

触媒的標的RNA切断機能を を有するキメラ人工核酸医薬



東北大学 多元物質科学研究所
教授 和田健彦

2023年7月11日

従来技術とその問題点

2

＊従来技術：

従来型核酸医薬（アンチセンス、siRNA等）は、標的RNAとの1:1複合体形成を経て、

1. 標的RNAの機能抑制
2. リボヌクレアーゼ（RNase）による消化により薬効を発現する。

＊核酸医薬実用化に向けた解決課題

1. 狭義・広義のオフターゲットとよばれる副作用の低減
2. 主に細胞内核酸医薬極低濃度に起因する薬効向上

DDSやタグ修飾による細胞内濃度の向上 ⇔ 副作用毒性増加

⇒ **低濃度でも効果的な薬効を発現する戦略構築が急務**

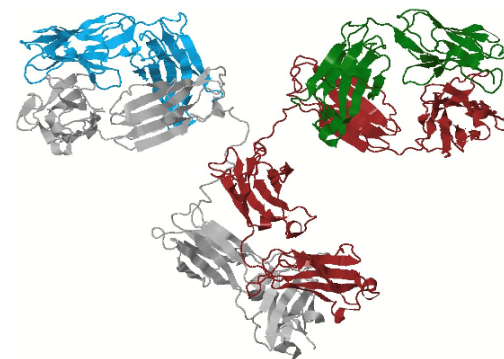


研究背景

次世代分子標的医薬モダリティー：核酸医薬

* 抗体医薬： 分子標的医薬・バイオ医薬

- ⇒ 高い標的選択性・高い標的との複合体形成能
高い生体内安定性・高い標的細胞到達能
- ⇒ 極めて優れた医薬品として高く評価
- ⇒ 医薬品売り上げトップ10を席卷



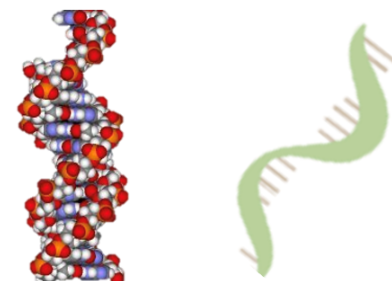
研究背景

- ・ 問題点・デメリット： 巨大な分子量 ⇒ 標的は細胞膜に存在するレセプタ・タンパク質に限定
基本特許・知財権の多くはアメリカ ⇒ 迅速な修飾/改善が困難・貿易赤字

* 核酸医薬 ⇒ 次世代の分子標的医薬品として有力な候補

核酸医薬の特徴

- ・ 疾患に応じたテーラード設計が可能
- ・ (抗体医薬と比較して) 低分子量，細胞内分子も標的化可能
- ・ (低分子医薬と比較して) 標的に対する高い選択性・複合体安定性
- ・ 基本特許・知財権はアメリカ独占ではなく日本を含め各国独自に所有



