

博士論文

H-ボラノホスホネート法による
ボラン修飾型アンチセンス核酸の合成

植原 渉

はじめに

本論文は、2009年4月から2014年6月にかけて、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 医用機能分子工学分野 和田研究室にて行った研究をまとめたものである。

目次

第一章 序論	1
第一節 核酸医薬	1
第二節 アンチセンス法	3
第三節 RNase H	5
第四節 ボラン修飾型核酸	7
1-4-1. 化学修飾核酸の種類	7
1-4-2. ボラノホスフェート DNA	7
> 性質	8
> 合成手法	12
1-4-3. ボラノホスホロチオエート DNA	20
第五節 2'- <i>O</i> -修飾型核酸	21
1-5-1. 2'- <i>O</i> -修飾型核酸の二重鎖形成能	21
1-5-2. 2'- <i>O</i> -Me	21
1-5-3. 2'- <i>O</i> -MOE	23
第六節 Locked Nucleic Acid (LNA)	24
第七節 <i>H</i> -ボラノホスホネート法によるボラン修飾型 ODN の合成	25
1-7-1. <i>H</i> -ボラノホスホネート法の概略	25
1-7-2. 研究目的	25
第二章 液相法によるボラン修飾型 ODN 二量体の合成	27
第一節 <i>H</i> -ボラノホスホネートモノマーユニットの合成	27
第二節 T _{PBH} T の合成	29
第三節 <i>H</i> -ボラノホスホネートジエステル体の DMTr ⁺ 存在下での安定性	32
第四節 T _{PBO} T の合成 (酸化反応)	36
第五節 T _{PBS} T の合成 (硫化反応)	38
第三章 固相法によるボラン修飾型 ODN の合成	39
第一節 チミジン誘導体の固相担体への導入	39
第二節 二量体の合成	41
3-2-1. <i>PBS</i> -ODN 二量体の合成	41
> T _{PBS} T の合成	41
> dA _{PBS} T, dC _{PBS} T, dG _{PBS} T の合成	47
3-2-2. <i>PBO</i> -ODN 二量体の合成	49
3-2-3. <i>PBN</i> -ODN 二量体の合成	51

> 2-(<i>N,N</i> -ジメチルアミノ)エチルアミノ基を有する <i>PBN</i> -ODN 二量体の合成	51
> 2-モルフォリノエチルアミノ基を有する <i>PBN</i> -ODN 二量体の合成	54
第三節 <i>PBO</i> , <i>PBS</i> -ODN 四量体の合成	58
第四節 <i>PBO</i> , <i>PBS</i> , <i>PBN</i> -ODN 十二量体の合成	61
第五節 ^{LNA} <i>PBO</i> -ODN の合成	65
3-5-1. LNA チミジン <i>H</i> -ボラノホスホネートモノマーユニットの合成	65
3-5-2. T ^L _{PBO} T ^L の合成	66
3-5-3. ^{LNA} <i>PBO</i> -ODN 十二量体の合成	69
第四章 二重鎖融解温度	73
第一節 チミジル酸十二量体の T_m 値	73
4-1-1. T(_{PO} T) ₁₁ , T(_{PBO} T) ₁₁ , T(_{PBS} T) ₁₁ の比較	73
4-1-2. T(_{PO} T) ₁₁ , T(_{PBO} T) ₁₁ , T(_{PBN} T) ₁₁ の比較	74
第二節 四種類全ての核酸塩基を有する十二量体の T_m 値	79
4-2-1. 2'-デオキシ十二量体 (natural, <i>PS</i> , <i>PBO</i> , <i>PBS</i> -ODN) の比較	79
4-2-2. LNA チミジンを有する十二量体の T_m 値	83
> ^{LNA} <i>PO</i> , ^{LNA} <i>PS</i> , ^{LNA} <i>PBO</i> -ODN の比較	83
> 三種類の <i>PBO</i> -ODN の比較	86
総括	88
実験項	90
参考文献	102
謝辞	106

略語表

A = Adenin-9-yl

A^{bz} = N⁶-Benzoyladenin-9-yl

Ac = Acetyl

Ac₂O = Acetic anhydride

Bop-Cl = Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride

Bz = Benzoyl

C = Cytosin-1-yl

C^{ibu} = N⁴-Isobutyrylcytosin-1-yl

CE = Cyanoethyl

CPG = Controlled-pore glass

DCA = Dichloroacetic acid

DIPEA = N,N-Diisopropylethylamine

DMAN = 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene

DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl

DTD = N,N'-Dimethylthiuram disulfide

G = Guanin-9-yl

G^{ce, ibu} = O⁶-Cyanoethyl-N²-isobutyrylguanin-9-yl

ⁱBu = Isobutyryl

LNA = Locked nucleic acid

^{LNA}PBO = LNA modified boranophosphate

^{LNA}PO = LNA modified phosphate

^{LNA}PS = LNA modified phosphorothioate

Me = Methyl

MNTP = 1,3-Dimethyl-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate

NT = 3-Nitro-1,2,4-triazole

ODN = Oligodeoxyribonucleotide

ORN = Oligoribonucleotide

Pac = Phenoxyacetyl

PBH = H-Boranophosphonate

PBN = Boranophosphoroamidate

PBO = Boranophosphate

PBS = Boranophosphorothioate

PO = Phosphate

PS = Phosphorothioate

PyNTP = 3-Nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium
hexafluorophosphate

T = Thymin-1-yl

T^{bz} = *N*³-Benzoylthymin-1-yl

T^L = LNA thymidine

TEA = Triethylamine

TEAA = Triethylammonium acetate

TEAB = Triethylammonium bicarbonate

TMS = Trimethylsilyl

第一章 序論

第一節 核酸医薬

近年、ゲノム解析技術の発展に伴い、遺伝情報に基づく核酸医薬の研究開発が盛んに行われている。核酸医薬の作用機序は、疾病原因遺伝子から mRNA への転写過程を阻害するアンチジーン DNA やデコイ核酸、タンパク質への翻訳過程を阻害するアンチセンス DNA、siRNA 及び miRNA、そしてタンパク質の機能を制御するアプタマーに大別される¹。このように、核酸医薬は疾病関連遺伝子やその代謝物に直接作用し、その働きを制御するため、癌や遺伝子疾患、自己免疫疾患など、従来の低分子医薬では治療が困難だった疾病に対して有効であることが期待されている。これまでに、米国食品医薬局 (FDA) に承認された核酸医薬を以下にまとめる。

■ Vitravene[®] (Fomivirsen)^{2,3} <アンチセンス核酸> / FDA 承認: 1998 年 8 月

・化学修飾: ホスホロチオエート DNA 21 量体 (5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT CTT GCG-3')

・標的疾患は、サイトメガロウイルス性網膜炎。眼球の硝子体に直接注射されることで薬効が発現する。しかし、承認後の臨床試験 (Phase IV) が順調に進まず現在は販売中止となっている。

■ Macugen[®] (Pegaptanib Sodium)⁴ <アプタマー> / FDA 承認: 2004 年 12 月

・化学修飾: 2'-OH / 2'-デオキシ / 2'-O-メチル (2'-O-Me) / 2'-F / ホスフェートジエステルキメラオリゴマー 28 量体, 3'-3'-T 修飾, 5'-PEG 修飾

・標的疾患は、加齢性黄斑変性症。血管内皮増殖因子の阻害剤である。Vitravene[®] 同様、眼球の硝子体に直接注射されることで薬効が発現する。

■ Kynamro[®] (Mipomersen)^{2,5} <アンチセンス核酸> / FDA 承認: 2013 年 1 月

・化学修飾: 20 量体 2'-デオキシ / 2'-O-メトキシエチル (2'-O-MOE) / ホスホロチオエートキメラオリゴマー (5'-G^{MOE}C^{MOE}C^{MOE} U^{MOE}C^{MOE}A GTC TG^{mC} TT^{mC} G^{MOE}C^{MOE}A^{MOE} C^{MOE}C^{MOE}-3'; ^{mC} = 5-メチルシトシン)

・標的疾患は、家族性高コレステロール血症。核酸医薬として初の全身投与薬である。静脈注射による体内への導入後、主に肝臓にデリバリーされ、肝臓で合成される apoB タンパク質の mRNA に結合し、翻訳過程を阻害する。apoB タンパク質は LDL コレステロールの構成タンパクであるため、apoB タンパク質をコードする mRNA を阻害することで、血中の LDL コレステロールレベルが低下する。

このように、現在までに上市された核酸医薬は三品目に限られており、核酸医薬がさらに発展するためには、克服しなければならない課題が数多くある。その一つに、細胞毒性が挙げられる。核酸分子が生体内に存在する核酸分解酵素に対して高い耐性を持ち、かつ優れた細胞膜透過性を獲得するために有機化学的手法による化学修飾を施すことが必須となっているが、その化学修飾によって細胞毒性が生じることがある。その代表例として、ホスホロチオエート修飾型核酸が挙げられる⁶⁻⁸。これは、天然型 DNA のリン酸ジエステル部位の非架橋酸素の一つを硫黄で置換した化学修飾型核酸である (Figure 1-1)。ヒト血清中での安定性が天然型 DNA の 10 倍高く^{9,10}、また細胞膜透過性に優れているが、硫黄原子がタンパク質に非特異的に結合することで細胞毒性が生じることが報告されている¹¹。そこで、本研究ではタンパク質との非特異的な相互作用による細胞毒性が生じない核酸分子として、リン原子上にボラン基 (BH₃) を有する種々のボラン修飾型核酸の開発を行った。さらに、ボラン修飾型核酸のアンチセンス医薬への応用を目指し、それらの物理化学的性質や生物学的性質を明らかにした。

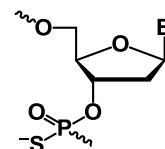


Figure 1-1. Structure of phosphorothioate DNA.

第二節 アンチセンス法

まず、アンチセンス法の概要を述べる。アンチセンス法とは、化学修飾を施したオリゴヌクレオチドを標的の mRNA に塩基配列特異的に結合させ、標的遺伝子の発現を制御する手法である。アンチセンス核酸の作用機序は、(a) Steric blocking、(b) Inducing RNase H activity に大別される (Figure 1-2)^{1, 12, 13}。

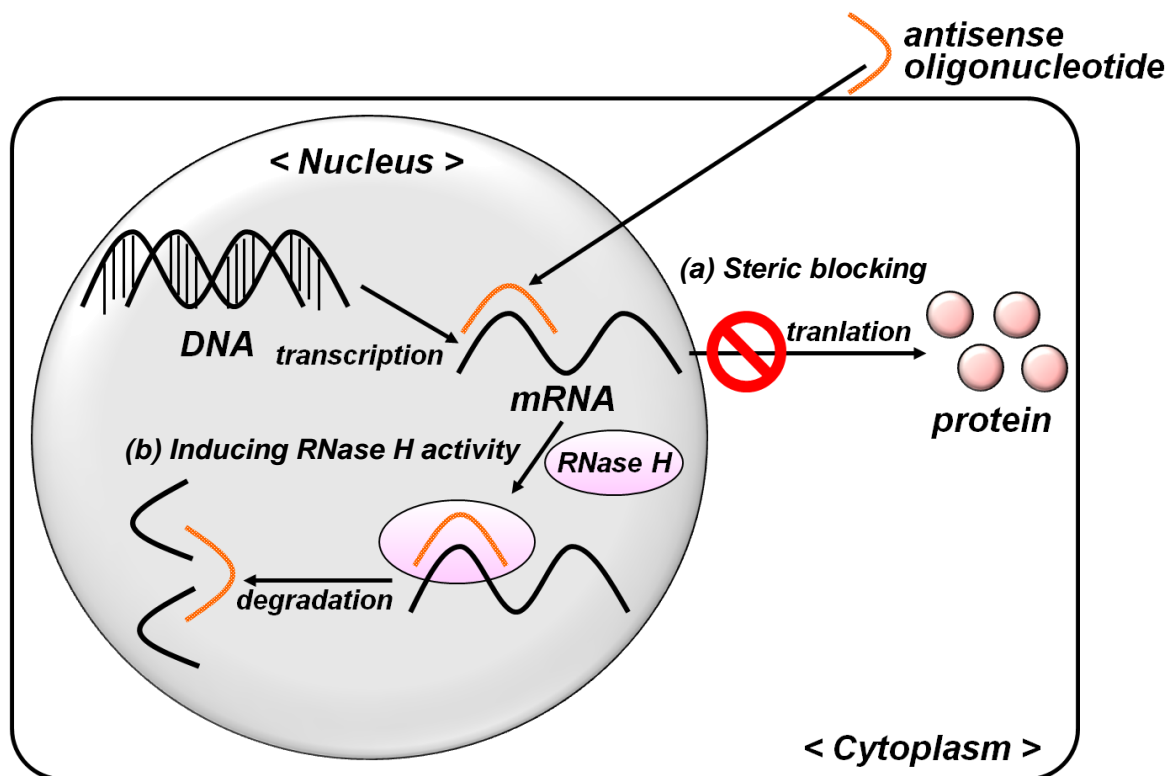


Figure 1-2. Antisense mechanism.

(a) Steric blocking

アンチセンス核酸が標的 mRNA に結合することで、リボソームの結合が阻害され、タンパク質の合成が阻害される。

(b) Inducing RNase H activity

DNA/RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖のみを選択的に加水分解する、生物種内在性の酵素 (RNase H) による標的 mRNA の分解を誘導する。

次に、アンチセンス医薬の本体である核酸誘導体に求められる条件を以下にまとめる^{1, 12-14}。

1) RNA との結合安定性

特定の塩基配列に対して選択的に、安定な二重鎖を形成できること。二重鎖の安定性を評価する際、二重鎖融解温度 (T_m 値) はある程度の指標となるが、高い T_m 値が必ずしも高いアンチセンス効果を示すとは限らない。例えば、 T_m 値が高す

ざるとミスマッチ認識能が低下する傾向があり、また切断された mRNA の解離も起こりにくくなる。

2) 核酸分解酵素耐性

生体内に存在する各種核酸分解酵素 (エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ) に対する高い耐性を持つこと。

3) 化学的安定性

生理的条件 (pH 7.4)、及びエンドソーム内 (pH 4-5) において安定であること。

4) 脂溶性

高い脂溶性を持つこと。脂溶性が高いほど、細胞膜や細胞組織への親和性が高く、細胞膜透過性が優れる。

5) 水溶性

血中で十分な濃度を維持するために、高い水溶性を持つこと。

6) 滞留性

十分な血中滞留性を持つこと。薬剤分子が体内で留まる時間が長いほど、薬効の持続性が向上する。

7) RNase H 活性

標的 mRNA の分解を促進する、生物種内在性の RNase H の活性を誘導できること。

上記の性質を兼ね備えたアンチセンス分子は、医薬候補分子として期待できる。

第三節 RNase H

RNase H は、バクテリアから哺乳動物まであらゆる生物に存在し、塩基配列非特異的に DNA/RNA 二重鎖を認識し、RNA 鎖のみを選択的に加水分解するエンドヌクレアーゼの一種である (RNA ウィルスが持つ RNase H はエキソヌクレアーゼ活性を示す)¹⁵。分解して生成する短鎖オリゴヌクレオチドは、5'-モノリン酸及び 3'-OH 体となる。RNase H は type 1、2 に分類され、古細菌を除く大抵の生物種は両タイプの RNase H を有している。

■ **RNase H1:** 核内及びミトコンドリア中に存在している^{16,17}。RNA 鎖側に連続する 4 残基以上のリボヌクレオチドが含まれている場合に限り、DNA/RNA 二重鎖を基質として認識する¹⁷。

■ **RNase H2:** 核内に存在している¹⁸。リボヌクレオチドが一つ含まれる DNA 二重鎖も認識し、リボヌクレオチドが含まれている鎖を切断する。主に、DNA 複製に必要な RNA primer を合成、除去したり、DNA ポリメラーゼに誤って取り込まれた RNA を除去する役割があると考えられている¹⁷。

【DNA/RNA 二重鎖の認識¹⁵】

2007 年、Nowotny らによって DNA/RNA 二重鎖と *human* RNase H1 複合体の X 線結晶構造が報告された (Figure 1-3)。

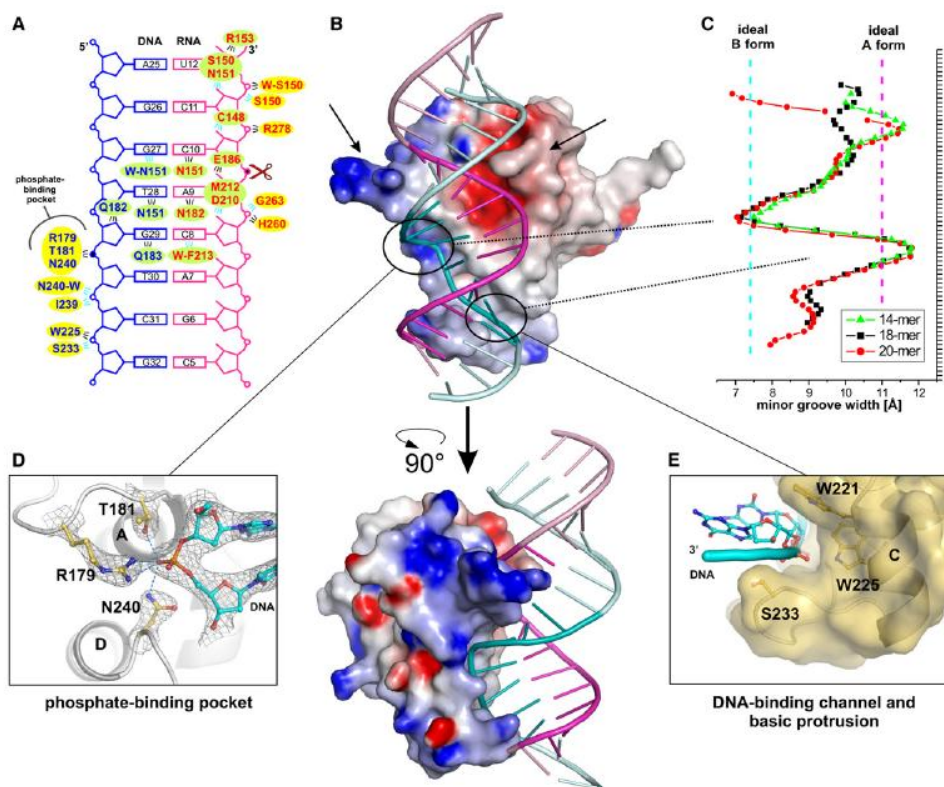


Figure 1-3. Orthogonal views of DNA/RNA duplex embedded in *human* RNase H1.

酵素には DNA 鎖を認識する phosphate-binding pocket (Figure 1-3, D)、DNA-binding channel 及び basic protrusion (Figure 1-3, E) が存在する。R179、T181、N240 から成る phosphate-binding pocket では、アミノ酸残基と DNA 鎖のリン酸ジエステル部位が相互作用している。この部位に入り込むために、DNA 鎖のリン酸ジエステル結合は通常構造から 150 °程度歪んでいる。また、DNA-binding channel に入り込むために、DNA の糖環パッカリングは C4'-*exo* を取る。その結果、酵素に取り込まれた DNA/RNA 二重鎖の高次構造は大きく歪み、minor groove 幅は 7–11.7 Å となる (Figure 1-3, C)。さらに、RNA 二重鎖の場合、DNA-binding channel 内に存在する W221 の indole 環と 2'-OH との立体障害のため、酵素に認識されない。このことから、高い基質特異性が発現していると推測されている。

【RNA 鎖の切断機構¹⁵⁾】

RNA 鎖を切断する分子は、二価の金属イオン (Mg^{2+} や Mn^{2+}) に配位結合したヒドロキシドイオン (OH^-) である。生物種によって酵素の活性中心に存在する金属イオン数は異なり、ヒト (*human RNase H1*) の場合、二つの金属イオンが存在している。一つの金属イオンが OH^- を活性化し、もう一つの金属イオンは構造的な安定化に関与していると考えられている。

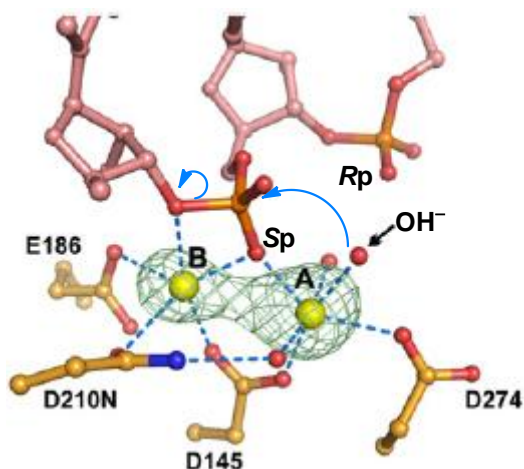


Figure 1-4. Cleavage mechanism of a phosphate backbone at *human RNase H1* active site.

Figure 1-4 に RNA の切断機構を示す。

金属イオン A に酵素の残基 (D145、D274)、リン酸ジエステルの Sp 酸素、及び OH^- が配位する。また、金属イオン B には酵素の残基 (D145、E186、D210)、リン酸ジエステルの Sp 酸素、及び 3'位の酸素原子が配位する。金属イオン A に配位した OH^- がリン原子に対して S_N2 様の求核攻撃をし、五配位中間体を経てリン酸ジエステル結合の切断が起こる。

第四節 ボラン修飾型核酸

1-4-1. 化学修飾型核酸の種類

核酸分子は核酸塩基部位、糖骨格部位、及びリン酸部位から構成されている。化学修飾を施す部位もこれら三つが対象となる。核酸塩基部位、及び糖骨格部位への化学修飾は、主に二重鎖の安定性の向上に寄与する。また、リン酸部位に化学修飾を施すことで、生体内に存在するヌクレアーゼに対する十分な耐性を獲得することができる。代表的な化学修飾型核酸を Figure 1-5 に示す^{1, 12, 13}。

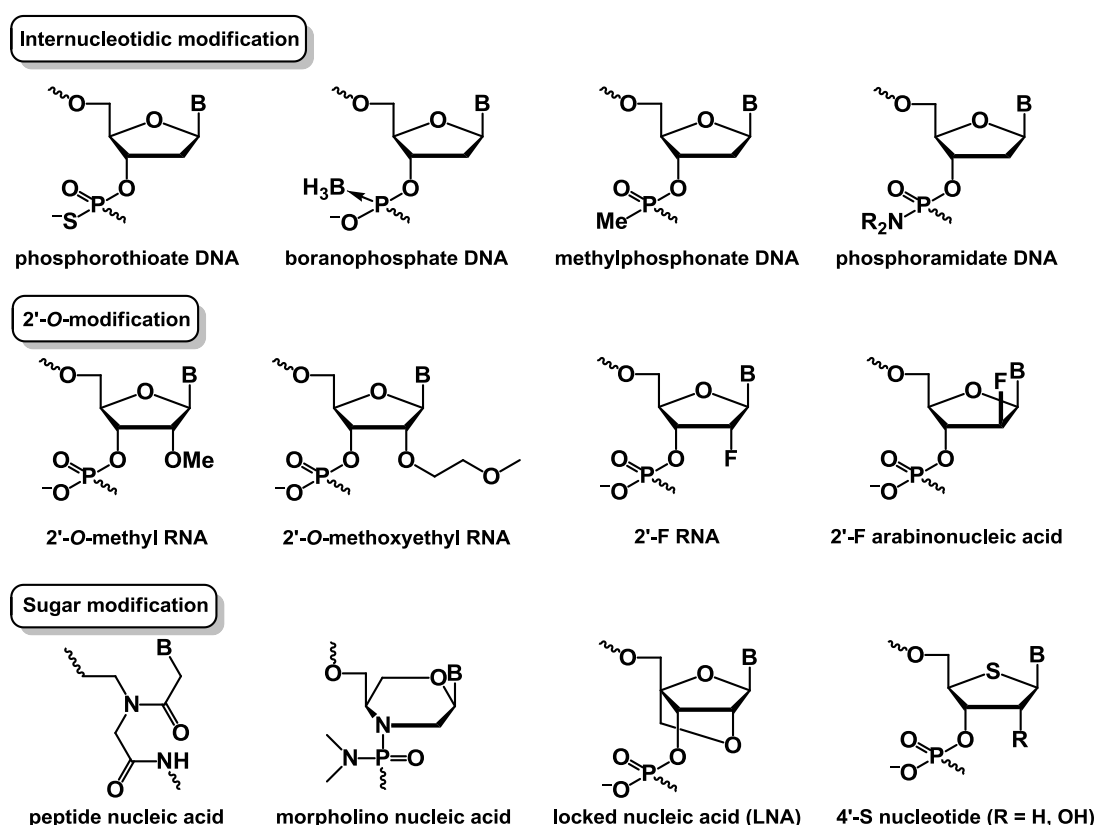


Figure 1-5. Structures of various antisense molecules.

1-4-2. ボラノホスフェート DNA

インターヌクレオチド修飾型核酸として最も広く研究が行われているのは、ホスホロチオエート DNA (*PS*-DNA) である。第一節で述べた通り、この核酸誘導体は天然型 DNA の約 10 倍高い 3'-エキソヌクレアーゼ耐性を有しており、ヒト血清中における半減期は天然型 DNA が 1 時間であるのに対し、*PS*-DNA は 10 時間と報告されている^{9, 10}。また、高い細胞膜透過性や RNase H 活性を示し、血中のアルブミンと結合することで滞留性に優れるという、アンチセンス分子として多くの利点を持つ⁶。さらに、ホスホロアミダイト法の酸化のステップを硫化に変えるだけで化学合成が可能であるため、工業的にも生産されている。しかし、硫黄

原子がタンパク質に非特異的に結合することで細胞毒性が生じるという医薬として致命的な欠点がある¹¹。近年、*PS-DNA* に代わる新たなインターヌクレオチド修飾型核酸として、リン原子がボランに配位結合したボラン修飾型核酸が注目を集めている。最も一般的なボラン修飾型核酸として、ボラノホスフェート DNA (*PBO-DNA*) が挙げられる (Figure 1-5)。これは、1990年に Shaw らによって初めて報告された核酸誘導体である¹⁹。*PS-DNA* 以上のヌクレアーゼ耐性を有し、水溶性及び脂溶性に優れ、また、RNase H 活性も誘導できる²⁰⁻²²。さらに、Shaw らによってホスホロチオエート修飾型 siRNA は *in vivo* で細胞毒性を示したのに対し、ボラノホスフェート修飾型 siRNA は細胞毒性が生じず、かつ効率的に標的遺伝子の発現を抑制したことが報告された²³。このことから、ボラン修飾型核酸は医薬候補分子として期待されている。以下に、これまでに報告されている *PBO-DNA* の性質及び合成法の概要をまとめる。

* 以後、二量体以上のオリゴデオキシヌクレオチドを示す場合は ODN、オリゴリボヌクレオチドを示す場合は ORN と表記する。

> 性質

【酵素耐性】

まず、*PBO-ODN* のヌクレアーゼ耐性について述べる。Shaw らによって報告された、天然型 ODN、*PS-ODN*、及び *PBO-ODN* の各種ヌクレアーゼに対する耐性を Table 1-1 にまとめる²⁰。

Table 1-1. Comparative stability of thymidylate 12mers toward various nucleases.^[a]

Enzyme	SVPDE		BSP		nP1		S1	
	2	20	5	50	0.01	10	0.01	5
T _{(PO)T} ₁₁	15 min	n / a ^[b]	20 min	n / a ^[b]	< 5 min	n / a ^[b]	< 5 min	n / a ^[b]
T _{(PS)T} ₁₁	n / a ^[b]	2 h ^[c]	n / a ^[b]	3 h	2 h	< 5 min	40 min	< 5 min
T _{(PBO)T} ₁₁	n / a ^[b]	7 h ^[c]	n / a ^[b]	1 h	Stable	6 h	Stable	70 h

[a] Subscript 'PO' = phosphate diester; 'PS' = phosphorothioate diester; 'PBO' = boranophosphate diester; 'SVPDE' = snake venom phosphodiesterase (3'-exonuclease); 'BSP' = bovine spleen phosphodiesterase (5'-exonuclease); 'nP1' = nuclease P1 (endonuclease); 'S1' = nuclease S1 (endonuclease). [b] Data not available. [c] Times that are necessary to reach half of the terminal hydrolysis, which corresponded to 42% for T_{(PS)T}₁₁ and 33% for T_{(PBO)T}₁₁.

このように、*PBO*-DNAは各種ヌクレアーゼに対し、*PS*-DNAよりも高い耐性を有する。

次に、ジアステレオマー間のヌクレアーゼ耐性の違いについて述べる。ボラノホスフェート結合中のリン原子にはキラリティーがあり (Figure 1-6)、*Rp* 体と *Sp* 体の立体異性体ではヌクレアーゼ耐性が異なる。

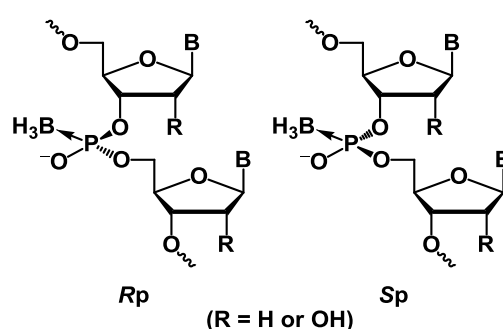


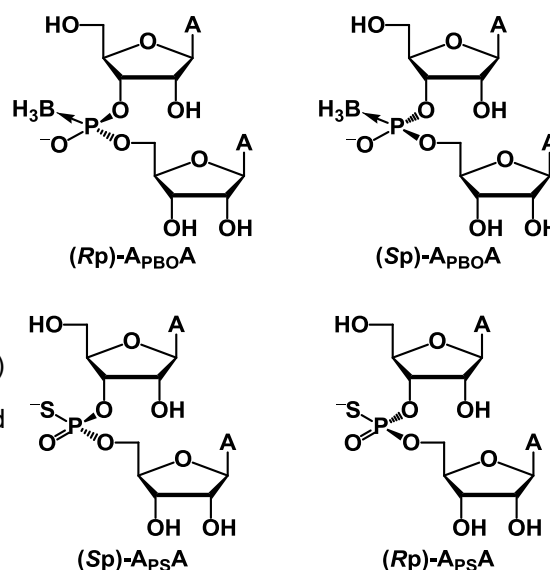
Figure 1-6. Structures of (*Rp*)- and (*Sp*)-*PBO*-ODN(ORN).
(R = H or OH)

Enya らは、立体を制御したジアデニル酸 *PBO*-ORN とジアデニル酸 *PS*-ORN の SVPDE 耐性、及び nP1 耐性の比較を行った (Table 1-2)²⁴。

Table 1-2. Comparative stability of diadenosine derivatives toward SVPDE and nP1.^[a]

Dimer	remained dimer [%]	
	SVPDE	nP1
<i>A</i> _{PO} <i>A</i>	0	0
(<i>Sp</i>)- <i>A</i> _{PBO} <i>A</i>	10	0.4
(<i>Rp</i>)- <i>A</i> _{PBO} <i>A</i>	83	77
(<i>Rp</i>)- <i>A</i> _{PS} <i>A</i>	2.8	75
(<i>Sp</i>)- <i>A</i> _{PS} <i>A</i>	96	0

[a] Each dimer was incubated with SVPDE (0.3 U) or nP1 (2U) for 24 h and samples were analyzed by RP-HPLC.



PS-ORN の *Rp* 体は、エンドヌクレアーゼ耐性に優れるがエキソヌクレアーゼ耐性は劣り、*Sp* 体は極めて高いエキソヌクレアーゼ耐性を示すがエンドヌクレアーゼ耐性は無い。一方で、*PBO*-ORN の場合、*Rp* 体はどちらのタイプの酵素にも高い耐性を示すが、*Sp* 体はどちらの酵素にも基質として認識される。また、Shaw らはジチミジル酸 *PBO*-ODN のそれぞれのジアステレオマーの SVPDE 耐性の比較実験を行った。その結果、*Sp* 体のみが SVPDE の基質になると報告しており、基質が DNA でも RNA でも基質特異性は同じである²⁵。

【二重鎖形成能】

一般に、インターヌクレオチド修飾型核酸は相補鎖への親和性が低い。一つのボラノホスフェートジエステル結合あたり、二重鎖融解温度 (T_m 値) は天然型 DNA に比べて 0.7–1 °C 低下する。これは、ボラノホスフェートジエステル結合がホスホロチオエートジエステル結合よりもさらに二重鎖を不安定化させることを示している (ホスホロチオエートジエステル結合が一つ増えると T_m 値は 0.5 °C 低下)。しかし、Shimizu らは、*PBO-DNA* の興味深い二重鎖形成能を報告している²⁶。四種類全ての核酸塩基を有する $d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T)_3$ は、相補鎖が DNA よりも RNA の場合に、より親和性が高いことが明らかとなった (*PBO-ODN/ODN* 39.7 °C; *PBO-ODN/ORN* 45.0 °C in 100 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , 0.1 M NaCl buffer (pH 7.0))。この結果は *PBO-ODN* がアンチセンス分子として有効に働くことを示唆するものである。さらに近年、Iwamoto らによるオキサザホスホリジン法を用いたリン原子の立体を制御したチミジル酸 *PBO-ODN* や²⁷、Takemura らによるウリジル酸 2'-*O*-Me-*PBO-ORN* の合成が達成され²⁸、それぞれのジアステレオマーを用いた T_m 値解析が行われた。チミジル酸とウリジル酸、どちらの場合も二重鎖形成能は *Sp* > stereo random > *Rp* の順に優れている。興味深いことに、(*Sp*)-2'-*O*-Me-*PBO-ORN* は 2'-*O*-Me-*PO-ORN* (*PO*: natural phosphate backbone) よりも T_m 値が高い ((*Sp*)-2'-*O*-Me-*PBO-ORN*/rA₁₂ = 33.7 °C; 2'-*O*-Me-*PO-ORN*/rA₁₂ = 24.9 °C; 2'-OH-*PO-ORN*/rA₁₂ = 10.4 °C in 10 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , 0.1 M NaCl buffer (pH 7.0))。この理由は、2'-*O*-Me 特有の、糖環パッキングが二重鎖形成能に優れた C3'-*endo* 型に偏るという性質に加え、水和ネットワークを乱すことなく二重鎖を形成でき、かつ疎水的官能基であるボラノ基が A 型二重螺旋の major groove 内側の疎水的な核酸塩基対の近傍に位置し、両者の間に疎水性相互作用が働くためであると考察されている (Figure 1-7)²⁸。

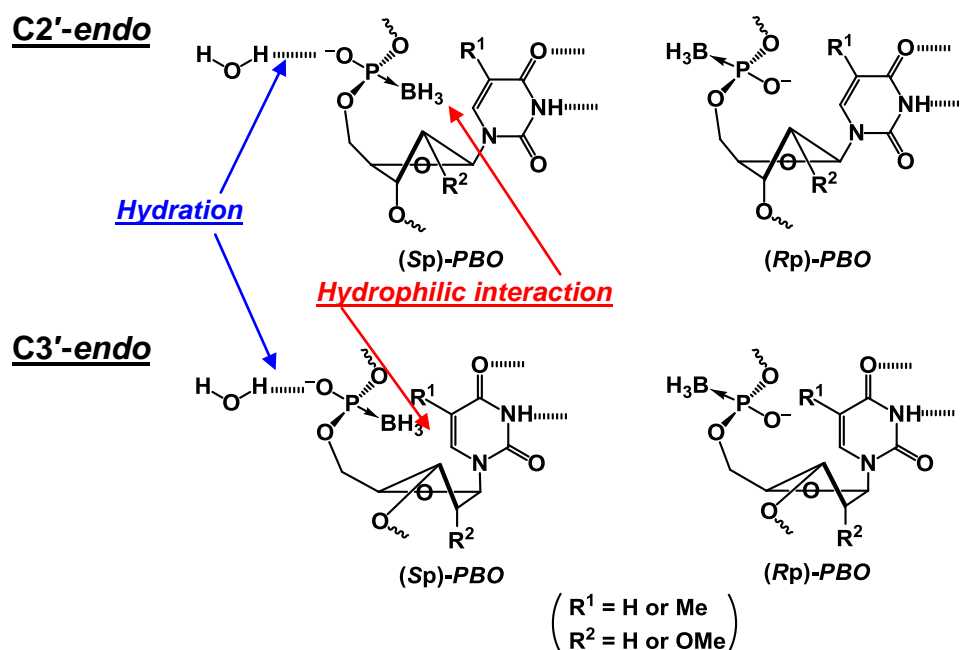


Figure 1-7. Conformation of 5'-O-boranophosphate modified pentafuranose sugar.

上記の図から、二重鎖の安定化に寄与する順は、C3'-endo Sp > C2'-endo Sp >> C3'-endo Rp ≈ C2'-endo Rp であると考えられる。Iwamoto らや Takemura らによって報告された T_m 値は、これに矛盾のない結果となっている。

【RNase H 活性】

アンチセンス分子が RNase H 活性を誘導するためには、アンチセンス鎖のリン原子上に、負に帯電した原子を有することが必須となっている。PS-ODN や PBO-ODN は、リン原子に結合した負に帯電した硫黄原子や酸素原子を有しているため、RNase H 活性を誘導できる。

Caruthers らは、チミジル酸 PO/PBO キメラオリゴマーの RNase H 活性を、チミジル酸 PO/PS キメラオリゴマーと比較検討している²⁹。その結果、全てのインターヌクレオチド部位をホスホロチオエート修飾しても RNase H 活性は天然型 DNA を用いた場合とほぼ同程度であるのに対し、全てボラノホスフェート修飾すると RNase H 活性は大きく低下すると報告している。また、Shaw らは、癌遺伝子の一種である erbB-2 の 5'-GGT GCT CAC TGC GGC-3' という配列に相補的な配列を有する (Sp)-PBO-ODN 十五量体は、天然型 DNA に比べて RNase H 活性が 10 倍程度低いことを報告している³⁰。このように、ボラノホスフェート結合は RNase H 活性を低下させる報告例があるが、明確な理由は明らかになっていない。さらに、Shaw らはボラノホスフェート結合を一箇所有する九量体 d(ATG GT_{PBO}G CTC) と相補鎖 RNA との二重鎖の高次構造、及びリン原子の絶対立体配置が

RNase H 活性に及ぼす影響を NMR 解析から推測している。ボラノ基が二重鎖 major groove の内側に向いている Sp 体は、RNase H の DNA 鎖を認識するアミノ酸残基との相互作用を阻害しないのに対し、ボラノ基が二重鎖 major groove の外側に向いている Rp 体は、酵素との相互作用を阻害するため、RNase H 活性は得られないのではないかと推測している³¹。

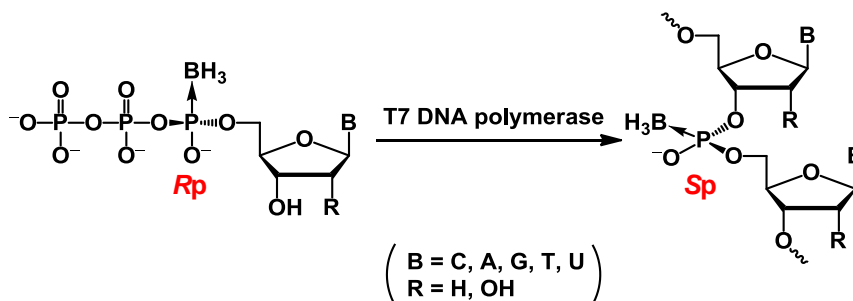
➤ 合成手法

次に、これまでに報告されている PBO-DNA の合成法について述べる。PBO-DNA の合成法は、酵素法と化学合成法に大別される。

【酵素法】

まず、酵素法について説明する。酵素法は、T7 DNA ポリメラーゼという DNA 合成酵素に dNTP α B を取り込ませ、PBO-ODN を合成する手法である (Scheme 1-1)^{32, 33}。しかし、酵素法の欠点として少量の目的物しか得られないことと、酵素が (Rp)-dNTP α B しか基質として取り込まないため、Sp 体の PBO-ODN しか合成できないことが挙げられる。

Scheme 1-1

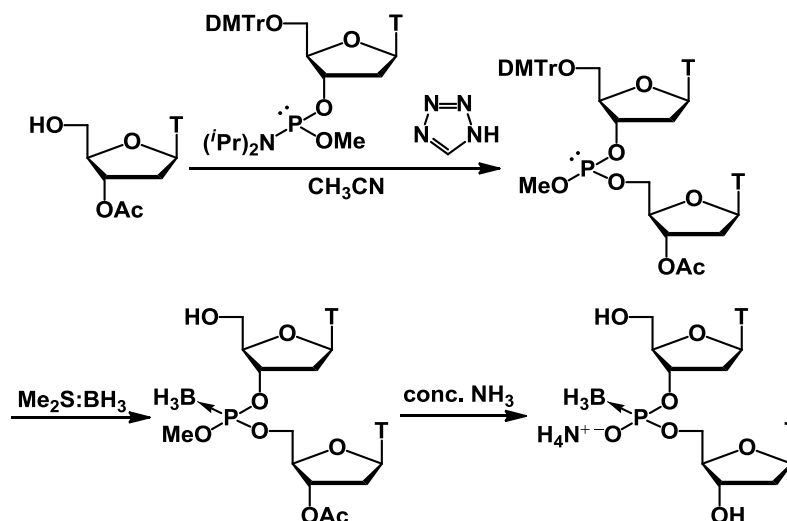


酵素法の欠点を克服するため、化学的合成法の開発が強く望まれている。主な化学合成法として、ホスホロアミダイト法、H-ホスホネート法、及びボラノホスホトリエステル法が挙げられる。しかし、いずれの手法も問題点があり、PBO-ODN の効率的な合成手法は未だ確立されていないのが現状である。以下に、それぞれの手法の概要をまとめる。

【化学合成法-1: ホスホロアミダイト法】

1990年、Shawらによってホスホロアミダイト法によるPBO-ODN二量体及び三量体の合成が報告された¹⁹。これは、ホスホロアミダイトモノマーユニットと5'位に遊離の水酸基を有するヌクレオシドを酸性活性化剤存在下縮合し、得られた三価のホスファイトトリエステル中間体に対してボラノ化を行う手法である(Scheme 1-2)。

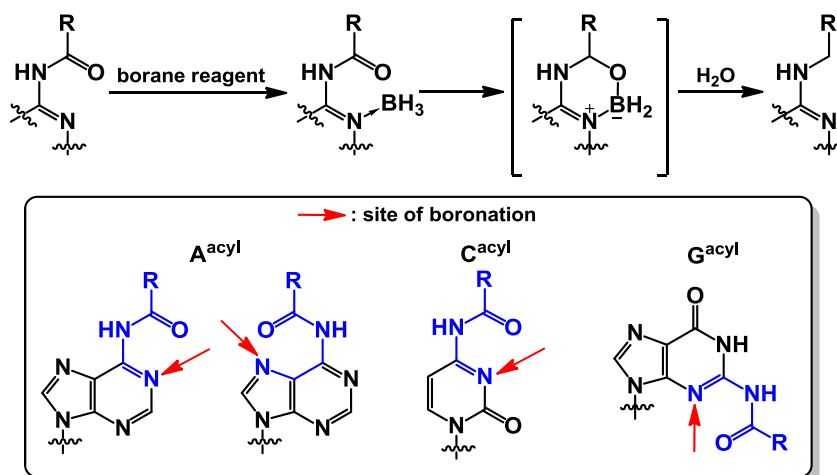
Scheme 1-2^[a]



[a] Ac = acetyl; DMTr = 4,4'-dimethoxytrityl; Me = methyl.

