

学位論文

ホスホン酸誘導体を用いた  
新規核酸合成法の開発

2024年3月

鶴崎 太樹

## はじめに

本論文は、2018年4月から2024年3月にかけて、東京理科大学薬学部生命創薬科学科および東京理科大学大学院薬学研究科薬科学専攻 和田猛研究室にて行なった研究をまとめたものである。

# 目次

<b>序論</b> .....	<b>5</b>
第一節 核酸医薬 .....	5
第二節 モルフォリノ核酸 .....	6
第三節 核酸合成法 (DNA の化学合成) .....	8
第四節 モルフォリノ核酸の合成法 .....	10
第五節 合成手法 .....	14
第六節 本研究について .....	16
第七節 ホスホン酸誘導体について .....	17
<b>本論</b> .....	<b>18</b>
<b>第一章 モルフォリノ核酸の新規効率的合成法の開発</b> .....	<b>18</b>
第一節 合成戦略 .....	18
第二節 <i>H</i> -ホスホンアミデートモノマーを用いた合成検討 .....	19
第三節 5'- <i>H</i> -ホスホネートモノエステルを用いた合成検討 .....	25
第四節 PMO オリゴマーの合成 .....	39
<b>第二章 <i>H</i>-ホスホンアミデート誘導体を用いた新規核酸合成法の開発</b> .....	<b>49</b>
第一節 諸言 .....	49
第二節 <i>H</i> -ホスホンアミデート誘導体の合成 .....	51
第三節 <i>H</i> -ホスホンアミデート誘導体の活性化 .....	52
第四節 <i>H</i> -ホスホンアミデート誘導体の活性化 (酸性条件) .....	67
<b>結論</b> .....	<b>84</b>
<b>実験項</b> .....	<b>86</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>121</b>
<b>原著論文</b> .....	<b>124</b>

## 略号表

BSA = *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide

Bz = benzoyl

BOPCl = *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolydiny)phosphinic chloride

BOMP = 2-(benzotriazol-1-yloxy)-1,3-dimethyl-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate

Bt = benzotriazole

DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

DCA = dichloroacetic acid

DIPEA = *N,N*-diisopropylethylamine

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

Piv = pivaloyl

PyBOP = (benzotriazol-1-yloxy)-tris(pyrrolidine-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate

PyNTP = 3-nitro-1,2,4-triazole-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate

Im = imidazole

TBAF = tetrabutylammonium fluoride

TBDPS = *tert*-butyldiphenylsilyl

TEA = triethylamine

TEAB = triethyl ammonium bicarbonate

TFA = trifluoroacetic acid

THF = tetrahydrofuran

TMS = trimethylsilyl

Tr = trityl

Tri = 1,2,4-triazole

# 序論

## 第一節 核酸医薬

近年、様々な疾患に対する治療薬として核酸医薬が注目を集めている。核酸医薬は従来の低分子医薬や抗体医薬が標的とすることができなかった、DNA や RNA といった遺伝子やその転写産物を標的とすることができる。原理的には、全てのタンパク質の発現を制御することが可能であるため、これまで治療が困難とされてきた難病の治療薬になると期待されている。そして、核酸医薬は化学合成による大量合成が可能であるという利点を有している。この利点を最大限に活かすことができれば、薬価の高い抗体医薬と比べ、より安価な医薬を供給することができる。しかし、現在のところ、大量合成技術の開発が課題として残されており、本研究では、この課題解決へと繋がる反応開発を目指した。

核酸医薬は、その作用機序によっていくつかの種類に分類される。標的遺伝子の DNA に結合することでその転写を阻害するアンチジーン医薬、mRNA に結合し翻訳を制御するアンチセンス医薬、siRNA が RISC (RNA 誘導サイレンシング複合体) を形成することで mRNA の分解を誘導する RNAi 医薬、タンパク質と結合し、その生理活性を阻害するアプタマー医薬など、様々な種類の核酸医薬が盛んに研究されている<sup>1</sup>。2023 年 10 月現在、海外企業による 17 製品と日本企業による 1 製品が承認を得ており、その内 10 製品がアンチセンス医薬品である。アンチセンス医薬品は、化学修飾を施したオリゴヌクレオチドを標的の mRNA に対して、塩基配列特異的に結合させ、標的遺伝子の発現を抑制する。アンチセンス医薬は作用機序の違いから以下の 2 種類に分類される。

### RNase H 依存型アンチセンス核酸

RNase H は主として核内に存在し、DNA/RNA 二重鎖を認識して RNA 鎖のみを選択的に切断する酵素である。この酵素を利用するアンチセンス医薬を RNase H 依存型アンチセンス核酸と称する。標的 mRNA とアンチセンス DNA が 2 本鎖を形成すると、RNase H が認識し、標的 mRNA のみを分解することができる<sup>2</sup>。標的 mRNA が分解されると、アンチセンス核酸が遊離し、これが他の mRNA と結合することで、その mRNA の切断を誘導するため、触媒的に作用させることが可能である。一方、アンチセンス核酸に過度な糖部修飾を施すと、RNase H がアンチセンス核酸と RNA 二重鎖を認識しなくなる。ギャップマー型アンチセンス核酸は、DNA 誘導体のウイング領域と呼ばれる 5'及び 3'末端の数残基に糖部修飾が施され、中央部のギャップ領域は、RNase H の基質となるように、少なく

とも連続する 5 つの DNA 骨格が導入されるのが一般的である。

### RNase H 非依存型アンチセンス核酸

RNase H による分解を誘導しないアンチセンス核酸を RNase H 非依存型アンチセンス核酸と称する。標的 RNA と配列特異的に結合し、RNA に作用する分子群と競合する。標的 RNA は切断などの化学反応を受けず、リボソーム、スプライソソームなどが認識する RNA 部位を物理的に阻害することで作用を示す<sup>2</sup>。2'-O-メチル RNA、2'-O-メトキシエチル (MOE) RNA、モルフォリノ核酸がこれに分類される。

## 第二節 モルフォリノ核酸

モルフォリノ核酸 (PMO: Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotide) は、核酸の糖骨格がモルフォリン環に置き換えられており、さらにリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子の一つをジメチルアミノ基に置き換えた構造を有している (Figure 1)<sup>3</sup>。これらの修飾は、モルフォリノ核酸に次のような性質を与えている。

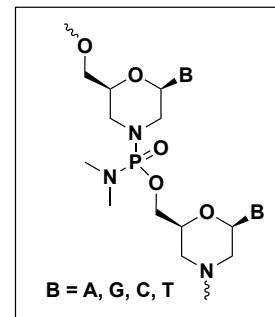


Figure 1 PMO

### 1. 生物学的安定性

モルフォリノ核酸は、糖骨格がモルフォリン環に変換されていること、DNA や RNA のような負電荷を有していないことに起因して、体内に存在する多くの分解酵素の認識から逃れ、高い分解酵素耐性を有している<sup>4,5</sup>。

### 2. 二重鎖形成能

モルフォリノ核酸は、RNA と極めて安定な二重鎖を形成する。天然型 DNA やアンチセンス医薬として汎用されているホスホロチオエート DNA よりも高い二重鎖形成能を有する<sup>3</sup>。

### 3. 低毒性

核酸医薬が毒性を示す要因の一つに、生体内タンパク質と核酸医薬の負電荷を有したリン酸結合部分との静電相互作用が挙げられる<sup>6</sup>。モルフォリノ核酸は、DNA や RNA のように負電荷を持たないため、静電的相互作用によるタンパク質との相互作用が少ない。このため、細胞毒性の原因となるタンパク質との非特異的な結合を引き起こさず、毒性が極めて低い<sup>7-9</sup>。

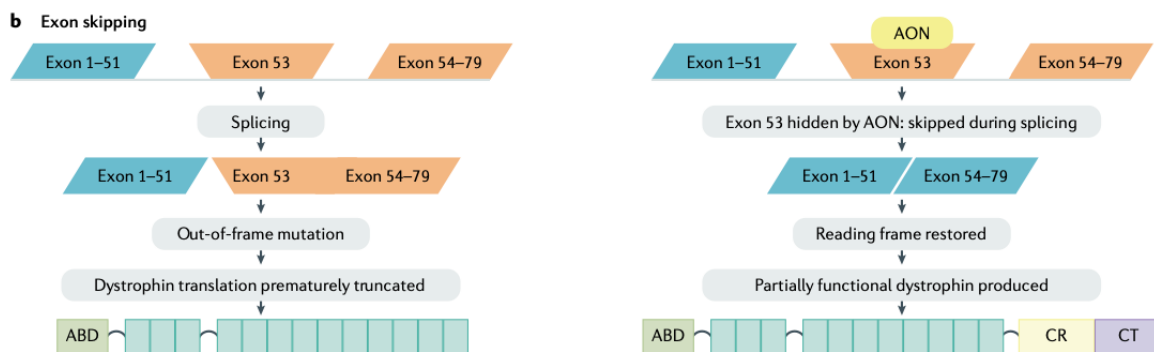
これらの性質はモルフォリノ核酸がアンチセンス医薬として、有望であることを示しており、現在、難病の一つであるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療薬として、Exondys51<sup>®10</sup>、Vyondays53<sup>®11</sup>、Viltepso<sup>®12</sup>、Amondys45<sup>®13</sup> の 4 つが認

可されており、今後も増加していくことが予想される。

### デュシェンヌ型筋ジストロフィーと治療法

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、男児 3000 人に一人の確率で発症すると言われている。この病気は、X 連鎖劣性遺伝形式をとり、ジストロフィン遺伝子（DMD 遺伝子）の異常によりジストロフィンタンパク質が欠損する。ジストロフィンタンパク質は筋細胞膜の安定化に関与し、その欠損は筋線維の変性・壊死をきたすため、進行性の全身の筋力低下により呼吸不全・心不全をきたす。ステロイドや人工呼吸器の普及により予後は改善してきたものの、それでも平均寿命は 20～40 歳台とされている<sup>14</sup>。

DMD 遺伝子は、79 個のエクソンから構成されている。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの疾患では、DMD 遺伝子がエクソン単位で欠損する変異が多く（60～70%）、この結果、正常なジストロフィンタンパク質が合成されない。Figure 2(左)で示した例では、エクソン 52 の欠失により、「エクソン 51 と 53 が結合した mRNA」が生じるが、エクソン 53 以降で読み枠がずれることにより、早期にストップコドンが生じる（フレームシフト変異：out of frame）。この結果生じた「C 末端が欠如した変異ジストロフィンタンパク質」は不安定なため、分解される。この状況に対して、エクソン 53 の ESE 領域（Exon splicing enhancer domain）と相補的に結合するアンチセンス核酸（ASO: antisense oligonucleotide）を導入すると、スプライシングが変化し、エクソン 53 も取り除かれる（エクソンスキップ）。これにより、生じた「エクソン 51 とエクソン 54 が結合した mRNA」は読み枠が合うことから、C 末端まで翻訳されることとなり、「エクソン 52、53 にコードされるアミノ酸が欠失した少し短いジストロフィンタンパク質」が合成される（Figure 2（右））。ここで、重要な点は、ジストロフィンタンパク質は N 末側の AB 領域（actin-binding domain）と C 末側の CR 領域（cysteine-rich domain）と CT 領域（C-terminal domain）が機能発現に必要であるが、中央部には繰り返しモチーフがあり、多少欠損しても機能が保持される点である。この性質を活かした治療法をエクソンスキップ療法と呼び、このエクソンスキップ薬としてモルフォリノ核酸が使用されている<sup>14</sup>。



**Figure 2** デュシェンヌ型筋ジストロフィーとアンチセンス核酸（AON）による治療. AON: antisense oligonucleotide, ABD: actin-binding domain, CR: cysteine-rich domain, CT: C-terminal domain<sup>14</sup>.

### 第三節 核酸合成法（DNA の化学合成）

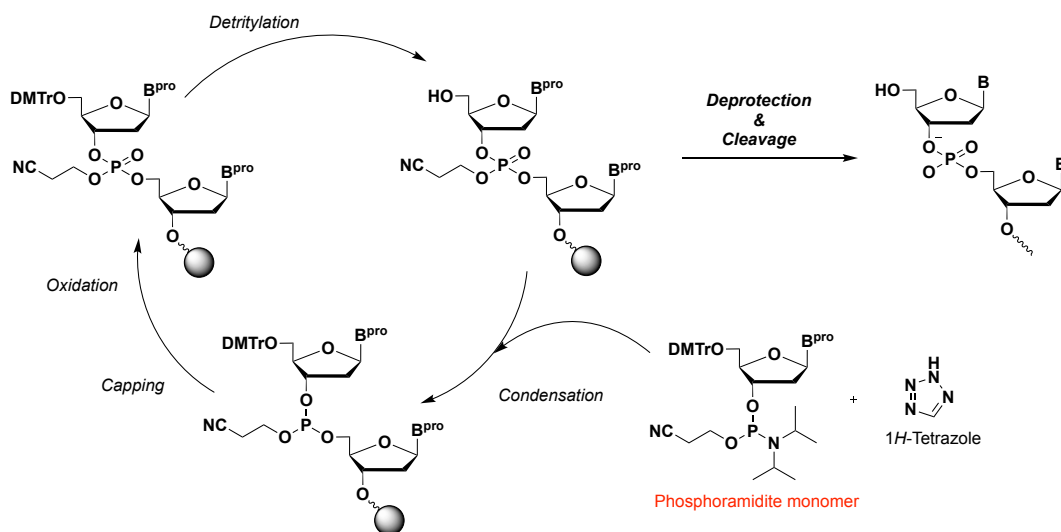
核酸医薬は、化学合成されたオリゴヌクレオチド誘導体を活性の本体とする医薬である。本節では核酸（DNA）の化学合成法について概説する。

#### A) ホスホロアミダイト法

ホスホロアミダイト法は、1981年に Beaucage らによって初めて報告され、現在、核酸合成に最も汎用的に用いられている合成法である<sup>15,16</sup>。ホスホロアミダイト法では、5'位と核酸塩基部が保護され、3'位がホスホロアミダイト化されたモノマーを用いる。一般的な DNA 固相合成の手順を以下に示す<sup>17</sup>。ホスホロアミダイトモノマーに対して、1*H*-テトラゾール等の酸性活性化剤を作用させ、これを3'末端が固相担体に担持されたオリゴマーの5'-水酸基と縮合することでホスファイトトリエステル結合を生成する。次に、未反応の5'-水酸基をアセチル基でキャップ化した後、ホスファイトの酸化を行い、リン酸トリエステルへと変換する。その後、酸性条件下、5'-水酸基の保護基である DMTr 基の除去を行う。本操作を目的の鎖長になるまで繰り返し行った後、核酸塩基部の脱保護、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基の除去、固相担体からの切り出しを行い、目的のオリゴヌクレオチドを得る（Scheme 1）。モノマーであるホスホロアミダイトは、高い反応性を有するために、良好な縮合効率で鎖長伸長が可能である。また、合成サイクルの酸化反応を硫化反応に変更することで、ホスホロチオエート核酸の合成が可能である<sup>18</sup>。加えて、ホスホロアミダイト法を用いた固相合成は、自動合成装置へ適用されているため、短時間で多様なオリゴヌクレオチドの合成が可能である。



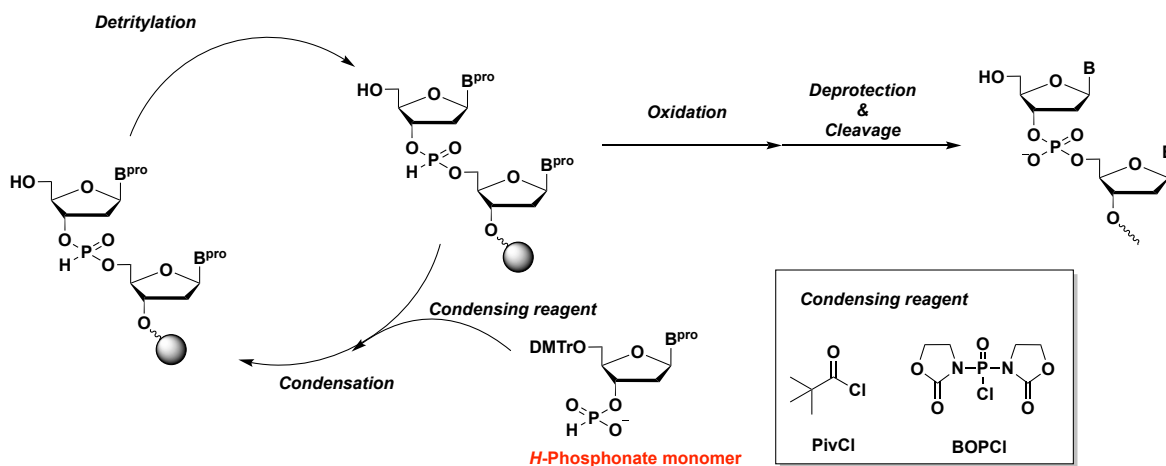
### Scheme 1 ホスホロアミダイト法を用いた固相合成



### B) *H*-ホスホネート法

*H*-ホスホネート法は、1986年に Froehler ら及び Garegg らによって初めて報告された<sup>19, 20</sup>。*H*-ホスホネート法では、5'位が保護され、3'位に *H*-ホスホネートモノエステル基を有するホスホン酸誘導体をモノマーとして用いる。一般的な DNA 固相合成の手順を以下に示す。*H*-ホスホネートモノマーを塩化ピバロイル (PivCl) や *N,N'*-bis(2-oxo-3-oxazolydinyl)phosphinic chloride (BOPCl) などの脱水縮合剤によって活性化し、3'末端が固相に担持されたオリゴマーの 5'-水酸基と縮合することで、*H*-ホスホネートジエステル結合を形成する。その後、5'-水酸基の脱保護を行い、再び縮合を行うサイクルを繰り返すことで、目的とする鎖長まで伸長する。その後、*H*-ホスホネートジエステル結合の酸化、核酸塩基部の脱保護と固相担体からの切り出しを行い、目的のオリゴヌクレオチドを得る (Scheme 2)。

### Scheme 2 *H*-ホスホネート法を用いた固相合成



*H*-ホスホネート法の一つの特徴として、中間体である *H*-ホスホネートジエステル結合に対して、適切な変換反応を行うことで、種々のリン原子修飾型核酸へと誘導可能であることが挙げられる<sup>21</sup>。これまで、ホスフェートジエステル<sup>22</sup>、ホスホチオエート<sup>23</sup>、ホスホセレノエート<sup>24</sup>、ホスホアミデート<sup>25</sup>、ボラノホスフェート<sup>26</sup>、アリルホスホネート<sup>27</sup>などへの変換が達成されている。また、オリゴマー合成においては、*H*-ホスホネートジエステル中間体のまま目的の長さまで鎖伸長を行った後、一度の変換反応ですべてのインターヌクレオチド部位を変換することが可能である。このことは、オリゴマー合成の工程数を少なくできるという点で本手法のメリットと言える。しかし、*H*-ホスホネートジエステル結合は、塩基性条件下不安定であるという欠点も有している<sup>28</sup>。

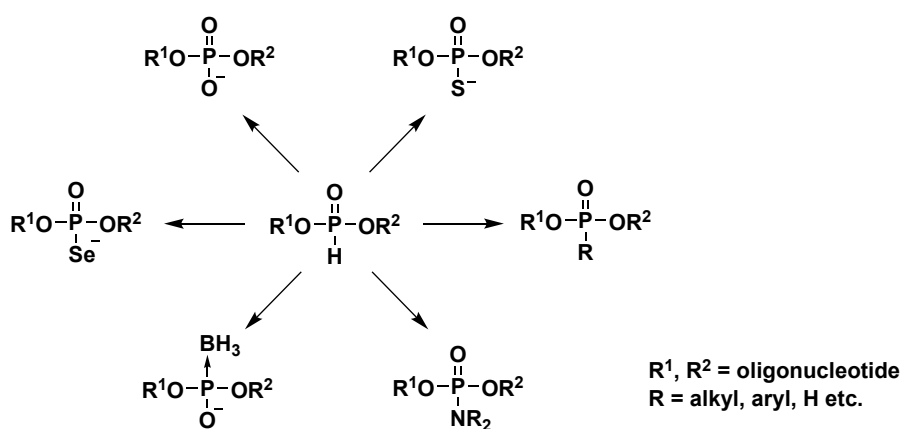


Figure 3 *H*-ホスホネートジエステル結合の変換反応

#### 第四節 モルフォリノ核酸の合成法

第三節では、DNAの合成法について概説した。本節では、モルフォリノ核酸（以下PMO）の合成法について概説する。なお、本論文におけるPMOの命名法は、モルフォリンを基本骨格とする命名法ではなく、親化合物のリボヌクレオシドの炭素番号を採用しており、Figure 4に示す炭素番号として定義している。

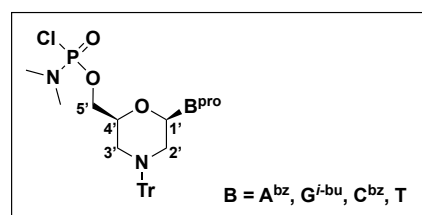
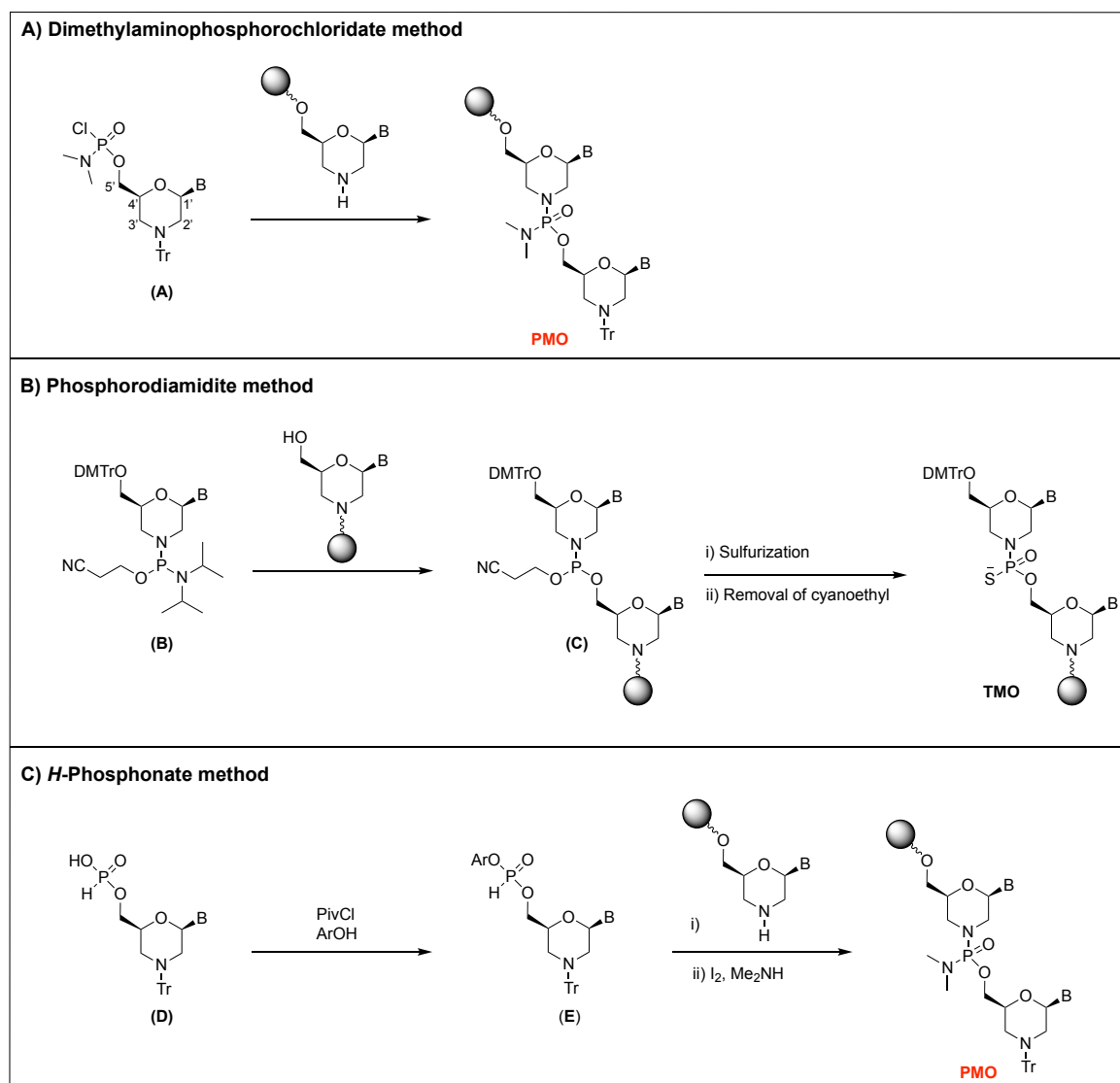


Figure 4 PMO モノマー

### Scheme 3 これまでに報告されている PMO の合成法



#### A) ジメチルアミノホスホクロリデートを用いた合成法

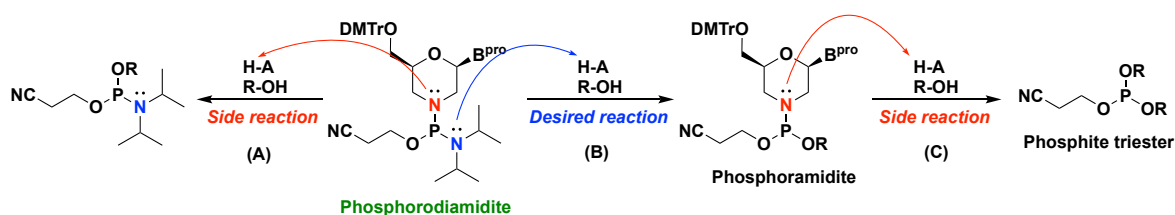
Summerton らは、1990 年代初頭、モルフォリノヌクレオシド 5'位にジメチルアミノホスホクロリデートを有するモノマー (A) を塩基存在下、遊離のアミノ基を有する誘導体と反応させることでインターヌクレオチド結合を形成し、PMO の合成に成功した (Scheme 3-A)<sup>29</sup>。しかし、モノマーの反応性が低く、縮合反応の完結に 1 時間と長時間を要している。一般的に、リン原子は酸化数が大きくなるほど求電子性が低下する。モノマー (A) は、モルフォリノヌクレオシド 5'位にジメチルアミノホスホクロリデートを有しているが、P-N 結合を有する 5 価のリン酸化剤は、リン原子の求電子性が低く、縮合反応速度が遅い。そのため、固相法による長鎖オリゴマー合成時の縮合効率は低く、液相法によるオリゴマー同士を反応するフラグメント縮合は未だ達成されていない。2012 年に、Sekine らに

よって、縮合系中に LiBr を添加することで縮合時間が大幅に短縮されることが報告された<sup>30</sup>。しかし、LiBr を添加した条件での PMO 合成は 2 量体のみであり、長鎖オリゴマーの合成例は無い。さらに、2021 年に、Li らは、反応温度を 90 °C にすることで、モノマーの反応性の低さを補い、8 分で縮合反応が完結することを報告した<sup>31</sup>。この反応とフローリアクターを用いることで、18 量体 PMO を 3.5 時間で合成することに成功している。2022 年には、Kundu らによって、液相法での 3 量体 PMO の合成例が報告された。また、自動合成装置を用いた固相合成によって、30 量体 PMO の合成を達成している<sup>32</sup>。

## B) ホスホロジアミダイト法

ホスホロアミダイト法は、第三節で記述した通り、DNA、RNA 合成に最も汎用的に用いられている合成法である。ホスホロアミダイトモノマーに対して、酸性活性化剤を作用させ、これをもう 1 分子の遊離の水酸基と縮合することで、ホスファイトを形成する（第三節参照）。しかし、この合成法をモルフォリノ核酸に適用する場合、問題が生じる。モノマーがホスホロジアミダイト誘導体となり、2 種類のアミノ基（モルフォリノ基、ジイソプロピルアミノ基）を有するため、酸性活性化剤で両方のアミノ基が活性化されてしまう可能性が生じる（Scheme 4 (A)、(B)）。モルフォリノ基とリン原子の結合を維持して目的のホスホロアミダイトを得たとしても（Scheme 4 (B)）、これが酸性活性化剤によって活性化され、アルコールが反応することで、ホスファイトトリエステルが生成する副反応が起こりうる（Scheme 4 (C)）。そのため、用いる酸性活性化剤を慎重に選択する必要がある。このような背景の中、2020 年に Caruthers らは適切な酸性活性化剤（5-ethylthiotetrazole: ETT）を用いて、ホスホロアミダイト法をモルフォリノ核酸合成に応用し、thiophosphoramidate morpholino oligonucleotides (TMOs)を合成した(Scheme 3-B)<sup>33</sup>。TMO は PMO と異なり、ホスホロチオアミデート結合を有している。現在、TMO は医薬品としての承認は得られていないものの、アンチセンスとして優れた性質を有している。一方で、この合成法では、ホスホロアミダイト (C) が中間体とし生成し、この中間体経由では、ホスホロジアミデート結合を有する PMO を合成することができないという欠点も有している。

Scheme 4 ホスホロアミダイト法を PMO 合成に応用した際の問題点



### C) *H*-ホスホネート法

Sinha らは、2015 年に核酸合成法の 1 つである *H*-ホスホネート法を PMO の合成に応用した (Scheme 3-C) <sup>34</sup>。この合成法では、モルフォリヌクレオシド 5' 位の水酸基をホスホニル化した *H*-ホスホネートモノエステル (**D**) をモノマーとして用いている。*H*-ホスホネートモノエステル (**D**) を縮合剤である PivCl を用いてフェノール誘導体と縮合し、活性エステル中間体 (**E**) を生成させ、これを真の活性種として用いている。活性エステル中間体 (**E**) とモルフォリヌクレオシドのアミノ基を縮合し、*H*-ホスホンアミデート結合を形成し、これを酸化的にアミノ化することで、目的のホスホロジアミデート結合を得ている。*H*-ホスホネート誘導体、はリン原子の酸化数が+3 であるため、ジメチルアミノホスホクロリデートを有するモノマー (**A**) と比べ反応性が高く、縮合反応は 10 分以内に完結している。

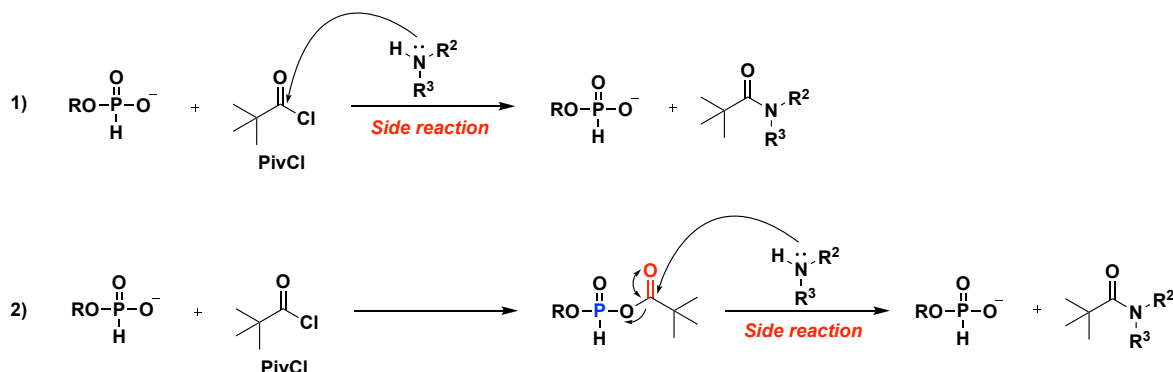
この合成法の留意点の 1 つは、活性エステル中間体 (**E**) を経由しなければならない点である。この理由を説明するために、過去の研究について言及する。

1990 年頃、*H*-ホスホンアミデート誘導体の合成に関して、Stawinski らによって詳細に検討がなされている <sup>35-38</sup>。PivCl を縮合剤として用いて、様々なアミンと *H*-ホスホネートモノエステルとの直接的な縮合反応を試みたところ、アミンの立体障害の大きさによって異なる結果が得られた。

#### [立体障害の小さいアミン (ブチルアミン、イソプロピルアミン、ピペリジン) ]

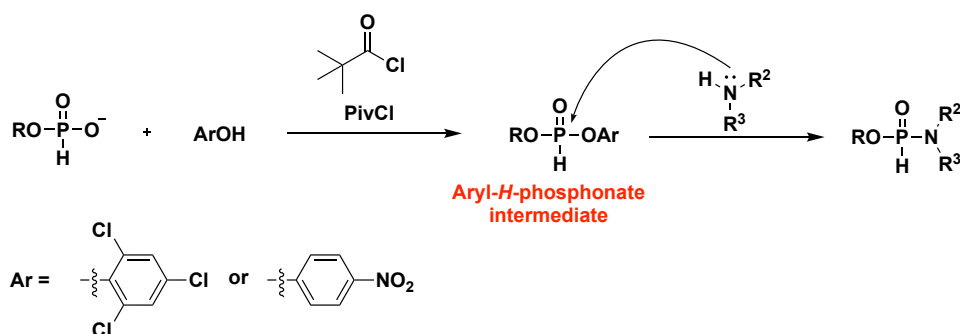
*H*-ホスホネートモノエステルと縮合するアミンの立体障害が小さい場合、アミノ基がアシル化され、縮合反応が起こらなかった <sup>37</sup>。アミンがアシル化される機構としては、①PivCl とアミンが直接反応する、②*H*-ホスホネートモノエステルと PivCl が反応して生じる混合酸無水物には二つの求電子部位 (リン原子とカルボニル炭素) があり、アミンがカルボニル炭素に求核攻撃する、この 2 通りの経路が考えられている (Scheme 5)。

Scheme 5 アミンがアシル化される機構



そこで、Stawinski らは *H*-ホスホネートモノエステルと *p*-nitrophenol または 2,4,6-trichlorophenol を PivCl によって縮合し、活性エステルを中間体として生成させた後に、立体障害の小さいアミンと縮合している (Scheme 6)。この場合、活性エステルの求電子中心はリン原子のみとなり、目的とする *H*-ホスホンアミデート結合のみが生成する<sup>37</sup>。

Scheme 6 活性エステル経由での *H*-ホスホンアミデート誘導体合成



#### [立体障害の大きいアミン (ジイソプロピルアミン) ]

立体障害の大きいアミンを用いた場合、アミノ基はアシル化されることなく、目的とする縮合反応のみが観測された。つまり、立体障害の大きなアミノ基は、*H*-ホスホネートモノエステルと直接的に縮合することができ、活性エステルを経由する必要がないことを示している。

これらの知見と、モルフォリノ核酸のアミノ基は「立体障害の小さいアミノ基」と考えられることを考慮して、PMO の合成戦略を立てると、活性エステルを経由するルートを選択するのが妥当である。実際に、Sinha らは活性エステルを経由する方法を PMO 合成に応用し、最終的には T-15 量体の合成を達成した。しかし、4 種塩基を含むオリゴマーの合成は達成されていない(Scheme 3-C)<sup>34</sup>。

## 第五節 合成手法

ここまで PMO を含めた種々のオリゴヌクレオチドのインターヌクレオチド結合形成方法について、用いるホスホン酸、リン酸誘導体の種類や活性化方法に焦点を当てて概説した。本節では、こうした方法を用いて実際に合成する際に使用する、(1)固相合成と液相合成、(2)ステップワイズ法とフラグメント法、のそれぞれの違いについて述べる。

## 1. 固相合成と液相合成

### 固相合成

固相合成は、ポリマーやガラスビーズなどの固体担体にリンカーを介してヌクレオチドを結合させた状態で、縮合反応や脱保護反応などの合成手順を繰り返してオリゴヌクレオチドの鎖長伸長を行う手法である<sup>16,17</sup>。固相合成では、オリゴマーが固相上に担持されているため、反応時に加えた過剰のモノマーや試薬の残渣をろ過・洗浄操作によって容易に除去することができる。このため、合成したい配列に依存せず、反応およびろ過・洗浄操作を繰り返すことでオリゴマーを合成可能である。DNA合成に関して、ホスホロホロアミダイト法による固相合成は、自動合成装置への応用が進展しており、多種多様なオリゴヌクレオチドの合成に使用されている<sup>17</sup>。一方で、固相合成には課題も存在する。不均一系の反応であり、固相担体に担持されたオリゴマーが溶媒に溶けていないため、反応性が低く、反応を完結させるために過剰量のモノマーや試薬が必要となる。こうした理由から大スケール合成を行うことが、後述する液相合成法と比較すると困難であり、例えば核酸医薬の製造といった必要量が多い誘導体の合成においてはスケールアップの課題がある。

### 液相合成

液相合成法では、オリゴマーが溶解した状態で鎖伸長が行われるため、小過剰量のモノマーや試薬で反応が効率的に進行する。このことから、スケールアップが容易という利点もある。一方で、液相合成ではオリゴマー、過剰に使用したモノマーや試薬がすべて溶解している状態であるため、反応時に加えたモノマーや試薬の残渣をどのように除去するかが重要な問題となる。各反応後に、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場合、1合成サイクルにおける操作が煩雑となり、多くの時間を必要とする。これまで、抽出<sup>39</sup>、再沈殿<sup>40,41</sup>といった比較的簡便な方法で各反応後の粗精製を行う液相合成法が開発されてきた。中でも、再沈殿や抽出といった簡便な操作によって反応後の粗精製を行う手法は、効率的な液相合成法となる可能性がある。オリゴマーの合成は固相合成によって行われることが一般的であったが、核酸医薬の開発が進み、特定の配列を大量に合成する需要が高まってきていることから、近年液相合成法の開発が盛んとなっている<sup>42</sup>。

## 2. 鎖長伸長方法

### 逐次延長法

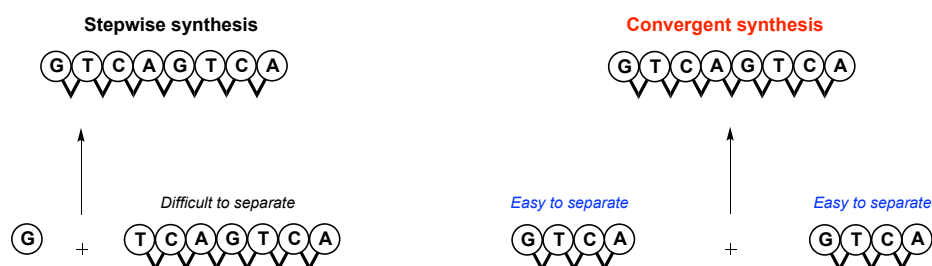
逐次延長法は、オリゴマー末端とモノマーユニットを繰り返し縮合することで

鎖長伸長を行う方法で、固相合成法、液相合成法を問わず一般的にこの手法が用いられている<sup>17</sup>。逐次延長法では、必要なモノマーユニットを用意することができれば、同じ操作を繰り返すだけでよく、自動合成装置への応用が容易であり、短時間で多種多様な配列や修飾を施した核酸医薬を合成することができる。しかし、この手法では、目的物より鎖長が1つ短いN-1量体の生成が避けられない。さらに、このN-1量体は目的物と非常に類似した疎水性を有するため、核酸合成において汎用されている逆相HPLCによる精製が困難となっている。

### フラグメント縮合法

フラグメント縮合法は、オリゴマー同士を連結する方法である<sup>43-46</sup>。ユニットがモノマーではなくオリゴマー（フラグメント）となっている。フラグメント同士を縮合することで鎖長伸長を行うため、N-1量体は原理的に生成しない。さらに、未反応のフラグメントと目的のオリゴマーとは、鎖長の違いから疎水性が大きく異なるため、精製操作も容易である。また、フラグメント縮合法によるオリゴマー合成では、逐次延長法と比較し、反応工程を大幅に短縮することができる<sup>43</sup>。しかし、フラグメント縮合法は、多種多様なオリゴマーの合成には適していない。配列や修飾を変更する場合、フラグメントを最初から合成する必要があるためである。そのため、フラグメント法は、配列や修飾が決定している上市品の大量合成に有用である。実際に、近年、DNA合成においては、フラグメント縮合による大量合成の有用性が実証されている<sup>43</sup>。しかし、PMO合成に関しては、既存の合成法の縮合効率が低いことに加え、フラグメント自体を合成することが難しいという課題がある。そのため、フラグメント縮合によるPMOの合成例は報告されていない。

### Scheme 7 鎖長伸長方法



## 第六節 本研究について

近年、核酸医薬の発展に伴い、オリゴヌクレオチドの必要量は増加の一途を辿っており、大量製造を見据えた効率的な化学的合成法の開発が強く求められてい



る。特に、PMO 医薬に関しては、ここ数年、連続して承認されているにも関わらず、従来の非効率的な合成法によって製造されており、莫大な費用が掛かっている。それ故に、医薬品の価格が高騰しており、病気に苦しむ患者や国の負担が大きくなっている。

これらの課題を受け、本博士論文研究では、新規効率的 PMO 合成法の開発を目指した（第一章）。また、PMO 合成に関する研究を通して、明らかとなった副反応から着想を得て、新規核酸合成法の開発を目指した（第二章）。

この際、ホスホン酸誘導体に着目して研究を進めた。本論文の全ての内容は、ホスホン酸誘導体が関与している。そこで、次節にてホスホン酸誘導体について概説した後本論へと移る。

## 第七節 ホスホン酸誘導体について

Figure 5 に本論文に登場するホスホン酸誘導体を示した。全ての化合物に共通する構造的特徴は、 $\text{H-P=O}$  結合を有する点である。リン原子上の置換基はアルコキシ基またはアミノ基となっている。そして、ホスホン酸誘導体の最大の特徴は、互変異性体の存在である。ホスホン酸誘導体には、 $H$ -ホスホネート型とホスファイト型の 2 種類の互変異性体が存在する。一般的に、 $H$ -ホスホネート型の方が熱力学的に安定であるため、通常は  $H$ -ホスホネート型で存在している。しかし、反応系中の塩基性が強くなるほど、または、リン原子上の置換基の電子吸引効果が大きくなるほど、ホスファイト型への互変異性化が促進されることが明らかとなっている。なお、ジエチルホスホネート ( $\text{R}=\text{Et}$ ) の DMSO 中での  $\text{pK}_a$  の値は 20.8 と報告されている<sup>61</sup>。第二章では互変異性化が重要な論点となっている。

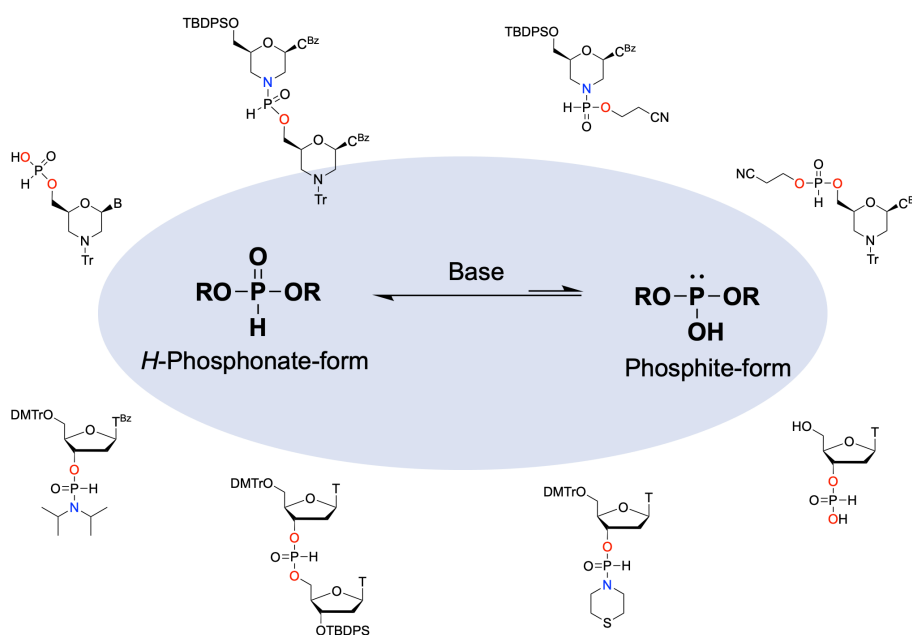


Figure 5 ホスホン酸誘導体

# 本論

## 第一章 モルフォリノ核酸の新規効率的合成法の開発

### 第一節 合成戦略

近年の PMO 医薬開発品目の増加に伴い、PMO の効率的かつ大量合成を可能とする、新規液相合成法の開発が期待されている。本章では、ホスホン酸誘導体を用いた、新規効率的 PMO 合成法について述べる。

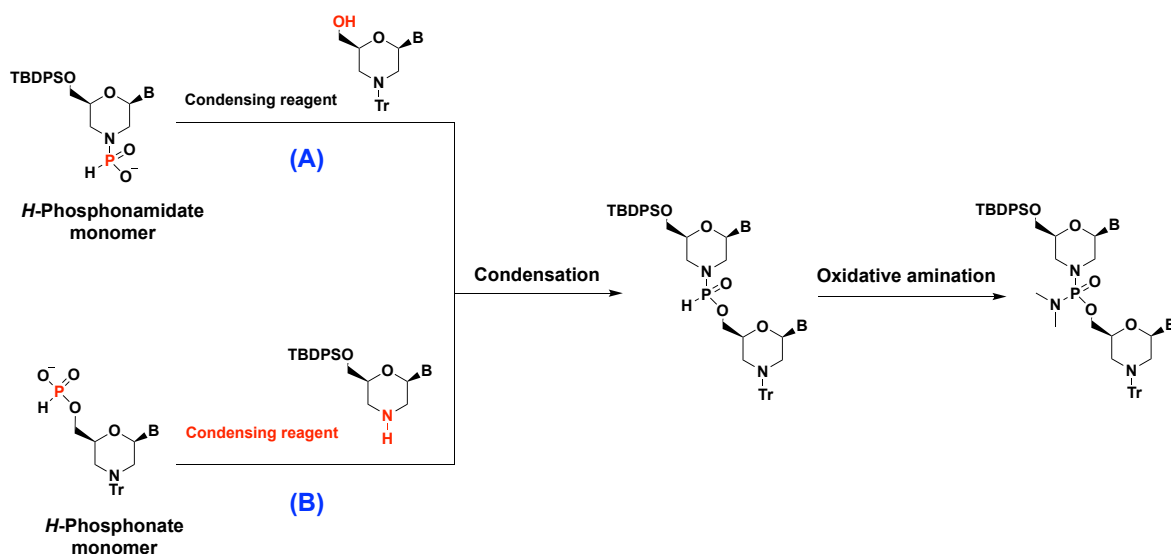
前述した通り、従来法が抱える課題の一つにモノマーの反応性の低さが挙げられる。一般的に、有機リン化合物のリン原子は酸化数が大きくなるほど求電子性が低下することが知られているが、これまでに汎用されているジメチルアミノホスホクロリデートモノマーのリン原子の酸化数は+5 であり、反応性が低い<sup>29</sup>。そこで本研究では、リン原子の酸化数が+3 である *H*-ホスホネート誘導体に着目した。モルフォリノヌクレオシドの *H*-ホスホネート誘導体は、官能基化する場所に応じて、2 種類存在する (Scheme 8)。1 つ目が、モルフォリノヌクレオシドのアミノ基をホスホニル化して得られる *H*-ホスホンアミデート誘導体である。2 つ目は、モルフォリノヌクレオシドの 5'-水酸基をホスホニル化して得られる *H*-ホスホネートモノエステルであり、これは Sinha らが用いたモノマーである<sup>34</sup> (序論/第四節参照)。

それぞれの、誘導体をモノマーとして用いた際の合成戦略を次に示す (Scheme 8)。*H*-ホスホンアミデート誘導体を用いる合成ルート(A)では、縮合相手はモルフォリノヌクレオシドの 5'-水酸基となる。DNA 合成の知見より、*H*-ホスホネートモノエステルと水酸基との縮合反応の場合、縮合剤を用いて直接的に縮合することが可能である。この知見を踏まえると、*H*-ホスホンアミデート誘導体とモルフォリノヌクレオシドの 5'-水酸基との直接的な縮合反応も問題なく進行することが予想される。ルート(A)で合成を達成した場合、二つの化合物を直接的に縮合することができるため、Sinha らが報告した活性エステルを経由する合成法と比較し、効率的でありかつ操作の煩雑さを回避することになる。

一方、*H*-ホスホネートモノエステルを用いる合成ルート(B)は、Stawinski らが詳細に検討した系と類似している。序論で述べた通り、*H*-ホスホネートモノエステルとアミノ基の縮合反応は、アミノ基の立体障害が大きい場合のみ直接的に行うことが可能で、モルフォリノヌクレオシドのアミノ基の立体障害は大きくはないと予想されるため、これまでは活性エステルを経由する方法が採用されていた (序論/第四節参照)。しかし、筆者は、縮合剤を変更することで、*H*-ホスホネートモノエステルとアミノ基を直接的に縮合することができると考えた。Wada ら

はこれまでに、ホスホン酸やホスフィン酸誘導体を効率的に活性化可能な様々な縮合剤を開発してきた。この知見を最大限に活かし、*H*-ホスホネートモノエステルとモルフォリノヌクレオシドのアミノ基を直接的に縮合させるための適切な縮合剤を見つけることを目指した。本論/第一章/第二節で *H*-ホスホンアミデート誘導体を用いる合成ルート(A)の検討結果を示し、本論/第一章/第三節で *H*-ホスホネートモノエステルを用いる合成ルート(B)の検討結果を示す。

### Scheme 8 *H*-ホスホネート誘導体を用いた PMO 合成ルート

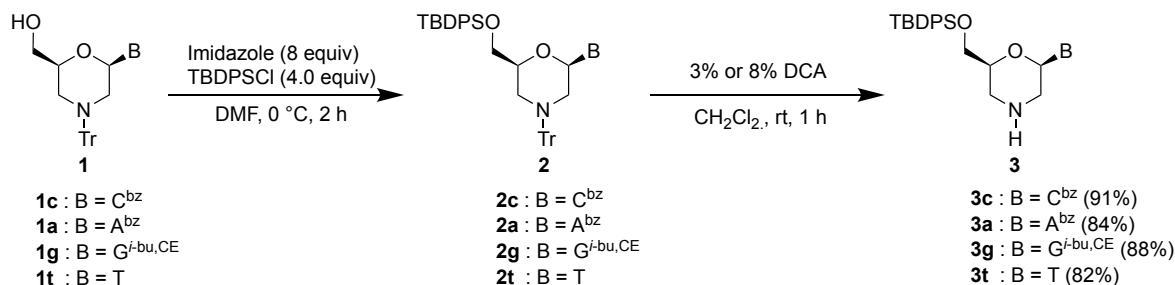


## 第二節 *H*-ホスホンアミデートモノマーを用いた合成検討

### 1. 5'-*O*-TBDPS モルフォリノヌクレオシドの合成

Scheme 9 に示す方法で、5'-*O*-TBDPS モルフォリノヌクレオシド **3c,a,g,t** の合成を行った。2 工程で 82%–91% と良好な単離収率で得た。

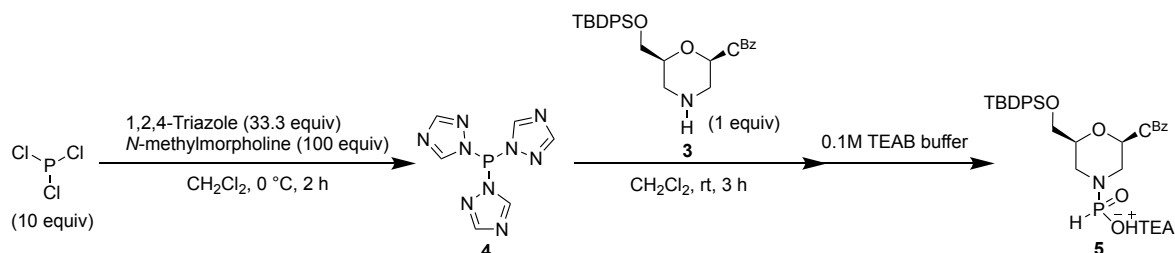
#### Scheme 9



### 2. 新規 *H*-ホスホンアミデートモノマーの合成

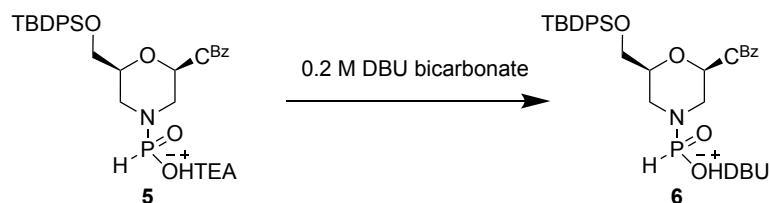
既存の合成法を参考にし、三塩化リンから誘導されるトリストリアゾリド誘導体 **4** を用いて、化合物 **3** のアミノ基のホスホニル化を試みた(Scheme 10)<sup>34</sup>。

