



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102791861 B

(45)授权公告日 2018.08.07

(21)申请号 201080044917.1

(22)申请日 2010.09.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102791861 A

(43)申请公布日 2012.11.21

(30)优先权数据
61/246,080 2009.09.25 US
61/307,654 2010.02.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.04.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/050173 2010.09.24

(87)PCT国际申请的公布数据
W02011/038210 EN 2011.03.31

(73)专利权人 库尔纳公司

地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 J·克拉德 O·霍克瓦舍曼
C·科伊托

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

代理人 刘博

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

审查员 高雅

权利要求书2页 说明书49页
序列表17页 附图3页

(54)发明名称

通过调节聚丝蛋白(FLG)的表达和活性而治疗FLG相关疾病

(57)摘要

本发明涉及调节聚丝蛋白(FLG)的表达和/或功能的反义寡核苷酸和/或化合物,尤其是,通过靶向聚丝蛋白(FLG)的天然反义多核苷酸。本发明还涉及这些反义寡核苷酸和/或化合物的鉴定以及它们在治疗FLG表达相关的疾病和病症中的用途。

1. 长度为10至30个核苷酸的至少一种反义寡核苷酸在制备体内或体外上调患者细胞或组织中聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸的功能和/或表达的药物中的用途, 其中所述至少一种寡核苷酸靶向聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸的天然反义转录物, 并且与包括SEQ ID NO:2的核苷酸1至4629中的10至30个连续核苷酸的多核苷酸的反向互补序列具有序列同一性, 其中所述至少一种寡核苷酸的序列选自如SEQ ID NO:3、5、9-10和13所列的至少一种寡核苷酸序列。

2. 靶向聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸的天然反义转录物的至少一种反义寡核苷酸在制备体内或体外调节患者细胞或组织中聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸的功能和/或表达的药物中的用途, 所述反义寡核苷酸在体内或体外上调患者细胞或组织中聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸的功能和/或表达, 且长度为10-30个核苷酸, 其中所述天然反义转录物的序列选自SEQ ID NO:2, 其中所述至少一种寡核苷酸的序列选自如SEQ ID NO:3、5、9-10和13所列的至少一种寡核苷酸序列。

3. 如权利要求2所述的用途, 其中所述至少一种反义寡核苷酸包括选自以下的一种或多种修饰: 至少一种修饰的糖部分、至少一种修饰的核苷间键、至少一种修饰的核苷酸、和其组合。

4. 如权利要求3所述的用途, 其中所述一种或多种修饰包括选自以下的至少一种修饰的糖部分: 2'-O-甲氧乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、二环的糖部分、和其组合。

5. 如权利要求3所述的用途, 其中所述一种或多种修饰包括选自以下的至少一种修饰的核苷间键: 硫代磷酸酯、2'-O甲氧乙基 (MOE)、2'-氟、膦酸烷基酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代膦酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酯、羧甲基酯、和其组合。

6. 如权利要求3所述的用途, 其中所述一种或多种修饰包括选自以下的至少一种修饰的核苷酸: 肽核酸 (PNA)、锁核酸 (LNA)、阿拉伯糖-核酸 (FANA)、类似物、衍生物、和其组合。

7. 长度为10至30个核苷酸的至少一种短干扰RNA (siRNA) 寡核苷酸在制备体内或体外调节哺乳动物细胞或组织中聚丝蛋白 (FLG) 基因的功能和/或表达的药物中的用途, 所述至少一种siRNA寡核苷酸是对聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸的具有选自SEQ ID NO:2所列序列的天然反义转录物有特异性的, 在体内和或体外上调哺乳动物细胞或组织中聚丝蛋白 (FLG) 基因的功能和/或表达, 其中所述至少一种siRNA寡核苷酸的序列选自如SEQ ID NO:3、5、9-10和13所列的至少一种寡核苷酸序列。

8. 长度为10至30个核苷酸的至少一种反义寡核苷酸在制备体内或体外上调哺乳动物细胞或组织中聚丝蛋白 (FLG) 的功能和/或表达的药物中的用途, 所述至少一种反义寡核苷酸是对聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸的天然反义链的非编码序列和/或编码序列特异性的, 其中所述至少一种反义寡核苷酸与如SEQ ID NO:2所列的核酸序列的反向互补序列具有序列同一性, 其中所述至少一种反义寡核苷酸的序列选自如SEQ ID NO:3、5、9-10和13所列的至少一种寡核苷酸序列。

9. 一种长度为至少约10至30个核苷酸的合成的、修饰的寡核苷酸, 所述寡核苷酸包括至少一种修饰, 其中所述至少一种修饰选自: 至少一种修饰的糖部分; 至少一种修饰的核苷酸间键; 至少一种修饰的核苷酸、和其组合; 其中所述寡核苷酸是与聚丝蛋白 (FLG) 基因的天然反义转录物杂交并与正常对照相比体内或体外上调其功能和/或表达的反义化合物, 其中所述天然反义转录物的序列选自SEQ ID NO: 2, 其中所述合成的、修饰的寡核苷酸的

序列选自如SEQ ID NO:3、5、9-10和13所列的至少一种寡核苷酸序列。

10. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述至少一种修饰包括选自以下组成的组的核苷酸间键:硫代磷酸酯、膦酸烷基酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代膦酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酯、羧甲基酯、和其组合。

11. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括至少一种硫代磷酸酯核苷酸间键。

12. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括硫代磷酸酯核苷酸间键的主链。

13. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括至少一种修饰的核苷酸,所述修饰的核苷酸选自:肽核酸、锁核酸(LNA)、类似物、衍生物、和其组合。

14. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括多个修饰,其中所述修饰包括选自以下的修饰的核苷酸:硫代磷酸酯、膦酸烷基酯、二硫代磷酸酯、烷基硫代膦酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙酰胺酯、羧甲基酯、和其组合。

15. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括多个修饰,其中所述修饰包括选自以下的修饰的核苷酸:肽核酸、锁核酸(LNA)、类似物、衍生物、和其组合。

16. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括选自以下的至少一种修饰的糖部分:2'-O-甲氧乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、二环的糖部分、和其组合。

17. 如权利要求9所述的寡核苷酸,其中所述寡核苷酸包括多个修饰,其中所述修饰包括选自以下的修饰的糖部分:2'-O-甲氧乙基修饰的糖部分、2'-甲氧基修饰的糖部分、2'-O-烷基修饰的糖部分、二环的糖部分、和其组合。

18. 一种组合物,所述组合物包含权利要求9所述的一种或多种寡核苷酸。

19. 如权利要求18所述的组合物,其中所述组合物进一步包括一种或多种FLG调节分子和药学上可接受的载体。

20. 如权利要求19所述的组合物,其中所述分子选自吡格列酮、洛美利嗪、安非他酮、苯丙氨酯、贝尼地平、吡罗昔康、托吡酯、伊拉地平、尼可地尔、吡贝地尔、奥沙普秦、格隆溴铵、格拉司琼、美金刚胺、尼莫地平 and 氨氯地平。

21. 如权利要求18所述的组合物,其中如SEQ ID NO:3、5、9-10和13所列的寡核苷酸包括一种或多种修饰或取代。

22. 如权利要求21所述的组合物,其中所述一种或多种修饰选自:硫代磷酸酯、膦酸甲酯、肽核酸、锁核酸(LNA)分子、和其组合。

通过调节聚丝蛋白 (FLG) 的表达和活性而治疗FLG相关疾病

发明领域

[0001] 本申请要求2009年9月25日提交的美国临时专利申请No. 61/246,080和2010年2月24日提交的美国临时专利申请No. 61/307,654的优先权,其通过引用全文并入本文。

[0002] 本发明的实施方案包括调节FLG和相关分子的表达和/或功能的寡核苷酸。

[0003] 背景

[0004] 聚丝蛋白是一种高度带电的阳离子蛋白,有助于角质蛋白丝的募集以及随后的二硫键键合。其来源于聚丝蛋白原,所述聚丝蛋白原是一种很大(4400kD)的经磷酸化的前体,表示为在表皮的颗粒层中的透明角质颗粒。在从颗粒层转移至角质层的过程中,聚丝蛋白原通过位点特异性的蛋白质水解作用和去磷酸化作用而变为聚丝蛋白。除了聚丝蛋白原加工成聚丝蛋白之外,从颗粒细胞向角质形成细胞的转变还具有以下特征:细胞核及其他细胞器的降解、角质化包膜的组装、以及角蛋白中间纤维网络重组成二维层状结构。聚丝蛋白对于产生和保持弹性且含水的角质层起着关键的作用,并且聚丝蛋白的水解被密切地调控,以便产生形成天然保湿因子(NMF)重要部分的游离氨基酸。在响应于仍未知的启动信号而从颗粒层向角质层的转变时,颗粒状前体(聚丝蛋白原)迅速变为弥散分布的蛋白。聚丝蛋白原表示为前体,而不是成熟的蛋白,这表明必须调控聚丝蛋白表达以防止细胞毒性作用。很多炎症性皮肤状况以伴有角化不全的颗粒层衰退为特征,即在角质层的角质形成细胞中保留有细胞核。虽然在这些炎症性状况中破坏终末分化的信号可以是不同的,但共同的最终主题是颗粒层的消失及随后的不完整终末分化。在聚丝蛋白原减少(如过敏性皮炎),或者实质上没有聚丝蛋白原(如寻常型鱼鳞病)的情况下,由于NMF-耗尽的角质层在环境的变干作用下没有能力保持含水,因而角质层的品质受到危害。

[0005] 天然保湿因子(NMF)在维持角质层的水分含量中执行着重要的功能。有报道指出,形成NMF重要成分的氨基酸由源自透明角质颗粒的经蛋白水解切割的聚丝蛋白产生。聚丝蛋白是一种由317个氨基酸组成的蛋白。由于已经阐明形成NMF重要成分的氨基酸源自于聚丝蛋白,因此一直推进对呈现干性皮肤的病态状态与聚丝蛋白的关系的研究。近年来,已经阐明如在老年性干燥症、特应性疾病等中所见那样,在此类干性皮肤中角质层的氨基酸含量有所减少,并且在这种干性皮肤中聚丝蛋白的表达有所减少。进而,众所周知皮肤问题例如皮肤粗糙是由于干燥环境所导致的。

[0006] 聚丝蛋白基因在建立皮肤屏障层中发挥作用,该基因的突变会导致一些状况,如湿疹。聚丝蛋白在皮肤最外层中是一种丰富蛋白,并且由聚丝蛋白基因产生。聚丝蛋白的功能是有助于产生位于皮肤最外层的不透性皮肤屏障层以及保持这些含水。皮肤固有的屏障功能类似于塑料膜或保鲜膜-用于防止皮肤的失水,重要的是保护身体免受来自环境中异物的侵害,如过敏原。缺乏完整的皮肤屏障会导致过敏原进入身体引起一系列的过敏反应,包括湿疹、哮喘、花粉热及其他的过敏症。

[0007] DNA-RNA杂交和RNA-RNA杂交对于核酸功能的许多方面是重要的,包括DNA复制、转录和翻译。杂交对于检测特定核酸或改变其表达的多种技术也是关键的。反义核苷酸,例如通过与靶RNA杂交从而干扰RNA剪接、转录、翻译和复制来破坏基因表达。反义DNA具有额外

的特性,即DNA-RNA杂合体用作被核糖核酸酶H消化的底物,这是在大多数细胞类型中存在的活性。反义分子可被递送到细胞中,如寡脱氧核苷酸(ODN)的情形,或反义分子可从内源基因表达为RNA分子。FDA最近批准了一种反义药物VITRAVENE™(用于治疗巨细胞病毒视网膜炎),反映了反义药物具有治疗效用。

[0008] 发明概述

[0009] 提供本概述以展示本发明的概述,以简要地指出本发明的性质和实质。提交本概述应理解的是,其不会用来解释或限制权利要求书的范围或含义。

[0010] 在一个实施方案中,本发明提供通过利用靶向天然反义转录物任何区域的反义寡核苷酸,导致相应有益基因的上调而抑制天然反义转录物作用的方法。本文还预期,天然反义转录物的抑制可由siRNA、核酶和小分子实现,认为这些在本发明的范围中。

[0011] 一个实施方案提供体内或体外调节患者细胞或组织中FLG多核苷酸的功能和/或表达的方法,包括将所述细胞或组织与长度为5至30个核苷酸的反义寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸与包括SEQ ID NO:2的核苷酸1至4629中的5至30个连续核苷酸的多核苷酸的反向互补序列具有至少50%序列同一性,从而体内或体外调节患者细胞或组织中FLG多核苷酸的功能和/或表达。

[0012] 在一个实施方案中,寡核苷酸靶向FLG多核苷酸的天然反义序列,例如,SEQ ID NO:2所列的核苷酸,和其任何变体、等位基因、同系物、突变体、衍生物、片段和互补序列。反义寡核苷酸的实例如SEQ ID NO:3至13所列。

[0013] 另一实施方案提供体内或体外调节患者细胞或组织中FLG多核苷酸的功能和/或表达的方法,包括将所述细胞或组织与长度为5至30个核苷酸的反义寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸与FLG多核苷酸的反义的反向互补序列具有至少50%序列同一性;从而体内或体外调节患者细胞或组织中FLG多核苷酸的功能和/或表达。

[0014] 另一实施方案提供体内或体外调节患者细胞或组织中FLG多核苷酸的功能和/或表达的方法,包括将所述细胞或组织与长度为5至30个核苷酸的反义寡核苷酸接触,其中所述寡核苷酸与FLG反义多核苷酸的反义寡核苷酸具有至少50%序列同一性;从而体内或体外调节患者细胞或组织中FLG多核苷酸的功能和/或表达。

[0015] 在一个实施方案中,组合物包括一种或多种结合有益和/或反义FLG多核苷酸的反义寡核苷酸。

[0016] 在一个实施方案中,组合物包括一种或多种结合有益和/或反义FLG多核苷酸的反义寡核苷酸、一种或多种FLG调节分子、药学上可接受的载体和其组合。

[0017] 在一个实施方案中,寡核苷酸包括一种或多种修饰或取代的核苷酸。

[0018] 在一个实施方案中,寡核苷酸包括一种或多种修饰的键。

[0019] 在又一实施方案中,修饰的核苷酸包括包含硫代磷酸酯、磷酸甲酯、肽核酸、2'-O-甲基、氟-或碳-亚甲基或其它锁核酸(LNA)分子的修饰的碱基。优选地,修饰的核苷酸是锁核酸分子,包括(α -L-LNA)。

[0020] 在一个实施方案中,寡核苷酸被皮下、肌内、静脉内或腹膜内地施用于患者。

[0021] 在一个实施方案中,寡核苷酸以药物组合物施用。治疗方案包括向患者施用反义化合物至少一次;然而,可修改该治疗以包括经一段时间的多个剂量。该治疗可与一种或多种其它类型的治疗联合。

[0022] 在一个实施方案中,寡核苷酸以药物组合物施用。治疗方案包括向患者施用包含一种或多种反义化合物和一种或多种FLG调节分子的组合物至少一次;可修改该治疗以在一段时间内包括多个剂量。该治疗可与一种或多种其它类型的治疗联合。

[0023] 在一个实施方案中,寡核苷酸被封装在脂质体中或被连接于载体分子(如,胆固醇、TAT肽)。

[0024] 其它方面在以下描述。

[0025] 附图简述

[0026] 图1是实时PCR结果的图,用利用Lipofectamine 2000引入的硫代磷酸酯寡核苷酸处理HepG2细胞后与对照相比FLG1 mRNA的倍数变化+标准差。实时PCR结果显示,用针对FLG1反义AK056431设计的两种寡核苷酸,HepG2细胞中FLG1 mRNA的水平显著增加。标为CUR-1157、CUR-1158、CUR-1159、CUR-1160和CUR-1161的条柱分别对应用SEQ ID NO:3、4、5、6和7处理的样品。

[0027] 图2显示用利用Lipofectamine 2000引入的带有3'反向T和2' O甲基gapmer磷酸二酯寡核苷酸的磷酸二酯寡核苷酸处理518A2细胞后与对照相比FLG1 mRNA的变化倍数+标准差。实时PCR结果显示,用针对FLG1反义AK056431设计的两种寡核苷酸,518A2细胞中FLGmRNA的水平显著增加。标为CUR-1128、CUR-1129、CUR-1130和CUR-1131的条柱分别对应用SEQ ID NO:8、9、10和11处理的样品。

[0028] 图3显示用利用Lipofectamine 2000引入的磷酸二酯寡核苷酸处理518A2细胞后与对照相比FLG1 mRNA的倍数变化+标准差。实时PCR结果显示,用针对FLG1反义AK056431设计的两种寡核苷酸,518A2细胞中FLG mRNA的水平显著增加。标为CUR-1396和CUR-1397的条柱分别对应用SEQ ID NO:12和13处理的样品。

[0029] 图4显示与未处理细胞相比,用化合物-吡格列酮、洛美利嗪、安非他酮、苯丙氨酯、贝尼地平、吡罗昔康、托吡酯、伊拉地平、尼可地尔、吡贝地尔、奥沙普秦、格隆溴铵、格拉司琼、美金刚胺、尼莫地平和氨氯地平处理的518A2细胞和原代角质形成细胞中聚丝蛋白mRNA表达的倍数变化。

[0030] 序列列表描述:

[0031] SEQ ID NO:1:智人聚丝蛋白(FLG),mRNA(NCBI登记号:NM_002016);SEQ ID NO:2:天然FLG反义序列AK056431;SEQ IDNO:3至13:反义寡核苷酸。*指示硫代磷酸酯键且'm'指示2' O me修饰。

[0032] 详述

[0033] 下面参考用于示例的实例应用来描述本发明的多个方面。应理解的是,列出许多具体细节、关联和方法以提供对本发明的完全理解。然而,相关领域普通技术人员将容易认识到,可没有一种或多种具体细节地实践本发明或以其它方法实践本发明。本发明不限于行为或事件的顺序,因为一些行为可以不同顺序进行和/或与其它行为或事件同时进行。而且,并非所有列举的行为或事件都是实施根据本发明的方法所需的。

[0034] 本文公开的所有基因、基因名称和基因产物意为对应来自本文公开的组合物和方法可适用的任何物种的同系物。因此,这些术语包括但不限于来自人和小鼠的基因和基因产物。应理解的是,当公开来自具体物种的基因或基因产物时,这一公开意为仅是示例,不解释为限制,除非其存在的上下文清楚地指明。因此,例如,对于本文公开的基因,其在一些

实施方案中涉及哺乳动物核酸和氨基酸序列,意为涵盖来自其它动物的同源和/或直系同源基因和基因产物,所述其它动物包括但不限于其它哺乳动物、鱼、两栖类、爬行动物和鸟类。在一个实施方案中,基因或核酸序列是人的。

[0035] 定义

[0036] 本文所用的术语仅是为了描述具体实施方案的目的,不意为限制本发明。除非上下文另外清楚地指明,否则本文所用的单数形式“一(a)”、“一个/种(an)”和“该(the)”意为包括复数形式。而且,在详述和/或权利要求书中使用术语“包括(including)”、“包括(includes)”、“具有(having)”、“具有(has)”、“带有(with)”或其变化形式的程度上,这些术语以类似于术语“包含(comprising)”的方式意图为内含式的。

[0037] 术语“约”或“大约”是指对于由本领域普通技术人员确定的特定数值在可接受的误差范围内,其将部分地取决于如何测量或确定该数值,即,测量系统的限度。例如,按照本领域中的实践,“约”可表示在1个或多于1个标准差内。可选地,“约”可表示给定数值的达20%、优选地达10%、更优选地达5%、仍更优选地达1%的范围。可选地,尤其是有关生物系统或方法,术语可表示在数值的数量级内,优选地在5倍内,更优选地在2倍内。当在本申请和权利要求书中描述特定数值时,除非另外指明,否则应假设术语“约”对特定数值表示在可接受的误差范围内。

[0038] 本文所用的术语“mRNA”是指靶基因的目前已知的mRNA转录物、和可能说明的任何进一步的转录物。

[0039] “反义寡核苷酸”或“反义化合物”是指结合另一RNA或DNA(靶RNA、DNA)的RNA或DNA分子。例如,如果其是RNA寡核苷酸,其借助于RNA-RNA相互作用结合另一RNA靶并改变靶RNA的活性。反义寡核苷酸可上调或下调特定多核苷酸的表达和/或功能。该定义意为包括从治疗、诊断或其它观点有用的任何外来RNA或DNA分子。这种分子包括,例如,反义RNA或DNA分子、干扰RNA(RNAi)、微RNA、诱饵RNA分子、siRNA、酶促RNA、治疗性编辑RNA和激动剂与拮抗剂RNA、反义寡聚化合物、反义寡核苷酸、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、可选剪接体、引物、探针、和与靶核酸的至少一部分杂交的其它寡聚化合物。如此,这些化合物可以单链、双链、部分单链或环状寡聚化合物的形式被引入。

[0040] 在本发明的范畴中,术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)或其模拟物的寡聚物或聚合物。术语“寡核苷酸”还包括天然和/或修饰的单体或键合的线性或环状寡聚物,包括脱氧核糖核苷、核糖核苷、取代形式和其 α -异头形式、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)、硫代磷酸酯、膦酸甲酯、和类似物。寡核苷酸能够经由规则方式的单体间相互作用,诸如Watson-Crick型碱基配对、Hoögsteen或逆Hoögsteen型碱基配对或类似物特异性结合靶多核苷酸。

[0041] 寡核苷酸可以是“嵌合的”,即,包括不同区域。在本发明的范畴中,“嵌合”化合物是寡核苷酸,其包含两个或多个化学区域,例如,DNA区域、RNA区域、PNA区域等等。每个化学区域由至少一个单体单位构成,在寡核苷酸化合物的情形中所述单体单位即为核苷酸。这些寡核苷酸通常包括至少一个区域,其中寡核苷酸被修饰以表现一种或多种期望特性。寡核苷酸的期望特性包括但不限于,例如,对核酸酶降解增加的耐受性、增加的细胞摄取、和/或对靶核酸增加的结合亲和力。因此,寡核苷酸的不同区域可具有不同特性。如上所述,本发明的嵌合寡核苷酸可形成为两种或多种寡核苷酸的混合结构、修饰的寡核苷酸、寡核苷

和/或寡核苷酸类似物。

[0042] 寡核苷酸可包括可被“成行(register)”地连接(即当单体被连续地连接时,如在天然DNA中)的区域,或经由间隔物连接的区域。预期间隔物构成区域之间的共价“桥”,在优选情形中具有不超过约100个碳原子的长度。间隔物可携带不同功能性,例如,具有正电荷或负电荷,携带特殊的核酸结合特性(嵌入剂、槽沟结合物、毒素、荧光团等等),为亲脂的,诱导特殊的二级结构,如例如,诱导 α -螺旋的含丙氨酸的肽。

[0043] 本文所用的“FLG”和“聚丝蛋白”包括所有家族成员、突变体、等位基因、片段、种类(species)、编码和非编码序列、有义和反义多核苷酸链等等。

[0044] 本文所用的词语‘聚丝蛋白’、FLG、FLG1和ATOD2被认为在文献中是相同的,并且在本文中可交换地使用。

[0045] 本文所用的术语“对...有特异性的寡核苷酸”或“靶向...的寡核苷酸”是指具有(i)能够与靶基因的一部分形成稳定复合体,或(ii)能够与靶基因的mRNA转录物的一部分形成稳定双链体的序列的寡核苷酸。复合体和双链体的稳定性可通过理论计算和/或体外测定来确定。用于确定杂交复合体和双链体的稳定性的示例测定在以下实施例中描述。

[0046] 本文所用的术语“靶核酸”涵盖DNA、从这种DNA转录的RNA(包括pre-mRNA和mRNA)、还有从这种RNA衍生的cDNA、编码序列、非编码序列、有义或反义多核苷酸。寡聚化合物与其靶核酸的特异性杂交干扰核酸的正常功能。特异性地与靶核酸杂交的化合物对靶核酸功能的这一调节通常称为“反义”。待干扰的DNA功能包括,例如,复制和转录。待干扰的RNA功能包括所有重要功能,诸如例如,RNA向蛋白翻译位置的移位,从RNA翻译蛋白,剪接RNA以产生一种或多种mRNA物质,可能由RNA参与或促进的催化活性。这种干扰靶核酸功能的总效果是调节编码产物或寡核苷酸的表达。

[0047] RNA干扰“RNAi”由对其“靶”核酸序列具有序列特异性的同源性的双链RNA(dsRNA)分子介导。在本发明的某些实施方案中,介导体是5-25个核苷酸的“小干扰”RNA双链体(siRNA)。siRNA来源于称为Dicer的RNase酶对dsRNA的加工。siRNA双链体产物被募集到称为RISC(RNA诱导沉默复合体)的多蛋白siRNA复合体中。不希望受任何特定理论束缚,认为随后RISC被引导至靶核酸(适当地为mRNA),在那里siRNA双链体以序列特异性方式相互作用来以催化方式介导裂解。根据本发明可使用的小干扰RNA可根据本领域公知并且本领域普通技术人员熟悉的方案合成和使用。用于本发明方法的小干扰RNA适当地包括约1至约50个核苷酸(nt)。在非限制性实施方案的实例中,siRNA可包括约5至约40nt、约5至约30nt、约10至约30nt、约15至约25nt或约20-25个核苷酸。

[0048] 通过利用自动比对核酸序列并指明同一性或同源性的区域的计算机程序来便于选择适当的寡核苷酸。这种程序用来比较获得的核酸序列,例如通过搜寻数据库诸如GenBank或通过对PCR产物测序。比较来自一定物种范围的核酸序列允许选择在物种之间展示适当的同一性程度的核酸序列。在未被测序的基因的情形中,进行Southern印迹以允许确定靶物种与其它物种的基因之间的同一性程度。如本领域所熟知的,通过以不同的严格性程度进行Southern印迹,可能获得近似的同一性测量。这些方案允许选择展现与待控制的受治疗者中的靶核酸序列的高程度互补性和与其它物种中的相应核酸序列的较低程度互补性的寡核苷酸。本领域技术人员将认识到,在选择用于本发明的基因的适当区域方面存在相当大的自由。

[0049] “酶促RNA”是指具有酶促活性的RNA分子(Cech, (1988) J.American.Med.Assoc. 260, 3030-3035)。酶促核酸(核酶)通过首先结合靶RNA来作用。这种结合经由被保持在邻近用于裂解靶RNA的分子的酶促部分处的酶促核酸的靶结合部分来进行。如此,酶促核酸首先识别靶RNA然后经由碱基配对结合靶RNA,结合到正确位置时,酶促地作用以切割靶RNA。

[0050] “诱饵RNA”是指模拟对配体的天然结合结构域的RNA分子。因此,诱饵RNA与天然结合靶竞争结合特定配体。例如,已经显示HIV反式激活响应(TAR) RNA的过表达可作为“诱饵”起作用并有效地结合HIV tat蛋白,从而阻止其结合HIV RNA中编码的TAR序列。这表示一个特定的实例。本领域技术人员将认识到,这仅是一个实例,利用本领域通常已知的技术可容易地产生其它实施方案。

[0051] 本文所用的术语“单体”通常是指被磷酸二酯键或其类似物连接以形成大小从数个单体单位如约3-4个至约数百个单体单位的寡核苷酸的单体。磷酸二酯键合的类似物包括:硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、硒代磷酸酯、氨基磷酸酯和类似物,如以下更完全地描述。

[0052] 术语“核苷酸”涵盖天然存在的核苷酸以及非天然存在的核苷酸。本领域技术人员应清楚的是,此前被认为是“非天然存在的”各种核苷酸后来已在自然界中发现。如此,“核苷酸”不仅包括已知的含嘌呤和嘧啶杂环的分子,还包括其杂环类似物和互变异构体。其它类型的核苷酸的示例性实例是含腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、嘌呤、黄嘌呤、二氨基嘌呤、8-氧代-N6-甲基腺嘌呤、7-脱氮黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N4,N4-桥亚乙基胞嘧啶、N6,N6-桥亚乙基-2,6-二氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-(C3-C6)-炔基胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、假异胞嘧啶、2-羟基-5-甲基-4-三唑并吡啶、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、肌苷的分子,和Benner等,美国专利No.5,432,272中描述的“非天然存在的”核苷酸。术语“核苷酸”预期涵盖这些实例的每一种和所有以及其类似物和互变异构体。尤其感兴趣的核苷酸是包含腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶的那些,它们被认为是与在人的治疗和诊断应用有关的天然存在的核苷酸。核苷酸包括天然2'-脱氧糖和2'-羟基糖,如,在Kornberg和Baker, DNA Replication (DNA复制), 第2版。(Freeman, San Francisco, 1992) 中描述的,以及它们的类似物。

[0053] 提及核苷酸的“类似物”包括具有修饰的碱基部分和/或修饰的糖部分的合成的核苷酸(参见如,通常描述于Scheit, Nucleotide Analogs (核苷酸类似物), John Wiley, New York, 1980; Freier&Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25 (22), 4429-4443, Toulmé, J. J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochimica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S.M., (1997) Nucleic Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E. (2000) Drug Discovery&Development, 3:203-213, Herdewin P. (2000) Antisense&Nucleic Acid DrugDev., 10:297-310); 2'-0,3'-C-连接的[3.2.0]二环阿拉伯糖核苷。这种类似物包括被设计以增强结合特性,如,双链体或三链体稳定性、特异性、或类似特性的合成的核苷酸。

