

博 士 論 文

オリゴヌクレオチド固相合成に利用する新規
ユニバーサルユニットの開発とその応用

山本 一輝

令和五年

博士論文

オリゴヌクレオチド固相合成に利用する
新規ユニバーサルユニットの開発とその応用

徳島文理大学大学院薬学研究科
薬学専攻 博士課程

山本 一輝

指導教授 張 功幸

令和五年提出

目次

緒論.....	1-6
第一章 ビシクロ[2.2.2]オクタン-2,3-ジオール骨格を持つ高脂溶性ユニバーサルリンカーの開発	
第一節 ユニバーサルリンカーの分子設計と合成.....	7-8
第二節 ユニバーサルリンカーを利用したオリゴヌクレオチド合成.....	8-9
第三節 塩基処理によるオリゴヌクレオチドの放出効率の評価.....	9-14
第二章 7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオール骨格を持つ高脂溶性ユニバーサルリンカーの開発	
第一節 ユニバーサルリンカーの分子設計と合成.....	15-17
第二節 ユニバーサルリンカーを利用したオリゴヌクレオチド合成.....	17-18
第三節 塩基処理によるオリゴヌクレオチドの放出効率の評価.....	19-25
第三章 O-アルキルホスホロアミダイトを用いたユニバーサルユニットの迅速な除去方法の確立	
第一節 O-アルキルホスホロアミダイトの設計概念.....	26
第二節 O-アルキルホスホロアミダイトを含むオリゴヌクレオチドの合成.....	27-28
第三節 塩基処理によるオリゴヌクレオチド放出能の評価.....	29-33
第四章 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトを用いたオリゴヌクレオチド合成	
第一節 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトの設計概念.....	34-35
第二節 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトのユニバーサルリンカーとしての活用.....	35-37
第三節 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトを用いたオリゴヌクレオチドのタンデム合成.....	38-40
総括.....	41-42
謝辞.....	43
実験の部.....	44
第一章の実験.....	44-47
第二章の実験.....	48-56

第三章の実験.....	57-59
第四章の実験.....	60-62
発表論文.....	63
参考文献.....	64-65

緒論

1981年、BeaucageとCaruthersはオリゴヌクレオチドの化学合成法としてホスホロアミダイト法を報告した。¹⁾ この方法はヌクレオシドのホスホロアミダイト体を用いてオリゴヌクレオチドの伸長を行い、当時報告されていた他の核酸合成法(リン酸トリエステル法やH-ホスホネート法など)²⁻⁷⁾と比較して短時間かつ高収率でオリゴヌクレオチドを合成可能であった。その後改良が加えられ、自動合成装置を用いた固相合成法と組み合わせることで、より効率的なオリゴヌクレオチドの化学合成が実現した。ホスホロアミダイト法を用いたオリゴヌクレオチドの固相合成サイクルをFigure 1に示す。まず、ヌクレオシドが担持された樹脂を出発原料とし、①酸性条件下(3 w/v% トリクロロ酢酸ジクロロメタン溶液等)、5'位水酸基の保護基であるジメトキシトリチル(DMT)基の脱保護を行う(脱DMT工程)、②1*H*-テトラゾールや5-エチルチオ-1*H*-テトラゾール(ETT)⁸⁾等の酸触媒下、ホスホロアミダイト体と5'位水酸基を縮合する(縮合工程)、③未反応の水酸基に対して、それ以上の鎖伸長が起きないように、無水酢酸と*N*-メチルイミダゾール等を用いてキャップを行う(キャップ工程)、④得られたホスファイトをヨウ素水溶液や*t*-ブチルヒドロペルオキシド⁹⁾等を用いて酸化する(酸化工程)、その後⑤の脱DMT工程を行い、再び縮合工程へとサイクルを繰り返すことで、目的のオリゴヌクレオチドを一塩基ずつ伸長させる。合成終了後は⑥の工程(塩基処理)により、オリゴヌクレオチドの固相からの切り出し、核酸塩基部やリン酸部の保護基の脱保護を行うことで、目的のオリゴヌクレオチドを得ることができる。

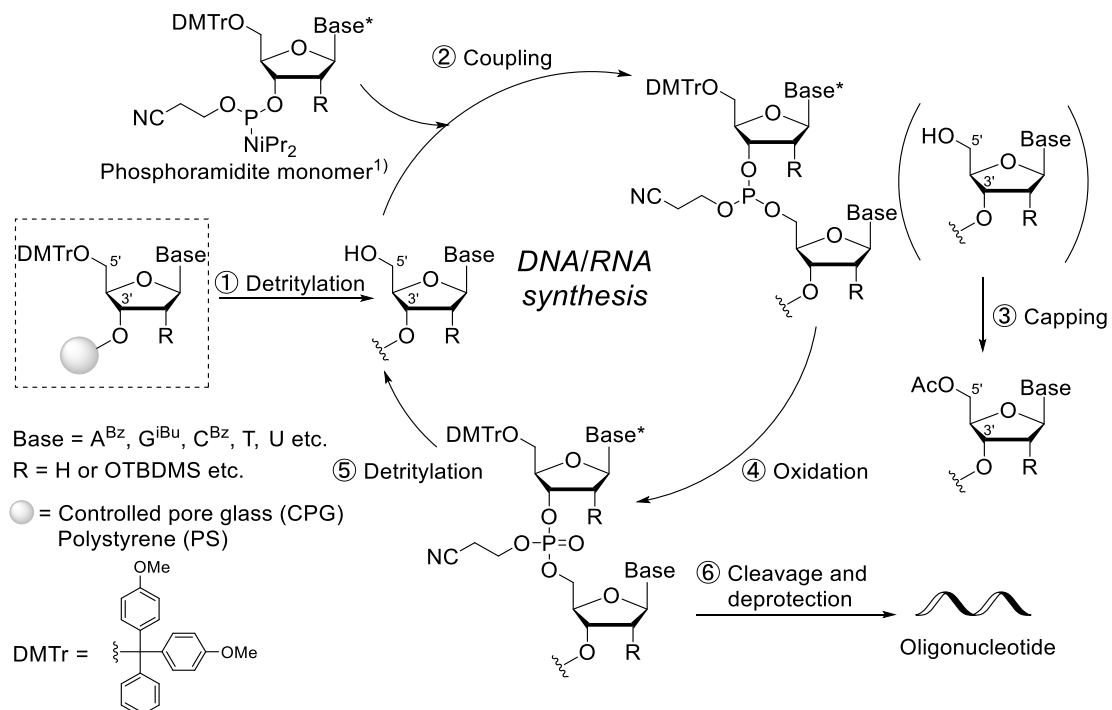
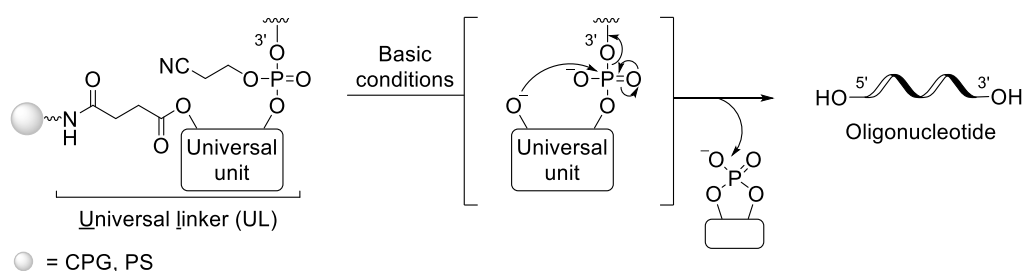


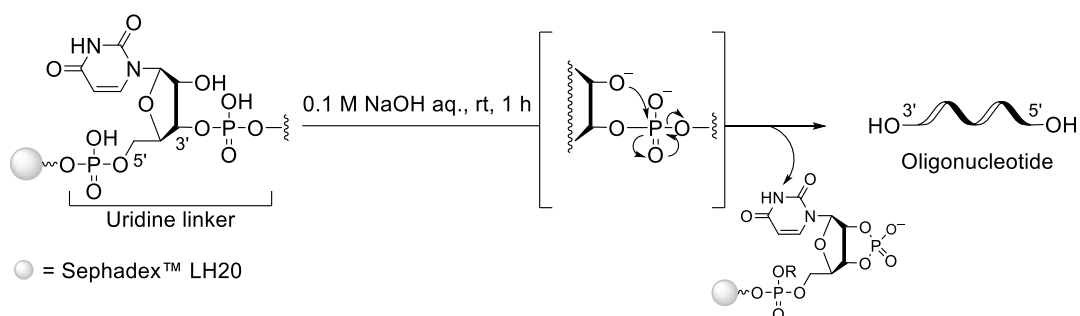
Figure 1. Synthetic cycle for oligonucleotides by a phosphoramidite method.

オリゴヌクレオチドの固相合成では、ヌクレオシドがあらかじめ担持された樹脂を用いるため、3'末端に非天然核酸や非核酸分子を持つオリゴヌクレオチドを合成することができない。そのような場合、ユニバーサルユニット (1,2-ジオール構造) を含むリンカー (ユニバーサルリンカー、UL) で表面修飾した樹脂を使用する (Scheme 1)。UL は天然の核酸塩基を有するヌクレオシドホスホロアミダイト体だけでなく、様々な非天然型ホスホロアミダイト体と縮合することができる。目的のオリゴヌクレオチドを合成後は、塩基処理を行うことで分子内求核置換反応が進行し、UL の基本となる構造であるユニバーサルユニットが除去される。これにより、3'末端に様々な分子を有するオリゴヌクレオチドの合成が可能となる。



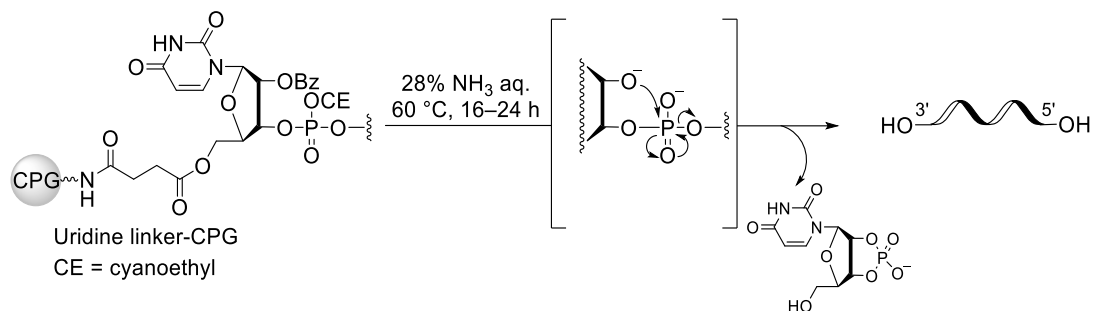
Scheme 1. Solid-phase oligonucleotide synthesis using a UL-attached resin.

UL はホスホロアミダイト法が提唱される以前から報告されており、1972 年に Köster と Heyns が、RNA オリゴヌクレオチド合成における副反応 (2'位水酸基からリン酸部への分子内求核置換反応による鎖切断)¹¹⁻¹³ を応用したものが最初である。¹⁰ この報告では、ウリジンをユニバーサルユニットとして用いており、リン酸ジエステル法³⁾ によりオリゴヌクレオチドを合成しているものの、モノマーごとに樹脂を調製することなく、3'末端修飾オリゴヌクレオチドの合成が達成された (Scheme 2)。



Scheme 2. Köster and Heyns's report.

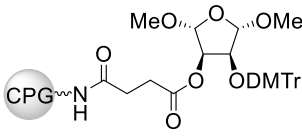
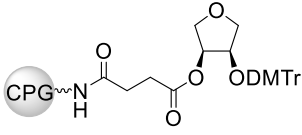
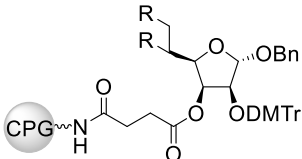
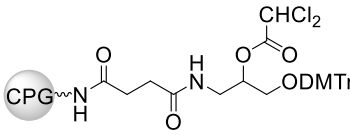
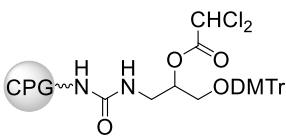
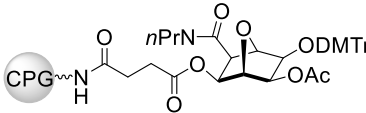
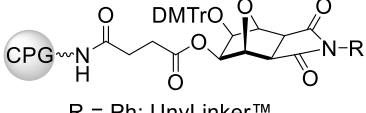
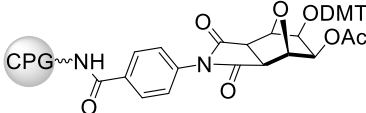
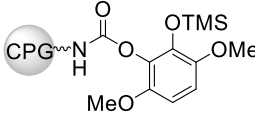
その後、Gough らは多孔質ガラス (controlled pore glass, CPG)¹⁴⁾ 表面をウリジン型のユニバーサルユニットで修飾した樹脂を用いてホスホロアミダイト法によるオリゴヌクレオチド合成を報告した (Scheme 3)。^{15), 16)} この報告により、Köster と Heyns が提唱したウリジンリンカーがホスホロアミダイト法でも利用可能であることが示された。また、Gough らはこの報告の中でウリジンリンカーのことを初めて「ユニバーサル」と呼び、UL の名称が定着する契機となった。



Scheme 3. Gough's report.

以後、UL の基本構造であるユニバーサルユニットの最適化が図られ、様々な種類のものが報告された (Table 1)。¹⁷⁻²⁷⁾ 1990 年代には、核酸塩基部を持たない単環型のユニバーサルユニットを含む UL が報告された (Table 1, entry 1-3)。中でも McLean らが開発した UL である Universal Support™ は現在でも利用されている (Table 1, entry 1)。¹⁷⁾ 2000 年代に入ると、Azhayev らによって鎖型のユニバーサルユニットを持つ UL が報告された (Table 1, entry 4, 5)。^{21), 22)} 鎖型の UL の一級水酸基とホスホロアミダイト体を縮合するため、効率よく目的のオリゴヌクレオチドを合成することができる。また、UL がアミド結合やウレア結合を介して樹脂表面に担持されているため、塩基処理後、樹脂から UL が切断されることなく目的のオリゴヌクレオチドのみを放出可能である。しかし、この UL を利用した際に用いる塩基処理 (2 M アンモニアメタノール溶液、室温、1 時間) では核酸塩基部の保護基の脱保護が完了しないため、追加で塩基処理を行う必要がある。その後、7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオール型 UL (Table 1, entry 6-8)²³⁻²⁶⁾ が用いられるようになり、近年ではその骨格からなる UnyLinker™ や Glen UnySupport™ (または CUTAG™) が汎用されている (Table 1, entry 7)。^{24), 25)} これらは濃アンモニア水、55 °C、8 時間、または AMA (濃アンモニア水と 40% メチルアミン水溶液の等量混合溶液)、65 °C、1 時間の処理でユニバーサルユニットを除去することができる。そのため、オリゴヌクレオチド合成における一般的な塩基処理条件 (濃アンモニア水、55 °C、16 時間など) で利用可能となった。

Table 1. Various ULs and their cleavage conditions.

Entry	Universal linker type	Cleavage conditions	Year	Reference
1	 <p>Universal Support™</p>	28% NH ₃ aq., 80 °C, 8 h AMA ^a , 55 °C, 17 h etc.	1994	17
2	 <p>Rainbow™ Universal</p>	0.5 M LiCl in 28% NH ₃ aq., 55 °C, 16 h	1997	18, 19
3	 <p>R = NHCOCF₃</p>	28% NH ₃ aq., 80 °C, 7 h AMA ^a , 53 °C, 17 h 0.5 M Zn ₂ Cl in 28% NH ₃ aq., 80 °C, 1 h etc.	1999	20
4	 <p>Universal Support II™</p>	2 M NH ₃ /MeOH, rt, 1 h	2001	21
5	 <p>Universal Support III™</p>		2011	22
6		28% NH ₃ aq., rt, 6 h then 55 °C, 8 h	2002	23
7	 <p>R = Ph: UnyLinker™ R = Me: Glen UnySupport™, CUTAG™</p>	28% NH ₃ aq., 55 °C, 8 h AMA ^a , 65 °C, 1 h	2006, 2008	24, 25
8		28% NH ₃ aq., 55 °C, 13 h	2007	26
9		28% NH ₃ aq., 80 °C, 2 h AMA ^a , 55 °C, 5 h etc.	2007	27

^a28% NH₃ aq. : 40% MeNH₂ aq. = 1 : 1

しかし、加熱下での塩基処理に弱い基質 (RNA など) を含むオリゴヌクレオチドを合成する場合は、これら UL を利用することが難しい。例えば、RNA の場合、加熱下での塩基処理により、2'位水酸基の保護基 (TBDMS 基など) が一部切断され、その後遊離した 2'位水酸基のアニオンが分子内のリン酸を求核攻撃し、3'位から 2'位へのリン酸の転移や加水分解による鎖切断が起こり、目的のオリゴヌクレオチドの収率が大きく低下する (Figure 2)。

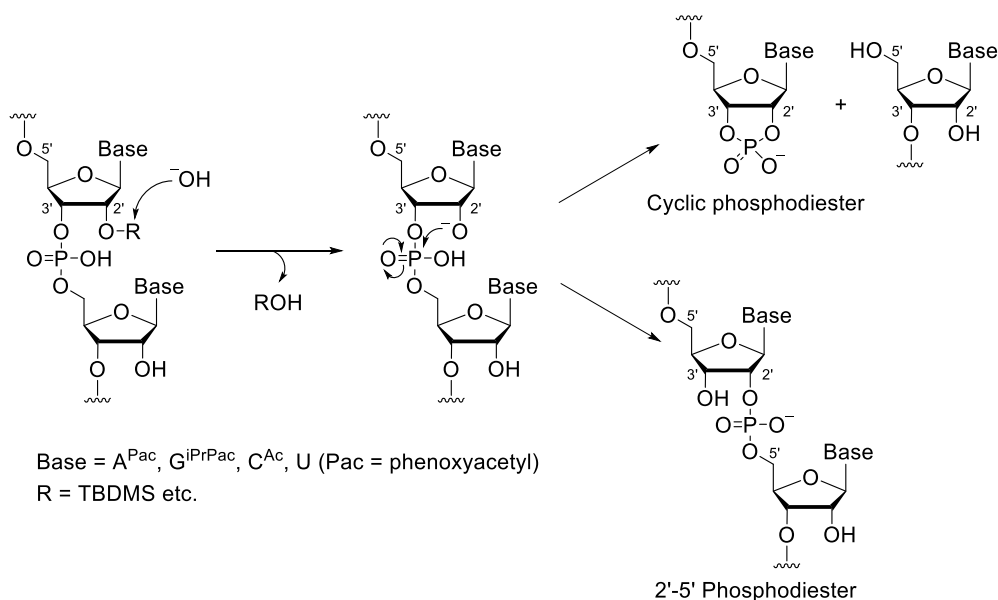


Figure 2. Strand cleavage of RNA oligonucleotides under basic conditions.

また、ユニバーサルユニットを除去するための塩基処理が不十分である場合、オリゴヌクレオチドを放出する前の中間体であるユニバーサルユニット付加体が生じる (Figure 3)。この付加体は、目的のオリゴヌクレオチドの精製をしばしば困難とする。特に、多数のジアステレオ混合物であるホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチド^{28),29)}では、HPLC 上でピークがブロード化する傾向があるため、精製がより困難となる。上記の「ユニバーサルユニットの除去条件が過酷」や「精製が困難」といった二つの課題は、未だに改善の余地があると言える。しかし、UL に関する研究は近年ではほとんど行われていないのが現状である。そこで著者は、新たな材料の開発を行うことで、これら問題の克服を目指した。

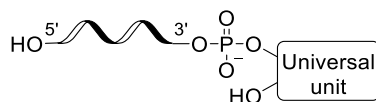


Figure 3. Universal unit attached-oligonucleotides.

本論文の第一章では、UL を用いたオリゴヌクレオチド固相合成における精製の問題を克服するため、高脂溶性かつ、高い化学安定性を持つビスクロ[2.2.2]オクタン-2,3-ジオール型 UL を開発した。この UL を固相合成に利用することで、やや過酷な塩基処理 (濃アンモニア水、55 °C、48 時間) を要するものの、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体を脂溶性の差を利用して容易に分離できることが判明した。

第二章では、第一章の知見を基に 7-オキサビスクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオールに脂溶性ユニットを付与したユニバーサルユニットを持つ UL を開発した。特に、脂溶性ユニットとしてフェナンスレンを付与した UL では、オリゴヌクレオチドを容易に精製できるだけでなく、汎用されている UL と同じ塩基条件 (濃アンモニア水、55 °C、8 時間など) 下、ユニバーサルユニットを除去できることが明らかになった。

第三章では、ユニバーサルユニットの除去条件をさらに温和にするため、*O*-アルキルホスホロアミダイトを開発した。このホスホロアミダイト体をオリゴヌクレオチドの 3' 末端に用いることで、オリゴヌクレオチド合成における温和な塩基条件として知られる UltraMILD Deprotection 条件 (濃アンモニア水、室温、2 時間または 50 mM 炭酸カリウム無水メタノール溶液、室温、4 時間)³⁰⁾ や UltraFAST Deprotection 条件 (AMA、室温、5 分)³⁰⁾ でユニバーサルユニットを除去できることを見出した。

第四章では、ユニバーサルユニットを含むホスホロアミダイトを新たに開発し、UL 修飾樹脂を必要としないオリゴヌクレオチド合成や従来よりも効率的なオリゴヌクレオチドのタンデム合成を実現できることを見出した。特にタンデム合成では、低分子干渉二重鎖 RNA (siRNA) オリゴヌクレオチド合成における二重鎖核酸を調製する手間を簡略化できる可能性を見出した。

第一章 ビシクロ[2.2.2]オクタン-2,3-ジオール骨格を持つ高脂溶性ユニバーサルリンカーの開発

第一節 UL の分子設計と合成

現在汎用されている UL 修飾樹脂 (UnyLinker™、Glen UnySupport™ または CUTAG™) は共通構造としてイミドを持ち、塩基処理により開環することでいくつかの副生成物が得られることが報告されている (Figure 4)。^{25), 31)} そのため、不十分な塩基処理を行った場合に生じるユニバーサルユニット付加体のピークは、HPLC 上で複数現れることとなり、目的のオリゴヌクレオチドの精製を困難にする。そこで、塩基処理に安定かつ高脂溶性のユニバーサルユニットを持つ UL の開発を目指した。これまでに開発されたユニバーサルユニットの中で、ジオール部をビシクロ型で固定したものが最もオリゴヌクレオチドの放出効率が高い (緒論、Table 1)。そこで、ユニバーサルユニットとしてビシクロ[2.2.2]オクタン-2,3-ジオール構造を持つ **UL1-3** を考案した (Figure 5)。これらは UnyLinker™ と Glen UnySupport™ (または CUTAG™) が持つユニバーサルユニットと比較して化学安定性や脂溶性が高いことが予想され、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体の HPLC 分離を容易にすることが期待される。

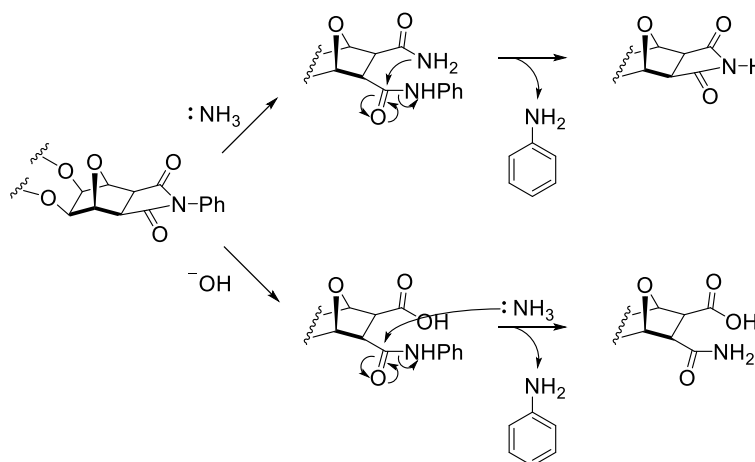


Figure 4. Mechanism of maleimide ring opening.

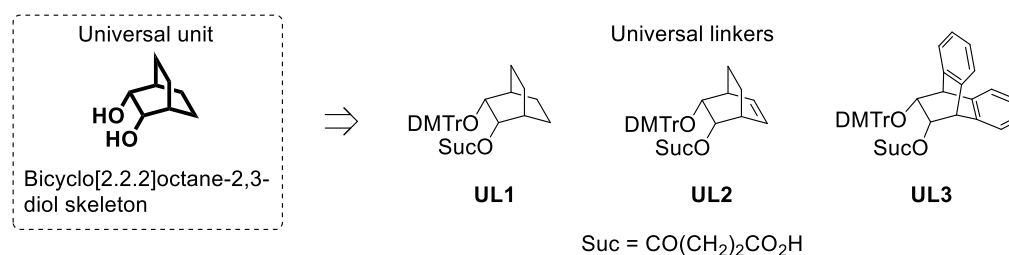
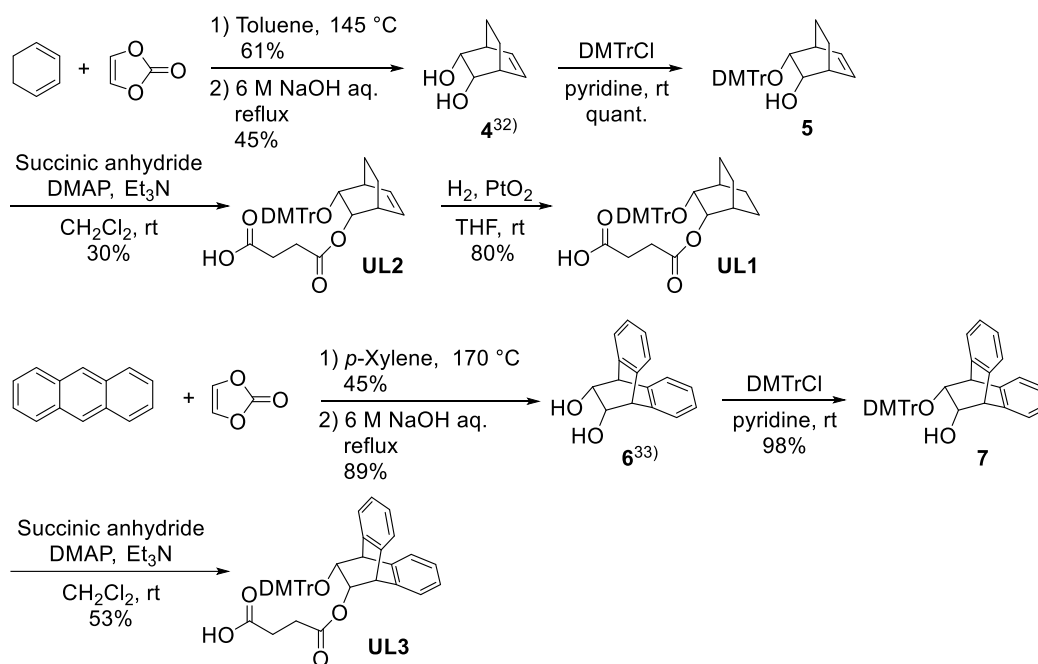


Figure 5. Universal linkers designed in this study.

設計した UL の合成経路を Scheme 4 に示す。1,3-シクロヘキサジエンとビニレンカーボナートとの Diels-Alder 反応、続くカーボナートの加水分解を行うことで、基本骨格となる文献既知のジオール体 **4** を得た。³²⁾ 続いて、**4** の DMTr 化を行うことで DMTr 体 **5** を得た。次に、**5** と無水コハク酸との縮合により樹脂に担持する前駆体である不飽和型 **UL2** を得た。また、**2** のオレフィン部分に対して酸化白金を触媒として用いた接触水素化を行うことで飽和型 **UL1** を得た。ジベンゾ型 **UL3** はアントラセンとビニレンカーボナートから³³⁾ 不飽和型 **UL2** と同様の手順で合成した。



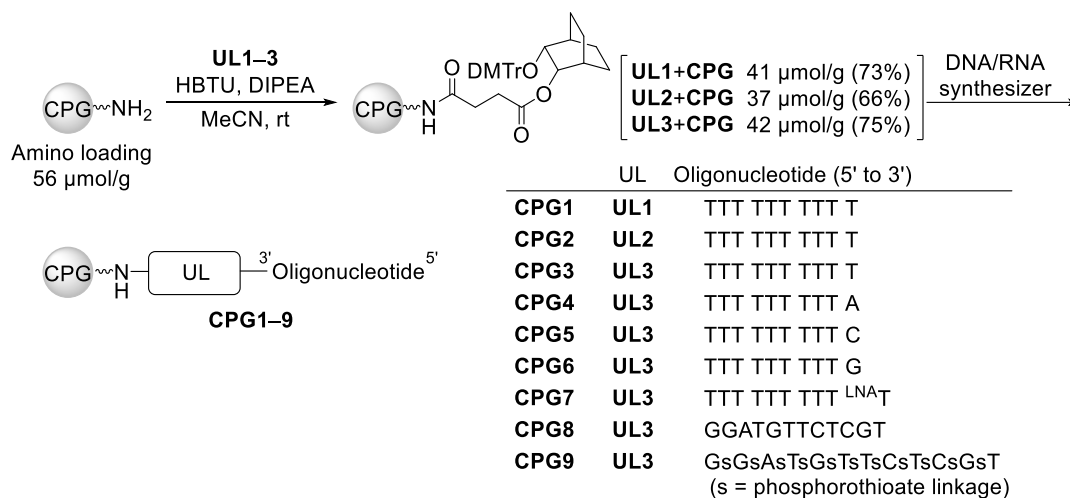
Scheme 4. Synthesis of UL1-3.

