

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6175236号
(P6175236)

(45) 発行日 平成29年8月9日(2017.8.9)

(24) 登録日 平成29年7月14日(2017.7.14)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A G

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 31/712 (2006.01)

A 6 1 K 31/712

A 6 1 K 31/7125 (2006.01)

A 6 1 K 31/7125

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/713

請求項の数 15 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-531063 (P2012-531063)
 (86) (22) 出願日 平成22年9月24日 (2010.9.24)
 (65) 公表番号 特表2013-505724 (P2013-505724A)
 (43) 公表日 平成25年2月21日 (2013.2.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/050173
 (87) 国際公開番号 W02011/038210
 (87) 国際公開日 平成23年3月31日 (2011.3.31)
 審査請求日 平成25年9月24日 (2013.9.24)
 審判番号 不服2016-1185 (P2016-1185/J1)
 審判請求日 平成28年1月27日 (2016.1.27)
 (31) 優先権主張番号 61/246,080
 (32) 優先日 平成21年9月25日 (2009.9.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/307,654
 (32) 優先日 平成22年2月24日 (2010.2.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 512156578
 カッパーアールエヌエー、インコーポレイ
 テッド
 アメリカ合衆国、フロリダ州 33137
 , マイアミ, 4400 ビスケイン ブル
 バード
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (72) 発明者 コラド, ジョゼフ
 アメリカ合衆国、フロリダ州 33483
 , デルレイ ビーチ, 1004 ブルック
 ス レーン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フィラグリン (F L G) の発現および活性の調整による F L G 関連疾患の処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中のフィラグリン (F L G) ポリヌクレオチドの発現を対照と比較して増加させるための 20 ~ 30 ヌクレオチド長のアンチセンスオリゴヌクレオチドであって、

患者の細胞または組織を、配列番号 2 を有するフィラグリン (F L G) ポリヌクレオチドの天然アンチセンスポリヌクレオチドの相補性領域をターゲットとして特異的にハイブリダイズする前記アンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させ、それによりインビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中のフィラグリン (F L G) ポリヌクレオチドの発現を増加させることにより、インビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中のフィラグリン (F L G) ポリヌクレオチドの発現を対照と比較して増加させ、

配列番号 3 または 5 に記載される配列を含む、
 アンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

前記アンチセンスオリゴヌクレオチドが、修飾糖部分、修飾ヌクレオシド間結合、修飾ヌクレオチド、およびそれらの組み合わせから選択される修飾を含む、請求項 1 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 3】

前記修飾が、2' - O - メトキシエチル修飾糖部分、2' - メトキシ修飾糖部分、2' - O - アルキル修飾糖部分、二環式糖部分、およびそれらの組み合わせから選択される修

飾糖部分を含む、請求項 2 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 4】

前記修飾が、ホスホロチオアート、2'-O-メトキシエチル(MOE)、2'-フルオロ、アルキルホスホナート、ホスホロジチオアート、アルキルホスホノチオアート、ホスホラミダート、カルバマート、カルボナート、ホスファートトリエステル、アセトアミダート、カルボキシメチルエステル、およびそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチド間結合を含む、請求項 2 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【請求項 5】

前記修飾が、ペプチド核酸(PNA)、ロックされた核酸(LNA)、アラビノ核酸(FANA)、類似体、誘導体、およびそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項 2 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 6】

インビボまたはインビトロでホ乳類の細胞または組織中のフィラグリン(FLG)遺伝子の発現を対照と比較して増加させる方法において使用するための低分子干渉RNA(sirNA)オリゴヌクレオチドであって、

前記方法は、前記細胞または組織を、20~30ヌクレオチド長の前記低分子干渉RNA(sirNA)オリゴヌクレオチドと接触させることを含み、

前記低分子干渉RNA(sirNA)オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 を有するフィラグリン(FLG)ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチドに特異的であり、

前記低分子干渉RNA(sirNA)オリゴヌクレオチドは、配列番号 3 または 5 に記載される配列を含む、
低分子干渉RNA(sirNA)オリゴヌクレオチド。

20

【請求項 7】

修飾糖部分、修飾ヌクレオチド間結合、修飾ヌクレオチド、およびそれらの組み合わせから選択される修飾を含む、20~30ヌクレオチド長の合成された修飾オリゴヌクレオチドであって、

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 を有するフィラグリン(FLG)遺伝子の天然アンチセンスポリヌクレオチドにハイブリダイズしてインビボまたはインビトロでフィラグリン(FLG)遺伝子の発現を正常な対照と比較して増加させるアンチセンス化合物であり、

30

前記オリゴヌクレオチドは、配列番号 3 または 5 に記載される配列を含む、オリゴヌクレオチド。

【請求項 8】

前記修飾が、ホスホロチオアート、アルキルホスホナート、ホスホロジチオアート、アルキルホスホノチオアート、ホスホラミダート、カルバマート、カルボナート、ホスファートトリエステル、アセトアミダート、カルボキシメチルエステル、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されるヌクレオチド間結合を含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

ホスホロチオアートヌクレオチド間結合を含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 10】

ホスホロチオアートヌクレオチド間結合のバックボーンを含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 11】

ペプチド核酸、ロックされた核酸(LNA)、類似体、誘導体、およびそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 12】

ホスホロチオアート、アルキルホスホナート、ホスホロジチオアート、アルキルホスホノチオアート、ホスホラミダート、カルバマート、カルボナート、ホスファートトリエステル、アセトアミダート、カルボキシメチルエステル、およびそれらの組み合わせから選

50

択される修飾ヌクレオチドを含む複数の修飾を含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

ペプチド核酸、ロックされた核酸 (LNA)、類似体、誘導体、およびそれらの組み合わせから選択される修飾ヌクレオチドを含む複数の修飾を含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 14】

2'-O-メトキシエチル修飾糖部分、2'-メトキシ修飾糖部分、2'-O-アルキル修飾糖部分、二環式糖部分、およびそれらの組み合わせから選択される修飾糖部分を含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

10

【請求項 15】

2'-O-メトキシエチル修飾糖部分、2'-メトキシ修飾糖部分、2'-O-アルキル修飾糖部分、二環式糖部分、およびそれらの組み合わせから選択される修飾糖部分を含む複数の修飾を含む、請求項 7 記載のオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本願は、全体が参照により本明細書に組み入れられた、2009年9月25日に出願された米国特許仮出願番号第61/246,080号および2010年2月24日に出願された米国特許仮出願番号第61/307,654号の優先権を主張するものである。

20

【0002】

本発明の実施形態は、FLGおよび関連の分子の発現および/または機能を調整するオリゴヌクレオチドを含む。

【背景技術】

【0003】

背景

フィラグリンは、ケラチンフィラメントの凝集および続いてのジスルフィド結合を助ける高度に帯電したカチオン性タンパク質である。それは、表皮の顆粒層中のケラトヒアリン顆粒として発現された大型の(4400kD)リン酸化前駆体プロフィラグリンから誘導される。プロフィラグリンは、顆粒層から角質層への移動の際に、部位特異的タンパク質分解および脱リン酸化により、フィラグリンに変換される。プロフィラグリンのフィラグリンへの処理に加えて、顆粒細胞から角質細胞への移動は、核および他のオルガネラの変性、コーニファイドエンベロープの組立て、ケラチン中間体フィラメントネットワークの二次元シートへの再編成により特徴づけられる。フィラグリンは、可撓性の水和角質層の生成および保持において重大な役割を担い、その加水分解を注意深く調節して、天然保湿因子(NMF)の大部分を形成する遊離アミノ酸を生成する。顆粒前駆体プロフィラグリンから散在的に分布するタンパク質への転位は、未だに知られていない開始シグナルに応答して、顆粒層から角質層へ転位する際に急速に行なわれる。そのプロフィラグリンは、成熟タンパク質よりもむしろ前駆体として発現されるため、フィラグリン発現を調節して細胞毒性作用を予防しなければならないことが示唆される。多くの炎症性皮膚状態は、随伴する不全角化、即ち、角質層のケラチノサイト中に保持された核を有する顆粒層の衰弱により特徴づけられる。最終分化を崩壊しているシグナルがこれらの炎症状態の間で異なっている可能性があるが、共通の最終テーマは、次の不完全な最終分化と共に顆粒層を消失させることである。プロフィラグリンが減少する状態、例えばアトピー性皮膚炎、または本質的に存在しない状態、例えば尋常性魚鱗癬では、NMFが枯渇した角質層が環境の乾燥作用の下で水和を保持することができないため、角質層の性質が損なわれる。

30

40

【0004】

天然保湿因子(NMF)は、角質層の水分量を保持することにおいて重要な機能を遂行する。NMFの主成分を形成するアミノ酸が、ケラトヒアリン顆粒に由来するフィラグリ

50

ンのタンパク質分解的切断により生成されることが報告された。フィラグリンは、317個のアミノ酸で構成されたタンパク質である。NMFの主成分を形成するアミノ酸が、フィラグリンから誘導されることは明白であるため、乾燥肌を示す病的状態とフィラグリンとの関連性についての研究が進展してきた。老人性乾皮症、アトピー性疾患などで認められる通り、角質層のアミノ酸量が乾燥肌で減少していること、およびそのような乾燥肌でフィラグリンの発現が減少していることが、近年になり明白となった。その上、鮫肌などの皮膚の問題が乾燥した環境により誘発されることは、周知である。

【0005】

フィラグリン遺伝子は、皮膚のバリア層を強化することにおいて役割を担い、この遺伝子の突然変異は、湿疹などの状態をもたらす。フィラグリンは、皮膚の最外層に豊富なタンパク質であり、フィラグリン遺伝子により生成される。フィラグリンの機能は、皮膚の最外表面に存在する不透過性の皮膚バリア層の生成を助けて、これらの水和を保持することである。皮膚に固有のバリア機能は、プラスチックまたはクリングフィルムと類似しており、つまりそれは皮膚からの水分消失を予防し、そして重要なこととして、身体を環境中の外来物質、例えばアレルゲンから防御する働きがある。無傷の皮膚バリアが欠如するとアレルゲンが身体に侵入して、湿疹、喘息、枯草熱および他のアレルギーをはじめとする一定範囲のアレルギー反応を起こす。

【0006】

DNA-RNAおよびRNA-RNAハイブリダイゼーションは、DNA複製、転写、および翻訳をはじめとする核酸機能の多くの態様にとって重要である。ハイブリダイゼーションは、特定の核酸を検出する、またはその発現を変化させる様々なテクノロジーの中核でもある。アンチセンスヌクレオチドは、例えば、ターゲットRNAにハイブリダズすることにより遺伝子発現を破壊し、それによりRNAスプライシング、転写、翻訳、および複製と干渉する。アンチセンスDNAは、DNA-RNAハイブリッドが、ほとんどの細胞型に存在する活性であるリボヌクレアーゼHによる消化の基質として作用するという追加的特徴を有する。アンチセンス分子は、オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の場合と同様に、細胞に送達することができるか、または内在性遺伝子からRNA分子として発現させることができる。FDAは近年になり、アンチセンス薬、VITRAVENE(商標)(サイトメガロウイルス網膜炎の処置用)を認可しており、つまりアンチセンスが治療的用途を有することを反映している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

概要

この概要は、本発明の性質および物質を端的に示す本発明の概要を表すために提供している。特許請求の範囲の範囲または意義を解釈または限定するために用いられているのではないことを、理解されたい。

【課題を解決するための手段】

【0008】

一実施形態において、本発明は、天然アンチセンス転写産物の任意の領域をターゲットとするアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、対応するセンス遺伝子のアップレギュレーションをもたらすことにより、天然アンチセンス転写産物の作用を阻害する方法を提供する。天然アンチセンス転写産物の阻害は、siRNA、リボザイムおよび低分子により実現しうることも本明細書において企図され、それは本発明の範囲内と見なされる。

【0009】

一実施形態は、患者の細胞または組織を、ヌクレオチド長5~30のアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させ、それによりインビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中のFLGポリヌクレオチドの機能および/または発現を調整することを含み、前記オリゴヌクレオチドが、配列番号2のヌクレオチド1~4629のうちの連続するヌクレオチドを5~30個含むポリヌクレオチドの逆相補鎖に対して少なくとも50%の配列同一

10

20

30

40

50

性を有する、インビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中の F L G ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調整する方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、F L G ポリヌクレオチド、例えば、配列 2 に示すヌクレオチド天然アンチセンス配列、ならびにその任意の変異体、対立遺伝子、相同体、突然変異体、誘導体、フラグメントおよび相補配列をターゲットとする。アンチセンスオリゴヌクレオチドの例を、配列番号 3 ~ 1 3 として示す。

【 0 0 1 1 】

別の実施形態は、患者の細胞または組織を、ヌクレオチド長が 5 ~ 3 0 のアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させ、それによりインビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中の F L G ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調整することを含み、前記オリゴヌクレオチドが、F L G ポリヌクレオチドのアンチセンスの逆相補鎖に対して少なくとも 5 0 % の配列同一性を有する、インビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中の F L G ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調整する方法を提供する。

10

【 0 0 1 2 】

別の実施形態は、患者の細胞または組織を、ヌクレオチド長 5 ~ 3 0 のアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させ、それによりインビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中の F L G ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調整することを含み、前記オリゴヌクレオチドが、F L G アンチセンスポリヌクレオチドのためのアンチセンスオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 5 0 % の配列同一性を有する、インビボまたはインビトロで患者の細胞または組織中の F L G ポリヌクレオチドの機能および/または発現を調整する方法を提供する。

20

【 0 0 1 3 】

一実施形態において、組成物は、センスおよび/またはアンチセンス F L G ポリヌクレオチドに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドを 1 種以上含む。

【 0 0 1 4 】

一実施形態において、組成物は、センスおよび/またはアンチセンス F L G ポリヌクレオチドに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド 1 種以上、F L G 調整分子 1 種以上、薬学的に許容しうる担体およびそれらの組み合わせを含む。

【 0 0 1 5 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾または置換されたヌクレオチドを 1 つ以上含む。

30

【 0 0 1 6 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、修飾された結合を 1 つ以上含む。

【 0 0 1 7 】

更に別の実施形態において、修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオアート、メチルホスホナート、ペプチド核酸、2' - O - メチル、フルオロ - もしくは炭素、メチレンまたは他のロックされた核酸 (L N A) 分子を含む修飾塩基を含む。好ましくは修飾ヌクレオチドは、 α - L - L N A をはじめとするロックされた核酸分子である。

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、患者に皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、または腹腔内投与される。

40

【 0 0 1 9 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、医薬組成物中で投与される。処置レジメンは、アンチセンス化合物を患者に少なくとも 1 回投与することを含むが、この処置を、一定期間の反復投与を含むように改変することができる。処置は、1 種以上の他のタイプの治療と組み合わせることができる。

【 0 0 2 0 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、医薬組成物中で投与される。処置レジメンは、1 種以上のアンチセンス化合物および 1 種以上の F L G 調整分子を含む組成物を、

50

患者に少なくとも1回投与することを含むが、この処置は、一定期間の反復投与を含むように改変することができる。処置は、1種以上の他のタイプの治療と組み合わせることができる。

【0021】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、リボソーム中にカプセル化されているか、または担体分子（例えば、コレステロール、TATペプチド）に付加されている。

【0022】

他の態様を以下に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】HepG2細胞を、リポフェクタミン2000を用いて導入されたホスホチオアートオリゴヌクレオチドで処理した後の、FLG1 mRNAのリアルタイムPCR結果の倍率変化+標準偏差を、対照と比較したグラフである。リアルタイムPCRの結果から、HepG2細胞中のFLG1 mRNAレベルが、FLG1アンチセンス AK056431に対して設計されたオリゴ2種で有意に増加することが示されている。CUR-1157、CUR-1158、CUR-1159、CUR-1160、およびCUR-1161として示された棒は、それぞれ配列番号3、4、5、6および7で処理された試料に対応する。

10

【図2】518A2細胞を、リポフェクタミン2000を用いて導入された3'反転Tおよび2' Oメチルギャップマーホスホジエステルオリゴを有するホスホジエステルオリゴヌクレオチドで処理した後の、FLG1 mRNAの倍率変化+標準偏差を対照と比較して示す。リアルタイムPCRの結果から、518A2細胞中のFLG1 mRNAレベルが、FLG1アンチセンス AK056431に対して設計されたオリゴ2種で有意に増加することが示される。CUR-1128、CUR-1129、CUR-1130、およびCUR-1131として示された棒は、それぞれ配列番号8、9、10、および11で処理された試料に対応する。

20

【図3】518A2細胞を、リポフェクタミン2000を用いて導入されたホスホジエステルオリゴヌクレオチドで処理した後の、FLG1 mRNAの倍率変化+標準偏差を、対照と比較して示す。リアルタイムPCRの結果から、518A2細胞中のFLG1 mRNAレベルが、FLG1アンチセンス AK056431に対して設計されたオリゴ2種で有意に増加することが示される。CUR-1396、およびCUR-1397として示された棒は、それぞれ配列番号12および13で処理された試料に対応する。

30

【図4】化合物 - ピオグリタゾン、ロメリジン、ブプロピオン、フェンプロバメート、ベンジピン、ピロキシカム、トピラマート、イスラジピン、ニコランジル、ピリベジル、オキサプロジン、グリコピロレート、グラニセトロン、メマンチン、ニモジピンおよびアムロジピンで処理された518A2細胞および初代ケラチノサイトにおけるフィラグリンmRNA発現の倍率変化を未処理細胞と比較して示す。

【図5】低分子ブプロピオン、ベンジピンおよびトピラマートで処理した後の初代ケラチノサイト中でのFLG天然アンチセンス転写産物のレベルを示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0024】

配列の説明：配列番号1：ヒトフィラグリン（FLG）、mRNA（NCBIアクセシオン番号：NM_002016）；配列番号2：天然FLGアンチセンス配列AK056431；配列番号3～13：アンチセンスオリゴヌクレオチド。*は、ホスホチオアート結合を示し、「m」は、2' Oメチル修飾を示す。

配列番号10および配列番号11のアンチセンスオリゴヌクレオチドは以下のように修飾されている。

【表 1】

オリゴヌクレオチド	配列（「m」は、2' Oメチル修飾を示す）
配列番号 1 0	mumcmcmcmu ctgtgacttc mcmcmumcmu
配列番号 1 1	mcmumcmcmc tctgtgactt cmcmcmumcm u

詳細な説明

本発明の複数の態様を、例示のための適用例を参考にして以下に記載する。数多くの具体的詳細、関連性、および方法が、本発明の完全な理解を提供するために示されていることを、理解しなければならない。しかし関連する技術分野の当業者は、本発明がその具体的詳細の1つ以上を用いずに、または他の方法を用いて実践しうることを容易に理解するであろう。幾つかの行為は異なる順序で、そして/または他の行為もしくは事象と同時に行されてもよく、本発明は活動または事象の順序に限定されない。更に、本発明による方法論を実行するのに、例示的行為または事象の全てが必要となるわけではない。

【0025】

本明細書に開示された全ての遺伝子、遺伝子名、および遺伝子産物は、本明細書に開示された組成物および方法が適用可能となる任意の種からの相同体に対応するものとする。つまりその用語は、非限定的に、ヒトおよびマウスからの遺伝子および遺伝子産物を包含する。特定の種からの遺伝子または遺伝子産物が開示されている場合、それが現れた文脈に明確に示されていないならば、この開示が例示にすぎず、限定と解釈してはならないことは理解されよう。つまり例えば、本明細書に開示された遺伝子の場合、幾つかの実施形態ではホ乳類核酸およびアミノ酸配列に関係するが、非限定的に、他のホ乳類、魚類、爬虫類、および鳥類をはじめとする他の動物からの相同および/またはオーソログ遺伝子および遺伝子産物を包含するものとする。一実施形態において、遺伝子または核酸配列は、ヒトである。

【0026】

定義

本明細書で用いられる用語は、特定の実施形態を説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。本明細書で用いられる単数形の「a」、「an」および「the」は、文脈に他に明白に示されない限り、複数形も同様に包含するものとする。更に、用語「はじめとする」、「包含する」、「有している」、「有する」、「共に」、またはその変形例が、詳細な説明および/または特許請求の範囲のいずれかで用いられる限りは、そのような用語は、用語「含んでいる」に類似の手法で包括的なものとする。

【0027】

用語「約」、「およそ」は、当業者に決定される特定の値の許容しうる誤差範囲内を意味し、値を測定または決定する方法、即ち測定システムの限界、に一部依存する。例えば「約」は、当該技術分野での実践あたり、1または1を超える標準偏差内を意味することができる。あるいは「約」は、所定の値の20%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%まで、より好ましくは1%までの範囲を意味することができる。あるいは、特に生物系または方法に関しては、その用語は、一桁、好ましくは5倍以内、より好ましくは2倍以内の値を意味することができる。特定の値が本願および特許請求の範囲に記載されている場合、他に断りがなければ、特定の値の許容しうる誤差範囲内を意味する用語「約」を仮定しなければならない。

【0028】

本明細書における用語「mRNA」は、ターゲット遺伝子の目下知られているmRNA転写産物、および解明されうる任意の更なる転写産物を意味する。

【0029】

「アンチセンスオリゴヌクレオチド」または「アンチセンス化合物」は、別のRNAまたはDNA（ターゲットRNA、DNA）に結合するRNAまたはDNA分子を意味する

。例えば、それがRNAオリゴヌクレオチドである場合、それは、RNA-RNA相互作用により別のRNAターゲットに結合して、ターゲットRNAの活性を変化させる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のポリヌクレオチドの発現および/または機能をアップレギュレートまたはダウンレギュレートすることができる。その定義は、治療、診断、または他の観点で有用となる任意の外来RNAまたはDNA分子を包含することになる。そのような分子としては、例えば、アンチセンスRNAまたはDNA分子、干渉RNA (RNAi)、マイクロRNA、デコイRNA分子、siRNA、酵素RNA、治療的エディティングRNA (therapeutic editing RNA)、アゴニストおよびアンタゴニストRNA、アンチセンスオリゴマー化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列 (external guide sequence) (EGS) オリゴヌクレオチド、選択的スプライサー、プライマー、プローブ、およびターゲット核酸の少なくとも一部にハイブリダイズする他のオリゴマー化合物が挙げられる。そのため、これらの化合物を、一本鎖、二本鎖、部分的な一本鎖、または環状オリゴマー化合物の形態で導入してもよい。

10

【0030】

本発明の文脈において、用語「オリゴヌクレオチド」は、リボ核酸 (RNA) もしくはデオキシリボ核酸 (DNA) またはそれらの模倣体のオリゴマーまたはポリマーを指す。用語「オリゴヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、それらの置換および α -芳香族形態、ペプチド核酸 (PNA)、ロックされた核酸 (LNA)、ホスホロチオアート、メチルホスホナートなどをはじめとする天然および/または修飾モノマーまたは結合の直鎖状または環状オリゴマーも包含する。オリゴヌクレオチドは、モノマー-モノマー相互作用の規則的パターン、例えば、ワトソン・クリック型塩基対合、フーグスティーン型または逆フーグスティーン型塩基対合などによってターゲットポリヌクレオチドに特異的に結合することができる。

20

【0031】

オリゴヌクレオチドは、「キメラ」であっても、即ち、異なる領域で構成されていてもよい。本発明の文脈において、「キメラ」化合物は、オリゴヌクレオチドであり、キメラ領域、例えばDNA領域、RNA領域、PNA領域などを2ヶ所以上含む。各キメラ領域は、少なくとも1つのモノマー単位、即ち、オリゴヌクレオチド化合物の場合にはヌクレオチドで構成されている。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、所望の特性を1つ以上示すようにオリゴヌクレオチドが修飾されている領域を少なくとも1つ含む。オリゴヌクレオチドの所望の特性としては、非限定的に、例えばヌクレアーゼ分解への高度の耐性、細胞内取り込みの増加、および/またはターゲット核酸に対する結合アフィニティーの上昇が挙げられる。それゆえ、オリゴヌクレオチドの異なる領域は、異なる特性を有する可能性がある。本発明のキメラオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドおよび/または先に記載されたオリゴヌクレオチド類似体の2種以上の混合構造として形成させることができる。

30

【0032】

モノマーがネーティブDNAと同様に連続して結合しているか、またはスパーサーを介して結合している場合には、オリゴヌクレオチドは、つまり「レジスター」内で結合する領域で構成させることができる。スパーサーは、領域間に共有結合的「架橋」を構成するものとし、好ましい例では、炭素原子が約100を超えない長さを有する。スパーサーは、異なる機能性を帯びて、例えば、正または負電荷を有していてもよく、特別な核酸結合特性 (インターカレーター、グループバインダー、毒素、フルオロフォアなど) を帯びて、親油性であっても、例えば α らせんを導入するアラニン含有ペプチドなど特別な二次構造などを導入してもよい。

40

【0033】

本明細書で用いられる「FLG」および「フィラグリン」は、全てのファミリーメンバー、突然変異体、対立遺伝子、フラグメント、種、コード配列および非コード配列、センスおよびアンチセンスポリヌクレオチド鎖などを包含する。

50

【0034】

本明細書で用いられる言語「フィラグリン」、FLG、FLG1およびATOD2は、本書においては同一と見なし、本願において互換的に用いられる。

【0035】

本明細書で用いられる用語「に対して特異的なオリゴヌクレオチド」または「ターゲットとするオリゴヌクレオチド」は、(i)ターゲット遺伝子の一部と安定した複合体を形成することができる、または(ii)ターゲット遺伝子のmRNA転写産物の一部と安定した二重鎖を形成することができる、配列を有するオリゴヌクレオチドを指す。複合体および二重鎖の安定性は、理論的計算および/またはインビトロアッセイにより決定することができる。ハイブリダイゼーション複合体および二重鎖の安定性を決定する例示的アッセイは、以下の実施例に記載されている。

10

【0036】

本明細書で用いられる用語「ターゲット核酸」は、DNA、そのようなDNAから転写されたRNA(プレ-mRNAおよびmRNAを含む)、およびそのようなRNAから誘導されたcDNA、コード配列、非コード配列、センスまたはアンチセンスポリヌクレオチドを包含する。オリゴマー化合物とターゲット核酸との特異的ハイブリダイゼーションは、核酸の正常な機能と干渉する。特異的にハイブリダイズする化合物によるターゲット核酸機能の調整は、一般に、「アンチセンス」と呼ばれる。干渉されるDNAの機能としては、例えば、複製および転写が挙げられる。干渉されるRNAの機能としては、生存機能の全て、例えば、タンパク質翻訳部位へのRNAのトランスロケーション、RNAからのタンパク質の翻訳、1種以上のmRNA種を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAに携わる、またはそれより容易になる可能性のある触媒活性が挙げられる。ターゲット核酸機能とのそのような緩衝の全体的効果が、コード化生成物またはオリゴヌクレオチドの発現の調整である。

20

【0037】

RNA干渉、つまり「RNAi」は、「ターゲット」核酸配列に対して配列特異的相同性を有する二本鎖RNA(dsRNA)分子により仲介される。本発明の特定の実施形態において、メディエーターは、ヌクレオチドが5~25個の「低分子干渉」RNA二重鎖(siRNA)である。siRNAは、Dicerとして公知のRNAアーゼ酵素によるdsRNAプロセッシングから得られる。siRNA二重鎖生成物は、RISC(RNA誘導型サイレンシング複合体)と呼ばれる多重タンパク質siRNA複合体に動員される。任意の特定理論に拘束されることを望むものではないが、その後RISCは、ターゲット核酸(適切にはmRNA)に案内され、そこでsiRNA二重鎖が配列特異的方法で相互作用して、触媒方式での切断を仲介すると考えられる。本発明により用いられうる低分子干渉RNAは、合成して当該技術分野で周知であり当業者に熟知された手順により用いることができる。本発明の方法で用いられる低分子干渉RNAは、適切にはヌクレオチドを約1~約50個含む。非限定的実施形態の例において、siRNAは、ヌクレオチドを約5~約40個、ヌクレオチドを約5~約30個、ヌクレオチドを約10~約30個、ヌクレオチドを約15~約25個、またはヌクレオチドを約20~約25個含むことができる。

30

【0038】

適切なオリゴヌクレオチドの選択は、核酸配列を自動的にアライメントして同一性または相同性の領域を示すコンピュータプログラムを用いることにより、容易になる。そのようなプログラムを用いて、例えばGeneBankなどのデータベースを検索することにより、またはPCR産物を配列決定することにより、得られた核酸配列を比較する。一定範囲の種からの核酸配列を比較すれば、種の間で適度な同一性を示す核酸配列を選択することができる。配列決定されていない遺伝子の場合、サザンブロットを実施して、ターゲット種と他の種の間での同一性の度合いを測定することができる。当該技術分野で周知の通り、サザンブロットを様々な度合いのストリンジェンシーで実施することにより、同一性の適切な指標を得ることが可能である。これらの手順により、制御される対象のターゲット核酸配列に高い相補性を示し、他の種の対応する核酸配列に低い相補性を示すオリゴヌ

40

50

クレオチドを選択することができる。本発明で用いられる遺伝子の適切な領域を選択するのにかなりの許容範囲があることは、当業者に理解されよう。

【 0 0 3 9 】

「酵素的RNA」は、酵素活性を有するRNA分子を意味する (Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035)。酵素的核酸 (リボザイム) は、最初にターゲットRNAに結合することにより作用する。そのような結合は、ターゲットRNAを切断する作用のある分子の酵素的部分の付近に保持されている、酵素的核酸のターゲット結合部分を介して行われる。つまり酵素的核酸は、最初は塩基対を介してターゲットRNAを認識し、その後それに結合して、正しい部位に結合すると、ターゲットRNAを酵素的に切断する作用がある。

10

【 0 0 4 0 】

「デコイRNA」は、リガンドへの天然結合ドメインを模倣するRNA分子を意味する。それゆえデコイRNAは、特異的リガンドの結合のための天然結合ターゲットと競合する。例えば、HIVトランス活性化応答 (TAR) RNAの過剰発現が、「デコイ」として作用することができ、HIV tatタンパク質に効率的に結合しすると、それによりHIV RNA中でコードされたTAR配列に結合するのを防ぐことが示された。これは、特定の実施例ということになる。これが一例にすぎないこと、そして当該技術分野で一般に知られる技術を用いて別の実施形態を生成しうることが、当業者に認識されよう。

