

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： 94111307

※ 申請日期： 94.11.27

※IPC 分類：

A61K 48/00
A61P 27/02

一、發明名稱：(中文/英文)

用於治療眼睛病症的結締組織生長因子(CTGF)RNA干擾(RNAi)抑制技術

RNAi INHIBITION OF CTGF FOR TREATMENT OF OCULAR DISORDERS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

艾爾康股份有限公司/ALCON, INC.

代表人：(中文/英文)

1. 史高尼德爾 馬汀/SCHNEIDER, MARTIN

2. 巴斯勒 史帝芬/BASLER, STEFAN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士胡南堡·保時69號·郵政信箱62號

P.O. Box 62, Bosch 69, CH-6331 Hunenberg, Switzerland

國 籍：(中文/英文)

瑞士/Switzerland

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 薛帕德 艾倫 R./SHEPARD, ALLAN R.

2. 彭玉豪/PANG, IOK-HOU

國 籍：(中文/英文)

1. 美國/USA

2. 美國/USA

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： 年 月 日。

☒ 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；2004,12,23；60/638,705

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

EP1827503) claim 5 與本發明不符
EP231543)
US 2006166919 (7622 454)
US 2010025969 (7838502)
US 2011028534
US 200606037

☐ 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。

五、中文發明摘要：

係提供一種抑制結締組織生長因子mRNA表現之RNA干擾，用於治療與CTGF表現有關之眼睛病症。涉及CTGF異常表現之眼睛病症包括青光眼(glaucoma)、黃斑退化(macular degeneration)、糖尿病視網膜病變(diabetic retinopathy)、脈絡膜血管新生(choroidal neovascularization)、增生性玻璃體視網膜病變(proliferative vitreoretinopathy)與傷口癒合(wound healing)。此類病症係以本發明干擾性RNA治療。

六、英文發明摘要：

RNA interference is provided for inhibition of connective tissue growth factor mRNA expression in ocular disorders involving CTGF expression. Ocular disorders involving aberrant CTGF expression include glaucoma, macular degeneration, diabetic retinopathy, choroidal neovascularization, proliferative vitreoretinopathy and wound healing. Such disorders are treated by administering interfering RNAs of the present invention.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明之專利申請範圍係用以補充美國專利暫時申請案號60/638,705，於2004年12月23日提申，其內文特別附於
5 參考資料中。

發明領域

本發明相關於RNA干擾(RNAi)組成物領域，其用於抑制眼睛病症中結締組織生長因子(CTGF)之表現。

【先前技術】

10 發明背景

大部分眼睛疾病係與細胞過程有關，包括細胞增生、存活、轉移、分化與血管新生。CTGF為一種分泌型細胞素，並在這些細胞過程中擔任重要媒介。尤其是，CTGF已知可增加細胞外基質之產生，主要經由增加膠原蛋白I與纖維連
15 結蛋白之沉積。CTGF之過度表現為某些病症之主要原因，如硬皮病、纖維過度增生疾病、細胞外基質成分過度堆積之疤。

在小樑網狀組織(TM)區域之細胞外基質過度堆積為多種青光眼之一徵兆；此種增加一般認為會導致房水排出抵抗性增加，因此增高眼內壓。國際專利申請案號
20 PCT/US2003/012521，Fleenor *et al.*，公開於2003年11月13號，以及WO 03/092584，讓渡給Alcon, Inc.，係描述在青光眼TM細胞中CTGF之mRNA量增加，與正常TM細胞相較。

黃斑退化為中央視網膜部份，術語為黃斑部，功能為

高精確度之影像，之光接受器損失。黃斑退化係與視網膜色素皮層與網狀脈絡膜之間膜上之細胞外基質成份不正常沉積有關。此類似碎片之物質稱之為透明疣。透明疣可在
5 使用眼底鏡檢查眼睛時觀察到。正常的眼睛黃斑部不具透明疣，透明疣可能會出現在視網膜周圍。黃斑部軟透明疣之出現，在不影響黃斑影像情況下，被認為是AMD的早期症狀。

脈絡膜血管新生通常發生於黃斑退化中，除了其他眼睛疾病外，並與脈絡膜內皮細胞增生、細胞外基質過度產
10 生，以及視網膜下纖維血管生成有關。視網膜色素內皮細胞增生以及血管新生因子之產生會影響脈絡膜血管新生。

糖尿病視網膜病變為一種眼睛病症，發展於糖尿病患
中，起因於微血管基底膜之增厚，且微血管之外被細胞與
內皮細胞之間缺乏接觸。外被細胞之損失會增加微血管裂
15 縫，並導致血管-視網膜屏障之崩毀。

增生性玻璃體視網膜病變係與細胞與纖維膜之細胞
增生有關，在玻璃膜內與視網膜表面上。視網膜色素內
皮細胞增生與轉移為此類常見眼睛病症。與增生性玻璃
體視網膜病變有關之膜係包含細胞外基質成份，如膠原
20 蛋白第I、II與IV型，以及纖維連結蛋白，並形成漸進式纖維化。

傷口癒合病症會導致眼睛組織嚴重受損，透過活化發炎細胞、釋放生長因子與細胞素、眼睛細胞之增生與分化、增加微血管之通透度、改變基底膜基質組成、增加細胞外

基質之沉積、纖維化、血管新生與組織重塑。

因此，CTGF之過度表現為這些眼睛疾病之主要原因。

目前的治療並非直接強調這些疾病之病理機制。

【發明內容】

5 發明概要

本發明係相關於以CTGF mRNA為目標，因而干擾CTGF之mRNA表現之干擾性RNA。本發明干擾性RNA可用於治療CTGF-相關之眼睛病症，如青光眼、黃斑退化、糖尿病視網膜病變、脈絡膜血管新生、增生性玻璃體視網膜病變以及傷口癒合。

本發明之一實施例係提供一種降低個體眼部結締組織生長因子mRNA表現之方法。該方法包含投以個體眼部一組成物，其包含有效劑量之具19至49個核苷酸長度之干擾性RNA，如雙股(ds)與單股(ss) siRNA，以及一醫藥上可接受載體之組成物。

雙股siRNA包含一同義核苷酸序列、一反義核苷酸序列，以及一至少19個核苷酸之至少接近完美鄰近互補之區域。此外，該反義序列可在生理條件下與SEQ ID NO:1(人類結締組織生長因子之同義股DNA序列，基因庫參考號NM_001901)對應mRNA之一部分雜合，並具一至少19個核苷酸之至少接近完美鄰近互補區域，互補於該SEQ ID NO:1對應mRNA之雜合部分。投以此類組成物可降低個體眼部結締組織生長因子mRNA之表現。

該單股siRNA具19至49個核苷酸，可在生理條件下與

SEQ ID NO:1，起始於核苷酸379、691、801、901、932、937、969、986、1119、1170、1201、1346、1473、1478、1481、1488、1626、1660或1666對應之mRNA之一部分雜合，並具有一至少接近完美鄰近互補區域，互補於SEQ ID
5 NO:1 對應之mRNA之雜合部分。

在本發明之一實施例中，該雙股干擾性RNA係設計為以SEQ ID NO:1，起始於核苷酸379、691、801、901、932、937、969、986、1119、1170、1201、1346、1473、1478、1481、1488、1626、1660或1666之對應mRNA核苷酸序列
10 為目標。

本發明之另一實施例為一種治療患有與結締組織生長因子相關之眼睛病症個體之方法。該方法包含投以個體眼部一組成物，其包含一具19至49個核苷酸長度之干擾性RNA以及一醫藥上可接受載體之組成物，該干擾性RNA包
15 含一同義核苷酸序列、一反義核苷酸序列、一至少19個核苷酸之至少接近完美鄰近之互補區域。該反義序列可在生理條件下與對應於SEQ ID NO:1之部分mRNA雜合，並具一至少19個核苷酸之至少接近完美鄰近互補區域，互補於該SEQ ID NO:1對應mRNA之雜合部分。該與結締組織生長因
20 子相關之眼睛病症因而被治療。

圖式簡單說明

第1圖顯示SITOXTM資料，顯示小樑網狀組織細胞之轉染速率並非速率限制步驟，搭配第1B圖。GTM3細胞以SITOXTM(Dharmacon)轉染控制。24小時後，係使用錐藍排

除法決定在SITOX™培養液中存活之細胞數，其反映了相對轉染率。空心柱：未轉染；實心柱：以SITOX™轉染。

第1B圖顯示GTM3細胞攝入siRNA之SIGLO™影像，顯示細胞之轉染速率並非速率限制步驟，搭配第1A圖。GTM3
5 細胞使用 LIPOFECTAMINE 2000™，以 SIGLO™ siRNA (Dharmacon)轉染。SIGLO™ siRNA攝入後24小時以螢光顯微鏡觀測(紅色不規則形狀)。單獨的細胞核係以DAPI (4',6-二醯胺基-2-苯基吡啶)，其為雙股DNA用染劑(藍色圓形區域)。依據第1A圖之資料與第1B圖之影像顯示，幾乎所有細
10 胞不是死亡(SITOX™)就是發螢光(SIGLO™)。

