

# 有機合成で創り出す核酸医薬への新しいアプローチ

東京理科大学薬学部 和田 猛

## 1. はじめに

近年、医学のめざましい進歩により、再生医療や遺伝子治療などの実用化にも道が開かれつつある。医薬品の開発に目を向けると、低分子医薬、抗体医薬に続く次世代の医薬として、核酸医薬の実用化に大きな期待が寄せられている。核酸医薬は、疾病に関連するDNA、RNA およびタンパク質を標的とするため、作用機序が明確であり、副作用も少ない。核酸医薬の実用化において解決すべき課題は、核酸誘導体の生体内における安定性の向上とデリバリー技術の確立である。我々は、これらの問題を克服するための手法の一つとして、核酸リン原子の化学修飾に着目して研究を行っている。核酸分解酵素は、DNA やRNA のリン酸ジエステル結合を加水分解するから、リン原子に適切な化学修飾を施すことにより、高い分解酵素耐性を獲得することができる。また、水溶性の高いリン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子を他の元素や置換基に変換することにより、核酸誘導体の脂溶性を高め、細胞膜透過性を向上させることも可能である。

本講演では、核酸医薬として有用なホスホロチオエート DNA および RNA の立体選択的合成と、立体が制御されたH-ホスホネート DNA を経由する様々なリン原子修飾 DNA 類縁体の立体選択的合成について報告する。

## 2. ホスホロチオエート DNA の立体選択的合成

ホスホロチオエート DNA は、これまでに最も広汎に研究されて来たリン原子修飾 DNA 類縁体であり、医薬品として実用化され、上市されているものもある。しかし、現在用いられているホスホロチオエート DNA はすべて多くの立体異性体の混合物である。ホスホロチオエート DNA の生理活性、物理化学的性質は、リン原子の絶対立体配置によって大きく異なることが知られており、それらを立体選択的に合成する意義は大きい。これまでに報告されているホスホロチオエート DNA の立体選択的合成法の多くは、ジアステレオマー混合物として得られるモノマーをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離精製して用いる。一般に、物理化学的性質が酷似したジアステレオマーのクロマトグラフィーによる分離は困難であり、モノマーユニットの合成収率が低いという問題がある。我々は、入手が比較的容易な光学活性アミノアルコールを不斉源とするヌクレオシド 3'-環状ホスホアミダイト（オキサザホスホリジン）誘導体の立体選択的合成に成功した。<sup>13)</sup> この方法の長所は、従来のリン原子修飾核酸類縁体の立体選択的合成法とは異なり、モノマーが立体選択的に合成できることである。立体化学的に純粋なモノマーとヌクレオシドを立体特異的に縮合することができれば、リン原子の立体が制御されたホスホロチオエート DNA の合成が可能となる。しかし、従来のホスホアミダイト法による DNA の合成では、求核

性の高いテトラゾールが活性化剤として用いられるために、縮合反応においてモノマーのエピマー化が進行する。これは、テトラゾールの共役塩基であるテトラゾリドアニオンがモノマーのリン原子を繰り返し求核攻撃するためである。そこで、我々は、求核性の低い新しい活性化剤である、N-(シアノメチル)ピロリジニウムトリフラート (CMPT) を開発し、立体化学的に純粋なオキサザホスホリジンモノマーを用いて、立体選択的な縮合反応を行うことに成功した (オキサザホスホリジン法)。縮合反応は5分以内に完結し、反応のジアステレオ選択性は99:1以上であった。この方法は改良が加えられ、自動合成機を用いて、リン原子の立体が制御された10~20量体程度のオリゴマーの合成を行なわれている (図1)。<sup>3)</sup>

