

博 士 論 文

3 連続アセタール構造を持つ架橋型核酸を含む
オリゴ核酸の合成と物性評価

徳島文理大学大学院薬学研究科

薬学専攻 博士課程

小路 美彩

指導教授 張 功幸

令和七年提出

目次

緒論	1
第一章 3連続アセタール構造を持つ架橋型核酸 Me-TaNA の開発	
第一節 Me-TaNA の分子設計と合成.....	5
第二節 Me-TaNA を含むオリゴ核酸の合成と物性評価	10
第二章 架橋部 7'位に様々な置換基を持つ TaNA 誘導体の開発	
第一節 TaNA 誘導体の分子設計と合成.....	22
第二節 TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸の合成と物性評価	27
総括	33
謝辞	35
実験の部.....	36
発表論文.....	67
参考文献.....	68

緒論

核酸医薬品はアンメットメディカルニーズの高い遺伝性疾患を対象とした新しい創薬モダリティの一つとして期待されている。^{1,2} 核酸医薬品の種類には、mRNA を標的とするアンチセンス核酸や siRNA をはじめ、他にも転写因子を標的とするデコイ核酸やタンパク質を標的とするアプタマーなどがあり、それらは RNA やタンパク質を標的として、タンパク質の発現量を制御することができる (Figure 1)。中でも、アンチセンス核酸は 2025 年 1 月時点で、核酸医薬品の中で最多の 13 品目 (21 品目中) が上市されており、近年その発展が目覚ましい。

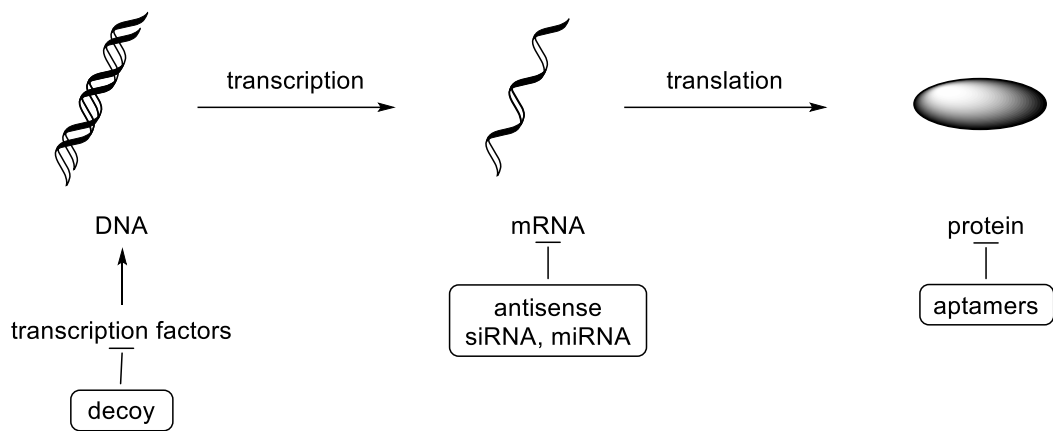


Figure 1. Classification of oligonucleotide therapeutics.

アンチセンス核酸は、一般的にリン酸部や糖部に化学修飾が施されており、承認された核酸医薬品にはホスホロチオエート (PS)、2'-*O*-メトキシエチル RNA (2'-MOE)、モルフォリノ核酸 (PMO)、チオホスホロアミデートといった化学修飾が利用されている (Figure 2)。³⁻⁶

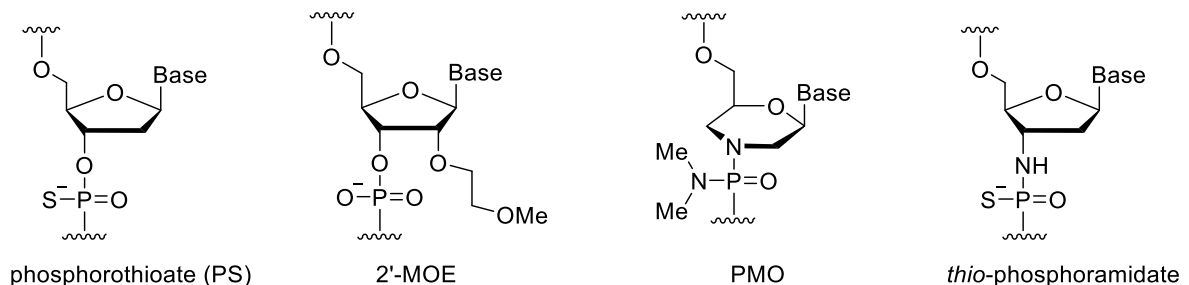


Figure 2. Approved oligonucleotide therapeutics.

また、近年では、アンチセンス核酸の材料となる新しい修飾核酸として、糖部の 2'位と 4'位を架橋でつないだ 2',4'-架橋型核酸が注目されており、現在 2'-O,4'-C-メチレン架橋型核酸 (2',4'-BNA/LNA)、^{7,8} 2'-O,4'-C-エチレン架橋型核酸 (ENA)、⁹ 6'位にメチル基を持つ LNA (*S*-cEt)¹⁰ が臨床試験で利用されている (Figure 3)。

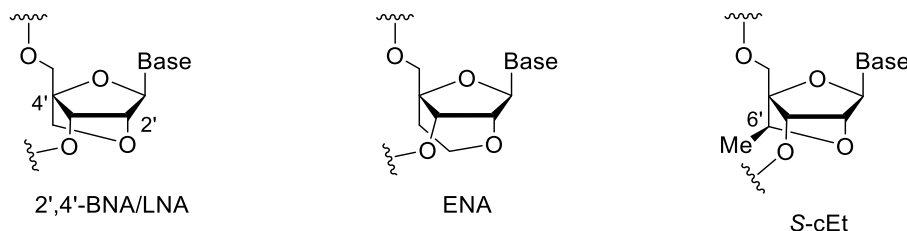


Figure 3. 2',4'-bridged nucleic acids in clinical trials.

通常、核酸の糖部の立体配座は S 型 (DNA 中での配座) と N 型 (RNA 中での配座) の平衡状態で存在しているが、架橋型核酸はその 2',4'-架橋により RNA の配座と同じ N 型に固定化することができる (Figure 4)。そのため、それを含むオリゴ核酸は一般的に非常に高い RNA 結合親和性を示すことが知られている。また、架橋部の立体障害のためにヌクレアーゼに対する抵抗性も向上する。最初に 1997 年に今西ら、1998 年に Wengel らによって 2',4'-BNA/LNA が報告されてから、今日までに数多くの 2',4'-架橋型核酸が開発されている。^{2,11,12}

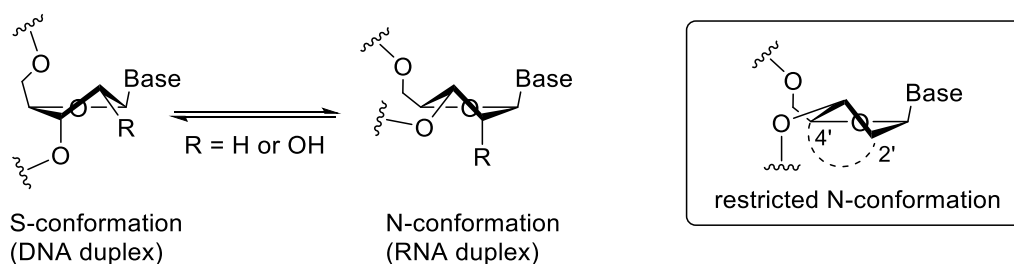


Figure 4. Conformational equilibrium of the furanose rings in DNA and RNA and conformation of 2',4'-bridged nucleic acids.

これまでの研究により、架橋型核酸の架橋部構造がオリゴ核酸の物性・性質に与える影響が明らかになりつつある。例えば、2',4'-BNA/LNA の 2'位の酸素原子は RNA 結合親和性の向上に寄与することが報告されており、¹³ 実際、2'-酸素原子を持つ架橋型核酸が多数報告されている (Figure 5)。また、2',4'-BNA/LNA の架橋部 6'位にメチル基を持つ *S*-cEt を含むオリゴ核酸は、2',4'-BNA/LNA よりヌクレアーゼに対する抵抗性が高く、加えて、毒性を改善することも報告されている。¹⁰ その他、6'位にメチル基を持つ ENA (6'-Me-ENA)¹⁴ や 7'位にメチル基を持つ 2'-O,4'-C-アミノメチレン架橋型核酸 (2',4'-

BNA^{NC}[NMe]¹⁵ を含むオリゴ核酸は、架橋部にメチル基を持たないもの (ENA、2',4'-BNA^{NC}[NH]) に比べて、ヌクレアーゼ抵抗性が向上することが報告されており、架橋部にメチル基のような簡単な修飾を施すことによってもオリゴ核酸の機能が改善することが示されている。このようなもの以外にも、数多くの架橋型核酸がこれまでに報告されているが、核酸材料として実用されているものは少なく、高い二重鎖形成能と高いヌクレアーゼ抵抗性を併せ持った有望な核酸材料の開発が望まれている。

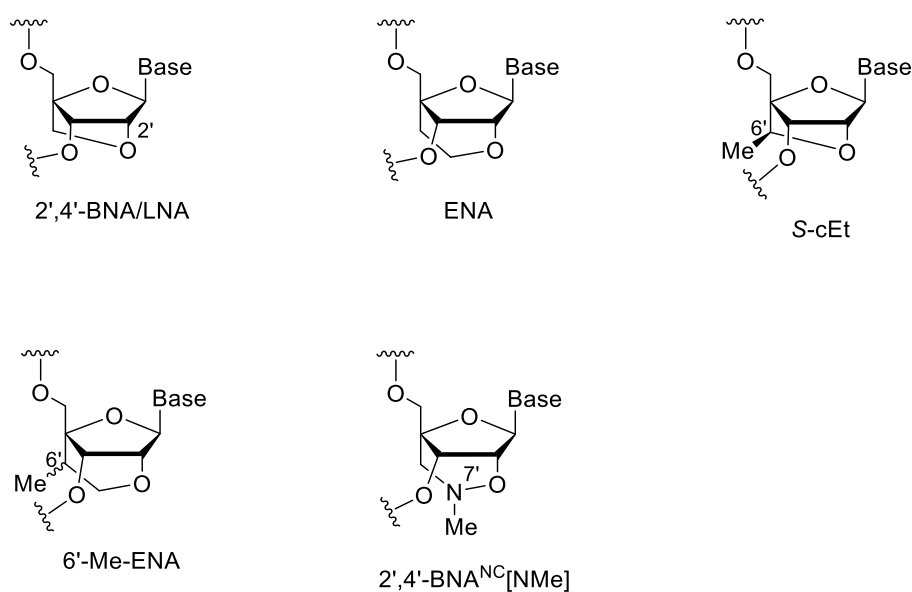
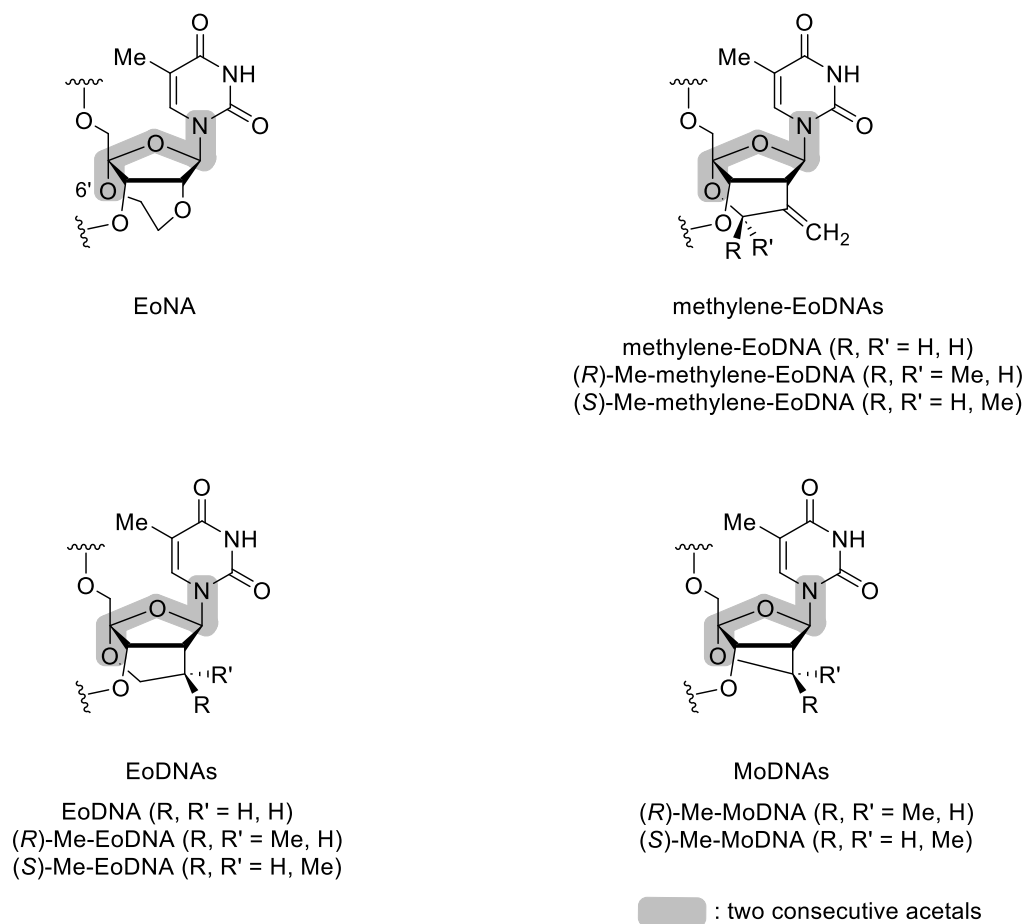


Figure 5. Representative 2',4'-bridged nucleic acids.

このような背景下、著者は興味深い分子デザインとして、連続するアセタールを含むユニークな構造からなる、架橋部 6'位に酸素原子を持つ架橋型核酸に着目した (Figure 6)。¹⁶⁻²⁰ これらは、その 6'-酸素原子の周りに水和ネットワークの構築が期待でき、標的核酸との結合親和性のさらなる向上が見込める。実際、2'-O,4'-C-エチレンオキシ架橋型核酸 (EoNA)¹⁷ は 6'位が炭素原子であるもの^{9b} に比べて、RNA に対する結合親和性やヌクレアーゼに対する抵抗性が向上することが報告されている。また、一見安定性に問題がありそうな構造ではあるが、十分安定に扱えることも報告されている。



EoNA = 2'-O,4'-C-ethyleneoxy bridged nucleic acid, EoDNA = 2'-C,4'-C-ethyleneoxy bridged 2'-deoxyribonucleic acid, MoDNA = 2'-C,4'-C-methyleneoxy bridged 2'-deoxyribonucleic acid.

Figure 6. 2',4'-bridged nucleic acids with 6'-oxygen atom.

そこで、これまでの架橋型核酸の構造活性相関の知見を基に、著者は、新たな架橋型核酸として、2'位かつ6'位に酸素原子を持つ、3つの連続アセタール構造を含むMe-TaNAを設計した (Figure 7)。第一章では、このMe-TaNAを合成し、それを修飾したオリゴ核酸の物性評価を行った。第二章では、架橋部のメチル基をよりかさ高くした4種類のTaNA誘導体を設計し、それらを修飾したオリゴ核酸の物性評価を行った。

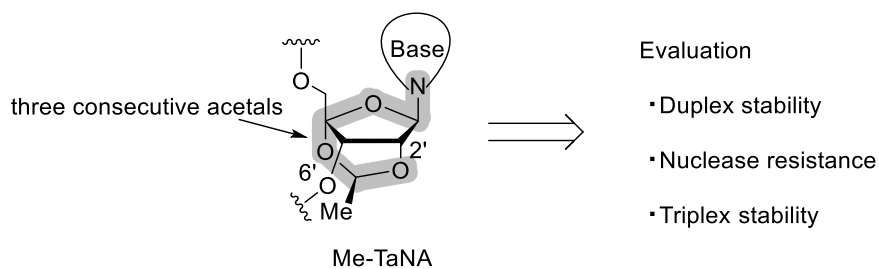


Figure 7. Molecular design of Me-TaNA.

第一章 3連続のアセタール構造を持つ

架橋型核酸 Me-TaNA の開発

第一節 Me-TaNA の分子設計と合成

2',4'-架橋型核酸の構造活性相関の知見を基に、2'位かつ6'位に酸素原子を持つ6員環架橋型核酸 Me-TaNA を設計した (Figure 8)。これは連続する3つのアセタール (O2'-C7'-O6'-C4'-O4'-C1'-N1) を有した特有の構造をとっており、その構造的特徴から高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが期待される。従って、この Me-TaNA を含むオリゴ核酸を合成し、相補鎖核酸との二重鎖安定性及びヌクレアーゼ抵抗性の物性評価を行うこととした。また、架橋部にメチル基を持たない無置換 TaNA についても合成を行い、それを含むオリゴ核酸の物性を Me-TaNA のものと比較し、架橋部7'位のメチル基が二重鎖の安定性やヌクレアーゼ抵抗性に与える影響について調べることにした。

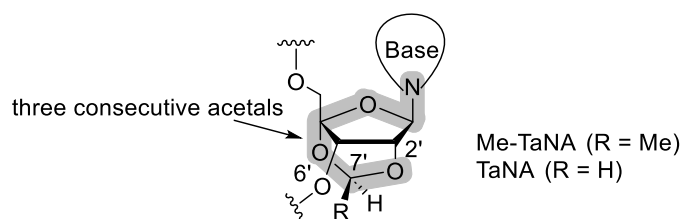


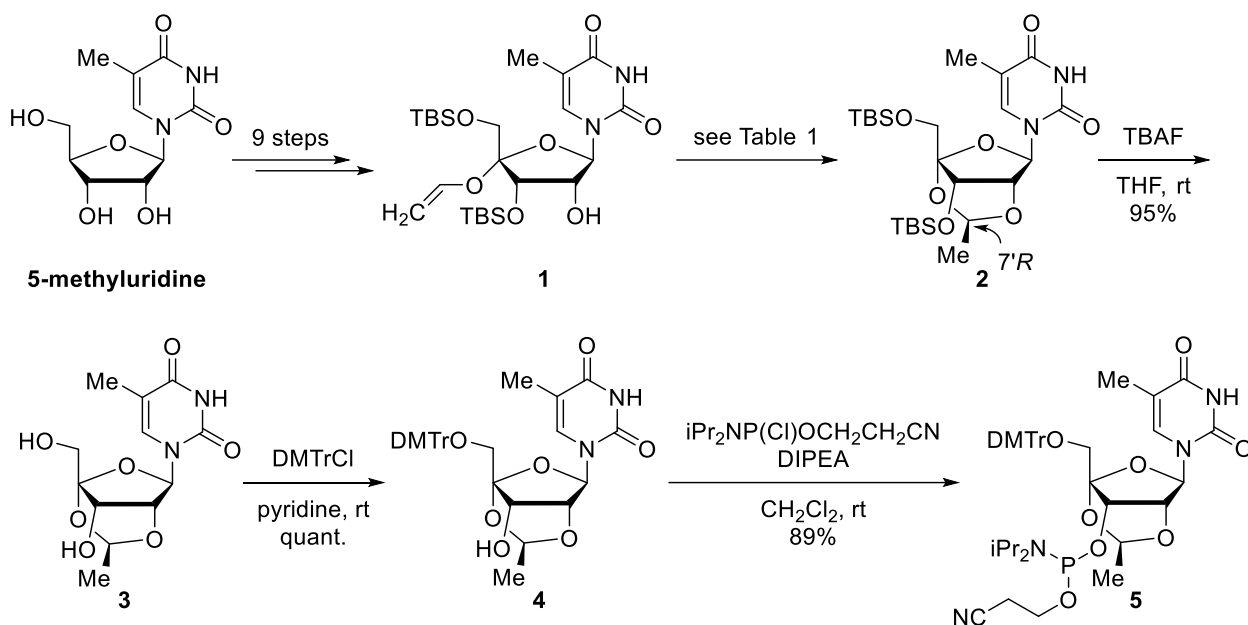
Figure 8. Structures of Me-TaNA and TaNA.

Me-TaNA に関しては、様々な配列に適用することを見据えて、チミン塩基及び5-メチルシトシン塩基^{注1}アナログの2種類の合成を行った。無置換 TaNA に関しては、比較検討のため、チミン塩基に限定して合成を行った。

Me-TaNA-T のホスホロアミダイト体の合成経路を Scheme 1 に示す。5-メチルウリジンを出発原料として、既知の方法に従って、ビニルエーテル体 **1** へと誘導した (Scheme 1)。²⁰ この化合物 **1** から分子内環化反応により化合物 **2** を得るため、幾つかの酸性条件下での反応を試みた (Table 1)。ルイス酸である金属トリフラート塩 (AgOTf、Sc(OTf)₃、Cu(OTf)₂、Zn(OTf)₂) を使用した場合には、いずれも *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS)

^{注1} CpG 配列を持つオリゴ核酸は TLR9 を介した自然免疫の活性化を誘発する恐れがあるため、それを回避する目的で、核酸塩基は一般的にシトシンの代わりに5-メチルシトシンが用いられる。

基が部分的に脱保護され、化合物 **2** とシラノール (TBSOH) との混合物として得られた。それらはシリカゲルカラムによる分離精製が困難であり、混合物の ^1H NMR から算出した化合物 **2** の収率は 7–39%と低収率であった (entry 1–4)。一方、プロトン酸である (+)-10-カンファースルホン酸 (CSA) を使用した場合は、TBSOH の生成は確認されず、98%の高収率で化合物 **2** を得ることに成功した (entry 5)。



Scheme 1. Synthesis of the phosphoramidite for Me-TaNA-T.

Table 1. Construction of three consecutive acetals via intramolecular acetal formation

entry	reagent	time (h)	yield of 2 (%)
1	AgOTf	5.5	27 ^a
2	Sc(OTf) ₃	0.5	30 ^a
3	Cu(OTf) ₂	5	39 ^a
4	Zn(OTf) ₂	24	7 ^{a,b}
5	CSA	0.5	98

All the reactions were conducted using 0.05 equiv of the reagent in CH_2Cl_2 at rt. ^aSince the resulting mixture was an inseparable mixture of compound **2** and TBSOH, the yield of compound **2** was estimated from ^1H NMR spectrum. ^b75% of the starting materials were recovered.

