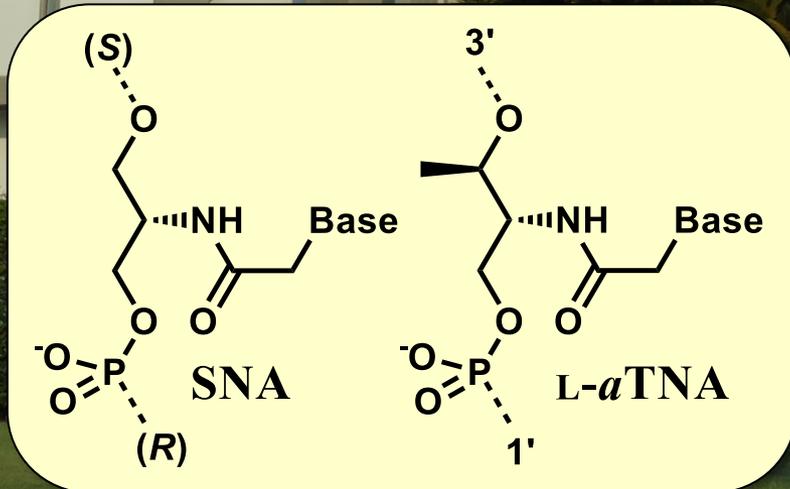


# 新たな創薬モダリティとしての非環状型人工核酸



名古屋大学大学院工学研究科

浅沼浩之



# 中分子医薬品としての核酸医薬

RNA

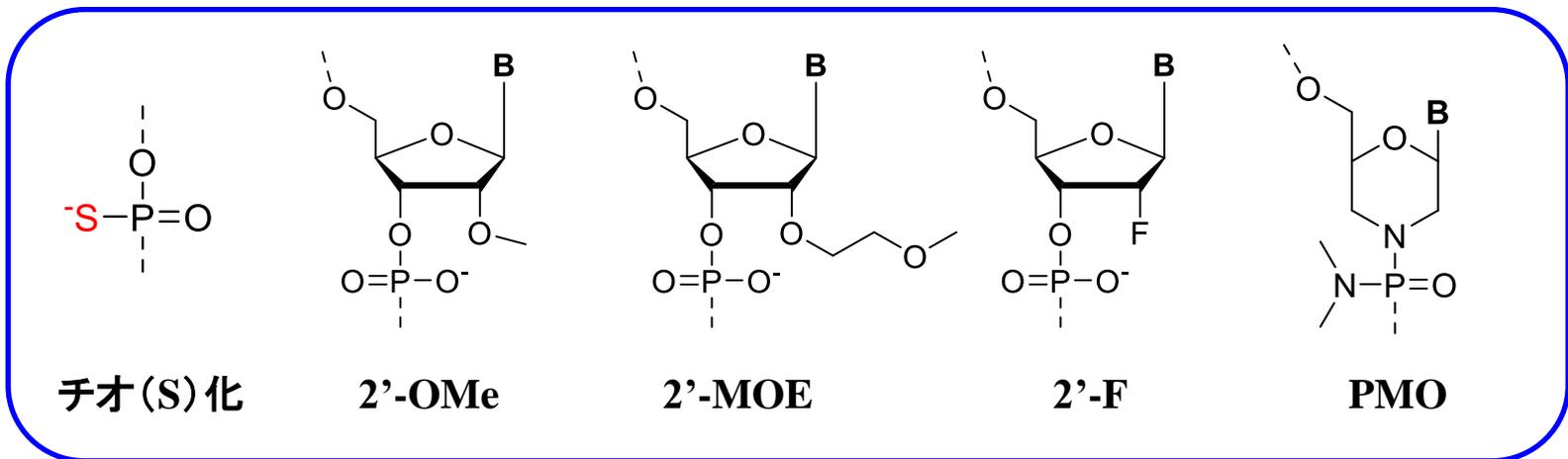
アンチセンスオリゴ (ASO)

2022年6月時点で、16種類の核酸医薬が承認 (2016年以降で13種類が承認)

出典: 国立医薬品衛生研究所; <http://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section2-1.pdf>

- 酵素耐性(安定性)の確保
  - 毒性の回避と活性向上の両立
- ➡ 人工核酸が必須

上市された核酸医薬で使用されている人工核酸



様々な新規モダリティが開拓されている。



# 作用機序による核酸医薬の分類

## 1. Gapmer型アンチセンスオリゴ (ASO)



RNase H依存的  
(catalytic にASOが機能)

## 2. Full-XNA (ASO)



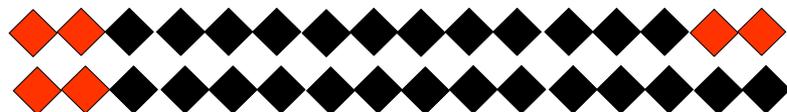
RNase Hによる切断が使えない場合  
(miRNA, Exon skipping)