- ・ 日本における核酸化学研究の世界に対する優位性

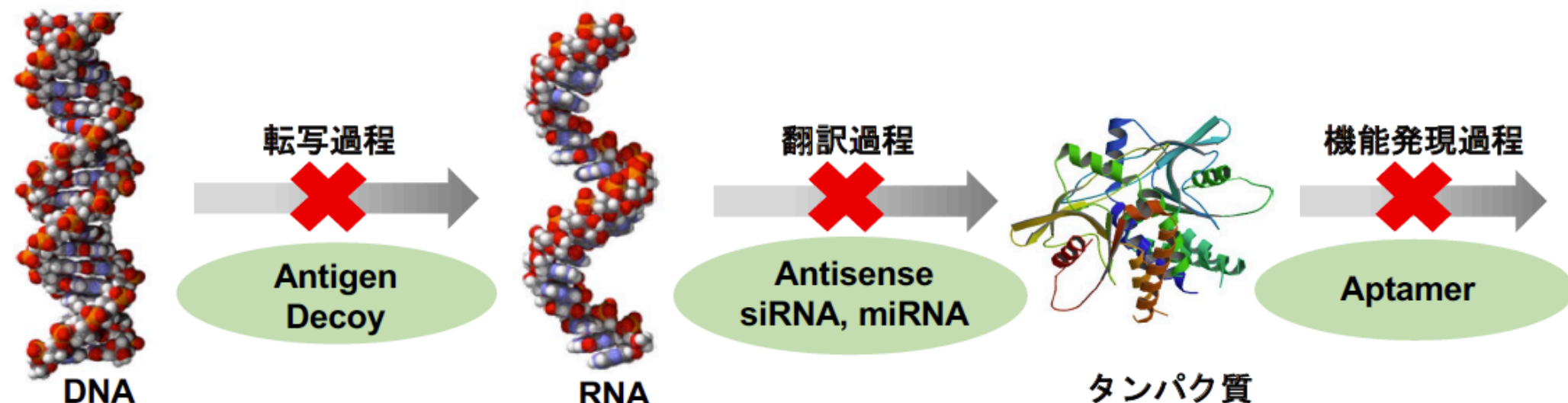
**mRNAワクチン
上市で効果実証！**

核酸医薬の課題と当技術開発に至る背景

4

核酸医薬戦略における多様な標的分子

研究背景



核酸医薬： 実用化に向け改善すべき課題

1. 標的に類似した塩基配列を有するRNAとの複合体形成に基づく機能阻害
2. DNAやRNA、タンパク質への非特異的結合・複合体形成に基づく副作用

⇒ オフターゲット効果と総称される副作用

3. 低い標的細胞到達能と細胞膜透過性：

核酸医薬骨格と細胞膜表面はともに負電荷を有し、核酸医薬の細胞膜透過性は低い

⇒ 細胞内低濃度に基づく低い治療効果

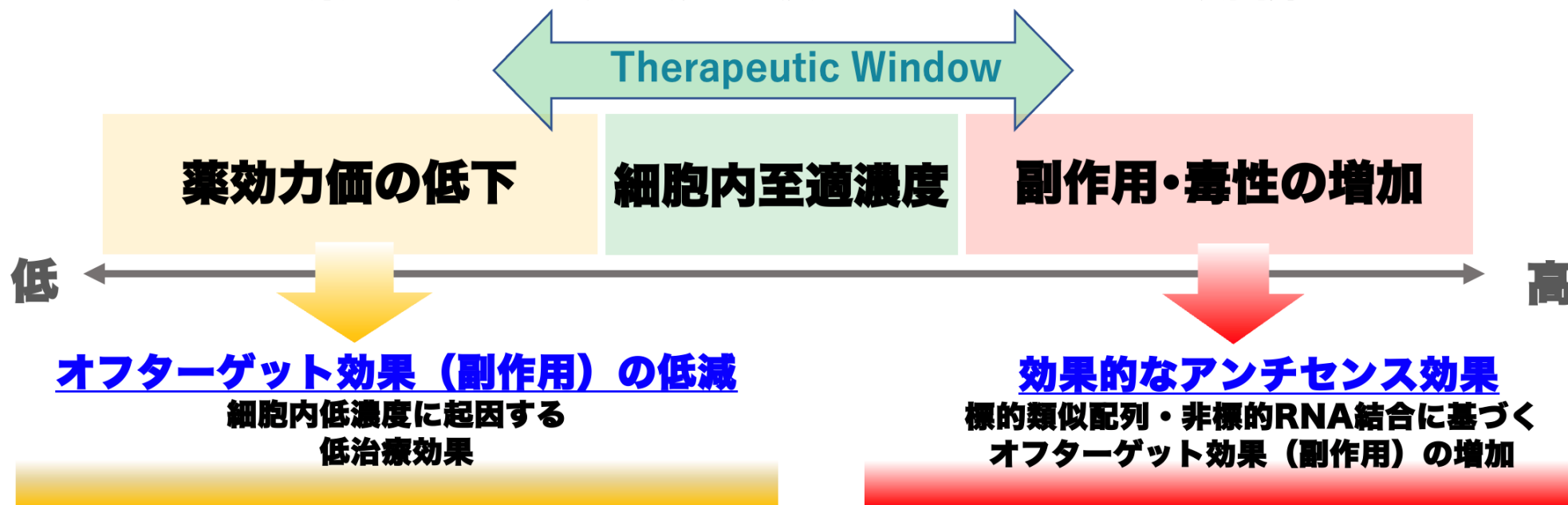
低濃度でも効果的な薬効を発現する戦略構築が急務

当技術で実現をめざす核酸医薬2.0戦略

5

従来の核酸医薬：Therapeutic Windowの拡大が喫緊の課題

薬効増強と副作用低減は背反関係DDSだけでは解決困難



低濃度 ⇒ オフターゲット効果を抑制

しかし… 低濃度では核酸医薬効果が十分発現しない：背反関係

**効果的な薬効発現とオフターゲット効果抑制を両立し得る方法論！
＝ 低濃度でも効果的な薬効を発現する戦略（一騎当千戦略）**

触媒的RNA消化核酸医薬戦略

6

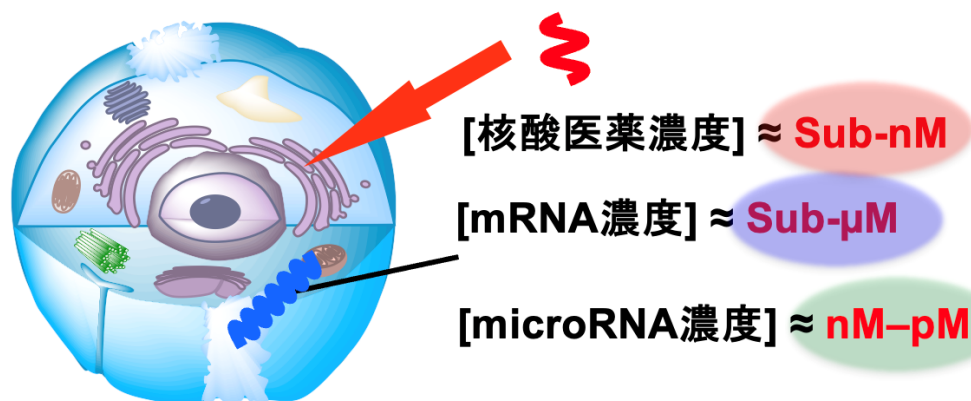
一般的な核酸医薬： アンチセンス核酸医薬戦略

研究背景

標的疾患細胞： 標的細胞内の濃度

1. mRNAを標的とした核酸医薬戦略

⇒ 現状の主な治療戦略は、1:1複合体形成に基づく標的RNAの機能抑制

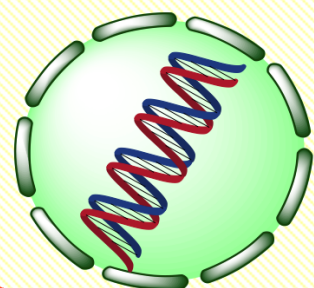


標的mRNAは核酸医薬の約1,000倍量も存在！
⇒ 効果的な薬効発現は期待出来ない！！

2. microRNAなら濃度比問題解決

⇒ 最近microRNAにフィードバック機構関与の報告
⇒ 1:1複合体形成戦略の有効性に懸念

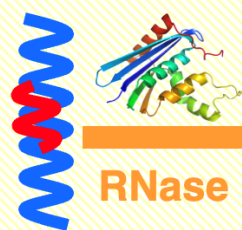
COVID-19 Infected Cell



核酸医薬

複合体形成

触媒的に次の
標的RNA消化に活用



標的RNAの消化

核酸医薬の細胞内低濃度問題を解決する戦略

⇒ RNase Hを活用した触媒的アンチセンス法

RNase HによるRNA選択的消化触媒サイクル7

通常のRNaseHによるRNA選択的切断

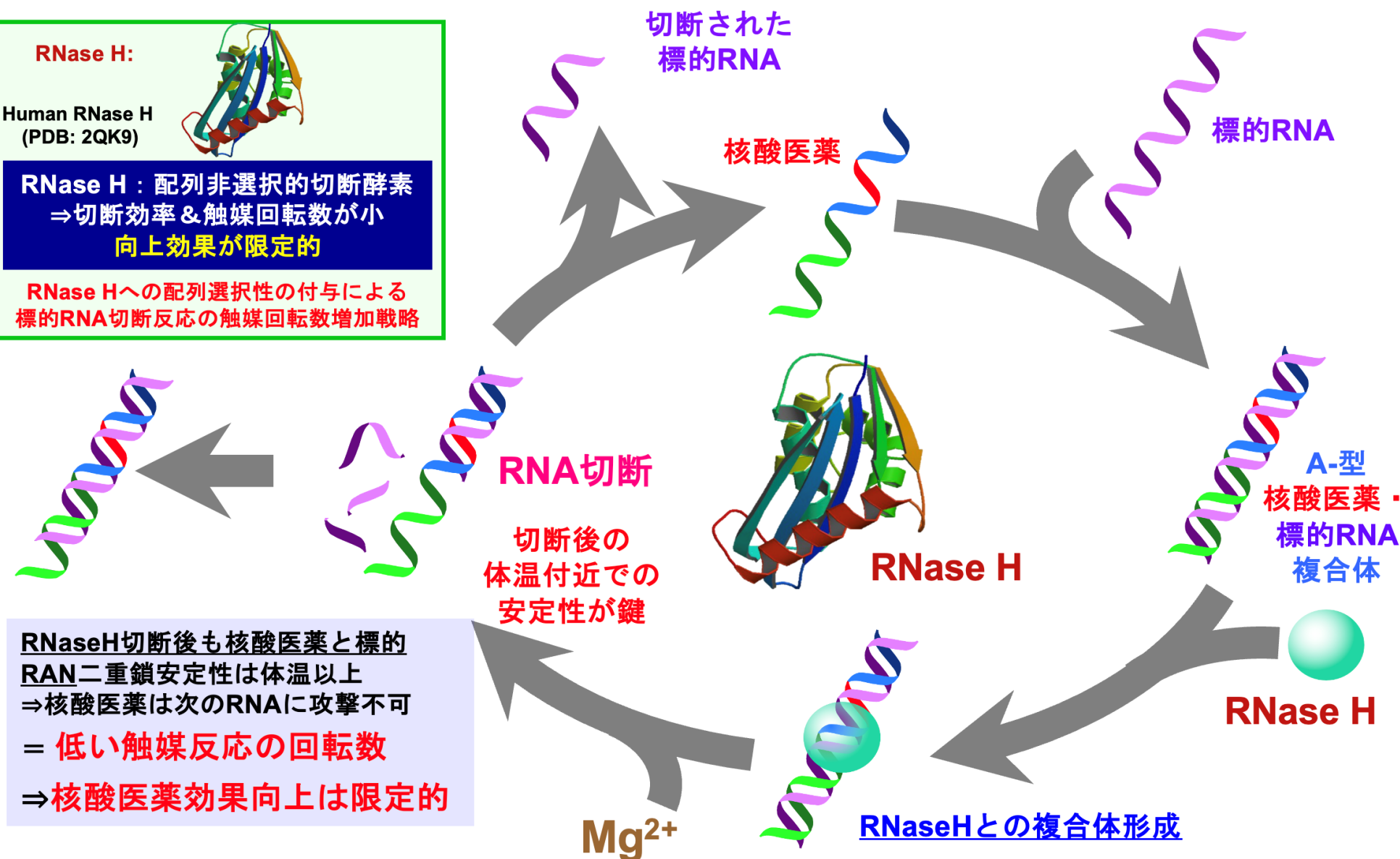
独自技術

RNase H:

