

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年7月3日(03.07.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/143001 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/87 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/045860

(22) 国際出願日: 2024年12月25日(25.12.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-221597 2023年12月27日(27.12.2023) JP

(71) 出願人: 東亜合成株式会社 (TOAGOSEI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1058419 東京都港区西新橋1丁目14番1号 (JP).

(72) 発明者: ベイリー 小林 菜穂子 (BAILEYKOBAYASHI, Nahoko); 〒1058419 東京都港区西新橋一丁目14番1号 東亜合成株式会社内 (JP). 吉田 徹彦 (YOSHIDA, Tetsuhiko);

〒1058419 東京都港区西新橋一丁目14番1号 東亜合成株式会社内 (JP). ベイリー エリック ネルソン (BAILEY, Eric Nelson); 〒3050032 茨城県つくば市竹園3丁目27番地23 (JP).

(74) 代理人: 安部 誠 (ABE, Makoto); 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内三丁目20番3号 BPR プレイス久屋大通 弁理士法人協働特許事務所 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: NOVEL DOUBLE-STRANDED RNA BASED ON C5 RNA SEQUENCE, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: C5 RNA 配列に基づく新規二本鎖RNA及びその利用

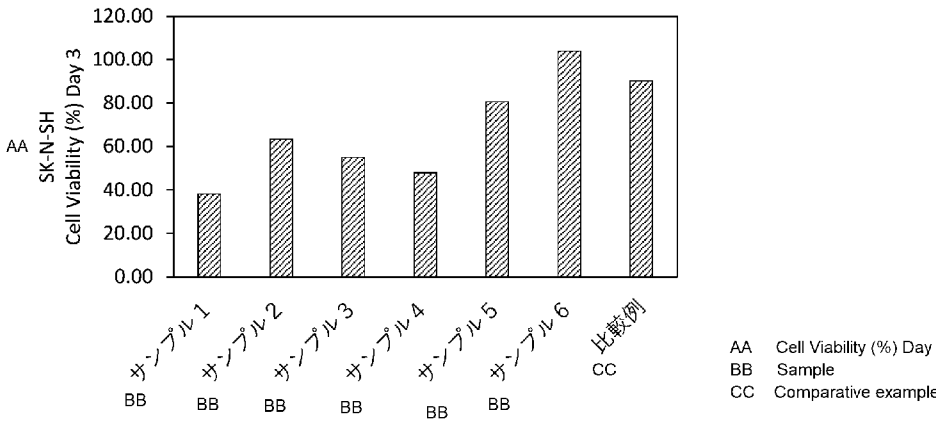


FIG.2

(57) Abstract: A double-stranded RNA disclosed herein has a first strand and a second strand that is complementary to the first strand, wherein the first strand has a main sequence comprising 19-23 nucleotides in which the 5'-terminal nucleotide is guanine (G) or cytosine (C), and an additional sequence comprising 2-4 nucleotides and added to the 3'-terminal side of the main sequence, and the main sequence is determined from among nucleotide sequences encoding signal peptide regions of a complement component C5.

(57) 要約: ここで開示される二本鎖RNAは、第1の鎖と、該第1の鎖に相補的な第2の鎖と、を有する二本鎖RNAであって、前記第1の鎖は、5'末端の塩基がグアニン(G)又はシトシン(C)である19以上23以下の塩基からなるメイン配列と、前記メイン配列の3'末端側に付加された2以上4以下の塩基からなる付加配列とを有しており、ここで、前記メイン配列は、補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列のうちから決定される。

WO 2025/143001 A1

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

C 5 RNA配列に基づく新規二本鎖RNA及びその利用

技術分野

[0001] 本開示は、二本鎖RNA及び該二本鎖RNAを含む組成物と、それらを利用する方法に関する。具体的には、腫瘍細胞の増殖又は転移を抑制又は阻害するために用いられる二本鎖RNAと、当該二本鎖RNAを備える組成物に関する。なお、本出願は、2023年12月27日に出願された日本国特許出願第2023-221597号に基づく優先権を主張しており、その出願の全内容は本明細書中の参照として組み入れられている。

背景技術

[0002] 補体系 (Complement system) は、自然免疫系の一部で、細菌やウイルス等の病原体の感染から生体を防御する。補体系は、数十種類の相互に作用し合うタンパク質からなる。補体系のタンパク質は、主に肝臓で作られ、血液と細胞外液中を循環している。補体系の大部分は、通常では活性がないが、細菌及びウイルス病原体の感染等によって活性化する。補体活性化経路は3つあり、古典経路 (第一経路)、レクチン経路 (マンノース結合レクチン経路)、副次経路 (第二経路) に分かれて作用する。補体系の活性化は、オプソニン作用、食細胞やリンパ球の遊走、および膜侵襲複合体 (MAC) による病原体の排除等を引き起こす。しかし、補体の過剰な活性化や不適切な調節が、結果として、自己免疫疾患、炎症性疾患、および腫瘍細胞の増殖、転移等に関与することが示唆されている。

[0003] 上記各経路の初期成分は局在的に働くが、どの経路も最終的に補体成分C5 (以下、単に「C5」ともいう。) の活性化を引き起こす。C5の活性化では、C5がC5aとC5bとに切断される。切断されたC5bは、C6、7、8及び9と結合し、MACを形成する。C5aは単独で拡散性シグナルとして作用し、食細胞やリンパ球を感染部位に引き寄せて炎症反応を促進す

る。以上のように、C5は補体活性化経路の後期成分として重要な役割を占めるため、C5の活性化及びC5の発現を阻害する医薬組成物も開示されている。例えば、特開2018-123125号公報には、C5を標的とした抗体医薬組成物が開示されている。また、特表2019-518028号公報には、C5を標的としたsiRNAが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2018-123125号公報

特許文献2：特表2019-518028号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 抗体医薬品等はコストが高く、品質を均一に保つのが難しい。核酸医薬品は、有機合成による大量生産が可能であり、品質の均一性を管理しやすい。本発明者は、核酸医薬品に着目し、特に、補体系で中心的な役割を占めるC5のシグナルペプチド領域に焦点を当てた。

[0006] 本開示は、補体成分C5の遺伝子発現が関与する細胞の増殖を抑制又は阻害する技術を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] ここで開示される二本鎖RNAは、第1の鎖と、該第1の鎖に相補的な第2の鎖とからなる。上記第1の鎖は、5'末端の塩基がグアニン(G)又はシトシン(C)である19以上23以下の塩基からなるメイン配列と、上記メイン配列の3'末端側に付加された2以上4以下の塩基からなる付加配列とを有する。ここで、上記メイン配列は、補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列のうちから決定される。

[0008] 上記二本鎖RNAは、少なくとも低分子干渉RNA (small interfering RNA: siRNA) として機能し得る。すなわち、かかる二本鎖RNAは、RNA干渉 (RNA interference: R

NA_i) を引き起こすことが予測される。かかる効果は、少なくとも補体成分C5の発現が抑制されるため、補体成分が関与する細胞の増殖を阻害する。

[0009] ここで開示される一態様の二本鎖RNAは、上記第2の鎖が、上記第1の鎖に相補的なメイン配列と、上記相補的なメイン配列の3'末端側に付加された2以上4以下の塩基からなる付加配列とを有する。かかる二本鎖RNAは、siRNAとして好適に機能し得る。これにより、より確実に補体成分が関与する細胞の増殖を阻害することができる。

[0010] ここで開示される一態様の二本鎖RNAは、上記メイン配列の3'末端側の5塩基のうち少なくとも3塩基はアデニン(A)及び/又はウラシル(U)である。これによって、補体成分C5の発現をより十分に抑制するため、補体成分が関与する細胞の増殖を阻害する。

[0011] ここで開示される一態様の二本鎖RNAは、上記補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列が、以下の塩基配列：

GGGCCTTTTGGGAATACTT (配列番号1) ;

GGCCTTTTGGGAATACTTT (配列番号2) ;

CCTTTTGGGAATACTTTGT (配列番号3) ;

CTTTTGGGAATACTTTGTT (配列番号4) ;

GGAATACTTTGTTTTTTAA (配列番号5) ;

のいずれかからなる。かかる二本鎖RNAは、より特異的に補体成分C5の発現を抑制する。これによって、補体成分C5の発現量が増加した細胞の増殖を阻害することができる。

[0012] ここで開示される一態様の二本鎖RNAでは、上記付加配列を構成する塩基配列がチミン・チミン(TT)である。これにより、二本鎖RNAの安定性を向上させることができる。

