

鎖状及び環状ジスルフィドを有する還元環境応答性プロドラッグ型
ホスホトリエステルの修飾オリゴ核酸の合成及び機能評価

2023 年度

大阪医科薬科大学
杉本 紀人

目次

緒論	5
1. 核酸医薬の概要	5
2. 医薬への応用における課題とそれを克服するための様々な化学修飾	7
3. プロドラッグ型ホスホトリエステル修飾核酸	11
4. 当研究室における還元環境応答性プロドラッグ型修飾核酸の開発	12
本論	15
第一章 鎖状ジスルフィドを有する PTE 修飾アンチセンス核酸の合成および機能評価	15
第一節 Linear SS PTE phosphoramidite unit の合成	17
第二節 Linear SS PTE ON の合成	19
第三節 Prodrug type SS PTE ON の還元条件下での変換反応の検討	23
小括	28
第二章 鎖状ジスルフィドを有する PTE 修飾オリゴ核酸の機能評価	29
第一節 Linear SS PTE ON のヌクレアーゼ耐性および細胞取り込み能の評価	30
第二節 アンチセンス活性評価系の構築	33
第三節 Prodrug type SS PTE gapmer AON の遺伝子発現抑制効果の評価	37
小括	40
第三章 5 員環ジスルフィドを有する PTE 修飾アンチセンス核酸の開発	41
第一節 5-membered cyclic SS PTE phosphoramidite の合成	44
第二節 5-membered cyclic SS PTE ON の合成および還元条件下での変換反応	49
小括	51
結論	52
論文目録	54
謝辞	55
実験の部	56
引用文献	67

略語一覽

AHP: acute hepatic porphyria
AON: antisense oligonucleotide
ApoB: apolipoprotein B
ASCVD: atherosclerotic cardiovascular disease
BNA/LNA: bridged/locked nucleic acid
CEM: Ca^{2+} enrichment of medium
CLSM: confocal laser scanning microscopy
CMV: cytomegalovirus
CPG: controlled pore glass
DCI: 4,5-dicyanoidiazole
DCM: dichloromethane
DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine
DMD: duchenne muscular dystrophy
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DMT: dimethoxytrityl
DNA: deoxyribonucleic acid
dsRNA: double strand RNA
ETT: 5-ethylthio-1*H*-tetrazole
FBS: fetal bovine serum
GalNAc: *N*-acetylgalactosamine
GSH: glutathione
hATTR: hereditary transthyretin amyloidosis
HeFH: heterozygous familial hypercholesterolemia
HoFH: homozygous familial hypercholesterolemia
MALDI: matrix assisted laser desorption ionization
MDTM: methyldithiomethyl
MeOH: methanol
Me-SATE: *S*-acetylthioethyl
MP: methylphosphonate
mRNA: messenger RNA
MS: mass spectrometry
NT: no treatment
ON: oligonucleotide
PDE: phosphodiester

PH: primary hyperoxaluria
PH1: primary hyperoxaluria type 1
PS: phosphorothioate
PTE: phosphotriester
REDUCT: reducing environment-dependent uncatalyzed chemical transforming
RISC: RNA-induced silencing complex
RNA: ribonucleic acid
RNAi: RNA interference
RNase H: ribonuclease H
RP-HPLC: reversed-phase high-performance liquid chromatography
RT-qPCR: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
siRNA: small interfering RNA
SOSICS: stereocontrolled oligonucleotide synthesis with iterative capping and sulfurization
SMA: spinal muscular atrophy
t-Bu-SATE: *S*-pivaloylthioethyl
TCA: trichloroacetic acid
TOF: time of flight
2'-OMe: 2'-*O*-methyl
2'-*O*-MOE: 2'-*O*-methoxyethyl
2'-F: 2'-fluoro

緒論

1. 核酸医薬の概要

Antisense oligonucleotide (AON) や small interfering RNA (siRNA) などに代表される核酸医薬とは、DNA や RNA などの核酸を十から数十塩基程度連結した短鎖のオリゴ核酸 (oligonucleotide: ON) で構成され、化学合成により製造される医薬の総称である。生物の遺伝情報は DNA として保存されており、DNA から RNA への転写、RNA からタンパク質への翻訳のセントラルドグマと呼ばれる過程を通じて、DNA はその機能を発現している。これまでに生活習慣病やがんなどの様々な疾患に対して、それぞれ有効な低分子医薬や抗体医薬が開発されてきたがタンパク質を標的としたこれらの医薬は、遺伝子疾患を中心とした希少疾病に対する医薬としての効果は十分でない。一方で siRNA や AON のような核酸医薬は、理論上セントラルドグマの上流の DNA や RNA に作用することでタンパク質発現の制御を可能とすることから、これまでに治療が困難であった難治性の遺伝子疾患などに対する新しい創薬モダリティとして世界で注目を集めている。ここではこれまでに開発されてきた AON と siRNA の特徴や作用機序、臨床応用の事例について紹介する。

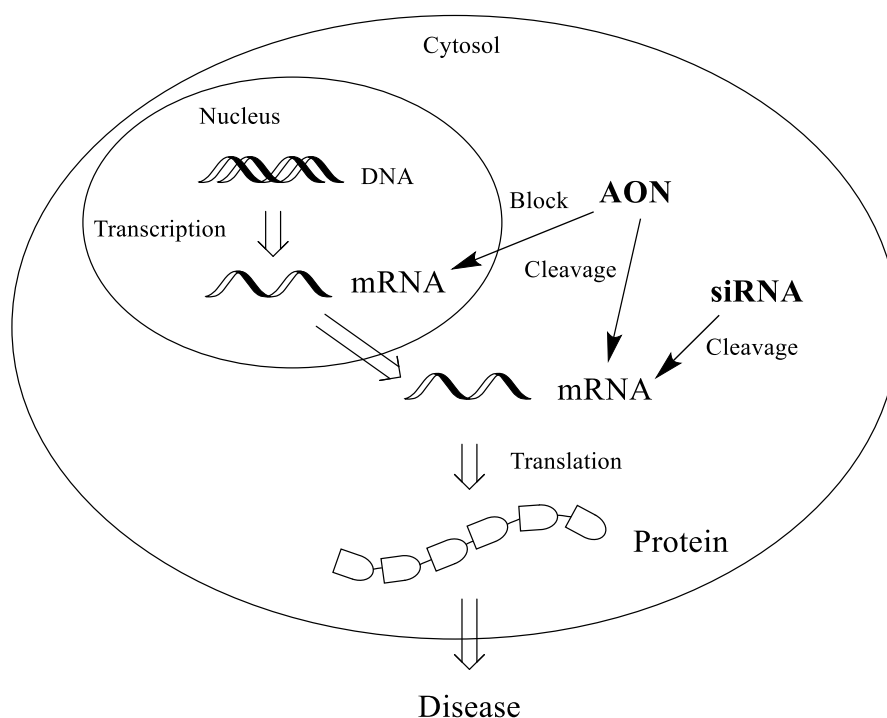


Fig. 1. Mechanism of oligonucleotide therapeutics.

Table 1. AON- and siRNA-based oligonucleotide therapeutics approved by FDA.¹⁾

Drug names	Market names	Approved by FDA	Indications ^{a)}	Drug modality
Fomivirsen	Vitravene	1998	CMV retinitis	AON
Mipomersen	Kynamro	2013	HoFH	AON
Eteplirsen	Exondys 51	2016	DMD	AON
Nusinersen	Spinraza	2016	SMA	AON
Patisiran	Onpattro	2018	Polyneuropathy of hATTR amyloidosis	siRNA
Givosiran	Givlaari	2019	AHP	siRNA
Golodirsen	Vyondys 53	2019	DMD	AON
Viltolasen	Viltepso	2020	DMD	AON
Lumasiran	Oxlumo	2020	PH1	siRNA
Inclisiran	Leqvio	2021	Hypercholesterolemia, ASCVD, HeFH	siRNA
Vutrisiran	Amvuttra	2022	Polyneuropathy of hATTR amyloidosis	siRNA
Nedosiran	Rivfloza	2023	PH	siRNA

a) CMV: cytomegalovirus, HoFH: homozygous familial hypercholesterolemia, DMD: duchenne muscular dystrophy, SMA: spinal muscular atrophy, hATTR: hereditary transthyretin amyloidosis, AHP: acute hepatic porphyria, PH1: primary hyperoxaluria type 1, ASCVD: atherosclerotic cardiovascular disease, HeFH: heterozygous familial hypercholesterolemia, PH: primary hyperoxaluria.

AON は数十塩基程度のヌクレオチドが連結した一本鎖 DNA であり、標的となる mRNA に Watson-Crick 塩基対形成を介して相互作用することで mRNA の発現を制御する。²⁾ 最も古典的な AON による遺伝子発現の制御は、1978 年に Zamecnik と Stephenson らによって報告された mRNA に相補的な配列を有する短鎖 AON による翻訳過程の阻害によるものである。³⁾ 1998 年に世界で初めて上市された核酸医薬である Fomivirsen (商品名: Vitravene) は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) 患者の免疫不全患者のサイトメガロウイルス (CMV) 網膜炎の治療薬であり、標的 mRNA に対して選択的に結合し、リボソームによる翻訳を阻害する。理論上、翻訳工程を阻害する AON は標的 mRNA に対して長時間結合しておく必要があることから AON の生体内における安定性は重要となる。そのため当時までは AON の全身投与は一般的でなく、Fomivirsen のように AON に化学修飾を施すことで安定性を高めた上で局所投与するなど、その使用方法是限定的であった。その後、化学修飾核酸研究の発展に伴い AON の更なる生体内安

定性の向上が可能となり、2013 年には世界初の全身投与可能な AON として家族性高コレステロール血症治療薬である Mipomersen (商品名: Kynamro) が上市された。本 AON は DNA/RNA 二本鎖中の RNA 鎖を選択的に分解する酵素である RNase H による mRNA の切断を誘導し、アンチセンス活性を示す。本作用機序においては RNA 鎖の分解後 AON が遊離することで、AON が次の mRNA を連続的に分解することから、RNase H による mRNA の切断を誘導する AON は高いアンチセンス活性を示すと考えられている。また近年では、AON が pre-mRNA 中のイントロンに特異的に作用することで、その効果を示すスプライシング制御型の AON も開発されており、このタイプの AON として脊髄性筋萎縮症の治療薬である Nusinersen (商品名: Spinraza) やデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 治療薬である Eteprisen (商品名: Exondys 51) や Golodirsen (商品名: Vyondys 53), Viltolarsen (商品名: Viltepso) などが上市されている。

RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) は、外来二本鎖 RNA (double strand RNA: dsRNA) により特定の mRNA が切断される現象であり、1998 年に Fire や Mello らによって初めて報告され、⁴⁾ さらにそのメカニズムを解明した功績によって、彼らはノーベル生理学・医学賞を 2006 年に受賞した。2001 年には Tuschl らによって化学合成した 21-23 mer 程度の dsRNA である siRNA を哺乳動物細胞に導入しても RNA 干渉を引き起こすことが可能であることが報告され、⁵⁾ siRNA は特定の遺伝子のみを抑制するための新たな実験ツールとなり、分子生物学の進歩に多大な影響を及ぼした。その後、十数年の時を経て 2018 年に遺伝性アミロイドーシス治療薬である Patisiran (商品名: Onpattro) が世界初の siRNA 医薬として米、欧にて承認され、⁶⁾ 2023 年 10 月までに計 6 種類の siRNA が上市されている。

このように AON や siRNA に代表される核酸医薬は、これまでに治療法がなかった難治性疾患に対する治療薬として非常に高いポテンシャルを有しており、その注目度の高さは今後更に高まることが期待できる。一方でドラッグデリバリーや安全性など、ON が医薬として普及していく上で、克服しなければならない問題点も数多く残されている。これらの問題を克服する方策の一つとして様々な化学修飾核酸が開発されている。

2. 医薬への応用における課題とそれを克服するための様々な化学修飾

一般に生体内には核酸分解酵素であるヌクレアーゼが広く分布することから核酸医薬を実用化するためには核酸の構造に化学修飾を施し、その性質を改善する必要がある。ON はリボース、核酸塩基、リン酸の 3 つの骨格で構成されて

おり、これらの箇所に化学修飾を導入することで、生体内安定性以外にも様々な機能付与が可能となる (Fig. 2)。⁷⁾

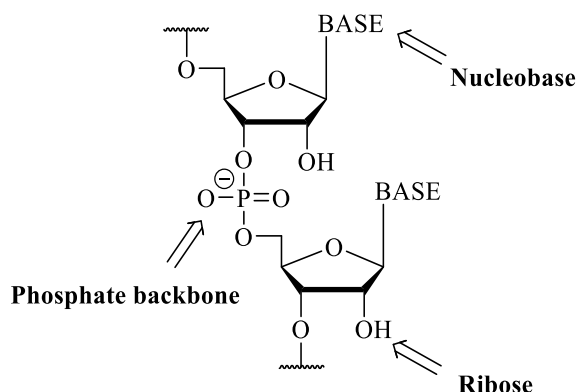


Fig. 2. Modification sites of oligonucleotide.

まず先に示した核酸医薬において汎用されている糖部 2'位への化学修飾について紹介する (Fig. 3)。2'-OMe (2'-O-methyl) 修飾は、主に RNA のヌクレアーゼ耐性の向上を目的に用いられ、RNA の 2'-水酸基のリン酸部への求核性を低下させることで、ヌクレアーゼ耐性を向上させることが可能となる。本修飾は生体内にも見られる化学修飾核酸であることから安全性も高いことが考えられ、先述した Patisiran を代表とする siRNA 医薬に広く用いられている。一方で 2'-OMe 修飾は RNA 干渉機構において、塩基配列内の修飾数や修飾部位によっては RNA-induced silencing complex (RISC) の形成を阻害することがあるため、ノックダウン活性が低下することも知られており、siRNA 中のどの箇所に 2'-OMe 修飾を導入するかといった分子設計が重要となる。⁸⁾ 2'-O-MOE (2'-O-methoxyethyl) 修飾は 2'-OMe (2'-O-methyl) 修飾と同じく siRNA のヌクレアーゼ耐性改善のために利用され、2'-OMe 修飾と同様に、2'-水酸基のリン酸部への求核性を低下させるだけでなく、MOE 基の親水性の高さから側鎖が環境中の水分子を捕捉し、水分子による RNA の加水分解を阻害すると考えられている。⁹⁾ 2'-F (2'-fluoro) 修飾は、置換によってヌクレアーゼ耐性の向上を狙えるだけでなく、フッ素原子のサイズが水酸基と同程度であることから、リボースのコンホメーションが RNA 型に近くなり、RNA/RNA 二本鎖の安定性の向上も狙うことが出来る。¹⁰⁾ このように、リボースのコンホメーションを RNA 型に近づけることで、相補的な RNA との高い結合親和性を示すことが可能になることから、1998 年にはリボースのコンホメーションを 2',4'-メチレン架橋により固定した架橋型核酸 (bridged/locked nucleic acid: BNA/LNA) が開発された。¹¹⁾ BNA/LNA は標的 mRNA

と極めて高い結合親和性を示すことから後述するギャップマー型 AON への導入が広く検討されており、次世代の核酸医薬としての注目が集まっている。

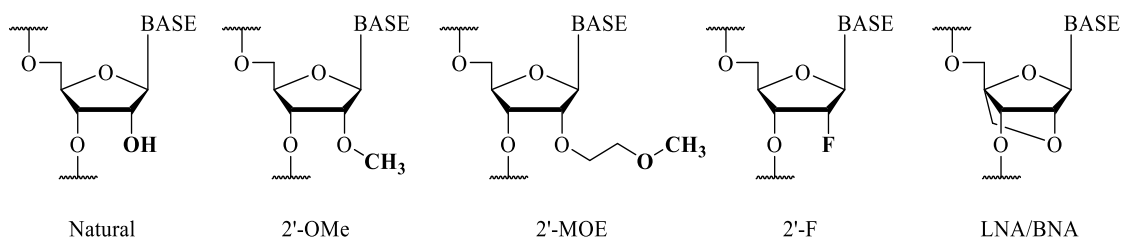


Fig. 3. Modifications of oligonucleotides at the C'2 position of the ribose residue.

核酸塩基への化学修飾は、標的 mRNA との二重鎖安定性や Watson-Crick 塩基対形成の特異性に大きく影響する特徴がある。天然型ピリミジン核酸塩基の C5 位を methyl 基に置換した化学修飾である 5-methyl cytosine は二重鎖安定性とヌクレアーゼ耐性を向上させることができ、免疫刺激性を抑制するため、¹²⁾ Mipomersen や Nusinersen などの核酸医薬で利用されている (**Fig. 4**)。他には、5 位の methyl 基を propynyl 基に置換した 5-propyne C もしくは 5-propyne T や、2 位のカルボニル基の酸素原子を硫黄に置換した 2-thio-thymine などが開発されている。5-propyne C および T は 5-methyl C に比べて、より強い塩基間のスタッキング相互作用により、二重鎖安定性の向上が期待でき、¹³⁾ 2-thiothymine はギャップマー型 AON に部分的に導入することで、RNase H による標的 RNA の切断部位に影響を与えることが可能であると報告されている。¹⁴⁾

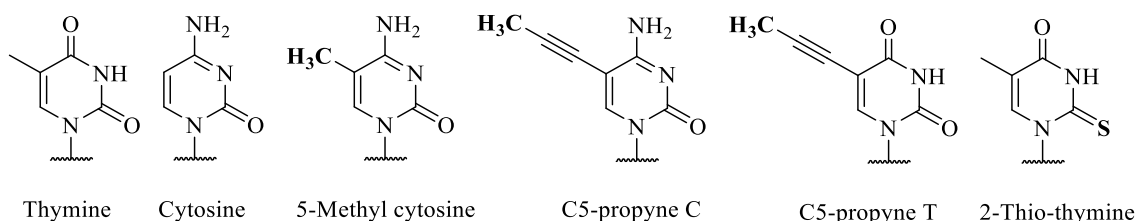


Fig. 4. Modifications of oligonucleotides on the nucleobase.

最後にヌクレアーゼ耐性を顕著に向上可能なリン酸部への修飾に関して説明する (**Fig. 5**)。ヌクレアーゼは ON のリン酸部を認識し活性化することで、水分子による加水分解反応を触媒的に進行させることから、リン酸部への化学修飾の導入はヌクレアーゼ耐性の向上に大きく寄与するものと考えられている。多くの AON において汎用されている PS (phosphorothioate) 修飾は、リン酸部のホスホジエステル (phosphodiester: PDE) 骨格に含まれる酸素原子を硫黄原子に置換したものであり、ヌクレアーゼ耐性を飛躍的に向上させることが可能であ

る。一方、PS 修飾はリン原子が不斉中心となるため、ON 中に修飾を複数導入すると無数の立体異性体が生じる。Wada らは立体選択的に PS 修飾 ON を合成するためのオキサザホスホリジン法を確立し、¹⁵⁾ さらに Iwamoto らはそれをさらに改良した SOSICS (stereocontrolled oligonucleotide synthesis with iterative capping and sulfurization) 法にて Mipomersen の立体異性体間の活性差を検討している。¹⁶⁾ これまでに PS 修飾 ON の Sp 体は Rp 体よりもヌクレアーゼ抵抗性が高いこと、Rp 体は Sp 体よりも標的 RNA との結合親和性が高くなることなどが明らかとなっているが、分子全体としての安定性や有効性は各 AON の配列ごとに異なり、それぞれの AON において最適な修飾様式を導く必要があると考えられている。¹⁷⁾ また PS 修飾は生体内のタンパク質と非特異的な相互作用を示し毒性を発現することも問題視されており、毒性発現の分子機構に基づいて、PS 修飾を他のリン酸部修飾へと置換した AON の開発なども行われている。¹⁸⁾ リン酸部の酸素原子をメチル基に置換した methylphosphonate (MP) は、電気的に中性なリン酸部修飾であり、本修飾もヌクレアーゼを向上させることが可能である。MP 修飾は電荷を有さないことから生体内のタンパク質との相互作用も起こしにくく、PS 修飾の代わりに配列の一部に MP 修飾を導入することで、毒性の軽減が可能であることが報告されている。¹⁹⁾ 同様の非荷電性の修飾基としてリン酸部にアルキル基を導入したホスホトリエステル (phosphotriester: PTE) 修飾は、1970 年代に Ts'o らに提唱されたリン酸部修飾核酸であり、²⁰⁾ ヌクレアーゼ耐性の向上だけでなく、非荷電性となることで ON の細胞取り込みが向上することが知られている。一方で本修飾基の導入によって標的 RNA との結合親和性が低下するため、アンチセンス活性が低下することが予想され本修飾を導入した AON の評価はほとんどなされていない。これらの背景を踏まえ筆者の所属する研究室では、Et-PTE 修飾を導入した AON の開発に取り組んだが、ヌクレアーゼ耐性の著しい向上と細胞取り込みの向上が見られるものの、予想していた通りアンチセンス活性はほとんど示さないことが分かっている。²¹⁾ 1990 年代に Imbach らは PTE 修飾の高いヌクレアーゼ耐性と細胞取り込みの高さに着目して、プロドラッグの概念を導入した化学修飾核酸を報告している。²²⁾ プロドラッグ型化学修飾核酸は、細胞外ではそれぞれの化学修飾の特性を維持しつつ、細胞内移行後に親化合物に変換されるため、理論上、上記に示したリン酸部修飾による不斉中心の有無による活性変化などを考慮する必要がないと考えられる。これまでにプロドラッグを親化合物に変換するための細胞内のトリガーとして、グルタチオン (glutathione: GSH)、エステラーゼ、レダクターゼ、熱、光などを用いた様々な修飾核酸が報告されており、次節においてこれらの詳細を説明する。²³⁾

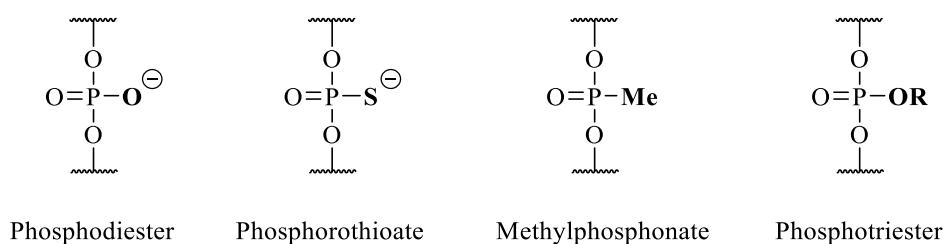


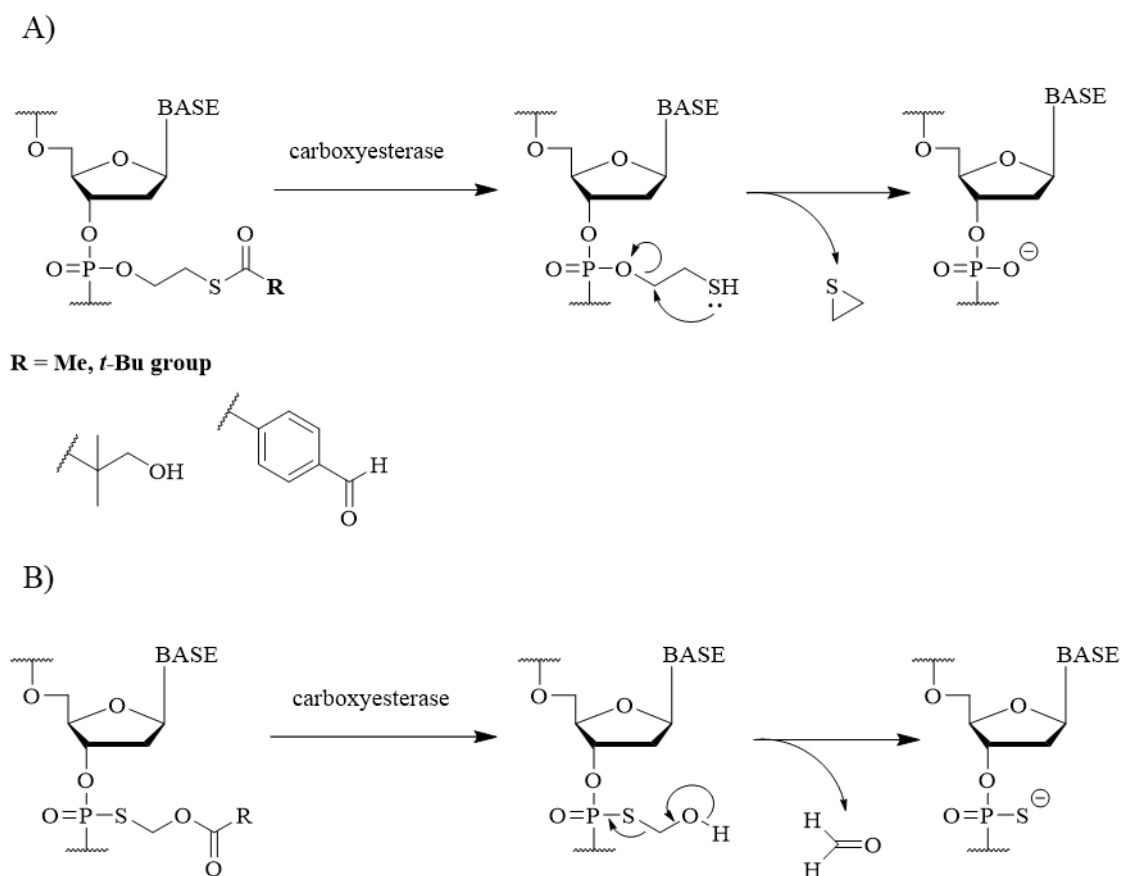
Fig. 5. Modifications of oligonucleotides at the phosphate backbone.

