

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業  
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) デリバリーと安全性を融合した新世代核酸医薬プラットフォームの構築  
(英語) Development of a new generation platform for oligonucleotide therapeutics that combines  
delivery and safety

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 小比賀 聡  
(英語) Satoshi Obika

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 大阪大学・大学院薬学研究科・教授  
(英語) Osaka University・Graduate School of Pharmaceutical Sciences・Professor

## II 研究開発の概要

### 日本語版

#### 1. はじめに

核酸医薬は標的とする遺伝子の発現を RNA レベルで制御できるという特徴から、難治性疾患に対する新たな治療法として期待されている。この数年は毎年複数の核酸医薬が承認されるなど、活発な研究開発が進められているが、臨床応用の最大化を図るために解決すべき課題として「デリバリー技術の整備」と「安全性の確保」が顕在化してきている。本研究開発課題では、これまでに開発してきた2つの要素技術：①有効性を高める修飾核酸技術（糖部修飾）、②安全性を高める修飾核酸技術（塩基部・糖部修飾）に加え、新たに2つの要素技術：③標的組織を拡大するコンジュゲート技術、④安全性を担保する毒性低減技術・評価技術の開発を行い、「ヒトでの安全性を最大限確保し、且つ、肝臓以外の組織で有効性を示すアンチセンス核酸」を創製するためのプラットフォーム技術の構築に取り組んできた。

具体的には、次の4つの研究開発項目（以下、項目）を有機的に連携しながら、目標達成に向けて研究開発を実施してきた。項目1では、リガンド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート（以下、コンジュゲート体）の合成に取り組んできた。リガンドとオリゴヌクレオチドを繋ぐリンカー構造の最適化に加え、人工核酸そのものの構造最適化にも取り組んできた。項目2では、合成したコンジュゲート体に対して、各種臓器・組織由来の細胞パネルを用いた *in vitro* 活性評価を行い、良好な成績を与えたコンジュゲート体に対して *in vivo* での活性並びに動態解析を実施した。項目3では、pre-mRNA データベースとアレイデータに基づき、オフターゲット毒性のリスクを最小化する *in silico* 技術を確立するとともに、ヒト肝キメラマウスを用いた毒性評価法を構築してきた。項目4ではプラットフォーム技術の総合評価として疾患モデル動物等に対する治療効果検証・安全性評価を実施した。以下、各項目における成果をまとめる。

#### 2. 研究成果

##### 2-1. コンジュゲート体の合成並びに人工核酸の開発（項目1）

標的 RNA 発現抑制効果を持つアンチセンスオリゴヌクレオチド（以下、ASO）に様々なリガンドをコンジュゲートさせ、コンジュゲート体のライブラリを作製した。令和元年度末までに、アミンとカルボン酸の縮合反応を基盤とするコンジュゲート方法に関して、反応条件の最適化、精製方法の確立、スケールアップ合成法の確立を達成した。同様に、アジドとアルキンの環化付加反応（クリック反応）を基盤とするコンジュゲート方法についても技術確立に成功した。これらの方法を基盤として、研究開発期間終了時（令和5年度末）までに *in vitro* 用コンジュゲート体 823 検体、*in vivo* 用コンジュゲート体 151 検体の合成に成功した。なお、コンジュゲート効果の検証や更なる活性向上を期待し、配列やリンカー構造を変化させたものについても合成を行ってきた。また、ヒットした有力リガンドに関して、類似構造を持つ誘導体を種々合成し、コンジュゲート化を実施してきた。さらに、リガンド分子の誘導化に特化した技術として、多成分連結反応である Ugi 反応を利用したコンジュゲート体の合成方法も確立した。前述の検体数には、これらのようなコンジュゲート体が含まれる。

また、毒性や肝臓集積に関与すると考えられるホスホロチオアート（PS）修飾の回避を目的として、新規人工核酸 11 種類の設計を行い、その合成を達成した。得られた人工核酸を搭載したオリゴ核酸について酵素分解耐性能や二重鎖形成能を評価し、10 種類に優れた基礎物性を見出した。また、特に優れた基礎物性が確認できた新規人工核酸に関して、ASO への導入を行い、導入箇所の脱 PS 化を実施した。結果として、PS 修飾を部分的に排除しても *in vivo* での活性は維持することが明らかになった。さらに、肝毒性に関しても、新規人工核酸の搭載によって低減できることが明らかになった。

## 2-2. 細胞パネルを用いた *in vitro* 活性評価並びに *in vivo* 活性・動態評価 (項目 2)

*In vitro* 活性評価については、ルシフェラーゼの発光強度を指標にしたスクリーニング系を構築し、2-1. で合成された 752 検体について、*in vitro* 活性評価に適した条件を用いて、由来臓器の異なる 10~11 種類の細胞株からなる細胞パネルに対する *in vitro* 活性評価 (1<sup>st</sup> SCR) を実施した (7,912 種類の組み合わせ)。その際、トランスフェクション試薬を用いて未修飾の ASO を導入した場合のルシフェラーゼ活性値を指標にクライテリアを設定した。その結果、活性の向上が見込める細胞-リガンド (検体) の組み合わせを 742 種類見出した。その後、再現性、濃度依存性等を検証し (2<sup>nd</sup> SCR)、未修飾の ASO よりもアンチセンス活性が向上する 88 検体 (144 通りの組み合わせ) を見出した。また、特に活性向上効果が高かったリガンドの妥当性を検証したところ、ルシフェラーゼ活性 (発光強度) だけでなく mRNA やタンパク質の発現量においてもリガンド単体では効果がなく、アンチセンス核酸とコンジュゲートすることで初めてアンチセンス活性が向上することを明らかにした。