## 3. siRNA



ASOより低濃度で効果がある

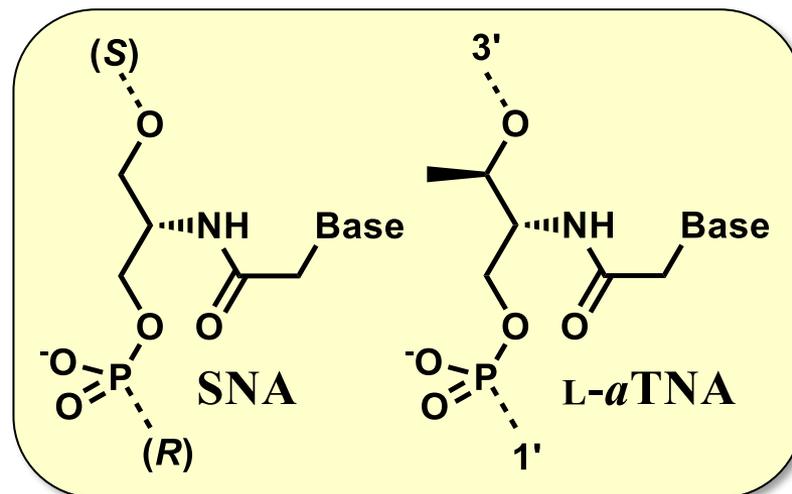
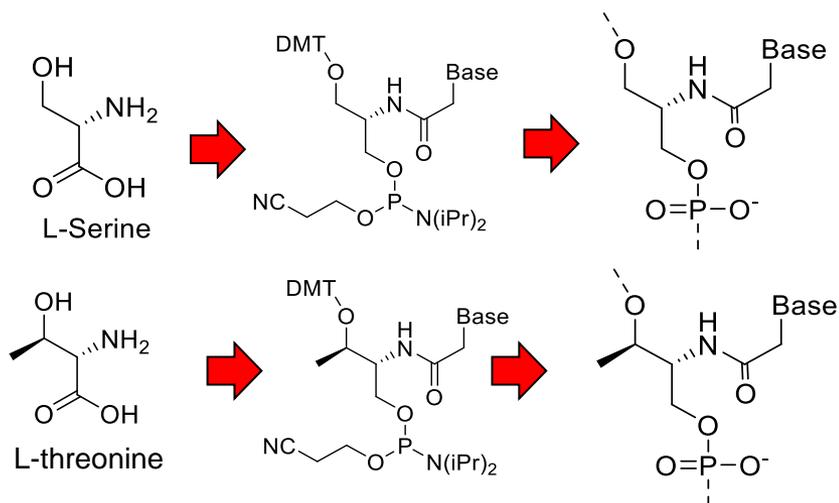
## 4. miRISC供給



siRNAと同じ設計  
RNAi machineryを使用して、  
ガイド鎖(miRNA)を供給



# 当研究室が開発した、アミノ酸由来の非環状型人工核酸



*Chem. Eur. J.*, 2013, 19, 14151-14158.

*J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 14702-14703.

*Chem. Commun.*, 2015, 51, 6500-6503. (Cover)

*Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 1285-1288. (VIP)

## 特徴

0. 核酸化学の従来の常識を覆す全く新たなコンセプトの人工核酸
1. 極めて高い生体内での安定性(酵素耐性)
2. RNAに対する高い親和性  
(L-aTNA/RNA > RNA/RNA > SNA/RNA > DNA/RNA)
3. 合成が極めて簡便(合成コストが低い。僅か4-5ステップ)
4. 多様な機能化が可能(合成の簡便性)
5. 生体毒性が低い



# 10%ウシ血清中での安定性の比較

ChemBioChem, 2017, 18, 1917

DNA ATC GAA TAG TCT GAC TAC AAC

SNA

Marker 0 5 min 10 min 30 min 1 h 2 h 6 h 12 h 24 h

Marker 0 5 min 10 min 30 min 1 h 2 h 6 h 12 h 24 h

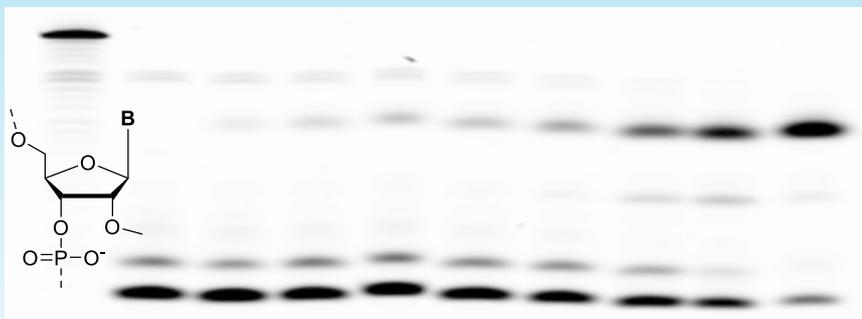


2'OMe

BNA(LNA)

