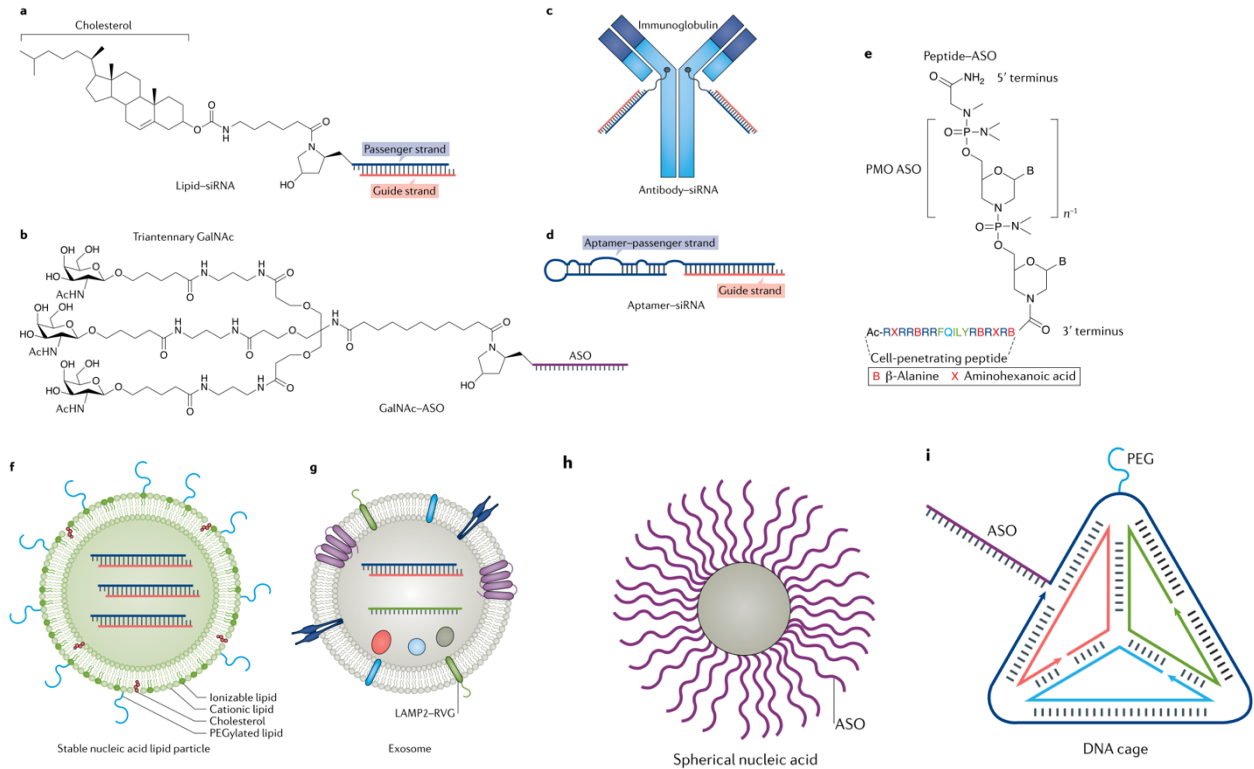


ASO の医薬品応用関連

- LNP などの DDS は用いないのか？

セミナー中では、そのまま用いると答えましたが、DDS として siRNA と同様に bioconjugation と LNP を用いた手法が用いられているようです。個々の詳細は省きますが、以下に示すようなものが用いられているようです。(T. Roverts *et al.*, *Snat. Rev. Drug. Discov.*, **2020**, *19*, 673)



- R<sub>p</sub>, S<sub>p</sub> のどちらが良いか予測できる？

ASO のメカニズムに関してかなり詳細を省いた説明をしてしまったのですが、ASO のメカニズムの一つとして、ASO が標的 mRNA と結合し heteroduplex を形成することで RNase H1 による mRNA の分解を引き起こすものがあります。この RNase H1 は「配列(塩基の種類)に寄らず」様々な ASO と mRNA の組み合わせの heteroduplex を認識するため、その認識部位の立体構造でリン酸ジエステルの P-O と相互作用する部位はある程度予測できます。そのため、より一般的な ASO におけるチオリン酸ジエステルの立体を考える上で、今回取り上げた Mipomersen で立体を変えた部分に対応する部分の立体を変えることが第一候補となるのではないかと思います。