[0013] 本開示により、少なくとも1種の細胞の増殖を阻害することができる組成物が提供される。ここで開示される組成物の一態様は、第1の鎖と、該第1の鎖に相補的な第2の鎖とからなり、上記第1の鎖は、5'末端の塩基がグ

アニン（G）又はシトシン（C）である19以上23以下の塩基からなるメイン配列と、上記メイン配列の3'末端側に付加された2以上4以下の塩基からなる付加配列とを有する。ここで、上記メイン配列は、補体系因子C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列のうちから決定される二本鎖RNAを含む。かかる組成物は、細胞に供給された場合、少なくとも補体成分C5の発現が抑制されるため、補体成分が関与する細胞の増殖を阻害する。

[0014] ここで開示される組成物の一態様において、上記組成物が増殖を阻害する細胞種は、腫瘍細胞である。これにより、より確実に細胞の増殖を阻害できる。

[0015] ここで開示される組成物の一態様は、細胞の外部から細胞膜を通過して細胞質内に外来物質を導入させ得る細胞膜透過性を有するペプチドフラグメントを含む。これにより、二本鎖RNAを目的の細胞に導入させやすくする。

[0016] 本開示により、少なくとも1種の細胞の増殖を阻害する方法が提供される。ここで開示される方法の一態様は、（1）ここで開示される組成物を用意する工程と、（2）上記組成物を、インビトロにおいて目的とする細胞に供給する工程とを包含する。これにより、補体成分が関与する細胞の増殖を阻害することができる。

[0017] ここで開示される方法の一態様は、上記細胞の生物種と、補体成分C5が含まれる生物種とが同じである。これにより、より確実に補体成分が関与する細胞の増殖を阻害することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]補体経路の概略を示す模式図である。

[図2]サンプル1～5および比較例における神経芽腫細胞の細胞生存率を示すグラフである。

[図3]サンプル1～4および比較例について、異なる添加量における神経芽腫の細胞生存率を示すグラフである。

[図4]サンプル1～4および比較例における乳がん細胞の細胞生存率を示すグ

ラフである。

[図5]サンプル5および比較例における肺がん細胞の細胞生存率を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0019] <用語の定義>

以下、ここで開示される技術について詳細に説明する。本明細書において特に言及している事項（例えば、二本鎖RNAの構成）以外の事柄であって、本技術の実施に必要な事柄（例えば、ポリヌクレオチドの合成方法、細胞培養技法、ペプチドや核酸を主成分とする構築物等に関するような一般的事項等）は、細胞工学、生理学、医学、薬学、有機化学、生化学、遺伝子工学、タンパク質工学、分子生物学、遺伝学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。ここに開示される技術は、本明細書に開示されている内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。

[0020] 本明細書において「ポリヌクレオチド」とは、複数（2以上）のヌクレオチドがリン酸ジエステル結合で結ばれたポリマーを指す用語であり、ヌクレオチドの数によって限定されない。例えば、ヌクレオチドとしてデオキシリボヌクレオチドとヌクレオチドとの両者を含むものも本明細書における「ポリヌクレオチド」に包含される。また、本明細書において「人為的に設計されたポリヌクレオチド」とは、そのヌクレオチド鎖（全長）がそれ単独で自然界に存在するものではなく、化学合成或いは生合成（すなわち遺伝子工学に基づく生産）によって人為的に合成されたポリヌクレオチドをいう。

[0021] 本明細書において、「第1の鎖」及び「第2の鎖」は、一方がセンス鎖（若しくはコード鎖若しくはパッセージャー鎖）であり、他方がアンチセンス鎖（若しくは鋳型鎖若しくは非コード鎖若しくはガイド鎖）を指す。すなわち、第1の鎖がセンス鎖である場合、第2の鎖はアンチセンス鎖を指す。また、第2の鎖がセンス鎖である場合、第1の鎖はアンチセンス鎖を指す。第1の鎖及び第2の鎖は、互いに完全に相補的であってもよく、少なくとも部

分的に相補的であってもよい。すなわち、少なくとも生理学的条件下においてハイブリダイズすることが可能であればよい。

[0022] 本明細書において塩基配列は「5'」及び「3'」の記載が付されていない限り、常に左側が5'末端側であり、右側が3'末端側を示す。また、本明細書において「アミノ酸残基」とは、特に言及する場合を除いて、ペプチド鎖のN末端アミノ酸およびC末端アミノ酸を包含する用語である。また、本明細書中に記載されるアミノ酸配列は、常に左側がN末端側であり右側がC末端側である。

[0023] 本明細書において「腫瘍」とは、広義に解釈される用語であり、癌腫及び肉腫或いは血液や造血組織の病変（白血病、リンパ種等）を含む腫瘍一般（典型的には悪性腫瘍）をいう。また、「腫瘍細胞」とは、「がん細胞」と同義であり、そのような腫瘍を形成する細胞であって、典型的には周辺の正常組織とは無関係に異常に増殖を行うに至った細胞（いわゆるがん化した細胞）をいう。したがって、特別に規定しない限り、正常細胞ではなく腫瘍細胞（がん細胞）に区分される細胞であれば、該細胞の起源や性状に関わりなく腫瘍細胞と呼称される。

[0024] 本明細書において数値範囲を「A～B（ここでA、Bは任意の数値）」と記載している場合は、「A以上B以下」を意味すると共に、「Aを超えてB未満」、「Aを超えてB以下」、および「A以上B未満」の意味を包含する。

[0025] <補体成分>

本明細書において、「補体成分」は、補体経路及びその活性化に関与するタンパク質を指す。補体成分は、例えば、C1（C1r、C1s、C1p）、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、CFB、CFD、MBL、及びMASP等である。図1は、補体活性化の概略を示した模式図である。古典経路では、主に補体成分C1、C2、C4等が関与する。古典経路は、IgMまたはIgGの抗体分子が補体成分C1qに結合することで開始する。C1r及びC1sが活性化され、C2及びC4がそれぞれC2a及

びC 2 b、C 4 a 及びC 4 b に分解される。その後、C 4 b とC 2 a とが複合体を形成する。C 4 b C 2 a 複合体が、C 3 転換酵素として働き、C 3 をC 3 a 及びC 3 b に分解する。副次経路は、微生物の細胞膜上でC 3 が加水分解されることで開始する。加水分解されたC 3 は、補体B 因子 (C F B) が結合し複合体を形成する。この複合体に補体D 因子 (C F D) が作用することで、C 3 転換酵素として働き、C 3 をC 3 a 及びC 3 b に分解する。レクチン経路では、血清レクチンの一種であるマンノース結合レクチン (M B L) 等が病原体の表面におけるマンノース等の糖鎖に結合して活性化されることで開始する。セリンプロテアーゼの1 種であるM A S P が活性化され、C 2 及びC 4 がそれぞれC 2 a 及びC 2 b、C 4 a 及びC 4 b に分解される。その後、古典経路と同様に、C 4 b とC 2 a とが複合体を形成する。C 4 b C 2 a 複合体が、C 3 転換酵素として働き、C 3 をC 3 a 及びC 3 b に分解する。このように補体系は、各経路がC 3 の活性化に収束する。

[0026] C 3 が活性化された後、古典経路及びレクチン経路では、C 3 b がC 2 a 及びC 4 b と複合体を形成する。C 4 b C 2 a C 3 b 複合体が、C 5 転換酵素として働き、C 5 をC 5 a とC 5 b に分解する。C 5 b は、C 6、C 7、C 8 及び複数のC 9 と結合し、M A C を形成する。副次経路では、C F B と2 つのC 3 b との複合体がC 5 転換酵素として働く。このように補体系は、最終的に各経路がC 5 の活性化に収束する。したがって、補体の過剰な活性化や不適切な調節を抑制するためにC 5 の発現を阻害することは効果的である。

[0027] <補体成分C 5 >

本明細書において「補体成分C 5 (単に「C 5」ともいう。)」は、補体系 (C o m p l e m e n t s y s t e m) に関与するタンパク質の1 種である。しかし、それに限定されないすべての同義語を包含することを意味し、天然に存在するC 5 並びにその変異体を含む。C 5 の由来となる生物種は、特に限定されないが、ここで開示される二本鎖R N A 又は組成物を供給する対象となる細胞の動物種と同じであることが好ましい。例えば、ヒト由来

の細胞にここで開示される二本鎖RNA又は組成物を供給する場合には、ヒトC5の塩基配列に基づいた塩基配列をメイン配列とするとよい。なお、ここでは、ヒト由来のC5を好適例として説明するが、ヒト以外の哺乳動物その他の動物種を含む生物種由来のC5であっても本技術は適応され得る。

