



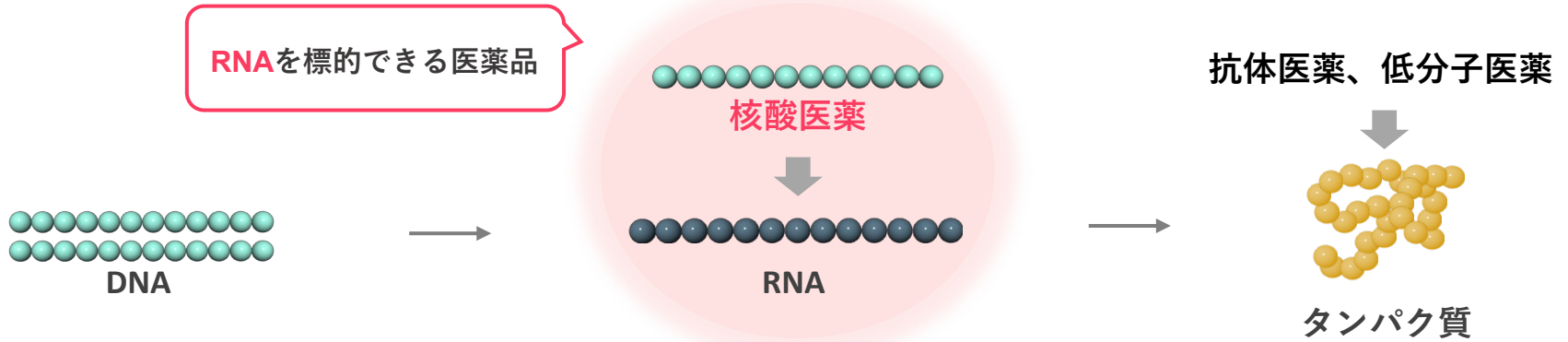
# 糖部修飾核酸を用いた 核酸医薬の分子設計

甲南大学 フロンティアサイエンス研究科  
博士後期課程2年 秋田 智香



KONAN  
FIRST

# 核酸医薬とは



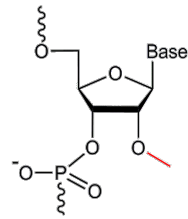
	アンチセンス	siRNA
標的	pre-mRNA, mRNA, miRNA	mRNA
医薬品構造	一本鎖核酸 	二本鎖核酸 
作用機序	 RNA分解/スプライシング阻害	 RNA分解