【 0 0 4 1 】

本明細書で用いられる用語「モノマー」は、典型的にはホスホジエステル結合またはその類似体により結合して、数個のモノマー単位から、例えば約3、4個のモノマー単位～約数百のモノマー単位の寸法範囲でオリゴヌクレオチドを形成させるモノマーを示す。ホスホジエステル結合の類似体としては、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、メチルホスホルナート、ホスホロセレノアート、ホスホラミダートなどが挙げられ、以下により完全に記載する。

20

【 0 0 4 2 】

用語「ヌクレオチド」は、天然由来ヌクレオチドおよび非天然由来ヌクレオチドを含む。これまで「非天然由来」と見なされてきた様々なヌクレオチドが、後に天然に見出されたことは、当業者に明確なはずである。つまり「ヌクレオチド」は、公知のプリンおよびピリミジン複素環含有分子だけでなく、複素環類似体およびその互変異性体も包含する。他のタイプのヌクレオチドの例は、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、プリン、キサンチン、ジアミノプリン、8 - オキソ - N 6 - メチルアデニン、7 - デアザキサンチン、7 - デアザグアニン、N 4 , N 4 - エタノシトシン、N 6 , N 6 - エタノ - 2 , 6 - ジアミノプリン、5 - メチルシトシン、5 - (C 3 ~ C 6) - アルキニルシトシン、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、シュードイソシトシン、2 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 4 - トリアゾロピリジン、イソシトシン、イソグアニン、イノシンおよびBennerらの米国特許第5,432,272号に記載された「非天然由来」ヌクレオチドを含む分子である。用語「ヌクレオチド」は、これらの例の全てと、その類似体および互変異性体も含むものとする。特に興味深いヌクレオチドは、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、およびウラシルを含むものであり、それらは、ヒトにおける治療および診断適用に関連する天然由来ヌクレオチドと見なされている。ヌクレオチドとしては、例えば、Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)に記載された、天然2' - デオキシおよび2' - ヒドロキシ糖、ならびにそれらの類似体が挙げられる。

30

40

【 0 0 4 3 】

ヌクレオチドに関連する「類似体」としては、修飾塩基部分および/または修飾糖部分を有する合成ヌクレオチド (例えば、Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429- 4443, Toulme, J.J., (2001) Nature Biotechnology 19:17-

50

18;

Manoharan M., (1999) Biochemica 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 Drug Dev

.,

10:297-310に概ね記載されたものを参照) ; 2' - O、3' - C - 結合 [3 . 2 . 0] ビシクロアラビノスクレオシドが挙げられる。そのような類似体としては、結合特性、例えば、二重鎖または三重鎖安定性、特異性などを高めるように設計された合成ヌクレオチド

10

【 0 0 4 4 】

本明細書で用いられる「ハイブリダイゼーション」は、オリゴマー化合物の実質的に相補的な鎖の対合を意味する。対合の1つのメカニズムは、水素結合を含み、それはオリゴマー化合物の鎖の相補的ヌクレオシドまたはヌクレオチド塩基(ヌクレオチド)の間のワトソン・クリック型、フーグスティーン型、または逆フーグスティーン型水素結合であってもよい。例えば、アデニンおよびチミンは、水素結合の形成を介して対合する相補的ヌクレオチドである。ハイブリダイゼーションは、様々な環境の下で起こりうる。

【 0 0 4 5 】

ターゲット核酸へのアンチセンス化合物の結合がターゲット核酸の正常な機能と干渉して、機能および/または活性の調整を起こし、そして特異的結合が望ましい条件下、即ち、インビボアッセイまたは治療的処置の場合の生理学的条件下、そしてインビトロとアッセイの場合のアッセイが実施される条件下で、非ターゲット核酸配列へのアンチセンス化合物の非特異的結合を回避するための十分な度合いの相補性が存在する場合には、アンチセンス化合物は「特異的にハイブリダイズ可能」である。

20

【 0 0 4 6 】

本明細書で用いられる成句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」または「ストリンジェントな条件」は、本発明の化合物がターゲット配列にハイブリダイズするが他の配列には最小数しかハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況では異なり、本発明の文脈において、オリゴマー化合物がターゲット配列にハイブリダイズする「ストリンジェントな条件」は、オリゴマー化合物の性質および組成と、それらを研究しているアッセイとによって決定される。一般にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、無機カチオン、例えば Na^{++} または K^{++} を有する低濃度 ($< 0.15 \text{ M}$) の塩(即ち、低イオン強度)、 $20 \sim 25$ よりも高くオリゴマー化合物: ターゲット配列複合体の T_m 未満の温度、および変性剤、例えば、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、または洗剤ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在を含む。例えば、ハイブリダイゼーション速度は、1%ホルムアミドで1.1%低下する。高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、0.1倍の塩化ナトリウム-クエン酸ナトリウム緩衝液(SSC)/0.1%(w/v) SDS、60、30分間である。

30

40

【 0 0 4 7 】

本明細書で用いられる「相補的」は、1または2個のオリゴマー鎖の2個のヌクレオチドの間で正確に対合する能力を指す。例えば、アンチセンス化合物の特定位置のヌクレオ塩基がターゲット核酸の特定位置のヌクレオ塩基と水素結合することが可能で、前記ターゲット核酸がDNA、RNAまたはオリゴヌクレオチド分子である場合、オリゴヌクレオチドとターゲット核酸の水素結合の位置は、相補的位置にあると見なされる。オリゴマー化合物および更なるDNA、RNA、またはオリゴヌクレオチド分子は、各分子の相補的位置の十分な数が、互いに水素結合可能なヌクレオチドにより占有されている場合には、互いに相補的である。つまり「特異的にハイブリダイズ可能な」および「相補的な」は、十分な数のヌクレオチド上の十分な数の正確な対合または相補性によって、安定した

50

特異的な結合がオリゴマー化合物とターゲット核酸の間に生じることを示すために用いられる用語である。

【 0 0 4 8 】

オリゴマー化合物の配列が特異的なハイブリダイズ可能になるのに、ターゲット核酸の配列に 1 0 0 % 相補的である必要がないことは、当該技術分野で理解されている。その上、オリゴヌクレオチドは、1 個以上のセグメントでハイブリダイズしてもよく、それにより介在または隣接するセグメントは、ハイブリダイゼーション事象（例えば、ループ構造、ミスマッチまたはヘアピン構造）に関与しない。本発明のオリゴマー化合物は、ターゲットとするターゲット核酸配列内のターゲット領域に対して、少なくとも約 7 0 %、または少なくとも約 7 5 %、または少なくとも約 8 0 %、または少なくとも約 8 5 %、または 10
少なくとも約 9 0 %、または少なくとも約 9 5 %、または少なくとも約 9 9 % の配列相補性を含む。例えば、アンチセンス化合物のヌクレオチド 1 8 ~ 2 0 個がターゲット領域に相補的であり、それゆえ特異的にハイブリダイズするアンチセンス化合物は、9 0 % の相補性を表すことになる。この例において、残りの非相補的ヌクレオチドは、相補的ヌクレオチドとクラスター化するか、またはそれを散在させていてもよく、互いに、または相補的ヌクレオチドに隣接する必要はない。そのため、ターゲット核酸と完全な相補性のある 2 つの領域により隣接されている非相補的ヌクレオチドを 4 個有するヌクレオチド長 1 8
20 のアンチセンス化合物は、ターゲット核酸と 7 7 . 8 % の全体的相補性を有することになり、つまり本発明の範囲に含まれる。アンチセンス化合物とターゲット核酸の領域との % 相補性は、当該技術分野で公知の BLAST プログラム（ベーシック・ローカル・アラインメント・サーチ・ツール）および PowerBLAST プログラムを用いて日常的に決定することができる。% ホモロジー、配列同一性または相補性は、例えば、Smith および Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489) のアルゴリズムを用いる、デフォルト設定を利用した G a p プログラム (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix (登録
商標), Genetics Computer Group, University Research
Park, Madison Wis.) により決定することができる。

【 0 0 4 9 】

本明細書で用いられる用語「熱的融点 (T_m)」は、定義されたイオン強度、pH、および核酸濃度の下で、ターゲット配列に対して相補的なオリゴヌクレオチドの 5 0 % がターゲット配列に対して平衡にハイブリダイズされる温度を指す。典型的にはストリンジェントな条件は、塩濃度が pH 7 . 0 ~ 8 . 3 で少なくとも約 0 . 1 ~ 1 . 0 M N a イオン濃度（または他の塩）であり、温度が短いオリゴヌクレオチド（例えば、1 0 ~ 5 0 個のヌクレオチド）で少なくとも約 3 0 であるそれらの条件であろう。ストリンジェントな条件は、不安定化剤、例えばホルムアルデヒドの添加により実現してもよい。

【 0 0 5 0 】

本明細書で用いられる「調整」は、遺伝子発現の増加（刺激）または減少（阻害）のいずれかを意味する。

【 0 0 5 1 】

ポリヌクレオチド配列の文脈で用いられる場合、用語「変異体」は、野生型遺伝子に関連するポリヌクレオチド配列を包含してもよい。この定義は、例えば、「対立遺伝子」、「スプライシング」、「種」、または「多形性」変異体を包含してもよい。スプライシング変異体は、参照分子に対して顕著な同一性を有していてもよいが、一般に、m R N A プロセシングの間のエクソンの選択的スプライシングのためにより多数の、またはより少数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加の機能的ドメインを有していてもよく、またはドメインが存在しなくてもよい。種変異体は、種によって変動するポリヌクレオチド配列である。本発明において特に有用性のあるものは、野生型遺伝子産物の変異体である。変異体は、核酸配列中の少なくとも 1 個の突然変異により得られる場合があり、変化した m R N A またはポリペプチドが得られてもよく、その構造または機能が変化していても、または変化していなくてもよい。任意の所定の天然または組換え遺伝子は、対立遺伝子形態を有していなくても、1 つまたは複数有していてもよい。

変異体に起こる共通の突然全変異的变化は、一般に、ヌクレオチドの自然な欠失、付加、または置換に起因する。これらのタイプの変化はそれぞれ、所定の配列内に単独で、または他と組み合わせて1回以上起こる場合がある。

【0052】

得られたポリペプチドは、一般に、互いに関して顕著なアミノ酸同一性を有するであろう。多形変異体は、所定の種の個体間の特定遺伝子のポリヌクレオチド配列における変異である。多形変異体は、「単独ヌクレオチド多形」(SNP)、またはポリヌクレオチド配列が1つの塩基により変動する単一塩基突然変異を包含してもよい。SNPの存在は、例えば、疾患状態の性向、即ち耐性への感受性を有する特定の集団を示していてもよい。

【0053】

誘導性ポリヌクレオチドは、化学修飾、例えば、アルキル、アシルまたはアミノ基による水素の置換を受けた核酸を包含する。誘導体、例えば誘導性オリゴヌクレオチドは、非天然由来部分、例えば変化した糖部分または糖鎖間結合を含んでもよい。これらのうちの例は、ホスホロチオアートおよび当該技術分野で公知の他の硫黄含有種である。誘導性核酸は、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、コファクター、阻害剤、磁気粒子などをはじめとする標識を含んでもよい。

【0054】

「誘導性」ポリペプチドまたはペプチドは、例えば、グリコシル化、ペグ化、リン酸化、硫酸化、還元/アルキル化、アシル化、化学的カップリング、または穏やかなホルマリン処理により、修飾されたものである。誘導体は、非限定的に放射性同位体標識、蛍光標識、および酵素標識をはじめとする検出可能な標識を直接的または間接的に含むように修飾されていてもよい。

【0055】

用語「薬学的に許容しうる塩」は、薬学的に許容しうる非毒性塩基または酸から調製される塩を指す。本発明の化合物が酸性である場合、その対応する塩は、無機塩基および有機塩基をはじめとする薬学的に許容しうる非毒性塩基から簡便に調製することができる。そのような無機塩基から誘導される塩としては、アルミニウム、アンモニウム、カルシウム、銅(第二および第一)、第二鉄、第一鉄、リチウム、マグネシウム、マンガン(第二および第一)、カリウム、ナトリウム、亜鉛および類似の塩が挙げられる。薬学的に許容しうる有機非毒性塩基から誘導される塩としては、第一級、第二級、および第三級アミン、ならびに環状アミンおよび置換アミン、例えば天然由来および合成置換アミンの塩が挙げられる。塩を形成しうる他の薬学的に許容しうる有機非毒性塩基としては、イオン交換樹脂、例えば、アルギニン、ベタイン、カフェイン、コリン、N,N'-ジベンジルエチルエネジアミン、ジエチルアミン、2-ジエチルアミノエタノール、2-ジメチルアミノエタノール、エタノールアミン、エチレンジアミン、N-エチルモルホリン、N-エチルピペリジン、グルカミン、グルコサミン、ヒスチジン、ヒドラバミン、イソプロピルアミン、リシン、メチルグルカミン、モルホリン、ペペラジン、ピペリジン、ポリアミン樹脂、プロカイン、プリン、テオブロミン、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリプロピルアミン、トロメタミンなどが挙げられる。

【0056】

本発明の化合物が塩基性である場合、対応する塩は、無機および有機酸をはじめとする薬学的に許容しうる非毒性酸から簡便に調製することができる。そのような酸としては、例えば、酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、ショウノウスルホン酸、クエン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコン酸、グルタミン酸、臭化水素酸、塩酸、イセチオン酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、粘液酸、硝酸、パモ酸、パントテン酸、リン酸、コハク酸、硫酸、酒石酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。薬学的に許容しうる塩の例としては、非限定的に、塩基性樹脂の鉱酸または有機酸塩、例えばアミン；酸性樹脂のアルカリまたは有機塩、例えばカルボン酸などが挙げられる。薬学的に許容しうる塩としては、例えば非毒性無機または有機酸から、形成された親化合物の従来の非毒性塩または第四級アンモニウム塩が挙げられる。例えばそのような

従来の非毒性塩としては、無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、スルファミン酸、リン酸、硝酸などから誘導されるそれらのもの、および有機酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、コハク酸、グリコール酸、ステアリン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、アスコルビン酸、パモ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、フェニル酢酸、グルタミン酸、安息香酸、サリチル酸、スルファニル酸、2 - アセトキシ安息香酸、フマル酸、トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、エタンジスルホン酸、シュウ酸、イセチオン酸などから調製される塩が挙げられる。

【 0 0 5 7 】

本発明の薬学的に許容しうる塩は、従来の化学的方法により合成することができる。一般に該塩は、適切な溶媒または溶媒混合物中で、遊離塩基または酸を、理論量または過剰量の所望の塩形成無機または有機酸または塩基と反応させることにより、調製される。

10

【 0 0 5 8 】

本発明の化合物は、不斉中心を有していてもよく、ラセミ体、ラセミ混合物および個々のジアステレオマーとして生じてもよい。光学異性体をはじめとするそのような異性体は全て、本発明に包含される。

【 0 0 5 9 】

スキンケア製品の例としては、非限定的に、保湿剤、フェイクタンニング調製剤、日焼けローション、マッサージオイル、バスオイル、香水、香油、クリーム、フェースパック、シェービングフォームおよびゲルが挙げられる。化粧品の例としては、非限定的に、口紅、ファンデーション、アイシャドー、アイライナー、ブラッシャーおよびコンシーラーが挙げられる。クレンジング製品の例としては、非限定的に、シャンプー（詳細には、フケ予防シャンプー）、石鹸、シャワーゲルおよびバブルバスをはじめとするパーソナルウォッシュ製品、衣類洗剤、および食器洗剤が挙げられる。ヘアケア製品の例としては、非限定的に、ヘアスタイリングムース、ヘアスタイリングスプレー、ヘアスタイリングゲル、ヘアコンディショナー、またはヘアカラーが挙げられる。

20

【 0 0 6 0 】

個体のプロフィラグリンジエノタイプを評価することにより、皮膚状態への個体の素因を決定することができる。「プロフィラグリンジエノタイプ」は、個体のゲノムにおけるプロフィラグリン対立遺伝子の同一性を意味する。本発明の方法により検査される個体は、典型的にはホ乳類である。一実施形態において、ホ乳類は、げっ歯類であってもよい。別の実施形態において、ホ乳類は、ヒトであってもよい。つまり本発明の方法により検査される個体は、複相体であり、そのためそれらのゲノム内にプロフィラグリン遺伝子のコピーを2個有する。個体がプロフィラグリン遺伝子の同一コピーを2個有する場合、それら是对立遺伝子がホモ接合である。個体がプロフィラグリン遺伝子の異なるコピーを2個有する場合、即ち、一方が他方に対して多形である場合、個体は対立遺伝子がヘテロ接合である。「素因」は、個体のゲノム内の個々のプロフィラグリン対立遺伝子、または個体のゲノム中に存在するプロフィラグリン対立遺伝子の組み合わせの存在が、皮膚状態に関連する、またはそれを予測させることを意味する。

30

【 0 0 6 1 】

本明細書で用いられる用語「皮膚状態」は、頭皮をはじめとする皮膚の全ての物理的パラメータ、例えば保水性、物質産生またはバリア形成を意味することを含む。一実施形態において、用語「皮膚状態」は、健康レベルのNMF産生を保持する皮膚の能力を指す。したがって本発明は、健康レベルのNMF産生を保持する個体の素因を決定する方法を提供する。別の言い方では、本発明は、異常なNMF産生に関連する状態への個体の感受性を決定する方法を提供する。典型的には異常なNMF産生により誘起または増悪される皮膚状態は、健康な皮膚よりも少ないNMFを産生することにより起こる。異常なフィラグリンおよびNMF産生に関連する状態としては、尋常性魚鱗癬が挙げられる。別の実施形態において、用語「皮膚状態」は、乾燥肌を指す。乾燥肌状態としては、老人性/閉経後の乾皮症、界面活性剤による乾皮症、冬季乾皮症、日焼けが挙げられる。別の実施形態において、用語「皮膚状態」は、頭皮の状態、例えば、フケを指す。別の実施形態にお

40

50

いて、用語「皮膚状態」は、紅斑、例えば洗剤による紅斑を指す。

【0062】

表現「ケラチン基質のケア」は、皮膚および/もしくは髪および/もしくは爪の健康な機能または任意の工程を保持または修復して、それらの外観および/または手触りを保持または改善する手段を提供する行動全てを指す。つまりケアとしては、水和、鎮静、全てのタイプの攻撃からの防御、特に日焼け止め、および老化の徴候への抵抗および予防が挙げられる。

【0063】

成句「皮膚老化の徴候」は、老化による皮膚の外観に関する改変全てを包含する。これらの改変の例としては、しわ、小じわ、弾力のない肌、緩んだ肌、薄く見える肌、弾力および/またははりの欠如、くすんだ肌、ならびに輝きのない肌が挙げられる。それは、皮膚の外観の変化で直接説明されない皮膚内部の改変も包含する。これらの内部改変の例には、UV線への連続暴露の結果、皮膚内部に生じた変性がある。表現「皮膚の外観を向上させること」は、結果的に皮膚外観の視覚的改善を有する可能性のある現象全てを包含する。皮膚は、より素晴らしい外見を有することになり、例えば、かなり美しく、固く、そして/または滑らかになる。小さな欠点は全て、低減または除去される。皮膚の薄い外観が、低減する。その上、本発明による有効成分、またはそれを含む組成物は、ケラチン基質、詳細には皮膚、髪、および爪を全てのタイプの外部攻撃から防御するためのものであってもよい。これらの活性剤、またはそれを含む組成物の使用により、ケラチン基質を防御して、環境がそれらに加えるストレスに、より良好に抵抗することができる。

【0064】

成句「外部攻撃」は、環境により生成される攻撃を指す。これらは、化学的、物理的、生物学的、または熱的原因のものであってもよい。

【0065】

表現「皮膚疾患または障害」は、皮膚に影響を及ぼす疾患全てを指し、視覚的結果を有する、または有さない場合がある。それゆえ例としては、分化および細胞増殖障害、角化障害、皮膚老化の徴候、炎症またはアレルギー反応、皮脂分泌機能の障害、真皮または表皮の増殖（悪性または非悪性）、UV線暴露による皮膚障害、ならびに経時的老化または化学線による老化に関連する病理を、列挙することができる。

【0066】

本明細書で用いられる用語「動物」または「患者」は、例えば、ヒト、ヒツジ、オオシカ、シカ、ミュールジカ、ミンク、ホ乳類、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ラット、マウス、トリ、ニワトリ、爬虫類、魚、昆虫およびクモを含むことになる。

【0067】

「ホ乳類」は、典型的には医療ケアの下にある、温血ホ乳類（例えば、ヒトおよび家畜）を含む。例としては、ヒトだけでなく、ネコ科、イヌ科、ウマ科、ウシ属、およびヒトが挙げられる。

【0068】

「処置する」または「処置」は、ホ乳類における疾患状態の処置を含み、(a)特にホ乳類が疾患状態の素因を持つが、まだその疾患を有していると診断されていない場合に、そのようなホ乳類において疾患状態が起きるのを予防すること；(b)疾患状態を阻害すること、例えばそれが進行するのを停止させること；および/または(c)疾患状態を緩和すること、例えば所望のエンドポイントに達するまで疾患状態を回帰させること、が挙げられる。処置することは、疾患の症状の改善（例えば、疼痛または不快感を低減する）を包含し、そのような改善は、疾患に直接影響を及ぼしても（例えば、伝達、発現などを起こす）、または及ぼさなくてもよい。

【0069】

本明細書で用いられる「癌」は、非限定的に、白血病、リンパ腫、メラノーマ、癌腫、および肉腫をはじめとする、ホ乳類中で見出される全ての型の癌または新生物または悪性腫瘍を指す。癌は、それ自体は「腫瘍」、または癌の悪性細胞を含む組織として症状発現

する。腫瘍の例としては、肉腫および癌腫、例えば非限定的に、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原生肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、滑膜腫、中皮腫、エウイング腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、膵臓癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、扁平上皮癌腫、基底細胞癌腫、腺癌、汗腺癌腫、脂腺癌腫、乳頭癌腫、乳頭腺癌、嚢胞腺癌腫、髄様癌腫、気管支原性癌腫、腎細胞癌腫、ヘパトーマ、胆管癌腫、絨毛癌腫、精上皮腫、胎児性癌腫、ウィルム腫瘍、子宮頸癌、睾丸腫瘍、肺癌腫、小細胞肺癌腫、膀胱癌腫、上皮癌腫、グリオーマ、星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、希突起神経膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫、および網膜芽細胞腫が挙げられる。本発明による開示された組成物により処置されうる更なる癌としては、非限定的に例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳癌、子宮癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺癌腫、原発性脳腫瘍、胃癌、結腸癌、悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイド、膀胱癌、胃癌、前悪性皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞癌、食道癌、尿生殖器管癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、副腎皮質癌、および前立腺癌が挙げられる。

【0070】

「神経疾患または障害」は、神経系および/または視覚系の任意の疾患または障害を指す。「神経疾患または障害」としては、中枢神経系（脳、脳幹および小脳）、末梢神経系（脳神経を含む）、および自律神経系（その一部は中枢神経系および末梢神経系の両方に存在する）を含む疾患または障害を包含する。神経障害の例としては、非限定的に、頭痛、昏迷および昏睡、認知症、発作、睡眠障害、心的外傷、感染症、新生物、神経眼科学、運動障害、脱髄疾患、脊髄障害、ならびに末梢神経、筋肉および神経筋接合部の障害が挙げられる。中毒症および精神病としては、非限定的に、双極性障害および統合失調症が挙げられ、それらは神経障害の定義にも含まれる。以下は、本発明による組成物および方法を用いて処置されうる複数の神経障害、症状、徴候および症候群の列举である：後天性てんかん性失語症、急性散在性脳脊髄炎、副腎白質ジストロフィー、加齢黄斑変性、脳梁欠損症、失認、アイカルディ症候群、アレキサンダー病、アルパーズ病、交互性片麻痺、血管性認知症、筋萎縮性側索硬化症、無脳症、アンジェルマン症候群、血管腫症、無酸素症、失語症、失行症、クモ膜嚢胞、クモ膜炎、アーノルド・キアリ奇形、動静脈奇形、アスペルガー症候群、毛細血管拡張性運動失調症、注意欠陥多動性障害、自閉症、自律神経機能障害、背痛、バッテン病、ベーチェット病、ベル麻痺、良性特発性眼瞼痙攣、良性限局性筋萎縮症、良性頭蓋内高血圧症、ピンスワンガー病、眼瞼痙攣、ブロッホ・サルツバーガー症候群、腕神経叢損傷、脳膿瘍、脳損傷、脳腫瘍（多形膠芽細胞腫を含む）、脊髄腫瘍、ブラウン・セカール症候群、カナバン病、手根管症候群、灼熱痛、中心性疼痛症候群、橋中央ミエリン溶解、頭部障害、脳動脈瘤、脳動脈硬化症、脳萎縮症、脳性巨人症、脳性麻痺、シャルコー・マリー・トゥース病、化学療法誘発性の神経障害および神経因性疼痛、キアリ奇形、舞蹈病、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、慢性疼痛、慢性局所痛症候群、コフィン・ローリー症候群、遷延性植物状態を含む昏睡、先天性両側顔面神経麻痺、大脳皮質基底核変性症、頭蓋動脈炎、頭蓋骨癒合症、クロイツフェルト・ヤコブ病、蓄積外傷疾患、クッシング症候群、巨大細胞性封入体症、サイトメガロウイルス感染、眼球クロームス・ミオクロームス症候群、ダンディウォーカー症候群、ドーソン病、ド・モルシェ症候群、デジェリン・クルンプケ麻痺、認知症、皮膚筋炎、糖尿病性神経障害、広汎性硬化症、自律神経障害、書字障害、失読症、失調症、早期乳児てんかん性脳症、エンブティセラ症候群、脳炎、脳瘤、脳三叉神経領域血管腫症、てんかん、エルブ麻痺、本態性振戦、ファブリー病、ファール症候群、失神、家族性痙攣性麻痺、熱性痙攣、フィッシャー症候群、フリードライヒ運動失調、前頭側頭性認知症および他の「タウオパチー」、ゴーシェ病、ゲルストマン症候群、巨細胞性動脈炎、巨細胞性封入病、球様細胞白質萎縮症、ギラン・バレー症候群、HTLV-1関連脊髄症、ハレルフォルデン・シュパッツ病、頭部損傷、頭痛、片側顔面痙攣、遺伝性痙攣性対麻痺、遺伝性多発神経炎性失調、耳带状疱疹、带状疱疹、平山症候群、HIV関連性認知症および神経障害（同じくAIDSの神経症状発

10

20

30

40

50

現)、全前脳症、ハンチントン病および他のポリグルタミン反復病、内水頭症、水頭症、副腎皮質機能亢進症、低酸素症、免疫介在性脳脊髄炎、封入体筋炎、色素失調症、乳児フィタン酸蓄積症、乳児レフサム病、乳児痙攣、炎症性筋障害、頭蓋内嚢胞、頭蓋内圧亢進、ジュベール症候群、キーンズ・セイアー症候群、ケネディ病、キンスボーム(Kinsbourne)症候群、クリベル・フェーユ症候群、クラッペ病、クーゲルベルク・ヴェランデル病、クーラー、ラフォラ病、ランバート・イートン筋無力症候群、ランドー・クレッフナー症候群、延髄外側(ワレンベルク)症候群、学習障害、リー病、レノックス・ガストー症候群、レッシュ・ナイハン症候群、白質萎縮症、レビー小体型認知症、脳回欠損、閉じ込め症候群、ルー・ゲーリグ病(即ち、運動ニューロン疾患または筋萎縮性側索硬化症)、腰椎椎間板症、ライム病-神経後遺症、マチャド・ジョセフ病、大脳症、巨大脳髄症、メルカーソン・ローゼンタール症候群、メニエール病、髄膜炎、メンケス病、異染性白質萎縮症、小頭症、片頭痛、ミラー・フィッシャー症候群、小卒中、ミトコンドリア筋障害、メビウス症候群、単肢筋萎縮症、運動ニューロン疾患、もやもや病、ムコ多糖体症、多発脳梗塞性認知症、多病巣性運動性神経障害、多発性硬化症および他の脱髄障害、体位性低血圧を伴う多系統萎縮症、筋ジストロフィー、重症筋無力症、ミエリン破壊性広汎性硬化症、乳児の間代性筋痙攣脳症、ミオクロオヌス、筋障害、先天性筋強直症、ナルコレプシー、神経線維腫症、神経弛緩薬性悪性症候群、AIDSの神経症状発現、狼瘡の神経後遺症、神経筋強直症、神経セロイド・リポフスチン症、ニューロン遊走異常、ニーマン・ピック病、オサリバン・マックレオド症候群、後頭神経痛、続発性潜在性脊髄閉鎖不全、大田原症候群、オリブ橋小脳萎縮、眼球クローヌス間代性筋痙攣、視神経炎、起立性低血圧、過用症候群、感覚異常、神経変性疾患または障害(パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、認知症、多発性硬化症ならびに神経細胞死に関連する他の疾患および障害)、先天性パラミオトニア、腫瘍随伴性疾患、発作性発病、パリー・ロンベルグ症候群、ペリツェーウス・メルツバッシャー病、周期性四肢麻痺、末梢神経障害、有痛性神経障害および神経因性疼痛、遷延性植物状態、広汎性発達障害、光性くしゃみ反射、フィタン酸蓄積症、ピック病、神経圧迫、下垂体腫瘍、多発性筋炎、孔脳症、ポリオ後症候群、帯状疱疹後神経痛、感染後脳脊髄炎、体位性低血圧、プラダー・ウィリー症候群、原発性側索硬化症、プリオン病、進行性片側顔面萎縮症、進行性多病巣性白質脳症、進行性硬化性ポリオジストロフィー、進行性核上性麻痺、偽脳腫瘍、ラムゼイ・ハント症候群(I型およびII型)、ラスムッセン脳炎、反射性交感神経性ジストロフィー症候群、レフサム病、反復運動性疾患、反復性ストレス障害、下肢静止不能症候群、レトロウイルス関連脊髄症、レット症候群、ライ症候群、聖ウィトウス舞蹈病、サンドホフ病、シドラー病、裂脳症、中隔視神経異形成、揺さぶられっ子症候群、帯状疱疹、シャイ・ドレーガー症候群、シェーグレン症候群、睡眠時無呼吸、ソートー症候群、痙攣、二分脊椎、脊髄損傷、脊髄腫瘍、脊髄性筋萎縮症、スティッフ・パーソン症候群、卒中、スタージ・ウェーバー症候群、亜急性硬化性汎脳炎、皮質下動脈硬化性脳症、シデナム舞蹈病、失神、脊髄空洞症、遅発性運動障害、テイ・サックス病、側頭動脈炎、脊髄係留症候群、トムゼン病、胸郭出口症候群、疼痛性チック、トッド麻痺、ツレット症候群、一過性脳虚血発作、伝染性海綿状脳症、横断性脊髄炎、外傷性脳損傷、振戦、三叉神経痛、熱帯瘧疾不全対麻痺、結節硬化症、血管性認知症(多発脳梗塞性認知症)、側頭動脈炎を含む脈管炎、フォンヒッペル・リンダウ病、ワレンベルク症候群、ウェルドニヒ・ホフマン病、ウェスト症候群、むち打ち、ウィリアムズ症候群、ウィルソン病、ならびにツェルウェガー症候群。

