[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1136327A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94194295.3

[51]Int.Cl[6]

C12N 15/11

[43]公开日 1996 年 11 月 20 日

[22]申请日 94.9.28

[30]优先权

[32]93.9.28 [33]US[31]08/128,035

[86]国际申请 PCT/US94/10943 94.9.28

[87]国际公布 WO95/09236 英 95.4.6

[85]进入国家阶段日期 96.5.27

[71]申请人 综合医院公司

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 海布里登公司

[72]发明人 C·A·马罗塔 R·E·马佐查

S·阿加拉瓦尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

A61K 31/70 C07H 21/00

A61K 38/18 C12N 5/10

C12Q 1/68 A61K 9/22

权利要求书 7 页 说明书 43 页 附图页数 23 页

[54]发明名称 用反义寡核苷酸调节神经生长并使β/A4 淀粉样肽诱导的形态逆转

[57]摘要

本发明提供由某些抑制老年性痴呆症和唐氏先天愚症的β/A4 肽表达的寡核苷酸和神经生长因子(NGF)组成的物质组合物，用于使神经元细胞中由β/A4 肽引起的形态学变化逆转。此外，还描述了治疗β/A4 淀粉样蛋白诱导的形态的药物组合物、试剂盒和方法，以及用于筛选候选反义寡核苷酸的检测方法，所述反义寡核苷酸可用于治疗β/A4 淀粉样肽对细胞产生的有害影响。

权 利 要 求 书

1.逆转由 β/A4 肽引起的细胞形态变化的方法，所述方法包括给细胞施用有效量的抗β/A4 寡核苷酸的步骤。

2.治疗或预防动物老年痴呆症的方法，所述方法包括给所述动物施用有效量的抗β/A4 寡核苷酸的步骤。

3.治疗动物唐氏先天愚症的方法，所述方法包括给所述动物施用有效量的抗β/A4 寡核苷酸的步骤。

4.根据权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述抗β/A4 寡核苷酸互补于β/A4 肽翻译起始密码子。

5.根据权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述起始密码子是 APP mRNA 的起始密码子。

6.根据权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述抗β/A4 寡核苷酸互补于含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列。

7.根据权利要求 6 的方法，其中含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列是 APP 基因或 RNA 。

8.降低动物包括人的β/A4 肽的方法，所述方法包括给所述动物施用有效量的β/A4 寡核苷酸的步骤。

9.根据权利要求 8 的方法，其中所述抗β/A4 寡核苷酸互补于β/A4 肽翻译起始密码子。

10.根据权利要求 9 的方法，其中所述起始密码子是 APP mRNA 的起始密码子。

11.根据权利要求 8 的方法，其中所述抗β/A4 寡核苷酸互补于含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列。

12.根据权利要求 11 的方法，其中含有编码β/A4 肽之核苷酸序

列的核苷酸序列是 APP 基因或 RNA。

13.一种抗β/A4 寡核苷酸，它互补于β/A4 肽翻译起始密码子。

14.根据权利要求 13 的寡核苷酸，其中所述起始密码子是 APP mRNA 的起始密码子。

15.一种抗β/A4 寡核苷酸，它互补于含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列。

16.根据权利要求 15 的寡核苷酸，其中含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列是 APP 基因或 RNA。

17.根据权利要求 13 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是混合骨架寡核苷酸，含有一个或多个硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯区和一个或多个烷基膦酸酯或烷基硫代膦酸酯区。

18.根据权利要求 13 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是杂种寡核苷酸，含有一个或多个脱氧核糖核苷酸区和一个或多个核糖核苷酸区，而且约一个到约全部的核苷酸间连键是硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键。

19.根据权利要求 13 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸在其 3'末端以及任选在其 5'末端有选自低级烷基或醇基团的帽结构和图 1 所示的结构。

20.根据权利要求 13 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是在 3'末端有自我互补区的自我稳定的寡核苷酸。

21.根据权利要求 15 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是混合骨架寡核苷酸，含有一个或多个硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯区和一个或多个烷基膦酸酯或烷基硫代膦酸酯区。

22.根据权利要求 15 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是杂种寡核苷酸，含有一个或多个脱氧核糖核苷酸区和一个或多个核糖核苷酸区，而且约一个到约全部的核苷酸间连键是硫代磷酸酯或二硫代磷酸

酯键。

23.根据权利要求 15 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸在其 3'末端以及任选在其 5'末端有选自低级烷基或醇基团的帽结构和图 1 所示的结构。

24.根据权利要求 15 的寡核苷酸，其中所述寡核苷酸是在 3'末端有自我互补区的自我稳定的寡核苷酸。

25.一种药物组合物，该组合物含有权利要求 13 或 15 的寡核苷酸及药物学可接受的载体。

26.一种物质组合物，该组合物含有神经生长因子和抗β/A4 寡核苷酸。

27.根据权利要求 26 的物质组合物，其中所述抗β/A4 寡核苷酸互补于β/A4 肽翻译起始密码子。

28.根据权利要求 27 的物质组合物，其中所述起始密码子是 APP mRNA 的起始密码子。

29.根据权利要求 26 的物质组合物，其中所述抗β/A4 寡核苷酸互补于含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列。

30.根据权利要求 29 的物质组合物，其中含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列是 APP 基因或 RNA 。

31.根据权利要求 27 的物质组合物，其中所述寡核苷酸是混合骨架寡核苷酸，含有一个或多个硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯区和一个或多个烷基膦酸酯或烷基硫代膦酸酯区。

32.根据权利要求 27 的物质组合物，其中所述寡核苷酸是杂种寡核苷酸，含有一个或多个脱氧核糖核苷酸区和一个或多个核糖核苷酸区，而且约一个到约全部的核苷酸间连键是硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键。

33.根据权利要求 27 的物质组合物，其中所述寡核苷酸在其 3'末

端有选自低级烷基或醇基团的帽结构和图 1 所示的结构。

34.根据权利要求 27 的物质组合物，其中所述寡核苷酸在其 3'末端及 5'末端有选自低级烷基或醇基团的帽结构和图 1 所示的结构。

35.根据权利要求 27 的物质组合物，其中所述寡核苷酸是在 3'末端有自我互补区的自我稳定的寡核苷酸。

36.根据权利要求 29 的物质组合物，其中所述寡核苷酸是混合骨架寡核苷酸，含有一个或多个硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯区和一个或多个烷基膦酸酯或烷基硫代膦酸酯区。

37.根据权利要求 29 的物质组合物，其中所述寡核苷酸是杂种寡核苷酸，含有一个或多个脱氧核糖核苷酸区和一个或多个核糖核苷酸区，而且约一个到约全部的核苷酸间连键是硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键。

38.根据权利要求 29 的物质组合物，其中所述寡核苷酸在其 3'末端有选自低级烷基或醇基团的帽结构和图 1 所示的结构。

39.根据权利要求 29 的物质组合物，其中所述寡核苷酸在其 3'末端及 5'末端有选自低级基或醇基团的帽结构和图 1 所示的结构。

40.根据权利要求 29 的物质组合物，其中所述寡核苷酸是在 3'末端有自我互补区的自我稳定的寡核苷酸。

41.一种药物组合物，该组合物含有在药物学可接受的载体中的权利要求 26-40 中任一项所述的物质组合物。

42.一种用于对需要的患者给药的试剂盒，它含有分成间隔的载体装置以便在其中密封装入一个或多个容器装置，其中

(a) 第一容器装置装有 β /A4 反义寡核苷酸;

(b) 第二容器装置装有生长因子。

43.权利要求 42 的试剂盒，其中所述反义寡核苷酸在含水缓冲液或生理溶液中以溶液形式存在。

44.权利要求 42 的试剂盒，其中所述生长因子是神经生长因子。

45.权利要求 42 的试剂盒，其中所述生长因子是表皮生长因子。

46.权利要求 44 的试剂盒，其中所述神经生长因子在含水缓冲液或生理溶液中以溶液形式存在。

47.权利要求 44 的试剂盒，其中所述神经生长因子以冻干形式存在。

48.权利要求 42 的试剂盒，该试剂盒还含有

(c) 一个或多个装有不同于步骤(b)所用的生长因子的容器，所述生长因子在含水缓冲液或生理溶液中以溶液形式存在。

49.权利要求 42 的试剂盒，该试剂盒还含有

(c)一个或多个装有不同于步骤(b)所用的生长因子的容器，所述生长因子在含水缓冲液或生理溶液中以溶液形式存在。

50.治疗淀粉样蛋白病变的方法，该方法包括给需要的患者施用有效量的权利要求 41 所述的药物组合物。

51.治疗患者的淀粉样蛋白病变的方法，该方法包括

(a)给需要的患者施用有效量的 β /A4 淀粉样蛋白反义寡核苷酸;

(b)提高患者部分或全部中枢神经系统的 NGF 水平以刺激所述患者的神经营养作用。

52.根据权利要求 51 的方法，其中通过将生产 NGF 的细胞植入大脑内部位而提高 NGF 的水平。

53.根据权利要求 51 的方法，其中通过将生产 NGF 所必需的基因转移到不分裂的神经元或腺细胞中而提高 NGF 水平。

54.根据权利要求 51 的方法，其中通过大脑内 NGF 输注而提高 NGF 水平。

55.根据权利要求 51 的方法，其中通过植入生物可降解的缓释植入体而提高 NGF 水平。

56.根据权利要求 51 的方法，其中通过载体介导的跨血脑屏障运输而提高 NGF 水平。

57.用于筛选候选反义寡核苷酸的检测方法，所述反义寡核苷酸可

用于治疗因β/A4 淀粉样肽作用于细胞而产生的不良影响，所述方法包括

(a)将哺乳动物神经元细胞培养物接种在数个容器中;

(b)通过将不同浓度的不同β/A4反义寡核苷酸加到步骤(a)所接种的容器中而制备检测样品;

(c)通过不加寡核苷酸或将无义寡核苷酸加到步骤(a)所接种的数个其他容器中而制备对照样品;

(d)将检测样品和对照样品与标记的甲硫氨酸一起保温约 6 至约 24 小时;

(e)从各容器中收集上清液;

(f)将来自各容器的上清液与蛋白质 A 琼脂糖(PAS)接触，形成 PAS －淀粉样蛋白复合物;

(g)将 PAS －淀粉样蛋白复合物与抗β淀粉样蛋白抗体接触，形成 PAS －淀粉样蛋白－抗体复合物;

(h)在丙烯酰胺凝胶上经电泳分离 PAS －淀粉样蛋白－抗体复合物，形成对应于各细胞培养物的 PAS －淀粉样蛋白－抗体复合物条带;

(i)用光密度分析法测定条带中存在的4.3KD β淀粉样蛋白的水平;

(j)比较检测样品和对照样品中的 4.3KD β淀粉样蛋白水平，从而确定β/A4 反义寡核苷酸在降低所述细胞中的淀粉样蛋白生产中的效力;

(k)从步骤(j)中选择降低淀粉样蛋白生产最有效的那些寡核苷酸;

(l)确定将步骤(j)中所选的所述寡核苷酸加到用刺激所述神经元细胞生长和分化的生长因子处理的哺乳动物神经元细胞中所产生的影响;

(m)从步骤(l)中选择不抑制所述生长因子的营养作用的那些寡核苷酸。

58.根据权利要求 57 的检测方法，其中所述生长因子是神经元生长因子。

59.根据权利要求 58 的检测方法，其中所述神经元生长因子是人神经元生长因子。

60.根据权利要求 58 的检测方法，其中所述神经元生长因子是鼠神经元生长因子。

61.根据权利要求 57 的检测方法，其中所述生长因子是表皮生长因子。

62.根据权利要求 61 的检测方法，其中所述表皮生长因子是人表皮生长因子。

63.根据权利要求 61 的检测方法，其中所述表皮生长因子是鼠表皮生长因子。

64.根据权利要求 57 的检测方法，其中所述哺乳动物神经元细胞系是 PC12 。

65.根据权利要求 57 的检测方法，其中所述哺乳动物神经元细胞系是 IMR － 32 。

说　明　书

用反义寡核苷酸调节神经生长并使 β/A4 淀粉样肽诱导的形态逆转

发明背景

发明领域

本发明涉及治疗老年性痴呆症和唐氏先天愚症的方法。更具体地说，本发明涉及开发能够逆转与老年性痴呆症和唐氏先天愚症有关的由 A4 淀粉样肽引起的有害影响之治疗剂。

相关领域综述

老年性痴呆症(AD)与公共健康的关系日益密切。 Katzman (N. Engl. J. Med. 314: 964-973 (1986))认为这种综合症的特征在于成人的智力损伤严重以致于影响了职业或社会活动。 Hay 和 Ernst (Am. J. Pub. Health 77: 1169-1175 (1987))认为 AD 是成人发作性痴呆的最常见形式，而且在美国是导致死亡的第四位的原因。

与 AD 有关的痴呆在脑中伴有神经病理学改变。 Hyman 等人(Science 225: 1168-1170 (1984))公开了海马的主要输入和输出路径有很高浓度的衰老斑(SP)和神经原纤维丛(NFT)，它们可能功能性隔离了海马，从而使记忆受到损伤。 Mountjoy 等人(Aging 4: 1-11 (1983))公开了 AD 大脑中神经元的明显损失。 Coyle 等人(Science 219: 1184-1190 (1983))发现 AD 大脑乙酰胆碱阳性位点有所减少。

常与 AD 有关的一个特征是在大脑中存在含淀粉样肽的衰老斑(SP)。 Majocha 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6182-6186 (1988))

发现这些衰老斑的直径为约 9 到 50μm，而且形态和密度也不同。Wisniewski 和 Terry (Progress in Neuropathology, Zimmerman 编， Grune and Stratton, New York, N. Y. pp. 1-26(1973))认为 SP 由细胞外淀粉样肽、反应性细胞、含 NFT 的退化轴突、溶酶体、异常线粒体和星形细胞突组成。 Mertz 等人(Acta Neuropathol. 60: 113-124 (1983))认为 SP 的核心是由包括直径为 4-8nm 原纤维的淀粉样肽形成的。

已确定了 SP 的淀粉样肽的性质。 Glenner 和 Wong (Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 885-890 (1984))公开了 4.2KD 的 AD 脑衍生肽，所述肽具有28个氨基酸的特有序列。 Glenner和Wong (Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 1131-1135 (1984))还从唐氏先天愚症脑血管淀粉样肽中分离出了有相似序列的多肽。在 11 位上的一个氨基酸取代， Glu代替Gln，使两种蛋白质有所不同。 Masters 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4245-4249 (1985))公开了淀粉样肽斑核心衍生的 4.2kd 肽，其序列与 Glenner 和 Wong 的 AD 衍生肽的序列几乎相同。它在各种溶剂中较不易溶。 Castano 等人(Biochem. Biophys. Res. Commun. 141: 782-789 (1986))发现与 4.2kd AD 肽有同源性结构的短合成肽表现出相似的聚集特性。 Kang 等人(Nature 325: 733-736 (1987))发现引起衰老斑的肽为 42 或 43 个氨基酸长。该肽是从一个较大蛋白质切下的，现已知这个较大蛋白质是一种淀粉样前体蛋白或 APP，是一种由 21 号染色体上的一个座位确定的普遍性跨膜糖蛋白(Goldgaber et al., Science 235:877-880 (1987); Kang et al., Nature 325: 733-736 (1987); Kitaguchi et al., Nature 331: 531-534 (1988); Tanzi et al., Science 235: 880-882 (1987); Tanzi et al., Nature 331: 528-530 (1988); Ponte, et al., Nature 331: 525-527 (1988); Zain et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 929-933 (1988))。本文称所述肽为 β /A4 肽。

分子克隆实验(Glodgaber et al., Science 235: 877-880 (1987); Kang

et al., Nature (London) 326: 733-736 (1987); Robakis et al., PNAS USA 84: 4190-4194 (1987); Tanzi et al., Science 235: 880-884 (1987); Kitaguchi et al., Nature 331: 530-532 (1988); Ponte et al., Nature 331: 525-527 (1988); Tanzi et al., Nature 331: 527-530 (1980))表明淀粉样β－蛋白是至少三种不同前体(βAPP_{695}、βAPP_{751}、βAPP_{770})的一部分，所述三种前体由人21号染色体上的一个基因编码(Robakis et al., Lancet 1: 384-385 (1987))。βAPP_{751}和βAPP_{770}均含有βAPP_{695}所没有的与Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂(KPI)有高度序列同源性的56氨基酸插入片段(Kitaguchi et al., Nature 331: 530-532 (1988); Ponte et al., Nature 331: 525-527 (1988); Tanzi et al., Nature 331: 527-530 (1988))。在经检测的几乎每种组织中都有βAPP表达(Tanzi et al., Science 235: 880-884 (1987)),在脑中，βAPP既存在于神经元细胞也存在于非神经元细胞中(Robakis et al. (1988) In：“Disorders of the Developing Nervous System: Changing views on their origins, diagnosis and treatments.”(Swan, J. W. 编)Alan R. Liss, Inc. New York, NY)。

正是APP的羧基末端含有约42个氨基酸的产淀粉样蛋白β肽区(Kang et al., Nature 325: 733-736 (1987))。在β肽内经组成性分泌途径可以切下这个APP区(Esch et al., Science 248: 1122-1124 (1990))，由于没有留下完整的β淀粉样肽，所述的分泌途径是防止淀粉样蛋白形成的过程。最近证明，4kDa β淀粉样肽是正常的分泌产物，是经高尔基核内体介导的过程产生的，然后从细胞中释放出来(Shoji et al., Science 258: 126-129 (1992); Golde et al., Science 225: 728-730 (1992); Seubert et al., Nature 361: 260-263 (1993))。

近来，用分子生物学工具在确定β/A4肽在老年性痴呆症的病理学中所起的作用方面做了相当多的研究。Maestre等人(Brain Res. 599: 64-72 (1992))发现，生产β/A4肽的转染的PC12细胞比未转染的对照

细胞大，有较长的轴突，而且有明显较大数量的类似气泡和微绒毛的受膜限制的表面延伸部分。发现β/A4 定位于这些膜突起物中。Majocha 等人(Mol. Chem. Neuropathol. 18: 99-113 (1993))发现，表达β/A4 肽的转染 PC12 细胞分泌刺激轴突延长以及使细胞分化成神经元表型的因子。 Tate 等人(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7090-7094 (1992))发现，表达β/A4 肽的转染细胞在植入大鼠脑中后可明显地改变昼夜活动。

患有唐氏先天愚症(DS)之个体的脑病理学与 AD 中所见的变化几乎相同。作为 AD 特征的 NFT 和 SP 在 40 岁以上的 DS 病例中均能见到。 NFT 和 SP 的形态学和免疫组织化学在这两种疾病之间难以区分。神经化学变化也是类似的(参见 Ikeda， S. et al., Lab. Invest. 61: 133-137 (1989); Cole et al., Acta Neuropathol. 85: 542-552 (1993); Patterson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8266-8270 (1988); Ikeda et al., Prog. Clin. Biol. Res. 317: 313-323 (1989); Beyreuther et al., Prog. Clin. Biol. Res. 379: 159-182 (1992))。

尽管 APP 广泛分布于真核细胞中，但这种蛋白质的正常功能尚未完全阐明。已有几个方面的证据显示 APP 和神经生长因子(NGF)之间的关系。用 NGF 处理后诱导释放含所述蛋白质 KPI 区，但没有羧基末端部分的 125 和 120kDa APP (Refolo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 664-670 (1989))。给大鼠脑施用 NGF 提高了 APP mRNA 的水平(Refolo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 664-670 (1989))。给发育中的基底前脑施用 NGF 时，前体蛋白质(prion protein, PrP)和 APP mRNA 水平同时也会增加(Mobley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 9811-9815 (1988))。 695 异构体(isoform)的水平选择性地提高，但较高分子量的 APP 则不会。用 NGF 处理 PC12 细胞后，由于除胞质外 APP 还定位于生长锥和突，所以会发生 APP 的重新分布

