

日本医療研究開発機構
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)
事後成果報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）革新的次世代核酸医薬
（英語）Innovative Next-Generation Oligonucleotide Therapeutics

研究開発実施期間：令和 3 年 10 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）和田 猛、原 倫太郎、坂本 泰一
（英語）Takeshi Wada, Rintaro Hara, Taiichi Sakamoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）学校法人東京理科大学東京理科大学薬学部・教授、国立大学法人東京科学大学・国際医工共創研究院
核酸・ペプチド創薬治療研究センター・特任准教授、学校法人千葉工業大学・先進工学部生命科学科・教授（英
語）Tokyo University of Science・Faculty of Pharmaceutical Sciences・Professor、Institute of Science
Tokyo・Nucleotide and Peptide Drug Discovery Center・Project Associate Professor、Chiba Institute of
Technology・Faculty of Advanced Engineering・Professor

II 研究開発の概要

【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 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)、を行った。

【研究成果概要】

① 革新的製造 G の研究成果概要

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。これまでにホスファイト部位の保護基の検討を行い、縮合反応、精製条件で安定でかつ容易に脱保護可能な保護基を見出した。こ

の保護基を用いたホスファイトは位置及び化学選択的に5'水酸基へと導入することが可能で、5'-ホスファイトモノマーを効率的に合成することに成功した。このモノマーを用いて4量体を合成し、4量体同士を縮合することで最長8量体を合成することに成功した。現在特許出願準備中である。

アンチセンス核酸として優れた性質を有するPMOは、現在リン原子の酸化数が+5のモノマーを用いて製造されているが、反応性が低いために縮合反応に長時間を要することが問題となっていた。そこで本課題では、反応性の高いリン原子の酸化数が+3の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合成手法について検討を行った。縮合反応に要する時間は20分と短時間で鎖長伸長が可能であり、オリゴマー同士を反応させることで最長20量体を効率的に合成することに成功した。現在特許出願準備中であり、関連する成果を論文発表している。

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、種々リン原子修飾体を合成した。これらの化学的安定性と細胞膜透過性の指標となる脂溶性を評価し、両者の面で有望な化学修飾体を選定した。さらに、選定した修飾体を最長20量体の合成に成功した。関連する特許出願を完了している。

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、オキサザホスホリジン法を用いることで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最大で97:3の立体選択性で合成することに成功した。関連する特許出願を完了し、学術論文がThe Journal of Organic Chemistry誌に受理された。

② PB核酸グループの研究成果概要

以後、キラリティ制御されたPBアンチセンス核酸をPB*-ASO、制御されていないものをPB-ASOと表記する。

PB*-ASOの合成について、まずモノマーの合成法の改良により、DNA、LNA、MOEモノマーを常時供給可能となった。DNA、LNAモノマーに比べてMOEモノマーは合成難易度が高かったが、合成・精製工程の検討によりいずれも純度90%以上で供給できた。次に、モノマーの縮合反応の条件検討を行い、縮合効率が顕著に向上する条件を見出した。また、G誘導体の縮合効率が低下する原因を解明し、G塩基に適切な保護基を導入することにより縮合効率が大幅に改善する手法を見出した。本内容を特許出願することができた。上記の改善された合成条件を用いて、*in vitro*量、マウス *in vivo*量のPB*-ASO計20種以上（8種の立体化学パターンの13、14、18量体）の合成を達成した。さらに、OligoPilot機を用いた大スケール合成を検討し、合成・精製条件検討とスケールアップに課題のあった反応について、安全かつ穏和に実施可能な条件を見出し、短鎖PB*核酸について0.2 mmolへのスケールアップを達成した。さらに、16量体程度のMOE修飾型PB*核酸の0.2 mmol以上のスケールでの合成を行い、目的のPB*核酸を取得できた。また、PB*-ASO分析検討の過程で、PB*-ASO合成時に生じる立体異性体の分離に有効なHPLC分析・精製法を見出した。逆相系を元にしつつ従来と異なる溶出溶媒を用いることでわずか1か所のキラリティが異なるオリゴマーを効率的に分離可能であり、特許出願に至った。また、蛍光偏光を利用したPB核酸とタンパク質との相互作用の結合評価試験系を構築し、アッセイ評価した結果、PB核酸は立体を制御することで、タンパク質への結合親和性の強弱をコントロールできることが明らかとなった。合成したPB*-ASOの*in vitro*、*in vivo*試験を実施し、活性や安全性など各種性質を評価し、マウス *in vivo*試験の結果を元に、カニクイザル試験に用いるPB*-ASO配列、キラリティパターンを選定して、PB*-ASOのカニクイザル試験を完了した。

