

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06459

研究課題名（和文）抗ウイルス薬と核酸医薬の開発を二元戦略とするヌクレオシド類のデザインと合成

研究課題名（英文）Design and synthesis of nucleosides to develop antiviral agents and oligonucleotide therapeutics

研究代表者

吉村 祐一（Yoshimura, Yuichi）

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00230813

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルス性疾患の治療薬開発と核酸医薬開発の双方に応用できる新規ヌクレオシド誘導体としてヌクレオシド糖部4'位に修飾を施した4'-チオヌクレオシドとジデオキシヌクレオシドの2種類をデザインし、その合成を検討した。得られたヌクレオシド誘導体の抗ウイルス活性評価は未達成であるが、核酸医薬への応用の点では、4'-置換4'-チオヌクレオシドから合成した4'-チオLNA/BNA型ヌクレオシドをオリゴヌクレオチドに導入し、その性質を解析・評価した。その結果、新たに合成した修飾ヌクレオシドの導入により、オリゴヌクレオチドの二重鎖形成が安定化され、さらにヌクレアーゼによる分解に抵抗性を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規抗ウイルス薬の開発は現在の創薬研究において高い緊急性を要するものとなっている。加えて、核酸医薬の実用化に向けた修飾ヌクレオチドの開発についても同様に高いニーズが存在する。これらの問題に対する取り組みとしては、構造的新規性を有するヌクレオシド誘導体の合成と評価を伴った基礎的取組が必要不可欠である。本研究では、抗ウイルス薬の開発と核酸医薬に適応可能なヌクレオチドユニットの創製を同時に行える戦略を取り、新たなヌクレオシド誘導体の合成を達成した。得られた誘導体を組み込んだオリゴヌクレオチドは期待通り、高い二重鎖安定性とヌクレアーゼ抵抗性を示し、新たな核酸医薬開発に道を開くものである。

研究成果の概要（英文）：Two novel nucleoside derivatives were designed, both of which can be applied to the development of antiviral drugs and nucleic acid therapeutics. These derivatives involve modifications at the 4' position of the nucleoside sugar moiety of a 4'-thionucleoside as well as a dideoxynucleoside. Although the antiviral activity evaluation of the obtained nucleoside derivatives remains inconclusive, in terms of application to nucleic acid therapeutics, the properties of 4'-thio LNA/BNA-type oligonucleotides synthesized from the above mentioned 4'-thionucleosides were analyzed and evaluated. As a result, the introduction of the newly synthesized nucleosides stabilized the double-stranded formation of oligonucleotides and demonstrated resistance to degradation by nucleases.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：核酸医薬 ヌクレオシド ヌクレオチド 4'-チオヌクレオシド ヌクレアーゼ抵抗性

## 1. 研究背景

2019 年末から発生した新型コロナウイルスを原因とする COVID-19 によるパンデミックは、人類に改めてウイルス感染症の恐怖を示すと同時に、ウイルスの脅威に対し、我々が十分な対抗策を有していないことを示すことになった。このウイルス性疾患に対する治療薬の中で極めて重要な位置を占めているのがヌクレオシド系代謝拮抗剤である。ソホスブビル(1)は従来の C 型肝炎治療薬に比

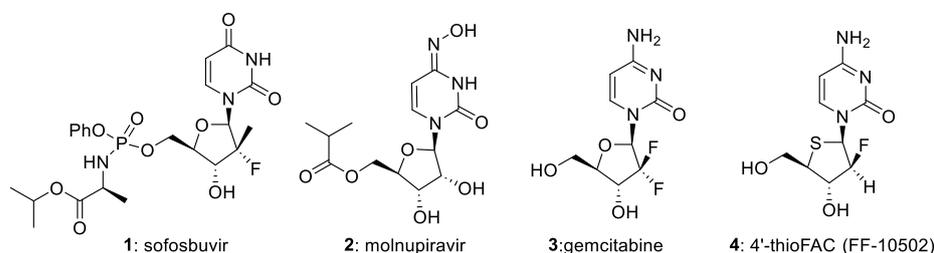


Fig 1 : ヌクレオシド系代謝拮抗剤

べ高い治療効果を示し、C 型肝炎治療に革命的变化をもたらした。さらに最近、COVID-19 に対する経口治療薬として開発されたのが、モルヌピラビル(2)である。また、ヌクレオシド系代謝拮抗剤は、癌治療薬としても極めて重要であり、ゲムシタビン(3)は、すい臓がんの治療薬として承認され、その後適応拡大があり、肺がん、卵巣がんなどの治療に使用されている。また、報告者もこれまでヌクレオシド糖部の環内酸素原子を硫黄原子で置換した 4'-チオヌクレオシド誘導体を中心に研究を重ね、新規抗癌剤候補として 4'-thioFAC (4: FF-10502) の創製に成功し、現在、米国を中心に Phase II が進行中である (Fig 1)。