[0028] C5は、様々な疾病、疾患で過剰発現していることが知られている。例えば、黄斑変性（網膜剥離、脈絡網膜変性、網膜変性、光受容体変性、RPE変性、ムコ多糖症、桿体錐体ジストロフィー、錐体桿体ジストロフィー、錐体変性）、加齢黄斑、癌、スタルガルト病、ベスト病、発作性夜間血色素尿症、非典型溶血性尿毒症症候群、関節リウマチ、及び神経変性疾患などでC5の発現量が関与していることが示唆されている。また、これらの疾病、疾患に伴う炎症反応や細胞死にも関与している。具体的には、腫瘍細胞の表面では、補体系のタンパク質の発現が増大していることが知られている。すなわち、ここに開示される二本鎖RNA及び組成物は、上記の疾患、疾病に伴いC5の発現量が増加している細胞に好適に作用し、その増殖を阻害することができる。また、C5の活性化は、補体経路において、C3の活性化よりも下流に位置する。したがって、C5の発現を抑制することは、上記の疾患、疾病に伴いC5の発現量が増加している細胞の増殖を阻害しつつ、C3bのオプソニン作用や貪食機能を維持することができるという利点がある。

[0029] <シグナルペプチド領域>

C5の塩基配列は、国際的なデータベースから入手することができる。例えば、国際的なデータベースは、NCBI (National Center for Biotechnology Information)、ENA (European Nucleotide Archive)、DDBJ (DNA Data Bank of Japan)、UniProt、Ensembl等である。具体的には、ヒトC5の塩基配列は、NCBIにおいてアクセッション番号NM_001735.3等で提供されている。なお、C5のシグナルペプチド領域の情報についても、上述の国際的なデータベースから入手することができる。

[0030] C5は、約1676アミノ酸残基からなる。配列番号11に示されるアミノ酸配列は、18アミノ酸残基からなり、ヒトC5のシグナルペプチドのアミノ酸配列を示す。また、配列番号12に示される塩基配列は、54塩基から構成され、ヒトC5のシグナルペプチドの塩基配列を示す。

[0031] <二本鎖RNA>

本開示の二本鎖RNAは、第1の鎖と、該第1の鎖に相補的な第2の鎖と、を有する二本鎖RNAである。なお、ここでは、第1の鎖をセンス鎖、第2の鎖をアンチセンス鎖として以下、詳細に説明する。センス鎖は、5'末端の塩基がグアニン(G)又はシトシン(C)である19塩基~23塩基からなるメイン配列と、該メイン配列の3'末端側に付加された2塩基~4塩基からなる付加配列とを有する。また、該メイン配列は、補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列から決定される。

[0032] メイン配列は、典型的には、リボヌクレオチドのポリマーであるポリヌクレオチドで構成される。換言すれば、メイン配列はRNAで構成される。すなわち、メイン配列の塩基配列は、典型的には、A(アデニン)、U(ウラシル)、G(グアニン)、C(シトシン)の4文字、またはa、u、g、cの4文字で表記される。ただし、添付の配列表では、ウラシルがT(チミン)で表示され得る。

[0033] センス鎖のメイン配列は、例えば、C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の一部の塩基配列であり得る。これにより、二本鎖RNAはC5をターゲットとしたsiRNA(small interfering RNA)として機能し得る。また、C5のシグナルペプチド領域の塩基配列はmRNAの上流側に存在するため、二本鎖RNAがsiRNAとして機能する際に、効果的にC5の発現を抑制することができ得る。

[0034] ここで開示される二本鎖RNAは、少なくともsiRNAとして機能し得る。すなわち、かかる二本鎖RNAは、RNA干渉(RNA interference: RNAi)を引き起こすことが予測される。RNAiはsiRNA等の短い二本鎖RNAによって、遺伝子発現を配列特異的に抑制する

遺伝子サイレンシングプロセスである。s i R N Aは細胞内に導入されると、細胞内のタンパク質とR I S C (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる複合体を形成する。R I S Cは標的とする遺伝子（ここでは、C 5 遺伝子）から転写されたm R N Aの相同配列に結合し、該m R N Aを特異的に切断する。これにより、翻訳が阻害される。

[0035] メイン配列は、好ましくはC 5 のシグナルペプチド領域又はC 5 のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の中から選択されるが、本技術の効果を奏する範囲において、1 塩基または複数の塩基（例えば、2 塩基）が他の塩基に置換、欠失及び／又は付加（挿入）されていてもよい。

[0036] メイン配列においてC 5 のシグナルペプチド領域又はC 5 のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列が占める割合は、メイン配列全体を1 0 0 %としたとき、例えば、4 5 %以上であることが好ましく、6 0 %以上、7 5 %以上、9 0 %以上、または1 0 0 %以上であってもよい。

[0037] メイン配列の5' 末端は、グアニン又はシトシンであることが好ましい。グアニン及びシトシンは相補鎖との結合力がアデニン及びウラシルよりも高いため、センス鎖の5' 末端側（すなわち、アンチセンス鎖の3' 末端側）の安定性が高くなる。換言すれば、アンチセンス鎖の5' 末端側の安定性が相対的に低くなる。メカニズムの詳細は明らかではないが、R N A i 関連タンパク質であるR I S Cはセンス鎖、アンチセンス鎖のうち、5' 末端側がよりエネルギー的に不安定な鎖を優先的に取り込む傾向がある。そのため、メイン配列の5' 末端がグアニン又はシトシンであることで、アンチセンス鎖がR I S Cに取り込まれやすくなり、R N A i をより好適に誘導し得る。これにより、二本鎖R N Aがs i R N Aとして好適に機能し得る。

[0038] メイン配列の3' 末端側の5 塩基において、アデニン及び／又はウラシルが6 0 %以上（すなわち3 塩基以上）含まれることが好ましく、8 0 %以上（すなわち4 塩基以上）含まれてもよく、1 0 0 %（すなわち5 塩基）であってもよい。これにより、アンチセンス鎖の5' 末端側の安定性が3' 末端側よりも相対的に低くなる。その結果、アンチセンス鎖がR I S Cに取り込

まれやすくなり、RNAiをより好適に誘導し得る。

[0039] メイン配列全体のGC含量（メイン配列を構成する塩基配列全体に占めるGおよびCの合計割合）は、特に限定されないが、例えば、20%以上60%以下であるとしてよく、30%以上50%以下が好ましく、30%以上45%以下であってもよい。GC含量は、RISCに取り込まれるアンチセンス鎖と、メイン配列を有するRNAとの結合力や、RNAの切断容易性等に関わるパラメータである。上記GC含量であれば、RNAiの効果を効率的に発揮できる。

[0040] メイン配列は、ヒトC5をコードする遺伝子のG又はCから19～23塩基を選択できる。例えば、メイン配列は、以下の塩基配列：

GGGCCUUUUGGGAUACUU（配列番号21）；

GGCCUUUUGGGAUACUUU（配列番号22）；

CCUUUUGGGAUACUUUGU（配列番号23）；

CUUUUGGGAUACUUUGUU（配列番号24）；

GGAAUACUUUGUUUUUUA（配列番号25）；

のいずれかであり得る。配列番号21乃至25に示す塩基配列はいずれもRNAで構成されている。配列番号21乃至25に示す塩基配列はいずれもC5遺伝子に特異的であり、ターゲット配列に類似した塩基配列を有する宿主細胞のmRNAの翻訳を阻害する虞（いわゆる、オフターゲット効果）を回避できる。また、配列番号21乃至25に示す塩基配列をメイン配列とする二本鎖RNAは、低濃度であっても異常増殖性細胞の増殖を顕著に抑制するため、非特異的な発現阻害や非特異的な細胞増殖阻害、細胞へのストレス等を回避し得る。

[0041] 配列番号1に示す塩基配列（配列番号21のRNA配列に対応するDNA配列）は、ヒトC5をコードする塩基配列（すなわち開始コドンから終始コドンまでの配列）の3番目～21番目の塩基配列である。配列番号2に示す塩基配列（配列番号22のRNA配列に対応するDNA配列）は、ヒトC5をコードする塩基配列の4番目～22番目の塩基配列である。配列番号3に

示す塩基配列（配列番号23のRNA配列に対応するDNA配列）は、ヒトC5をコードする塩基配列の6番目～24番目の塩基配列である。配列番号4に示す塩基配列（配列番号24のRNA配列に対応するDNA配列）は、ヒトC5をコードする塩基配列の7番目～25番目の塩基配列である。配列番号5に示す塩基配列（配列番号25のRNA配列に対応するDNA配列）は、ヒトC5をコードする塩基配列の13番目～21番目の塩基配列である。なお、配列番号1乃至5に示す塩基配列は、ヒトC5のシグナルペプチド領域の一部の塩基配列である。

