

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號 **06112906**

※ 申請日期：**96.4.12**

※IPC 分類：**A61K 48/00**

一、發明名稱：(中文/英文)

RNA干擾(RNAi)所媒介之與組織胺受體H1相關之病症的抑制作用

RNAi-MEDIATED INHIBITION OF HISTAMINE RECEPTOR H1-RELATED CONDITIONS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

艾爾康製造有限公司 / ALCON MANUFACTURING, LTD.

代表人：(中文/英文)

伯朗 吉瑞格 C. / BROWN, GREGG C.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國德州福特渥斯·南自由道 6201 號

6201 South Freeway, Fort Worth, TX 76134, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 耶尼 約翰 M. / YANNI, JOHN M.
2. 查特頓 強 E. / CHATTERTON, JON E.
3. 葛瑪斯 丹尼爾 A. / GAMACHE, DANIEL A.
4. 米勒 史蒂芬 T. / MILLER, STEVEN T.

國 籍：(中文/英文)

- 1.-4. 美國 / U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、 2006/04/13、 60/791,623

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明有關治療與組織胺受體H1 (HRH1)相關之病症之干擾性RNA組成物之領域。此等病症包括，例如，過敏性結膜炎、眼部發炎、皮膚炎、鼻炎、氣喘或過敏。

【先前技術】

發明背景

在醫療史上，過敏性結膜炎、眼部發炎、皮膚炎、鼻炎、氣喘以及過敏，係利用口服、鼻內或局部抗組織胺或口服或鼻內類固醇之療法，或者就過敏而言，以過敏原注射治療法來進行治療。系統性治療典型地需要投與較高的藥物化合物濃度，以便能提供有效的濃度至到達需要治療的位置。抗組織胺化合物已知具有中樞神經系統活性；困倦與黏膜乾燥係抗組織胺應用常見的副作用。

組織胺結合至組織胺受體H1，會引起，例如，血管滲漏(水腫)、平滑肌收縮(支氣管收縮)或神經纖維活化(搔癢、打噴嚏)。包括PATANOL®以及EMADINE®之許多藥物，經由結合至此受體而發揮其等一部分或全部之治療效果。

應該會希望有標靶該組織胺H1受體之劑以及治療方法，藉此阻斷局部環境中內源性組織胺之活性，同時避免系統性組織胺治療之副作用。本發明之具體例滿足此技藝中對此劑以及治療方法之需求。

【發明內容】

發明概要

本發明之具體例藉由提供強而有效的治療、預防或干預與HRH1相關之病症，克服了此等以及先前技藝之其它缺點。於一態樣中，本發明之方法包括藉由投與使HRH1 mRNA表達沈默之干擾性RNA（其在與HRH1相關之病症中，會干擾G蛋白偶合的受體訊號路徑，以及阻止與組織胺媒介之發炎反應相關事件之訊號級聯放大），來治療具有與HRH1相關之病症或有發展成與HRH1相關之病症之風險之對象。

本發明係針對會標靶HRH1 mRNA，藉此干擾HRH1 mRNA表達之干擾性RNA。本發明干擾性RNA可用於治療患有與HRH1相關之病症或有發展成與HRH1相關之病症之風險之病人。

本發明之具體例係一種使一對象之組織胺受體H1 mRNA的表達減少之方法，該方法包含對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA以及一藥學上可接受之載劑。組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。

本發明之另一具體例係一種治療一有此治療需求之對象中，與HRH1相關之病症之方法。該方法包含對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑。該與HRH1相關之病症因此而得到治療。於一具體例中，該對象

係人類，且該人類具有與HRH1相關之病症，以及於另一具體例中，該對象係人類，且該人類具有發展成與HRH1相關之病症之風險。

針對以上所述之具體例，該干擾性RNA包含一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸一致。

於以上所述之方法之另一個具體例中，該組成物進一步包含一第二干擾性RNA，其具有19至49個核苷酸長度以及包含一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之第二mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之第二mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸一致。

於本發明之又另一具體例中，減少一對象中組織胺受體H1 mRNA之表達之方法，包含對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，以及該干擾性RNA包含一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至少19

個核苷酸至少接近完全連續互補之區域，在此該反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交，以及具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編號：1之雜交部分之mRNA至少接近完全連續互補之區域。

5 域。組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。

治療有此治療需求之對象中，與HRH1相關之病症之方法係本發明之一具體例，該方法包含對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，該干擾性RNA包含一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；其中該反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交，以及具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編號：1之雜交部分的mRNA至少接近完全連續互補之區域。

10 含一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；其中該反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交，以及具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編號：1之雜交部分的mRNA至少接近完全連續互補之區域。

15 域。與HRH1相關之病症因此而得到治療。

針對以上所述之方法，該干擾性RNA之反訊息股被設計成可標靶對應於包含下列之序列辨識編號：1之mRNA：核苷酸285、324、410、581、584、660、672、801、817、1045、1059、1089、1157、1209、1223、1241、1253、1265、1363、1391、1488、1521、1624、1670、1673、1784、1873、1875、1985、2086、2087、2226、2297、2420、2421、2485、2603、2647或3431。

20 1363、1391、1488、1521、1624、1670、1673、1784、1873、1875、1985、2086、2087、2226、2297、2420、2421、2485、2603、2647或3431。

亦可對該對象投與一具有19至49個核苷酸長度之第二干擾性RNA；該第二干擾性RNA包含一核苷酸訊息股、一

核苷酸反訊息股，以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全互補之區域，其中該第二干擾性RNA之反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編碼1之第二部分的mRNA雜交，以及該反訊息股具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編碼1之第二雜交部分的mRNA至少接近完全連續互補之區域。

本發明之另外的具體例係一種減少一對象之組織胺受體H1 mRNA的表達之方法，其包含對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之單股干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，此時該單股干擾性RNA在生理條件下與對應於序列辨識編號1之一部分的mRNA雜交，該一部分的mRNA包含以上鑑別之核苷酸。

本發明之一具體例為一種治療一有此治療需求之對象中與HRH1相關之病症之方法。該方法包含對該對象投與一組成物，該組成物包含一雙股siRNA分子，其透過RNA干擾而向下調節HRH1基因之表達，其中該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19至約27個核苷酸；以及該siRNA分子中之一股包含具有實質上與對應於HRH1基因之mRNA互補之核苷酸序列，以致該siRNA分子透過RNA干擾直接打斷該mRNA。於此方法之另外的具體例中，該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19個核苷酸至約25個核苷酸，或長度約19個核苷酸至約21個核苷酸。

本發明之一具體例為一種組成物，該組成物包含一雙

股siRNA分子，其透過RNA干擾而向下調節HRH1基因之表達。該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19至約27個核苷酸；以及該siRNA分子中之一股包含具有實質上與對應於HRH1基因之mRNA互補之核苷酸序列，以致該siRNA分子

5 透過RNA干擾直接打斷該mRNA。於此組成物之另外的具體例中，該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19個核苷酸至約25個核苷酸，或長度約19個核苷酸至約21個核苷酸。

本發明之另外的具體例包括一種組成物，其包含一具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及包含一對應於

10 序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13-序列辨識編號：50中任一個之核苷酸序列，或其互補序列；以及一藥學上可接受之載劑。

任何在此所述之具體例於製備在此所述用於減少HRH1 mRNA之表達之藥劑上之用途，亦為本發明之具體

15 例。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

在此所引用之參考文獻、其等提供示範性程序的範圍或對該等在此所述之其它詳細的補充，在此明確地併入本

20 案以為參考。

依據本發明之揭示內容，熟悉此技藝之人士當能認知到，在此揭露之具體例之明顯的改質物，可在不逸離本發明之技術思想範圍之情況下被製得。依據本發明之揭露內容，在此所揭示之所有的具體例均可在不需過度的實驗下

製得。本發明之全部範疇闡明於揭示內容以及其相等的具體例中。此說明書不應被拿來作成不當的限縮所給予本發明完整保護範圍之權力之解釋。

除非特別指示，否則在此所使用之術語“一”意指“一個”、“至少一個”或“一或多個”。

在此使用之術語“與HRH1相關之病症”包括由組織胺所媒介之發炎反應，其與諸如過敏性結膜炎、眼部發炎、皮膚炎、鼻炎、氣喘以及過敏之病症有關，以及包括該等因HRH1-mRNA之表達所引起之細胞改變，其直接或間接導致與HRH1相關之病症。在此提供之干擾性RNA，提供了此沈默反應，同時避免了因非專一性劑所引起之不利的副作用。

在此使用之術語“過敏性結膜炎”意指結膜之發炎，結膜係一種嬌弱的膜，其為眼瞼之內襯且覆蓋住鞏膜之露出表面。術語“過敏性結膜炎”包括，例如，異位性角膜結膜炎、巨乳突結膜炎、枯草熱結膜炎、常年性過敏性結膜炎以及春季型角膜結膜炎。

在此使用之術語“皮膚炎”意指皮膚之發炎，包括，例如，過敏性接觸性皮膚炎、蕁麻疹、缺脂性皮膚炎(下肢皮膚乾燥)、異位性皮膚炎、接觸性皮膚炎，包括刺激性接觸性皮膚炎以及漆酚引起的接觸性皮膚炎、溼疹、重力性皮膚炎(gravitational dermatitis)、錢幣狀皮膚炎、外耳炎、口周圍皮炎、以及脂漏性皮膚炎。

在此使用之術語“鼻炎”意指鼻子之黏膜發炎，包括，

例如，過敏性鼻炎、異位性鼻炎、刺激性鼻炎、嗜伊紅性非過敏性鼻炎、藥物性鼻炎以及嗜中性鼻竇炎。

在此所使用之術語“氣喘”意指，導致將空氣從鼻子與嘴巴傳送到肺之氣管變窄之氣道發炎，包括，例如，過敏性氣喘、異位性氣喘、異位性支氣管IgE媒介的氣喘、支氣管性氣喘、細支氣管炎、肺氣腫氣喘、自發性氣喘、運動引起的氣喘、環境因素引起之外因性氣喘、初期氣喘、病生理混亂引起之內因性氣喘、非過敏性氣喘、非特異性氣喘以及喘鳴幼兒症候群。

10 術語“一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少90%的序列與對應於(序列辨識號)中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%的序列與對應於(序列辨識號)中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸一致”，容許一個核苷酸之取代。
15 此術語不包括二個核苷酸之取代(即， $11/13 = 85\%$ 一致/互補)。