(Fukuyama et al., Molec. Brain Res. 17: 17-22 (1993))。 APP 的抗体特异性地消除了 NGF 对轴突长度和分支的影响(Milward et al., Neuron 9: 129-137 (1992))。

此外，动物研究表明大脑中的上行胆碱能突出物表达低亲和性和高亲和性的 NGF 受体，而且是 NGF 敏感性的，可能也是 NGF 依赖性的。胆碱能损伤会导致认知障碍，但用 NGF 处理可改善动物的认知行为。此外，在人临床试验中，观察到在老年性痴呆症患者中进行 NGF 治疗得到阳性结果，表明部分逆转了 AD 在患者中的影响(Lars Olson, Experimental Neurology 124: 5-15 (1993))。

这些重要发现表明了β/A4 肽在 AD 和 DS 神经病理学中的活性作用。然而，需要确定可归因于β/A4 肽的病理学是否是可逆转的。治疗性化合物而不仅仅是预防剂的开发可能很大程度上取决于β/A4 肽诱导的病理学，特别是细胞体积增大、轴突延伸以及细胞分化成神经元表型的可逆转性。另外，还需要在所述潜在治疗性化合物用于临床试验前，测定所述化合物对老年性痴呆淀粉样肽生产的影响的体外检测方法。

发明概述

本发明涉及如下发现，即，有可能停止并逆转过度表达的β/A4 肽在细胞中的积累。因此，本发明提供逆转β/A4 肽对细胞造成的形态变化的方法。在第一方面，本发明方法包括给因β/A4 肽而发生形态变化的细胞施用能减少或消除β/A4 肽合成的寡核苷酸。可用于本发明方法的修饰的寡核苷酸主要是比常规寡核苷酸磷酸二酯更能耐受核酸降解作用的寡核苷酸，包括具有各种修饰的核苷间连键、混合骨架、核酸酶抗性 3'帽结构、形成整合三螺旋的结构或自我稳定结构、或其任何组合的寡核苷酸。所述的寡核苷酸酸优选具有与编码β

/A4 肽或其前体蛋白 APP(见图 13)的核苷酸序列互补或与β/A4 肽或 APP 转译起始密码子互补的核苷酸序列。令人惊奇的是，β/A4 肽表达的降低足以逆转由β/A4 肽诱导的形态变化，而不明显需要消除可能由β/A4 肽引起但随后由其他分子维持的其他作用。因此，需要检测在包括人的哺乳动物中降低β/A4 肽水平带来的影响，以测定β/A4 肽减少对整个生物的影响。本发明在第二方面提供了进行所述测定的方法。这些研究将优选先在非人哺乳动物中进行。所述研究包括给动物施用前述的修饰的寡核苷酸以逆转β/A4 肽对细胞造成的形态变化。

在第三方面，本发明还涉及治疗或预防动物特别是人的老年性痴呆症的方法。

在第四方面，本发明还涉及治疗动物特别是人的唐氏先天愚症的方法。

在第五方面，本发明提供了能降低细胞或动物中的β/A4 肽水平并能逆转β/A4 肽引起的细胞形态变化的寡核苷酸。本发明第一方面的讨论中已简要描述了这些寡核苷酸。

在第六方面，本发明还涉及药物组合物，所述药物组合物含有有效量的至少一种本发明的抗β/A4 寡核苷酸和药物可接受的载体。

在第七方面，本发明涉及含有神经生长因子和抗β/A4 寡核苷酸的物质组合物。

在第八方面，本发明提供含有神经生长因子和抗β/A4 寡核苷酸的药物组合物。

在第九方面，本发明教导了一种测定 APP 反义化合物对老年性痴呆淀粉样肽生产的影响的方法，包括增殖表达或优选过度表达β/A4 的哺乳动物细胞(如 PC12)的第一和第二培养物；将标记的甲硫氨酸加到第一和第二细胞培养物中；将细胞培养物培养一段时间；从第

一和第二细胞培养物中收集上清液；候选APP反义化合物。

在第十方面，本发明教导了一种预防、治疗和/或逆转β/A4淀粉样肽诱导的形态的方法，包括给需要的患者施用有效量的药物组合物，所述组合物含有神经生长因子和抗β/A4寡核苷酸。

附图的简要描述

图1：表示在本发明寡核苷酸的一个实施方案中所用的某些优选帽结构。

图2：表示本发明自我稳定的寡核苷酸实施方案的一种形式。

图3：表示本发明自我稳定的寡核苷酸实施方案的第二种形式。

图4：图示说明含淀粉样肽cDNA的Min载体。所示的插入片段携有β/A4肽(黑色垂直框)、APP编码序列的其余部分(白色垂直框)和非编码区(细垂直线)。

图5A、5B和5C：表示未转染细胞(图5A)、含转化载体而没有淀粉样肽插入片段的细胞(图5B)和用编码A4到APP C末端之载体DNA转染的细胞(图5C)的免疫染色图。

图6A、6B、6C和6D：表示与未转染细胞(图6A)或用无插入片段载体转染的细胞(图6B)相比较的β/A4转染的AC126(图6C)和AC127(图6D)细胞的光学显微照片。

图7：图示说明用无插入片段载体(V120)转染的细胞和β/A4转染细胞(AC126和AC127)的轴突长度和细胞大小。

图8A和图8C：表示未转染的(图8A)和β/A4转染的(图8B)PC12细胞的电子显微照片。

图9A、9B、9C和9D：表示未转染细胞(图9A)、无插入片段载体转染的细胞(图9B)和β/A4转染的AC126细胞(图9C)和AC127(图9D)细胞之膜突起物的电子显微照片。

图 10： 图示说明在未转染(NN)、无插入片段载体转染的(V120)和β/A4 转染的(AC126 和 AC127)细胞膜中微绒毛和/或气泡样结构的频率。

图 11A、 11B、 11C 和 11D： 表示未转染细胞(图 11 A)、用无插入片段载体转染的细胞(图 11B)和β/A4 转染的 AC126(图 11C)和 AC127 细胞(图 11D)的电子显微照片。

图 12A 和 12B： 用抗核糖核酸酶抑制剂蛋白抗体(图 12A)或抗β A/4 抗体(图 12B)免疫染色细胞的电子显微照片。

图 13A 和 13B： 描述 Kang 等人(Nature 325: 733-736 (1987))公开的 APP 的 cDNA 序列(SEQ ID No.12), 从中可构建与相应的 mRNA 序列互补的抗β/A4 寡核苷酸。起始密码子从核苷酸 147 开始。β/A4 蛋白质的编码序列是从核苷酸 1935 到 2060。 APP 编码序列终止于核苷酸 2231 。

图 14A 和图 14B: 描述不存在(图 14A)或存在(图 14B)具有 SEQ ID No.1 之反义寡核苷酸的情况下培养的免疫染色的 AC127 细胞。

图 15A、 15B 和 15C： 描述加入反义寡核苷酸后 PC12 细胞的形态。将 PC12 细胞与各种浓度的与 APP mRNA 5'末端区互补的寡核苷酸-1 反义寡核苷酸一起保温 1 周。图 15A： 未处理细胞。图 15B： 加入 10μg/ml 寡核苷酸-1 。图 15C： 加入 20μg/ml 寡核苷酸-1 。固定细胞，然后用 0.1%考马斯蓝染色。短横= 50μm 。

图 16： 描述影响细胞表面积的反义寡核苷酸量。将寡核苷酸-1 反义寡核苷酸和无关的寡核苷酸-2 以 0 、 10 和 20μg/ml 加到 PC12 细胞培养物中，保温 1 周。随后在细胞体面积的图象分析检测前，固定这些细胞，用 0.1%考马斯蓝染色。在用 10 和 20μg/ml 寡核苷酸-1 处理后，表面积有显著降低($p<0.01$)。寡核苷酸-2 的作用不显著。每种类型计数 150 个细胞。

图 17A、 17B 和 17C： 描述用 10μg/ml 寡核苷酸-1 处理 10 天后， PC12 细胞蛋白质提取物的 Western 印迹。用抗 APP 抗体进行免疫染色。图 17A：未处理细胞的蛋白质提取物有主要的 120-150kD APP 条带。标明了分子量标记。图 17B： 用 10μg/ml 寡核苷酸-1 处理，与未处理对照相比，按上样总蛋白量计 APP 水平有 33%的降低。图 17C： 用 15μg/ml 处理使 APP 水平降低 60%。用图象分析进行定量。

图 18： 描述用 NGF 预处理后，寡核苷酸-1 对 PC 细胞面积的影响。用 100ng/ml NGF 将细胞处理 48 小时，然后暴露于浓度为 15μg/ml 的寡核苷酸-1 中 0、 1 和 2 天，如图所示。在开始 NGF 处理后，细胞体大小(0 天标明的)显著高于($p<0.05$)低于 500μm^2 的未处理细胞的大小。随后加入寡核苷酸-1 1 和 2 天，对于对 NGF 的反应没有明显的影响。细胞体面积的图象分析前，固定细胞，然后用 0.1%考马斯蓝染色。每个柱代表至少 100 个观察结果的平均值。

图 19： 描述用 NGF 预处理后，寡核苷酸-1 对 PC12 轴突长度的影响。条件和资料分析与图 18 的说明中所述的相同。

图 20：描述用寡核苷酸-1 或寡核苷酸-2 预处理后， NGF 对 PC12 细胞面积的影响。将 PC12 细胞与 0、 5、 10 或 15μg/ml 的寡核苷酸-1 一起保温 2 天，然后在相同寡核苷酸浓度加 100ng/ml NGF 下再保持 4 天。在 15μg/ml，与未暴露于反义寡核苷酸的细胞相比，寡核苷酸-1 对表面积的影响显著($p<0.01$)。用 0 和 15μg/ml 寡核苷酸-2 重复相同的实验。固定细胞，用 0.1%考马斯蓝染色，然后用图象分析评估。每个柱代表至少 100 个测量结果的平均值。

图 21：描述用寡核苷酸-1 或寡核苷酸-2 预处理后， NGF 对 PC12 轴突长度的影响。在不存在寡核苷酸(对照)或存在指明的 15μg/ml 寡核苷酸-1 或寡核苷酸-2 的情况下，将 PC12 细胞培养 2 天。细胞有突起物伸出并测量轴突长度。与未暴露于寡核苷酸-1 的细胞相比，寡核

苷酸-1 的作用显著($p<0.01$)。每个柱代表至少 100 个测量结果的平均值。

图 22A 和 22B：描述 NGF 对用反义寡核苷酸预处理的 PC12 细胞的影响。图 22A：仅用 NGF 处理的细胞。图 22B：将 PC12 细胞与 15ng/ml 寡核苷酸-1 一起保温 2 天，然后在相同寡核苷酸浓度加 100ng/ml NGF 下再保持 4 天。短横 = 50 μm。

优选实施方案的详细描述

本发明涉及开发治疗老年性痴呆症(AD)和唐氏先天愚症(DS)的方法。本发明提供能预防和逆转用 β/A4 淀粉样肽作用于细胞而产生之有害影响的潜在治疗剂，所述肽对 AD 和 DS 的病理学有重要影响。因此，在本发明中，“治疗”指预防、减轻和/或逆转。

在第一方面，本发明提供逆转因在细胞中表达 β/A4 肽而诱导的形态变化的方法。在本发明的所述方法中，给表达 β/A4 肽并因其表达 β/A4 肽而产生形态变化的细胞施用抗 β/A4 寡核苷酸。所述的形态变化包括但不限于细胞体积的增大、细胞聚集、气泡和/或微绒毛样膜突起物的形成、轴突长度的增加。

在本发明方法中，“抗 β/A4 寡核苷酸”指这样一些寡核苷酸，其核苷酸序列通过特异性 Watson-Crick 或 Hoogstein 碱基配对与 β/A4 肽表达所涉及的特异性互补核苷酸序列相互作用从而降低 β/A4 肽的表达。优选地，所述寡核苷酸与 β/A4 肽表达所涉及的特异性核酸序列之间的相互作用是经 Watson-Crick 碱基配对形成双螺旋、经 Hoogstein 碱基配对形成三螺旋、或这两种情况的结合。β/A4 肽表达所涉及的特异性核酸序列是至少编码 β/A4 肽的基因或 RNA 分子。在这里，术语“基因”指含有启动子、至少编码 β/A4 肽之核苷酸序列和被动性终止子的结构。在一个最优选的实施方案中，所述基因是熟

知的 APP 基因。相似地，术语“ RNA ”包括至少编码β/A4 肽的核 RNA 或信使 RNA 。所述 RNA 优选编码 APP 蛋白质。在本发明方法的某些实施方案中，施用于细胞的寡核苷酸互补于含有β/A4 肽转译起始密码子的核苷酸序列。术语“互补于某个核苷酸序列”指与所述序列的互补性足以在细胞中即生理条件下与该序列杂交。实际上，通过确定基因表达是否被降低可以确定所述杂交存在与否。术语“β/A4 肽转译起始密码子”指作为转译开始密码子的转译起始密码子，所述的转译产生含有β/A4 肽的多聚氨基酸产物。在一个最优选的实施方案中，超始密码子是 APP 的起始密码子。在某些其他实施方案中，本发明方法施用与编码β/A4 肽之核苷酸序列互补的寡核苷酸。另外，所述寡核苷酸也可以与含编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列互补。后一寡核苷酸的一个优选实例是与编码 APP 之核苷酸序列互补的寡核苷酸。所述寡核苷酸的具体实例包括但不限于:

1. [SEQ ID NO. 1] 5′-CCTCTCTGTTTAAAACTTTATCCAT-3′;
2. [SEQ ID NO. 2] 5′-TTCATATCCTGAGTCATGTCG-3′;
3. [SEQ ID NO. 3] 3′-GTCCCAGCGCTACGACGGGCCAAA-5′;
4. [SEQ ID NO. 4] 3′-GTCCCAGCGCTAC-5′;
5. [SEQ ID NO. 5] 3′-TACGACGGGCCAAA-5′;
6. [SEQ ID NO. 6] 3′-GTCCCAGCGCTACGACGGGCC-5′;
7. [SEQ ID NO. 7] 3′-GTCCCAGCGCTACGACGG-5′;
8. [SEQ ID NO. 8] 3′-GTCCCAGCGCTACGA-5′;
9. [SEQ ID NO. 9] 3′-CCAGCGCTACGACGGGCCAAA-5′;
10. [SEQ ID NO. 10] 3′-GCGCTACGACGGGCCAAA-5′;
11. [SEQ ID NO. 11] 3′-CTACGACGGGCCAAA-5′;
12. [SEQ ID NO. 15] 5′-AAACCGGGCAGCATCGCGACCCTG-

在下文本发明第三方面的讨论中，将更详细地讨论在本发明本方面方法中有用的优选寡核苷酸。简言之，它们比常规的寡核苷酸磷酸二酯对核酸降解有更强的抗性。在某些优选实施方案中，所述寡核苷

酸可以有各种修饰的核苷间连键、混合骨架、核酸酶抗性 3'帽结构、形成整合三螺旋的结构或自我稳定结构或其任何组合。

本发明本方面的方法可用于各种目的。尤其是，本方法可提供有关细胞中产生各种形态变化所必需的β/A4 肽表达剂量或水平的资料。通过降低施用于细胞的寡核苷酸量，以便只是部分降低β/A4 肽的表达，可达到此目的。本方法通过首先完全逆转所述变化，然后除去寡核苷酸并观察再发生所述变化的时间和顺序，也可以提供有关由β/A4 肽诱导的形态变化的时间和顺序方面的资料。在应用中，所述方法提供了有关对逆转β/A4 肽诱导的形态变化最有效的寡核苷酸的具体性质方面的资料。本发明是基于令人惊奇地发现寡核苷酸可逆转β/A4 肽诱导的形态变化。但此外，通过考察剂量要求和形态变化逆转的程度，所述方法可以使本领域专业人员确定用于逆转形态变化的核苷酸序列、骨架组成、二级结构、碱基修饰等的最有效组合。

在第二方面，本发明提供了在动物包括人中降低β/A4 肽表达的方法。在本发明本方面的方法中，将寡核苷酸施用于动物从而使β/A4 肽表达降低。施用于非人动物时，所述寡核苷酸的核苷酸序列可以与适宜的非人β/A4 肽或 APP 基因互补。在下文本发明第三方面的讨论中，将详细描述所述寡核苷酸的化学组成。这些寡核苷酸的作用方式与对本发明第一方面方法描述的相同。可以将所述寡核苷酸经口、静脉内、鼻内、腹膜内、经肛门、注射到脑脊液中或直接注射到脑中给药。另外，可以将本发明寡核苷酸配制成含有聚合载体的植入物或缓释胶囊的一部分。例如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, Osol. (ed.) (1990)中公开了所述的聚合载体。在另一实施方案中，通过一个泵植入体或体外泵可以连续施用本发明的寡核苷酸。

施用寡核苷酸的优选剂量为 1-100mg/kg 动物体重。

可以作为药物组合物的一部分而施用抗β/A4寡核苷酸，所述的药物组合物含有药物学可接受的载体，例如可以是生理盐水或生理葡萄糖溶液。可含有可提高悬浮液粘度之物质的注射水悬浮液包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。悬浮液也可以含有稳定剂。制备和施用所述药物组合物的方法可参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, Osol (ed.) (1990)。

在开始的研究中，优选将所述的寡核苷酸施用于非人动物，最好是哺乳动物。所述的施用过程提供了有关在动物中降低β/A4 肽表达的最有效剂量和施用途径的资料。随后，将所述的寡核苷酸施用于患有 AD 或 DS 的人。预期所述的施用可逆转因β/A4 肽作用于脑细胞而诱导的形态变化，由此产生治疗效果。

在第三方面，本发明提供可用于逆转因β/A4 肽作用于细胞而诱导的形态变化的抗β/A4 寡核苷酸。本发明的“抗β/A4 寡核苷酸”包括具有与表达β/A4 肽有关的特定核酸序列相互作用从而降低β/A4 肽表达之核苷酸序列的那些寡核苷酸。优选地，寡核苷酸与涉及β/A4 肽表达之特定核酸序列间的相互作用是经 Watson-Crick 碱基配对形成双螺旋结构、经 Hoogstein 碱基配对形成三螺旋结构或其结合。参见，例如，PCT 公开号 WO91/06626、WO92/08791、WO92/11390 和 WO92/10590 。优选地，涉及β/A4 肽表达的特定核酸序列是至少编码β/A4 肽的基因或 RNA 分子。在本文中，术语“基因”指含有启动子、至少编码β/A4 肽的核苷酸序列、和被动终止子的结构。在一个最优选的实施方案中，所述基因是熟知的 APP 基因。相似地，术语“RNA”包括至少编码β/A4 肽的核或信使 RNA 。优选地，所述 RNA 编码 APP 蛋白。在本发明本方面的某些实施方案中，所述的寡核苷酸互补于含有β/A4 肽转译起始密码子的核苷酸序列。术语“互补于某核苷酸序列”指与某序列有足够的互补性从而能够在细胞中即生理条

件下与所述序列杂交。实践上，通过确定基因表达是否降低可以确定是否存在所述的杂交。术语“β/A4 肽转译起始密码子”指为生产含有β/A4 肽之多聚氨基酸产物的转译起开始密码子作用的转译起始密码子。在最优选的实施方案中，所述的起始密码子是 APP 的起始密码子。在某些其他实施方案中，抗β/A4 寡核苷酸与编码β/A4 肽的核苷酸序列互补。另外，所述的寡核苷酸可以与含有编码β/A4 肽之核苷酸序列的核苷酸序列互补。所述后一种核苷酸的优选实例是与编码 APP 之核苷酸序列互补的寡核苷酸。所述的寡核苷酸可含有约 8 - 约 100 个核苷酸碱基。