### Scheme 10



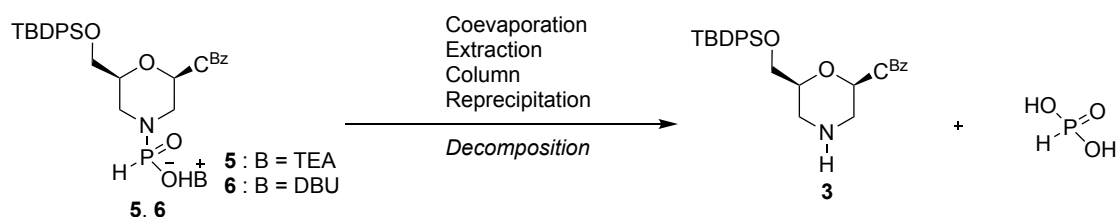
TLC による反応追跡の結果、室温 3 時間後に反応の完結を確認した。しかし、トリエチルアンモニウム塩である化合物 **5** は不安定であり、抽出操作、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、再沈殿操作時に加水分解し、化合物 **3** が脱離することが明らかとなった。そこで、より安定な DBU 塩に変換することで、分解の抑制を試みた (Scheme 11)。

### Scheme 11



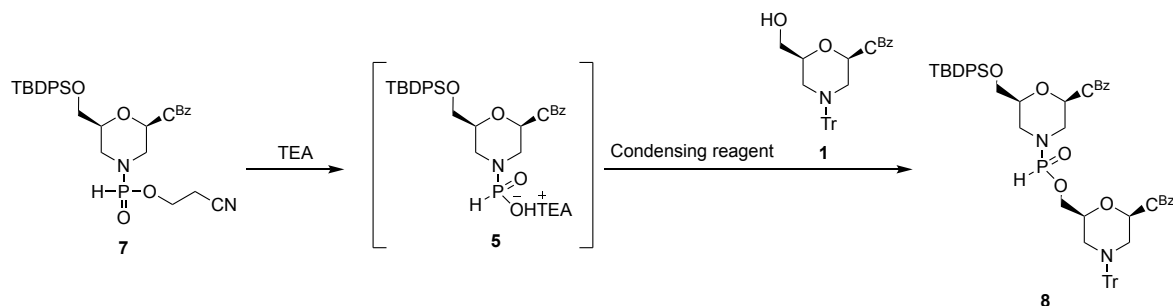
しかし、化合物 **6** も同様に、抽出操作、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、再沈殿操作時に加水分解した (Scheme 12)。

### Scheme 12



そこで、合成戦略を一部変更した。化合物 **5,6** が不安定なのは、ホスホン酸が解離していることが原因であると考えられる。一方で、解離のない化合物 **7** の状態であれば、安定性が向上し、抽出による精製が可能であると考えられる。そこで、化合物 **7** をモノマー前駆体として合成、単離した後、化合物 **5** への変換と縮合を 1 ポットで行う経路を検討した (Scheme 13)。

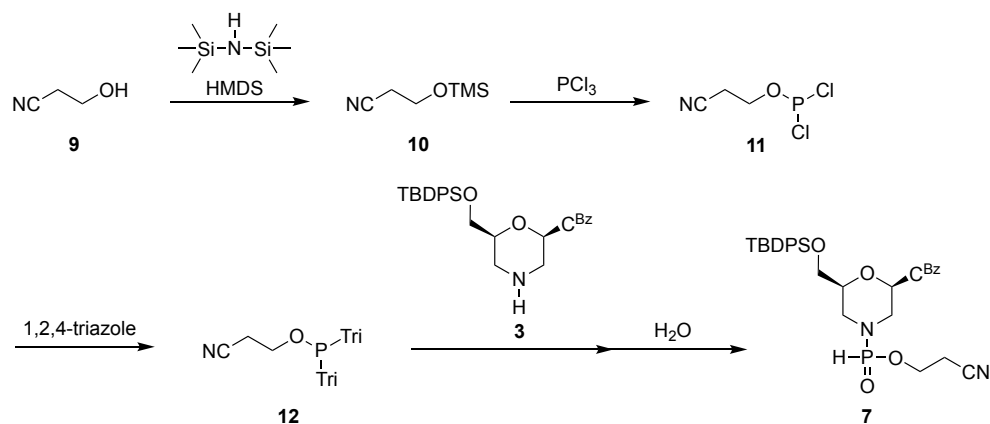
### Scheme 13 脱保護と縮合反応を1ポットで行う合成戦略



### 3. モノマー前駆体（化合物 7）の合成

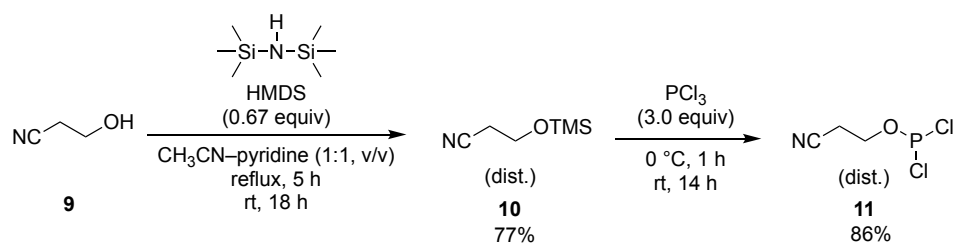
モノマー前駆体となる化合物 7 を抽出操作による粗精製のみで単離する経路を Scheme 14 のように立案した。シアノエタノール 9 をヘキサメチルジシロキサン (HMDS) で TMS 化した後、 $\text{PCl}_3$  と反応させ、ジクロリダイト誘導体 11 を得る。その後、トリアゾリド誘導体 12 へと変換し、化合物 3 のホスフィチル化と加水分解を経て目的物 7 を得る経路を立案した。

### Scheme 14 化合物 7 の合成経路



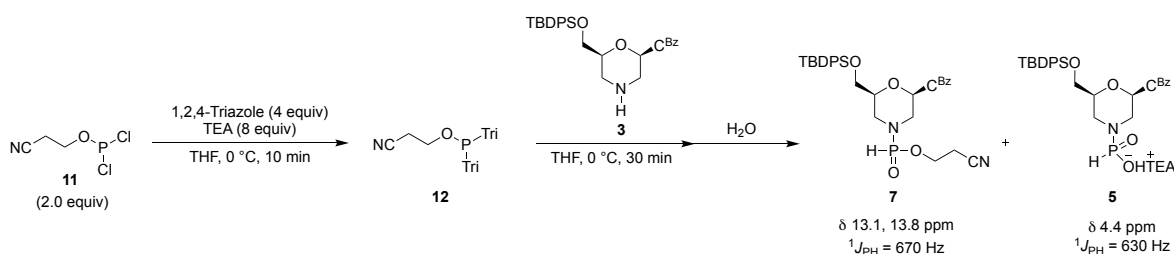
初めに、下記に示す手順で、化合物 10 及び 11 を合成し、減圧蒸留により目的物を得た。

### Scheme 15



次に、得られた化合物 **11** を用いて、化合物 **3** のアミノ基のホスフィチル化を行った (Scheme 16)。まず、化合物 **11** を氷浴下 THF 中、トリアゾールと反応させることで、化合物 **12** へと誘導した。反応溶液に化合物 **3** を加え P-N 結合を形成した後に、加水分解することで、化合物 **7** への変換を試みた。TLC による反応追跡の結果、化合物 **7** へと定量的に変換されていることを確認した。しかし、抽出操作後に、化合物 **7** のシアノエチル基が脱離した化合物 **5** が観測された。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を試みたが、化合物 **7** が一部分解したため、化合物 **7** の単離は断念した。

#### Scheme 16

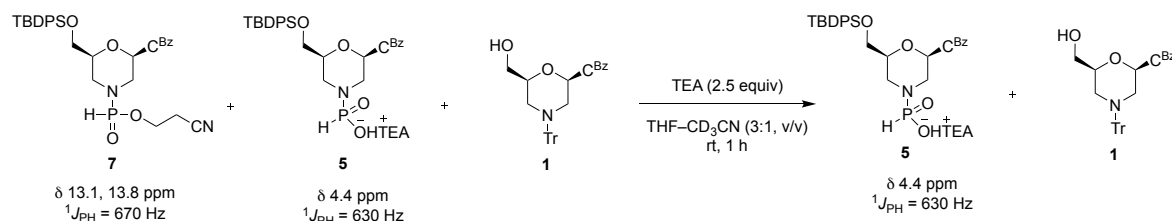


化合物 **7** を単離することはできなかったが、本合成戦略では、化合物 **7** を系中で化合物 **5** へと変換しつつ縮合反応を行うため、化合物 **7** ( $^{31}\text{P}$  NMR : 13.1, 13.8 ppm) と化合物 **5** ( $^{31}\text{P}$  NMR : 4.4 ppm) の混合物 (存在比, 化合物 **7** : 化合物 **5** = 91:9) を用いて、縮合反応の検討を行うこととした。

#### 4. モノマー前駆体活性化条件の検討

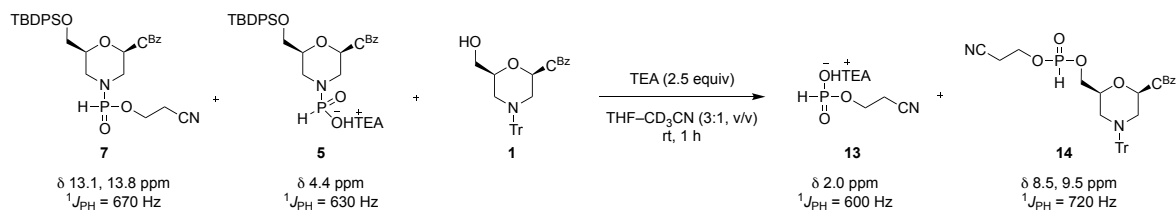
前項で化合物 **7** と化合物 **5** の混合物を得た。この混合物に対して、TEA を加え、化合物 **7** のシアノエチル基を除去することで、化合物 **5** への変換を試みた。化合物 **7** および **5** の混合物に対して遊離の水酸基を有する化合物 **1** と TEA を加え、 $^{31}\text{P}$  NMR を測定した。望みの反応が進行した場合、化合物 **7** ( $^{31}\text{P}$  NMR : 13.1, 13.8 ppm) 由来のシグナルが消失し、化合物 **5** ( $^{31}\text{P}$  NMR : 4.4 ppm) 由来のシグナルに収束すると考えられる (Scheme 17)。

#### Scheme 17 TEA によるシアノエチル基の除去検討 (期待する反応)



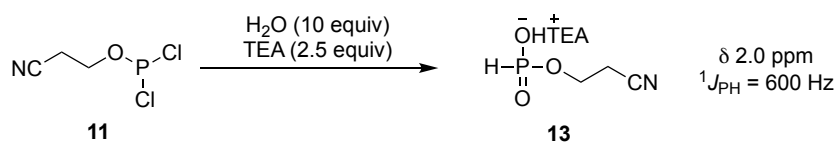
しかし、 $^{31}\text{P}$  NMR による反応追跡の結果、目的の反応は進行しておらず、化合物 **13** および **14** と思われるシグナルが観測された (Scheme 18)。

### Scheme 18 実際に起きた反応



なお、副生成物 **13** の同定は、Scheme 19 に示すルートで化合物 **13** を合成し、 $^{31}\text{P}$  NMR を比較することで行った。化合物 **11** を加水分解し、 $^{31}\text{P}$  NMR を測定したところ、ケミカルシフトと  $^1J_{\text{PH}}$  の値が一致した ( $^{31}\text{P}$  NMR: 2.0 ppm、 $^1J_{\text{PH}}=600$  Hz)。

### Scheme 19 化合物 13 の合成

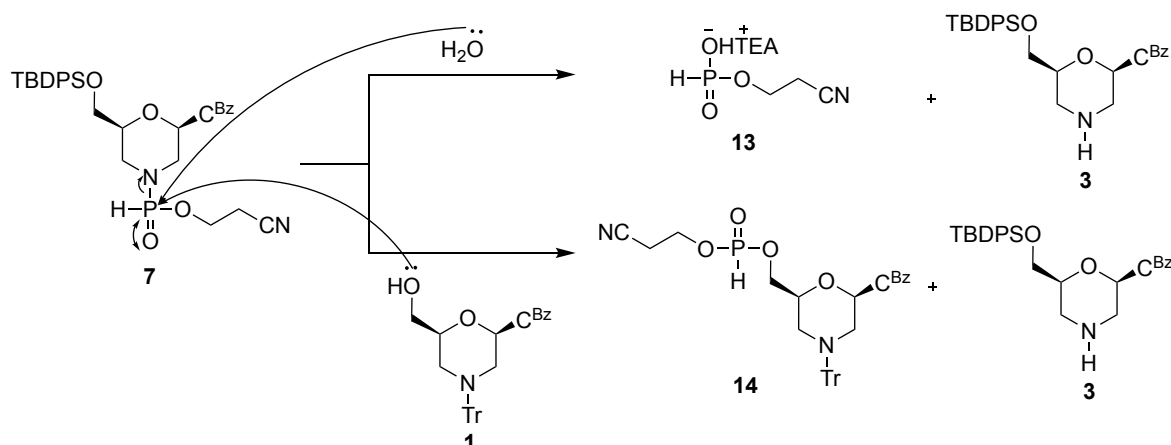


Scheme 18 で確認された化合物 **13** や **14** の生成機構は以下の通りであると考えられる。

#### [想定される反応機構]

はじめに、共沸操作によって除去しきれなかった  $\text{H}_2\text{O}$  が化合物 **7** のリン原子を求核攻撃し、モルフォリノヌクレオシドが脱離して、化合物 **13** が生成する。次に、 $\text{H}_2\text{O}$  が消費された後は、化合物 **1** の水酸基が同様に化合物 **7** のリン原子を求核攻撃し、化合物 **14** が生成したと考えられる (Scheme 20)。

**Scheme 20** 副反応として推定される機構

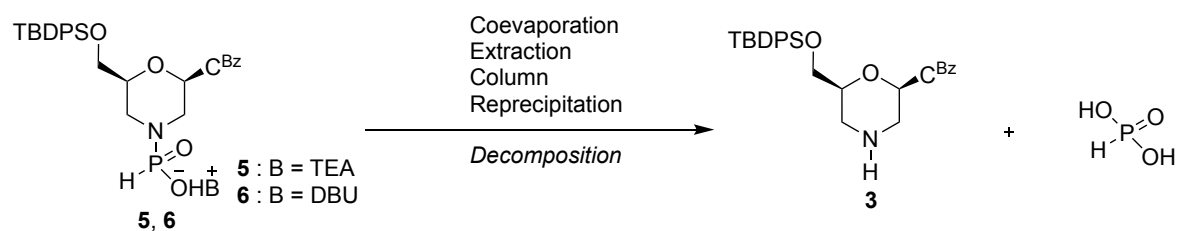


以上より、モノマー前駆体（化合物 **7**）の TEA による脱シアノエチル化反応が進行するよりも先に、*H*-ホスホンアミデートの加水分解、ホスホンアミドエステル交換反応が起こることが分かった。

**第二節の小括**

1. *H*-ホスホンアミデートモノマー **5** および **6** は極めて不安定な化合物であり、共沸、抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、及び再沈殿操作で分解が起こる（Scheme 21）。

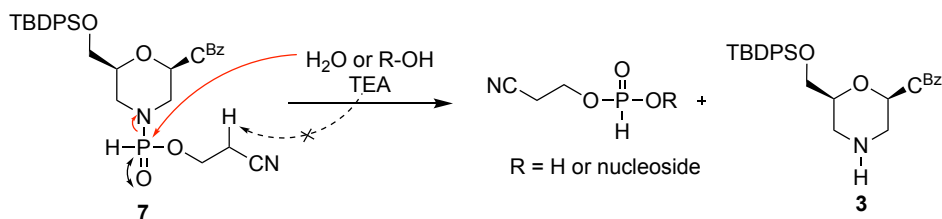
**Scheme 21**



2. モノマー前駆体（化合物 **7**）は塩基と H<sub>2</sub>O 存在下で、シアノエチル基の脱離より、加水分解反応が優先的に起こり、モルフォリノヌクレオシドが脱離する。また、アルコールが共存する場合も同様にリン原子上への求核攻撃が優先的に起こる (Scheme 22)。



Scheme 22



このように *H*-ホスホンアミデートが化学的に不安定である要因の一つは、核酸塩基部の電子求引効果によって、モルフォリノヌクレオシドの窒素原子の電子密度が低下しており、アミドイオンとして脱離しやすいことが挙げられる。以上の結果より、モルフォリノ窒素原子をホスホニル化した *H*-ホスホンアミデートをモノマーとする合成経路は困難であると判断した。

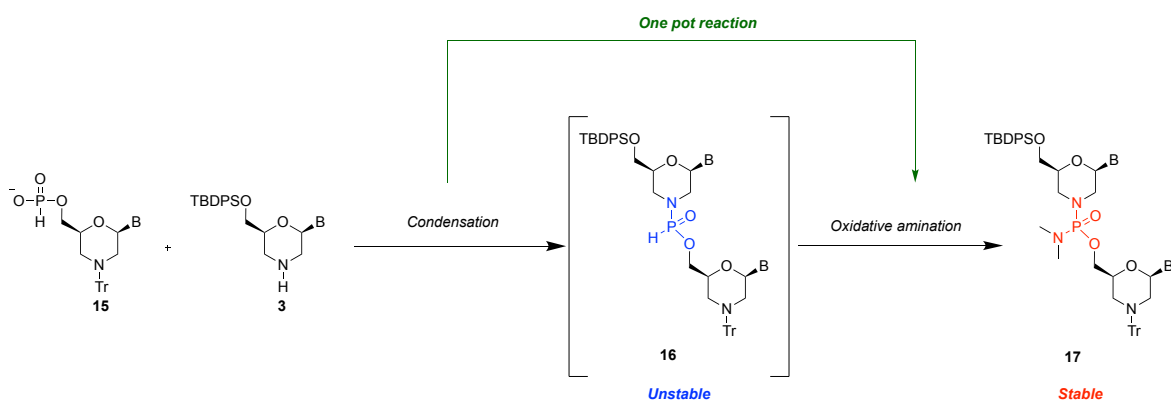
### 第三節 5'-*H*-ホスホネートモノエステルを用いた合成検討

本論/第一章/第一節で述べたように、2種類の合成ルートを計画したが、*H*-ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いる合成経路(A)を用いることは困難であると判断した。そこで、*H*-ホスホネートモノエステルを用いる合成経路(B)の検討を行うことにした。

#### 1. 合成戦略

第二節より、モルフォリノヌクレオシドは脱離能が高く、*H*-ホスホンアミデート結合は不安定であることが明らかとなった。そのため、縮合後の *H*-ホスホンアミデートの状態では、抽出操作を行うと、加水分解される可能性が高い。一方で、ホスホロジアミデート結合は非常に安定であることが知られている。そこで、本研究では縮合と酸化的アミノ化反応をワンポットで行い、安定なホスホロジアミデート結合に変換した後に、抽出・精製操作を行う方針を立てた。

Scheme 23 縮合・酸化的アミノ化ワンポット反応



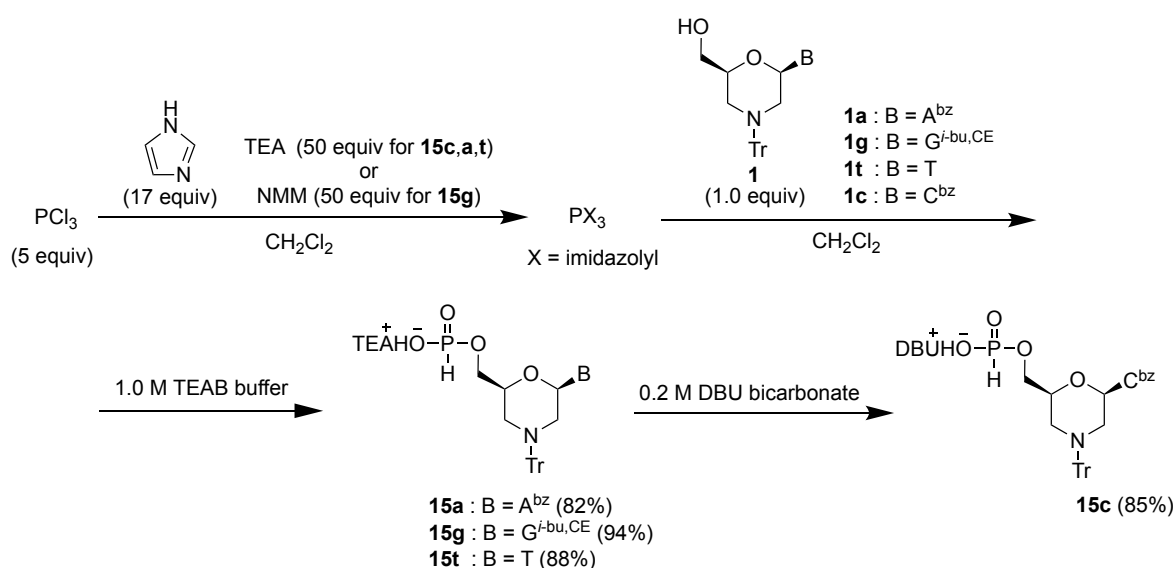
この合成ルートを実現するにあたり、検討すべき点は以下の2点である。

1. アミノ基と *H*-ホスホネートモノマーを直接的に縮合可能な縮合剤の探索
2. 過剰の縮合剤や縮合剤の残渣が共存する状態での酸化的アミノ化反応の検討

## 2. 5'-*H*-ホスホネートモノマーの合成

三塩化リンから誘導されるトリスイミダゾリルホスフィンを用いて、化合物 **1a,g,t,c** の 5'-水酸基のホスホニル化を行い、トリエチルアンモニウム塩又は DBU 塩として、化合物 **15a,g,t,c** を得た。82–94% と良好な単離収率で目的物を得た<sup>34</sup>。

Scheme 24



## 3. 縮合剤の検討

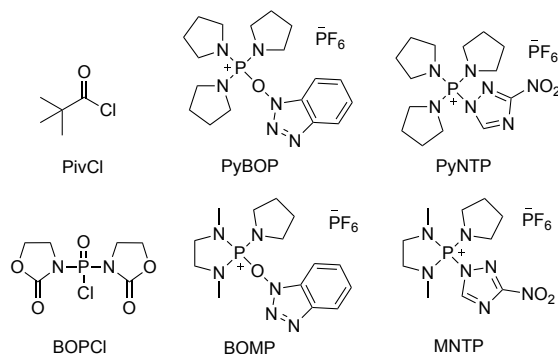
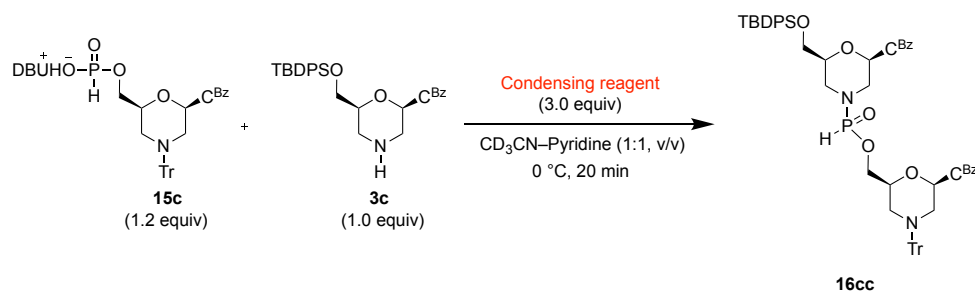
本合成戦略の最大の焦点である、モルフォリノ基と *H*-ホスホネートモノエステルを直接的に縮合することができる縮合剤の探索を行った。これまでに *H*-ホスホネートモノエステルの活性化に使用された縮合剤を用いて検討した。*H*-ホスホネートモノマー **15c** (1.2 当量) と化合物 **3c** を、 $\text{CH}_3\text{CN}$ -pyridine (1 : 1, v/v) 混合溶媒中、縮合剤を 3 当量用いて 0 °C で反応を行った。縮合反応開始から 20 分後の <sup>31</sup>P NMR を測定した。結果を Table1 に示す。

[縮合効率の算出方法]

(目的物のシグナルの積分値の合計) / { (縮合剤と縮合剤の残渣を除いたシグナルの積分値の合計) / 1.2\*}

\* *H*-ホスホネートモノマーを 1.2 当量使用しているため、1.2 で除している。

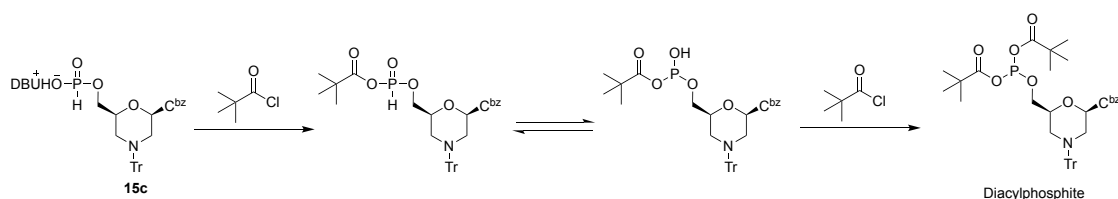
Table 1 縮合剤の検討



Entry	Condensing reagent	NMR yield (%)
1	PivCl	0
2	BOPCl	98
3	PyBOP	67
4	BOMP	98
5	PyNTP	98
6	MNTP	90

初めに、*H*-ホスホネート法で汎用されている縮合剤である PivCl を用いた。しかし、目的とする縮合反応は進行せず、ホスファイト領域 (124.2 ppm) にシグナルが観測された (entry 1)。これは、モノマーがオーバーアクティベーションされたことで生成したジアシルホスファイトであると推測している (Scheme 25)。化合物 **3** のアミノ基はリン原子を求核攻撃せず、カルボニル炭素を求核攻撃したと考えられ、Stawinski らの報告と合致する (序論/第四節参照)。

#### Scheme 25 オーバーアクティベーションによるジアシルホスファイトの生成



次に、こちらも *H*-ホスホネート法で汎用されている縮合剤である bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride (BOPCl) を用いた (entry 2)。縮合後 20 分の  $^{31}\text{P}$

NMR より、目的とする縮合反応が定量的に進行していることを確認した (Figure 6)。

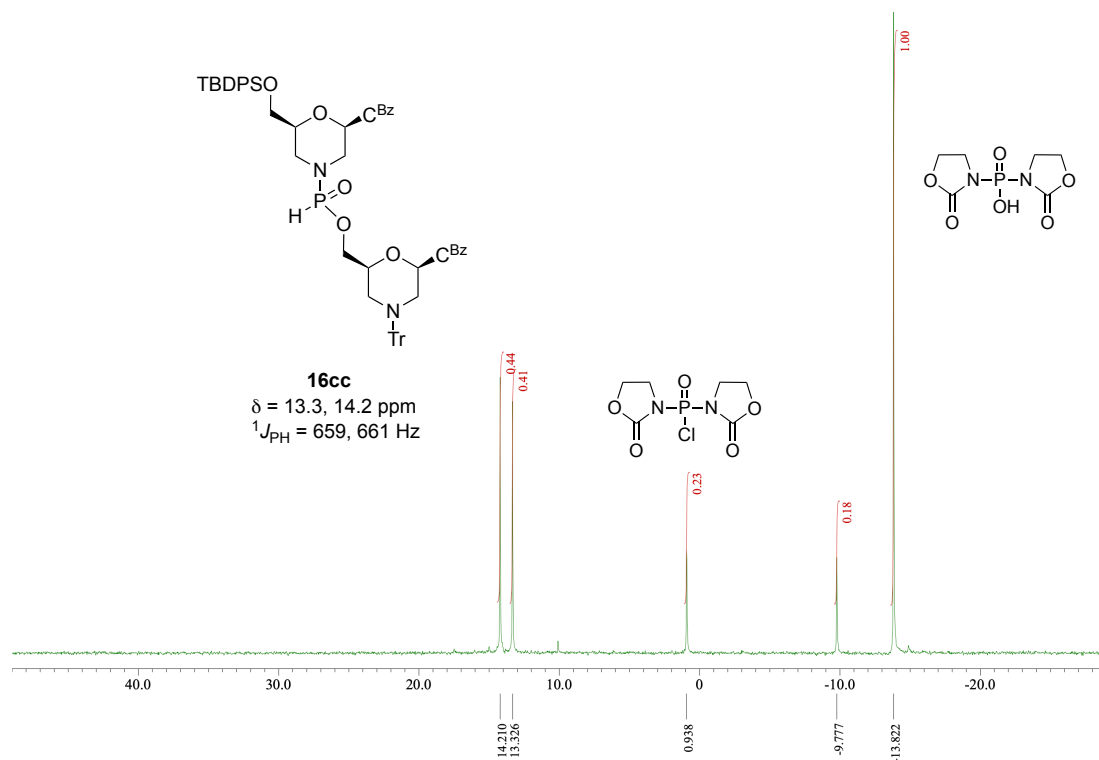


Figure 6 縮合後 20 分の  $^{31}\text{P}$  NMR

次に、ホスホニウム型縮合剤の検討を行った (entries 3–6)。benzotriazol-1-yloxy-tris(pyrrolidin-1-yl) phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) を用いた場合、20 分では、未反応の **15c** に由来するシグナルが観測され、縮合反応が完結しない結果となった (entry 3)。ジアザホスホリジニウム骨格を有し、PyBOP より反応性の高い、2-(benzotriazol-1-yloxy)-1,3-dimethyl-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate (BOMP)<sup>28</sup> を用いたところ、20 分以内に縮合反応は完結した (entry 4)。3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl) phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP)<sup>47</sup> を用いた場合も、20 分以内に縮合反応は完結した (entry 5)。しかし、1,3-dimethyl-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)-2-pyrrolidin-1-yl-1,3,2-diazaphospholidinium hexafluorophosphate (MNTP)<sup>47</sup> を用いた場合、18-20 ppm に複数のシグナルが観測され、副反応生成物が増加した (entry 6)。

Wada らの検討により得られた知見より、*H*-ホスホネート法における縮合剤の反応性の序列は MNTP > PyNTP > PyBOP かつ BOMP > PyBOP であることが明らかとなっている<sup>28,47</sup>。これらの縮合剤の反応性の違いは、縮合剤の骨格と脱離基によって決まる。

[骨格による反応性の違い]

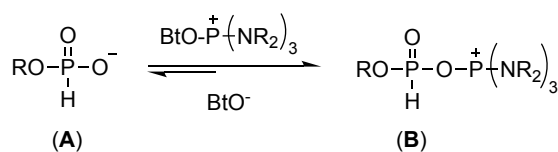
MNTP と BOMP は、リン原子に結合している 3 つのアミノ基のうち、2 つが同一環内に組み込まれることで、リン原子周りの立体障害が低下していることに加え、環歪みにより反応性が向上している。そのため、PyNTP や PyBOP と比較し、ホスホニウム中心への求核攻撃が起こりやすく、高い反応性を示す。

[脱離基による反応性の違い]

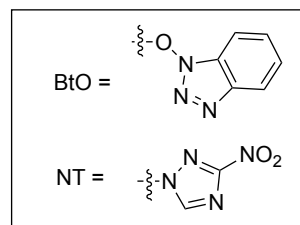
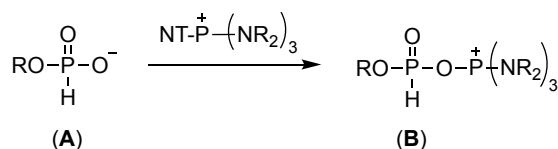
BOMP と PyBOP の脱離基は HOBt である。Wada らによって、HOBt を脱離基する縮合剤に関して、詳細な検討がなされている<sup>28</sup>。H-ホスホネートモノエステル (A) と HOBt を脱離基として有するホスホニウム型縮合剤を反応させると、活性中間体 (B) が生じる (Scheme 26)。しかし、この反応系中に、HOBt を過剰量添加すると、H-ホスホネートモノエステル (A) が観測される。これより、この反応は平衡反応になっており、BtO<sup>-</sup> は活性中間体 (B) のホスホニウム中心を攻撃することがわかる。つまり、BOMP と PyBOP の脱離基である BtO<sup>-</sup> は求核触媒としては働かない。また、トリスピロリジノホスホニウム型縮合剤の反応性は、脱離基の脱離能で決まることが明らかとなっている。すなわち、(A)→(B) が律速段階である。脱離能の序列はニトロトリアゾリドアニオン (NT<sup>-</sup>) > BtO<sup>-</sup> となるため NT を脱離基として有する PyNTP と MNTP の方が、PyBOP や BOMP と比較して反応性が高い。

Scheme 26 脱離基の違い

BOMP, PyBOP



MNTP, PyNTP



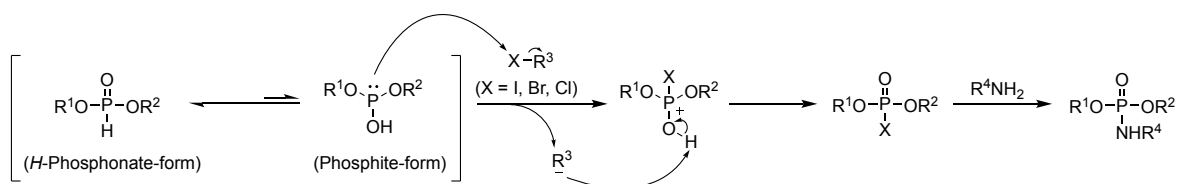
これらの知見と今回得られた実験結果はほぼ一致しており、最も反応性の低い PyBOP を用いた際には、縮合反応は完結せず、より反応性の高い BOMP や PyNTP を用いることで効率的に反応が進行した。一方で、最も活性の高い MNTP を用いると、活性の高さに起因して新しい副反応が起きたと考えられる。以上の検討よ

り、*H*-ホスホネートジエステルとモルフォリノヌクレオシドのアミノ基を直接縮合することに成功した。縮合剤としては、BOPCl、及びホスホニウム型縮合剤である BOMP、PyNTP が適していることが示唆された。

#### 4. 酸化的アミノ化条件の検討

縮合反応の条件を最適化することができたので、続く酸化的アミノ化反応の検討を行った。酸化的アミノ化の反応機構を Scheme 27 に示す<sup>21, 48, 49</sup>。*H*-ホスホネートジエステルには *H*-ホスホネート型とホスファイト型の互変異性体があり、一般的に強い塩基を用いるほど、ホスファイト型に大きく平衡が傾く性質を有している。酸化的アミノ化反応は、ホスファイト型のリン原子の非共有電子対がハロゲン化剤と反応することでハロゲン化ホスホリル中間体を形成し、この中間体に対してジメチルアミンが求核攻撃することで、アミデート体へと変換される機構となっている。

Scheme 27

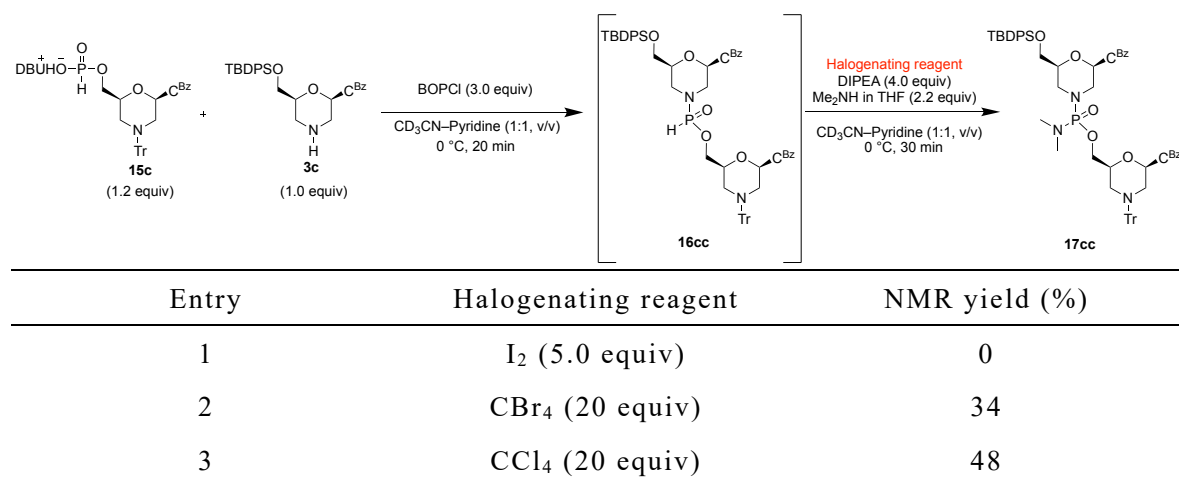


前述したように、縮合反応と酸化的アミノ化反応をワンポットで行う合成戦略としたため、本検討では、全て縮合反応開始後 20 分の反応溶液に対して、酸化的アミノ化に必要な試薬を加えて検討を行った。

##### A) ハロゲン化剤の検討

初めに、ハロゲン化試薬の最適化を行った。縮合反応に用いる縮合剤は BOPCl に統一し、ハロゲン化試薬として I<sub>2</sub>, CBr<sub>4</sub>, CCl<sub>4</sub> の 3 つを検討した。また、ホスファイト型への互変異性化を促進させることを目的として DIPEA を加えた。反応温度は縮合と同様に 0 °C とした。酸化的アミノ化反応開始後 30 分で反応溶液の <sup>31</sup>P NMR 測定を行い、変換率を算出した（算出方法はこれまでと同様）。結果を Table 2 に示す。

**Table 2** ハロゲン化試薬の検討

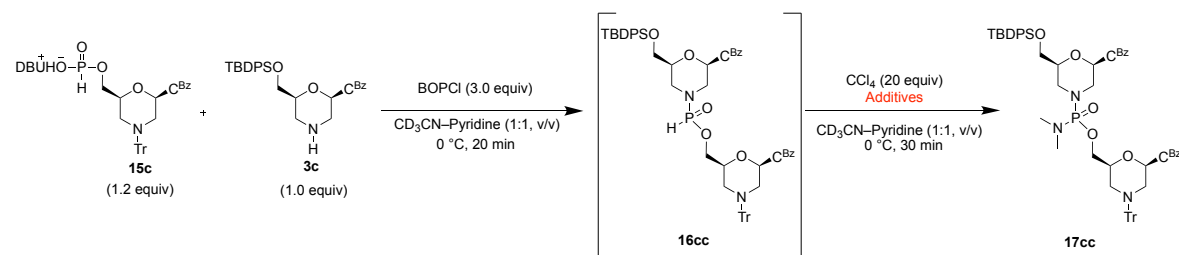


ハロゲン化剤としてヨウ素を用いた entry 1 では、目的物由来のシグナルが全く観測されなかった。一方、ハロゲン化剤として CBr<sub>4</sub>、CCl<sub>4</sub> を用いた場合、目的物への変換が確認された (<sup>31</sup>P NMR: 16.7, 16.9 ppm)。変換率の序列は CCl<sub>4</sub>>CBr<sub>4</sub>>>I<sub>2</sub> であった。一般的にリン原子はソフトな求核種であるため、ハロゲン化剤の中で、最もソフトな求電子剤である I<sub>2</sub> が良い結果を示すと推測されたが、予期に反する結果となった。ハロゲン化された中間体の安定性が酸化的アミノ化反応には重要であり、ヨウ化ホスホリル中間体は反応性が高く副反応が優先した可能性が考えられる。CCl<sub>4</sub> を最適ハロゲン化剤として、これ以降の検討に用いた。

## B) DIPEA 添加の検討

A) では、*H*-ホスホネート誘導体の互変異性をホスファイト型に傾けることを目的として、DIPEA を加えていた。一方、ジメチルアミンも塩基性を有しているため、DIPEA を添加しなくても、反応が効率的に進行する可能性がある。そこで、DIPEA の添加が反応に与える影響について調べた。結果を Table 3 に示す。

**Table 3** DIPEA の有無による影響



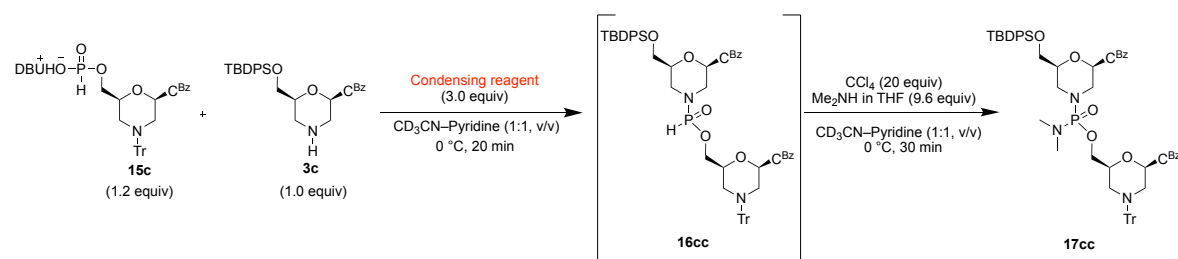
Entry	Additives	NMR yield (%)
1	Me <sub>2</sub> NH in THF (2.2 equiv) DIPEA (4.0 equiv)	48
2	Me <sub>2</sub> NH in THF (9.6 equiv)	47

Entry 2 では、DIPEA を用いない代わりに、ジメチルアミンを過剰に用いたところ、DIPEA を用いた場合と同様の結果が得られた。これより、DIPEA の添加が反応に与える影響は少ないと考えられる。また、entry 2 の方が用いる試薬の種類が少なく、今後の検討が行いやすくなると判断し、これ以降は entry 2 の条件を採用した。

### C) 縮合剤の検討

一連の検討では、縮合反応と酸化的アミノ化反応をワンポットで行うため、過剰の縮合剤や縮合剤の残渣が、酸化的アミノ化条件で副反応を起こす可能性が考えられる。実際に、BOPCl を用いた Table 2,3 の検討では多くの副反応が観測された。そこで、縮合剤と縮合剤の残渣が酸化的アミノ化反応に与える影響を調べた。酸化的アミノ化反応条件を統一し、BOPCl とホスホニウム型縮合剤の一つである PyNTP の二つで比較した。結果を Table 4 に示す。

Table 4 縮合剤の検討



Entry	Condensing reagent	NMR yield (%)
1	BOPCl	47
2	PyNTP	91



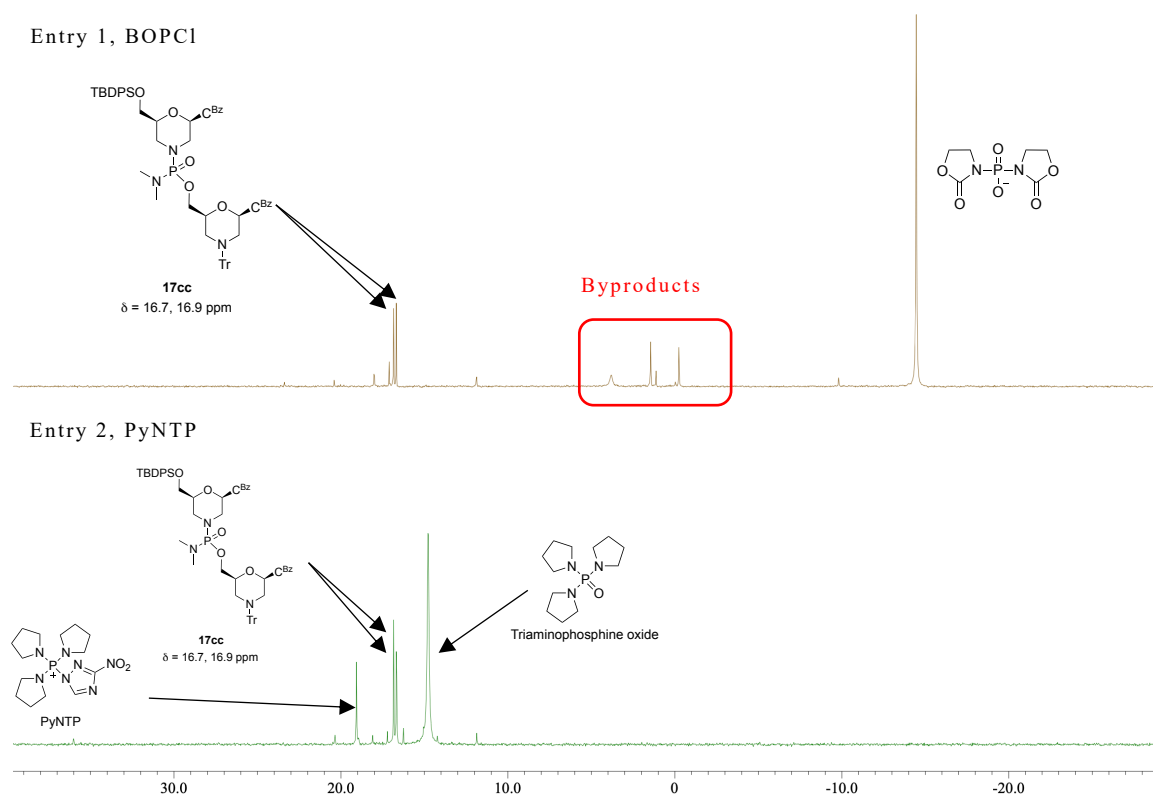
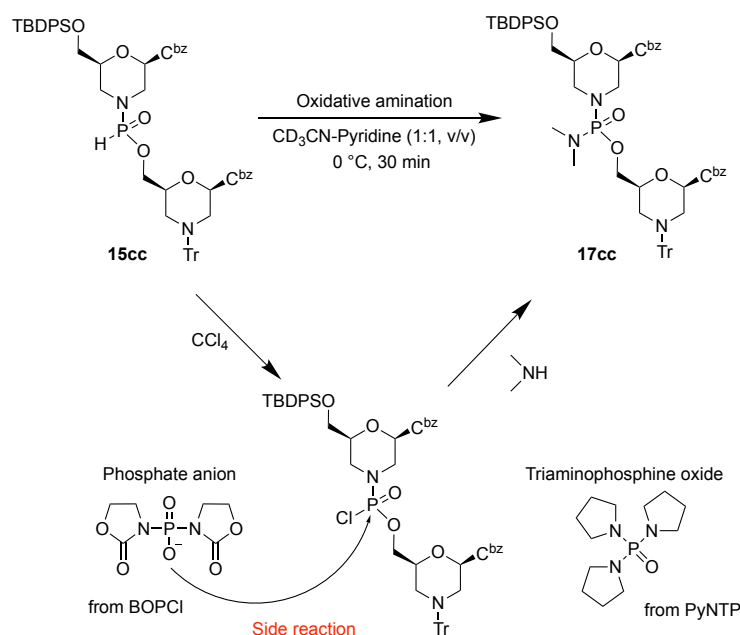


Figure 7 酸化的アミノ化後の  $^{31}\text{P}$  NMR (上 : BOPCl, 下 : PyNTP)

BOPCl を用いた entry 1 では  $^{31}\text{P}$  NMR で 0 ppm 付近に副生成物由来と思われるシグナルが観測された (Figure 7 上段)。一方、PyNTP を用いると、そのようなシグナルは観測されず、明らかに副反応が抑えられた (Figure 7 下段)。この結果より、BOPCl の残渣が副反応を起こしている可能性が示唆された。BOPCl の残渣は、求核性を有するリンオキシアニオンであり、これが塩化ホスホリル中間体と副反応を起こしたと考えられる。一方、ホスホニウム型縮合剤の場合、縮合剤の残渣は安定なトリアミノホスフィンオキシドであるため、副反応を起こさなかったと考察している (Scheme 28)。これらの結果より、本反応における最適な縮合剤はホスホニウム型縮合剤であると考えられる。また、縮合剤として BOPCl を用いた際に生じる副生成物の構造は同定されていないため、副反応の解明にはさらなる検討が必要である。

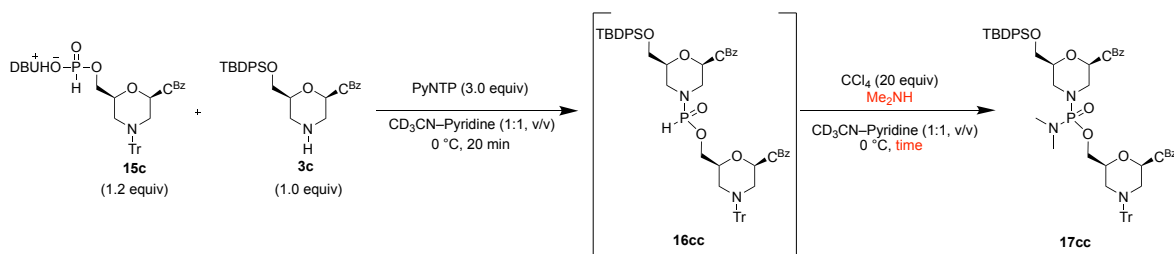
## Scheme 28 縮合剤の残渣による副反応



## D) ジメチルアミン溶液と反応時間の検討

酸化的アミノ化の工程に関して、用いるジメチルアミン溶液と反応時間の検討を行った。縮合剤は PyNTP を用いた。結果を Table 5 に示す。

Table 5 ジメチルアミン溶液の検討



Entry	$\text{Me}_2\text{NH}$	Time (min)	NMR yield (%)
1	$\text{Me}_2\text{NH}$ in THF (9.6 equiv)	30	91
2	$\text{Me}_2\text{NH}$ in $\text{H}_2\text{O}$ (9.6 equiv)	30	98
3	$\text{Me}_2\text{NH}$ in $\text{H}_2\text{O}$ (38 equiv)	30	98
4	$\text{Me}_2\text{NH}$ in $\text{H}_2\text{O}$ (38 equiv)	1	>99

初めに、ジメチルアミンの試薬として、2 M の THF 溶液を 9.6 当量用いた。30 分後の  $^{31}\text{P}$  NMR では、化合物 **16cc** は消失していたが、少量の副生成物が確認された (entry 1)。本来、*H*-ホスホネート誘導体に対する酸化的アミノ化反応では、アミンの水溶液が用いられる<sup>48,49</sup>。そこで、本検討においても同様に、ジメチルアミン水溶液を用いることとした。ジメチルアミンの 9.5 M in  $\text{H}_2\text{O}$  溶液を用いた

ところ、副反応が抑制され、変換率が向上した (entry 2)。ジメチルアミンの水溶液を用いることで、化合物 **16cc** の *H*-ホスホンアミデート結合が加水分解される危険性を考えていたが、目的とする酸化的アミノ化反応のみが進行した。これは、化合物 **16cc** の塩素化反応が、加水分解反応よりも優先的に進行し、クロリデート中間体を形成し、さらに、水よりも求核性の高いジメチルアミンが優先的に、クロリデート中間体と反応したためであると考えられる。

これまで、酸化的アミノ化の反応時間を 30 分に固定していたが、反応時間を 1 分まで短縮したところ、目的物のみが定量的に得られた (entry 4)。これまで、2%ほど副生成物が確認されていたが、これは核酸塩基部の保護基であるベンゾイル基が、過剰のジメチルアミンによって除去されたことで生成していたものであると考えられる。これらの結果より、縮合・酸化的アミノ化反応の最適条件を確立した (Table 5, entry 4)。

#### E) 4 種塩基への応用

最適化した縮合・酸化的アミノ化ワンポット反応条件 (Table 5, entry 4) を用いて、4 種類全ての核酸塩基部を有する誘導体において検討を行った (Table 6)。いずれの核酸塩基を有する誘導体においても、縮合・酸化的アミノ化反応が定量的に進行することが明らかとなった。縮合・酸化的アミノ化反応後の  $^{31}\text{P}$  NMR と  $^1\text{H}$  NMR を Figure 8、9 に示す。一方で、2 量体の単離を試みたが、縮合剤の残渣であるトリアミノホスフィンオキシドとの分離が困難であった。2 量体の保護基の除去を行うことでトリアミノホスフィンオキシドとの疎水性に差が生じ、分離が容易になると考え、粗精製物のまま次の反応に用いることとした。

Table 6 4 種塩基への応用

Entry	B	Product	NMR yields (%)
1	C <sup>bz</sup>	C <sub>PN</sub> C ( <b>17cc</b> )	>99
2	A <sup>bz</sup>	A <sub>PN</sub> A ( <b>17aa</b> )	>99
3	G <sup><i>i</i>-bu, CE</sup>	G <sub>PN</sub> G ( <b>17gg</b> )	>99
4	T	T <sub>PN</sub> T ( <b>17tt</b> )	>99

