-O-methyldithiomethyl (MDTM) 修飾と 2'-O-methyl (Me) 修飾が siRNA 活性に与える影響の比較

一般に siRNA の 2'位の修飾基は RNA 干渉において RISC の形成を阻害することが知られており、その導入箇所には制限がある。特に siRNA のアンチセンス鎖の 5'末端および seed 領域と呼ばれる 5'末端から 2-8 残基は RISC の構成タンパクである Ago2 と特に強く相互作用する箇所であることから、<sup>77-79)</sup> この箇所に修飾基を導入すると Ago2 との親和性が低下し、RISC 形成の阻害や RISC 中への siRNA センス鎖の誤取り込みが生じる。その結果、siRNA 活性の低下や非特異的な遺伝子発現抑制作用である off-target 効果が引き起こされやすくなるため、これらの位置への修飾基の導入は避けることが望まれる (Figure 8)。<sup>57)</sup>



**Figure 8.** Structure of siRNA: siRNA is double-stranded 21-23mer RNA, with 3'-overhang. The 1-8 nucleotide positions from 5'-end in the antisense strand are essential for formation of RISC.

先行研究においては 2'-O-MDTM-uridine を導入した siRNA が天然型 siRNA と比較して、同等以上の遺伝子発現抑制作用を有することを明らかにしている。<sup>76)</sup> 更に siRNA 中アンチセンス鎖 5'末端側に複数の 2'-O-MDTM 修飾を導入した場合の活性低下が起こらなかったことから、2'-O-MDTM 修飾を siRNA 中のいずれの箇所に導入した場合でも優れた遺伝子発現抑制作用を示すことが示唆された。

これらの結果を踏まえて筆者は、2'-O-MDTM 修飾の修飾位置および修飾数が siRNA 活性に与える影響をより詳細に評価することを目的として、従来から汎用されている 2'位修飾核酸である 2'-O-Me siRNA との活性を比較した。

## 第一節 異なるトランスフェクション法による siRNA 活性の比較

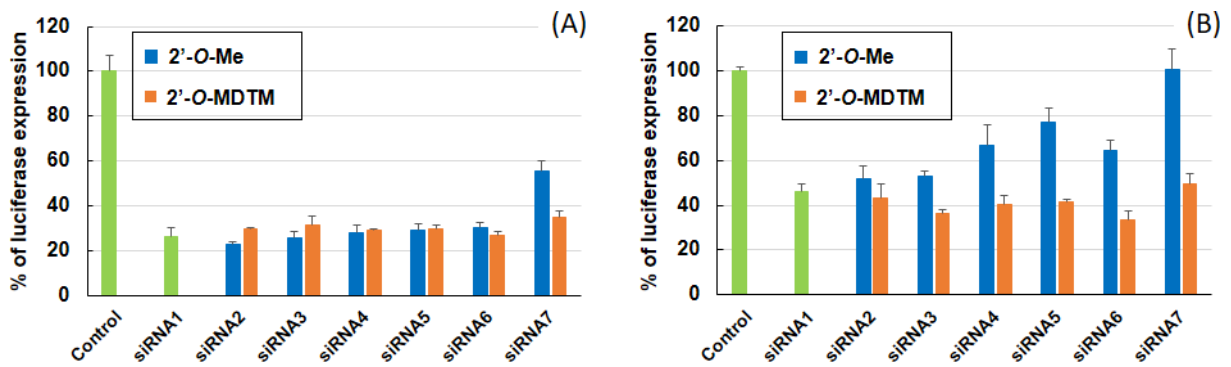
ポリアニオン性の高分子である siRNA は、細胞膜を通過することが出来ないため、何らかの手法により siRNA を細胞内に導入する必要がある。一般的に siRNA などのオリゴ核酸はトランスフェクション試薬として脂質二重膜構造を有するリポソームを用いた lipofection 法によって細胞内に導入される。先行研究においても、lipofection 法により siRNA を細胞内に導入し、2'-O-MDTM siRNA が天然型 siRNA と同等で以上の活性を示すことを明らかにしてきた。しかし、本手法はトランスフェクション試薬による毒性やオリゴ核酸-リポソーム複合体の形成効率の差によって偽陽性が引き起こされることが問題とされる。<sup>80)</sup> 近年、大阪大学の堀、小比賀らは lipofection 法に代わるトランスフェクション法として Ca<sup>2+</sup> enrichment of medium (CEM) 法を報告している。<sup>81)</sup> 本手法は通常の血清を含む細胞培養培地に高濃度の Ca<sup>2+</sup> を添加することで、オリゴ核酸を低毒性にて細胞内に導入できるものである。CEM 法ではオリゴ核酸を裸に近い状態で細胞内に導入可能であることから、トランスフェクション試薬の毒性やオリゴ核酸-リポソーム複合体形成効率に起因する偽陽性を引き起こしにくい。そこで筆者はより正確な活性評価を行うことを目的として、2'-O-MDTM siRNA を CEM 法によりトランスフェクションし遺伝子発現抑制効果を評価することとした。

まず先行研究と同様に lipofection 法を用いた場合での活性評価も行い、トランスフェクション法の変更による活性差が見られるかを検討した。抗ルシフェラーゼ siRNA 中のセンス鎖およびアンチセンス鎖に 2'-O-MDTM-または 2'-O-Me-uridine を組み込んだ siRNA 2-7 を調製した (Table 2)。得られた 2' 位修飾 siRNA (10 nM) をトランスフェクション試薬として lipofectamine 2000 を用いた lipofection 法または 9 mM の CaCl<sub>2</sub> を添加した 10 % (v/v) のウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) を用いた CEM 法によってルシフェラーゼ遺伝子を安定発現したヒト由来肺がん細胞 (A549-Luc) に導入した。その後、24 h 培養後の細胞中のルシフェラーゼ発現量を発光分析により測定した。抗ルシフェラーゼ活性のないランダム配列を有する control siRNA を導入した際のルシフェラーゼ発現量を 100 % として、抗ルシフェラーゼ活性を有する siRNA1-7 を導入後のルシフェラーゼ発現量の相対比率を求めた (Figure 9)。

**Table 2.** Sequences of siRNAs for anti-luciferase assay.

siRNA	Sense (5' to 3')	Antisense (3' to 5')
<b>Control</b>	<b>ACUUGUGGCCGUUUACGUCTT</b>	<b>TTUGAACACCGGCAAAUGCAG</b>
<b>siRNA1 (natural)</b>	<b>CUUACGCUGAGUACUUCGATT</b>	<b>TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU</b>
<b>siRNA2</b>	<b>CUUACGCUGAGUACUUCGATT</b>	<b>TTGAAUGCGAC<u>U</u>CAUGAAGCU</b>
<b>siRNA3</b>	<b>CUUACGC<u>U</u>GAG<u>U</u>ACUUCGATT</b>	<b>TTGAAUGCGAC<u>U</u>CAUGAAGCU</b>
<b>siRNA4</b>	<b>CUUACGC<u>U</u>GAGUACUUCGATT</b>	<b>TTGAAUGCGAC<u>U</u>CA<u>U</u>GAAGCU</b>
<b>siRNA5</b>	<b>CUUACGC<u>U</u>GAG<u>U</u>ACUUCGATT</b>	<b>TTGAAUGCGAC<u>U</u>CA<u>U</u>GAAGCU</b>
<b>siRNA6</b>	<b><u>C</u>U<u>U</u>ACGC<u>U</u>GAG<u>U</u>ACU<u>U</u>CGATT</b>	<b>TTGAAUGCGAC<u>U</u>CA<u>U</u>GAAGCU</b>
<b>siRNA7</b>	<b><u>C</u>U<u>U</u>ACGC<u>U</u>GAG<u>U</u>ACU<u>U</u>CGATT</b>	<b>TTGAA<u>U</u>GCGAC<u>U</u>CA<u>U</u>GAAGCU</b>

U: 2'-*O*-MDTM or 2'-*O*-Me uridine. Seed region (2-8 positions from 5'-end of antisense strand) is indicated in Italic letters.

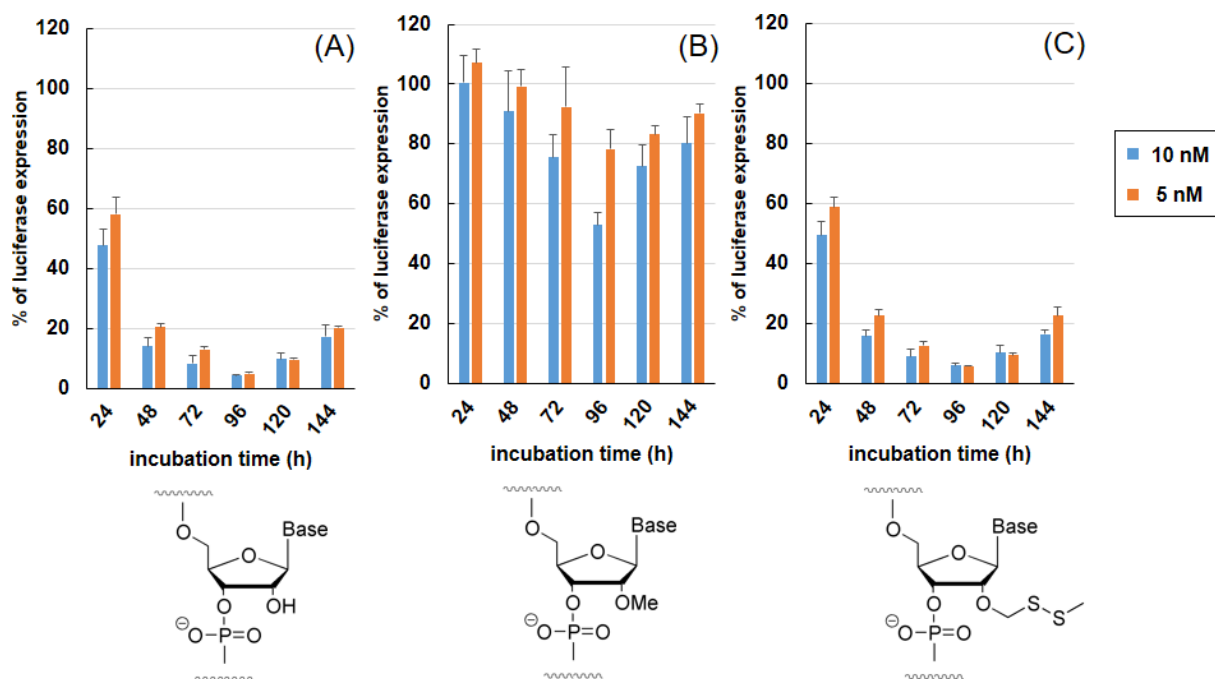


**Figure 9.** Effect of transfection methods on anti-luciferase activities of 2'-*O*-modified siRNAs. 2'-*O*-Me (blue bars) and 2'-*O*-MDTM (orange bars) siRNAs were transfected with lipofectamine 2000 (A) and by the CEM method (B) for 24 h at the concentration of 10 nM. Luciferase expressions were normalized to intracellular protein expression. Data are averages of at least three independent experiments and error bars mean +SD.

Lipofection 法によるトランスフェクションを行った場合、2'-O-Me および 2'-O-MDTM siRNA2-6 はともに天然型 siRNA1 と同等の抗ルシフェラーゼ活性を示した。唯一アンチセンス鎖の 5'末端に修飾を有する siRNA7 のみ 2'-O-Me 修飾を導入した場合において若干の活性低下は見られたが、修飾箇所による顕著な活性の変化は確認されなかった (Figure 9A)。一方、CEM 法によるトランスフェクションを行った場合、非プロドラッグ型の 2'-O-Me siRNA では修飾数の増加に伴い活性の低下が確認された (Figure 9B, blue bars)。特に seed 領域に修飾を有する siRNA4-6 は seed 領域に修飾を有さない siRNA2, 3 と比較して活性が低く、さらにアンチセンス鎖の 5'末端にも修飾基を導入した siRNA7 においては全く遺伝子発現抑制作用を示さなかった。これに対しプロドラッグ型の 2'-O-MDTM siRNA においては、CEM 法でトランスフェクションを行った場合でも、大きな活性低下は確認されなかった (Figure 9B, orange bars)。特に 2'-O-Me 修飾では著しい活性の低下が確認されたアンチセンス鎖 5'末端に 2'-O-MDTM 修飾を導入した siRNA7 においても優れた活性を示した。

2'-O-Me siRNA を lipofection 法により導入した場合、修飾数を増加させても顕著な活性の変化は見られなかったのに対し、CEM 法を用いた場合では修飾部位による活性の低下を顕著に確認することが出来た。この結果から CEM 法によるトランスフェクションは修飾部位が活性に与える影響をより精度よく評価するために有用であると考えられた。一方、プロドラッグ型 2'-O-MDTM siRNA は修飾数を増やした場合でも活性の低下は見られず、lipofection 法および CEM 法のどちらのトランスフェクション法を用いた場合でも、同じ傾向を確認できた。2'-O-Me siRNA と比較して、トランスフェクション法を変更した場合でも顕著な活性低下が見られなかったことから、2'-O-MDTM 修飾は従来の非プロドラッグ型修飾と比較して、トランスフェクション法や修飾位置および修飾数の違いによる siRNA 活性への影響が現れにくい修飾であることが明らかとなった。更にその活性は天然型 siRNA と同等であったことから、細胞内において変換反応が進行し、天然型 siRNA としてその活性を発現していることが示唆された。そこで筆者はプロドラッグ型 siRNA の活性発現の経時変化を調べることで、2'-O-MDTM siRNA の活性が変換後の天然型 siRNA によって引き起こされていることを推測できると考え、それぞれの siRNA 活性の経時変化に関して評価を行った。

先の検討にて 2'-O-Me と 2'-O-MDTM siRNA の活性差が顕著であった **siRNA7** を CEM 法により A549-Luc 細胞に導入し、24–144 h までの抗ルシフェラーゼ活性を発光分析により測定した。その後、先の検討と同様に遺伝子発現抑制効果を評価した (**Figure 10**)。



**Figure 10.** Time courses of anti-luciferase activities of natural and 2'-O-modified siRNAs. (A) 2'-OH (natural **siRNA1**), (B) 2'-O-Me siRNA, and (C) 2'-O-MDTM siRNA (**siRNA7**) were transfected by CEM method at the concentrations of 10 nM (blue bar) and 5 nM (orange bar). Luciferase expressions were normalized to intracellular protein expression and control siRNA-transfected cells were set as 100% expression. Data are averages of at least three independent experiments and error bars mean +SD.

天然型 siRNA はトランスフェクションから 96 h 後に最大の活性を示し、その後緩やかに活性が低下していくことが確認された (**Figure 10A**)。同様の傾向は 2'-O-Me および 2'-O-MDTM siRNA においても確認されたが、活性の強度は 2'-O-MDTM siRNA が 2'-O-Me siRNA に比べ著しく高かった (**Figure 10B and C**)。さらに 2'-O-MDTM siRNA の活性は天然型 siRNA と全ての時間においてほぼ同等であった。

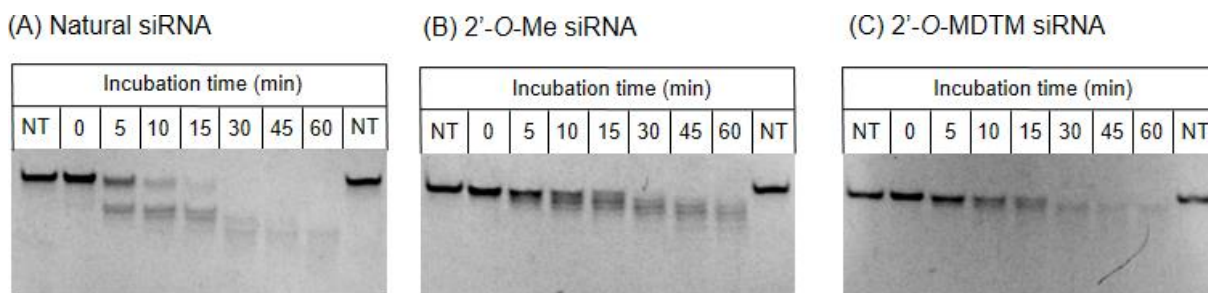
非プロドラッグ型 2'-O-Me siRNA では著しい活性の低下が見られたことから、2'位の置換基が残存していることで活性の低下が引き起こされることが予想される。一方、2'-O-MDTM siRNA の活性は

天然型 siRNA と全ての時間においてほぼ同等であったことから、細胞内に導入された 2'-O-MDTM siRNA は速やかに天然型 siRNA へと変換され siRNA 活性を発現していることが示唆された。

## 第二節 2'-O-MDTM siRNA の血清中での安定性評価

先行研究における血清中での安定性評価は 2'-O-MDTM-uridine を導入した一本鎖オリゴ核酸を用いて行われており、2'-O-MDTM 修飾が二本鎖である siRNA の安定性を向上させることが可能であるかは定かではなかった。そこで筆者は天然型、2'-O-MDTM および 2'-O-Me siRNA の血清中における安定性に関して評価を行った。

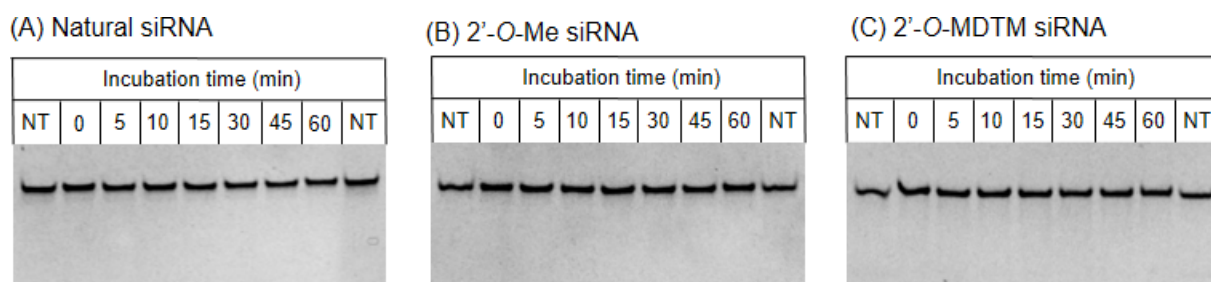
天然型 **siRNA1**, 2'-O-MDTM および 2'-O-Me **siRNA7** を 10 % の FBS 中にて 37 °C でインキュベートし、一定時間ごとに反応液を取り、反応液を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析した (**Figure 11**)。



**Figure 11.** Stabilities of 2'-O-modified siRNAs in 10 % FBS. Natural **siRNA1** (A) and 2'-O-Me **siRNA7** (B) and 2'-O-MDTM **siRNA7** (C) were incubated in 10 % FBS at 37 °C. NT; no treatment.

10 % FBS 中において、天然型 siRNA は 5 min 以内に分解が生じ、15 min 後には未変化の siRNA のバンドがほとんど確認されなかった。一方で 2'-O-Me および 2'-O-MDTM は 15 min 後においても未変化の siRNA と思われるバンドが確認されたことから、2'-O-Me および 2'-O-MDTM siRNA が天然型 siRNA と比較して血清中で高い安定性を有することが確認された。

以上の結果から、2'-O-MDTM siRNA が天然型 siRNA に比べ、血清中で高い安定性を有することが明らかとなったが、第一節および第二節の結果で確認された siRNA 活性は天然型 siRNA と同等であり、安定性向上による siRNA 活性の向上は確認されなかった。そこで筆者はトランスフェクションに用いた CEM 培地中での各 siRNA 安定性に関して評価を行った。

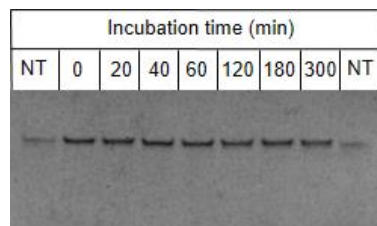


**Figure 12.** Stabilities of 2'-O-modified siRNAs in medium used in the CEM method. Natural siRNA1 (A) and 2'-O-Me siRNA7 (B) and 2'-O-MDTM siRNA7 (C) were incubated at 37 °C in medium used in the CEM method. NT; no treatment.

9 mM の  $\text{CaCl}_2$  を添加した 10 % FBS/DMEM 中に天然型、2'-O-Me および 2'-O-MDTM siRNA をそれぞれ加え、37 °C にてインキュベートした。一定時間ごとに採取した反応液を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分析し、CEM 培地中での安定性を評価した (Figure 12)。

CEM 培地中においては各 siRNA とともに 1 h まで、ほとんど分解を受けていないことが確認された。更に天然型 siRNA のみ 5 h まで反応時間を延長し安定性を確認したが、siRNA の分解は生じていなかった (Figure 13)。核酸分解酵素であるヌクレアーゼは 2 価金属である  $\text{Mg}^{2+}$  を活性中心に有することから、他の 2 価の金属による影響を受けやすい。特に  $\text{Ca}^{2+}$  は活性中心の  $\text{Mg}^{2+}$  と置き換わることで、ヌクレアーゼ活性を弱める働きが知られていることから、<sup>82)</sup> 高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  含む CEM 培地中においては、天然型 siRNA の分解が生じなかったことが考えられた。

当初 CEM 培地中には血清が含まれるため、天然型 siRNA は CEM 培地中で分解され、活性が低下することを期待していた。しかし、CEM 培地中では天然型 siRNA は全く分解を受けなかったことから、CEM 法を用いた *in vitro* での検討において天然型 siRNA の活性低下は見られなかったものと考えられた。



**Figure 13.** Stabilities of Natural **siRNA1** in medium used in the CEM method. NT; no treatment.



## 小括

筆者はまず2種のトランスフェクション法を用いて、2'-*O*-MDTM 修飾と 2'-*O*-Me 修飾が siRNA 活性に与える影響を評価した。その結果、CEM 法により siRNA をトランスフェクションすることで 2'-*O*-Me 修飾による著しい活性の低下を確認することができた。同時に 2'-*O*-Me 修飾を導入することで著しい活性の低下が見られた seed 領域およびアンチセンス鎖 5'末端に 2'-*O*-MDTM 修飾を導入しても、活性の低下は、ほとんど見られないことを確認することができた。

次に siRNA 活性を経時的に観察することで、2'-*O*-MDTM siRNA が 144 h まで天然型 siRNA と同等の活性を示すことを確認した。この結果から 2'-*O*-MDTM siRNA が細胞内において天然型 siRNA へと変換されることで、その活性を示すことが強く示唆された。

さらに血清中にて 2'-*O*-MDTM siRNA が天然型 siRNA と比較して優れた安定性を有することを確認した。複数個所に 2'-*O*-MDTM 修飾を導入しても活性低下が見られなかったことから修飾箇所を増やすことで、更なるヌクレアーゼ耐性の向上が期待できる。

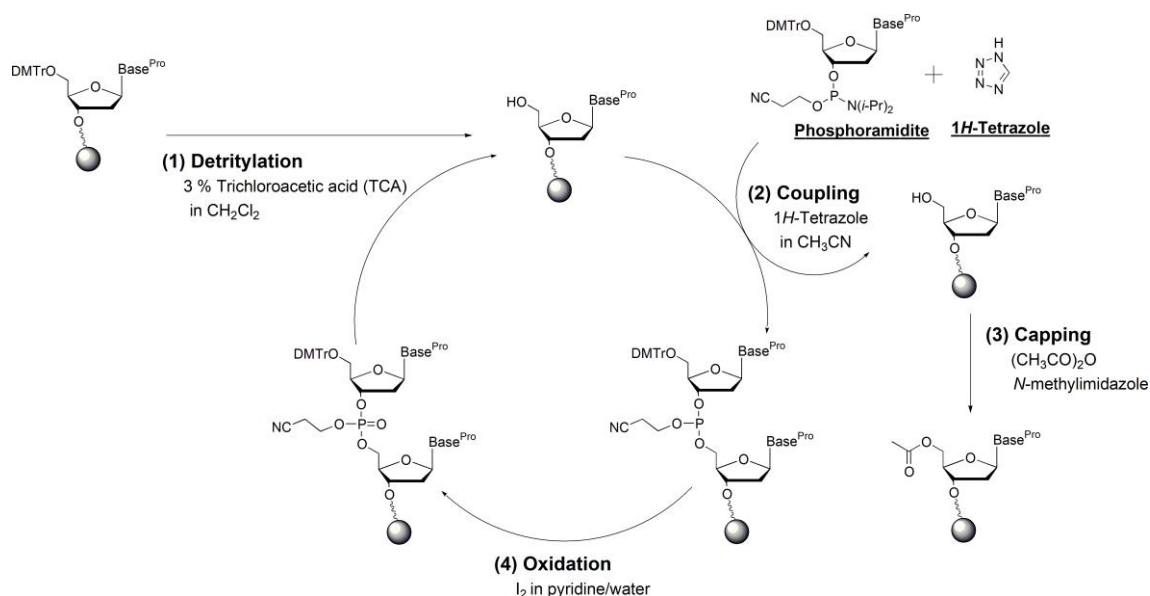
以上の結果から 2'-*O*-MDTM siRNA が siRNA 創薬において極めて重要な分子であることが考えられた。一方で、これまでの検討は siRNA 配列中の uridine の 2'位のみを修飾した 2'-*O*-MDTM siRNA を用いて行ってきた。そこで様々な遺伝子配列に対応可能な 2'-*O*-MDTM siRNA を開発するために、uridine 部位以外に 2'-*O*-MDTM 修飾を施したオリゴ核酸の合成検討を行った。

## 第二章 遺伝子配列拡張のための4種ヌクレオチド中の2'位に methyldithiomethyl 修飾を施したオリゴ核酸の合成法の確立

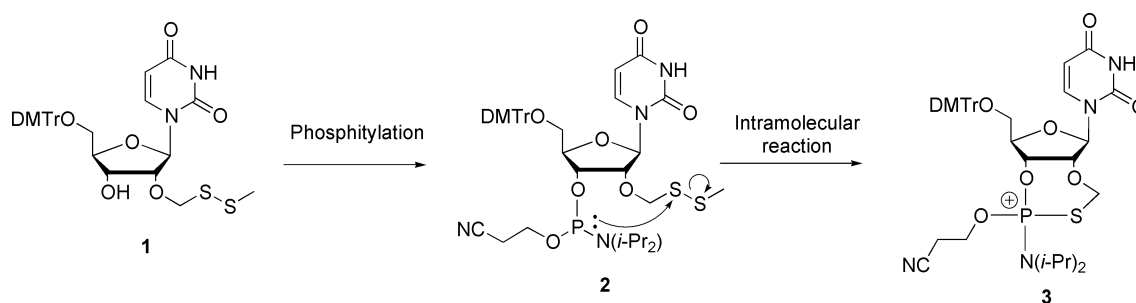
ここまでの検討より、siRNA 配列中の uridine 2'位に methyldithiomethyl (MDTM) 基を導入したプロドラッグ型 2'-O-MDTM-siRNA は非プロドラッグ型の 2'-O-Me-siRNA と比較して高い siRNA 活性を有することを明らかにした。そこで筆者はさらに多くの遺伝子配列に対応させるために、uridine 以外の adenosine, guanosine および cytidine の 2'位にも MDTM 基を組み込んだ 2'-O-MDTM siRNA の合成に取り組むこととした。

オリゴ核酸の化学合成は、3 価リン原子を有する phosphoramidite をモノマーユニットとして用いるホスホロアミダイト法による固相合成が一般的である。本手法は 1981 年に Caruthers らによって確立され、その後改良が加えられ、現在最も繁用される手法の一つである。<sup>83,84)</sup> ホスホロアミダイト法による固相合成では、(1) 固相に担持したヌクレオシドの 5'位の脱保護 (detritylation), (2)  $\beta$ -cyanoethyl phosphoramidite との縮合 (coupling), (3) 未反応の 5'位水酸基のアシル化 (capping), (4) 3 価のリン原子の酸化 (oxidation) の 4 工程を 1 サイクルとして目的の鎖長になるまで繰り返す。その後、固相担体からの切り出し、核酸塩基およびリン酸基の脱保護を行い目的のオリゴ核酸を得る (Figure 14)。