本发明的抗β/A4 寡核苷酸可以任选含有其他核糖核苷酸、 2'-取代的核糖核苷酸、和/或脱氧核糖核苷酸单体，它们经可包括本领域已知的任何核苷酸间连键的 5'到 3'键相连。优选地，所述修饰的寡核苷酸可以任选含有磷酸二酯键、磷酸三酯键、磷酰胺化物键、硅氧烷键、碳酸酯键、羧甲基酯键、乙酰胺化物键、氨基甲酸酯键、硫醚键、桥接的磷酰胺化物键、桥接的亚甲基膦酸酯键、桥接的硫代磷酸酯键和/或砜核苷酸间连键。本领域技术人员将会知道，含有上述任何核苷酸间连键的寡核苷酸的合成都是本领域技术人员所公知的，正如由 Uhlmann 和 Peyman, Chemical Reviews. 90: 543-584 (1990)和 Schneider 和 Banner, Tetrahedron Lett. 31: 335 (1990)的文章所说明的。优选地，本发明之修饰的寡核苷酸应共含有约 6 到约 100 个单体。所述修饰的寡核苷酸也可任选含有修饰的核酸碱基和/或糖，以及外加的取代基，如二胺、胆甾烯基或其它亲脂基团。

在一个优选的实施方案中，本发明抗β/A4 修饰寡核苷酸是混合骨架形式的寡核苷酸，它含有经硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯核苷酸间连键相连的一个或多个核苷酸区域(“硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯区域”)以及经烷基膦酸酯或烷基硫代膦酸酯核苷酸间连键相连的一个或

多个核苷酸区域(“烷基膦酸酯或烷基硫代膦酸酯区域”)。在该实施方案中，至少一个烷基膦酸酯区域优选包括位于或靠近寡核苷酸 5’末端和/或 3’末端的核苷酸。就本发明的目的而言，“位于或靠近寡核苷酸的 5’或 3’末端”指至少一个核苷酸在所述寡核苷酸 5’或 3’末端的约 5 个核苷酸内。优选地，烷基膦酸酯或烷基硫代膦酸酯区域含有经烷基膦酸酯连键相连的约 2 到约 10 个相邻的核苷酸。优选地，所述硫代膦酸酯或二硫代膦酸酯区含有至少 3 个，最多约 100 个经硫代膦酸酯或二硫代膦酸酯连键相连的相邻核苷酸。

通过固相方法，使硫代磷酸酯区的 H －膦酸酯化学和硫氧化作用与烷基膦酸酯区的烷基膦酰胺化物化学交替进行，从而合成本发明本实施方案的抗β/A4 修饰寡核苷酸。 Agrawal 等人的美国专利 5,149,798 教导了一种优选的 H －膦酸酯方法，所教导的内容引入本文作为参考。烷基膦酰胺化物化学是本领域熟知的，参见 Agrawal 和 Goodchild, Tetrahedron Lett. 28: 3539-3542 (1987)。合成含二硫代磷酸酯的寡核苷酸的方法也是本领域熟知的。参见美国专利 5,151,510 ，其内容引入本文作为参考(另见例如， Marshall 和 Caruthers, Science 259: 1564-1570 (1993)以及其中引用的文献)。最后，合成含烷基硫代膦酸酯的寡核苷酸的方法是本领域已知的，参见 Padmapriya 和 Agrawal, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 3:761-764 (1993)。

在另一优选的实施方案中，本发明抗β/A4 修饰寡核苷酸是杂交形式的寡核苷酸，含有脱氧核糖核苷酸区(“脱氧核糖核苷酸区”)和核糖核苷酸或 2’－取代的核糖核苷酸区(“核糖核苷酸区”)。优选地，约 1 个至所有的核苷酸间连键是硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯键。优选的 2’-取代的核糖核苷酸是卤素、氨基、烷基、芳基或低级烷基(1-6 个碳原子)取代的核糖核苷酸，特别是 2’-OMe-核糖核苷酸。优选至少某些核糖核苷酸区包括位于或靠近所述寡核苷酸 5’末端和/或 3’末端

的核苷酸。更优选的是，各核糖核苷酸区都含有约 2 个，优选约 4 到 100 个相邻的核糖核苷酸和/或 2'-取代的寡核苷酸。脱氧核糖核苷酸区是任选的，若有该区则它可含有约 1 到约 100 个相邻的脱氧核糖核苷酸。

一般通过固相方法，优选通过亚磷酰胺或 H-膦酸酯方法。使用用于脱氧核糖核苷酸区的脱氧核苷酸 H-膦酸酯和用于核糖核苷酸区的核糖核苷酸或 2'-取代的核糖核苷酸 H-膦酸酯，合成本发明本实施方案的抗β/A4 寡核苷酸。

在另一优选的实施方案中，本发明的抗β/A4 寡核苷酸是寡核苷酸形式的，在其 5'和/或优选在其 3'末端有一个帽结构，使所述寡核苷酸具有核酸外切酶抗性。所述修饰的寡核苷酸优选地也有 1 到约全部修饰的(非磷酸二酯)核苷酸间连键。优选的帽结构包括图 1 所示的结构，以及低级烷基(C1-C12)或醇基团。优选的修饰的核苷酸间连键包括磷酸三酯、磷酰胺化物、硅氧烷、碳酸酯、羧甲基酯、乙酰胺化物、氨基甲酸酯、硫醚、桥接的磷酰胺化物、桥接的亚甲基膦酸酯、桥接的硫代磷酸酯、砜、硫代磷酸酯和二硫代磷酸酯连键。

按照本领域熟知的方法(见如: Uhlmann 和 Peyman, Chemical Reviews 90: 543-584 (1990); Schneider 和 Banner, Tetrahedron Lett. 31: 335 (1990))合成本发明本实施方案的抗β/A4 寡核苷酸。为使寡核苷酸在 3'末端具有帽结构，将帽结构可逆地连在固相载体上，然后在合成过程中将其与第一个核苷酸单体偶联。为使寡核苷酸在 5'末端有帽结构，在合成过程中加入最后一个核苷酸单体后，将帽结构与所述寡核苷酸的末端偶联。

在另一优选的实施方案中，抗β/A4 寡核苷酸因在 3'末端有一个自我互补区而自我稳定，所述自我互补区与寡核苷酸分子内杂交，从而形成具有核酸外切酶抗性的发夹样结构。本发明本实施方案的抗β

/A4 寡核苷酸的一般特征在于有两个区：靶杂交区和自我互补区。所述靶杂交区含有与上文所述的靶互补的核苷酸序列。所述区优选有约6到约100个核苷酸。本发明的一种所述实施方案示于图2。在此实施方案中，以相连的方块表示靶杂交区，以相连的圆圈表示自我互补区。用相连的菱形表示靶流感病毒信使RNA分子中的互补核酸序列。用圆点表示核苷酸间的氢键。寡核苷酸是稳定的，即，通过靶杂交区与自我互补区之间的碱基配对和/或自我互补区内互补序列间的碱基配对而产生对核酸外切酶降解的抗性。如果寡核苷酸遇到具有互补核酸序列的靶核酸分子，则寡核苷酸的靶杂交区与自我互补区之间的碱基配对受到破坏，而由寡核苷酸的靶杂交区与靶核酸分子的互补核酸序列间的碱基配对所取代。这种碱基配对的破坏和取代之所以会发生原因在于通过靶核酸序列与靶杂交区之间经杂交而形成的分子间碱基配对结构比自我互补寡核苷酸形成的分子内碱基配对结构有更高的热力学稳定性。

本发明本实施方案的第二种寡核苷酸形式以与第一种形式相似的方式操作，但由于自我互补碱基配对形成了不同的结构。这种不同的形式形成如图3所示的锤状结构。在这种形式中，自我互补区含有可以与自我互补区内的其它寡核苷酸序列进行碱基配对的寡核苷酸序列。所述的自我互补区还可含有与靶杂交区互补的寡核苷酸序列。

本发明自我稳定寡核苷酸的第二个重要区域是自我互补区。所述自我互补区含有与寡核苷酸内的其他寡核苷酸序列互补的寡核苷酸序列。这些其他的寡核苷酸序列可以在靶杂交区内或在自我互补区内，或者它们可跨过这两个区。互补序列形成碱基对，从而形成如图2所示的发夹结构或如图3所示的锤状结构。发夹结构或锤状结构可以有由未配对的核苷酸形成的环，如图2所示的发夹结构，或者没有所述的环，如图3所示的锤状结构。涉及自我互补区的分子内杂交所

形成的碱基对的数量可能有变化，但应足以保持双链结构以使核酸外切酶不能接近3'末端。通常，约4个或更多的碱基对对于保持所述的双链结构是必需的。在优选的实施方案中，在自我稳定的寡核苷酸中形成约10个分子内碱基对，这10个碱基对是连续的，涉及最靠近3'的核苷酸。当然，分子内碱基配对可以很广泛以至涉及寡核苷酸的每个核苷酸。优选地，这将涉及约50个核苷酸或少于50个核苷酸的自我互补区。

本实施方案的寡核苷酸可以有 1 个到约所有如第四实施方案所述的修饰的核苷酸间连键。优选地，至少靶杂交区或自我互补区二者之一，且最好为两者，含有约2到约所有经硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯键偶联的核苷酸。

如前所述，尽管淀粉样前体蛋白(APP)广泛分布于真核细胞中，但其在细胞功能中的确切作用尚未完全搞清。 APP 是一种糖蛋白膜组分，可能有利于与膜有关的功能。研究了APP在介导细胞营养反应中起作用的可能性。制备APP 5'末端的反义寡核苷酸，并证明该反义寡核苷酸可特异性地降低APP异构体的水平。在顺序的混合实验中，观察到 APP 反义寡核苷酸并不明显地改变用 NGF 预处理过的 PC12 细胞的营养反应。然而，用反义寡核苷酸预处理细胞消除了 NGF 诱导的细胞大小和轴突长度的增加。这些结果表明APP可能在调节营养反应中起作用。由于已知NGF通常会提高APP水平，所以将APP反义寡核苷酸与神经营养剂结合使用在治疗老年性痴呆方面可能有临床实用性。

优选将本发明的上述寡核苷酸与神经生长因子(NGF)结合使用以预防和/或逆转体内或体外因淀粉样蛋白沉积而引起的形态变化。也可以使用其他生长因子例如表皮生长因子(EGF)，只要所用的细胞有该特定生长因子的受体，而且可以受到刺激而生长或分化。此外，包括

NGF 的生长因子的来源可以来自任何哺乳动物，包括小鼠和人。优选在加入/施用 NGF 后加入寡核苷酸以刺激正常神经元细胞的生长和增殖。

正如 L. Olson (Experimental Neurology 124: 5-15 (1993))所报导的，以来自在帕金森症患者中大脑内输注 NGF 的背景资料为基础，试图维持核内嗜铬组织移植物，用无线电控制的完全可移植泵装置将 NGF 输送到侧室，从而开始研究。在试验性病例中，观察到数个短暂的或更长持续期的改善。这些改善包括用正电子断层照相法评估的血流和烟碱结合的增加以及 EEG 和某些测试口头短期记忆能力的心理测验的改善。在尸检材料中证明，老年性痴呆脑组织的特征在于丢失了烟碱受体部位。因此，非常有趣的是，在老年性痴呆症已知受到侵害的皮层区中，老年性痴呆患者的[^{11}C] - 烟碱摄取和结合得到提高。一个有趣的意外现象是，使用标记的丁醇用正电子断层照相法证明大脑血流有明显的增加。此外， EEG 读数所表明的改善比测量血流时所见到的改善持续的时间明显较长。他们还提供了另一项患者积极变化的独立指标。在停止 NGF 输注一年后 EEG 的部分正常化仍然显著这一事实也令人鼓舞。

血流和烟碱结合的正电子断层照相测量结果、 EEG 的变化、某些认知测验、以及配偶所报告的言语交流和日常活动部分恢复，说明了积极的暂时变化。在跟踪调查中，这些变量中有一些恢复到治疗前的水平，这一事实表明：这些变量是暂时性地与 NGF 输注有关。

第一位接受NGF的老年性痴呆患者和接受由核内NGF输注维持的核内肾上腺髓质组织自体移植之帕金森症患者的结果表明，将高度纯化的小鼠β-NGF 长时间施用于人脑的核中心或侧室，其耐受程度相当好。

此外，在老年性痴呆症患者病例中，腰 CSF 样品中的 NGF 量和

生物活性的测量结果表明，即使离输注部位象腰部这样远，进行室内输注也使CSF中的NGF达到有效水平。另外，四个NGF治疗前、治疗期间和治疗之后的患者的血样已表明，来自这两个大脑内途径的NGF并未以任何明显的量进入全身性循环中，而且还表明也未形成显著量的抗NGF抗体。

因此，本发明的另一方面涉及含有神经生长因子和抗－β/A4寡核苷酸的物质组合物。抗β/A4寡核苷酸可以与β/A4肽转译起始密码子互补。此外，寡核苷酸可以是RNA，该RNA优选与β/A4 RNA区互补。预期RNA和DNA寡核苷酸与β/A4 mRNA(如暴露的核苷酸，例如作为β/A4 mRNA发夹环一部分的核苷酸)和/或编码APP的DNA结合，从而分别防止其转录和/或转译。所述物质组合物可用于例如分析检测中，以确定在治疗与过量生产天然细胞蛋白有关的变性疾病(如AD和DS)中，生长因子和反义寡核苷酸的理想组合。在这些疾病中，使用适当的生长因子可以促使恶变组织重建，而反义寡核苷酸则能调节天然蛋白质的生产水平。特别是，所述的检测提供了有关β/A4肽剂量或表达水平以及生长因子如NGF或EGF的剂量和种类的资料，这对于逆转在出现AD患者异常神经元细胞的形态特征的细胞中的各种异常形态变化是必需的。本发明的另一方面涉及用于给需要的患者用药的药盒，它含有分成间隔的载体装置以便在其中密封装入一个或多个容器装置，其中

(a) 第一容器装置装有β/A4反义寡核苷酸；

(b) 第二容器装置装有生长因子。

本发明的反义寡核苷酸在试剂盒中以含水缓冲液或生理溶液形式存在。本发明优选的生长因子是神经生长因子，但也可以用其它生长因子，例如表皮生长因子。生长因子如神经生长因子，可以在含水缓冲液或生理溶液中作为一种溶液而存在。生长因子如神经生长因子

可以以冻干形式存在。

此外，试剂盒还可以含有

(c) 装有与上述步骤(b)所用之生长因子不同的生长因子的一个或多个容器装置，所述不同的生长因子可以在含水缓冲液或生理溶液中作为一种溶液而存在。

本发明中的生理溶液指含有生理 pH(约 7.4)的化合物的溶液，它很接近于体液或生物流体，如 CSF、血液、血浆、等等。

本发明的另一方面涉及一种药物组合物，该组合物含有在药物学可接受的载体中的天然生产的或合成的生长因子和抗β/A4 寡核苷酸。若用于治疗 AD 或 DS，生长因子优选为神经生长因子，但也可以是在动物或人患者的神经元细胞上有其受体并且能够刺激神经元细胞生长和分化的任何生长因子。所述其它生长因子的实例是表皮生长因子(EGF)。

可以用许多种不同的方法增加 AD 和 DS 中的 NGF 紧张(tonus)。在其中的一些方法中，可以经相同的途经将 NGF 和反义寡核苷酸输送给患者。其它方法也可增加 NGF 紧张，而不依赖于所用的将寡核苷酸输送给患者的方法。有大量的报告表明大脑室内(icv)施用反义化合物可以作用于远离输注部位的脑区。参见例如， Wahlestedt et al., Science 259: 528-531 (1993); Sakai et al., J. Neurochem. 62: 2053-2056 (1994); Zhou et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 268: 1015-1023 (1994)。

1.大脑内输注。最直接的方法可能就是将纯化的 NGF 和/或寡核苷酸直接输送到中枢神经系统。由于 NGF 不能通过血脑屏障，因此必须将其输送到脑实质或 CSF 中。在帕金森症和老年性痴呆症中都进行过长期输注 NGF 的临床试验。

2.生物可降解的缓释植入体。作为长期输注的替代方法，可以将 NGF 和/或寡核苷酸掺入生物可降解的聚合物胶囊或微球中，从而提

供一种可植入的缓释源(Camarata et al., Neurosurgery 30: 313-319 (1992); Powell et al., Brain Res. 515: 309-311 (1990))。当脑中需要一段有限时间的 NGF 和/或寡核苷酸的局部源时，这种技术可能就是有用的。

3.载体介导的穿过血脑屏障的运输。第三种很有前途的方法是以 NGF 和/或寡核苷酸与能够穿过血脑屏障的载体偶联为基础的。最近已表明若将 NGF 与转铁蛋白受体抗体偶联，则它可作为一种静脉内注射剂穿过血脑屏障。并仍能保持全部的生物活性(Friden et al., Science 259: 373-377 (1993); Cotten et al., PNAS USA 87: 4033-4037 (1990); Cotten et al., PNAS USA 89: 6094-6098 (1992); Curiel et al., PNAS USA 88: 8850-8854 (1991); Wagner et al., PNAS USA 87: 3410-3414 (1990); Wagner et al., PNAS USA 88: 4255-4259 (1991); Wagner et al., Bioconjugate Chem. 2: 226-231 (1991))。由于在中枢神经系统血管中转铁蛋白受体是非常丰富的，因此该技术将在静脉内注射后，使 NGF 和/或寡核苷酸浓集在脑中而非外周中。

4.移植生产 NGF 的细胞。第四种方法是以移植能够将 NGF 合成到大脑内部位的细胞为基础的。人们可以利用正常生产 NGF 的细胞例如 Schwann 细胞或小鼠下颌腺细胞(Springer et al., Prog. Brain Res. 78: 401-407 (1988); Springer et al., J. Neurosci. Res. 19: 291-296 (1988))或利用已经过遗传工程改造而能生产并分泌大量 NGF 的细胞。已经表明后一种技术在动物中是有效的(Ernfors et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4756-4760 (1989); Rosenberg et al., Science 242: 1575-1578 (1988); Strömberg et al., J. Neurosci. Res. 25: 405-411 (1990))。尽管建立的细胞有一些与其使用相关的问题，例如有肿瘤形成的危险和/或 NGF 生产负向调节的危险，但使用优选来自需要进行治疗之患者的原始细胞系(Kawaja et al., J. Neurosci. 12: 2849-2864 (1992))，而且可能通过插

入能够在某种程度上控制 NGF 生产的其它基因，就可以克服这些问题。

5.直接将基因转移到脑中。将细胞转移到脑中的一种有趣的替代方法是只转移生产 NGF 所必需的基因。目前的几种有趣的方法表明，转染不分裂的神经元和/或腺细胞以达到长期提高 NGF 水平的目的的确是可能的(Le Gal La Salle et al., Science 259: 988-990 (1993))。

6.研制 NGF 受体兴奋剂。有关神经营养蛋白(neurotrophin)受体的知识正在迅速增加(Ebendal, T., J. Neurosci. Res. 32: 461-470 (1992); Ebendol et al., in Plasticity and Regeneration in the Nervous System (P. Timiras and A. Privat, Eds.), Plenum, New York)。这些知识加上正在研究的 NGF 三级结构(McDonald et al., Nature 354: 411 (1991))以及分子各区对于受体结合和激活的重要性(Ibáñez et al., Cell 69: 329-341 (1992); Ibánẽz et al., EMBO J. 10: 2105-2110 (1991); Ibáñez et al., EMBO J. 12: 2281-2293 (1993))，表明研制能够穿过血脑屏障并发挥 NGF 样作用的低分子量兴奋剂是可能的。