核酸の塩基特異性を利用してRNAに結合

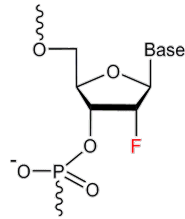
# 一般的に用いられる修飾核酸

## 糖部修飾

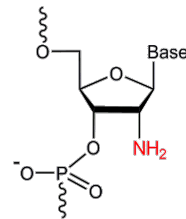
### 2'修飾核酸



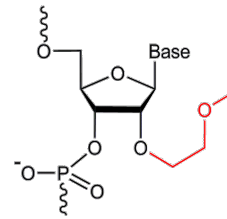
2'-OMe



2'-F



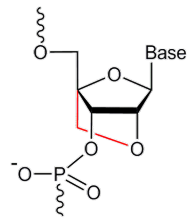
2'-NH<sub>2</sub>



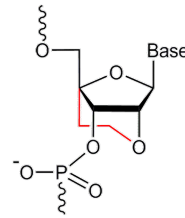
2'-MOE

- 承認・開発中医薬品
- 結合親和性
- ヌクレアーゼ耐性

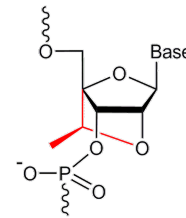
### 架橋型核酸



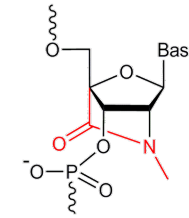
LNA



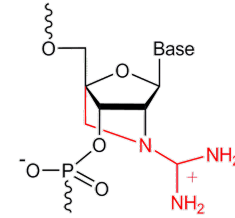
ENA



cEt

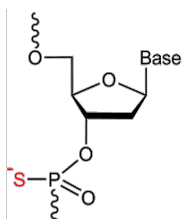


AmNA

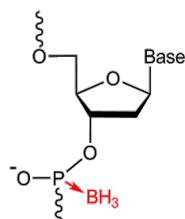


GuNA

## リン酸骨格部修飾

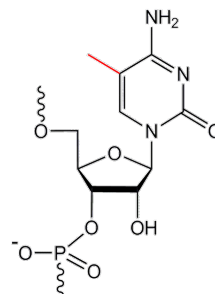


PS



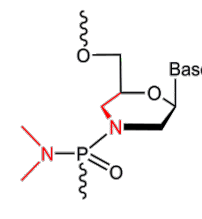
BP

## 塩基部修飾

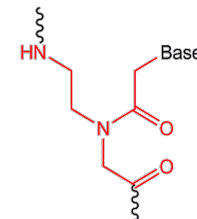


5-methyl-cytosine

## 全体修飾



PMO



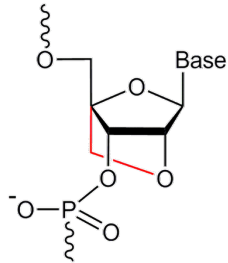
PNA

# 架橋型核酸の機能

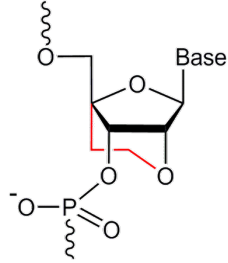
## 糖部修飾

### 架橋型核酸

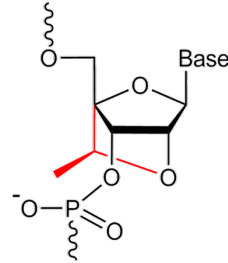
- 承認・開発中医薬品
- 結合親和性
- ヌクレアーゼ耐性



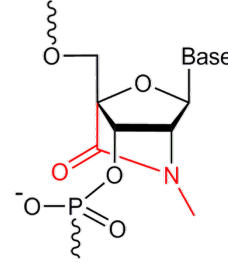
LNA



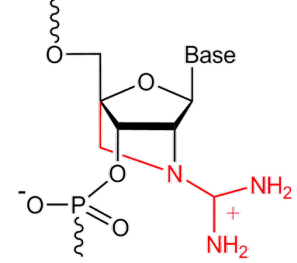
ENA



cEt



AmNA



GuNA

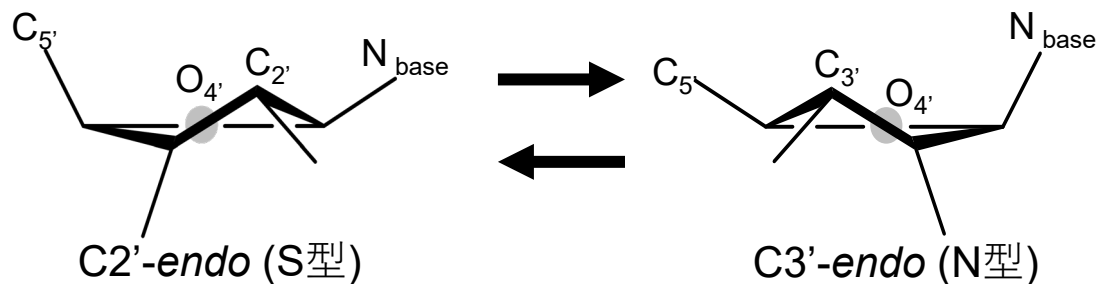
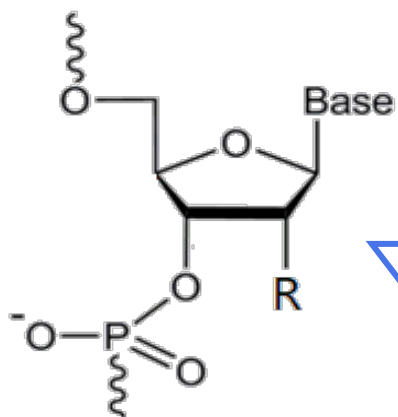
架橋型核酸は  
標的RNAとの結合親和性を大きく向上させる