第2A圖為CTGF基因外顯子(exon)(條狀)與內含子(intron)(線狀)結構與siRNA S1、S2與S3之位置，以及QPCR引子/探針組Q1與Q2，相關於基因庫CTGF序列NM_001901，該序列提供於SEQ ID NO:1。siRNA之序列/
15 探針組係提供於範例1。

第2B圖顯示CTGF mRNA使用外顯子5之引子/探針組Q2進行之QPCR倍增。使用S1與S4 siRNA，並無偵測到明顯的CTGF mRNA降低表現(knock-down)。

第2C圖顯示CTGF mRNA使用外顯子4/5跨越區之引子
20 /探針組Q1進行之QPCR倍增。每一siRNA皆偵測到CTGF mRNA降低表現，S2 siRNA觀測到~90%之降低表現。

第3圖顯示一滴定研究，其中各濃度之S2 siRNA係用以測試CTGF mRNA之降低表現(knock-down)。CTGF mRNA降低表現係以QPCR倍增評估，使用引子/探針組Q1。以範

例1之0、1、3、10、30與100 nM S2 siRNA處理GTM3細胞
24小時後，觀測到 $IC_{50} \sim 2.5$ nM。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

5 RNA干擾，術語為“RNAi”為一種降低目標基因表現之方法，係被小單-或雙股RNA分子影響。干擾性RNA包括小型干擾RNA，雙股或單股(ds siRNA或ss siRNA)、微型RNA(miRNA)、小型髮夾狀RNA(shRNA)或其他。若不想受理論束縛，RNA干擾會在體內產生，藉由切割dsRNA前驅
10 物形成約20至25個核苷酸長度之小RNA。切割係以RNaseIII-RNA解旋酶Dicer完成。siRNA之“同義(sense)”股，即與目標mRNA序列相同之股，係移除，留下“反義(antisense)”股，其與目標RNA互補，作用為降低mRNA之表現。siRNA之反義股會引導蛋白質複合物，已知為RISC
15 (RNA-誘發靜默複合物)至mRNA上，該複合物之後會切割mRNA，藉由RISC上之Argonaute蛋白，因而降低該mRNA所表現之蛋白質產生。干擾性RNA為催化性，且以次計量級之干擾性RNA便可降低mRNA之表現。mRNA表現之降低可經由轉錄與轉譯機制。

20 本發明相關於使用干擾性RNA，以抑制眼睛病症中結締組織生長因子之表現之用途。依據本發明，眼睛組織，尤其是眼睛小樑網狀細胞，係進行siRNA靜默(silencing)，並外加siRNA影響靜默。此外，依據本發明之觀點，使用以PCR為基礎之方法決定siRNA降低表現之效率，PCR倍增之

引子應設計為包含siRNA目標序列，以準確地測量靜默現象。

於此所指出之序列皆由5'端寫至3'端，除非另有指出。

術語“核酸”意指DNA或RNA，或其修飾形式，包含DNA中
 5 出現之嘌呤或嘧啶鹼基(腺嘌呤“A”、胞嘧啶“C”、鳥糞嘌呤
 “G”、胸腺嘧啶“T”)，或RNA中出現者(腺嘌呤“A”、胞嘧啶
 “C”、鳥糞嘌呤“G”、尿嘧啶“U”)。於此提供之干擾性RNA
 可包含“T”鹼基，尤其是在3'端，雖然“T”不會自然出現於
 RNA中。核酸包括術語“核苷酸”與“聚核苷酸”，並可為單
 10 股分子或雙股分子。雙股分子藉由華生-克立克鹼基對形
 成，A與T配對，C與G配對，以及A與U配對。雙股之股可
 為部份、實質上或全部互補，並形成雙雜合體，鍵結強度
 取決於互補序列鹼基之本質與互補程度。mRNA之序列可
 由DNA對應之同義或反義股序列而立即得知。例如，SEQ
 15 ID NO:1提供對應於結締組織生長因子mRNA之DNA同義
 股序列。該mRNA序列等同於DNA之同義股序列，其中“T”
 被取代為“U”殘基。因此，結締組織生長因子之mRNA序列
 可由SEQ ID NO:1得知。

結締組織生長因子之mRNA：生物科技資訊國際中心之
 20 基因庫資料庫，ncbi.nlm.nih.gov，提供對應於人類結締組
 織生長因子信息RNA之DNA序列，參考號為NM_001901，
 於此提供為SEQ ID NO:1。人類結締組織生長因子之編碼
 (coding)序列位置為146-1195。

SEQ ID NO:1 :

1 tccagtgcgc gagccgccc ggcgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccgggcc
61 ccacctccga ccaccgccag cgtccaggc cccgcgctcc ccgctcgccg ccaccgcgcc
121 ctccgctccg cccgcagtgc caaccatgac cgccgccagt atgggccccg tccgcgtcgc
5 181 ctctgtggtc ctctcgccc tctgcagccg gccggccgtc ggccagaact gcagcgggcc
241 gtgccgggtgc ccgacgagc cggcgccgcg ctgcccggcg ggcgtgagcc tctgtctgga
301 cggtcgccgc tctgcccgcg tctgcgcaa gcagctgggc gagctgtgca ccgagcgcga
361 cccctcgac ccgcacaagg gcctctctg tgacttcggc tccccggcca accgcaagat
421 cggcgtgtgc accgcaaag atgtgtctcc ctgcatctc ggtggtacgg tgtaccgcag
10 481 cggagagtc ttccagagca gctgcaagta ccagtgcacg tgcctggacg gggcgggtgg
541 ctgcatgccc ctgtgcagca tggacgttcg tctgccagc cctgactgcc cttccccgag
601 gagggtaag ctgcccggga aatgtgcga ggagtgggtg tgtgacgagc ccaaggacca
661 aaccgtggtt gggcctgccc tcgcggctta ccgactggaa gacacgtttg gccagacccc
721 aactatgatt agagccaact gcctgggtcca gaccacagag tggagcgcct gttccaagac
15 781 ctgtgggatg ggcatttcca cccgggttac caatgacaac gcctcctgca ggctagagaa
841 gcagagccgc ctgtgcatgg tcaggccttg cgaagctgac ctggaagaga acattaagaa
901 gggcaaaaag tgatccgta ctccaaaat ctccaagcct atcaagttg agctttctgg
961 ctgcaccagc atgaagacat accgagctaa attctgtgga gtatgtaccg acggccgatg
1021 ctgcaccccc cacagaacca ccacctgcc ggtggagttc aagtgcctg acggcgaggt
20 1081 catgaagaag aacatgatgt tcatcaagac ctgtgcctgc cattacaact gtcccggaga
1141 caatgacatc ttgaatcgc tgtactacag gaagatgtac ggagacatgg catgaagcca
1201 gagagtgaga gacattaact cattagactg gaactgaac tgattcacat ctcatcttc
1261 cgtaaaaatg atttcagtag cacaagttat ttaaactctgt ttttctaact gggggaaaag
1321 attccacccc aattcaaac attgtgcat gtcaaacaaa tagtctatct tccccagaca
25 1381 ctggtttgaa gaatgttaag actgacagt ggaactacat tagtacacag caccagaatg
1441 tatattaagg tgtggcttta ggagcagtg ggaggtagca gcagaaagg tagtatcatc
1501 agatagctct tatacgagta atatgcctgc tattgaagt glaattgaga aggaaaattt
1561 tagcgtgctc actgacctgc ctgtagcccc agtgacagct aggatgtgca ttctccagcc
1621 atcaagagac tgagtcaagt tgttccttaa gtcagaacag cagactcagc tctgacattc
30 1681 tgattcgaat gacactgttc aggaatcgga atcctgtcga ttagactgga cagcttgtgg
1741 caagtgaatt tctgtaaca agccagattt tttaaaattt atattgtaa tattgtgtgt
1801 gtgtgtgtgt gtgtatatat atatatatat gtacagttat ctaagttaat ttaaagttgt
1861 ttgtgccttt ttattttgt tttaaatgct ttgatatttc aatgttagcc tcaattctg
1921 aacaccatag gtagaatgta aagctgtct gatcgttcaa agcatgaaat ggatacttat
35 1981 atggaaatc tctcagatag aatgacagtc cgtcaaaaaca gattgtttgc aaaggggagg
2041 catcagtgct ctggcaggc tgatttctag gtaggaaatg tggtagctca cgctcacttt
2101 taatgaacaa atggccttta taaaaactg agtgactcta tatagctgat cagtttttct
2161 acctggaagc attgtttct actttgatat gactgtttt cggacagttt attgtttgag
2221 agtgtgacca aaagttacat gtttcacct ttctagtga aaataaagta tatttttct
40 2281 aaaaaaaaaa aaaaacgaca gcaacggaat tc.