次に、得られた化合物 **2** をテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) で処理することにより、ジオール体 **3** へと変換した。化合物 **3** については、X線結晶構造解析によ

りその構造を確認した (Figure 9)。単位格子中に結晶学的に独立した 2 つの Me-TaNA 分子と 3 つの水分子が観測され、この 2 つの Me-TaNA の P 値はそれぞれ 13.69°、14.86°であった。P 値は糖のパッカーリング解析値から算出される疑似回転の位相角のことであり、これにより糖部の立体配座が決定される。N 型すなわち C3'-endo 型 (RNA 中の配座) は 9–27° の範囲に P 値を持つとされており、^{21,22} Me-TaNA の P 値はこの範囲内であるため、当初、想定した通り、Me-TaNA の糖部の立体配座は LNA (14.7°)^{9b} や ENA (15.1°)^{9b} と同じ C3'-endo 型であることを確認した。また、7'-炭素の絶対配置は R であることが決定され、架橋部の 6 員環のいす型配座に対して、7'-メチル基がエカトリアル位であることが示された。

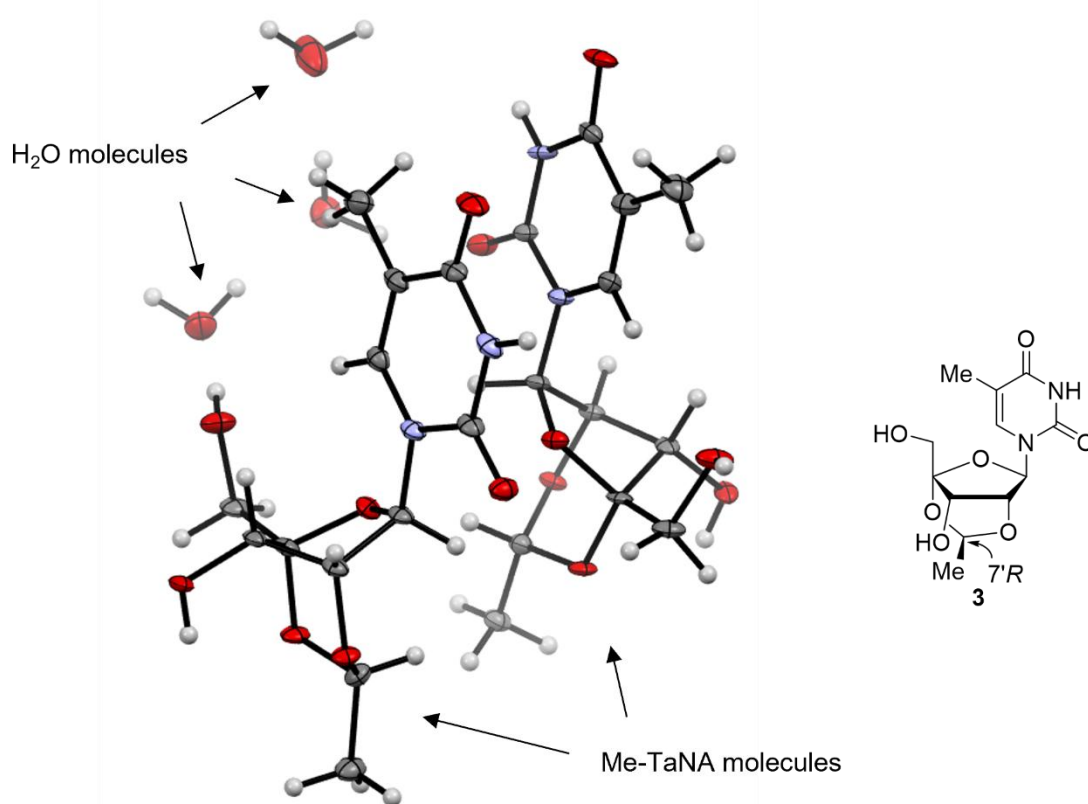
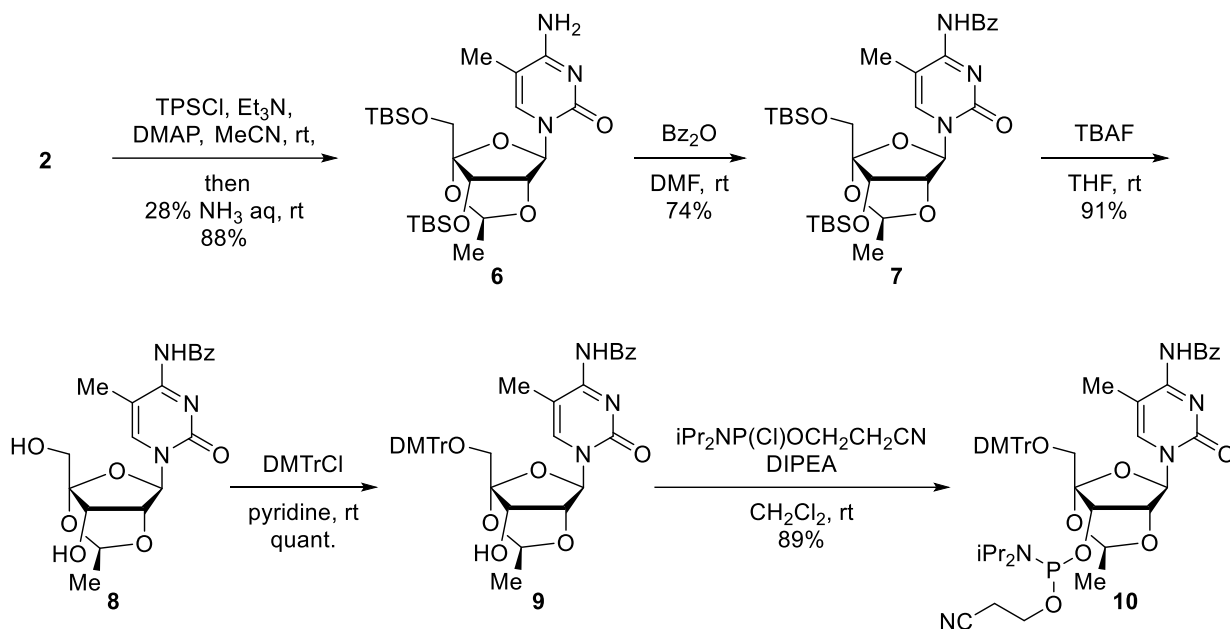


Figure 9. ORTEP of compound 3.

続いて、化合物 3 の 5'-ヒドロキシ基をジメトキシトリチル (DMTr) 基で保護した後、3'-ヒドロキシ基をホスフィチル化することにより、オリゴ核酸合成の材料となるホスホロアミダイト体 5 を合成した (Scheme 1)。

Me-TaNA-^mC のホスホロアミダイト体の合成経路を Scheme 2 に示す。Me-TaNA-T の合成中間体である化合物 2 に対して、2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルクロリド (TPSCI) を用いてスルホニル化を行った後、アンモニア処理することにより、核酸

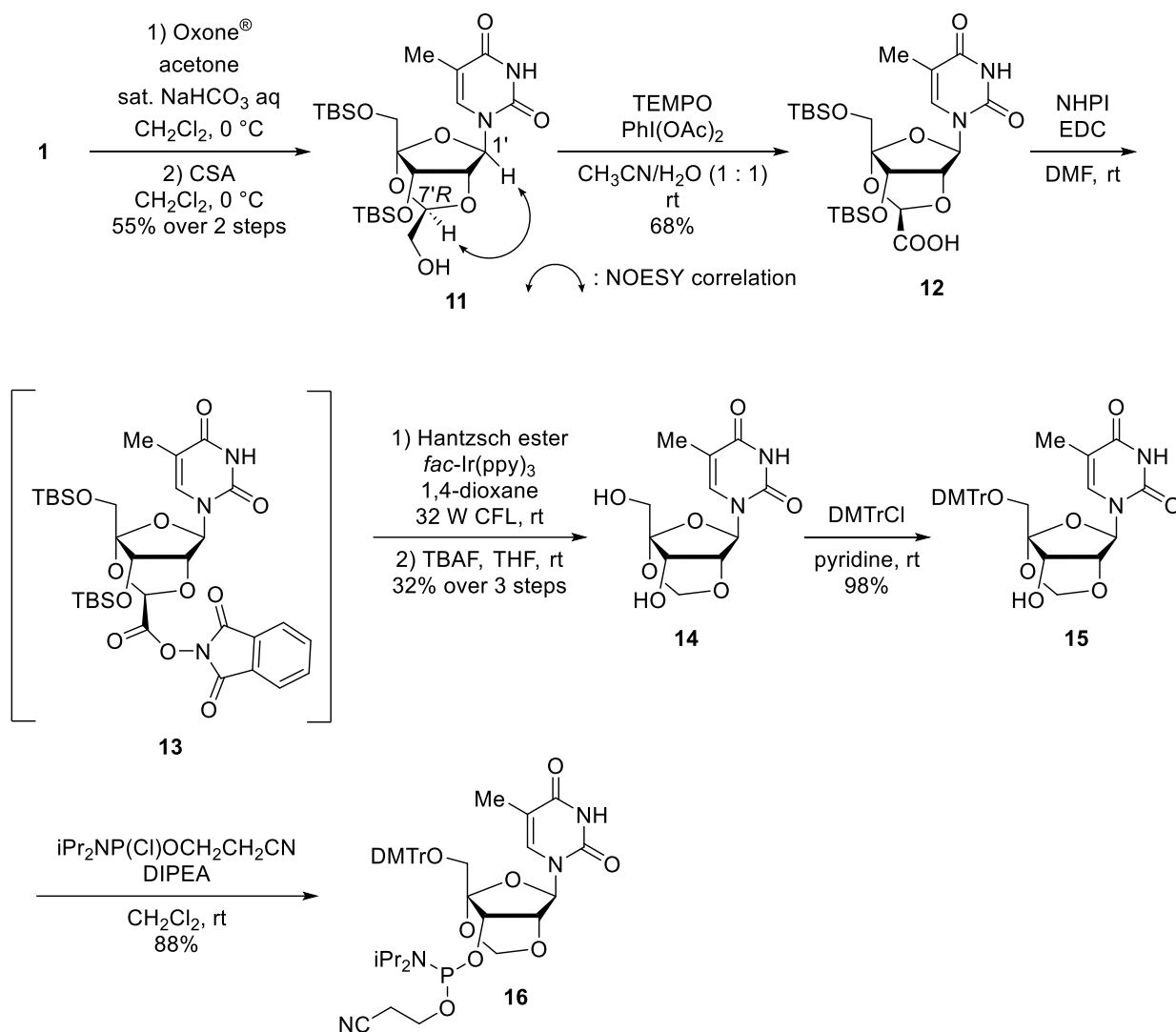
塩基部分を 5-メチルシトシン (**6**) へと変換した。その後、無水安息香酸 (**Bz₂O**) を用いて 4-アミノ基をベンゾイル基で保護して化合物 **7** を合成し、**TBAF** 処理によりジオール体 **8** を得た。その後、先ほどと同様の方法でホスホロアミダイト体 **10** へと誘導した。



TPSCI = 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride.

Scheme 2. Synthesis of the phosphoramidite for Me-TaNA-¹³C.

無置換 TaNA-T のホスホロアミダイト体の合成経路を Scheme 3 に示す。ビニルエーテル体 **1** のビニル基をオキソン®とアセトンを用いてエポキシ化した後、触媒量の CSA を用いてエポキシ環を開裂させ、化合物 **11** を得ることに成功した。この化合物 **11** の NOESY 測定により、1'位のプロトンと架橋部 7'位のプロトンの間で相関が見られたことから、先述した Me-TaNA と同様、7'-炭素の絶対配置は *R* であることが決定された。この化合物 **11** を (ジアセトキシヨード) ベンゼン (PhI(OAc)₂) 存在下、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシラジカル (TEMPO) 酸化することにより、カルボキシ体 **12** を得た。続いて、*N*-ヒドロキシフタルイミド (NHPI) と 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) を用いたエステル縮合により、レドックス活性エステル体 **13** へと誘導し、可視光照射下でのハンチュエステルとトリス (2-フェニルピリジナト) イリジウム (III) (*fac*-Ir(ppy)₃) を用いた還元的脱炭酸、^{23,24} 及び **TBAF** を用いた TBS 基の脱保護を順次行い、ジオール体 **14** を合成した。その後、先ほどと同様の方法で、ホスホロアミダイト体 **16** へと誘導した。

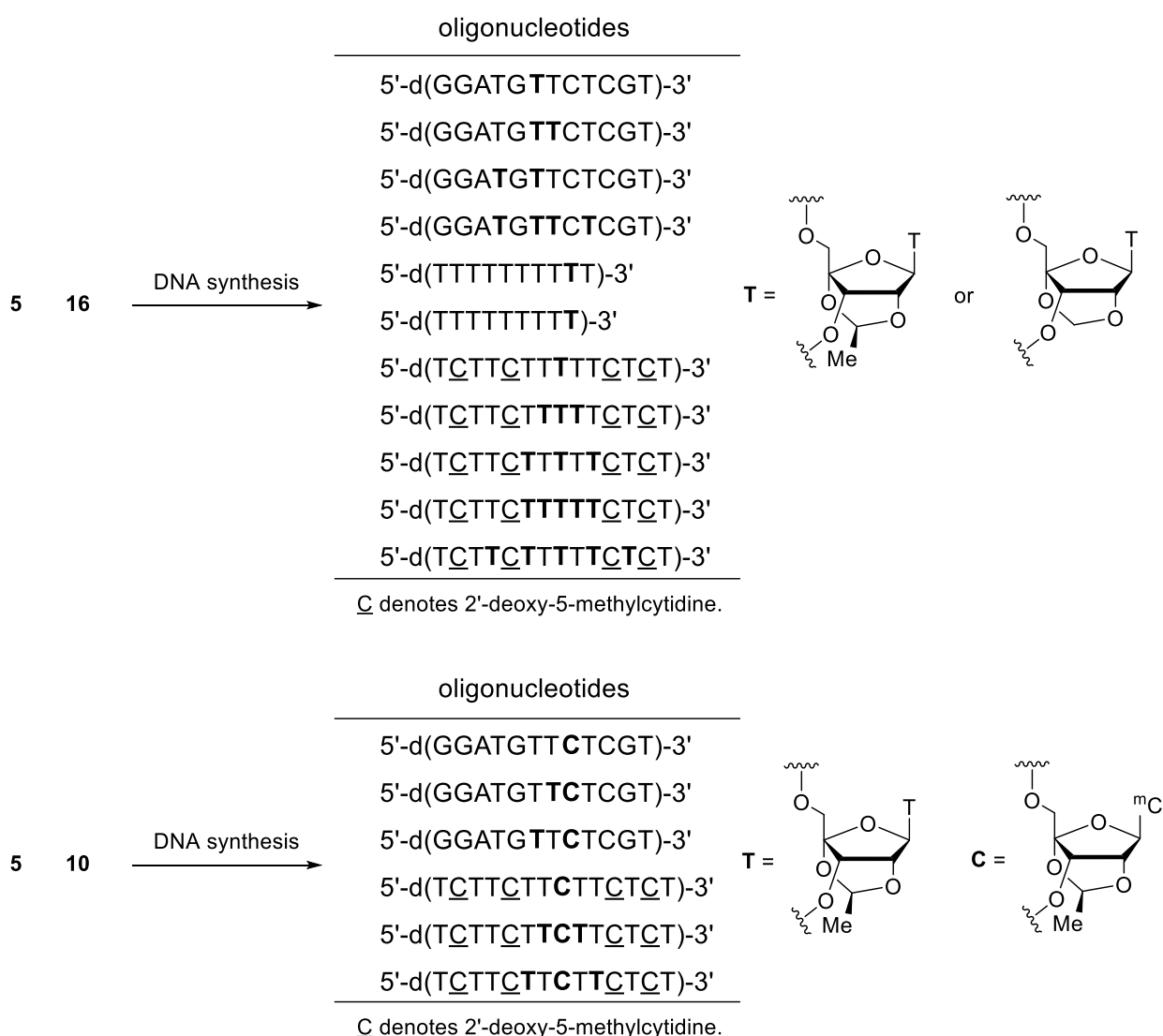


NHPI = *N*-hydroxyphthalimide, EDC = 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride,
fac-Ir(ppy)₃ = tris(2-phenylpyridinato)iridium(III), CFL = compact fluorescent lamp.

Scheme 3. Synthesis of the phosphoramidite for unsubstituted TaNA-T.

第二節 Me-TaNA を含むオリゴ核酸の合成と物性評価

合成した Me-TaNA 及び無置換 TaNA のホスホロアミダイト体 **5**, **10**, **16** を DNA 自動合成機により、オリゴ核酸に導入した (Scheme 4)。その後、28% アンモニア水溶液で処理することによりオリゴ核酸の樹脂からの切り出し及び核酸塩基部やリン酸部の脱保護を行い、Sep-Pak を用いた簡易精製を行った。簡易精製の際、脱 DMTr 化に使用する 1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液により、連続アセタール部分の分解が懸念されたが、全く問題なく目的のオリゴ核酸を得ることができた。これらのことから、Me-TaNA 及び無置換 TaNA は十分安定に扱えることが示された。

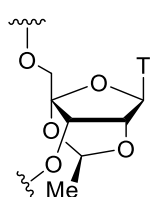
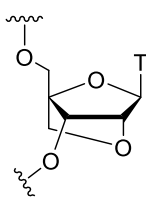
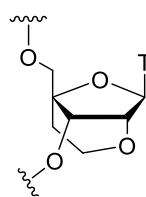
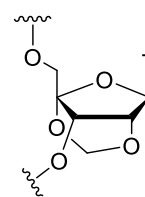


Scheme 4. Synthesis of oligonucleotides containing Me-TaNA-T, Me-TaNA-^mC, and TaNA-T.

合成した Me-TaNA 及び無置換 TaNA を含むオリゴ核酸の相補鎖核酸に対する二重鎖の熱安定性を T_m 測定により評価した (Table 2)。その際、核酸材料として頻繁に利用されている 2',4'-BNA/LNA、ENA 修飾のものと比較を行った。 T_m 測定は二重鎖の安定性の評価として頻繁に利用される測定方法であり、得られた T_m 値は二重鎖 DNA の 50% が解離して、一本鎖になる時の温度を示している。この値が高いほど、二重鎖が安定化しているといえる。相補鎖 RNA に対する Me-TaNA を含むオリゴ核酸 (ON2–ON5) との二重鎖の T_m 値は 58–79 °C であり、修飾数が増加するほど T_m 値は増加した。また、ON2–ON5 の T_m 値は天然のオリゴ核酸 (ON1, $T_m = 52$ °C) よりも高く、相補鎖 RNA との二重鎖を劇的に安定化した。これは 2',4'-BNA/LNA 修飾 (ON6–ON9, $T_m = 58$ –76 °C) 及び ENA 修飾 (ON10–ON13, $T_m = 58$ –77 °C) と同様の二重鎖安定性であった。具体的には、4 カ所修飾した場合、相補鎖 RNA に対して Me-TaNA 修飾 (ON5) の二重鎖の T_m 値は 79 °C であり、2',4'-BNA/LNA 修飾 (ON9, $T_m = 76$ °C) や ENA 修飾 (ON13, $T_m = 77$ °C) の T_m 値よりもわずかに高くなっている。また、相補鎖 DNA に対する Me-TaNA 修飾 (ON2–ON5) の T_m 値は 53–67 °C であり、天然のオリゴ核酸 (ON1, $T_m = 51$ °C) よりも高くなった。この傾向は 2',4'-BNA/LNA 及び ENA 修飾でも観察された。これは自由度の高い DNA が、予め N 型に固定化された 2',4'-架橋型核酸を含むオリゴ核酸と安定な二重鎖を形成できるためと考えられる。しかし、相補鎖 DNA に対する Me-TaNA 修飾の二重鎖の安定化能 (ΔT_m /mod.) は相補鎖 RNA に対するものよりも低く、Me-TaNA 修飾は RNA 選択性を有することが示された。従って、Me-TaNA 修飾は LNA や ENA 修飾のものに匹敵する実用レベルの相補鎖核酸認識能を持ち、かつ核酸創薬に好都合な RNA 選択性を有することが示された。この Me-TaNA を 4 カ所修飾したオリゴ核酸の UV 融解曲線の一部のデータを Figure 10 に示す。温度上昇に伴い、2',4'-BNA/LNA、ENA、天然と同様、二重鎖から一本鎖に解離するシグモイド曲線が見られ、二重鎖が形成されていることを確認した。一方、無置換 TaNA を含むオリゴ核酸 (ON14–ON17) との二重鎖の T_m 値は 58–79 °C であり、Me-TaNA 修飾と同様、天然のオリゴ核酸 (ON1, $T_m = 52$ °C) と比較して、相補鎖 RNA との二重鎖を劇的に安定化した (Table 2)。また、相補鎖 DNA に対する無置換 TaNA の二重鎖の T_m 値は 52–66 °C であり、天然のオリゴ核酸 (ON1, $T_m = 51$ °C) よりも高かったが、Me-TaNA 修飾と同様、相補鎖 DNA に対する安定化能は相補鎖 RNA に対するものよりも低く、無置換 TaNA においても RNA 選択性を有することが示された。従って、Me-TaNA 修飾は無置換 TaNA 修飾と同様の高い RNA 結合親和性を有しており、架橋部のメチル基は相補鎖 RNA に対する二重鎖の安定性に影響を与えないことが示された。

Table 2. Duplex stability of modified oligonucleotides with ssRNA and ssDNA

oligonucleotides	with ssRNA	with ssDNA
	T_m (ΔT_m /mod.) (°C)	T_m (ΔT_m /mod.) (°C)
5'-d(GGATGTTCTCGT)-3' (ON1)	52	51
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON2)	58 (+6.0)	53 (+2.0)
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON3)	66 (+7.0)	58 (+3.5)
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON4)	66 (+7.0)	58 (+3.5)
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON5)	79 (+6.8)	67 (+4.0)
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON6)	58 (+6.0)	54 (+3.0)
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON7)	64 (+6.0)	57 (+3.0)
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON8)	65 (+6.5)	58 (+3.5)
5'-d(GGATG T TCTCGT)-3' (ON9)	76 (+6.0)	64 (+3.3)
5'-d(GGATG I TCTCGT)-3' (ON10)	58 (+6.0)	52 (+1.0)
5'-d(GGATG I TCTCGT)-3' (ON11)	64 (+6.0)	57 (+3.0)
5'-d(GGAT I G I TCTCGT)-3' (ON12)	65 (+6.5)	57 (+3.0)
5'-d(GGAT I G I TCTCGT)-3' (ON13)	77 (+6.3)	64 (+3.3)
5'-d(GGATG t TCTCGT)-3' (ON14)	58 (+6.0)	52 (+1.0)
5'-d(GGATG tt CCTCGT)-3' (ON15)	65 (+6.5)	57 (+3.0)
5'-d(GGAT Gt TCTCGT)-3' (ON16)	66 (+7.0)	58 (+3.5)
5'-d(GGAT Gtt CtCGT)-3' (ON17)	79 (+6.8)	66 (+3.8)

**T** = Me-TaNA-T**T** = 2',4'-BNA/LNA-T**I** = ENA-T**t** = TaNA-T

Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM NaCl and 2.5 μ M of each oligonucleotide. The ssRNA and ssDNA sequences are 5'-r(ACGAGAACAUC)-3' and 5'-d(ACGAGAACATCC)-3', respectively. Changes in T_m values per modification (ΔT_m /mod.) relative to natural duplexes are shown in parentheses.

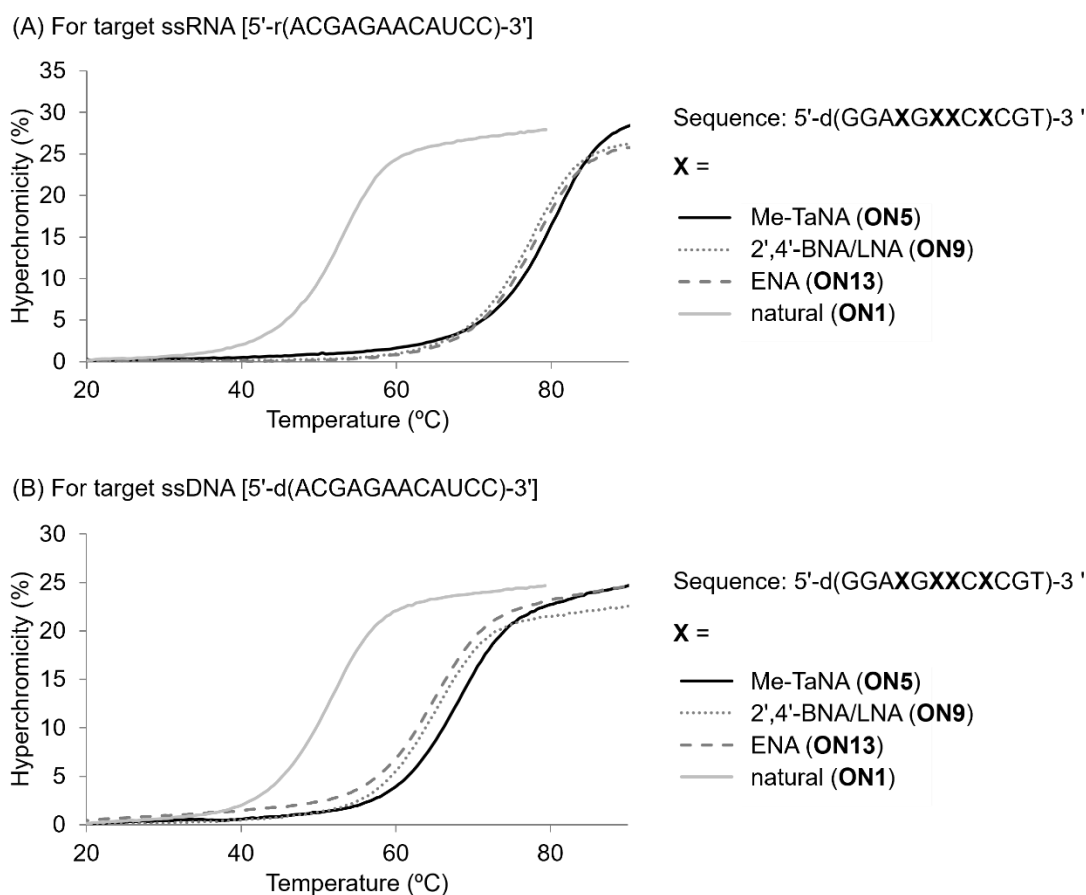
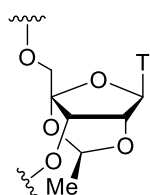


Figure 10. Selected UV melting curves of DNA/RNA duplex (A) and DNA/DNA duplex (B).

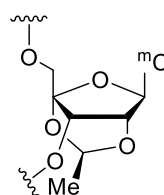
次に、Me-TaNA-Tに加え、Me-TaNA-^mCで修飾したオリゴ核酸 (ON19–ON21) と相補鎖核酸との二重鎖の熱安定性を T_m 測定により評価した (Table 3)。相補鎖 RNA に対する二重鎖の T_m 値は 58–65 °C であり、天然 (ON18, $T_m = 53$ °C) と比較して、より安定な二重鎖を形成することが示された。また、相補鎖 RNA に対する安定化能は相補鎖 DNA に対するものよりも高く、RNA 選択性を有することも示された。従って、Me-TaNA-^mCで修飾したオリゴ核酸においても Me-TaNA-T のみで修飾した場合と同様、高い RNA 結合親和性及び RNA 選択性を有することが示された。

Table 3. Duplex stability of modified oligonucleotides with ssRNA and ssDNA

oligonucleotides	with ssRNA	with ssDNA
	T_m (ΔT_m /mod.) ($^{\circ}\text{C}$)	T_m (ΔT_m /mod.) ($^{\circ}\text{C}$)
5'-d(GGATGTTCTCGT)-3' (ON18)	53	53
5'-d(GGATGTTCTCGT)-3' (ON19)	58 (+5.0)	54 (+1.0)
5'-d(GGATGTTCTCGT)-3' (ON20)	64 (+5.5)	56 (+1.5)
5'-d(GGATGTTCTCGT)-3' (ON21)	65 (+6.0)	58 (+2.5)



T = Me-TaNA-T

C = Me-TaNA-^mC

Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM NaCl and 2.5 μM of each oligonucleotide. **C** denotes 2'-deoxy-5-methylcytidine. The ssRNA and ssDNA sequences are 5'-r(ACGAGAACAUC)-3' and 5'-d(ACGAGAATCC)-3', respectively. Changes in T_m values per modification (ΔT_m /mod.) relative to natural duplexes are shown in parentheses.