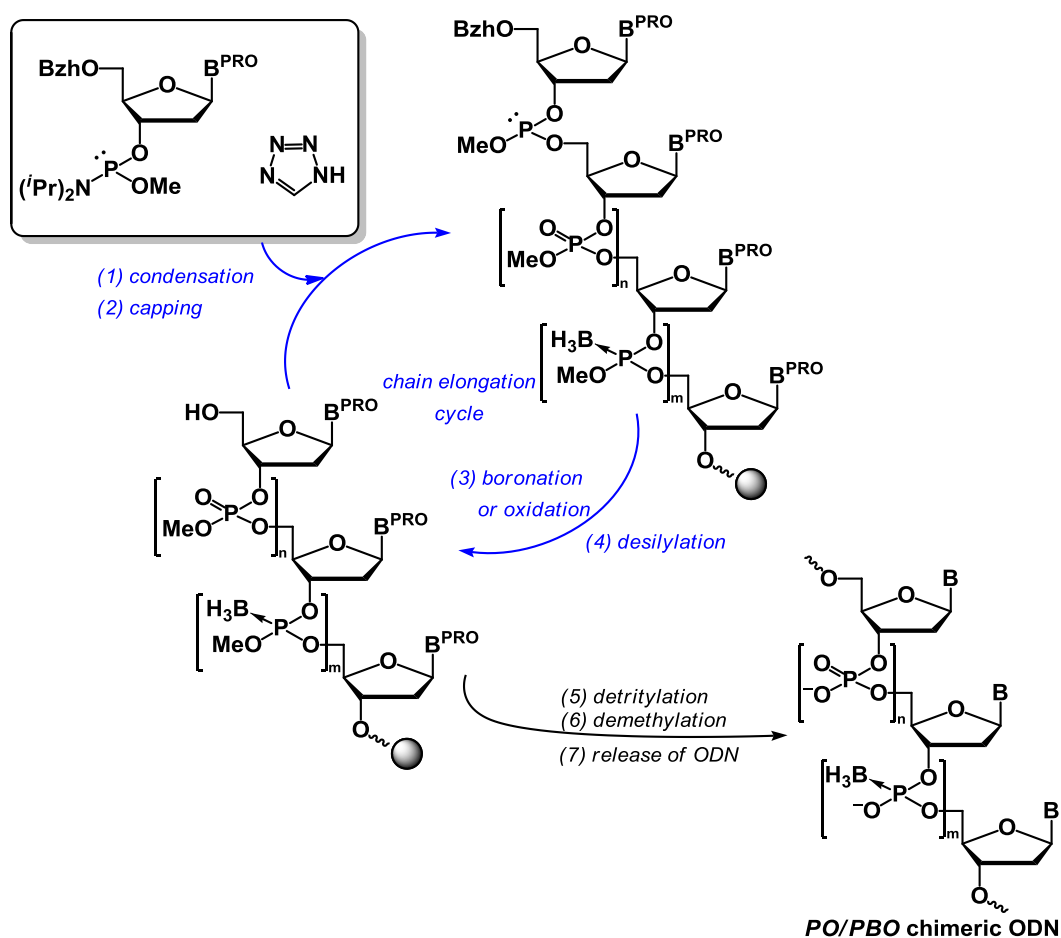
しかし、上記の手法は、無保護のチミン塩基及びウラシル塩基を用いる場合に限定される。アデニン、シトシン、及びグアニンの環外アミノ基の保護基として導入したアシル系の保護基が、過剰量のボラノ化試薬によって不可逆的に還元され、除去が不可能なアルキル基へと誘導されるためである(Scheme 1-3)²⁸。そのため、全ての核酸塩基を有するオリゴマー合成に適用することはできない。

Scheme 1-3



Caruthers らは、アシル系保護基の不可逆的な還元反応を避けるため、環外アミノ基に酸性条件下除去可能なトリチル系保護基、伸長末端の 5'位水酸基にフッ化物イオンによって除去可能なシリル系保護基を導入したモノマーユニットを用いることで、四種類全ての核酸塩基を有する *PBO*-ODN の合成に成功した^{29, 35-37}。さらに、ボラノ化と酸化を組み合わせることで、*PO/PBO* キメラオリゴマーの合成が可能となる利点がある (Scheme 1-4)²⁹。

Scheme 1-4^[a]

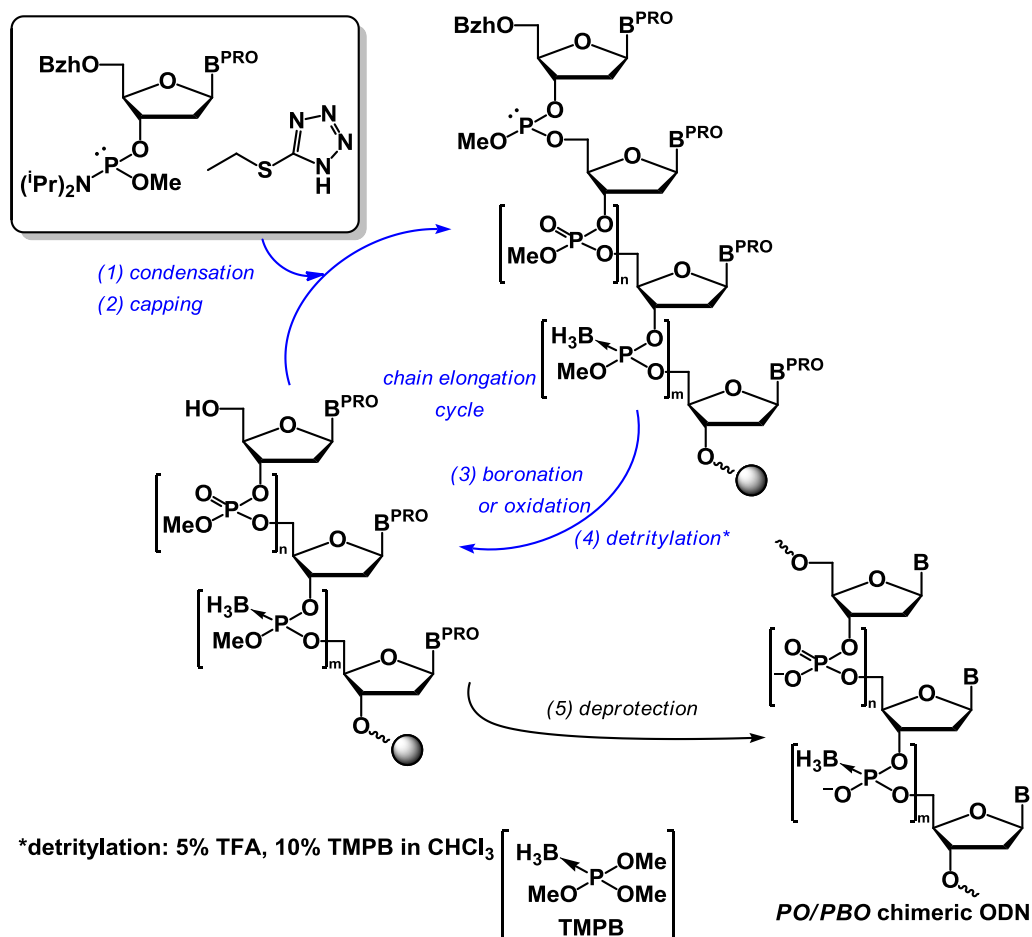


[a] B^{PRO} = Protected nucleobase; N³-anisoylthymine-1-yl; N⁶-dimethoxytrityladenine-9-yl;
N⁴-trimethoxytritylcytosine-1-yl; N²-(9-fluoromethoxycarbonyl)guanine-9-yl;
Bzh = benzhydroxy-bis(trimethylsilyloxy)silyl.

しかし、この方法では鎖長伸長の度にボラノ化、または酸化を行わなくてはならず、操作がより煩雑化することが懸念される。なお、Scheme 1-4 ではアデニンの N⁶位は DMTr 基、グアニンの N²位は 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) 基で保護されているが、これらの保護基を完全に除去することが困難であることから、その後環外アミノ基の保護基は 4,4',4''-trimethoxytrityl (TMTr) 基に統一された³⁷。

さらに、Caruthers らは 5'位水酸基の保護基に DMTr 基、環外アミノ基にシリル系保護基を導入したモノマーユニットを開発し、それを用いた *PO/PBO* キメラオリゴマー (10–24mer) の合成法を報告している (Scheme 1-5)³⁸。

Scheme 1-5^[a]



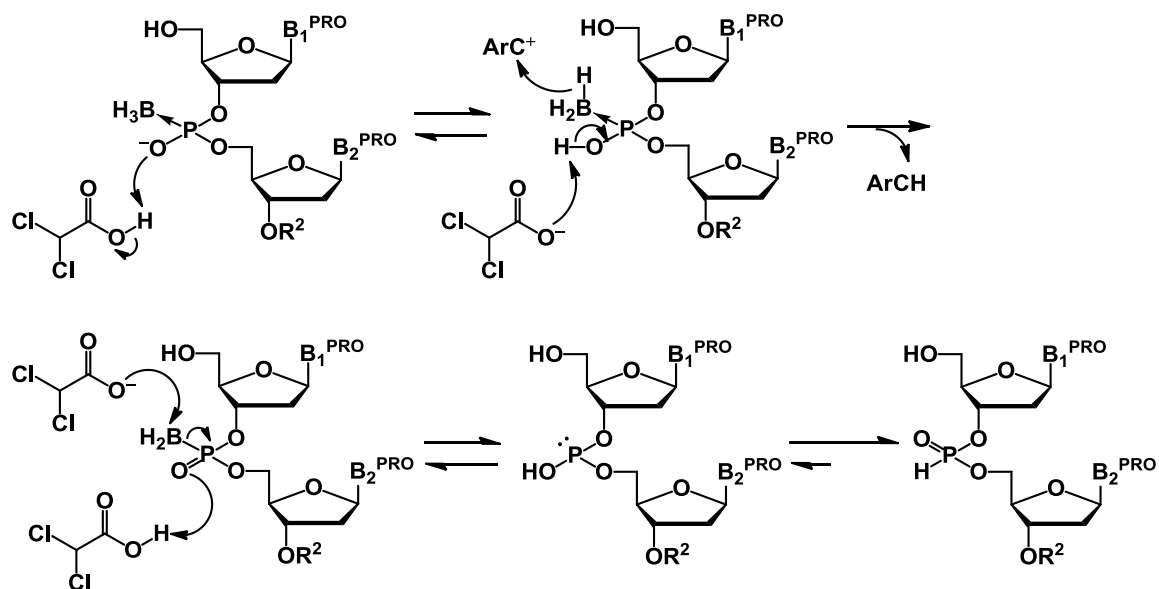
[a] B^{PRO} = Thymin-1-yl; N⁶-di(*tert*-buthyl)isobutylsilyladenin-9-yl;

N⁴-di(*tert*-buthyl)isobutylsilylcytosin-1-yl;

O⁶-di(*tert*-buthyl)isobutylsilyl-N²-di(*tert*-buthyl)isobutylsilylguanin-9-yl.

上記の手法の最大の特徴は、伸長末端の DMTr 基を酸性条件下除去する際に生成する DMTr カチオンの捕捉剤として、トリメチルホスファイトボラン (TMPB) を用いている点である。一般に、ボラン修飾型核酸のリン原子上のボラノ基は、トリチルカチオンによって酸化的に脱離するため、トリチルカチオンの捕捉剤を用いる必要がある。ただし、ボラノホスフェートジエステル体は如何なる捕捉剤を用いても速やかに *H*-ホスホネート誘導体に変換される (Scheme 1-6)^{39,40}。

Scheme 1-6



一方、ボラノホスホトリエステル体は、リン原子の電子密度が低いためトリチルカチオン存在下での安定性が高く、適切な捕捉剤を用いることで脱ボラノ化を抑制することができる。Shimizu らは、トリエチルシランを溶媒量用いることで脱ボラノ化の抑制に成功した⁴¹。しかし、Caruthers らは Scheme 1-5 においてトリエチルシランを用いても完全に脱ボラノ化を抑制できないと報告しており、その代わりに TMPB を用いることで効率的に *PBO*-ODN を得た。さらに、Shaw らは BH_3 -Pyridine complex を用いると、ボラノホスフェートジエステル体はボラノホスホトリエステル体と同程度の安定性を維持できることを報告している³⁹。

【化学合成法-2: *H*-ホスホネート法】

H-ホスホネート DNA は、天然型 DNA の非架橋酸素原子の一つを水素原子で置換した核酸誘導体である。*H*-ホスホネート DNA の水素原子は、様々な官能基へと変換可能であるため、種々のインターヌクレオチド修飾型核酸合成の有用な中間体として用いられている (Figure 1-8)⁴²。

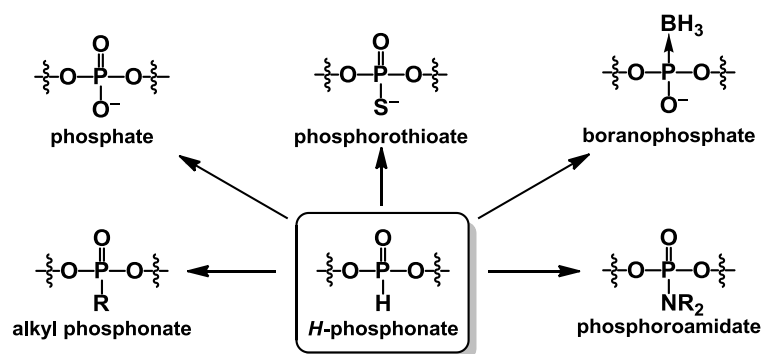
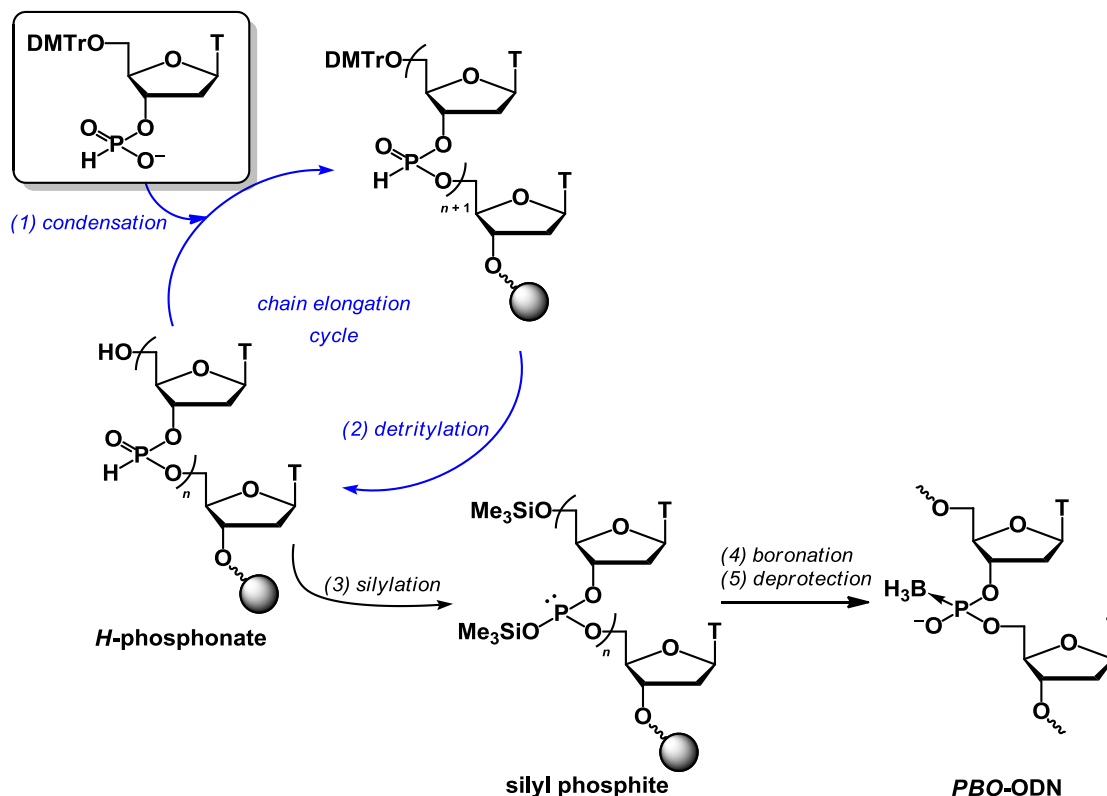


Figure 1-8. Versatility of *H*-phosphonate.

Caruthers ら⁴³ や Zang ら⁴⁴ は、*H*-ホスホネート法によって十五量体程度のチミジル酸 *PBO*-ODN を合成した。これは、*H*-ホスホネートモノマーユニットとヌクレオシドを脱水縮合し、中間体として *H*-ホスホネート DNA を得た後にシリルホスファイトへと変換し、ボラノ化を経て目的の *PBO*-ODN を得る手法である (Scheme 1-7)。

Scheme 1-7



前述の通り、過剰量のボラノ化試薬は核酸塩基に導入したアシル系保護基を不可逆的に還元するため、四種類全ての核酸塩基を有するオリゴマー合成には応用できない。そこでShawらは³⁹、核酸塩基無保護の*H*-ホスホネート法を可能にする 2-(benzotriazol-1-yloxy)-1,3-dimethyl-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate (BOMP) (Figure 1-9) を縮合剤として用いて*PBO*-ODN 十量体の合成を行った⁴⁵。しかし、長鎖の*H*-ホスホネートDNAは化学的に不安定であるため、十量体までの合成例しか報告されていない。

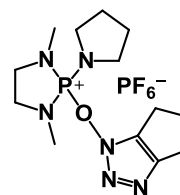


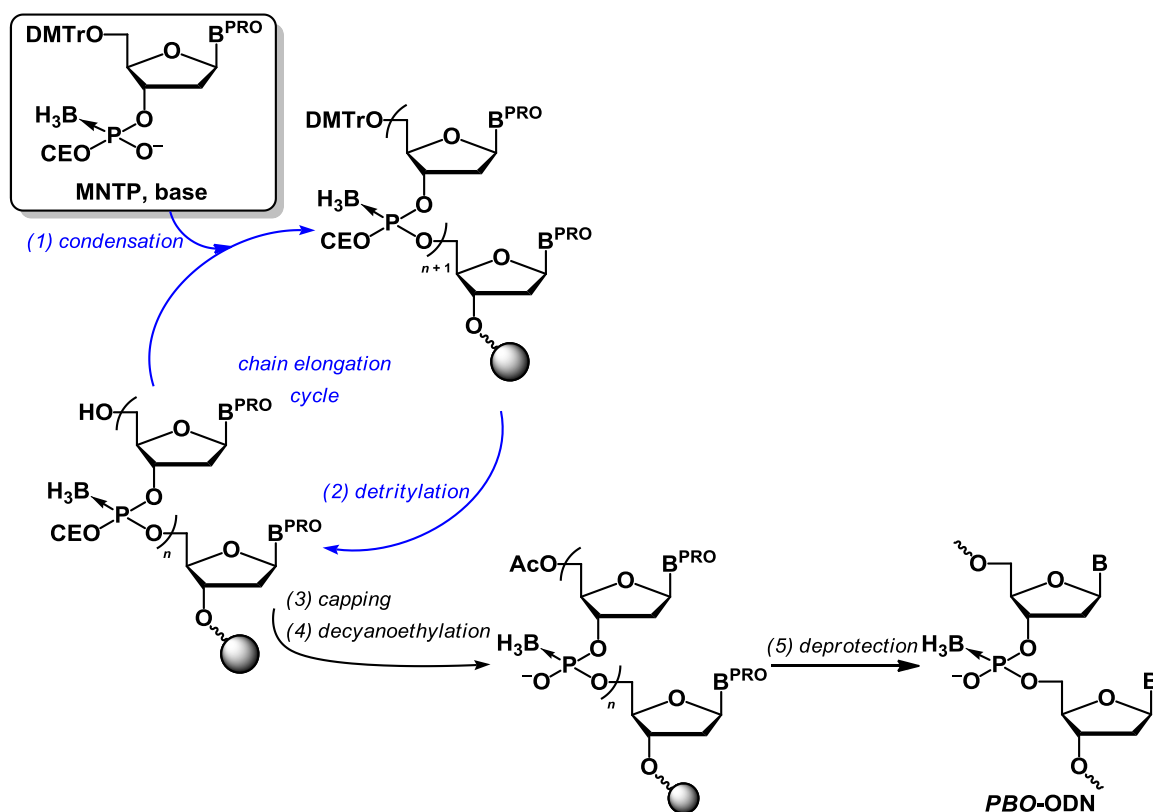
Figure 1-9. Structure of BOMP.

また、Caruthersらは*N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) などのシリル化剤存在下でボラノ化を行うと無保護のチミン塩基であっても、チミン塩基の N^3-C^4 結合が不可逆的に還元されることを報告している⁴³。このように、*H*-ホスホネート法による *PBO*-ODN の合成には限界がある。

【化学合成法-3: ボラノホスホトリエステル法】

ボラノ化試薬による核酸塩基部位の保護基の還元を回避するため、Wada らはボラノホスホトリエステル法を開発した (Scheme 1-8)^{26, 41}。予めリン原子がボランに配位結合したモノマーユニットを用いることで、この副反応を回避することができる。モノマーユニットとヌクレオシドを縮合してボラノホスホトリエステル体を得た後に、インターヌクレオチド部位の保護基であるシアノエチル (CE) 基を除去することで目的とする *PBO*-ODN が得られる。

Scheme 1-8^[a]



[a] B^{PRO} = *N*³-Benzoylthymine-1-yl; *N*⁶-benzoyladenine-9-yl; *N*⁴-benzoylcytosine-1-yl;

*O*⁶-diphenylcarbamoyl-*N*²-phenylacetylguanin-9-yl;

MNTP = 1,3-dimethyl-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidine-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate.

この手法により、アシル系保護基を用いた場合でも四種類の核酸塩基を有する *PBO*-ODN の合成が可能となった。しかし、モノマーユニットの縮合効率が低く、さらなる改良が求められた。二量体合成時に算出した縮合効率を Table 1-3 にまとめる²⁶。

Table 1-3. HPLC yields of *PBO*-ODN 2mers.

Entry	<i>PBO</i> -ODN 2mers	HPLC yield [%]	
		Single coupling ^[a]	Double coupling ^[b]
1	T _{PBO} T	90	96
2	A _{PBO} T	96	95
3	C _{PBO} T	96	96
4	G _{PBO} T	95	94

[a] Single coupling was performed by using 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene (DMAN) as a base in 5 min. [b] Double coupling was performed by using 2,4,6-collidine as a base in 2 × 5 min.

この手法は縮合効率が低いため、*PBO*-ODN の単離収率は、チミジル酸十二量体は 8%、d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T)₃ は 16%にとどまっている²⁶。

1-4-3. ボラノホスホロチオエート DNA

ボラノホスホロチオエート DNA (*PBS-DNA*) は、天然型 DNA の二つの非架橋酸素原子をボラノ基と硫黄原子で置換したボラン修飾型核酸の一種である (Figure 1-10)^{46, 47}。 *PBS-DNA* は、*PBO-DNA* よりもさらに高い脂溶性とヌクレアーゼ耐性を有することから、新規アンチセンス分子として期待されている。 Shaw らは、ニトロフェノール基を有するホスファイト中間体に対してボラノ化を行い、ボラノホスホトリエステル体を得た後に、硫化を施すことで *PBS-ODN* 二量体の合成を行った (Scheme 1-9)^{46, 47}。

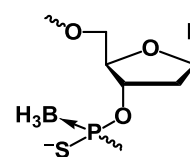
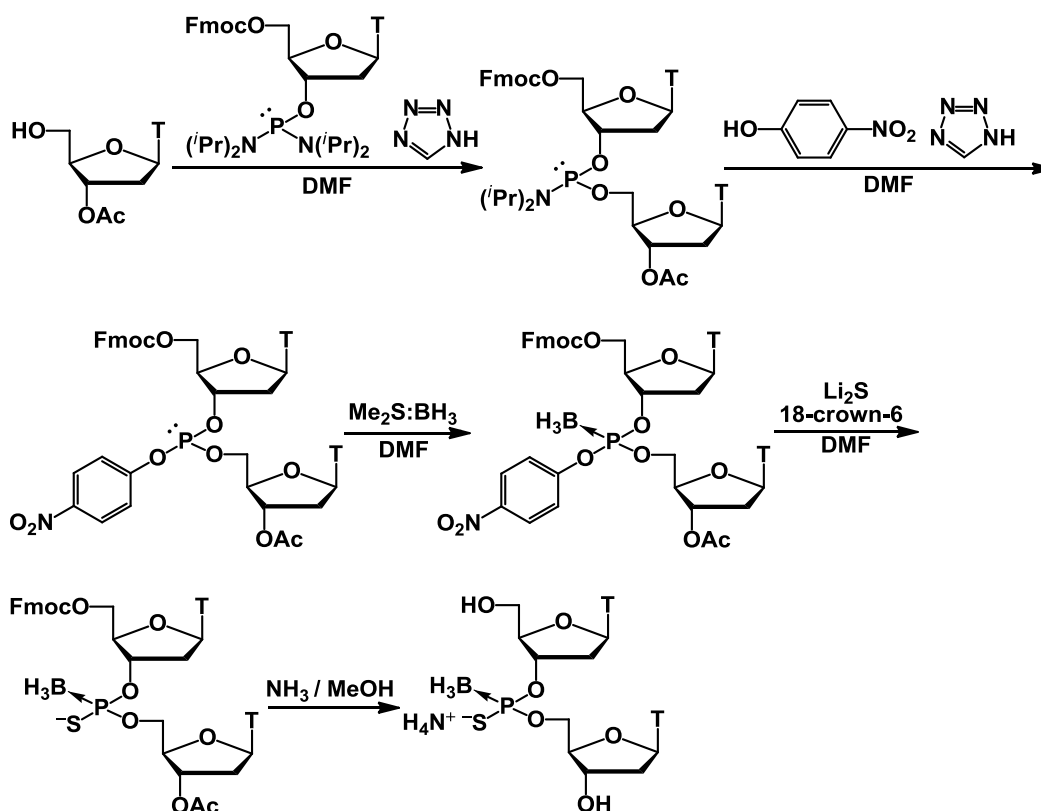


Figure 1-10. Structure of boranophosphorothioate DNA.

Scheme 1-9^[a]



[a] Fmoc = 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl.

この手法は、*PBO-DNA* の合成手法で述べた通り、過剰量のボラノ化試薬による核酸塩基部位への副反応が懸念される。そのため、三量体以上の *PBS-ODN* の合成法は報告されていない。

第五節 2'-O-修飾型核酸

前述の通り、インターヌクレオチド修飾型核酸は相補鎖 RNA への親和性が低い。そこで、二重鎖形成能に優れた化学修飾型核酸と組み合わせることで、この欠点を補うことができる。その一例として、RNA の 2'位水酸基に化学修飾を施した 2'-O-修飾型核酸が挙げられる。

1-5-1. 2'-O-修飾型核酸の二重鎖形成能

まず、2'-O-修飾型核酸が相補鎖 RNA との二重鎖形成能に優れる理由について述べる。フラノース環の配座は理論上無数に存在するが、ヌクレオシドや一本鎖オリゴヌクレオチド中では、主として C3'-endo と C2'-endo の平衡状態として存在している⁴⁸。その平衡は RNA と DNA で異なり、RNA の場合、O4'-O2'間のゴージュ効果により C3'-endo コンフォメーションが有利となる。二重鎖を形成すると平衡状態にある二つの配座は、一方に固定化される (Figure 1-11)。RNA/RNA 二重鎖は A-form (C3'-endo)、DNA/DNA 二重鎖は B-form (C2'-endo)、DNA/RNA 二重鎖は柔軟な DNA 鎖が C3'-endo を取ることで A-form 様の構造をとる (T/rA は例外的に B-form となる)。一本鎖での糖環パッカリングの配座を二重鎖形成後と同じ配座に固定しておけば、熱力学的パラメータのエントロピー項が有利に働く。つまり、標的が mRNA であるアンチセンス機構において、アンチセンス分子の糖環パッカリングを C3'-endo に固定しておくことが望ましい。

多くの 2'-O-修飾型核酸は、糖環パッカリングが C3'-endo に偏っているため、高い二重鎖形成能が発現する。本節では、アンチセンス分子として広く用いられている、2'-O-Me RNA 及び 2'-O-メトキシエチル (MOE) RNA について述べる。

1-5-2. 2'-O-Me RNA

2'-O-Me RNA (Figure 1-12) の二重鎖安定化の効果は、特にピリミジン塩基の含有率が高い塩基配列において強く観測される。これは、2'位水酸基に導入したメチル基とピリミジン塩基の O² 位との立体障害によって

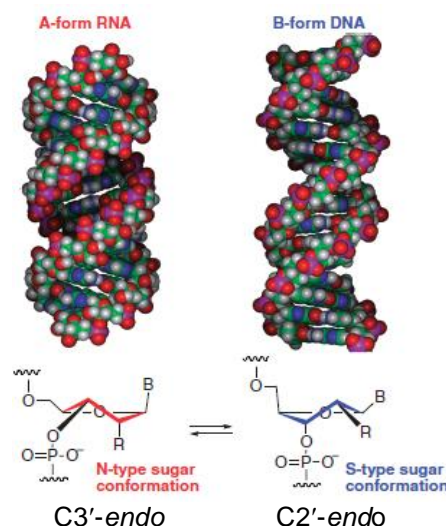


Figure 1-11. Conformation of the pentafuranose sugar and structures of A- and B-form duplexes.

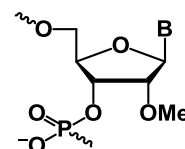


Figure 1-12. Structure of 2'-O-Me RNA.

C2'-endo 型が不利になるため、糖環パッキングが C3'-endo 型に大きく偏ることに起因する (Figure 1-13)⁴⁹。一つの 2'-O-Me 修飾当たり、 T_m 値は 2'-デオキシ体に比べて約 1.2 °C 向上する⁵⁰。

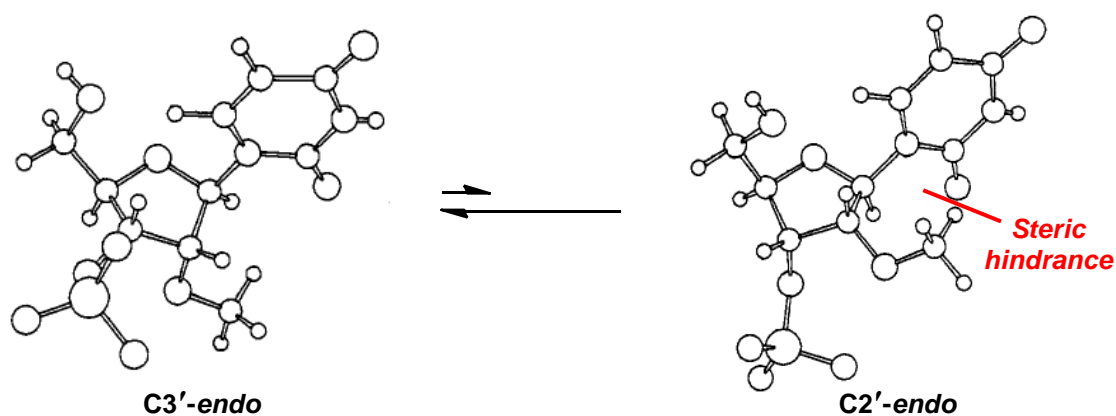


Figure 1-13. Conformation of 2'-O-Me modified pentafuranose sugar.

しかし、アンチセンス鎖全てに 2'-O-Me 修飾を施すと、相補鎖 RNA との二重鎖は剛直な A-form を形成するため、RNase H 活性を示さない⁵⁰。そこで、天然型 DNA や PS-DNA などの 2'-デオキシ誘導体を適切な位置に導入することで酵素の基質となる。この概念は、2'-O-Me だけでなく、後述する 2'-O-MOE や LNA など化学修飾体においても RNase H 活性を発現させる有効な戦略である。以下に、2'-O-Me 及び 2'-デオキシ体から構成される gapmer の性質を示す (Figure 1-14)^{14,50}。

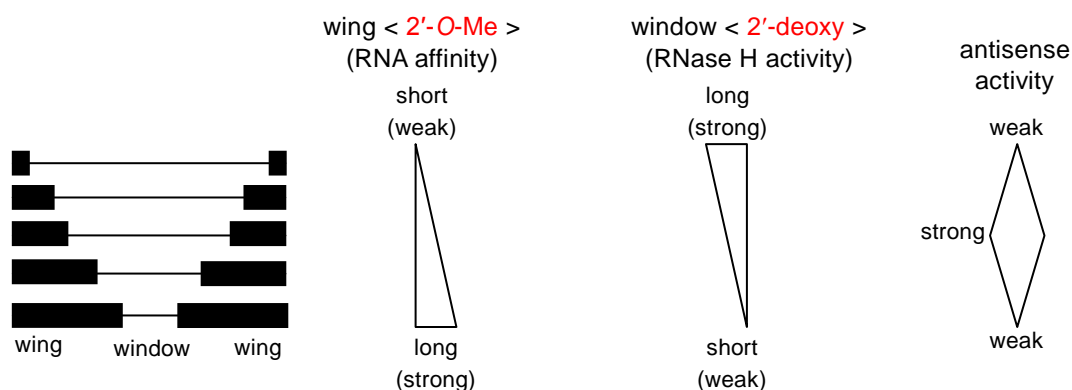


Figure 1-14. Outline of gapmer.

RNase H の認識部位となるアンチセンス鎖の中央部 (window 鎖) に 2'-デオキシ体、5'-、3'-両末端 (wing 鎖) に 2'-O-Me 修飾を施すことで、優れた二重鎖形成能を持ちながら RNase H 活性を誘導できる。以上のように、2'-O-Me RNA はアンチセンス分子として優れた性質を持つが、他の化学修飾型核酸に比べてヌクレアーゼ耐性は劣る^{10, 50}。そこで、インターヌクレオチド結合部位に PS などの化学修飾を施すことが求められる。

1-5-3. 2'-O-MOE RNA

2'-O-MOE RNA (Figure 1-15) は、一修飾当たり 2'-デオキシ体に比べて T_m 値が +0.9–1.7 °C 向上する^{51, 52}。この高い二重鎖形成能は、以下のように考察されている。酸素原子間のゴーシュ効果によって、2'-O-MOE RNA の糖環パッキングは C3'-endo 型に偏る。さらに、X 線結晶構造解析から C3'-endo コンフォメーションを取ることで、2'位、エチレングリコール骨格部位、及びリン酸ジエステル結合部位の酸素原子が水分子をキレートするように内包していることが明らかとなった (Figure 1-16)^{53, 54}。その結果、エンタルピー的に二重鎖形成が有利になると考えられている。

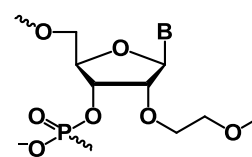


Figure 1-15. Structure of 2'-O-MOE RNA.

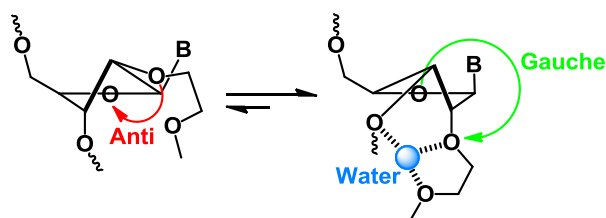


Figure 1-16. Conformational preorganization of 2'-O-MOE RNA due to gauche effect and hydrate.

また、2'-O-MOE RNA は酵素耐性に優れており、ウシ胎児血清中での安定性は 2'-デオキシ体の 24 倍、2'-O-Me の 3 倍であると報告されている⁵²。この理由は、エチレングリコール骨格によって、リン酸ジエステル結合周辺の立体障害が大きくなり、各種ヌクレアーゼに認識されにくくなるためであると考えられている⁵⁵。さらに、Manoharan らによって、2'-O-MOE/PS-ODN gapmer は RNase H 活性を誘導することができ、哺乳動物を用いた *in vivo* 実験において優れたアンチセンス活性を示すことが報告された⁵³。2013 年には、2'-O-MOE/PS-ODN gapmer から成るアンチセンス医薬である Kynamro[®] が FDA に認可された。

第六節 Locked Nucleic Acid (LNA)

近年、2'-O-修飾型核酸よりもさらに高い二重鎖形成能を有する核酸分子として、Wengel ら⁵⁶や Imanishi ら⁵⁷によって報告された 2',4'-架橋型ヌクレオシド (locked nucleic acid (LNA)) が注目されている。これは、2'位の酸素原子と 4'位の炭素原子がメチレン鎖で架橋された核酸誘導体であり、糖環パッカリングは C3'-endo に固定されている (Figure 1-17)。LNA の二重鎖形成能は極めて高く、一つの修飾当たり、 T_m 値は相補鎖が DNA の場合は+2-5 °C、RNA の場合は+4-8 °C 向上する⁵⁷。Koch らは、apoB タンパク質をコードする mRNA に相補的な配列を持つ PS-ODN 12mer (5'-G_{PS}C_{PS}A_{PS}T_{PS}T_{PS}G_{PS}G_{PS}T_{PS}A_{PS}T_{PS}T_{PS}C-3) と、LNA とホスホロチオエートの gapmer (5'-G^L_{PS}C^L_{PS}A_{PS}T_{PS}T_{PS}G_{PS}G_{PS}T_{PS}A_{PS}T_{PS}T^L_{PS}C^L-3'; B^L = LNA modified nucleoside)、それぞれを用いて T_m 測定を行い、LNA を導入すると T_m 値は大幅に向上することを報告した (PS-ODN 34 °C; LNA/PS-ODN gapmer 53 °C)⁵⁸。さらに、マウスを用いた apoB タンパク質の発現抑制効率を比較したところ、PS-ODN 12mer は薬理活性が発現しないが、LNA/PS-ODN gapmer を用いた場合に、血中の LDL コレステロールレベルを大幅に減少させることに成功し、LNA 修飾の有用性が示された⁵⁸。また、Kahn らは 100 種類の塩基配列の任意の位置に LNA 修飾を施したオリゴヌクレオチドと相補的な DNA 鎖の T_m 測定を行い、得られた T_m 値から熱力学的パラメータを算出した ($1/T_m = (R/\Delta H^\circ) \ln (C_T/4) + \Delta S^\circ/\Delta H^\circ$)。その結果から、隣り合う核酸塩基によってエントロピー項よりも、むしろエンタルピー項が有利に働くことで二重鎖が安定化する場合があることを報告している。なお、エンタルピー項が有利に働くとは、塩基対間の π - π スタッキングや水和による安定化の効果が大きいことを意味する。さらに、どの核酸塩基に LNA 修飾を施した場合に最も安定な二重鎖を形成するかを検討した結果、プリン塩基よりもピリミジン塩基に LNA 修飾を施した方が二重鎖が安定化し、二重鎖形成能は $C^L > T^L > G^L \gg A^L$ の順となると報告している⁵⁹。

このように、LNA は極めて高い二重鎖形成能を有し、*in vivo* においても有効な生理活性を示すことから医薬候補分子として大いに期待されている。

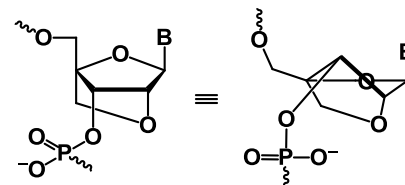


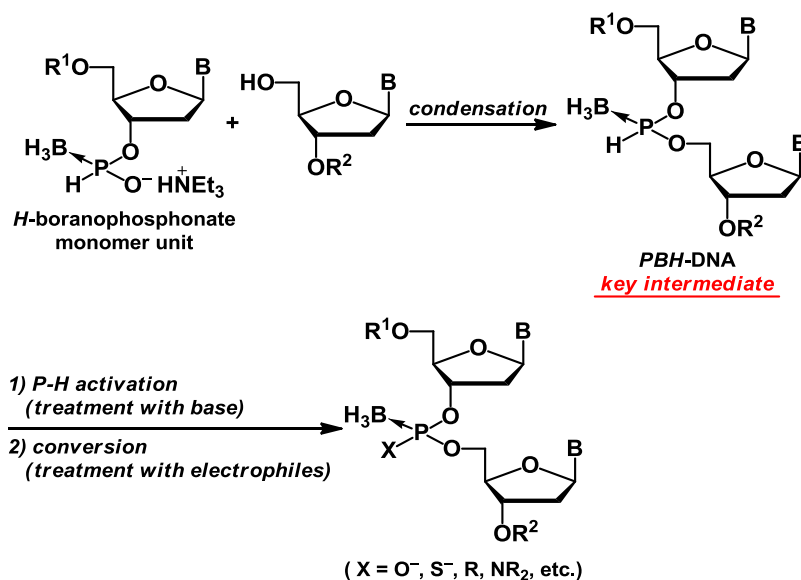
Figure 1-17. Structure and conformation of LNA.