その他、組織移行性を高めることを目的に標的の細胞器官に多く発現する受容体に特異的に結合するような官能基を ON に結合させるコンジュゲート型核酸がある。代表的なものでは、*N*-acetylgalactosamine (GalNAc) を siRNA の鎖末端にコンジュゲートさせることによって、肝細胞での遺伝子サイレンシング効果が顕著に促進されることが報告されている。²⁴⁾

3. プロドラッグ型ホスホトリエステル修飾核酸

リン酸部にプロドラッグ型修飾を導入したプロドラッグ型 PTE 修飾核酸はいくつかの研究グループに開発されてきた。前節で示した通り PTE 修飾の主な利点は、リン酸部の負電荷を打ち消し中性にするため細胞膜透過性が改善される点、ヌクレアーゼ耐性を向上させることができる点である。しかしながら、PTE 修飾を施すことで標的 RNA との親和性が低下し DNA/RNA 二本鎖が形成されにくくなるため、非プロドラッグ型の PTE 修飾 ON によるアンチセンス活性評価はほとんど行われていない。プロドラッグ型 PTE 修飾核酸は、細胞内の様々な刺激を利用して天然型核酸へと変換される分子設計の修飾核酸であり、理論上、細胞内で親化合物に変換されることで上記に示した PTE 修飾の欠点を補うことが可能である。Imbach らは、チオエステラーゼを利用したプロドラッグ型 PTE 修飾核酸として、Me-SATE (*S*-acetylthioethyl) 基および *t*-Bu-SATE (*S*-pivaloylthioethyl) を導入した修飾核酸を初めて報告した (Scheme 1A)。²²⁾ その後、SATE の誘導体として Agrawal らもエステラーゼによって変換される *S*-acyloxymethyl 基を導入したプロドラッグ型修飾核酸 (Scheme 1B) を報告している。²⁵⁾ 他にもニトロレダクターゼ²⁶⁾ や光刺激²⁷⁾ などの刺激により活性化するプロドラッグ型 PTE 修飾核酸が報告されている。しかしながら、それらの報告ではモデル化合物として、オリゴデオキシチミジン (オリゴ dT) にプロドラッグ型修飾を導入したものをを用いており、その合成およびヌクレアーゼ耐性などの基本的性質を示しているものの他の核酸塩基も有する ON を用いてアンチセンス活性は評価されていない。これは ON の化学合成時に核酸塩基の脱保護に用いるアンモニアなどの塩基性試薬に対して、チオエステルまたはエステル結

合を有する上記のプロドラッグ型 PTE 修飾が不安定であるため AON の合成が困難であったためであると考えられる。そのような背景から、プロドラッグ型 PTE 修飾 ON 研究は大きな進展がない期間が長く続いたが、2013 年に Dowdy らは *t*-Bu-SATE 修飾 ON が、より温和な条件で核酸塩基の保護基を脱保護することで分解されないことを見出し、*t*-Bu-SATE やその誘導体を siRNA に導入したプロドラッグ型 PTE 修飾 siRNA のアンチセンス活性を評価し、その医薬応用の可能性を示した (Scheme 1A)。²⁸⁾ この報告以降、現在までに医薬応用に至るものは報告されていないものの、一部のバイオ関連企業によってプロドラッグ型 PTE 修飾 siRNA の開発研究が進められている。



Scheme 1. Structures and conversion reactions of prodrug type SS PTE ONs into natural ONs. A) ON modified with various SATE groups,²²⁾ B) ON modified with *S*-acetyloxymethyl group.²⁵⁾

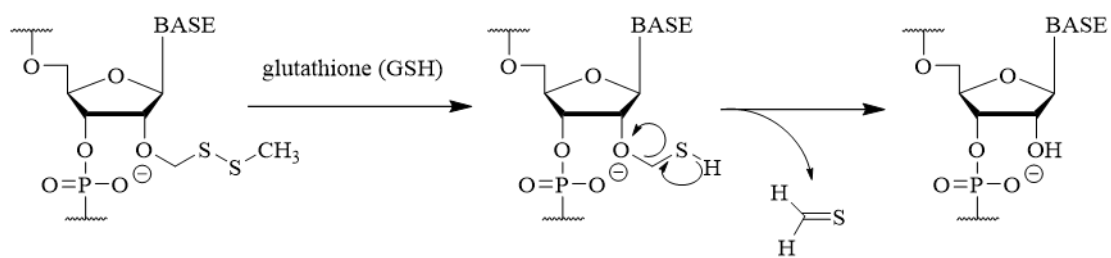
4. 当研究室における還元環境応答性プロドラッグ型修飾核酸の開発

当研究室でもプロドラッグ型修飾核酸に注目し、プロドラッグ修飾部にジスルフィド結合を有する還元環境応答性プロドラッグ型修飾核酸、REDUCT (reducing environment-dependent uncatalyzed chemical transforming) 核酸の開発に取り組んでいる。通常、細胞内ではグルタチオン (GSH) が 0.5–10 mM の濃度で存在するのに対し、細胞外では細胞内の 1/1000 程度しか存在しないことから、REDUCT 核酸はこのような細胞内還元環境を利用して、天然型核酸へと変換される設計となっている。

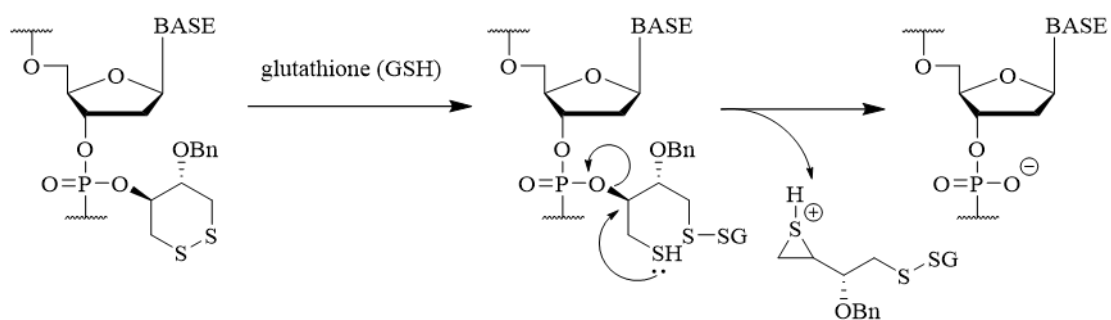
緒論 2 で示した通り、siRNA 中の 2' 位修飾は修飾数、部位に応じて siRNA 活性を低下させることがあるため、当研究室ではまず RNA の 2' 位に methylthiomethyl (MTM) 基を導入した 2'-O-MTM REDUCT RNA を合成し、その機能評価を行った (Scheme 2A)。²⁹⁾ その結果、本修飾は血清中にて DNA よりも高い安定性を示し、2'-O-MTM REDUCT RNA は模擬的な細胞内還元条件下で 2'-OH RNA へと 2 h 以内に完全に変換されることが確認された。さらに 2'-O-MTM 修飾を siRNA に組み込んだ 2'-O-MTM siRNA は siRNA の代表的な修飾である 2'-OMe 修飾を施した 2'-O-Me siRNA より強いノックダウン活性を示し、2'-O-Me siRNA で見られた修飾位置や数に依存した活性強度の変化が、2'-O-MTM siRNA では見られず、一定の活性を示した。これらの結果から、ジスルフィドを有する還元環境応答性プロドラッグ修飾が、核酸医薬へと応用する上で有用な性質を有することが明らかとなった。

そこで次に、REDUCT 修飾を AON のリン酸部に導入したプロドラッグ型 PTE 核酸の開発に取り組んだ。先行研究では、6 員環ジスルフィドを含む *trans*-5-benzyloxy-1,2-dithiane-4-yl 基をリン酸部に導入したプロドラッグ型 PTE 核酸 (6-membered cyclic SS PTE ON) を合成し、その機能評価を行った (Scheme 2B)。³⁰⁾ その結果、6-membered cyclic SS PTE ON は優れた細胞内取り込み能および血清中での安定性を示したが、AON に 6-membered cyclic SS PTE 修飾を導入した場合、アンチセンス活性をほとんど示さないことが明らかとなった。その低活性は細胞内での天然型核酸への変換速度に起因していると考えられたことから、さらなる変換速度の向上を指向して新たな分子設計を行うこととした。これらの背景を踏まえて、我々は細胞内での変換速度を制御することでより高活性なプロドラッグ型 PTE 修飾核酸を創出できると考えた。本論文では、様々なジスルフィド結合を有する新規プロドラッグ型 PTE 修飾 AON の合成および機能評価について検討したので、以下に詳しく報告する。

A)



B)



Scheme 2. Structures and conversion reactions of REDUCT ONs into natural ONs. A) 2'-O-MDTM siRNA,²⁹⁾ B) 6-membered cyclic SS PTE ON.³⁰⁾

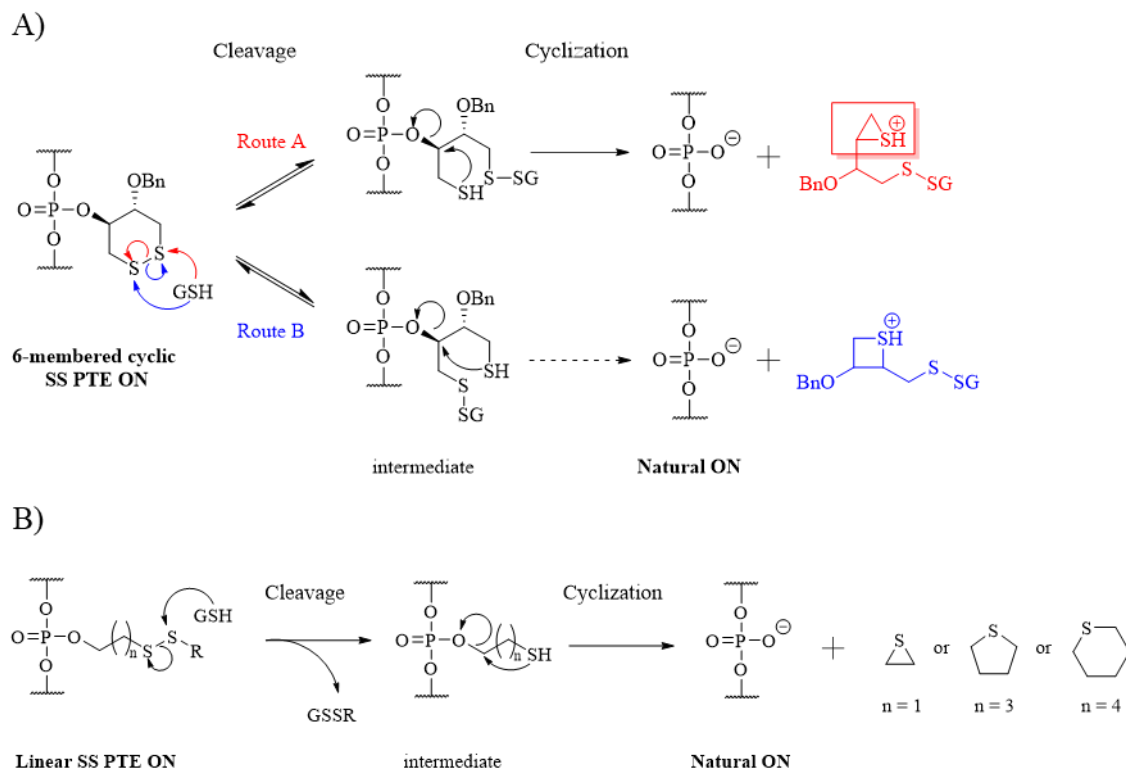
本論

第一章 鎖状ジスルフィドを有する PTE 修飾アンチセンス核酸の合成および機能評価

緒論で述べた通り、筆者の所属する研究室ではジスルフィド結合の開裂を経て天然型 ON へと変換されるプロドラッグ型核酸の合成とその機能評価に関して検討を行ってきた。それらの検討の中で、6 員環ジスルフィド構造をリン酸部に導入した ON (6-membered cyclic SS PTE ON) は、高いヌクレアーゼ耐性および細胞内取り込み能を有しているものの、本修飾を AON 中に導入しても、そのアンチセンス活性は汎用される PS 修飾 AON と比較しても著しく弱いことが明らかとなっている。本プロドラッグ修飾は細胞内を模倣した還元条件下における天然型 ON への変換反応が非常に緩やかであることから、細胞内においても十分な速度で変換反応が進行せず、修飾基が残存することで AON と標的 mRNA との結合親和性が低下し、そのアンチセンス活性が低下したものと考えられた。そこで変換速度を加速させることでアンチセンス活性の向上が期待できると考え、まず予想される細胞内還元条件下での変換反応の反応機構から、変換速度を向上させるための方法論を構築した。Scheme 3A に示すように、6-membered cyclic SS PTE ON はジスルフィド結合の開裂反応の後、生じたチオールによる環化反応によってリン酸部が脱離し変換反応が進行すると考えられる。³¹⁾ この時、チオール生成後の環化反応の反応速度は、GSH がジスルフィド結合のどちらの硫黄原子を攻撃するかにより変化することが考えられる。すなわち Route A においては 3 員環スルフィドの形成、Route B においては 4 員環スルフィドの形成を介して反応が進行するが、環状スルフィドを形成する際に必要な活性化エネルギーは 4 員環 > 6 員環 > 5 員環 > 3 員環の順に大きいことが報告されており、³²⁾ ジスルフィド結合の開裂後、Route A では 3 員環スルフィドを容易に形成して変換反応が進行するが、4 員環形成を経由する Route B では環化反応は進行せず、6 員環ジスルフィドが再形成されることが予想される。以上の反応機構より 6-membered cyclic SS PTE ON の変換反応では、チオールによる環化反応が変換反応全体の速度に大きく影響を及ぼすと予想されたことから、筆者はこの段階の反応速度を制御することで効率的に変換反応全体の反応速度を制御可能であると考えた。

そこで筆者は変換速度に影響を与える要因を評価することを目的とし、鎖状ジスルフィドを有する新規プロドラッグ型 PTE 修飾 ON (linear SS PTE ON) を設計した (Scheme 3B)。Linear SS PTE ON では、環化反応で 3 員環、4 員環、5 員環もしくは 6 員環スルフィドが形成されるように分子設計できるため、先に

示した環化反応が変換反応全体の反応速度に及ぼす影響を容易に検討可能になる。本章では、最初にオリゴ合成に必要な **linear SS PTE** 修飾ホスホロアミダイトユニットアナログの合成およびそれらを用いた **ON** 合成に関して述べる。その後、細胞内を模倣した還元条件下で変換反応を行い、反応中間体などの生成物解析から変換反応の反応速度を向上させるための要因に関して考察を行った。

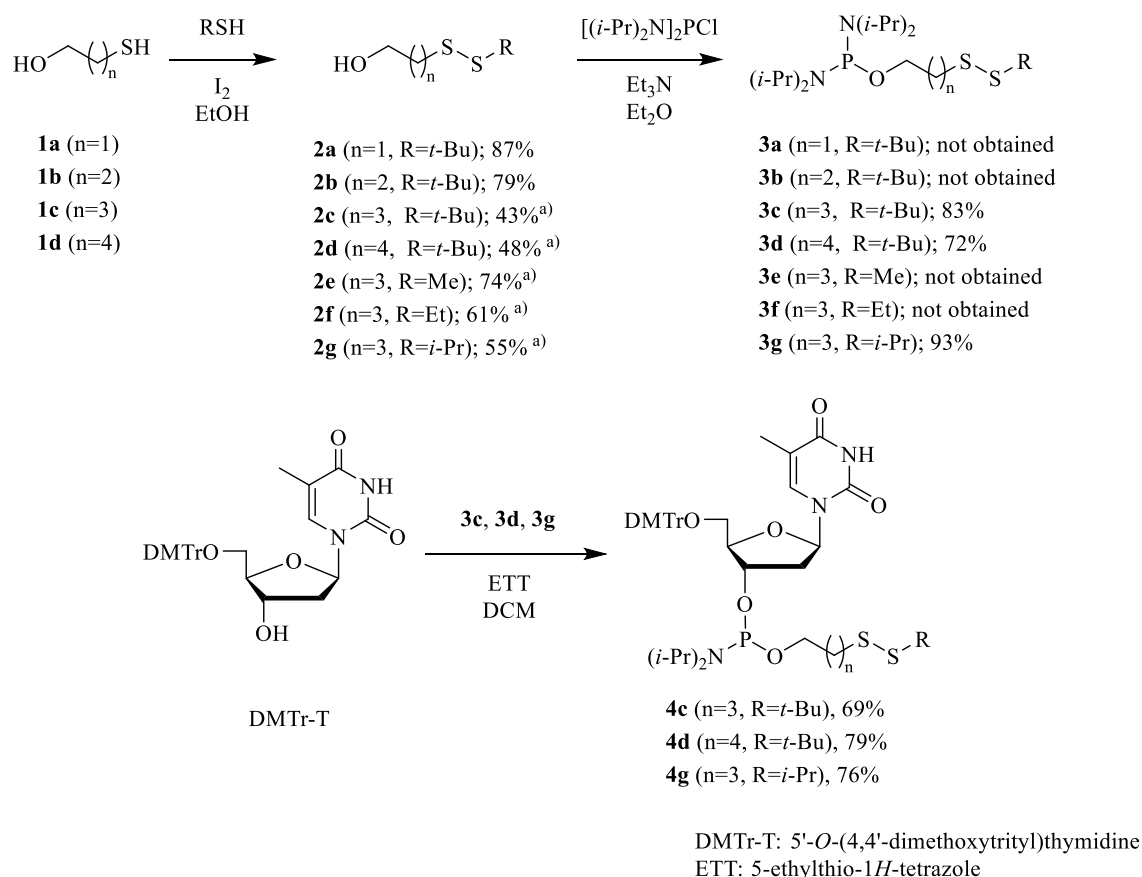


Scheme 3. Putative mechanism of the conversion reactions into natural ON under reducing environment. A) 6-membered cyclic SS PTE ON, B) linear SS PTE ON.

第一節 Linear SS PTE phosphoramidite unit の合成

Linear SS PTE 修飾を導入した ON の合成を目的として、最も一般的なオリゴ合成法であるホスホロアミダイト法を用いた合成を計画した。ホスホロアミダイト法ではモノマーユニットとして化学修飾を導入したホスホロアミダイトを合成する必要がある。前述の通り、環状スルフィドの形成能が変換反応速度に影響を及ぼすことを評価するため、ジスルフィド結合開裂後に 3-6 員環スルフィドを形成するような linear SS PTE 修飾を施した phosphorodiamidite **3** の合成を試みた (Scheme 4)。まず、mercaptoalcohol **1a-d** と *tert*-butylthiol をヨウ素触媒下で酸化させ、対応する disulfide **2a-d** を得た。なお mercaptoalcohol **1c** および **1d** は、市販されていなかったため対応する chloro-alcohol を出発物質としてチオウレアを用いた合成法にて目的物を得た。³³⁾ 続いて、**2** に bis(diisopropylamino)chlorophosphine を無水ジエチルエーテル中、塩基性条件で作用させ、*tert*-butyl 基を有する diamidite **3a-d** の合成を検討した。一般にホスホロアミダイトが有する P(III) 原子はジスルフィド結合を還元的に開裂させることから、分子内に両構造を有する **3** は化学的に不安定になる可能性がある。³⁴⁾ 本反応においては P(III) 原子とジスルフィド構造間に 4 個以上の炭素原子を有する **3c** および **3d** を得ることは成功したが、**3a** および **3b** は得ることができなかった。**3a** および **3b** の合成時に反応液を ³¹P NMR によって解析したところ、いずれも反応開始早期に 140 ppm 付近に見られる bis(diisopropylamino)chlorophosphine 由来のシグナルは消失したが、110 ppm 付近に出現すると予想される目的物由来のシグナルは確認できず、30 ppm 付近に目的物が P-S 間で分子内環化を起こしたと考えられるシグナルと 10 ppm 付近に水分子とホスホロアミダイトが反応した副生物由来と考えられるシグナルが見られた。その結果から、反応は進行して目的物は一時的に生成するものの、反応液中で分解したと考えられる。よって、**3a** や **3b** のように硫黄原子と酸素原子間の炭素数が 3 以下であるホスホロアミダイトは、リン原子が硫黄原子に攻撃を行う傾向があり、化合物として不安定であることが示唆された。次に、ジスルフィド構造周辺の立体構造が **3** のホスホロアミダイトの安定性に及ぼす影響を調べるため、**3c** の *tert*-butyl 基を立体障害の小さいアルキル基へと置換した **3e-3g** の合成を試みたところ、2 級アルキルを有する **3g** のみを得ることができた。**3a** や **3b** と同様に、反応液を ³¹P NMR によって解析したところ、**3e** の合成では 30 ppm や 10 ppm 付近に副生物由来と考えられるシグナルは見られたが、**3e** は全く生成されなかった。一方で、**3f** の合成ではそれら副生物由来と思われるシグナルも出現したものの、**3f** が全体の 16 %程度生成しているのが確認できた。しかしながら、30 ppm 付近に **3f** の環化生成物と考えられるシグナルも全体の 75%程度出現しており、結果的には生成した **3f** も反応中ま

たは後処理中に分解したと考えられる。よって、**3e** や **3f** のように P-S 間の炭素数の条件を満たすものでもジスルフィド末端に **methyl** 基や **ethyl** 基のような立体障害の小さいアルキル基を有するホスホロジアミダイトは不安定であることが示唆された。以上から、今回合成を計画した直鎖ジスルフィドを有する **diamidite 3** の安定性は、P(III) 原子と硫黄原子間の鎖長とジスルフィド基周辺の立体障害に強く依存しており、安定な化合物を得るためには、リン原子から硫黄原子の間に 6 本以上の単結合と、2 級以上のアルキル基を有するジスルフィド構造が必要なことを明らかにすることができた。続いて得られた **diamidite 3c, 3d** および **3g** を用いて、5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT) を活性化剤として 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)thymidine (DMTr-T) と反応させることで、対応する phosphoramidite **4c, 4d, 4g** をそれぞれ 69, 79, 76%の収率で得ることに成功した。



Scheme 4. Syntheses of linear SS PTE phosphoramidites. ^{a)} Yields over two steps from the corresponding chloro-alcohols.

