

核酸医薬品用オリゴヌクレオチドの製造



企業レポート

南海浩一*

Manufacturing of oligonucleotide for nucleic acid medicine

Key Words : oligonucleotide, nucleic acid, DNA, RNA

1. はじめに

“核酸医薬品”は次世代の医薬品として期待されているが、これまでに上市・承認された核酸医薬品は3品目で未だ開発途上である。その原因として核酸医薬品の本体であるオリゴヌクレオチドが生体内で不安定なことや有効なDDSがないことが挙げられるが、一昨年来米で承認された3品目目の核酸医薬品である KYNAMRO® は、化学修飾により生体内で分解されにくいヌクレオチドで構成され、全身投与が可能な仕様になっている。核酸医薬品開発は一時停滞感があったが、この承認の前後から以前にも増して活発になってきている。

(株) ジーンデザインではオリゴヌクレオチドの製造(化学合成)を行っており、研究開発用から治療薬まで生産している。本稿ではオリゴヌクレオチドの製造とその高機能化や分析方法などについて弊社での事例を少し交えながら紹介する。

2. 核酸医薬品

核酸医薬品とは、疾患ターゲットに対して有用な機能を持つようにヌクレオチドの順序を設計し、数個～百数十個程度のヌクレオチドを化学合成によりつなげたオリゴヌクレオチドである。核酸医薬品と

しての研究開発が進んでいるものでは図1に示すようなものなどが知られており、それらは全て基本的には同じように製造されている。同じく核酸を用いる遺伝子治療は、製造方法が化学合成ではないという点と、また核酸そのものが作用するのではなく、主としてタンパク質を発現させてそれが作用するという点が核酸医薬品とは大きく異なる。

核酸医薬品はターゲット特異的で副作用も少ないと考えられ、非常に有効な医薬品になりうるとされている。しかしオリゴヌクレオチドは生体内では速やかに分解・排出されてしまうことが核酸医薬品開発の障害となっている。血中ではエキソヌクレアー

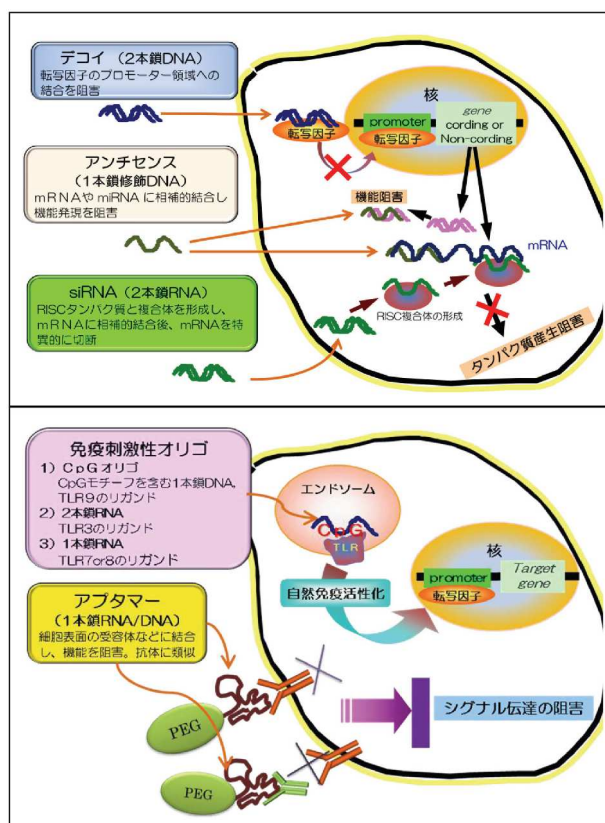


図1. 核酸医薬の種類(上:細胞内で作用するもの、下:受容体等に作用するもの)