【0071】

「炎症」は、全身炎症状態、ならびに単球、白血球および/または好中球の遊走および誘引に局所的に関連する状態を指す。炎症状態の例としては、非限定的に、病因となる生物体(グラム陽性菌、グラム陰性菌、ウイルス、真菌、および寄生虫、例えば原生動物および蠕虫を含む)への感染、移植片拒絶(固形臓器、例えば腎臓、肝臓、心臓、肺または角膜などの拒絶、および移植片対宿主病(GVHD)をはじめとする骨髄移植片の拒絶を含む)、または局所的な慢性もしくは急性自己免疫もしくはアレルギー反応による炎症が

挙げられる。自己免疫疾患としては、急性糸球体腎炎；リウマトイドまたは反応性関節炎；慢性糸球体腎炎；炎症性腸疾患、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎および壊死性腸炎；肝炎；敗血病；アルコール性肝臓病；非アルコール性脂肪症；顆粒球移植関連症候群；炎症性皮膚病、例えば、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、乾癬；全身エリテマトーデス（SLE）；自己免疫性甲状腺炎；多発性硬化症；および糖尿病の幾つかの形態；または対象自身の免疫系による攻撃が病理組織の破壊をもたらす任意の他の自己免疫状態が挙げられる。アレルギー反応としては、アレルギー性関節炎、慢性気管支炎、急性および遅延型過敏症が挙げられる。全身性炎症疾患状態としては、外傷、熱傷、再灌流後の虚血事象（例えば、心筋梗塞および卒中をはじめとする、心臓、脳、腸または末梢血管における血栓性事象）、敗血病、ARDS、または多臓器機能不全症候群に関連する炎症が挙げられる。炎症細胞の動員は、アテローム斑でも起こる。炎症としては、非限定的に、非ホジキンリンパ腫、ウェゲナー肉芽腫症、橋本甲状腺炎、肝細胞癌腫、胸腺委縮、慢性脾臓炎、関節リウマチ、反応性リンパ濾泡過形成、骨関節炎、潰瘍性大腸炎、乳頭癌腫、クローン病、潰瘍性大腸炎、急性胆嚢炎、慢性胆嚢炎、硬変、慢性唾液腺炎、腹膜炎、急性脾炎、慢性脾炎、慢性胃炎、腺筋炎、子宮内膜症、急性子宮頸炎、慢性子宮頸炎、リンパ濾泡過形成、多発性硬化症、特発性血小板減少性紫斑症に続発する肥大、原発性IgA腎症、全身エリテマトーデス、乾癬、肺気腫、慢性腎盂腎炎、および慢性膀胱炎が挙げられる。

10

【0072】

心臓血管疾患または障害は、心臓の再灌流により虚血を起こす可能性があるか、またはそれにより誘発されるそれらの障害を包含する。例としては、非限定的に、アテローム性硬化症、冠動脈疾患、肉芽腫性心筋炎、慢性心筋炎（非肉芽腫性）、原発性肥大型心筋症、末梢動脈疾患（PAD）、末梢血管疾患、静脈血栓塞栓症、肺塞栓症、卒中、狭心症、心筋梗塞、心停止により誘発された心臓血管組織損傷、心臓バイパスにより誘発された心臓血管組織損傷、心原性ショック、および心臓または血管の機能不全または組織損傷、特に非限定的にFLG活性化に関する組織損傷を含む、当業者に公知である関連状態が挙げられる。CVS疾患としては、非限定的に、アテローム性硬化症、肉芽腫性心筋炎、心筋梗塞、心臓弁膜症に続発する心筋線維症、梗塞を伴わない心筋線維症、原発性肥大型心筋症、および慢性心筋症（非肉芽腫性）が挙げられる。

20

【0073】

「神経変性疾患または障害」は、例えば、パーキンソン病、ハンチントン病、アルツハイマー病、筋委縮性側索硬化症（ALS）、認知症、多発性硬化症ならびに神経細胞死に関連する他の疾患および障害をはじめとする中枢および末梢神経系の広範囲の疾患および障害を指す。

30

【0074】

ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド組成物および分子

ターゲット：一実施形態において、ターゲットは、非限定的に、フィラグリン（FLG）に関連するセンスおよび/またはアンチセンス非コードおよび/またはコード配列をはじめとするFLGの核酸配列を含む。

【0075】

フィラグリン遺伝子は、皮膚のバリア層を強化することにおいて役割を担い、この遺伝子の突然変異は、湿疹などの状態をもたらす。フィラグリンは、皮膚の最外層に豊富なタンパク質であり、フィラグリン遺伝子により生成される。フィラグリンの機能は、皮膚の最外表面に存在する不透過性の皮膚バリア層の生成を助けて、これらの水和を保持することである。皮膚に固有のバリア機能は、プラスチックまたはクリングフィルムと類似しており、つまりそれは皮膚からの水分消失を予防し、そして重要なこととして、身体を環境中の外来物質、例えばアレルゲンから防御する働きがある。無傷の皮膚バリアが欠如するとアレルゲンが身体に侵入して、湿疹、喘息、枯草熱および他のアレルギーをはじめとする一定範囲のアレルギー反応を起こす。

40

【0076】

タンパク質フィラグリンの発現が欠如すると、個体が尋常性魚鱗癬、およびより近年に

50

はアトピー性湿疹または皮膚炎を発生し易くなることが示された。フィラグリン遺伝子は、表皮分化複合体中のヒト染色体1q21、つまり表皮の正常なバリア機能にとって重要である複数の他のタンパク質の遺伝子も常在する領域に存在する。フィラグリンの主たる機能は、表皮の細胞骨格を凝集して、高密なタンパク質-脂質マトリックスを形成し、それにより皮膚への水および外部粒子、例えばアレルゲンの透過性を調節すると思われる。

【0077】

ピオグリタゾン - ACTOS (ピオグリタゾン塩酸塩) は、主としてインスリン抵抗性を低下させることにより作用する経口抗糖尿病薬である。ACTOSは、2型糖尿病(インスリン依存性糖尿病[NIDDM]または成人発症性糖尿病としても知られる)の管理に用いられる。薬理的試験により、ACTOSが筋肉および脂肪組織中のインスリンへの感受性を改善し、そして肝糖新生を阻害することが示されている。ACTOSは、循環するインスリンレベルを低下させながら、血糖コントロールを改善する。ピオグリタゾン [(±)-5-[4-[2-(5-エチル-2-ピリジニル)エトキシ]フェニル]メチル]-2,4-チアゾリジンジオン-塩酸塩は、異なる化学分類に属し、スルホニル尿素、メトホルミン、またはα-グルコシダーゼ阻害剤とは異なる薬理学的作用を有する。その分子は、1つの不斉炭素を含み、その化合物は、合成されて、ラセミ混合物として用いられる。ピオグリタゾンの2種の鏡像異性体は、インビボで相互変換する。2種の鏡像異性体の間に、薬理活性の差は見出されなかった。

【0078】

ピオグリタゾン塩酸塩は、無臭の白色結晶粉末であり、分子式 $C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl$ および分子量392.90ダルトンを有する。N,N-ジメチルホルムアミドには可溶性、無水エタノールにはわずかに可溶性、アセトンおよびアセトニトリルには極わずかに可溶性、水には実質的に不溶性、そしてエーテルには不溶性である。

【0079】

ACTOSは、食事および運動の補助薬として適用され、2型糖尿病の成人において血糖コントロールを改善する。ピオグリタゾンは、非アルコール性脂肪性肝炎(脂肪肝)を処置するのに用いられてきたが、この使用は目下、実験的と見なされている。

【0080】

しかしピオグリタゾンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【0081】

ロメリジンは、抗片頭痛性を有するカルシウムチャネルブロッカーであり、大脳動脈の収縮を選択的に阻害する。それは、神経保護性があることが公知であり、緑内障については治験段階である。ロメリジンの副作用としては、極わずかな心臓血管副作用、不眠および顔面紅潮が挙げられる。

【0082】

しかしロメリジンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【0083】

ウェルブトリン、ジバン、ボクスラ(Voxra)、ブデプリオン、またはアブレンジンとしても公知で、正式にはアムフェブタモンとして公知であるブプロピオンは、アミノケトン類の抗うつ薬であり、三環、四環式、選択的セロトニン再取り込み阻害剤、または他の公知抗うつ薬とは化学的に無関係である。その構造は、ジエチルプロピオンの構造と非常に類似しており、それは、フェニルエチルアミンに関係する。

【0084】

ブプロピオンは、(±)-1-(3-クロロフェニル)-2-[(1,1-ジメチルエチル)アミノ]-1-プロパノン塩酸塩と称される。分子量は、276.2である。分子式は、 $C_{13}H_{18}ClNO \cdot HCl$ である。ブプロピオン塩酸粉末は、白色結晶であり、高度の水溶性である。苦味があり、口腔粘膜に局所麻酔の感覚を与える。

【0085】

ブプロピオンは、大うつ病の処置に適用される。大うつ病エピソード(DSM-IV)は、1)抑うつ気分または2)関心もしくは喜びの喪失に加えて、以下の症状の少なくとも

10

20

30

40

50

5 つが、同じ 2 週間に存在し、過去の機能からの変化を表す：抑うつ気分、通常活動における興味もしくは喜びの著しい低下、体重および／もしくは食欲の顕著な変化、不眠もしくは過眠、精神運動の興奮もしくは遅滞、疲労増加、罪悪感もしくは無価値感、思考緩徐もしくは集中力の減少、自殺企図、または自殺念慮。

【 0 0 8 6 】

ブプロピオンは、うつを合併した社会恐怖および不安の処置に若干の成功を示したが、広場恐怖を伴うパニック障害には示さなかった。その抗不安能を、セルトラリンおよびドキシペリンのそれと比較した。しかし、特に高用量では、数名の患者で興奮を誘発することができず、多くの場合、不安が増加し、メチルフェニデートと非常に類似していた。それは本来、精神刺激薬として不安を惹起する化合物であり、相反する利益はほとんど理解されておらず、見掛け上は矛盾している。

10

【 0 0 8 7 】

ブプロピオンは、ニコチン渴望および禁断症状の重症度を低下させる。ブプロピオンの他の適応症は、肥満および注意欠陥多動性障害 (A D H D) である。ブプロピオンは、季節性感情障害の予防用に F D A から認可された。複数のケーススタディーおよびパイロット試験によれば、ブプロピオンは、炎症メディエータである T N F - α のレベルを低下させて、自己炎症状態、例えばクローン病および乾癬に有用となる可能性がある。

【 0 0 8 8 】

しかしブプロピオンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

20

【 0 0 8 9 】

フェンプロバメートは、追加的な鎮痛および抗けいれん作用に加えて、中枢作用のある骨格筋弛緩薬である。過剰摂取すれば、精神安定剤と類似してくる。その作用機序は、おそらくメプロバメートに類似している。フェンプロバメートは、これまではヒトにおいて抗不安薬として用いられたが、場合により、全身麻酔において、そして筋けいれんおよびけい縮の処置に用いられる場合もある。フェンプロバメートは、欧州の数ヶ国で依然として用いられているが、一般にはより新規の薬物に変換されるようになってきた。フェンプロバメートは、アミド基の酸化的分解およびベンゼン環のオルトヒドロキシ化により代謝され、腎臓により尿中に排出される。

【 0 0 9 0 】

しかしフェンプロバメートは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

30

【 0 0 9 1 】

ベンジピンは、ベニジピナムまたはベニジピン塩酸塩としても公知であり、高い血圧 (高血圧) の処置のためのジヒドロピリジンカルシウムチャネルブロッカーである。ベニジピンは、L 型だけでなく、T 型カルシウムチャネルを阻害するジヒドロピリジンカルシウムチャネルブロッカーである。ベニジピンの化学名は、(4 R) - r e l - 1 , 4 - ジヒドロ - 2 , 6 - ジメチル - 4 - (3 - ニトロフェニル) - 3 , 5 - ピリジンジカルボン酸 3 - メチル 5 - [(3 R) - 1 - (フェニルメチル) - 3 - ピペリジニル] エステル塩酸塩である。インビトロおよびインビボで広範囲の活性を示す経口活性血圧降下薬。L 型、N 型および T 型 $C a^{2+}$ チャネルを阻害する。同じくアルドステロン誘導性鉱質コルチコイド受容体活性化を阻害する。心臓保護および抗動脈硬化作用を示す。

40

【 0 0 9 2 】

しかしベニジピンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【 0 0 9 3 】

ピロキシカムは、非ステロイド性抗炎症薬 (N S A I D) のオキシカム系の 1 種である。栗色と青色とを含むカプセルそれぞれが、ピロキシカム 1 0 mg を含み、栗色のカプセルそれぞれが、経口投与用のピロキシカムを 2 0 mg 含む。ピロキシカムの化学名は、4 - ヒドロキシ - 2 - メチル - N - 2 - ピリジニル - 2 H - 1 , 2 - ベンゾチアジン - 3 - カルボキサミド 1 , 1 - ジオキシドである。ピロキシカムは、水、希酸およびほとんどの有機溶媒への可溶性が乏しい白色結晶固体として生成される。それは、アルコールおよび水溶液にわずかに可溶性である。弱酸性の 4 - ヒドロキシプロトン (p K a 5 . 1) および

50

弱塩基性ピリジル窒素 ($pK_a 1.8$) を示す。ピロキシカムの分子量は、 331.35 である。分子式は、 $C_{15}H_{13}N_3O_4S$ である。

【0094】

ピロキシカムは、リウマトイド、骨関節、原発性月経困難、術後痛の症状を緩和するのに用いられる非ステロイド性抗炎症薬であり、特に炎症成分が存在する場合には、鎮痛薬として作用する。それは、獣医薬においても、シクロオキシゲナーゼ (COX) 受容体を発現する特定の新生物、例えば、膀胱癌、結腸癌および前立腺癌を処置するのに用いられる。

【0095】

しかしピロキシカムは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

10

【0096】

トピラマートは、スルファマートで置換された単糖である。TOPAMAX (登録商標) (トピラマート)錠が、経口投与用の 25mg 、 50mg 、 100mg 、および 200mg の丸い錠剤として利用できる。TOPAMAX (登録商標) (トピラマートカプセル) スプリンクルカプセルは、経口投与用の 15mg および 25mg スプリンクルカプセルをカプセルを丸ごとで、または開いて柔らかい食物に振りかけて利用できる。

【0097】

トピラマートは、苦味のある白色結晶粉末である。トピラマートは、水酸化ナトリウムまたはリン酸ナトリウムを含み、 $pH 9 \sim 10$ を有するアルカリ溶液中にほとんど可溶性である。それは、アセトン、クロロホルム、ジメチルスルホキシド、およびエタノールに大量に溶解できる。水への溶解度は、 9.8mg/mL である。その飽和溶液は、 $pH 6.3$ を有する。トピラマートは、分子式 $C_{12}H_{21}NO_8S$ および分子量 339.36 を有する。トピラマートは、化学的には 2, 3, 4, 5 - ジ - O - イソプロピリデン - β - D - フルクトピラノーススルファマートと称される。

20

【0098】

トピラマートは、単独で、または他の薬品と一緒に、てんかんを有するヒトの特定の型の発作を処置するのに用いられる。トピラマートは、他の薬品と共に、レノックス・ガストー症候群 (発作および発達遅延を起こす障害) を有するヒトにおける発作を管理するのにも用いられる。トピラマートは、他の抗発作薬を摂取していながら継続して発作を有する患者を処置するのに用いられる。トピラマートは、片頭痛を予防するのにも用いられるが偏頭痛が起こった時に片頭痛の疼痛を緩和するのには用いられない。トピラマートは、抗けいれん薬と呼ばれる薬品の分類に入る。それは、能の異常な興奮を低減する働きがある。

30

【0099】

トピラマートは、小児および成人におけるてんかんを処置するが、最初は、抗けいれん薬として販売された。小児ではそれは、レノックス・ガストー症候群、つまり発作および発達遅延を起こす障害の処置に適用される。それは、米国食品医薬品局 (FDA) により、片頭痛の予防用にも認可されており、それに処方されることが最も多い。精神病医は、双極性障害を処置するのにトピラマートを用いており、多くの場合、向精神薬を増加させるため、または多数の抗うつ薬に関連する体重増加を抑制するために、トピラマートを用

40

【0100】

トピラマートは、アルコール依存症および肥満の処置における使用、特に過食を抑制するための使用について研究されている。

【0101】

トピラマートは、心的外傷後ストレス障害を処置するための臨床試験でも用いられている。パイロット試験では、トピラマートが、点頭てんかんに対して効果的であることが示唆された。別の試験では、早産児の低酸素性虚血障害後の脳室周囲白質軟化症を予防する効果的処置として、トピラマートが推奨されている。トピラマートの他のオフラベル使用および研究使用としては、本態性振戦、神経性過食症、強迫性障害、アルコール依存症、

50

禁煙、特発性頭蓋内圧亢進、神経因性疼痛、群発頭痛、およびコカイン依存症の処置が挙げられる。トピラマートは、フェンテルミンとの混合物で、肥満を処置する Q n e x a と呼ばれる薬物を形成させるためにも試験されている。

【 0 1 0 2 】

しかしトピラマートは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【 0 1 0 3 】

イスラジピンは、カルシウムアンタゴニストである。イスラジピンは、化学的には 4 - (4 - ベンゾフラザニル) - 1 , 4 - ジヒドロ - 2 , 6 - ジメチル - 3 , 5 - ピリジンジカルボン酸メチル 1 - メチルエチルエステルである。イスラジピンは、黄色の微粒子粉末であり、無臭であるか、または微かで特徴的な臭いを有する。イスラジピンは、水に実質的に不溶性 (3 7 で < 1 0 mg / L) であるが、エタノールには可溶性であり、アセトン、クロロホルムおよび塩化メチルには大量に溶解できる。

10

【 0 1 0 4 】

イスラジピンは、高血圧の管理に適用される。それは、単独で、またはチアジド型利尿剤と併用して用いられてもよい。それは通常、卒中および心臓発作のリスクを低減するために高血圧の処置で処方される。動物モデルにおけるより近年の研究で、イスラジピンがパーキンソン病の処置で潜在的利用性を有しうることが示唆された。

【 0 1 0 5 】

しかしイスラジピンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【 0 1 0 6 】

20

ニコランジルは、狭心症の処置に用いられる一般用医薬品の 1 種である。薬物は、血管弛緩薬として分類することができる。

【 0 1 0 7 】

ニコランジルの作用は、血管の平滑筋を滑らかにする処理によるものと理解されている。作用は、静脈系の症例で特に顕著である。

【 0 1 0 8 】

ニコランジルは、カリウムチャネルを活性化することにより、そして酸化窒素を供与して酵素グアニレートシクラーゼを活性化させることにより、作用する。酵素グアニレートシクラーゼは、c G M P の活性化を誘発し、一方でミオシン軽鎖の脱リン酸化により動脈および静脈の血管弛緩をもたらす。血管カリウムチャネルへの選択性により、ニコランジルは、心臓収縮性および心伝達性に対する顕著な作用を有さない。

30

【 0 1 0 9 】

ニコランジルは、健常な個体の冠血管を弛緩しうが、虚血性心疾患を有する対象の冠血管に対するその効果は、それが既に完全に弛緩されているため、小さい。代わりにそれは、静脈系を弛緩して、心臓の前負荷および働きを低下させる。

【 0 1 1 0 】

しかしニコランジルは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【 0 1 1 1 】

ピリベジルは、主にパーキンソン病を処置するのに使用される D 2 アゴニストである。それは、ドーパミン受容体を刺激することにより作用し、それにより振戦のような様々な症状を軽減する。それは、D 2 アンタゴニスト効果により、循環器問題のような他の状態を処置するのににも用いられる。該薬物は、経口摂取しなければならない徐放性カプセルの形態で入手される商品名 T r i v a s t a l としても入手される。ピリベジルは、単独療法として、または早期および進行したパーキンソン病では L - ドーパ療法と併用して用いることができる。多くの高齢患者は、認知、例えば、記憶、注意および集中障害の処置における相対的効果のため、利益を受けている。

40

【 0 1 1 2 】

ピリベジルは、脳内に存在するドーパミン受容体を刺激することにより作用し、実際には中脳辺縁経路および中脳皮質経路のシナプス後 D 2 および D 3 受容体の欠損を処置する。その薬物は、血管弛緩作用も有し、それにより異なる認知症状を改善し、ノルアドレナ

50

リン作動性伝達を促進して、集中、注意および記憶の改善をもたらす。

【 0 1 1 3 】

ピリベジルは、高齢者の病的認知欠損（注意、動機づけ、記憶の障害など）の処置、高齢者のめまいの処置、網膜虚血の症状発現の処置、下肢の末梢血管疾患（PVD）による間欠性跛行（ステージ2）、アンヘドニア、ならびに単極性および双極性うつ病患者における処置抵抗性うつ病（オフラベル）、における補助的処置においても適用される。

【 0 1 1 4 】

しかしピリベジルは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【 0 1 1 5 】

オキサプロジン₁₀は、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）のプロピオン酸系の1種である。オキサプロジンカリウムの化学名は、4, 5 - ジフェニル - 2 - オキサゾレプロピオン酸カリウム塩である。その経験式は、 $C_{18}H_{14}NO_3K$ であり、分子量は331である。オキサプロジンカリウムは、白色～オフホワイトの粉末で融点が215である。アルコールにわずかに可溶性であり、水には非常に可溶性である。水中でのPKは、9.7である。

【 0 1 1 6 】

オキサプロジンは、骨関節炎および関節リウマチに関連する炎症、腫脹、強直および関節痛を緩和するのに用いられる。

【 0 1 1 7 】

しかしオキサプロジンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。₂₀

【 0 1 1 8 】

グリコピロレートは、化学名：3 [(シクロペンチルヒドロキシフェニルアセチル) オキシ] - 1, 1 - ジメチルプロリジニウムプロミドの第四級アンモニウム塩である。分子式は、 $C_{19}H_{28}BrNO_3$ であり、分子量は、398.33である。

【 0 1 1 9 】

グリコピロレート注射液は、麻酔導入および挿管時に、唾液、気管気管支および咽頭の分泌物を減少させるため；胃内分泌物の容量および遊離酸性度を低下させるため；そして心臓迷走神経阻害反射を遮断するための、術前抗ムスカリン作動薬としての使用に適用される。ロビヌル注射液は、適用される際には手術中に用いて、外科的導入による、または薬物導入による、または迷走神経の反射に関連する不整脈を妨害してもよい。グリコピロレートは、脱分極性筋弛緩薬による神経筋遮断から回復させるために投与されるコリン作動薬、例えばネオスチグミンおよびピリドスチグミンの末梢ムスカリン作用（例えば、徐脈および過剰な分泌）を防御する。₃₀

【 0 1 2 0 】

グリコピロレートは、迅速な抗コリン作動的効果が望ましい場合、または経口投薬に耐容性がない場合に、消化性潰瘍の処置の補助的治療として成人で使用されるために、消化性潰瘍に適用される。

【 0 1 2 1 】

麻酔では、グリコピロレート注射は、唾液、気管気管支、および咽頭の分泌物を減少させるため、そして；胃内分泌物の酸性度を低下させるために、術前薬として使用することができる。₄₀ 神経筋阻害拮抗薬ネオスチグミンとも一体化させて用いられ、ネオスチグミンのムスカリン性効果、例えば徐脈を予防する。それは、過剰な唾液（流涎症）を減少させるのにも用いられる。それは、胃内の酸分泌を減少させ、それにより他の薬品との併用で胃潰瘍を処置するのに用いてもよい。喘息およびCOPDの処置における使用が、記載された。それは、多汗を処置するのに局所的または経口的に用いられてきた。

【 0 1 2 2 】

しかしグリコピロレートは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【 0 1 2 3 】

グラニセトロン（グラニセトロン塩酸塩）、抗嘔吐および鎮吐薬。化学的にはそれは、エンド - N - (9 - メチル - 9 - アザビシクロ [3 . 3 . 1] ノン - 3 - イル) - 1 - メ₅₀

チル - 1 H - インダゾール - 3 - カルボキサミド塩酸塩であり、分子量は 348.9 (遊離塩基 312.4) である。その経験式は、 $C_{18}H_{24}N_4O \cdot HCl$ である。

【0124】

グラニセトロン[®]の適応症：グラニセトロン塩酸塩は、高用量シスプラチンをはじめとする催嘔吐性癌治療の初回および反復コースに関連する悪心および嘔吐の予防に用いられる。化学療法により誘発される悪心および嘔吐。5-HT₃受容体アンタゴニストは、化学療法による悪心および嘔吐を処置および予防するのに用いられる主要な薬物である。処置を開始する前に、それを約30分間にわたり何回も静脈投与する。術後および放射線照射後の悪心および嘔吐。急性もしくは慢性の医学的疾患または急性胃腸炎による悪心および嘔吐のための可能な治療である。有効性を確認する正式な治験は行われていないが、周期性嘔吐症候群の処置。全身放射線照射および分割腹部放射線照射をはじめとする放射線照射に関連する悪心および嘔吐。

10

【0125】

しかしグラニセトロンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【0126】

メマンチンは、経口活性NMDA受容体アンタゴニストである。メマンチン塩酸塩の化学名は、1 - アミノ - 3, 5 - ジメチルアダマンタン塩酸塩である。

【0127】

メマンチン塩酸塩は、軽度～重度のアルツハイマー型認知症の処置に適用される。メマンチンは、全般性不安障害、てんかん、オピオイド依存、全身性エリテマトーデス、うつ病、強迫性障害、トゥレット症候群、ギャンブル依存症、注意欠陥多動性障害 (ADHD)、緑内障、耳鳴り、複合性局所疼痛症候群をはじめとする神経因性疼痛、広汎性発達障害、HIV関連の認知症、眼振とう、多発性硬化症および自閉症に関しても検査されている。

20

【0128】

しかしメマンチンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【0129】

ニモジピンは、カルシウムチャネルブロッカーとして公知の薬理作用物質の分類に属する。ニモジピンは、イソプロピル 2 - メトキシエチル 1, 4 - ジヒドロ - 2, 6 - ジメチル - 4 - (m - ニトロフェニル) - 3, 5 - ピリジンジカルボキシレートである。それは、分子量 418.5 および分子式 $C_{21}H_{26}N_2O_7$ を有する。

30

【0130】

ニモジピンは、発作後の神経状態に関わらず、頭蓋内イチゴ状動脈瘤破裂によりくも膜下出血 (即ち、ハント・アンド・ヘス分類のグレード I ~ V) を起こした患者の虚血障害の発生および重症度を低下させることによる、神経学的転帰の改善に適用される。

【0131】

ニモジピンの主な使用は、特に発作後の神経状態に関わらず、頭蓋内イチゴ状動脈瘤破裂による、脳血管けいれんおよびその結果である虚血、クモ膜下出血 (脳出血の一形態) の合併の予防である。その投与をクモ膜下出血の4日以内に開始して、3週間継続する。血圧が5%を超えて降下した場合には、投薬を適合させる。ニモジピンは現在は頭部損傷には用いられていないが、臨床試験では有望であると示されている。2009年の試験 (Aslan A et al., February 2009

40

Pharmacol. Res. 59 (2):

120 - 4) では、標準手順により末梢静脈注射を介してニモジピンを投与された重度頭部損傷患者が、有意に高い脳灌流圧およびおよび頸静脈酸素飽和量を有するが、頭蓋内圧、頸静脈内乳酸および頸静脈グルコース量が減少することが見出された。その試験では、グラスゴー転帰尺度の値がより高くなり、脳代謝が改善したと結論づけられた。

【0132】

しかしニモジピンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【0133】

50

アムロジピン（ベシル酸アムロジピン）は、化学的には 3 - エチル - 5 - メチル（±） - 2 - [（2 - アミノエトキシ）メチル] - 4 - （2 - クロロフェニル） - 1，4 - ジヒドロ - 6 - メチル - 3，5 - ピリジンジカルボキシラートモノベンゼンスルホナートとして記載されている。その経験式は、 $C_{20}H_{25}ClN_2O_5 \cdot C_6H_6O_3S$ である。
【0134】

アムロジピン塩基（ベシル酸塩、メシル酸塩またはマレイン酸塩として）は、血圧降下薬として、そして狭心症の処置に用いられる、長期作用性カルシウムチャネルブロッカー（ジヒドロピリジン系）である。他のカルシウムチャネルブロッカーと同様に、アムロジピンは、動脈壁の平滑筋を弛緩させ、全末梢抵抗を低下させ、それにより血圧を低下させることにより作用する。

10

【0135】

アムロジピンは、高血圧の処置に適用される。それは、単独で、または他の血圧降下剤と併用して用いてもよい。それは、冠動脈疾患（CAD）にも適用される。アムロジピンは、慢性安定狭心症の対処療法に適用される。アムロジピンは、単独で、または他の抗狭心症薬と併用して用いてもよい。

【0136】

アムロジピンは、確認された冠れん縮性狭心症、または冠れん縮性狭心症の疑い例の処置にも適用される。アムロジピンは、単独療法で、または他の抗狭心症薬と併用して用いてもよい。

【0137】

血管造影法により冠動脈疾患（CAD）と近年に診断され、心不全でなく駆出率が 40 % 未満でない患者では、アムロジピンは、狭心症による入院のリスクを低下させ、そして冠血行再建のリスクを低下させるために適用される。