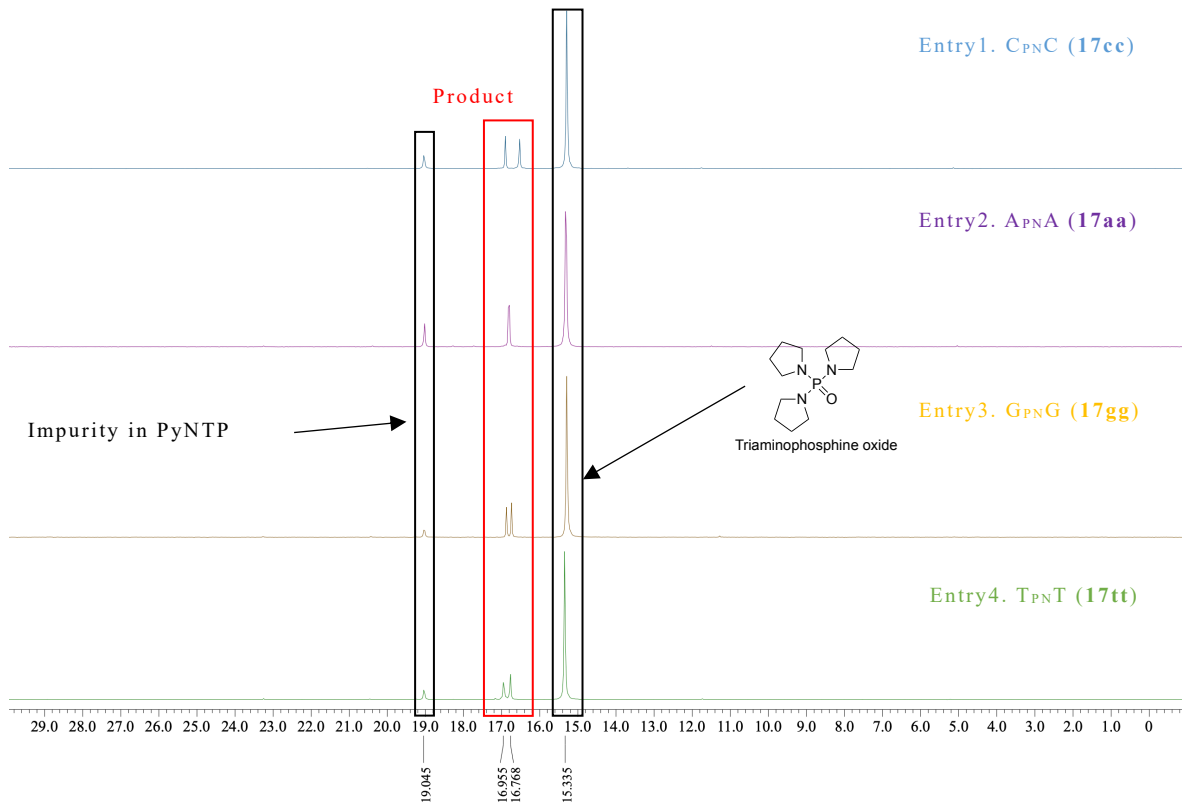


Figure 8 縮合・酸化的アミノ化 1 ポット反応後の  $^{31}\text{P}$  NMR

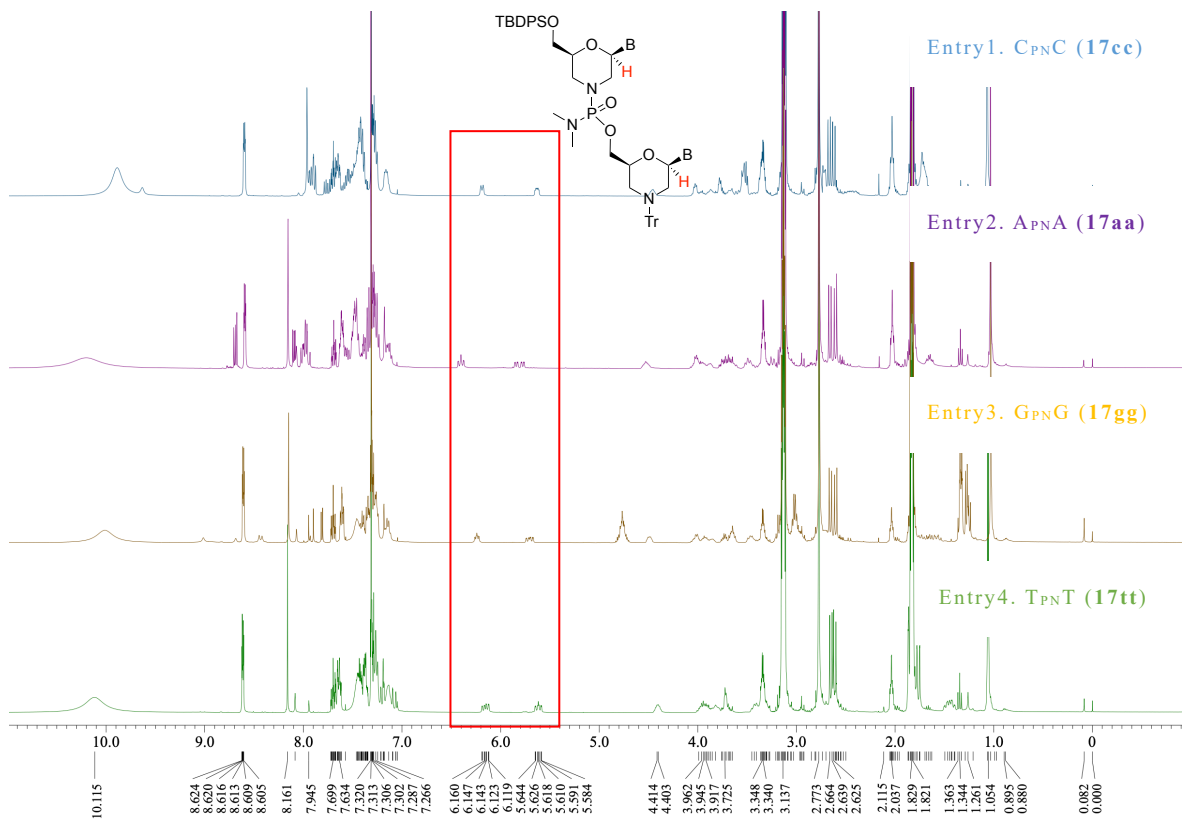
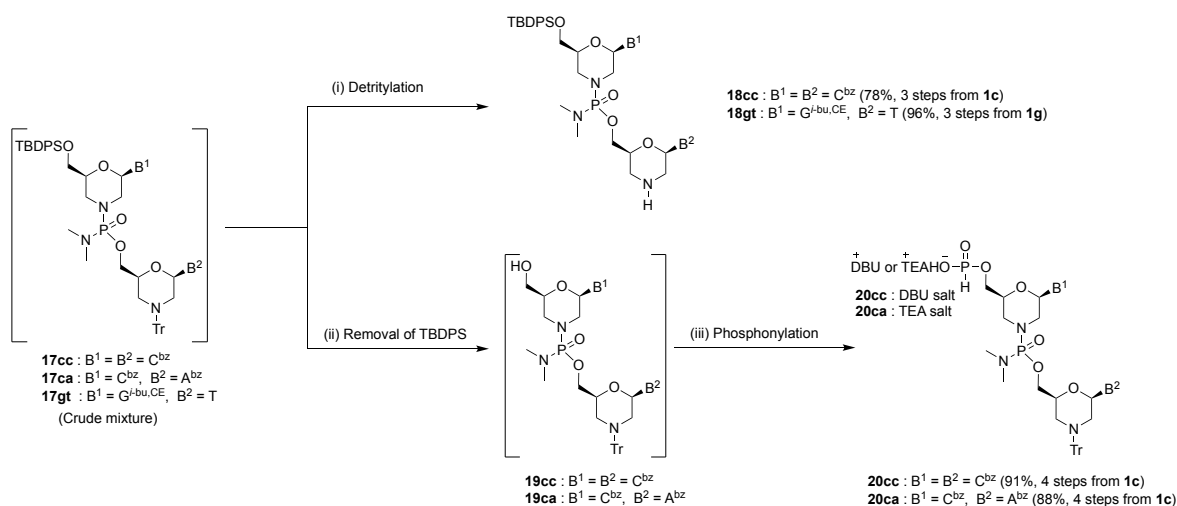


Figure 9 縮合・酸化的アミノ化 1 ポット反応後の  $^1\text{H}$  NMR

## F) 2-mer フラグメントの合成

フラグメント縮合を行う際に用いる 2-mer フラグメントの合成を行った。化合物 **17** は縮合・酸化アミノ化反応後に、分液抽出による粗精製のみを行い、次の各脱保護反応に用いた。(Scheme 29)

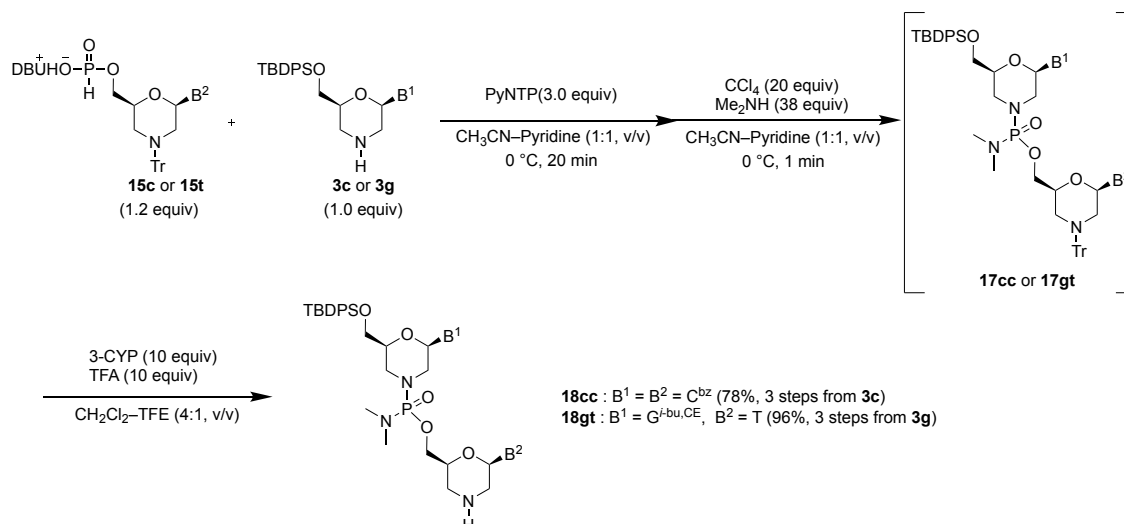
### Scheme 29 2-mer フラグメントの合成ルート



### i) 脱 Tr 化

縮合・酸化アミノ化反応後に、抽出操作を行って得られる化合物 **17** の粗生成物に対して脱 Tr 化反応を行った。PMO 合成における脱 Tr 化反応に汎用されている反応条件に従い、3-cyanopyridine-TFA (3-CYP) を試薬として用いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を経て、化合物 **18cc** と **18gt** を単離した。単離収率はそれぞれ 78% と 96% であった。この単離収率は化合物 **3c**, **3g** をそれぞれ基準としており、全 3 工程での収率を示している。

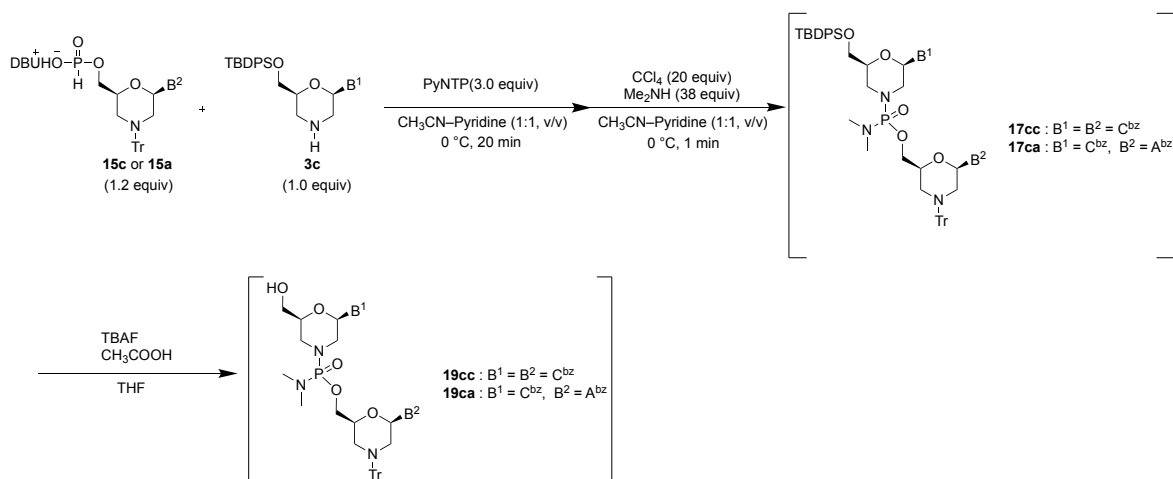
### Scheme 30



## ii) 脱 TBDPS 化

既存の合成法に従い、THF 中で酢酸存在下、フッ化テトラブチルアンモニウム (TBAF) を用いることにより、化合物 **17** の脱 TBDPS 化反応を行った (Scheme 31)。TLC による反応追跡の結果、定量的に脱 TBDPS 化反応は進行した。抽出操作を行い、得られた化合物 **19** の粗生成物を次のホスホニル化反応に用いた。

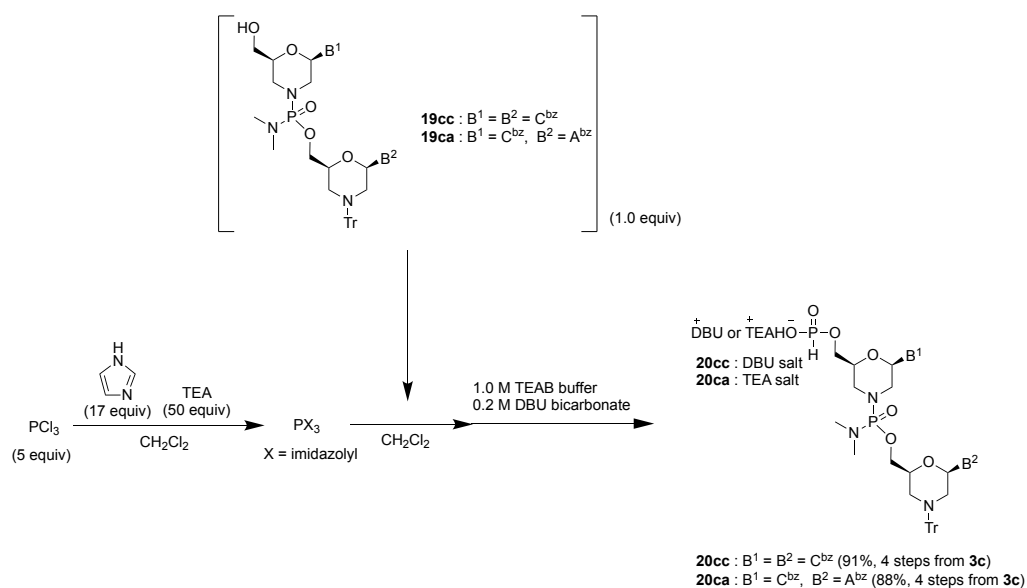
Scheme 31



## iii) ホスホニル化

モノマー合成と同条件で化合物 **19** のホスホニル化を行った。TLC で反応の完結を確認後、抽出操作とシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を経て、化合物 **20cc** と **20ca** を単離した。単離収率はそれぞれ 91% と 88% であった。この単離収率は化合物 **3** を基準にして算出しており、全 4 工程での収率を示している。

Scheme 32



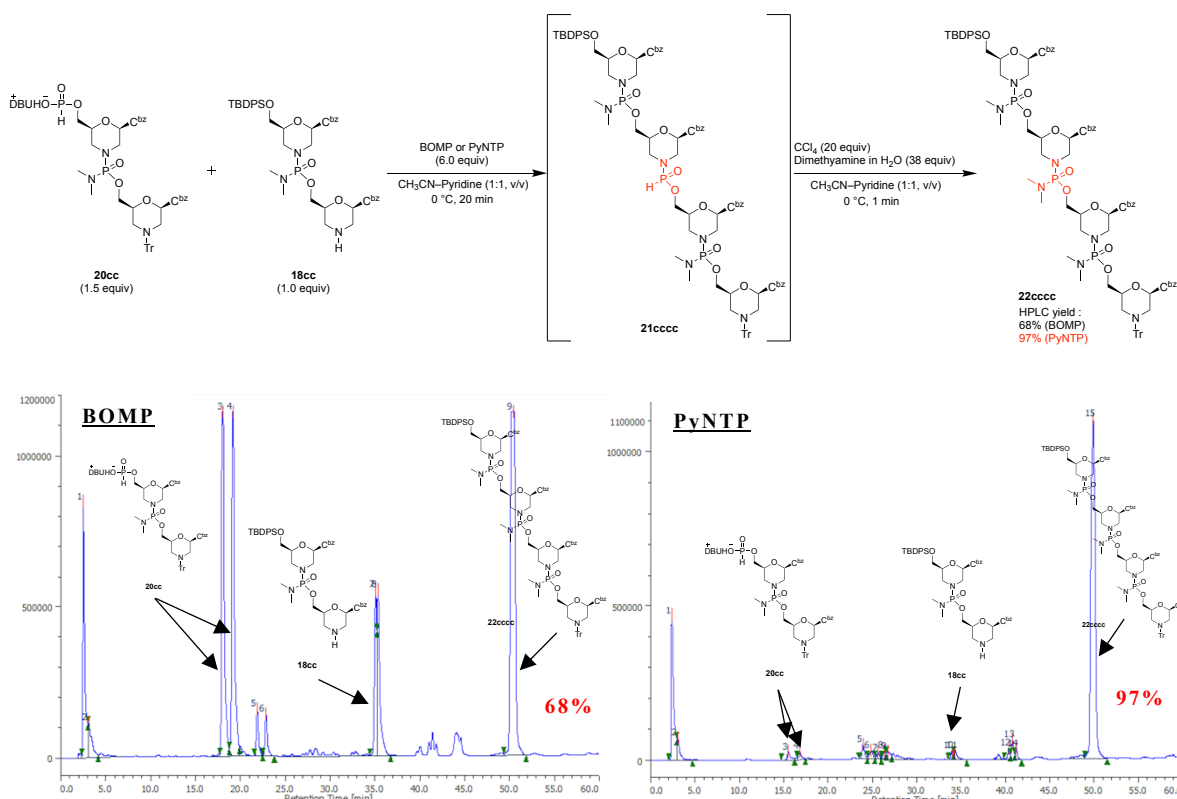
## 第四節 PMO オリゴマーの合成

最適化した縮合・酸化的アミノ化ワンポット反応条件を用いて、鎖長伸長の検討を行った。鎖長伸長方法として、固相合成法と液相合成法、及び逐次延長法とフラグメント縮合法の選択肢がある。本研究では、PMOの大量合成技術の開発を目的としているため、大量合成に適している液相法かつフラグメント縮合による鎖長伸長を選択した。フラグメント縮合による PMO 合成を達成した場合、世界初の報告例となる。

### A) フラグメント縮合の検討

前項で合成した化合物 **18** と **20** を用いて、フラグメント縮合の検討を行った。縮合・酸化的アミノ化ワンポット反応後の反応溶液を減圧下濃縮し、得られた粗生成物を RP-HPLC にて分析し、面積比（化合物 **22** / 化合物 **18** + 化合物 **22**）から縮合効率を算出した。反応条件は 2 量体合成時に最適化した条件を参考にした (Scheme 33)。縮合剤として BOMP と PyNTP の二つを用いた。それぞれの RP-HPLC チャートを示す。

#### Scheme 33



**Figure 10** HPLC profile of the crude 4-mer. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 40%–100% CH<sub>3</sub>CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7.0) over 60 min at 50 °C at a rate of 0.5 mL/min. (左 : BOMP, 右 : PyNTP)

RP-HPLC で見られた主なピークを分取し、ESI-MS によって構造を同定した。その結果、いずれの縮合剤を用いた場合も 4 量体の生成が確認され、PMO では世界初となるフラグメント縮合を達成した。また、縮合剤として BOMP を用いた際の縮合効率 は 68% であったのに対し、PyNTP を用いた場合は 97% と非常に優れた縮合効率を示した。これにより、フラグメント縮合において、縮合剤の反応性が重要であることが明らかとなり、ニトロトリアゾールが求核触媒として働き、縮合反応を促進していることが示唆された。また、PyNTP を縮合剤として用いることで、2 量体合成 (1-mer+1-mer) 時と同様の反応時間 (20 分) でフラグメント縮合が完結することが明らかとなり、本手法の有用性が示された。

さらに、RP-HPLC の結果より、2-mer フラグメントと 4-mer の保持時間を比較すると、大きな差がある。そのため、疎水性の違いを利用した精製操作が容易になり、フラグメント縮合の利点を最大限に活かすことが可能である。

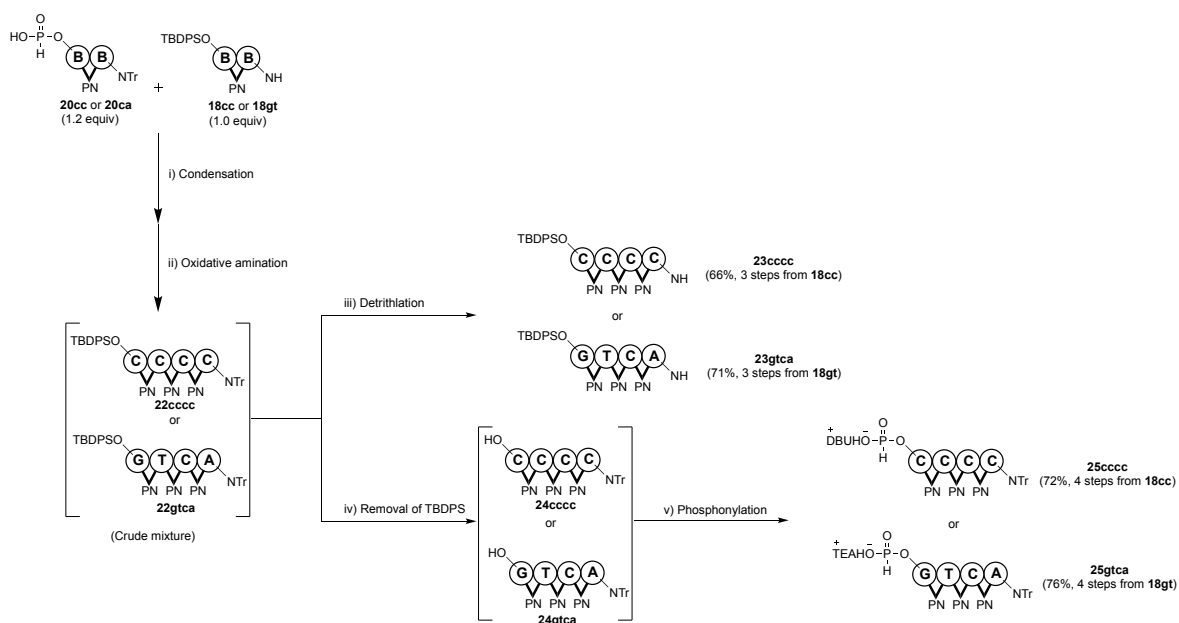
#### B) 4-mer フラグメントの合成

4 量体を効率よく合成することができたので、2-mer フラグメントの合成と同様の条件を用いて、4-mer フラグメントの合成を行った (Scheme 34)。

化合物 **18** と化合物 **20** を用いて、縮合・酸化的アミノ化 1 ポット反応を行い、抽出操作を経て、化合物 **22** を粗生成物として得た。この粗生成物に対して、脱 Tr 化を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を経て、化合物 **23cccc** と化合物 **23gtca** を単離収率 66% と 71% で得た (化合物 **18** からの 3 工程の収率)。一方で、粗生成物 **22** に対して、脱 TBDPS 化とホスホニル化を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を経て、化合物 **25cccc** と化合物 **25gtca** を単離収率 72% と 76% で得た (化合物 **18** からの 4 工程の収率)。これらの反応において目立った副反応は観測されず、目的とする反応が効率よく進行した。



## Scheme 34 4-mer フラグメントの合成



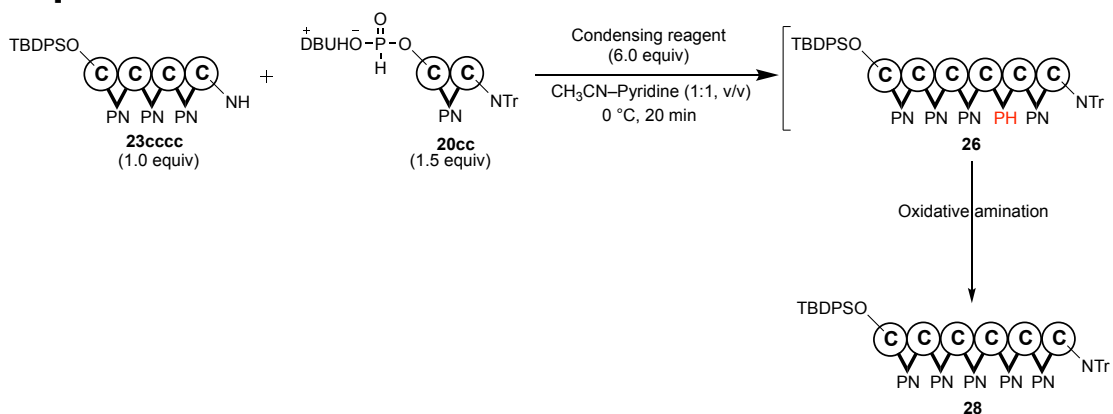
## C) 6-mer の合成

合成した 2-mer フラグメントと 4-mer フラグメントを用いて 6-mer 合成を行った。この際、2通りの合成ルートで 6-mer を合成した (Table 7)。ルート A では、アミノ基を有する 4-mer フラグメント (**23cccc**) と *H*-ホスホネートモノエステルを有する 2-mer フラグメント (**20cc**) を用いた。一方、ルート B では、鎖長の長さを逆にし、アミノ基を有する 2-mer フラグメント (**18cc**) と *H*-ホスホネートモノエステル基を有する 4-mer フラグメント (**25cccc**) を用いた。それぞれの合成ルートで得られる 6-mer の縮合効率を比較することで、フラグメントの鎖長の違いが縮合反応に与える影響を確認することができると考えた。

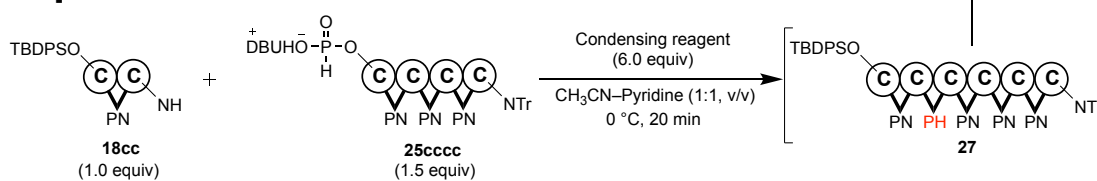
実験方法は、縮合・酸化的アミノ化ワンポット反応後の反応溶液を減圧下濃縮し、得られた粗生成物を RP-HPLC にて分析した。面積比 (化合物 **28** / 化合物 **28** + 化合物 **18cc** or 化合物 **23cccc**) から縮合効率を算出した。結果を Table 7 に示す。

Table 7 2 種類の 6-mer 合成経路

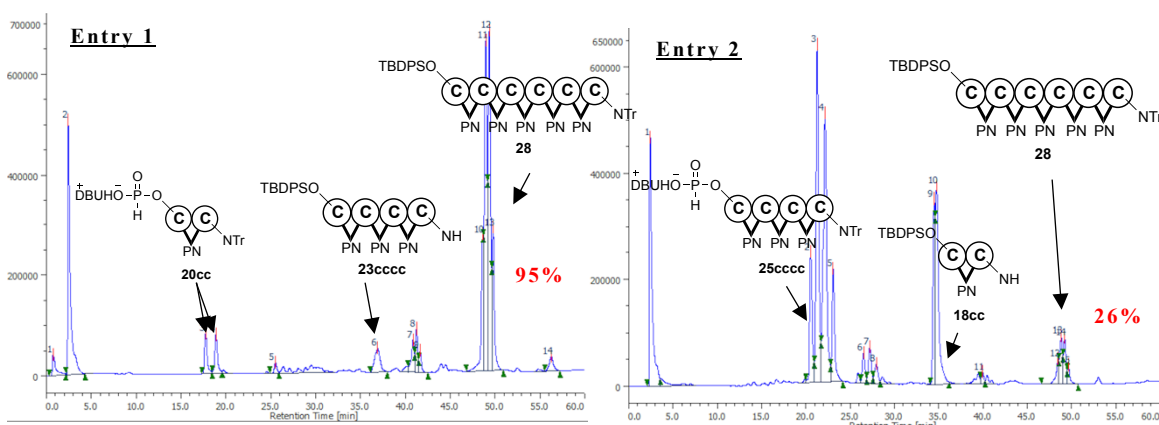
[Route A]

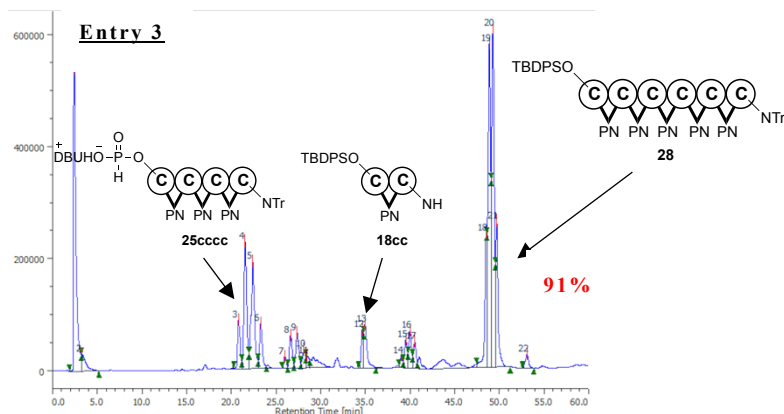


[Route B]



Entry	Route	Condensing reagent	Product	HPLC yield (%)
1	A	PyNTP	6-mer <b>28</b>	95
2	B	PyNTP	6-mer <b>28</b>	26
3	B	MNTP	6-mer <b>28</b>	91





**Figure 11** HPLC profile of the crude 6-mer. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 40%–100% CH<sub>3</sub>CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7.0) over 60 min at 50 °C at a rate of 0.5 mL/min.

初めに、縮合剤として PyNTP を用いて、ルート A で 6-mer を合成した。HPLC 収率は 95% と非常に良好な結果を示した (entry 1)。次に、縮合剤として PyNTP を用いて、ルート B で 6-mer を合成した。しかし、HPLC 収率は 26% と顕著に縮合効率が低下した (entry 2)。そこで、縮合剤を PyNTP から、より活性の高い MNTP へと変更して、同様の実験を行ったところ、HPLC 収率は 91% まで向上した (entry 3)。

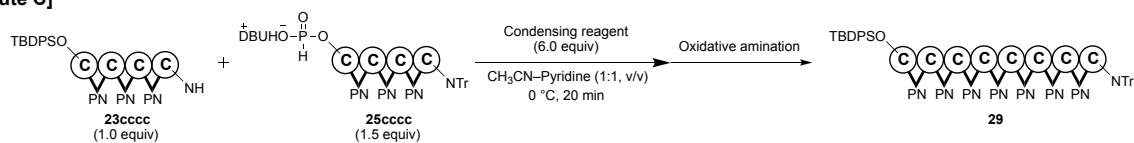
これらの結果より、*H*-ホスホネートモノエステルを有するフラグメントの鎖長が長くなるほど、縮合効率が低下することが示唆された。つまり、*H*-ホスホネートモノエステルを有するフラグメントの立体障害が縮合反応に大きく影響していると考えられる。一方で、アミノ基を有するフラグメントの立体障害による影響は確認されなかった。また、*H*-ホスホネートモノエステル基を有するフラグメントの立体障害による反応性の低下を、縮合剤の活性を向上させることで補うことができた。MNTP は、1-mer + 1-mer の縮合反応時には、活性の高さ故に副反応が確認されたが、フラグメント縮合時には、その活性の高さが効果的に働いたと考えられる。

#### D) 8-mer の合成

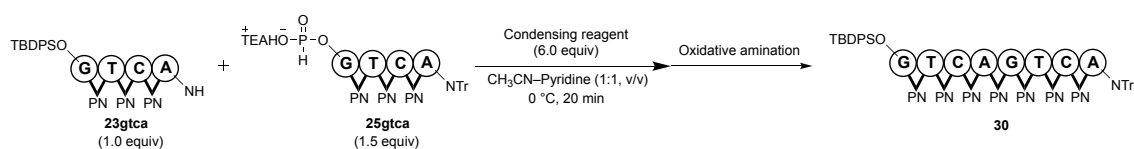
2 種類の 4-mer フラグメントを用いて、8-mer の合成を行った。実験方法は、縮合・酸化的アミノ化 1 ポット反応後の反応溶液を減圧下濃縮し、得られた粗生成物を RP-HPLC にて分析した。ルート C では、核酸塩基部が全てシチジンの 8 量体を、ルート D では、四種類の核酸塩基を全て含んだ 8 量体を合成した。面積比 {化合物 29 or 30 / (化合物 29 or 30 + 化合物 23cccc or 化合物 23gtca)} から縮合効率を算出した。結果を Table8 に示す。

**Table 8 8-mer の合成**

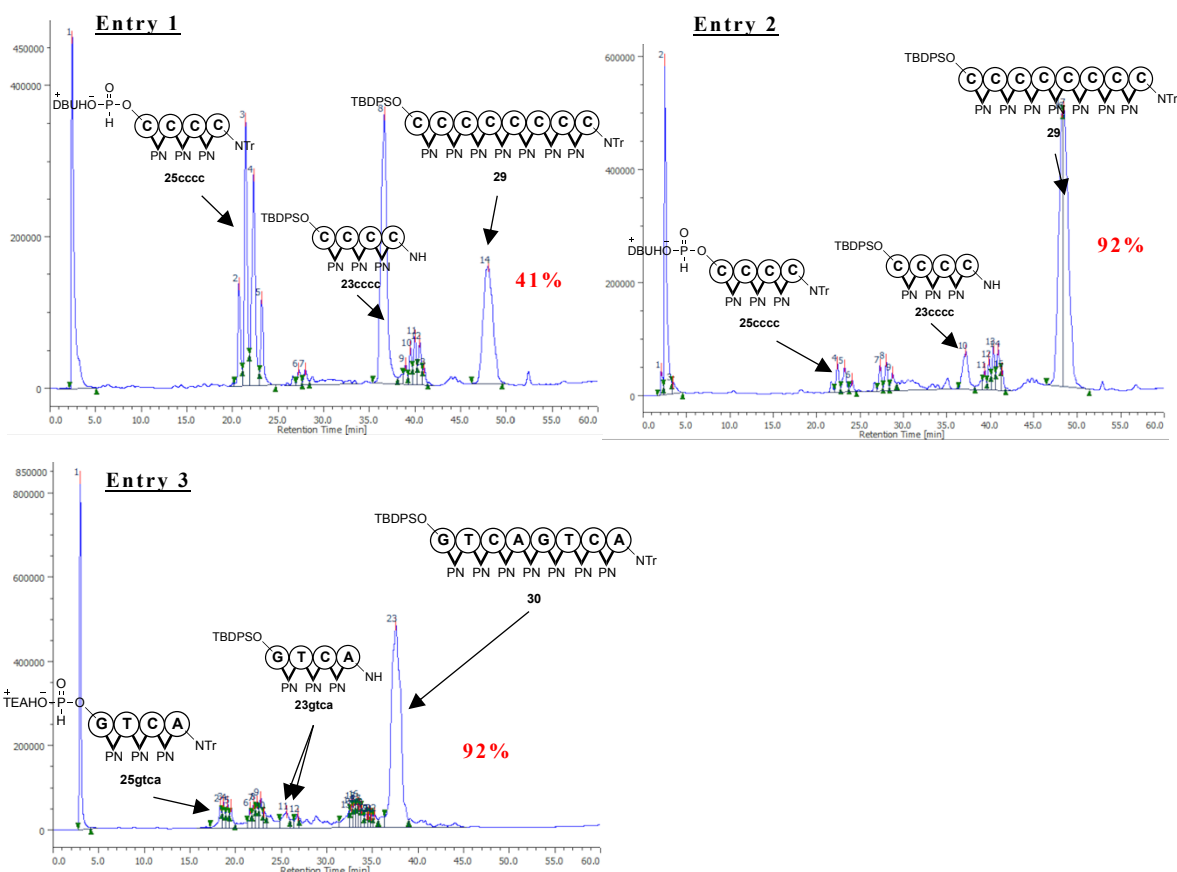
[Route C]



[Route D]



Entry	Route	Condensing reagent	Product	HPLC yield (%)
1	C	PyNTP	8-mer <b>29</b>	41
2	C	MNTP	8-mer <b>29</b>	92
3	D	MNTP	8-mer <b>30</b>	92



**Figure 12** HPLC profile of the crude 8-mer. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 40%–100% CH<sub>3</sub>CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7.0) over 60 min at 50 °C at a rate of 0.5 mL/min.

初めに、ルート C に示す条件で、8-mer (29) の合成を行った。縮合剤として PyNTP を用いたところ、縮合効率は 41% と低い結果が得られた (entry 1)。そこで、縮合剤を MNTP に変更したところ、縮合効率は 92% にまで向上した (entry 2)。これらの結果は、6-mer 合成時の実験結果と一致した。

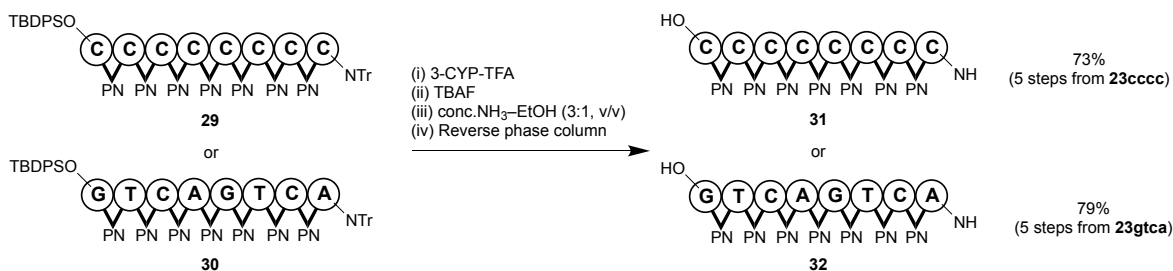
次に、ルート D に示す条件で、4 種塩基を全て含んだ 8-mer の合成を行った。縮合剤として MNTP を用いることで、縮合効率は 92% となり、非常に優れた結果が得られた (entry 3)。これより、フラグメント縮合が全ての核酸塩基部を有する誘導体に適応可能であることが示された。

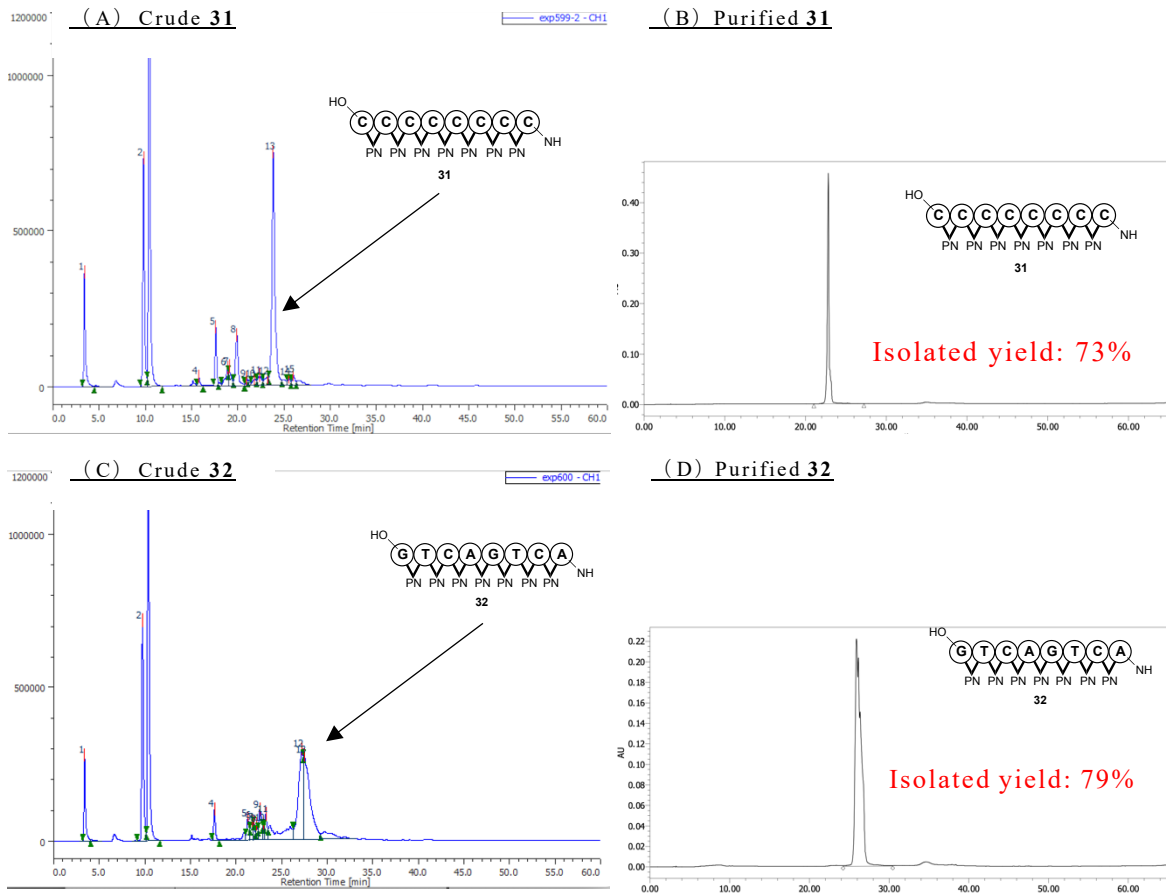
また、4 量体合成 (2-mer+2-mer) 時と同様に、4-mer と 8-mer の RP-HPLC での保持時間を比較すると、大きな差があった。そのため、疎水性の違いを利用した 4-mer と 8-mer の分離精製も容易になると考えられる。しかし、8-mer よりわずかに保持時間の短い副生成物が確認されており、精製操作を困難にする可能性がある。現在のところ、この副生成物の同定はできていない。

#### E) 8-mer の脱保護と単離

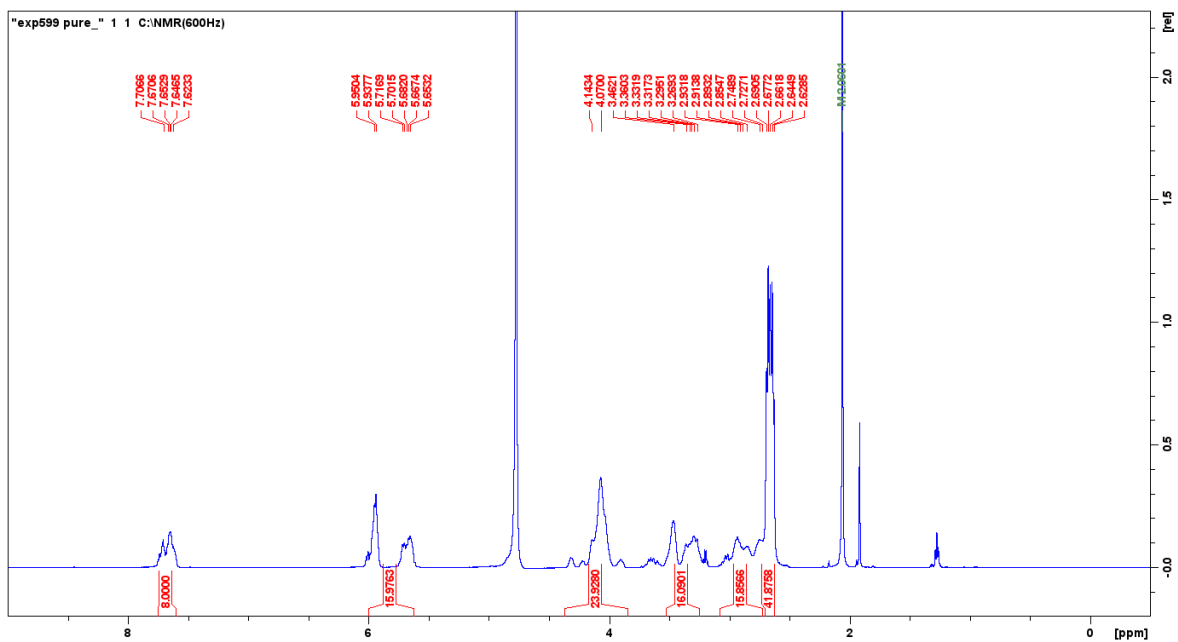
合成した 8-mer の脱保護反応を行った。縮合・酸化のアミノ化後の粗生成物の 9/10 を脱保護反応に用いた。脱保護反応は i) 脱 Tr 化反応 ii) 脱 TBDPS 化反応 iii) アンモニア処理による核酸塩基部の脱保護反応の順に行った。また、脱 Tr 化反応後と脱 TBDPS 化反応後には、減圧化で溶媒留去のみを行い、次の反応に用いた。アンモニア処理後に、ジエチルエーテル/H<sub>2</sub>O で抽出操作を行い、目的の 8-mer を水層に回収した。最後に、ODS カラムを用いたカラムクロマトグラフィーによる精製を経て、8-mer 31, 32 を単離収率 73%, 79% で得た (化合物 21 からの 5 工程の収率)。目的物の同定は、<sup>1</sup>H NMR、<sup>31</sup>P NMR、MS 分析によって行った。<sup>1</sup>H NMR がブロードニングしているのは、8 量体に由来する 8 つの水素原子かつ不斉リン原子に由来する 128 (2<sup>7</sup>) 個のジアステレオマーが存在するためである。また、D<sub>2</sub>O では、CH<sub>3</sub>CN (δ 2.06) を内部標準とした。

#### Scheme 35 8 量体の脱保護反応





**Figure 13** HPLC profile of the crude 8-mer. RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0%–60% CH<sub>3</sub>CN in 0.1 M TEAA buffer (pH 7.0) over 60 min at 50 °C at a rate of 0.5 mL/min.