上述 CTGF mRNA 序列之等效物為其選擇性拼接 (alternative splice) 形式、等位基因形式或同源物。同源物 (cognate) 為其他哺乳類物種之結締組織生長因子 mRNA，類似於 SEQ ID NO:1。相關於 SEQ ID NO:1 之 CTGF 核酸序列

5 為基因庫取得號 AK092280、AK125220、AY395801、AY550024、BT019794、CR541795、M92934、U14750、X78947，附於參考資料中。

降低 mRNA 之表現：此片語“降低 mRNA 之表現”係指投以一定量之干擾性 RNA，以降低細胞中目標基因之全長

10 mRNA 轉錄之量，因而降低 mRNA 轉譯成蛋白質，與不規則序列之控制組 RNA 相較。mRNA 表現之降低通常稱之為 mRNA “降低表現 (knock-down)”。降低表現之量係介於並包括 50% 至 100%，如實施例中所示範的。然而，本發明目的並不需要達到此種降低表現 (knock-down) 之程度。此外，兩

15 組干擾性 RNA，各自使用僅有輕微降低表現作用，但共同投予時則會有明顯增強作用。在一實施例中，單一 ds siRNA 之有效降低表現量達至多 70%。在另一實施例中，二或更多之 RNA 共同作用，有效降低表現量達至多 70%。

降低表現 (knock-down) 通常係以定量聚合酶連鎖反應

20 (QPCR) 之倍增而測量，或以西方墨漬或酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA) 測量蛋白質量。分析蛋白質之量可提供 mRNA 被 RNA 誘發靜默複合體 (RISC) 降解，以及轉譯抑制等兩項評估。其它用以測量降低表現之技術包括 RNA 溶液雜合法、核酸水解酶保護、北方雜合法、反轉錄、以微陣列監

測基因表現、抗體結合、放射免疫試驗以及螢光活化細胞分析。其它測量方法包括過度表現TGFβ2，其會誘發CTGF，之後加回CTGF siRNA，再以上述任一方法測量CTGF mRNA/蛋白之降低表現。

5 CTGF之抑制亦在人體或哺乳動物中眼睛疾病改善時觀測到。例如，與年紀相關之黃斑部退化，為一種緩慢或反覆性視覺損失，在青光眼病患中CTGF之抑制與CTGF mRNA之靜默可降低眼內壓，並延緩或預防個體症狀發作進而發展成青光眼之風險。

10 本發明實施例中之干擾性RNA為催化性作用，即干擾性RNA可僅以次計量級之量，達成目標mRNA之抑制作用。與反義療法相較，僅需使用明顯較少之干擾性RNA便可達到療效。

雙股干擾性RNA：雙股干擾性RNA(亦稱之為 ds
15 siRNA)，具有同義核苷酸序列與反義核苷酸序列，同義與反義核苷酸序列包含一至少19個核苷酸之至少接近完美鄰近之互補區域。該干擾性RNA之長度包含19至49核苷酸，並包含19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、
20 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。ds siRNA之反義序列係於在生理條件下與對應於SEQ ID NO:1之部分mRNA雜合，並具一至少19個核苷酸之至少接近完美鄰近互補區域，互補於該SEQ ID NO:1對應mRNA之雜合部分。

siRNA之反義股為siRNA之活性引導試劑，其中該反義

股結合至細胞中RISC複合物上，並引導該結合複合物結合至特定mRNA上，於該序列互補於反義RNA序列處，進而引發接下來該mRNA被該結合複合物切割。

篩選siRNA目標序列之技術係由Tuschl, T. *et al.*, “The siRNA User Guide”，於2004年5月6日修正，得自Rockefeller University 網頁；技術手冊 #506，“RNA Design Guidelines”，Ambion Inc.於Ambion’s web site；Invitrogen網頁，使用搜尋參數G/C含量最小值35%，最大55%；以及由Dharmacon網頁提供。目標序列係位於該mRNA之編碼區域或5’或3’未轉譯區域。

CTGF之DNA目標序列之一實施例係位於SEQ ID NO:1核苷酸1488至1506：

5’-ggtagtatcatcagatag-3’ SEQ ID NO:18。 nt1488

本發明之一雙股siRNA係以對應於SEQ ID NO:18為目標，並在每一股上具3’UU突出端：

5’-gguuaguaucaucagauagUU-3’ SEQ ID NO:25

3’-UUccaaucauaguagucuauc-3’ SEQ ID NO:26

該3’突出端可具有數個“U”殘基，例如介於並包括2、3、4、5與6個“U”殘基。5’端亦可具有5’核苷酸突出。本發明之一雙股siRNA係以對應於SEQ ID NO:18為目標，並在每一股上具3’TT突出端：

5’-gguuaguaucaucagauagTT-3’ SEQ ID NO:27

3’-TTccaaucauaguagucuauc-3’ SEQ ID NO:28

雙股siRNA之股可以髮夾環連接，形成如下之單股siRNA：

5'-gguuaguaucagauagUUNNN\

N

SEQ ID NO:29

3'-UUccaaucaguagucuaucNNNNN/

N為核苷酸A、T、C、G、U或經此技術領域已知之方法修飾。該核苷酸數字N為介於並包括3至23，或5至15，或7至13，或4至9，或9至11，或該核苷酸數字N為9。

表 1 列出 CTGF 之 SEQ ID NO:1 之 DNA 目標序列，得自本發明以前述方法設計之 siRNA。

表 1 siRNA 之 CTGF 目標序列

目標序列	SEQ ID NO:1 之起始序列號	SEQ ID NO:
gggcctcttctgtgacttc	379	2
ccgactggaagacacgttt	691	3
cccgggttaccaatgacaa	801	4
gggcaaaaagtgcacccgt	901	5
tccaagcctatcaagttgagctt	932	6
gcctatcaagttgagctt	937	7
gcatgaagacataccgagctaaatt	969	8
gctaaattctgtggagtat	986	9
gccattacaactgtcccggagacaa	1119	10
ggaagatgtacggagacat	1170	11
gagagtgaagacattaactcatta	1201	12
gccatgtcaaacaatagtctatct	1346	13
gggtaccagcagaaagggt	1473	14
ccagcagaaaggtagtat	1478	15
gcagaaaggtagtatcat	1481	16
gcagaaaggtagtatcatcagata	1481	17
ggtagtatcatcagatag	1488	18
ggtagtatcatcagatagctctta	1488	19
gagactgagtcaagttgttcctaa	1626	20
gcagactcagctctgacat	1660	21
tcagctctgacattctgattcgaat	1666	22
tcctgtcgattagactggacagctt	1712	23
gcttggtgcaagtgaattt	1733	24

如上述範例所指出，此技術領域者可使用表1所提供之目標序列設計干擾性RNA，具短於或長於表1所提供之序列，參照SEQ ID NO:1之序列位置，加入或刪除互補於或接近互補於SEQ ID NO:1之核苷酸。

- 5 被ds或ss siRNA之引導目標RNA切割反應具高度序列特異性。一般而言，包含等同於目標mRNA部份之同義核苷酸序列，以及完全互補於該同義序列之反義序列之siRNA為用以抑制CTGF mRNA之一實施例。然而，實施本發明並不需要同義與反義siRNA間100%互補。因此，本發明允許
- 10 序列變異，可能由於基因突變、細胞株多樣性或演化性變異。例如，接近目標序列，具有插入、刪去或單點突變之siRNA序列亦可有效抑制。

- 該反義序列siRNA具至少19個核苷酸之與mRNA目標序列至少接近完美之鄰近互補區域。“接近完美”意指該
- 15 siRNA之反義序列係“實質上互補於”，且該siRNA之同義序列係“實質上等同於”目標mRNA之至少部份序列。“等同度”，如此技術領域者所知，為核苷酸序列之間之相似度，以序列之間符合之程度決定。在一實施例中，RNA與目標mRNA序列具80%以及介於80%至100%互補度者，被認為乃
- 20 接近完美之互補，且可用於本發明。“完美”鄰近互補為鄰近鹼基對之標準華生-克立克鹼基對。“至少接近完美”之鄰近互補包括於此所使用之“完美”互補。用以決定等同度與互補度之電腦方法系設計以提供最佳核苷酸序列媒合，例如以BLASTP與BLASTN (Altschul, S. F., *et al.*(1990) *J. Mol.*

Biol. 215:403-410), 與FASTA。

SEQ ID NO:1之目標序列可為mRNA之5'或3'未轉譯區域, 以及mRNA之編碼區域。

雙股干擾性RNA之一或二者具有3'突出端, 為1至6個
5 核苷酸, 其可為核糖核酸或去氧核糖核酸或其混合物。突出端之核苷酸並非鹼基對。本發明之一實施例, 該干擾性ds RNA含有3'突出端TT或UU。

雙股siRNA之同義或反義股可為二單股所形成之二合體, 或是單一分子, 其中該互補區域為鹼基對, 並經一髮
10 夾狀區或環狀區共價聯結形成單股。一般相信該髮夾狀區會在細胞內被名為Dicer之蛋白質切割, 形成二單獨鹼基對RNA分子。

