

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-546667
(P2024-546667A)

(43)公表日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	Z Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713		4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全70頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2024-533904(P2024-533904)		(71)出願人 517452453		スーチョウ リボ ライフ サイエンス カ ンパニー、リミテッド SUZHOU RIBO LIFE SC IENCE CO., LTD. 中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアンフォン ロード ナンバー 1 6 8 (74)代理人 110000729 弁理士法人ユニアス国際特許事務所 (72)発明者 リャン、ツーツアイ 中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアンフォン ロード ナンバー 最終頁に続く	
(86)(22)出願日 令和4年12月19日(2022.12.19)					
(85)翻訳文提出日 令和6年6月5日(2024.6.5)					
(86)国際出願番号 PCT/CN2022/139942					
(87)国際公開番号 WO2023/116607					
(87)国際公開日 令和5年6月29日(2023.6.29)					
(31)優先権主張番号 202111575800.2					
(32)優先日 令和3年12月21日(2021.12.21)					
(33)優先権主張国・地域又は機関 中国(CN)					
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く					

(54)【発明の名称】 核酸、当該核酸を含む組成物及び複合体並びに調製方法と使用

(57)【要約】

本開示は、RPTOR遺伝子発現レベルを抑制し、mTORC1活性を調節するsiRNA、当該siRNAを含む医薬組成物及び複合体を提供する。前記siRNAは、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、前記siRNAにおけるヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列Iを含み、前記ヌクレオチド配列Iと配列番号1に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列IIを含み、前記ヌクレオチド配列IIと配列番号2に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下である。本開示により提供されるsiRNA、医薬組成物及び複合体は、mTORC1阻害剤としてmTORC1の活性化による関連疾患を効果的に治療し、オートファジー誘導剤としてオートファジー関連疾患又は症状を治療することができる。

【選択図】図2

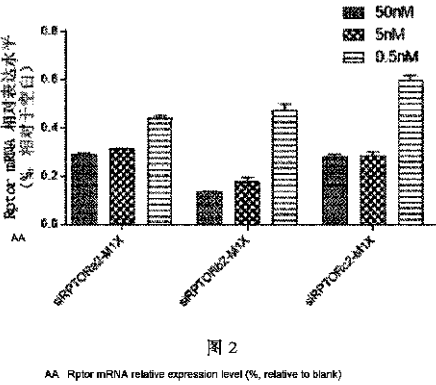


図2

AA: Rptor mRNA relative expression level (% relative to blank)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

センス鎖と、アンチセンス鎖とを含む *s i R N A* であって、前記 *s i R N A* におけるヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 *I* を含み、アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 *II* を含み、前記ヌクレオチド配列 *I* と前記ヌクレオチド配列 *II* は、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 *I* と前記ヌクレオチド配列 *II* とは、*i*) ~ *i i i*) に示される配列から選択される 1 組であり、

i) 前記ヌクレオチド配列 *I* と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 *II* と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - C U G C C A U G G A G U A U C U G A Z_{a1} - 3' (配列番号 1)、

5' - Z_{a2} U C A G A U A C U C C A U G G C A G - 3' (配列番号 2)

ただし、 Z_{a1} は A であり、 Z_{a2} は U であり、前記ヌクレオチド配列 *I* に、位置が Z_{a1} に対応するヌクレオチド Z_{a3} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 *II* に、位置が Z_{a2} に対応するヌクレオチド Z_{a4} が含まれ、前記 Z_{a4} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、或いは、

i i) 前記ヌクレオチド配列 *I* と配列番号 1 2 3 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 *II* と配列番号 1 2 4 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - A C A A C A U C A A G U A C U A C G Z_{b1} - 3' (配列番号 1 2 3)、

5' - Z_{b2} C G U A G U A C U U G A U G U U G U - 3' (配列番号 1 2 4)

ただし、 Z_{b1} は A であり、 Z_{b2} は U であり、前記ヌクレオチド配列 *I* に、位置が Z_{b1} に対応するヌクレオチド Z_{b3} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 *II* に、位置が Z_{b2} に対応するヌクレオチド Z_{b4} が含まれ、前記 Z_{b4} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、或いは、

i i i) 前記ヌクレオチド配列 *I* と配列番号 2 4 5 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 *II* と配列番号 2 4 6 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - C G A C U A C U A C A U C U C C G U Z_{c1} - 3' (配列番号 2 4 5)、

5' - Z_{c2} A C G G A G A U G U A G U A G U C G - 3' (配列番号 2 4 6)

ただし、 Z_{c1} は G であり、 Z_{c2} は C であり、前記ヌクレオチド配列 *I* に、位置が Z_{c1} に対応するヌクレオチド Z_{c3} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 *II* に、位置が Z_{c2} に対応するヌクレオチド Z_{c4} が含まれ、前記 Z_{c4} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドである、*s i R N A*。

【請求項 2】

前記ヌクレオチド配列 *I* と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 *II* と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、

或いは、前記ヌクレオチド配列 *I* と配列番号 1 2 3 に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 *II* と配列番号 1 2 4 に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、

或いは、前記ヌクレオチド配列 *I* と配列番号 2 4 5 に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が 1 つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 *II* と配列番号 2 4 6 に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が 1 つ以下である、請求項 1 に記載の *s i R N A*。

【請求項 3】

前記ヌクレオチド配列 *II* と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオ

チド差異は、 Z_{a4} の位置での差異を含み、 Z_{a4} がA、C又はGから選択され、

或いは、前記ヌクレオチド配列IIと配列番号124に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、 Z_{b4} の位置での差異を含み、 Z_{b4} がA、C又はGから選択され、

或いは、前記ヌクレオチド配列IIと配列番号246に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、 Z_{c4} の位置での差異を含み、 Z_{c4} がA、U又はGから選択される、請求項1又は2に記載のsiRNA。

【請求項4】

Z_{a3} は、 Z_{a4} と相補的なヌクレオチドであり、或いは、 Z_{b3} は、 Z_{b4} と相補的なヌクレオチドであり、或いは、 Z_{c3} は、 Z_{c4} と相補的なヌクレオチドである、請求項1～3のいずれか一項に記載のsiRNA。

10

【請求項5】

前記ヌクレオチド配列Iと前記ヌクレオチド配列IIとは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に3つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間にミスマッチがないことを指す、請求項1～4のいずれか一項に記載のsiRNA。

【請求項6】

前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが19～23ヌクレオチドであり、アンチセンス鎖の長さが19～26ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号3に示されるヌクレオチド配列であり、前記ヌクレオチド配列IIは、配列番号4に示されるヌクレオチド配列であり、

20

5'-CUGCCAUGGAGUAUCUGAZ_{a3}-3' (配列番号3)、

5'-Z_{a4}UCAGAUACUCCAUGGCAG-3' (配列番号4)

ただし、 Z_{a3} は、A、U、G又はCから選択され、 Z_{a4} は、 Z_{a3} と相補的なヌクレオチドであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号125に示されるヌクレオチド配列であり、前記ヌクレオチド配列IIは、配列番号126に示されるヌクレオチド配列であり、

5'-ACAACAUCAAGUACUACGZ_{b3}-3' (配列番号125)、

5'-Z_{b4}CGUAGUACUUGAUGUUGU-3' (配列番号126)

30

ただし、 Z_{b3} は、A、U、G又はCから選択され、 Z_{b4} は、 Z_{b3} と相補的なヌクレオチドであり、

或いは、前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号247に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列IIは、配列番号248に示されるヌクレオチド配列であり、

5'-CGACUACUACAUCUCCGUZ_{c3}-3' (配列番号247)、

5'-Z_{c4}ACGGAGAUGUAGUAGUCG-3' (配列番号248)

ただし、 Z_{c3} は、A、U、G又はCから選択され、 Z_{c4} は、 Z_{c3} と相補的なヌクレオチドである、請求項1～5のいずれか一項に記載のsiRNA。

【請求項7】

40

Z_{a3} はAであり、 Z_{a4} はUであり、或いは、 Z_{b3} はAであり、 Z_{b4} はUであり、或いは、 Z_{c3} はGであり、 Z_{c4} はCである、請求項6に記載のsiRNA。

【請求項8】

前記センス鎖は、ヌクレオチド配列IIIを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列IVを更に含み、ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVとは、長さがそれぞれ独立して1～4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列IIIがヌクレオチド配列Iの5'末端に結合され、ヌクレオチド配列IVがヌクレオチド配列IIの3'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列IIIと前記ヌクレオチド配列IVとは、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記実質的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的

50

とは、2つのヌクレオチド配列間にミスマッチがないことを指す、請求項1～7のいずれか一項に記載の s i R N A。

【請求項9】

前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I の塩基が A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも2ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が C A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも3ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が U C A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも4ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が G U C A であり、

10

或いは、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 2 3 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I の塩基が A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも2ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が C A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも3ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が U C A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも4ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A U C A であり、

20

或いは、前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 2 4 5 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I I の塩基が A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも2ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも3ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が C A A であり、又は、前記ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも4ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が G C A A である、請求項8に記載の s i R N A。

30

【請求項10】

前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 V を更に含み、ヌクレオチド配列 V は、長さが1～3ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の3'末端に結合され、アンチセンス鎖の3'突出端を構成し、及び／又は、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 V I を更に含み、ヌクレオチド配列 V I は、長さが1～3ヌクレオチドであり、前記センス鎖の3'末端に結合され、センス鎖の3'突出端を構成する、請求項1～9のいずれか一項に記載の s i R N A。

【請求項11】

前記ヌクレオチド配列 V 及び／又はヌクレオチド配列 V I は、長さが2ヌクレオチドである、請求項10に記載の s i R N A。

40

【請求項12】

前記ヌクレオチド配列 V 及び／又は V I は、連続した2つのチミンデオキシリボヌクレオチド又は連続した2つのウラシルリボヌクレオチドであり、或いは、前記ヌクレオチド配列 V が標的 m R N A の対応する位置のヌクレオチドと相補的であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列 V I が標的 m R N A の対応する位置のヌクレオチドと同じである、請求項10又は11に記載の s i R N A。

【請求項13】

前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号5に示されるヌクレオチドを含み、前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号6に示されるヌクレオチド配列を含み、

50

5' - CUGCCAUGGAGUAUCUGA Z_{a3} - 3' (配列番号5)、

5' - Z_{a4}UCAGAUACUCCAUGGCAGUG - 3' (配列番号6)

ただし、前記 Z_{a4} は、アンチセンス鎖の5'末端の第1位のヌクレオチドであり、Z_{a3} は、A、U、G又はCから選択され、Z_{a4} は、Z_{a3}と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号7に示されるヌクレオチド配列を含み、
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号8に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CACUGCCAUGGAGUAUCUGA Z_{a3} - 3' (配列番号7)、

5' - Z_{a4}UCAGAUACUCCAUGGCAGUGAC - 3' (配列番号8)

ただし、前記 Z_{a4} は、アンチセンス鎖の5'末端の第1位のヌクレオチドであり、Z_{a3} は、A、U、G又はCから選択され、Z_{a4} は、Z_{a3}と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号127に示されるヌクレオチド配列を含み、
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号128に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - ACAACAUCAAGUACUACG Z_{b3} - 3' (配列番号127)、

5' - Z_{b4}CGUAGUACUUGAUGUUGUUG - 3' (配列番号128)

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号129に示されるヌクレオチド配列を含み、
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号130に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CAACAACAUCAAGUACUACG Z_{b3} - 3' (配列番号129)、

5' - Z_{b4}CGUAGUACUUGAUGUUGUUGAU - 3' (配列番号130)

ただし、前記 Z_{b4} は、アンチセンス鎖の5'末端の第1位のヌクレオチドであり、Z_{b3} は、A、U、G又はCから選択され、Z_{b4} は、Z_{b3}と相補的なヌクレオチドであり、
或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号249に示されるヌクレオチド配列を含み、
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号250に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CGACUACUACAUCUCCGU Z_{c3} - 3' (配列番号249)、

5' - Z_{c4}ACGGAGAUGUAGUAGUCGUU - 3' (配列番号250)

或いは、前記 s i R N A のセンス鎖は、配列番号251に示されるヌクレオチド配列を含み、
前記 s i R N A のアンチセンス鎖は、配列番号252に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - AACGACUACUACAUCUCCGU Z_{c3} - 3' (配列番号251)、

5' - Z_{c4}ACGGAGAUGUAGUAGUCGUUGC - 3' (配列番号252)

ただし、前記 Z_{c4} は、アンチセンス鎖の5'末端の第1位のヌクレオチドであり、Z_{c3} は、A、U、G又はCから選択され、Z_{c4} は、Z_{c3}と相補的なヌクレオチドである、
請求項1～12のいずれか一項に記載の s i R N A。

【請求項14】

前記 s i R N A は、s i R P T O R a 1、s i R P T O R a 2、s i R P T O R a 3、
s i R P T O R b 1、s i R P T O R b 2、s i R P T O R b 3、s i R P T O R c 1、
s i R P T O R c 2及びs i R P T O R c 3のうちの1つである請求項1～13のいずれか一項に記載の s i R N A。

【請求項15】

前記センス鎖と前記アンチセンス鎖における少なくとも1つのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、及び／又は少なくとも1つのリン酸エステル基が修飾基を有するリン酸エステル基である、請求項1～14のいずれか一項に記載の s i R N A。

【請求項16】

前記センス鎖と前記アンチセンス鎖における各ヌクレオチドは、独立してフルオロ修飾ヌクレオチド又は非フルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項1～15のいずれか一項に記載の s i R N A。

【請求項17】

前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列Iとヌクレオチド配列IIに位置

10

20

30

40

50

し、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列Ⅰの少なくとも第7、8、9位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの少なくとも第2、6、14、16位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドである、請求項16に記載の*s i R N A*。

【請求項18】

前記非フルオロ修飾ヌクレオチドは、2'-O-メトキシ修飾又は2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドである、請求項16又は17に記載の*s i R N A*。

【請求項19】

5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの第3～6位のヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドである、請求項18に記載の*s i R N A*。

10

【請求項20】

前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの第3位又は第5位のヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドである、請求項19に記載の*s i R N A*。

【請求項21】

5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの第3～9位のヌクレオチドのうちの2つ以下のヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドである、請求項19に記載の*s i R N A*。

【請求項22】

前記センス鎖と前記アンチセンス鎖における他のヌクレオチドは、2'-O-メトキシ修飾ヌクレオチドである、請求項17～21のいずれか一項に記載の*s i R N A*。

20

【請求項23】

前記*s i R N A*は、*s i R P T O R a 1-M 1*、*s i R P T O R a 1-M 2*、*s i R P T O R a 1-M 3*、*s i R P T O R a 2-M 1*、*s i R P T O R a 2-M 2*、*s i R P T O R a 2-M 3*、*s i R P T O R a 3-M 1*、*s i R P T O R a 3-M 2*、*s i S R P T O R a 3-M 3*、*s i R P T O R b 1-M 1*、*s i R P T O R b 1-M 2*、*s i R P T O R b 1-M 3*、*s i R P T O R b 2-M 1*、*s i R P T O R b 2-M 2*、*s i R P T O R b 2-M 3*、*s i R P T O R b 3-M 1*、*s i R P T O R b 3-M 2*、*s i S R P T O R b 3-M 3*、*s i R P T O R c 1-M 1*、*s i R P T O R c 1-M 2*、*s i R P T O R c 1-M 3*、*s i R P T O R c 2-M 1*、*s i R P T O R c 2-M 2*、*s i R P T O R c 2-M 3*、*s i R P T O R c 3-M 1*、*s i R P T O R c 3-M 2*及び*s i S R P T O R c 3-M 3*のうちの1つである、請求項1～22のいずれか一項に記載の*s i R N A*。

30

【請求項24】

前記修飾基を有するリン酸エステル基は、リン酸エステル基におけるリン酸ジエステル結合の少なくとも1つの酸素原子が硫黄原子で置換されたチオリン酸エステル基である、請求項15に記載の*s i R N A*。

【請求項25】

前記*s i R N A*は、*s i R P T O R a 1-M 1 S*、*s i R P T O R a 1-M 1 X*、*s i R P T O R a 1-M 2 S*、*s i R P T O R a 1-M 2 X*、*s i R P T O R a 1-M 3 S*、*s i R P T O R a 1-M 3 X*、*s i R P T O R a 2-M 1 S*、*s i R P T O R a 2-M 1 X*、*s i R P T O R a 2-M 2 S*、*s i R P T O R a 2-M 2 X*、*s i R P T O R a 2-M 3 S*、*s i R P T O R a 2-M 3 X*、*s i R P T O R a 3-M 1 S*、*s i R P T O R a 3-M 1 X*、*s i R P T O R a 3-M 2 S*、*s i R P T O R a 3-M 2 X*、*s i R P T O R a 3-M 3 S*、*s i R P T O R a 3-M 3 X*、*s i R P T O R a 1-T 1 S*、*s i R P T O R a 1-T 2 S*、*s i R P T O R b 1-M 1 S*、*s i R P T O R b 1-M 1 X*、*s i R P T O R b 1-M 2 S*、*s i R P T O R b 1-M 2 X*、*s i R P T O R b 1-M 3 S*、*s i R P T O R b 1-M 3 X*、*s i R P T O R b 2-M 1 S*、*s i R P T O R b 2-M 1 X*、*s i R P T O R b 2-M 2 S*、*s i R P T O R b 2-M 2 X*、*s i R P T O R b 2-M 3 S*、*s i R P T O R b 2-M 3 X*、*s i R P T O R b 3-M 1 S*、*s i R P T O R b 3-M 1 X*、*s i R P T O R b 3-M 2 S*、*s i R P T O R b 3-M 2 X*、*s i R P T O*

40

50

Rb3-M3S、sirPTORb3-M3X、sirPTORb1-T1S、sirPTORb1-T2S、sirPTORc1-M1S、sirPTORc1-M1X、sirPTORc1-M2S、sirPTORc1-M2X、sirPTORc1-M3S、sirPTORc1-M3X、sirPTORc2-M1S、sirPTORc2-M1X、sirPTORc2-M2S、sirPTORc2-M2X、sirPTORc2-M3S、sirPTORc2-M3X、sirPTORc3-M1S、sirPTORc3-M1X、sirPTORc3-M2S、sirPTORc3-M2X、sirPTORc3-M3S、sirPTORc3-M3X、sirPTORc1-T1S及びsirPTORc1-T2Sのうちの1つである、請求項1～22のいずれか一項に記載のsirRNA。

10

【請求項26】

前記アンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドは、5'-リン酸ヌクレオチド又は5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドである、請求項15に記載のsirRNA。

【請求項27】

前記sirRNAは、sirPTORa1-M1P1、sirPTORa1-M2P1、sirPTORa1-M3P1、sirPTORa2-M1P1、sirPTORa2-M2P1、sirPTORa2-M3P1、sirPTORa3-M1P1、sirPTORa3-M2P1、sirPTORa3-M3P1、sirPTORa1-M1SP1、sirPTORa1-M2SP1、sirPTORa1-M3SP1、sirPTORa2-M1SP1、sirPTORa2-M2SP1、sirPTORa2-M3SP1、sirPTORa3-M1SP1、sirPTORa3-M2SP1、sirPTORa3-M3SP1、sirPTORa1-M1XP1、sirPTORa1-M2XP1、sirPTORa1-M3XP1、sirPTORa2-M1XP1、sirPTORa2-M2XP1、sirPTORa2-M3XP1、sirPTORa3-M1XP1、sirPTORa3-M2XP1、sirPTORa3-M3XP1、sirPTORb1-M1P1、sirPTORb1-M2P1、sirPTORb1-M3P1、sirPTORb2-M1P1、sirPTORb2-M2P1、sirPTORb2-M3P1、sirPTORb3-M1P1、sirPTORb3-M2P1、sirPTORb3-M3P1、sirPTORb1-M1SP1、sirPTORb1-M2SP1、sirPTORb1-M3SP1、sirPTORb2-M1SP1、sirPTORb2-M2SP1、sirPTORb2-M3SP1、sirPTORb3-M1SP1、sirPTORb3-M2SP1、sirPTORb3-M3SP1、sirPTORb1-M1XP1、sirPTORb1-M2XP1、sirPTORb1-M3XP1、sirPTORb2-M1XP1、sirPTORb2-M2XP1、sirPTORb2-M3XP1、sirPTORb3-M1XP1、sirPTORb3-M2XP1、sirPTORb3-M3XP1、sirPTORc1-M1P1、sirPTORc1-M2P1、sirPTORc1-M3P1、sirPTORc2-M1P1、sirPTORc2-M2P1、sirPTORc2-M3P1、sirPTORc3-M1P1、sirPTORc3-M2P1、sirPTORc3-M3P1、sirPTORc1-M1SP1、sirPTORc1-M2SP1、sirPTORc1-M3SP1、sirPTORc2-M1SP1、sirPTORc2-M2SP1、sirPTORc2-M3SP1、sirPTORc3-M1SP1、sirPTORc3-M2SP1、sirPTORc3-M3SP1、sirPTORc1-M1XP1、sirPTORc1-M2XP1、sirPTORc1-M3XP1、sirPTORc2-M1XP1、sirPTORc2-M2XP1、sirPTORc2-M3XP1、sirPTORc3-M1XP1、sirPTORc3-M2XP1及びsirPTORc3-M3XP1のうちの1つである、請求項26に記載のsirRNA。

20

30

40

【請求項28】

請求項1～27のいずれか一項に記載のsirRNA及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

50

【請求項 29】

前記 s i R N A と薬学的に許容可能な担体との重量比は、1 : (1 ~ 500) である、請求項 28 に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

前記 s i R N A と薬学的に許容可能な担体との重量比は、1 : (1 ~ 50) である、請求項 28 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

s i R N A 複合体であって、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の s i R N A と、当該 s i R N A に複合して結合される複合基とを含み、前記複合基は、薬学的に許容可能な少なくとも 1 つの標的基及び／又は送達補助基を含み、好ましくは、前記複合基は、リンカーを更に含み、前記リンカー及び／又は前記標的基又は前記送達補助基は、順に結合され、好ましくは、各前記標的基は、細胞表面受容体に結合できるリガンドから選択され、及び／又は各送達補助基は、送達目的器官又は組織における前記 s i R N A 複合体の生体適合性を向上させることができる基から選択される、s i R N A 複合体。