第七節 *H*-ボラノホスホネート法によるボラン修飾型 ODN の合成

1-7-1. *H*-ボラノホスホネート法の概略

本研究では、効率的なボラン修飾型 ODN の合成を目指し、*H*-ボラノホスホネート法に注目した。*H*-ボラノホスホネート法は、*H*-ボラノホスホネートモノマーユニットと 5'位に遊離の水酸基を有するヌクレオシドを縮合し、鍵中間体として *H*-ボラノホスホネート DNA (*PBH*-DNA) を得た後に、*PBH*-DNA の P-H 結合の水素原子を塩基で引き抜き、生じたリン原子上のアニオンと種々の求電子剤を反応させることで、様々なボラン修飾型 DNA の合成が可能となる手法である (Scheme 1-10)⁶⁰。

Scheme 1-10



また、*H*-ボラノホスホネートモノマーユニットのリン原子の酸化数は+1 であり、ボラノホスホトリエステル法で用いられたモノマーユニット (酸化数 = +3) よりもさらに酸化度が低い誘導体である。一般に、リンオキシ酸の縮合反応ではリン原子の酸化度が低いほど反応性が高いことが知られており、*H*-ボラノホスホネートモノマーユニットは高い反応性を有することが期待できる。これまでに、Higashida らはチミジン 3'-*H*-ボラノホスホネートモノマーユニットの合成に成功した。さらに、液相法でジチミジル酸 *PBH*-ODN (T_{PBH}T) と、T_{PBH}T を経由したジチミジル酸 *PBS*-ODN (T_{PBS}T) の合成条件も検討された^{60a}。

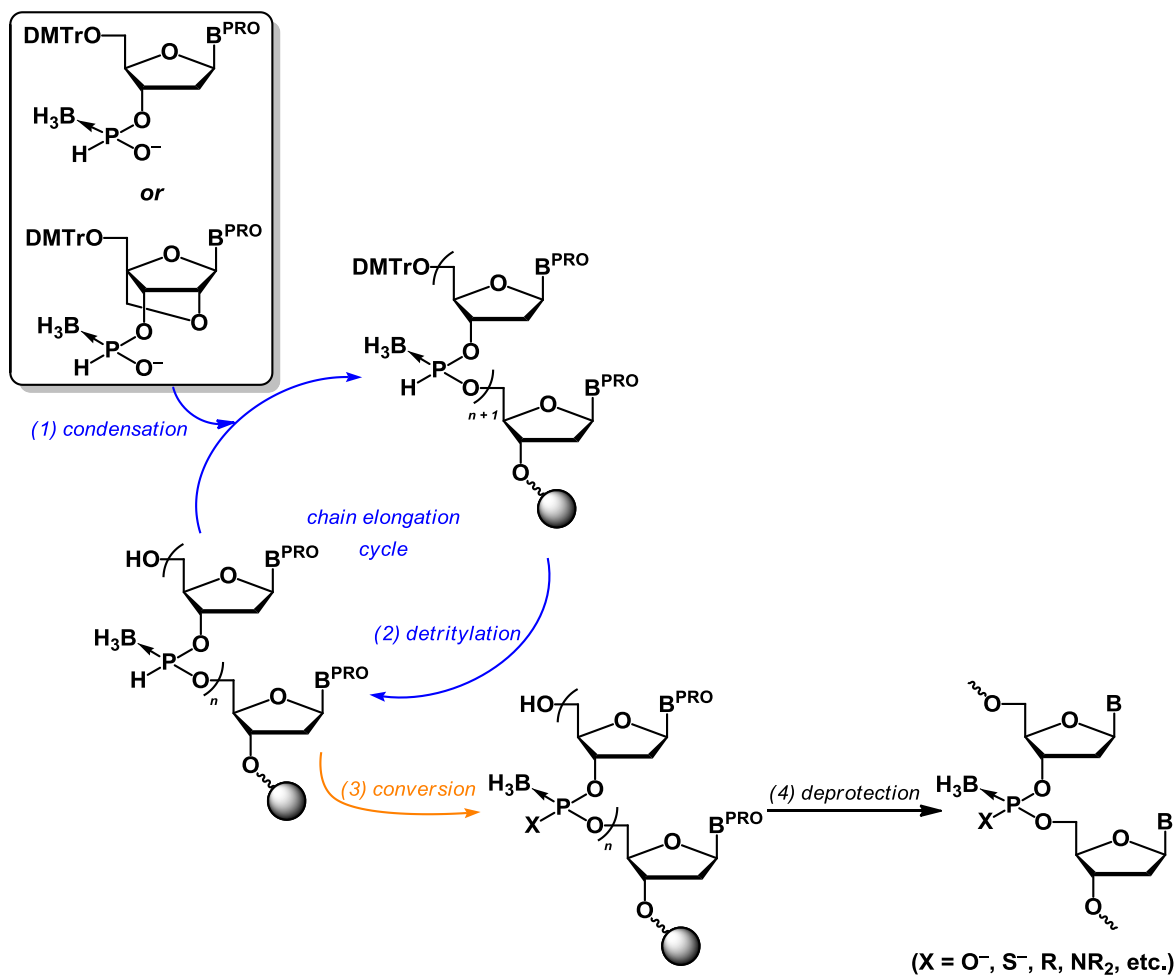
1-7-2. 研究目的

本研究では、*H*-ボラノホスホネート法を固相合成に応用し、種々の長鎖ボラン修飾型 ODN の合成を目指した。また、2'-デオキシボラン修飾型 ODN の欠点であ

る、相補鎖への低い親和性を補うために、LNA 修飾を施した *PBO*-ODN (^{LNA}PBO -ODN) を開発し、物理化学的性質や生物学的性質を明らかにすることで、医薬候補分子への応用を目指した。

固相合成の概略図を Scheme 1-11 に示す。まず、controlled-pore glass (CPG) などの固相担体に担持させたヌクレオシドとモノマーユニットを縮合し、次に伸長末端の DMTr 基の除去を行う。このサイクルを目的とする塩基配列に応じて繰り返し、*PBH*-ODN を得た後に、種々の変換反応を施す。最後に核酸塩基部位の保護基の除去と固相担体からの切り出しを行うことで、目的のボラン修飾型 ODN が得られる。

Scheme 1-11

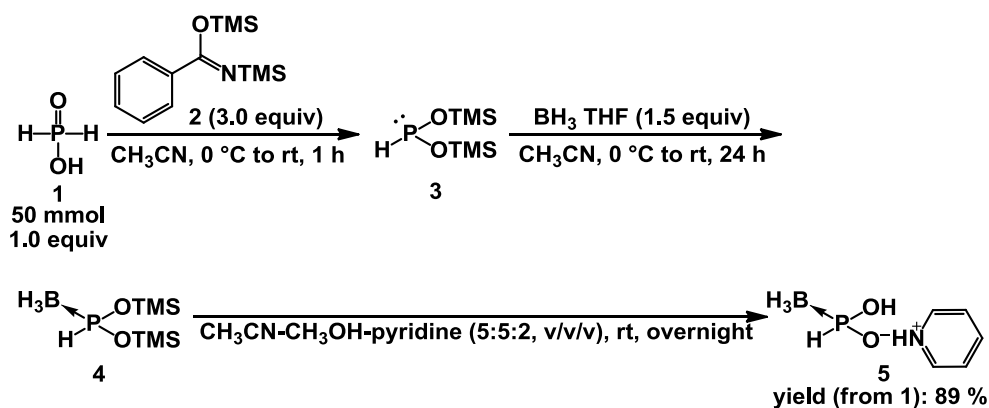


第二章 液相法によるボラン修飾型 ODN 二量体の合成

第一節 *H*-ボラノホスホネートモノマーユニットの合成

まず、モノマーユニット合成に用いる *H*-ボラノホスホニル化剤として、ピリジニウム *H*-ボラノホスホネート **5** を既知の手法で合成した (Scheme 2-1)^{60a}。

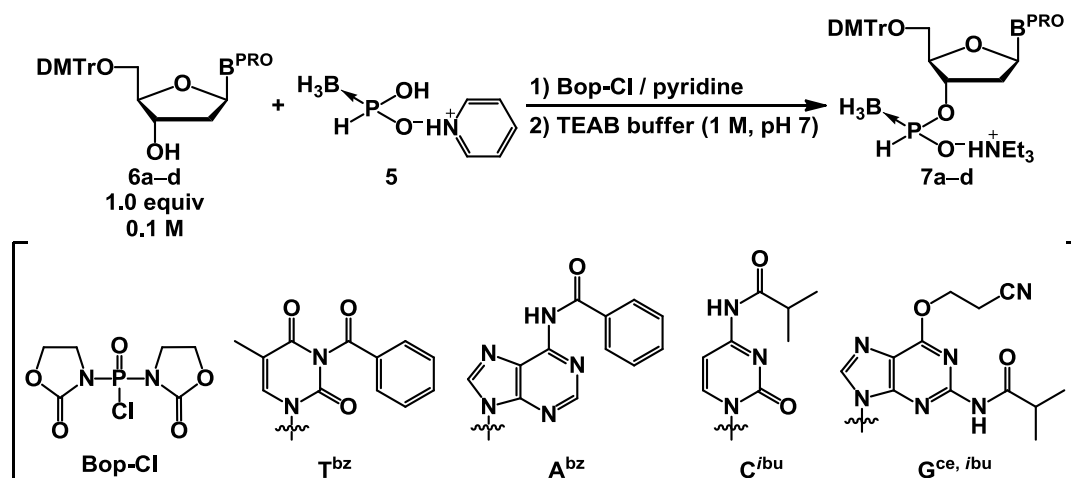
Scheme 2-1^[a]



[a] TMS = Trimethylsilyl.

次に、固相合成時に伸長末端となる5'位の水酸基に酸性条件下除去可能なDMTr基、核酸塩基部位にアンモニア水で除去可能なアシル系の保護基を導入したヌクレオシド **6a-d** と、ピリジニウム *H*-ボラノホスホネート **5** を、縮合剤に bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride (Bop-Cl) を用いて縮合し、3'-*H*-ボラノホスホネートモノマーユニット **7a-d** を合成した (Table 2-1)。

Table 2-1. Synthesis of monomer units **7a-d**.^[a]



Entry	6 (B ^{PRO})	Reagents and conditions	Yield of 7 [%]
1	a (T ^{bz}), 3.0 mmol	5 (1.2 equiv), Bop-Cl (1.2 equiv), rt, 1 h	95
2	b (A ^{bz}), 1.0 mmol	5 (1.5 equiv), Bop-Cl (1.5 equiv), rt, 4 h	49
3	c (C ^{bu}), 0.5 mmol	5 (1.8 equiv), Bop-Cl (1.8 equiv), rt, 1.2 h	36
4	d (G ^{ce, bu}), 1.0 mmol	5 (1.8 equiv), Bop-Cl (1.8 equiv), rt, 2 h	41
5	b (A ^{bz}), 1.0 mmol	5 (2.0 equiv), Bop-Cl (2.0 equiv), 0 °C to rt, 25 min	72
6	c (C ^{bu}), 1.0 mmol	5 (2.0 equiv), Bop-Cl (2.0 equiv), 0 °C to rt, 30 min	60
7	d (G ^{ce, bu}), 1.0 mmol	5 (2.0 equiv), Bop-Cl (2.0 equiv), 0 °C to rt, 15 min	74

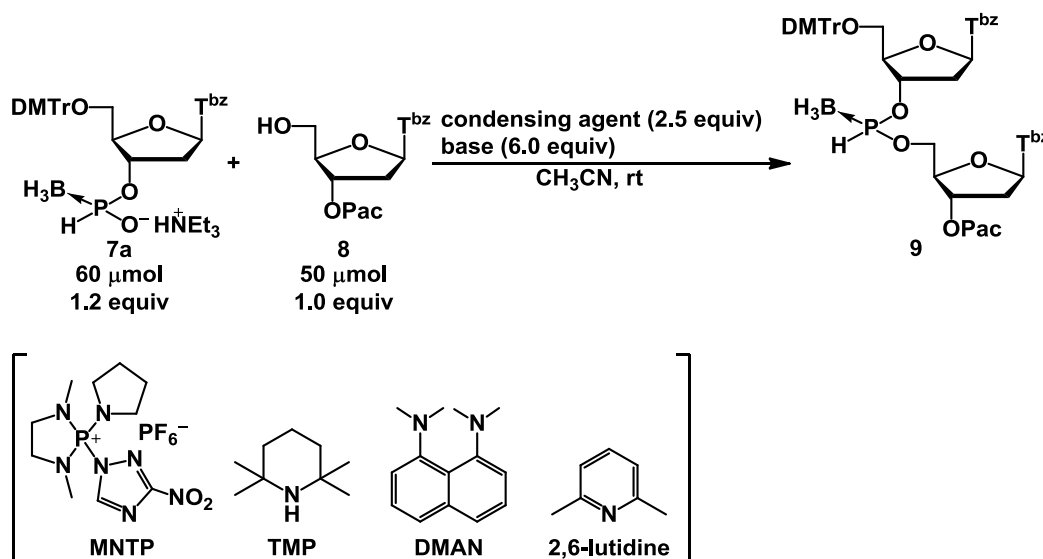
[a] TEAB = triethylammonium bicarbonate (Et₃NH⁺HCO₃⁻).

チミジンモノマーユニット **7a** は既知の手法で合成し、95%という良好な収率で得た **60a**。しかし、同様の条件を他の核酸塩基を有するモノマーユニット合成に適用したところ、目的物の収率は36–49%にとどまった (Table 2-1, Entry 2–4)。この理由は、Bop-Cl がピリジンに溶解する際に発生する溶解熱によって、*H*-ボラノホスホニル化剤が分解するなどの副反応が考えられた。そこで、氷浴下で Bop-Cl を系中に加え、その後反応温度を徐々に室温に上昇させた。また、長時間反応させると、モノマーユニットと未反応のヌクレオシドが縮合した 3'-3'-PBH-ODN 二量体が副生することから、縮合反応完結後、速やかに後処理を行った (反応開始から約 15–30 分後に反応を停止した)。このように縮合反応条件を改良した結果、チミン塩基以外の核酸塩基を有するモノマーユニットの単離収率は、60–74%に向上した (Table 2-1, Entry 5–7)。

第二節 T_{PBH}T の合成

固相合成に先駆け、液相においてチミジンモノマーユニット **7a** と 5'位に遊離の水酸基を有するチミジン誘導体 **8** を縮合することで、T_{PBH}T **9** を合成し、縮合反応の条件検討を行った (Table 2-2)。

Table 2-2. Synthesis of T_{PBH}T **9**.^[a]



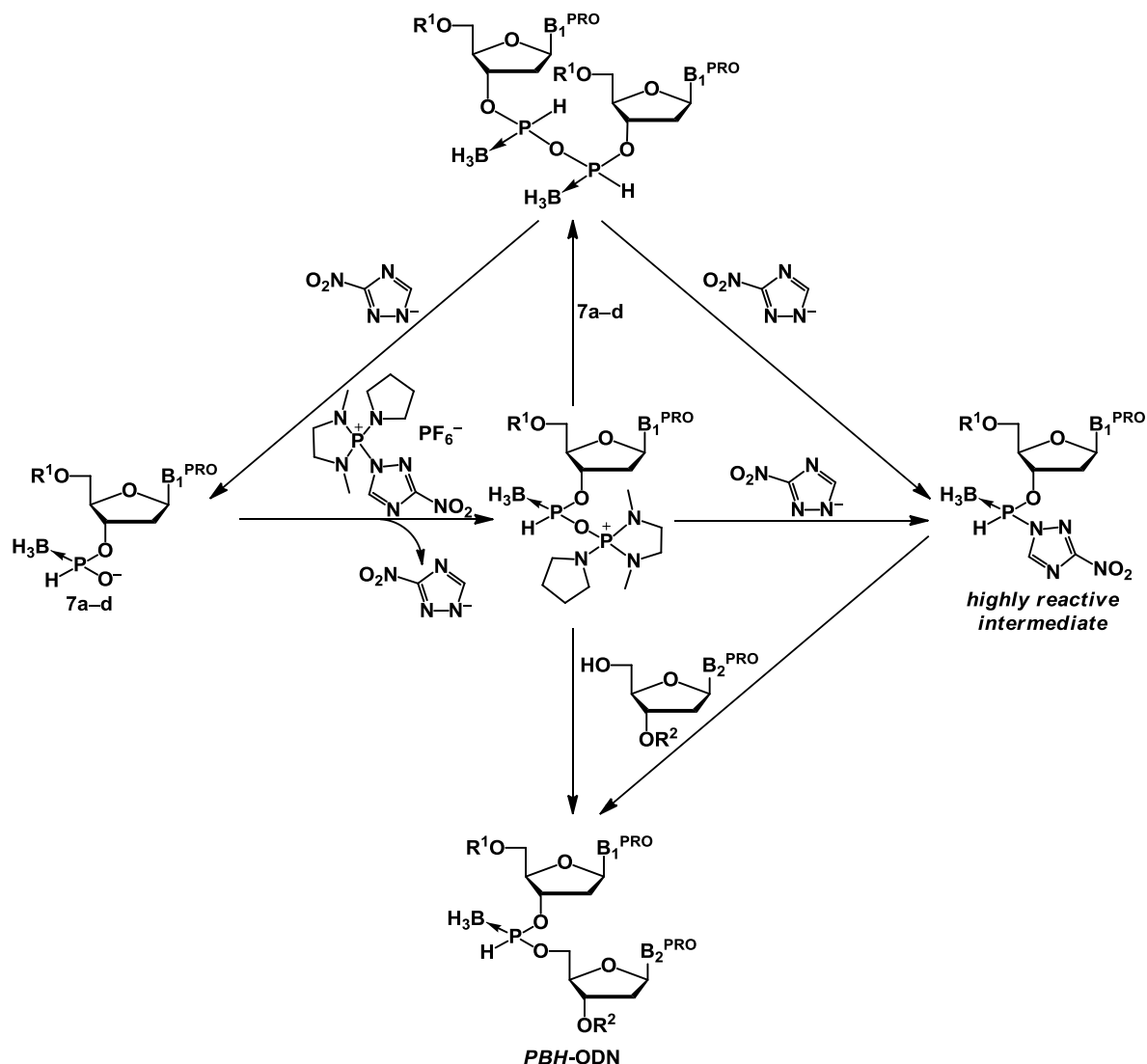
Entry	Reagents and conditions	Conversion [%] ^[b]	Yield of 9 [%]
1	Bop-Cl, TMP, 2 h	ca. 70	67
2	MNTP, DMAN, 30 min	quant	Not isolated
3	MNTP, 2,6-lutidine, 30 min	quant	88

[a] Pac = Phenoxyacetyl. [b] Determined by TLC analysis.

縮合剤に Bop-Cl、塩基に 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TMP) を用いた場合、TLC の反応追跡から縮合反応は 7 割程度で停止することが分かった (Table 2-2, Entry 1)。また、Bop-Cl 由来の塩酸塩が析出し、一部の DMTr 基が脱離した。さらに、難溶性の塩酸塩は、固相合成時に析出するとそれを洗浄により除去する工程が増えるため、操作がより煩雑化する。そこで、塩酸塩が副生しない縮合剤の検討を行った。縮合剤として、ボラノホスホトリエステル法に有効な 1,3-dimethyl-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidiniu hexafluorophosphate (MNTP)⁶¹ を選択した。MNTP は、数あるホスホニウム型縮合剤の中でも極めて高い縮合効率を示す。その理由は、分子軌道計算を用いたモデル反応の解析から、MNTP を用いた際に生成する中間体の LUMO のエネルギー準

位と求核種の HOMO とのエネルギー準位の差が、他の縮合剤を用いた場合よりも小さいことから、求核攻撃が起こり易いためであると考察されている⁶¹。また、MNTP は骨格内に 3-nitro-1,2,4-triazole (NT) を有しているため、別途求核触媒を加える必要がないことも利点として挙げられる。MNTP を用いた場合の PBH-ODN 二量体が生成する反応機構を Scheme 2-2 に示す。

Scheme 2-2



また、Table 2-2、Entry 2 では塩基として、立体的に嵩高く脱ボラノ化を引き起こさないと考えられる 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene (DMAN) (共役酸の pKa; 12.34⁶²) を用いた。TLC による反応の追跡から、DMTr 基の脱離は観測されず、反応は定量的に進行したことが示唆された。しかし、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行うと、TPBH 9 は全て分解した。さらに脱リン酸化が起こり、チミジン誘導体のみが単離された。これは、DMAN の塩基性によりシリ

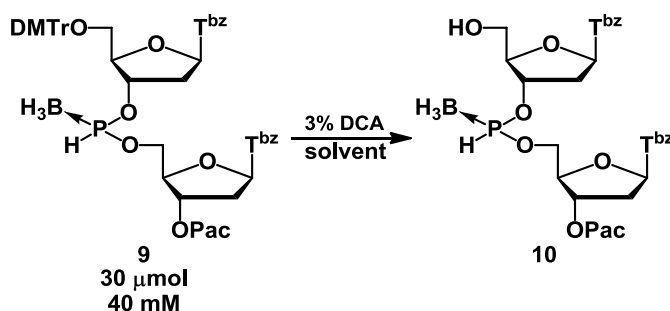
カゲルに含まれる水から生成した OH^- が、**9** のリン原子に対して求核攻撃することで加水分解が起こったためであると考えられる。DMAN は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製前に除去すべきだが、抽出操作を行っても目的物とともに有機層に回収された。そのため、**9** を単離する条件としては不適であったが、反応後の溶液をろ過、洗浄により除去可能な固相合成には適用できると判断した。また、Table 2-2、Entry 3 に示した MNTP、2,6-ルチジン (共役酸の pK_a ; 6.77⁶³) は、第三章で述べる固相合成で最適化した縮合反応条件を再度液相合成に適用した条件である。反応は定量的に進行し、さらに、2,6-ルチジンは塩基性が低く、シリカゲル中に水が含まれていても OH^- が生成しにくいため、**9** の加水分解が進行せず、88%という高収率で単離することができた。

なお、シリカゲルカラムクロマトグラフィーの際に、溶出溶媒に塩基を添加しないと脱 DMTr 化が進行する一方、トリエチルアミンなどの強塩基を添加すると目的物が全て加水分解した。種々の塩基を検討した結果、溶出溶媒にピリジンを 0.5% 添加することで、これらの副反応を回避することに成功した。

第三節 *H*-ボラノホスホネートジエステル体の DMTr⁺存在下での安定性

序論、第四節で述べた通り、ボラノホスフェートジエステル体は DMTr⁺存在下で速やかに *H*-ホスホネート誘導体に変換される。そこで、固相合成における最適な脱 DMTr 化の条件を探索するため、T_{PBH}T **9** を用いて *H*-ボラノホスホネートジエステル体の DMTr⁺存在下での安定性を評価した (Table 2-3)。なお、酸として核酸オリゴマーの合成で汎用されている 3% dichloroacetic acid (DCA) を用いた。

Table 2-3. Detritylation of *H*-boranophosphonate diester.



Entry	Solvent	Ratio and chemical shift of compounds ^[a]
1	CDCl ₃	10 (67%, δ 133.1 ppm) : 11 ^[b] (33%, δ 18.0 ppm)
2	CDCl ₃ -Et ₃ SiH (1:1, v/v)	10 (86%, δ 133.0 ppm) : 13 ^[c] (2%, δ 23.7 ppm) : 1 ^[c] (12%, δ 5.8 ppm)

[a] Estimated by ³¹P NMR after 2 h. [b] See, Figure 2-1 and Scheme 2-3. [c] See, Figure 2-2 and Scheme 2-4.

まず、DMTr⁺の捕捉剤を添加しなかった場合について述べる (Table 2-3, Entry 1)。³¹P NMR 測定より、67%の **10** が δ 133.1 ppm に確認されたが、同時に 33%の構造未知の化合物が δ 18.0 ppm に観測された (Figure 2-1)。

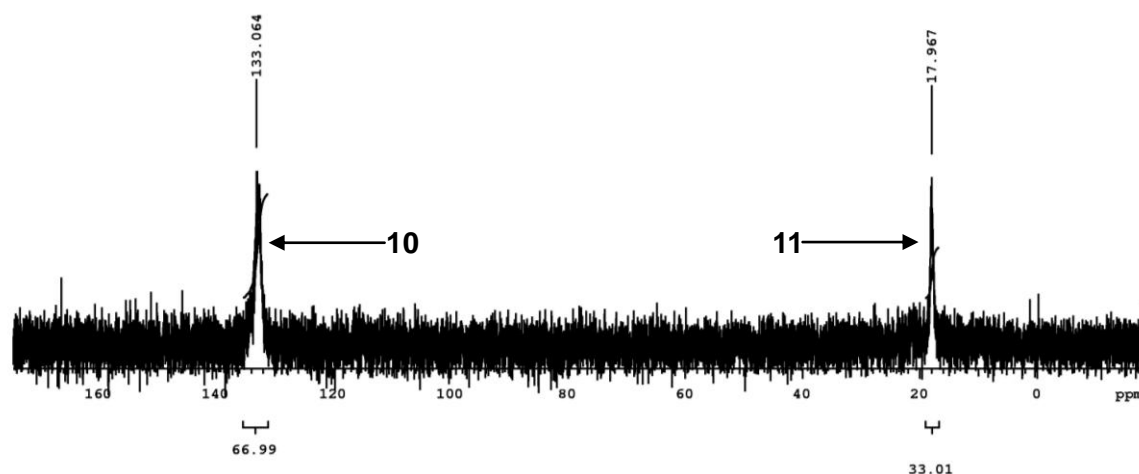
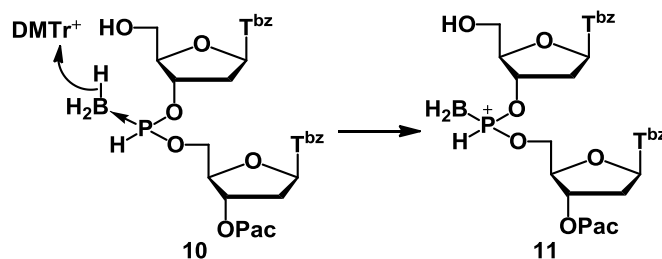


Figure 2-1. ³¹P NMR spectrum of crude mixture treated with 3% DCA in CDCl₃ (Table 2-3, Entry 1).

反応機構から $\delta 18.0$ ppm の化合物を推測すると、**10** のボラノ基が酸化されて生成する **11** 由来であると考えられる (Scheme 2-3)。しかし、明確な確証が得られていないため、今後 ^1H または ^{31}P NMR 測定から $^1J_{\text{PH}}$ などを算出し、正確な同定を行う必要がある。

Scheme 2-3



一方、DMTr⁺の捕捉剤としてトリエチルシラン存在下で反応を行った場合 (Table 2-3, Entry 2)、 $\delta 5.8$ ppm にホスフィン酸 **1** 由来、 $\delta 23.7$ ppm に P-DMTr 体 **13** 由来と考えられるシグナルが観測されたものの、目的物である **10** は 86%で得られた。また、Entry 1 で観測された **11** 由来のシグナルは観測されなかった (Figure 2-2)。

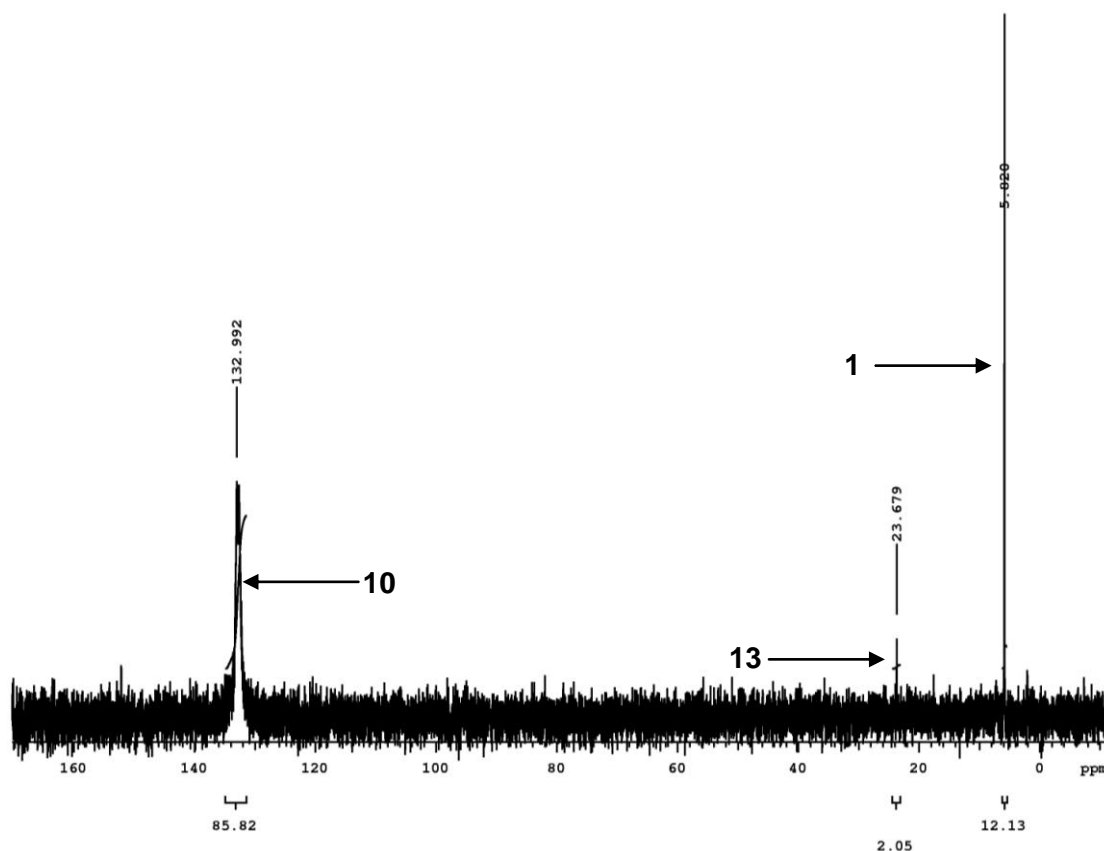
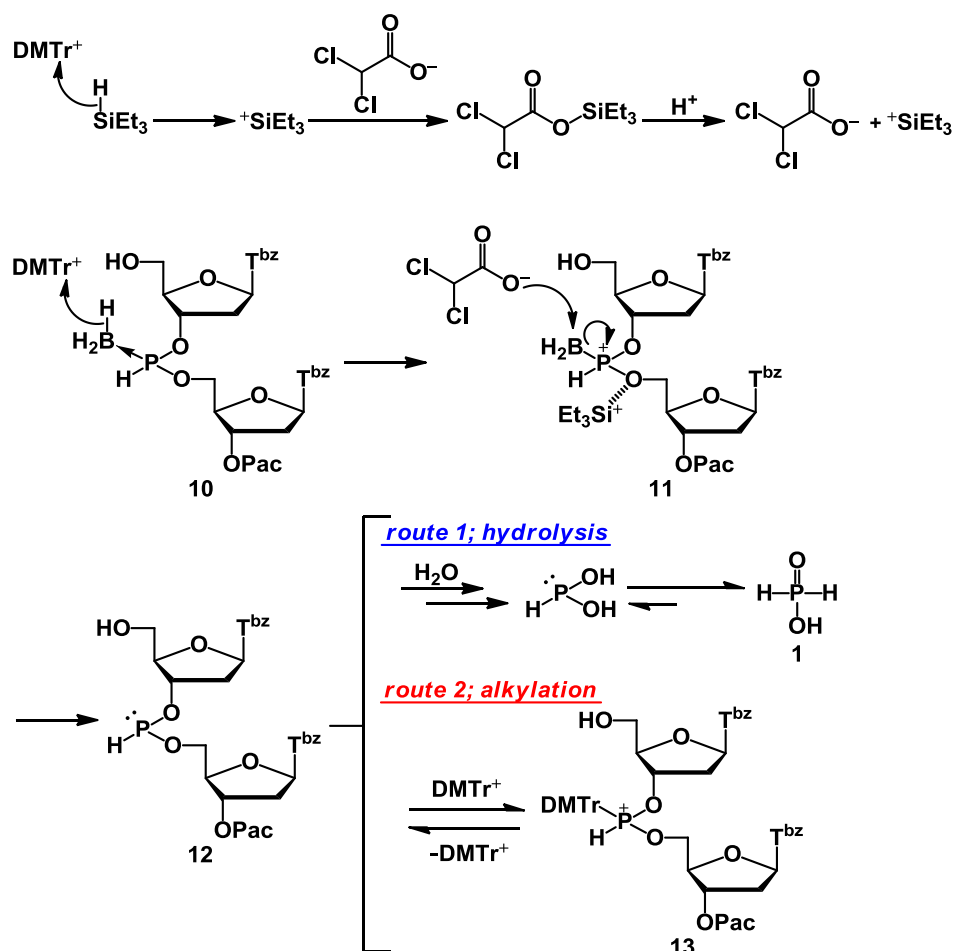


Figure 2-2. ^{31}P NMR spectrum of crude mixture treated with 3% DCA in $\text{CDCl}_3\text{-Et}_3\text{SiH}$ (Table 2-3, Entry 2).

1 と 13 が生成する反応機構について、以下のように考察した。まず、トリエチルシランが DMTr⁺を還元した際に生成するトリエチルシリルカチオンが、DCA 由来のカルボキシラートアニオンと反応し、シリルエステルが生成する。しかし、酸性条件下においてシリルエステルは不安定なため、再び系中にトリエチルシリルカチオンが生成する。その際、ホスホニウム中間体 11 のリン酸ジエステル部位の酸素原子に Lewis 酸として配位することで、リン原子の電子密度が下がる。その結果、DCA 由来のカルボキシラートアニオンが 11 の BH₂を引き抜き、ホスフィナイト中間体 12 が生成する。最後に、溶媒中に含まれる水分子によって 12 が加水分解し、ホスフィン酸 1 が生成した (Scheme 2-4, route 1)、または、DMTr⁺がトリエチルシランによって還元されるよりも早く、12 と反応することで P-DMTr 体 13 が生成したと考えられる (Scheme 2-4, route 2)。

Scheme 2-4



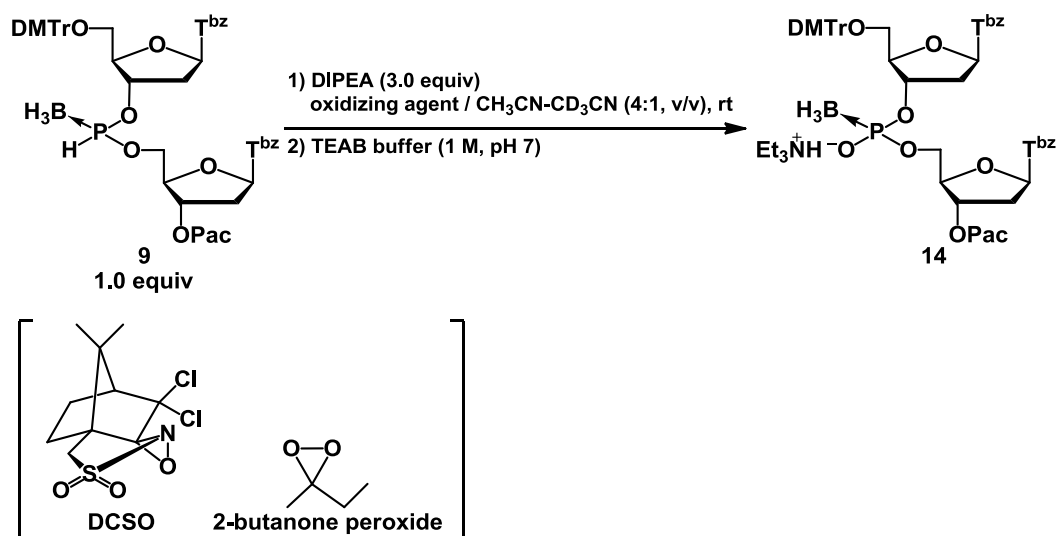
このように、トリエチルシランを用いても副反応を完全に抑制することはできなかった。トリエチルシランの当量を CDCl₃ よりも増やすと、原料の 9 が不溶となるため、Entry 2 の条件を固相合成に適用することにした。ただし、固相合成の際は DMTr⁺をできるだけ PBH-ODN に接触させないように、反応溶液を素早く洗浄

しなければならないことが示唆された。また、ボラン修飾型核酸に関して、DMTr⁺存在下での安定性を順に並べると次のようになることが明らかとなった。ボラノホスホトリエステル体 > H-ボラノホスホネートジエステル体 >> ボラノホスフエートジエステル体

第四節 T_{PBO}T の合成 (酸化反応)

T_{PBH}T **9** を酸化し、ジチミジル酸 PBO-ODN (T_{PBO}T) **14** を合成する反応条件を検討した (Table 2-4)。

Table 2-4. Synthesis of T_{PBO}T **14** via T_{PBH}T **9**.^[a]



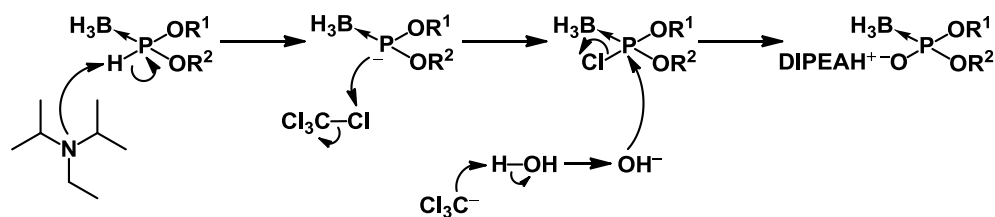
Entry	Reagents and conditions	Conversion [%]	Yield of 14 [%]
1	DCSO (3.0 to 6.0 equiv), 50 h	complex mixture	-
2	2-butanone peroxide (3.0 equiv), 23 h	43 ^[b]	Not isolated
3	CCl ₄ (10.0 equiv), H ₂ O (5.0 equiv), 1 h	quant ^[b]	87
3	I ₂ (10.0 equiv), H ₂ O (5.0 equiv), 2 h	complex mixture	-

[a] DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamine. [b] Estimated by ³¹P NMR of crude mixture.

酸化剤として(+)-(8,8-dichlorocamphorylsulfonyl)oxaziridine (DCSO) を用いた場合、反応開始から 50 時間経過した後に ³¹P NMR 測定を行ったが、**14** 由来のシグナルは観測されなかった (Table 2-4, Entry 1)。また、2-butanone peroxide を用いた場合 (Table 2-4, Entry 2)、³¹P NMR で δ 95 ppm 付近に **14** 由来のシグナルを確認したが、分解物由来のシグナルが δ 0 ppm 付近に観測された (**14** : 分解物 = 43% : 57%)。以上のように、DCSO や 2-butanone peroxide などの HASB 理論でハードな求電子剤に分類される過酸化系酸化剤を用いると、副反応が顕著に進行した。一方、PBH-ODN 二量体の P-H 結合の水素原子が塩基によって引き抜かれた際に生じるリンアニオンは、ソフトな求核種となる。そのため、ハードな求電子剤との反応性が低いと考えられる。そこで、ソフトな求電子剤であるポジティブハロ

ゲン化試薬を用いた (Table 2-4, Entry 3, 4)⁶⁴。ポジティブハロゲン化試薬として CCl_4 を用いて酸化反応を行った場合、TLC より反応は定量的に進行していることが確認された。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、収率 86% で $\text{T}_{\text{PBO}}\mathbf{14}$ を得た (Table 2-4, Entry 3)。 CCl_4 を用いた場合の酸化反応機構を Scheme 2-5 に示す。P-H 結合の水素原子を塩基で引き抜き、生じたリン原子上のアニオンと CCl_4 が反応して中間体としてボラノホスホクロリデートが生成し、これを加水分解することで目的の PBO-ODN 二量体が得られる。

Scheme 2-5

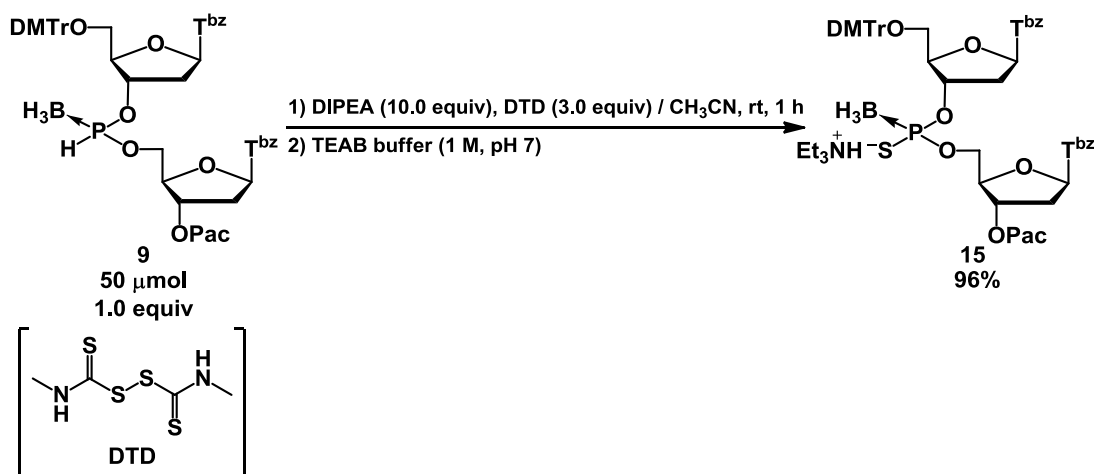


次に、ボラノホスホクロリデートよりもリン原子上にヨウ素を有するボラノホスホアイオデートの方が加水分解され易いと考え、ハロゲン化試薬としてヨウ素を用いた (Table 2-4, Entry 4)。しかし、³¹P NMR で反応を追跡した結果、 $\mathbf{14}$ 由来のシグナルは確認できなかった。その理由として、ヨウ素がアセトニトリルに難溶であるため、 $\text{T}_{\text{PBH}}\mathbf{9}$ のヨウ素化が効率的に進行しないことや、P-I 結合は生成するが、ヨウ素は原子半径が大きくかつ電子求引性の原子であるために、中間体であるボラノホスホアイオデートから脱ボラノ化が進行したことが考えられる。以上の検討から、酸化反応には DIPEA、 CCl_4 、 H_2O を組み合わせた条件が最適であると判断した。

第五節 T_{PBS}T の合成 (硫化反応)

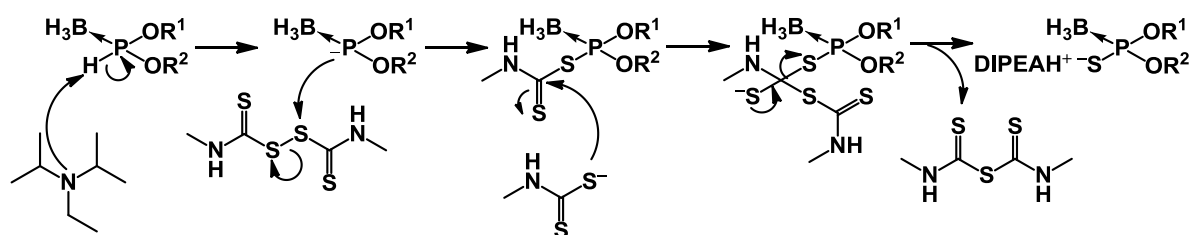
次に、T_{PBH}T **9** を硫化することで、T_{PBS}T **15** の合成を行った (Scheme 2-6)。

Scheme 2-6



硫化剤には、オキサザホスホリジン法による *PS*-ODN の合成に用いられる dimethylthiuramdisulfide (DTD)⁶⁵ を選択した。DTD 以外の硫化剤の候補として、S₈ や 3*H*-1,2-benzodithiol-3-one-1,1-dioxide (Beaucage Reagent)⁶⁶ が考えられた。しかし、S₈ はアセトニトリルに難溶なため固相合成に不適である。また、Beaucage Reagent は基質を硫化した後に生成する化合物が酸化剤としての活性を有するため、目的物が酸化される副反応が起こることが報告されている⁶⁶ これらの理由から、DTD が適切な硫化剤であると判断した。DTD を用いた場合の硫化反応機構を Scheme 2-7 に示す。

Scheme 2-7



P-H 結合の水素原子を引き抜く塩基として DIPEA を用いた場合、反応開始から一時間で硫化反応が完結したことを TLC より確認した。しかし、DIPEA の代わりに DMAN を用いると、反応開始から 17 時間経過しても原料の **9** は消失せず、硫化反応の効率が低かった。プロトンスポンジとして知られる DMAN は、その立体構造により系中に存在する遊離のプロトンしか捕捉しないため、P-H の脱プロトン化には適さないと考えられる。DIPEA 及び DTD を用いた条件で得た粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、T_{PBS}T **15** を収率 96% で得た。

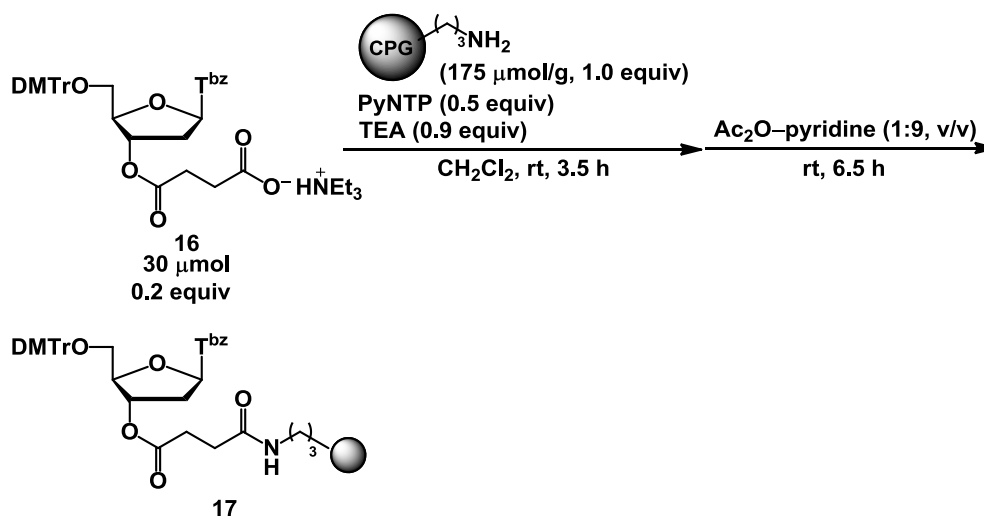
第三章 固相法によるボラン修飾型 ODN の合成

液相において、 $T_{PBH}T$ を経由して $T_{PBO}T$ 及び $T_{PBS}T$ を収率良く合成できたため、固相法によるオリゴマーの合成を試みた。本章では、その詳細を述べる。

第一節 チミジン誘導体の固相担体への導入

固相担体には、無機多孔質のガラスビーズである controlled-pore glass (CPG) を用いた。市販の CPG は、表面にシラノールが残存している可能性があるため、まず trimethylsilyl chloride を用いて CPG 表面をシリル化した。次に、3'位の水酸基をスクシニル化したチミジン誘導体 **16** と CPG 上のアミノ基を、3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP)⁴¹ を縮合剤として用いて縮合し、最後に未反応のアミノ基をアセチル基でキャップ化することで、チミジン誘導体を担持した固相担体 **17** を調製した (Scheme 3-1)。17 の 5'-O-DMTr 基を酸性条件下除去し、生成した DMTr⁺ の吸光度を定量することで、固相担体 1 g 当たり 20–30 μmol のチミジン誘導体が担持されていることを確認した。

Scheme 3-1^[a]



[a] TEA = Triethylamine; Ac_2O = acetic anhydride.