Human RNase H
(PDB: 2QK9)

**RNase H : 配列非選択的切断酵素
⇒切断効率&触媒回転数が小
向上効果が限定的**

**RNase Hへの配列選択性の付与による
標的RNA切断反応の触媒回転数増加戦略**



薬効向上に資するRNase H触媒回転数増加戦略

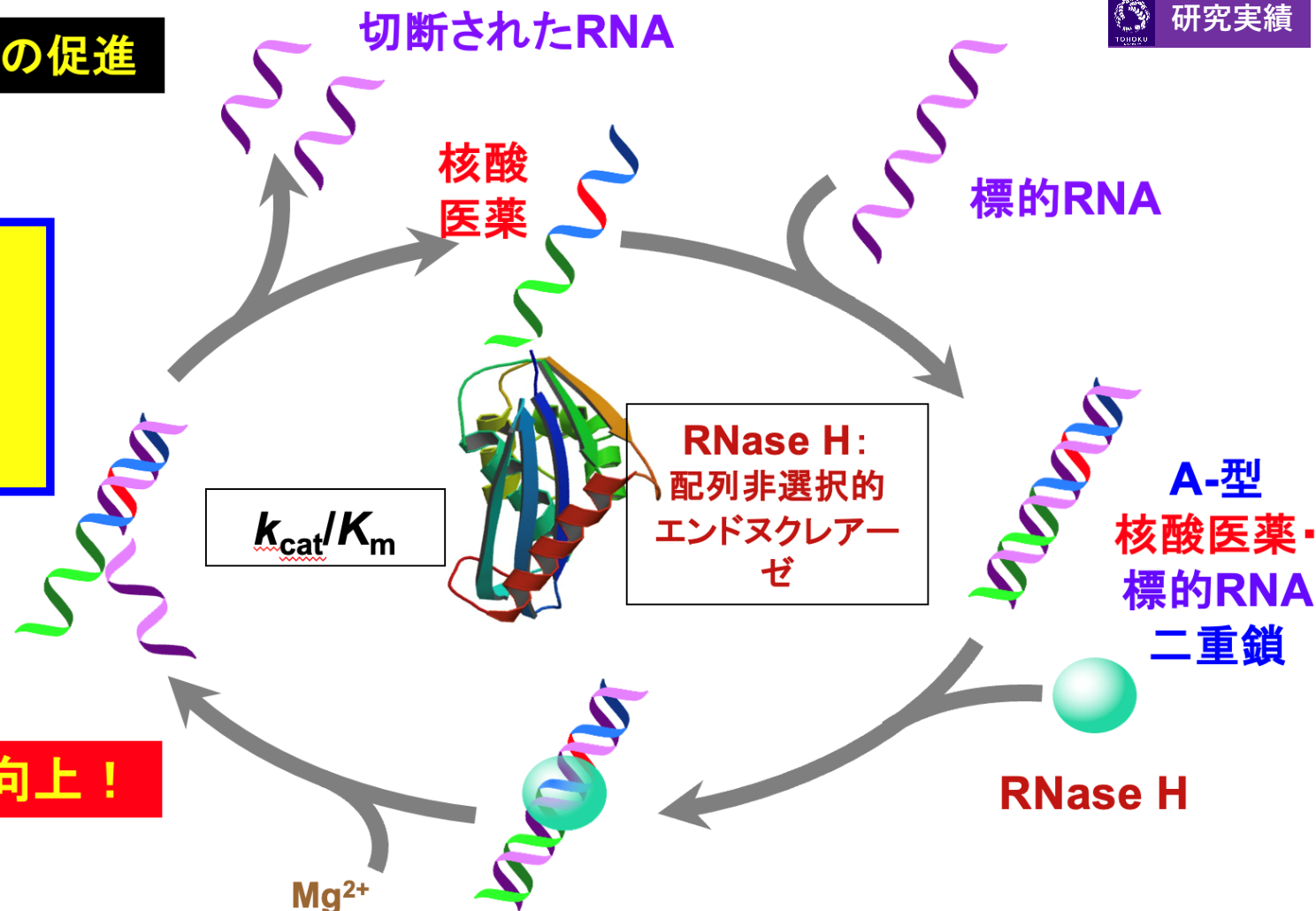
研究実績

2. 切断RNA解離過程の促進

標的RNA中央付近で切断
⇒ 核酸医薬/標的RNA
二重鎖の安定性が大きく低下
= 即座に二重鎖解離
核酸医薬は次の標的RNA攻撃

標的RNAの位置選択切断

核酸医薬効果の飛躍的な向上！

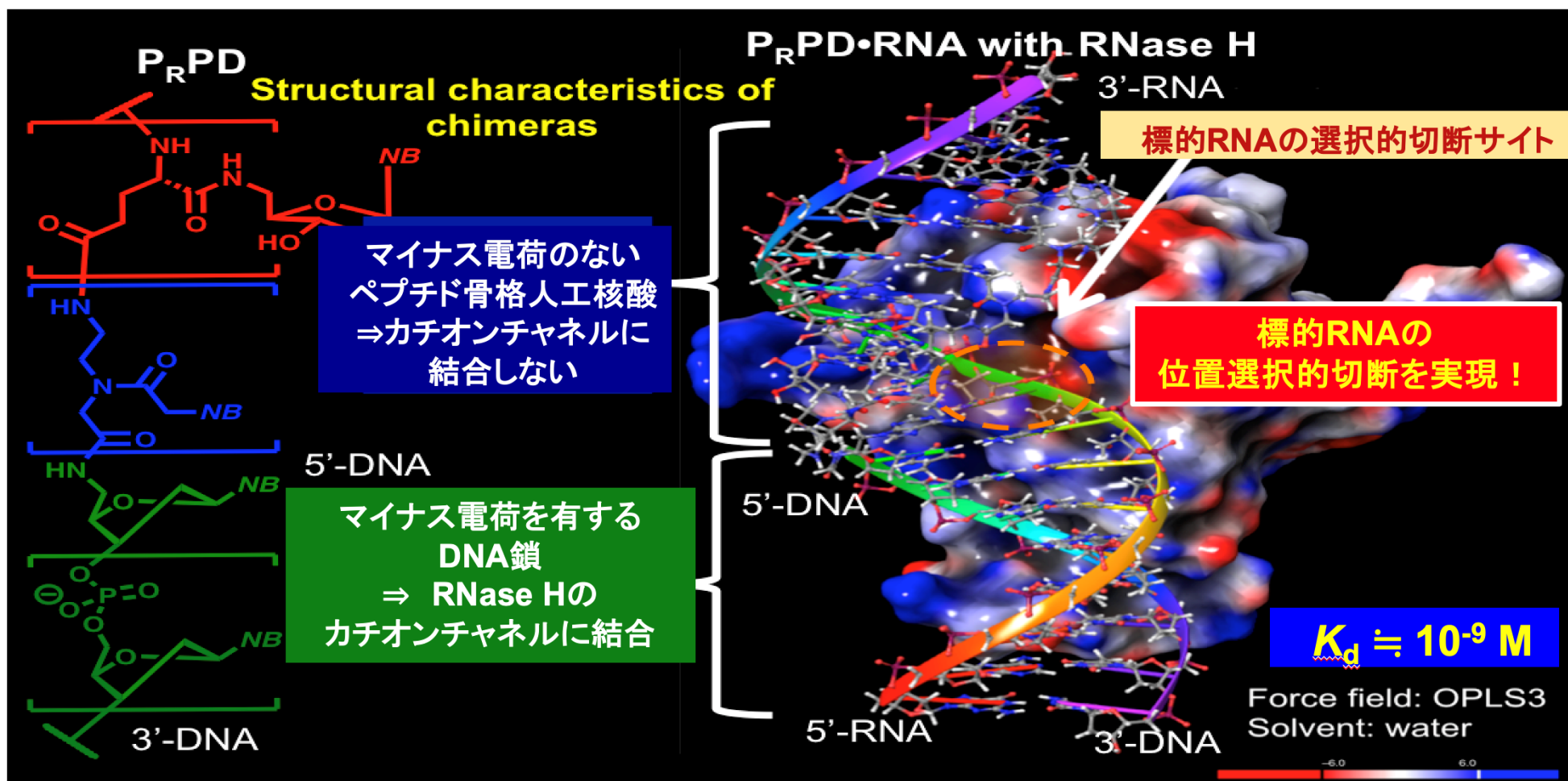


⇒ RNase Hによる標的RNAの
位置選択切断を実現する人工核酸の開発！！

高効率標的RNA消化機能付与キメラ人工核酸 9

人工核酸(DNA・アミド核酸キメラ・タンデム構造)の設計と合成戦略

カチオンチャンネルに結合するリン酸アニオン骨格DNAと中性のペプチド骨格を有し