【請求項 32】

前記 s i R N A 複合体は、式 (301) に示される構造を有し、ただし、Nu は、s i R P T O R a 2 - M 1 S、s i R P T O R b 2 - M 1 S、s i R P T O R c 2 - M 1 S、s i R P T O R c 1 - T 1 S 及び s i R P T O R c 1 - T 2 S のうちの 1 つに対応する配列を有し、前記複合基は、前記 Nu における s i R N A センス鎖の 3' 末端のヌクレオチドのリボース基の 3' 位に結合され、前記 s i R N A 複合体は、ナトリウム塩形態である、請求項 31 に記載の s i R N A 複合体。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の s i R N A、及び／又は、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項 31 又は 32 に記載の s i R N A 複合体の、細胞における R P T O R 遺伝子発現を抑制する薬物の調製における使用。

【請求項 34】

請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の s i R N A、及び／又は、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項 31 又は 32 に記載の s i R N A 複合体の、R P T O R 機能調節に関連する疾患又は症状を治療する薬物の調製における使用。

【請求項 35】

前記 R P T O R 機能調節に関連する疾患又は症状は、m T O R C 1 の活性化による疾患、及び細胞のオートファジー機能異常に関連する疾患である、請求項 34 に記載の使用。

【請求項 36】

前記 R P T O R 機能調節に関連する疾患又は症状は、神経変性疾患又は非アルコール性脂肪性肝炎である、請求項 35 に記載の使用。

【請求項 37】

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、前頭側頭型認知症、レビー小体型認知症、ハンチントン病、トゥレット症候群及びパーキンソン病のうちの 1 つ以上であり、好ましくは、前記神経変性疾患は、アルツハイマー病である、請求項 36 に記載の使用。

【請求項 38】

R P T O R 機能調節に関連する疾患又は症状の治療及び／又は予防方法であって、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の s i R N A、及び／又は、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項 31 又は 32 に記載の s i R N A 複合体を有効量で、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

【請求項 39】

細胞における R P T O R 遺伝子発現の抑制方法であって、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の s i R N A、及び／又は、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項 31 又は 32 に記載の s i R N A 複合体を有効量で前記細胞と接

触させることを含む、方法。

【請求項 40】

請求項 1～27 のいずれか一項に記載の s i R N A、及び／又は、請求項 28～30 のいずれか一項に記載の医薬組成物、及び／又は、請求項 31又は32に記載の s i R N A 複合体を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、m T O R C 1 の活性を抑制できる核酸、当該核酸を含む医薬組成物及び s i R N A 複合体に関する。本開示は、更に、これらの核酸、医薬組成物及び s i R N A 複合体の調製方法と使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

神経変性疾患は、神経細胞の死亡及びグリア細胞のバランスを含む神経細胞の構造と機能の進行性の喪失であり、認知症などの認知障害を引き起こす。パーキンソン病（P a r k i n s o n ' s d i s e a s e、PD）、アルツハイマー病（A l z h e i m e r ' s d i s e a s e、AD）、前頭側頭型認知症（F r o n t o t e m p o r a l d e m e n t i a）、ハンチントン病（H u n t i n g t o n d i s e a s e、HD）、筋萎縮性側索硬化症（A m y o t r o p h i c l a t e r a l s c l e r o s i s、ALS、通称 A L S）、脊髄性筋萎縮症（S p i n a l m u s c u l a r a t r o p h y、S M A）などが含まれる。AD及びPDは、主に中高年に発生し、人口の高齢化に伴い、AD及びPDの発症が益々増加し、HD、A L S、S M Aなどは、各年齢層で発生する可能性がある。

20

【0003】

現在、神経変性疾患の薬物治療は主に西洋薬に基づいているが、薬物治療には長期間の投薬が必要であり、明らかな副作用があり、中枢神経系、消化器系、呼吸器系などに影響を与えやすく、内分泌かく乱、気分の変化などを引き起こすこともある。

【0004】

哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（m a m m a l i a n t a r g e t o f r a p a m y c i n、m T O R）シグナル伝達経路は、タンパク質合成、細胞成長、増殖などを調節するシグナル伝達経路であり、細胞において、m T O R C 1とm T O R C 2の2つの異なる複合体が存在する。m T O R C 1は、R P T O R、R a s タンパク質脳組織相同類似体（R a s h o m o l o g e n r i c h e d i n b r a i n、R H E B）、DEPドメイン含有m T O R相互作用タンパク質（D E P d o m a i n - c o n t a i n i n g m T O R - i n t e r a c t i n g p r o t e i n、DEPTOR）、哺乳類致死性 S E C 13 タンパク質 8（m a m m a l i a n l e t h a l w i t h S E C 13 p r o t e i n 8、m L S T 8）、及び40kDaのプロリンリッチA k T 基質（P r o l i n e r i c h A K T s u b s t r a t e o f 40kDa、P R A S 40）からなる複合体であり、当該複合体は、オートファジー調節の重要な負調節因子である。これまでの研究により、アルツハイマー病（A l z h e i m e r ' s D i s e a s e、AD）患者及び動物モデルにおいてm T O R C 1が活性化され、ミトコンドリアオートファジーが抑制され、これがAD患者の老人斑、神経原線維変化及び認知機能低下の主な原因であることが明らかになっている。文献では、R P T O Rを抑制することによりm T O R C 1活性を抑制することができ、それにより細胞オートファジー及びミトコンドリアオートファジーを促進し、神経変性疾患患者の脳内のミスフォールドタンパク質を減少させることが報告されている。

30

40

【0005】

本分野では、R P T O R 遺伝子発現レベルを調節する新薬を開発することにより、m T O R C 1 活性を調節し、更にm T O R C 1 活性化及び異常なオートファジー機能に関連する疾患又は症状、特に神経変性疾患を調節して治療する必要性が大きくなる。

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本開示の発明者は、本開示により提供される以下の s i R N A 及びその修飾配列が細胞における R P T O R 遺伝子発現を特異的に抑制することができ、本開示の s i R N A を含む医薬組成物及び s i R N A 複合体が本開示の s i R N A を標的組織及び／又は細胞に効果的に送達することができ、それにより神経変性疾患、特にアルツハイマー病の治療又は予防において高い薬物形成の可能性を示すことを意外にも見出した。

【課題を解決するための手段】

【0007】

一態様において、本開示は、R P T O R 遺伝子発現を抑制できる s i R N A を提供し、当該 s i R N A は、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、前記 s i R N A におけるヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列 I を含み、前記アンチセンス鎖はヌクレオチド配列 I I を含み、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 I I とは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成し、前記ヌクレオチド配列 I と前記ヌクレオチド配列 I I とは、i) ~ i i i) に示される配列から選択される 1 組であり、

i) 前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 2 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - C U G C C A U G G A G U A U C U G A Z_{a1} - 3' (配列番号 1)、

5' - Z_{a2} U C A G A U A C U C C A U G G C A G - 3' (配列番号 2)

ただし、Z_{a1} は A であり、Z_{a2} は U であり、前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z_{a1} に対応するヌクレオチド Z_{a3} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z_{a2} に対応するヌクレオチド Z_{a4} が含まれ、前記 Z_{a4} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、或いは、

i i) 前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 1 2 3 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 1 2 4 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - A C A A C A U C A A G U A C U A C G Z_{b1} - 3' (配列番号 1 2 3)、

5' - Z_{b2} C G U A G U A C U U G A U G U U G U - 3' (配列番号 1 2 4)

ただし、Z_{b1} は A であり、Z_{b2} は U であり、前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z_{b1} に対応するヌクレオチド Z_{b3} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z_{b2} に対応するヌクレオチド Z_{b4} が含まれ、前記 Z_{b4} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、或いは、

i i i) 前記ヌクレオチド配列 I と配列番号 2 4 5 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I と配列番号 2 4 6 に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が 3 つ以下であり、

5' - C G A C U A C U A C A U C U C C G U Z_{c1} - 3' (配列番号 2 4 5)、

5' - Z_{c2} A C G G A G A U G U A G U A G U C G - 3' (配列番号 2 4 6)

ただし、Z_{c1} は G であり、Z_{c2} は C であり、前記ヌクレオチド配列 I に、位置が Z_{c1} に対応するヌクレオチド Z_{c3} が含まれ、前記ヌクレオチド配列 I I に、位置が Z_{c2} に対応するヌクレオチド Z_{c4} が含まれ、前記 Z_{c4} は、前記アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドである。

【0008】

別の態様において、本開示は、医薬組成物を提供し、前記医薬組成物は、本開示の s i R N A 及び薬学的に許容可能な担体を含む。

【0009】

更に別の態様において、本開示は、s i R N A 複合体を提供し、前記 s i R N A 複合体は、本開示により提供される s i R N A と、当該 s i R N A に複合して結合される複合基を含む。

【0010】

更に別の態様において、本開示は、本開示の s i R N A、及び／又は医薬組成物、及び／又は s i R N A 複合体の、R P T O R 機能調節に関連する疾患を治療及び／又は予防する薬物の調製における使用を提供する。

【0011】

更に別の態様において、本開示は、R P T O R 機能調節に関連する疾患又は症状、例えば、神経変性疾患又は非アルコール性脂肪性肝炎に関連する疾患又は症状、特にアルツハイマー病の治療方法を提供し、前記方法は、本開示の s i R N A、及び／又は医薬組成物、及び／又は s i R N A 複合体を有効量で、それを必要とする被験体に投与することを含む。

10

【0012】

更に別の態様において、本開示は、細胞における R P T O R 遺伝子発現の抑制方法を提供し、当該方法は、本開示の s i R N A、及び／又は医薬組成物、及び／又は s i R N A 複合体を有効量で前記細胞と接触させることを含む。

【0013】

また、本開示は、キットを更に提供し、前記キットは、本開示の s i R N A、及び／又は医薬組成物、及び／又は s i R N A 複合体を含む。

20

【0014】

〔引用による組み込み〕

本明細書で言及される全ての出版物、特許及び特許出願は、各々の出版物、特許又は特許出願が特別にかつ個別に引用により本明細書に組み込まれるのと同じ程度に、引用により本明細書に組み込まれる。

【発明の効果】

【0015】

本開示により提供される s i R N A、医薬組成物及び s i R N A 複合体は、安定性に優れ、R P T O R m R N A 抑制活性が高く、オフターゲット効果が低減され、及び／又は R P T O R 機能調節に関連する疾患又は症状を顕著に治療及び軽減することができる。

30

【0016】

例えば、本開示により提供される s i R N A、医薬組成物又は s i R N A 複合体は、体外細胞実験において優れた標的遺伝子発現抑制活性を示す。例えば、本開示の s i R N A は、体外 H e p G 2 ヒト肝癌細胞において、0.5 n M の低濃度で、少なくとも 40.5 % の R P T O R m R N A 抑制率を示し、5 n M の濃度で、少なくとも 68.3 % の R P T O R m R N A 抑制率を示し、50 n M の濃度で、少なくとも 71.1 %、ひいては 86.8 % の R P T O R m R N A 抑制率を示し、優れた R P T O R 遺伝子発現抑制効果を示す。また、異なる長さ及び修飾スキームを有する本開示の s i R N A は、いずれも高い抑制率を有する。

【0017】

また、例えば、本開示により提供される s i R N A、医薬組成物又は s i R N A 複合体は、体内における安定性及び標的 m R N A 抑制活性がより高い。例えば、3 m g / k g の濃度で、本開示の異なる修飾スキームの s i R N A 複合体は、C 5 7 B L / 6 j マウスの体内において 51.3 % 又は 52.9 % の R P T O R m R N A 発現抑制率を示し、優れた R P T O R m R N A 抑制活性を示す。

40

【0018】

このように、本開示により提供される s i R N A、医薬組成物及び s i R N A 複合体は、R P T O R 遺伝子の発現を抑制し、m T O R C 1 の活性化による疾患及び細胞のオートファジー機能異常に関連する疾患を効果的に治療することができ、応用において明るい見通しを有している。

50

【0019】

本開示の他の特徴と利点については、後述する発明を実施するための形態部分において詳しく説明する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】50nM濃度の本開示のsiRNA及び参照siRNAをトランスフェクションした後の、体外HepG2ヒト肝癌細胞におけるRPTOR mRNAの相対的発現レベルを示すヒストグラムである。

【図2】異なる濃度の本開示のsiRNAをトランスフェクションした後の、体外HepG2ヒト肝癌細胞におけるRPTOR mRNAの相対的発現レベルを示すヒストグラムである。

10

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、本開示の発明を実施するための形態を詳細に説明する。ここで説明される発明を実施するための形態は、本開示を説明し解釈するためのものに過ぎず、本開示を限定するためのものではないことを理解されたい。

【0022】

<定義>

本開示において、RPTOR mRNAとは、Genbank登録番号NM_020761.3に示される配列を指す。更に、特に説明がない限り、本開示において用いられる用語「標的遺伝子」とは、上記RPTOR mRNAをコードする遺伝子を指し、用語「標的mRNA」とは、上記RPTOR mRNAを指す。

20

【0023】

文脈において、特に説明がない限り、大文字C、G、U、Aは、ヌクレオチドの塩基配列を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字sは、当該文字sの左右に隣接する2つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、P1は、当該P1の右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチド又は5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドであることを表す。いくつかの実施形態において、P1は、修飾が特定されたVP、Ps又はPを表し、組合せ文字VPは、当該組合せ文字VPの右側に隣接する1つのヌクレオチドがビニルリン酸エステル(5'-(E)-vinylphosphate、E-VP)修飾ヌクレオチドであることを表し、組合せ文字Psは、当該組合せ文字Psの右側に隣接する1つのヌクレオチドがチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、大文字Pは、当該文字Pの右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチドであることを表す。

30

【0024】

文脈において、前記「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシがフッ素で置換されたヌクレオチドを指し、「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の2'位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。「ヌクレオチドアナログ」とは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデオキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指し、例えば、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド(bridged nucleic acid、BNAと略称される)又は非環式ヌクレオチドがある。前記「メトキシ修飾ヌクレオチド」とは、リボース基の2'-ヒドロキシがメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。

40

【0025】

本明細書の文脈において、用語「相補的」又は「逆相補的」は、互換的に使用されてもよく、当業者に周知の意味、即ち、二本鎖核酸分子において、一方の鎖の塩基と他方の鎖

50

上の塩基とが相補的に対合するという意味を有する。DNAにおいて、プリン塩基であるアデニン（A）は、常にピリミジン塩基であるチミン（T）（又は、RNAにおいてウラシル（U）である）と対合し、プリン塩基であるグアニン（G）は、常にピリミジン塩基であるシトシン（C）と対合する。各塩基対は、いずれも1つのプリンと1つのピリミジンを含む。一方の鎖上のアデニンが常に他方の鎖上のチミン（又はウラシル）と対合するとともに、グアニンが常にシトシンと対合する場合、両方の鎖同士が相補的である、またその相補的な鎖の配列から当該鎖の配列を推知できると考えられる。これに応じて、「ミスマッチ」は、本分野において、二本鎖核酸において、対応する位置の塩基が相補的に対合して存在しないことを意味する。

【0026】

文脈において、特に説明がない限り、「基本的に逆相補的」とは、関連する2つのヌクレオチド配列間に3つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、「実質的に逆相補的」とは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、「完全に逆相補的」とは、2つのヌクレオチド配列間に塩基ミスマッチが存在しないことを指す。

【0027】

文脈において、一方のヌクレオチド配列と他方のヌクレオチド配列に「ヌクレオチド差異」が存在するとは、前者が後者に比べて、同じ位置のヌクレオチドの塩基種類が変化したことを指し、例えば、後者において1つのヌクレオチド塩基がAであるとき、前者の同じ位置での、対応するヌクレオチド塩基がU、C、G又はTである場合に、当該位置で2つのヌクレオチド配列間にヌクレオチド差異が存在すると認められている。いくつかの実施形態において、元の位置のヌクレオチドの代わりに無塩基ヌクレオチド又はその等価物を用いる場合、当該位置でヌクレオチド差異が生じたとも考えられる。無塩基ヌクレオチドとは、ヌクレオチドの核酸塩基が他の基又は水素原子で置換されたモノマー化合物であり、当該他の基は、置換又は非置換の芳香族基又はヘテロアリアル基を含むが、これらに限定されない。

【0028】

文脈において、特に本開示のsiRNA、医薬組成物又はsiRNA複合体の調製方法を説明する際に、特に説明がない限り、前記ヌクレオシドモノマー（nucleoside monomer）とは、調製対象のsiRNA又はsiRNA複合体におけるヌクレオチドの種類と順序に応じてホスホルアミダイト固相合成に用いられる修飾又は未修飾のヌクレオシドホスホルアミダイトモノマー（unmodified or modified RNA phosphoramidites。RNA phosphoramiditesをNucleoside phosphoramiditesということもある）を指す。ホスホルアミダイト固相合成は、当業者に公知のRNA合成に用いられる方法である。本開示に用いられるヌクレオシドモノマーは、いずれも市販品として購入可能である。

【0029】

本開示の文脈において、特に説明がない限り、「複合」とは、それぞれ特定の機能を有する2つ以上の化学部分間が共有結合的に互いに結合されることを指し、これに応じて、「複合体」とは、当該各化学部分間が共有結合的に結合されることにより形成された化合物を指す。更に、「siRNA複合体」は、特定の機能を有する1つ又は複数の化学部分がsiRNAに共有結合的に結合されて形成された化合物を表す。siRNA複合体は、文脈により、複数のsiRNA複合体の総称、又はある化学式に示されるsiRNA複合体であると理解されるべきである。本開示の文脈において、「複合分子」は、反応することによりsiRNAに複合され、最終的に本開示のsiRNA複合体を形成することができる特定の化合物であると理解されるべきである。

【0030】

1つ又は複数の置換基を含む任意の基に関して、これらの基が、立体的に非現実的な、合成上実行不可能な及び／又は本質的に不安定な、いかなる置換又は置換パターンも導入

10

20

30

40

50

することは意図されないと、当業者に理解される。

【0031】

本明細書で用いられる場合、「アルキル」とは、特定の数の炭素原子を有する直鎖と分岐鎖を指し、前記数は、通常1～20個の炭素原子、例えば、1～8個又は1～6個などの1～10個の炭素原子である。例えば、C₁～C₆アルキルは、1～6個の炭素原子を含む直鎖と分岐鎖アルキルである。特定の数の炭素を有するアルキル残基に言及する場合、当該数の炭素を有する全ての分岐鎖及び直鎖形態を含むことを意図する。したがって、例えば、「ブチル」は、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル及びtert-ブチルを含むことを意味し、「プロピル」は、n-プロピル及びイソプロピルを含む。アルキレンは、アルキルのサブセットであり、アルキルと同じであるが2つの結合点を有する二価原子団を指す。

10

【0032】

本明細書で用いられる場合、「アルケニル」とは、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を有する不飽和分岐鎖又は直鎖アルキルを指し、前記炭素-炭素二重結合は、親アルキルの隣接する炭素原子から1つの水素分子を除去することにより得られる。当該基は、二重結合のシス又はトランス配置にあってもよい。典型的なアルケニル基としては、ビニルと、プロパー1-エン-1-イル、プロパー1-エン-2-イル、プロパー2-エン-1-イル（アリル）、プロパー2-エン-2-イルなどのプロペニルと、ブター1-エン-1-イル、ブター1-エン-2-イル、2-メチルプロパー1-エン-1-イル、ブター2-エン-1-イル、ブター2-エン-2-イル、ブター1,3-ジエン-1-イル、ブター1,3-ジエン-2-イルなどのブテニルとを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、アルケニル基は、2～20個の炭素原子を有するが、他の実施形態において、2～10個、2～8個又は2～6個の炭素原子を有する。アルケニレンは、アルケニルのサブセットであり、アルケニルと同じであるが2つの結合点を有する残基を指す。

20

【0033】

本明細書で用いられる場合、「アルコキシ」とは、酸素橋により結合された特定の数の炭素原子を有するアルキルを指し、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、2-ペンチルオキシ、イソペンチルオキシ、ネオペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、2-ヘキシルオキシ、3-ヘキシルオキシ、3-メチルペンチルオキシなどがある。アルコキシは、通常1～10個、1～8個、1～6個又は1～4個の、酸素橋により結合された炭素原子を有する。

30

【0034】

本開示において各種のヒドロキシ保護基を用いることができる。一般的には、保護基は、化学官能基を特定の反応条件に不敏感にすることができ、かつ分子の残りの部分を実質的に損傷することなく分子中の当該官能基に付加する、及びそれから除去することができる。代表的なヒドロキシ保護基は、Beaucageら、Tetrahedron 1992, 48, 2223-2311、及びGreene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 2, 2d ed, John Wiley & Sons, New York, 1991に開示されており、引用により、上記文献は、それぞれ全体として本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、保護基は、塩基性条件で安定しているが、酸性条件で除去することができる。いくつかの実施形態において、本明細書で使用するヒドロキシ保護基の非排他的な実例としては、ジメトキシトリチル(DMT)、モノメトキシトリチル、9-フェニルキサンテン-9-イル(Pixyl)及び9-(p-メトキシフェニル)キサンテン-9-イル(Mox)を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で使用するヒドロキシ保護基の非排他的な実例としては、Tr(トリチル)、MMTr(4-メトキシトリチル)、DMTr(4,4'-ジメトキシトリチル)及びTMTr(4,4',4'-トリメトキシトリチル)を含む。

40

50

【0035】

用語「被験体」は、本明細書で用いられる場合、任意の動物、例えば、哺乳動物又は有袋動物を指す。本開示の被験体としては、ヒト、非ヒト霊長類（例えば、アカゲザル又は他の種類のマカク属のサル）、マウス、ブタ、ウマ、ロバ、ウシ、ヒツジ、ラット及び任意の種類の家禽を含むが、これらに限定されない。

【0036】

本明細書で用いられる場合、「治療」とは、有益な又は所望の結果を得る方法を指し、治療効果を含むが、これに限定されない。「治療効果」は、治療される潜在的障害を根絶又は改善することを意味する。また、治療効果は、被験体が依然として潜在的障害の苦痛を受ける可能性があるにもかかわらず、潜在的障害に関連する1つ又は複数の生理的症状を根絶又は改善することにより、被験体に改善が観察されて得られる。