上記の反応を、ペプチド合成で汎用されている縮合剤である dicyclohexylcarbodiimide (DCC)

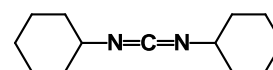
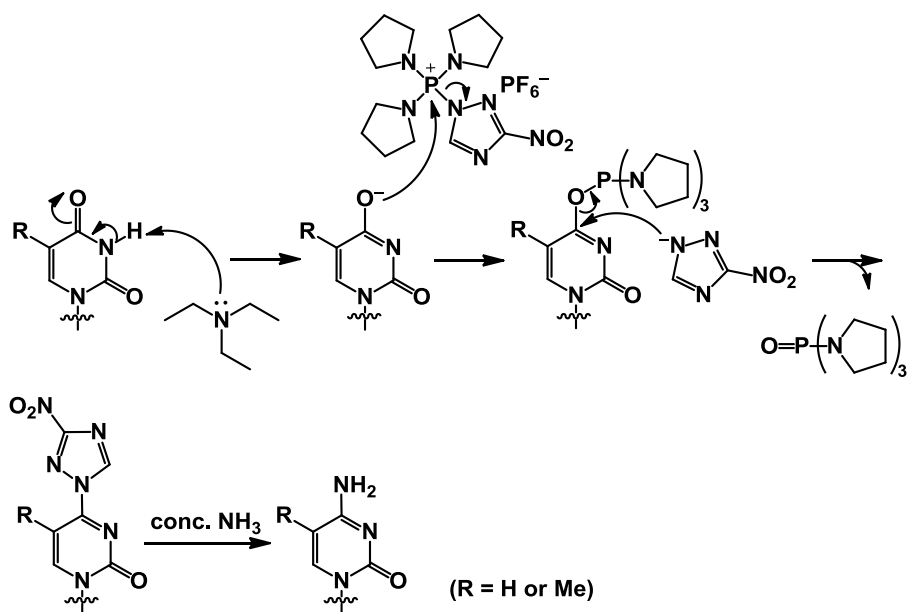


Figure 3-1. Structure of DCC.

(Figure 3-1) を用いて行くと、3'-O-スクシネート誘導体を CPG 表面のアミノ基に対して過剰量加えなくてはならず、導入量を制御することが困難となる。一方、PyNTP を用いる場合、目的とする導入量の分だけ 3'-O-スクシネート誘導体を加えれば良いため、固相担体の調製が容易いという利点が

ある。ただし、無保護のウリジンやチミジンを固相担体に導入する場合、PyNTPを用いると Scheme 3-2 のような副反応が進行し、一部のウラシル塩基やチミン塩基がシトシン塩基や 5-メチルシトシン塩基へと変換されるため、縮合剤に DCC を用いる必要がある。

Scheme 3-2



第二節 二量体の合成

3-2-1. PBS-ODN 二量体の合成

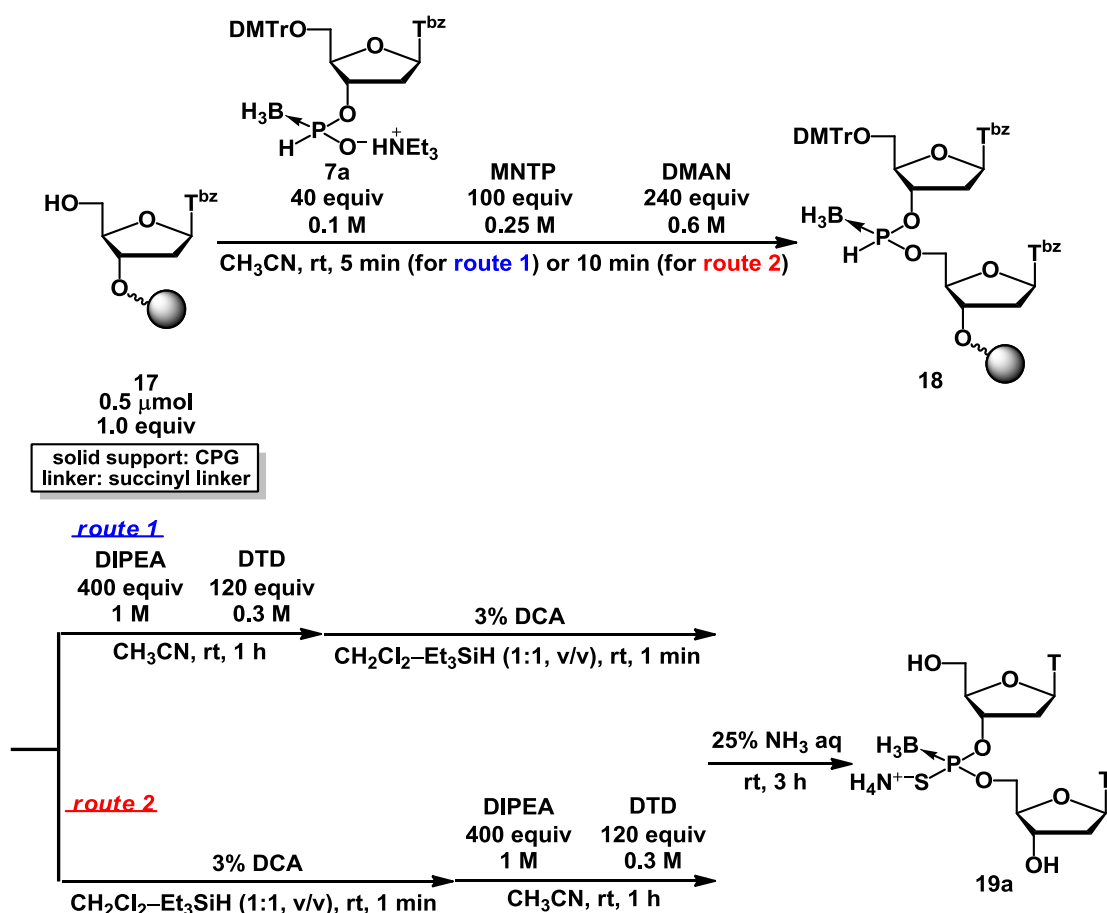
➤ T_{PBS}T の合成

まず、固相担体上で T_{PBS}T を合成することで、固相合成における種々の反応条件の検討を行った。

【脱 DMTr 化の条件検討】

第二章、第四節で述べた通り、ボラン修飾型核酸はリン原子の電子密度やリン原子上の置換基効果によって DMTr⁺存在下での安定性が異なる。そこで、DMTr 基を除去する工程を PBH-ODN 生成後、または PBS-ODN 生成後のどちらで行うべきかを検討した (Scheme 3-3, route 1 or route 2)。なお、液相での反応条件検討の結果を基に、縮合反応は MNTP と DMAN、硫化反応は DIPEA と DTD を用いて行った。

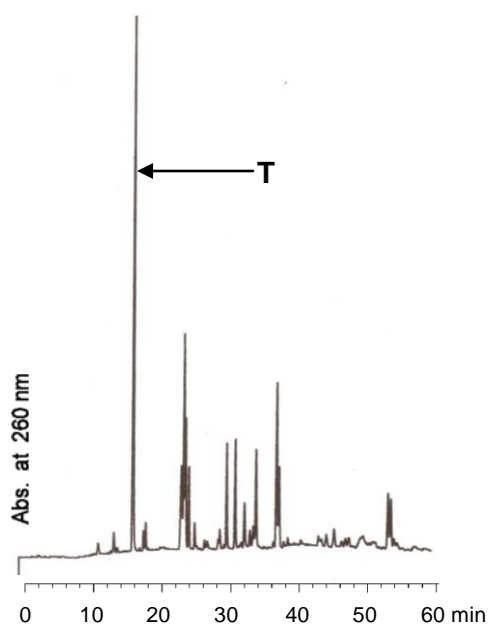
Scheme 3-3



* 縮合時間は route 1 では 5 分、route 2 では 10 分として行ったが、この時間の差では縮合効率に影響を与えないため、本質的な問題とならない。

硫化反応後に脱 DMTr 化を行った場合 (route 1)、Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) による分析の結果、チミジンがメインピークとして観測され、同定不能の副生成物も数多く確認された (Figure 3-2 (a))。一方、脱 DMTr 化後に硫化反応を行った場合 (route 2)、T_{PBS}T 19a がメインピークとして観測され、route 1 に比べて副生成物の生成を抑制することができた (Figure 3-2 (b))。19a の収率を RP-HPLC におけるチミジンのピークとの面積比から算出すると、T : T_{PBS}T 19a = 13 : 87 となった。

(a) route 1



(b) route 2

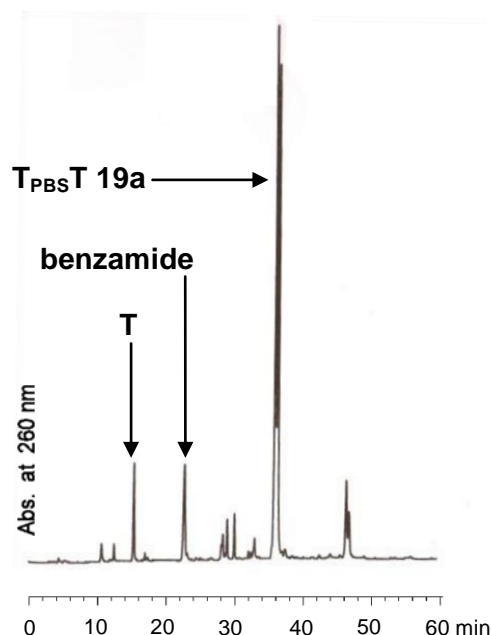
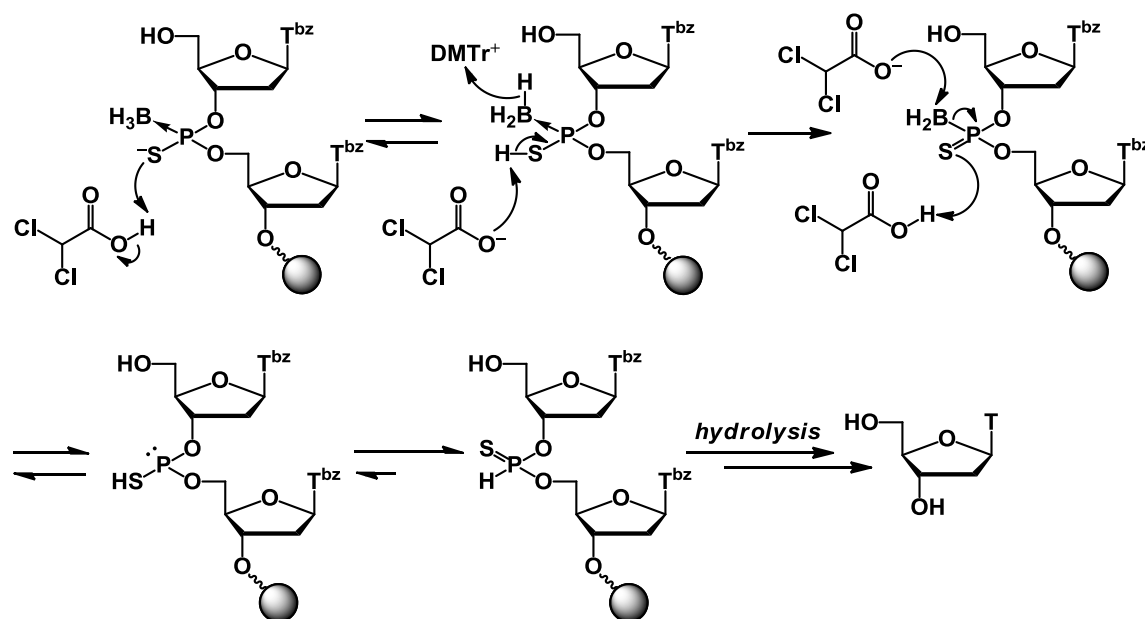


Figure 3-2. RP-HPLC profiles of crude T_{PBS}T 19a: (a) synthesized according to Scheme 3-3, route 1; (b) synthesized according to Scheme 3-3, route 2. RP-HPLC was performed with linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH 7) at 30 °C for 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min.

* 19a は、メインピークの分取後、MALDI-TOF MS 測定によって分子量を確認することで同定した。以後、様々なボラン修飾型核酸の二量体、四量体、及び十二量体の合成について述べるが、全て MALDI-TOF MS 測定によって同定を行った。各オリゴマーの分子量の計算値と実測値は、実験項に記した。

上記の結果から、ボラノホスホロチオエートジエステルはボラノホスフェートジエステルと同様に、トリエチルシランを用いても DMTr⁺によって脱ボラノ化が容易に進行したことが示唆された (Scheme 3-4)。このことから、PBH-ODN 生成後に脱 DMTr 化を行い、その後硫化反応を行うべきであると判断した。

Scheme 3-4



しかし、**route 2** で合成を行っても、チミジンや副生成物が観測されたため、脱 DMTr 化の条件検討を行った。まず、トリエチルシランの DMTr⁺の捕捉力が不十分であることが考えられたため、DMTr⁺との反応性が *H*-ボラノホスホネートジエステル体よりも高いボラノホスフェートジエステル体を捕捉剤として用いることにした。トリエチルシランの代わりに、0.1 M triethylammonium

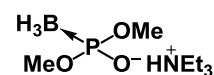


Figure 3-3. Structure of triethylammonium dimethylboranophosphate.

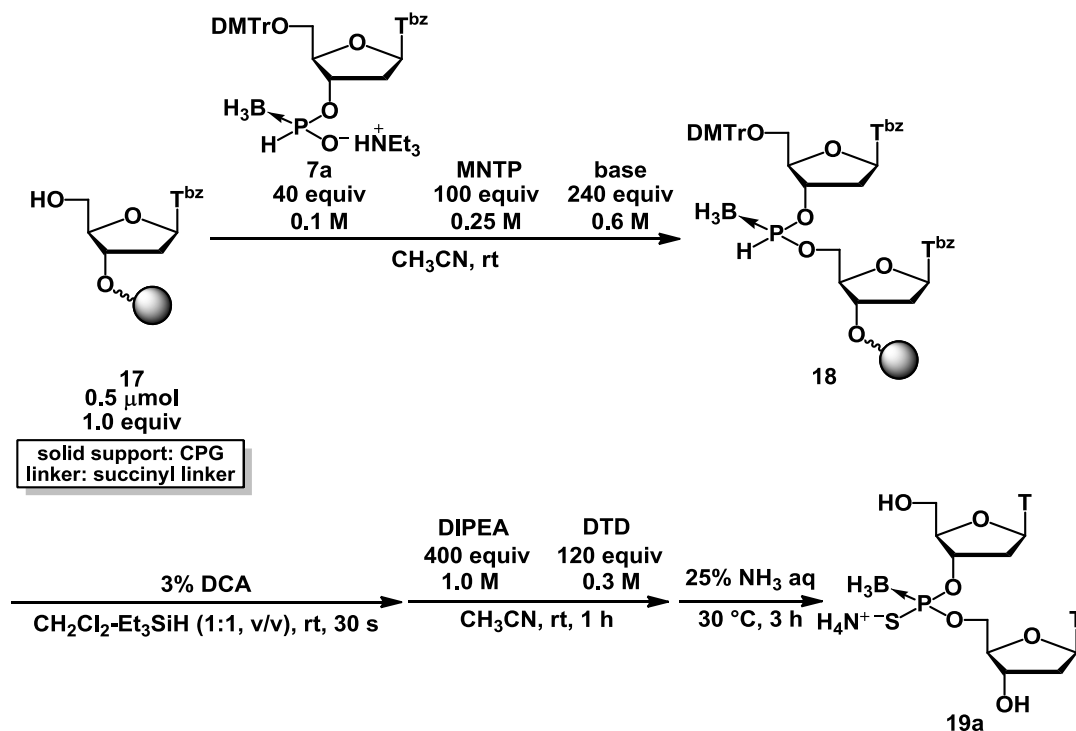
dimethylboranophosphate (Figure 3-3) を用いて Scheme 3-3、**route 2** と同様の手順で合成を行った。しかし、予期に反して T_{PBS}T **19a** の収率は 70%に低下した。トリエチルシランは溶媒量用いているが、triethylammonium dimethylboranophosphate は溶媒効果をもたらすほど添加していない。そのため、トリエチルシランよりも DMTr⁺を捕捉する効率が低いと考えられる。次に、DCA よりも酸性度の高い trifluoroacetic acid (TFA) を用いたが (1% TFA / CH₂Cl₂-Et₃SiH (DCA: pK_a = 1.29; TFA: pK_a = -0.25)、**19a** の収率は DCA を用いた場合と変わらなかった (T : T_{PBS}T = 13 : 87)。用いる酸の酸性度が高くなると、特に *N*⁶-ベンゾイルデオキシアデノシン誘導体のデプリネーションが起こりやすくなるため⁶⁷、四種類全ての核酸塩基

を有するオリゴマーの合成時に問題が生じる可能性がある。以上の検討から、脱 DMTr 化は 3% DCA / CH₂Cl₂-Et₃SiH で行うことにした。ただし、PBH-ODN が DMTr⁺と接触する時間をできるだけ短くするために、今後酸処理の時間は 30 秒に統一した。

【縮合反応の条件検討】

脱 DMTr 化の検討を行ったが、副反応を完全に抑制するには至らず、T_{PBS}T を合成するための最適な条件は見つからなかった。そこで、問題は縮合反応にあると考え、反応条件の検討を行った。縮合剤は MNTP に統一し、加える塩基及び反応時間の最適化を行った。塩基の種類や反応時間、**19a** の収率を Table 3-1 に示す。

Table 3-1. Solid-phase synthesis of T_{PBS}T **19a**.



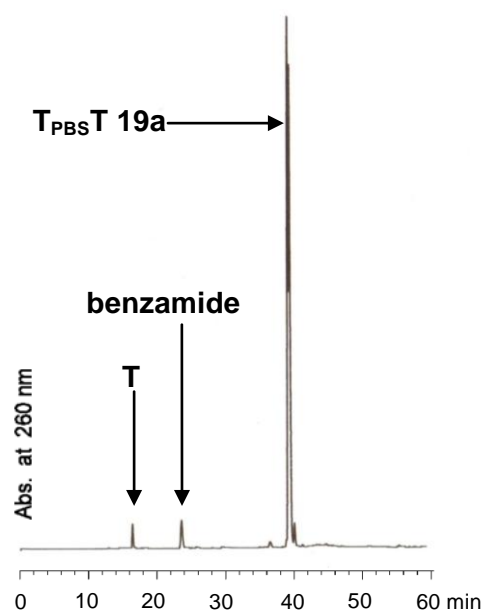
Entry	Reaction conditions of condensation	HPLC yield of 19a [%] ^[a]
1	DMAN, 10 min	87
2	DMAN, 30 min	86
3	2,6-lutidine, 10 min	96
4	2,6-lutidine, 5 min	96
5	2,6-lutidine, 1 min	98
6	2,6-lutidine, 20 s	97

[a] Estimated by the area ratio of T_{PBS}T **19a** compared with T.

まず、塩基に DMAN を用いて縮合時間の検討を行った。縮合時間が 10 分では不十分であると考え、30 分で行った (Table 3-2, Entry 2)。しかし、Entry 1 とほぼ同程度の収率となり、副生成物も依然として観測された (RP-HPLC チャートは Figure 3-2 (b) とほぼ同様のため割愛する)。このことから、縮合時間が問題ではないと判断した。次に、第二章、第二節で述べた液相法での T_{PBH}T 合成において、DMAN が残存した状態でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行うと、T_{PBH}T がシリカゲル中で全て加水分解したことに注目した。これは、PBH-DNA が強塩基性条件下で不安定であることを示唆している。固相合成時には、DMAN の強塩基性によって溶媒中に残存する水分子から OH⁻ が生成し、一部の PBH-DNA が分解したために副生成物が生成したと考えられた。そこで、DMAN よりも弱塩基性を示す 2,6-ルチジンを用いて合成を行ったところ (Entry 3)、T_{PBS}T **19a** の他にわずかな未反応のチミジン、及び保護基の残渣であるベンズアミドのみが観測され (Figure 3-4 (a))、目的物の収率は T : T_{PBS}T **19a** = 4 : 96 に向上した。2,6-ルチジンは水分子を活性化するほどの強塩基性を示さないため、副生成物の生成を抑制できたと考えられる。さらに、2,6-ルチジンはピリジン環の 2,6-位にメチル基を有しているため窒素原子の求核力が低く、脱ボラノ化に関与しないと考えられるため、本系において最適の塩基であると判断した。このように、T_{PBS}T を高収率で得るためには、縮合反応時に起こる副反応を抑制することが極めて重要であることが明らかとなった。

次に、PBH-ODN が塩基性条件下不安定であるという性質と、今後オリゴマー合成を行う際の合成サイクルの時間短縮を考慮し、縮合時間を 5 分、1 分、20 秒として同様の反応を行った (Entry 4-6)。その結果、わずか 20 秒でも縮合反応は十分に進行することが分かった (Entry 6, T : T_{PBS}T **19a** = 3 : 97)。このことから、H-ボラノホスホネートモノマーユニットは、ボラノホスホトリエステル法で用いられるボラノホスホジエステル構造を有するモノマーユニットよりも縮合効率が高いことが示唆された。なお、縮合時間は 20 秒で十分であるが、操作上の再現性を確保するために今後 1 分に統一した。縮合反応を 1 分で行った場合の RP-HPLC チャートを Figure 3-4 (b) に示す。

(a) 2,6-lutidine, 10 min



(b) 2,6-lutidine, 1 min

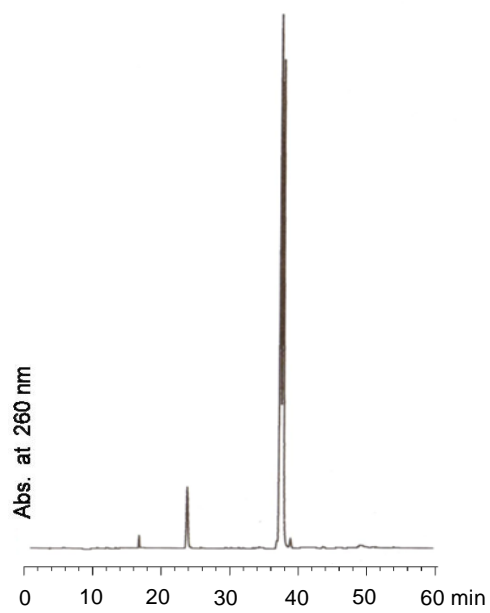
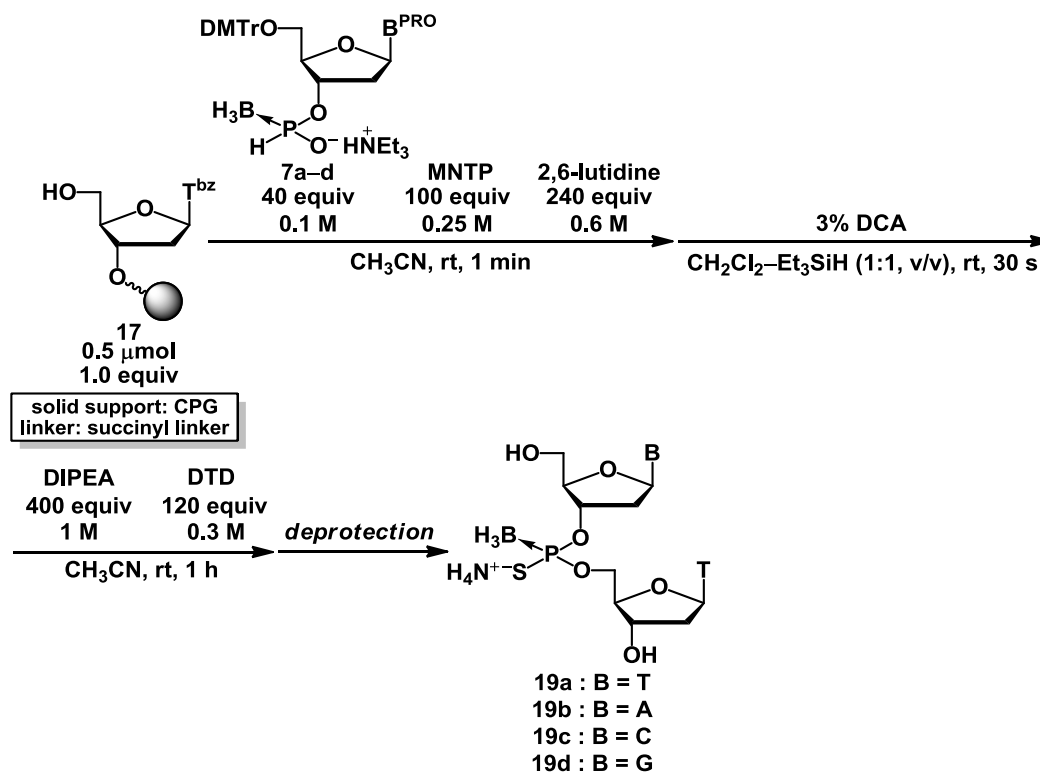


Figure 3-4. RP-HPLC profiles of crude T_{PBS}T **19a**: (a) 2,6-lutidine, 10 min; (b) 2,6-lutidine, 1 min. RP-HPLC was performed with linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) at 30 °C for 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min.

➤ **dA_{PBS}T, dC_{PBS}T, dG_{PBS}T の合成**

次に、T_{PBS}T の合成で最適化した種々の反応条件を、dA_{PBS}T、dC_{PBS}T、及び dG_{PBS}T の合成に適用した。核酸塩基部位に導入した保護基の除去条件と、PBS-ODN 二量体の収率を Table 3-2 に示す。いずれの二量体も T_{PBS}T 同様に高収率で得ることに成功した。

Table 3-2. Solid-phase synthesis of PBS-ODN 2mers **19a–d**.

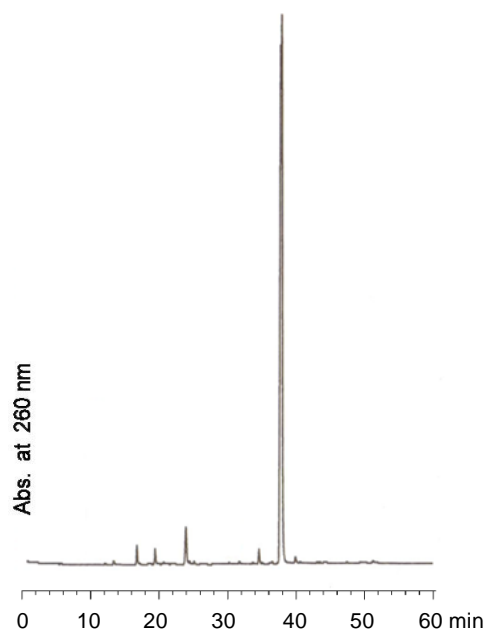


Entry	Monomer (B ^{RPO})	Conditions of deprotection	HPLC yield of 19 [%] ^[a]
1	7a (T ^{bz})	25% NH ₃ aq, 30 °C, 3 h	98
2	7b (A ^{bz})	25% NH ₃ aq, 30 °C, 12 h	96
3	7c (C ^{bu})	25% NH ₃ aq, 30 °C, 12 h	97
4	7d (G ^{ce, bu})	25% NH ₃ aq, 50 °C, 12 h	98

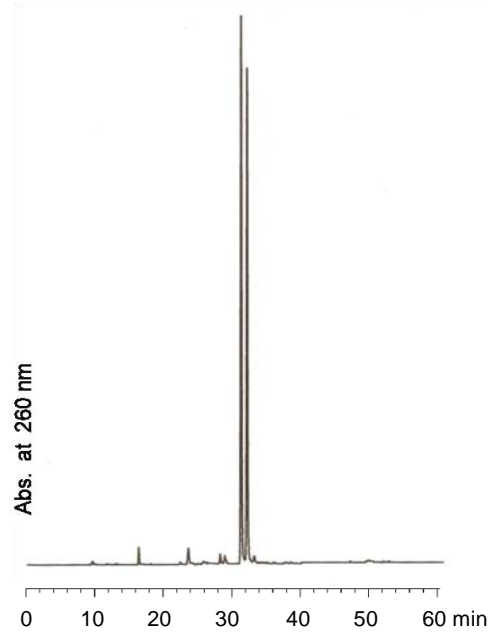
[a] Estimated by the area ratio of PBS-ODN 2mers compared with T.

未精製の $dA_{\text{PBS}}\text{T 19b}$ 、 $dC_{\text{PBS}}\text{T 19c}$ 、及び $dG_{\text{PBS}}\text{T 19d}$ の RP-HPLC チャートを Figure 3-5 (a)–(c) に示す。いずれも副生成物がほとんど観測されず、高純度で目的物が得られた。

(a) $dA_{\text{PBS}}\text{T 19b}$



(b) $dC_{\text{PBS}}\text{T 19c}$



(c) $dG_{\text{PBS}}\text{T 19d}$

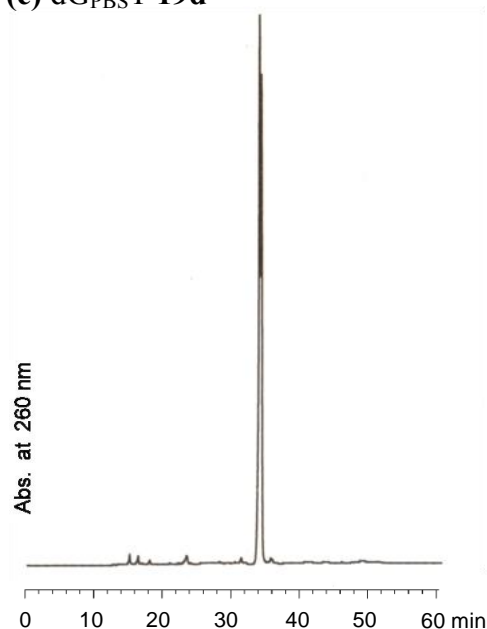
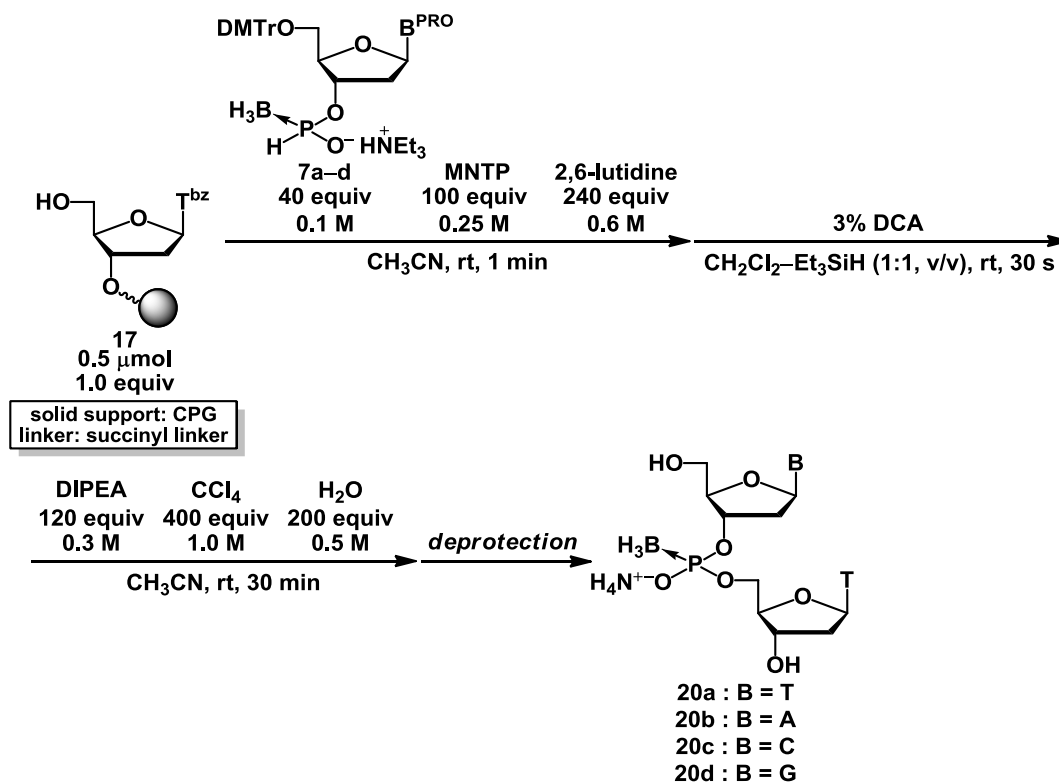


Figure 3-5. RP-HPLC profiles of crude *PBS*-ODN 2mers: (a) $dA_{\text{PBS}}\text{T 19b}$; (b) $dC_{\text{PBS}}\text{T 19c}$; (c) $dG_{\text{PBS}}\text{T 19d}$. RP-HPLC was performed with linear gradient of 0–30% CH_3CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) at 30 °C for 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min

3-2-2. PBO-ODN 二量体の合成

前節で確立した縮合反応と脱 DMTr 化、及び第二章、第四節で述べた酸化反応の条件を、各核酸塩基を有する PBO-ODN 二量体 **20a-d** の合成に適用した (Table 3-3)。

Table 3-3. Solid-phase synthesis of PBO-ODN 2mers **20a-d**.



Entry	Monomer (B ^{RPO})	Conditions of deprotection	HPLC yield of 20 [%] ^[a]
1	7a (T ^{bz})	25% NH ₃ aq-EtOH (3:1, v/v), 30 °C, 3 h	96
2	7b (A ^{bz})	25% NH ₃ aq-EtOH (3:1, v/v), 30 °C, 12 h	96
3	7c (C ^{bu})	25% NH ₃ aq-EtOH (3:1, v/v), 30 °C, 12 h	95
4	7d (G ^{ce, bu})	25% NH ₃ aq-EtOH (3:1, v/v), 50 °C, 12 h	97

[a] Estimated by the area ratio of PBO-ODN 2mers compared with T.

未精製の **20a–d** の RP-HPLC チャートを Figure 3-6 (a)–(d) に示す。いずれも *PBS*-ODN 二量体と同様に高収率かつ高純度で得ることに成功した。

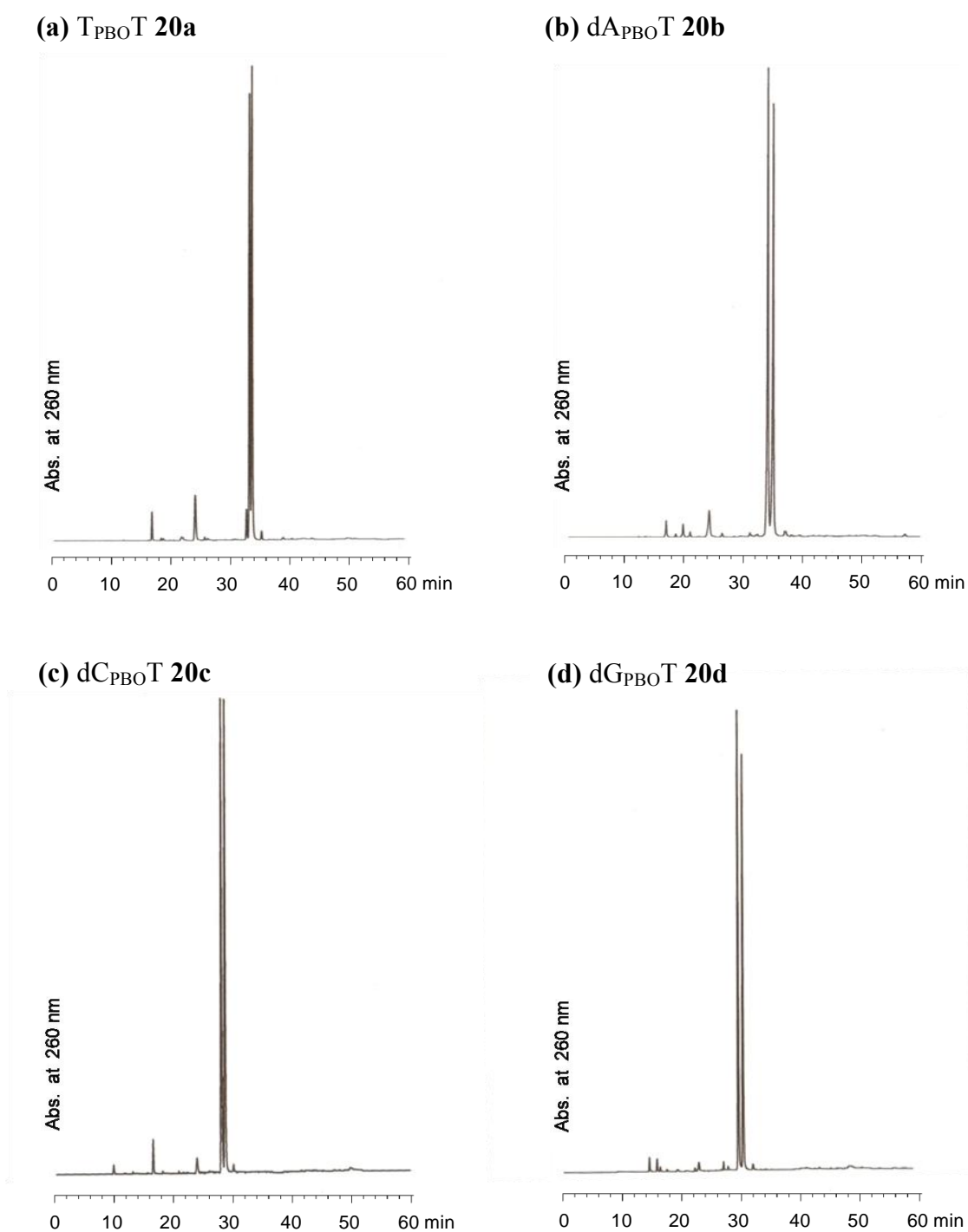


Figure 3-6. RP-HPLC profiles of crude *PBO*-ODN 2mers: (a) $T_{PBO}T\ 20a$; (b) $dA_{PBO}T\ 20b$; (c) $dC_{PBO}T\ 20c$; (d) $dG_{PBO}T\ 20d$. RP-HPLC was performed with linear gradient of 0–30% CH_3CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) at 30 °C for 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min.

3-2-3. *PBN*-ODN 二量体の合成

次に、*PBH*-DNA にアミノ化を施すことでボラノホスホロアミデート DNA (*PBN*-DNA) を合成した。以下の二点を考慮し、カチオン性の側鎖を持つ *PBN*-DNA をデザインした。

- 1) 水溶液中でイオン化できるカチオン性の側鎖を持つことで、十分な水溶性を確保できる。
- 2) 負に帯電した相補鎖のリン酸ジエステル部位との間に静電的相互作用が働き、高い二重鎖形成能を持つことが期待できる。

➤ 2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチルアミノ基を有する *PBN*-ODN 二量体の合成

まず、pH 7 の生理的条件下でプロトン化される側鎖を持つ *PBN*-DNA の合成を目指し、アミノ化試薬として *N,N*-dimethylethylenediamine (Figure 3-7) を選択した。

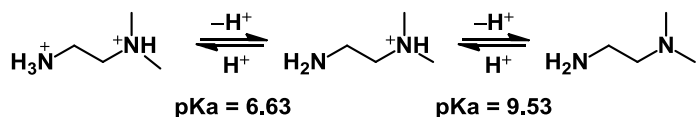
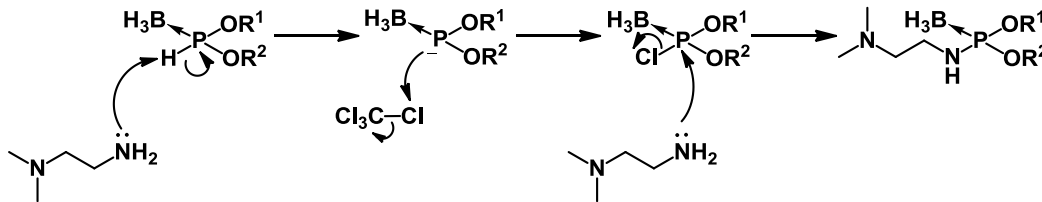


Figure 3-7. Structure and pKa values of *N,N*-dimethylethylenediamine⁶⁸.