*In vivo* 動態評価については、ASO の標的遺伝子を ncRNA である *Malat1* とし、ミリグラムスケール合成されたコンジュゲート体を BALB/c マウスに尾静脈投与し、投与 72 時間後の 12 臓器 [肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、心臓、肺、胃、大腸、脳、骨格筋、乳腺 (脂肪) および皮膚] における *Malat1* 発現量を定量的 RT-PCR により解析し、コンジュゲート体の *in vivo* における活性を評価した。投与検体は前述の *in vitro* 活性評価において有意な活性上昇を示したリガンドに加え、物性や生体内動態が明らかであらかじめ活性が見込まれるリガンドを含んだ。研究開発期間終了時までマウスに投与した検体数は、リンカー構造の違い等を含めコンジュゲート体としてのべ 158 検体に達し、このうち未修飾 ASO に対して有意に活性が向上した 31 検体を見出し、さらに 8 リガンド 9 検体については脳や脾臓、骨格筋等への臓器移行性に関して再現性が認められた。

## 2-3. 毒性低減技術・評価技術の開発 (項目 3)

毒性低減技術に関しては、ASO の配列設計において、①ASO との相補結合部位にミスマッチだけではなく、インサクションやデリーションを有するオフターゲット候補遺伝子 (pre-mRNA) を検索すること、②オフターゲット候補遺伝子の数が少なく、また、リスク遺伝子に可能な限りヒットしない配列を選択すること、③CMC やコストの観点から問題にならない範囲で塩基長を長めに設計することがオフターゲット毒性の低減に重要であることを見出した。本知見に基づき、*in silico* 毒性低減技術を開発した。毒性評価技術に関しては、肝臓がヒト肝由来細胞に置き換わったヒト肝キメラマウスを用いた肝毒性評価系を構築した。本評価系の妥当性の検証として、*in silico* 毒性低減技術を応用して設計した「マウスにおいてオフターゲット効果の影響が小さく、ヒトでオフターゲット効果の影響が大きいと考えられるアンチセンス」、および「臨床試験段階で肝毒性が生じたアンチセンス」を通常マウスとヒト肝キメラマウスに投与し肝毒性を評価したところ、ヒト肝キメラマウスのみで肝毒性を誘導することを見出した。以上から、本評価系が通常の動物を用いた非臨床試験では検知できず、ヒトにおいて初めて生じる肝毒性の発現を予測できる有用な予測・評価系であることが明らかとなった。

## 2-4. プラットフォーム技術の総合評価 (項目 4)

肝線維化や難治性がん、多系統萎縮症、成人 T 細胞白血病 (ATL) をモデルとして、プラットフォーム技術の総合評価を実施した。

[肝線維化] 標的遺伝子に対する ASO を *in vitro* においてスクリーニングし、最も効果的な抑制効果を示す ASO を選別した。その後、この ASO を NASH により肝臓の線維化を呈するマウスに投与したところ、肝臓において標的遺伝子の発現が抑制されるとともに、コラーゲンなどの線維化関連因子の発現も抑制されることを見出した。

[難治性がん] 難治性がんの治療を目的として、新規に合成した Ar14c ASO について、*in vitro* の free-uptake 法を用いた評価により、発現抑制効率が特に高い 3 種類の Ar14c ASO を選定した。そのうちの 1 種類の ASO について、*in vivo* の腫瘍モデルにおいて、既存の Ar14c ASO よりも高い発現抑制効果が確認された。新規配列の投与によって組織学的または血液学的な評価による明らかな肝毒性は認められなかった。腫瘍内 ASO の動態を評価

したところ、ELOSA 法にて新規配列は既存配列と同等以上の腫瘍移行性が認められた。

[多系統萎縮症] 多系統萎縮症を標的とした技術応用では、プラットフォーム技術と得られた最新知見に基づき塩基長を設定した $\alpha$ シヌクレイン抑制 ASO と種々の誘導体を合成し、*in vitro*, *in vivo*での有効性・安全性評価を実施した。この過程で得られた知見に基づき合成した ASO の誘導体において、マウスへの脳室内投与で目標と設定していたレベルの標的発現抑制を確認した。

[成人 T 細胞白血病] ATL 細胞で恒常的に発現する HBZ RNA を標的とする ASO の開発を行い、これまでに RNA 分解能及び転写機能抑制能を指標にスクリーニングを行った。分解活性が高い ASO を数種類同定し、これらに関してさらに最適化を行い、活性の高い ASO を取得した。ATL 細胞株への ASO 導入方法の検討を行い、導入効率を促進する添加化合物、抗体コンジュゲート ASO、化合物コンジュゲート ASO の有効性が示唆された。