* Hirokazu NANKAI

1970年3月生
近畿大学大学院工学研究科応用化学専攻
博士後期課程修了(1997年)
現在、株式会社ジーンデザイン
CMC開発部 部長
博士(工学), 博士(農学) 核酸化学
TEL: 072-640-5180
FAX: 072-640-5181
E-mail: nankai@genedesign.co.jp

ゼ（特に3'-エキソヌクレアーゼ）により、細胞内ではエンドヌクレアーゼにより分解されることが多く、またオリゴヌクレオチドは高い水溶性のため速やかに腎排泄もされてしまう。もうひとつの障害として有効なDDSがないことも挙げられる。このような障害を克服するためにこれまでオリゴヌクレオチドの化学修飾やオリゴヌクレオチドの末端への様々な分子の付加などが行われてきている。

3. オリゴヌクレオチドの製造

3-1 オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドの合成にはホスホロアミダイト法と呼ばれる固相合成法を用いるのが主流であり、この合成のための装置が市販されている。弊社でも少量合成用の装置を開発し、装置の販売も行ってい

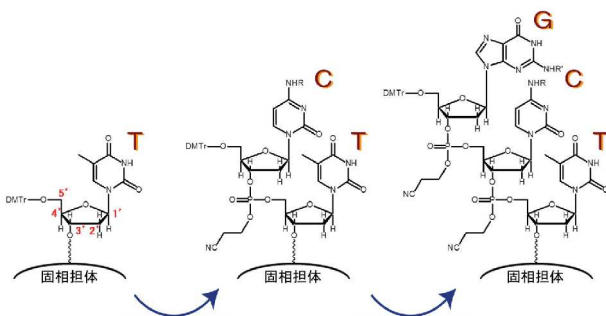


図2. オリゴヌクレオチドの合成 (3塩基【5'-GCT-3'】の合成例)

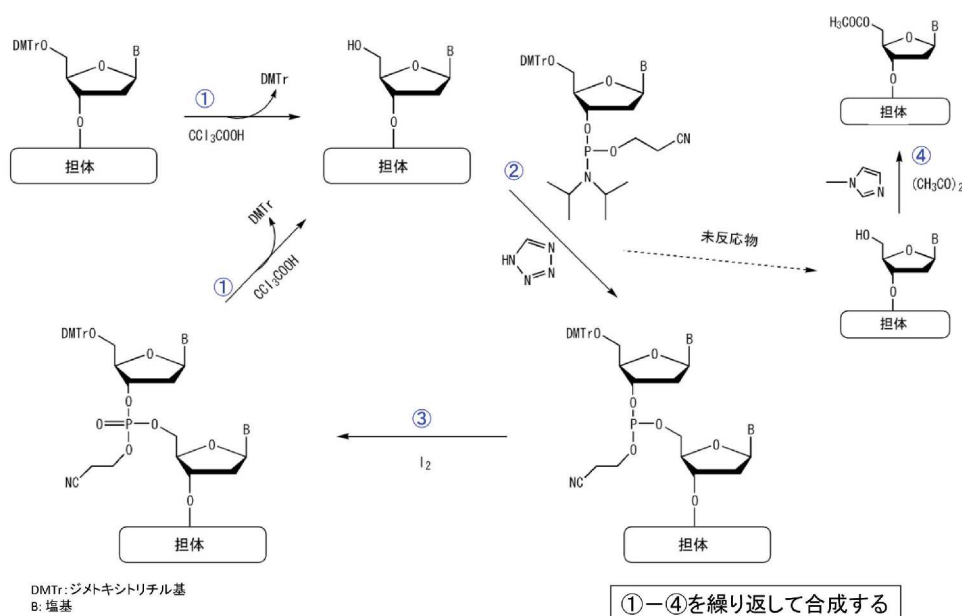


図3. オリゴヌクレオチドの合成サイクル (①→④の反応を繰り返して付加していく) (B:Base, 塩基)