**Figure 14** 8-mer 31 の <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)

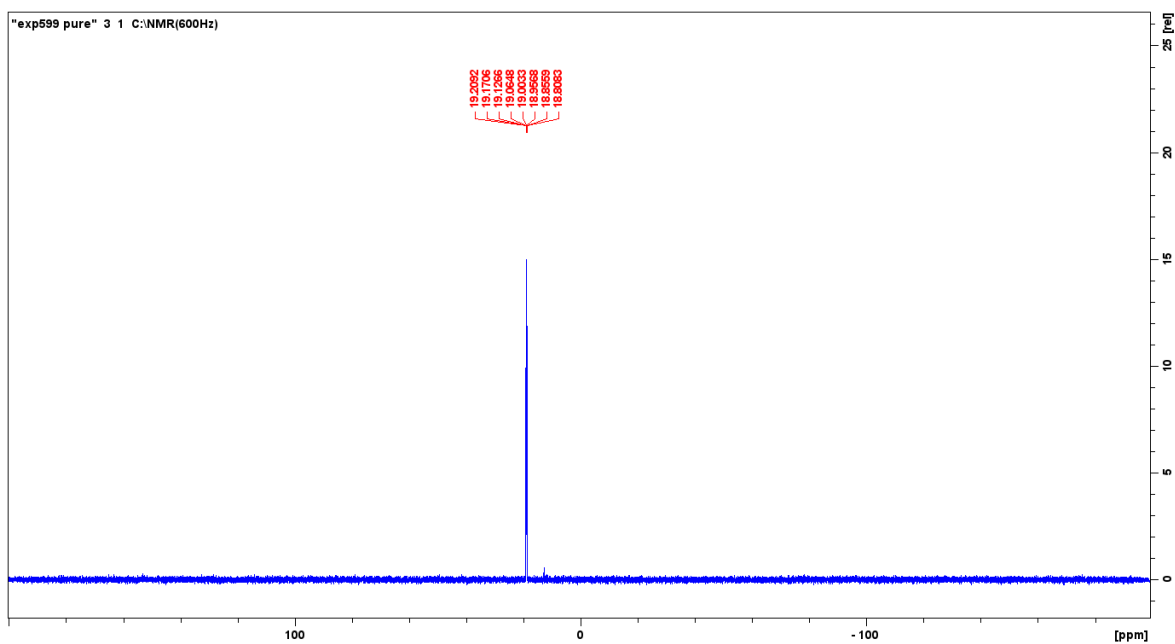


Figure 15 8-mer 31 の  $^{31}\text{P}$  NMR (243 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

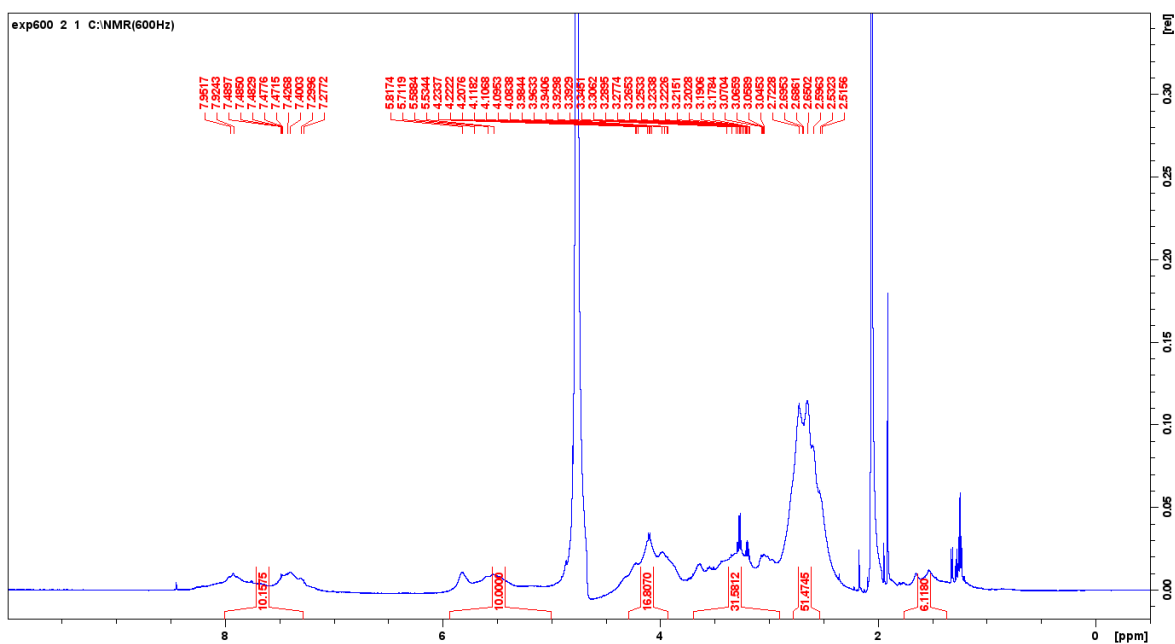


Figure 16 8-mer 32 の  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

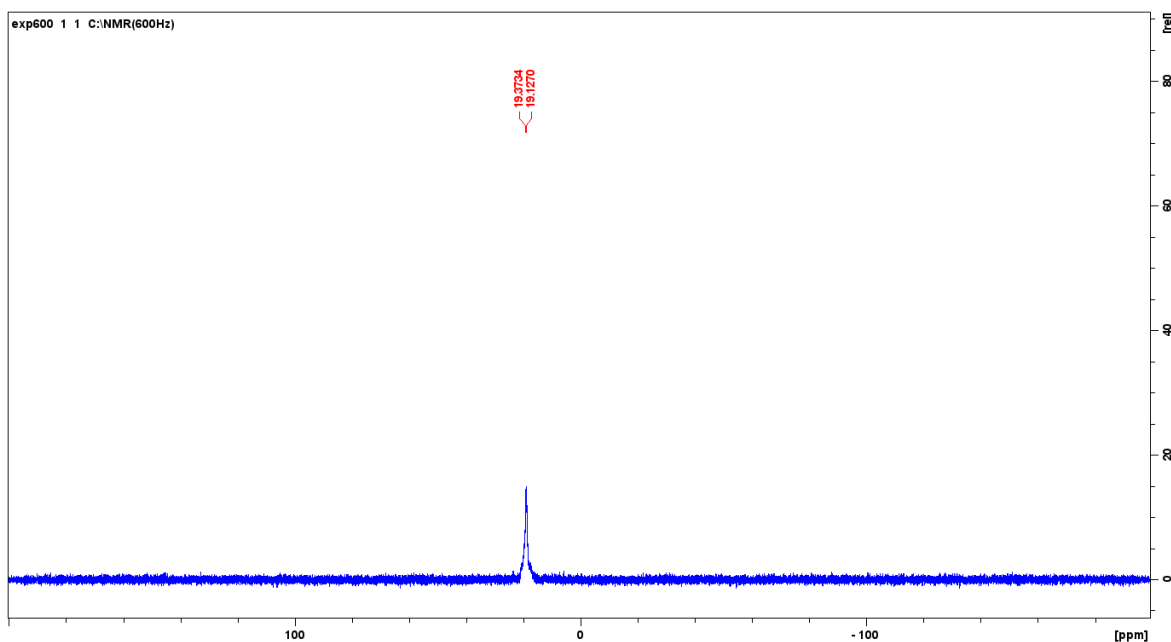


Figure 17 8-mer 32 の  $^{31}\text{P}$  NMR (243 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

以上のように、*H*-ホスホネートモノエステルとモルフォリノヌクレオシドを、ホスホニウム型縮合剤を用いてインターヌクレオチド結合を形成する戦略で4種塩基を含む8量体PMOを合成し、PMOでは世界初となるフラグメント縮合を達成した。本手法は、スケールアップが容易な液相法である点、*H*-ホスホネートモノエステルの反応性が高く、縮合反応が短時間で完結する点、フラグメント縮合を用いたことで、目的物の精製が容易になった点において、従来法の欠点を大幅に改善した新規PMO合成法であると言える。

また、本手法において、縮合反応後に生成する*H*-ホスホンアミデート誘導体は、様々なリン原子修飾体への変換を可能とする中間体である。将来的には、TMO(序論参照)を含む、多様なリン原子修飾型モルフォリノ核酸の合成にも応用可能と考えられる。



## 第二章 *H*-ホスホンアミデート誘導体を用いた新規核

### 酸合成法の開発

#### 第一節 諸言

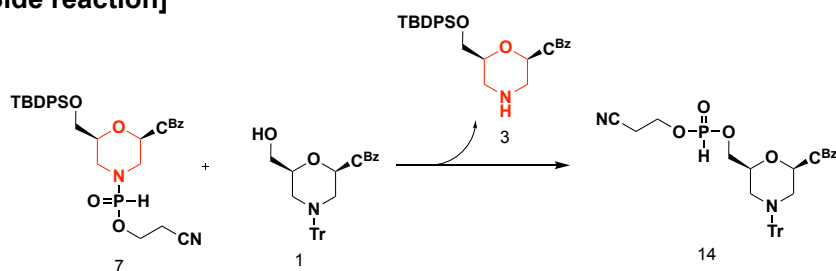
本章では、*H*-ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いる新規核酸合成法の開発について述べる。本研究では、第一章におけるモルフォリノ核酸の研究を通して明らかとなった副反応に着目し、その知見を元に新しい核酸合成法の開発に取り組んだ。

第一章/第二節にて、*H*-ホスホンアミデート誘導体（化合物 **7**）は塩基とアルコールの存在下で、シアノエチル基の脱保護より、アルコールのリン原子上への求核攻撃が優先し、ホスホンアミドエステル交換反応が起こり、*H*-ホスホネートジエステルが生成することを明らかにした（Scheme 36（上））。

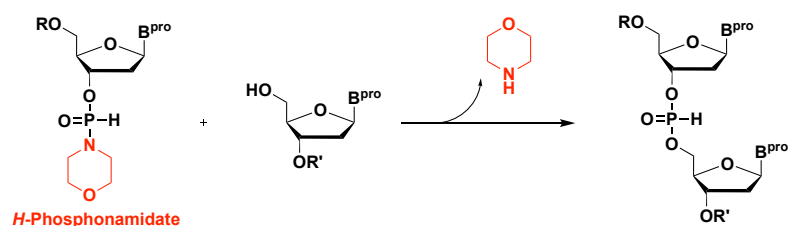
このように *H*-ホスホンアミデート結合が化学的に不安定である要因の一つは、核酸塩基部の電子求引効果によって、モルフォリノヌクレオシドの窒素原子の電子密度が低下しており、モルフォリノアミドイオンとして脱離しやすいことが考えられる。一方、この「不安定性」を別の視点で見ると、モルフォリンが「高い脱離能」を有していると捉えることができる。そこで、モルフォリン自体を脱離基として利用する新しい核酸合成法を考案した（Scheme 36（下））。

Scheme 36 副反応と新規核酸合成法

#### [Side reaction]



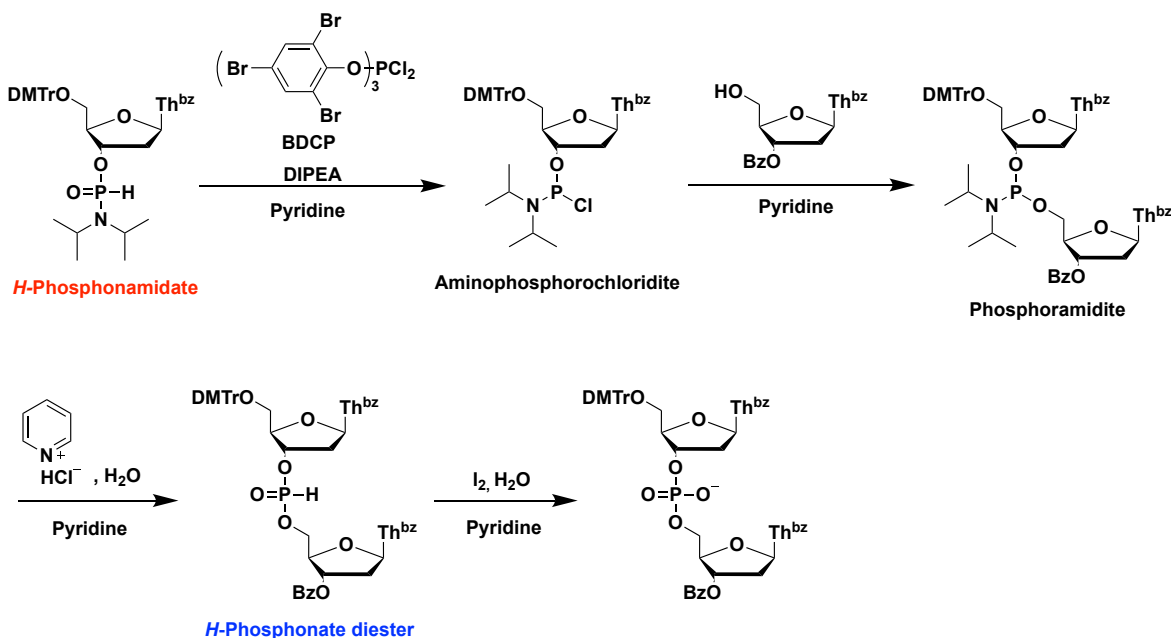
#### [New approach]



これまで、*H*-ホスホンアミデート誘導体に関しては、様々な研究がなされてきた。1986年、van Boomらによって、*H*-ホスホンアミデート誘導体の合成が初めて報告された<sup>50</sup>。その後、Stawinskiらによって、*H*-ホスホンアミデート誘導体の汎用的な合成法が開発された<sup>35-38</sup>。しかし、核酸合成法として、*H*-ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いた報告例は極めて少ない。

1990年、Wadaらは、ジイソプロピルアミノ基を有する*H*-ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いる核酸合成法を開発した (Scheme 37)<sup>51, 52</sup>。この方法では、初めに、*H*-ホスホンアミデート誘導体を P-N 結合の解離を伴わず、非酸化的な塩素化反応により、対応するアミノホスホロクロリダイトへと変換する。次に、アミノホスホロクロリダイトをヌクレオシドの 5'-水酸基と反応させることで、ホスホロアミダイトを得る。その後、ホスホロアミダイトの P-N 結合を加水分解することで、*H*-ホスホネートジエステルを合成する。*H*-ホスホンアミデート誘導体を出発物とすると、*H*-ホスホネートジエステルを得るまでに、3工程を要する。一方、本研究において、モルフォリノ基を脱離基として用いることができた場合、*H*-ホスホンアミデート誘導体から 1工程で *H*-ホスホネートジエステルを得ることができ、より効率的な核酸合成手法となる。

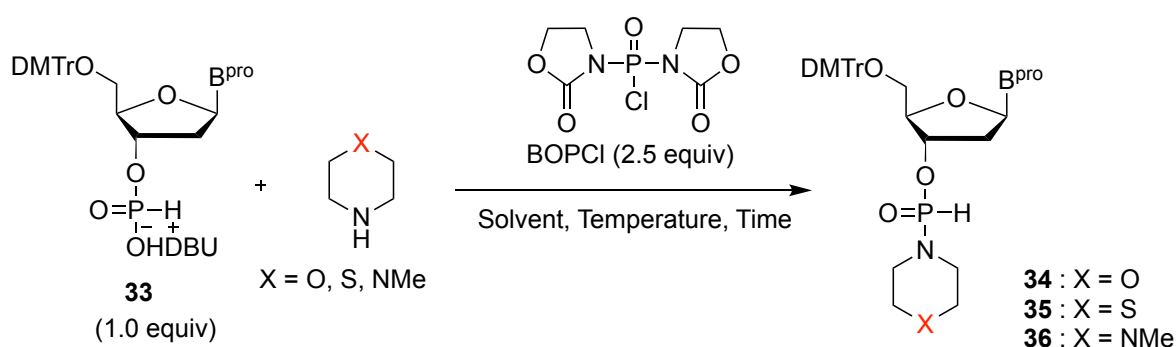
Scheme 37



## 第二節 *H*-ホスホンアミデート誘導体の合成

*H*-ホスホネートモノエステルとアミンを用いて、*H*-ホスホンアミデート誘導体の合成を行った。第一章の検討結果より、縮合剤として BOPCl やホスホニウム型縮合剤を用いることで、*H*-ホスホネートモノエステルとアミンを直接的に縮合することができる。今回は、抽出操作のみで残渣を除去することができる BOPCl を縮合剤として用いた。

**Table 9** *H*-ホスホンアミデート誘導体の合成



Entry	B <sup>pro</sup>	X	Amine (Equiv)	Solvent <sup>b</sup>	Temp (°C)	Time (min)	Product	Isolated Yield
1	T	O	1 to 2	A	rt	50	<b>34t</b>	43%
2	T	S	1 to 2	A	rt	50	<b>35t</b>	60%
3	T	NMe	1 to 2	A	rt	50	<b>36t</b>	Not isolated
4	A <sup>bz</sup>	S	1 to 2	A	rt	50	<b>35a</b>	53%
5	C <sup>i-bu</sup>	S	1 to 2	A	rt	50	<b>35c</b>	58%
6	G <sup>i-bu</sup>	S	1 to 2	A	rt	50	<b>35g</b>	Not isolated
7	G <sup>i-bu</sup>	S	1	B	0	20	<b>35g</b>	53%
8	T	S	1	B	0	20	<b>35t</b>	68%

<sup>a</sup> 34t, 35t, and 36t : B<sup>pro</sup> = thymine, 35a : B<sup>pro</sup> = N<sup>6</sup>-benzoyladenine, 35c : B<sup>pro</sup> = N<sup>4</sup>-isobutyrylcytosine, 35g : B<sup>pro</sup> = N<sup>2</sup>-isobutyrylguanine.

<sup>b</sup> Solvent A: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–pyridine (99:1, v/v), Solvent B: CH<sub>3</sub>CN–pyridine (1:1, v/v).

はじめに、チミジン誘導体を用いて *H*-ホスホンアミデート誘導体の合成を行った (entries 1–3)。 *H*-ホスホネートモノエステル **33** とモルフォリン (entry 1)、チオモルフォリン (entry 2)、*N*-メチルピペラジン (entry 3) を 2 当量用い、縮

合反応を行った。この際、既知論文を参考に、溶媒として  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -pyridine (99:1, v/v)を用いた<sup>37</sup>。縮合後、抽出操作とシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を得て、*H*-ホスホンアミデート **34t** と **35t** を単離収率 43%と 60%で得た。一方で、*N*-メチルピペラジンを導入した *H*-ホスホンアミデート **36t** はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製中に、分解することが明らかとなったので、抽出操作後の粗生成物を次の検討に用いることにした。

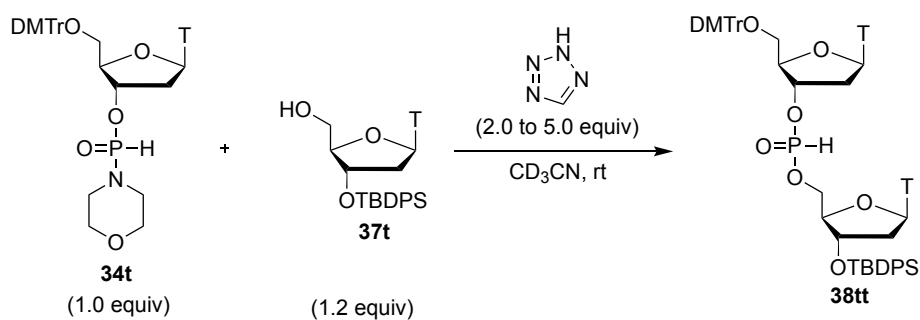
また、他の核酸塩基を有するヌクレオシドにも本反応を応用し、*H*-ホスホンアミデート **35a**, **35c**, **35g** の合成を行った (entries 4-7)。アデノシン誘導体とシチジン誘導体は、中程度の収率で単離することができた。一方で、グアノシン誘導体を合成する際に、副反応が起きていることが明らかとなった (entry 6)。これは、過剰に用いたチオモルフォリンが、グアニン *N*<sup>1</sup> 位のアミドプロトンを引き抜くことで、*O*<sup>6</sup> 位にオキシアニオンが生成し、これが BOPCl と反応したと考えられる。そこで、チオモルフォリンの当量を 1 当量に減らし、溶媒は第一章での縮合反応に用いた  $\text{CH}_3\text{CN}$ -pyridine (1:1, v/v)に変更した。その結果、副反応は観測されず、中程度の収率で目的物を得た (entry 7)。また、チミジン誘導体の合成時にも entry 2 の条件で、過剰のチオモルフォリンによってチミンの *O*<sup>4</sup> 位にオキシアニオンが生じ BOPCl と反応したと考えられた。そこで、グアノシン誘導体合成に用いた条件へと変更したところ、収率が改善した (entry 8)。

### 第三節 *H*-ホスホンアミデート誘導体の活性化

#### 1. 酸性活性化剤による活性化

続いて、合成した *H*-ホスホンアミデート誘導体 **34t** の活性化条件を探索した。最初に、モルフォリン環窒素原子を酸で活性化することを試みた。酸性活性化剤として、ホスホロアミダイト法で汎用されている 1*H*-テトラゾール (TET) を用いた。TET を加えて、30 分後の <sup>31</sup>P NMR を測定したところ、縮合反応が進行し、化合物 **38tt** の生成を確認した (<sup>31</sup>P NMR: 8.5, 9.4 ppm, <sup>1</sup>*J*<sub>PH</sub> = 715 Hz)。NMR の解析結果より、*H*-ホスホンアミデート誘導体 **34t** (<sup>31</sup>P NMR: 13.5, 13.8 ppm) が残存しており、縮合反応は完結していなかったため、さらに TET を 3 当量追加し、反応の完結を目指した。しかし、追加後 30 分の <sup>31</sup>P NMR を測定したところ、縮合反応はほとんど進行しなかった。

### Scheme 38



縮合後

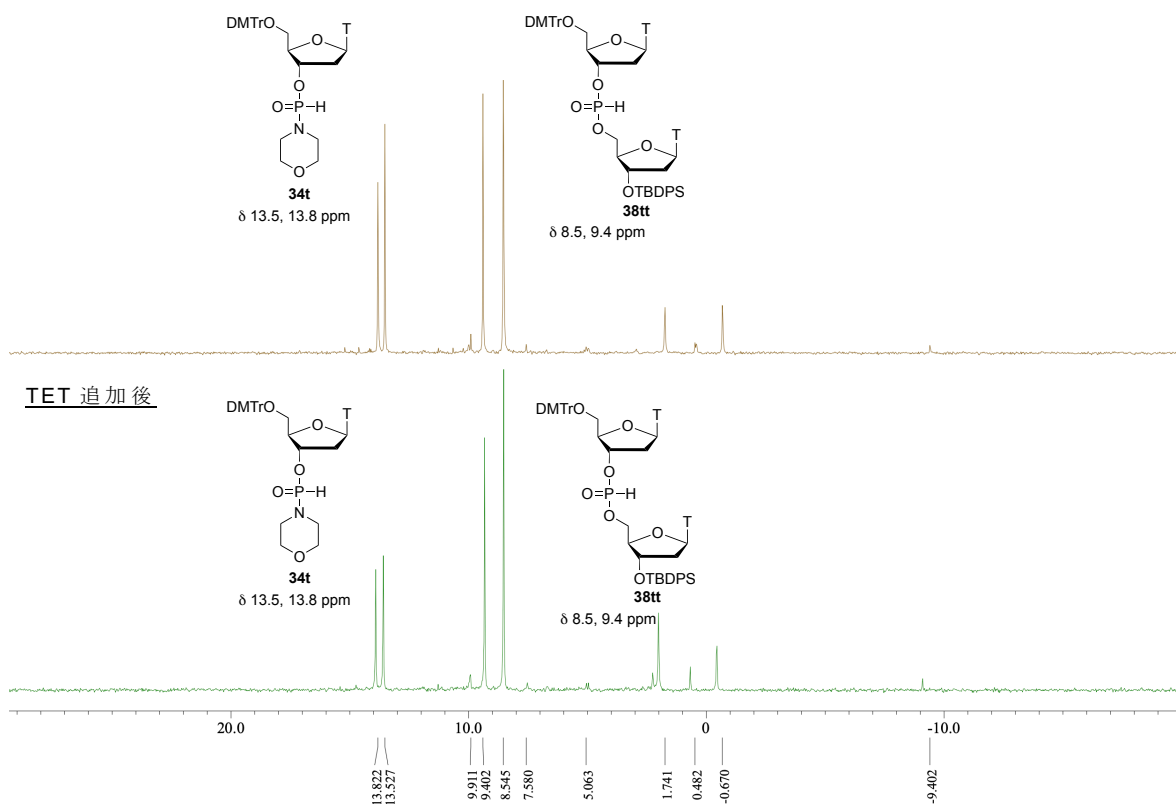


Figure 18 反応系中の  $^{31}\text{P}$  NMR (上：縮合後、下：TET 追加後)

これらの結果より、TETは縮合反応に影響を与えていない可能性が示唆された。そこで、TETを加える以前に行った実験操作を振り返ったところ、含有水分の除去を目的として行ったピリジン共沸操作時に縮合反応が進行した可能性が考えられた。そこで、化合物 **34t** と化合物 **37t** を混合し、ピリジン共沸を行った後の  $^{31}\text{P}$  NMR を測定したところ、ピリジン共沸中に縮合反応が進行していることが明らかとなった。

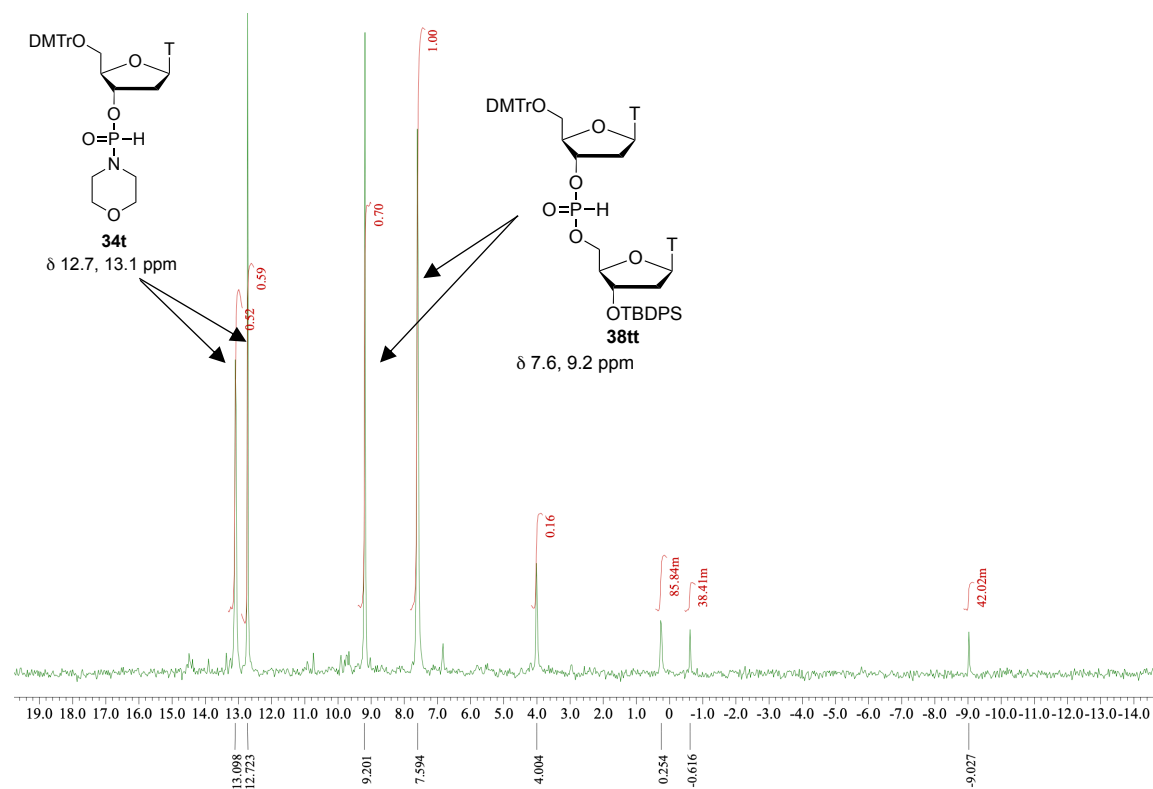


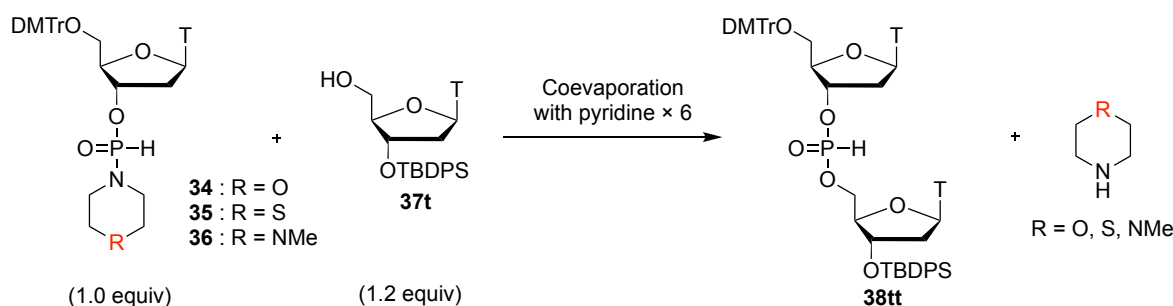
Figure 19 ピリジン共沸後の  $^{31}\text{P}$  NMR

以上の結果を踏まえると、*H*-ホスホンアミデート誘導体 **34t** は酸性条件下での活性化は起こらず、弱塩基性条件のピリジン中で活性化されたことがわかる。Wadaらは、ジイソプロピルアミノ基を有する、*H*-ホスホンアミデート誘導体を合成し、性質を調査している<sup>52</sup>。その際に、*H*-ホスホンアミデート誘導体のジイソプロピルアミノ基は0.5%TFA/ $\text{CHCl}_3$ の条件でも分解が進行しないなど、酸性条件下安定であることが明らかとなっており、今回の結果と一致している。しかし、*H*-ホスホンアミデート誘導体のアミノ基が、ピリジン溶媒中、脱離基として働くという知見は無く、本反応で初めて発見された事象である。これは、モルフォリノ基が電気陰性の酸素原子を有していることや、環状構造に起因するコンフォメーション変化等がアミノ基の脱離能の向上に寄与していると考察している。

## 2. ピリジン共沸による縮合

次に、異なる脱離基を有する *H*-ホスホンアミデート誘導体においても、同様のピリジン共沸時に縮合反応が進行するのかを確認した。結果を Table 10 に示す。

Table 10 ピリジン共沸による縮合検討



Entry	R	p <i>K</i> <sub>aH</sub> of heterocyclic amine	NMR yields (%)
1	O	8.5	86
2	S	9.1	77
3	NMe	9.1	65

結果より、全ての *H*-ホスホンアミデート誘導体が、ピリジン共沸中に縮合反応を起こした。また、縮合効率は、モルフォリンを導入した *H*-ホスホンアミデート誘導体 **34** を用いた際に最も高い結果となった。脱離基となるアミンの共役酸の *pK*<sub>a</sub> (*pK*<sub>aH</sub>) と縮合効率の間には、ある程度の相関があり、R がより電気陰性度の高い原子に置換されたアミン (*pK*<sub>aH</sub> は小さくなる。) ほど、高い脱離能を有し、縮合効率が向上する結果となった。

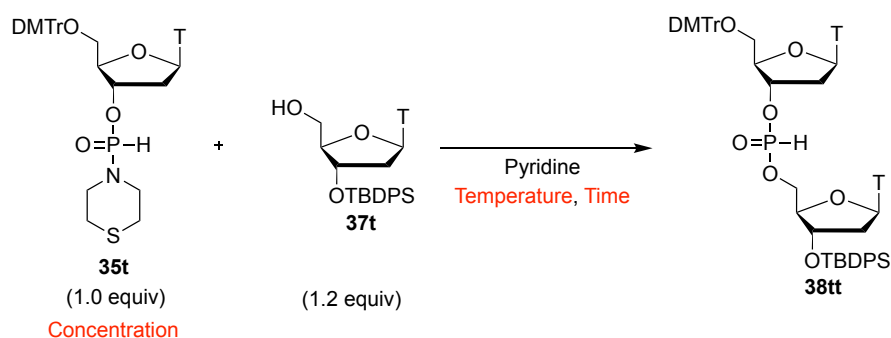
「共沸操作による縮合反応」では、人為的な誤差が生じやすく、正確な検討結果を得るには適していない。そこで、均一系（等温・等圧・等濃度条件）での検討を行うことにした。また、*H*-ホスホンアミデート誘導体の反応性と安定性の両方を考慮し、これ以降の検討にはチオモルフォリンを導入した *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35** を用いることとした。

### 3. 均一系での縮合検討

ピリジン共沸操作時（加温＋濃縮）に、縮合反応が進行していることから、反応温度と反応濃度の2点が、本反応において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、反応温度と反応濃度が縮合反応に与える影響を調査した。

*H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** と 1.2 当量の化合物 **37t** をピリジン溶媒中、等温・等濃度条件下にて反応させた。反応系中の <sup>31</sup>P NMR を測定し、縮合効率を算出した。検討結果を Table 11 に示す。

Table 11 均一系での縮合検討



Entry	Temperature (°C)	Concentration (M)	Time (h)	NMR yield (%) <sup>a</sup>
1	25	0.05	1	0
2	25	0.20	1	0
3	40	0.05	1	6
4	40	0.20	1	72
5	40	0.20	2	85

<sup>a</sup> Determined by <sup>31</sup>P NMR

反応温度を 25 °C、反応濃度を 0.05 M に設定し、1 時間後の <sup>31</sup>P NMR を確認したところ、全く縮合反応は進行していなかった (entry 1)。そこで、反応温度と反応濃度をそれぞれ 40 °C、0.2 M に変更した (entry 2,3)。しかし、ほとんど改善は見られない結果となった。そこで、反応温度と反応濃度の両方を変更した (entry 4)。すると、縮合反応の進行を確認することができた (縮合効率: 72%)。さらに、反応時間を 2 時間に延長することで、縮合効率 85% まで向上した (entry 5)。

これらの結果より、縮合反応には、反応温度と濃度の両パラメーターが重要であることが示された。本反応では、縮合剤等の添加剤を必要とせず、二つの化合物を混合・加熱するだけで鎖長伸長が可能であることから、液相法での大量合成を可能にすると期待される。

#### 4. 過剰に用いる *H*-ホスホンアミデート誘導体の除去方法の検討

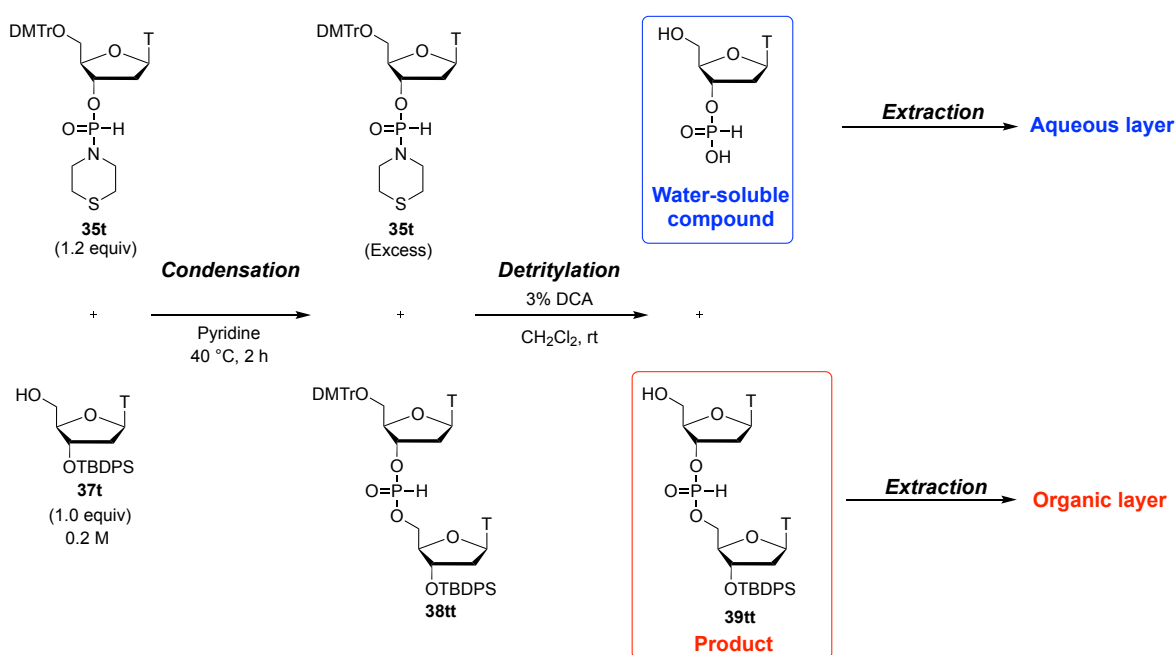
前節の検討では、*H*-ホスホンアミデート誘導体に対して、小過剰の化合物 **37t** を用いていた。しかし、オリゴマー合成を行う際、一般的には伸長末端の水酸基を完全に反応させる戦略が採用される。つまり、*H*-ホスホンアミデート誘導体の方を過剰に用いて、化合物 **37t** の 5'-水酸基を完全に反応させながら、鎖長伸長を目指す。そこで問題となるのが、過剰に用いた *H*-ホスホンアミデート誘導体の除



去方法となる。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製が選択肢の一つとして考えられるが、鎖長伸長ごとにカラム精製を行うと、オリゴマー合成を目指す上で、非常に多くの時間と労力が必要となる。そこでより簡便に、*H*-ホスホンアミデート誘導体を除去する方法の開発が求められる。

ここで、オリゴマー合成サイクルにおいて、縮合反応の次に行う工程である 5'-水酸基の脱保護反応に着目した。縮合後に生成する 2 量体 **38tt** と一緒に、過剰分の *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** に対しても、5'-水酸基の脱保護反応を行うことで、*H*-ホスホンアミデート誘導体は、水溶性の化合物へと変換され、抽出操作で水層へと除去できると考えられる (Scheme 39)。実際に、縮合反応後の混合物に対して、脱 DMTr 化反応と抽出操作を行った。縮合反応後と脱 DMTr 化及び抽出操作後の <sup>31</sup>P NMR をそれぞれ示す。

### Scheme 39 過剰の *H*-ホスホンアミデート誘導体の除去検討



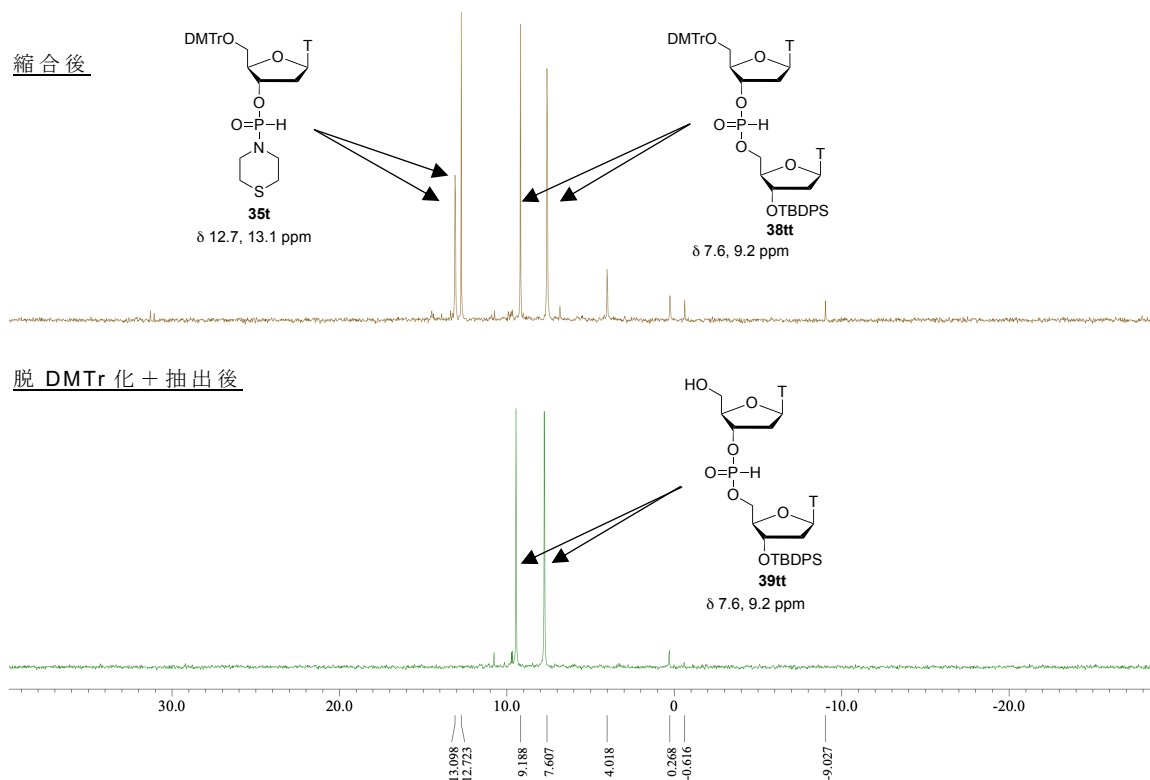


Figure 20  $^{31}\text{P}$  NMR (上：縮合後、下：脱 DMTr 化 + 抽出後)

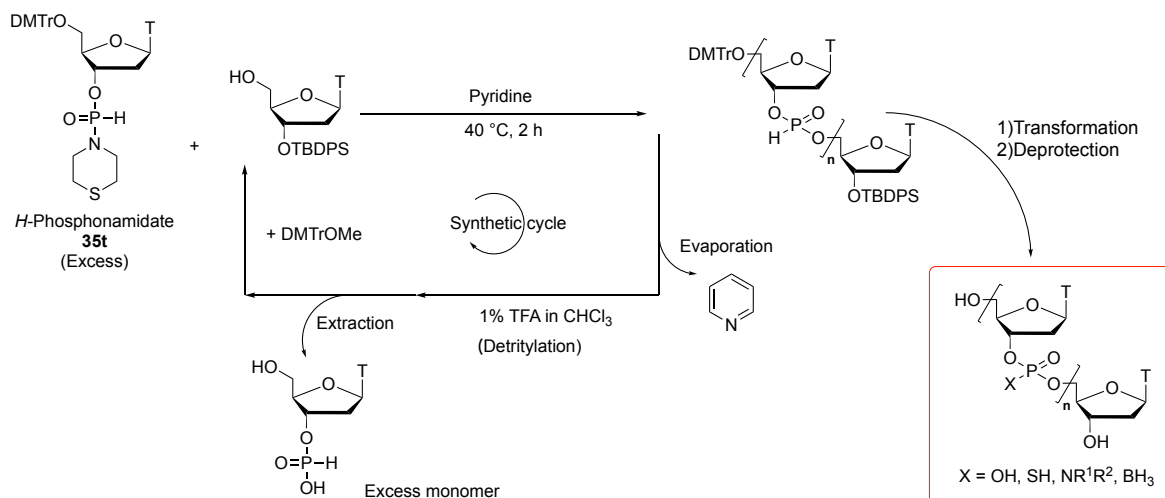
縮合後に残存していた過剰分の *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** は脱 DMTr 化反応を経て、水溶性の化合物へと変換された後、抽出操作によって水層へと除去されたことを確認した。

これにより、シリカゲルカラムクロマトグラフィーの様な煩雑な精製操作を必要とせず、簡便な抽出操作のみで純度の高い中間体を得ることができた。そこで、1) 縮合剤等の添加剤を必要とせず、化合物を混合・加熱するだけで縮合反応が進行する、2) 抽出操作のみで純度の高い中間体を得ることができる、この2点の特徴を活かしたオリゴマー合成サイクルを立案した。(Scheme 40)

#### オリゴマー合成サイクル

1. 小過剰の *H*-ホスホンアミデート誘導体を用いて、ピリジン溶媒中、縮合反応を行う。
  2. 溶媒として用いたピリジンを減圧下留去する。
  3. 5'-水酸基の脱保護反応を行う。
  4. 抽出操作にて、過剰分の *H*-ホスホンアミデート誘導体を水層へと除去する。
- 1~4 を目的とする鎖長まで繰り返し、最後に *H*-ホスホネートジエステル結合の変換反応と脱保護反応を行うことで、目的とするオリゴマーを得る。

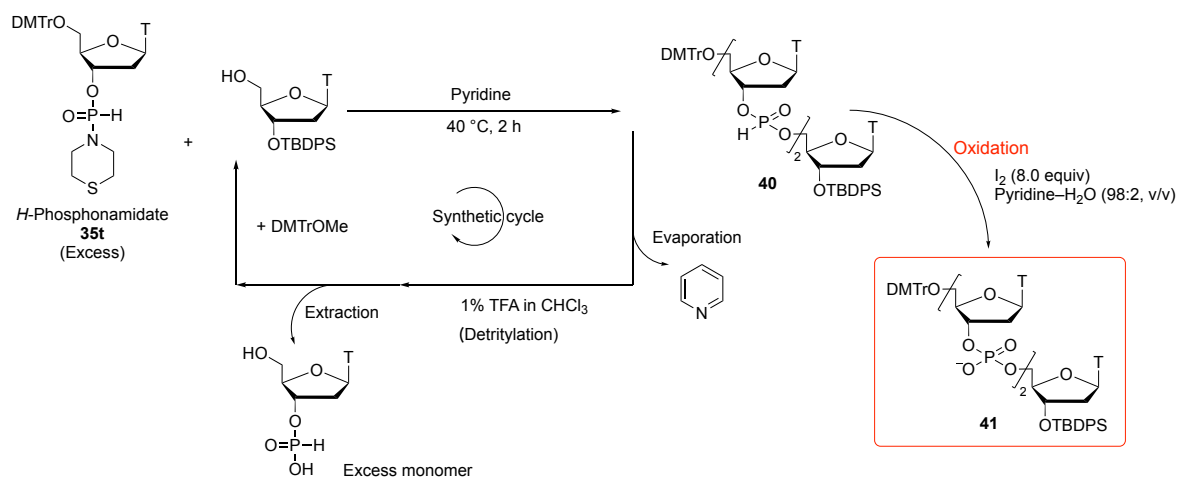
## Scheme 40 オリゴマー合成サイクル



## 5. 新規オリゴマー合成サイクルを用いた 3 量体の合成

立案したオリゴマー合成サイクルを用いて 3 量体 **41** の合成を行った。*H*-ホスホネートジエステル結合の変換は、ヨウ素による酸化反応を選択した。

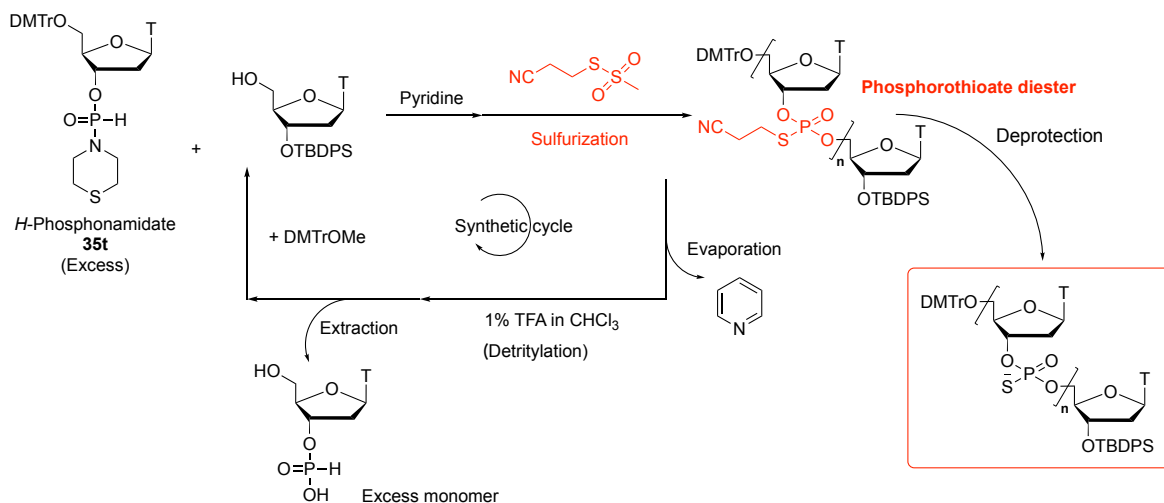
## Scheme 41



しかし、酸化反応後に  $^{31}\text{P}$  NMR を測定したところ、複数の副反応が進行していることが明らかとなった。これは、化合物 **40** の *H*-ホスホネートジエステル結合が、塩基性条件で高温になった際に分解したことが要因であると考えられる。これより、*H*-ホスホネートジエステル結合の状態で鎖長伸長を行うのは困難であると考えられる。そこで、*H*-ホスホネートジエステル結合を、安定な結合へと逐次的に変換しながら、鎖長伸長を目指すことにした。

ここでは、縮合反応後に生成する *H*-ホスホネートジエステル結合を硫化し、安定なホスホロチオエートジエステル結合へと変換することを選択した。改良したオリゴマー合成サイクルを Scheme 42 に示す。

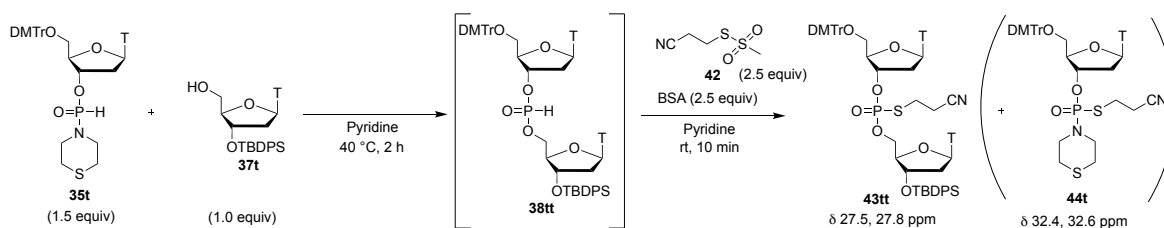
#### Scheme 42 逐次的硫化反応を含むオリゴマー合成サイクル



#### 6. 縮合及び硫化をワンポットで行う反応の検討

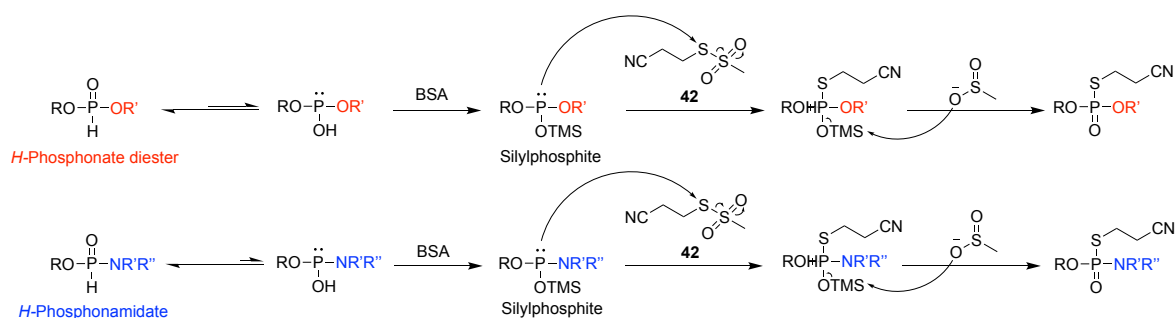
オリゴマーサイクルの確立を目指し、ホスホロチオエートジエステル 2 量体の合成を行った。これまでと同様に、ピリジン溶媒中、40 °C で 2 時間の縮合反応を行った後、室温に戻し、硫化剤 **42** と *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) を 2.5 当量ずつ用いて、硫化反応を行った (Scheme 43)<sup>53</sup>。

#### Scheme 43



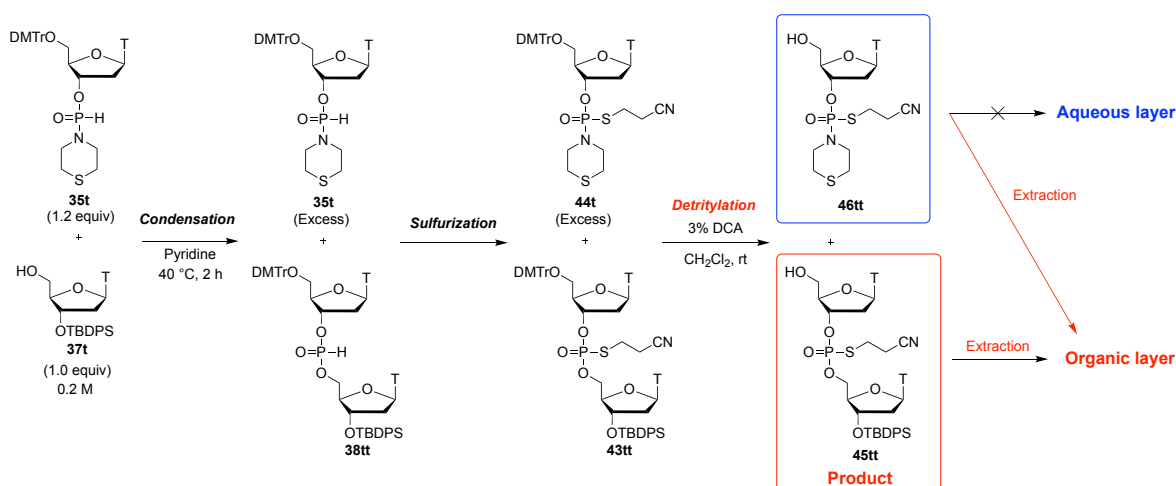
また、BSA 存在化では Scheme 44 に示す機構で反応が進行すると考えられる。シリル化剤である BSA はホスホン酸誘導体の 2 種類の互変異性体のうち、ホスファイト型の水酸基と反応し、シリルホスファイトへと変換される。これにより、互変異性化はホスファイト型へと固定される。そして、シリルホスファイトのリン原子上の非共有電子対が硫化剤 **42** と反応することで硫化反応は進行する。

### Scheme 44



硫化後 10 分の  $^{31}\text{P}$  NMR を測定したところ、反応の完結を確認した。化合物 **38tt** は化合物 **43tt** ( $^{31}\text{P}$  NMR: 27.5, 27.8 ppm) に、過剰に用いた *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** は化合物 **44t** ( $^{31}\text{P}$  NMR: 32.4, 32.6 ppm) にそれぞれ変換された。次に化合物 **43tt** と化合物 **44tt** の混合物に対して、5'-OH の脱保護反応を行い、抽出操作によって、過剰の *H*-ホスホンアミデート誘導体由来の化合物 **46tt** の水層への除去を試みた (Scheme 45)。

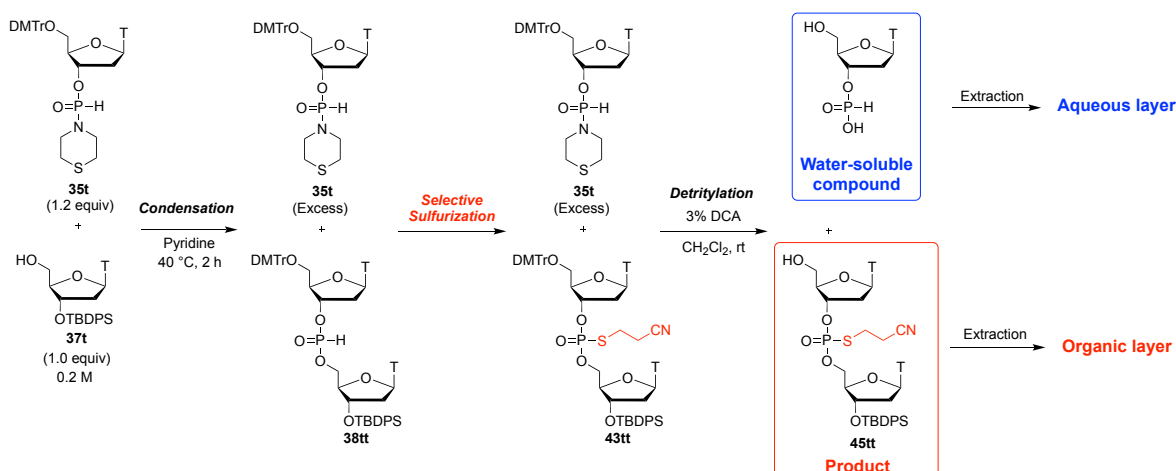
### Scheme 45



しかし、化合物 **46tt** は有機層に分配され、除去することができなかった。これは、化合物 **46tt** のシアノエチル基が疎水性の向上に寄与したためと考えられる。

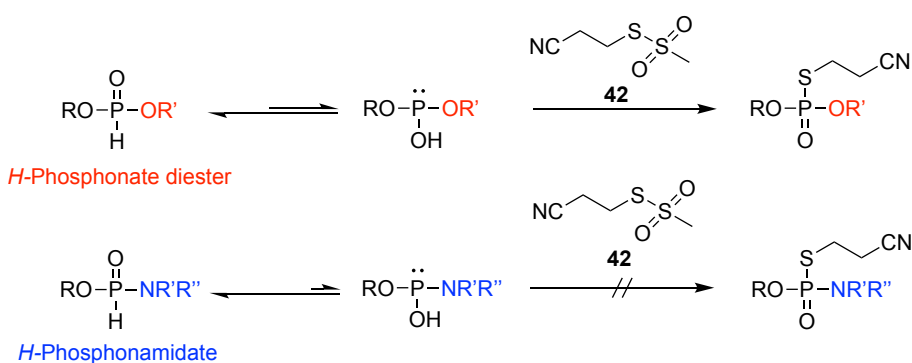
そこで、次の戦略として、目的物の *H*-ホスホネートジエステル結合のみを選択的に硫化することを考えた。その場合、これまで同様に抽出操作によって、過剰分の *H*-ホスホンアミデート誘導体を水層へと除去することができる (Scheme 46)。

**Scheme 46** *H*-ホスホネートジエステル選択的硫化反応を用いた合成



これまで、Wada らは、*H*-ホスホネートジエステル結合の方が *H*-ホスホンアミデート結合よりも、酸化剤や硫化剤との反応性が高いことを明らかにしてきた<sup>52</sup>。これには、それぞれの結合の互変異性化が関与している。*H*-ホスホネート誘導体には、*H*-ホスホネート型とホスファイト型の二種類の互変異性体が存在する。基本的に *H*-ホスホネート型の方に平衡は偏っているが、置換基の求電子性が高くなるほど、ホスファイト型への互変異性化が促進される。つまり、より電氣的に陰性な酸素原子が結合している *H*-ホスホネートジエステル体の方が、窒素原子が結合している *H*-ホスホンアミデート体よりホスファイト型への互変異性化が促進されている。また、酸化剤や硫化剤などの求電子剤は 2 種類の互変異性体のうち、ホスファイト型のリン原子と反応する。これにより、*H*-ホスホネートジエステル結合の方が硫化剤との反応性が高くなっている。

**Scheme 47** *H*-ホスホネート誘導体の硫化剤に対する反応性の違い



この反応性の差を利用し、化合物 **38tt** の *H*-ホスホネートジエステル結合を選択的に硫化する反応条件の確立に取り組んだ。Scheme43 では、硫化反応時に BSA をシリル化剤として用いた。これは、*H*-ホスホネート誘導体のホスファイト型へ誘導し、硫化反応を効率的に行う目的で加えていた。しかし、BSA は *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** もシリルホスファイトへと誘導するため、硫化剤と反応し、化合物 **46tt** が生成したと考えられる。

そこで今回は、BSA を加えず、硫化剤の当量も 2.5 当量から 1.2 当量まで減らし、*H*-ホスホネートジエステル結合のみを選択的に硫化することを試みた (Scheme 48)。硫化後の  $^{31}\text{P}$  NMR の結果より、期待通りに、*H*-ホスホネートジエステル結合選択的な硫化反応の進行を確認した (Figure 21 : 上)。

その後、5'-水酸基の脱保護と抽出操作を行ったところ、目的物のみを有機層に回収した。過剰に用いた *H*-ホスホンアミデート誘導体を、水層へ除くことができ、高純度かつ安定な中間体を抽出操作のみで得ることができた (Figure 21 : 下)。

