

休薬期間中： 休薬 8 及び 13 週目に 1 回  
 瀕死時： 剖検前（可能な限り）  
 採血量： 約 2 mL  
 採血方法： 大腿静脈から採血し，室温で 20～60 分間静置後，遠心分離（室温，1710×g，3000 rpm，10 分間）して得られた血清を用いる．  
 採血日に測定が出来ない場合は，超低温フリーザー（許容範囲：-70°C 以下）で凍結後に測定を実施する．

検査項目及び方法： 次の表に示す．

検査項目	単位	測定方法	機種
アスパラギン酸トランスアミナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	JCA-BM6070 <sup>a)</sup>
アラントランスアミナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
アルカリフォスファターゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
クレアチンキナーゼ	IU/L	JSCC 標準化対応	
総ビリルビン	mg/dL	バナジン酸酸化法	
総蛋白	g/dL	ビウレット法	
アルブミン	g/dL	BCG 法	
グロブリン	g/dL	計算式：総蛋白-アルブミン	-
A/G 比	-	計算式：アルブミン/グロブリン	-
総コレステロール	mg/dL	COD・HMMPS 法	JCA-BM6070 <sup>a)</sup>
トリグリセリド	mg/dL	GPO・HMMPS 法，グリセリン消去法	
ブドウ糖	mg/dL	ヘキソキナーゼ・G-6-PDH 法	
尿素窒素	mg/dL	ウレアーゼ・GIDH 法	
クレアチニン	mg/dL	クレアチニナーゼ・HMMPS 法	
無機リン	mg/dL	PNP・XDH 法	
カルシウム	mg/dL	MXB 法	
ナトリウム	mEq/L	電極法	
カリウム	mEq/L	電極法	
塩素	mEq/L	電極法	

w) 自動分析装置（日本電子株式会社）

## 21.13 病理学的検査

## 病理学的検査器官及び組織一覧表

器官及び組織名		器官重量	固定	病理組織学的検査 (標本作製及び検査)
気管		-	○	○
肺 (気管支を含む)	左	○	○	○
	右			○
舌		-	○	○
顎下腺	左	○	○	○
	右	○	○	○
食道	胸部	-	○	○
胃	胃体部	-	○	○
	幽門部	-		○
小腸	十二指腸	-	○	○
	空腸	-		○
	回腸	-		○
パイエル板 (回腸)		-		○
大腸	盲腸	-	○	○
	結腸	-		○
	直腸	-		○
膵臓		-	○	○
肝臓		○ <sup>a)</sup>	○	○
胆嚢		-	○	○
大動脈	胸部	-	○	○
心臓		○	○	○
腎臓	左	○	○	○
	右	○	○	○
膀胱		-	○	○
精巣	左	○	○	○
	右	○	○	○
精巣上体	左	○	○	○
	右	○	○	○
前立腺		○	○	○
精嚢	左	○	○	○
	右			-
卵巣	左	○	○	○
	右	○	○	○
子宮		○	○	○
膣		-	○	○
脳	大脳 <sup>b)</sup>	○	○	○
	小脳			○
	橋			○
	延髄			○
脊髄	胸部	-	○	○
坐骨神経	左	-	○	○
	右	-	○	-
胸骨/胸骨骨髓		-	○	○
大腿骨/大腿骨骨髓	左	-	○	○
	右	-	○	-
顎下リンパ節	左	-	○	○
	右	-	○	-

器官及び組織名	器官重量	固定	病理組織学的検査 (標本作製及び検査)
腸間膜リンパ節	-	○	○
脾臓	○	○	○
胸腺	○	○	○
下垂体	○	○	○
甲状腺／上皮小体	左	○	○
	右	○	○
副腎	左	○	○
	右	○	○
眼球／視神経	左	-	○
	右	-	○
涙腺	左	-	○
	右	-	○
骨格筋 (腓腹筋)	左	-	○
	右	-	-
乳腺／皮膚 (胸部)	左	-	○ <sup>c)</sup>
	右	-	-
皮膚 (背部) <sup>d)</sup>	-	○	○
投与部位 (背部皮下)	-	○	○
肉眼的異常部位	-	○	○

○：実施する

-：実施しない

c) 胆嚢を含む

d) 頭頂葉, 側頭葉, 間脳

e) 乳腺は雌のみ

f) 肩甲間部

## 21.13.1 剖検

(SOP : GTX/125, PAT/053, PAT/094)

例数： 全例

検査時期

死亡例： 発見後速やかに実施する。

瀕死例： 試験責任者の判断により、速やかに実施する。

生存例： 投与あるいは休薬期間終了の翌日

検査方法

死亡例： 体重を測定後、外表、内部器官及び組織を肉眼的に観察する。

瀕死例： 体重を測定後、ペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液（64.8 mg/mL, 0.4 mL/kg）の橈側皮静脈内投与により麻酔を行い、放血安楽死させ、外表、内部器官及び組織を肉眼的に観察する。

生存例： ペントバルビタールナトリウム（東京化成工業株式会社）水溶液（64.8 mg/mL, 0.4 mL/kg）の橈側皮静脈内投与により麻酔を行い、体重を測定後、放血安楽死させ、外表、内部器官及び組織を肉眼的に観察する。

### 21.13.2 器官重量 (絶対及び相対重量)

(SOP : PAT/011)

例数 : 全例  
測定方法 : 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す器官について、電子天秤 (HR-200, FX-3000N, GF-3000 あるいは HF-3000, 株式会社 エー・アンド・デイ) を用いて測定する。さらに、剖検時の体重から 1 kg あたりの相対重量を算出する。なお、左右個別に測定した器官については、左右の合計値も算出する。

### 21.13.3 病理組織学的検査

(SOP : PAT/032, PAT/070)

検査器官及び組織 : 病理学的検査器官及び組織一覧表に示す。

固定

例数 : 全例  
方法 : 眼球及び視神経は 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン混合液、精巣は Formalin-Sucrose-Acetic acid (FSA) 液、その他の器官及び組織は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定する。  
気管、胸骨及び大腿骨はカルキトックス (和光純薬工業株式会社) で脱灰を行う。

標本作製

例数 : 全例  
方法 : 切り出し後、パラフィン包埋及び薄切を行い、HE 染色を施す。

検査

例数 : 全例  
方法 : 病理組織学的に検査する。

### 21.13.4 凍結臓器サンプルの採取

(SOP : PAT/054)