20

【0138】

しかしアムロジピンは、皮膚科学の分野での使用は、未だ研究されていない。

【0139】

一実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび組成物は、FLG ファミリー物質に関連する疾患または障害を予防または処置するのに用いられる。アンチセンス化合物を用いて得られる幹細胞から再生される細胞／組織で処置されうる例示的なフィラグリン（FLG）介在疾患および障害としては、FLG の異常機能および／または発現に関連する疾患または障害、皮膚疾患または障害、皮膚老化の徴候、外部攻撃により誘発された皮膚状態、アレルギー、乾癬、喘息、湿疹、枯草熱、尋常性魚鱗癬、アトピー性皮膚炎（AD）、ヘルペス性湿疹、関節リウマチ、心臓血管疾患または障害、癌、炎症性疾患、免疫を介した疾患または障害、高免疫または低免疫疾患または障害、自己免疫疾患または障害、喘息、乾癬、アレルギー（例えば、アレルギー性鼻炎、接触型アレルギー、食物アレルギーなど）、セリアック病、神経性疾患または障害、神経変性疾患または障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ALS など）、AIDS 消耗症、皮膚のバリア機能に関連する疾患または障害、慢性炎症性皮膚疾患、臨床的乾燥肌を含む。

30

【0140】

一実施形態において、本発明の 1 種以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび／または組成物による FLG の調整は、それを必要とする患者に施され、正常な対象に比較して、FLG の異常な発現、機能、活性に関連する任意の疾患または障害を予防または処置する。

40

【0141】

一実施形態において、本発明の組成物は、フィラグリン（FLG）ポリヌクレオチド 1 種以上に特異的なオリゴヌクレオチド 1 種以上を含み、前記ポリヌクレオチドは、アンチセンス配列、相補配列、対立遺伝子、相同体、アイソフォーム、変異体、誘導体、突然変異体、フラグメント、またはそれらの組み合わせを含む。

【0142】

一実施形態において、本発明の組成物は、フィラグリン（FLG）ポリヌクレオチド 1

50

種以上に特異的なオリゴヌクレオチド 1 種以上と、F L G 調整分子 1 種以上とを含み、前記ポリヌクレオチドは、アンチセンス配列、相補配列、対立遺伝子、相同体、アイソフォーム、変異体、誘導体、突然変異体、フラグメント、またはそれらの組み合わせを含む。

【 0 1 4 3 】

本発明の一実施形態は、分子がピオグリタゾン、ロメリジン、ブプロピオン、フェンプロバメート、ベニジピン、ピロキシカム、トピラマート、イスラジピン、ニコランジル、ピリベジル、オキサプロジン、グリコピロレート、グラニセトロン、メマンチン、ニモジピンおよびアムロジピンの群から選択される、組成物を提供する。

【 0 1 4 4 】

本発明の一実施形態は、皮膚疾患または障害の処置に用いられ、1 種以上の F L G 調整分子および薬学的に許容しうる担体を含む組成物を提供する。

10

【 0 1 4 5 】

本発明の一実施形態は、化合物がピオグリタゾン、ロメリジン、ブプロピオン、フェンプロバメート、ベニジピン、ピロキシカム、トピラマート、イスラジピン、ニコランジル、ピリベジル、オキサプロジン、グリコピロレート、グラニセトロン、メマンチン、ニモジピンおよびアムロジピンの群から選択される、組成物を提供する。

【 0 1 4 6 】

本発明の一実施形態は、F L G の発現または活性を調整するアンチセンスオリゴヌクレオチドを更に含む組成物を提供する。

【 0 1 4 7 】

20

本発明の一実施形態は、組成物がフィラグリンの天然アンチセンス配列のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを更に 1 種含み、該アンチセンスオリゴヌクレオチドが対象における F L G 発現を調整する、組成物を提供する。

【 0 1 4 8 】

本発明の一実施形態は、オリゴヌクレオチドが配列番号 3 ~ 1 3 に示されたヌクレオチド配列を含む、組成物を提供する。

【 0 1 4 9 】

本発明の一実施形態は、配列番号 3 ~ 1 3 に示されたオリゴヌクレオチドが修飾または置換を 1 個以上含む、組成物を提供する。

【 0 1 5 0 】

30

本発明の一実施形態は、1 種以上の F L G 調整分子および薬学的に許容しうる担体を含む組成物を、対象に投与することを含む、対象における F L G 関連疾患または障害を処置する方法を提供する。

【 0 1 5 1 】

本発明の一実施形態は、化合物がピオグリタゾン、ロメリジン、ブプロピオン、フェンプロバメート、ベニジピン、ピロキシカム、トピラマート、イスラジピン、ニコランジル、ピリベジル、オキサプロジン、グリコピロレート、グラニセトロン、メマンチン、ニモジピンおよびアムロジピンからなる群より選択される、方法を提供する。

【 0 1 5 2 】

本発明の一実施形態は、組成物が F L G の発現または活性を調整するアンチセンスオリゴヌクレオチドを更に含む、方法を提供する。

40

【 0 1 5 3 】

本発明の一実施形態は、組成物がフィラグリンの天然アンチセンス配列のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを更に 1 種含み、該アンチセンスオリゴヌクレオチドが対象における F L G 発現を調整する、方法を提供する。

【 0 1 5 4 】

本発明の一実施形態は、少なくとも 1 種のフィラグリンポリヌクレオチドに関連する疾患が、皮膚疾患または障害、皮膚老化の徴候、外部攻撃により誘発された皮膚状態、アレルギー、乾癬、喘息、湿疹、枯草熱、尋常性魚鱗癬、アトピー性皮膚炎 (A D)、ヘルペス性湿疹、関節リウマチ、心臓血管疾患または障害、癌、炎症性疾患、免疫を介した疾患

50

または障害、高免疫または低免疫疾患または障害、自己免疫疾患または障害、喘息、乾癬、アレルギー（例えば、アレルギー性鼻炎、接触型アレルギー、食物アレルギーなど）、セリアック病、神経性疾患または障害、神経変性疾患または障害（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ALSなど）、AIDS消耗症、皮膚のバリア機能に関連する疾患または障害、慢性炎症性皮膚疾患、臨床的乾燥肌から選択される、方法を提供する。

【0155】

本発明の一実施形態は、皮膚状態を有する患者または皮膚状態を発生するリスクを有する患者に、治療有効量のフィラグリンをアップレギュレートする化合物、つまり前記少なくとも1種のフィラグリン（FLG）ポリヌクレオチドの天然アンチセンス配列に結合し、前記少なくとも1種のフィラグリン（FLG）ポリヌクレオチドの発現を調整する少なくとも1種のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、薬学的に許容しうる担体とを投与し、それにより少なくとも1種のフィラグリン（FLG）ポリヌクレオチドおよび/またはその少なくとも1種のコード化生成物に関連する皮膚状態を予防または処置することを含む、少なくとも1種のフィラグリン（FLG）ポリヌクレオチドおよび/またはその少なくとも1種のコード化生成物に関連する皮膚状態を予防または処置する方法を提供する。

10

【0156】

本発明の一実施形態は、化合物がピオグリタゾン、ロメリジン、ブプロピオン、フェンプロバメート、ベニジピン、ピロキシカム、トピラマート、イスラジピン、ニコランジル、ピリベジル、オキサプロジン、グリコピロレート、グラニセトロン、メマンチン、ニモジピンおよびアムロジピンからなる群より選択される、方法を提供する。

20

【0157】

本発明の一実施形態は、皮膚状態が炎症、日光障害または老化により誘発される、方法を提供する。

【0158】

本発明の一実施形態は、皮膚状態がしわ、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、日光性角化症、角化障害、表皮水疱症、剥脱性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、紅疹、円板性エリテマトーデス、皮膚筋炎、皮膚癌、または自然な老化作用の発生である、方法を提供する。

【0159】

本発明の一実施形態は、皮膚疾患または障害の処置のために薬品の製造における、請求項30記載の組成物の使用を提供する。

30

【0160】

本発明の一実施形態は、組成物がFLG発現または活性を調整するアンチセンスオリゴヌクレオチドを更に含む、使用を提供する。

【0161】

本発明の一実施形態は、組成物がフィラグリンの天然アンチセンス配列のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを更に1種含み、アンチセンスオリゴヌクレオチドが対象におけるFLG発現を調整する、使用を提供する。

【0162】

本発明の一実施形態は、化合物がピオグリタゾン、ロメリジン、ブプロピオン、フェンプロバメート、ベニジピン、ピロキシカム、トピラマート、イスラジピン、ニコランジル、ピリベジル、オキサプロジン、グリコピロレート、グラニセトロン、メマンチン、ニモジピンおよびアムロジピンからなる群より選択される、使用を提供する。

40

【0163】

本発明の一実施形態は、皮膚疾患または障害がしわ、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、日光性角化症、角化障害、表皮水疱症、剥脱性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、紅疹、円板性エリテマトーデス、皮膚筋炎、皮膚癌、または自然な老化作用の発生である、使用を提供する。

【0164】

本発明の一実施形態において、治療および/または化粧用レジメン、ならびに関連のオーダーメイド処置（related tailored treatments）は、皮

50

膚処置を必要とする対象、または皮膚処置を必要とする状態を発生するリスクのある対象に提供する。例えば、対象のFLG状態に基づいて、診断を行うことができる。所定の組織、例えば皮膚における患者のFLG発現レベルは、当業者に公知の方法、および本明細書の他の部分に記載された方法により、例えばPCRまたは抗体を基にした検出法を利用して組織を分析することにより、決定することができる。

【0165】

本発明の好ましい実施形態は、例えば皮膚内でのFLG発現を調整するための、本発明の化合物を含む皮膚処置および/または化粧用適用のための組成物を提供する。一実施形態において、細胞の寿命を増加させる、またはアポトーシスを予防するための本発明の化合物による局所処置。例えば皮膚は、本明細書に記載された通り、皮膚、例えば上皮細胞を処置することにより、老化、例えばしわの発生を防御することができる。例示的な実施例において、皮膚を本発明の医薬または化粧用組成物と接触させる。例示的な皮膚問題または皮膚状態としては、炎症、日光障害または自然な老化に関連する、またはそれより誘発される障害または疾患が挙げられる。例えば該組成物は、接触皮膚炎（刺激性接触皮膚炎およびアレルギー性接触皮膚炎を含む）、アトピー性皮膚炎（アレルギー性湿疹としても公知である）、日光性角化症、角化障害（湿疹を含む）、表皮水疱症（天疱瘡を含む）、剥脱性皮膚炎、脂漏性皮膚炎、紅疹（多形性紅斑および結節性紅斑を含む）、日光または他の光源により誘発される障害、円板性エリテマトーデス、皮膚筋炎、皮膚癌、および自然な老化作用の予防または処置において利用を見出す。

【0166】

本発明の一実施形態において、該組成物は、局所薬物投与に概ね適した局所担体を含み、当該技術分野で公知の任意のそのような材料を含む局所配合剤に組み込まれる。局所担体は、所望の形態、例えば、軟膏、ローション、クリーム、マイクロエマルジョン、ゲル、オイルなどとしての組成物を提供するように選択してもよく、天然由来または合成供給源の材料で構成されていてもよい。選択された担体が局所配合剤の活性剤または他の成分に有害な影響を及ぼさないことが好ましい。本明細書において用いられる適切な局所担体の例としては、水、アルコール、および他の非毒性有機溶媒、グリセリン、鉱物油、シリコン、ワセリン、ラノリン、脂肪酸、植物油、パラベン、ワックスなどが挙げられる。配合剤は、無色、無臭の軟膏、ローション、クリーム、マイクロエマルジョンおよびゲルであってもよい。

【0167】

本発明の組成物は、軟膏に組み入れてもよく、それは一般に半固形調製剤であり、典型的にはワセリンまたはワセリン誘導体を基剤とする。当業者に理解されるであろうが、用いられる特定の軟膏基剤は、最適な薬物送達を提供するもの、好ましくは他の所望の特徴、例えば柔軟性なども提供するものである。他の担体またはビヒクルと同様に、軟膏基剤は、不活性、安定性、非刺激性で、かつ非過敏化でなければならない。Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co.)に説明される通り、軟膏基剤は、油質基剤、乳化可能な基剤、エマルジョン基剤、および水溶性基剤、の4分類に分別することができる。油質の軟膏基剤としては、例えば、植物油、動物から得られる脂肪、および石油から得られる半固形炭化水素が挙げられる。吸収性軟膏基剤としても公知の乳化可能な軟膏基剤は、水をほとんど、または全く含まず、例えば、ヒドロキシステアリン硫酸、無水ラノリンおよび親水性ワセリンが挙げられる。エマルジョン軟膏基剤は、油中水(W/O)エマルジョンまたは水中油(O/W)エマルジョンのいずれかであり、例えば、セチルアルコール、グリセリルモノステアリン酸、ラノリンおよびステアリン酸が挙げられる。例示的な水溶性軟膏基剤は、様々な分子量のポリエチレングリコール(PEG)から調製される(例えば、上記のRemingtonの文献を参照)。

【0168】

本発明の組成物は、ローションに組み入れてもよく、それは一般に、摩擦を伴わずに皮膚表面に適用される調製剤であり、典型的には液体または半液体調製剤であり、活性剤を含む固体粒子が水またはアルコール基剤中に存在する。ローションは通常、固体の懸濁液

であり、水中油型の液体油状エマルジョンを含んでいてもよい。ローションは、より流動性の組成物を適用するのが容易であるため、身体の高い面積を処置するのに好ましい配合剤である。一般に、ローション中の不溶性材料を粒子化することが、必要となる。ローションは、典型的には良好な分散体、および皮膚と接触する活性剤を静置して保持するのに有用な化合物、例えばメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどを生成する懸濁剤を含むことになる。本発明の方法と組み合わせて使用されるローション配合剤は、親水性ワセリン、例えば、Beiersdorf, Inc. (コネチカット州ノルフォーク)の商標Aquaphor (登録商標)として得ることができるものと混合されたプロピレングリコールを含む。

【0169】

本発明の組成物は、クリームに組み入れてもよく、それは一般に、粘液または半固体エマルジョンで、水中油または油中水のいずれかである。クリーム基剤は、水洗可能であり、油相、乳化剤および水相を含んでいる。油相は、一般にワセリンおよび脂肪アルコール、例えばセチルまたはステアリルアルコールで構成され、水相は、必ずではないが通常は、油相の容量を超えており、一般に湿潤剤を含む。クリーム配合剤中の乳化剤は、上記のRemintonの文献に説明された通り、一般に非イオン性、陰イオン性、陽イオン性または両性界面活性剤である。

【0170】

本発明の組成物は、マイクロエマルジョンに組み入れてもよく、それは一般に、熱力学的に安定していて等方的に透明な、2種の非混和性液体、例えば油と水との分散体であり、界面活性剤分子の界面薄膜により安定化されている (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (New York: Marcel Dekker, 1992), volume 9)。マイクロエマルジョンの調製には、界面活性剤 (乳化剤)、共界面活性剤 (共乳化剤)、油相および水相が必要である。適切な界面活性剤としては、エマルジョン、例えばクリームの調製に典型的に用いられる乳化剤の調製において有用な任意の界面活性剤が挙げられる。共界面活性剤 (または共乳化剤) は、一般にポリグリセロール誘導体、グリセロール誘導体および脂肪アルコールからなる群より選択される。好ましい乳化剤 / 共乳化剤混合物は、必ずではないが一般には、モノステアリン酸グリセリルとステアリン酸ポリオキシエチレン; ポリエチレングリコールとパルミトステアリン酸エチレングリコール、ならびにカプリル酸およびカプリン酸トリグリセリドとオレイルマクロゴールグリセリドからなる群より選択される。水相は、水だけでなく、典型的には緩衝液、グルコース、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、好ましくは低分子量ポリエチレングリコール (例えば、PEG 300 および PEG 400)、および / またはグリセロールなどを含むが、油相は、一般には、例えば脂肪酸エステル、改質植物油、シリコン油、モノ -、ジ - およびトリグリセリドの混合物、PEG のモノ - およびジ - エステル (例えば、オレオイルマクロゴールグリセリド) などを含むであろう。

【0171】

本発明の組成物は、ゲル配合剤に組み入れてもよく、それは一般に、担体液全体に実質的に均一に分配された無機小粒子 (二相系) または有機大分子 (単相ゲル) のいずれかで構成された懸濁液からなる半固形系である。単相ゲルは、例えば、活性剤、担体液および適切なゲル化剤、例えばトラガカント (2 ~ 5%)、アルギン酸ナトリウム (2 ~ 10%)、ゼラチン (2 ~ 15%)、メチルセルロース (3 ~ 5%)、カルボキシメチルセルロースナトリウム (2 ~ 5%)、カルボマー (0.3 ~ 5%) またはポリビニルアルコール (10 ~ 20%) を一緒に混和し、特徴的な反固体生成物が生成するまで混合することにより生成することができる。他の適切なゲル化剤としては、メチルヒドロキシセルロース、ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレン、ヒドロキシエチルセルロースおよびゼラチンが挙げられる。ゲルは一般に水性担体液を用いるが、アルコールおよび油も担体液として用いることができる。

【0172】

当業者に公知の様々な添加剤を配合剤、例えば局所配合剤に含ませてもよい。添加剤の

10

20

30

40

50

例としては、非限定的に、可溶化剤、皮膚透過促進剤、乳白剤、防腐剤（例えば、抗酸化剤）、ゲル化剤、緩衝剤、界面活性剤（詳細には非イオン性および両性界面活性剤）、乳化剤、保湿剤、増粘剤、安定化剤、湿潤剤、着色剤、香料などが挙げられる。可溶化剤および／または皮膚透過促進剤を、乳化剤、保湿剤および防腐剤と共に含めることが、特に好ましい。最適な局所配合剤は、可溶化剤および／または皮膚透過促進剤をおよそ2重量％～60重量％、好ましくは2重量％～50重量％；乳化剤を2重量％～50重量％、好ましくは2重量％～20重量％、保湿剤を2重量％～20重量％、ならびに防腐剤を0.01重量％～0.2重量％含み、活性剤および担体（例えば、水）が、配合剤の残り部分を構成する。

【0173】

皮膚透過促進剤は、治療的レベルの活性剤の通過を容易にして、合理的サイズの破壊されていない皮膚の領域を通過させる働きがある。適切な促進剤は、当該技術分野で周知であり、例えば、低級アルカノール、例えばメタノール、エタノールおよび2-プロパノール；アルキルメチルスルホキシド、例えばジメチルスルホキシド（DMSO）、デシルメチルスルホキシド（C₁₀MSO）およびテトラデシルメチルスルホキシド；ピロリドン、例えば2-ピロリドン、N-メチル-2-ピロリドンおよびN-（-ヒドロキシメチル）ピロリドン；尿素；N,N-ジエチル-m-トルアミド；C₂～C₆アルカンジオール；非混和性溶媒、例えばジメチルホルムアミド（DMF）、N,N-ジメチルアセトアミド（DMA）およびテトラヒドロフルフリルアルコール；ならびに1-置換アザシクロヘプタン-2-オン、詳細には1-n-ドデシルシクラザシクロヘプタン-2-オン（ラウロカプラン；バージニア州リッチモンドのWhitby Research Incorporated, から販売される商標Azona（登録商標）として入手）が挙げられる。

【0174】

可溶化剤の例としては、非限定的に、以下のものが挙げられる：親水性エーテル、例えばジエチレングリコールモノエチルエーテル（エトキシジグリコール、Transcutol（登録商標）として市販される）およびジエチレングリコールモノエチルエーテルオレアートSoficutol（登録商標）として市販される）；ポリエチレンひまし油誘導体、例えばポリオキシ35ひまし油、ポリオキシ40水添ひまし油など；ポリエチレングリコール、詳細には低分子量ポリエチレングリコール、例えばPEG300およびPEG400、ならびにポリエチレングリコール誘導体、例えばPEG-8カプリル酸／カプリン酸グリセリド（Labrasol（登録商標）として市販される）；アルキルメチルスルホキシド、例えばDMSO；ピロリドン、例えば2-ピロリドンおよびN-メチル-2-ピロリドン；ならびにDMA。多くの可溶化剤は、吸収促進剤として作用することもできる。単一の可溶化剤を配合剤に組み入れてもよく、または可溶化剤の混合物をそれに組み入れてもよい。

【0175】

適切な乳化剤および共乳化剤としては、非限定的に、マイクロエマルジョン配合剤に関連して記載されたそれらの乳化剤および共乳化剤が挙げられる。保湿剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、グリセロール、イソプロピルミチスタート、ポリプロピレングリコール-2（PPG-2）ミリスチルエーテルプロピオナートなどが挙げられる。

【0176】

他の活性剤、例えば、非限定的にアントラニラート、ベンゾフェノン（詳細にはベンゾフェノン-3）、ショウノウ誘導体、シンナマート（例えば、オクチルメトキシシンナマート）、ジベンゾイルメタン（例えば、ブチルメトキシジベンゾイルメタン）、p-アミノ安息香酸（PABA）およびその誘導体、ならびにサリチラート（例えば、オクチルサリチラート）をはじめとする、日焼け防止配合剤中に一般に見出される他の抗炎症薬、鎮痛薬、抗菌剤、抗真菌剤、抗生物質、ビタミン、抗酸化剤、および日焼け止め剤が、配合剤に含まれていてもよい。

【0177】

本発明による組成物は、最も注目すべきは皮膚、粘膜、および／または半粘膜（semi-mucous membranes）へ使用される化粧品または医薬組成物として適用することができる。該組成物は、皮膚保護および／もしくはスキンケア製品として、またはしわ防止および／もしくは老化防止組成物として適用することができる。我々は、例えば他の活性剤との、混和組成物の領域に他の適用を想起することもできる。我々は、身体および髪のために化粧品組成物中で本発明による化合物を使用することもできる。

【0178】

その上、先に定義されたような本発明による化合物は、皮膚細胞の代謝機能を刺激する。それらは、タンパク質合成を増加させるが、それは、とりわけ細胞外マトリックスの構成タンパク質の合成を増加させることによるもので、その機能にとって肝要である。本発明による化合物、またはそれらを含む組成物は、こうして組織再生において正の作用を有する。本発明による化合物は、創傷治癒障害を処置するために特に効率的である。

10

【0179】

これまで定義されたFLGタンパク質の内因性合成を活性化させることを目的とする組成物は、局所使用のために医薬および／または化粧品組成物中で、またはそれを製造するために用いられる。それらは、より一般的な方法では、皮膚障害を処置するために用いられるであろう。

【0180】

その上、別の態様によれば、本発明によりこれまで定義された、皮膚細胞中のFLGタンパク質の内因性合成を活性化させることを目的とする化合物が、皮膚状態の処置のための薬品の製造に用いられる。本発明は、薬品としてのこれまで定義された化合物の使用にも関する。

20

【0181】

その上、別の態様によれば、本発明は、所望の作用を得るために、これまで定義されたような有効量の活性剤を皮膚表面に適用することからなるスキンケアならびに／またはヘアケアおよびネイルケア用の処置の化粧品工程に関する。該工程は、とりわけ、皮膚老化の徴候を治癒的および／または予防的手法で処置するために用いることができるが、外部攻撃、例えば照射、詳細にはUV照射の負の作用から皮膚および／もしくは髪および／もしくは爪を保護するため、または皮膚炎症および過敏症の徴候を抑制するために用いることもできる。

30

【0182】

本発明に関する化粧品処置の工程は、とりわけ、皮膚または髪のクリーム、ゲル、セラム、ローション、ミルク、シャンプー、および日光保護クリームの適用、ならびにガムに適用される歯磨きとしての適用など、組成物のために通常用いられる方法により先に定義された化粧品組成物を適用することにより、実行することができる。この化粧品処置工程の実施形態の特定の様式は、先行の説明からも得られる。

【0183】

本発明の化合物は、治療適用および非治療適用の両方に有用である。一実施形態において、本発明の化合物は、治療適用に用いられる。別の実施形態において、本発明の化合物は、非治療適用、例えば化粧品適用に用いられる。本発明の方法の治療適用は、医療的皮膚状態の原因を診断する手段を包含する。したがって、医療的皮膚状態の処置方法は、個体のフェのタイプを補足するように調整させることができる。本発明の方法の治療適用は、個体の皮膚が医薬調製剤、例えば局所投与される医薬調製剤に有害に反応する可能性があるかどうかを決定する手段も包含する。その場合、最大の治療利益を提供しながら個体の皮膚の状態への任意の不適当な作用を最小限に抑える、または回避するために、個体を特定の医薬調製剤に適合させることができる。

40

【0184】

本発明の方法の非治療適用は、薬剤、例えば、化粧品または体内に導入される任意の他の形態の調製剤の治験の目的で、個体を群分けする手段を包含する。これは、そのような

50

治験の間の異なる個体の皮膚反応が均一でない場合に、治験から得られる結果を解釈するのに有用となりうる。

【0185】

応答の不均一性は、皮膚状態の素因に従って個体を群分けまたは階層化することにより、より明確に解釈することができる。この方法を用いれば一部の個体での使用に適するが他には適さない薬物を開発することが可能となりうることを、当業者は理解するであろう。したがって、異なる個体で使用された場合に適切さを有する異なる薬剤を含む、薬剤の集合 (panel) を、構成させることができる。この治験に従い、そのような薬剤の使用を希望する個体が、本発明の方法を用いて、皮膚状態への自身の素因に基づいてどの薬剤が使用に最も適するかを決定することができる。つまり本発明の方法は、個体を、先に

10

【0186】

個体のプロフィラグリンジェノタイプを同定する方法は、個体の生体材料で実施される。好ましくは生体材料は、同定方法を実施する前に個体から取り出される。言い換えれば、典型的には生体材料は、エキスピボである。エキスピボ材料は、該方法を実施する前にインピトロで更に培養してもよい。

【0187】

エキスピボ試料は、身体の任意の部分から採取された組織または細胞を含んでいてもよい。好ましいエキスピボ試料は、循環器系から採取された材料、または体腔、例えば口腔から採取された材料を含む。特に好ましいエキスピボ試料は、唾液試料である。

20

【0188】

個体中に存在する対立遺伝子は、当該技術分野で公知の方法、例えばSchieおよびWilson (1997, Journal of Immunological Methods, 208, 91-101) に記載されたものを用いて、唾液試料から決定することができる。したがってエキスピボ試料は、特別な回収手段を必要とせずに個体により提供されてもよい。例えば唾液試料または口腔スワブは、検査前に、単に個体により提供させることができる。

【0189】

プロフィラグリン遺伝子およびタンパク質は、当該技術分野で周知であり、Gan他 (1990, Biochemistry, 29, 9432-9440) に記載されている。数多くのプロフィラグリン配列が、公的にアクセス可能なデータベースに保存された。プロフィラグリン遺伝子は、多数のフィラグリンリピート、通常は10、11または12リピートを含む。フィラグリンリピートは、典型的には互いに同一の長さ (972 bp、ヒトでは324 アミノ酸) であるが、これはmRNAの5' - および3' - 末端のフィラグリンリピートでは典型的により少ない。フィラグリンリピートは、同一の対立遺伝子上のリピート間で、そして異なる対立遺伝子間で、典型的には0 ~ 50%、より典型的には2 ~ 30%、より典型的には10 ~ 15%というかなりの配列変動性を示す可能性がある。通常、変動性は、単一塩基の変動に起因するが、電荷の変動を含む可能性がある (Gan et al (1990, Biochemistry, 29, 9432-9440))。ヒトフィラグリンリピートのアミノ酸のコンセンサス配列マップは、公知であり (Gan et al (1990) Biochemistry, 29, 9432-9440) 、好ましくはフィラグリンリピートは、そのコンセンサス配列またはGan他 (1990, Biochemistry, 29, 9432-9440) に示されたコンセンサス配列の変異体に対して、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは90%、更により好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するであろう。通常、アミノおよびカルボキシ末端をコードするアミノ酸配列は、遺伝子のコード部分に並んだ5' - および3' - DNA配列と同様に、より保存されている (Presland et al (1992) J Biol Chem, 267(33), 23772-23781) 。

30

40

【0190】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、FLGのポリヌクレオチドに特異的であり、非限定的に非コード領域を含む。FLGのターゲットは、FLGの変異体; SNPをはじめとするFLGの突然変異体; FLGの非コード配列; 対立遺伝子、フラグメントな

50

どを含む。好ましくはオリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNA分子である。

【0191】

本発明の実施形態によれば、ターゲット核酸分子は、FLGポリヌクレオチドのみに限定されず、FLGのアイソフォーム、受容体、相同体、非コード領域などのいずれにも及ぶ。

【0192】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、非限定的に、FLGのターゲットの変異体、対立遺伝子、相同体、突然変異体、誘導体、フラグメントおよび相補配列をはじめとする、FLGターゲットの天然アンチセンス配列（コードおよび非コード領域のための天然アンチセンス）をターゲットとする。好ましくはオリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNAまたはDNA分子である。

10

【0193】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は、異なる塩基が該化合物中の1ヶ所以上のヌクレオチド位置に存在する変異体も含む。例えば、第一のヌクレオチドがアデニンである場合、この位置にチミジン、グアノシン、シチジンまたは他の天然もしくは非天然ヌクレオチドを含む変異体が生成される可能性がある。これは、アンチセンス化合物の位置のいずれで実施してもよい。その後、本明細書に記載された方法を用いてこれらの化合物を検査して、ターゲット核酸の発現を阻害する能力を決定する。

【0194】

幾つかの実施形態において、アンチセンス化合物とターゲットの間の相同性、配列同一性または相補性は、約50%～約60%である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約60%～約70%である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約70%～約80%である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約80%～約90%である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約90%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%である。

20

【0195】

ターゲット核酸への化合物の結合がターゲット核酸の正常な機能と干渉して活性の損失を起こし、そして特異的結合が望ましい条件下でアンチセンス化合物の、非ターゲット核酸配列への非特異的結合が回避されるのに十分な相補性が存在する場合には、アンチセンス化合物は特異的にハイブリダイズすることが可能である。そのような条件は、即ち、インビボアッセイまたは治療的処置の場合の生理学的条件、およびインビトロアッセイの場合にはアッセイを実施する条件を包含する。