(T. Roverts *et al.*, *Snat. Rev. Drug. Discov.*, **2020**, *19*, 673., N. Iwamoto *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **2017**, *35*, 845)

## チオリン酸の性質関連

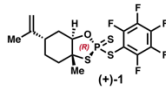
- チオリン酸の S-S 結合はできないのか？

チオリン酸とチオール間(Miyamoto and Yamamoto *Agr. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2581.)やチオホスフィン酸間(Ueki, *et al. Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 4181.)との S-S 結合の例はありましたが、チオリン酸間での S-S 結合についての知見は見つかりませんでした。見つかりなかったのが、単純に調べられていないのか形成されないからかはわかりませんが、かなり電子引っ張られてるので、チオ酸より酸化されにくいような気がします。

- リンの不斉はどのように決めているのか？

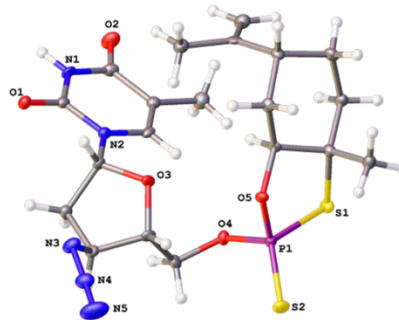
生成物であるチオリン酸ジエステルのリンの立体は UPLC での retention time で比較していました。原料と中間体に対応する 3' を azide に変換したチミン-P(V) に関しては、X 線結晶構造解析で立体を同定しています。(Science, **2018**, *361*, 1234)

Compound (+)-1 [(+)-ψ]

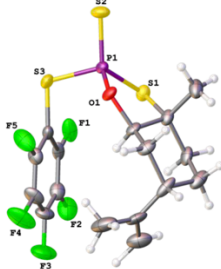


Compound (+)-1 prepared under identical conditions as (-)-1 using (-)-2. All characterization data were identical, minus the optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = 242$  (c 0.5, DCM).

X-ray crystal structure of loaded AZT nucleoside (Table S3)

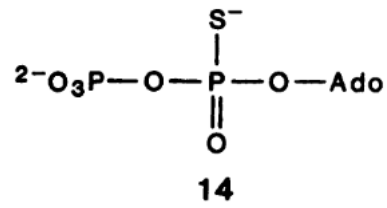
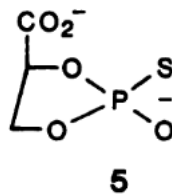
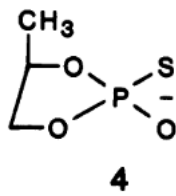
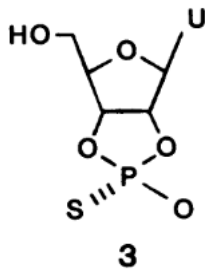


X-ray crystal structure of Compound (+)-1 (Table S2)



- チオリン酸のプロトン化状態と二重結合は SH+P=O? or OH+P=S?

これは色々調べましたが、核酸のチオリン酸ジエステルのプロトン化状態と結合次数に関しての情報はわかりませんでした。下の 3, 4, 5 の様な cyclic なチオリン酸ジエステルのモノアニオン種の場合、ammonium salt の結晶構造から endo の P-S, P-O の結合次数はそれぞれ 1.5 で電荷の局在は同じであると示されていました。ただ、14 の ADP analogue では P=O と S- を持ったような構造が確からしいです。また、カウンターカチオンの種類によっても電荷の局在が変わるらしいです。もう少し調べて見て何かわかったら情報を共有させていただきます。(Science **1985**, *228*, 541)

