

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780013188.1

[43] 公开日 2009年5月27日

[11] 公开号 CN 101443020A

[22] 申请日 2007.4.13

[21] 申请号 200780013188.1

[30] 优先权

[32] 2006.4.13 [33] US [31] 60/791,847

[86] 国际申请 PCT/US2007/066619 2007.4.13

[87] 国际公布 WO2007/121347 英 2007.10.25

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.13

[71] 申请人 爱尔康研究有限公司

地址 美国得克萨斯州

[72] 发明人 约翰·M·雅尼 乔恩·E·查特顿

丹尼尔·A·葛玛奇

史蒂文·T·米勒

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 杨淑媛 郑霞

权利要求书7页 说明书31页 附图1页

[54] 发明名称

RNAi 介导的脾酪氨酸激酶相关炎症病症的抑制

[57] 摘要

提供用于抑制脾酪氨酸激酶(Syk) mRNA 表达的 RNA 干扰, 具体而言, 用于治疗患有 Syk 相关炎症病症(Syk - related inflammatory condition) 或具有形成 Syk 相关炎症病症的危险的患者, 所述 Syk 相关炎症病症例如变应性结膜炎、眼部炎症(ocular inflammation)、皮炎、鼻炎、哮喘、变态反应或肥大细胞病。

1. 一种弱化受治疗者的 Syk mRNA 表达的方法，其包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA(iRNA)、以及药学上可接受的载体，所述干扰 RNA 包括选自下述组的区域：

一个至少 13 个连续核苷酸的区域，所述 13 个连续核苷酸与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3'端次末端的 13 个核苷酸具有至少 90%的序列互补性，或至少 90%的序列同一性；

一个至少 14 个连续核苷酸的区域，所述 14 个连续核苷酸与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3'端次末端的 14 个核苷酸具有至少 85%的序列互补性，或至少 85%的序列同一性；以及

一个至少 15、16、17 或 18 个连续核苷酸的区域，所述 15、16、17 或 18 个连续核苷酸分别与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3'端次末端的 15、16、17 或 18 个核苷酸具有至少 80%的序列互补性，或至少 80%的序列同一性，

其中所述 Syk mRNA 的表达由此而弱化。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述组合物进一步包括具有 19 至 49 个核苷酸长度并包括一个至少 13 个连续核苷酸的第二种干扰 RNA，所述 13 个连续核苷酸具有与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的第二种 mRNA 3'端次末端的 13 个核苷酸至少 90%的序列互补性，或至少 90%的序列同一性。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述干扰 RNA 是 shRNA。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中所述的组合物经由气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、鼻、眼、口、耳、胃肠外、贴片、皮下、舌下、局部或透皮途径施用。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述干扰RNA通过能够表达所述干扰RNA的表达载体的体内表达而被施用。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述干扰RNA是miRNA或siRNA中的至少一种。

7. 一种在需要对其治疗的受治疗者中治疗Syk相关炎症病症的方法, 其包括:

施用一种组合物到受治疗者, 所述组合物包括有效量的具有19至49个核苷酸长度的干扰RNA、以及药学上可接受的载体, 其中所述干扰RNA包括选自下述组的区域:

一个至少13个连续核苷酸的区域, 所述13个连续核苷酸与相应于SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13-40和SEQ ID NO: 44-47中任一个的mRNA 3'端次末端的13个核苷酸具有至少90%的序列互补性, 或至少90%的序列同一性;

一个至少14个连续核苷酸的区域, 所述14个连续核苷酸与相应于SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13-40和SEQ ID NO: 44-47中任一个的mRNA 3'端次末端的14个核苷酸具有至少85%的序列互补性, 或至少85%的序列同一性; 以及

一个至少15、16、17或18个连续核苷酸的区域, 所述15、16、17或18个连续核苷酸分别与相应于SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13-40和SEQ ID NO: 44-47中任一个的mRNA 3'端次末端的15、16、17或18个核苷酸具有至少80%的序列互补性, 或至少80%的序列同一性,

其中所述Syk相关炎症病症由此而治疗。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述组合物进一步包括具有19至49个核苷酸长度并且包括一个至少13个连续核苷酸的第二种干扰RNA, 所述13个连续核苷酸具有与相应于SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13-40和SEQ ID NO: 44-47中任一个的第二种mRNA 3'端次末端的13个核苷酸至少90%的序列互补性, 或至少90%的序列同一性。

9. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述干扰RNA是shRNA。

10. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述的组合物经由气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、鼻、眼、口、耳、胃肠外、贴片、皮下、舌下、局部或透皮途径施用。

11. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述干扰 RNA 通过能够表达所述干扰 RNA 的表达载体的体内表达而被施用。

12. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述干扰 RNA 是 miRNA 或 siRNA 中的至少一种。

13. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述受治疗者是人并且所述人患有 Syk 相关炎症病症或具有形成 Syk 相关炎症病症的危险。

14. 一种弱化受治疗者的 Syk mRNA 表达的方法，其包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，所述干扰 RNA 包括：

有义核苷酸链，反义核苷酸链，和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域；

其中所述反义链在生理条件下与选自下述组的 mRNA 的一部分杂交：

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸，以及，

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸，

其中所述 Syk mRNA 的表达由此而弱化。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所述受治疗者是人并且所述人患有 Syk 相关炎症病症或具有形成 Syk 相关炎症病症的危险。

16. 根据权利要求 14 所述的方法，其中受治疗者是人并且所述人患有 Syk 相关炎症病症或具有形成 Syk 相关炎症病症的危险。

17. 根据权利要求 14 所述的方法，其进一步包括向受治疗者施用第二种干扰 RNA，所述干扰 RNA 具有 19 至 49 个核苷酸的长度并且包括：

有义核苷酸链，反义核苷酸链，和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域；

其中所述第二种干扰 RNA 的反义链在生理条件下与选自下述组的 mRNA 的第二个部分杂交：

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸，以及，

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述的有义核苷酸链和所述反义核苷酸链通过环状核苷酸链连接。

19. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述的组合物经由气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、鼻、眼、口、耳、胃肠外、贴片、皮下、舌下、局部或透皮途径施用。

20. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述干扰 RNA 通过能够表达所述干扰 RNA 的表达载体的体内表达而被施用。

21. 一种在需要对其治疗的受治疗者中治疗 Syk 相关炎症病症的方法，其包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，所述干扰 RNA 包括有义核苷酸链，反义核苷酸链，和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域；

其中所述反义链在生理条件下与选自下述组的 mRNA 的一部分杂交：

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 642、789、791、860、861、

862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸，以及，

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸，

其中所述 Syk 相关炎症病症由此而治疗。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述受治疗者是人并且所述人患有 Syk 相关炎症病症或具有形成 Syk 相关炎症病症的危险。

23. 根据权利要求 35 所述的方法，其进一步包括向受治疗者施用第二种干扰 RNA，所述第二种干扰 RNA 具有 19 至 49 个核苷酸的长度并且包括：

有义核苷酸链，反义核苷酸链，和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域；

其中所述第二种干扰 RNA 的反义链在生理条件下与选自下述组的 mRNA 的第二个部分杂交：

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸，以及，

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的有义核苷酸链和所述反义核苷酸链通过环状核苷酸链连接。

25. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的组合物经由气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、鼻、眼、口、耳、胃肠外、贴片、皮下、舌下、局部或透皮途径施用。

26. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述干扰 RNA 通过能够表达

所述干扰 RNA 的表达载体的体内表达而被施用。

27. 一种弱化受治疗者的 Syk mRNA 表达的方法，其包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的单链干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，

其中所述单链干扰 RNA 在生理条件下与选自下述组的 mRNA 的一部分杂交：

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸，以及，

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸，

并且所述干扰 RNA 含有与相应于 SEQ ID NO: 1 的 mRNA 的杂交部分至少是近乎完全的连续互补的区域，

其中所述 Syk mRNA 的表达由此而弱化。

28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述的组合物经由气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、鼻、眼、口、耳、胃肠外、贴片、皮下、舌下、局部或透皮途径施用。

29. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述干扰 RNA 通过能够表达所述干扰 RNA 的表达载体的体内表达施用所述干扰 RNA。

30. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述干扰 RNA 是 miRNA 或 siRNA 中的至少一种。

31. 一种在需要对其治疗的受治疗者中治疗眼部炎症或结膜炎的方法，其包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括双链 siRNA 分子，其经由 RNA 干扰而下调 Syk 基因的表达，其中：

所述 siRNA 分子的每条链独立具有大约 19 至大约 27 个核苷酸的长

度；以及

所述 siRNA 分子的一条链包括与相应于 Syk 基因的 mRNA 大致互补的核苷酸序列,使得所述 siRNA 分子经由 RNA 干扰直接切割所述 mRNA。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述的组合物经由气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、鼻、眼、口、耳、胃肠外、贴片、皮下、舌下、局部或透皮途径施用。

33. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述干扰 RNA 通过能够表达所述干扰 RNA 的表达载体的体内表达而被施用。

34. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述干扰 RNA 是 miRNA。

35. 根据权利要求 31 所述的方法,其中 siRNA 分子的每条链独立具有大约 19 至大约 25 个核苷酸的长度,或独立具有大约 19 至大约 21 个核苷酸的长度。

36. 一种组合物,其包括具有 19 至 49 个核苷酸长度并且包括相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的核苷酸序列或其互补序列的干扰 RNA; 和药学上可接受的载体。

37. 一种组合物,其包括具有 19 至 49 个核苷酸长度并且主要由相应于 SEQ ID NO: 41 - 47 中任一个的核苷酸序列或其互补序列组成的干扰 RNA; 和药学上可接受的载体。

38. 根据权利要求 36 所述的组合物,其中所述干扰 RNA 是 shRNA、siRNA 或 miRNA 中的至少一种。

39. 根据权利要求 37 所述的组合物,其中所述干扰 RNA 是 shRNA、siRNA 或 miRNA 中的至少一种。

RNAi 介导的脾酪氨酸激酶相关炎症病症的抑制

本申请要求 2006 年 4 月 13 日提交的共同待决的美国临时专利申请序号为 60/791,847 的权益，其内容在此特定地通过引用并入本文。

技术领域

本发明涉及干扰 RNA 组合物的领域，所述干扰 RNA 组合物用于沉默脾酪氨酸激酶 (Syk) 和用于治疗 Syk 相关炎症病症 (Syk-related inflammatory condition)。所述病症例如包括变应性结膜炎、眼部炎症 (ocular inflammation)、皮炎、鼻炎、哮喘、变态反应或肥大细胞病。