[0054] 本文所用的“杂交”是指寡聚化合物的大致互补链的配对。配对的一种机制包括寡聚化合物的链的互补核苷或核苷酸碱基(核苷酸)之间的氢键合,其可以是Watson-Crick、Hoögsteen或逆Hoögsteen氢键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是经由氢键形成而配对的互补核苷酸。杂交可在不同情况下发生。

[0055] 当反义化合物与靶核酸的结合干扰靶核酸的正常功能以导致功能和/或活性的调节时,该化合物是“可特异性杂交的”,且在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件下,和在体外测定的情形中进行测定的条件下)存在足够程度的互补性以避免反义化合物与非靶核酸序列的非特异性结合。

[0056] 本文所用的短语“严格杂交条件”或“严格条件”是指本发明化合物将与其靶序列杂交,但与最小数目的其它序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的且在不同情况中将是不同的,并且在本发明范畴中,寡聚化合物与靶序列杂交的“严格条件”由寡聚化合物的性质和组成以及研究它们的测定决定。通常,严格杂交条件包括低浓度(<0.15M)的带无机阳离子诸如Na⁺⁺或K⁺⁺的盐(即,低离子强度)、比寡聚化合物:靶序列复合体的T_m高20°C-25°C的温度、和存在变性剂诸如甲酰胺、二甲基甲酰胺、二甲亚砷、或去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)。例如,对于每种1%甲酰胺,杂交率降低1.1%。高严格杂交条件的一个实例是在60°C,0.1×氯化钠-柠檬酸钠缓冲液(SSC)/0.1%(w/v) SDS进行30分钟。

[0057] 本文所用的“互补”是指一条或两条寡聚链上的两个核苷酸之间准确配对的能力。例如,如果在反义化合物某一位置的核碱基能够与在靶核酸某一位置的核碱基成氢键,所述靶核酸为DNA、RNA或寡核苷酸分子,则认为寡核苷酸与靶核酸之间的氢键合位置是互补位置。当每个分子的足够数目的互补位置被可彼此成氢键的核苷酸占据时,寡聚化合物和另外的DNA、RNA或寡核苷酸分子是彼此互补的。因此,“可特异性杂交”和“互补”是用来表示经足够数目的核苷酸足够程度的准确配对或互补性,从而在寡聚化合物和靶核酸之间发生稳定和特异性结合的术语。

[0058] 本领域应理解的是,寡聚化合物的序列不必与待可特异性杂交的其靶核酸的序列100%互补。而且,寡核苷酸可经一个或多个区段杂交,从而其间的或相邻区段不牵涉在杂交事件中(如,环结构、错配或发夹结构)。本发明的寡聚化合物包括与其所靶向的靶核酸序列中靶区域的至少约70%、或至少约75%、或至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约99%序列互补性。例如,其中反义化合物的20个核苷酸中的18个与靶区域互补从而将特异性杂交的反义化合物将表示90%互补性。在这一实例中,其余非互补核苷酸可成串或散布互补核苷酸,不必彼此连续或与互补核苷酸连续。如此,具有侧翼为与靶核酸具有完全互补性的两个区域的4(四)个非互补核苷酸的长度为18个核苷酸的反义化合物将与靶核酸具有77.8%总互补性,因此落入本发明的范围中。反义化合物与靶核酸的区域的互补性百分比可常规地利用本领域已知的BLAST程序(基本局部比对搜索工具)和PowerBLAST程序来确定。同源性、序列同一性或互补性的百分比可通过例如使用Smith和Waterman的算法(Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489)的Gap程序(Wisconsin序列分析软件包,用于Unix的版本8, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)确定,并使用默认设置。

[0059] 本文所用的术语“熔点(T_m)”是指在指定离子强度、pH和核酸浓度下,与靶序列互补的寡核苷酸的50%平衡地与靶序列杂交的温度。通常,严格条件将是其中盐浓度为至少约0.01至1.0M Na离子浓度(或其它盐)、pH 7.0至8.3,且对于短寡核苷酸(如,10至50个核苷酸)温度为至少约30°C的条件。严格条件还可通过加入去稳定剂诸如甲酰胺来实现。

[0060] 本文所用的“调节”是指基因表达的增加(刺激)或减少(抑制)。

[0061] 术语“变体”当在多核苷酸序列的上下文中使用时,可涵盖相对于野生型基因的多

核苷酸序列。这一定义还可包括,例如,“等位”、“剪接”、“物种”或“多态”变体。剪接变体可具有与参考分子显著的同源性,但由于在mRNA加工期间外显子的可选剪接通常将具有更大数目或更少数目的多核苷酸。相应的多肽可具有另外的功能结构域或缺少结构域。物种变体是在物种之间不同的多核苷酸序列。本发明中特别有用的是野生型基因产物的变体。变体可来源于核酸序列中至少一种突变,并可产生改变的mRNA或产生结构或功能可能改变或可能不改变的多肽。任何给定的天然或重组基因可具有0种、一种或多种等位基因形式。产生变体的常见突变改变通常归因于核苷酸的天然缺失、插入或取代。在给定序列中,这些类型改变的每一种可单独发生,或联合其它类型改变发生一次或多次。

[0062] 所得的多肽通常将具有相对于彼此显著的氨基酸同一性。多态变体是指定物种的个体之间特定基因的多核苷酸序列的变化。多态变体还可涵盖“单核苷酸多态性”(SNP)或其中多核苷酸序列差异为一个碱基的单碱基突变。SNP的存在可能指示,例如,具有对疾病状态的倾向的某一群体,所述倾向相比于耐受性为易感性。

[0063] 衍生物多核苷酸包括经受化学修饰,例如以烷基、酰基或氨基代替氢的核酸。衍生物如,衍生物寡核苷酸,可包括非天然存在的部分,诸如改变的糖部分或糖间键合。这些中示例的有硫代磷酸酯和本领域已知的其它含硫物质。衍生物核酸还可包含标记,包括放射性核苷酸、酶、荧光剂、化学发光剂、显色剂、底物、辅因子、抑制剂、磁性粒子和类似物。

[0064] “衍生物”多肽或肽是被修饰的多肽或肽,所述修饰例如糖基化、聚乙二醇化、磷酸化、硫酸化、还原/烷基化、酰化、化学偶合或适度福尔马林处理。衍生物还可被修饰以包含直接或间接可检测的标记,包括但不限于,放射性同位素、荧光和酶标记。

[0065] 本文所用的术语“药学上可接受的盐”是指由药学上可接受的无毒性碱或酸制备的盐。当本发明的化合物是酸性的时,其相应的盐可以容易地由药学上可接受的无毒性碱(包括无机碱和有机碱)制备。来源于这种无机碱的盐包括铝、铵、钙、铜(高价和低价)、铁、亚铁、锂、镁、锰(高价和低价)、钾、钠、锌等盐。来源于药学上可接受的有机无毒性碱包括伯胺、仲胺和叔胺的盐,以及环胺和取代的胺,例如自然生成和合成的取代胺。可形成盐的其他药学上可接受的有机无毒性碱包括离子交换树脂,例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙基氨基乙醇、2-二甲基氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、葡萄糖胺、葡萄糖胺、组氨酸、哈胺、异丙胺、赖氨酸、葡甲胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。

[0066] 当本发明的化合物是碱性的时,其相应的盐可以容易地由药学上可接受的无毒性酸(包括无机酸和有机酸)制备。这种酸包括例如醋酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡萄糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘液酸、硝酸、双羟萘酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸等。药学上可接受的盐的例子包括但不限于如胺类等碱性残基的矿物酸盐或有机酸盐;如羧酸等酸性残基的碱盐或有机盐等。所述药学上可接受的盐包括常用的无毒性盐或者例如由无毒性的无机酸或有机酸所形成的母体化合物的季铵盐。例如,这种常用的无毒性盐包括那些源自如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等无机酸的盐;以及由例如醋酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸、羟乙磺酸等有机酸制备的盐。

[0067] 本发明的药学上可接受的盐可通过常规的化学方法合成。一般来说,所述盐通过在适当溶剂或溶剂组合中使游离碱或酸与化学计量的或过量的形成所需盐的无机酸或碱或者有机酸或碱反应来制备。

[0068] 本发明的化合物可以具有不对称中心,并且以外消旋物、外消旋混合物和单独的非对映异构体的形式出现。所有这些异构体(包括光学异构体)均包括在本发明内。

[0069] 护肤产品的例子包括但不限于保湿剂、防晒制品、防晒乳液、按摩油、沐浴油、香水、香脂、面霜、面膜、剃须泡沫和凝胶剂。化妆品的例子包括但不限于唇膏、粉底霜、眼影、眼线笔、腮红(blusher)和遮瑕膏(concealer)。清洁产品的例子包括但不限于洗发剂(特别是去头皮屑洗发剂)、香皂、个人清洗用品(包括沐浴露(shower gel)、泡沫剂(bubble bath)、织物去污剂、碗盘去污剂)。护发产品的例子包括但不限于头发定型摩丝、头发定型喷雾剂、头发定型凝胶剂、护发素(hair conditioner)或染发剂(hair colourant)。

[0070] 通过评估个体的聚丝蛋白原基因型,可以确定该个体相对于皮肤状况的易患病体质。“聚丝蛋白原基因型”是指所述个体的基因组中聚丝蛋白原等位基因的同源性。通过本发明的方法测试的个体典型地为哺乳类动物。在一个实施方案中,所述哺乳类动物可以是啮齿类动物。在另一个实施方案中,所述哺乳类动物可以是人类。因此,通过本发明的方法测试的个体是二倍体并由此在它们的基因组中包含聚丝蛋白原基因的两个拷贝。如果个体具有聚丝蛋白原基因的两个相同的拷贝,则对于等位基因来说它们是纯合的。如果个体具有聚丝蛋白原基因的两个不同的拷贝,即一个对于另一个是多态的,则对于等位基因来说它们是杂合的。“易患病体质”是指个体基因组中存在的个别聚丝蛋白原等位基因或个体基因组中存在的聚丝蛋白原等位基因组合与皮肤状况有关或者是皮肤状况的先兆。

[0071] 本文所用的术语“皮肤状况”是指在其含义内包括皮肤(包括头皮)的所有物理参数,例如保湿、物质产生或屏障形成。在一个实施方案中,术语“皮肤状况”是指皮肤维持NMF产量的健康水平的能力。因此,本发明提供确定个体的易患病体质以维持NMF产量健康水平的方法。换言之,本发明提供确定个体对异常NMF产量相关状况的敏感性的方法。典型地说,由异常的NMF产量所导致或加重的皮肤状况是由于少于健康皮肤的NMF产量所导致的。与异常聚丝蛋白和NMF产量有关的状况包括寻常型鱼鳞病。在另一个实施方案中,术语“皮肤状况”是指干性皮肤。干性皮肤状况包括老年性干燥症/停经后干燥症、表面活性剂导致的干燥症、冬季干燥症、晒伤。在另一个实施方案中,术语“皮肤状况”是指头皮的状况,例如头皮屑。在另一个实施方案中,术语“皮肤状况”是指红斑,例如去污剂引起的红斑。

[0072] 表述“角质基质的护理”是指用于保护或修复皮肤和/或头发和/或指甲的健康功能的所有行为;或者提供用于保护或提高它们的外观和/或质地的手段的方法。因此,护理包括保湿、安抚、保护免受所有类型的侵害、显著地防晒以及抵抗和预防衰老体征。

[0073] 短语“皮肤衰老的体征”是指由于衰老在皮肤外观方面的所有改变。这些改变的例子包括皱纹和细纹、皮肤柔软(limp skin)、皮肤松弛、皮肤变薄、缺少弹性和/或肤色、皮肤暗沉、皮肤缺少光彩。其还包括不直接转化成外部皮肤外观的变化的内部皮肤改变。这些内部改变的一个例子是由于连续暴露于UV辐射下而在皮肤内部产生的退化。表述“用于提高皮肤外观”包括可能具有皮肤外观的视觉提高作为后果的所有现象。皮肤看起来更好,例如更加漂亮、紧实和/或光滑。减少或去除了所有的小缺点。皮肤如纸一样薄的外观会有所减弱。而且,根据本发明的活性剂或者含有该活性剂的组合物可用于保护角质基质,特别是保

护皮肤、头发和指甲免受所有类型的外部侵害。这些活性剂或者含有该活性剂的组合物的使用可以使得角质基质受到保护,进而更好地抵抗环境对它们所造成的应激。

[0074] 短语“外部侵害”是指环境所产生的侵害。它们可以是化学来源、物理来源、生物来源或热量来源。

[0075] 表述“皮肤病学疾病或病症”是指可能有或者没有明显后果的所有影响皮肤的疾病。因而,作为例子来说,可以提及:分化和细胞增殖紊乱、角质化紊乱、皮肤衰老的体征、炎症或过敏反应、分泌脂质的功能紊乱、真皮或表皮的增生(恶性的或非恶性的)、由于UV线暴露所导致的皮肤病症、与时间性老化或光化性老化有关的病状。

[0076] 本文所用的术语“动物”或“患者”意为包括,例如,人、绵羊、麋鹿、鹿、长耳鹿、貂、哺乳动物、猴、马、牛、猪、山羊、犬、猫、大鼠、小鼠、鸟类、鸡、爬行动物、鱼、昆虫和蛛形纲。

[0077] “哺乳动物”涵盖通常处于医疗护理下的温血哺乳动物(如,人和家养动物)。实例包括猫科动物、犬科动物、马科动物、牛科动物和人,以及仅仅人。

[0078] “治疗(Treating)”或“治疗(treatment)”涵盖治疗哺乳动物的疾病状态,并包括:(a)阻止疾病状态在哺乳动物中发生,尤其是当所述哺乳动物倾向于疾病状态但还未被诊断为患有其的时候;(b)抑制疾病状态,如,阻止其发展;和/或(c)缓解疾病状态,如,导致疾病状态消退,直到达到期望端点。治疗还包括疾病症状的改善(如,减轻疼痛或不适),其中所述改善可或不可直接影响疾病(如,起因、传染、表达等等)。

[0079] 本文所用的“癌症”是指见于哺乳动物的所有类型的癌症或赘生物或恶性肿瘤,包括但不限于:白血病、淋巴瘤、黑素瘤、癌和肉瘤。癌症本身表现为“肿瘤”或包括癌症恶性细胞的组织。肿瘤的实例包括肉瘤和癌,诸如但不限于:纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。可用根据本发明公开的组合物治疗的其它癌症包括但不限于,例如,霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺肿瘤、原发性脑瘤、胃癌、结肠癌、恶性胰岛肿瘤、恶性类癌瘤、膀胱癌、胃癌、恶变前皮肤损伤、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食管癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌和前列腺癌。

[0080] “神经病学疾病或病症”是指神经系统和/或视觉系统的任何疾病或病症。“神经病学疾病或病症”包括牵涉中枢神经系统(脑、脑干和小脑)、外周神经系统(包括颅神经)和自主神经系统(其部分位于中枢神经系统和外周神经系统二者中)的疾病或病症。神经病学病症的实例包括但不限于,头痛、麻痹和昏迷、痴呆、中风、睡眠障碍、外伤、感染、赘生物、神经眼科学、运动障碍、神经脱髓鞘病、脊髓病症、和外周神经、肌肉和神经肌肉接头的病症。成瘾和精神疾病,包括但不限于,双相性精神障碍和精神分裂症,也包括在神经病学病症的定义中。以下是可利用根据本发明的组合物和方法治疗的多种神经病学病症、症状、迹象和综

合征的列表:获得性癫痫样失语症;急性播散性脑脊髓炎;脑白质肾上腺萎缩症;年龄相关的黄斑变性;胼胝体发育不全;失认症;艾卡迪综合征;亚力山大病;阿尔佩斯病;交替性偏瘫;血管性痴呆;肌萎缩性侧索硬化;无脑;An凝胶man综合征;血管瘤病;缺氧症;失语症;失用症;蛛网膜囊肿;蛛网膜炎;阿-基氏脑畸形;动静脉畸形;阿斯佩各综合征;共济病症毛细血管扩张;注意力缺乏过动症;孤独症;自主神经病症;背痛;巴滕病;白塞病;贝耳麻痹;良性自发性睑痉挛;良性局灶性肌萎缩;良性颅内高压;宾斯旺格氏病;睑痉挛;Bloch Sulzberger综合征;臂丛损伤;脑脓肿;脑损伤;脑肿瘤(包括多形性胶质母细胞瘤);脊髓肿瘤;布朗-塞卡尔综合征;卡纳万病;腕管综合症;灼痛;中枢性疼痛综合症;脑桥中部髓鞘溶解;头部障碍;脑动脉瘤;脑动脉硬化;脑萎缩;大脑性巨人症;大脑性麻痹;夏-马-图三氏病;化疗引起的神经病和神经性疼痛;基氏脑畸形;舞蹈症;慢性炎症性脱髓鞘多神经病;慢性痛;慢性局部疼痛综合症;科-勒二氏综合征;昏迷,包括持续性植物人状态;先天性面瘫;皮质基底节变性;颅动脉炎;颅缝早闭;克雅氏病;积累性损伤错乱;柯兴综合征;巨细胞包涵体病;巨细胞病毒感染;眼舞蹈-足舞蹈综合症;丹-沃二氏综合征;Dawson病;德摩西埃氏综合征;下臂丛麻痹;痴呆;皮炎;糖尿病性神经病;弥漫性硬化症;家族性自主神经异常;书写困难;阅读困难;张力障碍;早期幼儿癫痫性脑病;空蝶鞍综合征;脑炎;脑膨出;脑三叉神经血管瘤病;癫痫;欧勃氏麻痹;特发性震颤;法布里氏病;法尔氏综合征;昏厥;家族性痉挛麻痹症;热性癫痫发作;菲希尔综合征;弗里德赖希氏共济病症;额颞痴呆和其它"tau病变";高歇病;格斯特曼氏综合征;巨细胞性动脉炎;巨细胞性包涵体病;球样细胞脑白质营养不良;格-巴二氏综合征;HTLV-1相关的骨髓病;哈-斯二氏病;头部损伤;头痛;半面痉挛;遗传性痉挛性截瘫;多神经炎型遗传性共济病症;耳部带状疱疹;带状疱疹;Hirayama综合征;HIV相关的痴呆和神经病(也是AIDS的神经病学表现);前脑无裂畸形;亨廷顿氏舞蹈病和其它多谷氨酰胺重复序列病;积水性无脑畸形;脑积水;皮质醇过多症;低氧;免疫介导的脑脊髓炎;包涵体肌炎;色素病症症;婴儿植烷酸贮积病;婴儿雷夫叙姆病;婴儿痉挛;炎性肌病;颅内囊肿;颅内高压;Joubert综合征;卡恩斯-塞尔综合征;Kennedy病;金斯布林纳综合征;克-费二氏综合征;克拉贝病;库-韦二氏病;库鲁病;拉福拉病;Lambert-Eaton肌无力综合征;Landau-Kleffner综合征;侧髓(瓦伦伯格氏)综合征;学习障碍;利氏病;Lennox-Gustaut综合征;莱-蔡二氏综合征;脑白质病变;路易体痴呆;无脑回症;闭锁综合征;Lou Gehrig病(即,运动神经元病或肌萎缩性侧索硬化);椎间盘退变;莱姆病-神经病学后遗症;Machado-Joseph病;巨头;巨脑;梅-罗二氏综合征;美尼尔症;脑膜炎;门克斯病;异染性脑白质营养不良;头小畸形;偏头痛;Miller Fisher综合征;小中风;线粒体肌病;默比厄斯氏综合征;单肢肌萎缩;运动神经元病;Moyamoya病;粘多糖贮积症;多发梗塞性痴呆;多灶性运动神经病;多发性硬化和其它脱髓鞘病症;伴有体位性低血压的多系统萎缩症;肌肉萎缩症;重症肌无力;脑脱髓鞘弥散性硬化;婴儿肌阵挛性脑病;肌阵挛;肌病;先天性肌强直;嗜睡病;神经纤维瘤病;抗精神药药的恶性综合征;AIDS的神经病学表现;狼疮的神经病学后遗症;神经性肌强直;神经元蜡样脂褐质沉积症;神经元移行异常;尼-皮二氏病;O'Sullivan-McLeod综合征;枕神经痛;隐性脊柱神经管闭合不全序列征;大田原综合征;橄榄体脑桥小脑萎缩;眼阵挛-肌阵挛;视神经炎;直立性低血压;过度使用综合征;感觉异常;神经变性疾病或病症(帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、痴呆、多发性硬化和与神经元细胞死亡相关的其它疾病和病症);先天性肌强直病;

副肿瘤性疾病;突发性癫痫;帕-罗二氏综合征;佩-梅氏病;周期性麻痹;外周神经病;痛性神经病和神经性疼痛;持续性植物人状态;全身性发育迟缓;光喷嚏反射;植烷酸贮积病;皮克氏病;神经挟捏;垂体肿瘤;多肌炎;孔洞脑;小儿麻痹症后期综合征;带状疱疹后神经痛;感染后脑脊髓炎;体位性低血压;帕-魏二氏综合征;原发性脊髓侧索硬化;朊病毒病;进行性面偏侧萎缩症;进行性多灶性白质脑病;进行性硬化性灰质萎缩;进行性核上性麻痹;假性脑瘤;Ramsay-Hunt综合征(I型和II型);Rasmussen脑炎;反射性交感神经营养不良综合征;雷夫叙姆病;重复性运动损伤;重复性压力损伤;多动腿综合征;逆转录病毒相关的脊髓病;Rett综合征;雷依氏综合征;圣维特斯舞蹈病;桑德霍夫病;谢耳德氏病;脑裂;视隔发育不全;摇晃婴儿综合症;带状疱疹;希-德二氏综合征;斯耶格伦氏综合征;睡眠窒息;Soto综合征;僵直;脊柱裂;脊髓损伤;脊髓肿瘤;脊髓性肌萎缩;僵人综合征;中风;斯特奇-韦伯综合征;亚急性硬化全脑炎;动脉硬化性皮层下脑病;西德纳姆舞蹈;晕厥;脊髓空洞症;迟发性运动障碍;泰-萨二氏病;颞动脉炎;脊髓拴系综合征;肌强直性白内障;胸部出口综合征;三叉神经痛;托德氏麻痹;图雷特综合症;暂时性缺血性发作;传染性海绵状脑病;横贯性脊髓炎;外伤性脑损伤;震颤;三叉神经痛;热带痉挛性轻截瘫;结节性脑硬化;血管性痴呆(多发梗塞性痴呆);血管炎(包括颞动脉炎);希-林二氏病;瓦伦伯格氏综合征;韦-霍二氏病;韦斯特综合征;鞭抽式损伤;威廉斯综合征;Wildon病和泽韦格综合征。

[0081] “炎症”是指系统性炎症疾患和局部地伴有单核细胞、粒细胞和/或中性白细胞的迁移和吸引的疾患。炎症的实例包括但不限于,病原生物体(包括革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、病毒、真菌和寄生虫诸如原生动物和蠕虫)感染引起的炎症、移植排斥(包括排斥实体器官诸如肾脏、肝脏、心脏、肺或角膜、以及排斥骨髓移植物包括移植物抗宿主病(GVHD))、或局部的慢性或急性自身免疫或变应性反应引起的炎症。自身免疫疾病包括急性肾小球性肾炎;类风湿性关节炎或反应性关节炎;慢性肾小球性肾炎;炎性肠病诸如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和坏死性小肠结肠炎;肝炎;败血症;酒精性肝病;非酒精性脂肪肝;粒细胞输血相关的综合征;炎症性皮肤病诸如接触性皮炎、特应性皮炎、银屑病;全身性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性甲状腺炎、多发性硬化、和一些形式的糖尿病、或其中受治疗者自身免疫系统的攻击导致病理学组织破坏的任何其它自身免疫状态。变应性反应包括变应性哮喘、慢性支气管炎、急性和延迟的过敏症。系统性炎症疾病状态包括外伤、烧伤、缺血事件后再灌注(如,心脏、脑、肠或外周脉管系统中的血栓形成事件,包括心肌梗塞和中风)相关的炎症、败血症、ARDS或多器官功能障碍综合征。炎性细胞募集也发生在动脉粥样硬化斑块中。炎症包括但不限于,非霍奇金淋巴瘤、韦格纳氏肉芽肿、桥本氏甲状腺炎、肝细胞癌、胸腺萎缩、慢性胰腺炎、类风湿性关节炎、反应性淋巴样增生、骨关节炎、溃疡性结肠炎、乳头状癌、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、急性胆囊炎、慢性胆囊炎、肝硬化、慢性涎腺炎、腹膜炎、急性胰腺炎、慢性胰腺炎、慢性胃炎、内在性子宫内膜异位症、子宫内膜异位症、急性宫颈炎、慢性宫颈炎、淋巴样增生、多发性硬化、特发性血小板减少性紫癜继发性的肥大、原发性IgA肾病、全身性红斑狼疮、银屑病、肺气肿、慢性肾盂肾炎和慢性膀胱炎。

[0082] 心血管疾病或病症包括可导致缺血或由心脏再灌注引起的那些病症。实例包括但不限于,动脉硬化、冠状动脉病、巨细胞性心肌炎、慢性心肌炎(非肉芽肿性)、原发性肥大型心肌病、外周动脉病(PAD)、外周血管病、静脉血栓栓塞症、肺栓塞、中风、心绞痛、心肌梗塞、心搏停止造成的心血管组织损伤、心脏旁路造成的心血管组织损伤、心源性休克、和本领域

技术人员已知的相关疾患或包括心脏或脉管系统的功能障碍或组织损伤的相关疾患,尤其是但不限于,FLG活化相关的组织损伤。CVS疾病包括但不限于,动脉硬化、肉芽肿性心肌炎、心肌梗塞、瓣膜性心脏病继发性心肌纤维化、无梗塞的心肌纤维化、原发性肥大性心肌病和慢性心肌炎(非肉芽肿性)。

[0083] “神经退行性疾病或病症”是指中枢和周围神经系统的范围广泛的疾病和病症,包括例如帕金森病、亨廷顿氏舞蹈症、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、多发性硬化症及与神经细胞死亡有关的其他疾病和病症。

[0084] 多核苷酸和寡核苷酸组合物和分子

[0085] 靶:在一个实施方案中,靶包括聚丝蛋白(FLG)的核酸序列,包括但不限于FLG相关的有义和/或反义的非编码和/或编码序列。

[0086] 聚丝蛋白基因在建立皮肤屏障层中发挥作用,并且该基因的突变会导致一些状况,如湿疹。聚丝蛋白在皮肤最外层中是一种丰富蛋白,并且由聚丝蛋白基因产生。聚丝蛋白的功能是有助于产生位于皮肤最外层的不透性皮肤屏障层以及保持这些含水。皮肤固有的屏障功能类似于塑料膜或保鲜膜-用于防止皮肤的失水,重要的是保护身体免受来自环境中异物的侵害,如过敏原。缺乏完整的皮肤屏障会导致过敏原进入身体引起一系列的过敏反应,导致湿疹、哮喘、花粉热及其他的过敏症。

[0087] 聚丝蛋白的表达缺乏会导致个体倾向于发展成寻常型鱼鳞病,更多地是发展成异位性湿疹或皮肤炎。聚丝蛋白基因定位于表皮分化复合物中的人类染色体1q21上,一种还包含对表皮的正常屏障功能重要的数种其他蛋白质的基因的区域。聚丝蛋白的主要功能看上去是聚集表皮细胞骨架以便形成密集的蛋白-脂质基质,从而调节皮肤对水和外部颗粒例如过敏原的渗透性。

[0088] 吡格列酮-ACTOS(盐酸吡格列酮)是一种口服的抗糖尿病药,主要通过降低胰岛素抵抗性而发挥作用。ACTOS用于控制II型糖尿病(也称为非胰岛素依赖性糖尿病[NIDDM]或成年发作型糖尿病)。药理学研究表明ACTOS改善肌肉和脂肪组织中胰岛素的敏感性并抑制肝脏糖异生。ACTOS改善血糖控制、同时降低循环胰岛素水平。相比较于磺酰脲类药物、二甲双胍或 α -葡萄糖苷酶抑制剂,吡格列酮[(±)-5-[[4-[2-(5-乙基-2-吡啶基)乙氧基]苯基]甲基]-2,4-]噻唑烷二酮单盐酸盐属于不同的化学类别并且具有不同的药理作用。该分子包含一个不对称碳原子,该化合物被合成为且用为外消旋混合物。吡格列酮的两个对映异构体在体内互变。发现所述两个对映异构体在药理活性方面上没有差别。

[0089] 盐酸吡格列酮是一种无味的白色晶体粉末,分子式为 $C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$,分子量为392.90道尔顿。其可溶于N,N-二甲基甲酰胺,微溶于无水乙醇,极微溶于丙酮和乙腈,几乎不溶于水和溶于乙醚。

[0090] ACTOS被用作饮食和运动的助剂以改善具有II型糖尿病的成人的血糖控制。吡格列酮还被用于治疗非酒精性脂肪性肝炎(脂肪肝),但是这种使用最近被认为是试验性的。