第二節 Linear SS PTE ON の合成

ホスホロアミダイト法では、多孔質ガラス (controlled pore glass: CPG) などの固相担体に結合したヌクレオシドに対して、比較的安定な 3 価のリン化合物であるホスホロアミダイトモノマーユニットを、テトラゾール誘導体などの活性化剤 (activator) 存在下で縮合 (coupling) させ、3 価リン原子を有する亜リン酸トリエステルとする。その後、ヨウ素-水による緩和な酸化法で 3 価のリン原子を酸化 (oxidation) させ、5 価のリン原子を有するホスホトリエステル結合とする。この工程を目的の鎖長の ON となるまで繰り返し、固相担体に結合した ON をアンモニア水などの塩基処理にて切り出し、目的とする ON を得る。ホスホロアミダイト法の特徴として、DNA/RNA 自動合成機によって合成を自動化できる点があり、筆者は本法を用いて linear SS PTE 修飾を導入した ON の合成を検討した。

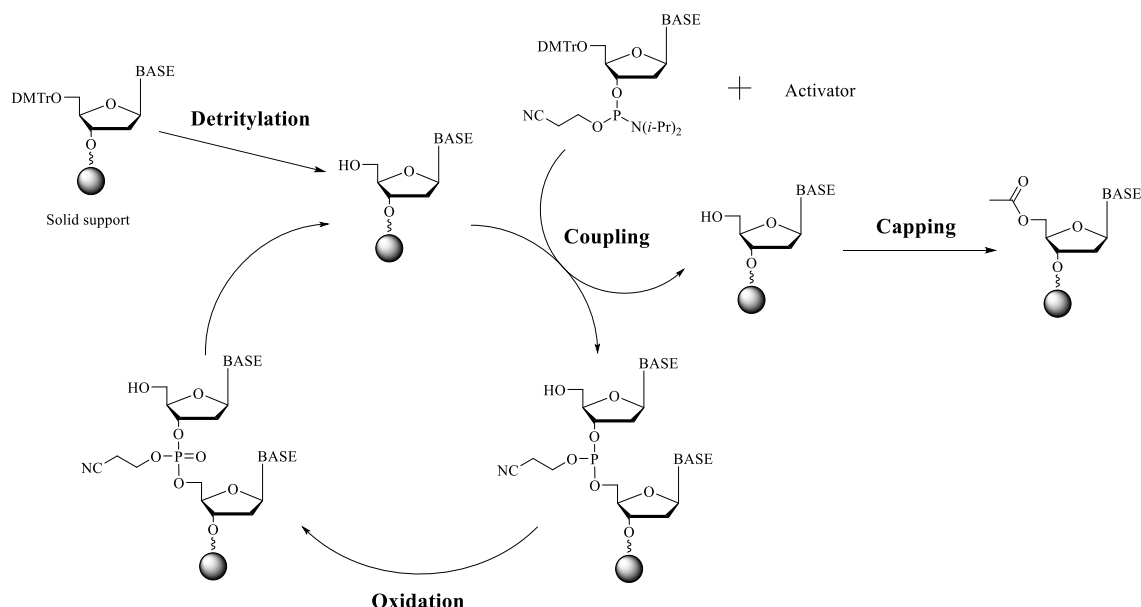
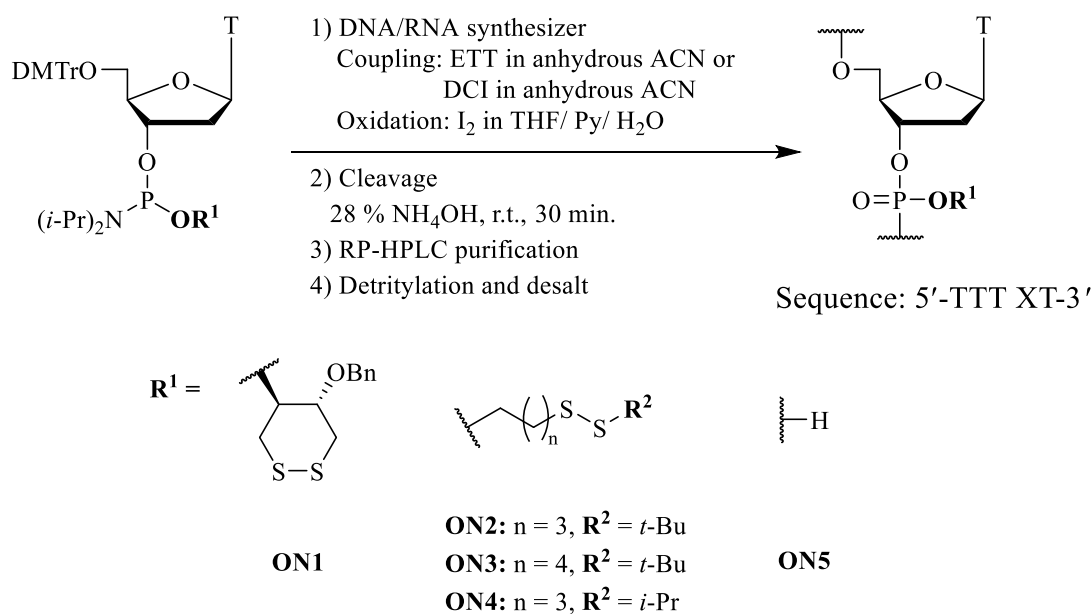


Fig. 6. Solid-phase oligonucleotide synthesis by phosphoramidite chemistry.

まず次節の還元条件下での変換反応の検討のために、T 5-mer の 3' 末端に先行研究にて報告した 6-membered cyclic SS PTE 修飾を導入した **ON1**、および前節で得られた phosphoramidite **4c**, **4d**, **4g** を用いて、linear SS PTE 修飾を導入した **ONs2-4** をそれぞれ合成した (Scheme 5, Table 1)。ON1 合成時の coupling 反応で用いる activator は過去の報告³⁰⁾と同様に DCI (4,5-dicyanoimidazole) を使い、ONs2-4 の合成時には特に RNA 合成において汎用されている ETT (5-ethylthio-1*H*-tetrazole) を用いた。Prodrug type SS PTE 修飾を導入する際には、合成効率を向

上させるために、coupling に要する時間を RNA 合成時の条件である 10 min とし coupling を行った。また oxidation 試薬は 0.02 M iodine の pyridine/water 溶液を、detritylation 試薬は 3% trichloroacetic acid (TCA) の DCM (dichloromethane) 溶液をそれぞれ用いた。なお ON の合成は RP-HPLC (reversed-phase high-performance liquid chromatography) での精製を容易にするために 5' 末端に DMT (dimethoxytrityl) 基を残した DMT-ON の条件にて合成した。得られた ON-固相担体の複合体を 28% NH₃ 水溶液で処理し、目的の ON を担体からの切り出し、およびリン酸部の β -cyanoethyl 基の脱保護を行った。一般にリン酸部にアルキル基を導入したホスホトリエステル構造は塩基に対して不安定であることが予想されるが、²⁰⁾ 今回は 28% NH₃ 水溶液を室温で 30 min 処理することでリン酸部にプロドラッグ修飾を残したまま目的の ON を切り出すことに成功した。切り出し後の反応液中の NH₃ を留去後、5' 末端の保護基である DMTr 基の脱離を防ぐことを目的として 2 M TEAA 緩衝液 (pH 7.0) を加えて反応溶液を保存した。その後、得られた反応溶液を RP-HPLC で分析したところ、coupling 不良により生じると予想されるチミジンと思われるピークがほとんど生じていないことが確認でき、今回合成した linear SS PTE 修飾 phosphoramidite **4c**, **4d**, **4g** は、通常の RNA 合成条件と同様の条件にて効率よく反応し、これらの条件にて目的の ON が合成可能であることが分かった (Fig. 7)。その後、得られた ON を RP-HPLC によって精製し、5'-O-DMTr 基を酸処理によって脱保護後、RP-HPLC で再度分析したところ、それぞれの ON は修飾基の導入によるジアステレオマー混合物と思われる 2 本のピークが確認された (Fig. 8)。各 ON の MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) による分析結果では、目的の ON の分子イオンピークのみがほぼ単一のピークとして得られたことから副生成物は生じておらず、目的とする linear SS PTE ON をジアステレオマー混合物として得ることに成功した。



Scheme 5. Syntheses of prodrug type SS PTE ONs.

Table 2. Sequences and analyses by MALDI-TOF MS of synthesized ONs.

ONs	Sequence (5' to 3') ^{a)}	Yield (%)	Formula	MALDI-TOF MS [M-H] ⁻	
				Calcd.	Found
ON1	d(TTT X ₁ T)	35	C ₆₁ H ₇₈ N ₁₀ O ₃₄ P ₄ S ₂	1682.3	1682.7
ON2	d(TTT X ₂ T)	23	C ₅₈ H ₈₂ N ₁₀ O ₃₃ P ₄ S ₂	1634.3	1634.5
ON3	d(TTT X ₃ T)	58	C ₅₉ H ₈₄ N ₁₀ O ₃₃ P ₄ S ₂	1648.4	1650.3
ON4	d(TTT X ₄ T)	63	C ₅₇ H ₈₀ N ₁₀ O ₃₃ P ₄ S ₂	1620.3	1620.5
ON5	d(TTT TT)	60	C ₅₀ H ₆₆ N ₁₀ O ₃₃ P ₄	1458.0	1457.9

a) X₁–X₄ are the modification sites. **ON1**: *trans*-5-benzyloxy-1,2-dithiane-4-yl phosphotriester-modified T 5-mer, **ON2**: *tert*-butyldithiobutyl phosphotriester-modified T 5-mer, **ON3**: *tert*-butyldithiopentyl phosphotriester-modified T 5-mer, **ON4**: isopropyldithiobutyl phosphotriester-modified T 5-mer.

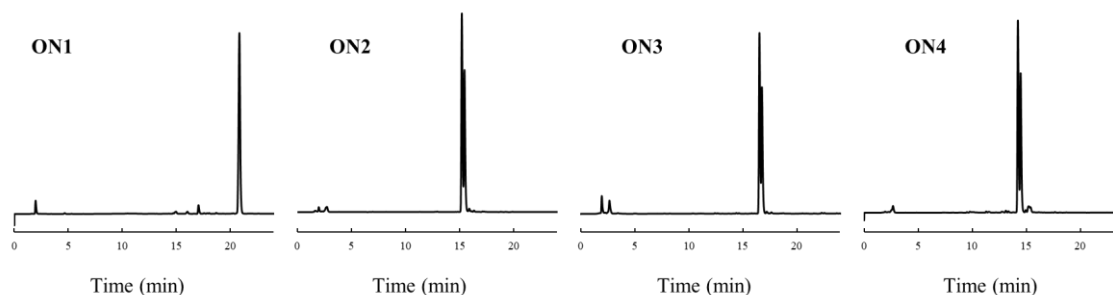


Fig. 7. RP-HPLC analyses of crude prodrug type SS PTE ONs with the 5'-*O*-DMTr group. Columns: XBridge BEH C18 column (4.6×100 mm, Waters), solv. A: 50 mM TEAA buffer (pH 7.0), solv. B: acetonitrile, gradient: 10-50% B/20 min, flow rate: 0.8 mL/min, temp.: 40°C, detection: 260 nm.

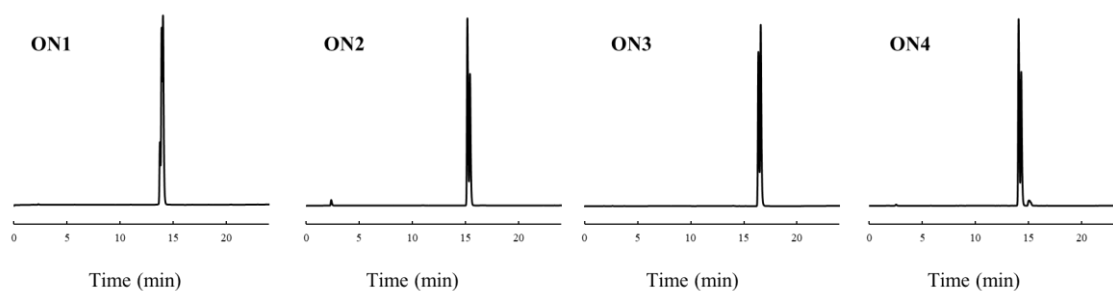
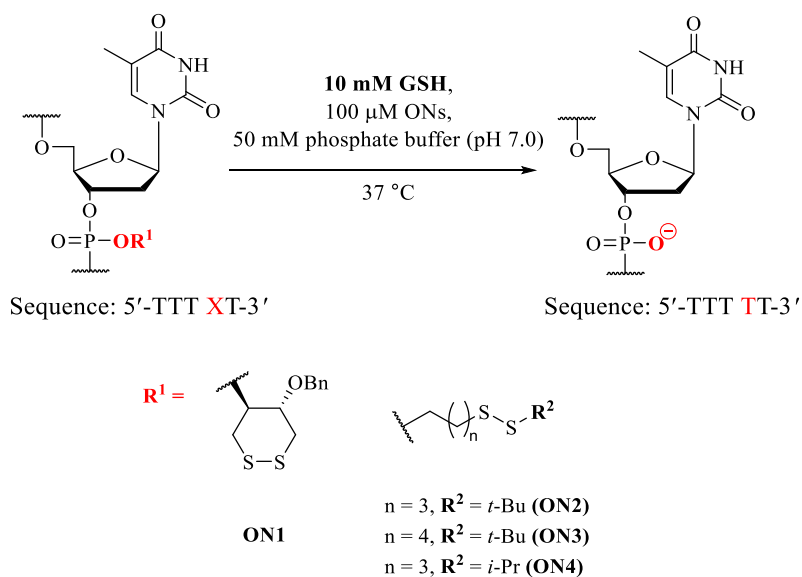


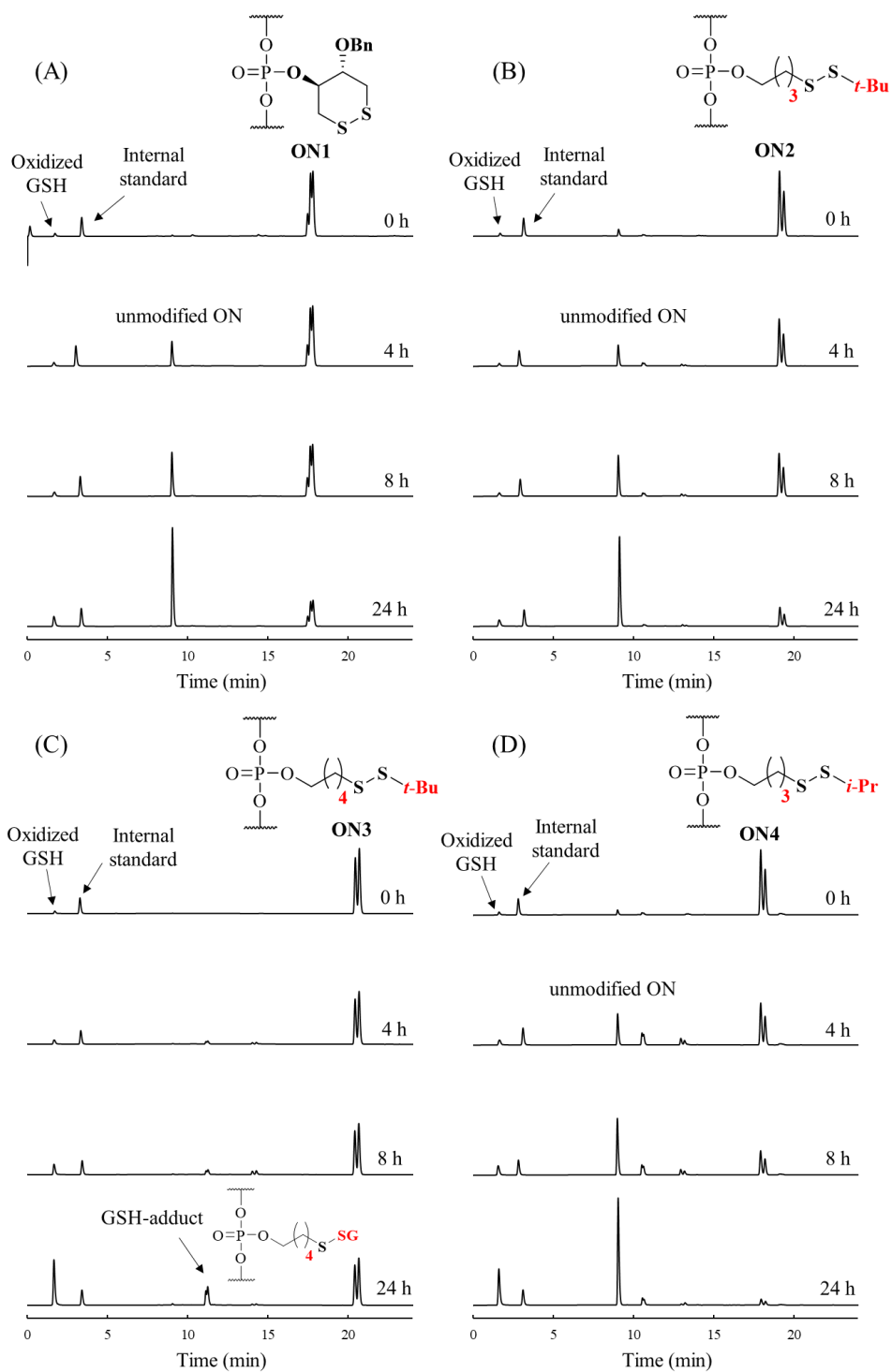
Fig. 8. RP-HPLC analyses of purified prodrug type SS PTE ONs. Columns: XBridge BEH C18 column (4.6×100 mm, Waters), solv. A: 50 mM TEAA buffer (pH 7.0), solv. B: acetonitrile, gradient: 10-50% B/20 min, flow rate: 0.8 mL/min, temp.: 40°C, detection: 260 nm.

第三節 Prodrug type SS PTE ON の還元条件下での変換反応の検討

還元条件下における prodrug type SS PTE ON の未修飾 ON への変換速度を評価するため、**ONs2-4** と以前報告した 6 員環ジスルフィドを有する **ON1** について変換反応を行った (**Scheme 6**)。³⁰⁾ GSH を含む細胞内還元環境を模した条件下で (10 mM GSH, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 37 °C)、終濃度が 100 μ M となるように **ONs1-5** を加え、37 °C で変換反応を行った。経時的にサンプリングした反応液を RP-HPLC にて分析した (**Fig. 9**)。 **ONs1-4** の retention time はいずれも 15–20 min 付近であり、未修飾 ON である T 5-mer は 9 min 付近で出現している。 **ON1**, **ON2** および **ON4** は prodrug 体の消失とともに、T 5-mer が時間とともに生成したが、**ON3** ではその消失も遅く、T 5-mer は現れてこなかった。 **ON3** は 24 h 反応後でも未修飾 ON にほとんど変換されず、代わりに 11 min 付近で生じたピークを分取後、MALDI-TOF MS によって解析すると、GSH 付加体が生じていることが確認された (**Fig. 9E**)。



Scheme 6. Conversion reactions of prodrug type SS PTE ONs under reducing condition.



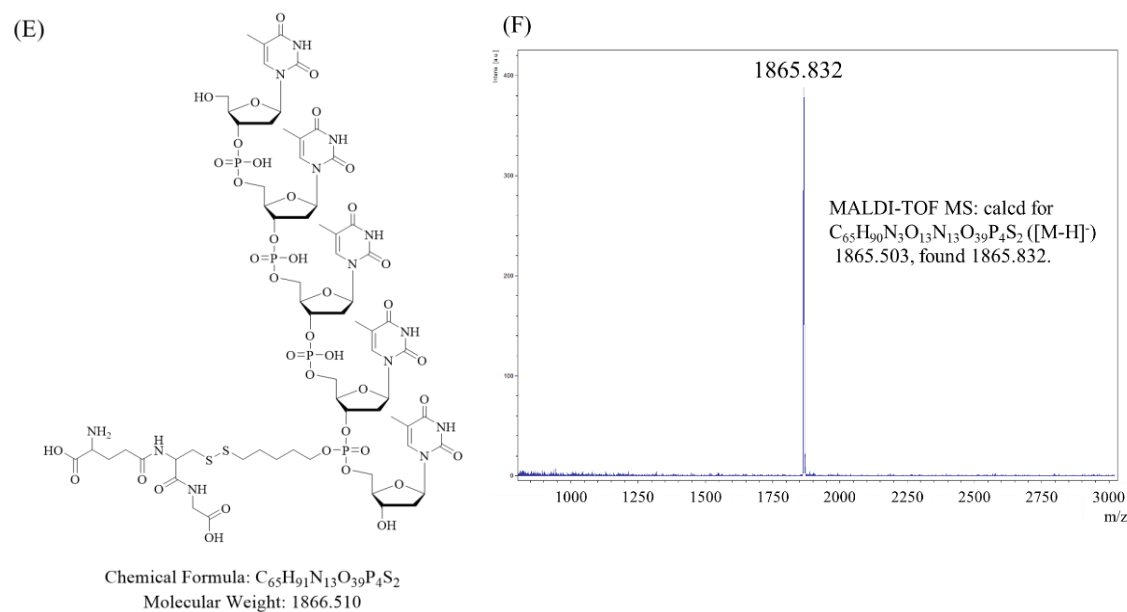


Fig. 9. Conversion reactions of prodrug type SS PTE ONs in an intracellular-mimetic reducing environment (10 mM GSH, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 37 °C). (A)–(D): HPLC analyses of conversion reactions of **ONs1–4**, (E): structure of the GSH adduct of **ON3**, (F) MALDI-TOF MS analysis of the GSH adduct of **ON3**.