る。また最近では実用化を見据えた液相合成法も開発が進んでおり、将来のスケールアップ製造時の大幅なコストダウンが期待されている。

固相合成に用いる担体としてはCPG (Controlled Pore Glass) と呼ばれる細孔を持つガラスビーズ、またはポリスチレンビーズを用いている。この担体表面上にアルキル鎖を介してモノマーのヌクレオチドの3'末端が結合したものをを用いることが多く、そこにアミダイトと呼ばれる修飾ヌクレオチドモノマーを繋げていきオリゴヌクレオチドを合成する。担体上への合成は、図2に示すように目的とするオリゴヌクレオチドの配列の3'末端側から5'末端に向けて1つずつヌクレオチドを付加していくが、1つのヌクレオチドを付加するためには、図3に示す4段階の反応が必要である。

合成サイクル完了後は、オリゴヌクレオチドを固相担体からの切り出しと塩基部の脱保護を行い、RNAの場合はさらに2'位の保護基を外す。以上の工程を経て粗オリゴヌクレオチド溶液が得られる。

3-2 オリゴヌクレオチドの精製

得られた粗オリゴヌクレオチド溶液は、次に液体クロマトグラフィーを用いて精製する。液体クロマトグラフィーとして、陰イオン交換液体クロマトグラフィー (AEX-LC) あるいは逆相イオンペア液体

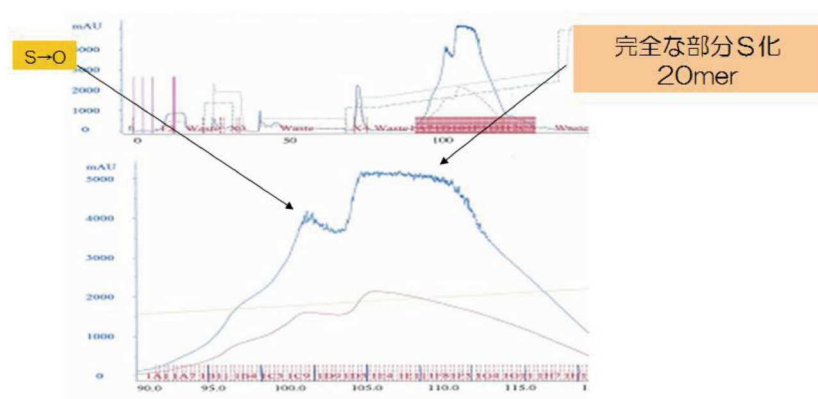


図4. オリゴヌクレオチドの精製例 (一部S化した20merDNAの精製例)

クロマトグラフィー (RP-IP-LC) を単独で、または両方を組み合わせて用いるものが多い。

分子量が数千から数万程度のオリゴヌクレオチドの精製を行うが、例えば図4に示すようにホスホロチオエート化 (S化) オリゴヌクレオチドに含まれるSがOに置き換わった不純物 (目的物の分子量より16小さい) でも条件を最適化すれば精製が可能である。

このように液体クロマトグラフィーにより分離した画分は、高速液体クロマトグラフィー (RP-IP-HPLC および AEX-HPLC) での純度確認や、質量分析による分子量の確認などの後に、目的の分子量のものを含み、目的の純度に達している画分を回収する。次に限外ろ過により溶媒の置換や塩の除去を行い目的のオリゴヌクレオチド水溶液を得る。さらに

この後、siRNAやデコイを製造する場合は、このあと2本鎖化が必要である。

4. オリゴヌクレオチドの高機能化

表1に示すようにオリゴヌクレオチドの化学修飾により機能性の向上が期待できる。配列内部の化学修飾として、ヌクレオチドそのものの修飾やリン酸ジエステル結合部分への修飾 (図5) がある。例えば、井上らが開発した2'-OMe¹⁾を用いるとヌクレアーゼ耐性の向上が見られ、今西・小比賀らのグループが開発したBNA²⁾や森田らが開発したENA³⁾を用いると、ヌクレアーゼ耐性の向上や2本鎖の安定性の向上 (Tm値の上昇) が見られる。山田らが開発したMCE⁴⁾を用いるとヌクレアーゼ耐性の向上や