器官及び組織 : 肝臓, 腎臓  
例数 : 全例 (死亡例は除く)  
採取頻度 : 各剖検時  
瀕死例については、可能な限り採取する。  
採取方法 : 各臓器の重量を測定後、肝臓、腎臓のそれぞれ一部 (約\_\_g) を採取する。採取した臓器は、直ちに液体窒素で凍結させ、超低温フリーザー (許容範囲 : -70°C 以下) で保存する。凍結肝臓サンプルは、試験終了までに試験から除外し、委託者に送付す

る。

#### 21.14 トキシコキネティクス

(SOP : GTX/217, HTL/501, HTL/513)

例数 : 全例 (対照群全例についても測定を実施する)

採血ポイント

1 回目投与日 : 6 時点

14 回目投与日 : 7 時点

採血量 : 後日記載

採血方法 : 大腿静脈からヘパリンナトリウム加注射筒を用いて採血する。血液は速やかに氷冷した後、遠心分離 (4°C, 1700×g, 5 分間) し、得られた血漿は超低温フリーザー (許容範囲 : -70°C 以下) で凍結保存する。

測定対象物質 : 後日記載

測定対象物質の血漿中での安定性 :

後日記載

測定 : 後日記載

パラメータ : 最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) , 最高血漿中濃度到達時間 ( $T_{max}$ ) , 血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-h}$ ) を個体別に算出する。なお、対照群についてはパラメータを算出しない。

残余サンプル : 試験終了までに廃棄する。

TK 測定報告書 : 試験主任者 (TK 測定) が作成した TK 測定報告書の写しを入手する。

#### 22. 統計学的手法

本試験では統計学的検定を実施しない。

#### 23. 試験成績の報告

本試験の成績について、最終報告書の草案 (和文) の電子ファイル (Microsoft Word) を委託者に提出する。最終報告書についてはその写し 1 部を試験委託者に提出する。

別添 1

被験物質に関する資料

被験物質の特性

被験物質の安定性

調製液の安定性

調製液の濃度測定

別添 2

表

- 29) 一般状態
- 30) 体重
- 31) 摂餌量
- 32) 眼科的検査
- 33) 血圧測定
- 34) 拘束下心電図検査
- 35) ホルター心電図検査
- 36) 呼吸数測定
- 37) 血液ガス検査
- 38) 尿検査
- 39) 血液学的検査
- 40) 血液生化学的検査
- 41) 剖検所見
- 42) 器官重量 (絶対及び相対重量)
- 43) 病理組織学的検査所見

別添 3

TK 測定報告書

添付資料

試験施設の信頼性保証陳述書

24. 記録, 資料, 試料及び標本の保存

試験施設で発生する記録, 資料, 試料及び標本は, 株式会社新日本科学 安全性研究所 (住所: 〒891-1394 鹿児島県鹿児島市宮之浦町 2438 番地) の以下の保存場所に最終報告書作成後 10 年間保存する. それ以降の保存については試験委託者と株式会社新日本科学 安全性研究所の間で協議するものとする.

株式会社新日本科学 安全性研究所 データ資料室

試験計画書及び試験計画書変更書

被験物質及び対照物質に関する記録, 資料

試験系に関する記録, 資料

飼育条件に関する記録, 資料

馴化記録

投与記録

一般状態観察記録

体重測定記録

摂餌量測定記録

眼科的検査記録  
血圧測定記録  
心電図検査記録  
呼吸数測定記録  
血液ガス検査記録  
尿検査記録  
血液学的検査記録  
血液生化学的検査記録  
剖検記録  
器官重量測定記録  
病理組織学的検査記録  
トキシコキネティクスに関する記録, 資料  
最終報告書草案  
最終報告書  
その他, 試験に関する資料

株式会社新日本科学 安全性研究所 被験物質保管庫  
保存用被験物質

株式会社新日本科学 安全性研究所 器官保管室  
血液塗抹標本 (鏡検した場合)  
ホルマリン固定標本 (真空パック)  
パラフィン包埋標本  
組織標本

## 25. 試験計画書の変更

試験計画内容に変更が生じた場合は, 試験計画書変更書を作成し, 変更箇所及びその理由を明確にする.

## 26. 文献

後日記載

27. 試験計画書の作成及び承認

試験計画書の作成

試験責任者 株式会社新日本科学 安全性研究所

年 月 日

---

松下 聡紀

試験計画書の承認

運営管理者 株式会社新日本科学 安全性研究所

年 月 日

---

平井 照正

試験計画書の承認

株式会社新日本科学 安全性研究所より提示された試験計画書を承認します。

試験委託者 国立循環器病研究センター研究所

年 月 日

---

斯波 真理子



様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「PCSK9をターゲットとした核酸医薬の薬事申請を目指した治験に橋渡しするための非臨床試験」  
 機関名 独立行政法人国立循環器病研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Serum Total Bilirubin Levels in Japanese Patients with Familial Hypercholesterolemia, 口頭	Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M	The 2nd World Congress of Clinical Lipidology	2014年12月5日～7日	外国
Development of archaeal L7Ae-based siRNA delivery vehicle with apoE mimetic-like effect, ポスター発表	Wada S, Saito H, Endo K, Wada F, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M	10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society	2014年10月12日～15日	外国
Management of pregnancy and delivery in 4 homozygous FH with LDL	Harada-Shiba M	9th LIPIDCLUB & Therapeutic Apheresis 2014	2014年6月6日～7日	外国
Long Term Effect of Bridged Nucleic Acid(BNA)-Based Antisense Targeting PCSK9 on Metabolism and Inflammation, ポスター発表	Harada-Shiba M, Yamamoto T, Yasuhara H, Wada F, Wada S, Shibata M. A, Obika S	82nd European Atherosclerosis Society	2014年5月31日～6月3日	外国
Plasma Mature and Furin-Cleaved PCSK9S are Removed by LDL Apheresis Treatment with Both LDL Adsorption and Double Membrane Filtration, ポスター発表	Hori M, Yuasa Y, Makino H, Komai H, Yanagi K, Koezuka R, Tamanaha T, Kishimoto I, Hattori H, Harada-Shiba M	82nd European Atherosclerosis Society	2014年5月31日～6月3日	外国
Efficacy of Evolocumab (AMG145) in Patients with PCSK9 Gain-of-Function Mutations, 口頭	Harada-Shiba M	82nd European Atherosclerosis Society	2014年5月31日～6月3日	外国
ApoE/NMU二重欠損マウスにおける血清脂質の上昇と肝臓におけるマクロファージ数の低下, ポスター発表	堀美香, 駒井仁美, 水野敏秀, 斯波真理子	第37回日本分子生物学会年会	2014年11月25日～27日	国内
フィブラート系薬剤との比較によるアンチセンス Apolipoprotein C-III 阻害剤の脂質低下効果の評価, ポスター発表	和田郁人, 山本剛史, 斯波真理子, 小比賀聡	アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014	2014年9月8日～9日	国内
コレステロール修飾型siRNAの肝臓における免疫惹起性の増大, ポスター発表	和田俊輔, 石井健, 小比賀聡, 斯波真理子	アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014	2014年9月8日～9日	国内
アンチセンス核酸のmRNA切断反応における効率的回転に関する検討, 口頭	山本剛史, 藤井奈緒子, 安原秀典, 斯波真理子, 小比賀聡	アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014	2014年9月8日～9日	国内

脂質異常症に対するアンチセンス医薬の開発, 口頭	斯波真理子	アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014	2014年9月8日～9日	国内
コレステロール修飾型siRNAの肝臓における免疫惹起促進の機序について, 口頭	和田俊輔, 石井健, 小比賀聡, 斯波真理子	遺伝子・デリバリー研究会 第14回夏期セミナー	2014年8月20日～21日	国内
コレステロール修飾型アンチセンス核酸の薬理効果及び、体内分布解析, 口頭	和田郁人, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子	遺伝子・デリバリー研究会 第14回夏期セミナー	2014年8月20日～21日	国内
動脈硬化の治療実験モデルとしてApoE-KOマウスを用いるための基礎的解析, ポスター	柴田映子, 柴田雅朗, 斯波真理子	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内
Effects of Selective Down-regulation of Apolipoprotein C- III by Antisense Oligonucleotides, ポスター	Wada F, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内
Sumeray M, Rationale and design of a phase 3 study evaluating the efficacy and safety of lomitapide in Japanese patients with homozygous familial hypercholesterolemia (HoFH), ポスター発表	Harada-Shiba M	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内
Characteristics of heterozygous familial hypercholesterolemia with mutations in between LDLR, PCSK9 and LDLRAP1 gene, ポスター発表	Ohta N, Hori M, Fujiwara A, Fujiyama H, Sano M, Tamanaha T, Makino H, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada-Shiba M	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内
冠動脈三枝病変を合併した家族性高コレステロール血症へテロ接合体高齢初産の1例, ポスター発表	小倉正恒, 榎野久土, 玉那覇民子, 肥後諒, 菱田藍, 長谷川夕希子, 岸本一郎, 斯波真理子	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 非ヘテロダイマー型 mature segment分子のLDL受容体分解活性, ポスター発表	石原光昭, 鯨岡健, 岩崎忠雄, 小川一行, 服部浩明, 堀美香, 斯波真理子	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内
ヒト血中におけるPCSK9の分子形態の解析, ポスター発表	鯨岡健, 石原光昭, 岩崎忠雄, 小川一行, 服部浩明, 堀美香, 斯波真理子	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内
GLP-1のコレステロール代謝に及ぼす影響, ポスター発表	長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子, 斯波真理子, 内瀬安子	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日～11日	国内

超音波で測定したアキレス腱厚と頸動脈内膜中膜複合体厚の関連, ポスター発表	道倉雅仁, 小倉正恒, 富家千鶴, 肥後諒, 菱田藍, 椽谷真由, 大畑洋子, 玉那覇民子, 榎野久士, 柴田映子, 堀美香, 岸本一郎, 斯波真理子	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日 ~11日	国内
Renal cysts as an emergent risk factor for arterial stiffness, ポスター発表	Ogura M, Harada-Shiba M	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日 ~11日	国内
LDL apheresis treatment by both LDL adsorption and double membrane filtration reduces plasma levels of mature and furin-cleaved PCSK9s, ポスター発表	Hori M, Yuasa Y, Makino H, Komai H, Yanagi K, Koezuka R, Tamanaha T, Kishimoto I, Hattori H, Harada-Shiba M	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日 ~11日	国内
Conjugation approach toward anti-PCSK9 antisense oligonucleotide agent for getting further inhibitory effects, ポスター発表	Wada S, Yasuhara H, Wada F, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日 ~11日	国内
我が国における家族性高コレステロール血症ホモ接合体の実体調査, 口頭	斯波真理子, 荒井秀典, 山下静也, 石橋俊	第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会	2014年7月10日 ~11日	国内
肝細胞におけるGLP-1のコレステロール代謝に及ぼす影響, 口頭	長谷川夕希子, 堀美香, 中神朋子, 斯波真理子, 内潟安子	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	2014年5月22日 ~24日	国内

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所(学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo	Yamamoto Y, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S	Organic & Bionolecular Chemistry	2015年	国外
Significant Gaps in Awareness of Familial Hypercholesterolaemia among Physicians in selected Asia-Pacific Countries	Pang J, Sullivan D R, Harada-Shiba M, YA Ding P, Selvey S, Ail S, Watts G F	Journal of Clinical Lipidology	2015年	国外

Removal of plasma mature and furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (pcsk9) by low-density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: Development and application of a new assay for pcsk9	Hori M, Ishihara M, Yuasa Y, Makino H, Yanagi K, Tamahara T, Kishimoto I, Kujiraoka T, Hattori H, Harada-Shiba M	J. Clin. Endocrinol. Metab	2014年	国外
Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia-ischemia	Ohshima M, Taguchi A, Tsuda H, Sato Y, Yamahara K, Harada-Shiba M, Miyazato M, Ikeda T, Iida H, Tsuji M	Brain Dev	2014年	国外
Evaluation of multiple-turnover capability of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in cell-free rnaase h-mediated antisense reaction and in mice	Yamamoto T, Fujii N, Yasuhara H, Wada S, Wada F, Shigesada N, Harada-Shiba M, Obika S	Nucleic acid therapeutics	2014年	国外
Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells	Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T	PLoS One	2014年	国外
Quick nuclear transportation of sirna and in vivo hepatic apob gene silencing with galactose-bearing polymeric carrier	Tachibana Y, Munisso MC, Kamata W, Kitagawa M, Harada-Shiba M, Yamaoka T	J. Biotechnol	2014年	国外
Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34+ cells in a mouse model of neonatal stroke	Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, Otani K, Yamahara K, Ihara M, Harada-Shiba M, Ikeda T, Matsuyama T	NeuroScience	2014年	国外

Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removed triglyceride from large VLDL particles from murine plasma	Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata MA, Harada-Shiba M	European Journal of Pharmacology	2014年	国外
Familial hypercholesterolemia	Teramoto I, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K, Harada-Shiba M, Arai H, Bujo H, Nohara A, Oikawa S, Okada T, Katsuki A	J Atheroscler Thromb	2014年	国外
Elevated atherogenic index following oral administration of quaternized polyamine nanogels, Colloids and Surfaces	Nagasaki Y, Yamazaki T, Kikuchi A, Harada-Shiba M	B, Biointerfaces	2014年	国外
Proeomic analysis of proteins eliminated by LDL-apheresis	Yuasa Y, Osaki T, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Usami M, Harada-Shiba M	Ther Apher Dial	2014年	国外
High-density lipoprotein levels have markedly increased over the past twenty years in japan	Yokoyama S, Ueshima H, Miida T, Nakamura M, Takata K, Fukukawa T, Goto T, Harada-Shiba M, Sano M, Kato K, Matsuda K	J Atheroscler Thromb	2014年	国外

Synthesis and Hybridization Property of a Boat-shaped Pyranosyl Nucleic Acid Containing an Exocyclic Methylene Group in the Sugar Moiety	Mori K, Kodama T, Obika S	Bioorg. Med. Chem	2015年	国外
Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance	Mitsuoka Y, Fujimura Y, Waki R, Kugimiya A, Yamamoto T, Hari Y, Obika S	Org. Lett	2014年	国外
C5-Azobenzene-substituted 2'-Deoxyuridine-containing-oligodeoxynucleotides for Photo-switching	Mori S, Morihiro K, Obika S	Molecules	2014年	国外
Photoinduced Changes in Hydrogen Bonding Patterns of 8-Thiopurine Nucleobase Analogues in a DNA Strand	Morihiro K, Kodama T, Mori S, Obika S	Org. Biomol. Chem	2014年	国外
Design and Evaluation of 2',4'-BNA/LNA Based Splice-switching Oligonucleotides in Vitro	Shimo T, Tachibana K, Saito K, Yoshida T, Tomita E, Waki R, Yamamoto T, Doi T, Inoue T, Kawakami J, Obika S	Nucleic Acids Res	2014年	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto T, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S	Amido-bridged Nucleic Acids with Small Hydrophobic Residues Enhance Hepatic Tropism of Antisense Oligonucleotides <i>in vivo</i>	Org. Biomol. Chem			2015年
Hori M, Ishihara M, Yuasa Y, Makino H, Yanagi K, Tamanaha T, Kishimoto I, Kujiraoka T, Hattori H, Harada-Shiba M	Removal of plasma mature and furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (pcsk9) by low-density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: Development and application of a new assay for pcsk9	J. Clin. Endocrinol. Metab			2014年
Yamamoto T, Fujii N, Yasuhara H, Wada S, Wada F, Shigesada H, Harada-Shiba M, Obika S	Evaluation of Multiple-Turnover Capability of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides in Cell-Free RNase H-Mediated Antisense Reaction and in Mice	Nucleic Acid Therapeutics	24	283-290	2014年
Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata MA, Harada-Shiba M	Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removed triglyceride from large VLDL particles from murine plasma	European Journal of Pharmacology	723	353-359	2014年
Yuasa Y, Osaki T, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Usami M, Harada-Shiba M	Proeomic analysis of proteins eliminated by LDL-apheresis	Ther Apher Dial	18 (1)	93-102	2014年
Mori K, Kodama T, Obika S	Synthesis and Hybridization Property of a Boat-shaped Pyranosyl Nucleic Acid Containing an Exocyclic Methylene Group in the Sugar Moiety	Bioorg. Med. Chem	23	33-37	2015年
Mitsuoka Y, Fujimura Y, Waki R, Kugimiya A, Yamamoto T, Hari Y, Obika S	Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance	Org. Lett	16	5640-5643	2014年

Mori S, Morihiro K, <u>Obika S</u>	C5-Azobenzene-substituted 2'-Deoxyuridine-containing-oligodeoxynucleotides for Photo-switching Hybridization Ability	Molecules	19	5109-5118	2014年
Morihiro K, Kodama T, Mori S, <u>Obika S</u>	Photoinduced Changes in Hydrogen Bonding Patterns of 8-Thiopurine Nucleobase Analogues in a DNA Strand	Org. Biomol. Chem	12	2468-2473	2014年
Shimo T, Tachibana K, Saito K, Yoshida T, Tomita E, Waki R, Yamamoto T, Doi T, Inoue T, Kawakami J, <u>Obika S</u>	Design and Evaluation of 2',4'-BNA/LNA Based Splice-switching Oligonucleotides in Vitro	Nucleic Acids Res	42	8174-8187	2014年





Cite this: DOI: 10.1039/c5ob00242g

## Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides *in vivo*<sup>†</sup>

Tsuyoshi Yamamoto,<sup>‡a,b</sup> Aiko Yahara,<sup>‡a</sup> Reiko Waki,<sup>a</sup> Hidenori Yasuhara,<sup>a,b</sup> Fumito Wada,<sup>a,b</sup> Mariko Harada-Shiba<sup>b</sup> and Satoshi Obika<sup>\*a</sup>

High scalability of a novel bicyclic nucleoside building block, amido-bridged nucleic acid (AmNA), to diversify pharmacokinetic properties of therapeutic antisense oligonucleotides is described. N2'-functionalization of AmNA with a variety of hydrophobic groups is straightforward. Combinations of these modules display similar antisense knockdown effects and improve cellular uptake, relative to sequence-matched conventional 2',4'-bridged nucleic acid (2',4'-BNA) *in vivo*.

Received 4th February 2015,  
Accepted 5th February 2015

DOI: 10.1039/c5ob00242g

www.rsc.org/obc

### Introduction

It has recently been demonstrated that naked therapeutic antisense oligonucleotides (AONs) exhibit robust systemic activity when comprised of several chemically modified nucleic acid building blocks.<sup>1</sup> In particular, conformationally constrained nucleotides such as 2',4'-bridged nucleic acid (2',4'-BNA) [also known as locked nucleic acid (LNA)]<sup>2</sup> in combination with phosphorothioate (PS) exhibit extraordinarily high target RNA binding and acceptable pharmacokinetics. However, only a small fraction of the administered PS-LNAs is distributed in the target tissues;<sup>3</sup> most of the dose is deposited subcellularly, which is undesirable.<sup>4</sup> Thus, overcoming the pharmacokinetic challenges of AONs is necessary to improve their potency and to address safety concerns.<sup>5</sup>

A number of targeted delivery strategies for antisense therapeutics have been developed, including the terminal conjugation of biofunctional molecules.<sup>6</sup> However, these ligands often interfere with knockdown activity, despite their advantageous effect on the pharmacokinetics of AONs. In contrast, numerous LNA analogues with unique bridging structures have been developed and refined, and apparently minor structural modification of LNA can significantly alter their biological properties.<sup>3a,7</sup> However, the design and synthesis of

this class of nucleotides are basically formidable. Therefore, evaluating the pharmacokinetics of AONs is formidable as well because we have only the option of evaluating them *in vivo*. On the other hand, Leumann *et al.* introduced hydrophobic side chains into the C6'-position of each tricyclo-DNA monomer through a metabolically labile ester group, then integrated these nucleotides into oligonucleotides and successfully improved cell-membrane permeability.<sup>8</sup> However, the effect of integration of these monomers on *in vivo* deposition remains obscure. In this context, we recently reported a promising alternative scaffold nucleoside, amido-bridged nucleic acid (AmNA),<sup>9</sup> which may be useful for addressing this issue (Fig. 1).

The furanose of AmNA is fused to a five-membered  $\gamma$ -lactam, whose amide bond is bridged between C2' and C4' of the ribose and rigidly fixed in C3'-*endo* conformation. The AmNA-modified AONs are much less susceptible to nuclease digestion than their LNA counterparts, possibly because of the steric hindrance of the N2'-methyl and neighboring carbonyl groups of the amide. These modified AONs maintain LNA-like high RNA affinity and show higher *in vitro* antisense activity than their LNA counterparts. Notably, N2'-functionalization is usually facile (AmNA[N-R]), making AmNA a promising building block for AONs. Other multivalent heteroatom-containing

<sup>a</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. E-mail: obika@phs.osaka-u.ac.jp;

Fax: +81 6 6879 8204; Tel: +81 6 6879 8200

<sup>b</sup>Department of Molecular Innovation in Lipidology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

<sup>†</sup>Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ob00242g

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work.

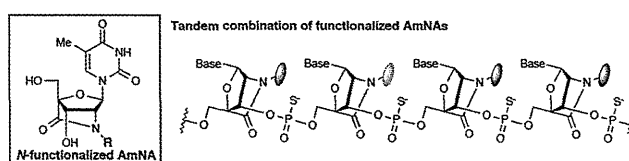


Fig. 1 Tandem arrangement strategy of N2'-functionalized AmNAs for improving the pharmacokinetics of antisense therapeutics.

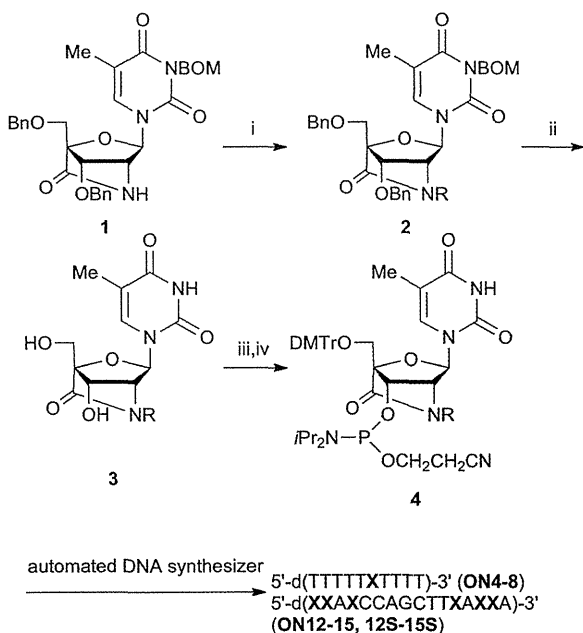
BNAs, such as 2'-amino-LNA,<sup>3c,10</sup> 2',4'-BNANC,<sup>7f</sup> *N*-Me-aminooxy BNA<sup>7c</sup> and 6'-thiol containing BNA,<sup>11</sup> are also intriguing alternatives in the same context, but *N*- or *S*-functionalized derivatives remain to be comprehensively developed.

To demonstrate the plasticity of our scaffold nucleoside for improving antisense therapeutics, we have developed a methodology to perturb the “*in vivo*” pharmacokinetics of AONs by using a variety of AmNA derivatives. Specifically, we synthesized AmNAs functionalized with a series of hydrophobic groups for potential improvement of intracellular and hepatic uptake of AONs and showed that hydrophobicity of the AmNA-AONs is readily adjustable by altering the substituents. We also demonstrated that a better tandem combination of *N*-alkylated AmNA (AmNA[*N*-R]) modules can improve hepatic disposition and potency of AONs *in vivo*.

## Results and discussion

### Phosphoramidite monomer synthesis

The phosphoramidite monomers corresponding to AmNA[*N*-H] **4a** and AmNA[*N*-Me] **4b** were obtained as previously described.<sup>9</sup> From known nucleoside **1**, we synthesized the five monomers AmNA[*N*-Et] **4c**, AmNA[*N*-*n*Pr] **4d**, AmNA[*N*-*i*Pr] **4e**, AmNA[*N*-Bn] **4f** and AmNA[*N*-Phen] **4g**, where abbreviated substituents indicate methyl, ethyl, *n*-propyl, *i*-propyl, benzyl and phenethyl, respectively (Scheme 1). Briefly, **1** was treated with



**Scheme 1** Reagents and conditions: (i) NaH, RX, DMF, 0 °C → rt, R = Et: EtBr, quant.; R = *n*Pr: *n*PrBr, 76%; R = *i*Pr: *i*PrI, quant.; R = Bn: BnBr, quant.; R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph: BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph, 43%; (ii) 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C, H<sub>2</sub>, THF, rt; (iii) DMTrCl, pyridine, rt, R = Et: 74% (2 steps); R = *n*Pr: 96% (2 steps); R = *i*Pr: 81% (2 steps); R = Bn: 90% (2 steps); R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph: 83% (2 steps); (iv) (i-Pr<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, *N,N*-diisopropylammonium tetrazolide, MeCN/THF (3 : 1), rt, R = Et: 77%; R = *n*Pr: 88%; R = *i*Pr: 49%; R = Bn: 61%; R = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph: 48%.

sodium hydride, followed by the addition of the corresponding alkyl halides to give *N*-substituted compounds **2a-g**. Despite steric hindrance, these coupling reactions provided high yields under optimized conditions. Hydrogenolysis of the O3', O5'-benzyl groups as well as N3-benzyloxymethyl groups of **2a-g** was effected using palladium on the carbon catalyst in THF followed by O5'-dimethoxytritylation to give *N*-substituted monomers **3a-g** in good yield over two steps (52–96%). Subsequent O3'-phosphitylation of **3a-g** was achieved with 2-cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite to provide desired thymine phosphoramidites **4a-g**.

### Oligonucleotide synthesis

Synthesis of oligonucleotides (ONs) containing AmNA[*N*-R] monomers was performed on an automated DNA synthesizer using a conventional phosphoramidite method. 5-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]-1*H*-tetrazole (Activator 42®) solution was used for the synthesis of all the oligonucleotides described here. *N*-Alkylated AmNAs **4a-g** were successfully coupled using an extended coupling time to 16 min. The synthesized ONs were purified by reverse-phase HPLC (RP-HPLC) and the composition and purity were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and RP-HPLC, respectively (Table 1 and ESI Table S1†). A purity greater than 95% was confirmed for all oligonucleotides. Note that the large-scale synthesis of phosphorothioate antisense oligonucleotides for *in vivo* usage and their purification were conducted by Gene Design Inc. (Ibaraki, Japan), where they used AmNA[*N*-R] phosphoramidite monomers provided by us and the composition and purity were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry and RP-HPLC, respectively.

### Physicochemical properties of AmNA-containing oligonucleotides

We compared the relative hydrophobicity of oligonucleotides singly modified with AmNAs (**4a-g**; **ON-1-8**) by RP-HPLC using an octadecyl (C18) silica column under the indicated conditions. The obtained retention times are shown in Table 1. AmNA[*N*-H]-modified oligonucleotide **ON-2** was the most

**Table 1** Oligonucleotides singly modified with AmNAs<sup>a</sup>

Oligonucleotides	ID	<i>T</i> <sub>m</sub> (Δ <i>T</i> <sub>m</sub> /mod.) (°C)		Retention time (min) <sup>b</sup>
		RNA	DNA	
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'	<b>ON-1</b>	19	21	8.4
5'-d(TTTTT <sub>H</sub> TTTT)-3'	<b>ON-2</b>	26 (+7)	20 (-1)	7.1
5'-d(TTTTT <sub>M</sub> TTTT)-3'	<b>ON-3</b>	26 (+7)	18 (-3)	10.7
5'-d(TTTTT <sub>E</sub> TTTT)-3'	<b>ON-4</b>	24 (+5)	18 (-3)	13.5
5'-d(TTTTT <sub>n</sub> TTTT)-3'	<b>ON-5</b>	21 (+2)	18 (-3)	15.5
5'-d(TTTTT <sub>i</sub> TTTT)-3'	<b>ON-6</b>	22 (+3)	17 (-4)	17.0
5'-d(TTTTT <sub>B</sub> TTTT)-3'	<b>ON-7</b>	23 (+4)	18 (-3)	22.4
5'-d(TTTTT <sub>P</sub> TTTT)-3'	<b>ON-8</b>	21 (+2)	18 (-3)	25.8

<sup>a</sup> *t*<sub>H</sub> = AmNA[*N*-H], *t*<sub>M</sub> = AmNA[*N*-Me], *t*<sub>E</sub> = AmNA[*N*-Et], *t*<sub>n</sub> = AmNA[*N*-*n*Pr], *t*<sub>i</sub> = AmNA[*N*-*i*Pr], *t*<sub>B</sub> = AmNA[*N*-Bn], and *t*<sub>P</sub> = AmNA[*N*-Phen].

<sup>b</sup> Conditions: eluent A: 0.1 M TEAA buffer, eluent B: A/MeCN (1/1, v/v), gradient: MeCN conc. = 8–13% (30 min), 260 nm.

hydrophilic. As expected, the retention times of the derivatives varied as a function of the hydrophobicity of the oligonucleotides and could be adjusted by changing the substituents and their number.

To estimate the effect of modifications (**4a–g**) on duplex stability, the thermal stability of duplexes was measured with unmodified complementary RNA and DNA strands and compared with the melting temperatures of the corresponding unmodified reference duplexes (Table 1). Single incorporation of AmNAs **4a–g** into the center of a DNA T decamer increased thermal stability for complementary RNA ( $\Delta T_m = +2$  to  $+7$  °C), but decreased stability for complementary DNA ( $\Delta T_m = -1$  to  $-4$  °C), indicating that high RNA-selective binding is maintained. These results are consistent with previous observations made using a series of BNAs whose bridges differed in size and composition from LNA.<sup>7a,12</sup> A previous crystal structure study of DNA–LNA heteroduplex revealed that the 2'-oxygen of LNA forms hydrogen bonds with water molecules.<sup>13</sup> The perturbation of these hydration patterns by the 2'-substituents of AmNAs probably affected duplex stability, but all derivatives retained high affinity.

#### Nuclease stability

The effect of AmNA modification on nuclease resistance was determined by incorporating AmNAs into the second base from the 3'-end of oligonucleotides, followed by incubation with CAPV for 40 min at 37 °C. The percentage of intact oligonucleotides was analyzed by RP-HPLC and found to be higher than with conventional AmNA[*N*-Me] (ESI Fig. S5†).<sup>7a</sup>

#### *In vivo* activities of AmNA-modified antisense oligonucleotides

We next evaluated hydrophobic AmNA-modified AONs *in vivo*. We previously developed a potent LNA-based AON that targets apolipoprotein CIII (apoC-III) for the treatment of dyslipidemia.<sup>14</sup> Truncated versions of this apoC-III AON were used in these *in vivo* studies because we recently revealed that these could be more potent.<sup>3d,15</sup> Six LNAs were incorporated into a 16-mer PS-AON, **ON-9S**. **ON-10S** retains a seven natural-nucleotide gap moiety, sufficient for maintaining RNase H (a key enzyme for antisense mechanism)-recruiting activity.

The primary purpose of the *in vivo* study was to confirm the effectiveness of this truncated version of LNA-AON to target apoC-III mRNA, and mice were dosed intravenously with **ON-10S** at a dose range of 5–20 mg kg<sup>-1</sup>. The expression levels of apoC-III mRNA in the liver were analysed 72 hours post-injection. Dose-dependent reduction in hepatic apoC-III mRNA through a single administration of **ON-10S** was observed without significant toxicity (ESI Fig. S6, S7.† The highest reduction in hepatic apoC-III mRNA (60%) was recorded at a dose of 20 mg kg<sup>-1</sup>, and statistical significance with saline control was found at doses above 10 mg kg<sup>-1</sup>. Thus, hydrophobic AmNAs-carrying AONs were evaluated *in vivo* at 15 mg kg<sup>-1</sup>.

*N*-Alkylated AmNAs **4b**, **e**, **f** were introduced into PS-AON **ON-9S** to obtain **ON-11S** to **-13S** as shown in Table 2. The rela-

**Table 2** Antisense oligonucleotides targeting murine apoC-III mRNA<sup>a</sup>

Oligonucleotides	ID	$T_m$ ( $\Delta T_m$ /mod.) (°C) RNA	Retention time (min) <sup>b</sup>
5'-d(TTATCCAGCTTTAATTA)-3'	<b>ON-9S</b>	39	5.8
5'-d(t <sub>L</sub> t <sub>L</sub> At <sub>L</sub> CCAGCTTt <sub>L</sub> At <sub>L</sub> t <sub>L</sub> A)-3'	<b>ON-10S</b>	63 (+4)	5.8
5'-d(t <sub>M</sub> t <sub>M</sub> At <sub>M</sub> CCAGCTTt <sub>M</sub> At <sub>M</sub> t <sub>M</sub> A)-3'	<b>ON-11S</b>	63 (+4)	5.8
5'-d(t <sub>i</sub> t <sub>i</sub> At <sub>i</sub> CCAGCTTt <sub>i</sub> At <sub>i</sub> t <sub>i</sub> A)-3'	<b>ON-12S</b>	61 (+4)	10.6
5'-d(t <sub>B</sub> t <sub>B</sub> At <sub>B</sub> CCAGCTTt <sub>B</sub> At <sub>B</sub> t <sub>B</sub> A)-3'	<b>ON-13S</b>	59 (+3)	21.2
5'-d(t <sub>i</sub> t <sub>i</sub> At <sub>M</sub> CCAGCTTt <sub>M</sub> At <sub>i</sub> t <sub>i</sub> A)-3'	<b>ON-14S</b>	62 (+4)	11.0
5'-d(t <sub>B</sub> t <sub>M</sub> At <sub>M</sub> CCAGCTTt <sub>M</sub> At <sub>M</sub> t <sub>B</sub> A)-3'	<b>ON-15S</b>	63 (+4)	13.0

<sup>a</sup> t<sub>L</sub> = LNA-T, t<sub>M</sub> = AmNA[*N*-Me], t<sub>i</sub> = AmNA[*N*-iPr] and t<sub>B</sub> = AmNA[*N*-Bn].

<sup>b</sup> Conditions: eluent A: 0.1 M TEAA buffer, eluent B: A/MeCN (1/1, v/v), gradient: MeCN conc. = 13–37% (30 min), 260 nm.

tive hydrophobicity of the oligonucleotides was gauged from their elution time of RP-HPLC.

Each PS modification increases the retention time of the AON; consequently the content of acetonitrile in the elution buffer was modified from 8–13% to 13–37%, as described in the footnote to Table 2. The retention times for **ON-11S** to **-13S** differed significantly and predictably from the singly-incorporated phosphodiester-version oligonucleotides (**ON-3**, **-6**, **-7**; Table 1). AmNA[*N*-Bn] **4f** and AmNA[*N*-iPr] **4e** increased the hydrophobicity of the AON, whereas steric hindrance of the gap moiety in **ON-12S** and **-13S** reduced potency. Therefore, we further designed and synthesized **ON-14S** and **-15S**, which showed well-controlled retention times. The  $T_m$  values of **ON-11S** to **-15S** were measured and found to be in approximately 60 °C under the indicated buffer conditions. C57Bl/6J male mice ( $n = 3$  per group) were intravenously injected with **ON-10S**, **-11S**, **-12S**, **-13S**, **-14S** or **-15S** at a dose of 2.9 μmol kg<sup>-1</sup> (15 mg kg<sup>-1</sup> for **ON-10S**). LNA counterpart **ON-10S** reduced apoC-III by 45%, and AmNA-AONs **ON-11S** and **ON-12S** achieved a similar knockdown of 40% and 30% respectively. This is the first demonstration of AmNA-AONs exhibiting LNA congener-like high activity *in vivo* (Fig. 2, ESI Fig. S8†). In contrast, AmNA[*N*-Bn] **4f**-based AON **ON-13S** showed no knockdown. The less hindered **ON-14S** and **-15S** in the gaps showed improved potency compared to **-11S**, **-12S**; interestingly, **ON-14S** achieved the highest knockdown of apoC-III mRNA of the AmNA-AONs tested, suggesting that a combination of functionalized AmNAs working in tandem can tailor potency of AONs.

#### Hepatic tropism of hydrophobic AmNA-modified antisense oligonucleotides

To investigate whether different combinations of hydrophobic AmNAs alter the tissue deposition of AONs, we measured the intact AONs that accumulated in the liver after intravenous administration using a previously described ELISA method.<sup>16</sup> The hepatic distribution of the more hydrophobic **ON-12S**, **-13S**, **-14S** and **-15S** was ~1.5 times higher than that of the LNA-AON **ON-10S**, whereas **ON-10S** and **ON-11S** exhibited

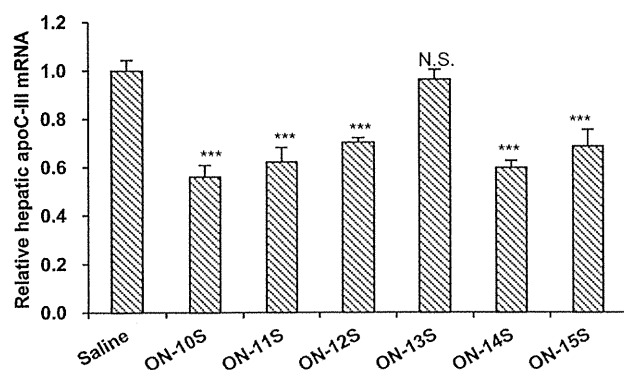


Fig. 2 Reduction of apoC-III mRNA in the livers of mice receiving a single intravenous dose of  $2.868 \mu\text{mol kg}^{-1}$  of a series of AONs. Dunnett's multiple comparison test, \*\*\* $P < 0.001$ , N.S.; not significant. Error bars represent group means + S.D.  $n = 3$ .

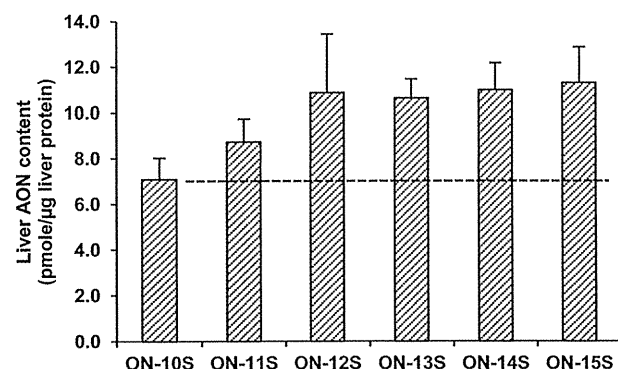


Fig. 3 ELISA-based quantification of a series of AONs distributed in murine liver after 72 hours post-injection. Error bars represent group means + S.D.  $n = 3$ .

hepatic distribution similar to each other (Fig. 3). However, the activity of all these AmNA-based AONs was at best comparable to the LNA counterpart ON-10S. It should primarily be noted that no statistical significance was found between these liver AON contents, which may contribute to this insignificant change in potency. It is also possible that the hydrophobic modification altered the suborgan distribution of AONs in liver. ApoC-III mRNA is predominantly expressed in hepatic parenchymal cells, which comprise 80% of the liver volume, whereas non-parenchymal cells such as Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells are relatively minor components of the liver. AONs should therefore selectively target the parenchymal cells. However, it is reported that 80% of PS-AONs accumulated in the liver are distributed in non-parenchymal cells and only 20% are in the parenchymal hepatocytes.<sup>4b</sup> The hydrophobic AONs developed here might foster this trend. Alternatively, there are at least two uptake pathways in parenchymal cells (a productive pathway and a bulk nonproductive pathway); the hydrophobic AONs might encourage the nonproductive uptake which undermines the knockdown activity of AONs.<sup>4a</sup>

## Conclusions

In summary, we here showed that AmNAs are an interesting class of antisense building blocks. A series of AmNAs functionalized with a variety of hydrophobic groups were synthesized: AmNA[*N*-Et] **4c**, AmNA[*N*-*n*Pr] **4d**, AmNA[*N*-*i*Pr] **4e**, AmNA[*N*-Bn] **4f** and AmNA[*N*-Phen] **4g**. We demonstrated that a tandem arrangement of these small substituents affects the systemic activity and tissue disposition of AONs *in vivo*. This strategy will allow more finely-tuned control of the properties of AONs than conventional strategies. Using this scaffold nucleoside, we will further develop useful modules and identify the best combination of these AmNA modules to tackle the issues currently confronting antisense therapeutics.

## Experimental

### General

All moisture-sensitive reactions were carried out in well-dried glassware under a  $\text{N}_2$  atmosphere. Anhydrous dichloromethane, DMF, MeCN, and pyridine were used as purchased.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded at 300 and 400 MHz and 500 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR were recorded at 75 and 100 MHz, and the  $^{31}\text{P}$  spectrum was recorded at 161 MHz. Chemical shift values are expressed in  $\delta$  values (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS) as an internal standard and a residual solvent for  $^1\text{H}$  NMR, and  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta = 77.00$  ppm), methanol ( $\delta = 49.00$  ppm), and DMSO (39.50 ppm) for  $^{13}\text{C}$  NMR, and 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $\delta = 0$  ppm) for  $^{31}\text{P}$  NMR. Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) were recorded in the positive ion mode. For column chromatography, silica gel PSQ 100B was used. Progress of the reaction was monitored by analytical thin layer chromatography (TLC) on pre-coated aluminium sheets (Silica gel 60 F<sub>254</sub> sheet, Merck), and the products were visualized by UV light.

### Synthesis of AmNA monomers and phosphoramidites

**General procedure 1 (synthesis of compound 2).** To the stirring solution of **1** (1.0 equiv.) in DMF (0.1 M) was added NaH (1.2 equiv.) at 0 °C. After stirring for 30 min, alkyl halide (1.2 equiv.) was added. The reaction temperature was gradually raised from 0 °C to room temperature and after completion of the reaction (approx. 30 min), ice-cold water was added. The solution was stirred for 15 min and the product was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine, dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), and concentrated. The product was purified by flash column chromatography (*n*-hexane–ethyl acetate = 3 : 1 or 2 : 1) to afford **2** as a white amorphous solid.

(2'-R)-3',5'-Di-*O*-benzyl-*N*<sup>3</sup>-benzoyloxymethyl-2'-ethylamino-2'-*N*,4'-*C*-oxomethylenethymidine (**2c**; *R* = *Et*). By following the general procedure 1, using bromoethane as an alkyl halide, **2c** was obtained in quant. as a white amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} +45.9$  (*c* 0.100,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr): 3071, 3033, 2930, 2871, 1725, 1708, 1665, 1454, 1273  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.22 (3H, t), 1.64 (3H, s), 3.35 (1H, dq  $J = 14$  Hz,