在此使用之術語“一致之百分比”，描述第一核酸分子中連續的核苷酸，與第二核酸分子中相同長度之連續的核苷酸組相同之百分比。術語“互補之百分比”描述第一核酸
20 分子中連續的核苷酸，可與第二核酸分子中連續的核苷酸組呈Watson-Crick鹼基配對之百分比。

“雜交”意指一種過程，其中具有互補或接近互補鹼基序列之單股的核酸，交互反應形成氫鍵結的複合物，稱為雜交體。雜交反應很敏感且具選擇性。於試管內，雜交之

特異性(即，嚴苛度)係由前雜交與雜交溶液中之鹽或甲醯胺之濃度以及，例如，雜交之溫度所控制，此為此技藝所熟悉之程序。尤其是，嚴苛度會因鹽之濃度減低、甲醯胺之濃度增加或雜交溫度提高而增加。

- 5 例如，在約50%甲醯胺，37°C至42°C下會產生高度嚴苛條件。在約35%至25%甲醯胺，30°C至35°C下會產生減低的嚴苛條件。有關雜交之嚴苛條件之例子於Sambrook, J., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y中提供。
- 10 嚴苛之雜交條件之另外的例子包括400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、1 mM EDTA、50°C或70°C，歷時12-16個小時，接著清洗；或在70°C下1XSSC或50°C下1XSSC，50%甲醯胺中雜交，接著在70°C，0.3XSSC中清洗；或在70°C，4XSSC或50°C 4XSSC，50%甲醯胺中雜交，接著在67°C，
- 15 1XSSC中清洗。雜交之溫度為低於雜交體之解鏈溫度(T_m)約5-10°C，此處 T_m 係針對長度介於19與49個鹼基對之間之雜交體，使用下列計算式而決定： $T_m^{\circ}\text{C} = 81.5 + 16.6 (\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{ G+C}) - (600/N)$ ，此處N係雜交體中鹼基之數目，而 $[\text{Na}^+]$ 係雜交緩衝液中鈉離子之濃度。
- 20 在此使用之術語“過敏”，意指免疫系統對通常為非傷害性之物質產生不正常的反應，包括，例如，皮膚過敏，諸如異位性皮膚炎、蕁麻疹以及血管性水腫；呼吸過敏，諸如過敏性鼻炎，以及對灰塵或黴菌之反應；食物過敏，諸如對牛奶、蛋白、花生、小麥、大豆、漿果、有殼水生

動物、玉米、豆子、黃色食用染料第5號以及阿拉伯膠中之蛋白質之反應；藥物過敏，諸如對盤尼西林、磺胺製劑、巴必妥酸鹽類、抗痙攣劑、胰島素、局部麻醉劑以及造影劑之反應；以及昆蟲叮咬過敏，諸如對蜜蜂、胡蜂、大黃蜂、黃蜂以及火蟻叮螫中之毒物之反應。

減少*mRNA*之表達：在此所使用之“減少*mRNA*之表達”一詞，意指投與或表達一數量的干擾性RNA (如*siRNA*)，透過打斷*mRNA*或直接抑制轉譯作用，減少標靶*mRNA*轉譯成蛋白質。此標靶*mRNA*或對應蛋白質之表達的減少，通常稱作“敲除作用(knock-down)”，且以相對於非標靶控制組RNA(如，非靶標控制組*siRNA*)之投與或表達後，所存在之位準來描述。在此之具體例預計敲除包括與介於50%與100%之間表達的數量。然而，本發明之目的不必然一定要達到此敲除作用之位準。於一具體例中，投與單一種標靶HRH1 *mRNA*之干擾性RNA。於另一具體例中，投與二或多種標靶HRH1 *mRNA*之干擾性RNA。

敲除作用，通常係藉由使用定量聚合酶鏈反應(qPCR)擴大作用測量*mRNA*之位準來作評估，或藉由使用西方點墨法或酵素連結免疫吸附分析法測量蛋白質位準來作評估。分析蛋白質之位準，可提供*mRNA*斷裂以及轉錄抑制之評估。用於測量敲除作用之另外的技術，包括RNA溶液雜交、核酸酶保護、北方雜交、用微陣列監控基因之表達、抗體結合、放射免疫分析以及螢光活化的細胞分析。

RNA干擾(RNAi)係一種過程，根據此過程，雙股RNA

(dsRNA)被用來使基因之表達沈默。雖不想受理論之約束，但RNAi係從較長的雙股RNA被像RNaseIII酵素，切酶(dicer)，打斷成較小的干擾性RNA (siRNA)開始。SiRNA係長度通常為約19至28個核苷酸或20至25個核苷酸或21至22
5 個核苷酸之雙股RNA，且常常包含2-核苷酸3'突出以及5'磷酸鹽以及3'羥基終端。該siRNA中之一股會併入核糖核蛋白質複合體，稱作RNA誘導的沉默複合體(RISC)。RISC使用此siRNA股來辨識至少部分地與該併入的siRNA股互補之mRNA分子，之後打斷此等標靶mRNA或抑制其等之轉
10 譯。因此，併入RISC之siRNA股稱作引導股或反訊息股。另一稱作信使股(passenger strand)或訊息股之siRNA股，從該siRNA中被排除，且至少部分地相似於該標靶mRNA。熟悉此技藝之人士當能認知到，原則上，siRNA之任一股均可併入RISC且可作為引導股。然而，siRNA之設計(如，在反
15 訊息股之5'端，siRNA雙股之安定性減少)會較偏向併入反訊息股至RISC中。

經RISC所媒介打斷具有至少部份地與該引導股互補之序列之mRNA，會導致由此mRNA所編碼之mRNA以及對應的蛋白質之恆穩態位準減少。選擇性地，RISC亦可在不打
20 斷該標靶mRNA之情況下，透過轉譯抑制減少對應的蛋白質之表達。其它RNA分子以及似RNA分子亦可與RISC交互反應而使基因表達沈默。可與RISC交互作用之其它RNA分子之例子包括短髮夾狀RNA (shRNA)、單股siRNA、微RNA (miRNA)以及切酶-基質27個鹼基(dicer-substrate 27-mer)雙

鏈。除非特別指示，否則在此所使用之術語“siRNA”意指雙股干擾性RNA。可與RISC交互作用之似RNA分子之例子包括含有一或多種化學改質的核苷酸、一或多種去氧核糖核酸和/或一或多種非磷酸二酯連繫之RNA分子。為目前討論之目的，可與RISC交互作用以及參與RISC所媒介之基因表達的改變之全部的RNA或似RNA分子，均稱作“干擾性RNA”。因此，SiRNA、shRNA、miRNA以及切酶-基質27個鹼基雙鏈為“干擾性RNA”之亞型。

本發明具體例中之干擾性RNA似乎是透過催化手段來打斷標靶mRNA，即干擾性RNA能夠以亞化學計量之數量來達到標靶mRNA之抑制。相較於反訊息療法，在此斷裂條件下需要顯著地較少的干擾性RNA來提供治療效果。

本發明一般有關干擾性RNA於抑制組織胺受體H1 (HRH1) mRNA之表達上之用途。該組織胺H1受體(HRH1) 係G蛋白偶合的受體(GPCR)超級家族之成員。組織胺結合至HRH1會活化其相關聯的異三元體G蛋白， $G_{q/11}$ ，引起磷脂酶C (PLC)以及蛋白質激酶C (PKC)之活化、1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)以及1,2-雙醯甘油之合成，導致細胞內 Ca^{2+} 增加以及其它訊號事件。標靶該HRH1 mRNA，藉此減少HRH1之局部表達，因此抑制組織胺於局部環境之作用，且打斷該組織胺所媒介之發炎反應。根據本發明，外源性提供或內源性表達之干擾性RNA對使HRH1 mRNA之沈默方面特別有效。

在此所述之核酸序列，除非有特別指示，否則以5'至3'

之方向書寫。在此使用之術語“核酸”意指DNA或RNA或其等之改質型，其包含在DNA（腺嘌呤“A”、胞嘧啶“C”、鳥嘌呤“G”、胸腺嘧啶“T”）中或在RNA（腺嘌呤“A”、胞嘧啶“C”、鳥嘌呤“G”、尿嘧啶“U”）中之嘌呤或嘧啶鹼基。在此

5 提供之干擾性RNA可包含“T”鹼基，特別是在3’端，即使“T”鹼基不會天然地存在RNA中。“核酸”包括術語“寡核苷酸”以及“多核苷酸”且可意指單股分子或雙股分子。雙股分子係在A與T鹼基之間、C與G鹼基之間以及A與U鹼基之間，經由華生-克里克鹼基配對所形成。雙股分子之各股彼此之間可能具有部分、實質上或完全的互補，且會形成雙鏈雜交體，其鍵結之強度視鹼基之序列互補的程度以及本質而定。

10

mRNA序列可輕易地由對應的DNA序列推衍而得。例如，序列辨識編號：1提供對應於HRH1之mRNA之DNA的

15 訊息股序列。該mRNA序列與DNA訊息股序列一致，然“T”鹼基由“U”鹼基取代。因此，可由序列辨識編號：1得知HRH1之mRNA序列。

組織胺受體H1 (HRH1) mRNA：GenBank資料庫提供有關HRH1之DNA序列，登錄號NM_000861，於“序列表”中，

20 以序列辨識編號：1形式提供。序列辨識編號：1提供對應於編碼HRH1之mRNA之DNA的訊息股序列(除了把“T”鹼基當作“U”鹼基外)。HRH1之編碼序列係從核苷酸179-1642。

以上所述之HRH1 mRNA序列之相等物係其選擇性的

剪接形式、對偶形式、同工酶或同源。同源係從其它哺乳動物物種而來之組織胺受體mRNA，其與序列辨識編號：1同源(即，異物種同源基因(ortholog))。與序列辨識編號：1有關之HRH1核酸序列包括該等具有GenBank登錄號

5 D14436、BC060802、Z34897、D28481、AB041380、X76786、AF026261、AY136743以及DQ047308者。

HRH1之抑制亦可於活體外，使用表達HRH1之人類細胞族群來測定。該等細胞較佳地可為，但不限於，如Cook *et al.*所述之原代人類結膜表皮細胞(Cook EB, *et al. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Feb, 39(2):336-43)或轉型的人類角膜表皮細胞株CEPI-17-CL4 (Offord EA, *et al. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 May, 40(6):1091-101)。HRH1干擾性RNA或控制組之活性的評估，可使用放射配位子結合進行(Sharif NA, *et al. J Ocul Pharmacol Ther.* 1996 Winter,