表1. 各種修飾とその機能性

修飾手法	修飾位置	アプリケーション例	効果
2'位 O-Methyl 化 2'位 F 化	内部配列	siRNA, アプタマー, アンチセンス	生体内安定性の向上 免疫刺激性の低減
LNA BNA	内部配列	siRNA, アンチセンス	生体内安定性やターゲット特異性の向上
ホスホロチオエート (S 化) ホスホロジチオエート (PS2 化)	内部配列	siRNA, アンチセンス, デコイ核酸, CpG ODN	生体内安定性の向上
ペプチド付加、糖付加、 リガンド分子の付加	末端に付加	siRNA, アプタマー, アンチセンス, CpG ODN	細胞導入効率の向上 組織特異的デリバリー
Cholesterol などの 疎水性分子付加	末端に付加	siRNA, アンチセンス	細胞導入効率の向上 組織特異的デリバリー
高分子ポリエチレングリコール (PEG)付加	末端に付加	アプタマー	血中滞留性の付与

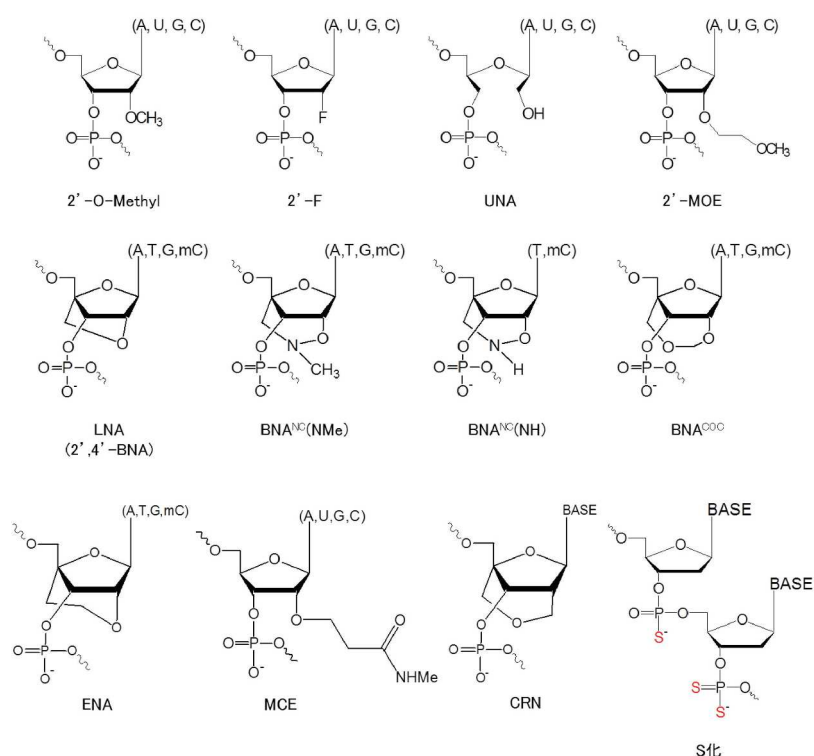


図5. 各種修飾核酸の例とリン酸ジエステル結合のS化

表2. 末端修飾と結合物質例

末端付加反応性官能基	結合様式・反応など	結合物質例
アミノ化(-NH ₂)	NHS 基を持つ活性エステルとアミド結合形成	高分子 PEG (10 kDa, 80 kDa など) 二価性リンカー
チオール化(-SH)	ペプチドの Cys 残基などとジスルフィド結合形成 マレイミド基への付加反応	膜透過シグナルペプチド 疎水性ペプチド
アルキン修飾(-C≡CH)	クリック反応	アジド化合物