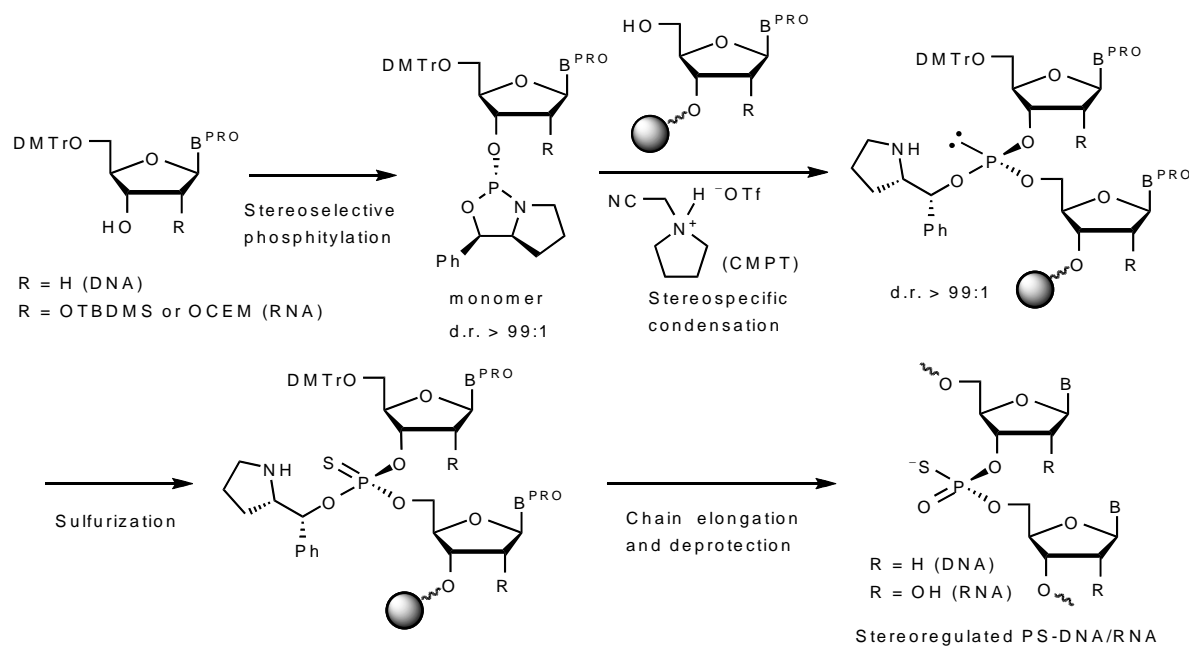


図1. オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート DNA/RNA の立体選択的合成

### 3. ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成

オキサザホスホリジン法によるホスホロチオエート DNA の立体選択的合成に成功したので、次に、この方法をホスホロチオエート RNA の立体選択的合成に応用した。まず、DNA 誘導体と同様の方法で、2'-水酸基が *t*-ブチルジメチルシリル基 (TBDMS 基) で保護されたオキサザホスホリジンモノマーを立体選択的に合成した。次に、CMPT を活性化剤として用い、液相法で2量体の合成を試みたところ、DNA 誘導体の場合と比較して、反応速度と立体選択性の顕著な低下が観察された。RNA 誘導体の合成では、2'-水酸基の保護基として、嵩高い TBDMS 基が導入されているため、その立体障害により、縮合反応速度が低下し、モノマーユニットがエピマー化することが原因であった。DNA 誘導体の場合もモノマーのエピマー化が進行するが、エピマー化の速度よりも縮合反応速度の方がはるかに大きいため、十分な立体選択性が発現する。そこで、これらの問題を克服するために、オキサザホスホリジン環の構造をさらに検討し、縮合反応条下でエピマー化し難い、熱力学的に安定

なオキサザホスホリジン骨格構造の再検討を行った。検討の結果、プロリンから誘導される二環式構造を有するモノマーを用いると、エピマー化がほぼ完全に抑制できることがわかった (図1)。さらに、この二環式構造を有するモノマーは、求核性の活性化剤の存在下でもエピマー化しないため、通常長鎖 RNA 合成で用いられる強力な活性化剤を使用することも可能である。実際に、長鎖のホスホロチオエート RNA を固相合成する際には、求核性を有する N-フェニルイミダゾールトリフラートが活性化剤として有効であった。この手法を用いて、リン原子の立体が制御されたウリジル酸ホスホロチオエート 10 量体の合成に成功した。<sup>4)</sup> しかし、4 の核酸塩基を含む長鎖オリゴマーの合成を試みたところ、十分な縮合効率が得られず、目的物の収率は極めて低かった。そこで、モノマーの反応性を向上させるために、2'-水酸基の保護基として、立体障害の少ない 2-シアノエトキシメチル基 (CEM 基) が導入されたモノマーを合成し、それを用いてオリゴマーの固相合成を行ったところ、縮合効率は顕著に改善され、目的とする 4 の核酸塩基を含むオリゴマーを良好な収率で得ることができた。相補的な塩基配列を有する天然型 RNA 鎖との二重鎖形成能を評価したところ、リン原子の絶対立体配置の違いにより、RNA 二重鎖の熱的安定性に顕著な差があることがわかった。今後、我々が開発した手法により合成されたリン原子の立体化学が厳密に制御されたホスホロチオエート RNA の核酸医薬への応用が期待される。<sup>5)</sup>

#### 4. H-ホスホネート DNA の立体選択的合成

上述したように、オキサザホスホリジン法は、5員環状リン化合物であるオキサザホスホリジン誘導体の立体電子効果を活用してリン原子の立体化学を制御する合成法である。オキサザホスホリジン骨格中の酸素原子に隣接する炭素原子に置換基を 2 つ導入すると、これが第三級炭素となる。縮合反応によって得られるホスファイト中間体を強酸性条件下処理すると、第三級カルボカチオンの生成を伴い、リン原子の立体化学純度を損なうこと無く、対応する H-ホスホネートジエステルへと変換可能であることを見出した。H-ホスホネート結合を有するオリゴヌクレオチド誘導体は、様々なリン原子修飾核酸類縁体の有用な合成中間体として知られるが、これまで、オリゴマーレベルで立体を制御した合成例が無く、本合成法が開発されたことにより、ホスホロチオエート以外の様々な置換基を有する核酸類縁体の合成が可能となる (図2)。<sup>7)</sup>