15 12(4):401-7)，相較於以非標靶控制組干擾性RNA轉染之細胞，以干擾性RNA轉染之細胞顯示出較少的結合。功能性評估，可使用鈣敏感性染料測量因應組織胺的刺激而產生之鈣的移動來進行，或使用 $[^3\text{H}]$ 磷酸肌醇($[^3\text{H}]$ IPs)之產生作為受體活化之指標來進行(Sharif NA, *et al. Invest*

20 *Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Dec, 39(13):2562-71)。相較於控制組，經干擾性RNA處理之細胞中讀數之減少，指出HRH1功能之抑制。

HRH1之抑制亦可於活體內，經事先以HRH1標靶的干擾性RNA治療，然後藉由阻止天竺鼠中組織胺誘導的血管

滲透性之改變來決定。Yanni *et al.*提供供用於活體內研究之方法(*J. Ocular Pharmacology* 10:665-675, 1994)。簡言之，透過耳邊緣靜脈，對頓金哈德萊(Dunkin Hartley)遠交系天竺鼠靜脈內注射1.0 ml之伊氏藍染料。染料注射45分鐘後，
5 結膜下以組織胺刺激動物們。之後，在組織胺注射30分鐘後，藍色染料之區域外滲進入結膜組織時，觀察局部組織反應。在組織胺注射之前48-72小時，局部施予干擾性RNA至眼睛。在以干擾性RNA治療之組織中，血管滲透性之改變減少，顯示出HRH1功能之抑制。

10 於人類或哺乳動物中，亦可藉由觀察與HRH1有關的病症徵候之改善，來推斷HRH1之抑制，像是與過敏性結膜炎、眼部發炎、皮膚炎、鼻炎、氣喘或過敏有關之徵候的改善。任何，例如，水腫、癢、發炎或對環境挑戰之耐受性之改善，均表示HRH1之抑制。

15 干擾性RNA：於本發明之一具體例中，干擾性RNA(如，siRNA)具有一訊息股以及一反訊息股，且該訊息股與反訊息股包含一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域。於本發明之另外的具體例中，干擾性RNA(如，siRNA)具有一訊息股以及一反訊息股，以及該反訊息股包
20 含一具有至少19個核苷酸與HRH1 mRNA之標靶序列至少接近完全連續互補之區域，而該訊息股包含一具有至少19個核苷酸與HRH1 mRNA之標靶序列至少接近完全連續一致之區域。於本發明之另外的具體例中，該干擾性RNA包含一具有至少13、14、15、16、17或18個連續的核苷酸之

區域，該區域具有部分的序列分別與mRNA內對應的標靶序列之3'端的次末位開始倒數13、14、15、16、17或18個核苷酸互補或具有部分的序列分別與mRNA內對應的標靶序列之3'端的次末位開始倒數13、14、15、16、17或18個核苷酸一致。

該干擾性RNA每一股之長度包含19至49個核苷酸，且可包含具19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48或49個核苷酸之長度。

siRNA之反訊息股係該siRNA之活性引導劑，因為該反訊息股被併入RISC中，因此使RISC能識別具至少部分的互補於該反訊息siRNA股之標靶mRNA，以供打斷或轉錄抑制。

於本發明之具體例中，使用有效的設計工具來選定標靶mRNA序列內之干擾性RNA標靶序列(如，siRNA標靶序列)。之後藉由轉染表達該標靶mRNA之細胞，接著評估以上所述之敲除作用，來測試對應於HRH1標靶序列之干擾性RNA。

用於選擇有關siRNA之標靶序列之技術由下列提供：
Tuschl, T. *et al.*, "The siRNA User Guide," 2004年5月6日校正，可獲自Rockefeller University之網站；Technical Bulletin #506, "siRNA Design Guidelines," Ambion Inc.位於Ambion之網站；以及其它網路為主(web-based)的設計工具，例如Invitrogen、Dharmacon、Integrated DNA Technologies、

Genscript或Proligo網站。一開始的搜尋參數可包括G/C含量介於35%與55%之間，以及siRNA長度介於19與27個核苷酸之間。該標靶序列可能位於該mRNA之編碼區域或5'或3'未轉錄之區域。

- 5 有關HRH1 mRNA之19個核苷酸DNA標靶序列之具體例，存在於序列辨識編號：1之核苷酸285至303處：

5'- CTATCTGCTTGGTCACAGT -3' 序列辨識編號：2。

- 本發明用於標靶序列辨識編號：2之對應的mRNA序列
10 且具有21個核苷酸之股以及2個核苷酸3'突出之siRNA為：

5'- CUAUCUGCUUGGUCACAGUNN -3' 序列辨識編號：3

3'- NNGAUAGACGAACCAGUGUCA -5' 序列辨識編號：4。

- 15 每一個“N”殘基可以是任何的核苷酸(A、C、G、U、T)或改質的核苷酸。該3'端可具有“N”殘基之數目介於1、2、3、4、5與6之間，以及包括1、2、3、4、5與6。於任一股上之“N”殘基可為相同的殘基(如，UU、AA、CC、GG或TT)或其等可為相異的(如，AC、AG、AU、CA、CG、CU、
20 GA、GC、GU、UA、UC或UG)。該3'突出可為相同的或其等可為相異的。於一具體例中，雙股均具有3'UU突出。

本發明用於標靶序列辨識編號：2之對應的mRNA序列且在各股上具有21個核苷酸之股以及3'UU突出之siRNA為：

5'- CUAUCUGCUUGGUCACAGUUU -3' 序列辨識

編號：5

3'- UUGAUAGACGAACCAGUGUCA -5' 序列辨識

編號：6。

- 5 該干擾性RNA亦可具有5'-之核苷酸突出或其可能具有鈍端。本發明用於標靶序列辨識編號：2之對應的mRNA序列且具有19個核苷酸以及鈍端之siRNA為：

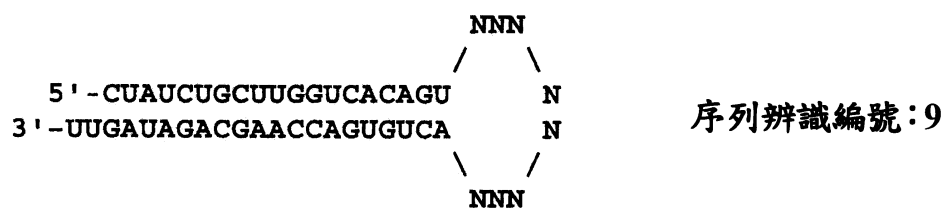
5'- CUAUCUGCUUGGUCACAGU -3' 序列辨識編

號：7

- 10 **3'- GAUAGACGAACCAGUGUCA -5' 序列辨識編**

號：8。

- 雙股的干擾性RNA (如siRNA)之股可連結以形成髮夾狀或莖-環結構(如，shRNA)。本發明標靶序列辨識編號：2之對應的mRNA序列且具有19個鹼基雙股莖區域以及3'UU
15 突出之shRNA為：



- N係核苷酸A、T、C、G、U或熟悉此技藝人士所熟知之改質型。於該環中核苷酸N之數目介於3至23，或5至15，或7至13，或4至9，或9至11之間以及包括3至23，或5至15，
20 或7至13，或4至9，或9至11，或核苷酸N之數目為9。該環中一些核苷酸可能牽涉與該環中其它的核苷酸之鹼基對之交互反應。可用於形成該環之寡核苷酸序列之例子包括

5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002) *Science* 296: 550)以及5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. *et al.* (2002) *RNA* 8:1454)。熟悉此技藝之人士當能認知到，所產生之單鏈寡核苷酸會形成包含能夠與RNAi機構交互反應之雙股區域之莖-環或髮夾結構。

以上所辨識之siRNA標靶序列之3'端可延長，以幫助切酶-基質27個鹼基雙鏈之設計。於HRH1 DNA序列(序列辨識編號：1)中所辨識之19個核苷酸DNA標靶序列(序列辨識編號：2)上延長6個核苷酸，可產生25個核苷酸DNA標靶序列，其存在於序列辨識編號：1之核苷酸789至813處：

**5'- CTATCTGCTTGGTCACAGTAGGGCT -3' 序列
辨識編號：10。**

本發明用於標靶序列辨識編號：10之對應的mRNA序列之切酶-基質27個鹼基雙鏈為：

**5'- CUAUCUGCUUGGUCACAGUAGGGCU -3' 序列
辨識編號：11**

**3'- UUGAUAGACGAACCAGUGUCAUCCCGA -5' 序
列辨識編號：12。**

在該訊息股之3'端的二個核苷酸(如，序列辨識編號：11之CU核苷酸)可為用於提高加工之去氧核糖核酸(即TG)。有關如在此所提供，從19-21個核苷酸標靶序列來設計切酶-基質27個鹼基雙鏈之方法，於Integrated DNA Technologies (IDT)網站以及Kim, D.-H. *et al.*, (February, 2005) *Nature Biotechnology* 23:2; 222-226中有進一步的討

論。

當干擾性RNA係由化學合成產生時，在一股或雙股之5'端之核苷酸的5'位置上磷酸化，可提高siRNA之效力以及所結合的RISC複合物之專一性，但不是必需的，因為磷酸化可能會在細胞內發生。

另外的具體例揭露減少一對象之組織胺受體H1 mRNA之表達之各種方法，其包含：

對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA以及一藥學上可接受之載劑，該干擾性RNA包含擇自於由下列所構成之群組之RNA：

一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸一致；

一具有至少14個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少85%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸互補，或至少85%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷

酸一；以及

一具有至少15、16、17或18個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少80%的序列分別地與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17或18個核苷酸互補，或至少80%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17或18個核苷酸一致，

其中組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。

10 亦揭露一種治療一有此治療需求之對象中與HRH1相關之病症之方法，其包含：

對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，其中

15 該干擾性RNA包含一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸一致；

一具有至少14個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少85%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次

末位開始倒數14個核苷酸互補，或至少85%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸一；以及

- 5 一具有至少15、16、17或18個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少80%的序列分別地與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17或18個核苷酸互補，或至少80%的序列與對應於序列辨識編號：2以及
- 10 序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17或18個核苷酸一致，
- 其中與HRH1相關之病症因此而得到治療。

其它的具體例揭示各種減少一對象之組織胺受體H1 mRNA之表達之方法，其包含：

- 15 對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA以及一藥學上可接受之載劑，該干擾性RNA包含：