エキソンスキッピングでモルフォリノ核酸と同等以上の効果が得られる。また、リン酸ジエステル結合部分へのS化を行うとヌクレアーゼ耐性が上がる。S化ではSが1個の場合光学異性体の混合物になるが、和田らのグループにより立体選択的なS化も開発され⁵⁾、WaVe Life Science 社により実用化研究が進められている。

一方末端への修飾では表2に示すように他の化合物を結合させるための反応性の官能基を付加することができ、そこからさらにさまざまな化合物を結合させることができる。アミノ基では5'末端、3'末端ともにこれまでのアミノ基よりも反応性の高いものが小松・小島らにより開発されている⁶⁾ (図6)。表2にも示すように末端修飾はDDSを目的とした

ものが多い。例えばアプタマーは、細胞表面の受容体と結合するため細胞内に導入する必要はないが、生体外へ速やかに排出されてしまうことを防ぎ、血中滞留性を向上させるために高分子のPEGを付加することがある。また、細胞内で作用するものでは、

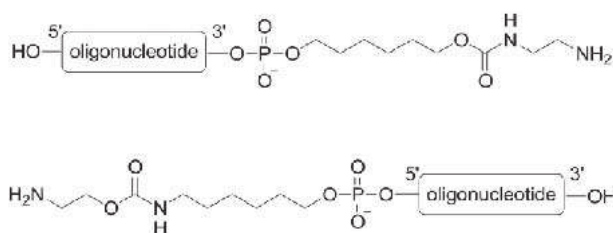


図6. 高反応性アミノリンカー (上: 3'末端用アミノリンカー (3'-アミノCAリンカー), 下: 5'末端用アミノリンカー (ssHアミノリンカー))

細胞内への導入効率向上を目指して末端にペプチドなどを付加することがある。

5. オリゴヌクレオチドの分析

得られたオリゴヌクレオチドが目的の通りに製造されたものかどうかを確認するために、種々の分析法により確認を行う。通常行う分析はRP-IP-HPLC, AEX-HPLC, キャピラリーゲル電気泳動などの純度分析, 質量分析 (MALDI-TOF-MS や LC-MS (TOF-MS または Orbitrap)) による質量の確認試験 (図7), その他には pH や凍結乾燥後の水分含量などがあり, 一般的な化学合成の低分子医薬品と同じように分析を行う。質量分析では数万の分子量でも検出可能な条件を見出している (図7-1)。例えば図7-2ではメ

インピークは目的の分子量だが, ピークの右側にショルダーがあり, この部分の分子量は目的物の分子量+14を示した。これは塩基部の脱保護時に使用したメチルアミン由来のシトシンへのメチル基の付加によるものだと考えられる。

また, オリゴヌクレオチド特有の分析として配列確認があり, これには質量分析を用いている。その方法として, 質量分析装置のイオン源内で分解させて解析する方法 (図8-1) や, MS/MS により解離させて解析する方法, 酵素あるいは酸⁷⁾で分解し分解物を質量分析で確認する方法 (図8-2), 合成途中でキャップされたもの (図3の④) を質量分析で検出することにより間接的に配列を確認する方法などがある。以上のような分析により, 核酸医薬品となるオリゴヌクレオチドの品質を管理している。