さらに、修飾オリゴ核酸の核酸塩基識別能を評価した (Table 4)。Me-TaNA、2',4'-BNA/LNA、ENA、天然のチミン塩基アナログのいずれの場合も、アデニンと選択的に結合できることを確認した。従って、Me-TaNA は 2',4'-BNA/LNA、ENA と同様、十分な塩基選択性を有していることが明らかになった。

Table 4. T_m and ΔT_m values ($^{\circ}\text{C}$) of full- and mis-matched duplexes with ssRNA

oligonucleotides		T_m ($\Delta T_m = T_m$ [mismatch] - T_m [match]) / ($^{\circ}\text{C}$)			
T	X =	A	G	U	C
natural-T (ON1)		52	48 (-4)	40 (-12)	38 (-14)
Me-TaNA-T (ON2)		58	53 (-5)	44 (-14)	44 (-14)
2',4'-BNA/LNA-T (ON10)		58	53 (-5)	44 (-14)	45 (-13)
ENA-T (ON14)		58	54 (-4)	43 (-15)	45 (-13)

Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM NaCl and 2.5 μM of each oligonucleotide. The ΔT_m values, which are the changes in T_m values relative to those of the full-match duplex (X = A), are shown in parentheses. Modified oligonucleotides are 5'-d(GGATGTTCTCGT)-3', and the ssRNA sequence is 5'-r(ACGAGAXCAUC)-3'.

次に、Me-TaNA 及び無置換 TaNA を含む二重鎖の全体的な構造を CD 測定により調べた。通常、RNA 二重鎖や DNA/RNA 二重鎖などの RNA を含む二重鎖は、A 型の二重らせん構造をとり、その CD スペクトルの特徴は 250 ~ 280 nm の間に強い正のコットン効果、210 nm 付近に負のコットン効果を示す (Figure 11A)。²⁵ また、RNA 二重鎖と DNA/RNA 二重鎖の CD スペクトルを比較すると、RNA 二重鎖の方が 260 nm 付近の正のコットン効果はわずかに短波長側へシフトし、210 nm 付近の負のコットン効果の強度は増加する。ここで、DNA/RNA 二重鎖の DNA 鎖に Me-TaNA を 1 カ所修飾した場合 (ON2/RNA)、二重鎖全体の構造が RNA 二重鎖様の構造をとることが示された。これは Me-TaNA を 1 カ所修飾しただけでも、二重鎖全体の構造に影響を及ぼしていることを意味している。また、複数カ所修飾した場合 (ON5/RNA) も同様、RNA 二重鎖様の構造をとることが示された。一方、無置換 TaNA を含む二重鎖の CD スペクトルにおいても、Me-TaNA と同様、1 カ所修飾するだけで、RNA 二重鎖様の構造をとることが示された (Figure 11B)。これらの結果から、Me-TaNA 及び無置換 TaNA を DNA 鎖に導入することで全体の構造としては RNA 二重鎖様の構造にシフトすることが示唆された。この結果は、2',4'-BNA/LNA 類似体^{7,15} を含むオリゴ核酸でも観察されており、Me-TaNA 及び無置換 TaNA においても同様の特徴を示すことが確認できた。

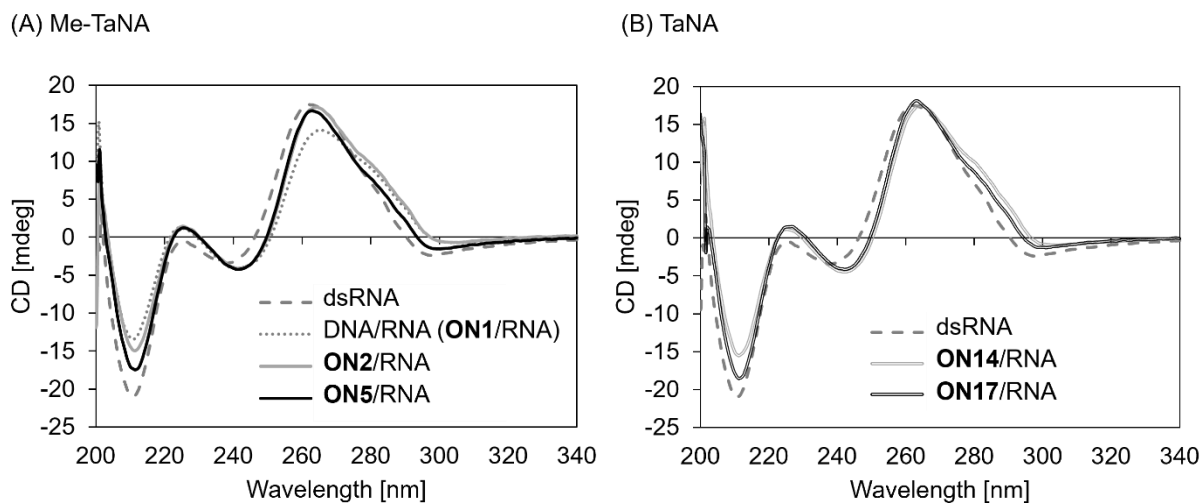


Figure 11. CD spectra of duplexes with RNA complements (A) by natural RNA and DNA (ON1) and Me-TaNA-modified oligonucleotides (ON2, ON5); (B) by TaNA-modified oligonucleotides (ON14, ON17). The sequence of the RNA complement was 5'-r(ACGAGAACAUC)-3'. dsRNA denotes RNA duplex [5'-r(ACGAGAACAUC)-3'/3'-r(UGCUCUUGUAGG)-5']. Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM NaCl and 2.5 μ M of each oligonucleotide at 25 $^{\circ}$ C.

次に、修飾オリゴ核酸のヌクレアーゼに対する抵抗性を調べた (Figure 12)。3'末端から 2 番目、あるいは 3'末端の位置に Me-TaNA、無置換 TaNA、ENA をそれぞれ修飾し

た配列を用いて、3'-エキソヌクレアーゼに対する抵抗性を天然のものと比較した。Aは修飾箇所の3'側での切れやすさ、Bは5'側での切れやすさを評価している。その結果、Me-TaNA 修飾オリゴ核酸は、ENA 修飾と同様、3'側と5'側のどちらの場合もヌクレアーゼで分解されにくいことが示された。3'-エキソヌクレアーゼはヌクレオシドの3'側のヒドロキシ基を認識して、そこから5'側を切断していくと想定されるが、配列中に架橋型核酸を導入することにより、その架橋部のかさ高さのために3'-ヒドロキシ基を認識しにくくなり、3'側及び5'側においても高いヌクレアーゼ抵抗性が示されたと考えられる。一方、無置換 TaNA 修飾オリゴ核酸では、3'側は比較的分解されやすくなっており、Me-TaNA の架橋部のメチル基はヌクレアーゼ抵抗性の向上に大きく寄与していることが示された。架橋部7'位にメチル基を持つ2',4'-BNA^{NC}[NMe]においても同様、架橋部のメチル基がヌクレアーゼ抵抗性の向上に寄与することが報告がされている。¹⁵

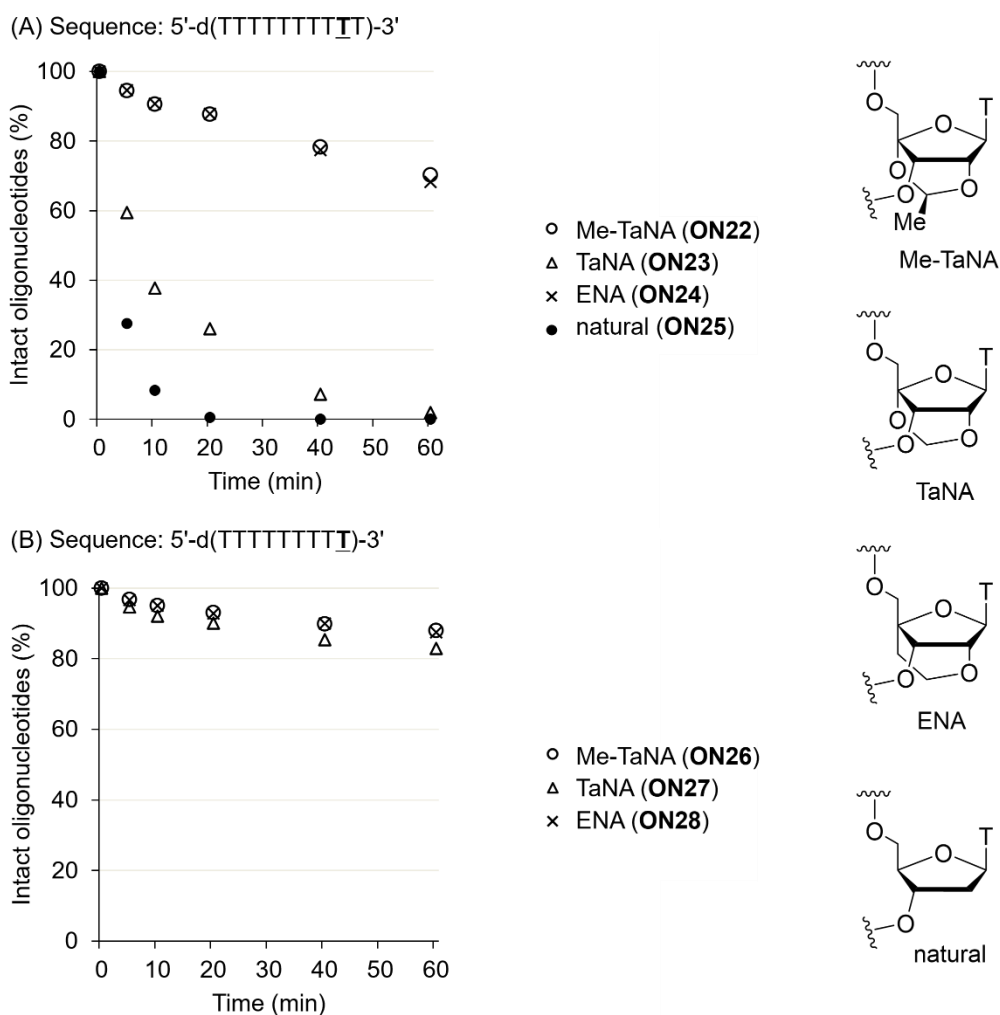


Figure 12. Nuclease resistance. (A) T10-mer oligonucleotides (ON22–ON25). (B) T9-mer oligonucleotides (ON26–ON28). Conditions: 0.01 unit/mL *Crotalus adamanteus* venom phosphodiesterase (CAVP), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, and 7.5 μM of each oligonucleotide at 37 °C.

以上、Me-TaNA は高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性を有しており、アンチセンス核酸として有望な修飾核酸であることが示唆された。

また、最近では、アンチセンス核酸の他にも様々な核酸の研究が行われており、中でも、二重鎖 DNA を標的とするアンチジーン核酸への関心が高まっている。アンチジーン核酸は、二重鎖 DNA に対して、配列特異的に結合して三重鎖 DNA を形成することにより、タンパク質の発現量を制御することができる (Figure 13)。一方で、三重鎖核酸は安定性の低さや標的とする二重鎖 DNA 配列に限られるなどの課題があり、課題解決に向けた研究が進められている。そのような中、三重鎖を形成する際、糖部の立体配座は N 型が適していることが示唆されており、N 型に固定化した 2',4'-BNA/LNA を含むオリゴ核酸は二重鎖 DNA に対して高い三重鎖形成能を有することが報告されている。²⁶⁻²⁸ このように、2',4'-架橋型核酸はアンチジーン核酸材料として有望であることが示唆されている。そこで、Me-TaNA 及び無置換 TaNA を含むオリゴ核酸に関して、二重鎖 DNA に対する三重鎖の熱安定性を T_m 測定により評価し (Table 5)、アンチジーン核酸としての有用性を調べることにした。

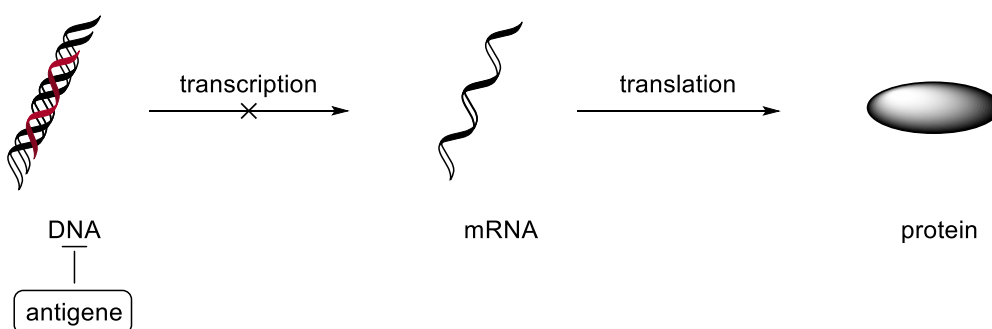


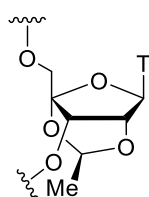
Figure 13. Antigen method.

Me-TaNA を含むオリゴ核酸 (ON30–ON34) の二重鎖 DNA に対する三重鎖の T_m 値は 36–70 °C であり、天然の三重鎖 (ON29, $T_m = 31$ °C) と比較して、二重鎖 DNA との三重鎖の熱安定性を大幅に向上させた。これは 2',4'-BNA/LNA 修飾 (ON35–ON39, $T_m = 37$ –63 °C) や ENA 修飾 (ON40–ON44, $T_m = 36$ –68 °C) と同程度であった。具体的には、Me-TaNA を複数カ所交互に修飾したオリゴ核酸 (ON32 及び ON34) の $\Delta T_m / \text{mod}$ は 3 つの修飾と 5 つの修飾でそれぞれ +7.3 °C と +7.8 °C であり、複数カ所連続で修飾したもの (ON31 及び ON33, 3 つの修飾と 5 つの修飾でそれぞれ +6.3 °C と +5.8 °C) よりも高い値を示した。このことは、連続修飾により生じる構造のひずみが 1 塩基あけることで自由度が上がり、調節できるようになったためであると考えられる。また、この Me-TaNA を 3 カ所交互に修飾したオリゴ核酸の UV 融解曲線の一部のデータを Figure 14 に示す。温度上昇に伴い、2',4'-BNA/LNA、ENA、天然と同様、三重鎖から一本鎖 DNA と二重鎖

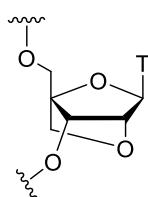
DNA に解離するシグモイド曲線が見られ、三重鎖が形成されていることを確認した。興味深いことに、交互に修飾したオリゴ核酸において、6員環架橋を持つ Me-TaNA 及び ENA は、5員環架橋を持つ 2',4'-BNA/LNA と異なり、修飾数の増加とともに ΔT_m /mod.が増加した。このことは7員環架橋を持つ EoNA においても同様の報告がされている。¹⁷ また、別のグループによって、2'-ヘテロ原子は三重鎖の安定性を高めるために重要であることも報告されている。²⁹ これらの結果から、Me-TaNA 修飾は 2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾と同等以上の高い三重鎖形成能を有しており、Me-TaNA の 2'位、6'位の酸素原子及び6員環架橋は三重鎖の安定化に寄与することが示唆された。一方、無置換 TaNA を含むオリゴ核酸 (ON45–ON49) の T_m 値は 35–66 °C であり、天然の三重鎖 (ON29, $T_m = 31$ °C) と比較すると高いものの、Me-TaNA 修飾 (ON30–ON34, $T_m = 36$ –70 °C) よりはずかに低下した。具体的には、複数の交互修飾したオリゴ核酸において、無置換 TaNA 修飾 (ON47 及び ON49) の T_m 値は3つ及び5つの修飾でそれぞれ 49 °C と 66 °C であり、Me-TaNA 修飾のもの (ON32 及び ON34, 3つ及び5つの修飾でそれぞれ 53 °C と 70 °C) よりも低い値を示した。従って、Me-TaNA の架橋部のメチル基は三重鎖の安定化に寄与することが示唆された。一方、過去に報告された 2',4'-BNA^{NC}[NMe]では、7'-メチル基を持たない 2',4'-BNA^{NC}[NH]よりも三重鎖形成能が著しく低くなることが示されており、Me-TaNA の結果とは異なる。しかし、2',4'-BNA^{NC}[NH]の場合は、架橋部の NH 基とバックボーンのリン酸酸素原子との水素結合により、三重鎖が安定化されたと考えられている。¹⁵

Table 5. Triplex stability of modified oligonucleotides with dsDNA

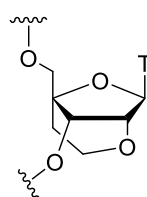
oligonucleotides	T_m ($\Delta T_m/\text{mod.}$) ($^{\circ}\text{C}$)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON29)	31
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON30)	36 (+5.0)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON31)	50 (+6.3)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON32)	53 (+7.3)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON33)	60 (+5.8)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON34)	70 (+7.8)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON35)	37 (+6.0)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON36)	46 (+5.0)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON37)	51 (+6.7)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON38)	52 (+4.2)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON39)	63 (+6.4)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON40)	36 (+5.0)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON41)	48 (+5.7)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON42)	51 (+6.7)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON43)	56 (+5.0)
5'-d(TCTTCTTTTTCTCT)-3' (ON44)	68 (+7.4)
5'-d(TCTTCTtTTCTCT)-3' (ON45)	35 (+4.0)
5'-d(TCTTCTtttTCTCT)-3' (ON46)	48 (+5.7)
5'-d(TCTTCTtTtTCTCT)-3' (ON47)	49 (+6.0)
5'-d(TCTTCTttttTCTCT)-3' (ON48)	58 (+5.4)
5'-d(TCTtCtTtTtCtCT)-3' (ON49)	66 (+7.0)



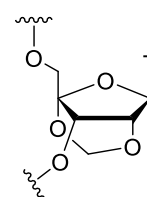
T = Me-TaNA-T



T = 2',4'-BNA/LNA-T



I = ENA-T



t = TaNA-T

Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 1.5 μM of each oligonucleotide. C denotes 2'-deoxy-5-methylcytidine. The dsDNA sequence is 5'-d(GGCAGAAGAAAAAGAGACGC)-spacerC18-d(GCGTCTCTTTTTCTTCTGCC)-3'. Changes in T_m values per modification ($\Delta T_m/\text{mod.}$) relative to natural duplexes are shown in parentheses.

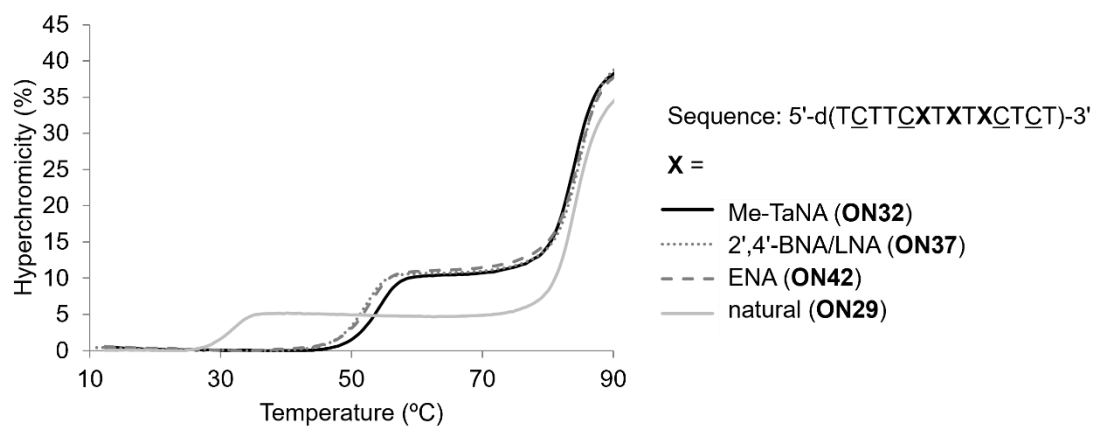
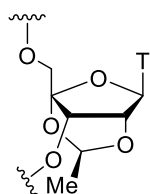


Figure 14. Selected UV melting curves of DNA triplex for target dsDNA.

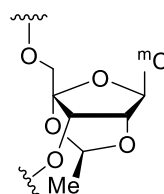
また、Me-TaNA-Tに加え、Me-TaNA-^mCで修飾したオリゴ核酸 (**ON51–ON53**) の二重鎖 DNA に対する三重鎖の安定性を評価した (Table 6)。 T_m 値は 38–57 °C であり、天然 (**ON50**, $T_m = 35$ °C) と比較して、より安定な三重鎖を形成することが示された。従って、Me-TaNA-^mCで修飾したオリゴ核酸においても Me-TaNA-T のみで修飾した場合と同様、安定な三重鎖を形成することが示された。

Table 6. Triplex stability of modified oligonucleotides with dsDNA

oligonucleotides	T_m (ΔT_m /mod.) (°C)
5'-d(TCTTCTTCTTCTCT)-3' (ON50)	35
5'-d(TCTTCTTCTTCTCT)-3' (ON51)	38 (+3.0)
5'-d(TCTTCTTCTTCTCT)-3' (ON52)	50 (+5.0)
5'-d(TCTTCTTCTTCTCT)-3' (ON53)	57 (+7.3)



T = Me-TaNA-T



C = Me-TaNA-^mC

Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 1.5 μM of each oligonucleotide. ^mC denotes 2'-deoxy-5-methylcytosine. The dsDNA sequence is 5'-d(GGCAGAAGAAGAAGAGACGC)-spacerC18-d(GCGTCTCTTCTTCTTCTGCC)-3'. Changes in T_m values per modification (ΔT_m /mod.) relative to natural duplexes are shown in parentheses.

