

A 型核酸二本鎖に結合する人工カチオン性分子の開発と、これを用いた核酸医薬の有効性・安全性・薬物動態の制御

(東京科学大院医歯) ○原 倫太郎

Development of artificial cationic molecules for binding to A-type nucleic acid duplexes and their application in controlling the properties of oligonucleotide therapeutics (*Institute of Science Tokyo*) Rintaro Hara

Despite recent advancements in the field of oligonucleotide therapeutics, there are still some problems including insufficient efficacy, safety, and delivery. A-type nucleic acid duplex structures are important for both the mechanism of oligonucleotide therapeutics and their structure. Duplex-type oligonucleotides include siRNAs composed of RNA/RNA duplexes, and DNA/RNA heteroduplex oligonucleotides (HDOs). In our study, we have developed A-type duplex-specific binding cationic oligosaccharides and oligopeptides capable of recognizing the narrow major groove of the A-type duplexes.

ODAGal 4mer were able to bind to siRNAs to increase not only their thermal stability but also their RNase A resistance. The binding of Dab 8mer accelerated the cleavage rate of DNA/RNA heteroduplexes by RNase H, and ODAGal4 selectively inhibited the cleavage of some mismatched DNA/RNA heteroduplexes. Since RNase H cleavage is one of the fundamental mechanisms of action of antisense oligonucleotides and HDOs, these results are promising for regulating the activity and safety of oligonucleotide therapeutics. Furthermore, the addition of Dab 12mer into cholesterol-conjugated HDOs (chol-HDOs) has been demonstrated to be effective in reducing their adverse effects. Intravenous injection of high-dose chol-HDOs has been shown to induce adverse effects, including sedation and aPTT prolongation, and Dab 12mer addition effectively suppressed such side effects.

As previously outlined, we have demonstrated that a wide range of properties of oligonucleotide therapeutics can be improved using our A-type nucleic acid duplex binding molecules. Additionally, we have developed A-type duplex binding molecules conjugated with ligand molecules to improve the delivery of oligonucleotide therapeutics, and we will present the details of these studies.

Keywords : *oligonucleotide therapeutics; A-type nucleic acid duplexes; cationic oligosaccharides; cationic oligopeptides, RNase H;*

核酸オリゴマーからなる核酸医薬は、遺伝子に直接作用可能であることを特徴とする中分子医薬品である。近年急速に開発が進展し、2010 年以降に 19 品目が日欧米で認可されているが、一方で有効性、安全性、薬物送達の問題から全身投与は肝臓標的のものしか承認されておらず、局所投与型の核酸医薬も対象疾病が極めて限定的である。多くの核酸医薬は、相補的な配列を有する標的 RNA との二本鎖形成が作用機序の中核である。また、RNA/RNA 二本鎖からなる siRNA 医薬や、現在我々が開発を進めている DNA/RNA ヘテロ二本鎖核酸 (HDO) などでは核酸医薬自体が二本型構造であり、核酸二本鎖構造は、核酸医薬の構造と作用機序の両面で重要である。

RNA やその類縁体を多く含む二本鎖核酸は A 型二本鎖を形成し、B 型と呼ばれる DNA 二本鎖の構造とは異なる構造である。本研究では、このような A 型核酸二本鎖

に結合する分子を開発し、核酸医薬の高機能化を目指した。我々は、負電荷を有するリン酸基が密集するメジャーグループの幅が、A型二本鎖では狭いことに注目し、A型二本鎖の両鎖のリン酸基を架橋するようなカチオン性分子を設計した(図1A)。アミノ基やグアニジノ基がメジャーグループ幅に適合した形で配置されることで、両鎖との効率的な静電相互作用により結合することができる。我々は、図1Bに示すような種々のA型核酸二本鎖結合性カチオン性人工オリゴ糖・オリゴペプチドを合成し、その性質を評価した。ODAGalの4量体はsiRNAと複合体形成することで、siRNAの熱安定性を向上し、さらにsiRNAのヌクレアーゼ(RNase A)による分解をほぼ完全に抑制することができた¹⁾。また、DNA/RNA二本鎖にDab8量体(Dab8)を結合させると、DNA/RNAのRNase Hによる切断反応速度が向上することを見出した²⁾。DNA/RNA二本鎖とODAGal4の複合体では、一部のミスマッチDNA/RNAにおいて切断速度の顕著な抑制が観測された³⁾。アンチセンス核酸医薬やHDOは内在RNase Hによる標的RNA鎖の切断反応が主要作用機序であるため、本結果はこれらの核酸医薬の活性向上・副作用抑制技術への応用が期待できる。また、我々が開発した脳標的コレステロール連結型HDO(chol-HDO⁴⁾)において、急速静注時にいくつかの副作用が観測されるが、Dab12量体(Dab12)と複合体形成することで異常鎮静やaPTT延長などの副作用が抑制されることを見出した⁴⁾。

以上述べたように、独自のA型核酸二本鎖結合性分子を用いて、核酸医薬の安定性のみならず活性や安全性なども制御可能であることを示した。さらに、これらの分子にリガンド分子等の機能性分子の連結することでデリバリー向上を志向した分子の開発も進めており、これらの詳細について報告する。

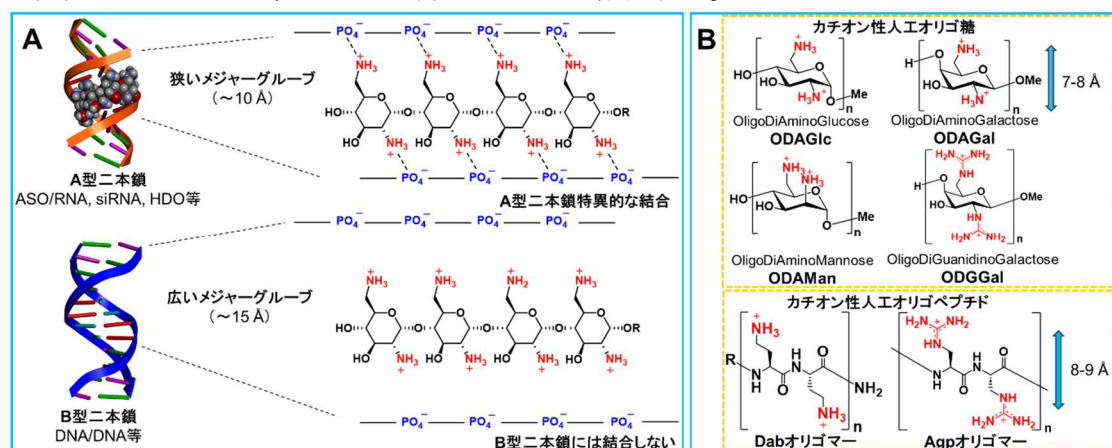


図1 (A) A型二本鎖への結合様式概念図 (B) : これまでに開発した人工カチオン性分子

- 1) Hara, R. I., Maeda, Y., Sakamoto, T., Wada, T., *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 1710-1717.
- 2) Hara, R. I.; Maeda, Y.; Fujimaki, H.; Wada, T., *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 8526-8529.
- 3) Hara, R. I.; Wada, T., *Org. Biomol. Chem.* **2021**, 19, 6865-6870.
- 4) Nagata, T.; Hara, R. I. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **2021**, 39, 1529-1536.
- 5) Ohara, M.; Hara, R. I. *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2024**, 35, 102289.