メカニズム：pre-organization効果

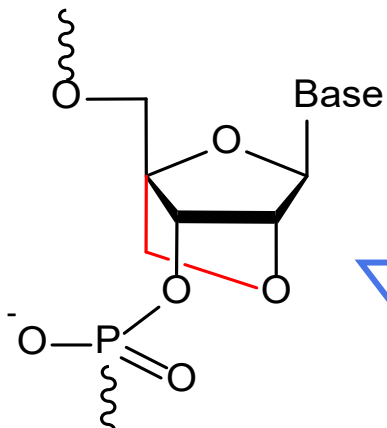
# pre-organizationによる結合親和性の向上

## 天然型核酸 (DNA, RNA)

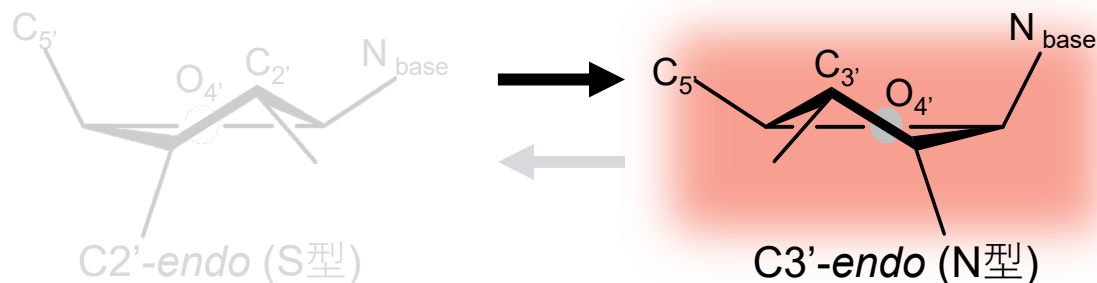


天然型の糖はS型, N型を行き来する

## 架橋型核酸 (LNA, ENA etc...)

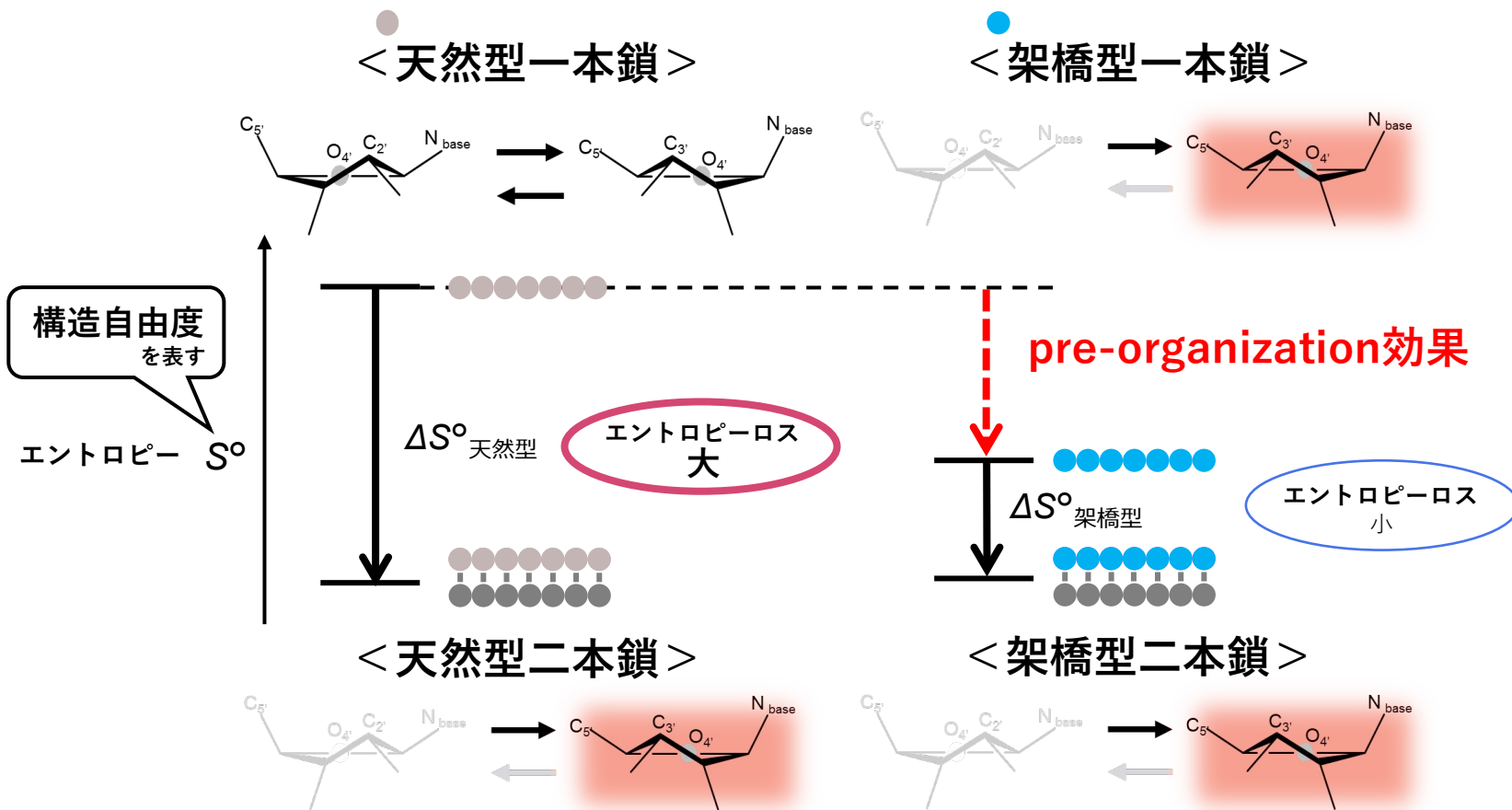


2',4'-BNA / LNA



糖を架橋してN型に固定化

# pre-organizationによる結合親和性の向上



負に大きいほど  
結合親和性大

エントロピーロスが小さいほど  
結合親和性大

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

$$= \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

