



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I407964B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：100116272

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 05 月 10 日

(51)Int. Cl. : **A61K31/7088 (2006.01)**

A61P29/00 (2006.01)

(71)申請人：私立輔仁大學(中華民國) FU JEN CATHOLIC UNIVERSITY (TW)

新北市新莊區中正路 510 號 輔仁大學

新光醫療財團法人新光吳火獅紀念醫院(中華民國) SHIN KONG WU HO SU
MEMORIAL HOSPITAL (TW)

臺北市士林區文昌路 95 號之新光吳火獅紀念醫院

(72)發明人：蔡明達 TSAI, MING DAR (TW)；李憶菁 LEE, YIH JING (TW)

(74)代理人：陳昭誠

(56)參考文獻：

US 20110044988A1

WO 2005037994A2

H. S. Smith, "One Door Opens, One Door Closes—Yielding Path to
Bradykinin-Induced Pain", Pain Physician, 2010, Vol. 13,
p.E317~E319.

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：1 共 0 頁

(54)名稱

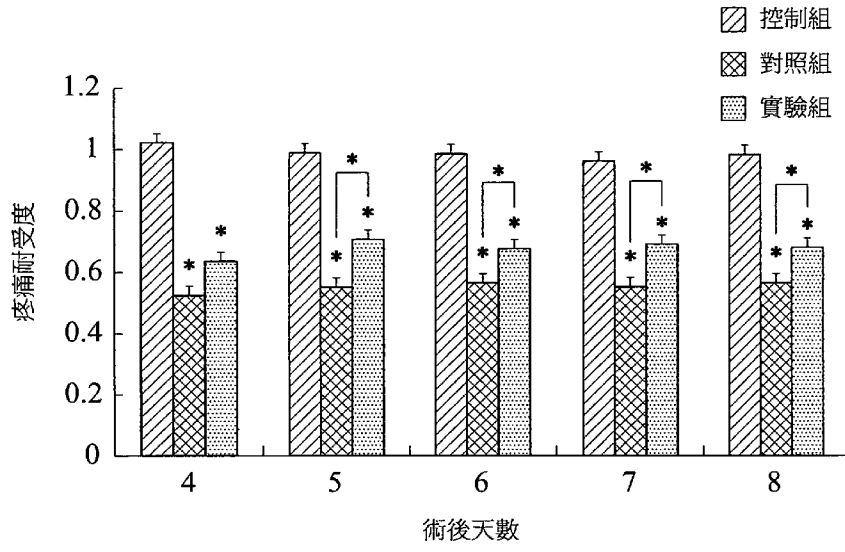
干擾性核糖核酸用於治療或減緩疼痛之用途

A USE OF A RNA INTERFERENCE FOR TREATING OR REDUCING PAIN

(57)摘要

干擾性核糖核酸用於治療或減緩疼痛之用途，該干擾性核糖核酸具有序列辨識編號 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之核酸序列，能夠有效抑制緩激肽 B2 受體表現，可用於治療或減緩神經病變性疼痛，或應用於製作減緩神經病變性疼痛之藥物。

A use of a RNA interference for treating or reducing pain. The RNA interference comprising the sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 is effective in blocking the expression of bradykinin B2 receptor. The RNA interference is useful for treating or reducing neuropathic pain and can be used for preparing a medicament for reducing neuropathic pain.



第1圖

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：10111272

※申請日：

※IPC 分類：

100. 5. 10

一、發明名稱：(中文/英文)

干擾性核糖核酸用於治療或減緩疼痛之用途

A USE OF A RNA INTERFERENCE FOR TREATING OR
REDUCING PAIN

二、中文發明摘要：

干擾性核糖核酸用於治療或減緩疼痛之用途，該干擾性核糖核酸具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之核酸序列，能夠有效抑制緩激肽 B2 受體表現，可用於治療或減緩神經病變性疼痛，或應用於製作減緩神經病變性疼痛之藥物。

三、英文發明摘要：

A use of a RNA interference for treating or reducing pain. The RNA interference comprising the sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4 is effective in blocking the expression of bradykinin B2 receptor. The RNA interference is useful for treating or reducing neuropathic pain and can be used for preparing a medicament for reducing neuropathic pain.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：
無。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於干擾性核糖核酸用於治療或減緩疼痛之用途，特別是有關於干擾性核糖核酸用於治療或減緩神經病變性疼痛之用途。