10

【0037】

本明細書で用いられる場合、「予防」とは、有益な又は所望の結果を得る方法を指し、予防効果を含むが、これに限定されない。「予防効果」を得るために、特定の疾患に対する診断が行われていないかもしれないが、*siRNA*、医薬組成物又は*siRNA*複合体を、当該疾患に罹患するリスクのある被験体に投与するか、又は当該疾患の1つ又は複数の生理的症状が報告された被験体に投与することができる。

【0038】

本開示の*siRNA*

一態様において、本開示は、*RPTOR*遺伝子発現を抑制することができる*siRNA*を提供する。

20

【0039】

本開示の*siRNA*は、基本的な構造単位としてヌクレオチド基を含み、前記ヌクレオチド基がリン酸基、リボース基及び塩基を含むことは、当業者に公知であるので、ここでは説明を省略する。

【0040】

本開示の*siRNA*は、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが19～23ヌクレオチドであり、アンチセンス鎖の長さが19～26ヌクレオチドである。このように、本開示により提供される*siRNA*のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、19/19、19/20、19/21、19/22、19/23、19/24、19/25、19/26、20/20、20/21、20/22、20/23、20/24、20/25、20/26、21/20、21/21、21/22、21/23、21/24、21/25、21/26、22/20、22/21、22/22、22/23、22/24、22/25、22/26、23/20、23/21、23/22、23/23、23/24、23/25又は23/26であってもよい。いくつかの実施形態において、前記*siRNA*のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、19/21、21/21、21/23又は23/25である。

30

【0041】

本開示によれば、前記*siRNA*は、センス鎖とアンチセンス鎖とを含み、前記*siRNA*におけるヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドであり、前記センス鎖はヌクレオチド配列Iを含み、アンチセンス鎖はヌクレオチド配列IIを含み、前記ヌクレオチド配列Iと前記ヌクレオチド配列IIとは、少なくとも一部で逆相補的に二本鎖領域を形成する。

40

【0042】

いくつかの実施形態において、本開示の*siRNA*は、以下の第1種、第2種又は第3種の*siRNA*であってもよく、以下、各種の*siRNA*をそれぞれ説明する。

【0043】

第1種の*siRNA*

いくつかの実施形態において、本開示の*siRNA*は、第1種の*siRNA*である。前

50

記ヌクレオチド配列Ⅰと配列番号1に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠと配列番号2に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、

5' - C U G C C A U G G A G U A U C U G A Z_{a1} - 3' (配列番号1)、

5' - Z_{a2} U C A G A U A C U C C A U G G C A G - 3' (配列番号2)

ただし、Z_{a1}はAであり、Z_{a2}はUであり、前記ヌクレオチド配列Ⅰに、位置がZ_{a1}に対応するヌクレオチドZ_{a3}が含まれ、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠに、位置がZ_{a2}に対応するヌクレオチドZ_{a4}が含まれ、前記Z_{a4}は、前記アンチセンス鎖の5'末端の第1位のヌクレオチドである。

【0044】

10

文脈において、「位置が対応する」とは、ヌクレオチド配列の同一端から、ヌクレオチド配列において同じ位置にあることを指す。例えば、ヌクレオチド配列Ⅰの3'末端の第1位のヌクレオチドは、位置が配列番号1の3'末端の第1位のヌクレオチドに対応するヌクレオチドである。

【0045】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ⅰのみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅠのみを含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ⅰと配列番号1に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が1つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列ⅠⅠと配列番号2に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド配列差異が1つ以下である。

20

【0046】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠと配列番号2に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_{a4}の位置での差異を含み、Z_{a4}がA、C又はGから選択される。いくつかの実施形態において、Z_{a3}は、Z_{a4}と相補的なヌクレオチドである。上記ヌクレオチド差異を有するs i R N Aは、標的m R N A抑制能力が高く、これらのヌクレオチド差異を含むs i R N Aも、本開示の保護範囲内にある。

【0047】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ⅰと前記ヌクレオチド配列ⅠⅠとは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に3つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に塩基ミスマッチがないことを指す。

30

【0048】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが同じか又は異なり、前記センス鎖の長さが19～23ヌクレオチドであり、アンチセンス鎖の長さが19～26ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列Ⅰは、配列番号3に示されるヌクレオチド配列であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠは、配列番号4に示されるヌクレオチド配列であり、

5' - C U G C C A U G G A G U A U C U G A Z_{a3} - 3' (配列番号3)、

5' - Z_{a4} U C A G A U A C U C C A U G G C A G - 3' (配列番号4)

40

ただし、Z_{a3}は、A、U、G又はCから選択され、Z_{a4}は、Z_{a3}と相補的なヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、Z_{a3}はAであり、Z_{a4}はUである。

【0049】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠⅠを更に含み、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅠⅠⅠとは、長さがそれぞれ1～4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠと前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠⅠとは、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠは、前記ヌクレオチド配列Ⅰの5'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠⅠは、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの3'末端に結合

50

される。

【0050】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ⅠⅤと第2のヌクレオチド配列は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該第2のヌクレオチド配列とは、標的 mRNA における、配列番号1に示されるヌクレオチド配列の5'末端に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列ⅠⅤと同じであるヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かって、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤとは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基がAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基がUであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が20/20であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤとは、長さがいずれも2ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がCAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がUGであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が21/21であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤとは、長さがいずれも3ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がUCAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がUGAであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が22/22であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤとは、長さがいずれも4ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がGUCAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がUGACであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が23/23である。

10

20

【0051】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤとは、完全に逆相補的であるため、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基が与えられると、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基も決定される。

【0052】

第2種の siRNA

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA は、第2種の siRNA である。前記ヌクレオチド配列Ⅰと配列番号123に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠと配列番号124に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、

30

5'-ACAACAUCAGUACUACG_{Z_{b1}}-3' (配列番号123)、

5'-_{Z_{b2}}CGUAGUACUUGAUGUUGU-3' (配列番号124)

ただし、Z_{b1}はAであり、Z_{b2}はUであり、前記ヌクレオチド配列Ⅰに、位置がZ_{b1}に対応するヌクレオチドZ_{b3}が含まれ、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠに、位置がZ_{b2}に対応するヌクレオチドZ_{b4}が含まれ、前記Z_{b4}は、前記アンチセンス鎖の5'末端の第1位のヌクレオチドである。

【0053】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Ⅰのみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅠのみを含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ⅰと配列番号123に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が1つ以下であり、及び/又は前記ヌクレオチド配列ⅠⅠと配列番号124に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が1つ以下である。

40

【0054】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠと配列番号124に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、Z_{b4}の位置での差異を含み、Z_{b4}がA、C又はGから選択される。いくつかの実施形態において、Z_{b3}は、Z_{b4}と相補的なヌクレオチドである。上記ヌクレオチド差異を有する siRNA は、標的 mRNA 抑制能力が高く、これらのヌクレオチド差異を含む siRNA も、本開示の保護範囲内にある。

。

【0055】

50

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ⅰと前記ヌクレオチド配列ⅠⅠとは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に3つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に塩基ミスマッチがないことを指す。

【0056】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Ⅰは、配列番号125に示されるヌクレオチド配列であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠは、配列番号126に示されるヌクレオチド配列であり、

5' - A C A A C A U C A A G U A C U A C G Z_{b3} - 3' (配列番号125)、

5' - Z_{b4} C G U A G U A C U U G A U G U U G U - 3' (配列番号126)

ただし、Z_{b3}は、A、U、G又はCから選択され、Z_{b4}は、Z_{b3}と相補的なヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、Z_{b3}はAであり、Z_{b4}はUである。

【0057】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列ⅠⅤを更に含み、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤとは、長さがそれぞれ1~4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠと前記ヌクレオチド配列ⅠⅤとは、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠは、前記ヌクレオチド配列Ⅰの5'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列ⅠⅤは、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠの3'末端に結合される。

【0058】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列ⅠⅤと第2のヌクレオチド配列は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該第2のヌクレオチド配列とは、標的mRNAにおける、配列番号123に示されるヌクレオチド配列の5'末端に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列ⅠⅤと同じであるヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かって、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤとは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基がAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基がUであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が20/20であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤとは、長さがいずれも2ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がCAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がUGであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が21/21であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤとは、長さがいずれも3ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がUCAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がUGAであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が22/22であり、或いは、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとⅠⅤとは、長さがいずれも4ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基配列がAUCAであり、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基配列がUGAUであり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が23/23である。

【0059】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠとヌクレオチド配列ⅠⅤとは、完全に逆相補的であるため、ヌクレオチド配列ⅠⅠⅠの塩基が与えられると、ヌクレオチド配列ⅠⅤの塩基も決定される。

【0060】

第3種のsiRNA

いくつかの実施形態において、本開示のsiRNAは、第3種のsiRNAである。前記ヌクレオチド配列Ⅰと配列番号245に示されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、前記ヌクレオチド配列ⅠⅠと配列番号246に示

10

20

30

40

50

されるヌクレオチド配列とは、長さが等しく、ヌクレオチド差異が3つ以下であり、

5' - CGACUACUACAUCUCCGU Z_{c1} - 3' (配列番号245)、

5' - Z_{c2} ACGGAGAUGUAGUAGUCG - 3' (配列番号246)

ただし、 Z_{c1} はGであり、 Z_{c2} はCであり、前記ヌクレオチド配列Iに、位置が Z_{c1} に対応するヌクレオチド Z_{c3} が含まれ、前記ヌクレオチド配列IIに、位置が Z_{c2} に対応するヌクレオチド Z_{c4} が含まれ、前記 Z_{c4} は、前記アンチセンス鎖の5'末端の第1位のヌクレオチドである。

【0061】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列Iのみを含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列IIのみを含む。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Iと配列番号245に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が1つ以下であり、及び／又は前記ヌクレオチド配列IIと配列番号246に示されるヌクレオチド配列とは、ヌクレオチド差異が1つ以下である。

10

【0062】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列IIと配列番号246に示されるヌクレオチド配列との間のヌクレオチド差異は、 Z_{c4} の位置での差異を含み、 Z_{c4} がA、U又はGから選択される。いくつかの実施形態において、 Z_{c3} は、 Z_{c4} と相補的なヌクレオチドである。上記ヌクレオチド差異を有するsiRNAは、標的mRNA抑制能力が高く、これらのヌクレオチド差異を含むsiRNAも、本開示の保護範囲内にある。

20

【0063】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Iと前記ヌクレオチド配列IIとは、基本的に逆相補的、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記基本的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に3つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、前記実質的に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に1つ以下の塩基ミスマッチが存在することを指し、完全に逆相補的とは、2つのヌクレオチド配列間に塩基ミスマッチがないことを指す。

【0064】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列Iは、配列番号247に示されるヌクレオチド配列であり、ヌクレオチド配列IIは、配列番号248に示されるヌクレオチド配列であり、

30

5' - CGACUACUACAUCUCCGU Z_{c3} - 3' (配列番号247)、

5' - Z_{c4} ACGGAGAUGUAGUAGUCG - 3' (配列番号248)

ただし、 Z_{c3} は、A、U、G又はCから選択され、 Z_{c4} は、 Z_{c3} と相補的なヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、 Z_{c3} はGであり、 Z_{c4} はCである。

【0065】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列IIIを更に含み、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列IVを更に含み、ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVとは、長さがそれぞれ1~4ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列IIIと前記ヌクレオチド配列IVとは、長さが等しく、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、前記ヌクレオチド配列IIIは、前記ヌクレオチド配列Iの5'末端に結合され、前記ヌクレオチド配列IVは、前記ヌクレオチド配列IIの3'末端に結合される。

40

【0066】

いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列IVと第2のヌクレオチド配列は、実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であり、当該第2のヌクレオチド配列とは、標的mRNAにおける、配列番号245に示されるヌクレオチド配列の5'末端に隣接し、かつ長さが前記ヌクレオチド配列IVと同じであるヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態において、5'から3'に向かって、前記ヌクレオチド配列IIIとヌクレオチド配列IVとは、長さがいずれも1ヌクレオチドであり、ヌクレオチド配列IIIの塩基がA

50

であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基が U であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $20/20$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも 2 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が A A であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基配列が U U であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $21/21$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも 3 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が C A A であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基配列が U U G であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $22/22$ であり、或いは、ヌクレオチド配列 I I I と I V とは、長さがいずれも 4 ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、ヌクレオチド配列 I I I の塩基配列が G C A A であり、ヌクレオチド配列 I V の塩基配列が U U G C であり、このとき、センス鎖とアンチセンス鎖の長さ比が $23/23$ である。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 I I I とヌクレオチド配列 I V とは、完全に逆相補的であるため、ヌクレオチド配列 I I I の塩基が与えられると、ヌクレオチド配列 I V の塩基も決定される。

【0068】

以下、ヌクレオチド配列 V、ヌクレオチド配列 V I、核酸配列、s i R N A 中のヌクレオチド修飾及び修飾配列の説明は、上記第 1 種の s i R N A、第 2 種の s i R N A 又は第 3 種の s i R N A に適用される。即ち、特に明記されていない場合、以下、s i R N A の説明は、第 1 種の s i R N A、第 2 種の s i R N A 及び第 3 種の s i R N A を 1 つずつ説明したものとみなされるべきである。例えば、特定の s i R N A が指定されていない場合、「前記 s i R N A がヌクレオチド配列 V を更に含む」とは、「第 1 種の s i R N A、第 2 種の s i R N A 又は第 3 種の s i R N A がヌクレオチド配列 V を更に含む」ことを意味する。

20

【0069】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖とアンチセンス鎖とは、長さが異なり、前記アンチセンス鎖は、ヌクレオチド配列 V を更に含み、ヌクレオチド配列 V は、長さが 1 ~ 3 ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖の 3' 末端に結合され、アンチセンス鎖の 3' 突出端を構成する。

30

【0070】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖は、ヌクレオチド配列 V I を更に含み、ヌクレオチド配列 V I は、長さが 1 ~ 3 ヌクレオチドであり、前記センス鎖の 3' 末端に結合され、センス鎖の 3' 突出端を構成する。

【0071】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、ヌクレオチド配列 V を含むが、ヌクレオチド配列 V I を含まない。これにより、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、 $19/20$ 、 $19/21$ 、 $19/22$ 、 $20/21$ 、 $20/22$ 、 $20/23$ 、 $21/22$ 、 $21/23$ 、 $21/24$ 、 $22/23$ 、 $22/24$ 、 $22/25$ 、 $23/24$ 、 $23/25$ 又は $23/26$ であってもよい。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A は、ヌクレオチド配列 V 及び V I を含む。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列 V とヌクレオチド配列 V I とは、長さが同じか又は異なる。これにより、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、 $(19 \sim 26) : (19 \sim 26)$ であってもよい。いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 V 及び V I は、長さが 2 ヌクレオチドであり、これにより、本開示により提供される s i R N A のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、 $19/21$ 、 $21/21$ 、 $21/23$ 、 $23/23$ 、 $23/25$ 又は $25/25$ であってもよい。

40

【0072】

前記ヌクレオチド配列 V における各ヌクレオチドは、任意のヌクレオチドであってもよ

50

く、合成しやすく合成コストを節約するために、いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 V は、連続した 2 つのチミンデオキシリボヌクレオチド (dTdT) 又は連続した 2 つのウラシルリボヌクレオチド (UU) であり、或いは、s iRNA のアンチセンス鎖と標的 mRNA との親和力を向上させるために、ヌクレオチド配列 V は、標的 mRNA の対応する位置のヌクレオチドと相補的である。したがって、いくつかの実施形態において、本開示の s iRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、19 / 21 又は 21 / 23 であり、このとき、本開示の s iRNA は、より高い mRNA サイレンシング活性を有する。

【0073】

前記ヌクレオチド配列 VI における各ヌクレオチドは、任意のヌクレオチドであってもよく、合成しやすく合成コストを節約するために、いくつかの実施形態において、前記ヌクレオチド配列 VI は、連続した 2 つのチミンデオキシリボヌクレオチド (dTdT) 又は連続した 2 つのウラシルリボヌクレオチド (UU) であり、或いは、s iRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖との親和力を向上させるために、ヌクレオチド配列 VI は、標的 mRNA の対応する位置のヌクレオチドと同じである。したがって、いくつかの実施形態において、本開示の s iRNA は、ヌクレオチド配列 V 及び VI を含み、s iRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖の長さ比は、21 / 21 又は 23 / 23 であり、このとき、本開示の s iRNA は、より高い mRNA サイレンシング活性を有する。

【0074】

標的 mRNA の対応する位置のヌクレオチドとは、5' 末端で標的 mRNA のヌクレオチド配列に隣接するヌクレオチド又はヌクレオチド配列を指し、当該標的 mRNA のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列 II と実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であるヌクレオチド配列であるか、又はヌクレオチド配列 II 及びヌクレオチド配列 IV から構成されるヌクレオチド配列と実質的に逆相補的又は完全に逆相補的であるヌクレオチド配列である。

【0075】

いくつかの実施形態において、前記 s iRNA のセンス鎖は、配列番号 5 に示されるヌクレオチドを含み、前記 s iRNA のアンチセンス鎖は、配列番号 6 に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CUGCCAUGGAGUAUCUGAZ_{a3} - 3' (配列番号 5)、

5' - Z_{a4}UCAGAUACUCCAUGGCAGUG - 3' (配列番号 6)

ただし、前記 Z_{a4} は、アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、Z_{a3} は、A、U、G 又は C から選択され、Z_{a4} は、Z_{a3} と相補的なヌクレオチドであり、或いは、前記 s iRNA のセンス鎖は、配列番号 7 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s iRNA のアンチセンス鎖は、配列番号 8 に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CACUGCCAUGGAGUAUCUGAZ_{a3} - 3' (配列番号 7)、

5' - Z_{a4}UCAGAUACUCCAUGGCAGUGAC - 3' (配列番号 8)

ただし、前記 Z_{a4} は、アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、Z_{a3} は、A、U、G 又は C から選択され、Z_{a4} は、Z_{a3} と相補的なヌクレオチドである。

【0076】

いくつかの実施形態において、前記 s iRNA のセンス鎖は、配列番号 127 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s iRNA のアンチセンス鎖は、配列番号 128 に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - ACAACAUCAAGUACUACGZ_{b3} - 3' (配列番号 127)、

5' - Z_{b4}CGUAGUACUUGAUGUUGUUG - 3' (配列番号 128)

或いは、前記 s iRNA のセンス鎖は、配列番号 129 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 s iRNA のアンチセンス鎖は、配列番号 130 に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CAACAACAUCAAGUACUACGZ_{b3} - 3' (配列番号 129)、

5' - Z_{b4}CGUAGUACUUGAUGUUGUUGAU - 3' (配列番号 130)

ただし、前記 Z_{b4} は、アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、 Z_{b3} は、A、U、G 又は C から選択され、 Z_{b4} は、 Z_{b3} と相補的なヌクレオチドである。
【0077】

いくつかの実施形態において、前記 *sirNA* のセンス鎖は、配列番号 249 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 *sirNA* のアンチセンス鎖は、配列番号 250 に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - CGACUACUACAUCUCCGU Z_{c3} - 3' (配列番号 249)、

5' - Z_{c4} ACGGAGAUGUAGUAGUCGUU - 3' (配列番号 250)

或いは、前記 *sirNA* のセンス鎖は、配列番号 251 に示されるヌクレオチド配列を含み、前記 *sirNA* のアンチセンス鎖は、配列番号 252 に示されるヌクレオチド配列を含み、

5' - AACGACUACUACAUCUCCGU Z_{c3} - 3' (配列番号 251)、

5' - Z_{c4} ACGGAGAUGUAGUAGUCGUUGC - 3' (配列番号 252)

ただし、前記 Z_{c4} は、アンチセンス鎖の 5' 末端の第 1 位のヌクレオチドであり、 Z_{c3} は、A、U、G 又は C から選択され、 Z_{c4} は、 Z_{c3} と相補的なヌクレオチドである。
【0078】

いくつかの実施形態において、本開示に記載された *sirNA* は、表 1 に列挙された *sirPTORa1*、*sirPTORa2*、*sirPTORa3*、*sirPTORb1*、*sirPTORb2*、*sirPTORb3*、*sirPTORc1*、*sirPTORc2* 及び *sirPTORc3* である。

【0079】

前述したように、本開示の *sirNA* におけるヌクレオチドは、それぞれ独立して修飾又は未修飾のヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、本開示の *sirNA* におけるヌクレオチドは、未修飾ヌクレオチドであり、いくつかの実施形態において、本開示の *sirNA* におけるヌクレオチドの一部又は全部は、修飾ヌクレオチドであり、ヌクレオチド基上のこれらの修飾により、本開示の *sirNA* が *RPTOR* 遺伝子発現を抑制する機能を明らかに弱めるか又は喪失させることがない。

【0080】

いくつかの実施形態において、本開示の *sirNA* は、少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む。本開示の文脈において、用いられる用語「修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の 2' 位のヒドロキシ基が他の基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログ、或いは、ヌクレオチド上の塩基が修飾された塩基であるヌクレオチドを指す。前記修飾ヌクレオチドにより、*sirNA* が遺伝子発現を抑制する機能を明らかに弱めるか又は喪失させることがない。例えば、J. K. Watts, G. F. Deleavey, and M. J. Damha, *Chemically modified siRNA: tools and applications*, *Drug Discovery Today*, 2008, 13 (19-20): 842-55 に開示された修飾ヌクレオチドを選択してもよい。

【0081】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される *sirNA* のセンス鎖又は前記アンチセンス鎖は、少なくとも 1 つのヌクレオチドが修飾ヌクレオチドであり、及び／又は少なくとも 1 つのリン酸エステル基が修飾基を有するリン酸エステル基である。言い換えれば、前記センス鎖と前記アンチセンス鎖において、少なくとも 1 本の一本鎖のリン酸-糖骨格中のリン酸エステル基及び／又はリボース基の少なくとも一部は、修飾基を有するリン酸エステル基及び／又は修飾基を有するリボース基である。

【0082】

いくつかの実施形態において、前記センス鎖及び／又は前記アンチセンス鎖におけるヌクレオチドは、全て修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、本開示により提供される *sirNA* のセンス鎖と前記アンチセンス鎖における各ヌクレオチドは、独立してフルオロ修飾ヌクレオチド又は非フルオロ修飾ヌクレオチドである。