得られたデータから prodrug type SS PTE ON の消失曲線と未修飾 ON の生成曲線を求めた。**Figure 10A** は変換反応中の **ONs1–4** の消失を示しており、細胞内を模倣した還元条件下で **ON4** >> **ON2** > **ON1** > **ON3** の順に速く反応することが確認でき、反応開始 10 h 後の prodrug type SS PTE ON の残存率は、それぞれ 32%, 63%, 72%, 85%であった。また、各 ON から生じた未修飾 ON に対する未反応の ON のピーク比から変換率をグラフ化したところ、その順序は **ON4** >> **ON2** ≈ **ON1** >> **ON3** であった (**Fig. 10B**)。

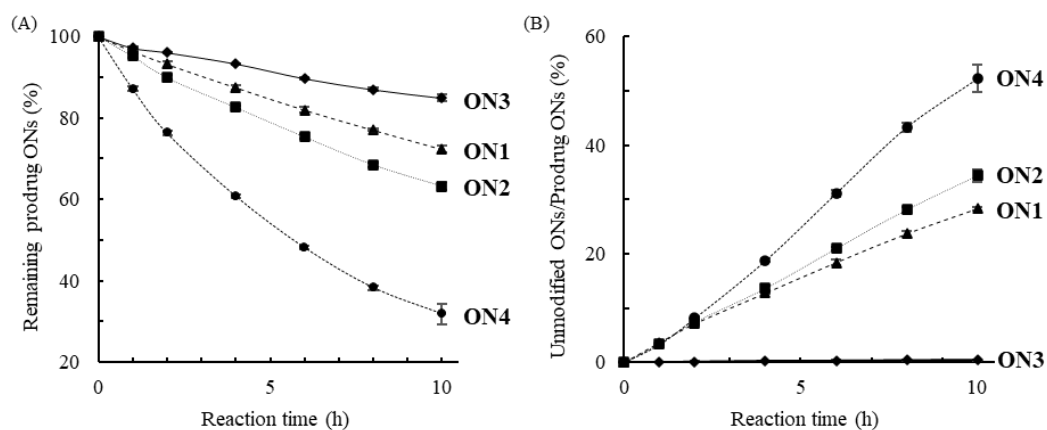
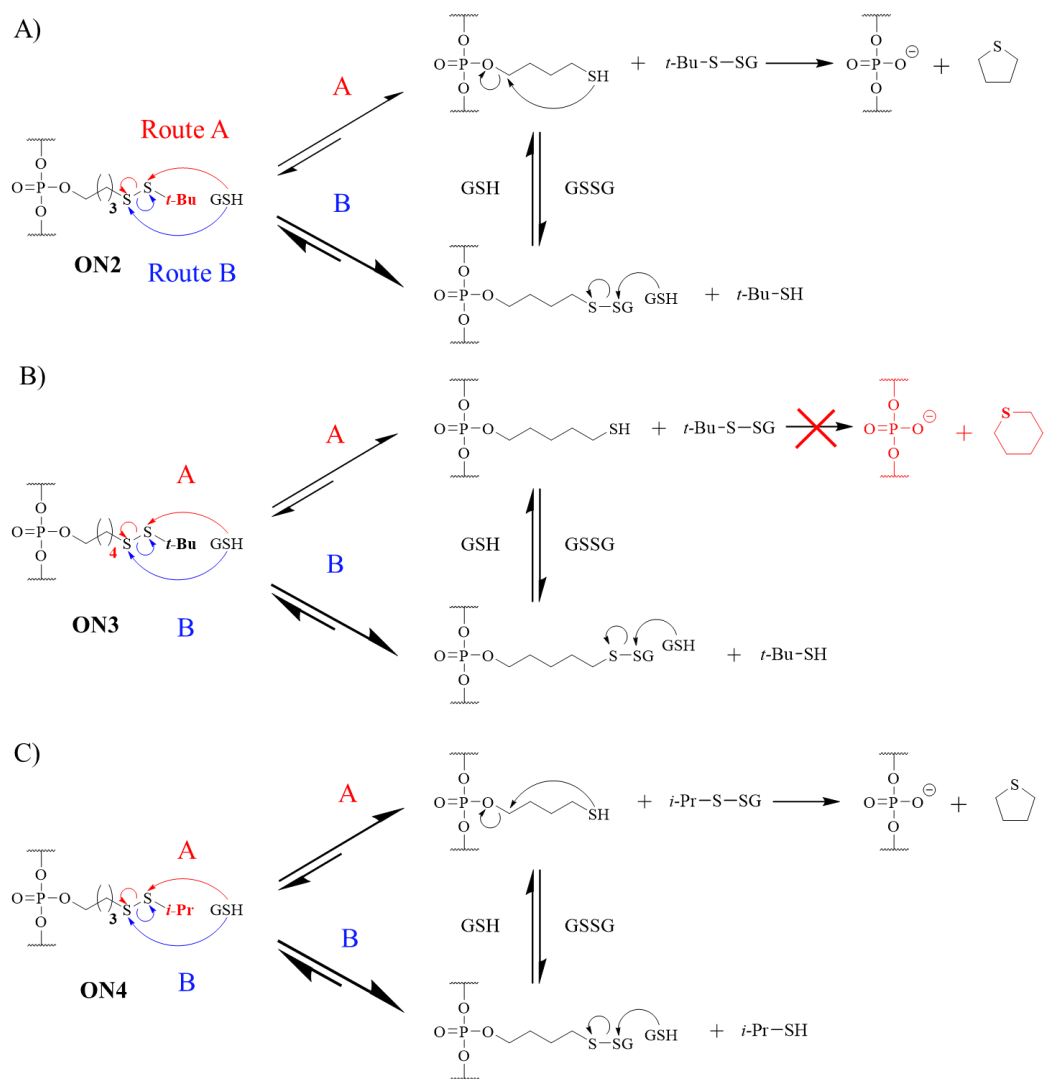


Fig. 10. Conversion reactions of prodrug type SS PTE ONs in an intracellular-mimetic reducing environment (10 mM GSH, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 37°C). The conversion reactions were analyzed by RP-HPLC periodically. Each data point is the average of three independent experiments. (A) Disappearance rates of **ONs1–4**. The standard deviations at 10 h are as follows: **ON1**: $\pm 0.5\%$, **ON2**: $\pm 1.2\%$, **ON3**: $\pm 0.1\%$, **ON4**: $\pm 2.5\%$. (B) Conversion rates of **ONs1–4** into **ON5**. Conversion rates were determined assuming the same molar extinction coefficients for prodrug **ONs1–4** as for unmodified **ON5**. The standard deviations at 10 h are as follows: **ON1**: $\pm 0.8\%$, **ON2**: $\pm 1.0\%$, **ON3**: $\pm 0.8\%$, **ON4**: $\pm 2.6\%$.

予想される **ONs2–4** の変換反応機構を **Scheme 7** に示した。まず、ジスルフィド末端に *tert*-butyl 基を有する **ON2** 及び **ON3** に関して考察する。**ON2** はジスルフィド結合の開裂後に Route A もしくは Route B を経由してチオール中間体となり、さらに環化反応によって未修飾の T 5-mer と 5 員環スルフィド化合物を生成して、変換反応が進行したものと考えられる (**Scheme 7A**)。一方で、**ON3** は反応開始 24 h 後も未修飾の T 5-mer を確認できず、反応が全く進行しないことがわかった (**Scheme 7B**)。この結果から、**ON2** はチオール中間体の環化反応によって 5 員環スルフィド化合物を形成したのに対して、**ON3** は 6 員環スルフィド化合物を形成速度が極度に遅いことが示唆され、これは第一章冒頭で紹介した環状スルフィドの形成速度に関する報告とよく一致する。³²⁾ よって、**ON3** のチオール中間体は **Scheme 7B** における右への反応が進行しないため、下への反応が進行し、GSH 付加体が蓄積したものと考えられる。また、**ON3** は *tert*-butyl 基のようなかさ高いアルキル基を有するため、立体障害の影響からアルキル基に隣接する硫黄原子に対して GSH が攻撃しづらく、Route B のように GSH が核酸側の硫黄原子に攻撃を行う傾向にあることも GSH 中間体が蓄積した要因と考えられる。次に、酸素原子と硫黄原子間の炭素数が 4 である **ON2** と **ON4** について比較する。**ON2** はジスルフィド末端に *tert*-butyl 基、**ON4** は isopropyl 基を有しており、変換速度は **ON4** >> **ON2** であることが確認できた。よって、**ON4** は **ON2** よりも立体障害の小さなアルキル基をジスルフィド構造に有するために、GSH の硫黄原子に対する攻撃を受けやすく、特に Route A のようにアルキル基側の硫黄原子に GSH が攻撃しやすくなるため、開裂反応が容易に進行し、変換速度が向上したと考えられる (**Scheme 7C**)。以上の結果から、我々は **ON4** のリン酸部修飾基である isopropylthiobutyl 基が、過去に報告した 6-membered cyclic SS PTE ON よりも、prodrug SS PTE ON として 2 倍程度高い変換速度を有することより、isopropylthiobutyl 基はプロドラッグ修飾として有望であると考えたので、次に性質評価を行うこととした。



Scheme 7. Putative mechanisms of conversion reactions of prodrug type SS PTE ONs under reducing condition.

小括

本章では、先行研究での 6-membered cyclic SS PTE 修飾 ON の課題である還元条件下での変換速度を改善するために、linear SS PTE 修飾 ON を分子設計し、合成検討を行った。まず、オリゴ合成に必要なホスホロアミダイトモノマーユニットに数種類の linear SS PTE 修飾を導入した。ジスルフィドを導入したホスホロアミダイトは P (III) 原子がジスルフィドを攻撃する傾向にあるため、化合物として不安定であることが予想されたが、モノマー合成の検討結果から、直鎖ジスルフィドを有するホスホロアミダイトが合成可能な安定性を得るためには、硫黄原子と酸素原子間に最低限 4 個の炭素原子が必要なこと、更にジスルフィド末端に 2 級以上のアルキル基を結合させる必要があることを明らかにすることができた。

次にモノマー合成が可能であると判明した 3 種類のプロドラッグ型修飾基、*tert*-butyldithiobutyl 基、*tert*-butyldithiopentyl 基、isopropyldithiobutyl 基をそれぞれ T 5-mer の 3' 末端側のリン酸基に導入した ON の合成を試みた。これらの ON は一般的な RNA の合成法と同様の手法及び条件で容易に得ることができた。

更に、得られた ON および 6-membered cyclic SS PTE 修飾 T 5-mer を、細胞内疑似的還元条件下で未修飾の T 5-mer への変換反応を行い、それらの変換能を比較した。結果として、ジスルフィド末端に isopropyl 基を導入し、酸素原子と硫黄原子間に 4 個の炭素原子を有する isopropyldithiobutyl 基が最も変換速度が速いことを明らかにした。

このことから、linear SS PTE 修飾は、ジスルフィド末端には立体障害の小さい官能基を導入し、環化反応においては 5 員環スルフィドを形成するような分子設計が望ましいことがわかった。本章では prodrug type SS PTE 修飾 ON の変換反応効率を調べることを目的として、得られた結果から反応機構に関する考察を行い、必要な化学的構造条件を見出すことができた。次節以降は、isopropyldithiobutyl 基による修飾をリン酸部に施した ON の生物学的特性を 6-membered cyclic SS PTE 修飾 ON と比較しながら評価していく。

第二章 鎖状ジスルフィドを有する PTE 修飾オリゴ核酸の機能評価

ここまで linear SS PTE ON の合成と 6-membered cyclic SS PTE ON を含めた各種 prodrug type SS PTE ON の変換速度の比較検討を行い、isopropylthiobutyl 基が ON の合成過程において十分な安定性を示し、更に本修飾を有する linear SS PTE ON が 6-membered cyclic SS PTE ON に勝る変換速度を示すことを明らかにした。

先行研究では、6-membered cyclic SS PTE 修飾 ON の血清中での安定性、細胞内取り込み能およびアンチセンス活性に関して評価した。その結果 6-membered cyclic SS PTE ON は未修飾の ON に比べて顕著に高い血清中での安定性を示し、トランスフェクション試薬なしで細胞内に導入可能であった。一方で抗ルシフェラーゼ配列中に修飾基を複数導入した 6-membered cyclic SS PTE AON はほとんどアンチセンス活性を示さなかった。

今回筆者が見出した linear SS PTE ON は 6-membered cyclic SS PTE ON と比較して変換速度が速いことから、本修飾を導入した AON であれば、細胞内で速やかに未修飾の AON へと変換され、アンチセンス活性を示すことが期待される。これらの背景を踏まえ今回設計した linear SS PTE ON の中でも特に変換速度の速かった isopropylthiobutyl 基をリン酸基に有する ON に焦点を当て、血清中での安定性、細胞内取り込み能およびアンチセンス活性に関して評価を行うこととした。

第一節 Linear SS PTE ON のヌクレアーゼ耐性および細胞取り込み能の評価

未修飾の ON は生体内で容易に切断されてしまうため、生体内での安定の向上は核酸医薬の臨床応用における重要な課題となっている。AON は、細胞内で標的となる mRNA と対合することによって作用を発揮するため、特に生体内のヌクレアーゼによる分解を防ぐ必要がある。緒論で示した通り、PTE 修飾は ON の酵素耐性を向上させることができる。先行研究では 6-membered cyclic SS PTE 修飾を ON に導入することで、未修飾 ON よりも血清中における安定性が飛躍的に向上することを明らかにしている。³⁰⁾ そこで、前章にて合成した linear SS PTE 修飾である isopropylthiobutyl 基を導入した ON についても、その血清中での安定性を 6-membered cyclic SS PTE ON および未修飾の ON と比較した。T 5-mer の 3'末端側のリン酸基に *trans*-5-benzyloxy-1,2-dithiane-4-yl 基を有する ON (ON1)、isopropylthiobutyl 基を有する ON (ON4)、および未修飾 ON (ON5) を、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) 中にて 37 °C で処理し、一定時間ごとの反応液を RP-HPLC で分析し、それぞれの ON のピーク面積から残存率を求めヌクレアーゼ耐性を評価した。作成したグラフより求めた ON1、ON4 および ON5 の消失半減期は、それぞれ約 100 min, 130 min, 27 min であり、ON1 および ON4 は ON5 の約 4-5 倍消失半減期が長く、さらに ON4 は ON1 に比べてやや安定であることが分かった (Fig. 11)。これらの結果から、linear SS PTE 修飾は 6-membered cyclic SS PTE 修飾と同等以上に、ON の血清中での安定性を向上させることを確認できた。

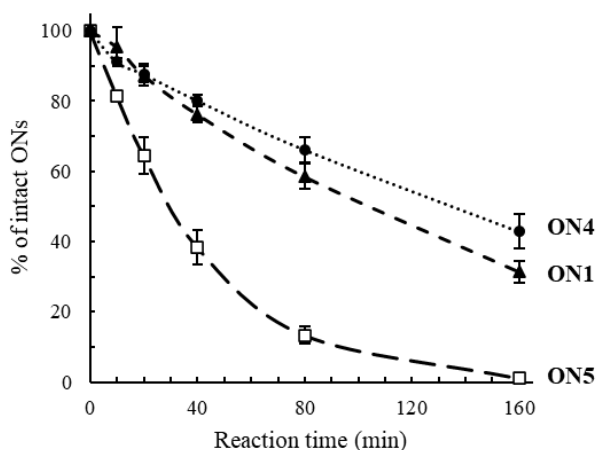


Fig. 11. Stability of prodrug type SS PTE ONs in 10% FBS. ▲: ON1, ●: ON4, □: ON5. 100 μM. ON1, ON4 and ON5 were treated with 10% FBS at 37 °C, and the reactions were analyzed by RP-HPLC.

またポリアニオン分子である ON は負電荷を帯びた細胞膜表面と電氣的に反発し、細胞膜を透過することができないため、ON 単独でアンチセンス効果を発揮することは困難である。一方 PTE 修飾は、リン酸部の負電荷が打ち消されて電荷的に中性となることで、脂溶性が向上し細胞内への取り込み量が向上すると考えられている。³⁵⁾

先行研究では、蛍光標識化した T 10-mer 中に、1-3 箇所 6-membered cyclic SS PTE 修飾を導入した ON を合成し、その細胞内取り込み能に関して評価した。その結果、トランスフェクション試薬を用いない場合、修飾数の増大に伴い細胞内取り込み能が向上し、T 10-mer 中に最低 2 箇所以上修飾基を導入した場合、細胞内で ON 由来と思われる蛍光が確認された。

そこで今回設計した linear SS PTE 修飾を導入した際にも ON の細胞内への取り込み能が向上するかを検討することを目的に、先行研究と同様に 3'-TAMRA 修飾によって蛍光標識した 3 種類の T 10-mer ON を、ホスホロアミダイト法にて合成した (Table 3)。T 10-mer 中に 3 か所の 6-membered cyclic SS PTE 修飾 (ON6)、linear SS PTE 修飾 (ON7) を有する ON、および未修飾 T 10-mer (ON8) をそれぞれ 5 μ M 含む DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 中で、A549 細胞を 7 h 培養し、培養後の細胞を CLSM で分析した。その結果、ON7 は ON6 よりわずかに弱い蛍光を示したが、両者とも未修飾の ON8 より顕著に強い蛍光を示した (Fig. 12)。このことから、linear SS PTE 修飾も 6-membered cyclic SS PTE 修飾と同様に ON の細胞内取り込み能を向上させる機能を有することが明らかになった。一方、本検討において、修飾 ON の細胞内分布をエンドソーム/リゾソームマーカーである LysoSensor Green を用いて評価したところ、ON6 および ON7 の蛍光シグナルは、LysoSensor Green と共局在していることが明らかとなった。このことからこれらの prodrug type SS PTE ON はエンドサイトーシス過程を経て細胞内に取り込まれることが示唆された。また RNase H は細胞質内に存在するため AON の作用発現のためには、これらの ON をエンドソームから放出する必要があることが考えられた。

Table 3. Sequences of prodrug type SS PTE ONs used for cellular uptake studies.

ON	Sequence (5' to 3') ^{a)}	MALDI-TOF MS [M-H] ⁻	
		Calcd.	Found
ON6	TTT TX ₁ T X ₁ TX ₁ T-TAMRA	4274.8	4275.9
ON7	TTT TX ₄ T X ₄ TX ₄ T-TAMRA	4088.9	4087.9
ON8	TTT TTT TTT T-TAMRA	3602.6	3604.1

a) **X₁** and **X₄** are the modification sites. **ON6**: *trans*-5-benzyloxy-1,2-dithiane-4-yl phosphotriester-modified T 10-mer, **ON7**: isopropylidithiobutyl phosphotriester-modified T 10-mer.

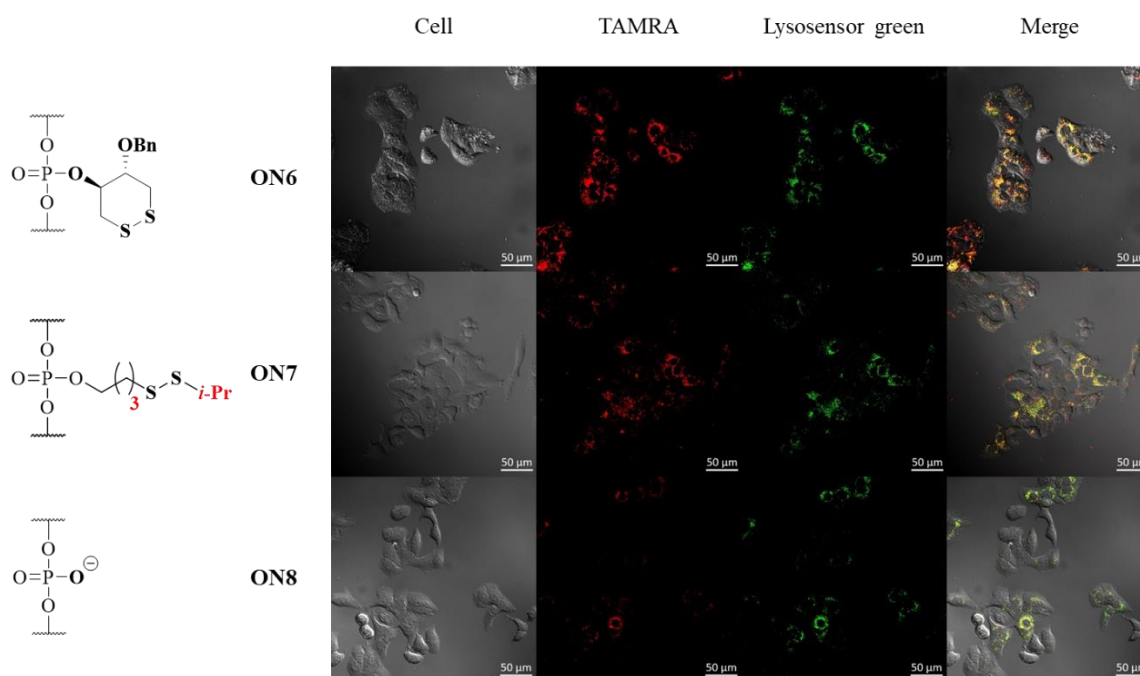


Fig. 12. Evaluation of cellular uptakes of prodrug type SS PTE ONs. 3'-TAMRA labeled **ONs6–8** at the concentration of 5 μM were incubated with A549 cells in FBS free DMEM without any transfection reagents for 7 h at 37 °C, and the fluorescence intensities of the cells were analyzed by CLSM.

第二節 アンチセンス活性評価系の構築

先行研究では、T 10-mer ON 中に 2 箇所以上の 6-membered cyclic SS PTE 修飾を導入することで、自発的な細胞内取り込み能を有していたことから、抗ルシフェラーゼ活性を有する 19-mer の配列に、6-membered cyclic SS PTE 修飾を 4 カ所導入した AON を用いてそのアンチセンス活性を評価した。³⁰⁾ 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) に対して CEM 法 (Ca²⁺ enrichment of medium) もしくはトランスフェクション試薬を用いない条件にて 1 μM の濃度の AON を導入し、72 h 後にルシフェラーゼ活性を測定した。CEM 法は、Obika らによって報告されたトランスフェクション法であり、高濃度の CaCl₂ を培地に添加することにより、様々な配列の AON において、その *in vitro* での活性と *in vivo* での活性が強い相関性を示すことから、高活性配列を有する AON 検出のための *in vitro* における 1 次スクリーニング法として注目されている。³⁶⁾ 当研究室においても、CEM 法が一般的なトランスフェクションの手法であるリポフェクション法と比較して、修飾 siRNA の修飾位置におけるノックダウン活性の変化の検出が可能になる方法であることを確認していたことから、²⁹⁾ 抗ルシフェラーゼ AON の活性評価においてはトランスフェクション法として CEM 法を用いている。結果として、CEM 法を用いた条件においても、汎用される PS 修飾 AON のアンチセンス活性は 70%程度と十分なものではなく、さらに 6-membered cyclic SS PTE 修飾 AON のアンチセンス活性は 20%程度であり、PS 修飾 AON よりも弱い活性を示すのみであった。また、トランスフェクション試薬を用いない条件においては、PS 修飾 AON および 6-membered cyclic SS PTE 修飾 AON のアンチセンス活性はほとんど消失し、その活性は、6-membered cyclic SS PTE 修飾の修飾数を 7 個まで増やした場合でも増強しなかった。³⁰⁾

本節では、linear SS PTE 修飾を導入した AON のアンチセンス活性を調べることを目的に先行研究での評価系の問題点の改善も含めて検討を行った。先行研究ではルシフェラーゼレポーターアッセイを行った際に、完全 PS 修飾 AON を導入した場合のみ、A549-Luc 細胞の細胞増殖阻害活性が見られ、このアッセイ法では AON 導入後の細胞数の差によってルシフェラーゼ発現量を正確に評価できていない懸念があった。そこで筆者は標的とする遺伝子を変更し、LDL-cholesterol 形成に重要な因子である apolipoprotein B (ApoB) をコードする ApoB mRNA の 10179 番目から 10192 番目の配列を標的とした AON によるアンチセンス活性を評価する評価系の構築を目指した。まず LNA 修飾等を導入した gapmer 型 AON によりアンチセンス活性を示すことが報告されている配列を用いて、³⁷⁾ LNA 修飾を導入しない non-gapmer 型 AON の場合に、PS 修飾の有無による AON のアンチセンス活性の比較を行った。AON の全てのリン酸部が

phosphodiester (PO) 構造もしくは PS 構造である AON を合成し、CEM 法にてヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞へ AON を導入し 24 h 後の ApoB mRNA 発現量を定量的逆転写 PCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction: RT-qPCR) にて分析したところ、どちらの AON も用量依存的なアンチセンス活性を示さなかった (**Fig. 13**)。通常 gapmer 型 AON は RNase H 依存的なアンチセンス活性を示すことから、gapmer 型 AON により活性が報告されている本配列においては、LNA 修飾が存在しない場合 mRNA との親和性が不十分でありその活性を示さないことが考えられた。

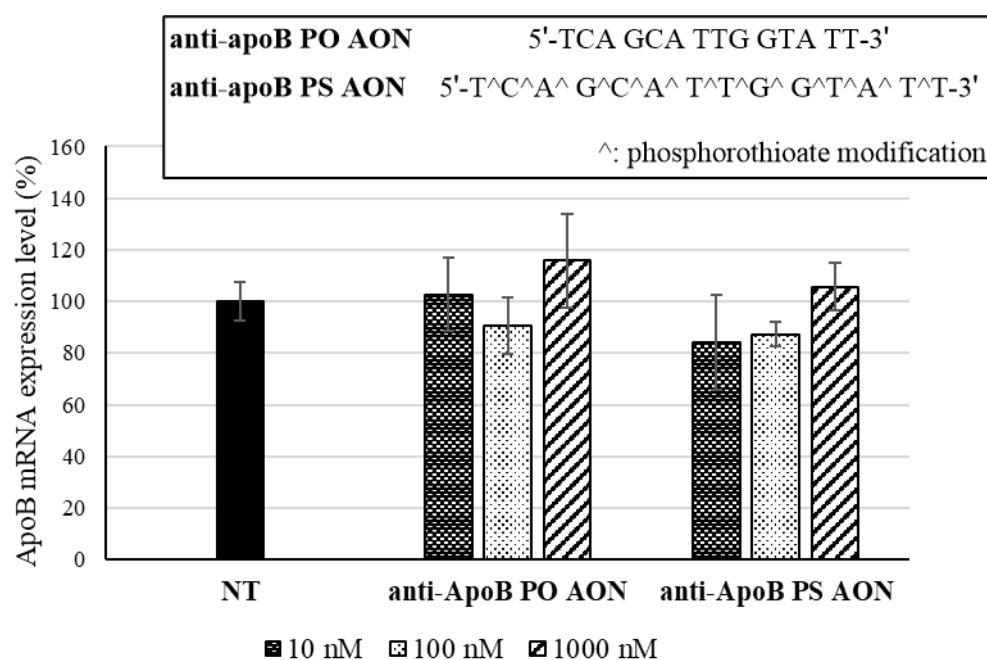


Fig. 13. Antisense activity of PO and PS ONs targeting an ApoB mRNA. Anti-ApoB AONs at the concentration of 10 nM, 100 nM or 1000 nM were transfected into HuH-7 cells by the CEM method.³⁶⁾ After 24 h incubation, the relative expression levels of ApoB mRNA to no treatment (NT) cells were quantitated by RT-qPCR.