一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；

- 20 其中該反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交，且具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編號：1之雜交部分之mRNA至少接近完全連續互補之區域，

其中組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。

各種具體例揭露治療一有此治療需求之對象中與HRH1相關之病症之方法，其包含：

對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，該干擾性RNA包含一核苷酸訊息股、一核苷酸反
5 訊息股以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；

其中該反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交，且具有一具有至少19個核苷
10 酸與對應於序列辨識編號：1之雜交部分之mRNA至少接近完全連續互補之區域，

其中該與HRH1相關之病症因此而得到治療。

亦揭示減少一對象中組織胺受體H1 mRNA之表達之方法，其包含：

15 對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之單股干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，

其中該單股干擾性RNA在生理條件下與對應於包含下列之序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交：核苷酸285、
20 324、410、581、584、660、672、801、817、1045、1059、1089、1157、1209、1223、1241、1253、1265、1363、1391、1488、1521、1624、1670、1673、1784、1873、1875、1985、2086、2087、2226、2297、2420、2421、2485、2603、2647或3431，以及該干擾性RNA具有一與對應於序列辨識編

號：1之雜交部分之mRNA至少接近完全連續互補之區域，
其中組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。

所揭露的亦為一種治療一有此治療需求之對象中與
HRH1相關之病症之方法，其包含：

- 5 對該對象投與一組成物，該組成物包含一雙股siRNA
分子，其透過RNA干擾向下調節HRH1基因之表達，

其中：

該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19至約27個
核苷酸；以及

- 10 該siRNA分子中之一股包含一與對應於HRH1基因之
mRNA實質上互補之核苷酸序列，以致該siRNA分子透過
RNA干擾而直接打斷該mRNA。

另外的具體例揭示一種組成物，其包含一雙股siRNA
分子，其透過RNA干擾向下調節HRH1基因之表達，其中：

- 15 該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19至約27個
核苷酸；以及

該siRNA分子中之一股包含一與對應於HRH1基因之
mRNA實質上互補之核苷酸序列，以致該siRNA分子透過
RNA干擾而直接打斷該mRNA。

- 20 雖然已示出以及說明出本發明之特殊的具體例，但許
多的變體與供選擇的具體例，應能在熟悉此技藝人士之心
裡出現。據此，可預期地本發明僅受附加的申請專利範圍
所限制。

在不逸離本發明之思想與基本特徵之情況下，本發明

可以其它特別的形式體現。所描述的具體例在各方面僅被視為例示性，而非限制性的。因此，本發明之範疇係以附加的申請專利範圍表明，而非前述之說明。落於該申請專利範圍之相等物之含意與範圍內，針對該申請專利範圍之

5 所有的改變，均囊括在該申請專利範圍之範疇內。另外，在此所提及之所有的公開文獻、專利以及申請案，其等之全部內容均在此併入本案以為參考。

範例

表1列出序列辨識編號：1之HRH1 DNA標靶序列之例

10 子，從其中以上述之方法設計本發明之siRNA。HRH1編碼如上所提到之組織胺受體H1。

表1，作為siRNA之HRH1標靶序例

Syk標靶序列	參考序列辨識 編號：1， 起始核苷酸之#	序列辨識編號：
CTATCTGCTTGGTCACAGT	285	2
TGTATGCCGTACGGAGTGA	324	13
GCCGTCGTCATGCCTATGA	410	14
TACCTTAAGTATCGTACCA	581	15
CTTAAGTATCGTACCAAGA	584	16
CCATTCTAGGCTGGAATCA	660	17
GGAATCACTTCATGCAGCA	672	18
GGTTCTATGCCAAGATCTA	801	19
CTACAAGGCCGTACGACAA	817	20
CAGCCAAGAGGATGATAGA	1045	21
ATAGAGAAGTAGACAAACT	1059	22
CACTTGATATTGTGCACAT	1089	23
AGCCATGGCCAGCTCAAGA	1157	24
GCGAGATATCAGAGGATCA	1209	25
GATCAGATGTTAGGTGATA	1223	26
AGCCAATCCTTCTCTCGAA	1241	27
TCTCGAACGGACTCAGATA	1253	28
TCAGATACCACCACAGAGA	1265	29
CTCGCATTCAAGACAGTAT	1363	30
TTGCACATGAACCGCGAAA	1391	31
TCATTGCCTTCTGCAAGAA	1488	32
ATTTGCACATGTTCAACCAT	1521	33
TCTGCATATTCGCTCCTAA	1624	34
TGATCCTTATGATGTCCAA	1670	35

Syk標靶序列	參考序列辨識 編號：1， 起始核苷酸之#	序列辨識編號：
TCCTTATGATGTCCAACAA	1673	36
AGTTCTTAGGCACCATAGA	1784	37
TCAGACCTGTTTCTTGTA	1873	38
AGACCTGTTTCTTGTA	1875	39
CAGACTCATTGTAATTCAA	1985	40
CCTGGAATGGAGCTGTATA	2086	41
CTGGAATGGAGCTGTATAA	2087	42
TTAACAGCTTTCTCCAGAA	2226	43
TGTTTAGAGTGGATAGAAA	2297	44
TTGAATGGTTGCACGTTAA	2420	45
TGAATGGTTGCACGTTAAA	2421	46
GTACTAGGTTTATCTCATT	2485	47
TAGCTAGTTATGTGAGAAA	2603	48
TCAGCTTATTGTAGCATAT	2647	49
GCATACTCTATGTGATTTA	3431	50

如在以上範例中所述的，熟悉此技藝之人士能夠使用表1中所提供之標靶序列資訊，藉由參考序列辨識編號：1之序列位置以及與對序列辨識編號：1互補或接近互補之核苷酸進行加入或缺失，來設計具有長度比在表1中所提供之序列更短或更長之干擾性RNA。

由siRNA以及其它形式的干擾性RNA引導之標靶RNA的斷裂反應係高度序列專一性的。一般而言，含有一序列與該標靶mRNA之一部分一致之核苷酸訊息股以及一與該

標靶 mRNA 之一部分完全互補之核苷酸反訊息股之 siRNA，係在此所述用於抑制 mRNA 之 siRNA 的具體例。然而，在該 siRNA 反訊息股與該標靶 mRNA 之間或該 siRNA 反訊息股與該 siRNA 訊息股之間 100% 序列互補，在本發明之
5 實務上並非必要的。因此，例如，本發明容許因基因突變、品種多形性或進化歧異預期產生的序列變體。

於本發明之一具體例中，該 siRNA 之反訊息股具有至少 19 個核苷酸與該標靶 mRNA 至少接近完全連續互補。在此所使用之“接近完全”，意指該 siRNA 之反訊息股與該標靶
10 mRNA 之至少一部分“實質上互補”以及該 siRNA 之訊息股與該標靶 mRNA 之至少一部分“實質上一致”。熟悉此技藝人士已知之“一致”，係核苷酸序列間經由配對該等序列間核苷酸之順序以及一致性之測定後，序列關聯性之程度。於一具體例中，與該標靶 mRNA 序列具有 80% 以及介於 80% 直
15 至 100% 之間，例如 85%、90% 或 95% 互補之 siRNA 之反訊息股，被視為接近完全互補，且可於本發明中使用。“完全”連續互補係鄰接的鹼基對之標準的華生-克里克鹼基配對。“至少接近完全”連續互補包括在此所使用之“完全”互補。用於決定一致性或互補之電腦方法，係設計成可識別
20 核苷酸序列最大程度的配對，例如 BLASTN (Altschul, S.F., *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410)。

標靶 mRNA (訊息股) 與 siRNA 之一股 (該訊息股) 間之關係係一致的。若有出現時，siRNA 之訊息股亦稱為信使股。標靶 mRNA (訊息股) 與 siRNA 之另一股 (該反訊息股) 間之關

係係互補的。siRNA之反訊息股亦稱為引導股。

以5'至3'方向書寫之核酸序列中，倒數第二個鹼基係最後鹼基之下一個，即緊鄰該3'鹼基之鹼基。以5'至3'方向書寫之核酸序列中，次末位開始倒數13個核酸序列係緊接該3'鹼基之最後13個鹼基，但不包含該3'鹼基之序列。相似地，以5'至3'方向書寫之核酸序列之次末位開始倒數14、15、16、17或18個鹼基，係分別地緊接該3'鹼基之最後14、15、16、17或18個鹼基，但不包含該3'鹼基之序列。

於本發明之一具體例中，連續的核苷酸之區域係一具有至少14個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少85%的序列與對應於由各序列序列辨識號識別之序列之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸互補或至少85%的序列與對應於由各序列序列辨識號識別之序列之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸一致。此片語包括二個核苷酸取代(即， $12/14 = 86\%$ 一致/互補)。

於本發明另外的具體例中，該連續的核苷酸區域係一具有至少15、16、17或18個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少80%的序列與對應於該序列辨識號之序列之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸互補，或至少80%的序列與對應於該序列辨識號之序列之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸一致。此片語包括三個核苷酸取代。

對應於序列辨識編號：1之mRNA中之標靶序列，可在該mRNA之5'或3'未轉譯區域中以及在該mRNA之編碼區

域中。

雙股干擾性RNA之一股或雙股可具有1至6個核苷酸之3'突出，其可為核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸或其混合物。該突出之核苷酸不是鹼基配對的。於本發明之一具體
5 例中，該干擾性RNA包含TT或UU之3'突出。於本發明之另一具體例中，該干擾性RNA包含至少一個鈍端。該終端通常具有5'磷酸鹽基團或3'羥基基團。於另一具體例中，該反訊息股具有5'磷酸鹽基團，而該訊息股具有5'羥基基團。於又另一具體例中，該終端進一步經由共價添加其它分子或
10 官能基團進行改質。

該雙股siRNA之訊息股與反訊息股可呈如上所述，由二個單股形成的雙鏈，或可為單一分子，此時互補的區域係鹼基配對的且由髮夾環共價地聯繫，以便形成一單股。一般認為髮夾狀在細胞內會被稱作切酶(dicer)之蛋白質打
15 斷，以形成具二個個別鹼基配對的RNA分子之干擾性RNA。