【0083】

本開示の発明者は、驚くべきことに、本開示により提供される s i R N A により、動物実験において血漿中安定性と遺伝子サイレンシング効率の高度なバランスが取られていることを見出した。

【0084】

いくつかの実施形態において、前記フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチド配列 I とヌクレオチド配列 I I に位置し、前記ヌクレオチド配列 I におけるフルオロ修飾ヌクレオチドが 5 つ以下であり、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列 I の第 7、8、9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、前記ヌクレオチド配列 I I におけるフルオロ修飾ヌクレオチドが 7 つ以下であり、前記ヌクレオチド配列 I I の第 2、6、14、16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドである。

10

【0085】

いくつかの実施形態において、5'末端から3'末端に向かって、前記センス鎖において、前記ヌクレオチド配列 I の第 7、8、9 位又は 5、7、8、9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、残りの位置のヌクレオチドが非フルオロ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列 I I の第 2、6、14、16 位又は第 2、6、8、9、14、16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、残りの位置のヌクレオチドが非フルオロ修飾ヌクレオチドである。

【0086】

本開示の文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の 2' 位のヒドロキシがフッ素で置換された、以下の式 (7) に示される構造を有するヌクレオチドを指す。「非フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の 2' 位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを指す。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、ヌクレオチドのリボース基の 2' 位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから独立して選択される 1 つである。

20

【0087】

これらのリボース基の 2' 位のヒドロキシが非フッ素基で置換されたヌクレオチドは、当業者に公知であり、これらのヌクレオチドは、2' - アルコキシ修飾ヌクレオチド、2' - 置換アルコキシ修飾ヌクレオチド、2' - アルキル修飾ヌクレオチド、2' - 置換アルキル修飾ヌクレオチド、2' - アミノ修飾ヌクレオチド、2' - 置換アミノ修飾ヌクレオチド、2' - デオキシヌクレオチドから選択される 1 つであってもよい。

30

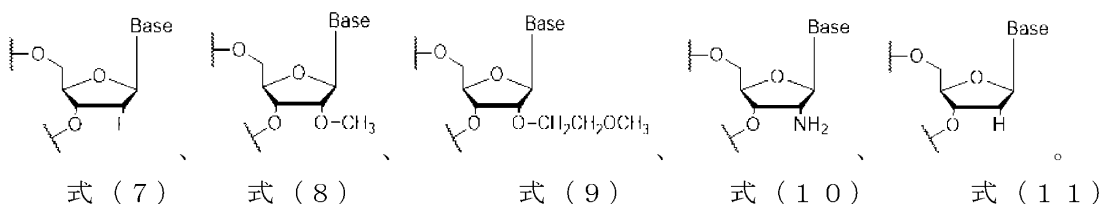
【0088】

いくつかの実施形態において、2' - アルコキシ修飾ヌクレオチドは、式 (8) に示されるメトキシ修飾ヌクレオチド (2' - O M e) である。いくつかの実施形態において、2' - 置換アルコキシ修飾ヌクレオチドは、例えば、式 (9) に示される 2' - オーメトキシエチル修飾ヌクレオチド (2' - M O E) であってもよい。いくつかの実施形態において、2' - アミノ修飾ヌクレオチド (2' - N H₂) は、式 (10) に示される。いくつかの実施形態において、2' - デオキシヌクレオチド (D N A) は、式 (11) に示される。

40

【0089】

【化 1】



【0090】

ヌクレオチドアナログとは、核酸においてヌクレオチドの代わりとなることができるが

50

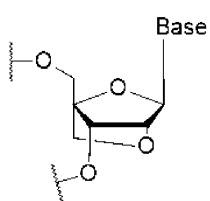
、アデニンリボヌクレオチド、グアニンリボヌクレオチド、シトシンリボヌクレオチド、ウラシルリボヌクレオチド又はチミンデオキシリボヌクレオチドと構造が異なる基を指す。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、架橋ヌクレオチド (bridged nucleic acid、BNAと略称される) 又は非環式ヌクレオチドであってもよい。

【0091】

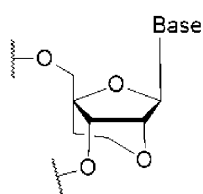
BNAとは、拘束された又は近づけないヌクレオチドを指す。BNAは、五員環、六員環又は七員環の、「固定された」C3'-エンド糖パッカリングを有する架橋構造を含んでもよい。通常、当該橋を当該リボースの2'-、4'-位に導入して2', 4'-BNAヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、BNAは、式(12)に示される LNA、式(13)に示されるENA、式(14)に示されるcET BNAなどであってもよい。

【0092】

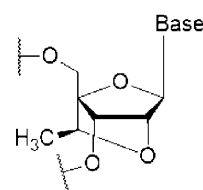
【化2】



式(12)



式(13)



式(14)

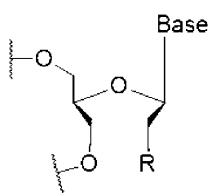
20

【0093】

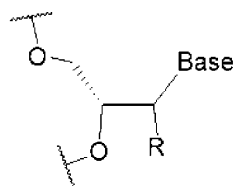
非環式ヌクレオチドは、ヌクレオチドの糖環が開環されたヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非環式ヌクレオチドは、式(15)に示されるアンロック核酸 (UNA)、又は式(16)に示されるグリセロール核酸 (GNA) であってもよい。

【0094】

【化3】



式(15)



式(16)

30

【0095】

上記式(15)及び式(16)において、Rは、H、OH又はアルコキシ (O-アルキル) から選択される。

【0096】

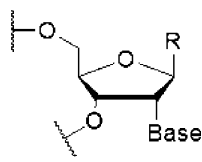
イソヌクレオチドとは、ヌクレオチドにおいて塩基のリボース環における位置が変化した化合物を指す。いくつかの実施形態において、イソヌクレオチドは、式(17)又は(18)に示される、塩基がリボース環の1'-位から2'-位又は3'-位に移行した化合物であってもよい。

【0097】

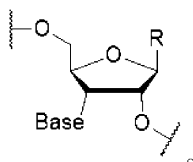
40

50

【化 4】



式 (17)



式 (18)

【0098】

上記式 (17) 及び式 (18) の化合物において、Base は、A、U、G、C 又は T などの核酸塩基を表し、R は、H、OH、F 又は上述した非フッ素基から選択される。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドアナログは、イソヌクレオチド、LNA、ENA、cET、UNA 及び GNA から選択される 1 つである。いくつかの実施形態において、各非フルオロ修飾ヌクレオチドは、いずれもメトキシ修飾ヌクレオチドである。文脈において、前記メトキシ修飾ヌクレオチドとは、リボース基の 2'-ヒドロキシがメトキシで置換されたヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態において、前記非フルオロ修飾ヌクレオチドは、独立して 2'-O-メトキシ修飾又は 2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドである。

10

【0099】

文脈において、「フルオロ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの 2'-ヒドロキシがフッ素で置換されて形成された、式 (7) に示される構造を有する化合物を指し、「メトキシ修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の 2'-ヒドロキシがメトキシで置換されて形成された、式 (8) に示される構造を有する化合物を指し、「2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドのリボース基の 2'-ヒドロキシ基がメトキシエチルで置換されて形成された、式 (9) に示される構造を有する化合物を指す。

20

【0100】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA は、以下の修飾を有する siRNA である。すなわち、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記センス鎖において、前記ヌクレオチド配列 I の第 7、8、9 位又は第 5、7、8、9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、前記アンチセンス鎖において、前記ヌクレオチド配列 II の第 2、6、14、16 位又は第 2、6、8、9、14、16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドである。

30

【0101】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA は、以下の修飾を有する siRNA である。すなわち、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 siRNA のセンス鎖におけるヌクレオチド配列 I の第 5、7、8 及び 9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のセンス鎖における残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 siRNA のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列 II の第 2、6、14、16 位又は第 2、6、8、9、14、16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のアンチセンス鎖における残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

40

或いは、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 siRNA のセンス鎖におけるヌクレオチド配列 I の第 5、7、8 及び 9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のセンス鎖における残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5' 末端から 3' 末端に向かって、前記 siRNA のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列 II の第 2、6、14 及び 16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のアンチセンス鎖における残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、

50

或いは、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のセンス鎖におけるヌクレオチド配列 I の第 7、8 及び 9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のセンス鎖における残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列 II の第 2、6、14 及び 16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のアンチセンス鎖における残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドである。

【0102】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA は、以下の修飾を有する siRNA である。すなわち、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のセンス鎖におけるヌクレオチド配列 I の第 7、8 及び 9 位又は第 5、7、8 及び 9 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、siRNA のセンス鎖における残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記 siRNA のアンチセンス鎖におけるヌクレオチド配列 II の第 2、6、14、16 位又は第 2、6、8、9、14、16 位のヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであり、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列 II の第 3～6 位のヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つが 2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、前記アンチセンス鎖において、第 3 位又は第 5 位のヌクレオチドが 2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドであり、残りの位置のヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、5'末端から3'末端に向かって、前記ヌクレオチド配列 II の第 3～9 位のヌクレオチドのうちの 2 つ以下のヌクレオチドは、2'-O-メトキシエチル修飾ヌクレオチドである。

【0103】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される siRNA は、任意に、siRPTORa1-M1、siRPTORa1-M2、siRPTORa1-M3、siRPTORa2-M1、siRPTORa2-M2、siRPTORa2-M3、siRPTORa3-M1、siRPTORa3-M2、siSRPTORa3-M3、siRPTORb1-M1、siRPTORb1-M2、siRPTORb1-M3、siRPTORb2-M1、siRPTORb2-M2、siRPTORb2-M3、siRPTORb3-M1、siRPTORb3-M2、siSRPTORb3-M3、siRPTORc1-M1、siRPTORc1-M2、siRPTORc1-M3、siRPTORc2-M1、siRPTORc2-M2、siRPTORc2-M3、siRPTORc3-M1、siRPTORc3-M2 及び siSRPTORc3-M3 から選択される 1 つである。

【0104】

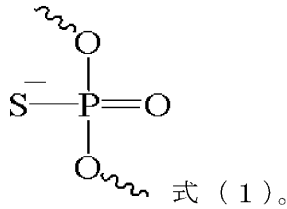
上記修飾を有する siRNA は、コストが低いだけでなく、血液中のリボヌクレアーゼで核酸を切断しにくくことができ、これにより、核酸の安定性を向上させ、核酸のヌクレアーゼ加水分解耐性という特性をより高めている。また、上記修飾 siRNA は、標的 mRNA 抑制活性が高い。

【0105】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される siRNA のセンス鎖とアンチセンス鎖において、少なくとも 1 本の一本鎖のリン酸-糖骨格中のリン酸エステル基の少なくとも一部は、修飾基を有するリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、修飾基を有するリン酸エステル基は、リン酸エステル基におけるリン酸ジエステル結合中の少なくとも 1 つの酸素原子が硫黄原子で置換されたチオリン酸エステル基である。いくつかの実施形態において、前記修飾基を有するリン酸エステル基は、式 (1) に示される構造を有するチオリン酸エステル基である。

【0106】

【化 5】



【0107】

このような修飾により、*siRNA* の二本鎖構造を安定化させ、塩基対合の高い特異性と高い親和力を維持することができる。

10

【0108】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される *siRNA* において、チオリン酸エステル基は、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意の一端の第 1 位のヌクレオチドと第 2 位のヌクレオチドとの間、センス鎖又はアンチセンス鎖の任意の一端の第 2 位のヌクレオチドと第 3 位のヌクレオチドとの間、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される少なくとも一箇所に結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステル基は、センス鎖の 5' 末端を除く全ての上記位置に結合されて存在する。いくつかの実施形態において、チオリン酸エステル基は、

20

前記センス鎖の 5' 末端から第 1 位のヌクレオチドと第 2 位のヌクレオチドとの間、
前記センス鎖の 5' 末端から第 2 位のヌクレオチドと第 3 位のヌクレオチドとの間、
前記センス鎖の 3' 末端から第 1 位のヌクレオチドと第 2 位のヌクレオチドとの間、
前記センス鎖の 3' 末端から第 2 位のヌクレオチドと第 3 位のヌクレオチドとの間、
前記アンチセンス鎖の 5' 末端から第 1 位のヌクレオチドと第 2 位のヌクレオチドとの間、

前記アンチセンス鎖の 5' 末端から第 2 位のヌクレオチドと第 3 位のヌクレオチドとの間、

前記アンチセンス鎖の 3' 末端から第 1 位のヌクレオチドと第 2 位のヌクレオチドとの間、及び

30

前記アンチセンス鎖の 3' 末端から第 2 位のヌクレオチドと第 3 位のヌクレオチドとの間の少なくとも一箇所に結合されて存在する。

【0109】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される *siRNA* は、任意に、*siRPTORa1-M1S*、*siRPTORa1-M1X*、*siRPTORa1-M2S*、*siRPTORa1-M2X*、*siRPTORa1-M3S*、*siRPTORa1-M3X*、*siRPTORa2-M1S*、*siRPTORa2-M1X*、*siRPTORa2-M2S*、*siRPTORa2-M2X*、*siRPTORa2-M3S*、*siRPTORa2-M3X*、*siRPTORa3-M1S*、*siRPTORa3-M1X*、*siRPTORa3-M2S*、*siRPTORa3-M2X*、*siRPTORa3-M3S*、*siRPTORa3-M3X*、*siRPTORa1-T1S*、*siRPTORa1-T2S*、*siRPTORb1-M1S*、*siRPTORb1-M1X*、*siRPTORb1-M2S*、*siRPTORb1-M2X*、*siRPTORb1-M3S*、*siRPTORb1-M3X*、*siRPTORb2-M1S*、*siRPTORb2-M1X*、*siRPTORb2-M2S*、*siRPTORb2-M2X*、*siRPTORb2-M3S*、*siRPTORb2-M3X*、*siRPTORb3-M1S*、*siRPTORb3-M1X*、*siRPTORb3-M2S*、*siRPTORb3-M2X*、*siRPTORb3-M3S*、*siRPTORb3-M3X*、*siRPTORb1-T1S*、*siRPTORb1-T2S*、*siRPTORc1-M1S*、*siRPTORc1-M1X*、*siRPTORc1-M2S*、*siRPTORc1-M2X*、*siRPTORc1-M3S*、*siRPTORc1-M3X*

40

50

、 siRPTORc2-M1S 、 siRPTORc2-M1X 、 siRPTORc2-M2S 、 siRPTORc2-M2X 、 siRPTORc2-M3S 、 siRPTORc2-M3X 、 siRPTORc3-M1S 、 siRPTORc3-M1X 、 siRPTORc3-M2S 、 siRPTORc3-M2X 、 siRPTORc3-M3S 、 siRPTORc3-M3X 、 siRPTORc1-T1S 及び siRPTORc1-T2S から選択される1つである。

【0110】

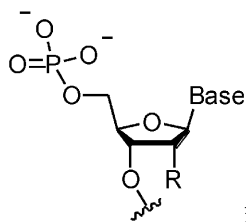
いくつかの実施形態において、前記 siRNA のアンチセンス鎖の5'末端のヌクレオチドは、5'-リン酸ヌクレオチド又は5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドである。

【0111】

通常用いられる前記5'-リン酸ヌクレオチド又は5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドは、当業者に公知であり、例えば、5'-リン酸ヌクレオチドは、以下の構造を有してもよい。

【0112】

【化6】



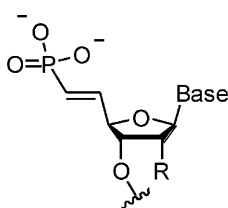
式(2)

【0113】

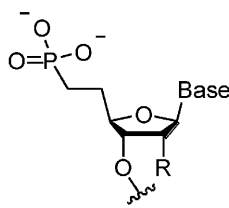
また、例えば、Anastasia Khvorova and Jonathan K. Watts, The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. Nature Biotechnology, 2017, 35(3): 238-48には、以下の4種類の5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドが開示されている。

【0114】

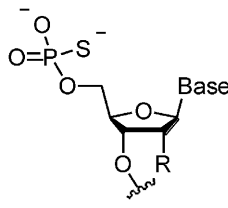
【化7】



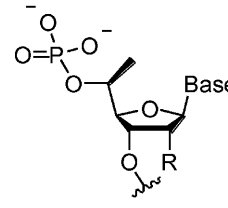
式(3)



式(4)



式(5)



式(6)

【0115】

ただし、Rは、H、OH、メトキシ、フッ素から選択され、Baseは、A、U、C、G又はTから選択される核酸塩基を表す。

【0116】

いくつかの実施形態において、5'-リン酸ヌクレオチドは、式(2)に示される、5'-リン酸修飾を含むヌクレオチドであり、5'-リン酸アナログ修飾ヌクレオチドは、式(3)に示される、ビニルリン酸エステル(5'-(E)-vinylphosphonate、E-VP)修飾を含むヌクレオチドであり、又は、式(5)に示されるチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドである。

【0117】

いくつかの実施形態において、本開示により提供される siRNA は、任意に、 siR

P T O R a 1 - M 1 P 1、s i R P T O R a 1 - M 2 P 1、s i R P T O R a 1 - M 3 P 1、s i R P T O R a 2 - M 1 P 1、s i R P T O R a 2 - M 2 P 1、s i R P T O R a 2 - M 3 P 1、s i R P T O R a 3 - M 1 P 1、s i R P T O R a 3 - M 2 P 1、s i R P T O R a 3 - M 3 P 1、s i R P T O R a 1 - M 1 S P 1、s i R P T O R a 1 - M 2 S P 1、s i R P T O R a 1 - M 3 S P 1、s i R P T O R a 2 - M 1 S P 1、s i R P T O R a 2 - M 2 S P 1、s i R P T O R a 2 - M 3 S P 1、s i R P T O R a 3 - M 1 S P 1、s i R P T O R a 3 - M 2 S P 1、s i R P T O R a 3 - M 3 S P 1、s i R P T O R a 1 - M 1 X P 1、s i R P T O R a 1 - M 2 X P 1、s i R P T O R a 1 - M 3 X P 1、s i R P T O R a 2 - M 1 X P 1、s i R P T O R a 2 - M 2 X P 1、s i R P T O R a 2 - M 3 X P 1、s i R P T O R a 3 - M 1 X P 1、s i R P T O R a 3 - M 2 X P 1、s i R P T O R a 3 - M 3 X P 1、s i R P T O R b 1 - M 1 P 1、s i R P T O R b 1 - M 2 P 1、s i R P T O R b 1 - M 3 P 1、s i R P T O R b 2 - M 1 P 1、s i R P T O R b 2 - M 2 P 1、s i R P T O R b 2 - M 3 P 1、s i R P T O R b 3 - M 1 P 1、s i R P T O R b 3 - M 2 P 1、s i R P T O R b 3 - M 3 P 1、s i R P T O R b 1 - M 1 S P 1、s i R P T O R b 1 - M 2 S P 1、s i R P T O R b 1 - M 3 S P 1、s i R P T O R b 2 - M 1 S P 1、s i R P T O R b 2 - M 2 S P 1、s i R P T O R b 2 - M 3 S P 1、s i R P T O R b 3 - M 1 S P 1、s i R P T O R b 3 - M 2 S P 1、s i R P T O R b 3 - M 3 S P 1、s i R P T O R b 1 - M 1 X P 1、s i R P T O R b 1 - M 2 X P 1、s i R P T O R b 1 - M 3 X P 1、s i R P T O R b 2 - M 1 X P 1、s i R P T O R b 2 - M 2 X P 1、s i R P T O R b 2 - M 3 X P 1、s i R P T O R b 3 - M 1 X P 1、s i R P T O R b 3 - M 2 X P 1、s i R P T O R b 3 - M 3 X P 1、s i R P T O R c 1 - M 1 P 1、s i R P T O R c 1 - M 2 P 1、s i R P T O R c 1 - M 3 P 1、s i R P T O R c 2 - M 1 P 1、s i R P T O R c 2 - M 2 P 1、s i R P T O R c 2 - M 3 P 1、s i R P T O R c 3 - M 1 P 1、s i R P T O R c 3 - M 2 P 1、s i R P T O R c 3 - M 3 P 1、s i R P T O R c 1 - M 1 S P 1、s i R P T O R c 1 - M 2 S P 1、s i R P T O R c 1 - M 3 S P 1、s i R P T O R c 2 - M 1 S P 1、s i R P T O R c 2 - M 2 S P 1、s i R P T O R c 2 - M 3 S P 1、s i R P T O R c 3 - M 1 S P 1、s i R P T O R c 3 - M 2 S P 1、s i R P T O R c 3 - M 3 S P 1、s i R P T O R c 1 - M 1 X P 1、s i R P T O R c 1 - M 2 X P 1、s i R P T O R c 1 - M 3 X P 1、s i R P T O R c 2 - M 1 X P 1、s i R P T O R c 2 - M 2 X P 1、s i R P T O R c 2 - M 3 X P 1、s i R P T O R c 3 - M 1 X P 1、s i R P T O R c 3 - M 2 X P 1及びs i R P T O R c 3 - M 3 X P 1から選択される1つである。

10

20

30

40

50

【0118】

本開示の発明者は、本開示により提供されるs i R N Aが顕著に向上した血漿とリソソーム安定性を有するだけでなく、非常に高い遺伝子抑制活性を維持することを、意外にも見出した。

【0119】

本開示により提供されるs i R N Aは、本分野における通常のs i R N A調製方法（例えば、固相合成方法及び液相合成方法）によって得ることができる。固相合成は、既に商用カスタマイズサービスが行われている。対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを用いることにより修飾ヌクレオチドを本開示に記載されたs i R N Aに導入することができ、対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを調製する方法、及び修飾ヌクレオチドをs i R N Aに導入する方法も、当業者によく知られている。

【0120】

医薬組成物

一態様において、本開示は、医薬組成物を提供し、前記医薬組成物は、活性成分としての上述したs i R N Aと、薬学的に許容可能な担体とを含む。

【0121】

前記薬学的に許容可能な担体は、s i R N A投与分野で通常用いられる担体であってもよく、例えば、磁性ナノ粒子（magnetic nanoparticles、例えば