[0042] 配列番号21乃至25に示すメイン配列で構成される二本鎖RNAは、少なくとも1種の細胞に供給することで、当該細胞の増殖を抑制又は阻害することができる。典型的には、腫瘍細胞（例えば、神経芽腫、乳がん、肺がん等）に供給することで当該腫瘍細胞の増殖を抑制又は阻害することができる。なお、C5は、腫瘍細胞以外の正常な細胞での発現は低い、腫瘍細胞において過剰発現している。そのため、ここで開示される二本鎖RNAを正常な細胞に供給したとしても、正常細胞中におけるC5の存在量は比較的微量であるため、二本鎖RNAによる影響はほとんどないと考えられる。

[0043] <付加配列>

ここで開示される二本鎖RNAのセンス鎖は、メイン配列の5'末端側または3'末端側に付加される2塩基～4塩基からなる付加配列を備え得る。好ましくは、付加配列はメイン配列の3'末端側に付加される。付加配列が付加されることにより、RNAiがより効果的に誘導され得る。

[0044] 付加配列は、ポリヌクレオチド（ダイマー、トリマー、若しくはテトラマー）で構成される。付加配列を構成するポリヌクレオチドは、リボヌクレオチドのみ、デオキシヌクレオチドのみ、またはリボヌクレオチドとデオキシヌクレオチドとの両方を含んで構成されていてもよい。すなわち、センス鎖およびアンチセンス鎖は、全体がRNAであってもよく、RNAとDNAとのキメラポリヌクレオチドであってもよい。また、付加配列は修飾デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、その他の公知のヌクレオチド類

似体等を含み得る。

[0045] 付加配列を構成する塩基配列は、特に限定されないが、少なくとも1塩基以上のアデニン又はウラシル若しくはチミンを含んでいることが好ましい。また、二本鎖RNAの安定性を向上させるという観点から、付加配列を構成する塩基配列はTT（チミン・チミン）であることがより好ましい。

[0046] <センス鎖及びアンチセンス鎖>

センス鎖は、例えば、21塩基以上27塩基以下の塩基配列で構成され、21塩基以上25塩基以下、または21塩基以上23塩基以下で構成され得る。好適な一例では、メイン配列19塩基と、付加配列2塩基と、からなる21塩基で構成される。かかる例では、RNAiが効果的に誘導され得る。

[0047] アンチセンス鎖は、センス鎖のメイン配列と相補的な塩基配列を有する。これにより、アンチセンス鎖はセンス鎖とハイブリダイズされ、二本鎖構造が形成される。また、アンチセンス鎖の塩基配列は、センス鎖のメイン配列と一部が相補的であってもよい。すなわち、アンチセンス鎖の1塩基または複数の塩基（例えば、2塩基）が他の塩基に置換、欠失及び／又は付加（挿入）されていてもよい。少なくとも生理学的条件下において、上記センス鎖と上記アンチセンス鎖がハイブリダイズすることが可能であれば、siRNAとして機能し得る。なお、上記相補的な塩基配列の部分は、典型的には、リボヌクレオチドのポリマー（RNA）で構成されている。

[0048] 本開示の二本鎖RNAにおいて、センス鎖又はアンチセンス鎖は、典型的には、化学的に修飾されていないリボヌクレオチド（RNA）で構成されている。しかし、本開示の技術を著しく損なわない程度において、本開示の二本鎖RNAは、DNA、化学的に修飾されたDNA又はRNA、その他の公知のヌクレオチド類似体等を含んでいてもよい。すなわち、センス鎖又はアンチセンス鎖の1塩基または複数の塩基（例えば、2塩基）がメチル化、シュードウリジル化等の化学的に修飾されたRNA（又はDNA）に置換されていてもよい。化学的に修飾されたRNAの例としては、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、5-メチルシトシン、またはイノシン等

が挙げられる。例えば、本開示の二本鎖RNA中のいずれか1塩基または複数（例えば、2塩基）のウリジンをシュドウリジンに置換することができる。

[0049] 本開示の二本鎖RNAにおいて、アンチセンス鎖は、センス鎖に相補的なメイン配列と、該相補的なメイン配列の5'末端又は3'末端側に付加された2塩基～4塩基からなる付加配列とを有していてもよい。付加配列は、siRNAとしての機能向上の観点から、上記相補的な塩基配列の3'末端側に付加されているとよい。好ましい一例では、センス鎖の付加配列がメイン配列の3'末端側に付加されているとき、アンチセンス鎖の付加配列は上記相補的な塩基配列の3'末端側に付加されている。なお、アンチセンス鎖における付加配列の構成は、上述したセンス鎖の付加配列の構成と同様であってもよい。典型的には、アンチセンス鎖の付加配列の塩基配列は、ハイブリダイズするセンス鎖の付加配列と同じであるが、異なる塩基配列であってもよい。

[0050] アンチセンス鎖は、例えば、21塩基以上27塩基以下の塩基配列で構成され、21塩基以上25塩基以下、または21塩基以上23塩基以下で構成され得る。アンチセンス鎖はセンス鎖と同じ長さの塩基配列で構成され、付加配列を除く塩基配列の全て又は一部がセンス鎖のメイン配列と相補的な塩基配列で構成される。好適な一例では、アンチセンス鎖はセンス鎖と同じ長さの塩基配列で構成され、付加配列を除く塩基配列が全てセンス鎖のメイン配列と相補的な塩基配列で構成される。

[0051] <二本鎖RNAの製造方法>

ここで開示される二本鎖RNAを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖は、一般的な化学合成方法に準じて製造することができる。例えば、市販のDNA/RNA自動合成機を使用して合成することができる。また、インビトロまたはインビボにおいて、遺伝子工学的手法に基づいてセンス鎖及びアンチセンス鎖を合成してもよい。なお、合成されたセンス鎖及びアンチセンス鎖は精製されていることが好ましく、例えば、HPLC等により精製する

ことができる。

[0052] ここで開示される二本鎖RNAは、例えば、センス鎖およびアンチセンス鎖をアニーリング（ハイブリダイズ）することで製造することができる。アニーリング方法は従来公知の方法に従えばよく、一例では、センス鎖とアンチセンス鎖とを溶媒中で等量混合し、90℃で1分～5分間加熱後、4℃～室温まで冷却することで、アニーリングを行うことができる。かかる溶媒としては、例えば、蒸留水、純水、超純水、バッファー（例えば、pH7.4のHEPES-KOHバッファー、PBS等）等を使用できる。なお、活性のあるRNase（RNA分解酵素）が溶媒に混入することを防ぐため、溶媒は、例えば、DEPC処理、オートクレーブ処理等がされたものが好ましく用いられる。

[0053] <組成物>

ここで開示される組成物は、上述した二本鎖RNAを含む。また、上述した二本鎖RNAに加え、使用形態に応じて医薬（薬学）上許容され得る種々の担体を含み得る。担体としては、例えば、希釈剤、賦形剤等として医薬において一般的に使用される担体が好ましい。かかる担体としては、組成物の用途や形態に応じて適宜異なる。典型的には、水、生理学的緩衝液、種々の有機溶媒等が挙げられる。また、かかる担体は、適当な濃度のアルコール（エタノール等）水溶液、グリセロール、オリーブ油のような不乾性油、或いはリポソーム等であってもよい。医薬用組成物に含有させ得る副次的成分としては、種々の充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、表面活性剤、色素、香料等が挙げられる。また、従来公知のドラッグデリバリーシステム（DDS）に利用される担体を含み得る。

[0054] ここで開示される組成物の形態は、特に限定されない。例えば、典型的な組成物の形態として、液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル、泡沫剤、顆粒剤、粉末剤、錠剤、カプセル、軟膏が挙げられる。また、注射等に用いるため、使用直前に生理食塩水又は適当な緩衝液（例えばPBS）等に溶解して薬液を調製するための凍結乾燥物、造粒物とすることもできる。また、二本鎖R

NA（主成分）および種々の担体（副成分）を材料にして種々の形態の薬剤（組成物）を調製するプロセス自体は従来公知の方法に準じればよく、かかる製剤方法自体は本開示を特徴付けるものでもないため、詳細な説明は省略する。処方に関する詳細な情報源として、例えば、Comprehensive Medicinal Chemistry, Corwin Hansch監修、Pergamon Press刊（1990）が挙げられる。

[0055] ここで開示される組成物は、少なくとも1種の細胞の増殖を阻害する。増殖が阻害される細胞は、C5の発現が関与している細胞であり、例えば、腫瘍細胞（例えば、神経芽細胞腫、乳がん、肺がん、リンパ種等）、肝細胞、眼細胞等である。このうち、本開示の組成物は、好適には腫瘍細胞の増殖を阻害する。すなわち、本開示の二本鎖RNA及び組成物は、腫瘍細胞の増殖を抑制する抗腫瘍剤（抗がん剤）として好適に使用され得る。