[0091] 然而,还没有对吡格列酮在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0092] 洛美利嗪是一种钙通道阻滞剂,具有抗偏头痛药性质和选择性抑制脑动脉的压缩。已知洛美利嗪具有神经保护作用、并且在试验中用于青光眼。洛美利嗪的副作用包括极微的心血管副作用、嗜睡和潮红。

[0093] 然而,还没有对洛美利嗪在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0094] 安非他酮-也被称作Wellbutrin、Zyban、Voxra、Budeprion或Aplenzin;之前被称作安非布他酮,其作为一种氨基酮类的抗抑郁药,与三环类、四环类、选择性5-羟色胺重吸收抑制剂或者其他已知的抗抑郁药在化学上无关。其结构与安非拉酮非常相似;其与苯乙胺相关。

[0095] 安非他酮命名为(±)-1-(3-氯苯基)-2-[(1,1-二甲基乙基)氨基]-1-丙酮盐酸盐。分子量为276.2。分子式为 $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ 。安非他酮盐酸盐粉末是白色晶体,且于水中具有高溶解性。其具有苦味,且在口腔黏膜上产生一种局部麻醉的感觉。

[0096] 安非他酮被用于治疗重度抑郁症。严重抑郁发作(DSM-IV)意味着存在以下情况:1)情绪低落或者2)失去兴趣或快乐;另外,以下症状中的至少5个已在相同2周内存在并且表示之前功能的变化:情绪低落、在平常活动中明显失去兴趣或快乐、在体重和/或食欲上有明显的改变、失眠或嗜睡、精神运动兴奋或迟缓、疲劳增加、内疚感或无用感、思维迟钝或注意力不集中、企图自杀或有自杀意念。

[0097] 安非他酮在治疗社交恐惧症和伴有抑郁的焦虑中有一些成功,但是在伴有广场恐怖症的惊恐障碍的治疗中并无成功。其抗焦虑潜力曾经与舍曲林和多虑平进行过比较。然而,在一些患者中其能导致激动不安、特别是在更高剂量作用下,并且经常增加焦虑、与哌醋甲酯非常类似。作为精神兴奋药,其固有地为抗焦虑化合物,相反的利益知之甚少且看上去是矛盾的。

[0098] 安非他酮减轻尼古丁成瘾和戒断症状的严重性。安非他酮的其他适应症是肥胖症和注意力缺失过动症(ADHD)。经FDA证实,安非他酮用于预防季节性情绪紊乱。根据数个案例研究和初步研究,安非他酮降低炎症介质TNF- α 的水平且在自发炎症状况(如克罗恩病和牛皮癣)中可能有用。

[0099] 然而,还没有对安非他酮在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0100] 苯丙氨酯-是一种中枢作用骨骼肌松弛剂,具有额外的镇静剂和抗痉挛剂作用。服药过量则与巴比妥酸盐类似。其作用机理可能与甲丙氨酯类似。苯丙氨酯之前作为抗焦虑药被用于人类,目前仍然有时用于全身麻醉和用于治疗抽筋和强直。苯丙氨酯仍在一些欧洲国家中使用,但是其已经普遍地被更新的药物所取代。苯丙氨酯通过酰胺基的氧化降解和苯环的邻位羟基化被代谢,并且通过肾脏在尿液中被清除。

[0101] 然而,还没有对苯丙氨酯在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0102] 贝尼地平-也被称作Benidipinum或贝尼地平盐酸盐,其为用于治疗高血压(血压过高)的二氢吡啶类钙通道阻滞剂。贝尼地平是一种不仅阻滞L-型钙通道而且阻滞T-型钙通道的二氢吡啶类钙通道阻滞剂。贝尼地平的化学名是(4R)-rel-1,4-二氢-2,6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-3,5-吡啶二甲酸3-甲基酯5-[(3R)-1-(苯基甲基)-3-哌啶基]酯盐酸盐。是在体外和体内表现出多种活性的口服有效的抗高血压药。阻滞L-型、N-型和T-型的钙离子通道。还抑制醛固酮诱导的盐皮质激素受体活性。呈现心脏保护作用 and 抗动脉粥样硬化效应。

[0103] 然而,还没有对贝尼地平在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0104] 吡罗昔康-是非甾体抗炎药物(NSAID)的昔康类药物的成员之一。每粒褐红色和蓝色胶囊含有10mg吡罗昔康,每粒褐红色胶囊含有20mg吡罗昔康,用于口服施用。吡罗昔康的化学名是4-羟基-2-甲基-N-2-吡啶基-2H-1,2,-苯并噻嗪-3-甲酰胺1,1-二氧化物。吡罗昔

康呈白色结晶固体,略溶于水、稀酸和大多数的有机溶剂。微溶于乙醇和水溶液。其呈现弱酸性的4-羟基质子(pKa 5.1)和弱碱性的吡啶基氮(pKa1.8)。吡罗昔康的分子量为331.35。其分子式为C₁₅H₁₃N₃O₄S。

[0105] 吡罗昔康是一种非甾体抗炎药物,用于减轻类风湿关节炎和骨关节炎、原发性痛经、术后疼痛的症状;并且作为止痛药起作用,特别是在有炎性组份的情况下。其还在用于治疗表达环氧合酶(COX)受体的某些瘤形成(例如膀胱癌、结肠癌和前列腺癌)的兽药中使用。

[0106] 然而,还没有对吡罗昔康在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0107] 托吡酯-是一种氨基磺酸酯取代的单糖。TOPAMAX®(托吡酯)片可作为25mg、50mg、100mg和200mg的圆形片剂来使用,用于口服施用。TOPAMAX®(托吡酯胶囊)分散型胶囊(Sprinkle Capsule)可作为15mg和25mg的分散型胶囊来使用,作为整个胶囊或打开并洒在软食品上以用于口服施用。

[0108] 托吡酯是一种白色结晶粉末,稍带苦味。托吡酯大部分溶于包含氢氧化钠或磷酸钠、具有pH 9~10的碱性溶液中。易溶于丙酮、氯仿、二甲基亚砷和乙醇。水中的溶解度为9.8mg/mL。其饱和溶液的pH为6.3。托吡酯的分子式为C₁₂H₂₁N₀₈S、分子量为339.36。托吡酯的化学命名为2,3:4,5-二-O-异丙叉基-β-D-吡喃果糖氨基磺酸酯。

[0109] 托吡酯单独使用或者与其他药物联用,用于治疗患有癫痫的人的某些类型的癫痫发作。托吡酯还与其他药物一起使用以控制患有Lennox-Gastaut综合症(导致发作和发育迟缓的病症)的人的癫痫痉挛。托吡酯还被用于治疗那些即便服用其他抗癫痫发作药物时仍继续出现癫痫发作的患者。托吡酯还被用于预防偏头痛,但不会减轻出现偏头痛发生时的疼痛。托吡酯是被称作抗惊厥药的药物中的一类。其通过减少大脑的异常兴奋而发挥作用。

[0110] 托吡酯治疗儿童和成人的癫痫症,最初作为抗惊厥药在市场上销售。在儿童中,托吡酯用于治疗Lennox-Gastaut综合症,即一种导致癫痫发作和发育迟缓的病症。其还经美国食品和药物管理局(FDA)批准用于、并且最频繁地被开处方用于预防偏头痛。精神病医生使用托吡酯治疗双相性精神障碍,且经常使用托吡酯来增强拟精神药物或抵抗与很多抗抑郁药有关的体重增加。

[0111] 已经研究将托吡酯用于治疗酒精中毒和肥胖症、特别是减轻暴食症。

[0112] 托吡酯还在临床试验中被用于治疗创伤后应激障碍。初步研究表明,托吡酯有效地抵抗婴儿性痉挛。另一项研究推荐,托吡酯是一种对于预防早产儿在缺氧缺血性损伤后的脑室周围白质软化症有效的治疗药物。托吡酯的其他标签外和研究的用途包括对特发性震颤、神经性贪食症、强迫症、酒精中毒、戒烟、先天颅内高血压、神经性疼痛、丛集性头痛和可卡因依赖性的治疗。还对托吡酯与苯丁胺的混合物进行了研究,该混合物形成用于治疗肥胖症的被称作“Qnexa”的药物。

[0113] 然而,还没有对托吡酯在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0114] 伊拉地平-是一种钙拮抗剂。化学上,伊拉地平是4-(4-苯并咪唑基)-1,4-二氢-2,6-二甲基-3,5-吡啶二羧酸甲基酯1-甲基乙基酯。伊拉地平是一种黄色、细小的结晶粉末,无味或者带有微弱的特征气味。伊拉地平几乎不溶于水(37℃下<10mg/L),但溶于乙醇,且易溶于丙酮、氯仿和二氯甲烷。

[0115] 伊拉地平被用于治疗高血压。可单独使用或者与噻嗪类利尿剂同时使用。经常被开处方用于治疗高血压以便减少中风和心脏病发作的风险。动物模型中的最近研究表明,伊拉地平有潜在的治疗帕金森病的用途。

[0116] 然而,还没有对伊拉地平在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0117] 尼可地尔-是用于治疗心绞痛的常规药物。该药物可被分类为血管舒张药。

[0118] 尼可地尔的作用应理解为是通过对血管的平滑肌进行光滑处理的过程。该作用在静脉系统的情形下尤为显著。

[0119] 尼可地尔通过激活钾通道、且通过提供一氧化氮来激活鸟苷酸环化酶来发挥作用。所述鸟苷酸环化酶导致cGMP的活化,cGMP通过肌球蛋白轻链的去磷酸化作用依次引起动脉和静脉的血管舒张。由于尼可地尔对于血管钾通道具有选择性,所以对心脏收缩力和传导没有显著的作用。

[0120] 尼可地尔能够扩张健康个体的冠状血管,然而其对于患有缺血性心脏病的某些患者的冠状血管的作用却很小,其原因在于冠状血管已经被完全地扩张。然而,其会扩张静脉系统,减少心脏的预负荷和工作。

[0121] 然而,还没有对尼可地尔在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0122] 吡贝地尔-是一种D2激动剂,主要用于治疗帕金森病。其通过刺激多巴胺受体从而减轻例如颤抖等症状来发挥作用。由于其D2拮抗作用,其还被用于治疗循环系统问题等其他情况。该药还以商标名Trivastal出现,Trivastal以应该经口服用的延长释放胶囊的形式出现。在早期和晚期的帕金森病中,吡贝地尔能够以单一疗法或者与左旋多巴疗法一起使用。由于其在认知能力(如治疗受损的记忆、注意力和集中力)的相对作用,所以很多老年患者从中受益。

[0123] 吡贝地尔通过刺激脑中存在的多巴胺受体而发挥作用,实际上其治疗中脑边缘及中脑皮层通路的突触后D2和D3受体的缺乏。该药物还具有血管舒张的作用(从而提高不同的认知症状),并且加强去甲肾上腺素传导来改善集中力、注意力和记忆。

[0124] 吡贝地尔被用于治疗老年人的病理性认知缺陷(受损的注意力、积极性、记忆等)、治疗老年人的眩晕、治疗视网膜缺血性临床表现、辅助治疗由于下肢的外周血管疾病所导致的间歇性跛行(阶段2)、治疗单极性抑郁症和双极性抑郁症中的快感缺失和治疗抗性抑郁症(标签外使用)。

[0125] 然而,还没有对吡贝地尔在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0126] 奥沙普秦-是非甾体抗炎药物(NSAID)的丙酸类的成员之一。奥沙普秦钾的化学名是4,5-二苯基-2-噁唑丙酸钾盐。其经验式为C₁₈H₁₄N₀O₃K,分子量为331。奥沙普秦镁是白色至灰白色粉末,熔点215℃。微溶于乙醇、易溶于水。水中的PK值为9.7。

[0127] 奥沙普秦用于减轻与骨关节炎和类风湿关节炎有关的炎症、肿胀、僵硬和关节疼痛。

[0128] 然而,还没有对奥沙普秦在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0129] 格隆溴铵-是一种季铵盐,化学名为3[(环戊基羟基苯基乙酰基)氧基]-1,1-二甲基吡咯烷鎓溴化物。分子式为C₁₉H₂₈BrN₀O₃,分子量为398.33。

[0130] 格隆溴铵注射剂被用作术前的抗毒蕈碱剂,以减少唾液、支气管和咽部的分泌;减少胃液分泌的体积和游离酸度;以及在诱导麻醉和插管时阻滞心脏-迷走神经的抑制反射。

必要时,Robinul注射剂可在手术期间使用,以抵抗手术或药物导致的或者与迷走神经反射有关的心律失常。格隆溴铵保护机体免受拟胆碱药的外周毒蕈碱作用(如心动过缓和过度分泌),所述拟胆碱药例如有用于逆转由于非去极化型肌松药所导致的神经肌肉阻滞的新斯的明和吡斯的明。

[0131] 格隆溴铵被用于消化道溃疡,在期望快速的抗胆碱能作用或者无法进行口服给药时用作成人消化性溃疡治疗的辅助治疗。

[0132] 在麻醉时,格隆溴铵注射剂可用作术前用药,以减少唾液、支气管和咽部的分泌,以及降低胃液分泌的酸度。其还可以与新斯的明(一种神经肌肉阻滞逆转剂)结合使用,以预防新斯的明的毒蕈碱作用,例如心动过缓。其还用于减少过多的唾液(流涎)。其降低胃中的酸分泌,因而可与其他药物联合用于治疗胃溃疡。其在治疗哮喘和COPD中的用途已有描述。其已经局部地和口服地用于治疗多汗症。

[0133] 然而,还没有对格隆溴铵在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0134] 格拉司琼-格拉司琼盐酸盐,一种止恶心药和止吐药。化学上,其为内-N-(9-甲基-9-氮杂双环[3.3.1]壬-3-基)-1-甲基-1H-吡啶-3-甲酰胺盐酸盐,分子量为348.9(312.4游离碱)。其经验式为 $C_{18}H_{24}N_4O \cdot HCl$ 。

[0135] 格拉司琼适应症:格拉司琼盐酸盐用于预防与包括呕吐发生性癌症疗法(包括高剂量顺铂)的最初和重复过程有关的恶心和呕吐。化学疗法所引起的恶心和呕吐。5-HT₃受体拮抗剂是用于治疗 and 预防化学疗法所引起的恶心和呕吐的主要药物。这种药物经常在开始治疗前约30分钟静脉注射给药。术后和辐射后的恶心和呕吐。是用于由急性或慢性疾病或者急性胃肠炎所导致的恶心和呕吐的合理疗法。周期性呕吐症状的治疗,尽管还没有证实疗效的正式试验。与辐射(包括全身辐射和分割腹部辐射)有关的恶心和呕吐。

[0136] 然而,还没有对格拉司琼在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0137] 美金刚胺-是一种口服有效的NMDA受体拮抗剂。美金刚胺盐酸盐的化学名是1-氨基-3,5-二甲基金刚烷盐酸盐。

[0138] 美金刚胺盐酸盐被用于治疗来减轻阿尔茨海默氏病的严重痴呆。美金刚胺还尝试被用于广泛性焦虑症、癫痫症、阿片类药物依赖、系统性红斑狼疮、抑郁、强迫症、妥瑞症、问题赌博、注意力缺失过动症(ADHD)、青光眼、耳鸣、包括复杂性局部疼痛综合症的神经营痛、广泛性发展障碍、与HIV有关的痴呆、眼球震颤、多发性硬化症和自闭症。

[0139] 然而,还没有对美金刚胺在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0140] 尼莫地平-属于被称为钙通道阻滞剂的药理学活性剂种类。尼莫地平是1,4-二氢-2,6-二甲基-4-(间硝基苯基)-3,5-吡啶二羧酸异丙基酯2-甲氧基乙基酯。其分子量为418.5,分子式为 $C_{21}H_{26}N_2O_7$ 。

[0141] 尼莫地平被用于通过减小患有由破裂的颅内果浆状动脉瘤(与它们的发作后的神经学状况无关)(即Hunt和Hess I-V级)所导致的蛛网膜下腔出血的患者的缺血损害发生率和严重性,来改善神经学结果。

[0142] 尼莫地平的主要用途是预防脑血管痉挛和由此导致的局部缺血,一种特别是由于破裂的颅内果浆状动脉瘤(与患者的发作后的神经学状况无关)所导致的蛛网膜下腔出血(一种脑出血形式)的并发症。其在蛛网膜下腔出血的4天内开始施用并持续3周。如果血压下降超过5%,则调整剂量。虽然目前尼莫地平并未被用于头部损伤,但在临床研究中其已

经显示是有希望的。2009年的研究(Aslan A等人, February 2009 Pharmacol. Res. 59 (2) : 120-4)发现,与标准程序一起通过外周静脉注射给予尼莫地平的患者具有明显更高的脑灌注压和颈静脉血氧饱和度,而颅内压、颈静脉乳酸盐、颈静脉葡萄糖更低。该研究的结论是格拉斯哥结果评分值更高且脑代谢得以改善。

[0143] 然而,还没有对尼莫地平在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0144] 氨氯地平-苯磺酸氨氯地平在化学上被描述为(±)-2-[(2-氨基乙氧基)甲基]-4-(2-氯苯基)-1,4-二氢-6-甲基-3,5-吡啶二羧酸3-乙基-5-甲基酯单苯磺酸盐。其经验式为 $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ 。

[0145] 氨氯地平碱(作为苯磺酸盐、甲磺酸盐或马来酸盐)是一种长效的钙通道阻滞剂(二氢吡啶类),用于抗高血压和治疗心绞痛。像其他钙通道阻滞剂一样,氨氯地平通过松弛动脉壁的平滑肌而发挥作用,降低总外周阻力且由此降低血压。

[0146] 氨氯地平被用于治疗高血压。可单独使用或者与其他抗高血压药联合使用。其还被用于治疗冠状动脉疾病。氨氯地平被用于慢性稳定性心绞痛的对症治疗。氨氯地平可单独使用或者与其他抗心绞痛药联合使用。

[0147] 氨氯地平还被用于治疗确证的或疑似的血管痉挛性心绞痛。氨氯地平可以以单一疗法使用或者与其他抗心绞痛药联合使用。

[0148] 对于患有最近通过血管造影术证明的冠状动脉疾病、没有心力衰竭或射血分数<40%的患者而言,氨氯地平被用于减少由于心绞痛导致的住院治疗的风险以及减少冠状动脉血管重建术过程的风险。

[0149] 然而,还没有对氨氯地平在皮肤病学领域中的使用进行研究。

[0150] 在一个实施方案中,本发明的反义寡核苷酸和组合物被用于预防或治疗FLG家族成员相关的疾病或病症。能够被由干细胞(使用所述反义化合物获得)再生的细胞/组织治疗的典型的示例性聚丝蛋白(FLG)介导的疾病和病症包含:FLG的异常功能和/或表达相关的疾病或病症、皮肤病学疾病或病症、皮肤衰老的体征、由于外部侵害所导致的皮肤状况、过敏症、牛皮癣、哮喘、湿疹、花粉热、寻常型鱼鳞病、异位性皮炎(AD)、疱疹样湿疹、类风湿性关节炎、心血管疾病或病症、癌症、炎症性疾病、免疫介导性疾病或病症、免疫力过高性或免疫低免疫力低下性的下性疾病或病症、自身免疫疾病或病症、哮喘、牛皮癣、过敏症(例如过敏性鼻炎、接触型过敏症、食物过敏症等)、乳糜泻、神经病学疾病或病症、神经退行性疾病或病症(例如阿尔茨海默氏病、帕金森病、ALS等)、AIDS消瘦症、与皮肤屏障功能相关的疾病或病症、慢性炎症性皮肤病、临床性干性皮肤。

[0151] 在一个实施方案中,将一种或多种反义寡核苷酸和/或本发明的组合物对FLG的调节向需要其的患者施用以预防或治疗与正常对照相比的FLG异常表达、功能、活性相关的任何疾病或病症。

[0152] 在一个实施方案中,本发明的组合物包括一种或多种对聚丝蛋白(FLG)多核苷酸有特异性的寡核苷酸,该多核苷酸包括但不限于反义序列、互补序列、等位基因、同系物、亚型、变体、衍生物、突变体、片段或其组合。

[0153] 在一个实施方案中,本发明的组合物包括一种或多种对一种或多种聚丝蛋白(FLG)多核苷酸和一种或多种FLG调节分子有特异性的寡核苷酸,该多核苷酸包括反义序列、互补序列、等位基因、同系物、亚型、变体、衍生物、突变体、片段或其组合。

[0154] 本发明的一个实施方案提供一种组合物,其中所述分子选自吡格列酮、洛美利嗪、安非他酮、苯丙氨酯、贝尼地平、吡罗昔康、托吡酯、伊拉地平、尼可地尔、吡贝地尔、奥沙普秦、格隆溴铵、格拉司琼、美金刚胺、尼莫地平和氨氯地平。

[0155] 本发明的一个实施方案提供一种用于治疗皮肤病学疾病或病症的组合物,该组合物包括一种或多种FLG调节分子和药学上可接受的载体。

[0156] 本发明的一个实施方案提供一种组合物,其中化合物选自吡格列酮、洛美利嗪、安非他酮、苯丙氨酯、贝尼地平、吡罗昔康、托吡酯、伊拉地平、尼可地尔、吡贝地尔、奥沙普秦、格隆溴铵、格拉司琼、美金刚胺、尼莫地平和氨氯地平。

[0157] 本发明的一个实施方案提供一种组合物,其中该组合物进一步包括调节FLG表达和活性的反义寡核苷酸。

[0158] 本发明的一个实施方案提供一种组合物,其中该组合物进一步包括聚丝蛋白天然反义序列的一种反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸在受治疗者中调节FLG表达。

[0159] 本发明的一个实施方案提供一种组合物,其中该寡核苷酸包括如SEQ ID NO:3至13所列的核苷酸序列。

[0160] 本发明的一个实施方案提供一种组合物,其中如SEQ ID NO:3至13所列的寡核苷酸包括一种或多种修饰或取代。

[0161] 本发明的一个实施方案提供一种治疗受治疗者的FLG相关疾病或病症的方法,所述方法包括向该受治疗者施用包含一种或多种FLG调节分子和药学上可接受的载体的组合物。

[0162] 本发明的一个实施方案提供一种方法,其中所述化合物选自吡格列酮、洛美利嗪、安非他酮、苯丙氨酯、贝尼地平、吡罗昔康、托吡酯、伊拉地平、尼可地尔、吡贝地尔、奥沙普秦、格隆溴铵、格拉司琼、美金刚胺、尼莫地平和氨氯地平。

[0163] 本发明的一个实施方案提供一种方法,其中所述组合物进一步包括一种调节FLG表达或活性的反义寡核苷酸。

[0164] 本发明的一个实施方案提供一种方法,其中所述组合物进一步包括聚丝蛋白天然反义序列的一种反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸在受治疗者中调节FLG表达。

[0165] 本发明的一个实施方案提供一种方法,其中与至少一种聚丝蛋白多核苷酸相关的疾病选自:皮肤病学疾病或病症、皮肤衰老的体征、由于外部侵害所导致的皮肤状况、过敏症、牛皮癣、哮喘、湿疹、花粉热、寻常型鱼鳞病、异位性皮炎(AD)、疱疹样湿疹、类风湿性关节炎、心血管疾病或病症、癌症、炎症性疾病、免疫介导性疾病或病症、免疫力过高性或免疫力低下性疾病或病症、自身免疫疾病或病症、哮喘、牛皮癣、过敏症(例如过敏性鼻炎、接触型过敏症、食物过敏症等)、乳糜泻、神经病学疾病或病症、神经退行性疾病或病症(例如阿尔茨海默氏病、帕金森病、ALS等)、AIDS消瘦症、与皮肤屏障功能相关的疾病或病症、慢性炎症性皮肤病、临床性干性皮肤。

[0166] 本发明的一个实施方案提供一种预防或治疗与至少一种聚丝蛋白(FLG)多核苷酸和/或其至少一种编码产物相关的皮肤状况的方法,其包括:向具有皮肤状况或有发展成皮肤状况的风险的患者施用治疗有效剂量的聚丝蛋白上调化合物、至少一种结合所述至少一种聚丝蛋白(FLG)多核苷酸的天然反义序列并调节所述至少一种聚丝蛋白(FLG)多核苷酸的表达的反义寡核苷酸、和药学上可接受的载体;从而预防或治疗至少一种聚丝蛋白(FLG)

多核苷酸和/或其至少一种编码产物相关的疾病皮肤状况。

[0167] 本发明的一个实施方案提供一种方法,其中所述化合物选自吡格列酮、洛美利嗪、安非他酮、苯丙氨酯、贝尼地平、吡罗昔康、托吡酯、伊拉地平、尼可地尔、吡贝地尔、奥沙普秦、格隆溴铵、格拉司琼、美金刚胺、尼莫地平和氨氯地平。

[0168] 本发明的一个实施方案提供一种方法,其中所述皮肤状况是由炎症、光损伤和衰老导致的。

[0169] 本发明的一个实施方案提供一种方法,其中所述皮肤状况是起皱纹、接触性皮炎、异位性皮炎、光化性角化病、角质化病症、大疱性表皮松解症、剥脱性皮炎、脂溢性皮炎、红斑、盘状红斑狼疮、皮炎、皮肤癌或自然衰老效应。

[0170] 本发明的一个实施方案提供根据权利要求30所述的组合物在制造用于治疗皮肤病学疾病或病症的药物中的用途。

[0171] 本发明的一个实施方案提供一种用途,其中所述组合物进一步包括一种调节FLG表达或活性的反义寡核苷酸。

[0172] 本发明的一个实施方案提供一种用途,其中所述组合物进一步包括聚丝蛋白天然反义序列的一种反义寡核苷酸,其中所述反义寡核苷酸在受治疗者中调节FLG表达。

[0173] 本发明的一个实施方案提供一种用途,其中所述化合物选自吡格列酮、洛美利嗪、安非他酮、苯丙氨酯、贝尼地平、吡罗昔康、托吡酯、伊拉地平、尼可地尔、吡贝地尔、奥沙普秦、格隆溴铵、格拉司琼、美金刚胺、尼莫地平和氨氯地平。

[0174] 本发明的一个实施方案提供一种用途,其中所述皮肤状况是起皱纹、接触性皮炎、异位性皮炎、光化性角化病、角质化病症、大疱性表皮松解症、剥脱性皮炎、脂溢性皮炎、红斑、盘状红斑狼疮、皮炎、皮肤癌或自然衰老效应。

[0175] 在本发明的实施方案中,向需要皮肤治疗或者处于将会需要皮肤治疗的发展中状况的危险中的受治疗者提供治疗性方案和/或美容方案以及相关的特定治疗。可根据例如受治疗者的FLG状态进行诊断。患者的给定组织(例如皮肤)中的FLG表达水平可以通过本领域技术人员公知的方法或者本文他处描述的方法例如通过使用PCR或基于抗体的检测方法分析组织来确定。

[0176] 本发明的优选实施方案提供一种用于皮肤治疗和/或美容应用的组合物,该组合物包含本发明的化合物,例如用于调节皮肤中的FLG表达。在实施方案中,通过本发明化合物的局部治疗来增加细胞寿命、预防细胞凋亡。例如,如本文所述,通过处理皮肤(例如上皮细胞)可以保护皮肤避免衰老,例如起皱纹。在一个示例性实施方案中,使皮肤与本发明的药物组合物或美容组合物相接触。示例性皮肤折磨或皮肤状况包括与炎症、晒伤或自然衰老有关的病症或疾病或者由炎症、晒伤或自然衰老所导致的病症或疾病。例如,所述组合物在预防和治疗接触性皮炎(包括刺激性接触性皮炎和过敏性接触性皮炎)、异位性皮炎(也称作过敏性湿疹)、光化性角化病、角质化病症(包括湿疹)、大疱性表皮松解症(包括天疱疮)、剥脱性皮炎、脂溢性皮炎、红斑(包括多形性红斑和结节性红斑)、由于太阳或其他光源所导致的损伤、盘状红斑狼疮、皮炎、皮肤癌以及自然衰老效应中有效。

[0177] 在本发明的实施方案中,将所述组合物掺合至包含通常适于局部药物施用的局部载体以及包括本领域内公知的任何此类物质的局部制剂中。所述局部载体可以如此选择以便以所需形式(例如以软膏剂、洗剂、乳膏剂、微乳剂、凝胶剂、油剂、溶液等形式)提供组合

物,并且可以由天然存在或合成来源的物质组成。优选的是所选载体不会对局部制剂中的有效剂或其他组份造成不利影响。适于本文使用的局部载体的例子包括水、醇、其他的无毒有机溶剂、甘油、矿物油、硅酮、石油膏、羊毛脂、脂肪酸、植物油、尼泊金类、蜡类等。制剂可以是无色无味的软膏剂、洗剂、乳膏剂、微乳剂和凝胶剂。

[0178] 本发明的组合物可以掺入到软膏剂中,所述软膏剂通常为代表性地基于凡士林和其他凡士林衍生物的半固体制剂。如那些本领域技术人员所领会到的,所使用的特定的软膏剂基质用于提供最适宜的药物递送,优选是提供其他所需要的特性(例如柔润性等)。如同其他载体或媒介物那样,软膏剂基质应该是惰性的、稳定的、无刺激性的和非致敏性的。如Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co.)中解释的那样,软膏剂基质可分为四类:油性基质;可乳化基质;乳剂基质;和水溶性基质。油性软膏剂基质包括例如植物油、源自动物的脂肪和源自石油的半固体烃类。可乳化软膏剂基质也称作可吸收的软膏剂基质,包含很少的水或者不含水,并且包括例如硫酸羟基硬脂精、无水羊毛脂和吸水性凡士林。乳剂软膏剂基质是油包水(W/O)乳剂或水包油(O/W)乳剂中的任一种,并且包括例如鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯、羊毛脂和硬脂酸。示例性水溶性软膏剂基质由不同分子量(例如参见Remington's,同上)的聚乙二醇(PEG)制备。