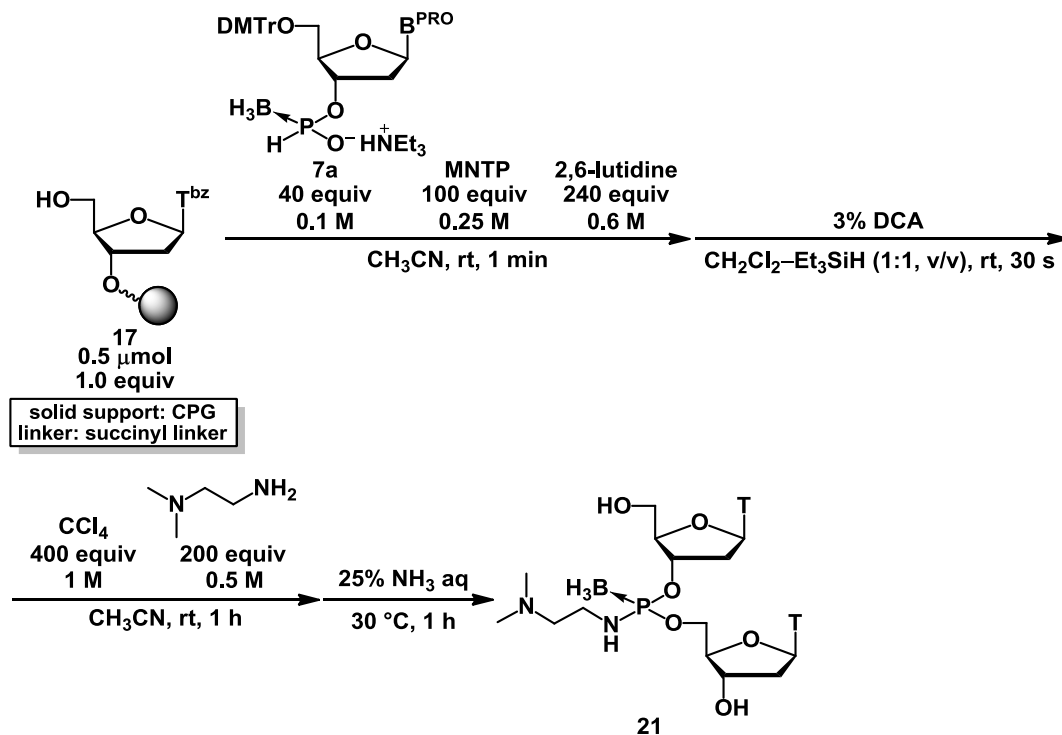
PBH-DNA のアミノ化は、まず求核性の高いアミノ基が P-H 結合の水素原子を引き抜き、生じたリン原子上のアニオンと CCl₄ が反応して中間体としてボラノホスホロクロリデートが生成した後に、アミンがリン原子に求核攻撃することで進行する (Scheme 3-5)。この反応機構は、第二章、第四節で示した酸化反応機構と酷似している。

Scheme 3-5



Scheme 3-6 に従い、2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチルアミノ基を有する $T_{PBN}T$ **21** を合成した。なお、*PBN*-DNA はリン原子上に解離性の官能基を持たないため、アンモニア水処理の際に加水分解されやすいことが示唆された。そこで、**21** の固相担体からの切り出しは1時間で行った。

Scheme 3-6



Scheme 3-6 に従って合成した **21** を固相担体から切り出し、溶液を留去した後、再度超純水に溶解することで RP-HPLC 分析用のサンプル調製を行った。サンプル調製を行ってから1時間後に分析を行った結果を Figure 3-8 に示す。このときの収率は、 $T : T_{PBN}T$ **21** = 8 : 92 だった。

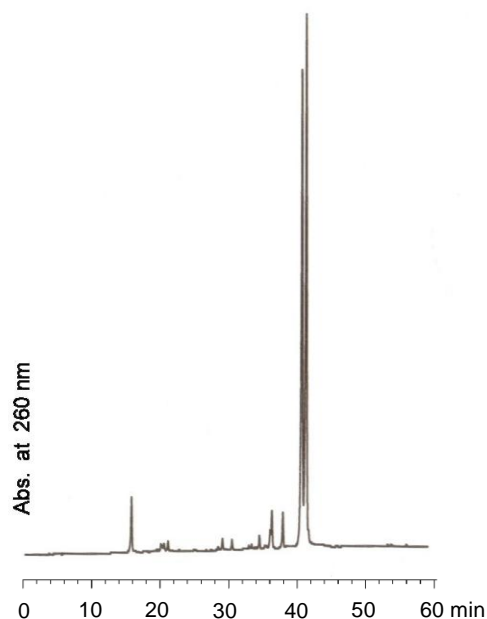
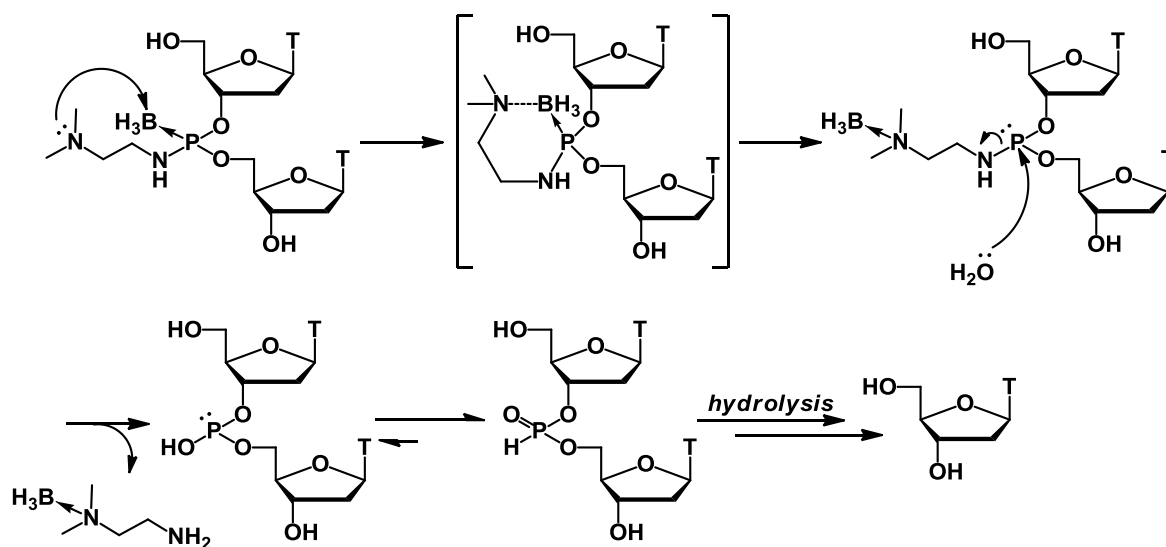


Figure 3-8. RP-HPLC profile of crude T_{PBN}T **21**. RP-HPLC was performed with linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) at 30 °C for 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min.

しかし、T_{PBN}T **21** は超純水中で徐々に分解することが明らかとなった。超純水中で 50 時間放置した後に RP-HPLC 分析を行うと、収率は T : T_{PBN}T **21** = 28 : 72 に低下した。**21** が超純水中で分解する理由は、六員環遷移状態を経由してジメチルアミノ基による分子内脱ボラノ化反応が起こるためであると考えられる (Scheme 3-7)。

Scheme 3-7



そこで、六員環よりも不安定な七員環遷移状態を形成させる

N,N-dimethylaminopropylamine (Figure 3-9) を

用いて Scheme 3-6 と同様の手順で合成を行っ

た。その結果、超純水中での安定性は向上し、48 時間後の分解は 7%にとどまった。しかし、アルキル鎖長を長くしても脱ボラノ化を完全に抑制できないことから、他の側鎖を持つ *PBN*-DNA の合成を行うことにした。

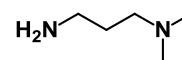


Figure 3-9. Structure of *N,N*-dimethylaminopropylamine.

➤ 2-モルフォリノエチルアミノ基を有する *PBN*-ODN 二量体の合成

アルキル基鎖長を長くするという手法では脱ボラノ化を完全に抑制できないことから、置換基の立体電子効果によって脱ボラノ化を抑制することを目指した。

そこで、2-モルフォリノエチルアミノ基に着目した。2-モルフォリノエチルアミノ基が有するモルフォリン骨格部位の窒素原子は、酸素原子による電子求引効果によって電子密度が低く、かつ立体障害も大きい。そのため、*N,N*-ジメチルアミノ基よりも求核力が低いことから脱ボラノ化に関与しにくいと考えた。

4-(2-aminoethyl)morpholine の pKa を Figure 3-10 に示す⁶⁸。

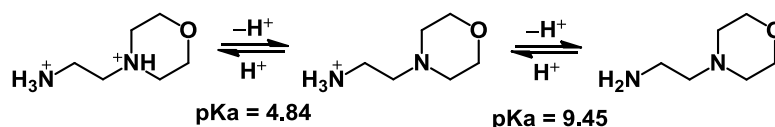
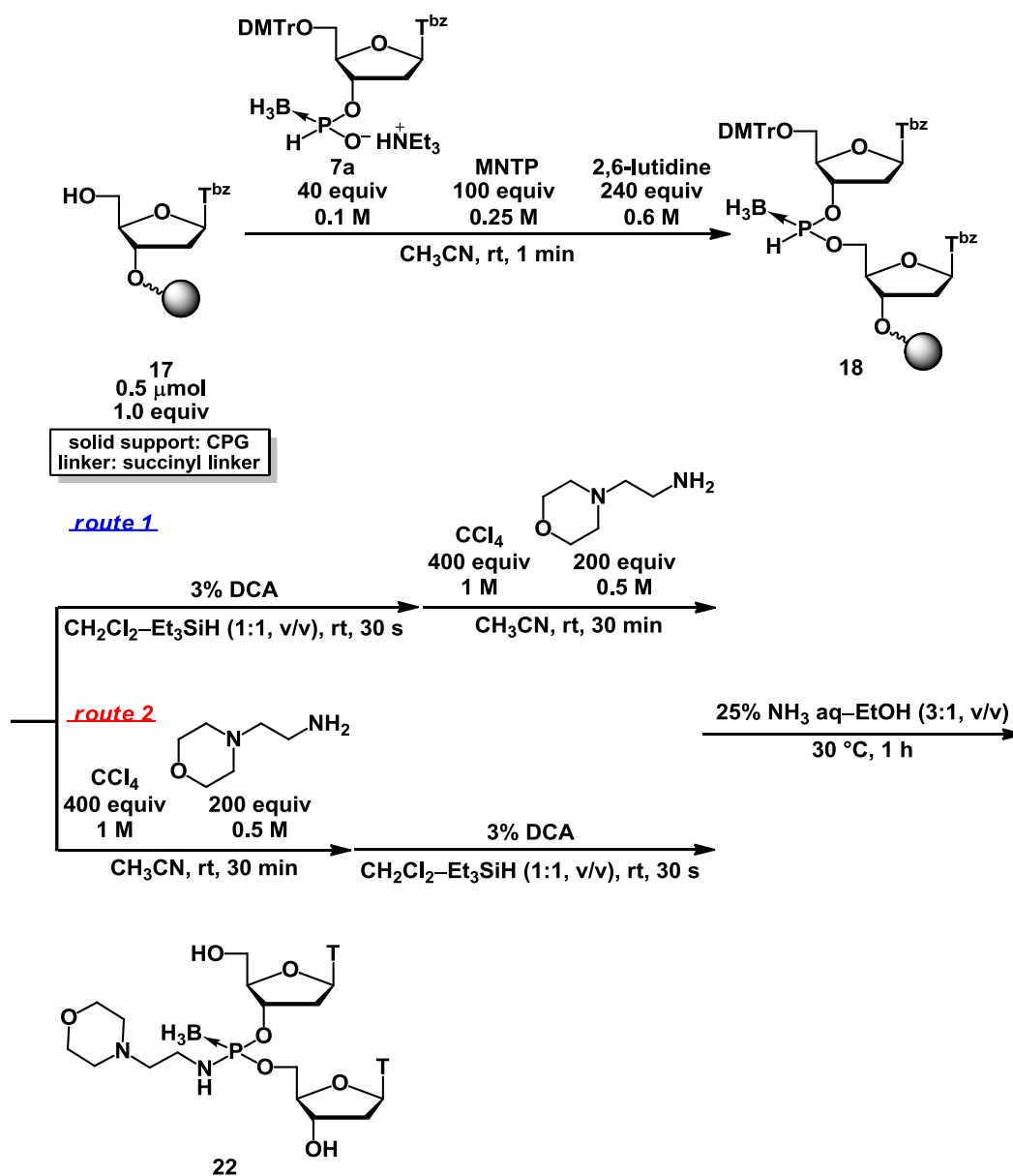


Figure 3-10. Structure and pKa values of 4-(2-aminoethyl)morpholine.

また、Letsinger らによって、2-モルフォリノエチルアミノ基を有するホスホロアミデート誘導体は、酸性の緩衝液中で側鎖のモルフォリン部位の窒素原子がプロトン化され、相補鎖 DNA との間に静電的相互作用が働き、二重鎖形成能が天然型 DNA よりも高くなることが報告されている⁶⁹。

これまで、*PBS*-ODN や *PBO*-ODN の合成時には、*PBH*-ODN が生成した後に脱 DMTr 化を行い、その後変換反応を行った。一方、*PBN*-ODN は P-N 結合の窒素原子は、酸性条件下プロトン化されることで強い電子求引性を示す。そのため、リン原子上の電子密度が低下し、*PBO*、*PBS*、及び *PBH*-ODN よりも脱ボラノ化が起こりにくいと考えた。そこで、脱 DMTr 化の後にアミノ化を施す **route 1** と、アミノ化の後に脱 DMTr 化を行う **route 2** に従って T_{PBN}T **22** の合成を行った (Scheme 3-8)。

Scheme 3-8

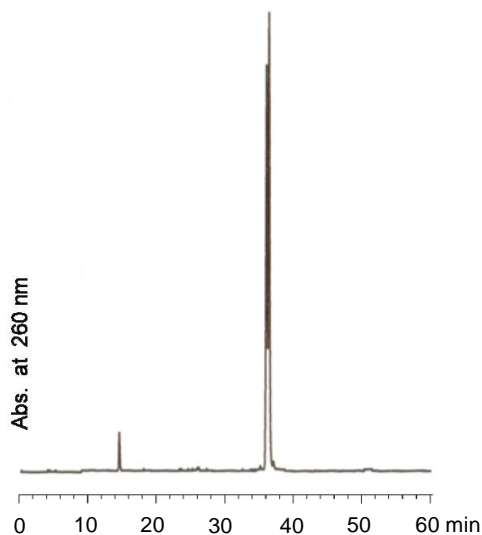


RP-HPLC による分析の結果、脱 DMTr 化を行った後にアミノ化を行った場合 (**route 1**)、目的物の収率は T : T_{PBN}T **22** = 6 : 94 となった (Figure 3-11 (a))。一方、

アミノ化を行った後に脱 DMTr 化を行った場合 (route 2)、T : T_{PBN}T 22 = 4 : 96 となり (Figure 3-11 (b))、若干ではあるが route 2 の方が高収率で目的物を与えた。

(a) route 1

T : T_{PBN}T 22 = 6 : 94



(b) route 2

T : T_{PBN}T 22 = 4 : 96

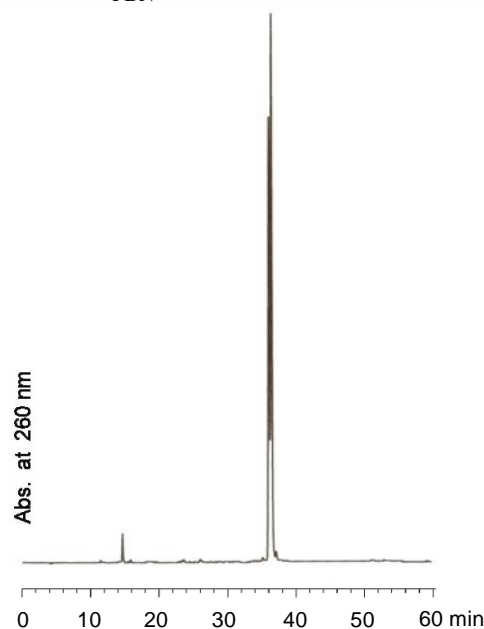
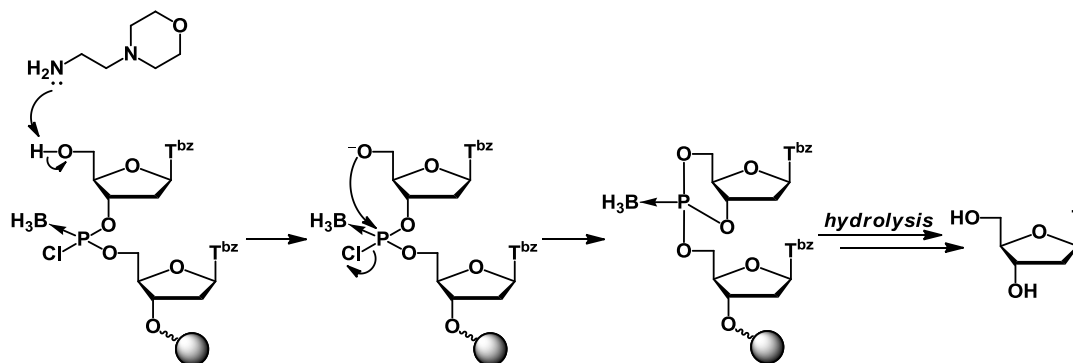


Figure 3-11. RP-HPLC profiles of crude T_{PBN}T 22: (a) synthesized according to Scheme 3-10, route 1; (b) synthesized according to Scheme 3-10, route 2. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–45% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

脱 DMTr 化とアミノ化を行う順序によって 22 の収率に差が生じる理由を以下のように考察した。5'位に遊離の水酸基を有する場合、中間体として生成するボラノホスホクロリデートのリン原子に対して活性化された 5'位水酸基が求核攻撃し、3',5'-環状ボラノホスホトリエステル体が生じ、それが加水分解されてチミンが生成する分子内反応が起こると考えられた (Scheme 3-9)。

Scheme 3-9



このような副反応を回避するために、5'位水酸基を DMTr 基で保護した状態でアミノ化を施し、その後 DMTr 基を除去すべきであることが示唆された。

また、 $T_{\text{PBN}}T$ **22** の超純水中での安定性は、2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチルアミノ基を有する $T_{\text{PBN}}T$ **21** よりも顕著に増大し、32 時間放置しても 0.5% 程度しか分解しなかった。

次に、四種類全ての核酸塩基を有する *PBN*-ODN の合成を目指し、最も過酷な脱保護条件である、25% NH_3 aq-EtOH (3:1, v/v), 50 °C, 6 時間 (グアニン塩基の N^2 位に導入したイソブチリル基の脱保護条件) で **22** の切り出しを行い、ボラノホスホアミデートジエステル体のアンモニア水中での安定性を評価した。その結果、目的物の収率は $T : T_{\text{PBN}}T$ **22** = 17 : 83 となり、現段階での核酸塩基部位の保護基の組み合わせでは、四種類全ての核酸塩基を有する *PBN*-ODN の合成は困難であると判断した。今後、より穏和な条件下で除去可能な保護基を核酸塩基部位に導入し (A^{pac} 、 $G^{\text{ce, pac}}$ 、 T^{bz} 、 C^{ibu})、かつヌクレオシドを固相担体に担持させるためのリンカーを、無水塩基性条件下で切り出しが可能なオキサリルリンカー (Figure 3-12) に変更することで、四種類全ての核酸塩基を有する *PBN*-ODN の合成が可能になると考えられる。

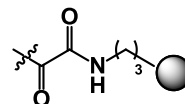
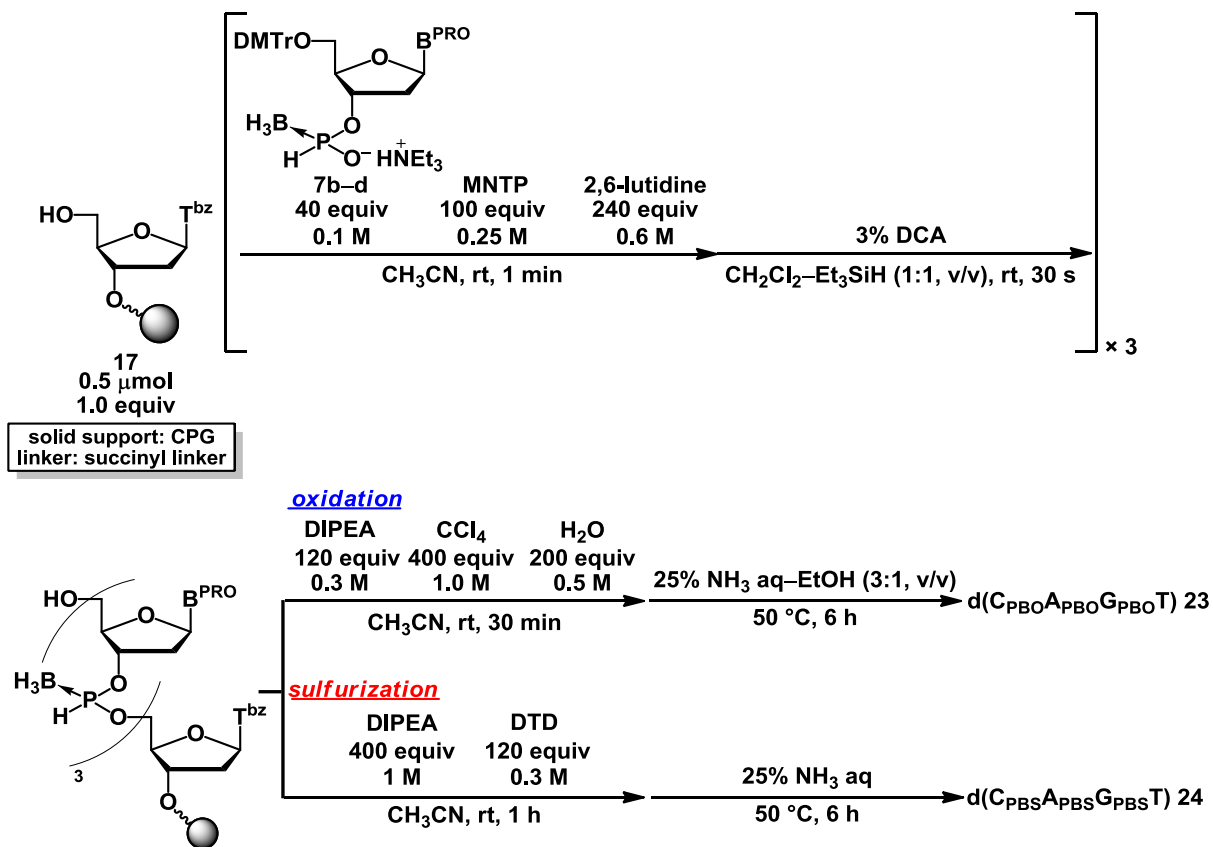


Figure 3-12. Structure of oxalyl linker.

第三節 PBO, PBS-ODN 四量体の合成

次に、縮合反応と脱 DMTr 化を繰り返し行うことで鎖長伸長し、その後変換反応を施すことで四種類の核酸塩基を有する PBO-ODN 四量体 **23**、及び PBS-ODN 四量体 **24** の合成を行った (Scheme 3-10)。

Scheme 3-10



未精製及び精製後の **23**、**24** の RP-HPLC チャートを Figure 3-13、14 に示す。

(a) crude d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T) **23** (b) purified d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T) **23**

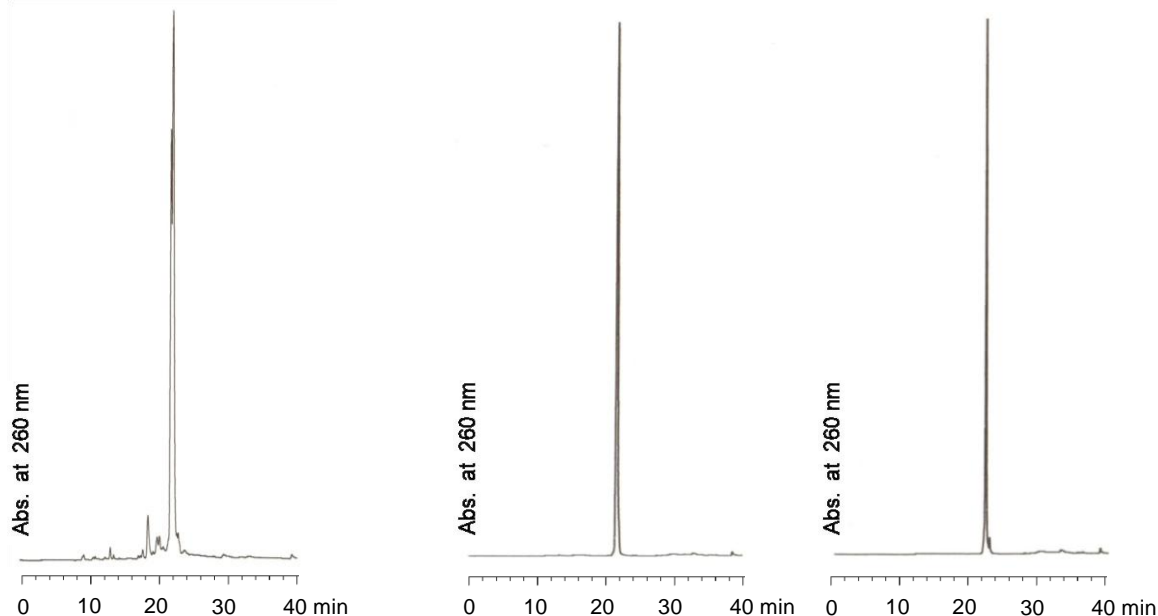


Figure 3-13. RP-HPLC profiles of (a) crude and (b) purified d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T) **23**. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–40% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 40 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

(a) crude d(C_{PBS}A_{PBS}G_{PBS}T) **24**

(b) purified d(C_{PBS}A_{PBS}G_{PBS}T) **24**

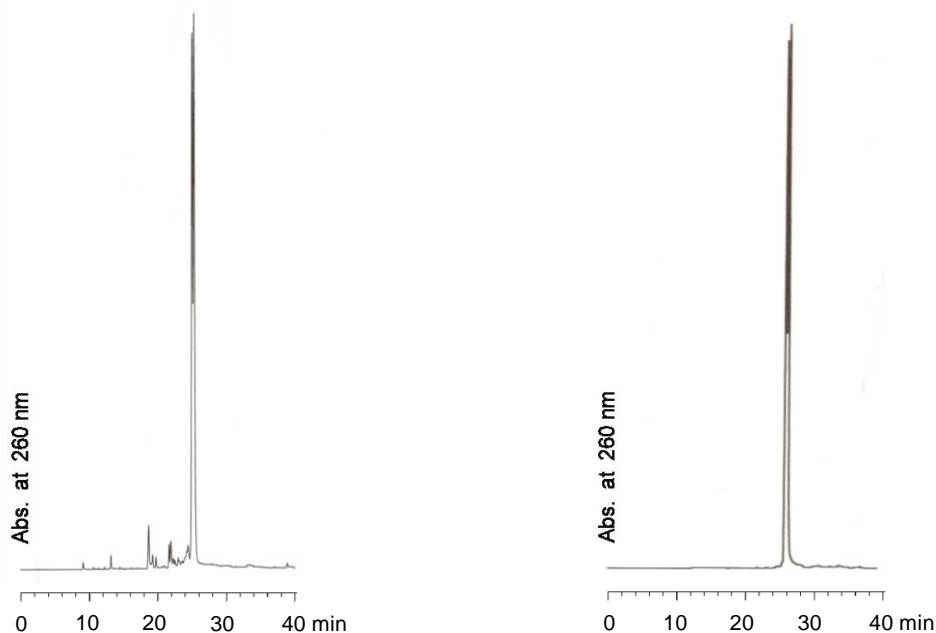


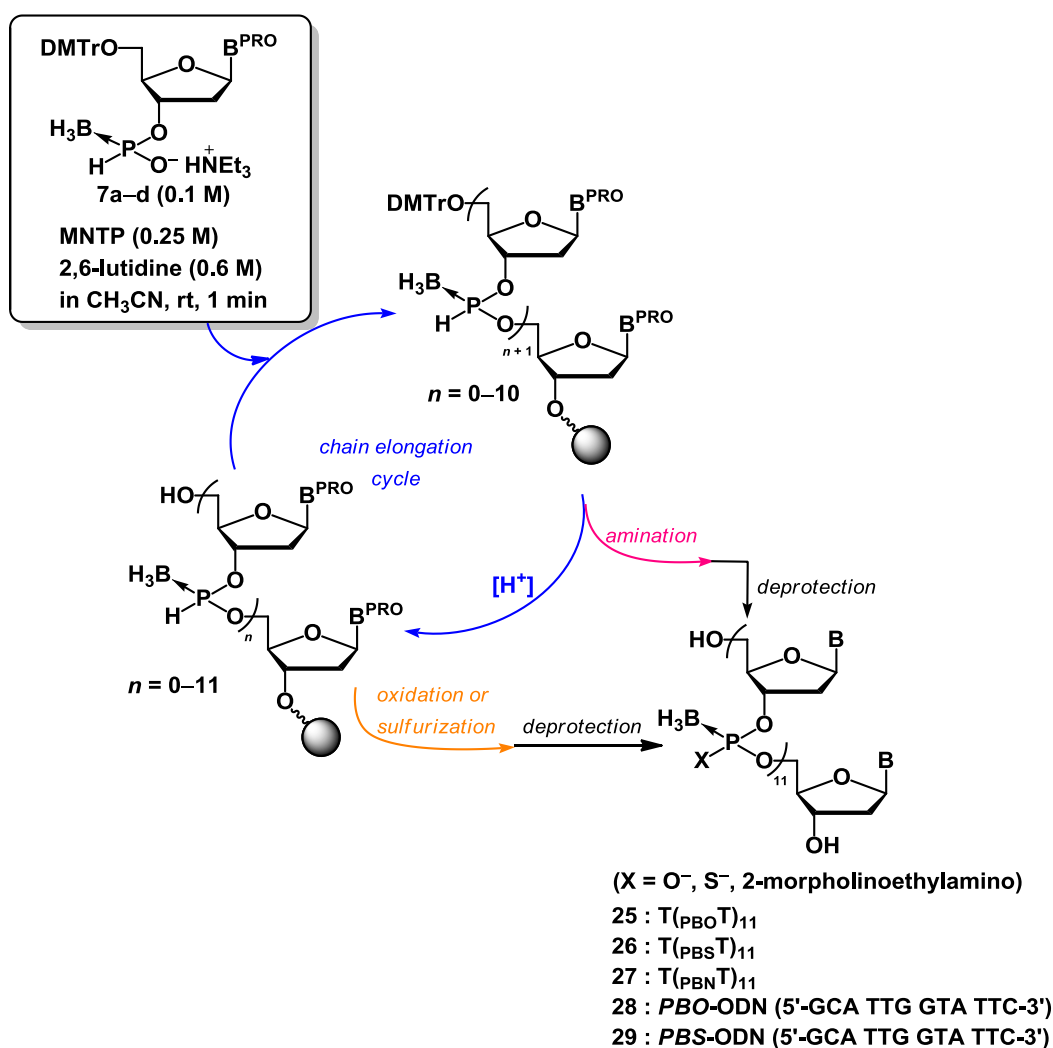
Figure 3-14. RP-HPLC profiles of (a) crude and (b) purified d(C_{PBS}A_{PBS}G_{PBS}T) **24**. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–40% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 40 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

いずれの四量体も、鎖長の短いオリゴマー由来のピークがほとんど観測されず、合成が効率的に進行したことが示唆された。また、*PBO-ODN* 四量体においては分取後のサンプルの UV 定量を行い、69%という高収率で単離したことを確認した。これらの結果から、本手法はより長鎖のオリゴマーの合成に適用可能であると判断した。

第四節 PBO, PBS, PBN-ODN 十二量体の合成

次に、四量体合成と同様の手順で鎖長伸長を行い、最後に種々の変換反応を施すことで、PBO、PBS、及び PBN-ODN 十二量体の合成を行った。オリゴマーの塩基配列は、T₁₂、または apoB タンパク質をコードする mRNA に相補的な配列 (5'-GCA TTG GTA TTC-3')⁵⁸ の二種類である。なお、5'-GCA TTG GTA TTC-3' のオリゴマー合成に用いる固相担体は、Scheme 1-1 と同様の条件で調製した C^{ibu} が 21.7 μmol/g 導入された CPG を用いた。オリゴマー合成の流れの概略図と単離収率を Table 3-4 に示す。

Table 3-4. Solid-phase synthesis of PBS, PBO and PBN-ODN 12mers.^[a]



Entry	PBX-ODN	Isolated yield [%]
1	T _{(PBO)T} ₁₁ 25	28
2	T _{(PBS)T} ₁₁ 26	31
3	T _{(PBN)T} ₁₁ 27	10
4	5'-G _{PBO} C _{PBO} A _{PBO} T _{PBO} T _{PBO} G _{PBO} G _{PBO} T _{PBO} A _{PBO} T _{PBO} T _{PBO} C-3' 28	44
5	5'-G _{PBS} C _{PBS} A _{PBS} T _{PBS} T _{PBS} G _{PBS} G _{PBS} T _{PBS} A _{PBS} T _{PBS} T _{PBS} C-3' 29	16

[a] Detritylation: 3% DCA in CH₂Cl₂-Et₃SiH (1:1, v/v), rt, 30 s; oxidation: DIPEA, CCl₄, H₂O in CH₃CN, rt, 30 min; sulfuration: DIPEA, DTD in CH₃CN, rt, 1 h; amination: CCl₄, 4-(2-aminoethyl)morpholine in CH₃CN, rt, 30 min; deprotection: see the experimental section.

未精製及び精製後の各オリゴマーの RP-HPLC チャートを、Figure 3-15 – Figure 3-19に示す。いずれの未精製オリゴマーの RP-HPLC チャートにおいても、目的物由来のピークがシャープに検出された。これは、合成が効率的に進行したことと、本来 2¹¹ = 2048 通りあるジアステレオマーの RP-HPLC カラムの固定相 (C₁₈) への親和性がかなり近いことを示唆している。

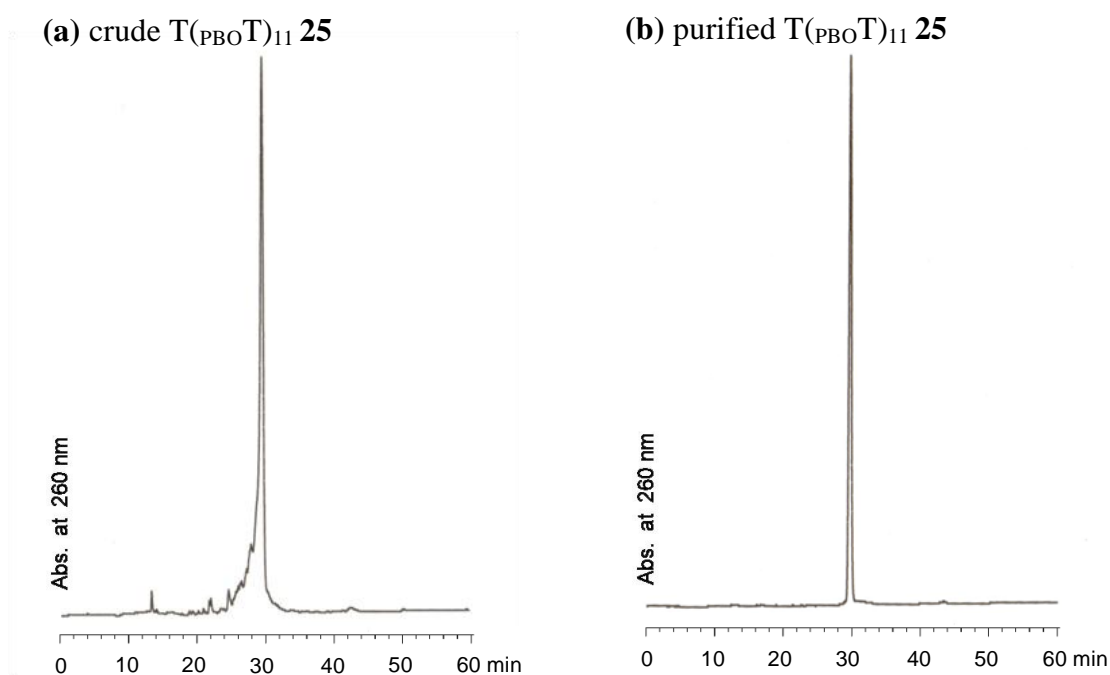
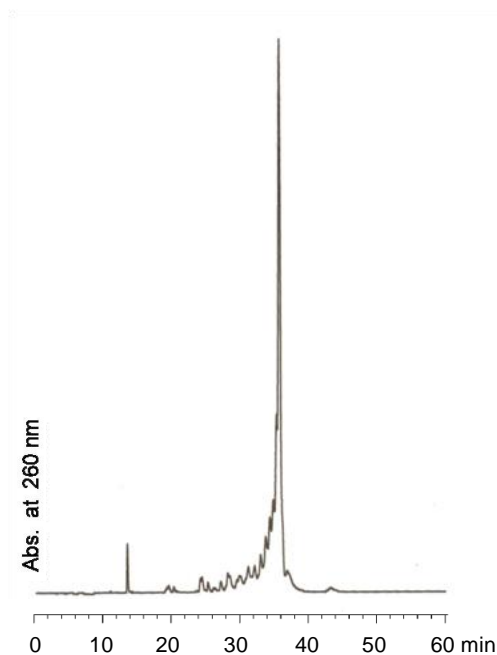


Figure 3-15. RP-HPLC profiles of (a) crude and (b) purified T_{(PBO)T}₁₁ **25**. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

(a) crude T_{(PBS)T}₁₁ **26**



(b) purified T_{(PBS)T}₁₁ **26**

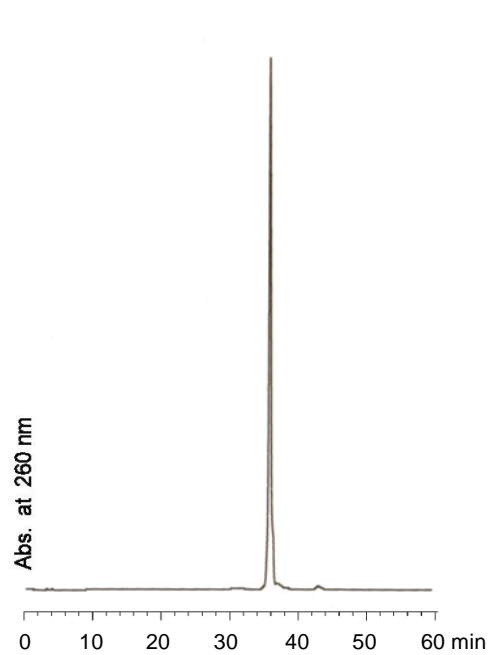
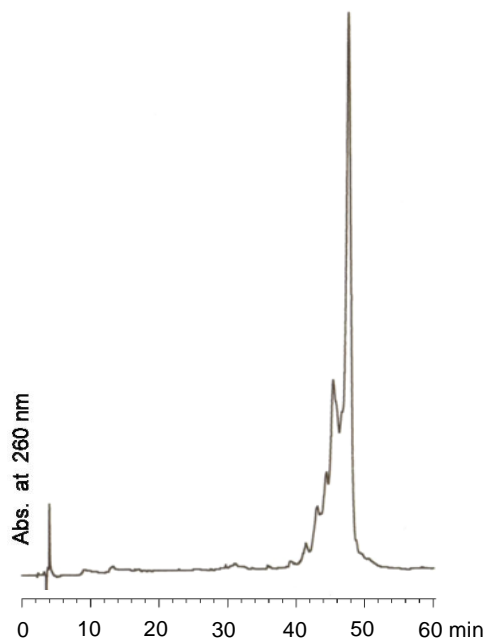


Figure 3-16. RP-HPLC profiles of (a) crude and (b) purified T_{(PBS)T}₁₁ **26**. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

(a) crude T_{(PBN)T}₁₁ **27**



(b) purified T_{(PBN)T}₁₁ **27**

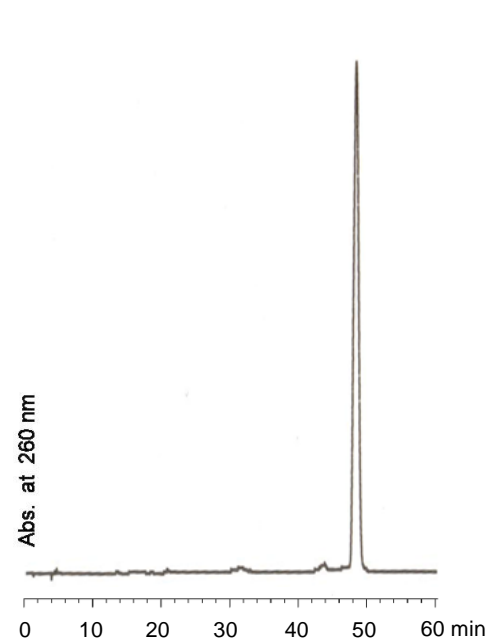
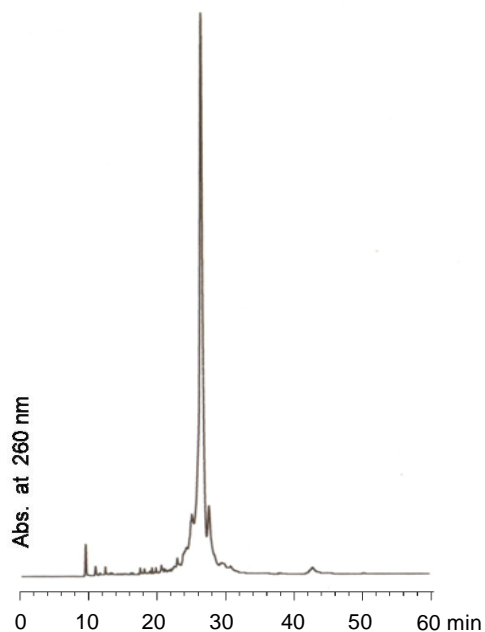


Figure 3-17. RP-HPLC profiles of (a) crude and (b) purified T_{(PBN)T}₁₁ **27**. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