[0056] ここで開示される組成物の一態様は、上述した二本鎖RNAに加え、細胞の外部から細胞膜を通過して細胞質内に外来物質を導入させ得る細胞膜透過性を有するペプチドフラグメント（細胞膜透過性ペプチド：Cell Penetrating Peptide、CPP）を含む。該ペプチドフラグメントは、本開示の二本鎖RNAと、直接的または間接的に結合（連結）することによって、ペプチドフラグメントと二本鎖RNAとの構築物を構築する。一般的に、二本鎖RNAは、負の電荷を有しているため、細胞膜を通過することができない。しかしながら、例えば、ペプチドフラグメントのN末端側及び／又はC末端側に、ここで開示される二本鎖RNAを直接的または間接的に結合（連結）することによって、上記ペプチドフラグメントと上記二本鎖RNAの構築物を細胞質内に導入させることができる。なお、ペプチドフラグメントのアミノ酸残基の数は、細胞膜透過性を損なわれない限りにおいて限定されるものではない。

[0057] 上記ペプチドフラグメントと上記二本鎖RNAとが間接的に結合している場合には、例えば、ペプチドフラグメントと二本鎖RNAの間にはリンカーが配置される。リンカーの種類は、特に限定されない。典型的には、ペプ

チド性リンカー、非ペプチド性リンカー等である。また、ペプチドフラグメントと二本鎖RNAとの結合方法は、特に限定されず、従来公知の種々の科学的手法に従って実施することができる。

[0058] ここで開示される組成物の一態様は、ペプチドフラグメントと、本開示の二本鎖RNAを含んでいる。しかし、二本鎖RNAは、ペプチドフラグメントのN末端側またはC末端側に結合していなくてもよい。かかる態様において、例えば、電気的な相互作用または分子的な相互作用により、二本鎖RNAとペプチドフラグメントとが複合体を形成し得る。かかる複合体は、真核細胞内に導入されやすくなるため、二本鎖RNAを効率よく導入することができ得る。二本鎖RNA等の核酸は、典型的には、負に帯電している。したがって、使用されるペプチドフラグメントは、塩基性アミノ酸の割合が高く、正に帯電しているものが好ましい。また、この場合のペプチドフラグメントの割合は、モル換算で、二本鎖RNAの5倍～100倍であってもよく、40倍～60倍が好ましい。

[0059] <ここで開示される組成物の製造方法、その利用>

本開示により、ここで開示される組成物を用いて少なくとも1種の細胞の増殖を抑制する方法が提供され得る。ここで開示される方法は、本開示の組成物を用意する用意工程と、当該組成物を目的とする細胞に供給する工程とを含む。

[0060] 用意工程では、例えば、上述したように、従来公知の方法によりここで開示される組成物を準備すればよい。

[0061] 供給工程では、ここで開示される組成物を生体内（インビボ）または生体外（インビトロ）において少なくとも1種の細胞（例えば、腫瘍細胞等）に供給する。供給される細胞の動物種は特に限定されず、例えば、哺乳類、鳥類、両生類、爬虫類、魚類等であってよい。好ましくは、組成物に含まれる二本鎖RNAのメイン配列の基となるC5の由来となる動物種と、対象の細胞の動物種とが同じである。対象とする細胞の種類も特に限定されないが、好ましくは腫瘍細胞、より好ましくは神経芽腫、乳がん、又は肺がんである

。なお、組成物の供給先に腫瘍細胞以外の細胞が存在していてもよいが、目的とする細胞（すなわち、腫瘍細胞）のみに組成物を供給してもよい。

[0062] 組成物の投与方法は、従来動物の治療に使用されている方法に準じればよく、特に限定されない。組成物は、生体内（インビボ）において、その形態及び目的に応じた方法や用量で使用され得る。例えば、液剤として、静脈内、リンパ管内、筋肉内、皮下、皮内若しくは腹腔内へ注射によって患者又は動物個体（すなわち生体）の患部（例えば、悪性腫瘍組織、ウイルス感染組織、炎症組織等）に所望する量だけ投与することができる。あるいは、錠剤等の固体形態のものや軟膏等のゲル状若しくは水性ゼリー状のものを、直接所定の組織（例えば、腫瘍細胞、炎症細胞等を含む組織や器官等の患部）に投与することができる。あるいは、錠剤等の固体形態のものは経口投与することができる。経口投与の場合は、消化管内での消化酵素分解を抑止すべくカプセル化や保護（コーティング）材の適用が好ましい。

[0063] インビボにおいて、供給する組成物の量は、特に限定されない。例えば、動物個体 1 k g あたりに対する二本鎖 RNA の量の下限値は 0. 0 1 m g 以上、0. 0 5 m g 以上、または 0. 1 m g 以上であり得る。また、動物個体 1 k g あたりに対する二本鎖 RNA の量の上限値は、例えば、1 0 m g 以下、5 m g 以下、または 1 m g 以下であり得る。また、インビトロにおいて、供給する組成物の量は、特に限定さない。細胞等の供給対象物の培養液中において、二本鎖 RNA 濃度の下限値は、例えば、1 n M 以上、5 n M 以上、または 1 0 n M 以上であり得る。また、かかる培養液中の二本鎖 RNA 濃度の上限値は、例えば、1 0 μ M 以下、5 μ M 以下、2 μ M 以下、1 μ M 以下、または 1 0 0 n M 以下であり得る。

[0064] ここで開示される組成物は、公知のトランスフェクション方法により、対象の細胞内部に供給することができる。例えば、カチオン性分子（市販のトランスフェクション試薬等）を利用した化学的遺伝子導入方法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション当の物理的導入方法、ウイルスを利用した生物学的遺伝子導入方法等を含み得る。また、上述したように、細

胞膜透過性を有するペプチドフラグメントを用いて細胞内部に供給してもよい。

実施例

[0065] 以下、ここに開示される技術に関するいくつかの試験例を説明するが、ここで開示される技術をかかす試験例に示すものに限定することを意図したものではない。

[0066] <二本鎖RNAの調製>

配列番号9～31に示す塩基配列のポリヌクレオチドを人工的に合成した。各ポリヌクレオチドの塩基配列を表1に示す。なお、各ポリヌクレオチドにおいて、3'末端側の「TT」（付加配列）はDNAであり、その他の配列（メイン配列）部分はRNAで構成されている。得られたポリヌクレオチドは、相補的な配列を有するセンス鎖とアンチセンス鎖とをアニーリングさせることで、表1に示すサンプル1～5及びサンプル6に用いる二本鎖RNAをそれぞれ調製した。サンプル1～5及びサンプル6に示す二本鎖RNAをそれぞれRNAの濃度が2mMとなるようにPBSに溶解し、RNA溶液を調製した。

[0067] [表1]

サンプル	センス鎖	アンチセンス鎖	配列番号
サンプル1	5' GGGCCUUUUGGGAAUACUUTT 3'	3' TTCCCGGAAAACCCUUGUGAA 5'	(配列番号9)
			(配列番号10)
サンプル2	5' GGCCUUUUGGGAAUACUUUTT 3'	3' TTCCCGGAAAACCCUUGUGAAA 5'	(配列番号11)
			(配列番号12)
サンプル3	5' CCUUUUGGGAAUACUUUGUTT 3'	3' TTGGAAAACCCUUGUGAAACA 5'	(配列番号13)
			(配列番号14)
サンプル4	5' CUUUUGGGAAUACUUUGUUTT 3'	3' TTGAAAACCCUUGUGAAACAA 5'	(配列番号15)
			(配列番号16)
サンプル5	5' GGAAUACUUUGUUUUUUAATT 3'	3' TTCCUUGUGAAACAAAAAUU 5'	(配列番号17)
			(配列番号18)
サンプル6	5' UUUCUAGCAAAGAUUUUUUTT 3'	3' TTAAGAUCGUUUCUAAAAAA 5'	(配列番号19)
			(配列番号20)

[0068] 表1に示すように、サンプル1の二本鎖RNAのセンス鎖は、配列番号21からなるメイン配列（C5のシグナルペプチドの領域をコードする塩基配列の一部）と、該メイン配列の3'末端側に付加されたTTからなる付加配