第二節 UL を利用したオリゴヌクレオチド合成

合成した 3 種類の **UL1-3** と表面がアミノ基修飾された CPG を、2-(1*H*-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスファート (HBTU) を用いて縮合しそれぞれの UL 修飾樹脂 (**UL1-3+CPG**) を得た (Scheme 5)。UL の樹脂への担持量を DMTr アッセイ法^{注1}により算出した結果、縮合収率は 66-75%であった。得られた UL 修飾樹脂を用いて、Scheme 5 に示す配列を有するオリゴヌクレオチドを DNA/RNA 自動合成装置を使用し、0.2 μmol スケールで固相合成した。固相合成の脱 DMTr 化工程と UL との縮合工程のみ反応時間を延長した (脱 DMTr 化工程: 8 秒→20 秒、縮合工程: 25 秒→10 分)。オリゴヌクレオチド合成終了時、オリゴヌクレオチドの 5'末端

注1 3 w/v%トリクロロ酢酸ジクロロメタン溶液などの酸溶媒により修飾樹脂を処理し、その際遊離する DMTr⁺の吸収極大波長 (504 nm) における吸光度の値から、樹脂表面に担持された DMTr 基を有する化合物の量を算出した。³⁴⁾

の DMTr 基を脱保護した (DMTr-off モード)。なお、オリゴヌクレオチドの合成は DNA/RNA 自動合成装置のトリチルモニターの値から、いずれの配列でも定量的に進行していることを確認した (平均縮合効率 **CPG1–3**: $\geq 99.3\%$ 、**CPG4–9**: $\geq 99.0\%$)。



Scheme 5. Loading of **UL1–3** onto CPG and synthesis of oligonucleotides.

第三節 塩基処理によるオリゴヌクレオチドの放出効率の評価

核酸塩基の保護基の不要なチミジン 10 mer (T_{10}) からなる **CPG1–3** に対して、オリゴヌクレオチド合成において一般的に用いられる濃アンモニア水、55 °C、16 時間処理や、50 mM 炭酸カリウム無水メタノール溶液、室温、24 時間処理を行った (Figure 6)。続いて、HPLC 分析により目的のオリゴヌクレオチド (T_{10}) とユニバーサルユニット付加体 (T_{10-1-3}) のピーク面積比を算出した。それぞれのオリゴヌクレオチドは、ESI-MS により同定した。また、 T_{10-1} や T_{10-3} で確認される 2 種類の近接したピークは、それぞれ同じ m/z であり、ユニバーサルユニットに由来するジアステレオマーであると考えられる。飽和型 **UL1** を用いた場合、いずれの条件でも T_{10} の放出される割合が低く、オリゴヌクレオチドの放出が不十分であった (左の HPLC チャート: $T_{10} : T_{10-1} = 38 : 62$ 、右の HPLC チャート: $T_{10} : T_{10-2} = 22 : 78$)。次に、不飽和型 **UL2** を用いた場合では、飽和型 **UL1** の結果よりも T_{10} の放出される割合が高くなった (左の HPLC チャート: $T_{10} : T_{10-2} = 55 : 45$ 、右の HPLC チャート: $T_{10} : T_{10-2} = 62 : 38$)。さらに、ジベンゾ型 **UL3** を用いた場合では、濃アンモニア水を用いる条件において最も T_{10} の放出割合が高く ($T_{10} : T_{10-3} = 78 : 22$)、効率的にユニバーサルユニットからオリゴヌクレオチドを放出できることが判明した。また、 T_{10-1} と T_{10-2} はアセトニトリル濃度 5% から 15% のグラジエントで ODS カラムから溶出したのに対して、 T_{10-3} は同条件下溶出しなかった (Figure 6 ではアセトニトリル濃度 8% から 18% を使用)。これは、**UL3** が持つユニバーサルユニットの高い脂溶性によると考えられる。これらの結果から、オリゴヌクレオチドの放出効率と分離精製の点において **UL3** が最も有用であることが示された。

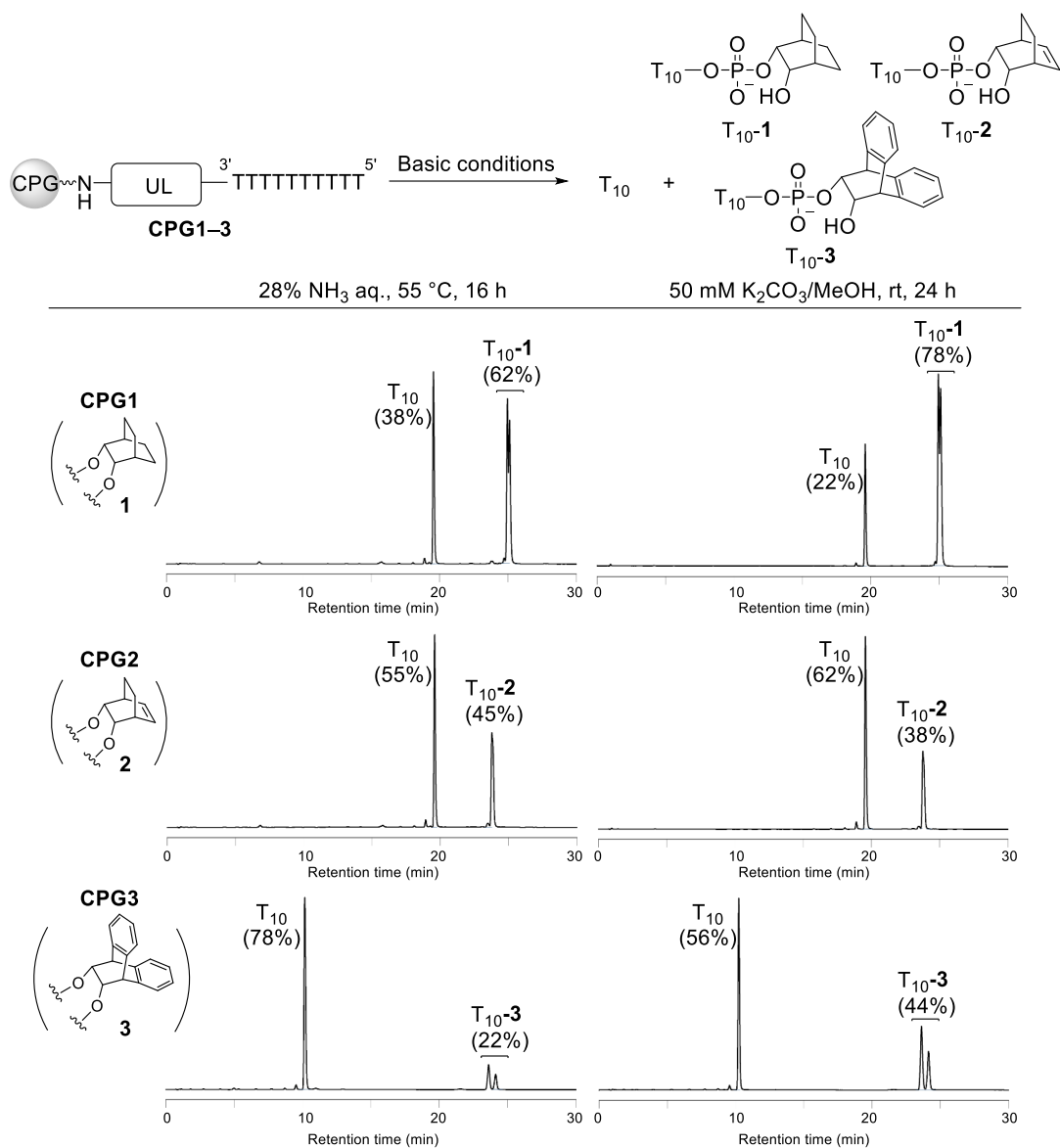


Figure 6. HPLC analysis of the T₁₀ released from CPG1-3 under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6 × 50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 (CPG1 and CPG2) and a/b = 92/8 to 82/18 (CPG3) for 30 min (a, 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) in H₂O; b, MeCN).

3'末端に様々なヌクレオシドモノマーを含むオリゴヌクレオチドである CPG4-7 を濃アンモニア水、55 °C、16 時間処理を行い、HPLC 分析を行った (Figure 7)。その結果、3'末端のヌクレオシドの種類にかかわらず、UL3 が適用できることが示された (T₉X : T₉X-3 =>80 : 20, X = A, C, G)。その際、3'末端が T よりも他の塩基の方が、ユニバーサルユニットの除去が速いことが分かり、2',4'-架橋型核酸 (LNA) 修飾体 CPG7 では付加体のピークがほぼ消失し、目的のオリゴヌクレオチドのみが確認された (T₉^{LNA}T : T₉^{LNA}T-3 =>99 : 1)。

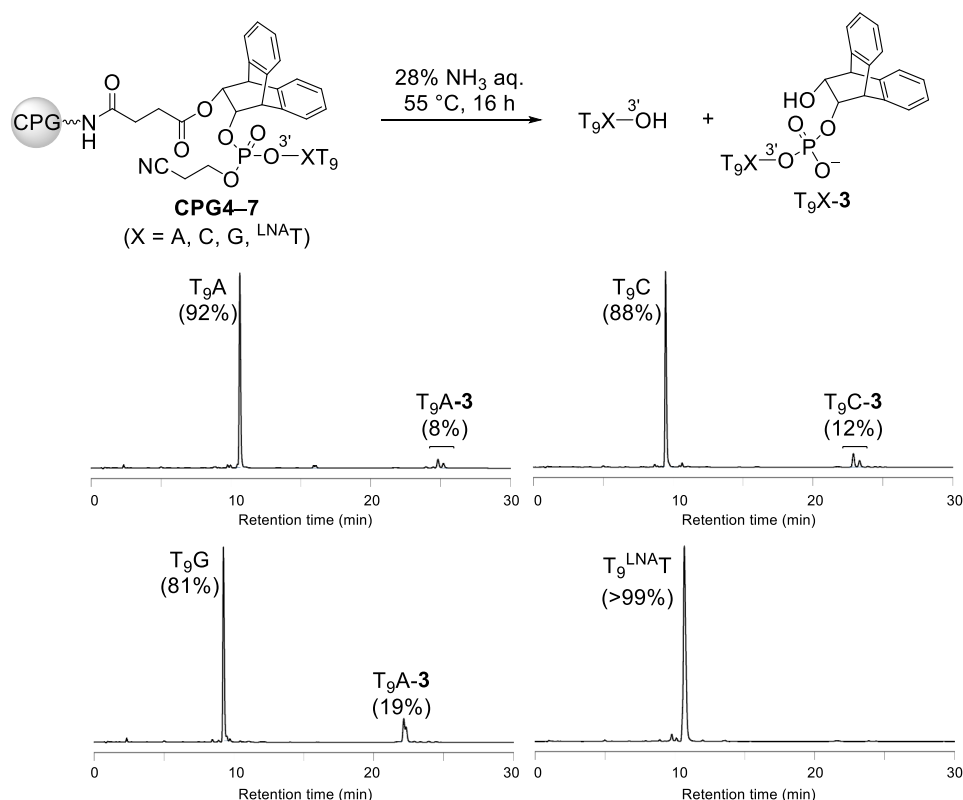


Figure 7. HPLC analysis of the T₉X (X = A, C, G, LNAT) released from CPG4-7 under basic condition. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6 × 50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 92/8 to 82/18 (CPG4-7) for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H₂O; b, MeCN).

続いて、市販の UL (Universal Support™, US) を用いた時のオリゴヌクレオチドが放出される割合を調べた (Figure 8)。US を用いて合成したオリゴヌクレオチド (T₁₀, T₉A, T₉C, T₉G) を Figure 7 と同条件 (濃アンモニア水、55 °C、16 時間) で処理した結果、いずれの配列においても、目的のオリゴヌクレオチド (T₉X) とユニバーサルユニット付加体 (T₉X-US) とのピークが近くなり、ジベンゾ型 UL3 を用いた場合よりも低い放出効率 (T₉X:T₉X-US=>60:40) であった。この結果から、市販の US よりも UL3 の方が、HPLC 上で目的のオリゴヌクレオチドを容易に分離精製でき、高い放出効率を示した。また、今回開発した UL3 や市販の US において、3'末端が T である場合、オリゴヌクレオチドが放出しにくいことが分かった。この特徴は UL 修飾樹脂を用いたオリゴヌクレオチド合成に共通する可能性が示唆された。

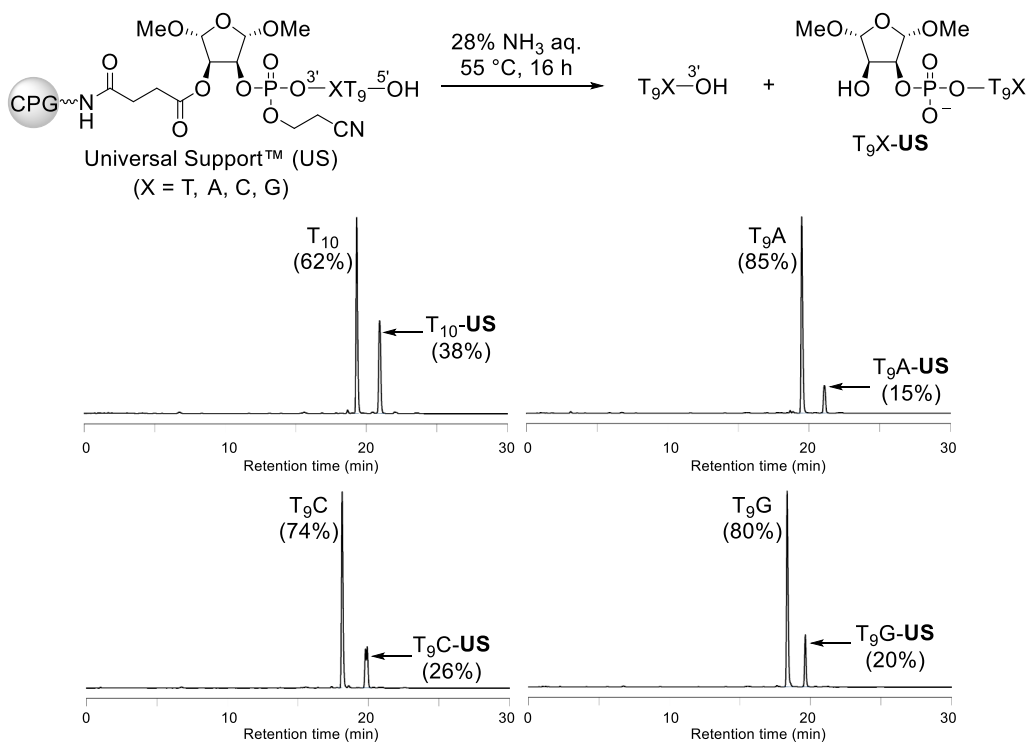


Figure 8. HPLC analysis of the T_9X ($X = T, A, C, G$) released from US under basic condition. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40°C ; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

次に、4種類の核酸塩基 (T, A, C, G) を含むオリゴヌクレオチドからなる **CPG8** を用いて、ジベンゾ型 **UL3** 由来のユニバーサルユニット付加体が消失する塩基条件を検討した (Figure 9)。その結果、濃アンモニア水、 55°C 、48 時間処理や濃アンモニア水、 80°C 、8 時間処理で、ユニバーサルユニット付加体がほぼ消失することが示された。しかし、オリゴヌクレオチドの放出にはビシクロ構造を持つ **UnyLinker™** や **Glen UnySupport™** および **CUTAG™** (除去条件: 濃アンモニア水、 55°C 、8 時間など) よりも長時間要することとなった。

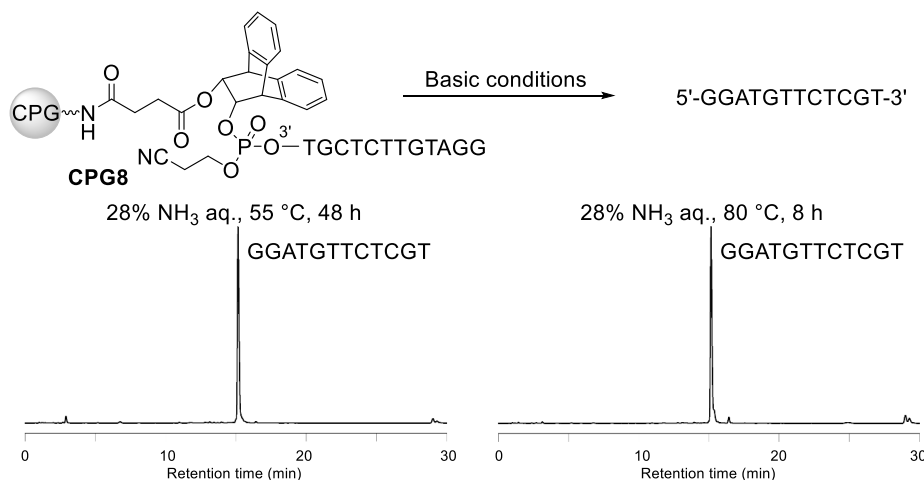


Figure 9. HPLC analysis of the mixed sequence oligonucleotide released from **CPG8** under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40°C ; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

以前 McLean らは 3 種類の UL (US、A、B) を開発し、それらのオリゴヌクレオチド放出効率は US で最も高くなることを報告している (Figure 10)。¹⁷⁾ おそらく、ユニバーサルユニット環内に酸素原子を導入することでアルコールの酸性度が上がり、速やかに分子内環化反応が進行したと考えられる。この知見から、環内が炭素原子のみで構成されているジベンゾ型 **UL3** はアルコールの酸性度が低くなり、オリゴヌクレオチドの放出に時間を要したと考えられる。しかしながら、**UL3** は市販の US と同塩基条件 (濃アンモニア水、80 °C、8 時間) でオリゴヌクレオチドを放出可能であることから、十分実用に耐えうるものと考えられる。

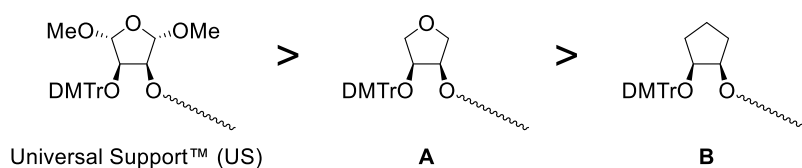


Figure 10. Releases efficiency of oligonucleotides from ULs.

最後に、ジベンゾ型 **UL3** をホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドの合成に適用した (Figure 11)。多くの核酸医薬品に採用されているホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドは、リン酸ジエステルの酸素原子の一つが硫黄原子に置換されており、リン原子上に不斉中心を持つため多数のジアステレオ混合物となる。そのため、HPLC 上で複数のピークが重なることでピークがブロード化し、ユニバーサルユニット付加体の分離がしばしば困難となる。実際に、市販の US を用いた場合では、一つの幅広いピーク中に目的のオリゴヌクレオチド (s-oligo, calcd: 3844.09 [M], found: 3843.90) とユニバーサルユニット付加体 (s-oligo-US, calcd: 4070.21 [M], found: 4070.00) のピークが重なり分離することが困難であった (Figure 11、右の HPLC チャート)。それに対して **UL3** を用いた場合、ユニバーサルユニットの高い脂溶性により、ユニバーサルユニット付加体 (s-oligo-3) を容易に分離できることが明らかになった (Figure 11、左の HPLC チャート)。

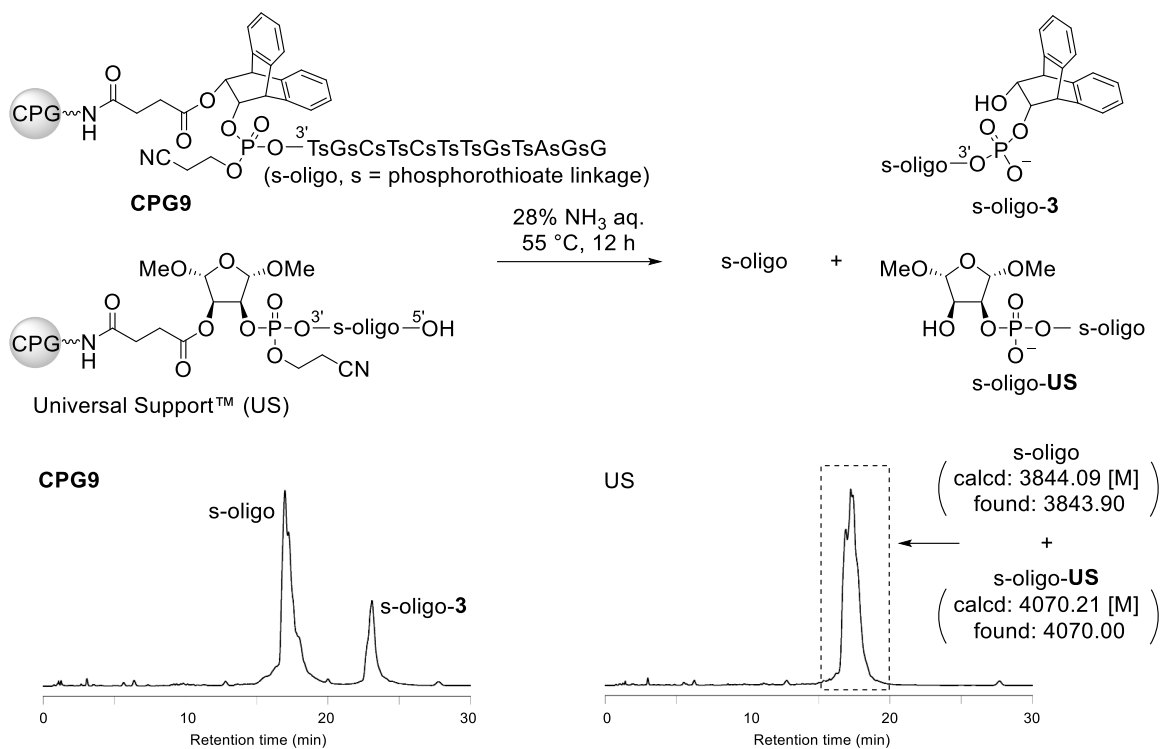


Figure 11. HPLC analysis of the phosphorothioate-modified oligonucleotide (s-oligo) released from **CPG9** and **US** under basic condition. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6 × 50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 75/25 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H₂O; b, MeCN).

以上、ビスシクロ[2.2.2]オクタン-2,3-ジオールを有するジベンゾ型 **UL3** の開発に成功した。これを用いることで、オリゴヌクレオチドの放出に従来よりも時間がかかるものの、ユニバーサルユニットの脂溶性や化学安定性の高さから、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体を容易に分離できることが明らかになった。

第二章 脂溶性を向上させた 7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオール骨格を持つ高脂溶性 UL の開発

第一節 UL の分子設計と合成

前章で開発したジベンゾ型 **UL3** により、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体を脂溶性の差を利用して容易に分離することができた。しかし、ユニバーサルユニットからオリゴヌクレオチドを放出するためには、従来よりも長時間の加熱処理 (濃アンモニア水、55 °C、48 時間) を必要とした。そこで、より短時間でオリゴヌクレオチドを放出することを目指し、UL の基本骨格として 7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオール骨格に脂溶性ユニットを付与したユニバーサルユニットを持つ **UL8a-e**、**UL9a-d** を考案した (Figure 12)。本骨格は現在汎用されている UL (UnyLinker™、Glen UnySupport™または CUTAG™) の基本骨格であり、それらに使用される塩基条件 (濃アンモニア水、55 °C、8 時間) でオリゴヌクレオチドの放出が可能であると考えられる。さらに、設計した UL が持つ脂溶性ユニットにより、前章と同様、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体を脂溶性の差を利用して簡便に分離できることが期待される。

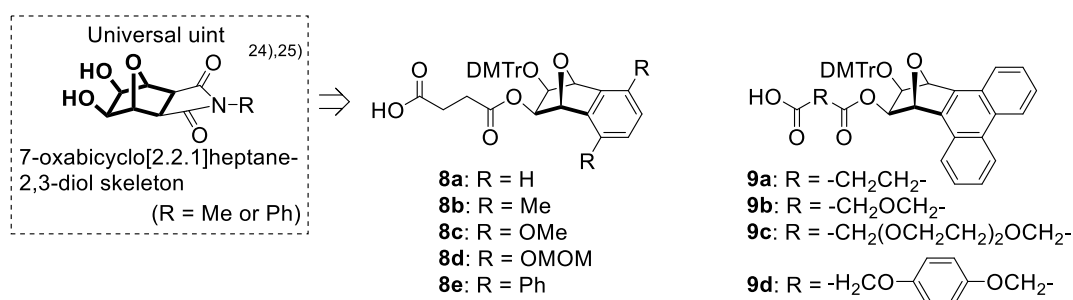
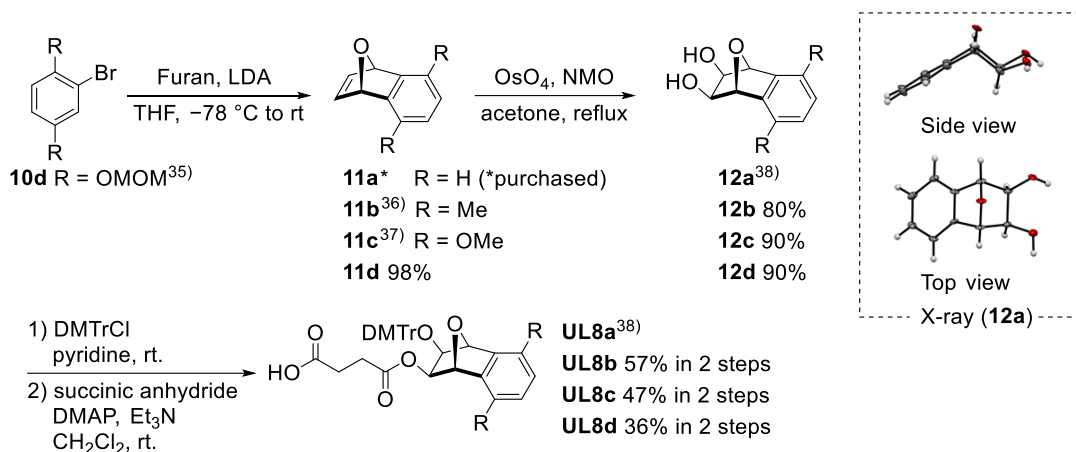


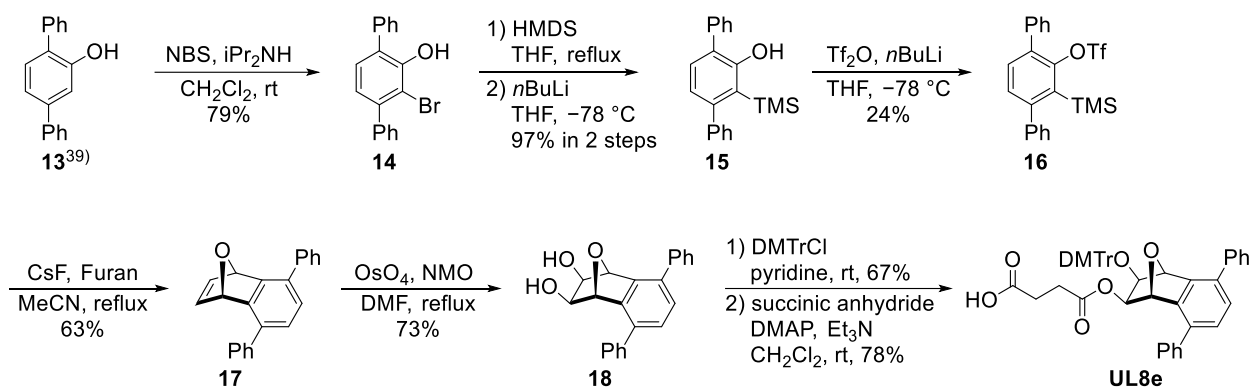
Figure 12. Universal linkers designed in this study.

設計した **UL8a-d** の合成経路を Scheme 6 に示す。**UL8a** の合成については既知の文献に従い、³⁸⁾ 市販のオレフィン体 **11a** から合成した。まず、4-メチルモルホリン-N-オキシドと触媒量の四酸化オスミウムによるジヒドロキシル化を行うことでジオール体 **12a** を得た。なお、**12a** の立体構造を X 線結晶構造解析により確認したところ、ジオール部は酸素原子と同じ側であることが判明した。これは、脂溶性ユニットのベンゼン環が立体障害となり、原子半径の大きい四酸化オスミウムが酸素原子側から選択的に接近するためであると考えられる。その後、DMTr 化、無水コハク酸を用いた縮合を行い、樹脂に担持する前駆体である **UL8a** を得た。**UL8b** と **UL8c** については既知の文献^{36),37)} に従い合成したオレフィン体 **11b** と **11c** を用い、**UL8a** と同様の手順で合成した。また、**UL8d** は LDA 存在下、プロモ体 **10d**³⁵⁾ とフランとの Diels-Alder 反応にてオレフィン体 **11d** へと導き、その後は **UL8a** と同様の手順で合成した。



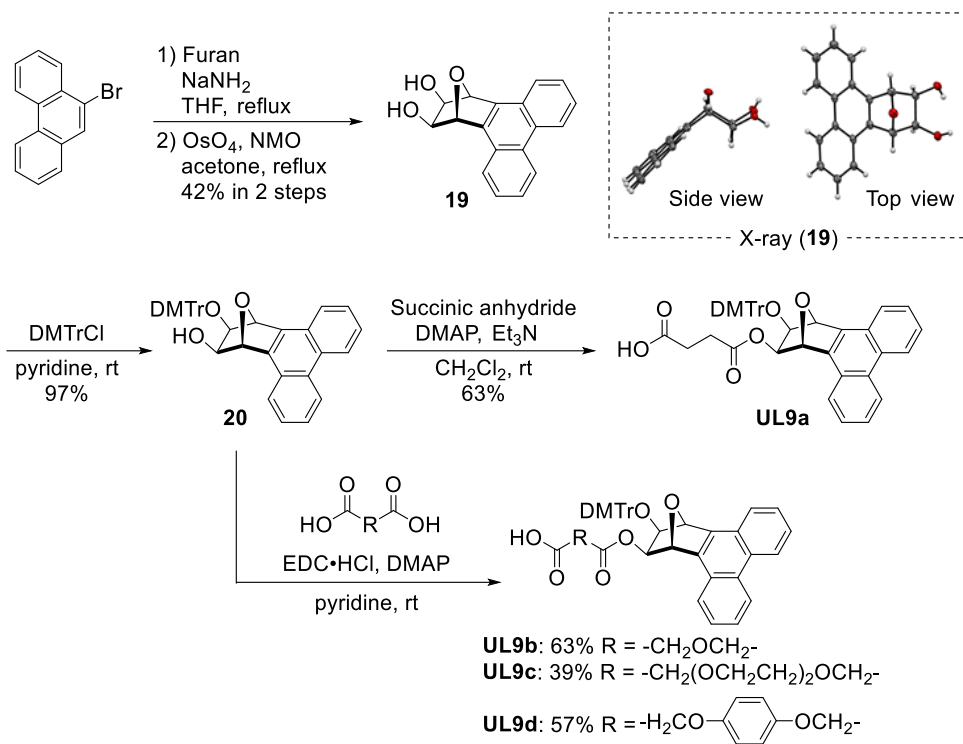
Scheme 6. Synthesis of **UL8a–d**.