背景技术

变应性结膜炎、眼部炎症、皮炎、鼻炎、哮喘、变态反应和肥大细胞病历史上是以下述方法治疗：口服、鼻内或局部施用抗组胺剂，或者口服或鼻内施用类固醇，或者在变态反应情况下注射变应原治疗。全身疗法通常需要施用更高浓度的药物化合物，以提供到达所需治疗位点的有效浓度。抗组胺类化合物已知具有中枢神经系统的活性；困倦和粘膜干燥通常是抗组胺剂使用的副作用。

通过免疫受体例如 IgE 受体 (FcεRI) 的信号传导包括募集和激活信号传导级联的多个组分，包括非受体酪氨酸激酶，Syk。Syk 激活导致 PLCγ 和 PI3K 途径的激活并且最终导致肥大细胞脱颗粒作用和激活。靶向 Syk mRNA 会降低 Syk 蛋白水平并且中断 FcεRI 途径。这种作用会干扰 IgE 介导的肥大细胞脱颗粒作用并且释放组胺和其他的促炎介质。

在气道内使用气溶胶化反义 Syk 激酶来抑制过敏性炎症由 Stenton, G.R. 等报道 (*J Immunol.* 169:1028-1036 (2002))。通过在支气管上皮细胞系

HS-24 中和卵清蛋白(OA)诱导哮喘的大鼠模型中的短干扰 RNA 的方法来抑制 Syk 表达, 据报道其抑制了所诱导的炎性应答的标志的表达(在国际专利申请第 WO 2005007623 号中公布)。使用靶向 FC ϵ R1A 的短发夹 RNA 抑制包括在 IgE 产生中的基因表达, 和治疗 IgE 介导的疾病例如哮喘和过敏性鼻炎在公布的国际专利申请第 WO 2005085443 号中报道。这些文献中没有一个公开了本发明的干扰 RNA。

22219v.1 45263/P022WO2

关于靶向 Syk 酪氨酸激酶需要额外试剂和治疗方法, 以此阻断内源性肥大细胞脱颗粒作用, 并且释放组胺和其他的促炎介质而避免全身性抗组胺剂治疗的副作用。本发明的实施方式解决了本领域对这种试剂和治疗方法的需求。

发明内容

通过提供强有力的和高效的治疗、预防或介入 Syk 相关炎性病征, 本发明的实施方式克服了现有技术的这些和其他缺点。在一方面, 本发明的方法包括治疗患有 Syk 相关炎性病征或具有形成 Syk 相关炎性病征的危险的患者, 所述方法是通过施用沉默 Syk mRNA 表达的干扰 RNA, 因而干扰 PLC γ 和 PI3K 的信号传导途径、并且预防与肥大细胞脱颗粒作用相关的级联事件, 而且在 Syk 相关炎性病征中释放组胺和其他的促炎介质。

本发明是直接关于靶向 Syk mRNA 并且因此干扰 Syk mRNA 表达的干扰 RNA。本发明的干扰 RNA 用于治疗患有 Syk 相关炎性病征或具有形成 Syk 相关炎性病征的危险的患者。

本发明的一个实施方式是一种在受治疗者中弱化 Syk mRNA 表达的方法, 所述方法包括施用一种组合物到受治疗者, 所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体。Syk mRNA 表达由此而弱化。

本发明的另一个实施方式是一种在需要对其治疗的受治疗者中治疗 Syk 相关炎性病征的方法。所述方法包括施用一种组合物到受治疗者, 所

述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体。Syk 相关炎症病症由此而治疗。在一个实施方式中受治疗者是人并且所述人患有 Syk 相关炎症病症以及，在另一个实施方式中，受治疗者是人并且所述人具有形成 Syk 相关炎症病症的危险。

对于上述引用的实施方式，所述的干扰 RNA 包括一个至少 13 个连续核苷酸的区域，所述 13 个连续核苷酸与 mRNA 3'端次末端的 13 个核苷酸具有至少 90%的序列互补性，或至少 90%的序列同一性，所述 mRNA 相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个。

上述引用方法的另外的实施方式中，所述组合物进一步包括具有 19 至 49 个核苷酸长度以及包括至少 13 个连续核苷酸的第二种干扰 RNA，所述 13 个连续核苷酸具有与第二种 mRNA 3'端次末端的 13 个核苷酸至少 90%的序列互补性，或至少 90%的序列同一性，所述第二种 mRNA 相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个。

在本发明的另一个实施方式中，提供一种在受治疗者中弱化 Syk mRNA 表达的方法，所述方法包括施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，并且所述干扰 RNA 包括有义核苷酸链，反义核苷酸链，和具有至少是近乎完全的连续互补性（contiguous complementarity）的至少 19 个核苷酸的区域，其中所述反义链在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸。所述 Syk mRNA 的表达由此而弱化。在另一个实施方式中，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA，其中所述反义链在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸。在一个实施方式中，所述反义链与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，以第 1007、1698 或 1769 位核苷

酸起始，并且所述反义链具有 19 或 20 个核苷酸长度。

本发明的一个实施方式是在需要对其治疗的受治疗者中治疗 Syk 相关炎性病症的方法，所述方法包括施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，所述干扰 RNA 包括有义核苷酸链，反义核苷酸链，和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域；其中所述反义链在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸。所述 Syk 相关炎性病症由此而治疗。在另一个实施方式中，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA，其中所述反义链在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸。在一个实施方式中，所述反义链与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，以第 1007、1698 或 1769 位核苷酸起始，并且所述反义链具有 19 或 20 个核苷酸长度。

具有 19 至 49 个核苷酸长度的第二种干扰 RNA 也能被施用到受治疗者；所述第二种干扰 RNA 包括有义核苷酸链，反义核苷酸链，和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域，其中所述第二种干扰 RNA 的反义链在生理条件下与 mRNA 的第二个部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸。具有 19 至 49 个核苷酸长度的第二种干扰 RNA 能施用到受治疗者，其中所述反义链在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸。在一个实施方式中，所述反义链与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，以第 1007、1698 或 1769 位核苷酸起始，

并且所述反义链具有 19 或 20 个核苷酸长度。

本发明的另一个实施方式是弱化受治疗者的 Syk mRNA 表达的方法，所述方法包括施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的单链干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，其中所述单链干扰 RNA 在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 与 SEQ ID NO: 1 相应，包括上述鉴定的核苷酸。

作为另一个实施方式本发明包括一种组合物，所述组合物包括具有 19 至 49 个核苷酸长度以及包括相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的核苷酸序列或其互补序列的干扰 RNA；和药学上可接受的载体。本发明另一个实施方式是一种组合物，所述组合物包括具有 19 至 49 个核苷酸长度并且包括相应于 SEQ ID NO: 41 - 47 中任一个的核苷酸序列或其互补序列的干扰 RNA；和药学上可接受的载体。

本发明的一个实施方式是一种在需要对其治疗的受治疗者中治疗眼部炎症或结膜炎的方法，所述方法包括施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括双链 siRNA 分子，其经由 RNA 干扰而下调 Syk 基因的表达，其中 siRNA 分子的每条链独立具有大约 19 至大约 27 个核苷酸的长度；以及 siRNA 分子的一条链包括与相应于 Syk 基因的 mRNA 大致互补的核苷酸序列，使得所述 siRNA 分子经由 RNA 干扰直接切割所述 mRNA。这种方法的另一个实施方式中，siRNA 分子的每条链独立具有大约 19 至大约 25 个核苷酸的长度，或大约 19 至大约 21 个核苷酸的长度。

如本文描述的任何实施方式在制备用于弱化本文所示 Syk mRNA 表达的药物的用途也是本发明的一个实施方式。

附图说明

图 1 提供了 293FT 细胞的 SYK 蛋白质印迹，所述 293FT 细胞用#2、#5、#6 和#8 的 SYK siRNA，和无 RISC 的对照 siRNA 进行转染，每种以 10 nM、1 nM 和 0.1 nM；用 10 nM 的非靶向对照 siRNA(NTC2)进行转染；以及用缓冲液对照(-siRNA)进行转染。箭头指示 72-kDa SYK 和 42-kDa 肌

动蛋白条带的位置。

具体实施方式

本文引用的参考资料通过引用结合入本文，引用程度至它们提供对于本文所阐述内容具有补充性的示例性程序或其他细节。

本领域技术人员在本发明公开内容的启发下，应理解在不偏离本发明的精神和范围情况下可以对本文公开的实施方式进行显而易见的修改。在本发明公开内容的启发下，在无过多实验情况下能进行和执行本文公开的所有实施方式。在公开的内容和其等同的实施方式中陈述了本发明的全部范围。本说明书不应被解释为不当地缩小了本发明给予保护的全部范围。

除非另有说明如本文使用的术语“一(a)”和“一个(an)”用来指“一个”，“至少一个”或“一个或更多”。

如本文使用的术语“Syk 相关炎性病症”，包括涉及组胺和其他促炎症介导的应答的病症，例如变应性结膜炎、眼部炎症、皮炎、鼻炎、哮喘、变态反应和肥大细胞病；并且包括源于 Syk mRNA 表达形成的那些细胞变化，所述 Syk mRNA 表达直接或间接导致 Syk 相关炎性病症。本文提供的干扰 RNA 提供这种沉默，同时避免由非特异性试剂造成的不期望的副作用。

如本文使用的术语“变应性结膜炎”指结膜的炎症，所述结膜是分布在眼睑和覆盖巩膜的暴露面的脆弱的膜。术语“变应性结膜炎”包括例如特应性角膜结膜炎、巨乳头性结膜炎、枯草热性结膜炎、常年性过敏性结膜炎、和春季角膜结膜炎。