30

【0196】

ターゲットDNAまたはRNA分子への化合物の結合がターゲットDNAまたはRNAの正常な機能と干渉して有用性の損失を起こし、そして特異的結合が望ましい条件下、即ち、インビボアッセイまたは治療的処置の場合の生理学的条件、およびインビトロアッセイの場合にはアッセイを実施する条件下で、アンチセンス化合物の、非ターゲット核酸配列への非特異的結合が回避されるのに十分な相補性が存在する場合には、DNA、RNA、キメラ、置換などのいずれであれ、アンチセンス化合物は特異的にハイブリダイズすることが可能である。

40

【0197】

一実施形態において、非限定的に、例えばPCR、ハイブリダイゼーションなどを用いて同定および拡張されたアンチセンス配列、配列番号2に示された1種以上の配列などをはじめとするFLGのターゲティングは、FLGの発現または機能を調整する。一実施形態において、発現または機能は、対照と比較してアップレギュレートされている。一実施形態において、発現または機能は、対照と比較してダウンレギュレートされている。

【0198】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えばPCR、ハイブリダイゼーションなどを用いて同定および拡張されたアンチセンス配列をはじめとする配列番号3～13に

50

示された核酸配列を含む。これらのオリゴヌクレオチドは、1種以上の修飾ヌクレオチド、より短いまたは長いフラグメント、修飾された結合などを含むことができる。修飾された結合またはヌクレオチド間結合の例は、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアートなどを含む。一実施形態において、ヌクレオチドは、リン誘導体を含む。本発明の修飾オリゴヌクレオチド中の糖または糖類似部分に付加しうるリン誘導体（または修飾リン酸基）は、モノホスファート、ジホスファート、トリホスファート、アルキルホスファート、アルカンホスファート、ホスホロチオアートなどであってもよい。先に記録されたホスファート類似体の調製、ならびにヌクレオチド、修飾ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドへのそれらの組み入れ自体は、同じく公知であり、本明細書に記載する必要はない。

【0199】

10

アンチセンスの特異性および感受性も、治療的使用の当業者によって利用される。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物およびヒトにおける疾患状態の処置において治療的部分として用いられてきた。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトに安全および効果的に投与され、数多くの治験が目下、進行中である。こうして、オリゴヌクレオチドが細胞、組織および動物、特にヒトの処置のための処置レジメンに有用となるよう構成させることができる有用な治療モダリティとなりうることは、確立されている。

【0200】

本発明の一実施形態において、オリゴマーアンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドは、ターゲット核酸分子に結合して、ターゲット遺伝子によりコードされた分子の発現および/または機能を調整する。干渉されるDNAの機能は、例えば、複製および転写を含む。干渉されるRNAの機能は、生存機能の全て、例えば、タンパク質翻訳部位へのRNAのトランスロケーション、RNAからのタンパク質の翻訳、1種以上のmRNA類を得るためのRNAのスプライシング、およびRNAが携わる、またはRNAにより容易になる可能性がある触媒活性を含む。機能は、所望の機能に応じてアップレギュレートまたは阻害してもよい。

20

【0201】

アンチセンス化合物としては、アンチセンスオリゴマー化合物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、外部ガイド配列（EGS）オリゴヌクレオチド、選択的スプライサー、プライマー、プローブ、およびターゲット核酸の少なくとも一部にハイブリダイズする他のオリゴマー化合物が挙げられる。そのため、これらの化合物を、一本鎖、二本鎖、部分的一本鎖、または環状オリゴマー化合物の形態で導入してもよい。

30

【0202】

本発明の文脈において、特定の核酸分子に対するアンチセンス化合物のターゲティングは、多段階工程であってもよい。該工程は通常、ターゲット核酸を同定して機能が調整されることにより開始する。このターゲット核酸は、例えば、発現が特定の障害もしくは疾患状態に関連する細胞内遺伝子（または遺伝子から転写されたmRNA）、または感染物質からの核酸分子であってもよい。本発明において、ターゲット核酸は、フィラグリン（FLG）をコードする。

【0203】

ターゲティング工程は、通常、アンチセンス相互作用のためのターゲット核酸内の少なくとも1つのターゲット領域、セグメント、または部位を決定することで、所望の効果、例えば発現の調整が得られることも含む。本発明の文脈において、用語「領域」は、少なくとも1つの同定可能な構造、機能、または特徴を有するターゲット核酸の一部と定義される。ターゲット核酸の領域内に、セグメントが存在する。「セグメント」は、ターゲット核酸内の領域のより小さな部分、または副次的部分と定義される。本発明で用いられる「部位」は、ターゲット核酸内の位置と定義される。

40

【0204】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、フィラグリン（FLG）の天然アンチセンス配列に結合し、FLG（配列番号1）の発現および/または機能を調整する。アンチセンス配列の例としては、配列番号2～13が挙げられる。

50

【0205】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、フィラグリン（FLG）ポリヌクレオチドの1ヶ所以上のセグメントに結合し、FLGの発現および/または機能を調整する。該セグメントは、FLGセンスまたはアンチセンスポリヌクレオチドの少なくとも5個の連続するヌクレオチドを含む。

【0206】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、FLGの天然アンチセンス配列に特異的であり、そこではFLGの天然アンチセンス配列にオリゴヌクレオチドが結合して、FLGの発現および/または機能が調整される。

【0207】

一実施形態において、オリゴヌクレオチド化合物は、配列番号3～13に示された配列、例えばPCR、ハイブリダイゼーションなどを用いて同定および拡張されたアンチセンス配列を含む。これらのオリゴヌクレオチドは、1種以上の修飾ヌクレオチド、より短いまたは長いフラグメント、修飾された結合などを含むことができる。修飾された結合またはヌクレオチド間結合の例は、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアートなどを含む。一実施形態において、ヌクレオチドは、リン誘導体である。本発明の修飾オリゴヌクレオチド中の糖または糖類似部分に付加しうるリン誘導体（または修飾リン酸基）は、モノホスファート、ジホスファート、トリホスファート、アルキルホスファート、アルカンホスファート、ホスホロチオアートなどであってもよい。先に記録されたホスファート類似体の調製、ならびにヌクレオチド、修飾ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドへのそれらの組み入れ自体は、同じく公知であり、本明細書に記載する必要はない。

【0208】

当該技術分野で公知の通り、翻訳開始コドンは、典型的には5'-AUG（転写されたmRNA分子内；対応するmRNA分子内では5'-ATG）であるため、翻訳開始コドンは、「AUGコドン」、「開始コドン」または「AUG開始コドン」とも呼ばれる。少数の遺伝子は、RNA配列5'-GUG、5'-UUG、または5'-CUGを有する翻訳開始コドンを有し、5'-AUA、5'-ACGおよび5'-CUGは、インビボで機能することが示された。つまり用語「翻訳開始コドン」および「開始コドン」は、各例での開始アミノ酸が典型的にはメチオニン（真核生物では）またはホルミルメチオニン（原核生物では）であったとしても、多くのコドン配列を包含することができる。真核生物および原核生物の遺伝子は、2種以上の選択的開始コドンを有することができ、その任意の1種は、特定の細胞型もしくは組織内で、または特定の組み合わせの条件下で、翻訳開始に優先的に用いることができる。本発明の文脈において、「開始コドン」および「翻訳開始コドン」は、フィラグリンをコードする遺伝子から転写されたmRNAの翻訳を開始するためにインビボで用いられる1つまたは複数のコドンを指す。遺伝子の翻訳終止コドン（または「終結コドン」）は、これらの配列、即ち、5'-UAA、5'-UAGおよび5'-UGA（対応するDNA配列はそれぞれ5'-TAA、5'-TAGおよび5'-TGAである）のうちの1つを有する。

【0209】

用語「開始コドン領域」および「転写開始コドン領域」は、翻訳開始コドンからいずれかの方向（即ち、5'または3'）に約25～約50の連続ヌクレオチドを含むそのようなmRNAまたは遺伝子の一部を指す。同様に用語「終結コドン領域」および「翻訳終止コドン領域」は、翻訳終止コドンからいずれかの方向（即ち、5'または3'）に約25～約50の連続ヌクレオチドを含むそのようなmRNAまたは遺伝子の一部を指す。結果として、「開始コドン領域」（または「転写開始コドン領域」）および「終結コドン領域」（または「翻訳終止コドン領域」）は、本発明のアンチセンス化合物が効果的にターゲティングしうる全ての領域である。

【0210】

当該技術分野で公知であるオープンリーディングフレーム（ORF）または「コード領域」は、翻訳開始コドンと翻訳終止コドンの間の領域を指すことが当該技術分野で公知で

10

20

30

40

50

あり、効果的にターゲットとなりうる領域でもある。本発明の文脈において、ターゲットとなる領域は、遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）の翻訳開始または終止コドンを含む遺伝子内領域である。

【0211】

他のターゲット領域としては、翻訳開始コドンから5'方向に1つのmRNAの部分を目指すことが当該技術分野で公知であり、つまり、mRNA（または遺伝子上の対応するヌクレオチド）の5'キャップ部位と翻訳開始コドンの間のヌクレオチドを含む、5'非翻訳領域（5'UTR）が挙げられる。更に別のターゲット領域としては、翻訳終止コドンから3'方向に1つのmRNAの部分を目指すことが当該技術分野で公知であり、つまり、mRNA（または遺伝子上の対応するヌクレオチド）の翻訳終止コドンと3'-末端の間のヌクレオチドを含む、3'非翻訳領域（3'UTR）が挙げられる。mRNAの5'キャップ部位は、5'-5'三リン酸結合を介してmRNAの最も5'-側の残基に接続するN7-メチル化グアノシン残基を含む。mRNAの5'キャップ領域は、5'キャップ構造そのものに加え、キャップ部位に隣接する最初の50のヌクレオチドを含むと考えられる。本発明の別のターゲット領域は、5'キャップ領域である。

【0212】

幾つかの真核生物mRNAの転写産物は、直接翻訳されるが、多くは「イントロン」として知られる1つ以上の領域を含み、それが翻訳される前に転写産物から切除される。残された（そしてそのため翻訳された）領域は、「エクソン」として公知であり、一緒にスプライシングされて、連続mRNA配列を形成する。一実施形態において、スプライシング部位、即ちイントロン-エクソン・ジャンクションまたはエクソン-イントロン・ジャンクションをターゲティングすることが、異常スプライシングが疾患に関係する状況、または特定のスプライシング生成物の過剰生成が疾患に関係する状況では、特に有用となる。再編成または欠失による異常な融合ジャンクションが、ターゲット部位の別の実施形態である。異なる遺伝子供給源からの2個（またはそれ以上）のmRNAのスプライシング工程により生成されたmRNA転写産物は、「融合転写産物」として公知である。イントロンは、例えばDNAまたはプレ-mRNAをターゲットとするアンチセンス化合物を用いて効果的にターゲティングすることができる。

【0213】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ターゲットポリヌクレオチドのコードおよび/または非コード領域に結合して、ターゲット分子の発現および/または機能を調整する。

【0214】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然アンチセンスポリヌクレオチドに結合して、ターゲット分子の発現および/または機能を調整する。

【0215】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、センスポリヌクレオチドに結合して、ターゲット分子の発現および/または機能を調整する。

【0216】

代替的RNA転写産物を、DNAの同じゲノム領域から生成することができる。これらの代替的転写産物は、一般に「変異体」として公知である。より具体的には「プレ-mRNA変異体」は、開始または終止位置のいずれかにおいて同一ゲノムDNAから生成された他の転写産物とは異なる、同一ゲノムDNAから生成された転写産物であり、イントロン配列およびエクソン配列の両方を含む。

【0217】

1個以上のエクソン領域もしくはイントロン領域、またはスプライシング時のその部分を切除する際に、プレ-mRNAは、より小さな「mRNA変異体」を生成する。その結果、mRNA変異体は、処理されたプレ-mRNA変異体であり、独特の各プレ-mRNA変異体が、スプライシングの結果として独特のmRNA変異体を常に生成しなければならない。これらのmRNA変異体は、「選択的スプライシング変異体」としても公知であ

10

20

30

40

50

る。プレ - m R N A 変異体のスプライシングが起こらない場合には、プレ - m R N A 変異体は、m R N A 変異体と同一である。

【 0 2 1 8 】

転写を開始または終結させる代替的シグナルの使用を介して、変異体を生成させることができる。プレ - m R N A および m R N A は、開始コドンまたは終結コドンを 1 個を超えて有することができる。代替的開始コドンを使用するプレ - m R N A または m R N A を起源とする変異体は、プレ - m R N A または m R N A の「代替的開始変異体」として公知である。代替的終結コドンを用いるそれらの転写産物は、そのプレ - m R N A または m R N A の「代替的終結変異体」として公知である。代替的終結変異体の 1 つの特異的タイプが「ポリ A 変異体」であり、そこでは生成された複数の転写産物が、転写装置による「ポリ A 終結シグナル」の 1 つ代替的選択から得られ、それにより独特のポリ A 部位で終止する転写産物を生成する。本発明の文脈において、本明細書に記載された変異体のタイプも、ターゲット核酸の実施形態である。

10

【 0 2 1 9 】

アンチセンス化合物がハイブリダイズするターゲット核酸の位置は、活性アンチセンス化合物がターゲティングするターゲット領域の少なくとも 1 つの 5 - ヌクレオチド長部分として定義される。

【 0 2 2 0 】

特定の例示的ターゲットセグメントの特異的配列を本明細書に示しているが、これらが例示として示され、本発明の範囲内の特定の実施形態を記載していることは、当業者に認識されよう。追加的なターゲットセグメントは、本開示の観点では当業者により容易に同定可能である。

20

【 0 2 2 1 】

例示的な好ましいターゲットセグメント内から選択される少なくとも 5 個の連続するヌクレオチドのストレッチを含むヌクレオチド長 5 ~ 1 0 0 のターゲットセグメントも、ターゲティングに適していると見なされる。

【 0 2 2 2 】

ターゲットセグメントは、例示的な好ましいターゲットセグメントの 1 つの 5 ' - 末端から少なくとも 5 個の連続するヌクレオチドを含む DNA または RNA 配列を含むことができる（残りのヌクレオチドは、ターゲットセグメントの 5 ' - 末端の直ぐ上流で開始し、DNA または RNA が約 5 ~ 約 1 0 0 のヌクレオチドを含むまで連続する、同一 DNA または RNA の連続するストレッチである）。同様に好ましいターゲットセグメントは、例示的な好ましいターゲットセグメントの 1 つの 3 ' - 末端から少なくとも 5 個の連続するヌクレオチドを含む DNA または RNA 配列により表わされる（残りのヌクレオチドは、ターゲットセグメントの 3 ' - 末端の直ぐ下流で開始し、DNA または RNA が約 5 ~ 約 1 0 0 のヌクレオチドを含むまで連続する、同一 DNA または RNA の連続するストレッチである）。本明細書に例示されたターゲットセグメントを供給する当業者は、過度の実験を行わなくとも、更に好ましいターゲットセグメントを同定することができよう。

30

【 0 2 2 3 】

1 つ以上のターゲット領域、セグメントまたは部位が同定されたら、ターゲットに十分相補的である、即ち、十分に良好に、そして十分な特異性によってハイブリダイズして所望の効果を与える、アンチセンス化合物が選択される。

40

【 0 2 2 4 】

本発明の一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、特定のターゲットのアンチセンス鎖に結合する。該オリゴヌクレオチドは、少なくとも 5 ヌクレオチド長であり、合成することができる、そのため各オリゴヌクレオチドが重複配列をターゲティングすれば、オリゴヌクレオチドがターゲットポリヌクレオチドの全長を含むように合成される。ターゲットは、コード領域および非コード領域も含む。

【 0 2 2 5 】

50

一実施形態において、アンチセンスヌクレオチドにより特異的核酸をターゲットとすることが好ましい。アンチセンス化合物の特定核酸へのターゲティングは、多段階工程である。該工程は通常、核酸配列を同定して機能が調整されることにより開始する。これは例えば、発現が特定の障害もしくは疾患状態に関連する細胞内遺伝子（または該遺伝子から転写された mRNA）、または非コードポリヌクレオチド、例えば非コード RNA（ncRNA）であってもよい。

【0226】

RNA は、(1) タンパク質に翻訳されるメッセンジャー RNA（mRNA）、および (2) 非タンパク質コード RNA（ncRNA）に分類することができる。ncRNA は、マイクロ RNA と、アンチセンス転写産物と、高密度の終結コドンを含み、任意の広大な「オープンリーディングフレーム」を欠く他の転写単位（TU）と、を含む。多くの ncRNA は、タンパク質コード遺伝子座の 3' 非翻訳領域（3' UTR）の開始部位から出発するようである。ncRNA は多くはまれであり、FANTOM コンソーシアムにより配列決定された ncRNA の少なくとも半分は、ポリアデニル化されていないようである。ほとんどの研究者は、明白な理由で、処理されて細胞質に輸送されるポリアデニル化 mRNA に関心を向けてきた。近年になり、非ポリアデニル化核 RNA の組が非常に大きい可能性があること、そしてそのような転写産物の多くがいわゆる遺伝子間領域から生じることが示された。ncRNA が遺伝子発現を調節しうるメカニズムは、ターゲット転写産物との塩基対合によるものである。塩基対合により機能する RNA は、(1) 同一遺伝子位置であるが、作用する RNA に対して反対の鎖でコードされ、それによりターゲットへの完全な相補性を示すシスにコードされた RNA、および (2) 作用する RNA とは異なる染色体位置でコードされ、一般にターゲットと完全な塩基対合の可能性を示さないトランスにコードされた RNA、に群分けすることができる。

【0227】

理論に拘束されるのを望むものではないが、本明細書に記載されたアンチセンスオリゴヌクレオチドによるアンチセンスポリヌクレオチドの変動（perturbation）は、対応するセンスメッセンジャー RNA の発現を変化させることができる。しかしこの調節は、不一致的（アンチセンスノックダウンがメッセンジャー RNA の増加をもたらす）または一致的（アンチセンスノックダウンが付随的なメッセンジャー RNA の減少をもたらす）のいずれかの可能性がある。これらの場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンス転写産物の重複または非重複部分をターゲティングして、ノックダウンまたは捕捉をもたらす可能性がある。コードおよび非コードアンチセンスは、同一手法でターゲティングすることができ、そのいずれかの種類が、対応するセンス転写産物を一致的手法または不一致的手法のいずれかで調節することができる。ターゲットに対抗して使用される新規なオリゴヌクレオチドを同定するのに用いられる方策は、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるアンチセンス RNA 転写産物のノックダウン、または所望のターゲットを調整する任意の他の手段に基づくことができる。

【0228】

方策 1：不一致的調節の場合、アンチセンス転写産物をノックダウンすると、従来の（センス）遺伝子の発現が増加する。後期遺伝子が公知または推定の薬物ターゲットをコードするはずであり、そうすればアンチセンス相当物のノックダウンにより、おそらく受容体アゴニストまたは酵素刺激物質の作用を模倣することができる。

【0229】

方策 2：一致的調節の場合、アンチセンス転写産物およびセンス転写産物の両方を同時にノックダウンし、それにより従来の（センス）遺伝子発現の相乗的減少を実現することができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてノックダウンを実現する場合、この方策を利用して、センス転写産物をターゲットとする一方のアンチセンスオリゴヌクレオチドと、対応するアンチセンス転写産物のためのもう一方のアンチセンスオリゴヌクレオチドとを適用するか、または重複するセンス転写産物およびアンチセンス転写産物を同時にターゲティングする、単一のエネルギー的に対称なアンチセンスオリゴヌクレオ

チドを適用することができる。

【0230】

本発明によれば、アンチセンス化合物としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、外部ガイド配列 (EGS) オリゴヌクレオチド、siRNA化合物、一本鎖または二本鎖RNA干渉 (RNAi) 化合物、例えばsiRNA化合物、およびターゲット核酸の少なくとも一部にハイブリダイズしてその機能を調整する他のオリゴマー化合物が挙げられる。そのためそれらは、DNA、RNA、DNA様物質、RNA様物質、もしくはその混合物であってもよく、またはこれらの1種以上の模倣体であってもよい。これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、またはヘアピン型オリゴマー化合物であってもよく、構造要素、例えば内部もしくは末端バルジ、ミスマッチまたはループを含んでもよい。アンチセンス化合物は、日常的には直鎖状に調製されるが、接続させるか、さもなければ環状および/もしくは分枝状に調製することができる。アンチセンス化合物は、構造物、例えば全体としてもしくは部分的に二本鎖化合物を形成するためにハイブリダイズされた二本鎖、または完全もしくは部分的な二本鎖化合物のハイブリダイゼーションもしくは形成を可能にするために十分な自己相補性を有する一本鎖を含むことができる。その2本の鎖は、内部で結合して、遊離3'もしくは5'-末端を後に残すことができ、または連続ヘアピン構造もしくはループを形成させるように結合させることができる。ヘアピン構造は、5'または3'-末端のいずれかにオーバーハングを含むことで、一本鎖特性の延長を生成することができる。二本鎖化合物は、場合により、末端にオーバーハングを含むことができる。更なる修飾は、末端の一方、選択されたヌクレオチド位置、糖の位置またはヌクレオシド間結合の一方に付加された共役基を含むことができる。あるいは2本の鎖は、非核酸部分またはリンカー基を介して結合させることができる。1本のみの鎖から形成された場合、dsRNAは二重鎖を形成するように自身を折り畳む自己相補的ヘアピン型分子の形態をとることができる。つまりdsRNAは、完全または部分的に二本鎖になることができる。遺伝子発現の特異的調整は、トランスジェニック細胞系ではdsRNAヘアピンの安定発現により実現することができるが、幾つかの実施形態において、遺伝子発現または機能がアップレギュレートされる。2本の鎖、または二重鎖を形成するように自身を折り畳む自己相補的ヘアピン型分子の形態をとった一本鎖から形成された場合、その2本の鎖 (または一本鎖の二重鎖形成領域) は、ワトソン-クリック様式で塩基を対合する相補的RNA鎖である。

【0231】

本発明の化合物は、一旦、系に導入されると、1種以上の酵素または構造タンパク質の作用を誘発して、ターゲット核酸の切断もしくは他の修飾を実行してもよく、または占有率に基づくメカニズムを介して働いてもよい。一般に核酸 (オリゴヌクレオチドを含む) は、「DNA様物質」 (即ち、一般に1個以上の2'-デオキシ糖と、U塩基ではなくT塩基とを有する) または「RNA様物質」 (即ち、一般に1個以上の2'-ヒドロキシまたは2'-修飾糖と、T塩基ではなくU塩基とを有する) と記載してもよい。核酸のらせんは、1を超える型の構造、最も一般的にはA型およびB型を採用することができる。一般に、B型に類似した構造を有するオリゴヌクレオチドは、「DNA様物質」であり、A型に類似した構造を有するものは、「RNA様物質」であると考えられる。幾つかの (キメラ) 実施形態において、アンチセンス化合物は、A型領域およびB型領域の両方を含んでもよい。

【0232】

一実施形態において、所望のオリゴヌクレオチドまたはアンチセンス化合物は、アンチセンスRNA、アンチセンスDNA、キメラアンチセンスオリゴヌクレオチド、修飾された結合を含むアンチセンスオリゴヌクレオチド、干渉RNA (RNAi)、低分子干渉RNA (siRNA)、マイクロ干渉RNA (miRNA)、低分子一過性 (small temporal) RNA (stRNA)、または低分子ヘアピン型RNA (shRNA)、低分子RNA誘発遺伝子活性化 (RNAa)、低分子活性化RNA (saRNA)、またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも1種を含む。

【0233】

dsRNAは、遺伝子発現、つまり「低分子RNA誘発遺伝子活性化」またはRNAaと呼ばれてきたメカニズムを活性化することもできる。dsRNAがターゲットとする遺伝子プロモーターは、関連の遺伝子の強力な転写活性化を誘発する。RNAaは、「低分子活性化RNA」(saRNA)と呼ばれる合成dsRNAを用いてヒト細胞中で実証された。現在のところ、RNAaが他の器官で保存されるかは知られていない。

【0234】

低分子の二本鎖RNA(dsRNA)、例えば、低分子干渉RNA(siRNA)およびマイクロRNA(miRNA)は、RNA干渉(RNAi)として公知の進化的保存メカニズムの惹起物質であることが見出された。RNAiは、再構築クロマチンを介した遺伝子サイレンシングを不変的に誘導し、それにより転写を抑制して、相補的mRNAを分解するか、またはタンパク質の翻訳を遮断する。しかし、以下の実施例の区分に詳細に記載される例では、オリゴヌクレオチドは、フィラグリン(FLG)ポリヌクレオチドおよびそのコード化生成物の発現および/または機能を上昇させることが示された。dsRNAは、低分子活性化RNA(saRNA)として作用してもよい。理論に拘束されることを望むものではないが、saRNAは、遺伝子プロモーター中の配列をターゲティングすることにより、dsRNA誘発転写活性化(RNAa)と呼ばれる現象においてターゲット遺伝子発現を誘発する。

【0235】

更なる実施形態において、本明細書で同定された「好ましいターゲットセグメント」は、フィラグリン(FLG)ポリヌクレオチドの発現を調整する追加的化合物のためのスクリーニングに用いてもよい。「モジュレーター」は、FLGをコードする核酸分子の発現を減少または増加させるそれらの化合物であり、好ましいターゲットセグメントに相補的な5-ヌクレオチド部分を少なくとも1つ含む。スクリーニング方法は、FLGのセンスまたは天然アンチセンスポリヌクレオチドをコードする核酸分子の好ましいターゲットセグメントを、候補モジュレーター1種以上と接触させるステップ、およびFLGポリヌクレオチド、例えば配列番号3~13をコードする核酸分子の発現を減少または増加させる候補モジュレーターを1種以上選択するステップ、を含む。1種の候補モジュレーターまたは複数の候補モジュレーターが、FLGポリヌクレオチドをコードする核酸分子の発現を調整(例えば、減少または増加)することが可能であることが示されたら、モジュレーターをFLGポリヌクレオチドの機能の更なる研究試験に、または本発明による研究、診断もしくは治療薬としての使用のために用いてもよい。

【0236】

天然アンチセンス配列をターゲットとすることで、好ましくはターゲット遺伝子の機能を調整する。例えば、FLG遺伝子(例えば、アクセション番号NM_002016)。一実施形態において、ターゲットは、FLG遺伝子のアンチセンスポリヌクレオチドである。一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、FLGポリヌクレオチド(例えば、アクセション番号NM_002016)、その変異体、対立遺伝子、アイソフォーム、相同体、突然変異体、誘導體、フラグメントおよび相補配列のセンスオリゴヌクレオチドおよび/または天然アンチセンス配列をターゲットとする。好ましくはオリゴヌクレオチドは、アンチセンス分子であり、ターゲットは、アンチセンスおよび/またはセンスFLGポリヌクレオチドのコードおよび非コード領域を含む。

【0237】

本発明の好ましいターゲットセグメントを本発明の各相補的アンチセンス化合物と組み合わせ、安定化された二本鎖(二重鎖)オリゴヌクレオチドを形成してもよい。

【0238】

そのような二本鎖オリゴヌクレオチド分子は、ターゲット発現を調整し、アンチセンスメカニズムを介して翻訳だけでなくRNAプロセッシングも調節することが、当該技術分野で示された。その上、二本鎖部分は、化学修飾を受けていてもよい。例えばそのような二本鎖部分は、二重鎖のアンチセンス鎖によるターゲットへの古典的ハイブリダイゼーショ

ンでターゲットの酵素的分解が惹起されることにより、ターゲットを阻害することが示された。

【 0 2 3 9 】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、フィラグリン (F L G) ポリヌクレオチド (例えば、アクセション番号 NM_002016)、その変異体、対立遺伝子、アイソフォーム、相同体、突然変異体、誘導体、フラグメントおよび相補配列をターゲットとする。好ましくはオリゴヌクレオチドは、アンチセンス分子である。

【 0 2 4 0 】

本発明の実施形態によれば、ターゲット核酸分子は、F L G のみに限定されず、F L G 分子のアイソフォーム、受容体、相同体などのいずれにも及ぶ。

10

【 0 2 4 1 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、F L G ポリヌクレオチド、例えば、配列番号 2 として示されたポリヌクレオチド、ならびにその任意の変異体、対立遺伝子、相同体、突然変異体、誘導体、フラグメントおよび相補配列、の天然アンチセンス配列をターゲットとする。アンチセンスオリゴヌクレオチドの例は、配列番号 3 ~ 13 に示される。

【 0 2 4 2 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、非限定的に F L G ポリヌクレオチドに関連する非コードセンスおよび / またはアンチセンス配列をはじめとする、F L G アンチセンスの核酸配列に相補的であるか、またはそれに結合して、F L G 分子の発現および / または機能を調整する。

20

【 0 2 4 3 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 に示された F L G の天然アンチセンスの核酸配列に相補的であるか、またはそれに結合して、F L G 分子の発現および / または機能を調整する。

【 0 2 4 4 】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号 3 ~ 13 のうちの少なくとも 5 個の連続するヌクレオチドの配列を含み、F L G 分子の発現および / または機能を調整する。

【 0 2 4 5 】

ポリヌクレオチドは、そのファミリーメンバーを含む F L G、F L G の変異体、S N P を含む F L G の突然変異体、F L G の非コード配列、F L G の対立遺伝子、種変異体、フラグメントなどを含む。好ましくはオリゴヌクレオチドは、アンチセンス分子である。

30

【 0 2 4 6 】

一実施形態において、F L G ポリヌクレオチドをターゲットとするオリゴヌクレオチドは、アンチセンス RNA、干渉 RNA (R N A i)、低分子干渉 RNA (s i R N A)、マイクロ干渉 RNA (m i R N A)、低分子一過性 RNA (s t R N A)、低分子ヘアピン型 RNA (s h R N A)、低分子 RNA 誘発遺伝子活性化 (R N A a)、または低分子活性化 RNA (s a R N A) を含む。

【 0 2 4 7 】

一実施形態において、フィラグリン (F L G) ポリヌクレオチド、例えば配列番号 2 のターゲティングが、これらのターゲットの発現または機能を調整する。一実施形態において、発現または機能は、対照に比較してアップレギュレートされる。一実施形態において、発現または機能は、対照に比較してダウンレギュレートされる。

40

【 0 2 4 8 】

一実施形態において、アンチセンス化合物は、配列番号 3 ~ 13 に示された配列を含む。これらのオリゴヌクレオチドは、1 種以上の修飾ヌクレオチド、より短いまたは長いフラグメント、修飾された結合などを含むことができる。

