

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(RNA 標的創薬技術開発)
研究開発中間進捗／成果概要報告書 (公開版)

令和5年9月12日

1. 公募研究開発課題名：核酸医薬品実用化のための製造及び分析基盤技術開発
2. 研究開発課題名：革新的次世代核酸医薬
3. 代表機関名：学校法人東京理科大学
4. 研究開発代表者名：和田猛
5. 所属・役職：薬学部・教授
6. 全研究開発期間：令和3年10月1日 ～ 令和8年3月31日 (予定)

【研究開発概要】

本研究の目的は、従来の核酸医薬よりも体内で安定であり、高い有効性を示し、かつ副作用が低減された新しい構造を有する革新的次世代核酸医薬の製造・精製・分析技術を総合的に開発することである。具体的には、①従来の核酸の合成法を刷新し、DNA やモルフォリノ核酸 (PMO) を効率的に合成可能な手法の確立と、PMO のリン原子修飾体、キラリティ制御体の合成法の開発 (革新的製造 G)、②ホスホロチオエート (PS) 核酸に代わる革新的核酸モダリティとして、ボラノホスフェート (PB) 核酸の製造法を確立し、さらに、そのリン原子のキラリティを制御した次世代型核酸医薬の実用化 (PB 核酸 G)、③革新的製造 G や PB 核酸 G で合成されたモノマーやオリゴマーの立体化学を含めた純度、同定を可能にする分析法の確立 (革新的分析 G)、を行う。

【研究開発中間進捗／研究成果概要】

製造 G では、DNA や RNA の効率的な新規合成法として、5'-ホスファイト法の開発を行った。本手法は無保護のヌクレオシドからわずか1工程で合成されるモノマーを用い、短工程での合成を可能にする。ホスファイトの保護基について検討を行い、容易に除去が可能で、かつモノマーが安定に単離可能な保護基の選定に至った。今後はオリゴマー合成を行う。さらに、*H*-ホスホネートモノエステル体をモノマーとする新たな PMO 合成手法について、本課題でその大スケール合成を試みたところ、2量体同士の縮合反応による4量体合成を極めて効率的に、かつグラムスケールで行うことに成功した。PMO に関し、新たなリン原子修飾体が合成可能な手法についても検討を行い、修飾体計7種を合成し、その化学的安定性や脂溶性から有望な修飾体を選定するに至った。今後はオリゴマーの合成を行う。リン原子のキラリティを制御した合成についても検討を行い、PMO のモノマーユニットとなるクロロホスホロアミデートモノマー体を97:3程度の立体選択性で合成することに成功した。

PB 核酸 G では、まずキラリティ制御型核酸オリゴマー (PB*-ASO) 合成について、DNA、LNA、MOE 修飾を有する様々な PB*-ASO の合成を目指した。固相担体、酸性活性化剤、溶媒、など種々の条件を最適化し、難易度の低い配列では PB*-ASO を1mg以上取得することに成功した。一方で特定の塩基配列において著しく縮合効率が低下することが認められた。その改善策として新規モノマー分子を開発し、これを用いることで高難度配列でも高い縮合効率が得られた。これらの条件改良により、複数の配列で *in vivo* の PB*-ASO の合成を達成し、また PB*-ASO の *in vitro* 評価及び *in vivo* 試験を実施した。キラリティ非制御 PB-ASO 合成も検討を行い、本事業にて初めて自動合成機を用いた PB-ASO に成功した。PB/PS/PO 修飾を同時に有するキメラ核酸の合成についても検討を行い、DNA と 2'-OMe-RNA から成る12量体の PB/PS/PO キメラ核酸の合成に成功した。

分析 G では、和田が開発した合成法で得られるオリゴマーの精密な分析法、純度検定法の確立を目的に、キラリティ非制御の12塩基の PB/PS/PO 核酸検体を用いて各種分離法の検討を実施し、1塩基欠損体を含む種々の不純物を分離可能な HPLC 分析法を確立し、PB 核酸の0.1%水準の不純物検出が可能であることを確認した。また、PB 核酸の両立体化学のダイマーおよびトリマーについて、¹⁰B 標識や ¹¹B, ³¹P, ¹H の三重共鳴プローブを用いた NMR スペクトルの解析により、立体異性体の不純物を検出する方法を確立した。さらに、PO/PB オリゴマーの精密質量分析衝突誘起解離 (CID) 解析により、PB 修飾部位および塩基配列を正確に同定可能であることを立証した。¹⁰B および重水素標識を用いて PB 修飾オリゴマーの立体異性を同定する系を確立した。これにより、望ましい性質を有するアンチセンス核酸のリン原子修飾の立体化学の組み合わせを決定することが可能になると期待される。