### 3. 技術導出について

本研究開発成果に対して、独自に最適化した方法に基づく先行技術調査・FTO 調査を実施した。本研究開発成果に関し、新規人工核酸群について 6 ファミリの特許出願 (PCT 出願) を、また本事業内連携の成果をもとに 1 ファミリの特許出願 (国内出願) を行った。リガンド技術については 1 ファミリの特許出願 (国内出願) を行った。さらに連携企業に対する報告会、非連携企業に対する個別報告会を実施した。これらの導出活動を通じて、本事業期間内に 2 件の企業導出を達成した。

### 4. おわりに

本研究開発課題で構築してきたプラットフォーム技術は、「デリバリー」や「安全性」の観点で、様々なアンチセンス核酸に対して適用可能な汎用性の高いプラットフォーム技術である。これらの技術によって、これまで標的とすることが困難であった各種臓器・組織での核酸医薬開発が可能となり、多くの難治性疾患に対する治療の道を拓く大きな一歩となることが期待される。また、本研究開発課題で創出した毒性低減・評価技術は、開発段階でのドロップアウトを抑えるものであり、これらは標的組織に関わらず核酸医薬品の創出を広く下支えする基盤技術として極めて重要なものであり、我が国の創薬産業の活性化に大きく寄与するものと考えられる。

## 英語版

### 1. Introduction

Oligonucleotide therapeutics control gene expression at the RNA level and are expected to treat refractory diseases. However, delivery technology and ensuring safety have become challenges. In this research, we developed chemical modification technology, as well as ligand conjugation technology and toxicity reduction technology, to establish a platform for creating "antisense oligonucleotides that ensure safety in humans and exhibit efficacy in organs other than the liver."

### 2. Results

#### 2-1. Synthesis of conjugates and development of novel artificial nucleic acids

Successful synthesis of conjugates by conjugating ligands to antisense oligonucleotides (ASOs) was achieved, and their efficacy was confirmed *in vitro* and *in vivo*. In the development of novel artificial nucleic acids, efforts were made to avoid phosphorothioate (PS) modification, evaluating nuclease resistance and duplex-forming ability. ASOs modified with novel artificial nucleic acids remained efficacy even with partial removal of PS modifications, leading to reduced hepatotoxicity.

#### 2-2. *In vitro* activity evaluation using cell panels, *in vivo* activity, and pharmacokinetics

We conducted *in vitro* activity evaluations on 10-11 different cell lines from various organs using a luciferase luminescence-based screening system and identified 742 combinations of cell-ligand with potential activity enhancement. Additionally, we analyzed the *in vivo* activity of conjugates administered to BALB/c mice, revealing that 31 samples exhibited significantly enhanced activity compared to unmodified ASO, and 8 ligands across 9 samples showed reproducible organ specificities.

### 2-3. Development of toxicity reduction and evaluation technologies

Through ASO sequence design, we have identified strategies for reducing off-target toxicity. Additionally, we have developed *in silico* toxicity reduction technologies and established a new evaluation system using human liver chimeric mice for hepatotoxicity assessment. This evaluation system has proven to be a valuable method for predicting hepatotoxicity in humans, undetectable in conventional animal tests.

### 2-4. Evaluation of the platform technologies

The platform technologies were evaluated using models of liver fibrosis, refractory cancers, multiple system atrophy (MSA), and adult T-cell leukemia (ATL). For liver fibrosis, ASOs targeting specific genes were screened *in vitro*, with the most effective ones selected. When administered to mice with liver fibrosis, these ASOs not only suppressed the expression of target genes but also inhibited the expression of fibrosis-related factors like collagen. For refractory cancers, highly efficient *Arl4c* ASOs were selected via *in vitro* evaluation, with one showing superior suppression *in vivo* compared to previously discovered ASOs, without apparent hepatotoxicity. The levels of ASOs within tumors were assessed, revealing equal or greater tumor penetration compared to existing sequences. For MSA, ASOs targeting  $\alpha$ -synuclein were synthesized based on platform technologies, demonstrating target suppression upon intracerebroventricular administration in mice. For ATL, ASOs targeting *HBZ* were developed and optimized based on their RNA degradation and transcriptional inhibition abilities. Several high-activity ASOs were identified and further optimized to enhance efficacy.

### 3. Licensing-out of the platform technologies

We conducted surveys and FTO investigations. We filed six patent applications for the novel artificial nucleic acids and one patent application based on collaborative achievements. Additionally, one patent application was filed for the ligand technology. We also held closed meetings with collaborating companies and individual closed meetings with non-collaborating companies. Through these activities, we successfully licensed our technologies to two companies within the project period.

### 4. Summary

The platform technologies developed in this project facilitate the development of oligonucleotide therapeutics for challenging diseases in various organs and tissues. Additionally, the toxicity reduction and evaluation technologies are essential for minimizing dropouts during the development of oligonucleotide therapeutics. These platform technologies will greatly contribute to the revitalization of drug development.