以上、Me-TaNA は高い三重鎖形成能を有しており、アンチジーン核酸としても有望な修飾核酸であることが示唆された。アンチジーン核酸は、現在、基礎研究は行われているものの、まだ実用レベルには達していない。そのような中、本研究で得られた Me-TaNA の知見は今後の核酸創薬や核酸テクノロジーの進展に役立つと考えられる。

このように、第一章では Me-TaNA のチミン塩基及び 5-メチルシトシン塩基アナログを合成し、それらを含むオリゴ核酸は高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが示された。また、二重鎖 DNA に対する三重鎖形成においても十分な安定性を有することが示された。さらに、無置換 TaNA 修飾との比較により、架橋部のメチル基は二重鎖の安定性に影響を与えず、高い安定性を維持したまま、ヌクレアーゼ抵抗性を改善することが示された。また、架橋部のメチル基は三重鎖の安定化にも寄与することが示された。そこで、第二章では、Me-TaNA を上回る特性を持つ新たな材料の開発を目指して、架橋部のメチル基をよりかさ高くした場合の RNA に対する結合親和性やヌクレアーゼに対する抵抗性を調べることにした。

第二章 架橋部 7'位に様々な置換基を持つ

TaNA 誘導体の開発

第一節 TaNA 誘導体の分子設計と合成

前章で、Me-TaNA を含むオリゴ核酸は優れた物性 (高い RNA 結合親和性、高いヌクレアーゼ耐性、高い三重鎖形成能) を有しており、その架橋部のメチル基はヌクレアーゼ抵抗性の向上に大きく寄与することが示された。そこで、Me-TaNA を上回る特性を持つ材料の開発を目指して、架橋部 7'位にメチル基よりもかさ高い置換基を導入した、比較的合成が容易である 4 種類の TaNA 誘導体 (Hydroxymethyl-TaNA、Methoxymethyl-TaNA、Aminomethyl-TaNA、Acetamidomethyl-TaNA) を設計した (Figure 15)。これら 4 種類の TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸において、二重鎖安定性が低下するなどの問題がなければ、将来、オリゴ核酸を合成した後に誘導化する修飾法を用いて、R 部分の置換基に関して、更なる検討を行うことができると考えた。従って、これら 4 種類の TaNA 誘導体に関して、それぞれ共通の合成中間体から対応する官能基変換を行い、目的の化合物の合成を行った。

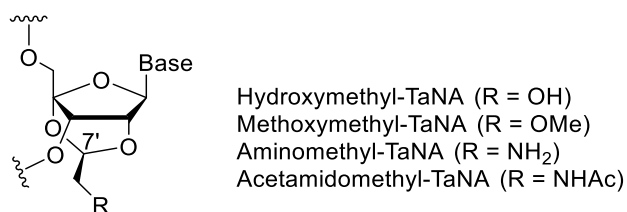
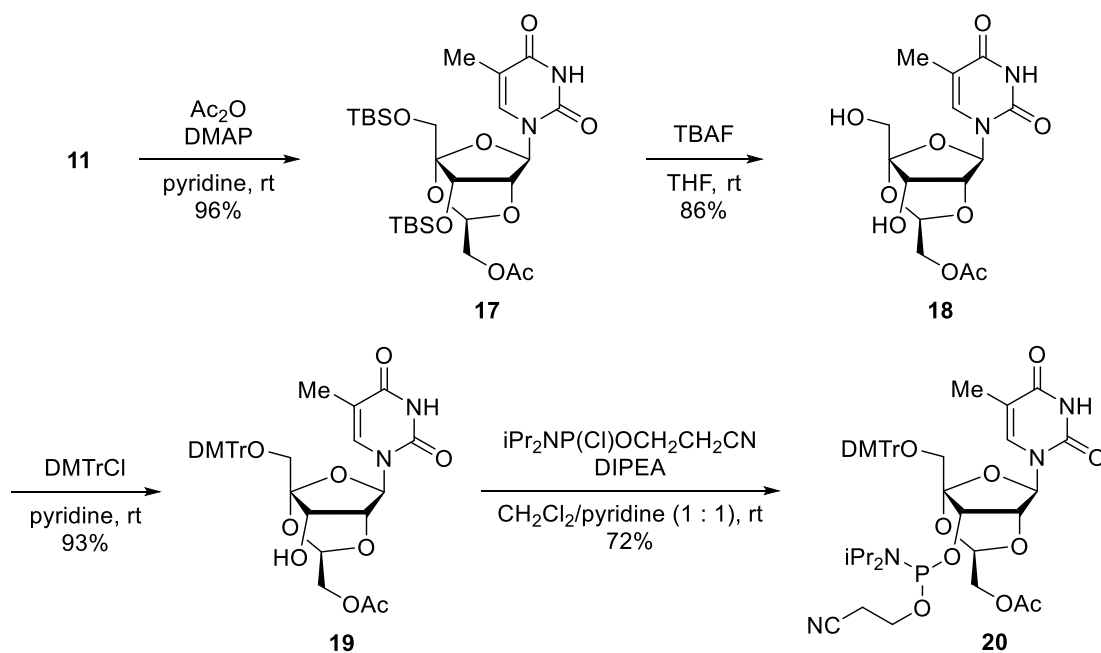


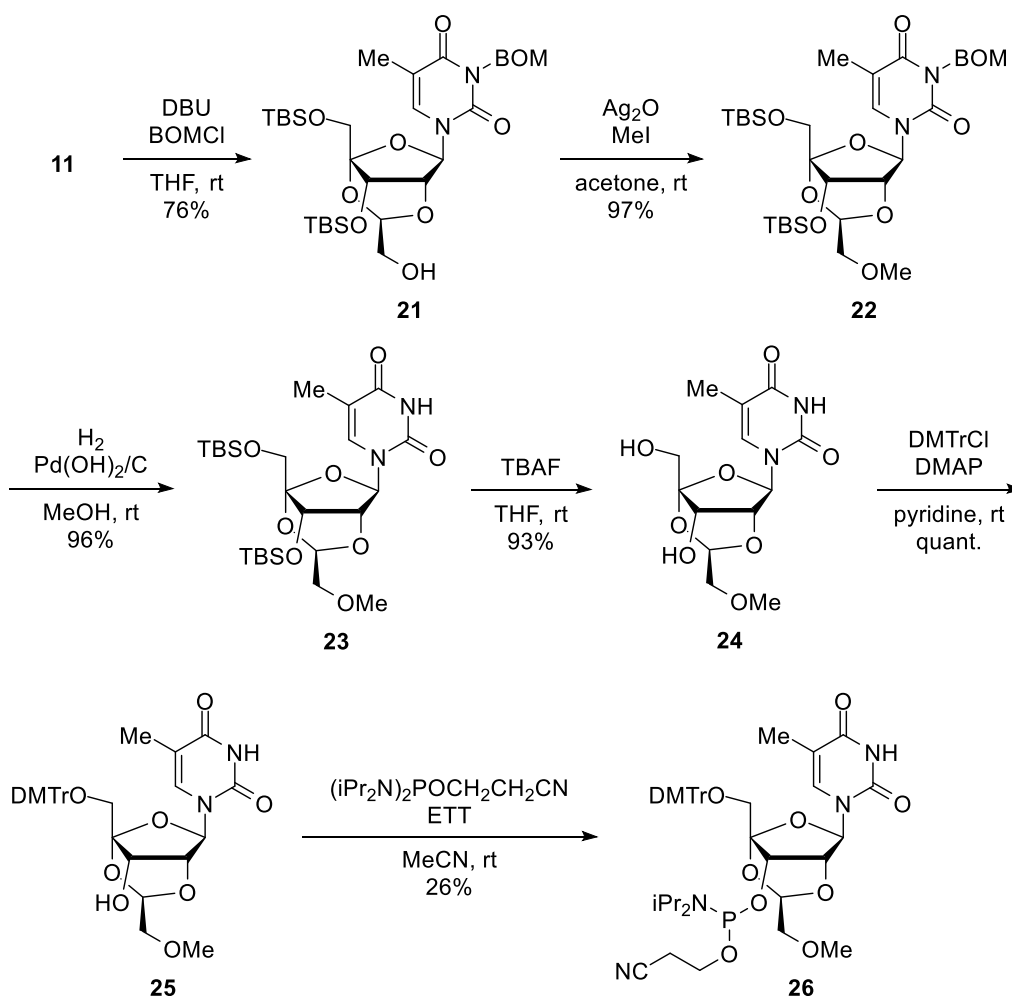
Figure 15. Structure of Me-TaNA derivatives.

Hydroxymethyl-TaNA-T のホスホロアミダイト体の合成経路を Scheme 5 に示す。共通の合成中間体 **11** から DNA 合成時に容易に脱保護ができるアセチル基でヒドロキシ基を保護して、化合物 **17** を合成し、TBS 基を脱保護することにより、ジオール体 **18** を得た。その後、Me-TaNA 合成時と同様、5'-ヒドロキシ基を DMTr 基で保護し、ホスホロアミダイト体 **20** へと誘導した。



Scheme 5. Synthesis of the phosphoramidite for Hydroxymethyl-TaNA-T.

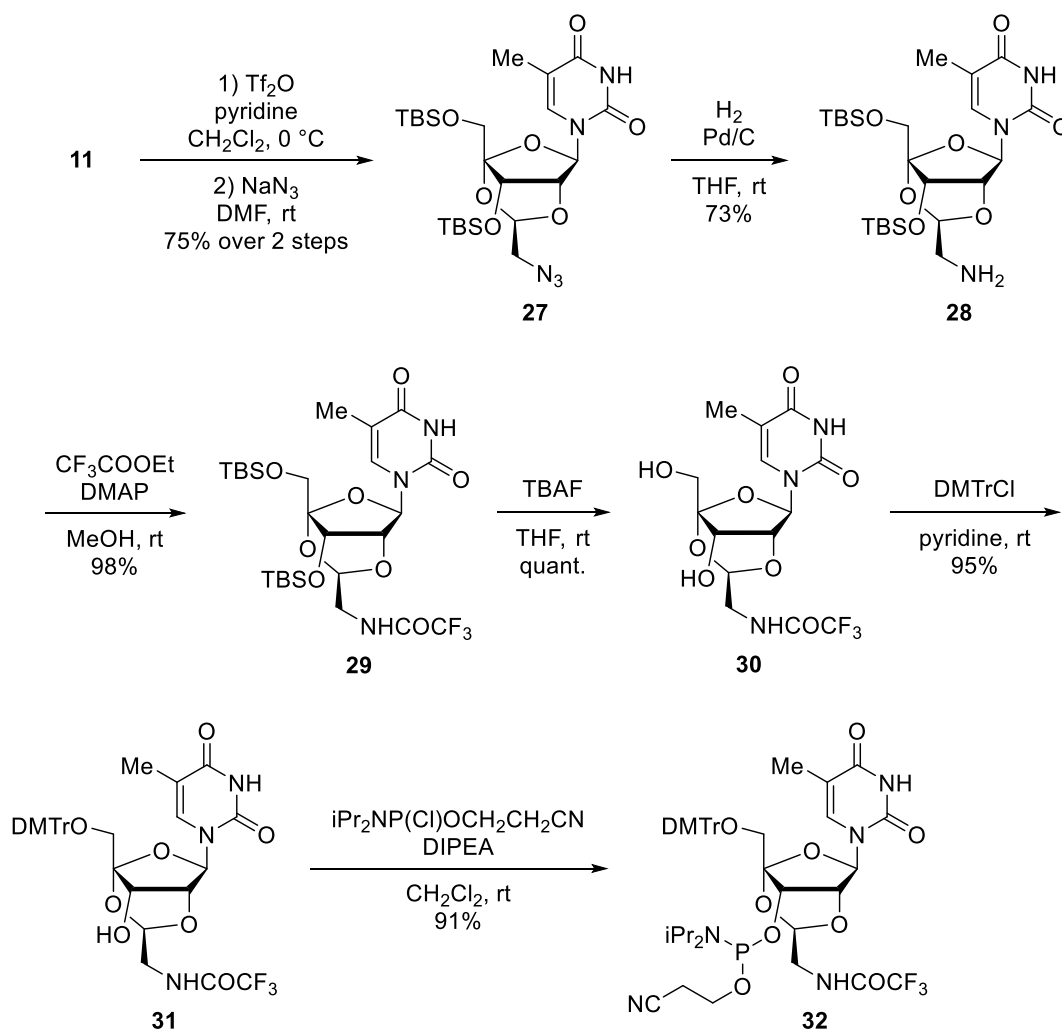
Methoxymethyl-TaNA-T のホスホロアミダイト体の合成経路を Scheme 6 に示す。共通の合成中間体 **11** から塩基部分の窒素原子を 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (DBU) とベンジルクロロメチルエーテル (BOMCl) を用いてベンジルオキシメチル (BOM) 基で保護し、酸化銀 (Ag₂O) とヨウ化メチル (MeI) を用いてメチル化を行うことにより、化合物 **22** を得ることに成功した。続いて、水酸化パラジウム (Pd(OH)₂/C) を用いた接触還元により BOM 基を脱保護した後、TBAF 処理により TBS 基を脱保護してジオール体 **24** を合成した。その後、Me-TaNA 合成時と同様、ホスホロアミダイト体 **26** へと誘導した。



DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene, BOMCl = benzyl chloromethyl ether, ETT = 5-(ethylthio)-1*H*-tetrazole.

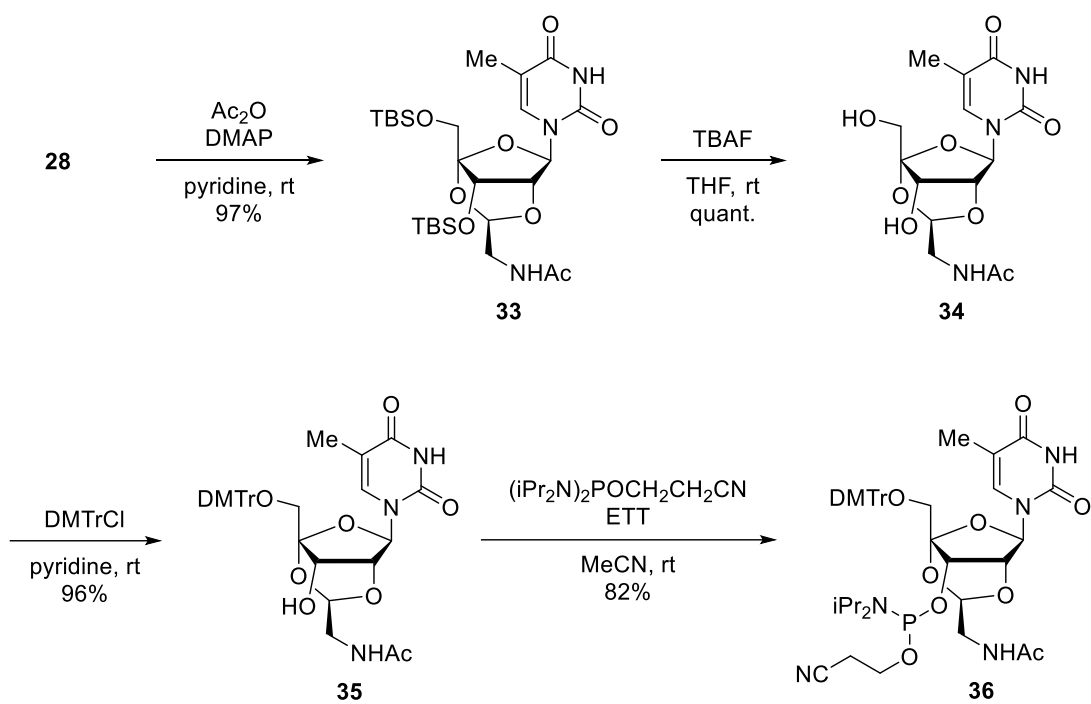
Scheme 6. Synthesis of the phosphoramidite for Methoxymethyl-TaNA-T.

Aminomethyl-TaNA-T のホスホロアミダイト体の合成経路を Scheme 7 に示す。共通の合成中間体 **11** からトリフルオロメタンスルホン酸 (Tf₂O) を用いて、架橋部のヒドロキシ基をトリフラート化した後、アジ化ナトリウム (NaN₃) により、アジド化した。続いて、パラジウム炭素 (Pd/C) を用いた接触還元により、アジドをアミノ基に変換し、DNA 合成時に容易に脱保護ができるトリフルオロアセチル基で保護して化合物 **29** を得た。その後、TBS 基を脱保護することによりジオール体 **30** を合成し、Me-TaNA 合成時と同様、ホスホロアミダイト体 **32** へと誘導した。



Scheme 7. Synthesis of the phosphoramidite for Aminomethyl-TaNA-T.

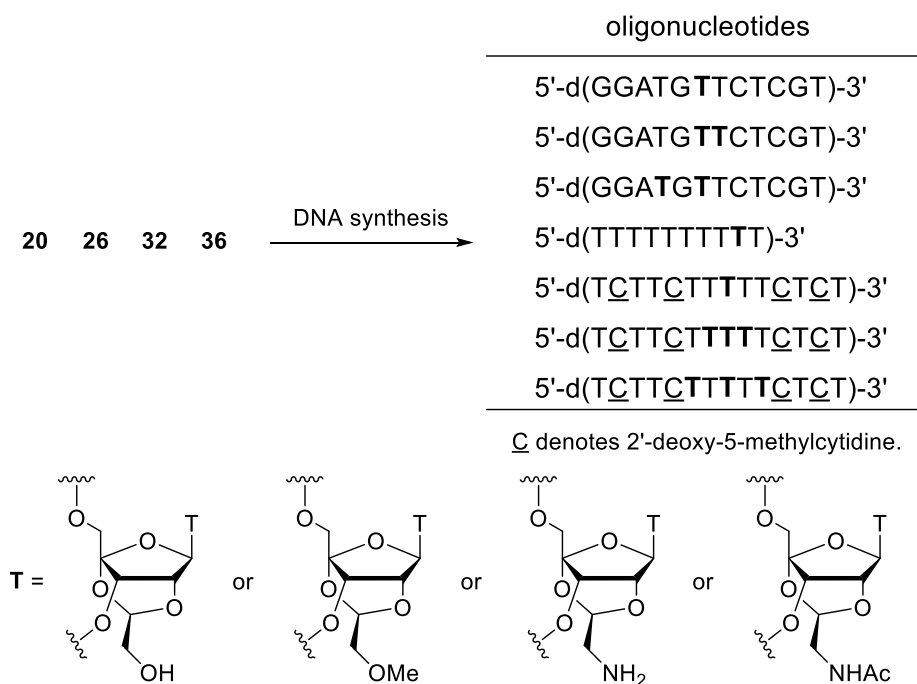
Acetamidomethyl-TaNA-T のホスホロアミダイト体の合成経路を Scheme 8 に示す。Aminomethyl-TaNA の合成中間体 **28** から無水酢酸 (Ac_2O) を用いて、アミノ基をアセチル化して化合物 **33** を合成した。その後、TBS 基を脱保護することによりジオール体 **34** を合成し、Me-TaNA 合成時と同様、ホスホロアミダイト体 **36** まで誘導した。



Scheme 8. Synthesis of the phosphoramidite for Acetamidomethyl-TaNA-T.

第二節 TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸の合成と物性評価

合成した 4 種類の TaNA 誘導体のホスホロアミダイト体 **20**, **26**, **32**, **36** を DNA 自動合成機により、オリゴ核酸に導入した (Scheme 9)。その後、任意の塩基条件で処理することにより、樹脂からの切り出し及び核酸のリン酸部や架橋部の脱保護を行った。いずれの TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸においても安定性の問題なく目的のオリゴ核酸を得ることができた。



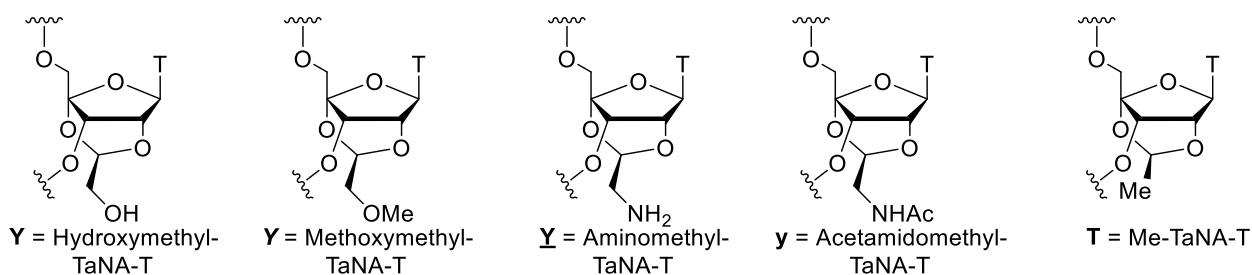
Scheme 9. Synthesis of oligonucleotides containing TaNA-T derivatives.

これら合成した TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸の相補鎖核酸に対する二重鎖の熱安定性を T_m 測定により評価した (Table 7)。その際、Me-TaNA 修飾のものと比較した。相補鎖 RNA に対する二重鎖の T_m 値は、Hydroxymethyl-TaNA 修飾 (**ON54–ON56**) では 58–66 °C、Methoxymethyl-TaNA 修飾 (**ON57–ON59**) では 58–66 °C、Aminomethyl-TaNA 修飾 (**ON60–ON62**) では 57–63 °C、Acetamidomethyl-TaNA 修飾 (**ON63–ON65**) では 59–67 °C であり、天然のオリゴ核酸 (**ON1**, $T_m = 52$ °C) と比較して、相補鎖 RNA との二重鎖を劇的に安定化した。これは Me-TaNA 修飾 (**ON2–ON4**, $T_m = 58–66$ °C) と同様の二重鎖安定性であった。従って、架橋部にメチル基よりもかさ高い置換基を導入しても、相補鎖 RNA に対する二重鎖の安定性に影響を与えないことが示唆された。また、相補鎖 DNA に対する二重鎖の T_m 値は、Hydroxymethyl-TaNA 修飾 (**ON54–ON56**) では 53–58 °C、Methoxymethyl-TaNA 修飾 (**ON57–ON59**) では 53–58 °C、Aminomethyl-TaNA 修飾

(ON60–ON62) では 53–57 °C、Acetamidomethyl-TaNA 修飾 (ON63–ON65) では 53–59 °C であり、天然のオリゴ核酸 (ON1, $T_m = 51$ °C) と比較して高くなった。しかし、TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸の相補鎖 DNA に対する安定化能は相補鎖 RNA に対するものよりも低く、Me-TaNA 修飾と同様、RNA 選択性を有することが示された。従って、これら TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸は Me-TaNA 修飾と同様、高い RNA 結合親和性かつ RNA 選択性を有していることが示された。

Table 7. Duplex stability of modified oligonucleotides with ssRNA and ssDNA

oligonucleotides	with ssRNA	with ssDNA
	T_m (ΔT_m /mod.) (°C)	T_m (ΔT_m /mod.) (°C)
5'-d(GGATGTTCTCGT)-3' (ON1)	52	51
5'-d(GGATG <u>Y</u> TCTCGT)-3' (ON54)	58 (+6.0)	53 (+2.0)
5'-d(GGATG <u>YY</u> TCTCGT)-3' (ON55)	65 (+6.5)	57 (+3.0)
5'-d(GGAYGYTCTCGT)-3' (ON56)	66 (+7.0)	58 (+3.5)
5'-d(GGATG <u>Y</u> TCTCGT)-3' (ON57)	58 (+6.0)	53 (+2.0)
5'-d(GGATG <u>YY</u> TCTCGT)-3' (ON58)	65 (+6.5)	57 (+3.0)
5'-d(GGAYGYTCTCGT)-3' (ON59)	66 (+7.0)	58 (+3.5)
5'-d(GGATG <u>Y</u> TCTCGT)-3' (ON60)	57 (+5.0)	53 (+2.0)
5'-d(GGATG <u>YY</u> TCTCGT)-3' (ON61)	63 (+5.5)	58 (+3.5)
5'-d(GGAYGYTCTCGT)-3' (ON62)	63 (+5.5)	57 (+3.0)
5'-d(GGATG <u>y</u> TCTCGT)-3' (ON63)	59 (+7.0)	53 (+2.0)
5'-d(GGATG <u>yy</u> TCTCGT)-3' (ON64)	66 (+7.0)	58 (+3.5)
5'-d(GGAYGyTCTCGT)-3' (ON65)	67 (+7.5)	59 (+4.0)
5'-d(GGATG <u>T</u> TCTCGT)-3' (ON2)	58 (+6.0)	53 (+2.0)
5'-d(GGATG <u>TT</u> TCTCGT)-3' (ON3)	66 (+7.0)	58 (+3.5)
5'-d(GGATG <u>TT</u> TCTCGT)-3' (ON4)	66 (+7.0)	58 (+3.5)



Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM NaCl and 2.5 μM of each oligonucleotide. The ssRNA and ssDNA sequences are 5'-r(ACGAGAACAUC)-3' and 5'-d(ACGAGAACATCC)-3', respectively. Changes in T_m values per modification (ΔT_m /mod.) relative to natural duplexes are shown in parentheses.

次に、これら 4 種類の TaNA 誘導体を含む二重鎖の全体構造を CD 測定により調べた (Figure 16)。いずれの場合においても、Me-TaNA と同様、オリゴ核酸を導入することで RNA 二重鎖様の構造になっていることが示された (Figure 11A 参照)。

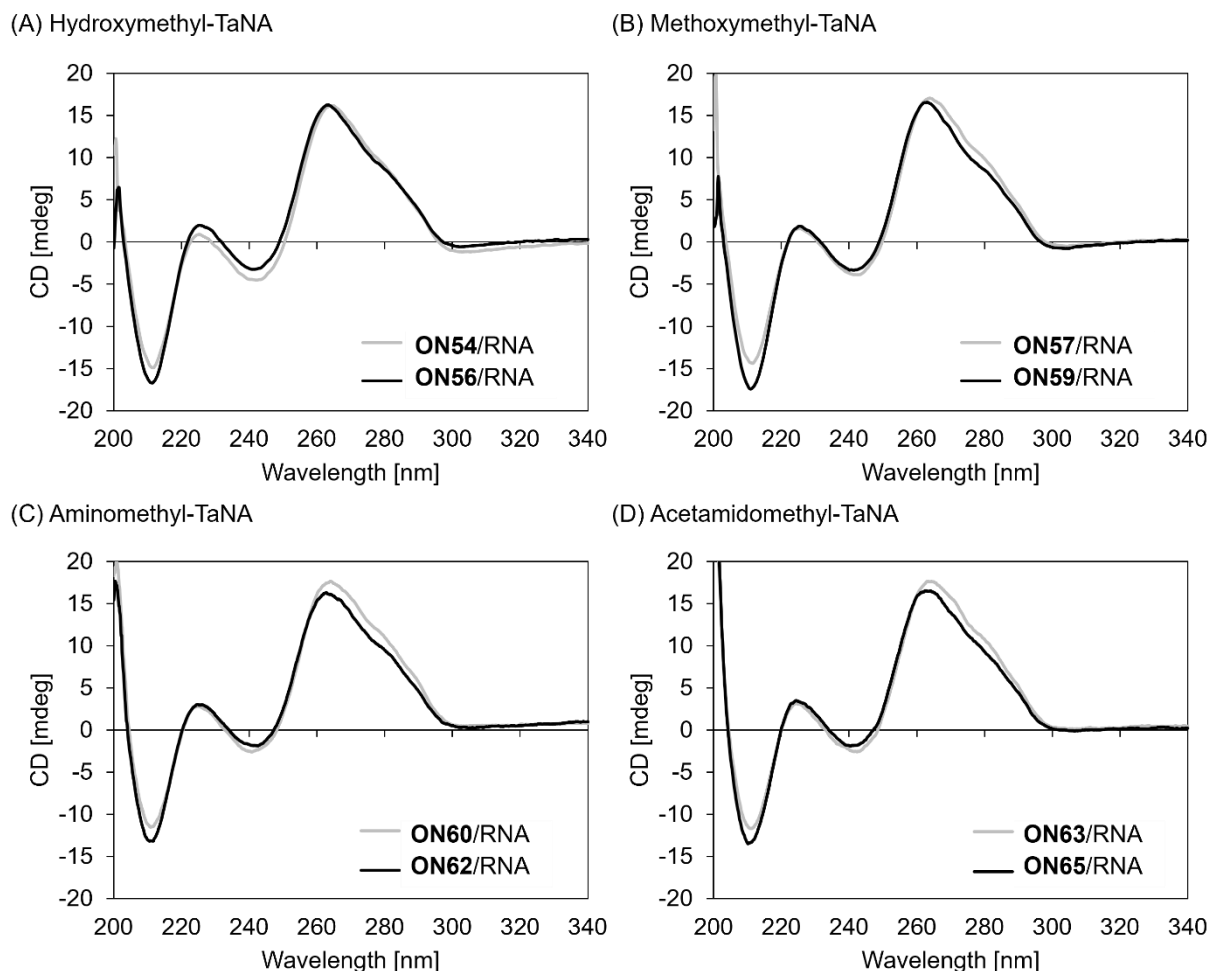


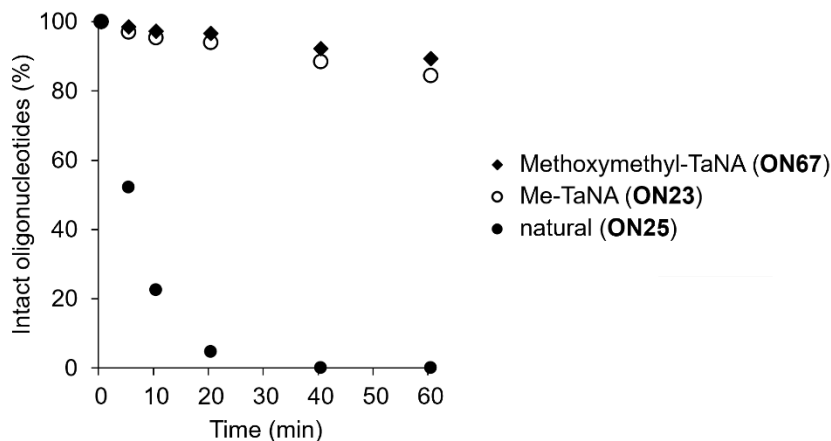
Figure 16. CD spectra of duplexes with RNA complements by oligonucleotides containing TaNA derivatives. The sequence of the RNA complement was 5'-r(ACGAGAACAUC)-3'. dsRNA denotes RNA duplex [5'-r(ACGAGAACAUC)-3'/3'-r(UGCUCUUGUAGG)-5']. Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM NaCl and 2.5 μ M of each oligonucleotide at 25 $^{\circ}$ C.