如本文使用的术语“皮炎”指皮肤的炎症并且包括，例如过敏性接触性皮炎、皮脂缺乏性皮炎（小腿上的干性皮肤）、特应性皮炎、尾蚴性皮炎、接触性皮炎包括刺激性接触性皮炎和漆酚诱导的接触性皮炎、疱疹样皮炎、出汗障碍性皮炎、湿疹、重力性皮炎、感染性皮炎、钱币状皮炎、外耳炎、口周皮炎、假单胞菌皮炎（hot tub rash）和脂溢性皮炎。

如本文使用的术语“鼻炎”是指鼻粘膜的炎症，并且包括例如，过敏

性鼻炎、特应性鼻炎、传染性鼻炎、刺激性鼻炎、嗜酸细胞性非变应性鼻炎、药物性鼻炎和嗜中性鼻窦炎（neutrophilic rhinosinusitis）。

如本文使用的术语“哮喘”指气道的炎症，导致气道狭窄，所述气道从鼻和口传递空气到肺，所述哮喘包括例如过敏性哮喘、特应性哮喘、特应性支气管 IgE 介导的哮喘、支气管哮喘、支气管溶解（bronchiolysis）、肺气肿哮喘、神经性哮喘、运动诱发性哮喘、由环境因素引起的外源性哮喘、初期哮喘（incipient asthma）、由病理生理扰乱引起的内源性哮喘、非过敏性哮喘、非特应性哮喘和婴儿哮喘综合征（wheezy infant syndrome）。

如本文使用的术语“变态反应”指对于通常不具有有害性的物质的免疫系统的异常应答，并且包括例如皮肤变态反应例如特应性皮炎、荨麻疹和血管性水肿；呼吸性变态反应例如过敏性鼻炎和对粉尘或霉菌的反应；食物变态反应例如对于牛奶、蛋清、花生、小麦、大豆、浆果、贝类、玉米、豆类、黄色食用色素 5 号（yellow food dye No. 5）和阿拉伯胶中的蛋白质的反应；药物变态反应例如对于青霉素、磺胺、巴比妥类、抗惊厥药、胰岛素、局部麻醉药和造影剂的反应；以及昆虫咬伤变态反应例如对蜜蜂、黄蜂、大胡蜂、胡蜂和火蚁螫伤的毒液的反应。

如本文使用的术语“肥大细胞病”指系统性肥大细胞增多症，其特征存在于肥大细胞在组织中聚集。所述聚集能影响器官例如骨髓、皮肤、胃肠道、肝脏和脾。医师通过发现除皮肤之外身体其他部位的肥大细胞来诊断系统性肥大细胞增多症，并且通常用抗组胺剂治疗。

短语“与对应于任何一个（序列鉴定子）的 mRNA 3'端次末端的 13 个核苷酸具有至少 90%的序列互补性或至少 90%的序列同一性的至少 13 个连续核苷酸的区域”允许一个核苷酸取代。两个核苷酸取代（即，11/13 = 85%同一性/互补性）不包括在该短语中。

“杂交”指一种过程，其中单链核酸与互补性或近乎互补性的碱基序列相互作用形成氢键连接的复合体，称为杂化物。杂交反应具有敏感性和选择性。在体外，杂交的特异性（即严格性）例如通过预杂交和杂交液中盐或甲酰胺浓度控制，以及通过杂交温度控制；这种试验方案在本领域是已知的。具体而言，通过降低盐浓度、增加甲酰胺浓度或提高杂交温度可

增加严格性。

如本文使用的术语“同一性百分比”描述了，第一个核酸分子中的连续核苷酸，与在第二个核酸分子中相同长度的一组连续核苷酸相同的百分比。术语“互补性百分比”描述了，第一个核酸分子中的连续核苷酸，以 Watson-Crick 原理 (sense) 能与第二个核酸分子中一组连续核苷酸、碱基配对的百分比。

弱化 mRNA 的表达: 如本文使用的术语“弱化 mRNA 的表达”指施用或表达一定量的干扰 RNA (例如 siRNA) 以减少靶 mRNA 至蛋白质的翻译, 通过 mRNA 切割或通过直接抑制翻译实现。靶 mRNA 或相应蛋白表达的减少通常被称为“敲低 (Knock-down)”, 并且相对于施用或表达的非靶向 RNA 对照 (例如非靶向 siRNA 对照) 后存在的水平而被报道。本文实施方式涵盖了包括而且处于 50% 和 100% 之间的量的表达的敲低。然而, 达到这种沉默水平不是为本发明的目的所必须的。在一个实施方式中, 施用单个靶向 Syk mRNA 的干扰 RNA。在其他实施方式中, 施用二个或更多个靶向 Syk mRNA 的干扰 RNA。

“杂交”指一种过程, 其中单链核酸与互补性或近乎互补性的碱基序列相互作用形成氢键连接的复合体称为杂化物。杂交反应具有敏感性和选择性。在体外, 杂交的特异性 (即严格性) 例如通过预杂交和杂交液中盐或甲酰胺浓度控制, 以及通过杂交温度控制; 这种试验方案在本领域是已知的。具体而言, 通过降低盐浓度、增加甲酰胺浓度或提高杂交温度可增加严格性。

例如, 高严格性条件能以 37°C 至 42°C、含 50% 甲酰胺条件发生。降低的严格条件能以 30°C 至 35°C、含 35% 至 25% 甲酰胺条件发生。用于杂交的严格条件的例子在 Sambrook, J., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 中提供。严格杂交条件的进一步的例子包括 400 mM NaCl、40 mM PIPES pH 6.4、和 1 mM EDTA, 50°C 或 70°C 维持 12-16 小时, 然后洗涤; 或者含 50% 甲酰胺、在 1XSSC 中 70°C 或在 1XSSC 中 50°C 杂交, 然后在 0.3XSSC 中 70°C 洗涤; 或者含 50% 甲酰胺、在 4XSSC 中 70°C 或在 4XSSC 中 50°C 杂

交,然后在 1XSSC 中 67°C 洗涤。杂交温度比杂化物的解链温度(T_m)低大约 5-10°C,其中在 19 至 49 个碱基对长度的杂化物的 T_m 的确定是使用下列计算: $T_m^{\circ}\text{C} = 81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G+C}) - (600/\text{N})$, 其中 N 是杂化物中碱基数目, 并且 $[\text{Na}^+]$ 是杂交缓冲液中钠离子浓度。

敲低通常使用定量多聚酶链式反应 (qPCR) 扩增、通过测量 mRNA 水平来评估, 或使用蛋白质印迹或酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、通过测量蛋白水平评估。分析蛋白水平提供了 mRNA 切割以及翻译抑制的评估。用于测量敲低的更多的技术包括 RNA 溶液杂交、核酸酶保护、Northern 杂交、以微点阵监控的基因表达、抗体结合、放射免疫测定和荧光激发细胞分析 (fluorescence activated cell analysis)。

RNA 干扰(RNAi)是双链 RNA (dsRNA)藉以用于沉默基因表达的方法。不想受缚于理论, RNAi 开始于通过 RNA 酶 III - 类酶 (切丁酶) 切割长 dsRNA 成短干扰 RNA (siRNA)。siRNA 是 dsRNA 并且通常具有大约 19 至 28 个核苷酸、或 20 至 25 个核苷酸或者 21 至 22 个核苷酸的长度, 并且通常含有 2 个核苷酸的 3'突出端、以及 5'磷酸基和 3'羟基末端。siRNA 的一条链引入到核糖核蛋白复合体, 其已知为 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC)。RISC 使用这个 siRNA 链鉴定 mRNA 分子, 所述 mRNA 分子与引入的 siRNA 链具有至少部分的互补性, 并且然后切割这些靶 mRNA 或者抑制它们的翻译。因此, 引入到 RISC 中的 siRNA 链已知为引导链或反义链。另一条 siRNA 链, 其已知为过客链或有义链, 其从 siRNA 中除去并且至少部分的与靶 mRNA 同源。本领域技术人员应能认识到, 原则上 siRNA 中任一链均能引入到 RISC 中并且作为引导链行使功能。然而, siRNA 设计 (例如在反义链的 5'端降低 siRNA 双链体稳定性) 能有益于引入反义链到 RISC 中。

RISC 介导切割至少部分的与引导链具有互补性的 mRNA, 这导致了 mRNA 和这种 mRNA 编码的相应蛋白稳态水平的下降。可选择地, RISC 也可经由不需切割靶 mRNA 的翻译抑制来减少相应蛋白的表达。其他 RNA 分子和 RNA - 类分子也能与 RISC 相互作用并且沉默基因表达。能与 RISC 相互作用的其他 RNA 分子的例子包括短发夹 RNA(shRNA)、单链 siRNA、

微小 RNA(miRNA)和切丁酶-底物 27-mer 双链体 (dicer-substrate 27-mer duplexes)。如本文使用的术语“siRNA”除非另有说明是指双链干扰 RNA。能与 RISC 相互作用的 RNA-类分子的例子包括含有一个或更多的化学修饰的核苷酸、一个或更多的脱氧核糖核苷酸和/或一个或更多的磷酸二酯键的 RNA 分子。至于本发明讨论的目的,能与 RISC 相互作用、以及参与 RISC 介导的基因表达改变的所有 RNA 或 RNA-类分子,被称为“干扰 RNA”。因此,siRNA、shRNA、miRNA 和切丁酶-底物 27-mer 双链体是“干扰 RNA”的亚类。

本发明实施方式的干扰 RNA 显现出以催化方式作用来切割靶 mRNA,即干扰 RNA 能够在亚化学计量上影响靶 mRNA 的抑制。当与反义疗法相比时,在这种切割条件下需要明显较少的干扰 RNA 来提供疗效。

本发明涉及干扰 RNA 抑制 Syk mRNA 表达的用途,所述 Syk mRNA 是非受体酪氨酸激酶的 mRNA。通过免疫受体例如 IgE 受体(FcεRI)的信号传导包括募集和激活信号传导级联的多个组分,包括 Syk。Syk 激活导致 PLCγ 和 PI3K 途径的激活并且最终导致肥大细胞脱颗粒作用和激活。靶向如本文所提供的 Syk mRNA,会降低 Syk 蛋白水平并且中断 FcεRI 途径。这种作用会干扰 IgE 介导的肥大细胞脱颗粒作用并且释放组胺和其他的促炎介质。依照本发明,外源提供或内源表达的干扰 RNA 对于沉默 Syk mRNA 特别有效。