[0179] 本发明的组合物可以掺入到洗剂中,所述洗剂通常是没有摩擦地应用于皮肤表面的制剂,并且典型地为液体或半液体制剂,其中包括活性剂的固体颗粒存在于水或醇基质中。洗剂经常是固体的混悬剂,可以包括水包油型的液体-油状乳剂。由于易于应用更多液体的组合物,因而洗剂优选是用于治疗大身体面积的制剂。通常需要洗剂中的不溶物质被很好地分开。洗剂典型地包含用于产生良好分散的助悬剂以及对于局部化活性剂并保持其与皮肤接触有用的化合物,例如甲基纤维素、羧甲基纤维素钠等。与目前方法结合使用的示例性洗剂制剂包含混合有吸水性凡士林的丙二醇,其可以以商标AquaphorTM由拜尔斯道夫公司(Beiersdorf, Inc.) (Norwalk, Conn.) 获得。

[0180] 本发明的组合物可以掺入到乳膏剂中,所述乳膏剂通常为粘性的液体或者半固体乳剂,可以是水包油或油包水乳剂的任一种。乳膏剂基质是可水洗的,并且包含油相、乳化剂和水相。该油相通常由凡士林和脂肪醇如鲸蜡醇或硬脂醇构成;该水相经常但并非必须在体积上超过油相,并且通常包含润湿剂。如Remington's,同上所解释的那样,乳膏剂制剂中的乳化剂通常是非离子型、阴离子型、阳离子型或两性表面活性剂。

[0181] 本发明的组合物可以掺入到微乳剂中,所述微乳剂通常是热力学上稳定的、两种不混溶液体(如油和水)的各向同性地透明的分散体,通过表面活性剂分子的界面膜得以稳定(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (New York:Marcel Dekker,1992),卷9)。对于微乳剂的制备,需要表面活性剂(乳化剂)、共表面活性剂(共乳化剂)、油相和水相。适合的表面活性剂包括任何在制备乳剂中有用的表面活性剂,例如典型地用于制备乳膏剂的乳化剂。所述共表面活性剂(或“共乳化剂”)通常选自聚甘油衍生物、丙三醇衍生物和脂肪醇。优选的乳化剂/共乳化剂组合通常但并非必须选自:单硬脂酸甘油酯和聚氧乙烯硬脂酸酯;聚乙二醇和硬脂酸棕榈酸乙二醇酯;辛酸甘油三酯和癸酸甘油三酯以及油酰基聚乙二醇甘油酯。水相不仅包括水,还典型地包括缓冲液、葡萄糖、丙二醇、聚乙二醇,优选低分子量聚乙二醇(例如PEG 300和PEG 400)和/或丙三醇等,而油相通常包括如脂肪酸酯、改性植物油、硅酮油、甘油单酯和甘油二酯和甘油三酯的混合物、PEG的单酯和二酯(例如油酰基

聚乙二醇甘油酯)等。

[0182] 本发明的组合物可以掺合到凝胶制剂中,所述凝胶制剂通常是包含由小的无机颗粒构成的悬浮液(双相系统)或基本上均匀地分布在载体溶液中的大的有机分子(单相凝胶)的半固体系统。单相凝胶可如下制作:例如通过将所述活性剂、载体液体、适合的胶凝剂,如黄蓍胶(2-5%)、藻酸钠(2-10%)、明胶(2-15%)、甲基纤维素(3-5%)、羧甲基纤维素钠(2-5%)、卡波姆(0.3-5%)或聚乙烯醇(10-20%)组合在一起并且混合直至产生特征性半固体产物。其他适合的胶凝剂包括羟甲基纤维素、聚氧乙烯-聚氧丙烯、羟乙基纤维素和明胶。尽管凝胶通常采用水性载体液体,但醇和油也可用作载体液体。

[0183] 本领域技术人员所熟知的各种添加剂也可包括在制剂中,例如局部制剂。添加剂的例子包括但不限于增溶剂、透皮促渗剂、遮光剂、防腐剂(例如抗氧化剂)、胶凝剂、缓冲剂、表面活性剂(特别是非离子型和两性表面活性剂)、乳化剂、软化剂、增稠剂、稳定剂、润湿剂、着色剂、芳香剂(fragrance)等。特别优选与乳化剂、软化剂和防腐剂一起,含有增溶剂和/或透皮促渗剂。最佳的局部制剂主要包括:约2wt.%~60wt.%、优选2wt.%~50wt.%的增溶剂和/或透皮促渗剂;2wt.%~50wt.%、优选2wt.%~20wt.%的乳化剂;2wt.%~20wt.%的软化剂;和0.01~0.2wt.%防腐剂,以及制备所述制剂剩余部分的活性剂和载体(例如水)。

[0184] 透皮促渗剂对促进治疗水平的活性剂通过合理大小面积的完整皮肤有用。适合的促进剂在本领域是熟知的,包括例如链烷醇(如甲醇、乙醇和2-丙醇);烷基甲基亚砷(如二甲甲基亚砷(DMSO)、癸基甲基亚砷(C₁₀MSO)和十四烷基甲基亚砷);吡咯烷酮(如2-吡咯烷酮,N-甲基-2-吡咯烷酮和N-(2-羟基乙基)吡咯烷酮);脲;N,N-二乙基-间甲苯酰胺;C₂-C₆链烷二醇;混溶性溶剂(如二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)和四氢呋喃甲醇);1-取代的氮杂环庚烷-2-酮,特别是1-正十二烷基环氮杂环庚烷-2-酮(月桂氮酮);以商标AzoneTM可由Whitby Research股份有限公司(Richmond,Va)获得。

[0185] 增溶剂的例子包括但不限于以下物质:亲水性醚,如二乙二醇单乙醚(乙氧基二甘醇,可以TranscutolTM市售可得)和二乙二醇单乙醚油酸酯(可以SoficutolTM市售可得);聚乙烯蓖麻油衍生物,如聚氧乙烯(35)蓖麻油、聚氧乙烯(40)氢化蓖麻油等;聚乙二醇,特别是低分子量聚乙二醇,如PEG 300和PEG 400,以及聚乙二醇衍生物,如PEG-8辛酸/癸酸甘油酯(可以LabrasolTM市售可得);烷基甲基亚砷,如DMSO;吡咯烷酮,如2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮;和DMA。很多增溶剂还可作为吸收促进剂发挥作用。可将单独的增溶剂掺合至制剂中,或者可以将增溶剂的混合物掺合至制剂中。

[0186] 合适的乳化剂和共乳化剂包括但不限于那些关于微乳剂制剂所描述的乳化剂和共乳化剂。软化剂包括例如丙二醇、丙三醇、肉豆蔻酸异丙酯、聚丙二醇-2 (PPG-2) 肉豆蔻基醚丙酸酯等。

[0187] 其他的活性剂也可包含在制剂中,例如其它抗炎药、止痛药、抗菌剂、抗真菌剂、抗生素、维生素、抗氧化剂、以及通常在防晒制剂中发现的防晒剂,所述防晒剂包括但不限于邻氨基苯甲酸盐、二苯甲酮(特别是二苯甲酮-3)、樟脑衍生物、肉桂酸酯(例如甲氧基肉桂酸辛酯)、二苯甲酰甲烷(例如丁基甲氧基二苯甲酰甲烷)、对氨基苯甲酸PABA)及其衍生物、以及水杨酸盐(例如水杨酸辛酯)。

[0188] 最为明显的是,根据本发明的组合物可用作在皮肤、黏膜和/或半黏液性膜上使用

的美容组合物或药物组合物。该组合物可用作皮肤防护产品和/或皮肤护理产品或者用作抗皱纹和/或抗衰老组合物。我们也可预想在例如与其他活性剂组合的组合物领域内的其他应用。我们还可在用于身体和头发健康的美容组合物中使用根据本发明的化合物。

[0189] 而且,根据本发明的化合物(如之前定义的)刺激皮肤细胞的代谢功能。通过显著地增加细胞外基质的结构蛋白的合成来允许蛋白质合成增多,这对于其发挥作用是必不可少的。因此,根据本发明的化合物或者包含所述化合物的组合物在组织再生方面具有积极作用。根据本发明的化合物特别高效以便治疗创伤愈合病症。

[0190] 旨在活化之前定义的FLG蛋白的内源性合成的组合物被用于制造局部使用的药物组合物和/或美容组合物。它们将以更为普通的方式使用以便治疗皮肤病学病症。

[0191] 而且,根据另一个方面,旨在活化皮肤细胞的FLG蛋白的内源性合成的根据本发明之前定义的化合物被用于制造用于治疗皮肤状况的药物。本发明还涉及之前定义为药物的化合物的用途。

[0192] 而且,根据另一个方面,本发明涉及用于皮肤护理和/或头发及指甲护理的治疗的美容过程,所述美容过程包含将有效量的如之前所定义的活性剂涂抹在皮肤表面,由此获得所需要的作用。特别地,该过程不但可用于以治愈和/或预防的方式治疗皮肤衰老的体征,而且还可用于保护皮肤和/或头发和/或指甲免受外部侵害,如辐射的副作用、特别是UV辐射,或者用于与皮肤炎症和刺激的体征作斗争。

[0193] 特别地,本发明的美容治疗过程可根据组合物经常使用的方法通过施用上述定义的美容组合物得以实现,如在皮肤或头发上施用乳膏剂、凝胶剂、精华液、洗剂、乳状物、洗发剂和防晒霜,和以牙膏的形式施用于牙龈。该美容治疗过程的实施方案的特定模式也由之前的描述引起。

[0194] 本发明的化合物在治疗性和非治疗性的应用中均有用。在一个实施方案中,本发明的化合物用于治疗性的应用。在另一个实施方案中,本发明的化合物用于非治疗性的应用,例如美容应用。本发明的方法的治疗性应用包括诊断医学皮肤状况的原因的手段。因此,医学皮肤状况的治疗方法可以调整为补充个体的表型。本发明的方法的治疗性应用还包括确定个体的皮肤是否有可能与药物制剂(如局部给药的药物制剂)不利地反应的手段。在这种情况下,可将该个体与特定药物制剂相匹配,以便提供最大的治疗作用,同时最小化或消除对个体皮肤状况的任何不希望的副作用。

[0195] 本发明的非治疗性应用的方法包括为了对药剂、例如化妆品或任何其他引入身体的制剂形式进行试验而对个体进行分组的手段。这有助于解释获自这种试验的结果,例如在试验过程中不同个体的皮肤的反应是不一致的。

[0196] 可以通过根据个体对皮肤状况的易患病体质而对个体进行分组或分类来更清晰地解释反应的不均一性。技术人员将理解,使用该方法将会可能开发出适用于一些个体、但不适用于其他个体的药剂。因此可以建立一组药剂,该组中包括对不同个体具有适合性的不同药剂。根据该试验,希望使用这种药剂的个体可以使用本发明的方法来确定在基于他们自身对皮肤状况的易患病体质下哪种药剂最适于使用。因而,本发明的方法使得个体能够与个人护理产品(例如上文列出的那些产品)相匹配。

[0197] 鉴定个体的聚丝蛋白原基因型的方法在该个体的生物学物质上进行。优选在进行鉴定方法之前,将该生物学物质从该个体身上移除。也就是说,通常该生物学物质是离体

的。该离体物质可在进行所述方法之前进一步在体外进行培养。

[0198] 离体样品可包括取自身体任何部分的组织或细胞。优选的离体样品包括取自循环系统的物质、或者取自体腔(如口腔)的物质。最优选的离体样品是唾液样品。

[0199] 个体内存在的等位基因可以使用本领域公知的方法由唾液样品确定,所述方法如在Schie和Wilson(1997, *Journal of Immunological Methods*, 208, 91-101)中描述的方法。因此,所述离体样品由个体提供,而不需要专业采集手段。例如,在测试之前唾液样品或颊拭子可简单地由该个体提供。

[0200] 聚丝蛋白原基因和蛋白在本领域内是熟知的,且描述于Gan等人(1990, *Biochemistry*, 29, 9432-9440)中。许多聚丝蛋白原序列被储存于公共可访问的数据库中。聚丝蛋白原基因包括多种聚丝蛋白重复,常为10、11或12个重复。聚丝蛋白重复通常具有彼此相同的长度(人体中为972bp, 324个氨基酸),尽管这对在mRNA的5'-和3'-端的聚丝蛋白不太常见。该聚丝蛋白重复可以表现相当多的序列差异,典型地在相同等位基因上的重复之间或在不同等位基因之间有0-50%、更典型地有2-30%、进一步典型地有10-15%的差异。通常来说,差异可归因于单碱基变化,但也可包含电荷变化(Gan等人(1990) *Biochemistry*, 29, 9432-9440)。人聚丝蛋白重复的共有氨基酸序列图是已知的(Gan等人(1990) *Biochemistry*, 29, 9432-9440),并且优选聚丝蛋白重复与Gan等人(1990, *Biochemistry*, 29, 9432-9440)中所示的该共有序列或该共有序列的变体具有至少50%、更优选至少75%、进一步优选90%、更加优选至少95%的序列同一性。正常情况下,编码氨基端和羧基端的氨基酸序列是更保守的,如同5'和3' DNA序列的两侧为基因的编码部分(Presland等人(1992) *J Biol Chem*, 267 (33), 23772-23781)。

[0201] 在一个实施方案中,寡核苷酸是对FLG多核苷酸有特异性,该多核苷酸包括但不限于非编码区。FLG靶包括FLG的变体;FLG的突变体,包括SNP;FLG的非编码序列;等位基因、片段和类似物。优选地寡核苷酸是反义RNA分子。

[0202] 根据本发明的实施方案,靶核酸分子不限于仅FLG多核苷酸,还延伸到FLG的任何同种型、受体、同系物、非编码区和类似物。

[0203] 在一个实施方案中,寡核苷酸靶向FLG靶的天然反义序列(与编码区和非编码区天然反义),包括但不限于,其变体、等位基因、同系物、突变体、衍生物、片段和互补序列。优选地寡核苷酸是反义RNA或DNA分子。

[0204] 在一个实施方案中,本发明的寡聚化合物还包括变体,其中在化合物中一个或多个核苷酸位置存在不同碱基。例如,如果第一个核苷酸是腺嘌呤,可产生在这一位置包含胸苷、鸟苷、胞苷或其它天然或非天然核苷酸的变体。这可在反义化合物的任何位置进行。随后利用本文所述的方法测定这些化合物以确定它们抑制靶核酸表达的能力。

[0205] 在一些实施方案中,反义化合物与靶之间的同源性、序列同一性或互补性是从约50%至约60%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约60%至约70%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约70%至约80%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约80%至约90%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是约90%、约92%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[0206] 当反义化合物与靶核酸的结合干扰靶核酸的正常功能以导致活性的丧失时,该化合物是可特异性杂交的,且在期望特异性结合的条件下存在足够程度的互补性以避免反义

化合物与非靶核酸序列的非特异性结合。这种条件包括,即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件,和在体外测定的情形中进行测定的条件。

[0207] 当反义化合物(无论是DNA、RNA、嵌合、取代的等等)与靶DNA或RNA分子的结合干扰靶DNA或RNA的正常功能以致导致效用的丧失时,该化合物是可特异性杂交的,且在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件下,和在体外测定的情形中进行测定的条件下)存在足够程度的互补性以避免反义化合物与非靶序列的非特异性结合。

[0208] 在一个实施方案中,FLG的靶向包括但不限于,利用例如PCR、杂交等鉴定和扩展的反义序列、一种或多种如SEQ ID NO:2所列的序列、和调节FLG表达或功能的类似物。在一个实施方案中,与对照相比表达或功能被上调。在一个实施方案中,与对照相比表达或功能被下调。

[0209] 在一个实施方案中,寡核苷酸包括如SEQ ID NO:3至13所列的核酸序列,包括利用例如PCR、杂交等鉴定和扩展的反义序列。这些寡核苷酸可包括一种或多种修饰的核苷酸、更短或更长的片段、修饰的键和类似物。修饰的键或核苷酸间键合的实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或类似物。在一个实施方案中,核苷酸包括磷衍生物。可附加于本发明的修饰的寡核苷酸中的糖或糖类似物部分的磷衍生物(或修饰的磷酸酯基团)可以是单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、磷酸烷基酯、磷酸烷烃酯、硫代磷酸酯和类似物。上述磷酸酯类似物的制备、和将其向核苷酸、修饰的核苷酸和寡核苷酸的掺入本身是已知的,不必在此描述。

[0210] 反义的特异性和灵敏性还由本领域技术人员利用以用于治疗用途。反义寡核苷酸已在动物和人的疾病状态的治疗中用作治疗部分。反义寡核苷酸已经安全且有效地施用于人,目前正在许多进行许多临床试验。因此已经确定,寡核苷酸可以有用的治疗形态,可被配置以用于治疗细胞、组织和动物,尤其是人的治疗方案。

[0211] 在本发明的实施方案中,寡聚反义化合物,尤其是寡核苷酸,结合靶核酸分子并调节靶基因编码的分子的表达和/或功能。待干扰的DNA功能包括,例如,复制和转录。待干扰的RNA功能包括所有重要功能,诸如例如,RNA向蛋白翻译位置的移位,从RNA翻译蛋白,剪接RNA以产生一种或多种mRNA物质,和可能由RNA参与或促进的催化活性。取决于期望的功能,功能可被上调或抑制。

[0212] 反义化合物包括,反义寡聚化合物、反义寡核苷酸、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、可选剪接体、引物、探针、和与靶核酸的至少一部分杂交的其它寡聚化合物。如此,这些化合物可以单链、双链、部分单链或环状寡聚化合物的形式被引入。

[0213] 在本发明范畴中,将反义化合物靶向特定核酸分子可以是多步骤的过程。该过程通常开始于鉴定待调节其功能的靶核酸。这一靶核酸可以是,例如,其表达与特定病症或疾病状态相关的细胞基因(或从基因转录的mRNA)、或来自感染物的核酸分子。在本发明中,靶核酸编码聚丝蛋白(FLG)。

[0214] 靶向过程通常还包括确定靶核酸中发生反义相互作用从而产生期望作用如调节表达的至少一个靶区域、区段或位置。在本发明范畴中,术语“区域”定义为具有至少一种可鉴定结构、功能或特征的靶核酸的一部分。靶核酸区域中是区段。“区段”定义为靶核酸中较小区域或区域的亚部分。本发明中使用的“位置”定义为靶核酸中的位置。

[0215] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸结合聚丝蛋白(FLG)的天然反义序列并调节FLG

(SEQ ID NO:1)的表达和/或功能。反义序列的实例包括SEQ ID NO:2至13。

[0216] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸结合聚丝蛋白(FLG)多核苷酸的一个或多个区并调节FLG的表达和/或功能。区段包括FLG的有义或反义多核苷酸的至少五个连续核苷酸。

[0217] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸是对FLG的天然反义序列有特异性,其中寡核苷酸对FLG的天然反义序列的结合调节FLG的表达和/或功能。

[0218] 在一个实施方案中,寡核苷酸化合物包括如SEQ ID NO:3至13所列的序列、利用例如PCR、杂交等鉴定和扩展的反义序列。这些寡核苷酸可包括一种或多种修饰的核苷酸、更短或更长的片段、修饰的键和类似物。修饰的键或核苷酸间键合的实例包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或类似物。在一个实施方案中,核苷酸包括磷衍生物。可附加于本发明的修饰的寡核苷酸中的糖或糖类似物部分的磷衍生物(或修饰的磷酸酯基团)可以是单磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、磷酸烷基酯、磷酸烷烃酯、硫代磷酸酯和类似物。上述磷酸酯类似物的制备、和将其向核苷酸、修饰的核苷酸和寡核苷酸的掺入本身是已知的,不必在此描述。

[0219] 如本领域已知的,因为翻译起始密码子通常是5'-AUG(在转录的mRNA分子中;在相应DNA分子中是5'-ATG),翻译起始密码子也称为"起始密码子"、"起始密码子"或"AUG起始密码子"。少数基因具有具有RNA序列5'-GUG、5'-UUG或5'-CUG的翻译起始密码子;且5'-AUA、5'-ACG和5'-CUG已显示在体内起作用。因此,术语"翻译起始密码子"和"起始密码子"可涵盖许多密码子序列,尽管每种情形中的起始氨基酸通常是甲硫氨酸(真核细胞中)或甲酰甲硫氨酸(原核细胞中)。真核基因和原核基因可具有两个或多个替代性起始密码子,其任何一个可在特定细胞类型或组织中或在特定条件设置下优先地用于翻译起始。在本发明范畴中,"起始密码子"和"翻译起始密码子"是指体内用于起始从编码聚丝蛋白(FLG)的基因转录的mRNA的翻译的一种或多种密码子,而不论这种密码子的序列。基因的翻译终止密码子(或"终止密码子")可具有三种序列即,5'-UAA、5'-UAG和5'-UGA之一(对应的DNA序列分别是5'-TAA、5'-TAG和5'-TGA)。

[0220] 术语"起始密码子区"和"翻译起始密码子区"是指这种mRNA或基因的一部分,涵盖以任一方向(即,5'或3')从翻译起始密码子的约25至约50个连续核苷酸。类似地,术语"终止密码子区"和"翻译终止密码子区"是指这种mRNA或基因的一部分,涵盖以任一方向(即,5'或3')从翻译终止密码子的约25至约50个连续核苷酸。因此,"起始密码子区"(或"翻译起始密码子区")和"终止密码子区"(或"翻译终止密码子区")都是可以本发明的反义化合物有效地靶向的区域。

[0221] 本领域已知开放读码框(ORF)或"编码区"是指翻译起始密码子与翻译终止密码子之间的区域,也是可被有效地靶向的区域。在本发明范畴中,靶向的区域是涵盖基因开放读码框(ORF)的翻译起始或终止密码子的基因内区域。

[0222] 另一靶区域包括5'非翻译区(5'UTR),本领域已知是指mRNA以5'方向从翻译起始密码子的部分,因此包括mRNA的5'帽位置与翻译起始密码子之间的核苷酸(或基因上相应的核苷酸)。又一靶区域包括3'非翻译区(3'UTR),本领域已知是指mRNA以3'方向从翻译终止密码子的部分,因此包括mRNA的翻译终止密码子与3'端之间的核苷酸(或基因上相应的核苷酸)。mRNA的5'帽位置包括经由5'-5'三磷酸酯键合与mRNA的最5'残基连接的N7-甲基化鸟苷残基。认为mRNA的5'帽区域包括5'帽结构本身以及与帽位置相邻的前50个核苷酸。本发明的另一靶区域是5'帽区域。

[0223] 尽管一些真核mRNA转录物被直接翻译,但是许多包含一个或多个称为“内含子”的区域,在翻译前从转录物切除。剩余(因此被翻译的)区域称为“外显子”,被剪接在一起以形成连续的mRNA序列。在一个实施方案中,靶向剪接位置,即,内含子-外显子结点或外显子-内含子结点在其中疾病中牵涉异常剪接的情形、或其中疾病中牵涉特定剪接产物的过度产生的情形尤其有用。由于重排或缺失的异常融合结点是靶位置的另一形式。由剪接来自不同基因来源的两个(或多个)mRNA的过程产生的mRNA转录物称为“融合转录物”。利用靶向例如DNA或pre-mRNA的反义化合物可有效地靶向内含子。

[0224] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸结合靶多核苷酸的编码区和/或非编码区并调节靶分子的表达和/或功能。

[0225] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸结合天然反义多核苷酸并调节靶分子的表达和/或功能。

[0226] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸结合有义多核苷酸并调节靶分子的表达和/或功能。

[0227] 可从DNA的相同基因组区域产生可选RNA转录物。这些可选转录物通常称为“变体”。更具体地,“pre-mRNA变体”是从相同基因组DNA产生的转录物,在其起始或终止位置与从相同基因组DNA产生的其它转录物不同,并包含内含子序列和外显子序列二者。

[0228] 在剪接期间切除一个或多个外显子或内含子区域或其部分后,pre-mRNA变体产生更小的“mRNA变体”。因此,mRNA变体是加工的pre-mRNA变体,且每个独特的pre-mRNA变体必定因为剪接而产生独特的mRNA变体。这些mRNA变体还称为“可选剪接变体”。如果不进行pre-mRNA变体的剪接,则pre-mRNA变体与mRNA变体相同。

[0229] 变体可经由可选信号产生以起始或终止转录。Pre-mRNA和mRNA可具备多于一个起始密码子或终止密码子。来源于使用可选起始密码子的pre-mRNA或mRNA的变体称为该pre-mRNA或mRNA的“可选起始变体”。使用可选终止密码子的那些转录物称为该pre-mRNA或mRNA的“可选终止变体”。一种特殊类型的可选终止变体是“polyA变体”,其中产生的多个转录物由“polyA终止信号”之一被转录机制可选选择所致,从而产生在独特polyA位点终止的转录物。在本发明范畴中,本文所述的变体类型也是靶核酸的实施方案。

[0230] 靶核酸上与反义化合物杂交的位置定义为活性反义化合物靶向的靶区域的至少5-核苷酸长的部分。

[0231] 尽管本文列出了某些示例性靶区段的具体序列,但是本领域技术人员将理解,这些用于阐释和描述在本发明范围中的具体实施方案。本领域普通技术人员考虑到本公开内容可容易地鉴定另外的靶区段。

[0232] 认为包括选自示例性优选的靶区段中的至少五个(5)连续核苷酸的段的长度为5-100个核苷酸的靶区段也适合于靶向。

[0233] 靶区段可包括包括从示例性优选的靶区段之一的5'-末端的至少5个连续核苷酸的DNA或RNA序列(其余核苷酸为从靶区段5'-末端的紧邻上游开始的相同DNA或RNA的连续段并延伸直到DNA或RNA包含约5至约100个核苷酸)。类似地优选的靶区段由包括从示例性优选的靶区段之一的3'-末端的至少5个连续核苷酸的DNA或RNA序列代表(其余核苷酸为从靶区段3'-末端的紧邻下游开始的相同DNA或RNA的连续段并延伸直到DNA或RNA包含约5至约100个核苷酸)。借助本文所示例的靶区段的本领域技术人员将能够鉴定另外的优选的靶

区段而不需过度试验。

[0234] 已经鉴定出一种或多种靶区域、区段或位置后,选择与靶足够地互补,即,充分地并以足够特异性杂交的反义化合物以获得期望作用。

[0235] 在本发明的实施方案中,寡核苷酸结合特定靶的反义链。寡核苷酸长度为至少5个核苷酸并可被合成以使每个寡核苷酸靶向重叠序列,从而寡核苷酸被合成以覆盖靶多核苷酸的整个长度。靶还包括编码区以及非编码区。

[0236] 在一个实施方案中,将反义寡核苷酸靶向特定核酸是优选的。将反义化合物靶向特定核酸是多步骤的过程。该过程通常开始于鉴定待调节其功能的核酸序列。这一核酸序列可以是,例如,其表达与特定病症或疾病状态相关的细胞基因(或从基因转录的mRNA)、或非编码多核苷酸,诸如例如,非编码RNA(ncRNA)。

[0237] RNA可分为(1)信使RNA(mRNA),其被翻译为蛋白,和(2)非蛋白-编码RNA(ncRNA)。ncRNA包括microRNA、反义转录物和包含高密度终止密码子和缺少任何广泛的“开放读码框”的其它转录单位(TU)。许多ncRNA表现为从蛋白-编码基因座的3'非翻译区(3'UTR)中的起始位点开始。ncRNA通常是罕见的,已被FANTOM财团测序的ncRNA的至少一半似乎不是多腺苷酸化的。出于明显的原因,大多数研究者集中于被加工并输出到细胞质的多腺苷酸化mRNA。最近,显示非多腺苷酸化的核RNA的组可能是非常大的,且许多这样的转录物来源于所谓的基因间区。ncRNA可调节基因表达的机制是通过与靶转录物的碱基配对。通过碱基配对起作用的RNA可分为(1)顺式编码的RNA,其在它们所作用的RNA的相同遗传位置但在相对链上被编码,因此与其靶展示极佳的互补性,和(2)反式编码的RNA,其在不同于它们所作用的RNA的染色体位置被编码,通常不与其靶展示极佳的碱基-配对可能。

[0238] 不希望受限于理论,反义多核苷酸被本文所述的反义寡核苷酸的扰动可改变相应有义信使RNA的表达。然而,这一调节可以是不一致的(反义敲低导致信使RNA升高)或一致的(反义敲低导致相伴的信使RNA减少)。在这些情形中,反义寡核苷酸可靶向于反义转录物的重叠或非重叠部分,导致其敲低或隔离。编码以及非编码反义可以相同方式靶向,任一种类能够调节相应的有义转录物-以一致的或不一致的方式。鉴定针对靶使用的新寡核苷酸中采用的策略可基于反义RNA转录物被反义寡核苷酸的敲低或调节期望靶的任何其它手段。