、 Fe_3O_4 又は Fe_2O_3 に基づくナノ粒子)、カーボンナノチューブ(carbon nanotubes)、メソポーラスシリコン(mesoporous silicon)、リン酸カルシウムナノ粒子(calcium phosphate nanoparticles)、ポリエチレンイミン(polyethylenimine、PEI)、ポリアミドアミンデンドリマー(polyamidoamine (PAMAM) dendrimer)、ポリリジン(poly(L-lysine)、PLL)、キトサン(chitosan)、1,2-ジオレオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane、DOTAP)、ポリD-又はL-乳酸／グリコール酸共重合体(poly(D&L-lactic/glycolic acid) copolymer、PLGA)、ポリ(アミノエチルエチレンリン酸エステル)(poly(2-aminoethyl ethylene phosphate)、PPEEA)及びポリ(N,N-ジメチルアミノエチルメタクリレート)(poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)、PDMAEMA)並びにこれらの誘導体のうちの1つ又は複数があるが、これらに限定されない。

10

【0122】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物において、siRNAと薬学的に許容可能な担体の含有量について特段の要件がなく、いくつかの実施形態において、siRNAと薬学的に許容可能な担体の重量比は、1：(1～500)であってもよく、いくつかの実施形態において、上記重量比は、1：(1～50)である。

20

【0123】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物には、薬学的に許容可能な他の添加剤が含まれてもよく、当該添加剤は、本分野で通常用いられる各種の製剤又は化合物のうちの1つ又は複数であってもよい。例えば、前記薬学的に許容可能な他の添加剤は、pH緩衝液、保護剤及び浸透圧調節剤のうちの少なくとも1つを含んでもよい。

【0124】

前記pH緩衝液は、pH7.5～8.5のトリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩緩衝液及び／又はpH5.5～8.5のリン酸塩緩衝液であってもよく、例えば、pH5.5～8.5のリン酸塩緩衝液であってもよい。

【0125】

前記保護剤は、イノシトール、ソルビトール、スクロース、トレハロース、マンノース、マルトース、ラクトース及びグルコースのうちの少なくとも1つであってもよい。前記医薬組成物の全重量を基準とし、前記保護剤の含有量は、0.01～30重量%であってもよい。

30

【0126】

前記浸透圧調節剤は、例えば、塩化ナトリウム及び／又は塩化カリウムであってもよい。前記浸透圧調節剤の含有量は、前記医薬組成物の浸透圧が200～700ミリオスモル／キログラム(mOsm/kg)となるように決定される。所望の浸透圧により、当業者は、前記浸透圧調節剤の含有量を容易に決定することができる。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物から製造された製剤の投与過程における用量は、投与方式によって調整される。

40

【0127】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、注射液などの液体製剤であってもよく、凍結乾燥粉末注射剤として、投与時に液体添加剤と混合して、液体製剤としてもよい。前記液体製剤は、皮下、筋肉、脳室内又は髄腔内注射投与に用いることができるが、これらに限定されず、鼻腔投与、口腔吸入、噴霧投与などの方式で前記医薬組成物を送達することもできるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、髄腔内注射により送達される。いくつかの実施形態において、脊髄液への前記医薬組成物の髄腔内注射は、ボーラス注射の方式で又はマイクロポンプを介して行うことができ、これらのマイクロポンプを皮下に埋め込むことにより、siRNAを脊髄液に規則的

50

10

20

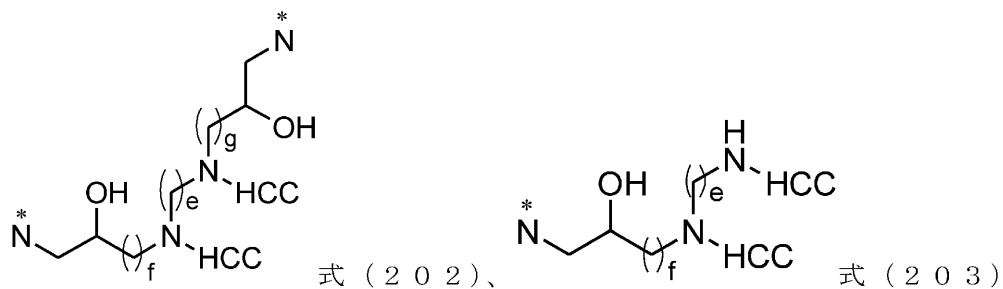
30

【化 8】



【 0 1 3 2 】

【化 9】



10

【 0 1 3 3 】

ただし、 g 、 e 及び f は、それぞれ独立して 1 ～ 6 の整数であり、「H C C」は、炭化水素鎖を表し、各 $^*N$ は、式 (2 0 1) における窒素原子を表す。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態において、 R_{103} は、ポリアミンである。他の実施形態において、 R_{103} は、ケタールである。いくつかの実施形態において、式 (2 0 1) における R_{101} 及び R_{102} のそれぞれは、独立して、任意に置換又は無置換の、分岐鎖又は直鎖アルキル又はアルケニルであり、前記アルキル又はアルケニルは、3 ～ 約 20 個の炭素原子、例えば、8 ～ 約 18 個の炭素原子、及び 0 ～ 4 個の二重結合、例えば、0 ～ 2 個の二重結合を有する。

20

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態において、 n と m のそれぞれは、独立して 1 又は 3 である場合、 R_{103} は、下記式 (2 0 4) ～ 式 (2 1 3) のいずれか 1 つであってもよい。

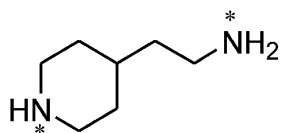
【 0 1 3 6 】

30

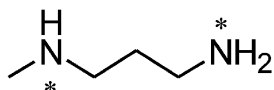
40

50

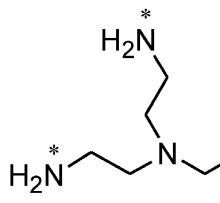
【化 10】



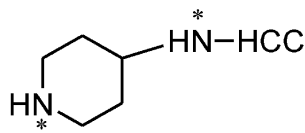
式 (204)、



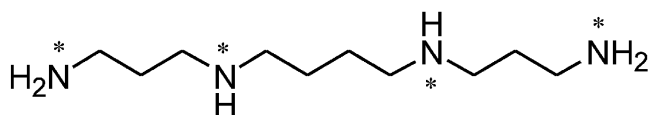
式 (205)、



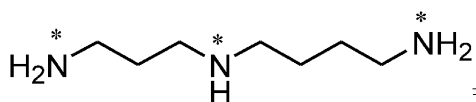
式 (206)、



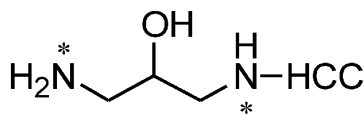
式 (207)、



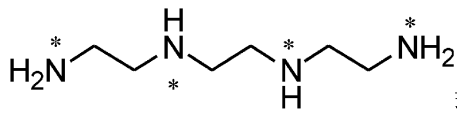
式 (208)、



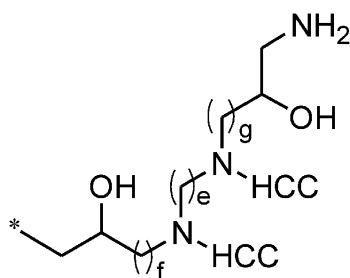
式 (209)、



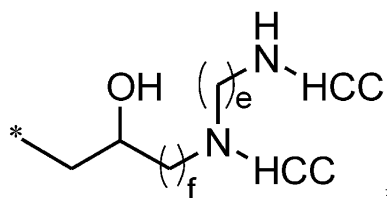
式 (210)、



式 (211)、



式 (212) 及び



式 (213)

【0137】

式 (204) ~ 式 (213) 中、 g 、 e 及び f は、それぞれ独立して、1 ~ 6 の整数であり、各「HCC」は、炭化水素鎖を表し、各*は、 R_{103} と式 (201) における窒素原子との結合可能点を示し、任意の*位置上の各Hは、式 (201) における窒素原子との結合を実現するために置換されてもよい。

【0138】

式 (201) に示される化合物は、中国特許出願公開第 103380113 号明細書の記載により調製されてもよい。

【0139】

10

20

30

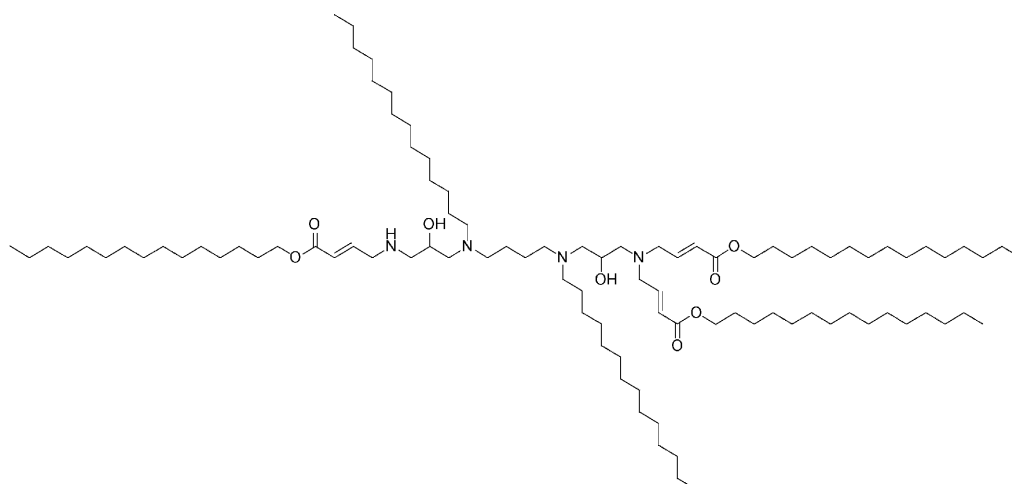
40

50

いくつかの実施形態において、前記有機アミンは、式（２１４）に示される有機アミン及び／又は式（２１５）に示される有機アミンである。

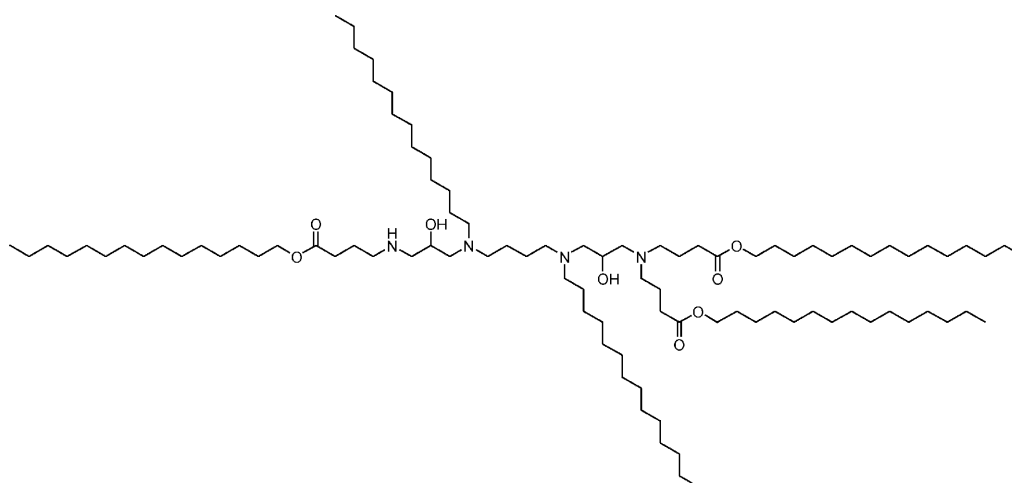
【０１４０】

【化１１】



10

式（２１４）、



20

式（２１５）

30

【０１４１】

前記補助脂質は、コレステロール、コレステロールのアナログ及び／又はコレステロールの誘導体であり、

前記ポリエチレングリコール化脂質は、１，２－ジパルミトイル－sn－グリセロ－３－ホスファチジルエタノールアミン－N－[メトキシ（ポリエチレングリコール）]－2000である。

【０１４２】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物において、前記有機アミン、前記補助脂質及び前記ポリエチレングリコール化脂質のモル比は、（１９．７～８０）：（１９．７～８０）：（０．３～５０）であり、例えば、（５０～７０）：（２０～４０）：（３～２０）であってもよい。

40

【０１４３】

いくつかの実施形態において、本開示の siRNA と上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された医薬組成物の粒子は、約 30 nm ～ 約 200 nm の平均径を有し、一般的に約 40 nm ～ 約 135 nm であり、より一般的には、当該リポソーム粒子の平均径は、約 50 nm ～ 約 120 nm、約 50 nm ～ 約 100 nm、約 60 nm ～ 約 90 nm 又は約 70 nm ～ 約 90 nm であり、例えば、当該リポソーム粒子の平均径は、約 30、40、50、60、70、75、80、85、90、100、110、120、130、140、150 又は 160 nm である。

50

【0144】

いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A と上記アミン含有トランスフェクション試薬により形成された医薬組成物において、s i R N A と全脂質（例えば有機アミン、補助脂質及び／又はポリエチレングリコール化脂質）の重量比（重量／重量比）は、約 1：1～約 1：50、約 1：1～約 1：30、約 1：3～約 1：20、約 1：4～約 1：18、約 1：5～約 1：17、約 1：5～約 1：15、約 1：5～約 1：12、約 1：6～約 1：12 又は約 1：6～約 1：10 の範囲内にあり、例えば、本開示の s i R N A と全脂質の重量比は、約 1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：11、1：12、1：13、1：14、1：15、1：16、1：17 又は 1：18 である。

【0145】

いくつかの実施形態において、前記医薬組成物は、市販時に各成分が独立して存在してもよく、使用時に液体製剤として存在してもよい。いくつかの実施形態において、本開示により提供される s i R N A と上記薬学的に許容可能な担体により形成された医薬組成物は、既知の各種の方法に従い調製されてもよく、従来の s i R N A の代わりに本開示により提供される s i R N A を用いればよい。いくつかの実施形態において、以下の方法に従い調製されてもよい。

【0146】

有機アミン、補助脂質及びポリエチレングリコール化脂質を上記モル比でアルコールに懸濁させ均一に混合して脂質溶液を得る。アルコールの用量は、得られた脂質溶液の総質量濃度が 2～25 mg/mL、例えば、8～18 mg/mL となるように決定される。前記アルコールは、薬学的に許容可能なアルコール、例えば、エタノール、プロピレングリコール、ベンジルアルコール、グリセリン、ポリエチレングリコール 200、ポリエチレングリコール 300、ポリエチレングリコール 400 などの、室温付近で液体であるアルコールから選択される 1 つ又は複数であり、例えばエタノールであってもよい。

【0147】

本開示により提供される s i R N A を緩衝塩溶液に溶解し、s i R N A 水溶液を得る。緩衝塩溶液の濃度は、0.05～0.5 M であり、例えば、0.1～0.2 M であってもよく、緩衝塩溶液の pH は、4.0～5.5 に調節され、例えば、5.0～5.2 であってもよく、緩衝塩溶液の用量は、s i R N A の濃度が 0.6 mg/mL 以下、例えば、0.2～0.4 mg/mL となるように決定される。前記緩衝塩は、可溶性酢酸塩、可溶性クエン酸塩から選択される 1 つ又は複数であり、例えば、酢酸ナトリウム及び／又は酢酸カリウムであってもよい。

【0148】

脂質溶液と s i R N A 水溶液を混合した後、得られた生成物を 40～60℃で少なくとも 2 分間、例えば、5～30 分間インキュベートし、インキュベートしたリポソーム製剤を得る。脂質溶液と s i R N A 水溶液の体積比は 1：（2～5）であり、例えば、1：4 であってもよい。

【0149】

インキュベートしたリポソーム製剤を濃縮又は希釈し、不純物を除去して除菌し、本開示により提供される医薬組成物を得る。その物理化学的パラメータとしては、pH が 6.5～8、封入効率が 80% 以上、粒子径が 40～200 nm、多分散指数が 0.30 以下、浸透圧が 250～400 mOsm/kg である。例えば、物理化学的パラメータは、pH が 7.2～7.6、封入効率が 90% 以上、粒子径が 60～100 nm、多分散指数が 0.20 以下、浸透圧が 300～400 mOsm/kg であってもよい。

【0150】

濃縮又は希釈は、不純物を除去する前、不純物を除去した後、又は不純物を除去すると同時に行われてもよい。不純物を除去する方法としては、従来の各種の方法を用いてもよく、例えば、タンジェンシャルフロー系、中空糸カラムを用い、100 KDa の条件で限外濾過し、限外濾過交換溶液を pH 7.4 のリン酸塩緩衝液（PBS）としてもよい。除菌方法としては、従来の各種の方法を用いてもよく、例えば、0.22 μm のフィルター

10

20

30

40

50

で濾過して除菌してもよい。

【0151】

s i R N A 複合体

更に別の態様において、本開示は、s i R N A 複合体を提供し、前記 s i R N A 複合体は、上記 s i R N A と、当該 s i R N A に複合して結合される複合基とを含む。

【0152】

一般的には、前記複合基は、薬学的に許容可能な少なくとも1つの標的基及び／又は送達補助基を含む。いくつかの実施形態において、前記複合基は、リンカー (l i n k e r) を更に含み、前記リンカー及び／又は前記標的基又は前記送達補助基は、順に結合されている。いくつかの実施形態において、前記標的基は、1～6個である。いくつかの実施形態において、前記標的基は、2～4個である。前記 s i R N A 分子は、前記複合基に非共有結合的又は共有結合的に複合されてもよく、例えば、前記複合基に共有結合的に複合されてもよい。s i R N A と複合基との複合部位は、s i R N A のセンス鎖の3'末端又は5'末端にあってもよく、アンチセンス鎖の5'末端にあってもよく、s i R N A の内部配列にあってもよい。いくつかの実施形態において、前記 s i R N A と複合基との複合部位は、s i R N A のセンス鎖の3'末端にある。いくつかの実施形態において、前記複合基は、ヌクレオチドのリン酸基、2'-位のヒドロキシ又は塩基に結合されてもよい。いくつかの実施形態において、前記複合基は、3'-位のヒドロキシに結合されてもよく、この場合、ヌクレオチド間が2'-5'リン酸ジエステル結合により結合されている。複合基は、s i R N A 鎖の末端に結合される場合、通常ヌクレオチドのリン酸基に結合され、s i R N A の内部配列に結合される場合、通常リボース糖環又は塩基に結合される。各種の結合方法については、Muthiah Manoharan et. al. s i R N A conjugates carrying sequentially assembled trivalent N-acetyl galactosamine linked through nucleosides elicit robust gene silencing in vivo in hepatocytes. ACS Chemical biology, 2015, 10 (5): 1181-7を参照することができる。

【0153】

いくつかの実施形態において、前記 s i R N A と複合基との間が酸不安定又は還元可能な化学結合により結合されてもよく、細胞エンドソームの酸性環境で、これらの化学結合が分解され、s i R N A が遊離状態になることができる。分解できない複合方法については、複合基は、s i R N A のセンス鎖に結合され、複合による s i R N A 活性への影響をできるだけ低下させることができる。

【0154】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容可能な標的基は、s i R N A 投与分野で通常用いられるリガンドであってもよい。いくつかの実施形態において、前記各リガンドは、細胞表面受容体と結合できるリガンドから独立して選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的リガンドは、中枢神経系 (C N S) 組織への送達を媒介する受容体を標的とする。これらのリガンドの種類は、当業者に公知であり、それらの作用として、一般的に標的細胞表面の特異的受容体と結合し、リガンドに結合される s i R N A の標的細胞への送達を媒介する。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの前記標的基は、R P T O R 遺伝子を発現する細胞表面受容体と結合できるリガンドから選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的基は、肝の実質細胞表面の受容体を標的とするリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つ又は各標的基は、肝細胞表面のアシアロ糖タンパク質受容体を標的とするリガンドである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つ又は各標的基は、N-アセチルガラクトサミン (G a l N A c) である。いくつかの実施形態において、本開示の複合体は、C N 1 1 0 9 5 9 0 1 1 A に開示された各種の s i R N A 複合体構造を有し、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

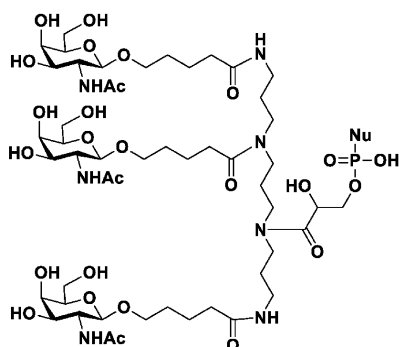
50

【0155】

いくつかの実施形態において、本開示の複合体は、式（301）に示される構造を有する。

【0156】

【化12】



式（301）

10

【0157】

ただし、Nuは、本開示のsiRNAによって形成されるsiRNA基を表す。いくつかの実施形態において、前記siRNA複合体は、式（301）に示される構造を有し、ただし、Nuは、siRPTORa2-M1S、siRPTORb2-M1S、siRPTORc2-M1S、siRPTORc1-T1S及びsiRPTORc1-T2Sのうちの1つに対応する配列を有し、前記複合基は、前記NuにおけるsiRNAセンス鎖の3'末端のヌクレオチドのリボース基の3'位に結合され、前記siRNA複合体は、ナトリウム塩形態である。

20

【0158】

いくつかの実施形態において、各前記標的基は、RPTOR遺伝子を発現する細胞表面受容体と結合できるリガンドから選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的基は、CNSの標的細胞表面の受容体を標的とするリガンドである。いくつかの実施形態において、各標的基は、CNSの標的細胞表面の受容体を標的とするリガンドである。いくつかの実施形態において、リガンドは、siRNAと複合して、特異的なCNS組織への送達を実現することができ、いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的基は、ペプチドリガンドである。いくつかの実施形態において、各標的基は、ペプチドリガンドである。いくつかの実施形態において、標的リガンドは、アンジオテンシン2、リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP）リガンド、bEnd.3細胞結合リガンド、トランスフェリン受容体（TfR）リガンド、マンノース受容体リガンド、グルコーストランスポーター及びLDL受容体リガンドからなる群から選択される。例えば、中国特許出願公開第112400018号明細書に記載された各種の標的基（例えば、段落【0856】に記載されたリガンド）があり、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