干擾性RNA可不同於自然產生之RNA, 為經插入、刪
去、取代或一或多個核苷酸經修飾。非核苷酸材料可結合
15 至干擾性RNA上, 不論是5'端或3'端, 或內部。此類設計一般係用於增加干擾性RNA對於核酸水解酶之抵抗性, 而增進細胞攝入、加強細胞內目標攻擊、幫助追蹤干擾性RNA或更進一步增進穩定度。例如, 干擾性RNA可在突出末端端包含一嘌呤核苷酸。將膽固醇聯結至ds siRNA同義股之
20 3'端, 如藉由一吡咯烷聯結基, 可增進siRNA之穩定性。其它修飾包括3'端生物素分子、具細胞穿透特性之胜肽、奈米顆粒、胜肽模擬物、螢光染劑或如樹枝狀高分子, 舉例而言。

核苷酸可於該分子之鹼基部份、糖基部份或磷酸鹽基

部份進行修飾，並在本發明實施例中執行其功能。修飾包括以烷基、烷氧基、胺基、去氨基、鹵素、羥基、硫基或其結合物取代。核苷酸可以類似物取代，以得更佳之穩定性，如以2'去氧-T取代U，或具一醣基修飾基，如以2'胺基或2'甲基、2'甲氧基乙基或2'-0,4'-C甲烯基橋鍵取代2'OH。核苷酸之嘌呤或嘧啶類似物包括黃質或次黃質、嘧啶、甲基硫腺嘌呤、7-去氮-腺苷與O-與N-修飾核苷酸。核苷酸之磷酸部分可將磷酸基上之一或多個氧以氮或硫取代(磷酸硫鹽基)修飾。

10 該反義siRNA上可有部份區域不與SEQ ID NO:1對應mRNA之一部分互補。非互補區域可為互補區域之3'、5'或兩端。

干擾性RNA可合成產生、體外轉錄產生、以siRNA表現載體或PCR表現組產生，舉例而言。干擾性RNA可為經轉染之siRNA以及體內表達之siRNA。

干擾性RNA可經化學合成，使用經保護之核糖核苷亞磷醯胺鹽與一般DNA/RNA合成儀，可得自供應商如Ambion Inc. (Austin, Texas)、Invitrogen (Carlsbad, CA)或Dharmacon (Lafayette, Colo., USA)。干擾性RNA可經由溶劑或樹脂萃取、沉澱、電泳、層析或其結合方式純化。此外，干擾性RNA僅須少量純化，若有需要，而避免由於樣品處理所造成之損失。

干擾性RNA可由重組質體表現而得，使用連續式或誘發式驅動子，如U6或H1 RNA pol III驅動子，巨細胞病毒驅

動子、SP6、T3或T7驅動子，為熟習此技術領域者所熟知。例如，得自InvivoGen (San Diego, CA)之psiRNATM可在細胞內產生siRNA，由RNA pol III驅動子驅動。表現自重組質體之干擾性RNA可以標準技術分離出。

- 5 用於表現干擾性RNA之病毒載體可衍生自腺病毒、腺相關病毒、痘苗病毒、反轉錄病毒(如慢病毒、桿狀病毒、嚙齒類白血病毒)、皰疹病毒或其類似物，使用上述，如用於質體之驅動子。病毒載體之篩選、干擾性RNA之表現方法以及傳送該病毒載體之方法為此技術領域之習知技
- 10 藝。

- 15 干擾性RNA之表現亦可使用SILENCER EXPRESSTM (AMBION, Austin, Texas)，經表現組(SECs)，使用人類H1、人類U6與小鼠U6驅動子，以PCR方式。靜默子(silencer)表現組為PCR產物，包括側接髮夾狀siRNA模版之驅動子與終
- 20 端子序列。轉染至細胞中時，髮夾狀siRNA係表現自PCR產物，並誘發特定靜默現象。

- 20 在生理條件下之雜合反應：“雜合”係指單股核酸(DNA或RNA)可相互作用，經由互補或接近互補之核酸形成氫鍵複合體，稱之為雜合體。雜合反應具敏感性與選擇性，使
- 20 得有興趣之特定序列等同於樣品，且為低濃度。雜合反應之特異性(即嚴苛度)係受控於體外預雜合與雜合溶液之鹽類或甲醯胺濃度。尤其是，嚴苛度會由於鹽類濃度減少、甲醯胺濃度增加或雜合溫度升高而增加。

例如，高嚴苛條件可於50%甲醯胺，37°C至42°C下進

行。較不嚴苛之條件可為35%至25%甲醯胺，於約30°C至35°C。雜合嚴苛環境之範例係提供於Sambrook, J., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.。嚴苛雜
5 合條件之其他範例包括400 mM NaCl、40 mM PIPES, pH 6.4, 1mM EDTA, 50°C或70°C，反應12至16小時，之後於70°C，以1XSSC，或是50°C，以1XSSC，50%甲醯胺清洗或雜合，之後於70°C，以0.3X SSC清洗，或於70°C以4XSSC或50°C以4XSSC，50%甲醯胺雜合，之後於67°C以1XSSC清洗。雜
10 合溫度較熔解溫度(T_m)低5-10°C，其中 T_m 係以介於19至49鹼基對長度之雜合體決定，使用下列計算式： $T_m\text{ }^{\circ}\text{C}=81.5+16.6(\log_{10}[\text{Na}^{+}])+0.41(\%G+C)-(600/N)$ ，其中N為雜合體中鹼基數目， $[\text{Na}^{+}]$ 為雜合緩衝液中鈉離子之濃度。

本發明之一實施例中，干擾性RNA之反義股，可在體
15 外高嚴苛環境下與CTGF mRNA雜合，會在生理條件下於體內結合。在高嚴苛環境下不會雜合之相關核酸可於較不嚴苛之環境下辨識與分離出。

單股干擾性RNA：如上所述，干擾性RNA最終會以單股形式作用。SS siRNA已發現會影響mRNA之靜默，儘管
20 較雙股RNA效用低。因此，本發明實施例亦提供ss siRNA之投藥，其中該單股siRNA可在生理條件下與對應於SEQ ID NO:1之部分mRNA雜合，並具一至少19個核苷酸之至少接近完美鄰近互補區域，互補於該SEQ ID NO:1對應mRNA之雜合部分。該ss siRNA具19至49個核苷酸，如同上述之

ds siRNA。該ss siRNA具5'磷酸根，或可於5'端進行原位或體內磷酸化。術語“5'磷酸化”係用於描述，如，聚核苷酸或寡核苷酸具一磷酸根，經由酯類連結至5'糖基上之C5'羥基（即，5'核糖或去氧核糖或其類似物）。該ss siRNA可具有單
5 -、二-或三磷酸基。

SS siRNA係以化學合成或經由用於ds siRNA之載體產生。5'磷酸根可經由激酶加入，或5'磷酸根可為RNA經核酸水解酶切割之結果。傳送方式類似ds siRNA。在一實施例中，ss siRNA具經保護末端與核酸水解酶抵抗修飾，投藥以產生
10 靜默作用。SS siRNA可乾燥儲存或溶於水溶液中。該溶液可含有緩衝液或鹽類以抑制黏合(annealing)或維持穩定。

髮夾狀干擾性RNA：髮夾狀干擾性RNA為單股，並在一股上同時具有同義與反義序列。以一DNA載體為例，對應於同義siRNA序列之至少19個核苷酸之DNA寡核苷酸，
15 係經由一短空間子與其反義互補序列聯結。若需要選擇表現載體，可加入3'端T與可形成限制酶切割區域之核苷酸。所得之RNA轉錄物會自行折疊，形成軀幹環狀之結構。

投藥模式：干擾性RNA可直接傳送至眼睛，經由眼部組織注射，如眼周、結膜、囊下、室內、玻璃體內、視網
20 膜下、眼球後或小管內注射；直接投予眼睛，使用導管或其他替代裝置，如視網膜藥片、眼內置入、栓劑或植入含有孔狀、非孔狀或明膠型材料；局部眼藥水或藥膏；或於凹陷內置入緩慢釋放裝置或於鞏膜附近(經鞏膜)或於眼內植入。室內注射可經由角膜進入前室，使試劑可達小樑網

狀組織。小管內注射可進入靜脈收集管道而排至Schlemm小管或進入Schlemm小管。

個體：患有眼睛病症，或有發展成眼睛病症風險之待治療個體為人體或其他哺乳動物體，具有與CTGF表現與活性相關之症狀或可發展成此症狀之風險，如CTGF-相關之眼部病症。此類眼部病症可包括，例如，青光眼、黃斑退化、糖尿病視網膜病變、脈絡膜血管新生、增生性玻璃體視網膜病變、傷口癒合，以及與過量增疤有關之症狀，由於內皮細胞增生或纖維過度增生。與此類病症相關之眼睛構造可包括，如視網膜、脈絡膜、水晶體、角膜、小樑網狀組織、視網膜桿、視錐、神經節、黃斑、虹膜、鞏膜、水樣液室、玻璃室、睫狀體、視神經盤、刺或視網膜中央凹。

配方與劑量：醫藥用配方包含一本發明干擾性RNA或其鹽類，至多99%重，以及醫藥上可接受眼用載體介質，如水、緩衝液、生理食鹽水、甘胺酸、透明質酸、甘露醇及其類似物。