[0239] 策略1:在不一致调节的情形下,敲低反义转录物升高常规(有义)基因的表达。如果后者基因编码已知或推测的药物靶,则其反义对应物的敲低能够可设想地模拟受体激动剂或酶刺激剂的作用。

[0240] 策略2:在一致调节的情形下,人们可以协同地敲低反义转录物和有义转录物二者,从而实现常规(有义)基因表达的协同减少。例如,如果反义寡核苷酸用来实现敲低,则这一策略可用来施加靶向有义转录物的一种反义寡核苷酸和靶向相应反义转录物的另一反义寡核苷酸,或同时靶向重叠的有义转录物和反义转录物的单个有力地对称的反义寡核苷酸。

[0241] 根据本发明,反义化合物包括反义寡核苷酸、核酶、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、siRNA化合物、单链或双链RNA干扰(RNAi)化合物诸如siRNA化合物、和杂交于靶核酸的至少一部分并调节其功能的其它寡聚化合物。如此,它们可以是DNA、RNA、DNA-样、RNA-样、或其混合物,或可以是一种或多种这些的模拟物。这些化合物可以是单链、双链、环状或发夹寡

聚化合物,并可包含结构元件,诸如内部凸出或末端凸出、错配或环。常规线性地制备反义化合物,但可被连接或以其它方式制备为环状和/或分支的。反义化合物可包括构建体,诸如例如,两条链杂交以形成完全或部分双链的化合物,或具有足够自互补性的单链以允许杂交和形成完全或部分双链的化合物。两条链可在内部被连接,留下自由的3'或5'末端,或可被连接以形成连续的发夹结构或环。发夹结构可包含在5'或3'末端的悬垂,产生单链特征的延伸段。双链化合物任选地可包括在末端的悬垂。进一步的修饰可包括附加于末端之一、所选的、核苷酸位置、糖位置或核苷间键合之一的缀合物基团。可选地,两条链可经由非核酸部分或接头基团连接。当从仅一条链形成时,dsRNA可采取自互补发夹型分子的形式,其与自身对折以形成双链体。如此,dsRNA可以是完全或部分双链的。基因表达的特异性调节可通过在转基因细胞系中稳定表达dsRNA发夹来实现,然而在一些实施方案中,基因表达或功能被上调。当从两条链、或采取与自身对折以形成双链体的自互补发夹型分子形式的单链形成时,两条链(或单链的双链体形成区)是以Watson-Crick方式碱基配对的互补RNA链。

[0242] 被引入系统中后,本发明的化合物可引发一种或多种酶或结构蛋白的作用以实现靶核酸的裂解或其它修饰,或可经由基于占位性的机制作用。通常,核酸(包括寡核苷酸)可描述为“DNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-脱氧糖,且通常具有T而不是U碱基)或“RNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-羟基或2'-修饰的糖,且通常具有U而不是T碱基)。核酸螺旋可采用多于一种类型的结构,最通常是A-和B-形式。通常认为,具有B-形式-样结构的寡核苷酸是“DNA-样”,且具有A-形式样结构的是“RNA-样”。在一些(嵌合)实施方案中,反义化合物可包含A-形式区域和B-形式区域二者。

[0243] 在一个实施方案中,期望寡核苷酸或反义化合物包括以下至少一种:反义RNA、反义DNA、嵌合反义寡核苷酸(包括修饰的键的反义寡核苷酸)、干扰RNA(RNAi)、短干扰RNA(siRNA);微、干扰RNA(miRNA);小、临时RNA(stRNA);或短、发夹RNA(shRNA);小RNA-诱导的基因活化(RNAa);小活化RNA(saRNA)、或其组合。

[0244] dsRNA还可活化基因表达,这是已被称为“小RNA-诱导的基因活化”或RNAa的机制。dsRNA靶向基因启动子诱导相关基因的有效的转录活化。RNAa在人细胞中利用合成的dsRNA证实,称为“小活化RNA”(saRNA)。目前未知RNAa在其它生物体中是否是保守的。

[0245] 已发现小双链RNA(dsRNA),诸如小干扰RNA(siRNA)和微RNA(miRNA)是称为RNA干扰(RNAi)的进化保守机制的触发物。RNAi不变性经由重建染色质导致基因沉默,从而阻遏转录,降解互补mRNA,或阻滞蛋白翻译。然而在以下实施例部分详细描述的情况下,寡核苷酸显示增加聚丝蛋白FLG多核苷酸和其编码产物的表达和/或功能。dsRNA还可作为小活化RNA(saRNA)作用。不希望受理论束缚,通过靶向基因启动子中的序列,saRNA将以称为dsRNA-诱导的转录活化(RNAa)的现象诱导靶基因表达。

[0246] 在进一步的实施方案中,本文鉴定的“优选的靶区段”可用于筛选调节聚丝蛋白(FLG)多核苷酸表达的另外的化合物。“调节剂”是减少或增加编码FLG的核酸分子表达的那些化合物,且包括与优选的靶区段互补的至少5-核苷酸部分。筛选方法包括以下步骤:将编码FLG的有义或天然反义多核苷酸的核酸分子的优选的靶区段与一种或多种候选调节剂接触,并选择减少或增加编码FLG多核苷酸的核酸分子如,SEQ ID NO:3至13的表达的一种或多种候选调节剂。显示一种或多种候选调节剂能够调节(如,减少或增加)编码FLG多核苷酸

的核酸分子的表达后,随后调节剂可用于FLG多核苷酸功能的进一步研究性研究,或用作根据本发明的研究剂、诊断剂或治疗剂。

[0247] 靶向天然反义序列优选地调节靶基因的功能。例如,FLG基因(如,登录号NM_002016)。在一个实施方案中,靶是FLG基因的反义多核苷酸。在一个实施方案中,反义寡核苷酸靶向FLG多核苷酸(如,登录号NM_002016)的有义和/或天然反义序列、其变体、等位基因、同种型、同系物、突变体、衍生物、片段和互补序列。优选地寡核苷酸是反义分子且靶包括反义和/或有义FLG多核苷酸的编码区和非编码区。

[0248] 本发明优选的靶区段还可与本发明的其各自的互补反义化合物组合形成稳定的双链(双链体)寡核苷酸。

[0249] 在本领域中,这种双链寡核苷酸部分已显示经由反义机制调节靶表达和调节翻译以及RNA加工。而且,可对双链部分进行化学修饰。例如,这种双链部分已经显示通过双链体的反义链与靶经典杂交,从而触发靶的酶促降解来抑制靶。

[0250] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸靶向聚丝蛋白(FLG)多核苷酸(如,登录号NM_002016)、其变体、等位基因、同种型、同系物、突变体、衍生物、片段和互补序列。优选地寡核苷酸是反义分子。

[0251] 根据本发明的实施方案,靶核酸分子不限于仅FLG,还延伸到FLG分子的同种型、受体、同系物和类似物的任一种。

[0252] 在一个实施方案中,寡核苷酸靶向FLG多核苷酸的天然反义序列,例如,如SEQ ID NO:2所列的多核苷酸,和其任何变体、等位基因、同系物、突变体、衍生物、片段和互补序列。反义寡核苷酸的实例列在SEQ ID NO:3至13。

[0253] 在一个实施方案中,寡核苷酸与FLG反义的核酸序列互补或结合,包括但不限于FLG多核苷酸相关的非编码有义和/或反义序列,并调节FLG分子的表达和/或功能。

[0254] 在一个实施方案中,寡核苷酸与如SEQ ID NO:2所列的FLG天然反义的核酸序列互补或结合,并调节FLG分子的表达和/或功能。

[0255] 在一个实施方案中,寡核苷酸包括SEQ ID NO:3至13的至少5个连续核苷酸的序列,并调节FLG分子的表达和/或功能。

[0256] 多核苷酸靶包括FLG,包括其家族成员、FLG的变体;FLG的突变体,包括SNP;FLG的非编码序列;FLG的等位基因;物种变体、片段和类似物。优选地寡核苷酸是反义分子。

[0257] 在一个实施方案中,靶向FLG多核苷酸的寡核苷酸包括:反义RNA、干扰RNA(RNAi)、短干扰RNA(siRNA);微干扰RNA(miRNA);小、临时RNA(stRNA);或短、发夹RNA(shRNA);小RNA诱导的基因活化(RNAa);或小活化RNA(saRNA)。

[0258] 在一个实施方案中,靶向聚丝蛋白(FLG)多核苷酸如,SEQ ID NO:2,调节这些靶的表达或功能。在一个实施方案中,与对照相比表达或功能被上调。在一个实施方案中,与对照相比表达或功能被下调。

[0259] 在一个实施方案中,反义化合物包括如SEQ ID NO:3至13所列的序列。这些寡核苷酸可包括一种或多种修饰的核苷酸、更短或更长片段、修饰的键和类似物。

[0260] 在一个实施方案中,SEQ ID NO:3至13包括一种或多种LNA核苷酸。

[0261] 期望靶核酸的调节可以本领域已知的多种方式进行。例如,反义寡核苷酸、siRNA等。酶促核酸分子(如,核酶)是能够催化多种反应的一种或多种,包括以核苷酸碱基序列特

异性方式重复地裂解其它单独核酸分子的能力的核酸分子。这种酶促核酸分子可用于，例如，靶向几乎任何RNA转录物。

[0262] 由于其序列特异性，反式裂解酶促核酸分子显示用作人疾病的治疗剂的希望 (Usman&McSwiggen, (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen和Marr, (1995) J. Med. Chem. 38, 2023-2037)。可设计酶促核酸分子以裂解细胞RNA背景中的特定RNA靶。这种裂解事件使得mRNA无功能并消除从该RNA的蛋白表达。以这种方式，可选择性地抑制疾病状态相关的蛋白的合成。

[0263] 通常，具有RNA裂解活性的酶促核酸通过首先结合靶RNA来作用。这种结合经由被保持在邻近用于裂解靶RNA的分子的酶促部分的酶促核酸的靶结合部分来进行。如此，酶促核酸首先识别靶RNA然后经由互补碱基配对结合靶RNA，结合到正确位置时，酶促地作用以切割靶RNA。对这种靶RNA的关键裂解将破坏其指导编码蛋白合成的能力。在酶促核酸已经结合和裂解其RNA靶后，其从该RNA释放以搜寻另一靶并可重复地结合和裂解新的靶。

[0264] 多种方法诸如体外选择(进化)策略 (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. London, B 205, 435) 已经用于进化能够催化多种反应，诸如磷酸二酯键合和酰胺键合的裂解和连接的新核酸催化剂。

[0265] 催化活性最佳的核酶的开发将显著有助于为了调节基因表达的目的采用RNA-裂解核酶的任何策略。例如，锤头核酶在饱和(10mM)浓度的Mg²⁺辅因子存在下以约1min⁻¹的催化速率(kcat)作用。人工的“RNA连接酶”核酶已经显示以约100min⁻¹的速率催化相应的自修饰反应。此外，已知具有DNA制成的底物结合臂的某些修饰的锤头核酶以接近100min⁻¹的多倍周转率催化RNA裂解。最后，用某些核苷酸类似物代替锤头的催化核心中的特定残基获得显示催化速率改进多达10倍的修饰的核酶。这些发现证明，核酶可促进化学转化，伴随催化速率显著大于大多数天然自裂解核酶体外展示的催化速率。那么可能可优化某些自裂解核酶的结构以获得最大催化活性，或可能可制备对于RNA磷酸二酯裂解展示显著更快速率的完全新的RNA基序。

[0266] 符合“锤头”模型的RNA催化剂对RNA底物的分子间裂解首次在1987年显示 (Uhlenbeck, O.C. (1987) Nature, 328: 596-600)。回收RNA催化剂并与多种RNA分子反应，证实其真正是催化性的。

[0267] 通过在催化性RNA中进行适当的碱基改变以保持与靶序列必需的碱基配对，基于“锤头”基序设计的催化性RNA已用于裂解特定靶序列。这已经允许使用催化性RNA来裂解特定靶序列并指示，按照“锤头”模型设计的催化性RNA可能可体内裂解特定底物RNA。

[0268] RNA干扰(RNAi)已经变成在哺乳动物和哺乳动物细胞中调节基因表达的强有力工具。这一方法要求利用表达质粒或病毒和被加工为siRNA的小发夹RNA的编码序列递送作为RNA本身或作为DNA的小干扰RNA(siRNA)。这一系统使得能够有效地运输pre-siRNA到细胞质，在那里它们是活性的，并允许使用为了基因表达的受控型启动子和组织特异性启动子。

[0269] 在一个实施方案中，寡核苷酸或反义化合物包括核糖核酸(RNA)和/或脱氧核糖核酸(DNA)的寡聚物或聚合物、或其模拟物、嵌合体、类似物或同系物。这一术语包括包括天然存在的核苷酸、糖和共价核苷间(主链)键的寡核苷酸以及具有类似地起作用的非天然存在的部分的寡核苷酸。因为期望特性诸如例如，对增加的细胞摄取、对靶核酸增加的亲和力和在核酸酶存在下增加的稳定性，这种修饰的或取代的寡核苷酸通常相比于天然形式是期望

的。

[0270] 根据本发明,寡核苷酸或“反义化合物”包括反义寡核苷酸(如,RNA、DNA、其模拟物、嵌合体、类似物或同系物)、核酶、外部指导序列(EGS)寡核苷酸、siRNA化合物、单链或双链RNA干扰(RNAi)化合物诸如siRNA化合物、saRNA、aRNA和与靶核酸的至少一部分杂交并调节其功能的其它寡聚化合物。如此,它们可以是DNA、RNA、DNA-样、RNA-样、或其混合物,或可以是一种或多种这些的模拟物。这些化合物可以是单链、双链、环状或发夹寡聚化合物,并可包含结构元件,诸如内部凸出或末端凸出、错配或环。常规线性地制备反义化合物,但可被连接或以其它方式制备为环状和/或分支的。反义化合物可包括构建体,诸如例如,两条链杂交以形成完全或部分双链的化合物,或具有足够自互补性的单链以允许杂交和形成完全或部分双链的化合物。两条链可在内部被连接,留下自由的3'或5'末端,或可被连接以形成连续的发夹结构或环。发夹结构可包含在5'或3'末端的悬垂,产生单链特征的延伸段。双链化合物任选地可包括在末端的悬垂。进一步的修饰可包括附加于末端之一、所选的核苷酸位置、糖位置或核苷间键合之一的缀合物基团。可选地,两条链可经由非核酸部分或接头基团连接。当从仅一条链形成时,dsRNA可采取自互补发夹型分子的形式,其与自身对折以形成双链体。如此,dsRNA可以是完全或部分双链的。基因表达的特异性调节可通过在转基因细胞系中稳定表达dsRNA发夹来实现。当从两条链、或采取与自身对折以形成双链体的自互补发夹型分子形式的单链形成时,两条链(或单链的双链体形成区)是以Watson-Crick方式碱基配对的互补RNA链。

[0271] 被引入系统中后,本发明的化合物可引发一种或多种酶或结构蛋白的作用以实现靶核酸的裂解或其它修饰,或可经由基于占位性的机制作用。通常,核酸(包括寡核苷酸)可描述为“DNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-脱氧糖,且通常具有T而不是U碱基)或“RNA-样”(即,通常具有一个或多个2'-羟基或2'-修饰的糖,且通常具有U而不是T碱基)。核酸螺旋可采用多于一种类型的结构,最通常是A-和B-形式。通常认为,具有B-形式-样结构的寡核苷酸是“DNA-样”,且具有A-形式样结构的是“RNA-样”。在一些(嵌合)实施方案中,反义化合物可包含A-形式区域和B-形式区域二者。

[0272] 根据本发明的反义化合物可包括长度为从约5至约80个核苷酸(即,从约5至约80个连接的核苷)的反义部分。这是指反义化合物的反义链或部分的长度。换言之,本发明的单链反义化合物包括从5至约80个核苷酸,且本发明的双链反义化合物(例如诸如dsRNA)包括长度为5至约80个核苷酸的有义和反义链或部分。本领域普通技术人员将理解,这包括长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79或80个核苷酸、或其中的任何范围的反义部分。

[0273] 在一个实施方案中,本发明的反义化合物具有长度为10至50个核苷酸的反义部分。本领域普通技术人员将理解,这包括具有长度为10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、49或50个核苷酸、或其中的任何范围的反义部分的寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸长度为15个核苷酸。

[0274] 在一个实施方案中,本发明的反义或寡核苷酸化合物具有长度为12或13至30个核

苷酸的反义部分。本领域普通技术人员将理解,这包括具有长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸、或其中的任何范围的反义部分的反义化合物。

[0275] 在一个实施方案中,本发明的寡聚化合物还包括变体,其中在化合物中一个或多个核苷酸位置存在不同碱基。例如,如果第一个核苷酸是腺嘌呤,可产生在这一位置包含胸苷、鸟苷或胞苷的变体。这可在反义或dsRNA化合物的任何位置进行。随后利用本文所述的方法测定这些化合物以确定它们抑制靶核酸表达的能力。

[0276] 在一些实施方案中,反义化合物与靶之间的同源性、序列同一性或互补性是从约40%至约60%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约60%至约70%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约70%至约80%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是从约80%至约90%。在一些实施方案中,同源性、序列同一性或互补性是约90%、约92%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%。

[0277] 在一个实施方案中,反义寡核苷酸,诸如例如SEQ ID NO:2至13所列的核酸分子,包括一种或多种取代或修饰。在一个实施方案中,核苷酸是以锁核酸(LNA)取代的。

[0278] 在一个实施方案中,寡核苷酸靶向与FLG和如SEQ ID NO:1和2所列的序列相关的编码和/或非编码序列的有义和/或反义的核酸分子的一个或多个区域。寡核苷酸还靶向于SEQ ID NO:1和2的重叠区域。

[0279] 本发明某些优选的寡核苷酸是嵌合寡核苷酸。在本发明范畴中,“嵌合寡核苷酸”或“嵌合体”是包含两个或多个化学不同区域的寡核苷酸,每个区域由至少一个核苷酸组成。这些寡核苷酸通常包含赋予一种或多种有益特性(诸如例如,增加的核酸酶耐受性、增加的摄取入细胞、增加的对靶的结合亲和力)的修饰的核苷酸的至少一个区域和为能够裂解RNA:DNA或RNA:RNA杂合体的酶的底物的区域。例如,RNA酶H是裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶。因此,RNA酶H的活化导致RNA靶的裂解,从而大大增强基因表达的反义调节的效力。因此,与杂交于相同靶区域的硫代磷酸酯脱氧寡核苷酸相比,当使用嵌合寡核苷酸时以较短寡核苷酸通常可获得可比较的结果。RNA靶的裂解可常规地通过凝胶电泳来检测,如果需要,通过本领域已知的相关核酸杂交技术来检测。在一个实施方案中,嵌合寡核苷酸包括被修饰以增加靶结合亲和性的至少一个区域和通常作用为RNA酶H底物的区域。寡核苷酸对其靶(在这一情形中是编码ras的核酸)的亲和性常规地通过测量寡核苷酸/靶配对的 T_m 来确定, T_m 是寡核苷酸与靶解离的温度;分光光度地检测解离。 T_m 越高,寡核苷酸对靶的亲和性越大。

[0280] 本发明的嵌合反义化合物可形成为两种或多种寡核苷酸、如上所述的修饰的寡核苷酸、寡核苷和/或寡核苷酸模拟物的复合结构。这种化合物在本领域中也已称为杂合体或gapmer。教导这种杂合体结构的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.5,013,830;5,149,797;5,220,007;5,256,775;5,366,878;5,403,711;5,491,33;5,565,350;5,623,065;5,652,355;5,652,356和5,700,922,其每一个通过引用并入本文。

[0281] 在一个实施方案中,被修饰的寡核苷酸的区域包括在糖的2'位置修饰的至少一个核苷酸,最优选地2'-O-烷基、2'-O-烷基-O-烷基或2'-氟-修饰的核苷酸。在另一个实施方案中,RNA修饰包括在RNA 3'端的嘧啶、脱碱基残基或反向碱基的核糖上的2'-氟、2'-氨基和2'-O-甲基修饰。这种修饰常规地掺入寡核苷酸,这些寡核苷酸已经显示对指定靶具有比2'-

脱氧寡核苷酸更高的 T_m (即,更高的靶结合亲和性)。这种增加的亲和性的作用是大大增强基因表达的RNAi寡核苷酸抑制。RNA酶H是裂解RNA:DNA双链体的RNA链的细胞核酸内切酶;因此该酶的活化导致RNA靶的裂解,从而可大大增强RNAi抑制的效力。RNA靶的裂解可常规地通过凝胶电泳来证实。在一个实施方案中,嵌合寡核苷酸还被修饰以增强核酸酶耐受性的。细胞包含多种可降解核酸的核酸外切酶和核酸内切酶。多种核苷酸和核苷修饰已经显示使得掺入它们的寡核苷酸比天然寡脱氧核苷酸对核酸酶消化更耐受。核酸酶耐受性常规地通过如下测量:培养寡核苷酸与细胞提取物或分离的核酸酶溶液,并随着时间测量剩余的完整寡核苷酸的程度,通常通过凝胶电泳测量。已被修饰以增强其核酸酶耐受性的寡核苷酸比未修饰的寡核苷酸保持完整更长时间。多种寡核苷酸修饰已被证实增强或赋予核酸酶耐受性。包含至少一种硫代磷酸酯修饰的寡核苷酸目前是更优选的。在一些情形中,增强靶结合亲和性的寡核苷酸修饰也独立地能够增强核酸酶耐受性。

[0282] 本发明预期的一些优选的寡核苷酸的具体实例包括包括修饰的主链的那些,例如,硫代磷酸酯、磷酸三酯、磷酸甲基酯、短链烷基或环烷基糖间键合或短链杂原子或杂环糖间键合。更优选的是具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸和具有杂原子主链的那些,尤其是 $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$ 、 $\text{CH--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$ [称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链]、 $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ 和 $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$ 主链,其中天然磷酸二酯主链表示为 O--P--O--CH 。由De Mesmaeker等(1995) *Acc. Chem. Res.* 28:366-374公开的酰胺主链也是优选的。还优选的是具有吗啉代主链结构的寡核苷酸(Summerton和Weller,美国专利No.5,034,506)。在另一个实施方案中,诸如肽核酸(PNA)主链,寡核苷酸的磷酸二酯主链被聚酰胺主链代替,核苷酸被直接或间接地结合于聚酰胺主链的氮杂氮原子。寡核苷酸还可包括一种或多种取代的糖部分。优选的寡核苷酸在2'位置包括以下之一:OH、SH、SCH₃、F、OCN、OCH₃OCH₃、OCH₃(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nNH₂或O(CH₂)_nCH₃,其中n是1至约10;C₁至C₁₀低级烷基、烷氧基烷氧基、取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基;Cl;Br;CN;CF₃;OCF₃;O--、S--或N-烷基;O--、S--或N-烯基;SOCH₃;SO₂CH₃;ONO₂;NO₂;N₃;NH₂;杂环烷基;杂环烷芳基;氨基烷基氨基;聚烷基氨基;取代的甲硅烷基;RNA裂解基团;报告基团;嵌入剂;用于改善寡核苷酸药代动力学特性的基团;或用于改善寡核苷酸药效学特性的基团、和具有类似特性的其它取代基。优选的修饰包括2'-甲氧基乙氧基[2'-O-CH₂CH₂OCH₃,还称为2'-O-(2-甲氧乙基)]。其它优选的修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH₃)、2'-丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₃)和2'-氟(2'-F)。还可在寡核苷酸上的其它位置进行类似修饰,尤其是3'末端核苷酸上糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如环丁基来代替戊呋喃糖基。

[0283] 另外或可选地,寡核苷酸还可包括核碱基(本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。本文所用的“未修饰”或“天然”核苷酸包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核苷酸包括天然核酸中仅仅罕见或短暂出现的核苷酸,如,次黄嘌呤、6-甲基腺嘌呤、5-Me嘧啶、尤其是5-甲基胞嘧啶(也称为5-甲基-2'脱氧胞嘧啶,本领域中通常称为5-Me-C)、5-羟基甲基胞嘧啶(HMC)、糖基HMC和龙胆二糖基HMC、以及合成的核苷酸,如,2-氨基腺嘌呤、2-(甲基氨基)腺嘌呤、2-(咪唑基烷基)腺嘌呤、2-(氨烷基氨基)腺嘌呤或其它杂取代的烷基腺嘌呤、2-硫代尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟基甲基尿嘧啶、8-氮杂鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N₆(6-氨基己基)腺嘌呤和2,6-二氨基嘌呤。可包括本领域中已知的“通用”碱基,如,肌苷。5-Me-C取代已显示增加核酸双链体的稳定性0.6-

1.2°C,是目前优选的碱基取代。

[0284] 本发明寡核苷酸的另一修饰包括向该寡核苷酸化学连接增强寡核苷酸的活性或细胞摄取的一种或多种部分或缀合物。这种部分包括但不限于脂质部分诸如胆固醇部分、胆固醇基部分、脂肪族链如十二烷二醇或十一烷基残基、聚胺或聚乙二醇链、或金刚烷乙酸。包括亲脂部分的寡核苷酸和制备这种寡核苷酸的方法是本领域已知的,例如,美国专利No.5,138,045;5,218,105和5,459,255。

[0285] 指定寡核苷酸中的所有位置不必一致地被修饰,事实上多于一个上述修饰可被掺入单个寡核苷酸中或甚至在寡核苷酸中的单个核苷中。本发明还包括为上文定义的嵌合寡核苷酸的寡核苷酸。

[0286] 在另一实施方案中,本发明的核酸分子缀合于另一部分,该另一部分包括但不限于脱碱基核苷酸、聚醚、聚胺、聚酰胺、肽、碳水化合物、脂质或聚烃化合物。本领域技术人员将认识到,这些分子可在糖、碱基或磷酸酯基团上的多个位置连接于一种或多种任何核苷酸(包括核酸分子)。

[0287] 根据本发明使用的寡核苷酸可方便和常规地通过公知的固相合成技术制备。用于这种合成的设备由包括Applied Biosystems的多个供应商出售。还可采用用于这种合成的任何其它手段;寡核苷酸的实际合成充分地在在本领域普通技术人员的才能范围内。还公知的是使用类似技术来制备其它寡核苷酸诸如硫代磷酸酯和烷基化衍生物。还公知的是使用类似技术和市售可获得的修饰的亚酰胺化物(amidite)和可控孔度玻璃(CPG)产物诸如生物素、荧光素、吡啶或补骨脂素-修饰的亚酰胺化物和/或CPG(可从Glen Research, Sterling VA获得)来合成荧光标记的、生物素化的或其它修饰的寡核苷酸,诸如胆固醇-修饰的寡核苷酸。

[0288] 根据本发明,使用修饰诸如使用LNA单体来增强包括本发明化学性质诸如MOE、ANA、FANA、PS等的寡核苷酸的效力、特异性和作用持续时间并增宽所述寡核苷酸施用途径。这可通过以LNA单体取代本发明寡核苷酸中的一些单体来实现。LNA修饰的寡核苷酸可具有与亲本化合物相似的大小,或可更大或优选地更小。优选地,这种LNA-修饰的寡核苷酸包含少于约70%、更优选地少于约60%、最优选地少于约50%的LNA单体,且其大小为约5至25个核苷酸,更优选地约12至20个核苷酸。

[0289] 优选的修饰的寡核苷酸主链包括但不限于,硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨烷基磷酸三酯、磷酸甲基酯和其它磷酸烷基酯(包括磷酸3'亚烷基酯和手性磷酸酯)、亚磷酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨烷基氨基磷酸酯)、硫羰氨基磷酸酯、硫羰磷酸烷基酯、硫羰烷基磷酸三酯、和具有正常3'-5'键合的硼磷酸酯、这些的2'-5'连接的类似物、和具有倒转极性的那些,其中相邻的核苷单元对是3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'连接的。还包括多种盐、混合盐和游离酸形式。

[0290] 教导以上含磷键合的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361和5,625,050,其每一个通过引用并入本文。

[0291] 其中不包含磷原子的优选的修饰的寡核苷酸主链具有由短链烷基或环烷基核苷

间键合、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键合、或一种或多种短链杂原子或杂环核苷间键合形成的主链。这些包括具有吗啉代键合(部分地从核苷的糖部分形成)的那些;硅氧烷主链;硫化物、亚砷和砷主链;甲酰基(form乙酰基)和硫代甲酰基主链;亚甲基甲酰基和硫代甲酰基主链;含链烯的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚胺基和亚甲基胍基主链;磺酸酯和磺胺主链;酰胺主链;和具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的其余主链。

[0292] 教导以上寡核苷的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437和5,677,439,其每一个通过引用并入本文。

[0293] 在其它优选的寡核苷酸模拟物中,核苷酸单元的糖和核苷间键合二者即主链被新的基团代替。碱基单元被保留用于与适当的核酸靶化合物杂交。一种这样的寡聚化合物,即已显示具有极佳的杂交特性的寡核苷酸称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖-主链被包含酰胺的主链,特别是氨基乙基甘氨酸主链代替。核碱基被保留,并直接或间接与主链的酰胺部分的氮杂氮原子结合。教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.5,539,082;5,714,331和5,719,262,其每一个通过引用并入本文。PNA化合物的进一步教导可见于Nielsen等(1991) Science 254,1497-1500。