7.控制内源 NGF 生产。最后，随着我们对控制内源 NGF 合成、贮存和释放有进一步的了解，预计会出现能提高内源 NGF 利用率的药物治疗方法。

本发明的另一方面涉及治疗 β /A4 淀粉样蛋白诱导的异常形态(淀粉样蛋白症)的方法，包括给需要的患者施用有效量的上面讨论的药物组合物。

正如本领域公知以及本说明书所指的，淀粉样蛋白症或 β /A4 淀粉样蛋白诱导的异常形态指人和其它动物中的致病状态，其特征在于在神经组织如脑中形成 A β 淀粉样蛋白。

本发明的另一方面涉及用于筛选候选反义寡核苷酸的检测方法，所述反义寡核苷酸可有效治疗因 β /A4 淀粉样肽作用于细胞而产生的有害作用，所述检测方法包括:

(a) 将哺乳动物神经元细胞培养物接种在几个容器中;

(b) 通过将不同浓度的不同β/A4 反义寡核苷酸加到几个容器中而制备检测样品;

(c) 通过不加寡核苷酸或将无义寡核苷酸加到几个容器中而制备对照样品;

(d) 将检测样品和对照与标记的甲硫氨酸一起保温约 6 到约 24 个小时。

(e) 从各容器中收集上清液;

(f) 将从各容器中收集的上清液与蛋白 A 琼脂糖(PAS)接触, 形成 PAS - 淀粉样蛋白复合物;

(g) 将 PAS - 淀粉样蛋白复合物与β - 淀粉样蛋白抗体接触, 形成 PAS - 淀粉样蛋白 - 抗体复合物;

(h) 在丙烯酰胺凝胶上电泳分离 PAS - 淀粉样蛋白 - 抗体, 形成对应于各细胞培养物的 PAS - 淀粉样蛋白 - 抗体复合物条带;

(i) 用光密度分析法测定条带中 4.3kD β - 淀粉样蛋白的水平;

(j) 将检测样品中 4.3kD β - 淀粉样蛋白的水平与对照样品进行比较, 由此确定在所述细胞中β/A4 反义寡核苷酸降低淀粉样蛋白生产的效力;

(k) 从步骤(j)选择在降低淀粉样蛋白生产方面最有效的那些寡核苷酸;

(l) 确定将步骤(j)所选的所述寡核苷酸加到用刺激所述神经元细胞生长和分化的生长因子处理过的哺乳动物神经元细胞中的影响;

(m) 从步骤(l)中选择不抑制所述生长因子的营养作用的那些寡核苷酸。

本说明书中所用的标记的甲硫氨酸指以任何形式与可用本领域已知的任何几种方法检测的物质相结合的甲硫氨酸。所述标记的甲硫氨酸的实例是放射标记的甲硫氨酸(如 ^{35}S - 甲硫氨酸)或者生物素化的甲硫氨酸。

在 PAS - 淀粉样蛋白复合物或 PAS - 淀粉样蛋白 - 抗体复合物

中所用的复合物一词指经任何可能形式的键而维系在一起的上述分子。

本领域技术人员将会认识到，可结合上述各种优选实施方案的特征以得到可能具有更强的抗β/A4作用的其它实施方案。

本发明的抗β/A4寡核苷酸可用于各种目的。首先，它们可用于逆转体外因表达β/A4肽而引起的细胞形态变化。其次，它们可用于检测动物包括人中，β/A4肽表达降低的影响。第三，它们可用于进行所设计的临床试验以获得所述寡核苷酸作为老年性痴呆症治疗药物的销售许可。第四，它们可用于治疗患老年性痴呆症的患者和/或预防或延迟这种病的发作。最后，它们可用于治疗患DS的患者。

下列实施例将进一步说明本发明的某些优选实施方案，但并不是限制性的。在实施例1和2中描述的工作已公开在Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 337-341 (1989)和Brain Research 599: 64-72 (1992)中。

实施例

材料和方法

除非特别说明，将用下列材料和方法进行实施例中所教导的本发明的示例性实施方案。

细胞的增殖

在组织培养瓶(Becton Dickson, Franklin Lakes, NJ)中，于37℃，5.0% CO_2中，将PC12细胞保持于Dulbecco改良伊格耳培养基(DMEM, GIBCO, BRL, Grand Island, NY)中，所述培养基含2.0mM (在0.85% NaCl终浓度中350.4mg) L-Gln (GIBCO, BRL, Grand Island, NY)、1.2mM终浓度的丙酮酸钠(Sigma, St. Louis, MO)、在0.9% NaCl中的100U青霉素/ml和120μg/ml链霉素(Sigma, St. Louis, MO)、10%小牛血清、5%胎牛血清、20μg/ml庆大霉素(Sigma, St. Louis, MO)。一旦汇合后，在Hank平衡盐溶液中用0.25%胰蛋白酶处理细胞，然后分

到两个培养瓶中。用冷 10%二甲亚砜(DMSO)以 1 × 10^6 个细胞/ml Eppendorf 管冷冻 PC12 细胞，并贮于液氮中，需要时取出。用血细胞计数器进行细胞计数。用锥虫蓝测定细胞存活率。

细胞形态特征的定量分析

用含有微型光密度测量计算机软件的图象分析测量系统(Bioquant, R & M Biometrics, Inc., Nashville, TN)，在光学显微镜水平确定细胞大小和轴突长度。在带分隔的载玻片上使细胞生长 48 小时，用 Hank 缓冲盐水漂洗，然后用 4%仲甲醛固定 30 分钟。漂洗后，将细胞用考马斯蓝染色 5 分钟。然后漂洗载玻片，干燥并放上盖玻片。用 Leitz 显微镜在 40X 镜检细胞视野。使用图象测量系统划出细胞体的边界并计算出细胞体的平均面积。在附图的注释中说明了在每个实验中测得的细胞数。

硫代磷酸酯寡核苷酸

以 10μmol 的规模用亚磷酰胺法在自动 DNA 合成仪(8700 型，Millipore, Milford)上合成寡核苷酸硫代磷酸酯(PS - 寡核苷酸)。用与以前报导相同的方法(Agarwal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7595-7599 (1991))纯化 PS - 寡核苷酸。合成两个 24 聚体 PS - 寡核苷酸: 寡核苷酸-1: 5'-AAACCGGGCAGCATCGCGACCCTG-3' (SEQ. ID NO: 15)，它与 APP 核糖体结合位点互补；寡核苷酸-2: 5'-ACACAGC GCGTACGACGACGCGCT-3' (SEQ. ID NO: 16)，它是一个对照的随机反义寡核苷酸。将冻干的反义寡核苷酸溶于无菌水中制得贮液，贮存于-70 ℃。使用前，将各等份试样贮于 4 ℃，然后放到室温下。根据实验条件(见结果)以 5-50μg/ml 的终浓度加入反义寡核苷酸。每隔 3 天将寡核苷酸加到新鲜培养基中。在 24 孔聚苯乙烯平板上，以 5 × 10^3 个细胞/孔培养细胞。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

为了进行 SDS PAGE，将细胞以 5 × 10^5 个细胞/孔的浓度铺在 3.5cm 6 孔聚苯乙烯平板(Becton Dickson, Lincoln Park, NJ)上。用无血清培养基和在温热 HBSS 中的 1.2mM 钙、1.0mM 镁和 0.01M Hepes 溶液(pH7.2)进行漂洗。将 100μl 2% SDS 溶液加到各孔中，于室温下保温 30 分钟。将溶解的细胞溶液吸到 1.5ml 小离心管中。将离心管煮沸 5 分钟，然后冷却到室温。将细胞溶解产物贮于 4 ℃备用。上样前用二辛可宁酸蛋白质测定法(Deutscher, M. P., "General Methods for Handling Proteins and Enzymes", in Methods in Enzymology, Vol. 182, 60-62 (1990))测定蛋白质含量。将溶解产物加到 7.5%凝胶上。在样品缓冲液(Schagger and Von Jagow, 1987)中每孔上样约 70μg 蛋白质，总体积为 70μl/泳道。凝胶以 15mA/凝胶电泳过夜。

Western 印迹

将凝胶转移到 TE 系列 Transphor 电泳仪(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA)中的 Immobilon P, PVDF 膜(Millipore Corp., Bedford, MA)上。转移缓冲液由在 TRIS 碱缓冲液中的 0.19M 甘氨酸和甲醇组成，pH6.8。将蛋白质以 1000mA 转移 3 小时。然后用 0.2% Ponceau 将膜染色以确定每泳道的总蛋白质含量。用计算机图象分析法测定染色密度(见下文)。用 10%奶粉溶液将膜阻断 30 分钟，然后于室温下用抗 APP 初级单克隆抗体(Ab) (Boehringer Mannheim)以 1μg/ml 免疫染色过夜。除去初级 Ab，用 TBST (20mM Tris、0.3M NaCl、0.1% Triton-X100, pH7.2)将膜洗涤 3 次。次级抗体是用 ICC (2% BSA、0.3M NaCl、20mM Tris、0.1% Triton-X100 和 0.1%乙基汞硫代水杨酸钠)以 1: 1000 稀释的过氧化物酶结合羊抗小鼠 IgG 完整分子(Cappel, West Chester, PA)。与次级 Ab 于室温下保温 1 小时后，用 TBST 洗涤印迹 4 次，每次 15 分钟。显现步骤使用在 1mg/ml 终浓度咪唑缓冲液，pH7.0 (Sigma, St. Louis, MO)中的 0.5μl 30% H_2O_2/ml 和 0.5mg/ml 二氨基联苯胺(Sigma, St. Louis, MO)。用水充分漂洗膜数

次。然后用图象处理仪扫描印迹，将抗体染色的光密度校正到 Ponceau 染色。

图象分析

用图象分析测量系统用光学显微镜测定细胞面积。用含 5mM EGTA/孔和200μl 0.4%戊二醛的 Hanks 缓冲盐水预固定准备进行图象分析的细胞 5 分钟。除去上述盐水，加入 2%戊二醛将细胞固定过夜。然后在 20% MeOH 和 1%乙酸中用 0.1%考马斯蓝将细胞染色 20 分钟。为了脱色，除去考马斯蓝染料，用 20% MeOH 加 1%乙酸将细胞漂洗 2 分钟。用 1%乙酸将细胞漂洗 2 次，然后放在 1%乙酸中待分析。用 Reichert Biostar 倒置显微镜检查细胞视野。图象分析系统由高分辨的黑白摄影机(Javelin, JE7362 型)、Optimas 软件 4.2 版(可得自 Image Analysis Systems (Woburn, MA))和 IBM 兼容 486 计算机组成。用图象测量系统，划出细胞体的边界，并计算细胞体的平均面积。

统计分析

用 Microsoft Excel 程序计算平均值和标准偏差和标准误差。用电子制表软件计算细胞体大小的平均值。

实施例 1

过度表达β/A4 肽的 PC12 细胞系的建立

超始克隆载体是以猿猴病毒 40(SV40)为基础的载体 pKo + RI/ML，由 pBR322 的衍生物 PML_2(没有对真核细胞复制有害的某些原核序列)、大肠杆菌的 Lac UV5 启动子以及一些 SV40 序列组成，所述 SV40 序列包括增强子、复制起点、早期启动子、小肿瘤(t)/大肿瘤(T)抗原拼接位点、和多聚腺苷酸化位点。用 T/t 抗原的 ATG 密码子修饰起始载体，得到三个有三种不同翻译阅读框的变异体 Min + 1、Min + 2 和 Min + 3(见图 4)。用起始载体和修饰形式进行实验。Min 系列的前体含有特有的 Pvu II 位点(增强子起始点)和 BamHI 位点(多聚(A)加入位点)，用标准技术将两者均修饰成 XbaI 位点。

从用噬菌体λ制备的 AD 脑 cDNA 表达载体文库得到一插入片段，称为 amy37，它包括 A4 序列和侧接区域。用 Min 载体构建体将 EcoRI 消化的 amy37 cDNA 片段插入三个翻译阅读框中。为了在特有的 EcoRI 位点切割，用 EcoRI 限制性核酸内切酶消化载体，然后再用碱性磷酸酶消化载体。用 EcoRI 酶消化λt11-amy37 嵌合体，然后将 1.1kb 长的片段用已有的技术连接到 Min 载体中。增殖在 3 个阅读框中分别产生的 amy37-1.1 嵌合质粒，然后分离 DNA，纯化并用于转染实验。用于这些实验的细胞系是 PC12，得白大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤。

进行常规的永久转染实验。用转染培养基进行 1.1kb 淀粉样蛋白 cDNA 插入片段的整合，所述转染培养基含有 10μg 含 amy37-1.1 插入片段的载体或者含有由不带淀粉样蛋白 cDNA 插入片段的载体 DNA 组成的对照、5μg PSV_2CAT DNA(克隆在 SV40 基质粒中的氯霉素乙酰转移酶基因，它带有对 Geneticin 敏感的新霉素抗性基因)。在 0.4g/升 Geneticin (G418, GIBCO)存在 6 天，再在 0.3g/升 Geneticin 存在 3 天的情况下，筛选存活的各转染子。随后在 0.2g/升保持细胞。附图中所示的细胞已经历了至少 20 次细胞分裂。

从细胞中分离 DNA，制备 Southern 印迹。在杂交溶液中于 52 ℃过夜杂交 Nytran 滤膜，所述杂交溶液含 3 × Denhardt's 溶液(1 × Denhardt's 溶液 = 0.02%聚乙烯吡咯烷酮/0.02% Ficoll/ 0.02%牛血清白蛋白)和已于 80 ℃热变性 8 分钟的 8ng/ml (2.5 × 10^6cpm/ml)amy37-1.1 核糖探针(riboprobe)。所制备的核糖探针的比活性为 3.1 × 10^8cpm/μg。于 25 ℃，用 2 × SSC(1 × SSC = 0.15M NaCl 和 0.015M 柠檬酸钠)/ 0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)将滤膜洗 2 次，每次洗 5 分钟，然后于 53 ℃用 0.1% SSC/ 0.1% SDS 洗 2 次，每次洗 30 分钟。将滤膜空气干燥，然后用于放射自显影。β/A4 C 末端转染子表现出相当于约 1200-1300bp(编码 C 末端区的已知 EcoRI 片段的大小)人β/A4 DNA 片段的杂交信号。

用框内载体 Min + 2amy 37-1.1 和框外载体 Min + 3-amy 37-1.1

转染之前和之后免疫染色 PC12 细胞。在加入抗 A4 mAbs 后，未转染细胞和携带不含编码 A4 之插入片段的载体的细胞对数期培养物几乎没有可检测的抗原水平(分别见图 5A 和 5B)。但是， 免疫染色后，框内载体得到的细胞含有异常高水平的反应产物(图 5C)。在某些情况下，抗原似乎浓缩在细胞外周的周围或位于细胞一端。正在分裂的细胞的免疫染色较轻，其反应产物分布不均匀。已经将过度表达 A4 抗原决定基的 PC12 细胞系在培养基中增殖 2 个月以上。检测过的细胞系称为 NN(未转染的 PC12 细胞)、 V120(无插入片段载体转染的 PC12 细胞)、 AC126 和 AC127(表达 β /A4 C 末端肽的 PC12 细胞)。

实施例 2

评估过度表达 β /A4 肽的细胞的形态变化

用带有微型光密度测量计算机软件的图象分析测量系统(Bioquant, R & M Biometrics, Inc., Nashville, TN) 在光学显微镜水平测定细胞大小和轴突长度。在带分隔的载玻片上使细胞生长 48 小时，然后在用 4%仲甲醛固定 30 分钟前，用 Hanks 缓冲盐水漂洗。漂洗后，用考马斯蓝将细胞染色 5 分钟。漂洗载玻片，干燥并盖上盖玻片。用 Leitz 显微镜在 40X 检查细胞视野。用图象测量系统划出细胞体的边界，然后计算细胞体的平均面积。描出所测量的各细胞的轴突，然后计算轴突长度。通过计数来自两个不同实验的 100 个 V120 细胞和来自 3 个不同实验的 150 个 NN 、 AC126 和 AC127 细胞而得到数据。通过方差分析比较数据。

为了进行电子显微镜检，用 0.1M 卡可酸盐缓冲液(pH7.4)中的 2%仲甲醛、 2.5%戊二醛将细胞固定 30 分钟，用 OsO_4 后固定 30 分钟，用浓度递增的乙醇脱水，然后包埋到带盖玻片玻璃载片上的 Epon 中。用超薄切片机(60nm)切成切片，然后放在栅极上。用 JEOL 1200EX 电子显微镜，放大 5,000X 、 10,000X 和 40,000X 检查栅极。为了达到定量分析膜结构的目的，用在 5,000X 拍摄的照片制作图片剪辑。

观察到以前描述的类似微绒毛和气泡的膜突起物。前者在电子显微照片中是细胞表面的圆形或指形膜限制的胞质突出，直径为 0.1 到

10μm。由于在其内部含有核糖体或内质网，所以其它突起物类似于气泡。气泡状突起物常常作为细胞表面的泡囊而出现，这可能反映了材料块的切片平面。

为了进行免疫电子显微镜检，使细胞在 35mm 塑料平板中生长。用 Hank 盐溶液短暂漂洗平板，然后用 0.13M NaCl、0.02M 磷酸盐缓冲液 pH7.4(PBS)中的新鲜 4%仲甲醛于室温固定 30 分钟。用 PBS 漂洗 3 次，每次 10 分钟。

用针对具有β/A4 序列之合成多肽的单克隆抗体(IgG)将细胞免疫染色。为了进行比较研究，使用没有膜抗原亲和性的第二种 mAb。在这种情况下，制备针对碱性核糖核酸酶抑制剂蛋白(RIP) (Promega)的 mAb。RIP 是一种起稳定 RNA 和核糖体作用的胞质内调节蛋白。若将结果与抗β/A4 免疫染色进行比较，则用生产抗 RIP 抗体(IgG)之杂交瘤细胞系的上清液作为免疫细胞化学的阴性对照。

用免疫染色缓冲液(2%牛血清白蛋白、0.3M NaCl、0.02M 磷酸盐 pH7.2、0.01% Triton X-100)将初级抗体上清液以 1:5 稀释。于 4℃过夜保温。第二天，用含 0.3M NaCl 和 20mM Tris 的缓冲液将细胞洗 3 次，每次 10 分钟，然后在免疫染色缓冲液(不含去污剂)中与 5μg/ml 生物素化的羊抗小鼠 IgG (Jackson Immunoresearch)一起保温 2 小时。如上所述洗涤细胞。然后在免疫染色缓冲液(不含去污剂)中与 0.25μg/ml 抗生蛋白链菌素－辣根过氧化物酶结合物(Sigma)一起保温 2 小时，然后如上所述进行洗涤。所用的色原是二氨基联苯胺(Sigma) 0.5mg/ml、咪唑(Sigma) 1mg/ml、在 100mM Tris 中，pH7.0。临用前加入 0.015%过氧化氢(1μl 30% H_2O_2/2ml)。反应于室温下进行 2 分钟，然后用蒸馏水漂洗两次。按常规电子显微镜检的要求，用 2%戊二醛后固定细胞，但被拍摄的切片不用铅盐或铀盐复染。

先用方差分析，然后用 Tukey 保护性 T 检验比较对应于电子显微镜水平膜突频率的平均值。

观察到用β/A4 C 末端 DNA 转染的 PC12 细胞系(AC126 和 AC127)有形态上的改变。与未转染的 PC12 细胞(NN)和仅用载体转染

的细胞(V120)相比，β/A4 阳性转染子明显较大(图 6，C 和 D 幅)，而且有以高密度聚集的趋势。

定量形态测量光学显微镜分析表明，在 AC126 和 AC127 细胞中，轴突的数量并未增加(NN 的 75%和 85%)。相反，与 NN 相比，AC126 和 AC127 的轴突长度明显增加(分别为 123%和 254%)，细胞面积也是如此(分别为 144%和 234%) (图 7)。V120 的轴突长度或细胞面积没有增加(分别为 NN 细胞数值的 76%和 96%，图 7)。