通常、修飾オリゴ核酸の合成は、その合成前駆体である phosphoramidite に修飾基を導入しておき、合成サイクル中でオリゴ核酸へと組み込むことで達成される。すなわち本手法により、2'-O-MDTM オリゴ核酸を得るためには、その前駆体として 2'-O-MDTM phosphoramidite が必要となる。一方で 2'-O-MDTM phosphoramidite は分子内に 3 価リン原子とジスルフィド結合が共存する構造となっているため、分子内での酸化還元反応が起こり不安定である。予備的検討においても 5'-DMTr-2'-O-MDTM-uridine **1** を phosphityl 化すると目的の 2'-O-MDTM phosphoramidite **2** は得られず、3 価リン原子とジスルフィドが反応することで **3** と思われる化合物が生じることを分子量測定によって確認している (Scheme 1)。

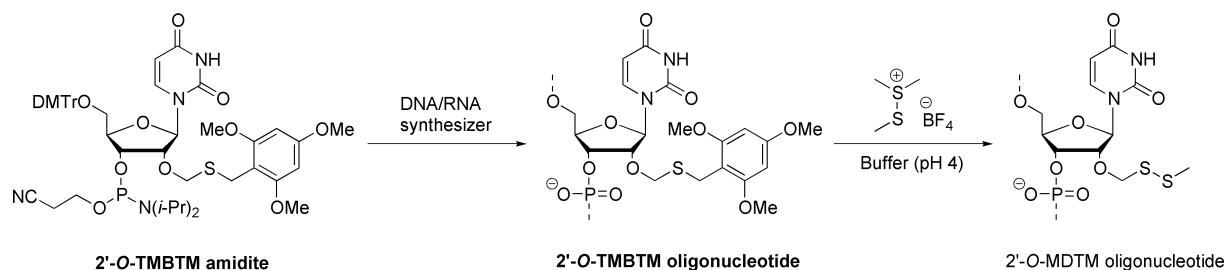


**Figure 14.** Solid-phase oligonucleotide synthesis by phosphoramidite chemistry.



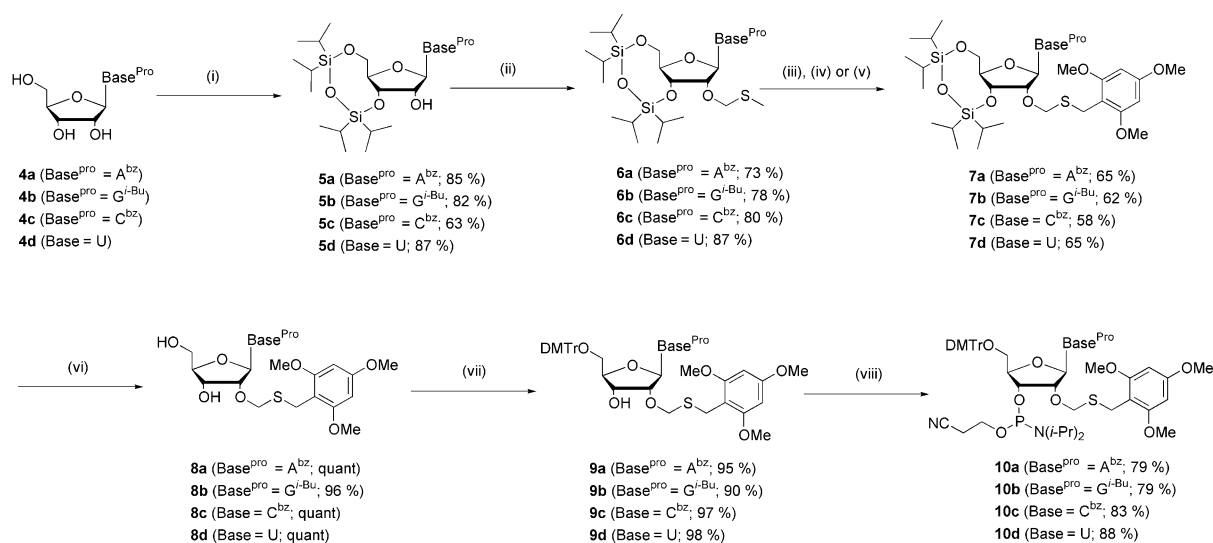
**Scheme 1.** Proposed degradation mechanism of 2'-O-methyldithiomethyl phosphoramidite.

そのため、先行研究では 2'-O-MDTM へと変換可能な官能基である 2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl (TMBTM) 基を導入した phosphoramidite を原料としてオリゴ核酸を合成後、MDTM への変換を行う「オリゴ核酸合成後修飾法」によって 2'-O-MDTM オリゴ核酸を合成してきた (**Figure 15**)。これまでの検討では、オリゴ核酸中の uridine 2'位において TMBTM 基から MDTM へ効率よく変換可能であることを明らかにしている。<sup>75)</sup> これらの先行研究を踏まえて筆者は、より多くの遺伝子配列に対応可能な 2'-O-MDTM-RNA を合成するために uridine 以外の adenosine, guanosine, cytidine の 2'位に MDTM 基を導入したオリゴ核酸の合成検討を行った。



**Figure 15.** Post-synthetic approach for the synthesis of 2'-O-MDTM oligonucleotide modified at uridine residue.

### 第一節 2'-O-TMBTM phosphoramidite unit の合成



**Scheme 2.** Syntheses of phosphoramidite units bearing 2'-O-TMBTM group. (i) TIPDS-Cl<sub>2</sub>, pyridine; (ii) DMSO, Ac<sub>2</sub>O, AcOH; (iii) SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (iv) 2,4,6-trimethoxybenzylmercaptan, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (for **7a-c**); (v) 2,4,6-trimethoxybenzylmercaptan, NaH, DMF (for **7d**); (vi) 3HF-Et<sub>3</sub>N, THF; (vii) DMTr-Cl, pyridine; (viii) 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite, DIEA, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

まず 2'-O-TMBTM オリゴ核酸の合成前駆体である 2'-O-TMBTM phosphoramidite の合成に取り組んだ (Scheme 2)。ホスホロアミダイト法によるオリゴ核酸合成の最終工程では、高温条件下アンモニア水にて処理することで、オリゴ核酸の固相担体からの切り出し、核酸塩基およびリン酸基の脱保護を行う。修飾核酸によっては本条件において、オリゴ核酸が分解することなどが問題となる為、より緩やかな条件で脱保護可能な保護基を選択する必要がある。一方で先行研究において 2'-O-TMBTM オリゴ核酸は本条件において安定であったことから、核酸塩基のアミノ基の保護基として adenosine, cytidine には benzoyl (Bz) 基を、guanosine には isobutyryl (*i*-Bu) 基を選択した。

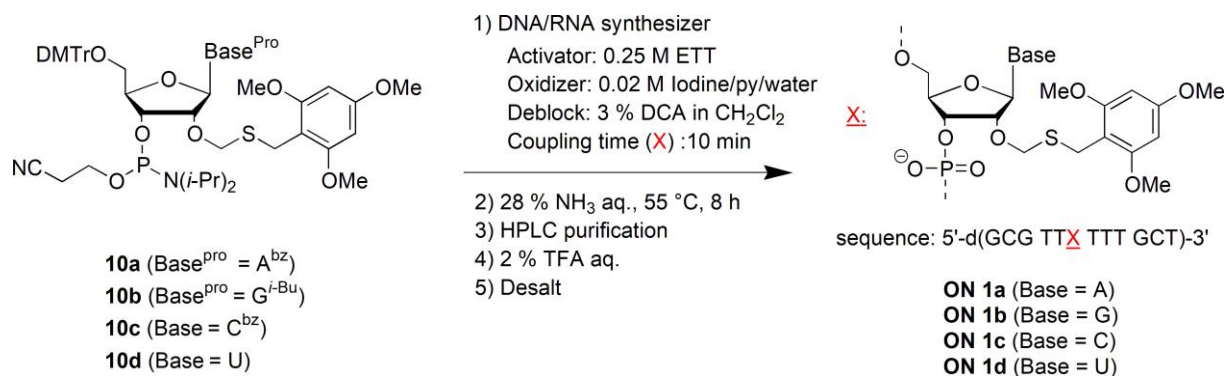
N-保護ヌクレオシド **4a-d** の 3',5'-水酸基を 1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxanediyl (TIPDS) 基にて保護し、**5a-d** とした後 Pummerer 転位にて 2'-O-methylthiomethyl (2'-O-MTM) 体 **6a-d** を得た。2'-O-TMBTM 体 **7a-d** の合成に先立ち、まず先行研究にて報告した手法にて uridine 誘導体である **6d** を用いて TMBTM 化を行った。<sup>75)</sup> 2'-O-methylthiomethyl-uridine **6d** に CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中で SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を作用させ、2'-O-chloromethyl 中間体とした後、過剰量の SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を減圧留去した。得られた残渣を dimethylformamide (DMF) に溶解後、NaH 存在下 2,4,6-trimethoxybenzylmercaptane [(MeO)<sub>3</sub>BnSH] を作用させることで目的とする 2'-O-TMBTM 体 **7d** を収率 65 % で得た。次に uridine 誘導体 **7d** の合成と同様の手法にて、2'-O-TMBTM adenosine **7a** の合成を試みた。**6a** に CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中で SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を作用させた後、過剰量の SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> および CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を減圧留去すると、TLC 上にて 2'-O-chloromethyl 中間体以外に 2'-OH 体などの分解物と思われるスポットが複数確認された。その後得られた残渣を DMF に溶解後 NaH および (MeO)<sub>3</sub>BnSH を作用させても反応は進行せず、反応時の TLC にて目的物と思われるスポットはほとんど確認されなかった。詳細は不明であるが、反応中間体である 2'-O-chloromethyl adenosine が uridine の場合よりも不安定であり、減圧留去時に加温することで、分解が生じていることが考えられた。そこで 2'-O-chloromethyl 中間体の分解を抑制する目的で、反応温度を 0 °C として CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中で SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を作用させた後、減圧留去を行わず、速やかに反応液に diisopropylethylamine (DIEA) および (MeO)<sub>3</sub>BnSH を加えることで目的とする 2'-O-TMBTM adenosine **7a** を収率 65 % で得ることに成功した。Adenosine 誘導体 **7a** と同様の手法にて guanosine および cytidine 誘導体 **7b**, **7c** の合成も行ったところ、それぞれ

55 % の収率で **7b** を、58 % の収率で **7c** を得ることに成功した。一方、同様の手法にて uridine 誘導体 **7d** の合成を試みたが、長時間  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  に uridine が暴露されることにより uracil 塩基 5 位の塩素化が進行し、副生成物として 5-chlorouridine 誘導体が生じ、目的物の収率が低下した。

得られた 2'-*O*-TMBTM 体 **7a-d** の 3',5'-TIPDS 保護を 3HF-Et<sub>3</sub>N にて脱保護し **8a-d** とした後、4,4'-dimethoxytrityl chloride を作用させることで 5'-DMTr 体 **9a-d** を得た。その後 3'位を塩基性条件下にて 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite と反応させることで、目的とする 2'-*O*-TMBTM phosphoramidite unit **10a-d** を *N*-保護ヌクレオシドから 6 工程にて総収率 24–42 % にて得ることに成功した。

## 第二節 2'-*O*-MDTM オリゴ核酸の合成

次に 2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸の合成および合成後修飾法による 2'-*O*-MDTM オリゴ核酸への変換を試みた。まず DNA/RNA 合成機にて、前節で得られた 2'-*O*-TMBTM phosphoramidite unit **10a-d** を用いて、2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸の合成を行った。先行研究にて合成していた 12 mer オリゴ核酸の配列の一部に 2'-*O*-TMBTM-adenosine, guanosine, cytidine および uridine を組み込んだ (**Scheme 3**)。



**Scheme 3.** Syntheses of 2'-*O*-TMBTM oligonucleotides.

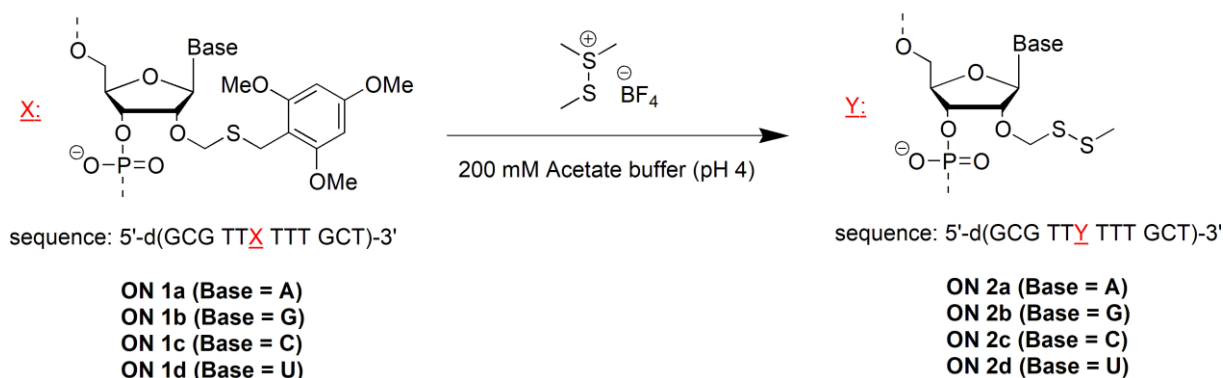
DNA/RNA 自動合成機中では coupling 試薬として RNA 合成において繁用される 5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT)の acetonitrile 溶液を、oxidation 試薬として 0.02 M iodine の pyridine/water 溶液を、deprotect 試薬として 3 % dichloroacetic acid (DCA) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液をそれぞれ用いた。また 2'-*O*-TMBTM phosphoramidite unit の coupling 時間は RNA 合成時の条件である 10 min とし、伸長反応を行った。自動合成機によりオリゴ核酸を合成後、樹脂を 28 % アンモニア水中にて 55 °C にて 8 h 処理することで、オリゴ核酸の樹脂からの切り出しおよび核酸塩基部のアミノ基の脱保護を行った。得られたオリゴ核酸を HPLC にて精製後、精製後のオリゴ核酸を簡易 C18 カラム (Waters Sep-Pak plus) 上にて 2 % trifluoroacetic acid (TFA) 処理することで 5'末端の DMTr 基の脱保護し、その後脱塩処理を行うことで目的とする 2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸 (**ON 1a–d**) を得た。得られたオリゴ核酸を UV 測定により定量後、matrix-assisted laser desorption ionization time of flow (MALDI-TOF) MS にて分子量を測定し、構造確認を行った (**Table 3**)。

**Table 3.** Sequences and characterization of synthesized 2'-*O*-TMBTM oligonucleotides (ONs).

ONs	Sequence (5' to 3') <sup>a)</sup>	Isolated	Formula	MALDI-TOF Mass	
		yield (%)		Calcd. (M-H) <sup>-</sup>	Found
<b>ON 1a</b>	d (GCG TTA <u>A</u> TTT GCT)	31	C <sub>129</sub> H <sub>165</sub> N <sub>38</sub> O <sub>79</sub> P <sub>11</sub> S	3883.7	3884.2
<b>ON 1b</b>	d (GCG TT <u>G</u> TTT GCT)	25	C <sub>129</sub> H <sub>165</sub> N <sub>38</sub> O <sub>80</sub> P <sub>11</sub> S	3899.7	3899.0
<b>ON 1c</b>	d (GCG TTC <u>C</u> TTT GCT)	68	C <sub>128</sub> H <sub>165</sub> N <sub>36</sub> O <sub>80</sub> P <sub>11</sub> S	3859.7	3859.2
<b>ON 1d</b>	d (GCG TT <u>U</u> TTT GCT)	61	C <sub>128</sub> H <sub>164</sub> N <sub>35</sub> O <sub>81</sub> P <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	3860.6	3859.1

a) 2'-*O*-TMBTM-modified positions are underlined.

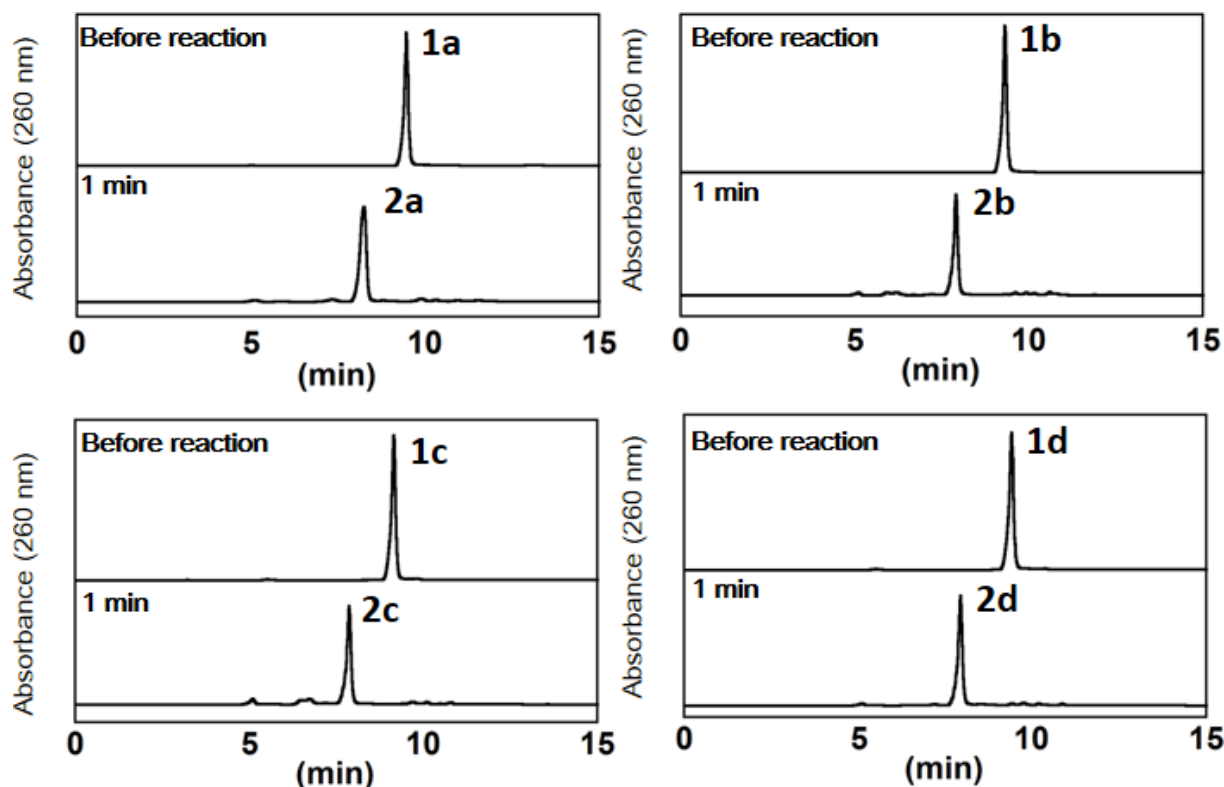
次に先行研究での uridine を用いた検討と同様の手法にて、他のヌクレオシド上のリボース 2'位において合成後修飾法による 2'-*O*-MDTM オリゴ核酸が合成可能か検討した。先に得られた 2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸 (ON 1a-d) を用いて、合成後修飾法による 2'-*O*-MDTM 化を行った (Scheme 4)。



**Scheme 4.** Syntheses of 2'-*O*-MDTM oligonucleotides by post-synthetic modifications.

酢酸緩衝液中 (pH 4.0) にて 100 mM に調製した 2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸溶液中に、オリゴ核酸に対して約 300 当量分の dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate (DMTSF) の水性懸濁液を加え、反応の進行を HPLC にて確認した (Figure 17)。これまでの uridine を用いた検討では、MDTM 化試薬として DMTSF を水に完全に溶解させた後、反応を行っていた。一方で DMTSF は水中で容易に加水分解されることが知られており、<sup>85)</sup> 合成後修飾法による MDTM 化は数時間程度の反応時間を要していた。そこで、筆者は DMTSF を水に懸濁させた後、速やかに反応試薬として用いることで DMTSF の加水分解を抑え速やかに変換反応が進行するのではないかと考え、反応直前に用時調製した水性 DMTSF 懸濁液を用いて反応を行った。その結果、2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸 (ON 1a-d) は 1 min 以内に速やかに消失し、HPLC 上で 2'-*O*-MDTM オリゴ核酸と思われるピークが確認された (Figure 16)。得られた生成物のピークを分取し、MALDI-TOF MS にて解析を行ったところ、目的物の 2'-*O*-MDTM オリゴ核酸 (ON 2a-d) のピークが確認され、MDTM 化反応が効率よく進行していることが明らかとなった (Table 4)。





**Figure 16.** HPLC charts of the conversions of 2'-*O*-TMBTM (ON **1a–d**) into 2'-*O*-MDTM (ON **2a–d**) oligonucleotides by treatment with DMTSF in 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 37 °C.

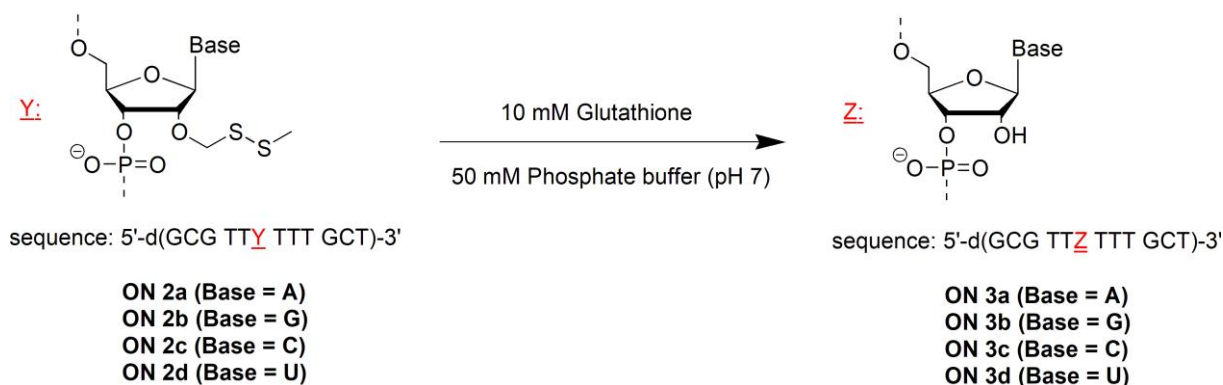
**Table 4.** Sequences and characterization of synthesized 2'-*O*-MDTM oligonucleotides (ONs).

ONs	Sequence (5' to 3') <sup>a)</sup>	Isolated yield (%)	Formula	MALDI-TOF Mass	
				Calcd. (M-H) <sup>-</sup>	Found
<b>ON 2a</b>	d (GCG TTA <u>T</u> TT GCT)	38	C <sub>120</sub> H <sub>155</sub> N <sub>38</sub> O <sub>76</sub> P <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	3749.6	3750.5
<b>ON 2b</b>	d (GCG TTG <u>G</u> TTT GCT)	43	C <sub>120</sub> H <sub>155</sub> N <sub>38</sub> O <sub>77</sub> P <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	3765.6	3765.6
<b>ON 2c</b>	d (GCG TTC <u>C</u> TTT GCT)	41	C <sub>119</sub> H <sub>155</sub> N <sub>36</sub> O <sub>77</sub> P <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	3725.5	3726.1
<b>ON 2d</b>	d (GCG TTU <u>U</u> TTT GCT)	45	C <sub>119</sub> H <sub>154</sub> N <sub>35</sub> O <sub>78</sub> P <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	3726.5	3727.9

a) 2'-*O*-MDTM-modified positions are underlined.

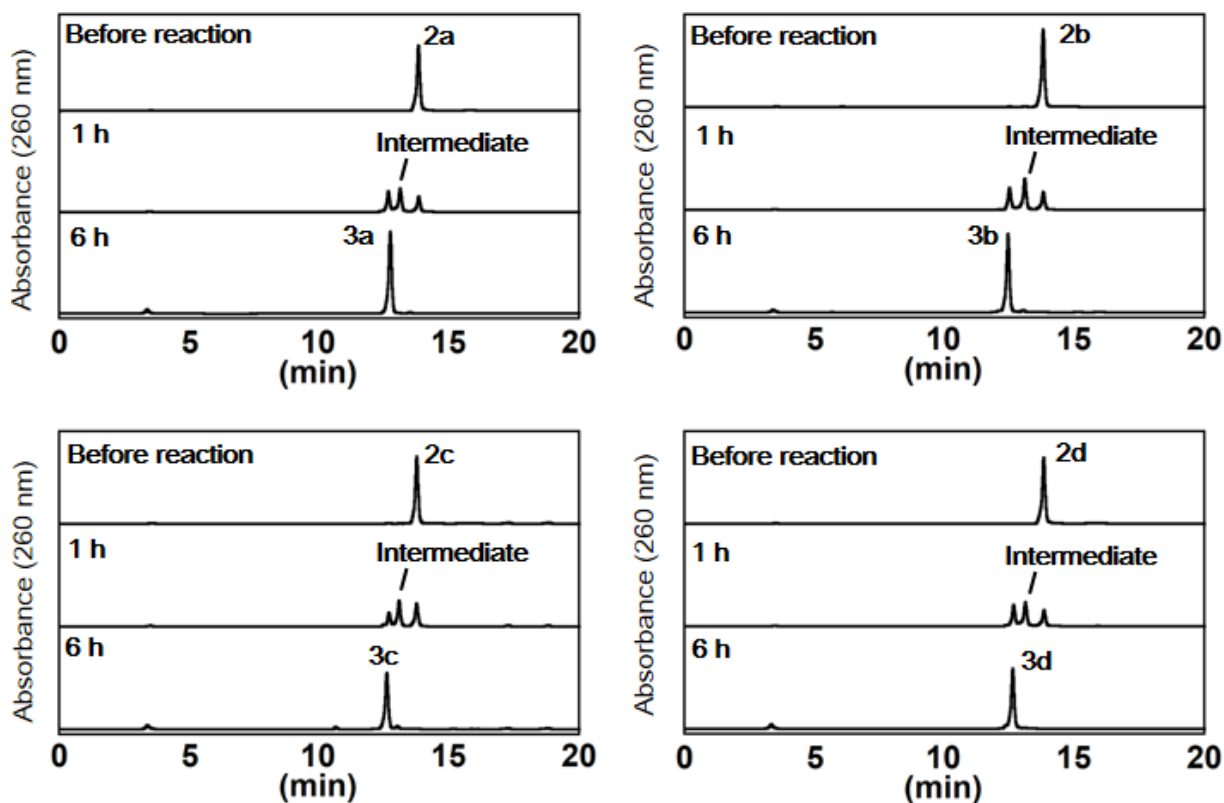
### 第三節 2'-O-MDTM オリゴ核酸のグルタチオンによる天然型オリゴ核酸への変換反応

ここまでの検討より、合成後修飾法による 2'-O-MDTM オリゴ核酸への変換反応が、uridine の糖部 2'位のみならず、adenosine, guanosine および cytidine の糖部 2'位においても効率よく進行することが明らかとなり、配列中の任意のヌクレオチド残基に 2'-O-MDTM 修飾を施すことが可能となった。次に 4 種のヌクレオシド上の 2'-O-MDTM 修飾が uridine 上と同様に還元条件にて天然型オリゴ核酸に変換可能であるかの評価を行った (Scheme 5)。



**Scheme 5.** Conversions of 2'-O-MDTM oligonucleotides into natural oligonucleotides.

50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 50  $\mu$ M の濃度に調製した 2'-O-MDTM オリゴ核酸 (ON 2a-d) に最終濃度 10 mM となるように GSH 溶液を加え、37  $^{\circ}$ C にて反応を行い、反応の進行を HPLC にて確認した (Figure 17)。細胞内を模倣した還元条件 (10 mM GSH, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) において 2'-O-MDTM 核酸 (ON 2a-d) のピークは 1 h 後にはほとんど消失しており、6 h 後には天然型オリゴ核酸と思われるピークが確認された (Figure 17)。反応液を脱塩後 MALDI-TOF MS にて解析を行ったところ、天然型の 2'-OH オリゴ核酸 (ON 3a-d) のピークが確認され、2'-O-MDTM 基を uridine 以外の 2'位に導入した場合でも効率よく天然型オリゴ核酸へと変換されることを確認した (Table 5)。



**Figure 17.** HPLC charts of the conversions of 2'-*O*-MDTM (ON **2a–d**) into 2'-OH (ON **3a–d**) oligonucleotides under the cytosol-mimetic reducing environment (10 mM GSH, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) at 37 °C.