[0294] 在本发明的一个实施方案中,具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸和具有杂原子主链的寡核苷,尤其是-CH₂-NH-O-CH₂-称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链的-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂和-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂,其中天然磷酸二酯主链表示为以上引用的美国专利No.5,489,677的-O-P-O-CH₂-和以上引用的美国专利No.5,602,240的酰胺主链。还优选的是具有以上引用的美国专利No.5,034,506的吗啉代主链结构的寡核苷酸。

[0295] 修饰的寡核苷酸还可包含一种或多种取代的糖部分。优选的寡核苷酸在2'位置包括以下之一:OH;F;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;O-、S-或N-炔基;或O烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是取代或未取代的C至C₁₀烷基或C₂至C₁₀烯基和炔基。尤其优选的是O(CH₂)_nO_mCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nNH₂和O(CH₂)_nON(CH₂)_mCH₃,其中n和m可以为1至约10。其它优选的寡核苷酸包括在2'位置包括以下之一:C至C₁₀低级烷基、取代的低级烷基、烷芳基、芳烷基、O-烷芳基或O-芳烷基、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、OCF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ON₂、N₂、N₃、NH₂、杂环烷基、杂环烷芳基、氨基烷基氨基、聚烷基氨基、取代的甲硅烷基、RNA裂解基团、报告基团、嵌入剂、用于改善寡核苷酸药代动力学特性的基团、或用于改善寡核苷酸药效学特性的基团、具有类似特性的其它取代基。优选的修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-CH₂CH₂OCH₃,还称为'-O-(2-甲氧乙基)或2'-MOE)即,烷氧基烷氧基基团。另外优选的修饰包括如在本文以下实施例中描述的2'-二甲基氨基乙氧基,即O(CH₂)₂ON(CH₃)₂基团,还称为2'-DMAOE,和2'-二甲基氨基乙氧基乙氧基(本领域还称为2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基或2'-DMAEOE),即,2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂。

[0296] 其它优选的修饰包括2'-甲氧基(2'-O--CH₃)、2'-氨基丙氧基(2'-OCH₂CH₂CH₃)和2'-氟(2'-F)。还可在寡核苷酸上的其它位置进行类似修饰,尤其是3'末端核苷酸或2'-5'连接的寡核苷酸上糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡核苷酸还可具有糖模拟物诸如

环丁基部分来代替戊呋喃糖基糖。教导这种修饰的糖结构的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No. 4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633和5,700,920,其每一个通过引用并入本文。

[0297] 寡核苷酸还可包括核碱基(本领域中通常简称为“碱基”)修饰或取代。本文所用的“未修饰”或“天然”核苷酸包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)、和嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核苷酸包括其它合成的和天然核苷酸诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶和2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假-尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫氢基、8-硫烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代尤其是5-溴、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤和3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0298] 此外,核苷酸包括美国专利No. 3,687,808中公开的那些、'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering(聚合物科学和工程的简明百科全书)',第858-859页,Kroschwitz,J.I.编著,John Wiley&Sons,1990中公开的那些、Englisch等,'Angewandte Chemie,International Edition',1991,30,第613页中公开的那些、和Sanghvi,Y.S.,第15章,'Antisense Research and Applications(反义研究和应用)',第289-302页,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编著,CRC Press,1993中公开的那些。这些核苷酸的某些尤其有用于增加本发明寡聚化合物的结合亲和性。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶、N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已显示增加核酸双链体稳定性0.6-1.2°C(Sanghvi,Y.S.,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编著,'Antisense Research and Applications(反义研究和应用)',CRC Press,Boca Raton,1993,pp.276-278),并且是目前优选的碱基取代,甚至更尤其是当与2'-O甲氧乙基糖修饰组合时。

[0299] 教导上述修饰的核苷酸以及其它修饰的核苷酸的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No. 3,687,808、以及4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,596,091;5,614,617;5,750,692和5,681,941,其每一个通过引用并入本文。

[0300] 本发明寡核苷酸的另一修饰包括将寡核苷酸化学连接于增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一种或多种部分或缀合物。

[0301] 这种部分包括但不限于,脂质部分诸如胆固醇部分、胆酸、硫醚,如,己基-S-三苯甲基硫醇、硫胆固醇、脂肪族链,如,十二烷二醇或十一烷基残基、磷脂,如,二-十六烷基-rac-甘油或1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-H-膦酸三乙基铵、聚胺或聚乙二醇链、或金刚烷乙酸、棕榈酰基部分、或十八胺或己基氨基-羰基-t羟胆固醇部分。

[0302] 教导这种寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利

No. 4, 828, 979; 4, 948, 882; 5, 218, 105; 5, 525, 465; 5, 541, 313; 5, 545, 730; 5, 552, 538; 5, 578, 717; 5, 580, 731; 5, 580, 731; 5, 591, 584; 5, 109, 124; 5, 118, 802; 5, 138, 045; 5, 414, 077; 5, 486, 603; 5, 512, 439; 5, 578, 718; 5, 608, 046; 4, 587, 044; 4, 605, 735; 4, 667, 025; 4, 762, 779; 4, 789, 737; 4, 824, 941; 4, 835, 263; 4, 876, 335; 4, 904, 582; 4, 958, 013; 5, 082, 830; 5, 112, 963; 5, 214, 136; 5, 082, 830; 5, 112, 963; 5, 214, 136; 5, 245, 022; 5, 254, 469; 5, 258, 506; 5, 262, 536; 5, 272, 250; 5, 292, 873; 5, 317, 098; 5, 371, 241; 5, 391, 723; 5, 416, 203; 5, 451, 463; 5, 510, 475; 5, 512, 667; 5, 514, 785; 5, 565, 552; 5, 567, 810; 5, 574, 142; 5, 585, 481; 5, 587, 371; 5, 595, 726; 5, 597, 696; 5, 599, 923; 5, 599, 928和5, 688, 941, 其每一个通过引用并入本文。

[0303] 药物发现: 本发明的化合物还可应用于药物发现和靶确认的领域。本发明涵盖本文鉴定的化合物和优选的靶区段在药物发现尝试中使用以阐明聚丝蛋白 (FLG) 多核苷酸与疾病状态、表型或疾患之间存在的关联。这些方法包括检测或调节FLG多核苷酸, 包括将样品、组织、细胞或生物体与本发明化合物接触, 在处理后的某一时间测量FLG多核苷酸的核酸或蛋白水平和/或相关的表型或化学端点, 和任选地将测量值与未处理样品或用本发明另外化合物处理的样品比较。这些方法还可与其它试验平行或联合进行, 以为靶确认方法确定未知基因的功能, 或确定特定基因产物作为治疗或预防特定疾病、疾患或表型的靶的有效性。

[0304] 评价基因表达的上调或抑制:

[0305] 外源核酸向宿主细胞或生物体中的转移可通过直接检测细胞或生物体中该核酸的存在来评价。这种检测可通过本领域公知的多种方法来实现。例如, 外源核酸的存在可通过Southern印迹或利用特异性地扩增与该核酸相关的核苷酸序列的引物通过聚合酶链式反应 (PCR) 技术来检测。外源核酸的表达还可利用包括基因表达分析的常规方法测量。例如, 从外源核酸产生的mRNA可利用Northern印迹和逆转录PCR (RT-PCR) 来检测和定量。

[0306] RNA从外源核酸的表达还可通过测量酶促活性或报告蛋白活性来检测。例如, 反义调节活性可间接地作为靶核酸表达的减少或增加来测量, 靶核酸表达的减少或增加作为外源核酸在产生效应RNA的指示。基于序列保守性, 可设计引物并用于扩增靶基因的编码区域。最初, 来自每个基因的最高度表达的编码区域可用于构建模式对照基因, 尽管可使用任何编码或非编码区域。通过在报告基因编码区域和其poly (A) 信号之间插入每个编码区域来组装每个对照基因。这些质粒将产生报告基因在基因的上游部分且可能的RNAi靶在3'非编码区域的mRNA。单独反义寡核苷酸的效果将通过报告基因的调节来测定。可用于本发明方法的报告基因包括乙酰羟酸合酶 (AHAS)、碱性磷酸酶 (AP)、 β 半乳糖苷酶 (LacZ)、 β 葡萄糖醛酸酶 (GUS)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、绿色荧光蛋白 (GFP)、红色荧光蛋白 (RFP)、黄色荧光蛋白 (YFP)、青色荧光蛋白 (CFP)、辣根过氧化物酶 (HRP)、荧光素酶 (Luc)、胭脂碱合酶 (NOS)、章鱼碱合酶 (OCS)、和其衍生物。赋予对氨苄西林、博来霉素、氯霉素、庆大霉素、潮霉素、卡那霉素、林可霉素、甲氨蝶呤、草丁膦、嘌呤霉素和四环素抗性的多种选择标记是可得。确定报告基因的调节的方法是本领域公知的, 包括但不限于, 荧光方法 (如, 荧光光谱学、荧光激活细胞分选术 (FACS)、荧光显微镜检术)、抗生素抗性确定。

[0307] FLG蛋白和mRNA表达可利用本领域技术人员已知和在本文别处描述的方法来测定。例如, 免疫测定诸如ELISA可用于测量蛋白水平。FLG ELISA测定试剂盒是市售可获得

的,如,从R&DSYSTEMS (Minneapolis,MN)。

[0308] 在实施方案中,利用本发明反义寡核苷酸处理的样品(如,体内或体外的细胞或组织)中的FLG表达(如,mRNA或蛋白)通过与对照样品中的FLG表达比较来评价。例如,蛋白或核酸的表达可利用本领域技术人员已知的方法与模拟处理或未处理样品中的比较。可选地,取决于期望的信息,可与以对照反义寡核苷酸(如,具有改变的或不同序列的反义寡核苷酸)处理的样品进行比较。在另一实施方案中,处理样品vs.未处理样品中FLG蛋白或核酸的表达差异可与处理样品vs.未处理样品中不同核酸(包括研究者认为适当的任何标准,如,看家基因)的表达差异比较。

[0309] 观察到的差异可如期望地表示,如,比率或分数的形式,用于与对照比较。在实施方案中,以本发明反义寡核苷酸处理的样品中FLG mRNA或蛋白的水平相对于未处理样品或以对照核酸处理的样品增加或减少约1.25倍至约10倍或更多。在实施方案中,FLG mRNA或蛋白的水平增加或减少至少约1.25倍、至少约1.3倍、至少约1.4倍、至少约1.5倍、至少约1.6倍、至少约1.7倍、至少约1.8倍、至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3倍、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、或至少约10倍或更多。

[0310] 试剂盒、研究试剂、诊断和治疗

[0311] 本发明的化合物可用于诊断、治疗和预防,和作为研究试剂和试剂盒的成分。而且,能够以强烈特异性抑制基因表达的反义寡核苷酸通常被本领域技术人员用来阐明特定基因的功能或区分生物途径的不同组件的功能。

[0312] 对于在试剂盒和诊断和不同生物系统中使用,本发明的化合物,单独或与其它化合物或治疗组合地,可用作差异和/或组合分析中的工具来阐明细胞和组织中表达的基因的一部分或完全互补序列的表达模式。

[0313] 本文所用的术语“生物系统”或“系统”定义为表达或被使得能够表达聚丝蛋白(FLG)基因产物的任何生物体、细胞、细胞培养物或组织。这些包括但不限于,人、转基因动物、细胞、细胞培养物、组织、异种移植物、移植物和其组合。

[0314] 作为一个非限制性实例,将以一种或多种反义化合物处理的细胞或组织中的表达模式与未被反义化合物处理的对照细胞或组织比较,并按照其属于所检查的基因的例如疾病关联、信号传导途径、细胞定位、表达水平、大小、结构或功能分析所产生的模式的基因表达差异水平。这些分析可对刺激或未刺激的细胞进行,并在影响表达模式的其它化合物存在或不存在下。

[0315] 本领域已知的基因表达分析方法的实例包括DNA阵列或微阵列、SAGE(基因表达系列分析)、READS(消化的cDNA的限制性酶扩增)、TOGA(总基因表达分析)、蛋白阵列和蛋白质组学、表达的序列标签(EST)测序、消减RNA指纹技术(SuRF)、消减克隆、差异展示(DD)、比较基因组杂交、FISH(荧光原位杂交)技术和质谱方法。

[0316] 本发明的化合物可用于研究和诊断,因为这些化合物杂交于编码聚丝蛋白(FLG)的核酸。例如,在本文公开的这种条件下以这种效力杂交的为有效的FLG调节剂的寡核苷酸,在有利基因扩增或检测的条件下分别是有效的引物或探针。这些引物和探针可用于需要特异性检测编码FLG的核酸分子的方法,和可用于扩增用于检测或用于进一步研究FLG的所述核酸分子。本发明的反义寡核苷酸,尤其是引物和探针与编码FLG的核酸的杂交可通过

本领域已知的手段检测。这种手段可包括将酶缀合于寡核苷酸、放射性标记寡核苷酸、或任何其它适当的检测手段。还可制备利用这种检测手段来检测样品中FLG水平的试剂盒。

[0317] 本领域技术人员还利用反义的特异性和灵敏性用于治疗用途。反义化合物已经在动物包括人的疾病状态的治疗中用作治疗部分。反义寡核苷酸药物已经安全且有效地施用于人,目前正在进行许多临床试验。因此已经确定,反义化合物可以是有用的治疗形态,可被配置以用于治疗细胞、组织和动物,尤其是人的治疗方案。

[0318] 对于治疗,通过施用根据本发明的反义化合物来治疗怀疑具有可通过调节FLG多核苷酸的表达来治疗的疾病或病症的动物,优选地人。例如,在一个非限制性实施方案中,方法包括向需要治疗的动物施用治疗有效量的FLG调节剂的步骤。本发明的聚丝蛋白(FLG)调节剂有效地调节FLG的活性或调节FLG蛋白的表达。在一个实施方案中,与对照相比,动物中FLG的活性或表达被抑制约10%。优选地,动物中FLG的活性或表达被抑制约30%。更优选地,动物中FLG的活性或表达被抑制50%或更多。因此,与对照相比,寡聚化合物调节聚丝蛋白(FLG)mRNA的表达至少10%、至少50%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%。

[0319] 在一个实施方案中,与对照相比,动物中聚丝蛋白(FLG)的活性或表达增加约10%。优选地,动物中FLG的活性或表达增加约30%。更优选地,动物中FLG的活性或表达增加50%或更多。因此,与对照相比,寡聚化合物调节FLG mRNA的表达至少10%、至少50%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%。

[0320] 例如,可测量动物的血清、血液、脂肪组织、肝脏或任何其它体液、组织或器官中聚丝蛋白(FLG)表达的减少。优选地,被分析的所述体液、组织或器官中包含的细胞包含编码FLG肽和/或FLG蛋白本身的核酸分子。

[0321] 通过向适当的药学上可接受的稀释剂或载体加入有效量的本发明化合物,本发明的化合物可以药物组合物利用。本发明的化合物和方法的用途还可以是预防上有用的。

[0322] 缀合物

[0323] 本发明寡核苷酸的另一修饰包括将该寡核苷酸化学连接至增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一种或多种部分或缀合物。这些部分或缀合物可包括共价结合官能团诸如伯羟基或仲羟基基团的缀合物基团。本发明的缀合物基团包括嵌入剂、报告分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、增强寡聚物药代动力学特性的基团、增强寡聚物药效学特性的基团。典型缀合物基团包括胆固醇、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、葱醌、吡啶、荧光素、罗丹明、香豆素和染料。在本发明范畴中,增强药效学特性的基团包括改进摄取、增强对降解的耐受性、和/或加强与靶核酸序列特异性杂交的基团。在本发明范畴中,增强药代动力学特性的基团包括改进本发明化合物的摄取、分布、代谢或排泄的基团。代表性缀合物基团公开在1992年10月23日提交的国际专利申请No. PCT/US92/09196和美国专利No. 6,287,860中,其通过引用并入本文。缀合物部分包括但不限于,脂质部分诸如胆固醇部分、胆酸、硫醚,如,己基-5-三苯甲基硫醇、硫胆固醇、脂肪族链,如,十二烷二醇或十一烷基残基、磷脂,如,二-十六烷基-rac-甘油或1,2-二-O-十六烷基-rac-甘油-3-H磷酸三乙基铵、聚胺或聚乙二醇链、或金刚烷乙酸、棕榈酰基部分、或十八胺或己基氨基-羧基-羟胆固醇部分。本

发明的寡核苷酸还可缀合于活性药物物质,例如,阿斯匹林、华法林、苯基丁氮酮、布洛芬、舒洛芬、芬布芬、酮洛芬、(S)-(+)-普拉洛芬、卡洛芬、丹肌氨酸、2,3,5-三碘苯甲酸、氟灭酸、亚叶酸、苯并噻二嗪、氯噻嗪、二氮杂环庚三烯、吡啶美辛、巴比妥酸盐、头孢菌素、磺胺药物、抗糖尿病药、抗菌药或抗生素。

[0324] 教导这种寡核苷酸缀合物的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利 No.4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941。

[0325] 制剂

[0326] 为了辅助摄取、分布和/或吸收,本发明的化合物还可与其它分子、分子结构或化合物的混合物混合、包封、缀合或以其它方式关联,例如脂质体、受体靶向分子、口服、直肠、局部或其它制剂。教导这种摄取、分布和/或吸收辅助制剂的制备的代表性美国专利包括但不限于,美国专利No.5,108,921;5,354,844;5,416,016;5,459,127;5,521,291;5,543,165;5,547,932;5,583,020;5,591,721;4,426,330;4,534,899;5,013,556;5,108,921;5,213,804;5,227,170;5,264,221;5,356,633;5,395,619;5,416,016;5,417,978;5,462,854;5,469,854;5,512,295;5,527,528;5,534,259;5,543,152;5,556,948;5,580,575和5,595,756,其每一个通过引用并入本文。

[0327] 尽管反义寡核苷酸不必以载体的背景施用以便调节靶表达和/或功能,但是本发明的实施方案涉及用于表达反义寡核苷酸的表达载体构建体,包括启动子、杂合体启动子基因序列,并具备强的组成型启动子活性、或在期望情形中可被诱导的启动子活性。

[0328] 在一个实施方案中,发明实践包括以适当的核酸递送系统施用至少一种上述反义寡核苷酸。在一个实施方案中,该系统包括可操作地连接于多核苷酸的非病毒载体。这种非病毒载体的实例包括单独寡核苷酸(如,SEQ ID NO:3至13的任何一种或多种)或寡核苷酸以及适当的蛋白、多糖或脂质制剂。

[0329] 另外适当的核酸递送系统包括病毒载体,通常序列来自以下的至少一种:腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、辅助病毒依赖型腺病毒、逆转录病毒、或日本血凝病毒-脂质体(HVJ)复合物。优选地,病毒载体包括可操作地连接于多核苷酸的强的真核启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子。

[0330] 另外优选的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼氏鼠白血病病毒和基于HIV的病毒。一种优选的基于HIV的病毒载体包括至少两种载体,其中gag和pol基因来自HIV基因组且env基因来自另一病毒。DNA病毒载体是优选的。这些载体包括痘病毒载体诸如正痘病毒或禽痘病毒载体、疱疹病毒载体诸如I型单纯疱疹病毒(HSV)载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。

[0331] 本发明的反义化合物涵盖任何药学上可接受的盐、酯或这种酯的盐、或当施用于

包括人的动物时能够提供(直接或间接)生物活性代谢物的任何其它化合物、或其残留物。

[0332] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的生理上和药学上可接受的盐:即,保留亲本化合物的期望生物活性且不对其赋予不期望的毒物学作用的盐。对于寡核苷酸,药学上可接受的盐和其用途的优选的实例进一步描述于美国专利No.6,287,860,其通过引用并入本文。

[0333] 本发明还包括包含本发明反义化合物的药物组合物和制剂。取决于期望局部还是系统治疗和待治疗的区域,本发明的药物组合物可以多种方式施用。施用可以是局部的(包括眼睛和向粘膜,包括阴道和直肠递送)、肺部,如,通过吸入或喷入粉末或气雾剂,包括通过喷雾器;气管内、鼻内、表皮和经皮)、口服或肠胃外。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌内注射或输注;或颅内,如鞘内或心室内的施用。

[0334] 对于治疗中枢神经系统中的组织,施用可通过如,注射或输注到脑脊液中进行。反义RNA向脑脊液的施用描述在如,美国专利申请公布No.2007/0117772“Methods for slowing familial ALS disease progression(减慢家族性ALS病进展的方法)”中,通过引用全文并入本文。

[0335] 当预期本发明的反义寡核苷酸被施用于中枢神经系统中的细胞时,可以能够促进本发明反义寡核苷酸跨越血脑屏障的渗透的一种或多种试剂施用。注射可在如内嗅皮质或海马中进行。通过向肌肉组织中的运动神经元施用腺病毒载体来递送神经营养因子描述在如,美国专利No.6,632,427“Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons(腺病毒载体介导的向脊髓运动神经元的基因转移)”中,通过引用并入本文。向脑如,纹状体、丘脑、海马或黑质直接递送载体是本领域已知的,描述在如,美国专利No.6,756,523“Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain(用于向中枢神经系统尤其是脑的细胞转移外来基因的腺病毒载体)”中,通过引用并入本文。施用可以是快速的,如通过注射,或经一段时间进行,如通过缓慢输注或施用缓释制剂。

[0336] 本发明反义寡核苷酸可还连接或缀合于提供期望的药物或药效学特性的试剂。例如,反义寡核苷酸可偶联于本领域已知的促进跨血脑屏障渗透或运输的任何物质,诸如转铁蛋白受体的抗体,并通过静脉内注射施用。反义化合物可连接于病毒载体,例如,使得反义化合物更有效和/或增加反义化合物跨血脑屏障的运输的病毒载体。渗透血脑屏障破坏还可通过如,输注以下物质来实现:糖,包括但不限于,赤藓糖醇、木糖醇、D(+)半乳糖、D(+)乳糖、D(+)木糖、卫矛醇、肌醇、L(-)果糖、D(-)甘露醇、D(+)葡萄糖、D(+)阿拉伯糖、D(-)阿拉伯糖、纤维二糖、D(+)麦芽糖、D(+)棉子糖、L(+)鼠李糖、D(+)蜜二糖、D(-)核糖、侧金盏花醇、D(+)阿拉伯糖醇、L(-)阿拉伯糖醇、D(+)岩藻糖、L(-)岩藻糖、D(-)来苏糖、L(+)来苏糖和L(-)来苏糖、或氨基酸包括但不限于,谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、缬氨酸和牛磺酸。用于增强血脑屏障渗透的方法和材料描述在,如,美国专利No.4,866,042“Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier(用于跨血脑屏障递送遗传材料的方法)”,美国专利No.6,294,520“Material for passage through the blood-brain barrier(用于穿过血脑屏障的材料)”和美国专利No.6,936,589“Parenteral delivery systems(肠胃外递送系统)”,都通过引用全文并入

本文。

[0337] 为了帮助摄取、分布和/或吸收,本发明反义化合物可与其它分子、分子结构或化合物混合物,例如,脂质体、受体靶向分子、口服、直肠、局部或其它制剂混合、包封、缀合或以其它方式关联。例如,阳离子脂质可被包括在制剂中以促进寡核苷酸摄取。显示促进摄取的一种这样的组合物是LIPOFECTIN(可从GIBCO-BRL, Bethesda, MD获得)。

[0338] 认为具有至少一种2'-O-甲氧乙基修饰的寡核苷酸尤其可用于口服施用。用于局部施用的药物组合物和制剂可包括经皮贴片、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规药物载体、水性、粉状、或油性基质、增稠剂和类似物可以是必需或期望的。涂覆的避孕套、手套和类似物也是可用的。

[0339] 可方便地以单位剂型呈现的本发明的药物制剂,可按照制药工业中公知的常规技术制备。这种技术包括将有效成分与药物载体或赋形剂关联的步骤。通常,制剂通过以下制备:均匀且密切地将有效成分与液态载体或磨碎的固态载体或二者关联,然后,如果需要,将产品成型。

[0340] 本发明的组合物可配制为任何的许多可能剂型,诸如但不限于,片剂、胶囊、凝胶、液体糖浆剂、软凝胶、栓剂和灌肠剂。本发明的组合物还可配制为在含水、不含水或混合介质中的悬浮剂。含水悬浮剂可进一步包含增加悬浮剂粘度的物质,包括例如,羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮剂还可包含稳定剂。

[0341] 本发明的药物组合物包括但不限于,溶液、乳液、泡沫剂和含脂质体制剂。本发明的药物组合物和制剂可包括一种或多种渗透促进剂、载体、赋形剂或其它活性或无活性配料。

[0342] 乳剂通常是一种液体以直径通常超过0.1 μ m的液滴形式分散在另一液体中的非均匀系统。除了分散相和可作为以水相、油相或本身作为单独相的溶液存在的活性药物以外,乳剂可包含另外的成分。包括微乳剂作为本发明的实施方案。乳剂和其用途是本领域公知的,进一步描述在美国专利No.6,287,860。

[0343] 本发明的制剂包括脂质体制剂。本发明所用的术语“脂质体”是指包括以一个或多个球形双层排列的两亲性脂质的囊泡。脂质体是单层或多层囊泡,具有从亲脂性材料形成的膜和包含待递送的组合物的含水内部。阳离子脂质体是带正电荷的脂质体,认为其与带负电荷的DNA分子相互作用形成稳定复合体。认为pH-敏感或带负电荷的脂质体捕获DNA而不是与其复合。阳离子和非阳离子脂质体二者已经用于向细胞递送DNA。

[0344] 脂质体还包括“空间上稳定的”脂质体,本文所用的该术语是指包括一种或多种特化的脂质的脂质体。当被掺入脂质体时,这些特化的脂质产生相对于松散这种特化脂质的脂质体具有增强的循环生命周期的脂质体。空间上稳定的脂质体的实例是其中脂质体的形成囊泡的脂质部分的部分包括一种或多种糖脂或以一种或多种亲水性聚合物诸如聚乙二醇(PEG)部分衍生化的脂质体。脂质体和其用途进一步描述在美国专利No.6,287,860中。

[0345] 本发明的药物制剂和组合物还可包括表面活性剂。表面活性剂在药物产物、制剂和乳剂中的使用是本领域公知的。表面活性剂和其用途进一步描述在美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。

[0346] 在一个实施方案中,本发明采用多种渗透促进剂来实现核酸尤其是寡核苷酸的有效递送。除了帮助非亲脂性药物跨细胞膜的扩散,渗透促进剂还增强亲脂性药物的渗透性。

渗透促进剂可分为属于五个宽的分类之一,即,表面活性剂、脂肪酸、胆酸、螯合剂和非螯合非表面活性剂。渗透促进剂和其用途进一步描述在美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。

[0347] 本领域技术人员将认识到,制剂常规地根据其预期用途,即施用途径来设计。

[0348] 用于局部施用的优选的制剂包括其中本发明的寡核苷酸与局部递送剂诸如脂质、脂质体、脂肪酸、脂肪酸酯、类固醇、螯合剂和表面活性剂混合的制剂。优选的脂质和脂质体包括中性(如,二油酰基-磷脂酰DOPE乙醇胺、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱DMPC、二硬脂酰磷脂酰胆碱)、阴性(如,二肉豆蔻酰磷脂酰甘油DMPG)和阳离子(如,二油酰基四甲基氨基丙基DOTAP和二油酰基-磷脂酰乙醇胺DOTMA)。

[0349] 对于局部或其它施用,本发明的寡核苷酸可被脂质体封装或可与其形成复合体,尤其是阳离子脂质体。可选地,寡核苷酸可与脂质,尤其是阳离子脂质复合。优选的脂肪酸和酯、其药学上可接受的盐、和其用途进一步描述在美国专利No.6,287,860中。

[0350] 用于口服施用的组合物和制剂包括粉末剂或颗粒剂、微颗粒、纳米颗粒、水或非水介质中的悬浮剂或溶液、胶囊、凝胶胶囊、囊剂、片剂或小片剂。增稠剂、芳香剂、稀释剂、乳化剂、分散助剂或粘合剂可以是期望的。优选的口服制剂是其中本发明的寡核苷酸连同一种或多种渗透促进剂、表面活性剂和螯合剂一起施用的那些。优选的表面活性剂包括脂肪酸和/或其酯或盐、胆酸和/或其盐。优选的胆酸/盐和脂肪酸和其用途进一步描述在美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。还优选的是渗透促进剂的组合,例如,脂肪酸/盐以及胆酸/盐。尤其优选的组合是月桂酸的钠盐、癸酸和UDCA。进一步的渗透促进剂包括聚氧乙烯-9-月桂基醚、聚氧乙烯-20-十六烷基醚。本发明的寡核苷酸可以包括喷雾干燥颗粒的粒状形式口服递送,或被复合以形成微颗粒或纳米颗粒。寡核苷酸络合剂和其用途进一步描述在美国专利No.6,287,860中,其通过引用并入本文。

[0351] 用于肠胃外、鞘内或心室内施用的组合物和制剂可包括还可包含缓冲剂、稀释剂和其它适当的添加剂(诸如但不限于渗透促进剂、载体化合物和其它药学上可接受的载体或赋形剂)的无菌水溶液。