【先前技術】

疼痛是一種複雜的神經反應，身體或內臟神經末端的傷害感受器(nociceptor)，能夠感覺物理性、溫度、化學性的刺激。傷害性刺激，例如炎症、組織壞死、缺血、缺氧等情況發生時，組織會釋放一些激素或體液物質來激活痛覺受體，引起疼痛。包括乙醯膽鹼、5-羥色胺、組織胺、緩激肽及其同類的多肽類、前列腺素、鉀離子、氫離子以及組織損傷時產生的酸性產物等。

緩激肽是身體周邊出現發炎反應時所生成的一種胜肽，會強烈刺激痛覺受器，屬於疼痛的強刺激物。經研究發現，緩激肽是表現於痛苦感受神經元之緩激肽 B2 受體的促效劑，B2 受體經由緩激肽作用會促使痛苦感受神經纖維中 B2 受體的活化，而使人類或動物個體感到疼痛。若能有效阻斷緩激肽 B2 受體，即可進一步防止這些受體造成痛覺受器之活化。

神經性疼痛是神經系統異常所造成的一種疼痛。引起疼痛的原因很多，包括神經發炎、壓迫或受傷等因素。例如，感染疱疹病毒造成神經發炎之帶狀疱疹，這種神經痛常持續到疱疹皮症好了以後仍然存在，又稱為疱疹後神經

痛 (post-herpetic neuralgia)。此外，三叉神經痛、糖尿病、腦中風、脊髓外傷、周邊神經受傷、截肢後、以及腕隧道症候群的病人，都可能引發程度不一的神經性疼痛。另一方面，神經受壓迫或受傷，例如骨頭斷裂、椎間盤凸出（坐骨神經痛）或是腫瘤壓迫亦可能造成神經痛。

神經病變性疼痛 (Neuropathic pain) 對傳統止痛劑常發生反應不佳的困擾。另一方面，由於長期慢性的神經性疼痛，不僅有疼痛的症狀，還會合併失眠、焦慮、憂鬱等症狀，不但會影響工作表現，同時也會造成病人社會功能與生活品質的退化，除了個人的病痛外，對家庭與社會更是沉重的負擔。

因此，仍需要一種能夠有效治療或減緩疼痛，特別是神經病變性疼痛的方法。

【發明內容】

為達上述及其他目的，本發明提供一種干擾性核糖核酸用於治療或減緩疼痛之用途，該干擾性核糖核酸具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之核酸序列，能夠有效抑制緩激肽 B2 受體表現，可用於治療或減緩神經病變性疼痛，或應用於製作減緩神經病變性疼痛之藥物。

本發明之另一目的係提供一種干擾性核糖核酸用於製作減緩疼痛之醫藥品之用途，該醫藥品係以具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之干擾性核糖核酸作為活性成分，且視需要含有

醫藥可接受之載劑。

本發明之又一目的係提供一種用於治療或減緩疼痛之醫藥組成物，該組成物係以具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 核酸序列之干擾性核糖核酸作為活性成分，且視需要含有醫藥可接受之載劑。

本發明之再一目的係提供一種干擾性核糖核酸用於製作抑制緩激肽 B2 受體表現之醫藥品，該醫藥品係以具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之干擾性核糖核酸作為活性成分，且視需要含有醫藥可接受之載劑。

【實施方式】

以下係藉由特定的具體實施例說明本發明之實施方式，熟習此技藝之人士可由本說明書所揭示之內容輕易地瞭解本發明之優點及功效。本發明亦可藉由其它不同之實施方式加以施行或應用，本說明書中的各項細節亦可基於不同觀點與應用，在不悖離本發明所揭示之精神下賦予不同之修飾與變更。

核酸干擾是細胞用於調控基因表現的一種方式，主要是利用雙鏈核糖核酸(double-stranded RNA, dsRNA)降解細胞中的訊息核糖核酸(messenger RNA, mRNA)進而調控基因表現。進行核酸干擾之雙鏈核糖核酸會先被核糖核酸水解酵素 III (RNase III) 之酶切蛋白(Dicer)剪切成具有約 19 至 25 個連續核苷酸的小干擾核糖核酸(Small interfering RNA, siRNA)，該種小干擾核糖核酸與核糖核酸誘導沉默