生物評価試験のコントロールとして用いるPB-ASOの供給のため、Hボラノホスホネート法によるPB-ASOの自動合成機での合成を検討した。従来の手動固相合成法から各種反応条件を改良することで核酸自動合成機での製法を確立し、複数のDNA及びMOE修飾型PB-ASO（18量体）の安定的な合成・供給体制を構築した。一方でPB*-ASOではOligoPilot機を用いた大スケール合成を検討した。合成・精製条件検討とスケールアップに課題のあった反応について、安全かつ穏和に実施可能な条件を見出し、MOEを含んだ3mer~16merのPB*核酸について0.2 mmolへのスケールアップを達成した。

キメラ型核酸のテーマでは、*H*-ボラノホスホネート、*H*-ホスホノチオエートモノエステル体をモノマーとして用いて、インターヌクレオチド結合として対応するジエステル結合を形成しながら鎖長伸長し、最後に一括で酸化してボラノホスフェート (PB)、ホスホロチオエート (PS) 結合へと変換する手法により、PB/PS キメラ型核酸の合成を行った。固相担体、縮合条件について詳細に検討することで、縮合効率の向上に成功した。さらに、インターヌクレオチド結合の変換反応に関しても、分解を伴うことなく PB、PS 結合へと変換可能な条件を見出した。PB/PS キメラ型核酸の精製時に、PS 結合が PO 結合となる脱硫体が生成し、これを目的物と分離することが大きな課題となったが、精製に用いる UPLC のカラムの種類や溶離液条件、脱硫を防ぐ添加剤の検討により、目的物を純度よく得ることが可能になった。さらに、オリゴマーの自動合成を、市販されている核酸自動合成機に適用することが可能となった。これらの検討を踏まえ、課題開始時には 12 量体が最長の合成例であったが、最終的には 2'-*O*-MOE 修飾を含むギャップマー型のオリゴマー 20 量体を単離収率 1.2%、3 種の手法で分析した結果、純度 91%以上で得ることに成功した。

③ 分析グループの研究成果概要

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、純度検定法の確立が急務である。そこで、新規モノマーやオリゴマーの高度な分離・分析を可能とする新規技術を開発した。特に、キラリティ制御核酸の分離・分析法を確立した。精密質量分析と NMR を駆使してキラリティ制御核酸の構造決定法や純度検定法、立体化学の最適化手法の開発を行った。

(1) 「HPLC 分析」

はじめに、キラリティ制御型核酸の重要中間体である各種モノマーに関して、立体異性体を分離可能な試験法の開発及び純度確認を行った。複数種の分析用カラムを検討した結果、イオン交換性を有するキラルカラムを用いることで、オキササホスホリジンモノマー、*H*-ホスホノチオエート及び *H*-ボラノホスホネートの各立体異性体を完全分離可能な系を確立した。次にキラリティ非制御型 PB 核酸を用いて、1 塩基欠損体の分離条件を検討し、逆相イオンペアとイオン交換の複数試験法で 0.1%水準の不純物検出が可能な試験法を開発した。イオン交換法では逆相イオンペアと組み合わせた 2D-HPLC 法を開発したことで、通常質量分析に導入できない不揮発性塩を含む移動相を用いる質量分析を可能とした。さらに、キラリティ制御型 PB 核酸を用いて立体異性体を分離可能な試験法の開発を行った結果、イオン交換法とキャピラリーゲル電気泳動法が PB 核酸の立体異性体分離に優れることを見出した。さらに、開発した試験法についてガイドラインに準拠したバリデーション試験を実施した。その結果、本試験法は 0.1%不純物に対する十分な検出感度と良好な直線性 (相関係数 $R = 0.999$) を示した。加えて、立体異性体および 1 塩基欠損体に対する分離度はいずれも 1.5 以上であったことから、本試験法は分析法として妥当であると判断した。

(2) 「NMR 分析」

PB 核酸は、新たなモダリティとして注目されるものの、その絶対立体配置の決定や、純度検定に関する知見は少ない。そこで NMR を駆使して、その絶対立体配置の決定や、立体化学純度検定手法を確立することを目的とした。はじめに、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、 ^{10}B 標識や ^{11}B , ^{31}P , ^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、 BH_3 に由来するシグナルを先鋭化することに成功し、立体異性体の不純物を検出する方法を確立した。さらに、PB 核酸を含む 12 量体についても、両立体異性体を区別して分析することに成功した。次に対象をモルフォリノ核酸として、NMR を用いた絶対立体配置の決定および立体化学純度検定手法の検討を進めた。ダイマーについて、NOESY、TOCSY、 ^1H , ^{13}C -HSQC スペクトルを測定し、NMR シグナルを帰属した。NOESY スペクトルにより絶対立体配置を決定し、ホスホロジアミデート部位の両立体異性体間における化学シフトの違いを明らかにした。さらに、PMO のリン原子の絶対立体配置の決定をおこなった。また、モルフォリノ核酸を 1 残基含む 12 量体について NMR 解析し、モルフォリノ核酸の近傍のイミノプロトンシグナルが、大きくシフトすることを明らかにした。