除非另有说明,本文引用的核酸序列是以 5'至 3'方向书写。如本文使用的术语“核酸”指 DNA 或 RNA 或其修饰形式,包括存在于 DNA (腺嘌呤“A”、胞嘧啶“C”、鸟嘌呤“G”和胸腺嘧啶“T”)或 RNA (腺嘌呤“A”、胞嘧啶“C”、鸟嘌呤“G”和尿嘧啶“U”)中的嘌呤或嘧啶碱基。本文提供的干扰 RNA 可以包括“T”碱基,特别是在 3'端,尽管“T”碱基不天然存在于 RNA 内。“核酸”包括术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”并且能够指单链分子或双链分子。双链分子是通过在 A 和 T 碱基之间、C 和 G 碱基之间和 A 和 U 碱基之间的 Watson-Crick 碱基配对形成。双链分子彼此间具有部分的、主要的或完全的互补性,并且会形成双链体杂化物,其结合的强度取决于碱基序列的性质和互补程度。

mRNA 容易从相应的 DNA 序列推导出。例如, SEQ ID NO: 1 提供了相应于 Syk mRNA 的 DNA 的有义链序列。除了“T”碱基被“U”碱基替代, mRNA 序列与 DNA 的有义链序列一致。因此, Syk 的 mRNA 序列是从 SEQ ID NO: 1 得知。

脾酪氨酸激酶(Syk) mRNA: GenBank 数据库以登录号 NM_003177 提供了 Syk 的 DNA 序列, 在“序列表”中作为 SEQ ID NO: 1 提供。SEQ ID NO: 1 提供了相应于编码 Syk 的 mRNA 的、DNA 的有义链序列(除了“T”碱基对于“U”碱基之外)。Syk 的编码序列来自于第 148-2055 位核苷酸。

等同于上述引用的 Syk mRNA 序列的是替代的剪接形式、等位形式、同工酶或其关联物(cognate)。一种关联物是来自于另一种哺乳动物的脾酪氨酸激酶 mRNA, 其与 SEQ ID NO: 1 同源(即直向同源物)。涉及 SEQ ID NO: 1 的 Syk 核酸序列包括那些 GenBank 库中登录号 BC001645、BC002962、L28824、X73568、BC011399 和 Z29630 的序列。

如下述通过监控免疫攻击(immunologically-challenged)的肥大细胞中组胺的释放, Syk 的抑制也可以体外测定。单个分散的人肥大细胞制剂在免疫激活时释放促炎介质。通过以抗原或抗-人 IgE 刺激细胞后、释放到培养物上清液中组胺的量来测定激活程度(参阅 Miller 等 *Ocular Immunol Inflamm.* 4:39-49, 2006)。以靶向 Syk 的干扰 RNA 转染的肥大细胞的免疫攻击, 与观察到的用非转染的肥大细胞、或用非靶向干扰 RNA 对照转染的肥大细胞的免疫攻击相比, 形成明显较少的组胺释放。

Syk 的抑制也可以在体外通过使用人结膜组织肥大细胞或在 LAD2 肥大细胞中, 检测 IgE 介导的组胺释放来测定。人结膜组织肥大细胞例如使用美国专利第 5,360,720 号概述的方法获得。LAD2 肥大细胞由美国国立卫生研究院、变应性疾病实验室, Bethesda, MD 批准(*Leuk Res.* 2003 年 8 月 27(8):677-82)。简要的说, 人结膜组织肥大细胞从人结膜组织酶促释放, 并且随后通过在 PERCOLL® 垫层上的密度梯度离心部分地富集。从产生的沉淀获得单个分散的细胞混悬液, 并且将这些细胞用于组胺释放测定。细胞用 Syk 干扰 RNA 或干扰 RNA 对照转染 72h 后用抗-人 IgE 刺激, 这促发了肥大细胞脱颗粒作用并且组胺释放到上清液中。然后通过 RIA

(Beckman Coulter)、EIA (Beckman Coulter)或本领域技术人员已知的其他方法测量上清液中的组胺。相对于对照转染的细胞或非转染的细胞，Syk 干扰 RNA 转染的细胞中组胺释放的下降，指示干扰 RNA 在弱化 Syk 和阻断 FceRI 信号传导途径方面有效。

LAD2 肥大细胞很大程度上以相同的方法使用，除了：细胞被动地以人 IgE 骨髓瘤致敏，然后用抗-人 IgE 刺激，以交联受体结合的 IgE 并且促发脱颗粒作用。

通过观察 Syk 相关性病症症状的改善，也可以从人和哺乳动物中推断 Syk 的抑制，所述 Syk 相关性病症症状的改善例如与变应性结膜炎、眼部炎症、皮炎、鼻炎、哮喘、变态反应或肥大细胞病相关的症状改善。例如任何水肿、搔痒和炎症的改善，或对环境攻击 (environmental challenge) 的耐受，对于 Syk 的抑制具有指示性。

干扰 RNA: 在本发明的一个实施方式中，干扰 RNA(例如 siRNA)具有有义链和反义链，并且所述有义和反义链包括含有至少 19 个核苷酸、具有至少是近乎完全的连续互补性的区域。在本发明的另一个实施方式中，干扰 RNA(例如 siRNA) 具有有义链和反义链，并且所述反义链包括含有至少 19 个核苷酸、具有与 Syk mRNA 的靶序列至少是近乎完全的连续互补性的区域，并且所述有义链包括含有至少 19 个核苷酸、具有与 Syk mRNA 的靶序列至少是近乎完全的连续同一性 (contiguous identity) 的区域。在本发明的另一个实施方式中，所述干扰 RNA 包括一个至少 13、14、15、16、17 或 18 个连续核苷酸的区域，所述 13、14、15、16、17 或 18 个连续核苷酸分别与 mRNA 内相应靶序列的 3'端次末端的 13、14、15、16、17 或 18 个核苷酸，具有序列互补性的百分比或序列同一性的百分比。

干扰 RNA 的每条链的长度包括 19 至 49 个核苷酸，并且可以包括含有 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 个核苷酸的长度。

siRNA 的反义链是 siRNA 中的有活性的引导剂，因为反义链被引入 RISC, 因而允许 RISC 鉴定与 siRNA 反义链至少部分的互补性的靶 mRNA,

所述互补性用于切割或翻译抑制。

在本发明的实施方式中,使用可获得的设计工具选择在靶 mRNA 序列内的干扰 RNA 靶序列(例如 siRNA 靶序列)。然后通过转染表达靶 mRNA 的细胞而后以上文描述评估敲低,测试相应于 Syk 靶序列的干扰 RNA。

选择 siRNA 靶序列的技术在下述方面提供: Tuschl, T. 等, "The siRNA User Guide (siRNA 使用者指南)," 2004 年 5 月 6 日修订,可在 Rockefeller University 网站获得; Technical Bulletin #506, "siRNA Design Guidelines (siRNA 设计指导方针)," Ambion Inc. 在 Ambion 的网站; 以及其他基于网络设计工具,例如在 Invitrogen、Dharmacon、Integrated DNA Technologies、Genscript 或 Prologo 网站上的。初始搜索参数可包括在 35%至 55%之间的 G/C 含量,以及 siRNA 长度在 19 至 27 个核苷酸之间。靶序列可以位于编码区域或 mRNA 的 5'或 3'未翻译区域。

关于 Syk mRNA 的 19 个核苷酸 DNA 靶序列的一个实施方式出现在 SEQ ID NO: 1 的第 789 至 807 位核苷酸:

5' - GCACTATCGCATCGACAAA -3' SEQ ID NO: 2.

用于靶向 SEQ ID NO: 2 的相应 mRNA 序列、并且具有 21 个核苷酸的链和 2 个核苷酸的 3'突出端的本发明的 siRNA 是:

5' - GCACUAUCGCAUCGACAAANN -3' SEQ ID NO: 3

3' -NNCGUGAUAGCGUAGCUGUUU -5' SEQ ID NO: 4.

每个 "N" 残基可以是任何的核苷酸(A、C、G、U 和 T)或修饰核苷酸。3' 端可有许多 "N" 残基,包括和在 1、2、3、4、5 和 6 个之间。任一条链上的 "N" 残基可以是相同的残基(例如 UU、AA、CC、GG 或 TT)或者它们可以是不同的(例如 AC、AG、AU、CA、CG、CU、GA、GC、GU、UA、UC 或 UG)。3'突出端可以是相同的或者它们可以是不同的。在一个实施方式中,两条链均有 3'UU 突出端。

用于靶向 SEQ ID NO: 2 的相应 mRNA 序列、并且具有 21 个核苷酸的链和每条链上均有 3'UU 突出端的本发明的 siRNA 是:

5'- GCACUAUCGCAUCGACAAAU -3' SEQ ID NO: 5

3'- UUCGUGAUAGCGUAGCUGUUU -5' SEQ ID NO: 6.

干扰 RNA 也可以具有 5'突出端的核苷酸或其可以具有平端。用于靶向 SEQ ID NO: 2 的相应 mRNA 序列、并且具有 19 个核苷酸的链和平端的本发明的 siRNA 是:

5'- GCACUAUCGCAUCGACAAA -3' SEQ ID NO: 7

3'- CGUGAUAGCGUAGCUGUUU -5' SEQ ID NO: 8.

双链干扰 RNA(例如 siRNA)的链可以连接起来形成发夹或茎环结构(例如 shRNA)。靶向 SEQ ID NO: 2 的相应 mRNA 序列、并且具有 19bp 双链茎区和 3'UU 突出端的本发明的 shRNA 是:

```

NNN
 /  \
5'-GCACUAUCGCAUCGACAAA   N
3'-UUCGUGAUAGCGUAGCUGUUU   N   SEQ ID NO: 9.
 \  /
NNN

```

N 是 A、T、C、G 和 U 核苷酸或者本领域技术人员已知的修饰形式。环中 N 核苷酸的数目是包括和在 3 至 23 个之间、或 5 至 15 个之间、或 7 至 13 个之间、或 4 至 9 个之间、或 9 至 11 个之间, 或者 N 核苷酸的数目是 9。环中的一些核苷酸能参与与环中其他核苷酸发生碱基配对的相互作用。用于形成环的寡核苷酸序列的例子包括 5'- UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T.R.等 (2002) *Science* 296: 550)和 5'- UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. 等 (2002) *RNA* 8:1454)。本领域技术人员应能识别产生的单链寡核苷酸形成茎环或发夹结构, 所述茎环或发夹结构包括能与 RNAi 结构相互作用的双链区域。

上述鉴定的 siRNA 靶序列可以在 3'端延伸, 便于切丁酶-底物 27-mer 双链体的设计。Syk DNA 序列中 (SEQ ID NO: 1) 中鉴定的 19 个核苷酸

DNA 靶序列 (SEQ ID NO: 2) 延伸 6 个核苷酸, 产生 25 个核苷酸 DNA 靶序列, 所述 25 个核苷酸 DNA 靶序列出现在 SEQ ID NO: 1 的第 789 至 813 位核苷酸。

5' - GCACTATCGCATCGACAAAGACAAG -3' SEQ ID NO: 10.