この結果を踏まえ、次に LNA 修飾を施した gapmer AON の PS 修飾の有無によるアンチセンス活性の評価を試みた。Gapmer AON は、標的 mRNA と DNA/RNA 二本鎖構造を形成し、この二本鎖が主に細胞質内に存在する核酸分解酵素である RNase H と相互作用し RNA が切断されることで強力なアンチセンス活性を示す。この時標的 mRNA との親和性が重要となるため、親和性を向上させるために化学修飾の導入が必須と考えられている (**Fig. 14**)。⁷⁾ Gapmer AON の両末端から数塩基は wing 領域と呼ばれ、これらの箇所に RNA との親和性の

向上が期待できる 2'-*O*-methoxy (2'-OMe) 修飾 RNA、2'-*O*-methoxyethyl (2'-MOE) 修飾 RNA や架橋型核酸 (locked nucleic acid: LNA) などの化学修飾核酸を配置し、そして RNase H による認識能を維持するために gapmer AON の配列中央部である gap 領域に DNA を配置するのが一般的である。この時 gap 領域に糖部への化学修飾を導入すると、RNase H による認識が阻害され、アンチセンス活性が低下することが考えられるため、通常 gap 領域への糖部化学修飾の導入は避ける必要がある。一方通常の DNA 構造では、ヌクレアーゼ耐性が不十分なため全リン酸部を PS 修飾として用いられることが多い。

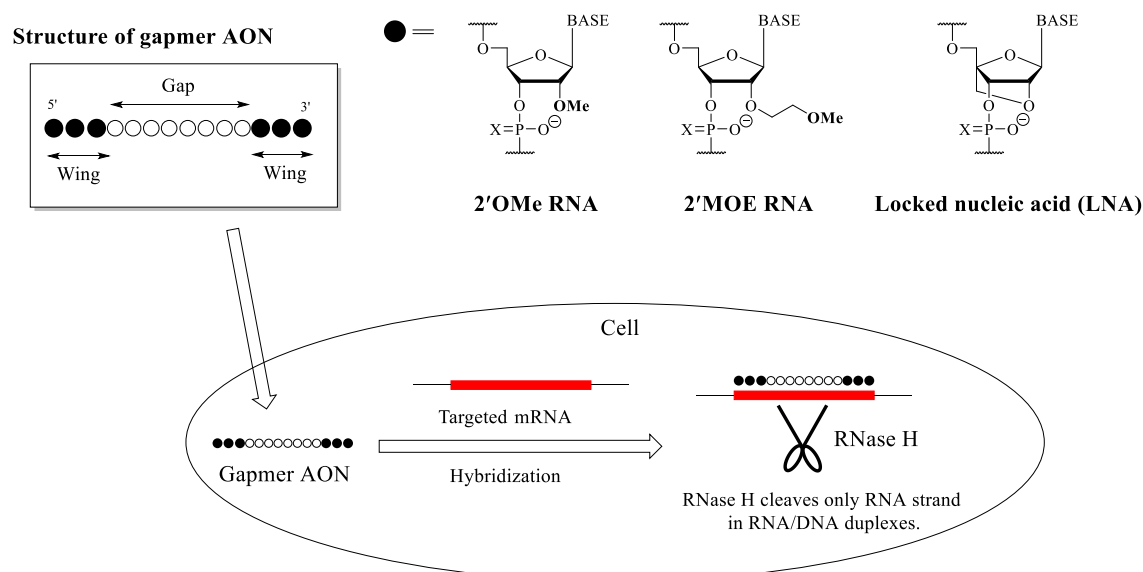


Fig. 14. Structure of gapmer AON and RNase H-dependent cleavage mechanism of targeted mRNA.

そこで ApoB 標的 AON に関しても、これらの設計を基本として wing 領域に 3 塩基ずつもしくは 4 塩基ずつ LNA を導入した gapmer AON の合成を行い、先述の anti-ApoB AON と同様の方法 (Fig. 13) で PS 修飾の有無によるアンチセンス活性を比較した (Fig. 15)。その結果、リン酸基が PO 構造となっている AON はほとんど活性を示さなかったのに対し (Fig. 15A)、PS 修飾を導入した AON は用量依存的なアンチセンス活性を示したため、PS 修飾はアンチセンス活性の発現において必須であることが分かった。特に wing 領域に 3 塩基ずつ LNA を導入した **W3 PS gap AON** が最も強い活性を示したことから (Fig. 15B)、これ以降の検討では、wing 領域に 3 塩基の LNA を導入した完全 PS 修飾 gapmer AON をベースに、プロドラッグ型 PTE 修飾 gapmer AON の活性評価を行うこととした。

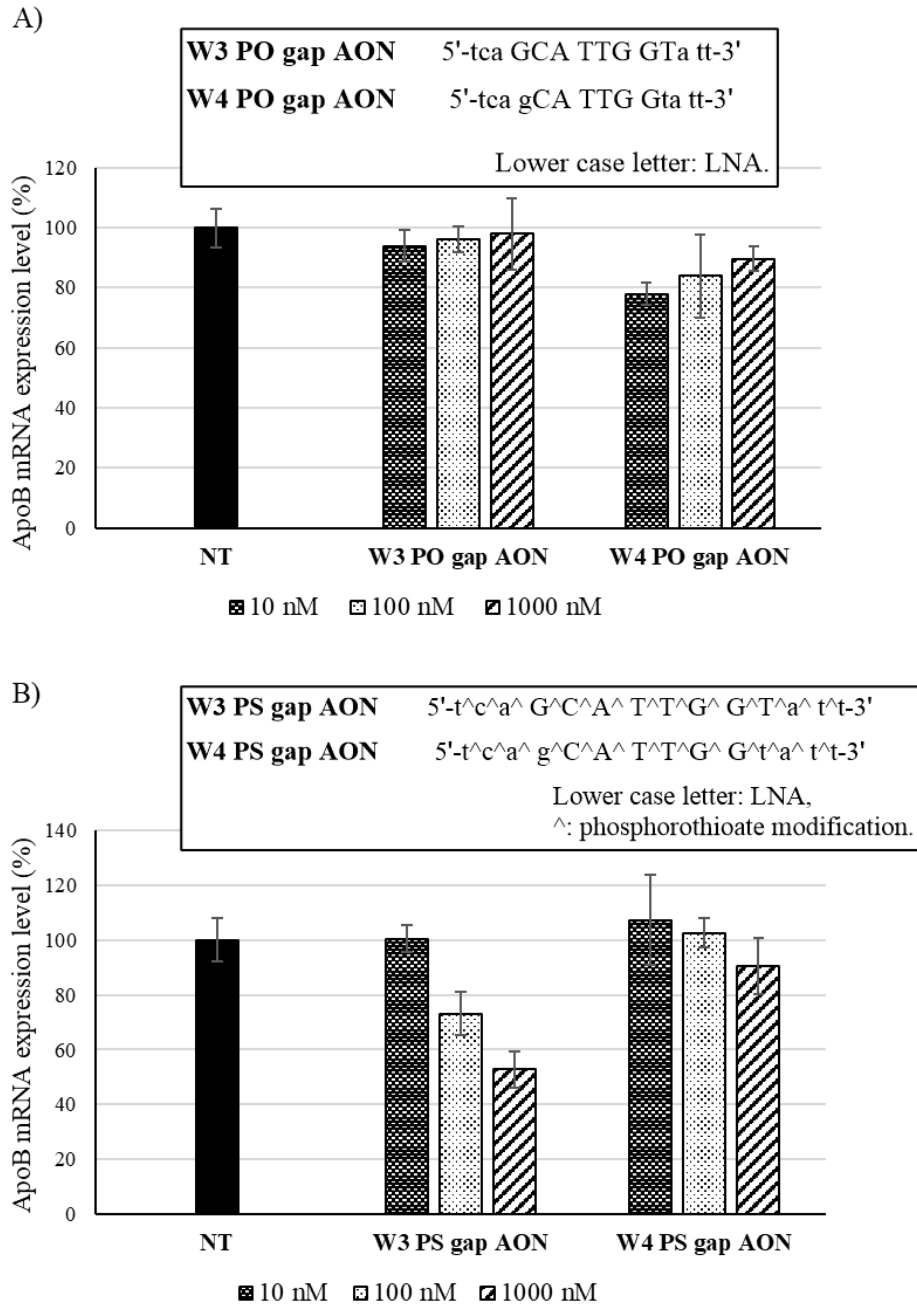


Fig. 15. Antisense activity of LNA-modified gapmer AONs targeting an ApoB mRNA. A) The activities of gapmer AONs with PO linkages. B) The activities of gapmer AONs with PS linkages. Anti-ApoB AONs at the concentration of 10 nM, 100 nM or 1000 nM were transfected into HuH-7 cells by the CEM method.³⁶⁾ After 24 h incubation, the relative expression levels of ApoB mRNA to no treatment (NT) cells were quantitated by RT-qPCR.

第三節 Prodrug type SS PTE gapmer AON の遺伝子発現抑制効果の評価

以上の予備検討の結果を基に gapmer AON の gap 領域に prodrug type SS PTE 修飾もしくは PS 修飾を施した prodrug type SS PTE gapmer を設計した (Fig. 16)。Gapmer AON の gap 領域への修飾基の導入は RNase H による認識を阻害するため、その活性が著しく低下することが考えられる。今回設計した prodrug type SS PTE gapmer では gap 領域へのプロドラッグ修飾の有無により、その活性が変化することが考えられるため、変換速度の差による活性変化を鋭敏に検出可能であると考えられる。また、AON の PTE 修飾を施していないリン酸部はヌクレアーゼ耐性を向上させるため、PS 修飾を施した。

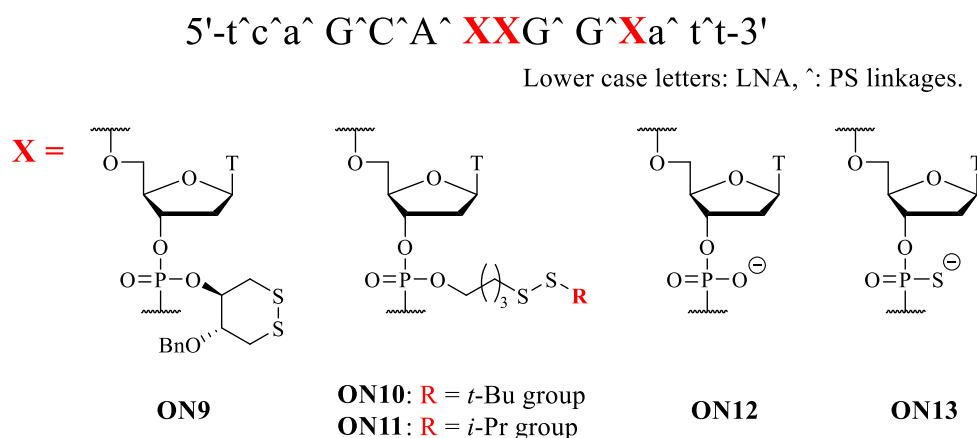


Fig. 16. Sequences and structures of anti-ApoB prodrug type SS PTE gapmer AONs and anti-ApoB gapmer AONs.

まず、ApoB 標的 gapmer AON の gap 領域の特定の 3 カ所のリン酸部に対して、6-membered cyclic SS PTE 修飾 (**ON9**), linear SS PTE 修飾 (*tert*-butyldithiobutyl group: **ON10**, isopropyldithiobutyl group: **ON11**), PO 構造 (**ON12**), PS 修飾 (**ON13**) をそれぞれ導入した (Fig.16)。この検討では、最も変換速度が速かった isopropyldithiobutyl 基を有する **ON11** に加え、isopropyldithiobutyl 基に比べて変換速度が顕著に遅い *tert*-butyldithiobutyl 基を有する linear SS PTE ON (**ON10**) 及び 6-membered cyclic SS PTE ON (**ON9**) も比較対象として評価に追加した。1 μ M の **ON9-13** を含む 10% FBS/DMEM 培地中で、CEM 法を用いて HuH-7 細胞に導入した後、一定時間培養後の ApoB mRNA の発現量を RT-qPCR によって分析した (Fig. 17)。AON を導入してから 12 h 後のアンチセンス活性は、全てのリン酸部に PS 修飾を施した **ON13** および変換後の部分 PO-gapmer **ON12** で 40%程度、2 種の linear SS PTE 修飾 gapmer **ON10** および **ON11** で 25%程度であったのに対して、変換反応が顕著に遅い 6-membered cyclic SS PTE gapmer **ON9** ではほとんど

アンチセンス活性を示さなかった。続いて 24 h 時点では、最も変換速度が速いと思われる **ON11** は **ON9** と **ON10** よりもわずかに強いアンチセンス活性を示し、48 h 時点では、**ON12** のみ顕著なアンチセンス活性の減弱が確認された。これは PO 構造を有する **ON12** では血清を含む培地中や細胞内などの安定性が十分でないことによるものであることが予想される。

このように、変換速度の遅いプロドラッグ修飾を有する 6-membered cyclic SS PTE gapmer である **ON9** は、linear SS PTE gapmer である **ON10** および **ON11** よりもアンチセンス活性の発現に長時間を要することがわかり、prodrug type SS PTE 修飾の変換速度がアンチセンス活性の発現に影響したことが示唆された。さらに、24 h 時点では、linear SS PTE gapmer である **ON10** と **ON11** では、変換速度の速い **ON11** がわずかに強いアンチセンス活性を示したことからも、変換速度がアンチセンス活性に影響を与えることが考えられた。一方で先の実験において還元条件下における変換速度は isopropylthiobutyl group > tert-butylthiobutyl group \geq 6-membered cyclic SS group であったことから、当初筆者は、細胞内では **ON11** の方が **ON10** よりも変換されやすいことで、それらの活性により顕著な差が見られることを予想していた。しかしジスルフィドに隣接するアルキル基のかさ高さが GSH 存在下での変換速度に与える影響は大きい一方で、同様の主骨格を有する 2 種の linear SS PTE gapmer AON では、隣接アルキル基のかさ高さが与えるアンチセンス活性への影響は限定的であった。Bradshaw らは、同様のプロドラッグ修飾を有する 2'-fluoro siRNA が、同程度の遺伝子発現阻害効果を示すことを報告しているが、³⁸⁾ それらのプロドラッグ型修飾基の変換速度については報告されていない。**ON10** と **ON11** のアンチセンス活性に関する我々の検討結果は、siRNA 活性に関する彼らの検討結果とよく一致しており、ジスルフィド結合に隣接するアルキル基のかさ高さが、*in vitro* でのアンチセンス活性に与える影響は限定的である可能性を示している。細胞内では、一連のチオール-ジスルフィド酸化還元酵素など、GSH 以外のジスルフィド基の還元機構も働いていることから、2 種類の linear SS PTE 修飾 ON (**ONs10, 11**) のジスルフィド還元反応は同様の速度で進行し、同等の活性を示した可能性があるため、今後これらの詳細に関しても検討予定である。³⁹⁾

本検討では、前節で確立した gapmer AON を用いた実験系を利用することで、prodrug type SS PTE 修飾を施した場合においてもアンチセンス活性を有することを明らかにした。さらに、アンチセンス活性の経時変化から、6-membered cyclic SS PTE gapmer AON より linear SS PTE gapmer AON の方がアンチセンス活性を速く発現することが分かった。

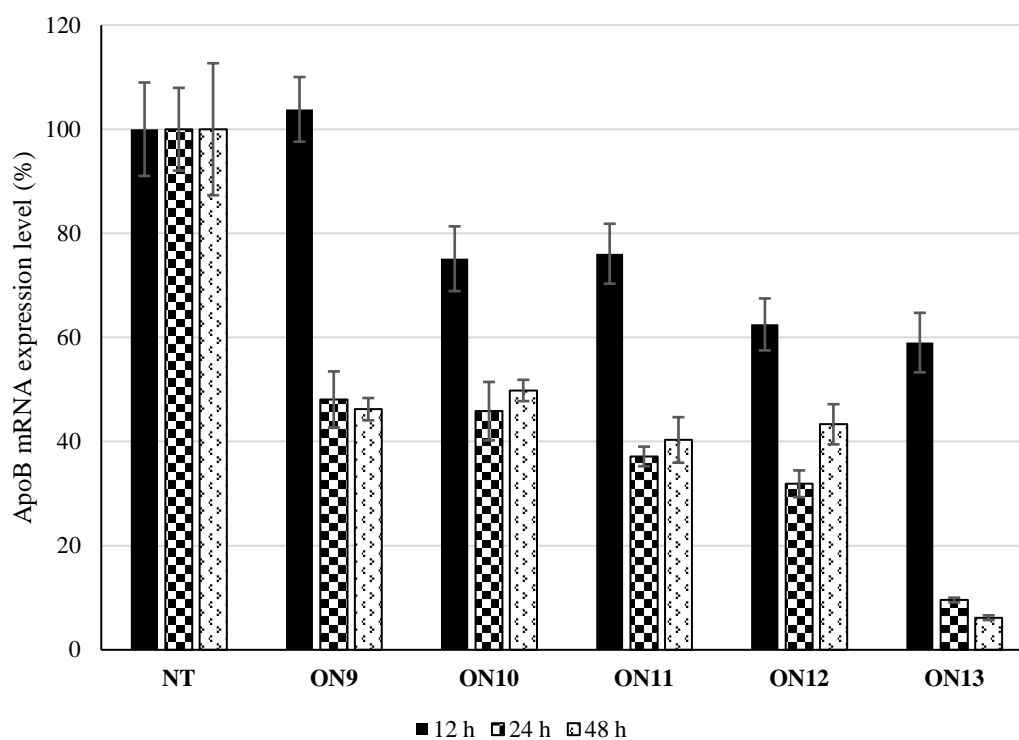


Fig. 17. Antisense activity of anti-ApoB prodrug type SS PTE gapmer AONs and anti-ApoB gapmer AONs. **ONs9–13** at the concentration of 1 μ M. AONs were transfected into HuH-7 cells by the CEM method.³⁶⁾ After 12, 24, and 48 h incubation, the relative expression levels of ApoB mRNA to no treatment (NT) cells were quantitated by RT-qPCR.

小括

本章では、isopropylthiobutyl 基を有する linear SS PTE 修飾を施した ON について、6-membered cyclic SS PTE 修飾 ON と比較しながら性質評価を行った。

まず、isopropylthiobutyl 基を有する linear SS PTE 修飾 ON についてヌクレアーゼ耐性および細胞内取り込み能に関する検討を行ったところ、6-membered cyclic SS PTE 修飾 ON と同様に、非修飾 ON に比べてヌクレアーゼ耐性および細胞内取り込み能を飛躍的に改善することが明らかになった。

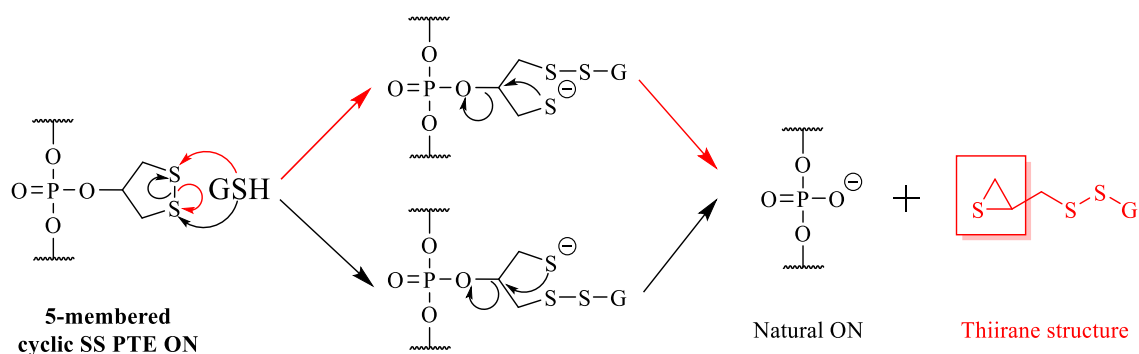
次に、prodrug type SS PTE 修飾を AON に導入した際に、prodrug type SS PTE 修飾の変換速度がアンチセンス活性に与える影響を調べることを目的として、prodrug type SS PTE AON の分子設計、合成および活性評価を行った。Wing 領域に 3 塩基ずつの LNA 修飾を配置し、配列中の全てのリン酸基を PS 化した AON を基本構造として、linear SS PTE 修飾もしくは 6-membered cyclic SS PTE 修飾を gap 領域に施した gapmer AON の活性を評価した。その結果、変換速度の遅い 6-membered cyclic SS PTE AON ではアンチセンス活性発現に 24 h 以上要したのに対し、linear SS PTE AON では 12 h 時点から活性を示し、プロドラッグの変換速度がアンチセンス活性に影響を及ぼしていることが示唆された。また *tert*-butylthiobutyl 基と isopropylthiobutyl 基を有する **ON10** と **ON11** のアンチセンス活性の比較から、ジスルフィドに隣接するアルキル基のかさ高さがアンチセンス活性に与える影響は限定的であり、SS 結合が開裂後の変換反応がアンチセンス活性により大きな影響を与えていることが考えられた。

以上のことから、変換速度がアンチセンス活性に影響を及ぼす可能性があることが確認できたため、次章では linear SS PTE 修飾に比べて更なる変換速度の向上が期待できる新規 prodrug type SS PTE 修飾の開発に取り組むこととした。

第三章 5員環ジスルフィドを有する PTE 修飾アンチセンス核酸の開発

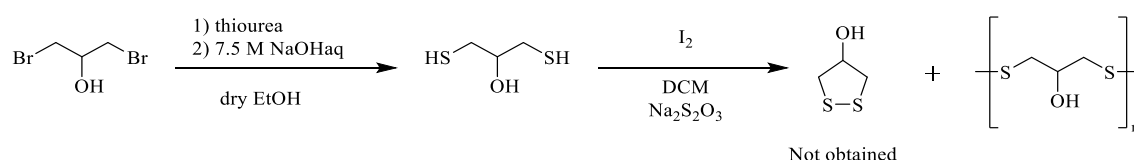
我々は prodrug type SS PTE ON の還元条件下での変換速度の向上を目的に、先行研究で報告された 6-membered cyclic SS PTE ON よりも変換速度が速い isopropylthiobutyl 基を含む linear SS PTE ON を開発した。また、これらの prodrug type SS PTE 修飾を施した AON のアンチセンス活性を評価し、変換速度がアンチセンス活性の発現に影響を及ぼす傾向にあることを明らかにした。そこで、更なる変換速度の向上を求めて、5員環ジスルフィドを有するプロドラッグ型 PTE 修飾 ON (5-membered cyclic SS PTE ON) の開発に取り組んだ。

5-membered cyclic SS PTE ON の分子設計について説明する。第一章でも述べたように、prodrug type SS PTE ON はジスルフィドの開裂反応と生じたチオールが環化反応の二段階の反応を経て進行していると考えられる。そして、6-membered cyclic SS PTE ON は第一章冒頭で説明した通り、GSH がジスルフィド結合のどちらの硫黄原子を攻撃するかによって、チオール生成後の環化反応の反応速度が変化することが考えられる (Scheme 3A)。一方で、5-membered cyclic SS PTE ON は 6-membered cyclic SS PTE ON とは異なり、ジスルフィド結合の開裂反応の後、GSH がどちらの硫黄原子を攻撃した場合でも、3員環スルフィドの形成を介した変換反応が進行すると考えられる。また、第一章での変換反応の検討から、環化反応の際に 6員環スルフィドよりも 5員環スルフィドの方が容易に形成し変換反応が進行したこと、5員環スルフィドよりも形成が速い 3員環スルフィドを形成する分子設計とすることで、変換速度が 6-membered cyclic SS PTE ON および linear SS PTE ON より速くなることが期待できる (Scheme 8)。



Scheme 8. Putative mechanism of conversion reactions of 5-membered cyclic SS PTE ON under reducing condition.