通过电子显微镜检发现，NN 和 V120 细胞在形态上与β/A4 阳性转染子不同。从光学水平显微镜检预期 AC126 和 AC127 细胞和细胞核比对照的大，而且在整个细胞表面含有更多的不规则突起物。图 8 中示出了代表性实例。就细胞核与胞质比例而言，四种细胞(NN、V120、AC126、AC127)之间没有明显的差异，核占细胞总体积的约 29%。

AC126 和 AC127 细胞系在胞质中含有较少的嗜铬颗粒，但与对照相比，β/A4 阳性转染子中线粒体的大小和密度没有变化。特征形状和轮廓分明的嵴得到保持，而且由线粒体所占据的细胞面积也没有观察到显著的不同。脂褐质颗粒的数量没有明显变化。核糖体、多核糖体、粗糙或光滑内质网、片层体或高尔基体没有观察到差异。

用电子显微镜检查细胞膜以评估与对照相比β/A4 淀粉样蛋白阳性转染子的表观形态变化。详细检查 AC126 和 AC127 细胞系表明，类似于微绒毛和气泡的膜突出物的数量有所增加(图 9)。

确定对照和β/A4 阳性转染子中细胞表面突出物的数量，并进行比较。与正常对照和 V120 细胞相比，β/A4 阳性转染子中这些结构的频率明显增加(图 10)。但 V120 和 NN 细胞之间没有显著差异。

通过用电子显微镜检查免疫染色的切片考察细胞表面β/A4 积累位点的增加与膜伸出部分的出现之间可能的关系。在使用针对β/A4 而制备的单克隆抗体后，将 AC126 和 AC127 转染子的电子显微照片与对照细胞进行比较。两个β/A4 阳性细胞系细胞体内的抗原水平有所增加，而且沿质膜长度有明显的免疫染色(图 11)。在类似于气泡和

微绒毛的膜突起物内，β/A4 淀粉样蛋白抗原的沉积物也得到浓缩(图11)。

为了证明抗淀粉样蛋白 mAb 并不非特异性地标记质膜，用一种不相关的抗胞质蛋白的对照 mAb 进行比较。后者对大鼠和人核糖核酸酶抑制剂蛋白(RIP)有高度的亲和性。用相同的方法将两种 mAb 均施用于 AC126 细胞。抗 RIP mAb 以弥散的方式轻度标记细胞质，而且不能检测膜(图 12A)。相反，如前所述，抗β/A4 mAb 将膜突起物染色(图 12B)，这说明用所述的免疫细胞化学法时，并未优先发生 IgG 的非特异性结合。

这些结果说明，由于β淀粉样肽的表达，PC12 细胞发生了很大改变。这说明β/A4 肽插入到细胞膜中后使细胞膜扩张，而且它与其它未鉴定的因子一起作用而使 PC12 细胞增大并形成异常延长的轴突。最后，这说明β/A4 肽可能促使转染的 PC12 细胞的聚集增加。

下面表 1 中列出了在大量实验基础上而平均得出的 PC12 细胞和 AC127 细胞细胞面积和轴突长度的数据。

表 1

β/A4 肽使 PC12 细胞形态发生的变化		
	PC12 细胞	AC127 细胞
细胞面积(μm^2) %增加	274.76 ± 31 -	642.28 ± 59 234
轴突长度(μm) %增加	10.36 ± 1.21 -	26.27 ± 3.32 254

实施例 3

用寡核苷酸逆转β/A4 肽诱导的形态变化

测试两种寡核苷酸逆转 PC12 细胞中β/A4 肽诱导的形态变化的能力。所测试的两种寡核苷酸都是寡核苷硫代磷酸酯(全部是硫代磷酸

核苷酸间连键)。第一种寡核苷酸的核苷酸序列为[SEQ ID NO.1] 5'-CCTCTCTGTTTAAAACTTTATCCAT-3'。该序列互补于包括β/A4肽序列翻译起始密码子的核酸序列，在这种情况下包括SV40 T抗原起始密码子。所测试的第二种寡核苷酸的核苷酸序列为[SEQ ID NO.2]5'-TTCATATCCTGAGTCATGTCG-3'。该寡核苷酸互补于部分APP编码序列(编码氨基酸601-607)，相当于编码β/A4肽氨基酸5-11的序列。

在下列实验中，用带有微型光密度测量计算机软件的图象分析测量系统(得自Bioquant, R & M Biometrics, Inc., Noshville, TN)，在光学显微镜水平测定细胞大小和轴突长度。一般来说，用于比较目的的细胞参数(体积、长度)的定量数据只能通过使用以计算机为基础的光学成象系统而得到，而不是通过图片的定性比较。

首先，从正常对照PC12细胞收集数据，然后与过度表达β淀粉样蛋白的AC127细胞进行比较以确定基线数据。在一些实验中，细胞面积的增加似乎先于轴突的延长。如上所述进行形态测量。对照PC12细胞的细胞面积为274.76 ± 31 μm^2，轴突的长度为10.36 ± 1.21 μm。AC127细胞的细胞面积为642.28 ± 59 μm^2(面积增加234%)，轴突的长度为26.27 ± 3.32 μm(长度增加254%)。见表1。

在第一组实验中，在含或不含50 μg/ml两种受试寡核苷酸之一的情况下将如实施例2所述制备的AC127细胞培养8天。然后比较经寡核苷酸处理的和未处理细胞的形态特征。用互补于β/A4肽翻译起始密码子的寡核苷酸[SEQ ID NO.1]处理细胞会大大降低β/A4肽的免疫染色。如图14A和14B所示，未接受反义寡核苷酸的淀粉样蛋白阳性细胞(图 14A)与接受寡核苷酸的细胞(图 14B)相比，免疫染色明显较深。另外，这些处理过的细胞显然是解聚集的。在一个实验中，被处理细胞的大小从455.76 ± 33.11 μm^2降到299.12 ± 31.98 μm^2(50个细胞的平均值)。

在另一个实验中，用互补于β/A4肽编码序列的寡核苷酸[SEQ ID NO.2]处理细胞使细胞面积从 751.67 ± 111.35 μm^2 降到 286.25 ±

60.55 μm^2(25 个细胞的平均值)。

在并列比较中，各寡核苷酸逆转由β/A4 肽诱导的 PC12 细胞形态变化有相同的效力，而且这两种寡核苷酸结合的效力也相近。未处理细胞的面积为 715.16 ± 66.96 μm^2。用具有 SEQ ID NO.1 的寡核苷酸处理的细胞的面积为 378.71 ± 36.29 μm^2。用具有 SEQ ID NO.2 的寡核苷酸处理的细胞的面积为 347.12 ± 35.36 μm^2。每个实验中均测量 50 个细胞。

在进一步的实验中，确定两种反义寡核苷酸的混合物对淀粉样蛋白阳性 PC12 细胞的细胞面积的影响。将 0 或 50 μg/ml 具有 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 的反义寡核苷酸的混合物加到培养细胞中。与用所述混合物处理的细胞的 386.55 ± 34.08 μm^2 相比，在没有反义寡核苷酸的情况下培养的细胞的面积为 786.69 ± 68.32 μm^2。测量 50 个细胞。因此，结果表明两种反义寡核苷酸的混合物明显降低细胞的大小。

接下来确定具有 SEQ ID NO.2 的反义寡核苷酸对淀粉样蛋白阳性 PC12 细胞轴突长度的影响。过度表达β淀粉样蛋白的细胞其轴突的长度延伸最后达到正常对照 PC12 细胞的几乎 2 倍。在该实验中，确定了其有SEQ ID NO.2的反义寡核苷酸对有正常长度的细胞和有异常长延伸的细胞的影响。正常对照 PC12 轴突的长度为 10.36 ± 1.21 μm。在第一组中，与用反义寡核苷酸处理后的 13.31 ± 1.06 μm 相比，淀粉样蛋白阳性细胞轴突长度为 13.12 ± 1.21 μm 。在第二组中，与用反义寡核苷酸处理后的 11.80 ± 0.94 μm 相比，淀粉样蛋白阳性细胞轴突长度为 14.29 ± 1.23 μm。在第三组中，与用反义寡核苷酸处理后的 8.952 ± 1.14 μm 相比，淀粉样蛋白阳性细胞轴突长度为 22.66 ± 3.45 μm。最后这一组细胞有异常长的轴突。这些数据表明，只有当转染子延伸到长于对照值的正常长度时，具有 SEQ ID NO.2 的反义寡核苷酸才能有效降低过度表达β淀粉样蛋白的细胞的轴突长度。

在进一步的实验中，测试具有下列序列并与β淀粉样蛋白完全无

关的反义寡核苷酸的效力:

[SEQ ID NO.13] 5'-TTGTTGCGCAGCAGCGTCGTC-3'

[SEQ ID NO.14] 5'-GGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAGCA-3'

以 50μg/ml 的总浓度使用两种寡核苷酸的等摩尔混合物。与用具有 SEQ ID NO.13 和 14 的反义寡核苷酸混合物处理后的 379.29μm 相比，处理前转染细胞的平均大小为 560.45μm。

综上所述，这些数据表明，抗β/A4 寡核苷酸能有效地使已增大的β阳性细胞的大小降低约 50%。所得的处理过的细胞平均比正常对照 PC12 细胞大不到 18%。相反，与β淀粉样蛋白调节无关的寡核苷酸使β阳性 PC12 细胞的大小降低 32%。所得细胞比正常对照 PC12 细胞平均大 28%。因此，互补于β/A4 肽翻译起始密码子或编码β/A4 肽的核苷酸序列的反义寡核苷酸，能够逆转因β/A4 肽作用于细胞而产生的形态变化。

实施例 4

用反义寡核苷酸处理的 PC12 细胞的形态

用光学显微镜对用 10 或 20μg/ml 互补于 APP 5'末端的寡核苷酸-1 反义寡核苷酸处理 1 星期的 PC12 细胞进行形态学评估。与正常对照 PC12 细胞(图 15A)和用无关的随机寡核苷酸(寡核苷酸-2)处理的细胞相比，加入反义寡核苷酸会明显降低细胞体的大小(图 15B 和 15C)。细胞仍是活的，而且其形态在其他方面保持不变。

通过未处理和经处理的 PC12 细胞的定量形态学测量证实细胞面积的明显降低。如图 16 中所示，在存在 10μg/ml 寡核苷酸-1 的条件下培养 1 星期的细胞其细胞表面积有明显的减小。与未处理细胞相比，反义寡核苷酸为 20μg/ml 时，细胞表面积还有进一步的降低。加入寡核苷酸-2 没有使细胞表面积有显著的减小。

实施例 5

用反义寡核苷酸处理后的 APP 水平

在变性 SDS 凝胶上分离从正常对照 PC12 细胞和用 PS 寡核苷酸处理的细胞中经去污剂提取的蛋白质，然后用抗 APP 抗体进行免疫染

色。在免疫印迹上 APP 有两个主带，迁移在 120-150kDa 范围内(图 17A)。与未处理的对照细胞相比，用 10μg/ml 寡核苷酸-1 处理 10 天的 PC12 细胞，其去污剂提取的 APP 水平降低了 33%(图 17B)。反义寡核苷酸为 15μg/ml 时，提取的 APP 降低了 60% (图 17C)。相同浓度不相关的寡核苷酸-2 反义寡核苷酸没有显著的作用。在对酪氨酸羟化酶免疫染色的 Western 印迹上。 PS 寡核苷酸处理的和未处理的细胞之间的酪氨酸羟化酶水平没有显著的差异。

实施例 6

将反义寡核苷酸加入到 NGF 处理的 PC12 细胞中的影响

如所预期的，用 100μg/ml NGF 处理的 PC12 细胞有显著的营养反应。在 3 天的时间里，细胞面积从不到 500μm^2 增加到 1300μm^2 以上，而且它们比未刺激细胞大 2 倍以上。在相同的时间间隔内，轴突长度增加到约 100μm 。

评估 APP 反义寡核苷酸对用 NGF 预处理的 PC12 细胞的潜在影响。 PC12 细胞暴露于 NGF48 小时后发生分化，随后加入 15μg/ml 寡核苷酸-1 后，并没有明显的影响。细胞面积(图 18)和轴突长度(图 19)增加，达到近似于 NGF 处理的未暴露于反义寡核苷酸的细胞的水平。寡核苷酸-1 不能阻碍 PC12 细胞的营养反应与寡核苷酸酸-2 所得的结果相似(图 19)。

实施例 7

加入 NGF 对用反义寡核苷酸处理的 PC12 细胞的影响

在存在不同浓度寡核苷酸-1 的条件下，将 PC12 细胞连续培养 6 天。 2 天后，在其余的 4 天中细胞也暴露于 NGF ，然后再进行形态测量。如图 20 和 21 所示，浓度逐渐增加的 APP 反义寡核苷酸抑制对 NGF 的营养反应的能力也逐渐增加。相反，在相同条件下，随机序列寡核苷酸-2 没有显著的作用。光学显微镜检确证，除大小和轴突长度外，暴露于寡核苷酸-1 的 PC12 细胞仍有正常的形态，而且对细胞活力没有明显的不利影响(图 22A 和 22B)。

在实施例 4-7 中，通过使用反义寡核苷酸来检查 APP 对神经营养

剂作用的贡献。早期的报告表明 NGF 与培养细胞的 APP 的重新分布和释放之间有联系(Fukuyama et al., Molec. Brain Res. 17: 17-22 (1993); Mobley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 9811-9815 (1988); Refolo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 664-670 (1989); Schubert et al., Neuron. 3: 689-694 (1989))。但以前的研究并未检查 APP 水平与对 NGF 的营养反应之间在机理上的联系。

尚未了解 APP 水平的调节与 PC12 细胞表面积和轴突长度的保持相关联的机理。直接地(通过分子结合研究)(Ghiso et al., J. Biochem. 288: 1053-1059 (1992); Kibbey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 336-342 (1993); Maestre et al., Neuroscience 18: 1437 [abs. 60.1], 1437 (1992); Schubert et al., Neuron. 3: 689-694 (1989))和间接地(利用抗 APP 抗体) (Breen et al., J. Neurosci. Res. 28: 90-100 (1991); Chen & Yankner, Neurosci. Lett. 125: 223-226 (1991))证明 APP 与细胞粘附有关。因此，寡核苷酸-1 诱导的细胞表面积的减小可能与细胞粘附的减少有关。表面粘附的减少使细胞形态更圆，从而可能导致表面积明显减小。另外，细胞大小的保持可能与 APP 的可能刺激作用有关。已知 APP 是由 PC12 细胞分泌的(Schubert et al., Neuron. 3: 689-694 (1989); Refolo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 664-670 (1989))。用寡核苷酸-1 处理可能会减少 APP 的分泌，从而降低组织培养基中的水平。尚不清楚 APP 分泌水平的调节是否对细胞粘附和活力很重要。在较早的研究中，观察到过度表达 APP C 末端区的 PC12 细胞的条件培养基对正常 PC12 细胞有营养作用。

使用随机 PS 寡核苷酸所得的结果并不支持寡核苷酸-1 的活性归因于非特异性作用的假设。寡核苷酸-2 对 PC12 形态和对 NGF 的营养反应的影响不显著。寡核苷酸-1 并不介导非特异性细胞现象的进一步证据是，在本研究所用的检测系统中，观察到寡核苷酸-1 的作用是浓度依赖性的。

随后加入反义寡核苷酸并不影响 PC12 细胞应答 NGF 而产生的分化状态。相反，用寡核苷酸-1 预处理细胞改变了随后对 NGF 的营

养反应。这些观察结果表明 APP 水平对于分化的早期可能是很重要的。在用 NGF 处理的 PC12 细胞中， APP 的 695 异构形式增加(Fukuyama et al., Molec. Brain Res. 17: 17-22 (1993))。NGF 处理后，APP 从未分化状态的胞质中重新分布于生长锥、突起物和胞质中。暴露于 NGF 后， APP 的分泌马上就会有所增加(Fukuyama et al., Molec. Brain Res. 17: 17-22 (1993))。在本研究中所观察到的反义寡核苷酸诱导的 APP 水平的降低可能足以直接调节 NGF 的某种细胞影响。另外，或同时， APP 的减少可能导致质膜结构的改变，从而足以改变 NGF 受体的活化。

来自各方的观点已讨论了 NGF 治疗 AD 的潜在价值(Mobley, W. C. Neurobiol. Aging 10: 578-580 (1989); Olson L., Exp. Neurol. 124: 5-15 (1993))， 而 NGF 已开始用于临床(Seiger et al., Behav. Brain Res. 57: 255-261 (1993))。然而，观察到 NGF 诱导 APP 的生产(Fukuyama et al., Molec. Brain Res. 17: 17-22 (1993); Mobley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 9811-9815 (1988); Refolo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164: 664-670 (1989))，从而可能会引起进一步的营养刺激或非特异性作用，这表明上述治疗方法有潜在的障碍。尚不清楚 NGF 诱导的 APP 升高是否是造成 AD 特有的淀粉样蛋白病变的原因。然而据报道 AD 的特征在于皮层 NGF 水平的增加而不是降低(Crutcher et al., Detection of NGF-Like Activity in Human Brain Tissue: Increased Levels in Alzheimer's Disease (1993))。本研究表明用反义寡核苷酸可以特异性调节 APP 水平。从所提出的 AD 神经营养疗法的潜在益处来看，相继使用生长因子和用于调节 APP 水平的反义寡核苷酸可能会在老年性痴呆症的治疗中有临床应用价值。

实施例 8

测量 APP 反义化合物对老年性痴呆淀粉样蛋白生产的作用的方法

材料和方法

除下列改变外，按 Greene & Tischler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA

73: 2424-2428 (1976))所述增殖 PC12(可以用任何神经元细胞系)细胞: 含2mM L-Gln、 1mM 丙酮酸钠、 100μg/ml 链霉素、 100 单位/ml 青霉素、 10%小牛血清、 5%胎牛血清的 Dulbecco 改良伊格耳培养基(DMEM)。若加入 NGF，则在预培养 48 小时后，使用 100ng/ml (50-200ng)的 NGF(2.5S 或优选 7S 小鼠， Sigma; 大鼠、小鼠或人 NGF 均可使用)，并以 3 天(2-4 天)的间隔更新。在潮湿的培养箱中，于 37 ℃(34-38 ℃)、 5% CO_2 中培养。

以 50-100,000/cm^2 铺细胞，然后在上述培养基中培养 24 小时(12-48 小时)。在生理盐水中制备寡核苷酸(20-25 聚体)，然后以 10μg/ml (10-50μg/ml = 1.5-7.7μM)加到培养物中。

可从 DAKO 得到蛋白质 A 琼脂糖。抗老年性痴呆β淀粉样蛋白的抗体可得自美国专利 5,231,000 (1993 年 7 月 27 日授权)或按该专利制备。

用固相免疫沉淀法检测淀粉样蛋白

除不加血清，但加入 1%牛血清白蛋白外，如上所述培养细胞。使用几种浓度的包括无义寡核苷酸在内的各种寡核苷酸(1-8μM)。除不含任何寡核苷酸的对照外，还用无义寡核苷酸作对照。对照可用于检测任何非特异性反应，无义寡核苷酸对照还可用于检测寡核苷酸本身的毒性。加入 100μCi/ml (10-100μCi/ml)的 ^{35}S-甲硫氨酸。将细胞培养过夜(6-24 小时)。