本發明干擾性RNA可以溶液、懸浮液或乳劑形式投藥。下列範例為本發明可實施之具體配方。

	量，%重
干擾性RNA	至多99；0.1-99；0.1-50；0.5-10.0
羥基丙基甲基纖維素	0.5
氯化鈉	0.8
苯扎氯胺	0.01
EDTA	0.01
NaOH/HCl	qs pH 7.4
純水	qs 100 mL

	量，%重
干擾性RNA	至多99；0.1-99；0.1-50；0.5-10.0
磷酸鹽緩衝生理食鹽水	1.0
苯扎氯胺	0.01
聚山梨醇酯80	0.5
純水	qs 100 mL

	量，%重
干擾性 RNA	至多 99；0.1-99；0.1-50；0.5-10.0
磷酸鈉單鹼基鹽	0.05
磷酸鈉雙鹼基鹽(無水)	0.15
氯化鈉	0.75
EDTA 二鈉鹽	0.05
鯨蠟硬脂醚 EL	0.1
苯扎氯胺	0.01
HCl 及/或 NaOH	pH 7.3-7.4
純水	qs 至 100%

	量，%重
干擾性 RNA	至多 99；0.1-99；0.1-50；0.5-10.0
磷酸鹽緩衝生理食鹽水	1.0
羥基丙基-β-環糊精	4.0
純水	qs 100 mL

一般而言，本發明實施例中干擾性RNA之有效量係包含眼睛位置或附近之細胞內濃度為200 pM至100 nM，或1nM至50 nM，或5 nM至25 nM。局部組成物係經由表面傳送至眼睛，每日一至四次，依據醫師所熟知之投藥路徑斟酌。配方之pH值約為pH 4-9，或pH 4.5至pH 7.4。

既然精確的處方係由醫師斟酌，干擾性RNA可滴入一滴於每眼中，每日一至四次，或如醫師指示。有效劑量之

配方可依據數種因素，如年紀、種族或個體性別，或眼睛疾病之嚴重度。在一實施例中，干擾性RNA係局部傳送至眼睛，並到達小樑網狀組織、視網膜或視神經頭，達醫療劑量，因而減輕CTGF相關病症之發展。

- 5 可接受之載體：眼用可接受之載體為會導致最低或無眼部刺激感者，若有需要可提供適當防腐劑，並傳送一或多種均一劑量之本發明干擾性RNA。用於本發明干擾性RNA投藥之可接受載體包括Mirus TransIT[®]-TKO siRNA 轉染套組 (Mirus Corporation, Madison, Wisconsin)、
- 10 LIPOFECTIN[®]、lipofectamine、OLIGOFECTAMINE[™] (Invitrogen, Carlsbad, CA)、CELLFECTIN[®]、DHARMAFECT[™] (Dharmacon, Chicago, IL)，或聚陽離子如聚離胺酸、微脂體，或脂溶性試劑如膽固醇。微脂體係由標準載體形成脂類與固醇類，如膽固醇所形成，並可包括
- 15 一目標分子如具內皮細胞表面抗原親和性之單株抗體。此外，該微脂體可為PEG化之微脂體。

- 就眼部傳送而言，干擾性RNA可與眼用可接受之防腐劑、共-溶劑、界面活性劑、黏度增強劑、穿透度增強劑、緩衝液、氯化鈉或水，形成水性、無菌眼用懸浮液或溶液。
- 20 眼用溶液配方可將抑制劑溶解於生理上可接受之等張緩衝液中而製備。此外，眼用溶液可包括一眼用可接受之界面活性劑，幫助溶解該抑制劑。黏度建立劑，如羥基甲基纖維素、羥基乙基纖維素、甲基纖維素、聚乙基吡咯酮或其類似物，可加入本發明組成物中，以增進化合物之滯留

性。

為了製備無菌之眼用藥膏製劑，干擾性RNA係與防腐劑於適當載劑中結合，如油、液狀綿羊油或白色石油醚。無菌眼用凝膠配方可將該干擾性RNA懸浮於親水性基底中製備，該基底製備自，如，CARBOPOL[®]-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC)，或其類似物，依據此領域其他眼用製劑已知之技術。VISCOAT[®] (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) 可用於眼內注射，舉例而言。本發明之其他組成物可包含穿透度增強劑，如鯨蠟硬脂醚與TWEEN[®] 80(聚氧基乙

10 烯基山梨醇單月桂酸酯，Sigma Aldrich, St. Louis, MO)，在干擾性RNA較不易穿透至眼睛之情況下。

套組：本發明實施例係提供一套組，其包括可降低CTGF mRNA在細胞中之表現量之試劑。該套組包含一DNA模板，具有二不同驅動子，如T7驅動子、T3驅動子或SP6

15 驅動子，每一者皆可操作聯接至一核苷酸序列上，其代表對應於干擾性RNA之二互補單股RNA。RNA轉譯自DNA模板，並可黏合形成雙股RNA，有效降低目標mRNA之表現。套組可選擇性地含有放大引子，以倍增DNA模板之DNA序列與三磷酸核苷(即ATP、GTP、CTP與UTP)，以合成RNA。

20 選擇性地，該套組可含有二RNA聚合酶，每一者皆可結合至DNA模板之一驅動子上，並影響該連結驅動子處之核苷酸序列之轉錄，使用純化管柱，如使用尺寸排除管柱，純化單股RNA，並使用一或多種緩衝液，如用於黏合單股RNA之緩衝液，以產生雙股RNA，以及RNase A或RNase T以純

化雙股RNA。

範例 1

用於靜默小樑網狀組織細胞中 CTGF 之干擾性 RNA 以及測量靜默之標準

5 本發明係測試CTGF干擾性RNA降低人類小樑網狀組織(TM)內生性CTGF表現之能力。本發明亦提供決定干擾性RNA對於mRNA作用效力之標準，使用QPCR引子測量。

人類TM轉型細胞株品系GTM3或HTM-3之轉染(請見 Pang. I.H. et al., 1994. *Curr. Eye Res.* 13:51-63)，係使用體內
10 CTGF 干擾性 RNA 標準濃度 (100 nM) 與 LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California)，以1：1(w/v)之比例。市售設計未知序列干擾性RNA匯集物(*siGENOME SMARTPOOL* CTGF干擾性RNA(此處稱之為siRNA S4)，Dharmacon, Lafayette, Colorado)係用
15 以攻擊CTGF。不規則與核纖蛋白(lamin) A/C siRNA (Dharmacon)係作為控制組。

控制組試驗結果為，使用核纖蛋白A/C siRNA可得核纖蛋白A/C將近90%降低表現效率，與不規則干擾性RNA控制組相較。初始試驗顯示使用*siGENOME SMARTPOOL*
20 CTGFsiRNA M-012633-00-0020(siRNA S4)，引子/探針組 Q2，導向至CTGF 外顯子5之mRNA 3'UTR處，可得約20-30%之CTGF降低表現效率(第2B圖)。Q2為QPCR TAQMAN® 引子/探針組，購自ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA)。

為了決定CTGF siRNA低效率之原因，係測試數種變數。測試CTGF干擾性RNA之劑量反應，以決定是否未使用最佳之干擾性RNA濃度或干擾性RNA：脂質之比例。所得結果指出，CTGF siRNA低效率之原因並非所使用之干擾性RNA濃度或干擾性RNA：脂質之比例。由此可知細胞攝入對於siRNA活性之重要，以及轉染TM細胞本質上之困難，因此係依據上述條件決定TM細胞之轉染效率。轉染效率可為SITOXTM(Dharmacon)傳送至細胞質所引發之細胞死亡之反映結果，亦可以SIGLOTM(Dharmacon)測量細胞質螢光量而得。在此二情況下，幾乎所有細胞不是死亡(第1A圖；SITOXTM)就是發螢光(第1B圖；SIGLOTM)，顯示轉染效率接近大量，並非此方法之速率決定步驟。

此外，由Ambion Inc.(Austin, Texas)購得之三個額外CTGF siRNA，命名為siRNA S1、S2、S3，係與二不同之QPCR TAQMAN[®]引子/探針組Q1與Q2(Applied Biosystems, Foster City, CA)結合試驗。Ambion siRNA之目標序列如下，基因庫參考序列號 NM_001901，為CTGF之核苷酸：

以S1為目標：(nts 379-397)：gggcctcttctgtgacttc SEQ ID NO:2
 以S2為目標：(nts 901-919)：gggcaaaaaagtgcacccgt SEQ ID NO:5
 以S3為目標：(nts 1488-1506)：ggtagtatcatcagatag SEQ ID NO:18

在上述目標序列每一股上帶有3'TT突出端之雙股siRNA為：

siRNA S1：
 5'-gggccucuucugugacuucTT-3' SEQ ID NO:30
 3'-TTcccggagaagacacugaag-5' SEQ ID NO:31

siRNA S2 :

5'-gggcaaaaagugcauaaguTT-3' SEQ ID NO:32

3'-TTcccguuuuucacguaggca-5' SEQ ID NO:33。

5 siRNA S3 :