しかしながら、5 員環ジスルフィド構造は-C-S-S-C結合の二面角ひずみが大きいことから化学的に非常に不安定であることが知られている。⁴⁰⁾ ジスルフィド化合物はそれぞれの構造によって、-C-S-S-C結合の二面角が顕著に異なり、例えば、最も安定な直鎖ジスルフィドは-C-S-S-C結合の二面角は約 90°であり、比較的安定な環状ジスルフィドである 6 員環ジスルフィドの二面角は約 60°であるのに対し、5 員環ジスルフィドの場合は約 35°にまで制限される。この二面角が小さいほど、2 つの硫黄原子上の非共有電子対を収容した p 軌道同士が重なり合うため、反発が生じて不安定になる。そのため、二面角が約 35°である 5 員環ジスルフィドは開環してより安定な直鎖ポリジスルフィドに重合する傾向がある。実際に、**Scheme 9** に示した合成経路にて筆者は無置換 5 員環ジスルフィドの合成を検討したが、目的物は得られず、ジスルフィドポリマーと考えられる化合物の生成が確認できた。

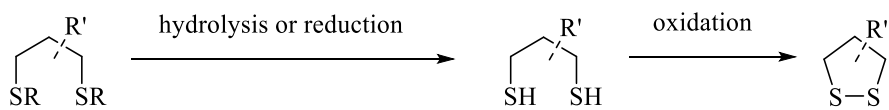


Scheme 9. Preliminary experiments for the synthesis.

最近、Scheutz らは phenyl 基や dimethyl 基のような置換基を 5 員環ジスルフィド上に導入することで、ジスルフィドの安定性が向上することを報告した。⁴⁰⁾ さらに、従来の 1,2-dithiolane 誘導体の合成法はチオエーテルを還元もしくは加水分解してジチオールにした後に、ジチオールを酸化させ、ジスルフィド体を得るといった二段階の反応であったが (**Scheme 10A**)、Scheutz らはチオエーテルを臭素によって酸化させ、直接ジスルフィド体を高収率で合成することに成功している (**Scheme 10B**)。筆者は本合成法を用いて、化学的な安定性を有する 5 員環ジスルフィドを合成可能であると考えた。また、その ON について、疑似的細胞内還元条件下での変換反応を行い、6-membered cyclic SS PTE 修飾 ON と比較した。

A) Conventional synthesis

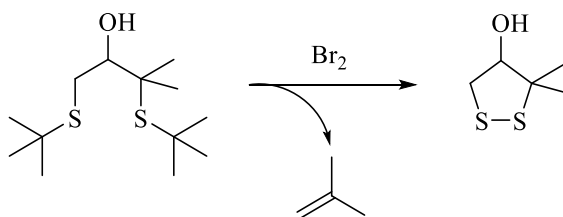
2 step reaction



R = Ac, CN, Bn, *etc.*

B) New synthesis

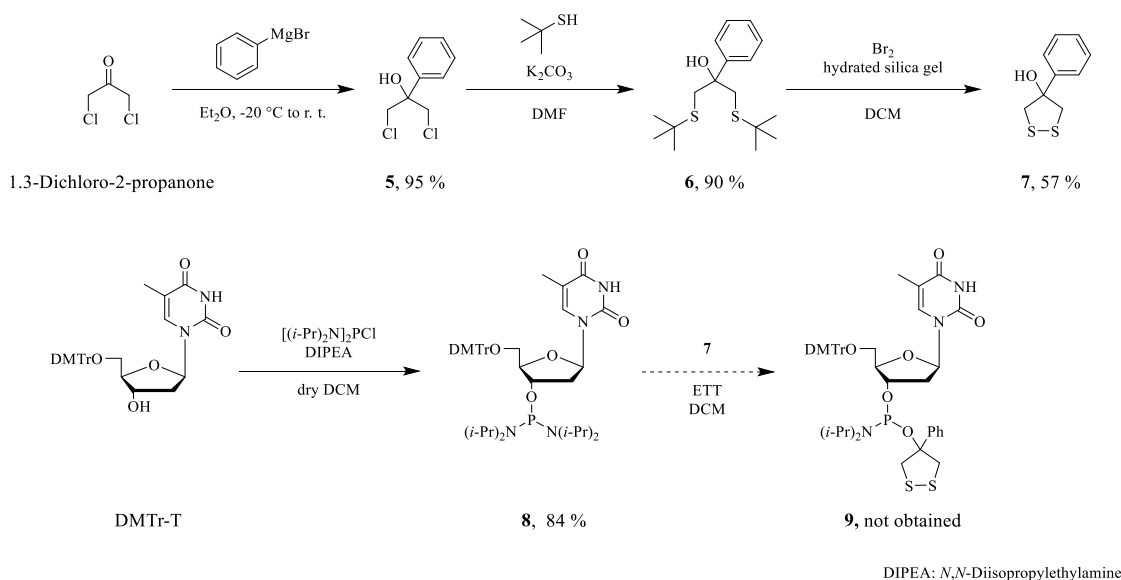
1 step reaction



Scheme 10. Syntheses of substituted 1,2-dithiolane analogs.

第一節 5-membered cyclic SS PTE phosphoramidite の合成

Scheutz らが合成した 5 員環ジスルフィド誘導体の中から、高収率で得ることに成功している phenyl 基を 4 位に導入した 5 員環ジスルフィド体 **7** を同様の方法で合成し、さらに **7** を用いてホスホロアミダイト **9** の合成を試みた (Scheme 11)。1,3-dichloro-2-propanone を出発物質として、Grignard 反応により phenyl 基を導入し、ジクロロアルコール **5** を合成した。次に **5** に *tert*-butylthiol を塩基条件下で反応させ、チオエーテルである **6** を得た後、臭素を作用させ、5 員環ジスルフィド体 **7** を 57% の収率で得た。その後 DMTr-T と bis(diisopropyl-amino)chlorophosphine を反応させることで得たジアミダイト **8** と 5 員環ジスルフィド体 **7** を ETT 存在下で反応させ ^{31}P -NMR によって反応の進行を確認した。その結果 140–150 ppm 付近にシグナルが出現すると考えられるアミダイト体 **9** の生成は確認できず、13 ppm 付近のシグナルが確認された (Fig. 18)。これは反応系中に微量に含まれる水分子によって **8** のリン酸部が攻撃され生成した *H*-phosphonamidate であると予測した。そこで反応系中の無水度を向上させるために、モレキュラーシーブ共存下での反応も試みたが、目的とする **9** は得られなかった。これらのことから容易に合成できる 5 員環ジスルフィド **7** は 3 級アルコールであるため、立体障害により基質として適切でないことが考えられた。



Scheme 11. Synthesis of the phosphoramidite containing 4-phenyl-1,2-dithiolane-4-yl group.

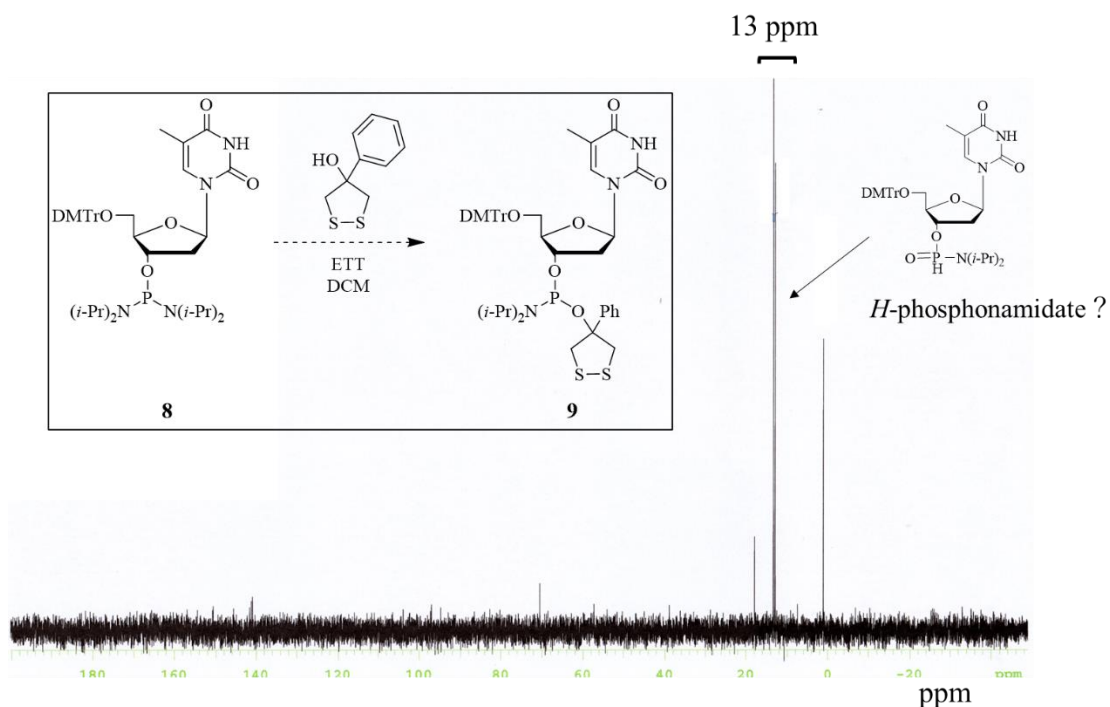
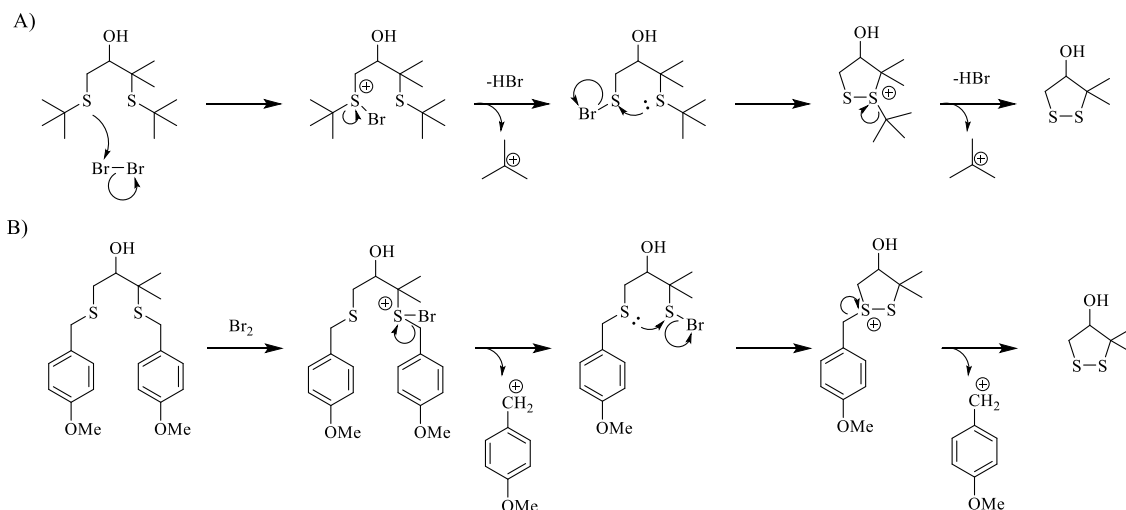


Fig. 18. ^{31}P NMR spectrum of the coupling reaction mixture of compounds **8** with **7** in the presence of ETT activator.

過去の6員環ジスルフィドを導入したホスホロアミダイトの合成検討では、6員環ジスルフィドユニット中の2級アルコールを上記と同様の方法にてアミダイトに導入することに成功していた。そこで5員環ジスルフィドの3位にdimethyl基を置換した5員環ジスルフィド体**13**を2級アルコールとして導入したホスホロアミダイト**14**の合成を試みた (**Scheme 13**)。さらに、Scheutzらの合成法では、5員環ジスルフィドの合成前駆体としてdi-*tert*-butylthioether体を用いていた。この化合物の合成には悪臭の強い*tert*-butylthiolを用いる必要性があったため、特に大量合成には不向きと考え合成法の改善にも取り組んだ。

Scheutzらによるdi-*tert*-butyl thioether体から5員環ジスルフィドが形成される反応の予測される反応機構を**Scheme 12A**に示す。本反応ではthioether中の硫黄と臭素の反応によりbromosulfoniumが形成し、その後、脱離反応、引き続く環化反応を経て5員環ジスルフィドを形成すると考えられている。Scheutzらは反応液中で1,2-dibromo-2methylpropaneおよび2-bromo-2-methylpropaneが副生していることを確認しており、脱離反応が進行することでイソブチレンが生成し、これが反応液中の未反応の臭素および副生するHBrとそれぞれ反応することで生じたと提唱している。またこれらの臭素付加体は反応性に富むことから、彼らは反応液中にシリカゲルを共存させておくことで、これらの副生成物を補足し収

率を改善することに成功している。一方でシリカゲルを反応系中に共存させる方法は一般的でなく、反応中に中間体などがシリカゲルに吸着することで、十分に反応が進行しないことなどが懸念される。

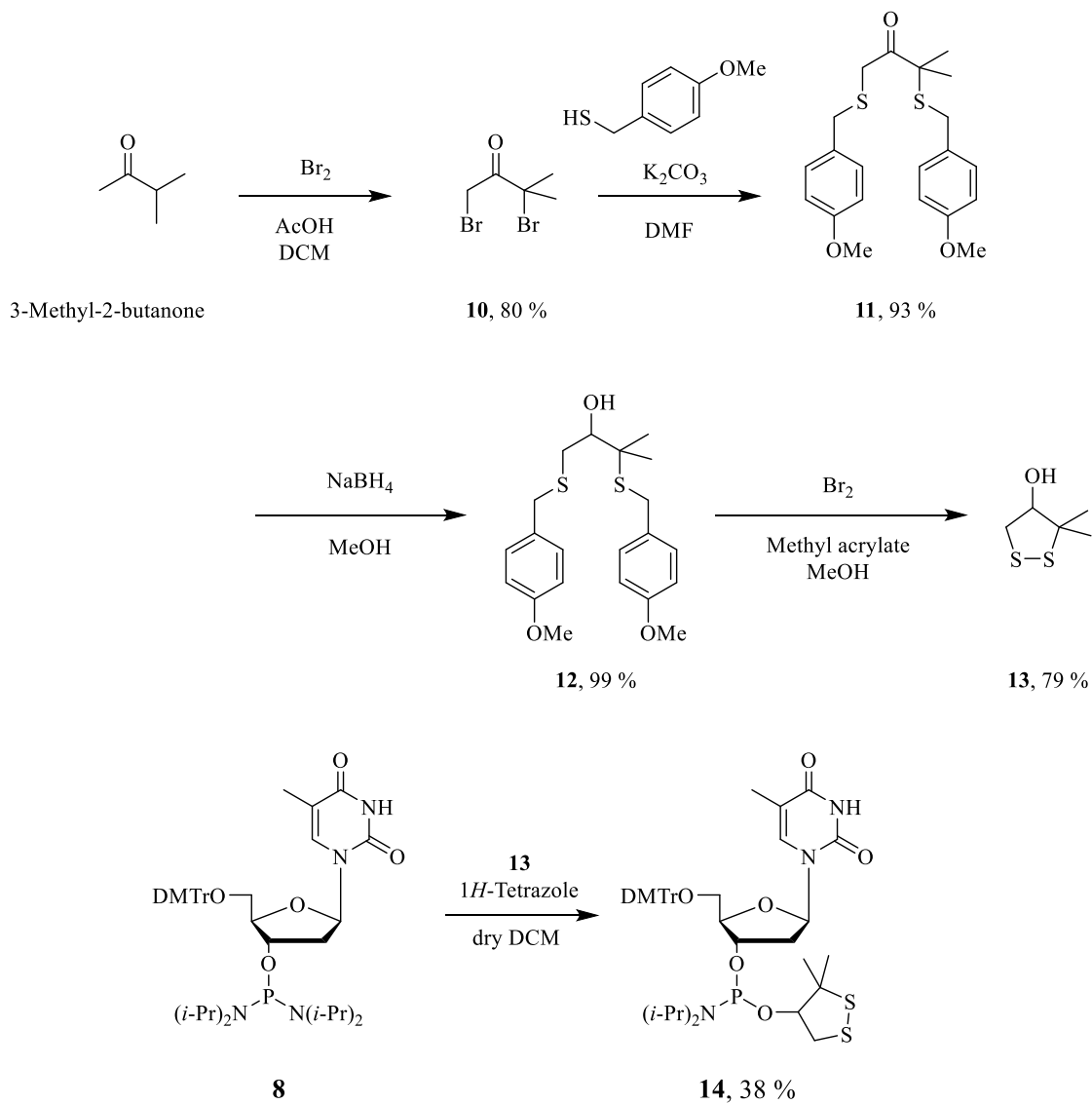


Scheme 12. Putative reaction mechanism of the formation of the 5-membered cyclic disulfide. A) Reported by Scheutz *et al.*,⁴⁰⁾ B) developed by author.

筆者は本反応機構を参考に、反応の進行において 3 級アルキルを用いた脱離反応を利用している点、反応液中には HBr が副生する条件下で反応が進行している点から、本反応条件において E1 脱離反応により進行していると考えられることから、 E1 反応の進行により **benzyl cation** が生成可能であり、より臭気の弱いチオールを用いて合成可能な **di-4-methoxybenzylthioether** 体を 5 員環ジスルフィドの合成前駆体として用いる合成法を考案した (**Scheme 12B**)。

Scheme 13 に示したように、3-methyl-2-butanone を α -臭素化してジブロモケトン体 **10** を合成し、さらに 4-methoxybenzylthiol を反応させることで、チオエーテル **11** を収率 93% で得た。また、**11** の合成は 14 mmol スケールでの合成が可能であったことから、悪臭の問題は解決したといえる。その後、 NaBH_4 を用いて **11** のカルボニル基を還元し、得られたアルコール **12** に臭素を作用させることでジスルフィドを形成させ、5 員環ジスルフィド **13** を 3-methyl-2-butanone から 4 工程にて収率 58% で合成することができた。Scheutz らは 4 工程、収率 24% であったことから、収率の改善にも成功したといえる。この際、反応液中に副生すると考えられる 4-methoxybenzyl cation は溶媒である MeOH により捕捉されることで、目的とする **13** と cation との逆反応を抑制することに成功している。得られた **13** とジアミダイト **8** を 1H-tetrazole を活性化剤として用いてカップリングさせた。予想通り、反応させる基質を 2 級アルコールとすることで反応性は向上し、

反応液中の ^{31}P NMR でも目的物と思われる 140–150 ppm 付近のアミダイト体 **14** と思われるシグナルが確認され (Fig. 19)、目的とするホスホアミダイト **14** を 38%の収率で得ることに成功した。



Scheme 13. Synthesis of the phosphoramidite containing 3,3-dimethyl-1,2-dithiolane-4-yl group.

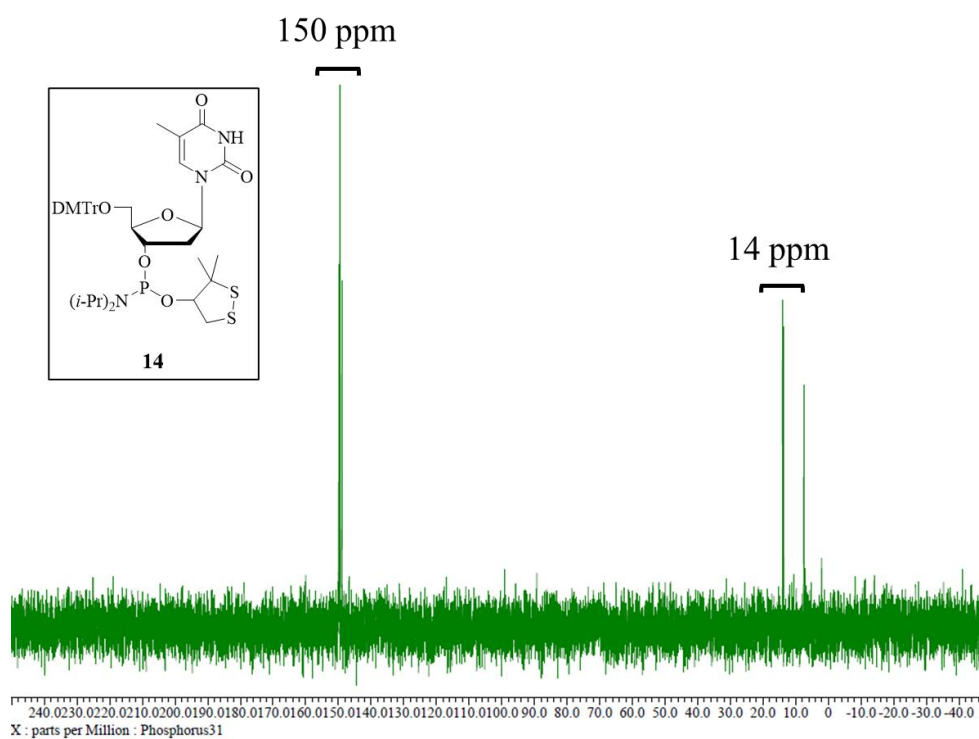


Fig. 19. ^{31}P -NMR spectrum of the coupling reaction mixture of compounds **8** with **13** in the presence of ETT activator.

第二節 5-membered cyclic SS PTE ON の合成および還元条件下での変換反応

5 員環ジスルフィドを有する prodrug type SS PTE ON の還元環境下における変換反応速度を調べることを目的に、まず 3'末端側のリン酸基に prodrug type SS PTE 修飾を導入した T 5-mer (**ON14**) の合成を行った (Table 4, Fig. 20)。ON14 は前節で合成したホスホロアミダイトを用いて、第一章に示した合成法と同様に DNA 合成機を用いたホスホロアミダイト法によって合成した。

Table 4. Sequence and analysis by MALDI-TOF MS of synthesized ONs.

ONs	Sequence (5' to 3') ^{a)}	Yield (%)	Formula	MALDI-TOF MS [M-H] ⁻	
				Calcd.	Found
ON14	d(TTT X ₅ T)	15	C ₅₅ H ₇₄ N ₁₀ O ₃₃ P ₄ S ₂	1590.2	1590.5

a) **X**₅ is the modification site. **ON14**: 3,3-dimethyl-1,2-dithiolane-4-yl group phosphotriester-modified T 5-mer.