Marker 0 5 min 10 min 30 min 1 h 2 h 6 h 12 h 24 h

Marker 0 5 min 10 min 30 min 1 h 2 h 6 h 12 h 24 h



従来的人工核酸より圧倒的に優れた安定性(酵素耐性) 5



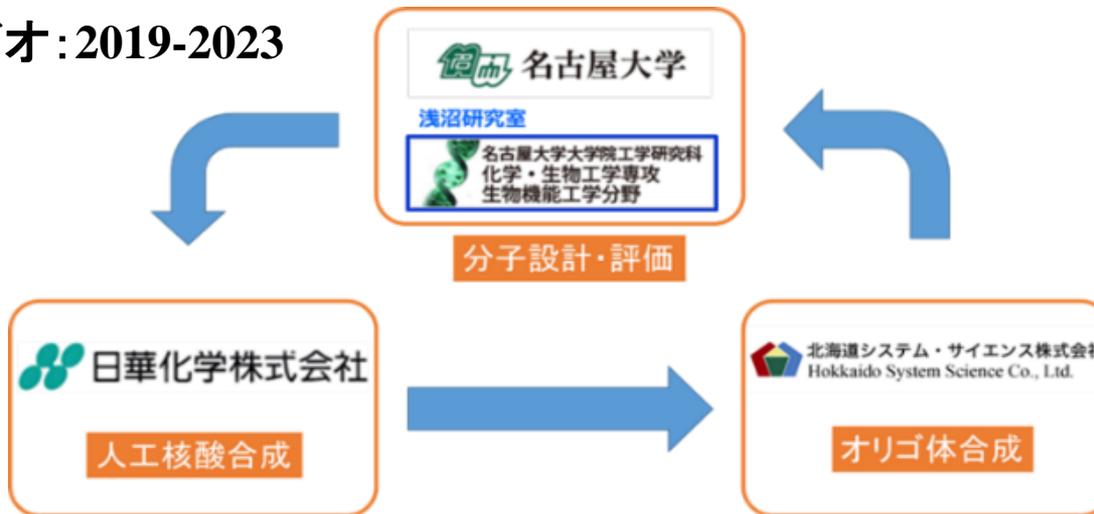
# 非環状型人工核酸の供給体制の確立・市販化

国立研究開発法人  
JST 科学技術振興機構  
Japan Science and Technology Agency

2017-2019:「JST A-STEPステージⅡ」



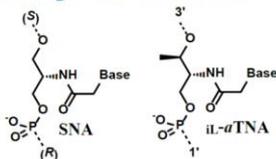
AMED先端バイオ:2019-2023



## 非環状型機能性人工核酸モノマー

天然核酸と安定に結合、高い酵素耐性を示す

### SNA / iL-aTNA



名古屋大学 生命分子工学専攻 分子生命化学講座  
浅沼研究室にて開発された新規人工核酸です。

天然核酸の主鎖構造を非環状骨格に改変した非環状型機能性人工核酸は天然核酸と安定な二重鎖を形成し、高い酵素耐性を示します。

<参考文献>  
Y. Kamiya, et al. *ChemBioChem* 2014, 15, 2549-2555.  
K. Murayama et al., *Chem. Commun.*, 2015, 51, 6500-6503.  
Y. Kamiya et al., *ChemBioChem* 2017, 18, 1917 - 1922

### 製品情報

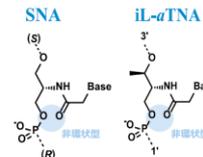
日華化学では、SNAおよびiL-aTNAのオリゴ合成用アミダイトモノマーを販売しております。

## 非環状型人工核酸 合成受託サービス

北海道システム・サイエンス株式会社は、名古屋大学 生命分子工学専攻 分子生命化学講座 浅沼研究室と日華化学株式会社との共同研究により、従来の人工核酸を凌駕する非環状型人工核酸 <SNA> や <iL-aTNA> を配合したオリゴヌクレオチドを製造する技術を開発しました。

非環状型人工核酸は、天然核酸の主鎖構造を非環状骨格に改変した人工核酸で、以下のような特長を持ち、核酸医薬開発や高感度蛍光プローブへの応用が期待できます。

- 特長
  - 天然の DNA や RNA と安定な二重鎖を形成
  - 高いヌクレアーゼ耐性
  - 従来の核酸医薬に使用されている糖部修飾核酸と同等の毒性
- 利用例
  - siRNA、anti-miRNA oligo (AMO)、antisense oligo (ASO)
  - 高感度モレキュラービーコンプローブ



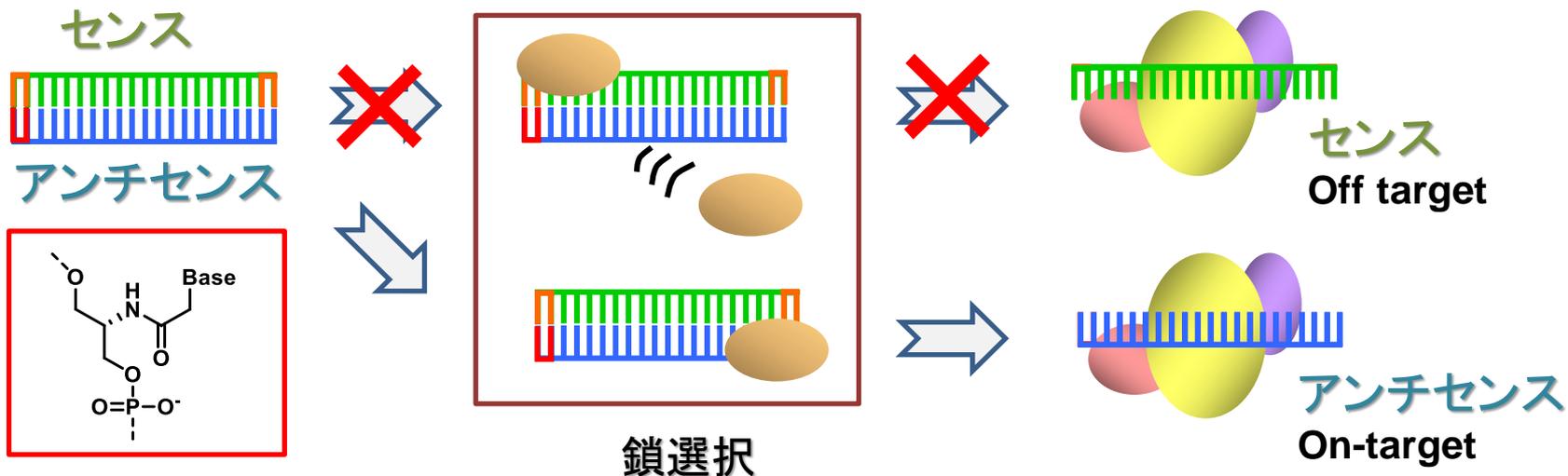
- オリゴヌクレオチド合成サービス
- 弊社では、非環状型人工核酸 SNA、iL-aTNA を配合したオリゴヌクレオチドを製造しております。
- 少量～大量合成まで、ご希望のスケールに対応
  - 各種修飾（蛍光・化学修飾）の導入も可能