列とから構成されている。同様に表1に示すサンプル2～5の二本鎖RNAのセンス鎖は、配列番号22～25からなるメイン配列（C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列の一部）と、該メイン配列の3'末端に付加されたTTからなる付加配列とから構成されている。サンプル6の二本鎖RNAのセンス鎖は、配列番号8からなるメイン配列（ランダムに人工的に作製した配列）と、該メイン配列の3'末端側に付加されたTTからなる付加配列とから構成されている。各例のアンチセンス鎖は、メイン配列と相補的な配列と、当該配列の3'末端側にTTからなる付加配列とから構成されている。

[0069] <ヒト神経芽腫細胞の細胞増殖試験>

腫瘍細胞としてヒト神経芽腫細胞であるSK-N-SH株を使用した。SK-N-SH細胞を培養培地である10%FBS (fetal bovine serum) + E-MEM (富士フィルム和光純薬株式会社製、Cat No. 051-07615) + 1%MEM非必須アミノ酸溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社製、Cat No. 139-15651) で前培養を行った。なお、前培養時のみ0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン (富士フィルム和光純薬株式会社製、Cat No. 168-23191) を培養培地に添加しているが、以下の培養および評価時には添加しなかった。

[0070] 1日目に培養プレートに接着したSK-N-SH細胞をPBSで洗浄後、0.25%トリプシン/EDTA溶液を添加し、37℃中で2分間インキュベートを行った。該インキュベート後、上記培養培地を加え、トリプシンを不活性化させた。その後、150×gで5分間の遠心分離を行い、細胞を沈殿させた。遠心分離によって生じた上清を取り除いた後、沈殿（細胞ペレット）に上記培養培地を加え、おおよそ 5×10^4 cells/mLの細胞懸濁液を調製した。市販の96ウェルプレートを1枚準備し、該細胞懸濁液を各ウェルに 5×10^3 cells/100 μL/wellとなるように播種し、37℃、5%CO₂下で一晩インキュベートした。

[0071] (サンプル1)

2日目にPBSで2 mMに調製したRNA溶液3 μ LとOpti-MEM (商標) 75 μ Lとを混合し、溶液Aを調製した。また、Lipofectamine (商標) RNAiMAXを4.5 μ LとOpti-MEM (商標) 75 μ Lとを混合し、溶液Bを調製した。次に、溶液Aと溶液Bとを等量混合して溶液Cを調製し、室温で5分間インキュベートした。調製した溶液Cを11 μ L/well (二本鎖RNAの終濃度は4 μ M) となるように、SK-N-SH細胞が培養されているウェルに添加した。その後、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で3日間インキュベートした。

[0072] 細胞の増殖は、Cell Counting Kit-8 (CCK-8、同人科学研究所) を用いて評価した。5日目 (siRNA添加後から3日目) にSK-N-SH細胞が培養された96ウェルプレートを取り出し、CCK-8を各ウェルに10 μ L加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で1.5時間インキュベートした。各ウェルの450 nmにおける吸光度を測定した。なお、吸光度は3ウェルの平均値とした。また、ブランクとして培養培地とCCK-8試薬のみのウェルを設けた。サンプル1における吸光度からブランクの吸光度を引いた値をサンプル1における測定値とした。

[0073] (サンプル2~6)

サンプル2~6における二本鎖RNAを表1に示すサンプル2~6の二本鎖RNAに変更した以外は、サンプル1と同様にした。

[0074] (比較例)

比較例では、サンプル1におけるRNA溶液の代わりにPBS溶液を使用した以外は、サンプル1と同様にした。すなわち、比較例では二本鎖RNAを導入しなかった。

[0075] RNA溶液及びLipofectamine (商標) RNAiMAXを添加しなかった以外はサンプル1と同様にした未処理のウェルを用意した。各試験例における細胞生存率は、上記未処理のウェルの測定値を100%としたときの割合で表し、図2に示している。図2は、表1に示す二本鎖RNAを用いた試験、すなわち、神経芽腫細胞に対して、C5のシグナルペプチド

の領域をコードする塩基配列の一部（配列番号1～5）をメイン配列とした二本鎖RNAの結果を示す。

[0076] 図2に示すように、サンプル1～5の細胞生存率は減少しており、比較例と比べ細胞生存率が大きく低下していた。また、サンプル1（配列番号1）が、最も細胞生存率が低下していた。以上の試験結果から、サンプル1～5の二本鎖RNAは、腫瘍細胞（神経芽腫細胞）の増殖を阻害する機能を有していると考えられる。また、上記配列番号7の塩基配列は、サンプル1～5の塩基配列とほぼ同等のATCG含量を有するランダム配列である。上記配列番号7をメイン配列としたサンプル6では、細胞の増殖に影響を与えることはなかった。したがって、これらのサンプル1～5の配列は、C5遺伝子に特異的である。このため、サンプル1～5の二本鎖RNAは、オフターゲット効果を回避でき、他の器官に影響を与えることがなく、臨床応用が十分に期待できる。

[0077] <低濃度の二本鎖RNAを使用したヒト神経芽腫細胞の細胞増殖試験>

表1に示すサンプル1～5に用いる二本鎖RNAをそれぞれ調製した。サンプル1～5に示す二本鎖RNAをそれぞれRNAの濃度が2mMとなるようにPBSに溶解し、RNA溶液を調製した。その後、さらにPBSで10倍に希釈し、RNAの濃度が200 μ Mとなる低濃度RNA溶液を調製した。上記低濃度RNA溶液を使用したこと以外はヒト神経芽腫細胞の細胞増殖試験と同様に試験を行った。すなわち、SK-N-SH細胞が培養されているウェルに添加した二本鎖RNAの終濃度が0.4 μ Mとなるようにした。なお、各試験例における細胞生存率は、未処理のウェルの測定値を100%としたときの割合で表した。

[0078] 図3は、添加した二本鎖RNAの終濃度が、4.0 μ Mの場合と0.4 μ Mの場合との細胞生存率を比較したグラフである。図3に示すように、サンプル1～5の細胞生存率は減少している。また、比較例に対し、サンプル1～5の細胞生存率は大きく低下していた。このことから、サンプル1～5の二本鎖RNAは、低濃度でも腫瘍細胞（神経芽腫細胞）の増殖を阻害する機

能を有していた。サンプル1～5の二本鎖RNAは、低濃度であっても十分な腫瘍細胞の増殖阻害機能を有していることから、非特異的な発現阻害や非特異的な細胞増殖阻害を回避でき、臨床応用が十分に期待できる。そのなかでも、サンプル1及びサンプル2の二本鎖RNAは、とりわけ優れたヒト神経芽腫細胞の増殖抑制効果を示した。また、サンプル1～5の二本鎖RNAは、濃度10分の1でも同等又はそれ以上の細胞阻害機能を有していた。このうち、サンプル2の二本鎖RNAは、濃度を下げたことにより、ヒト神経芽腫細胞の増殖を阻害する機能がより向上していた。

[0079] <ヒト乳がん細胞の細胞増殖試験>

腫瘍細胞としてヒト乳がん細胞であるMDA-MB-231株を使用したこと以外はヒト神経芽腫細胞の細胞増殖試験と同様にした。各試験例における細胞生存率は、上記未処理のウェルの測定値を100%としたときの割合で表し、図4に示している。

[0080] 図4に示すように、サンプル1～5の細胞生存率は減少しており、比較例と比べ細胞生存率が大きく低下していた。また、サンプル5（配列番号5）が、最も細胞生存率が低下していた。以上の結果から、サンプル1～5の二本鎖RNAは、腫瘍細胞（乳がん細胞）の増殖を阻害する機能を有していると考えられる。

[0081] <A549株の細胞増殖試験>

腫瘍細胞としてヒト肺がん細胞であるA549株を使用した。また、細胞の増殖は、4日目（siRNA添加後から2日目）にA549細胞が培養された96ウェルプレートを取り出し、CCK-8を各ウェルに10 μ L加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で2.0時間インキュベートすることで評価した。それ以外はヒト神経芽腫細胞の細胞増殖試験と同様にした。各試験例における細胞生存率は、上記未処理のウェルの測定値を100%としたときの割合で表し、図5に示している。

[0082] 図5に示すように、サンプル5の細胞生存率は減少しており、比較例と比べ細胞生存率が大きく低下していた。また、サンプル5では、siRNAの

添加後から2日経過後であるにも関わらず、細胞生存率が顕著に減少していた。このことから、サンプル5の二本鎖RNAは、腫瘍細胞（肺がん細胞）の増殖を阻害する格別な機能を有していると考えられる。なお、上記試験、すなわち、図2～5に示す試験はそれぞれ別日に独立して行った。

[0083] 以上、ここに開示される技術の具体例を詳細に示したが、これらは例示にすぎず、請求の範囲を限定するものではない。請求の範囲に記載の技術には、以上に例示した具体例を様々に変形、変更したものが含まれる。