カチオンチャンネルに結合しない人工核酸を融合したキメラ人工核酸を設計



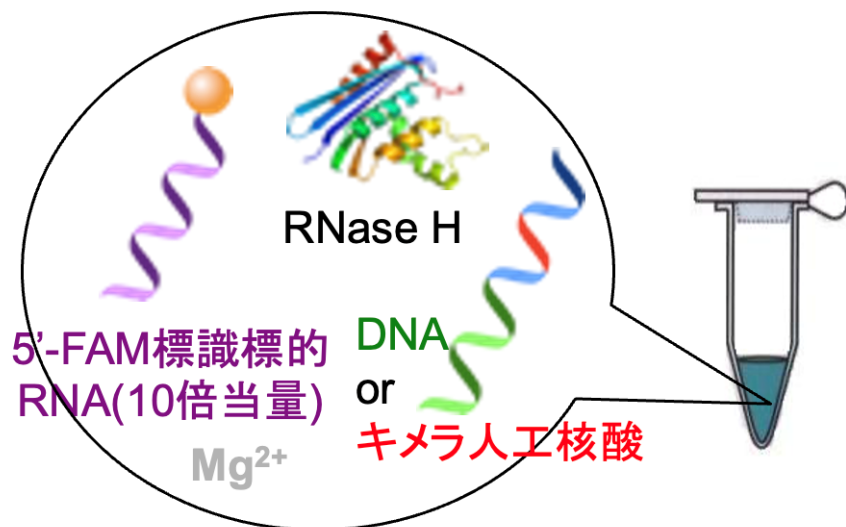
固相法によるラボスケールでのオリゴ有機合成により薬理活性・選択性・毒性が評価可能

知財関連番号：WO2021/015234

キメラ分子、標的RNA切断方法、標的核酸切断用又は診断用キット

高キメラ人工核酸による高効率標的RNA消化 10

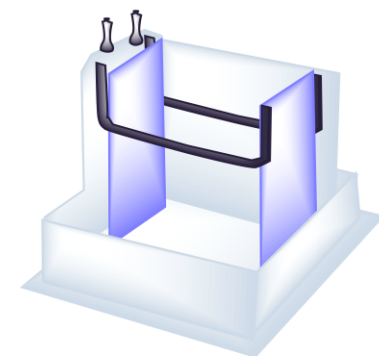
研究実績



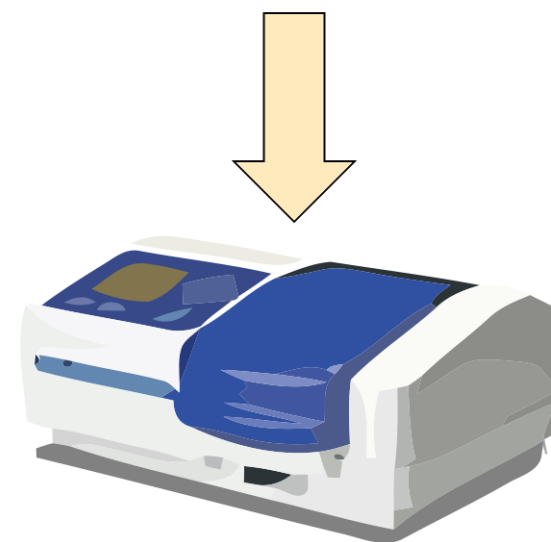
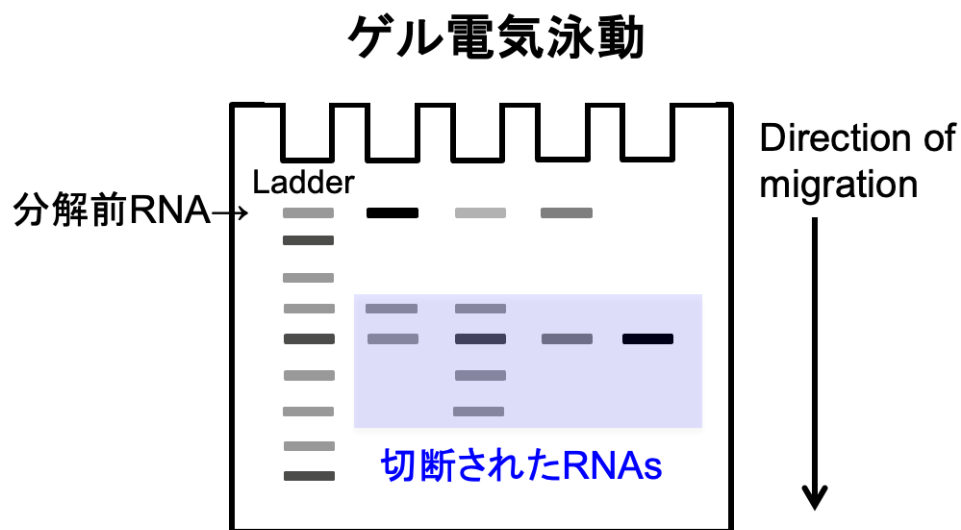
40 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.5),
4 mM MgCl₂, 1 mM DTT

37 °C, 30 min

50 mM EDTA,
7 M urea
熱変成
(70 °C, 10 min)