詳細はお問い合わせください。  
✉ [dna@hssnet.co.jp](mailto:dna@hssnet.co.jp)



# SNAを用いたsiRNAの設計

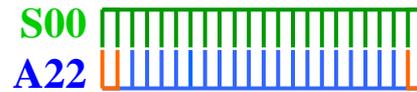
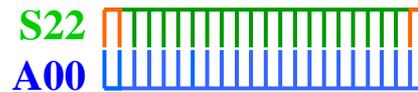
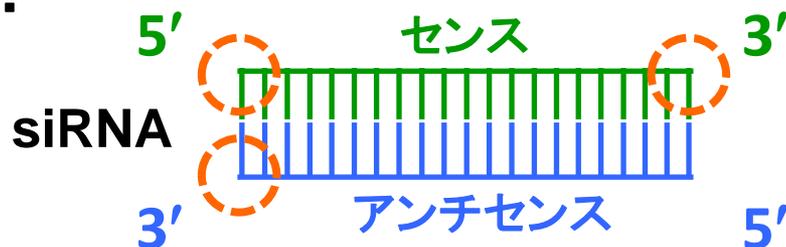
## 鎖選択性、酵素耐性、高活性化



標的RNA : ...AACCUUACCCACCUCAUGUAUCU...

5'-AACCUUACCCACCUCAUGUAUCU-3'

3'-UUGGAAUGGGUGGAGUACAUGA-5'



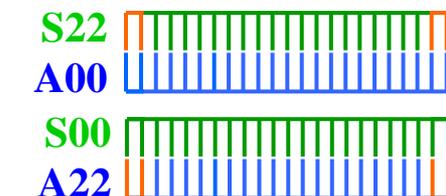
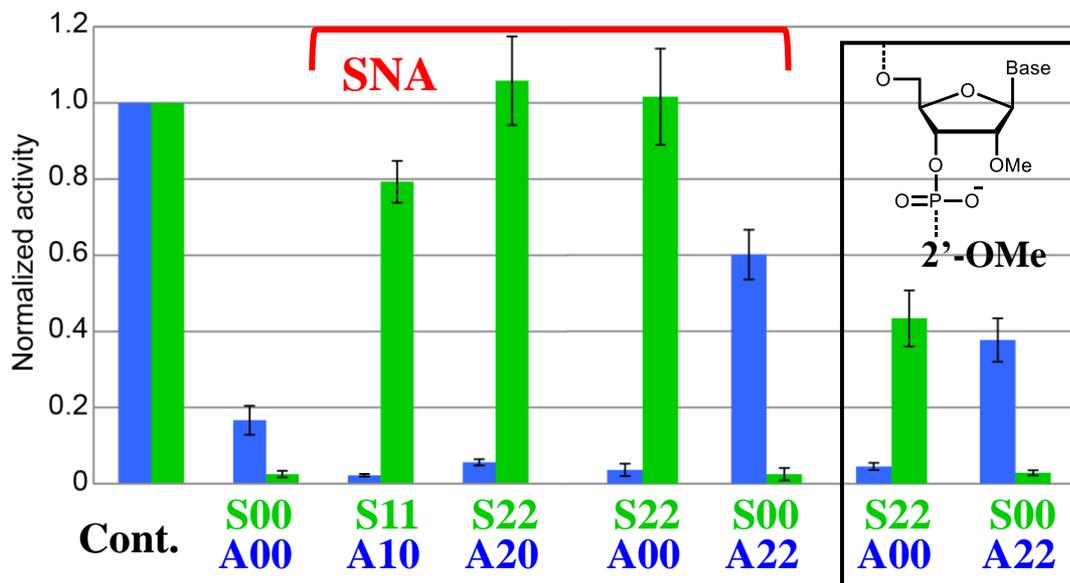
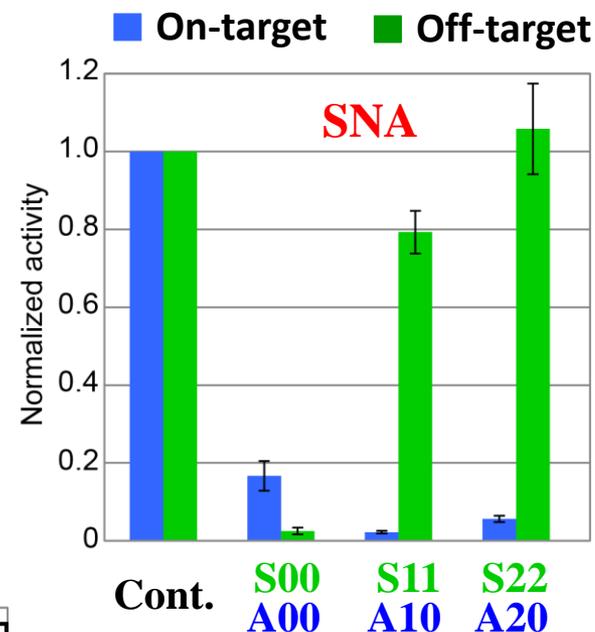
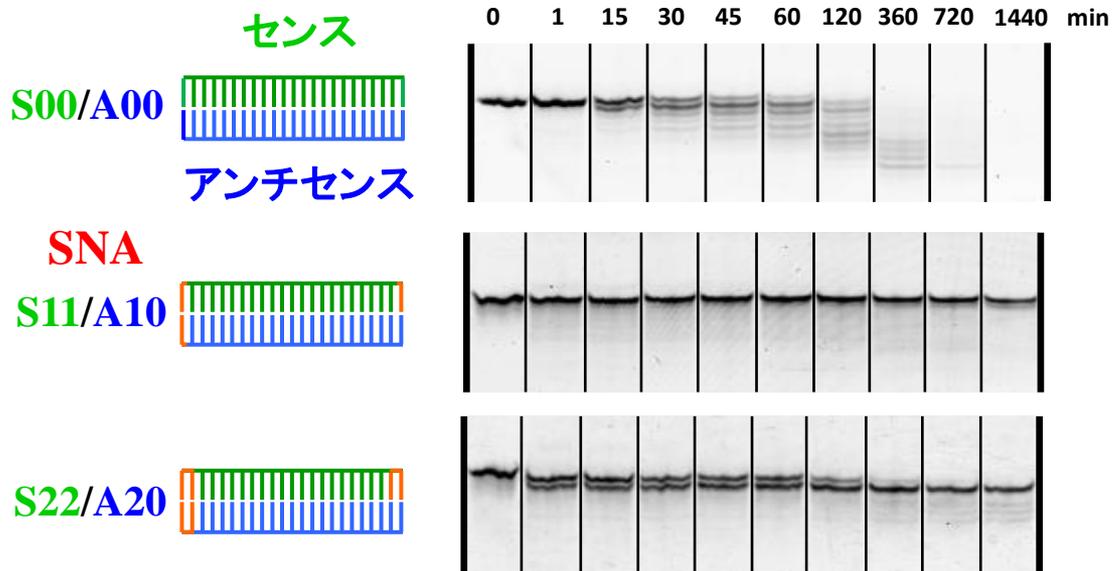