(a) crude *PBO*-ODN 12mer **28**
(5'-GCA TTG GTA TTC-3')



(b) purified *PBO*-ODN 12mer **28**
(5'-GCA TTG GTA TTC-3')

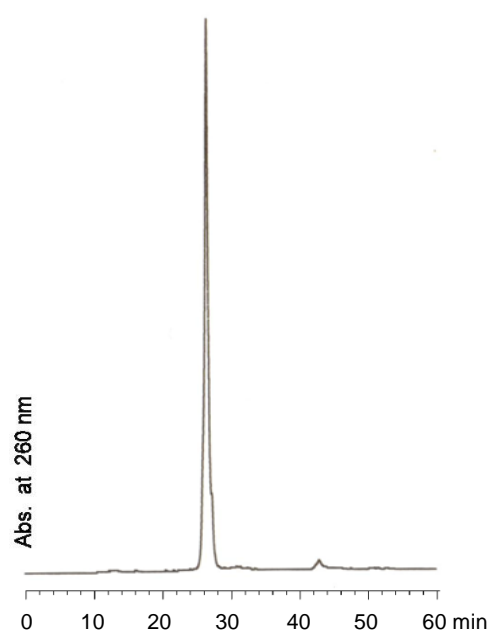
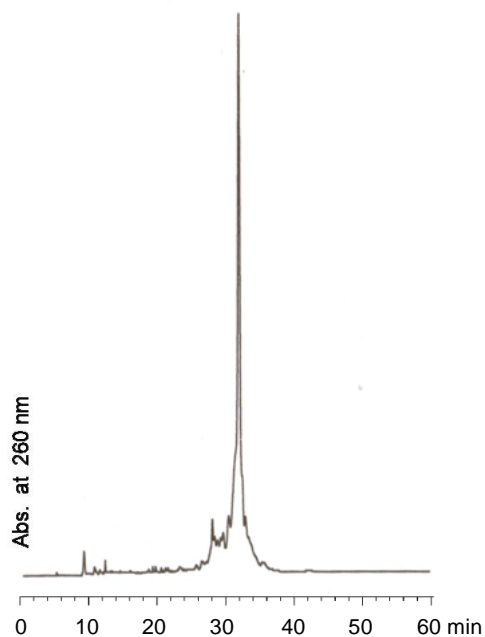


Figure 3-18. RP-HPLC profiles of (a) crude and (b) purified *PBO*-ODN 12mer **28** (5'-GCA TTG GTA TTC-3'). RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

(a) crude *PBS*-ODN 12mer **29**
(5'-GCA TTG GTA TTC-3')



(b) purified *PBS*-ODN 12mer **29**
(5'-GCA TTG GTA TTC-3')

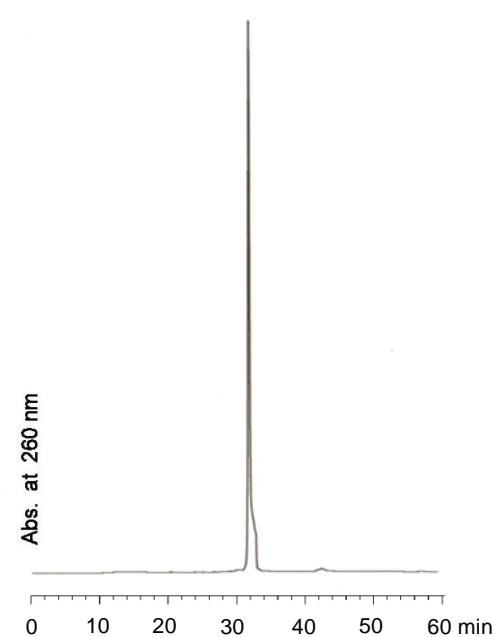


Figure 3-19. RP-HPLC profiles of (a) crude and (b) purified *PBS*-ODN 12mer **29** (5'-GCA TTG GTA TTC-3'). RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

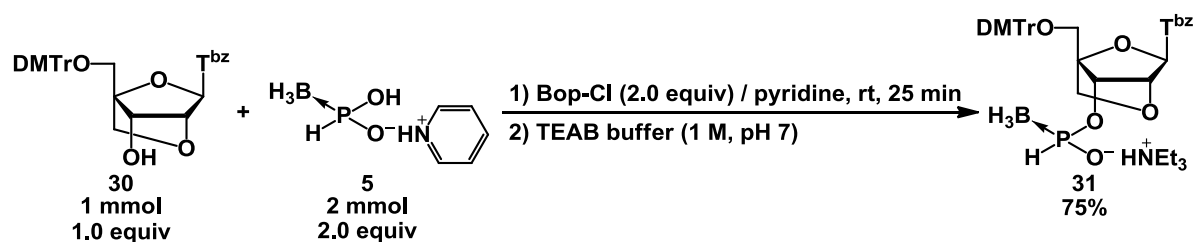
第五節 ^{LNA}PBO-ODN の合成

2'-デオキシボラン修飾型 ODN の欠点である、相補鎖への低い親和性を補うために、LNA チミジンを導入したボラノホスフェートオリゴヌクレオチド (^{LNA}PBO-ODN) を合成し、物理化学的性質や生物学的性質を評価した。本節では、LNA チミジン *H*-ボラノホスホネートモノマーユニット、及び ^{LNA}PBO-ODN の合成についての詳細を述べる。

3-5-1. LNA チミジン *H*-ボラノホスホネートモノマーユニットの合成

まず、Scheme 3-11 に従い、LNA チミジン *H*-ボラノホスホネートモノマーユニット **31** を合成した。

Scheme 3-11

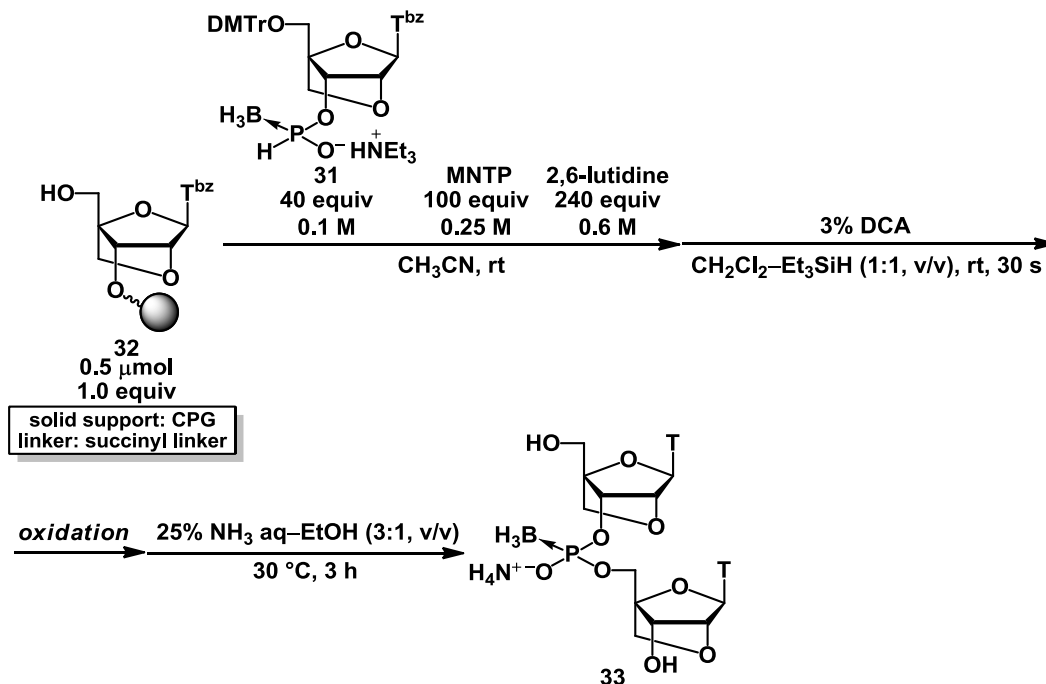


2'-デオキシ *H*-ボラノホスホネートモノマーユニット同様、75%という高い収率で **31** を得ることができた (cf. 第二章、第一節)。

3-5-2. T^L_{PBO}T^L の合成

次に、2'-デオキシ T_{PBO}T の合成に用いた条件が LNA 誘導体に適用できるかを検証するため、固相担体上で LNA ジチミジル酸ボラノホスフェート (T^L_{PBO}T^L) **33** を合成した (Table 3-5)。なお、LNA チミジンが担持された CPG **32** は、Scheme 1-1 と同様に調製した。

Table 3-5. Solid-phase synthesis of T^L_{PBO}T^L **33**.



Entry	Conditions of condensation	Conditions of oxidation ^[a]	HPLC yield of 33 [%] ^[b]
1	2,6-lutidine, 1 min	A	90
2	2,6-lutidine, 1 min × 2	A	91
3	2,6-lutidine, 1 min	B	91
4	2,6-lutidine, 1 min	C	91

[a] A: DIPEA (0.3 M), CCl₄ (1 M), H₂O (0.5 M) in CH₃CN, rt, 30 min;

B: TEA (0.1 M) in CCl₄-pyridine-H₂O (5:9:1, v/v/v), rt, 1 h;

C: TEA (0.1 M) in CCl₄-2,6-lutidine-H₂O (5:13:1, v/v/v), rt, 1 h.

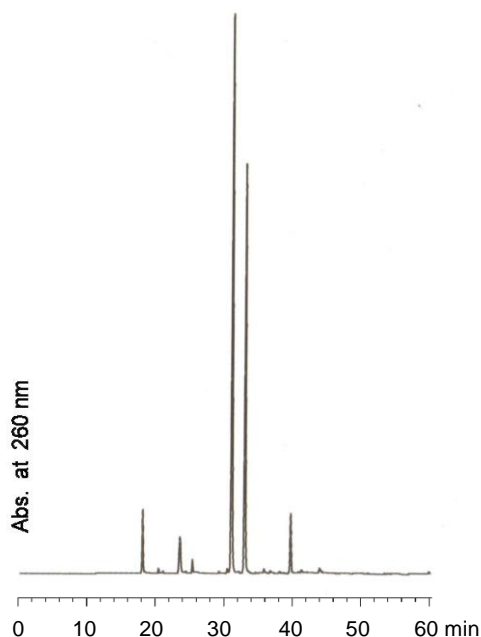
[b] Estimated by the area ratio of T^L_{PBO}T^L **33** compared with T^L.

まず、T_{PBO}T と同様の酸化条件 (DIPEA (0.3 M), CCl₄ (1 M), H₂O (0.5 M) in CH₃CN: Condition A) で T^L_{PBO}T^L **33** を合成した (Table 3-5, Entry 1)。しかし、RP-HPLC による分析の結果、T_{PBO}T 合成時には観測されなかった同定不能の副生成物が 40 分付近に観測された (Figure 3-20 (a))。LNA チミジン H-ボラノホスホネ

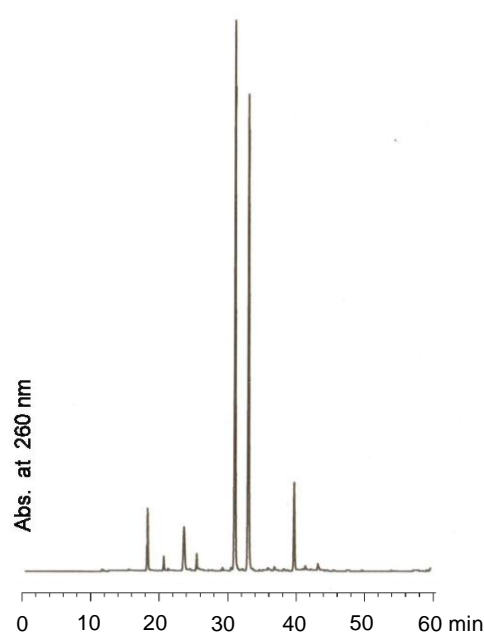
ートモノマーユニットの縮合効率が低いことが考えられたため、縮合反応を2回繰り返すダブルカップリングを行ったが、目的物の収率は改善しなかった (Entry 2, Figure 3-20 (b))。これらの結果から、酸化反応に問題があると考え、酸化反応の条件検討を行った。Manoharan らが報告した⁷⁰、*H*-ホスホネート ODN の酸化条件 (TEA (0.1 M) in CCl₄-pyridine-H₂O (5:9:1, v/v/v): Condition B) を用いたところ (Entry 3)、40 分付近の副生成物は観測されなかった (Figure 3-20 (c))。溶媒量の CCl₄ や H₂O を用いることで、*PBH*-ODN の塩素化、または中間体であるボラノホスホクロリデートの加水分解が速やかに進行し、副生成物の生成を抑制できたと考えられる。さらに、ピリジンによる脱ボラノ化を防ぐために、ピリジンよりも窒素原子の求核力が低い 2,6-ルチジンを用いたところ (Entry 4)、Entry 3 と同様に 40 分付近の副生成物は観測されなかった (Figure 3-20 (d))。なお、両親媒性の溶媒であるピリジンや 2,6-ルチジンは、CCl₄ と H₂O を混和する役割がある。ピリジンや 2,6-ルチジンの代わりに、アセトニトリルを用いると CCl₄ と H₂O が混和せず、酸化反応の溶媒には適さなかった。

以上の検討の結果、酸化条件は、TEA (0.1 M) in CCl₄-2,6-lutidine-H₂O (5:13:1, v/v/v): Condition C が適切であると判断した。しかし、LNA チミジンモノマーユニットの縮合効率が 2'-デオキシ *H*-ボラノホスホネートモノマーユニットよりも低く、T^L_{PBO}T^L **36** の収率は 91%以上にならなかった。

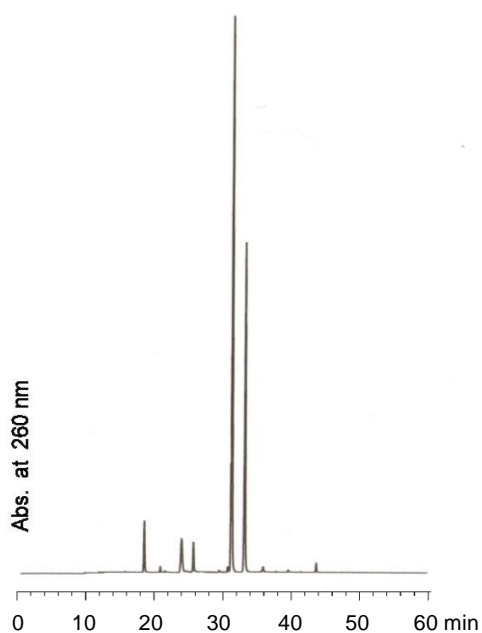
(a) Condition A



(b) Condition A (double coupling)



(c) Condition B



(d) Condition C

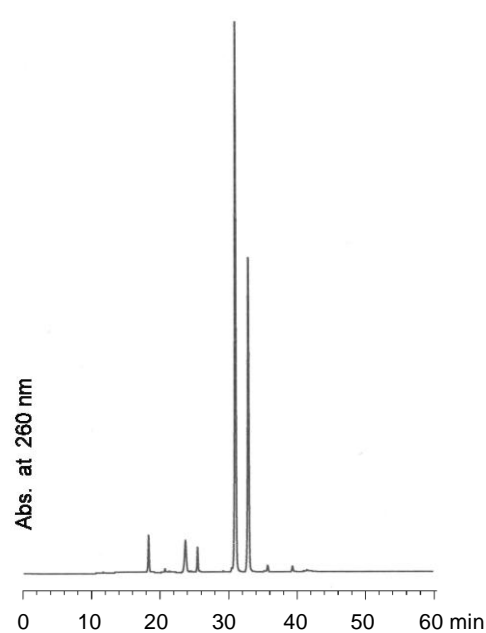
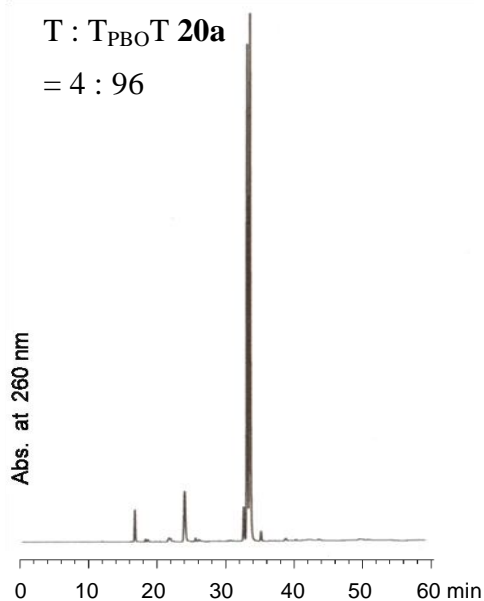


Figure 3-20. RP-HPLC profiles of crude T^L_{PBO}T^L **33**: (a) oxidized with Condition A; (b) oxidized with Condition A (double coupling); (c) oxidized with Condition B; (d) oxidized with Condition C. RP-HPLC was performed with linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) at 30 °C for 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min.

また、Condition C が 2'-デオキシ T_{PBO}T **20a** の合成に適用できるかを検討した。Condition A との比較を Figure 3-21 に示す。

(a) Condition A

T : T_{PBO}T **20a**
= 4 : 96



(b) Condition C

T : T_{PBO}T **20a**
= 3 : 97

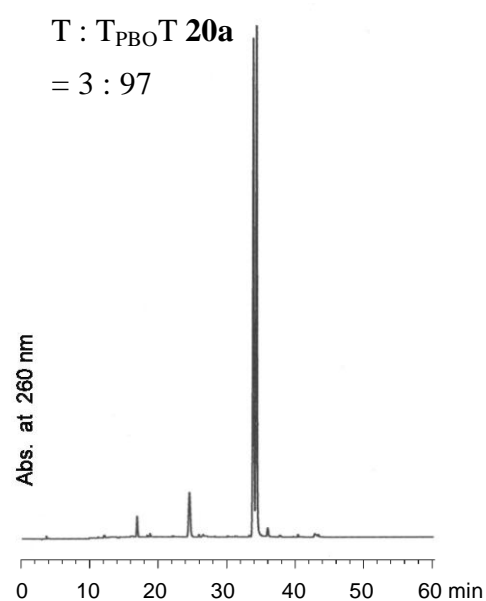


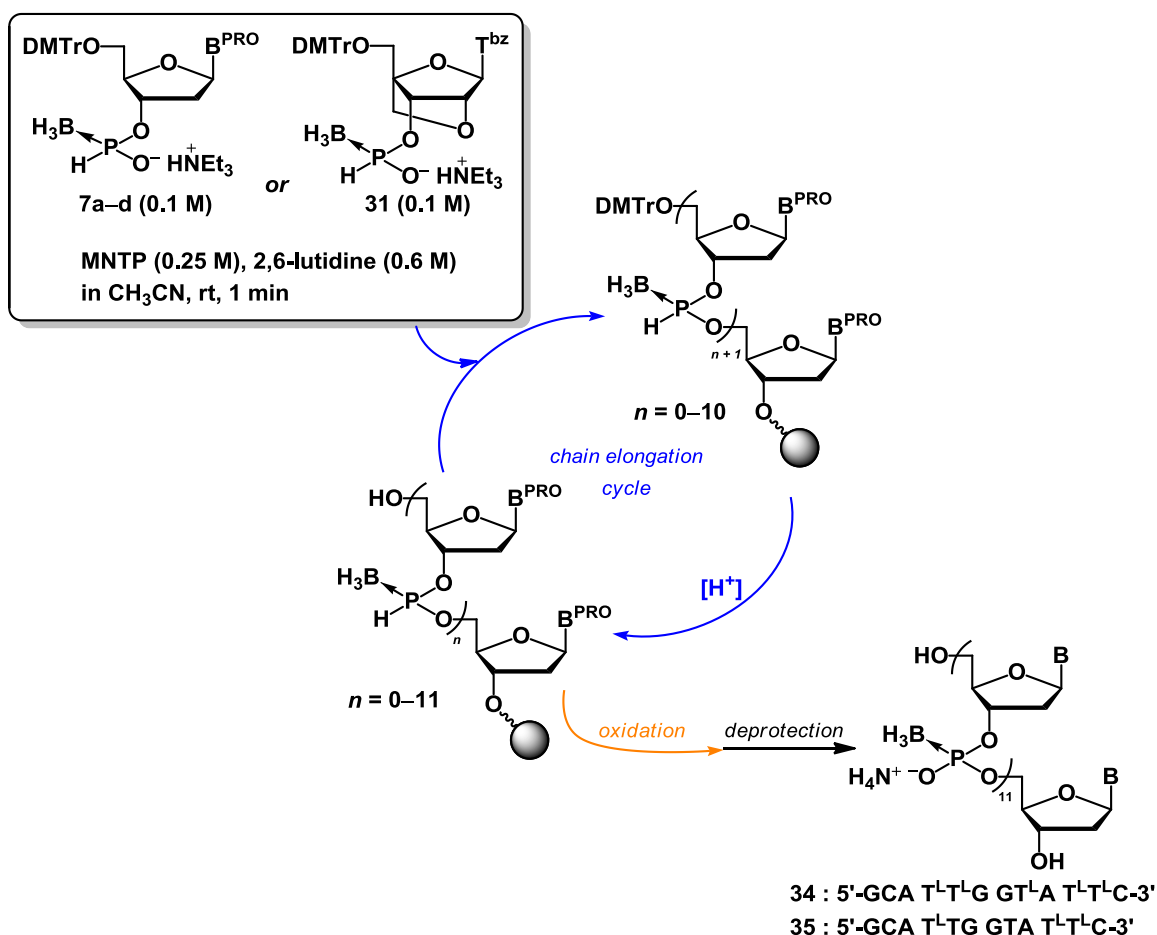
Figure 3-21. RP-HPLC profiles of crude T_{PBO}T **20a**: (a) oxidized with Condition A; (b) oxidized with Condition C. RP-HPLC was performed with linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) at 30 °C for 60 min at a flow rate of 0.5 mL/min.

このように、Condition C を用いて酸化反応を行っても、Condition A と同様に副生成物が生成することなく T_{PBO}T **20a** を 97% で得ることができた。これらの結果から、Condition C は LNA/2'-デオキシキメラオリゴマーの合成に適用可能であると判断した。

3-5-3. ^{LNA}PBO-ODN 十二量体の合成

次に、apoB タンパク質をコードする mRNA に相補的な配列を持つ十二量体のチミジンを全て LNA チミジンで置換した ^{LNA}PBO-ODN **34** (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3') と、オリゴマー中央部を 2'-デオキシ体とし、RNase H 活性の誘導が期待できる ^{LNA}PBO-ODN **35** (5'-GCA T^LTG GTA T^LT^LC-3') を合成した。合成の概略図と単離収率を Table 3-6 に示す。

Table 3-6. Solid-phase synthesis of ^{LNA}PBO-ODN **34** and **35**.^[a]

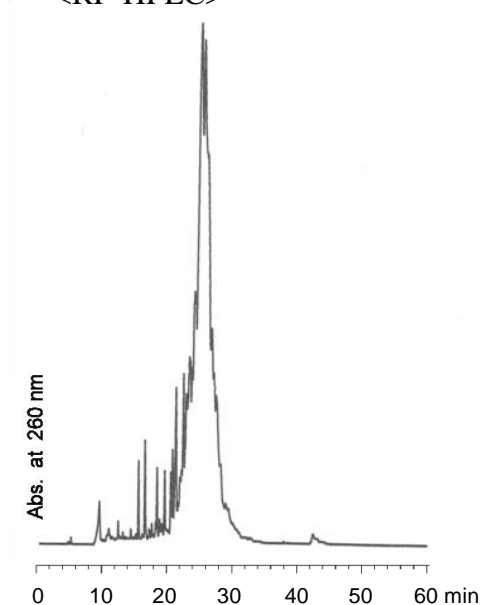


Entry	^{LNA} PBO-ODN	Isolated yield [%]
1	5'-G _{PBO} C _{PBO} A _{PBO} T ^L _{PBO} T ^L _{PBO} G _{PBO} G _{PBO} T ^L _{PBO} A _{PBO} T ^L _{PBO} T ^L _{PBO} C-3' 34	7
2	5'-G _{PBO} C _{PBO} A _{PBO} T ^L _{PBO} T _{PBO} G _{PBO} G _{PBO} T _{PBO} A _{PBO} T ^L _{PBO} T ^L _{PBO} C-3' 35	10

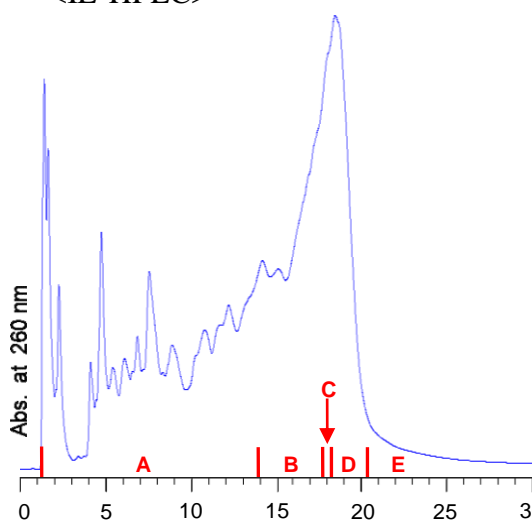
[a] Detritylation: 3% DCA in CH₂Cl₂-Et₃SiH (1:1, v/v), rt, 30 s; oxidation: TEA (0.1 M) in CCl₄-2,6-lutidine-H₂O (5:13:1, v/v/v), rt, 1 h; deprotection: 25% NH₃ aq-EtOH (3:1, v/v), 50 °C, 12 h.

これらのオリゴマーは、LNA チミジン *H*-ボラノホスホネートモノマーユニットの縮合効率が低いことが要因となり、単離収率は7-10%にとどまった。次に、**34** の HPLC チャートを Figure 3-22、**35** の HPLC チャートを Figure 3-23 に示す。オリゴマー中にジアステレオマー間で C₁₈ への親和性が大きく異なる LNA チミジンが含まれているため、RP-HPLC ではピークがブロード化し、分取は困難であると判断した。そこで、イオン強度の違いによって精製を行うことができるイオン交換カラムクロマトグラフィー (IE-HPLC) によって精製を行い、高純度で目的物を得ることに成功した。

(a) crude ^{LNA}PBO-ODN 12mer **34**
 (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3')
 <RP-HPLC>



(b) crude ^{LNA}PBO-ODN 12mer **34**
 (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3')
 <IE-HPLC>



(c) purified ^{LNA}PBO-ODN 12mer **34**
 (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3')
 <IE-HPLC>

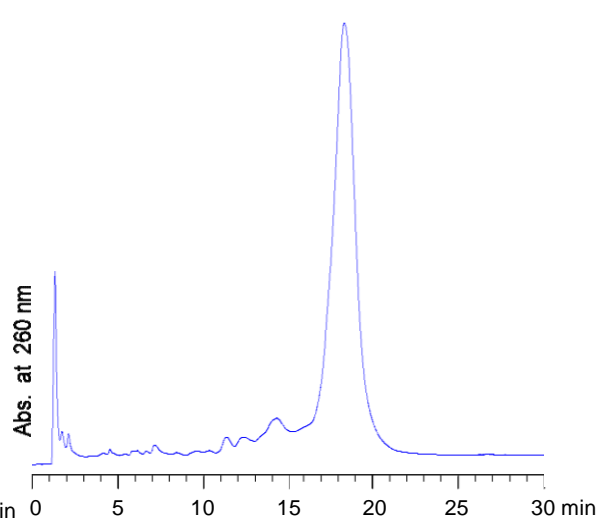
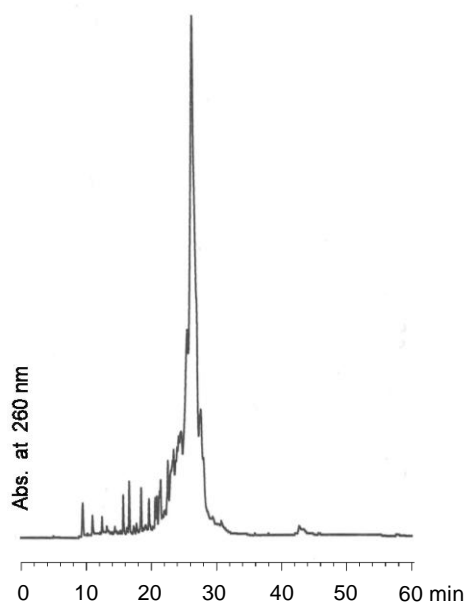
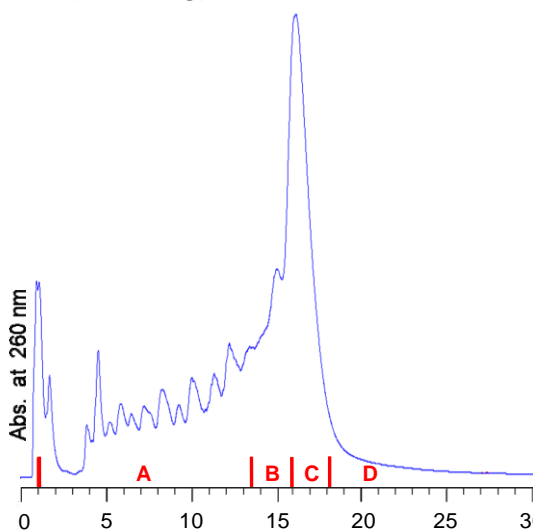


Figure 3-22. HPLC profiles of (a) crude <RP-HPLC>, (b) crude <IE-HPLC> and (c) purified <IE-HPLC> of ^{LNA}PBO-ODN 12mer **34** (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3'). RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min. IE-HPLC was performed with a linear gradient of 0–1 M NaCl, 50–25% CH₃CN in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8) for 20 min at rt at a flow rate of 0.8 mL/min.

(a) crude ^{LNA}PBO-ODN 12mer **35**
(5'-GCA T^LTG GTA T^LT^LC-3')
<RP-HPLC>



(b) crude ^{LNA}PBO-ODN 12mer **35**
(5'-GCA T^LTG GTA T^LT^LC-3')
<IE-HPLC>



(c) purified ^{LNA}PBO-ODN 12mer **35**
(5'-GCA T^LTG GTA T^LT^LC-3')
<IE-HPLC>

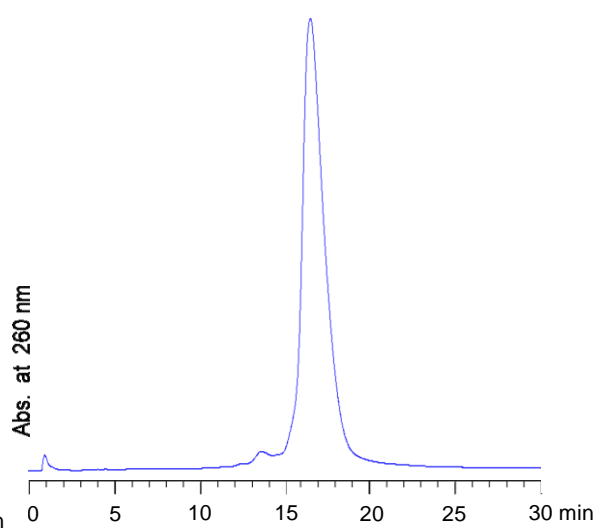


Figure 3-23. HPLC profiles of (a) crude <RP-HPLC>, (b) crude <IE-HPLC> and (c) purified <IE-HPLC> of ^{LNA}PBO-ODN 12mer **35** (5'-GCA T^LTG GTA T^LT^LC-3'). RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min. IE-HPLC was performed with a linear gradient of 0–1 M NaCl, 50–25% CH₃CN in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8) for 20 min at rt at a flow rate of 0.8 mL/min.

第四章 二重鎖融解温度

合成したオリゴマーと、相補鎖 ODN 及び ORN との T_m 測定を行い、オリゴマーの二重鎖形成能を評価した。

第一節 チミジル酸十二量体の T_m 値

4-1-1. $T_{(PO)_{11}}$, $T_{(PBO)_{11}}$, $T_{(PBS)_{11}}$ の比較

まず、天然型チミジル酸十二量体 ($T_{(PO)_{11}}$ **36**)、 $T_{(PBO)_{11}}$ **25**、 $T_{(PBS)_{11}}$ **26** と相補鎖 dA_{12} または rA_{12} の T_m 値の比較を行った。測定は、0.1 M NaCl または 1 M NaCl の塩濃度に調製した 10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 7.0) 緩衝液中で行った。それぞれの塩濃度における UV 曲線を Figure 4-1 に示す。なお、本節において様々な UV 曲線を示すが、全ての図において点線は相補鎖に ODN、実線は相補鎖に ORN を用いた場合を表す。

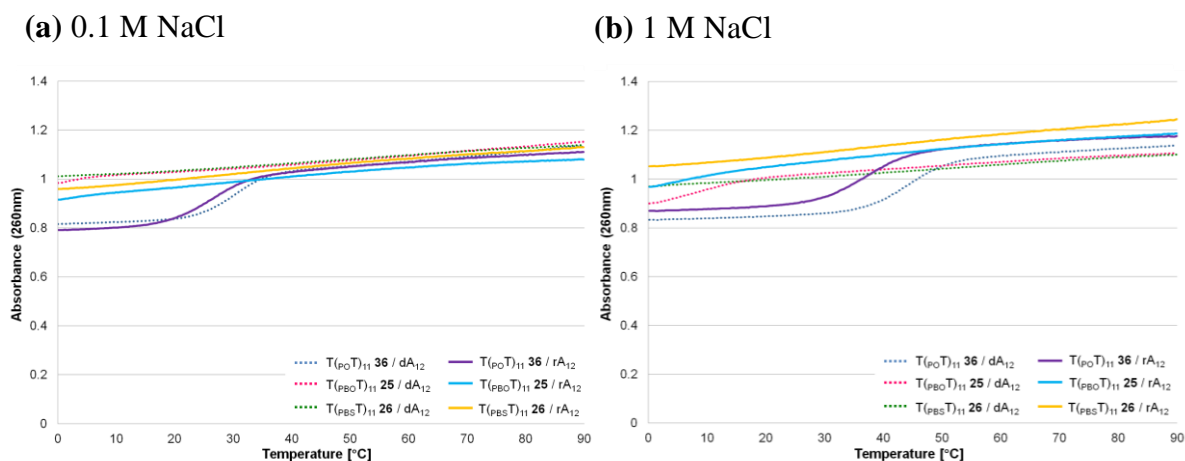


Figure 4-1. UV melting curves of the duplexes of $T_{(PO)_{11}}$ **36**, $T_{(PBO)_{11}}$ **25** and $T_{(PBS)_{11}}$ **26** with dA_{12} and rA_{12} in 10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer solutions (pH 7.0): (a) 0.1 M NaCl; (b) 1 M NaCl.

$T_{(PO)_{11}}$ を用いた場合、明確な変曲点が観測されたが、 $T_{(PBO)_{11}}$ は相補鎖が dA_{12} の場合のみ 10 °C 以下に変曲点が観測された。ただし、測定機器の検出限界を超えているため T_m 値の算出には至らなかった (Table 4-1)。Shimizu らは、 $T_{(PBO)_{11}}$ の T_m 値について 0.1 M NaCl では測定不能であり、1 M NaCl では $T_m = 12.8$ °C であると報告している²⁶。また、Iwamoto らはどちらの塩濃度においても T_m 値の算出には至らなかったと報告しており²⁷、本研究の結果とほぼ一致している。 $T_{(PBS)_{11}}$ を用いた場合は変曲点が一切確認されず、二重鎖形成能が全く無いことが示唆された。

Table 4-1. T_m values of the duplexes of $T_{(PO)11}$ **36**, $T_{(PBO)11}$ **25** and $T_{(PBS)11}$ **26** with dA_{12} and rA_{12} .

Entry	Oligonucleotide	Complementary strand	
		dA_{12} T_m [°C]	rA_{12} T_m [°C]
0.1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , pH 7.0			
1	$T_{(PO)11}$ 36	29.1	25.8
2	$T_{(PBO)11}$ 25	[a]	[a]
3	$T_{(PBS)11}$ 26	[a]	[a]
1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , pH 7.0			
4	$T_{(PO)11}$ 36	43.1	37.3
5	$T_{(PBO)11}$ 25	[a]	[a]
6	$T_{(PBS)11}$ 26	[a]	[a]

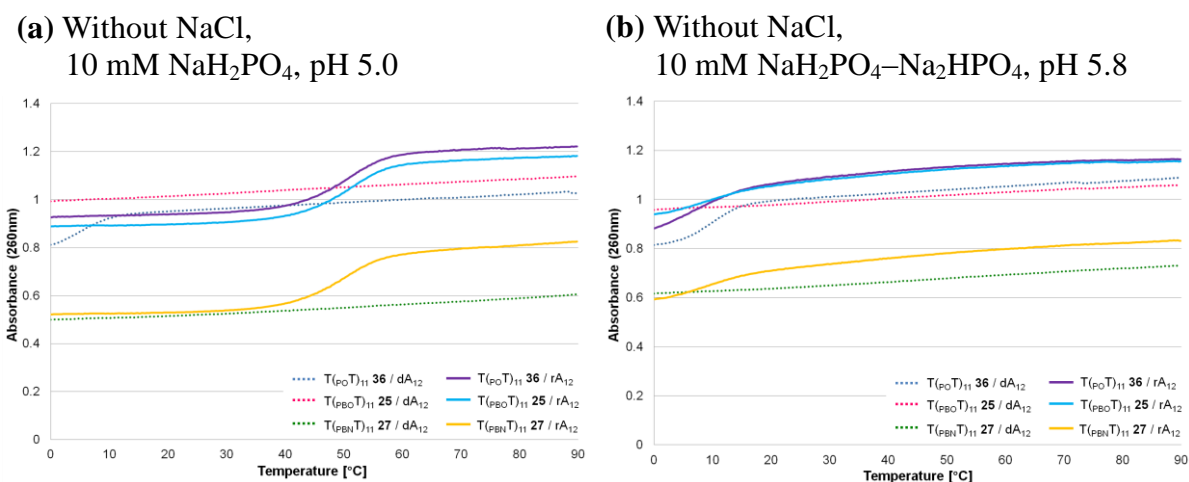
[a] T_m values could not determined.

4-1-2. $T_{(PO)11}$, $T_{(PBO)11}$, $T_{(PBN)11}$ の比較

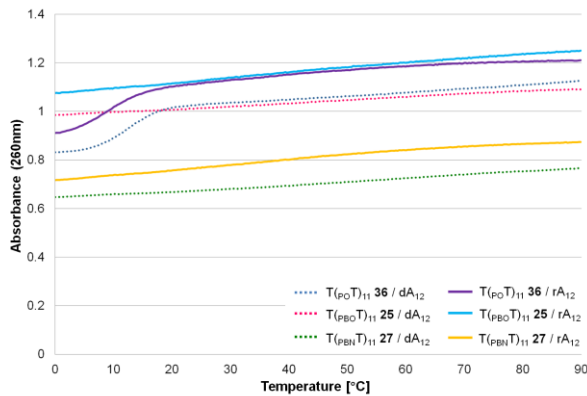
次に、 $T_{(PO)11}$ **36**、 $T_{(PBO)11}$ **25**、 $T_{(PBN)11}$ **27** と dA_{12} または rA_{12} の T_m 値の比較を行った。 $T_{(PBN)11}$ 中の 2-モルフオリノエチルアミノ基がプロトン化されることで相補鎖への親和性が高くなることを期待し、以下の五種類のリン酸水溶液中で測定を行った。

- Without NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 (pH 5.0) solution
- Without NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 (pH 5.8) buffer
- Without, 0.1 M or 1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 (pH 7.0) buffer

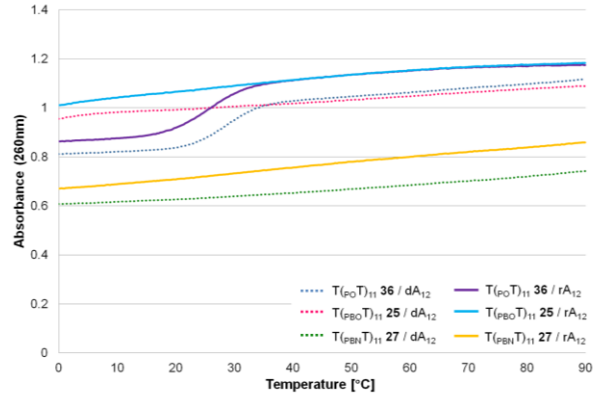
それぞれのリン酸水溶液中における UV 曲線を Figure 4-2 に示す。



(c) Without NaCl,
10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.0



(d) 0.1 M NaCl,
10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.0



(e) 1 M NaCl,
10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.0

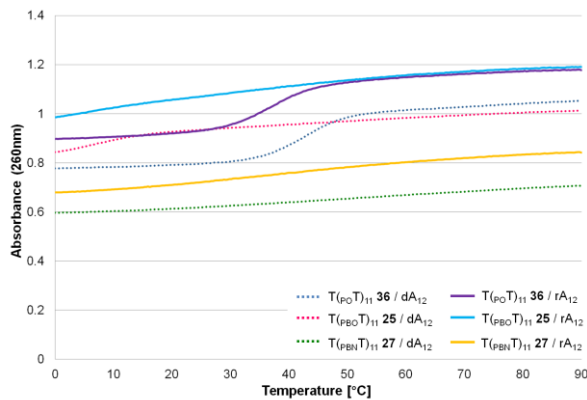


Figure 4-2. UV melting curves of the duplexes of T(_{po}T)₁₁ **36**, T(_{pBO}T)₁₁ **25** and T(_{pBN}T)₁₁ **27** with dA₁₂ and rA₁₂ in buffers of various pH values: (a) Without NaCl, 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 5.0; (b) Without NaCl, 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 5.8; (c) Without NaCl, 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.0; (d) 0.1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.0; (e) 1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7.0.

pH 7.0 のリン酸緩衝液中では、いずれの塩濃度でも T(_{po}T)₁₁ のみが二重鎖を形成した。しかし、pH 5.8 の緩衝液中では T(_{po}T)₁₁ だけでなく、相補鎖が rA₁₂ の場合に限り、T(_{pBO}T)₁₁ や T(_{pBN}T)₁₁ を用いても二重鎖の形成が示唆された。さらに、pH 5.0 のリン酸水溶液中ではいずれのチミジル酸十二量体を用いても、相補鎖が rA₁₂ の場合に 50 °C 付近に変曲点が観測された。一見、リン原子回りの電子的環境が全く異なる三種類の十二量体において、同程度の T_m 値となることが示唆された。しかし一般的に、一本鎖 poly (rA) は酸性の水溶液中でアデニン塩基の N^1 位がプロトン化されることで、poly (rAH⁺) / poly (rAH⁺) という二重鎖を形成し得ること、そして二重螺旋と一本鎖の構造変化は可逆的であり、温度依存的に平衡が

どちらかに偏ることが知られている⁴⁸。そこで、一本鎖 rA_{12} のみを用いて T_m 測定を行った。その結果を Figure 4-3 に示す。

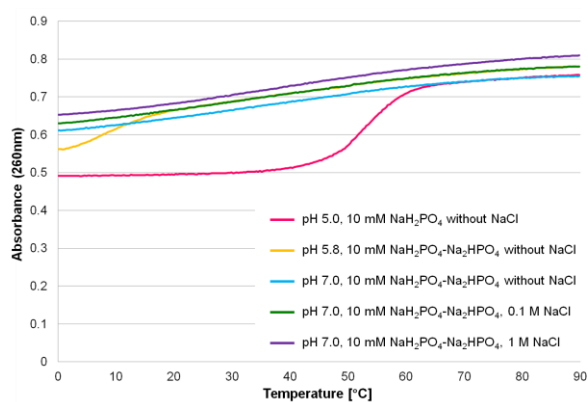


Figure 4-3. UV melting curves of rA_{12} in various buffers: Without NaCl, 10 mM $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$, pH 5.0; Without NaCl, 10 mM $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$, pH 5.8; Without NaCl, 10 mM $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$, pH 7.0; 0.1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0; 1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0.