**Table 5.** Sequences and characterization of synthesized 2'-OH oligonucleotides (ONs).

ONs	Sequence (5' to 3') <sup>a)</sup>	Formula	MALDI-TOF Mass	
			Calcd. (M-H) <sup>-</sup>	Found
<b>ON 3a</b>	d (GCG TTA <u>T</u> TTT GCT)	C <sub>118</sub> H <sub>151</sub> N <sub>38</sub> O <sub>76</sub> P <sub>11</sub>	3657.4	3658.0
<b>ON 3b</b>	d (GCG TTG <u>T</u> TTT GCT)	C <sub>118</sub> H <sub>151</sub> N <sub>38</sub> O <sub>77</sub> P <sub>11</sub>	3673.4	3672.5
<b>ON 3c</b>	d (GCG TTC <u>T</u> TTT GCT)	C <sub>117</sub> H <sub>151</sub> N <sub>36</sub> O <sub>77</sub> P <sub>11</sub>	3633.4	3632.6
<b>ON 3d</b>	d (GCG TTU <u>T</u> TTT GCT)	C <sub>117</sub> H <sub>150</sub> N <sub>35</sub> O <sub>78</sub> P <sub>11</sub>	3634.4	3633.7

a) 2'-OH positions are underlined.

## 第一部 総括

筆者は 2'-*O*-MDTM-オリゴ核酸を用いた治療薬の開発を目指して、4 種のヌクレオシド上に 2'-*O*-MDTM 修飾を施したオリゴ核酸の合成検討を行った。先行研究ではまず 2'-*O*-MDTM-uridine を有するオリゴ核酸をモデル化合物として「合成後修飾法」により得た後、細胞内を模倣した還元条件での天然型核酸への変換反応に関して評価を行ってきた。<sup>75)</sup> 一方で uridine 以外の部位を修飾した 2'-*O*-MDTM-オリゴ核酸が同様の「合成後修飾法」により得られるかは定かではなく、さらに細胞内を模倣した条件にて uridine 以外の部位を修飾した 2'-*O*-MDTM-オリゴ核酸が天然型核酸へと変換されるかも明らかとなっていなかった。

本章における実験結果より先行研究において開発された「合成後修飾法」による 2'-*O*-MDTM-オリゴ核酸の合成は、uridine 部位のみならず他のヌクレオシド上においても効率よく反応が進行し、汎用性の高い合成法であることが確認された。同様に 2'-*O*-MDTM-オリゴ核酸の細胞内を模倣した条件下での変換反応も uridine 部位以外でも効率的に進行し、核酸塩基の違いが天然型オリゴ核酸への変換反応に影響を及ぼさないことが確認された。

これらの結果と先行研究<sup>75,76)</sup>および第一部第一章での結果を踏まえ、2'-*O*-MDTM siRNA は 2'-*O*-MDTM 修飾を siRNA の配列上の任意の部位に導入した場合でも、細胞内での還元環境によって天然型 siRNA へと変換され十分な遺伝子発現抑制作用を示すことが示唆された。現在、uridine 以外の部位に 2'-*O*-MDTM 修飾を導入した miRNA, siRNA を合成し、その生体内安定性および活性評価を計画している。

## 第二部 細胞内還元環境に応答するリン酸部修飾プロドラッグ型オリゴ核酸の開発

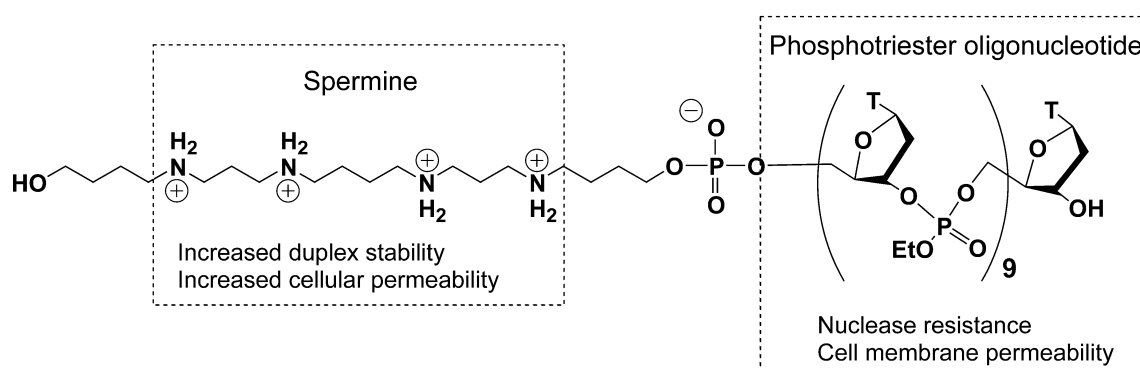
### 第一章 REDUCT の概念を利用したリン酸修飾プロドラッグ型核酸の開発の為にリン酸トリエステル-オリゴ核酸-スペルミンコンジュゲートの合成と機能評価

筆者は第一部において、RNA のリボース 2'位に修飾を施した細胞内還元環境で天然型 RNA へと変換されるプロドラッグ型 RNA (REDUCT-RNA) に関してその活性および合成検討を行って来た。これらの結果から細胞内還元環境によって天然型オリゴ核酸へと変換される REDUCT-オリゴ核酸がプロドラッグ型核酸として十分利用可能であることが明らかとなった。そこで次に筆者は、本 REDUCT の概念をリン酸修飾核酸へと応用することで、新たな機能を有する新規プロドラッグ型核酸が開発できると考え、その合成検討を行うこととした。

これまでに開発されているリン酸部修飾型プロドラッグ型核酸は、序論 4 に示したリン酸トリエステル (phosphotriester, PTE) 構造を有している。PTE 核酸は 1970 年代に Miller, Ts'o らによって提唱された修飾核酸であり、リン酸基修飾に伴い高い核酸分解酵素耐性を有すること、オリゴ核酸中の負電荷を解消し脂溶性を高めることによって細胞膜透過性が向上することが知られている。<sup>12,43)</sup> 一方で、これらの検討は 3 mer 程度の短鎖オリゴ核酸を用いてなされており、オリゴ PTE 核酸が有する核酸分解酵素耐性、細胞膜透過性およびアンチセンス効果を正確に評価した例はない。そこで筆者はリン酸部を修飾 REDUCT-オリゴ核酸の開発の前段階として、まずオリゴ PTE 核酸の合成法の確立および性質評価を行うこととした。一方、オリゴ PTE 核酸は負電荷の解消により、水溶性が著しく低下するため直接オリゴ PTE 核酸の性質評価を行うことは困難である。そこで筆者はオリゴ PTE 核酸の性質評価を行うために、PTE 核酸本来の性質を損なわず水溶性の問題を解消可能な分子を新たに設計することとした。

スペルミジンやスペルミンに代表されるポリアミンは、細胞の分化や増殖など、細胞内の様々な反応に関与しているとされる生体内分子である。<sup>86)</sup> 近年 Behr らはポリアミンであるスペルミンをオリ

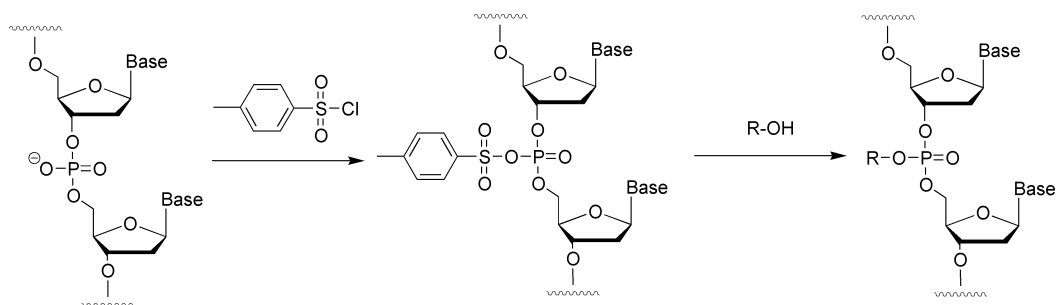
ゴ核酸の 5'末端に結合させることで、リン酸ジエステル (phosphodiester, PDE) 部分との静電的相互作用によって標的 RNA との親和性が向上すること、<sup>87)</sup> および正電荷付与に伴って細胞膜透過性が向上することを報告している。<sup>88)</sup> これらの報告を参考に筆者はオリゴ PTE 核酸の 5'末端にスperlミンを結合させることで、二重鎖形成能および細胞膜透過性の向上が期待でき、更に正電荷の付与に伴う水溶性の向上が見込まれることで難水溶性のオリゴ PTE 核酸の性質評価を行うことが可能となると考え、オリゴ PTE 核酸-スperlミンコンジュゲート (**Figure 18**) を新たに設計し、その合成に取り組んだ。



**Figure 18.** Structure and design of spermine-conjugated PTE oligonucleotide.

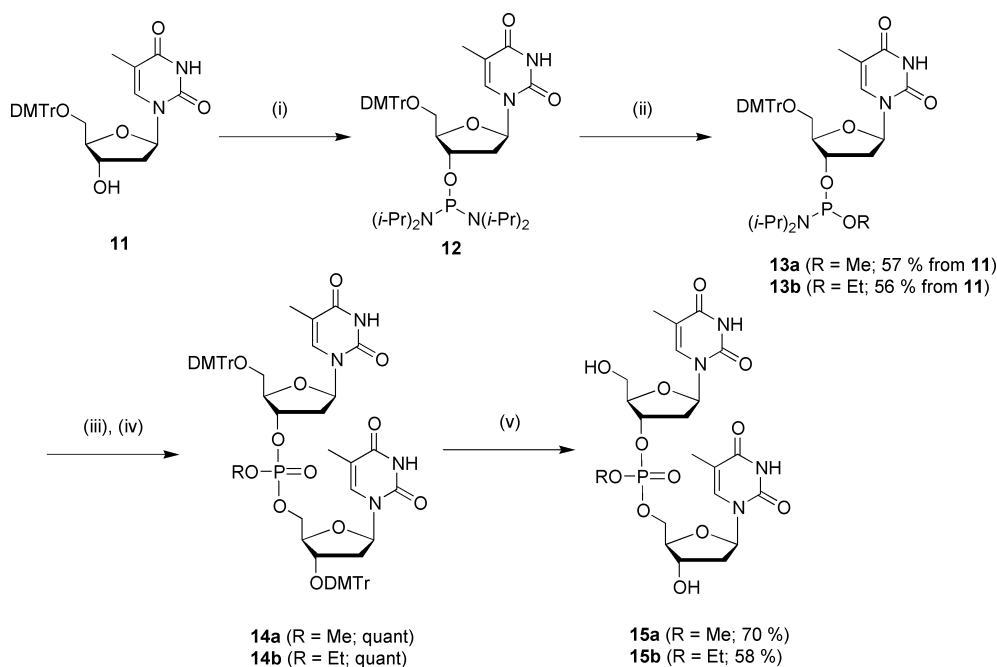
### 第一節 ホスホロアミダイト法によるオリゴ PTE 核酸の合成検討と核酸分解酵素耐性の評価

1970 年代の Miller らの検討による PTE 核酸の合成法は PDE 構造を有するオリゴ核酸に *p*-toluenesulfonyl chloride (TsCl) を作用させ、リン酸基を活性化した後、メタノールもしくはエタノールを作用させ、リン酸基をアルキル化する方法にて行われていた (**Figure 19**)。一方、本法では複数のリン酸基を有する長鎖オリゴ PTE 核酸配列中の任意の箇所に導入することは難しく、また反応可能なアルコールが低級アルコールに限られるため実用的な合成法ではない。そこで筆者は第二章第一節に示したホスホロアミダイト法によって合成を行うことで、任意の箇所に PTE 構造を導入したオリゴ核酸が効率的に得られると考えた。



**Figure 19.** Synthesis of PTE oligonucleotide by post-synthetic modification used in 1970s.

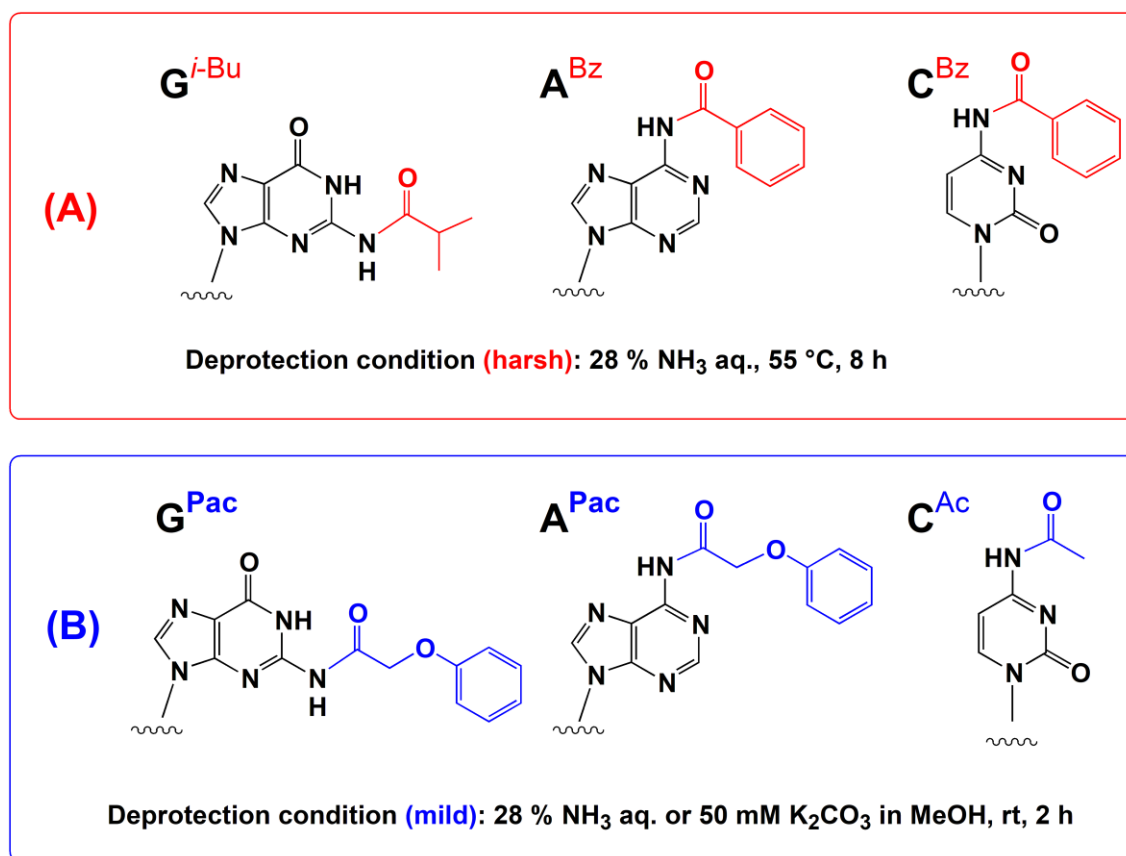
ホスホロアミダイト法によるオリゴ核酸合成の最終工程では、55 °C でアンモニア水処理を行うことで、オリゴ核酸の固相担体からの切り出し、核酸塩基およびリン酸基の脱保護を行う。一般に PTE 構造は塩基性条件下で不安定であると考えられていることから、より緩やかな条件で切り出し、脱保護を行う必要があると予想された。そこで、ホスホロアミダイト法による PTE 核酸合成に必要な最終工程での脱保護条件を探索することを目的として、thymidine 2 量体の PTE dimer の合成を行った (Scheme 6)。



**Scheme 6.** Synthesis of PTE dimer **15** [Tp(OR)T] : (i) [(*i*-Pr)<sub>2</sub>N]<sub>2</sub>PCl, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (ii) ROH, 1*H*-tetrazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (iii) 3'-*O*-DMTr thymidine, 1*H*-tetrazole, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (iv) 6.7 % 2-butanone peroxide in toluene; (v) 80 % AcOH in water.

5'-O-DMTr-thymidine **11** に塩基性条件下、Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphine を作用させることで phosphordiamidite 体 **12** を得た。その後、**12** に 1*H*-tetrazole 存在下で MeOH または EtOH を作用させることで、methyl- 及び ethyl-phosphoramidite **13a** および **13b** をそれぞれ 2 工程で収率 57 % および 56 % で得た。得られた phosphoramidite **13a, b** を用いて 1*H*-tetrazole 存在下 3'-O-DMTr-thymidine と縮合させ phosphite triester とした後、6.7 % 2-butanone peroxide の toluene 溶液を加え酸化することで、3',5'-DMTr 保護 methyl- および ethyl-PTE dimer **14a, b** を得た。その後 80 % 酢酸水溶液を用いて、脱 DMTr 化をすることで 5'-Tp(OR)T-3' からなる methyl- および ethyl-PTE dimer **15a, b** を得ることが出来た。

得られた PTE dimer **15a, b** を用いて、ホスホロアミダイト法によるオリゴ核酸合成の最終工程で用いる塩基性条件での安定性を評価した。



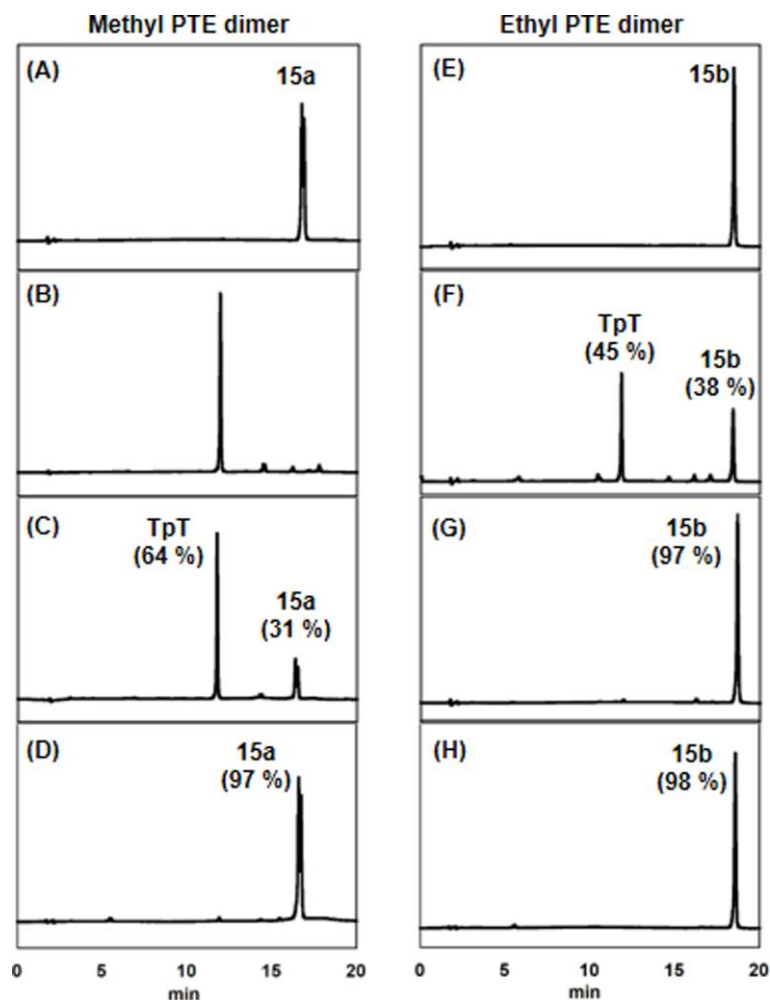
**Figure 20.** Typical protective groups for nucleobases used in oligonucleotide synthesis. (A) Classical and (B) labile protective groups.



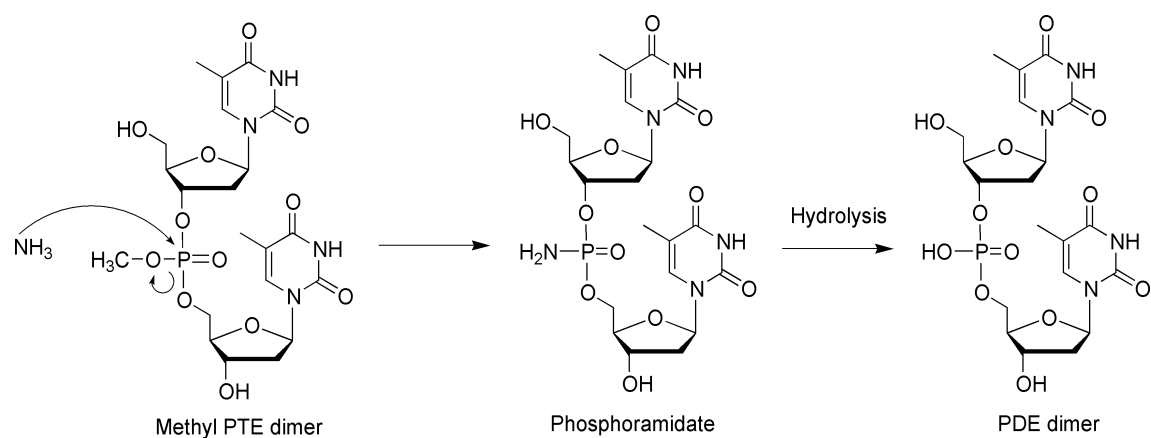
ホスホロアミダイト法によるオリゴ核酸合成に繁用される保護基を **Figure 20** に示した。通常のオリゴPDE核酸合成には核酸塩基の保護基として adenosine および cytidine には Bz 基が、guanosine には *i*-Bu 基が用いられる (**Figure 20A**)。これらの保護基の脱保護は、濃アンモニア水を用いて高温条件にて行われるため、塩基性条件下において不安定な修飾核酸には適用することが出来ない。一方、近年では塩基性条件下で分解を起こしやすい修飾核酸を合成する際に、より緩和な条件にて脱保護可能な保護基として adenosine および guanosine には phenoxyacetyl (Pac) 基を cytidine には acetyl (Ac) 基が用いられる (**Figure 20B**)。<sup>89)</sup> これらのことを踏まえて筆者はそれぞれの保護基を脱保護する条件下での PTE 構造の安定性を評価し、PTE 核酸合成時に必要な保護基の検討を行った。

PTE dimer **15a, b** を **Figure 20** に示したそれぞれの条件にて処理後、反応液を HPLC にて分析し PTE dimer **15a, b** の残存率を求めた (**Figure 21**)。通常のオリゴ核酸の合成条件として繁用される条件 (28 %NH<sub>3</sub> aq., 55 °C, 8 h) にて処理をすると methyl PTE dimer **15a** は、ほぼ PDE dimer (TpT) に分解しており、ethyl PTE dimer **15b** も 50 % 以上の分解が生じていることが確認された (**Figure 21B and F**)。次に、アンモニア水を用いた緩和な脱保護条件 (28 %NH<sub>3</sub> aq., rt, 2 h) にて処理を行うと、methyl PTE dimer **15a** は残存率が 30 % 程度であったのに対し、ethyl PTE dimer **15b** は、ほとんど分解していないことが分かった (**Figure 21C and G**)。更にアンモニア水に代わる塩基として炭酸カリウムを用いた条件 (50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH, rt, 4 h) にて処理を行ったところ、methyl および ethyl PTE dimer **15a,b** 共にほとんど分解していなかった (**Figure 21D and H**)。これらの結果から、緩和な条件にて脱保護可能な Pac 基、Ac 基を用い、炭酸カリウムを用いた条件で脱保護を行うことで、ホスホロアミダイト法によるオリゴ PTE 核酸が合成可能であると考えられた。

またアンモニア水を用いた緩和な脱保護条件において、ethyl PTE 核酸は methyl PTE 核酸よりも化学的安定性が高いことが確認できた。この安定性の差は ethyl 基と methyl 基のリン原子への電子供与性の差に起因するものと考えられ、methyl PTE 核酸では求核性の高いアンモニアがリン原子を攻撃後、生じた phosphoramidate が加水分解されることで、天然型 PDE 核酸が生じたと考えられた (**Figure 22**)。



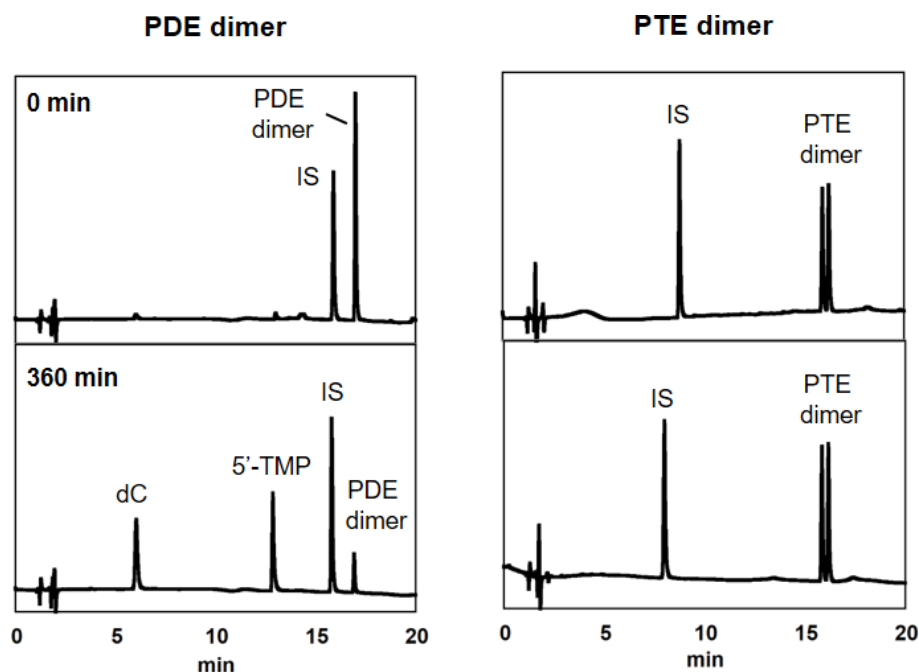
**Figure 21.** HPLC analysis of the degradation of methyl (**15a**) and ethyl (**15b**) PTE dimers under alkaline conditions. Dimers were treated under deprotection conditions. (A and E) untreated; (B and F) 28%  $\text{NH}_3$  aq., 55 °C, 8 h; (C and G) 28%  $\text{NH}_3$  aq., r.t., 2 h; (D and H) 50 mM  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in MeOH, rt, 4 h.