# in vitroでの酵素耐性とsiRNA活性

Y. Kamiya, et. al. *ChemBioChem*, 2014, 15, 2549-2555.

Back Cover

Incubation with HeLa lysate at 37 °C



SNA置換で  
RNAi活性、鎖選択性、酵素耐性  
全て改善



# Full-XNA型ASO(1)

マイクロRNA21 (miR21) : ガン細胞に共通して過剰に発現

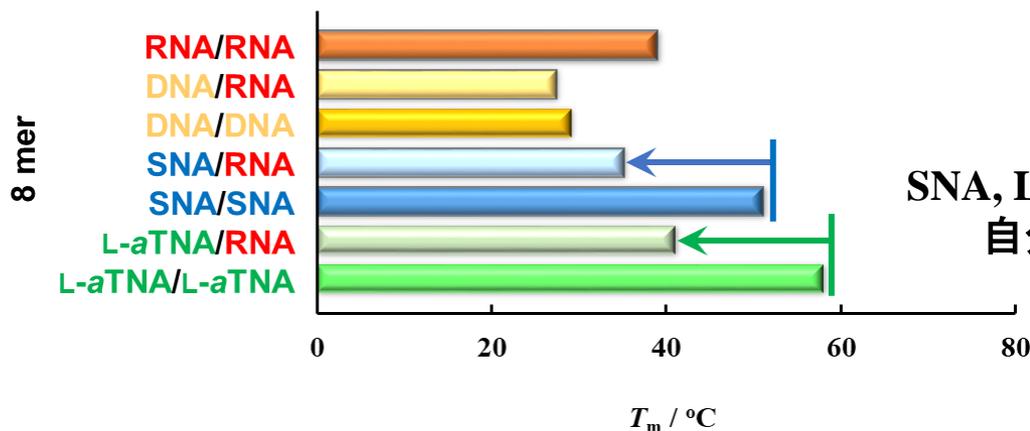
*ChemBioChem*, 2017, 18, 1917-1922.