ターフェニル構造を持つ **UL8e** の合成は以下の Scheme 7 に従って合成した。文献既知の 2,5-ジフェニルフェノール³⁹⁾ を出発原料とし、*N*-ブロモスクシンイミドと触媒量のジイソプロピルアミン⁴⁰⁾ を用いてオルト位のプロモ化を行い、ブロモ体 **14** を得た。次に、フェノール性水酸基をトリメチルシリル基で保護し、続けてトリメチルシリル基の転位反応を行うことでトリメチルシリル体 **15** を得た。続いて、トリフルオロメタンスルホン酸無水物を用いてフェノール性水酸基を保護することで、トリメチルシリルトリフラート体 **16** を得た。その後、フッ化セシウム存在下、フランとの Diels-Alder 反応によりオレフィン体 **17** を得た。その後は Scheme 6 と同様の手順で、目的の樹脂に担持する前駆体である **UL8e** を得た。



Scheme 7. Synthesis of **UL8e**.

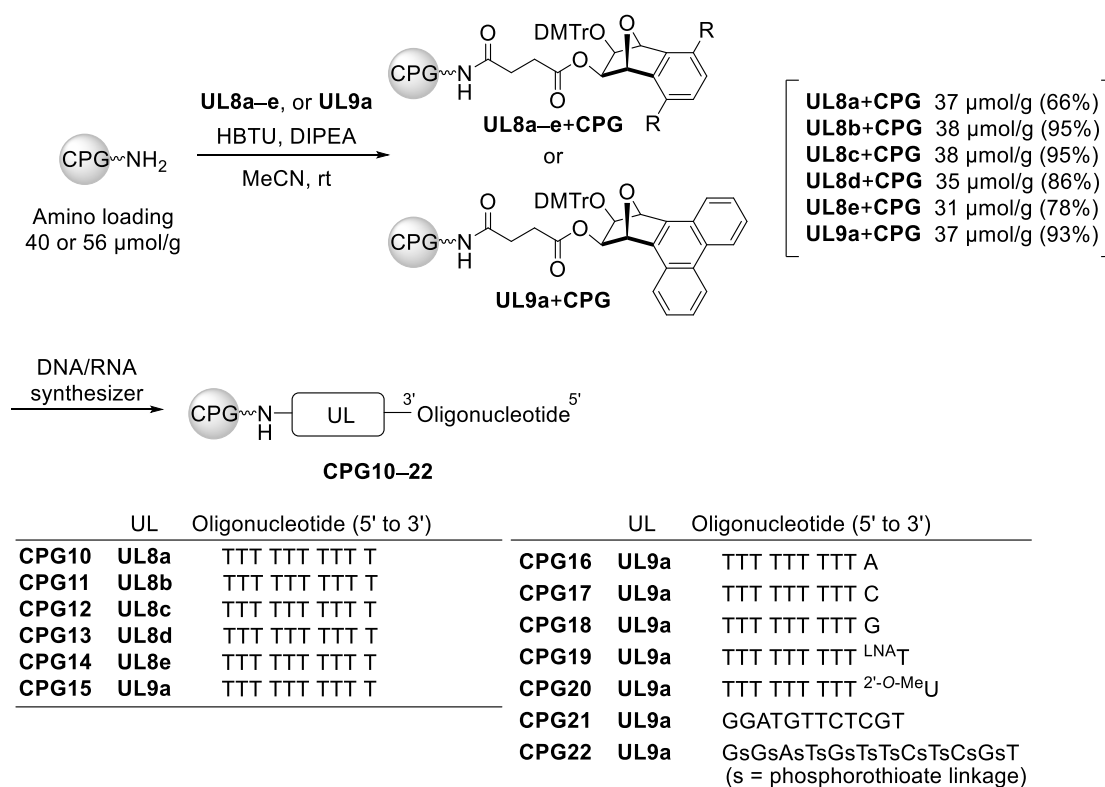
フェナンスレン構造を持つ **UL9a–d** の合成経路を Scheme 8 に示す。市販の 9-ブロモフェナンスレンを出発原料に用いて、Scheme 6 と同様の手順で合成し、**UL9a** を得た。なお、ジオール体 **19** の立体構造は X 線結晶構造解析により確認した。また、DMTr 体 **20** とジカルボン酸を 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC·HCl) を用いた脱水縮合により、リンカー部の構造が異なる **UL9b–d** を得た。



Scheme 8. Synthesis of **UL9a-d**.

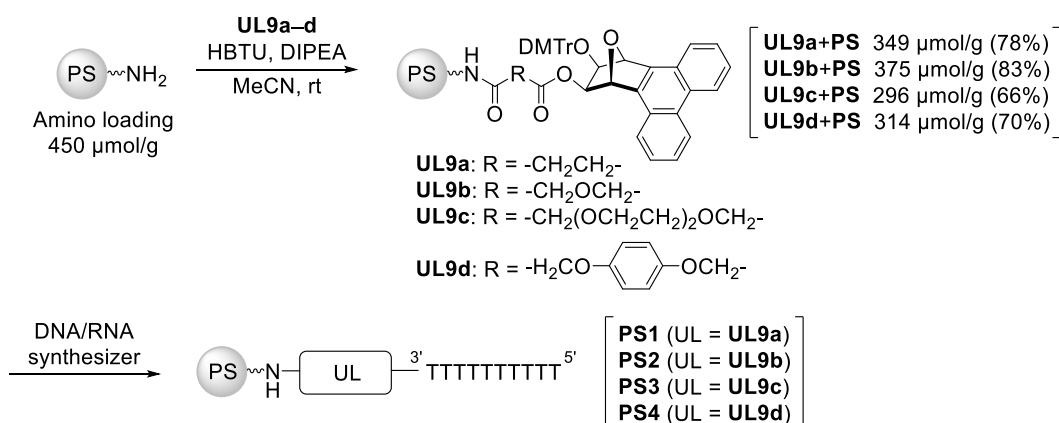
第二節 UL を利用したオリゴヌクレオチド合成

合成した 6 種類の **UL8a-e** および **UL9a** と表面がアミノ基修飾された CPG を、HBTU を用いて縮合し望みの UL 修飾樹脂 (**UL8a-e+CPG**, **UL9a+CPG**) を得た (Scheme 9)。**UL8a-e** および **UL9a** の樹脂への担持量は DMTr アッセイ法により算出した結果、縮合収率は 66–95%であった。次に、得られた UL 修飾樹脂を用いて Scheme 9 に示す配列を有するオリゴヌクレオチドを DNA/RNA 自動合成装置を用いて 0.2 μmol スケールで固相合成した。固相合成の脱 DMTr 工程と UL との縮合工程のみ、反応時間をそれぞれ 20 秒、10 分に延長した。なお、オリゴヌクレオチド合成効率は DNA/RNA 自動合成装置のトリチルモニターの値から、いずれの配列でも定量的に進行していることを確認した (平均縮合効率 **CPG10–15**: ≥99.4%、**CPG16–22**: ≥99.1%)。



Scheme 9. Loading of **UL8a–e** and **UL9a** onto CPG and synthesis of oligonucleotides.

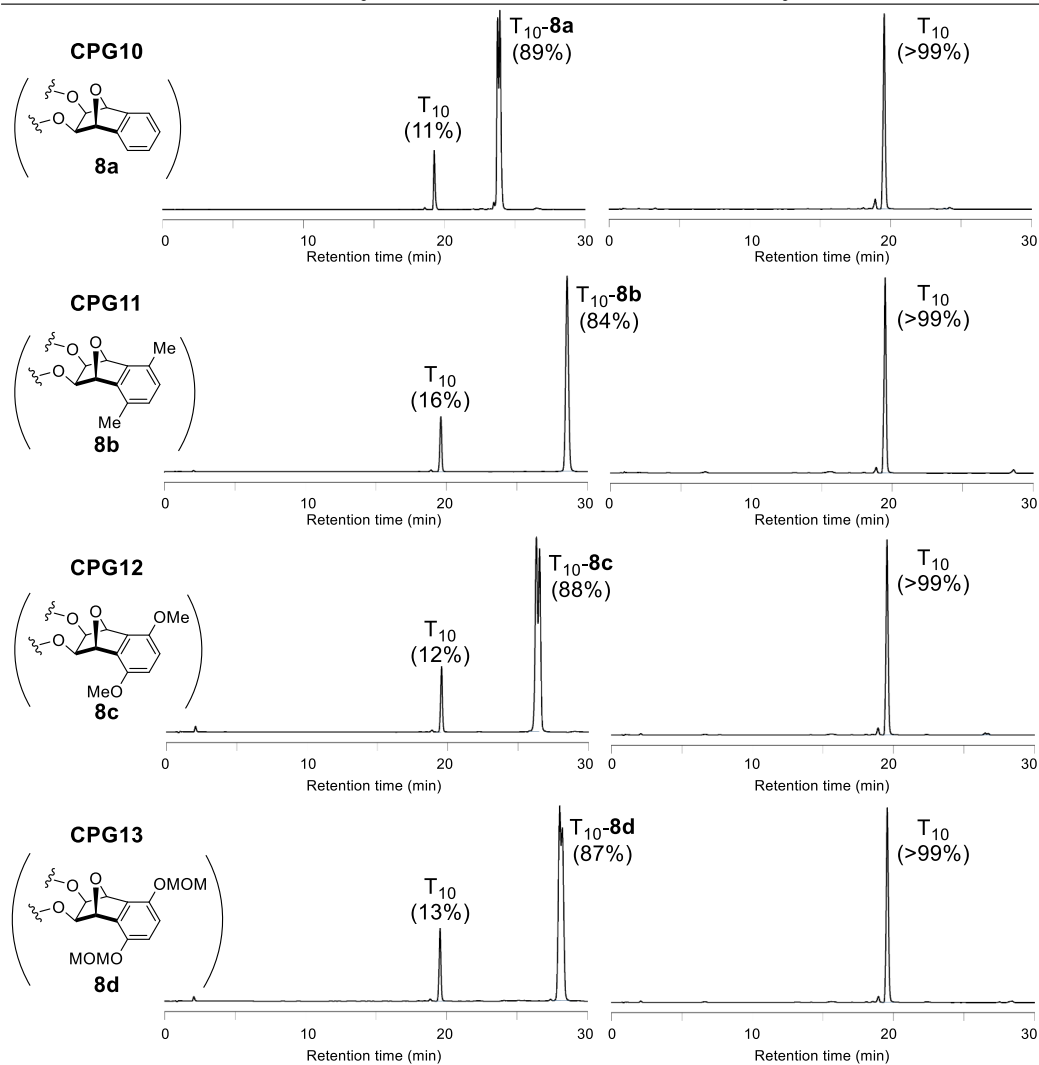
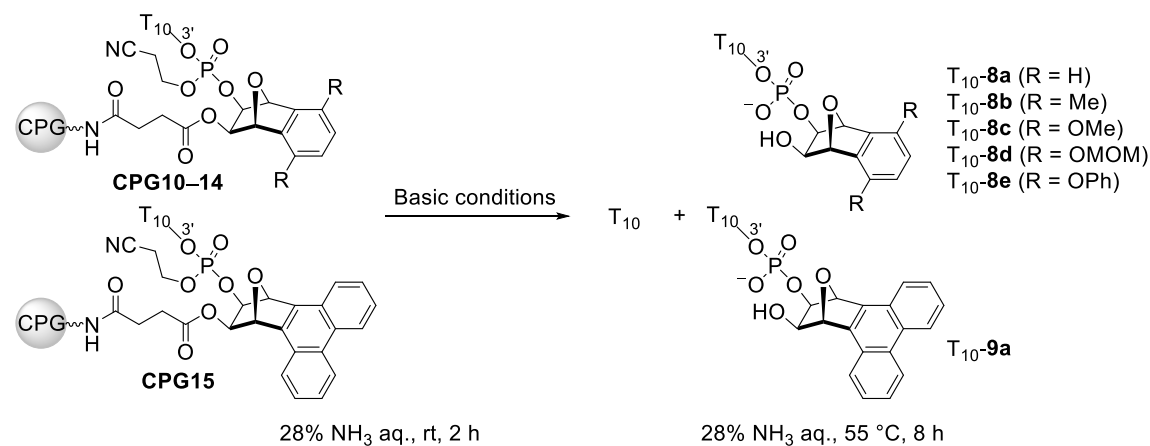
また、合成した 4 種類のフェナンスレン型 **UL9a–d** と表面がアミノ基修飾された PS を、HBTU を用いて縮合し望みの UL 修飾樹脂をそれぞれ得た (Scheme 10)。UL の樹脂への担持量 DMTr アッセイ法により算出した結果、縮合収率は 66–83%であった。得られた UL 修飾樹脂を用いて Scheme 10 に示す T₁₀ モデル配列を有するオリゴヌクレオチドを DNA/RNA 自動合成装置を用いて 1 μmol スケールで固相合成した。固相合成の脱 DMTr 工程と UL との縮合工程のみ、反応時間をそれぞれ 30 秒、10 分に延長した。なお、オリゴヌクレオチド合成効率は DNA/RNA 自動合成装置のトリチルモニターの値から、いずれの配列でも定量的に進行していることを確認した (平均縮合効率 **PS1–4**: ≥99.8%)。このことから、UL とホスホロアミダイト体の縮合は、問題なく進行したと考えられる。



Scheme 10. Loading of UL9a–d onto PS and synthesis of oligonucleotides.

第三節 塩基処理によるオリゴヌクレオチドの放出効率の評価

核酸塩基の保護基の不要なチミジン 10 mer (T_{10}) からなる **CPG10–15** に対して、オリゴヌクレオチド合成において利用される最も温和な塩基条件の 1 つである濃アンモニア水、室温、2 時間処理および、汎用されている UL の除去条件である濃アンモニア水、55 °C、8 時間処理を行った (Figure 13)。その後、HPLC 分析により、目的のオリゴヌクレオチド (T_{10}) とユニバーサルユニット付加体 (T_{10} -**8a–e** および T_{10} -**9a**) のピーク面積比を算出した。それぞれのオリゴヌクレオチドは ESI-MS による質量分析により同定した。まず、濃アンモニア水、55 °C、8 時間の処理を行った場合、今回開発したいずれの UL でもユニバーサルユニット付加体が消失し、目的のオリゴヌクレオチドのみが見られた。一方、濃アンモニア水、室温、2 時間処理を行った場合では、いずれの UL でも T_{10} の放出がほとんど見られなかったが、 T_{10} とユニバーサルユニット付加体を十分分離できることが示された。中でも、ターフェニル構造を持つ UL を用いた **CPG14** とフェナンスレン構造を持つ UL を用いた **CPG15** では、ユニバーサルユニットの高い脂溶性によりユニバーサルユニット付加体をより容易に分離できることが示された (Figure 13 に示す HPLC チャートのアセトニトリル濃度のグラジエントは **CPG10–13** で 5–15% であるのに対し、**CPG14**、**15** では 5–50% を使用した)。さらに、これら二つの UL を用いた場合のみ、オリゴヌクレオチド放出に伴い生じるユニバーサルユニット部の環状リン酸体 (**Cp-8e** と **Cp-9a**) を HPLC 上で検出できることが判明した。この理由として、脂溶性ユニットとして採用したターフェニルやフェナンスレンが HPLC での測定波長 254 nm において高いモル吸光係数 (ϵ) を持つためであると考えられ (ターフェニル: $\epsilon_{254} \cong 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、フェナンスレン: $\epsilon_{254} \cong 60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、^{41), 42)} **Cp-9a** がより高感度に検出できることが示された。



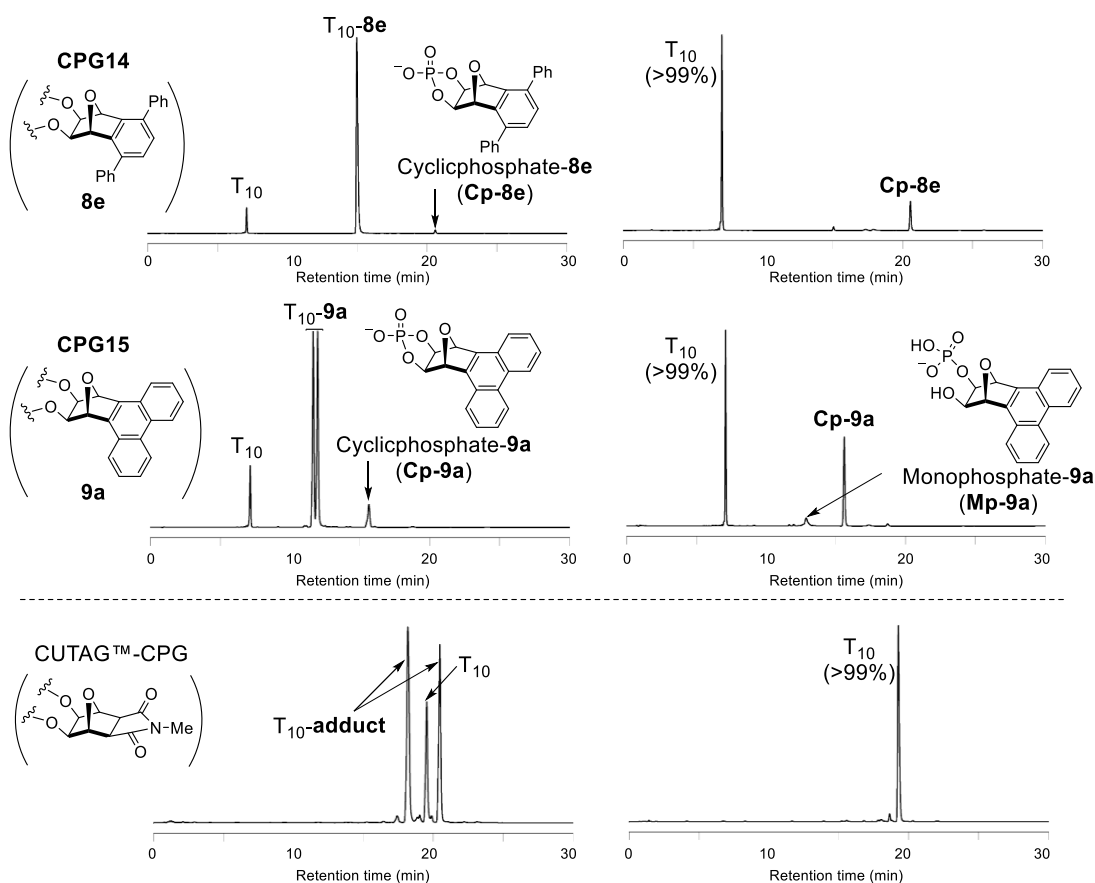


Figure 13. HPLC analysis of the T_{10} released from CPG10–15 under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40°C ; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 (CPG10–13), 95/5 to 50/50 (CPG14 and 15) for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

次に、3'末端に様々なヌクレオシドモノマーを含むオリゴヌクレオチドである CPG16–20 を用いて、汎用されている UL の除去条件である濃アンモニア水、 55°C 、8 時間処理を行い、HPLC により分析した (Figure 14)。その結果、いずれの場合でも目的のオリゴヌクレオチドのみが見られ、フェナンスレン型 UL9a は様々なヌクレオシドに対して利用できることが示された。

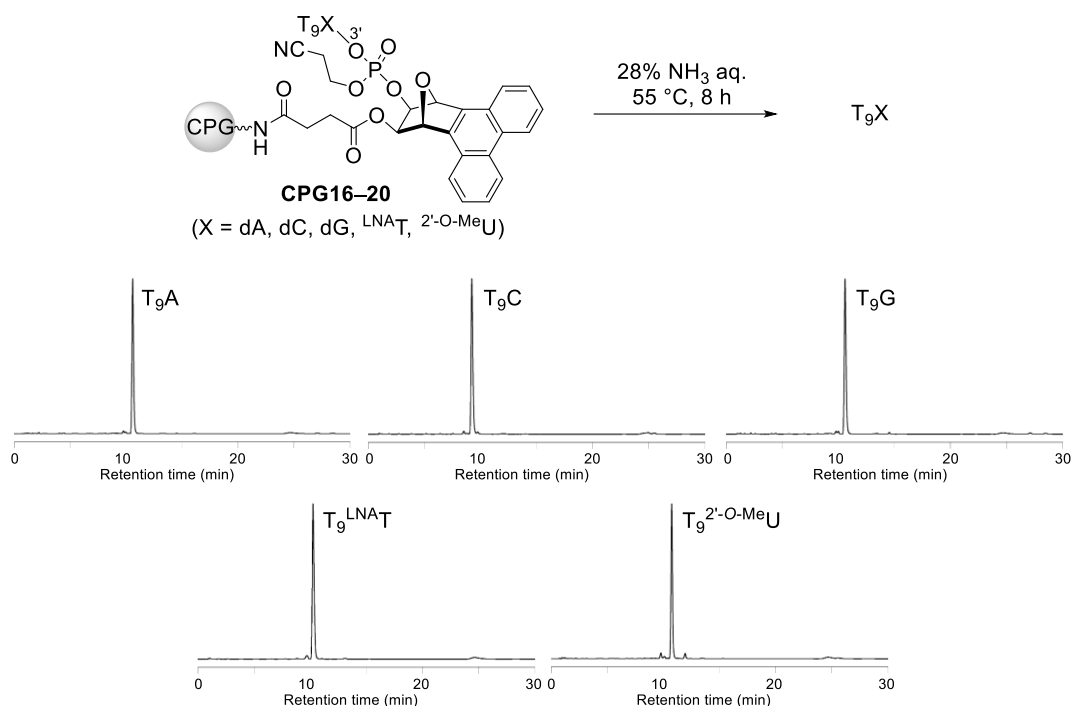


Figure 14. HPLC analysis of T_9X ($X = dA, dC, dG, LNAT, 2'-O-MeU$) released from **CPG16-20** under basic condition. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40°C ; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 92/8 to 82/18 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

また、**UL9a** の汎用性を確認するため、4種類の核酸塩基 (T, A, C, G) を含む配列のオリゴヌクレオチドからなる **CPG21** を濃アンモニア水、 55°C 、8時間処理を行い、HPLC分析を行った (Figure 15)。その結果、先ほどと同様、**UL9a** を利用できることが示された。加えて、オリゴヌクレオチド合成において一般的に利用されるリン酸部の保護基 (シアノエチル基) のみを除去する塩基条件 (20 v/v% ジエチルアミンアセトニトリル溶液、室温、30分)⁴³⁾ で前処理した場合にも利用できることが分かった。

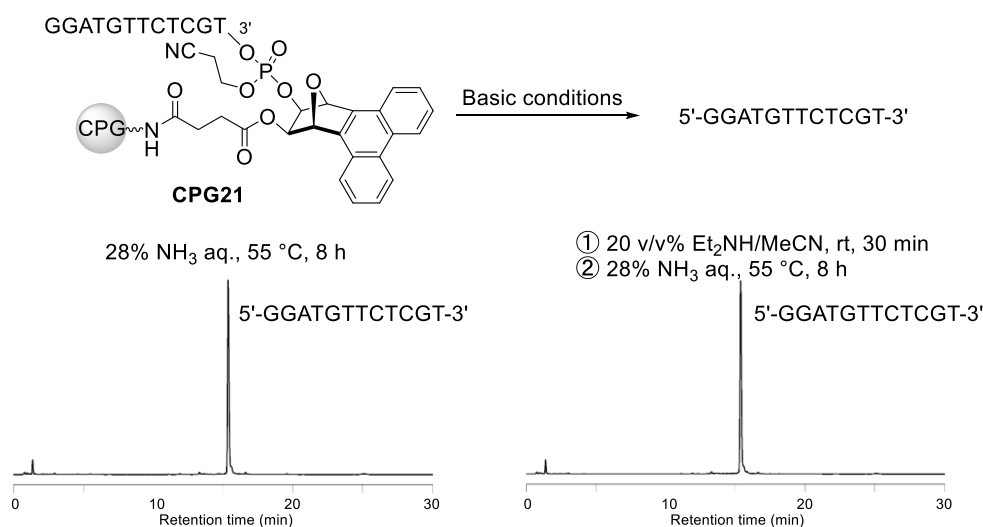


Figure 15. HPLC analysis of the mixed sequence oligonucleotide released from **CPG21** under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40°C ; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

続いて、汎用されている別の UL の除去条件 (緒論、Table 1) である AMA、65 °C、1 時間処理においてフェナンスレン型 **UL9a** が利用可能であるか **CPG15** を用いて検討した (Figure 16)。その結果、目的のオリゴヌクレオチド (T_{10}) をユニバーサルユニットから高効率 (98%) で放出できることが示され、本塩基条件を用いた場合でも十分利用可能であることが分かった (Figure 16、左の HPLC チャート)。また、塩基処理後有機溶媒で抽出したところ、副生成物である環状リン酸体 **Cp-9a** とその開環体 **Mp-9a** を除去できることが判明した (Figure 16、右の HPLC チャート)。

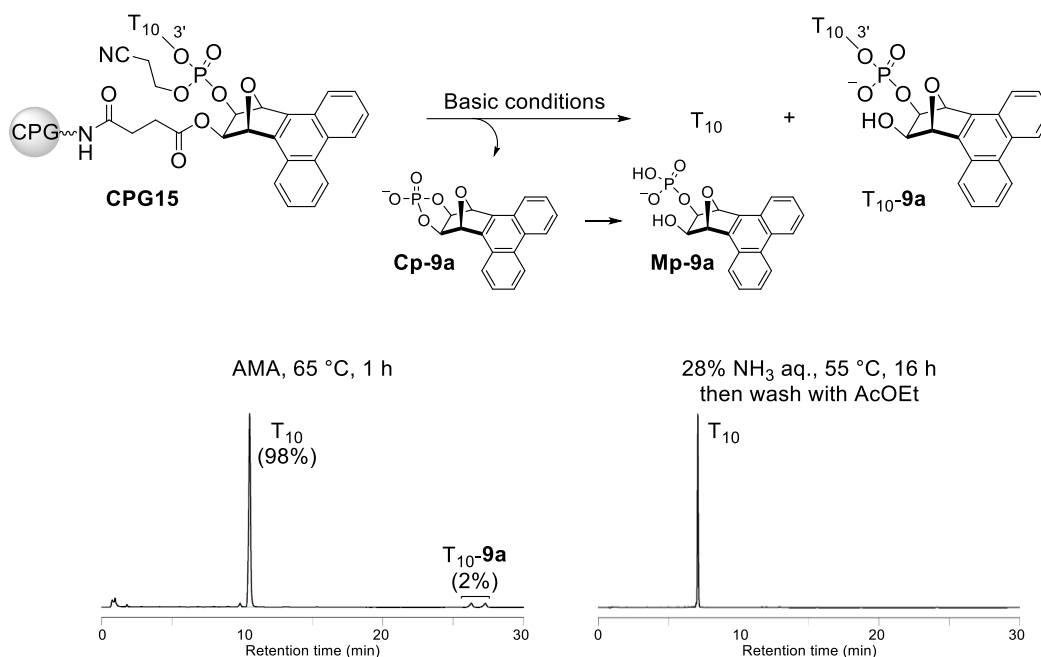


Figure 16. HPLC analysis of the T_{10} released from **CPG15** under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 92/8 to 82/18 (left), 95/5 to 50/50 (right) for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

次に、フェナンスレン型 **UL9a** をホスホロチオエート修飾オリゴヌクレオチドの合成に利用した (Figure 17)。汎用されている UL である CUTAG™-CPG を用いた場合、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体のピークが重なっていることが ESI-MS により確認され、HPLC によりそれらを分離することが困難であった (Figure 17、下の HPLC チャート)。これに対して、今回開発した **UL9a** を用いた場合、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体 (s-oligo-**9a**) を十分分離できることが明らかになった (Figure 17、上の HPLC チャート)。