しかし、これらヌクレオシド誘導体には常に薬剤耐性の問題が存在し、その克服には新たな誘導体の創製が不可欠となっている。一方、新規創薬モダリティとしても注目を集めている核酸医薬は、抗体医薬とともに 21 世紀の治療薬として大きな期待が寄せられている。近年、相次いで新たな核酸医薬が認可され臨床での使用が可能となっているが、日本における核酸医薬開発は、抗体医薬同様、欧米から大きく後れを取っているのが現状である。

## 2. 研究の目的

ヌクレオシド系代謝拮抗剤の耐性出現の問題や新たな核酸医薬開発へのアプローチに関し鍵となるのが、新たなヌクレオシド誘導体の創製である。特に、構造的新規性を有するヌクレオシド(ヌクレオチド)誘導体の合成と評価を伴った基礎的取組が必要不可欠である。ヌクレオシド誘導体には抗ウイルス薬の開発や核酸医薬への応用など多くの機能・効果が期待でき、探索研究を行うにあたり、抗ウイルス薬開発と核酸医薬探索を両立した二元戦略を取ることにした。具体的には、リン酸ジエステル結合による高分子化が容易となるようジオールユニットを適切な位置に配したヌクレオシド誘導体をデザインし、その合成を検討することを計画した。

## 3. 研究の方法

前述の戦略にそって標的分子のデザインと合成を行うにあたり、核酸医薬に適応可能なヌクレオチドユニットの創製と抗ウイルス薬の開発を同時に達成できる工夫が必要となる。そこで、オリゴヌクレオチド化が可能となるよう、通常

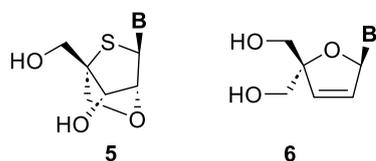


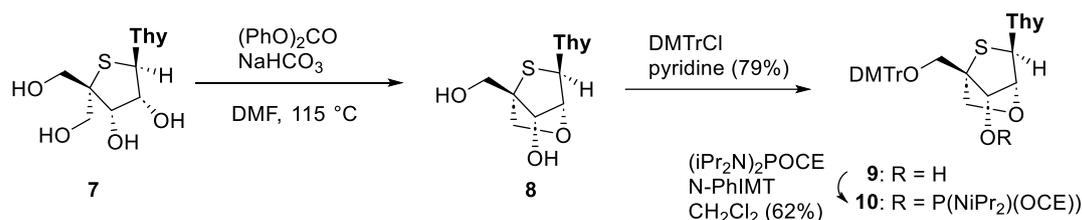
Fig 2 : 標的化合物

## 4. 研究成果

### (1) 4'-チオ LNA/BNA ヌクレオシドユニットの合成と機能性評価

新たな核酸医薬候補として RNA への親和性が高い LNA/BNA と核酸分解酵素であるヌクレアーゼに対する抵抗性に優れた 4'-チオヌクレオシドのハイブリッドとなる 4'-チオ LNA/BNA をデザインし、そのヌクレオシドモノマー合成について検討を行った。本合成での中間体となる 4'-ヒドロキシメチル-4'-チオヌクレオシド 7 については、先に当研究室で開発したタンデム型縮環-アルドール反応と Pummerer 型チオグリコシル化反応を鍵段階とする方法により合成した。得

られた同誘導体の糖部ヒドロキシ基の選択的保護を経由した分子内環化反応を検討したが不調であった。次に、糖部保護基を完全に脱保護した 4'-ヒドロキシメチル-4'-チオウリジン炭酸水素ナトリウム存在下、炭酸ジフェニルと処理したところ、1 段階で目的とする 4'-チオ LNA/BNA



Scheme 1 : 4'-thioLNA/BNA モノマーの合成

モノマーが得られることを見出した。今回見出した反応を用い、チミン型 4'-チオ LNA/BNA モノマー **8** の合成を達成した。得られたモノマーは、5'位をジメトキシトリチル基で保護し、化合物 **9** とした後、残った 3'位ヒドロキシ基のアミダイト化を行い、対応するアミダイト体 **10** に変換した (Scheme 1)。