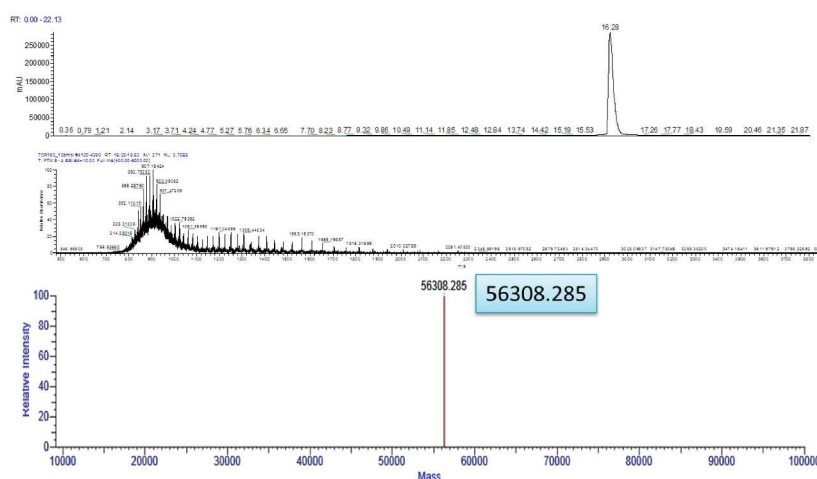


図7-1. LC-MSによる質量分析の例 (190mer DNA, 分子量56309) (上:クロマトグラム, 中:メインピークのマススペクトル, 下:デコンボリューション後の結果)

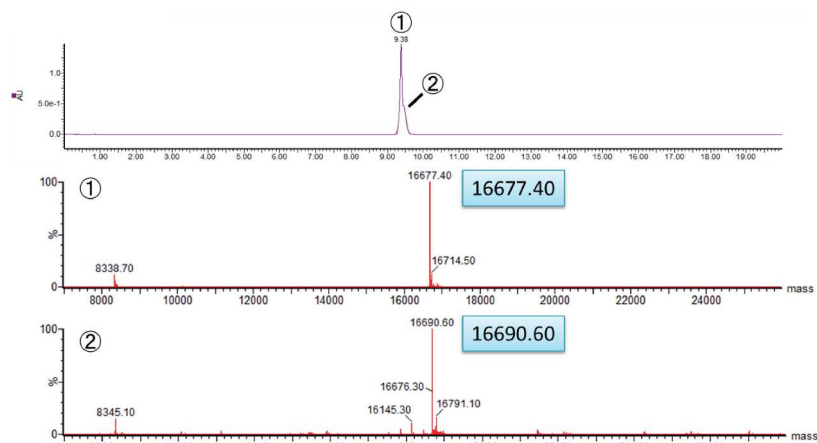


図7-2. LC-MSによる質量分析の例 (52mer RNA, 分子量16676) (上:クロマトグラム, 中:メインピークのMSのデコンボリューション後の結果, 下:ショルダー部分のMSのデコンボリューション後の結果)

6. おわりに

核酸医薬品の研究開発は国内でも活発になってきており、今後医薬品として実用化が期待できる。上述のように核酸の化学修飾などは日本発の技術が多く、このような技術を基に核酸医薬品が創出されることを願っている。この中で弊社も微力ながら日本発の核酸医薬品開発に貢献したい。

参考文献

- 1) H. Inoue, Y. Hayase, A. Imura, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka *Nucleic acids research*, **15** 6131-6148 (1987)
- 2) S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8735-8738 (1997). S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi, T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5401-5404 (1998). T. Imanishi, S. Obika, *Chem. Commun.*, **8**, 1653-1659 (2002). S.M.A. Rahman, S. Seki, S. Obika, H. Yoshikawa, K. Miyashita, T. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4886-4896 (2008).
- 3) K. Morita, C. Hasegawa, M. Kaneko, S. Tsutsumi, J. Sone, T. Ishikawa, T. Imanishi, M. Koizumi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 73-76 (2002). K. Morita, M. Takagi, C. Hasegawa, M. Kaneko, S. Tsutsumi, J. Sone, T. Ishikawa, T. Imanishi, M. Koizumi, *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 2211-2226 (2003).
- 4) T. Yamada, N. Okaniwa, H. Saneyoshi, A. Ohkubo, K. Seio, T. Nagata, Y. Aoki, S. Takeda, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, **76**, 3042-3053 (2011).
- 5) N. Oka, M. Yamamoto, T. Sato, T. Wada, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 16031-16037 (2008). Y. Nukaga, K. Yamada, T. Ogata, N. Oka, T. Wada, *J. Org.*