藉由一或多個核苷酸之加入、缺失、取代或修飾，干擾性RNA可能與自然產生的RNA不同。可在該干擾性RNA之5'端、3'端或中間結合非核苷酸材料。此修飾通常係設計成可增加該干擾性RNA之核酶抗性，改善細胞之攝入、提
20 高細胞標靶性、幫助追縱該干擾性RNA、進一步改善安定性或減少活化該干擾素路徑之可能性。例如，干擾性RNA可在突出端包含嘌呤核苷酸。用，例如，吡咯烷酮接頭，於siRNA分子之訊息股的3'端結合膽固醇，亦可提供siRNA安定性。

進一步的修飾包括，例如，3'終端的生物素分子(一種已知具有細胞穿透特性的胜肽)、奈米粒子、擬肽類物質、螢光染料或樹枝狀聚合物。

本發明之具體例中，可修飾核苷酸之鹼基部分、糖部分或磷酸鹽部分之分子與功能。修飾包括以，例如，烷基、烷氧基、胺基、去氫、鹵基、羥基、硫醇基或其等之組合取代。核苷酸可以具有較高安定性之類似物取代，諸如以去氧核糖核苷酸取代核糖核苷酸，或具有糖改質物，像是以，例如，2'胺基基團、2' O-甲基基團、2'甲氧乙基基團或2'-O, 4'-C亞甲基橋，取代2' OH基團。核苷酸之嘌呤或嘧啶類似物包括黃嘌呤、次黃嘌呤、氮雜嘌呤、甲硫腺嘌呤、7-去氫-腺苷以及O-與N-改質的核苷酸。該核苷酸之磷酸鹽基團，可利用以氮或硫(硫代磷酸酯)取代磷酸鹽基團之一或多個氧進行改質。改質物可用於，例如，提供官能性、改善安定性或滲透性或引導局部化或標靶。

干擾性RNA之反訊息股可以有不會與序列辨識編號：1之一部分互補之區域。非互補之區域可在互補區域之3'、5'或二端，或二個互補區域之間。

干擾性RNA可外源性地利用化學合成、活體外轉錄或利用切酶(dicer)或其它具相似活性之適當的核酶打斷較長的雙股RNA而產生。使用習用的DNA/RNA合成器，從保護的核糖核苷酸亞磷醯胺產生之化學合成的干擾性RNA，可由諸如Ambion Inc. (Austin, TX)、Invitrogen (Carlsbad, CA)或Dharmacon (Lafayette, CO)之供應商獲得。干擾性RNA可

經由，例如，以溶劑或樹脂萃取、沈澱、電泳、色層分析或其等之組合進行純化。選擇性地，若需純化的話，可使用僅需稍微純化之干擾性RNA，以避免樣品於處理過程而流失。

- 5 干擾性RNA亦可內源地由質體或病毒表達載體表達，或由最小化的表達匣表達，例如，PCR產生的片段，其包含針對干擾性RNA之一或多個起動子以及一適當的樣版。供shRNA用之市售以質體為主的表達載體之例子包括pSilencer系列 (Ambion, Austin, TX) 與 pCpG-siRNA
- 10 (InvivoGen, San Diego, CA)之成員。供干擾性RNA之表達之病毒載體可由各種病毒衍生而來，包括腺病毒、腺相關病毒、慢病毒(如，HIV、FIV以及EIAV)以及皰疹病毒。供shRNA表達之市售病毒載體之例子包括pSilencer adeno (Ambion, Austin, TX) 與 pLenti6/BLOCK-iT™-DEST (Invitrogen,
- 15 Carlsbad, CA)。病毒載體之選擇、從該載體表達該干擾性RNA之方法以及傳送該病毒載體之方法係此技藝習知之技藝。用於生產PCR產生的shRNA表達匣之套組包括Silencer Express (Ambion, Austin, TX)以及siXpress (Mirus, Madison, WI)。第一干擾性RNA可透過能夠表達該第一干擾性RNA
- 20 之第一表達載體於活體內表達而投與，第二干擾性RNA可透過能夠表達該第二干擾性RNA之第二表達載體於活體內表達而投與，或二種干擾性RNA可透過能夠表達二種干擾性RNA之單一表達載體於活體內表達而投與。

干擾性RNA可由熟悉此技藝之人士所熟知之各種真核

起動子表達，包括諸如U6或H1起動子之pol III起動子或諸如巨細胞病毒起動子之pol II起動子。熟悉此技藝之人士當能認知到，亦可將此等起動子改造成能夠誘導性的表達該干擾性RNA。

- 5 在生理條件下之雜交：於本發明之特別的具體例中，干擾性RNA之反訊息股會呈RISC複合物之一部分，在活體內與mRNA雜交。

以上所述活體外雜交之分析，可提供一種預測候選的siRNA與標靶之間之結合是否具有專一性之方法。然而，在
10 RISC複合物之背景下，在活體外，以反訊息股專一性的打斷標靶之作用，亦可在沒有顯示出高度嚴苛之雜交條件下發生。

單股干擾性RNA：如上所述，干擾性RNA最後是呈單股形式作用。已發現單股(ss)干擾性RNA會造成mRNA沈
15 默，雖然其效果比雙股的RNA差。因此，本發明之具體例亦提供投與一種單股干擾性RNA，其在生理條件下與序列辨識編號：1之一部分雜交，且具有一具有至少19個核苷酸與序列辨識編號：1之雜交部分至少接近完全互補之區域。該單股干擾性RNA具有與上述雙股干擾性RNA相同19至49
20 個核苷酸之長度。該單股干擾性RNA具有5'磷酸鹽或在原處或在活體內於該5'位置處被磷酸化。術語“5'磷酸化”係用於描述，例如，具有依附上磷酸鹽基團之多核苷酸或寡核苷酸，其中該磷酸鹽基團之依附係透過酯連繫該多核苷酸或寡核苷酸5'端之糖(如，核糖、去氧核糖或相同之類似物)

的C5羥基而得。

單股干擾性RNA係化學合成的，或經由活體外之轉錄或與雙股干擾性RNA一樣內源地從載體或表達匣表達出來的。5'磷酸鹽基團可透過激酶而加入，或5'磷酸鹽可因核酶打斷RNA而產生。傳送方式與雙股干擾性RNA一樣。於一具體例中，投與一具有保護端以及核酶抗性改質物之單股干擾性RNA進行沈默作用。可將單股干擾性RNA予以乾燥以供貯存，或將其溶於水溶液中。該溶液可含有緩衝液或鹽類，以抑制黏接或提供安定性。

10 髮夾狀干擾性RNA：髮夾狀干擾性RNA係一種單一分子(如，單寡核苷酸鏈)，其包含呈莖-環或髮夾結構(如，shRNA)之干擾性RNA之訊息股與反訊息股。例如，shRNA可由DNA載體表達出來，其中編碼干擾性RNA訊息股之DNA寡核苷酸與編碼干擾性RNA逆互補反訊息股之DNA寡核苷酸，透過短的隔件而結合在一起。假如所選之表達載體需要，可加入形成限制位置之3'端T's以及核苷酸。所產生之RNA轉錄產物會反折到自己上面，而形成莖-環結構。

20 投與模式：干擾性RNA可透過，例如，氣霧、頰、皮膚、皮膚內、吸入、肌肉內、鼻內、眼內、肺內、靜脈內、腹膜內、鼻、眼部、口服、耳部、非口服的、貼片、皮下、舌下、局部或穿皮投與傳送。

可經由下列方式直接投與至眼睛：透過諸如眼周圍、結膜、筋膜囊下(subtenon)、前房內、玻璃體內、眼內、視網膜下、結膜下、眼球後、小管內或脈絡膜上之眼部組織

投與：經注射，使用導管或其它放置裝置直接施用於眼睛，諸如視網膜丸、眼內鑲嵌物、栓劑或包含多孔性、非多孔性或凝膠狀材料之植入物；經由局部眼部滴液或軟膏；或經由在盲管(cul-de-sac)中或經鞏膜(transscleral)或眼睛內

5 植入緩釋裝置。前房內注射可穿過角膜進入前房，使該劑到達小梁組織網。小管內注射可進入排出施萊姆氏管之靜脈收集管或進入施萊姆氏管。其它投與模式包括錠劑、丸劑以及膠囊。

可直接透過，例如，局部耳部滴液或軟膏、耳朵中之

10 緩釋裝置或耳旁之植入物直接投與至耳朵。局部投與包括耳部肌肉內、鼓膜腔以及耳蝸注射之投與途徑。此外，可藉由放置吸滿干擾性RNA之明膠海棉或相似的吸收物與吸附產品於內耳，靠著中耳/內耳之圓窗膜或鄰近的結構來投與劑。

15 可透過，例如，氣霧化的製品以及經由吸入器或噴霧器吸入而直接投與至肺。

對象：有與HRH1相關之病症之治療需求或有發展成與HRH1相關之病症之風險之對象，係具有與HRH1相關之病症或有發展成與HRH1相關之病症之風險之人類或其它哺

20 乳動物。該等與HRH1相關之病症係諸如，例如，與在此所述之HRH1之不欲的或不適當的表達或活化有關聯之過敏性結膜炎、眼部發炎、皮膚炎、鼻炎、氣喘或過敏。

與此病症有關聯之眼部結構可包括，例如，眼睛、視網膜、脈絡膜、晶體、角膜、小梁組織網、虹膜、視神經、

視神經頭、鞏膜、水漾腔、玻璃體腔、睫狀體或後房部分。

與此病症有關聯之耳部結構包括，例如，內耳、中耳、外耳、鼓室或膜、耳蝸或耳咽管。

與此病症有關聯之肺部結構可包括鼻子、嘴巴、咽頭、
5 喉頭、支氣管、氣管、脊(分開右與左主支氣管之開口之橋樑)以及肺，特別係下肺，諸如細支氣管與肺泡。

對象亦可為耳細胞、肺細胞、眼細胞、細胞培養、器官或回體(*ex vivo*)器官或組織。

配方與劑量：藥學配方包含本發明之干擾性RNA或其
10 等之鹽類高達99重量%，混合與諸如水、緩衝液、食鹽水、甘油、玻璃酸、甘露糖醇等等之生理上可接受之載劑。

本發明之干擾性RNA係以固體、溶液、懸浮液或乳狀液之形式投與。下列係本發明之可能的具體配方之例子。

	數量，單位重量%
干擾性RNA	高達99；0.1-99；0.1 – 50；0.5 – 10.0
羥丙基甲基纖維素	0.5
氯化鈉	0.8
氯化苯二甲烴銨	0.01
EDTA	0.01
NaOH/HCl	適量pH 7.4
純水(無RNase的)	適量100 MI