ゲル電気泳動

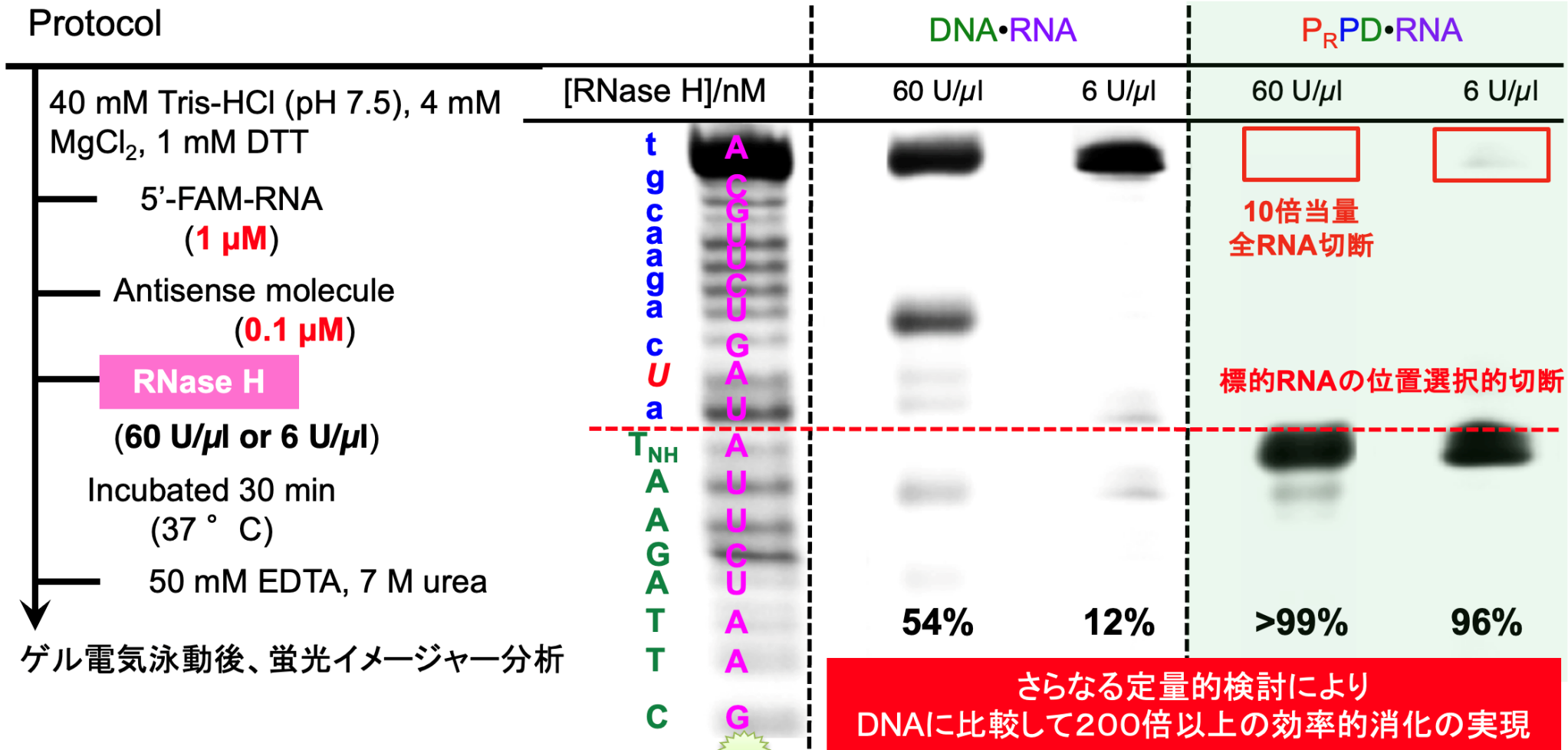


蛍光イメージャーで定量分析

高効率標的RNA消化機能付与キメラ人工核酸 11

Sequence P_RPD: 5'- **t g c a a g a c U a** T_{NH} **A A G A T T C**-3' T_m = 54.5 °C
DNA: 5'- **T G C A A G A C T A T** **A A G A T T C**-3' T_m = 54.0 °C
5'-FAM-RNA: 3'- **A C G U U C U G A U A** **U U C U A A G**-FAM-5'

(**X** = RNA, **X** = DNA, **X** = PRNA, **x** = PNA)