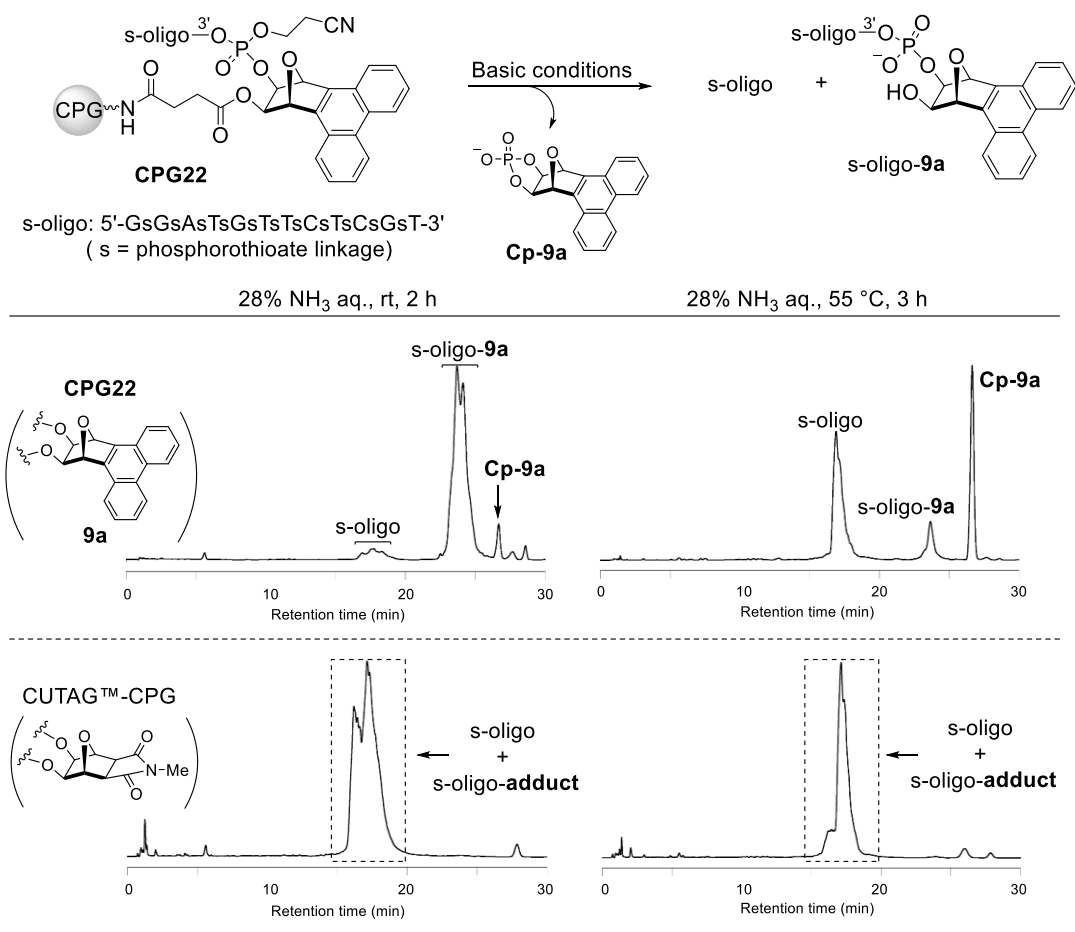


Figure 17. HPLC analysis of the phosphorothioate-modified oligonucleotide (s-oligo) released from **CPG22** and CUTAG™-CPG under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = $95/5$ to $75/25$ for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

最後にポリスチレン樹脂への適用を行った (Figure 18)。ポリスチレン樹脂を用いたオリゴヌクレオチド合成は古くから報告例⁴⁴⁻⁴⁶⁾があるが、現在では CPG が主流として用いられている。しかしながら、ポリスチレン樹脂は表面修飾量が CPG よりも多く、大量合成に有用とされ近年製造レベルでの利用が進んでいる。Figure 18 にはフェナンスレン型 **UL9a-d** で表面修飾した PS 樹脂を用いて合成した **PS1-4** を塩基処理した結果を示す。まず、**UL9b** を含む **PS2** と **UL9d** を含む **PS4** を用いた場合、不十分な合成により副生する短鎖オリゴチミジレート ($T_n, n \leq 9$) が認められた (**PS2, PS4**: $T_{10} : T_n = 75 : 25$)。固相合成サイクルにおける脱 DMTr 工程において、DMTr で保護された樹脂表面のアルコール体の構造や、使用する固相担体の性質に依存し、反応時間を要することが報告されている。⁴⁷⁾ このことから、短鎖オリゴヌクレオチドが生成した理由として、縮合工程やキャップ工程が十分でなかった可能性だけでなく、脱 DMTr 工程が不十分であった可能性が考えられる。これに対して **UL9a** を含む **PS1** と **UL9c** を含む **PS3** 用いた場合、 T_n の割合が減少し (**PS1, PS3**: $T_{10} : T_n = 95 : 5$)、ほぼ定量的に目的のオリゴヌクレオチドを合成可能であることが示された。また、3'末端の縮合を通常反応時間 (25 秒) とした場合、

PS1 では T_n の割合が増加 ($T_{10}:T_n=85:15$) するのに対し、**PS3** では縮合時間を延長 (10分) した場合と同じ T_n の割合であった ($T_{10}:T_n=95:5$)。以上の結果から、PS樹脂を用いた固相合成には長いエステルリンカーを持つ **UL9c** を含む **PS3** が最も適していることが考えられる。

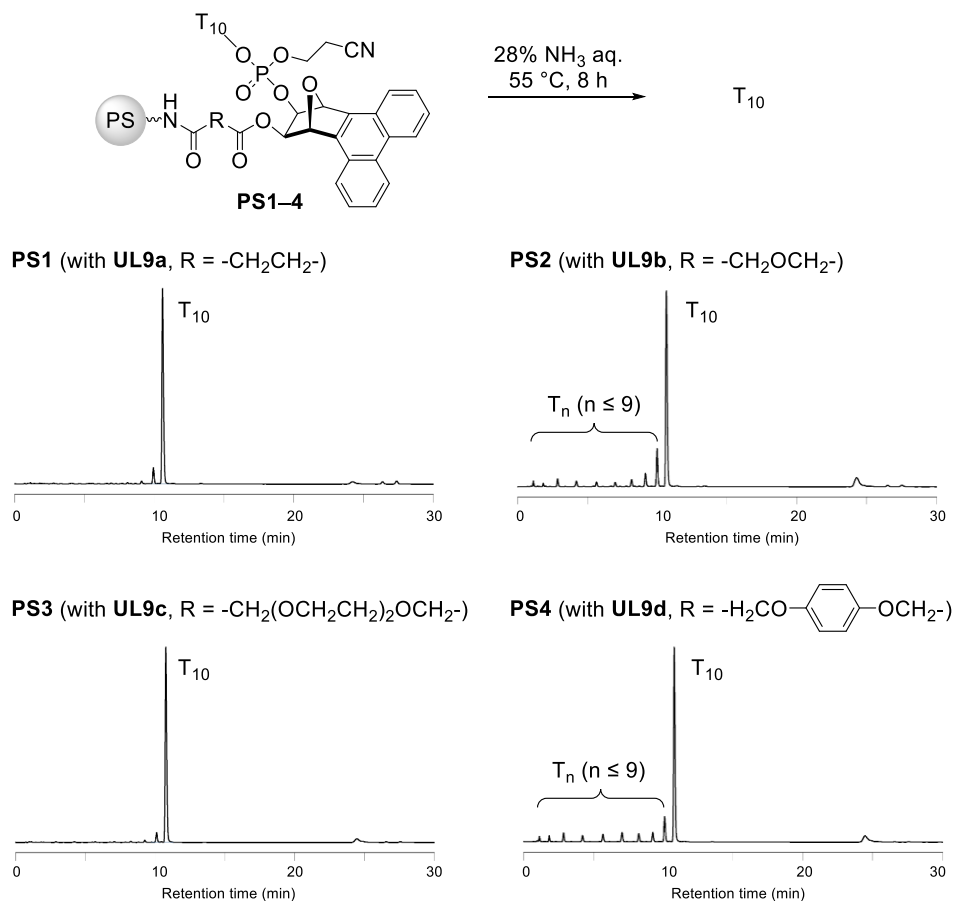


Figure 18. HPLC analysis of the T_{10} released from PS1-4 under basic condition. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 92/8 to 82/18 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

以上、7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-2,3-ジオール構造にフェナンスレンユニットを付与したユニバーサルユニットを持つ **UL9a** の開発に成功した。このものは、オリゴヌクレオチドの精製を容易にすることに加えて、従来と同条件でユニバーサルユニットを除去することが可能であった。さらに、**UL9a** のエステル部を変更した **UL9c** を利用することで、PS樹脂へ適用できることも実証した。

第三章 O-アルキルホスホロアミダイトを用いたユニバーサルユニットの迅速な除去方法の確立

第一節 O-アルキルホスホロアミダイトの設計概念

第一章、第二章で開発したジベンゾ型 **UL3**、フェナンスレン型 **UL9a** の利用により精製問題を改善できることを示したが、UL を除去するためには未だ長時間の加熱処理が必要であった。そのため、現状では RNA オリゴヌクレオチドや熱に不安定なオリゴヌクレオチドの合成に UL を適用することが困難である。そこで、UL を迅速に除去することを目的として、UL からオリゴヌクレオチドが放出される反応のメカニズムに着目した (Figure 19)。オリゴヌクレオチド固相合成ではリン酸部の保護基としてシアノエチル基が利用されており、塩基処理により速やかに β 脱離を起こす。従って、UL からオリゴヌクレオチドが放出される際、主にリン酸ジエステルに対して分子内環化反応が進行する (Figure 19、上段)。すなわち、リン酸モノアニオンであるために、リン原子への求核攻撃が進行しにくいと考えた。実際、市販の Universal Support III™ (US III) ではリン酸ジエステルを経由する場合、オリゴヌクレオチドの放出が困難であることが知られている。⁴⁸⁾ そこで、3'末端リン酸部の保護基を従来のシアノエチル基から β 脱離の起こらないアルキル基へ変更することを考えた (Figure 19、下段)。本戦略ではリン酸トリエステルに対する分子内環化反応が主に進行するため、従来よりもオリゴヌクレオチドを迅速に放出できることが期待される。

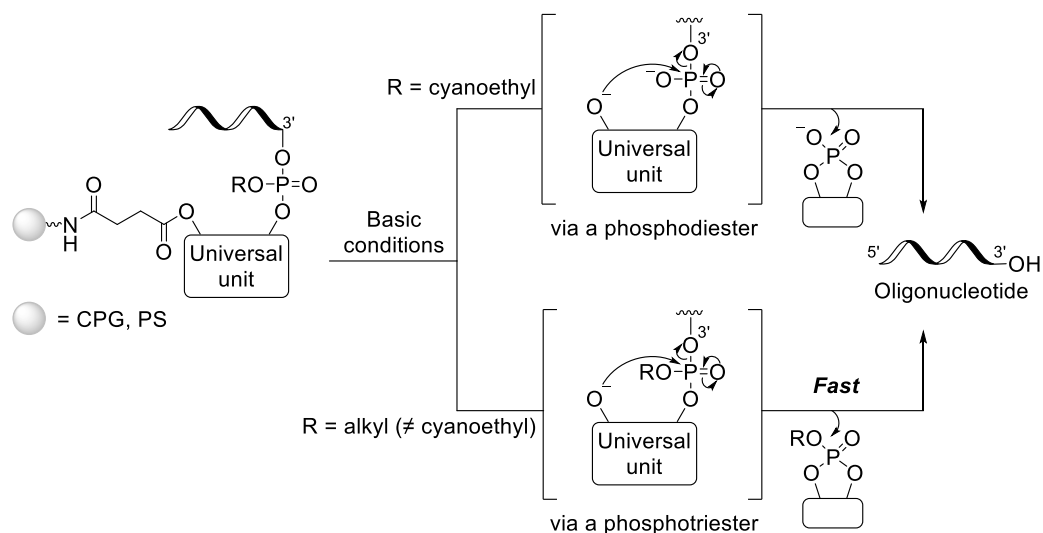
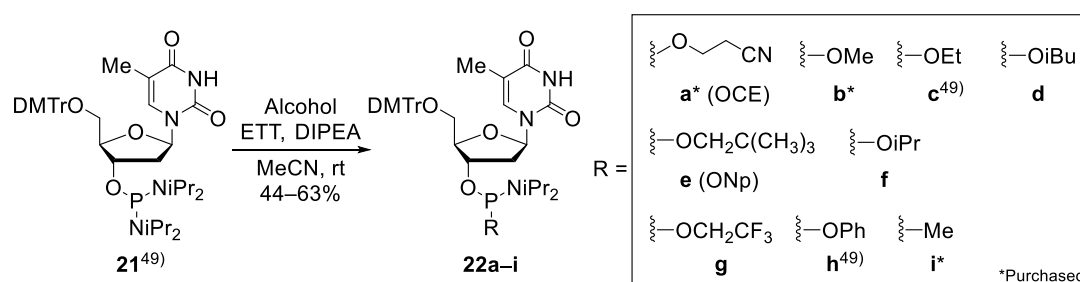


Figure 19. Mechanism of release of oligonucleotides from universal units.

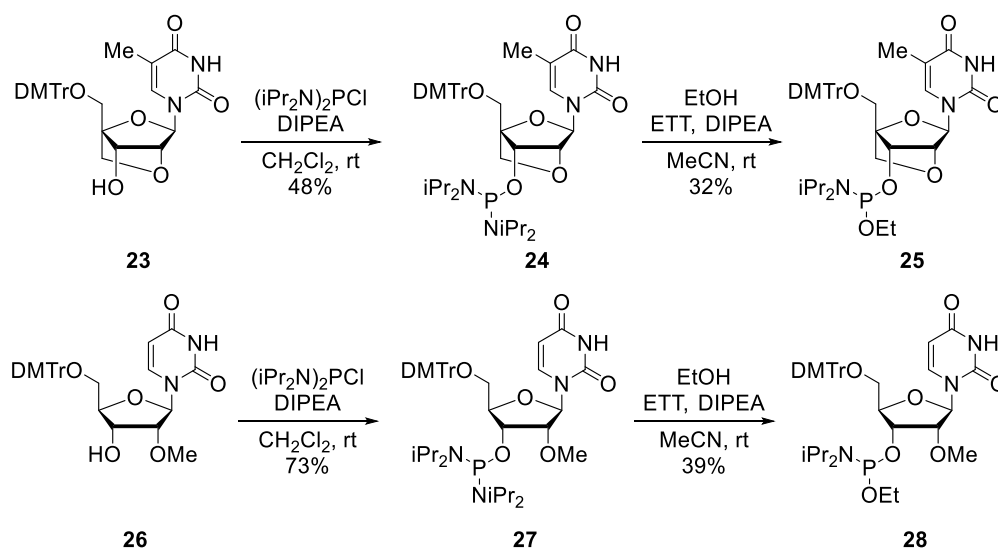
第二節 *O*-アルキルホスホロアミダイトを含むオリゴヌクレオチドの合成

天然型ヌクレオシドの *O*-アルキルホスホロアミダイト体 **22** の合成を以下の Scheme 11 に示す。リン酸部の保護基がシアノエチル基とメチル基である **22a**、**22b** および、メチルホスホンアミダイト **22i** は市販品を用いた。また、**22c** と **22h** は既知の文献に従い合成した。⁴⁹⁾ 文献既知のチミジンジアミダイト体 **21**⁵⁰⁾ と対応するアルコールを ETT により縮合し、望みの *O*-アルキルホスホロアミダイト体 **22c-g** を収率 44–63% で得た。



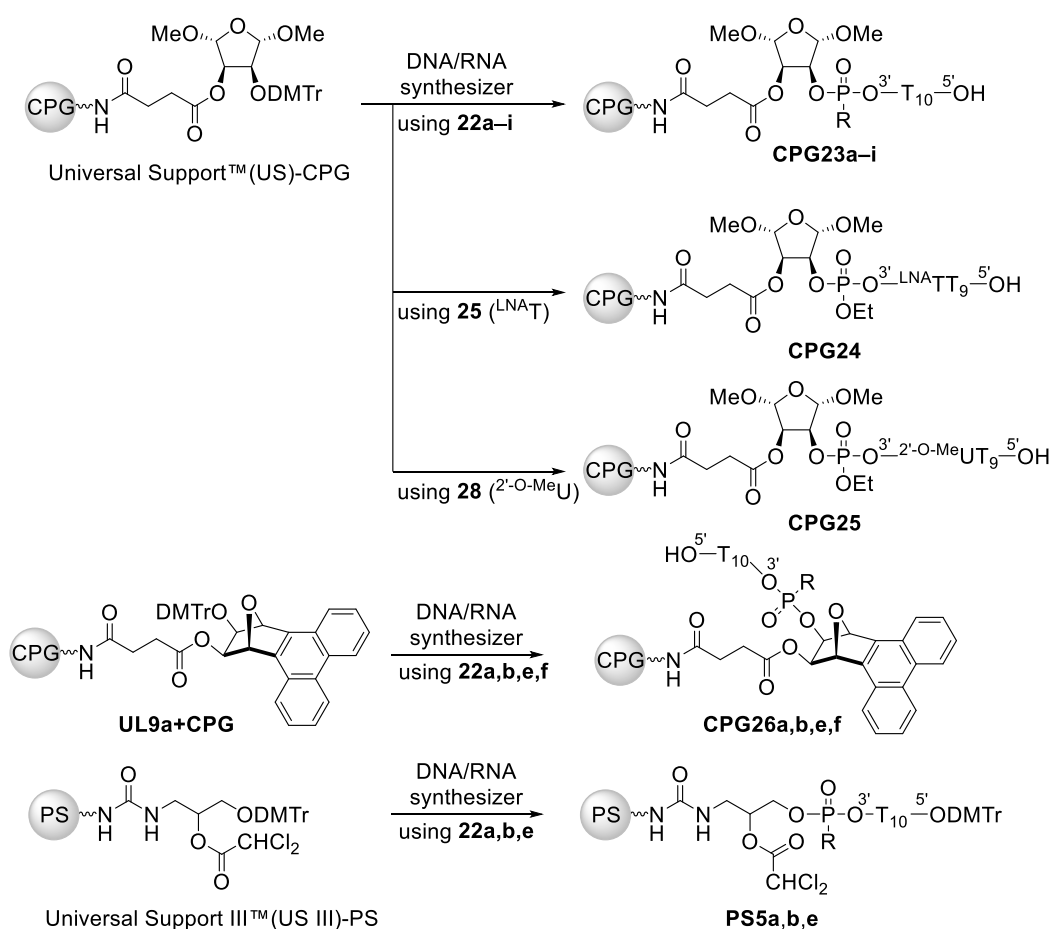
Scheme 11. Synthesis of *O*-alkyl phosphoramidites.

さらに、糖部修飾核酸については *O*-エチルホスホロアミダイト体 **25** と **28** の合成を行った (Scheme 12)。2',4'-架橋型核酸 (^{LNA}T) や 2'-*O*-Me 修飾核酸 (2'-*O*-MeU) の DMTr 体 (**23** と **26**)⁵¹⁾ を出発原料として、ビス(ジイソプロピル)クロロホスフィンを用いてジアミダイト化し、ジアミダイト体 **24** と **27** を得た。その後、先と同様の手順で合成することで糖部修飾核酸の *O*-エチルホスホロアミダイト体 **25** と **28** を得た。



Scheme 12. Synthesis of *O*-alkyl phosphoramidites **25** and **28**.

続いて、UL 修飾樹脂 (US-CPG, **UL9a+CPG**, US III-PS) を用いて **22a-i** および **25**、**28** を 3'末端に含むオリゴヌクレオチドを DNA/RNA 自動合成装置を用いて 0.2 μmol スケールにて固相合成した (Scheme 13)。固相合成の脱 DMTr 工程と UL との縮合工程のみ、反応時間をそれぞれ 20 秒、10 分に延長した。これらのオリゴヌクレオチド合成効率は DNA/RNA 自動合成装置のトリチルモニターの値から、いずれの配列でも定量的に進行していることを確認した (平均縮合効率 **CPG23a-i**、**CPG24**、**25**: $\geq 99.7\%$ 、**PS5a,b,e**: $\geq 99.8\%$)。その後、US-CPG に担持されたオリゴヌクレオチド **CPG23a-i** および **CPG24**、**25** に対して塩基処理を行い、オリゴヌクレオチドの放出効率を評価することとした。



Scheme 13. Synthesis of oligonucleotides using *O*-alkyl phosphoramidites **22a-h**, **25**, **28**, and methylphosphonamidite **22i**.

第三節 塩基処理によるオリゴヌクレオチド放出能の評価

オリゴヌクレオチド合成において利用される最も温和な塩基条件である UltraMILD Deprotection 条件 (濃アンモニア水、室温、2 時間または、50 mM 炭酸カリウム無水メタノール溶液、室温、4 時間)³⁰⁾ と UltraFAST Deprotection 条件 (AMA、室温、5 分)³⁰⁾ で **CPG23a-i** を処理した。濃アンモニア水、室温、2 時間処理後、HPLC 分析を行った結果の一例を Figure 22 に示す。3'末端のリン酸部の保護基として従来のシアノエチル基を用いた **CPG23a** では、ユニバーサルユニットから目的のオリゴヌクレオチド (T_{10}) の放出される割合が 1 割程度であった。このことから、分子内環化反応が十分進行せず、大半 (約 9 割) は中間体であるユニバーサルユニット付加体 (T_{10} -US) の状態で残ることが示された。これに対してリン酸部の保護基を β 脱離の起こらないアルキル基とした **CPG23b** ($R = \text{OMe}$) を用いた場合、 T_{10} の放出される割合が劇的に改善され、約 5 割に向上した。さらに、**CPG23e** ($R = \text{ONp}$) では、 T_{10} を 9 割以上放出できることが判明した。一方、**CPG23h** ($R = \text{OPh}$) を用いた場合、 T_{10} -US が 8 割以上残る結果となった。

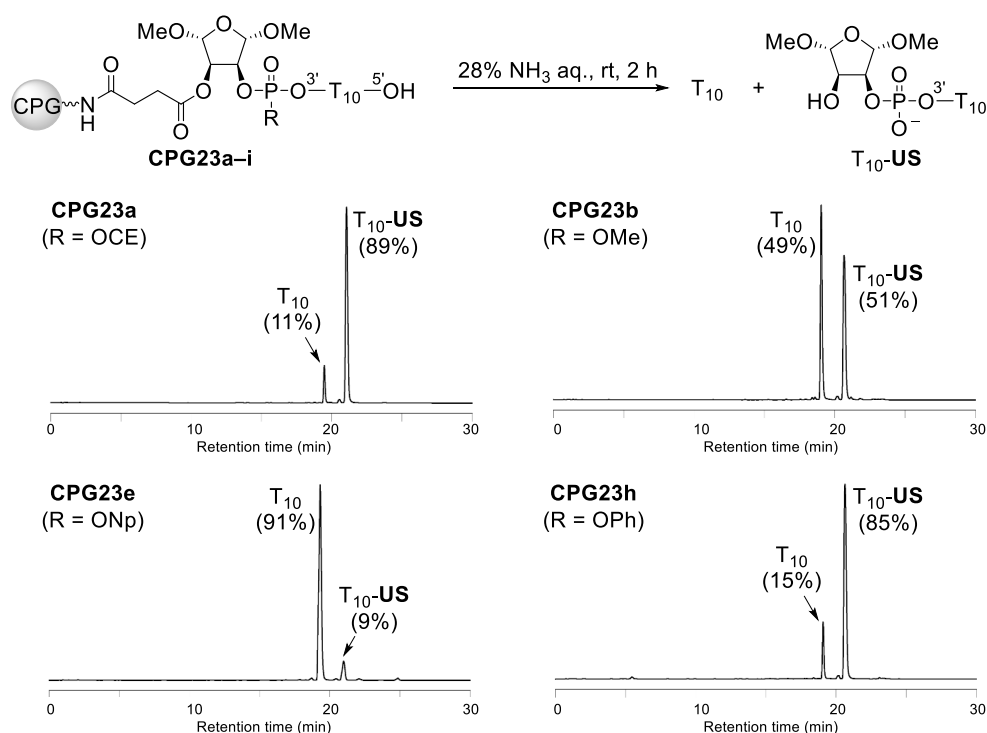


Figure 22. HPLC analysis of the T_{10} released from **CPG22a, b, e, h** under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6 \times 50 mm at 40 $^{\circ}\text{C}$; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min (a, TEAA in H_2O ; b, MeCN).

CPG23a-i を用いた結果 (T₁₀ と T₁₀-US のピーク面積比) を Table 2 にまとめた。まず、CPG23a はいずれの塩基条件でもユニバーサルユニットから放出される T₁₀ の割合が低かった (<15%)。また、CPG23b を用いた場合、炭酸カリウム無水メタノール溶液を用いる条件においてほぼ定量的 (>99%) に T₁₀ が放出されたが、濃アンモニア水や AMA といった塩基性水溶液を用いる条件では T₁₀-US が 3 割以上残存した。これに対して CPG23c-f を用いた場合、いずれの条件でも T₁₀ を 8 割以上放出できることが示された。特に 3'末端のリン酸部の保護基としてネオペンチル基 (e) やイソプロピル基 (f) を用いた CPG23e や CPG23f では、いずれの条件でも T₁₀ を 9 割以上放出することが明らかとなった。CPG23g と h を用いた場合、塩基性水溶液を用いる条件において、従来用いられているシアノエチル体 CPG23a と同程度の放出効率を示した。次に 3'末端がメチルホスホネートとなる CPG23i を用いた場合、いずれの条件でも定量的 (>99%) に T₁₀ を放出可能であったが、短鎖オリゴチミジレート (T₉) とそのユニバーサルユニット付加体 (T₉-US) が全ての条件下で確認された (T₁₀ : T₉ : T₉-US = 94 : 2 : 4)。^{注2} 3'末端に糖部修飾核酸の O-エチルホスホロアミダイト体を用いて合成した CPG25、26 についても同様に塩基処理を行ったところ、いずれの条件でも効率よく目的のオリゴヌクレオチドを放出できることが判明した (>90%)。この結果から、O-アルキルホスホロアミダイト体を用いる本手法は修飾核酸にも適用できることが示された。

Table 2. Peak area ratio (T₁₀ : T₁₀-US) in HPLC chromatograms under the conditions.

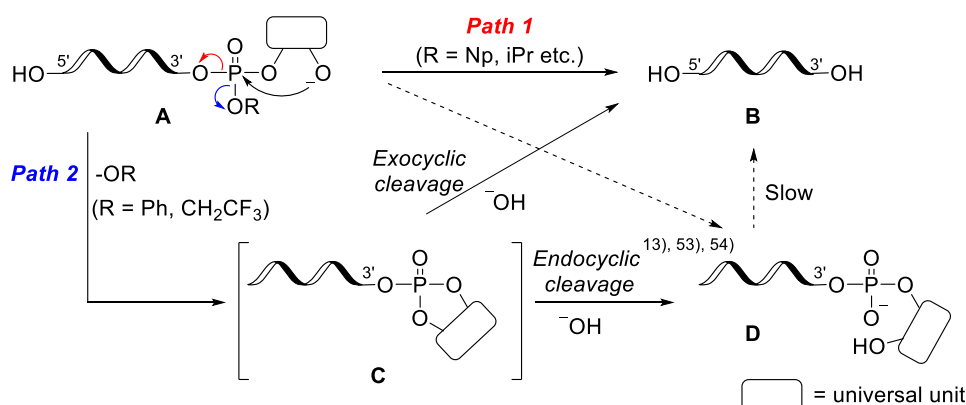
CPG23	Mild basic conditions		
	28% NH ₃ aq., rt, 2 h	AMA ^a , rt, 5 min	50 mM K ₂ CO ₃ /MeOH, rt, 4 h
a (OCE)	11 : 89	14 : 86	13 : 87
b (OMe)	49 : 51	66 : 34	>99 : 1
c (OEt)	80 : 20	90 : 10	>99 : 1
d (OiBu)	86 : 14	94 : 6	>99 : 1
e (ONp)	91 : 9	97 : 3	>99 : 1
f (OiPr)	91 : 9	97 : 3	>99 : 1
g (OCH ₂ CF ₃)	20 : 80	20 : 80	>99 : 1
h (OPh)	15 : 85	22 : 78	>99 : 1
i (Me)	>99 : 1*	>99 : 1*	>99 : 1*
CPG25 (L ^{NA} T-OEt)	>99 : 1	>99 : 1	>99 : 1
CPG28 (2'-O-MeU-OEt)	90 : 10	94 : 6	>99 : 1

*All conditions: T₁₀ : T₉ : T₉-US = 94 : 2 : 4. ^a28% NH₃ aq. : 40% MeNH₂ aq. = 1 : 1.

^{注2} ホスホンアミダイト体はホスホロアミダイト体よりも反応性が低いことが報告されている。

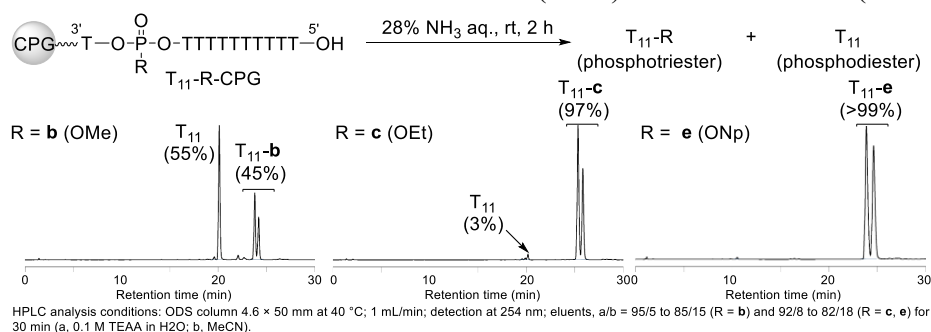
⁵²⁾ そのため、UL との縮合が定量的に進行しなかったと考えられる。

塩基性水溶液を用いた場合、用いるホスホロアミダイトの種類によって目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体の割合が異なる。この理由としては次のように考えた (Scheme 14)。まず、塩基処理により樹脂から切り出されたリン酸トリエステル体 **A** は分子内環化反応後、主に二通りの経路で進行することが考えられる。ユニバーサルユニット部の分子内環化反応によりオリゴヌクレオチド **B** を直接放出する経路 (経路 1、赤矢印) とアルコールが脱離し環状リン酸体 **C** が生成する経路 (経路 2、青矢印) である。リン酸部の保護基としてトリフルオロエチル基 (**g**) やフェニル基 (**h**) を有する場合、脱離するアルコールの酸性度が高いことから、優先して経路 2 が進行する。その後、endocyclic cleavage によって **C** からユニバーサルユニット付加体 **D** に大半が変換されたと考えられる。この結果は、Table 2 においてユニバーサルユニット付加体である T₁₀-US が高い割合を示したことや、環状リン酸の開環が塩基性条件下 endocyclic cleavage を優先する報告例と一致することから妥当であると言える。^{13), 53), 54)} 従って、リン酸部の保護基としてネオペンチル基 (**e**) やイソプロピル基 (**f**) を用いた場合は、Table 2 で T₁₀-US がほとんど得られないことから経路 2 が進行しにくく、主に経路 1 が進行したと考えられる。また、リン酸部の保護基としてメチル基 (**b**) を用いると、一部メチル基に対する S_N2 反応によって **A** から **D** の経路が進行することで、T₁₀ の放出される割合が低くなったと考えられる。^{注 3}



Scheme 14. Plausible mechanism of 3'-dephosphorylation via cyclic phosphate formation.