	數量，單位：重量%
干擾性RNA	高達99；0.1-99；0.1 – 50；0.5 – 10.0
磷酸鹽緩衝的食鹽水	1.0
氯化苯二甲煙銨	0.01
聚山梨糖醇酯80	0.5
純水(無RNase的)	適量至100%

	數量，單位：重量%
干擾性RNA	高達99；0.1-99；0.1 – 50；0.5 – 10.0
磷酸一鈉	0.05
磷酸氫二鈉(無水)	0.15
氯化鈉	0.75
EDTA二鈉	0.05
聚氧乙烯蓖麻油EL (Cremophor EL)	0.1
氯化苯二甲煙銨	0.01
HCl和/或NaOH	pH 7.3-7.4
純水(無RNase的)	適量至100%
氯化鈉	0.75

	數量，單位：重量%
干擾性RNA	高達99；0.1-99；0.1 – 50；0.5 – 10.0
磷酸鹽緩衝的食鹽水	1.0
羥丙基- β -環葡聚糖	4.0
純水(無RNase的)	適量至100%

一般而言，本發明具體例之干擾性RNA之有效量在標靶細胞的表面處，會產生細胞外濃度從100 pM至100 nM或從1 nM至50 nM或從5 nM至約10 nM或約25 nM。欲達到此局部濃度所需之劑量會隨著許多因素而改變，包括傳送方法、
5 傳送位置、介於該傳送位置與該標靶細胞或組織間細胞層的數目、傳送係局部或系統性的，等等。在傳送位置的濃度可能相當高於其在該標靶細胞或組織之表面上的濃度。每天傳送局部組成物至該標靶器官一至四次，或根據有經驗的臨床醫師針對投藥途徑之考慮，以延長的傳送計劃傳
10 送，像是根據每天、每週、二週、每月或更長。該配方之pH值約pH 4-9或pH 4.5至pH 7.4。

用針對對抗HRH1 mRNA之siRNA治療病人，預期優於用小分子之治療，藉由增加作用的期間，從而使能夠減少投藥之頻率以及得到較好的病人順從性。

15 配方之有效量應視諸如，例如，該對象之年齡、種族以及性別、與HRH1相關之病症之嚴重性、標靶基因轉錄/蛋白質替換之速率、干擾性RNA之強度以及干擾性RNA之安定性之因素而定。於一具體例中，該干擾性RNA係透過局部傳送至標靶器官，且在治療劑量下到達含組織胺受體
20 之組織，藉此改善與HRH1相關的進程。

可接受之載劑：可接受之載劑意指該等會引起至多輕微至無眼睛刺激，需要的話，提供適合的防腐以及於同質之劑型中傳送一或多種本發明之干擾性RNA之載劑。供投與本發明之具體例之干擾性RNA之可接受的載劑包括，陽

- 離子脂質為主的轉染試劑 TransIT®-TKO (Mirus Corporation, Madison, WI)、LIPOFECTIN®、Lipofectamine、OLIGOFECTAMINE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) 或 DHARMAFECT™ (Dharmacon, Lafayette, CO); 聚陽離子，
- 5 諸如聚乙烯亞胺；陽離子肽類，諸如 Tat、聚精胺酸或穿膜肽 (Antp 胜肽)；或微脂粒。微脂粒是從，例如，標準的成囊 (vesicle-forming) 脂質以及諸如膽固醇之固醇形成，且可包括標靶分子，諸如，對內皮表面抗原具有結合親和力之單株抗體。此外，該微脂粒可為聚乙二醇化微脂粒。
- 10 該干擾性 RNA 可於溶液中、懸浮液中或生物可溶蝕的或非生物可溶蝕的傳送裝置中傳送。該干擾性 RNA 可單獨傳送或呈具有共價結合特性之組成形式傳送。該干擾性 RNA 亦可與陽離子脂質類、陽離子胜肽類或陽離子聚合物類複合；與具核酸結合特性之蛋白質、融合蛋白質或蛋白質區域(如，精蛋白)複合；或包覆於奈米粒子中。組織或細胞專一性的傳送，可藉由包含諸如抗體或抗體片段之適當的標靶部分完成。
- 15

- 在眼睛、耳部或肺傳送方面，干擾性 RNA 可與眼科、耳部或肺可接受之防腐劑、共溶劑、界面活性劑、增稠劑、
- 20 滲透增強劑、緩衝液、氯化鈉或水結合，以形成水性、無菌之懸浮液或溶液。溶液配方可藉由將該干擾性 RNA 溶於生理上可接受之等張水性緩衝液中而製得。此外，該溶液可包括可接受之界面活性劑，以幫助溶解該抑制劑。可於本發明之組成物中加入諸如羥甲基纖維素、羥乙基纖維

素、甲基纖維素、聚乙烯吡咯烷酮或類似物之黏度增加劑，以改善化合物之滯留量。

為製備無菌軟膏配方，將該干擾性RNA與防腐劑於諸如礦物油、液體羊毛脂或白色礦脂之適當的載體中結合。

- 5 根據業界熟知之方法，無菌凝膠配方可藉由將該干擾性RNA懸浮於，例如，CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC)或類似物之組合物所製得之親水性鹼中而製得。例如，VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX)可用於眼內注射。當干擾性RNA在有興趣之器官或組織
- 10 中之穿透性較低時，本發明之其它組成物可包含諸如聚氧乙烯蓖麻油與TWEEN® 80 (單月桂酸山梨糖聚氧乙烯，Sigma Aldrich, St. Louis, MO)之滲透增強劑。

- 套組：本發明之具體例提供一種套組，其包括用於減少細胞中在此所述之mRNA之表達的試劑。該套組包含
- 15 siRNA或shRNA表達載體。在siRNA與非病毒性shRNA表達載體方面，該套組亦可包含轉染試劑或其它適合的傳送載劑。在病毒性shRNA表達載體方面，該套組可包含該病毒載體和/或供用於病毒載體產品之必須組份(如，包裝細胞株以及包含該病毒載體樣版之載體以及供包裝之額外的輔助
- 20 載體)。該套組亦包含陽性與陰性控制組siRNA或shRNA表達載體(如，非標靶性控制組siRNA或標靶不相關之mRNA之siRNA)。該套組亦可包含用於評估計劃中的標靶基因之敲除作用的試劑(如，用於定量PCR，以偵測該標靶mRNA之引子與探針和/或用於西方點墨法，抗對應的蛋白質之抗

體)。選擇性地，該套組可包含siRNA序列或shRNA序列，以及在活體外轉錄或建構shRNA表達載體來產生siRNA時所必須之說明書與材料。

進一步提供呈套組形式之藥學組合物，其呈包裝組合形式時，包括一適合接收一與其緊密限制之容器工具之運載工具，以及一包括干擾性RNA組成物以及可接受之載劑之第一容器工具。需要的話，此套組可進一步包括一或多種各種習知的藥學套組組份，像是，例如，具有一或多種藥學上可接受之載劑之容器，對熟悉此技藝之人士而言顯而易見之額外的容器等等。該套組亦可包括呈插入物或標籤形式之印刷說明，其指示欲投與組份的數量、投與方式之指南和/或有關混合該等組成物之指南。

以下列方法可評估在活體外，HRH1干擾性RNA敲除，例如，人類角膜表皮細胞中內源性HRH1表達位準之能力。在於KGM角質細胞培養基(Cambrex, East Rutherford, NJ)中進行轉染之前24個小時，先將經轉化的人類角膜表皮細胞，例如，CEPI-17細胞株(Offord *et al.* (1999) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **40**:1091-1101)製成薄板。使用DharmaFECT™ 1 (Dharmacon, Lafayette, CO)，依據製造商之說明書，在HRH1干擾性RNA濃度範圍從0.1 nM – 100 nM下進行轉染。非標靶控制組干擾性RNA以及lamin A/C干擾性RNA (Dharmacon)作為控制組。使用，例如，TAQMAN®正向與反向引子以及包含該標靶位置之探針組(Applied Biosystems, Foster City, CA)，在轉染後24小時進行定量

PCR(qPCR)，來評估標靶mRNA位準。可經由，例如，西方點墨法評估轉染後將近72個小時標靶蛋白質之位準(實際時間取決於蛋白質的轉換率)。從培養的細胞中分離出RNA和/或蛋白質之標準方法，係熟悉此技藝人士所熟知的。為
5 減少非專一性、脫靶反應之機會，所以使用盡可能低濃度的HRH1干擾性RNA，其在標靶基因之表達方面，可產生所欲的敲除位準。

在此所引述之參考文獻，其等提供例示程序之範圍或針對該等在此所述之其它詳細的補充，均明確地在此併入
10 本案以為參考。

根據本發明之揭示內容，熟悉此技藝之人士應能領會，在此所述之具體例之顯而易見的改質物可在不逸離本發明之技術思想之情況下製得。根據本發明之揭示內容，在此所揭示之具體例均可在不需過度的實驗之情況下製得
15 或執行。本發明之完整的範疇述於揭示內容以及其相等的具體例中。本說明書不應被解釋成不當地限縮本發明所主張之完整的保護範疇。

【圖式簡單說明】

(無)

20 【主要元件符號說明】

(無)

序 列 表

<110> Yanni, John M.
Chatterton, Jon E.
Gamache, Daniel A.
Miller, Steven T.