[0352] 本发明的某些实施方案提供包含一种或多种寡聚化合物和通过非反义机制起作用的一种或多种其它化疗剂的药物组合物。这种化疗剂的实例包括但不限于,癌症化疗药物诸如柔红霉素、道诺霉素、放线菌素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、依索比星、博来霉素、马磷酰胺、异环磷酰胺、阿糖胞苷、双氯乙亚硝基脲、白消安、丝裂霉素C、放线菌素D、光神霉素、泼尼松、羟孕酮、睾酮、他莫昔芬、达卡巴嗪、丙卡巴肼、六甲蜜胺、五甲蜜胺、米托蒽醌、安吡啶、苯丁酸氮芥、甲基环己亚硝基脲、氮芥、美法仑、环磷酰胺、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氮杂胞苷、羟基脲、脱氧柯福霉素、4-羟基过氧环磷酰胺、5-氟尿嘧啶(5-FU)、5-氟脱氧尿苷(5-FUdR)、甲氨蝶呤(MTX)、秋水仙碱、泰素、长春新碱、长春碱、依托泊苷(VP-16)、三甲曲沙、伊立替康、托泊替康、吉西他滨、替尼泊苷、顺铂和己烯雌酚(DES)。当与本发明的化合物一起使用时,这种化疗剂可单独地使用(如,5-FU和寡核苷酸),顺序地使用(如,5-FU和寡核苷酸持续一段时间,随后是MTX和寡核苷酸),或联合一种或多种其它这种化疗剂使用(如,5-FU、MTX和寡核苷酸,或5-FU、放疗和寡核苷酸)。包括但不限于非甾体药物和皮质激素的抗炎药物,和抗病毒药物,包括但不限于利巴韦林、阿糖腺苷、无环鸟苷和更昔洛韦,也可组合在本发明的组合物中。反义化合物与其它非反义药物的组合也在本发

明的范围中。两种或多种组合的化合物可一起或顺序地使用。

[0353] 在另一相关实施方案中,本发明的组合物可包含靶向第一核酸的一种或多种反义化合物,尤其是寡核苷酸,和靶向第二核酸靶的一种或多种另外的反义化合物。例如,第一靶可以是聚丝蛋白(FLG)的特定反义序列,第二靶可以是来自另一核苷酸序列的区域。可选地,本发明的组合物可包含靶向同一聚丝蛋白(FLG)核酸靶的不同区域的两种或多种反义化合物。本文阐述了反义化合物的许多实例,其它的可选自本领域已知的适当的化合物。两种或多种组合的化合物可一起或顺序地使用。

[0354] 给药:

[0355] 相信治疗性组合物的配制和其随后的施用(给药)在本领域技术人员的能力范围内。给药依赖于待治疗的疾病状态的严重度和响应性,治疗的时期持续数天到数月,或直到实现治愈或实现疾病状态的减少。最佳给药计划可从患者体内药物积累的测量来计算。本领域普通技术人员可容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。最佳剂量可取决于单独寡核苷酸的相对效力而变化,通常可基于在有效的体外和体内动物模型中有效的EC₅₀来估算。通常,剂量是每kg体重从0.01 μ g至100g,可每天、每周、每月或每年一次或多次,或甚至每2至20年一次地提供。本领域普通技术人员可基于测量的药物在体液或组织中的停留时间和浓度容易地估算重复率。在成功治疗之后,可能期望对患者进行维持疗法以阻止疾病状态复发,其中寡核苷酸以维持剂量施用,范围从每kg体重0.01 μ g至100g,每天一次或多次,至每20年一次。

[0356] 在实施方案中,患者以至少约1、至少约2、至少约3、至少约4、至少约5、至少约6、至少约7、至少约8、至少约9、至少约10、至少约15、至少约20、至少约25、至少约30、至少约35、至少约40、至少约45、至少约50、至少约60、至少约70、至少约80、至少约90或至少约100mg/kg体重的药物剂量治疗。反义寡核苷酸的某些注射剂量描述于,如,美国专利No.7,563,884“Antisense modulation of PTP1B expression(PTP1B表达的反义调节)”,通过引用全文并入本文。

[0357] 尽管以上已经描述了本发明多种实施方案,应理解的是,它们仅以示例而非限制的方式呈现。可根据本公开内容对公开的实施方案进行多种改变而不偏离本发明的主旨或范围。因此,本发明的宽度和范围不应限于任何上述的实施方案。

[0358] 本文提及的所有文件通过引用并入本文。本申请中提及的所有出版物和专利文件为了所有目的通过引用并入本文,其程度如同每个单独出版物或专利文件被单独地提及。通过在本文件中提及多个参考文献,申请人不承认任何特定参考文献是本发明的“现有技术”。本发明组合物和方法的实施方案在以下实施例中阐述。

实施例

[0359] 以下非限制性实施例用于阐述本发明的选定实施方案。应理解的是,所示组分的成分比例和其它选择方面的改变对于本领域技术人员是明显的,并且在本发明实施方案范围中。

[0360] 实施例1:对与聚丝蛋白(FLG)反义的核酸分子和/或FLG多核苷酸的有义链有特异性的反义寡核苷酸的设计

[0361] 如上所述,术语“对...有特异性的寡核苷酸”或“寡核苷酸靶”是指具有(i)能够与

靶向基因的一部分形成稳定双链体,或(ii)能够与靶基因的mRNA转录物的一部分形成稳定双链体的序列的寡核苷酸。

[0362] 通过利用自动比对核酸序列并指明同一性或同源性的区域的计算机程序来便于选择适当的寡核苷酸。这种程序用来比较获得的核酸序列,例如通过搜寻数据库诸如GenBank或通过对PCR产物测序。比较来自一定范围物种的核酸序列允许选择在物种之间展示适当的同一性程度的核酸序列。在未被测序的基因的情形中,进行Southern印迹以允许确定靶物种与其它物种的基因之间的同一性程度。如本领域已知的,通过以不同的严格性程度进行Southern印迹,可能获得近似的同一性测量。这些方案允许选择展现与待控制的受治疗者中的靶核酸序列的高程度互补性和与其它物种中的相应核酸序列的较低程度互补性的寡核苷酸。本领域技术人员将认识到,在选择用于本发明的基因的适当区域方面存在相当大的自由。

[0363] 当反义化合物与靶核酸的结合干扰靶核酸的正常功能以导致功能和/或活性的调节时,该化合物是“可特异性杂交的”,且在期望特异性结合的条件下(即,在体内测定或治疗性治疗的情形中的生理条件下,和在体外测定的情形中进行测定的条件下)存在足够程度的互补性以避免反义化合物与非靶核酸序列的非特异性结合。

[0364] 本文所述寡核苷酸的杂交特性可通过本领域已知的一种或多种体外测定确定。例如,本文所述寡核苷酸的特性可利用解链曲线测定确定靶天然反义与可能的药物分子之间的结合强度来获得。

[0365] 靶天然反义与可能的药物分子(分子)之间的结合强度可利用测量分子间相互作用强度的任何已建立的方法例如解链曲线测定来估算。

[0366] 对于天然反义/分子复合体,解链曲线测定确定双链向单链构象的快速转变发生的温度。这一温度被广泛接受作为两种分子之间相互作用强度的可靠量度。

[0367] 解链曲线测定可利用对应分子结合位置的实际天然反义RNA分子或合成的DNA或RNA核苷酸的cDNA拷贝进行。多种包含所有进行这一测定所必需的试剂的试剂盒是可获得的(如,Applied Biosystems Inc.MeltDoctor试剂盒)。这些试剂盒包括包含双链DNA(dsDNA)结合染料之一(诸如ABI HRM染料,SYBR Green,SYTO,等等)的适当的缓冲溶液。dsDNA染料的特性是使得它们在自由形式几乎不发出荧光,,但当结合dsDNA时是高度荧光的。

[0368] 为了进行测定,将cDNA或相应的寡核苷酸与具体制造商的说明书规定的浓度的分子混合。将混合物加热到95℃以使所有预形成的dsDNA复合体解离,然后缓慢冷却到室温或试剂盒制造商规定的其它较低温度以允许DNA分子退火。然后将新形成的复合体缓慢加热到95℃,同时连续收集反应产生的荧光的量的数据。荧光强度与反应中存在的dsDNA的量成反比。数据可利用与试剂盒相容的实时PCR仪器(如ABI's StepOne Plus实时PCR系统或LightTyper instrument,Roche Diagnostics,Lewes,UK)来收集。

[0369] 利用适当的软件(例如LightTyper(Roche)或SDS Dissociation Curve,ABI)将荧光相对于温度的负导函数(y轴上的 $-d(\text{荧光})/dT$)对温度(x轴)绘图来构造熔融峰。分析数据以确定dsDNA复合体向单链分子快速转变的温度。这一温度称为 T_m ,与两种分子之间相互作用的强度成正比。通常, T_m 将超过40℃。

[0370] 实施例2:FLG多核苷酸的调节

[0371] 以反义寡核苷酸处理HEPG2细胞

[0372] 在37℃和5%CO₂下将来自ATCC(目录号HB-8065)的HepG2细胞生长在生长培养基(MEM/EBSS(Hyclone目录号SH30024,或Mediatech目录号MT-10-010-CV)+10%FBS(Mediatech目录号MT35-011-CV)+青霉素/链霉素(Mediatech目录号MT30-002-CI))中。在实验当天,将6孔板中的培养基更换为新鲜的生长培养基。将所有反义寡核苷酸稀释到20μM的浓度。将此溶液的2μl与400μl Opti-MEM培养基(Gibco目录号31985-070)和4μl Lipofectamine 2000(Invitrogen目录号11668019)在室温下一起培养20min,施加到带有HEPG2细胞的6孔板的每个孔中。代替寡核苷酸溶液的包括2μl水的类似混合物用于模拟转染的对照。在37℃和5%CO₂培养3-18h后,将培养基更换为新鲜的生长培养基。加入反义寡核苷酸48h后,去除培养基且利用来自Promega的SV总RNA分离系统(目录号Z3105)或来自Qiagen的RNeasy总RNA分离试剂盒(目录号74181)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600ng RNA加入到利用来自Thermo Scientific的Verso cDNA试剂盒(目录号AB1453B)或高容量cDNA逆转录试剂盒(目录号4368813)如制造商的说明书所述地进行的逆转录反应中。来自这一逆转录反应的cDNA用于利用ABITaqman基因表达混合物(目录号4369510)和由ABI(由Applied Biosystems Inc.,Foster City CA的Applied Biosystems Taqman基因表达测定:Hs00856927_g1)设计的引物/探针通过实时PCR监控基因表达。利用Mx4000热循环仪(Stratagene)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。

[0373] 结果:

[0374] 实时PCR结果显示,用针对FLG1反义AK056431设计的两种寡核苷酸,HepG2细胞中FLG1 mRNA的水平显著增加(图1)。

[0375] 用反义寡核苷酸处理518A2细胞

[0376] 在37℃和5%CO₂下将获自Albert Einstein-Montefiore Cancer Center,NY的518A2细胞生长在生长培养基(MEM/EBSS(Hyclone目录号SH30024,或Mediatech目录号MT-10-010-CV)+10%FBS(Mediatech目录号MT35-011-CV)+青霉素/链霉素(Mediatech目录号MT30-002-CI))中。实验前一天,将细胞以 1.5×10^5 /ml的密度重新铺板到6孔板中,在37℃和5%CO₂下培养。在实验当天,将6孔板中的培养基更换成新鲜的生长培养基。将所有反义寡核苷酸稀释到20μM的浓度。将此溶液的2μl与400μl Opti-MEM培养基(Gibco目录号31985-070)和4μl Lipofectamine 2000(Invitrogen目录号11668019)在室温下一起培养20min,施加到带有518A2细胞的6孔板的每个孔中。代替寡核苷酸溶液的包括2μl水的类似混合物用于模拟转染的对照。在37℃和5%CO₂培养3-18h后,将培养基更换为新鲜的生长培养基。加入反义寡核苷酸48h后,去除培养基且利用来自Promega的SV总RNA分离系统(目录号Z3105)或来自Qiagen的RNeasy总RNA分离试剂盒(目录号74181)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600ng RNA加入到利用来自Thermo Scientific的Verso cDNA试剂盒(目录号AB1453B)或高容量cDNA逆转录试剂盒(目录号4368813)如制造商的说明书所述地进行的逆转录反应中。来自这一逆转录反应的cDNA用于利用ABI Taqman基因表达混合物(目录号4369510)和由ABI(由Applied Biosystems Inc.,Foster City CA进行的Applied Biosystems Taqman基因表达测定:Hs00856927_g1)设计的引物/探针通过实时PCR监控基

因表达。利用StepOne Plus Real Time PCR Machine (Applied Biosystems) 使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。以反义寡核苷酸处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。

[0377] 结果:实时PCR结果显示,用针对FLG1反义AK056431设计的两种寡核苷酸,518A2细胞中FLG1 mRNA的水平显著增加(图2)。另一组实时PCR结果显示,用针对FLG1反义AK056431设计的两种寡核苷酸,518A2细胞中FLG mRNA的水平显著增加(图3)。

[0378] 实施例3:FLG表达和活性的调节

[0379] 用小分子化合物处理518A2细胞

[0380] 在37℃和5%CO₂下将518A2细胞生长在生长培养基[DMEM (Mediatech目录号10-013-CV)+5%FBS (Mediatech目录号MT35-011-CV)+青霉素/链霉素 (Mediatech目录号MT30-002-CI)]中。实验前一天,将细胞以 1×10^4 /ml (或者由90%汇合,约1/5稀释)的密度重新铺板到6孔板中,在37℃和5%CO₂下培养过夜。在实验当天,将6孔板中的培养基更换成2ml新鲜的生长培养基。将小分子化合物在DMSO中稀释到1000μM的浓度。在实验当天,用新鲜生长培养基将该溶液稀释1:100。以相同比例(1:100)用培养基稀释纯DMSO以处理媒介物对照样品。对每孔进行给药,将200ul该化合物或纯DMSO溶液直接施加到6孔板的孔中。化合物的终浓度为1μM。若需要不同浓度的化合物,则调整给药体积。给药后,将板置于37℃、5%CO₂下培养过夜。加入小分子化合物24h后,将培养基更换为新鲜的生长培养基,如上所述那样重复进行给药。在第二次给药24h后,利用来自Promega的SV总RNA分离系统(目录号Z3105)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600ng总RNA加入到利用来自Applied Biosystems的高容量cDNA逆转录试剂盒(目录号4368813)如制造商的说明书所述地进行的逆转录反应中。来自这一逆转录反应的cDNA用于利用ABI Taqman基因表达混合物(目录号4369510)和由ABI(例如测定FLG的ID#Hs00856927_g1)设计的引物/探针通过实时PCR监控基因表达。利用StepOne热循环仪(ABI)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。用于标准化mRNA水平的18S的测定由ABI(目录号4319413E)制造。以小分子化合物处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。

[0381] 结果:实时PCR结果显示,用小分子化合物处理后,518A2细胞中聚丝蛋白mRNA表达的倍数变化(图4)。

[0382] 用小分子化合物处理原代角质形成细胞

[0383] 在37℃和5%CO₂下将原代角质形成细胞(获自Promocell)生长在生长培养基(Keratinocyte Growth Media, Promocell目录号C-20011)中。实验前一天,将细胞以 5×10^4 /ml (或者由90%汇合,约1/3稀释)的密度重新铺板到包被有胶原的24孔板中(Beckton Dickinson BioCoat plates目录号356408),在37℃、5%CO₂下培养过夜。在实验当天,将24孔板中的培养基更换成1ml新鲜的生长培养基。将小分子化合物在DMSO中稀释到1000μM的浓度。在实验当天,用新鲜生长培养基将该溶液稀释1:100。以相同比例(1:100)用培养基稀释纯DMSO以处理媒介物对照样品。对每孔进行给药,将100ul该化合物或纯DMSO溶液直接施加到24孔板的孔中。化合物的终浓度为1μM。若需要不同浓度的化合物,则调整给药体积。给药后,将板置于37℃、5%CO₂下培养过夜。加入小分子化合物24h后,将培养基更换为新鲜的

生长培养基,如上所述那样重复进行给药。在第二次给药24h后,利用来自Promega的SV总RNA分离系统(目录号Z3105)按照制造商的说明书从细胞提取RNA。将600ng总RNA加入到利用来自Applied Biosystems的高容量cDNA逆转录试剂盒(目录号4368813)如制造商的说明书所述地进行的逆转录反应中。来自这一逆转录反应的cDNA用于利用ABI Taqman基因表达混合物(目录号4369510)和由ABI(例如测定FLG的ID#Hs00856927_g1)设计的引物/探针通过实时PCR监控基因表达。利用StepOne热循环仪(ABI)使用以下PCR循环:50℃持续2min、95℃持续10min、40个循环的(95℃持续15秒、60℃持续1min)。用于标准化mRNA水平的18S的测定由ABI(目录号4319413E)制造。以小分子化合物处理后的基因表达倍数变化基于处理样品和模拟转染样品之间18S-标准化的dCt值的差异来计算。

[0384] 结果:实时PCR结果显示,用小分子化合物处理后的原代角质形成细胞中聚丝蛋白mRNA表达的倍数变化(图4)。另一组实时PCR结果显示,用小分子化合物安非他酮、贝尼地平 and 托吡酯处理后,原代角质形成细胞的FLG天然反义转录物水平显著降低(图5)。

[0385] 尽管已经参照一种或多种实现来说明和描述了本发明,本领域技术人员在阅读和理解说明书和附图后将进行等价的改变和修饰。此外,尽管仅关于多种实现之一公开了本发明的特定特征,这种特征可如所需地与其它实现的一种或多种其它特征联合,如对于任何给定或特定应用可能是期望和有利的。

[0386] 本公开内容的摘要将允许读者快速地确定技术公开内容的性质。提交其应理解的是,其将不用于解释或限制所附权利要求书的范围或含义。

序列表

<110> CuRNA, Inc.

<120> 通过调节聚丝蛋白(FLG)的表达和活性而治疗 FLG 相关疾病

<130> FLG

<150> US61/246,080
<151> 2009-09-25

<150> US61/307,654
<151> 2010-02-24

<160> 13

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1
<211> 12747
[0001] <212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<300>
<308> NM_002016
<309> 2010-08-08
<313> (1)..(12747)

<400> 1
cttttggtga acaaggttca catttattgc caaaagatgt ctactctct ggaaaacatc 60
ttgccataa tfaatctttt caagcaatat tcaaaaaaag ataaaaacac tgacacattg 120
agtaaaaaag agctgaagga acttctgga aaggaatttc ggcaaatcct gaagaatcca 180
gatgaccag atatggttga tctcttcatg gatcacttgg atatagacca caacaagaaa 240
attgacttca ctgagtttct tctgatggta ttcaagttgg ctcaagcata ttatgagtct 300
accagaaaag agaatttacc gatatcagga cacaagcaca gaaagcacag tcatcatgat 360
aaacatgaag ataataaaca ggaagaaaac aaagaaaaca gaaaagacc ctcaagtctg 420

	gaaagaagaa acaatagaaa agggaataag ggaagatcca agagcccaag agaacaggg	480
	gggaaaaggc atgaatctag ttctgaaaa aaagaagaa aaggatattc acctactcat	540
	agagaagaag aatatgaaa aaaccatcat aactcaagta aaaaagagaa aaacaagact	600
	gaaaatacta gattaggaga caataggaag aggctaagtg aaagacttga agagaagaa	660
	gacaatgaag aaggagtata tgattatgaa aatacaggaa gaatgactca aaaatggata	720
	caatcaggcc atattgccac atattacaca atccaggatg aagcctatga caccactgat	780
	agtctattag aagaaaaca aatatatgaa agatcaaggt catctgatgg caaatcatca	840
	tctcaagtga acaggtaag acatgaaaat acaagccagg taccattgca ggagtccagg	900
	acaagaaagc gtaggggatc cagagttagc caggacaggg acagtaggg acactcagaa	960
	gactctgaga ggcaactctgg gtcggcttcc agaaaccatc atggatctgc gtgggagcag	1020
	tcaagagatg gctccagaca ccccaggctc catgatgaag acagagccag tcatgggcac	1080
[0002]	tctgcagaca gctccagaca atcaggcact cgtcacgcag agacttctc tcgtggacag	1140
	actgcatcat cccatgaaca ggcaagatca agtccaggag aaagacatgg atccggccac	1200
	cagcagtcag cagacagctc cagacactca gccactgggc gcgggcaagc tcatctgca	1260
	gtcagcgatc gtggacaccg ggggtctagc ggtagtacag ccagtacag tgaggacat	1320
	tcagaaaact cagacacaca atcagtgta gccacggaa aggctgggt gagacagcag	1380
	agccaccaag agtccacagc tggccggtca ggggaacggt ctggacgtc agggcttcc	1440
	ctctaccagg tgagcactca tgaacagcct gactctgcc atggacggac cgggaccagc	1500
	actggaggaa gacaaggatc gcaccacgag caggcacgag acagtccag gcattcagcg	1560
	tccaagagg gtcaggacac cattcgtgga cccccgggt caagcagagg aggaaggcag	1620
	ggatcccacc acgagcaatc ggtaaatagg tctggacact caggltccca tcacagccac	1680
	accacatccc agggaaggtc tgatgcctcc catgggcagt caggatccag aagtcaagc	1740

	agacaaacac gaaatgagga acaatcagga gacggcacca ggcactcagg gtcacgtcat	1800
	catgaagctt cctctcaggc tgacagctct agacactcac aggtgggcca gggacaatca	1860
	tcggggccca ggacaagtag gaaccaggga tccagtgtta gccaggacag tgacagtcat	1920
	ggacactcag aagactctga gagtggtct ggtctgctt ccagaaacca tcatggatct	1980
	gctcaggagc agtcaagaga tggctccaga caccccaggc cccatcacga agacagagct	2040
	ggtcatgggc actctgcaga cagctccaga aatcaggca ctcgtcacac acagaattcc	2100
	tctagtggac aggtcgcgc atcccatgaa caggcaagat caagtgcagg agaaagacat	2160
	ggatcccgcc accagctcca gtcagcagac agctccagac actcaggcac tgggcacgga	2220
	caagcttcat ctgcagtcat agacagtga caccgagggt ccagtggtag tcaggccact	2280
	gacagtgagg gacattcaga agactcagac acacagtcat tgcaggcca tggacaggct	2340
	ggtcaccatc agcagagcca ccaagagtc gcacgtgacc ggtcagggga aaggtctcga	2400
[0003]	cgttcagggt ctctctcta ccaggtagc actcataaac agtctgagtc ctccatgga	2460
	tggacagggc ccagcactgg agtaagacaa ggatcccacc atgagcaggc acgagacaac	2520
	tccaggcact cagcatccca agatggtcag gacaccattc gtggacacc ggggtcaagc	2580
	agaagaggaa ggcaggggtc ccaccacgag caatcggtag ataggtctgg acactcagg	2640
	tccatcaca gccacaccac atcccaggga aggtctgatg cctcccgtgg gcagtcatga	2700
	tccagaagtg caagcagaac aacacgtaat gaggaacaat caagagacgg ctccaggcac	2760
	tcagggtcac gtcacatga agcttctct catgccgaca tctctagaca ctcacaggca	2820
	ggccagggac aatcagaggg gtccaggaca agcaggcgcc agggatccag ttttagccag	2880
	gacagtgaca gtgagggaca ttcagaagac tctgagaggt ggtctgggtc tgcctccaga	2940
	aaccatcgtg gatctgctca ggagcagtca agacatggct ccagacacc caggctccat	3000
	cacgaagaca gagccggtca cgggcactct gcagacagct ccagacaatc aggaactcct	3060

	cacgcagaga cttcctctgg tggacaggct gcgtcatccc atgaacaggc aagatcaagt	3120
	ccaggagaaa gacacggatc ccgccaccag cagtcagcag acagctccag aactcaggc	3180
	attccgcga gacaagcttc atctgcagtc agagacagtg gacactgggg gtccagtgt	3240
	agtcaggcca gtgatagtga gggacattca gaggagtcag acacacagtc agtgtcaggc	3300
	catggacagg atgggcccc taccagagc caccaagagt ccgcacgtga ctggtcaggg	3360
	ggaaggtctg gacgttcagg gtcttctc taccaggtga gcactcatga acagtctgag	3420
	tctgcccatt ggccgaccag gaccagcact ggacgaagac aaggatccca ccacgagcag	3480
	gcacgagaca gctccaggca ctacagctcc caagagggtc aggacacatc tctgtcacac	3540
	ccggggctca ggagaggagg aaggcaggga tcccacatg agcaatcggg agatagatct	3600
	ggacactcag ggtcccatca cagccacacc acatcccagg gaaggtctga tgcctcccat	3660
	gggcagtcag gatccagaag tgcaagcaga caaactcgtg aggacaaaca atcaggagac	3720
[0004]	ggctccaggc actcagggtc acgtcacat gaagctgcct ctgggctga cagctctaga	3780
	cactcacagg tggacagga acaatcatc gggctccagg caagcaggca ccagggatcc	3840
	agtgttagcc aggacagtga cagtgagaga cactcagacg actccgagag gttgtctggg	3900
	tctgcttcca gaaacctca tggatctct cgggagcagt caagagatgg ctccagacac	3960
	cctgggttcc atcaagaaga cagagccagt cacgggcact ctgcagacag ctccagaaa	4020
	tcaggcactc atcacacaga gtcttctct catggacagg ctgtgtcatc ccatgaacag	4080
	gcaagatcaa gtccaggaga aagacatgga tcccgccacc agcagtcagc agacagctcc	4140
	agacactcag gcattgggca cagacaagct tcactgcag tcagagacag tggacaccga	4200
	gggtccagtg gtatcagggt cactaacagt gagggacatt cagaagactc agacacacag	4260
	tcagtgtcag cccacggaca agctgggccc catcagcaga gccacaaaga gtccgcactg	4320
	ggccagtcag gggaaagctc tggacgttca aggtcttcc tctaccaggt gagctctcat	4380

	gaacagtctg agtccacaca cggacagact gcaccagca ctggaggaag acaaggatcc	4440
	cgccatgagc aggcacgaaa cagctctagg cactcagcat cccaagacgg tcaggacacc	4500
	attctggac acccggggtc aagcagagga ggaaggcagg gatcctacca cgagcaatca	4560
	gtagataggt ctggacactc aggttaccat cacagccaca ccacaccca gggaaagtct	4620
	gatgcctccc atgggcagtc aggaccaga agtgcaagca ggcaacaag aatgaggaa	4680
	caatcaggag acggctccag gcactcaggg tcacgtcacc atgaacctc cactcgggcc	4740
	ggcagctcta gacactcaca ggtgggccag ggagaatcag cggggtcaa gacaagcagg	4800
	cgccagggat ccagtgttag tcaggacagg gacagtagg gacactcaga agactctgag	4860
	aggcggctg agtcggctc cagaaacct tatggatctg ctcgggagca gtcaagacat	4920
	ggctccagga accccaggtc ccatcaagaa gatagagcca gtcattggca ctctgcagag	4980
	agctccagac aatcaggcac tcgtcatgca gagacttct ctggtggaca ggctgcatca	5040
[0005]	tcccaggaac aggcaaggtc aagtccagga gaaagacatg gatcccgcca ccagcagtca	5100
	gcagacagct ccacagactc aggcactggg cgcagacaag attcatctgt agtcggagac	5160
	agtggaaacc gagggtccag tggtagccag gccagtgaca gcgagggaca ctcagaagag	5220
	tcagacacac agtcagtgtc agcccacgga caggctgggc cccatcagca gagccaccaa	5280
	gagtcacac gtggccagtc aggggaaagg tctggacgtt cagggtctt cctctaccag	5340
	gtgagcactc atgaacagtc tgagtccc catggacgca cagggccag cactggagga	5400
	agacaaagat cccgccacga gcaggcacga gacagctcca ggcactcagc gtccaagag	5460
	ggtcaggaca ccattcgtg acaccaggg tcaagcagag gaggaaggca gggatcccac	5520
	tatgagcaat cggtagatag ttctggacac tcagggtctc atcacagcca caccagctcc	5580
	caggaaaggt ctgatgtctc ccgtggcag tcaggatcca gaagtgtcag cagacaaaca	5640
	cgtaatgaga acaatcagg agacggtcc aggcactcag ggtcgcgtca ccatgaagct	5700