β/A4 分泌到细胞培养物的上清液中。因此，收集细胞培养物的上清液，向各上清液中加入 200μM 冷甲硫氨酸以防止 ^{35}S-甲硫氨酸的非特异性结合。在室温(18-25 ℃)以 40,000xg 将上清液离心 30 分钟以除去任何细胞碎片或其他外来物质。为了消除化合物而不是淀粉样蛋白与在下一步中加入的抗淀粉样蛋白抗体的任何非特异性结合，取去来自各离心样品的上清液，于室温与 1mg/ml 蛋白质 A 琼脂糖(PAS)保温 2 小时(1-4 小时)。本方法的变化应包括将抗淀粉样蛋白抗体直接与琼脂糖珠偶联，或者使用琼脂糖结合的次级抗体，例如山羊、兔、绵羊或马的针对制备初级抗体时所用的任何动物的抗体。但采用这些

变化时程序上会稍有不同。这些调整是常规的，并且在本领域专业人员的知识范围内。以 10,000xg 离心 5 分钟除去 PAS 。老年性痴呆β淀粉样蛋白的抗体(针对β淀粉样蛋白氨基酸 1-42 之不同序列的单克隆或多克隆抗体)以 5μg/ml 加到上清液中，这是对单克隆而言的，多克隆抗体的情况类似，优选亲和纯化的多克隆抗体。于室温保温 2-4 小时。如上所述加入蛋白 A 琼脂糖 2 小时。收集抗体结合的 PAS，用含 0.5% Triton X-100 去污剂的磷酸盐缓冲盐水洗涤数次。

在 16%丙烯酰胺凝胶(Schagger & von Jagow, Anal. Biochem. 166: 368-379 (1987))上分离制备的 PAS-淀粉样蛋白－抗体复合物。干燥凝胶，将其放在胶片上。然后确定所得条带的分子量。用光密度分析法测量条带强度。将各细胞培养样品中 4.3kD β-淀粉样蛋白条带的水平与对照进行比较，从而确定各反义寡核苷酸对细胞中β淀粉样蛋白生产的影响，以及各寡核苷酸的效力程度和各寡核苷酸降低β淀粉样蛋白生产的最有效浓度。

一旦确定了哪些寡核苷酸在什么浓度可最有效地防止和/或消除淀粉样蛋白的生产，则可按上述实施例 4-7 所述，在细胞培养物中测试其治疗效力。然后可将最有效的寡核苷酸/NGF 组合用于动物和/或人的治疗。

实施例 9

NGF 和/或寡核苷酸输送系统。使用遥控的可植入输注系统。可经皮注入的泵和终止于脑侧室的皮下导管，以克服给耐受力有限的患者长期输药而产生的问题(Harbaugh, R., Psychopharmacol. Bull. 22: 106-108 (1986); Harbaugh et al., J. Neurosurg. 71: 481-486 (1989))。用定向手术在全身麻醉下植入泵系统，从待插入 NGF 和/或寡核苷酸输送套管的部位得到顶枕颞连接处的大脑皮质柱状活检组织。利用大脑脊液的自由流动确认套管尖的放置。将程序可控泵(Synchromed, Meditronic)放在腹壁，立即启动 NGF 和/或寡核苷酸的泵送。泵的速率为 15μl/小时，将约 75μg/24 小时剂量的 NGF 输送给患者。

实施例 10

NGF 制备。制得小鼠β-NGF，在按最近的有关用于一名帕金森症患者以维持肾上腺髓质自体移植物的叙述进行临床应用前，先进行测试(Olson et al., Arch. Neurol. 48: 373-381 (1991))。用雄性成年小鼠的下颌腺提取 NGF (Chapman et al., Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 104: 34l-344 (1979); Ebendal et al., in Cellular and Molecular Biology of Neuronal Development, I. Black, ed., Plenum, New York (1984), pp. 231-242; Mobley et al., Biochemistry 15: 5543-5552 (1976))，然后测试 NGF 的纯度和比活性。优选地，5ng/ml 浓度的制剂应在标准化的鸡胚胎神经节生物检测中发挥全部的体外生物活性。临床使用前，将 NGF 制剂无菌过滤两次，对林格氏葡萄糖透析。在官方标准的高度严格条件下测试无菌情况。还要测试平行批次是否存在热原和外源遗传物质以确证它们不含这些污染物。NGF 制剂在 37 ℃下应保持其全部生物学活性数星期(Olson et al., Arch. Neurol. 48: 373-381 (1991))。

实施例 11

测定 NGF 和 NGF 抗体。在治疗患者之前、期间和之后得到重复的血样，然后用于检测是否存在 NGF 和是否存在抗 NGF 抗体。这些技术概述于一个病例报告中(Olson, J. Neural., Transm. (PD-Sect.) 4: 79-95 (1992)，详细描述见 Larkforts & Ebendal, J. Immunol. Methods 97-31-47 (1987); Olson et al., Arch. Neurol. 48: 373-381 (1991); Söderström et al., J. Neurosci. Res. 27: 665-677 (1990))。

实施例 12

认知试验组。用 7 种不同的试验，分别监测基本精神状态(Folstein et al., J. Psychiatr. Res. 12: 189-198 (1975))、面孔识别、空间记忆(Sharps & Gollin, J. Gerontol. 42: 336-341 (1987))、词语识别(Backman, L. Exp. Aging Res. 12: 135-140 (1986))、选择性回忆(Buschke, H., J. Verb. Learn. Verb. Behav. 12: 543-550 (1973)、数位范围(Wechsler, D., Wechsler Adult Intelligence Scale: Manual Psychological Corp., New York (1955)) 和言语流畅性(Lezak, M. Neuropsychological Assessment, Oxford Univ. Press, New York (1983))，从而考察治疗对认知功能的任何潜在作用。

(有关该试验组的进一步描述和这些试验的参考资料请参见 Olson, J. Neural. Transm. (PD-Sect.) 4:79-95 (1992))。

实施例 13

正电子断层照相法。预备性的正电子断层照相研究包括放射标记的烟碱、放射标记的丁醇和放射标记的 2-脱氧葡萄糖。开始操作后，为了减少放射性量并减少患者的压力，只进行了烟碱和丁醇正电子断层照相。尽管血流测量相对直接，但从设计模型的角度看，烟碱数据的解释就会更复杂，这是因为它不仅受脑组织中特异性结合的影响，也受血流以及血液中特异性和非特异性结合的影响。(这些方法及数据解释的详细讨论，请参见 Olson et al., Arch. Neurol. 48: 373-381 (1991) 和 Nordberg 及其同事的工作(Nordberg et al., J. Neural. Transm. (PD-Sect.) 2: 215-224 (1990): Nordberg et al., in Alzheimer's Disease: Basic Mechanisms, Diagnosis and Therapeutic Strategies, K. Iqbal et al., eds., John Wiley, New York (1991), pp. 517-523; Nordberg et al., J. Neural. Transm. (PD-Sect.) 1: 195-205 (1989); Nordberg et al., in Alzheimer's Disease: Current Research in Early Diagnosis, Becker & Giacobini, eds., Taylor and Francis, New York (1990), pp. 329-338; Nordberg & Winblad, Neurosci. Lett. 72: 115-119 (1986))。

实施例 14

EEG 记录。使用多个记录位点的标准技术。逐个地并用计算机辅助的动力光谱分析法来分析 EEG 记录。

上文引述的所有出版物以及所述出版物中引用的参考文献均全文引入本文作为参考。

虽然上述发明已作了详细描述以便清楚和便于理解，但本领域技术人员阅读了本公开的内容后将会认识到，在不违背本发明及所附的权利要求书的真实范围的前提下，可以在形式上和细节上作出各种变化。

说　明　书　附　图

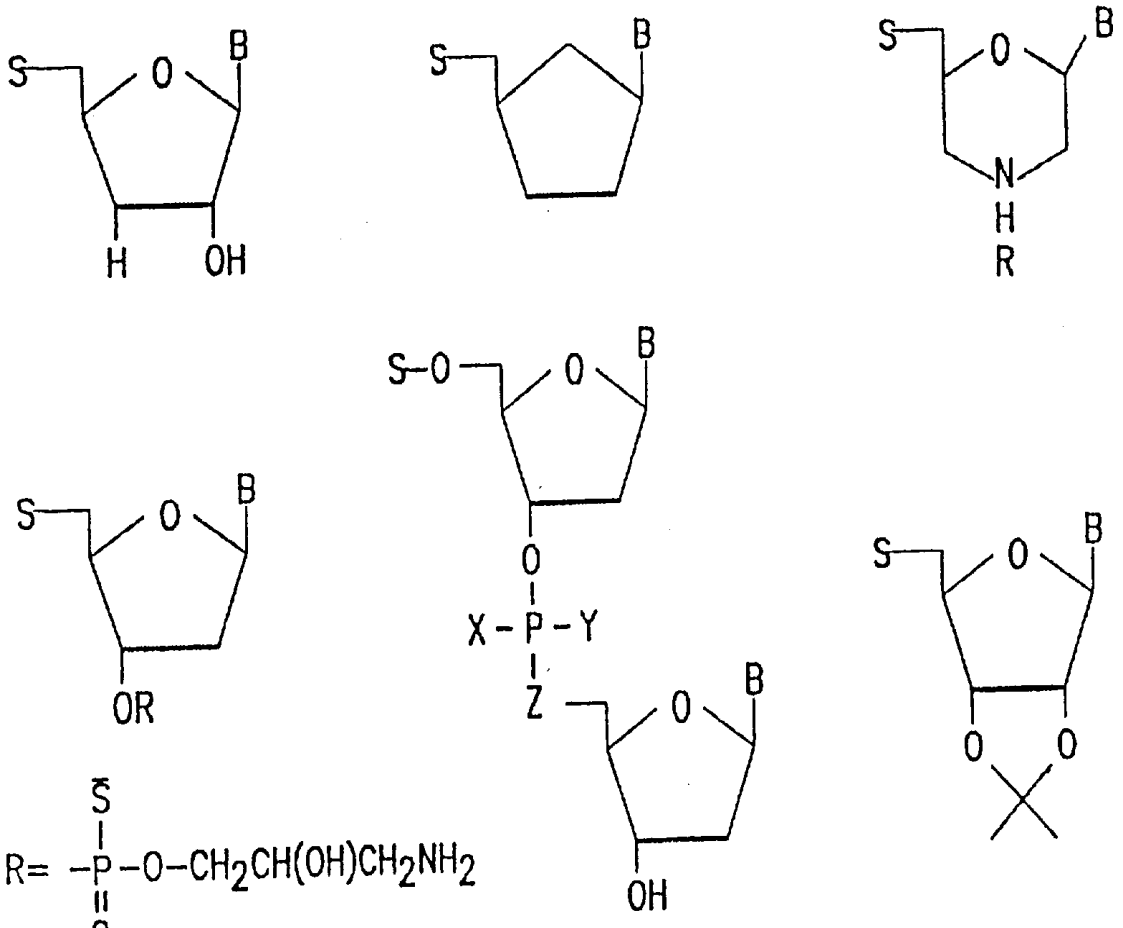
S
O
B
H
OH
S
B
S
O
B
N
H
R
S-O
O
B
O
X-P-Y
Z
O
B
OH
S
O
B
OR
S
O
B
O
O
R= -P-O-CH2CH(OH)CH2NH2
O
B = 碱基
X = S 或 O
Y = S 或 CH3
Z = O

图　1

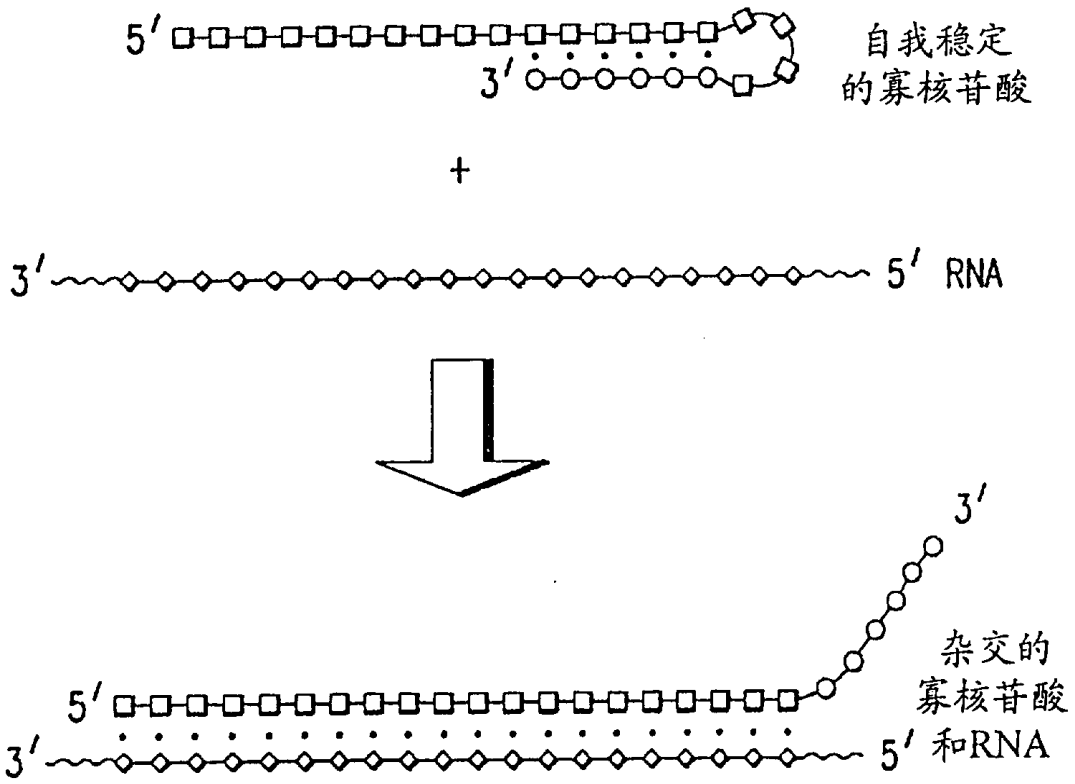

图 2

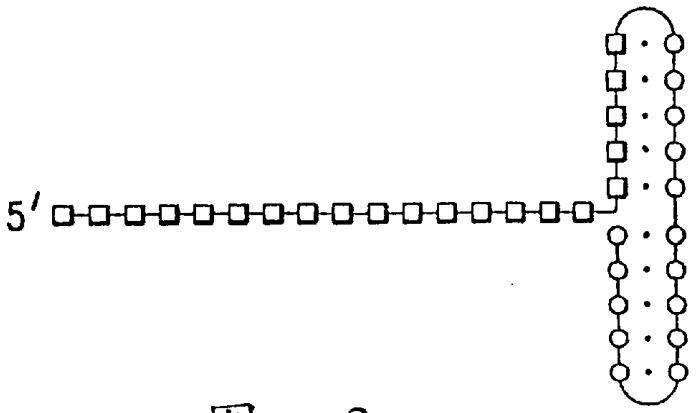

图 3

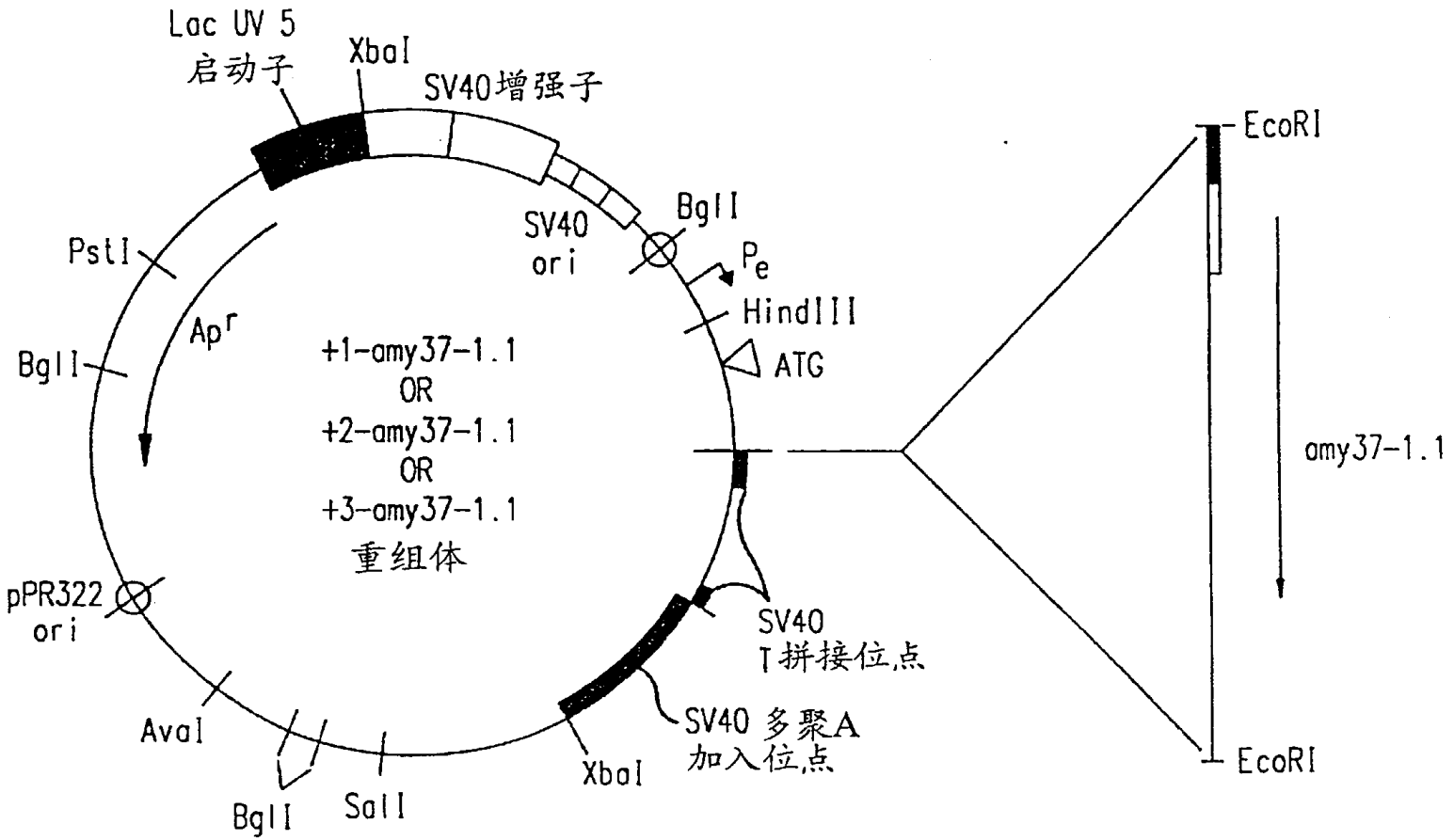
Lac UV 5
启动子
XbaI
SV40增强子
SV40
ori
BglI
Pe
HindIII
ATG
PstI
Ap^r
BglI
+1-amy37-1.1
OR
+2-amy37-1.1
OR
+3-amy37-1.1
重组体
pPR322
ori
AvaI
BglI
SalI
XbaI
SV40
T拼接位点
SV40 多聚A
加入位点
EcoRI
amy37-1.1
EcoRI