(3) 「立体化学最適化」

本事業ではリン原子修飾核酸の立体化学を制御する合成法と、安定同位体標識を組み合わせ、有効なアンチセンス核酸のリン原子の立体化学の組み合わせを決定する手法の開発を目指している。はじめに PO/PS 修飾および PO/PB 修飾オリゴマーの精密質量分析により、塩基配列およびリン原子修飾を正確に同定可能な手法を確立した。次に ^{10}B 濃縮 PB 修飾および立体化学と紐づいた重水素標識塩基が導入されたオリゴマーの衝突誘起解離 (CID) スペクトルから、重水素標識塩基の導入部位を含めた塩基配列を正確に決定することで、立体化学が制御されたオリゴマーの立体化学の決定に成功した。また重水素標識塩基の導入部位が異なる ^{10}B 濃縮 PB 修飾オリゴマーの混合物から特定の立体化学を持つオリゴマーの定量的な特定に成功した。さらにオリゴマーの立体異性体の混合物からエンドヌクレアーゼ分解耐性の高い立体化学を持つオリゴマーの選択的な特定に成功したことにより、望ましい性質を有するリン原子修飾の立体化学の組み合わせが決定可能なことを実証した。さらに、立体化学が制御された 4mer PB 核酸を対象にしたイオンモビリティシフト (IMS) 測定結果を用いることで、4merPB 核酸の絶対立体配置を決定できることを示した。

英文：

<Manufacture Group>

A 5'-phosphite method uses a nucleoside 5'-phosphite derivative as a monomer unit which is synthesized from an unprotected nucleoside only 1 step. We have developed a new phosphite protecting group which is stable under condensation reaction and purification conditions while easily removed under deprotection conditions. Using a nucleoside 5'-phosphite derivative having the new protecting group, tetramers were successfully synthesized. Additionally, an octamer was obtained via a condensation reaction between two tetramers.

For the synthesis of PMOs, a P(V) derivative is used as a monomer unit, but the condensation reaction takes a long time owing to the low reactivity of the monomer unit. In this research, a 5'-*H*-phosphonate monoester nucleoside, which is a P(III) derivative, was used as a monomer unit. The reaction time of the condensation reactions was reduced to only 20 min, and PMOs up to icosamer were successfully synthesized in a highly efficient manner.

To improve the properties of PMOs, a variety of *P*-modified PMOs were synthesized, and their chemical stability and lipophilicity were evaluated. From this investigation, we found a promising modification and obtained oligomers up to icosamer.

Stereocontrol of phosphorus stereochemistries would be an effective strategy to improve the properties of PMOs. Using a 5'-oxazaphospholidine derivative, dimethylamino phosphorochloridate monomers were synthesized in a highly stereoselective manner.

<PB-ASO Group>

※PB-ASO: stereorandom boranophosphate ASO, PB*-ASO: stereopure boranophosphate ASO

For the synthesis of PB*-ASO, all of the steps, including monomer preparation, coupling reactions, boronation, and purification, were fully optimized. As a result, PB*-ASOs for both *in vitro* and *in vivo* studies were successfully synthesized for multiple sequences. Furthermore, large-scale synthesis using OligoPilot was investigated and coupling steps were examined and a 0.2 mmol scale of short-chain PB*-ASO was synthesized. In addition, protein-PB oligonucleotide binding assay system was established using Fluorescence Polarization, and a novel separation method useful for the stereoisomers of PB*-ASOs was developed. Through these experiments, the effect of the chirality patterns of PB*-ASOs on various biological properties was studied. To supply PB-ASOs (stereorandom type), the automated synthesis of PB-ASOs using the *H*-boranophosphonate method was investigated and

the synthesis of a 18-mer PB-ASO was achieved. For the synthesis of chimeric oligonucleotides bearing both boranophosphate (PB) and phosphorothioate (PS) linkages, the *H*-boranophosphonate and *H*-phosphonothioate methods were applied for an automated synthesizer. 2'-*O*-MOE gapmers were successfully synthesized up to 20mer.

<Analytical group>

We developed analytical methods for both monomers and oligomers of stereo-controlled PB nucleic acids. For monomers, ion-exchange chiral columns enabled complete stereoisomer separation. For oligomers, reversed-phase ion-pair-RP, ion-exchange, and CGE techniques, including 2D-HPLC, allowed impurity detection and stereoisomer analysis.

Using NMR, we determined the stereochemical configuration of boranophosphate oligodeoxynucleotides and phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides and established a method to analyze their stereochemical purity.

We established an LC/MS method to identify the sequence of boranophosphate (PB)-modified oligodeoxynucleotides (ODNs) and the stereochemistry of PBs from collision-induced dissociation spectra, enabling the determination of a nuclease-resistant stereoisomer in PB ODN mixtures. Moreover, we demonstrated the ability to discriminate the stereoisomers of short PB ODNs by ion mobility shift measurements.