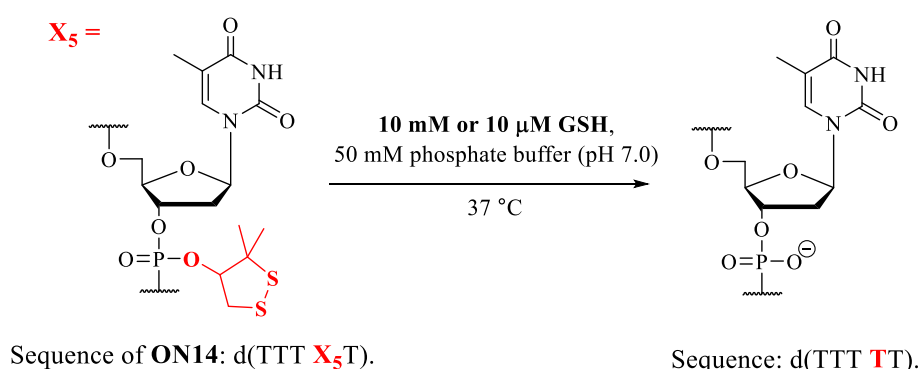


Fig. 20. Conversion reaction of 5-membered cyclic SS PTE ON under reducing condition.

次に **ON14** を用いて 5 員環ジスルフィドを有する prodrug type SS PTE ON の変換速度の評価を行った (Fig. 20)。第一章第三節と同様に 10 mM GSH, 37 °C, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) の条件下で、**ON14** を反応させ、反応液を HPLC により分析した。その結果、GSH を添加直後にプロドラッグ体が完全に未修飾体へと変換されていることが確認でき、予想どおり prodrug type SS PTE ON の変換速度を著しく向上させることに成功した (Fig. 21A)。一方で、本プロドラッグ体は、細胞外と同等の低濃度 GSH (10 μM) 条件下でも変換反応が進行し、反応開始 24 h の時点で 38%のプロドラッグ体 (**ON14**) が未修飾体へと変換されてしまうことが分かった (Fig. 21B)。

これらの結果から、今回設計した 5-membered cyclic SS PTE ON はジスルフィド結合の開裂後に 3 員環スルフィド形成を介して変換反応が速やかに進行することで、飛躍的に変換速度が向上したと考えられた。一方で、5-membered cyclic SS PTE ON は細胞外を模した環境条件では安定性が低く、細胞内に移行する前に未修飾 ON に変換されることが懸念されるため、今後、低濃度 GSH 条件下では安定な分子設計を行う必要がある。

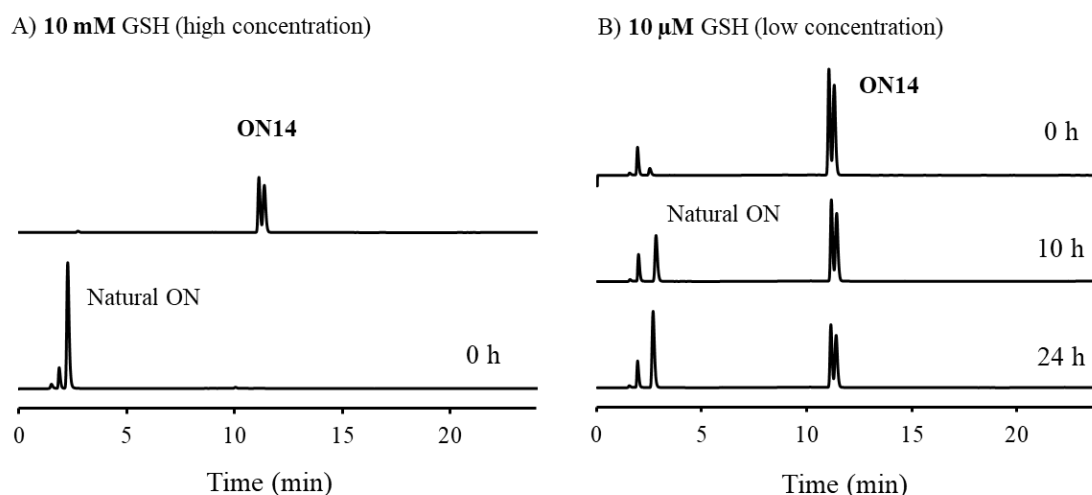


Fig. 21. HPLC analyses of conversion reactions of 5-membered cyclic SS PTE ONs in an intracellular- or extracellular-mimetic reducing environment (10 mM GSH (A) or 10 μM GSH (B), 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 37 °C).

小括

本章では、5 員環ジスルフィドを有するプロドラッグ型 PTE 修飾 ON の合成と、還元条件下でのそれらの変換反応について検討した。

まず、今回筆者が改良した方法を用いて 5 員環ジスルフィド分子の合成検討を行った。Scheutz らの報告した di-*tert*-butylthioether 体を用いる合成経路では **13** を 3-methyl-2-butanone から 4 工程、収率 24%程度でしか得られていない。一方筆者は独自に考案した di-4-methoxybenzylthioether 体を用いる合成経路では、同化合物を 4 工程にて収率 58%で得ることに成功しており、その収率を大幅に改善できた。特に Scheutz らの合成法では **11** の合成時に反応性の乏しい 3 級チオールである *tert*-butylthiol を 4 当量も用いる必要があり、過剰な未反応の試薬が悪臭につながるため、その取扱いが煩雑であった。一方筆者が考案した方法では、**11** 合成時に 4-methoxybenzylthiol をほぼ当量の 2.2 当量用いるだけでも、速やかに反応が進行し、基質自体の臭気の弱さだけでなく、より取り扱いが容易な合成方法として有用であると考えられる。さらに第一節で述べたように 3 級アルコールを有する 5 員環ジスルフィドからホスホロアミダイトを得ることは困難であったが、2 級アルコールを反応基質として用いることで、目的とする 5 員環ジスルフィドを導入したホスホロアミダイトの合成に成功した。

得られたホスホロアミダイトを用いて、前章と同様の方法にて 5 員環ジスルフィドを有する ON を合成することに成功した。本プロドラッグ型 ON は、飛躍的な変換速度の向上は認められたが、還元的条件下で極めて不安定で、細胞外を模した低濃度 GSH (10 μ M) 条件下でも変換が緩やかに進行し、期待した応答性を保持していないことから、5 員環ジスルフィド構造を最適化して、細胞外での安定性を保持したプロドラッグ型 ON の開発に取り組む必要がある。

結論

本論文では、細胞内還元環境に応答し未修飾 ON へと変換されるプロドラッグ型ホスホトリエステル修飾 ON について検討を行った。先行研究で開発された 6-membered cyclic SS PTE ON は、還元条件下での変換速度が極めて遅かったことから、主に変換速度を速めることを目的として、鎖状のジスルフィド構造を有する linear SS PTE ON の合成および性質評価、更にそこで得られた結果をもとに 5 員環ジスルフィドを有する 5-membered cyclic SS PTE ON の合成検討を行った。

第一章では、prodrug type SS PTE ON の予測される変換反応機構から、より速く変換反応が進行すると考えられた linear SS PTE ON の設計・合成および還元条件下での変換反応の評価を行った。合成した linear SS PTE ON 数種の中では、isopropylthiobutyl 基を有する linear SS PTE ON が、6-membered cyclic SS PTE ON と比較して顕著に速く未修飾 ON へと変換されることを明らかにした。

第二章では、この結果を踏まえ isopropylthiobutyl 基を有する linear SS PTE ON の核酸医薬へ応用する上で必要とされる性質評価を行った。その結果、新たに得られた linear SS PTE ON は、過去に開発した 6-membered cyclic SS PTE ON と同程度の細胞内取り込み能とスクレアーゼ耐性を示した。更にそのアンチセンス活性は 6-membered cyclic SS PTE ON よりも早く発現することが明らかとなり、prodrug type SS PTE ON の変換速度がアンチセンス活性の発現に影響を与えている可能性が示唆された。

第三章では、linear SS PTE ON よりも更に速く変換反応が進行することが予想される 5-membered cyclic SS PTE ON が還元環境応答性プロドラッグ核酸の新規研究シーズとなるか検討を行った。通常、5 員環ジスルフィド分子は化学的に不安定であるため、これまでに汎用的な合成法は確立されていなかった。筆者は、最近になって報告された 5 員環ジスルフィドの 1 pot 合成法に改良を加えた新規 5 員環ジスルフィドの合成法を考案し、高スケールかつ高収率で目的物を得る方法を確立した。得られた 5 員環ジスルフィドを用いて、ホスホロアミダイトの合成、さらにこれを用いてオリゴ核酸の合成に成功した。合成できた 5-membered cyclic SS PTE ON の還元的条件下での変換速度は飛躍的に向上したが、その安定性は低く初期検討では満足いく新規 prodrug type SS PTE ON は得られていないが、これをシーズとして新たな分子を設計及び合成できる方法論を確立できた。

このように本博士論文では、核酸医薬への応用を目指して、ジスルフィド結合の開裂をへて活性化される prodrug type SS PTE ON の設計、合成及び性質評価に関する種々の検討を行った。本検討によりプロドラッグ部の鎖状ジスルフィド

の構造と変換速度の相関を明らかにするとともに、変換速度とアンチセンス活性の関連が示唆され、さらなる変換速度の向上を目指し 5 員環ジスルフィドを有するプロドラッグ核酸の開発研究の基盤を確立した。本研究で得られた知見は、更なる新規プロドラッグ型 PTE 修飾核酸の開発に貢献できるものと期待している。

論文目録

第一章及び第二章の内容

Prodrug-Type Phosphotriester Oligonucleotides with Linear Disulfide Promoieties Responsive to Reducing Environment.

N. Sugimoto, J. Hayashi, R. Funaki, S. Wada, F. Wada, M. Harada-Shiba, H. Urata, *Chembiochem.* **2023**, e202300526.

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医科薬科大学 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医科薬科大学 和田俊一 准教授および林淳祐 助教に深く感謝致します。

本研究に際し、ご協力いただいた国立循環器病センター 斯波真理子 博士 (現大阪医科薬科大学循環器センター) ならびに和田郁人 博士 (現リードファーマ株式会社) に深く感謝致します。

NMR 測定をしていただきました大阪医科薬科大学 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。

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、鮫澤佑介 学士、船木涼平 学士、大谷昌成 学士ならびに機能分子創製化学研究室内の皆様に心より御礼申し上げます。

実験の部

General methods and materials

市販品として購入した全ての試薬と溶媒は、精製処理を行わずに使用した。¹H NMR, ¹³C NMR, ³¹P NMR スペクトルは、Agilent Mercury-300, Agilent UNITY INOVA-500, Agilent 400-MR-DD2, JEOL JNM-ECZ400S, Agilent NMR System 600-DD2 NMR のいずれかで測定した。¹H NMR の化学シフトは、試料中に含まれる TMS のシグナル (0 ppm) を基準とした。¹³C NMR の化学シフトは、試料中に含まれる CDCl₃ のシグナル (77 ppm) を基準とした。³¹P NMR の化学シフトは、別に用意した 85% H₃PO₄ 標準物質 (0 ppm) を基準とした。オリゴ核酸の分析又は分取は、それぞれ Waters 社製 XBridge BEH C18 column (4.6 mm×100 mm 又は 19.0×100 mm) 又は Nacalai tesque 社製 Cosmosil 5C₁₈ MS-II column (4.6 mm×250 mm 又は 10.0×250 mm) を用いて RP-HPLC で行った。低分子化合物 **1–14** のマスマスペクトルは、日本電子 JMS-700 質量分析計を用い、ポジティブイオンモードで測定した。

この論文で使用された ON は全て ABI Model 392 DNA/RNA (Applied Biosystems) もしくは NTS M-2-MX (Nihon Techno Service) を用いて合成した。また、オリゴ合成用の各種試薬は Glen Research Corporation から購入した。3'-TAMRA 標識 **ON6** および **ON8** の合成は、以前に報告している方法にて合成した。³⁰⁾ **ONs1–5**, **ON7** および **ONs9–14** の合成のために固相担体として、thymidine-CPG support, 3'-TAMRA-CPG support および Universal Support III PS をそれぞれ使用した。また、5-ethylthio-1*H*-tetrazole (ETT) を活性化剤として利用し、**4c**, **4d** および **4g** のカップリングに要する反応時間を 600 s に延長した。さらに、亜リン酸トリエステルの酸化には 0.02 M ヨウ素溶液を使用し、5'-ODMT_r 基の脱保護には CH₂Cl₂ (DCM) 中の 3% trichloroacetic acid/DCM を用いた。オリゴ合成終了後、T 5-mer を基本骨格とした **ONs1–5**, **ON14** および 3'-TAMRA によって標識された **ON7** はそれぞれ室温で 0.5 h または 2 h、28% NH₃ 水溶液によって処理し、gapmer AON である **ONs9–13** は、室温で 4 h、50 mM K₂CO₃ in methanol によって処理することで、脱保護反応と固相担体からの切断を行った。反応終了後、懸濁液中の NH₃ を空気の吹き付けにより除去した。その後、2.0 M triethylammonium acetate (TEAA) 緩衝液 (pH 7.0) を目的のオリゴ核酸を含む懸濁液に添加した。懸濁液を 0.22 μm のシリンジフィルター (Shimadzu GLC) によってろ過し、脱離した固相担体を除いた。得られたオリゴ核酸について RP-HPLC で分析及び精製し、遠心エバポレーターで濃縮した。2.0 M TEAA buffer を加えた後、オリゴ核酸を Sep-Pak C18 plus cartridge (Waters) に吸着させ、100 mM TEAA buffer で洗浄した。その後、2% trifluoroacetic acid 溶液を加えてオリゴ核酸の 5'

末端の保護基である 5'-DMTr 基を除去し、さらに milli-Q 水で脱塩を行った。オリゴ核酸 50% ACN/H₂O (ACN: acetonitrile) で溶出させ、遠心エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥を行い目的とするオリゴ核酸の粉末を得た。得られたオリゴ核酸を milli-Q 水で再度溶解後、260 nm の吸光度を BioSpectrometer (Eppendorf) にて測定し、Oligo Calc⁴¹⁾ を用いて濃度を決定し、収量、収率を求めた。その後、RP-HPLC および MALDI-TOF MS (Voyager-DE STR, Applied Biosystems or Microflex LRF, Bruker) で分析、純度および構造を確認した。

HPLC conditions of **ONs1–5, 7 and 9–14**

Analytical condition:

ONs1–5, 9–14 における HPLC による分析は、XBridge BEH C18 column (4.6×100 mm, Waters) を用いて、流速を 0.8 mL/min, 検出波長を 260 nm で行った。**ON7** における HPLC による分析は、Cosmosil 5C₁₈ MS-II column (4.6 mm×250 mm, Nacal Tesque) を用いて、流速を 1.0 mL/min, 検出波長を 260 nm で行った。移動相は 50 mM TEAA buffer (pH 7.0) と ACN の混合溶媒を用いており、**ONs1–5, ON14** は 10–50%, **ON7** は 10–70%, **ONs9–11** は 20–70%, **ONs12,13** は 20–60% の ACN/50 mM TEAA buffer のリニアグラジエントで 40 °C, 20 min で溶出した。

Purification condition:

ONs1–5, 9–13 における HPLC による分取は、XBridge BEH C18 column (19×100 mm, Waters) を用いて、流速を 5.0 mL/min, 検出波長を 260 nm で行った。**ON7** における HPLC による分取は、Cosmosil 5C₁₈ MS-II column (10.0 mm×250 mm, Nacal Tesque) を用いて、流速を 3.0 mL/min, 検出波長を 260 nm で行った。移動相は 50 mM TEAA buffer (pH 7.0) と ACN の混合溶媒を用いており、**ON1** は 20–70%, **ONs2–5, ON14** は 10–50%, **ON7** は 10–70%, **ONs9–11** は 20–70%, **ONs12,13** は 20–60% の ACN/50 mM TEAA buffer のリニアグラジエントで 40 °C, 20 min で溶出した。

第一章第一節の実験

Synthesis of linear disulfide units **2a–2g**

市販品されていない mercaptoalcohol **1c, 1d** は、参考文献の手順に従い対応する chloro-alcohol から合成し³³⁾、それ以外の mercaptoalcohol **1a, 1b** については市販品を用いた。次に、mercaptoalcohol (**1a–d**) および対応する thiol (**5 eq**) を含む ethanol 溶液中に、ethanol に溶解させた I₂ (約 1 g/mL) を滴下し、反応液が持続的に黄色みを帯びるのを確認して、滴下を終了した。滴下終了後は室温で 1 h

攪拌し、10w/v% Na₂S₂O₃ 水溶液を加え反応を停止させた。反応液を酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を蒸留水および飽和食塩水で洗浄、無水芒硝にて乾燥させ、綿栓ろ過した後に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で精製し、**2a–g** を黄色から無色の油状液体として得た。

2a: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.88 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.86 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.06 (br s, 1H), 1.35 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 60.6, 48.1, 42.7, 29.8; HRMS (EI): calcd for C₆H₁₄OS₂ (M⁺) 166.0486, found 166.0486.

2b: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.76 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.97–1.92 (m, 2H), 1.65 (br s, 1H), 1.34 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 61.1, 47.9, 36.9, 31.9, 29.9; HRMS (EI): calcd for C₇H₁₆OS₂ (M⁺) 180.0643, found 180.0641.

2c: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.68 (t, *J* = 6.4, 2H), 2.74 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.78–1.65 (m, 4H), 1.33 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 62.4, 47.8, 40.4, 31.4, 29.9, 25.5; HRMS (EI): calcd for C₈H₁₈OS₂ (M⁺) 194.0799, found 194.0799.

2d: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.66 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.74–1.66 (m, 2H), 1.61–1.56 (m, 2H), 1.50–1.44 (m, 2H), 1.33 (s, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 62.8, 47.7, 40.7, 32.3, 29.9, 29.0, 24.7; HRMS (EI): calcd for C₉H₂₀OS₂ (M⁺) 208.0956, found 208.0956.

2e: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.69 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.75 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.84–1.77 (m, 2H), 1.72–1.65 (m, 2H), 1.38 (br s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 62.4, 37.8, 31.4, 25.4, 23.3; HRMS (EI): calcd for C₅H₁₂OS₂ (M⁺) 152.0330, found 152.0329.

2f: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.68 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.75–2.68 (m, 4H), 1.83–1.75 (m, 2H), 1.72–1.64 (m, 2H), 1.60 (br s, 1H), 1.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 62.4, 38.8, 32.7, 31.4, 25.5, 14.4; HRMS (EI): calcd for C₆H₁₄OS₂ (M⁺) 166.0486, found 166.0486.

2g: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.68 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.00 (sep, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.73 (t, *J* = 7.2 Hz), 1.81–1.64 (m, 5H), 1.31 (d, *J* = 6.8 Hz); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 62.4, 41.0, 39.6, 31.4, 25.5, 22.6; HRMS (EI): calcd for C₇H₁₆OS₂ (M⁺) 180.0643, found 180.0643.

Synthesis of phosphordiamidite **3c**, **3d** and **3g**

Et₃N (5 eq) 及び bis(diisopropyldithio)chlorophosphine (1.5 eq) を加えた無水ジエチルエーテル溶液に、無水ジエチルエーテルで溶解させたジスルフィド **3c**, **3d**, **3g** (1 eq) を加え、室温で 1 h 攪拌した。その後、反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (3% Et₃N/hexane) によって精製し、フラクションを集めて濃縮

した。得られた **3c, 3d** および **3g** は無色油状液体として得られ、精製せずに次の反応に使用した。

Synthesis of phosphoramidite 4c, 4d and 4g

DMTr-T (1 eq) を無水 DCM で溶解した混合液に、ETT (0.6 eq) および対応する phosphordiamidite **3c, 3d** および **3g** (1.5 eq) を加え、室温で 1 h 攪拌した。その後、反応液に Et₃N および飽和重曹水を加えて、反応を終了した。反応液を DCM で抽出し、有機層を飽和重曹水、蒸留水および飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝にて乾燥し、綿栓ろ過した後に、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、**4c, 4d** および **4g** を白色泡状固体として得た。

4c: ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 147.3, 146.7; HRMS (FAB): calcd for C₄₅H₆₃N₃O₈PS₂ ([M+H]⁺), 868.3794, found 868.3783.

4d: ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 147.8, 147.2; HRMS (FAB): calcd for C₄₆H₆₅N₃O₈PS₂ ([M+H]⁺), 882.3950, found 882.3954.

4g: ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 147.2, 146.6; HRMS (FAB): calcd for C₄₄H₆₀N₃O₈PS₂Na ([M+Na]⁺) 876.3457, found 876.3463.

第一章第三節の実験

Conversion reaction of prodrug type SS PTE oligonucleotides into natural oligonucleotides

各 ON (10 nmol) を 10 mM GSH を含む 50 mM PBS に溶解し、さらに内部標準物質として 40.5 μM の deoxyadenosine (dA) を添加して、最終液量を 100 μL とした。変換反応は 37 °C で行い、反応開始 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 時点で反応液をサンプリングして、RP-HPLC でモニターした。

得られたデータから、各サンプルの消失速度および T 5-mer の生成速度を表すグラフ (**Fig. 10**) は以下の計算法で作成した。

まず、X h 時点での dA のピーク面積、サンプルのピーク面積および T 5-mer のピーク面積をそれぞれ [dA]_x, [S]_x および [T5]_x として、dA によって補正された X h 時点でのサンプルのピーク面積 ([S_{correct}]_x) および T 5-mer のピーク面積 ([T5_{correct}]_x) を以下の式から求めた。

$$[S_{\text{correct}}]_x = [S]_x / [dA]_x \cdot [dA]_0$$

$$[T5_{\text{correct}}]_x = [T5]_x / [dA]_x \cdot [dA]_0 - [T5]_0$$

その後、X h 時点での補正されたサンプルのピーク面積 ([S_{correct}]_x) の、0 h 時点でのサンプルのピーク面積 ([S]₀) に対する比率を残存率として、以下の計算

式から求めた。

$$\text{残存率 (\%)} = [S_{\text{correct}}]_X / [S]_0 \cdot 100$$

また、X h 時点での補正された T 5-mer のピーク面積 ($[T5_{\text{correct}}]_X$) の、0 h 時点でのサンプルのピーク面積 ($[S]_0$) に対する比率を生成率として、以下の計算式から求めた。

$$\text{生成率 (\%)} = [T5_{\text{correct}}]_X / [S]_0 \cdot 100$$

尚、各サンプルの測定は計 3 回行い、それぞれの残存率および生成率の平均値および標準偏差を求め、それらをグラフにプロットした。

HPLC conditions

HPLC による分析は、XBridge BEH C18 column (4.6×100 mm, Waters) を用いて、流速を 0.8 mL/min, 検出波長を 260 nm で行った。移動相は 50 mM TEAA buffer (pH 7.0) と ACN の混合溶媒を用いており、各 ON は 5–45% ACN/50 mM TEAA のリニアグラジエントで 40 °C, 20 min で溶出した。

第二章第一節の実験

Nuclease resistance of prodrug type SS PTE oligonucleotides

10% Fetal bovine serum (FBS, 100 μ L) に各 ON (10 nmol) を添加し、37 °C で培養した。0, 10, 20, 40, 80, 160 min に反応混合物から 10 μ L ずつサンプリングし、10 μ L の formamide と混合して反応を終了させた。カラムは COSMOSIL 5C₁₈-MS-II column (4.6×250 mm, Nacalai Tesque) を用い、1 mL/min の流速で RP-HPLC (n = 3) によってサンプルを分析した。移動相は 50 mM TEAA (pH 7.0) と ACN の混合溶媒で、ON は 10–50% ACN/50 mM TEAA のリニアグラジエントにより各種オリゴ核酸を 40 °C, 20 min で溶出させ、検出波長を 260 nm として分析した。得られたデータから、0 h 時点での各 ON のピーク面積を 100% として、X h 時点での各 ON のピーク面積の存在率を求めた。次に、各 ON について同様に行った複数回の検討結果についても同様に ON の残存率を求め、その値から平均値および標準偏差を求め、グラフにプロットした。

Cell culture

A549 細胞は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより、HuH-7 細胞は JCRB 細胞バンクより入手した。10v/v% 非動化处理済み FBS を添加した DMEM (high-glucose) もしくは DMEM (low-glucose) 中で、37 °C, 5% CO₂ の条件下でそれぞれの細胞を培養した。

CLSM analysis of internalized 3'-TAMRA labeled prodrug type SS PTE oligonucleotides

まず、A549 細胞 (8×10^4 cells) を 4-chamber glass bottom dish (Greiner Bio-One) に播種した。37 °C, 5% CO₂ の条件下で 24 h 培養した後、5 μM 蛍光 3'-TAMRA 標識オリゴ核酸を含む 100 μL DMEM を加えて、さらに 37 °C で 7 h 培養した。培養後、細胞を PBS で洗浄した。その後、細胞を LysoSensor Green DND-189 (Thermo Fisher Scientific) でメーカーのプロトコルに従って処理し、さらに 1 h 培養した。培養後、細胞をフェノールレッド不含 DMEM で洗浄し、蛍光分布を CLSM (Carl Zeiss LSM700) で解析した。

第二章第二節の実験

Procedure for RT-qPCR

まず、HuH-7 細胞 (8×10^3 個) を 96 well 細胞培養プレート (Asahi Glass) に播種した。37 °C, 5% CO₂ 条件下で 24 h 培養した後、9 mM CaCl₂ (100 μL) を含む、10% FBS/DMEM 培地にて 1 μM の濃度になるように希釈した 抗 ApoB LNA gapmer AON (100 μL) を添加し、37 °C で 12, 24, 48 h 培養した。細胞を PBS で洗浄し、SuperPrep Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo) を用いて、細胞中の total mRNA から cDNA template を合成した。細胞中の ApoB 遺伝子発現は、Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) と StepOnePlus システム (Applied Biosystems) を用いて、メーカーの手順に従って qPCR で測定した。標的 ApoB 遺伝子の発現量解析は、別途作成した cDNA の希釈群から検量線を作成し、相対定量法を用いて行った。検量線作成用の cDNA は未処理の HuH-7 細胞から NucleoSpin RNA (Takara) を用いてメーカー添付のプロトコルに従い total RNA を抽出後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI) を用いて作成した。発現量は、リファレンス遺伝子として GAPDH (ハウスキーピング遺伝子) を用いて、GAPDH の発現量に対する ApoB 発現量の発現量を求めることで補正した。また、PCR 時に使用したプライマーは以下の通りである。

ヒト ApoB 遺伝子 (forward: 5'-TTC TCA AGA GTT ACA GCA GAT CCA-3' ; reverse : 5'-TGG AAG TGA GTT ACA GCA GAT CCA-3'); ヒト GAPDH 遺伝子 (forward: 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'; reverse: 5'-TGG TGA AGG CTG AGA AC-3').