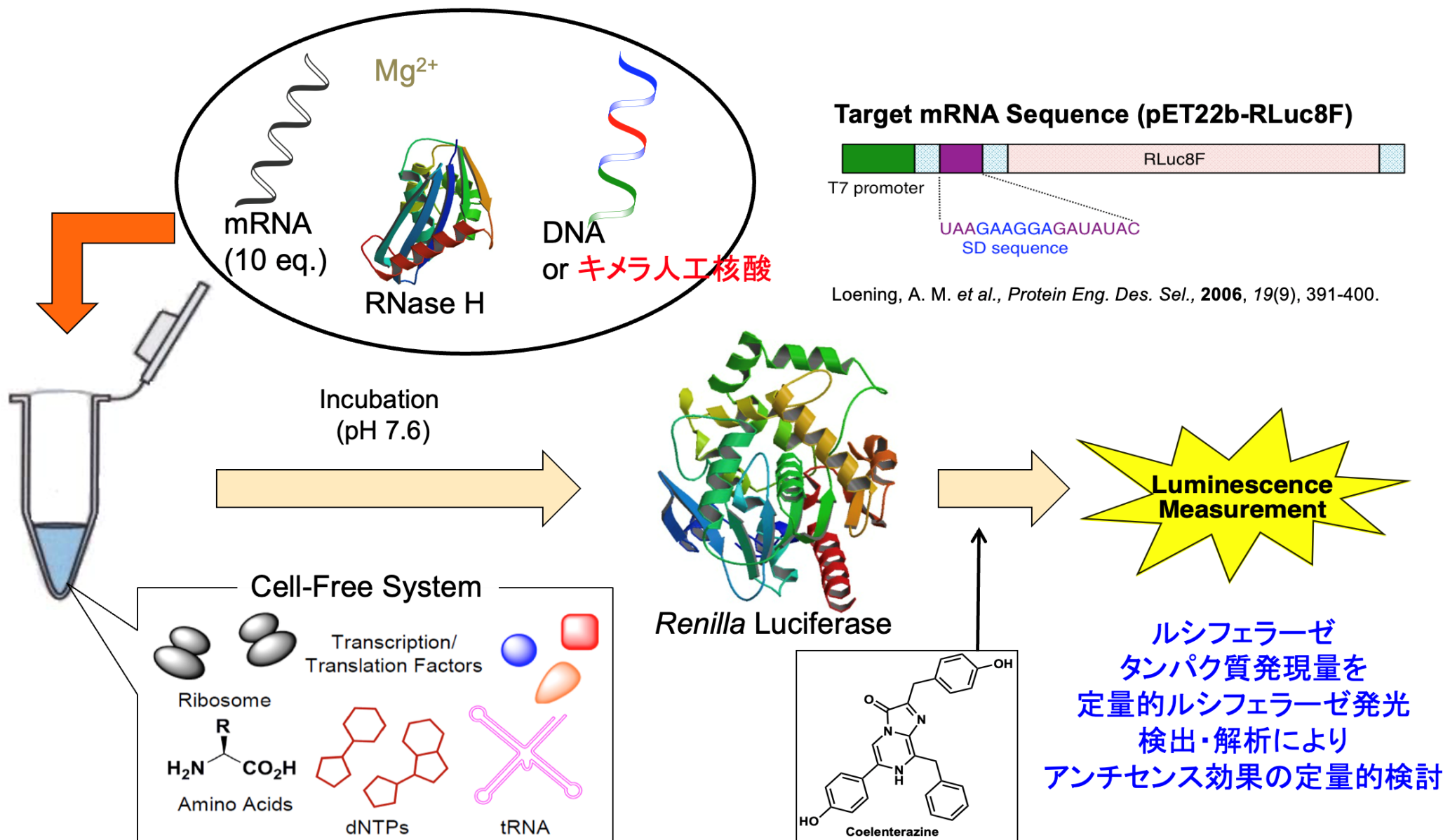


高効率標的RNA消化機能付与キメラ人工核酸 12

無細胞タンパク質合成系を用いた核酸医薬効果・アンチセンス効果の検討

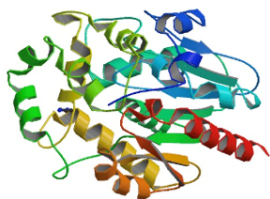


研究実績



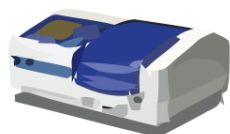
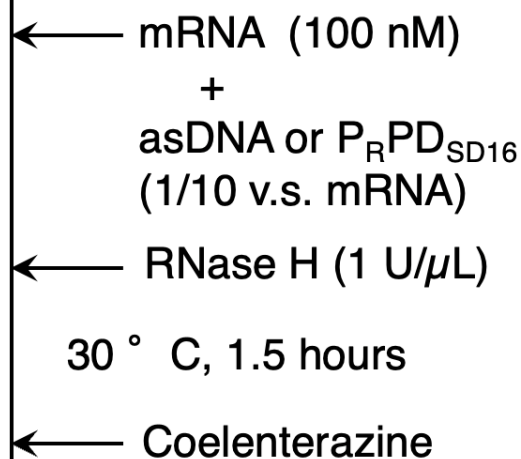
高効率標的RNA消化機能付与キメラ人工核酸 13

研究実績



Renilla Luciferase 発現抑制実験

Wheat Germ Extract



Luminescence measurement

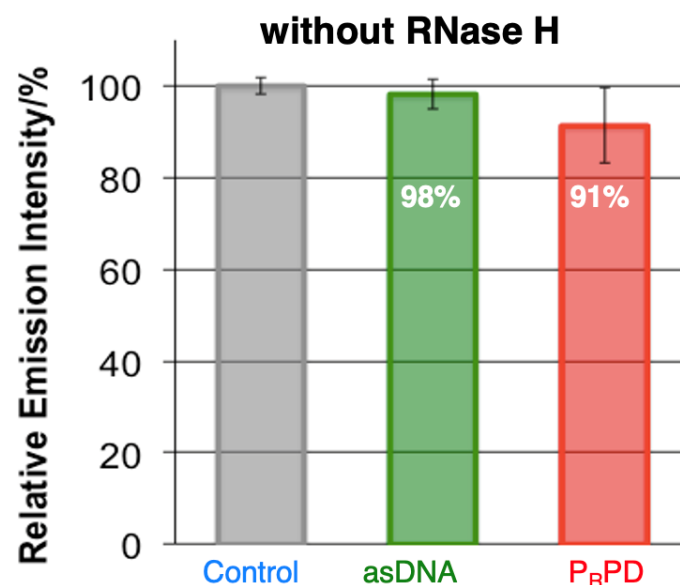
P_RPD_{SD16}: N-Lys-gtaUatctccT_{NH}TCTTA-3'

DNA_{SD16}: 5'-GTATATCTCCTTCTTA-3'

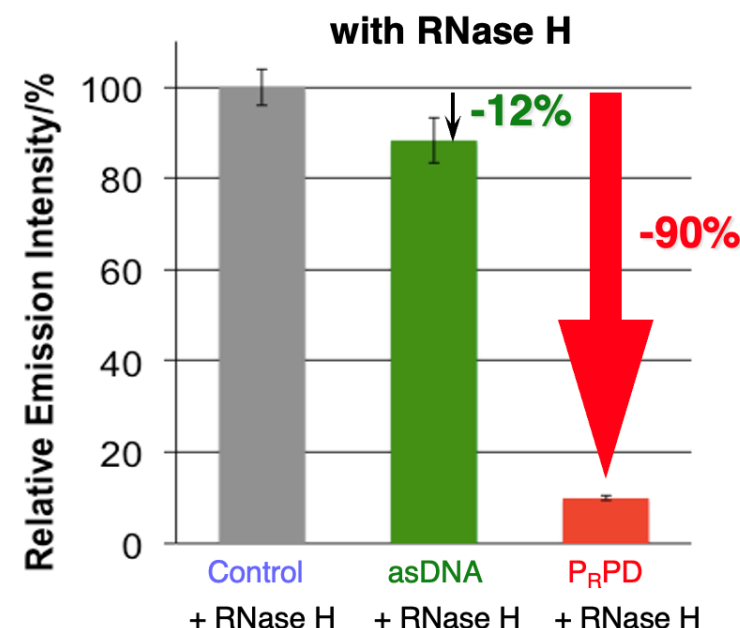
[mRNA] = 100 nM

[asDNA or P_RPD] = 10 nM

(1/10 vs. mRNA)



Luminescence Intensity of Renilla luciferin;
[mRNA] = 100 nM in cell-free protein synthesis
system (Wheat germ extract).



Luminescence Intensity of Renilla luciferin;
[mRNA] = 100 nM, [RNase H] = 1 U/μL, [Mg²⁺] =
2.5 mM in cell-free protein synthesis system

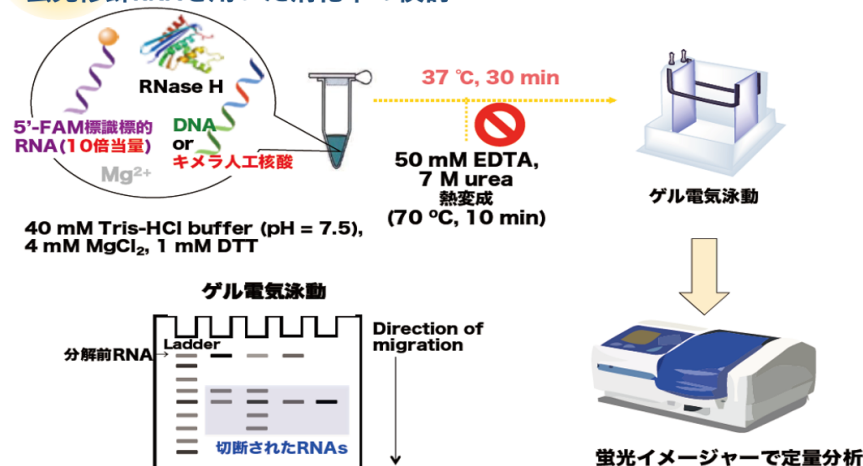
**キメラ人工核酸はRNaseH存在下で
DNAに比較して顕著なアンチセンス効果を発現
⇒ 極少量でもキメラ人工核酸は効果的な治療効果を発現
⇒ 細胞実験、初期的動物実験でも有意なデータ確認済**