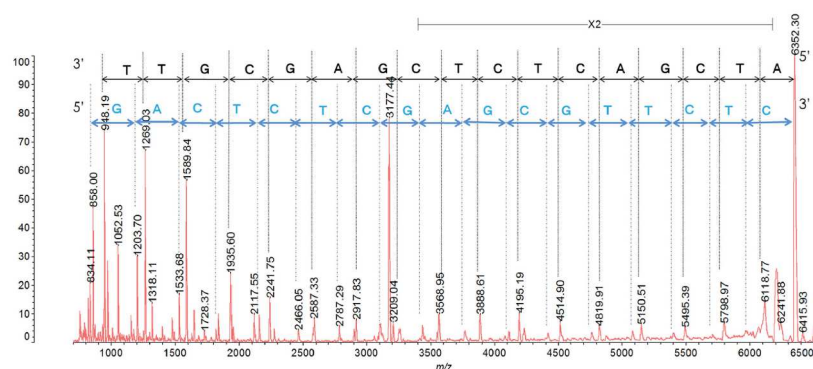


図8-1. MALDI-TOF-MSのIn source decayによる配列解析例
(配列: ATCGACTCTCGAGCGTTCTC 全S化DNA配列は文献⁸⁾に記載のもの)
MALDI-TOF-MSのイオン源でS化DNAを分解させ測定し、質量差から製造したオリゴヌクレオチドの配列を確認した。

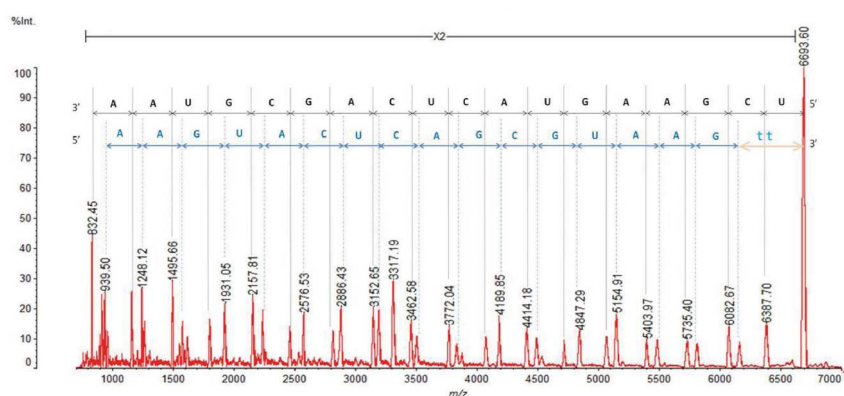


図8-2. 酸加水分解によるRNAの配列解析例 (配列: UCGAAGUACUCAGUGUAAGtt配列は文献⁹⁾に記載のもの)
酸で加水分解したRNAをMALDI-TOF-MSで測定し、質量差から製造したオリゴヌクレオチドの配列を確認した。

- Chem.*, **77**, 7913-7922(2012).
- 6) Y. Komatsu, N. Kojima, M. Sugino, A. Mikami, K. Nonaka, Y. Fujinawa, T. Sugimoto, K. Sato, K. Matsubara, E. Ohtsuka *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 941-949 (2008). N. Kojima, T. Takebayashi, A. Mikami, E. Ohtsuka, Y. Komatsu *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**, 2144-2147 (2009).
- 7) U. Bahr, H. Aygun, M. Karas *Anal. Chem.*, **81**, 3173-3179 (2009).
- 8) F. Takeshita, C.A. Leifer, I Gursel, K.J. Ishii, S. Takeshita, M. Gursel, D.M. Klinman, *J Immunol* **167**, 3555-3558 (2001).
- 9) S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *NATURE*, **411**, 494-498 (2001).