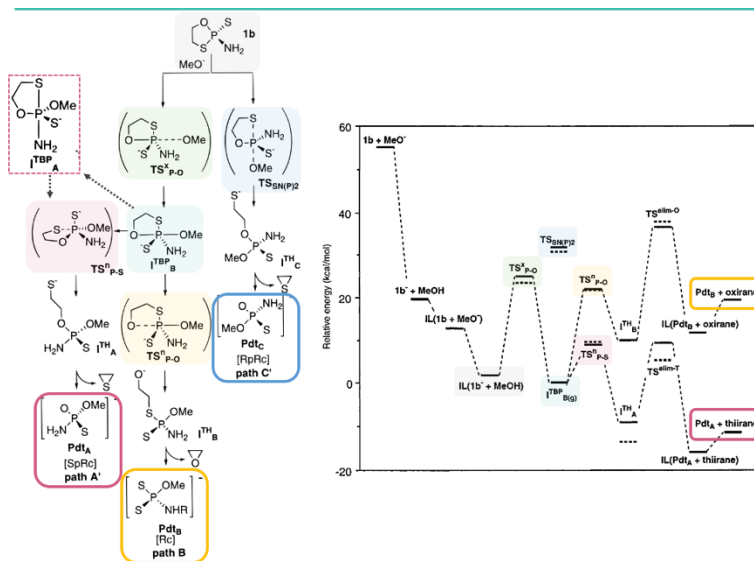


## チオリン酸化反応関連

- Stec らの例ではなぜ大量合成が難しいのか？

Baran らの主張として、カップリング効率が低いこと、試薬のジアステレオマーでの精製が難しいこと、労力がかかることを大量合成に応用するには難しい点としてあげていました。元の Stec らの論文では、dodecamer の合成では、予測としてカップリングが 90% で進行するものの、ジアステレオマーを 95% の purity で用いると  $0.90^{11} \times 0.95^{11} = 0.31 \times 0.57 = 0.18$  18% と目的のジアステレオマーの収率が非常に低くなってしまいます。Baran らの方法は、カップリング効率そのものについては Stec らの報告と大差ありませんが、試薬の ジアステレオマーの単離しやすさ という点で優れていると思われる。Stec らの報告では、ラボスケールではジアステレオマーの分離が可能ではありますが、工業スケールとなると試薬のジアステレオマーの分離が難しく、95% 収率が限界となると考えられます。一方、Baran らの  $\psi$  reagent は入手容易なキラル源を用い、非常に高いジアステレオ選択性で試薬の調製が可能で、カップリング段階でのジアステレオ選択性だけでなく、試薬そのものの調製という点でも今回の報告は評価されているのではないかと思います。ただ、やはりカップリングの収率が低いところは今後の課題だと思えます。

- Stereoselectivity の計算に関して  $TS^{X_{P-O}}$  (緑) が  $TS^{SN(P)2}$  (青) よりエネルギーが低くなるのはなぜか？ また、 $TS^{P-S}$  (桃) が  $TS^{P-O}$  (黄色) よりエネルギーが低くなるのはなぜか？



前者に関して、Uchimaru らの報告では直接比較はしておらず、その理由も言及されていませんでした。apicophilicity について比較をすると、axial に S が equatorial に O が配置される方が、axial に O が equatorial に S が配置されるよりエネルギー的に不利なのだと思えます。詳しい説明の前に、電気陰性な配位子が apical に配位しやすい apicophilicity について簡単に説明します。

TBP におけるリンは最外殻に 10 電子を共有しています。これは、equatorial 方向の  $sp^2$  混成軌道を使った  $\sigma$  結合で 6 電子、axial 方向の p 軌道を使った 3 中心 4 電子の結合によって形成されています。この axial 方向はリンの p 軌道と配位子の 2 つの軌道の混成によって形成され、結合性、非結合性、反結合性の 3 つに分かれ、結合性、非結合性軌道に電子が収容されます。そして、HOMO は非結合性軌道となり、HOMO の電子は apical 配位者に局在することとなります。そのため、電気陰性度の高い配位者が apical に配置されることでその負電荷を安定化することができ、高い apicophilicity を示します。(C. R. Chimie 2010, 13, 1249)

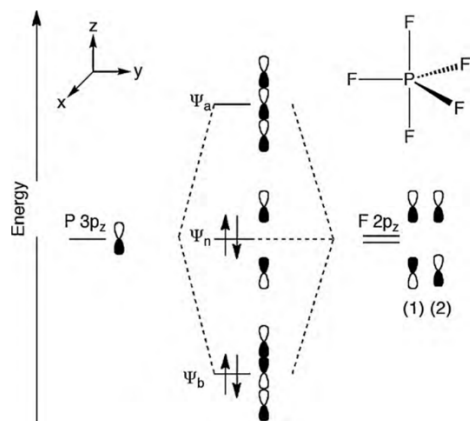


Fig. 2. Molecular orbital of apical bonds of  $PF_5$ .

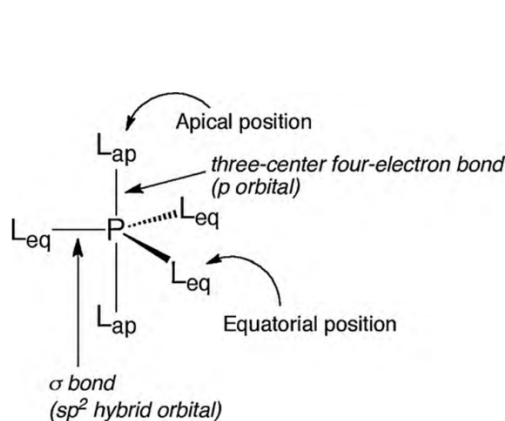


Fig. 1. Trigonal bipyramidal structure of pentacoordinated phosphoranes.