图 4

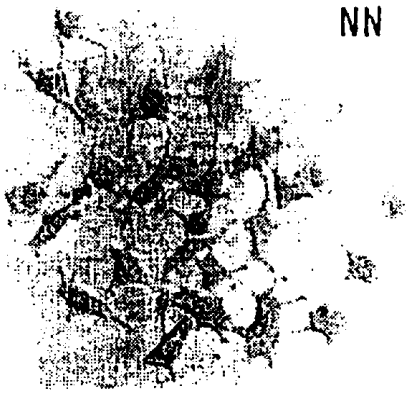

图 5A

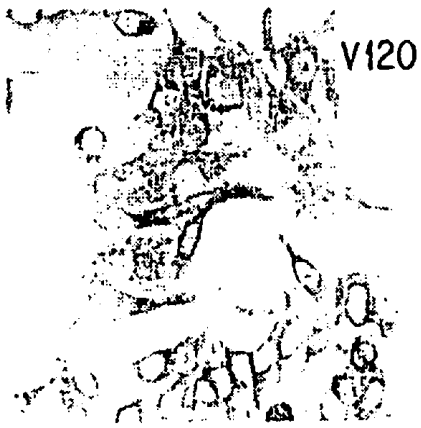

图 5B

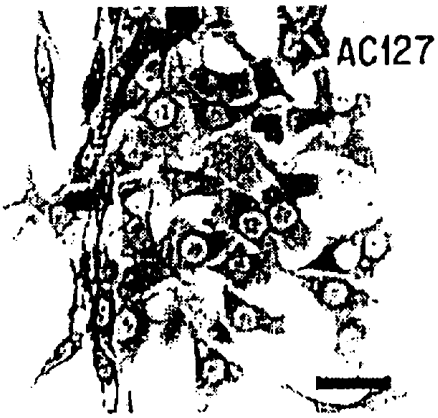

图 5C



图 6A

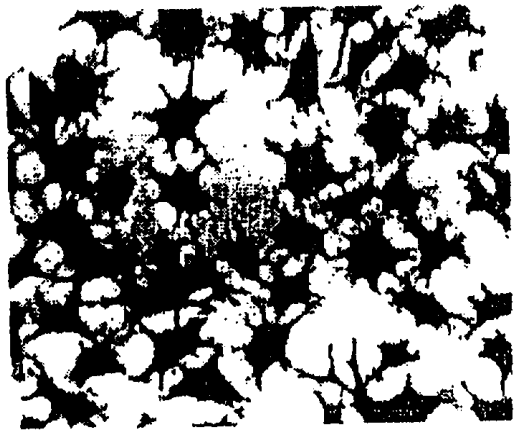

图 6B



图 6C



图 6D

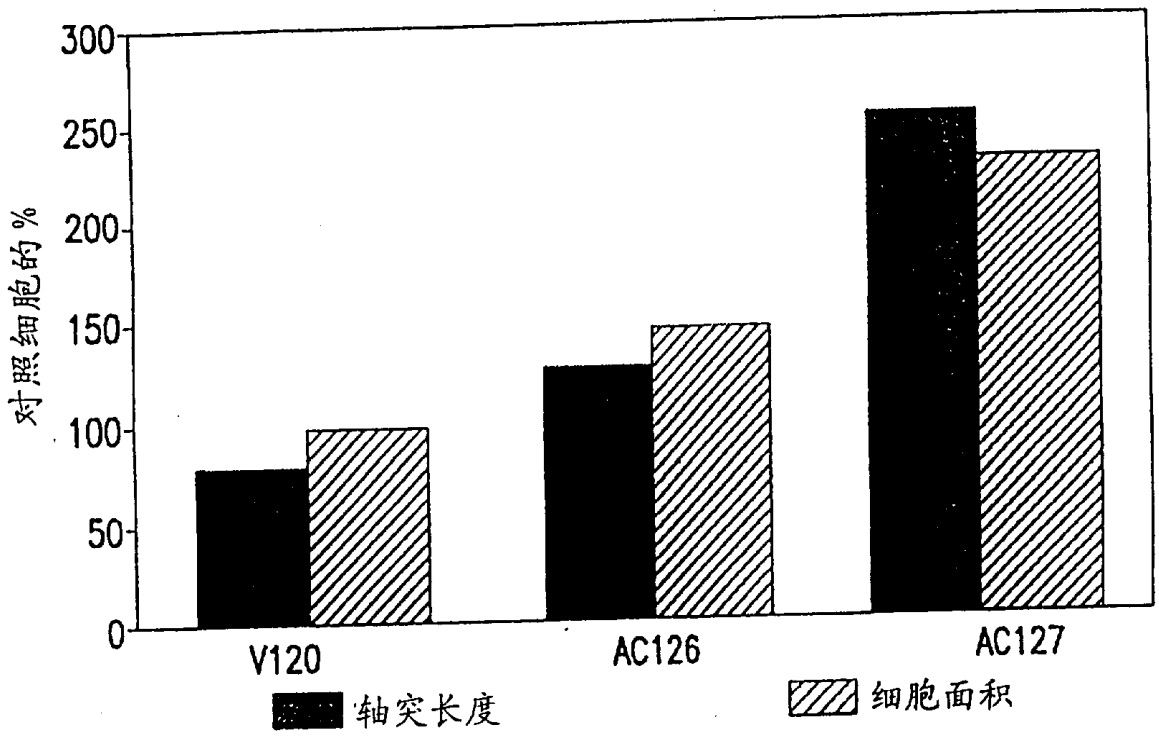

图 7



图 8A



图 8B



图 9A

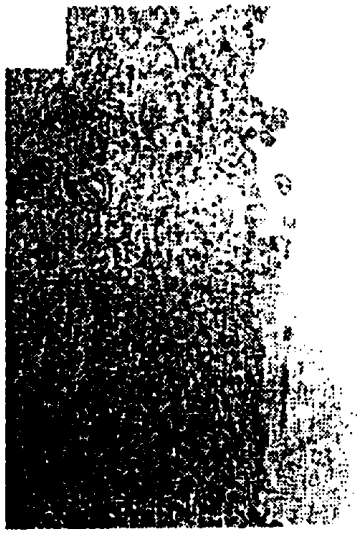

图 9B



图 9C



图 9D

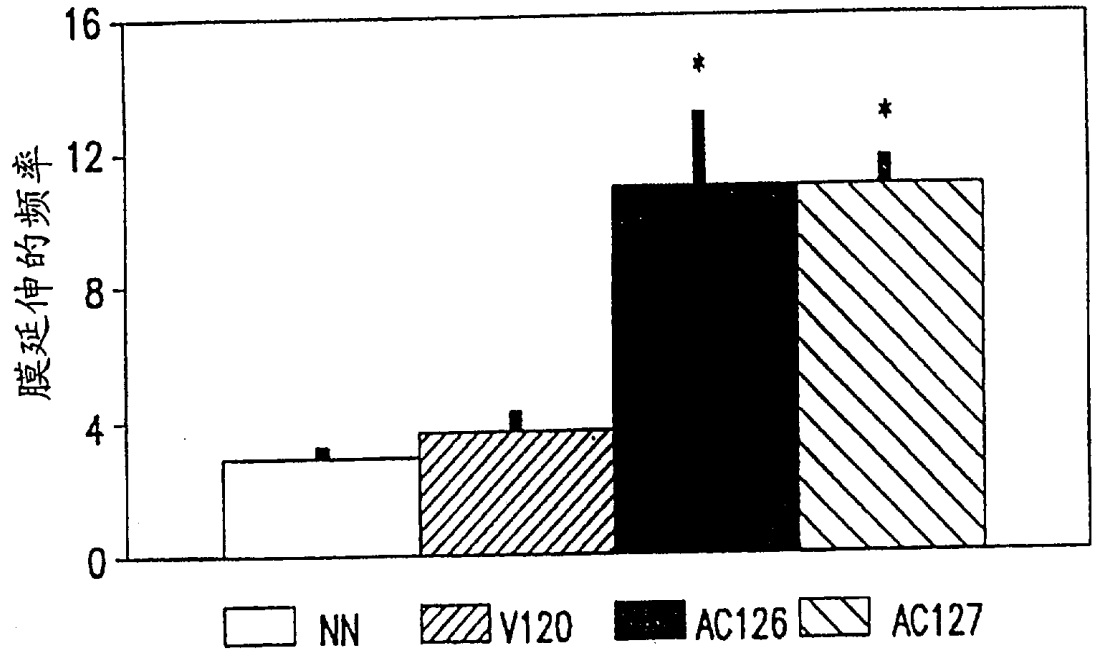

图 10



图 11A



图 11B

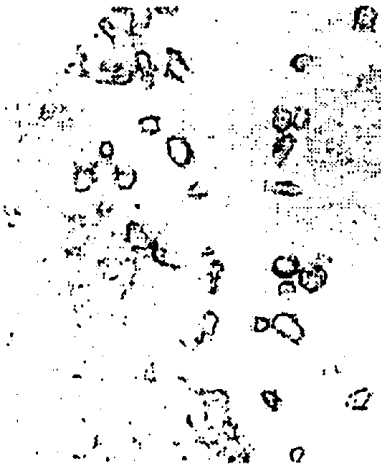

图 11C



图 11D



图 12A

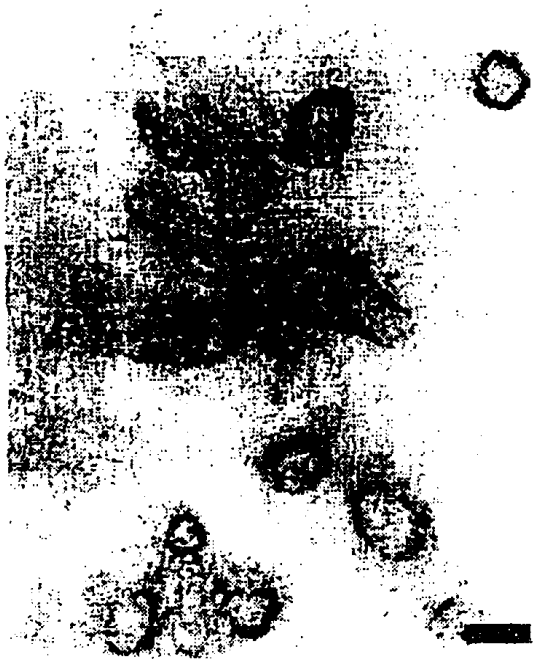

图 12B

AGTTTCCTCG GCAGCGGTAG GCGAGAGCAC GCGGAGGAGC GTGCGCGGGG CCCCGGGAGA 60

CGGCGGCGGT GGCGGCGCGG GCAGAGCAAG GACGCGGCGG ATCCCACTCG CACAGCAGCG 120

CACTCGGTGC CCCGCGCAGG GTCGCGATGC TGCCCGGTTT GGCACTGCTC CTGCTGGCCG 180

CCTGGACGGC TCGGGCGCTG GAGGTACCCA CTGATGGTAA TGCTGGCCTG CTGGCTGAAC 240

CCCAGATTGC CATGTTCTGT GGCAGACTGA ACATGCACAT GAATGTCCAG AATGGGAAGT 300

GGGATTCAGA TCCATCAGGG ACCAAAACCT GCATTGATAC CAAGGAAGGC ATCCTGCAGT 360

ATTGCCAAGA AGTCTACCCT GAACTGCAGA TCACCAATGT GGTAGAAGCC AACCAACCAG 420

TGACCATCCA GAACTGGTGC AAGCGGGGCC GCAAGCAGTG CAAGACCCAT CCCCACTTTG 480

TGATTCCCTA CCGCTGCTTA GTTGGTGAGT TTGTAAGTGA TGCCCTTCTC GTTCCTGACA 540

AGTGCAAATT CTTACACCAG GAGAGGATGG ATGTTTGCGA AACTCATCTT CACTGGCACA 600

CCGTCGCCAA AGAGACATGC AGTGAGAAGA GTACCAACTT GCATGACTAC GGCATGTTGC 660

TGCCCTGCGG AATTGACAAG TTCCGAGGGG TAGAGTTTGT GTGTTGCCCA CTGGCTGAAG 720

AAAGTGACAA TGTGGATTCT GCTGATGCGG AGGAGGATGA CTCGGATGTC TGGTGGGGCG 780

GAGCAGACAC AGACTATGCA GATGGGAGTG AAGACAAAGT AGTAGAAGTA GCAGAGGAGG 840

AAGAAGTGGC TGAGGTGGAA GAAGAAGAAG CCGATGATGA CGAGGACGAT GAGGATGGTG 900

ATGAGGTAGA GGAAGAGGCT GAGGAACCCT ACGAAGAAGC CACAGAGAGA ACCACCAGCA 960

TTGCCACCAC CACCACCACC ACCACAGAGT CTGTGGAAGA GGTGGTTCGA GTTCCTACAA 1020

CAGCAGCCAG TACCCCTGAT GCCGTTGACA AGTATCTCGA GACACCTGGG GATGAGAATG 1080

AACATGCCCA TTTCCAGAAA GCCAAAGAGA GGCTTGAGGC CAAGCACCGA GAGAGAATGT 1140

图 13A

CCCAGGTCAT GAGAGAATGG GAAGAGGCAG AACGTCAAGC AAAGAACTTG CCTAAAGCTG 1200

ATAAGAAGGC AGTTATCCAG CATTTCCAGG AGAAAGTGGA ATCTTTGGAA CAGGAAGCAG 1260

CCAACGAGAG ACAGCAGCTG GTGGAGACAC ACATGGCCAG AGTGGAAGCC ATGCTCAATG 1320

ACCGCCGCCG CCTGGCCCTG GAGAACTACA TCACCGCTCT GCAGGCTGTT CCTCCTCGGC 1380

CTCGTCACGT GTTCAATATG CTAAAGAAGT ATGTCCGCGC AGAACAGAAG GACAGACAGC 1440

ACACCCTAAA GCATTTCGAG CATGTGCGCA TGGTGGATCC CAAGAAAGCC GCTCAGATCC 1500

GGTCCCAGGT TATGACACAC CTCCGTGTGA TTTATGAGCG CATGAATCAG TCTCTCTCCC 1560

TGCTCTACAA CGTGCCTGCA GTGGCCGAGG AGATTCAGGA TGAAGTTGAT GAGCTGCTTC 1620

AGAAAGAGCA AAACTATTCA GATGACGTCT TGGCCAACAT GATTAGTGAA CCAAGGATCA 1680

GTTACGGAAA CGATGCTCTC ATGCCATCTT TGACCGAAAC GAAAACCACC GTGGAGCTCC 1740

TTCCCGTGAA TGGAGAGTTC AGCCTGGACG ATCTCCAGCC GTGGCATTCT TTTGGGCTG 1800

ACTCTGTGCC AGCCAACACA GAAAACGAAG TTGAGCCTGT TGATGCCCGC CCTGCTGCCG 1860

ACCGAGGACT GACCACTCGA CCAGGTTCTG GGTTGACAAA TATCAAGACG GAGGAGATCT 1920

CTGAAGTGAA GATGGATGCA GAATTCCGAC ATGACTCAGG ATATGAAGTT CATCATCAAA 1980

AATTGGTGTT CTTTGCAGAA GATGTGGGTT CAAACAAAGG TGCAATCATT GGACTCATGG 2040

TGGGCGGTGT TGTCATAGCG ACAGTGATCG TCATCACCTT GGTGATGCTG AAGAAGAAAC 2100

AGTACACATC CATTCATCAT GGTGTGGTGG AGGTTGACGC CGCTGTCACC CCAGAGGAGC 2160

GCCACCTGTC CAAGATGCAG CAGAACGGCT ACGAAAATCC AACCTACAAG TTCTTTGAGC 2220

AGATGCAGAA CTAGACCCCC GCCACAGCAG CCTCTGAAGT TGGACAGCAA AACCATTGCT 2280

TCACTACCCA TCGGTGTCCA TTTATAGAAT AATGTGGGAA GAAACAAACC CGTTTTATGA 2340

TTTACTCATT ATCGCCTTTT GACAGCTGTG CTGTAACACA AGTAGATGCC TGAACTTGAA 2400

图 13B

TTAATCCACA CATCAGTAAT GTATTCTATC TCTCTTTACA TTTTGGTCTC TATACTACAT 2460

TATTAATGGG TTTTGTGTAC TGTAAAGAAT TTAGCTGTAT CAAACTAGTG CATGAATAGA 2520

TTCTCTCCTG ATTATTTATC ACATAGCCCC TTAGCCAGTT GTATATTATT CTTGTGGTTT 2580

GTGACCCAAT TAAGTCCTAC TTTACATATG CTTTAAGAAT CGATGGGGGA TGCTTCATGT 2640

GAACGTGGGA GTTCAGCTGC TTCTCTTGCC TAAGTATTCC TTTCCTGATC ACTATGCATT 2700

TTAAAGTTAA ACATTTTTAA GTATTTCAGA TGCTTTAGAG AGATTTTTTT TCCATGACTG 2760

CATTTTACTG TACAGATTGC TGCTTCTGCT ATATTTGTGA TATAGGAATT AAGAGGATAC 2820

ACACGTTTGT TTCTTCGTGC CTGTTTTATG TGCACACATT AGGCATTGAG ACTTCAAGCT 2880

TTTCTTTTTT TGTCCACGTA TCTTTGGGTC TTTGATAAAG AAAAGAATCC CTGTTCATTG 2940

TAAGCACTTT TACGGGGCGG GTGGGGAGGG GTGCTCTGCT GGTCTTCAAT TACCAAGAAT 3000

TCTCCAAAAC AATTTTCTGC AGGATGATTG TACAGAATCA TTGCTTATGA CATGATCGCT 3060

TTCTACACTG TATTACATAA ATAAATTAAA TAAAATAACC CCGGGCAAGA CTTTTCTTTG 3120

AAGGATGACT ACAGACATTA AATAATCGAA GTAATTTTGG GTGGGGAGAA GAGGCAGATT 3180

CAATTTTCTT TAACCAGTCT GAAGTTTCAT TTATGATACA AAAGAAGATG AAAATGGAAG 3240

TGGCAATATA AGGGGATGAG GAAGGCATGC CTGGACAAAC CCTTCTTTTA AGATGTGTCT 3300

TCAATTTGTA TAAAATGGTG TTTTCATGTA AATAAATACA TTCTTGGAGG AGC 3353

图 13C



图 14A



图 14B

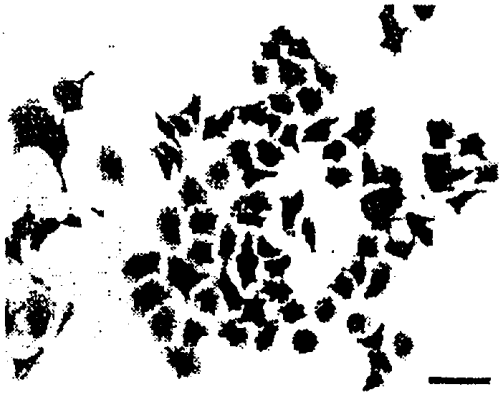

图 15A

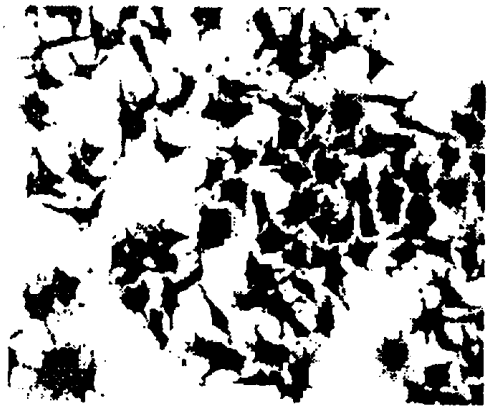

图 15B



图 15C

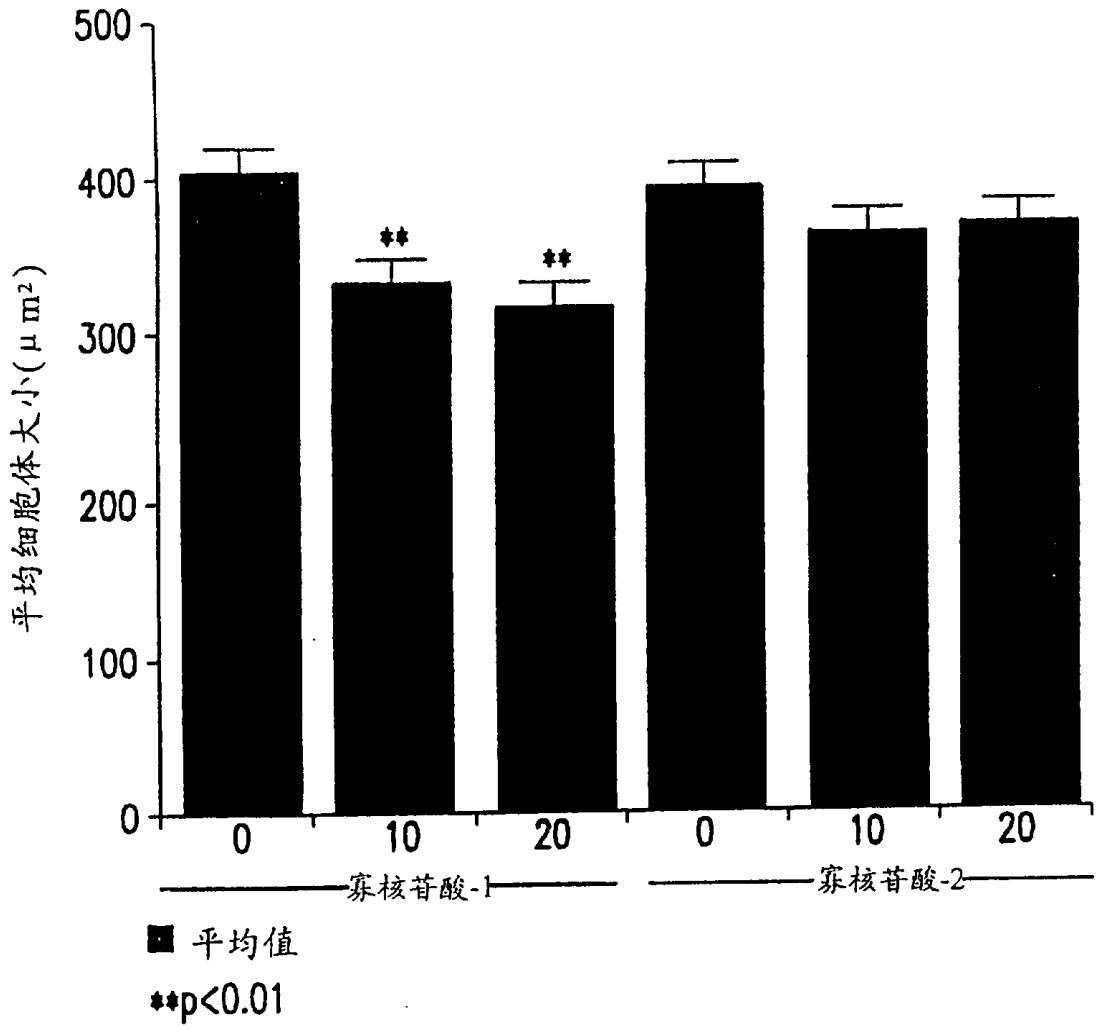
500
400
300
200
100
0
平均细胞体大小(μm²)
**
**
0
10
20
0
10
20
寡核苷酸-1
寡核苷酸-2
平均值
**p<0.01