用于靶向 SEQ ID NO: 10 的相应 mRNA 序列的本发明的切丁酶 - 底物 27-mer 双链体是:

5'- GCACUAUCGCAUCGACAAAGACAAG -3' SEQ ID NO: 11

3'- UUCGUGAUAGCGUAGCUGUUUCUGUUC -5' SEQ ID NO: 12.

为增强加工, 有义链的 3'端 2 个核苷酸 (即 SEQ ID NO: 11 的 AG 核苷酸) 可以是脱氧核苷酸。例如本文提供的从 19 至 21 个核苷酸靶序列设计的切丁酶 - 底物 27-mer 双链体, 在 Integrated DNA Technologies (IDT) 网站、以及 Kim, D. -H.等,(2005 年 2 月) *Nature Biotechnology* 23:2; 222-226. 中有进一步讨论。

当通过化学合成的方法生产干扰 RNA 时, 在一条或二条链 (当存在时) 的 5'端的核苷酸的 5'位置磷酸化, 能加强 siRNA 的效力和所结合的 RISC 复合体的特异性, 但这不是必需的因为磷酸化能在细胞内出现。

本文也公开了一种在受治疗者中弱化 Syk mRNA 表达的方法, 包括:

施用一种组合物到受治疗者, 所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA (iRNA)、以及药学上可接受的载体, 所述干扰 RNA 包括选自由下述组的区域:

一个至少 13 个连续核苷酸的区域, 所述 13 个连续核苷酸与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3'端次末端的 13 个核苷酸具有至少 90% 的序列互补性, 或至少 90% 的序列同一性;

一个至少 14 个连续核苷酸的区域, 所述 14 个连续核苷酸与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3'端次末端的 14 个核苷酸具有至少 85% 的序列互补性, 或至少 85%

的序列同一性；以及

一个至少 15、16、17 或 18 个连续核苷酸的区域，所述 15、16、17 或 18 个连续核苷酸分别与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3' 端次末端的 15、16、17 或 18 个核苷酸具有至少 80% 的序列互补性，或至少 80% 的序列同一性，

其中所述 Syk mRNA 的表达由此而弱化。

也公开了一种在需要对其治疗的受治疗者中治疗 Syk 相关炎症病症的方法，包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，其中所述干扰 RNA 包括区域选自下述组的区域：

一个至少 13 个连续核苷酸的区域，所述 13 个连续核苷酸与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3' 端次末端的 13 个核苷酸具有至少 90% 的序列互补性，或至少 90% 的序列同一性；

一个至少 14 个连续核苷酸的区域，所述 14 个连续核苷酸与相应于 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 13 - 40 中任一个的 mRNA 3' 端次末端的 14 个核苷酸具有至少 85% 的序列互补性，或至少 85% 的序列同一性；以及

一个至少 15、16、17 或 18 个连续核苷酸的区域，所述 15、16、17 或 18 个连续核苷酸分别与相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的 mRNA 3' 端次末端的 15、16、17 或 18 个核苷酸具有至少 80% 的序列互补性，或至少 80% 的序列同一性，

其中所述 Syk 相关炎症病症由此而治疗。

另外的实施方式包括一种弱化受治疗者的 Syk mRNA 表达的方法，包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，所述干扰 RNA 包

括:

有义核苷酸链, 反义核苷酸链, 和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域;

其中所述反义链在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交, 所述 mRNA 选自由下述 mRNA 组成的组:

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA, 其包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸, 以及,

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA, 其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸,

其中所述 Syk mRNA 的表达由此而弱化。

本文也公开了在需要对其治疗的受治疗者中治疗 Syk 相关炎症病症的方法, 包括:

施用一种组合物到受治疗者, 所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的干扰 RNA、以及药学上可接受的载体, 所述干扰 RNA 包括有义核苷酸链, 反义核苷酸链, 和具有至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸的区域;

其中所述反义链在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交, 所述 mRNA 选自由下述 mRNA 组成的组:

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA, 其包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸, 以及,

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA, 其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸,

其中所述 Syk 相关炎症病症由此而治疗。

另外的实施方式包括一种弱化受治疗者的 Syk mRNA 表达的方法，包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括有效量的具有 19 至 49 个核苷酸长度的单链干扰 RNA、以及药学上可接受的载体，

其中所述单链干扰 RNA 在生理条件下与 mRNA 的一部分杂交，所述 mRNA 选自由下述 mRNA 组成的组：

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 642、789、791、860、861、862、867、868、1009、1273、1394、1436、1471、1472、1533、1535、1547、1680、1738、1739、1766、1880、1947、2022、2036、2328、2329、2473、2509、2520、2524、2558、或 2613 位核苷酸，以及，

与 SEQ ID NO: 1 相应的 mRNA，其包括第 1007、1698 或 1769 位核苷酸，

并且所述干扰 RNA 含有与相应于 SEQ ID NO: 1 的 mRNA 的杂交部分至少是近乎完全连续互补性的区域，

其中所述 Syk mRNA 的表达由此而弱化。

也公开了在需要对其治疗的受治疗者中治疗眼部炎症或结膜炎的方法，包括：

施用一种组合物到受治疗者，所述组合物包括双链 siRNA 分子，其经由 RNA 干扰而下调 Syk 基因的表达，

其中：

siRNA 分子的每条链独立具有大约 19 至大约 27 个核苷酸的长度；以及

siRNA 分子的一条链包括与相应于 Syk 基因的 mRNA 大致互补的核苷酸序列，使得所述 siRNA 分子经由 RNA 干扰直接切割所述 mRNA。

也公开了各种组合物，所述组合物包括具有 19 至 49 个核苷酸长度并且包括相应于 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 13 - 40 和 SEQ ID NO: 44 - 47 中任一个的核苷酸序列或其互补序列的干扰 RNA；和药学上可接受的载

体。也公开了各种其他的组合物，所述组合物包括具有 19 至 49 个核苷酸长度，并且主要由相应于 SEQ ID NO: 41 - 47 中任一个的核苷酸序列或其互补序列组成的干扰 RNA；和药学上可接受的载体。

虽然已显示和描述了本发明的特定实施方式，本领域技术人员可想到各种变更和替代实施方式。相应地，本发明预期仅通过所附权利要求来限定。

在不偏离本发明的精神和必要特征下，本发明可以其他特定形式实施。所描述的实施方式被认为在所有方面仅具有说明性而不具有限制性。因此本发明的范围不是由上述描述内容而是由所附权利要求指示。在等同于权利要求意义和范围内的、对于权利要求的任何改变均包括在其范围内。此外，本文提及的所有公开的文献、专利和申请，在此通过引用结合入本文，如同以其整体提出。

实施例

表 1 列出了 SEQ ID NO: 1 的 Syk DNA 靶序列的实施例，从其中以上文阐述的方式设计本发明的 siRNA。如上述记录 Syk 编码脾酪氨酸激酶。

表 1 关于 siRNA 的 Syk 靶序列

Syk 靶序列	关于 SEQ ID NO: 1 起始核苷酸的#	SEQ ID NO:
GCACTATCGCATCGACAAA	789	2
ACTATCGCATCGACAAAGA	791	13
GGCAGCTAGTCGAGCATT	860	14
GCAGCTAGTCGAGCATTAT	861	15
CAGCTAGTCGAGCATTATT	862	16
AGTCGAGCATTATTCTTAT	867	17
GTCGAGCATTATTCTTATA	868	18
AGTTATTAGCAGAAGCAAA	1394	19
CGTACATCGTGCGCATGAT	1436	20
GAGTCTGGATGCTAGTTA	1471	21
AGTCTGGATGCTAGTTAT	1472	22
ACAGACATGTCAAGGATAA	1535	23
AGGATAAGAACATCATAGA	1547	24
TGATTTCCGACTCTCCAAA	1680	25
CATGAAAGTGGCCTGTCA	1738	26
ATGAAAGTGGCCTGTCAA	1739	27
CTCCGGAATGCATCAACTA	1766	28
GAAGTGAAGTCACCGCTAT	1880	29
GATGTACGATCTCATGAAT	1947	30
GCTGCGCAATTACTACTAT	2022	31
ACTATGACGTGGTGA ACTA	2036	32
TTACGATCTGTTTCCAAAT	2328	33
TACGATCTGTTTCCAAATC	2329	34
CTTAGCATGTGACTCCTGA	2473	35
AGGAATTTGGCTGCTTCTA	2509	36
TGCTTCTACGGCCATGAGA	2520	37
TCTACGGCCATGAGACTGA	2524	38
AAGCTTTCCTGACAATAAA	2558	39
CCAGTGCAGTTTCTAAGCA	2613	40

表 2 关于 siRNA 的另外的 Syk 靶序列

Syk 靶序列	关于 SEQ ID NO: 1 起始核苷酸的#	SEQ ID NO:
GTGGAATAATCTCAAGAAT	1007	41
AGCACTGCGTGCTGATGAA	1698	42
CGGAATGCATCAACTACTA	1769	43
AAUGCCUUGGUCCAUGGA	642	44
GGAAUAAUCUCAAGAAUCA	1009	45
GAACUGGGCUCUGGUAUU	1273	46
GAACAGACAUGUCAAGGAU	1533	47