従来型核酸医薬との比較評価検討

14

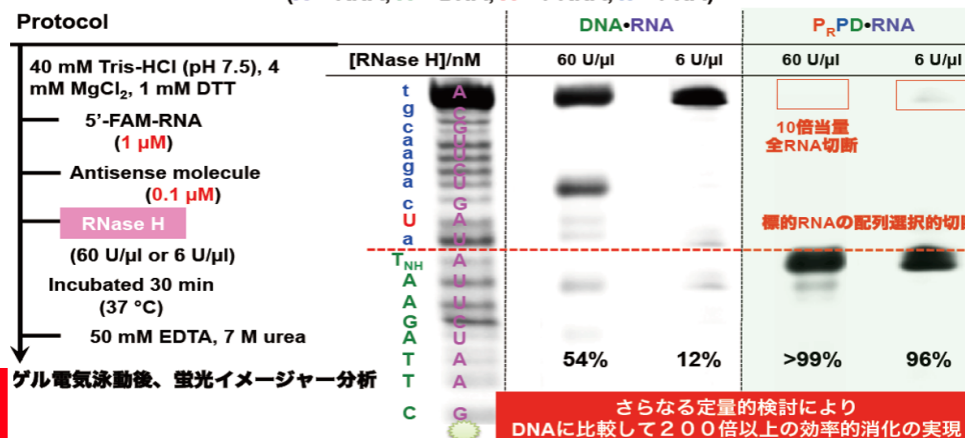
研究実績

キメラ人工核酸およびファレンスDNAによる
蛍光修飾RNAを用いた消化率の検討



試行錯誤によるキメラ人工核酸構造最適化
既存技術より約2,000倍の切断効率向上を達成！

Sequence P_RPD: 5'- t g c a a g a c U a T_{NH} A A G A T T C -3' T_m = 54.5 °C
DNA: 5'- T G C A A G A C T A T A A G A T T C -3' T_m = 54.0 °C
5'-FAM-RNA: 3'- A C G U U C U G A U A U U C U A A G -FAM-5'
(X = RNA, X = DNA, X = PRNA, x = PNA)

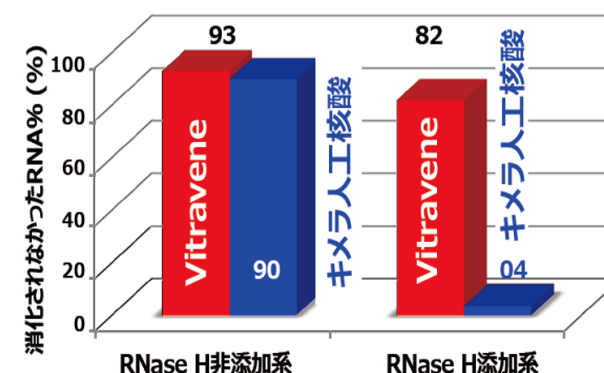


CMV網膜症治療用ホスホロチオエート・アンチセンス核酸Vitraveneとの薬効比較

- ①キメラ人工核酸はVitraveneに比較して
20～100倍効率的に標的RNAを消化
- ②ミスマッチ感受性向上し、Vitraveneより
オフターゲット効果抑制が期待
- ③MTTアッセイによりキメラ人工核酸は**毒性がない**



Vitravene
(Novartis)
アンチセンス核酸医薬



⇒ キメラ人工核酸: Vitraveneより優れた核酸医薬特性の実証

⇒ キメラ人工核酸を用いたモデルマウスでの実証試験へ

**In vitro・細胞試験での有効性実証&
動物試験での安全性実証に成功！**

新技術の特徴・従来技術との比較

15

- 従来の核酸医薬（アンチセンス、siRNA等）と同等の高い選択性を持ちながら、その触媒的切断機能に基づき、分子あたりの比活性が20～100倍と格段に高く、オフターゲット効果に起因する副作用が生じにくく、高力価で効力を発揮できることが期待される。
- また、その生物学的安全性については、マウス *in vivo*での反復投与試験にて毒性がないことを、一部検証済である。
- 一本鎖領域のみならずステム・二重らせん領域RNAも標的化可能

展開研の紹介(1): COVID-19治療薬への展開

研究実績

感染症制御・治療戦略

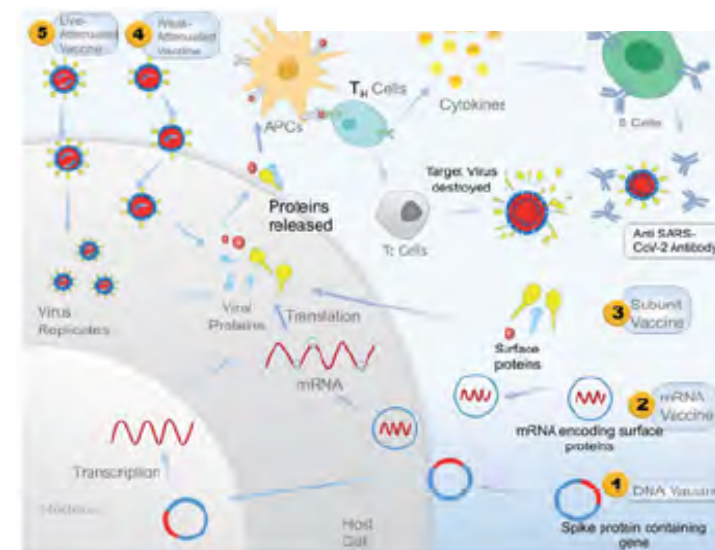
mRNAワクチンのように即対応できるのは核酸医薬



高活性触媒的標的RNA消化機能付与型
キメラ人工核酸を活用したCOVID-19治療薬開発

我々の3つの分子標的に基づく治療戦略

- 1) SARS-CoV-2ゲノムRNA切断による増殖抑制
- 2) 一過性局所ACE2発現抑制に基づく感染抑制
- 3) IL-6/STAT3標的サイトカインストーム制御



Funk, C. D. et al., Frontiers in Pharmacology, 2020, 11, 937.

SARS-CoV-2ゲノムRNA標的候補配列の網羅的探索と評価

保存性の高いゲノムRNA配列領域を標的

メインプロテアーゼとスパイクタンパク、ヌクレオキャプシドタンパクコーディング領域

＊ 10塩基シフト法を用いPS-アンチセンス核酸⇒ 標的候補RNA配列情報取得

＊ 細胞へのSARS-CoV-2感染抑制率 ⇒ RT-PCR & WST/MTTアッセイ (東北大医学系P3施設実施)

展開研の紹介(2): COVID-19治療薬への展開

SARS-CoV-2ゲノムRNA標的キメラ人工核酸戦略

研究実績

治療標的配列に対するキメラ人工核酸開発
⇒ **RT-PCR & WST/MTT アッセイ**
(東北大学医学系研究科P3施設で実施)