5'-gguuagaucaucagauagTT-5' SEQ ID NO:27

3'-TTccaucauaguagucuauc-5' SEQ ID NO:28

QPCR Q1引子為適當之序列，得自ABI ASSAY ON DEMAND™ Hs00170014_m1(Applied Biosystems)。

10 QPCR Q2正向引子具下列序列：

5'-CAGCTCTGACATTCTGATTCGAA-3' SEQ ID NO:34

以及QPCR Q2反向引子具下列序列：

5'-TGCCACAAGCTGGTCGACTCT-3' SEQ ID NO:35

Q2探針具下列序列：

15 5'-AATCGACAGGATTCCGATTCCTGAACAGTG-3' SEQ ID NO:36

並具一FAM基團於5'端(6-羧基螢光基團)以及一TAMRA基團於3'端(Applied Biosystems)。

相關於每一siRNA之siRNA目標處之引子/探針組位置係示於第2A圖中。第2A圖顯示CTGF基因外顯子(exon)(條狀)與內含子(intron)(線狀)結構與siRNA S1、S2與S3之位置，以及QPCR引子/探針組Q1與Q2，相關於基因庫CTGF序列NM_001901，該序列提供於SEQ ID NO:1。

第2B圖顯示CTGF mRNA使用外顯子5引子/探針組Q2進行之QPCR倍增。使用S1與S4 siRNA，並無偵測到明顯的CTGF mRNA降低表現。降低表現係於siRNA S2與S3中觀測到。引子/探針組Q2近似於S2與S3siRNA之目標，與S1

siRNA之目標相較。

第2C圖顯示CTGF mRNA使用外顯子4/5延伸引子/探針組Q1進行之QPCR倍增。每一siRNA皆偵測到CTGF mRNA之降低表現，S2 siRNA觀測到~90%之降低表現。該引子/探針組Q1之siRNA降低表現效率顯然較Q2引子/探針組高。

第2B與2C圖之資料顯示，使用3'-UTR-導向引子/探針組Q2倍增之特定區域相對地較穩定，因此是以siRNA攻擊而切割與降解CTGF mRNA之較差選擇。因此，在某些特定情況下，其QPCR倍增區域落於siRNA目標區域外，因而siRNA之效率不符報導。

為了降低非特異性、無目標作用之機會，係決定抑制CTGF mRNA表現量之最低可能siRNA濃度。CTGF mRNA降低表現係以QPCR倍增技術評估，使用引子/探針組Q1。CTGF S2 siRNA於GTM3細胞中之劑量反應係示於第3圖。以範例1之0、1、3、10、30與100 nM S2 siRNA處理GTM3細胞24小時後，觀測到 $IC_{50} \sim 2.5$ nM。數據係使用GraphPad Prism 4軟體 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)，以可變斜率、反曲(sigmoidal)劑量反應運算，頂端限制(top constraint)為100%。

由這些範例之結果顯示i)小樑網狀組織係進行siRNA靜默，ii)於此所引用之所有siRNA皆具有相當程度之靜默作用，以及iii)當使用PCR-為基礎之方法決定siRNA降低表現之效率時，PCR所使用之引子設計為包含siRNA目標序列，

以使靜默偵測最佳化。

目標 mRNA 被 RISC 內核酸水解酶切割發生於 siRNA 目標序列之中心 (Elbashir, S.M., *et al.*, 2001. *Gene Dev* 15:188-200), 並由 Argonaute RNaseH 活性完成 (Liu, J., *et al.*, 5 2001. *Science* 305:1437-1441)。然而, 並不保證剩餘的 mRNA 會被完全降解。穩定的 mRNA 片段會在 Argonaute 切割後存留, 且這些片段會經由 QPCR 倍增, 而產生不符報導之 siRNA 效力。本發明提供一實施例, 其中 QPCR 引子組包含 siRNA 目標序列, 以確保可讀出最佳 siRNA 效率。

10 於此所列出之參考資料, 其提供示範流程或其他補充性細節, 特別列於參考資料中。

熟習此技術領域者, 由本發明所揭示之內容, 可瞭解到可進行所揭示實施例之修飾, 而不脫離本發明精神與範疇。所有於此揭示之實施例皆可實施與執行, 不進行不適
15 當之試驗。本發明之完整範疇係包括揭示內容與實施例之等效物。此份說明書不應限制或窄化本發明之保護範圍。

如此所使用的術語, “一”係指“一種”、“至少一種”或“一或多種”, 除非另有指出。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示SITOX™資料，顯示小樑網狀組織細胞之轉染速率並非速率限制步驟，搭配第1B圖。GTM3細胞以SITOX™(Dharmacon)轉染控制。24小時後，係使用錐藍排除法決定在SITOX™培養液中存活之細胞數，其反映了相對轉染率。空心柱：未轉染；實心柱：以SITOX™轉染。

第1B圖顯示GTM3細胞攝入siRNA之SIGLO™影像，顯示細胞之轉染速率並非速率限制步驟，搭配第1A圖。GTM3細胞使用LIPOFECTAMINE 2000™，以SIGLO™ siRNA(Dharmacon)轉染。SIGLO™ siRNA攝入後24小時以螢光顯微鏡觀測(紅色不規則形狀)。單獨的細胞核係以DAPI (4',6-二醯胺基-2-苯基吲哚)，其為雙股DNA用染劑(藍色圓形區域)。依據第1A圖之資料與第1B圖之影像顯示，幾乎所有細胞不是死亡(SITOX™)就是發螢光(SIGLO™)。

第2A圖為CTGF基因外顯子(exon)(條狀)與內含子(intron)(線狀)結構與siRNA S1、S2與S3之位置，以及QPCR引子/探針組Q1與Q2，相關於基因庫CTGF序列NM_001901，該序列提供於SEQ ID NO:1。siRNA之序列/探針組係提供於範例1。

第2B圖顯示CTGF mRNA使用外顯子5之引子/探針組Q2進行之QPCR倍增。使用S1與S4 siRNA，並無偵測到明顯的CTGF mRNA降低表現(knock-down)。

第2C圖顯示CTGF mRNA使用外顯子4/5跨越區之引子/探針組Q1進行之QPCR倍增。每一 siRNA皆偵測到CTGF

mRNA降低表現，S2 siRNA觀測到~90%之降低表現。

第3圖顯示一滴定研究，其中各濃度之S2 siRNA係用以測試CTGF mRNA之降低表現(knock-down)。CTGF mRNA降低表現係以QPCR倍增評估，使用引子/探針組Q1。以範例1之0、1、3、10、30與100 nM S2 siRNA處理GTM3細胞24小時後，觀測到 IC_{50} ~2.5 nM。

【主要元件符號說明】

(無)

序列表

<110> Shepard, Allan R.
Pang, Iok-Hou

<120> 用於治療眼睛病症的結締組織生長因子(CTGF) RNA干擾(RNAi) 抑制技術

<130> 34576.42

<150> 60/638,705

<151> 2004-12-23

<160> 36

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2312

<212> DNA

<213> 人類

<400> 1

```
tccagtgacg gagccgcccc gccgacagcc ccgagacgac agcccggcgc gtcccgggtcc 60
ccacctccga ccaccgccag cgctccaggc cccgcgtcc ccgctcgccg ccaccgcgcc 120
ctccgctccg cccgcagtgc caaccatgac cgccgccagt atgggccccg tccgcgtcgc 180
cttcgtgggtc ctctcgccc tctgcagccg gccggccgtc ggccagaact gcagcgggcc 240
gtgccgggtgc ccggacgagc cggcgccgcg ctgcccggcg ggcgtgagcc tcgtgctgga 300
cggctgcggc tgctgccgcg tctgcgcaa gcagctgggc gagctgtgca ccgagcgca 360
cccctgcgac ccgcacaagg gcctcttctg tgacttcggc tccccggcca accgcaagat 420
cggcgtgtgc accgcaaag atggtgctcc ctgcatcttc ggtggtacg tgtaccgcag 480
cggagagtcc ttccagagca gctgcaagta ccagtgcacg tgcctggacg gggcgggtggg 540
ctgcatgccc ctgtgcagca tggacgttcg tctgcccagc cctgactgcc ctttcccag 600
gaggggtcaag ctgcccggga aatgctgcga ggagtgggtg tgtgacgagc ccaaggacca 660
aaccgtgggtt gggcctgccc tcgcggctta ccgactggaa gacacgtttg gccagaccc 720
aactatgatt agagccaact gcctggtcca gaccacagag tggagcgcct gttccaagac 780
ctgtgggatg ggcattctca cccgggttac caatgacaac gcctcctgca ggctagagaa 840
gcagagccgc ctgtgcatgg tcaggccttg cgaagctgac ctggaagaga acattaagaa 900
gggcaaaaag tgcattcgta ctccaaaat ctccaagcct atcaagtttg agctttctgg 960
ctgcaccagc atgaagacat accgagctaa attctgtgga gtatgtaccg acggccgatg 1020
ctgcaccccc cacagaacca ccaccctgcc ggtggagttc aagtgccttg acggcgaggt 1080
catgaagaag aacatgatgt tcatcaagac ctgtgcctgc cattacaact gtcccggaga 1140
caatgacatc tttgaatcgc tgtactacag gaagatgtac ggagacatgg catgaagcca 1200
gagagtgaga gacattaact cattagactg gaacttgaac tgattcacat ctcatTTTTT 1260
```