赤、及びオレンジの線で示したように、酸性の水溶液中では rA_{12} のみを用いても二重鎖を形成した。つまり、Figure 4-2 における酸性水溶液中での UV 曲線は、 T_{12}/rA_{12} ヘテロ二重鎖の融解ではなく、 $(rAH^+)_{12}/(rAH^+)_{12}$ の二重螺旋構造から一本鎖 rA_{12} への構造変化を反映していたことになる。このように、予期に反して $T(PBN T)_{11}$ は酸性水溶液中においても二重鎖を形成しなかった (Table 4-2)。

Table 4-2. T_m values of the duplexes of T_{(PO)11} **36**, T_{(PBO)11} **25** and T_{(PBN)11} **27** with dA₁₂ and rA₁₂.

Entry	Oligonucleotide	Complementary strand	
		dA ₁₂ T_m [°C]	rA ₁₂ T_m [°C]
Without NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 5.0			
1	T _{(PO)11} 36	[a]	49.6 ^[b]
2	T _{(PBO)11} 25	[a]	50.1 ^[b]
3	T _{(PBN)11} 27	[a]	48.9 ^[b]
Without NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 5.8			
4	T _{(PO)11} 36	10.5	[a]
5	T _{(PBO)11} 25	[a]	10.4 ^[b]
6	T _{(PBN)11} 27	[a]	9.9 ^[b]
Without NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
7	T _{(PO)11} 36	12.7	10.9
8	T _{(PBO)11} 25	[a]	[a]
9	T _{(PBN)11} 27	[a]	[a]
0.1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
10	T _{(PO)11} 36	29.1	25.8
11	T _{(PBO)11} 25	[a]	[a]
12	T _{(PBN)11} 27	[a]	[a]
1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
13	T _{(PO)11} 36	43.1	37.3
14	T _{(PBO)11} 25	[a]	[a]
15	T _{(PBN)11} 27	[a]	[a]

[a] T_m values could not be determined. [b] The values correspond not to the dissociation of the ODN/ORN hetero duplex but to the dissociation of the protonated homo rA12mer duplex.

本研究では合成可能だったチミン塩基を有する *PBN*-ODN に関してのみ検討を行ったが、今後四種類の核酸塩基を有する *PBN*-ODN を合成し、より詳細な物理化学的性質を評価する必要がある。

このように、いずれのボラン修飾型チミジル酸十二量体も、相補鎖と安定な二重鎖を形成しなかった。そのため、チミジル酸の T_m 測定の結果からはボラン修飾型 ODN の物理化学的性質を評価することはできなかった。

第二節 四種類全ての核酸塩基を有する十二量体の T_m 値

次に、apoB タンパク質をコードする mRNA に相補的な配列を持つ十二量体 (5'-GCA TTG GTA TTC-3') の T_m 測定を行った。

4-2-1. 2'-デオキシ十二量体 (natural, PS, PBO, PBS-ODN) の比較

まず、PBO-ODN 28 と PBS-ODN 29 の T_m 値を同塩基配列の天然型 ODN 37 (5'-G_{PO}C_{PO}A_{PO}T_{PO}T_{PO}G_{PO}G_{PO}T_{PO}A_{PO}T_{PO}T_{PO}C-3')、及び PS-ODN 38 (5'-G_{PS}C_{PS}A_{PS}T_{PS}T_{PS}G_{PS}G_{PS}T_{PS}A_{PS}T_{PS}T_{PS}C-3') と比較した。 T_m 測定は、10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0)、0.1 M NaCl または 1 M NaCl の緩衝液中で行った。それぞれの塩濃度における UV 曲線を Figure 4-4、4-5 に示す。

<0.1 M NaCl>

(a) ODNs with complementary ODN

(b) ODNs with complementary ORN

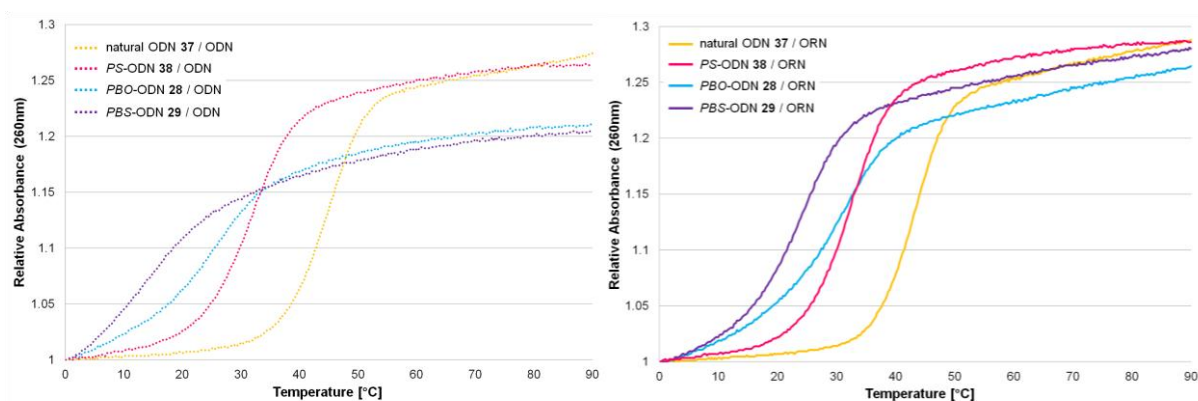


Figure 4-4. UV melting curves of the duplexes in 0.1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer solutions (pH 7.0): (a) natural ODN 37, PS-ODN 38, PBO-ODN 28 and PBS-ODN 29 with complementary ODN; (b) natural ODN 37, PS-ODN 38, PBO-ODN 28 and PBS-ODN 29 with complementary ORN.

<1 M NaCl>

(a) ODNs with complementary ODN

(b) ODNs with complementary ORN

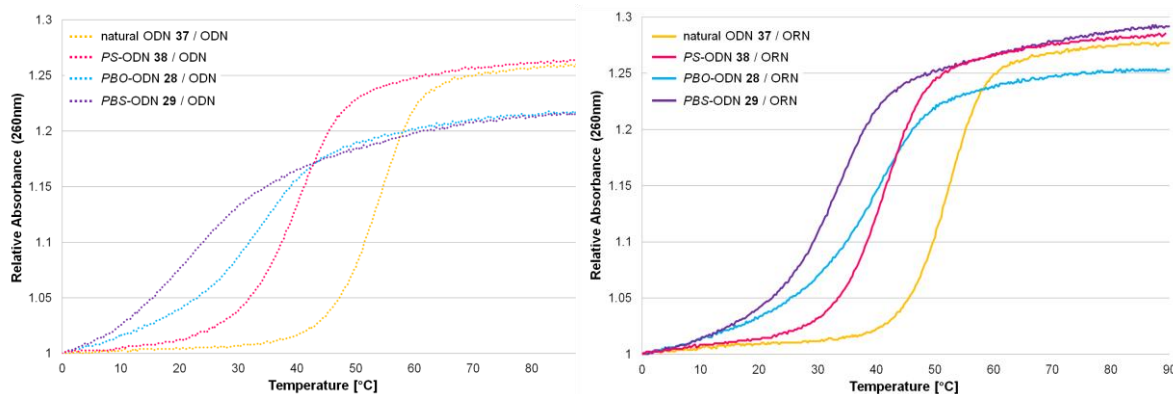


Figure 4-5. UV melting curves of the duplexes in 1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer solutions (pH 7.0): (a) natural ODN **37**, PS-ODN **38**, PBO-ODN **28** and PBS-ODN **29** with complementary ODN; (b) natural ODN **37**, PS-ODN **38**, PBO-ODN **28** and PBS-ODN **29** with complementary ORN.

四種類の核酸塩基を有する十二量体を用いた場合、ホスホロチオエート、ボラノホスフェート、ボラノホスホロチオエートの全ての修飾体において相補鎖と二重鎖を形成したことを示唆する UV 曲線が得られた。これは、グアニン塩基とシトシン塩基が含まれているために、水素結合数が増加したことや、塩基対間の π - π スタッキングが有効に働いたことで、二重鎖の高次構造が安定化したためであると考えられる。得られた UV 曲線から算出した T_m 値を Table 4-4 に示す。

Table 4-4. T_m values of the duplexes of natural ODN **37**, *PS*-ODN **38**, *PBO*-ODN **28** and *PBS*-ODN **29** with complementary ODN and ORN.

Entry	Oligonucleotide	Complementary strand	
		ODN ^[a] T_m [°C] (ΔT_m [°C] ^[c] , $\Delta T_m/\text{mod.}$ [°C] ^[d])	ORN ^[b] T_m [°C] (ΔT_m [°C] ^[c] , $\Delta T_m/\text{mod.}$ [°C] ^[d])
0.1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
1	natural ODN 37	42.7	42.0
2	<i>PS</i> -ODN 38	31.3 (-11.4, -1.0)	32.2 (-9.8, -0.9)
3	<i>PBO</i> -ODN 28	25.9 (-16.8, -1.5)	29.9 (-12.1, -1.1)
4	<i>PBS</i> -ODN 29	15.7 (-27.0, -2.5)	25.0 (-17.0, -1.5)
1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
5	natural ODN 37	53.2	52.0
6	<i>PS</i> -ODN 38	40.3 (-12.9, -1.2)	41.6 (-10.4, -0.9)
7	<i>PBO</i> -ODN 28	33.1 (-20.1, -1.8)	39.0 (-13.0, -1.2)
8	<i>PBS</i> -ODN 29	20.9 (-32.3, -2.9)	32.9 (-19.1, -1.7)

[a] 3'-CGT AAC CAT AAG-5'. [b] 3'-CGU AAC CAU AAG-5'. [c] Difference from the T_m of natural ODN/ODN(ORN). [d] Difference of the T_m values per *PS*, *PBO* or *PBS* linkage.

二重鎖形成能が高い順に ODN を列挙すると、天然型 ODN > *PS*-ODN > *PBO*-ODN > *PBS*-ODN となった。また、天然型 ODN と *PS*-ODN は、相補鎖に ODN と ORN のどちらを用いても T_m 値に顕著な差はないが、*PBO*-ODN と *PBS*-ODN は、相補鎖が ORN の場合、ODN と比較して T_m 値が 5–10 °C 上昇した。これらの結果を考察するために、各修飾体における糖環のコンフォメーションを、核酸塩基がチミンの場合を例として Figure 4-6 (C2'-endo 型)、及び Figure 4-7 (C3'-endo 型) に示した。なお、第一章、第五節で述べた通り、アンチセンス鎖の糖環パッカリングは、相補鎖が ODN の場合は C2'-endo 型、相補鎖が ORN の場合は C3'-endo 型に偏っている。

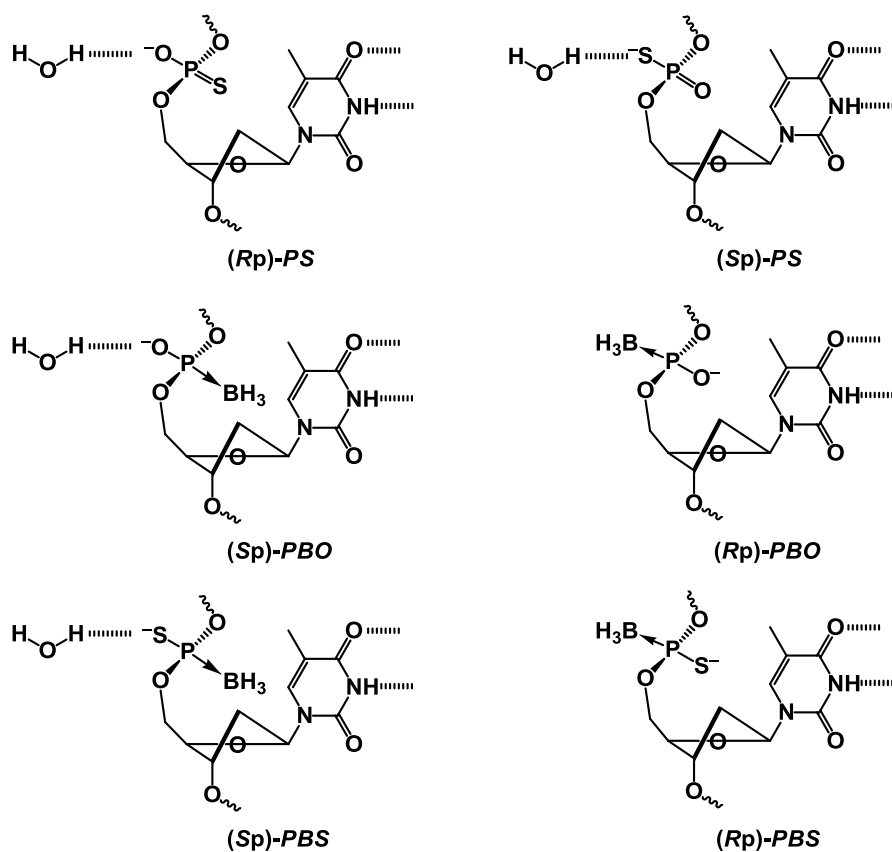


Figure 4-6. C2'-endo Conformation of phosphorothioate, boranophosphate and boranophosphorothioate modified pentafuranose sugar.

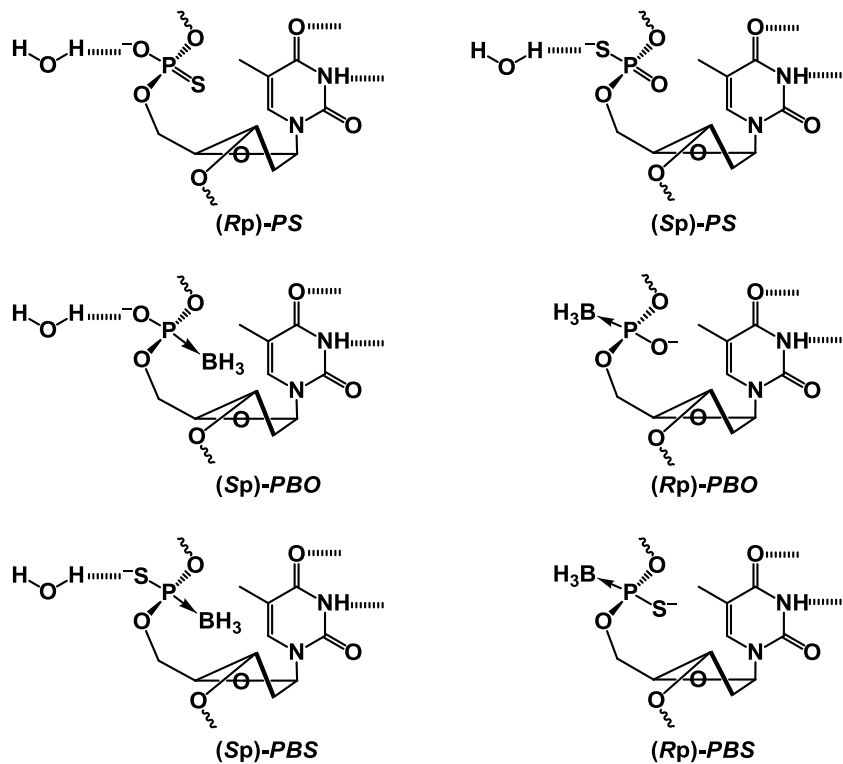


Figure 4-7. C3'-endo Conformation of phosphorothioate, boranophosphate and boranophosphorothioate modified pentafuranose sugar.

PS-ODN の場合、*Rp* 体では酸素原子よりも疎水的な硫黄原子が二重鎖 major groove 内側の疎水的環境にある核酸塩基対近傍に位置することで、相補鎖との二重鎖形成が有利になる。一方、疎水的な硫黄原子が二重鎖 major groove の外側に位置し、水和を妨げる *Sp* 体では二重鎖形成がエンタルピー的に不利になる。そのため、天然型 ODN よりも二重鎖が不安定化したと考えられる。*PBO*-ODN の場合、硫黄原子よりもさらに疎水的なボラノ基が核酸塩基対近傍に位置し、かつ水和構造を乱さない *Sp* 体は、*PS*-ODN の *Rp* 体よりも二重鎖形成能が優れていると推測される。これに対し、負電荷を有する親水的な酸素原子が疎水的環境にある核酸塩基対近傍に位置し、かつ水和を妨げるボラノ基が二重鎖 major groove の外側に位置する *Rp* 体は二重鎖形成が著しく不利になり、結果的に *PS*-ODN よりも T_m 値が低くなったと示唆される。また、相補鎖が ODN と ORN の場合で T_m 値に差が生じる理由は、糖環パッカリングが *C3'-endo* 型の場合、*C2'-endo* 型よりもボラノ基が核酸塩基に近付くため、疎水的相互作用がより強く働くためであると考えられる。さらに、*PBS*-ODN の場合、ボラノ基が核酸塩基近傍に位置する *Sp* 体でも、酸素原子よりも水素結合能が低く、水和に不利な硫黄原子が二重鎖 major groove の外側に位置するため、*PBO*-ODN よりも二重鎖が不安定化したと考えられる。

このように、ボラン修飾型 ODN はボラノ基の置換基効果によって、相補鎖が ODN よりも ORN の場合に T_m 値がより高くなった。この傾向は、Shimizu らによって報告された *PBO*-ODN²⁶、及び Caruthers らによって報告されたメチルボラノホスホネート ODN⁷¹ の性質と一致する。しかし、ボラノ基によって二重鎖は不安定になり、天然型 ODN と比較すると T_m 値は 12–18 °C 低い。そのため、37 °C の生体内で標的 mRNA と安定な二重鎖を形成することは難しく、2'-デオキシ体のボラン修飾型 ODN は医薬への応用は困難であると判断した。

4-2-2. LNA チミジンを有する十二量体の T_m 値

次に、^{LNA}*PBO*-ODN 十二量体の T_m 測定を行った。

➤ ^{LNA}*PO*, ^{LNA}*PS*, ^{LNA}*PBO*-ODN の比較

まず、apoB タンパク質をコードする mRNA に相補的な配列を持つ十二量体のチミジンを、全て LNA チミジンで置換した十二量体 (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3') を用いて T_m 測定を行った。なお、インターヌクレオチド結合は、ホスフェートジエステル (^{LNA}*PO*-ODN 39: 5'-G_{PO}C_{PO}A_{PO}T^L_{PO}T^L_{PO}G_{PO}G_{PO}T^L_{PO}A_{PO}T^L_{PO}T^L_{PO}C-3')、ホスホロチオエート (^{LNA}*PS*-ODN 40: 5'-G_{PS}C_{PS}A_{PS}T^L_{PS}T^L_{PS}G_{PS}G_{PS}T^L_{PS}A_{PS}T^L_{PS}T^L_{PS}C-3')、及び第三章、第

五節で合成したボラノホスフェート ($LNA PBO$ -ODN **34**) の三種類で比較した。測定は、10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 7.0)、0.1 M NaCl または 1 M NaCl の緩衝液中で行った。得られた UV 曲線を Figure 4-8、4-9 に示す。

<0.1 M NaCl>

(a) ODNs with complementary ODN

(b) ODNs with complementary ORN

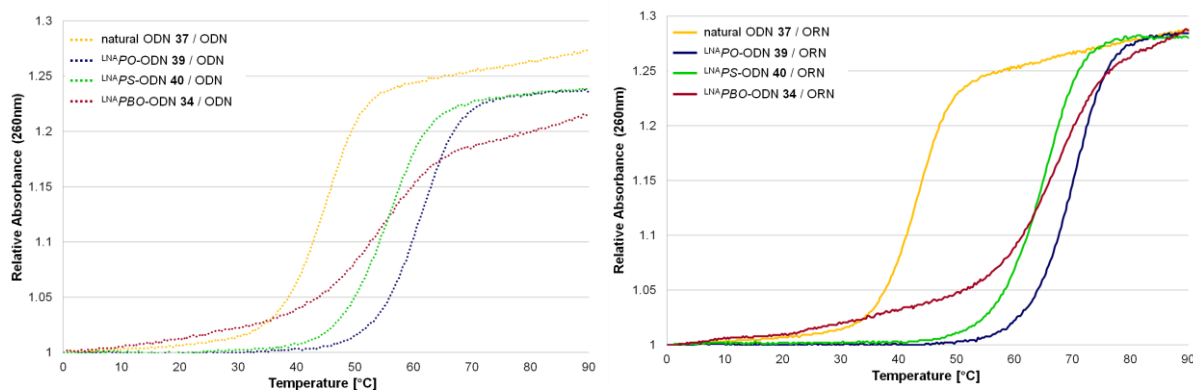


Figure 4-8. UV melting curves of the duplexes in 0.1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer solutions (pH 7.0): (a) natural ODN **37**, $LNA PO$ -ODN **39**, $LNA PS$ -ODN **40** and $LNA PBO$ -ODN **34** with complementary ODN; (b) natural ODN **37**, $LNA PO$ -ODN **39**, $LNA PS$ -ODN **40** and $LNA PBO$ -ODN **34** with complementary ORN.

<1 M NaCl>

(a) ODNs with complementary ODN

(b) ODNs with complementary ORN

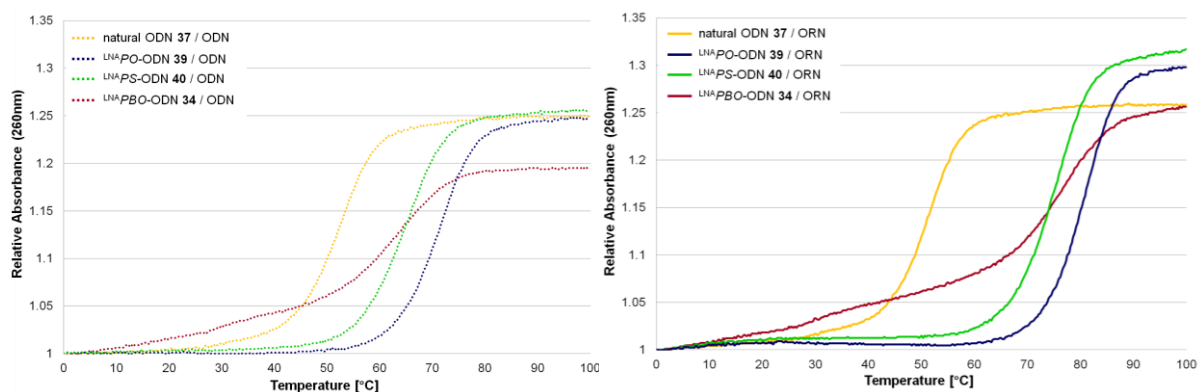


Figure 4-9. UV melting curves of the duplexes in 1 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer solutions (pH 7.0): (a) natural ODN **37**, $LNA PO$ -ODN **39**, $LNA PS$ -ODN **40** and $LNA PBO$ -ODN **34** with complementary ODN; (b) natural ODN **37**, $LNA PO$ -ODN **39**, $LNA PS$ -ODN **40** and $LNA PBO$ -ODN **34** with complementary ORN.

UV 曲線から算出した T_m 値を Table 4-5 にまとめる。

Table 4-5. T_m values of the duplexes of natural ODN **37**, ^{LNA}PO-ODN **39**, ^{LNA}PS-ODN **40** and ^{LNA}PBO-ODN **34** with complementary ODN and ORN.

Entry	Oligonucleotide	Complementary strand	
		ODN ^[a]	ORN ^[b]
		T_m [°C] (ΔT_m [°C], $\Delta T_m/\text{mod.}$ [°C])	T_m [°C] (ΔT_m [°C], $\Delta T_m/\text{mod.}$ [°C])
0.1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
1	natural ODN 37	42.7	42.0
2	^{LNA} PO-ODN 39	60.1 (+17.4 ^[c] , +3.5 ^[d])	69.0 (+27.0 ^[c] , +5.4 ^[d])
3	^{LNA} PS-ODN 40	54.6 (-5.5 ^[e] , -0.5 ^[f])	64.2 (-4.8 ^[e] , -0.4 ^[f])
4	^{LNA} PBO-ODN 34	52.1 (-8.0 ^[e] , -0.7 ^[f])	63.9 (-5.1 ^[e] , -0.5 ^[f])
1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
5	natural ODN 37	53.2	52.0
6	^{LNA} PO-ODN 39	71.0 (+17.8 ^[c] , +3.6 ^[d])	80.1 (+28.1 ^[c] , +5.6 ^[d])
7	^{LNA} PS-ODN 40	64.5 (-6.5 ^[e] , -0.6 ^[f])	74.5 (-5.6 ^[e] , -0.5 ^[f])
8	^{LNA} PBO-ODN 34	63.6 (-7.4 ^[e] , -0.7 ^[f])	75.9 (-4.2 ^[e] , -0.4 ^[f])

[a] 3'-CGT AAC CAT AAG-5'. [b] 3'-CGU AAC CAU AAG-5'. [c] Difference from the T_m of natural ODN/ODN(ORN). [d] Difference of the T_m values per LNA thymidine. [e] Difference from the T_m of ^{LNA}PO-ODN/ODN(ORN). [f] Difference of the T_m values per PS or PBO linkage.

^{LNA}PBO-ODN の T_m 値は、^{LNA}PO-ODN より 5–8 °C 低い天然型 ODN と比べると大幅に上昇した。また、生理的条件に近い 0.1 M NaCl のリン酸緩衝液中では ^{LNA}PS-ODN と同程度、1M NaCl では ^{LNA}PS-ODN 以上の T_m 値となった。このように、LNA 修飾を施すことでボラノ基による二重鎖の不安定化を補うことができることが明らかとなった。さらに、相補鎖が ODN の場合に比べ、ORN の場合に T_m 値がより高いことから、アンチセンス医薬への応用が期待できる。ただし、Figure 4-8、4-9 に示した UV 曲線の形状から以下のことが示唆された。^{LNA}PBO-ODN は天然型 ODN、^{LNA}PO-ODN、及び ^{LNA}PS-ODN を用いた場合と比較して、温度上昇に伴う吸光度変化が緩やかであった。これは、温度上昇に伴い二重鎖が末端から徐々に解離することを反映していると考えられる。この性質がどの程度アンチセンス活性に影響を及ぼすか、今後 *in vivo* で詳細に評価する必要がある。

➤ 三種類の *PBO*-ODN の比較

最後に、2'-デオキシ *PBO*-ODN **28**、^{LNA}*PBO*-ODN **34** (5'-G_{PBO}C_{PBO}A_{PBO}T^L_{PBO}T^L_{PBO}G_{PBO}G_{PBO}T^L_{PBO}A_{PBO}T^L_{PBO}T^L_{PBO}C-3')、及び^{LNA}*PBO*-ODN **35** (5'-G_{PBO}C_{PBO}A_{PBO}T^L_{PBO}T_{PBO}G_{PBO}G_{PBO}T_{PBO}A_{PBO}T^L_{PBO}T^L_{PBO}C-3') の T_m 値を比較した。測定は、10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 7.0)、0.1 M NaCl または 1 M NaCl の緩衝液中で行った。得られた UV 曲線を Figure 4-10、4-11 に示す。

<0.1 M NaCl>

(a) ODNs with complementary ODN

(b) ODNs with complementary ORN

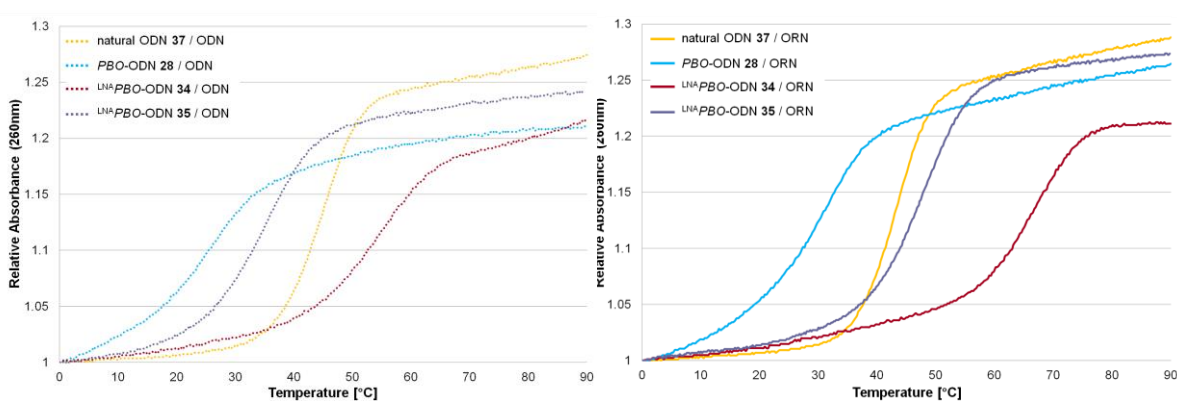


Figure 4-10. UV melting curves of the duplexes in 0.1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer solutions (pH 7.0): (a) natural ODN **37**, *PBO*-ODN **28**, ^{LNA}*PBO*-ODN **34** and ^{LNA}*PBO*-ODN **35** with complementary ODN; (b) natural ODN **37**, *PBO*-ODN **28**, ^{LNA}*PBO*-ODN **34** and ^{LNA}*PBO*-ODN **35** with complementary ORN.

<1 M NaCl>

(a) ODNs with complementary ODN

(b) ODNs with complementary ORN

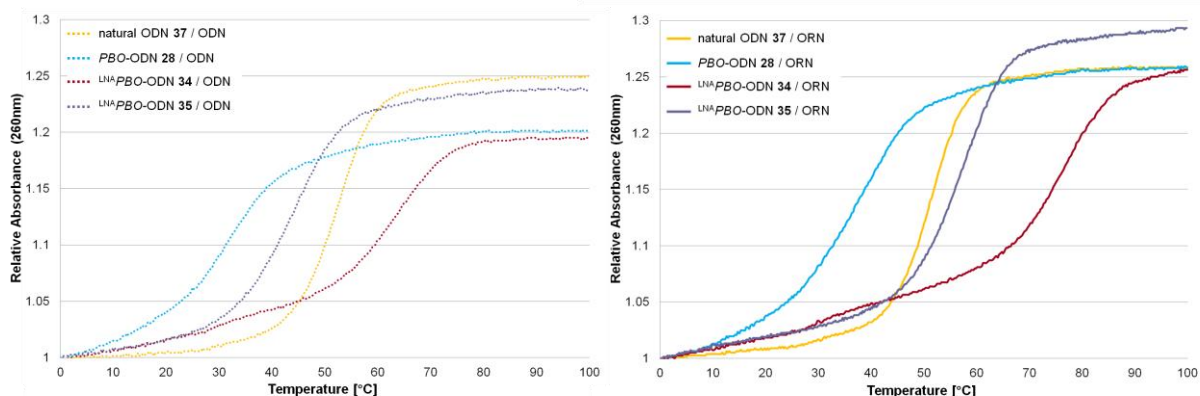


Figure 4-11. UV melting curves of the duplexes in 1 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer solutions (pH 7.0): (a) natural ODN **37**, *PBO*-ODN **28**, ^{LNA}*PBO*-ODN **34** and ^{LNA}*PBO*-ODN **35** with complementary ODN; (b) natural ODN **37**, *PBO*-ODN **28**, ^{LNA}*PBO*-ODN **34** and ^{LNA}*PBO*-ODN **35** with complementary ORN.

三種類の *PBO*-ODN 及び天然型 ODN の T_m 値を Table 4-6 にまとめる

Table 4-6. T_m values of the duplexes of natural ODN **37**, *PBO*-ODN **28**, ^{LNA}*PBO*-ODN **34** and ^{LNA}*PBO*-ODN **35** with complementary ODN and ORN.

Entry	Oligonucleotide	Complementary strand	
		ODN ^[a]	ORN ^[b]
		T_m [°C] (ΔT_m [°C], $\Delta T_m/\text{mod.}$ [°C])	T_m [°C] (ΔT_m [°C], $\Delta T_m/\text{mod.}$ [°C])
0.1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
1	natural ODN 37	42.7	42.0
2	<i>PBO</i> -ODN 28	25.9 (-16.8 ^[c] , -1.5 ^[d])	29.9 (-12.1 ^[c] , -1.1 ^[d])
3	^{LNA} <i>PBO</i> -ODN 34	52.1 (+26.2 ^[e] , +5.2 ^[f])	63.9 (+34.0 ^[e] , +6.8 ^[f])
4	^{LNA} <i>PBO</i> -ODN 35	34.4 (+8.5 ^[e] , +2.8 ^[f])	47.2 (+17.3 ^[e] , +5.8 ^[f])
1 M NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ , pH 7.0			
5	natural ODN 37	53.2	52.0
6	<i>PBO</i> -ODN 28	33.1 (-20.1 ^[c] , -1.8 ^[d])	39.0 (-13.0 ^[c] , -1.2 ^[d])
7	^{LNA} <i>PBO</i> -ODN 34	63.6 (+30.5 ^[e] , +6.1 ^[f])	75.9 (+36.9 ^[e] , +7.4 ^[f])
8	^{LNA} <i>PBO</i> -ODN 35	42.9 (+9.8 ^[e] , +3.3 ^[f])	56.7 (+17.7 ^[e] , +5.9 ^[f])

[a] 3'-CGT AAC CAT AAG-5'. [b] 3'-CGU AAC CAU AAG-5'. [c] Difference from the T_m of natural ODN/ODN(ORN). [d] Difference of the T_m values per *PBO* linkage. [e] Difference from the T_m of *PBO*-ODN/ODN(ORN). [f] Difference of the T_m values per LNA thymidine.

^{LNA}*PBO*-ODN **35** の T_m 値は、相補鎖が ODN の場合には天然型 ODN よりも低い
が、相補鎖が ORN の場合には天然型 ODA よりも約 5 °C 高い結果となった。さ
らに、生理的条件に近い緩衝液中において生体内の温度である 37 °C よりも約
10 °C、 T_m 値が高いことから (Table 4-6, Entry 4, Complementary strand = ORN)、
^{LNA}*PBO*-ODN **34** と同様、アンチセンス医薬への応用が期待できる。今後、マウス
を用いた *in vivo* 実験によって標的遺伝子の発現抑制効率を詳細に比較検討する。

総括

本研究では、*H*-ボラノホスホネート法による効率的なボラン修飾型オリゴマーの合成、及びオリゴマーの物理化学的性質の評価を行った。

まず、オリゴマー合成に用いるモノマーユニットの合成を行った。既存の方法では、チミジンモノマーユニット **7a** は 95%という高い収率で得ることができたが、他の核酸塩基を有するモノマーユニットの収率は 36–49%にとどまった。そこで、反応温度を最適化したところ、目的物を 60–74%で得ることに成功した。

次に、固相法におけるオリゴマー合成に先駆け、液相でチミジンモノマーユニット **7a** と 5'位遊離の水酸基を有するチミジン誘導体を縮合することで、ジチミジル酸 *H*-ボラノホスホネート **9** の合成を行い、縮合反応の条件検討を行った。縮合剤に MNTP、塩基に DMAN を用いたところ、反応が定量的に進行したことを確認した。しかし、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製操作の際に、**9** が全て加水分解し、**9** は強塩基性条件下において不安定であることが明らかとなった。ただし、DMAN を洗浄操作によって除去可能な固相合成には応用できると判断した。次に、**9** の変換反応として、酸化反応及び硫化反応の条件検討を行った。DIPEA、CCl₄、及び H₂O を用いて **9** の酸化反応を行ったところ、ジチミジル酸ボラノホスフェート **14** が 86%で得られた。また、DIPEA と DTD を用いて **9** の硫化反応を行ったところジチミジル酸ボラノホスホロチオエート **15** を 96%という高収率で得た。そこで次に、これらの条件を固相合成に適用した。

本手法をオリゴマー合成に応用するために、固相担体上でジチミジル酸ボラノホスホロチオエート **19a** を合成することで、縮合反応のさらなる最適化を行った。縮合反応時に添加する塩基に DMAN を用いた場合、収率は T : T_{PBS}T **19a** = 13 : 87にとどまり、副生成物が多数確認された。これは、DMAN の強塩基性によって溶媒中に残存する水分子から OH⁻が生成し、中間体である *H*-ボラノホスホネートジエステル体の一部が加水分解したためであると考えられる。これに対し、塩基に 2,6-ルチジンを用いた場合、収率は T : T_{PBS}T **19a** = 4 : 96 に大幅に向上し、副反応を抑制することに成功した。2,6-ルチジンは水分子を活性化するほどの強塩基性がないため、本系において最適の塩基であると言える。さらに、縮合時間の検討を行った結果、わずか 20 秒で縮合反応が完結することが明らかとなり、*H*-ボラノホスホネートモノマーユニットの高い縮合効率が示された。**19a** の合成で最適化した縮合反応条件を、他の核酸塩基を有するボラノホスホロチオエート二量体、ボラノホスホフェート二量体、及びボラノホスホロアミデート二量体合成に適用したところ、いずれも高収率かつ高純度で目的物を得ることに成功した。これらの結果から、より長鎖のオリゴマー合成に適用可能であると判断した

縮合反応と脱 DMTr 化を繰り返し行うことで鎖長伸長し、最後に変換反応を施

すことで、種々のボラン修飾型十二量体オリゴマーの合成を行った。RP-HPLCによる分析の結果、いずれのオリゴマー合成においても種々の反応が効率的に進行したことが示唆された。さらに、本研究において、2'-デオキシボラン修飾型オリゴマーの欠点である相補鎖への低い親和性を補うために、LNA チミジンを導入したボラノホスフェート十二量体を初めて合成することに成功した。

種々のオリゴマーを効率的に合成することに成功したため、それらを用いて二重鎖形成能の評価を行った。2'-デオキシ体のボラン修飾型オリゴマーは、ボラノ基の置換基効果によって二重鎖形成能が天然型 DNA よりも低く、 T_m 値は 12-18 °C 程度低い値となった。そのため、生体内で安定な二重鎖を形成することは困難であると判断した。しかし、LNA 修飾を施したボラノホスフェートの T_m 値は、天然型 DNA よりも大幅に上昇した (天然型 DNA/相補鎖 RNA = 42 °C, LNA 修飾型ボラノホスフェート/相補鎖 RNA = 64 °C)。これは、生体内で相補鎖と安定な二重鎖を形成するのに十分な値と言える。この結果から、LNA 修飾を施すことでボラノ基による二重鎖の不安定化を補うことができることが明らかとなった。

本手法は、四種類全ての核酸塩基に適用可能であり、かつオリゴマーの任意の位置に LNA を導入することができる。そのため、目的に応じた多様なアンチセンス医薬候補分子を創出することができると言える。今後、LNA 修飾を施したボラノホスフェートの生理活性なども含めた詳細な機能が明らかとなれば、合成及び分子デザインの両面からアンチセンス医薬の開発に大いに貢献できる。

実験項

1. General Information

All the reactions were conducted under Ar atmosphere unless otherwise noted. Dry organic solvents were prepared by appropriate procedures prior to use. All NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 spectrometer. ^1H NMR spectra were obtained at 300 MHz with tetramethylsilane (TMS) (δ 0.0) as an internal standard in CDCl_3 . ^{13}C NMR spectra were obtained at 75 MHz with TMS (δ 77.0) as an internal standard in CDCl_3 . ^{31}P NMR spectra were obtained at 121.5 MHz with 85% H_3PO_4 (δ 0.0) as an external standard in CDCl_3 . COSY, DEPT and HMQC were used to assign the NMR signals. Analytical thin layer chromatography was performed on Merck TLC plates Silica gel 60 F₂₅₄. Silica gel column chromatography was carried out using Kanto Silica Gel 60N (spherical, neutral, 40–50 μm or 63–210 μm). Manual solid-phase synthesis was performed by using a glass filter (10 mm \times 50 mm) with a stopper at the top and a stopcock at the bottom as a reaction vessel. Controlled-pore glass (CPG) was purchased from 3-Prime. Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) was carried out using a μ -BONDASPHERE 5 μm C 18 column (100 Å, 3.9 mm \times 159 mm) (Waters) or a SOUCETM 5RPC ST 5 μm column (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm) (GE Healthcare). Ion-exchange HPLC (IE-HPLC) was carried out using a MiniQTM 4.6/50PE column (3 μm , 4.6 mm \times 50 mm) (GE Healthcare). Isolated yields of oligomers were estimated by measuring UV-Vis spectra on a JASCO V-550 UV/VIS spectrophotometer. Monomer units and oligomers were characterized by ESI-HRMS spectra and MALDI-TOF MS spectra, respectively. MALDI-TOF MS spectrometric analyses were performed on an Applied Biosystems Voyager System 4327 or AB SCIEX TOF/TOFTM 5800 System in the negative or positive mode by using 3-hydroxypicolinic acid as MATRIX. UV melting curves of the duplexes were recorded on a Shimadzu UV-1650PC UV/Vis spectrophotometer.

2. Experimental Section

2.1. Synthesis of pyridinium *H*-boranophosphonate (**5**)

Pyridinium *H*-boranophosphonate **5** was synthesized from phosphinic acid solution in water (50 wt%) **1** and *N,O*-bis(trimethylsilyl)benzamide **2** according to the procedure described in the literature except for the boronating conditions (BH_3 THF (1.5 equiv), 24 h).^[54a] Isolated yield: 89%.

2.2. Synthesis of monomer units

Triethylammonium 5'-O-dimethoxytrityl-N³-benzoylthymidine 3'-H-boranophosphate as a mixture of (Sp)- and (Rp)-diastereomers (7a)

Compound **7a** was synthesized from 5'-O-DMTr-N³-benzoylthymidine **6a** and **5** according to the procedure described in the literature.^[54a] Isolated yield: 95%.