第三章第一節の実験

Synthesis of 1,3-dichloro-2-phenylpropan-2-ol (5)

三口丸底フラスコ、滴下漏斗、ジムロート冷却器、Mg turnings (0.75 g, 31 mmol, 1.5 eq) を 160 °C で 2 h 乾燥させた。乾燥後、三口丸底フラスコに Mg turnings を加えて、dry bromobenzene (3.2 mL, 30 mmol, 1.5 eq) の dry Et₂O (18 mL) 溶液を半量、ゆっくり滴下しながら攪拌した。溶液が赤茶色になったのを確認した後、残りの bromobenzene の dry Et₂O 溶液をゆっくり滴下し、滴下終了後 1 h 加熱還流した。反応液を氷冷しながら、dry Et₂O (33 mL) で希釈した 1,3-dichloro-2-propanone (2.6 g, 21 mmol, 1 eq) を滴下した。滴下終了後、室温に戻し、2 h 後に原料の消失を確認し、飽和塩化アンモニウム水溶液 (60 mL) をゆっくり加えることで、反応を停止した。反応液を Et₂O で 2 回抽出、飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝にて乾燥させ、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 (50% DCM/hexane) にて精製し、**5** (4.0 g, 19 mmol, 95%) を赤色透明油状液体として得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.52–7.33 (m, 5H), 3.98 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 3.93 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 2.91 (s, 1H); HRMS (EI): calcd for C₉H₁₀Cl₂O (M⁺) 204.0109, found 204.0107.

Synthesis of 1,3-bis(*tert*-butylthio)-2-phenylpropan-2-ol (6)

dry DMF (55.7 mL, **5** の終濃度が 0.3 M となる) に K₂CO₃ (12 g, 84 mmol, 5 eq) を加え、Ar バブリングを行った。次に、*tert*-butylthiol (11 mL, 100 mmol, 6 eq), **5** (3.4 g, 17 mmol) を順に加え、室温で攪拌した。反応開始 20 h 後に原料の消失を確認し、反応液に Et₂O と 5 w/v% NaOH 水溶液 (60 mL) を加えて反応を停止した。反応液を Et₂O で 2 回抽出、1 M HCl 水溶液及び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、綿栓ろ過し、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 (8–29% EtOAc/hexane) にて精製し、無色油状液体として **6** (5.3 g, 17 mmol, 90%) を得た。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.48–7.26 (m, 5 H), 3.43 (s, OH), 3.17 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 3.04 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.29 (s, 18H), HRMS (EI): calcd for C₁₇H₂₈OS₂ (M⁺) 312.1528, found 312.1582.

Synthesis of 4-hydroxy-4-phenyl-1,2-dithiolane (7)

シリカゲル ([g]_{silica gel} / [mmol]_{thiol} = 2, Wakosil[®] 60, 64–210 μm, 2.0 g) に蒸留水

(1 mL) を吸着させて (50wt/wt% H₂O / silica gel)、hydrated silica gel を調製した。**6** (0.33 g, 1.1 mmol) に hydrated silica gel と DCM (20 mL) を加えた。室温で Br₂ (0.3 M in DCM) を滴下しながら攪拌し、持続的に黄色みを帯びるまで滴下を続けた。滴下終了時点で原料の消失を確認し、反応液に methyl acrylate (0.9 mL, 10 mmol, 9 eq) を加えて 2 h 攪拌した。その後、反応液を半量濃縮しては濃縮した分と同量のヘキサンを加え、濃縮するといった工程を 4 度繰り返した。得られたヘキサン溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0–10% Et₂O/hexane) にて精製し、として **7** (0.12 g, 0.60 mmol, 57%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43–7.26 (m, 5H), 3.51 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 3.27 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 3.19 (br, OH); HRMS (EI): calcd for C₉H₁₀OS₂ (M⁺) 198.0173, found 198.0171.

Synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-[N,N,N,N-(bisdiisopropylamino)]phosphinylthymidine (8)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)thymidine (5.4 g, 10 mmol) を dry toluene (10 mL) で 3 回共沸した。その後 dry DCM (50 mL) に溶解させ、そこに *N,N*-diisopropylethylamine (17 mL, 100 mmol, 10 eq)、[(*i*-Pr)₂N]₂PCl (4.0 g, 15 mmol, 1.5 eq) を順に加え、室温で反応させた。反応開始 1 h 後に原料の消失を確認したので、飽和重曹水によってクエンチを行い、反応を終了した。CHCl₃によって 2 回抽出を行い、飽和重曹水にて洗浄した。有機層を無水芒硝で乾燥を行い、綿栓ろ過した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHROMATOREX NH-DM 1020, 30–70% CHCl₃/hexane) にて精製し、白色泡状固体として **8** (6.5 g, 8.4 mmol, 84%) を得た。

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ 115.9; HRMS (EI): calcd for C₄₃H₅₉N₄O₇P (M⁺) 774.4121, found 775.4190.

Synthesis of 1,3-dibromo-3-methyl-2-butanone (10)

三口フラスコに 3-methyl-2-butanone (10 mL, 94 mmol), acetic acid (1 mL), DCM (28 mL) を加えて室温で攪拌した。続いて、Br₂ (9.7 mL, 188 mmol, 2 eq) の DCM (28 mL) の溶液を緩やかに滴下し、反応液が黄色みを帯びるのを確認して、滴下を終了した。滴下終了後、10% Na₂S₂O₃ 水溶液を加えてガスの発生がなくなるまで攪拌することで、反応を停止した。反応液を DCM で抽出後、飽和食塩水で洗浄し、無水芒硝にて乾燥、綿栓ろ過後に溶媒を減圧留去した。得られた残渣を 18 hPa / 60 °C の条件下で減圧留去し、**10** (18 g, 76 mmol, 80%) を赤色油状液体と

して得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.45 (s, 2H), 1.95 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): 196.8, 62.6, 30.0, 29.9; HRMS (EI): calcd for $\text{C}_5\text{H}_8\text{Br}_2\text{O}$ (M^+) 241.8942, found 241.8938.

Synthesis of 1,3-bis(4-methoxybenzylthio)-3-methylbutane-2-one (11)

K_2CO_3 (5.5 g, 40 mmol, 5 eq), dry DMF (26.6 mL, 最終的な **10** の濃度が 0.3 M とする) を加え、Ar バブリングを行った。次に、4-methoxybenzylthiol (2.4 mL, 18 mmol, 2.2 eq), **10** (2.0 g, 8.0 mmol) を順に加えて室温で攪拌させた。1 h 後に原料の消失を確認し、蒸留水を加え反応を停止後、反応液を 20% EtOAc/hexane にて抽出、蒸留水及び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し、綿栓ろ過した後、溶媒を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (3–10% EtOAc/hexane) にて精製し、**11** (2.9 g, 7.4 mmol, 93%) を白色固体として得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.28 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.53 (s, 2H), 3.40 (s, 2H), 1.49 (s, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 202.0, 158.7, 130.3, 130.2, 129.4, 128.5, 113.9, 113.8, 55.2, 55.2, 53.5, 35.6, 33.6, 33.0, 24.4; HRMS (EI): calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{S}_2$ (M^+) 390.1323, found 390.1321.

Synthesis of 1,3-bis(4-methoxybenzylthio)-3-methylbutane-2-ol (12)

化合物 **11** (0.40 g, 1.0 mmol) を methanol (20 mL) に溶解させ、氷冷しながら NaBH_4 (45 mg, 1.4 mmol, 1.4 eq) を加えて攪拌した。原料の消失を確認後、10% 塩化アンモニウム水溶液を加え反応を停止した。反応液を DCM で抽出、飽和食塩水を用いて洗浄し、有機層を無水芒硝で乾燥させ、綿栓ろ過し、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (0–10% EtOAc/hexane) にて精製し、無色油状液体として **12** (0.39 g, 1.0 mmol, 99%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.24 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.83 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.76–3.66 (m, 4H), 3.57–3.53 (m, 1H), 2.98 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 2.74 (dd, J = 14.0, 1.6 Hz, 1H), 2.50 (dd, J = 13.6, 10.4 Hz, 1H), 1.33 (s, 3H), 1.24 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 158.7, 158.6, 130.1, 130.0, 129.9, 129.7, 114.0, 113.9, 75.2, 55.2, 50.6, 35.5, 33.7, 32.3, 25.1, 23.9; HRMS (EI): calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{S}_2$ (M^+) 392.1480, found 393.1565.

Synthesis of 3,3-dimethyl-4-hydroxy-1,2-dithiolane (13)

12 (1.9 g, 5.0 mmol) を methanol (100 mL) に溶解させ、そこへ methyl acrylate (4.4 mL, 50 mmol, 10 eq) を加え室温で攪拌した。Br₂ を 0.3 M になるように調製した methanol 溶液を滴下し、反応液が持続的に黄色みを帯びるまで滴下した。滴下を終了後、原料の消失を確認し、反応液を分液漏斗に移し、EtOAc と蒸留水にて目的物を抽出、蒸留水および飽和食塩水で洗浄した。さらに、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、綿栓ろ過した後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5% EtOAc/hexane) にて精製し、**13** (0.59 g, 3.9 mmol, 79%) を黄色固体として得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.06 (ddd, *J* = 12.0, 4.0, 1.2 Hz, 1H), 3.34 (dd, *J* = 11.2, 4.0 Hz, 1H), 3.18 (dd, *J* = 11.2, 1.2 Hz, 1H), 2.32 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 1.49 (s, 3H), 1.43 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 82.5, 64.8, 43.2, 26.3, 21.2; HRMS (EI): calcd for C₅H₁₀OS₂ (M⁺) 150.0173, found 150.0172.

Synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-O-3,3-dimethyl-1,2-dithiolane-4-oxyn-(N,N-diisopropylamino)phosphinylthymidine (14)

8 を dry toluene にて 3 回共沸し、dry DCM (10 mL), 1*H*-tetrazole (50 mg, 0.71 mmol, 0.7 eq), **13** (0.15 g, 1.0 mmol, 1 eq) を順に加えて Ar 気流下かつ室温で反応させた。反応開始 30 min 後に 1*H*-tetrazole (18 mg, 0.25 mmol, 0.25 eq) 及び **13** (60 mg, 0.4 mmol, 0.4 eq) を追加し、その後 ³¹P-NMR によって分析したところ、原料の消失を確認したため、飽和重曹水を加えて反応を停止した。沈殿物をガラスフィルターでろ過した後、ろ液から CHCl₃ にて目的物を抽出し、飽和食塩水で洗浄した。さらに、有機層を無水芒硝にて乾燥させ、綿栓ろ過した後に、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 (25-50% EtOAc/hexane) にて精製し、白色泡状固体として **14** (0.31 g, 0.38 mmol, 38%) を得た。

³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): δ 148.2, 148.9, 149.3; HRMS (FAB): calcd for C₄₂H₅₄N₃O₈PS₂Na (M+Na⁺) 846.2988, found 846.0000.

第三章第二節の実験

Conversion reaction of prodrug type SS PTE oligonucleotides into natural oligonucleotides

ON14 (10 nmol) を 10 mM GSH (低濃度 GSH の検討では 10 μM GSH とした)

を含む 50 mM PBS に溶解し、さらに内部標準物質として 40.5 μ M の deoxyadenosine (dA) を添加して、最終液量を 100 μ L とした。変換反応は 37 °C で行い、反応開始 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 時点で反応液をサンプリングして、RP-HPLC でモニターした。

HPLC conditions

HPLC による分析は、XBridge BEH C18 column (4.6 \times 100 mm, Waters) を用いて、流速を 0.8 mL/min, 検出波長を 260 nm で行った。移動相は 50 mM TEAA buffer (pH 7.0) と ACN の混合溶媒を用いており、各種オリゴ核酸は 5–45% ACN/50 mM TEAA のリニアグラジエントで 40 °C, 20 min で溶出した。

引用文献

- (1) H. Xiong, R. N. Veedu, S. D. Diermeier, *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22, 3295.
- (2) a) K. Dhuri, C. Bechtold, E. Quijano, H. Pham, A. Gupta, A. Vikram, R. Bahal, *J. Clin. Med.*, **2020**, 9, 2004.
- b) S. T. Crooke, B. F. Baker, R. M. Crooke, X.-h. Liang, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2021**, 20, 427–453.
- c) A. Kilanowska, S. Studzińska, *RSC Adv.*, **2020**, 10, 34501–34516.
- (3) P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1978**, 75, 280–284.
- (4) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature*, **1998**, 391, 806–811.
- (5) S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature*, **2001**, 411, 494–498.
- (6) W. Alshaer, H. Zureigat, A. A. Karaki, A. Al-Kadash, L. Gharaibeh, M. M. Hatmal, A. A. Aljabali, A. Awidi, *Eur. J. Pharmacol.*, **2021**, 905, 174178.
- (7) a) W. B. Wan, P. P. Seth, *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 9645–9667.
- b) S. T. Crooke, X.-h. Liang, R. M. Crooke, B. F. Baker, R. S. Geary, *Biochem. Pharmacol.*, **2021**, 189, 114196.
- (8) a) S. Shukla, C. S. Sumaria, P. I. Pradeepkumar, *ChemMedChem*, **2010**, 5, 328–349.
- b) J. B. Bramsen, M. B. Laursen, C. K. Damgaard, S. W. Lena, B. R. Babu, J. Wengel, J. Kjems, *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 5886–5897.
- c) W. F. Lima, H. Wu, J. G. Nichols, H. Sun, H. M. Murray, S. T. Crooke, *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 26017–26028.
- (9) M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G. B. Inamati, P. D. Cook, M. Manoharan, M. Egli, *Nat. Struct. Biol.*, **1999**, 6, 535–539.
- (10) a) C. R. Allerson, N. Sioufi, R. Jarres, T. P. Prakash, N. Naik, A. Berdeja, L. Wanders, R. H. Griffey, E. E. Swayze, B. Bhat, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 901–904.
- b) P. S. Pallan, E. M. Greene, P. A. Jicman, R. K. Pandey, M. Manoharan, E. Rozners, M. Egli, *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39, 3482–3495.
- (11) a) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 8735–8738.
- b) S. K. Singh, J. Wengel, *Chem. Commun.*, **1998**, 1247–1248.
- (12) a) L. Nardo, M. Lamperti, D. Salerno, V. Cassina, N. Missana, M. Bondani, A. Tempestini, F. Mantegazza, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, 43, 10722–10733.
- b) S. Henry, K. Stecker, D. Brooks, D. Monteith, B. Conklin, C. F. J. Bennett, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, 292, 468–479.

- (13) R. W. Wagner, M. D. Matteucci, J. G. Lewis, A. J. Gutierrez, C. Moulds, B. C. Froehler, *Science*, **1993**, *260*, 1510–1513.
- (14) M. E. Østergaard, A. L. Southwell, H. Kordasiewicz, A. T. Watt, N. H. Skotte, C. N. Doty, K. Vaid, E. B. Villanueva, E. E. Swayze, C. F. Bennett, M. R. Hayden, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.*, **2013**, *41*, 9634–9650.
- (15) N. Oka, T. Wada, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5829–5843.
- (16) N. Iwamoto, D. C. D. Butler, N. Svrzikapa, S. Mohapatra, I. Zlatev, D. W. Y. Sah, Meena, S. M. Standley, G. Lu, L. H. Apponi, M. Frank-Kamenetsky, J. J. Zhang, C. Vargeese, G. L. Verdine, *Nat. Biotechnol.*, **2017**, *35*, 845–851.
- (17) ファルマシア 2012 年 48 巻 7 号 p. 663–667.
- (18) W. Shen, C. L. D. Hoyos, M. T. Migawa, T. A. Vickers, H. Sun, A. Low, T. A. Bell 3rd, M. Rahdar, S. Mukhopadhyay, C. E. Hart, M. Bell, S. Riney, S. F. Murray, S. Greenlee, R. M. Crooke, X.-h. Liang, P. P. Seth, S. T. Crooke, *Nat. Biotechnol.*, **2019**, *37*, 640–650.
- (19) M. T. Migawa, W. Shen, W. B. Wan, G. Vasquez, M. E. Oestergaard, A. Low, C. L. D. Hoyos, R. Gupta, S. Murray, M. Tanowitz, M. Bell, J. G. Nichols, H. Gaus, X.-h. Liang, E. E. Swayze, S. T. Crooke, P. P. Seth, *Nucleic. Acids. Res.*, **2019**, *47*, 5465–5479.
- (20) J. C. Barrett, P. S. Miller, P. O. P. Ts'o, *Biochem.*, **1974**, *13*, 4897–4906.
- (21) J. Hayashi, T. Hamada, I. Sasaki, O. Nakagawa, S.-i. Wada, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 3610–3615.
- (22) C. Perigaud, G. Gosselin, I. Lefebvre, J. L. Girardet, S. Benzaria, I. Barber, J. L. Imbach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*, 2521–2526.
- (23) F. Debart, C. Dupouy, J.-J. Vasseur, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, *14*, 436–469.
- (24) a) J. K. Nair, J. L. S. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, Md. R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V. Kel'in, S. Milstein, N. Taneja, J. O'Shea, S. Shaikh, L. Zhang, R. J. v. d. Sluis, M. E. Jung, A. Akinc, R. Hutabarat, S. Kuchimanchi, K. Fitzgerald, T. Zimmermann, T. J. C. v. Berkel, M. A. Maier, K. G. Rajeev, M. Manoharan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 16958–16961.
 b) T. P. Prakash, M. J. Graham, J. Yu, R. Carty, A. Low, A. Chappell, K. Schmidt, C. Zhao, M. Aghajan, H. F. Murray, S. Riney, S. L. Booten, S. F. Murray, H. Gaus, J. Crosby, W. F. Lima, S. Guo, B. P. Monia, E. E. Swayze, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.*, **2014**, *42*, 8796–8807.
- (25) R. P. Iyer, D. Yu, S. Agrawal, *Bioorg. Chem.*, **1995**, *23*, 1–21.
- (26) N. Zhang, C. Tan, P. Cai, P. Zhang, Y. Zhaob, Y. Jiang, *Chem. Commun.*, **2009**, 3216–3218.

- (27) K. Alvarez, J.-J. Vasseur, T. Beltran, J.-L. Imbach, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 6319–6328.
- (28) B. R. Meade, K. Gogoi, A. S. Hamil, C. Palm-Apergi, A. v. d. Berg, J. C. Hagopian, A. D. Springer, A. Eguchi, A. D. Kacsinta, C. F. Dowdy, A. Presente, P. Lönn, M. Kaulich, N. Yoshioka, E. Gros, X.-S. Cui, S. F. Dowdy, *Nat. Biotechnol.*, **2014**, *32*, 1256–1261.
- (29) a) Y. Ochi, O. Nakagawa, K. Sakaguchi, S. Wada, H. Urata, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 7620–7622.
- b) Y. Ochi, M. Imai, O. Nakagawa, J. Hayashi, S. Wada, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, 845–848.
- c) J. Hayashi, M. Nishigaki, Y. Ochi, S. Wada, F. Wada, O. Nakagawa, S. Obika, M. Harada-Shiba, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2018**, *28*, 2171–2174.
- (30) J. Hayashi, Y. Samezawa, Y. Ochi, S. Wada, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2017**, *27*, 3135–3138.
- (31) G. Butora, N. Qi, W. Fu, T. Nguyen, H.-C. Huang, I. W. Davie, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 14046–14050.
- (32) a) S. Gronert, J. M. Lee, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 6731–6736.
- b) K. Nagasawa, A. Yoneta, *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 5048–5052.
- (33) W. Suchaoain, S. Bonengel, S. Hussain, C. W. Huck, B. N. Ma, A. Bernkop-Schnürch, *J. Pharm. Sci.*, **2015**, *104*, 2523–2530.
- (34) A. Semenyuk, M. Kwiatkowski, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 469–472.
- (35) E. Vivès, C. Dell'Aquila, J.-C. Bologna, F. Morvan, B. Rayner, J.-L. Imbach, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 4071–4076.
- (36) S. Hori, T. Yamamoto, R. Waki, S. Wada, F. Wada, M. Noda, S. Obika, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, e128.
- (37) a) A. Yahara, A. R. Shrestha, T. Yamamoto, Y. Hari, T. Osawa, M. Yamaguchi, M. Nishida, T. Kodama, S. Obika, *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 2513–2516.
- b) J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen, V. A. Erdmann, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 1911–1918.
- c) T. Osawa, M. Sawamura, F. Wada, T. Yamamoto, S. Obika, Y. Hari, *Org. Biomol.*, **2017**, *15*, 3955–3963.
- (38) C. W. Bradshaw, S. Sakamuri, L. Eltepu, S. Lam, D. Liu, B. Meade, G. D. Iacono, J. Stock, B. Liu (Solstice Biologics, LTD), **2015**, WO 2015188197.
- (39) C. S. Sevier, C. A. Kaiser, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2002**, *3*, 836–847.
- (40) G. M. Scheutz, *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, *18*, 6509–6513.
- (41) W. A. Kibbe, *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, W43–W46.