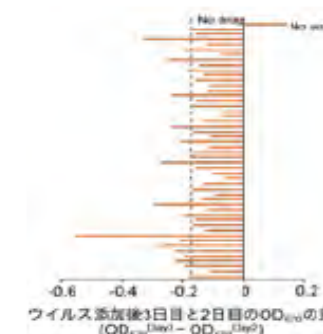
＊ **In vitro**での有効性確認

＊ 細胞試験での有効性確認初期的データ取得

＊ マウス気管内投与での安全性確認

＊ **vivo**のデータを取りつつある中、令和3年度で終了

⇒ **新興・再興感染症対策に有効な戦略候補**



課題：従来の核酸医薬設計は経験に基づく試行錯誤

⇒ 治療基盤としての展開には学理に基づく合理的設計指針構築が必要不可欠

**高活性触媒的標的RNA切断機能付与型人工核酸の構築と
革新的治療基盤としての展開**

注) 東北大学災害科学国際研究所 (医学研究科兼任) 児玉栄一教授らとの
AMED新興・再興感染症治療基盤技術事業による共同研究に基づく成果

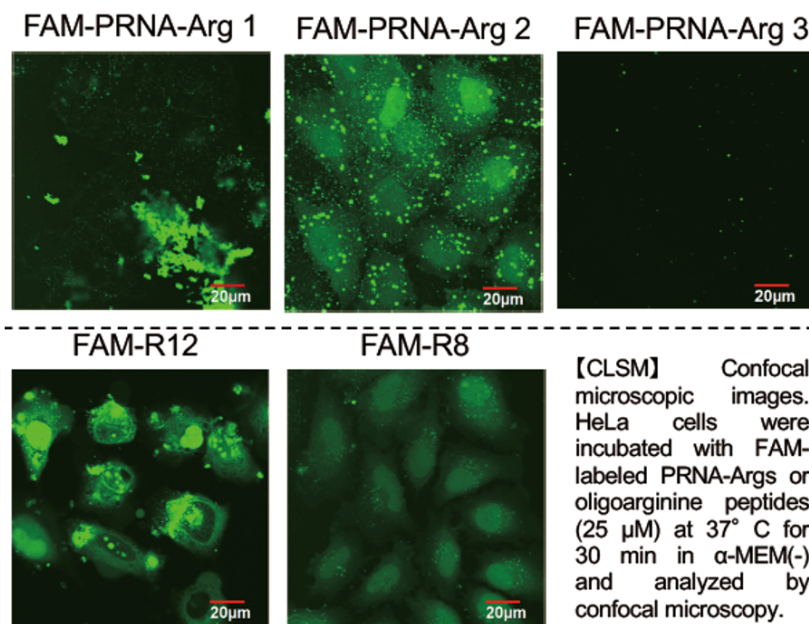
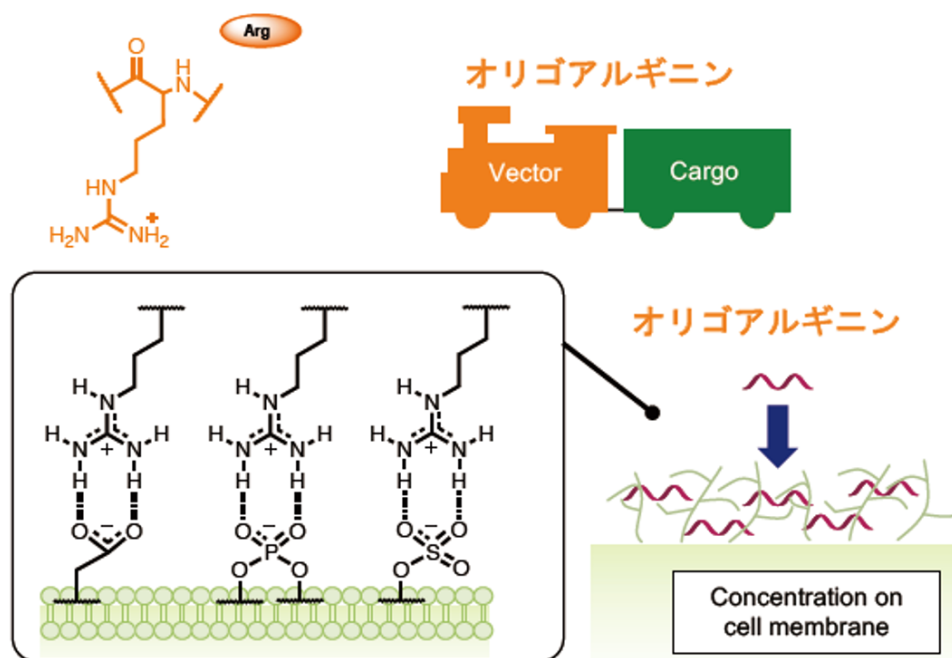
細胞内高効率導入能付与型キメラ人工核酸 18

キメラ人工核酸の剤型・投与方法提案に向けた効率的細胞膜透過機能付与の検討

＊高活性触媒的標的RNA消化機能キメラ人工核酸の投与方法

- ⇒ ポリオンコンプレックス型DDS活用による効率的腫瘍近傍へのデリバリー
- = ユニットPICの活用は核酸医薬の適用症例として好都合
- ⇒ 血中安定性や肝毒性・腎毒性、免疫系活性化などの問題は回避可能
- ⇒ 細胞膜透過性と細胞移行が重要な改善課題

＊オリゴアルギニン導入によるマクロピノサイトーシスによる高効率細胞内取込み戦略



【CLSM】 Confocal
microscopic images.
HeLa cells were
incubated with FAM-
labeled PRNA-Args or
oligoarginine peptides
(25 µM) at 37° C for
30 min in α-MEM(-)
and analyzed by
confocal microscopy.

想定される用途

19

- アンチセンスやsiRNAによる既存開発品を当技術に置き換えることにより、より高い薬効で、オフターゲット効果に起因する副作用の少ない、切れ味の良い新規核酸医薬の開発や、標的の検証が期待できる。
- 転写因子や細胞内シグナル分子など、undruggableな細胞内分子標的を対象とした、次世代核酸医薬での新規アプローチ。分子標的研究ツール等への利用。
- 新興感染症やがん、難治性疾患、あるいは稀少疾患など、疾患ゲノム解析からのターゲットアプローチを迅速展開する新規次世代核酸医薬分野に参入可能。

実用化に向けた課題

20

- 現在、COVID-19に対する治療薬の基礎研究として、分子標的に基づく、配列設計とin vivo薬効評価、毒性評価、非臨床に向けた液相法による高効率大量有機合成（特許化技術）が可能のところまで進捗。
- 今後、共同研究を希望する企業と、企業の保有する分子標的について、我々のノウハウに基づく複数の配列設計・合成に基づき評価された候補の薬効評価や開発等、ともに連携して展開できる企業を募集中。
- 更なる高活性をin silicoのみで高確度で得られる合理的分子設計理論の構築に向けた研究※は進める計画。
- 優れたDDSや細胞内移行性を高める安全性の高い分子修飾技術による最適化も、実用化に向け進めたい。

※）2023年度科学研究費補助金 基盤研究（S）に採択されて実施を計画

企業への期待

21

- 従来型のオリゴ核酸創薬の研究開発で課題を抱える企業、特に有望な分子標的を持ちながら、オフターゲット毒性や十分な薬効が得られずに、開発途上でドロップアウトのリスクを抱える製薬企業の方々に、是非とも当技術を活用いただきたい。
- 新規に核酸医薬事業参入機会を検討中の企業の方々に、前向きに共同研究して活用いただきたい。
- 優れた核酸医薬用DDS技術をお持ちの企業は、当技術と組み合わせたDDS技術の有用性評価も含め、連携に向けて是非ともお声がけいただきたい。

本技術に関する知的財産権

22

- 発明の名称：キメラ分子、医薬組成物、標的核酸の切断方法、及び標的核酸切断用又は診断用キット
- 知財関連番号：WO2021/015234
- 出願人：東北大学（単独出願）
- 発明者：和田健彦ら

お問い合わせ先

23

東北大学 産学連携機構 ワンストップ窓口

問い合わせフォーム

<https://www.rpip.tohoku.ac.jp/jp/aboutus/form>

TEL 022-795 - 5275

FAX 022-795 - 5286