如上述实施例所引用,通过参考 SEQ ID NO: 1 中的序列位置并且添加

或删除与 SEQ ID NO: 1 具有互补性或近乎互补性的核苷酸,本领域技术人员能使用表 1 提供的靶序列信息来设计干扰 RNA,所述干扰 RNA 具有短于或长于表 1 提供序列的长度。

由 siRNA 和其他形式的干扰 RNA 指导的靶 RNA 切割反应具有高度序列特异性。通常,siRNA 是抑制本文所引用 mRNA 的 siRNA 实施方式,所述 siRNA 含有与靶 mRNA 的一部分在序列相同的有义核苷酸链,以及恰好与靶 mRNA 的一部分互补的反义核苷酸链。然而,在反义 siRNA 链和靶 mRNA 之间,或在反义 siRNA 链和有义 siRNA 链之间的 100%序列互补性,并不是实践本发明所必需的。因此,例如,本发明允许有序列变异,所述序列变异可能由于基因突变、株多态性 (strain polymorphism) 或进化趋异造成。

在本发明的一个实施方式中,siRNA 的反义链具有与靶 mRNA 至少是近乎完全的连续互补性的至少 19 个核苷酸。如本文使用的“近乎完全的”指 siRNA 的反义链与靶 mRNA 的至少一部分“大致互补”,并且 siRNA 的有义链与靶 mRNA 的至少一部分“大致同一”。“同一性”如本领域技术人员所已知的,是通过匹配序列之间的核苷酸顺序和同一性而确定的核苷酸序列之间的序列亲缘关系程度。在一个实施方式中,具有与靶 mRNA 序列 80%和在 80%至 100%之间的互补性 (例如 85%、90%或 95%的互补性) 的 siRNA 反义链被认为具有近乎完全的互补性,并且可以用于本发明中。

“完全的”连续互补性是连续碱基对的标准 Watson-Crick 碱基配对。“至少是近乎完全的”连续互补性包括如本文使用的“完全的”互补性。用于测定同一性或互补性的计算机方法例如 BLASTN (Altschul, S.F., 等 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410), 被设计用于鉴定核苷酸序列匹配的最大程度。

靶 mRNA (有义链) 与 siRNA 的一条链 (有义链) 之间的关系是同一性关系。如果出现的话,siRNA 的有义链也称作过客链。靶 mRNA (有义链) 和 siRNA 的另一条链 (反义链) 之间的关系是互补性关系。siRNA 的反义链也称作引导链。

以 5'至 3'方向书写的核酸序列中的次末端碱基是,紧靠着最后的碱基的,即紧靠 3'碱基的碱基。以 5'至 3'方向书写的核酸序列中的次末端 13 个

碱基,是紧靠 3'碱基的序列中的最后 13 个碱基并且不包括 3'碱基。相似地,以 5'至 3'方向书写的核苷酸序列中的次末端 14、15、16、17 或 18 个碱基,分别是紧靠 3'碱基的序列中的最后 14、15、16、17 或 18 个碱基并且不包括 3'碱基。

在本发明的一个实施方式中,连续核苷酸区域是,与 mRNA 3'端次末端的 14 个核苷酸具有至少 85%的序列互补性、或至少 85%的序列同一性的 14 个连续核苷酸的区域,所述 mRNA 相应于由每个序列鉴定子(sequence identifier)鉴定的序列。两个核苷酸的置换(即 $12/14 = 86\%$ 同一性/互补性)包括在该短语中。

在本发明另一个实施方式中,连续核苷酸区域是与 mRNA 3'端次末端的 14 个核苷酸具有至少 80%的序列互补性、或至少 80%的序列同一性的至少 15、16、17 或 18 个连续核苷酸的区域,所述 mRNA 相应于由每个序列鉴定子的序列。三个核苷酸的置换包括在该短语中。

相应于 SEQ ID NO: 1 的 mRNA 中的靶序列,可以在 mRNA 5'或 3'未翻译区域中,以及在 mRNA 的编码区域中。

双链干扰 RNA 的一条或两条链可以含有 1 至 6 个核苷酸的 3'突出端,其可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或其混合物。突出端的核苷酸不是碱基配对的。在本发明一个实施方式中,干扰 RNA 包括 TT 或 UU 的 3'突出端。在本发明的另一个实施方式中,干扰 RNA 包括至少一个平端。末端通常具有 5'磷酸基或 3'羟基。在其他的实施方式中,反义链具有 5'磷酸基并且有义链具有 5'羟基。仍然在其他的实施方式中,通过共价加入其他分子或官能团进一步修饰末端。

双链 siRNA 的有义和反义链可以是如上文描述的两条单链的双链体结构,或可以是单分子,其中互补性区域是碱基配对的并且通过发夹环共价连接以形成单链。据信发夹通过称为切丁酶的蛋白在细胞内切割,形成两个单独碱基配对 RNA 分子的干扰 RNA。

通过添加、删除、置换或修饰一个或更多的核苷酸,干扰 RNA 可不同于天然存在的 RNA。非核苷酸物质可以结合到干扰 RNA 的 5'端、3'端

或中间。所述修饰通常设计用于增加干扰 RNA 的核酸酶抵抗性、改善细胞吸收、增强细胞靶向、协助追踪干扰 RNA、进一步改善稳定性或降低干扰素途径激活的可能性。例如，在突出端的末端干扰 RNA 可以包括嘌呤核苷酸。例如通过吡咯烷连接体连接胆固醇到 siRNA 有义链 3'端，对于 siRNA 也提供了稳定性。

另外的修饰例如包括 3'端生物素分子、已知具有细胞渗透性质的肽、纳米粒子、拟肽 (peptidomimetic)、荧光染料或树状聚体。

核苷酸可以在分子的碱基部分、在糖基部分或在磷酸部分上修饰并且在本发明的实施方式中行使功能。修饰例如包括用烷基、烷氧基、氨基、脱氮物 (deaza)、卤素、羟基、巯基或其组合来置换。例如，核苷酸可以被具有更高稳定性的类似物来置换、例如用脱氧核糖核苷酸替代核糖核苷酸，或可以被具有糖基修饰的类似物置换、例如用 2'氨基、2'甲氧基、2'甲氧乙基或 2'-O,4'-C 亚甲基桥替代 2'OH。核苷酸的嘌呤或嘧啶类似物例子包括黄嘌呤、次黄嘌呤、氮杂嘌呤 (azapurine)、甲硫腺嘌呤、7-脱氮腺苷以及 O-和 N-修饰核苷酸。通过用氮或用硫 (磷硫酰) 置换磷酸基团的一个或更多氧，可以修饰核苷酸的磷酸基团。例如对于增强功能、对于提高稳定性或渗透性或者对于直接定位或靶向，修饰具有有用性。

可以有与 SEQ ID NO: 1 的部分不具有互补性的反义干扰 RNA 链的区域。非互补性区域可以在互补性区域的 3'端、5'端或两端，或者在两个互补性区域之间。

通过化学合成、通过体外转录、或者通过用切丁酶或具有相似活性的另一种适当的核酸酶切割较长的双链 RNA，可以外源性产生干扰 RNA。使用传统的 DNA/RNA 合成仪，从受保护的核糖核苷亚磷酰胺生产的化学合成的干扰 RNA，可以从商业供应厂商例如 Ambion Inc. (Austin, TX)、Invitrogen (Carlsbad, CA) 或 Dharmacon (Lafayette, CO) 获得。通过例如用溶剂或树脂、沉淀作用、电泳、层析或它们的联合进行提取，纯化干扰 RNA。可选择地，可以使用具有很少 (如果有) 纯化的干扰 RNA 以避免由于样品加工带来的损失。

从质粒或病毒表达载体、或从最小表达盒也可以内源性表达干扰 RNA，所述最小表达盒例如 PCR 产生的片段，其包括一个或更多的启动子和干扰 RNA 的适当模板。用于 shRNA 的商业上可获得的基于质粒的表达载体的例子包括，pSilencer 系列的成员 (Ambion, Austin, TX) 和 pCpG-siRNA (InvivoGen, San Diego, CA)。用于表达干扰 RNA 的病毒载体可以得自多种病毒，所述病毒包括腺病毒、腺伴随病毒、慢病毒属 (例如 HIV、FIV、和 EIAV) 和疱疹病毒。用于 shRNA 表达的商业上可获得的病毒载体的例子包括 pSilencer adeno (Ambion, Austin, TX) 和 pLenti6/BLOCK-iT™-DEST (Invitrogen, Carlsbad, CA)。病毒载体的选择、从载体表达干扰 RNA 的方法以及递送病毒载体的方法，是本领域普通技术人员已知的。试剂盒的例子包括 Silencer Express (Ambion, Austin, TX) 和 siXpress (Minis, Madison, WI)，所述试剂盒用于产生、PCR 产生的 shRNA 表达盒。经由能够表达第一个干扰 RNA 的、第一个表达载体的体内表达，可以施用第一个干扰 RNA；并且经由能够表达第二个干扰 RNA 的、第二个表达载体的体内表达，可以施用第二个干扰 RNA；或者经由能够表达二种干扰 RNA 的、单个表达载体的体内表达，可以施用二种干扰 RNA。

干扰 RNA 可以从多种本领域技术人员已知的真核细胞的启动子表达，包括 pol III 启动子 (例如 U6 或 H1 启动子) 或 pol II 启动子 (例如巨细胞病毒启动子)。本领域技术人员应认识到这些启动子也能适应于允许干扰 RNA 的诱导性表达。

在生理条件下杂交：在本发明的某些实施方式中，在体内干扰 RNA 的反义链与 mRNA 杂交而作为 RISC 复合体的部分。

上文描述的在体外的杂交测定，提供了预测候选 siRNA 和靶之间的结合是否具有特异性的方法。然而，在 RISC 复合体情况下，特异性靶切割也能发生在反义链，其在体外没有证明杂交的高严格性。

单链干扰 RNA：如上文引用，干扰 RNA 最终以单链行使功能。单链 (ss) 干扰 RNA 已发现影响 mRNA 沉默，虽然与双链干扰 RNA 相比具有较少的有效性。因此本发明的实施方式也提供单链干扰 RNA 的施用，所述单链干扰 RNA 在生理条件下与 SEQ ID NO: 1 的一部分杂交，并且与