^{注 3} 1 か所の *O*-アルキルリン酸トリエステルを含むオリゴヌクレオチド (T₁₁-R-CPG) に対して塩基処理を行ったところ、リン酸部の保護基としてメチル基 (**b**) を持つ場合、メチル基に対する S_N2 反応による脱メチル化⁵⁵⁾ が進行し、高い割合でジエステル体 (T₁₁) が確認された (55%)。一方、メチル基以外の場合では、ほぼトリエステル体 (T₁₁-R) のみが見られた (≥97%)。



続いて、第二章で開発したフェナンスレン型 UL 修飾樹脂を用いたオリゴヌクレオチド合成に *O*-アルキルホスホロアミダイトを適用した (Table 3)。フェナンスレン型ユニバーサルユニットは HPLC 分析における測定波長 254 nm に吸収がある。そのため、T₁₀-**9a** のピーク面積を T₁₀ とのモル吸光係数比 (T₁₀-**9a**/T₁₀ ≅ 1.40) で補正した後、ピーク面積比を算出した。その結果、Table 2 で得た結果と同様、ネオペンチル基 (**e**) やイソプロピル基 (**f**) を用いた場合、いずれの塩基条件でも効率的にオリゴヌクレオチドを放出できることが示された。

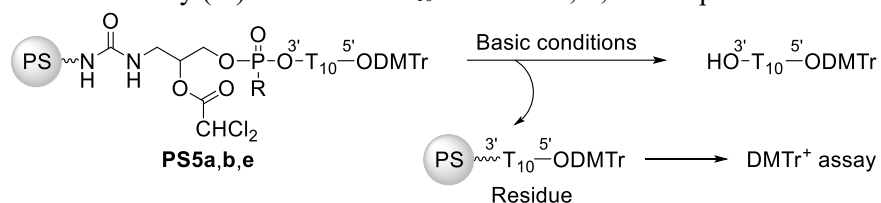
Table 3. Peak area ratio (T₁₀ : T₁₀-**9a**) in HPLC chromatograms under the conditions.

CPG26	Mild basic conditions		
	28% NH ₃ aq., rt, 2 h	AMA ^a , rt, 5 min	50 mM K ₂ CO ₃ /MeOH, rt, 4 h
a (OCE)	9 : 91	8 : 92	88 : 12
b (OMe)	31 : 69	66 : 34	>99 : 1
e (ONp)	86 : 14	94 : 6	>99 : 1
f (OiPr)	91 : 9	97 : 3	>99 : 1

^a28% NH₃ aq. : 40% MeNH₂ aq. = 1 : 1.

最後に、市販の US III-PS を用いた結果を Table 4 に示す。US III はウレア結合を介して樹脂表面に担持されており、塩基処理で樹脂から UL が放出されることなく、目的のオリゴヌクレオチドのみを放出することができる。しかし、放出効率が悪く、樹脂上にオリゴヌクレオチドが残存することが問題となる。実際に、US III からオリゴヌクレオチド (T₁₀) を放出するための条件 (2 M アンモニアメタノール溶液、室温、1 時間) で **PS5a** を処理したところ、T₁₀ が約半分 (52%) しか放出されない結果となった (Table 4)。これに対して 3'末端に *O*-ネオペンチルホスホロアミダイト **22e** を用いて合成した **PS5e** では、従来よりも効率よくオリゴヌクレオチドを放出することが可能であった (52%→76%)。さらに、オリゴヌクレオチドの放出効率が著しく低下する塩基性水溶液 (濃アンモニア水、室温、2 時間) による処理においても、ネオペンチル体 **PS5e** では放出効率が高いことが判明した (24%→80%)。

Table 4. Efficiency (%)* of released T₁₀ from **PS5a, b, e** in respective conditions.



PS5	Basic conditions	
	28% NH ₃ aq, rt, 2 h	2 M NH ₃ /MeOH, rt, 1 h
a (OCE)	24	52
b (OMe)	45	59
e (ONp)	80	76

*The efficiencies (%) of T₁₀ were estimated by DMTr assay of the amount of residue.

以上、ユニバーサルユニットからオリゴヌクレオチドが放出されるメカニズムに着目し、*O*-アルキルホスホロアミダイトを開発した。これをオリゴヌクレオチドの3'末端に用いることで、オリゴヌクレオチド合成における最も温和な塩基条件下、ユニバーサルユニットからオリゴヌクレオチドを放出可能であることが明らかとなった。この技術により、RNA オリゴヌクレオチドをはじめとする塩基条件に不安定なオリゴヌクレオチドの合成に UL 修飾樹脂を適用できることが期待される。

第四章 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトを用いたオリゴヌクレオチド合成

第一節 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトの設計概念

著者は、ユニバーサルユニットを持つヌクレオシドのホスホロアミダイト体を新たに設計した (Figure 24)。このホスホロアミダイトを 3'末端を含むオリゴヌクレオチドの合成によって、UL 修飾樹脂を用いることなくオリゴヌクレオチドの合成が実現する。また、オリゴヌクレオチド鎖中に導入した場合、複数のオリゴヌクレオチドを一挙に得ることができるオリゴヌクレオチドのタンデム合成が可能となる。オリゴヌクレオチドのタンデム合成は、1994 年 MacLean らによって提唱され、⁵⁶⁾ 分子内に二つのユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイト体である TOPS™ (Figure 25、左) を用いて行う。また、最近著者らは TOPS™ よりも温和な塩基条件でオリゴヌクレオチドを放出できる鎖切断型スペーサー (CS-1) を報告した (Figure 25、右)。³⁸⁾ しかし、これらの分子は合成に多工程を必要とすることや、オリゴヌクレオチド合成の際スペーサー分子を導入するために 1 サイクル余分に必要となる。一方で、今回設計したユニバーサルユニット含有ヌクレオシドホスホロアミダイト体は短い工程で合成できるだけでなく、ユニバーサルユニットが一体化しているため、合成サイクルを増やさずにオリゴヌクレオチド合成が可能になると考えられる。

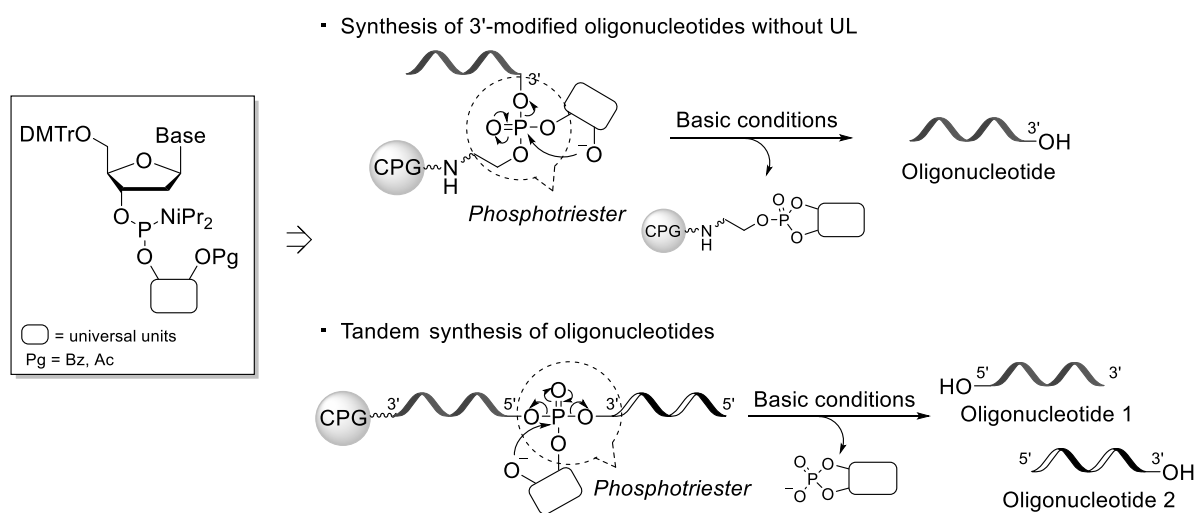


Figure 24. Strategy for oligonucleotide synthesis using universal unit-conjugated phosphoramidites.

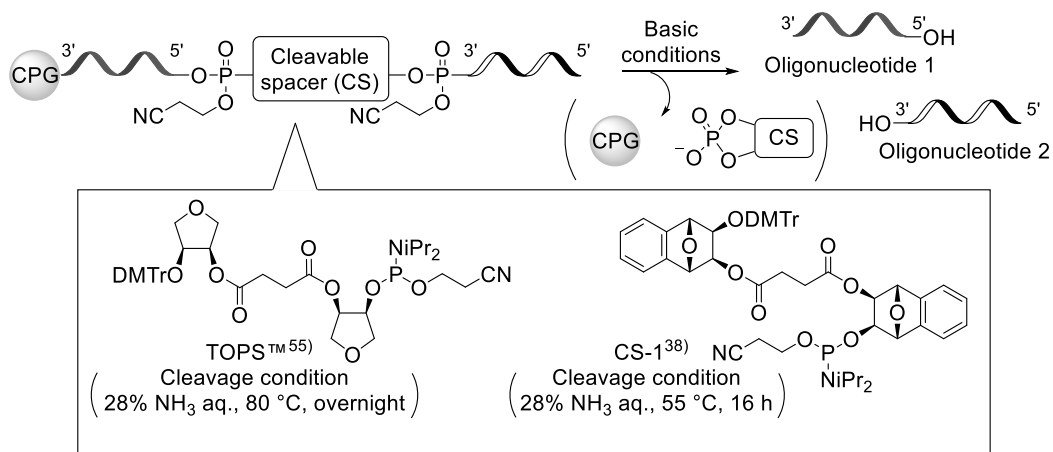
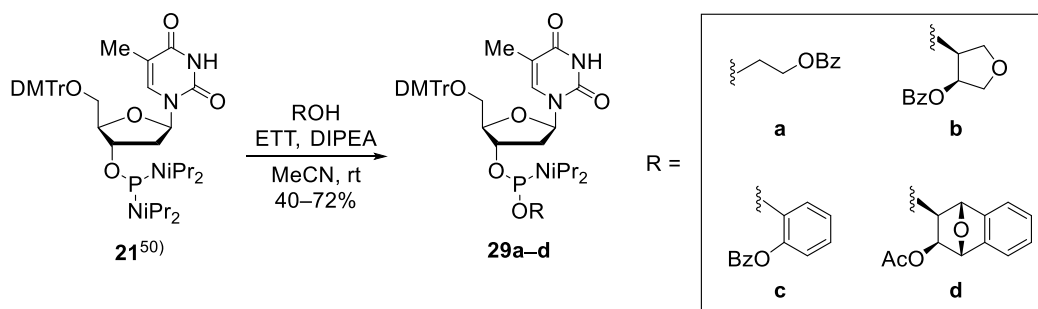


Figure 25. Cleavable spacers for tandem synthesis of multiple oligonucleotides in a single sequence.

第二節 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトのULとしての活用

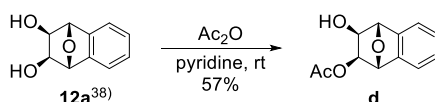
設計したユニバーサルユニット含有ホスホロアミダイト体 **29a-d** の合成経路を Scheme 15 に示す。それらは、チミジンから得ることができる文献既知のジアミダイト体 **21**⁵⁰⁾ とベンゾイル基やアセチル基で保護された計 4 種類のアルコール (**a-d**)⁵⁷⁻⁵⁹⁾ を ETT を用いて縮合することで合成した。^{注4}



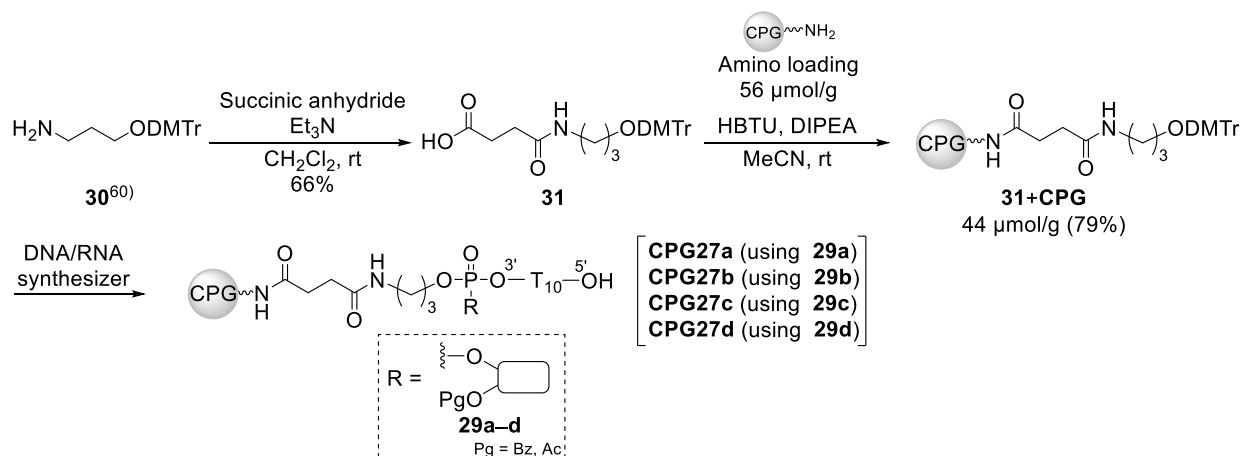
Scheme 15. Synthesis of phosphoramidites **29a-d**.

UL を利用しないオリゴヌクレオチド合成に利用するため、樹脂表面が水酸基である修飾樹脂 **31**+CPG を以下の Scheme16 に従って合成した。文献既知の DMTr 体 **30**⁶⁰⁾ と無水コハク酸との縮合を行い、樹脂に担持する前駆体 **31** を得た。その後、**31** と樹脂表面がアミノ基修飾された CPG を HBTU を用いて縮合することで、望みの修飾樹脂 **31**+CPG を得た。**31** の樹脂への担持量は DMTr アッセイ法により算出した結果、縮合収率は 79% であった。その後、DNA/RNA 自動合成装置を用いてホスホロアミダイト体 **29a-d** を 3' 末端に含むオリゴヌクレオチドを 0.2 μmol スケールで固相合成した。固相合成の脱 DMTr

注4 ユニバーサルユニット含有ホスホロアミダイト体 **29d** の合成に用いたアルコール **d** は、以下のスキームに従い合成した。



工程と UL との縮合工程のみ、反応時間をそれぞれ 20 秒、10 分に延長した。なお、オリゴヌクレオチド合成効率は DNA/RNA 自動合成装置のトリチルモニターの値から、いずれの配列でも定量的に進行していることを確認した (平均縮合効率 **CPG27a-d**: $\geq 99.5\%$)。

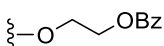
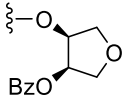
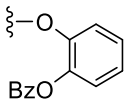
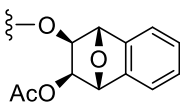


Scheme 16. Loading of **31** onto CPG and synthesis of oligonucleotides using a phosphoramidites **29a-d**.

オリゴヌクレオチド合成において利用される最も温和な塩基条件である UltraMILD Deprotection 条件 (濃アンモニア水、室温、2 時間または、50 mM 炭酸カリウム無水メタノール溶液、室温、4 時間)³⁰⁾ と UltraFAST Deprotection 条件 (AMA、室温、5 分)³⁰⁾ で **CPG27a-d** を処理し、その結果を Table 5 にまとめた。また、その反応の一例として、濃アンモニア水、室温、2 時間処理後 HPLC 分析した結果を Figure 26 に示す。まず、 T_{10} と T_{10} -**29a-d** のピーク面積比を算出したところ、いずれの条件でも T_{10} の割合が高いことが示された ($T_{10} : T_{10}$ -**29a-d** = $\geq 70 : 30$)。次に、樹脂から切り出されたオリゴヌクレオチドの量を調べるため、放出されたオリゴヌクレオチドの収率 (T_{10} と T_{10} -**29a-d** の総収率) を算出した。^{注5} その結果、塩基性水溶液である濃アンモニア水あるいは AMA で処理した場合、**CPG27a** と **CPG27b** は放出されたオリゴヌクレオチドが 5 割以下であり、半分以上樹脂に担持されたままであることが示された。これに対して **CPG27d** では、塩基性水溶液を用いた条件だけでなく、炭酸カリウム無水メタノール溶液を用いる条件でも、樹脂からオリゴヌクレオチドが効率よく放出される結果となった ($\geq 82\%$)。以上の結果から、ビシクロ型のユニバーサルユニットを含むヌクレオシドホスホロアミダイト体 **29d** を利用することで、UL 修飾樹脂を用いることなく 3' 末端修飾オリゴヌクレオチドを合成できることが示唆された。

^{注5} 既知濃度の T_{10} を用いて検量線を作成し、それを基に測定対象となる試料の総ピーク面積 (T_{10} と T_{10} -**29a-d**) からオリゴヌクレオチドの収率を求めた。

Table 5. T₁₀ release efficiency (%)^{*} and peak area ratio^{**} (T₁₀ : T₁₀-**29a-d**).

3'-end (29)	Mild basic conditions		
	28% NH ₃ aq., rt, 2 h	AMA ^a , rt, 5 min	50 mM K ₂ CO ₃ /MeOH, rt, 4 h
 a	42 (70 : 30)	13 (75 : 25)	77 (>99 : 1)
 b	49 (71 : 29)	36 (79 : 21)	82 (>99 : 1)
 c	71 (81 : 19)	12 (86 : 14)	63 (>99 : 1)
 d	90 (78 : 22)	88 (93 : 7)	82 (>99 : 1)

^{*}The total yield of T₁₀ and T₁₀-**29a-d** estimated by HPLC using an external standard method. ^{**}The peak area ratios are shown in parentheses. ^a28% NH₃ aq. : 40% MeNH₂ aq. = 1 : 1.

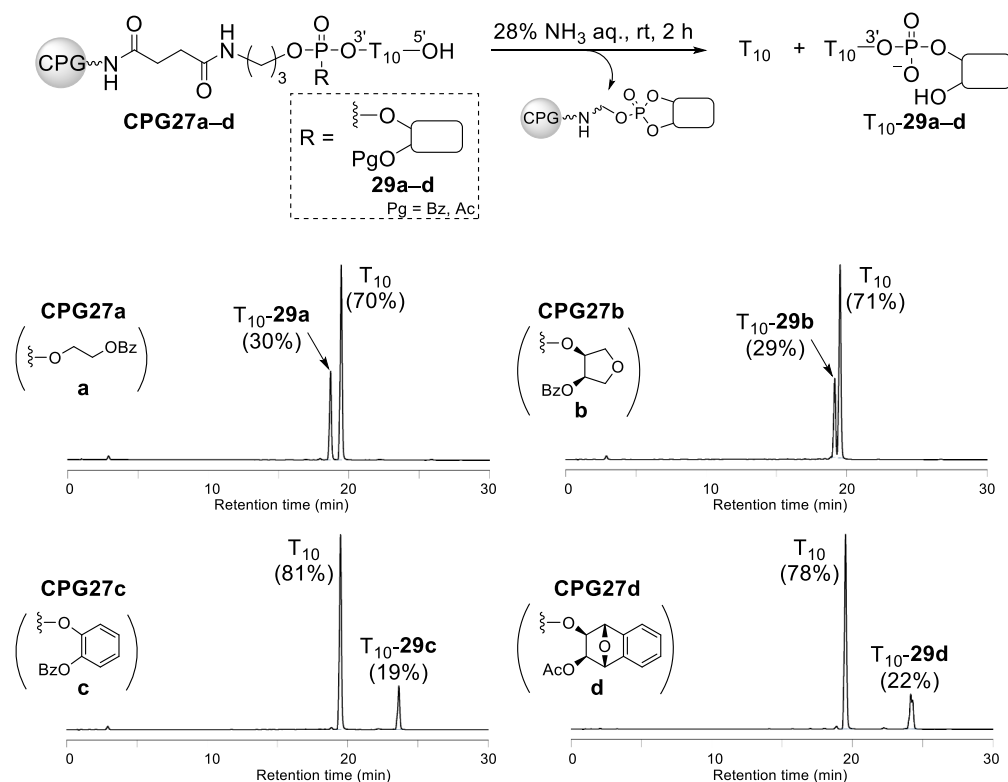
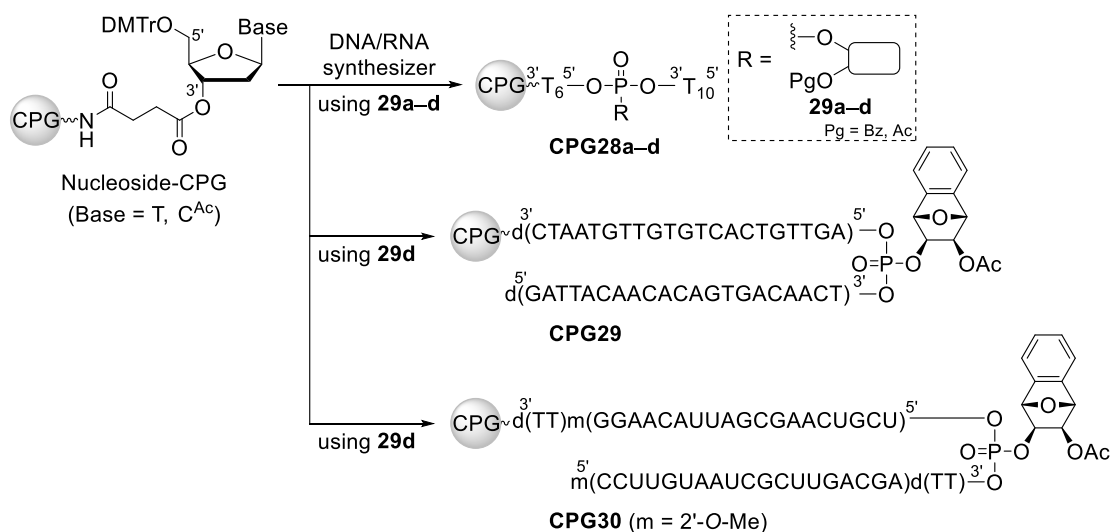


Figure 26. HPLC analysis of the T₁₀ released from universal units (**a-d**) under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6 × 50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H₂O; b, MeCN).

第三節 ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイトを用いたオリゴヌクレオチドのタンデム合成

ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイト体 **29a-d** をオリゴヌクレオチドのタンデム合成に適用した (Scheme 16)。市販のヌクレオシドが担持された CPG を用いて、DNA/RNA 自動合成装置を用いてホスホロアミダイト体 **29a-d** を配列中に含むオリゴヌクレオチドを 0.2 μmol スケールで固相合成した。その際、ホスホロアミダイト体 **29a-d** の縮合工程のみ反応時間を 10 分に延長した。なお、オリゴヌクレオチド合成効率は DNA/RNA 自動合成装置のトリチルモニターの値から、いずれの配列でも定量的に進行していることを確認した (平均縮合効率 **CPG28a-d**: $\geq 99.5\%$ 、**CPG29**、**30**: $\geq 99.0\%$)。



Scheme 16. Tandem synthesis of multiple oligonucleotides using phosphoramidites **29a-d**.

得られた **CPG28a-d** に対してオリゴヌクレオチド合成において一般的に用いられる濃アンモニア水、55 °C、16 時間処理や、UltraMILD Deprotection 条件である 50 mM 炭酸カリウム無水メタノール溶液、室温、4 時間処理した後、HPLC 分析を行った (Figure 27)。その結果、**29a-c** を用いて合成したオリゴヌクレオチド (T₁₆) からなる **CPG28a-c** を濃アンモニア水処理すると、鎖切断により T₆、T₁₀、並びにそれぞれのユニバーサルユニット付加体が確認された (Figure 27、左の HPLC チャート)。一方、**29d** を用いて合成した **CPG28d** では、ユニバーサルユニット付加体が完全に消失し、目的のオリゴヌクレオチドのみが得られた。さらに、従来のオリゴヌクレオチドのタンデム合成では利用できない温和な塩基条件 (50 mM 炭酸カリウム無水メタノール溶液、室温、4 時間) も利用可能であった (Figure 27、右の HPLC チャート)。

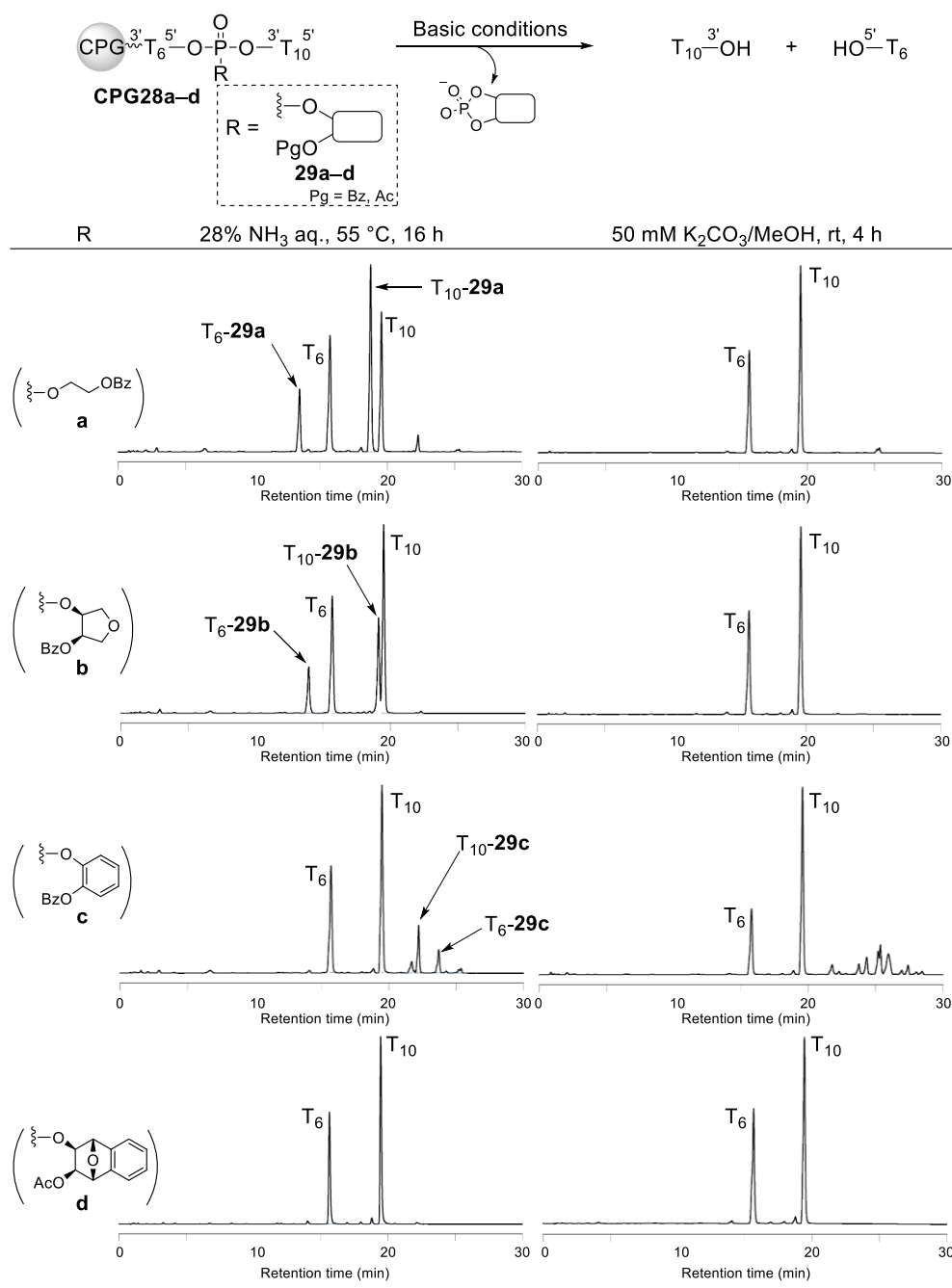


Figure 27. HPLC analysis of the T₆ and T₁₀ released from **CPG28a–d** under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6 × 50 mm at 40 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H₂O; b, MeCN).