### Scheme 48

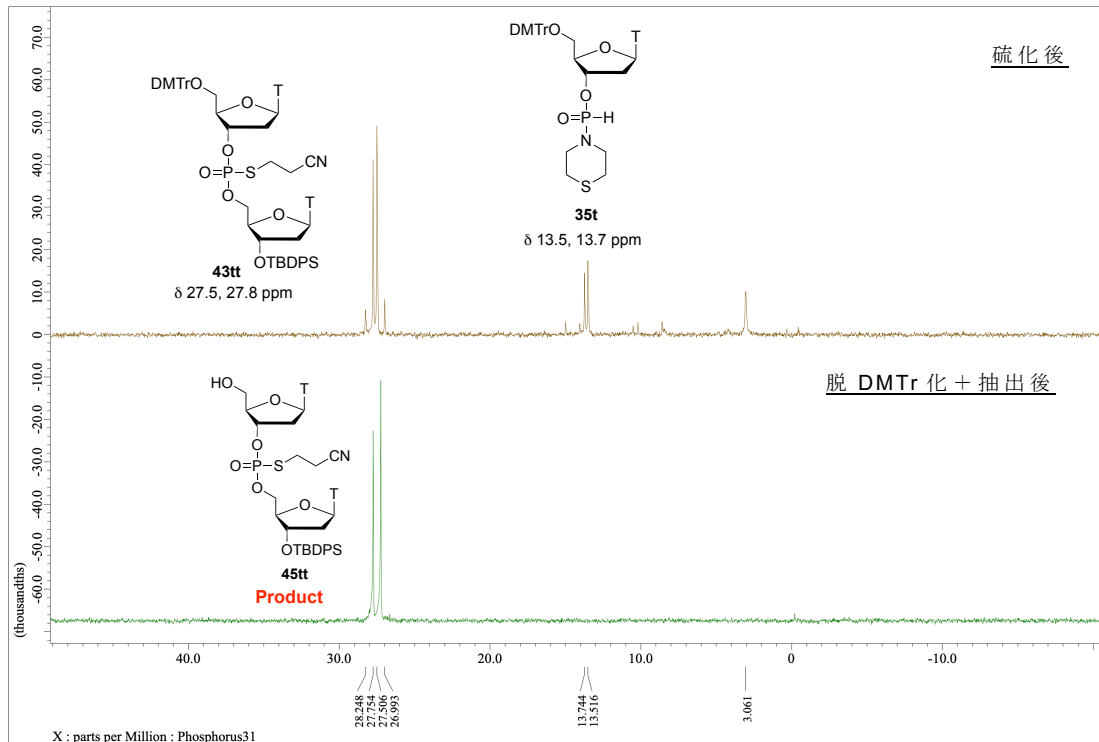
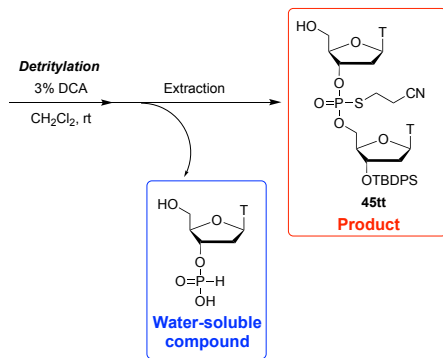
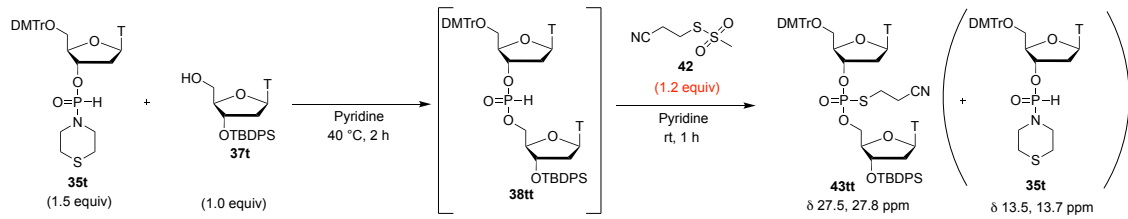


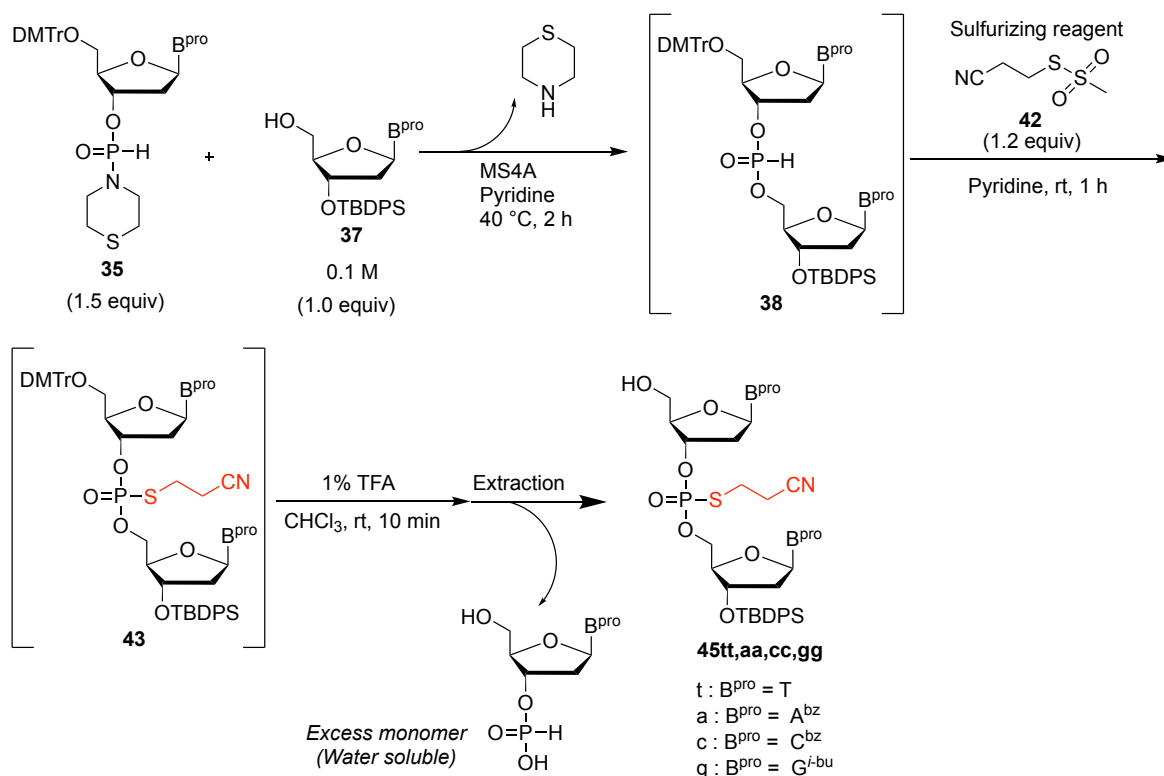
Figure 21  $^{31}\text{P}$  NMR 結果 (上 : 硫化後、下 : 脱 DMTr 化 + 抽出後)

## 7. 4種塩基への応用

新規オリゴマー合成サイクルの確立を目指し、チミジン以外の核酸塩基を有する誘導体においても、同様の反応を適応することができるかの確認を行った。

縮合反応、硫化反応、脱 DMTr 化反応、抽出操作、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を経て、5'-水酸基遊離の2量体 **45** を収率 74-78% で単離した。これにより、全ての核酸塩基部を有する誘導体において、本合成法が適応可能であることを示した。

Table 12 4種塩基を含む誘導体での合成



Entry	<i>H</i> -Phosphonamidate monomer	5'-OH nucleoside	Product	Isolated yield (%)
1	<b>35t</b>	<b>37t</b>	<b>45tt</b>	74
2	<b>35a</b>	<b>37a</b>	<b>45aa</b>	75
3	<b>35c</b>	<b>37c</b>	<b>45cc</b>	75
4	<b>35g</b>	<b>37g</b>	<b>45gg</b>	78

## 8. T-3量体の合成

ここまで最適化してきた条件を用い、液相でのトリチミジンホスホロチオエート3量体 (T<sub>Ps</sub>T<sub>Ps</sub>T) の合成を試みた。ここでは、抽出による精製操作のみで3量体の合成を行っている。具体的な合成手順は以下の通りである。(Scheme49,



Table13) (1) 3'-TBDPS-チミジン **37t** と *H*-ホスホンアミデートモノマー **35t** をピリジン溶媒中、加熱することで縮合した。(2) 硫化剤 **42** を用いて硫化後、過剰の硫化剤をジメチルホスホネートでクエンチした。(3) トルエン共沸を行い、溶媒として用いたピリジンを除去した。(4) 1% TFA/CHCl<sub>3</sub> を用いて、DMTr 基の脱保護を行った。(5) 有機層に CHCl<sub>3</sub>、水層に sat NaHCO<sub>3</sub> aq を用いた抽出により、縮合時に加えた過剰の *H*-ホスホンアミデートモノマーの残渣を水層側へと除去した。(6)–(10) (1)–(5)と同様の操作を繰り返し、3 量体を合成した。(11)–(13) 3 量体の脱保護反応、抽出操作を順次行った。(14) 有機層にジエチルエーテル、水層に 3% (w/w)アンモニア水を用いた抽出により、保護基の残渣を有機層に除去しつつ、目的の 3 量体 **46** をアンモニウム塩の状態の水層側を取得した。溶媒を留去し、得られた混合物を ODS カラムを用いた逆相 HPLC で分析した。

#### Scheme 49 チミジン 3 量体(46)の合成

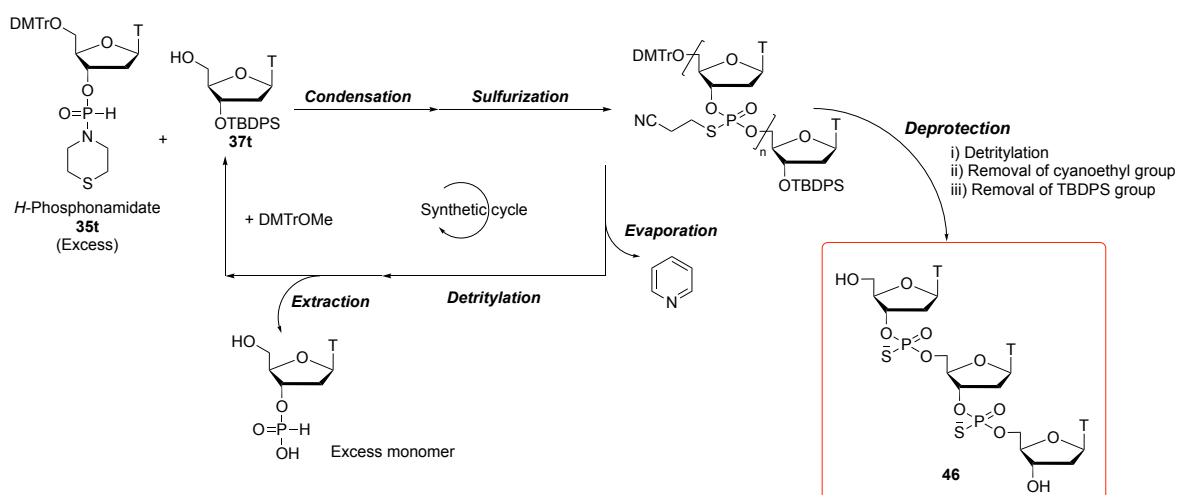
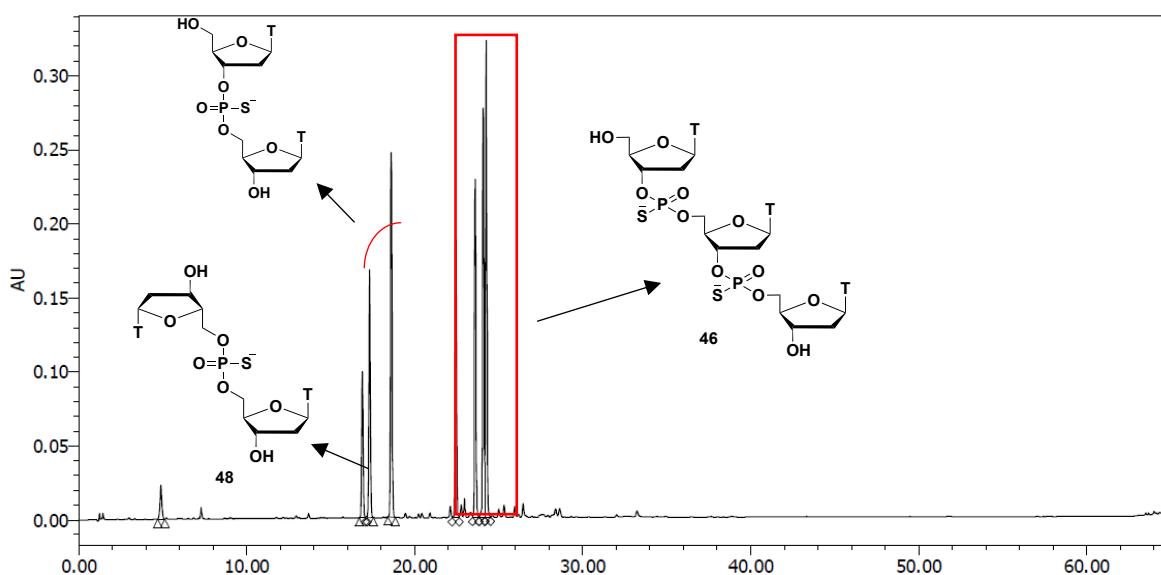


Table 13 反応条件と合成操作

Step	Operation	Reagents and conditions
1	Condensation	<b>33t</b> (1.5 equiv), <b>35t</b> (std), pyridine, 40 °C, 2 h
2	Sulfurization	Sulfurizing reagent <b>40</b> (1.2 equiv) in pyridine, rt, 1 h → Quenched with dimethyl phosphonate (6 equiv)
3	Evaporation	Coevaporation with toluene × 3
4	Detritylation	1% TFA in CHCl <sub>3</sub> , rt, 10 min
5	Extraction	CHCl <sub>3</sub> –sat. NaHCO <sub>3</sub>
6	Condensation	<b>33t</b> (1.5 equiv), pyridine, 40 °C, 2 h

7	Sulfurization	Sulfurizing reagent <b>40</b> (1.2 equiv) in pyridine, rt, 1 h
8	Evaporation	Coevaporation with toluene × 3
9	Detritylation	1% TFA in CHCl <sub>3</sub> , rt, 10 min
10	Extraction	CHCl <sub>3</sub> -sat. NaHCO <sub>3</sub>
11	Removal of cyanoethyl group	BSA (8 equiv), DBU (13 equiv) in CH <sub>3</sub> CN, rt, 10min
12	Extraction	CHCl <sub>3</sub> -1.0 M TEAB buffer (pH 8)
13	Removal of TBDPS group	TBAF (15 equiv) in THF, rt, 2 h
14	Extraction	Et <sub>2</sub> O-EtOH-3% NH <sub>3</sub> aq



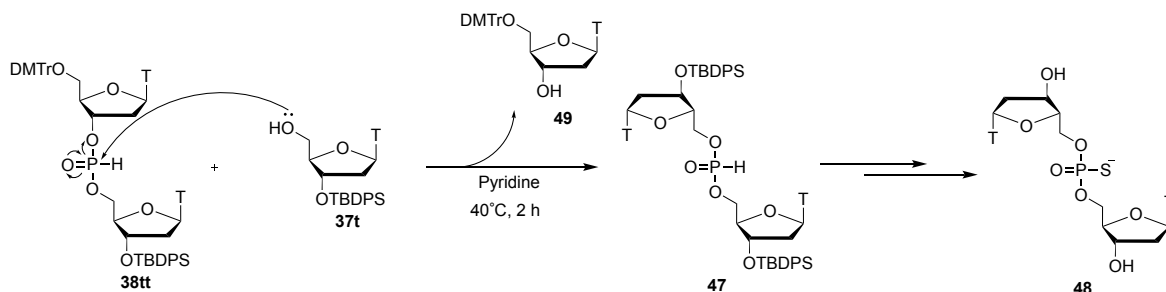
**Figure 22** RP-HPLC profile of crude TPsTPsT; RP-HPLC was performed with a linear gradient of 0%–30% CH<sub>3</sub>CN in 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) buffer (pH 7.0) over 60 min at 50°C at a rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>.

得られた HPLC チャートを Figure 22 に示す。23–24.5 分付近のピークを分取して ESI-MS によって分析したところ、目的物である 3 量体 **46** の  $m/z$  と一致したため、目的物が主生成物として得られたことがわかった (HPLC 収率: 70%)。また、過剰に用いた *H*-ホスホンアミデートモノマーに由来するピークは観測されず、抽出操作のみで鎖長伸長を目指す本合成戦略の有用性が示された。最終的には C18 シリカを用い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、3'-*O*-TBDPS チミジン **37t** を基準として、単離収率 32% で 3 量体 **46** を得た。

しかし、HPLC の結果より、未反応の 2 量体と 5'-対称構造を有する化合物が観

測された。5'-対称体は、1 回目の縮合反応時の副反応に由来すると考えられる (Scheme 50)。この副反応では、縮合反応によって生成した目的物 **38tt** の *H*-ホスホネートジエステル結合に対し、化合物 **37t** の水酸基が求核攻撃し、化合物 **49** が脱離することで 5'-対称体 **47** が生成する。縮合反応後の混合物に対して  $^{31}\text{P}$  NMR 解析と質量分析を行い、5'-対称体 **47** を同定した ( $^{31}\text{P}$  NMR : 9.6 ppm、HRMS (ESI-TOF) :  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{63}\text{N}_4\text{NaO}_{11}\text{PSi}_2^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1029.3662; found 1029.3669.)。続く硫化反応において、この 5'-対称体 **47** も目的物と同様に硫化され安定な化合物へと変換されたと考えられる。最終的に脱保護反応を経て 5'-対称体 **48** へと変換されたと考えられる。

### Scheme 50 副反応による 5'-対称体の生成機構



これらの結果より、本合成法では以下の課題を解決する必要がある。

1. 反応性の低さ (40 °C, 2 h で縮合効率 70% では反応性が不十分)
2. 5'-対称体の生成

### 第三節 小括

本節では、塩基性条件下 2 つの化合物を混合、加熱するだけで縮合反応が進行する新しい合成法の開発を達成した。また、抽出操作のみで安定かつ純度の高い中間体を得ることができるため、液相法での大量合成への応用が期待される。一方で、反応性の低さや 5'-対称体が生成する副反応が確認されており、改善の余地が残されている。

## 第四節 *H*-ホスホンアミデート誘導体の活性化 (酸性条件)

### 1. 酸性活性化剤による活性化

第三節で述べたように、モルフォリノ基を導入した *H*-ホスホンアミデート誘導体は、酸性活性化剤である TET では活性化されないことが示されている。そこで、チオモルフォリノ基を導入した場合でも、同様の結果を示すのかを確認することにした。*H*-ホスホンアミデートモノマー **35t** と化合物 **37t** を様々な酸性活性化剤

存在化、CD<sub>3</sub>CN 溶媒中で縮合反応を試みた。反応 2 時間後の <sup>31</sup>P NMR を測定し、縮合効率を確認した。結果を Table 14 に示す。また、縮合効率と酸性活性化剤の pKa の関係を Figure 23 に示した。なお、これ以降の全ての実験において、NMR 収率の算出方法として以下に示す計算方法を採用している。

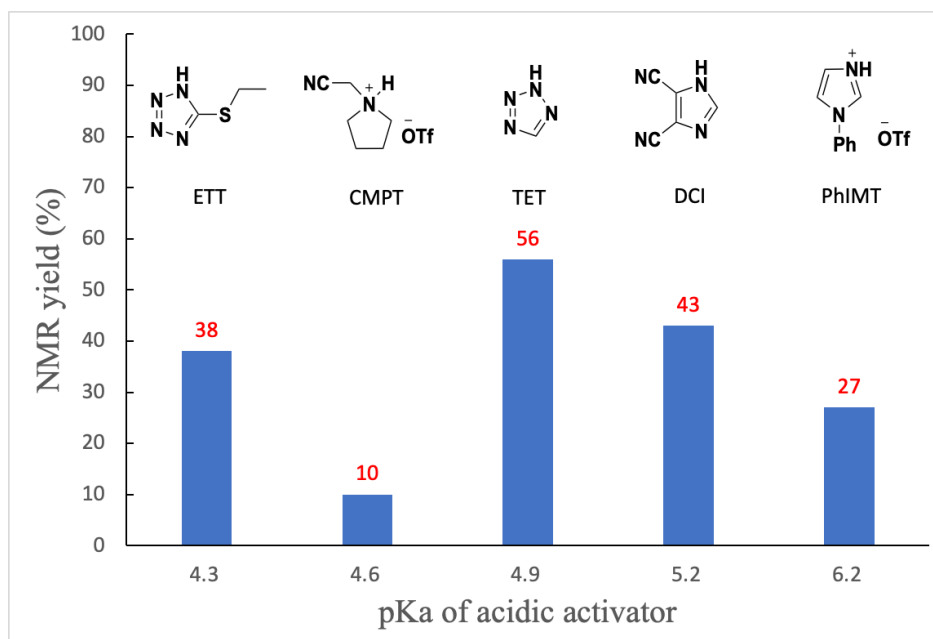
[NMR 収率算出方法]

{(目的物のシグナルの積分値の合計) / (全てのシグナルの積分値の合計)} / 1.2\*

\*H-ホスホンアミデートモノマーを 1.2 当量用いているので、1.2 で除している。

Table 14 酸性活性化剤を用いた縮合反応の検討

Entry	Acidic activator	pKa of acidic activator	NMR yields (%)
1	ETT	4.3	38
2	CMPT	4.6	10
3	TET	4.9	56
4	DCI	5.2	43
5	PhIMT	6.2	27



**Figure 23 酸性活性化剤の pKa と縮合効率の関係**

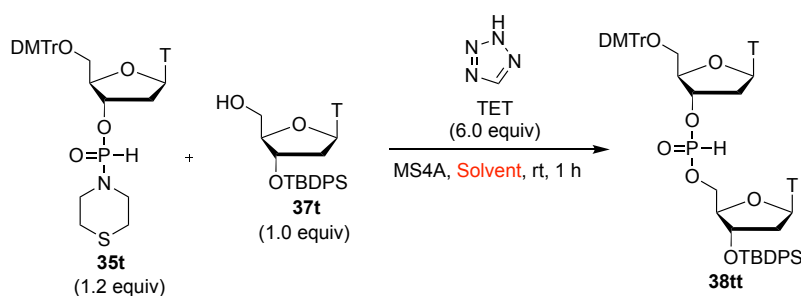
その結果、どの酸性活性化剤を用いた際にも、縮合反応が進行し、*H*-ホスホネートジエステル **38tt** の生成が確認された ( $^{31}\text{P}$  NMR: 9.3, 8.5 ppm,  $^1J_{\text{PH}} = 720, 726$  Hz)。前述した通り、これまで、ジイソプロピルアミノ基やモルフォリノ基を導入した *H*-ホスホンアミデート誘導体は酸性条件下で活性化されないことが明らかとなっていた。本反応は *H*-ホスホンアミデート誘導体を酸性条件下で活性化した初の事例となる。

Figure 23 より、TET<sup>54</sup> を用いた際に、最も優れた結果を示している (entry 3)。最も酸性度の高い ETT<sup>55</sup> や最も求核性の高い PhIMT<sup>56</sup> を用いた際には、縮合効率が低下した (entry 1, 5)。また、求核性を有さない酸性活性化剤として開発された CMPT<sup>57</sup> を用いると顕著に縮合効率が低下していること分かる (entry 4)。これより、*H*-ホスホンアミデート誘導体の活性化には、酸性活性化剤の求核性と酸性度の両方が重要であることが示唆された。

## 2. 溶媒の検討

次に、反応溶媒の検討を行った。*H*-ホスホンアミデートモノマー **35t**、化合物 **37t**、酸性活性化剤として TET を用いて、様々な溶媒中での縮合反応を行った。反応 1 時間後の  $^{31}\text{P}$  NMR を測定し、縮合効率を確認した。結果を Table 15 に示した。

Table 15 溶媒が縮合反応に与える影響の検討



Entry	Solvent	Additives	NMR yields (%)
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	–	0
2	THF	–	12
3	CH <sub>3</sub> CN	–	22
4	CH <sub>3</sub> CN	Pyridine (6 equiv)	80
5	Pyridine (p <i>K</i> <sub>aH</sub> = 5.2)	–	95
6	2,6-Lutidine (p <i>K</i> <sub>aH</sub> = 6.6)	–	16

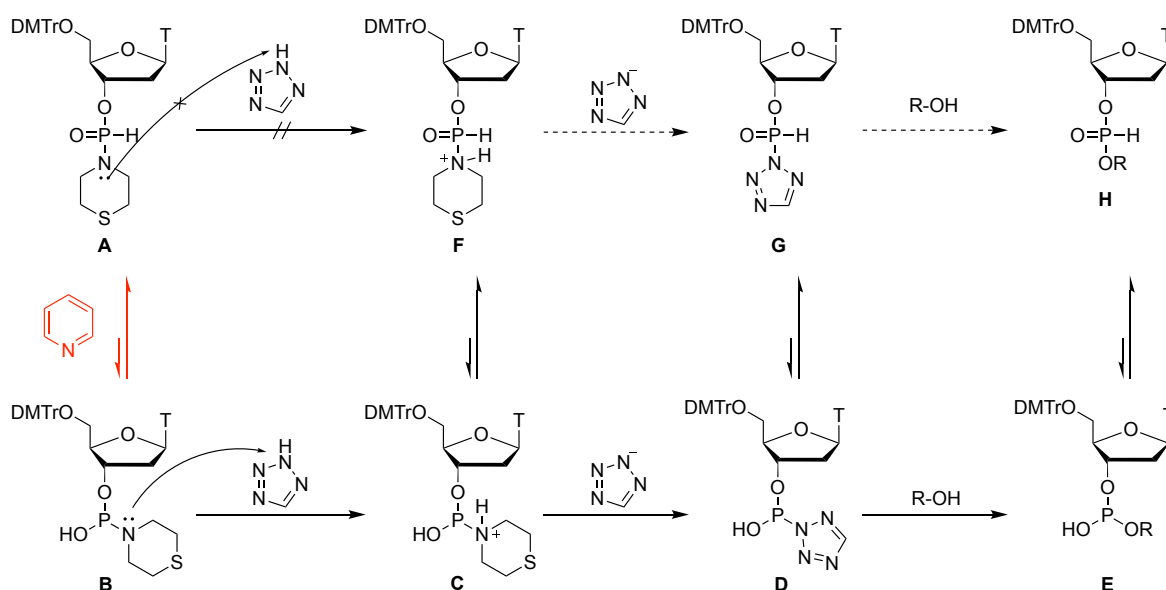
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中では、全く縮合反応が進行しなかった (entry 1)。THF、CH<sub>3</sub>CN 中では一部、縮合反応が進行した (entry 2, 3)。一方、CH<sub>3</sub>CN 中で 6 当量の pyridine を加えることで、大幅に縮合効率が向上した (entry 4)。そこで、pyridine 溶媒中で縮合反応を行ったところ、縮合効率 95% と優れた結果を得た (entry 5)。pyridine が縮合反応に与えた影響を以下のように考察した。*H*-ホスホンアミデート誘導体の活性化機構 (推定) を Scheme 51 に示す。*H*-ホスホンアミデート誘導体の互変異性体の一つである *H*-ホスホネート型 (**A**) のチオモルフォリノ基は塩基性が低く、TET で活性化されない。一方で、もう一つの互変異性体であるホスファイト型 (**B**) のチオモルフォリノ基は TET で活性化される。一般的に *H*-ホスホネート誘導体の二つの互変異性体間の平衡は、大きく *H*-ホスホネート型 (**A**) に偏っている。そのため、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、THF、CH<sub>3</sub>CN 中での縮合反応は効率よく進行しなかったと考えられる。しかし、pyridine 中では、pyridine 自体が塩基として働き、ホスファイト型 (**B**) への互変異性を促進した。これによって、pyridine 中での縮合効率が向上したと考えられる。

そこで、pyridine (p*K*<sub>aH</sub> = 5.2) より塩基性の高い 2,6-lutidine (p*K*<sub>aH</sub> = 6.6) を溶媒として用いることで、系中の塩基性を高くし、互変異性の促進を図った (entry 6)。しかし、縮合効率は大幅に低下した。これは、ホスファイト型 (**B**) のチオモルフォリノ基の塩基性が 2,6-lutidine より低く、系中に加えた TET が 2,6-lutidine によって脱プロトン化され、2,6-lutidinium tetrazolide を形成し、チオモルフォリ

ノ基の活性化を阻害したと考えられる。これより、 $pK_{aH}$ の序列は pyridine ( $pK_{aH} = 5.2$ ) < *H*-ホスホンアミデートのチオモルフォリノ基 < 2,6-lutidine ( $pK_{aH} = 6.6$ ) であると推察される。

また、2,6-lutidine 中で、16%ほど縮合反応が進行した理由としては、2,6-lutidine が塩基として働き、化合物 **37t** の 5'-水酸基が *H*-ホスホンアミデート誘導体のリン原子に対して、直接的に求核攻撃する反応を促進したと考えられる。この反応は、第三節で記述した塩基性条件下での縮合反応と類似した反応である。

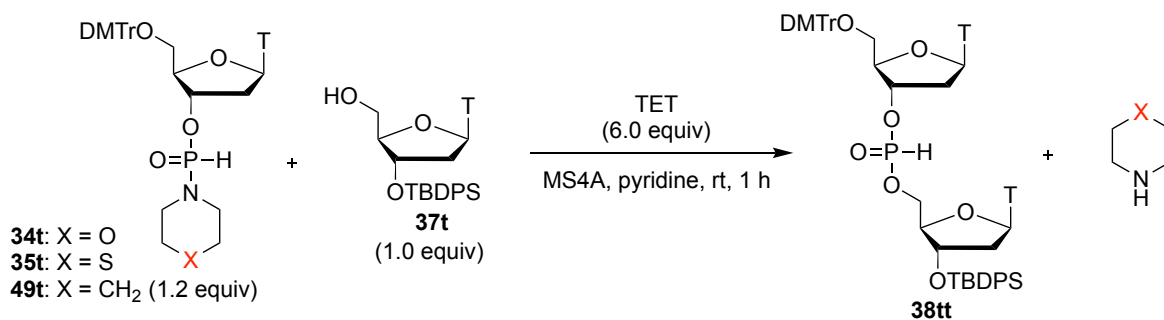
Scheme 51 推定反応機構とピリジンの効果



### 3. 脱離基の検討

次に、*H*-ホスホンアミデート誘導体の脱離基が縮合反応に与える影響を検討した。脱離基として、モルフォリノ基、チオモルフォリノ基、ピペリジノ基を有する *H*-ホスホンアミデート誘導体 **34t**, **35t**, **49t** を検討に用いた。*H*-ホスホンアミデート誘導体 **34t** と **35t** は第 3 節で合成・単離したものをを用いた。*H*-ホスホンアミデート誘導体 **49t** は既存の合成法に従って合成・単離したものをを用いた<sup>37</sup>。3 種類の *H*-ホスホンアミデート誘導体、化合物 **37t** と TET を用いて縮合反応を行った。Pyridine 中で 1 時間反応を行った後に、<sup>31</sup>P NMR の測定を行い、縮合効率を確認した。結果を Table 16 に示す。

Table 16 脱離基が縮合効率に与える影響



Entry	<i>H</i> -phosphonamidate monomers	X	p <i>K</i> <sub>aH</sub> of leaving group	NMR yields (%)
1	<b>49t</b>	CH <sub>2</sub>	11.1	63
2	<b>35t</b>	S	9.1	95
3	<b>34t</b>	O	8.3	87 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Byproducts were observed.

ピペリジノ基を有する *H*-ホスホンアミデート誘導体 **49t** を用いた場合、縮合反応は完結していなかった (entry 1)。一方で、チオモルフォリノ基、モルフォリノ基を有する *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t**, **34t** を用いると、縮合効率が向上した (entry 2, 3)。これらの結果より、環内に電気陰性度の高い原子 (S, O) を有する環状アミノ基が脱離基として優れていることが示唆された。ピペリジノ基の炭素原子を電気陰性の原子に置換すると、アミノ基の塩基性が低下し、TET による活性化が阻害され、縮合効率は低下することが予想された。しかし、縮合効率が向上する結果が得られた。この要因も、電気陰性度の高い原子が *H*-ホスホンアミデート誘導体のホスファイト型への互変異性化を促進したためと考えられる。この仮説の場合、O より S の方がより電氣的に陰性であるため、モルフォリノ基をもつ *H*-ホスホンアミデート誘導体 **34t** の方が (entry 3)、チオモルフォリノ基を有する *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** (entry 2) より優れた結果を示すと考えられるが、反対の結果が得られた。これは、前述したように、チオモルフォリノ基の方がモルフォリノ基より高い塩基性を示すため、TET による活性化が効率的に進行したためであると考えられる。つまり、環状アミノ基の塩基性とホスファイト型への互変異性化促進効果の両方が本縮合反応には重要であり、チオモルフォリノ基が最適であったと考えられる。

一方で、*H*-ホスホンアミデート誘導体 **34t** を用いると、副生成物が検出された (<sup>31</sup>P NMR: 30.2, 30.1 ppm)。この副生成物の量は極めて少量であるため、Table 16 が示す脱離基の違いによる反応性の序列には影響を与えていない。そこで、これ以降の検討には *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** を使用している。



#### 4. *H*-ホスホンアミデート誘導体に対する DFT 計算

前項で、「電気陰性度の高い原子が *H*-ホスホンアミデート誘導体のホスファイト型への互変異性化を促進した。」と述べた。この仮説を検証するために DFT 計算を行った。それぞれの *H*-ホスホンアミデート誘導体の 2 つの互変異性体に対して DFT 計算 (B3LYP/6-31G\*) を行った<sup>58</sup>。その際、ヌクレオシドの部分をもチル基に代用したモデル化合物 **I**, **J**, **K** (*H*-ホスホネート型), **i**, **j**, **k** (ホスファイト型) を用いた。Total energy と互変異性体間でのエネルギー差を Table 17 に示す。

Table 17 *H*-ホスホンアミデート誘導体の互変異性体間のエネルギー差

**I**: X = CH<sub>2</sub>  
**J**: X = S  
**K**: X = O

**H-Phosphonate form**

$\rightleftharpoons$

**Phosphite form**

**i**: X = CH<sub>2</sub>  
**j**: X = S  
**k**: X = O

Model Compounds	X	Total Energy (au)		Δ (kcal/mol) <sup>a</sup>
		<i>H</i> -Phosphonate	Phosphite	
<b>I</b> or <b>i</b>	CH <sub>2</sub>	- 783.33553	- 783.32123	8.98
<b>J</b> or <b>j</b>	S	- 1142.17342	- 1142.16018	8.31
<b>K</b> or <b>k</b>	O	- 819.22236	- 819.21000	7.76

$$^a \{(\text{phosphite form}) - (\text{H-phosphonate form}) \times 627.51$$

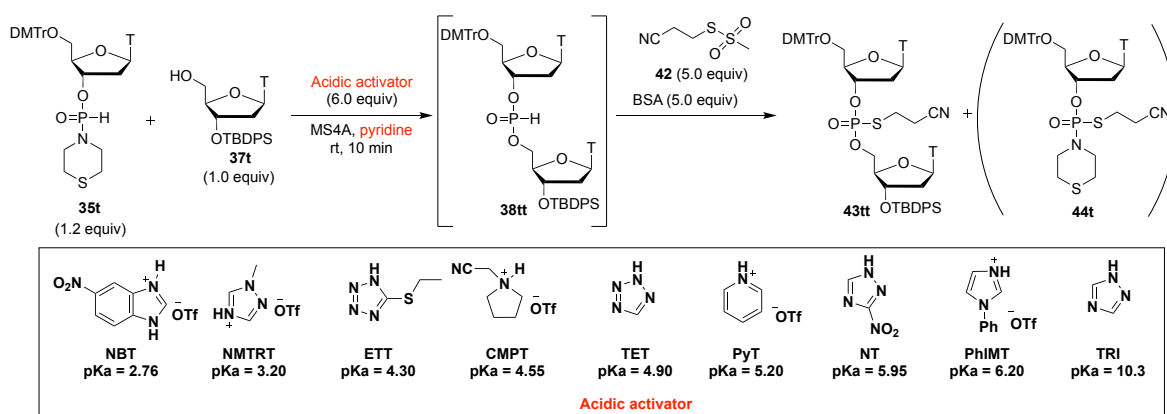
計算結果より、*H*-ホスホネート型の方が、ホスファイト型よりエネルギー的に安定であることが確認された。また、互変異性体間のエネルギー差は、ピペリジノ基を有する *H*-ホスホンアミデート誘導体で最も大きくなった (8.98 kcal/mol: **I**–**i**, X=CH<sub>2</sub>)。そして、ピペリジノ基の炭素原子を電気陰性の原子 (S, O) で置換することで、エネルギー差が小さくなることが明らかとなった (8.31 kcal/mol: **J**–**j**, X=S, 7.76 kcal/mol: **K**–**k**, X=O)。つまり、「電気陰性度の高い原子が *H*-ホスホンアミデート誘導体のホスファイト型への互変異性化を促進した。」という仮説と一致する計算結果が得られた。これにより、電気陰性度の高い原子を有する環状アミノ基が脱離基として適していることが示された。

#### 5. 酸性活性化剤の検討 (Pyridine 溶媒中)

これまでの検討により、最適溶媒が pyridine、最適脱離基がチオモルフォリノ基であることを示した。そこで、これらを用いた条件で、酸性活性化剤の検討を行った。*H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t**、化合物 **37t**、様々な酸性活性化剤を用

いて、pyridine 中で縮合反応を行った。本検討は、酸性活性化剤の反応性の差を明らかとすることを目的としている。そこで、反応時間を 10 分と短時間に設定することで、反応性の差を顕著に観測できるようにした。反応時間を正確に 10 分にするために、縮合 10 分後の反応溶液に硫化剤 **42** と BSA (シリル化剤) を加え、2 量体 **38tt** と未反応の *H*-ホスホンアミデート誘導体 **35t** を、それぞれ安定なホスホロチオエートジエステル **43tt** とホスホロチオアミデートモノエステル **44t** へと変換した。この硫化反応は試薬を加えると、瞬時に完結することを前節で確認しているため、硫化後の反応溶液を  $^{31}\text{P}$  NMR で測定することで、縮合後 10 分の縮合効率を算出することができる。結果を Table 18 と Figure 24 に示す。

**Table 18** 酸性活性化剤の検討 (Pyridine 溶媒中)



Entry	Acidic activator	pKa of acidic activator	NMR yields (%)
1	TRI	10.3	5
2	PhIMT	6.20	62
3	NT	5.95	37
4	PyT	5.20	55
5	TET	4.90	46
6	CMPT	4.55	68
7	ETT	4.30	55
8	NMTRT	3.20	59
9	NBT	2.76	63

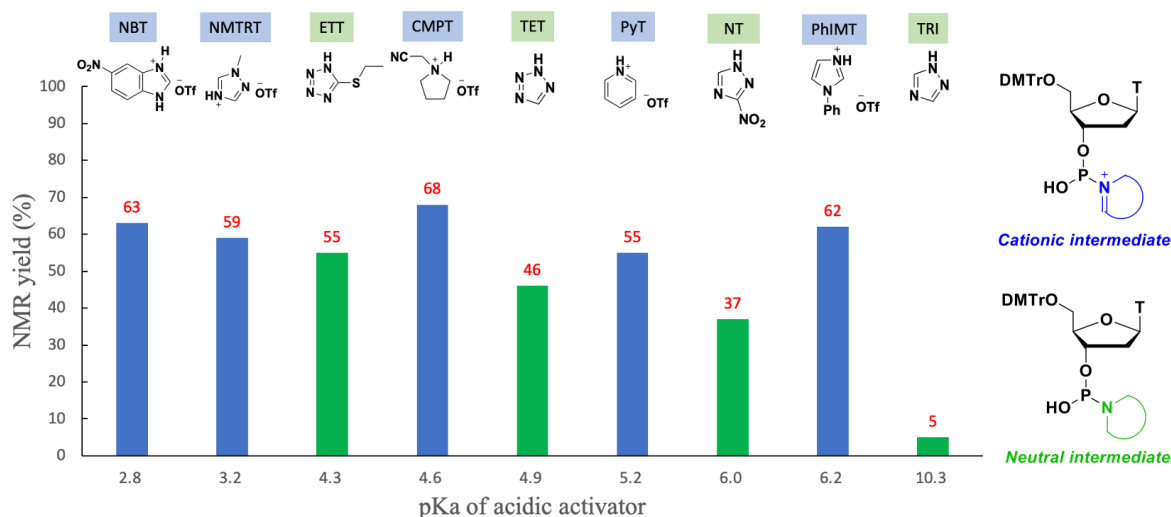


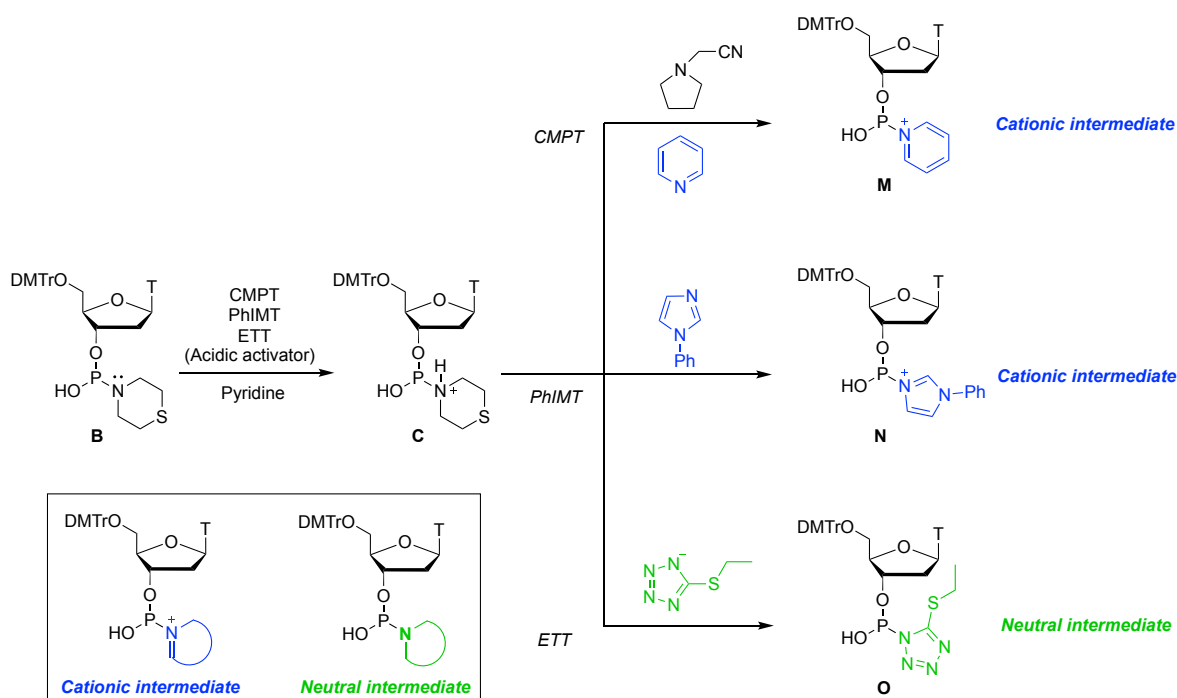
Figure 24 縮合効率と酸性活性化剤の  $pK_a$  の関係

$pK_a$  が 2.76 から 10.3 の範囲の様々な酸性活性化剤を検討した。Figure 24 より、酸性度が高くなるほど、縮合効率が向上する傾向が得られた。また、CMPT (entry 5)、NMTRT<sup>59</sup> (entry 7)、NBT<sup>60</sup> (entry 8) を用いた際には、同程度の縮合効率であったことから、酸性活性化剤の酸性度が縮合反応に与える効果は、 $pK_a = 4.5$  付近で飽和していると言える。

また、注目すべき点は、 $CH_3CN$  中では最も活性の低かった CMPT が、pyridine 中では最も高い活性を示した点である。CMPT を  $CH_3CN$  中で用いた場合、系中には求核触媒が存在しない。一方、TET のような酸性活性化剤を用いた際には、TET の共役塩基 (テトラゾリドアニオン) が求核触媒として働き、縮合反応が促進されると考えられる。それに対し、pyridine 中では、pyridine 自体が求核触媒としても働くことができるため、CMPT のような非求核性の酸性活性化剤を用いた際にも、縮合反応が促進されたと考えられる (Scheme 52)。

一方で、PhIMT (entry 2) や ETT (entry 7) を用いた際の結果が、「酸性度が高いほど高い縮合効率を示す。」という傾向から外れていた。これは、酸性活性化剤が与える中間体を考慮すると説明ができる。Figure 23 において、青色で示した酸性活性化剤は、カチオン性の中間体を与える。一方で、緑色で示したものは、非イオン性の中間体を与える。カチオン性中間体を与える酸性活性化剤の例として CMPT と PhIMT を、非イオン性中間体を与える例として ETT を Scheme 52 に示した。

## Scheme 52 酸性活性化剤が与える中間体



PhIMT の  $pK_a$  は 6.2 と低いにも関わらず、比較的高い縮合効率 (62%, entry 2) を示したのは、反応性の高いカチオン性中間体 **N** を経由するためであると考えられる。一方、酸性度は CMPT ( $pK_a = 4.6$ ) より高いにも関わらず、ETT ( $pK_a = 4.3$ ) の縮合効率が低かった要因は、CMPT が与えるピリジニウム中間体 **M** と比較して、活性の劣る非イオン性中間体 **O** を経由したためであると考えられる。これらの結果より、適度な酸性度を有し、カチオン性の中間体を与える CMPT が、pyridine 中での最適な酸性活性化剤であると考えられる。

## 6. 中間体に対する DFT 計算

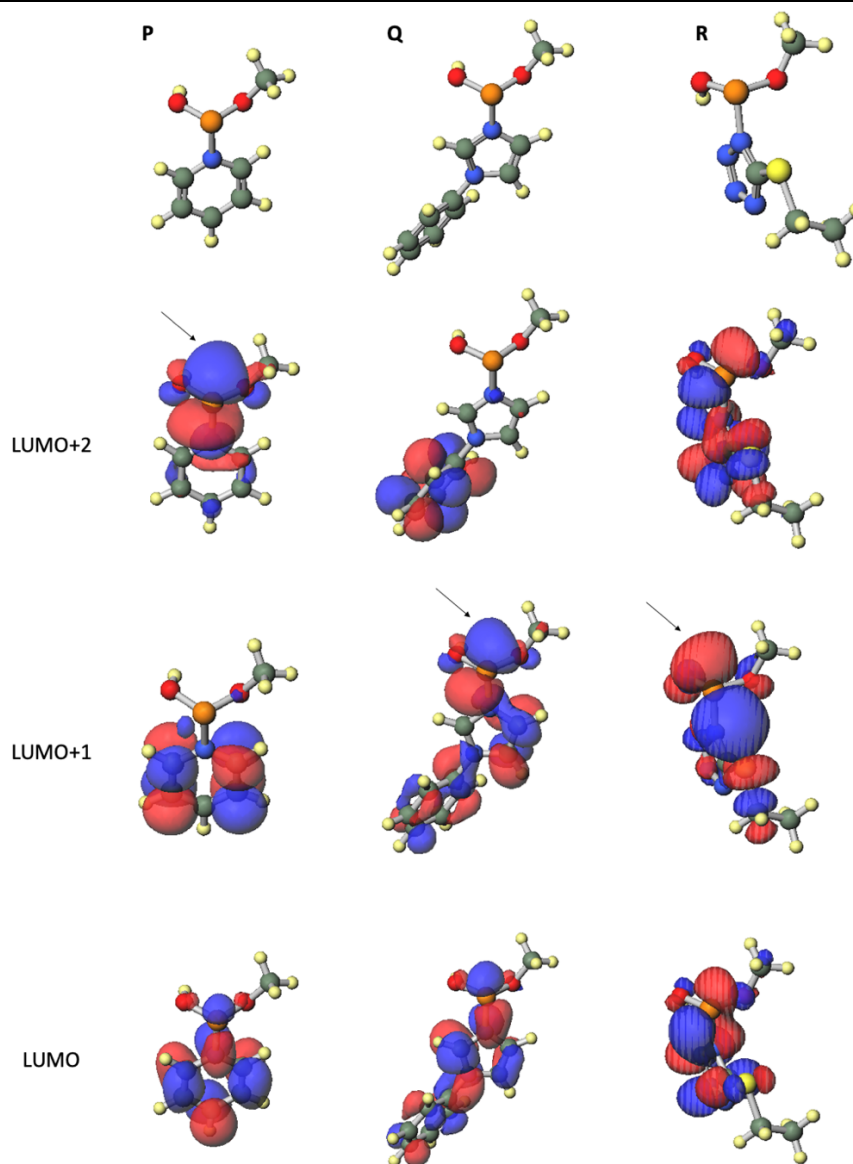
前項で示した、中間体 **M**、**N**、**O** に対して DFT 計算を行い、反応性の違いを確認した。その際、ヌクレオシドの部分をもチル基に代用したモデル化合物 **P**、**Q**、**R** に対して DFT 計算 (B3LYP/6-31G\*) を行った<sup>58</sup>。軌道エネルギー、最適化された分子構造、分子軌道を Table 19 と Figure 25 に示す。

縮合反応には、リン原子上かつ脱離基の反対側に存在する軌道が重要である。ピリジニウム中間体 **P** は、脱離基の反対側に、大きな LUMO+2 が存在する。一方で、フェニルイミダゾリウム中間体 **Q** とエチルテトラゾリド中間体 **R** は、脱離基の反対側に、大きな LUMO+1 が存在する (Figure 25)。これらの軌道エネルギーを比較すると、非イオン性のエチルテトラゾリド中間体 **R** (LUMO+1: -0.4626 eV) より、カチオン性のピリジニウム中間体 **P** (LUMO+2: -4.1769 eV) とフェニルイミダゾリウム中間体 **Q** (LUMO+1: -3.8123 eV) の方が顕著に低くなっていること

が分かる。つまり、カチオン性の中間体の方が、求核種に対して高い反応性を示すと言え、実験結果と一致する。よって、適度な酸性度を有し、ピリジニウム中間体のような、カチオン性中間体を与える酸性活性化剤が *H*-ホスホンアミデート誘導体の活性化に適していることが、実験結果と計算結果から示された。

**Table 19** 中間体の軌道エネルギー

	Orbital Energy (eV)		
	Pyridinium intermediate (P)	Phenylimidazolium intermediate (Q)	Ethylthiotetrazolide intermediate (R)
LUMO+2	-4.1769	-3.5130	0.5116
LUMO+1	-5.1420	-3.8123	-0.4626
LUMO	-6.1226	-4.7620	-0.7538

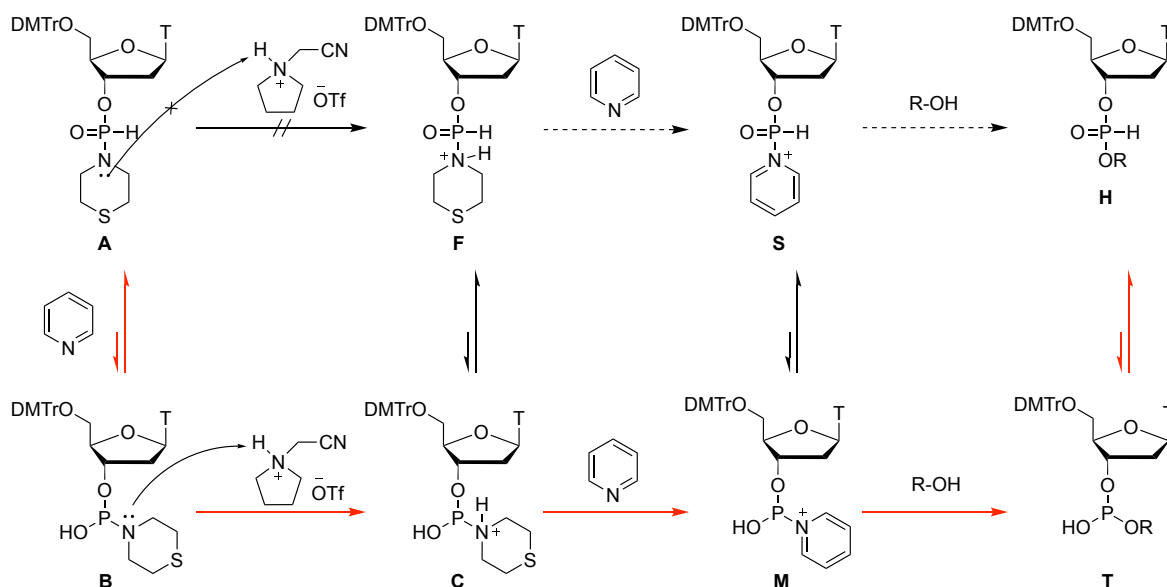


**Figure 25** 最適構造と分子軌道

## 7. 反応機構の推察

これまでの結果を踏まえて、*H*-ホスホンアミデート誘導体が CMPT で活性化される機構を考察した (Scheme 53)。初めに、*H*-ホスホネート型 **A** からホスファイト型 **B** への互変異性化が pyridine によって促進される。ホスファイト型 **B** のチオモルフォリノ基が CMPT で活性化され、ピリジニウム中間体 **M** が生成する。これが水酸基と反応し、*H*-ホスホネートジエステル **H** が得られる。