続いて、TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸のヌクレアーゼに対する抵抗性を評価した (Figure 17)。3'末端から 2 番目の位置に Methoxymethyl-TaNA、Aminomethyl-TaNA、Acetamidomethyl-TaNA をそれぞれ修飾した T10-mer のオリゴ核酸のヌクレアーゼに対する抵抗性を Me-TaNA 修飾のものと比較した。一方、Hydroxymethyl-TaNA 修飾 (ON66) に関しては、T10-mer と T9-mer のピークの保持時間がほとんど同じであり、解析することができなかった。今回評価できた 3 種類の TaNA 誘導体の結果、いずれも Me-TaNA 修飾と同様の高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが示された。また、いず

れの場合も、3'末端の T が切断された T9-mer で切断が止まっており、それ以降の分解は認められなかった。この結果は、ヌクレアーゼによる TaNA 誘導体の 5'側での切断は極めて起こりにくいことを意味している。

(A) Sequence: 5'-d(TTTTTTTTTT**T**)-3'

[**T** = Methoxymethyl-TaNA]



(B) Sequence: 5'-d(TTTTTTTTTT**T**)-3'

[**T** = Aminomethyl-TaNA, Acetamidomethyl-TaNA]

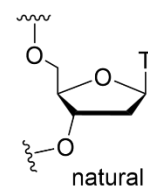
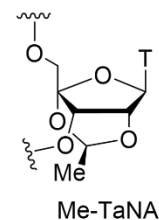
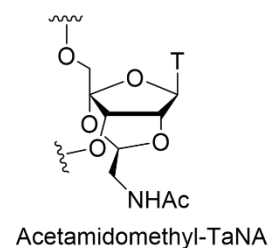
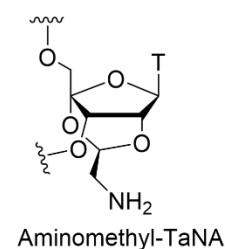
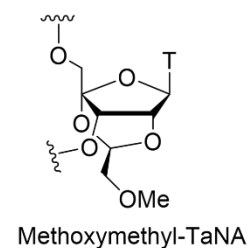
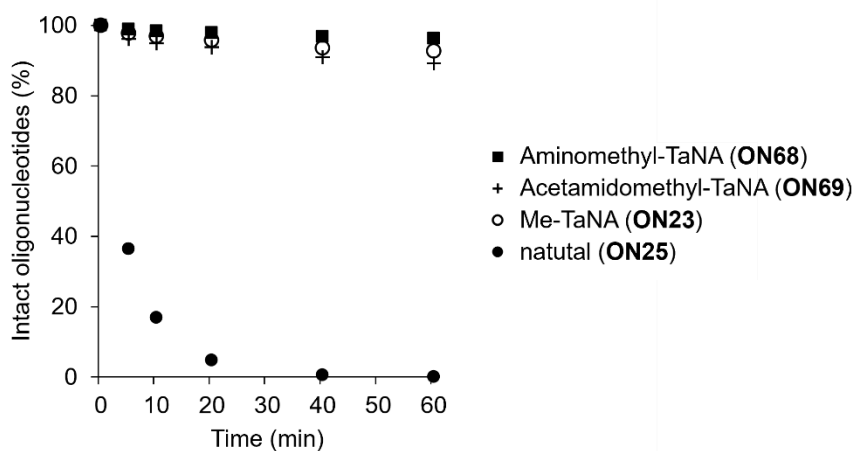


Figure 17. Nuclease resistance.

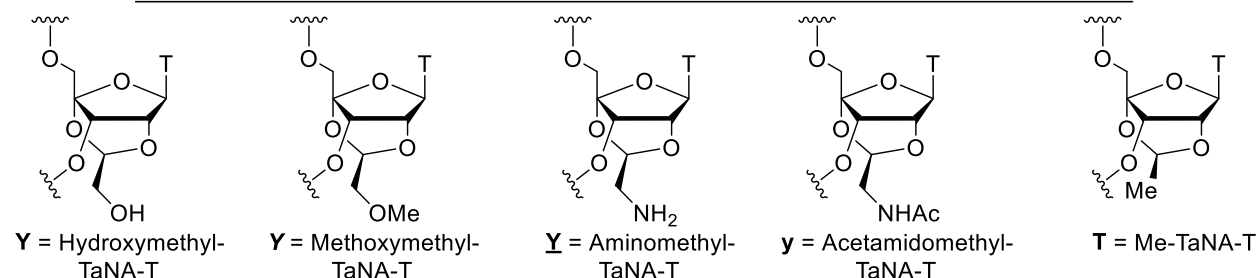
Conditions: 0.01 unit/mL CAVP, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, and 7.5 μM of each oligonucleotide at 37 °C.

次に、二重鎖 DNA に対する TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸の三重鎖形成能を T_m 測定により評価した (Table 8)。その際、Me-TaNA 修飾のものと比較した。TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸の二重鎖 DNA に対する三重鎖の T_m 値は、Hydroxymethyl-TaNA 修飾 (ON70–ON72) では 36–54 °C、Methoxymethyl-TaNA 修飾 (ON73–ON75) では 34–49 °C、

Aminomethyl-TaNA 修飾 (ON76–ON78) では 38–54 °C、Acetamidomethyl-TaNA 修飾 (ON79–ON81) では 36–54 °C であり、天然のオリゴ核酸 (ON29, $T_m = 31$ °C) と比較して、二重鎖 DNA との三重鎖の熱安定性を大幅に向上させた。これは、Me-TaNA 修飾 (ON30–ON32, $T_m = 36$ –53 °C) と同様の高い三重鎖形成能を示しており、メチル基よりもかさ高い置換基を導入しても、二重鎖 DNA に対する三重鎖の安定性に大きな影響を与えないことが示唆された。

Table 8. Triplex stability of modified oligonucleotides with dsDNA

oligonucleotides	T_m (ΔT_m /mod.) (°C)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> TTTTTCTCT)-3' (ON29)	31
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> TYTTCTCT)-3' (ON70)	36 (+5.0)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> YYYTCTCT)-3' (ON71)	51 (+6.7)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>Y</u> TYTYCTCT)-3' (ON72)	54 (+7.7)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> YTTCTCT)-3' (ON73)	34 (+3.0)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> YYYTCTCT)-3' (ON74)	46 (+5.0)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>Y</u> TYTYCTCT)-3' (ON75)	49 (+6.0)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> YTTCTCT)-3' (ON76)	38 (+7.0)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> YYYTCTCT)-3' (ON77)	51 (+6.7)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>Y</u> TYTYCTCT)-3' (ON78)	54 (+7.7)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> TyTTCTCT)-3' (ON79)	36 (+5.0)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> yyyTCTCT)-3' (ON80)	51 (+6.7)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>y</u> TyTyCTCT)-3' (ON81)	54 (+7.7)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> TTTTTCTCT)-3' (ON30)	36 (+5.0)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> TTTTTCTCT)-3' (ON31)	50 (+6.3)
5'-d(TC <u>T</u> TC <u>T</u> TTTTTCTCT)-3' (ON32)	53 (+7.3)

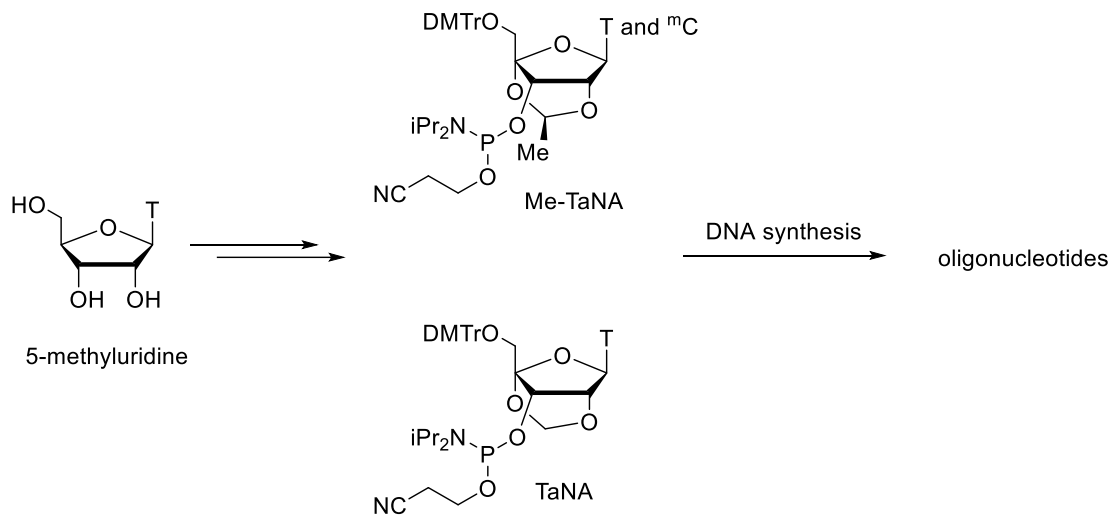


Conditions: 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 200 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 1.5 μM of each oligonucleotide. C denotes 2'-deoxy-5-methylcytidine. The dsDNA sequence is 5'-d(GGCAGAAGAAAAAGAGACGC)-spacerC18-d(GCGTCTCTTTTTTCTTCTGCC)-3'. Changes in T_m values per modification (ΔT_m /mod.) relative to natural duplexes are shown in parentheses.

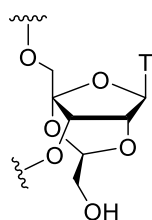
以上、架橋部に比較的かさ高い置換基を持つ4種類の TaNA 誘導体を合成し、それらを修飾したオリゴ核酸は Me-TaNA と同様の高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性を有することが示された。また、TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸は二重鎖 DNA に対する三重鎖形成においても十分な安定性を有することが示された。従って、将来的に TaNA を母格として、架橋部の置換基をさらに種々検討することにより、高い二重鎖安定性や高いヌクレアーゼ抵抗性に加え、さらに別の新しい機能 (蛍光標識による核酸イメージング、細胞膜透過性の亢進、毒性の低減など) を付与させた有用な材料の開発ができると考えられる。³⁰⁻³⁷

総括

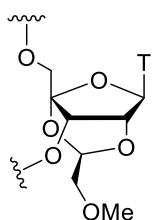
第一章では、3連続アセタール構造を持つ Me-TaNA を設計し、出発原料 5-メチルウリジンから Me-TaNA 及び無置換 TaNA のホスホロアミダイト体を合成した。これらを修飾したオリゴ核酸は 2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾と同等以上の高い RNA 結合親和性かつ RNA 選択性を有することが示された。また、Me-TaNA を含むオリゴ核酸は ENA 修飾と同様の高いヌクレアーゼ抵抗性を有することも示された。さらに、Me-TaNA 修飾は 2',4'-BNA/LNA や ENA 修飾と同等以上の高い三重鎖形成能を有することも示された。Me-TaNA の架橋部のメチル基においては、ヌクレアーゼ抵抗性の向上及び三重鎖の安定化に寄与することが示された。



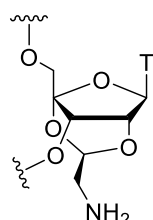
第二章では、TaNA の架橋部にメチル基よりもかさ高い置換基を導入した 4 種類の TaNA 誘導体を設計し、共通の合成中間体からそれぞれ対応する官能基変換を行い、ホスホロアミダイト体を合成した。これら 4 種類の TaNA 誘導体を含むオリゴ核酸は Me-TaNA 修飾と同様、高い RNA 結合親和性及び高いヌクレアーゼ抵抗性、さらに高い三重鎖形成能を有することが示された。従って、架橋部によりかさ高い置換基を導入しても、RNA との二重鎖に影響を与えず、高いヌクレアーゼ抵抗性を維持できる可能性が示唆された。



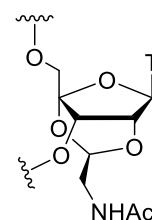
Hydroxymethyl-TaNA



Methoxymethyl-TaNA

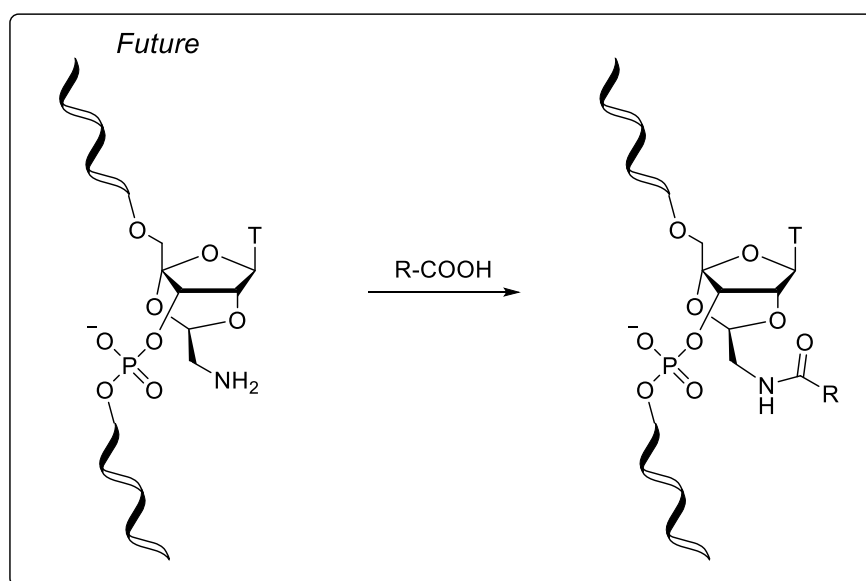


Aminomethyl-TaNA



Acetamidomethyl-TaNA

近年では、1つのオリゴ核酸から様々な誘導体を合成できるオリゴ核酸合成後修飾法が報告されている。³⁸⁻⁴¹ この手法を用いて、例えば、Aminomethyl-TaNA と R 部分に様々なユニットを持つカルボン酸との反応により、様々な種類のオリゴ核酸が合成できると考えられる。その方法を利用することにより、今回合成した TaNA 誘導体を上回る特性を持つ新たな材料の創出につながることを期待される。このように、TaNA 誘導体は核酸医薬材料として有望であり、今後の核酸創薬や核酸テクノロジーの進展に役立つと考えられる。



謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました恩師、張 功幸 教授に心より御礼を申し上げます。

本研究に際し、数々の助言、ご尽力を尽くして頂きました淵 靖史 講師、伊藤 勇太 講師、並びに大澤 昂志 助教 (現在、大阪大学大学院薬学研究科) に深く感謝致します。

本研究の論文審査にあたり、有益な助言とご指導を賜りました主査の吉田 昌裕 教授、及び副査の堂上 美和 教授、山本 博文 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。

研究室生活の中で、日々実験や勉学に勤しみ共に協力しました徳島文理大学薬学部放射薬品学教室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。

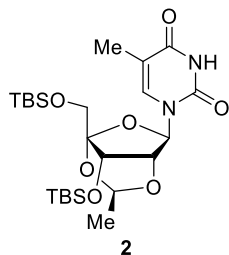
最後に、著者の長きにわたる学生生活を理解し、支えてくれた家族に心より感謝致します。

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TMを装着した MercuryPlus 300 MHz (Varian または Agilent)、Mercury 300 MHz (Varian または Agilent)、Avance III HD 500 MHz (Bruker) を用いて測定した。測定溶媒は、重クロロホルム (CDCl_3)、重メタノール (CD_3OD) 及び重アセトン ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) を用い、 ^1H NMR はテトラメチルシラン (0.00 ppm)、または非重水素化体 (メタノール: 3.31 ppm, アセトン: 2.05 ppm)、 ^{13}C NMR は重水素化体 (重クロロホルム: 77.0 ppm, 重メタノール: 49.0 ppm, 重アセトン: 29.8 ppm)、 ^{19}F NMR はヘキサフルオロベンゼン (-164.9 ppm) を内部標準として用い、 ^{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、quartet、AB quartet、double doublet、double doublet、multiplet、broad singlet、broad をそれぞれ s、d、t、q、ABq、dd、ddd、m、br s、br と略した。赤外吸収 (IR) スペクトルは、FT/IR-4200 (日本分光) を用い、ATR 法にて測定した。高分解能質量分析 (HRMS) スペクトルは、EI、CI、FAB の場合は JMS-700 MStation (日本電子)、MALDI-TOF の場合は JMS-S3000 (日本電子)、ESI-TOF の場合は SYNAPT G2-Si HDMS (Waters) を用いて測定した。反応の進行は、薄層クロマトグラフィー (シリカゲル 70F254 TLC プレート-ワコー (富士フィルム和光純薬)、シリカゲル 60F254 TLC プレート (Merck)) にて追跡した。シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーの吸着剤は、FL-PSQ60B (富士シリシア化学) を用いた。X 線結晶構造解析は、Mo/ $K\alpha$ 線源を使用し、Smart Apex Ultra (Bruker) を用いて行った。オリゴヌクレオチド合成は、nS-8II (ジーンデザイン) を用い、0.2 μmol のスケールで行った。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、フラクションコレクター CHF122SC (ADVANTEC) を備えた EXTREMA (PU-4180, CO-4060 または CO-4061, UV-4075 または AS-4050) (日本分光) システムを用い、分析カラムは、XBridge[®] Oligonucleotides BEH C18 (Waters) または XBridgeTM Shield RP18 (Waters) または XBridge[®] BEH Shield RP18 (Waters) カラムを用いて行った。 T_m 測定は、 T_m 分析付属品を備えた V-730 UV/VIS (日本分光) を使用して実施した。CD 測定は水冷ペルチェセルホルダ PTC-514 を装着した J-1100 (日本分光) または水冷ペルチェセルホルダ PTC-348 を装着した J-725 (日本分光) を使用して実施した。

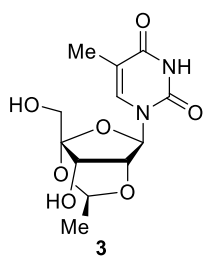
第一章の実験

モノマーの合成



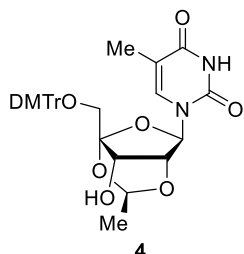
化合物 **2**: アルゴン気流下、(+)-10-カンファースルホン酸 (21 mg, 0.09 mmol) を、化合物 **1** (957 mg, 1.81 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (15 mL) に 0 °C で加えた。反応混合物を室温で 40 分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) で精製し、化合物 **2** (934 mg, 98%) を白色泡状物として得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.27 (1H, br s), 7.69 (1H, q, $J = 1.0$ Hz), 6.18 (1H, s), 5.39 (1H, q, $J = 5.0$ Hz), 4.27 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.79 (2H, s), 3.87 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 1.95 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 1.39 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 3.79 (2H, s), 0.96 (9H, s), 0.93 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.14 (3H, s), 0.11 (3H, s), 0.08 (3H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 163.3, 149.7, 134.3, 110.5, 106.0, 92.5, 85.7, 77.2, 64.7, 60.9, 26.1, 25.6, 20.1, 18.8, 18.0, 12.6, -4.4, -4.8, -5.0, -5.5. IR (ATR) ν : 2954, 2929, 2894, 2857, 1698, 1471 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 551.2585; found, 551.2585.



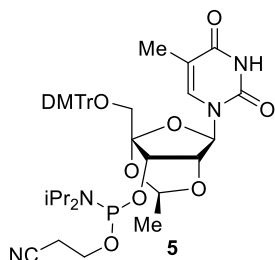
化合物 **3**: アルゴン気流下、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1 M テトラヒドロフラン溶液, 0.64 mL, 0.64 mmol) を化合物 **2** (162 mg, 0.31 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (9 mL) に加え、反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 20/1) で精製し、化合物 **3** (87 mg, 95%) を白色固体として得た。化合物 **3** をアセトニトリルを用いて再結晶化し、X線結晶構造解析を行った。

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.03 (1H, br s), 6.19 (1H, s), 5.46 (1H, q, $J = 5.0$ Hz), 4.33 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.91 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.73, 3.68 (2H, ABq, $J = 12.0$ Hz), 1.86 (3H, s), 1.40 (3H, d, $J = 5.0$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 166.5, 151.9, 136.8, 110.8, 107.1, 94.1, 86.7, 79.0, 65.5, 60.1, 20.0, 12.6. IR (ATR) ν : 3469, 3186, 3060, 2987, 2920, 1693, 1671, 1472, 1417 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 323.0855; found, 323.0858.



化合物 **4**: アルゴン気流下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (489 mg, 1.44 mmol) を化合物 **3** (145 mg, 0.48 mmol) の無水ピリジン溶液 (3 mL) に加え、反応混合物を室温で 6 時間攪拌した後、メタノールを加えて 30 分間攪拌し、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 50/1–20/1) で精製し、化合物 **4** (290 mg, >99%) を淡黄色の泡状物として得た。

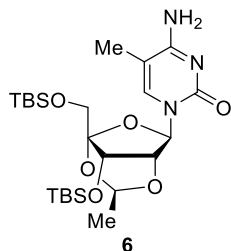
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 10.03 (1H, br s), 7.80 (1H, s), 7.45–7.19 (9H, m), 6.84 (4H, d, $J = 7.5$ Hz), 6.22 (1H, s), 5.38 (1H, q, $J = 5.0$ Hz), 4.48 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.32 (1H, dd, $J = 11.0$ and 3.0 Hz), 3.76 (6H, s), 3.48, 3.39 (2H, ABq, $J = 10.0$ Hz), 3.10 (1H, d, $J = 11.0$ Hz), 1.36 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 1.28 (3H, s). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 164.3, 158.8, 158.7, 150.3, 143.9, 135.0, 134.8, 134.3, 130.1, 130.1, 128.1, 127.2, 113.4, 111.2, 106.0, 92.9, 87.2, 85.4, 77.5, 65.8, 60.5, 55.2, 19.8, 12.0. IR (ATR) ν : 3173, 3062, 2950, 2933, 2910, 2836, 1689, 1607, 1581, 1508 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_9$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 625.2162; found, 625.2161.



化合物 **5**: アルゴン気流下、2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (0.18 mL, 0.8 mmol) を化合物 **4** (96 mg, 0.16 mmol) 及び *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.42 mL, 2.4 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に 0 °C で加えた。反応混合物を室温で 3 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢

酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー（ヘキサン/酢酸エチル = 1/1）で精製し、化合物 **5** (114 mg, 89%) を白色固体として得た。

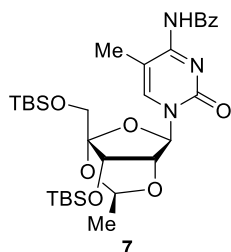
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.38 (0.5H, br s), 8.34 (0.5H, br s), 7.83 (0.5H, s), 7.82 (0.5H, s), 7.42–7.39 (2H, m), 7.32–7.23 (7H, m), 6.86–6.81 (4H, m), 6.20 (0.5H, s), 6.19 (0.5H, s), 5.42–5.36 (1H, m), 4.61 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.58 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.33 (0.5H, dd, $J = 8.0$ and 3.0 Hz), 4.29 (0.5H, dd, $J = 7.0$ and 3.0 Hz), 3.95–3.50 (11H, m), 3.40–3.35 (1H, m), 2.69–2.55 (1H, m), 2.46–2.34 (1H, m), 1.34–1.07 (18H, m). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 163.5, 163.4, 158.9, 158.9, 158.8, 158.8, 149.8, 149.7, 143.8, 143.7, 134.9, 134.7, 134.7, 134.3, 134.2, 130.4, 130.4, 130.4, 130.3, 128.5, 128.4, 128.0, 128.0, 127.4, 127.3, 117.4, 117.4, 113.3, 113.2, 111.0, 111.0, 106.0 (d, $J = 6.9$ Hz), 105.7 (d, $J = 7.9$ Hz), 92.7, 92.6, 87.1, 86.2, 86.1, 75.9, 75.8, 66.6 (d, $J = 12.9$ Hz), 66.1 (d, $J = 16.8$ Hz), 60.7, 60.5, 58.2 (d, $J = 17.8$ Hz), 57.6 (d, $J = 18.8$ Hz), 55.3, 55.2, 43.5, 43.4, 24.7, 24.6, 24.6, 24.6, 24.5, 24.5, 20.4 (d, $J = 7.0$ Hz), 20.2 (d, $J = 5.9$ Hz), 20.1, 20.0, 11.8, 11.7. ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 149.5. IR (ATR) ν : 2966, 2935, 2879, 2836, 1690, 1607, 1581, 1508 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{NaO}_{10}\text{P}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 825.3241; found, 825.3243.