**Figure 22.** Proposed degradation mechanism of methyl PTE dimer by  $\text{NH}_3$ .

更に筆者は PTE 核酸の核酸分解酵素耐性の評価を行った。血液中などの生体環境では酵素分解酵素として 3'-エキソヌクレアーゼが高発現している。3'-エキソヌクレアーゼはオリゴ核酸の 3'末端の PDE 結合を分解し、一塩基短くなった 3'-OH オリゴ核酸と 5'-モノリン酸 (5'-nucleoside monophosphate, 5'-NMP) を生成する。そのため TpT の配列からなる dimer を用いて 3'-エキソヌクレアーゼによる酵素分解反応を行った場合、分解産物として thymidine および 5'-TMP が生じると考えられる。一方で分解様式が異なることで、5'-TMP 以外にも 3'-TMP が生じた場合、分解物を明確に区別することは困難であることが予想される。そこで筆者は PTE 核酸の酵素分解後の分解産物も推定する目的で、CpT の配列からなる methyl PTE よりも化学的に安定であった ethyl PTE dimer を先述した方法と同様の方法にて合成し、酵素耐性評価に用いることとした。

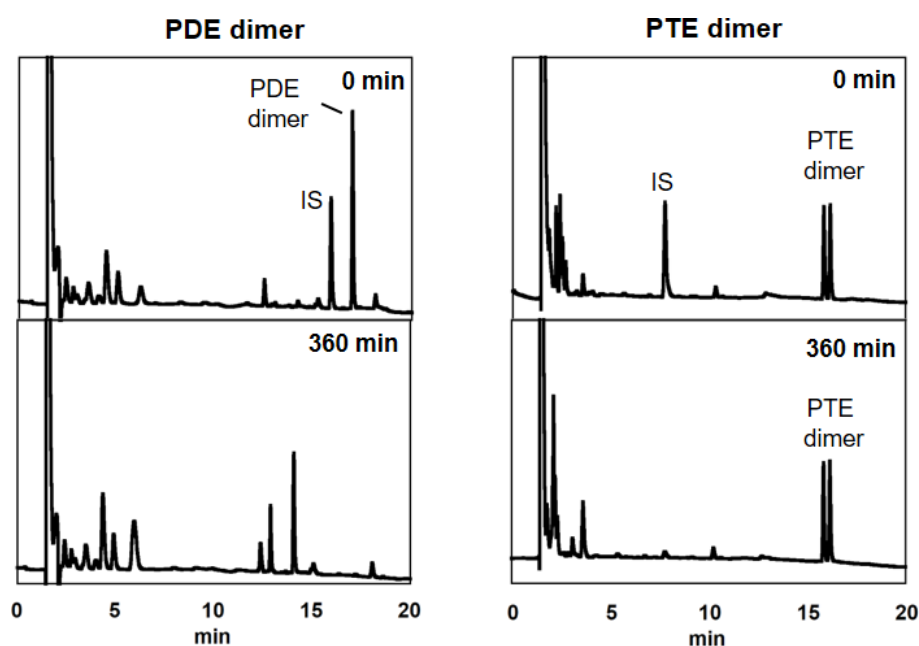
まず蛇毒由来の 3'-エキソヌクレアーゼである snake venom phosphodiesterase (SVPDE) に対する酵素耐性評価を行った。CpT の配列からなる PDE および ethyl PTE dimer を Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中、37 °C にて SVPDE と反応させ、反応液を HPLC にて分析した (Figure 22)。



**Figure 22.** HPLC charts of the digestion reaction of PDE and ethyl PTE dimers with 3'-exonuclease (SVPDE). The dimers were treated with SVPDE (0.4  $\mu$ g) in 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 37 °C. IS; internal standard (deoxyadenosine, dA)

SVPDE による処理を行うと 360 min 後には PDE dimer は deoxycytidine (dC) と 5'-TMP に分解されており PDE dimer の残存率は 10 % 以下であった (半減期 20 min)。一方、PTE dimer はジアステレオマー由来の 2 本ピークに変化は見られず、優れた酵素耐性を有することが確認できた。

次により生体に近い条件として 10 % のウシ胎児血清 (FBS) 中での安定性評価を行った (Figure 23)。



**Figure 23.** HPLC charts of the digestion reaction of PDE and ethyl PTE dimers in 10 % FBS. The dimers were treated in 10 % FBS at 37 °C. IS; internal standard (deoxyadenosine, dA)

本条件においても、PDE dimer は 360 min 後には完全に分解しているのに対し (半減期 60 min)、PTE dimer ジアステレオマー由来の 2 本ピークに変化は見られず、優れた血清中での安定性を示すことが明らかとなった。

以上の結果からホスホロアミダイト法によるオリゴ PTE 核酸の合成が可能であると考えられた。また PTE dimer は血清中において、ほとんど分解を受けず優れた核酸分解酵素耐性を有することも確認できたことから、オリゴ PTE 核酸においても同様の分解酵素耐性を有するものと考えられた。次に筆者はオリゴ PTE 核酸の細胞膜透過性に関して検討を行った。

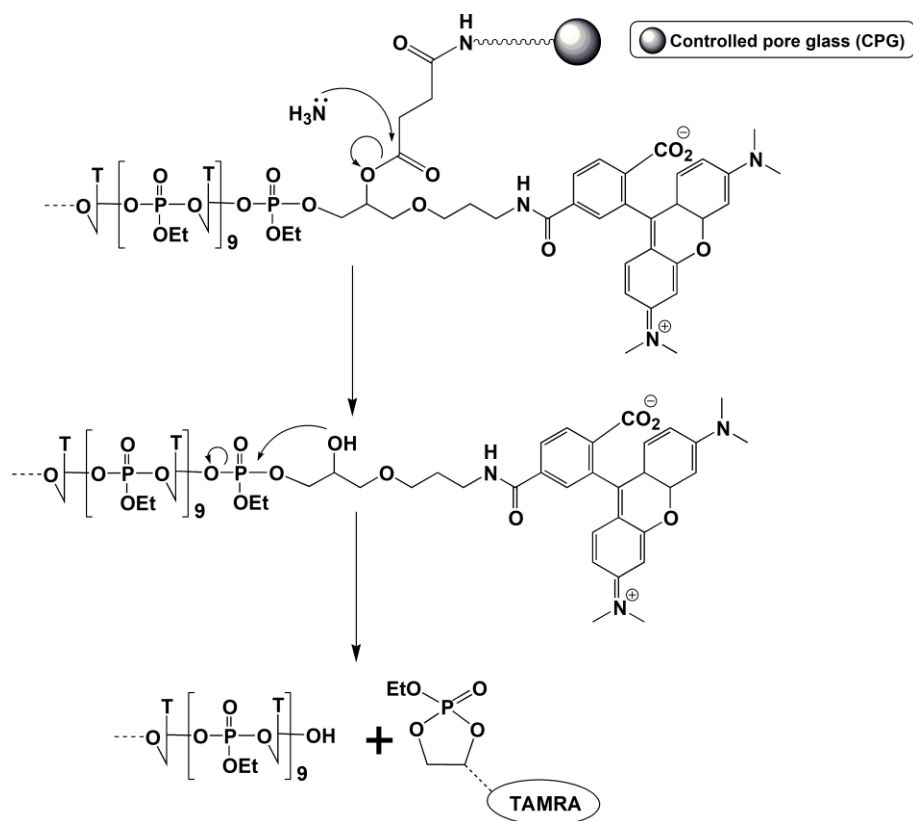
## 第二節 3'-蛍光標識化オリゴ PTE 核酸ースペルミンコンジュゲートの合成と細胞膜透過性評価

ここまでの結果から、ホスホロアミダイト法によるオリゴ PTE 核酸の合成が可能であり、さらに PTE 構造が血清中で優れた安定性を有することが確認された。次に筆者は、オリゴ PTE 核酸の細胞膜透過性を評価するために、3'-末端を蛍光標識化したオリゴ PTE 核酸ースペルミンコンジュゲートの合成を行った (Scheme 7)。

DNA 自動合成機で用いる coupling 試薬として RNA 合成において繁用される 5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT) の acetonitrile 溶液を、oxidation 試薬として 0.02 M iodine の pyridine/water 溶液を、detritylation 試薬として 3 % dichloroacetic acid (DCA) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液をそれぞれ用いた。また各工程での coupling 時間は 10 min とし、縮合反応を行った。DNA 自動合成機中で蛍光色素である carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) が結合した固相担体 (3'-TAMRA CPG) に、まず天然の DNA 合成に用いられる thymidine cyanoethylphosphoramidite **16** を反応させた後、thymidine ethylphosphoramidite **13b** を縮合させることで Thymidine 10 mer の配列からなる 3'-TAMRA-labeled PTE T<sub>10</sub>-CPG **17** を合成した。得られた **17** にさらに市販の spermine phosphoramidite **18** を反応させ 3'-蛍光標識化 5'-*O*-spermine-conjugated PTE T<sub>10</sub>-CPG **19** とした。得られた樹脂を 28 % アンモニア水中にて室温で 2 h 処理することで、オリゴ核酸の樹脂からの切り出しを行い、逆相 HPLC にて精製後、凍結乾燥を繰り返すことで脱塩を行い目的とする 3'-TAMRA-labeled 5'-*O*-spermine-conjugated PTE T<sub>10</sub> **ON4** を得た。当初 3'-TAMRA 結合固相樹脂と ethylphosphoramidite **13b** を最初の工程にて縮合することで、オリゴ PTE 核酸と 3'-TAMRA の結合を PTE 結合とすることを試みたが、この場合、切り出し時の塩基処理を行った後に TAMRA が脱離したオリゴ PTE 核酸が得られた。これは Figure 23 に示した反応機構により、5 員環構造を有する PTE 核酸が形成されることで生じたものと考えられた。

また同様の方法にて比較対照用のオリゴ核酸として 3'-TAMRA 標識化 PTE T<sub>10</sub> **ON5** (PTE-spermine unconjugate 体)、3'-TAMRA 標識化 5'-*O*-spermine-conjugated PDE T<sub>10</sub> **ON6** (PDE-spermine conjugate 体) および 3'-TAMRA 標識化 PDE T<sub>10</sub> **ON7** (PDE-spermine unconjugate 体) を合成した (Table 6)。





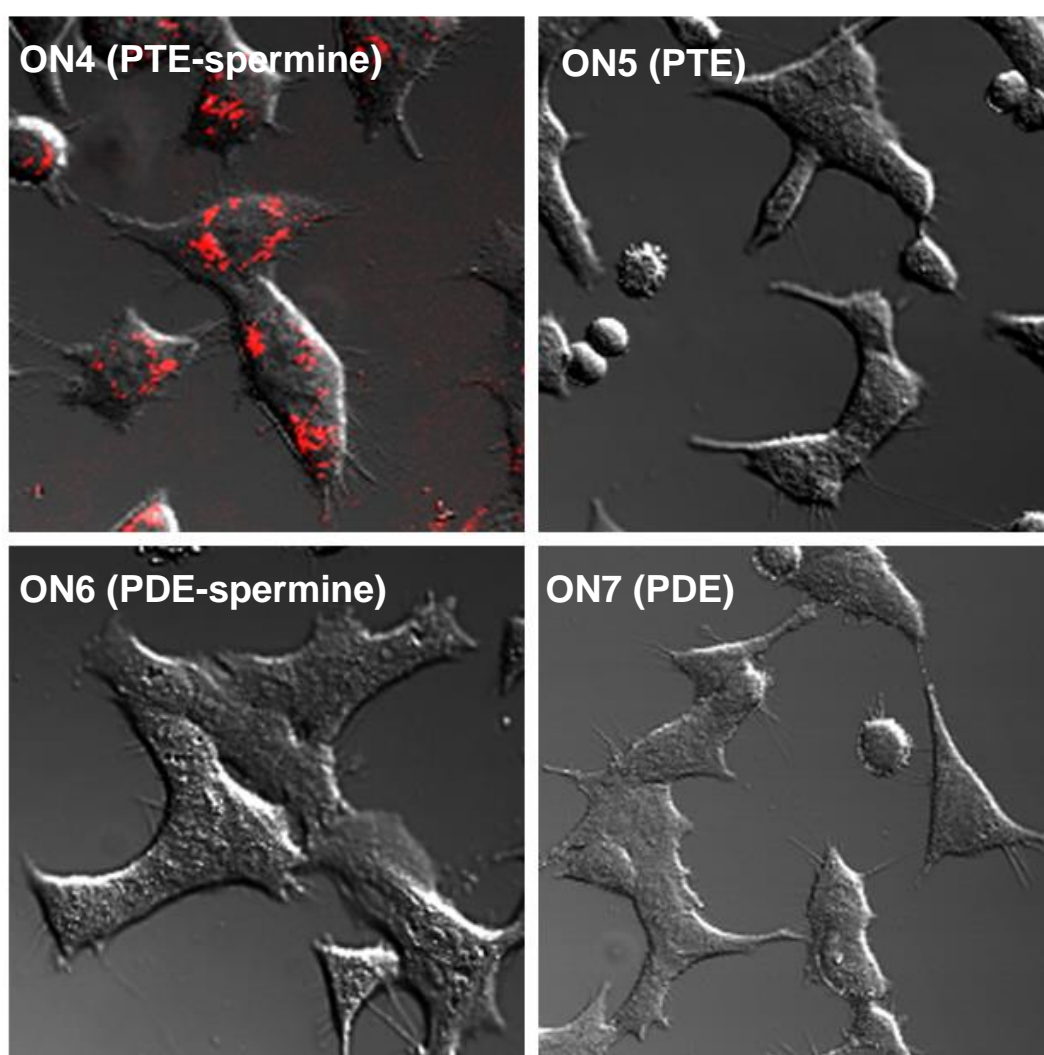
**Figure 23.** Proposed mechanism of cleavage of PTE  $T_{10}$ -3'-TAMRA linker under alkaline conditions.

**Table 6.** Characterization of synthesized 3'-TAMRA-labeled-5'-*O*-spermine-conjugated and unconjugated ONs.

ON	Structure <sup>a)</sup>	Yield (%)	Formula	MALDI-TOF Mass <sup>b)</sup>	
				Calcd. (M+H) <sup>+</sup>	Found
<b>ON4</b>	Sp- $T_{10}$ (PTE)-TAMRA	35	$C_{167}H_{244}N_{27}O_{81}P_{11}$	4265.3	4266.0
<b>ON5</b>	$T_{10}$ (PTE)-TAMRA	58	$C_{149}H_{203}N_{23}O_{77}P_{10}$	3857.0	3857.4
<b>ON6</b>	Sp- $T_{10}$ (PDE)-TAMRA	19	$C_{149}H_{208}N_{27}O_{81}P_{11}$	4013.1	4013.6
<b>ON7</b>	$T_{10}$ (PDE)-TAMRA	61	$C_{131}H_{167}N_{23}O_{77}P_{10}$	3604.7	3605.3

a) Sp: spermine,  $T_{10}$ : 5'-TTTTTTTTTTT-3'  $\epsilon=84000$  (L/mol  $\cdot$  cm), PTE: phoshotriester, PDE: phosphodiester. b) Matrix: A mixture of 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA)/diammonium hydrogen citrate = 9/1.

得られた蛍光標識化 **ON4-7** を用いて細胞膜透過性の検討を行った。10  $\mu$ M の 3'-蛍光標識オリゴ核酸 **ON4-7** を含む培地 (Opti-MEM) 中で、ヒト肺がん由来細胞 (A549 cell) を 37 °C にて 8 h 培養し、オリゴ核酸の細胞内導入を行った。オリゴ核酸導入後の細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) にて洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscope, CLSM) にて、細胞内の蛍光を観察した (**Figure 24**)。

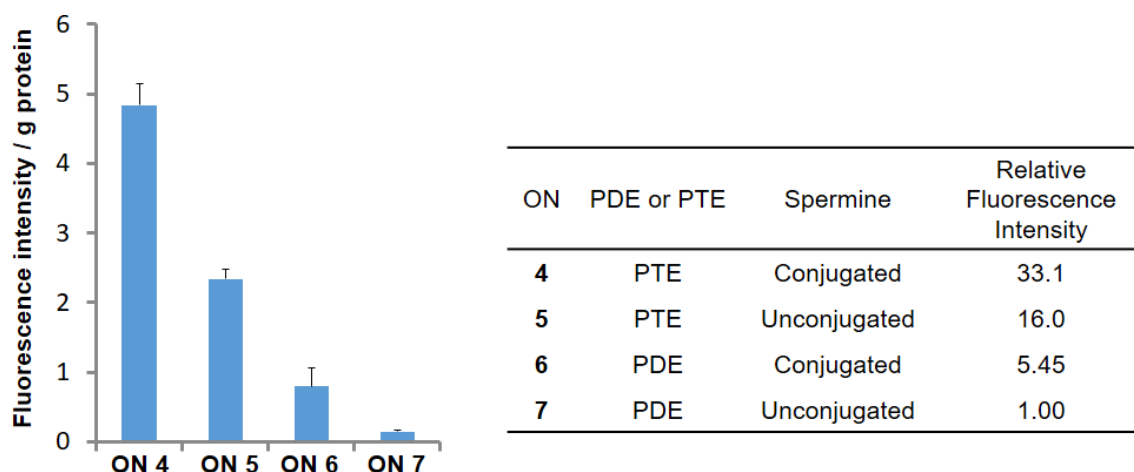


**Figure 24.** CLSM images of A549 cells. Cells were incubated with 3'-TAMRA-labeled ONs (**ON4-7**) at the concentration of 10  $\mu$ M in Opti-MEM for 8 h at 37 °C. After the washing steps, fluorescence intensities of cells were analyzed by CLSM.



細胞内の蛍光量は spermine-conjugated PTE (**ON4**) で最も多く、その他の **ON5-7** によって処理を行った細胞中では顕著な蛍光を確認することができなかった。また **ON4** 処理後の細胞では、蛍光が一部円形に抜けていることから、オリゴ核酸が細胞膜表面に吸着しているのではなく、細胞質に達し核の周囲に集積しているものと考えられた。

次にこれらのオリゴ核酸の細胞内蛍光量の定量を行った。先に示した方法と同様の方法にて 3'-蛍光標識オリゴ核酸 **ON4-7** を A549 cell 導入した。導入後の細胞を PBS にて洗浄し、細胞溶解用試薬を加えることで細胞を溶解させ、細胞溶解液中の蛍光量を測定した。その後、細胞内の総タンパク 1 g 当たりの蛍光量をオリゴ核酸の細胞内導入量として評価した (**Figure 25**)。



**Figure 25.** Comparison of intracellular fluorescence of **ON4-7**. A549 cells were incubated with each 10  $\mu$ M **ON** in Opti-MEM for 8 h at 37 °C. After the washing steps, fluorescence intensities of cell lysates were analyzed (n=4).

細胞内蛍光量は **ON4>ON5>ON6>ON7** の順となり、spermine-conjugated PTE (**ON4**) は天然の PDE **ON** (**ON7**) の 30 倍以上、細胞内導入されていることが分かった。Spermine を結合させることによる蛍光増大はオリゴ PDE 核酸の場合 (**ON6** と **ON7** の比較) で約 5 倍、オリゴ PTE 核酸の場合 (**ON4** と **ON5** の比較) で約 2 倍であったのに対し、PDE を PTE とすることによる蛍光の増大は spermine-conjugated 体 (**ON4** と **ON6** の比較) で約 6 倍、spermine-unconjugated 体 (**ON5** と **ON7** の比較) で約 16 倍であった。Spermine を結合させた場合よりも PDE 構造を PTE 構造との方が、細胞内蛍光量が大きく増大したことから、長鎖オリゴ PTE 核酸が優れた細胞膜透過性を有することが確認された。

## 小括

筆者はオリゴ PTE 核酸の性質評価のために、まずホスホロアミダイト法による PTE 核酸の合成検討を行った。オリゴ PTE 核酸合成用の thymidine methylphosphoramidite および thymidine ethylphosphoramidite 体の合成を行った後、モデル化合物として TpT の配列から成る methyl- および ethyl-PTE dimer の合成を行った。その後、オリゴ核酸合成における最終工程である樹脂からの切り出しおよび核酸塩基の脱保護に用いる塩基性条件下での PTE dimer の化学的安定性を評価した。その結果、PTE 核酸は  $K_2CO_3$  のメタノール溶液を用いた緩和な脱保護条件において安定であり、本条件において脱保護可能な核酸塩基の保護基を用いることで、オリゴ PTE 核酸が合成可能であることが示唆された。

次に筆者は PTE 核酸が有する核酸分解酵素耐性に関しても評価を行った。その結果、PDE が完全に分解される条件においても PTE 核酸の分解は確認できず、PTE 核酸が優れた 3'-エキソヌクレアーゼ耐性を有し、血清中でも十分に安定性を有することが確認された。

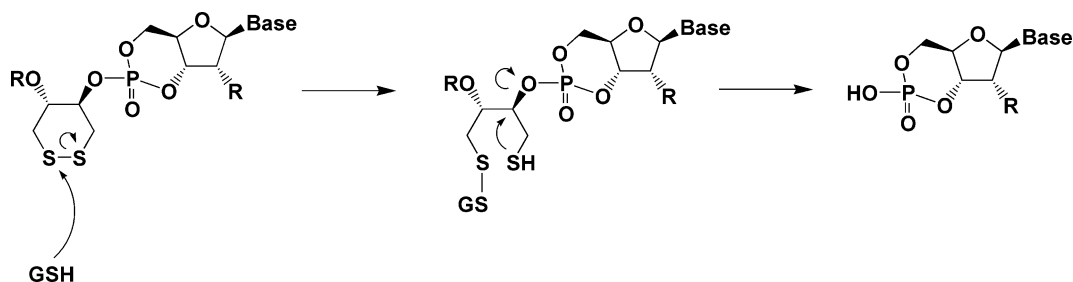
更に筆者はオリゴ PTE 核酸の細胞膜透過性に関しても評価を行った。オリゴ PTE 核酸においては、水に対する溶解性が評価を行う上での問題となる為、ポリアミンである spermine を 5'末端に結合させたオリゴ PTE 核酸を用いて評価を行った。その結果 spermine を結合させることによって細胞内導入量が 2-5 倍程度しか増加しなかったのに対し、PDE 結合を PTE 結合とすることで細胞内導入量が 6-16 倍も増加することが確認され、オリゴ PTE 核酸が優れた細胞膜透過性を有することが確認された。

これらの結果から、オリゴ PTE 核酸が核酸医薬に応用する上で重要となる、血清中での安定性および細胞膜透過性を有することが確認できた。次に筆者は、REDUCT の概念を利用したオリゴ PTE 核酸の設計および合成を行い、その機能評価を行うこととした。

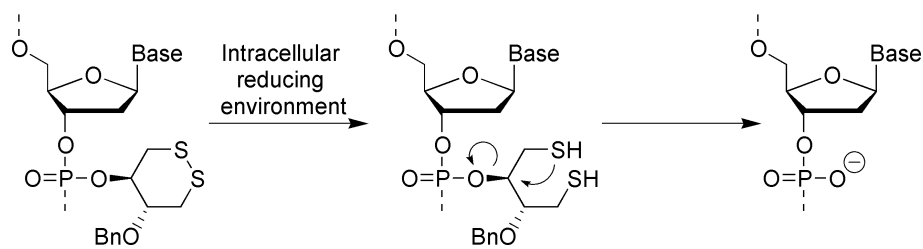
## 第二章 REDUCT の概念を利用したリン酸修飾プロドラッグ型核酸の開発

次に筆者は REDUCT の概念を適用した細胞内還元環境において天然型核酸へと変換されるプロドラッグ型オリゴ PTE 核酸 (REDUCT-PTE 核酸) の合成を試みた。ホスホロアミダイト法による REDUCT-PTE 核酸の合成には、ジスルフィド結合を含む官能基を導入した phosphoramidite unit を合成する必要がある。一方で、ジスルフィド結合を有する phosphoramidite unit は、分子内での酸化還元反応が引き起こされるため不安定であることが予想される。そこで筆者は安定な phosphoramidite unit を得るために、直鎖状ジスルフィド結合よりも化学的な安定性が高い環状ジスルフィド結合<sup>90)</sup>を有する官能基を導入した REDUCT-PTE 核酸の開発を試みることにした。

Butora ら<sup>91)</sup> はリン酸部に環状ジスルフィドである酸化型 dithiotreitol (DTT) 誘導体を導入したプロドラッグ型モノヌクレオチドが GSH による還元反応を経て天然型ヌクレオチドに変換されることを報告している (Figure 26)。この報告を基に筆者は、同様の環状ジスルフィド結合を有する官能基をオリゴ核酸のリン酸部に導入することで、細胞内の還元環境で天然型オリゴ核酸へと変換される新規 REDUCT-PTE 核酸が開発可能ではないかと考え、その合成を試みた (Figure 27)。

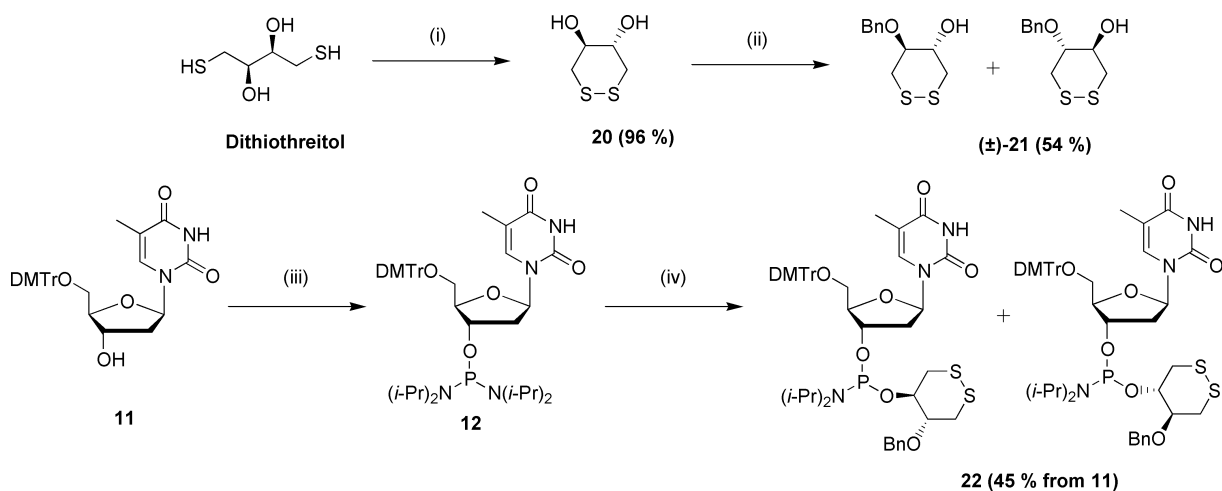


**Figure 26.** GSH-activation of the mononucleotide prodrug bearing *trans*-5-alkoxy -1, 2-dithiane-4-yl moiety.



**Figure 27.** Design and conversion of REDUCT-PTE oligonucleotide containing cyclic disulfide moiety into natural oligonucleotide.

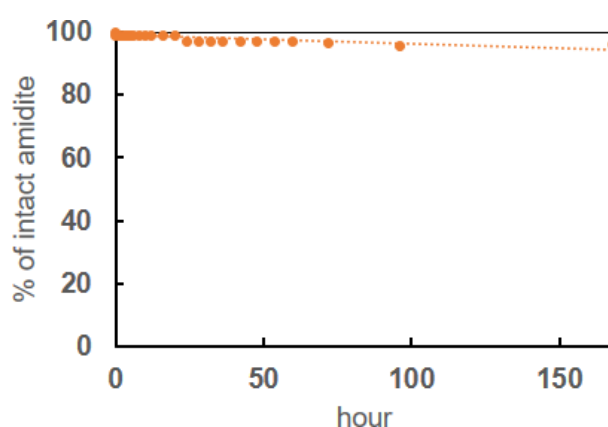
### 第一節 ホスホロアミダイト法による REDUCT-PTE 核酸の合成



**Scheme 8.** Synthesis of phosphoramidite unit **22**. (i) DMSO, 120 °C, (ii) benzyl bromide, tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBAHS), THF/5 M KOH aq (1/1 v/v), r.t., (iii)  $[(i\text{-Pr})_2\text{N}]_2\text{PCl}$ , DIEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 2 h; (iv) (±)-**21**, 5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t..