Scheme 53

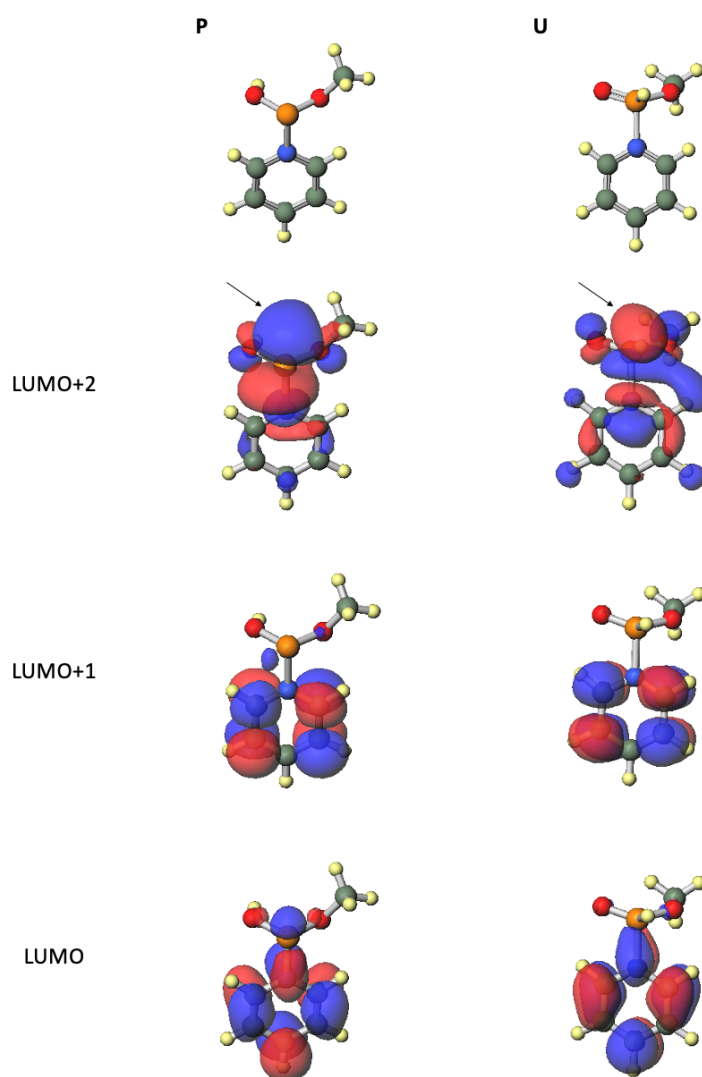


この反応機構の場合、ピリジニウム中間体 **M** の互変異性体であるピリジニウム中間体 **S** が **R-OH** と反応する可能性も考えられる。そこで、この二つの中間体に対して、DFT 計算を行い、反応性を確認した。その際、ヌクレオシドの部分をもチル基に代用したモデル化合物 **P**, **U** に対して DFT 計算 (B3LYP/6-31G\*) を行った。軌道エネルギー、最適化された分子構造、分子軌道を Table 20 と Figure 26、27 に示す。Figure 26 に示すように、どちらのピリジニウム中間体においても、脱離基の反対側に大きな LUMO+2 が存在している。これらの軌道エネルギーを比較すると、ホスファイト型中間体 **P** (LUMO+2: -4.1769 eV) の方が *H*-ホスホネート型中間体 **U** (LUMO+2: -3.0722 eV) より低く、反応性が高いことが分かる。また、軌道の大きさを比較した際にも、ホスファイト型の方が大きく、求核種の軌道と強い相互作用を示すと考えられる (Figure 26)。Figure 27 には、各中間体の HOMO と MeOH の LUMO を示している。ホスファイト型中間体 **P** には、リン原子上に大きな HOMO が存在しているのに対し、*H*-ホスホネート型中間体 **U** には P=O 結合の酸素原子上に小さな HOMO が存在している。一方、求核種である **R-OH** のモデル化合物として MeOH を計算に用いたが、MeOH の水酸基の水素原子上に大き

な LUMO が存在することが分かる。以上より、ホスファイト型中間体 **P** の HOMO と求核種である R-OH の LUMO の間には、二次的分子軌道相互作用が働くと考えられる (Figure 28)。一方、*H*-ホスホネート型中間体 **U** の P=O 結合の酸素原子上の HOMO の軌道係数が小さく、二次的分子軌道相互作用の寄与は小さい (Figure 28)。これらの理由から、ホスファイト型のピリジニウム中間体 **M** が真の活性種であると考えられる。

**Table 20** *H*-ホスホネート型中間体とホスファイト型中間体の軌道エネルギー

	Orbital Energy (eV)	
	Phosphite-form ( <b>P</b> )	<i>H</i> -phosphonate-form ( <b>U</b> )
LUMO+2	-4.1769	-3.0722
LUMO+1	-5.1402	-5.4831
LUMO	-6.1226	-6.6124



**Figure 26** *H*-ホスホネート型中間体とホスファイト型中間体の最適構造と LUMO

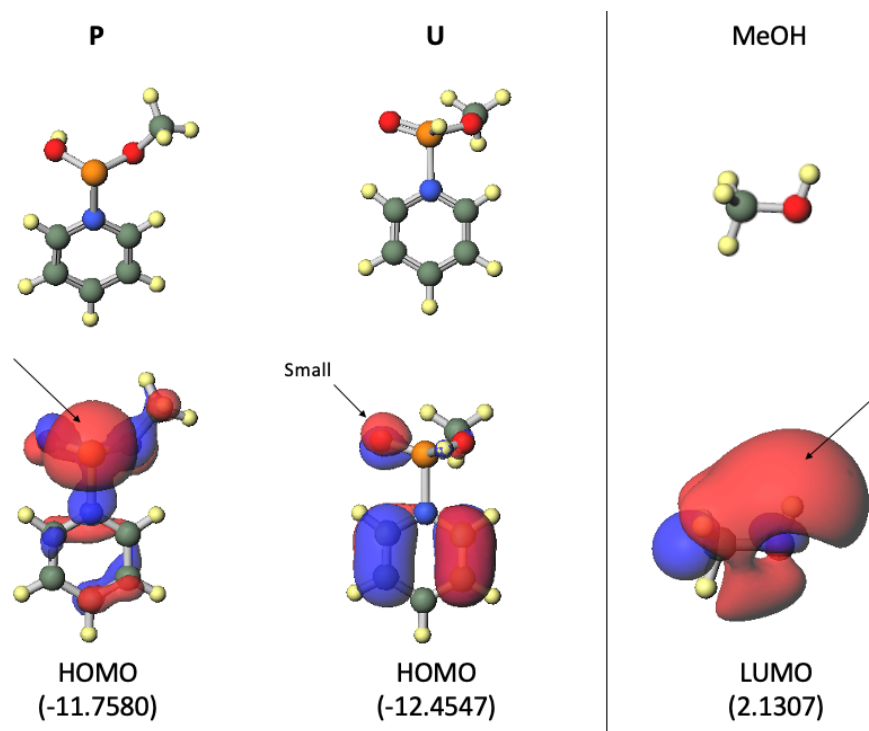


Figure 27 *H*-ホスホネート型中間体とホスファイト型中間体の HOMO と MeOH の LUMO

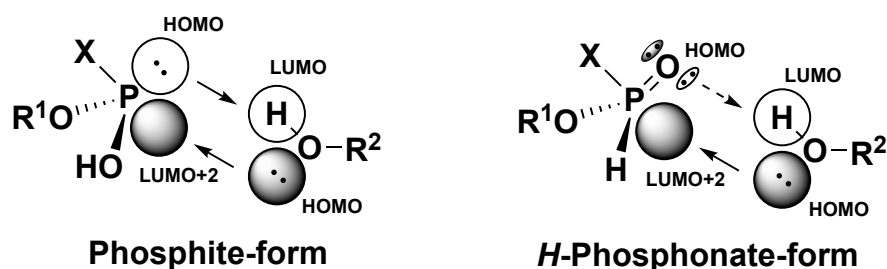


Figure 28 ホスファイト型中間体、*H*-ホスホネート型中間体とアルコールの間に働く二次的分子軌道相互作用

第二章/第三節では、塩基性条件下にて縮合反応が進行することについて述べたが、詳細な反応機構については明らかとなっていなかった。そこで、本節において、得られた知見をもとに反応機構を推察した (Scheme 54)。塩基性条件下の縮合反応においても、重要となるのが互変異性化である。本反応でも、求核種であるアルコールと反応するのは *H*-ホスホネート型 **A** ではなく、ホスファイト型 **B** であると考えられる。これは、2つの互変異性体 (脱離基: チオモルフォリン) に対して DFT 計算を行うことで確認した。その際、ヌクレオシドの部分をもチル基に代

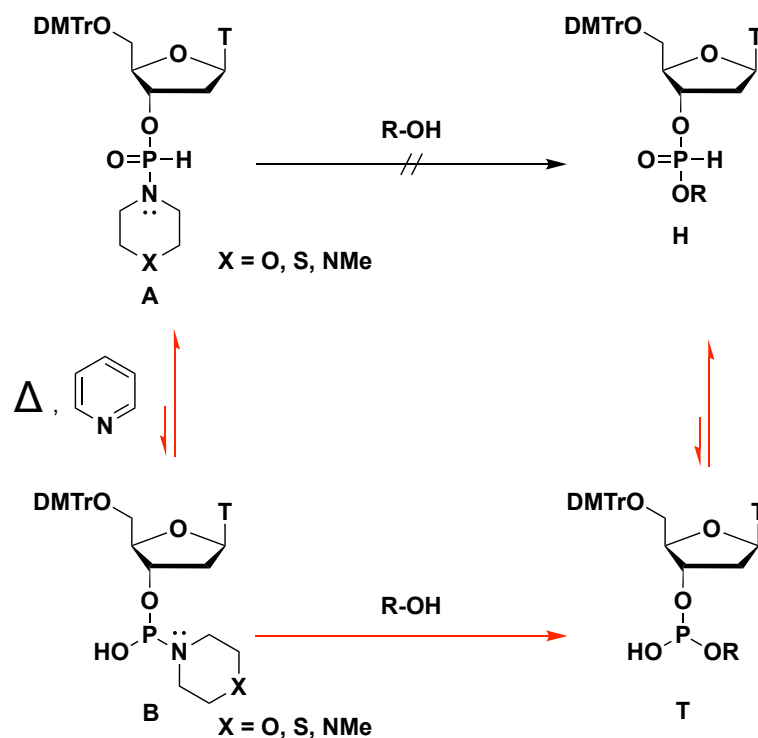


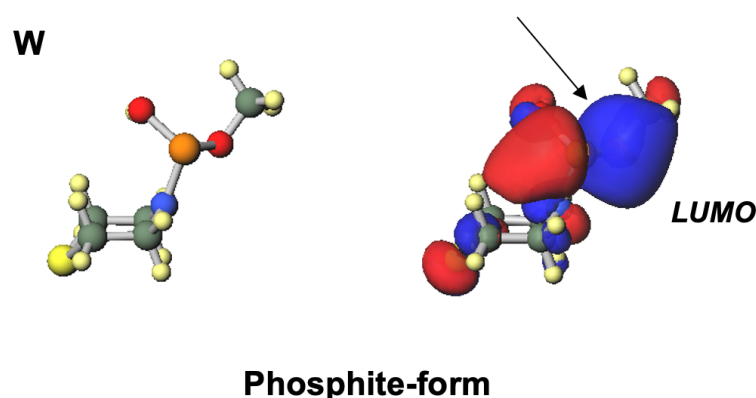
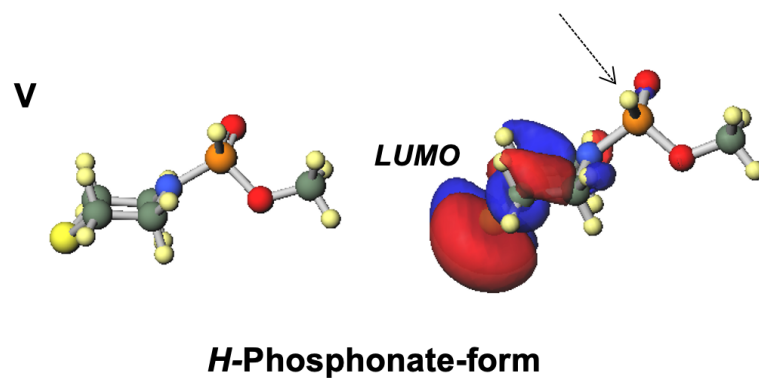
用したモデル化合物 **V**, **W** に対して DFT 計算 (B3LYP/6-31G\*) を行った。最適化された分子構造と LUMO を Figure 29 に示す。Figure 29 に示すように、ホスファイト型 **W** にはリン原子上かつ脱離基であるチオモルフォリンの反対側に大きな LUMO が確認された。一方で、*H*-ホスホネート型 **V** にはリン原子上には LUMO が存在していない。つまり、求核種であるアルコールと反応することができるのはホスファイト型 **B** であると考えられる。

また、脱離基の X がより電気陰性の原子に置換されるほど、ホスファイト型への互変異性化が促進される。さらに、電気陰性の原子によって脱離基の脱離能自体も向上するため、モルフォリンがチオモルフォリンよりも脱離基として優れた結果を示した Table 10 の結果は妥当である。

さらに、本反応でも、溶媒として用いた pyridine がホスファイト型への互変異性化を促進している。また、本反応では加熱することにより、縮合効率が向上する結果が得られていた。これは、加熱によっても、ホスファイト型への互変異性化が促進されることを示唆している。

**Scheme 54**



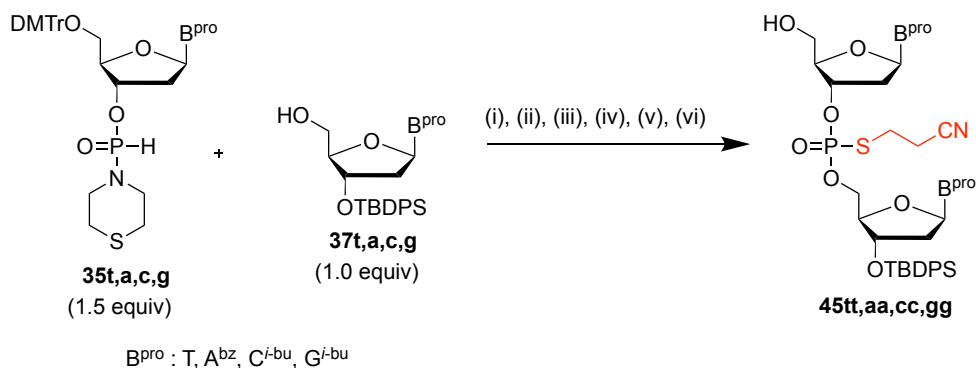


**Figure 29** *H*-ホスホンアミデート誘導体 (*H*-ホスホネート型とホスファイト型) の最適構造と LUMO

## 8. 最適条件での 2 量体合成

最後に、最適化した条件で、4 種塩基を有する 2 量体を合成した。*H*-ホスホンアミデート誘導体 **35** と化合物 **37** を用い、ホスホロチオエートジエステル **45** を合成した。手順は Table 21 に示す通りであり、縮合反応以外は、第三節-7 項と全く同様の操作を行なっている。全ての 2 量体を単離収率 74%–78% で得ることができ、本反応が全ての核酸塩基を有する誘導体に適応可能であることが示された。また、各反応を TLC で追跡しており、その際、全ての反応の完結を確認している。そのため、単離収率が 75% 程度にとどまった理由は、抽出操作やシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製時に失ったためであると考えている。本反応は室温、30 分で縮合反応が完結しており、第三節で述べた塩基性条件下での縮合反応条件である 40 °C、2 h と比較し、より効率的かつ実用性の高いものとなった。

Table 21 2量体の合成



Step	Operation	Reagents and conditions
(i)	Condensation	<b>35</b> (1.5 equiv), <b>37t</b> (std), CMPT (6.0 equiv), pyridine, rt, 30 min
(ii)	Sulfurization	Sulfurizing reagent <b>42</b> (1.2 equiv), pyridine, rt, 1h
(iii)	Evaporation	Coevaporation with toluene × 3
(iv)	Detritylation	1% TFA in CHCl <sub>3</sub> , rt, 5 min
(v)	Extraction	CHCl <sub>3</sub> -sat. NaHCO <sub>3</sub>
(vi)	Colum chromatography	Neutral silica

Entry	H-Phosphonamidate monomer	5'-OH nucleoside	Product	Isolated yield (%)
1	<b>35t</b>	<b>37t</b>	<b>45tt</b>	78
2	<b>35a</b>	<b>37a</b>	<b>45aa</b>	76
3	<b>35c</b>	<b>37c</b>	<b>45cc</b>	75
4	<b>35g</b>	<b>37g</b>	<b>45gg</b>	74

以上のように、環状アミノ基を有する *H*-ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いる新規核酸合成法の開発を達成した。*H*-ホスホンアミデート誘導体は、温和な塩基性条件下（ピリジン溶媒中、40 °C）にて、縮合反応が進行することを明らかにした。また、*H*-ホスホネートジエステル選択的な硫化反応を確立し、抽出操作のみで、純度の高い中間体を得ることができる合成サイクルを確立した。さらに、ピリジン溶媒中に酸性活性化剤を添加することで、*H*-ホスホンアミデート誘導体のアミノ基を活性化することができ、縮合時間を大幅に短縮することができた。また、DFT 計算と実験結果から、反応機構を推察し、*H*-ホスホンアミデート誘導体に関する新しい知見を得ることができた。

## 結論

本博士論文研究では、ホスホン酸誘導体を用いた、新規 PMO 合成法（第一章）及び新規核酸合成法（第二章）の開発を行った。

### 第一章

第一章では、*H*-ホスホネート誘導体を用いた新規 PMO 合成法の開発について述べた。

この研究では、*H*-ホスホネート法を使用して、PMO の新規液相合成法の開発を行った。はじめに、モルフォリノアミノ基をホスホニル化することで得られる *H*-ホスホンアミデートをモノマーとする合成法の開発に取り組んだ。しかし、*P*-*N* 結合は極めて不安定であったことから、合成戦略を変更し、モルフォリノヌクレオシドの 5'-水酸基をホスホニル化して得られる、*H*-ホスホネートモノエステルをモノマーとして用いることを検討した。この合成戦略では、ホスホニウム型縮合剤（PyNTP、BOMP、MNTP）を用いることで、*H*-ホスホネートモノマーとモルフォリノヌクレオシドのアミノ基を直接的に縮合させることに成功した。しかし、縮合反応後に得られた *H*-ホスホンアミデート結合が、極めて不安定であることが明らかとなったため、縮合反応と酸化的アミノ化反応をワンポットで行うことで、安定なホスホロジアミデート結合へと変換した。これらの反応により、従来法と比較し、縮合時間が大幅に短縮された。

次に、オリゴマー同士を反応させるフラグメント縮合による鎖長伸長を検討した。2種類のフラグメント（5'-*H*-ホスホネートモノエステルおよび 3'-NH 誘導体）を合成し、良好な収率で得た。これらのフラグメントとホスホニウム型縮合剤を用いて、PMO では困難とされていたフラグメント縮合を達成した。しかし、*H*-ホスホネート側のフラグメントは、鎖長が長くなるにつれて、反応性が低下することが明らかとなったが、反応性の高い縮合剤である MNTP を用いることでこの問題を解決した。最終的には、極めて良好な単離収率で、8 量体 PMO の合成を達成した。また、従来法では、目的物とそれよりも鎖長が 1 つ短い *N*-1 量体との分離が困難であるという課題があった。本手法では、フラグメント縮合による鎖長伸長を採用したことで、*N*-1 量体の生成は起こらず、目的物の精製操作を容易に行うことができた。

本手法は、スケールアップの容易な液相合成法かつ、フラグメント縮合による鎖長伸長方法を採用していることから、PMO の大量合成が可能となる。さらに、中間体として得られる *H*-ホスホンアミデート誘導体は、適切な変換によりチオホスホロアミデートモルフォリノ核酸（TMO）などの様々なリン原子修飾 PMO を

得ることが可能である。本手法は、PMOの今後の発展に大きく貢献することが期待される。

## 第二章

第二章では、第一章で明らかとなった副反応から着想を得て、*H*-ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いる新規核酸合成法を開発した。

PMO合成において、*H*-ホスホンアミデート結合が極めて不安定であったことに着目し、モルフォリノ基などの複素環アミノ基を有する*H*-ホスホンアミデートを用いると、アミノ基を優れた脱離基として利用することできると考えた。はじめに、モルフォリン、チオモルフォリン、*N*-メチルピペラジンを導入した*H*-ホスホンアミデート誘導体を合成した。合成した*H*-ホスホンアミデート誘導体を用いて検討を行った結果、ピリジン共沸操作時に縮合反応が進行していることが明らかとなった。これは共沸操作した時に加熱、濃縮されることで縮合反応が進行したと考えられる。本反応を利用し、二つの化合物をピリジン溶媒中、混合・加熱するだけで、縮合反応が進行しインターヌクレオチド結合が形成される新規核酸合成法を開発した。本手法は、添加剤を必要としないことから、液相法での大量合成への応用が期待される。

第二章後半では、ピリジン溶媒中、酸性活性化剤を加えることで、縮合反応が効率的に進行することを明らかとした。本反応には、溶媒、脱離基、酸性活性化剤の選択が重要である。特に、溶媒と脱離基の種類によっては、全く縮合反応が進行しない。溶媒と脱離基の選択は、*H*-ホスホンアミデート誘導体のホスファイト型への互変異性化反応へと影響を与え、酸性活性化剤の選択は、*H*-ホスホンアミデート誘導体から生じる反応中間体の反応性に影響を与えることを明らかとした。さらに、モデル化合物のDFT計算と実験結果を組み合わせ、反応機構の解明と縮合条件の最適化を達成した。前述のピリジン中で混合、加熱を行う反応系では、加熱が必要にも関わらず、縮合反応に時間を要するが(40℃、2時間)、本反応は室温かつ30分で完結するため、反応効率を大きく向上させることに成功した。

また、いずれの合成法でも、過剰に用いたモノマーは抽出操作によって、水層へと除去されるように合成サイクルを構築した。これにより、純度の高い中間体を1度の抽出操作のみで得ることができ、液相法の課題である「複雑な精製操作」を解決した。今後は、脱離基として環状アミン以外も検討するなど、合成法の最適化を行った後、スケールアップの検討を行うことによって、液相でのオリゴ核酸大量合成を可能にすると期待される。

# 実験項

## 共通情報

反応に用いた溶媒は、蒸留した後、モレキュラーシーブで乾燥したものをを用いた。<sup>1</sup>H NMR は 400, 500, 600 MHz で測定し、Pyridine-d<sub>5</sub>, CD<sub>3</sub>CN, CDCl<sub>3</sub> ではテトラメチルシラン (δ 0.0) を内部標準とした。D<sub>2</sub>O では、CH<sub>3</sub>CN (δ 2.06) を内部標準とした。<sup>13</sup>C NMR は 101, 126, 151 MHz で測定し、CDCl<sub>3</sub> (δ 77.0) を内部標準とした。D<sub>2</sub>O では、CH<sub>3</sub>CN (δ 1.47) を内部標準とした。<sup>31</sup>P NMR は 162, 202, 243 MHz で測定し、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を外部標準 (δ 0.0) とした。IR は、ATR-IR スペクトロメーターを使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、中性シリカゲルとして silica gel 60N (spherical, neutral, 63-210 μm) を用いて、手動カラムを行い、Yamazen UNIVERSAL Premium column (30 μm 60 Å)、ODS シリカゲルとして Yamazen UNIVERSAL Premium column (30 μm 120 Å) を用いて、automated flash chromatography system W-prep 2XY による自動カラム精製を行った。薄層クロマトグラフィー (TLC) には、TLC plates Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, No. 5715) を用いた。RP-HPLC 分析には μBondasphere 5 μm C18, 100 Å, 19 × 150 mm<sup>2</sup> (Waters) を使用した。質量分析には、電子スプレーイオン化測定法 (ESI-MS) を使用した。

## 第一章

### 5'-O-tert-Butyldiphenylsilyl-morpholino nucleosides (3a, 3g, 3c, or 3t) の合成

*N*<sup>6</sup>-benzoyl-*N'*-trityl-morpholino adenosine **1a** (0.597 g, 1.0 mmol)、*N*<sup>2</sup>-isobutyryl-*O*<sup>6</sup>-cyanoethyl-*N'*-trityl-morpholino guanosine **1g** (0.879 g, 1.39 mmol)、*N*<sup>4</sup>-benzoyl-*N'*-trityl-morpholino cytidine **1c** (5.715 g, 10 mmol) または *N'*-trityl-morpholino thymidine **1t** (0.967 g, 2.0 mmol) を無水 DMF (**3a** の合成の場合は 5 mL、**3g** の合成の場合は 6.95 mL、**3c** の合成の場合は 50 mL、**3t** の合成の場合は 10 mL) にアルゴン雰囲気下で溶解させた。次に、イミダゾール (**3a** の合成の場合は 0.545 g, 8.0 mmol、**3g** の合成の場合は 0.757 g, 11.12 mmol、**3c** の合成の場合は 5.45 g, 80 mmol、**3t** の合成の場合は 1.09 g, 16 mmol) と *tert*-ブチルジフェニルクロロシラン (TBDPSCl) (**3a** の合成の場合は 1.0 mL, 4.0 mmol、**3g** の合成の場合は 1.43 mL, 5.56 mmol、**3c** の合成の場合は 10.24 mL, 40 mmol、**3t** の合成の場合は 2.05 mL, 8.0 mmol) を 0°C で溶液に添加し、室温で指定された時間 (**3a** の合成の場合は 2 時間、**3c** の合成の場合は 4 時間、**3g** の合成の場合は 1 時間、**3t** の合成の場合は 45 分) 攪拌した。混合物にメタノール (**3a**、**3g**、および **3c** の合成の場合は各 5 mL、**3t** の合成

の場合は 1 mL) を添加した。反応溶液を酢酸エチル (**3a** の合成の場合は 30 mL、**3g** の合成の場合は 50 mL、**3c** の合成の場合は 100 mL、**3t** の合成の場合は 20 mL) で希釈し、水 (**3c** の合成の場合は 1×100 mL、**3t** の合成の場合は 1×30 mL) および食塩水 (**3a** の合成の場合は 3×30 mL、**3g** の合成の場合は 3×50 mL、**3c** の合成の場合は 2×100 mL、**3t** の合成の場合は 2×30 mL) で洗浄した。水層をまとめ、酢酸エチル (**3a** と **3t** の合成の場合は各 3×90 mL、**3g** の合成の場合は 1×150 mL、**3c** の合成の場合は 3×100 mL) で逆抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧下で濃縮した。粗生成物は、これ以上の精製を行わず、次の反応に用いた。残渣を無水ジクロロメタン (**3a** の合成の場合は 20 mL、**3g** の合成の場合は 28 mL、**3c** の合成の場合は 50 mL、**3t** の合成の場合は 10 mL) にアルゴン雰囲気下で溶解した。溶液にジクロロ酢酸 (DCA) のジクロロメタン溶液 (6%、**3a** の合成の場合は 20 mL、**3g** の合成の場合は 6%、28 mL、**3c** の合成の場合は 16%、50 mL、**3t** の合成の場合は 6%、10 mL) を加え、指定された時間 (**3a** と **3g** の合成の場合は 1 時間、**3c** の合成の場合は 2 時間、**3t** の合成の場合は 4 時間) 攪拌した。( **3t** の合成のためには、DCA (1.4 mL) を反応混合物に段階的に添加した。) その後、反応溶液にメタノール (**3a**、**3g**、および **3c** の合成の場合は各 5 mL、**3t** の合成の場合は 1 mL) を添加した。反応溶液をクロロホルム (**3a**、**3g**、**3t** の合成の場合は各 10 mL、**3c** の合成の場合は 50 mL) で希釈し、飽和重曹水 (**3a** と **3t** の合成の場合は各 3×30 mL、**3g** の合成の場合は 3×50 mL、**3c** の合成の場合は 3×100 mL) および食塩水 (**3c** の合成の場合は 1×100 mL) で洗浄した。水層をまとめ、ジクロロメタン (**3a** の合成の場合は各 3×90 mL、**3g** の合成の場合は各 3×150 mL、**3c** の合成の場合は 1×100 mL、**3t** の合成の場合は各 4×90 mL) およびクロロホルム (**3c** の合成の場合は 2×100 mL) で逆抽出した。有機層は硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (**3a** と **3g** の合成の場合は各 20 g、**3c** の合成の場合は 150 g、**3t** の合成の場合は 60 g の中性シリカゲルを使用) にて精製した。**3a**、**3g**、**3c**、または **3t** を含む分画を収集し、減圧下で濃縮して **3a**、**3g**、**3c**、または **3t** を得た。

#### ***N*<sup>6</sup>-Benzoyl-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-morpholino adenosine (**3a**).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1-95:5, v/v)) で精製し、化合物 **3a** を無色フォームとして得た。(0.499 g, 0.842 mmol, 84%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.04 (s, 1H (-CONH)), 8.80 (s, 1H (H-2)), 8.12 (s, 1H (H-8)), 8.02 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H (Ar)), 7.68-7.58 (m, 5H (Ar)), 7.52 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (Ar)), 7.45-7.32 (m, 6H (Ar)), 5.92 (dd, *J* = 10.1, 2.3 Hz, 1H (H-1')), 4.01-3.97 (m, 1H (H-4')), 3.79 (dd, *J* = 10.8, 4.8 Hz, 1H (H-5')), 3.72 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, 1H (H-5')),

3.37 (dd,  $J = 11.9, 2.3$  Hz, 1H (H-2')), 3.15 (dd, 12.6, 2.1 Hz, 1H (H-3')), 3.03 (dd,  $J = 11.2, 10.1$  Hz, 1H (H-2')), 2.82 (dd,  $J = 11.7, 10.8$  Hz, 1H (H-3')), 1.9 (s, 1H (-NH)), 1.05 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.6 (-CONH-), 152.7 (C-2), 151.2 (C-4), 149.4 (C-6), 140.6 (C-8), 135.5, 135.5, 133.6, 133.1, 132.8, 129.8, 128.9, 127.8, 127.7 (Ar), 122.8 (C-5), 80.8 (C-1'), 78.8 (C-4'), 64.6 (C-5'), 50.5 (C-2'), 46.9 (C-3'), 26.7 (-C( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )<sub>3</sub>), 19.2 (- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$ )<sub>3</sub>)

ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_3\text{Si}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 593.2691; found 593.2692.

***N*<sup>2</sup>-Isobutyryl-*O*<sup>6</sup>-cyanoethyl-5'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-morpholino guanosine (3g).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH (99:1-96:4, v/v) ) で精製し、化合物 **3g** を無色フォームとして得た。(0.764 g, 1.21 mmol, 88%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.94 (s, 1H (H-8)), 7.85 (br, 1H (-CONH-)), 7.67-7.60 (m, 4H (Ar)), 7.44-7.33 (m, 6H (Ar)), 5.78 (dd,  $J = 10.1, 2.3$  Hz, 1H (H-1')), 4.82-4.76 (m, 2H (-O $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -), 3.98-3.95 (m, 1H (H-4')), 3.77 (dd,  $J = 10.8, 5.0$  Hz, 1H (H-5')), 3.69 (dd,  $J = 10.5, 5.5$  Hz, 1H (H-5')), 3.31 (dd,  $J = 12.1, 2.7$  Hz, 1H (H-2')), 3.13 (dd,  $J = 12.6, 2.3$  Hz, 1H (H-3')), 3.01 (t,  $J = 6.4$  Hz, 3H (- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$ ), - $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.98 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H (H-2')), 2.78 (dd,  $J = 12.8, 10.5$  Hz, 1H (H-3')), 1.29 (dd,  $J = 6.9, 1.4$  Hz, 6H (- $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.04 (s, 9H (-C( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.7 (- $\underline{\text{C}}\text{ONH-}$ ), 159.6 (C-6), 152.5 (C-4), 151.7 (C-2), 139.8 (C-8), 135.5, 135.5, 133.1, 133.1, 129.8, 129.8, 127.7 (Ar), 117.6 (C-5), 116.8 (- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$ ), 80.7 (C-1'), 78.6 (C-4'), 64.6 (C-5'), 61.6 (-O $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -), 50.4 (C-2'), 46.9 (C-3'), 35.9 (- $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$ ), 26.7 (-C( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )<sub>3</sub>), 19.3 (- $\underline{\text{C}}\text{H}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$ ), - $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.1 (- $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$ )

ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_4\text{Si}$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 628.3062; found 628.3061.

***N*<sup>4</sup>-Benzoyl-5'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-morpholino cytidine (3c).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH (100:0-95:5, v/v) ) で精製し、化合物 **3c** を無色フォームとして得た。(5.17g, 9.09 mmol, 91%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.91 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H (Ar)), 7.80 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H (H-6)), 7.66 (td,  $J = 7.6, 0.9$  Hz, 4H (Ar)), 7.61 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H (Ar)), 7.55-7.35 (m, 9H (H-5, Ar)), 5.72 (dd,  $J = 9.6$  Hz, 2.3 Hz, 1H (H-1')), 3.94-3.84 (m, 1H (H-4')), 3.79 (dd,  $J = 11.0, 4.6$  Hz, 1H (H-5')), 3.73 (dd,  $J = 10.8, 5.3$  Hz, 1H (H-5')), 3.40 (dd,  $J = 12.4$  Hz, 2.3 Hz, 1H (H-2')), 3.07 (dd,  $J = 13.0$  Hz, 2.1 Hz, 1H (H-3')), 2.73 (dd,  $J = 13.0, 10.8$  Hz, 1H (H-3')), 2.42 (dd,  $J = 12.4, 9.6$  Hz, 1H (H-2')), 1.06 (s, 9H (-C( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )<sub>3</sub>)).



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.6 (-CONH-), 162.1 (C-4), 154.3 (C-2), 144.3 (C-6), 135.5 133.2, 133.0, 133.0, 129.8, 129.0, 127.7, 127.7, 127.5 (Ar), 96.6 (C-5), 82.5 (C-1'), 79.2 (C-4'), 64.6 (C-5'), 49.9 (C-2'), 46.6 (C-3'), 26.7 (-C( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )<sub>3</sub>), 19.2 (- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$ )<sub>3</sub>). ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 569.2578; found 569.2570.

#### **5'-O-(tert-Butyldiphenylsilyl)-morpholino thymidine (3t).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH (99.5:0.5-97:3, v/v) ) で精製し、化合物 **3t** を無色フォームとして得た。(0.786 g, 1.64 mmol, 82%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.65 (td,  $J = 7.8, 0.9$  Hz, 4H (Ar)), 7.45-7.34 (m, 6H (Ar)), 7.22 (s, 1H (H-6)), 5.71 (dd,  $J = 10.1, 2.3$  Hz, 1H (H-1')), 3.93-3.83 (m, 1H (H-4')), 3.74 (dd,  $J = 11.0, 4.6$  Hz, 1H (H-5')), 3.69 (dd,  $J = 10.8, 5.3$  Hz, 1H (H-5')), 3.13 (dd,  $J = 12.4, 2.3$  Hz, 1H (H-2')), 3.06 (dd,  $J = 12.8, 1.8$  Hz, 1H (H-3')), 2.73 (dd,  $J = 11.0, 12.4$  Hz, 1H (H-3')), 2.60 (dd, 12.4, 10.1 Hz, 1H (H-2')), 1.88 (s, 3H (5- $\text{CH}_3$ )), 1.06 (s, 9H (-C( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )<sub>3</sub>)) ;  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.4 (C-4), 149.8 (C-2), 135.5 (C-6), 135.5, 133.1, 129.8, 127.7 (Ar), 110.7 (C-5), 80.5 (C-1'), 78.9 (C-4'), 64.6 (C-5'), 49.2 (C-2'), 46.6 (C-3'), 26.7 (-C( $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )<sub>3</sub>), 19.3 (- $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)$ )<sub>3</sub>), 12.5 (5- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )  
ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 480.2313; found 480.2298.

#### **Triethylammonium or 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium *N'*-trityl-morpholino nucleoside 5'-*H*-phosphonate (15a, 15g, 15c, or 15t) の合成**

imidazole (**15a** の合成の場合は 2.32 g、34 mmol、**15g** の合成の場合は 0.232 g、3.4 mmol、**15c** の場合は 5.79 g、85 mmol、**15t** の合成の場合は 2.32 g、34 mmol) および TEA (**15a** の合成の場合は 14 mL、100 mmol、**15c** の合成の場合は 35 mL、250 mmol、**15t** の合成の場合は 14 mL、100 mmol) または *N*-メチルモルホリン (**15g** の合成の場合は 1.1 mL、10 mmol) を、無水ジクロロメタン (**15a** の合成の場合は 100 mL、**15g** の合成の場合は 10 mL、**15c** の合成の場合は 250 mL、**15t** の合成の場合は 100 mL) にアルゴン雰囲気下で溶解させた。 $\text{PCl}_3$  (**15a** の合成の場合は 0.88 mL、10 mmol、**15g** の合成の場合は 0.087 mL、1.0 mmol、**15c** の合成の場合は 2.2 mL、25 mmol、**15t** の合成の場合は 0.88 mL、10 mmol) を室温で溶液に加え、30 分間攪拌した。その後、反応溶液を  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  まで冷却した (溶液 A)。*N*<sup>6</sup>-benzoyl-*N'*-trityl-morpholino adenosine **1a** (1.19 g、2.0 mmol)、*N*<sup>2</sup>-isobutyryl-*O*<sup>6</sup>-cyanoethyl-*N'*-trityl-morpholino guanosine **1g** (0.126 g、0.2 mmol)、*N*<sup>4</sup>-benzoyl-*N'*-trityl-morpholino cytidine **1c** (2.86 g、5.0 mmol) または *N'*-trityl-morpholino thymidine **1t** (0.967 g、2.0 mmol) をピリジン共沸により脱水し、ジクロロメタン (**15a** と **15t** の合成の場合は各 30 mL、**15g** の合成の場合は 3.3 mL、**15c** の合成の場合は 75 mL)

に溶解させた。これを、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で溶液 A に滴下にて加えた (**15a** の合成の場合は 50 分、**15g** の合成の場合は 20 分、**15c** の合成の場合は 1.5 時間、**15t** の合成の場合は 45 分かけて)。反応溶液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 30 分間攪拌し、その後室温で指定された時間 (**15a** の合成の場合は 1.5 時間、**15g** の合成の場合は 30 分、**15c** の合成の場合は 2 時間、**15t** の合成の場合は 1 時間) 攪拌した。混合物に 1.0 M 緩衝液 (**15a** の合成の場合は 150 mL、**15g** の合成の場合は 15 mL、**15c** の合成の場合は 375 mL、**15t** の合成の場合は 100 mL) を加え、5 分間攪拌した。有機層を 1.0 M TEAB 緩衝液 (**15g** の合成の場合は各 20 mL、**15t** の合成の場合は各 100 mL) で洗浄した。水層をまとめ、ジクロロメタン (**15a** の合成の場合は各 400 mL、**15g** の合成の場合は各 60 mL、**15c** の合成の場合は各 500 mL、**15t** の合成の場合は各 200 mL) で逆抽出した。有機層をまとめて硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (中性シリカゲルを、**15a** の合成の場合は 90 g、**15g** の合成の場合は 10 g、**15c** の合成の場合は 150 g、**15t** の合成の場合は 100 g 使用) によって精製した。**15a**、**15g**、**15c**、または **15t** を含む分画を収集、減圧下で濃縮し、**15a**、**15g**、または **15t** をトリエチルアンモニウム塩として得た。**15c** の残渣にクロロホルム-ピリジン (2:1、体積比) の溶液 (100 mL) を加え、0.2 M 炭酸水素 DBU 緩衝液 (各  $2 \times 100$  mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルム-ピリジン (各  $3 \times 200$  mL) で逆抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧下で濃縮し、**15c** を DBU 塩として得た。

#### **Triethylammonium *N*<sup>6</sup>-benzoyl-*N'*-trityl-morpholino adenosine 5'-*H*-phosphonate (**15a**).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH-Et<sub>3</sub>N (98:1:1-93:6:1, v/v/v) で精製し、化合物 **15a** を無色フォームとして得た。 (1.36 g, 1.64 mmol, 82% yield).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.6 (br, 1H (-CONH-)), 8.77 (s, 1H (H-2)), 8.00 (s, 2H (Ar)), 7.98 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H (H-8)), 7.58-7.39 (m, 8H (Ar)), 7.34-7.23 (m, 6H (Ar)), 7.18 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H (Ar)), 6.84 (d,  $J = 623.0$  Hz, 1H (P-H)), 6.39 (dd,  $J = 9.8, 2.1$  Hz, 1H (H-1')), 4.53-4.37 (m, 1H (H-4')), 3.95-3.83 (m, 2H (H-5')), 3.50 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H (H-2')), 3.26 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H (H-3')), 2.93 (q,  $J = 7.3$  Hz, 5H (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 1.83 (t,  $J = 10.5$  Hz, 1H (H-2')), 1.62 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H (H-3')), 1.23 (t,  $J = 7.3$  Hz, 7.5H (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164.9 (-NHCO-), 152.6 (C-2), 151.2 (C-4), 149.4 (C-6), 140.8 (C-8), 133.5, 132.7, 129.1, 128.7, 127.9, 127.9, 126.6 (Ar), 122.7 (C-5), 80.1 (C-1'), 76.9 (-C(Ar)<sub>3</sub>), 76.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 7.7 Hz, C-4'), 64.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 2.9 Hz, C-5'), 53.0 (C-2'), 49.3 (C-3'), 45.4 (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 8.5 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.9 ( $^1J_{\text{PH}} = 630$  Hz).

ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_5\text{P}$   $[\text{M}-\text{H}-\text{TEA}]^-$ , 659.2177; found 659.2153.

**Triethylammonium  $O^6$ -cyanoethyl- $N^2$ -*i*-butyryl- $N'$ -trityl-morpholino guanosine 5'- $H$ -phosphonate (15g).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ - $\text{Et}_3\text{N}$  (96.5:3:0.5-93.5:6:0.5, v/v/v)) で精製し、化合物 **15g** を無色フォームとして得た。(0.158 g, 0.187 mmol, 94% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.7 (br, 1H (-NHCO-)), 7.78 (s, 1H (H-8)), 7.47 (br, 5H (Ar)), 7.28 (t,  $J = 7.8$  Hz, 7H (Ar)), 7.17 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H (Ar)), 6.87 (d,  $^1J_{\text{PH}} = 625.3$  Hz, PH), 6.25 (dd,  $J = 9.8, 2.1$  Hz, 1H (H-1')), 4.76 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H (-OCH $_2$ CH $_2$ -)), 4.45-4.42 (m, 1H (H-4')), 3.92-3.82 (m, 2H (H-5')), 3.45 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H (H-2')), 3.22 (d, 11.9 Hz, 1H (H-3')), 3.02-2.95 (m, 6H (-NCH $_2$ CH $_3$ )), 1.81 (t,  $J = 10.5$  Hz, 1H (H-2')), 1.56 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H (H-3')), 1.34 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H (-CH(CH $_3$ ) $_2$ )), 1.32 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H (-CH(CH $_3$ ) $_2$ )), 1.26 (t,  $J = 7.3$  Hz, 9H (-CH $_2$ CH $_3$ ));  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.8 (-NHCO-), 159.5 (C-6), 152.5 (C-4), 152.0 (C-2), 139.6 (C-8), 129.2, 127.9, 126.5 (Ar), 117.3 (C-5), 116.9 (-CH $_2$ CN), 80.0 (C-1'), 75.8 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 6.7$  Hz, C-4'), 64.4 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 3.9$  Hz, C-5'), 61.6 (-OCH $_2$ -), 52.6 (C-2'), 49.2 (C-3'), 45.5 (-NCH $_2$ -), 35.9 (-CH(CH $_3$ ) $_2$ ), 19.4, 19.3 (-CH(CH $_3$ ) $_2$ , rotamers), 18.1 (-CH $_2$ CN), 8.5 (-NCH $_2$ CH $_3$ );  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.9 ( $^1J_{\text{PH}} = 626$  Hz)

ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}$   $[\text{M}-\text{H}-\text{TEA}]^-$ , 694.2548; found 694.2544.

**1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enium  $N^4$ -benzoyl- $N'$ -trityl-morpholino cytidine 5'- $H$ -phosphonate (15c).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ - $\text{Et}_3\text{N}$  (98:1.5:0.5-94.5:5:0.5, v/v/v): 1回目、 $\text{CHCl}_3$ - $\text{MeOH}$ - $\text{Et}_3\text{N}$  (99:0:1-89:10:1, v/v/v) : 2回目) で精製し、目的物のトリエチルアミン塩を得た。これにクロロホルム-ピリジン (2:1、体積比) の溶液 (100 mL) を加え、0.2 M 炭酸水素 DBU 緩衝液 (各  $2 \times 100$  mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルム-ピリジン (各  $3 \times 200$  mL) で逆抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧下で濃縮し、化合物 **15c** の DBU 塩を無色フォームとして得た。(3.57 g, 4.24 mmol, 85% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.90 (s, 1H (H $^+$ DBU)), 7.88 (s, 1H (Ar)), 7.73 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H (H-6)), 7.57 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H (Ar)), 7.53-7.39 (m, 7H (Ar)), 7.33-7.22 (m, 9H (Ar, H-5)), 7.16 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H (Ar)), 6.85 (d,  $J_{\text{PH}} = 617.7$  Hz, PH), 6.22 (dd,  $J = 1.8, 9.1$  Hz, 1H (H-1')), 4.41-4.32 (m, 1H (H-4')), 3.93-3.78 (m, 2H (H-5')), 3.53 (d,  $J$

= 11.4 Hz, 1H (H-2')), 3.49–3.42 (m, 2H (DBU)), 3.40 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H (DBU)), 3.33 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H (DBU)), 3.17 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H (H-3')), 2.82–2.76 (m, 2H (DBU)), 2.01–1.89 (m, 2H (DBU)), 1.78–1.58 (m, 6H (DBU)), 1.51 (t,  $J = 11.2$  Hz, 1H (H-3')), 1.28 (t,  $J = 10.5$  Hz, 1H (H-2')).  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.1 (C-DBU), 162.2 (C-4), 154.2 (C-2), 144.7 (C-6), 133.1, 129.1, 128.9, 127.8, 127.7, 126.4 (Ar), 96.7 (C-5'), 82.0 (C-1'), 76.2 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 6.7$  Hz, C-4'), 64.2 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 2.3$  Hz, C-5'), 54.3 (-CH<sub>2</sub>-(DBU)), 52.7 (C-2'), 49.3 (C-3'), 48.6 (-CH<sub>2</sub>-(DBU)), 37.8 (-CH<sub>2</sub>-(DBU)), 32.1 (-CH<sub>2</sub>-(DBU)), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-(DBU)), 26.8 (-CH<sub>2</sub>-(DBU)), 24.0 (-CH<sub>2</sub>-(DBU)), 19.4 (-CH<sub>2</sub>-(DBU));  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.1 ( $^1J_{\text{PH}} = 620$  Hz).

ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}$  [M-H-DBU]<sup>-</sup>, 635.2065; found 635.2045.

#### Triethylammonium *N'*-trityl-morpholino thymidine 5'-*H*-phosphonate (**15t**).

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH-Et<sub>3</sub>N (98.5:1:0.5–91.5:8:0.5, v/v/v)) で精製し、化合物 **15t** を無色フォームとして得た。(1.24 g, 1.76 mmol, 88% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.5 (br, 1H (H-3)), 7.57–7.33 (br, 5H (Ar)), 7.32–7.22 (m, 7H (Ar)), 7.19 (t,  $J = 6.6$  Hz, 3H (Ar)), 7.01 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H (H-6)), 6.87 (d,  $J = 622.5$  Hz, 1H (PH)), 6.12 (dd,  $J = 9.6, 2.3$  Hz, 1H (H-1')), 4.41–4.31 (m, 1H (H-4')), 3.96–3.79 (m, 2H (H-5')), 3.32 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H (H-2')), 3.17 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H (H-3')), 3.00 (q,  $J = 7.3$  Hz, 6H (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 1.79 (d,  $J = 0.7$  Hz, 3H (5-CH<sub>3</sub>)), 1.49–1.42 (m, 2H (H-2', H-3')), 1.29 (t,  $J = 7.3$  Hz, 9H (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>));  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.6 (C-4), 150.0 (C-2), 135.6 (C-6), 129.1, 127.8, 126.5 (Ar), 110.4 (C-5), 80.3 (C-1'), 77.2 (-C(Ar)<sub>3</sub>), 76.0 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 6.7$  Hz, C-4'), 64.3 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 2.9$  Hz, C-5'), 51.7 (C-2'), 49.2 (C-3'), 45.5 (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.4 (5-CH<sub>3</sub>), 8.6 (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.0 ( $^1J_{\text{PH}} = 626$  Hz).

ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$  [M-H-TEA]<sup>-</sup>, 546.1799; found 546.1800.

#### 縮合反応の検討

モルホリノヌクレオシド **3c** (0.0284 g, 0.050 mmol) と *H*-ホスホネートモノマー **15c** (0.0473 g, 0.060 mmol) を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (0.5 mL) と  $\text{CD}_3\text{CN}$  (0.5 mL) の混合溶液に溶解した。縮合剤 (0.15 mmol) を 0 °C で溶液に加え、0 °C で 15 分間攪拌した。反応溶液を NMR サンプル管 (5 mm × 180 mm) に移し、 $^{31}\text{P}$  NMR を測定した。化合物 **16cc** の生成は、 $^{31}\text{P}$  NMR スペクトル ( $\delta$  14.2, 13.3,  $^1J_{\text{PH}} = 655, 661$  Hz) によって確認した。

### 酸化アミノ化反応の検討

モルホリノヌクレオシド (**3a**、**3g**、**3c**、または **3t**、0.050 mmol) と *H*-ホスホネートモノマー (**15a**、**15g**、**15c**、または **15t**、0.060 mmol) を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (0.5 mL) と CD<sub>3</sub>CN (0.5 mL) の混合溶液に溶解した。縮合剤 (0.15 mmol) を 0 °C で溶液に加え、0 °C で 20 分間攪拌した。反応溶液に、ハロゲン化剤 (I<sub>2</sub>、CBr<sub>4</sub>、または CCl<sub>4</sub>) とジメチルアミンを 25°C または 0°C で加え、25°C または 0°C で指定された時間攪拌した。反応溶液を NMR サンプル管 (5 mm × 180 mm) に移し、<sup>31</sup>P NMR を測定した。化合物 **17cc**、**17aa**、**17gg**、または **17tt** の生成は、<sup>31</sup>P NMR スペクトル (**17cc**: δ 16.9, 16.5, **17aa**: δ 16.8, **17gg**: δ 16.9, 16.7 および **17tt**: δ 17.0, 16.8) によって確認した。

### 2-mer fragments bearing 3'-NH group (**18cc** or **18gt**)の合成

モルホリノヌクレオシド **3c** (0.455 g, 0.80 mmol) または **3g** (0.628 g, 1.0 mmol) および *H*-ホスホネートモノマー **15c** (0.757 g, 0.96 mmol) または **15t** (0.778 g, 1.2 mmol) を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (**18cc** の合成の場合は 8 mL、**18gt** の合成の場合は 10 mL) とアセトニトリル (**18cc** の合成の場合は 8 mL、**18gt** の合成の場合は 10 mL) の混合溶液に溶解した。PyNTP (**18cc** の合成の場合は 1.19 g, 2.4 mmol、**18gt** の合成の場合は 1.50 g, 3.0 mmol) を 0 °C で溶液に加え、0 °C で 20 分間攪拌した。その後、CCl<sub>4</sub> (**18cc** の合成の場合は 1.55 mL、16 mmol、**18gt** の合成の場合は 1.93 mL、20 mmol) および 9.5 M ジメチルアミン水溶液 (**18cc** の合成の場合は 3.2 mL、30.4 mmol、**18gt** の合成の場合は 4.0 mL、38 mmol) を 0 °C で加え、0 °C で 1 分間攪拌した。その後、反応溶液をクロロホルム (**18cc** の合成の場合は 100 mL、**18gt** の合成の場合は 50 mL) で希釈し、飽和重曹水 (**18cc** の合成の場合は各 3×100 mL、**18gt** の合成の場合は各 3×50 mL) で洗浄した。水層をまとめ、ジクロロメタン (**18cc** の合成の場合は各 3×300 mL、**18gt** の合成の場合は各 3×150 mL) で逆抽出した。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタン (**18cc** の合成の場合は 16 mL、**18gt** の合成の場合は 20 mL) に溶解した (溶液 A)。3-シアノピリジン (**18cc** の合成の場合は 0.833 g, 8 mmol、**18gt** の合成の場合は 1.04 g, 10 mmol) および CF<sub>3</sub>COOH (**18cc** の合成の場合は 0.61 mL, 8 mmol、**18gt** の合成の場合は 0.76 mL, 10 mmol) を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (10:6, v/v) の混合溶液 (**18cc** の合成の場合は 16 mL、**18gt** の合成の場合は 20 mL) に溶解した (溶液 B)。溶液 A に溶液 B を室温で加え、指定された時間 (**18cc** の合成の場合は 45 分、**18gt** の合成の場合は 30 分) 攪拌した。反応溶液をジクロロメタン (40 mL) で希釈し、飽和重曹水 (各 3×50 mL) で洗浄した。水層をまとめ、ジクロロメタン (各 3×150 mL) で逆抽出

した。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（中性シリカゲル：18ccの合成の場合は20 g、18gtの合成の場合は25 g）によって精製した。18ccまたは18gtを含む分画を収集、減圧下で濃縮し、18ccまたは18gtを得た。

#### C-C 2-mer fragment bearing 3'-NH group (18cc)

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CHCl<sub>3</sub>-MeOH (97:3-95:5, v/v)）で精製し、化合物 18cc を無色フォームとして得た。（0.615 g, 0.622 mmol, 78 % yield from 3c, 3 steps).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.11 (d, *J* = 7.3 Hz, 0.5H, H-6 (3'-downstream), one of diastereomers), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.5 H (3'-downstream), one of diastereomers), 7.96-7.83 (m, 4H (Ar)), 7.76 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6 (5'-upstream)), 7.70-7.35 (m, 18H, H-5, Ar), 5.82 (dd, *J* = 9.4, 2.1 Hz, 1H, H-1' (3'-downstream)), 5.69 (dd, *J* = 9.6, 2.3 Hz, 1H, H-1' (5'-upstream)), 4.15-3.70 (m, 7H, H-2' (5'-upstream), H-4', H-5', 5' '), 3.61-3.29 (m, 2H, H-2' (3'-downstream), H-3' (3'-downstream)), 3.07-2.65 (m, 9H, H-3', -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.59-2.40 (m, 2H, H-2' '), 1.07 (s, 9H (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.8 (-NHCO-), 162.4 (C-4 (5'-upstream)), 162.2 (C-4 (3'-downstream)), 154.1 (C-2 (3'-downstream)), 153.9 (C-2 (5'-upstream)), 144.7, 144.5 (C-6 (3'-downstream), diastereomers), 143.6 (C-6 (5'-upstream)), 135.3, 133.0, 132.9, 132.8, 132.8, 132.7, 132.7, 129.8, 128.7, 127.9, 127.6, 127.6, 127.3 (Ar), 96.9 (C-5 (3'-downstream)), 96.7 (C-5 (5'-upstream)), 82.3, 82.1 (C-1' (3'-downstream), diastereomers), 81.5, 81.4 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 8.7 Hz, C-1' (5'-upstream), diastereomers), 77.8, 77.7 (C-4', diastereomers), 77.2 (C-4'), 65.2 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 4.8 Hz, C-5' (3'-downstream), one of diastereomers), 65.0 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, C-5' (3'-downstream), one of diastereomers), 64.1, 64.0 (C-4' (5'-upstream), diastereomers), 49.4 (C-2'), 48.0, 47.9 (C-2', diastereomers), 45.7, 45.6 (C-3', diastereomers), 45.0 (C-3'), 36.6, 36.5 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 26.6 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.0, 16.4.