化合物 **6**: アルゴン気流下、トリエチルアミン (0.64 mL, 4.61 mmol)、2,4,6-トリスプロピルベンゼンスルホンクロリド (474 mg, 1.57 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (23 mg, 0.18 mmol) を化合物 **2** (487 mg, 0.92 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (10 mL) に加えた。反応混合物を室温で 4 時間攪拌した後、4-ジメチルアミノピリジン (23 mg, 0.18 mmol) を加え、さらに 2 時間攪拌した。次に、28% アンモニア水溶液 (4 mL) を加え、反応混合物を室温で 16 時間攪拌した。続いて、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、有機層を水及び飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー（クロロホルム/メタノール = 30/1）で精製し、化合物 **6** (427 mg, 88%) を淡褐色固体として得た。

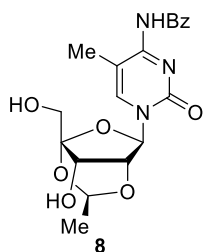
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.35 (1H, br s), 7.72 (1H, q, $J = 1.0$ Hz), 6.21 (1H, s), 5.42 (1H, q, $J = 5.0$ Hz), 5.35 (1H, br s), 4.33 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.82 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.78 (2H, s), 1.95

(3H, d, $J = 1.0$ Hz), 1.38 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 0.96 (9H, s), 0.91 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.14 (3H, s), 0.08 (3H, s), 0.04 (3H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 165.5, 155.4, 137.8, 106.0, 101.2, 92.6, 86.4, 77.4, 64.7, 61.2, 26.3, 25.8, 20.3, 18.9, 18.2, 13.4, -4.2, -4.7, -4.8, -5.3. IR (ATR) ν : 2955, 2930, 2898, 2858, 1651, 1604 cm^{-1} . HRMS (MALDI-TOF): Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{NaO}_6\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 550.2739; found, 550.2728.



化合物 **7**: アルゴン気流下、無水安息香酸 (28 mg, 0.12 mmol) を化合物 **6** (54 mg, 0.10 mmol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液 (1 mL) に加えた。反応混合物を室温で 18 時間攪拌した後、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 100/1) で精製し、化合物 **7** (48 mg, 74%) を白色固体として得た。

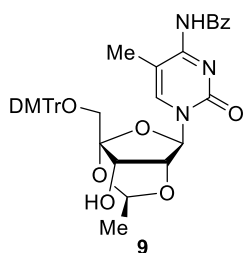
^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 13.43 (1H, br s), 8.31 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.92 (1H, s), 7.58 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), 7.48 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 6.28 (1H, s), 5.50 (1H, q, $J = 5.0$ Hz), 4.62 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.14 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.85, 3.82 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 2.14 (3H, s), 1.40 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 1.02 (9H, s), 0.95 (9H, s), 0.25 (3H, s), 0.24 (3H, s), 0.13 (3H, s), 0.10 (3H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 180.1, 161.1, 148.1, 138.3, 137.5, 133.3, 130.6, 129.0, 111.1, 107.0, 93.2, 87.1, 77.5, 65.7, 61.9, 26.6, 26.1, 20.6, 19.4, 18.6, 13.9, -4.2, -4.7, -4.8, -5.1. IR (ATR) ν : 2954, 2930, 2886, 2858, 1705, 1641 cm^{-1} . HRMS (MALDI-TOF): Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 654.3001; found, 654.3007.



化合物 **8**: アルゴン気流下、テトラブチルアンモニウムフルオライド (1 M テトラヒドロフラン溶液, 0.61 mL, 0.61 mmol) を化合物 **7** (153 mg, 0.24 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (4 mL) に加え、反応混合物を室温で 2.5 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。

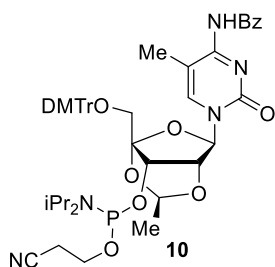
残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 50/1) で精製し、化合物 **8** (89 mg, 91%) を白色固体として得た。

^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 13.49 (1H, br s), 8.33–8.30 (3H, m), 7.57 (1H, t, $J = 7.0$ Hz), 7.48 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 6.28 (1H, s), 5.53 (1H, q, $J = 5.0$ Hz), 4.95 (1H, t, $J = 5.0$ Hz), 4.47 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.09 (1H, d, $J = 10.5$ Hz), 4.02 (1H, dd, $J = 7.0$ and 3.0 Hz), 3.83–3.72 (2H, m), 2.07 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 1.39 (3H, d, $J = 5.0$ Hz). ^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 180.1, 161.5, 148.2, 138.5, 138.4, 133.2, 130.5, 129.0, 111.0, 107.0, 93.6, 86.5, 78.3, 65.2, 59.7, 20.1, 13.7. IR (ATR) ν : 3453, 1696, 1687, 1646, 1594, 1559, 1483 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_7$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 426.1277; found, 426.1277.



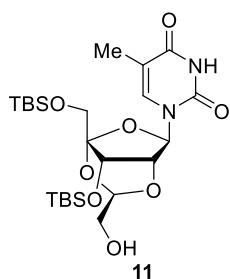
化合物 **9**: アルゴン気流下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (173 mg, 0.51 mmol) を化合物 **8** (122 mg, 0.30 mmol) の無水ピリジン溶液 (3 mL) に加えた。反応混合物を室温で7時間攪拌した後、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (82 mg, 0.24 mmol) を加え、さらに16時間攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 3/2) で精製し、化合物 **9** (212 mg, >99%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 13.44 (1H, br s), 8.28 (2H, d, $J = 7.0$ Hz), 7.93 (1H, s), 7.52 (1H, t, $J = 7.0$ Hz), 7.45–7.41 (4H, m), 7.35–7.30 (6H, m), 7.27–7.24 (1H, m), 6.88–6.85 (4H, m), 6.24 (1H, s), 5.39 (1H, q, $J = 5.0$ Hz), 4.48 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.29 (1H, dd, $J = 12.0$ and 3.0 Hz), 1.39 (3H, d, $J = 5.0$ Hz), 3.81 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.47, 3.40 (2H, ABq, $J = 10.0$ Hz), 2.62 (1H, d, $J = 12.0$ Hz), 1.46 (3H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 179.9, 159.8, 159.0, 158.9, 147.7, 144.1, 137.1, 135.5, 135.1, 134.9, 132.7, 130.4, 130.3, 130.1, 128.3, 128.3, 127.4, 113.6, 112.5, 106.3, 93.1, 87.4, 85.8, 77.6, 65.9, 60.7, 55.4, 20.1, 13.2. IR (ATR) ν : 3066, 3002, 2933, 2837, 1703, 1644, 1598, 1563, 1508 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{NaO}_9$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 728.2584; found, 728.2589.



化合物 **10**: アルゴン気流下、2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (0.15 mL, 0.68 mmol) を化合物 **9** (96 mg, 0.14 mmol) 及び *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.36 mL, 2.0 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に 0 °C で加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で精製し、化合物 **10** (104 mg, 84%) を白色固体として得た。

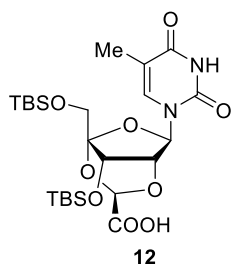
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 13.44 (1H, br s), 8.29 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.00 (1H, s), 7.54–7.27 (12H, m), 6.89–6.83 (4H, m), 6.25 (0.5H, s), 6.24 (0.5H, s), 5.43–5.38 (1H, m), 4.66 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.63 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.36–4.32 (1H, m), 3.92–3.50 (11H, m), 3.39 (1H, t, $J = 10.0$ Hz), 2.72–2.53 (1H, m), 2.46–2.33 (1H, m), 1.37–1.07 (18H, m). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 179.7, 179.6, 160.0, 160.0, 158.9, 158.9, 158.8, 158.8, 147.7, 147.6, 144.0, 143.9, 137.3, 137.1, 135.7, 135.6, 134.9, 134.9, 134.7, 134.7, 132.4, 132.3, 130.5, 130.4, 130.4, 129.9, 128.5, 128.4, 128.1, 128.0, 127.4, 127.3, 117.4, 113.3, 113.3, 113.3, 112.3, 112.2, 106.1 (d, $J = 7.0$ Hz), 105.9 (d, $J = 7.9$ Hz), 92.7, 92.6, 87.2, 86.5, 86.5, 75.7, 75.7, 66.5 (d, $J = 12.9$ Hz), 66.1 (d, $J = 16.8$ Hz), 60.7, 60.6, 58.3 (d, $J = 17.8$ Hz), 57.6 (d, $J = 18.8$ Hz), 55.3, 55.2, 43.5 (d, $J = 2.0$ Hz), 43.4 (d, $J = 2.0$ Hz), 24.7, 24.6, 24.6, 24.6, 24.5, 24.5, 20.4 (d, $J = 6.9$ Hz), 20.2 (d, $J = 6.9$ Hz), 20.1, 20.0, 12.9, 12.8. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ : 149.7, 149.6. IR (ATR) ν : 2966, 2932, 2883, 2837, 1703, 1645, 1598, 1566 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, 906.3843; found, 906.3847.



化合物 **11**: アセトン (8 mL) 及び飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 mL) を化合物 **1** (416 mg, 0.79 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) に加えた。反応混合物を 0 °C に冷却

し、オキソン® (996 mg, 1.57mmol) の水溶液 (10 mL) を滴下した。0 °C で 1 時間攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣 (438 mg) をアルゴン気流下で無水ジクロロメタン溶液 (10 mL) に溶解し、(+)-10-カンファースルホン酸 (9.3 mg, 0.040 mmol) を 0 °C で加えた。反応混合物を 1 時間攪拌し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで抽出した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 3/1-2/1) で精製し、化合物 **11** (236 mg, 化合物 **1** から 2 段階で 55%) を白色固体として得た。

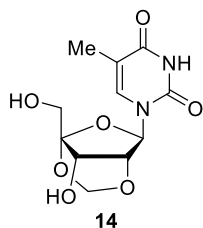
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.04 (1H, br s), 7.65 (1H, s), 6.20 (1H, s), 5.34 (1H, t, *J* = 3.0 Hz), 4.36 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 3.93 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 3.85, 3.81 (2H, ABq, *J* = 11.0 Hz), 3.77–3.71 (2H, m), 2.18 (1H, br s), 1.95 (3H, s), 0.96 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.15 (3H, s), 0.12 (3H, s), 0.11 (3H, s). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ: 163.7, 149.8, 134.0, 110.7, 105.7, 93.9, 85.5, 77.1, 64.8, 63.4, 60.7, 26.1, 25.6, 18.8, 18.0, 12.6, -4.51, -4.90, -4.97, -5.49. IR (ATR) *v*: 3174, 3064, 2953, 2930, 2886, 2857, 1697, 1471 cm⁻¹. HRMS (ESI): Calcd for C₂₄H₄₄N₂NaO₈Si₂ [M + Na]⁺, 567.2534; found, 567.2530.



化合物 **12**: 化合物 **11** (915 mg, 1.7 mmol) のアセトニトリル/水 (1 : 1) 溶液 (40 mL) に、(ジアセトキシヨード) ベンゼン (1.4 g, 4.2 mmol) 及び 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシラジカル (105 mg, 0.67 mmol) を加えた。混合物を室温で 4 時間攪拌した後、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液で反応を停止させ、クロロホルムで抽出した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 10/1) で精製し、化合物 **12** (634 mg, 68%) を白色固体として得た。

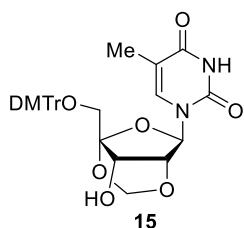
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.66 (1H, s), 6.26 (1H, s), 5.61 (1H, s), 4.57 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 4.07 (1H, d, *J* = 3.0 Hz), 3.86 (2H, s), 1.90 (3H, s), 0.98 (9H, s), 0.93 (9H, s), 0.19 (3H, s), 0.18 (3H, s), 0.15 (3H, s), 0.12 (3H, s). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ: 168.9, 166.3, 151.8, 136.0, 111.2, 107.3, 90.8, 87.2, 78.6, 66.6, 61.8, 26.6, 26.2, 19.6, 19.0, 12.9, -4.3, -4.6, -4.8, -5.2. IR

(ATR) ν : 3168, 3086, 2953, 2929, 2888, 2857, 1754, 1698, 1651 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{Si}_2$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 581.2327; found, 581.2329.



化合物 **14**: 化合物 **12** (484 mg, 0.87 mmol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液 (8 mL) に、*N*-ヒドロキシフタルイミド (255 mg, 1.6 mmol) 及び 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 (299 mg, 1.6 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 2.5 時間攪拌した後、反応を水で停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。得られた残渣 (847 mg) を 1,4-ジオキサン溶液 (8 mL) に溶解し、ハンチュエステル (482 mg, 1.9 mmol) 及びトリリス (2-フェニルピリジナト)イリジウム (III) (5.7 mg, 8.7 μmol) を加え、アルゴンバブリングで 30 分間脱気した。反応混合物を室温で攪拌し、32 W コンパクト蛍光灯を照射した。3 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 100/1–10/1) で精製した。得られた中間体 (206 mg) を無水テトラヒドロフラン溶液 (4 mL) に溶解し、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1 M テトラヒドロフラン溶液, 0.88 mL, 0.88 mmol) を加え、反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 20/1–10/1) で精製し、化合物 **14** (80 mg, 化合物 **12** から 3 段階で 32%) を白色固体として得た。

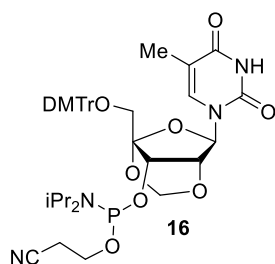
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.03 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.22 (1H, s), 5.32 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 5.01 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.34 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.94 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.75, 3.69 (2H, ABq, $J = 12.0$ Hz), 1.86 (3H, d, $J = 1.0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ : 166.5, 151.9, 136.8, 110.9, 106.7, 87.8, 86.5, 78.7, 66.2, 60.0, 12.6. IR (ATR) ν : 3394, 3218, 3069, 2928, 2823, 1687 cm^{-1} . HRMS (CI): Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 287.0879; found, 287.0877.



化合物 **15**: アルゴン気流下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (160 mg, 0.47 mmol) を化合物 **14** (80 mg, 0.28 mmol) の無水ピリジン溶液 (2 mL) に加えた。反応混合物を室温で 2

時間攪拌した後、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (75 mg, 0.22 mmol) を加え、さらに 1.5 時間攪拌した。続いて、さらに 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (38 mg, 0.11 mmol) を加え、反応混合物を 1 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1–1/2) で精製し、化合物 **15** (161 mg, 98%) を淡黄色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.55 (1H, br s), 7.76 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.43–7.23 (9H, m), 6.86–6.84 (4H, m), 6.22 (1H, s), 5.25 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.99 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.47 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.30 (1H, dd, $J = 12.0$ and 3.0 Hz), 3.79 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.47, 3.49 (2H, ABq, $J = 10.0$ Hz), 2.81 (1H, d, $J = 12.0$ Hz), 1.28 (3H, d, $J = 1.0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.4, 158.8, 158.8, 149.7, 143.8, 134.9, 134.7, 134.1, 130.1, 130.1, 128.1, 128.1, 127.3, 113.4, 111.3, 105.8, 87.3, 86.7, 85.2, 77.4, 66.5, 60.5, 55.2, 11.9. IR (ATR) ν : 3435, 3192, 3069, 3037, 3005, 2951, 2932, 2902, 2836, 1686 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{NaO}_9$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 611.2006; found, 611.2008.



化合物 **16**: アルゴン気流下、2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホアミダイト (0.17 mL, 0.77 mmol) を化合物 **9** (114 mg, 0.19 mmol) 及び *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.40 mL, 2.3 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に 0 °C で加えた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1–1/1) で精製し、化合物 **15** (133 mg, 88%) を白色固体として得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.12 (1H, br s), 7.84 (0.5H, s), 7.82 (0.5H, s), 7.42–7.38 (2H, m), 7.34–7.24 (7H, m), 6.87–6.81 (4H, m), 6.22 (0.5H, s), 6.21 (0.5H, s), 5.28–5.24 (1H, m), 5.02–4.99 (1H, m), 4.65 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.54 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.39–4.30 (1H, m), 3.94–3.35 (12H, m), 2.64–2.60 (1H, m), 2.49–2.31 (1H, m), 1.22–1.05 (15H, m). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.6, 163.5, 159.0, 158.9, 158.9, 158.9, 149.8, 149.7, 143.8, 143.5, 134.8, 134.6,

134.2, 134.1, 130.5, 130.5, 130.3, 130.3, 128.6, 128.4, 128.0, 128.0, 127.5, 127.3, 117.4, 117.4, 113.3, 113.2, 111.2, 111.2, 105.6–105.5 (m), 87.3, 87.2, 86.6, 86.6, 86.0, 76.5 (d, $J = 3.0$ Hz), 75.8 (d, $J = 3.0$ Hz), 67.1 (d, $J = 13.9$ Hz), 66.4 (d, $J = 18.8$ Hz), 60.7, 60.5, 58.5 (d, $J = 17.8$ Hz), 57.9 (d, $J = 18.8$ Hz), 55.3, 55.2, 43.6, 43.5, 43.5, 43.4, 24.6, 24.6, 24.6, 24.6, 24.5, 24.5, 24.5, 24.4, 20.4 (d, $J = 5.9$ Hz), 20.2 (d, $J = 6.0$ Hz), 11.7, 11.6. ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 150.3, 149.6. IR (ATR) ν : 3169, 3064, 3034, 3003, 2966, 2931, 2887, 2837, 1688 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{NaO}_{10}\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 811.3084; found, 811.3083.

X 線結晶構造解析

化合物 **3** はアセトニトリル溶媒から再結晶した。結晶構造のデータを Table 9 に示す。

Table 9. Crystallographic and refinement parameters of compound **3**

	3
Empirical formula	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₇
Formula weight	300.27
Crystal dimensions	0.2 × 0.35 × 0.35 mm
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ (#4)
<i>a</i> / Å	10.7122 (17)
<i>b</i> / Å	10.9090 (16)
<i>c</i> / Å	13.2906 (17)
α / deg	90
β / deg	104.3770 (10)
γ / deg	90
Volume / Å ³	1504.5 (4)
<i>Z</i>	4
Density (calc.) / g / cm ³	1.326
<i>F</i> ₀₀₀	632
Reflections collected	7610
Unique reflections	4754
<i>R</i> _{int}	0.0237
Absorption coefficient / mm ⁻¹	0.110
<i>R</i> ₁ [I > 2.00σ(I)]	0.0466
<i>wR</i> ₂ (All reflections)	0.1472
Goodness-of-fit on F ²	1.027
Largest diff. peak / hole / e Å ⁻³	0.322 / -0.297
CCDC No.	2177499

オリゴヌクレオチドの合成

ホスホロアミダイト体 **5**, **10**, dA^{Bz} ホスホロアミダイト (Glen Research)、dG^{iBu} ホスホロアミダイト (Glen Research)、dC^{Bz} ホスホロアミダイト (Glen Research)、dT ホスホロアミダイト (Glen Research) 及び LNA^T ホスホロアミダイト (コスモ・バイオ)、ENA^T ホスホロアミダイト (神戸天然物化学)、d^{5Me}C^{Ac} ホスホロアミダイト (合成) は無水アセトニトリル溶液に溶解し、0.1 M 溶液とした。ホスホロアミダイト体 **16** はアセトニトリル/ジクロロメタン (3 : 2) 溶液に溶解し、0.1 M 溶液とした。オリゴヌクレオチドは nS-8II DNA 自動合成機 (ジーンデザイン) を用いて、0.25 M 5-(エチルチオ)-1*H*-テトラゾール (ETT) のアセトニトリル溶液を活性化剤として、0.2 μmol スケールで合成した。ON26–ON28 については CUTAG CPG (Merck)、その他のオリゴヌクレオチドについては dT が担持された CPG 固相担体 (Biosearch Technologies) を使用した。ホスホロアミダイト体 **5**, **10**, **16**、LNA^T ホスホロアミダイト、ENA^T ホスホロアミダイトには脱 DMTr 化を 10 秒×2、カップリングを 10 分に設定し、その他のものは標準合成サイクル (トリチルオンモード) に従って合成した。合成後、室温で 1.5 時間、28% アンモニア水溶液で処理することにより CPG 樹脂から切断した。オリゴヌクレオチドの全ての保護基は 55 °C、16 時間、28% アンモニア水溶液で処理することにより脱保護した。得られた残渣を Sep-Pak Plus C18 (Waters) カートリッジにアプライし、1% TFA 溶液を流すことにより 5'-O-DMTr を脱保護した。分離されたオリゴヌクレオチドは逆相 HPLC によりさらに精製した。HPLC は下記の条件にて実施した。得られた新規のオリゴヌクレオチドの ESI-MS データは Table 10 に示す。

ON2–ON5, ON9–ON17, ON19–ON23, ON26, ON27, ON31, ON32, ON38, ON39, ON43–ON47, ON51–ON53:

ODS column = XBridge[®] Oligonucleotides BEH C18 OBD Prep Column (10 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 2 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

ON33, ON34, ON48, ON49:

ODS column = XBridge[®] Oligonucleotides BEH C18 OBD Prep Column (10 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 2 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 92/8 to 82/18 for 30 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

T_m測定

相補鎖 RNA (または DNA) との二重鎖の T_m測定では、最終濃度が 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、200 mM NaCl、2.5 μM オリゴヌクレオチドになるようにサンプルを調製した。サンプルは測定前に 100 °C で加熱してアニールし、その後、室温までゆっくり冷却した。UV 融解曲線は、サンプルを 20 °C から 90 °C まで昇温し、波長 260

nm の吸光度変化を走査速度 0.5 °C/分で記録した。T_m 値は得られた UV 融解曲線を用いて中線法により算出し、3 回の独立した実験の平均値を結果とした。

二重鎖 DNA との三重鎖の T_m 測定では、最終濃度が 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、200 mM KCl、5 mM MgCl₂、1.5 μM オリゴヌクレオチドになるようにサンプルを調製した。サンプルは測定前に 100 °C で加熱してアニールし、その後、室温までゆっくり冷却した。UV 融解曲線は、サンプルを 10 °C から 90 °C まで昇温し、波長 260 nm の吸光度変化を走査速度 0.5 °C/分で記録した。T_m 値は得られた UV 融解曲線を用いて中線法 (ON34, ON39, ON44, ON49 は微分法) により算出し、3 回の独立した実験の平均値を結果とした。

CD 測定

CD 測定では最終濃度が 200 mM NaCl、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、2.5 μM オリゴヌクレオチドになるようにサンプルを調製した。CD スペクトルは 25 °C、340–200 nm で記録した。

ヌクレアーゼ抵抗性評価

最終濃度が 0.01 unit/mL *Crotalus adamanteus* 毒ホスホジエステラーゼ (Worthington Biochemical Corp.)、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂、7.5 μM オリゴヌクレオチドになるようにサンプルを調整し、37 °C で実施した。切断反応は 37 °C で行った。各反応混合物の一部を一定時間間隔で採取し、100 °C で 10 分間加熱して酵素を不活化した。採取したサンプルの一部を逆相 HPLC で分析した。残存する完全なオリゴヌクレオチドの割合を計算し、経過時間に対してプロットした。HPLC 分析は下記の条件にて実施した。

ON22, ON23, ON25, ON26–ON28:

ODS column = XBridge™ Shield RP18 (4.6 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 1 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 95/5 to 87/13 for 30 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

ON24:

ODS column = XBridge™ Shield RP18 (4.6 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 1 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 93/7 to 89/11 for 60 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

Table 10. Sequences of ONs and ESI-MS data [M] of new ONs

ON	Molecular formula	Found	Calcd.
ON1	- ^a		
ON2	C ₁₂₀ H ₁₅₂ N ₄₁ O ₇₆ P ₁₁	3726.00	3725.46
ON3	C ₁₂₂ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3784.00	3783.49
ON4	C ₁₂₂ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3783.60	3783.49
ON5	C ₁₂₆ H ₁₅₈ N ₄₁ O ₈₂ P ₁₁	3899.90	3899.57
ON6	- ^b		
ON7	- ^b		
ON8	- ^b		
ON9	C ₁₂₂ H ₁₅₀ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3779.90	3779.46
ON10	C ₁₂₀ H ₁₅₂ N ₄₁ O ₇₅ P ₁₁	3710.00	3709.46
ON11	C ₁₂₂ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₇₆ P ₁₁	3752.00	3751.50
ON12	C ₁₂₂ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₇₆ P ₁₁	3752.00	3751.50
ON13	C ₁₂₆ H ₁₅₈ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3836.00	3835.57
ON14	C ₁₁₉ H ₁₅₀ N ₄₁ O ₇₆ P ₁₁	3710.50	3711.43
ON15	C ₁₂₀ H ₁₅₀ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3755.50	3755.44
ON16	C ₁₂₀ H ₁₅₀ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3755.50	3755.44
ON17	C ₁₂₂ H ₁₅₀ N ₄₁ O ₈₂ P ₁₁	3842.50	3843.46
ON18	- ^a		
ON19	C ₁₂₁ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₇₆ P ₁₁	3739.90	3739.49
ON20	C ₁₂₃ H ₁₅₆ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3797.90	3797.52
ON21	C ₁₂₃ H ₁₅₆ N ₄₁ O ₇₈ P ₁₁	3797.80	3797.52
ON22	C ₁₀₂ H ₁₃₃ N ₂₀ O ₇₀ P ₉	3038.30	3038.02
ON23	C ₁₀₁ H ₁₃₁ N ₂₀ O ₇₀ P ₉	3023.50	3023.99
ON24	- ^b		
ON25	- ^a		
ON26	C ₉₂ H ₁₂₀ N ₁₈ O ₆₃ P	2734.20	2733.83
ON27	C ₉₁ H ₁₁₈ N ₁₈ O ₆₃ P ₈	2719.50	2719.80
ON28	- ^c		
ON29	- ^a		
ON30	C ₁₄₂ H ₁₈₉ N ₃₂ O ₉₄ P ₁₃	4251.30	4250.86
ON31	C ₁₄₆ H ₁₉₃ N ₃₂ O ₉₈ P ₁₃	4367.30	4366.94
ON32	C ₁₄₆ H ₁₉₃ N ₃₂ O ₉₈ P ₁₃	4367.70	4366.94
ON33	C ₁₅₀ H ₁₉₇ N ₃₂ O ₁₀₂ P ₁₃	4483.40	4483.01

ON34	$C_{150}H_{197}N_{32}O_{102}P_{13}$	4483.60	4483.01
ON35	- ^c		
ON36	- ^c		
ON37	- ^c		
ON38	$C_{145}H_{187}N_{32}O_{97}P_{13}$	4333.60	4332.88
ON39	$C_{145}H_{187}N_{32}O_{97}P_{13}$	4333.50	4332.88
ON40	- ^c		
ON41	- ^c		
ON42	- ^c		
ON43	$C_{150}H_{197}N_{32}O_{97}P_{13}$	4403.60	4403.01
ON44	$C_{150}H_{197}N_{32}O_{97}P_{13}$	4403.70	4403.01
ON45	$C_{141}H_{187}N_{32}O_{94}P_{13}$	4236.50	4236.84
ON46	$C_{143}H_{187}N_{32}O_{98}P_{13}$	4324.50	4324.85
ON47	$C_{143}H_{187}N_{32}O_{98}P_{13}$	4324.50	4324.85
ON48	$C_{145}H_{187}N_{32}O_{102}P_{13}$	4411.50	4412.87
ON49	$C_{145}H_{187}N_{32}O_{102}P_{13}$	4411.50	4412.87
ON50	- ^a		
ON51	$C_{142}H_{190}N_{33}O_{93}P_{13}$	4250.40	4249.88
ON52	$C_{146}H_{194}N_{33}O_{97}P_{13}$	4366.40	4365.95
ON53	$C_{146}H_{194}N_{33}O_{97}P_{13}$	4366.40	4365.95

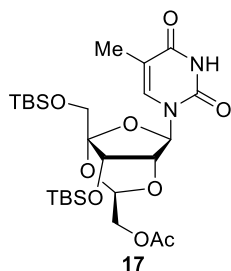
^aPurchased.