複合體 (RNA-induced silencing complex, RISC) 結合，解旋成單鏈後，序列特異性地結合在標靶訊息核糖核酸上，專一性地調節基因表現，造成轉譯後基因沉默現象。

由於小干擾核糖核酸可經由多種不同轉染 (transfection) 技術導入細胞內，且對特定基因產生具專一性的阻斷 (knock-down) 效果，造成基因沉默現象，使小干擾核糖核酸成為研究基因功能與藥物目標的一項重要工具。在疾病治療方面，小干擾核糖核酸已被用於多種疾病治療，例如老年視黃斑退化、肌肉萎縮性側索硬化症、類風濕性關節炎、肥胖症等。另一方面，小干擾核糖核酸也被用於抗病毒治療，例如帕金森病等神經系統疾病，以及腫瘤治療。但目前為止，小干擾核糖核酸尚未有效地應用於疼痛治療，特別是與緩激肽 B2 受體表現有關的神經病變性疼痛治療。

本發明係使用干擾性核糖核酸，特別是具有約 19 至 25 個連續核苷酸的小干擾核糖核酸，透過抑制緩激肽 B2 受體表現之特性，應用於治療或減緩疼痛，例如神經病變性疼痛，或用於製作減緩疼痛之藥物。本發明所使用之干擾性核糖核酸可為單股干擾性核糖核酸或雙股干擾性核糖核酸，該干擾性核糖核酸至少一股具有列序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之核酸序列：

SEQ ID NO:1 5'- GCACUGUGGCUGAGAUCUA-3'

SEQ ID NO:2 5'- GAACGAGCGUGCCGUGGAU-3'

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

SEQ ID NO:4 5'- UGGUGAACACUAUGAUUA-3'

於另一具體實例中，本發明用於治療或減緩疼痛之醫藥品包括具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 及 SEQ ID NO:4 之干擾性核糖核酸之混合物。於該具體實例中，具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1 之干擾性核糖核酸、SEQ ID NO:2 之干擾性核糖核酸、SEQ ID NO:3 之干擾性核糖核酸及 SEQ ID NO:4 之之干擾性核糖核酸分別係以約 0.5-1.5 : 0.5-1.5 : 0.5-1.5 : 0.5-1.5 之比例存在於該干擾性核糖核酸之混合物中；較佳者，具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1 之干擾性核糖核酸、SEQ ID NO:2 之干擾性核糖核酸、SEQ ID NO:3 之干擾性核糖核酸及 SEQ ID NO:4 之之干擾性核糖核酸分別係以約 1 : 1 : 1 : 1 之比例存在於該干擾性核糖核酸之混合物中。

另一方面，本發明所使用之干擾性核糖核酸亦包括與列序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 作用之標靶 mRNA 具有至少 80% 互補度之 siRNA。

本發明所使用之干擾性核糖核酸可藉由化學合成法獲得，視需要在一股或雙股 5' 核苷酸之 5' 部分進行磷酸化，以增進該干擾性核糖核酸之功效。

於一具體實例中，本發明利用干擾性核糖核酸治療或減緩疼痛，係先將具有列序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 核酸序列之干擾

性核糖核酸，視需要搭配醫藥可接受之載劑，例如水、緩衝劑、鹽、甘胺酸、甘油(glycerol)、玻尿酸(hyaluronic acid)、甘露醇(mannitol)等；培養基；或轉染試劑配製為醫藥品，再利用注射的方式施予患者，例如靜脈注射(intravenous)、脊髓腔注射(intrathecal)、神經節側注射(periganglionic)、腦室內投予(intraventricular)、腦內投予(intraparenchymal)以及肌肉注射、皮下注射等。

以下係藉由特定之具體實施例進一步說明本發明之特點與功效，但非用於限制本發明之範疇。

實施例

製備例

將化學合成之單股小干擾核糖核酸(具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 及 SEQ ID NO:4 核酸序列之混合物)懸浮於生理食鹽水中，儲存濃度(stock concentration)200 μ M。使用時，以生理食鹽水稀釋至 200 nM，再以 155 μ l 之培養基及 7.5 μ l 之轉染試劑(oligofectamine)稀釋並培養 24 小時，即為實施樣品 1。