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>50</sub>H<sub>59</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>PSi [M+H]<sup>+</sup>, 988.3937; found 988.3930.

#### G-T 2-mer fragment bearing 3'-NH group (18gt).

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（CHCl<sub>3</sub>-MeOH (99:1-90:10, v/v)）で精製し、化合物 18gt を無色フォームとして得た。（0.919 g, 0.959 mmol, 96% yield from 3g, 3 steps).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.23 (s, 0.5H, -NHCO- (guanosine), one of

diastereomers), 9.1 (br, 1H, H-3 (thymidine)), 8.94 (s, 0.5H, -NHCO- (guanosine), one of diastereomers), 7.94, 7.91 (s, 1H, H-8 (guanosine), diastereomers), 7.68–7.59 (m, 4H, Ar), 7.46–7.32 (m, 6H, Ar), 7.24, 7.21 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H, H-6 (thymidine), diastereomers), 5.83 (dt,  $J = 10.1, 2.3$  Hz, 1H, H-1' (guanosine)), 5.74 (dt,  $J = 8.9, 2.3$  Hz, 1H, H-1' (thymidine)), 4.87–4.74 (m, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 4.20–3.91 (m, 4H, H-4', H-5' (thymidine)), 3.83–3.60 (m, 3.5H, H-2', H-3', H-5' (guanosine), one of diastereomers), 3.43 (t,  $J = 10.3$  Hz, 0.5H, H-3', one of diastereomers), 3.21–2.81 (m, 8.5H, H-2', H-3', -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, one of diastereomers), 2.79–2.62 (m, 6.5H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, H-2' (thymidine), one of diastereomers), 1.84, 1.80 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>, diastereomers), 1.27 (d,  $J = 6.9$  Hz, 6H, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.05 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  176.3, 175.9 (-NHCO-, diastereomers), 163.3, 163.3 (C-4 (thymidine), diastereomers), 159.6, 159.6 (C-6 (guanosine), diastereomers), 152.4, 152.4 (C-4 (guanosine), diastereomers), 152.3, 152.2 (C-2 (guanosine), diastereomers), 150.0, 149.9 (C-2 (thymidine), diastereomers), 139.2 (C-8 (guanosine)), 135.5 (Ar), 135.0 (C-6 (thymidine), diastereomers), 132.8, 132.8, 132.8, 132.7, 130.0, 129.9, 129.9, 129.8, 127.8 (Ar), 117.4, 117.4 (C-5 (guanosine), diastereomers), 116.9, 116.9 (-CN, diastereomers), 111.0, 111.0 (C-5 (thymidine), diastereomers), 80.4, 80.3 (C-1' (thymidine), diastereomers), 79.6, 79.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-1' (guanosine), diastereomers), 77.9, 77.8 (C-4', diastereomers), 77.4, 77.3 (C-4', diastereomers), 65.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-5' (thymidine), one of diastereomers), 65.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, C-5' (thymidine), one of diastereomers), 64.1, 64.0 (C-5' (guanosine), diastereomers), 61.7, 61.6 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, diastereomers), 48.9, 48.7 (C-2', diastereomers), 48.4, 48.3 (C-2', diastereomers), 46.1 (C-3'), 45.7, 45.4 (C-3', diastereomers), 36.8, 36.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 35.8, 35.7 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 26.7 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.4 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 19.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 12.5, 12.5 (5-CH<sub>3</sub>, diastereomers); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H}NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  17.5, 17.1.

ESI-MS  $m/z$  calcd for C<sub>45</sub>H<sub>61</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>PSi [M+H]<sup>+</sup>, 958.4155; found 958.4157.

### **2-mer fragments bearing H-phosphonate monoester on 5'-OH (20cc or 20ca)の合成**

モルホリノヌクレオシド **3c** (**20cc** の合成の場合は 0.455 g、0.80 mmol、**20ca** の合成の場合は 0.569 g、1.0 mmol) および *H*-ホスホネートモノマー**15c** (**20cc** の合成の場合は 0.757 g、0.96 mmol)、または、*H*-ホスホネートモノマー**15a** (**20ca** の合成の場合は 0.914 g、1.2 mmol) を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (**20cc** の合成の場合は 8 mL、**20ca** の合成の場合は 10 mL) とアセトニトリル (**20cc** の合成の場合は 8 mL、**20ca** の合成の場合は 10 mL) の混合溶液に溶解した。PyNTP

(**20cc** の合成の場合は 1.19 g、2.4 mmol、**20ca** の合成の場合は 1.5 g、3.0 mmol) を 0 °C で反応溶液に加え、0 °C で 20 分間攪拌した。その後、CCl<sub>4</sub> (**20cc** の合成の場合は 1.55 mL、16 mmol、**20ca** の合成の場合は 1.93 mL、20 mmol) および 9.5 M ジメチルアミン水溶液 (**20cc** の合成の場合は 3.2 mL、30.4 mmol、**20ca** の合成の場合は 4 mL、38 mmol) を 0 °C で加え、0 °C で 1 分間攪拌した。その後、反応溶液をクロロホルム (**20cc** の合成の場合は 100 mL、**20ca** の合成の場合は 50 mL) で希釈し、飽和重曹水 (**20cc** の合成の場合は各 3×100 mL、**20ca** の合成の場合は各 3×50 mL) で洗浄した。水層をまとめ、ジクロロメタン (**20cc** の合成の場合は各 3×300 mL、**20ca** の合成の場合は各 3×150 mL) で逆抽出した。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。粗生成物は、これ以上の精製操作を行わず、次の反応に用いた。残渣に対してトルエン共沸を行い、THF (**20cc** の合成の場合は 8 mL、**20ca** の合成の場合は 10 mL) に溶解した。1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) THF 溶液 (**20cc** の合成の場合は 2.4 mL、2.4 mmol、**20ca** の合成の場合は 3.0 mL、3.0 mmol) と酢酸 (**20cc** の合成の場合は 0.137 mL、2.4 mmol、**20ca** の合成の場合は 0.17 mL、3.0 mmol) の混合溶液を 0 °C で加え、指定された時間 (**20cc** の合成の場合は 0 °C で 2.5 時間、**20ca** の合成の場合は 0 °C で 45 分、その後室温で 30 分) 攪拌した。その後、反応溶液をクロロホルム (**20cc** の合成の場合は 100 mL、**20ca** の合成の場合は 50 mL) で希釈し、飽和重曹水 (**20cc** の合成の場合は各 3×100 mL、**20ca** の合成の場合は各 3×50 mL) で洗浄した。水層をまとめ、ジクロロメタン (**20cc** の合成の場合は各 3×300 mL、**20ca** の合成の場合は各 3×150 mL) で逆抽出した。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。粗生成物は、これ以上の精製操作を行わず、次の反応に用いた。Imidazole (**20cc** の合成の場合は 0.924 g、13.6 mmol、**20ca** の合成の場合は 1.157 g、17 mmol) と TEA (**20cc** の合成の場合は 5.6 mL、40 mmol、**20ca** の合成の場合は 7.0 mL、50 mmol) を、アルゴン雰囲気下でジクロロメタン (**20cc** の合成の場合は 40 mL、**20ca** の合成の場合は 50 mL) に溶解した。PCl<sub>3</sub> (**20cc** の合成の場合は 0.35 mL、4 mmol、**20ca** の合成の場合は 0.44 mL、5 mmol) を室温で溶液に加え、30 分間攪拌した。その後、反応溶液を -78 °C まで冷却した (溶液 C)。粗生成物 (**19cc** または **19ca**) をピリジン共沸により脱水後、ジクロロメタン (**20cc** の合成の場合は 13.3 mL、**20ca** の合成の場合は 16.6 mL) に溶解し、-78 °C で溶液 C に滴下した (**20cc** の合成の場合は 35 分、**20ca** の合成の場合は 30 分)。反応溶液は -78 °C で 30 分間攪拌され、その後室温で指定された時間 (**20cc** の合成の場合は 1.5 時間、**20ca** の合成の場合は 1 時間) 攪拌した。反応溶液に 1.0 M TEAB 緩衝液 (**20cc** の合成の場合は 60 mL、**20ca** の合成の場合は 70 mL) を加え、5 分間攪拌した後、分液漏斗で分離した。水層をクロロホルム



(**20cc** の合成の場合は各 6×60 mL、**20ca** の合成の場合は各 3×70 mL) で逆抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (中性シリカゲル : **20cc** の合成の場合は 20 g、**20ca** の合成の場合は 25 g) で精製した。目的物が含まれる分画を回収、減圧下で濃縮し、**20cc** と **20ca** を TEA 塩として得た。**20cc** の残渣にクロロホルム-ピリジン (2 : 1、v/v、70 mL) の溶液を加え、0.2 M 炭酸水素 DBU 緩衝液 (1×70 mL) で洗浄した。水層を、クロロホルム-ピリジン (各 6×70 mL) で逆抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮することで、**20cc** を DBU 塩として得た。

#### **C-C 2-mer fragment bearing *H*-phosphonate monoester on 5'-OH group (**20cc**).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-Et<sub>3</sub>N (98:1:1-92:7:1, v/v/v)) で精製した後に、上記に示した手法で DBU 塩への塩交換を行い、化合物 **20cc** を無色フォームとして得た。(0.877 g, 0.73 mmol, 91% yield from **3c**, 4 steps).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.9–11.8 (br, 0.5H), 8.01–7.66 (m, 7H, H-6, Ar), 7.62–7.36 (m, 12H, H-5, Ar), 7.31–7.27 (m, 3H, Ar), 7.21–7.00 (m, 7H, Ar), 6.92 (d, *J*<sub>PH</sub> = 610 Hz, 1H, P-H), 6.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-1'), 5.70–5.62 (m, 1H, H-1'), 4.51–4.33 (m, 1H, H-4'), 4.10–3.78 (m, 5H, H-4', H-5'), 3.73–3.31 (m, 9H, H-2', H-3', DBU), 3.10 (t, *J* = 13.5 Hz, 1H, H-3'), 2.88–2.84 (m, 2H, DBU), 2.77–2.27 (m, 8H, H-2', H-3', -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.01–1.94 (m, 2H, DBU), 1.77–1.64 (m, 6H, DBU), 1.55–1.24 (m, 2H, H-2', H-3'); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.1, 167.0 (-CONH-), 165.8 (C-DBU), 162.6, 162.5, 162.4 (C-4, diastereomers), 154.3, 154.1, 154.0 (C-2, diastereomers), 144.6, 144.2, 144.0 (C-6, diastereomers), 135.2, 133.0, 132.9, 132.8, 132.7, 128.9, 128.6, 128.5, 128.5, 127.8, 127.7, 126.3, 121.3 (Ar), 97.3, 97.0, 96.9 (C-5, diastereomers), 82.0, 81.6 (C-1' (3'-downstream), diastereomers), 81.4 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 6.7 Hz, C-1' (5'-upstream), one of diastereomers), 81.1 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 7.7 Hz, C-1' (5'-upstream), one of diastereomers), 76.4, 75.3, 75.2, 75.1 (C-4', diastereomers), 65.4, 63.3 (C-5'), 54.1 (C-DBU), 52.2 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 7.7 Hz, C-2' (5'-upstream)), 48.6 (C-3' (3'-downstream)), 48.4 (C-DBU), 47.7, 47.5 (C-2' (3'-downstream), diastereomers), 44.7 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 4.8 Hz, C-3' (5'-upstream)), 37.7 (C-DBU), 36.5, 36.4 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 32.0 (C-DBU), 28.7 (C-DBU), 26.5 (C-DBU), 23.8 (C-DBU), 19.2 (C-DBU); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 16.9, 16.7 (phosphorodiamidate), 5.2 (<sup>1</sup>*J*<sub>PH</sub> = 615 Hz), 5.1 (<sup>1</sup>*J*<sub>PH</sub> = 615 Hz) (*H*-phosphonate monoester).

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>53</sub>H<sub>54</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> [M-H-DBU]<sup>-</sup>, 1054.3424; found 1054.3413.

**C-A 2-mer fragment bearing *H*-phosphonate monoester on 5'-OH group (20ca).**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-Et<sub>3</sub>N (98:1:1-94:5:1, v/v/v)) で精製し、化合物 **20cc** を無色フォームとして得た。(1.034 g, 0.88 mmol, 88% yield from **3c**, 4 steps).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.79, 8.74 (s, 1H, H-2 (adenosine), diastereomers), 8.18 (s, 0.5H, H-8 (adenosine), one of diastereomers), 8.14 (s, 0.5H, H-8 (adenosine), one of diastereomers), 8.10–7.97 (m, 2H, -NHCO-, Ar), 7.96–7.85 (m, 2.5H, -NHCO-, Ar, H-6 (cytidine), one of diastereomers), 7.79 (d, *J* = 7.3 Hz, 0.5H, H-6 (cytidine), one of diastereomers), 7.61–7.14 (m, 23H, Ar, H-5 (cytidine)), 6.88 (d, *J*<sub>PH</sub> = 620 Hz, 0.5H, P-H, one of diastereomers), 6.85 (d, *J*<sub>PH</sub> = 629 Hz, 0.5H, P-H, one of diastereomers), 6.41 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-1' (adenosine)), 5.65 (d, *J* = 9.6 Hz, 0.5H, H-1' (cytidine), one of diastereomers), 5.56 (d, *J* = 9.2 Hz, 0.5H, H-1' (cytidine), one of diastereomers), 4.57–4.38 (m, 1H, H-4'), 4.05–3.13 (m, 9H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 3.00 (q, *J* = 6.9 Hz, 6H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.82–2.23 (m, 8H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, H-2', H-3'), 1.89 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-2' (adenosine)), 1.63 (q, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-3'), 1.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.1, 166.9 (-CONH-, diastereomers), 165.2, 165.0 (-CONH-, diastereomers), 162.4, 162.3 (C-4 (cytidine), diastereomers), 153.9 (C-2 (cytidine)), 152.6, 152.5 (C-2 (adenosine), diastereomers), 151.3, 151.3 (C-4 (adenosine), diastereomers), 149.8, 149.4 (C-6 (adenosine), diastereomers), 144.1 (C-6 (cytidine)), 141.2, 141.0 (C-8 (adenosine), diastereomers), 133.6, 133.1, 133.0, 132.6, 132.5, 129.5, 129.1, 128.9, 128.6, 128.5, 128.1, 127.9, 127.7, 126.5 (Ar), 123.3, 122.9 (C-5 (adenosine), diastereomers), 96.8 (C-5 (cytidine)), 81.4 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 7.7 Hz, C-1' (cytidine), one of diastereomers), 81.3 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 8.7 Hz, C-1' (cytidine), one of diastereomers), 80.2, 79.7 (C-1' (adenosine), diastereomers), 76.8, 76.8 (C-4', diastereomers), 75.3, 75.2 (C-4', diastereomers), 65.4 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, C-5'), 63.5, 63.3 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 2.9 Hz, C-5', diastereomers), 52.7, 52.6 (C-2' (adenosine)), 48.8, 48.7 (C-3', diastereomers), 47.8, 47.6 (C-2' (cytidine), diastereomers), 45.4 (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 45.0, 44.8 (C-3', diastereomers), 36.6, 36.5 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 8.5 (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.0, 16.6 (phosphorodiamidate), 5.2 (<sup>1</sup>*J*<sub>PH</sub> = 620 Hz), 5.0 (<sup>1</sup>*J*<sub>PH</sub> = 620 Hz) (*H*-phosphonate monoester).

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>54</sub>H<sub>54</sub>N<sub>11</sub>O<sub>10</sub>P<sub>2</sub> [M-H-TEA]<sup>-</sup>, 1078.3536; found 1078.3527.

フラグメント縮合による 4 量体の合成検討

3'-NH 基を有する 2-mer フラグメント **18cc** (4.94 mg, 5 μmol) と、5'位に *H*-ホスホネートモノエステルを有する 2-mer フラグメント **20cc** (9.06 mg, 7.5 μmol)

を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (50  $\mu$ L) とアセトニトリル (50  $\mu$ L) の混合溶液に溶解した。縮合剤 (30  $\mu$ mol) を 0  $^{\circ}$ C で溶液に加え、0  $^{\circ}$ C で 20 分間攪拌した。次に、 $\text{CCl}_4$  (10  $\mu$ L、100  $\mu$ mol) および 9.5 M ジメチルアミン水溶液 (20  $\mu$ L、190  $\mu$ mol) を 0  $^{\circ}$ C で加え、0  $^{\circ}$ C で 1 分間攪拌した。その後、反応溶液をクロロホルム (3 mL) で希釈し、クロロホルム (3 $\times$ 3 mL)、トルエン (2 $\times$ 3 mL) で共沸した。残渣を RP-HPLC によって分析した。RP-HPLC は、C18 カラム (100  $\text{\AA}$ 、3.9 mm $\times$ 150 mm) を使用し、0.1 M TEAA 緩衝液 (pH 7.0) 中、アセトニトリルを 60 分間で 0% から 60% の線形勾配で、50  $^{\circ}$ C、0.5 mL/min の流速で実施した。反応効率は、HPLC の面積比から算出した。(4-mer (**22cccc**)/ 4-mer (**22cccc**) + 2-mer (**18cc**))

#### **4-mer fragments bearing 3'-NH group (23cccc or 23gtca) の合成**

3'-NH 基を有する 2-mer フラグメント **18cc** (0.198 g、0.20 mmol) または **18gt** (0.192 g、0.20 mmol) と、5'-OH 基に H-ホスホネートモノエステルを有する 2-mer フラグメント **20cc** (0.289 g、0.24 mmol) または **20ca** (0.283 g、0.24 mmol) を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (2 mL) とアセトニトリル (2 mL) の混合溶液に溶解した。PyNTP (0.299 g、0.60 mmol) を 0  $^{\circ}$ C で溶液に加え、0  $^{\circ}$ C で 20 分間攪拌した。次に、 $\text{CCl}_4$  (0.39 mL、4.0 mmol) および 9.5 M ジメチルアミン水溶液 (0.8 mL、7.6 mmol) を 0  $^{\circ}$ C で加え、0  $^{\circ}$ C で指定された時間 (**23cccc** の合成の場合は 20 分、**23gtca** の合成の場合は 1 分) 攪拌した。その後、反応溶液をクロロホルム (30 mL) で希釈し、飽和重曹水 (3 $\times$ 30 mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルム (3 $\times$ 90 mL) で逆抽出した。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタン (4 mL) に溶解した (溶液 A)。3-シアノピリジン (0.208 g、2.0 mmol) と  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (0.15 mL、2.0 mmol) を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (6:4、v/v、4 mL) の混合溶液に溶解した (溶液 B)。溶液 A に、溶液 B を室温に加え、指定された時間 (**23cccc** の合成の場合は 1 時間、**23gtca** の合成の場合は 30 分) 攪拌した。次に、反応溶液をクロロホルム (30 mL) で希釈し、飽和重曹水 (3 $\times$ 30 mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルム (3 $\times$ 90 mL) で逆抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (中性シリカゲル、16 g) によって精製した。**23cccc** または **23gtca** を含む分画を集め、減圧下で濃縮し、**23cccc** または **23gtca** を得た。

#### **C-C-C-C 4-mer fragments bearing 3'-NH group (23cccc)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH (97:3-84:16,

v/v) で精製し、化合物 **23cccc** を無色フォームとして得た。(0.241 g, 0.13 mmol, 66 % yield from **18cc**, 3 steps).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.26–7.34 (m, 38H, Ar, H-5, H-6), 5.96–5.63 (m, 4H, H-1'), 4.33–3.71 (m, 13H, H-2', H-4', H-5'), 3.62–3.26 (m, 3H, H-2', H-3'), 3.13–2.30 (m, 30H, H-2', H-3',  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.06 (s, 9H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167.3, 166.7 (m,  $-\text{CONH}-$ , diastereomers), 162.9, 162.8, 162.6, 162.5, 162.2 (C-4, diastereomers), 154.3, 154.2 (C-2, diastereomers), 144.9, 144.7, 144.6, 144.2, 143.5 (C-6, diastereomers), 135.5, 135.5, 133.0, 132.9, 132.8, 132.6, 129.9, 128.8, 128.7, 128.1, 128.0, 128.0, 127.8, 127.8, 127.7, 127.6 (Ar), 97.1 (C-5), 82.4, 82.1, 81.7 (C-1', diastereomers), 77.9, 76.1 (C-4', diastereomers), 65.4, 65.0, 64.6, 64.2, 64.1 (C-5', diastereomers), 49.5, 49.2, 48.3, 48.1, 47.9, 47.8, 47.6, 47.5 (C-2', diastereomers), 45.8, 45.7, 45.6, 45.1, 44.6, 44.4, 44.2 (C-3', diastereomers), 36.7, 36.4 ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , diastereomers), 26.7 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.2, 19.2 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , diastereomers);  $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  17.2–16.2. ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{86}\text{H}_{104}\text{N}_{19}\text{O}_{19}\text{P}_3\text{Si}$  [ $\text{M} + 2\text{H}$ ] $^{2+}$ , 913.8364; found 913.8364.

#### **G-T-C-A 4-mer fragment bearing 3'-NH group (23gtca)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3$ –MeOH (97:3–82:18, v/v) で精製し、化合物 **23gtca** を無色フォームとして得た。(0.252 g, 0.14 mmol, 71% yield from **18gt**, 3 steps).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.82–8.74 (m, 1H), 8.82–8.31 (m, 4H), 8.14–7.85 (m, 6H), 7.66–7.32 (m, 15H), 7.27–7.17 (m, 1H, H-6 (thymidine)), 6.09 (t,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-1'), 5.91–5.60 (m, 3H, H-1'), 4.83–4.70 (m, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 4.45–3.66 (m, 14H, H-2', H-4', H-5'), 3.62–2.95 (m, 10H, H-2', H-3',  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.92–2.52 (m, 25H,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , H-2', H-3'), 1.77–1.61 (m, 3H, 5- $\text{CH}_3$  (thymidine)), 1.28–1.23 (m, 6H,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.03 (s, 9H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.7, 175.6 ( $-\text{NHCO}-$ , diastereomers), 167.6, 166.9, 166.8, 166.7, 166.6, 166.3, 165.4, 165.3, 165.0, 164.9, 164.6, 164.5, 164.1, 164.0 (C-4 (thymidine), diastereomers), 162.7, 162.6, 162.6, 162.5, 162.5, 162.4 (C-4 (cytidine), diastereomers), 159.6 (C-6 (guanosine)), 154.1 (C-2 (cytidine)), 152.6, 152.4, 151.9 (C-2 (thymidine)), 151.5, 151.4, 151.1, 150.2, 149.9, 150.2, 150.2, 149.9, 149.8, 145.1, 145.0, 144.6, 144.5, 144.4, 144.3, 144.1, 144.0, 143.9, 141.6, 141.4, 139.5, 135.4, 134.7, 134.6 (C-6 (thymidine), diastereomers), 133.7, 133.1, 132.8, 132.7, 132.5, 132.4, 132.2, 130.8, 129.8, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.1, 128.0, 127.7, 127.4 (Ar), 123.0, 117.4, 116.9, 116.9 ( $-\text{CN}$ , diastereomers), 110.9 (C-5 (thymidine)), 97.0, 97.0, 96.9, 96.7 (C-5 (cytidine), diastereomers), 81.4, 81.3,

81.2, 80.4, 80.1, 79.9, 79.7, 79.5 (C-1', diastereomers), 76.4, 76.2, 76.0, 75.9, 75.8 (C-4', diastereomers), 65.5, 65.2, 65.0, 64.7, 64.0, 64.0 (C-5', diastereomers), 61.6 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 49.6, 49.5, 49.4, 49.3, 49.0, 49.0, 48.3, 48.1, 48.0, 47.7, 47.5, 47.3, 47.1 (C-2', diastereomers), 45.7, 45.5, 45.3, 44.9, 44.6, 44.6, 44.3, 44.0 (C-3', diastereomers), 36.9, 36.8, 36.7, 36.6, 36.6 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 35.7, 35.6 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 26.7 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.3 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 19.2 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN), 12.2, 12.2, 12.0 (5-CH<sub>3</sub> (thymidine), diastereomers); <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.4–15.6. ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>82</sub>H<sub>106</sub>N<sub>23</sub>O<sub>18</sub>P<sub>3</sub>Si [M + 2 H]<sup>2+</sup>, 910.8529; found 910.8528.

#### 4-mer fragments bearing *H*-phosphonate monoester on 5'-OH (25cccc or 25gtca)の合成

3'-NH 基を有する 2-mer フラグメント **18cc** (0.198 g, 0.20 mmol) または **18gt** (0.192 g, 0.2 mmol) および 5'-OH 基に H-ホスホネートモノエステルを有する 2-mer フラグメント **20cc** (0.289 g, 0.24 mmol) または **20ca** (0.283 g, 0.24 mmol) を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (2 mL) とアセトニトリル (2 mL) の混合溶液に溶解した。PyNTP (0.299 g, 0.60 mmol) を 0 °C で溶液に加え、0 °C で 20 分間攪拌した。次に、CCl<sub>4</sub> (0.39 mL, 4.0 mmol) および 9.5 M ジメチルアミン水溶液 (0.8 mL, 7.6 mmol) を 0 °C で加え、0 °C で指定された時間 (**25cccc** の合成の場合は 20 分、**25gtca** の合成の場合は 1 分) 攪拌した。その後、反応溶液をクロロホルム (30 mL) で希釈し、飽和重曹水 (3×30 mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルム (3×90 mL) で逆抽出した。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。粗生成物はこれ以上の精製を行わず、次の反応に用いた。残渣をトルエン共沸し、THF (2 mL) に溶解した。1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) THF 溶液 (0.6 mL, 0.60 mmol) および酢酸 (0.034 mL, 0.60 mmol) の混合溶液を 0 °C で加え、指定された時間 (**25cccc** の合成の場合は 0 °C で 1 時間、**25gtca** の合成の場合は 0 °C で 30 分、その後室温で 1 時間) 攪拌した。**25cccc** の合成では、1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) THF 溶液 (0.4 mL, 0.40 mmol) および酢酸 (0.023 mL, 0.40 mmol) の混合溶液を追加し、20 分間攪拌した。次に、反応溶液をクロロホルム (30 mL) で希釈し、飽和重曹水 (3×30 mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルム (3×90 mL) で逆抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。粗生成物はこれ以上の精製を行わず、次の反応に用いた。イミダゾール (0.231 g, 3.4 mmol) および TEA (1.4 mL, 10 mmol、**25cccc** の合成の場合) または N-メチルモルホリン (1.1 mL, 10 mmol、**25gtca** の合成の場合) は、アルゴン雰囲気下で

ジクロロメタン (10 mL) に溶解した。PCl<sub>3</sub> (0.087 mL, 1.0 mmol) を室温で溶液に加え、30 分間攪拌した。その後、反応溶液を -78 °C に冷却した (溶液 C)。粗混合物 (**24cccc** または **24gtca**) をピリジン共沸により脱水した後、ジクロロメタン (3.3 mL) に溶解し、-78 °C で指定された時間 (**25cccc** の合成の場合は 23 分、**25gtca** の合成の場合は 25 分) かけて溶液 C に滴下した。反応溶液は -78 °C で 30 分間攪拌し、その後室温で指定された時間 (**25cccc** の合成の場合は 1 時間、**25gtca** の合成の場合は 30 分) かけて攪拌した。反応溶液に 1.0 M TEAB 緩衝液 (15 mL) を加え、5 分間攪拌した後、分液漏斗で分離した。水層はクロロホルム-ピリジン (2:1, v/v) の溶液 (**25cccc** の合成の場合: 3×20 mL) またはクロロホルム (**25gtca** の合成の場合: 3×50 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (中性シリカゲル: 16 g) を用いて精製し、**25cccc** または **25gtca** を含む分画を集め、減圧下で濃縮し、TEA 塩として得た。**25cccc** の残渣に、クロロホルム-ピリジン (2:1, v/v, 30 mL) の混合溶液を加え、0.2 M 炭酸水素 DBU 緩衝液 (1×30 mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルム-ピリジン (3×30 mL) で逆抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮し、**25cccc** を DBU 塩として得た。

#### **C-C-C-C 4-mer fragment bearing *H*-phosphonate monoester on 5'-OH group (**25cccc**)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-Et<sub>3</sub>N (96:3:1-89:10:1, v/v/v)) で精製した後に、上記に示した手法で DBU 塩への塩交換を行い、化合物 **25cccc** を無色フォームとして得た。(0.293 g, 0.143 mmol, 72% yield from **18cc**, 4 steps).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 11.9 (s, 1H, HDBU<sup>+</sup>), 8.18–7.63 (m, 14H, Ar, H-6), 7.63–7.29 (m, 23H, Ar, H-5), 7.26–7.07 (m, 6H, Ar), 6.88 (d, *J*<sub>PH</sub> = 614 Hz, 1H, P-H), 6.27 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-1'), 5.87–5.60 (m, 3H, H-1'), 4.50–3.68 (m, 10H, H-2', H-4', H-5'), 3.61–3.19 (m, 13H, H-2', H-3', DBU), 3.13–3.00 (m, 1H, H-3'), 2.97–2.37 (m, 28H, H-2', H-3', -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, DBU), 2.04–1.97 (m, 2H, DBU), 1.77–1.65 (m, 6H, DBU), 1.58–1.32 (m, 2H, H-2', H-3'); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 167.0, 166.9 (-NHCO-), 166.2 (C-DBU), 163.2, 162.9, 162.7, 162.6 (C-4), 154.5, 154.3, 154.3 (C-2), 144.8, 144.7, 144.5, 144.4, 144.3, 144.2, 144.1 (C-6, diastereomers), 133.0, 132.9, 129.1, 129.0, 128.7, 128.5, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 126.5 (Ar), 97.2, 97.1, 97.0, 96.9 (C-5), 82.0, 81.7, 81.4, 81.2 (C-1'), 77.8, 76.4, 76.1, 76.0, 75.4, 75.4, 75.3 (C-4', diastereomers), 65.7, 65.6, 65.1, 65.0, 65.0, 64.9, 64.8, 63.4, 63.3 (C-5', diastereomers), 54.3 (C-DBU), 52.4, 52.3, 52.3 (C-2', diastereomers), 48.9, 48.8, 48.8, 48.7 (C-3',

diastereomers), 48.6 (C-DBU), 47.9, 47.5, 47.4, 47.0 (C-2', diastereomers), 45.4, 45.1, 44.9, 44.9, 44.7, 44.6, 44.2 (C-3', diastereomers), 42.8, 42.5 (C-2', diastereomers), 37.9 (C-DBU), 36.6 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 32.1 (C-DBU), 29.0 (C-DBU), 26.8 (C-DBU), 24.0 (C-DBU), 19.5 (C-DBU); <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 17.1–16.5 (phosphorodiamidate), 5.3, 5.1 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 616, 611 Hz) (*H*-phosphonate monoester).

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>89</sub>H<sub>97</sub>N<sub>19</sub>O<sub>21</sub>P<sub>4</sub> [M-2H-DBU]<sup>2-</sup>, 945.8034; found 945.8037.

#### **G-T-C-A 4mer fragment bearing *H*-phosphonate monoester on 5'-OH group (25gtca)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-Et<sub>3</sub>N (96.5:3:0.5–87.5:12:0.5, v/v/v)) で精製し、化合物 **25gtca** を無色フォームとして得た。(0.303 g, 0.152 mmol, 76% yield from **18gt**, 4 steps).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.4–9.65 (m, 0.5H, -CONH-, one of diastereomers), 8.92–8.34 (m, 2H), 8.32–7.74 (m, 7H, H-6 (cytidine)), 7.70–7.34 (m, 16H, Ar), 7.27–7.11 (m, 6H, H-6 (thymidine)), 6.85 (d, *J*<sub>PH</sub> = 620 Hz, 1H, P-H), 6.46 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-1'), 5.85–5.56 (m, 3H, H-1'), 4.77 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 4.58–4.43 (m, 1H, H-4'), 4.12–3.72 (m, 10H, H-4', H-5'), 3.55–3.05 (m, 12H, H-2', H-3', -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.05–2.74 (m, 9H, H-2', -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.73–2.42 (m, 21H, H-2', H-3', -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.00–1.53 (m, 5H, H-2', H-3', 5-CH<sub>3</sub> (thymidine)), 1.30–1.25 (m, 15H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 175.9, 175.8, 175.7, 175.6, 175.5, 175.4, 175.3 (-CONH-), 168.4, 168.3, 167.1, 167.0, 166.7, 166.4, 166.1, 166.0, 165.7, 165.5, 165.4, 165.3, 165.2, 165.0, 164.3, 163.9 (C-4 (thymidine), diastereomers), 162.5, 162.4, 162.3, 162.2 (C-4 (cytidine), diastereomers), 159.5 (C-6 (guanosine)), 154.1, 153.9, 153.9, 153.7 (C-2 (cytidine), diastereomers), 152.6, 152.4, 152.0, 151.9, 151.3, 151.2, 151.1, 150.2, 150.1, 150.0, 149.8, 149.7 (C-2 (thymidine), diastereomers), 144.2, 144.1, 144.0, 143.9, 143.5, 143.5, 141.7, 141.5, 141.3, 141.1, 141.0, 141.0, 140.9, 140.7, 140.6, 140.4, 140.2, 140.0, 139.9, 139.8, 139.7, 138.9, 138.8, 135.1, 134.9, 134.7 (C-6 (thymidine), diastereomers), 133.9, 133.6, 133.5, 133.1, 133.0, 133.0, 132.8, 132.5, 132.4, 132.1, 129.6, 129.4, 129.0, 128.8, 128.7, 128.6, 128.6, 128.3, 128.2, 128.1, 127.9, 127.4, 126.5, 126.3, 123.2, 123.1, 123.0, 122.9, 122.7, 122.5, 117.4, 116.9 (-CN), 111.0, 110.9, 110.8, 110.8 (C-5 (thymidine), diastereomers), 97.5, 97.4, 97.2, 97.2, 97.0, 97.0, 96.8 (C-5 (cytidine), diastereomers), 81.3, 81.1, 81.1, 80.9, 80.8, 80.8, 80.7, 80.4, 80.2, 80.1, 79.8, 79.6, 79.5, 79.4, 79.2 (C-1', diastereomers), 76.4, 76.2, 76.0, 75.8, 75.7, 75.4, 75.3, 75.2, 75.1, 75.0, 74.7, 74.7 (C-4', diastereomers), 65.5, 65.4, 65.3, 65.1, 65.1, 64.9, 64.8, 63.3, 63.2 (C-5', diastereomers), 61.5 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 52.8, 52.7, 52.5,

52.4, 52.4 (C-2', diastereomers), 48.7, 48.6, 48.5, 48.2, 48.0, 47.9, 47.7, 47.5, 47.3, 47.2, 47.1, 46.7 (C-2', C-3', diastereomers), 45.3 (-N $\underline{C}$ H<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 45.2, 45.0, 44.7, 44.5, 44.4, 44.3, 44.1, 43.7 (C-2', C-3', diastereomers), 40.2 (C-2'), 36.7, 36.5, 36.2 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 35.7, 35.6 (- $\underline{C}$ H(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 19.3 (-CH( $\underline{C}$ H<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 18.0 (-CH<sub>2</sub> $\underline{C}$ H<sub>2</sub>CN), 12.4, 12.2, 12.1, 12.1 (5-CH<sub>3</sub> (thymidine), diastereomers), 8.4 (-NCH<sub>2</sub> $\underline{C}$ H<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  17.3–15.6 (phosphorodiamidate), 5.4 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 620 Hz) (*H*-phosphonate monoester).

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>85</sub>H<sub>100</sub>N<sub>23</sub>O<sub>20</sub>P<sub>4</sub> [M-H-TEA]<sup>1-</sup>, 1886.6471; found 1886.6472.

### フラグメント縮合による 6 量体・8 量体の合成検討

3'-NH 基を有する 2-mer または 4-mer フラグメント (**18cc**、**23cccc**、**23gtca** : 5  $\mu$ mol) と、5'-OH 基に *H*-ホスホネートモノエステルを有する 2-mer または 4-mer フラグメント (**20cc**、**25cccc**、**25gtca** : 7.5  $\mu$ mol) を、ピリジン共沸により脱水した後、ピリジン (50  $\mu$ L) とアセトニトリル (50  $\mu$ L) の混合溶液に溶解した。縮合剤 (30  $\mu$ mol) を 0 °C で溶液に加え、0 °C で 20 分間攪拌した。次に、CCl<sub>4</sub> (10  $\mu$ L、100  $\mu$ mol) および 9.5 M ジメチルアミン水溶液 (20  $\mu$ L、190  $\mu$ mol) を 0 °C で加え、0 °C で 1 分間攪拌した。その後、反応溶液をクロロホルム (3 mL) で希釈し、クロロホルム (3 $\times$ 3 mL)、トルエン (2 $\times$ 3 mL) で共沸した。残渣の 10 分の 1 を RP-HPLC で分析した。RP-HPLC は、C18 カラム (100 Å、3.9 mm $\times$ 150 mm) を使用し、0.1 M TEAA 緩衝液 (pH 7.0) 中、アセトニトリルを 60 分間で 0% から 60% の線形勾配、50 °C、0.5 mL/min の流速で実施した。反応効率は、目的物と未反応の 3'-NH 基を有するフラグメントの HPLC 面積比から算出した。(6-mer (**28**) or 8-mer (**29**, **30**) / {6-mer (**28**) or 8-mer (**28**)} + {2-mer (**18cc**) or 4-mer (**23cccc**, **23gtca**)} )

#### C-C-C-C-C-C 6-mer (**28**)

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>141</sub>H<sub>160</sub>N<sub>29</sub>O<sub>29</sub>P<sub>5</sub>Si [M+2H]<sup>2+</sup>, 1454.020; found 1454.352.

#### C-C-C-C-C-C-C-C 8-mer (**29**)

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>177</sub>H<sub>204</sub>N<sub>39</sub>O<sub>39</sub>P<sub>7</sub>Si [M+2H]<sup>2+</sup>, 1873.156; found 1874.634.

#### G-T-C-A-G-T-C-A 8-mer (**30**)

ESI-MS *m/z* calcd for C<sub>169</sub>H<sub>211</sub>N<sub>47</sub>O<sub>37</sub>P<sub>7</sub>Si [M+3H]<sup>3+</sup>, 1245.1330; found 1245.1357.



## 8 量体の脱保護反応

8-mer (**29**, **30**) の 9/10 (4.5  $\mu$  mol) を、ジクロロメタン (0.5 mL) に溶解した (溶液 D)。3-シアノピリジン (0.021 g, 200  $\mu$  mol) と  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (15  $\mu$  L, 200  $\mu$  mol) を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ - $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (3:2, v/v) の混合溶液 (0.5 mL) に溶解した (溶液 E)。溶液 D に、溶液 E を室温で加え、1 時間攪拌した。その後、減圧下で濃縮し、残渣を THF (0.2 mL) に溶解した。1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) THF 溶液 (0.2 mL, 200  $\mu$  mol) を室温で溶液に加え、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を減圧下で濃縮し、残渣を濃アンモニア水-エタノール (3:1, v/v, 2 mL) に溶解し、55  $^\circ\text{C}$  で 16 時間反応を行った。反応溶液を  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) で希釈し、 $\text{Et}_2\text{O}$  (1  $\times$  10 mL) で洗浄した。有機層を  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) で逆抽出した。水層を減圧下で濃縮し、残渣を RP-HPLC によって分析した。RP-HPLC は、C18 カラム (100  $\text{\AA}$ , 3.9 mm  $\times$  150 mm) を使用し、0.1 M TEAA 緩衝液 (pH 7.0) 中、アセトニトリルを 60 分間で 0% から 60% の線形勾配、50  $^\circ\text{C}$ 、0.5 mL/min の流速で実施した。8-mer (**31** および **32**) を、逆相カラムクロマトグラフィによって精製した。カラムクロマトグラフィには、Yamazen UNIVERSAL Premium ODS カラム (M サイズ) と自動フラッシュクロマトグラフィシステム W-prep 2XY (ヤマゼン株式会社) を使用した。

### 8-mer (CCCCCCCC) (**32**)

粗生成物を逆相カラムクロマトグラフィー (0.1 M TEAA buffer-MeCN (100:0-70:30, v/v)) で精製した。目的物のいるフラクションを回収し、凍結乾燥することで化合物 **32** を無色フォームとして得た。 (7.2 mg, 3.0  $\mu$ mol, 73% yield from **10cccc**, 5 steps).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.60–7.75 (m, 8H, C-6), 6.01–5.62 (m, 16H, H-5, H-1'), 4.36–3.24 (m, 24H, H-4', H-5'), 3.53–3.25 (m, 16H, H-2', H-3'), 3.08–2.74 (m, 16H, H-2', H-3'), 2.71–2.63 (m, 42H,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  166.4, 166.3 (C-4), 157.1, 156.8 (C-2), 142.0, 141.9, 141.7 (C-6), 97.1, 96.7 (C-5), 81.2, 81.0, 80.0, 79.8 (C-1'), 78.2, 77.9, 76.4, 76.0 (C-4'), 66.3, 66.0 (C-5'), 47.3, 47.1, 45.9, 44.6, 44.2, 43.3, 43.3 (C-2', C-3'), 36.4 ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ );  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (243 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  19.2–18.8.

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{86}\text{H}_{143}\text{N}_{39}\text{O}_{31}\text{P}_7$   $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , 811.6320; found 811.6319.

### 8-mer (GTCAGTCA) (**33**)

粗生成物を逆相カラムクロマトグラフィー (0.1 M TEAA buffer-MeCN (100:0-70:30, v/v)) で精製した。目的物のいるフラクションを回収し、凍結乾燥すること

で化合物 **33** を無色フォームとして得た。(8.3 mg, 3.2  $\mu\text{mol}$ , 79% yield from **23gtca**, 5 steps).

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.01–7.30 (m, 10H, H-2 (adenine), H-8 (adenine), H-8 (guanine), H-6 (thymine), H-6 (cytosine)), 5.95–5.01 (m, 10H, H-5 (cytosine), H-1'), 4.29–3.94 (16H, H-4', H-5'), 3.70–2.91 (m, 31H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 2.78–2.53 (m, 51H, H-2', H-3',  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.76–1.36 (m, 6H (5- $\text{CH}_3$ ));  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (243 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  20.0–18.5;  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR: Due to the low solubility of **33** in water, the measurement of  $^{13}\text{C}$  NMR was difficult.

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{92}\text{H}_{145}\text{N}_{45}\text{O}_{31}\text{P}_7$   $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , 864.3100; found 864.3100.

## 第二章

### 5'-*O*-Dimethoxytritylthymidine 3'-morpholino *H*-phosphonamidate (**34t**) の合成

1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-enium 5'-*O*-dimethoxytritylthymidine 3'-*H*-phosphonate monoester **33t** (0.380 g, 0.5 mmol) とモルホリン (0.044 mL, 0.50 mmol) をジクロロメタン (10 mL) およびピリジン (0.1 mL) に溶解し、MS4A (1.0 g) を使用して乾燥した。その後、縮合剤として BOPCl (0.32 g, 1.25 mmol) を室温で溶液に加え、室温で 20 分間攪拌した。その後、モルホリン (0.044 mL, 0.50 mmol) を反応溶液に追加し、室温で 30 分間攪拌した。反応溶液をジクロロメタン (40 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (2 回  $\times$  30 mL)。水層をまとめ、ジクロロメタンで逆抽出した (2 回  $\times$  30 mL)。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Yamazen UNIVERSAL Premium カラム (M サイズ) と、自動フラッシュクロマトグラフィシステム W-prep 2XY (山善株式会社) を使用した ( $\text{CHCl}_3$ -Acetone (100:0-0:100, v/v))。化合物 **34t** を無色フォームで得た (0.144 g, 0.21 mmol, 43%)。

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.01, 8.98 (br, 1H (H-3), diastereomers), 7.57, 7.56 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H (H-6), diastereomers), 7.39–7.36 (m, 2H (Ar)), 7.33–7.22 (m, 7H (Ar)), 6.86–6.83 (m, 4H (Ar)), 6.81 (d,  $J = 657$  Hz, 1H (P-H)), 6.47 (dd,  $J = 8.8, 5.5$  Hz, 1H (H-1'), one of diastereomers), 6.44 (dd,  $J = 8.5, 5.6$  Hz, 1H (H-1'), one of diastereomers), 5.15–5.08 (m, 1H (H-3')), 4.25, 4.20 (dd,  $J = 4.7, 2.4, 4.7, 2.5$  Hz, 1H (H-4'), diastereomers), 3.79 (s, 6H ( $-\text{OCH}_3$ )), 3.67–3.52 (m, 5H (H-5',  $-\text{NCH}_2-$ )), 3.37 (dd,  $J = 11.8, 2.6$  Hz, 1H (H-5'), diastereomers), 3.18–3.00 (m, 4H ( $-\text{CH}_2\text{O}-$ )), 2.63–2.55 (m, 1H (H-2')), 2.46–2.40 (m, 1H (H-1')), 1.43, 1.42 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H (5- $\text{CH}_3$ ), diastereomers);

$^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  163.6, 163.6 (C-4, diastereomers), 158.8, 158.8 (Ar), 150.4 (C-2), 144.0, 143.9 (Ar), 135.1, 135.0 (C-6, diastereomers), 134.9, 134.9 (Ar), 130.1, 129.1, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 127.3, 127.2, 113.3, 113.3 (Ar), 111.7, 111.6 (C-5, diastereomers), 87.2, 87.2 ( $-\text{OC}(\text{Ar})_3$ ), 84.8 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 5.3$  Hz, C-4', one of diastereomers), 84.7 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 5.9$  Hz, C-4', one of diastereomers), 84.3, 84.3 (C-1', diastereomers), 75.0 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 5.7$  Hz, C-3', one of diastereomers), 74.7 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 5.9$  Hz, C-3', one of diastereomers), 66.9, 66.9 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 5.5$  Hz,  $-\text{NCH}_2-$ , diastereomers), 63.2, 62.9 (C-5', diastereomers), 55.2 ( $-\text{OCH}_3$ ), 42.6 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 1.5$  Hz,  $-\text{OCH}_2-$ ), 39.5 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 3.5$  Hz, C-2', one of diastereomers), 39.3 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 3.9$  Hz, C-2', one of diastereomers), 11.7, 11.6 ( $5-\text{CH}_3$ , diastereomers);  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.1 ( $^1J_{\text{PH}} = 659$  Hz), 12.7 ( $^1J_{\text{PH}} = 655$  Hz)

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_9\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , 695.2840; found 695.2844.

### 5'-O-Dimethoxytritylthymidine 3'-thiomorpholino H-phosphonamidate (35t)の合成

1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-enium 5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-H-phosphonate monoester **33t** (1.52 g, 2.0 mmol) とチオモルホリン (0.19 mL, 2.0 mmol) をピリジン (20 mL) および MeCN (20 mL) に溶解し、MS3A (4.0 g) を使用して乾燥した。その後、BOPCl (1.27 g, 5.0 mmol) を 0 °C で溶液に加え、0 °C で 20 分間攪拌した。反応溶液をジクロロメタン (80 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (2 回  $\times$  60 mL)。水層をまとめ、ジクロロメタンで逆抽出した (2 回  $\times$  60 mL)。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Yamazen UNIVERSAL Premium カラム (L サイズ) と、自動フラッシュクロマトグラフィシステム W-prep 2XY (山善株式会社) を使用した ( $\text{CHCl}_3$ -pyridine-Acetone (99:1:0-0:0:100, v/v/v))。化合物 **35t** を無色フォームで得た (0.94 g, 1.35 mmol, 68%)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.2-9.1 (br, 1H (H-3)), 7.57 (d,  $J = 1.4$  Hz, 0.5H (H-6) one of diastereomers), 7.56 (d,  $J = 0.9$  Hz, 0.5H (H-6) one of diastereomers), 7.39-7.36 (m, 2H (Ar)), 7.33-7.23 (m, 7H (Ar)), 6.87-6.82 (m, 4H (Ar)), 6.78 (d,  $J = 655.9$  Hz, (P-H) one of diastereomers), 6.73 (d,  $J = 653.2$  Hz, (P-H) one of diastereomers), 6.49-6.42 (m, 1H (H-1')), 5.12-5.05 (m, 1H (H-3')), 4.22 (q,  $J = 2.3$  Hz, 0.5H (4'), diastereomers), 4.20 (q,  $J = 1.8$  Hz, 0.5H (4'), diastereomers), 3.79 (s, 6H ( $-\text{OCH}_3$ )), 3.56-3.51 (m, 1H (H-5')), 3.45-3.19 (m, 5H (H-5'', thiomorpholine- $\text{NCH}_2$ )), 2.62-2.39

(m, 6H (H-2', thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>)), 1.43 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1.5H (5-CH<sub>3</sub>), one of diastereomers), 1.40 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1.5H (5-CH<sub>3</sub>), diastereomers); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.6, 163.6 (C-4, diastereomers), 158.8, 158.8, 158.8, 158.7 (Ar), 150.4 (C-2), 144.0, 143.9 (Ar), 135.1, 135.1 (C-6, diastereomers), 135.0, 134.9, 134.9, 130.1, 130.0, 130.0, 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 127.3, 127.2, 113.3, 113.3 (Ar), 111.7, 111.6 (C-5, diastereomers), 87.2, 87.2 (-C<sub>Ar</sub>3, diastereomers), 84.7, 84.7 (<sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 5.7 Hz, C-4', diastereomers), 84.3, 84.3 (C-1', diastereomers), 74.9 (<sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.7 Hz, C-3', one of diastereomers), 74.7 (<sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.9 Hz, C-3', one of diastereomers), 63.2, 62.9 (C-5', diastereomers), 55.2 (-OCH<sub>3</sub>), 44.3 (<sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>), 39.4 (<sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 3.5 Hz, CH<sub>2</sub> (2'), one of diastereomers), 39.3 (<sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 3.8 Hz, CH<sub>2</sub> (2'), one of diastereomers), 27.4, 27.3 (thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>, diastereomers), 11.7, 11.6 (5-CH<sub>3</sub>), diastereomers); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.6 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 655 Hz), 13.2 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 655 Hz)

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>PS<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 711.2612; found 711.2627.