cgtaaaaatg atttcagtag cacaagttat ttaaattctgt ttttctaact gggggaaaag 1320
attccccacc aattcaaaac attgtgccat gtcaaacaaa tagtctatct tccccagaca 1380
ctggtttgaa gaatgttaag acttgacagt ggaactacat tagtacacag caccagaatg 1440
tatattaagg tgtggcttta ggagcagtg gagggtacca gcagaaagg tagtatcatc 1500
agatagctct tatacgagta atatgcctgc tttttgaagt gtaattgaga aggaaaattt 1560
tagcgtgctc actgacctgc ctgtagcccc agtgacagct aggatgtgca ttctccagcc 1620
atcaagagac tgagtcaagt tgttccttaa gtcagaacag cagactcagc tctgacattc 1680
tgattcgaat gacactgttc aggaatcgga atcctgtcga ttagactgga cagcttgtgg 1740
caagtgaatt tcctgtaaca agccagattt tttaaaattt atattgtaa tattgtgtgt 1800
gtgtgtgtgt gtgtatatat atatatatat gtacagttat ctaagttaat ttaaagttgt 1860
ttgtgccttt ttatttttgt ttttaatgct ttgatatttc aatgttagcc tcaatttctg 1920
aacaccatag gtagaatgta aagcttgtct gatcgttcaa agcatgaaat ggatacttat 1980
atggaaattc tctcagatag aatgacagtc cgtcaaaaca gattgtttgc aaaggggagg 2040
catcagtgtc cttggcaggc tgatttctag gtaggaaatg tggtagctca cgctcacttt 2100
taatgaacaa atggccttta ttaaaaactg agtgactcta tatagctgat cagttttttc 2160
acctggaagc atttgtttct actttgatat gactgttttt cggacagttt atttgttgag 2220
agtgtgacca aaagttacat gtttgcacct ttctagttga aaataaagta tattttttct 2280
aaaaaaaaa aaaaacgaca gcaacggaat tc 2312

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 目標序列

<400> 2
gggcctcttc tgtgacttc 19

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 目標序列

<400> 3
ccgactggaa gacacgttt 19

<210> 4

<211> 19
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 目標序列

<400> 4
cccgggttac caatgacaa 19

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 目標序列

<400> 5
tccaagccta tcaagtttga gcttt 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 目標序列

<400> 6
tccaagccta tcaagtttga gcttt 25

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 目標序列

<400> 7
gcctatcaag tttgagctt 19

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 目標序列

<400> 8
gcatgaagac ataccgagct aaatt 25

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>		
<223>	目標序列	
<400>	9	
	gctaaattct gtggagtat	19
<210>	10	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	目標序列	
<400>	10	
	gccattacaa ctgtcccgga gacaa	25
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	目標序列	
<400>	11	
	ggaagatgta cggagacat	19
<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	目標序列	
<400>	12	
	gagagtgaga gacattaact catta	25
<210>	13	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	目標序列	
<400>	13	
	gccatgtcaa acaaatagtc tatct	25
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	目標序列	

	<400> 14 gggtaccagc agaaaggtt	19
	<210> 15 <211> 19 <212> DNA <213> 人造	
:	<220> <223> 目標序列	
:	<400> 15 ccagcagaaa ggttagtat	19
	<210> 16 <211> 19 <212> DNA <213> 人造序列	
	<220> <223> 目標序列	
	<400> 16 gcagaaaggt tagtatcat	19
.		
	<210> 17 <211> 25 <212> DNA <213> 人造序列	
.		
.	<220> <223> 目標序列	
	<400> 17 gcagaaaggt tagtatcatc agata	25
	<210> 18 <211> 19 <212> DNA <213> 人造序列	
	<220> <223> 目標序列	
.	<400> 18 ggttagtatc atcagatag	19
.		
.	<210> 19 <211> 25 <212> DNA <213> 人造序列	
	<220> <223> 目標序列	
	<400> 19 ggttagtatc atcagatagc tctta	25

<210> 20	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 目標序列	
<400> 20	
gagactgagt caagttgttc cttaa	25
<210> 21	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 目標序列	
<400> 21	
gcagactcag ctctgacat	19
<210> 22	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 目標序列	
<400> 22	
tcagctctga cattctgatt cgaat	25
<210> 23	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 目標序列	
<400> 23	
tcctgtcgat tagactggac agctt	25
<210> 24	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 目標序列	
<400> 24	
gcttgtggca agtgaattt	19
<210> 25	

<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 同義股	
<400> 25	
gguuaguauc aucagauagu u	21
<210> 26	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 反義股	
<400> 26	
cuaucugaug auacuaaccu u	21
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 具有3'TT之同義股	
<220>	
<221> misc_RNA	
<222> (1)..(19)	
<223> 核醣核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (20)..(21)	
<223> 去氧核醣核苷酸	
<400> 27	
gguuaguauc aucagauagt t	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人造序列	
<220>	
<223> 具有3'TT之反義股	
<220>	
<221> misc_RNA	
<222> (1)..(19)	
<223> 核醣核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (20)..(21)	

<223> 去氧核糖核苷酸

<400> 28
cuaucugaug auacuaacct t 21

<210> 29
<211> 51
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 具環之髮夾狀雙股

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(21)
<223> 核糖核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(30)
<223> any, A, T/U, C, G

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(51)
<223> 核糖核苷酸

<400> 29
gguuaguauc aucagauagu unnnnnnnnnn cuaucugaug auacuaaccu u 51

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 具有3'TT之同義股

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

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 去氧核糖核苷酸

<400> 30
gggccucuuc ugugacuuct t 21

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>

<223> 具有3'TT之反義股

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> 核醣核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 去氧核醣核苷酸

<400> 31
gaagucacag aagaggccct t 21

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 具有3'TT之同義股

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> 核醣核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 去氧核醣核苷酸

<400> 32
gggcaaaaag ugcauccgut t 21

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造

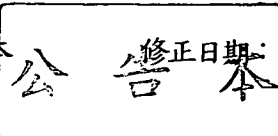
<220>
<223> 具有3'TT之反義股

<220>
<221> misc_RNA
<222> (1)..(19)
<223> 核醣核苷酸

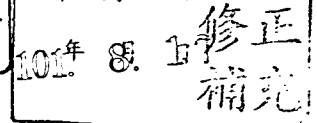
<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 去氧核醣核苷酸

<400> 33
acggaugcac uuuuugccct t 21

<210>	34	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	探針/引子序列	
<400>	34	
cagctctgac attctgattc gaa		23
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	探針/引子序列	
<400>	35	
tgccacaagc tgtccagtct		20
<210>	36	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	探針/引子序列	
<400>	36	
aatcgacagg attccgattc ctgaacagtg		30



修正日期: 101年8月17日



十、申請專利範圍：

1. 一種用於治療青光眼之組成物，其包含具19至49個核苷酸長度之干擾性RNA以及一醫藥上可接受載體，該干擾性RNA包含：

一同義(sense)核苷酸序列、一反義(antisense)核苷酸序列、以及一至少19個核苷酸至少接近完美鄰近(contiguous)互補之區域；

其中該反義序列可在生理條件下與SEQ ID NO:1對應之mRNA之一部分雜合，且具有一至少19個核苷酸至少接近完美鄰近互補的區域，互補於該SEQ ID NO:1所對應之mRNA之雜合部分，其中該反義序列係設計為以包含SEQ ID NO:1核苷酸691、801、901、932、937、969、986、1119、1170、1201、1346、1473、1478、1481、1488、1626、1660或1666之對應mRNA核苷酸序列為目標。

2. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該反義序列具一至少21至23個核苷酸至少接近完美鄰近互補之區域，互補於該SEQ ID NO:1對應之mRNA之雜合部分，並包含一額外的TT序列於每一同義與反義序列之3'端。
3. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該同義核苷酸序列與該反義核苷酸序列係以一環狀核苷酸序列相連接。
4. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該組成物係被製備為用以經局部、玻璃體內(intravitreal)，或經鞏膜(transcleral)路徑投藥。

5. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該反義序列係設計為以SEQ ID NO:1起始於核苷酸691、801、901、932、937、969、986、1119、1170、1201、1346、1473、1478、1481、1488、1626、1660或1666之對應mRNA核苷酸序列為目標。
6. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該反義序列係設計為以SEQ ID NO:1起始於核苷酸901或1488之對應mRNA核苷酸序列為目標。
7. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該反義序列係設計為以包含SEQ ID NO:1核苷酸901或1488之對應mRNA核苷酸序列為目標。
8. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該反義序列包含：
3'-TTcccguuuucacguaggca-5' SEQ ID NO:33。
9. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該反義序列包含：
3'-TTcccggagaagacacugaag-5' SEQ ID NO:31。
10. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該反義序列包含：
3'-TTccaaucauaguagucuauc-5' SEQ ID NO:28。
11. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該干擾性RNA包含：
5'-gggcaaaaagugcauccguTT-3' SEQ ID NO:32以及
3'-TTcccguuuucacguaggca-5' SEQ ID NO:33。
12. 如申請專利範圍第1項之組成物，其中該干擾性RNA包含：
5'-gguuagaucaucagauagTT-3' SEQ ID NO:27以及
3'-TTccaaucauaguagucuauc-5' SEQ ID NO:28。
13. 如申請專利範圍第1項之組成物，其更包含一具19至49