敗血症等の炎症反応 (NF- $\kappa$ B) を亢進

miR21抑制効果を持つアンチセンス核酸(AMO-21)は、敗血症やガン治療への効果が期待できる

miR-21	5' -UAG CUU AUCAGACUGAU GUU GA- 3'
AMO	-ATC GAA TAGTCTGACTA CAA C-

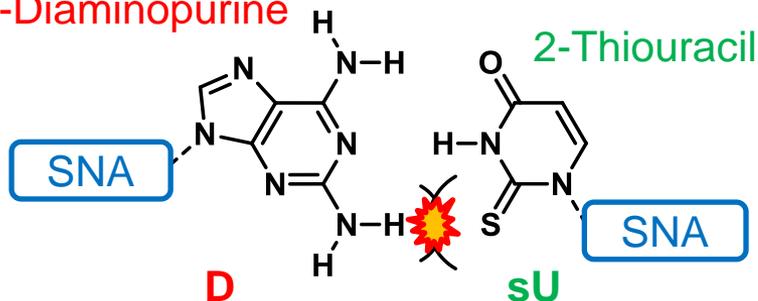
11 mer の自己相補領域を持つ



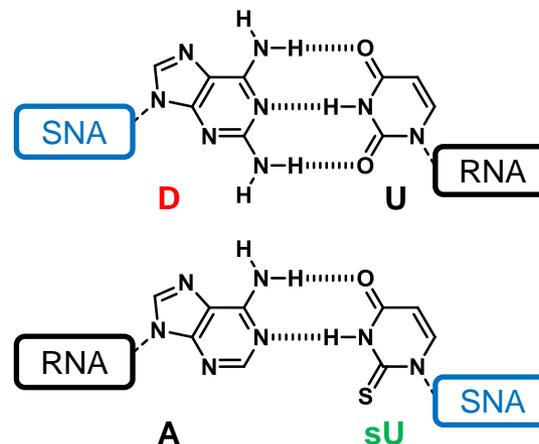
SNA, L-aTNAは、自己相補領域があると、自分自身と二重鎖を組んでしまう。

*Chem. Asian J.*, 2020, 15, 1266  
PCT/JP2021/003332

2,6-Diaminopurine



D-sUは塩基対を形成できない





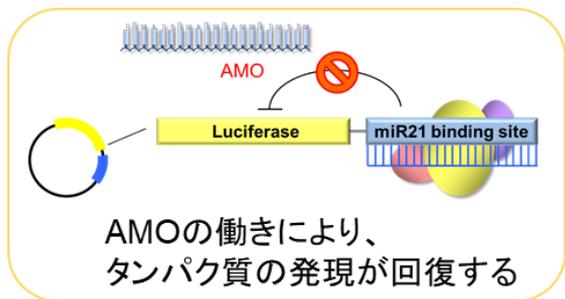
# D-sU導入型AMOの*in vitro*での活性評価

PCT/JP2021/003332

## 標的

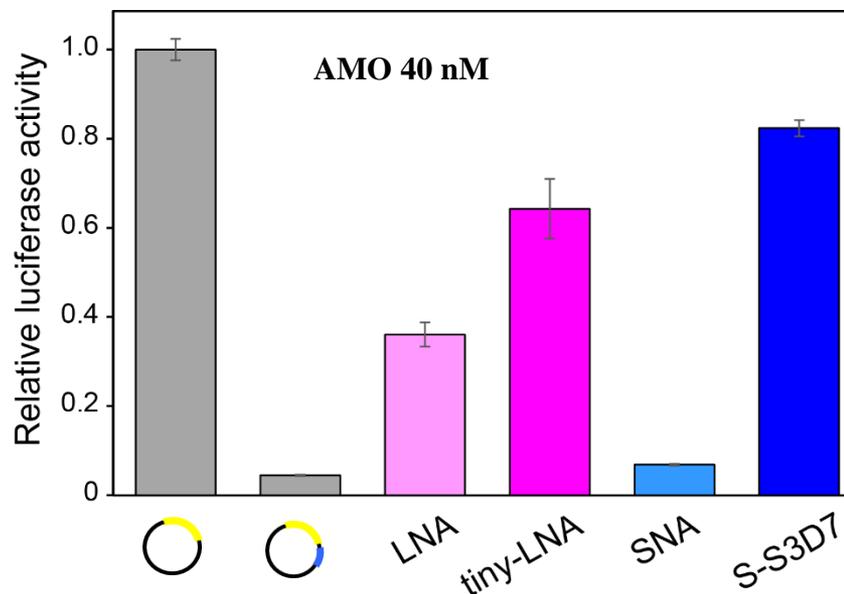
miRNA-21 (miR-21): 5' -UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A- 3' AUC AGA CUG AUG 自己相補領域

	Sequences	AMO/AMO二重鎖 融解温度	AMO/miR-21二重鎖 融解温度
LNA/DNA mixmer <sup>[1]</sup>	3' -ATC GAA <span style="background-color: #d9e1f2;">TAG TCT GAC TAC</span> AAC- 5'	50.5	82.8
tiny-LNA <sup>[2]</sup>	3' -TC GAA TAG- 5'	no data	65.0
	[1] Exiqon製 miR-21 inhibitor (LNA導入箇所は不明)		
	[2] S. Obad, <i>et al.</i> , <i>Nat. Genet.</i> , <b>2011</b> , 43, 371 (全てLNA)		
SNA	(R)-ATC GAA <span style="background-color: #d9e1f2;">TAG TCT GAC TAC</span> AAC-(S)	62.3	67.3
S-S3D7	(R)-ATC <span style="color: red;">GDD</span> <span style="color: green;">sUDG</span> <span style="color: green;">sUCT</span> <span style="color: red;">GDC</span> <span style="color: green;">sUDC</span> <span style="color: red;">DDC</span> -(S)	—	76.6



### Experimental conditions

- HeLa cells were cotransfected with 40 nM AMO and reporter plasmid by Lipofectamine 2000
- After incubation for 24 h, relative luciferase activity (firefly/Renilla) was evaluated.
- 1.0: luciferase activity in the presence of pmirGLO, which has no miR21-target region, and oligonucleotide with scramble sequence).