まず REDUCT-PTE 核酸合成の為の phosphoramidite の合成を試みた (Scheme 8)。還元型 DTT を原料として DMSO 中にて 120 °C に加温することで、酸化型 DTT **20** を得た後、**20** を benzyl bromide と反応させることで、片側の水酸基を benzyl 保護した (±)-**21** を得た。その後第二部第一章と同様の方法にて合成した diamidite **12** と (±)-**21** を 5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT) 存在下で反応させることで、目的とする phosphoramidite **22** を 4 種のジアステレオマー混合物として 5'-DMTr 保護 thymidine **11** から収率 45 % で得た。

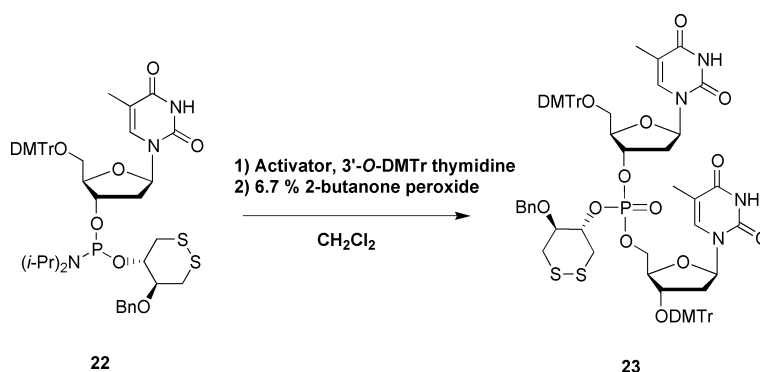
次に分子内に 3 価のリン原子とジスルフィド結合を含む phosphoramidite **22** の安定性を評価した。重水素化 acetonitrile ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) 中で 0.1 M の濃度になるように **22** 溶液を調製後、 $^{31}\text{P}$  NMR を経時的測定し、溶解直後の **22** のピークを 100 % とした際のピークの残存率を求めた (Figure 28)。その結果 **22** は 7 日後においても  $\text{CD}_3\text{CN}$  溶液中で 95 % 以上残存しており、ホスホロアミダイト法による合成に十分に適用可能な安定性を有していることが分かった。



**Figure 28.** Stability of phosphoramidite **22** in acetonitrile- $d_3$  (0.1 M) at 25 °C.  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of the amidite were periodically measured at 25 °C and the ratio of the intact amidite was plotted.

次にオリゴ核酸合成における coupling 時の activator を検討することを目的として REDUCT-PTE dimer の合成を行った。**22** を 3'-*O*-DMTr thymidine と種々の activator 存在下で反応させ、6.7 % 2-butanone peroxide の toluene 溶液を加え酸化することで、3',5'-DMTr 保護 dimer **23** を合成した。その結果、tetrazole 系の activator である ETT や 5-(benzylthio)-1*H*-tetrazole (BTT) を用いた場合には、長時間反応を行っても原料の消失が見られたのに対し、4,5-dicyanoimidazole (DCI) を用いた場合には 3 h 程度で原料の消失が確認され、REDUCT-PTE dimer **23** が高収率で得られた (Table 7)。DCI は tetrazole 系の activator よりも求核性が高く、かさ高い置換基を有する phosphoramidite を効率的に縮合可能であることが知られている。<sup>92)</sup> Phosphoramidite **22** もかさ高い官能基を有することから、**22** の coupling には activator として DCI を用いることが最適であると考えられた。以上の結果を踏まえ、次にオリゴ核酸合成の検討を行った。

**Table 7.** Screening of the activator for the synthesis of REDUCT-PTE dimer.



Entry	Activator	pKa	Time (h)	Yield (%)
1	ETT	4.3	45	26
2	BTT	4.1	21	54
3	DCI	5.2	3	80

DNA 自動合成機で用いる coupling 試薬として先の検討で最も反応効率の高かった DCI の acetonitrile 溶液を、oxidation 試薬として 0.02 M iodine の pyridine/water 溶液を、deprotection 試薬として 3 % dichloroacetic acid (DCA) の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液をそれぞれ用いた。また環状ジスルフィド結合を含む phosphoramidite の coupling 時間は 10 min として縮合反応を行った。得られた樹脂を 50 mM  $\text{K}_2\text{CO}_3$  の MeOH 溶液中で室温にて 4 h 処理することで、オリゴ核酸の樹脂からの切り出しを行い、逆相 HPLC にて精製後、簡易ゲルろ過カラム (NAP-25, GE Healthcare) にて脱塩し、オリゴ T 10 mer 中に 1–3 カ所修飾基を導入した REDUCT-PTE 核酸 (**ON8–11**) を合成した。また同様の方法にて 3'-末端に蛍光標識化を行った **ON12–15** およびアンチセンス活性評価のための抗ルシフェラーゼ活性を有する配列<sup>93)</sup> である **ON16, 17** の合成も行った (Table 8)。

これらの結果からホスホロアミダイト法によって効率よく REDUCT-PTE 核酸が合成可能であることが明らかとなったため、次にこれらのオリゴ核酸を用いて、その性質評価を行った。

**Table 8.** Sequences and characterization of REDUCT-PTE ONs.

ON	Sequence (5' to 3') <sup>a)</sup>	Fluorescence	MALDI-TOF Mass	
		labeling	Calcd. (M-H) <sup>-</sup>	Found
<b>ON8</b>	d (TTT TTT TTT T)	None	2978.9	2979.7
<b>ON9</b>	d (TTT TTT TTT <sub>pss</sub> T)	None	3203.3	3204.3
<b>ON10</b>	d (TTT TTT T <sub>pss</sub> TT <sub>pss</sub> T)	None	3427.6	3428.7
<b>ON11</b>	d (TTT TT <sub>pss</sub> T T <sub>pss</sub> TT <sub>pss</sub> T)	None	3652.0	3652.9
<b>ON12</b>	d (TTT TTT TTT T)	3'-TAMRA	3602.6	3604.1
<b>ON13</b>	d (TTT TTT TTT <sub>pss</sub> T)	3'-TAMRA	3826.9	3827.4
<b>ON14</b>	d (TTT TTT T <sub>pss</sub> TT <sub>pss</sub> T)	3'-TAMRA	4051.2	4051.6
<b>ON15</b>	d (TTT TT <sub>pss</sub> T T <sub>pss</sub> TT <sub>pss</sub> T)	3'-TAMRA	4275.6	4275.7
<b>ON16</b>	d(AACCGCT <sub>pss</sub> T <sub>pss</sub> CCCCGACT <sub>pss</sub> T <sub>pss</sub> CC)	None	6555.1	6556.0
<b>ON17</b>	d(AACC <sub>pss</sub> GC <sub>pss</sub> TT <sub>pss</sub> CC <sub>pss</sub> CC <sub>pss</sub> GACT <sub>pss</sub> TC <sub>pss</sub> C)	None	7215.1	7215.0

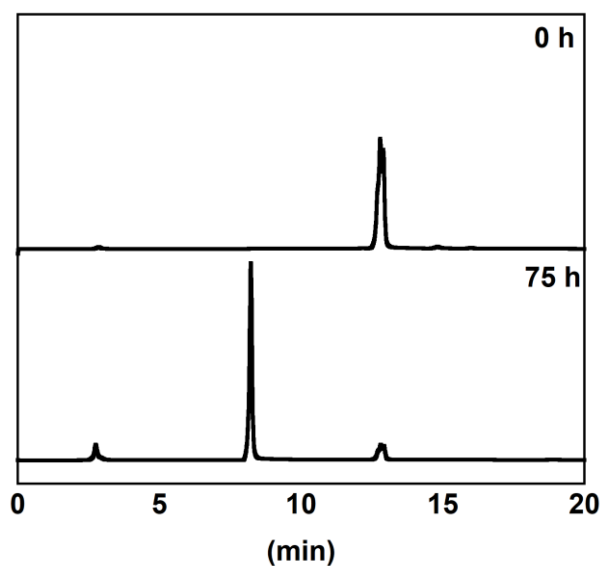
a) T<sub>pss</sub>, C<sub>pss</sub>: *trans*-5-benzyloxy-1,2-dithiane-4-yl modified thymidine and cytidine.

## 第二節 REDUCT-PTE 核酸の性質評価

次に合成した REDUCT-PTE 核酸 (**ON8–15**) を用いて、細胞内を模倣した条件下での変換反応の確認、血清中での安定性評価および細胞膜透過性の評価を行った。

第一節の検討において得られた T 10 mer 中に 1 カ所修飾基を導入した **ON9** を用いて、REDUCT-PTE 核酸が細胞内を模倣した還元条件において天然型核酸へと変換されるかを評価した。50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にて 0.1 mM の濃度になるように **ON9** を調製後、最終濃度 10 mM となるように GSH 溶液を加え、37 °C にて反応を行い、反応の進行を HPLC にて確認した (**Figure 29**)。

その結果 75 h 後において **ON9** のピークは、ほとんど消失しており天然型オリゴ核酸である thymidine 10 mer (**T<sub>10</sub>**) が、ほぼ単一のピークとして確認された。この結果から、本 REDUCT-PTE 核酸が細胞内を模倣した還元条件において、天然型オリゴ核酸へと変換されることが明らかとなった。

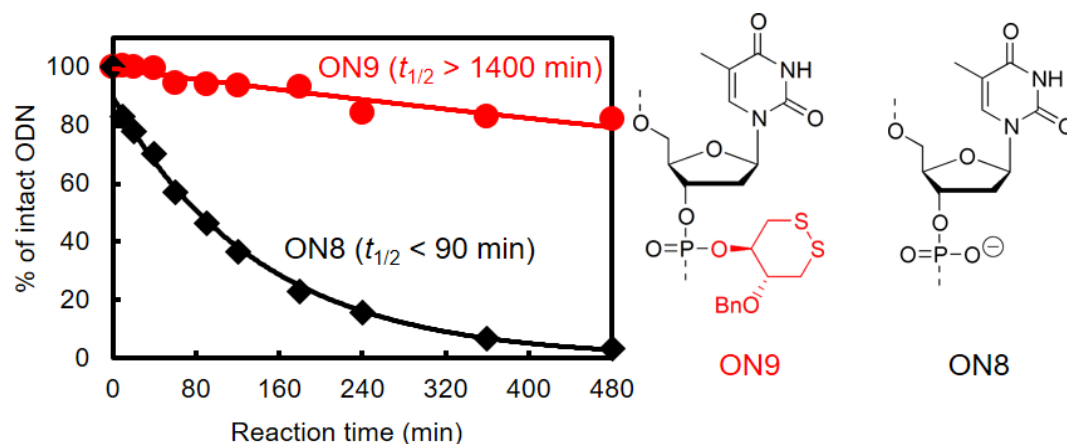


**Figure 29.** RP-HPLC chromatograms of the conversion of **ON9** under cytosol-mimetic reductive condition (10 mM glutathione, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 37 °C).

次に REDUCT-PTE 核酸の血清中での安定性評価を行った。天然型 **T<sub>10</sub>** (**ON8**) および 1 カ所に修飾を施した **ON9** の溶液に最終濃度が 10 % (v/v) となるように FBS を加え、37 °C にて反応を行った。一定時間ごとの反応液を HPLC にて分析し、それぞれのオリゴ核酸の残存率をピーク面積から求め、オリゴ核酸の 10 % (v/v) FBS 中での安定性を評価した (**Figure 30**)。

その結果、天然型の **ON 8** は 4 h 程度で 80 % 以上が分解しており、その半減期が 90 min 未満であった。一方 **T 10 mer** 中の 3'末端に一カ所修飾を施した **ON 9** は 8 h 後においても 20 % 以下しか分解が生じておらず、半減期が 1400 min と延長していた。このことから、血清中での安定性がわずか一カ所の修飾を施すだけでも、15 倍以上向上することが明らかとなった。



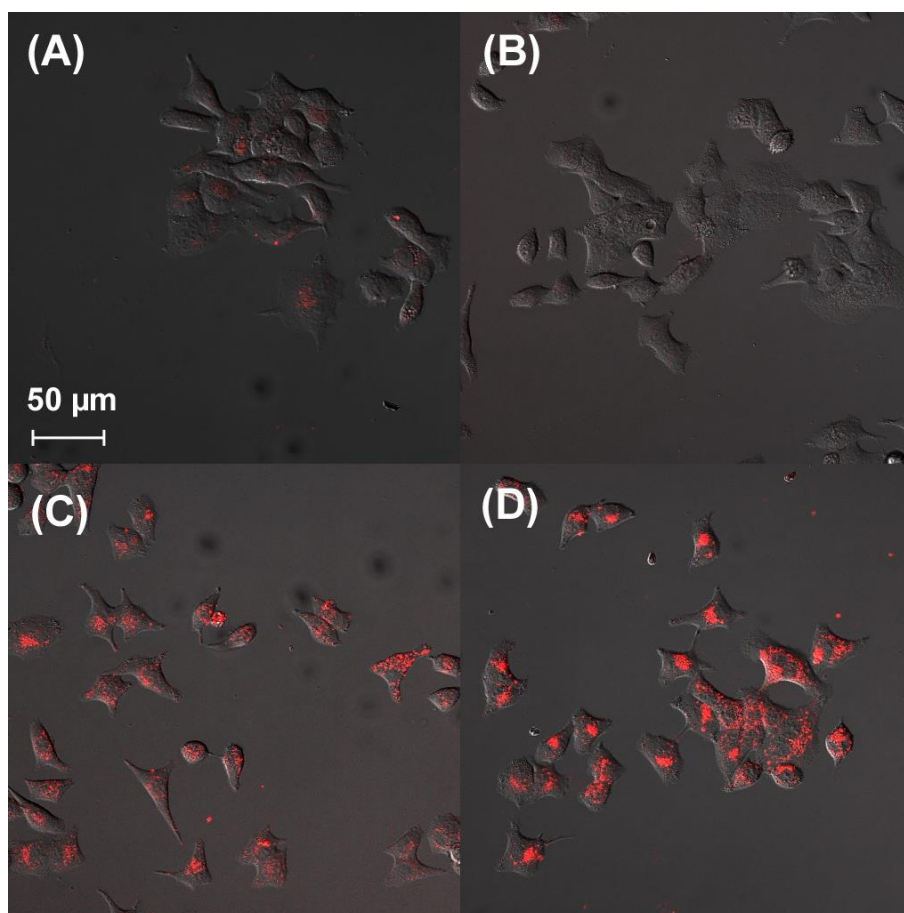


**Figure 30.** Comparison of nuclease resistance of REDUCT PTE ON (**ON9**: ●) and natural ON T<sub>10</sub> (**ON8**: ▲). ONs were incubated in 10 % FBS and the reactions were analyzed by RP-HPLC.

次に蛍光標識化オリゴ核酸 **ON12–15** を用いて REDUCT-PTE 核酸の細胞膜透過性に関する検討を行った。トランスフェクション試薬を含まない 5  $\mu$ M の 3'-蛍光標識オリゴ核酸 **ON12–15** を含む培地 (DMEM) 中で、A549 細胞を 37 °C にて 4 h 培養することで、オリゴ核酸の細胞内導入を行った。オリゴ核酸導入後の細胞を PBS にて洗浄後、CLSM にて、細胞内の蛍光を観察した (**Figure 31**)。

T10 mer 中に 1 カ所のみを修飾した **ON13** および天然型の **ON12** においては CLSM において、ほとんど蛍光を確認できなかった (**Figure 31A and B**)。一方で 2 カ所以上の修飾を施した **ON14** および **ON15** においては強い蛍光が確認されたことから、これらの REDUCT-PTE 核酸が優れた細胞膜透過性を有していることが明らかとなった (**Figure 31C and D**)。これらの結果からオリゴ核酸の脂溶性が増大することで細胞膜透過性が向上することが示唆され、十分な膜透過能を付与するためには、9 個のリン酸基による負電荷に対して少なくとも 2 個以上の PTE 修飾を導入する必要があることが考えられた。

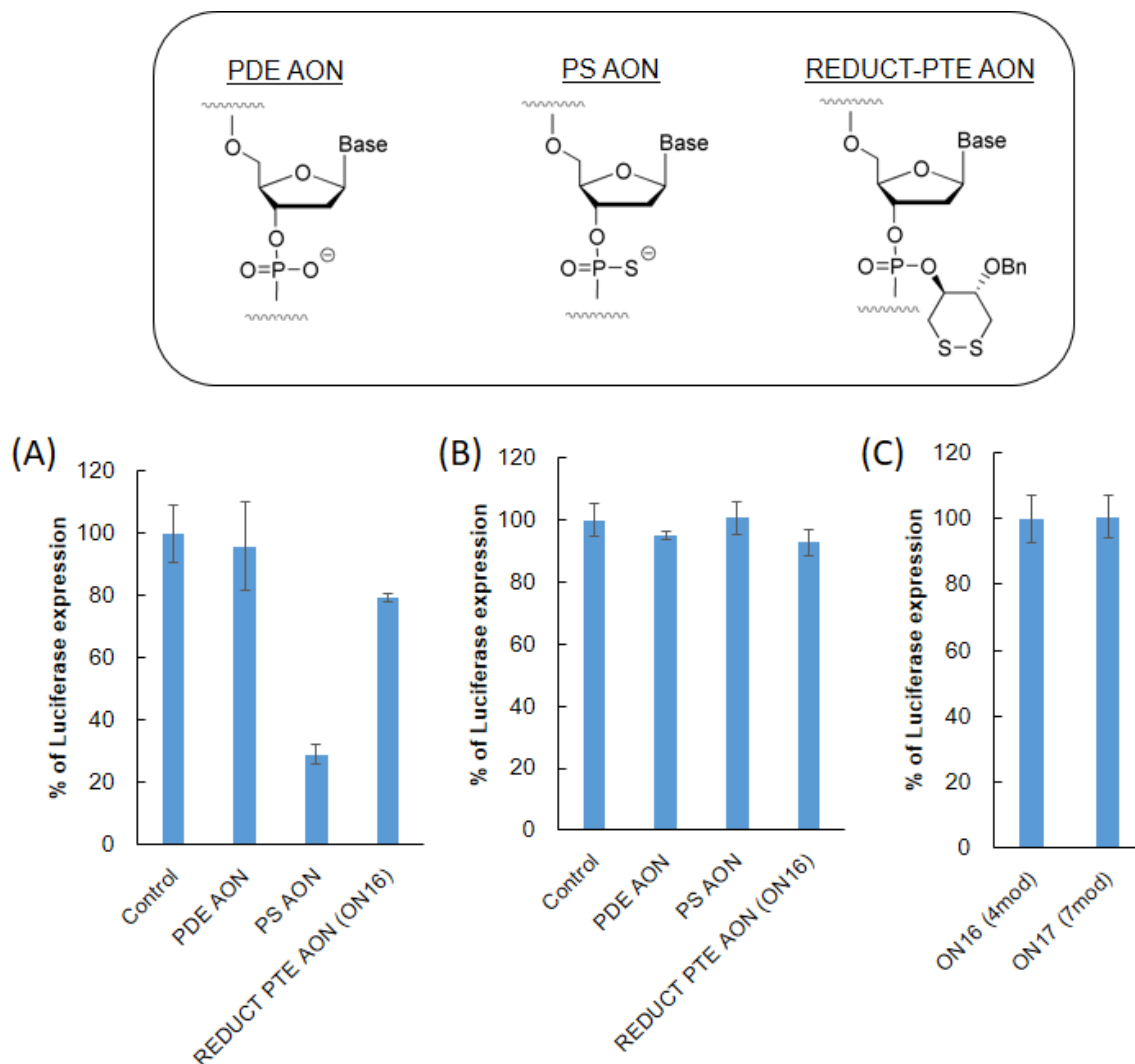
以上の結果から REDUCT-PTE 核酸が優れた血清中での安定性と細胞膜透過性を有し、細胞内還元環境において天然型核酸へと変換されることから、優れたアンチセンス活性を有することが期待されたため、次に合成した REDUCT-PTE 核酸を用いてアンチセンス活性に関する検討を行った。



**Figure 31.** CLSM analysis of A549 cells incubated with 3'-TAMRA labeled **ONs 12–15** at the concentration of 5  $\mu$ M in serum-free DMEM for 4 hours at 37 °C. (A) **ON12** (unmodified T10), (B) **ON13** (one modification), (C) **ON14** (two modifications), and (D) **ON15** (three modifications).

### 第三節 ルシフェラーゼアッセイを用いた REDUCT-PTE 核酸のアンチセンス活性

最後に REDUCT-PTE 核酸がアンチセンス活性を有するかの評価を行った。1  $\mu$ M の抗ルシフェラーゼ活性を有する 19 mer の配列からなる PDE 核酸、phosphorothioate (PS) および 19 mer 配列中に 4 カ所修飾を施した REDUCT-PTE 核酸 (**ON 16**) を、ルシフェラーゼ遺伝子を安定発現したヒト由来肺癌細胞 (A549-Luc) に CEM 法を用いて導入した。72 h 培養後の細胞中のルシフェラーゼ発現量を発光分析により測定し、抗ルシフェラーゼ活性のないランダム配列を有する control オリゴ核酸を導入した際のルシフェラーゼ発現量を 100 % として、各オリゴ核酸導入後のルシフェラーゼ発現量の相対比率を遺伝子発現抑制効果として評価した (**Figure 32A**)。



**Figure 32.** Anti-luciferase activities of phosphodiester AON (PDE AON), phosphorothioate AON (PS AON) and REDUCT PTE AON at the concentration of 1  $\mu$ M AONs for 72 h (A and B) and 96 h (C) incubation (n = 3). (A) AONs were transfected with CEM method, (B) and (C) without any transfecting reagents. Control; 5'-TGC TCA ACA GTA TGA-3', AONs; 5'-AAC CGC TTC CCC GAC TTC C-3'. All the phosphates are modified in PS AON. Modified sites of REDUCT-PTE AONs were shown in **Table 8**.

CEM 法によるトランスフェクションを行った場合では天然型の PDE 核酸では抑制は 10 % 未満であったのに対して、PS 核酸では 70 % 程度の抑制が確認された。一方 REDUCT-PTE 核酸 (ON 16) では抑制効率が 20 % 程度と低いものの、天然型 PDE 核酸以上の抑制効率を示していることが分かった (Figure 32A)。

次にトランスフェクション試薬を用いずにそれぞれのオリゴ核酸を含む培地中 (DMEM) で A549-Luc 細胞を処理し、72 h 後のルシフェラーゼ発現量を評価した (Figure 32B)。その結果 PDE および PS 核酸の抑制効率は 5 % 程度であり、PS 核酸のアンチセンス活性が特に低下したことから、PS 核酸が細胞内へ導入されていないことが考えられた。一方、細胞膜透過性を有すると考えられる REDUCT-PTE 核酸 (ON 16) の抑制効率も 10 % 程度と低く、細胞膜透過性を有さない PDE および PS 核酸と比較して顕著なアンチセンス活性の増大は確認されなかった。また各オリゴ核酸の濃度を 10  $\mu$ M にまで上げ同様の検討を行ったが、同様の結果が得られ顕著な活性差は確認されなかった (data not shown)。当初、細胞膜透過性の検討より 9 個のリン酸基に対して 2 カ所以上の PTE 構造を導入する必要があると考えられたため、18 個のリン酸基を有する 19 mer オリゴ核酸においては 4 カ所の修飾を有する ON 16 を設計した。一方で十分なアンチセンス活性の向上が見込めなかったことから、19 mer オリゴ核酸中への修飾数を 7 カ所に増やした ON 17 を新たに合成し、その活性を ON 16 と比較した (Figure 32C)。しかしながら、培養時間を 96 h まで延長し修飾数を増大させた場合でも、顕著な活性差は確認されず、脂溶性増大による細胞膜透過性の向上に伴う活性の増大は見られなかった。

第二節までの結果から REDUCT-PTE 核酸が高い血清中での安定性および高い細胞膜透過性を有し、細胞内を模倣した還元環境において天然型オリゴ核酸へと変換されることが確認できたが、十分なアンチセンス活性は示さなかった。この原因の一つとして、本分子の細胞内還元環境下における天然型オリゴ核酸への変換速度が極めて遅いことが考えられた。第二節での GSH を用いた変換反応の検討においても、1 カ所に修飾基を導入した場合で天然体への変換反応の半減期が 30 h と極めて遅いことが確認されている。一般に酵素的な分解反応が連鎖的に続く siRNA と比較して、アンチセンス核酸は mRNA に直接作用することで活性を示すことからアンチセンス核酸自身の mRNA との親和性が極めて重要であり、その用量依存性も強い。また PTE 核酸はリン酸基修飾により mRNA との親和性が低下することも知られていることから、<sup>94)</sup> 本 REDUCT-PTE 核酸のリン酸部修飾が一部残存しており、mRNA との親和性が低下し、十分な活性を示さなかったことが考えられた。現在この原因を明らかにすることを目的として、天然型へと速やかに変換される新たな REDUCT-PTE 核酸の設計を行っている。

## 第二部 総括

筆者は第二部において REDUCT の概念を利用した新規リン酸部修飾核酸の開発を目指し、その合成法の確立および性質評価を行った。

これまでにプロドラッグ型のリン酸部修飾核酸として phosphotriester (PTE) 構造を有するオリゴ核酸が合成されてきた。これらのプロドラッグ型 PTE 核酸はホスホロアミダイト法によりいくつかの合成例があるものの、核酸塩基の保護が不要な thymidine オリゴマーを用いた検討がほとんどで、天然型 4 種の塩基を有するオリゴ PTE 核酸の合成例はほとんどない。また一般に PTE 核酸は細胞膜透過性および核酸分解酵素耐性が向上することが知られているものの、過去の検討では単鎖 PTE 核酸を用いて行われており、オリゴ PTE 核酸の性質を詳細に評価した例はなかった。

そこで筆者は第一章においてオリゴ PTE 核酸の合成法の確立とその性質評価を行った。本章による結果から、PTE 構造は核酸塩基の緩和な脱保護条件 (50 mM  $K_2CO_3$  in MeOH, rt, 4h) で安定であり、本条件で脱保護可能な保護基を核酸塩基の保護基として使用することでオリゴ PTE 核酸は十分に合成可能であることが明らかとなった。またオリゴ PTE 核酸の水溶性を向上させるために生体内ポリアミンであるスぺルミンを結合させたオリゴ PTE 核酸-スぺルミンコンジュゲートは優れた細胞膜透過性を有し、さらにその細胞膜透過性の向上は PDE 構造を PTE 構造へと変更することで顕著に向上することを見出した。

次に筆者は第二章において環状ジスルフィド結合を含む官能基を導入した REDUCT-PTE 核酸の設計と合成を行った。第一章にて PTE 構造が安定であることが明らかとなった緩和な脱保護条件を用いて、REDUCT-PTE 核酸を合成し、本分子が細胞内を模倣した還元条件において天然型オリゴ核酸へと変換されること、優れた血清中での安定性および細胞膜透過性を有することが明らかとなった。残念ながら、本分子のアンチセンス活性の著しい向上は確認されなかったが、得られた結果を踏まえて現在、新たな REDUCT-PTE 核酸の開発を行っている。

## 結論

今回の検討で、筆者は核酸医薬への応用を指向して、細胞内の還元環境において天然型核酸へと変換されるプロドラッグ型核酸 (Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming (REDUCT)-核酸) の開発を行った。

第一部においては RNA 型のプロドラッグ型核酸である 2'-*O*-methyldithiomethyl (MDTM)-RNA を筆者の所属する研究室で独自に開発された 2'-*O*-TMBTM-RNA を前駆体とした「オリゴ核酸合成後修飾法」により合成し、その siRNA 活性に関して評価を行った。その結果本分子が優れた遺伝子発現抑制効果を有し、また siRNA 中のいずれの箇所に修飾を施しても活性の低下が見られないことが明らかとなった。この性質は従来から繁用される非プロドラッグ型の 2'位修飾核酸では見られなかった性質であり、siRNA 医薬の開発において、特に分解耐性が必要な箇所に 2'-*O*-MDTM 基を導入することで siRNA 活性を維持しながら核酸分解酵素耐性を獲得することが可能となる。

更に塩基配列の拡張を目指し「オリゴ核酸合成後修飾法」により uridine 以外の 2'位に MDTM 修飾を導入した RNA 分子の合成法を確立した。現在、病態原因遺伝子に対する 2'-*O*-MDTM-siRNA の設計及び合成を行っており、今後薬理活性などを評価していくことを計画している。

第二部においてはアンチセンス型の核酸医薬への応用を目指しプロドラッグ型 phosphotriester (PTE) 核酸の合成および機能評価を行った。本研究により見出した環状ジスルフィド結合を有する官能基を導入した REDUCT-PTE 核酸は、オリゴ核酸を医薬応用する上で重要となる優れた血清中での安定性および細胞膜透過性を有することが明らかとなった。残念ながら、十分なアンチセンス活性の向上は確認されなかったものの、今後、本研究により得られた知見から十分なアンチセンス活性を有する新規 REDUCT 核酸の開発を行う予定である。

## 論文目録

### 1. 第一部 第一章の内容

Effective gene silencing activity of prodrug-type 2'-*O*-methyldithiomethyl siRNA compared with non-prodrug-type 2'-*O*-methyl siRNA.