【 0 2 4 9 】

一実施形態において、配列番号 3 ~ 13 は、1 個以上の L N A ヌクレオチドを含む。

【 0 2 5 0 】

50

所望のターゲット核酸の調整は、当業者に公知に複数の方法で実施することができる。例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA* など。酵素的核酸分子（例えば、リボザイム）は、様々な反応の1種以上を触媒することが可能な核酸であり、ヌクレオチド塩基配列に特異的な手法で他の別個の核酸分子を繰り返し切断する能力を含む。そのような酵素的核酸分子は、例えば任意のRNA転写産物を事実上ターゲットとするために用いることができる。

【0251】

それらの配列特異性により、トランス切断型の酵素的核酸分子は、ヒト疾患の治療薬として有望であることが示された（Usman & McSwiggen, (1995) *Ann. Rep. Med. Chem.* 30, 285-294; Christoffersen and Marr, (1995) *J. Med. Chem.* 38, 2023-2037）。酵素的核酸分子は、細胞内RNAのバックグランド内で特異的RNAターゲットを切断するように設計することができる。そのような切断事象により、mRNAが非機能的になり、そのRNAからタンパク質発現が消去される。この手法において、疾患状態に関連するタンパク質の合成を、選択的に阻害することができる。

【0252】

一般に、RNA切断活性を有する酵素的核酸は、最初にターゲットRNAへの結合により作用する。そのような結合は、ターゲットRNAを切断する作用のある分子の酵素的部分の付近に保持されている酵素的核酸のターゲット結合部分を介して起こる。つまり酵素的核酸は、最初にターゲットRNAを認識し、その後相補的塩基対合を介してそれに結合し、一旦、正しい部位に結合すると、ターゲットRNAを酵素的に切断する作用がある。そのようなターゲットRNAの戦略的切断は、コード化タンパク質の合成を指導する能力を破壊する。酵素的核酸が結合してRNAターゲットを切断した後、それはRNAから遊離されて別のターゲットについて調査し、繰返し、新しいターゲットと結合して、それを切断することができる。

【0253】

複数のアプローチ、例えばインビトロ選別（進化）戦略（Orgel, (1979) *Proc. R. Soc. London*, B 205, 435）を用いて、様々な反応、例えばホスホジエステル結合およびアミド結合の切断およびライゲーション、を触媒することが可能な新規の核酸触媒を発展させてきた。

【0254】

触媒活性に最適なりボザイムの開発は、遺伝子発現を調節する目的のRNA切断リボザイムを用いる任意の戦略に大きく貢献することになる。例えばハンマーヘッドリボザイムは、飽和濃度（10 mM）の Mg^{2+} コファクターの存在下で約1 / 分の触媒速度（*k_{cat}*）で機能する。人工的「RNAリガーゼ」リボザイムは、約100 / 分速度で対応する自己修飾反応を触媒することが示された。加えて、DNAで生成された基質結合アームを有する特定の修飾ハンマーヘッドリボザイムは、100 / 分に近似するマルチターンオーバー速度でRNA切断を触媒することが公知である。ハンマーヘッドの触媒コア内の特異的残基を特定のヌクレオチド類似体で置換すると、触媒速度が10倍もの高い改善を示す修飾リボザイムが与えられる。これらの知見により、リボザイムがほとんどの天然自己切断リボザイムによりインビトロで置換されたものよりも有意に大きな触媒速度で、化学変換を促進しうることが実証される。その後、特定の自己切断リボザイムの構造を最大触媒活性を与えるように最適化させうること、または全体としてRNAホスホジエステル切断の有意に速い速度を示す新規なRNAモチーフを製造しうることが可能である。

【0255】

「ハンマーヘッド」モデルに適合するRNA触媒によるRNA基質の分子間切断は、最初、1987年に示された（Uhlenbeck, O. C. (1987) *Nature*, 328: 596-600）。RNA触媒は再生され、複数のRNA分子と反応させて、それが実際に触媒的であることを実証した。

【0256】

「ハンマーヘッド」モチーフに基づいて設計された触媒RNAを用いて、触媒RNAの

中で適切な塩基を変換させてターゲット配列を有する必要な塩基対合を保持することにより、特異的ターゲット配列を切断した。これにより触媒RNAを使用して、特異的ターゲット配列を切断することが可能になり、「ハンマーヘッド」モデルに従って設計された触媒RNAがインビボで特異的基質RNAを切断する可能性があることが示される。

【0257】

RNA干渉(RNAi)は、哺乳類および哺乳類細胞における遺伝子発現を調整するための強力なツールとなった。このアプローチでは、発現プラスミドまたはウイルスと、siRNAにプロセシングされる低分子ヘアピン型RNAのコード配列とを用いて、低分子干渉RNA(siRNA)をRNA自身またはDNAのいずれかとして送達する必要がある。このシステムは、プレ-siRNAを細胞質に効率的に運搬することを可能にし、そこでsiRNAが活性となり、遺伝子発現のための調節された組織特異的プロモーターの使用が可能になる。

10

【0258】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドまたはアンチセンス化合物は、リボ核酸(RNA)および/もしくはデオキシリボ核酸(DNA)のオリゴマーもしくはポリマー、またはその模倣体、キメラ、類似体もしくは相同体を含む。この用語は、天然由来のヌクレオチド、糖および共有結合的ヌクレオシド間(バックボーン)結合で構成されたオリゴヌクレオチド、ならびに同様に機能する非天然由来部分を有するオリゴヌクレオチドを包含する。そのような修飾または置換オリゴヌクレオチドは、多くの場合、所望の性質、例えば細胞内取り込みの増加、ターゲット核酸へのアフィニティーの上昇およびヌクレアーゼの存在下での安定性の上昇などにより、ネイティブ形態よりも望ましい。

20

【0259】

本発明によれば、オリゴヌクレオチドまたは「アンチセンス化合物」としては、アンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、RNA、DNA、その模倣体、キメラ、類似体もしくは相同体)、リボザイム、外部ガイド配列(EGS)オリゴヌクレオチド、siRNA化合物、一本鎖または二本鎖RNA干渉(RNAi)化合物、例えばsiRNA化合物、saRNA、aRNA、およびターゲット核酸の少なくとも一部にハイブリダイズしてその機能を調整する他のオリゴマー化合物が挙げられる。そのためそれらは、DNA、RNA、DNA様物質、RNA様物質、もしくはその混合物であってもよく、またはこれらの1種以上の模倣体であってもよい。これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、またはヘアピン型オリゴマー化合物であってもよく、構造要素、例えば内部もしくは末端バルジ、ミスマッチまたはループを含んでいてもよい。アンチセンス化合物は、日常的には直鎖状に調製されるが、接続させるか、さもなければ環状および/もしくは分枝状に調製することができる。アンチセンス化合物は、構造物、例えば全体としてもしくは部分的に二本鎖化合物を形成するためにハイブリダイズされた二本鎖、または完全もしくは部分的な二本鎖化合物のハイブリダイゼーションもしくは形成を可能にするために十分な自己相補性を有する一本鎖を含むことができる。その2本の鎖は、内部で結合して、遊離3'もしくは5'-末端を残すことができ、または連続ヘアピン構造もしくはループを形成させるように結合させることができる。ヘアピン構造は、5'または3'-末端のいずれかにオーバーハングを含むことで、一本鎖特性の延長を生成することができる。二本鎖化合物は、場合により、末端にオーバーハングを含むことができる。更なる修飾は、末端の一方、選択されたヌクレオチド位置、糖の位置またはヌクレオシド間結合の一方に付加された共役基を含むことができる。あるいは2本の鎖は、非核酸部分またはリンカー基を介して結合させることができる。1本のみの鎖から形成された場合、dsRNAは二重鎖を形成するように自身を折り畳む自己相補的ヘアピン型分子の形態をとることができる。つまりdsRNAは、完全または部分的に二本鎖になることができる。遺伝子発現の特異的調整は、トランスジェニック細胞系ではdsRNAヘアピンの安定発現により実現することができる。2本の鎖、または二重鎖を形成するように自身を折り畳む自己相補的ヘアピン型分子の形態をとった一本鎖から形成された場合、その2本の鎖(または一本鎖の二重鎖形成領域)は、ワトソン-クリック様式で塩基を対合する相補的RNA鎖である。

30

40

50

【 0 2 6 0 】

本発明の化合物は、一旦、系に導入されると、1種以上の酵素または構造タンパク質の作用を誘発して、ターゲット核酸の切断もしくは他の修飾を実行してもよく、または占有率に基づくメカニズムを介して働いてもよい。一般に核酸（オリゴヌクレオチドを含む）は、「DNA様物質」（即ち、一般に1個以上の2'-デオキシ糖と、U塩基ではなくT塩基とを有する）または「RNA様物質」（即ち、一般に1個以上の2'-ヒドロキシまたは2'-修飾糖と、T塩基ではなくU塩基とを有する）と記載してもよい。核酸のらせんは、1を超える型の構造、最も一般的にはA型およびB型を採用することができる。一般に、B型に類似した構造を有するオリゴヌクレオチドは、「DNA様物質」であり、A型に類似した構造を有するものは、「RNA様物質」であると考えられる。幾つかの（キメラ）実施形態において、アンチセンス化合物は、A型領域およびB型領域の両方を含んでいてもよい。

10

【 0 2 6 1 】

本発明によるアンチセンス化合物は、約5～約80ヌクレオチド長（即ち、約5～約80の結合したヌクレオチド）のアンチセンス部分を含むことができる。これは、アンチセンス化合物のアンチセンス鎖または部分の長さを表す。言い換えれば、本発明の一本鎖アンチセンス化合物は、ヌクレオチドを5～約80個含み、本発明の二本鎖アンチセンス化合物（例えば、dsRNA）は、ヌクレオチド長5～約80のセンスおよびアンチセンス鎖または部分を含む。これがヌクレオチド長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、もしくは80、またはその中の任意の範囲のアンチセンス部分を含むことは、当業者に理解されよう。

20

【 0 2 6 2 】

一実施形態において、本発明のアンチセンス化合物は、ヌクレオチド長10～50のアンチセンス部分を有する。これがヌクレオチド長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もしくは50、またはその中の任意の範囲のアンチセンス部分を有するオリゴヌクレオチドを具体化していることは、当業者に理解されよう。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド長15である。

30

【 0 2 6 3 】

一実施形態において、本発明のアンチセンスまたはオリゴヌクレオチド化合物は、ヌクレオチド長12または13～30のアンチセンス部分を有する。これがヌクレオチド長12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29もしくは30、またはその中の任意の範囲のアンチセンス部分を有するオリゴヌクレオチドを具体化していることは、当業者に理解されよう。

40

【 0 2 6 4 】

一実施形態において、本発明のオリゴマー化合物は、化合物内のヌクレオチド位置1ヶ所以上に異なる塩基が存在する変異体も包含する。例えば最初のヌクレオチドがアデノシンである場合、この位置にチミジン、グアノシンまたはシチジンを含む変異体が生成される可能性がある。これは、アンチセンスまたはdsRNA化合物の位置のいずれでも実施される可能性がある。これらの化合物を、その後、本明細書に記載された方法を用いて検査して、ターゲット核酸の発現を阻害する能力を決定する。

【 0 2 6 5 】

幾つかの実施形態において、アンチセンス化合物とターゲットの間の相同性、配列同一

50

性または相補性は、約 40 % ~ 約 60 % である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約 60 % ~ 約 70 % である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約 70 % ~ 約 80 % である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約 80 % ~ 約 90 % である。幾つかの実施形態において、相同性、配列同一性または相補性は、約 90 %、約 92 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 % または約 100 % である。

【0266】

一実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチド、例えば、配列番号 2 ~ 13 に示された核酸分子は、置換または修飾を 1 つ以上含む。一実施形態において、ヌクレオチドは、ロックされた核酸 (LNA) で置換されている。

10

【0267】

一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、FLGに関連するコードおよび/または非コード配列、ならびに配列番号 1 および 2 として示された配列、の核酸分子センスおよび/またはアンチセンスの 1 つ以上の領域をターゲットとする。該オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 および 2 の重複領域もターゲットとする。

【0268】

本発明の特定の好ましいオリゴヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドである。本発明の文脈において「キメラオリゴヌクレオチド」または「キメラ」は、それぞれが少なくとも 1 個のヌクレオチドで構成されている化学的に異なる領域を、2 個以上含むオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、1 つ以上の有益な性質 (例えば、ヌクレアーゼ耐性の上昇、細胞内取り込みの増加、ターゲットへの結合アフィニティーの上昇) を供与する修飾ヌクレオチドの少なくとも 1 つの領域と、RNA : DNA または RNA : RNA ハイブリッドを切断することが可能な酵素の基質となる領域と、を含む。例としては、RNase H は、RNA : DNA 二重鎖の RNA 鎖を切断する細胞内エンドヌクレアーゼである。それゆえ RNase H の活性化により、RNA ターゲットが切断され、それにより遺伝子発現のアンチセンス調整の効率が大きく上昇する。その結果、多くの場合、同じターゲット領域にハイブリダイズするホスホロチオアートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、キメラオリゴヌクレオチドを用いた場合により短いオリゴヌクレオチドとなり、同等の結果を得ることができる。RNA ターゲットの切断は、ゲル電気泳動と、必要に応じて当該技術分野で公知の関連する核酸ハイブリダイゼーション技術とにより、日常的に検出することができる。一実施形態において、キメラオリゴヌクレオチドは、ターゲット結合アフィニティーが上昇するように修飾された少なくとも 1 つの領域と、通常は RNase H の基質として作用する領域とを含む。そのターゲット (この場合、ras をコードする核酸) に対するオリゴヌクレオチドのアフィニティーは、オリゴヌクレオチド / ターゲット対の T_m 、つまりオリゴヌクレオチドおよびターゲットが解離する温度を測定することにより日常的に決定され、解離は分光光度法により検出される。 T_m が高い程、ターゲットに対するオリゴヌクレオチドのアフィニティーが大きくなる。

20

30

【0269】

本発明のキメラアンチセンス化合物は、先に記載されたオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、および/またはオリゴヌクレオチド模倣体の 2 個以上の複合構造として形成されてもよい。そのような化合物は、当該技術分野では、ハイブリッドまたはギャップマーとも呼ばれてきた。そのようなハイブリッド構造の調製を教示する代表的な米国特許は、非限定的に、米国特許第 5,013,830 号; 同第 5,149,797 号; 同第 5,220,007 号; 同第 5,256,775 号; 同第 5,366,878 号; 同第 5,403,711 号; 同第 5,491,133 号; 同第 5,565,350 号; 同第 5,623,065 号; 同第 5,652,355 号; 同第 5,652,356 号および同第 5,700,922 号を含み、そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0270】

50

一実施形態において、修飾されるオリゴヌクレオチドの領域は、糖の2'位で修飾された少なくとも1つのヌクレオチド、最も好ましくは2'-O-アルキル、2'-O-アルキル-O-アルキルまたは2'-フルオロで修飾されたヌクレオチドを含む。他の実施形態において、RNAの修飾は、RNAの3'-末端のピリミジンのリボース、脱塩基の残基または逆塩基上に2'-フルオロ、2'-アミノおよび2'-O-メチル修飾を含む。そのような修飾は、オリゴヌクレオチドに日常的に組み込まれ、これらのオリゴヌクレオチドは、所定のターゲットに対して2'-デオキシリボヌクレオチドよりも高いT_m（即ち、より高いターゲット結合アフィニティー）を有することが示された。そのような高いアフィニティーの効果は、遺伝子発現のRNAiオリゴヌクレオチド阻害を大きく高めることである。RNAase Hは、RNA:DNA二重鎖のRNA鎖を切断する細胞内エンドヌクレアーゼであり、それゆえこの酵素の活性化は、RNAターゲットの切断をもたらし、つまりRNAi阻害の効率を大きく高めることができる。RNAターゲットの切断は、ゲル電気泳動により日常的に実証することができる。一実施形態において、キメラオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ耐性を高めるための修飾もされている。細胞は、核酸を分解しうる様々なエキソ-およびエンド-ヌクレアーゼを含む。複数のヌクレオチドおよびヌクレオシド修飾は、本来のオリゴヌクレオチドよりもヌクレアーゼ消化に対しより大きな耐性を組み込まれたオリゴヌクレオチドを生成させることが示された。オリゴヌクレオチドを細胞抽出物または単離されたヌクレアーゼ溶液と共にインキュベートし、経時的に残留するインタクトオリゴヌクレオチドの度合いを、通常はゲル電気泳動により測定することにより、ヌクレアーゼ耐性が日常的に測定される。ヌクレアーゼ耐性を高めるように修飾されたオリゴヌクレオチドは、非修飾オリゴヌクレオチドよりも長期間、インタクトで生存する。様々なオリゴヌクレオチド修飾がヌクレアーゼ耐性を高めるまたは供与することが、実証された。少なくとも1つのホスホロチオアート修飾を含むオリゴヌクレオチドが、目下より好ましい。幾つかの例において、ターゲット結合アフィニティーを高めるオリゴヌクレオチド修飾も、ヌクレアーゼ耐性を独立して高めることができる。

【0271】

本発明に想定される幾つかの好ましいオリゴヌクレオチドの特異的例としては、修飾バックボーン、例えば、ホスホロチオアート、ホスホトリエステル、メチルホスホナート、短鎖アルキルもしくはシクロアルキル糖間結合、または短鎖ヘテロ原子もしくは複素環糖間結合を含むものが挙げられる。最も好ましいのは、ホスホロチオアートバックボーンを有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子バックボーンを有するそれら、詳細にはCH₂-NH-O-CH₂、CH-N(CH₃)-O-CH₂ [メチレン(メチルイミノ)またはMMIバックボーンとして公知]、CH₂-O-N(CH₃)-CH₂、CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂およびO-N(CH₃)-CH₂-CH₂バックボーン(ここで、本来のホスホジエステルバックボーンは、O-P-O-CHとして表わされる)である。De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374により開示されたアミドバックボーンも、好ましい。同じく好ましいのは、モルホリノバックボーン構造を有するオリゴヌクレオチドである(Summerton and Weller, U.S. Pat. No. 5,034,506)。他の実施形態、例えばそのようなペプチド核酸(PNA)バックボーンにおいて、オリゴヌクレオチドのホスホジエステルバックボーンが、ポリアミドバックボーンと置換されていて、ヌクレオチドをポリアミドバックボーンのアザ窒素原子に直接的または間接的に結合している。オリゴヌクレオチドが、1個以上の置換された糖分子を含んでいてもよい。好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に以下のものの1つを含む: OH、SH、SCH₃、F、OCN、OCH₃OCH₃、OCH₃O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nNH₂またはO(CH₂)_nCH₃(ここで、nは、1~約10である); C₁~C₁₀低級アルキル; アルコキシアルコキシ、置換された低級アルキル、アルカリール、またはアラールキル; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-、S-、またはN-アルキル; O-、S-、またはN-アルケニル; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; ヘテロシクロアルキル; ヘテロシクロアルカリール; アミノアルキルアミノ; ポリアルキルアミノ; 置換されたシリル; RNA切断基; レポーター基; インターカ

レーター；オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善する基；またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善する基および類似の特性を有する他の置換基。好ましい修飾としては、2'-メトキシエトキシ[2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2-メトキシエチル)としても公知]が挙げられる。他の好ましい修飾としては、2'-メトキシ(2'-O-CH₃)、2'-プロボキシ(2'-OCH₂CH₂CH₃)および2'-フルオロ(2'-F)が挙げられる。類似の修飾は、オリゴヌクレオチド上の他の位置、詳細には3'-末端ヌクレオチド上の糖の3'位および5'-末端ヌクレオチドの5'位で生成されてもよい。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル基の代わりに糖模倣体、例えばシクロブチルを有していてもよい。

【0272】

オリゴヌクレオチドは、追加的または代替的に、ヌクレオ塩基(当該技術分野では多くの場合、単に「塩基」と呼ばれる)の修飾または置換を含んでいてもよい。本明細書で用いられる「非修飾」または「天然」ヌクレオチドとしては、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)が挙げられる。修飾ヌクレオチドは、天然の核酸中にまれに、または一過性にだけ見出されるヌクレオチド、例えば、ヒポキサンチン、6-メチルアデニン、5-Meピリミジン、特に5-メチルシトシン(5-メチル-2'-デオキシシトシンとも呼ばれ、当該技術分野では多くの場合5-Me-Cと呼ばれる)、5-ヒドロキシメチルシトシン(HMC)、グリコシルHMCおよびゲントピオシルHMC、ならびに合成ヌクレオチド、例えば、2-アミノアデニン、2-(メチルアミノ)アデニン、2-(イミダゾリルアルキル)アデニン、2-(アミノアルキルアミノ)アデニンまたは他のヘテロ置換されたアルキルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、5-プロモウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、8-アザグアニン、7-デアザグアニン、N6(6-アミノヘキシル)アデニンおよび2,6-ジアミノプリンが挙げられる。当該技術分野で公知の「ユニバーサル」塩基、例えば、イノシンを包含してもよい。5-Me-C置換は、核酸二重鎖安定性を0.6~1.2上昇させることが示されており、目下好ましい塩基置換である。

【0273】

本発明のオリゴヌクレオチドの別の修飾は、オリゴヌクレオチドの活性または細胞内取り込みを促進する1つ以上の部分または共役体をオリゴヌクレオチドに化学結合させることを含む。そのような部分としては、非限定的に、脂質部分、例えばコレステロール部分、コレステリル部分、脂肪鎖、例えばドデカンジオールもしくはウンデシル残基、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸が挙げられる。親油性部分を含むオリゴヌクレオチドおよびそのようなオリゴヌクレオチドを調製する方法は、例えば、米国特許第5,138,045号、同第5,218,105号、同第5,218,105号および同第5,459,255号など、当業者に公知である。

【0274】

所定のオリゴヌクレオチドの全ての位置で、均一に修飾されている必要はなく、実際に1つを超える前述の修飾が、単一のオリゴヌクレオチド内、またはオリゴヌクレオチド内の単一ヌクレオチド内に組み込まれていてもよい。本発明は、本明細書の先に定義されたキメラオリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドも含む。

【0275】

別の実施形態において、本発明の核酸分子は、非限定的に、脱塩基ヌクレオチド、ポリエーテル、ポリアミン、ポリアミド、ペプチド、炭水化物、脂質、またはポリ炭化水素化合物をはじめとする別の部分と共役している。これらの分子が、糖、塩基またはリン酸基の複数の位置に核酸分子を含む任意のヌクレオチド1つ以上に結合しうるとは、当業者に認識されよう。

【0276】

本発明により使用されるオリゴヌクレオチドは、固相合成の周知技術を通して簡便にそして日常的に生成してもよい。そのような合成の器具は、Applied Biosystemsをはじめとする複数の販売業者により販売されている。そのような合成の任意の

10

20

30

40

50

別の手段が用いられてもよく、オリゴヌクレオチドの実際の合成は、当業者の技量に十分に含まれる。類似の技術を用いて、他のオリゴヌクレオチド、例えばホスホロチオアートおよびアルキル化誘導体を調製することも、周知である。類似の技術および市販の修飾アミダイトおよびコントロールドポアガラス（CPG）製品、例えばビオチン、フルオレsein、アクリジンまたはソラレン修飾アミダイトおよび/またはCPG（Glen Research, Sterling VAから入手される）を用いて、蛍光標識されたビオチン化または他の修飾オリゴヌクレオチド、例えばコレステロール修飾オリゴヌクレオチドを合成することも周知である。

【0277】

本発明によれば、効力、特異性および作用の持続期間を増加させて、オリゴヌクレオチドの投与経路を拡大するための修飾の利用、例えばLNAモノマーの使用は、現行の化学物質、例えばMOE、ANA、FANA、PSなどで構成される。これは、現行のオリゴヌクレオチド中のモノマーの幾つかをLNAモノマーで置換することにより実現することができる。LNA修飾オリゴヌクレオチドは、親化合物と類似の寸法を有していてもよく、またはより大きくても、または好ましくはより小さくてもよい。そのようなLNA修飾オリゴヌクレオチドが約70%未満、より好ましくは約60%未満、最も好ましくは約50%未満のLNAモノマーを含むこと、そしてその寸法が約5~25ヌクレオチド、より好ましくは約12~20ヌクレオチドであることが、好ましい。

【0278】

好ましい修飾オリゴヌクレオチドバックボーンは、非限定的に、ホスホロチオアート、キラルホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホロトリエステル、3'アルキレンホスホナートおよびキラルホスホナートを含むメチルおよび他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、3'-アミノホスホラミダートおよびアミノアルキルホスホラミダートを含むホスホラミダート、チオノホスホラミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、通常の3'-5'結合を有するボラノホスファート、これらの2'-5'結合類似体、ならびにヌクレオシド単位の隣接する対が、結合した3'-5'~5'-3'または2'-5'~5'-2'である逆極性（inverted polarity）を有するものを含む。様々な塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。

【0279】

上記リン含有結合の調製を教示する代表的な米国特許は、非限定的に、米国特許第3,687,808号；同第4,469,863号；同第4,476,301号；同第5,023,243号；同第5,177,196号；同第5,188,897号；同第5,264,423号；同第5,276,019号；同第5,278,302号；同第5,286,717号；同第5,321,131号；同第5,399,676号；同第5,405,939号；同第5,453,496号；同第5,455,233号；同第5,466,677号；同第5,476,925号；同第5,519,126号；同第5,536,821号；同第5,541,306号；同第5,550,111号；同第5,563,253号；同第5,571,799号；同第5,587,361号；および同第5,625,050号を含み、それらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる。

【0280】

リン原子を含まない好ましい修飾オリゴヌクレオチドは、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子、およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間結合、または1つ以上の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド間結合により形成されるバックボーンを有する。これらは、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から一部が形成される）；シロキサンのバックボーン；スルフィド、スルホキシドおよびスルホンバックボーン；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチルバックボーン；アルケン含有バックボーン；スルファマートバックボーン；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノバックボーン；スルホナートおよびスルホンアミドバックボーン；アミドバックボーン；ならびにN

10

20

30

40

50

、O、SおよびCH₂の混合成分の部分有するその他を有するそれらのものを含む。

【0281】

上記オリゴヌクレオシドの調製を教示する代表的な米国特許は、非限定的に、米国特許第5,034,506号；同第5,166,315号；同第5,185,444号；同第5,214,134号；同第5,216,141号；同第5,235,033号；同第5,264,562号；同第5,264,564号；同第5,405,938号；同第5,434,257号；同第5,466,677号；同第5,470,967号；同第5,489,677号；同第5,541,307号；同第5,561,225号；同第5,596,086号；同第5,602,240号；同第5,610,289号；同第5,602,240号；同第5,608,046号；同第5,610,289号；同第5,618,704号；同第5,623,070号；同第5,663,312号；同第5,633,360号；同第5,677,437号；および同第5,677,439号を含み、それらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる。

【0282】

他の好ましいオリゴヌクレオチド模倣体において、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド間結合の両方、即ちバックボーンは、新規の基で置換されている。塩基単位は、適切な核酸ターゲット化合物とのハイブリダイゼーションのために保持される。そのようなオリゴマー化合物の1種であり、優れたハイブリダイゼーション特性を有することが示されたオリゴヌクレオチド模倣体は、ペプチド核酸(PNA)と呼ばれる。PNA化合物において、オリゴヌクレオチドの糖バックボーンは、アミド含有バックボーン、詳細にはアミノエチルグリシンバックボーンにより置換されている。ヌクレオ塩基は保持されていて、バックボーンのアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合されている。PNA化合物の調製を教示する代表的な米国特許は、非限定的に、米国特許第5,539,082号；同第5,714,331号；および同第5,719,262号を含み、それらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる。PNA化合物の更なる教示は、Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500に見出すことができる。

【0283】

本発明の実施形態において、ホスホロチオアートバックボーンを有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子バックボーンを有するオリゴヌクレオチド、詳細には -CH₂-NH-O-CH₂-、メチレン(メチルイミノ)またはMMIバックボーンとして公知の -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-、-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-、-CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- および -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (ここで、本来のホスホジエステルバックボーンは、先に参照された米国特許第5,489,677号の -O-P-O-CH₂として表わされる)、および先に参照された米国特許第5,602,240号のアミドバックボーン。同じく好ましいのは、先に参照された米国特許第5,034,506号のホルホリノバックボーン構造を有するオリゴヌクレオチドである。

【0284】

修飾オリゴヌクレオチドは、1つ以上の置換された糖部分を含んでもよい。好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に以下のものを1つ以上含む：OH；F；O-、S-、もしくはN-アルキル；O-、S-、もしくはN-アルケニル；O-、S-、もしくはN-アルキニル；またはO-アルキル-O-アルキル(ここで、アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換のC-COアルキルまたはC₂-COアルケニルおよびアルキニルであってもよい)。特に好ましいのは、O(CH₂)_nOMCH₃、O(CH₂)_nOCH₃、O(CH₂)_nNH₂、O(CH₂)_nCH₃、O(CH₂)_nONH₂、およびO(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂(ここでnおよびmは、1~10であってもよい)である。他の好ましいオリゴヌクレオチドは、2'位に以下のものを2つ以上含む：C~CO、低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカニール、O-アルカニールまたはO-アラニール、SH、SCH₃、OCN、Cl、Br、CN、CF₃、SOCH₃、SO₂CH₃、ONO₂、NO₂、N₃、NH₂、ヘテロシクロアルキル

、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、RNA切断基；レポーター基；インターカレーター；オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善する基；またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善する基および類似の特性を有する他の置換基。好ましい修飾は、2'-メトキシエトキシ(2'-O-CH₂CH₂OCH₃、2'-O-(2'-メトキシエチル)または2'-MOEとしても公知)、即ちアルコキシアルコキシ基を含む。更に好ましい修飾は、2'-ジメチルアミノオキシエトキシ、即ち、本明細書の以下の実施例に記載される2'-DMAOEとしても公知のO(CH₂)₂ON(CH₃)₂基、および2'-ジメチルアミノエトキシエトキシ(当該技術分野において2'-O-ジメチルアミノエトキシエチルまたは2'-DMAEOEとしても公知)、即ち、2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂を含む。