ホスホロチオエートに代わる新しいリン原子修飾核酸として、ボラノホスフェート型核酸が近年注目されている。ボラノホスフェートは、天然型のホスホジエステルやホスホロチオエートと比較して脂溶性が高く、細胞膜透過性に優れる。また、細胞毒性が低い一方、ヌクレアーゼ耐性は高く、特に DNA 類縁体の場合、RNA と形成する二重鎖が RNase H の基質となるため、アンチセンス核酸として有効である。また、RNA 類縁体の場合、高い RNAi 活性を示すことから次世代の核酸医薬として注目されている。我々が開発したオキサザホスホリジン法を用いることにより、リン原子の立体が制御されたボラノホスフェート型核酸類縁体を合成することができる。<sup>8,9)</sup> 現在、核酸塩基部への副反応を抑制可能な新規合成法を開発中であり、近い将来、その実用化が期待される。

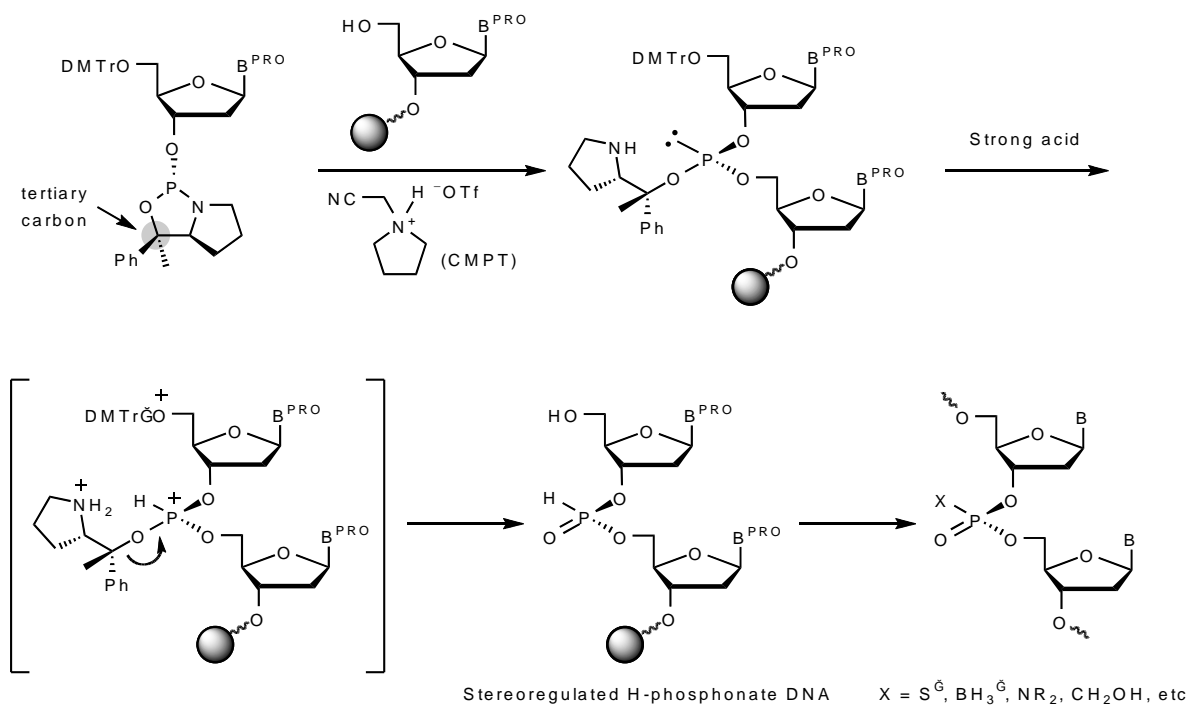


図2. H-ホスホネート DNA を経由するリン原子修飾核酸の立体選択的合成

<参考文献>

1. Oka, N., Wada, T., Saigo, K. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 4962-4963 (2002).
2. Oka, N., Wada, T., Saigo, K. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8307-8317 (2003).
3. Oka, N., Yamamoto, M., Sato, T., Wada, T. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 16031-16037 (2008).
4. Oka, N., Kondo, T., Fujiwara, S., Maizuru, Y., Wada, T. *Org. Lett.* 11, 967-970 (2009).
5. Nukaga, Y., Yamada, K., Ogata, T., Oka, N., Wada, T. *J. Org. Chem.* 77, 7913-7922 (2012).
6. Oka, N., Wada, T. *Chem. Soc. Rev.* 40, 5829-5843 (2011).
7. Iwamoto, N., Oka, N., Sato, T., Wada, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 496-499 (2009).
8. Iwamoto, N., Oka, N., Wada, T. *Tetrahedron Lett.* 53, 4361-4364 (2012).
9. Wada, T., Maizuru, Y., Oka, N., Saigo, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3111-3114 (2006).