[0084] ここで開示される技術は、特段の問題が生じない限りにおいて、各構成要素やここで言及された各処理は適宜に省略され、または、適宜に組み合わせられうる。また、本明細書は、以下の各項に記載の開示を含んでいる。

[0085] 項1：第1の鎖と、該第1の鎖に相補的な第2の鎖と、を有する二本鎖RNAであって、前記第1の鎖は、5'末端の塩基がグアニン（G）又はシトシン（C）である19以上23以下の塩基からなるメイン配列と、前記メイン配列の3'末端側に付加された2以上4以下の塩基からなる付加配列とを有しており、ここで、前記メイン配列は、補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列のうちから決定される、二本鎖RNA。

[0086] 項2：上記第2の鎖は、上記第1の鎖に相補的なメイン配列と、上記相補的なメイン配列の3'末端側に付加された2～4塩基からなる付加配列とから構成される、項1に記載の二本鎖RNA。

[0087] 項3：上記メイン配列の3'末端側の5塩基のうち少なくとも3塩基はアデニン（A）及び／又はウラシル（U）である、項1または2に記載の二本鎖RNA。

[0088] 項4：前記補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列が、以下の塩基配列：

GGGCTTTTTGGGAATACTT（配列番号1）；

GGCTTTTTGGGAATACTTT（配列番号2）；

CCTTTTTGGGAATACTTTGT（配列番号3）；

CTTTTTGGGAATACTTTGTT（配列番号4）；

G G A A T A C T T T T G T T T T T T T A A (配列番号5) ;

のいずれかからなる、項1から3のいずれか1項に記載の二本鎖RNA。

[0089] 項5 : 上記付加配列を構成する塩基配列がチミン・チミン (TT) である、項1から4のいずれか1つに記載の二本鎖RNA。

[0090] 項6 : 項1から5のいずれか1つに記載の二本鎖RNAを含む、少なくとも1種の細胞の増殖を阻害する組成物。

[0091] 項7 : 上記細胞は腫瘍細胞である、項6に記載の組成物。

[0092] 項8 : 上記組成物は、細胞の外部から細胞膜を通過して細胞質内に外来物質を導入させ得る細胞膜透過性を有するペプチドフラグメントを含む、項6または7に記載の組成物。

[0093] 項9 : 少なくとも1種の細胞の増殖を抑制する方法であって、項6から8のいずれか1つに記載の組成物を用意する用意工程と、上記組成物をインビトロまたはインビボにおいて上記細胞に供給する工程とを含む方法。

[0094] 項10 : 前記細胞の生物種と、前記補体系成分C5が含まれる生物種とが同じである、項9に記載の方法。

産業上の利用可能性

[0095] 上述したように、ここで開示される二本鎖RNAは、細胞の増殖を阻害（または抑制する）ことができる。そのため、該二本鎖RNAを使用することによって、少なくとも1種の細胞（例えば腫瘍細胞）の増殖を阻害する組成物（例えば、抗腫瘍剤）を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 第1の鎖と、該第1の鎖に相補的な第2の鎖と、を有する二本鎖RNAであって、
- 前記第1の鎖は、5'末端の塩基がグアニン（G）又はシトシン（C）である19以上23以下の塩基からなるメイン配列と、
- 前記メイン配列の3'末端側に付加された2以上4以下の塩基からなる付加配列と、を有しており、
- ここで、前記メイン配列は、
- 補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列のうちから決定される、二本鎖RNA。
- [請求項2] 前記第2の鎖は、前記第1の鎖に相補的なメイン配列と、前記相補的なメイン配列の3'末端側に付加された2以上4以下の塩基からなる付加配列とを有する、請求項1に記載の二本鎖RNA。
- [請求項3] 前記メイン配列の3'末端側の5塩基のうち少なくとも3塩基はアデニン（A）及び／又はウラシル（U）である、請求項1に記載の二本鎖RNA。
- [請求項4] 前記補体成分C5のシグナルペプチド領域をコードする塩基配列が、以下の塩基配列：
- GGGCCTTTTGGGAATACTT（配列番号1）；
- GGCCTTTTGGGAATACTTT（配列番号2）；
- CCTTTTGGGAATACTTTGT（配列番号3）；
- CTTTTGGGAATACTTTGTT（配列番号4）；
- GGAATACTTTGTTTTTTAA（配列番号5）；
- のいずれかからなる、請求項1に記載の二本鎖RNA。
- [請求項5] 前記付加配列を構成する塩基配列がチミン・チミン（TT）である、請求項1に記載の二本鎖RNA。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1項に記載の二本鎖RNAを含む、少なくとも1種の細胞の増殖を阻害する組成物。

- [請求項7] 前記細胞は腫瘍細胞である、請求項6に記載の組成物。
- [請求項8] 細胞の外部から細胞膜を通過して細胞質内に外来物質を導入させ得る細胞膜透過性を有するペプチドフラグメントを含む、請求項7に記載の組成物。
- [請求項9] 少なくとも1種の細胞の増殖を抑制する方法であって、
請求項8に記載の組成物を用意する用意工程と、
前記組成物をインビトロにおいて前記細胞に供給する工程と
を含む方法。
- [請求項10] 前記細胞の生物種と、前記補体成分C5が含まれる生物種とが同じである、請求項9に記載の方法。

[図1]

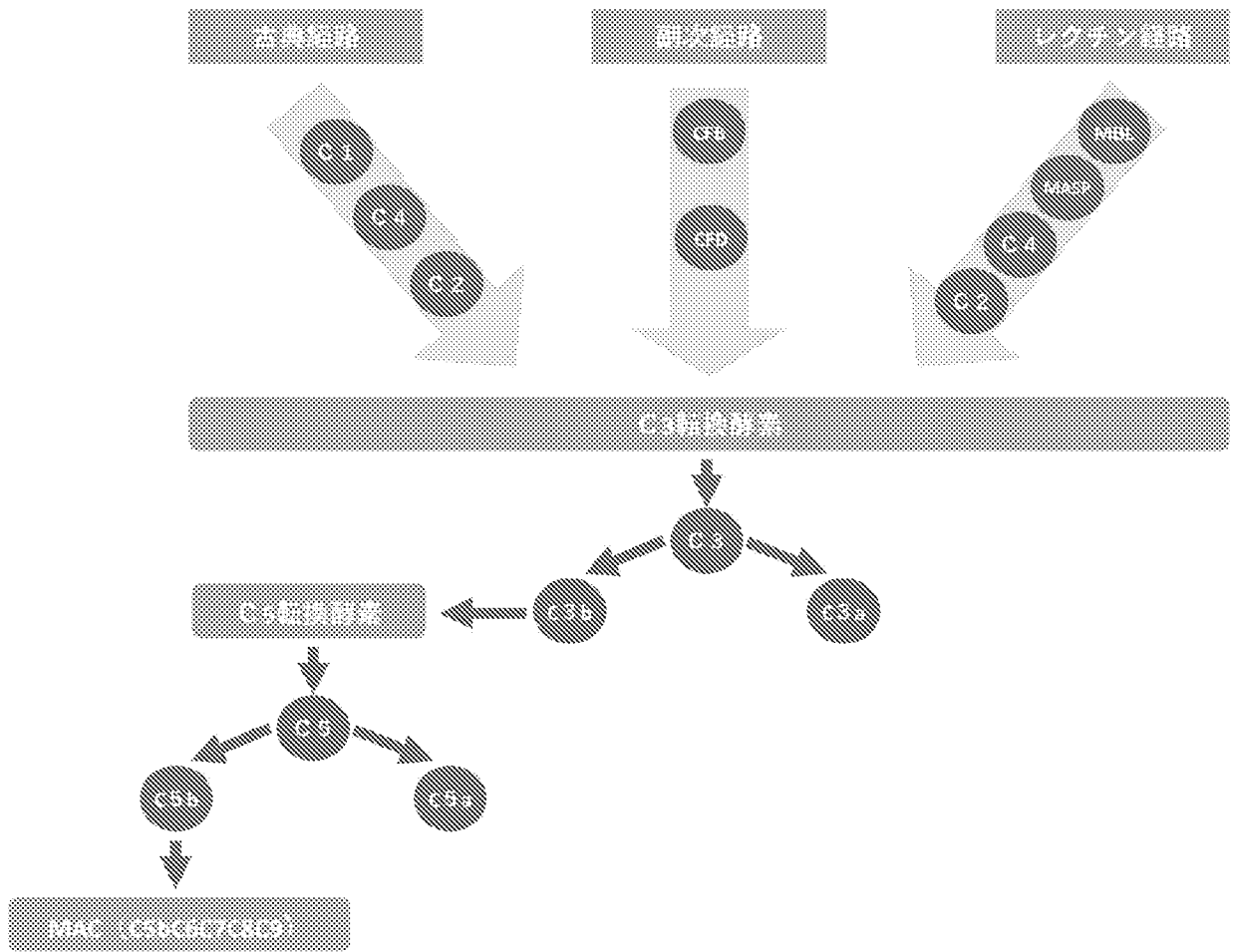


FIG.1

[図2]