J. Hayashi, M. Nishigaki, Y. Ochi, S. Wada, F. Wada, O. Nakagawa, S. Obika, M. Harada-Shiba and H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28, 2171-2174.

### 2. 第一部 第二章の内容

Syntheses of prodrug-type 2'-*O*-methyldithiomethyl oligonucleotides modified at natural four nucleoside residues and their conversions into natural 2'-hydroxy oligonucleotides under reducing condition.

J. Hayashi, Y. Ochi, Y. Morita, K. Soubou, Y. Ohtomo, M. Nishigaki, Y. Tochiyama, O. Nakagawa, S. Wada and H. Urata, *Bioorg. Med. Chem.*, **2018**, 26, 5838-5844.

### 3. 第二部 第一章の内容

Synthesis of novel cationic spermine-conjugated phosphotriester oligonucleotide for improvement of cell membrane permeability.

J. Hayashi, T. Hamada, I. Sasaki, O. Nakagawa, S. Wada and H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 3610-3615.

### 4. 第二部 第二章の内容

Syntheses of prodrug-type phosphotriester oligonucleotides responsive to intracellular reducing environment for improvement of cell membrane permeability and nuclease resistance.

J. Hayashi, Y. Samezawa, Y. Ochi, S. Wada and H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 3135-3138.

## 謝辞

本研究の遂行並びに論文作成にあたり、直接指導を賜りました大阪薬科大学 浦田秀仁 教授に深謝致します。

本研究に際し、終始御指導御鞭撻下さいました大阪薬科大学 和田俊一 准教授および中川治 助手 (現大阪大学大学院薬学研究科 特任講師) に深く感謝致します。

NMR 測定していただきました大阪薬科大学 箕浦克彦 准教授、MS スペクトルを測定していただきました藤嶽美穂代 講師に感謝致します。

CEM 法によるトランスフェクションに関してご指導、ご助言いただきました国立循環器病研究センター病態代謝部 斯波真理子 部長および和田郁人 博士に感謝致します。

最後に、本研究に御助力、ご助言下さいました 越智洋輔 博士ならびに機能分子創製化学研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。



## 実験の部

無水条件反応は、アルゴンガス気流下、反応溶媒にナカライテスク社製モレキュラーシーブス 4A 1/6 で乾燥させた特級溶媒を使用した。アミダイト体合成に使用した亜リン酸化剤は、富士フィルム和光純薬工業の 2-cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidite または 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite を使用した。薄層クロマトグラフィーは、Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> を使用し、カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは、富士フィルム和光純薬工業 Wakosil C-200 (64-210  $\mu$ m)、あるいは、Wakogel C-400HG (20-40  $\mu$ m) を使用した。NMR スペクトルは、Agilent NMR System 600-DD2 (600 MHz), Varian UNITY INOVA-500 (500 MHz), Agilent 400-MR (400 MHz), Varian Mercury-300 (300 MHz), Varian Gemini-200 (200 MHz) のいずれかを用い、測定溶媒に Merck chloroform-*d*<sub>1</sub>, Merck DMSO-*d*<sub>6</sub>, ISOTEC methanol-*d*<sub>4</sub>, Sigma Ardrich acetonitrile-*d*<sub>3</sub> を使用し、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定ではテトラメチルシランを内部標準 (0 ppm)、<sup>31</sup>P-NMR スペクトルでは 85 % リン酸を外部標準 (0 ppm) とし、ケミカルシフトは  $\delta$  (ppm) 値で示した。シグナルの多重線の表示は s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = double doublet, sep = septet, m = multiplet, br = broad を用いた。MS スペクトルは、日本電子社製 JOEL JMS-700 を使用し、高速原子衝撃 (FAB) 法により測定し、FAB 法のマトリックスには *m*-ニトロベジルアルコール (NBA) またはトリエタノールアミン (TEOA) を用いた。オリゴ核酸合成の試薬は GLEN RESEARCH 社製もしくは Chemgenes 社製の以下の試薬を用いた。Coupling 時の activator には 0.25 M 5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT)/acetonitrile 溶液もしくは 0.25 M 4,5-dicyanoimidazole (DCI)/acetonitrile 溶液または 0.45 M 1*H*-tetrazole/acetonitrile 溶液を、capping A 試薬には Ac<sub>2</sub>O/THF/pyridine 溶液、capping B 試薬には 10 % methylimidazole/THF/pyridine 溶液、deprotection 試薬には 3 % dichloroacetic acid (DCA)/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液、oxidation 試薬には 0.02 M iodine/THF/pyridine/water、非修飾 RNA phosphoramidite は 2'-*O*-TBDMS 保護 cyanoethoxy A<sup>Bz</sup>, G<sup>Ac</sup>, C<sup>Bz</sup>, U を、非修飾 DNA phosphoramidite は dA<sup>Bz</sup>, dG<sup>dmf</sup>, dC<sup>Bz</sup>, dT を用い、アミダイト体の溶解剤には無水 acetonitrile を使用した。オリゴヌクレオチドの合成は、Applied Biosystems 社製 Model 392 DNA/RNA

synthesizer により行った。高速液体クロマトグラフィーは、島津製作所 LC-20A, LC-10, LC-6A のいずれかを使用し、逆相カラムである Waters  $\mu$ Bondasphere 5C18  $\phi$  3.9 $\times$ 250 mm または Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II  $\phi$  4.6 $\times$ 250 mm で分析、Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II  $\phi$  10.0 $\times$ 250 mm で分取精製した。天然型オリゴ核酸の脱塩は、Waters Sep-Pak Plus (C18)、または GE Healthcare NAP-25 (gel-filtration column) を用いた。MALDI-TOF MS は、Perkin-Elmer Applied Biosystem 社製 Voyager-DE STR もしくは Bruker 社製 microflex を UV スペクトルは島津製作所 BioSpec-mini もしくは Eppendorf 社製 BioSpectrometer basic で測定した。また酵素耐性評価には FBS として Biosera 社製 FBS (Dominican Republic Origin) を用いた。

## **細胞実験**

ヒト肺癌細胞 A549 は東北大学加齢医学研究所から分与していただき、ルシフェラーゼ安定発現 A549 細胞 (A549-Luc) は独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクにて購入した。それぞれの細胞は 10 % (v/v) FBS/ DMEM を用い、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。共焦点レーザースキャン顕微鏡には Carl Zeiss 社製 LSM510 または LSM700 を用いた。マイクロプレートリーダーには発光分析には Berthold technologies 社製 Tristar LB941 を、吸光度測定には BIO-RAD Model 680 を用いた。タンパク定量には Thermo scientific 社製 BCA protein assay kit もしくは micro BCA protein assay kit を用いた。ルシフェラーゼアッセイ試薬には Promega 社製 Luciferase assay kit を用い、その際の細胞溶解試薬には Repoter lysis buffer を用い測定を行った。

## **第一部第一章の実験**

### **Preparations of siRNAs**

一本鎖の antisense, sense RNA (50  $\mu$ M) をそれぞれ 30  $\mu$ L および 5 $\times$ annealing buffer (500 mM potassium acetate, 150 mM HEPES-KOH pH 7.4, 10 mM magnesium acetate) 15  $\mu$ L を混合し (全量 75  $\mu$ L)、90  $^{\circ}$ C にて 1 min 加熱後、37  $^{\circ}$ C にて 60 min 静置した (最終濃度 20  $\mu$ M siRNA)。調製した siRNA はフィルター (Millex-GV, 0.22  $\mu$ m, Millipore) を用いて、ろ過滅菌後 10–15  $\mu$ L ずつ分注し-80  $^{\circ}$ C にて保存した。

### **Preparations of the medium used in the CEM method**

FBS 10 mL と DMEM 189 mL を混合後、1800 mM の濃度に調製した  $\text{CaCl}_2$  溶液 1 mL を加えた (最終濃度 9 mM  $\text{CaCl}_2$  in 10 % FBS/DMEM)。

### **Procedure for Luciferase assay**

ルシフェラーゼ発現 A549 (A549-Luc) 細胞の  $8.0 \times 10^4$  cells/mL 希釈液を 96 well 細胞培養プレートに 100  $\mu$ L ずつのせ 1 晩培養した (8000 cells/well)。Lipofection 法による siRNA の細胞導入は lipofectamine 2000 (Thermo fisher) を用い、標準のプロトコルに従い行った (10 nM siRNAs/ 3  $\mu$ g lipofectamine 2000)。CEM 法による siRNA の細胞導入は播種後の細胞を CEM 培地にて 3 回洗浄後、CEM 培地中にて 10 nM の濃度に調製した siRNAs 溶液を 100  $\mu$ L 加えて、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて 37  $^{\circ}$ C で培養を行った。24 h 培養後の細胞を PBS にて 3 回洗浄後、残った PBS を除き、Promega 社製 Reporter lysis buffer を 1well あたり 50  $\mu$ L ずつ加え、よく攪拌後、-80  $^{\circ}$ C で一晩冷凍保存した。得られた細胞溶解液を遠心後、5  $\mu$ L  $\times$  2 を 96 well 発光分析用マイクロプレートにのせ、Berthold technologies 社製 Tristar LB 941 を用いて発光分析を行った。得られた発光強度から単位タンパク量当たりの発光強度を求め、細胞内でのルシフェラーゼ発現量として用いた。抗ルシフェラーゼ活性を有さないコントロール siRNA を導入した場合の細胞内ルシフェラーゼ発現量を 100 % として、遺伝子抑制効果を評価した。この操作は 1 サンプルあたり 3 回以上行い、平均値および SD を求めグラフ化した。

Target mRNA sequence; 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG-3' (luciferase pGL3)

Control siRNA sequence; 5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UdTdT-3', 5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CdTdT-3'

### **Luminescence conditions**

発光分析はPromega社製 Luciferase assay system を用いて行った。凍結乾燥済みのルシフェラーゼアッセイ用基質にルシフェラーゼアッセイ緩衝液 (10 mL) を加え、それをBerthold technologies社製 Tristar LB 941に装着し、発光分析を行った。(試薬量: 25  $\mu$ l/sample, delay: 2 sec, 発光取り込み時間: 10 sec)。

### **Quantification of intracellular proteins**

透明 96well マイクロプレートに 80  $\mu$ L ずつ PBS を加え、各細胞溶解液 10  $\mu$ L を 3 well/サンプルずつ加えた。Micro BCA assay kit (Thermo scientific) の BCA 液を 90  $\mu$ L/well 加え、マイクロプレートを 37 °C で 2 h 加温後、室温に戻してからマイクロプレートリーダーで 560 nm における吸光度を測定した。別途標準タンパク溶液を用いて検量線を作成し、細胞溶解液中のタンパク量を求めた。

### **Assay for time-course of siRNA activity**

各時間培養後の細胞数が一定となるように、24 h では 8000/well, 48 h では 4000/ well, 72 h では 2000/well, 96 h では 1000/well, 120 h では 1000/well, 144 h では 500/well として細胞を播種し、CEM 法によるトランスフェクションにより一定時間培養後の細胞内ルシフェラーゼ発現量を上記の方法にて測定した。

### Assay for nuclease resistance of siRNA

アニーリング後の siRNA 溶液 (10  $\mu$ M) 10  $\mu$ L と milliQ 80  $\mu$ L を混合し、FBS 10  $\mu$ L を加えた後、37  $^{\circ}$ C にて反応を行った (最終濃度 1  $\mu$ M siRNA, 10 % FBS)。一定時間ごとに反応液 10  $\mu$ L を取り、loading dye (50 % (v/v) glycerol, 0.02 % (w/v) bromophenol blue, 1 % (w/v) sodium dodecyl sulfate) 2  $\mu$ L を加え、攪拌遠心後すぐに-30  $^{\circ}$ C にて凍結保存した。得られたサンプル溶液を非変性 PAGE にて分析し、泳動後のゲルを 1  $\mu$ g/mL のエチジウムブロマイド (EtBr) 水溶液に 30 min 浸け siRNA を染色後、超純水にて 30 min 浸けゲルを洗浄後、Amersham Imager 600 (GE healthcare) にて蛍光の撮影を行った (取り込み時間 1 sec)。また CEM 培地中での安定性はアニーリング後の siRNA 溶液 (10  $\mu$ M) 10  $\mu$ L と CEM 培地 90  $\mu$ L を混合し、同様に反応および解析を行った。

## 第一部第二章の実験

### Synthesis of *N*-protected-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-nucleosides (5a-d)

*N*-protected nucleoside (**4a-d**) を dry pyridine にて 3 回共沸した後、dry pyridine にて懸濁させ、氷冷下、TIPDS-Cl<sub>2</sub> を加えた後、室温にて 0.5-3 h 反応させた。反応液に飽和重曹水を加え中和後、酢酸エチルにて抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水芒硝で乾燥させ、綿栓ろ過後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、溶媒を減圧留去し **5a-d** を得た。

### *N*<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)adenosine (**5a**)

白色粉末, 収率 85 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 9.08 (1H, br s), 8.76 (1H, s), 8.16 (1H, s), 8.03 (2H, d,  $J$  = 7.7 Hz), 7.63-7.60 (1H, m), 7.54-7.52 (2H, m), 6.05 (1H, s), 5.14-5.12 (1H, m), 4.63 (1H, d,  $J$  = 5.6 Hz), 4.16-4.05 (3H, m), 3.22 (1H, br s), 1.15-1.08 (28H, m). HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub> 614.2829 [M+H]<sup>+</sup>, found 614.2833.

*N*<sup>2</sup>-Isobutyryl-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)guanosine (**5b**)

白色粉末, 収率 82 %; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.17 (1H, s), 8.57 (1H, br s), 7.90 (1H, s), 5.89 (1H, s), 4.59-4.55 (1H, m), 4.30-4.03 (3H, m), 3.16 (1H, br s), 2.68-2.59 (1H, m), 1.28 (6H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.09-1.02 (28H, m). MS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub> 596.2935 [M+H]<sup>+</sup>, found 596.

*N*<sup>4</sup>-Benzoyl-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)cytidine (**5c**)

白色粉末, 収率 63 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.74 (1H, br s), 8.24 (1H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.90 (2H, d, *J* = 6.6 Hz), 7.6 (1H, t, *J* = 7.8 Hz), 7.52 (2H, t, *J* = 7.8 Hz), 5.86 (1H, s), 4.33 (1H, dd, *J* = 9.0, 4.8 Hz), 4.29 (1H, d, *J* = 13.8 Hz), 4.26 (1H, d, *J* = 4.2 Hz), 4.23-4.21 (1H, m), 4.03 (1H, dd, *J* = 13.2, 2.4 Hz), 2.95 (1H, br s), 1.12-0.99 (28H, m). HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub> 590.2717 [M+H]<sup>+</sup>, found 590.2723.

*3',5'-O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)uridine (**5d**)

白色粉末, 収率 87 %; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.24 (1H, br s), 7.65 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 5.73 (1H, s), 5.68 (1H, dd, *J* = 8.1, 3.2 Hz), 4.40 (1H, dd, *J* = 8.4, 4.8 Hz), 4.22-4.17 (2H, m), 4.11-3.98 (2H, m), 2.95 (1H, br s), 1.09-1.00 (28H, m). HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Si<sub>2</sub> 487.2295 [M+H]<sup>+</sup>, found 487.2295.

**Synthesis of *N*-protected-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-*O*-[(methylthio)methyl] nucleosides (**6a-d**)**

*N*-protected-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-nucleosides (**5a-d**) に DMSO (45 eq), 酢酸 (52 eq) および 無水酢酸 (24 eq) を加え室温にて 18–24 h 反応させた。反応液を飽和重曹水に慎重に加え中和後、酢酸エチルにて抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水芒硝で乾燥させ、綿栓ろ過後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、溶媒を減圧留去し **6a-d** を得た。

*N*<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-[(methylthio)methyl]adenosine (**6a**)

白色粉末, 收率 73%; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.12 (1H, br s), 8.78 (1H, s), 8.34 (1H, s), 8.04 (2H, d, *J* = 7.7 Hz), 7.63-7.60 (1H, m), 7.55-7.52 (2H, m), 6.12 (1H, s), 5.07 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 5.01 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 4.73-4.68 (2H, m), 4.26 (1H, br. d, *J* = 13.2 Hz), 4.20-4.18 (1H, m), 4.04 (1H, dd, *J* = 13.4, 2.4 Hz), 2.21 (3H, s), 1.18-1.02 (28H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 164.6, 152.5, 150.8, 149.4, 140.9, 133.6, 132.8, 128.9, 127.9, 123.3, 88.7, 81.9, 77.6, 74.8, 68.9, 59.6, 17.44, 17.38, 17.33, 17.29, 17.1, 17.03, 17.01, 16.9, 13.45, 13.42, 12.9, 12.8, 12.6. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>SSi<sub>2</sub> 674.2863 [M+H]<sup>+</sup>, found 674.2868.

*N*<sup>2</sup>-Isobutyryl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-[(methylthio)methyl]guanosine (**6b**)

黄白色粉末, 收率 78%; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 12.0 (1H, s), 8.51 (1H, s), 8.00 (1H, s), 5.86 (1H, s), 5.02 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.96 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.50-4.47 (2H, m), 4.24 (1H, br d, *J* = 3.2 Hz), 4.15-4.13 (1H, m), 4.01 (1H, dd, *J* = 14.4, 2.5 Hz), 2.67 (1H, sep, *J* = 6.9 Hz), 2.17 (3H, s), 1.29-1.24 (6H, m), 1.14-0.97 (28H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 178.2, 155.5, 147.4, 146.9, 136.3, 121.9, 87.6, 81.9, 77.8, 74.3, 68.4, 59.6, 36.5, 19.0, 18.9, 17.4, 17.28, 17.23, 17.1, 16.99, 16.97, 16.84, 16.76, 16.71, 13.45, 13.43, 12.9, 12.5. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>SSi<sub>2</sub> 656.2969 [M+H]<sup>+</sup>, found 656.2969.

*N*<sup>4</sup>-Benzoyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-[(methylthio)methyl]cytidine (**6c**)

白色粉末, 收率 80%; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.80 (1H, br s), 8.37 (1H, br d, *J* = 7.1 Hz), 7.90 (1H, br s), 7.63-7.51 (4H, m), 5.85 (1H, s), 5.14 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 5.01 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.40 (1H, br s), 4.31 (1H, d, *J* = 13.2 Hz), 4.22 (2H, dd, *J* = 11.8, 9.9 Hz), 4.01 (1H, d, *J* = 13.5 Hz), 2.21 (3H, s), 1.13-0.92 (28H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 167.7, 162.2, 161.6, 144.8, 133.4, 129.1, 127.6, 98.6, 95.8, 89.9, 82.2, 77.6, 74.4, 67.5, 66.1, 59.3, 17.5, 17.4, 17.3, 17.00, 16.97, 16.9, 16.8, 13.5, 13.3, 13.1, 12.9, 12.5. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>SSi<sub>2</sub> 650.2751 [M+H]<sup>+</sup>, found 650.2748.

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-[(methylthio)methyl]uridine (6d)

白色粉末, 収率 87%;  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9.02 (1H, s), 7.90 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz), 5.73 (1H, s), 5.69 (1H, dd,  $J = 8.2, 2.0$  Hz), 4.99 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz), 4.97 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz), 4.36 (1H, d,  $J = 4.7$  Hz), 4.28-4.23 (1H, m), 4.22 (1H, d,  $J = 4.7$  Hz), 4.15-4.13 (1H, m), 3.98 (1H, dd,  $J = 13.5, 2.4$  Hz), 2.19 (1H, s), 1.14-0.94 (28H, m).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 163.3, 149.8, 139.3, 101.6, 88.8, 82.0, 77.5, 74.2, 67.8, 59.3, 17.5, 17.4, 17.29, 17.25, 17.24, 17.21, 17.00, 16.97, 16.93, 16.8, 13.4, 13.1, 13.0, 12.8, 12.5. HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_7\text{SSi}_2$  547.2329  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , found 547.2325.

Syntheses of N-protected-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)nucleosides (7a-d)

*N*-protected-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-[(methylthio)methyl]adenosine, guanosine および cytidine (**6a-c**) の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液 (1.3 eq, 約 1 mL) を氷冷下にて 1 min かけて滴下し、反応液を室温に戻した後、30 min 攪拌した。2,4,6-Trimethoxybenzylmercaptan (2.5 eq) と *N,N*-diisopropylethylamine (5.0 eq) の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液を氷冷下にてゆっくり加え、室温に戻した後 1.5–3.0 h 攪拌した。反応液を 0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液に慎重に加え中和後、酢酸エチルにて抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水芒硝で乾燥させ、綿栓ろ過後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、溶媒を減圧留去し **7a-c** を得た。また uridine 誘導体 **7d** は既存の方法に従い<sup>75)</sup> 合成した。



*N<sup>6</sup>-Benzoyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)adenosine (7a)*

白色粉末, 收率 65% ; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.17 (1H, br s), 8.74 (1H, s), 8.17 (1H, s), 8.04 (2H, d, *J* = 7.1 Hz), 7.63-7.60 (1H, m, 1H), 7.53 (2H, t, *J* = 7.9 Hz), 6.10 (2H, s), 6.01 (1H, s), 5.21 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 4.97-4.95 (1H, m), 4.95 (1H, d, *J* = 11.8 Hz), 4.78 (1H, d, *J* = 5.0 Hz), 4.19 (1H, dd, *J* = 13.1, 1.9 Hz), 4.16-4.14 (1H, m), 4.03 (1H, dd, *J* = 13.2, 2.8 Hz), 3.95 (1H, d, *J* = 12.7 Hz), 3.81 (1H, d, *J* = 12.7 Hz), 3.80 (3H, s), 3.77 (6H, s), 1.11–1.05 (28H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.5, 160.3, 158.8, 152.3, 150.9, 149.3, 142.0, 133.6, 132.8, 130.1, 128.9, 127.9, 108.1, 90.6, 89.2, 81.8, 74.7, 69.7, 60.0, 55.8, 55.3, 22.9, 17.5, 17.4, 17.33, 17.30, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 13.4, 13.0, 12.8, 12.7. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>SSi<sub>2</sub> 840.3493 [M+H]<sup>+</sup>, found 840.3505.

*N<sup>2</sup>-Isobutyryl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)guanosine (7b)*

白色粉末, 收率 62 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11.9 (1H, s), 8.22 (1H, s), 7.95 (1H, s), 6.11 (2H, s), 5.83 (1H, s), 5.15 (1H, d, *J* = 11.7 Hz), 5.01 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 4.59 (1H, d, *J* = 4.7 Hz), 4.51 (1H, dd, *J* = 9.4, 4.7 Hz), 4.21 (1H, br d, *J* = 13.2 Hz), 4.16-4.13 (1H, m), 4.01 (1H, dd, *J* = 13.2, 2.7 Hz), 3.93 (1H, d, *J* = 12.3 Hz), 3.87 (1H, d, *J* = 12.3 Hz), 3.80 (3H, s), 3.78 (6H, s), 2.41 (1H, sep, *J* = 7.0 Hz), 1.19 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.15 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.12-0.95 (28H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 178.0, 160.5, 158.8, 155.4, 147.2, 147.0, 136.3, 121.9, 107.8, 91.0, 88.1, 81.8, 77.9, 74.1, 69.3, 59.7, 56.0, 55.4, 36.5, 22.9, 18.8, 17.4, 17.29, 17.25, 17.2, 17.05, 16.99, 16.87, 13.4, 12.94, 12.90, 12.6. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>37</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>SSi<sub>2</sub>Na 844.3418 [M+Na]<sup>+</sup>, found 844.3422.

*N<sup>4</sup>*-Benzoyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzyl-thiomethyl)cytidine

(7c)

白色粉末, 收率 58 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.69 (1H, br s), 8.35 (1H, br d, *J* = 5.0 Hz), 7.89 (2H, br s), 7.62-7.50 (4H, m), 6.13 (2H, s), 5.90 (1H, s), 5.10 (1H, d, *J* = 11.5 Hz), 5.06 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 4.44 (1H, d, *J* = 3.6 Hz), 4.32-4.23 (3H, m), 4.04 (1H, d, *J* = 12.9 Hz), 4.04-4.02 (1H, m), 3.81 (6H, s), 3.80 (3H, s), 3.76 (1H, d, *J* = 12.9 Hz), 1.14-0.94 (28H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 166.1, 162.3, 160.1, 158.9, 144.6, 133.1, 129.0, 127.5, 108.9, 95.7, 92.3, 90.7, 90.0, 82.1, 78.1, 73.3, 70.2, 67.8, 59.5, 55.8, 55.3, 30.3, 22.0, 17.5, 17.4, 17.33, 17.30, 17.1, 16.99, 16.98, 16.87, 13.5, 13.3, 13.1, 12.9, 12.8, 12.6. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>39</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>SSi<sub>2</sub>Na 838.3200 [M+Na]<sup>+</sup>, found 838.3199.

*3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-uridine (7d)*

白色粉末, 收率 65 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.31 (1H, s), 7.85 (1H, d), 6.12 (2H, s), 5.76 (1H, s), 5.66 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 4.99 (2H, s), 4.44 (1H, d, *J* = 4.6 Hz), 4.29-4.24 (2H, m), 4.15 (1H, dd, *J* = 9.7, 1.8 Hz), 3.99 (1H, dd, *J* = 13.5, 2.4 Hz), 3.95 (1H, d, *J* = 13.2 Hz), 3.81 (6H, s), 3.80, (3H, s), 3.77 (1H, d, *J* = 12.9 Hz), 1.11-0.96 (28H, m). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.0, 160.2, 158.9, 149.5, 139.7, 108.4, 101.4, 90.6, 89.2, 82.0, 77.6, 73.3, 68.3, 59.5, 55.8, 55.3, 22.0, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 16.99, 16.95, 16.8, 13.5, 13.0, 12.9, 12.6. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>39</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>SSi<sub>2</sub>Na 735.2778 [M+Na]<sup>+</sup>, found 735.2772.