最後に、ビスクロ型ユニバーサルユニットを持つホスホロアミダイト体 **29d** を二重鎖核酸のタンデム合成に適用した (Figure 28)。二重鎖核酸は siRNA が核酸医薬品として利用されており、通常それぞれのオリゴヌクレオチドを別々に合成し、HPLC 精製後 1:1 で混合、再び精製を行うことで得られる。中でも混合工程では、ラボでの小スケール合成において、それぞれのオリゴヌクレオチドの等量での混合が困難となる。そこで、今回開発した **29d** を配列中に有する二重鎖核酸を合成し、塩基処理後 HPLC 分析を行った。その結果、DNA 配列である **CPG29** および 2'-O-Me 修飾を持つ siRNA 配列である **CPG30** のいずれを用いた場合でも、塩基処理後一挙に二重鎖核酸として得られることが判明した。この結果から、二重鎖核酸調製の工程を簡略化できる可能性が示唆された。

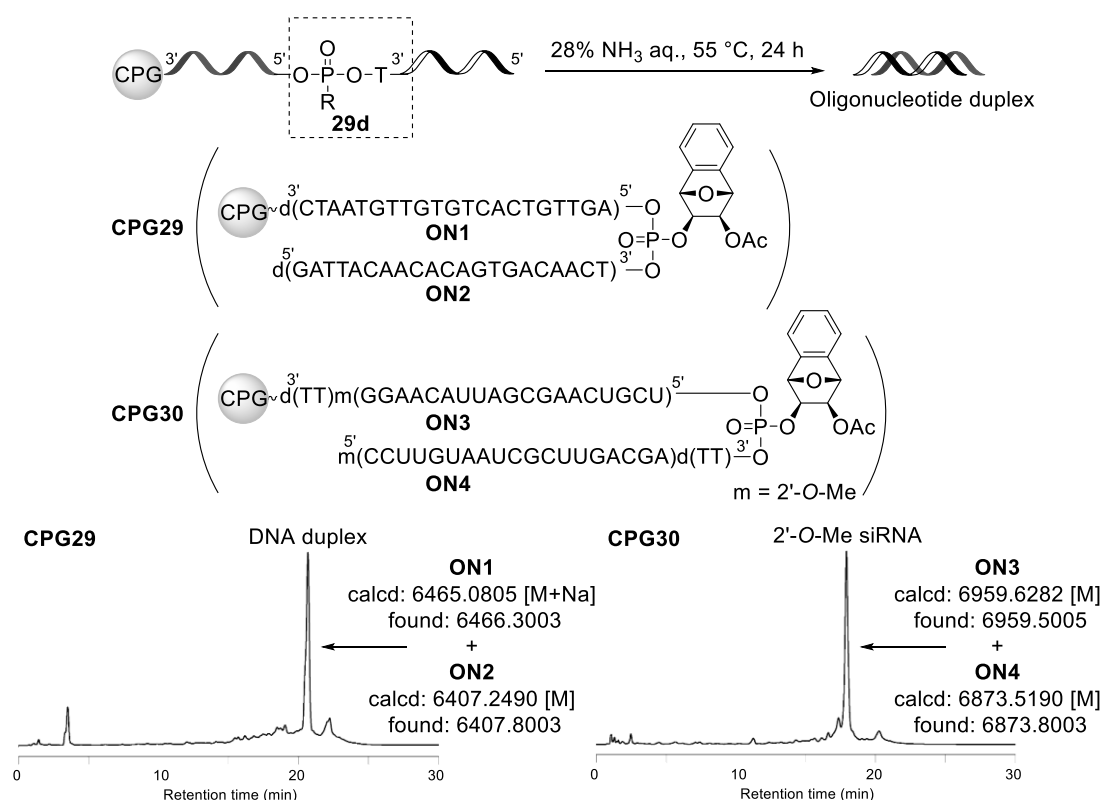
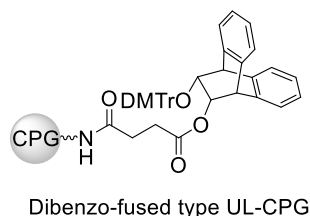


Figure 28. HPLC analysis of the duplex oligonucleotides released from **CPG29**, **30** under basic conditions. HPLC analysis conditions: ODS column 4.6×50 mm at 20 °C; 1 mL/min; detection at 254 nm; eluents, a/b = $95/5$ to $85/15$ (**CPG29**) and $92/8$ to $82/18$ (**CPG30**) for 30 min (a, 0.1 M TEAA in H_2O ; b, MeCN).

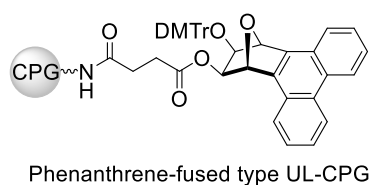
以上、新たな試みとして、ユニバーサルユニットを持つヌクレオシドホスホロアミダイトを開発し、様々なオリゴヌクレオチド合成に適用した。これをオリゴヌクレオチドの 3'末端に用いることで、UL 修飾樹脂を利用することなく 3'末端修飾オリゴヌクレオチドの合成を可能とした。また、オリゴヌクレオチド鎖中に導入した場合、オリゴヌクレオチドのタンデム合成が可能であり、従来よりも温和な塩基条件下、複数のオリゴヌクレオチドを一挙に得られることが示された。特に、二重鎖核酸のタンデム合成では、鎖切断後二重鎖核酸として、一挙に得られることも見出した。

総括

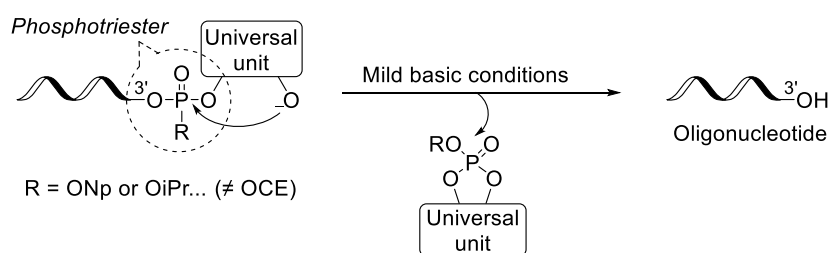
第一章では、ビシクロ[2.2.2]オクタンジオール骨格を持つジベンゾ型 UL を開発した。これをオリゴヌクレオチド固相合成に利用することで、目的のオリゴヌクレオチドとユニバーサルユニット付加体を脂溶性の差を利用して容易に分離することに成功した。



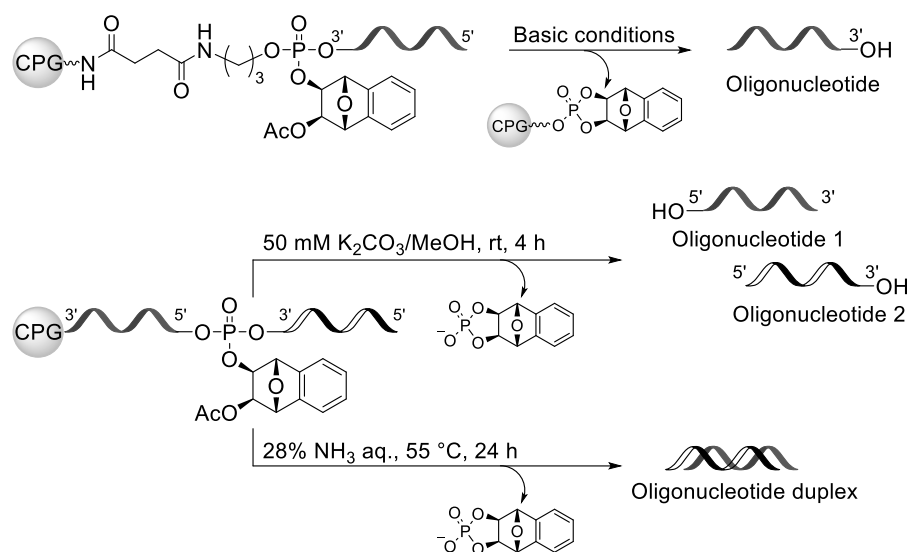
第二章では、7-オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタンジオール骨格に脂溶性ユニットとしてフェナンスレンを付与したユニバーサルユニットを持つ UL を開発した。これを用いることで、オリゴヌクレオチドの精製が容易になることだけでなく、汎用されている UL と同条件下、ユニバーサルユニットを除去できることを明らかにした。



第三章では、*O*-アルキルホスホロアミダイトを開発した。これを UL 修飾樹脂を用いたオリゴヌクレオチド合成に利用することで、温和な塩基条件にて、迅速にユニバーサルユニットを除去できることを見出した。



第四章では、ユニバーサルユニットを分子内に組み込んだホスホロアミダイトの開発により、そのもの自身を UL として利用するオリゴヌクレオチド合成やオリゴヌクレオチドのタンデム合成が実現した。



以上、これらの新たな材料により、多様化するオリゴヌクレオチド合成のさらなる効率化に寄与することが期待される。

謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました恩師、張 功幸教授に心から感謝致します。

本研究に際し、数々の御助言、御尽力を尽くして頂きました瀧 靖史助教、伊藤 勇太助教、ならびに大澤 昂志助教 (現在、大阪大学大学院薬学研究科 助教) に深く感謝致します。

本研究の論文審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました主査の田中 好幸教授、および副査の山本 博文教授、吉田 昌裕教授ならびに徳島大学大学院医歯薬研究部 南川 典昭教授に深く感謝致します。

質量分析スペクトルを測定して頂きました岡本 育子講師に深く感謝致します。

研究室生活で、日々実験や勉学に勤しみ共に協力し合いました徳島文理大学薬学部放射薬品学教室の卒業生の同級生、後輩ならびに在校生の皆様に深く感謝致します。

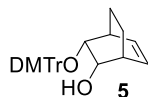
また、本研究の遂行に際し、公益社団法人日本薬学会長井記念薬学奨励支援事業 (Nagai Memorial Research Scholarship from the Pharmaceutical Society of Japan)、公益財団法人徳島新聞社会文化事業団生命科学分野研究支援、ならびに公益社団法人大塚芳満記念財団奨学助成により御支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、生まれてから博士号取得までの長い長い道のりを常日頃から支えてくれた両親をはじめとした家族、親戚の皆様に深く感謝致します。

実験の部

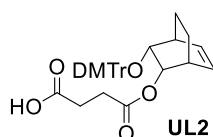
^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^{31}P NMR および ^{19}F NMR スペクトルは、BBO クライオプローブ™を装着した Bruker AVANCE III HD-500 を用いて測定した。測定溶媒は、重クロロホルム (CDCl_3)、重ジメチルスルホキシド (d_6 -DMSO) および重メタノール (CD_3OD) を使い、 ^1H NMR はテトラメチルシラン (0.00 ppm)、または非重水素化体 (ジメチルスルホキシド: 2.50 ppm、メタノール: 3.31 ppm)、 ^{13}C NMR はそれぞれの非重水素化体 (クロロホルム: 77.0 ppm、ジメチルスルホキシド: 39.5 ppm、メタノール: 49.0 ppm)、 ^{19}F NMR はヘキサフルオロベンゼン (-162.9 ppm) を内部標準として使い、 ^{31}P NMR は 5 v/v% リン酸水溶液 (0.00 ppm) を外部標準として用いた。分裂様式は singlet、doublet、triplet、doublet、multiplet、AB quartet、broad singlet をそれぞれ s、d、t、dd、m、AB q、br s と略した。赤外吸収 (IR) スペクトルは、日本分光 FT/IR-4200 を使い、ATR 法にて測定した。高分解能質量分析 (HRMS) スペクトルは、日本電子 JMS-700 (EI, FAB)、日本電子 JMS-S3000 (MALDI-TOF)、Waters SYNAPT G2-Si HDMS (ESI-TOF) を用いて測定した。反応は、薄層クロマトグラフィー (富士フィルム和光純薬シリカゲル 70F₂₅₄ TLC プレート-Wako および Merk シリカゲル 60F₂₅₄ TLC プレート) にて追跡した。フラッシュシリカゲルクロマトグラフィーの吸着剤は、富士シリシア化学 FL-PSQ60B (平均粒子径 60 μm) を用いた。オリゴヌクレオチド合成は、大日本精機 nS-8II を使い、0.2 μmol または 1 μmol のスケールで行った。合成したオリゴヌクレオチドに対する加熱下での塩基処理は、Eppendorf ThermoMixer® C (設定: 任意の温度、500 rpm) を用いて行った。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、日本分光 EXTREMA (PU-4180, CO-4060, UV-4075) を使い、分析カラムは、Waters Xbridge™ Shield RP18 (4.6 mm \times 5 cm) を用いて行った。なお、サンプルの回収は ADVANTEC CHF122SC を用いた。DMTr アッセイには、日本分光 V-650 を用いた。X 線結晶構造解析は、Bruker Apex III Ultra を用いて行った。

第一章の実験



化合物 **5**: アルゴン気流下、化合物 **4** (260 mg, 1.71 mmol) の無水ピリジン溶液 (10 mL) に、室温で塩化 4,4'-ジメトキシトリチル (694 mg, 2.05 mmol) を加えて 23 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 2:1) にて精製し、化合物 **5** (913 mg, quant.) を得た。

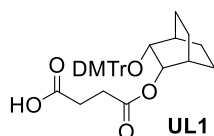
A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.45–7.43 (m, 2H), 7.37–7.32 (m, 4H) 7.31–7.28 (m, 3H), 7.27–7.22 (m, 1H) 6.86–6.82 (m, 1H), 6.23 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.13 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 3.80 (s, 6H), 3.78 (d, 1H, $J = 2.0$), 3.66–3.62 (m, 1H), 3.43 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz), 2.75–2.74 (m, 1H), 1.61–1.60 (m, 1H), 1.27–1.18 (m, 1H), 1.13–1.06 (m, 1H), 1.05–0.99 (m, 1H), 0.90–0.84 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 158.7, 145.3, 136.6, 136.5, 132.5, 131.9, 130.2, 130.2, 128.3, 127.9, 127.0, 113.3, 113.2, 87.2, 73.8, 71.4, 55.2, 37.9, 35.0, 22.4, 20.4. IR (ATR) cm^{-1} : 3484, 2950, 2934, 2904, 2867, 1605, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{NaO}_4$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 465.2042, found 465.2048.



UL2: アルゴン気流下、化合物 **5** (100 mg, 0.226 mmol) とトリエチルアミン (0.313 mL, 2.26 mmol) の無水ジクロロメタン (2 mL) 溶液に、室温で無水コハク酸 (90.5 mg, 0.904 mmol) と 4-ジメチルアミノピリジン (27.6 mg, 0.226 mmol) を加えて 18 時間攪拌した。反応溶液に水を加えた後、クロロホルムとメタノールの混合溶液 (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) で 5 回抽出した。

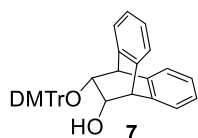
有機層を水で1回、飽和食塩水で1回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルムのみからクロロホルム：メタノール = 20 : 1）で精製し、**UL2** (36.4 mg, 30%) を得た。

A pale yellow foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.43–7.41 (m, 2H), 7.34–7.24 (m, 9H), 7.21–7.16 (m, 2H), 6.82–6.78 (m, 4H), 6.23 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.14 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 4.71 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, 3.0 Hz), 3.79 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.77–3.76 (m, 1H), 2.72–2.71 (m, 1H), 2.67–2.54 (m, 4H), 1.95–1.94 (m, 1H), 1.30–1.25 (m, 1H), 1.13–1.03 (m, 2H), 0.94–0.87 (m, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 176.6, 171.6, 158.5, 158.5, 146.0, 137.2, 137.1, 132.8, 130.8, 130.2, 128.4, 127.7, 126.8, 126.8, 113.0, 113.0, 86.9, 73.8, 73.5, 55.2, 35.6, 34.8, 29.4, 28.8, 22.4, 20.3. IR (ATR) cm^{-1} : 2953, 2937, 2907, 2868, 2836, 1711, 1606, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 565.2202, found 565.2202.



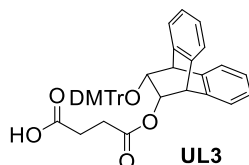
UL1: 水素気流下、**UL2** (130 mg, 0.226 mmol) の無水テトラヒドロフラン (3 mL) 溶液に、酸化白金 (0.98 mg, 4.32 μmol) を加えて室温にて16時間攪拌した。反応溶液をろ過した後、ろ液を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルムのみからクロロホルム：メタノール = 20 : 1）で精製し、**UL1** (104 mg, 80%) を得た。

A pale yellow foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.46 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.33 (d, 4H, $J = 9.0$ Hz), 7.28–7.25 (m, 2H), 7.22–7.16 (m, 2H), 6.80 (d, 4H, $J = 8.5$ Hz), 4.57 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, 4.0 Hz), 3.78–3.77 (m, 7H), 2.72–2.62 (m, 4H), 2.05–1.99 (m, 1H), 1.81 (br s, 1H), 1.76–1.69 (m, 1H), 1.41–1.13 (m, 6H), 1.00 (br s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 176.7, 171.5, 158.5, 146.0, 140.2, 137.3, 137.2, 130.2, 130.2, 129.1, 128.5, 128.0, 127.7, 126.5, 126.8, 113.0, 113.0, 86.6, 72.6, 70.3, 55.2, 30.3, 29.4, 28.8, 28.7, 23.1, 21.8, 19.4, 19.2. IR (ATR) cm^{-1} : 3565, 2909, 2860, 2867, 1714, 1606, 1579, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 567.2359, found 567.2358.



化合物 **7**: 化合物 **5** と同様の手順にて合成した（精製条件: *n*-ヘキサン：酢酸エチル = 4 : 1）。その結果、化合物 **6** (93.0 mg, 0.390 mmol) から化合物 **7** (207 mg, 97%) を得た。

A white foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.38–7.35 (m, 3H), 7.32–7.26 (m, 9H), 7.24–7.18 (m, 2H), 7.14 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.05 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.01–6.96 (m, 2H), 6.87 (d, 4H, $J = 9.0$ Hz), 6.76 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 4.43 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz), 4.05–3.99 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.05 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 2.78 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 158.9, 144.7, 140.2, 139.9, 139.8, 138.8, 136.3, 136.1, 130.3, 130.2, 128.5, 128.0, 127.3, 126.5, 126.3, 126.2, 126.1, 126.0, 124.7, 124.4, 113.4, 113.3, 88.2, 70.9, 68.2, 52.0, 48.8. IR (ATR) cm^{-1} : 3526, 3065, 3055, 3004, 3022, 2951, 2930, 2903, 2835, 1606, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{32}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 563.2198, found 563.2196.



UL3: **UL2** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL3** (400 mg, 0.740 mmol) から化合物 **7** (250 mg, 53%) を得た。

A pale brown foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.35 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 7.28–7.20 (m, 11H), 7.17–7.13 (m, 2H), 7.05–6.98 (m, 3H), 6.85–6.82 (m, 4H), 6.78 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz), 5.09 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, 3.5 Hz), 4.50 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz), 4.05 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, 1.5 Hz), 3.79 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.93 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 2.63–2.56 (m, 2H), 2.55–2.51 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 177.3, 177.6, 158.8, 145.6, 141.0, 139.4, 139.2, 138.5, 137.1, 136.9, 130.2, 130.1, 128.4, 127.9, 127.0, 126.5, 126.4, 126.2,

126.1, 126.0, 125.2, 125.1, 124.2 113.3, 113.2, 87.2, 76.8, 71.7, 71.1, 55.3, 49.3, 48.6, 29.3, 28.7. IR (ATR) cm^{-1} : 2957, 2935, 2929, 2907, 1735, 1601, 1506. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 663.2359, found 663.2362.

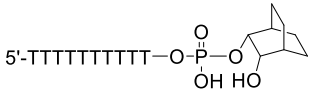
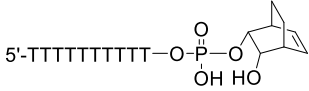
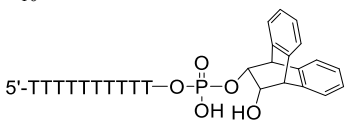
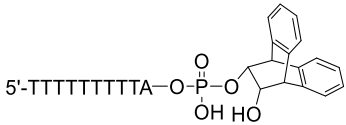
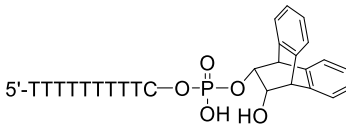
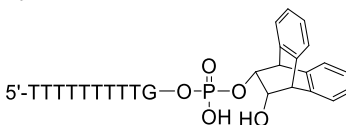
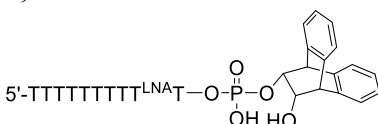
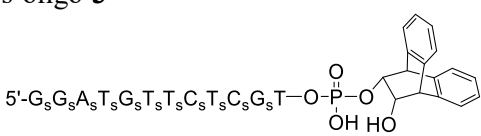
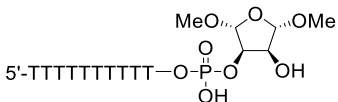
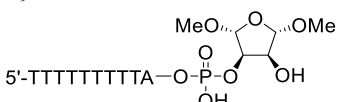
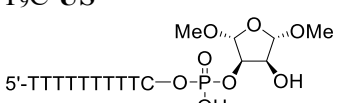
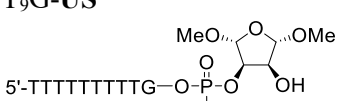
修飾樹脂 **UL1+CPG**: アルゴン気流下、Amino SynBase™ CPG 1000 (200 mg, アミノ基含有量: 11.2 μmol) の無水アセトニトリル (1 mL) 懸濁液に、ジイソプロピルエチルアミン (6.80 μL , 40.0 μmol) と **UL1** (6.10 mg, 11.2 μmol) を室温下にて加えた。2-(1*H*-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート (4.25 mg, 11.2 μmol) を加え、1時間攪拌した後、反応液をろ過し、得られた固体をアセトニトリルで洗浄した。その固体を一晩真空乾燥した後、Cap A (9 v/v 無水酢酸テトラヒドロフラン溶液、0.5 mL) と Cap B (10 w/v *N*-メチルイミダゾールテトラヒドロフラン溶液、0.5 mL) に懸濁し、室温にて 30 分攪拌した。反応液をろ過し、得られた固体をアセトニトリルで洗浄、一晩真空乾燥することで修飾樹脂 **UL1+CPG** を得た。得られた修飾樹脂の一部を、3 w/v % トリクロロ酢酸ジクロロメタン溶液にて処理することで、遊離したジメトキシトリチルカチオンを含む溶液を得た。その溶液を用いて、504 nm における紫外外部吸収を 3 回測定し、その吸光度の値から **UL1** の樹脂担持量を算出した ($41 \pm 0.2 \mu\text{mol/g}$, 73%)。なお、ジメトキシトリチルカチオンのモル吸光係数 (ϵ_{504}) は文献にて報告されている値 ($76 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いた。³⁴⁾

修飾樹脂 **UL2+CPG**: 修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL2** (6.07 mg, 11.2 μmol) から修飾樹脂 **UL2+CPG** ($37 \pm 1.4 \mu\text{mol/g}$, 66%) を得た。

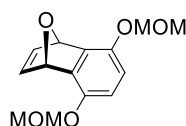
修飾樹脂 **UL3+CPG**: 修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL3** (7.18 mg, 11.2 μmol) から修飾樹脂 **UL3+CPG** ($42 \pm 2.2 \mu\text{mol/g}$, 75%) を得た。

オリゴヌクレオチドの合成: **UL1-3+CPG** を固相担体として用い、標準的なホスホロアミダイト法により 0.2 μmol スケールにて合成した。ヌクレオシドのホスホロアミダイト体は、 dA^{Bz} phosphoramidite、 dG^{IBu} phosphoramidite、 dC^{Bz} phosphoramidite、 dT phosphoramidite および LNAT phosphoramidite を 0.1 M 無水アセトニトリル溶液として用いた。ホスホロチオエート修飾を持つオリゴヌクレオチドの合成では、 dA^{Pac} phosphoramidite、 dG^{IPac} phosphoramidite、 dC^{Ac} phosphoramidite を用いた。脱 DMTr 工程は 3 w/v % トリクロロ酢酸ジクロロメタン溶液を用い、縮合工程は ETT activater (0.25 M ETT アセトニトリル溶液) を用い、キャップ工程は Cap A (9 v/v 無水酢酸テトラヒドロフラン溶液) と Cap B (10 w/v *N*-メチルイミダゾールテトラヒドロフラン溶液) を用い、酸化工程は Oxidizer (0.02 M ヨウ素テトラヒドロフラン-水溶液) を用いて、これらの工程を順に繰り返すことで、任意の配列のオリゴヌクレオチドを合成した。また、硫化工程は、((ジメチルアミノメチリデン)アミノ)-3*H*-1,2,4-ジチアザオリン-3-チオン (DDTT) を 0.05 M 無水ピリジンと無水アセトニトリルの混合溶液 (無水ピリジン : 無水アセトニトリル = 3 : 2) として用いた。なお、各工程は基本的に、通常の反応時間 (脱 DMTr 工程: 8 秒、縮合工程: 25 秒、キャップ工程: 45 秒、酸化工程: 10 秒、硫化工程: 10 分) で行った。その後、オリゴヌクレオチドが担持された樹脂に対して、濃アンモニア水や炭酸カリウム無水メタノール溶液を用いる任意の塩基条件にて処理を行い、樹脂からの切り出し、核酸塩基部やリン酸部の脱保護、およびユニバーサルユニットの除去を一挙に行った。反応溶液からアンモニアまたはメタノールを、遠心式濃縮機 (タイテック VC-15s) を用いて減圧留去した後、粗成績物を HPLC にて分析した。その際得られた新規オリゴヌクレオチド (**T₁₀-1-3**、**T₉A-3**、**T₉C-3**、**T₉G-3**、**T₉^{LNAT}-3** および **s-oligo-3**) の構造は、ESI-TOF-MS 測定 (Negative mode) にて決定した (Table 6)。なお、US を用いた場合も上記と同様の手順でオリゴヌクレオチドの合成、塩基処理を行った。

Table 6. Structures and ESI-MS analysis data of new oligonucleotides (ONs).

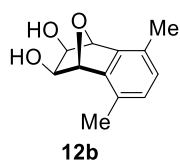
Structure	Formula	Calcd. [M]	Found [M]
T₁₀-1 	C ₁₀₈ H ₁₄₄ N ₂₀ O ₇₂ P ₁₀	3184.15	3184.50
T₁₀-2 	C ₁₀₈ H ₁₄₂ N ₂₀ O ₇₂ P ₁₀	3182.13	3182.60
T₁₀-3 	C ₁₁₄ H ₁₄₄ N ₂₀ O ₇₂ P ₁₀	3280.23	3280.60
T₉A-3 	C ₁₁₆ H ₁₄₃ N ₂₃ O ₇₀ P ₁₀	3289.60	3289.50
T₉C-3 	C ₁₁₅ H ₁₄₃ N ₂₁ O ₇₁ P ₁₀	3265.22	3265.50
T₉G-3 	C ₁₁₆ H ₁₄₃ N ₂₃ O ₇₁ P ₁₀	3305.25	3305.50
T₉^{LNA}T-3 	C ₁₁₇ H ₁₄₄ N ₂₀ O ₇₃ P ₁₀	3308.24	3308.60
s-oligo-3 	C ₁₃₄ H ₁₆₃ N ₄₁ O ₆₇ P ₁₂ S ₁₁	4144.30	4144.20
T₁₀-US 	C ₁₀₆ H ₁₄₂ N ₂₀ O ₇₅ P ₁₀	3206.10	3206.60
T₉A-US 	C ₁₀₆ H ₁₄₁ N ₂₃ O ₇₃ P ₁₀	3215.12	3215.40
T₉C-US 	C ₁₀₅ H ₁₄₁ N ₂₁ O ₇₄ P ₁₀	3191.09	3191.50
T₉G-US 	C ₁₀₆ H ₁₄₁ N ₂₃ O ₇₄ P ₁₀	3231.12	3231.40

第二章の実験



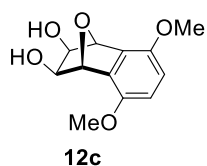
化合物 **11d**: アルゴン気流下、**10d** (900 mg, 3.25 mmol) の無水テトラヒドロフラン (10 mL) 溶液に、室温でフラン (4.71 mL, 65.0 mmol) を加えた。-78 °C 下、リチウムジイソプロピルアミドテトラヒドロフラン溶液 (2 M, 1.79 mL, 3.58 mmol) を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。氷冷下、反応溶液に水を加え、酢酸エチルで希釈した。有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) で精製し、化合物 **11d** (839 mg, 98%) を得た。

A yellow oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.05 (s, 2H), 6.69 (s, 2H), 5.94 (s, 2H), 5.11 and 5.06 (AB q, 4H, $J = 6.5$ Hz), 3.49 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 146.2, 142.8, 138.4, 116.2, 95.7, 80.6, 56.0. IR (ATR) cm^{-1} : 2953, 2900, 1619, 1485. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 287.0895, found 287.0895.



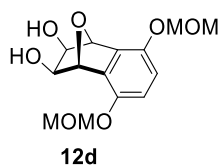
化合物 **12b**: 化合物 **11b** (2.48 g, 14.4 mmol) のアセトン (10 mL) 溶液に、50 w/v% *N*-メチルモルフォリンオキシド水溶液 (4.22 g, 8.50 mL, 36.0 mmol) と四酸化オスミウム *tert*-ブタノール溶液 (0.1 M, 0.144 mL, 14.4 μmol) を加えて、3 時間加熱還流した。反応溶液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、水で希釈した後、クロロホルムとメタノールの混合溶液 (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) で 5 回抽出をした。有機層を水で 1 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、化合物 **12b** (2.39 g, 80%) を得た。

A white powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 6.89 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.90 (br s, 2H), 2.29 (s, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 140.3, 129.0, 127.8, 84.1, 70.6, 17.9. IR (ATR) cm^{-1} : 3309, 2949, 2919, 2862, 1499, 1454. HRMS (ESI-TOF): calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 229.0841, found 229.0842.