30

【0159】

いくつかの実施形態において、前記薬学的に許容可能な送達補助基は、脂肪族化合物又は脂環式化合物を含む親油基であってもよい。いくつかの実施形態において、親油基は、直鎖脂肪族炭化水素、分岐鎖脂肪族炭化水素又はステロイドを含む。いくつかの実施形態において、親油基は、飽和又は不飽和のC₄-C₃₀炭化水素鎖を含む。いくつかの実施例において、親油基は、飽和又は不飽和のC₆-C₁₈炭化水素鎖（例えば、直鎖C₆-C₁₈アルキル又はアルケニル）を含む。いくつかの実施例において、親油基は、飽和又は不飽和のC₁₆炭化水素鎖（例えば、直鎖C₁₆アルキル又はアルケニル）を含む。いくつかの実施例において、親油基は、C₆-C₃₀脂肪族アシルであり、前記C₆-C₃₀脂肪族アシルとは、C₆-C₃₀脂肪酸からヒドロキシを除去した後の残りの原子団を指す。いくつかの実施形態において、親油基は、siRNAに非共有結合的又は共有結合

40

50

的に複合される。いくつかの実施形態において、親油基と s i R N A との複合部位は、s i R N A のセンス鎖の 3' 末端又は 5' 末端にある。いくつかの実施形態において、親油基と s i R N A との複合部位は、アンチセンス鎖の 5' 末端にある。いくつかの実施形態において、親油基と s i R N A との複合部位は、s i R N A の内部配列にあってもよい。いくつかの実施形態において、親油基は、ヌクレオチドのリン酸基、リボース糖環又は塩基に結合される。いくつかの実施形態では、親油基がヌクレオチドの塩基に複合される場合、好ましい位置は、塩基対合に必要な水素結合相互作用を妨げない位置である。いくつかの実施形態において、親油基は、ヌクレオチドのリン酸基、2' -位のヒドロキシ又は塩基に結合される。いくつかの実施形態において、親油基は、2' -位のヒドロキシを介してリボース糖環に複合されてもよい。送達補助基を s i R N A に結合する様々な方法は、当業者に周知であり、例えば、中国特許出願公開第 1 1 2 4 0 0 0 1 8 号明細書に記載された各種の調製方法（例えば、段落 [1 0 5 3] ~ [1 0 6 5] に記載された調製方法）があり、引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

10

【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態において、前記標的基は、1つ又は複数のリンカーを介して s i R N A に複合される。本開示の発明者は、本開示の s i R N A 複合体が、顕著に向上した血漿中安定性を有するとともに、高い R P T O R m R N A サイレンシング活性を更に示すことを意外にも見出した。いくつかの実施形態において、本開示の s i R N A は、表 1 a 、1 b 及び 1 c に示される s i R N A のうちの 1 つであってもよい。これらの s i R N A を用いると、本開示の s i R N A 複合体は、より高い R P T O R m R N A サイレンシング活性を示す。

20

【 0 1 6 1 】

表 1 a 本開示の第 1 種の s i R N A

30

40

50

【表 1】

s i RNA番号	配列番号	配列方向5' - 3'
s i RPTOR a 1	9	CUGCCAUGGAGUAUCUGAA
	10	UUCAGAUACUCCAUGGCAGUG
s i RPTOR a 2	11	CUGCCAUGGAGUAUCUGAACG
	12	UUCAGAUACUCCAUGGCAGUG
s i RPTOR a 3	13	CACUGCCAUGGAGUAUCUGAA
	14	UUCAGAUACUCCAUGGCAGUGAC
s i RPTOR a 1 -M1	15	CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	16	UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 1 -M2	17	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	18	UmU f CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 1 -M3	19	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	20	UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 2 -M1	21	CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
	22	UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 2 -M2	23	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
	24	UmU f CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 2 -M3	25	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
	26	UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 3- M1	27	CmAmCmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	28	UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGmAmCm
s i RPTOR a 3 -M2	29	CmAmCmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	30	UmU f CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGmAmCm
s i RPTOR a 3 -M3	31	CmAmCmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	32	UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGmAmCm
s i RPTOR a 1 -M1S	33	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	34	Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1 -M1X	35	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
	36	Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1 -M2S	37	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	38	Um s U f s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1 -M2X	39	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
	40	Um s U f s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1 -M3S	41	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
	42	Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1 -M3X	43	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
	44	Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2 -M1S	45	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
	46	Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2 -M1X	47	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm s Cm s Gm
	48	Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2 -M2S	49	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
	50	Um s U f s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2 -M2X	51	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm s Cm s Gm
	52	Um s U f s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2 -M3S	53	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
	54	Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2	55	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm s Cm s Gm

10

20

30

40

50

—M3X	56	UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 3	57	Cm s Am s CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M1S	58	UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	59	Cm s Am s CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
—M1X	60	UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	61	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M2S	62	UmsUf s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	63	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
—M2X	64	UmsUf s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	65	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M3S	66	UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	67	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
—M3X	68	UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 1	69	CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M1P1	70	P1UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 1	71	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M2P1	72	P1UmU f CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 1	73	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M3P1	74	P1UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 2	75	CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
—M1P1	76	P1UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 2	77	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
—M2P1	78	P1UmU f CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 2	79	CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
—M3P1	80	P1UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm
s i RPTOR a 3	81	CmAmCmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M1P1	82	P1UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGmAmCm
s i RPTOR a 3	83	CmAmCmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M2P1	84	P1UmU f CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGmAmCm
s i RPTOR a 3	85	CmAmCmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M3P1	86	P1UmU f CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGmAmCm
s i RPTOR a 1	87	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M1SP1	88	P1Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1	89	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
—M1XP1	90	P1Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1	91	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M2SP1	92	P1Um s U f s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1	93	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
—M2XP1	94	P1Um s U f s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1	95	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
—M3SP1	96	P1Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1	97	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
—M3XP1	98	P1Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2	99	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
—M1SP1	100	P1Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2	101	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm s Cm s Gm
—M1XP1	102	P1Um s U f s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2	103	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm

10

20

30

40

50

−M2SP1	104	P1UmsUf s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2	105	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm s Cm s Gm
−M2XP1	106	P1UmsUf s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2	107	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAmCmGm
−M3SP1	108	P1UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 2	109	Cm s Um s GmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm s Cm s Gm
−M3XP1	110	P1UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 3	111	Cm s Am s CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
−M1SP1	112	P1UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	113	Cm s Am s CmUmGmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
−M1XP1	114	P1UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	115	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
−M2SP1	116	P1UmsUf s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	117	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
−M2XP1	118	P1UmsUf s CmAmGmA f UmA f C f UmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	119	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
−M3SP1	120	P1UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 3	121	Cm s Am s CmUmGmCmC f AmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGm s Am s Am
−M3XP1	122	P1UmsUf s CmAmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGmUmGm s Am s Cm
s i RPTOR a 1	373	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
−T1S	374	Um s U f s <u>Cmoe</u> AmGmA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm
s i RPTOR a 1	375	Cm s Um s GmCmCmAmU f G f G f AmGmUmAmUmCmUmGmAmAm
−T2S	376	Um s U f s CmAmG <u>mo</u> eA f UmAmCmUmCmCmAmU f GmG f CmAmGm s Um s Gm

10

20

30

40

50

【0162】

表1b 本開示の第2種のs i R N A

【表 2】

s i RNA番号	配列番号	配列方向5' - 3'
s i RPTOR b 1	1 3 1	ACAACAUCAAGUACUACGA
	1 3 2	UCGUAGUACUUGAUGUUGUUG
s i RPTOR b 2	1 3 3	ACAACAUCAAGUACUACGACG
	1 3 4	UCGUAGUACUUGAUGUUGUUG
s i RPTOR b 3	1 3 5	GUACAACAUCAAGUACUACGA
	1 3 6	UCGUAGUACUUGAUGUUGUUGAU
s i RPTOR b 1 -M1	1 3 7	AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 3 8	UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 1 -M2	1 3 9	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 4 0	UmC f GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 1 -M3	1 4 1	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 4 2	UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 2 -M1	1 4 3	AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
	1 4 4	UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 2 -M2	1 4 5	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
	1 4 6	UmC f GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 2 -M3	1 4 7	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
	1 4 8	UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 3 -M1	1 4 9	CmAmAmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 5 0	UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGmAmUm
s i RPTOR b 3 -M2	1 5 1	CmAmAmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 5 2	UmC f GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGmAmUm
s i RPTOR b 3 -M3	1 5 3	CmAmAmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 5 4	UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGmAmUm
s i RPTOR b 1 -M1 S	1 5 5	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 5 6	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1 -M1 X	1 5 7	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
	1 5 8	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1 -M2 S	1 5 9	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 6 0	Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1 -M2 X	1 6 1	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
	1 6 2	Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1 -M3 S	1 6 3	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
	1 6 4	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1 -M3 X	1 6 5	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
	1 6 6	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2 -M1 S	1 6 7	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
	1 6 8	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2 -M1 X	1 6 9	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm s Cm s Gm
	1 7 0	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2 -M2 S	1 7 1	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
	1 7 2	Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2 -M2 X	1 7 3	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm s Cm s Gm
	1 7 4	Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2 -M3 S	1 7 5	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
	1 7 6	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2	1 7 7	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm s Cm s Gm

10

20

30

40

50

–M3X	178	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 3	179	Cm s Am s AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M1S	180	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	181	Cm s Am s AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
–M1X	182	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	183	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M2S	184	Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	185	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
–M2X	186	Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	187	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M3S	188	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	189	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
–M3X	190	Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 1	191	AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M1P1	192	P1UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 1	193	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M2P1	194	P1UmC f GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 1	195	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M3P1	196	P1UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 2	197	AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
–M1P1	198	P1UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 2	199	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
–M2P1	200	P1UmC f GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 2	201	AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
–M3P1	202	P1UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm
s i RPTOR b 3	203	CmAmAmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M1P1	204	P1UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGmAmUm
s i RPTOR b 3	205	CmAmAmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M2P1	206	P1UmC f GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGmAmUm
s i RPTOR b 3	207	CmAmAmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M3P1	208	P1UmC f GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGmAmUm
s i RPTOR b 1	209	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M1SP1	210	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1	211	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
–M1XP1	212	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1	213	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M2SP1	214	P1Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1	215	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
–M2XP1	216	P1Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1	217	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
–M3SP1	218	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1	219	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
–M3XP1	220	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2	221	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
–M1SP1	222	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2	223	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm s Cm s Gm
–M1XP1	224	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2	225	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm

10

20

30

40

50

−M2SP1	226	P1Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2	227	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm s Cm s Gm
−M2XP1	228	P1Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2	229	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAmCmGm
−M3SP1	230	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 2	231	Am s Cm s AmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm s Cm s Gm
−M3XP1	232	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 3	233	Cm s Am s AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
−M1SP1	234	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	235	Cm s Am s AmCmAmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
−M1XP1	236	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	237	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
−M2SP1	238	P1Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	239	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
−M2XP1	240	P1Um s C f s GmUmAmG f UmA f C f UmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	241	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
−M3SP1	242	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 3	243	Cm s Am s AmCmAmAmC f AmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCm s Gm s Am
−M3XP1	244	P1Um s C f s GmUmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUmUmGm s Am s Um
s i RPTOR b 1	377	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
−T1S	378	Um s C f s <u>Gmoe</u> UmAmG f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm
s i RPTOR b 1	379	Am s Cm s AmAmCmAmU f C f A f AmGmUmAmCmUmAmCmGmAm
−T2S	380	Um s C f s GmUm <u>Amoe</u> G f UmAmCmUmUmGmAmU f GmU f UmGmUm s Um s Gm

10

20

30

40

50

【0163】

表1c 本開示の第3種のs i R N A

【表 3】

s iRNA番号	配列番号	配列方向5' - 3'
s iRPTOR c 1	253	CGACUACUACAUCUCCGUG
	254	CACGGAGAUGUAGUAGUCGUU
s iRPTOR c 2	255	CGACUACUACAUCUCCGUGUA
	256	CACGGAGAUGUAGUAGUCGUU
s iRPTOR c 3	257	CGCGACUACUACAUCUCCGUG
	258	CACGGAGAUGUAGUAGUCGUUGC
s iRPTOR c 1 -M1	259	CmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	260	CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s iRPTOR c 1 -M2	261	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	262	CmA f CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s iRPTOR c 1 -M3	263	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	264	CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s iRPTOR c 2 -M1	265	CmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
	266	CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s iRPTOR c 2 -M2	267	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
	268	CmA f CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s iRPTOR c 2 -M3	269	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
	270	CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s iRPTOR c 3 -M1	271	AmAmCmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	272	CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUmGmCm
s iRPTOR c 3 -M2	273	AmAmCmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	274	CmA f CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUmGmCm
s iRPTOR c 3 -M3	275	AmAmCmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	276	CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUmGmCm
s iRPTOR c 1 -M1 S	277	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	278	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 1 -M1 X	279	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
	280	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 1 -M2 S	281	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	282	Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 1 -M2 X	283	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
	284	Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 1 -M3 S	285	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
	286	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 1 -M3 X	287	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
	288	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 2 -M1 S	289	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
	290	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 2 -M1 X	291	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm s Um s Am
	292	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 2 -M2 S	293	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
	294	Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 2 -M2 X	295	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm s Um s Am
	296	Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 2 -M3 S	297	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
	298	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s iRPTOR c 2	299	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm s Um s Am

10

20

30

40

50

—M3X	300	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 3	301	Am s Am s CmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M1S	302	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm s Gm s Cm
s i RPTOR c 3	303	Am s Am s CmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
—M1X	304	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm s Gm s Cm
s i RPTOR c 3	305	Am s Am s CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M2S	306	Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm s Gm s Cm
s i RPTOR c 3	307	Am s Am s CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
—M2X	308	Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm s Gm s Cm
s i RPTOR c 3	309	Am s Am s CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M3S	310	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm s Gm s Cm
s i RPTOR c 3	311	Am s Am s CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
—M3X	312	Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm s Gm s Cm
s i RPTOR c 1	313	CmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M1P1	314	P1 CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s i RPTOR c 1	315	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M2P1	316	P1 CmA f CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s i RPTOR c 1	317	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M3P1	318	P1 CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s i RPTOR c 2	319	CmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
—M1P1	320	P1 CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s i RPTOR c 2	321	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
—M2P1	322	P1 CmA f CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s i RPTOR c 2	323	CmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
—M3P1	324	P1 CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUm
s i RPTOR c 3	325	AmAmCmGmAmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M1P1	326	P1 CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUmGmCm
s i RPTOR c 3	327	AmAmCmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M2P1	328	P1 CmA f CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUmGmCm
s i RPTOR c 3	329	AmAmCmGmAmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M3P1	330	P1 CmA f CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGmUmUmGmCm
s i RPTOR c 1	331	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M1SP1	332	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 1	333	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
—M1XP1	334	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 1	335	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M2SP1	336	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 1	337	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
—M2XP1	338	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmA f U f GmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 1	339	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm
—M3SP1	340	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 1	341	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGm s Um s Gm
—M3XP1	342	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 2	343	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm
—M1SP1	344	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 2	345	Cm s Gm s AmCmUmAmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGm s Um s Am
—M1XP1	346	P1 Cm s A f s CmGmGmA f GmAmUmGmUmAmGmU f AmG f UmCmGm s Um s Um
s i RPTOR c 2	347	Cm s Gm s AmCmU f AmC f U f A f CmAmUmCmUmCmGmUmGmUmAm

10

20

30

40

50

−M2SP1	348	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAfUfGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmsUmsUm
s i RPTORc 2	349	CmsGmsAmCmUfAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGmsUmsAm
−M2XP1	350	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAfUfGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmsUmsUm
s i RPTORc 2	351	CmsGmsAmCmUfAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGmUmAm
−M3SP1	352	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmsUmsUm
s i RPTORc 2	353	CmsGmsAmCmUfAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGmsUmsAm
−M3XP1	354	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmsUmsUm
s i RPTORc 3	355	Am s Am s CmGmAmCmUmAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGm
−M1SP1	356	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmUmUm s Gms Cm
s i RPTORc 3	357	Am s Am s CmGmAmCmUmAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmsUmsGm
−M1XP1	358	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmUmUm s Gms Cm
s i RPTORc 3	359	Am s Am s CmGmAmCmUfAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGm
−M2SP1	360	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAfUfGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmUmUm s Gms Cm
s i RPTORc 3	361	Am s Am s CmGmAmCmUfAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmsUmsGm
−M2XP1	362	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAfUfGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmUmUm s Gms Cm
s i RPTORc 3	363	Am s Am s CmGmAmCmUfAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGm
−M3SP1	364	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmUmUm s Gms Cm
s i RPTORc 3	365	Am s Am s CmGmAmCmUfAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmsUmsGm
−M3XP1	366	P1CmsAfsCmGmGmAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmUmUm s Gms Cm
s i RPTORc 1	381	CmsGmsAmCmUmAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGm
−T1S	382	CmsAfsCmoeGmGmAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmsUmsUm
s i RPTORc 1	383	CmsGmsAmCmUmAmCfUfAfCmAmUmCmUmCmCmGmUmGm
−T2S	384	CmsAfsCmGmGmoeAfGmAmUmGmUmAmGmUfAmGfUmCmGmsUmsUm

10

20

40

50

【0164】

ここで、大文字C、G、U、Aは、ヌクレオチドの塩基配列を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字sは、当該文字の左右2つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、P1は、当該P1の右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'−リン酸ヌクレオチド又は5'−リン酸アナログ修飾ヌクレオチドであることを表す。いくつかの実施形態において、P1は、修飾が特定されたVP、Ps又はPを表し、組合せ文字VPは、当該組合せ文字VPの右側に隣接する1つのヌクレオチドがビニルリン酸エステル（5'−（E）−vinylphosphate、E−VP）修飾ヌクレオチドであることを表し、組合せ文字Psは、当該組合せ文字Psの右側に隣接する1つのヌクレオチドがチオリン酸エステル修飾ヌクレオチドであることを表し、大文字Pは、当該文字Pの右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'−リン酸ヌクレオチドであることを表す。組合せ文字moeは、当該組合せ文字moeの左側に隣接する1つのヌクレオチドが2'−O−メトキシエチル修飾を有するヌクレオチドであることを表す。例えば、組合せ文字Gmoeは、当該組合せ文字moeの左側に隣接するヌクレオチドが、塩基がグアニンであり、2'−O−メトキシエチル修飾を有するヌクレオチドであることを表す。また、組合せ文字Cmoeは、当該組合せ文字moeの左側に隣接するヌクレオチドが、塩基が5'−メチルシトシンであり、2'−O−メトキシエチル修飾を有するヌクレオチドであることを表す。また、上記表に示される配列中の各Uは、任意にTで置換されてもよく、s i R N Aの活性又はオフターゲット効果に明らかな影響を与えない。

【0165】

本開示に記載されたs i R N A、医薬組成物又はs i R N A複合体において、各隣接するヌクレオチド間がリン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合により結合され、リン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、負電荷を帯び、ヒドロキシ又はスルフヒドリルとして存在してもよく、ヒドロキ

シ又はスルフヒドリルにおける水素イオンは、一部又は全部がカチオンで置換されてもよい。前記カチオンは、任意のカチオン、例えば、金属カチオン、アンモニウムイオン NH_4^+ 、有機アンモニウムカチオンのうちの1つであってもよい。溶解性の向上を考慮すると、1つの実施形態において、前記カチオンは、アルカリ金属イオン、第3級アミンにより形成されたアンモニウムカチオン及び4級アンモニウムカチオンから選択される1つ又は複数である。アルカリ金属イオンは、 K^+ 及び／又は Na^+ であってもよく、第3級アミンにより形成されたカチオンは、トリエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオン、及び／又は N 、 N -ジイソプロピルエチルアミンにより形成されたアンモニウムイオンであってもよい。したがって、本開示に記載された *siRNA* 又は *siRNA* 複合体は、少なくとも一部が塩として存在してもよい。一態様において、リン酸ジエステル結合又はチオリン酸ジエステル結合における非架橋酸素原子又は硫黄原子は、少なくとも一部がナトリウムイオンに結合され、本開示に記載された *siRNA* 又は *siRNA* 複合体は、ナトリウム塩又は部分ナトリウム塩として存在する。

10

【0166】

当業者であれば明らかに知っているように、対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを用いることにより修飾ヌクレオチド基を本開示に記載された *siRNA* に導入することができる。対応する修飾を有するヌクレオシドモノマーを調製する方法、及び修飾ヌクレオチド基を *siRNA* に導入する方法も、当業者によく知られている。全ての修飾ヌクレオシドモノマーは、いずれも市販品として購入されてもよく、既知の方法により調製されてもよい。

20

【0167】

任意の合理的な合成経路により本開示の *siRNA* 複合体を調製してもよい。例えば、標的基と、ホスホルアミダイトと反応して共有結合を形成できる活性な反応性基とを含む複合分子の場合、まず、当該複合分子内の活性基を保護剤で保護した後に固体担体に結合し、次に、ホスホルアミダイト固相合成方法を用いて、*siRNA* のセンス鎖とアンチセンス鎖のヌクレオチドの種類と順序により、3' から5' に向かってヌクレオシドモノマーを1つずつ結合し、各ヌクレオシドモノマーの結合が脱保護、カップリング、キャッピング、酸化又は硫化の4つの反応を含み、*siRNA* のセンス鎖及びアンチセンス鎖を単離し、アニールを行い、それにより本開示の *siRNA* 複合体を得る。

30

【0168】

更に、*siRNA* 複合体の調製は、既存の文献の開示内容を参照して行うこともできる。例えば、国際公開第2019010274号には、実施例1に、特定の構造を有する連結基及び標的リガンドを反応させて *siRNA* に順に結合する方法が記載されている。引用によりその開示内容が全体として本明細書に組み込まれる。

【0169】

本開示の *siRNA*、当該 *siRNA* を含む医薬組成物及び *siRNA* 複合体の使用
いくつかの実施形態において、本開示は、本開示の *siRNA*、及び／又は医薬組成物、及び／又は *siRNA* 複合体の、RPTOR機能調節に関連する疾患又は症状を治療及び予防する薬物の調製における使用を提供する。いくつかの実施形態において、前記RPTOR機能調節に関連する疾患又は症状は、mTORC1の活性化による疾患、及び細胞のオートファジー機能異常に関連する疾患である。いくつかの実施形態において、前記神経変性疾患に関連する疾患又は症状はアルツハイマー病及び／又はパーキンソン病であり、好ましくは、前記神経変性疾患は、アルツハイマー病である。いくつかの実施形態において、前記細胞のオートファジー機能異常に関連する疾患は、非アルコール性脂肪性肝炎である。