10

【0285】

他の好ましい修飾は、2'-メトキシ(2'-OCH₃)、2'-アミノプロポキシ(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂)および2'-フルオロ(2'-F)を含む。類似の修飾が、オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に3'-末端ヌクレオチド上の糖の3'位、または5'-末端ヌクレオチドの2'-5'結合オリゴヌクレオチドおよび5'位で生成されていてもよい。オリゴヌクレオチドは、ペントフラノシル糖の代わりに糖模倣体、例えばシクロブチル部分を有していてもよい。そのような修飾糖構造の調製を教示する代表的な米国特許は、非限定的に、米国特許第4,981,957号；同第5,118,800号；同第5,319,080号；同第5,359,044号；同第5,393,878号；同第5,446,137号；同第5,466,786号；同第5,514,785号；同第5,519,134号；同第5,567,811号；同第5,576,427号；同第5,591,722号；同第5,597,909号；同第5,610,300号；同第5,627,053号；同第5,639,873号；同第5,646,265号；同第5,658,873号；同第5,670,633号；および同第5,700,920号を含み、それらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0286】

オリゴヌクレオチドは、ヌクレオ塩基(当該技術分野では多くの場合、単に「塩基」と呼ばれる)の修飾または置換を含んでもよい。本明細書で用いられる「非修飾」または「天然」ヌクレオチドは、アデニン(A)、グアニン(G)、ピリミジン塩基のチミン(T)、シトシン(C)およびウラシル(U)を含む。修飾ヌクレオチドは、他の合成および天然ヌクレオチド、例えば5-メチルシトシン(5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニルウラシルおよびシトシン、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル(シュードウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシルおよび他の8-置換されたアデニンおよびグアニン、5-ハロ、詳細には5-プロモ、5-トリフルオロメチルおよび他の5-置換されたウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニンおよび3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンを含む。

30

40

【0287】

更に、ヌクレオチドは、米国特許第3,687,808号に開示されたもの、The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', pages 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されたもの、Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613に開示されたもの、およびSanghvi, Y.S., Chapter 15, 'Antisense Research and Applications', pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993に開示されたものを含む。

50

。これらのヌクレオチドの特定のもは、本発明のオリゴマー化合物の結合アフィニティを上昇させるため、特に有用である。これらは、2 - アミノプロピルアデニン、5 - プロピルウラシルおよび5 - プロピニルシトシンを含む5 - 置換されたピリミジン、6 - アザピリミジンならびにN - 2、N - 6およびO - 6置換されたプリンを含む。5 - メチルシトシン置換は、核酸二重鎖安定性を0.6 ~ 1.2 上昇させることが示されており (Sanghvi,

Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278)、目下好ましい塩基置換であり、2' - Oメトキシエチル糖修飾と組み合わせると、より特別に好ましい。

10

【0288】

先に記載された修飾ヌクレオチドおよび他の修飾ヌクレオチドの調整を教示する代表的な米国特許は、米国特許第3,687,808号、同第4,845,205号；同第5,130,302号；同第5,134,066号；同第5,175,273号；同第5,367,066号；同第5,432,272号；同第5,457,187号；同第5,459,255号；同第5,484,908号；同第5,502,177号；同第5,525,711号；同第5,552,540号；同第5,587,469号；同第5,596,091号；同第5,614,617号；同第5,750,692号、および同第5,681,941号を含み、そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる。

【0289】

20

本発明のオリゴヌクレオチドの別の実施形態には、オリゴヌクレオチドに、オリゴヌクレオチドの活性、細胞内分布、細胞内取り込みを促進する1種以上の部分または共役体を化学結合させることを含む。

【0290】

そのような部分は、非限定的に、脂質部分、例えば、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えばヘキシル - S - トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基、リン脂質、例えばジヘキサデシル - r a c - グリセロール、またはトリエチルアンモニウム1,2 - ジ - O - ヘキサデシル - r a c - グリセロ - 3 - H - ホスホナート、ポリアミン、ポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミチル部分、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ - カルボニル - t - オキシコレステロール部分を含む。

30

【0291】

そのようなオリゴヌクレオチド共役体の調製を教示する代表的な米国特許は、非限定的に、米国特許第4,828,979号、同第4,948,882号、同第5,218,105号；同第5,525,465号；同第5,541,313号；同第5,545,730号；同第5,552,538号；同第5,578,717号；同第5,580,731号；同第5,580,731号；同第5,591,584号；同第5,109,124号；同第5,118,802号；同第5,138,045号；同第5,414,077号；同第5,486,603号；同第5,512,439号；同第5,578,718号；同第5,608,046号；同第4,587,044号；同第4,605,735号；同第4,667,025号；同第4,762,779号；同第4,789,737号；同第4,824,941号；同第4,835,263号；同第4,876,335号；同第4,904,582号；同第4,958,013号；同第5,082,830号；同第5,112,963号；同第5,214,136号；同第5,082,830号；同第5,112,963号；同第5,214,136号；同第5,245,022号；同第5,254,469号；同第5,258,506号；同第5,262,536号；同第5,272,250号；同第5,292,873号；同第5,317,098号；同第5,371,241号；同第5,391,723号；同第5,416,203号；同第5,451,463号；同第5,510,475号；同第5,512,667号；同第5,514,785号；同第5,565,552号；同第5,567,810号；同第5,574,142号

40

50

；同第5，585，481号；同第5，587，371号；同第5，595，726号；同第5，597，696号；同第5，599，923号；同第5，599，928号および同第5，688，941号を含み、そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる。

【0292】

創薬：本発明の化合物は、創薬およびターゲットバリデーションの分野において適用することもできる。本発明は、フィラグリン（FLG）ポリヌクレオチドと疾患状態、フェノタイプまたは状態との間に存在する関連性を解明するための、創薬努力における該化合物および本明細書で同定された好ましいターゲットセグメントの使用を含む。これらの方法は、試料、組織、細胞、または生物体を本発明の化合物と接触させること、処理後の幾つかの時点でFLGポリヌクレオチドおよび/または関連のフェノタイプもしくは化学的エンドポイントの核酸またはタンパク質レベルを測定すること、場合により、測定値を未処理試料または本発明の更なる化合物で処理された試料と比較すること、を含むFLGポリヌクレオチドを検出または調整することを包含する。これらの方法は、他の実験と並行して、またはそれと組み合わせて実施して、未知の遺伝子の機能をターゲットバリデーションの工程について決定するか、または特定疾患、状態、またはフェノタイプの処置または予防のターゲットとしての特定遺伝子産物の妥当性を決定することもできる。

【0293】

遺伝子発現のアップレギュレーションまたは阻害の評価：

外来性核酸の、宿主細胞または生物体への移入を、細胞または生物体中の核酸の存在を直接検出することにより評価することができる。そのような検出は、当該技術分野で周知の複数の方法により実行することができる。例えば、外来性核酸の存在は、サザンブロットにより、または核酸に関連するヌクレオチド配列を特異的に増幅するプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術により検出することができる。外来性核酸の発現は、遺伝子発現解析をはじめとする従来の方法を用いて測定することもできる。例えば、外来性核酸から生成されたmRNAは、ノーザンブロットおよび逆転写PCR（RT-PCR）を用いて検出および定量することができる。

【0294】

外来性核酸からのRNAの発現は、酵素活性またはレポータータンパク質活性を測定することにより検出することもできる。例えばアンチセンス調整活性は、外来性核酸がエフェクターRNAを生成している指標としての、ターゲット核酸発現の減少または増加として、間接的に測定することができる。配列保存に基づいて、プライマーを設計および使用して、ターゲット遺伝子のコード領域を増幅させることができる。最初は、各遺伝子からの最も発現の高いコード領域を用いて、モデル対照遺伝子を構築することができるが、任意のコードまたは非コード領域を用いてもよい。各対照遺伝子は、レポーターコード領域とそのポリ（A）シグナルの間に各コード領域を挿入することにより組み立てられる。これらのプラスミドは、遺伝子の上流部分のレポーター遺伝子と、3'非コード領域の潜在的RNA i ターゲットとを有するmRNAを生成する。各アンチセンスオリゴヌクレオチドの効力は、レポーター遺伝子の調整によりアッセイされる。本発明の方法において有用なレポーター遺伝子としては、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHS）、アルカリホスファターゼ（AP）、βガラクトシダーゼ（LacZ）、βグルクロニダーゼ（GUS）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、赤色蛍光タンパク質（RFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼ（Luc）、ノパリンシンターゼ（NOS）、オクトピンシンターゼ（OCS）、およびそれらの誘導体が挙げられる。アンピシリン、ブレオマイシン、クロラムフェニコール、ジェンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、メトトレキサート、ホスフィノトリシン、プロマイシン、およびテトラサイクリンへの耐性を供与する多重選択マーカー（multiple selectable markers）を入手することができる。レポーター遺伝子のモジュレーションを決定する方法は、当該技術分野で周

10

20

30

40

50

知であり、非限定的に、蛍光分光法（例えば、蛍光光度法、蛍光活性化細胞選別法（FACS）、蛍光顕微鏡）、抗生物質耐性決定などが挙げられる。

【0295】

FLGタンパク質およびmRNA発現を、当業者に公知の方法および本明細書の他の部分に記載された方法を用いてアッセイすることができる。例えば、ELISAなどの免疫アッセイを利用して、タンパク質レベルを測定することができる。FLG ELISAアッセイキットは、例えばR&D Systems（ミネソタ州ミネアポリス）から、市販されている。

【0296】

実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて検査された試料（例えば、インビボまたはインビトロでの細胞または組織）中でのFLG発現（例えば、mRNAまたはタンパク質）を、対照試料中でのFLG発現との比較により評価する。例えばタンパク質または核酸の発現を、当業者に公知の方法を用いて、モック処理または未処理試料中のものと比較することができる。あるいは対照アンチセンスオリゴヌクレオチド（例えば、改変された配列または異なる配列を有するもの）で処理された試料との比較を、所望の情報に応じて実施することができる。別の実施形態において、未処理試料に対比させた処理試料の、FLGタンパク質または核酸の発現の差を、未処理試料に対比させた処理試料の、異なる核酸（研究者により適切と考えられた任意の標準を含む、例えばハウスキーピング遺伝子）の発現の差と比較することができる。

【0297】

観察された差は、所望なら、対照との比較に用いるために、例えば比率または分数の形態で、表わすことができる。実施形態において、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された試料中のFLG mRNAまたはタンパク質のレベルは、未処理試料または対照核酸で処理された試料に対して、約1.25倍～約10倍増加または減少する。実施形態において、FLG mRNAまたはタンパク質のレベルは、少なくとも約1.25倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約4.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約5.5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約6.5倍、少なくとも約7倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約8倍、少なくとも約8.5倍、少なくとも約9倍、少なくとも約9.5倍、または少なくとも約10倍もしくはそれ以上増加または減少する。

【0298】

キット、研究試薬、診断、および治療

本発明の化合物は、診断、治療、および予防用に、そして研究試薬およびキットの成分として利用することができる。更に、精巧な特異性により遺伝子発現を阻害することが可能であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、多くの場合、当業者により、特定遺伝子の機能を解明する、または様々な生物学的経路の機能を区別するために用いられる。

【0299】

キットおよび診断薬、ならびに様々な生物系に使用するために、本発明の化合物を単独で、または他の化合物もしくは治療薬と組み合わせると、細胞および組織中で発現された遺伝子の補体全体または一部の発現様式を解明するための差異分析および/またはコンビナトリアル分析のツールとして有用となる。

【0300】

本明細書において用いられる用語「生物系」または「系」は、フィラグリン（FLG）遺伝子の産物を発現する、またはその産物を発現する競合物質を生成する、任意の生物体、細胞、細胞培養物または組織と定義される。これらには、非限定的に、ヒト、トランスジェニック動物、細胞、細胞培養、組織、異種移植片、移植片およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【0301】

1つの非限定的実施例として、1種以上のアンチセンス化合物で処理された細胞または組織内の発現様式を、アンチセンス化合物で処理されていない細胞または組織と比較して、生成された様式を、例えば検査される遺伝子の疾患関連性、シグナル伝達経路、細胞内局在性、発現レベル、寸法、構造または機能に関係することから、遺伝子発現の差異レベルに関して分析する。これらの分析は、刺激または非刺激細胞で、そして発現様式に影響を及ぼす他の化合物の存在下または非存在下で、実施することができる。

【0302】

当該技術分野で公知の遺伝子発現分析の方法の実施例としては、DNAアレイまたはマイクロアレイ、SAGE（遺伝子発現の連続解析）、READS（消化されたcDNAの制限酵素増幅）、TOGA（全遺伝子発現解析）、タンパク質アレイおよびプロテオミクス、発現配列タグ（EST）の配列決定、サブトラクティブRNAフィンガープリンティング（SuRF）、サブトラクティブクローニング、ディファレンシャルディスプレイ（DD）、比較ゲノムハイブリダイゼーション、FISH（蛍光インサイチュハイブリダイゼーション）技術および質量分析法が挙げられる。

【0303】

本発明の化合物は、フィラグリン（FLG）をコードする核酸にハイブリダイズするため、研究および診断に有用である。例えば、本明細書に開示されたような効率および条件でハイブリダイズして効果的なFLGモジュレーターとなるオリゴヌクレオチドは、それぞれ遺伝子増幅または検出に好適な条件下で効果的プライマーまたはプローブとなる。これらのプライマーおよびプローブは、FLGをコードする核酸分子の特異的検出が必要な方法において、そしてFLGの検出のため、または更なる研究への使用のための前記核酸分子の増幅ににおいて有用となる。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、詳細にはプライマーおよびプローブと、FLGをコードする核酸とのハイブリダイゼーションは、当該技術分野で公知の手段により検出することができる。そのような手段は、オリゴヌクレオチドへの酵素の共役、オリゴヌクレオチドの放射線標識、または任意の他の適切な検出手段を含んでいてもよい。試料中のFLGレベルを検出するそのような検出手段を用いるキットを、調製してもよい。

【0304】

アンチセンスの特異性および感受性は、治療的使用のための当業者によっても利用される。アンチセンス化合物は、ヒトをはじめとする動物の疾患状態の処置における治療的部分として用いられてきた。アンチセンスオリゴヌクレオチド薬は、ヒトに安全かつ効果的に投与されてきており、数多くの臨床試験が目下、進行中である。つまりアンチセンス化合物は、細胞、組織および動物、特にヒトの処置のための処置レジメンに有用になるよう構成させることができる有用な治療モダリティとなることは、確立されている。

【0305】

治療では、FLGポリヌクレオチドの発現を調整することにより処置されうる疾患または障害を有する疑いのある動物、好ましくはヒトを、本発明によるアンチセンス化合物の投与により処置する。例えば1つの非限定的実施形態において、該方法は、処置を必要とする動物に、治療有効量のFLGモジュレーターを投与するステップを含む。本発明のFLGモジュレーターは、FLGの活性を、またはFLGタンパク質の発現を効果的に調整する。一実施形態において、動物におけるFLGの活性または発現が、対照に比較して約10%阻害される。好ましくは、動物におけるFLGの活性または発現が、約30%阻害される。より好ましくは、動物におけるFLGの活性または発現が、約50%以上阻害される。つまり該オリゴマー化合物は、フィラグリン（FLG）mRNAの発現を、対照に比較して少なくとも10%、少なくとも50%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%調整する。

【0306】

一実施形態において、フィラグリン（FLG）の、そして/または動物における活性ま

たは発現が、対照に比較して約10%増加する。好ましくは動物におけるFLGの活性または発現が、約30%増加する。より好ましくは動物におけるFLGの活性または発現が、50%増加する。つまり該オリゴマー化合物は、FLG mRNAの発現を、対照に比較して少なくとも10%、少なくとも50%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%調整する。

【0307】

例えば、フィラグリン (FLG) の発現の減少を、動物の血清、血液、脂肪組織、肝臓または任意の他の体液、組織もしくは器官で測定してもよい。好ましくは、分析される前記液体、組織または器官に含まれる細胞は、FLGペプチドおよび/またはFLGタンパク質そのものをコードする核酸分子を含む。

10

【0308】

本発明の化合物は、有効量の化合物を適切な薬学的に許容しうる希釈剤または担体に添加することにより、医薬組成物中で用いることができる。該化合物の使用および本発明の方法は、予防的に有用となる可能性もある。

【0309】

共役体

本発明のオリゴヌクレオチドの別の調整は、オリゴヌクレオチドの活性、細胞内分布または細胞内取り込みを促進する1つ以上の部分または共役体をオリゴヌクレオチドに化学結合させることを含む。これらの部分または共役体は、官能基、例えば第一級または第二級ヒドロキシル基に共有結合する共役基を包含してもよい。本発明の共役基としては、インターカレーター、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学的特性を高める基、およびオリゴマーの薬物動態特性を高める基が挙げられる。典型的な共役基としては、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸塩、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、および染色剤が挙げられる。本発明の文脈において薬力学的特性を高める基としては、取り込みを改善する基、分解への耐性を高める基、および/またはターゲット核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを促進する基が挙げられる。本発明の文脈において、薬物動態特性を高める基としては、本発明の化合物の取り込み、分布、代謝または排泄を改善する基が挙げられる。代表的な共役基は、1992年10月23日に出願された国際特許出願第PCT/US92/09196および米国特許第6,287,860号に開示されており、それらは、参照により本明細書に組み入れられる。共役部分としては、非限定的に、脂質部分、例えば、コレステロール部分、コール酸、チオエーテル、例えばヘキシル-5-トリチルチオール、チオコレステロール、脂肪族鎖、例えばドデカンジオールまたはウンデシル残基、リン脂質、例えばジ-ヘキサデシル-rac-グリセロールまたはトリエチルアンモニウム1,2-ジ-O-ヘキサデシル-rac-グリセロ-3-H-ホスホナート、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖、またはアダマンタン酢酸、パルミチル部分、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ-カルボニル-オキシコレステロール部分が挙げられる。本発明のオリゴヌクレオチドは、活性薬物物質、例えばアスピリン、ワルファリン、フェニルブタゾン、イブプロフェン、スプロフェン、フェンブフェン、ケトプロフェン、(S)-(+) - プラノプロフェン、カルプロフェン、ダンシルサルコシン、2,3,5-トリヨード安息香酸、フルフェナム酸、ホリン酸、ベンゾチアジアジド、クロロチアジド、ジアゼピン、インドメタシン、バルビツレート、セファロsporin、サルファ薬、抗糖尿病薬、抗菌薬または抗生物質に共役していてもよい。

20

30

40

【0310】

そのようなオリゴヌクレオチド共役体の調製を教示する代表的な米国特許としては、非限定的に、米国特許第4,828,979号、同第4,948,882号、同第5,218,105号；同第5,525,465号；同第5,541,313号；同第5,545

50

、730号；同第5、552、538号；同第5、578、717号；同第5、580、731号；同第5、580、731号；同第5、591、584号；同第5、109、124号；同第5、118、802号；同第5、138、045号；同第5、414、077号；同第5、486、603号；同第5、512、439号；同第5、578、718号；同第5、608、046号；同第4、587、044号；同第4、605、735号；同第4、667、025号；同第4、762、779号；同第4、789、737号；同第4、824、941号；同第4、835、263号；同第4、876、335号；同第4、904、582号；同第4、958、013号；同第5、082、830号；同第5、112、963号；同第5、214、136号；同第5、082、830号；同第5、112、963号；同第5、214、136号；同第5、245、022号；同第5、254、469号；同第5、258、506号；同第5、262、536号；同第5、272、250号；同第5、292、873号；同第5、317、098号；同第5、371、241号；同第5、391、723号；同第5、416、203号；同第5、451、463号；同第5、510、475号；同第5、512、667号；同第5、514、785号；同第5、565、552号；同第5、567、810号；同第5、574、142号；同第5、585、481号；同第5、587、371号；同第5、595、726号；同第5、597、696号；同第5、599、923号；同第5、599、928号および同第5、688、941号が挙げられる。

【0311】

本発明の化合物は、取り込み、分布および/または吸収を補助するために、例えばリボソーム、受容体ターゲット分子、経口、経直腸、局所または他の配合剤として、化合物の他の分子、分子構造または混合物と混和、カプセル化、共役または会合させてもよい。そのような取り込み、分布および/または吸収を補助する配合剤の調製を教示する代表的な米国特許としては、非限定的に、米国特許第5、108、921号；同第5、354、844号；同第5、416、016号；同第5、459、127号；同第5、521、291号；同第5、543、165号；同第5、547、932号；同第5、583、020号；同第5、591、721号；同第4、426、330号；同第4、534、899号；同第5、013、556号；同第5、108、921号；同第5、213、804号；同第5、227、170号；同第5、264、221号；同第5、356、633号；同第5、395、619号；同第5、416、016号；同第5、417、978号；同第5、462、854号；同第5、469、854号；同第5、512、295号；同第5、527、528号；同第5、534、259号；同第5、543、152号；同第5、556、948号；同第5、580、575号；および同第5、595、756号が挙げられ、それらのそれぞれは、参照により本明細書に組み入れられる。

【0312】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ターゲット発現および/または機能を調整するためにベクターに関連して投与される必要はないが、本発明の実施形態は、プロモーターを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドの発現のためのベクター構造物を発現し、プロモーター遺伝子配列をハイブリダイズさせ、そして強い構成プロモーター活性または所望の例に誘導しうるプロモーター活性を有することに関する。

【0313】

一実施形態において、発明の実践は、前述のアンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも1種を適切な核酸送達系と共に投与することを含む。一実施形態において、その系は、ポリヌクレオチドに機能的に連結された非ウイルスベクターを含む。そのような非ウイルスベクターの例としては、単独のオリゴヌクレオチド（例えば、配列番号3～13のうちの任意の1種以上）または適切なタンパク質、多糖もしくは脂質配合剤との組み合わせが挙げられる。

【0314】

加えて、適切な核酸送達系としては、ウイルスベクター、典型的には少なくとも1種のアデノウイルスの配列、アデノウイルス随伴ウイルス（AAV）、ヘルパー依存型アデノ

10

20

30

40

50

ウイルス、レトロウイルス、またはセンダイウイルス - リポソーム (H V J) 複合体のうちの少なくとも 1 種の配列が挙げられる。好ましくはウイルスベクターは、ポリヌクレオチドに機能的に連結された強度の真核生物プロモーター、例えばサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターを含む。

【 0 3 1 5 】

加えて、好ましいベクターとしては、ウイルスベクター、融合タンパク質および化学的共役体が挙げられる。レトロウイルスベクターとしては、モロニー Maus 白血病ウイルスおよび H I V を基にしたウイルスが挙げられる。1 つの好ましい、H I V を基にしたウイルスベクターは、少なくとも 2 個のベクターを含み、そのうち g a g および p o l 遺伝子は、H I V ゲノム由来であり、e n v 遺伝子は、別のウイルス由来である。D N A ウィルスベクターが好ましい。これらのベクターは、ボックスベクター、例えばオルトボックスまたはアピボックスベクター、ヘルペスウイルスベクター、例えば単純ヘルペス I 型ウイルス (H S V) ベクター、アデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターが挙げられる。

10

【 0 3 1 6 】

本発明のアンチセンス化合物は、任意の薬学的に許容しうる塩、エステル、もしくはそのようなエステルの塩、またはヒトをはじめとする動物への投与時に生物活性代謝産物もしくはその残渣を提供 (直接的または間接的に) しうる任意の他の化合物を包含する。

【 0 3 1 7 】

用語「薬学的に許容しうる塩」は、本発明の化合物の生理学的および薬学的に許容しうる塩、即ち、親化合物の所望の生物活性を保持して、不適切な毒性作用を付与しない塩を指す。オリゴヌクレオチドの場合、薬学的に許容しうる塩およびその使用の好ましい例が、米国特許第 6, 287, 860 号に更に記載されており、それは参照により本明細書に組み入れられる。

20

【 0 3 1 8 】

本発明は、本発明のアンチセンス化合物を含む医薬組成物および配合剤も包含する。本発明の医薬組成物は、局所または全身処置が望ましいか、そして処置される領域にも応じて、複数の方法で投与してもよい。投与は、局所 (眼を含む、そして膈および直腸送達をはじめとする粘膜へ)、肺、例えばネブライザーをはじめとする粉末またはエアロゾルの吸入または吹送により、気管内、鼻腔、表皮および経皮)、経口または非経口であってもよい。非経口投与としては、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内または筋肉内への注射または注入、例えば髄腔内または脳室内への投与が挙げられる。

30

【 0 3 1 9 】

中枢神経系内の組織の処置では、投与は、例えば脳脊髄液への注射または注入により、実施することができる。アンチセンス R N A の脳脊髄液への投与は、例えば、全体が参照により本明細書に組み入れられた、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 1 1 7 7 7 2、「Methods for slowing familial ALS disease progression」に記載されている。

【 0 3 2 0 】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが中枢神経系の細胞に投与されることを目的とする場合、表題のアンチセンスオリゴヌクレオチドの血液脳関門への浸透を促進しうる薬剤 1 種以上と共に投与することができる。嗅内皮質または海馬において、注射を実施することができる。アデノウイルスベクターを筋肉組織中の運動ニューロンに投与することによる神経栄養因子の送達、参照により本明細書に組み入れられた、米国特許第 6, 632, 427 号、「Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons」に記載されている。脳、例えば線条体、視床、海馬、または黒質への直接のベクター送達は、当該技術分野で公知であり、例えば参照により本明細書に組み入れられた、米国特許第 6, 756, 523 号、「Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into

40

cells of the central nervous system particularly in brain」に記載されている。投与は、注射のように急速に、または緩徐注入もしくは徐放性配合剤の投与のように一定期

50

間をかけて行うことができる。

【0321】

表題のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、所望の薬学的または薬力学的特性を提供する薬剤と結合または共役させることもできる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、血液脳関門への浸透または輸送を促進することが当該技術分野で公知の任意の物質、例えばトランスフェリン受容体への抗体、に結合させて、静脈注射により投与することができる。アンチセンス化合物をウイルスベクターと結合させて、例えば、アンチセンス化合物をより効果的にし、そして/または血液脳関門を通したアンチセンス化合物の輸送を増加させることができる。血液脳関門の浸透圧破壊は、例えば非限定的に、メソエリトリトール、キシリトール、D(+)ガラクトース、D(+)ラクトース、D(+)キシロース、ダルシトール、ミオイノシトール、L(-)フルクトース、D(-)マンニトール、D(+)グルコース、D(+)アラビノース、D(-)アラビノース、セロビオース、D(+)マルトース、D(+)ラフィノース、L(+)ラムノース、D(+)メリビオース、D(-)リボース、アドニトール、D(+)アラビトール、L(-)アラビトール、D(+)フコース、L(-)フコース、D(-)リキソース、L(+)リキソース、およびL(-)リキソースをはじめとする糖、または非限定的にグルタミン、リシン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、チロシン、バリン、およびタウリンをはじめとするアミノ酸の注入により果たすこともできる。血液脳関門の浸透を促進するための方法および材料が、例えば、米国特許第4,866,042号「Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier」、同第6,294,520号「Material for passage through the blood-brain barrier」、および同第6,936,589号「Parenteral delivery systems」に記載されており、それらの全てが参照により本明細書に組み入れられている。

【0322】

表題のアンチセンス化合物は、取り込み、分布および/または吸収を補助するために、例えばリボソーム、受容体ターゲット分子、経口、経直腸、局所または他の配合剤として、化合物の他の分子、分子構造または混合物と混和、カプセル化、共役または会合させてもよい。例えばカチオン性脂質を配合剤に含ませて、オリゴヌクレオチドの取り込みを容易にしてもよい。取り込みを容易にすることが示されたそのような一組成物が、LIPOFECTIN(メリーランド州ベセスダのGIBCO-BRLから入手)である。

【0323】

2'-O-メトキシエチル修飾を少なくとも1個有するオリゴヌクレオチドは、経口投与に特に有用であると考えられる。局所投与用の医薬組成物および配合剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、滴下薬、坐剤、スプレー、液体および粉末を含んでいてもよい。従来の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが、必要であるか、または望ましい場合がある。コーティングされたコンドーム、手袋などが有用となる場合もある。

【0324】

簡便には単位投与形態中に存在してもよい、本発明の医薬配合剤は、医薬品業界で周知の従来技術により調製してもよい。そのような技術は、有効成分を医薬担体または賦形剤と会合させるステップを含む。一般には該配合剤は、有効成分を液体担体もしくは微粒子固体担体、またはその両方と均一かつ緊密に会合させ、その後、必要に応じて生成物を成形することにより調製される。

【0325】

本発明の組成物は、多くの可能な投与形態、例えば非限定的に、錠剤、カプセル、ゲルカプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐剤および浣腸剤のいずれかに配合されていてもよい。本発明の組成物は、水性、非水性または混合媒体中の懸濁液として配合されていてもよい。水性懸濁液は、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールお

10

20

30

40

50

よび／またはデキストランをはじめとする懸濁液の粘性を上昇させる物質を更に含んでもよい。懸濁液は、安定化剤を含んでもよい。

【0326】

本発明の医薬組成物としては、非限定的に、溶液、エマルジョン、フォームおよびリソーム含有配合剤が挙げられる。本発明の医薬組成物および配合剤は、1種以上の浸透促進剤、担体、賦形剤または他の有効もしくは非有効成分を含んでもよい。

【0327】

エマルジョンは、典型的には、通常は0.1 μm径を超える液滴の形態で一方の液体を他方に分散させた非均質系である。エマルジョンは、分散相に加えて追加の成分と、水相、油相中の液体として、またはそれ自体が分離した相として存在しうる活性薬物とを含んでもよい。マイクロエマルジョンは、本発明の実施形態として包含される。エマルジョンおよびその使用は周知であり、米国特許第6,287,860号に更に記載されている。

10

【0328】

本発明の配合剤としては、リボソーム配合剤が挙げられる。本明細書で用いられる用語「リボソーム」は、1つまたは複数の球状二層中に配置された両性脂質で構成された小胞を意味する。リボソームは、親油性材料から形成された膜と、送達される組成物を含む水性内面と、を有するユニラメラまたはマルチラメラ小胞である。カチオン性リボソームは、正電荷リボソームであり、負電荷DNA分子と相互作用して安定した複合体を形成すると考えられる。pH感受性または負電荷であるリボソームは、DNAと複合体を形成するよりもむしろDNAを封入していると考えられる。カチオン性および非カチオン性リボソームは両者とも、DNAを細胞に送達するために用いられてきた。