<120> RNA 干擾(RNAi)所媒介之與組織胺受體 H1 相關之病症之抑制作用

<130> 45263-P022WO

<150> 60/791,847

<151> 2006-04-13

<160> 43

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 2672
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1	
aggaagagcc gcgggccccgg cggctgaggc caccgccggcg gcggctggag agcgaggagg	60
agcggggtggc cccgcgctgc gcccgccttc gcctcacctg gcgcaggtgg acacctgcgc	120
aggtgtgtgc cctccggccc ctgaagcatg gccagcagcg gcatggctga cagcgccaac	180
cacctgccct tctttttcgg caacatcacc cgggaggagg cagaagatta cctgggtccag	240
gggggcatga gtgatgggct ttatttgctg cgccagagcc gcaactacct gggtggcttc	300
gccctgtccg tggcccacgg gaggaaggca caccactaca ccatcgagcg ggagctgaat	360
ggcacctacg ccatcgccgg tggcaggacc catgccagcc ccgccgacct ctgccactac	420
cactcccagg agtctgatgg cctgggtctgc ctctcaaga agcccttcaa ccggcccca	480
ggggtgcagc ccaagactgg gccctttgag gatttgaagg aaaacctcat cagggaatat	540
gtgaagcaga catggaacct gcagggtcag gctctggagc aggccatcat cagtcagaag	600
cctcagctgg agaagctgat cgctaccaca gccatgaaa aaatgccttg gttccatgga	660
aaaatctctc gggaagaatc tgagcaaatt gtcctgatag gatcaaagac aaatggaaag	720
ttcctgatcc gagccagaga caacaacggc tcctacgcc tgtgcctgct gcacgaagg	780
aaggtgctgc actatcgcat cgacaaagac aagacaggga agctctccat ccccgaggga	840
aagaagttcg acacgctctg gcagctagtc gagcattatt cttataaagc agatggtttg	900
ttaagagttc ttactgtccc atgtcaaaaa atcggcacac agggaaatgt taattttgga	960

ggccgtccac aacttccagg ttcccatcct gcgacttggc cagcgggtgg aataatctca 1020
 agaatcaaat catactcctt cccaaagcct ggccacagaa agtcctcccc tgcccaaggg 1080
 aaccggcaag agagtactgt gtcattcaat ccgtatgagc cagaacttgc accctgggct 1140
 gcagacaaag gccccagag agaagcccta cccatggaca cagaggtgta cgagagcccc 1200
 tacgcggacc ctgaggagat caggcccaag gaggtttacc tggaccgaaa gctgctgacg 1260
 ctggaagaca aagaactggg ctctggtaat tttggaactg tgaaaaaggg ctactaccaa 1320
 atgaaaaaag ttgtgaaaac cgtggctgtg aaaatactga aaaacgaggc caatgacccc 1380
 gctcttaaag atgagttatt agcagaagca aatgtcatgc agcagctgga caaccgtac 1440
 atcgtgcgca tgatcgggat atgcgaggcc gagtcctgga tgctagttaa ggagatggca 1500
 gaacttggtc cctcaataa gtatttgcag cagaacagac atgtcaagga taagaacatc 1560
 atagaactgg ttcattcagg ttccatgggc atgaagtact tggaggagag caattttgtg 1620
 cacagagatc tggctgcaag aaatgtgttg ctagttaccc aacattatgc caagatcagt 1680
 gatttcggac tctccaaagc actgcgtgct gatgaaaact actacaaggc ccagacccat 1740
 ggaaagtggc ctgtcaagtg gtacgctccg gaatgcatca actactacaa gttctccagc 1800
 aaaagcgatg tctggagctt tggagtgttg atgtgggaag cattctccta tgggcagaag 1860
 ccatatcgag ggatgaaagg aagtgaagtc accgctatgt tagagaaaagg agagcggatg 1920
 ggggtgccctg cagggtgtcc aagagagatg tacgatctca tgaatctgtg ctggacatac 1980
 gatgtggaaa acaggcccgg attcgagca gtggaactgc ggctgcgcaa ttactactat 2040
 gacgtggatg actaaccgct cccgcacctg tcgggtggctg cctttgatca caggagcaat 2100
 cacaggaaaa tgtatccaga ggaattgatt gtcagccacc tccctctgcc agtcgggaga 2160
 gccaggcttg gatggaacat gcccacaact tgtacccaa agcctgtccc aggactcacc 2220
 ctccacaaag caaaggcagt cccgggagaa aagacggatg gcaggatcca aggggctagc 2280
 tggatttggt tgttttcttg tctgtgtgat ttccatacag gttattttta cgatctgttt 2340
 ccaaatccct ttcatgtctt tccacttctc tgggtcccgg ggtgcatttg ttactcatcg 2400
 ggcccaggga cattgcagag tggcctagag cactctcacc ccaagcggcc ttttccaaat 2460
 gcccgaaggat gccttagcat gtgactcctg aagggaaggc aaaggcagag gaatttggct 2520
 gcttctacgg ccatgagact gatccctggc cactgaaaag ctttcctgac aataaaaatg 2580
 tttttaggct ttaaaaagaa aatcaagttt gaccagtgc gtttctaagc atgtagccag 2640

ttaaggaaag aaagaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2672

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 標靶序列

<400> 2
gcactatcgc atcgacaaa 19

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 具 3'NN 之訊息股

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> 核糖核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 任一的, A, T/U, C, G

<400> 3
gcacuaucgc aucgacaaan n 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 具 3'NN 之反訊息股

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> 核糖核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)

<223> 任一的，A，T/U，C，G

<400> 4
uuugucgaug cgauagugcn n 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 股息股

<400> 5
gcacuaucgc aucgacaaau u 21

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 反股息股

<400> 6
uuugucgaug cgauagugcu u 21

<210> 7
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 股息股

<400> 7
gcacuaucgc aucgacaaa 19

<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 反股息股

<400> 8
uuugucgaug cgauagugc 19

<210> 9
<211> 48

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> Hairpin duplex with loop

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> 核糖核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(27)
<223> 任一的, A, T/U, C, G

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(48)
<223> 核糖核苷酸

<400> 9
gcacuaucgc aucgacaaan nnnnnnnuuu gucgaugcga uagugcuu 48

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 股息股

<400> 10
gcactatcgc atcgacaaag acaag 25

<210> 11
<211> 25
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> 股息股

<400> 11
gcacuaucgc aucgacaaag acaag 25

<210> 12
<211> 27
<212> RNA
<213> 人工的

<220>

<223>	反股息股	
<400>	12	
	cuugucuuug ucgaugcgau agugcuu	27
<210>	13	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	13	
	actatcgcat cgacaaaga	19
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	14	
	ggcagctagt cgagcatta	19
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	15	
	gcagctagtc gagcattat	19
<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	16	
	cagctagtcg agcattatt	19
<210>	17	
<211>	19	

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	17	
	agtcgagcat tattcttat	19
<210>	18	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	18	
	gtcgcagcatt attcttata	19
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	19	
	agttatttagc agaagcaaa	19
<210>	20	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	20	
	cgtacatcgt gcgcatgat	19
<210>	21	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	21	
	gagtcctgga tgctagtta	19

<210>	22	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	22	
	agtcctggat gctagttat	19
<210>	23	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	23	
	acagacatgt caaggataa	19
<210>	24	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	24	
	aggataagaa catcataga	19
<210>	25	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	25	
	tgatttcgga ctctccaaa	19
<210>	26	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

<223> 標靶序列

<400> 26
catggaaagt ggcctgtca 19

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 標靶序列

<400> 27
atggaaagtg gcctgtcaa 19

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 標靶序列

<400> 28
ctccggaatg catcaacta 19

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 標靶序列

<400> 29
gaagtgaagt caccgctat 19

<210> 30
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 標靶序列

<400> 30
gatgtacgat ctcatgaat 19

<210> 31
<211> 19

<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	31	
	gctgcgcaat tactactat	19
<210>	32	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	32	
	actatgacgt ggtgaacta	19
<210>	33	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	33	
	ttacgatctg tttccaaat	19
<210>	34	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	34	
	tacgatctgt ttccaaatc	19
<210>	35	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	35	
	cttagcatgt gactcctga	19

<210>	36	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	36	
	aggaatttgg ctgcttcta	19
<210>	37	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	37	
	tgcttctacg gccatgaga	19
<210>	38	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	38	
	tctacggcca tgagactga	19
<210>	39	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	39	
	aagctttcct gacaataaa	19
<210>	40	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		

<223>	標靶序列	
<400>	40	
	ccagtgcagt ttctaagca	19
<210>	41	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	41	
	gtggaataat ctcaagaat	19
<210>	42	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	42	
	agcactgcgt gctgatgaa	19
<210>	43	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	標靶序列	
<400>	43	
	cggaatgcat caactacta	19

五、中文發明摘要：

本發明提供RNA干擾來抑制組織胺受體H1 mRNA的表達，特別是，供用於治療具有與HRH1相關之病症或有發展成與HRH1相關之病症之風險之病人，該等病症諸如過敏性結膜炎、眼部發炎、皮膚炎、鼻炎、氣喘或過敏。

六、英文發明摘要：

RNA interference is provided for inhibition of histamine receptor H1 mRNA expression, in particular, for treating patients having an HRH1-related condition or at risk of developing an HRH1-related condition such as allergic conjunctivitis, ocular inflammation, dermatitis, rhinitis, asthma, or allergy.

十、申請專利範圍：

1. 一種干擾性RNA於製造用於減少一對象之組織胺受體H1 mRNA的表達之藥劑上之用途，其包含：

對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有
 5 有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA以及一藥學上可
 接受之載劑，該干擾性RNA包含擇自於由下列所構成之
 群組之區域：

一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有
 至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨
 10 識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'
 端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%的序
 列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13－序
 列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始
 倒數13個核苷酸一致；

15 一具有至少14個連續的核苷酸之區域，該區域具有
 至少85%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨
 識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'
 端的次末位開始倒數14個核苷酸互補，或至少85%的序
 列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13－序
 20 列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始
 倒數14個核苷酸一致；以及

一具有至少15、16、17或18個連續的核苷酸之區
 域，該區域具有至少80%的序列分別地與對應於序列辨
 識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50

中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17
或18個核苷酸互補，或至少80%的序列與對應於序列辨
識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50
中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17
5 或18個核苷酸一致，

其中該組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。

2. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該組成物進一步包
含一第二干擾性RNA，其具有19至49個核苷酸長度以及
包含一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有
10 至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨
識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之第二mRNA
之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%
的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：
13－序列辨識編號：50中任一個之第二mRNA之3'端的
15 次末位開始倒數13個核苷酸一致。

3. 如申請專利範圍第1或2項之用途，其中該干擾性RNA係
shRNA。

4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項之用途，其中該組成
物係透過氣霧、頰、皮膚、皮膚內、吸入、肌肉內、鼻
20 內、眼內、肺內、靜脈內、腹膜內、鼻、眼部、口服、
耳部、非口服的、貼片、皮下、舌下、局部或穿皮途徑
投與。

5. 如申請專利範圍第1至4項中任一項之用途，其中該干擾
性RNA之投與，係透過於活體內，由能夠表達該干擾性

RNA之表達載體表達出來。

6. 如申請專利範圍第1至5項中任一項之用途，其中該干擾性RNA為miRNA或siRNA。

5 7. 一種干擾性RNA於製造用於治療一有此治療需求之對象中與HRH1相關之病症之藥劑上之用途，其包含：

對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，其中

10 該干擾性RNA包含一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之
15 mRNA之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸一致；