Table 1 : 4'-thioLNA/BNA を含むオリゴヌクレオチドの ssRNA 及び ssDNA に対する安定性

ONs (5'-3')	ssRNA		ssDNA		RNA selectivity $T_m(\text{RNA}) - T_m(\text{DNA})$ (°C)
	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	
d(gcgttttttgct) ( <b>ON1</b> )	46.2	-	48.4	-	-
d(gcgttxtttgct) ( <b>ON2</b> )	52.0	+5.8	52.2	+3.8	-0.2
d(gcgttyttttgct) ( <b>ON3</b> )	46.0	-0.2	50.1	+1.7	-3.9
d(gcgttzttttgct) ( <b>ON4</b> )	48.8	+2.6	47.8	-0.6	+1.0

x = LNA/BNA-T, y = 2'-deoxy-4'-thio-T, z = 4'-thioLNA/BNA-T.  $\Delta T_m$ : 未修飾の天然型オリゴヌクレオチド(**ON1**)と比較した  $T_m$  値の変化

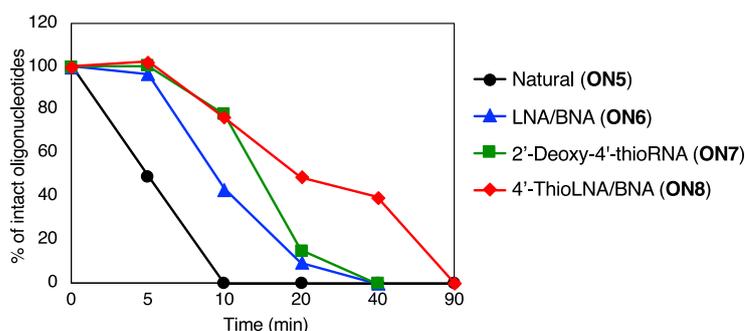


Fig 3 : ヌクレアーゼに対する抵抗性の比較

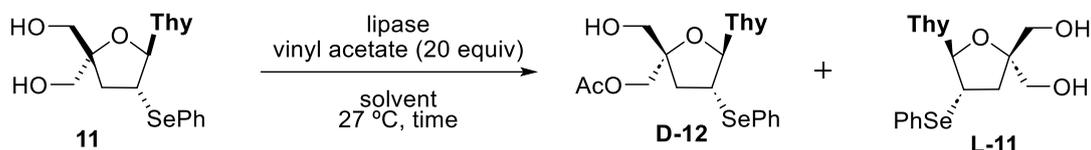
ではなく、目的とするオリゴヌクレオチドの合成を達成した。得られた 4'-チオ LNA/BNA について、二重鎖形成の安定性を評価するため、融解温度 ( $T_m$ ) の分析と比較を行った。LNA/BNA (**ON6**) と同じく糖部コンホメーションが N 型に固定された 4'-チオ LNA/BNA (**ON8**) は、期待通り高い RNA 親和性を示したが、LNA/BNA (**ON6**) と 2'-デオキシ-4'-チオ RNA (**ON7**) のほぼ中間に相当する安定性であった (Table 1)。一方、ヌクレアーゼに対する効果については、デザイン元となった LNA/BNA (**ON6**) や 2'-デオキシ-4'-チオ RNA (**ON7**) よりも、4'-チオ LNA/BNA (**ON8**) の方が、高いヌクレアーゼ抵抗性を示した (Fig 3)。

以上の結果から、今回開発した 4'-チオ LNA/BNA は、LNA/BNA 同様に核酸医薬における有用なヌクレオチドユニットとして利用できることが示され、核酸医薬開発の可能性を広げる重要な知見と考えられる。

このアミダイトユニットを用い、DNA/RNA 合成装置により 4'-チオ LNA/BNA を含むオリゴヌクレオチドの合成を行った。合成条件としては、共同研究者の南川らが 2'-デオキシ-4'-チオヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを合成した際用いた条件を使用した。今回新たに調整したアミダイト体 **10** を含むオリゴヌクレオチドの合成収率については、通常のオリゴヌクレオチド合成と比べ特に差

(2) 4'-ヒドロキシメチルスタブジンの合成と核酸医薬への応用の検討

抗 HIV 薬候補と核酸医薬用アミダイト候補を両立できる 2 つ目のヌクレオシド誘導体として、4'-置換スタブジン誘導体を標的分子とし、同誘導体の両エナンチオマー獲得を目指し検討を行った。すでに以前の研究で 4'-置換スタブジン誘導体については、ラセミ体での合成を達成していたことから、光学活性体の合成は、lipase を用いた速度論的光学分割を利用することとした。まず始めに出発原料として 1,3-ジヒドロキシアセトンダイマーを用い、既知の方法でジヒドロフラン誘導体を合成した。さらに当研究室で開発された酸化グリコシル化反応によりヌクレオシド誘導体へと導いた。ジシリル体のフェニルセラニル基の脱離と脱保護を経て、Lipase の基質となりうる複数のアルコール誘導体を調整し速度論的光学分割を検討した。