ギブス自由エネルギー変化

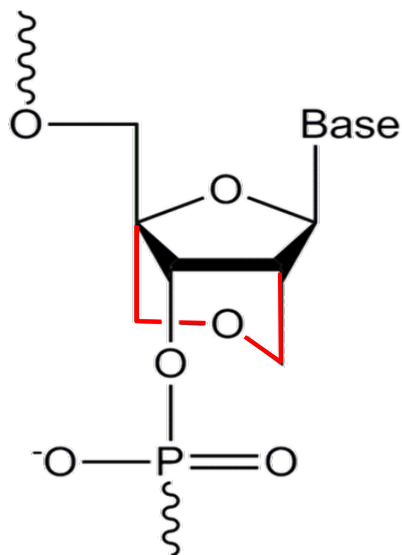
結合定数

エンタルピー変化

エントロピー変化

# 糖部を架橋した核酸であれば結合親和性を向上させる？

**CRN**: 2',4'-C-bridged 2'-deoxynucleoside



Sequence	$T_m$ for DNA (°C)	$\Delta T_m$ /Mod. (°C)
5'- d(ATCTCTCCGCTTCCTTTC) -3'	58.3	
5'- d(ATCTCT <b>CCGCTTCCTTTC</b> ) -3'	57.1	-0.4
5'- d(AT <b>CTCTCCGCTTCCTTTC</b> ) -3'	57.3	-0.1

※配列の太文字がCRN導入箇所

Guangyi Wang, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1147 (1999).