一具有至少14個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少85%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸互補，或至少85%的序
20 列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數14個核苷酸一致；以及

一具有至少15、16、17或18個連續的核苷酸之區域，該區域具有至少80%的序列分別地與對應於序列辨

識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50
中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17
或18個核苷酸互補，或至少80%的序列與對應於序列辨
識編號：2以及序列辨識編號：13－序列辨識編號：50
5 中任一個之mRNA之3'端的次末位開始倒數15、16、17
或18個核苷酸一致，

其中該與HRH1相關之病症因此而得到治療。

8. 如申請專利範圍第7項之用途，其中該組成物進一步包
含一第二干擾性RNA，其具有19至49個核苷酸長度以及
10 包含一具有至少13個連續的核苷酸之區域，該區域具有
至少90%的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨
識編號：13－序列辨識編號：50中任一個之第二mRNA
之3'端的次末位開始倒數13個核苷酸互補，或至少90%
的序列與對應於序列辨識編號：2以及序列辨識編號：
15 13－序列辨識編號：50中任一個之第二mRNA之3'端的
次末位開始倒數13個核苷酸一致。
9. 如申請專利範圍第7或8項之用途，其中該干擾性RNA係
shRNA。
10. 如申請專利範圍第7至9項中任一項之用途，其中該組成
20 物係透過氣霧、頰、皮膚、皮膚內、吸入、肌肉內、鼻
內、眼內、肺內、靜脈內、腹膜內、鼻、眼部、口服、
耳部、非口服的、貼片、皮下、舌下、局部或穿皮途徑
投與。
11. 如申請專利範圍第7至10項中任一項之用途，其中該干

擾性RNA之投與，係透過於活體內，由能夠表達該干擾性RNA之表達載體表達出來。

12. 如申請專利範圍第7至11項中任一項之用途，其中該干擾性RNA為miRNA或siRNA。
- 5 13. 如申請專利範圍第7至12項中任一項之用途，其中該對象係人類，以及該人類具有與HRH1相關之病症或有發展成與HRH1相關之病症之風險。
14. 一種干擾性RNA於製造用於減少一對象之組織胺受體H1 mRNA的表達之藥劑上之用途，其包含：
 - 10 對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA以及一藥學上可接受之載劑，該干擾性RNA包含：
 - 一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；
 - 15 其中該反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交，且具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編號：1之雜交部分的mRNA至少接近完全連續互補之區域，
 - 其中該組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。
 - 20 15. 如申請專利範圍第14項之用途，其中該對象係人類，以及該人類具有與HRH1相關之病症或有發展成與HRH1相關之病症之風險。
 16. 如申請專利範圍第14或15項之用途，其中該干擾性RNA之反訊息股被設計成可標靶對應於包含下列之序列辨

識編號：1之mRNA：核苷酸285、324、410、581、584、
660、672、801、817、1045、1059、1089、1157、1209、
1223、1241、1253、1265、1363、1391或1488，或

5 對應於包含下列之序列辨識編號：1之mRNA：核
苷酸1521、1624、1670、1673、1784、1873、1875、1985、
2086、2087、2226、2297、2420、2421、2485、2603、
2647或3431。

17. 如申請專利範圍第14至16項中任一項之用途，其進一步
包含對該對象投與一第二干擾性RNA，其具有19至49
10 個核苷酸長度以及包含：

一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至
少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；

其中該第二干擾性RNA之反訊息股在生理條件下
與對應於序列辨識編碼：1之第二部分的mRNA雜交，
15 以及該反訊息股具有一具有至少19個核苷酸與對應於
序列辨識編碼：1之第二雜交部分的mRNA至少接近完
全連續互補之區域。

18. 如申請專利範圍第14至17項中任一項之用途，其中該核
苷酸訊息股以及該核苷酸反訊息股經由環核苷酸股而
20 連接在一起。

19. 如申請專利範圍第14至18項中任一項之用途，其中該組
成物係透過氣霧、頰、皮膚、皮膚內、吸入、肌肉內、
鼻內、眼內、肺內、靜脈內、腹膜內、鼻、眼部、口服、
耳部、非口服的、貼片、皮下、舌下、局部或穿皮途徑

投與。

20. 如申請專利範圍第14至19項中任一項之用途，其中該干擾性RNA之投與，係透過於活體內，由能夠表達該干擾性RNA之表達載體表達出來。

5 21. 一種干擾性RNA於製造用於治療一有此治療需求之對象中與HRH1相關之病症之藥劑上之用途，其包含：

對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，該干擾性RNA包含一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；

10

其中該反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編碼：1之一部分的mRNA雜交，且具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編碼：1之雜交部分的mRNA至少接近完全連續互補之區域，

15

其中該與HRH1相關之病症因此而得到治療。

22. 如申請專利範圍第21項之用途，其中該對象係人類，以及該人類具有與HRH1相關之病症或有發展成與HRH1相關之病症之風險。

20 23. 如申請專利範圍第21或22項之用途，其中該干擾性RNA之反訊息股被設計成可標靶對應於包含下列之序列辨識編號：1之mRNA：核苷酸285、324、410、581、584、660、672、801、817、1045、1059、1089、1157、1209、1223、1241、1253、1265、1363、1391或1488，或

對應於包含下列之序列辨識編號：1之mRNA：核苷酸1521、1624、1670、1673、1784、1873、1875、1985、2086、2087、2226、2297、2420、2421、2485、2603、2647或3431。

- 5 24. 如申請專利範圍第21至23項中任一項之用途，其進一步包含對該對象投與一第二干擾性RNA，其具有19至49個核苷酸長度以及包含：

一核苷酸訊息股、一核苷酸反訊息股以及一具有至少19個核苷酸至少接近完全連續互補之區域；

- 10 其中該第二干擾性RNA之反訊息股在生理條件下與對應於序列辨識編碼：1之第二部分的mRNA雜交，以及該反訊息股具有一具有至少19個核苷酸與對應於序列辨識編碼：1之第二雜交部分的mRNA至少接近完全連續互補之區域。

- 15 25. 如申請專利範圍第21至24項中任一項之用途，其中該核苷酸訊息股以及該核苷酸反訊息股經由環核苷酸股而連接在一起。

- 20 26. 如申請專利範圍第21至25項中任一項之用途，其中該組成物係透過氣霧、頰、皮膚、皮膚內、吸入、肌肉內、鼻內、眼內、肺內、靜脈內、腹膜內、鼻、眼部、口服、耳部、非口服的、貼片、皮下、舌下、局部或穿皮途徑投與。

27. 如申請專利範圍第21至26項中任一項之用途，其中該干擾性RNA之投與，係透過於活體內，由能夠表達該干擾

性RNA之表達載體表達出來。

28. 一種干擾性RNA於製造用於減少一對象之組織胺受體H1 mRNA的表達之藥劑上之用途，其包含：

5 對該對象投與一組成物，該組成物包含一有效量具有19至49個核苷酸長度之單股干擾性RNA，以及一藥學上可接受之載劑，

其中該單股干擾性RNA在生理條件下與對應於包含下列之序列辨識編號：1之一部分的mRNA雜交：核苷酸285、324、410、581、584、660、672、801、817、
10 1045、1059、1089、1157、1209、1223、1241、1253、1265、1363、1391、1488、1521、1624、1670、1673、1784、1873、1875、1985、2086、2087、2226、2297、2420、2421、2485、2603、2647或3431，以及該干擾性RNA具有一與對應於序列辨識編號：1之雜交部分至少
15 接近完全連續互補之區域，

其中該組織胺受體H1 mRNA之表達因此而減少。

29. 如申請專利範圍第28項之用途，其中該組成物係透過氣霧、頰、皮膚、皮膚內、吸入、肌肉內、鼻內、眼內、肺內、靜脈內、腹膜內、鼻、眼部、口服、耳部、非口服的、貼片、皮下、舌下、局部或穿皮途徑投與。
20

30. 如申請專利範圍第28或29項之用途，其中該干擾性RNA之投與，係透過於活體內，由能夠表達該干擾性RNA之表達載體表達出來。

31. 如申請專利範圍第28至30項中任一項之用途，其中該干

擾性RNA為miRNA或siRNA。

32. 一種干擾性RNA於製造用於治療一有此治療需求之對象中與HRH1相關之病症之藥劑上之用途，其包含：

5 對該對象投與一組成物，該組成物包含一雙股siRNA分子，其透過RNA干擾而向下調節HRH1基因之表達，

其中：

該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19至約27個核苷酸；以及

10 該siRNA分子中之一股包含一具有與對應於該HRH1基因之mRNA實質上互補之核苷酸序列，以致該siRNA分子透過RNA干擾直接打斷該mRNA。

33. 如申請專利範圍第32項之用途，其中該組成物係透過氣霧、頰、皮膚、皮膚內、吸入、肌肉內、鼻內、眼內、
15 肺內、靜脈內、腹膜內、鼻、眼部、口服、耳部、非口服的、貼片、皮下、舌下、局部或穿皮途徑投與。

34. 如申請專利範圍第32或33項之用途，其中該干擾性RNA之投與，係透過於活體內，由能夠表達該干擾性RNA之表達載體表達出來。

20 35. 如申請專利範圍第32至34項中任一項之用途，其中該干擾性RNA為miRNA。

36. 如申請專利範圍第32至35項中任一項之用途，其中該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19個核苷酸至約25個核苷酸，或獨立地為約19個核苷酸至約21個核苷酸

之長度。

37. 一種組成物，其包含一干擾性RNA，該干擾性RNA具有
19至49個核苷酸之長度，且包含對應於序列辨識編號：
2以及序列辨識編號：13 - 序列辨識編號：50中任一個
5 之核苷酸序列，或其互補序列；以及一藥學上可接受之
載劑。
38. 如申請專利範圍第37項之組成物，其中該干擾性RNA為
shRNA、siRNA或miRNA。
39. 一種組成物，其包含一雙股siRNA分子，其透過RNA干
10 擾向下調節HRH1基因之表達，
其中：
該siRNA分子之每一股之長度獨立地為約19至約
27個核苷酸；以及
該siRNA分子中之一股包含一與對應於該HRH1基
15 因之mRNA實質上互補之核苷酸序列，以致該siRNA分
子透過RNA干擾而直接打斷該mRNA。
40. 如申請專利範圍第39項之組成物，其中該siRNA分子之
每一股之長度獨立地為約19個核苷酸至約25個核苷
酸，或獨立地為約19個核苷酸至約21個核苷酸之長度。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)