图 16

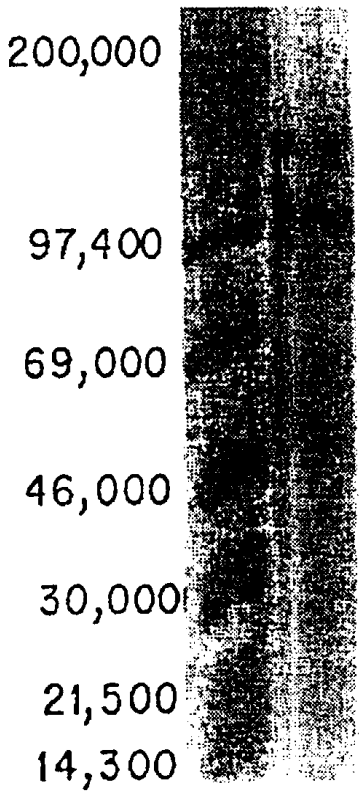

图 17A

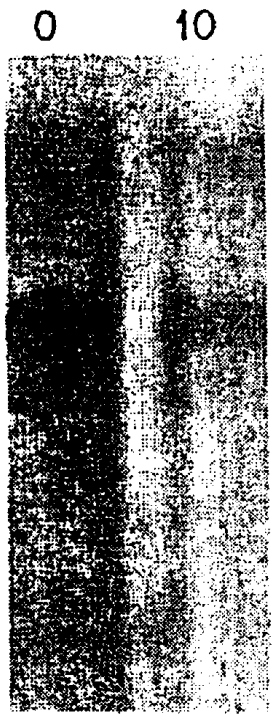

图 17B

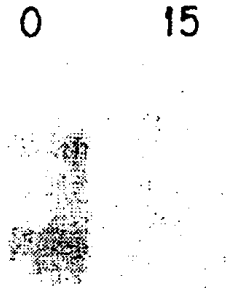

图 17C

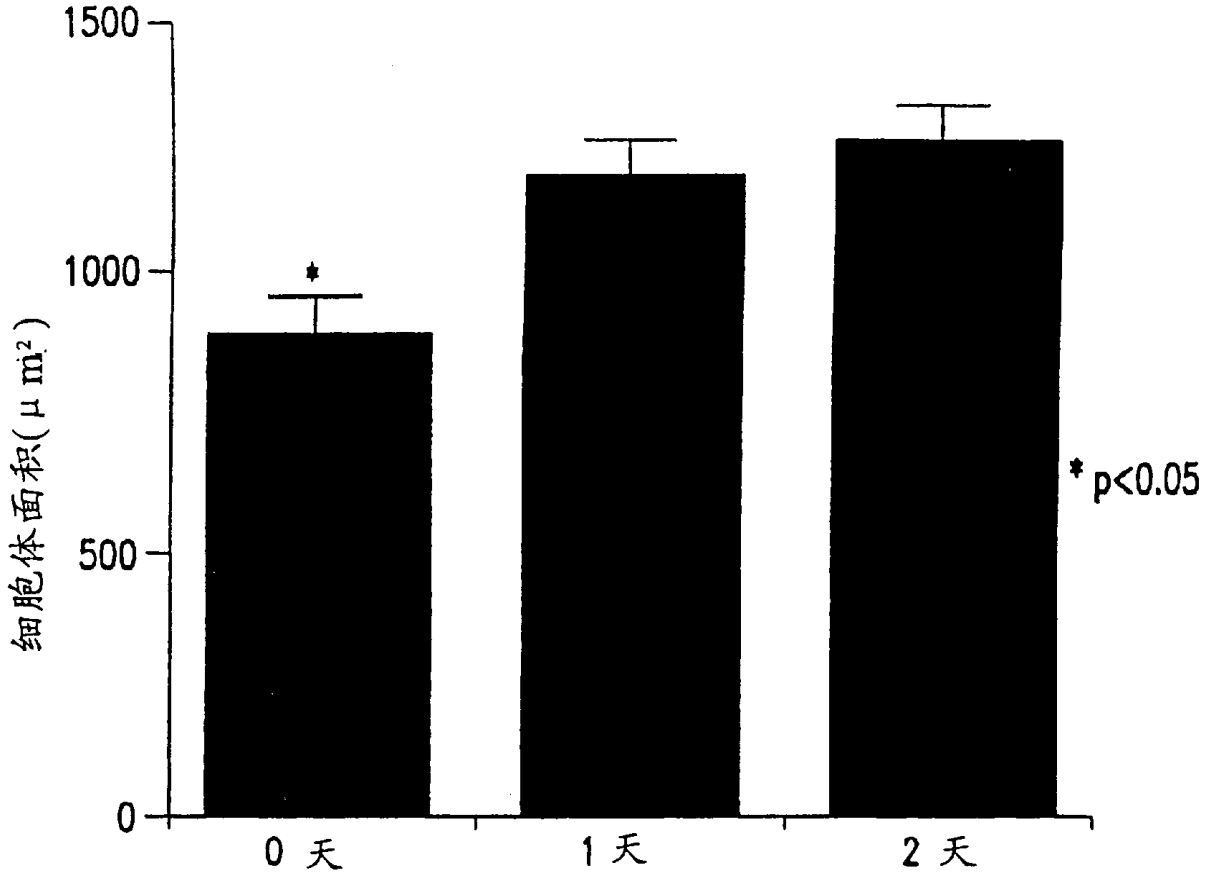

图 18

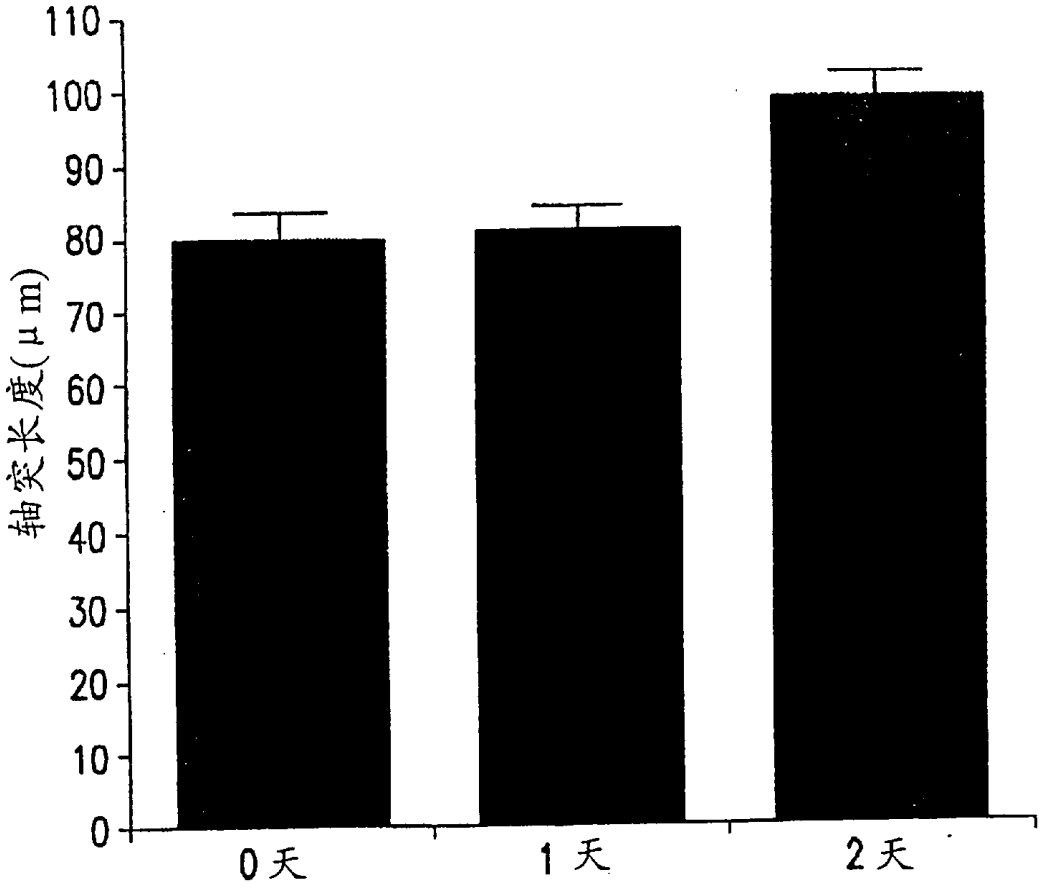

图 19

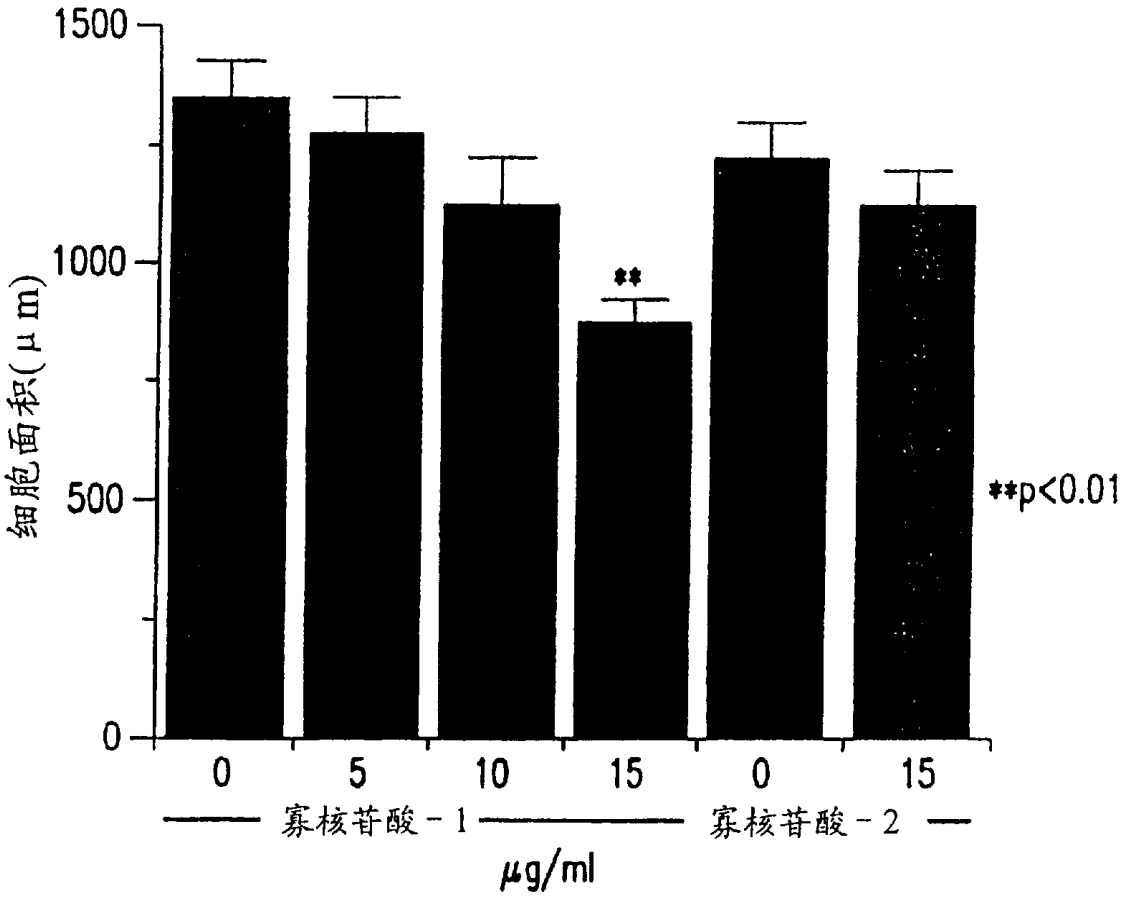

图　20

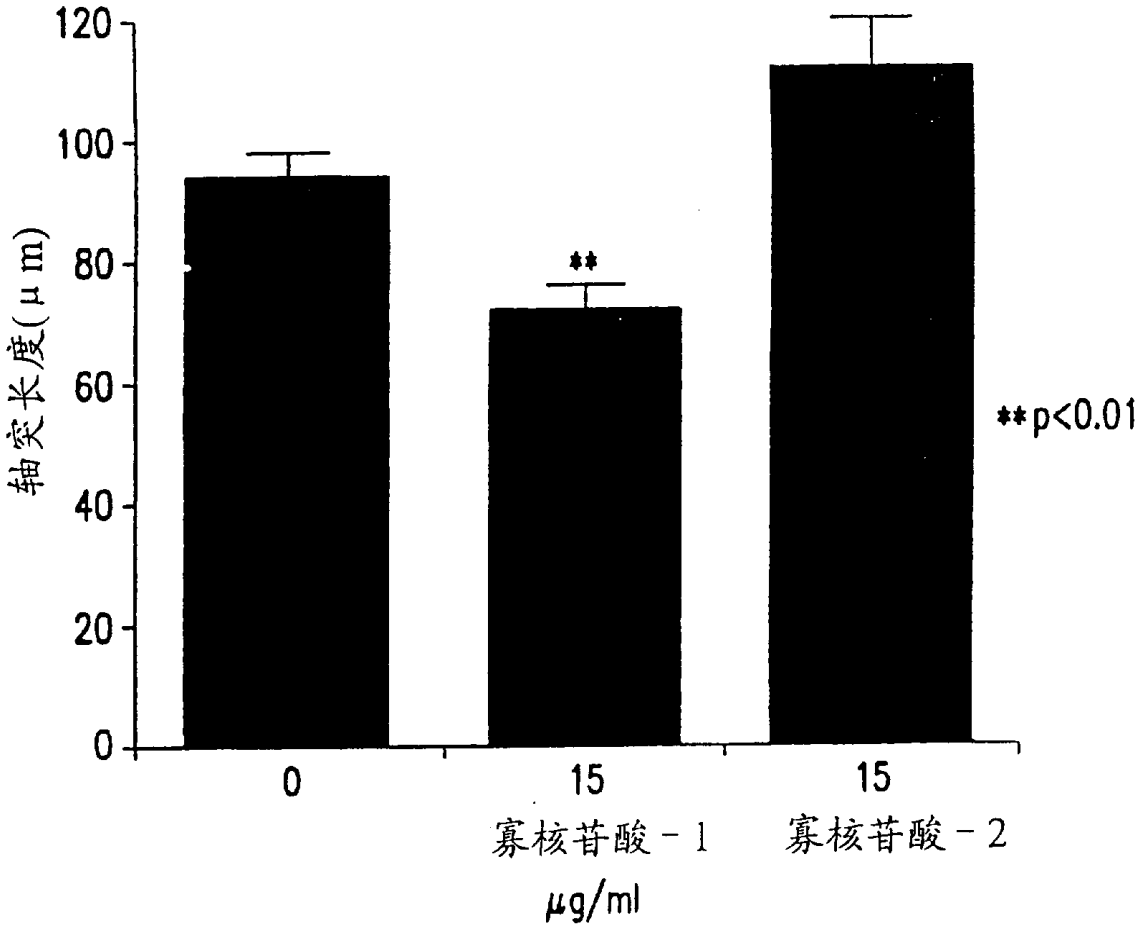

图　21

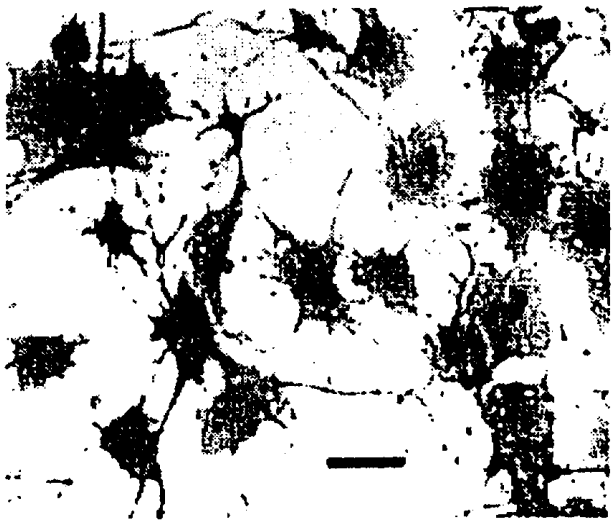

图 22A

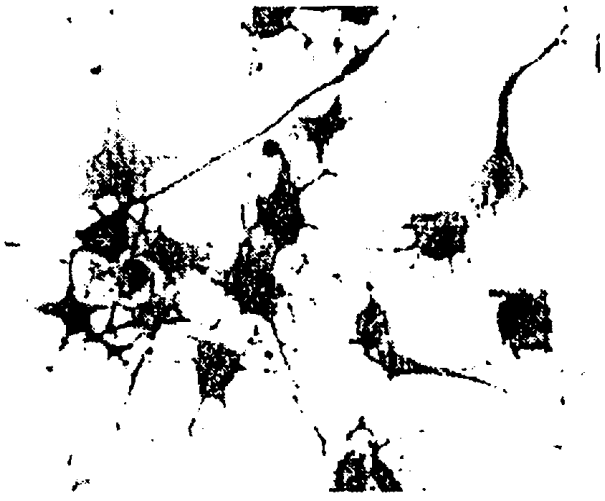

图 22B