**LNAを凌駕するAMO活性の実現**



# Full-XNA型ASO(2)-ES-ASO

正常なジストロフィンタンパク質をコードしている遺伝子



ジストロフィンタンパク質の発現

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 患者: 例えばエクソン50の欠如



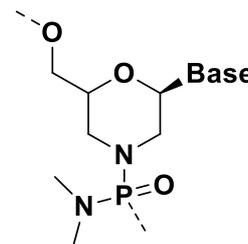
Out of frame ... 正常なジストロフィンタンパク質が発現しない

エクソン51を読み飛ばすためのアンチセンスオリゴ(ES-ASO)



In frame ... 不完全だが機能するジストロフィンタンパク質が発現

## 認可された ES-ASO

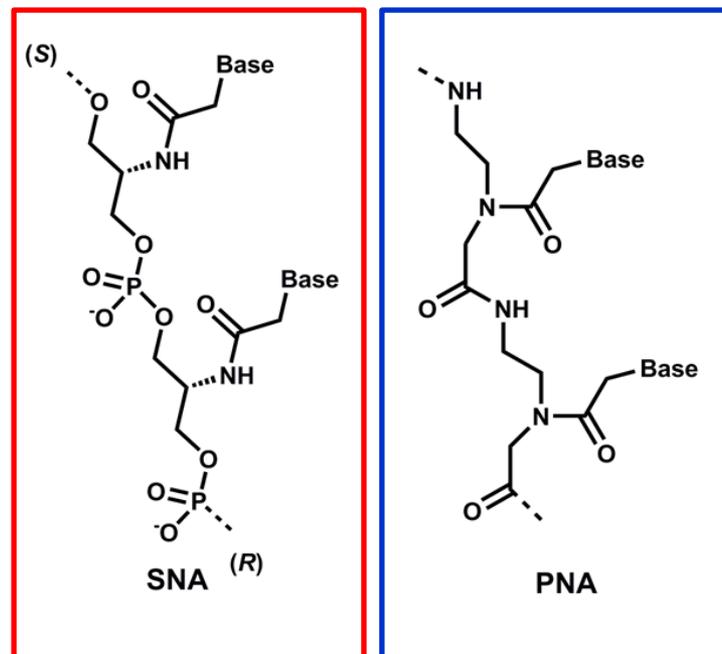
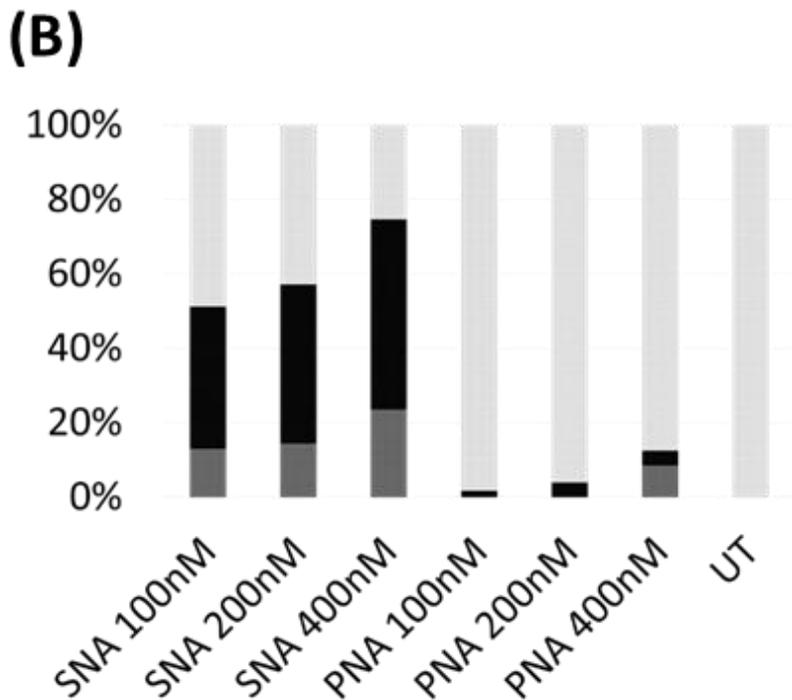
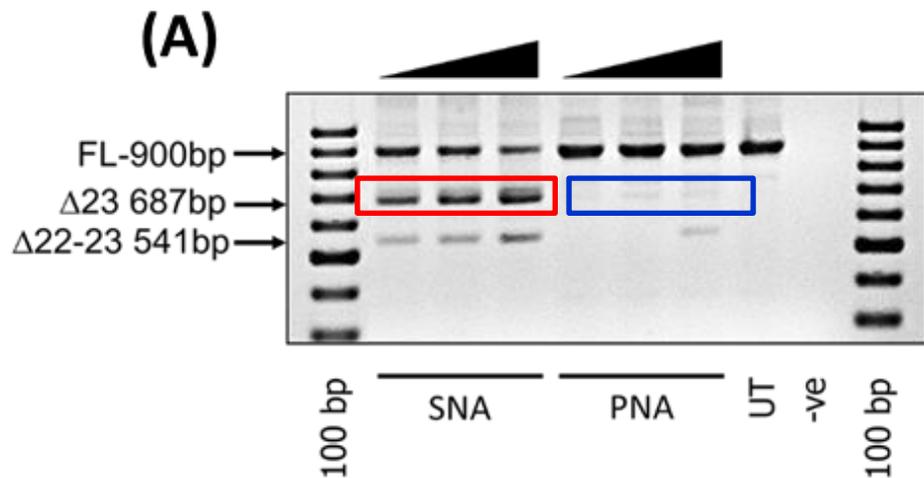