さて、ここで  $TS^X_{P-O}$ (緑)が  $TS^{SN(P)_2}$ (青)よりエネルギーが低くなる理由に戻ります。TBP において HOMO は、MeOH 由来の酸素と  $TS^X_{P-O}$ (緑)では環の酸素、 $TS^{SN(P)_2}$ (青)では環の硫黄に局在します。この時、O より S の方がその HOMO が高くなってしまい、S が apical にくると脱離が非常に起きやすい不安定な状態となります。そのため、path C では TBP 中間体を経由せず、apical からの S の脱離が MeOH の付加と同時に起こってしまい、 $TS^X_{P-O}$ (緑)より  $TS^{SN(P)_2}$ (青)のエネルギーが高くなっているのではないかと考えています。

この apicophilicity の議論は  $TS^n_{P-S}$ (桃)と  $TS^n_{P-O}$ (黄色)の比較でも重要となってきます。TBP 中間体に関して apical から付加して脱離するという Westheimer 則によれば、本来 path A は  $I^{TBP}_A$  を経由する必要があります。しかし、 $I^{TBP}_A$  は上記の議論で S が apical に配置される非常に不安定な TBP となります。そのため、 $I^{TBP}_A$  は中間体として存在しえませんが、TBP 中間体は形成できないものの、擬回転は配位者によらず結合の bending によって起こるため、擬回転の遷移状態は取ることができます。その擬回転において、P-S 結合は axial になろうとしますが、先ほどの議論の通り P-S 結合は高い HOMO を持つ非結合性軌道に変化していきます。そのため、P-S の結合長が大きくなり結合を保てず、P-S 結合の切断にいたってしまいます。 $TS^n_{P-O}$ (黄色)は apicophilicity の大きい酸素配位者の TBP 中間体からの脱離の遷移状態であるのに対し、 $TS^n_{P-O}$ (黄色)は一般にエネルギー障壁の小さい擬回転の遷移状態で脱離が進行してしまうためこのようなエネルギー差が生じていると述べられています。このような TBP 中間体からの脱離過程は 1960 年代に提唱

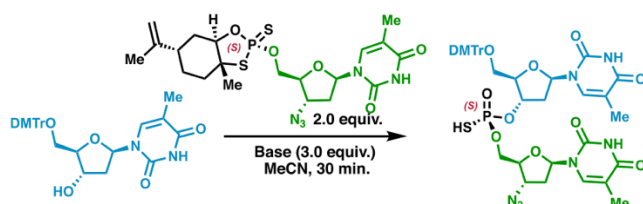
された Westheimer 則に沿っていないものではありますが、その後の他の研究でも擬回転の過程で TBP 中間体の脱離が起きうるという計算結果も出ているようです。

また、リンに結合する配位子の超共役が四面体リン酸の付加や TBP 中間体の脱離、擬回転に大きな影響を与えるらしいので、この超共役も今回の話に関係あると思いますが、現在勉強中です。

- DBU は一般的なアルコールの activator となるか？

現在 DBU と alcohol の組み合わせが良いのかどうか調査中ですが、以下に dinucleotide 合成でのカップリングにおける塩基の  $^{31}\text{P}$  NMR でのスクリーニング結果を載せました。この結果を見る限り、pKa の高い DBU と TMG (tetramethylguanidine) で反応が進行していることから、DBU だからというより alcohol の脱プロトンがギリギリできる塩基だからという説明の方が良いような気が個人的にはしています。おそらく完全水中だと DBU や TMG は容易にプロトン化し、alcohol を脱プロトン化できるほどの pKa は出せないはずです。そのため、Serine selective bioconjugation では DMF:H<sub>2</sub>O = 4:1 と有機溶媒増し増しの条件でしか alcohol を活性化できず、完全水中ではできなかったのではないかと考えています。逆に言えば、alcohol を適切に活性化できれば(ここが一番難々)水中でもこの  $\psi$  reagent はうまく機能するのではないかと思います。

#### Base Screen



#### Crude $^{31}\text{P}$ NMR analysis