實施例 1

選用 200 至 250 克之雄性 SD 大鼠(Sprague-Dawley Rats)，所有動物係飼養於 12 小時亮光-12 小時暗光(12L-12D)之病原體控制環境，充足供應飲水，允許自由攝食。利用 Kim 和 Chung 等在 1992 年所提出之 SNL 模型(L5/L6 spinal nerve ligation model)，又稱為及神經結紮損傷模型，進行手術與試驗。SD 大鼠秤重後，使用水合三氯

乙醛以腹腔注射進行麻醉(RDH, 0.4 g/ml i.p.)。手術時，坐骨神經，以及腓腸(sural)、總腓(common peroneal)、脛神經(tibial nerves)等三條主要分支神經係暴露於左大腿，利用夾鉗(premium surgiclip)箝制左側 L5 脊神經，接著縫合肌肉及外皮。傷口癒合後，在加熱毯上恢復。大鼠分成兩組，控制組係於左邊 L5 脊神經進行結紮，實驗組係於左邊 L5 脊神經進行結紮，術後立即利用注射方式投予實施樣品 1，注射量為 200 μ l，注射位置為左腰椎，然後每 2~3 天在同部位再補劑一次。術後一週，進行疼痛感覺評估之行為測試。

所有實驗大鼠在接受基礎試驗前，皆飼養於測試環境 3 至 7 天。測試環境之室溫及溼度均保持穩定。

機械性觸感疼痛(mechanical allodynia): 使用電子式馮弗雷纖維細絲測試儀(Electronic Von Frey Anesthesiometer, IITC Life Science, 2390 型)進行機械性觸感疼痛測試。該測試所使用之單絲纖維係最大值 800 gm 之 Rigid Tip。該方法係測試大鼠後爪之坐骨神經分佈區域。將進行試驗之大鼠置於塑膠籠之鐵絲網層上，待大鼠安靜 5 至 10 分鐘後，進行測試。藉由戳刺大鼠中脛區(middle tibial zone)後掌所引起之撤足決定閾值刺激(threshold stimulus)。首先戳刺右後掌，再戳刺左後掌，使兩後掌均進行測試。受測試大鼠被戳刺的腿感覺疼痛時，可能會發生舔後掌、咬後掌之行為，或將重心移至相對位置。重複進行 11 次並記錄結果。結果如表 1 及第 1 圖所示。

表 1

術後天數	耐受度 (mean±SEM)		
	控制組	對照組	實驗組
4	102.7±3.4%	52.8±4.9%	64.4±5.4%
5	99.9±4.3%	55.4±3.5%	71.4±2.4%
6	99.6±3.2%	56.5±3.6%	68.2±2.7%
7	97.2±2.8%	55.7±3.6%	69.6±3.9%
8	99.0±2.9%	57.2±4.0%	68.7±3.2%

動物在疼痛時對於刺激的耐受度會降低，所以越低的刺激測量值，代表對疼痛的耐受度越差。動物實驗的耐受度(resistance)以百分比(%)來表示，因每隻動物的疼痛(刺激)耐受度不同，所以每隻動物個別未做任何手術或處理之前，腳掌可以耐受的刺激重量為該動物耐受度 100%。實驗動物分為沒有處理的控制組(Control)、進行神經結紮損傷模型手術的對照組(Neuropathic)、以及進行神經結紮損傷模型加上干擾性核糖核酸處理的實驗組(Neuropathic+RNAi)。

實驗數據以單因子變異數分析方法加上 Bonferroni 事後檢定分析，星號 * 代表與控制組比較或指示的兩組比較，有顯著的差異 $p < 0.05$ 。結果顯示，神經結紮損傷模型手術會讓動物的疼痛程度增加，但是加入干擾性核糖核酸處理之後，可以減緩疼痛的程度而增加耐受度，確實能夠

達到舒解或減輕疼痛之目的。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

第 1 圖係顯示本發明實施例 1 之結果。

【主要元件符號說明】

無。

序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 私立輔仁大學以及新光醫療財團法人新光吳火獅紀念醫院

<120> 干擾性核糖核酸用於治療或減緩疼痛之用途

<160> 4

<170> PatentIn Version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> SiRNA