架橋型核酸であるCRNを導入すると不安定化  
従来の考えとは矛盾

# CRNがもたらす熱力学的影響を詳細に検討

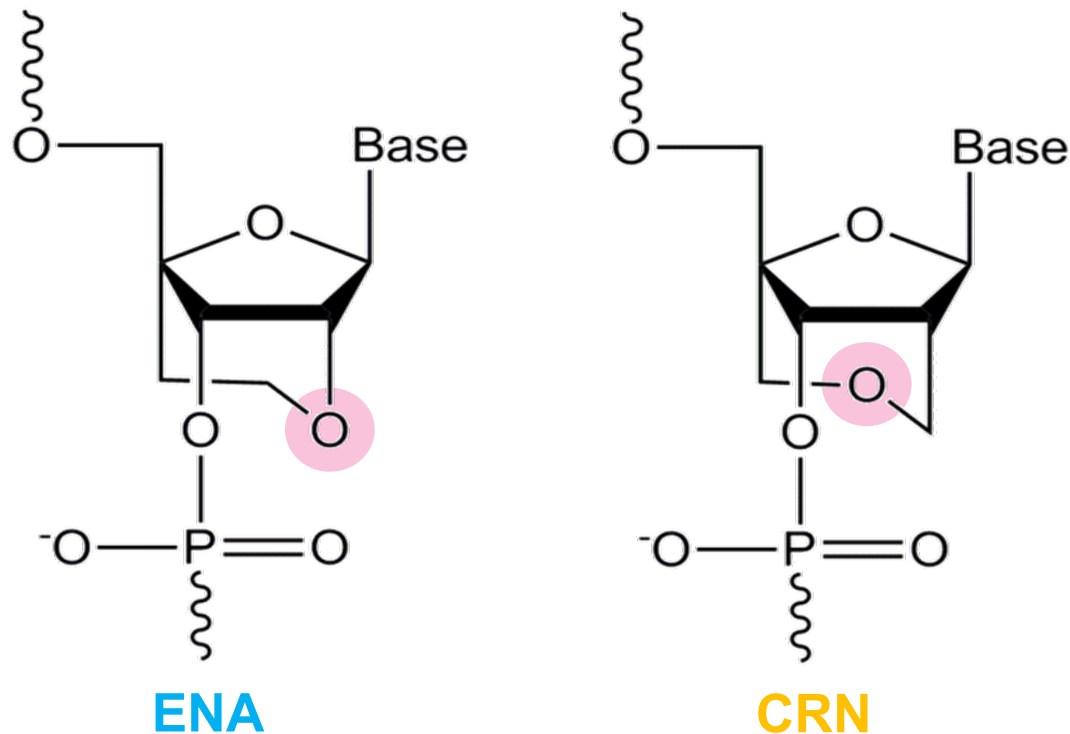


Figure. Chemical structures of a 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleotide (ENA) and a 2',4'-C-bridged 2' -deoxynucleotide (CRN).

## In This Study

酸素原子の位置が異なるENAと  
CRNとの熱力学的性質の比較を行った

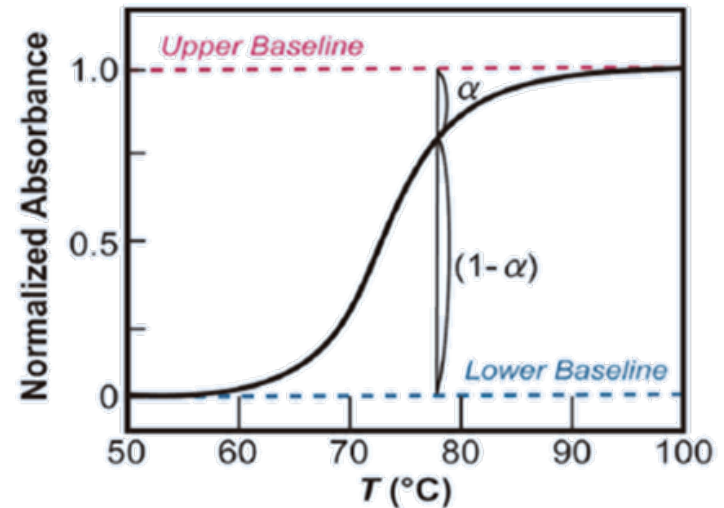


# 本研究で使用した配列と熱力学的解析

Table. Oligonucleotides used in this study

name	sequence (5' to 3')
RNA_b	UGCAAAAUCAAUGU
DNA_b	ACATTTGATTTTGCA
ENA4	ACA <u>T</u> TTGATTTTGCA
ENA5	ACAT <u>T</u> TGATTTTGCA
ENA6	ACATT <u>T</u> GATTTTGCA
ENA4+5	ACA <u>TT</u> TGATTTTGCA
ENA5+6	ACATT <u>TT</u> GATTTTGCA
CRN4	ACA <u>t</u> TTGATTTTGCA
CRN5	ACAT <u>t</u> TGATTTTGCA
CRN6	ACATT <u>t</u> GATTTTGCA
CRN4+5	ACA <u>tt</u> TGATTTTGCA
CRN5+6	ACAT <u>tt</u> GATTTTGCA

TT indicate ENA-thymine and tt indicate CRN-thymine.