**Syntheses of *N*-protected-2'-*O*-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl) nucleosides (9a-d)**

*N*-protected-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-*O*-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl) nucleosides (**7a-d**) の THF 溶液に Et<sub>3</sub>N·3HF (3 eq) および Et<sub>3</sub>N (3 eq) を加え室温で、1.5–3.0 h 撹拌した。反応液に飽和重曹水を加えた後、クロロホルムにて抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水芒硝で乾燥させ、綿栓ろ過後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、溶媒を減圧留去し 3',5'-hydroxy-*N*-protected-2'-*O*-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)nucleosides **8a-d** を得た。得られた **8a-d** をそれぞれ、ピリジンに溶解後 4,4'-dimethoxytrityl chloride (1.5 eq) を加え、室温で 1.5–3.0 h 撹拌した。反応液を飽和重曹水に加えた後、酢酸エチルにて抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水芒硝で乾燥させ、綿栓ろ過後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、溶媒を減圧留去し **9a-d** を得た。

***N*<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-*O*-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)adenosine (9a)**

白色粉末, **7a** からの収率 95%; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9.00 (1H, br s), 8.71 (1H, s), 8.18 (1H, s), 8.02 (2H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.63-7.60 (1H, m), 7.55-7.51 (2H, m), 7.44-7.16 (9H, m), 6.84-6.79 (4H, m), 6.21 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 6.12 (2H, s), 4.94 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.91 (1H, t, *J* = 5.2 Hz), 4.73 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.57 (1H, dd, *J* = 9.1, 4.4 Hz), 4.27 (1H, dd, *J* = 7.3, 3.8 Hz), 3.85 (2H, d, *J* = 4.1 Hz), 3.81 (6H, s), 3.80 (3H, s), 3.78 (6H, s), 3.50 (1H, dd, *J* = 10.6, 3.2 Hz), 3.41 (1H, dd, *J* = 9.6, 4.1 Hz), 3.02 (1H, d, *J* = 4.7 Hz). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 160.8, 158.8, 158.6, 152.1, 150.6, 150.2, 147.3, 143.3, 139.4, 133.4, 133.0, 130.1, 129.1, 129.0, 128.2, 127.9, 127.8, 127.6, 127.1, 124.6, 113.2, 106.2, 90.7, 89.6, 88.0, 82.3, 81.4, 75.7, 71.0, 63.3, 55.8, 55.4, 55.2, 24.1. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>49</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S 900.3277 [M+H]<sup>+</sup>, found 900.3282.

*N*<sup>2</sup>-Isobutyryl-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)guanosine (**9b**)

白色粉末, **7b** からの収率 86 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11.9 (1H, s), 7.78 (1H, s), 7.56-7.53 (3H, m), 7.41-7.16 (7H, m), 6.84-6.77 (4H, m), 6.11 (2H, s), 5.83 (1H, d, *J* = 7.1 Hz), 5.20 (1H, dd, *J* = 7.0, 5.0 Hz), 4.95 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.63 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.52-4.50 (1H, m), 4.19 (1H, dd, *J* = 5.3, 2.9 Hz), 3.86 (1H, d, *J* = 12.3 Hz), 3.84 (1H, d, *J* = 12.4 Hz), 3.80 (3H, s), 3.78 (6H, s), 3.77 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.51 (1H, dd, *J* = 10.7, 1.9 Hz), 3.12 (1H, dd, *J* = 10.7, 3.4 Hz), 2.95 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 1.59 (1H, sep, *J* = 6.8 Hz), 0.92 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 0.70 (3H, d, *J* = 6.7 Hz). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 178.1, 160.7, 158.8, 158.7, 155.4, 148.1, 147.0, 144.9, 139.4, 139.1, 136.1, 135.7, 130.04, 130.02, 129.1, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7, 127.1, 127.0, 122.6, 113.24, 113.22, 113.1, 106.6, 90.6, 86.4, 86.2, 84.4, 78.7, 74.9, 69.9, 63.7, 55.8, 55.4, 55.2, 36.0, 23.7, 18.5, 18.5. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>46</sub>H<sub>52</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>S 882.3383 [M+H]<sup>+</sup>, found 882.3389.

*N*<sup>4</sup>-Benzoyl-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)cytidine (**9c**)

白色粉末, **7c** からの収率 97 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.59 (1H, br s), 8.51 (1H, br s), 7.87 (2H, br s), 7.61 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.52 (2H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.45-7.43 (2H, m), 7.35-7.26 (7H, m), 6.90-6.87 (4H, m), 6.12 (2H, s), 5.97 (1H, s), 5.09-5.02 (2H, m), 4.47-4.43 (1H, m), 4.29 (1H, d, *J* = 5.3 Hz), 4.05-4.02 (1H, m), 3.91 (1H, d, *J* = 12.7 Hz), 3.832 (3H, s), 3.830 (3H, s), 3.82 (6H, s), 3.81 (1H, d, *J* = 12.9 Hz), 3.79 (3H, s), 3.59-3.54 (2H, m), 2.99 (1H, d, *J* = 8.8 Hz). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 160.6, 160.5, 158.85, 158.82, 158.7, 158.6, 147.3, 144.1, 139.4, 135.7, 135.3, 133.4, 133.2, 130.2, 130.1, 129.1, 128.3, 128.0, 127.84, 127.75, 127.5, 127.2, 127.1, 113.3, 113.2, 106.9, 106.8, 90.7, 89.2, 87.0, 85.6, 83.6, 81.4, 80.2, 80.0, 74.6, 73.8, 68.4, 67.7, 61.4, 61.2, 55.9, 55.38, 55.37, 55.2, 23.5, 22.9. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>48</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>S 876.3165 [M+H]<sup>+</sup>, found 876.3160.

2'-O-(2,4,6-Trimethoxybenzylthio-methyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)uridine (**9d**)

白色粉末, **7d** からの収率 98 %; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.24 (1H, br d, *J* = 1.8 Hz), 7.91 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.39-7.38 (2H, m), 7.32-7.23 (7H, m), 6.87-6.82 (4H, m), 6.13 (2H, s), 5.95 (1H, d, *J* = 3.3 Hz), 5.26 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz), 4.98 (1H, d, *J* = 12.1 Hz), 4.80 (1H, d, *J* = 12.0 Hz), 4.47 (1H, dd, *J* = 11.9, 6.3 Hz), 4.37 (1H, dd, *J* = 5.3, 3.2 Hz), 4.05-4.03 (1H, m), 3.89 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 3.83 (1H, d, *J* = 12.6 Hz), 3.809 (6H, s), 3.801 (3H, s), 3.798 (6H, s), 3.50 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 2.95 (1H, d, *J* = 6.8 Hz). <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 163.3, 160.5, 158.8, 158.6, 150.1, 144.3, 140.1, 135.3, 135.0, 130.2, 130.1, 128.1, 128.0, 127.1, 113.2, 106.7, 102.0, 90.6, 87.2, 87.0, 83.7, 79.6, 73.8, 68.8, 61.9, 55.8, 55.3, 55.2, 23.0. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>41</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>S 772.2665 [M]<sup>+</sup>, found 772.2670.

Syntheses of *N*-protected-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)nucleosides (**10a-d**)

*N*-protected-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)nucleosides (**9a-d**) の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液に 2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite (1.5 eq), *N,N*-diisopropylethylamine (2.0 eq), および 4-dimethylaminopyridine (0.5 eq) を加え氷冷下で加え、反応液を室温に戻した後、1.5–3.0 h 撹拌した。反応液を飽和重曹水に加えた後、酢酸エチルにて抽出し、有機層を水、飽和食塩水で洗浄した。得られた有機層を無水芒硝で乾燥させ、綿栓ろ過後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、溶媒を減圧留去し **10a-d** を得た。

*N*<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthio-methyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)adenosine (**10a**)

白色粉末, 収率 79%; <sup>31</sup>P NMR (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 151.4, 150.7. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>58</sub>H<sub>67</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>PS 1100.4356 [M+H]<sup>+</sup>, found 1100.4360.

*N*<sup>2</sup>-Isobutyryl-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthio-methyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)guanosine (**10b**)

白色粉末, 収率 79%; <sup>31</sup>P NMR (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.8, 150.4. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>55</sub>H<sub>69</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>PS 1082.4461 [M+H]<sup>+</sup>, found 1082.4459.

*N*<sup>4</sup>-Benzoyl-2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthio-methyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)cytidine (**10c**)

白色粉末, 収率 83%; <sup>31</sup>P NMR (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.9, 150.7. HRMS (FAB): *m/z* calculated for C<sub>57</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>PS 1076.4244 [M+H]<sup>+</sup>, found 1076.4241.

*2*'-O-(2,4,6-Trimethoxybenzylthiomethyl)-3'-O-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)uridine (**10d**)

白色粉末, 収率 88%; <sup>31</sup>P NMR (161.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.6, 150.3. HRMS (FAB): *m/z* alculated for C<sub>50</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>SP 973.3822 [M+H]<sup>+</sup>, found 973.3828.

#### **Syntheses of 2'-O-TMBTM oligonucleotides (ON 1a-d)**

第一部のオリゴ核酸の合成は 1 μmol スケールにて ABI Model 392 DNA/RNA synthesizer を用いて Trityl-on モードにて合成した。2'-O-TMBTM-phosphoramidites **10a-d** の coupling 反応は activator として 5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT) を用いて反応時間を 600 sec に延長し合成した。Oxidation 試薬として 0.02 M iodine/THF/Py/H<sub>2</sub>O を用い、その他の phosphoramidites の coupling は反応時間を 55 sec とした合成サイクルにて合成した。合成後の樹脂をバイアルにとり、28 % アンモニア水を加え 55 °C にて 8.0 h 反応を行った。空気の吹き付けによりアンモニアを留去後、樹脂をシリンジフィルター (Millex-LG 0.20 μm, Millipore) にてろ過後、得られた溶液を RP-HPLC にて分析及び精製を行った。オリゴ核酸を含む分画を集め遠心エバポレーターにて 500 μL 程度まで濃縮後、2.0 M TEAA を 100 μL 程度加えた。

得られた溶液を Sep-Pak C18 plus (Waters) に付し、100 mM TEAA にて洗浄後、2 % TFA 水溶液を加えることで脱 DMT 化反応を行った。超純水にて洗浄することで脱塩後、オリゴ核酸を 50 % acetonitrile/water にて溶出させ、得られた溶液を遠心エバポレーターにて 500  $\mu$ L 程度まで濃縮後、凍結乾燥を行った。得られたオリゴ核酸は、HPLC で純度を確認し、UV スペクトルにて、260 nm における吸光度から終了を求めた。またオリゴ核酸の構造は、MALDI-TOF-MS を用いて確認した (Matrix; 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (THAP) /ammonium citrate (AC) = 2/1)。

#### HPLC conditions (ON1a-d)

##### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 10-50 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 40 °C.

##### Purification condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 10-50 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 x 250 mm), 温度: 40 °C.

#### Syntheses of 2'-O-MDTM oligonucleotides by post-synthetic modifications (ON 2a-d)

2'-O-TMBTM oligonucleotides (ON 1a-d) を 最終濃度が 0.1 mM になるように酢酸緩衝液 (pH 4, 最終濃度 200 mM) に溶解後、DMTSF の水性懸濁液 (ca. 300 eq) を加え 37 °C にて 1 min 反応させた。反応の進行を RP-HPLC にて確認後、過剰の DMTSF と緩衝液を簡易ゲルろ過カラム (GE Healthcare NAP-25) を用いて除いた。得られた 2'-O-MDTM Oligonucleotides (ON 2a-d) を RP-HPLC にて精製後、溶液を簡易ゲルろ過カラム (GE Healthcare, NAP-25) にて脱塩した。得られた溶液を遠心エバポレーターで濃縮し、凍結乾燥を行った。得られたオリゴ核酸は、RP-HPLC で純度を確認し、UV スペクトルにて 260 nm における吸光度から終了を求めた。またオリゴ核酸の構造は、MALDI-TOF-MS を用いて確認した (Matrix; 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (THAP) /ammonium citrate (AC) = 2/1)。

#### HPLC conditions (ON 2a-d)

##### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 5-25 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 40 °C.

##### Purification condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 5-25 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 x 250 mm), 温度: 40 °C.

#### Conversions of 2'-O-MDTM oligonucleotides into natural oligonucleotides (ON 3a-d)

2'-O-MDTM oligonucleotides (ON 2a-d) それぞれ 2 nmol を 36  $\mu$ L のリン酸緩衝液 (pH 7, 最終濃度 50 mM) に溶解後, 4  $\mu$ L の 100 mM GSH 水溶液を加え 37 °C にて反応を行った (最終濃度 50  $\mu$ M オリゴ核酸, 10 mM GSH)。反応の進行は RP-HPLC にて確認し、反応液の一部を ZipTip C<sub>18</sub> (Millipore) にて脱塩後、オリゴ核酸の構造を MALDI-TOF-MS を用いて確認した (Matrix; 2,4,6-Trihydroxyacetophenone (THAP) /ammonium citrate (AC) = 2/1)。 .

#### HPLC conditions (ON 3a-d)

##### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 5-25 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 40 °C.



## 第二部第一章の実験

### Synthesis of 5'-O-dimethoxytrityl thymidine (11)

Thymidine (1.2 g, 5 mmol) の pyridine (50 ml) 懸濁液に、triethylamine (0.54 ml, 3.9 mmol, 0.7 eq)、DMAP (36 mg, 0.25 mmol, 0.05 eq) 及び 4,4'-dimethoxytrityl chloride (2.5 g, 7.5 mmol, 1.5 eq) を加え、室温で 2.5 h 反応させた。原料の消失を確認後水にて反応を停止させ、酢酸エチルにて目的物を抽出した。有機層を無水芒硝で乾燥させ溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-400HG, 112 g) に付し、1 % メタノール/クロロホルムにて溶出し **11** (3.1g, quant) を得た。

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.49 (1H, br), 7.58 (1H, s), 7.42-7.32 (9H, m), 6.80 (4H, m), 6.41 (1H, t,  $J=6.2$  Hz), 4.58-4.55 (1H, m), 4.06-4.04 (1H, m), 3.79 (6H, s), 3.47 (2H, dd,  $J = 12.0, 3.2$  Hz), 2.45-2.21 (1H, m) 1.47 (3H, s). HRMS (FAB):  $m/z$  alculated for 544  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$  [ $\text{M}^+$ ] found 544.

### Syntheses of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-alkyloxy-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinylthymidine (13a,b)

5'-DMTr thymidine **11** を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 ml) に溶解後、*N,N*-diisopropylethylamine (10 eq)、bis(*N,N*-diisopropylamino) chlorophosphine (1.4 eq) を加え、室温で 2 h 反応させた。原料の消失を確認後、飽和重曹水にて反応を停止させ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  にて目的物を抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去させ phosphordiamidite 体 **12** を得た。得られた残渣を pyridine, toluene の順に共沸後、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  に溶解させ、1*H*-tetrazole (0.5 eq) および無水 methanol (1.4 eq) または無水 ethanol (1.2 eq) を加え、室温で 3 h 反応させた。 $^{31}\text{P}$  NMR にて目的物が生成されていることを確認後、トリエチルアミン (8 ml) を加え、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し **13a** および **13b** を得た

### 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-methoxy-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinylthymidine (13a)

白色粉末, 収率 57 %;  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149.71, 149.06

5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-ethoxy-(N, N-diisopropylamino)phosphinylthymidine (**13b**)

白色粉末, 収率 56 %;  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 148.23, 147.35.

Syntheses of *P*-alkyl-thymidylyl-(3'→5')-thymidines (**15a, b**)

3'-DMTr thymidine の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液に、粉末 MS 3A を加えた後、**13a** または **13b** (1.2 eq) および 1*H*-tetrazole (40 mg, 0.45 mmol, 1.5 当量) を加えて室温で 3 h 反応させた。その後、反応液に 6.7% 2-butanone peroxide/toluene 溶液を加え、さらに 15 min 反応させた。粉末 MS 3A をセライトろ過にて除き、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で目的物を抽出し、飽和重曹水、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、**14a, b** を得た。得られた **14a, b** にそれぞれ 80%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  aq. (6 mL) を加え、室温で 2 h 反応させた後、反応液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し **15a, b** を得た。

*P*-Methyl-thymidylyl-(3'→5')-thymidine (**15a**)

白色粉末, 収率 70 %;  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 0.33, 0.18. HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for 560  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{P}$  [ $\text{M}^+$ ] found 560.

*P*-Ethyl-thymidylyl-(3'→5')-thymidine (**15b**)

白色粉末, 収率 48 %;  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : -1.54, -1.37. HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for 575  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{P}$  [ $\text{M}^+$ ] found 575.

### **Stability of PTE dimers under basic conditions.**

PTE dimer **15a,b** を 1 OD ずつガラス製バイアルに入れ凍結乾燥後、下記に示す条件にて処理し HPLC で分析することで安定性を評価した。Dimer 残存率は RT が 5-20 min までのピーク面積の総和に対する **15a,b** のピーク面積から求めた。また水は超純水、methanol はナカライテスク社製 HPLC 用特級試薬を用いた。

条件 (A), (E); dimer に水 1 mL を加え、HPLC に 5  $\mu$ L インジェクションした。

条件 (B), (F); dimer に 28 %  $\text{NH}_3\text{aq.}$  を 2 mL 加え、55  $^{\circ}\text{C}$ 、8 h 処理後、溶媒を留去し、水 1 mL を加え HPLC に 5  $\mu$ L インジェクションした。

条件 (C), (G); dimer に 28 %  $\text{NH}_3\text{aq.}$  を 2 mL 加え、室温 2 h 処理後、溶媒を完全に留去し、水 1 mL を加え HPLC に 5  $\mu$ L インジェクションした。

条件 (D), (H); dimer に 50 mM  $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$  溶液を 1 mL 加え、室温 4 h 処理後、酢酸 5.7 $\mu$ L を加え中和後、溶媒を完全に留去し、水 1 mL を加え HPLC に 5  $\mu$ L インジェクションした。

### **HPLC conditions**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 0.8 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile 濃度勾配: B conc.: 5-25 % (0-20 min), カラム: Waters  $\mu$ Bondasphere 5C18 (3.9 x 250 mm), 温度: 25  $^{\circ}\text{C}$ .

### **Nuclease resistance of PDE and PTE dimers toward SVPDE digestion**

CpT dimer (5 nmol,  $\epsilon=7600$  (L/mol  $\cdot$  cm)) を緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) に溶解させ、内部標準物質として 1 OD/mL に調製した 2'-deoxyadenosine (dA) 溶液 50  $\mu$ L を加えた後、希釈した SVPDE 溶液 (0.08  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) を 5  $\mu$ L (0.4  $\mu\text{g}$ , 96 Unit) を加え、全量を 400  $\mu$ L として 37  $^{\circ}\text{C}$  にて反応させた。酵素を入れた時を 0 min とし、一定時間 (0, 1, 5, 10, 20, 40, 90, 180, 360 min) ごとに反応液 40  $\mu$ L を取り、90  $^{\circ}\text{C}$  で 2 min 加熱することで、酵素を失活させた。その後それぞれのサンプル 8  $\mu$ L インジ

ェクションし HPLC で分析を行った。0 min 時点での dA のピーク面積に対するダイマーのピーク面積を 100 % として、それぞれの反応時間でのダイマーの残存率を求めた。

#### **Nuclease resistance of PDE and PTE dimers in 10 % FBS**

CpT dimer (5 nmol) を超純水に溶解させ、内部標準物質として 1 OD/mL に調製した 2'-deoxyadenosine (dA) 溶液 50  $\mu$ L を加えた後、FBS を 40  $\mu$ L を加え、全量を 400  $\mu$ L として 37 °C にて反応させた。酵素を入れた時を 0 min とし、一定時間 (0, 1, 5, 10, 20, 40, 90, 180, 360 min) ごとに反応液 40  $\mu$ L を取り、ホルムアミドを 40  $\mu$ L 加え、酵素を失活させた。その後それぞれのサンプル 12  $\mu$ L インジェクションし HPLC で分析を行った。0 min 時点でのダイマーのピーク面積を 100 % として、それぞれの反応時間でのダイマーの残存率を求めた。

#### **HPLC conditions**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 0.8 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile 濃度勾配: B conc.: 0-15 % (0-20 min) PDE, 5-25 % (0-20 min) PTE, カラム: Waters  $\mu$ Bondasphere 5C18 (3.9  $\times$  250 mm), 温度: 25°C.

#### **Synthesis of 3'-TAMRA-labeled-5'-O-spermine-conjugated PTE oligonucleotide (ON 4)**

合成した thymidine ethylphosphoramidite **13b** および spermine phosphoramidite **18** (Glen research) を acetonitrile で 0.1 M になるように溶解しフィルター (Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45  $\mu$ m PVDF) で濾過後、DNA 合成機に装着した。Coupling 反応では activator として 0.25 M ETT/acetonitrile 溶液を使用し、oxidation 試薬として 0.02 M iodine/THF/Py/H<sub>2</sub>O、deprotection 試薬として 3 % DCA/DCM、capping 試薬として Ac<sub>2</sub>O/THF/pyridine 溶液を用いて伸長反応を行った。また capping 試薬の活性化剤には 10 % 1-methylimidazole/THF を使用した。合成は 3'-TAMRA-CPG を用い、1  $\mu$ mol スケールで DMTr-off にて縮合時間は全て 600 sec として合成した。反応終了後、CPG をバイアルに移

し、28 % アンモニア水 (1.5 mL) を加え、室温、2 h 静置し、CPG からの切り出し、および脱保護を行った。その後、空気の吹き付けによってアンモニアを留去し、メンブランフィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45  $\mu$ m PVDF) で CPG を除去した。得られた濾液を、RP-HPLC で 2-3 回に分けて分取精製した。全ての分画に 100  $\mu$ L ずつ 2 M TEAA (pH 7.0) を加え中和した後、目的のオリゴ核酸を含む分画を遠心エバポレーターにて溶媒を濃縮し、1 つにまとめた。得られたオリゴ核酸は、HPLC で純度を確認し、オリゴ核酸の収量は、UV スペクトルにて、260 nm における吸光度から求めた。またオリゴ核酸の構造は、MALDI-TOF-MS を用いて確認した (Matrix; 3-Hydroxypicolinic acid/ 5 % (w/v %) Diammonium hydrogen citrate = 9/1)。

#### **HPLC conditions (ON 4)**

##### **Analytical condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 0.5 % (v/v %) 酢酸添加 50 mM TEAA (pH 4.3), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 20-70 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 25 °C.

##### **Purification condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 0.5 % (v/v %) 酢酸添加 50 mM TEAA (pH 4.3), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 20-70 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 x 250 mm), 温度: 25°C.

#### **Synthesis of 3'-TAMRA labeled PTE oligonucleotide (ON 5)**

合成したthymidine ethylphosphoramidite **13b** を無水acetonitrile で0.1 Mになるように溶解し、フィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45  $\mu$ m PVDF) で濾過後、それを DNA 合成機に装着した。Coupling反応ではactivatorとして 0.25 M ETT/acetonitrile溶液を使用し、oxidation試薬として 0.02 M iodine/THF/Py/H<sub>2</sub>O、deprotection試薬として 3 % DCA/DCM、capping試薬としてAc<sub>2</sub>O/THF/pyridine溶

液を用いて伸長反応を行った。またcapping試薬の活性化剤には10 % 1-methylimidazole/THF を使用した。合成は3'-TAMRA-CPGを用い、1  $\mu$ mol スケールでDMTr-offにて縮合時間は全て600 sec として合成した。目的のオリゴ核酸を合成後、CPG をバイアルに移し、50 mM  $K_2CO_3$ /MeOH溶液 (2 mL) を加え、室温、4 h 静置し、CPG からの切り出し、およびリン酸基の脱保護を行った。切り出し処理終了後 2 M TEAA (pH 7.0) 1.5 mL を加え中和し、メンブランフィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45  $\mu$ m PVDF) でCPGを除去した。得られた濾液を、逆相カラム HPLCで 2-3回に分けて分取精製した。目的のオリゴ核酸を含む分画を、遠心濃縮機にて溶媒を濃縮し、1つにまとめた。得られたオリゴ核酸は、HPLC で純度を確認した。オリゴ核酸の収量は、UV スペクトルにて、260 nm における吸光度から求めた。またオリゴ核酸の構造は、MALDI-TOF-MS を用いて確認した (Matrix; 3-Hydroxypicolinic acid/ 5 % (w/v %) Diammonium hydrogen citrate = 9/1)。

#### HPLC conditions (ON 5)

##### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 20-70 %, カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 25°C.

##### Purification condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 20-70 %, カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 x 250 mm), 温度: 25°C.

#### Synthesis of 3'-TAMRA-labeled-5'-O-spermine-conjugated PDE oligonucleotide (ON 6)

Spermine phosphoramidite **18** (Glen research)を0.1 Mの濃度になるよう無水acetonitrileに溶解後、フィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45  $\mu$ m PVDF) で濾過し、DNA 合成機に装着した。また市販のcyanoethyl phosphoramidite **16**も0.1 Mの濃度になるように無水acetonitrileに溶解後、DNA 合成機に装着した。Coupling反応ではactivatorとして 0.25 M ETT/acetonitrile溶液を使用し、oxidation試薬

として 0.02 M iodine/THF/Py/H<sub>2</sub>O、detritylation 試薬として 3 % DCA/DCM、capping 試薬として Ac<sub>2</sub>O/THF/pyridine 溶液を用いて伸長反応を行った。縮合時間 55 sec として (spermine amidite のみ 600 sec) DMTr-on にて合成した後、CPG をバイアルに移し、28 % アンモニア水 (1.5 mL) を加え、室温、2 h 静置し、CPG からの切り出し、および脱保護を行った。その後、空気の吹き付けによってアンモニアを留去し、メンブランフィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45 µm PVDF) で CPG を除去した。得られた濾液を、逆相カラム HPLC で 2-3 回に分けて分取精製した。目的のオリゴ核酸を含む分画を、遠心エバポレーターにて溶媒を濃縮し、1 つにまとめた。サンプルを簡易型逆相カートリッジカラム Waters Sep-Pak Plus (C18) を用いて、まず 100 mM TEAA (5 mL) で平衡化し、サンプルをアプライした後、2 % トリフルオロ酢酸 (TFA) (10 mL) で DMTr 基の脱保護を行った。その後、100 mM TEAA (5 mL) で洗浄し、MilliQ 水 (10 mL) で水溶性の塩を除去した。最後に、50 % acetonitrile/水の混合液でオリゴ核酸を溶出し、オリゴ核酸を含む分画を遠心エバポレーターにて溶媒を留去した。得られたオリゴ核酸は、HPLC で純度を確認した。オリゴ核酸の収量は、UV スペクトルにて、260 nm における吸光度から求めた。またオリゴ核酸の構造は、MALDI-TOF-MS (Matrix: 3-Hydroxypicolinic acid/ 5 % (w/v %) Diammonium hydrogen citrate = 9/1) を用いて確認した。

#### HPLC conditions (ON 6)

##### Analytical condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 0-30 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 25 °C.

##### Purification condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 0-30 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 x 250 mm), 温度: 25 °C.

### **Synthesis of 3'-TAMRA-labeled PDE oligonucleotide (ON 7)**

市販の cyanoethyl phosphoramidite **16** を 0.1 M の濃度になるように無水 acetonitrile に溶解後、DNA 合成機に装着した。Coupling 反応では activator として 0.45 M 1*H*-tetrazole/acetonitrile 溶液を使用し、oxidation 試薬として 0.02 M iodine/THF/Py/H<sub>2</sub>O、deprotection 試薬として 3 % DCA/DCM、capping 試薬として Ac<sub>2</sub>O/THF/pyridine 溶液を用いて伸長反応を行った。Coupling 時間 55 sec として DMTr-on にて合成した後、CPG をバイアルに移し、28 % アンモニア水 (1.5 mL) を加え、室温、2 h 静置し、CPG からの切り出し、および脱保護を行った。その後、空気の吹き付けによってアンモニアを留去し、メンブランフィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45 μm PVDF) で CPG を除去した。得られた濾液を、逆相カラム HPLC で 2-3 回に分けて分取精製した。目的のオリゴ核酸を含む分画を、遠心エバポレーターにて溶媒を濃縮し、1 つにまとめた。サンプルを簡易型逆相カートリッジカラム Waters Sep-Pak Plus (C18) を用いて、まず 100 mM TEAA (5 mL) で平衡化し、サンプルをアプライした後、2 % トリフルオロ酢酸 (TFA) (10 mL) で DMTr 基の脱保護を行った。その後、100 mM TEAA (5 mL) で洗浄し、MilliQ 水 (10 mL) で水溶性の塩を除去した。最後に、50 % acetonitrile/水の混合液でオリゴ核酸を溶出し、オリゴ核酸を含む分画を遠心エバポレーターにて溶媒を留去した。得られたオリゴ核酸は、HPLC で純度を確認した。オリゴ核酸の収量は、UV スペクトルにて、260 nm における吸光度から求めた。またオリゴ核酸の構造は、MALDI-TOF-MS (Matrix: 3-Hydroxypicolinic acid/ 5 % (w/v %) Diammonium hydrogen citrate = 9/1) を用いて確認した。

### **HPLC conditions (ON 7)**

#### **Analytical condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 0-30 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 25 °C.