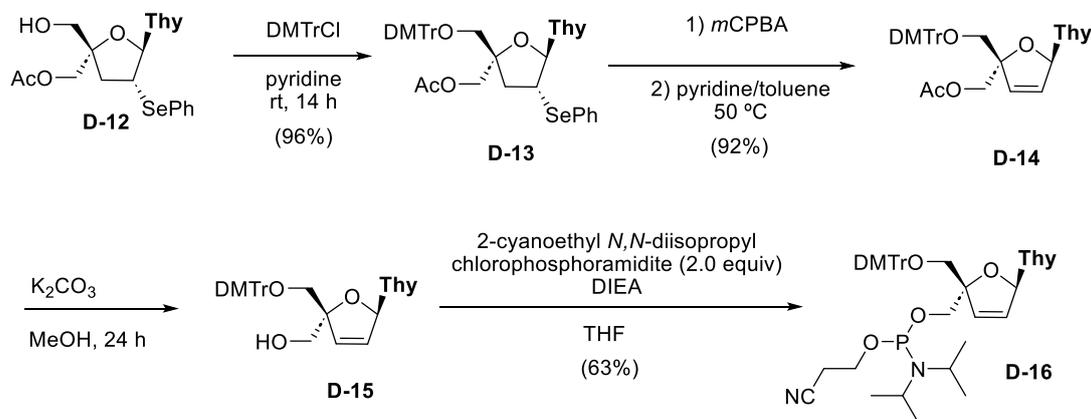
Scheme 2 : リパーゼを用いた速度論的光学分割

Table 2: リパーゼによる速度論的光学分割の検討 (まとめ)

entry	lipase	solvent	time	D-12		L-11		E value
				%	%ee	%	%ee	
1	AK	CCl <sub>4</sub> :CHCl <sub>3</sub> =1:1	43 h	44	97	44	84	165
2	PSSD	CCl <sub>4</sub> :CHCl <sub>3</sub> =1:1	20 d	20	97	80	31	83
3	PSIM	CHCl <sub>3</sub>	2 h	45	99	54	91	421

モノ TBDPS 体を基質とした場合、リパーゼによるアセチル化はほとんど進行しなかったが、ジオール体 **11** を基質とした際にモノアセチル体 **D-12** が高い不斉収率で得られることを見出した (Scheme 2, Table 2)。いくつかのリパーゼを用いて反応条件の最適化を検討し結果、アマノ社製の固定化リパーゼ **PSIM** を利用した場合、モノアセチル体 **D-12** が収率 45%, 不斉収率 99%ee で得られ、さらに未反応のジオール体 **L-12** を収率 54%, 不斉収率 91%ee で回収した。ここで得られたモノアセチル体を既知化合物である 2',3'-ジデオキシ-4'-メチルチミジンへ導き、旋光度を比較することでその絶対構造を D-体と決定した。

さらに光学活性なモノアセチル体 **D-12** から数工程を経て、目的とする 4'-ヒドロキシメチルスタブジンの光学活性体を得ることが出来た。また、中間体であるモノアセチル体 **D-12** の 1 級ヒドロキシ基をジメトキシトリチル基で保護し化合物 **D-13** とした。同誘導体のセラニル基を酸化し脱離によりスタブジン誘導体 **D-14** へ導き、アセチル基の除去、アミダイト化を経て、核酸自動合成機に適用可能なアミダイトブロック **D-16** の合成を達成した (Scheme 3)。