40

【0170】

いくつかの実施形態において、本開示は、RPTOR機能調節に関連する疾患又は症状の予防及び／又は治療方法を提供し、当該方法は、本開示の *siRNA* 及び／又は医薬組成物及び／又は *siRNA* 複合体を有効量で、それを必要とする被験体に投与することを含む。本開示の *siRNA* 活性成分を、それを必要とする被験体に投与することにより、

50

RNA干渉機構により疾患を予防及び／又は治療する目的を達成することができる。したがって、本開示のsiRNA及び／又は医薬組成物及び／又はsiRNA複合体は、RPTOR機能調節に関連する疾患又は症状の予防及び／又は治療に用いられてもよく、RPTOR機能調節に関連する疾患又は症状を予防及び／又は治療する薬物の調製に用いられてもよい。

【0171】

本明細書で用いられる用語「薬物投与／投与」とは、本開示のsiRNA、医薬組成物及び／又はsiRNA複合体を少なくとも一部で所望の部位に局在化して所望の効果を生じさせる方法又は経路により、本開示のsiRNA、医薬組成物及び／又はsiRNA複合体を被験体の体内に入れることを指す。本開示の方法に適した投与経路は、局所投与と全身投与を含む。一般的には、局所投与により、被験体の体循環よりも多くのsiRNA複合体が特定の部位に送達されるが、全身投与により、本開示のsiRNA、医薬組成物及び／又はsiRNA複合体が被験体の基本体循環に送達される。本開示が神経変性疾患の予防及び／又は治療手段を提供することを意図することを考慮すると、いくつかの実施形態において、薬物を中枢神経系組織に送達することができる投与方法が用いられる。いくつかの実施形態において、薬物を髄腔内に送達することができる投与方法が用いられる。いくつかの実施形態において、薬物を脊髄液に注射することができる投与方法が用いられる。

10

【0172】

本分野で既知の任意の適切な経路で被験体に投与することができ、前記経路としては、経口投与又は胃腸外経路、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経皮投与、気管内投与（エアロゾル）、脳室内投与、髄腔内投与、鼻部投与、直腸投与及び局所投与（口腔内投与と舌下投与を含む）を含むが、これらに限定されない。投与頻度は、1日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月又は1年に1回又は複数回であってもよい。本開示に記載されたsiRNA、医薬組成物又はsiRNA複合体の用量は、本分野における通常の用量であってもよく、前記用量は、各種のパラメータ、特に被験体の年齢、体重及び性別により決定されてもよい。細胞培養又は実験動物で標準薬学的手順により毒性と治療効果を測定し、例えば、LD₅₀（50%の群体を死亡させる致死用量）及びED₅₀（計量的反応において、50%の最大反応強度を引き起こすことができる用量を指し、計数的反応において、50%の実験対象に陽性反応が発生する場合の用量を指す）を測定してもよい。細胞培養分析及び動物研究により得られたデータに基づいてヒト用量の範囲を得ることができる。いくつかの実施形態において、前記siRNA、医薬組成物又はsiRNA複合体から製造された製剤の投与過程における用量は、投与方式によって調整される。

20

30

【0173】

本開示に記載されたsiRNA、医薬組成物、及び／又はsiRNA複合体を投与する場合、例えば、雄性又は雌性、6～12週齢、体重18～25gのC57BL/6J又は30～45gのob/obマウスに対するsiRNAの量は、次のとおりである。(i) siRNA複合体について、そのsiRNA用量は0.001～100mg/kg体重であってもよく、いくつかの実施形態においては0.01～50mg/kg体重であり、更なる実施形態においては0.05～20mg/kg体重であり、より更なる実施形態においては0.1～15mg/kg体重であり、また更なる実施形態においては0.1～10mg/kg体重である。(ii) siRNA及び薬学的に許容可能な担体により形成された医薬組成物について、そのsiRNA用量は0.001～50mg/kg体重であってもよく、いくつかの実施形態においては0.01～10mg/kg体重であり、更なる実施形態においては0.05～5mg/kg体重であり、より更なる実施形態においては0.1～3mg/kg体重である。

40

【0174】

いくつかの実施形態において、本開示は、細胞におけるRPTOR遺伝子発現の抑制方法を提供し、当該方法は、本開示のsiRNA及び／又は医薬組成物及び／又はsiRNA複合体を有効量で前記細胞と接触させ、本開示のsiRNA及び／又は医薬組成物及び

50

／又はs i R N A複合体を前記細胞に導入し、R N A干渉機構により細胞におけるR P T O R遺伝子発現を抑制する目的を達成することを含む。

【0175】

本開示により提供される方法により細胞におけるR P T O R遺伝子発現を抑制し、提供される修飾s i R N A、医薬組成物及び／又はs i R N A複合体におけるs i R N A用量は、一般的に、標的遺伝子の発現を低減でき、標的細胞表面では1 p M ~ 1 μ M、0 . 0 1 n M ~ 1 0 0 n M、0 . 0 5 n M ~ 5 0 n M、又は0 . 0 5 n M ~ 約5 n Mの細胞外濃度となる量である。当該局所濃度を達成するのに必要な量は、送達方法、送達部位、送達部位と標的細胞又は組織との間の細胞層の数、送達経路（局所か全身か）等を含む各種の因子により変化する。送達部位での濃度は、標的細胞又は組織の表面での濃度よりも顕著に高くてもよい。

10

【0176】

キット

一態様において、本開示は、キットを提供し、前記キットは、有効量の本開示のs i R N A、医薬組成物及びs i R N A複合体のうちの少なくとも1種を含む。

【0177】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、容器でs i R N Aを提供することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、薬学的に許容可能な賦形剤を提供する容器を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットには、他の成分、例えば、安定化剤又は防腐剤などが含まれてもよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されたキットは、本明細書に記載されたs i R N Aを提供する容器とは別の容器で少なくとも1種の他の治療剤を含んでもよい。いくつかの実施形態において、前記キットは、s i R N Aと薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤又は他の成分（存在する場合）を混合するための説明書を含んでもよい。

20

【0178】

本開示のキットにおいて、前記s i R N A及び薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤、並びに、前記修飾s i R N A、医薬組成物及び／又はs i R N A複合体、及び／又は薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤は、任意の形態、例えば、液体形態、乾燥形態又は凍結乾燥形態で提供されてもよい。いくつかの実施形態において、前記s i R N A及び薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤、並びに前記医薬組成物及び／又はs i R N A複合体の薬学的に許容可能な担体及び／又は添加剤は、基本的にクリーン及び／又は無菌である。いくつかの実施形態において、本開示のキットで無菌水を提供することができる。

30

【0179】

以下、実施例により本開示を更に説明するが、本開示は、これによって何ら制限されない。

【実施例】

【0180】

特に説明がない限り、以下の実施例で用いられる試薬、培地は、いずれも市販品であり、用いられる核酸電気泳動、real-time PCRなどの操作は、いずれもMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))に記載された方法を参照して行われる。

40

【0181】

別に説明がない限り、以下で提供される試薬割合は、いずれも体積比(v/v)として計算される。データ分析では、Graphpad prism 8.0統計分析ソフトウェアが用いられる。

【0182】

特に説明がない限り、以下の実施例で用いられる試薬、培地は、いずれも市販品であり、用いられる核酸電気泳動、real-time PCRなどの操作は、いずれもMolecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))に記載された方法を参照して行われる。

50

tory Press (1989)) に記載された方法を参照して行われる。

【0183】

調製例 1～5：本開示により提供される s i R N A の合成

固相合成方法により、それぞれ表 2 に列挙された s i R N A 配列を合成し、等モルの表 2 における相補的なセンス鎖及びアンチセンス鎖を D E P C 水にそれぞれ溶解し、その後アニールして、本開示により提供される s i R P T O R a 2-M1X、s i R P T O R b 2-M1X、s i R P T O R c 2-M1X、s i R P T O R c 1-T2S 及び s i R P T O R c 1-M1S を得た。超純水 (M i l l i-Q 超純水装置、抵抗率 18.2 MΩ*cm (25℃)) を用いて s i R N A を濃度 0.2 g/mL (s i R N A として) に希釈した後、液体クロマトグラフィー質量分析計 (L C-M S、L i q u i d C h r o m a t o g r a p h y-M a s s S p e c t r o m e t r y、W a t e r s 社から購入、型番：L C T P r e m i e r) を用いて、分子量を検出した。実測値が理論値と一致しており、合成された s i R N A が目的設計の二本鎖核酸配列であることが示された。

10

【0184】

比較調製例 1：参照 s i R N A の合成

固相合成方法により、それぞれ表 2 における、s i R N A 番号が N C の s i R N A に対応するセンス鎖及びアンチセンス鎖を合成した。等モルのセンス鎖及びアンチセンス鎖を D E P C 水に溶解し、その後アニールして、参照 s i R N A を得、番号を N C にした。N C は、R P T O R m R N A と配列相同性を有さない陰性対照 s i R N A である。

20

【0185】

表 2 s i R N A 配列

30

40

50

【表 4】

調製例番号	s i R N A 番号	配列方向 5' - 3'		配列番号
調製例	s i R P T O R a 2 - M 1 X	センス鎖	C m s U m s G m C m C m A m U f G f G f A m G m U m A m U m C m U m G m A m A m s C m s G m	4 7
		アンチセ ンス鎖	U m s U f s C m A m G m A f U m A m C m U m C m C m A m U f G m G f C m A m G m s U m s G m	4 8
調製例 2	s i R P T O R b 2 - M 1 X	センス鎖	A m s C m s A m A m C m A m U f C f A f A m G m U m A m C m U m A m C m G m A m s C m s G m	1 6 9
		アンチセ ンス鎖	U m s C f s G m U m A m G f U m A m C m U m U m G m A m U f G m U f U m G m U m s U m s G m	1 7 0
調製例 3	s i R P T O R c 2 - M 1 X	センス鎖	C m s G m s A m C m U m A m C f U f A f C m A m U m C m U m C m C m G m U m G m s U m s A m	2 9 1
		アンチセ ンス鎖	C m s A f s C m G m G m A f G m A m U m G m U m A m G m U f A m G f U m C m G m s U m s U m	2 9 2
調製例 4	s i R P T O R c 1 - T 2 S	センス鎖	C m s G m s A m C m U m A m C f U f A f C m A m U m C m U m C m C m G m U m G m	3 8 3
		アンチセ ンス鎖	C m s A f s C m G m G m <u>m o e</u> A f G m A m U m G m U m A m G m U f A m G f U m C m G m s U m s U m	3 8 4
調製例 5	s i R P T O R c 1 - M 1 S	センス鎖	C m s G m s A m C m U m A m C f U f A f C m A m U m C m U m C m C m G m U m G m	2 7 7
		アンチセ ンス鎖	C m s A f s C m G m G m A f G m A m U m G m U m A m G m U f A m G f U m C m G m s U m s U m	2 7 8
比較調製例 1	N C	センス鎖	U m s U m s C m U m C m C m G f A f A f C m G m U m G m U m C m A m C m G m U m	3 6 7
		アンチセ ンス鎖	P A m s C f s G m U m G m A f C m A m C m G m U m U m C m G f G m A f G m A m A m s C m s U m	3 6 8

【0186】

ここで、大文字C、G、U、Aは、ヌクレオチドの塩基配列を表し、小文字mは、当該文字mの左側に隣接する1つのヌクレオチドがメトキシ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字fは、当該文字fの左側に隣接する1つのヌクレオチドがフルオロ修飾ヌクレオチドであることを表し、小文字sは、当該文字sの左右の2つのヌクレオチド間がチオリン酸エステル基により結合されていることを表し、大文字Pは、当該文字Pの右側に隣接する1つのヌクレオチドが5'-リン酸ヌクレオチドであることを表し、組合せ文字m o eは、当該組合せ文字m o eの左側に隣接する1つのヌクレオチドが2'-O-メトキシエチル修飾を有するヌクレオチドであることを表す。

【0187】

上記本開示のs i R N A又は参照s i R N Aの調製が完了した後、固体粉末に凍結乾燥して使用に備えた。

【0188】

10

20

30

40

50

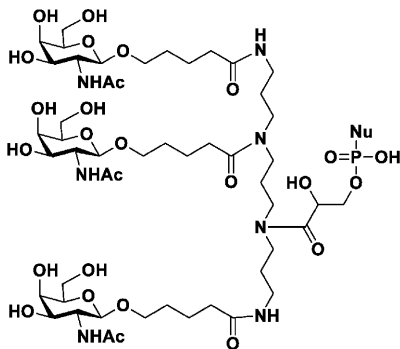
調製例 6 及び 7：複合体 1 及び複合体 2 の合成

国際公開第 2019/105437 号の調製例 1 における「複合体 1」の調製方法により本開示の複合体 1 を得たが、センス鎖及びアンチセンス鎖の一本鎖を調製したとき、表 2 における *s i R P T O R c 1-T 2 S* のセンス鎖とアンチセンス鎖の配列に従って、対応する位置のヌクレオシドモノマーをそれぞれ 1 つずつ結合した点のみが異なっている。液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) により分子量を検出した。その結果、センス鎖の理論値が 7468.3、センス鎖の実測値が 7467.2 であり、アンチセンス鎖の理論値が 7107.7、アンチセンス鎖の実測値が 7106.7 であった。実測値が理論値と一致しており、合成された複合体 1 が、式 (301) に示される基を含む、目的設計の二本鎖核酸配列であることが決定された。複合体 1 の構造を、以下の式 (301) により示す。

10

【0189】

【化 13】



式 (301)

20

【0190】

式 (301) 中の Nu は、本開示の表 1 における *s i R P T O R c 1-T 2 S* であり、複合基は、*s i R P T O R c 1-T 2 S* のセンス鎖の 3' 末端のリボース基の 3' 位に結合され、前記複合体は、ナトリウム塩形態である。

【0191】

上記方法により本開示の複合体 2 を調製したが、センス鎖及びアンチセンス鎖の一本鎖を調製したとき、表 2 における *s i R P T O R c 1-T 2 S* のセンス鎖とアンチセンス鎖の配列に従って、対応する位置のヌクレオシドモノマーをそれぞれ 1 つずつ結合した点のみが異なっている。液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) により分子量を検出した。その結果、センス鎖の理論値が 7468.3、センス鎖の実測値が 7467.2 であり、アンチセンス鎖の理論値が 7063.7、アンチセンス鎖の実測値が 7062.7 である。実測値が理論値と一致しており、合成された複合体 2 が、式 (301) に示される基を含む、目的設計の二本鎖核酸配列であることが決定された。複合体 2 の構造を、以下の式 (301) により示す。式 (301) 中の Nu は、本開示の表 1 における *s i R P T O R c 1-M 1 S* であり、複合基は、*s i R P T O R c 1-M 1 S* のセンス鎖の 3' 末端のリボース基の 3' 位に結合され、前記複合体は、ナトリウム塩形態である。

30

40

【0192】

実験例 1：本開示の *s i R N A* の体外 (*i n v i t r o*) における抑制活性

本実験例では、本開示の *s i R P T O R a 2-M 1 X*、*s i R P T O R b 2-M 1 X* 及び *s i R P T O R c 2-M 1 X* の体外 *H e p G 2* ヒト肝癌細胞における抑制活性を考察した。

【0193】

10% のウシ胎児血清 (FBS、RMBIO 社) を添加した DMEM 培地 (Hyclone 社) で *H e p G 2* ヒト肝癌細胞 (南京科佰生物技術有限公司から購入) を 37℃ で 5% CO₂ / 95% 空気含有インキュベーターにおいて培養した。

【0194】

50

Hep G2 細胞を 2.0×10^5 個の細胞／ウェルで 12 ウェルプレートに接種し、1 ウェルあたり 1 mL の細胞液で 24 h 培養した後、培養ウェル中の培地をすべて吸引し、各ウェルに別途 500 μ L の Opti-MEM 培地 (GIBCO 社) を添加した。

【0195】

PBS 緩衝液を用いて、調製例 1～3 で調製した siRPTORa2-M1X、siRPTORb2-M1X 及び siRPTORc2-M1X から、それぞれ濃度 20 μ M の siRNA 希釈標準溶液を調製した。

【0196】

各 siRNA に対して、1A1 溶液を調製し、1 部の 1A1 溶液は、48.5 μ L の Opti-MEM 培地及び 1.5 μ L の 20 μ M の siRNA 希釈標準溶液を含む。

【0197】

1B 溶液を調製し、1 部の 1B 溶液は、49 μ L の Opti-MEM 培地及び 1 μ L の LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 社) を含む。

【0198】

各 siRNA に対して、それぞれ 1 部の 1B 溶液と 1 部の 1A1 溶液を室温で 20 min インキュベートして、トランスフェクション複合体 1Xa、1Xb 又は 1Xc を得た。

【0199】

1 部の 1B 溶液を 50 μ L の Opti-MEM 培地と混合し、室温で 20 min インキュベートして、トランスフェクション複合体 1X を得た。

【0200】

2 つの培養ウェル (いずれも上記 Hep G2 細胞及び 500 μ L の Opti-MEM 培地を含む培養ウェルであり、以下同じ) 中に、それぞれトランスフェクション複合体 1Xa を 100 μ L／ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、最終濃度が 50 nM のトランスフェクション混合物を得、試験群 1 と記した。

【0201】

2 つの培養ウェル (いずれも上記 Hep G2 細胞及び 500 μ L の Opti-MEM 培地を含む培養ウェルであり、以下同じ) 中に、それぞれトランスフェクション複合体 1Xb を 100 μ L／ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、最終濃度が 50 nM のトランスフェクション混合物を得、試験群 2 と記した。

【0202】

2 つの培養ウェル (いずれも上記 Hep G2 細胞及び 500 μ L の Opti-MEM 培地を含む培養ウェルであり、以下同じ) 中に、それぞれトランスフェクション複合体 1Xc を 100 μ L／ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、最終濃度が 50 nM のトランスフェクション混合物を得、試験群 3 と記した。

【0203】

別の 2 つの培養ウェルに、それぞれトランスフェクション複合体 1X を 100 μ L／ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、siRNA を含まないトランスフェクション混合物を得、ブランク対照群と記した。

【0204】

上記試験群 1～3 及びブランク対照群を培養ウェルで 4 h 培養した後、各培養ウェル中の上清を吸引し、各ウェルに 1 mL の Opti-MEM 培地を添加した。12 ウェルプレートを CO₂ インキュベーターに置いて、37℃で培養を 24 h 継続した。

【0205】

生工生物社の UNIQ-10 カラム式全 RNA 抽出キット (生工生物社から購入、番号: TC13KA4109) を用いて、説明書に記載された方法に基づいて各ウェルの細胞中の全 RNA を抽出した。

【0206】

各ウェルの細胞につき、それぞれ 1 μ g の全 RNA を取り、逆転写キット GoldenstarTM RT6 cDNA Synthesis Kit (北京ケイ科新業生物技術有限公司から購入) により提供された試薬を使用し、GoldenstarTM OL

10

20

30

40

50

igo (dT)₁₇をプライマーとして選択し、キットの説明書における逆転写操作工程に従って逆転写反応系20 μLを調製し、各ウェルの細胞の全RNAを逆転写した。逆転写の条件は、以下のとおりである。各逆転写反応系に対して、逆転写反応系を50℃で50 minインキュベートし、次に85℃で5 minインキュベートし、最後に4℃で30 sインキュベートし、反応が終了した後、逆転写反応系にDEPC水80 μLを添加して、cDNAを含む溶液を得た。

【0207】

各逆転写反応系に対して、それぞれ上記cDNAを含む溶液5 μLをテンプレートとし、NovoStart (登録商標) SYBR qPCR SuperMix Plusキット (近岸蛋白質科技有限公司から購入、番号E096-01B) により提供された試薬を使用してqPCR反応系20 μLを調製した。目的遺伝子RPTOR及び内因性参照遺伝子GAPDHを増幅するためのPCRプライマー配列は、表3に示すとおりであり、各プライマーの最終濃度は、0.25 μMである。各qPCR反応系をABI StepOne Plus Real-Time PCR装置に置き、3段階法を用いて増幅した。増幅プロセスとしては、95℃で10 min予め変性し、次に95℃で30 s変性し、60℃で30 sアニールし、72℃で30 s伸長し、上記変性、アニール、伸長工程を合計40回繰り返して、目的遺伝子RPTOR及び内因性参照遺伝子GAPDHを増幅した生成物W1を得た。生成物W1を直ちに95℃で15 s、60℃で1 min、95℃で15 s順にインキュベートし、定量的リアルタイムPCR装置によりそれぞれ生成物W1中の目的遺伝子及び内因性参照遺伝子GAPDHの溶解曲線を回収し、目的遺伝子RPTOR及び内因性参照遺伝子GAPDHのCt値を得た。

【0208】

表3 プライマー情報

【表5】

遺伝子名	プライマータイプ	ヌクレオチド配列 (5' → 3')	配列番号
ヒトRPTOR	上流プライマー	CAGCTGTGTGACGAGTCTGT	369
	下流プライマー	GGCATCCGGGGATCAAAGAT	370
ヒトGAPDH	上流プライマー	GGTCGGAGTCAACGGATTT	371
	下流プライマー	CCAGCATCGCCCCACTTGA	372

【0209】

比較Ct (ΔΔCt) 法を用い、各試験群における目的遺伝子RPTORを相対的かつ定量的に算出した。算出方法は以下のとおりである。

【0210】

$\Delta Ct (\text{試験群}) = Ct (\text{試験群の目的遺伝子}) - Ct (\text{試験群の内因性参照遺伝子})$

$\Delta Ct (\text{対照群}) = Ct (\text{対照群の目的遺伝子}) - Ct (\text{対照群の内因性参照遺伝子})$

$\Delta \Delta Ct (\text{試験群}) = \Delta Ct (\text{試験群}) - \Delta Ct (\text{対照群の平均値})$

$\Delta \Delta Ct (\text{対照群}) = \Delta Ct (\text{対照群}) - \Delta Ct (\text{対照群の平均値})$

ΔCt (対照群の平均値) は、対照群の2つの培養ウェルのそれぞれのΔCt (対照群) の算術平均値である。それにより、試験群及び対照群の各培養ウェルは、1つのΔΔCt値に対応する。