Triethylammonium 5'-O-dimethoxytrityl-N⁶-benzoyladenosine 3'-H-boranophosphate as a mixture of (Sp)- and (Rp)-diastereomers (7b)

5'-O-DMTr-N⁶-benzoyladenosine **6b** (0.66 g, 1.0 mmol) and **5** (0.30 g, 2.0 mmol) were dried individually by repeated coevaporation with dry pyridine (3 × 3 mL for **6b** and 5 × 3 mL for **5**) and dissolved together in dry pyridine (10 mL) at 0 °C under argon. Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride (Bop-Cl) (0.51 g, 2.0 mmol) was added, and the mixture was stirred for 25 min at rt. The mixture was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with 1 M triethylammonium bicarbonate (TEAB) buffer (pH 7) (3 × 50 mL). The washings were combined and back-extracted with CH₂Cl₂ (2 × 150 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by silica gel column chromatography [3.7 × 4.8 cm, 28 g of silica gel (spherical, neutral, 40–50 μm), ethyl acetate–MeOH–TEA (99:1:1, v/v/v) to CH₂Cl₂–MeOH–TEA (99.5:0.5:1–99:1:1, v/v/v)]. The fractions containing **7b** were combined and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate (100 mL) and washed with 1 M TEAB buffer (100 mL). The washings were combined and back-extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered, concentrated under reduced pressure to afford **7b** (0.61 g, 0.72 mmol, 72%) as a colorless foam. ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.09 (brs, 1H), 8.71, 8.70 (s, s, 1H), 8.23, 8.18 (s, s, 1H), 8.04–8.00 (m, 2H), 7.63–7.58 (m, 1H), 7.54–7.49 (m, 2H), 7.42–7.38 (m, 2H), 7.31–7.16 (m, 7H), 7.31 (brd, ¹J_{PH} = 389 Hz, 1H), 6.81–6.76 (m, 4H), 6.61–6.55 (m, 1H), 5.13–5.02 (m, 1H), 4.49–4.42 (m, 1H), 3.77, 3.77 (s, s, 6H), 3.43, 3.42 (s, s, 2H), 3.01–2.75 (m, 9H), 1.22 (t, J = 7.4 Hz, 11H), 1.03–0.08 (br, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 164.7, 158.3, 158.3, 152.1, 151.4, 151.3, 149.3, 144.4, 144.3, 141.5, 141.3, 135.5, 135.4, 135.4, 133.5, 133.5, 132.6, 129.9, 129.8, 128.6, 127.9, 127.9, 127.7, 126.7, 123.4, 113.0, 112.9, 86.3, 86.2, 86.0, 85.9, 85.6, 85.6, 84.6, 84.5, 76.8, 76.7, 75.5, 75.5, 63.4, 63.2, 55.0, 45.1, 40.1, 39.0, 8.5; ³¹P NMR (CDCl₃) δ 105.6–102.4 (m). ESI-HRMS: Calcd for C₃₈H₃₈BN₅O₇P⁻ [M–H]⁻ 718.2607, found 718.2615.

Triethylammonium 5'-O-dimethoxytrityl-*N*⁴-isobutyrylcytidine 3'-*H*-boranophosphate as a mixture of (*Sp*)- and (*Rp*)-diastereomers (**7c**)

Compound **7c** was obtained in 60% (0.48 g, 0.60 mmol) from 5'-*O*-DMTr-*N*⁴-isobutyrylcytidine **6c** (0.60 g, 1.0 mmol) and **5** (0.30 g, 2.0 mmol) as a colorless foam in a similar manner to the synthesis of **7b**, except for the reaction time (30 min) and the conditions for silica gel column chromatography [3.7 × 5.3 cm, 30 g of silica gel (spherical, neutral, 40–50 μm), ethyl acetate–MeOH–TEA (99:1:0.5, v/v/v) to CH₂Cl₂–MeOH–TEA (99:1:0.5 to 99:1:1, v/v/v)]. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.28, 8.26 (s, s, 1H), 8.20, 8.17 (s, s, 1H), 7.41–7.37 (m, 2H), 7.33–7.23 (m, 7H), 7.28 (brd, ¹J_{PH} = 394 Hz, 1H), 7.15–7.08 (m, 1H), 6.87–6.83 (m, 4H), 6.29, 6.22 (t, *J* = 6.0 Hz, t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 5.09–5.01, 4.87–4.79 (m, m, 1H), 4.40–4.30 (m, 1H), 3.81, 3.80 (s, s, 6H), 3.46–3.44 (m, 2H), 2.95–2.87 (m, 8H), 2.57, 2.56, (sept, *J* = 6.9 Hz, sept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 2.40–2.26 (m, 1H), 1.25–1.20 (m, 16.5H), 1.04–0.07 (br, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177.0, 176.9, 162.3, 162.2, 158.4, 154.9, 154.9, 144.4, 144.4, 144.0, 143.9, 135.3, 135.3, 135.1, 135.1, 129.9, 129.9, 129.8, 128.0, 127.9, 127.8, 127.8, 126.9, 113.1, 113.1, 96.1, 96.0, 87.0, 86.8, 86.7, 86.6, 85.7, 85.6, 85.5, 85.4, 76.3, 76.1, 73.5, 73.4, 62.5, 62.0, 55.1, 45.2, 41.3, 40.7, 36.3, 36.2, 19.0, 18.8, 8.5; ³¹P NMR (CDCl₃) δ 107.1–102.2 (m). ESI-HRMS: Calcd for C₃₄H₄₀BN₃O₈P[−] [M–H][−] 660.2652, found 660.2653.

Triethylammonium 5'-O-dimethoxytrityl-*O*⁶-cyanoethyl-*N*²-isobutyrylguanosine 3'-*H*-boranophosphate as a mixture of (*Sp*)- and (*Rp*)-diastereomers (**7d**)

Compound **7d** was obtained in 74% (0.66 g, 0.74 mmol) from 5'-*O*-dimethoxytrityl-*O*⁶-cyanoethyl-*N*²-isobutyrylguanosine **6d** (0.67 g, 1.0 mmol) and **5** (0.30 g, 2.0 mmol) as a colorless foam in a similar manner to the synthesis of **7b**, except for the reaction time (15 min) and the conditions for silica gel column chromatography [3.7 × 4.8 cm, 28 g of silica gel (spherical, neutral, 40–50 μm), ethyl acetate–MeOH–TEA (99:1:1, v/v/v) to CH₂Cl₂–MeOH–TEA (99:1:1, v/v/v)]. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.01, 7.98 (s, s, 1H), 7.93, 7.90 (s, s, 1H), 7.42–7.39 (m, 2H), 7.28 (brd, ¹J_{PH} = 390 Hz, 1H), 7.31–7.17 (m, 7H), 6.79–6.74 (m, 4H), 6.44–6.38 (m, 1H), 5.23–5.11 (m, 1H), 4.80, 4.79 (t, *J* = 6.6 Hz, t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.40–4.35 (m, 1H), 3.77, 3.77 (s, s, 6H), 3.38, 3.36 (s, s, 2H), 3.06, 3.04 (t, *J* = 6.6 Hz, t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.01–2.83 (m, 9H), 2.76–2.66 (m, 2H), 1.23–1.14 (m, 18H), 1.02–0.07 (br, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.4, 159.4, 158.3, 152.7, 152.6, 151.5, 151.5, 144.5, 144.4, 140.8, 140.7, 135.6, 135.5, 135.5, 135.5, 129.8, 127.9, 127.7, 127.6, 126.7, 118.0, 118.0, 116.9, 112.9, 112.9, 86.2, 86.1, 85.7, 85.6, 85.4, 85.3, 84.4, 84.3, 76.1, 76.0, 75.2, 75.1, 63.4, 63.3, 61.4, 55.0, 45.2, 39.6,

38.8, 35.6, 29.5, 29.1, 19.1, 19.0, 17.9, 8.5; ^{31}P NMR (CDCl_3) 105.1–102.1 (m). ESI-HRMS: Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{BN}_6\text{O}_8\text{P}^- [\text{M}-\text{H}]^-$ 753.2979, found 753.2986.

Triethylammonium (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-3-(*N*³-benzoylthymidin-1-yl)-1-dimethoxytrityloxymethyl-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptane-7-*H*-boranophosphonate as a mixture of (*Sp*)- and (*Rp*)-diastereomers (31)

Compound **31** was obtained in 75% (0.65 g, 0.75 mmol) from (1*R*,3*R*,4*R*,7*S*)-3-(*N*³-benzoylthymidin-1-yl)-1-dimethoxytrityloxymethyl-7-hydroxy-2,5-dioxabicyclo[2.2.1]heptane **30** (0.69 g, 1.0 mmol) and **5** (0.30 g, 2.0 mmol) as a colorless foam in a similar manner to the synthesis of **7b**, except for the reaction time (20 min) and the conditions for silica gel column chromatography [3.7×15.8 cm, 85 g of silica gel (spherical, neutral, 63–210 μm), ethyl acetate–hexane–TEA (67:33:0.5, v/v/v) to CH_2Cl_2 –MeOH–TEA (99.5:0.5:0.5, v/v/v)]. ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.00–7.93 (m, 2H), 7.83, 7.81 (d, $J = 1.2$ Hz, d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 7.67–7.61 (m, 1H), 7.53–7.46 (m, 4H), 7.41–7.30 (m, 6H), 7.43, 7.36 (brd, $^1J_{\text{PH}} = 385$ Hz, brd, $^1J_{\text{PH}} = 410$ Hz, 1H), 7.24–7.21 (m, 1H), 6.89–6.85 (m, 4H), 5.63 (s, 1H), 4.92, 4.66 (d, $J = 6.6$ Hz, d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.67, 4.63 (s, s, 1H), 4.00–3.72 (m, 8H), 3.57–3.44 (m, 2H), 2.90 (q, $J = 7.2$ Hz, 7.5H), 1.68, 1.66 (d, $J = 0.9$ Hz, d, $J = 0.9$ Hz, 3H), 1.21 (t, $J = 7.2$ Hz, 11H), 1.01–0.07 (br, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 168.8, 162.8, 158.5, 148.7, 148.7, 144.4, 144.2, 135.3, 135.3, 135.1, 135.0, 134.9, 134.4, 134.3, 131.3, 131.2, 130.5, 130.4, 130.0, 129.9, 129.8, 129.1, 129.1, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 126.9, 113.3, 113.2, 110.3, 110.3, 88.1, 88.0, 87.9, 87.4, 86.5, 78.6, 78.5, 74.6, 74.4, 72.2, 72.1, 71.5, 57.8, 57.5, 55.1, 45.3, 12.6, 12.5, 8.4; ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 107.5 (m). ESI-HRMS: Calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{BN}_2\text{O}_{10}\text{P}^- [\text{M}-\text{H}]^-$ 737.2441, found 737.2443.

2.2. Liquid-phase synthesis of PBX-ODN 2mers

5'-*O*-Dimethoxytrityl-*N*³-benzoylthymidin-3'-yl 3'-*O*-phenoxyacetyl-*N*³-benzoylthymidin-5'-yl *H*-boranophosphonate as a mixture of (*Sp*)- and (*Rp*)-diastereomers (9) (Table 2-2, Entry 3)

Triethylammonium 5'-*O*-dimethoxytrityl-*N*³-benzoylthymidine 3'-*H*-boranophosphonate **7a** (49 mg, 60 μmol) and 3'-*O*-phenoxyacetyl-*N*³-benzoylthymidine **8** (24 mg, 50 μmol) were dissolved in dry CH_3CN (1 mL) under argon. Distilled 2,6-lutidine (35 μL , 0.30 mmol) and 1,3-dimethyl-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate (MNTP) (56 mg, 0.13 mmol) were added, and the mixture was stirred for 30 min at rt. The mixture was diluted with CHCl_3 (10 mL) and

washed with saturated NaCl aq (3 × 10 mL). The washings were combined and back-extracted with CHCl₃ (1 × 30 mL). The organic layers were combined and washed with saturated NaHCO₃ aq (1 × 40 mL). The washings were combined and back-extracted with CHCl₃ (1 × 40 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by silica gel column chromatography [1.0 × 8.1 cm, 8.5 g of silica gel (spherical, neutral, 63–210 μm), ethyl acetate–toluene–pyridine (20:80:0.5, v/v/v)]. The fractions containing **9** were combined and concentrated under reduced pressure. The residue was coevaporated with toluene (3 × 2 mL) and CHCl₃ (5 × 2 mL) and dried *in vacuo* to afford **9** (52 mg, 44 μmol, 88%) as a colorless foam. ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.94–7.91 (m, 4H), 7.70–7.62 (m, 3H), 7.48 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.42–7.15 (m, 11H), 7.00–6.96 (m, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.7 Hz, 5H), 6.45–6.21 (m, 2H), 5.31–5.18 (m, 2H), 4.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 4.39–4.35 (m, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.12–4.03 (m, 2H), 3.79 (s, 6H), 3.53–3.35 (m, 2H), 2.66–2.18 (m, 4H), 1.98, 1.94 (s, s, 3H), 1.65 (m, 1H), 1.51, 1.48 (s, s, 3H), 0.88–0.07 (br, 3H); ³¹P NMR (CDCl₃) δ 134.5 (m).

Triethylammonium 5'-*O*-dimethoxytrityl-*N*³-benzoylthymidin-3'-yl 3'-*O*-phenoxyacetyl-*N*³-benzoylthymidin-5'-yl boranophosphate as a mixture of (*Sp*)-and (*Rp*)-diastereomers (**14**) (Table 2-4, Entry 3)

5'-*O*-Dimethoxytrityl-*N*³-benzoylthymidin-3'-yl 3'-*O*-phenoxyacetyl-*N*³-benzoylthymidin-5'-yl *H*-boranophosphate **9** (59 mg, 50 μmol) was dried by repeated coevaporation with dry CH₃CN (3 × 2 mL) and dissolved in dry CH₃CN (0.8 mL) under argon. CD₃CN containing distilled *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (26 μL, 0.15 mmol), CCl₄ (48 μL, 0.50 mmol) and H₂O (5 μL, 0.25 mmol) was added, and the mixture was stirred for 1 h at rt. The mixture was then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography [1.0 × 7.1 cm, 7.0 g of silica gel (spherical, neutral, 63–210 μm), ethyl acetate–MeOH–TEA (100:0:1–90:10:1, v/v/v)]. The fractions containing **14** were combined and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL) and washed with 1 M TEAB buffer (50 mL). The washings were combined and back-extracted with CH₂Cl₂ (50 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure to afford **14** (56 mg, 43 μmol, 87%) as a colorless foam. ³¹P NMR (CDCl₃) δ 92.3 (m).

Triethylammonium 5'-O-dimethoxytrityl-N³-benzoylthymidin-3'-yl 3'-O-phenoxyacetyl-N³-benzoylthymidin-5'-yl boranophosphorothioate as a mixture of (Sp)-and (Rp)-diastereomers (15) (Table 2-4, Entry 3)

5'-O-Dimethoxytrityl-N³-benzoylthymidin-3'-yl 3'-O-phenoxyacetyl-N³-benzoylthymidin-5'-yl *H*-boranophosphonate **9** (59 mg, 50 μmol) was dissolved in dry CH₃CN (1 mL) under argon. Distilled DIPEA (87 μL, 0.50 mmol) and dimethylthiuram disulfide (DTD) (32 mg, 0.15 mmol) was added, and the mixture was stirred for 1 h at rt. The mixture was diluted with CHCl₃ (10 mL) and washed with 1 M TEAB buffer (pH 7) (3 × 30 mL). The washings were combined and back-extracted with CHCl₃ (1 × 100 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by silica gel column chromatography [1.0 × 8.3 cm, 8.4 g of silica gel (spherical, neutral, 63–210 μm), ethyl acetate–MeOH–TEA (100:0:0.5–97:3:0.5, v/v/v)]. The fractions containing **15** were combined and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in CHCl₃ (50 mL) and washed with 1 M TEAB buffer (50 mL). The washings were combined and back-extracted with CHCl₃ (50 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered, concentrated under reduced pressure to afford **15** (65 mg, 48 μmol, 97%) as a colorless foam. ³¹P NMR (CDCl₃) δ 161.1 (m).

2.3. Solid-phase synthesis of PBX-ODN 2mers

A general procedure for the manual solid-phase synthesis of PBO and PBS-ODN 2mers via PBH-ODN 2mers

CPG loaded with 5'-O-DMTr-N³-benzoylthymidine *via* a succinate linker (0.5 μmol) was treated with 3% dichloroacetic acid (DCA) in dry CH₂Cl₂ (4 × 15 s), washed with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and then dried *in vacuo* for 10 min. Condensation reaction of the corresponding 2'-deoxyribonucleoside 3'-*H*-boranophosphonate monomer units **7a–d** (0.1 M) was carried out in the presence of MNTP (0.25 M) and 2,6-lutidine (0.6 M) in dry CH₃CN for 1 min under argon. The solid support was then washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. The 5'-O-DMTr group of the resultant PBH-ODN 2mer was removed by treatment with 3% DCA in CH₂Cl₂–Et₃SiH (1:1, v/v) (6 × 5 s), and the solid support was washed with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and dried *in vacuo* for 10 min. The resultant PBH-ODN 2mer was oxidized or sulfurized as described below.

PBO-ODN 2mers (20a–d) (Table 3-3)

PBH-ODN 2mer generated as above was oxidized with DIPEA (0.3 M), CCl₄ (1 M) and

H₂O (0.5 M) in dry CH₃CN at rt for 30 min under argon, and the CPG was successively washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. The CPG was then treated with 25% NH₃ aq–EtOH (3:1, v/v) at 30 °C for 3 h (for T_{PBO}T **20a**), at 30 °C for 12 h (for A_{PBO}T **20b** and C_{PBO}T **20c**), or at 50 °C for 12 h (for G_{PBO}T **20d**), filtered, and washed with EtOH (4 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ-BONDASPHERE 5 μm C18 column (100 Å, 3.9 mm × 159 mm) (Waters). MALDI-TOF MS: Calcd for T_{PBO}T **20a** [M–H][–] 543.17, found 543.51. Calcd for dA_{PBO}T **20b** [M–H][–] 552.18, found 552.21. Calcd for dC_{PBO}T **20c** [M–H][–] 528.17, found 528.10. Calcd for dG_{PBO}T **20d** [M–H][–] 568.17, found 568.10.

PBS-ODN 2mers (19a–d) (Table 3-2)

PBH-ODN 2mer generated as above was sulfurized with DIPEA (1 M) and DTD (0.3 M) in dry CH₃CN at rt for 1 h under argon, and the CPG was successively washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. The CPG was then treated with 25% NH₃ aq at 30 °C for 3 h (for T_{PBS}T **19a**), at 30 °C for 12 h (for A_{PBS}T **19b** and C_{PBS}T **19c**), or at 50 °C for 12 h (for G_{PBS}T **19d**), filtered, and washed with EtOH (1 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ-BONDASPHERE 5 μm C18 column (100 Å, 3.9 mm × 159 mm) (Waters). MALDI-TOF MS: Calcd for T_{PBS}T **19a** [M–H][–] 559.14, found 559.45. Calcd for dA_{PBS}T **19b** [M–H][–] 568.16, found 568.68. Calcd for dC_{PBS}T **19c** [M–H][–] 544.14, found 544.09. Calcd for dG_{PBS}T **19d** [M–H][–] 584.15, found 584.53.

T_{PBN}T (21) (Scheme 3-6)

T_{PBH}T generated as above was treated with CCl₄ (1 M) and *N,N*-dimethylethylenediamine (0.5 M) in dry CH₃CN at rt for 1 h under argon, and the CPG was then successively washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. The CPG was then treated with 25% NH₃ aq at 30 °C for 1 h, filtered, and washed with EtOH (4 × 1 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow

rate of 0.5 mL/min using a μ -BONDASPHERE 5 μ m C18 column (100 \AA , 3.9 mm \times 159 mm) (Waters). MALDI-TOF MS: Calcd for $[M+H]^+$ 615.27, found 615.05.

T_{PBN}T (22) (Scheme 3-8, route 2)

5'-O-DMTr-T_{PBH}T synthesized as described above was treated with CCl₄ (1 M) and 4-(2-aminoethyl)morpholine (0.5 M) in dry CH₃CN at rt for 30 min under argon, and the CPG was then successively washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. The 5'-O-DMTr group was removed by treatment with 3% DCA in CH₂Cl₂-Et₃SiH (1:1, v/v) (6 \times 5 s), and the CPG was washed with dry CH₂Cl₂. The CPG was then treated with 25% NH₃ aq-EtOH (3:1, v/v) at 30 $^{\circ}$ C for 1 h, filtered, and washed with EtOH (4 \times 1 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–45% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 $^{\circ}$ C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ -BONDASPHERE 5 μ m C18 column (100 \AA , 3.9 mm \times 159 mm) (Waters). MALDI-TOF MS: Calcd for $[M+H]^+$ 657.28, found 657.31.

T_{PBO}^LT^L (33) (Table 3-5, Condition C)

CPG loaded with 5'-O-DMTr-N³-benzoyl-LNA thymidine *via* a succinate linker (0.5 μ mol) was treated with 3% DCA in dry CH₂Cl₂ (4 \times 15 s), washed with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and then dried *in vacuo* for 10 min. Condensation of LNA thymidine *H*-boranophosphonate monomer unit **31** and N³-benzoyl-LNA thymidine bearing 5'-OH was carried out as well as 2'-deoxy 2mers. The CPG was then washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. The 5'-O-DMTr group of the T_{PBH}^LT^L was removed by treatment with 3% DCA in CH₂Cl₂-Et₃SiH (1:1,v/v) (6 \times 5 s), and the CPG was washed with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and dried *in vacuo* for 10 min. The resultant T_{PBH}^LT^L was oxidized⁷⁰ with TEA (0.1 M) in CCl₄-2,6-lutidine-H₂O (5:13:1, v/v/v) at rt for 1 h under argon, and the CPG was successively washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. The CPG was then treated with 25% NH₃ aq-EtOH (3:1, v/v) at 30 $^{\circ}$ C for 3 h, filtered, and washed with EtOH (4 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure, and the residue was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0–30% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 $^{\circ}$ C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ -BONDASPHERE 5 μ m C18 column (100 \AA , 3.9 mm \times 159 mm) (Waters). MALDI-TOF MS: Calcd for $[M-H]^-$ 599.17, found 599.38 (for faster diastereomer), 599.31 (for laister diastereomer).

2.4. Solid-phase synthesis of 4mers (23, 24) (Scheme 3-10)

CPG loaded with 5'-*O*-DMTr-*N*³-benzoylthymidine (0.5 μmol) *via* a succinate linker was treated with 3% DCA in dry CH₂Cl₂ (4 × 15 s), washed with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and dried *in vacuo* for 10 min. Chain elongation was performed by repeating 3 times the following steps (a) and (b). (a) Condensation of the corresponding nucleoside 3'-*H*-boranophosphonate monomer units **7b–d** (0.1 M) in the presence of MNTP (0.25 M) and 2,6-lutidine (0.6 M) in dry CH₃CN for 1 min under argon and subsequent washing with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. (b) Removal of 5'-*O*-DMTr group by treatment with 3% DCA in CH₂Cl₂–Et₃SiH (1:1, v/v) (6 × 5 s), subsequent washing with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and drying *in vacuo* for 5 min. The resultant d(C_{PBH}A_{PBH}G_{PBH}T) were oxidized or sulfurized as described above. After the conversions, the CPG was treated with 25% NH₃ aq–EtOH (3:1, v/v) at 50 °C for 6 h (for d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T) **23**) and 25% NH₃ aq at 50 °C for 6 h (for d(C_{PBS}A_{PBS}G_{PBS}T) **24**). Then, the CPG was filtered and washed with EtOH (4 × 1 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in H₂O (4 mL) and washed with CHCl₃ (6 × 500 μL). The aqueous layer was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–40% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 40 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ-BONDASPHERE 5 μm C18 column (100 Å, 3.9 mm × 159 mm) (Waters). RP-HPLC purification was performed with a linear gradient of 8–40% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at rt at a flow rate of 1 mL/min using a SOUCE™ 5RPC ST 5 μm column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) (GE Healthcare). Isolated yield: 69% (d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T) **23**). MALDI-TOF MS: Calcd for d(C_{PBO}A_{PBO}G_{PBO}T) **23** [M–H][–] 1166.35, found 1166.16; Calcd for d(C_{PBS}A_{PBS}G_{PBS}T) **24** [M–H][–] 1214.28, found 1214.03.

2.5. Solid-phase synthesis of 12mers

2'-deoxy PBO-ODN 12mers (25, 28) and PBS-ODN 12mers (26, 29) (Table 3-4)

CPG loaded with 5'-*O*-DMTr-*N*³-benzoylthymidine or 5'-*O*-DMTr-*N*⁴-isobutyrylcytidine (0.5 μmol) *via* a succinate linker was treated with 3% DCA in dry CH₂Cl₂ (4 × 15 s), washed with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and dried *in vacuo* for 10 min. Chain elongation was performed by repeating 11 times the following steps (a) and (b). (a) Condensation of the corresponding nucleoside 3'-*H*-boranophosphonate monomer units **7a–d** (0.1 M) in the presence of MNTP (0.25 M) and 2,6-lutidine (0.6 M) in dry CH₃CN for 1 min under argon and subsequent washing with dry CH₃CN and CH₂Cl₂. (b) Removal of 5'-*O*-DMTr

group by treatment with 3% DCA in CH₂Cl₂–Et₃SiH (1:1, v/v) (6 × 5 s), subsequent washing with dry CH₂Cl₂ and CH₃CN, and drying *in vacuo* for 5 min. The resultant *PBH*-ODN 12mers were oxidized or sulfurized as well as 2'-deoxy 2mers. After the conversions, the CPG was treated with 25% NH₃ aq–EtOH (3:1, v/v) at 30 °C for 12 h (for T_{(PBO)T}₁₁ **25**), 25% NH₃ aq at 30 °C for 12 h (for T_{(PBS)T}₁₁ **26**), 25% NH₃ aq–EtOH (3:1, v/v) at 50 °C for 12 h (for *PBO*-ODN 12mer **28** (5'-GCA TTG GTA TTC-3')) and 25% NH₃ aq at 50 °C for 12 h (for *PBS*-ODN 12mer **29** (5'-GCA TTG GTA TTC-3')). Then, the CPG was filtered and washed with EtOH (4 × 1 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in H₂O (4 mL) and washed with CHCl₃ (6 × 500 μL). The aqueous layer was analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ-BONDASPHERE 5 μm C18 column (100 Å, 3.9 mm × 159 mm) (Waters). RP-HPLC purification was performed with a linear gradient of 8–44% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 90 min at rt at a flow rate of 1 mL/min using a SOUCETM 5RPC ST 5 μm column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) (GE Healthcare). Isolated yields: 28% (T_{(PBO)T}₁₁ **25**); 31% (T_{(PBS)T}₁₁ **26**); 44% (*PBO*-ODN 12mer **28** (5'-GCA TTG GTA TTC-3')); 16% (*PBS*-ODN 12mer **29** (5'-GCA TTG GTA TTC-3')). MALDI-TOF MS: Calcd for T_{(PBO)T}₁₁ **25** [M–H][–] 3564.01, found 3564.17; Calcd for T_{(PBS)T}₁₁ **26** [M–H][–] 3739.75, found 3739.05; Calcd for *PBO*-ODN 12mer **28** (5'-GCA TTG GTA TTC-3') [M–H][–] 3627.05, found 3626.82; Calcd for *PBS*-ODN 12mer **29** (5'-GCA TTG GTA TTC-3') [M–H][–] 3802.80, found 3801.52.

L^{NA} *PBO*-ODN 12mer (**34, 35**) (Table 3-6)

LNA modified *H*-boranophosphonate (L^{NA}*PBH*-ODN) 12mers synthesized by repeating condensation and detritylation were oxidized as well as T^L_{PBO}T^L **33**. The CPG was successively washed with dry CH₃CN and CH₂Cl₂, and then treated with 25% NH₃ aq–EtOH (3:1, v/v) at 50 °C for 12 h, filtered, and washed with EtOH (4 × 1 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was dissolved in H₂O (4 mL) and washed with CHCl₃ (6 × 500 μL). The aqueous layer was then analyzed by RP-HPLC, ion-exchange HPLC (IE-HPLC) and MALDI-TOF MS. RP-HPLC analysis was performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ-BONDASPHERE 5 μm C18 column (100 Å, 3.9 mm × 159 mm) (Waters). IE-HPLC analysis and purification were performed with a linear gradient of 0–1 M NaCl,

50–25% CH₃CN in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8) for 20 min at rt at a flow rate of 0.8 mL/min using a MiniQ™ 4.6/50PE column (3 μm, 4.6 mm × 50 mm) (GE Healthcare). Fractions containing **34** (see Figure 3-21 (b), fraction D) or containing **35** (see, Figure 3-22 (b), fraction C) were combined and concentrated to dryness under reduced pressure, respectively. They were desalted with a Sep-Pak C₁₈ cartridge. The Sep-pak was washed with H₂O (6 × 5 mL), and then the desired product was eluted with 50% CH₃CN. Isolated yield: 7% (^{LNA}PBO-ODN 12mer **34** (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3')); 10% (^{LNA}PBO-ODN 12mer **35** (5'-GCA T^LTG GTA T^LT^LC-3')). MALDI-TOF MS: Calcd for ^{LNA}PBO-ODN 12mer **34** (5'-GCA T^LT^LG GT^LA T^LT^LC-3') [M–H][–] 3767.02, found 3767.06; Calcd for ^{LNA}PBO-ODN 12mer **35** (5'-GCA T^LTG GTA T^LT^LC-3') [M–H][–] 3711.03, found 3711.02.

T_{(PBN T)₁₁} (**27**) (Table 3-4)

5'-O-DMTr-T_{(PBH T)₁₁}

 synthesized by repeating condensation and detritylation was aminated as well as T_{PBN T} **22**. The 5'-O-DMTr group was removed by treatment with 3% DCA in CH₂Cl₂–Et₃SiH (1:1, v/v) (6 × 5 s) and washed with dry CH₂Cl₂. The CPG was treated with 25% NH₃ aq–EtOH (3:1, v/v) at 30 °C for 1 h, filtered, and washed with EtOH (4 × 1 mL). The filtrate and washings were combined and concentrated to dryness under reduced pressure. The residue was then analyzed by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. RP-HPLC analysis and purification were performed with a linear gradient of 0–60% CH₃CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7) for 60 min at 30 °C at a flow rate of 0.5 mL/min using a μ-BONDASPHERE 5 μm C18 column (100 Å, 3.9 mm × 159 mm) (Waters). Isolated yield: 10%. MALDI-TOF MS: Calcd for [M+H]⁺ 4799.12, found 4799.43.

2.6. Thermal denaturation studies

T_{(PO T)₁₁} (**36**), T_{(PBO T)₁₁} (**25**) and T_{(PBS T)₁₁} (**26**) with dA₁₂ and rA₁₂

and

5'-GCA TTG GTA TTC-3' (natural ODN (**37**), PS-ODN (**38**), PBO-ODN (**28**) and PBS-ODN (**29**)) with complementary ODN and ORN

Pairs of complementary strands (1:1 molar ratio, 4.0 μM, 0.60 nmol each) were dissolved in 10 mM NaH₂PO₄–Na₂HPO₄ buffer solutions (pH 7.0) containing 0.1 or 1 M NaCl. The solutions were heated for 10 min at 90 °C and cooled to 0 °C at a rate of –0.5 °C/min, and then left at 0 °C for 1 h. Denaturation studies were carried out in a 1 cm pathlength quartz cell. UV absorbance values (260 nm) were recorded at a rate of 0.5 °C/min from 0 °C to 90 °C.

5'-GCA TTG GTA TTC-3' (natural ODN (37), ^{LNA}PO-ODN (39), ^{LNA}PS-ODN (40), ^{LNA}PBO-ODN (34) and (35) with complementary ODN and ORN

Pairs of complementary strands (1:1 molar ratio, 4.0 μ M, 0.60 nmol each) were dissolved in 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer solutions (pH 7.0) containing 0.1 or 1 M NaCl. The solutions were heated for 10 min at 90 °C (0.1 M NaCl) or for 15 min at 95 °C (1 M NaCl) and cooled to 0 °C at a rate of -0.5 °C/min, and then left at 0 °C for 1 h. Denaturation studies were carried out in a 1 cm pathlength quartz cell. UV absorbance values (260 nm) were recorded at a rate of 0.5 °C/min from 0 °C to 90 °C (0.1 M NaCl) or 100 °C (1 M NaCl).

T_{(PO)11} (36), T_{(PBO)11} (25) and T_{(PBN)11} (27) with dA₁₂ and rA₁₂

Pairs of complementary strands (1:1 molar ratio, 4.0 μ M, 0.60 nmol each) were dissolved in (a) 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ buffer solutions (pH 7.0) containing 0, 0.1, or 1 M NaCl, (b) 10 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH 5.8) without NaCl or (c) 10 mM NaH₂PO₄ (pH 5.0) without NaCl. The solutions were heated for 10 min at 90 °C and cooled to 0 °C at a rate of -0.5 °C/min, and then left at 0 °C for 1 h. Denaturation studies were carried out in a 1 cm pathlength quartz cell. UV absorbance values (260 nm) were recorded at a rate of 0.5 °C/min from 0 °C to 90 °C.

参考文献

1. Wilson, C.; Keefe, A. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 607-614.
2. Jiang, K. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 252.
3. <http://www.isispharm.com/Pipeline/Therapeutic-Areas/Other.htm#Vitravene>
4. <http://www.druginformation.com/RxDrugs/P/Pegaptanib%20Sodium%20Injection.html>
5. <http://www.isispharm.com/Pipeline/Therapeutic-Areas/Cardiovascular.htm>
6. Sands, H.; Gorey-Feret, L. J.; Cocuzza, A. J.; Hobbs, F. W.; Chidester, D.; Trainor, G. L. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 932-943.
7. Henry, S. P.; Giclas, P. C.; Leeds, J.; Pangburn, M.; Auletta, C.; Levin, A. A.; Kornbrust, D. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *281*, 810-816.
8. Zon, G. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 795-804.
9. Champbell, J. M.; Bacon, T. A.; Wickstrom, E. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1990**, *20*, 259-267.
10. Kurreck, J.; Wyszko, E.; Erdmann, V. A. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911-1918.
11. Levin, A. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 69-84.
12. Kurreck, J. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.
13. Yano, J.; Smyth, G. E. *Adv. Polym. Sci.* **2012**, *249*, 1-48.
14. 「RNAi 法とアンチセンス法」 第一版 講談社 関根光雄・多比良和誠 著
15. Nowotny, M.; Gaidamakov, S. A.; Gairlando, R.; Cerritelli, S. M.; Crouch, R. J.; Yang, W. *Molecular Cell*, **2007**, *28*, 264-276.
16. Wu, H.; Lima, W. F.; Zhang, H.; Fan, A.; Sun, H.; Crooke, S. T. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17181-17189.
17. Rychlik, M. P.; Chon, H.; Cerritelli, S. M.; Klimek, P.; Crouch, R. J.; Nowotny, M. *Molecular Cell*, **2010**, *40*, 658-670.
18. Asbroek, A. L. M.; Groenigen, M.; Nooji, M.; Baas, F. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 583-592.
19. Sood, A.; Shaw, B. R.; Spiclvogel, B. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9000-9001.
20. Sergueev, D. S.; Shaw, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9417-9427.
21. Summers, J. S.; Shaw, B. R. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1147-1155.
22. Li, P.; Sergueeva, Z. A.; Dobrikov, M.; Shaw, B. R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4746-4796.
23. Hall, A. H. S.; Wan, J.; Shaughnessy, E. E.; Shaw, B. R.; Alexander, K. A. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5991-6000.
24. Enya, Y.; Yano, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9154-9160.

25. Seugueeva, Z. A.; Seugueev, D. S.; Riberio, A. A.; Summers, J. S.; Shaw, B. R. *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 1377-1391.
26. Shimizu, M.; Saigo, K.; Wada, T. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4262-4269.
27. Iwamoto, N.; Oka, N.; Wada, T. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4361-4364.
28. 武邑哲彦 2011年度 修士論文
29. McCuen, H. B.; Noé, M. S.; Olesiak, M.; Sierzchala, A. B.; Caruthers, M. H.; Higson, A. P. *Phosphorus Sulfur Silicon* **2008**, *183*, 349-363.
30. Wang, X.; Dobrikov, M.; Sergueev, D.; Shaw, B. R. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acid*, **2003**, *22*, 1151-1153.
31. Johnson, C. N.; Spring, A. M.; Sergueev, D.; Shaw, B. R.; Germann, M. W. *Biochemistry*, **2011**, *50*, 3903-3912.
32. Tomasz, J.; Shaw, B. R.; Porter, K.; Spielvogel, B. F.; Sood, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1373-1375.
33. Porter, W. K.; Briley, J. D.; Shaw, B. R. *Nucleic Acids Research*, **1997**, *25*, 1611-1617.
34. Seugueeva, Z. A.; Sergueev, D. S.; Shaw, B. R. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acid*, **2000**, *19*, 275-282.
35. Brummel, H. A.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 749-751.
36. McCuen, H. B.; Noé, M. S.; Sierzchala, A. B.; Higson, A. P.; Caruthers, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8138-8139.
37. Olesiak, M.; Krivenko, A.; Krishna, H.; Caruthers, M. H. *Phosphorus Sulfur Silicon* **2011**, *186*, 921-932.
38. Roy, S.; Olesiak, M.; Shang, S.; Caruthers, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6234-6241.
39. Seugueeva, Z. A.; Sergueev, D. S.; Shaw, B. R. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acid*, **2001**, *20*, 789-795.
40. Shimizu, M.; Tamura, K.; Wada, T.; Saigo, K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 371-374.
41. Shimizu, M.; Wada, T.; Oka, N.; Saigo, K. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5261-5268.
42. Kraszewski, A.; Stawiński, J. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2217-2227.
43. Higson, A. P.; Sierzchala, A.; Brummel, H.; Zhao, Z.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3899-3902.
44. Zhang, J.; Terhorst, T.; Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4957-4960.
45. Wada, T.; Sato, Y.; Honda, F.; Kawahara, S.; Sekine, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12710-12721.
46. Lin, J.; Shaw, B. R. *Chem. Commun.* **1999**, 1517-1518.

47. Lin, J.; Shaw, B. R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 587-596.
48. (a)「核酸構造 (上)」第一版 三松堂印刷株式会社 W.ゼンガー 著 西村善文 訳; (b)「核酸構造 (下)」第一版 三松堂印刷株式会社 W.ゼンガー 著 西村善文 訳
49. Kawai, G.; Yamamoto, Y.; Kamimura, T.; Masegi, T.; Sekine, M.; Hata, T.; Iimori, T.; Watanabe, T.; Miyazawa, T.; Yokoyama, S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1040-1046.
50. Monia, B. P.; Lesnik, E. A.; Gonzalez, C.; Lima, W. F.; McGee, D.; Guinosso, C. J.; Kawasaki, A. M.; Cook, P. D.; Freier, S. M. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14514-14522.
51. Martin, P. *Helv. Chim. Acta.* **1995**, *78*, 486-504.
52. Tereshko, V.; Portmann, S.; Tay, E. C.; Martin, P.; Natt, F.; Altmann, K.-H.; Egli, M. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 10626-10634.
53. Manoharan, M. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 117-130.
54. Prakash, T. P. *Chem. Biodiv.* **2011**, *8*, 1616-1641.
55. Teplova, M.; Minasov, G.; Tereshko, V.; Inamati, G. B.; Cook, P. D.; Manoharan, M.; Egli, M. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 535-539.
56. (a) Singh, S. K.; Nielsen, P.; Koshkin, A. A.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **1998**, 455-456.; (b) 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.
57. (a) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Morio, K.; In, Y.; Ishida, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735-8738.; (b) Obika, S.; Rahman, S. M. A.; Fujisaka, A.; Kawada, Y.; Baba, T.; Imanishi, T. *Heterocycles* **2010**, *81*, 1347-1392.
58. Straarup, E. M.; Fisker, N.; Hedtjærn, M.; Lindholm, M. W.; Rosenbohm, C.; Aarup, V.; Hansen, H. F.; Ørum, H.; Hansen, J. B. R.; Koch, T. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7100-7111.
59. McTigue, P. M.; Peterson, R. J.; Kahn, J. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5388-5405.
60. (a) Higashida, R.; Oka, N.; Kawanaka, T.; Wada, T. *Chem. Commun.* **2009**, 2466-2468.; (b) Oka, N.; Takayama, Y.; Ando, K.; Wada, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4571-4574.
61. Oka, N.; Shimizu, M.; Saigo, K.; Wada, T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3667-3673.
62. Alder, R. W.; Bowman, P. S.; Steele, W. R.; Winterman, D. R. *Chem. Commun.* **1968**, 723-724.
63. Clarke, K.; Rothwell, K. *J. Chem. Soc.* **1960**, 1885-1895.
64. (a) Froehler, B. C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5575-5578; (b) Tömösközi, I.; Gács-Baitz, E.; Ötvös, L. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6797-6804.
65. Song, Q.; Wang, Z.; Sanghvi, Y. S. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*,

629-633.

66. Stawiński, J.; Thelin, M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5169-5175.
67. Vu, H.; McCollum, C.; Jacobson, K.; Theisen, P.; Vinayak, R.; Spiess, E.; Andrus, A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7269-7272.
68. Bjerrum, J., et al. *Stability Constants*, Chemical Society, London, 1958.
69. *P*-(2-Morpholinoethylamino) substituent has been used to develop polycationic phosphoramidate oligonucleotides. Letsinger R. L.; Singman, C. N.; Hestand, G.; Salunkhe, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4470-4471.
70. Maier, M. A.; Guzaev, A. P.; Manoharan, M. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1819–1822.
71. Krishna, H.; Caruthers, M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9844-9854.

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の場を与えてくださった東京理科大学 和田猛教授に心から感謝申し上げます。

和田猛教授には、核酸化学の基本的な知識から、高度な実験技術を細かく指導して頂きました。思い通りに研究が進まないときには、いつでも親身になって相談に乗って頂き、適切なアドバイスをして下さいました。心から感謝致します。

本研究を行うにあたり、LNA チミジンを提供して下さいました、大阪大学大学院 薬学研究科の小比賀聡教授に厚く御礼申し上げます。

岐阜大学工学部応用化学科の岡夏央准教授には、学会でお会いした際に適切なアドバイスをして頂きました。深く感謝致します。

御多忙の中、本論分の審査をお引き受け下さり、貴重なアドバイスをして下さいました、東京大学大学院工学系研究科の野崎京子教授、東京大学大学院新領域創成科学研究科の渡邊俊樹教授、津本浩平教授、泊幸秀教授、鈴木穰教授に心より感謝申し上げます。

研究室生活における事務手続きなどで大変お世話になりました、秘書の山中利枝さん、高峯悦子さんに心から感謝致します。

修士一年から博士後期課程三年までの五年間の研究生活において、研究の進め方や実験器具の扱い方を丁寧に教えて頂き、また、研究室を牽引して下さいました諸先輩方に感謝申し上げます。

常に切磋琢磨しながら、共に研究生活を過ごした同輩と後輩に感謝致します。

また、博士後期課程三年において、心強い支援をして頂きました、日本学生支援機構に深く感謝申し上げます。

最後に、私を遠くから応援し、経済的にも支えてくれた、父、母、祖父、祖母に感謝します。

平成 26 年 6 月