#### 5'-O-Dimethoxytritylthymidine 3'-N-methylpiperadino H-phosphonamidate (36t) の合成

1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-enium 5'-O-dimethoxytritylthymidine 3'-H-phosphonate monoester **33t** (0.380 g, 0.5 mmol) と *N*-メチルピペラジン (0.055 mL, 0.50 mmol) を、ジクロロメタン (10 mL) とピリジン (0.1 mL) に溶解し、MS4A (1.0 g) を使用して乾燥した。その後、BOPCl (0.32 g, 1.25 mmol) を室温で溶液に加え、室温で 20 分間攪拌した。その後、*N*-メチルピペラジン (0.055 mL, 0.50 mmol) を反応溶液に追加し、室温で 30 分間攪拌した。反応溶液をジクロロメタン (40 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (2 回×30 mL)。水層をまとめ、ジクロロメタンで逆抽出した (2 回×30 mL)。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過、減圧下で濃縮し、無色フォームの **36t** を得た。化合物 **36t** は、これ以上の精製操作を行わずに、次の反応に使用した。

<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.1 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 650 Hz), 12.9 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 646 Hz)

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 691.2891; found 691.2890.

#### 5'-O-Dimethoxytrityl-N<sup>6</sup>-benzoyldeoxyadenosine 3'-thiomorpholino H-phosphonamidate (35a) の合成

1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-enium 5'-O-dimethoxytrityl-N<sup>6</sup>-benzoyldeoxyadenosine 3'-H-phosphonate monoester **33a** (0.44 g, 0.50 mmol) およびチオモルフォリン (0.047 mL, 0.50 mmol) を、ジクロロメタン (10 mL) および

ピリジン (0.1 mL) に溶解し、MS4A (1.0 g) を使用して乾燥した。その後、BOPCl (0.32 g、1.25 mmol) を室温で溶液に加え、室温で 20 分間攪拌した。その後、チオモルフォリン (0.047 mL、0.50 mmol) を溶液に追加し、室温で 30 分間攪拌した。反応溶液をジクロロメタン (40 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (2 回 × 30 mL)。水層をまとめ、ジクロロメタンで逆抽出した (2 回 × 30 mL)。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。カラムクロマトグラフィーには、Yamazen UNIVERSAL Premium カラム (L サイズ) と、自動フラッシュクロマトグラフィシステム W-prep 2XY (山善株式会社) を使用した (CHCl<sub>3</sub>-Acetone (100:0-0:100, v/v))。化合物 **35a** を無色フォームで得た (0.21 g, 0.26 mmol, 53%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.11 (s, 1H (-CONH-)), 8.72 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H (H-2)), 8.16 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H (8-H)), 8.02 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H (Ar)), 7.60 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H (Ar)), 7.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H (Ar)), 7.40–7.36 (m, 2H (Ar)), 7.29–7.19 (m, 7H (Ar)), 6.82 (d, *J* = 657.7 Hz, 1H (P-H)), 6.82–6.79 (m, 4H (Ar)), 6.53–6.49 (m, 1H (H-1')), 5.26–5.16 (m, 1H (H-3')), 4.38–4.33 (m, 1H (H-4')), 3.77 (s, 6H (-OCH<sub>3</sub>)), 3.50–3.30 (m, 6H (H-5', 5'', thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>)), 3.13–3.06 (m, 1H (H-2')), 2.85–2.74 (m, 1H (H-2'')), 2.64–2.49 (m, 4H (thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>)); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.5 (-CONH-), 158.5 (Ar), 152.6 (C-2), 151.4 (C-4), 149.5 (C (6)), 144.2 (Ar), 144.1 (Ar), 141.4, 141.4 (C-8, diastereomers), 135.3, 135.3, 135.2, 133.5, 132.7, 129.9, 129.9, 129.1, 128.8, 128.0, 127.9, 127.8, 127.0 (Ar), 123.5 (C-5), 113.2 (Ar), 86.7 (O-C(Ar)<sub>3</sub>), 85.2, 85.1 (C-4'', diastereomers), 84.5 (C-1'), 75.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 4.8 Hz, C-3', one of diastereomers), 74.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-3', one of diastereomers), 63.1, 62.8 (C-5', diastereomers), 55.2 (-OCH<sub>3</sub>), 44.4, (<sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>, diastereomers), 44.3 (thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>, diastereomers), 38.9, 38.8 (C-2', diastereomers), 27.4, 27.4 (thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>, diastereomers); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.9 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 650 Hz), 13.0 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 659 Hz)

HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C<sub>42</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>PS<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 807.2724; found 807.2726.

### **5'-O-Dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryldeoxycytidine 3'-thiomorpholino H-phosphonamidate (35c)の合成**

1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-enium 5'-O-dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-isobutyryldeoxycytidine 3'-H-phosphonate monoester **33c** (0.41 g、0.50 mmol) およびチオモルフォリン (0.047 mL、0.50 mmol) を、ジクロロメタン (10 mL) およびピリジン (0.1 mL) に溶解し、MS4A (1.0 g) を使用して乾燥した。その後、BOPCl (0.32 g、1.25 mmol) を室温で溶液に加え、室温で 20 分間攪拌した。その後、チ

オモルフォリン (0.047 mL, 0.50 mmol) を反応溶液に追加し、室温で 30 分間攪拌した。反応溶液をジクロロメタン (40 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (2 回×30 mL)。水層をまとめ、ジクロロメタンで逆抽出した (2 回×30 mL)。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。カラムクロマトグラフィーには、Yamazen UNIVERSAL Premium カラム (L サイズ) と、自動フラッシュクロマトグラフィシステム W-prep 2XY (山善株式会社) を使用した (CHCl<sub>3</sub>-Acetone (100:0-0:100, v/v))。化合物 **35c** を無色フォームで得た (0.22 g, 0.29 mmol, 58%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.26 (br, 1H (-CONH-)), 8.14 (d, *J* = 7.3 Hz, 0.5H (H-6), one of diastereomers), 8.09 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.5H (H-6), one of diastereomers), 7.37-7.14 (m, 9H (Ar)), 6.87-6.84 (m, 4H (Ar)), 6.79 (d, *J* = 651.8 Hz, 0.5H (P-H) one of diastereomers), 6.71 (d, *J* = 654.1 Hz, 0.5H (P-H) one of diastereomers), 6.33-6.26 (m, 1H (H-1')), 5.06-4.99 (m, 1H (H-3')), 4.34-4.31 (m, 1H (H-4')), 3.80 (s, 6H (-OCH<sub>3</sub>)), 3.52-3.25 (m, 6H (H-5', 5'', thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>)), 2.89-2.80 (m, 1H (H-2')), 2.62-2.50 (m, 5H (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>)), 2.36-2.27 (m, 1H (H-2')), 1.24-1.21 (m, 6H (-CH(CH<sub>3</sub>))); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176.5 (-CONH-), 162.2 (C-4), 158.7 (Ar), 155.0 (C-2), 144.2 (C-6), 143.8 (Ar), 135.1, 135.0, 135.0, 134.9, 130.0, 130.0, 128.0, 127.2, 113.3 (Ar), 96.2 (C-5'), 87.1 (-C<sub>Ar</sub>3), 87.1, 86.9 (C-1', diastereomers), 85.4, 85.3 (C-4', diastereomers), 74.0, 73.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-3', diastereomers), 62.5, 62.1 (C-5', diastereomers), 55.2 (CH<sub>3</sub> (-OCH<sub>3</sub>)), 44.3, 44.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, CH<sub>2</sub> (thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>, diastereomers), 40.7, 40.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 3.8 Hz, C-2', diastereomers), 36.8 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.4, 27.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, CH<sub>2</sub> (thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>)), 19.0, 19.0 (CH<sub>3</sub> (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.5 (<sup>1</sup>J<sub>PH</sub> = 650 Hz)

HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>PS<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 749.2768; found 749.2766.

### 5'-O-Dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-isobutyryldeoxyguanosine 3'-thiomorpholino H-phosphonamidate (35g)の合成

1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-enium 5'-O-dimethoxytrityl-N<sup>2</sup>-isobutyryldeoxyguanosine 3'-H-phosphonate monoester **33g** (0.43 g, 0.50 mmol) およびチオモルフォリン (0.047 mL, 0.50 mmol) を、ピリジン (5 mL) および MeCN (5 mL) に溶解し、MS3A (1.0 g) を使用して乾燥した。その後、BOPCl (0.32 g, 1.25 mmol) を 0 °C で溶液に加え、0 °C で 20 分間攪拌した。反応溶液をジクロロメタン (40 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (2 回×30 mL)。水層をまとめ、ジクロロメタンで逆抽出した (2 回×30 mL)。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、

ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。カラムクロマトグラフィーには、Yamazen UNIVERSAL Premium カラム (Lサイズ) と、自動フラッシュクロマトグラフィシステム W-prep 2XY (山善株式会社) を使用した(1回目: CHCl<sub>3</sub>-Acetone (100:0-0:100, v/v)、2回目: CHCl<sub>3</sub>-pyridine-Acetone (99:1:0-39:1:60, v/v/v))。化合物 **35g** を無色フォームで得た(0.21 g, 0.27 mmol, 53%)。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.0 (brs, 1H (NH-1)), 9.37 (s, 0.5H (-COHN-), one of diastereomers), 8.98 (s, 0.5H (-COHN-), one of diastereomers), 7.78 (s, 1H, H-8), 7.42-7.40 (m, 1H (Ar)), 7.36-7.34 (m, 1H (Ar)), 7.30-7.16 (m, 7H (Ar)), 6.83-6.73 (m, 4H (Ar)), 6.82 (d, *J* = 659.1 Hz, P-H), 6.71 (d, *J* = 656.4 Hz, P-H), 6.17-6.13 (m, 1H (H-1')), 5.62-5.57 (m, 0.5H (H-3'), one of diastereomers), 5.46-5.41 (m, 0.5H (H-3'), one of diastereomers), 4.23-4.19 (m, 1H (H-4')), 3.77, 3.76 (s, 6H (-OCH<sub>3</sub>)), 3.44-3.19 (m, 6H (H-5', thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>)), 3.17-3.03 (m, 1H (H-2')), 2.71-2.53 (m, 3H (H-2', thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>)), 2.46 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H (thiomorpholine-SCH<sub>2</sub>)), 2.37 (quin, *J* = 6.9 Hz, 0.5H (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), one of diastereomers), 2.17 (quin, *J* = 6.9 Hz, 0.5H (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), one of diastereomers), 1.14-0.95 (m, 6H (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), diastereomers, rotamers); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 178.9, 178.8 (-CONH-, diastereomers), 158.6, 158.6 (Ar), 155.5, 155.5 (C-6, diastereomers), 147.8, 147.6 (C-2, diastereomers), 147.5, 147.4 (C-4, diastereomers), 144.4, 144.3 (Ar), 137.9 (C-8), 135.5, 135.2, 135.2, 129.8, 127.9, 127.9, 127.9, 127.1, 127.0 (Ar), 121.9, 121.8 (C-5, diastereomers), 113.2, 113.1 (Ar), 86.4, 86.4 (-CAr<sub>3</sub>, diastereomers), 84.2 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 6.7 Hz, C-4', one of diastereomers) 84.2, 83.9 (C-1', diastereomers) 83.8 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 6.7 Hz, C-4', one of diastereomers), 73.9 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 4.8 Hz, C-3', one of diastereomers), 73.8 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-3', one of diastereomers), 62.9, 62.1 (C-5', diastereomers), 55.2 (-OCH<sub>3</sub>), 44.3, 44.2 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, CH<sub>2</sub> (thiomorpholine-NCH<sub>2</sub>), diastereomers), 38.4, 38.2 (C-2', diastereomers), 36.1, 36.1 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.3 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 5.9 Hz, CH<sub>2</sub> (thiomorpholine-SCH), one of diastereomers), 27.3 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 4.8 Hz, CH<sub>2</sub> (thiomorpholine-SCH), one of diastereomers), 18.7, 18.7 (CH<sub>3</sub> (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), diastereomers); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14.2 (<sup>1</sup>*J*<sub>PH</sub> = 652 Hz), 13.4 (<sup>1</sup>*J*<sub>PH</sub> = 659 Hz)

HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C<sub>39</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>PS<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 789.2830; found 789.2831.

#### ピリジン共沸による縮合反応の検討

最初に、*H*-ホスホンアミデートモノマー **34t** (0.0254 g, 0.0375 mmol)、**35t** (0.0260 g, 0.0375 mmol)、または **36t** (0.0259 g, 0.0375 mmol) と化合物 **37t** (0.0120 g, 0.025 mmol) を混合し、ピリジン共沸による脱水を行った (6回 × 1 mL)。その後、

残渣を  $\text{CDCl}_3$  (0.5 mL) に溶解し、 $^{31}\text{P}$  NMR を測定した。**38tt** の形成は、 $^{31}\text{P}$  NMR ( $\delta$  9.2, 7.6,  $^1J_{\text{PH}} = 715, 724$  Hz) および質量分析(HRMS (ESI-TOF))  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{57}\text{H}_{63}\text{N}_4\text{NaO}_{13}\text{Psi}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1093.3791; found 1093.3817)によって確認した。

### 均一 (等温、等濃度、等圧) 条件での縮合検討

まず、*H*-ホスホンアミデートモノマー**35t** (0.0173 g, 0.025 mmol) と化合物 **37t** (0.0144 g, 0.030 mmol) を、pyridine- $d_5$  (0.125 または 0.50 mL) に溶解し、MS4A (0.4 g) で乾燥した。反応溶液を 25°C または 40°C で 1 または 2 時間攪拌した後、NMR サンプル管 (5 mm×180 mm) に移し、 $^{31}\text{P}$  NMR を測定した。**38tt** の生成を  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\delta$  9.1, 7.6,  $^1J_{\text{PH}} = 715, 724$  Hz)によって確認した。

### 2 量体の合成 (塩基性条件)

*H*-ホスホンアミデートモノマー**35t** (0.0416 g, 0.060 mmol : **45tt** の合成)、*H*-ホスホンアミデートモノマー**35a** (0.0484 g, 0.060 mmol : **45aa** の合成)、*H*-ホスホンアミデートモノマー**35c** (0.0449 g, 0.060 mmol : **45cc** の合成)、または *H*-ホスホンアミデートモノマー**35g** (0.0473 g, 0.060 mmol : **45gg** の合成)と化合物 **37t** (0.0192 g, 0.040 mmol : **45tt** の合成)、化合物 **37a** (0.0238 g, 0.040 mmol : **45aa** の合成)、化合物 **37c** (0.0214 g, 0.040 mmol : **45cc** の合成)、または化合物 **37g** (0.0230 g, 0.040 mmol : **45gg** の合成)を、ピリジン (0.40 mL) に溶解し、MS4A (0.8 g) で乾燥した。反応溶液を 40°C で 2 時間攪拌した後、3-(メタンスルホニルスルファニル)プロパンニトリル (**42**) のピリジン溶液 (0.8 mL, 0.048 mmol) を添加した。反応溶液を室温で 1 時間攪拌した後、トルエン共沸によって溶媒として用いたピリジンを除去した。残渣をクロロホルム (2 mL) に溶解し、2% (v/v) TFA in  $\text{CHCl}_3$  溶液 (2 mL) を添加した。反応溶液を室温で 10 分間攪拌した後、MeOH (2 mL) を加え、反応を停止した。反応溶液をクロロホルム (30 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (3 × 20 mL)。水層をまとめ、クロロホルムで逆抽出した (1 × 30 mL)。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Yamazen UNIVERSAL Premium カラム (M サイズ) と自動フラッシュクロマトグラフィーシステム W-prep 2XY (山善株式会社) を使用した。

#### **T<sub>PSCE</sub>T dimer (45tt)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) で精製し、化合物 **45tt** を無色フォームとして得た。(0.0252 g, 0.030 mmol, 74%)



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.62, 9.48, 9.46 (s, 2H, H-3, diastereomers), 7.66–7.63 (m, 4H, Ar), 7.51–7.39 (m, 7H, H-6 (5'-upstream), Ar), 7.18, 7.15 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H, H-6 (3'-downstream), diastereomers), 6.34, 6.31 (t,  $J = 6.9$  Hz, , 1H, H-1' (3'-downstream), diastereomers), 6.16 (t,  $J = 6.9$  Hz, , 1H, H-1' (5'-upstream), one of diastereomers), 6.13 (t,  $J = 7.1$  Hz, , 1H, H-1' (5'-upstream), one of diastereomers), 5.24–5.16 (m, 1H, H-3' (5'-upstream)), 4.40–4.34 (m, 1H, H-3' (3'-downstream)), 4.15–3.70 (m, 6H, H-4', H-5'), 3.38 (br, 1H, 5'-OH), 3.12–2.92 (m, 2H,  $-\text{SCH}_2-$ ), 2.89–2.68 (m, 2H,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.54–2.28 (m, 3H, H-2'), 2.07–1.99 (m, 1H, H-2' (3'-downstream)), 1.90–1.83 (m, 6H, 5- $\text{CH}_3$ ), diastereomers), 1.09 (s, 9H,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ) ;  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  164.1 (C-4 (3'-downstream)), 164.0, 163.9 (C-4 (5'-upstream), diastereomers), 150.5, 150.4 (C-2 (5'-upstream), diastereomers), 150.3 (C-2 (3'-downstream)), 136.6, 136.4 (C-6 (5'-upstream), diastereomers), 136.0, 135.9 (C-6 (3'-downstream), diastereomers), 135.7, 135.7, 132.8, 132.6, 130.3, 130.2, 128.1, 128.0 (Ar), 117.4 ( $-\text{CN}$ ), 111.4, 111.3 (C-5 (3'-downstream), diastereomers), 111.2 (C-5 (5'-upstream)), 86.1 (C-1' (5'-upstream)), 85.8 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 3.9$  Hz, C-4' (3'-downstream), one of diastereomers), 85.6 (C-1' (3'-downstream)), 85.4 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 5.8$  Hz, C-4' (3'-downstream), one of diastereomers), 84.8 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 8.7$  Hz, C-4' (5'-upstream), one of diastereomers), 84.7 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 7.7$  Hz, C-4' (5'-upstream), one of diastereomers), 78.9 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 6.7$  Hz, C-3' (5'-upstream) one of diastereomers), 78.5 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 4.8$  Hz, C-3' (5'-upstream) one of diastereomers), 72.8, 72.6 (C-3' (3'-downstream), diastereomers), 67.1 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 7.7$  Hz, C-5' (3'-downstream), one of diastereomers), 67.0 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 6.7$  Hz, C-5' (3'-downstream), one of diastereomers), 61.9, 61.7 (C-5' (5'-upstream), diastereomers), 40.0, 39.9 (C-2' (3'-downstream), diastereomers), 38.4 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 2.9$  Hz, C-2' (5'-upstream), one of diastereomers), 38.3 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 5.8$  Hz, C-2' (5'-upstream), one of diastereomers), 26.8 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.7, 26.4 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 3.9$  Hz,  $-\text{SCH}_2-$ , diastereomers), 19.8 ( $-\text{CH}_2\text{CN}$ ), 19.0 ( $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 12.5, 12.4, 12.4 (5- $\text{CH}_3$ , diastereomers) ;  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  27.8, 27.3

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{PSSi}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 854.2651; found 854.2652.

#### APSCeA dimer (45aa)

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) で精製し、化合物 **45aa** を無色フォームとして得た。(0.0324 g, 0.030 mmol, 75%)

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.23–9.17 (m, 2H ( $-\text{CONH}-$ )), 8.72–8.70 (m, 2H, H-2),

8.17–8.14 (m, 2H, H-8), 8.02–7.94 (m, 4H (Ar)), 7.71–7.69 (m, 4H (Ar)), 7.61 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H (Ar)), 7.54–7.42 (m, 11H (Ar)), 6.55 (dd,  $J = 12.4$  Hz, 5.9 Hz, 1H, H-1' (3'-downstream)), 6.44–6.30 (m, 1H, H-1' (5'-upstream)), 5.9–5.8 (br, 1H (5'-OH)), 5.30–5.25 (m, 1H H-3' (5'-upstream)), 4.75–4.71 (m, 1H, H-3' (3'-downstream)), 4.28 (d, 2H, H-4'), 4.16–3.71 (m, 4H, H-5'), 3.22–2.90 (m, 3H, H-2' (5'-upstream), -SCH<sub>2</sub>-), 2.77–2.48 (m, 5H, H-2', -CH<sub>2</sub>CN), 1.14 (s, 9H (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.8, 164.5 (-CONH-, diastereomers), 152.5 (C-2 (3'-downstream)) 152.0 (C-2 (5'-upstream)), 151.6 (C-4 (3'-downstream)), 150.5 (C-4 (5'-upstream)), 150.2 (C-6) 3'-downstream), 149.6 (C-6 (5'-upstream)), 142.7 (C-8 (5'-upstream)), 141.7, 141.6 (C-8 (3'-downstream), diastereomers), 135.7, 133.4, 133.2, 132.9, 132.8, 132.6, 130.3, 128.8, 128.7, 128.1, 128.0, 127.9 (Ar), 124.4 (C-5 (5'-upstream)), 123.6 (C-5 (3'-downstream)), 117.2 (-CN), 87.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 2.9 Hz, C-4' (3'-downstream), one of diastereomers), 87.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 4.8 Hz, C-4' (3'-downstream), one of diastereomers), 87.1, 86.9 (C-1' (5'-upstream), diastereomers), 85.5, 85.4, 85.4 (C-4' (5'-upstream), diastereomers), 84.8, 84.6 (C-1' (3'-downstream), diastereomers), 80.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 6.3 Hz, C-3' (5'-upstream), one of diastereomers), 80.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.9 Hz, C-3' (5'-upstream), one of diastereomers), 73.0, 72.9 (C-3' (3'-downstream), diastereomers), 66.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-5' (3'-downstream)), 62.8 (C-5' (5'-upstream)), 40.0 (C-2' (5'-upstream)), 38.9 (C-2' (3'-downstream)), 26.8 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.7, 26.5 (-SCH<sub>2</sub>-, diastereomers), 19.7 (-CH<sub>2</sub>CN), 19.0 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27.4, 26.5

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for C<sub>53</sub>H<sub>55</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>PSSi<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 1080.3406; found 1080.3390.

### C<sub>PSCE</sub>C dimer (45cc)

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) で精製し、化合物 **45cc** を無色フォームとして得た。(0.0288 g, 0.030 mmol, 75%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.99–8.83 (m, 2H (-CONH-)), 8.25, 8.21 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-6 (5'-upstream), diastereomers), 7.93 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-6 (3'-downstream), one of diastereomers), 7.89 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H-6 (3'-downstream), one of diastereomers), 7.66–7.62 (m, 4H (Ar)), 7.50–7.38 (m, 8H, H-5, Ar), 6.28 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H, H-1' (3'-downstream)), 6.16 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H, H-1' (5'-upstream)), 5.31–5.22 (m, 1H, H-3' (5'-upstream)), 4.46–4.36 (m, 1H, H-3' (3'-downstream)), 4.23–4.13 (m, 2H, H-4'), 4.09–3.90 (m, 2H, H-5'), 3.86–3.60 (m, 2H, H-5'), 3.07–2.97 (m, 2H, -SCH<sub>2</sub>-), 2.80–2.59 (m, 6H, H-2', -CH<sub>2</sub>CN, -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.45–2.36 (m, 1H, H-2' (5'-

upstream )), 2.00–1.92 (m, 1H, H-2' (3'-downstream )), 1.21, 1.18 (d,  $J = 6.9$  Hz, 12H, -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.08 (s, 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ; <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 177.5, 177.4, 177.2, 177.2 (-CONH-, diastereomers, rotamers), 162.6 (C-4 (5'-upstream)), 162.5 (C-4 (3'-downstream)), 155.3 (C-2 (5'-upstream)), 155.2, 155.2 (C-2 (3'-downstream), diastereomers), 145.4 (C-6 (5'-upstream)), 144.4, 144.3 (C-6 (3'-downstream), diastereomers), 135.7, 135.6, 135.5, 132.9, 132.9, 132.5, 130.3, 130.2, 128.1, 128.0 (Ar), 117.4, 117.3 (-CN, diastereomers), 96.8 (C-5 (5'-upstream)), 96.6 (C-5 (3'-downstream)), 88.0 (C-1'), 86.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, C-4' (5'-upstream), one of diastereomers), 86.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-4' (5'-upstream), one of diastereomers), 85.6, 85.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 7.7 Hz, C-4' (3'-downstream), diastereomers), 78.7, 78.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 5.8 Hz, C-3' (5'-upstream), diastereomers), 72.7, 72.5 (C-3' (3'-downstream), diastereomers), 66.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 7.7 Hz, C-5' (3'-downstream)), 61.5, 61.4 (C-5' (5'-upstream), diastereomers), 41.6, 41.3 (C-2' (3'-downstream), diastereomers), 39.8, 39.6 (C-2' (5'-upstream), diastereomers), 36.6, 36.5 (-COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.8 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 3.9 Hz -SCH<sub>2</sub>-), 19.8 (-CH<sub>2</sub>CN), 19.0 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.9 (-COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ; <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 27.8, 27.2  
 HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C<sub>45</sub>H<sub>59</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>PSSi<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 964.3495; found 964.3484.

#### G<sub>PSCE</sub>G dimer (45gg)

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) で精製し、化合物 **45gg** を無色フォームとして得た。(0.0326 g, 0.031 mmol, 78%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.4–12.2 (m, 2H (1), diastereomers, rotamers), 10.9, 10.6 (s, 1H (-NHCO-), diastereomers), 10.0, 9.69 (s, 1H (-NHCO-), diastereomers), 7.96, 7.94 (s, 1H, H-8 (5'-upstream), diastereomers), 7.71–7.64 (m, 5H, H-8 (3'-downstream, Ar)), 7.53–7.40 (m, 6H (Ar)), 6.29–6.23 (m, 1H, H-1' (3'-downstream)), 6.10 (dd,  $J = 8.6, 6.4$  Hz, 0.3 H, H-1' (5'-upstream), one of diastereomers), 5.76 (dd  $J = 8.9, 5.7$  Hz, 0.7H, H-1' (5'-upstream ), one of diastereomers), 5.18 (t,  $J = 6.9$  Hz, 0.3H, H-3' (5'-upstream), one of diastereomers), 5.02 (t,  $J = 5.5$  Hz, 0.7H, H-3' (5'-upstream), one of diastereomers), 4.57 (m, 0.3H, H-3' (3'-downstream), one of diastereomers), 4.45 (d,  $J = 4.6$  Hz, 0.7H, H-3' (3'-downstream), one of diastereomers), 4.24–4.09 (m, 3.3H, H-4', H-5', diastereomers), 3.90–3.83 (m, 0.7H, H-5' (5'-upstream), one of diastereomers), 3.75–3.69 (m, 1.3H, H-5', diastereomers), 3.59 (d,  $J = 11.0$  Hz, 0.7H, H-5' (5'-upstream), one of diastereomers), 3.14–2.61 (m, 8H, H-2', -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -SCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CN), diastereomers), 2.49–2.44 (m, 1H, H-2'), 2.30–2.26 (m, 1H, H-2'), 1.32–1.10 (m, 21H, -COCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, diastereomers, rotamers) ; <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$ 180.7, 180.2, 180.0, 179.4 (-NHCO-, diastereomers, rotamers), 156.5, 155.8, 155.6, 155.5 (C-6, diastereomers, rotamers), 148.6, 148.4, 148.3, 148.3 (C-4, diastereomers, rotamers), 148.2, 148.1, 147.7, 147.2 (C-2, diastereomers, rotamers), 139.8 (C-8 (5'-upstream)), 138.2, 132.8, 138.0, 137.8 (C-8 (3'-downstream), diastereomers, rotamers), 135.7, 135.6, 132.8, 132.6, 132.6, 130.4, 130.3, 128.1, 128.0 (Ar), 123.0 (C-5 (3'-downstream)), 121.7, 121.3, 121.2 (C-5 (5'-upstream), diastereomers), 117.4, 117.1 (-CN, diastereomers), 87.0 (C-1' (3'-downstream)), 86.3 (d,  $^3J_{PC} = 4.8$  Hz, C-4', one of diastereomers), 86.2 (d,  $^3J_{PC} = 6.7$  Hz, C-4', one of diastereomers), 85.4 (d,  $^3J_{PC} = 7.7$  Hz, C-4', one of diastereomers), 85.1 (d,  $^3J_{PC} = 8.7$  Hz, C-4', one of diastereomers), 84.6, 84.6 (C-1', diastereomers), 80.6, 80.2 (d,  $^2J_{PC} = 6.7$  Hz, C-3' (5'-upstream), diastereomers), 73.6, 72.8 (C-3' (3'-downstream), diastereomers), 67.7, 66.4 (d,  $^2J_{PC} = 6.7$  Hz, C-5' (3'-downstream), diastereomers), 62.1, 61.9 (C-5' (5'-upstream), diastereomers), 38.6 (C-2'), 36.2, 36.1, 35.9, 35.9 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers, rotamers), 26.8 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.4, 26.0 (d,  $^2J_{PC} = 3.9$  Hz, -SCH<sub>2</sub>-, diastereomers) 19.7 (d,  $^3J_{PC} = 2.9$  Hz, -CH<sub>2</sub>CN), 19.2, 19.2 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers), 19.1 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0, 18.9, 18.9, 18.6, 18.5 (-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, diastereomers, rotamers) ;  $^{31}\text{P}$  { $^1\text{H}$ }NMR (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  27.9, 27.5

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for C<sub>47</sub>H<sub>59</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>PSSi<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>, 1044.3618; found 1044.3599.

### 3 量体(T<sub>Ps</sub>T<sub>Ps</sub>T (46))の合成

*H*-ホスホンアミデートモノマー**35t** (0.0208 g, 0.030 mmol) と化合物 **37t** (0.0096 g, 0.02 mmol) を、ピリジン (0.20 mL) に溶解し、MS4A (0.4 g) で乾燥した。反応溶液を 40°C で 2 時間攪拌した。3-(メタンスルホニルスルファニル)プロパンニトリル (**42**) のピリジン溶液 (0.8 mL, 0.048 mmol) を添加し、室温で 1 時間攪拌した。ジメチルホスホネート (0.011 mL, 0.12 mmol) を添加し、室温で 1 時間攪拌した。その後、トルエン共沸によってピリジンを除去した。残渣をクロロホルム (1 mL) に溶解し、2% TFA in CHCl<sub>3</sub> 溶液 (1 mL) を添加した。反応溶液を室温で 10 分間攪拌し、MeOH (1 mL) を加え、反応を停止した。反応溶液をクロロホルム (30 mL) で希釈し、H<sub>2</sub>O (20 mL) と飽和重曹水 (5 × 30 mL) で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣はこれ以上の精製操作を行わず、次の反応に用いた。残渣に対してピリジン共沸による脱水を行った後、ピリジン (0.2 mL) に溶解した。*H*-ホスホンアミデートモノマー**35t** (0.0208 g, 0.030 mmol) を加え、MS4A (0.4 g) で乾燥した。反応溶液を 40°C で 2 時間攪拌した。3-(メタンスルホニルスルファニル)プロパンニトリル

(42) のピリジン溶液 (0.8 mL、0.048 mmol) を添加し、室温で 1 時間攪拌した。その後、トルエン共沸によってピリジンを除去した。残渣をクロロホルム (1 mL) に溶解し、2% TFA in CHCl<sub>3</sub> 溶液 (1 mL) を添加した。反応溶液を室温で 10 分間攪拌し、MeOH (1 mL) を加え、反応を停止した。反応溶液をクロロホルム (20 mL) で希釈し、飽和重曹水 (3 × 20 mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルムで逆抽出した (1 × 30 mL)。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣を MeCN (0.32 mL) に溶解し、BSA (0.04 mL、0.16 mmol) と DBU (0.04 mL、0.26 mmol) を添加した。反応溶液を室温で 10 分間攪拌した後、クロロホルム (20 mL) で希釈し、1.0 M TEAB 緩衝液 (pH 8) (3 × 20 mL) で洗浄した。水層をまとめ、クロロホルムで逆抽出した (1 × 30 mL)。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣を THF (0.9 mL) に溶解し、1 M TBAF in THF 溶液 (0.3 mL、0.3 mmol) を添加した。反応溶液を室温で 2 時間攪拌した後、EtOH (3 mL) と 3% (v/v) アンモニア水溶液 (15 mL) を添加した。反応溶液をジエチルエーテルで洗浄した (2 × 20 mL)。有機層をまとめ、3% (v/v) アンモニア水溶液で逆抽出した (10 mL)。水層をまとめ、減圧下で濃縮し、粗体の 3 量体 (T<sub>Ps</sub>T<sub>Ps</sub>T) を得た。粗体を RP-HPLC によって分析した。RP-HPLC は、C18 カラム (100 Å、3.9 mm×150 mm) を使用し、0.1 M TEAA 緩衝液 (pH 7.0) 中、アセトニトリルを 40 分間で 0% から 30% の線形勾配、50 °C、0.5 mL/min の流速で実施した。粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Yamazen UNIVERSAL Premium ODS カラム (M サイズ) と自動フラッシュクロマトグラフィーシステム W-prep 2XY (山善株式会社) を使用した (1 回目: 0%-30% MeCN in 0.1 M TEAA バッファー (pH 7.0)、2 回目: 0%-30% MeCN in H<sub>2</sub>O)。目的物のいるフラクションを回収し、凍結乾燥を行い、3 量体 (T<sub>Ps</sub>T<sub>Ps</sub>T (46)) のテトラブチルアンモニウム塩を無色フォームとして得た。(8.7 mg、6.4 μmol、32%)

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.80–7.64 (m, 3H, H-6), 6.32–6.24 (m, 3H, H-1'), 5.12–5.02 (m, 2H, H-3'), 4.58 (m, 1H, H-3'), 4.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-4'), 4.22–4.16 (m, 6H, H-4', H-5'), 3.84–3.79 (m, 2H, H-5'), 3.20 (t, *J* = 4.4 Hz, 16H, -NCH<sub>2</sub>-), 2.54–2.35 (m, 6H, H-2'), 1.95–1.87 (m, 9H, 5-CH<sub>3</sub>), 1.65 (br, 16H, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1.38–1.34 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.99–0.92 (m, 24H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 168.0 (C-4), 153.0, 152.9 (C-2), 137.9, 137.6 (C-6), 112.3, 112.2, 112.1 (C-5), 86.1, 85.6, 84.9, 84.6 (C-1', C-4'), 76.8, 76.4, 75.8, 71.5 (C-3'), 66.1, 65.8, 61.6 (C-5'), 58.7 (-NCH<sub>2</sub>-), 39.5, 38.4, 38.2 (C-2'), 23.7 (-NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 19.8 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.5, 12.5, 12.3 (5-CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} NMR (162 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 56.1, 55.9, 55.8

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $C_{30}H_{38}N_6O_{17}P_2S_2^{2-}$   $[M-2H]^{2-}$ , 440.0611; found 440.0609.

### 酸性活性化剤の検討 (MeCN 溶媒中)

*H*-ホスホンアミデートモノマー **35t** (0.0208 g, 0.030 mmol) と化合物 **37t** (0.0120 g, 0.025 mmol) を、 $CD_3CN$  (0.50 mL) に溶解し、MS3A (0.4 g) で乾燥した。酸性活性化剤 (0.15 mmol) を室温で溶液に添加し、反応溶液を室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を NMR サンプル管 (5 mm × 180 mm) に移し、 $^{31}P$  NMR を測定した。**38tt** の生成を  $^{31}P$  NMR ( $\delta$  9.3, 8.5,  $^1J_{PH} = 720, 726$  Hz) で確認した。

### 溶媒の検討

*H*-ホスホンアミデートモノマー **35t** (0.0208 g, 0.030 mmol) と化合物 **37t** (0.0120 g, 0.025 mmol) を、各溶媒 (entry 1: MeCN, entry 2: pyridine, entry 3: 2,6-lutidine, 0.50 mL) に溶解し、MS4A (0.4 g) で乾燥した。*1H*-テトラゾール (0.0105 g, 0.15 mmol) を反応溶液に加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、反応溶液に重溶媒 (entry 1:  $CD_3CN$ , entry 2: pyridine- $d_5$ , entry 3:  $CDCl_3$ , 0.20 mL) を加えた。その後、反応溶液を NMR サンプル管 (5 mm × 180 mm) に移し、 $^{31}P$  NMR を測定した。**38tt** の生成を  $^{31}P$  NMR (MeCN:  $\delta$  9.3, 8.5,  $^1J_{PH} = 720, 726$  Hz, pyridine:  $\delta$  10.2, 8.6,  $^1J_{PH} = 723, 724$  Hz, 2,6-lutidine:  $\delta$  8.7, 6.9) で確認した。

### 脱離基の検討

*H*-ホスホンアミデートモノマー **34t**、**35t**、**36t** または **49t** (0.030 mmol) と化合物 **37t** (0.0120 g, 0.025 mmol) を、pyridine- $d_5$  (0.50 mL) に溶解し、MS4A (0.4 g) で乾燥した。*1H*-テトラゾール (0.15 mmol) を反応溶液に加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、反応溶液を NMR サンプル管 (5 mm × 180 mm) に移し、 $^{31}P$  NMR を測定した。**38tt** の生成を  $^{31}P$  NMR ( $\delta$  10.2, 8.6,  $^1J_{PH} = 723, 724$  Hz) で確認した。

### NMTRT の合成

*N*-メチルトリアゾール (0.68 mL, 12 mmol) を MeOH-Et<sub>2</sub>O (13.6 mL, 1:1, v/v) に溶解し、0 °C で攪拌した。ここに、トリフルオロメタンスルホン酸 (1.1 mL, 12 mmol) を滴下にて加え、0 °C で 10 分間攪拌した。その後、反応溶液を Et<sub>2</sub>O (55 mL) に加え、生成した結晶を吸引濾過によって収集し、Et<sub>2</sub>O (80 mL) で洗浄した。その後、真空下で乾燥することで、白色の結晶性固体である NMTRT を得た。(1.41 g, 6.0 mmol, 50%)

IR (neat,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3164, 3116, 2941, 2839, 1577, 1542, 1434, 1419, 1371, 1358, 1282, 1249, 1224  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  9.30 (s, 1H (H-5)), 8.61 (s, 1H (H-3)), 4.06 (d,  $J = 0.7$  Hz, 3H (1-Me));  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  143.4 (C-3), 142.0 (C-5), 121.8 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 320$  Hz,  $-\text{CF}_3$ ) 39.5 (1- $\text{CH}_3$ ).

ESI-MS  $m/z$  calcd for  $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_3$   $[\text{M}-\text{OTf}]^+$ , 84.0556; found 84.0554.

### 酸性活性化剤の検討 (Pyridine 溶媒中)

*H*-ホスホンアミデートモノマー **35t** (0.0208 g, 0.030 mmol) と化合物 **37t** (0.0120 g, 0.025 mmol) をピリジン (0.50 mL) に溶解し、MS4A (0.4 g) で乾燥した。酸性活性化剤 (0.15 mmol) を溶液に加え、室温で 10 分間攪拌した。その後、pyridine- $d_5$  (0.2 mL) に溶解させた *S*-(シアノエチル)メタンスルホノチオエート **42** (0.015 mL, 0.125 mmol) と *N, O*-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド (BSA) (0.031 mL, 0.125 mmol) を反応溶液に加えた。反応溶液を NMR サンプル管 (5 mm  $\times$  180 mm) に移し、 $^{31}\text{P}$  NMR を測定した。目的物 **43tt** の生成は  $^{31}\text{P}$  NMR で確認した ( $\delta$  27.7, 27.4)。

### 2 量体の合成 (酸性活性化剤使用)

*H*-ホスホンアミデートモノマー **35t** (0.0416 g, 0.060 mmol: **45tt** の合成)、*H*-ホスホンアミデートモノマー **35a** (0.0484 g, 0.060 mmol: **45aa** の合成)、*H*-ホスホンアミデートモノマー **35c** (0.0449 g, 0.060 mmol: **45cc** の合成)、または *H*-ホスホンアミデートモノマー **35g** (0.0473 g, 0.060 mmol: **45gg** の合成) と化合物 **37t** (0.0192 g, 0.040 mmol: **45tt** の合成)、化合物 **37a** (0.0238 g, 0.040 mmol: **45aa** の合成)、化合物 **37c** (0.0214 g, 0.040 mmol: **45cc** の合成)、または化合物 **37g** (0.0230 g, 0.040 mmol: **45gg** の合成) を、ピリジン (0.80 mL) に溶解し、MS4A (0.8 g) で乾燥した。反応溶液に CMPT (0.0635, 0.24 mmol) を加え、室温で 30 分攪拌した。その後、3-(メタンスルホニルスルファニル)プロパンニトリル (**42**) のピリジン溶液 (0.8 mL, 0.048 mmol) を添加し、室温で 1 時間攪拌した。トルエン共沸によって溶媒として用いたピリジンを除去した。残渣をクロロホルム (2 mL) に溶解し、2% (v/v) TFA in  $\text{CHCl}_3$  溶液 (2 mL) を添加した。反応溶液を室温で 5 分間攪拌した後、MeOH (2 mL) を加え、反応を停止した。反応溶液をクロロホルム (30 mL) で希釈し、飽和重曹水で洗浄した (3  $\times$  20 mL)。水層をまとめ、クロロホルムで逆抽出した (1  $\times$  30 mL)。有機層を、硫酸ナトリウムで乾燥、ろ過し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Yamazen UNIVERSAL Premium カラム (M サイズ) と自動フラッシュクロマトグラフィーシステム W-prep 2XY (山善株式会

社) を使用した。

**T<sub>PSCE</sub>T dimer (45tt)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) で精製し、化合物 **45tt** を無色フォームとして得た。(0.0265 g, 0.031 mmol, 78%)

<sup>1</sup>H NMR、<sup>31</sup>P NMR を測定し、前述した同一化合物と一致することを確認した。

**A<sub>PSCE</sub>A dimer (45aa)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) で精製し、化合物 **45aa** を無色フォームとして得た。(0.0328 g, 0.030 mmol, 76%)

<sup>1</sup>H NMR、<sup>31</sup>P NMR を測定し、前述した同一化合物と一致することを確認した。

**C<sub>PSCE</sub>C dimer (45cc)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) で精製し、化合物 **45cc** を無色フォームとして得た。(0.0287 g, 0.030 mmol, 75%)

<sup>1</sup>H NMR、<sup>31</sup>P NMR を測定し、前述した同一化合物と一致することを確認した。

**G<sub>PSCE</sub>G dimer (45gg)**

粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (a linear gradient of 0%–10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) で精製し、化合物 **45gg** を無色フォームとして得た。(0.0310 g, 0.030 mmol, 74%)

<sup>1</sup>H NMR、<sup>31</sup>P NMR を測定し、前述した同一化合物と一致することを確認した。



## 参考文献

1. C. Wilson and A. D. Keefe, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 607-614.
2. R. Kole, A. R. Krainer and S. Altman, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2012, **11**, 125-140.
3. J. Summerton, *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression*, 1999, **1489**, 141-158.
4. J. Summerton and D. Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997, **7**, 187-195.
5. R. M. Hudziak, E. BAROFSKY, D. F. BAROFSKY, D. L. WELLER, S.-B. HUANG and D. D. WELLER, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1996, **6**, 267-272.
6. J. E. Summerton, *Curr. Top Med. Chem.*, 2007, **7**, 651-660.
7. P. Sazani, D. L. Weller and S. B. Shrewsbury, *Int. J. Toxicol.*, 2010, **29**, 143-156.
8. B. Wu, P. Lu, E. Benrashid, S. Malik, J. Ashar, T. Doran and Q. Lu, *Gene Ther.*, 2010, **17**, 132-140.
9. H. Heemskerk, C. De Winter, P. Van Kuik, N. Heuvelmans, P. Sabatelli, P. Rimessi, P. Braghetta, G.-J. B. van Ommen, S. De Kimpe and A. Ferlini, *Mol. Ther.*, 2010, **18**, 1210-1217.
10. D. E. Baker, *Hospital Pharmacy*, 2017, **52**, 302-305.
11. Y.-A. Heo, *Drugs*, 2020, **80**, 329-333.
12. S. Dhillon, *Drugs*, 2020, **80**, 1027-1031.
13. M. Shirley, *Drugs*, 2021, **81**, 875-879.
14. D. Duan, N. Goemans, S. i. Takeda, E. Mercuri and A. Aartsma-Rus, *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2021, **7**, 13.
15. S. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 1859-1862.
16. S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 2223-2311.
17. Y. S. Sanghvi, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 2011, **46**, 4.1. 1-4.1. 22.
18. R. P. Iyer, L. R. Phillips, W. Egan, J. B. Regan and S. L. Beaucage, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 4693-4699.
19. B. Froehler and M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 469-472.
20. P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg and C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 4055-4058.
21. J. Stawinski and A. Kraszewski, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 952-960.
22. A. Zehl, A. Starke, D. Cech, T. Hartsch, R. Merkl and H.-J. Fritz, *ChemComm*, 1996, 2677-2678.
23. J. Stawinski and M. Thelin, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 5169-5175.
24. J. Stawiński and M. Thelin, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 7255-7258.

25. B. C. Froehler, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 5575-5578.
26. D. S. Sergueev, Z. A. Sergueeva and B. R. Shaw, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2001, **20**, 789-795.
27. A. Kers and J. Stawiński, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 4263-4266.
28. T. Wada, Y. Sato, F. Honda, S.-i. Kawahara and M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 12710-12721.
29. J. E. Summerton and D. D. Weller, US Patent 5185444, 1993.
30. T. Harakawa, H. Tsunoda, A. Ohkubo, K. Seio and M. Sekine, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 1445-1447.
31. C. Li, A. J. Callahan, M. D. Simon, K. A. Totaro, A. J. Mijalis, K.-S. Phadke, G. Zhang, N. Hartrampf, C. K. Schissel and M. Zhou, *Nat. Commun.*, 2021, **12**, 4396.
32. J. Kundu, A. Ghosh, U. Ghosh, A. Das, D. Nagar, S. Pattanayak, A. Ghose and S. Sinha, *J. Org. Chem.*, 2022, **87**, 9466-9478.
33. H. K. Langner, K. Jastrzebska and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 16240-16253.
34. J. Bhadra, J. Kundu, K. C. Ghosh and S. Sinha, *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, 4565-4568.
35. A. Kraszewski, M. Sobkowskia and J. Stawiński, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1993, 1699-1704.
36. A. Sobkowska, M. Sobkowski, J. Stawiński and A. Kraszewski, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 1995, **14**, 703-706.
37. A. Sobkowska, M. Sobkowski, J. Cieślak, A. Kraszewski, I. Kers and J. Stawiński, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4791-4794.
38. I. Kers, J. Stawiński and A. Kraszewski, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 11579-11588.
39. M. C. de Koning, A. B. Ghisaidoobe, H. I. Duynstee, P. B. Ten Kortenaar, D. V. Philippov and G. A. van der Marel, *Org Process Res Dev*, 2006, **10**, 1238-1245.
40. G. Creusen, C. O. Akintayo, K. Schumann and A. Walther, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 16610-16621.
41. Y. Matsuno, T. Shoji, S. Kim and K. Chiba, *Org. Lett.*, 2016, **18**, 800-803.
42. H. Lönnberg, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2017, **13**, 1368-1387.
43. X. Zhou, W. F. Kiesman, W. Yan, H. Jiang, F. D. Antia, J. Yang, Y. A. Fillon, L. Xiao and X. Shi, *J. Org. Chem.*, 2021, **87**, 2087-2110.
44. J. M. Brown, C. Christodoulou, A. S. Modak, C. B. Reese and H. T. Serafinowska, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1989, 1751-1767.
45. C. B. Reese and H. Yan, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*,

- 2002, 2619-2633.
46. C.-H. Chen, W.-Y. Chen, Y.-C. Chen, M.-J. Lee, C.-D. Huang, K. Chanda and C.-M. Sun, *Aust. J. Chem.*, 2010, **63**, 227-235.
  47. N. Oka, M. Shimizu, K. Saigo and T. Wada, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 3667-3673.
  48. F. Atherton, H. Openshaw and A. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1945, 660-663.
  49. F. Atherton and A. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1947, 674-678.
  50. J. Marugg, A. Burik, M. Tromp, G. Van der Marel and J. Van Boom, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 2271-2274.
  51. T. Wada, K. Ishikawa and T. Hata, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 6363-6366.
  52. T. Wada, K. Ishikawa and T. Hata, *Tetrahedron*, 1993, **49**, 2043-2054.
  53. N. Iwamoto, D. C. Butler, N. Svrzikapa, S. Mohapatra, I. Zlatev, D. W. Sah, S. M. Standley, G. Lu, L. H. Apponi and M. Frank-Kamenetsky, *Nat. Biotechnol.*, 2017, **35**, 845-851.
  54. F. R. Benson, *Chem. Rev.*, 1947, **41**, 1-61.
  55. E. Lieber and T. Enkoji, *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 4472-4479.
  56. Y. Hayakawa, R. Kawai, A. Hirata, J.-i. Sugimoto, M. Kataoka, A. Sakakura, M. Hirose and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 8165-8176.
  57. N. Oka, T. Wada and K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8307-8317.
  58. G. M. Barca, C. Bertoni, L. Carrington, D. Datta, N. De Silva, J. E. Deustua, D. G. Fedorov, J. R. Gour, A. O. Gunina and E. Guidez, *J. Chem. Phys.*, 2020, **152**, 154102.
  59. R. M. Claramunt, D. Sanz, G. Boyer, J. Catalán, J. L. G. de Paz and J. Elguero, *Magn. Reson. Chem.*, 1993, **31**, 791-800.
  60. M. Sekine, A. Ohkubo and K. Seio, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 5478-5492.
  61. Tsvetkov, E. N.; Terekhova, M. I.; Petrov, É. S.; Malevannaya, R. A.; Mesyats, S. P.; Shatenshtein, A. I.; Kabachnik, M. I. *Russ. Chem. Bull.* **1978**, 27, 1743-1746.

## 原著論文

1. “Convergent synthesis of phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMOs) by the *H*-phosphonate approach”  
Taiki Tsurusaki, Kazuki Sato, Hiroki Imai, Kunihiro Hirai, Daisuke Takahashi & Takeshi Wada  
*Sci. Rep.*, 2023, **13**, 12576.  
DOI: 10.1038/s41598-023-38698-2
2. “Development of a new synthetic method for oligodeoxynucleotides using 3'-*H*-phosphoramidate derivatives”  
Taiki Tsurusaki, Kazuki Sato and Takeshi Wada  
*Org. Biomol. Chem.*, 2023, **21**, 2486-2492.  
DOI: 10.1039/D2OB02292C
3. “Internucleotidic bond formation using *H*-phosphoramidate derivatives and acidic activators”  
Taiki Tsurusaki, Kazuki Sato and Takeshi Wada  
*RSC Adv.*, 2023, **13**, 31674-31686.  
DOI: 10.1039/D3RA06193K

## 謝辞

本研究を行うにあたり、お世話になった皆様に感謝の意を述べさせていただきます。

和田 猛教授には、ディスカッションを通じて常に適切な助言を頂きました。御多忙の中でも快くディスカッションに時間を割いて頂き、深く感謝しております。先生の丁寧で情熱溢れる指導、あらゆることに対する好奇心、研究における発想の全てが、私の研究に対するモチベーションを高めて下さいました。そのお陰で、私のこの6年間の研究生活は本当に充実したものとなりました。

ご多忙の中、本論文の審査、ディスカッションに多くの時間を割いて頂きました、東京理科大学薬学部の内呂拓実教授、青木伸教授、高橋秀依教授、西川元也教授にこの場を借りてお礼申し上げます。

佐藤一樹講師には、研究や進路に対するアドバイスをして頂きました。ご多忙の中でも快くディスカッションに時間を割いて頂き、丁寧なアドバイスをくださったおかげで、私の成長に繋がりました。また、雑談等の気分転換にも付き合ってください、充実した6年間を過ごすことができました。深く感謝いたします。

研究に伴う事務作業においてお世話になりました秘書の新井有希子さん、研究活動に関する種々のご支援をいただきました東京理科大学薬学部の職員の皆様に深く感謝いたします。

本研究は JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェロシップ創設事業 JPMJFS2144 の支援を受けたものです。3年間に渡り、研究、私生活、進路等、様々なサポートをしてくださったことで、充実した3年間を送ることができました。深く感謝いたします。

ここで挙げた方々以外にも、研究室の先輩、後輩の皆様には公私にわたって大変お世話になりました。お礼申し上げます。

最後になりましたが、これまでの学生生活を支えてくださった両親、兄を慕ってくれる妹弟、常に応援してくれる祖父母、共に大学生活を支え合った妻に深く感謝いたします。