個核苷酸長度之第二干擾性RNA，並包含

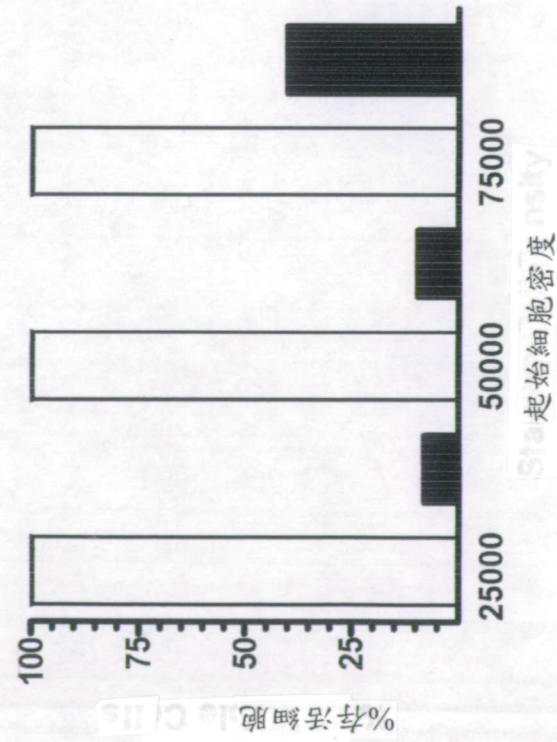
一同義核苷酸序列、一反義核苷酸序列、以及一至少19個核苷酸至少接近完美互補之區域；

其中該第二干擾性RNA之反義序列可在生理條件下與SEQ ID NO:1對應之mRNA之一第二部分雜合，以及該反義序列具一至少19個核苷酸至少接近完美鄰近互補之區域，互補於該SEQ ID NO:1對應之mRNA之第二雜合部分。

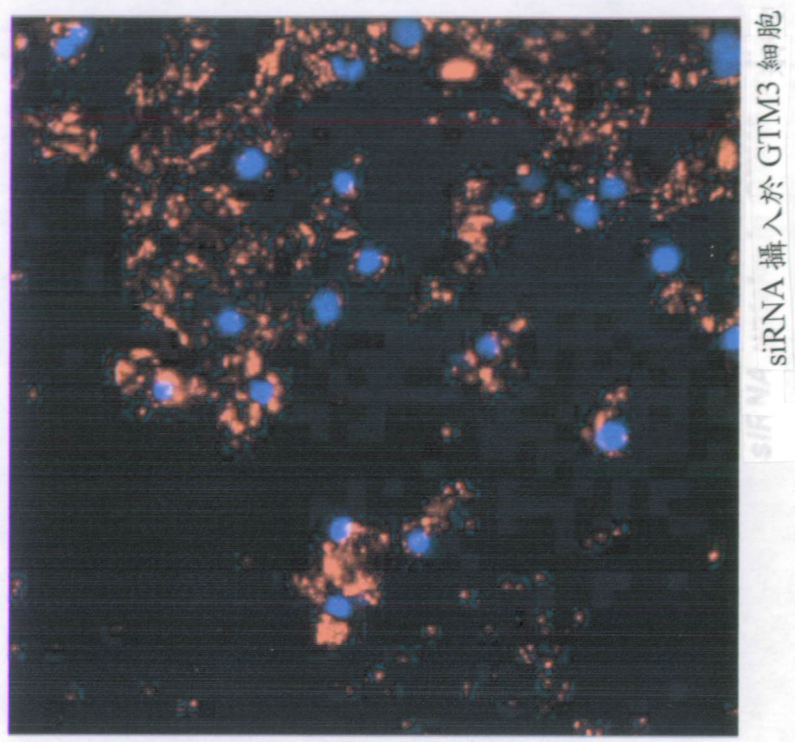
14. 一種用於治療青光眼之組成物，其包含一具19至49個核苷酸長度之單股干擾性RNA以及一醫藥上可接受載體，

其中該單股干擾性RNA可於生理條件下與SEQ ID NO:1起始於核苷酸691、801、901、932、937、969、986、1119、1170、1201、1346、1473、1478、1481、1488、1626、1660或1666對應之mRNA之一部分雜合，且該干擾性RNA具一至少接近完美互補之區域，互補於SEQ ID NO:1對應之mRNA之雜合部分。

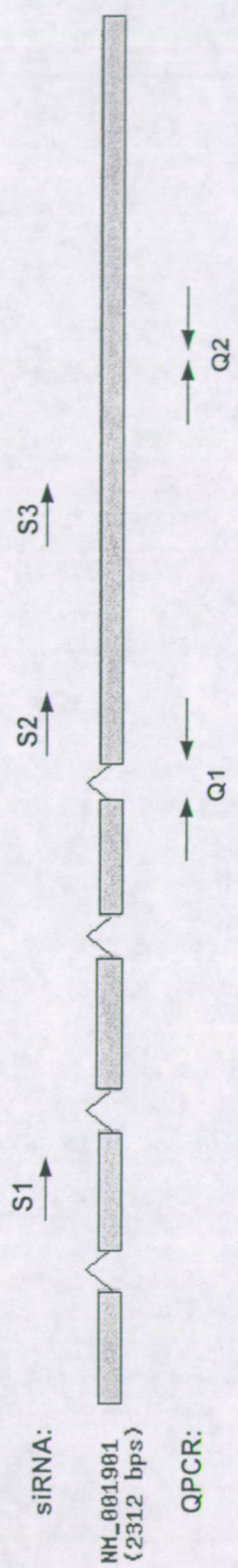
第 1A 圖



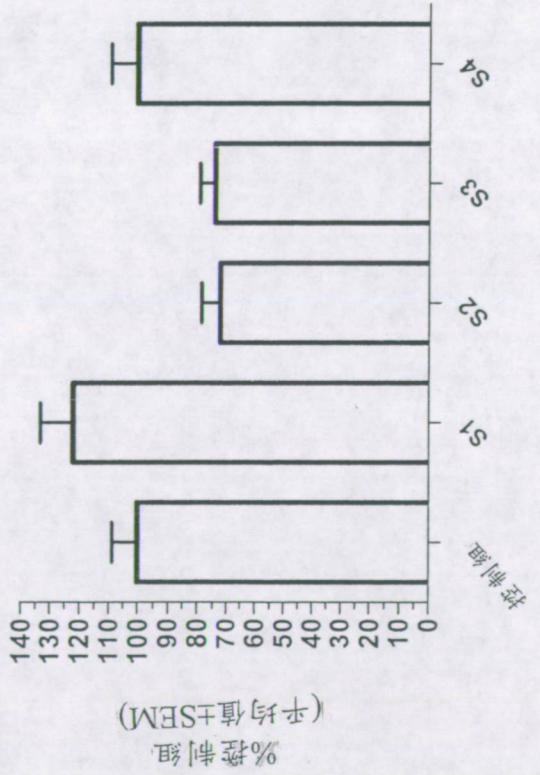
第 1B 圖



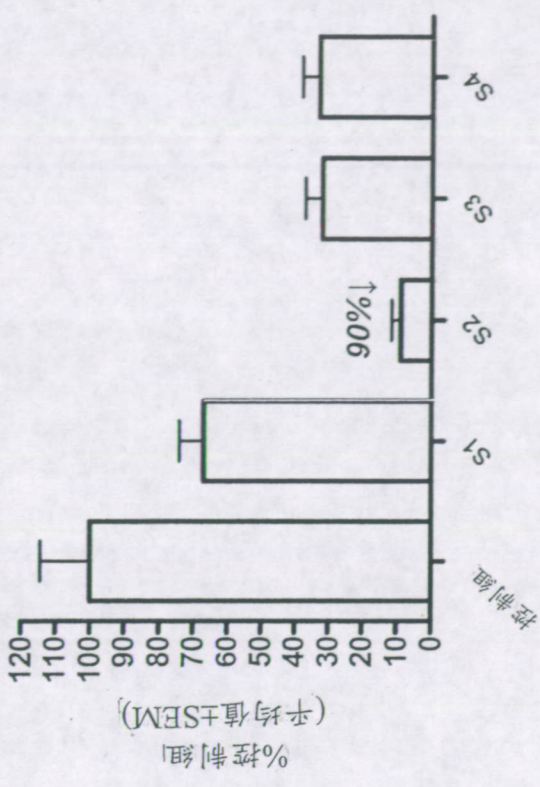
第 2A 圖



第 2B 圖



第 2C 圖



第 3 圖