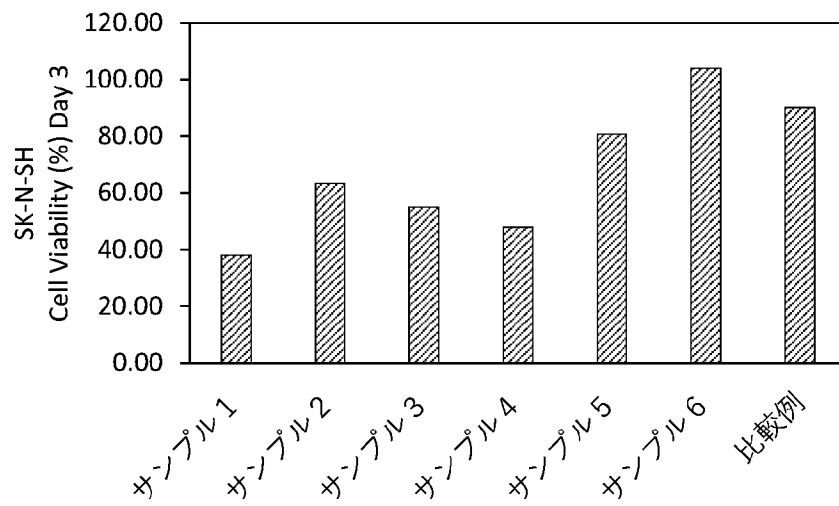


FIG.2

[図3]

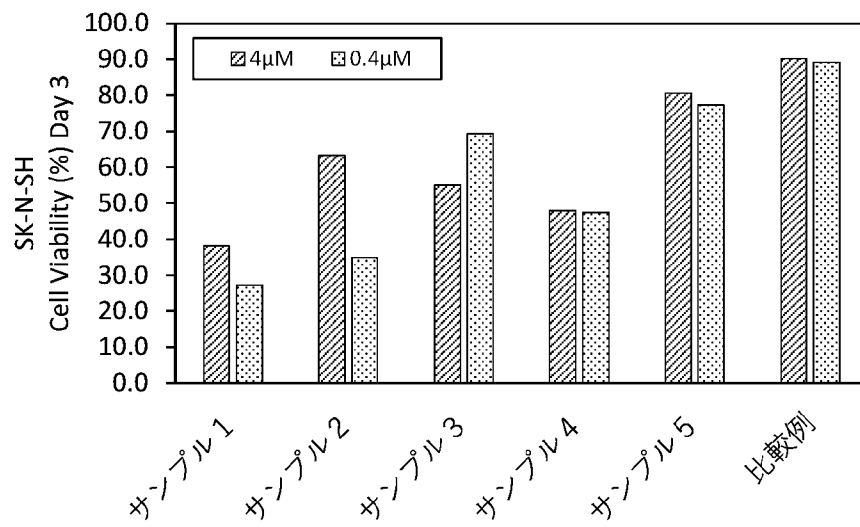


FIG.3

[図4]

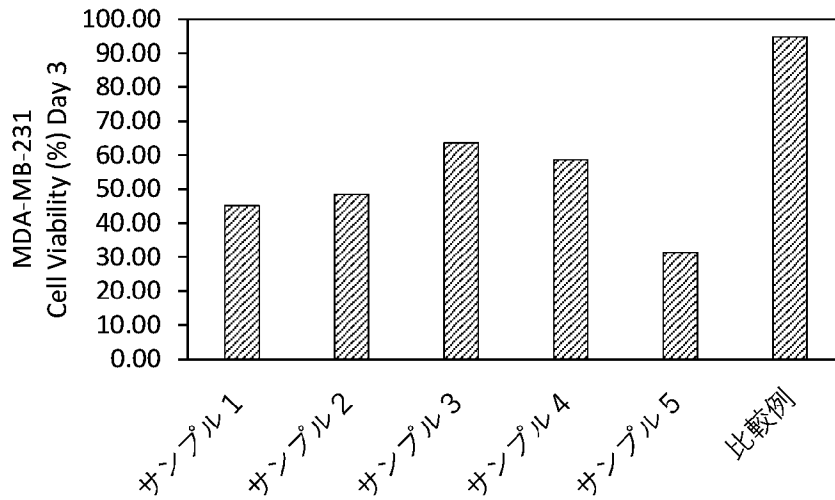


FIG.4

[図5]

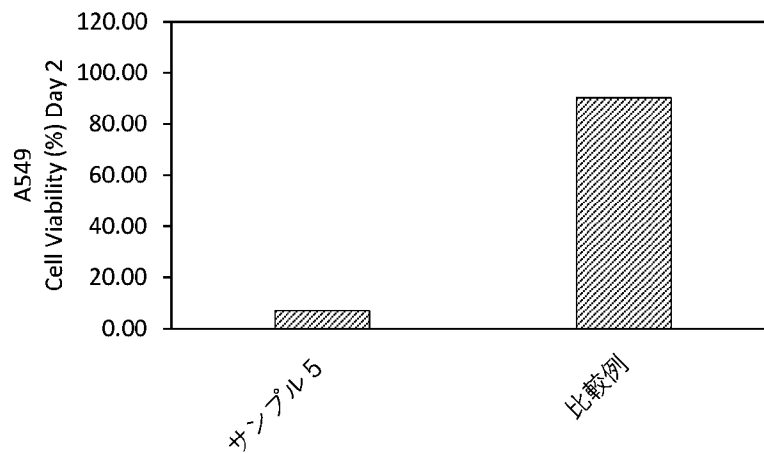


FIG.5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/045860

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/113</i> (2010.01)i; <i>C12N 15/87</i> (2006.01)i FI: C12N15/113 Z ZNA; C12N15/87 Z According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/113; C12N15/87		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2025 Registered utility model specifications of Japan 1996-2025 Published registered utility model applications of Japan 1994-2025		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2019-518028 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 27 June 2019 (2019-06-27) claims, paragraphs [0658], [0697], examples	1-10
X	JP 2016-518331 A (ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.) 23 June 2016 (2016-06-23) claims, paragraphs [0751], [0789], examples	1-10
X	US 2019/0218550 A1 (DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.) 18 July 2019 (2019-07-18) claims, pages 166-167	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 March 2025		Date of mailing of the international search report 18 March 2025
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/045860

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/045860

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2019-518028 A	27 June 2019	US 2019/0256845 A1 claims, paragraphs [0722], [0732], examples WO 2017/214518 A1 EP 3469083 A1	
JP 2016-518331 A	23 June 2016	US 2015/0247143 A1 claims, paragraphs [0881], [0891], examples WO 2014/160129 A2 EP 2970974 A2 KR 10-2015-0127243 A CN 105324485 A	
US 2019/0218550 A1	18 July 2019	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/113(2010.01)i; C12N 15/87(2006.01)i FI: C12N15/113 Z ZNA; C12N15/87 Z		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/113; C12N15/87 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2025年 日本国実用新案登録公報 1996-2025年 日本国登録実用新案公報 1994-2025年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2019-518028 A (アルナイラム ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 27.06.2019 (2019-06-27) 特許請求の範囲、[0658]、[0697] 段落、実施例	1-10
X	JP 2016-518331 A (アルナイラム ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 23.06.2016 (2016-06-23) 特許請求の範囲、[0751]、[0789] 段落、実施例	1-10
X	US 2019/0218550 A1 (DICERNA PHARMACEUTICALS, INC.) 18.07.2019 (2019-07-18) 特許請求の範囲、第166頁～第167頁	1-10
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07.03.2025	国際調査報告の発送日 18.03.2025
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 上村 直子 4B 4508 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/045860

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2019-518028 A	27.06.2019	US 2019/0256845 A1 特許請求の範囲、[0722]、[0732] 段落、 実施例 WO 2017/214518 A1 EP 3469083 A1	
JP 2016-518331 A	23.06.2016	US 2015/0247143 A1 特許請求の範囲、[0881]、[0891] 段落、 実施例 WO 2014/160129 A2 EP 2970974 A2 KR 10-2015-0127243 A CN 105324485 A	
US 2019/0218550 A1	18.07.2019	(ファミリーなし)	