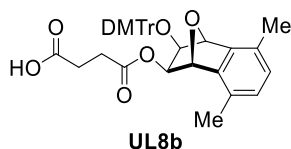
化合物 **12c**: 化合物 **12b** と同様の手順にて合成した。その結果、化合物 **11c** (900 mg, 4.41 mmol) から化合物 **12c** (944 mg, 90%) を得た。

A pale yellow powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.67 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 3.96 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.79 (s, 6H), 3.10 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 147.5, 131.1, 112.1, 83.0, 70.5, 56.0. IR (ATR) 3384, 2996, 2945, 2835, 1618, 1498. HRMS (ESI-TOF) calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 261.0739, found 261.0740.



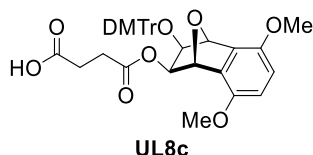
化合物 **12d**: 化合物 **12b** の合成と同様の手順にて、化合物 **11d** (700 mg, 2.65 mmol) から化合物 **12d** (713 mg, 90%) を得た。

A pale yellow oil. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 6.86 (s, 2H), 5.34 (s, 2H), 5.13 and 5.10 (AB q, 4H, $J = 6.5$ Hz), 3.99 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz), 3.49 (s, 6H), 3.12 (d, 2H, $J = 4.0$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 145.8, 132.1, 116.8, 95.3, 83.3, 70.7, 56.1. IR (ATR) cm^{-1} : 3382, 2954, 2827, 1622, 1491. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 321.0950, found 321.0951.



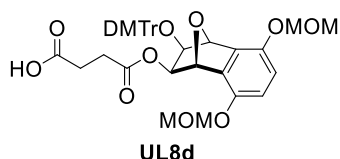
UL8b: アルゴン気流下、化合物 **12b** (180 mg, 0.873 mmol) の無水ピリジン溶液 (5 mL) に、室温で塩化 4,4'-ジメトキシトリチル (354 mg, 1.05 mmol) を加えて 19 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1) にて精製し、中間体 (401 mg, 90%) を得た。続いて、アルゴン気流下、この中間体 (344 mg, 0.676 mmol) とトリエチルアミン (0.937 mL, 6.76 mmol) の無水ジクロロメタン (10 mL) 溶液に、室温で無水コハク酸 (271 mg, 2.70 mmol) と 4-ジメチルアミノピリジン (82.6 mg, 0.676 mmol) を加えて 21 時間攪拌した。反応溶液に水を加えた後、クロロホルムとメタノールの混合溶液 (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) で 5 回抽出した。有機層を水で 1 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルムのみからクロロホルム : メタノール = 20 : 1) で精製し、**UL8b** (260 mg, 2 工程 57%) を得た。

A pale yellow foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.47–7.45 (m, 2H), 7.37–7.33 (m, 4H), 7.30–7.20 (m, 4H), 6.87–6.82 (m, 5H), 6.76 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 5.23 (d, 1H, $J = 0.5$ Hz), 4.97 (d, 1H, $J = 0.5$ Hz), 4.59 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 4.09 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 2.77–2.60 (m, 4H), 2.25 (s, 3H), 2.00 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 175.6, 172.3, 158.6, 145.2, 141.1, 140.2, 136.5, 136.4, 130.3, 130.2, 128.9, 128.8, 128.5, 128.2, 127.9, 127.4, 127.0, 113.3, 87.9, 83.4, 82.3, 73.9, 73.1, 55.2, 29.1, 28.5, 18.3, 17.8. IR (ATR) cm^{-1} : 2950, 1732, 1713, 1607, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{O}_8$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 607.2332, found 607.2335.



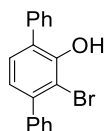
UL8c: **UL8b** と同様の手順にて合成した。化合物 **12c** (868 mg, 3.64 mmol) から中間体 (916 mg, 47%) を得た。その中間体 (520 mg, 0.962 mmol) から **UL8c** (616 mg, 2 工程 47%) を得た。

A pale yellow foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.45–7.43 (m, 2H), 7.35–7.28 (m, 6H), 7.22–7.19 (m, 1H), 6.84–6.81 (m, 4H), 6.58 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 6.54 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 5.35 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz), 4.91 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 4.68 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz), 4.06 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 3.79 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.86–2.69 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 176.8, 172.1, 158.6, 158.5, 147.5, 147.0, 145.2, 136.4, 136.2, 132.0, 130.5, 130.3, 128.4, 127.9, 126.8, 113.3, 112.2, 111.8, 87.9, 81.6, 81.0, 81.3, 73.7, 72.9, 56.2, 55.5, 55.2, 29.2, 28.7. IR (ATR) cm^{-1} : 2933, 2835, 1734, 1713, 1607, 1499. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{35}\text{O}_{10}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 639.2230, found 639.2230.



UL8d: UL8b と同様の手順にて合成した。化合物 **12d** (276 mg, 0.925 mmol) から中間体 (343 mg, 未精製) を得た。その中間体から **UL8d** (234 mg, 2 工程 36%) を得た。

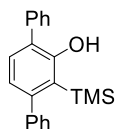
A pale yellow foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.45–7.43 (m, 2H), 7.35–7.28 (m, 6H), 7.23–7.20 (m, 1H), 6.84–6.81 (m, 4H), 6.79 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 6.77 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 5.36 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz), 5.08 (s, 2H), 5.04 and 5.00 (AB q, 2H, $J = 6.5$ Hz), 4.89 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 4.76 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz), 4.12 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz), 3.79 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 2.86–2.68 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 175.3, 172.0, 158.6, 145.6, 145.4, 145.2, 136.4, 136.1, 132.7, 131.5, 130.3, 128.4, 127.9, 126.9, 116.8, 115.9, 113.3, 95.1, 94.7, 87.9, 81.8, 81.3, 73.8, 72.9, 56.0, 55.9, 55.2, 29.2, 28.5. IR (ATR) cm^{-1} : 2936, 2834, 1732, 1714, 1607, 1507, 1494. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{O}_{12}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 699.2442, found 699.2440.



14

化合物 **14**: アルゴン気流下、化合物 **13** (554 mg, 2.25 mmol) とジイソプロピルアミン (31.6 μL , 0.230 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (20 mL) に *N*-ブロモスクシンイミド (400 mg, 2.25 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (20 mL) を、室温で滴下し、1 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧留去した。得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (富士シリシア化学 DIOL MB100-45/75, *n*-ヘキサンのみ) にて精製後、*n*-ヘキサンで再結晶し化合物 **14** を得た (580 mg, 79%)。

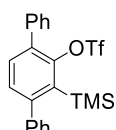
Colorless crystals. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.60–7.59 (m, 2H), 7.49–7.37 (m, 8H), 7.31 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.99 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.97 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 149.4, 142.6, 140.9, 137.3, 129.4, 129.2, 128.5, 128.2, 128.1, 127.8, 127.7, 122.9, 112.1. IR (ATR) cm^{-1} : 3454, 3031, 1599, 1471, 1439. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{BrO}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 323.0072, found 323.0071.



15

化合物 **15**: アルゴン気流下、化合物 **14** (2.50 g, 7.69 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (40 mL) に 1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン (1.93 mL, 9.23 mmol) を加え、23 時間加熱還流した。反応溶液から溶媒を減圧留去した後、得られた粗成績物の無水テトラヒドロフラン (40 mL) 溶液に、 -78 $^{\circ}\text{C}$ 下、*n*-ブチルリチウム *n*-ヘキサン溶液 (1.56 M, 9.87 mL, 15.4 mmol) を滴下し、同温にて 1 時間攪拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサンのみ) にて精製し、化合物 **15** (2.37 g, 2 工程 97%) を得た。

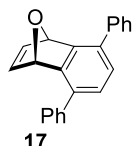
A white powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.53–7.49 (m, 4H), 7.43–7.31 (m, 6H), 7.22 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.86 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 5.57 (s, 1H), 0.00 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 157.4, 150.6, 144.6, 137.1, 130.2, 129.5, 129.3, 129.3, 128.0, 127.7, 127.0, 125.9, 124.1, 122.8, 1.27. IR (ATR) cm^{-1} : 3532, 2953, 1592, 1541, 1455. HRMS (ESI-TOF): calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{OSi}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 317.1362, found 317.1364.



16

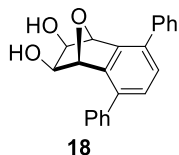
化合物 **16**: アルゴン気流下、化合物 **15** (2.00 g, 6.28 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (30 mL) に $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下、*n*-ブチルリチウム *n*-ヘキサン溶液 (1.56 M, 4.83 mL, 7.54 mmol) を滴下し、同温にて 1 時間攪拌した。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (1.55 mL, 9.42 mmol) を加えて、同温にて再び 1 時間攪拌した。反応溶液に水を加えた後、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサンのみ) にて精製し、化合物 **16** (682 mg, 24%) を得た。

A pale yellow powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.47–7.36 (m, 12H), 0.12 (s, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 151.8, 150.6, 143.1, 136.8, 134.9, 134.8, 132.8, 130.2, 129.8, 129.3, 128.4, 128.2, 128.0, 118.0 (q, $J = 319\text{ Hz}$), 2.22. IR (ATR) cm^{-1} : 2960, 1601, 1532, 1448. $^{19}\text{F NMR}$ (470 MHz, CDCl_3): δ -77.1 . HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_3\text{SSi}$ [M] 450.0933, found 450.0932.



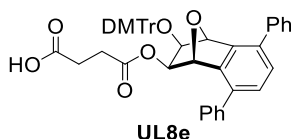
化合物 **17**: アルゴン気流下、化合物 **16** (780 mg, 1.73 mmol) とフラン (0.376 mL, 5.19 mmol) の無水アセトニトリル (10 mL) 溶液に、室温でフッ化セシウム (1.32 g, 8.66 mmol) を加えて、2 時間加熱還流した。反応溶液に水を加えて、酢酸エチルで希釈した。有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 7 : 1) で精製し、化合物 **17** (324 mg, 63%) を得た。

A white powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.51–7.48 (m, 4H), 7.41–7.39 (m, 6H), 7.28 (s, 2H), 7.19 (s, 2H), 5.88 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 147.0, 143.1, 139.4, 133.9, 128.8, 128.1, 127.5, 125.6, 82.0. IR (ATR) cm^{-1} : 3013, 1600, 1575, 1468. HRMS (EI): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}$ [M] 296.1201, found 296.1198.



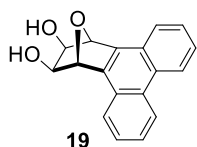
化合物 **18**: 化合物 **12b** の合成と同様の手順にて、化合物 **17** (295 mg, 0.995 mmol) から化合物 **18** (240 mg, 73%) を得た (精製条件: クロロホルムのみからクロロホルム : メタノール = 5 : 1)。

A white powder. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 7.52–7.51 (m, 8H), 7.44–7.40 (m, 4H), 5.19 (s, 2H), 4.22 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 142.6, 140.6, 135.7, 130.2, 129.4, 129.2, 129.0, 86.5, 71.7. IR (ATR) cm^{-1} : 3379, 2507, 1600, 1473. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{NaO}_3$ [M+Na] $^+$ 353.1154, found 353.1157.



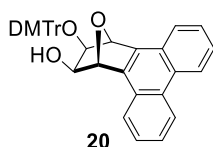
UL8e: **UL8b** と同様の手順にて合成した。その結果、化合物 **18** (230 mg, 0.696 mmol) から中間体 (343 mg, 未精製) を得た。その中間体から **UL8e** (234 mg, 2 工程 36%) を得た。

A pale brown foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.52–7.43 (m, 7H), 7.40–7.26 (m, 7H), 7.20–7.13 (m, 7H), 6.66 (d, 4H, $J = 9.0\text{ Hz}$), 5.80 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.72 (d, 1H, $J = 5.5\text{ Hz}$), 4.27 (d, 1H, $J = 5.5\text{ Hz}$), 3.77 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 2.63–2.40 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 175.6, 171.6, 158.6, 144.9, 141.8, 140.2, 139.3, 138.4, 136.1, 134.8, 133.9, 130.3, 129.0, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4, 127.8, 127.7, 127.5, 127.0, 113.1, 113.0, 88.0, 84.4, 83.7, 74.2, 72.6, 55.2, 28.9, 28.5. IR (ATR) cm^{-1} : 3023, 2929, 1732, 1712, 1606, 1578, 1507, 1473. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{47}\text{H}_{39}\text{O}_8$ [M-H] $^-$ 731.2645, found 731.2646.



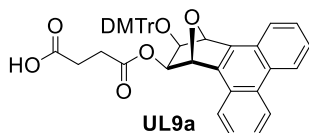
化合物 **19**: アルゴン気流下、9-ブロモフェナンスレン (2.00 g, 7.78 mmol) とフラン (5.63 mL, 77.8 mmol) の無水テトラヒドロフラン (15 mL) 溶液に、ナトリウムアミド (910 mg, 23.3 mmol) を加えて、19 時間加熱還流した。氷冷下、反応溶液に水を加え、酢酸エチルで希釈し、有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 1 から 50 : 1) で精製し、中間体 (1.10 g, 混合物) を得た。続いて、その中間体 (1.10 g, 混合物) のアセトン (40 mL) 溶液に、50 w/v% *N*-メチルモルフォリンオキシド水溶液 (2.28 g, 4.56 mL, 19.5 mmol) と四酸化オスミウム *tert*-ブタノール溶液 (0.1 M, 77.8 μ L, 7.78 μ mol) を加えて、3 時間加熱還流した。反応溶液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えた後、水で希釈し、クロロホルムとメタノールの混合溶液 (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) で 5 回抽出をした。集めた有機層を水で 1 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルムのみからクロロホルム : メタノール = 100 : 1) で精製し、化合物 **19** (910 mg, 2 工程 42%) を得た。

A pale brown powder. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.90–8.88 (m, 2H), 8.10–8.08 (m, 2H), 7.74–7.70 (m, 4H), 5.75 (s, 2H), 5.17–5.15 (m, 2H), 3.70–3.67 (m, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 138.6, 129.7, 127.3, 126.7, 125.6, 124.5, 123.8, 83.6, 69.1. IR (ATR) cm^{-1} : 3355, 3240, 2939, 1512, 1427. HRMS (MALDI-TOF): calcd. for C₁₈H₁₄NaO₃ [M+Na]⁺ 301.0841, found 301.0831.



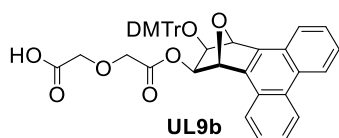
化合物 **20**: 第一章 (実験の部) に示す化合物 **5** と同様の手順にて合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1)。その結果、化合物 **19** (500 mg, 1.80 mmol) から化合物 **20** (1.01 g, 97%) を得た。

A pale yellow foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.66–8.63 (m, 2H), 7.91–7.89 (m, 1H), 7.65–7.48 (m, 6H), 7.39–7.26 (m, 7H), 7.20 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 6.90–6.86 (m, 4H), 5.73 (s, 1H), 5.12 (s, 1H), 3.98 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 3.91–3.87 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 158.9, 158.8, 144.7, 138.4, 138.0, 136.1, 135.8, 130.3, 130.2, 128.3, 128.2, 127.2, 126.7, 126.5, 126.4, 126.0, 125.5, 125.0, 124.4, 123.5, 123.3, 113.5, 88.9, 84.7, 83.0, 73.0, 70.6, 55.3. IR (ATR) cm^{-1} : 3499, 3004, 2953, 2834, 1607, 1580, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₃₉H₃₂NaO₅ [M+Na]⁺ 603.2147, found 603.2149.



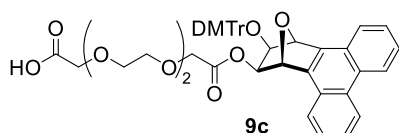
UL9a: 第一章 (実験の部) に示す **UL2** と同様の手順にて合成した。その結果、化合物 **20** (500 mg, 0.861 mmol) から **UL9a** (368 mg, 63%) を得た。

A pale brown foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.63 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.95–7.93 (m, 1H), 7.64–7.60 (m, 3H), 7.55–7.49 (m, 3H), 7.42–7.36 (m, 4H), 7.31–7.21 (m, 4H), 6.87–6.82 (m, 4H), 5.83 (s, 1H), 5.26 (s, 1H), 4.76 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 4.09 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.95–2.77 (m, 4H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.7, 158.7, 158.6, 145.4, 138.7, 137.8, 136.7, 136.4, 130.3, 130.2, 128.3, 128.0, 127.4, 126.9, 126.8, 126.7, 126.4, 125.8, 125.4, 125.0, 123.4, 123.3, 113.4, 88.1, 84.7, 83.6, 82.6, 73.9, 73.1, 55.3, 29.3. IR (ATR) cm^{-1} : 3649, 3007, 2929, 2833, 1733, 1716, 1607, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₄₃H₃₆NaO₈ [M+Na]⁺ 703.2308, found 703.2303.



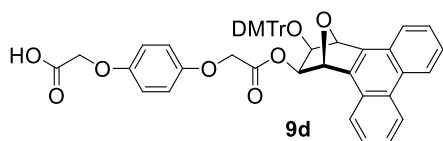
UL9b: アルゴン気流下、化合物 **20** (200 mg, 0.344 mmol) の無水ピリジン (3 mL) 溶液に、2,2'-オキシ二酢酸 (55.4 mg, 0.413 mmol) を加えた。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (65.9 mg, 0.344 mmol) と 4-ジメチルアミノピリジン (4.20 mg, 3.44 μ mol) を加え、室温で 16 時間攪拌した。反応溶液を水で希釈し、クロロホルムとメタノールの混合溶液 (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) で 5 回抽出をした。集めた有機層を水で 1 回、飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム : トリエチルアミン = 100 : 1) にて精製し、**UL9b** (161 mg, 63%) を得た。

A white foam (Et₃N salt). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.65–8.63 (m, 2H), 7.99–7.98 (m, 1H), 7.66–7.60 (m, 3H), 7.55–7.47 (m, 3H), 7.41–7.36 (m, 4H), 7.30–7.20 (m, 4H), 6.87–6.83 (m, 4H), 5.85 (s, 1H), 5.24 (s, 1H), 4.83 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 4.62 and 4.45 (AB q, 2H, *J* = 16.0 Hz), 4.22 and 4.16 (AB q, 2H, *J* = 16.0 Hz), 4.09 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.94 (m, 6H), 1.21 (t, 9H, *J* = 7.5 Hz). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 175.6, 171.2, 158.7, 158.6, 145.3, 138.7, 137.8, 136.7, 136.3, 130.3, 130.2, 128.3, 128.0, 127.4, 126.9, 126.7, 126.4, 125.8, 125.4, 125.0, 124.6, 123.4, 123.3, 113.4, 88.0, 83.5, 82.7, 73.9, 72.9, 70.5, 67.8, 55.3, 45.1, 9.2. IR (ATR) cm⁻¹: 2977, 1748, 1606, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₄₃H₃₅O₉ [M-H]⁻ 695.2281, found 695.2284.



UL9c: **UL9b** と同様の手順にて合成した。その結果、化合物 **20** (200 mg, 0.344 mmol) から **UL9c** (105 mg, 39%) を得た。

A white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.66–8.64 (m, 2H), 7.97–7.95 (m, 1H), 7.66–7.61 (m, 3H), 7.57–7.54 (m, 1H), 7.48–7.47 (m, 2H), 7.47–7.22 (m, 8H), 6.87–6.83 (m, 4H), 5.87 (s, 1H), 5.33 (s, 1H), 4.79 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 4.48 and 4.24 (AB q, 2H, *J* = 16.5 Hz), 4.16 (s, 2H), 4.12 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 3.86–3.72 (m, 14H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 171.4, 171.0, 158.7, 145.3, 138.7, 137.5, 136.6, 136.2, 130.4, 130.3, 128.3, 128.0, 127.0, 126.8, 126.5, 125.8, 125.3, 125.0, 124.5, 123.4, 113.4, 88.1, 83.6, 82.6, 77.3, 77.2, 77.0, 76.8, 73.9, 73.1, 71.5, 70.8, 70.7, 70.3, 69.0, 68.6, 55.3. IR (ATR) cm⁻¹: 2929, 1746, 1607, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₄₇H₄₃O₁₁ [M-H]⁻ 783.2805, found 783.2809.



UL9d: **UL9b** と同様の手順にて合成した。その結果、化合物 **20** (200 mg, 0.344 mmol) から **UL9d** (174 mg, 57%) を得た。

A white foam (Et₃N salt). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.65 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.98–7.96 (m, 1H), 7.64–7.61 (m, 3H), 7.57–7.54 (m, 1H), 7.51–7.49 (m, 2H), 7.41–7.34 (m, 5H), 7.30–7.23 (m, 3H), 6.92–6.81 (m, 8H), 5.87 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.82 (m, 2H), 4.65 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 4.43 (s, 2H), 4.12 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 3.80 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.00 (m, 6H), 1.24 (t, 9H, *J* = 7.5 Hz). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 174.8, 169.7, 158.7, 153.9, 151.8, 145.2, 138.7, 137.6, 136.6, 136.2, 130.4, 130.3, 130.2, 128.3, 128.0, 127.4, 127.0, 126.9, 126.8, 126.5, 125.8, 125.4, 125.0, 124.6, 123.4, 123.3, 115.7, 115.6, 113.4, 88.2, 83.7, 82.6, 77.3, 77.2, 77.0, 76.7, 73.9, 73.5, 67.9, 66.3, 55.3, 45.0, 8.81. IR (ATR) cm⁻¹: 2948, 1752, 1606, 1505. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₄₉H₃₉O₁₀ [M-H]⁻ 787.2543, found 787.2542.

修飾樹脂 **UL8a+CPG**: 第一章 (実験の部) に示す修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL8a** (6.50 mg, 11.2 μmol) から修飾樹脂 **UL8a+CPG** ($35\pm 1.7 \mu\text{mol/g}$, 63%) を得た。

修飾樹脂 **UL8b+CPG**: 第一章 (実験の部) に示す修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL8b** (4.87 mg, 8.00 μmol) から修飾樹脂 **UL8b+CPG** ($38\pm 1.0 \mu\text{mol/g}$, 95%) を得た。

修飾樹脂 **UL8c+CPG**: 第一章 (実験の部) に示す修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL8c** (5.13 mg, 8.00 μmol) から修飾樹脂 **UL8c+CPG** ($38\pm 0.4 \mu\text{mol/g}$, 95%) を得た。

修飾樹脂 **UL8d+CPG**: 第一章 (実験の部) に示す修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL8d** (5.61 mg, 8.00 μmol) から修飾樹脂 **UL8d+CPG** ($35\pm 1.0 \mu\text{mol/g}$, 86%) を得た。

修飾樹脂 **UL8e+CPG**: 第一章 (実験の部) に示す修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL8e** (5.86 mg, 8.00 μmol) から修飾樹脂 **UL8e+CPG** ($31\pm 0.7 \mu\text{mol/g}$, 78%) を得た。

修飾樹脂 **UL9a+CPG**: 第一章 (実験の部) に示す修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、**UL9a** (13.6 mg, 20.0 μmol) から修飾樹脂 **UL9a+CPG** ($37\pm 1.3 \mu\text{mol/g}$, 93%) を得た。

修飾樹脂 **UL9a+PS**: 第一章 (実験の部) に示す方法に従い、Primer Support™ 5G amino (200 mg, アミノ基含有量: 90.0 μmol) と **UL9a** (61.3 mg, 45.0 μmol) から修飾樹脂 **UL9a+PS** ($349\pm 10 \mu\text{mol/g}$, 78%) を得た。

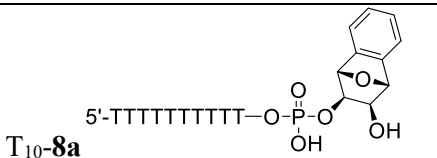
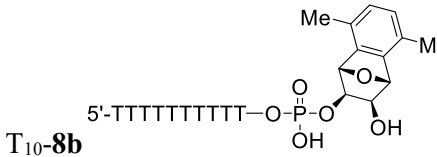
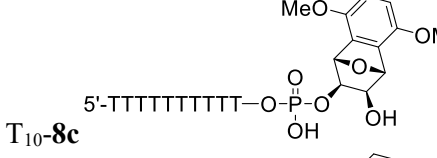
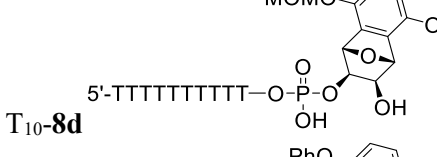
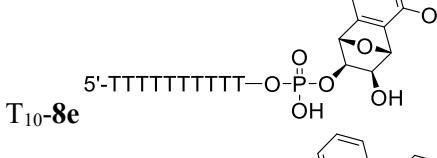
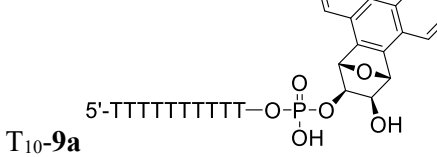
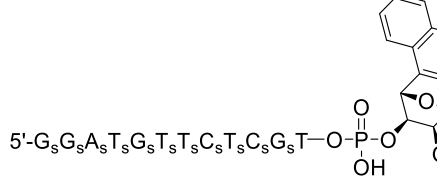
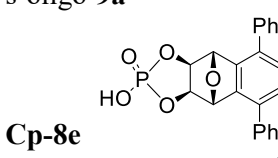
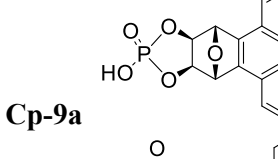
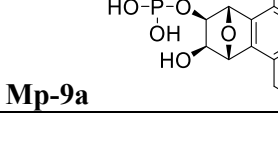
修飾樹脂 **UL9b+PS**: 第一章 (実験の部) に示す方法に従い、Primer Support™ 5G amino (100 mg, アミノ基含有量: 45.0 μmol) と **UL9b** (35.9 mg, 45.0 μmol) から修飾樹脂 **UL9b+PS** ($375\pm 13 \mu\text{mol/g}$, 83%) を得た。

修飾樹脂 **UL9c+PS**: 第一章 (実験の部) に示す方法に従い、Primer Support™ 5G amino (100 mg, アミノ基含有量: 45.0 μmol) と **UL9c** (35.3 mg, 45.0 μmol) から修飾樹脂 **UL9c+PS** ($296\pm 21 \mu\text{mol/g}$, 66%) を得た。

修飾樹脂 **UL9d+PS**: 第一章 (実験の部) に示す方法に従い、Primer Support™ 5G amino (100 mg, アミノ基含有量: 45.0 μmol) と **UL9d** (40.1 mg, 45.0 μmol) から修飾樹脂 **UL9d+PS** ($314\pm 44 \mu\text{mol/g}$, 70%) を得た。

オリゴヌクレオチドの合成: **UL8a-e+CPG** および **UL9a+CPG** を固相担体として用いたオリゴヌクレオチドの合成やその後の塩基処理は、第一章に示した方法にて行った。また、**UL9a-d+PS** を用いたオリゴヌクレオチドの合成は、1 μmol スケールにて DMTr-off モードで行った。塩基処理の際得られた新規オリゴヌクレオチド (**T₁₀-8a-e**, **T₁₀-9a**, **s-oligo-9a**) と副生成物 (**Cp-8e**, **Cp-9a**, **Mp-9a**) を Table 7 に示す。

Table 7. Structures and ESI-MS analysis data of new ONs, **Cp-8e**, **Cp-9a**, and **Mp-9a**.

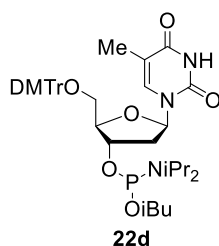
Structure	Formula	Calcd. [M]	Found [M]
 T₁₀-8a	C ₁₁₀ H ₁₄₀ N ₂₀ O ₇₃ P ₁₀	3220.13	3220.60
 T₁₀-8b	C ₁₁₂ H ₁₄₄ N ₂₀ O ₇₃ P ₁₀	3248.19	3248.70
 T₁₀-8c	C ₁₁₂ H ₁₄₄ N ₂₀ O ₇₅ P ₁₀	3280.19	3280.70
 T₁₀-8d	C ₁₁₄ H ₁₄₈ N ₂₀ O ₇₇ P ₁₀	3340.24	3340.70
 T₁₀-8e	C ₁₂₂ H ₁₄₈ N ₂₀ O ₇₃ P ₁₀	3372.33	3372.40
 T₁₀-9a	C ₁₁₈ H ₁₄₄ N ₂₀ O ₇₃ P ₁₀	3320.25	3320.40
 s-oligo-9a	C ₁₃₆ H ₁₆₃ N ₄₁ O ₆₈ P ₁₂ S ₁₁	4184.36	4184.40
 Cp-8e	C ₂₂ H ₁₇ O ₅ P	391.0735 [M-H] ⁻	391.0733
 Cp-9a	C ₁₈ H ₁₂ O ₅ P	339.0422 [M-H] ⁻	339.0422
 Mp-9a	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ P	357.0528 [M-H] ⁻	357.0531

化合物 **19** の X 線結晶構造解析 (CCDC-2210913): *n*-ヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒から再結晶した薄黄色ブロック状結晶 (0.5 × 0.5 × 0.6 mm) を用いて行った (Table 8)。

Table 8. Crystallographic and refinement parameters of compound **19**.