20

【0329】

リボソームは、「立体的に安定化した」リボソームを包含し、本明細書で用いられるその用語は、1種以上の特殊な脂質を含むリボソームを指す。これらの特殊な脂質は、リボソームに取り込まれると、そのような特殊な脂質を欠くリボソームに比較して循環寿命の長いリボソームが得られる。立体的に安定したリボソームの例は、リボソームの小胞形成脂質部分の一部が1種以上の糖脂質を含むか、または1種以上の親水性ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)部分で誘導体化されている、それらのものである。リボソームおよびその使用は、米国特許第6,287,860号に更に記載されている。

30

【0330】

本発明の医薬配合剤および組成物は、界面活性剤を含んでもよい。薬物製品、配合剤およびエマルジョン中での界面活性剤の使用は、当該技術分野で周知である。界面活性剤およびその使用は、参照により本明細書に組み入れられた米国特許第6,287,860号に記載されている。

【0331】

一実施形態において、本発明は、様々な浸透促進剤を用いて、核酸、詳細にはオリゴヌクレオチドの効率的送達を実行する。浸透促進剤は、細胞膜を通した非親油性薬物の拡散を補助することに加えて、親油性薬物の透過性も高める。浸透促進剤は、5種の広範の分類、即ち、界面活性剤、脂肪酸、胆汁酸塩、キレート化剤および非キレート化非界面活性剤のうちの1種に属するように分類してもよい。浸透促進剤およびその使用は、参照により本明細書に組み入れられた米国特許第6,287,860号に記載されている。

40

【0332】

配合剤がそれらの目的とする使用、即ち、投与経路に従って日常的に設計されることは、当業者に認識されよう。

【0333】

局所投与用の好ましい配合剤としては、本発明のオリゴヌクレオチドが局所送達剤、例えば脂質、リボソーム、脂肪酸、脂肪酸エステル、ステロイド、キレート化剤および界面活性剤と混和されているそれらのものが挙げられる。好ましい脂質およびリボソームは、中性(例えば、ジオレオイル-ホスファチジルDOPEエタノールアミン、ジミリストイ

50

ルホスファチジルコリン D M P C、ジステアロイルホスファチジルコリン)、陰性(例えば、ジミリストイルホスファチジルグリセロール D M P G)およびカチオン性(例えば、ジオレイルテトラメチルアミノプロピル D O T A P およびジオレオイル - ホスファチジルエタノールアミン D O T M A)を含む。

【0334】

局所または他の投与では、本発明のオリゴヌクレオチドは、リボソーム内に封入されていてもよく、またはリボソーム、詳細にはカチオン性リボソームへの複合体を形成していてもよい。あるいはオリゴヌクレオチドは、脂質、詳細にはカチオン性脂質に複合体化していてもよい。好ましい脂肪酸およびエステル、薬学的に許容しうるその塩、ならびにその使用は、米国特許第 6, 287, 860 号に更に記載されている。

10

【0335】

経口投与用の組成物および配合剤としては、粉末もしくは細粒、微粒子、ナノ粒子、水性もしくは非水性媒体中の懸濁液もしくは溶液、カプセル、ゲルカプセル、サシェ、錠剤またはミニ錠が挙げられる。増粘剤、着香剤、希釈剤、乳化剤、分散助剤または結合剤が望ましい場合がある。好ましい蛍光配合剤は、本発明のオリゴヌクレオチドを 1 種以上の浸透促進剤、界面活性剤およびキレート化剤と一体化させて投与するそれらのものである。好ましい界面活性剤は、脂肪酸および/またはそのエステルもしくは塩、胆汁酸および/またはその塩を含む。好ましい胆汁酸/塩および脂肪酸、ならびにそれらの使用は、米国特許第 6, 287, 860 号に記載されており、それは参照により本明細書に組み入れられる。同じく好ましいのは、浸透促進剤の組み合わせ、例えば胆汁酸/塩と組み合わせた脂肪酸/塩である。特に好ましい組み合わせは、ラウリル酸のナトリウム塩、カプリル酸、および U D C A である。更なる浸透促進剤としては、ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン - 20 - セチルエーテルが挙げられる。本発明のオリゴヌクレオチドは、噴霧乾燥粒子をはじめとする細粒形態で経口で送達してもよく、または複合体化させて微粒子もしくはナノ粒子を形成させてもよい。オリゴヌクレオチド複合体化剤 (c o m p l e x i n g a g e n t s) およびその使用は、米国特許第 6, 287, 860 号に記載されており、それは参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0336】

非経口、髄腔内または心室内投与用の組成物および配合剤は、滅菌水溶液を含んでいてもよく、それは緩衝液、希釈剤および他の適切な添加剤、例えば非限定的に浸透促進剤、担体化合物および他の薬学的に許容しうる担体または賦形剤を含んでいてもよい。

30

【0337】

本発明の特定の実施形態は、1 種以上のオリゴマー化合物と、非アンチセンスメカニズムにより機能する 1 種以上の化学療法剤とを含む医薬組成物を提供する。そのような化学療法剤の例としては、非限定的に、癌化学療法薬、例えばダウノリビシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、エソルビシン、ブレオマイシン、マフォスファミド、イフォスファミド、シトシンアラビノシド、ビスクロロエチルニトロソ尿素、ビスルファン、マイトマイシン C、アクチノマイシン D、ミトラマイシン、プレドニソン、ヒドロキシプロゲステロン、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソ尿素、窒素マスタード、メルファラン、シクロホスファミド、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコフォルマイシン、4 - ヒドロキシペルオキシシクロホスホラミド、5 - フルオロウラシル (5 - F U)、5 - フルオロデオキシウリジン (5 - F U d R)、メトトレキサート (M T X)、コルヒチン、タキソール、ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド (V P - 16)、トリメトトレキサート、イリノテカン、トポテカン、ゲムシタピン、テニポシド、シスプラチンおよびジエチルスチルベストロール (D E S) が挙げられる。そのような化学療法剤は、本発明の化合物と共に用いる場合、個別に (例えば、5 - F U とオリゴヌクレオチド)、連続して (例えば、5 - F U とオリゴヌクレオチドの一定時間の後、M T X とオリゴヌク

40

50

レオチド)、または他のそのような化学療法剤1種以上と併用して(例えば、5-FUとMTXとオリゴヌクレオチド、または5-FUと放射線療法とオリゴヌクレオチド)用いてもよい。非限定的に非ステロイド性抗炎症薬およびコルチコステロイドをはじめとする抗炎症薬と、非限定的にリバビリン、ピダラビン、アシクロビルおよびガンシクロビルをはじめとする抗ウイルス薬とを、本発明の組成物中で併用してもよい。アンチセンス化合物と他の非アンチセンス薬との併用も、本発明の範囲内である。2種以上の組み合わせた化合物と一緒に、または連続して用いてもよい。

【0338】

他の関連の実施形態において、本発明の組成物は、第一の核酸をターゲットとする1種以上のアンチセンス化合物、詳細にはオリゴヌクレオチドと、第二の核酸ターゲットとする1種以上の追加のアンチセンス化合物とを含んでもよい。例えば第一のターゲットは、フィラグリン(FLG)の特定のアンチセンス配列であってもよく、第二のターゲットは、別のヌクレオチド配列からの領域であってもよい。あるいは本発明の組成物は、同一フィラグリン(FLG)核酸ターゲットの異なる領域をターゲットとする1種以上のアンチセンス化合物を含んでもよい。アンチセンス化合物の数多くの実施例を本発明に例示しているが、その他を当該技術分野で公知の適切な化合物から選択してもよい。1種以上の組み合わせた化合物を、一緒にまたは連続して用いてもよい。

【0339】

投薬:

医薬組成物の配合およびそれに続く投与(投薬)の配合剤は、当業者の技能の範囲内であると考えられる。投薬は、処置される疾患状態の重症度および応答性に依存し、処置コースは数日~数ヶ月、または治癒が実行されるまで、または疾患状態の縮小が実現されるまで、継続する。最適な投薬計画を、患者の体内の薬物蓄積の測定から計算することができる。当業者は、最適な投薬量、投薬方法論および反復速度を容易に決定することができる。最適な投薬量は、各オリゴヌクレオチドの相対的能力に応じて変動してもよく、一般に効果的インビトロおよびインビボ動物モデルであることが見出された EC_{50} に基づいて推定することができる。一般に投薬量は、 $0.01\mu g \sim 100g/kg$ 体重であり、それを1日、1週間、1ヶ月もしくは1年間に1回以上、または2~20年毎に1回与えてもよい。当業者は、体液または組織中の薬物の測定された滞留時間および濃度に基づいて、投薬量の反復速度を容易に推定することができる。有効な処置に続いて、患者に維持療法を受けさせて、疾患状態の再発を予防することが望ましく、そこではオリゴヌクレオチドを $0.01\mu g \sim 100g/kg$ 体重で1日1回以上~20年毎に1回の範囲内の維持用量で投与する。

【0340】

一実施形態において、患者は、少なくとも約1、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、少なくとも約30、少なくとも約35、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約60、少なくとも約70、少なくとも約80、少なくとも約90、または少なくとも約100mg/kg体重である薬物投薬量で処置される。アンチセンスオリゴヌクレオチドの特定の注射投薬量は、例えば、全体が参照により本明細書に組み入れられた米国特許第7,563,884号「Antisense modulation of PTP1B expression」に記載されている。

【0341】

本発明の様々な実施形態を先に記載したが、それらが例示として表わされていて限定ではないことを理解しなければならない。本明細書の開示により、本発明の精神または範囲を逸脱せずに、開示された実施形態の数多くの変更を実行することができる。つまり本発明の幅および範囲を、先に記載された実施形態のいずれかにより限定してはならない。

【0342】

本明細書に列挙された全ての文書が、参照により本明細書に組み入れられる。本願に引

10

20

30

40

50

用された全ての発行物および特許文書は、各個別の発行物または特許文書がそのように個別に示されているのと同程度に、全ての目的で参照により組み入れられる。本文書における様々な参照の引用により、本出願人は、任意の特定の参照を発明の先行技術であることを認めない。本発明の組成物および方法の実施形態を、以下の実施例に示す。

【0343】

実施例

以下の非限定的実施例は、本発明の選択された実施形態を例示するためのものである。示された成分の要素の割合の変動および代替物が当業者に明白であり、本発明の実施形態の範囲内であることは、理解されよう。

実施例1：フィラグリン（FLG）の核酸分子アンチセンスおよび/またはFLGポリヌクレオチドのセンス鎖に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの設計

【0344】

先に示された用語「に対して特異的なオリゴヌクレオチド」または「オリゴヌクレオチドターゲット」は、(i) ターゲット遺伝子の一部と安定した複合体を形成することができるか、または(ii) ターゲット遺伝子のmRNA転写産物の一部と安定した二重鎖を形成することができる、配列を有するオリゴヌクレオチドを指す。

【0345】

適切なオリゴヌクレオチドの選択は、核酸配列を自動的にアライメントして同一性または相同性の領域を示すコンピュータプログラムを用いることにより、容易になる。そのようなプログラムを用いて、例えばGeneBankなどのデータベースを検索することにより、またはPCR産物を配列決定することにより、得られた核酸配列を比較する。一定範囲の種からの核酸配列を比較すれば、種の間で適度な同一性を示す核酸配列を選択することができる。配列決定されていない遺伝子の場合、サザンブロットを実施して、ターゲット種と他の種の間の同一性の度合いを測定することができる。当該技術分野で周知の通り、サザンブロットを様々な度合いのストリンジェンシーで実施することにより、同一性の適切な指標を得ることが可能である。これらの手順により、制御される対象のターゲット核酸配列に高い相補性を示し、他の種の対応する核酸配列に低い相補性を示すオリゴヌクレオチドを選択することができる。本発明で用いられる遺伝子の適切な領域を選択するのにかなりの許容範囲があることは、当業者に理解されよう。

【0346】

ターゲット核酸へのアンチセンス化合物の結合がターゲット核酸の正常な機能と干渉して、機能および/または活性の調整を起こし、そして特異的結合が望ましい条件下、即ち、インビボアッセイまたは治療的処置の場合の生理学的条件下、そしてインビトロとアッセイの場合のアッセイが実施される条件下で、非ターゲット核酸配列へのアンチセンス化合物の非特異的結合を回避するための十分な度合いの相補性が存在する場合には、アンチセンス化合物は「特異的にハイブリダイズ可能」である。

【0347】

本明細書に記載されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性は、当該技術分野で公知の1種以上のインビトロアッセイにより決定することができる。例えば本明細書に記載されたオリゴヌクレオチドの特性は、融解曲線アッセイを利用して、ターゲット天然アンチセンスと潜在的薬物分子の間の結合強度を決定することにより、得ることができる。

【0348】

ターゲット天然アンチセンスと潜在的薬物分子の間の結合強度は、分子間相互作用の強度を測定する確立された方法のいずれか、例えば融解曲線アッセイを用いて推定することができる。

【0349】

融解曲線アッセイにより、二本鎖コンホメーションから単一鎖コンホメーションへの急速な転位が、天然アンチセンス/分子複合体で起こる温度が決定される。この温度は、2種の分子の間の相互作用強度の信頼できる指標として広く受け入れられている。

【0350】

融解曲線アッセイは、分子の結合部位に対応する実際の天然アンチセンスRNA分子または合成DNAもしくはRNAヌクレオチドのcDNAコピーを用いて実施することができる。このアッセイを実施するのに必要な試薬を全て含む多数のキットが、入手可能である（例えば、Applied Biosystems Inc、Melt Doctorキット）。これらのキットは、二本鎖DNA（dsDNA）結合染色剤の1種（例えば、ABI HRM染色剤、SYBR Green、SYTOなど）を含む適切な緩衝溶液を含む。dsDNA染色剤の特性により、それらは遊離形態では蛍光をほとんど発光せず、dsDNAと結合すると高度の蛍光を発光する。

【0351】

アッセイを実施するために、cDNAまたは対応するオリゴヌクレオチドを、特定の製造業者のプロトコルにより定義された濃度の分子と混合する。混合物を95℃に加熱して、予め形成されたdsDNA複合体の全てを解離させ、その後、室温またはキットの製造業者が定義した他のより低い温度まで冷却して、DNA分子をアニーリングさせる。その後、新たに形成された複合体を95℃まで緩やかに加熱して、同時に反応により生成された蛍光の量についてのデータを連続して回収する。蛍光強度は、反応物中に存在するdsDNAの量に逆比例する。キットと適合性のあるリアルタイムPCR機器（例えば、ABI's StepOne Plus Real Time PCR System、またはLightTyper instrument, Roche Diagnostics, 英国ルイス）を利用して、データを回収することができる。

【0352】

適切なソフトウェア（例えば、LightTyper（Roche）、またはSDS Dissociation Curve, ABI）を用いて、温度に関する蛍光の負の導関数（y軸上の $(-d(\text{蛍光})/dT)$ ）を温度（x軸）に対してプロットすることにより、融解ピークを作成する。データを解析して、dsDNA複合体から一本鎖分子へ急速な転位の温度を同定する。この温度は T_m と呼ばれ、2分子間の相互作用の強度に正比例する。典型的には T_m は、40℃を超えるであろう。

【0353】

実施例2：FLGポリヌクレオチドの調整

アンチセンスオリゴヌクレオチドによるHEPG2細胞の処理

ATCCのHepG2細胞（カタログ番号HB-8065）を、生育培地（MEM/EBSS（Hyclone カatalog番号SH30024、またはMediatech カatalog番号MT-10-010-CV）+10%FBS（Mediatech カatalog番号MT35-011-CV）+ペニシリン/ストレプトマイシン（Mediatech カatalog番号MT30-002-CI））中で、37℃および5%CO₂で生育させた。実験当日に、6穴プレート中の培地を新しい培地に交換した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの全てを、20μM濃度に希釈した。この溶液2μlをOpti-MEM培地400μl（Gibco カatalog番号31985-070）およびリポフェクタミン2000 4μl（Invitrogen カatalog番号11668019）と共に室温で20分間インキュベートして、6穴プレートの各ウェルにHEPG2細胞を付加した。オリゴヌクレオチド溶液の代わりに水2μlを含む類似の混合物を、モックトランスフェクションの対照に用いた。37℃および5%CO₂で3~18時間インキュベートした後、培地を新しい生育培地に交換した。アンチセンスオリゴヌクレオチド添加の48時間後に、培地を除去して、PromegaのSV Total RNA Isolation System（カタログ番号Z3105）またはQiagenのRNeasy Total RNA Isolationキット（カタログ番号74181）を用いて、製造業者の使用説明書に従い、RNAを細胞から抽出した。Thermo ScientificのVerso cDNAキット（カタログ番号AB1453B）またはHigh Capacity cDNA Reverse

Transcriptionキット（カタログ番号4368813）を用いて、製造業者

のプロトコルに記載された通り実施した逆転写反応物に、RNA 600ngを添加した。この逆転写反応物のcDNAを用いて、ABI Taqman Gene Expression Mix (カタログ番号4369510)およびABIにより設計されたプライマー/プローブ(カリフォルニア州フォスターシティーのApplied Biosystems Inc.,によるApplied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs00856927_g1)を用いたリアルタイムPCRにより遺伝子発現をモニタリングした。以下のPCRサイクルを用いた: M×4000サーマルサイクラー(Stratagene)を用いて、50 で2分間、95 で10分間、(95 で15秒間、60 で1分間)を40サイクル。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された後の遺伝子発現の倍率変化を、処理試料とモックトランスフェクション試料の間の18S標準化dCt値の差に基づいて計算した。

結果: リアルタイムPCRの結果から、HepG2細胞中のFLG1 mRNAレベルがFLG1アンチセンスAK056431に対して設計されたオリゴの2種で有意に上昇することが示される(図1)。

【0354】

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる518A2細胞の処理

ニューヨークのAlbert Einstein-Montefiore Cancer Centerから得られた518A2細胞を、生育培地(MEM/EBS S(Hyclone カatalog番号SH30024、またはMediatech カatalog番号MT-10-010-CV)+10%FBS(Mediatech カatalog番号MT35-011-CV)+ペニシリン/ストレプトマイシン(Mediatech カatalog番号MT30-002-CI))中で、37 および5%CO₂で生育させた。実験前日に、細胞を1.5×10⁵/mlの密度で6穴プレートに入れて、37 および5%CO₂でインキュベートした。実験当日に、6穴プレート中の培地を新しい培地に交換した。アンチセンスオリゴヌクレオチドの全てを、20μM濃度に希釈した。この溶液2μlをOpti-MEM培地400μl(Gibco カatalog番号31985-070)およびリポフェクタミン2000 4μl(Invitrogen カatalog番号11668019)と共に室温で20分間インキュベートして、6穴プレートの各ウェルに518A2細胞を付加した。オリゴヌクレオチド溶液の代わりに水2μlを含む類似の混合物を、モックトランスフェクションの対照に用いた。37 および5%CO₂で3~18時間インキュベートした後、培地を新しい生育培地に交換した。アンチセンスオリゴヌクレオチド添加の48時間後に、培地を除去して、PromegaのSV Total RNA Isolation System(カタログ番号Z3105)またはQiagenのRNeasy Total RNA Isolationキット(カタログ番号74181)を用いて、製造業者の使用説明書に従い、RNAを細胞から抽出した。Thermo ScientificのVerso cDNAキット(カタログ番号AB1453B)またはHigh Capacity cDNA Reverse Transcriptionキット(カタログ番号4368813)を用いて、製造業者のプロトコルに記載された通り実施した逆転写反応物に、RNA 600ngを添加した。この逆転写反応物のcDNAを用いて、ABI Taqman Gene Expression Mix(カタログ番号4369510)およびABIにより設計されたプライマー/プローブ(カリフォルニア州フォスターシティーのApplied Biosystems Inc.,によるApplied Biosystems Taqman Gene Expression Assay: Hs00856927_g1)を用いたリアルタイムPCRにより遺伝子発現をモニタリングした。以下のPCRサイクルを用いた: StepOne Plus Real Time PCR Machine (Applied Biosystems)を用いて、50 で2分間、95 で10分間、(95 で15秒間、60 で1分間)を40サイクル。アンチセンスオリゴヌクレオチドで処理された後の遺伝子発現

10

20

30

40

50

の倍率変化を、処理試料とモックトランスフェクション試料との18S標準化dCt値の差に基づいて計算した。

結果：リアルタイムPCRの結果から、518A2細胞中のFLG mRNAレベルがFLG1アンチセンスAK056431に設計されたオリゴの2種で有意に増加することが示される(図2)。別の組み合わせのリアルタイムPCRの結果から、518A2細胞中のFLG mRNAレベルがFLG1アンチセンスAK056431に設計されたオリゴの2種で有意に上昇することが示される(図3)。

【0355】

実施例3：FLG発現および活性の調整

低分子化合物による518A2細胞の処理

518A2細胞を生育培地[DMEM(Mediatech カタログ番号MT-10-010-CV)+5%FBS(Mediatech カタログ番号MT35-011-CV)+ペニシリン/ストレプトマイシン(Mediatech カタログ番号MT30-002-CI)]中で、37 °Cおよび5%CO₂で生育させた。実験前日に、細胞をおよそ1×10⁴/mlで(または90%コンフルエンスの約1/5希釈で)6穴プレートに入れて、37 °Cおよび5%CO₂で一晩インキュベートした。実験当日に、6穴プレート中の培地を新しい培地2mlに交換した。低分子化合物をDMSOで1000 μMの濃度に希釈した。実験当日に、この溶液を新しい生育培地で1:100に希釈した。純粋なDMSOを培地で同じ比率(1:100)で希釈して、ビヒクル対照試料を処理した。1つのウェルに投与するために、化合物または純粋なDMSO溶液200 μlを6穴プレートのウェルに直接添加した。化合物の最終濃度は、1 μMであった。異なる濃度の化合物が望ましい場合、投与容量を調整した。投与後にプレートを37 °C、5%CO₂で一晩インキュベートした。低分子化合物添加の24時間後に、培地を新しい生育培地と交換して、先に記載された通り投与を繰り返した。2回目の投与の24時間後に、PromegaのSV Total RNA Isolation System(カタログ番号Z3105)を用いて、製造業者の使用説明書に従い、RNAを細胞から抽出した。Applied BiosystemsのHigh Capacity cDNA Reverse Transcriptionキット(カタログ番号4368813)を用いて、製造業者のプロトコルに記載された通り実施した逆転写反応物に全RNA 600 ngを添加した。この逆転写反応物のcDNAを用いて、ABI Taqman Gene Expression Mix(カタログ番号4369510)およびABIにより設計されたプライマー/プローブ(例えば、FLG用のHs00856927_g1)を用いたリアルタイムPCRにより遺伝子発現をモニタリングした。以下のPCRサイクルを用いた：StepOneサーマルサイクラー(ABI)を用いて、50 °Cで2分間、95 °Cで10分間、(95 °Cで15秒間、60 °Cで1分間)を40サイクル。mRNAレベルを標準化するために用いられる18Sのアッセイは、ABIにより製造された(カタログ番号4319413E)。低分子化合物で処理された後の遺伝子発現の倍率変化を、処理試料とモックトランスフェクション試料との18S標準化dCt値の差に基づいて計算した。

結果：リアルタイムPCRの結果から、低分子で処理された518A2細胞中でのフィラグリンmRNA発現の倍率変化が示される(図4)。

【0356】

低分子化合物による初代ケラチノサイトの処理

初代ケラチノサイト(Promocell)を生育培地(Keratinocyte Growth Media, Promocell カタログ番号C-20011)中で、37 °Cおよび5%CO₂で生育させた。実験前日に、細胞をおよそ5×10⁴/mlで(または90%コンフルエンスの約1/3希釈で)24穴コラーゲンコーティングプレート(Beckton Dickinson BioCoat plates cat #356408)に入れて、37 °Cおよび5%CO₂で一晩インキュベートした。実験当日に、24穴プレート中の培地を新しい培地1mlに交換した。低分子化合物をDMSOで1000 μMの濃度に希釈した。実験当日に、この溶液を新し

い生育培地で1:100に希釈した。純粋なDMSOを培地で同じ比率(1:100)に希釈して、ビヒクル対照試料を処理した。1つのウェルに投与するために、化合物または純粋なDMSO溶液100 μ lを24穴プレートのウェルに直接添加した。化合物の最終濃度は、1 μ Mであった。異なる濃度の化合物が望ましい場合、投与容量を調整した。投与後にプレートを37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で一晩インキュベートした。低分子化合物添加の24時間後に、培地を新しい生育培地と交換して、先に記載された通り投与を繰り返した。2回目の投与の24時間後に、PromegaのSV Total RNA Isolation System(カタログ番号Z3105)を用いて、製造業者の使用説明書に従い、RNAを細胞から抽出した。Applied BiosystemsのHigh Capacity cDNA Reverse Transcriptionキット(カタログ番号4368813)を用いて、製造業者のプロトコルに記載された通り実施した逆転写反応物に、全RNA 600ngを添加した。この逆転写反応物のcDNAを用いて、ABI Taqman Gene Expression Mix(カタログ番号4369510)およびABIにより設計されたプライマー/プローブ(例えば、FLG用のHs00856927 $_{-}g$ 1)を用いたリアルタイムPCRにより遺伝子発現をモニタリングした。以下のPCRサイクルを用いた: StepOneサーマルサイクラー(ABI)を用いて、50 $^{\circ}$ Cで2分間、95 $^{\circ}$ Cで10分間、(95 $^{\circ}$ Cで15秒間、60 $^{\circ}$ Cで1分間)を40サイクル。mRNAレベルを標準化するために用いられる18Sのアッセイは、ABIにより製造された(カタログ番号4319413E)。低分子化合物で処理された後の遺伝子発現の倍率変化を、処理試料とモックトランスフェクション試料との18S標準化dCt値の差に基づいて計算した。

結果:リアルタイムPCRの結果から、低分子で処理された初代ケラチノサイト中でのフィラグリンmRNA発現の倍率変化が示される(図4)。別の組み合わせのリアルタイムPCRの結果から、初代ケラチノサイト中でのFLG天然アンチセンス転写産物のレベルが、低分子ブプロピオン、ベンジピンおよびトピラマートで処理した後に有意に低下することが示される(図5)。

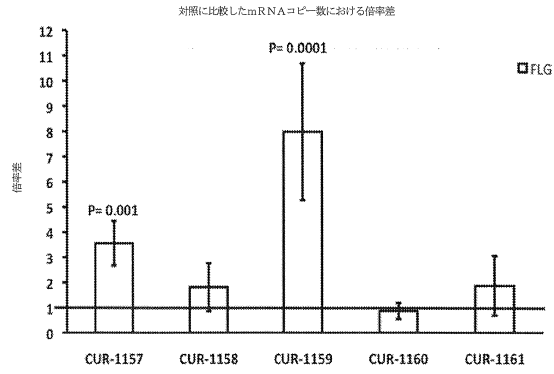
【0357】

本発明を1種以上の実施に関して例示および記載したが、他の当業者には、この明細書および添付の図面を読んで理解すれば、均等な変更および修正が起こりうるであろう。加えて本発明の特定の特徴を複数の実施のうちの1つのみに関して開示したが、任意の所定の、または特定の適用に望ましく有利となる可能性があるなら、そのような特徴を他の実施の他の特徴1つ以上と組み合わせてもよい。

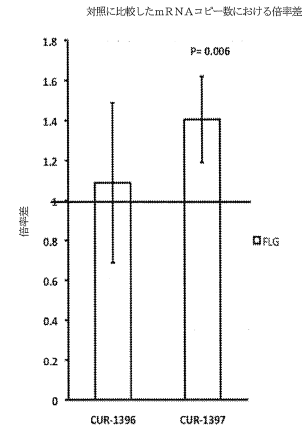
【0358】

本開示の要約書により、読者は技術的開示の本質を迅速に確認することができよう。それは、以下の特許請求の範囲の範囲および意義を解釈または限定するために用いられているのではないことを、理解されたい。

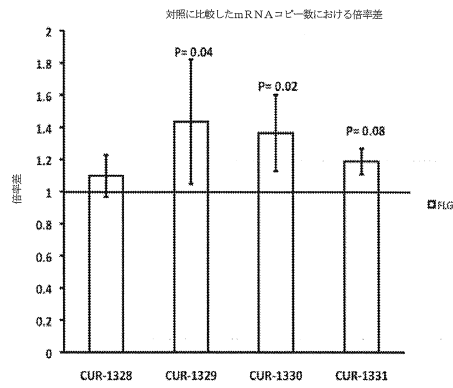
【図 1】



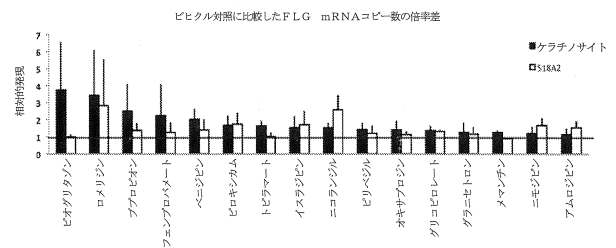
【図 3】



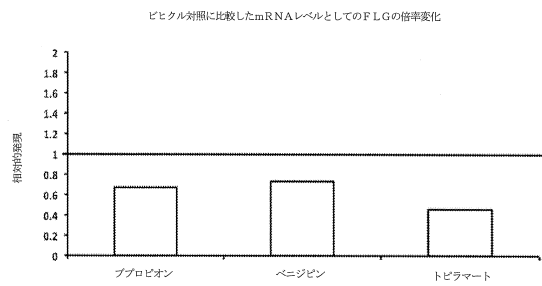
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006175236000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	17/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/04
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	17/16 (2006.01)	A 6 1 P	17/16
A 6 1 P	17/18 (2006.01)	A 6 1 P	17/18
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 P	21/02
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00 1 0 1
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
		C 1 2 Q	1/68 A

- (72)発明者 コルコワ シャーマン, オルガ
 アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 4 6 9, テケスタ, 1 8 2 8 8 エスイー ヘリテイジ ドラ
 イブ
- (72)発明者 コイト, カルロス
 アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 4 1 7, # 2 6 ウエスト パームビーチ, 4 5 1 8 コーニ
 ッチェ サークル

合議体

審判長 大宅 郁治
 審判官 松田 芳子
 審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 J. Allergy Clin. Immunol., 2006, 118(1), p. 214-9
 J. Invest. Dermatol., 1993, 101(2), p. 118-26
 Science, 2005, 309(5740), p. 1564-6

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00
 PubMed
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq