

201449008A

厚生労働科学研究委託費

肝炎等克服実用化研究事業

B型肝炎ウイルス感染を抑制可能な高機能型核酸医薬品の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山本 剛史（大阪大学大学院薬学研究科）

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、山本 剛史が実施した平成26年度「厚生労働科学研究委託事業（B型肝炎ウイルス感染を抑制可能な高機能型核酸医薬品の開発）」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
B型肝炎ウイルス感染を抑制可能な高機能型核酸医薬品の開発に関する研究 （HBVを標的としたアンチセンス核酸の設計・合成・機能評価） -----	1
山本 剛史	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
HBV ゲノム発現プラスミドおよびアデノウイルスベクターを用いた HBV 感染 モデルマウスの作製に関する研究 -----	30
櫻井 文教	
III. 学会等発表実績 -----	140
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	150

厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

B型肝炎ウイルス感染を抑制可能な高機能型核酸医薬品の開発に関する研究

（HBV を標的としたアンチセンス核酸の設計・合成・機能評価）

担当責任者 山本 剛史 （大阪大学大学院薬学研究科・助教）

#### 研究要旨

B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus; HBV）の感染を原因とするB型肝炎は、我が国に約150万人のHBV感染者が存在すること、その一部は肝硬変や肝臓癌に進行することから、大きな問題となっている。現在、B型肝炎治療薬としてはインターフェロン（IFN）や核酸アナログが使用されているが、種々の問題から画期的抗HBV薬の開発が期待される。アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）は、10～20塩基長の化学合成オリゴヌクレオチドであり、相補的な配列を有する標的遺伝子mRNAに結合することで、その発現を高効率に阻害すること、肝臓に効率良く集積することなどから、肝疾患に対する医薬品として適しており、実際にC型肝炎、高コレステロール血症などに対する医薬品として承認・新規開発が進んでいる。本研究では、ASOを用いてHBVの感染抑制を試みた。

研究協力者

医学研究科教授

櫻井 文教 大阪大学大学院薬学研  
究科 准教授

脇田 隆宇 国立感染症研究所ウイ  
ルス第2部 部長

小比賀 聡 大阪大学大学院薬学研  
究科 教授

渡士 幸一 国立感染症研究所ウイ  
ルス第2部 主任研究官

水口 裕之 大阪大学大学院薬学研  
究科 教授

A. 研究目的

立花 雅史 大阪大学大学院薬学研  
究科助教

B型肝炎ウイルス（Hepatitis B  
Virus; HBV）の感染を原因とするB

山本 達郎 大阪大学大学院薬学研  
究科大学院生

型肝炎は、国内に約150万人のHBV感  
染者が存在すること、その一部は肝硬

田中 靖人 名古屋市立大学大学院

変や肝臓癌に進行することから、大きな

問題となっている。現在、B型肝炎治療薬としてはインターフェロン (IFN) や核酸アナログが使用されているが、種々の問題から画期的抗HBV薬の開発が期待される。アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は、10~20塩基長の化学合成オリゴヌクレオチドであり、相補的な配列を有する標的遺伝子 mRNA に結合することで、その発現を高効率に阻害すること、肝臓に効率良く集積することなどから、肝疾患に対する医薬品として期待されている。実際に、PSCK9 に対する ASO は家族性高コレステロール血症治療薬として承認・販売されており、C型肝炎ウイルスの増殖に必須の miR-122a の ASO は、C型肝炎治療薬として臨床開発が進められている。そこで本研究では、HBV 感染を抑制可能な ASO の開発を試みた。

## B. 研究方法

### B. 1. HBx 遺伝子に対する ASO

#### (ASO-HBx) の設計

HBV・HBx 遺伝子において各 Genotype に保存されている領域に対し、449 種の候補標的領域から選抜した 16 種の ASO を化学合成した。それらの ASO には、標的に対する親和性の向上ならびに分解に対する耐性の向上を目的に、種々の化学修飾を施した。

### B. 2. ASO-HBx による HBV 感染抑制

Genotype D の HBV 粒子を恒常的に産生する HepG2. 2. 15. 7 細胞に対し ASO-HBx を終濃度 100 nM で Lipofectamine2000 を用いて Transfection した。Transfection 72 時間後、細胞内の RNA を回収し、HBx mRNA 量を定量的 RT-PCR により定量した。さらに培養上清中の HBV ゲノム量を定量的 PCR により検討した。

### B. 3. ASO-HBx による細胞毒性の評価

HepG2. 2. 15. 7 細胞に ASO-HBx を上記 B. 2. と同様に導入した。72 時間後、培養上清中の Lactate dehydrogenase (LDH) 活性を LDH-細胞毒性テストワコー (和光純薬) を用いて評価した。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

## C. 研究成果

### C. 1. HBx 遺伝子に対する ASO の設計

本研究では、標的遺伝子として HBx 遺伝子を選択した。HBV ゲノムは 4 つの遺伝子 (HBx, Core, Pol, S) から構成されている。HBx 遺伝子産物は、HBV の複製、Reactive Oxygen Species (ROS) の産生など多くの機能を有しており、HBx 遺伝子の発現を抑制することで HBV の感染を大きく抑制可能であることが報告されている (Shin et al., Virus Res., 2006)。設計にあたっては、HBx 遺伝子の Genotype A-D 間で共通の配列領域について設計した。共通

配列より 449 種の候補を生成し、既知の免疫惹起モチーフ (CpG モチーフ)・自己高次構造配列 (GGGG モチーフなど) を有するモノの排除、さらに結合力や配列相同性のパラメータを考慮し、活性アンチセンス核酸を選抜する独自アルゴリズムを用いて 16 種選択した。これら 16 種について BNA を搭載したアンチセンス核酸を化学合成した。

### C. 2. ASO-HBx による HBV 感染抑制

次に設計・合成した ASO-HBx を Hep2. 2. 15. 7 細胞に Transfection し、HBV 感染抑制能について検討した。その結果、2 つの ASO において HBx mRNA 量が 60% 以下に抑制された。さらに培養上清中の HBV ゲノム量についても、50% 以下に抑制された。また、Genotype D 以外の Genotype についても HBx mRNA 抑制効果を検討したところ、Genotype D のみならず、Genotype A-C の HBV において HBx mRNA 量を 40% 以下に抑制することに成功した。以上の結果より、ASO を用いて HBV の感染を抑制可能であることが示された。

### C. 3. ASO-HBx による細胞毒性の評価

さらに、ASO-HB の細胞毒性について検討するために、ASO-HBx を Hep2. 2. 15. 7 細胞に Transfection し、培養上清中の LDH 活性を測定した。その結果、上記 C. 2 の検討において HBV 感染抑制効果を示した ASO では、未処理群と比較し有意な細胞毒性は観察

されなかった。従って、細胞毒性によって HBV 感染が抑制されたのではないことが示唆されるとともに、ASO が高い安全性を有することが示唆された。

### D. 考察

近年、ASO は次世代の革新的医薬品として大きな期待を集めている。ASO は、キャリアーを必要とせずに単体の状態で肝臓に送達可能であること、化学的に大量合成可能であること、核酸に化学修飾を施すことによって安定性や組織移行性を付与することが可能であるなどの特長を有している。既に米国においては ApoB に対する ASO が家族性高コレステロール血症に対する治療薬として承認を受けている。また miR-122a に対する ASO が C 型肝炎治療薬として Phase IIa に進んでいる。本研究では HBV 感染を抑制することを目的に、HBx 遺伝子に対する ASO を設計し、その抑制効率を検討した。HBV は 4 つの遺伝子から構成されており、今回標的とした HBx 遺伝子以外にも S 遺伝子や pol 遺伝子を標的として siRNA を用いて感染抑制が見られることが報告されている。しかしながら、HBx 遺伝子産物は種々のメカニズムを介して HBV の感染ならびに症状の発症に関与しており、本遺伝子をノックダウンすることで高い HBV 感染ならびに

発症の抑制が得られると考えた。今後は更に多くの ASO を用いてスクリーニングを行うとともに、in vivo における HBV 感染抑制を試みる。

#### E. 結論

- HBx 遺伝子を標的とした ASO を設計するとともに、本 ASO を用いて HBV 感染を抑制可能であった。
- HBV 感染抑制を示した ASO は、細胞毒性を示さず高い安全性を有することが示された。

#### F. 健康危険情報

該当事項無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Yamamoto, T., Yahara, A., Waki, R., Yasuhara, H., Wada, F., Harada-Shiba, M. and Obika, S. (2015) Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo. *Org Biomol Chem*.
- ② Mitsuoka, Y., Fujimura, Y., Waki, R., Kugimiya, A., Yamamoto, T., Hari, Y. and Obika, S. (2014) Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization,

and High Nuclease Resistance. *Org. Lett.*, **16**, 5640–5643.

- ③ Shimo, T., Tachibana, K., Saito, K., Yoshida, T., Tomita, E., Waki, R., Yamamoto, T., Doi, T., Inoue, T., Kawakami, J. *et al.* (2014) Design and evaluation of locked nucleic acid-based splice-switching oligonucleotides in vitro. *Nucleic Acids Research*.
  - ④ Yamamoto, T., Fujii, N., Yasuhara, H., Wada, S., Wada, F., Shigesada, N., Harada-Shiba, M. and Obika, S. (2014) Evaluation of multiple-turnover capability of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in cell-free RNase H-mediated antisense reaction and in mice. *Nucleic Acid Ther*, **24**, 283–290.
- ##### 2. 学会発表
- ① 櫻井文教、山本剛史、森大輔、山本達郎、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、立花雅史、小比賀聡、水口裕之。2',4'-BNA/LNA 導入型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる B 型肝炎ウイルスの感染抑制。2014 年 9 月 8-9 日 第 24 回アンチセンスシンポジウム
  - ② 山本剛史、藤井奈緒子、安原秀典、

ス波真理子、小比賀聡、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、2014年9月8-9日、第24回アンチセンスシンポジウム

③ 堀真一郎、山本剛史、小比賀聡、アンチセンス核酸の簡便な in vitro 活性向上法、2014年9月8-9日、第24回アンチセンスシンポジウム

④ Tsuyoshi Yamamoto, Naoko Fujii, Hidenori Yasuhara, Shunsuke Wada, Fumito Wada, Naoya Shigesada, Mariko Harada-Shiba and Satoshi Obika, Turnover Capability of BNA Antisense Oligonucleotides under Excess

RNase H conditions and in Mice, 2014. 10. 11-16, 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society.

⑤ Shin-ichiro Hori, Tsuyoshi Yamamoto, Reiko Waki, Satoshi Obika, Simple addition of calcium chloride to media enhances the effect of various naked oligonucleotides, 2014. 10. 11-16, 10<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当事項無し。



厚生労働科学研究委託費（肝炎等克服実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括）

HBV ゲノム発現プラスミドおよびアデノウイルスベクターを用いた HBV 感染  
モデルマウスの作製に関する研究

担当責任者 櫻井 文教（大阪大学大学院薬学研究科・准教授）

研究要旨

B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus; HBV）の感染を原因とする B型肝炎は、我が国において緊急に克服すべき課題となっている。HBV の生活環の解明や抗 HBV 薬の創成、および B型肝炎発症機構に向けては、HBV 感染モデルマウスの開発が必要不可欠である。これまで HBV 感染モデルマウスとしては、ヒト肝臓キメラマウス、もしくはプラスミドやアデノウイルスベクターを用いて HBV ゲノムを肝臓に導入したマウスが用いられてきた。しかし、ヒト肝臓キメラマウスは重度の免疫不全のために HBV 感染による免疫応答が評価できない。また HBV ゲノムを肝臓に導入したマウスでは、HBV ゲノムの発現が一過性であり、慢性感染状態を再現できない。そこで本研究では新生児マウスに HBV ゲノムをアデノウイルス（Ad）ベクターを用いて導入することにより、HBV 慢性感染モデルマウスの作製を試みる。まず本年度は HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作製するとともに、新生児マウスにおける遺伝子導入特性を検討した。

研究協力者	田中 靖人	名古屋市立大学大学院 医学研究科教授	
水口 裕之	大阪大学大学院薬学研 究科教授	脇田 隆字	国立感染症研究所ウイ ルス第2部 部長
立花 雅史	大阪大学大学院薬学研 究科助教	渡士 幸一	国立感染症研究所ウイ ルス第2部 主任研究官
山本 達郎	大阪大学大学院薬学研 究科大学院生		
飯塚 俊輔	大阪大学大学院薬学研 究科大学院生	A. 研究目的	B型肝炎ウイルス（Hepatitis B

Virus; HBV) の感染を原因とする B 型肝炎は、我が国において非常に多くの患者を有すること、核酸アナログ製剤などが開発されているが、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題を有することなどから、革新的な治療薬の開発が求められている。B 型肝炎の主要な症状に、免疫応答を主因とする強い肝障害が挙げられる。従って新規 B 型肝炎治療薬の創成に向けては、HBV に対する免疫応答も加味した HBV 感染モデル動物が必要不可欠である。これまで HBV 感染モデル動物としては、ヒト肝臓キメラマウスが用いられてきた。ヒト肝臓キメラマウスは、肝細胞のほとんどがヒト肝細胞に置き換わったマウスである。ヒト肝臓キメラマウスでは効率よく HBV が感染するが、極めて高価であること、重度の免疫不全マウスであるため免疫応答を評価できないといった問題点を有する。また、野生型マウスに Ad ベクターやプラスミドを用いて HBV ゲノムを導入し発現させることも可能であるが (マウス肝細胞では HBV 粒子は感染できないが、HBV ゲノムを導入することで感染性の HBV 粒子が産生される)、この場合、肝細胞中の HBV ゲノム量が急速に減少していくため、一過性の HBV 感染しか模倣できない。そこで本研究では、免疫機構が成熟化していない新生仔マウス

に Ad ベクターを用いて HBV ゲノムを導入することを試みることにした。本年度は、HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作製するとともに、新生仔マウスにおける Ad ベクターの遺伝子導入特性を評価した。

## B. 研究方法

### B. 1. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターの開発

Genotype A-C の HBV ゲノムを非増殖型 Ad ベクターゲノムの E1 欠損領域に挿入した。Genotype A-C の HBV ゲノムは、田中靖人教授 (名古屋市立大学大学院医学研究科) よりご供与いただいた。また遺伝子導入効率を補正することを目的に、Cytomegalovirus (CMV) プロモーターによってドライブされる Gaussia Luciferase (gLuc) 発現カセットを HBV ゲノムの下流に挿入した (Figure 1)。Ad ベクターの調製は、improved in vitro ligation 法を用いて調製した。

### B. 2. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターによる各種培養細胞への HBV ゲノム導入

上記 B. 2 で作製した Ad ベクターをヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞に 300 vector particle (VP)/cell もしくは 3000 VP/cell で作用させた。Ad ベクター作用 72 時間後、培養上清中の HBV

ゲノム量を定量的 PCR により、HBV 抗原量 (HBs 抗原、HBcr 抗原) を化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA 法) を用いて測定した。また培養上清中の gLuc 活性については、Gaussia Luciferase assay kit (New England Biolabs) を用いて行った。

### B. 3. Ad ベクターを用いた新生仔マウスへの遺伝子導入と遺伝子発現解析

CMV プロモーターによってホタルルシフェラーゼを発現する発現カセットを搭載した Ad ベクター (Ad-L2) を、生後 2 日のマウスに対し、眼窩静脈叢より全身投与した。投与より 2 日後、各臓器を回収し、ホモジネートを調製した。遠心後、上清のルシフェラーゼ活性を測定することで、遺伝子発現効率を評価した。また、経日的に血液を回収し、肝障害マーカーである血清中の Alanine aminotransferase (ALT) および Aspartate aminotransferase (AST) 値を測定することで、Ad ベクター投与による肝障害を評価した。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

## C. 研究成果

### C. 1. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターの開発

マウス肝臓に高効率に HBV ゲノムを導入することを目的に、非増殖型 Ad ベクターに HBV ゲノムを搭載した。さらに、遺伝子導入効率を補正することを目的に gLuc 発現カセットを挿入した。gLuc は分泌型ルシフェラーゼであることから、培養上清もしくは血液中の gLuc 活性をそのまま測定することが可能である。本 Ad ベクターは、従来の Ad ベクター作製法により効率よく調製することが可能であった。

### C. 2. HBV ゲノム搭載 Ad ベクターによる各種培養細胞への HBV ゲノム導入

次に作製した Ad ベクターが HBV 粒子産生能を有するか検討するために、ヒト肝癌細胞株である HepG2 細胞に HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作用させ、培養上清中の HBV ゲノム量ならびに HBV 抗原量を定量した。これまでに HepG2 細胞は、HBV ゲノム搭載プラスミドを Transfection することにより HBV 粒子が産生されることが多く報告されている。HepG2 細胞に HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作用させたところ、Ad ベクター量依存的に培養上清中に HBV ゲノムが検出された。さらに、HBs 抗原ならびに HBcr 抗原が検出された。本結果より、作製した HBV 搭載 Ad ベクターを肝細胞に作用させることに

よりHBV粒子が産生されることが示唆された。

### C. 3. Ad ベクターを用いた新生仔マウスへの遺伝子導入と遺伝子発現解析

新生仔マウスへの HBV ゲノム搭載 Ad ベクター投与に先立ち、ルシフェラーゼ発現 Ad ベクターを用いて新生仔マウスにおける Ad ベクターの遺伝子導入特性について検討した。生後 2 日の新生仔マウスの眼窩静脈叢より投与したところ、肝臓において最も高い発現が見られた。しかし、成体マウスと比較するとその発現量は低く、肝臓の次に高い遺伝子発現を示した心臓との差は、成体マウスでは約 1500 倍あったのに対し、新生仔マウスでは約 30 倍であった。また経日的にマウス肝臓におけるルシフェラーゼ活性を測定したところ、投与後徐々にルシフェラーゼ活性は減少していき、投与 28 日目にはほとんどバックグラウンドレベルにまで減少した。

次に肝障害マーカーである血清中の AST, ALT 値を測定することにより新生仔マウスにおける Ad ベクター投与後の肝障害について検討した。その結果、PBS 投与群と比較し、有意な AST, ALT 値の上昇は観察されなかった。以上の結果より、Ad ベクターを用いるこ

とで新生仔マウスの肝臓に高効率かつ安全に遺伝子導入可能であることが示された。

### D. 考察

本研究ではHBV感染モデルマウスの作製に向けて、HBV ゲノム搭載 Ad ベクターを作製するとともに、新生仔マウスにおける Ad ベクターの遺伝子導入特性を明らかにした。Ad ベクターは他のウイルスベクターと比較し高いタイターが回収可能であることや比較的大きな遺伝子を搭載可能であることに加えて、静脈内投与後、肝臓に極めて高効率に遺伝子導入可能であることから、HBV ゲノムをマウス肝臓に送達するのに極めて適したベクターであると言える。今回、HepG2 細胞に本 Ad ベクターを作用させたところ、培養上清中に HBV ゲノムならびに HBV 抗原が検出されたことから、HBV 粒子が産生させているものと思われる。今後は新生仔マウスに全身投与することでHBV慢性感染モデルマウスの開発を試みる。

また本年度はHBV慢性感染モデルマウスの開発に先立ち、新生仔マウスにおける Ad ベクターの遺伝子導入特性を検討した。新生仔マウスでは、獲得免疫が未発達のため、Ad タンパク質に対する免疫応答が起こらずに遺伝子

発現が長期間にわたり得られるものと期待される。すなわち HBV ゲノムを長期間維持・発現することで、HBV 慢性感染モデルマウスが得られると考えた。新生仔マウスでは全身投与後、肝臓において高い遺伝子発現が得られたが、その効率は成体マウスと比較して低いものであった。実際に肝臓中の Ad ベクターゲノムコピー数を測定したところ、成体マウスと比較して低いものであった。新生仔マウスでは血管が未成熟なために、投与した Ad ベクターが血管から漏れ出て抹消組織に分布し肝臓への移行量が減ったものと思われる。

また肝臓における導入遺伝子の発現は、投与後徐々に減少していき、投与 28 日後には検出限界以下であった。この原因のひとつとしては、新生仔マウスの状態から成長するにつれて肝臓も大きくなったために、肝細胞あたりの Ad ベクターゲノム量も少なくなったためと思われる。しかし、Ad ベクターを用いて新生仔マウス肝臓に HBV ゲノムを導入した場合、HBV ゲノムはマウス肝細胞内で増殖することから、新生仔マウスに導入し肝臓が大きくなってもそれほど肝細胞あたりの HBV ゲノム量は減少しないものと予想される。

## E. 結論

- HBV ゲノム搭載 Ad ベクターの作製に成功し、HepG2 細胞に作用させることにより、HBV 粒子を産生させることに成功した。
- 新生仔マウスに Ad ベクターを全身投与することにより、マウス肝臓に高効率に遺伝子を導入することに成功した。

## F. 健康危険情報

該当事項無し。

## G. 研究発表

### G.1. 論文発表

該当事項無し。

### G.2. 学会発表

- (1) 櫻井文教、山本剛史、森大輔、山本達郎、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、立花雅史、小比賀聡、水口裕之. 2',4'-BNA/LNA 導入型アンチセンスオリゴヌクレオチドによる B 型肝炎ウイルスの感染抑制. 2014 年 9 月 8-9 日 第 24 回アンチセンスシンポジウム
- (2) 飯塚俊輔、櫻井文教、清水かほり、立花雅史、水口裕之. アデノウイルスベクターの新生仔マウスにおける遺伝子発現特性の解析. 2014 年 10 月 11 日 第 64 回日本

薬学会近畿支部総会・大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項無し。



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>

Received 4th February 2015,  
Accepted 5th February 2015

DOI: 10.1039/c5ob00242g

www.rsc.org/obc

High scalability of a novel bicyclic nucleoside building block, amido-bridged nucleic acid (AmNA), to diversify pharmacokinetic properties of therapeutic antisense oligonucleotides is described. *N*2'-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*.

### 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 *N*2'-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, *N*2'-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.

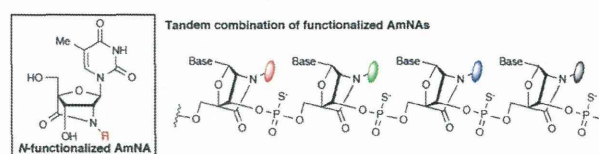


Fig. 1 Tandem arrangement strategy of *N*2'-functionalized AmNAs for improving the pharmacokinetics of antisense therapeutics.

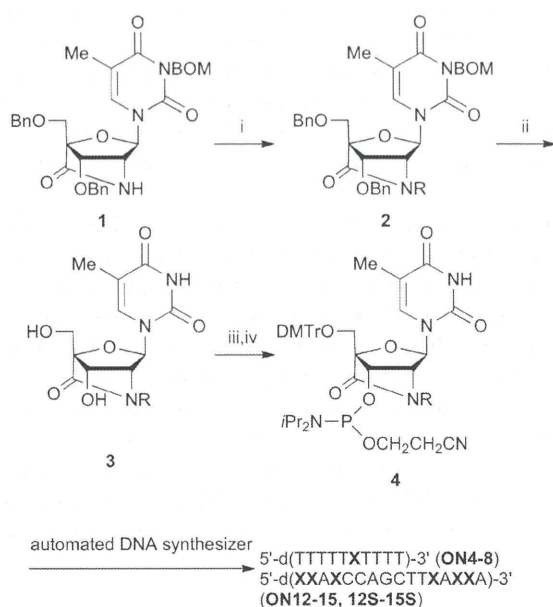
BNAs, such as 2'-amino-LNA,<sup>3c,10</sup> 2',4'-BNANC,<sup>7f</sup> *N*-Me-aminoxy BNA<sup>7c</sup> and 6'-thiol containing BNA,<sup>11</sup> are also intriguing alternatives in the same context, but *N*- or *S*-functionalized derivatives remain to be comprehensively developed.

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) DMTCl, 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 *N*3-benzoyloxymethyl 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<sub>m</sub></i> (Δ <i>T<sub>m</sub></i> /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>†</sup>).<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<sup>†</sup>). 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<sup>†</sup>). 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

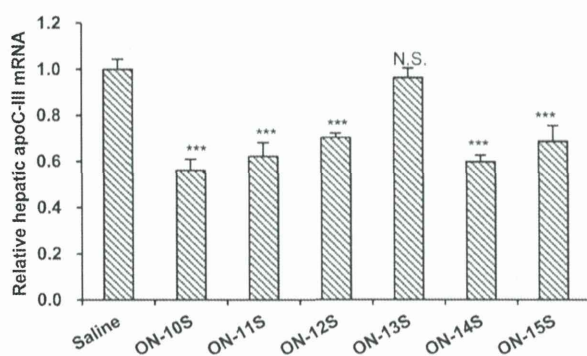


Fig. 2 Reduction of apoC-III mRNA in the livers of mice receiving a single intravenous dose of  $2.868 \mu\text{mol kg}^{-1}$  of a series of AONs. Dunnett's multiple comparison test, \*\*\* $P < 0.001$ , N.S.; not significant. Error bars represent group means + S.D.  $n = 3$ .

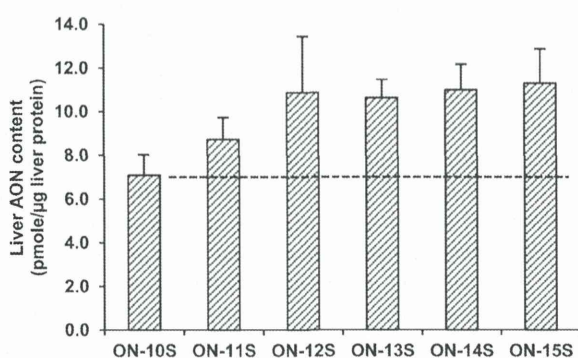


Fig. 3 ELISA-based quantification of a series of AONs distributed in murine liver after 72 hours post-injection. Error bars represent group means + S.D.  $n = 3$ .

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>-benzyloxymethyl-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,

7 Hz), 3.52 (1H, dq  $J = 14$  Hz, 7 Hz), 3.95, 4.10 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.07 (1H, s), 4.13 (1H, s), 4.52, 4.54 (2H, AB,  $J = 12$  Hz), 4.59, 4.63 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.70 (2H, s), 5.39 (1H, s), 5.45, 5.47 (2H, AB,  $J = 9.5$  Hz), 7.18–7.39 (15H, m), 7.54 (1H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.8, 13.7, 36.5, 62.4, 63.2, 70.1, 72.2, 72.3, 73.7, 76.7, 78.1, 85.4, 87.6, 109.8, 127.6, 127.6, 127.9, 128.1, 128.4, 133.8, 136.3, 137.4, 137.6, 150.5, 163.1, 170.1. MS (FAB):  $m/z$  612  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . HRMS (FAB): calcd for  $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 612.2710. Found: 612.2693.

(2'*R*)-3',5'-Di-*O*-benzyl-*N*<sup>3</sup>-benzyloxymethyl-2'-propylamino-2'-*N*,4'-*C*-oxomethylenethymidine (**2d**:  $R = n\text{Pr}$ ). By following the general procedure 1, using 1-bromopropane as an alkyl halide, **2d** was obtained in 76% as a white amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} +29.2$  ( $c$  1.000,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr): 3066, 3029, 2910, 2863, 1724, 1709, 1664, 1455, 1274  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0.93 (3H, q,  $J = 7.0$  Hz), 1.56–1.64 (2H, m), 1.64 (3H, s), 3.33 (2H, ddq), 3.95, 4.09 (2H, AB,  $J = 12$  Hz), 4.07 (1H, s), 4.13 (1H, s), 4.53 (2H, s), 4.59, 4.65 (2H, AB,  $J = 11.0$  Hz), 4.71 (2H, s), 5.40 (1H, s), 5.46 (2H, t,  $J = 9.5$  Hz), 7.19–7.37 (15H, m), 7.54 (1H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.1, 12.9, 21.9, 43.4, 62.9, 63.3, 70.2, 72.3, 72.3, 72.4, 73.8, 78.2, 85.3, 87.5, 109.8, 127.6, 127.6, 127.6, 127.7, 128.0, 128.2, 128.2, 128.2, 128.4, 133.8, 136.3, 137.4, 137.4, 137.7, 150.6, 163.2, 170.5. MS (FAB):  $m/z$  626  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . HRMS (FAB): calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 626.2866. Found: 626.2867.

(2'*R*)-3',5'-Di-*O*-benzyl-*N*<sup>3</sup>-benzyloxymethyl-2'-isopropylamino-2'-*N*,4'-*C*-oxomethylenethymidine (**2e**:  $R = i\text{Pr}$ ). By following the general procedure 1, using 2-iodopropane as an alkyl halide, **2e** was obtained in quant. as a white amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} +57.2$  ( $c$  1.000,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr): 3064, 3031, 2927, 2873, 1728, 1708, 1666, 1455, 1275  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.18 (3H, d,  $J = 7$  Hz), 1.31 (3H, d,  $J = 7$  Hz), 1.64 (3H, s), 3.94, 4.10 (2H, AB,  $J = 12$  Hz), 4.07 (1H, s), 4.28 (1H, s), 4.36–4.47 (1H, m), 4.50, 4.54 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.58, 4.63 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.71 (2H, s), 5.37 (1H, s), 5.46, 5.49 (2H, AB,  $J = 9.5$  Hz), 7.18–7.39 (15H, m), 7.54 (1H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.53 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.9, 20.6, 21.1, 42.6, 58.9, 63.2, 70.1, 72.2, 72.2, 73.7, 78.2, 86.1, 88.0, 109.6, 127.3, 127.4, 127.5, 127.6, 127.6, 127.9, 128.1, 128.2, 128.2, 128.4, 129.4, 133.8, 136.2, 137.4, 137.7, 150.5, 163.2, 169.4. MS (FAB):  $m/z$  626  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . HRMS (FAB): calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 626.2866. Found: 626.2869.

(2'*R*)-3',5'-Di-*O*-benzyl-*N*<sup>3</sup>-benzyloxymethyl-2'-benzylamino-2'-*N*,4'-*C*-oxomethylenethymidine (**2f**:  $R = \text{Bn}$ ). By following the general procedure 1, using bromomethylbenzene as an alkyl halide, **2f** was obtained in quant. as a white amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} +17.1$  ( $c$  1.000,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr): 3064, 3030, 2871, 1728, 1665, 1454, 1277  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.60 (3H, s), 3.98, 4.12 (2H, AB,  $J = 12$  Hz), 4.20, 4.26 (2H, AB,  $J = 11$  Hz), 4.21, 4.85 (2H, AB,  $J = 15$  Hz), 4.58, 4.65 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.67 (2H, s), 5.34 (1H, s), 5.39, 5.45 (2H, AB,  $J = 9.5$  Hz), 7.02–7.36 (20H, m), 7.48 (2H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.0, 45.1, 61.9, 63.2, 70.3, 72.3, 72.4, 74.0, 77.8, 85.0, 87.5, 109.9, 127.5, 127.7, 127.8, 128.0, 128.1, 128.1, 128.3, 128.4, 128.6, 128.6, 128.8, 133.9, 135.8, 136.2, 137.5, 137.8, 140.0, 150.5, 151.6, 163.3, 170.5. MS (FAB):  $m/z$  674  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

HRMS (FAB): calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 674.2866. Found: 674.2841.

(2'*R*)-3',5'-Di-*O*-benzyl-*N*<sup>3</sup>-benzyloxymethyl-2'-phenethylamino-2'-*N*,4'-*C*-oxomethylenethymidine (**2g**:  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ ). By following the general procedure 1, using 2-bromoethylbenzene as an alkyl halide, **2g** was obtained in 43% as a white amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} +0.2$  ( $c$  0.320,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr): 3029, 2930, 1722, 1701, 1667, 1453, 1274  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.62 (3H, s), 2.82–3.02 (2H, m), 3.52–3.75 (2H, m), 3.94, 4.08 (2H, AB,  $J = 12$  Hz), 4.02 (1H, s), 4.12 (1H, s), 4.44 (2H, s), 4.58, 4.63 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 4.70 (2H, s), 5.29 (1H, s), 5.44, 5.48 (2H, AB,  $J = 9.5$  Hz), 7.14–7.40 (20H, m), 7.49 (1H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.53 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.0, 34.7, 43.1, 63.3, 63.3, 70.3, 72.4, 72.5, 74.0, 78.3, 85.3, 87.5, 110.0, 126.7, 127.7, 127.7, 127.8, 128.1, 128.3, 128.3, 128.6, 128.6, 128.7, 133.9, 136.4, 137.5, 137.8, 137.9, 150.6, 163.3, 170.7. MS (FAB):  $m/z$  688  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . HRMS (FAB): calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 688.3023. Found: 688.3015.

**General procedure 2 (synthesis of compound 3).** To the solution of **2** (1.0 equiv.) in THF or methanol (0.1 M) was added 20% palladium on carbon (1.0 w/w) and the reaction vessel was degassed several times with hydrogen. The reaction mixture was stirred under a hydrogen atmosphere for 1–5 h at room temperature. After completion of the reaction, the reaction solution was filtered using filter paper and washed thoroughly with hot methanol. After evaporation of solvents, the product was dissolved with methanol (0.3 M) and 28% ammonia solution (0.3 M) was added and the solution was stirred at room temperature. After 5 min, the product was concentrated to afford **S1** as a white solid.

To the solution of **S1** in anhydrous pyridine (0.1 M) was added DMTrCl (1.3 equiv.) and the solution was stirred at room temperature. After stirring for 1–19 h, ice-cold water was added 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 = 1 : 1 or 1 : 3) to afford **3** as a white amorphous solid.

(2'*R*)-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-ethylamino-2'-*N*,4'-*C*-oxomethylenethymidine (**3c**:  $R = \text{Et}$ ). By following the general procedure 2, **3c** was obtained in 45% (for 2 steps) as a white amorphous solid.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +12.9$  ( $c$  1.000,  $\text{CHCl}_3$ ). IR (KBr): 3087, 2967, 2872, 1729, 1698, 1665, 1509, 1464  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.16 (3H, t,  $J = 7$  Hz), 1.62 (3H, s), 3.23–3.55 (2H, m), 3.63, 3.84 (2H, AB,  $J = 11.5$  Hz), 3.74 (6H, s), 4.10 (1H, s), 4.24 (1H, s), 4.51 (1H, s), 5.39 (1H, s), 6.79–6.83 (4H, m), 7.13–7.45 (9H, m), 7.81 (1H, s), 10.33 (1H, s).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.53 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 12.4, 13.4, 36.5, 55.1, 56.3, 64.9, 72.6, 85.3, 86.6, 88.8, 110.5, 112.9, 113.2, 127.0, 127.6, 127.8, 127.9, 129.0, 130.0, 135.1, 135.4, 144.3, 150.2, 158.4, 164.6, 170.5. MS (FAB):  $m/z$  636  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ . HRMS (FAB): calcd for  $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ : 636.2322. Found: 636.2312.

(2'*R*)-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-propylamino-2'-*N*,4'-*C*-oxomethylenethymidine (**3d**:  $R = n\text{Pr}$ ). By following the general

procedure 2, **3d** was obtained in 96% (for 2 steps) as a white amorphous solid.

$[\alpha]_D^{26} +33.1$  (*c* 1.000, CHCl<sub>3</sub>). IR (KBr): 3384, 3021, 2838, 1704, 1699, 1509, 1254 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.17 (3H, t, *J* = 7 Hz), 1.62 (3H, s), 3.34–3.58 (2H, m), 3.61, 3.90 (2H, AB, *J* = 12 Hz), 3.91–3.98 (2H, m), 3.88 (6H, s), 4.28 (1H, s), 4.53 (1H, d, *J* = 7 Hz), 5.50 (1H, s), 6.83–6.85 (4H, m), 7.23–7.36 (7H, m), 7.44 (2H, d, *J* = 7 Hz), 7.82 (1H, s), 9.40 (1H, s). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 11.2, 12.5, 21.7, 43.6, 55.2, 56.5, 65.2, 72.8, 85.2, 86.9, 88.6, 110.7, 113.3, 113.4, 127.1, 127.9, 128.1, 130.0, 135.1, 135.3, 144.3, 150.1, 158.6, 164.3, 170.6. MS (FAB): *m/z* 650 [M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>: 650.2478. Found: 650.2508.

(2′R)-5′-O-(4,4′-Dimethoxytrityl)-2′-isopropylamino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**3e**; *R* = *iPr*). By following the general procedure 2, **3e** was obtained in 78% (for 2 steps) as a white amorphous solid.

$[\alpha]_D^{23} -3.83$  (*c* 1.000, CHCl<sub>3</sub>). IR (KBr): 3366, 3190, 2968, 2836, 1704, 1686, 1509, 1249 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.17 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.28 (3H, d, *J* = 6.5 Hz), 1.69 (3H, s), 2.54 (1H, s), 3.59, 3.92 (2H, AB, *J* = 12 Hz), 3.77 (6H, s), 4.28 (1H, s), 4.28–4.37 (1H, m), 4.40 (1H, s), 5.37 (1H, s), 6.82–6.84 (4H, m), 7.20–7.36 (7H, m), 7.44 (2H, d, *J* = 7 Hz), 7.79 (1H, s), 9.65 (1H, s). <sup>13</sup>C NMR (100.53 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 12.5, 20.5, 21.1, 42.8, 55.2, 56.5, 61.5, 72.9, 86.0, 86.9, 89.2, 110.6, 113.3, 113.4, 127.1, 127.9, 128.1, 130.0, 135.2, 135.3, 144.4, 150.1, 158.6, 164.3, 169.4. MS (FAB): *m/z* 650 [M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>: 650.2478. Found: 650.2490.

(2′R)-5′-O-(4,4′-Dimethoxytrityl)-2′-benzylamino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**3f**; *R* = *Bn*). By following the general procedure 2, **3f** was obtained in 90% (for 2 steps) as a white amorphous solid.

$[\alpha]_D^{25} +3.8$  (*c* 1.000, CHCl<sub>3</sub>). IR (KBr): 3063, 2967, 2837, 1686, 1607, 1509, 1249 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.57 (3H, s), 3.67, 3.88 (2H, AB, *J* = 12 Hz), 3.74 (6H, s), 4.21 (1H, s), 4.44 (1H, s), 4.47, 4.52 (2H, AB, *J* = 15 Hz), 5.13 (1H, s), 6.79–6.83 (4H, m), 7.14–7.34 (7H, m), 7.39–7.44 (2H, d, *J* = 7 Hz), 7.74 (1H, s), 9.97 (1H, s). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 12.5, 45.6, 55.2, 56.5, 65.1, 72.4, 84.7, 86.8, 88.7, 110.6, 113.0, 113.3, 127.1, 127.9, 128.0, 128.7, 128.8, 130.0, 135.1, 135.2, 135.7, 144.3, 150.1, 158.6, 164.4, 170.7. MS (FAB): *m/z* 698 [M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>39</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>: 698.2478. Found: 698.2484.

(2′R)-5′-O-(4,4′-Dimethoxytrityl)-2′-phenethyl amino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**3g**; *R* = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph). By following the general procedure 2, **3g** was obtained in 84% (for 2 steps) as a white amorphous solid.

$[\alpha]_D^{21} +4.6$  (*c* 0.400, CHCl<sub>3</sub>). IR (KBr): 3190, 2958, 2929, 1721, 1694, 1672, 1509, 1270 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 1.67 (3H, d, *J* = 8.5 Hz), 2.93–3.01 (2H, m), 3.56–3.66 (1H, m), 3.58, 3.87 (2H, AB, *J* = 12 Hz), 3.81 (7H, m), 4.07 (1H, s), 4.22 (1H, m), 4.34 (1H, s), 5.30 (1H, s), 6.83–7.85 (4H, m), 7.16–7.54 (14H, m), 7.72 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.61 (1H, s). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13.0, 34.7, 43.1, 63.3, 63.3, 70.3, 72.4, 72.5, 74.0, 78.3, 85.3, 87.5, 109.9, 126.7, 127.7, 127.7, 127.8, 128.1, 128.3, 128.3, 128.6, 128.6, 128.7, 133.9, 136.4, 137.5, 137.8,

137.9, 150.6, 163.3, 170.7. MS (FAB): *m/z* 712 [M + Na]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>40</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Na [M + Na]<sup>+</sup>: 712.2635. Found: 712.2631.

**General procedure 3 (synthesis of compound 4).** To the solution of **3** (1.0 equiv.) in anhydrous MeCN–THF (3 : 1, 0.1 M) were added *N,N*-diisopropylammonium tetrazolide (0.75 equiv.) and 2-cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphorodiamidite (1.2 equiv.). After stirring at room temperature for 9 h–19 h, ice-cold water was added and the product was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with brine, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), and concentrated. The product was purified by flash column chromatography (0.05 eq. of triethylamine in *n*-hexane–ethyl acetate = 1 : 1) to afford **4c** (*R* = Et; 39 mg, 77%) as a white amorphous solid.

(2′R)-3′-O-[2-Cyanoethoxy(disopropylamino)phosphino]-5′-O-(4,4′-dimethoxytrityl)-2′-ethylamino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**4c**; *R* = Et). By following the general procedure 3, **4c** was obtained in 77% as a white amorphous solid.

M.p. 100–103 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–hexane). <sup>31</sup>P NMR (161.83 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 149.2, 150.3. MS (FAB): *m/z* 814 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 814.3581. Found: 814.3588.

(2′R)-3′-O-[2-Cyanoethoxy(disopropylamino)phosphino]-5′-O-(4,4′-dimethoxytrityl)-2′-propylamino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**4d**; *R* = *nPr*). By following the general procedure 3, **4d** was obtained in 88% as a white amorphous solid.

M.p. 83–86 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–hexane). <sup>31</sup>P NMR (161.83 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 149.8, 150.2. MS (FAB): *m/z* 828 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 828.3737. Found: 828.3745.

(2′R)-3′-O-[2-Cyanoethoxy(disopropylamino)phosphino]-5′-O-(4,4′-dimethoxytrityl)-2′-isopropylamino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**4e**; *R* = *iPr*). By following the general procedure 3, **4e** was obtained in 32% as a white amorphous solid.

M.p. 101–104 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–hexane). <sup>31</sup>P NMR (161.83 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 149.5, 151.3. MS (FAB): *m/z* 828 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>44</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 828.3737. Found: 828.3729.

(2′R)-3′-O-[2-Cyanoethoxy(disopropylamino)phosphino]-5′-O-(4,4′-dimethoxytrityl)-2′-benzylamino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**4f**; *R* = *Bn*). By following the general procedure 3, **4f** was obtained in 61% as a white amorphous solid.

M.p. 99–101 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–hexane). <sup>31</sup>P NMR (161.83 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 150.0, 150.2. MS (FAB): *m/z* 876 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>48</sub>H<sub>55</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 876.3737. Found: 876.3735.

(2′R)-3′-O-[2-Cyanoethoxy(disopropylamino)phosphino]-5′-O-(4,4′-dimethoxytrityl)-2′-phenethylamino-2′-N,4′-C-oxomethylenethymidine (**4g**; *R* = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ph). By following the general procedure 3, **4g** was obtained in 48% as a white amorphous solid.

M.p. 98–101 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–hexane). <sup>31</sup>P NMR (161.83 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 149.6, 150.8. MS (FAB): *m/z* 890 [M + H]<sup>+</sup>. HRMS (FAB): calcd for C<sub>49</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>P [M + H]<sup>+</sup>: 890.3894. Found: 890.3909.