^bReported in our previous paper (*J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 13336-13344).

^cReported in our previous paper (*J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 9093-9100).

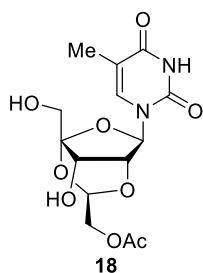
第二章の実験

モノマーの合成



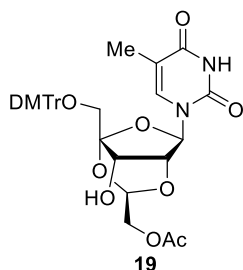
化合物 **17**: アルゴン気流下、無水酢酸 (22 μ L, 0.23 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (2.3 mg, 0.019 mmol) を化合物 **11** (105 mg, 0.19 mmol) の無水ピリジン溶液 (2 mL) 溶液に加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、水で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で精製し、化合物 **17** (109 mg, 96%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.12 (1H, br s), 7.65 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.19 (1H, s), 5.39 (1H, t, $J = 4.5$ Hz), 4.34 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.21 (1H, dd, $J = 12.0$ and 4.0 Hz), 4.15 (1H, dd, $J = 12.0$ and 4.0 Hz), 3.91 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.84, 3.79 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 2.11 (3H, s), 1.95 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 0.96 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.14 (3H, s), 0.11 (3H, s), 0.08 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 170.5, 163.8, 149.9, 134.1, 110.7, 105.9, 92.2, 85.5, 77.2, 64.9, 64.6, 60.7, 26.1, 25.6, 20.8, 18.8, 18.0, 12.6, -4.38, -4.90, -5.43. IR (ATR) ν : 3196, 3067, 2954, 2929, 2886, 2857, 1749, 1697 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 609.2640; found, 609.2640.



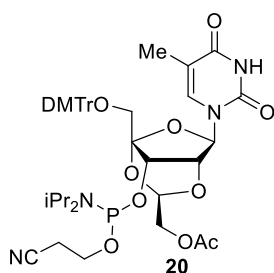
化合物 **18**: アルゴン気流下、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1 M テトラヒドロフラン溶液, 1.4 mL, 1.4 mmol) を化合物 **17** (381 mg, 0.65 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (8 mL) に加え、反応混合物を室温で 1.5 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 20/1) で精製し、化合物 **18** (201 mg, 86%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.01 (1H, s), 6.22 (1H, s), 5.49 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 4.42 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.27–4.21 (2H, m), 3.96 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.76, 3.72 (2H, ABq, $J = 12.0$ Hz), 2.08 (3H, s), 1.86 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ : 172.2, 166.5, 151.9, 136.7, 111.0, 107.1, 93.8, 86.6, 79.0, 65.7, 65.2, 59.9, 20.5, 12.6. IR (ATR) ν : 3428, 3213, 3070, 2959, 2931, 2824, 1740, 1683 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_9$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 381.0910; found, 381.0910.



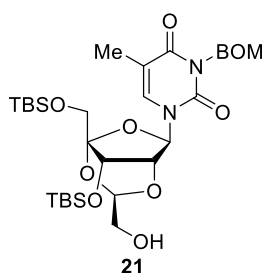
化合物 **19**: アルゴン気流下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (323 mg, 0.95 mmol) を化合物 **18** (201 mg, 0.56 mmol) の無水ピリジン溶液 (5 mL) に加えた。反応混合物を 5 時間攪拌した後、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (152 mg, 0.45 mmol) を加え、さらに 17 時間攪拌した。反応混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1-クロロホルム/メタノール = 5/1) で精製し、化合物 **19** (346 mg, 93%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.85 (1H, br s), 7.75 (1H, s), 7.42–7.23 (9H, m), 6.85 (4H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.21 (1H, s), 5.40 (1H, br), 4.52 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.33 (1H, dd, $J = 12.0$ and 3.0 Hz), 4.23 (1H, dd, $J = 12.0$ and 2.5 Hz), 4.18 (1H, dd, $J = 12.0$ and 2.5 Hz), 3.79 (6H, s), 3.50, 3.41 (2H, ABq, $J = 10.0$ Hz), 2.95 (1H, d, $J = 12.0$ Hz), 2.11 (3H, s), 1.25 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 170.1, 163.5, 158.8, 158.8, 149.8, 143.8, 134.9, 134.6, 134.0, 130.1, 130.1, 128.1, 128.1, 127.3, 113.4, 111.4, 106.0, 92.2, 87.3, 85.3, 77.5, 66.0, 63.4, 60.4, 55.2, 20.7, 11.9. IR (ATR) ν : 3182, 3067, 3036, 3003, 2955, 2907, 1747, 1690 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{NaO}_{11}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 683.2217; found, 683.2213.



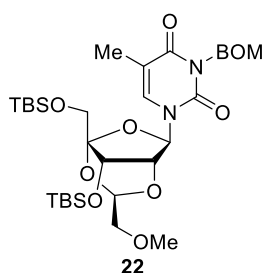
化合物 **20**: アルゴン気流下、2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (0.16 mL, 0.71 mmol) を化合物 **19** (94 mg, 0.14 mmol) 及び *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.37 mL, 2.1 mmol) の無水ジクロロメタン/ピリジン溶液 (1 : 1, 4 mL) に 0 °C で加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) で精製し、化合物 **20** (88 mg, 72%) を白色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.70–8.38 (1H, br), 7.80–7.79 (1H, m), 7.79 (0.4H, d, *J* = 1.0 Hz), 7.42–7.39 (2H, m), 7.33–7.25 (7H, m), 6.87–6.82 (4H, m), 6.21 (0.4H, s), 6.20 (0.6H, s), 5.41–5.37 (1H, m), 4.68–4.66 (1H, m), 4.39–4.34 (1H, m), 4.19–4.05 (2H, m), 3.92–3.46 (11H, m), 3.42–3.38 (1H, m), 2.68–2.56 (1H, m), 2.45–2.35 (1H, m), 2.07 (1.2H, s), 2.07 (1.8H, s), 1.31–1.06 (15H, m). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 170.3, 163.7, 163.5, 158.9, 158.9, 158.8, 150.0, 149.8, 143.7, 143.6, 134.8, 134.6, 134.6, 134.1, 134.0, 130.4, 130.4, 130.3, 128.5, 128.4, 128.0, 127.4, 127.3, 117.4, 113.3, 113.3, 111.2, 111.2, 105.9 (d, *J* = 6.9 Hz), 105.6 (d, *J* = 7.9 Hz), 92.3, 92.2, 87.2, 86.1, 86.0, 75.8 (d, *J* = 2.0 Hz), 66.8 (d, *J* = 12.9 Hz), 66.2 (d, *J* = 16.8 Hz), 64.5, 64.3, 60.5, 60.3, 58.2 (d, *J* = 17.9 Hz), 57.5 (d, *J* = 18.8 Hz), 55.3, 55.2, 43.4, 43.3, 24.6, 24.6, 24.6, 24.5, 24.5, 20.8, 20.7, 20.4 (d, *J* = 7.0 Hz), 20.2 (d, *J* = 6.9 Hz), 11.7, 11.7. ³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃) δ: 150.0, 149.7. IR (ATR) ν: 3168, 3059, 2966, 2932, 2882, 2837, 1746, 1686, 1607 cm⁻¹. HRMS (ESI): Calcd for C₄₄H₅₃N₄NaO₁₂P [M + Na]⁺, 883.3295; found, 883.3296.



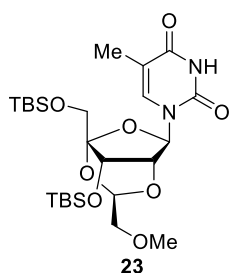
化合物 **21**: アルゴン気流下、ジアザビシクロウンデセン (18 μL, 0.12 mmol) 及びベンジルクロロメチルエーテル (15 μL, 0.11 mmol) を化合物 **11** (51 mg, 0.093 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (2 mL) に 0 °C で加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 3/1) で精製し、化合物 **21** (47 mg, 76%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.59 (1H, s), 7.38–7.25 (5H, m), 6.19 (1H, s), 5.52, 5.47 (2H, ABq, $J = 9.5$ Hz), 5.34 (1H, t, $J = 3.0$ Hz), 4.72 (2H, s), 4.34 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.92 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.84, 3.81 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 3.77–3.69 (2H, m), 2.06 (1H, t, $J = 6.0$ Hz), 1.95 (3H, s), 0.96 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.15 (3H, s), 0.12 (3H, s), 0.10 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.2, 150.6, 137.8, 132.7, 128.3, 127.7, 127.7, 110.2, 105.7, 93.9, 85.9, 77.2, 72.4, 70.4, 65.0, 63.5, 60.7, 26.1, 25.6, 18.8, 18.0, 13.3, -4.5, -4.9, -4.9, -5.5. IR (ATR) ν : 3496, 3070, 2953, 2929, 2885, 2857, 1709, 1666 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 687.3109; found, 687.3108.



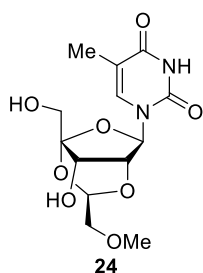
化合物 **22**: アルゴン気流下、化合物 **21** (136 mg, 0.21 mmol) の無水アセトン溶液 (3 mL) に、酸化銀 (I) (371 mg, 1.6 mmol) 及びヨードメチル (13 μL , 2.1 mmol) を加えた。反応混合物を暗所、室温で2日間攪拌した後、セライトで濾過し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 5/1) で精製し、化合物 **22** (134 mg, 97%) を無色油状物質として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.61 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.38–7.26 (5H, m), 6.18 (1H, s), 5.51, 5.47 (2H, ABq, $J = 9.5$ Hz), 5.38 (1H, t, $J = 4.5$ Hz), 4.71 (2H, s), 4.31 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.89 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.86, 3.79 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 3.58–3.52 (2H, m), 3.42 (3H, s), 1.94 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 0.95 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.15 (3H, s), 0.13 (3H, s), 0.10 (3H, s), 0.08 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.3, 150.6, 137.8, 132.9, 128.3, 127.7, 127.7, 110.0, 105.8, 93.3, 85.9, 77.2, 73.4, 72.3, 70.4, 65.0, 60.8, 59.7, 26.1, 25.6, 18.8, 18.0, 13.3, -4.4, -4.9, -4.9, -5.5. IR (ATR) ν : 2953, 2928, 2884, 2857, 1711, 1666 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 701.3266; found, 701.3267.



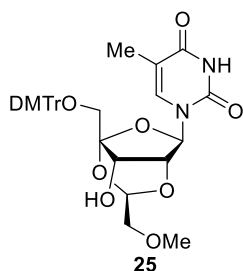
化合物 **23**: 化合物 **22** (380 mg, 0.56 mmol) をメタノール溶液 (14 mL) に溶解し、水酸化パラジウム (380 mg) を加えて、室温で水素気流下、存在させた。反応混合物を 1 時間攪拌した後、セライトで濾過し、溶媒を減圧留去した。次に、メタノール/クロロホルム (2 : 1) 溶液 (15 mL) 中のトリエチルアミン (7.8 μ L, 0.056 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で精製し、化合物 **23** (300 mg, 96%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.80 (1H, br s), 7.66 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.18 (1H, s), 5.37 (1H, t, $J = 4.5$ Hz), 4.32 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.90 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.86, 3.80 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 3.57–3.51 (2H, m), 3.42 (3H, s), 1.94 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 0.95 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.16 (3H, s), 0.13 (3H, s), 0.10 (3H, s), 0.08 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.6, 149.7, 134.2, 110.5, 105.8, 93.2, 85.6, 77.1, 73.4, 64.9, 60.8, 59.7, 26.1, 25.6, 18.8, 18.0, 12.6, -4.4, -4.9, -4.9, -5.5. IR (ATR) ν : 3167, 3034, 2953, 2928, 2885, 2857, 1693 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 581.2690; found, 581.2690.



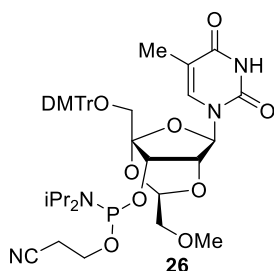
化合物 **24**: アルゴン気流下、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1 M テトラヒドロフラン溶液, 1.3 mL, 1.3 mmol) を化合物 **23** (300 mg, 0.54 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (10 mL) に加え、反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 20/1–10/1) で精製し、化合物 **24** (165 mg, 93%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.01 (1H, s), 6.22 (1H, s), 5.42 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 4.39 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.95 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.75, 3.71 (2H, ABq, $J = 12.0$ Hz), 3.59 (2H, d, $J = 4.0$ Hz), 3.42 (3H, s), 1.87 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ : 166.5, 151.9, 136.7, 110.9, 107.0, 95.0, 86.7, 79.0, 74.0, 65.8, 60.0, 59.9, 12.6. IR (ATR) ν : 3423, 3209, 3067, 2933, 2826, 1686 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_8$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, 329.0985; found, 329.0987.



化合物 **25**: アルゴン気流下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (288 mg, 0.85 mmol) を化合物 **24** (165 mg, 0.50 mmol) の無水ピリジン溶液 (6 mL) に加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、4-ジメチルアミノピリジン (31 mg, 0.25 mmol) を加え、さらに 4 時間攪拌した。続いて、さらに 4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (136 mg, 0.40 mmol) を加え、17 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 3/2–1/3) で精製し、化合物 **25** (316 mg, 定量的) を白色固体として得た。

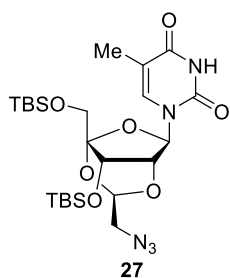
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.28 (1H, br s), 7.77 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.42–7.23 (9H, m), 6.85–6.83 (4H, m), 6.18 (1H, s), 5.31 (1H, t, $J = 2.0$ Hz), 4.51 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.33 (1H, dd, $J = 12.5$ and 3.0 Hz), 3.80 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.57–3.50 (3H, m), 3.44–3.40 (4H, m), 3.32 (1H, d, $J = 12.5$ Hz), 1.23 (3H, d, $J = 1.0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.3, 158.8, 158.8, 149.7, 143.8, 134.9, 134.7, 134.1, 130.2, 130.1, 128.2, 128.1, 127.3, 113.4, 111.2, 105.9, 93.5, 87.3, 85.5, 77.4, 72.2, 65.9, 60.5, 60.1, 55.2, 11.9. IR (ATR) ν : 3479, 3190, 3068, 3037, 3002, 2933, 2836, 1687, 1607 cm^{-1} . HRMS (EI): Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{10}$ [M], 632.2370; found, 632.2373.



化合物 **26**: アルゴン気流下、2-シアノエチル N,N,N',N' -テトライソプロピルホスホロジアミダイト (0.10 mL, 0.33 mmol) を化合物 **25** (51 mg, 0.081 mmol) 及び 5-(エチルチオ)-1*H*-テトラゾール (32 mg, 0.24 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (2 mL) に加えた。反応混合物を室温で 1.5 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 0 °C で加えて反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣を分取薄層クロマトグラフィー

(ヘキサン/酢酸エチル = 1/3, トリエチルアミン 1%) で精製し、化合物 **26** (17 mg, 26%) を白色固体として得た。

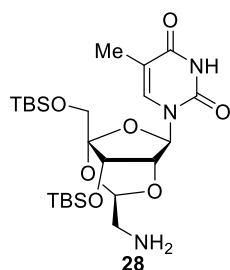
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.55–8.50 (1H, br), 7.82–7.81 (1H, m), 7.41–7.38 (2H, m), 7.32–7.24 (7H, m), 6.86–6.81 (4H, m), 6.22, 6.21 (1H, s \times 2), 6.21 (0.6H, s), 5.40–5.36 (1H, m), 4.66–4.64 (1H, m), 4.38–4.32 (1H, m), 3.91–3.37 (17H, m), 2.65–2.55 (1H, m), 2.46–2.33 (1H, m), 1.26–1.06 (15H, m). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.7, 163.7, 158.9, 158.9, 158.8, 158.8, 149.9, 149.8, 143.8, 143.6, 134.9, 134.7, 134.7, 134.2, 134.1, 130.4, 130.4, 130.4, 130.3, 128.5, 128.4, 128.0, 127.4, 127.3, 117.4, 117.4, 113.3, 113.2, 111.1, 111.1, 105.8 (d, $J = 6.9$ Hz), 105.6 (d, $J = 8.0$ Hz), 93.4, 93.2, 87.2, 86.1, 86.1, 75.8 (d, $J = 3.0$ Hz), 73.3, 73.2, 66.8 (d, $J = 12.9$ Hz), 66.2 (d, $J = 16.9$ Hz), 60.6, 60.4, 59.7, 59.6, 58.3 (d, $J = 17.8$ Hz), 57.6 (d, $J = 19.8$ Hz), 55.3, 55.2, 43.4, 43.3, 24.7, 24.6, 24.6, 24.6, 24.6, 24.5, 20.4 (d, $J = 6.9$ Hz), 20.2 (d, $J = 5.9$ Hz), 11.7, 11.7. ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 149.7, 149.7. IR (ATR) ν : 3171, 3067, 2966, 2930, 2881, 2836, 1687, 1607 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{NaO}_{11}\text{P}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 855.3346; found, 855.3344.



化合物 **27**: アルゴン気流下、ピリジン (38 μL , 0.47 mmol) 及びトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (31 μL , 0.19 mmol) を化合物 **11** (51 mg, 93 μmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に 0 $^{\circ}\text{C}$ で加えた。反応混合物を 0 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した後、水で反応を停止し、クロロホルムで抽出した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。次に、得られた残渣 (65 mg) をアルゴン気流下で無水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (12 mg, 0.19 mmol) を加えた。反応混合物を室温で 20 時間攪拌した後、酢酸エチルで希釈した。有機層を水及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) で精製し、化合物 **27** (化合物 **11** から 2 段階で 40 mg, 75%) を白色固体として得た。

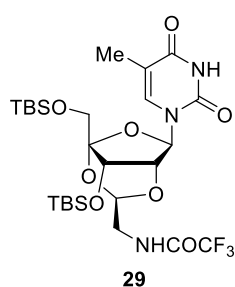
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.71 (1H, br s), 7.64 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.18 (1H, s), 5.34 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 4.36 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.93 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.83, 3.79 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 3.39 (1H, dd, $J = 13.0$ and 4.0 Hz), 3.34 (1H, dd, $J = 13.0$ and 4.0 Hz), 1.95 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 0.96 (9H, s), 0.94 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.14 (3H, s), 0.12 (3H, s), 0.10 (3H, s). ^{13}C NMR (126

MHz, CDCl₃) δ : 163.5, 149.7, 134.0, 110.8, 106.0, 93.4, 85.5, 77.3, 64.8, 60.6, 52.9, 26.1, 25.6, 18.8, 18.0, 12.6, -4.45, -4.92, -5.46. IR (ATR) ν : 3179, 3066, 2954, 2929, 2893, 2884, 2857, 2106, 1697 cm⁻¹. HRMS (ESI): Calcd for C₂₄H₄₃N₅NaO₇Si₂ [M + Na]⁺, 592.2599; found, 592.2595.



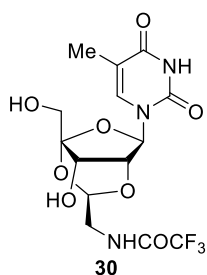
化合物 **28**: 化合物 **27** (298 mg, 0.52 mmol) をテトラヒドロフラン溶液 (6 mL) に溶解し、パラジウム炭素 (300 mg) を加えて、室温で水素気流下、存在させた。反応混合物を 4 時間攪拌した後、セライトで濾過し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 20/1) で精製し、化合物 **28** (209 mg, 73%) を白色固体として得た。

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.65 (1H, s), 6.18 (1H, s), 5.19 (1H, br), 4.32 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 3.90 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 3.82, 3.79 (2H, ABq, *J* = 11.0 Hz), 2.91–2.83 (2H, m), 1.95 (3H, s), 0.97 (9H, s), 0.91 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.15 (3H, s), 0.11 (3H, s), 0.09 (3H, s). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ : 163.7, 149.9, 134.0, 110.6, 105.8, 94.7, 85.5, 77.2, 64.9, 60.8, 45.0, 26.1, 25.6, 18.8, 18.0, 12.5, -4.45, -4.91, -4.98, -5.47. IR (ATR) ν : 3374, 3179, 3067, 2953, 2929, 2886, 2857, 1694 cm⁻¹. HRMS (ESI): Calcd for C₂₄H₄₅N₃NaO₇Si₂ [M + Na]⁺, 566.2694; found, 566.2695.



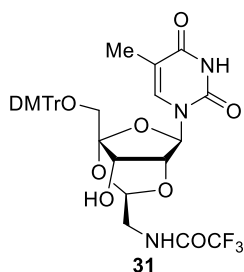
化合物 **29**: アルゴン気流下、トリフルオロ酢酸エチル (80 μ L, 0.66 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (31 mg, 0.26 mmol) を化合物 **28** (278 mg, 0.51 mmol) の無水メタノール溶液 (5 mL) に加えた。反応混合物を室温で 2 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 50/1) で精製し、化合物 **29** (320 mg, 98%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.02 (1H, br s), 7.62 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.75 (1H, br s), 6.20 (1H, s), 5.43 (1H, t, $J = 3.0$ Hz), 4.36 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.95 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.83, 3.78 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 3.63–3.61 (2H, m), 1.95 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 0.97 (9H, s), 0.92 (9H, s), 0.18 (3H, s), 0.15 (3H, s), 0.13 (3H, s), 0.11 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.5, 157.4 (q, $J = 37.7$ Hz), 149.8, 133.7, 115.7 (q, $J = 287.4$ Hz), 111.0, 105.8, 91.5, 85.3, 77.5, 65.1, 60.5, 42.7, 26.1, 25.7, 18.9, 18.2, 12.5, -4.79, -4.86, -5.48. ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ : -78.6. IR (ATR) ν : 3417, 3268, 3070, 2954, 2931, 2896, 2887, 2859, 1691 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{26}\text{F}_3\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8\text{Si}_2$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, 638.2541; found, 638.2543.