SEQ ID NO: 1 的杂交部分具有至少近乎完全互补性的至少 19 个核苷酸。如上文引用的双链干扰 RNA，表 1 的单链干扰 RNA 具有 19 至 49 个核苷酸的长度。单链干扰 RNA 具有 5'磷酸或在 5'位置原位或在体内磷酸化。术语“5'磷酸化”用于描述例如具有磷酸基的多核苷酸或寡核苷酸，所述磷酸基经由酯键连接到多核苷酸或寡核苷酸 5'端糖基（例如核糖、脱氧核糖或同样的类似物）的 C5 羟基上。

单链干扰 RNA 通过化学合成，或者通过体外转录、或者从关于双链干扰 RNA 的载体或表达盒内源性表达。5'磷酸基可以经由激酶加入，或者 5'磷酸可以是核酸酶切割 RNA 的结果。递送如同双链干扰 RNA。在一个实施方式中，施用具有保护性末端和核酸酶抵抗性修饰的单链干扰 RNA 用于沉默。单链干扰 RNA 可干燥用于储存或溶解在水溶液中。所述溶液可以含有缓冲液或盐以抑制退火或用于稳定作用。

发夹干扰 RNA：发夹干扰 RNA 是单个分子（例如单个寡核苷酸链），其包括茎环和发夹结构的干扰 RNA（例如 shRNA）的有义和反义链。例如，shRNA 可从 DNA 载体表达，其中编码有义干扰 RNA 链的 DNA 寡核苷酸通过短的间隔区连接到，编码相反的反义干扰 RNA 链的 DNA 寡核苷酸。如果选择表达载体需要，可以加入 3'末端 T 的（T's）和核苷酸形成限制位点。产生的 RNA 转录物回折到自身上形成茎环结构。

施用模式：干扰 RNA 可以经由，例如气雾剂、含服、皮肤、皮内、吸入、肌内、鼻内、眼内、肺内、静脉内、腹膜内、鼻、眼、口、耳、胃肠外、贴片（patch）、皮下、舌下、局部或透皮（transdermal）施用递送。

可以通过如下方式直接施用到眼：通过眼部组织施用，例如眼周的、结膜的、囊下（subtenon）、前眼房内的（intracameral）、玻璃体内的、眼内的、视网膜下的、结膜下的、眼球后的、小管内的或脉络膜上的施用；通过注射，通过使用导管或其他敷设装置（placement device）直接应用到眼，所述导管或其他敷设装置例如视黄醛片（retinal pellet）、眼内插入物（intraocular insert）、栓剂或植入物，所述植入物包括多孔的、无孔的或胶状的物质；通过局部的眼的滴剂或软膏剂；或者通过在结膜穹窿中的缓释装置，或者邻近巩膜（透巩膜的）植入的或者眼内的缓释装置。前眼房内

注射可以通过角膜进入前房，以允许试剂到达小梁网。小管内注射可以到达静脉集合管引流施累姆管（venous collector channels draining Schlemm's canal）或到达施累姆管。进一步的施用模式包括片剂、丸剂和胶囊剂。

经由例如局部耳的滴剂或软膏剂、在耳内或植入到邻近耳的缓释装置，施用可以直接到达耳。局部施用包括耳肌内的、鼓室内的（intratympanic cavity）和耳蜗内的注射途径施用。此外，试剂可以施用到内耳，其通过敷设明胶海绵或相似的吸收剂和附着物并用干扰 RNA 浸润，所述干扰 RNA 对抗中耳/内耳或邻近结构的窗膜（window membrane）。

经由例如气雾剂（aerosolized preparation），以及例如通过经由吸入器或雾化器的吸入，施用可以直接到达肺。

受治疗者：需要治疗 Syk 相关炎症病症或具有形成 Syk 相关炎症病症的危险的受治疗者是，患有 Syk 相关炎症病症或具有形成 Syk 相关炎症病症的危险的人或其他哺乳动物，所述 Syk 相关炎症病症例如变应性结膜炎、眼部炎症、皮炎、鼻炎、哮喘、变态反应或肥大细胞病，例如其与本文引用的 Syk 的所不希望的或不适当的表达或活性有关。

与这种疾病相关的眼的结构例如可以包括眼、视网膜、脉络膜、晶状体、角膜、小梁网、虹膜、视神经、视神经乳头、巩膜、眼房、玻璃体房、睫状体或后段。

与这种疾病相关的耳的结构例如可以包括内耳、中耳、外耳、鼓室或鼓膜、耳蜗或欧氏管。

与这种疾病相关的肺结构例如可以包括鼻、口、咽、喉、小支气管、气管、隆凸（分开右和左主支气管的洞的脊）和肺，尤其是下肺例如细支气管和肺泡。

受治疗者也可以是耳细胞、肺细胞、眼细胞、细胞培养物、器官或者活体外器官或组织。

制剂和剂量：药物制剂包括本发明的干扰 RNA 或其盐，其以高达 99% 的重量比例与生理学上可接受的载体介质混合，所述生理学上可接受的载体介质例如水、缓冲液、生理盐水、甘氨酸、透明质酸、甘露醇及类似物。

本发明的干扰 RNA 可作为固体、溶液、混悬液和乳剂施用。下面内容是本发明实现的可能的制剂的实例。

	重量百分 (%) 含量
干扰 RNA	高达 99; 0.1 - 99; 0.1-50; 0.5-10.0
羟丙基甲基纤维素	0.5
氯化钠	0.8
氯化苯甲烃铵	0.01
EDTA	0.01
NaOH/HCl	适量 pH7.4
纯化水 (无 RNA 酶)	适量至 100 MI

	重量百分 (%) 含量
干扰 RNA	高达 99; 0.1 - 99; 0.1-50; 0.5-10.0
磷酸盐缓冲的生理盐	
水	1.0
氯化苯甲烃铵	0.01
聚山梨酯 80	0.5
纯化水 (无 RNA 酶)	适量补足到 100 %

	重量百分 (%) 含量
干扰 RNA	高达 99; 0.1 - 99; 0.1-50; 0.5-10.0
磷酸二氢钠	0.05
磷酸氢二钠 (无水)	0.15
氯化钠	0.75
EDTA 二钠	0.05
聚氧乙烯蓖麻油	0.1
氯化苯甲烃铵	0.01
HCl 和/或 NaOH	pH 7.3-7.4
纯化水 (无 RNA 酶)	适量补足到 100 %

	重量百分 (%) 含量
干扰 RNA	高达 99; 0.1 - 99; 0.1-50; 0.5-10.0
磷酸盐缓冲的生理盐	
水	1.0
羟丙基 - β - 环糊精	4.0
纯化水 (无 RNA 酶)	适量补足到 100 %

通常，本发明实施方式的有效量的干扰 RNA，在靶细胞表面形成的细胞外浓度是从 100 pM 至 100 nM、或从 1 nM 至 50 nM、或从 5 nM 至大约 10 nM、或者大约 25 nM。获得这种局部浓度的所需剂量会取决于许多因素而变化，所述因素包括递送方法、递送的位点、在递送位点和靶细胞或组织之间的细胞层的数目，递送是局部性的还是全身性，等。递送位点的浓度可以相当大地高于在靶细胞或组织表面的浓度。每天一至四次递送局部的组合物到靶器官表面，或者以延长的递送时间表例如每天、每周、每两周、每月或更长的时间表，这根据临床医师的常规判断。制剂的 pH 值是大约 pH 4-9、或者 pH 4.5 至 pH 7.4。

用 siRNA 的患者的治疗性治疗，其通过增加作用的持续时间、而预期具有超过小分子治疗的有益性，所述 siRNA 直接对抗 Syk mRNA，因而允许较低频率的给药和较高的患者依从性。

制剂的有效量可以取决于下列因素，例如受治疗者的年龄、种族和性别，例如 Syk 相关炎性病证的严重度、靶基因转录/蛋白质周转的速率、干扰 RNA 的效力和干扰 RNA 的稳定性。在一个实施方式中，干扰 RNA 被局部递送到靶器官，并且以治疗的剂量到达含有脾酪氨酸激酶的组织，因而改善了 Syk 相关性病变。

可接受载体：可接受载体指那些载体，所述那些载体最多导致几乎没有至没有眼部刺激、而且如果需要的话提供适合的保护，并且递送均匀剂量的本发明的一个或更多的干扰 RNA。本发明实施方式的、用于施用干扰 RNA 的可接受载体包括基于阳离子脂质的转染试剂 TransIT[®]-TKO (Minis Corporation, Madison, WI)、 LIPOFECTIN[®]、 Lipofectamine、 OLIGOFECTAMINE[™] (Invitrogen, Carlsbad, CA) 或 DHARMAFECT[™] (Dharmacon, Lafayette, CO); 多聚阳离子例如聚乙烯亚胺; 阳离子肽例如 Tat、多聚精氨酸或者 Penetratin (Antp 肽); 或者脂质体。脂质体是从标准的形成泡囊 (vesicle) 的脂质或固醇 (例如胆固醇) 形成，并且可以包括靶向分子例如单克隆抗体，例如所述靶分子具有对于上皮细胞表面抗原的亲合力。此外，脂质体可以是聚乙二醇化脂质体。

干扰 RNA 可以以溶液、混悬液、生物蚀解性或非生物蚀解性的递送

装置递送。干扰 RNA 可以单独递送或者作为确定的共价的共轭物的组分递送。干扰 RNA 也可以与阳离子脂质、阳离子肽或者阳离子聚合物络合；与蛋白质、融合蛋白或者具有核酸结合性质的蛋白质区域（例如鱼精蛋白）络合；或者包裹在纳米粒子中。通过包括适当的靶向部分例如抗体或抗体片段，能完成组织特异性或细胞特异性递送。

关于眼、耳或肺的递送，干扰 RNA 可以与下述物质结合：眼科、光学或肺可接受的防腐剂，共溶剂，表面活性剂，粘性增强剂，渗透促进剂，缓冲液，氯化钠，或者水，以形成水溶液，灭菌混悬液或溶液。通过用生理学上可接受的等渗水性缓冲液（isotonic aqueous buffer）溶解干扰 RNA，可以制备溶液制剂。此外，所述溶液可以包括可接受表面活性剂以协助溶解抑制剂。粘性建立试剂（Viscosity building agent）例如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或者类似物可以加入到本发明的组合物中以改善化合物的滞留（retention）。