Scheme 3 : 4'-ヒドロキシメチルスタブジンアミダイトの合成

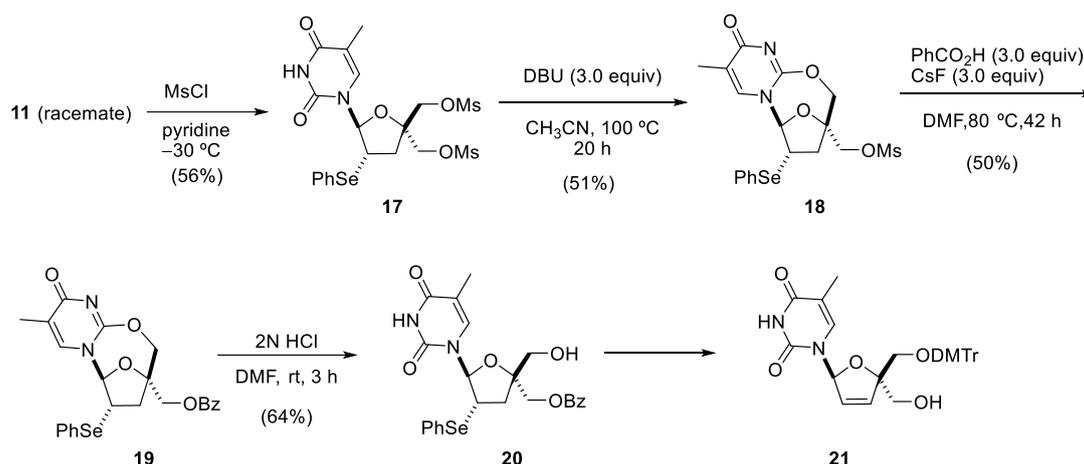
得られた D - 体のアミダイトブロック **D-16** を用い、オリゴヌクレオチドの合成を行った。自動 DNA/RNA 合成装置を使用して配列の中央に修飾ヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドを調製した。修飾ヌクレオシドを含むアミダイトブロックのカップリング効率は、トリチルモニター上で市販の天然アミダイトブロック同様ほぼ定量的に進行した。脱保護等を経て、C18 カートリッジ カラムで精製した後、得られたオリゴヌクレオチドを LC-MS で分析し、目的の構造を有することを確認した。得られたオリゴヌクレオチドを用い、先の 4'-チオ LNA/BNA のときと同様に、融解温度 ( $T_m$ ) の比較による二重鎖形成の安定性を評価した (Table 3)。

Table 3. 4'-ヒドロキシメチルスタブジンを含むオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能

ODNs (5'-3')	ssDNA		ssRNA	
	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
d(gcgttttttgcct) ( <b>ODN1</b> )	48.5	–	45.4	–
d(gcgttt <b>x</b> tttgcct) ( <b>ODN2</b> )	35.8	–12.7	33.6	–11.8

x = 4'-ヒドロキシメチルスタブジン。

今回調整したオリゴヌクレオチドは、ssDNA や ssRNA と二重鎖を形成するものの天然ヌクレオシドのみのオリゴヌクレオチドと比べ、融解温度 ( $T_m$ ) は 10 度程度下がり、熱的不安定化を引き起こした。これは、近年注目を集めるフレキシブルな構造を含んだ UNA や GNA と同等と評価することができ、この結果は、我々が合成したヌクレオシド誘導体が、望ましくないハイブリダイゼーションの不安定化を導入し、オフターゲットの緩和を達成できる可能性を示唆している。



Scheme 4 : 4'-ヒドロキシメチルスタブジンアミダイトの L-体合成法の開発

また、今回開発した合成法の拡張として、エナンチオダイバージェントな合成への応用を目指し L-体の合成ルート確立についても検討を行った。実際の合成検討ではラセミ体のジオール **11** を用い合成研究を展開した。2 つある 1 級水酸基をメシル化しジメシル体 **17** へと変換した後、2 位カルボニル基との分子内  $S_N2$  反応を行い、O-シクロ体 **18** を合成した。同誘導体を経由することで一方の水酸基を選択的に保護した形になり、以降数工程を経て目的とするジメトキシトリチル体 **21** の合成を達成した。先のリパーゼを用いた速度論的光学分割で回収した L-**11** に対し、開発した本合成法を適用することで L-型アミダイトの合成も可能となった (Scheme 4)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Rion, Saito-Tarashima Noriko, Wakamatsu Hideaki, Natori Yoshihiro, Minakawa Noriaki, Yoshimura Yuichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Synthesis and Properties of 4'-ThioLNA/BNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4062 ~ 4066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.1c01306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 名取 良浩、西 由之、渡邊 義之、若松 秀章、斎藤 有香子、皆瀬 麻子、山口 健太郎、兵頭 直、吉村 祐一
2. 発表標題 酢酸イオンによる三員環スルホニウムイオンの開環を鍵工程とするコルジセピンの4'-チオヌクレオシド誘導体の合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉村祐一、前田璃音、田良島典子、若松秀章、名取良浩、南川典昭
2. 発表標題 4'-チオLNA/BNAの合成
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiki Miyazawa, Rion Maeda, Noriko Saito-Tarashima, Yuichi Yoshimura, Noriaki Minakawa
2. 発表標題 Synthesis and Properties of 4'-ThioLNA/BNA
3. 学会等名 第48回国際核酸化学シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	南川 典昭  (Minakawa Noriaki)  (40209820)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授   (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------