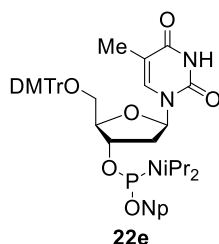
	Compound 19
Empirical formula	C ₁₈ H ₁₄ O ₃
Crystal system	Triclinic
Space group	<i>P</i> -1 (#2)
<i>a</i> / Å	8.967 (4)
<i>b</i> / Å	12.152 (6)
<i>c</i> / Å	12.309 (6)
α / deg	94.914 (5)
β / deg	93.405 (6)
γ / deg	95.207 (6)
Volume / Å ³	1327.8 (10)
<i>Z</i>	4
Density (calc.) / g / cm ³	1.392
<i>F</i> ₀₀₀	584
Reflections collected	6649
Unique reflections	4741
<i>R</i> _{int}	0.0195
Absorption coefficient / μ / mm ⁻¹	0.094
<i>R</i> ₁ [I>2.00σ(I)]	0.0373
<i>wR</i> ₂ (All reflections)	0.1017
Goodness-of-fit on F ²	1.036
Largest diff. peak / hole / e Å ⁻³	0.22 / -0.26

第三章の実験



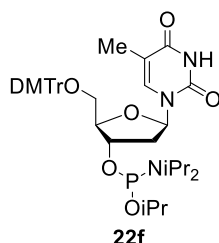
化合物 **22d**: アルゴン気流下、化合物 **21** (150 mg, 0.194 mmol) の無水アセトニトリル (2 mL) 溶液に、ジイソプロピルエチルアミン (40.5 μ L, 0.232 mmol) と 2-メチルプロパノール (21.5 μ L, 0.232 mmol) を加えた。5-(エチルチオ)-1*H*-テトラゾール (30.2 mg, 0.232 mmol) を加え、室温で 16 時間攪拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで希釈した。有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1) で精製し、化合物 **22d** (68.0 mg, 44%) を得た。

A white foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.96 (br s, 1H), 7.66, 7.62 (br s \times 2, 1H), 7.41–7.39 (m, 2H), 7.31–7.22 (m, 7H), 6.83–6.82 (m, 4H), 6.43–6.39 (m, 1H), 4.67–4.62 (m, 1H), 4.20, 4.15 (d \times 2, 1H, J = 2.0 Hz), 3.79 (s, 6H), 3.61–3.46 (m, 3H), 3.42–3.16 (m, 3H), 2.56–2.45 (m, 1H), 2.33–2.28 (m, 1H), 1.88–1.66 (m, 1H), 1.40, 1.39 (s \times 2, 3H), 1.16–1.04 (m, 12H), 0.92–0.81 (m, 6H). $^{31}\text{P NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ 147.2, 146.9. IR (ATR) cm^{-1} : 2963.0, 2929, 1686, 1607, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{NaO}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 770.3546, found 770.3539.



化合物 **22e**: 2,2'-ジメチル-1-プロパノール (27.3 mg, 0.310 mmol) を用い、化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1)。その結果、化合物 **21** (200 mg, 0.258 mmol) から化合物 **22e** (94.8 mg, 47%) を得た。

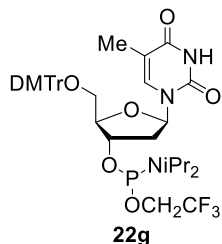
A white foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 8.03 (br s, 1H), 7.66, 7.61 (d \times 2, 1H, J = 1.0 Hz), 7.40 (dd, 2H, J = 2.0 Hz, J = 8.0 Hz), 7.30–7.22 (m, 7H), 6.84–6.81 (m, 4H), 6.43–6.40 (m, 1H), 4.68–4.62 (m, 1H), 4.20, 4.14 (d \times 2, 1H, J = 2.0 Hz), 3.79 (s, 6H), 3.62–3.45 (m, 3H), 3.40–3.26 (m, 2H), 3.19–3.06 (m, 1H), 2.55–2.45 (m, 1H), 2.33–2.32 (m, 1H), 1.40–1.38 (m, 3H), 1.17–1.04 (m, 12H), 0.91, 0.82 (s \times 2, 9H). $^{31}\text{P NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ 147.6, 147.4. IR (ATR) cm^{-1} : 2962, 1684, 1607, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{NaO}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 784.3703, found 784.3701.



化合物 **22f**: イソプロピルアルコール (17.9 μ L, 0.232 mmol) を用い、化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1)。その結果、化合物 **21** (150 mg, 0.194 mmol) から化合物 **22f** (64.0 mg, 45%) を得た。

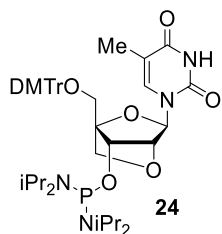
A white foam. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7.99 (br s, 1H), 7.66, 7.63 (d \times 2, 1H, J = 1.0 Hz), 7.42–7.39 (m, 2H), 7.31–7.22 (m, 7H), 6.84–6.81 (m, 4H), 6.44–6.39 (m, 1H), 4.64–4.59 (m, 1H), 4.21, 4.18 (d \times 2,

1H, $J = 2.0$ Hz), 4.07–3.89 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.59–3.46 (m, 3H), 3.36–3.30 (m, 1H), 2.57–2.45 (m, 1H), 2.33–2.26 (m, 1H), 1.39–1.37 (m, 3H), 1.26–1.04 (m, 18H). ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3): δ 145.2, 144.6. IR (ATR) cm^{-1} : 2966.0, 2928, 1686, 1607, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{NaO}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 756.3390, found 756.3391.



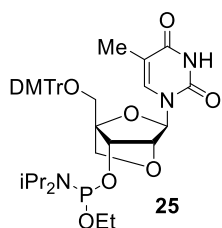
化合物 **22g**: 2,2,2-トリフルオロエタノール (16.6 μL , 0.232 mmol) を用い、化合物 **22d** と同様の手順で合成した。その結果、化合物 **21** (150 mg, 0.194 mmol) から化合物 **22g** (64.0 mg, 45%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.95 (br s, 1H), 7.66, 7.58 (d \times 2, 1H, $J = 1.0$ Hz), 7.40–7.39 (m, 2H), 7.31–7.23 (m, 7H), 6.84–6.82 (m, 4H), 6.41–6.38 (m, 1H), 4.68–4.64 (m, 1H), 4.19, 4.14 (d \times 2, 1H, $J = 2.5$ Hz), 3.99–3.82 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.77–3.70 (m, 1H), 3.64–3.47 (m, 3H), 3.33, 3.31 (d \times 2, 1H, $J = 2.0$ Hz), 2.55–2.46 (m, 1H), 2.36–2.28 (m, 1H), 1.43–1.40 (m, 3H), 1.18–1.07 (m, 12H). ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3): δ -78.14–78.22 (m). ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3): δ 152.6, 152.6, 152.4, 152.4. IR (ATR) cm^{-1} : 2968, 1695, 1608, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{47}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 796.2951, found 796.2952.



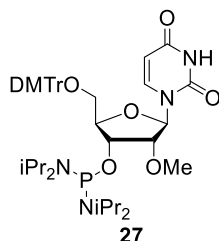
化合物 **24**: アルゴン気流下、化合物 **23** (310 mg, 0.543 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (0.227 mL, 1.30 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (5 mL) 溶液に、氷冷下、ビス(ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン (154 mg, 0.652 mmol) を加え、室温で4時間攪拌した。反応溶液の溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル : トリエチルアミン = 75 : 25 : 1) で精製し、化合物 **24** (210 mg, 48%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (br s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz), 7.49–7.47 (m, 2H), 7.37–7.34 (m, 4H), 7.30–7.22 (m, 5H), 6.84–6.82 (m, 4H), 5.68 (s, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.08 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 3.89 and 3.85 (AB q, 2H, $J = 18.0$ and 7.5 Hz), 3.79 (s, 6H), 3.58 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz), 3.43–3.36 (m, 5H), 1.73 (s, 3H), 1.13 (d, 6H, $J = 6.5$ Hz), 1.10 (d, 6H, $J = 7.0$ Hz), 1.03 (d, 6H, $J = 6.5$ Hz), 0.91 (d, 6H, $J = 6.5$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 163.5, 158.6, 149.4, 144.4, 135.4, 134.6, 130.2, 128.2, 127.9, 127.0, 113.2, 110.1, 88.1, 87.5, 86.7, 78.5, 78.4, 72.6, 71.2, 71.1, 58.8, 55.2, 44.8, 44.7, 44.6, 24.3, 24.2, 24.1, 24.0, 12.5. ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 117.6. IR (ATR) cm^{-1} : 2966, 1687, 1607, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 803.4149, found 803.4148.



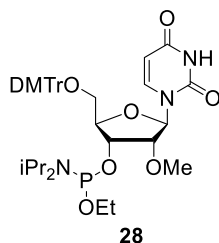
化合物 **25**: エタノール (9.60 μL , 0.164 mmol) を用い、化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1)。その結果、化合物 **24** (110 mg, 0.134 mmol) から化合物 **25** (33.0 mg, 32%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (br s, 1H), 7.70 (brs, 1H), 7.49–7.45 (m, 2H), 7.37–7.22 (m, 7H), 6.85–6.82 (m, 4H), 5.65 (s, 0.7H), 5.64 (s, 0.3H), 4.57 (s, 0.7H), 4.51 (s, 0.3H), 4.36 (d, 0.3H, J = 9.0 Hz), 4.27 (d, 0.7H, J = 6.5 Hz), 3.87 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 3.80–3.79 (m, 7H), 3.71–3.47 (m, 5H), 3.45–3.41 (m, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.22–0.99 (m, 15H). ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 147.4, 147.2. IR (ATR) cm^{-1} : 2966, 1687, 1607, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_3\text{NaO}_9\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 770.3182, found 770.3182.



化合物 **27**: 化合物 **24** と同様の手順で合成した (精製条件: PEI MB 100-40/75, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1)。その結果、化合物 **26** (1.00 g, 1.88 mmol) から化合物 **27** (1.09 g, 73%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.34 (br s, 1H), 8.01 (d, 2H, J = 8.0 Hz), 7.30–7.22 (m, 9H), 6.84–6.82 (m, 4H), 6.01 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 5.25 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 4.37–4.33 (m, 1H), 4.26–4.25 (m, 1H), 3.88 (dd, 1H, J = 4.0 and 3.5 Hz, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.59–3.42 (m, 6H), 3.56 (s, 3H), 1.17 (d, 6H, J = 2.0 Hz), 1.16 (d, 6H, J = 2.0 Hz), 1.14 (d, 6H, J = 7.0 Hz), 1.04 (d, 6H, J = 6.5 Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 162.9, 158.7, 149.9, 144.3, 140.2, 135.3, 135.1, 130.2, 128.3, 127.9, 127.1, 113.2, 101.9, 87.4, 87.2, 84.0, 83.9, 82.9, 70.4, 70.3, 62.1, 58.6, 55.2, 44.7, 44.6, 24.6, 24.5, 24.4, 24.2, 24.1, 24.0. ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 118.3. IR (ATR) cm^{-1} : 2968, 1684, 1508. HRMS (FAB): calcd. for $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 791.4149, found 791.4147.

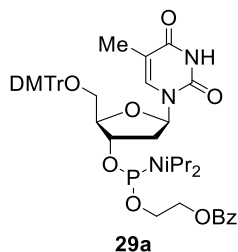


化合物 **28**: エタノール (53.1 μL , 0.911 mmol) を用い、化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: PEI MB 100-40/75, *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1)。その結果、化合物 **27** (600 mg, 0.759 mmol) から化合物 **28** (219 mg, 39%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (br s, 1H), 8.10–8.04 (m, 1H), 7.43–7.23 (m, 10H), 6.85–6.82 (m, 4H), 5.99–5.97 (m, 1H), 5.19–5.16 (m, 1H), 4.60–4.43 (m, 1H), 4.23–4.22 (m, 1H), 3.84–3.70 (m, 7H), 3.67–3.46 (m, 8H), 1.26–1.03 (m, 15H). ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 148.3, 147.9. IR (ATR) cm^{-1} : 2966, 1607, 1508. HRMS (FAB): calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 736.3363, found 736.3375.

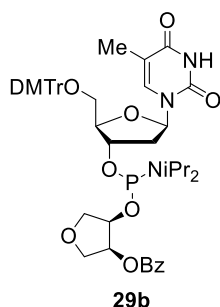
オリゴヌクレオチドの合成: 第一章に示した方法にて行った。なお、固相担体として Universal Support III™を用いる場合のみ、DMTr-on モード (合成終了時に 5'末端の DMTr 基を脱保護しない方法) を利用した。

第四章の実験



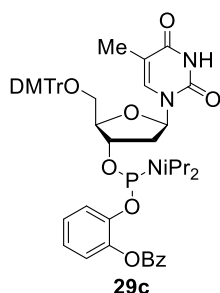
化合物 **29a**: 2-ヒドロキシエチルベンゾエート (77.3 mg, 0.465 mmol) を用い、第三章 (実験の部) に示す化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1)。その結果、化合物 **21** (300 mg, 0.759 mmol) から化合物 **29a** (220 mg, 68%) を得た。

Compound 29a: white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.08–7.94 (m, 3H), 7.64–7.51 (m, 2H), 7.41–7.36 (m, 4H) 7.30–7.21 (m, 7H), 6.83–6.81 (m, 4H), 6.41–6.37 (m, 1H), 4.69–4.61 (m, 1H), 4.51–4.43 (m, 1H), 4.33 (t, 1H, *J* = 5.0 Hz), 4.20–4.11 (m, 1H), 3.99–3.83 (m, 1H) 3.79 (m, 6H), 3.76–3.72 (m, 1H), 3.62–3.51 (m, 2H), 3.49–3.44 (m, 1H), 3.33–3.28 (m, 1H), 2.57–2.45 (m, 1H), 2.32–2.22 (m, 1H), 1.41–1.30 (m, 3H), 1.16–1.04 (m, 12H). ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ 148.5, 148.0. IR (ATR) cm⁻¹: 2962, 1685, 1605, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₄₆H₅₄N₃NaO₁₀P [M+Na]⁺ 862.3445, found 862.3448.



化合物 **29b**: 4-ヒドロキシテトラヒドロフラン-3-イル (48.3 mg, 0.232 mmol) を用い、第三章 (実験の部) に示す化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1)。その結果、化合物 **21** (150 mg, 0.194 mmol) から化合物 **29b** (69 mg, 40%) を得た。

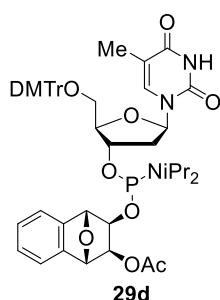
A white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.06–7.96 (m, 3H), 7.63–7.34 (m, 6H), 7.32–7.24 (m, 7H), 6.85–6.81 (m, 4H), 6.37–6.24 (m, 1H), 5.56–5.29 (m, 1H), 4.61–4.29 (m, 2H), 4.21–3.63 (m, 11H) 3.52–3.36 (m, 3H), 3.27–3.19 (m, 1H), 2.44–2.19 (m, 1H), 1.43–1.39 (m, 3H), 1.10–0.93 (m, 12H). ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ 150.0, 149.6, 149.3, 148.3. IR (ATR) cm⁻¹: 2965, 2931, 1713, 1686, 1606, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for C₄₈H₅₆N₃NaO₁₁P [M+Na]⁺ 904.3550, found 904.3544.



化合物 **29c**: 2-ヒドロキシフェニルベンゾエート (49.9 mg, 0.232 mmol) を用い、第三章 (実験の部) に示す化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1)。その結果、化合物 **21** (150 mg, 0.194 mmol) から化合物 **29c** (124 mg, 72%) を得た。

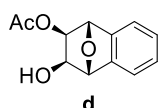
A white foam. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.19–8.12 (m, 2H), 7.97, 7.96 (br s × 2, 1H), 7.60–7.57 (m, 1H), 7.47–7.42 (m, 3H), 7.38–7.34 (m, 2H) 7.29–7.18 (m, 9H), 7.13–7.00 (m, 2H) 6.81–6.79 (m, 4H), 6.35–6.25 (m, 1H), 4.66–4.59 (m, 1H), 4.03–3.96 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.59–3.51 (m, 2H), 3.41–3.14 (m, 2H), 2.40–1.98 (m, 2H), 1.43–1.40 (m, 3H), 1.16–0.98 (m, 12H). ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ 147.6, 147.5.

IR (ATR) cm^{-1} : 2968, 1686, 1605, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{50}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{NaO}_{10}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 910.3445, found 910.3444.



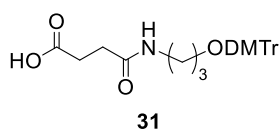
化合物 **29d**: 注 4 に示す化合物 **d** (100 mg, 0.454 mmol) を用い、第三章 (実験の部) に示す化合物 **22d** と同様の手順で合成した (精製条件: *n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1)。なお、5-(エチルチオ)-1*H*-テトラゾールは 71.0 mg (0.545 mmol)、ジイソプロピルエチルアミンは 0.227 mL (1.30 mmol) 使用した。その結果、化合物 **21** (215 mg, 0.277 mmol) から化合物 **29d** (172 mg, 69%) を得た。

A white foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.99–7.96 (m, 1H), 7.72–7.62 (m, 1H), 7.41–7.36 (m, 2H), 7.32–7.17 (m, 11H), 6.85–6.78 (m, 4H), 6.52–6.41 (m, 1H), 5.37–5.20 (m, 2H), 4.90–4.74 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.27–4.03 (m, 2H), 3.78–3.76 (m, 6H), 3.70–3.46 (m, 3H), 3.35–3.29 (m, 1H), 2.56–2.31 (m, 2H), 2.13 (s, 1.5H), 2.09, 2.06, 2.05 (s \times 3, 1.5H), 1.42–1.34 (m, 3H), 1.26–1.02 (m, 12H). ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3): δ 150.3, 150.1, 149.6, 148.4. IR (ATR) cm^{-1} : 2966, 1740, 1686, 1607, 1508. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{49}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{P}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 916.3550, found 916.3552.



化合物 **d**: アルゴン気流下、化合物 **12a** (356 mg, 2.00 mmol) の無水ピリジン (5 mL) 溶液に、室温で無水酢酸 (0.200 mL, 2.00 mmol) を滴下し、2 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製し、化合物 **d** (249 mg, 57%) を得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.32–7.31 (m, 2H), 7.24–7.22 (m, 2H), 5.28 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 4.81 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz), 4.11 (dd, 1H, $J = 10.0$ and 5.5 Hz), 2.36 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 2.20 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.4, 142.0, 141.5, 128.1, 128.0, 120.8, 120.7, 85.6, 82.6, 73.4, 71.5, 20.9. IR (ATR) cm^{-1} : 3419, 1732, 1462, 1421, 1376. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 243.0633, found 243.0636.



化合物 **31**: アルゴン気流下、化合物 **30** (300 mg, 0.795 mmol) とトリエチルアミン (1.10 mL, 7.95 mmol) の無水ジクロロメタン (8 mL) 溶液に、室温で無水コハク酸 (318 mg, 3.18 mmol) を加えて 4 時間攪拌した。反応溶液に水を加えた後、クロロホルムとメタノールの混合溶液 (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) で 5 回抽出した。有機層を水で 1 回、飽和食塩水で 1 回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧留去し、得られた粗成績体をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルムのみからクロロホルム : メタノール = 10 : 1) で精製し、化合物 **31** (252 mg, 66%) を得た。

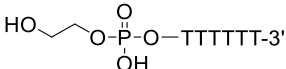
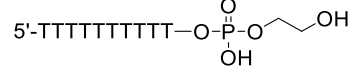
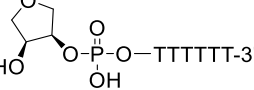
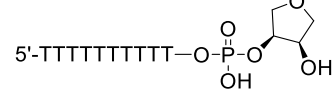
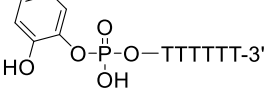
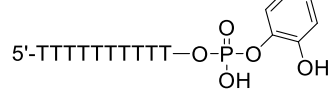
A pale brown foam. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.41–7.40 (m, 2H), 7.32–7.22 (m, 7H), 6.86–6.83 (m, 4H), 6.39 (br s, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.37 (dd, 2H, $J = 12.0$ and 6.0 Hz), 3.25 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz), 2.63–2.60 (m, 2H), 2.38–2.35 (m, 2H), 1.79 (quint, 2H, $J = 6.0$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 173.7, 173.0, 158.8, 145.1, 136.3, 130.2, 128.3, 128.1, 127.1, 113.4, 86.6, 62.2, 55.5, 51.9, 45.2, 38.5, 31.6, 31.3, 30.4.

29.9, 29.3. IR (ATR) cm^{-1} : 3360, 2931, 1715, 1606, 1507. HRMS (ESI-TOF): calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{NNaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 500.2049, found 500.2050.

修飾樹脂 **31+CPG**: 第一章（実験の部）に示す修飾樹脂 **UL1+CPG** と同様の手順にて合成した。その結果、化合物 **31** (5.35 mg, 11.2 μmol) から、修飾樹脂 **31+CPG** ($44 \pm 0.8 \mu\text{mol/g}$, 79%) を得た。

オリゴヌクレオチドの合成: 第一章に示した方法に従って合成した。なお、2'-*O*-Me 修飾 RNA 配列を持つオリゴヌクレオチドの合成では、縮合工程における反応時間を全て 5 分とした。また、塩基処理後に得られる新規オリゴヌクレオチド (**T₆-29a-c**, **T₁₀-29a-c**) を Table 9 に示す。

Table 9. Structures and ESI-MS analysis data of new ONs.

Structure	Formula	Calcd. [M]	Found [M]
T₆-29a 	$\text{C}_{62}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{44}\text{P}_6$	1887.24	1887.40
T₁₀-29a 	$\text{C}_{102}\text{H}_{136}\text{N}_{20}\text{O}_{72}\text{P}_{10}$	3104.02	3104.30
T₆-29b 	$\text{C}_{64}\text{H}_{86}\text{N}_{12}\text{O}_{45}\text{P}_6$	1929.27	1929.50
T₁₀-29b 	$\text{C}_{104}\text{H}_{138}\text{N}_{20}\text{O}_{73}\text{P}_{10}$	3146.05	3146.40
T₆-29c 	$\text{C}_{66}\text{H}_{84}\text{N}_{12}\text{O}_{44}\text{P}_6$	1935.28	1935.50
T₁₀-29c 	$\text{C}_{106}\text{H}_{136}\text{N}_{20}\text{O}_{72}\text{P}_{10}$	3152.06	3152.50

発表論文

- Bicyclo[2.2.2]octane-2,3-diol as a universal linker for the solid-phase synthesis of oligonucleotides
Kazuki Yamamoto, Yasufumi Fuchi, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
Tetrahedron **2021**, 92, 132261.
- Benzo-fused 7-oxabicyclo[2.2.1]heptane-2,3-diol derivatives as an alternative universal linker for the solid-phase oligonucleotide synthesis
Yasufumi Fuchi, Kazuki Yamamoto, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
Synthesis, *in press* (doi: 10.1055/s-0042-1751405).
- Expansion of phosphoramidite chemistry in solid-phase oligonucleotide synthesis: Rapid 3'-dephosphorylation and strand cleavage
Kazuki Yamamoto, Yasufumi Fuchi, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
J. Org. Chem., *in press* (doi: 10.1021/acs.joc.2c02195).

その他の発表論文

- New cleavable spacers for tandem synthesis of multiple oligonucleotides
Kazuki Yamamoto, Yasufumi Fuchi, Masaya Okabe, Takashi Osawa, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
Synthesis **2021**, 53, 4440–4448.
- Construction of pyrimidine bases bearing carboxylic acid equivalents at the C5 position by postsynthetic modification of oligonucleotides
Yuta Ito, Kazuki Yamamoto, Yoshiyuki Hari
Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. **2019**, 78, e91.
- Post-synthetic modification of oligonucleotides containing 5-trifluoromethylpyrimidine bases
Yuta Ito, Misaki Matsuo, Kazuki Yamamoto, Wakana Yamashita, Takashi Osawa, Yoshiyuki Hari
Tetrahedron **2018**, 74, 6854–6860.

参考文献

- 1) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- 2) Michaelson, A. M.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632–2638.
- 3) Gilham, P. T.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212–6222.
- 4) Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4801–4803.
- 5) Marugg, J. E.; Piel, N.; McLaughlin, L. W.; Tromp, M.; Veeneman, G. H.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 8639–8651.
- 6) Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 469–472.
- 7) Garegg, P. J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R.; Henrichson, C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4051–4054.
- 8) Hampel, A.; Mullah, B.; Tsou, D.; Andrus, A.; Vinavak, R. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **1995**, *14*, 255–273.
- 9) Hayakawa, Y.; Uchiyama, M.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4191–4194.
- 10) Köster, H.; Heyns, K. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 1531–1534.
- 11) Perreault, D. M.; Anslyn, E. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 432–450.
- 12) Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lönnberg, H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 961–990.
- 13) Zhou, D. M.; Taira, K. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 991–1026.
- 14) Köster, H.; Biernat, J.; McManus, J.; Wolter, A.; Stumpe, A.; Narang, C. K.; Sinha, N. D. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 103–112.
- 15) R. Gough, M. J. Brunden, and P. T. Gilham *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5321–5324.
- 16) Debear, J. S.; Hayes, J. A.; Koleck, M. P.; Gough, G. R. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **1987**, *6*, 821–830.
- 17) Scott, S.; Hardy, P.; Sheppard, R. C.; McLean, M. J. *Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis, 3rd International Symposium*, **1994**; Epton R., Ed. Mayflower Worldwide, 1994; 115–124.
- 18) Nelson, P. S.; Muthini, S.; Kent, M. A.; Smith, T. H. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **1997**, *16*, 1951–1959.
- 19) Nelson, P. S.; Muthini, S.; Vierra, M.; Acosta, L.; Smith, T. H. *Biotechniques* **1997**, *22*, 752–756.
- 20) Azhayev, A. V. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 787–800.
- 21) Yagodka, A.; Weisel, J.; Azhayev, A. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **2011**, *30*, 475–489.
- 22) Azhayev, A. V.; Antopolsky, M. L. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4977–4986.
- 23) Guzaev, A. P.; Manoharan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2380–2381.
- 24) Ravikumar, V. T.; Kumar, R. K.; Zhu, X. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2269–2274.
- 25) Ravikumar, V. T.; Kumar, R. K.; Olsen, P.; Moore, M. N.; Carty, R. L.; Andrade, M.; Gorman, D.; Zhu, X.; Cedillo, I.; Wang, Z.; Mendez, L.; Scozzari, A. N.; Aguirre, G.; Somanathan, R.; Berneès, S. *Org. Proc. Res. Dev.* **2008**, *12*, 399–410.
- 26) Wang, Z.; Olsen, P.; Ravikumar, V. T. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids* **2007**, *26*, 259–269.
- 27) Anderson, K. M.; Jaquinod, L.; Jensen, M. A.; Ngo, N.; Davis, R. W. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9875–9880.
- 28) Iyer, R. P.; Phillips, L. R.; Egan, W.; Regan, J. B.; Beaucage, S. L. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4693–4699.
- 29) Guzaev, A. P. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 434–437.
- 30) *Glen report 20.24* (October 2008). URL: <http://www.glenresearch.com/report/gr20-24>
- 31) Brooks, J. L.; Olsen, P.; Chen, L.; Rodriguez, A. A. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 1050–1052.
- 32) Lambert, J. B.; Holcomb, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3952–3956.
- 33) Newman, M. S.; Addor, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3789–3793.
- 34) Damha, M. J.; Giannaris, P. A.; Zabarylo, S. V. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3813–3821.
- 35) Feldman, K. S.; Selfridge, B. R. *Heterocycles* **2010**, *81*, 117–143.
- 36) Jung, K. Y.; Koreeda, M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5667–5675.
- 37) Lautens, M.; Fagnou, K.; Yang, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14884–14892.
- 38) Yamamoto, K.; Fuchi, Y.; Okabe, M.; Osawa, T.; Ito, Y.; Hari, Y. *Synthesis* **2021**, *53*, 4440–4448.
- 39) Uryu, M.; Hiraga, T.; Koga, Y.; Saito, Y.; Murakami, K.; Itami, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 6551–6554.
- 40) Fujisaki, S.; Eguchi, H.; Omura, A.; Okamoto, A.; Nishida, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 1576–1579.

- 41) Pavlopoulos, T. G.; Hammond, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6568–6579.
- 42) Stringfellow, W. T.; Aitken, M. D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 357–362.
- 43) Capaldi, D. C.; Ravikumar, V. T.; Gaus, H.; Krotz, A. H.; Arnold, J.; Carty, R. L.; Moore, M. N.; Scozzari, A. N.; Lowery, K.; Cole, D. L. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 832–838.
- 44) Letsinger, R. L.; Mahadevan, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526–3527.
- 45) Letsinger, R. L.; Mahadevan, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5319–5324.
- 46) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223–2311.
- 47) Kumar, R. K.; Ravikumar, V. T. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3426–3429.
- 48) *Glen report 31.25* (December 2019). URL: <http://www.glenresearch.com/report/gr31-25>
- 49) Hayakawa, Y.; Hirose, M.; Hayakawa, M.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 925–930.
- 50) Marugg, J. E.; Burik, A.; Tromp, M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2271–2274.
- 51) Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- 52) Gryaznov, S. M.; Letsinger, R. L. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1879–1882.
- 53) Kluger, R.; Covitz, F.; Dennis, E.; Williams, L. D.; Westheimer, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6066–6072.
- 54) Oivanen, M.; Kuusela, S.; Lönnberg, H. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 961–990.
- 55) Hayashi, J.; Hamada, T.; Sasaki, I.; Nakagawa, O.; Wada, S.; Urata, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3610–3615.
- 56) Hardy, P. M.; Holland, D.; Scott, S.; Garman, A. J.; Newton, C. R.; Mclean, M. J. R. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2998–3004.
- 57) Targel, T.; Ramesh, P.; Portnoy, M. *European J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 3017–3021.
- 58) Matsumoto, K.; Mitsuda, M.; Ushijima, N.; Demizu, Y.; Onomura, O.; Matsumura, Y. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8453–8456.
- 59) Wakita, N.; Hara, S. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7939–7945.
- 60) Aviñó, A.; Garcia, R. G.; Albericio, F.; Mann, M.; Wilm, M.; Neubauer, G.; Eritja, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1649–1658.