Target	Name
Dys exon 51	Eteplirsen
Dys Exon 53	Golodirsen
Dys Exon 53	Viltolarsen
Dys Exon 45	Casimersen



# ES-ASO活性

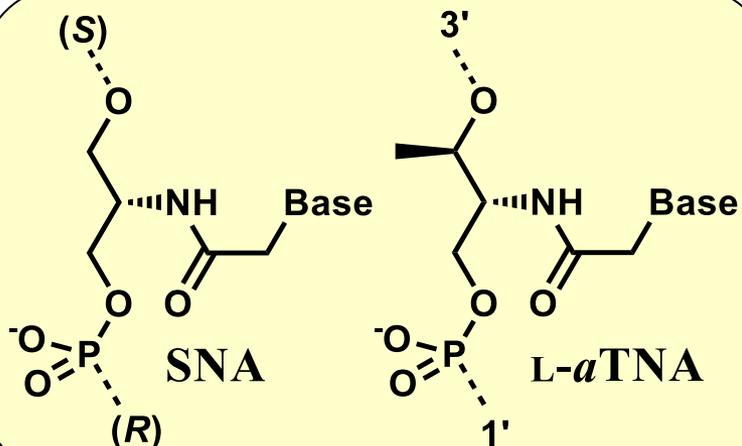
RSC Advances, 2017, 7, 34049  
(Collaboration with Prof. Veedu)



SNAはES-ASO活性を持つ



## まとめ



1. 人工塩基D, sUの導入で、SNA, L-aTNA同士の自己二重鎖形成を抑制しつつ、RNAに対する親和性向上を実現
2. siRNAとFull XNA型ASOで、*in vitro*で従来型を凌駕する活性
3. 低い生体毒性 (Full XNA型)

## 今後の展望

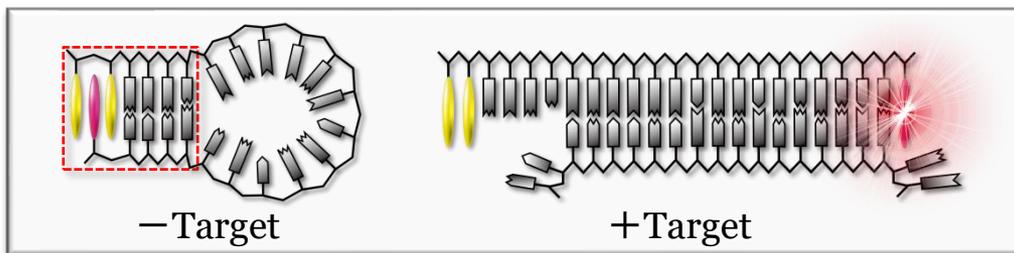
1. *in vivo*での評価 (医学部との共同研究)、適用系の拡大
2. 細胞透過性、ターゲティング能の付与
3. DDSフリー化
4. 診断薬としての展開
5. 人工核酸アプタマー



# 診断薬としての展開

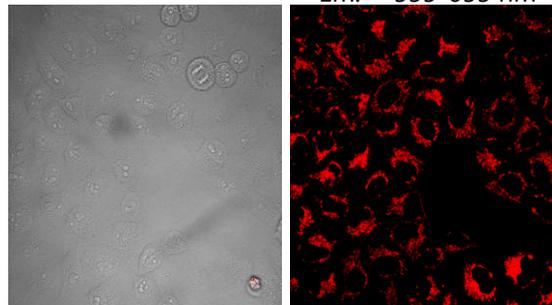
## 細胞内RNAの、配列特異的検出

### SNA-MB



Bright field

Cy3 excitation  
Ex. = 543 nm  
Em. = 555-655 nm

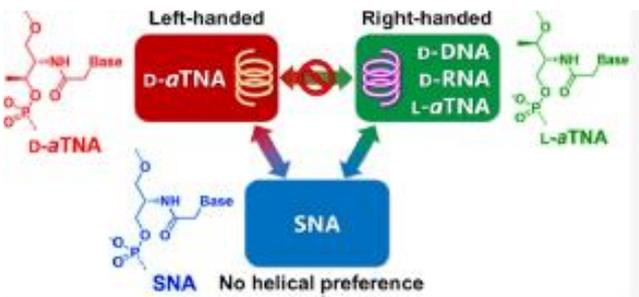


*ChemBioChem*, 2015, 16, 1298

1塩基ミスマッチの検出も可能

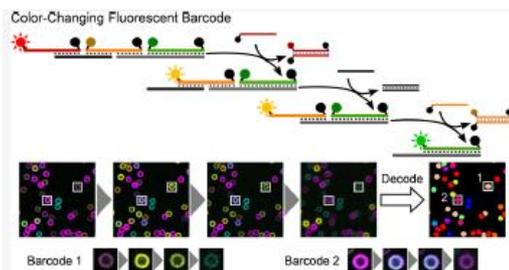
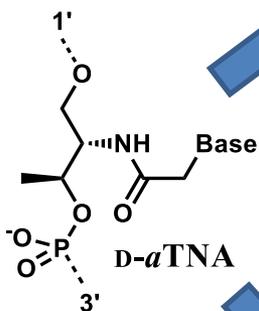


Point mutationもmRNAで識別可能



人工核酸の直交性を利用した増幅検出

*J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144, 5887-5892



細胞内タンパク質のマルチカラーイメージング

*J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144, 1572-1579.