<213>人工序列

<400> 1

gcacuguggc ugagaucua

19

<210> 2

<211> 19

<212> SiRNA

<213>人工序列

<400> 2

gaacgagcgu gccguggau

19

<210>3

<211> 19

<212> SiRNA

<213>人工序列

<400> 3

guuccuacgu ggccuauag

19

<210>4
<211> 19
<212> SiRNA
<213>人工序列

<400> 4

uggugaacac uaugauaua

19

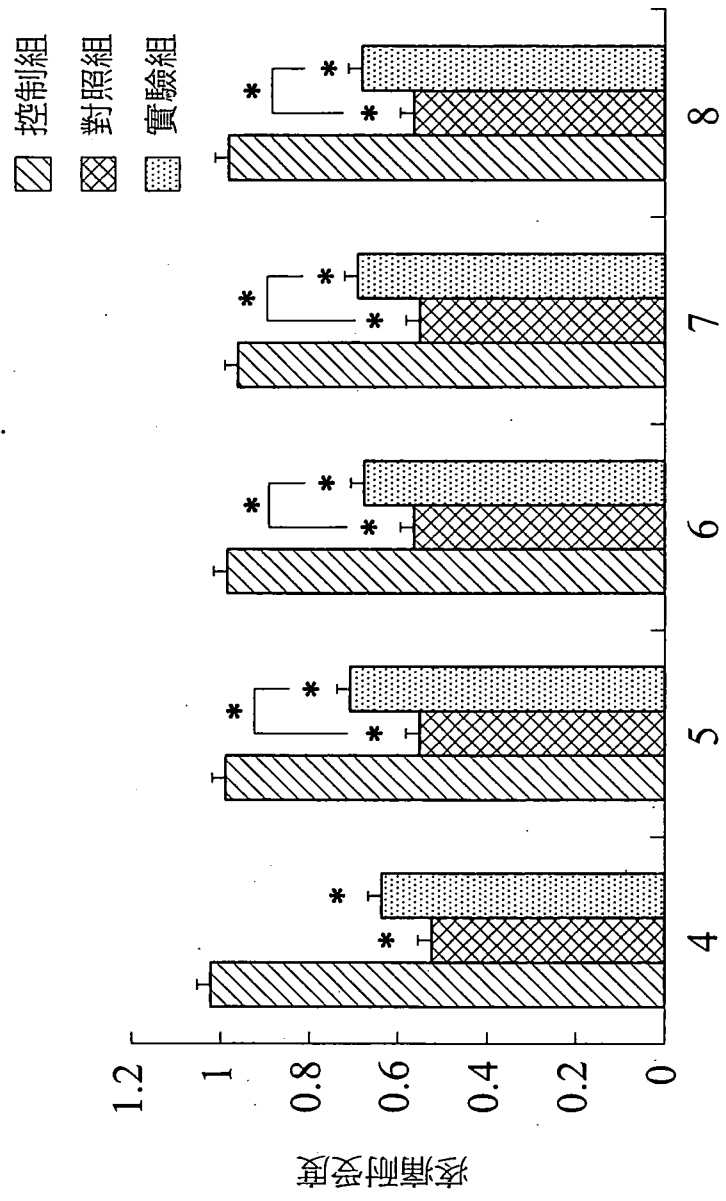
5

5

5

七、申請專利範圍：

1. 一種干擾性核糖核酸之用途，係用於製作減緩疼痛之醫藥品，該醫藥品係以具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之干擾性核糖核酸作為活性成分。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中，該疼痛係神經病變性疼痛。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中，該醫藥品復包括醫藥可接受之載劑。
4. 一種干擾性核糖核酸之用途，係用於製作抑制緩激肽 B2 受體表現之醫藥品，該醫藥品係以具有序列辨識編號 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 之干擾性核糖核酸作為活性成分。
5. 一種用於治療或減緩疼痛之醫藥組成物，係以具有 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 核酸序列之干擾性核糖核酸作為活性成分。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之組成物，復包括醫藥可接受之載劑。



術後天數

第1圖