	tctctcggg ccgacagctc tagacactcg caggctggcc agggacaatc atcagggcc	5760
	aggacaagca ggaaccaggg atccagtgt agccaggaca gtgacagtca gggacactca	5820
	gaagactctg agagggtgct tgggtctgct tccagaaacc atcttggatc tgcttggag	5880
	cagcaagag atggctccag acacctggg tccatcacg aagacagagc cggtcacggg	5940
	cactctgcag acagctccag acaatcaggc actcgtcaca cagagtctc ctctctgga	6000
	caggctgctg catccatga acaggcaaga tcaagtgcag gagaagaca tggatccac	6060
	caccagctcc agtcagcaga cagctccaga cactcaggca ttggcatgg acaagctca	6120
	tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg tacagtgta gtcaggccag tgacagtgag	6180
	ggacattcag aagactcaga cacacagtca gtgtcagcac agggaaaagc tggcccat	6240
	cagcagagcc acaaagagtc cgcacgtggc cagtcagggg aaagctctgg acgttcaggg	6300
	tcttctct accaggtgag cactcatgaa cagtctgagt ccacctgg acagtctcg	6360
[0006]	cccagactg gaggaagaca aggatccat tatgatcagg cacaagacag ctccaggcac	6420
	tcagatccc aagagggtca ggacaccatt cgtggacacc cggggccaag cagaggagga	6480
	agacaggggt cccaccaaga gcaatcggta gataggtctg gacactcagg gtctcatcac	6540
	agccacacca catcccaggg aaggtctgat gcctccctg ggcatcagg atccagaagt	6600
	gcaagcagaa aaacatatga caaggaaca tcaggagatg gctctaggca ctcagggtcg	6660
	catcatcatg aagcttctc ttggccgac agctctagac actcactggt gggccaggga	6720
	caatcatcag ggcccaggac aagcaggccc cgggatcca gtgttagcca ggacagtgc	6780
	agtgaggac actcagaaga ttctgagagg cggctgggt ctgcgtccag aaacctcat	6840
	ggatctgctc aggagcagtc aagagatggc tccagacacc ccaggtccca tcacgaagac	6900
	agagccgtc atgggcactc tgcagagagc tccagacaat caggcactca tcatcagag	6960
	aattctctg gtggacaggc tgcacatcc catgaacagg caagatcaag tgcaggagag	7020

	agacacggat cccaccacca gcagtcagca gacagctcca gacactcagg cattgggcac	7080
	ggacaagctt catctgcagt cagagacagt ggacaccgag ggtccagtgg tagtcaggcc	7140
	agtgacagtg agggacattc agaagactca gacacacagt cagtgtcagc ccacggacag	7200
	gctgggcccc atcagcagag ccaccaagag tccacacgtg gccggtcagc aggaaggtct	7260
	ggacgttcag ggtctttcct ctaccaggtg agcactcatg aacagtctga gtccgcccac	7320
	ggacggaccg ggaccagcac tggaggaaga caaggatccc accacaagca ggcacgagac	7380
	agctccaggc actcaacgtc ccaagagggt caggacacca ttcattggaca cccggggta	7440
	agcagtggag gaaggcaggg atcccactac gagcaattgg tagatagatc tggacactca	7500
	gggtctcadc acagccacac cacatcccag ggaaggtctg atgcctccca tgggcactca	7560
	ggatccagaa gtgcaagcag acaaaactcgt aacgatgaac aatcaggaga cggctccagg	7620
	cactcagggt cgcgtacca tgaagcttcc tctcgggccg acagctctgg aactcgcag	7680
[0007]	gtgggccagg gacaatcaga ggggccagg acaagcagga actggggatc cagttttagc	7740
	caggacagtg acagtacagg aactcagaa gactctgaga ggtggtctgg gtctgtctcc	7800
	agaaaccatc atggatctgc tcaggagcag ctaagagatg gctccagaca ccccaggtcc	7860
	catcaagaag acagagctgg tcatgggcac tctgcagaca gctccagaca atcaggcact	7920
	cgtcacacac agacttctc tggtgacag gctgcatcat cccatgaaca ggcaagatca	7980
	agtcaggag aaagacatgg atcccaccac cagcagtcag cagacagctc cagacactca	8040
	ggcattgggc acggacaagc ttcattctga gtcagagaca gtggacaccg aggttacagt	8100
	ggtagtccag ccagtgaaa tgaggacat tcagaagact cagacacaca gtcagtgtca	8160
	gcccacggac aggtctgggtc ccatcagcag agccaccaag agtccgcacg tggccggtca	8220
	ggggaacgt ctggacattc aggatcttc cctaccagg tgagcactca tgaacagtct	8280
	gagtcctccc atggatggac ggggccagc actagaggaa gacaaggatc ccgcatgag	8340

	caggcacaag acagctccag gcactcagca tccaagacg gtcaggacac cattcgtgga	8400
	cacccggggt caagcagagg aggaaggcag gggaccacc acgagcattc ggtagatagc	8460
	tctggacct cagggctcca tcacagccac accacatccc agggaaggtc tgatcctcc	8520
	cgtaggcagt caggatccag aagtgcaagc agaacaacac gtaatgagga acaatcagga	8580
	gacggctcca ggcactcagg gtcgcgtcac catgaagctt cactcatgc cgacatctt	8640
	agacactcac aggcagtcca gggacaatca gagggtcca ggagaagcag gcgccaggga	8700
	tccagtgtga gccaggacag tgacagttag ggacattcag aagacttga gagtggtct	8760
	gggtctgctt ccagaacca tcatggatct gctcaggagc agctaagaga tggctccaga	8820
	caccccaggf cccatcaaga agacagagct ggtcatgggc actctgcaga cagctccaga	8880
	caatcaggca ctgctcac acagacttcc tctggtggac aggctgcatc atccatgaa	8940
	caggcaagat caagtgcagg agaaagacat ggatcccacc accagcagtc agcagacagc	9000
[0008]	tccagacct caggcattgg gcacggaca gcttcatctg cagtcagaga cagtggacac	9060
	cgaggttaca gtgtagtca ggccagtac aatgaggac atcagaaga ctacagacaca	9120
	cagtcagtgt cagcccacgg acaggctggg tccatcagc agagccacca agagtccga	9180
	cgtagccggg caggggaac gctggacat tcaggatctt tctctacca ggtgagcact	9240
	catgaacagt ctgagtcctc ccatggatgg acggggccca gcactagagg aagacaagga	9300
	tcccctatg agcaggcaca agacagctcc aggcactcag catccaata cggtcaggac	9360
	accattcgtg gacacccggg gtcaagcaga ggaggaaggc aggggtacca ccacgagcat	9420
	tcgtagata gctctggaca ctcagggtcc catcacagcc acaccacatc ccagggaagg	9480
	tctgatcct cccgtgggca gtcaggatcc agaagtgcaa gcagaacaac acgtaatgag	9540
	gaacaatcag gagacagctc caggcactca gtgtcacgtc accatgaagc ttccactcat	9600
	gccgacatct ctacacactc acaggcagtc cagggacaat cagaggggtc caggagaagc	9660

	aggcgccagg gatccagtgt gagccaggac agtgacagtg agggacattc agaagactct	9720
	gagaggtggt ctgggtctgc ttccagaaac catcgtgat ctgttcagga gcagtcaagg	9780
	cacggctcca gacaccccag gtcccatcac gaagacagag ccggtcacgg gcactctgca	9840
	gaccgctcca gacaatcagg cactcgtcac gcagagactt cctctggtgg acaggctgca	9900
	tcatcccatg aacaggcaag atcaagtcca ggagagagac acggatcccg ccaccagcag	9960
	tcagcagaca gctccagaca ctcaggcatt ccgctggac aagcttcac tgcaagcaga	10020
	gacagtagac actgggggtc cagtggtagt caggccagtg atagtgagg acattcagaa	10080
	gagtcagaca cacagtcagt gtcaggccat ggacaggctg ggccccatca gcagagccac	10140
	caagagtccg cacgtgaccg gtcaggggga aggtctggac gttcagggtc tttctctac	10200
	caggtagaca ctcatgaaca gtctgagtct gccatgggc ggaccaggac cagcactgga	10260
	cgaagacaag gatcccacca cgagcaggea cgagacagct ccaggcactc agcgtcccaa	10320
[0009]	gagggtcagg acaccattcg tggacacccg gggtaagca gaagaggaag gcagggatcc	10380
	cactacgagc aatcggtaga taggtctgga cactcagggt cccatcacag ccacaccaca	10440
	tcccagggaa ggtctgatgc ctcccgtggc cagtcaggat ccagaagtgc cagcagaaa	10500
	actcgtaatg acgaacaac aggagatggc tccaggcact catggtcga tcaccatgaa	10560
	gcttcactc agcgggacag ctctagacac tcacagtccg gccagggaca atcagcgggg	10620
	cccaggaaa gcaggaacca gggatccagt gtagccagg acagtgacag tcagggacac	10680
	tcagaagact ctgagaggtg gtctgggtct gcttcagaa accatcgtgg atctgctcag	10740
	gagcagtcaa gagatggctc cagacacccc acgtcccac acgaagacag agccggctac	10800
	gggcactctg cagagagctc cagacaatca ggcactcacc atgcagagaa ttcctctggt	10860
	ggacaggctg catcatcca tgaacaggca agatcaagt caggagagag acatggatcc	10920
	caccaccagc agtcagcaga cagctccaga cactcaggca ttgggcacgg acaagcttca	10980

	tctgcagtca gagacagtgg acaccgaggg tccagtggtgta gtcaggccag tgacagtgag	11040
	ggacattcag aagacticaga cacacagtca gtgtcagccc acggacaggc tgggcccatt	11100
	cagcagagcc accaagagtc cacacgtggc cggtcagcag gaaggtctgg acgttcaggg	11160
	tcttctct accaggtgag cactcatgaa cagtctgagt ctgccatgg acgggctggg	11220
	cccagtactg gaggaagaca aggatcccg cagcagcagg cacgagacag ctccaggcac	11280
	tcagcgtccc aagagggta ggacaccatt cgtggacacc cggggtaag gagaggagga	11340
	agacagggat cctaccacga gcaatcggta gataggtctg gacactcagg gtcccatcac	11400
	agccacacca catcccagg aaggtctgat gcctcccatg ggcagtcagg atccagaagt	11460
	gcaagcagag aaacacgtaa tgaggaacag tcaggagacg gctccaggca ctcagggtcg	11520
	cgtcacatg aagctccac tcaggctgac agctctagac actcacagtc cggccagggt	11580
	gaalcagcgg ggtccaggag aagcagggc cagggatcca gtgttagcca ggacagtgac	11640
[0010]	agtgaggcat acccagagga ctctgagagg cgatctgagt ctgcttcag aaaccatcat	11700
	ggatcttctc gggagcagtc aagagatggc tccagacacc cggatcctc tcaccgcat	11760
	acagccagtc atgtacagtc ttcacctgta cagtcagact ctagtaccgc taaggaacat	11820
	ggtcacttta gtagctttc acaagattct gcgtatcact caggaatata gtcacgtggc	11880
	agtcctcaca gtctagttc ttatcattat caatctgagg gcaactgaaag gcaaaaaggt	11940
	caatcaggtt tagttggag acatggcagc tatgtagtg cagattatga ttatggtgaa	12000
	tccgggttta gacactctca gcacggaagt gttagttaca attccaatcc tgtgttttc	12060
	aaggaaagat ctgatatctg taaagcaagt gcgtttgta aagatcatcc aaggtattat	12120
	gcaactgata ttaataagga cccagggtta tgtggccatt ctagtatat atcgaacaa	12180
	ctgggattta gtcagtcaca gagatactat tactatgagt aagaaattaa tggcaaagga	12240
	attaatcaa gaatagaaga atgaagcaag ttcacittca atcaagaac ttcataatac	12300

ttcaggaa gttatcttt cctgtcaatc tgtttaaata atgctatagt attcattag 12360
 ttgggtgta gcttatttt attgtgtaat gatctttaa cgctatatt cagaaatatt 12420
 aatggaaga aatcaatc atggagagct aacttagaa aactagctgg agtattttag 12480
 gagattctgg gtcaagtaat gtttatgt tttgaaagt taagttag acactcecca 12540
 aattctaaa ttaatcttt tcagaaat cgaaggagcc aaaaataa aacagtctg 12600
 tatacaaag tggctatc aacatcagg ctagcacatc ttctctalt atctctat 12660
 tgaatteta gtattctgta tcaaaaaat catctggac ataattaata ttatagtaag 12720
 ctgcatctaa attaaaaata aactatt 12747

 <210> 2
 <211> 4629
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

 [0011]
 <400> 2
 aatgctcca catggccca gtcacctgc agaaaagaaa tcatcagctt tctgcagcat 60
 cagacttagc agcatctcc tgtccaaga gaagagggga tgggaggatg gcatggtca 120
 gggcttaggg gaggatagg gagaaaaagt ggaagcaaag ggagaggccc aggaaggatc 180
 ttgtgcgac atgtacctg ggctgcacct gctgtatgca agagaagagg ctgggagtcc 240
 cctctcagg gtgtcatgc cccatctctg tgccacgagg agtgggctg ctgaaggata 300
 tatcagcaca acttctctg tccaactagt ctacattgca aagcatctcc tagtgtttt 360
 ggaagaagga tctatgcat gagtctcac ctggtagagg gaagacctg aacgtccaga 420
 ccgtccct gaccggccac gtgtggactc ttgtggctc tctgtctca gccagcctt 480
 lccgtggcct gacactgall gtgtctga gtttctgaa tglccctcac tglcactggc 540
 ctgactaccg ctgaccccc ggtgtccacg atcgtgact gcagatgaag cttgcccgcg 600
 cccagtggct gagtctctgg agctctctg tgaactctgg tggccgcatc catgtctttc 660

	tcttgactt gatctgcct gttcatggga tgatgcagtc tgcccacag aggaagtctc	720
	tgctgacga gtccctgatt gtctggagct gtctgcagag tgcccatgac tggctctgtc	780
	ttcalcatgg gacctgggggt gtctggagcc atctcttgac tgctcccacg cagatccatg	840
	atggtttctg gaagccgacc cagagtgcct ctcagagtct tctgagtgc cctcactgtc	900
	cctgtctctgg ctaactctgg atcccctacg ctttctgtc ctggactcct gcaatgactc	960
	ataatatgct tgagccaact tgaataccat cagaagaaac tcagtgaagt caattttctt	1020
	gttgtgtctc atatccaagt gatccatgaa gacatcaacc atatctgggt catctggatt	1080
	ctgtacagag ggaagtcaca gagggagact gcatcagaca gaatcacatt atcagccaat	1140
	taattcaaag ttaaittaag gaacctgac ttgagtatt aaaaagtggg acaaaatctt	1200
	ttttttta agacttttt gtctcatcct caticcagtg ttatatgta acaaagatgt	1260
	agactagtaa ggtatcaaga ttgatgggg atatccagac aactggagc caagtccca	1320
[0012]	cagctggatc agacaacttt tggtagatc tcacagtgtg gattatcaag ccagtgtac	1380
	agctggagc ctaggtttt ttgcccttag ctttctcag gatgactct gctcttctat	1440
	ggcaatactt gagaagctac agctttgatt agacgagagg ctatttcaat aactttctc	1500
	tgataagaag accaccgacc gtggacggat tctggccagt ttacaaaggc tgcataccat	1560
	agggcagggc acccactat ggcaaacact aataatgata ttgctcctga tttgtttct	1620
	gaagggaatg cctctaagat ttctcatta attataagag actgggtctc actctgttc	1680
	ccaagctgga gaacagtggc accatcatag ctcactgcag ccttcaact ctgggctcaa	1740
	gtgtctcc cacctcagcc tccaagtag ctgggacaac agtgaaatt gaaggccagc	1800
	tttggaaact caacctcaa aggaactaa aattccatt atgtagagtc cctgaggaaa	1860
	ctggatccac tagctacact ggtgagaat gctctcacc caggattca tttttttt	1920
	accacatcat tgttgglate ttaagalcaa tgtactggag cagcggggc tcacaaagag	1980

	gatacctggt gacacgcca ggcttcaga atgcactata gggcttagt gactgtcca	2040
	ggftcagctg aatgtgcca tctgggacct actaatgctt gttgaacttt actggatctc	2100
	agaagctggg ttcagaagc tcagatgttc ctacagagcta cgatatcaac aacctgtgat	2160
	gacagagaga aggttgctcc atgatggatt tggaaactta ctggctagct aacctgact	2220
	gaatgggaag gaatgtggat agctttggaa ctctagtffc actagatgag ctggaattfg	2280
	tatttgaca aattgcacgt tatgattatt aagtaatgca actgatttt tttccctta	2340
	aaacaaaca tctagaatct gtgtaatcaa aataatttci ctaaaaggct gcaagtatat	2400
	gcttaaagtg ttggggcatt cagagcattt ggaacattac attctttga atgtcaattg	2460
	gtagatgaaa ataccagctt ttaagtcata catttgattt ttgaaacaa tatgcattta	2520
	gagtttgtaa gtcaagtgaa taactgataa ggtaaaaaaa agggggagtt cattgttgag	2580
	tatgaattta aagtaaccag actgcctttt gtccagtggc tgcagtaat ttacttcagc	2640
[0013]	aggcatttt ttttttgag gctgttctat gatacatga cccttctgt aggaatgtgc	2700
	ttccagtggg gaggcagtct gagaatgtgt gaagcagtat aatgaagcca gaccaagatg	2760
	gaagcttggc ctgggattfg agcatcagga aaactgttga agggttatgt atacacaca	2820
	cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ctctctcca tactcctata	2880
	acaacgtata gtattfacta tacctggatg caggtattta ctatacttg ttgaagatct	2940
	ataacatgga atgcctagtg ctaagtgcag tgccttagt gaaattgat tggtttgaa	3000
	ttatttatga gtttgggatt attgtcact acccttaaat gatcttgaca ctacactatt	3060
	tgaaaagata ttgaggattt gccatttgat atgaccagg gtgtattgtg cacaaatatt	3120
	gtgaatatac atctgtctgt ccttaaatca ctgtaagttt taactggaat agattgctc	3180
	cacattactc ggtagggctg atatttcatg cctcatggat gagaaaagaa taggcaaaaa	3240
	ttatatctcg ggctgcctca cacatctttt aacaggataa gggaaaaata aatataagac	3300

	ctatgagtta tggcatcagg ctgaaacttt aatttatgaa ttaaccaac aatattattg	3360
	attattgcaa ttatctatct taatttcatt tgttctcctt ttaaaaatta attatgttta	3420
	ttttacctat tgtgaataaa gtcactcctc ccatgtgctt atttcttgac tctggcacta	3480
	attattcttc agtgccctaga tttctcggga ctgctcagtt taagtaactt ctgaacattg	3540
	gtctctgaga gaaaagacag tgaagtggga tctgtggaaa aacacatctg caaatgtctc	3600
	atTTTTTct tcaggggtaa gTTTTctcc ttggagactc ttgtctttaa aaagtatac	3660
	tagatcacca ttggcaaga taattacaaa aggcagatag agtaattatt ttacatagct	3720
	gttatagggt gactaagatc tcagggaatg actgtgttct gtaatccact tgccccactc	3780
	aatacccaaa gttttataca agccaaagat gcttgagaca gaatctgcta cctgaggctc	3840
	cagggccttg gcctagggaa actaactt aacttttaa gtggctattg atgacatccc	3900
	actccttct gagatgggta tgattgaaa ggcaggtgta ttcattggaga gcagggcttg	3960
[0014]	ggaccittgc tgcaagagga ggaactatta gcctagactt ttctaataag gactttctca	4020
	tacctgttc ctatctcgg tccacataga agaaacagg gaacacacag ggtaggactc	4080
	ttaaaggagt atgtttcttg gcttttctt aaaaactaaa acaaaaacat tcatagcaaa	4140
	gcagtttagc ccagtgacta agagtataga cattggaatc tgaagatct gggttggaat	4200
	tctgcttcag ccatttacta attatgtaac ttcacatctc tgagaatggg ggaaatttc	4260
	ttgcagggt tgttacaag cttaaaagag ttaagtcaag tgcctggaac agaacagcca	4320
	ttcaataaat catagaatt tttgtttta cacaaattt taaaagtaa tatttttgc	4380
	attgttaga aagactatat tttctgttta gtggatgaca tcatcatcat aaaaactact	4440
	gttacaagtt ttttttgag aattaaaac atatattaat cccaatcaca ttgtgtggg	4500
	attaatcaac atctctgggc atctaatact gtaaaaacat ggctgtgat tggctgctt	4560
	ggaagtgcac ctgtgtctg gctcagttgg ctagtgggcc acattgatta aagatgaata	4620

	caatgccaa	4629
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 3	
	ctccctctgt gacttcctc t	21
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0015]	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 4	
	gctatccaca ttcctccca	20
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 5	
	gcagagccac caagagtcca	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	6	
		gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt	20
	<210>	7	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	7	
		tccacattcc ttccattca	20
[0016]	<210>	8	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	8	
		ccctctgtga cttccctc	18
	<210>	9	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	反义寡核苷酸	
	<400>	9	
		ccacattcct tccattcag	20

	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 10	
	mumcmcmcmu ctgtgactc mcmcmumcmu	30
	<210> 11	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 11	
[0017]	mcmumcmcmc tctgtgactc cmcmumcm u	31
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 12	
	ctccctctgt gactccctc t	21
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 反义寡核苷酸	
	<400> 13	
[0018]	tccacattcc ttccattca	20

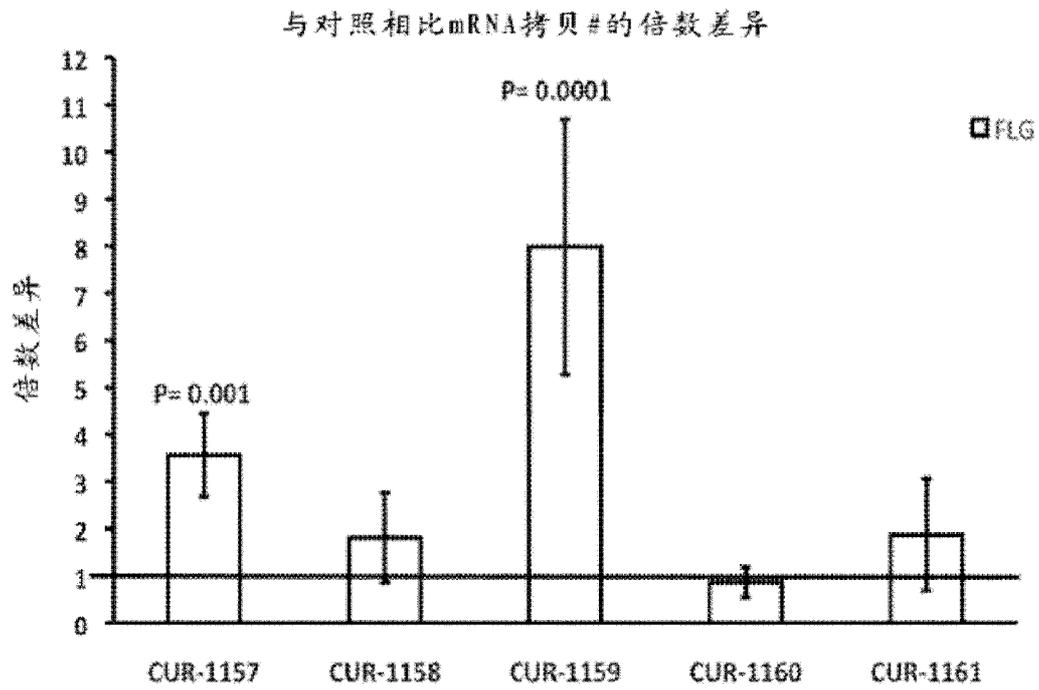


图1

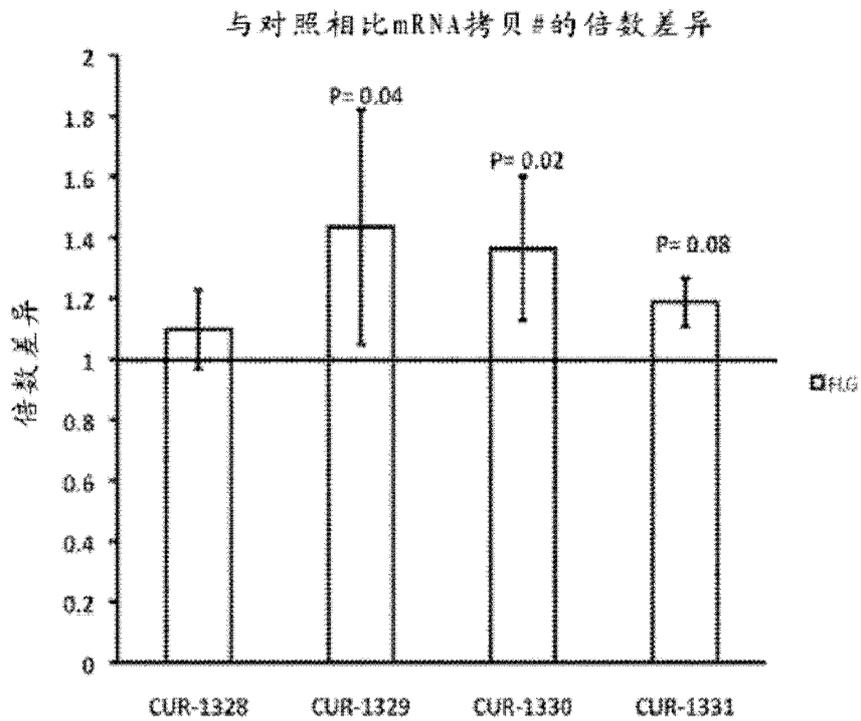


图2

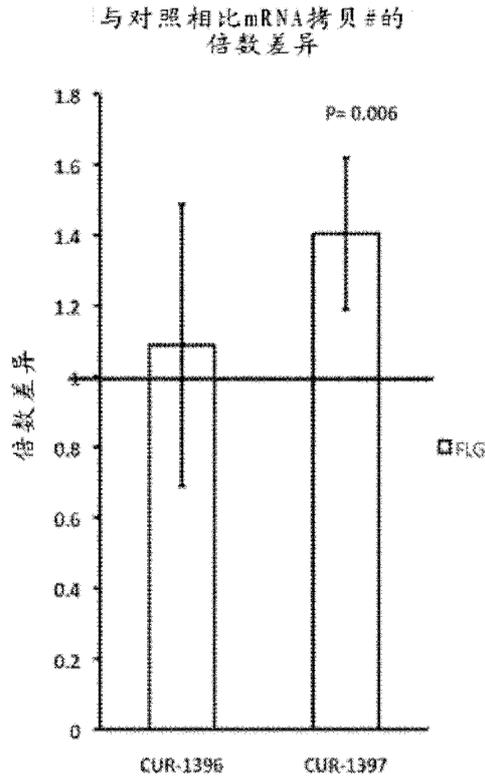


图3

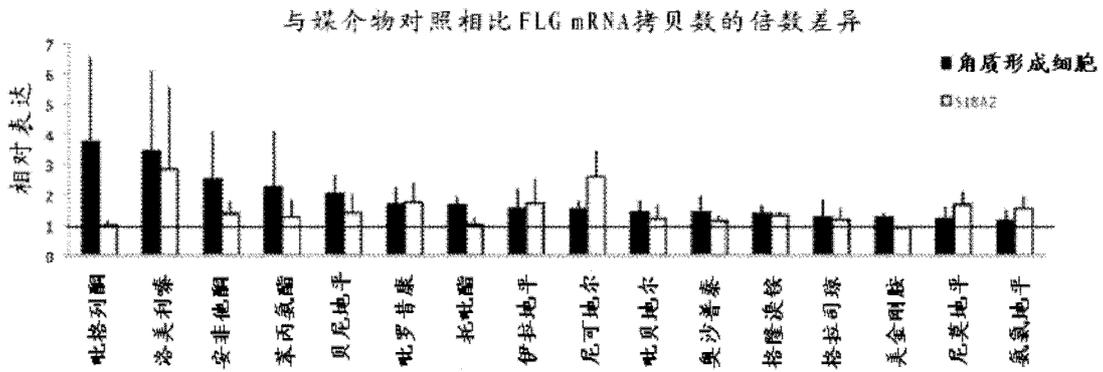


图4

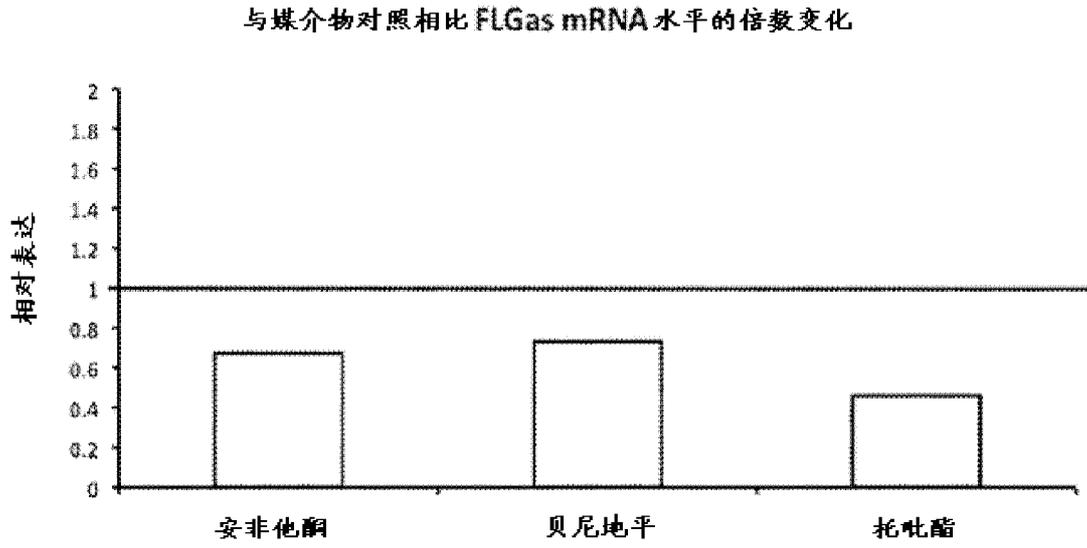


图5