为了制备无菌软膏制剂，可将干扰 RNA 在适当的载体中与防腐剂结合，所述防腐剂例如矿物油、液体羊毛脂或白凡士林。通过在亲水性碱中悬浮干扰 RNA，可以制备无菌凝胶制剂，所述亲水性碱依照本领域已知的方法，例如由 CARBOPOL[®]-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC) 或类似物的联合体制备。例如 VISCOAT[®] (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) 可以用于眼内注射。在干扰 RNA 较少渗透进所感兴趣的器官或组织的情况下，本发明的其他组合物可以含有渗透增强剂例如 Cremephor 和 TWEEN[®] 80 (聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。

试剂盒：本发明的实施方式提供了一种试剂盒，其包括如本文所引用的在细胞中用于弱化 mRNA 表达的试剂。试剂盒含有 siRNA 或 shRNA 表达载体。对于 siRNA 和非病毒 shRNA 表达载体，试剂盒也可以含有转染试剂和其他适合的递送载体。对于病毒 shRNA 表达载体，试剂盒可以含有病毒载体和/或病毒载体产生的必要元件（例如包装细胞系以及一种载体，所述载体包括病毒载体模板和用于包装的额外辅助性载体）。试剂盒也可以含有 siRNA 或 shRNA 表达载体的阳性和阴性对照（例如非靶向 siRNA 对照或者靶向不相关 mRNA 的 siRNA）。试剂盒也可以含有用于评

估预期靶基因敲低的试剂（例如引物和探针，其用于定量 PCR 以检测靶 mRNA 和/或抗体，所述靶 mRNA 和/或抗体对抗用于蛋白质印迹的相关蛋白）。可选择地，试剂盒可以包括 siRNA 序列或 shRNA 序列，以及用于通过体外转录产生 siRNA、或者用于构建 shRNA 表达载体所必需的说明书和材料。

进一步提供了在试剂盒形式中的药物联合体，所述药物联合体包括在包装的联合体中的载体工具和第一容器工具，所述载体工具适应于以与其紧密限制的方式接受容器工具，所述第一容器工具包括干扰 RNA 组合物和可接受的载体。如果需要这种试剂盒能进一步包括，例如一个或更多的不同的传统的药物试剂盒组分，例如含有一个或更多的药学上可接受载体的容器以及另外的容器等，这些对于本领域技术人员应该容易理解。印刷的技术说明书也能包括在试剂盒中，所述技术说明书作为插件或作为标签，指示施用组分的量、施用的指导方针、和/或混合组分的指导方针。

如下述在体外评估了 Syk 干扰 RNA 的能力，所述能力是 Syk 干扰 RNA 敲低例如在人角膜上皮细胞中内源性 Syk 表达的水平。转化的人角膜上皮细胞，例如 CEPI-17 细胞系 (Offord 等 (1999) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1091-1101)，平板培养 24h 后在 KGM 角质形成细胞培养基中 (Cambrex, East Rutherford, NJ) 转染。依照制造商的技术说明书使用 DharmaFECT™ 1 (Dharmacon, Lafayette, CO) 进行转染，Syk 干扰 RNA 的浓度范围处于 0.1nM - 100nM 之间。非靶向干扰 RNA 对照和核纤层蛋白 A/C 干扰 RNA (Dharmacon) 用作对照。靶 mRNA 水平转染后 24h 通过 qPCR 评估，使用例如 TAQMAN® 正向和反向引物和包括靶位点的探针组合 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行。大约转染后 72h (准确时间取决于蛋白质周转率) 例如通过蛋白质印迹可以评估靶蛋白水平。从所培养的细胞中分离 RNA 和/或蛋白质的标准技术对于本领域的技术人员是广泛知晓的。为减少非特异性和脱靶效应 (off-target effect) 的可能性，使用 Syk 干扰 RNA 的最低可行浓度以产生靶基因表达中期望水平的敲低。

本文引用的参考资料通过引用结合入本文，引用程度至它们提供对于本文所阐述内容具有补充性的示例性程序或其他细节。

本领域技术人员在本发明公开内容的启发下，应理解在不偏离本发明的精神和范围情况下可以对本文公开的实施方式进行显而易见的修改。在本发明公开内容的启发下，在无过多实验情况下能进行和执行本文公开的所有实施方式。在公开的内容和其等同的实施方式中陈述了本发明的全部范围。本说明书不应被解释为不当地缩小了本发明给予保护的全部范围。

在 293FT 细胞中特异性沉默 SYK 的干扰 RNA

本研究检测了 SYK 干扰 RNA 的能力，所述能力是在所培养的 293FT 细胞中沉默内源性 SYK 蛋白表达的水平。

使用 SYK siRNA、无 RISC siRNA #1 si 对照、或者非靶向 siRNA #2 (NTC2) si 对照和 DHARMAFECT® #1 转染试剂(Dharmacon, Lafayette, CO) 的标准体外浓度(0.1-10 nM)，完成 293FT 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 转染。所有的 siRNA 溶解在 1X siRNA 缓冲液中，所述缓冲液是 20 mM KCl、6 mM HEPES (pH 7.5)和 0.2 mM MgCl₂ 的水溶液。对照样品包括缓冲液对照，其中 siRNA 的体积被同等体积的 1X siRNA 缓冲液(-siRNA)替代。使用抗-SYK 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 进行蛋白质印迹以评估 SYK 蛋白表达。SYK siRNA 是双链干扰 RNA，其具有对于下述靶序列的特异性：siSYK #2 靶向序列 AAUGCCUUGGUUCCAUGGA (SEQ ID NO: 44); siSYK #5 靶向序列 GGAAUAAUCUCAAGAAUCA (SEQ ID NO: 45); siSYK #6 靶向序列 GAACUGGGCUCUGGUAUU (SEQ ID NO: 46); siSYK #8 靶向序列 GAACAGACAUGUCAAGGAU (SEQ ID NO: 47)。如图 1 中数据显示，相对于 siRNA 对照，siSYK #5、siSYK #6 和 siSYK #8 在 10 nM 和 1 nM 浓度时明显降低了 SYK 蛋白表达，但在 0.1 nM 时显示降低的效力。siSYK #6 和 siSYK #8 siRNA 尤其有效。在所有三种浓度时 siSYK #2 siRNA 是无效的。

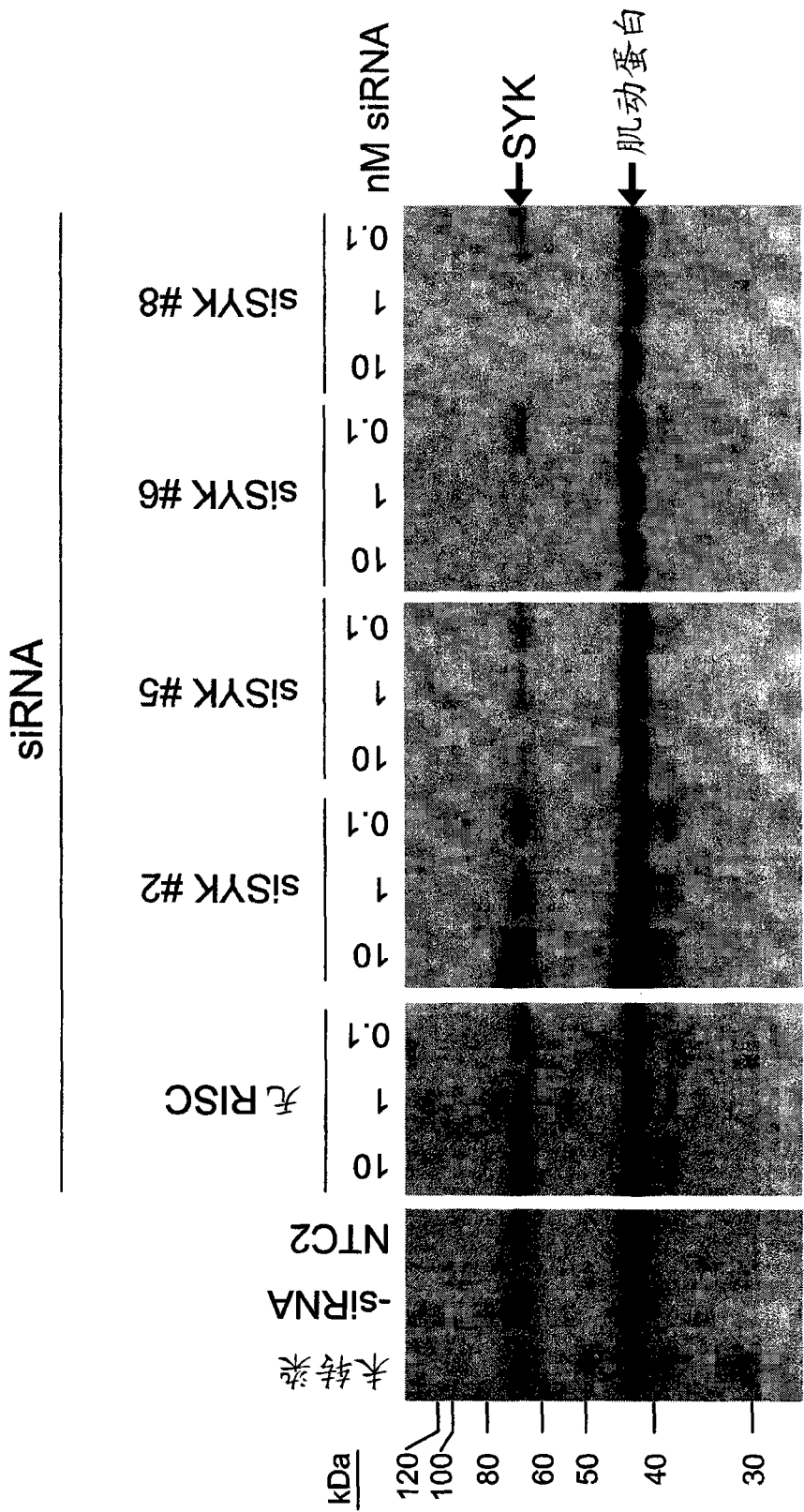


图1