化合物 **30**: アルゴン気流下、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1 M テトラヒドロフラン溶液, 98 μL , 98 μmol) を化合物 **29** (29 mg, 45 μmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (1 mL) に加え、反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 20/1–10/1) で精製し、化合物 **30** (18 mg, > 99%) を白色固体として得た。

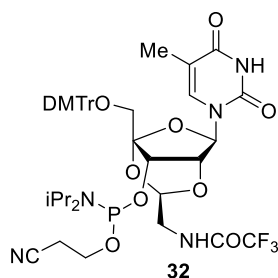
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.00 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.20 (1H, s), 5.47 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 4.42 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.99 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.76, 3.72 (2H, ABq, $J = 12.0$ Hz), 3.58 (2H, d, $J = 4.0$ Hz), 1.86 (3H, d, $J = 1.0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ : 166.5, 159.3 (q, $J = 37.6$ Hz), 151.9, 136.7, 117.5 (q, $J = 286.3$ Hz), 111.0, 107.1, 93.6, 86.7, 79.1, 65.4, 60.0, 43.7, 12.6. ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ : -76.9. IR (ATR) ν : 3414, 3276, 3078, 2934, 2822, 1689, 1566, 1472 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{14}\text{F}_3\text{H}_{16}\text{N}_3\text{NaO}_8$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 434.0787; found, 434.0785.



化合物 **31**: アルゴン気流下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (142 mg, 0.42 mmol) を化合物 **30** (101 mg, 0.25 mmol) の無水ピリジン溶液 (2 mL) に加えた。反応混合物を室温で 4 時間攪拌した後、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (83 mg, 0.25 mmol) を加え、さら

に1時間攪拌した。続いて、さらに4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (33 mg, 98 μmol) を加え、反応混合物を1時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=1/1-1/2) で精製し、化合物 **31** (167 mg, 95%) を白色固体として得た。

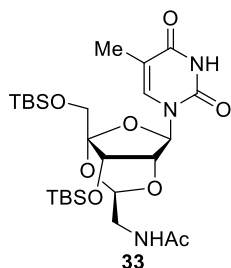
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.94 (1H, br s), 7.69 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 7.41–7.23 (9H, m), 6.87–6.83 (4H, m), 6.16 (1H, s), 5.38 (1H, t, $J = 3.5$ Hz), 4.52 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.24 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz and 3.0 Hz), 3.79 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.64–3.54 (2H, m), 3.49 (2H, s), 2.90 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 1.31 (3H, d, $J = 1.0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.6, 158.9, 158.9, 157.6 (q, $J = 37.7$ Hz), 149.9, 143.8, 134.8, 134.7, 134.0, 130.1, 130.1, 128.2, 128.0, 127.4, 115.7 (q, $J = 287.4$ Hz), 113.5, 111.5, 105.9, 92.1, 87.5, 85.5, 77.5, 65.6, 60.6, 55.3, 42.4, 11.9. ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ : -78.9. IR (ATR) ν : 3288, 3067, 3036, 3007, 2952, 2937, 2910, 2838, 1689 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{35}\text{F}_3\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{10}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, 712.2118; found, 712.2115.



化合物 **32**: アルゴン気流下、2-シアノエチル *N,N*-ジイソプロピルクロロホスホロアミダイト (0.16 mL, 0.73 mmol) を化合物 **31** (104 mg, 0.15 mmol) 及び *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.38 mL, 2.2 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (2 mL) に 0 $^{\circ}\text{C}$ で加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 2/1-1/1) で精製し、化合物 **32** (120 mg, 91%) を白色固体として得た。

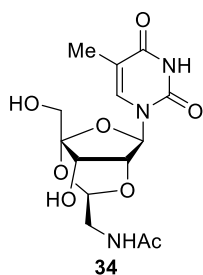
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.52 (1H, br s), 7.81–7.79 (1H, m), 7.39–7.21 (9H, m), 6.89–6.81 (5H, m), 6.24, 6.21 (1H, s \times 2), 6.21 (0.5H, s), 5.46 (0.5H, t, $J = 3.0$ Hz), 5.38 (0.5H, t, $J = 4.0$ Hz), 4.69 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.51 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.43–4.36 (1H, m), 3.82–3.18 (14H, m), 2.62–2.26 (2H, m), 1.22–1.01 (15H, m). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 163.8, 163.7, 159.1, 159.0, 158.9, 158.9, 157.8-156.9 (m), 150.0, 149.9, 143.5, 143.1, 134.6, 134.6, 134.2, 134.2, 133.8, 133.8, 130.6, 130.3, 128.8, 128.4, 128.0, 128.0, 127.7, 127.4, 117.4, 117.2, 115.7 (q, $J =$

287.3), 113.3, 113.2, 113.2, 113.1, 111.5, 111.5, 105.8 (d, $J = 8.9$ Hz), 105.7 (d, $J = 6.9$ Hz), 91.7, 91.6, 87.5, 87.4, 86.0, 85.8, 76.9 (d, $J = 2.9$ Hz), 76.4 (d, $J = 2.0$ Hz), 67.0 (d, $J = 17.8$ Hz), 65.4 (d, $J = 22.8$), 60.4, 60.1, 58.8 (d, $J = 19.9$ Hz), 57.8 (d, $J = 19.8$ Hz), 55.3, 55.2, 43.4, 43.3, 42.6, 42.5, 24.7, 24.6, 24.5, 24.5, 24.5, 24.4, 20.3 (d, $J = 7.9$ Hz), 20.0 (d, $J = 8.0$ Hz), 11.6, 11.3. ^{19}F NMR (470 MHz, CDCl_3) δ : -78.7, -78.8. ^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 151.7, 150.1. IR (ATR) ν : 3253, 3065, 2968, 2933, 2883, 2838, 1690 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{44}\text{F}_3\text{H}_{51}\text{N}_5\text{NaO}_{11}\text{P}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 936.3172; found, 936.3174.



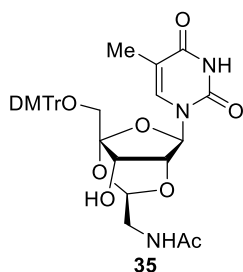
化合物 **33**: 無水酢酸 (45 μL , 0.48 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (5 mg, 40 μmol) を化合物 **28** (217 mg, 0.40 mmol) の無水ピリジン溶液 (4 mL) に加えた。反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水および食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 1/3) で精製し、化合物 **33** (227 mg, 97%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.26 (1H, br s), 7.63 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.17 (1H, s), 5.94 (1H, t, $J = 5.0$ Hz), 5.33 (1H, t, $J = 3.5$ Hz), 4.34 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.92 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.82, 3.78 (2H, ABq, $J = 11.0$ Hz), 3.59 (1H, ddd, 3.5, 5.0 and 14 Hz), 3.47–3.42 (1H, m), 2.01 (3H, s), 1.95 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 0.96 (9H, s), 0.93 (9H, s), 0.17 (3H, s), 0.15 (3H, s), 0.13 (3H, s), 0.11 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 170.3, 163.7, 149.9, 133.9, 110.8, 105.8, 92.4, 85.4, 77.3, 65.0, 60.6, 42.5, 26.1, 25.7, 23.2, 18.8, 18.1, 12.5, -4.54, -4.82, -4.90, -5.46. IR (ATR) ν : 3307, 3201, 3067, 2953, 2929, 2886, 2857, 1691 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{NaO}_8\text{Si}_2$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 608.2799, found 608.2804.



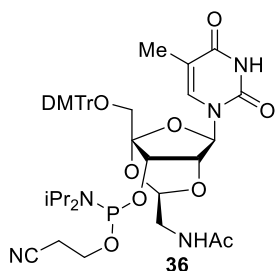
化合物 **34**: アルゴン気流下、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1 M テトラヒドロフラン溶液, 0.81 mL, 0.81 mmol) を化合物 **33** (217 mg, 0.37 mmol) の無水テトラヒドロフラン溶液 (4 mL) に加え、反応混合物を室温で 1 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 10/1–5/1) で精製し、化合物 **34** (134 mg, 定量的) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 8.00 (1H, d, $J = 1.0$ Hz), 6.19 (1H, s), 5.35 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 4.40 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.95 (1H, d, $J = 3.0$ Hz), 3.76, 3.71 (2H, ABq, $J = 12.0$ Hz), 3.47 (1H, d, $J = 4.0$ Hz), 1.97 (3H, s), 1.86 (3H, d, $J = 1.0$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ : 173.7, 166.7, 152.0, 136.7, 110.9, 107.1, 94.3, 86.7, 79.1, 65.6, 60.0, 43.2, 22.5, 12.6. IR (ATR) ν : 3328, 3075, 2934, 2822, 1692, 1659, 1556 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{NaO}_8$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 380.1070, found 380.1068.



化合物 **35**: アルゴン気流下、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド (193 mg, 0.57 mmol) を化合物 **34** (120 mg, 0.34 mmol) の無水ピリジン溶液 (2 mL) に加えた。反応混合物を室温で 5 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 50/1–30/1) で精製し、化合物 **35** (218 mg, 96%) を白色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.35 (1H, br s), 7.75 (1H, s), 7.41–7.21 (9H, m), 6.85–6.82 (4H, m), 6.33 (1H, br s), 6.14 (1H, s), 5.26 (1H, t, $J = 4.0$ Hz), 4.52 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 4.29 (1H, dd, $J = 9.0$ and 2.5 Hz), 3.78 (3H, s), 3.77 (3H, s), 3.60–3.55 (1H, m), 3.47–3.36 (4H, m), 1.97 (3H, s), 1.25 (3H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 170.9, 163.9, 158.8, 158.8, 150.1, 143.8, 134.9, 134.7, 134.2, 130.1, 130.1, 128.1, 128.1, 127.3, 113.4, 111.3, 106.1, 93.0, 87.3, 85.5, 77.5, 65.7, 60.5, 55.2, 41.9, 23.1, 11.9. IR (ATR) ν : 3329, 3207, 3069, 3036, 3004, 2951, 2934, 2836, 1689 cm^{-1} . HRMS (ESI): Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{NaO}_{10}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 682.2377, found 682.2377.



化合物 **36**: アルゴン気流下、2-シアノエチル *N,N,N',N'*-テトライソプロピルホスホロジ
 アミダイト (78 μ L, 0.25 mmol) を化合物 **35** (54 mg, 82 μ mol) 及び 5-(エチルチオ)-1*H*-テ
 トラゾール (16 mg, 0.12 mmol) の無水アセトニトリル溶液 (1 mL) に加えた。反応混合物
 を室温で 3 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 0 $^{\circ}$ C で加えて反応を停
 止させ、酢酸エチルで希釈した。有機層を水および塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウ
 ムで乾燥させ、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグ
 ラフィー (クロロホルム/メタノール = 50/1–30/1) で精製し、化合物 **36** (58 mg, 82%) を白
 色固体として得た。

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 8.62 (1H, br s), 7.81 (1H, br s), 7.40–7.21 (9H, m), 6.88–6.81
 (4H, m), 6.21 (0.5H, s), 6.19 (0.5H, s), 6.03–5.98 (1H, m), 5.34 (0.5H, t, $J = 4.0$ Hz), 5.29 (0.5H,
 t, $J = 3.0$ Hz), 4.64 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.55 (0.5H, d, $J = 3.0$ Hz), 4.41–4.32 (1H, m), 3.88–
 3.33 (14H, m), 2.64–2.59 (1H, m), 2.36–2.32 (1H, m), 1.98 (3H, s), 1.28–1.02 (15H, m). ^{13}C
 NMR (126 MHz, CDCl_3) δ : 170.2, 163.6, 163.5, 159.0, 159.0, 158.9, 158.9, 149.9, 149.8, 143.6,
 143.3, 134.7, 134.7, 134.4, 134.4, 134.0, 130.6, 130.5, 130.4, 130.4, 128.7, 128.4, 128.0, 128.0,
 127.6, 127.4, 117.4, 117.3, 113.3, 113.2, 111.3, 105.7 (d, $J = 2.0$ Hz), 105.7 (d, $J = 4.0$ Hz), 92.6,
 87.4, 87.3, 86.0, 86.0, 76.9 (d, $J = 3.0$ Hz), 76.1 (d, $J = 2.0$ Hz), 67.0 (d, $J = 15.8$ Hz), 65.9 (d, J
 = 20.8 Hz), 60.5, 60.3, 58.6 (d, $J = 19.8$ Hz), 57.9 (d, $J = 19.8$ Hz), 55.3, 55.2, 43.6–43.4 (m),
 42.4, 42.3, 24.7–24.5 (m), 23.1, 23.1, 20.4 (d, $J = 6.9$ Hz), 20.2 (d, $J = 6.9$ Hz), 11.6, 11.5. ^{31}P
 NMR (202 MHz, CDCl_3) δ : 150.8, 150.3. IR (ATR) ν : 3383, 3187, 3065, 2967, 2932, 2838, 1692
 cm^{-1} . HRMS (FAB): Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 860.3636, found 860.3638.

オリゴヌクレオチドの合成

ホスホロアミダイト体 **20** はアセトニトリル/ジクロロメタン (1 : 1) 溶液、ホスホロアミダイト体 **26**, **36** はアセトニトリル/ジクロロメタン (2 : 3) 溶液、ホスホロアミダイト体 **32** はアセトニトリル溶液にそれぞれ溶解し、0.1 M 溶液とした。ホスホロアミダイト体 **20**, **26**, **32**, **36** は脱 DMTr 化を 10 秒×2、カップリングを 10 分に設定し、その他のものは標準合成サイクル (トリチルオンモード) に従って合成した。その他の実験方法に関しては、第一章と同様の方法により合成した。HPLC は下記の条件にて実施した。得られた新規のオリゴヌクレオチドの ESI-MS データは Table 11 に示す。

ON54–ON81:

ODS column = XBridge[®] Oligonucleotides BEH C18 OBD Prep Column (10 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 2 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 95/5 to 85/15 for 30 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

T_m測定

第一章と同様の方法により測定した。

CD測定

第一章と同様の方法により測定した。

ヌクレアーゼ抵抗性評価

第一章と同様の方法により評価した。HPLC 分析は下記の条件にて実施した。

ON23, ON25, ON68:

ODS column = XBridge[®] Oligonucleotides BEH C18 (4.6 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 1 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 95/5 to 87/13 for 30 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

ON67:

ODS column = XBridge[®] Oligonucleotides BEH C18 (4.6 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 1 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 93/7 to 89/11 for 60 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

ON69:

ODS column = XBridge[®] Oligonucleotides BEH C18 (4.6 × 50 mm) at 40 °C, flow rate = 1 mL/min, I = 254 nm, eluents a/b = 93/7 to 90/10 for 60 min; a = 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7), b = MeCN.

Table 11. Sequences of ONs and ESI-MS data [M] of new ONs

ON	Molecular formula	Found	Calcd.
ON54	C ₁₂₀ H ₁₅₂ N ₄₁ O ₇₇ P ₁₁	3741.80	3741.46
ON55	C ₁₂₂ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₈₀ P ₁₁	3816.00	3815.49
ON56	C ₁₂₂ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₈₀ P ₁₁	3815.90	3815.49
ON57	C ₁₂₁ H ₁₅₄ N ₄₁ O ₇₇ P ₁₁	3756.10	3755.48
ON58	C ₁₂₄ H ₁₅₈ N ₄₁ O ₈₀ P ₁₁	3843.90	3843.55
ON59	C ₁₂₄ H ₁₅₈ N ₄₁ O ₈₀ P ₁₁	3843.80	3843.55
ON60	C ₁₂₀ H ₁₅₃ N ₄₂ O ₇₆ P ₁₁	3739.50	3740.47
ON61	C ₁₂₂ H ₁₅₆ N ₄₃ O ₇₈ P ₁₁	3813.00	3813.52
ON62	C ₁₂₂ H ₁₅₆ N ₄₃ O ₇₈ P ₁₁	3813.50	3813.52
ON63	C ₁₂₂ H ₁₅₅ N ₄₂ O ₇₇ P ₁₁	3781.50	3782.51
ON64	C ₁₂₆ H ₁₆₀ N ₄₃ O ₈₀ P ₁₁	3896.50	3897.60
ON65	C ₁₂₆ H ₁₆₀ N ₄₃ O ₈₀ P ₁₁	3896.50	3897.60
ON66	C ₁₀₂ H ₁₃₃ N ₂₀ O ₇₁ P ₉	3054.20	3054.02
ON67	C ₁₀₃ H ₁₃₅ N ₂₀ O ₇₁ P ₉	3068.20	3068.04
ON68	C ₁₀₂ H ₁₃₄ N ₂₁ O ₇₀ P ₉	3052.50	3053.04
ON69	C ₁₀₄ H ₁₃₆ N ₂₁ O ₇₁ P ₉	3094.50	3095.07
ON70	C ₁₄₂ H ₁₈₉ N ₃₂ O ₉₅ P ₁₃	4267.40	4266.86
ON71	C ₁₄₆ H ₁₉₃ N ₃₂ O ₁₀₁ P ₁₃	4415.20	4414.93
ON72	C ₁₄₆ H ₁₉₃ N ₃₂ O ₁₀₁ P ₁₃	4415.40	4414.93
ON73	C ₁₄₃ H ₁₉₁ N ₃₂ O ₉₅ P ₁₃	4281.40	4280.89
ON74	C ₁₄₉ H ₁₉₉ N ₃₂ O ₁₀₁ P ₁₃	4457.50	4457.01
ON75	C ₁₄₉ H ₁₉₉ N ₃₂ O ₁₀₁ P ₁₃	4457.50	4457.01
ON76	C ₁₄₂ H ₁₉₀ N ₃₃ O ₉₄ P ₁₃	4265.00	4265.88
ON77	C ₁₄₆ H ₁₉₆ N ₃₅ O ₉₈ P ₁₃	4412.00	4411.98
ON78	C ₁₄₆ H ₁₉₆ N ₃₅ O ₉₈ P ₁₃	4411.00	4411.98
ON79	C ₁₄₄ H ₁₉₂ N ₃₃ O ₉₅ P ₁₃	4307.50	4307.92
ON80	C ₁₅₂ H ₂₀₂ N ₃₅ O ₁₀₁ P ₁₃	4538.00	4538.09
ON81	C ₁₅₂ H ₂₀₂ N ₃₅ O ₁₀₁ P ₁₃	4538.00	4538.09

発表論文

主論文

- Synthesis and characterization of oligonucleotides containing 2'-O,4'-C-methyleneoxy-bridged 5-methyluridine with an unsubstituted bridge
Misa Shoji, Yasufumi Fuchi, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
Tetrahedron **2024**, *163*, 134140.
- Synthesis and properties of oligonucleotides containing 2'-O,4'-C-methyleneoxy-bridged pyrimidine derivatives
Misa Shoji, Yasufumi Fuchi, Takashi Osawa, Han Kim, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
J. Org. Chem. **2022**, *87*, 11743-11750.

参考論文

- Synthesis of purine derivatives of Me-TaNA and properties of Me-TaNA-modified oligonucleotides
Yasufumi Fuchi, Kouki Watanabe, Misa Shoji, Yuta Ito, Yoshiyuki Hari
Org. Biomol. Chem. **2023**, *21*, 5203-5213.
- Synthesis of 2'-C,4'-C-methyleneoxy-bridged thymidine derivatives and properties of modified oligonucleotides
Takashi Osawa, Han Kim, Misa Shoji, Miku Saijo, Masakazu Dohi, Yuta Ito, Satoshi Obika, Yoshiyuki Hari
J. Org. Chem. **2019**, *84*, 13336-13344.

参考文献

1. Review: Kulkarni, J. A.; Witzigmann, D.; Thomson, S. B.; Chen, S.; Leavitt, B. R.; Cullis, P. R.; van der Meel, R. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 630–643.
2. Review: Khvorova, A.; Watts, J.K. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 238–248.
3. Review: Prakash, T. P. *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 1616–1641.
4. Review: Wan, W. B.; Seth, P. P. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645–9667.
5. Review: Crooke, S. T.; Baker, B. F.; Crooke, R. M.; Liang, X. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2021**, *20*, 427–453.
6. Review: Egli, M.; Manoharan, M. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 2529–2573.
7. (a) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, K.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735–8738; (b) Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **1998**, 455–456; (c) 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; (d) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.; Morio, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401–5404.
8. Review: Hagedorn, P. H.; Persson, R.; Funder, E. D.; Albæk, N.; Diemer, S. L.; Hansen, D. J.; Møller, M. R.; Papargyri, N.; Christiansen, H.; Hansen, B. R.; Hansen, H. F.; Jensen, M. A.; Koch, T. *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 101–114
9. (a) Morita, K.; Hasegawa, C.; Kaneko, M.; Tsutsumi, S.; Sone, J.; Ishikawa, T.; Imanishi, T.; Koizumi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 73–76; (b) Morita, K.; Takagi, M.; Hasegawa, C.; Kaneko, M.; Tsutsumi, S.; Sone, J.; Ishikawa, T.; Imanishi, T.; Koizumi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *11*, 2211–2226.
10. (a) Seth, P. P.; Siwkowski, A.; Allerson, C. R.; Vasquez, G.; Lee, S.; Prakash, T. P.; Wancewicz, E. V.; Witchell, D.; Swayze, E. E. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 10–13; (b) Seth, P. P.; Vasquez, G.; Allerson, C. A.; Berdeja, A.; Gaus, H.; Kinberger, G. A.; Prakash, T. P.; Migawa, M. T.; Bhat, B.; Swayze, E. E. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1569–1581.
11. Review: Moai, Y.; Kodama, T. *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151708.
12. Review: Kaur, H.; Babu, B. R.; Maiti, S. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4672–4697.
13. Xu, J.; Liu, Y.; Dupouy, C.; Chattopadhyaya, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6534–6554.
14. a) Ito, Y.; Tsutsui, N.; Osawa, T.; Hari, Y. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 9093–9100. b) Ito, Y.; Nishida, K.; Tsutsui, N.; Fuchi, Y.; Hari, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 4993–5002.
15. Rahman, S. M. A.; Seki, S.; Obika, S.; Yoshikawa, H.; Miyashita, K.; Imanishi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4886–4896.

16. Review: Hari, Y. *Heterocycles* **2020**, *100*, 681–717.
17. Hari, Y.; Morikawa, T.; Osawa, T.; Obika, S. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3702–3705.
18. Osawa, T.; Obika, S.; Hari, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9481–9484.
19. Osawa, T.; Sawamura, M.; Wada, F.; Yamamoto, T.; Obika, S.; Hari, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3955–3963.
20. Osawa, T.; Kim, H.; Shoji, M.; Saijo, M.; Dohi, M.; Ito, Y.; Obika, S.; Hari, Y. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 13336–13344.
21. Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205–8212.
22. Neidle, S. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Elsevier: U.K., 2008.
23. Okada, K.; Okamoto, K.; Oda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8736–8738.
24. Okada, K.; Okubo, K.; Morita, N.; Oda, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7377–7380.
25. Gray, D.M.; Hung, S.H.; Johnson, K.H. *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 19–34.
26. Obika, S.; Hari, Y.; Sugimoto, T.; Sekiguchi, M.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8923–8927.
27. Torigoe, H.; Hari, Y.; Sekiguchi, M.; Obika, S.; Imanishi, T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2354–2360.
28. Obika, S.; Uneda, T.; Sugimoto, T.; Nanbu, D.; Minami, T.; Doi, T.; Imanishi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1001–1011.
29. Højland, T.; Kumar, S.; Babu, B. R.; Umemoto, T.; Albæk, N.; Sharma, P. K.; Nielsen, P.; Wengel, J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2375–2379.
30. Review: Astakhova, I. K.; Wengel, J. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1768–1777.
31. Lou, C.; Vester, B.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4024–4027.
32. Ries, A.; Kumar, R.; Lou, C.; Kosbar, T.; Vengut-Climent, E.; Jørgensen, P. T.; Morales, J. C.; Wengel, J. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10845–10856.
33. Lou, C.; Samuelsen, S. V.; Christensen, N. J.; Vester, B.; Wengel, J. *Bioconj. Chem.* **2017**, *28*, 1214–1220.
34. Hvam, M. L.; Cai, Y.; Dagnæs-Hansen, F.; Nielsen, J. S.; Wengel, J.; Kjems, J.; Howard, K. A. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1710–1717.
35. Kumar, R.; Ries, A.; Wengel, J. *Molecules* **2017**, *22*, 852.
36. Ejlersen, M.; Christensen, N. J.; Sørensen, K. K.; Jensen, K. J.; Wengel, J.; Lou, C. *Bioconj. Chem.* **2018**, *29*, 1025–1029.
37. Osawa, T.; Yamashita, S.; Nakanishi, A.; Ito, Y.; Hari, Y. *Heterocycles* **2019**, *99*, 502–520.
38. Johannsen, M. W.; Crispino, L.; Wamberg, M. C.; Kalra, N.; Wengel, J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 243–252.

39. Jørgensen, A. S.; Gupta, P.; Wengel, J.; Astakhova, I. K. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10751–10753.
40. Astakhova, I. K.; Hansen, L. H.; Vester, B.; Wengel, J. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4240–4249.
41. Yamashita, S.; Nishida, K.; Osawa, T.; Nakanishi, A.; Ito, Y.; Hari, Y. *Molecules* **2020**, *25*, 346.