Curve fitting

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

$$K = \frac{2\alpha}{(1-\alpha)^2 Ct} = \exp\left(-\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}\right)$$

$\log C_t$  plot

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^\circ} \cdot \ln\left(\frac{C_t}{4}\right) + \frac{\Delta S^\circ}{\Delta H^\circ}$$

DNA/RNA二重鎖のDNA鎖にENAもしくはCRNを導入した安定化効果を比較

# CRN導入による安定化効果は導入個数によって異なる

$\Delta G^{\circ}_{37}$  が負に大きいほど  
より安定に二重鎖形成

架橋型の安定化効果  $\Delta\Delta G^{\circ}_{37} =$   
 $\Delta G^{\circ}_{37}$  (架橋型) -  $\Delta G^{\circ}_{37}$  (天然型)

$\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$  が正 → 天然型の方が安定  
 $\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$  が負 → 架橋型の方が安定

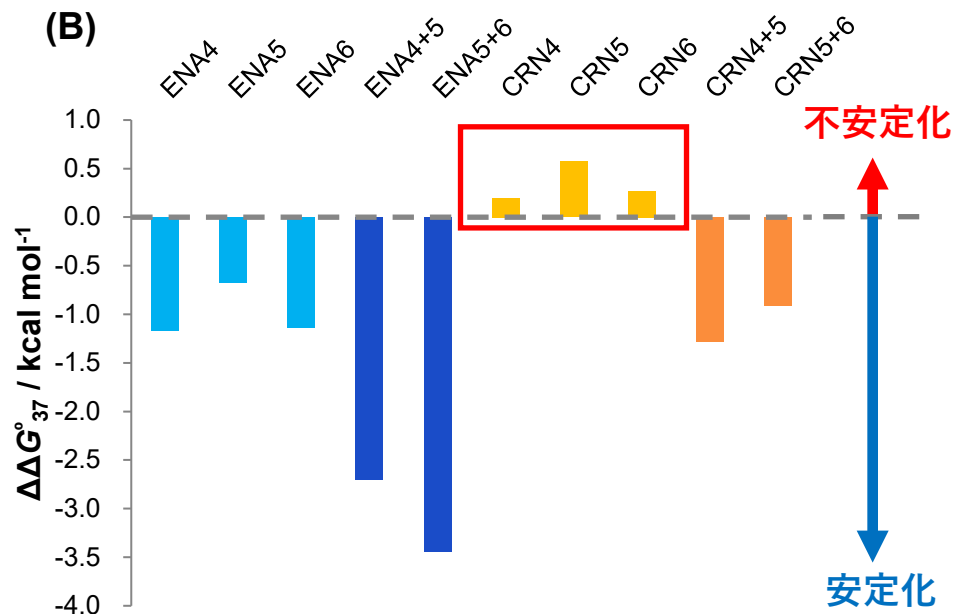
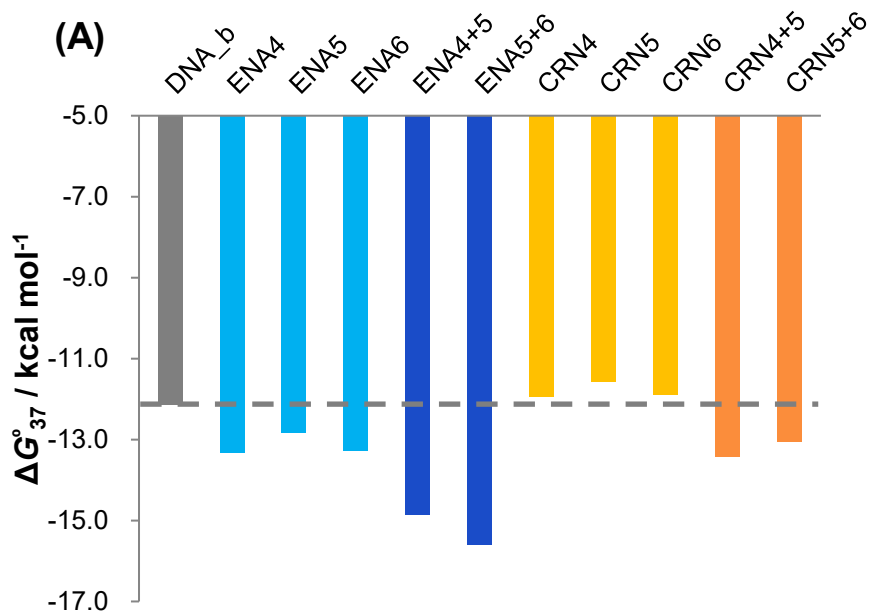


Figure. (A) Stabilization effect by ENA or CRN introduction. The parameters were obtained for the duplexes with complementary RNA\_b.

ENAを導入すると安定化したのに対し、CRNを導入すると不安定化が見られた。  
必ずしも全ての架橋型核酸が二本鎖の安定化をもたらすとは限らない。

本研究では、このメカニズムについて詳細を考察