#### Purification condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 0-30 %, カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 x 250 mm), 温度: 25 °C.

#### CLSM analysis of internalized 3'-TAMRA-labeled ONs

TE緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8) にて100  $\mu$ Mに希釈したONをOpti-MEMで10倍希釈し、10  $\mu$ M ONs in Opti-MEM (200  $\mu$ L) を作成した。撥水加工済みスライドガラスに、 $8.0 \times 10^4$  cells/mL の濃度に希釈したA549細胞を200  $\mu$ L/wellずつのせ1晩培養した後、Opti-MEMにて3回洗浄後、作成した 10  $\mu$ M ODNs in Opti-MEM (200  $\mu$ L) をのせ、37 °C にて一定時間インキュベーションした。インキュベーション後の細胞をフェノールレッド不含DMEMで3回洗浄し、カバーガラスを乗せ封入した後、それぞれのガラスプレートをCLSM (ZEISS LSM510) (励起波長: 543 nm (光源 HeNe1)、蛍光フィルター: LP-560) にて観察した。

#### Quantification of internalized 3'-TAMRA-labeled ONs

24 well マルチプレートに  $8.0 \times 10^4$  cells/mL の濃度に希釈した A549細胞を 1 mL のせ 1 晩培養した後、Opti-MEM にて 3 回洗浄した。その後 10  $\mu$ M ODNs in Opti-MEM (800  $\mu$ L) を加え、37 °C にて 8 h インキュベーションした。インキュベーション後の細胞をリン酸緩衝液 (PBS) にて 3 回洗浄後、0.25 % トリプシン- 1 mM EDTA (200  $\mu$ L) を加え 37 °C にて 10 min 加温した。得られた細胞浮遊液を集め、4 °C, 3000 rpm にて 5 min 遠心し、細胞を沈殿させた後、上澄みを捨て、0.5 % ウシ血清アルブミン (BSA)-PBS にて洗浄する作業を 3 回繰り返した。最後に上澄みを除いた後、細胞溶解用試薬である RIPA 緩衝液 (25 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) SDS, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (v/v) sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) 150  $\mu$ L を加え 1 h 氷冷し、-80 °C で一晩冷凍保存した。得られた細胞溶解液を 4 °C, 8400 rpm, 10 min 遠心することで、細胞の浮遊断片を沈殿させた後、上澄み 140  $\mu$ L を 96 well 蛍光用マイクロプレートにのせ、蛍光強度の測定を行った。(Thermo Varioskan Flash, Ex: 543 nm,

Em: 580 nm, 取り込み時間 1 sec) 測定は同じサンプルに対して 5 回行い、平均値を採用した。

得られた蛍光強度の単位タンパク量当たりの蛍光強度を求め、細胞内 ODN 導入量として評価した。

### **Quantification of intracellular proteins**

PBS 72  $\mu\text{L}$  が入った吸光度測定用 96 well マルチプレートに蛍光強度を測定したサンプル 28  $\mu\text{L}$  を加えた。そこにタンパク定量用反応液 (Thermo scientific 'Pierce® BCA protein assay kit' A 液:B 液=50:1) を 200  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。試薬を加えてからすぐに 37 °C で 30 min 反応させ、室温に戻した後に 560 nm の吸光度を測定した。別途求めた検量線から得られた式:  $A_{560}=0.0675 \times c (\mu\text{g/mL}) + 0.0172$  を用いてタンパク定量を行った。この操作は 1 サンプルに対して、5 回行い平均値をデータとして採用した。

## **第二部第二章の実験**

### **Synthesis of (4S,5S)-1,2-dithiane-4,5-diol (20)**

酸化型dithiothreitol (1.09 g, 7.1 mmol) をDMSO (505  $\mu\text{L}$ ) に溶解し、120 °Cにて3 h 攪拌した。生じた沈殿物をろ取し、 $\text{CHCl}_3$  にて再結晶を行うことで、**20** (1.03 g, 96 %) を白色柱状結晶として得た。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 5.29 (2H, d,  $J = 3.5$  Hz), 3.46-3.32 (2H, m), 3.04 (2H, m), 2.73 (2H, m).

MS (EI):  $m/z$  alculated for 152  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{S}_2$  [ $\text{M}^+$ ] found 152.

### **Synthesis of (4S,5S)-5-(benzyloxy)-1,2-dithian-4-ol (21)**

**20** (0.78 g, 5.0 mmol)を THF (10 mL) に溶解後、benzyl bromide (0.78 mL, 6.6 mmol, 1.3 eq), 5 M KOH aq. (10 mL), tetrabutylammonium hydrogen sulfate (0.5 g, 1.5 mmol, 0.3 eq) の順に加え、室温で 18 h 激しく攪拌した。原料の消失を確認後、目的物を酢酸エチルにて抽出し、有機層を無水芒硝にて乾燥後溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し **21** (0.67 g, 2.8 mmol, 54 %) を白色粉末として得た。

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$ : 7.41-7.26 (5H, m), 4.74-4.71 (1H, m), 4.54-4.50 (1H, m), 3.80-3.72 (1H, m), 3.54-3.46 (1H, m), 3.19-3.10 (2H, m), 3.02-2.89 (2H, m). MS (EI):  $m/z$  calculated for 242  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$  [ $\text{M}^+$ ] found 242.

**Synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-(4S,5S)-5-(benzyloxy)-1,2-dithian-4-oxy-(N,N-diisopropyl amino)phosphinylthymidine (22)**

5'-DMTr thymidine **11** (0.8 g, 1.5 mmol) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) に溶解後、*N,N*-diisopropylethylamine (9 eq)、bis(*N,N*-diisopropylamino) chlorophosphine (1.3 eq) を加え、室温で 2 h 反応させた。原料の消失を確認後、飽和重曹水にて反応を停止させ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  にて目的物を抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去させ phosphordiamidite 体 **12** を得た。得られた残渣を toluene で 3 回共沸後、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  に溶解させ、ETT (0.17 g, 1.3 mmol, 0.85 eq) および **21** (0.4 g, 1.7 mmol, 1.1 eq) を加え、室温で 2 h 反応させた。 $^{31}\text{P}$  NMR にて目的物が生成されていることを確認後、飽和重曹水にて反応を停止させ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  にて目的物を抽出した後、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝で乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、phosphoramidite **22** (0.62 g, 0.68 mmol, 45 %) を得た。

$^{31}\text{P}$  NMR (161 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 149.5, 148.6, 140.8, 138.4. MS (FAB):  $m/z$  calculated for 916  $\text{C}_{48}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_9\text{PS}_2$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  found 916.

**Stability of phosphoramidite 22 in acetonitrile**

Phosphoramidite **22** を  $\text{CD}_3\text{CN}$  に溶解後 25 °C にて静置し、一定時間 (0.16, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 42, 48, 54, 60, 72, 96, 168 h) 後に  $^{31}\text{P}$  NMR を測定した。溶解直後のアミダイトのピーク高さを 100 % として、一定時間ごとのピーク高さからアミダイトの残存率を求めた。

### **Synthesis of REDUCT-PTE oligonucleotides (ON 9-11, 13-17)**

合成したphosphoroamidite **22**を0.1 Mの濃度になるよう無水acetonitrileに溶解後、フィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45  $\mu$ m PVDF) で濾過し、DNA 合成機に装着した。また市販の cyanoethyl phosphoramiditeも0.1 Mの濃度になるように無水acetonitrileに溶解後、DNA 合成機に装着した。Coupling反応ではactivatorとして 0.25 M DCI/acetonitrile溶液を使用し、oxidation試薬として 0.02 M iodine/THF/Py/H<sub>2</sub>O、detritylation試薬として 3 % DCA/DCM、capping 試薬としてAc<sub>2</sub>O/THF/pyridine溶液を用いて伸長反応を行った。縮合時間 600 sec にて DMTr-onにて合成した後、CPG をバイアルに移し、50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/MeOH溶液 (2 mL) を加え、室温、4 h 静置し、CPG からの切り出し、およびリン酸基の脱保護を行った。切り出し処理終了後 2 M TEAA (pH 7.0) 1.5 mL を加え中和し、メンブレンフィルター(Whatman 13 mm GD/X Syringe Filters 孔径 0.45  $\mu$ m PVDF) でCPGを除去した。得られた濾液を、逆相カラム HPLCで 2-3回に分けて分取精製した。目的のオリゴ核酸を含む分画を、遠心濃縮機にて溶媒を濃縮し、1つにまとめた。サンプルを簡易型逆相カートリッジカラム Waters Sep-Pak Plus (C18) を用いて、まず 100 mM TEAA (5 mL) で平衡化し、サンプルをアプライした後、2 % トリフルオロ酢酸 (TFA) (10 mL) で DMTr 基の脱保護を行った。その後、100 mM TEAA (5 mL) で洗浄し、MilliQ水 (10 mL) で水溶性の塩を除去した。最後に、50 % acetnitrile/水の混合液でオリゴ核酸を溶出し、オリゴ核酸を含む分画を遠心エバポレーターにて溶媒を留去した。得られたオリゴ核酸は、HPLCで純度を確認した。オリゴ核酸の収量は、UV スペクトルにて、260 nm における吸光度から求めた。またオリゴ核酸の構造は、MALDI-TOF-MS (Matrix: THAP/AC = 9/1) を用いて確認した。

### **HPLC conditions (ON 9-11, 13-17)**

#### **Analytical condition:**

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 10-70 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 40 °C.

#### Purification condition:

検出波長: UV 260 nm, 流速: 3.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile, 濃度勾配: B conc.: 10-70 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (10 x 250 mm), 温度: 40 °C.

#### Conversions of REDUCT-PTE oligonucleotides into natural oligonucleotides

REDUCT-PTE oligonucleotides (**ON 9**) をリン酸緩衝液 (pH 7, 最終濃度 50 mM) に溶解後, 25  $\mu$ L の 40 mM GSH 水溶液を加え 37 °C にて反応を行った (最終濃度 100  $\mu$ M オリゴ核酸, 10 mM GSH, 50 mM buffer)。反応の進行は RP-HPLC にて確認し、変換後の天然型オリゴ核酸 T 10 mer のピークは別途合成した T<sub>10</sub> mer (**ON 8**) と比較することで同定した。

#### HPLC conditions

検出波長: UV 260 nm, 流速: 1.0 mL/min, 移動相 (A): 50 mM TEAA (pH 7.0), (B): acetonitrile 濃度勾配: B conc.: 10-70 % (0-20 min), カラム: Nacalai COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 x 250 mm), 温度: 40 °C.

#### Nuclease resistance of REDUCT-PTE oligonucleotides

天然型核酸 (**ON 8**) および REDUCT-PTE 核酸 (**ON 9**) が最終濃度 12.5 mM となるように超純水にて希釈し、FBS を加えて 37 °C にて反応を行った (最終濃度 12.5 mM オリゴ核酸、10 % (v/v) FBS、反応液 400  $\mu$ L)。FBS を添加した直後を 0 min として一定時間 (0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min) ごとに反応液を 20  $\mu$ L ずつサンプリングし、それぞれ formamide を 20  $\mu$ L 加えて反応を停止させた。RP-HPLC にてそれぞれの反応液 12  $\mu$ L を分析し、0 min 時点でのオリゴ核酸のピーク面積を 100 % としてそれぞれのオリゴ核酸の残存率を求めた。

### **CLSM analysis of internalized 3'-TAMRA-labeled ONs**

100  $\mu\text{M}$ に希釈した3'-TAMRA標識REDUCT-PTE核酸 (ON 13-15) および天然型核酸 (ON 11)をDMEMで20倍希釈し、5  $\mu\text{M}$  ONs in DMEM (200  $\mu\text{L}$ ) を作成した。撥水加工済みスライドグラスに、 $8.0 \times 10^4$  cells/ml の濃度に希釈したA549細胞を200  $\mu\text{L}$ /wellずつのせ1晩培養した後、DMEMにて3回洗浄後、作成した 5  $\mu\text{M}$  ODNs in Opti-MEM (200  $\mu\text{L}$ ) をのせ、37  $^{\circ}\text{C}$  にて4 hインキュベーションした。インキュベーション後の細胞をフェノールレッド不含DMEMで3回洗浄し、カバーガラスを乗せ、封入した後、それぞれのガラスプレートをCLSM (ZEISS LSM510) (励起波長: 543 nm (光源 HeNe1)、蛍光フィルター: LP-560)にて観察した。

### **Procedure for Luciferase assay**

ルシフェラーゼ発現 A549 (A549-Luc) 細胞の  $8.0 \times 10^4$  cells/mL 希釈液を 96 well 細胞培養プレートに 100  $\mu\text{L}$  ずつのせ 1 晩培養した (8000 cells/well)。CEM 法による AON の細胞導入は播種後の細胞を CEM 培地にて 3 回洗浄後、CEM 培地中にて 1  $\mu\text{M}$  の濃度に調製した AON 溶液を 100  $\mu\text{L}$  加えて、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養を行った。CEM 法を用いない場合では 1  $\mu\text{M}$  AON を含む DMEM を 100  $\mu\text{L}$  加えて、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養を行った。一定時間培養後の細胞を PBS にて 3 回洗浄後、残った PBS を除き、Promega 社製 Repoter lysis buffer を 1well あたり 50  $\mu\text{L}$  ずつ加え、よく攪拌後、-80  $^{\circ}\text{C}$  で一晩冷凍保存した。得られた細胞溶解液を遠心後、5  $\mu\text{L} \times 2$  を 96 well 発光分析用マイクロプレートにのせ、Berthold technologies 社製 Tristar LB 941 を用いて発光分析を行った。得られた発光強度から単位タンパク量当たりの発光強度を求め、細胞内でのルシフェラーゼ発現量として用いた。抗ルシフェラーゼ活性を有さないコントロール AON を導入した場合の細胞内ルシフェラーゼ発現量を 100 % として、遺伝子抑制効果を評価した。この操作は 1 サンプルあたり 3 回以上行い、平均値および SD を求めグラフ化した。

### Sequences of oligonucleotides

Control; 5'-TGC TCA ACA GTA TGA-3'

AONs; 5'-AAC CGC TTC CCC GAC TTC C-3'

### Luminescence conditions

発光分析はPromega社製 Luciferase assay system を用いて行った。凍結乾燥済みのルシフェラーゼアッセイ用基質にルシフェラーゼアッセイ緩衝液 (10 mL) を加え、それをBerthold technologies社製 Tristar LB 941に装着し、発光分析を行った。(試薬量: 25  $\mu$ L/sample, delay: 2 sec, 発光取り込み時間: 10 sec)。

### Quantification of intracellular proteins

透明 96well マイクロプレートに 80 $\mu$ L ずつ PBS を加え、各細胞溶解液 10  $\mu$ L を 3 well/サンプルずつ加えた。Micro BCA assay kit (thermo fisher)の BCA 液を 90 $\mu$ L/well 加え、マイクロプレートを 37 °C で 2 h 加温後、室温に戻してからマイクロプレートリーダーで 560 nm における吸光度を測定した。別途標準タンパク溶液を用いて検量線を作成し、細胞溶解液中のタンパク量を求めた。

## 引用文献

- (1) Sun, H.; Zhu, X.; Lu, P. Y.; Rosato, R. R.; Tan, W.; Zu, Y. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2014**, *3*, e182.
- (2) Morishita, R.; Sugimoto, T.; Aoki, M.; Kida, I.; Tomita, N.; Moriguchi, A.; Maeda, K.; Sawa, Y.; Kaneda, Y.; Higaki, J.; Ogihara, T. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 894.
- (3) Kurreck, J. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628.
- (4) Harding, P. L.; Fall, A. M.; Honeyman, K.; Fletcher, S.; Wilton, S. D. *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 157.
- (5) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391*, 806.
- (6) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Nature* **2001**, *411*, 494.
- (7) Rupaimoole, R.; Slack, F. J. *Nat. Reviews Drug Discovery* **2017**, *16*, 203.
- (8) Akao, Y.; Nakagawa, Y.; Hirata, I.; Iio, A.; Itoh, T.; Kojima, K.; Nakashima, R.; Kitade, Y.; Naoe, T. *Cancer Gene Ther.* **2010**, *17*, 398.
- (9) van Rooij, E.; Kauppinen, S. *EMBO Mol. Med.* **2014**.
- (10) Stein, C. A.; Castanotto, D. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1069.
- (11) Barrett, J. C.; Miller, P. S.; Ts'o, P. O. P. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4897.
- (12) Miller, P. S.; Barrett, J. C.; Ts'o, P. O. P. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4887.
- (13) Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1978**, *75*, 280.
- (14) Wickstrom, E. *J. Biochem. Bioph. Methods* **1986**, *13*, 97.
- (15) Eckstein, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 4718.
- (16) Matsukura, M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Mitsuya, H.; Reitz, M.; Cohen, J. S.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1987**, *84*, 7706.
- (17) Campbell, J. M.; Bacon, T. A.; Wickstrom, E. *J. Biochem. Bioph. Methods* **1990**, *20*, 259.
- (18) Ratajczak, M. Z.; Kant, J. A.; Luger, S. M.; Hijjiya, N.; Zhang, J.; Zon, G.; Gewirtz, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1992**, *89*, 11823.



- (19) Citro, G.; Perrotti, D.; Cucco, C.; D'Agnano, I.; Sacchi, A.; Zupi, G.; Calabretta, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1992**, *89*, 7031.
- (20) Yokozaki, H.; Budillon, A.; Tortora, G.; Meissner, S.; Beaucage, S. L.; Miki, K.; Cho-Chung, Y. S. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 868.
- (21) Lisiewicz, J.; Sun, D.; Metelev, V.; Zamecnik, P.; Gallo, R. C.; Agrawal, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1993**, *90*, 3860.
- (22) Nardo, L.; Lamperti, M.; Salerno, D.; Cassina, V.; Missana, N.; Bondani, M.; Tempestini, A.; Mantegazza, F. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 10722.
- (23) Henry, S.; Stecker, K.; Brooks, D.; Monteith, D.; Conklin, B.; Bennett, C. F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 468.
- (24) Wagner, R.; Matteucci, M.; Lewis, J.; Gutierrez, A.; Moulds, C.; Froehler, B. *Science* **1993**, *260*, 1510.
- (25) Wagner, R. W.; Matteucci, M. D.; Grant, D.; Huang, T.; Froehler, B. C. *Nat. Biotech.* **1996**, *14*, 840.
- (26) Lin, K.-Y.; Jones, R. J.; Matteucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873.
- (27) Flanagan, W. M.; Wolf, J. J.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 3513.
- (28) Buhr, C. A.; Wagner, R. W.; Grant, D.; Froehler, B. C. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2974.
- (29) Chollet, A.; Kawashima, E. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 305.
- (30) Gryaznov, S.; Schultz, R. G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2489.
- (31) Manoharan, M.; Ramasamy, K. S.; Mohan, V.; Cook, P. D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7675.
- (32) Krieg, A. M.; Stein, C. A. *Antisense Res. Dev.* **1995**, *5*, 241.
- (33) Levin, A. A. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1999**, *1489*, 69.
- (34) Rait, V.; Sergueev, D.; Summers, J.; He, K.; Huang, F.; Krzyzanowska, B.; Shaw, B. R. *Nucleos. nucleotid.* **1999**, *18*, 1379.
- (35) Hall, A. H. S.; Wan, J.; Shaughnessy, E. E.; Ramsay Shaw, B.; Alexander, K. A. *Nucleic Acids Res.* **2004**,

32, 5991.

- (36) Gryaznov, S.; Chen, J.-K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3143.
- (37) Gryaznov, S. M.; Lloyd, D. H.; Chen, J. K.; Schultz, R. G.; DeDionisio, L. A.; Ratmeyer, L.; Wilson, W. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, *92*, 5798.
- (38) Skorski, T.; Perrotti, D.; Nieborowska-Skorska, M.; Gryaznov, S.; Calabretta, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1997**, *94*, 3966.
- (39) Faria, M.; Spiller, D. G.; Dubertret, C.; Nelson, J. S.; White, M. R.; Scherman, D.; Helene, C.; Giovannangeli, C. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 40.
- (40) Miller, P. S.; Cassidy, R. A.; Hamma, T.; Kondo, N. S. *Pharmacology & Therapeutics* **2000**, *85*, 159.
- (41) Shoji, Y.; Akhtar, S.; Periasamy, A.; Herman, B.; Juliano, R. L. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5543.
- (42) Marcus-Sekura, C. J.; Woerner, A. M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Quinnan, G. V. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 5749.
- (43) Miller, P. S.; Fang, K. N.; Kondo, N. S.; Ts'o, P. O. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6657.
- (44) Stec, W. J.; Wilk, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 709.
- (45) Watts, J. K.; Katolik, A.; Viladoms, J.; Damha, M. J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1904.
- (46) Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 589.
- (47) Cekaite, L.; Furset, G.; Hovig, E.; Sioud, M. *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 90.
- (48) Judge, A. D.; Bola, G.; Lee, A. C. H.; MacLachlan, I. *Mol. Ther.* **2006**, *13*, 494.
- (49) Teplova, M.; Minasov, G.; Tereshko, V.; Inamati, G. B.; Cook, P. D.; Manoharan, M.; Egli, M. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 535.
- (50) Lima, Walt F.; Prakash, Thazha P.; Murray, Heather M.; Kinberger, Garth A.; Li, W.; Chappell, Alfred E.; Li, Cheryl S.; Murray, Susan F.; Gaus, H.; Seth, Punit P.; Swayze, Eric E.; Crooke, Stanley T. *Cell* **2012**, *150*, 883.
- (51) Prakash, T. P.; Kinberger, G. A.; Murray, H. M.; Chappell, A.; Riney, S.; Graham, M. J.; Lima, W. F.; Swayze, E. E.; Seth, P. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2817.

- (52) Prakash, T. P.; Allerson, C. R.; Dande, P.; Vickers, T. A.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Baker, B. F.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bhat, B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4247.
- (53) Allerson, C. R.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Prakash, T. P.; Naik, N.; Berdeja, A.; Wanders, L.; Griffey, R. H.; Swayze, E. E.; Bhat, B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 901.
- (54) Pallan, P. S.; Greene, E. M.; Jicman, P. A.; Pandey, R. K.; Manoharan, M.; Rozners, E.; Egli, M. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3482.
- (55) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.-i.; Morio, K.-i.; Doi, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401.
- (56) Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607.
- (57) Shukla, S.; Sumaria, C. S.; Pradeepkumar, P. I. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 328.
- (58) Bramsen, J. B.; Laursen, M. B.; Damgaard, C. K.; Lena, S. W.; Ravindra Babu, B.; Wengel, J.; Kjems, J. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5886.
- (59) Lima, W. F.; Wu, H.; Nichols, J. G.; Sun, H.; Murray, H. M.; Crooke, S. T. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 26017.
- (60) Barber, I.; Rayner, B.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 563.
- (61) Barber, I.; Tosquellas, G.; Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1441.
- (62) Tosquellas, G.; Barber, I.; Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 457.
- (63) Tosquellas, G.; Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J.-L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 263.
- (64) Tosquellas, G.; Alvarez, K.; Dell'Aquila, C.; Morvan, F.; Vasseur, J. J.; Imbach, J. L.; Rayner, B. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2069.
- (65) Vivès, E.; Dell'Aquila, C.; Bologna, J. C.; Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J. L. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4071.
- (66) Meade, B. R.; Gogoi, K.; Hamil, A. S.; Palm-Apergi, C.; van den Berg, A.; Hagopian, J. C.; Springer, A. D.; Eguchi, A.; Kacsinta, A. D.; Dowdy, C. F.; Presente, A.; Lonn, P.; Kaulich, M.; Yoshioka, N.; Gros, E.; Cui, X. S.;

Dowdy, S. F. *Nat. Biotech.* **2014**, 32, 1256.

(67) Zhang, N.; Tan, C.; Cai, P.; Zhang, P.; Zhao, Y.; Jiang, Y. *Chem. Commun.* **2009**, 3216.

(68) Saneyoshi, H.; Iketani, K.; Kondo, K.; Saneyoshi, T.; Okamoto, I.; Ono, A. *Bioconjug. Chem.* **2016**, 27, 2149.

(69) Grajkowski, A.; Pedras-Vasconcelos, J.; Wang, V.; Ausín, C.; Hess, S.; Verthelyi, D.; Beaucage, S. L. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 3550.

(70) Lavergne, T.; Baraguey, C.; Dupouy, C.; Parey, N.; Wuensche, W.; Sczakiel, G.; Vasseur, J. J.; Debart, F. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 5719.

(71) Johnsson, R.; Lackey, J. G.; Bogojeski, J. J.; Damha, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 3721.

(72) Tsujita, T.; Okuda, H. *Eur. J. Biochem.* **1983**, 133, 215.

(73) Hong, R.; Han, G.; Fernández, J. M.; Kim, B.-j.; Forbes, N. S.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1078.

(74) Jones, D. P.; Carlson, J. L.; Samiec, P. S.; Sternberg, P.; Mody, V. C.; Reed, R. L.; Brown, L. A. S. *Clin. Chim. Acta* **1998**, 275, 175.

(75) Ochi, Y.; Nakagawa, O.; Sakaguchi, K.; Wada, S.; Urata, H. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7620.

(76) Ochi, Y.; Imai, M.; Nakagawa, O.; Hayashi, J.; Wada, S.; Urata, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 845.

(77) Ma, J.-B.; Yuan, Y.-R.; Meister, G.; Pei, Y.; Tuschl, T.; Patel, D. J. *Nature* **2005**, 434, 666.

(78) Parker, J. S.; Roe, S. M.; Barford, D. *Nature* **2005**, 434, 663.

(79) Wang, Y.; Juranek, S.; Li, H.; Sheng, G.; Tuschl, T.; Patel, D. J. *Nature* **2008**, 456, 921.

(80) Zhang, Y.; Qu, Z.; Kim, S.; Shi, V.; Liao, B.; Kraft, P.; Bandaru, R.; Wu, Y.; Greenberger, L. M.; Horak, I. *D. Gene Ther.* **2011**, 18, 326.

(81) Hori, S.-i.; Yamamoto, T.; Waki, R.; Wada, S.; Wada, F.; Noda, M.; Obika, S. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, e128.

(82) Rosta, E.; Yang, W.; Hummer, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 3137.

- (83) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859.
- (84) Roy, S.; Caruthers, M. *Molecules* **2013**, 18, 14268.
- (85) Adams, E. J. and Oscarson, S. Dimethyl(methylthio)sulfonium Tetrafluoroborate (DMTSF). *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. **2005**. doi:10.1002/047084289X.rd349.pub2.
- (86) Feuerstein, B. G.; Pattabiraman, N.; Marton, L. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1986**, 83, 5948.
- (87) Noir, R.; Kotera, M.; Pons, B.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13500.
- (88) Nothisen, M.; Kotera, M.; Voirin, E.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17730.
- (89) Schulhof, J. C.; Molko, D.; Teoule, R. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 397.
- (90) Houk, J.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6825.
- (91) Butora, G.; Qi, N.; Fu, W.; Nguyen, T.; Huang, H.-C.; Davies, I. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 14046.
- (92) Vargeese, C.; Carter, J.; Yegge, J.; Krivjansky, S.; Settle, A.; Kropp, E.; Peterson, K.; Pieken, W. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1046.
- (93) Xu, Y.; Zhang, H.-Y.; Thormeyer, D.; Larsson, O.; Du, Q.; Elmén, J.; Wahlestedt, C.; Liang, Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 306, 712.
- (94) Iyer, R. P.; Yu, D.; Jiang, Z.; Agrawal, S. *Tetrahedron* **1996**, 52, 14419.