【0211】

対照群の平均値を基準として、試験群RPTOR mRNAの発現レベルを正規化し、ブランク対照群RPTOR mRNAの発現レベルの平均値を100%と定義する。

【0212】

試験群RPTOR mRNAの相対的発現レベル = $2^{-\Delta \Delta Ct (\text{試験群})} \times 100\%$

試験群RPTOR mRNAの抑制率 = $(1 - \text{試験群RPTOR mRNAの相対的発現レベル}) \times 100\%$

【0213】

実験結果を図1に示した。

【0214】

比較実験例1：参照s i R N A N Cの体外（i n v i t r o）における抑制活性
実験例1の方法により陰性参照s i R N A N Cの体外H e p G 2ヒト肝癌細胞における抑制活性を同時に考察したが、s i R P T O R a 2 - M 1 X、s i R P T O R b 2 - M 1 X又はs i R P T O R c 2 - M 1 Xの代わりに比較調製例で調製した参照s i R N A N Cを用いて、濃度20 μ Mのs i R N A希釈標準溶液を調製して試験した点のみが異なっている。結果を図1に示した。

【0215】

図1は、50 nMの本開示のs i R N A及び参照s i R N A N Cをトランスフェクションした後の、体外H e p G 2ヒト肝癌細胞におけるR P T O R mRNAの相対的発現レベルを示すヒストグラムであり、図1において、NCは、参照s i R N A N Cを表す。図1の結果から分かるように、体外H e p G 2ヒト肝癌細胞において、50 nMの濃度で、s i R P T O R a 2 - M 1 XのR P T O R mRNA抑制率が76.8%であり、50 nMの濃度で、s i R P T O R b 2 - M 1 XのR P T O R mRNA抑制率が86.8%であり、50 nMの濃度で、s i R P T O R c 2 - M 1 XのR P T O R mRNA抑制率が78.8%であり、優れたR P T O R mRNA抑制活性を示し、優れたR P T O R遺伝子発現抑制効果を示した。

【0216】

実験例2：本開示のs i R N Aの体外（i n v i t r o）における標的mRNA抑制活性

本実験例では、異なる濃度の本開示のs i R P T O R a 2 - M 1 X、s i R P T O R b 2 - M 1 X及びs i R P T O R c 2 - M 1 Xの体外H e p G 2ヒト肝癌細胞におけるR P T O R mRNA抑制活性を考察した。

【0217】

10%のウシ胎児血清（FBS、RMBIO社）を添加したDMEM培地（Hyclone社）でH e p G 2ヒト肝癌細胞（南京科佰生物技術有限公司から購入）を37℃で5%CO₂／95%空気含有インキュベーターにおいて培養した。

【0218】

H e p G 2細胞を2.0 x 10⁵個の細胞／ウェルで12ウェルプレートに接種し、1ウェルあたり1mLの細胞液で24h培養した後、培養ウェル中の培地をすべて吸引し、各ウェルに別途500 μ LのOpti-MEM培地（GIBCO社）を添加した。

【0219】

各s i R N Aに対して、PBS緩衝液を用いて、調製例1～3で調製したs i R P T O R a 2 - M 1 X、s i R P T O R b 2 - M 1 X及びs i R P T O R c 2 - M 1 Xから、それぞれ濃度20 μ M、2 μ M及び0.2 μ Mのs i R N A希釈標準溶液を調製した。

【0220】

各s i R N Aに対して、2A1溶液を調製し、1部の2A1溶液は、48.5 μ LのOpti-MEM培地及び1.5 μ Lの濃度20 μ Mのs i R N A希釈標準溶液を含み、それぞれ2A1a、2A1b又は2A1cのs i R N A希釈標準溶液を得た。

【0221】

各s i R N Aに対して、2A2溶液を調製し、1部の2A2溶液は、48.5 μ LのOpti-MEM培地及び1.5 μ Lの濃度2 μ Mのs i R N A希釈標準溶液を含み、それぞれ2A2a、2A2b又は2A2cのs i R N A希釈標準溶液を得た。

【0222】

各s i R N Aに対して、2A3溶液を調製し、1部の2A3溶液は、48.5 μ LのOpti-MEM培地及び1.5 μ Lの濃度0.2 μ Mのs i R N A希釈標準溶液を含み、それぞれ2A3a、2A3b又は2A3cのs i R N A希釈標準溶液を得た。

【0223】

2 B 溶液を調製し、1 部の 2 B 溶液は、49 μ L の Opti-MEM 培地及び 1 μ L の LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 社) を含む。

【0224】

2 X 0 溶液を調製し、1 部の 2 B 溶液を 50 μ L の Opti-MEM 培地と混合し、室温で 20 min インキュベートして、ブランクトランスフェクション複合体 2 X 0 を得た。

【0225】

2 X 1 溶液を調製し、1 部の 2 B 溶液を 1 部の 2 A 1 a 溶液、1 部の 2 A 2 a 溶液及び 1 部の 2 A 3 a 溶液とそれぞれ混合し、室温で 20 min インキュベートして、それぞれトランスフェクション複合体 2 X a 1、2 X a 2 及び 2 X a 3 を得た。

【0226】

2 X 2 溶液を調製し、1 部の 2 B 溶液を 1 部の 2 A 1 b 溶液、1 部の 2 A 2 b 溶液及び 1 部の 2 A 3 b 溶液とそれぞれ混合し、室温で 20 min インキュベートして、それぞれトランスフェクション複合体 2 X b 1、2 X b 2 及び 2 X b 3 を得た。

【0227】

2 X 3 溶液を調製し、1 部の 2 B 溶液を 1 部の 2 A 1 c 溶液、1 部の 2 A 2 c 溶液及び 1 部の 2 A 3 c 溶液とそれぞれ混合し、室温で 20 min インキュベートして、それぞれトランスフェクション複合体 2 X c 1、2 X c 2 及び 2 X c 3 を得た。

【0228】

各 siRNA に対して、2 つの培養ウェル（いずれも上記 Hep G 2 細胞及び 500 μ L の Opti-MEM 培地を含む培養ウェルであり、以下同じ）中に、それぞれトランスフェクション複合体 2 X a 1、2 X a 2 又は 2 X a 3 を 100 μ L / ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、siRPTORa 2-M1X を含む、最終濃度が 50 nM、5 nM 又は 0.5 nM のトランスフェクション混合物を得、試験群 1 と記した。

【0229】

各 siRNA に対して、2 つの培養ウェル（いずれも上記 Hep G 2 細胞及び 500 μ L の Opti-MEM 培地を含む培養ウェルであり、以下同じ）中に、それぞれトランスフェクション複合体 2 X b 1、2 X b 2 又は 2 X b 3 を 100 μ L / ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、siRPTORb 2-M1X を含む、最終濃度が 50 nM、5 nM 又は 0.5 nM のトランスフェクション混合物を得、試験群 2 と記した。

【0230】

各 siRNA に対して、2 つの培養ウェル（いずれも上記 Hep G 2 細胞及び 500 μ L の Opti-MEM 培地を含む培養ウェルであり、以下同じ）中に、それぞれトランスフェクション複合体 2 X c 1、2 X c 2 又は 2 X c 3 を 100 μ L / ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、siRPTORc 2-M1X を含む、最終濃度が 50 nM、5 nM 又は 0.5 nM のトランスフェクション混合物を得、試験群 3 と記した。

【0231】

別の 2 つの培養ウェルに、それぞれブランクトランスフェクション複合体 2 X 0 を 100 μ L / ウェルの添加量で添加し、均一に混合して、siRNA を含まないトランスフェクション混合物を得、ブランク対照群と記した。

【0232】

上記試験群 1 ~ 3 及びブランク対照群を培養ウェルで 4 h 培養した後、各培養ウェル中の上清を吸引し、各ウェルに 1 mL の Opti-MEM 培地を添加した。12 ウェルプレートに CO₂ インキュベーターに置いて、37 °C で培養を 24 h 継続した。

【0233】

実験例 1 と同じ方法を用いて各ウェルの細胞中の全 RNA を抽出し、逆転写して、各試験群における標的遺伝子 RPTOR mRNA を相対的かつ定量的に算出した。結果を図 2 に示した。

【0234】

図 2 は、異なる濃度の本開示の siRNA をトランスフェクションした後の、体外 He

10

20

30

40

50

p G 2 ヒト 肝 癌 細 胞 に お け る R P T O R m R N A の 相 対 的 発 現 レ ベ ル を 示 す ヒ ス ト グ ラ ム で あ る 。 図 2 の 結 果 か ら 分 か る よ う に 、 体 外 H e p G 2 ヒ ト 肝 癌 細 胞 に お い て 、 s i R P T O R c 2 - M 1 X が 0 . 5 n M の 低 濃 度 で 少 な く と も 4 0 . 5 % の R P T O R m R N A 抑 制 率 を 示 し 、 s i R P T O R a 2 - M 1 X が 5 n M の 濃 度 で は 少 な く と も 6 8 . 3 % 、 5 0 n M の 濃 度 で は 少 な く と も 7 1 . 1 % の R P T O R m R N A 抑 制 率 を 示 し 、 s i R P T O R b 2 - M 1 X が 5 0 n M の 濃 度 で 8 6 . 4 % に 達 す る R P T O R m R N A 抑 制 率 を 示 し て お り 、 優 れ た R P T O R 遺 伝 子 発 現 抑 制 効 果 を 示 し た 。

【 0 2 3 5 】

実 験 例 3 : s i R N A 複 合 体 の マ ウ ス 体 内 に お け る 抑 制 活 性

調 製 例 6 及 び 7 で 調 製 し て 得 た 複 合 体 1 及 び 複 合 体 2 を 、 そ れ ぞ れ P B S に 溶 解 し 、 3 m g / m l の s i R N A 複 合 体 溶 液 (s i R N A と し て) と し た 。 C 5 7 B L / 6 マ ウ ス (雌 性 、 体 重 1 6 ~ 1 8 g 、 6 ~ 8 週 齢 、 ス 貝 福 公 司 か ら 購 入) を ラ ン ダ ム に 3 群 に 分 け 、 1 群 当 た り マ ウ ス 6 匹 と し 、 そ れ ぞ れ 番 号 を 付 け た 。 首 後 部 に 皮 下 注 射 す る 方 式 で 、 第 1 群 の 各 マ ウ ス に そ れ ぞ れ 上 記 s i R N A 複 合 体 1 溶 液 を 投 与 し 、 投 与 前 に 体 重 を 測 定 し て 記 録 し 、 投 与 体 積 を 5 m L / k g と し て 体 重 に 応 じ て 投 与 し 、 試 験 群 1 と 記 し た 。 第 2 群 の 各 マ ウ ス に そ れ ぞ れ 上 記 s i R N A 複 合 体 2 溶 液 を 投 与 し 、 投 与 前 に 体 重 を 測 定 し て 記 録 し 、 投 与 体 積 を 5 m L / k g と し て 体 重 に 応 じ て 投 与 し 、 試 験 群 2 と 記 し た 。 残 り の 群 の 各 マ ウ ス に 投 与 体 積 を 5 m L / k g と し て P B S を 投 与 し 、 ブ ラ ン ク 対 照 群 と し た 。

【 0 2 3 6 】

投 与 時 点 を 1 日 目 と し て 、 8 日 目 に 試 験 群 及 び ブ ラ ン ク 対 照 群 の 各 マ ウ ス の 肝 臓 組 織 を 取 り 、 R N A l a t e r で 保 存 し た 。

【 0 2 3 7 】

実 験 例 1 と 同 じ 方 法 を 用 い て 各 ウ ェ ル の 細 胞 中 の 全 R N A を 抽 出 し 、 逆 転 写 し て 、 各 試 験 群 に お け る 標 的 遺 伝 子 R P T O R を 相 対 的 か つ 定 量 的 に 算 出 し 、 用 い ら れ る プ ラ イ マ ー 情 報 を 上 記 表 3 に 示 し 、 ブ ラ ン ク 対 照 群 の 結 果 を 正 規 化 し た 。 結 果 を 表 4 に 示 し た 。

【 0 2 3 8 】

表 4 s i R N A 複 合 体 の マ ウ ス 体 内 に お け る 抑 制 活 性

【 表 6 】

群 別	試 験 群 1	試 験 群 2
R P T O R m R N A 抑 制 率 (%)	5 2 . 9 %	5 1 . 3 %

【 0 2 3 9 】

結 果 か ら 分 か る よ う に 、 ブ ラ ン ク 対 照 群 の 結 果 と 比 較 し て 、 3 m g / k g の 濃 度 で 、 本 開 示 の 異 な る 修 飾 ス キ ー ム の s i R N A 複 合 体 は 、 投 与 後 1 週 間 以 内 に C 5 7 B L / 6 j マ ウ ス に お い て 依 然 と し て 5 0 % を 超 え る 体 内 R P T O R m R N A 抑 制 率 を 示 し 、 優 れ た R P T O R m R N A 抑 制 活 性 と 長 時 間 の 体 内 安 定 性 を 示 し た 。

【 0 2 4 0 】

上 記 実 験 結 果 か ら 分 か る よ う に 、 本 開 示 の s i R N A は 、 細 胞 に お け る R P T O R 遺 伝 子 発 現 を 効 果 的 に 抑 制 す る こ と が で き る た め 、 m T O R C 1 の 異 常 活 性 化 及 び 細 胞 の オ ー ト フ ァ ジ ー に 関 連 す る 疾 患 、 例 え ば N A S H 又 は 神 經 変 性 疾 患 、 又 は 関 連 す る 症 状 を 治 療 及 び / 又 は 予 防 す る 薬 物 の 調 製 に お い て 高 い 応 用 の 可 能 性 を 示 す 。

【 0 2 4 1 】

以 上 、 本 開 示 の 好 ま し い 実 施 形 態 を 詳 細 に 説 明 し た が 、 本 開 示 は 、 上 記 実 施 形 態 の 具 体 的 な 内 容 に 限 定 さ れ る も の で は な く 、 本 開 示 の 技 術 的 思 想 範 囲 内 に 、 本 開 示 の 技 術 手 段 に 対 し て 複 数 の 簡 単 な 変 更 を 行 う こ と が で き 、 こ れ ら の 簡 単 な 変 更 は 、 い ず れ も 本 開 示 の 保 護 範 囲 に 属 す る 。

【 0 2 4 2 】

な お 、 上 記 発 明 を 実 施 す る た め の 形 態 に 説 明 さ れ た 各 具 体 的 な 技 術 的 特 徴 は 、 矛 盾 し な い 場 合 に 、 任 意 の 適 切 な 方 式 で 組 み 合 わ せ る こ と が で き る 。 不 要 な 重 複 を 回 避 す る た め に

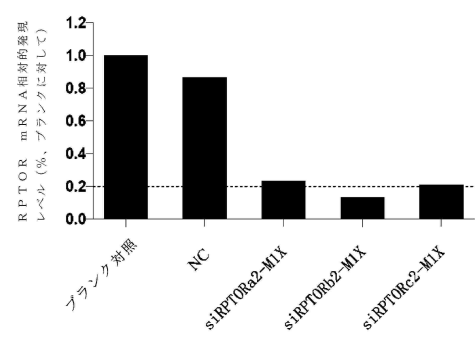
、本開示は、可能なあらゆる組み合わせ方式を別途に説明しない。

【 0 2 4 3 】

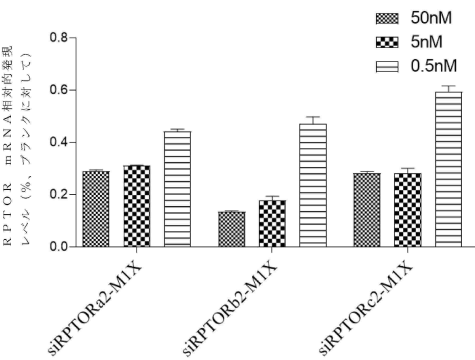
また、本開示の様々な異なる実施形態は、任意に組み合わせることができ、本開示の思想から逸脱しない限り、同様に本開示に開示された内容と見なすべきである。

【図面】

【図 1】



【図 2】



【配列表】

2024546667000001.xml

10

20

30

40

50

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139942

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/113(2010.01)i;A61K31/713(2006.01)i 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) C12N A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, WANFANG DATA RETRIEVAL SYSTEM, pubmed, patentics, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, GENBANK, STN: SEQ ID NOs: 1-384, RPTOR, Regulatory Associated Protein Of MTOR Complex 1, regulatory associated protein of mTOR, siRNA, RNAi, shRNA, RNA干扰, 小干扰RNA, mTOR, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, mammalian target of rapamycin		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112423795 A (SUZHOU RIBO LIFE SCIENCE CO., LTD.) 26 February 2021 (2021-02-26) entire document	1-40
A	US 2019091256 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER et al.) 28 March 2019 (2019-03-28) entire document	1-40
A	US 2019345497 A1 (CURIGIN CO., LTD.) 14 November 2019 (2019-11-14) entire document	1-40
A	US 2021311076 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 07 October 2021 (2021-10-07) entire document	1-40
A	WO 2009143371 A2 (INTRADIGM CORPORATION) 26 November 2009 (2009-11-26) entire document	1-40
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 03 March 2023		Date of mailing of the international search report 10 March 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/139942

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010064851 A2 (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) 10 June 2010 (2010-06-10) entire document	1-40
X	KHOR, E.S. et al. "Endothelial Replicative Senescence Delayed by the Inhibition of Mtorc1 Signaling Involves Microrna-107" <i>International Journal of Biochemistry and Cell Biology</i> , Vol. vol. 101, 29 May 2018 (2018-05-29), pp. 64-73	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CN2022/139942

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:	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139942

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **38, 39**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 38 and 39 respectively relate to a method for treating and/or preventing diseases or symptoms related to RPTOR function regulation, and a method for inhibiting the expression of a RPTOR gene in cells, which both belong to the subject matter for which a search is not required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1(iv): (4) methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods practiced on the human or animal body. The international search is provided on the basis of the use thereof in the preparation of corresponding drugs.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/139942

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112423795	A	26 February 2021	None			
US	2019091256	A1	28 March 2019	WO	2017151732	A1	08 September 2017
US	2019345497	A1	14 November 2019	EP	3578655	A1	11 December 2019
				EP	3578655	A4	23 December 2020
				CA	3052038	A1	09 August 2018
				AU	2018216509	A1	15 August 2019
				US	11149272	B2	19 October 2021
				US	2021054378	A1	25 February 2021
				WO	2018143626	A1	09 August 2018
				JP	2020509782	A	02 April 2020
				JP	6962600	B2	05 November 2021
US	2021311076	A1	07 October 2021	WO	2020018461	A1	23 January 2020
				WO	2020018461	A8	20 February 2020
WO	2009143371	A2	26 November 2009	WO	2009143371	A3	14 January 2010
WO	2010064851	A2	10 June 2010	WO	2010064851	A3	07 October 2010

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/139942
A. 主题的分类 C12N15/113(2010.01)i;A61K31/713(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, CNTXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 万方数据检索系统, pubmed, patents, 中国专利生物序列检索系统, GENBANK, STN: SEQ ID NOs:1-384, RPTOR, Regulatory Associated Protein Of MTOR Complex 1, regulatory associated protein of mTOR, siRNA, RNAi, shRNA, RNA干扰, 小干扰RNA, mTOR, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, mammalian target of rapamycin		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 112423795 A (苏州瑞博生物技术股份有限公司) 2021年2月26日 (2021 - 02 - 26) 全文	1-40
A	US 2019091256 A1 (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER 等) 2019年3月28日 (2019 - 03 - 28) 全文	1-40
A	US 2019345497 A1 (CURIGIN CO.,LTD.) 2019年11月14日 (2019 - 11 - 14) 全文	1-40
A	US 2021311076 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 2021年10月7日 (2021 - 10 - 07) 全文	1-40
A	WO 2009143371 A2 (INTRADIGM CORPORATION) 2009年11月26日 (2009 - 11 - 26) 全文	1-40
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。 * 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “D” 申请人在国际申请中引证的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年3月3日		国际检索报告邮寄日期 2023年3月10日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 李宁 电话号码 (+86) 010-53961932

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/139942
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)), ☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。 2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。 3. 补充意见:		

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/139942
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：		
1.	☒ 权利要求： 38, 39 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： 权利要求38, 39分别涉及治疗和/或预防与RPTOR功能调节相关的疾病或症状的方法，抑制细胞中RPTOR基因表达的方法，其均属于PCT细则39.1(iv)定义的不要求国际检索单位检索的主题：(4)通过外科手术或治疗对人体或动物体进行处置的方法及在人体或动物体上实施的诊断方法。国际检索基于制备相应药物的用途而作出。	10
2.	☐ 权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：	
3.	☐ 权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告 关于同族专利的信息						国际申请号 PCT/CN2022/139942	
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112423795	A	2021年2月26日	无			
US	2019091256	A1	2019年3月28日	WO	2017151732	A1	2017年9月8日
US	2019345497	A1	2019年11月14日	EP	3578655	A1	2019年12月11日
				EP	3578655	A4	2020年12月23日
				CA	3052038	A1	2018年8月9日
				AU	2018216509	A1	2019年8月15日
				US	11149272	B2	2021年10月19日
				US	2021054378	A1	2021年2月25日
				WO	2018143626	A1	2018年8月9日
				JP	2020509782	A	2020年4月2日
				JP	6962600	B2	2021年11月5日
US	2021311076	A1	2021年10月7日	WO	2020018461	A1	2020年1月23日
				WO	2020018461	A8	2020年2月20日
WO	2009143371	A2	2009年11月26日	WO	2009143371	A3	2010年1月14日
WO	2010064851	A2	2010年6月10日	WO	2010064851	A3	2010年10月7日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),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,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,I
T,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,
MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,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

1 6 8

- (72)発明者 チャン、ホンイェン
中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアン
フォン ロード ナンバー 1 6 8
- (72)発明者 カオ、シャン
中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアン
フォン ロード ナンバー 1 6 8
- (72)発明者 ティン、シュエフォン
中華人民共和国 チアンスー 2 1 5 3 0 0、クンシャン シティー、ユイシャン タウン、ユアン
フォン ロード ナンバー 1 6 8

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC01 CC16 CC21 CC41 DD63 DD66 EE59 FF70
4C084 AA13 NA13 ZA02 ZA16 ZA75 ZA94 ZC01 ZC33
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 ZA02 ZA16 ZA75 ZA94
ZC01 ZC33